

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
平成 30 年度分担研究報告書

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立：膀胱発がん物質の評価

研究分担者 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 講師

## 研究要旨

本研究は、膀胱を標的とする発がん物質を早期に検出できる指標の探索を目的としている。現在まで DNA 二重鎖切断マーカーである H2AX が、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。平成 30 年度は H2AX に関して、膀胱発がん物質のみならず、単独では発がん性を示さない発がん促進物質での検討とともに、発がん物質ながら膀胱に発がん性を示さない物質を用いて、感受性や特異性についても検討した。結果、膀胱発がん物質のみならず発がん促進物質でも H2AX の有意な上昇を認め、この試験法の感受性が高いことを示した。一方で、膀胱に発がん性を示さない発がん物質では H2AX 標識率が対照群と差がなく、検出法の膀胱発がん物質への特異性についても示された。以上の結果から、化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱において、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱への発がん性を示す物質を検出でき、膀胱発がん促進物質についても検出できる可能性を示せた。

## A . 研究目的

近年、発がん過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識されている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種である H2AX が速やかにリン酸化され、H2AX を形成する。H2AX は DNA 修復因子の結合標的となり、二重鎖切断修復に必須の役割を果たすことが知られている。H2AX は損傷部位から離れた領域まで広範囲に集積する特徴があり、特異抗体によって核内の小型点状集として検出することが可能となっている。

以前および去年の研究において、膀胱を標的とする発がん物質について化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱について検討した結果、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱発がん物質を投与された膀胱尿路上皮において、H2AX 免疫染色による核陽性細胞が有意に上昇することが示され、膀胱発がん物質を短期間（4 週間）の投与で検出し得る可能性が示唆された。

平成 30 年度は、この検出法の検出精度を詳細に検討する目的で、遺伝毒性・非遺伝毒性膀胱発がん物質での検討とともに、単独では発がん性を示さない発がん促進物質や、他臓器では発がん性を示すものの膀胱には発がん性を認めない化学物質を用いて特異性についても検討した。

## B . 研究方法

6 週齢 F344 雄ラットに、0.028% N-Butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine (BCPN)、0.005% 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を飲水投与、0.75% 1-Naphtyl-N-methyl carbamate (Carbaryl)、0.3% Tributyl phosphate (TBP)、5% Saccharin sodium salt dihydrate (Na-Sac) を混餌投与し、4 週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。肝臓を分担研究者に要望された状態（凍結）で送付した。また、6 週齢 F344 雄ラットに、膀胱発がん促進物質である 0.0114%

nicotine hydrogen tartrate (0.004% nicotine 換算; nicotine) を飲水投与し、4 週間後に屠殺・剖検し、膀胱を採取した。全ての膀胱組織について免疫組織染色を行い、 $\gamma$ H2AX および Ki67 の標識率を検討した。

（倫理面への配慮）

倫理面の配慮については、名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

## C . 研究結果

試験開始 1 週間後に 0.005% 4NQO 投与群が体重減少を来したため、2 週目以降は 0.0025% に濃度変更を行った。試験期間中、Carbaryl および 4NQO 投与群において対照群に比べ、体重増加抑制傾向を認め、屠殺・剖検時の体重は、上記 Carbaryl、4NQO および TBP 投与群で有意に抑制された。Nicotine についても試験期間中に体重抑制傾向および、屠殺・剖検時体重の有意な抑制を認めた。

膀胱組織学的検討の結果、BCPN および nicotine 投与群全てに simple hyperplasia を認め、TBP 投与群全てに papillary/nodular (PN) hyperplasia を認めた。

膀胱粘膜上皮における  $\gamma$ H2AX 標識率は、BCPN、Carbaryl および TBP 投与群で強い上昇を認め、多群間比較検定でも有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、上記の BCPN、Carbaryl および TBP とともに Na-Sac においても標識率の有意な上昇を認めた。一方で 4NQO では対照群と差がなかった (図 1)。Nicotine 投与群においても対照群と比較し有意な上昇を認めた (nicotine, control:  $2.8 \pm 0.3$ ,  $0.8 \pm 0.1\%$ , respectively;  $P < 0.001$ )。

膀胱粘膜上皮における Ki67 標識率は、BCPN、Carbaryl および TBP 投与群で上昇を認め、多群間比較検定でも有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対

一での比較を行った結果、上記のBCPN、CarbarylおよびTBPとともにNa-Sacにおいても標識率の有意な上昇を認めた。一方で4NQOでは対照群と差がなかった(図2)。Nicotine投与群においても対照群と比較し有意な上昇を認めた(nicotine, control:  $8.4 \pm 3.4$ ,  $3.2 \pm 1.4\%$ , respectively;  $P < 0.001$ )。

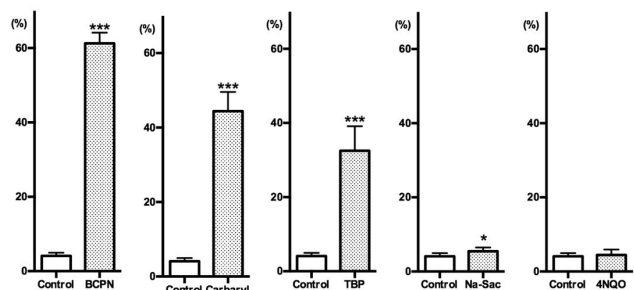


図1. 膀胱粘膜上皮細胞における H2AX陽性細胞の定量解析

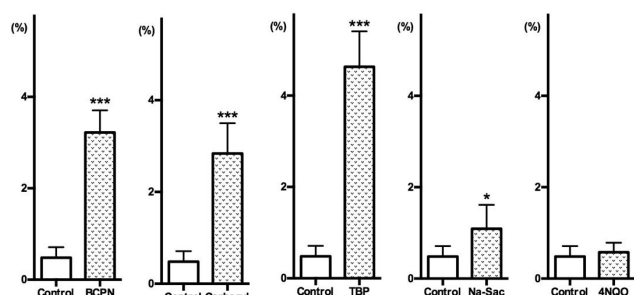


図2. 膀胱粘膜上皮細胞におけるKi67陽性細胞の定量解析

#### D. 考察

化審法で実施される28日間反復投与試験においては、各化学物質を対照群と比較検討すると考えるため、今回の膀胱発がん物質検出法を検討するにあたり、各化学物質と対照群との一対一での比較が重要と考えている。その結果、 $\gamma$ H2AXは膀胱発がん物質のみならず、発がん促進物質であるNa-Sacやnicotineにおいても検出可能だった。また、この結果はKi67でも同様に得られた。一方で、発がん物質ながら膀胱への標的性のない4NQOは $\gamma$ H2AXおよびKi67の標識率はいずれも対照群と差がなく、これら指標の上昇には臓器特異性が関与することが示された。

#### E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した膀胱を用いた H2AX免疫染色による標識率の検討は、膀胱に特異的な発がん物質の検出法として有用であることを示した。また、膀胱発がん促進物質も検出できる可能性を示せた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ito, Y., Naiki-Ito, A., Kato, H., Suzuki, S., Kuno, T., Ishiguro, Y., Takahashi, S., Uemura,

H.: Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by down-regulation of androgen receptor. *Oncotarget* (2018) 9:13859-13869.

- 2) Suzuki, S., Cohen, S.M., Arnold, L.L., Kato, H., Fuji, S., Pennington, K.L., Nagayasu, Y., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Takahashi, S.: Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology* (2018) 398-399:31-40.
- 3) Naiki, T., Naiki-Ito, A., Iida, K., Etani, T., Kato, H., Suzuki, S., Yamashita, Y., Kawai, N., Yasui, T., Takahashi, S.: GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. *Oncotarget* (2018) 9:15847-15859.
- 4) Hayashi, Y., Nishiyama, T., Nakatochi, M., Suzuki, S., Takahashi, S., Sugiura-Ogasawara, M.: Association of genetic variants of PD1 with recurrent pregnancy loss. *Reprod Med Biol* (2018) 17:195-202.
- 5) Takeshita, S., Yamashita, Y., Shiomi, K., Suzuki, N., Yoshida, J., Naiki-Ito, A., Suzuki, S., Akatsuka, S., Toyokuni, S., Takahashi, T., Mase, S., Arakawa, A., Sugiura-Ogasawara, M., Takahashi, S. Expression of P-REX2a is associated with poor prognosis in endometrial malignancies. *Oncotarget* (2018) 9:24778-24786.
- 6) Suzuki, S., Kato, H., Fuji, S., Naiki, T., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Takahashi, S.: Early detection of prostate carcinogenesis by immunohistochemistry of HMGB2. *J Toxicol Sci* (2018) 43:359-367.
- 7) Kuno, T., Kato, H., Naiki-Ito, A., Suzuki, S., Tanaka, T., Takahashi, S., Mori, H.: Preventive effects of fermented brown rice and rice bran on spontaneous lymphomagenesis in AKR/NS1c female mice. *Asian Pac J Cancer Prev* (2018) 19:3217-3223.
- 8) Mapoung, S., Suzuki, S., Fuji, S., Naiki-Ito, A., Kato, H., Yodkeeree, S., Ovatlarnporn, C., Takahashi, S., Limtrakul, P.: Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration resistance prostate cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci* (2019) 110:596-607.

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第107回日本病理学会総会、2017年6月、札幌。
- 2) 鈴木周五、他、ラット膀胱発がんに対するニコチンの影響、第77回日本癌学会学術総会、2017年9月、大阪。

- 3) 鈴木周五、他、ラット膀胱癌に対するニコチンの影響、第 35 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2019 年 1 月、東京.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む。)

1. **特許取得**  
特になし。
2. **実用新案登録**  
特になし。
3. **その他**  
特になし。