

令和 1 年度厚生労働科学研究費補助金(労働安全衛生総合研究事業)

分担研究報告書

ヒト膀胱がんの臨床病理学研究と動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価
による発がん機序の解明

研究分担者 鱈渕 英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 教授

研究要旨

芳香族アミンによる膀胱がん発生のメカニズムはいまだ明らかな点が多く、本研究では①芳香族アミン取扱事業所で発生したヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究と、②動物モデルを用いた Acetoaceto-o-toluidide (AAOT) の膀胱発がん性評価を行い、ヒトと動物モデルの両面から発がんに関わる分子メカニズムの解明を目指す。①臨床病理学研究に関して本年度は、昨年度に施行した芳香族アミン取扱事業所で発生したヒト膀胱がん、芳香族アミン類のばく露のない膀胱がんについて次世代シーケンサーを用いたがん関連遺伝子の変異スペクトラム解析を行った。両者の遺伝子変異数、遺伝子変異スペクトラムに有意な差は認められなかった。②AAOT の膀胱発がん性評価に関して本年度は、AAOT の発がんメカニズムを明らかにするため AAOT を 6 週齢の F344 ラットに 0%、0.167%、1.5%濃度で 4 週間単独投与し、ラット膀胱上皮から RNA を抽出し、マイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。その結果、JUN とその下流にある「腫瘍の増生」関連遺伝子の発現が亢進していたことが明らかになった。このことから、AAOT の膀胱発がんには JUN シグナリング伝達経路の活性化が関与していることが示唆された。

研究協力者

魏民、行松直、鈴木周五 (大阪市立大学)、柳場由絵、須田恵、甲田茂樹 (独立行政法人労働者健康安全機構 労働安全衛生総合研究所)

A. 研究目的

芳香族アミンによる膀胱がん発生のメカニズムは未だ明らかでない点が多い。本研究では、芳香族アミン取扱事業所で発生した膀胱がんについて、ヒト腫瘍検体と動物モデルの両面から解析し、acetoaceto-o-toluidide (AAOT) の毒性について評価することで、発がんメカニズム解明とヒトへの外挿可能な動物モデルの開発を目指す。

B. 研究方法

①ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究

膀胱がん発症患者の協力を得て、膀胱がんのホルマリン固定パラフィン包埋組織標本 (FFPE) を収集した。ニードルダイセクション法によって FFPE ブロックの腫瘍部を切り出し、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、次世代シーケンサー (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2) を用いて、50 種類の代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異を検索した。前年度は、ortho-toluidine (OTD)などの芳香族アミン取り扱い事業所で発生した職業性膀胱がん 6 例 (OTD ばく露群)と、芳香族アミン非ばく露群 8 例 (喫煙歴、性別、病理学的進行度をマッチングした大阪市立大学附属病院の膀胱がん症例 (OTD 非ばく露群)の遺伝子変異頻度を解析した。本年度は、さらに各群の遺伝子変異数の差の検索、詳細な変異スペクトラム解析を行った。

②動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

前年度までに、*in vitro* における AAOT の代謝および毒性評価、AAOT の投与経路および用量を決定するための短期毒性試験、AAOT の膀胱発がん性を検討するための 2 段階膀胱

発がん試験を行い、膀胱発がん性を明らかにしてきた。本年度は、AAOT のその発がんメカニズムを明らかにするため網羅的遺伝子発現解析を行った。

6 週齢の雄 F344 ラット 18 匹を 3 群に分け、AAOT を 0%、0.167%、1.5%の濃度で 4 週間混餌投与し、解剖を行った。最高投与濃度 1.5% は 2 段階発がん試験で膀胱発がん用量である。観察期間中には毎週飲水量、摂餌量、体重を測定した。解剖時に、ラット膀胱上皮を採取し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を用いてマイクロアレイ解析を行った。対照群 (0%) に対して 1.5%投与群において発現が変動した遺伝子を選出し、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems) を用いてパスウェイ解析を行った。そこで得られた遺伝子ネットワークに関わる 9 つの遺伝子の発現をリアルタイム PCR にて評価した。また、解剖時に採取しホルマリン固定を行ったラット膀胱組織に対して JUN、prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2; COX2)の免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト組織標本を用いる研究であり、研究を実施するにあたり、大阪市立大学倫理委員会の承認を得ている (受付番号 3560)。また、動物実験に関しては大阪市立大学実験動物施設の承認を得ている。動物実験施設飼育規定を遵守し、動物愛護の精神で飼育するとともに、解剖に際しては苦痛を与えないように麻酔下で施行した。

C. 研究結果

①ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究

同意を得られた OTD ばく露群 7 名の FFPE

ブロックから DNA を抽出した。7 例中 6 例で次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析が可能であった。比較対象としての OTD 非ばく露群の膀胱がん症例では全例で遺伝子変異解析が施行できた。前年度は両群で変異遺伝子を調べたが、両群間に各遺伝子変異率の差はなかった。本年の追加検討の結果、両群間で non-synonymous (非同義)、synonymous (同義)、合計の変異数はそれぞれ有意差を認めなかった (表 1)。また、単塩基変異 (SNV) の塩基スペクトラム解析の結果、置換を受けた塩基、置換された後の塩基についても両群間に有意差は認められなかった (図 1)

表 1. OTD ばく露群、OTD 非ばく露群における遺伝子変異数

	Number of mutations		
	Non-synonymous	Synonymous	Total
OTD 暴露群			
Case 1	15	5	20
Case 2	14	6	20
Case 3	10	4	14
Case 4	11	5	16
Case 5	12	6	18
Case 6	7	8	15
Average	11.5	5.7	17.2
SD	2.9	1.4	2.6
OTD 非暴露群			
Case 1	14	8	22
Case 2	7	7	14
Case 3	10	3	13
Case 4	15	5	20
Case 5	14	7	21
Case 6	11	7	18
Case 7	15	6	21
Case 8	12	7	19
Average	12.3	6.3	18.5
SD	2.8	1.6	3.3

② 動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

ラット膀胱上皮から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、対照群と比較し 1.5% 投与群で、94 個の発現変動遺伝子が認められた。そのうち 65 個は発現亢進しており、29 個は発現低下していた。これらの 94 個の発現変動遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis を用いて解析を行った結果「腫瘍の増生」に關与するネットワークが検出された (図 2)。このネッ

トワークは、JUN、PTGS2 を上流調節因子とし、9 つの発現亢進された遺伝子により形成されていた (図 2)。

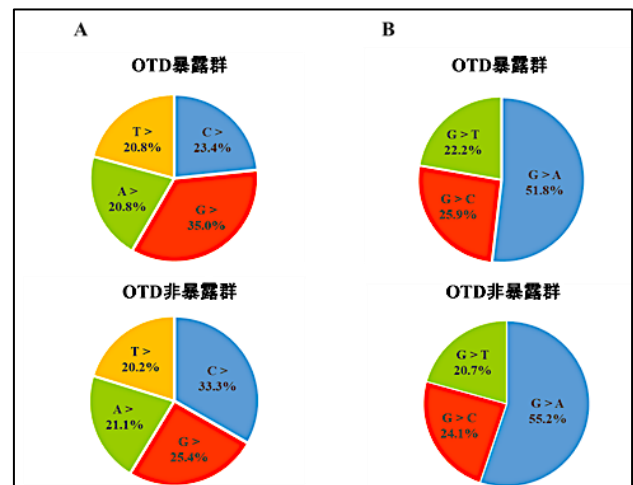


図 1. OTD ばく露群、OTD 非ばく露群における塩基変化の分布 A. 置換を受けた塩基の分布 B. G が置換された後の塩基の分布

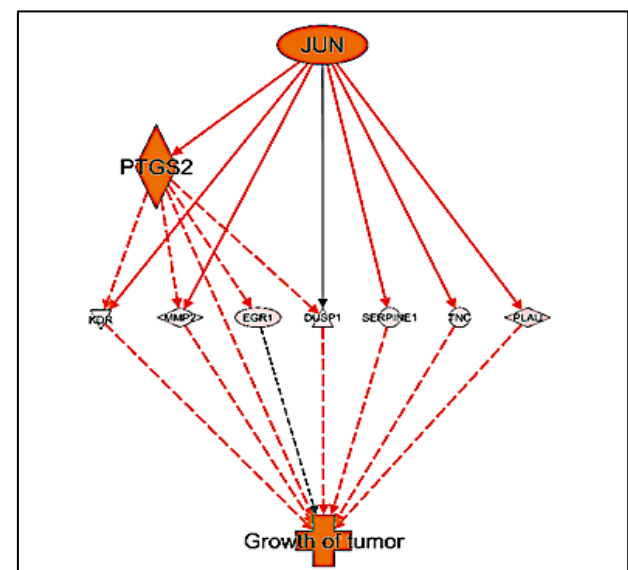


図 2. 「腫瘍の増生」関連遺伝子ネットワーク

ラット膀胱上皮から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR を施行した結果、上流調節因子である、JUN、PTGS2 および、PLAU、DUSP1、SERPINE1 の mRNA 発現は 1.5% 投与群で有意に亢進していた。また、解析した 9 つの遺伝子全て、AAOT 投与量に關して mRNA 発現

が亢進していた (図 3)。

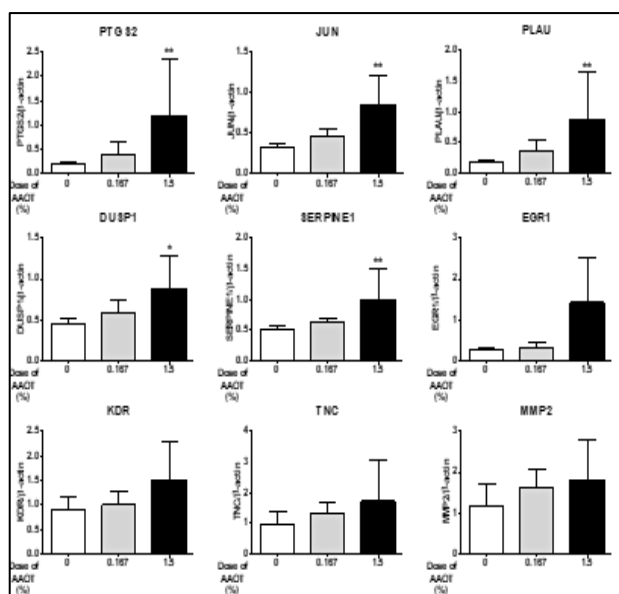


図 3. ラット膀胱上皮における mRNA 発現

ラット膀胱粘膜組織に対し、JUN および PTGS2 免疫染色を行った結果、JUN は対照群および 1.5% 投与群の形態学的に正常な膀胱上皮細胞の核内で染色された (図 4)。膀胱上皮細胞の JUN 核陽性率は、1.5% 投与群で有意に上昇していた (図 5)。PTGS2 は、1.5% 投与群の単純過形成を来した膀胱上皮の基底層の細胞質で染色され、対照群及び 1.5% 投与群の正常な膀胱上皮細胞では染色されなかった (図 4)。

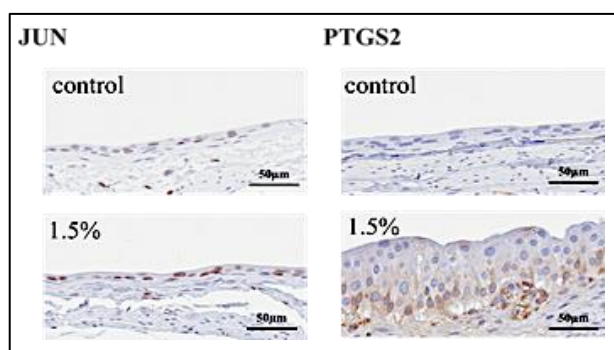


図 4. ラット膀胱上皮における JUN, PTGS2 発現

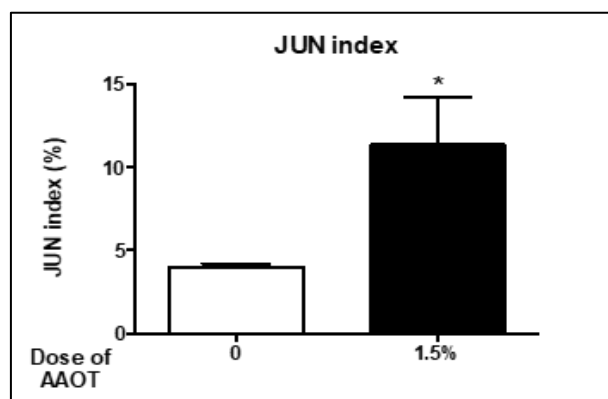


図 5. ラット膀胱上皮における JUN 陽性率

D. 考察

① ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究

OTD の発がんメカニズムとして、OTD の代謝物である N-hydroxyl-OTD が膀胱上皮の主にグアニン(G)に対して DNA 付加体を形成し DNA 損傷を引き起こすことが知られている¹⁾。今回、SNV の塩基スペクトラム解析を行ったが、両群間に有意差は認められなかった。

膀胱がんリスクの主な原因として喫煙があり、膀胱がんの約半数に關与していると考えられている²⁾。喫煙による膀胱がんのリスクの増加には、タバコの煙中に含まれる既知の膀胱発がん物質である OTD、2-ナフチルアミン、4-アミノビフェニルなどの芳香族アミンのばく露が關与していると報告されている³⁾。今回の対照群である OTD 非ばく露群 8 人の膀胱がん患者全員に喫煙歴がある。本研究の芳香族アミンばく露膀胱がん、非ばく露膀胱がんの遺伝子変異に有意差がないという結果は、喫煙による膀胱がん発症にはタバコ煙中に存在する膀胱発がん物質である芳香族アミンが主に關与しているという考えを支持するものと考えられる。

② 動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

前年度までに施行した AAOT の短期毒性試

験、2 段階発がん試験にて、AAOT はラット膀胱に対して発がん促進作用を有し、AAOT が既知の膀胱発がん物質である OTD に代謝され発がん性をもつことが明らかとなった。

今年度は、AAOT を単独投与したラット膀胱上皮を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、変動遺伝子による発がんメカニズムを検討した。その結果、「腫瘍の増生」に参与するネットワークが検出され、JUNとその下流にある標的遺伝子の発現が亢進していた。実際に、ラット膀胱上皮から抽出した RNA を用いてリアルタイム定量的 PCR を施行した結果、これらの遺伝子は AAOT 投与群で用量に相関して発現亢進を認めた。上流調節因子である JUN、PTGS2 免疫染色の結果からも AAOT 投与群における膀胱上皮内の JUN、PTGS2 の過剰発現が示唆され、AAOT の膀胱発がん性には JUN とその下流にある「腫瘍の増生」関連遺伝子の発現が亢進したことが明らかになった。

E. 結論

ヒト膀胱がん腫瘍組織を用いた臨床病理学研究において、今回の手法では芳香族アミンばく露群の膀胱がんの特徴的な遺伝子変異は得られなかった。

動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価では、AAOT の膀胱発がん性には JUN シグナル伝達経路の活性化が関与していることが示唆された。

引用文献

- 1) Synthesis, characterization, and conformational analysis of dna adducts from methylated anilines present in tobacco smoke. Marques MM, Mourato LL, Santos MA, Beland FA. 1996: Chem Res Toxicol. 9(1):99-108
- 2) A comparison of exposures and meta

analysis of incidence and mortality risks. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La Vecchia C. 2016: Eur Urol. 70(3):458-466

- 3) Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: Current state of knowledge and future research directions. Besaratinia A, Tommasi S. 2013: Faseb j. 27(6):2090-2100

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, and Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-*o*-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. Arch Toxicol. 93: 3617-3631, 2019.

2. 学会発表

- 1) 奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. Acetoaceto-*o*-toluidide はラット膀胱上皮の細胞増殖を促進し、発がん促進作用を示す. 第 108 回日本病理学会総会、東京(2019 年 5 月)
- 2) 鰐渕英機、魏民. 芳香族アミンによる職業性膀胱がんに関する最新知見. 第 78 回日本癌学会学術総会、京都(2019 年 9 月)
- 3) 行松直、奥野高裕、魏民、梯アンナ、鰐渕英機. ラットにおける BBN 誘発膀胱発がんに対するアセトアセト-*o*-トルイジドの促進効果. 第 78 回日本癌学会学術総会、京都(2019 年 9 月)
- 4) 行松直、魏民、梯アンナ、鈴木周五、鰐渕英機. ラットにおける BBN 誘発膀胱発がんに対する *o*-Acetoacetotoluidide の促進効

果. 第 36 回日本毒性病理学会総会、東京(2020年2月)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特になし

