

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和元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 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 准教授

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。令和元年度はH2AXに関して、膀胱発がん物質および非膀胱発がん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日間反復投与と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日間反復投与と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。

令和元年度は、この検出法の検出精度を詳細に検討する目的で、膀胱発がん物質での検討とともに、遺伝毒性を有する非発がん物質や有さない非発がん物質を用いて、化学物質に対する特異性について検討した。

B．研究方法

6週齢F344雄ラットに、16 mg/kg Pioglitazone (PGZ)、50 mg/kg Rosiglitazone (RGZ)、90 mg/kg 1-Nitropropane (1-NP)を強制胃内投与し、173 ppm Sodium arsenite (NaAsO₂)、0.3% 8-Hydroxyquinoline (8HQ)を混餌投与した。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cotinineを13、40、120 ppm

で飲水投与し、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、H2AXおよびKi67の標識率を検討した。

（倫理面への配慮）

大阪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3日後に90 mg/kg 1-NP投与群が体重減少を来したため、以降は45 mg/kgに濃度変更を行った。試験期間中、1-NP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、1-NP投与群で有意に抑制された。

膀胱組織学的検討の結果、NaAsO₂群で、軽度肥厚傾向を認めたものの、simple hyperplasiaと診断する所見は見られなかった。

膀胱粘膜上皮におけるH2AX標識率は、NaAsO₂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NaAsO₂において標識率の有意な上昇と、8HQの有意な低下を認めた。他の群では対照群と差がなかった(図1)。

膀胱粘膜上皮におけるKi67標識率は、NaAsO₂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NaAsO₂および8HQにおいて有意な標識率の上昇を認めた。他群では対照群と差がなかった(図2)。

Cotinine投与群において、H2AX標識率は、濃度依存性にいずれの濃度においても対照群と比較し有意な上昇を認めた。一方、Ki67標識率は、40 ppm以上の投与群で対照群と比較し有意な上昇を認めた(図3)。

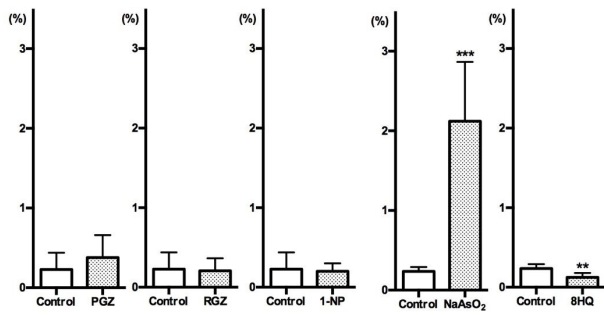


図1. 膀胱粘膜上皮細胞における H2AX陽性細胞の定量解析

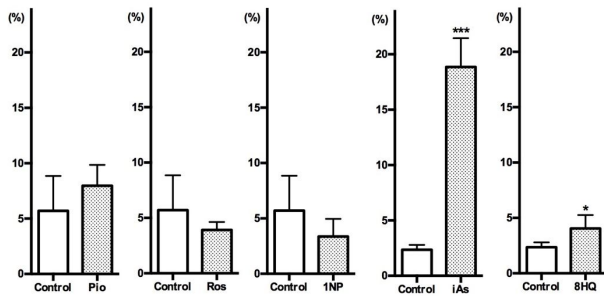


図2. 膀胱粘膜上皮細胞におけるKi67陽性細胞の定量解析

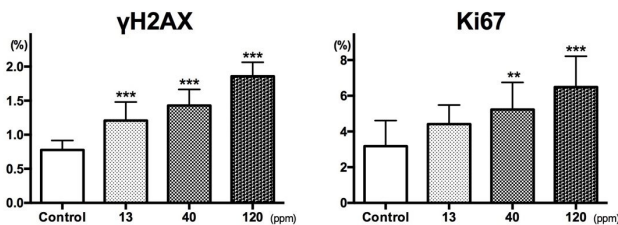


図3. Cotinine投与ラットの膀胱粘膜上皮細胞におけるH2AXおよびKi67陽性細胞の定量解析

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。結果として、膀胱発がん物質NaAsO₂および発がん促進物質cotinineについては、検出可能だった。一方、PGZについては、組織学的に膀胱粘膜上皮の肥厚は比較的目的たず、過形成病変を認めなかった。結石による増殖性病変形成が今回の実験条件では乏しかったため、H2AXやKi67標識率の陽性率上昇が乏しかったと推察する。一方で、膀胱発がん性を認めない化学物質3つは、H2AX標識率はいずれも有意な上昇を示さず、H2AXの膀胱発がん性に対する特異性を確認出来た。

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抽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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy. *J Clin Med.* 2019; 8.
- 2) Kobayashi M, Inaguma S, Raffeld M, Kato H, Suzuki S, Wakasugi T, Mitsui A, Kuwabara Y, Lasota J, Ikeda H, Miettinen M, Takahashi S. Epithelioid variant of gastrointestinal stromal tumor harboring PDGFRA mutation and MLH1 gene alteration: A case report. *Pathol Int.* 2019; 69: 541-6.
- 3) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration-resistant prostate cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 2019; 110: 596-607.
- 4) Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci.* 2019; 110: 2485-92.
- 5) Okabe A, Kiriya Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 91-9.
- 6) Suzuki S, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Akagi JI, Cho YM, Ogawa K, Takahashi S. Dimethylarsinic acid may promote prostate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 73-7.
- 7) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Arch Toxicol.* 2019; 93: 3617-31.
- 8) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology.* 2019: in press.

2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、高橋智ラット膀胱発がんに対するコチニンの影響、第 108 回日本病理学会総会、東京 (2019 年 5 月)
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、鰐淵英機、高橋智、ラット尿路上皮に対するコチニンの腫瘍促進効果、第 78 回日本癌学会学術総会、大阪 (2019 年 9 月)
- 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智、ラット尿路上皮に対するコチニンの増殖性病変促進効果、第 36 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京 (2019 年 2 月)

**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。