

平成 30 年度～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 鰐渕 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でない点が多く、本研究では芳香族アミン取扱事業所で発生した職業性膀胱がんを用いた臨床病理学研究と、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行った。芳香族アミン取扱事業所で発生した職業性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解析を行った結果、TP53 や FGFR3 などが全例で認められ、さらにこれまでの報告では変異率が高くない FLT3、KDR、STK11、PDGFR、APC、ERBB4、RET なども高率に変異が認められた。ラットを用いた 36 週間二段階膀胱発がん試験では、AAOT が BBN 誘発ラット膀胱発がんに対して促進作用を有することを明らかにした。また、AAOT 投与時の尿中から AAOT および *o*-toluidine (OTD) などの 7 つの下流代謝物が検出され、OTD 濃度は AAOT 及び多の代謝物よりも少なくとも 10 倍以上高いことを明らかになった。さらに、4 週間短期試験において、AAOT 投与群では膀胱尿路上皮の細胞増殖活性亢進とともに、DNA 傷害の指標である γ -H2AX 形成の亢進を認めた。加えて、JUN とその下流にある「腫瘍の増生」関連遺伝子 (PTGS2、KDR、MMP2、DUSP1、EGR1、SERPINE1、TNC、および PLAU) の発現亢進が明らかになった。これらの結果から、AAOT が他の発がん性芳香族アミンと同様に、膀胱発がん性を有することが強く示唆された。その発がんメカニズムに 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。さらに、尿中代謝物である OTD が AAOT 誘発膀胱発がんの鍵となる物質であることを示した。

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職業性膀胱がんについて、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ヒト膀胱がん組織を用いた臨床病理学研究

解析対象として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)を用いた。ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本(FPPE)標本から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、がん抑制遺伝子について変異の有無を検索した。また、芳香族アミン取り扱い事業所で発生した膀胱がんの遺伝子変異解析の結果を、芳香族アミンの曝露ない膀胱がん症例や、既存の膀胱がん遺伝子変異データベース(The Cancer Genome Atlas; TCGA)との比較を行うことで、芳香族アミン暴露によっておこる特徴的な遺伝子変異の有無を検討した。

②動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

1) AAOT の投与用量を決定するためのラット短期毒性試験(4週間)

F344 ラットに AAOT を混餌で 0、1.5%、3%で4週間投与した後、膀胱について病理組織学的な検索及び膀胱上皮の細胞増殖活性について検討した。また、AAOT 3%混餌投与3日後

の雌ラットの尿を強制排尿にて回収し、尿中の AAOT、o-toluidine (OTD)の濃度をクロマトグラフィにて測定した。

2) AAOT の膀胱発がん性を検討するためのラット二段階膀胱発がん試験(36週間)

6週齢の雄雌 F344 ラット 162 匹(雄 81 匹、雌 81 匹)を雄雌それぞれ 4 群ずつ、計 8 群に群分けした。既知の膀胱発がん物質である N-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)を4週間飲水投与し、1週間の休薬期間後、AAOTを0%、0.167%、0.5%、1.5%濃度で31週間混餌投与した。実験開始36週後に、膀胱を採取して重量を測定し、ホルマリン注入固定後に病理組織学的な検索を行った。

3) AAOT の膀胱発がんメカニズム解析(4週間)

6週齢の雄 F344 ラット 18 匹を 3 群に分けた。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。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

芳香族アミン暴露群と非暴露群で変異の頻度が高かった遺伝子について、TCGA データベースで報告されている変異率を加えて、表1に示す。芳香族アミン暴露群ではこれまで膀胱がんで変異率が高いと報告されている TP53 や FGFR3 などが全例で認められ、さらにこれまでの報告では変異率が低い FLT3、KDR、STK11、PDGFR、APC、ERBB4、RET など高率に変異が認められた。しかしながら、これらの

表 1. 芳香族アミン取り扱い事業所で発生した膀胱がんで検出された遺伝子変異

	芳香族アミン 曝露群(n=6)	芳香族アミン 非曝露群(n=8)	TCGA2017 (n=412)
TP53	6 (100%)	7 (87.5%)	198 (48.1%)
FGFR3	6 (100%)	8 (100%)	58 (14.1%)
FLT3	6 (100%)	8 (100%)	10 (2.4%)
KDR	6 (100%)	8 (100%)	17 (4.1%)
STK11	6 (100%)	7 (87.5%)	0 (0%)
PDGFRA	6 (100%)	8 (100%)	15 (3.7%)
APC	6 (100%)	8 (100%)	25 (6.1%)
ERBB4	5 (83.3%)	6 (75%)	13 (3.2%)
RET	5 (83.3%)	7 (87.5%)	9 (2.2%)
CSF1R	4 (66.7%)	7 (87.5%)	11 (2.7%)
PIK3CK	3 (50%)	2 (25%)	91 (22.1%)
HRAS	3 (50%)	2 (25%)	18 (4.4%)
ALK	3 (50%)	2 (25%)	13 (3.2%)

遺伝子の変異は、芳香族アミン非暴露群の膀胱がんでも高率に検出され、両群間に各遺伝子の変異頻度には有意な差は認められなかった。また、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。なお、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みられなかった。

② 動物モデルを用いた AAOT の膀胱発がん性評価

1) AAOT の用量を決定するためのラット短期毒性試験 (発表論文 1 参照)

AAOT1.5%以上投与した群では膀胱尿路上皮の過形成とともに、DNA 傷害の指標である γ -H2AX 形成の亢進が認められた。AAOT を投与したラット尿中から OTD が高濃度で検出されることから、AAOT は生体内で OTD に変換されることで、膀胱上皮細胞の増殖および DNA 傷害誘発に関与している可能性が示唆された。また、雌雄3%投与群いずれも10%以上の体重減少が観察されたことから、二段階膀胱発がん試験において、AAOT の最高用量を1.5%と設定した。

2) ラット二段階膀胱発がん試験 (発表論文 2 参照)

肉眼的に雄雌ともに AAOT 投与群では膀胱の腫瘍性病変の数及びサイズが増加していた (図 1)。膀胱を病理組織学的に検討した結果、(1) 雄ラットでは、1.5%群の乳頭腫の発生率と、0.5、1.5%群の尿路上皮癌および総腫瘍病変 (乳頭腫+尿路上皮癌)の発生率は、対照群と比較して有意に増加した。(2) 雌ラットでは、0.5、1.5%群の尿路上皮癌の発生率、1.5%群の総腫瘍病変の発生率は有意に増加した。(3) 総腫瘍病変の発生数は、雌ラットの 0.5、1.5%群と雌ラットの 1.5%群で有意に増加した。

36 週時の尿中 AAOT および代謝物を分析した結果、AAOT および 7 つの下流代謝物 (OTD、N-acetyl-OTD、4-amino-*m*-cresol、2-amino-*m*-cresol、2-aminobenzyl alcohol、Anthranilic acid、および N-acetyl anthranilic

acid)が検出された。これらの尿中代謝物は、AAOT 投与濃度依存性に増加した。OTDは主な代謝物であり、他の物質よりも少なくとも 10 倍以上高い濃度で存在することが明らかになった。

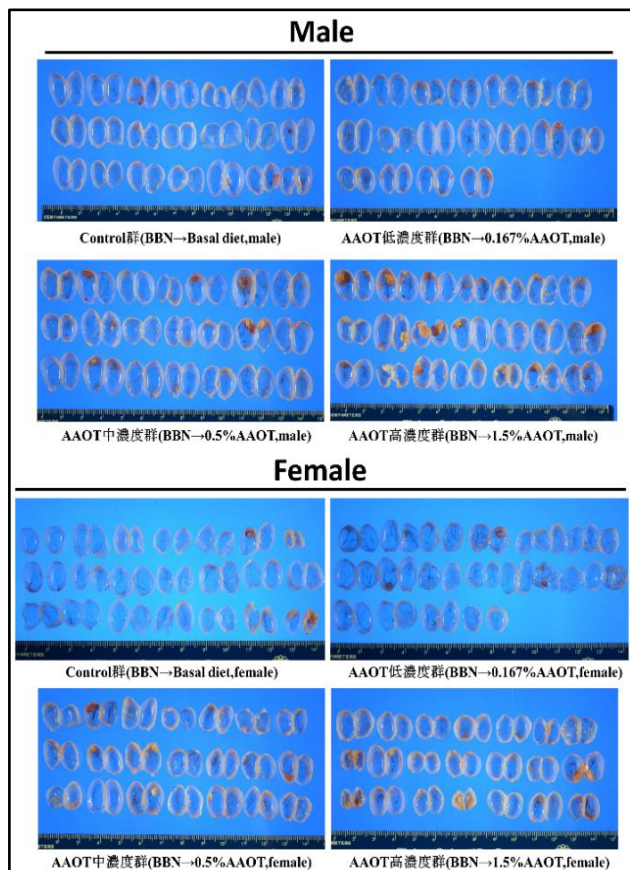


図 1. AAOT 二段階膀胱発がん試験(膀胱肉眼像)

3) AAOT の膀胱発がんメカニズム解析 (発論文 2 参照)

対照群と比較し、発がん促進用量である 1.5% 投与群の膀胱上皮において、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 個は発現低下を認めた。これらの 94 個の発現変動遺伝子を用いた pathway 解析を行った結果、JUN を中心とした「腫瘍の増生」関連遺伝子 (PTGS2, KDR, MMP2, DUSP1, EGR1, SERPINE1, TNC 及び PLAU) の発現亢進を認めた(図 2)。

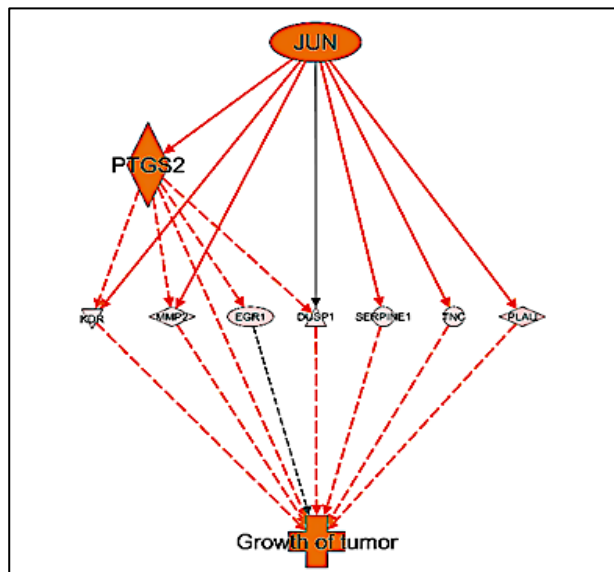


図 2. 「腫瘍の増生」関連遺伝子ネットワーク

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

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関与していると考えられている。喫煙による膀胱がんリスクの増加は、タバコの煙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関与していると報告されている。今回の対照群である芳香族アミン非ばく露群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関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

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差異解析を行った結果、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。

E. 結論

芳香族アミン取扱事業所で発生した職業性膀胱がんを高頻度にがん関連遺伝子の変異が生じたことが明らかになった。

AAOT が他の発がん性芳香族アミンと同様に、膀胱発がん性を有することが強く示唆された。その発がんメカニズムには体内での代謝が重要で、発生した OTD が AAOT 誘発膀胱がんの鍵となる物質であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, and Wanibuchi H. Acetoaceto-*o*-Toluidide Enhances Cellular Proliferative Activity in the Urinary Bladder of Rats. *Toxicol Sci.* 169: 456-464. 2019.
- 2) 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) 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)
- 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) 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)
- 5) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。*o*-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討。第 35 回日本毒性病理学会総会、東京(2019 年 1 月)
- 6) 奥野高裕、行松直、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析。第 18 回分子予防環境医学研究会大会、名古屋(2019 年 1 月)
- 7) 奥野高裕、行松直、藤岡正喜、梯アンナ、魏民、神吉将之、鰐渕英機。Induction of cell proliferation and DNA damage by Acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) in the urinary bladder of rats. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪(2018 年 9 月)
- 8) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機。*o*-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討。第 33 回発癌病理研究会、静岡(2018 年 8 月)
- 9) 熊田賢次、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、行松直、梯アンナ、鰐渕英機。*o*-Acetoacetotoluidide(AAOT)の毒性影響の検討。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、沖縄(2018 年 1 月)
- 10) 鰐渕英機。芳香族アミンによる膀胱癌の臨床病理学的研究と AAOT の毒性、発がん性評価。第 45 回産業中毒・生物学的モ

ニタリング研究会、山形(2017年10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし