

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合分担研究報告書

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。以前にDNA二重鎖切断マーカーである γ H2AXが、遺伝毒性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。 γ H2AXに関して、膀胱発がん物質、膀胱発がん促進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で γ H2AXの有意な上昇を認め、加えて発がん促進物質でも有意な上昇が存在し、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や非発がん物質では γ 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、 γ H2AXを形成する。 γ 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。 γ 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巣として検出することが可能となっている。

以前の研究において、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、遺伝毒性膀胱発がん物質を投与された膀胱尿路上皮において、 γ 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。

3年間において、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、遺伝毒性膀胱発がん物質1% 1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)、0.5% Phenacetin (PNC)を混餌投与、N-Butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine (BCPN)を飲水投与、非遺伝毒性膀胱発がん物質0.4% N-Nitrosodiphenylamine (NDPA)、2% Sodium o-phenylphenol (SOPP)、1.5% 11-Aminoundecanoic acid (AUDA)、0.75% 1-Naphtyl-N-methylcarbamate (Carbaryl)、0.3% Tributyl phosphate (TBP)、173 ppm Sodium arsenite (NaAsO₂)

を混餌投与、16 mg/kg Pioglitazone (PGZ)を強制胃内投与、膀胱発がん促進物質0.0114% nicotine hydrogen tartrate (nicotine)、0.012% cotinineを飲水投与、5% Saccharin sodium salt dihydrate (Na-Sac)を混餌投与、遺伝毒性非膀胱発がん物質0.005 (→0.0025)% 4-Nitroquinoline 1-oxide (4NQO)を飲水投与、非遺伝毒性非膀胱発がん物質50 mg/kg Rosiglitazone (RGZ)、90 (→45) mg/kg 1-Nitropropane (1-NP)を強制胃内投与、0.3% 8-Hydroxyquinoline (8-HQ)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。全ての膀胱組織について免疫組織染色を行い、 γ H2AX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、大阪市立大学動物実験委員会および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て、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、ADBAQ、SOPP、AUDA、Carbaryl、4NQO、1-NP、nicotine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・剖検時の体重は有意に抑制された。

膀胱組織学的検討の結果、TBP投与群全てにpapillary/nodular (PN) hyperplasiaを認めた。BCPNおよびnicotine投与群全てにsimple hyperplasiaを認め、AUDA投与群においては、5匹中2匹に、cotinine投与群では、10匹中3匹にsimple hyperplasiaを認めた。

膀胱粘膜上皮における γ H2AX標識率は、膀胱発がん物質ADBAQ、PNC、NDPA、SOPP、AUDA、BCPN、Carbaryl、TBP、NaAsO₂投与群で有意な上昇を認めた。一方、PGZ投与群のみ対照群と差がなかった。また、膀胱発がん促進物質nicotine、cotinine、Na-Sac投与群では、有意な上昇を認めた。遺伝毒性の有無に関わらず非膀胱発がん物質RGZ、1-NP、4NQO、8-HQは対照群と差がなかった。(図1~4参照)

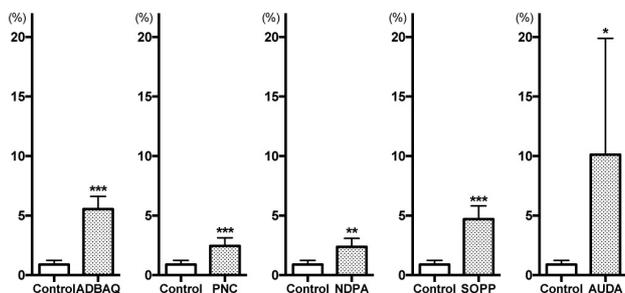


図1. 2017年度 膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

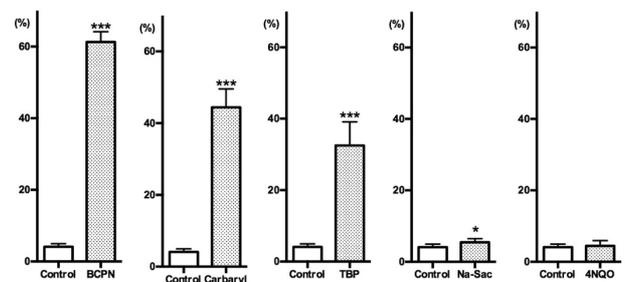


図2. 2018年度 膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

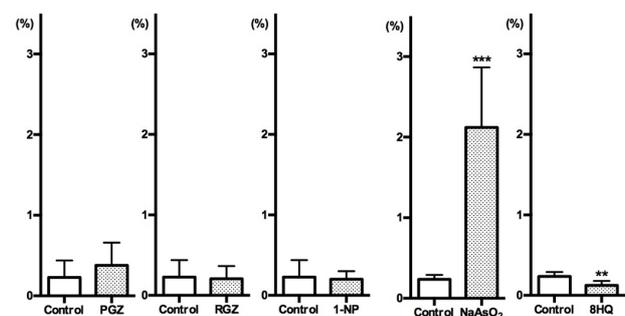


図3. 2019年度 膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

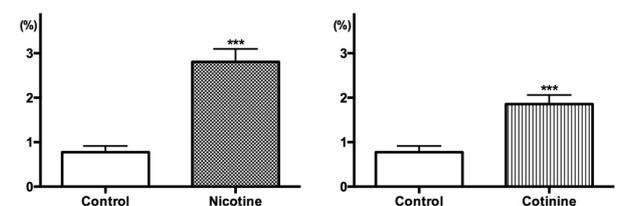


図4. NicotineおよびCotinine投与膀胱粘膜上皮細胞における γ H2AX陽性細胞の定量解析

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、PGZを除く膀胱発がん物質については、遺伝毒性の有無に関わらず検出可能であった。加えて、膀胱発がん促進物質3つについても検出できたことから、この試験法の感受性の高さを示した。一方で、膀胱発がん性を認めない化学物質4つの γ H2AX標識率はいずれも有意な上昇を示さず、 γ H2AXの膀胱発がん性に対する特異性を確認出来た。

今までの膀胱発がん物質に対する γ H2AXを指標とした膀胱発がん物質検出の感度は82.9% (29/35)、特異度は100% (30/30)であった(図5)。

		ラット膀胱に対する発がん性	
		+	-
膀胱上皮における γ -H2AX形成	+	29 2-NA, 2-AAF, BCPN, BBN, o-Anisidine, DHPN, EHB, APNH, p-Cre, COP, PEITC, DMAB, CPA, 2-NT, o-Toluidine, BOP, DB1, MNU, TBP, Carbaryl, Melamine, Uracil, NTA, ADBAQ, PNC, AUDA, SOPP, NDPA, iAs(III)	0
	-	6 ANP, NMOR, DMA, m-Cre, SSZ, PGZ	30 DMN, 2,4-Xylidine, PhIP, DMBA, Glycidol, MNNG, 2-NP, 4NQO, ENU, DMH, DEN, DMB, TBPP, KBrO ₃ , AA, p-Toluidine, 2,6-DAT, 5-FU, 6-MP, Aniline, d-Limonene, DEHP, DO, TAA, CBX, AMP, ETP, 8-HQ, RGZ, 1-NP

感度 = 82.9%(29/35)、特異度 = 100%(30/30)

図5. γ -H2AX形成を指標としたラット膀胱発がん性の検出感度および特異度。

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 γ 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が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. in press.
- 2) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.
- 3) 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.
- 4) 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.
 - 5) Okabe A, Kiriyama 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) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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: 24778-86.
 - 11) Suzuki S, Kato H, Fuji S, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2. J Toxicol Sci. 2018; 43: 359-67.
 - 12) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Kato H, Fuji S, Pennington KL, 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.
 - 13) 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: 15847-59.
 - 14) 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: 3217-23.
 - 15) 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 the down-regulation of the androgen receptor. Oncotarget. 2018; 9: 13859-69.
 - 16) 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.
 - 17) Kataoka H, Miura Y, Kawaguchi M, Suzuki S, Okamoto Y, Ozeki K, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Asai K, Joh T. Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours. Mol Med Rep. 2017; 16: 3095-102.
 - 18) Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S. The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. Toxicol Pathol. 2017; 45: 544-50.
2. 学会発表
 - 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、久野壽也、高橋智、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第106回日本病理学会総会、東京（2017年4月）
 - 2) 鈴木周五、加藤寛之、不二哲、内木綾、山下依子、久野壽也、高橋智、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第76回日本癌学会学術総会、横浜（2017年9月）
 - 3) 鈴木周五、内木綾、加藤寛之、高橋智、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立、第34回日本毒性病理学会総会および学術集会、沖縄（2018年1月）

- 4) 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ニコチンの影響、第107回日本病理学会総会、札幌（2018年6月）
- 5) 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ニコチンの影響、第77回日本癌学会学術総会、大阪（2018年9月）
- 6) 鈴木周五、加藤寛之、不二哲、内木綾、高橋智、ラット膀胱発がん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、東京（2019年1月）
- 7) 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）
- 8) 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）
- 9) 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

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。