

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための
短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究**

(研究課題番号 H23-化学-指定-007)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉見 直己

平成25(2013)年 3月

目 次

．総括研究報告

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究 （吉見直己）	1- 7
---	------

．分担研究報告

1．大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発 （吉見直己）	9-12
2．前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 （高橋智）	13-14
3．胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発 （塚本徹哉）	15-16
4．大腸前癌病変を構成する細胞の起源に関する研究 （久野壽也）	17-18
5．遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発 （魏民）	19-36
6．肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 （横平政直）	37-46
7．膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発 （小川久美子）	47-52
8．網羅的なDNA付加体解析法を用いた化学物質のDNA損傷性評価 （戸塚ゆ加里）	53-56
9．ヒストン修飾を指標としたin vitro発がんリスク 評価系の開発 （伊吹裕子）	57-60

．研究成果の刊行に関する一覧表	61-62
-----------------	-------

．研究班員名簿	63
---------	----

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究（H23-化学-007）

研究代表者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科 腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

化学物質は毎年新規に開発され、その一部は Ames 試験等の変異原性試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの安全性の確認が必要である。そのため、発がん試験には動物による代替実験試験を要するが、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難であるため、本研究では発がん性を検証するために病理組織学的な診断を利用により、変異原性陽性物質に対する少数での動物系での中・短期のバイオアッセイ系を開発することを目的とした。臓器により、病理組織学的に早期の腫瘍性病変を特定できるように検討を始めた(大腸・肺臓・肝臓)。他の臓器でも早期病巣の特定とその特徴解析の検討を準備した。加えて、分担者間での多施設共同として動物臓器供与のシステムの構築に関して検討したが、その輸送などの具体的な実施方法を今後詰めていく必要がある。

A．研究目的

本研究で、短・中期発がん予測バイオアッセイ系を開発し、そのガイドライン設定の方向性への提唱が目的である。既にヨーロッパ・ユーロ圏の諸国での研究施設では、特に化粧品関連物質に関して、法的に動物実験系ができなくなるため、代替実験法が開発が急がれ、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難である。そのため、動物モデルでの評価法は未だに必要不可欠である。しかし、国際的に動物試験に対する 3 R（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）の原則は、動物系実験を肯定的に考えている研究者でさえ、当然の考慮として受け入れられている。この現状のためにも、腫瘍形成を正確に判定し得る病理組織学的な評価を基とした各臓器別の発がん試験として短・中期でのバイオアッセイ系の開発が望まれる。ヒトの場合においても各臓器のがんの早期発見がその治療と予後に重要な関与があることは周知の事実である。実際、ヒトにおける生検標本での病理診断技術の発達、内視鏡的に病変を認めない場合でも、ランダム生検により、病理組織学的に異型細胞の存在は重要な診断価値があり、その後の精査の対象となっている。しかるに、未知物質の発がん性試験には長期動物実験による肉眼的な腫瘍形成を指標としており、その観察される腫瘍の病理組織学的な検索はあくまでも腫瘍の確定するためのものであった。しかし、動物実験においても従前より前がん病変として種々の早期に発現する病巣の研究がなされてきた。その多くの研究は腫瘍発生の科学的機序の視点でのものであった。このため、本研究では、前がん病変とされてきたもののうち、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものは、その肉眼的な腫瘍形成に関わらず、腫瘍として認められるものを指標として検索できる試験法を開発

を目指すことにした。

B．研究方法

以下のように、主に臓器別に中・短期バイオアッセイ系の確立と新規 *in vitro* 発がん性予測試験を実施した。

1) 中・短期バイオアッセイ系

大腸

(ア) 前がん病変の組織学的検索

4週齢のF344ラットに対し、発癌剤azoxymethane (AOM; 15 mg/kg体重)を投与して大腸発がんを誘発し、5、7、10週で屠殺を行い、大腸粘膜表面における前がん病変に関して検討した。メチレンブルー染色によって大腸変異巣 aberrant crypt foci (ACF)ないしアルシアンブルー染色で粘液涸渇巣 mucin-depleted foci (MDF)を個々に観察し、その後、大腸粘膜に対し水平に薄切したパラフィン包埋組織標本作製した。大腸粘膜組織標本をHE染色で確認した後、スライドガラスデジタル化装置(パーチャルスライド)により組織標本画像をデータベース化し、インターネットでの観察・閲覧可能な状態を構築した。このパーチャルスライド組織標本を本研究班の病理医に依頼診断してもらい、回答をアンケート形式で募った。

(イ) 前がん病変を構成する細胞起源検索

6週齢のICRマウスに対しAOM (10 mg/kg 体重)を投与した1週間後に1.5% dextran sodium sulfateを1週間飲水投与して大腸増殖性病変を誘発した。実験開始4週間後に屠殺し、大腸を摘出し、粘膜面に対して垂直な病理組織標本作製した。粘膜内病変をHE染色で確認したのち、Lgr5の免疫染色を行い、染色性と染色パターンを評価した。次に、*Apc^{Min/+}*と*Lgr5-GFP*

knock-in マウスを交配して作製したマウスの大腸腺腫に対し Lgr5, β -catenin, GFP の免疫染色を行い、染色性を評価した。また、*Lgr5-GFP-IRES-creERT2* knock-in; *Rosa26-LacZ* reporter mice と *Apc^{Min/+}* mice を交配し、Lgr5 発現細胞が大腸前がん病変及び腫瘍において幹細胞として機能している可能性を Lineage tracing 法で検討した。

(ウ) 二次胆汁酸によるマウス大腸発がん促進効果の検討

8 週齢の雄性 C57BL6 マウスに対し AOM (10 mg/kg 体重) を 1 回/週、4 週皮下注射した後、2 次胆汁酸である deoxycholate を 0.04, 0.2, 0.5% の濃度でそれぞれ混餌投与した。実験開始 24 週後に大腸を摘出し、粘膜内病変を病理組織学的に評価した。

(エ) 大腸陰窩の分離腺管を利用した遺伝子発現

正常マウスに X 線照射した後の大腸陰窩における遺伝子発現変化をモデルに用いた。大腸陰窩を 30mM EDTA in Hanks' Balance solution にて腺管分離を行い、PAXgene Tissue container (QIAGEN) を用いて、分離腺管の固定を行い、実体顕微鏡下に、陰窩を腺底部から腺開口部まで領域ごとに 3 分割して、PAXgene RNA kit (QIAGEN) を用いて、total RNA の抽出を行った。GAPDH を内部標準として、p21, p53, β -catenin, cyclin D1 の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法により検討した。Quantitect SYBR Green RT-PCR kit を用い Rotor-GeneQ (QIAGEN) を使って定量的に、RT-PCR を行った。加えて、X 線照射に対して発現量が増加あるいは減少するタンパクの同定を試みた。大腸分離腺管から蛋白質を抽出し、得られた可溶性蛋白質を二次元電気泳動法により分離し、非照射群と照射群と比較した。発現量に差異のあるスポットを、MALDI-TOF/TOF タンデム質量分析計によって解析した。同定されたタンパクについて、Western blotting 法および免疫組織化学により発現変動と発現部位を検討した。

肝臓

(実験 1) 遺伝毒性と発がん性を包括的に検出できる肝発がんリスク評価法の開発

in vivo 変異原性の検索が可能な F344 系 *gpt delta* ラット (以下 *gpt delta* ラットと略す) を用いた中期肝発がん性試験法 (伊東法) において、発がん性および変異原性の包括評価における有用性を評価した。具体的に、遺伝毒性肝発がん物質である 2-AAF を用いて、その肝発がん修飾作用、及び *gpt* アッセイおよび Spi アッセイにより *in vivo* 変異原性を検討した。

(実験 2) ジクロロメタンおよびジクロロプロパンの肝胆道系に及ぼす影響の検討

近年、大阪の印刷工場従業員において胆管がんが多発しており、dichloromethane (DCM) 及び dichloropropane (DCP) などを含む有機溶剤への

高濃度・長期間曝露が胆管がん発症の原因として疑われている。本研究では、8 週齢雄性 B6C3F1 マウス及び 8 週齢雄性シリアンハムスターに DCM 及び DCP を 500 mg/kg bw の用量で 1 日 1 回、3 日間強制胃内投与を行い、これらの化学物質の肝胆道系に及ぼす影響を検討した。

肺臓

(実験 1) NNK 誘発マウス肺腫瘍 (腺系腫瘍、16 週) および NTCU 誘発マウス肺扁平上皮異形成 (20 週) DHPN ラット肺腫瘍 (腺系腫瘍、30 週) の固定標本を用い、SP-C (sc-1379, Santa Cruz, CA, USA, 1:50) および Clara cell secretory protein (CCSP, CC10) (sc-9773, Santa Cruz, CA, USA, 1:2000) について二重免疫染色を行い評価した。

(実験 2) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍 (腺系腫瘍、30 週) の固定標本を用い、cyclin D1, Napsin A, p27, TTF-1, Ki-67, Cytokeratin (CK) 7, CK 20, CK 34 E12, CK 5/6, SP-A, p53, EGF-R, ER, PR, CEA, p16, PCNA, chromogranin A および synaptophysin について免疫染色を行い評価した。用いた抗体の情報および希釈倍率等に関しては表 1 に示す。

(実験 3) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍 (過形成、腺系腫瘍、12 週および 30 週) および NNK 誘発 F344 雄ラット肺過形成病変 (12 週および 30 週、NNK 単独群 30 週では病巣がほぼ見られないので、NNK 投与後に 2mg quartz 微粒子/0.2ml 生理的食塩水の懸濁液を気管内投与した NNK+quartz 群について検討した) の固定標本を用い、cyclin D1, Napsin A, p27, TTF-1 および ER について免疫染色を行い評価した。

(実験 4) 微粒子の気管内投与後 28 日後の F344 雄ラット肺の固定標本を用い、Napsin A について免疫染色を行い評価した。微粒子は quartz, NiO および CuO の 3 種類であり、いずれも 2mg/0.2ml 生食の用量で被験微粒子を気管内投与した。

膀胱

種々の DNA 損傷修復酵素の発現動態について、F344 ラットに遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) を投与し誘発した膀胱の癌組織および正常～過形成粘膜、ならびに、無処置ラット膀胱粘膜において比較検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、2 重鎖切断のマーカーである -H2AX, MRE11, XRCC1、直接損傷修復に関わる MGMT、ミスマッチ修復に関わる MLH1, MSH6、塩基除去修復に関わる APE1、ヌクレオチド除去修復に関わる DDB1, ERCC1、ブルーフリーディング修復に関わる TREX1、細胞周期チェックポイントのマーカーである SMC1 および複製後修復に関わる RAD18 について、免疫組織化学染色を行った。

前立腺

Methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) および 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) の臓器標的性の解析実験から、リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) 発現上昇が前立腺発がん物質をスク

リーニングする指標として有用ではないかと考えられた。そこで、前立腺発がん物質に対する γ -H2AXの特異性について検討すると同時に、マイクロアレイにて抽出した High mobility group box 2 (HMGB2)および Ki-67 についても解析を行った。6週齢 F344 雄ラットに、前立腺発がん物質である N-methyl-N-nitrosourea(MNU)、N-nitrosobis-(2-oxo-propyl)amine (BOP)、前立腺に標的性のない肝・腎発がん物質である Dimethylnitrosamine (DMN)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline (MeIQx)、大腸発がん物質である 1,2-dimethylhydrazine (DMH)、乳腺発がん物質である 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を単回投与した。投与経路は、それぞれ皮下投与(BOP)、胃内投与(MeIQx、DMBA)もしくは腹腔内投与(MNU、DMN、DMH)を用いた。投与2日後に前立腺、大腸、肺、肝、腎を摘出し、それぞれホルマリン固定および凍結組織を採取した。免疫組織染色を行い、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

2) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

最近、ジクロロメタンやジクロロプロパン等のハロゲン系炭化水素は職業性胆管がんの原因物質の可能性が示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。本研究では、遺伝子変異の基となる、ハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析を試みた。ハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素(GSTT1)により GSH が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。そこで、ジクロロメタン由来の DNA 付加体の標準品を化学合成し、分析条件の確立を LC-ESI-MS/MS を用いて行なった。また、これら付加体がハロゲン系炭化水素と GSH の共存下で GSTT1 の作用により生成するかについても検討をおこなった。更に、同サンプルを用いて、DNA-アルキル-GSH 付加体以外の生成について、網羅的解析法(アダクトーム法)を用いて検討中である

ヒストン修飾を指標とした解析法

化学物質作用後のヒストン修飾を、H2AX(Ser139)、H3 リン酸化(Ser10, Ser28)、アセチル化(global, Lys9, Lys14)に焦点を絞り検討した。また、ヒストン H3 リン酸化部位でのがん遺伝子発現制御について、ChIP 法にて検討した。

3) 多施設共同システム構築

分担者ごとに動物実験の対象臓器以外の臓器に関して、他施設で研究対象にする臓器を一定の固定・保存状態をするための共通プロトコールを班会議等で議論を開始した。

(倫理面への配慮)

全ての分担者の動物施設においての規程に基づいて、実験計画の許可とともに、遺伝子を利用する場合はそれぞれの施設での組み換え DNA 実験委員会の許可を得、厳正に動物愛護と倫理面を配慮した実験を施行した。また、ヒト検体を検討する場合は、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C. 研究結果

1) 中・短期バイオアッセイ系

大腸

(ア) 前がん病変の組織学的検索

5週目の採取標本において、大腸粘膜表面の観察にて ACF の出現を確認し、同じ領域での組織標本の回答結果は腫瘍性(腺腫)47.4%、過形成病変26.7%、炎症性病変21.1%、病変特定不可15.8%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)20%、過形成病変33.3%、炎症性病変20%、病変特定不可26.3%であった。7週目の採材標本において、ACFでは腫瘍性(腺腫)12.5%、過形成病変75%、炎症性病変12.5%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)38.5%、過形成病変46.2%、炎症性病変0%であった。10週目の採材標本において、ACFでは腫瘍性(腺腫)54.5%、過形成病変18.1%、炎症性病変9%、病変特定不可18.1%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)77.7%、腫瘍性(癌腫)16.6%、過形成病変5.5%、炎症性病変0%であった。結果として、前がん性病変と考えられている ACF や MDF でも早期腫瘍性病変として病理組織診断が可能であると考えられた。特に10週目の MDF の判定では、腫瘍性と診断される一致率が90%を越えており、発がん性試験として利用できると思われる。

(イ) 前がん病変を構成する細胞の起源

陰窩の複雑な分岐はマウス大腸前がん病変と考えられている β -catenin accumulated crypt の特徴でもあり、萌出部の Lgr5 の発現は大腸前がん病変の発生に関係があると思われる。大腸早期増殖性病変および腺腫に Lgr5 は高発現しており、大腸発がんリスクの評価に用いることが可能と考えられた。Apc^{Min/+} × Lgr5-GFP knock-in mouse に生じた腺腫が Lgr5(+)となったにもかかわらず GFP 陰性となったのは不明であるが、一部の腺腫が Lgr5(-)の stem cell 由来である可能性も考えられた。Lineage tracing 法を用いた検討では大腸 microadenoma のみならず肉眼的に認識可能な腫瘍中にも幹細胞由来として機能する可能性がある Lgr5 陽性細胞を確認した。

(ウ) 二次胆汁酸によるマウス大腸発がん促進効果の検討

マウス大腸粘膜内病変を対象とした系では実験期間 24 週で被験化合物の発がんプロモーション効果の評価が可能であり、deoxycholate の混餌投与は AOM 誘発大腸前がん病変の発生を有意に促進した。

(エ) 大腸陰窩の分離腺管を利用した遺伝子発現

1 腺管あるいは腺底部部分 1、3、10 個を用いて、内部標準に用いる GAPDH と発現変動が期待される p21 に関して定量的に RT-PCR を行った。その結果、腺管あるいは腺底部いずれを用いた場合でも GAPDH、p21 のいずれもほぼ定量的な結果が得られた。p21 mRNA は、腺開口部では恒常的に発現していた。腺底部では、正常では低値であったが、X 腺照射と共に 15 倍程度に発現が上昇した。p53 と cyclin D1 は、腺底部に高値で、腺開口部では低値であった。-catenin レベルはほぼ一定であった。二次元電気泳動によって発現量の上昇するタンパクと減少するタンパクが確認され、Western blotting により 発現変動を確認したところ、ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) および 活性型 phospho-ERM の経時的な上昇、high mobility group protein box 1 (HMGB1) の経時的な減少が確認された。ERM に関して、免疫組織学的に検討したところ、大腸、小腸上皮細胞の核に集積する像が得られた。

肝臓

(実験 1) 遺伝毒性と発がん性を包括的に検出できる肝発がんリスク評価法の開発

ラット肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞集の数および面積を検討した結果、対照群に比較して 2-AAF 投与群で有意に増加し、2-AAF の肝発がん促進作用が認められた。また、*gpt* アッセイと *Spi* アッセイでは対照群に比較して 2-AAF 投与群で点突然変異頻度および欠失変異頻度の有意な増加が認められ、2-AAF の *in vivo* 変異原性が確認された。これらの結果がこれまでの 2-AAF の肝発がん性および *in vitro* 変異原性に関する報告と一致しており、*gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験法は化学物質の肝発がん性と *in vivo* 変異原性を包括的に検出できる発がんリスク評価法として有用であることが考えられた。

(実験 2) ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパンの肝胆道系に及ぼす影響の検討

マウスを用いた投与試験において、病理組織学的には DCM 投与群で異常所見は認められなかったが、DCP 投与群では、5 匹中 4 匹に肝臓の小葉中心性壊死が認められた。しかし、いずれの投与群においても、胆管上皮傷害は認められなかった。DCM の代謝酵素である GST-T1 の免疫組織化学染色解析の結果、対照群のマウスの肝細胞および胆管上皮の細胞質で GST-T1 の発現が認められた。しかし、DCM 投与群における発現増強は認められなかった。なお、DCP 投与群においても GST-T1 発現増強は認められなかった。現在、薬物代謝酵素である P450 の発現を検討中である。

ハムスターを用いた投与試験において、病理組織学的には DCM 投与群で異常所見は認められなかったが、DCP 投与群では、5 匹中全例に肝臓の小葉中心性壊死が認められた。しかし、いずれの投与群においても、胆管上皮傷害は認められなかった。さらに、胆管上皮細胞では GST-T1 の発現は認められず、投与による発現変動は認められなかった。

一方、肝細胞における GST-T1 発現において、DCP 投与群においてのみ明らかな増強が認められた。

以上より、マウスおよびハムスターにおいては、DCP による強い肝毒性が認められた。来年度は、DCP および DCM による代謝酵素誘導および肝障害の用量相関性を明らかにする予定である。本実験は DCM および DCP の胆管発がんリスク評価モデルの開発に有用な基礎データを提供できると期待される。

肺臓

(実験 1) NNK 誘発 A/J 雌マウス肺および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺ではいずれも肺胞上皮過形成病変、腺腫、腺癌が見られた。DHPN 誘発 F344 雄ラット肺では腺癌の結節の一部に扁平上皮化生が見られた。マウスおよびラットともに、肺胞上皮過形成性病変、腺腫、腺癌のいずれも SP-C に強く陽性を示した。肺胞上皮過形成性病変および腺系腫瘍部に CCSP の発現は見られなかった。

一方、NTCU 誘発 A/J 雌マウス扁平上皮異形成、および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腺癌中の扁平上皮化生成分ではいずれも CCSP に陽性を示していた。

(実験 2) DHPN 誘発の肺過形成病変および腺腫に関して、良好に染色された抗体は、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER、CK 34 E12 および CK 5/6 の 7 種類であった。このうち、CK 34 E12 および CK 5/6 に関しては扁平上皮化生を示す部分に陽性像を示していた。しかし、これらは、過形成病変の鑑別には適さないと判断した。以上より、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 および ER が、さらに詳細な検討を行うべきマーカーの候補として挙げた。

(実験 3) NNK および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺病変に対して、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER のいずれも病変部が良好に染色された。一方で、DHPN 誘発過形成病変と NNK 誘発過形成病変を比較すると、その発現に差が見られたのは Napsin A および TTF-1 であった。いずれも、DHPN 誘発過形成病変においては、肺胞壁を構成する細胞に強く発現を示したが、NNK 誘発過形成性病変では肺胞壁の細胞の発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内の成分では発現が見られた。また、Napsin A は TTF-1 と比べて染色性が良好であった。以上から、Napsin A のラットの肺胞壁内細胞への高発現は malignant potential を示唆すると考えられた。実験 3 におけるその他の所見は以下の通りである。Napsin A は腫瘍において、悪性度が高いと発現が低下していた。一方で、ER は悪性度が上昇すると発現が上昇する傾向が見られた。TTF-1 は悪性度の違いによる発現の変化は見られなかった。

(実験 4) 炎症により発生する過形成病変は、発癌物質によって誘発される過形成と比べて腫瘍化する可能性は低いと推測される。この炎症性過形成について、Napsin A の肺胞壁内細胞への発現が乏しいのか検討を行った。Quartz、NiO および CuO を F344 雄ラットに気管内投与すると、28 日目には肺に炎症性過形成病変が認められる。Napsin A はこれらの部に実験 3 での NNK 誘発過形成性病変とほぼ同様の染

色性を示した。すなわち、肺胞壁内細胞への発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内成分への高発現が認められた。

膀胱

免疫組織化学染色の結果、1) 本研究で検索した DNA 修復酵素の多くは、対照動物の膀胱粘膜上皮にも恒常的に発現しており、BBN 投与による変化は見られなかった。2) MGMT は BBN 投与後の正常様～過形成性粘膜で発現が認められる一方、癌細胞では陰性であった。3) γ -H2AX は対照動物では陰性であるのに対し、BBN 投与後の膀胱では、正常様/増殖性細胞のいずれも核内に顆粒状 focus がみられた。

以上の結果から、BBN による膀胱発がん機序には MGMT および γ -H2AX 発現が関与する可能性が示唆され、今後、BBN 以外の膀胱発がん剤による、 γ -H2AX 発現誘導について検討を行う予定である。

前立腺

前立腺における γ -H2AX 標識率は、MNU では各葉において増加傾向はあるものの有意差はみられなかった。BOP, MeIQx, DMBA, DMN, DMH ではいずれの葉においても対照群に比較して増加傾向、有意差は観察されなかった。HMGB2 標識率は PhIP では腹葉前立腺、DMAB, MNU では腹葉、側葉、背葉のいずれにおいても有意な増加が観察されたが、BOP, MeIQx, DMBA, DMN, DMH では有意差はみられなかった。また、Ki-67 標識率は PhIP, DMAB では腹葉前立腺、MNU は背葉、BOP は側葉で有意な増加が認められたが、前立腺を標的とししない発がん物質である MeIQx, DMBA, DMN, DMH ではいずれも有意な増加がみられなかった。

2) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

CT-DNA との反応で生成させたジクロロメタン由来の 4 種の GSCH₂-DNA 付加体 (GSCH₂-dG, GSCH₂-dC, GSCH₂-dA, GSCH₂-dT) の生成について調べたところ、GSCH₂-dG がその他の塩基由来の付加体と比べ 40 ~ 1400 倍も多く生成することがわかった。また、マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画である cytosol 存在下で、ジクロロメタン、グルタチオン及び 4 種のデオキシモノヌクレオシドを反応させたところ、反応混液中に GSCH₂-dG に相当するピークのみが観察された。このことから、ジクロロメタン由来の GSH 付加体は GSCH₂-dG がメジャーな付加体であることが推測された。一方、同じサンプルを LC-MS/MS を用いた網羅的解析法 (アダクトーム法) により解析したところ、多数の DNA 付加体が観察されたことから、GSCH₂-dG 付加体以外にも多くの付加体が生成されており、新規の職業性胆管癌リスクのバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

ヒストン修飾を指標とした解析法

化学物質により特異的なヒストン修飾パターンを示した。例えば、formaldehyde、

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の作用後のヒストン修飾パターンでは、DNA 損傷誘導を示す H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) また、H3 のリン酸化 (Ser10,28) の誘導が両化学物質作用後に認められた。一方、ヒストンのアセチル化は、NNK 作用後に顕著に認められ、クロマチン構造の変化と遺伝子発現の変化が示唆された。ChIP アッセイの結果、*proto-oncogene* である *c-fos*, *c-jun* プロモーター領域で H3(Ser10) のリン酸化は上昇していることから、このヒストン修飾が発がんプロモーションに繋がることが示された。

3) 多施設共同システム構築

各施設、主体とする臓器以外には必ずしも、動物解剖時に保存していないことが判明したために、共通の臓器保存をしていくかを協議した結果、早急に各施設の対象臓器の摘出固定・保存の方法をまとめることが第一課題として準備している。

D. 考察

各臓器別で早期癌病巣を特定できる中短期モデルの開発を目標に進行しているが、大腸では比較的多くの前がん病変が知られており、特に ACF は従来より、がんの化学予防のバイオマーカーとしても利用されるとともに、ヒトにおいても動物で提唱された前がん病変の存在が大腸癌の内視鏡的なマーカーとして認識されている。加えて、MDF は中期(10 週)では腫瘍性と病変として認識される率が 9 割以上であった。そのため、これらの早期の病理組織学的検索は発がん性試験として十分に利用できると考えられた。

また、肺臓での過形成病変を免疫組織学的な検索により、NapsinA の染色性で発がん予測として役立つと考えられ、指標とした代替法の確立を目指すことにした。肝臓は従来からの伊東モデルを変異原性・遺伝毒性を *in vivo* で確認できる gpt-delta ラットを利用することで、変異原性・発癌モデルとして利用できる可能性を示唆したが、経済的な側面での考慮が必要である。

膀胱・前立腺においては免疫組織学的に膀胱で γ -H2AX, 前立腺で γ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 標識率を組織学的な早期病変に加味して検討を進めているが、今後、更なる検討が必要と思われる。

新規系での試験では、新たに LC-TOF MS を用いてアダクトーム法を確立の可能性を示唆され、今後の未知物質に対する検討が必要であり、最近、注目されている環境性因子が示唆されているヒト肝内胆管癌発生の可能性が示唆されているジクロロメタン等の未知物質での検出法としての活用が期待される。また、ヒストン修飾ではヒストン H2AX(Ser139)リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3(Ser10)のリン酸化により前がん遺伝子の発現制御を捉えることが可能であることが明らかになり、*in vitro* 新規発がんリスク評価指標候補として、膀胱・前立腺における動物系との連携で検討することが必要と考えられた。

E. 結論

動物を供する発がん試験における代替法の確立は化

学物質のヒトへの安全性に対して重要である。しかし、動物実験に対する3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は決して動物を使用しないということではないため、今回の研究目標はその精神に基づいてヒトとしての生体に近い動物での発がんすなわち、腫瘍形成の有無を推測できるシステムの構築の確立を目指すものと位置づけることができ、その観点で、その可能性を示唆できるものと考えている。

F. 健康危険情報

1,2-ジクロロプロパンがマウスおよびハムスターでは肝毒性を示す。ヒトに関しては特定できていないが、1,2-ジクロロプロパンが印刷所で使用されていることと昨今の印刷所での肝内胆管癌の発生を考慮すると、今後、その機序を含め、科学的な検索が必要であると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai E, Yoshimi N et al. Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Sci.* 103: 144-149, 2012.
- 2) Cui C, Yoshimi N et al. The pre-neoplastic lesion, mucin-depleted foci, reveals as *de novo* high-grade dysplasia in rat colon carcinogenesis. *Oncology Reports*, 27: 1365-1370, 2012.
- 3) Takahashi, S. et al. Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. *Prostate*, 72:1559-1572, 2012.
- 4) Long, N., Takahashi, S. et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci.* in press.
- 5) Kobayashi, D., Takahashi, S. et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. *Prostate*, in press.
- 6) Tsukamoto T et al. Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol*, in press.
- 7) Kuno T et al. Organoamnesium suppress inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj:CD-1 mice. *Carcinogenesis*. Epub 2012.
- 8) Kuno T et al. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry*. 3: 156-173. 2012.
- 9) Takamatsu M, Aoki H, Hirose Y, Kobayashi K, Tomita H, Kuno T, Koumura H, Hara A. Teratoma showing the features of retinal structure: A case of sacrococcygeal teratoma. *Oncology Letters*. 3: 1023-26. 2012.
- 10) Xie XL, Wei M, et al. 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ) promotes mouse hepatocarcinogenesis by activating transforming growth factor- and Wnt/ -catenin signaling pathways. *Toxicol Sci*, 125: 392-400, 2012.
- 11) Nakatani S, Wei M, et al. Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephrin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transpl*, 27: 1889-1897, 2012.
- 12) Wei M et al. Lack of Hepatocarcinogenicity of Combinations of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats: Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol*, 25: 209-214, 2012.
- 13) Yokohira M et al. Toxicity of nicotine by repeated intratracheal instillation to F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 25:257-263, 2012.
- 14) Yokohira M, et al. Strain differences in pleural mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) infused directly into the thoracic cavity. *Exp. Toxicol. Pathol.*, in press.
- 15) Kato T, Totsuka Y, et al. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay systems. *Nanotoxicology*. Epub 2012.
- 16) Matsubara S, Totsuka Y. et al. Induction of Glandular Stomach Cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile, *Int J Cancer*, 130:259-66, 2012.
- 17) Toyooka T, Ibuki Y et al. Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutat. Res.* 741: 57-64, 2012.
- 18) Toyooka T, Ibuki Y et al. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat. Res.* 742: 84-91, 2012.
- 19) Ibuki Y et al. Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 46; 7629-7636, 2012.
- 20) Toyooka T, Ibuki Y et al. UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenolpolyethoxylates-- remarkable generation of -H2AX with degradation of

chemical structure. Mutagenesis. 28: 7-14, 2013.

2. 学会発表

1. 横平政直, 他 Immunohistochemical characteristics of the lung proliferative lesions in F344 rats., 第71回日本癌学会総会, 2012.
2. Kousuke Ishino, Yukari Totsuka, et al. A comprehensive analysis of metabolic syndrome-related DNA adducts in human leukocytes, 第71回日本癌学総会. 2012.
3. Kousuke Ishino, Yukari Totsuka et al. Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) 第3回アジア環境変異原学会. 2012.
4. Yukari Totsuka, Kousuke Ishino, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama, Analysis of DNA adducts derived from dihaloalkanes, 第41回日本環境変異原学会. 2012.
5. Akihiro Sekine, Yukari Totsuka et al. Adductome analysis of DNA adducts in lungs of mice exposed to magnetite (MGT) 第41回日本環境変異原学会. 2012.
6. Kousuke Ishino, Yukari Totsuka et al. Exploration of novel DNA adducts using comprehensive adduct analysis (DNA adductome analysis) 第41回日本環境変異原学会. 2012.
7. 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化とがん原遺伝子発現制御. 第39回日本毒性学会学術年会 (仙台) pp.232, 2012年7月
8. Ikuma Yoshida, Yuko Ibuki et al. Formaldehyde-induced histone modifications and expression of proto-oncogenes. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012.
9. 伊吹裕子他 たばこ副流煙によるヒストン修飾変化. 第39回日本毒性学会学術年会. 2012.
10. 伊吹裕子他 化学物質によるヒストン修飾変化とそれを指標とした毒性評価系の構築. 第27回発癌病理研究会, 2012.
11. 吉田唯真, 伊吹裕子他, -不飽和アルデヒドによるヒストン修飾変化. 第41回日本環境変異原学会, 2012年.
12. 松下実理, 伊吹裕子他 17- β -estradiol によるヒストンアセチル化と紫外線感受性変化. 第41回日本環境変異原学会, 2012.
13. 趙曉旭, 伊吹裕子他 銀は紫外線誘導ヒストン H2AX のリン酸化を増強する. 第41回日本環境変異原学会, 2012.

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発に関する研究

研究分担者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

大腸粘膜における発がん試験の指標として、前がん病変の病理組織学的な意義を、ラット DMH 大腸発がんモデルで経時的に検討した。その病理組織像の推移から、従前より前がん病変と考えられている変異陰窩巢(aberrant crypt foci ; ACF)よりも早期から粘液染色で陰性の粘液枯渇陰窩巢(mucin-depleted foci ; MDF)が腺腫ないし腺がんに類する所見の有無を多くのヒト消化管病理を専門とする病理医に診断要請する予定である。長期実験での腫瘍形成を指標とするのではなく、中・短期での大腸発がん試験法として大腸粘膜での MDF を組織学的に検索する代替法の可能性を模索する予定である。

A . 研究目的

ヒト大腸発がん過程において、腺腫・癌連鎖仮説で説明がつかない平坦型大腸癌が最近注目されている。動物モデルで見られる mucin-depleted foci (MDF)は平坦型の前がん病変の可能性がある。そのため、従前から動物モデルでの前がん病変として認識され、発がん予測バイオマーカーとして利用されている aberrant crypt foci (ACF)との病理組織学的な経時的な変化に関して検討し、本研究目的である中短期での発がん試験への利用の可能性を検討した。

B . 研究方法

4 週齢の F344 ラットに対し、発癌剤 azoxymethane (AOM; 15 mg/kg 体重)を投与して大腸発がんを誘発し、5、7、10 週でと殺を行い、大腸粘膜表面における前がん病変に関して検討した。メチレンブルー染色によって大腸変異巢 aberrant crypt foci (ACF)ないしアルシアンブルー染色で粘液枯渇巢 mucin-depleted foci (MDF)を個々に観察し(図 1)、その後、大腸粘膜に対し水平に薄切したパラフィン包埋組織標本を作製した。大腸粘膜組織標本を HE 染色で確認した後、スライドガラスデジタル化装置(バーチャルスライド)により組織標本画像をデータベース化し、インターネットでの観察・閲覧可能な状態を構築した。このバーチャルスライド組織標本を本研究班の病理医に依頼診断してもらい、回答をアンケート形式で募った。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、琉球大学動物実験施設の実験動物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

5 週目の採取標本において、大腸粘膜表面の観察にて ACF の出現を確認し、同じ領域での組織標本の回答結果は腫瘍性(腺腫)47.4%、過形成病変 26.7%、炎症性病変 21.1%、病変特定不可 15.8%であった。MDF では、腫瘍性(腺腫)20%、過形成病変 33.3%、炎症性病変

20%、病変特定不可 26.3%であった(図 2)。7 週目の採材標本において、ACF では腫瘍性(腺腫)12.5%、過形成病変 75%、炎症性病変 12.5%であった。MDF では、腫瘍性(腺腫)38.5%、過形成病変 46.2%、炎症性病変 0%であった(図 3)。10 週目の採取標本において、ACF では腫瘍性(腺腫)54.5%、過形成病変 18.1%、炎症性病変 9%、病変特定不可 18.1%であった。MDF では、腫瘍性(腺腫)77.7%、腫瘍性(癌腫)16.6%、過形成病変 5.5%、炎症性病変 0%であった(図 4)。結果として、前がん性病変と考えられている ACF や MDF でも早期腫瘍性病変として病理組織診断が可能であると考えられた。特に 10 週目の MDF の判定では、腫瘍性と診断される一致率が 90%を越えており、発がん性試験として利用できると思われる。

D . 考察

各臓器別で早期癌病巣を特定できる中短期モデルの開発を目標に進行しているが、大腸では比較的多くの前がん病変が知られており、特に ACF は従前より、がんの化学予防のバイオマーカーとしても利用されるとともに、ヒトにおいても動物で提唱された前がん病変の存在が大腸癌の内視鏡的なマーカーとして認識されている。加えて、MDF は中期(10 週)では腫瘍性と病変として認識される率が 9 割以上であった。そのため、これらの早期の病理組織学的検索は発がん性試験として十分に利用できると考えられた。

E . 結論

大腸発がん試験の代替法として、全大腸粘膜での病理組織学的検索を施行することで、肉眼的な検出できない微小病変の早期病巣の有無の検出方法のシステム化を提唱できると考えている。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai E, Yoshimi N et al. Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci

in patients with sporadic colorectal cancer.
Cancer Sci. 103: 144-149, 2012.

- 2) Cui C, Yoshimi N et al. The pre-neoplastic lesion, mucin-depleted foci, reveals as *de novo* high-grade dysplasia in rat colon carcinogenesis Oncology Reports, 27: 1365-1370, 2012.

2. 学会発表
特になし。

G . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

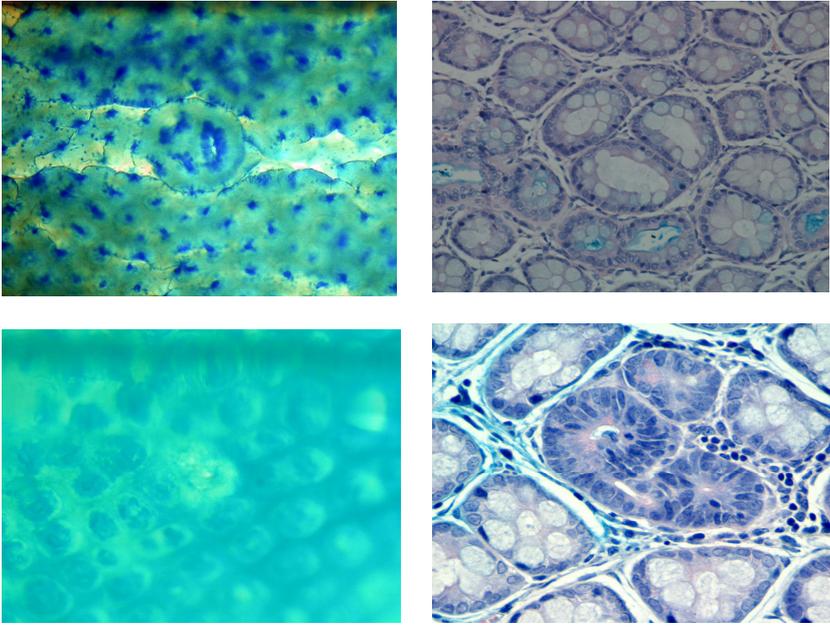


図 1 ACF(上段)と MDF(下段)

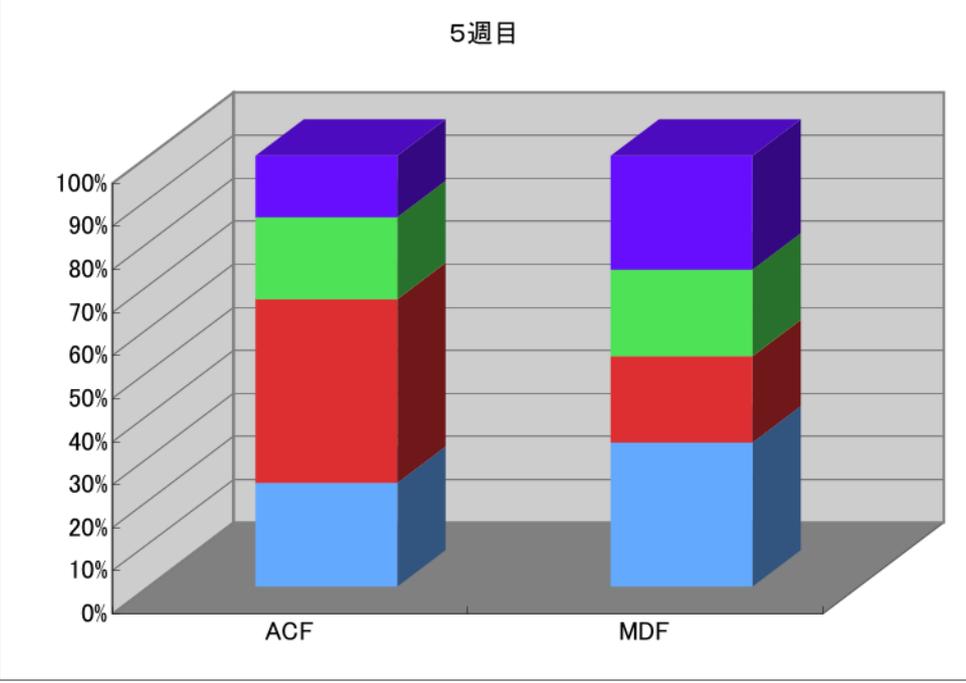


図 2

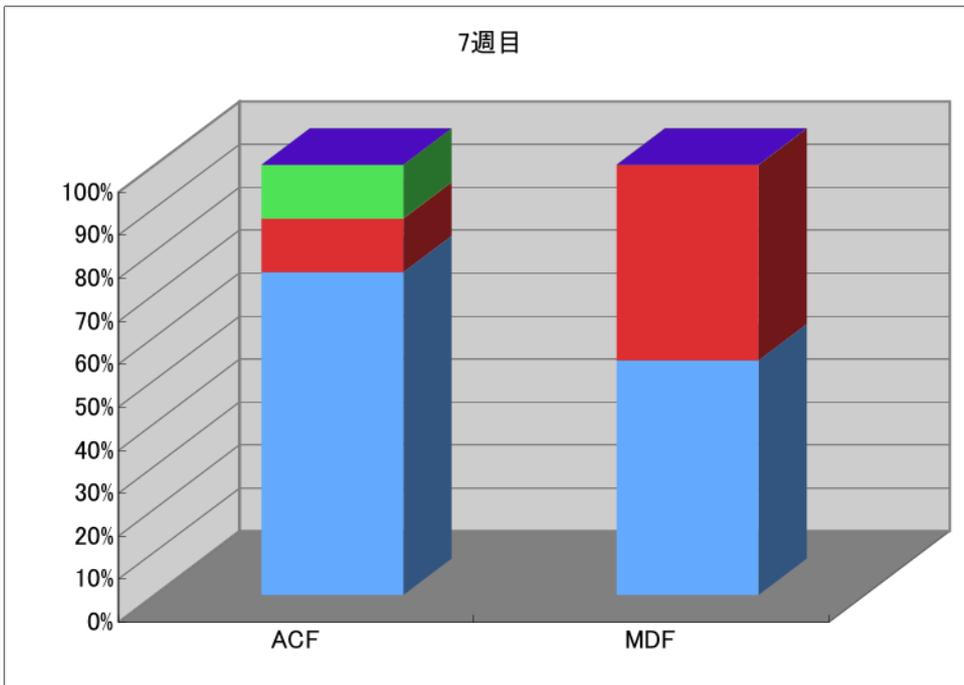


図 3

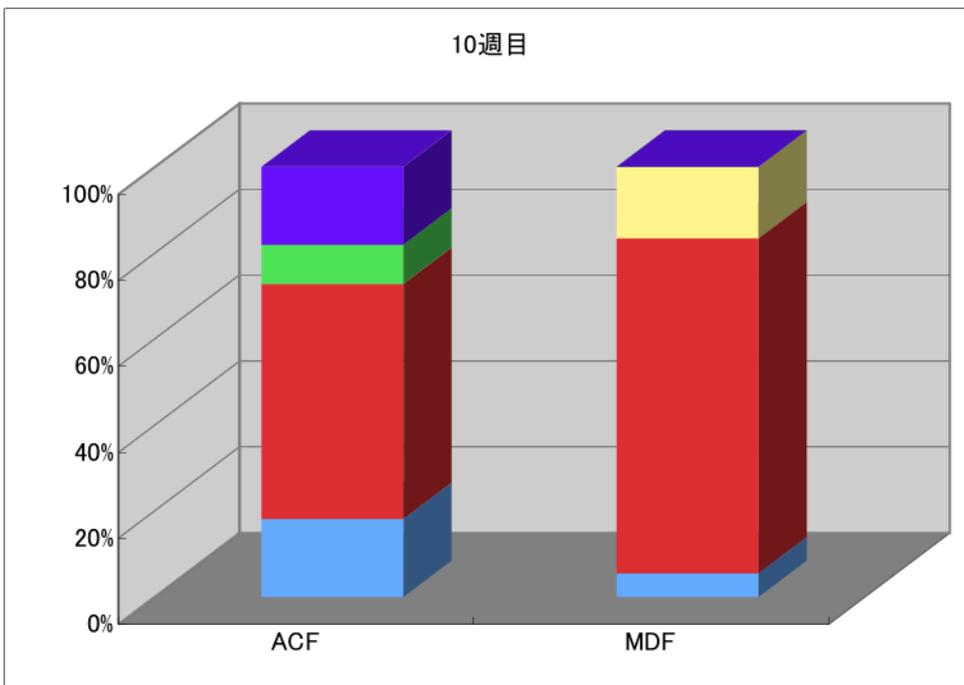


図 4



図 2-4. 前がん病変(ACF と MDF)の組織学的診断の各週でのまとめ

前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発

分担研究者 高橋 智 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨

前立腺発がんリスク評価のための短・中期発がんモデル樹立を目的にラットを用いて検討した。我々は以前に、前立腺発がん物質である PhIP, DMAB を投与したラットにおいて、リン酸化ヒストン H2AX(γ -H2AX)発現が有意に上昇することを見いだした。そこで本年度は、PhIP, DMAB 以外の前立腺発がん物質 (MNU, BOP) あるいは前立腺以外に標的性を示す発がん物質 (DMN, MeIQx, DMH, DMBA) をラットに投与し、発がん標的臓器における γ -H2AX 発現の特異性について検討した。また、 γ -H2AX と同様に前立腺で有意な上昇を示す遺伝子として HMGB2, Ki-67 を抽出し、 γ -H2AX と同様に検討した。その結果、今回検討したいずれの物質も前立腺における γ -H2AX 標識率に有意差はみられなかった。HMGB2 では PhIP, DMAB, MNU, Ki-67 では PhIP, DMAB, MNU, BOP のすべての前立腺発がん物質で有意な上昇を認められたが、他の発がん物質では HMGB2, Ki-67 の両者とも対照群と差はみられなかった。以上の結果から、HMGB2 および Ki-67 標識率が前立腺発がん物質を検出するのに有用なマーカーである可能性が示唆された。また、前立腺以外の臓器における発がん標的の特異性について肝で検討した結果、HMGB2 および Ki-67 標識率は肝発がん物質で有意な上昇を示した。 γ -H2AX 標識率は肝発がん物質 DMAB, MNU で上昇を認めず、発がん物質検出マーカーとして特異性に乏しい可能性が示唆された。

A . 研究目的

前立腺癌は世界的に男性癌の中で4番目に多い腫瘍で、日本でも2020年には肺癌について2番目の罹患率になると予測されており、増加率が一番高いがんである。前立腺がんの原因については未だ不明な点が多いが、食事要因がその発症に深く関与していることが示唆されている。前立腺がんの発症を予防するにはその発がん因子を同定して、それらの摂取を極力抑える事が重要であると考えられ、環境中の発がん因子を同定するための短・中期発がんモデルが必要である。

発がんモデルではがん、あるいは前がん病変を指標にする事が一般的であるが、ラットの前立腺がんモデルでは前がん病変を惹起するには30-40週、がんでは50-60週必要であり、多数の被検物質をスクリーニングするには効率的ではない。そこで、これらの病変を代替する分子・遺伝子群を抽出、同定し、これらを指標にした前立腺発がんモデルの樹立を試みた。

我々は以前に、前立腺発がん物質である 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP)の臓器標的性に関わる諸要因を解析し、PhIPをラットに投与した際に発がん標的臓器においてのみリン酸化ヒストンH2AX (γ -H2AX)発現が上昇することを明らかにした。また、PhIPと同様に前立腺発がん物質である 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)を投与した場合においても γ -H2AX標識率の増加が認められ、前立腺発がん物質をスクリーニングする指標として γ -H2AXが有用ではないかと考えられた。そこで、本年度は前立腺発がん物質に対する γ -H2AXの特異性を検討すると同時にマイクロアレイにて同様に上昇をした遺伝子として High mobility group box 2 (HMGB2)およびKi-67につい

ても解析を行った。また、これら3つの遺伝子について発がん標的の特異性を検討するに当たり、肝組織でも計測した。

B . 研究方法

6週齢 F344 雄ラットに、前立腺発がん物質である N-Methyl-N-nitrosourea(MNU) 、 N-Nitrosobis-(2-oxo-propyl)amine (BOP)、前立腺以外の臓器に対する発がん物質として Dimethylnitrosamine (DMN)(標的臓器：肝、腎)、2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(MeIQx)(標的臓器：肝)、1,2-Dimethylhydrazine (DMH)(標的臓器：大腸)、7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) (標的臓器：乳腺)を単回投与した。投与経路は、それぞれ皮下投与 (BOP, DMH)、胃内投与 (MeIQx, DMBA) もしくは腹腔内投与 (MNU, DMN) を用いた。投与 2 日後に前立腺、肝、腎、大腸を摘出し、ホルマリン固定および一部は凍結組織を採取した。免疫組織染色を行い、 γ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 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

前立腺腹葉、側葉および背葉における γ -H2AX標識率は、MNUで上昇傾向を認めるものの有意差はみられなかった。BOPでは対照群と差がなかった。DMBA, MeIQx, DMHおよびDMNのいずれにおいても全ての葉で対照群との差は見られなかった。HMGB2標識率は、前立腺発がん物質PhIP

では発がん性を示す腹葉においてのみ有意な上昇を認め、DMABおよびMNUは全ての葉で有意な上昇を観察した。一方、BOP、DMBA、MeIQx、DMHおよびDMNでは全ての葉において対照群との差は見られなかった。Ki67標識率はPhIP、DMABでは腹葉、MNUでは背葉、BOPでは側葉および背葉において有意な上昇が観察された。一方、前立腺に標的性のない発がん物質DMBA、MeIQx、DMHおよびDMNはいずれも全ての葉で対照群との差は見られなかった。

一方、肝組織における γ -H2AX、HMGB2およびKi-67標識率を検討した結果、肝発がん物質における γ -H2AX標識率はMeIQx、DMNでは有意な上昇を認めたもののMNU、DMABでは差がみられなかった。一方、肝に標的性のない発がん物質PhIP、DMBA、BOPでは対照群と差がなかったもののDMHは有意な上昇を示した。HMGB2およびKi67標識率は肝発がん物質DMAB、MNU、MeIQxおよびDMNのいずれにおいても有意な上昇を示した。一方、肝に標的性のない発がん物質PhIP、BOPについては対照群と差がなかったものの、HMGB2ではDMBAで、Ki-67ではDMHにおいて有意な上昇を示した。

D. 考察

免疫組織学的に γ -H2AX、HMGB2およびKi-67標識率を算出して、前立腺発がん物質検出における特異性について検討した結果、HMGB2およびKi-67では比較的良好な結果が得られたが、 γ -H2AXではMNU、BOPの両者を検出することは困難であった。さらに対照群の前立腺上皮における標識率は、HMGB2で20~30%、Ki-67で5%程度であったのに対し、 γ -H2AXで0.02~0.05%と極めて低い値を示し、解析範囲による値の変動が大きくなる恐れがあり、検出マーカーとして使用するには不相当である可能性が示唆された。

肝発がん物質の観点からも検討したところ、今回検討したすべての肝発がん物質でHMGB2、Ki-67標識率の有意な上昇が観察された。肝標的性のない発がん物質DMBAはHMGB2標識率、DMHはKi-67標識率において有意な上昇がみられたが、HMGB2、Ki-67の両者では偽陰性は観察されなかったことから、発がん物質のスクリーニング系としては有用である可能性が示唆された。 γ -H2AXではMeIQx、DMNで有意な上昇がみられたが、DMAB、MNUでは差がみられず、発がん物質検出系として利用するにはその特異性に問題があると考えられた。

E. 結論

HMGB2 あるいは Ki-67 標識率を指標にした動物モデルは前立腺発がん物質の検出スクリーニングに有用であり、前立腺以外の臓器に対する発がん物質の検出にも利用できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

- 1) Naiki, T., Takahashi, S. et al. Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice. Prostate, 72:533-541, 2012.

- 2) Takahashi, S. et al. Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. Prostate, 70:1559-72, 2012.
- 3) Long, N., Takahashi, S. et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. Cancer Sci., 104:298-303, 2013.
- 4) Kobayashi, D., Takahashi, S. et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. Prostate, in press.
- 5) Tang, D., Takahashi, S., et al. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-(PhIP)-DNA adducts in benign prostate and subsequent risk for prostate cancer. Int. J. Cancer, in press.

2. 学会発表

- 1) 高橋智、前立腺がんの予防、市民公開講座「がん予防の最前線」、第19回日本がん予防学会、2012年6月、岐阜。
- 2) 龍訥、高橋智、他。ラット前立腺発がんに対する紫トウモロコシ色素の化学予防効果の検討、第19回日本がん予防学会、2012年6月、岐阜。
- 3) 鈴木周五、高橋智、他。内因性活性酸素誘導酵素NADPH oxidaseの阻害によるTRAPラットを用いた前立腺発癌に対する抑制効果、第19回日本がん予防学会、2012年6月、岐阜。
- 4) 鈴木周五、高橋智、他。Inhibition of NADPH oxidase, an endogenous superoxide inducer, suppresses prostate cancer progression、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月、札幌。
- 5) 佐藤慎哉、高橋智、他。OBP-801, histone deacetylase inhibitor, suppressed prostate cancer growth through downregulation of androgen receptor、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月、札幌。
- 6) 鈴木周五、高橋智、他。NADPH oxidase 阻害剤 apocynin による前立腺発癌抑制効果、第29回日本毒性病理学会、2013年1月、つくば。
- 7) 佐藤慎哉、高橋智、他。HDAC 阻害剤 OBP-801 による前立腺癌予防作用の検討、第29回日本毒性病理学会、2013年1月、つくば。

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。

胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 塚本徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

マウスに X 線照射後、大腸分離腺管を用いて、2次元電気泳動法および質量分析計により、発現変動を示すタンパクの同定を試みた。その結果、HMGB1の経時的減少とERMの発現上昇が認められた。ERMは消化管上皮細胞の核に集積した。今後、化学物質による遺伝子損傷刺激後の胃および大腸消化管上皮細胞における反応を、幹細胞領域と分化した腺開口部領域に分けて解析する必要があると考えられた。

A. 研究目的

Helicobacter pylori (ピロリ菌)感染率の低下や治療法の進歩と共に胃がんは減少の一途をたどっている。その一方で、食事の欧米化とともに大腸がんは増加傾向にある。慢性炎症は、種々の臓器で発がんの重要なリスクファクターであることが知られており、活性酸素によるDNA損傷、遺伝子のメチル化等による発現異常が重要な因子であることが明らかとなってきている。しかし、胃あるいは大腸発がん初期過程における遺伝子変異あるいは遺伝子発現異常、さらにはそれに伴う形態変化は未だ明らかではない。そこで、遺伝子障害のごく初期のマーカーを同定するため、遺伝子損傷刺激に対して大きな変動を示すタンパクの同定を試みた。

B. 研究方法

12日齢および7週齢の正常雌雄マウスにX線照射し、照射後6、24、72時間後の小腸および大腸陰窩における遺伝子発現変化を検討した。大腸陰窩を30mM EDTA in Hanks' Balance solutionにて腺管分離を行い、PAXgene Tissue container (QIAGEN)を用いて、分離腺管の固定を行った。大腸分離腺管から蛋白質を抽出し、得られた可溶性蛋白質を二次元電気泳動法により分離した。蛍光色素で染色後、イメージスキャナーで得られたゲル内の全スポットを非照射群(0 hr)と照射群(6 hr)、あるいは照射後24hrと72hrで比較した。発現量に差異のあるスポットから蛋白質成分を抽出・酵素(Lys-K)処理後、MALDI-TOF/TOF タンデム質量分析計によって解析し、ProteinPilot Software 3.0を用いたデータベースサーチにより、X線照射によって発現量の増加あるいは減少するタンパクの同定を試みた。

同定されたタンパクの検証のためにWestern blotを行った。1次抗体として、rabbit anti-high mobility group protein B1 antibody (Sigma)、rabbit anti-Ezrin/Radixin/Moesin polyclonal Antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Phospho-Ezrin (Thr567)/Radixin (Thr564)/Moesin (Thr558) (41A3) mAb (Cell Signaling Technology)を用いた。2次抗体およびシグナルの同定には、Amersham ECL Plus

Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Life Science)を用いた。得られたシグナルは、densitometerで計測後、GAPDH発現量を内部標準として定量的に判定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月文部科学省告示)及び藤田保健衛生大学動物実験取扱規定を遵守し、同大学動物実験委員会の承認のもとに遂行した。

C. 研究結果

12日齢雌雄大腸分離腺管を用いた検討では、0時間と6時間で比較して変動するものとして、spectrin, elongatin factor 2, catenin delta-2, chloride intracellular channel protein 1, high mobility group protein B1, carbonic anhydrase 1, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1が得られた。また、24時間と72時間で比較した場合は、spectrin, elongatin factor 2, chloride intracellular channel protein 1, high mobility group protein B1, carbonic anhydrase 1, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1, ezrin /radixin/moesin (ERM)が大きな変動をしめした。0, 6, 24, 72時間と経時的には、catenin delta-2, spectrin, ERM, carbonic anhydrase 1の増加、chloride intracellular channel protein 1, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1の減少が窺われた。また、HMGB1は、発現量が低下あるいは脱リン酸化されていると判断された。

更に、経時的な発現変動をWestern blottingにて、検討した。12日齢マウスの大腸分離腺管におけるHMGB1の相対値は0時間を 1.00 ± 0.18 (Ave \pm SE)とすると、6, 24, 72時間では、 0.52 ± 0.21 , 0.22 ± 0.07 , 0.28 ± 0.07 と、経時的に減少することが証明された(0 vs. 24 hr, 0 vs. 72hr, $P < 0.05$, One Way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)。一方、増加するものとして、抗ERM抗体が利用でき、大腸陰窩では、0時間を 1.00 ± 0.91 とすると、6, 24, 72時間では、 0.00 ± 0.00 , 0.41 ± 0.19 , 14.92 ± 6.12 (0 vs. 72hr, $P < 0.05$, One Way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)と増

加が見られた。また、小腸上皮においても、0時間を1.00±0.14とすると、6, 24, 72時間では、0.00±0.00、1.99±0.47、7.05±2.14と上昇した(0 vs. 72hr, $P < 0.05$, One Way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)。

ERM抗体を用いて免疫組織学的に検討すると、X線照射6時間後には、ERMの大腸および小腸陰窩および絨毛上皮細胞の核への集積が見られた。

D. 考察

大腸陰窩腺底部のいわゆる幹細胞領域では、恒常的にp53 mRNAが発現しており、X線照射によって、p53タンパクの発現誘導と、同部でのp21 mRNAの発現誘導がおこることを明らかにしてきた。通常の病理検体を用いて検索する場合、タンパク量の大きな変動が同定できれば、免疫組織学的に容易に検索が可能である。また、タンパクの解析により、翻訳後修飾の変化も同定できる。そこで、大腸分離腺管からタンパクを抽出し、2次元電気泳動を行って、X線照射によって誘導されるタンパク発現量の変動を検討した。経時的に減少するタンパクとしてHMGB1が、増加するタンパクとしてERM (ezrin/radixin/moesin)ファミリーが同定された。

HMGB1は、核内に存在しDNAに結合する転写制御因子であり、p53やNF- κ Bなどの転写因子の機能発現に重要な役割を果たしている。一方、活性化した樹状細胞や壊死細胞から細胞外に放出されて他の細胞のToll-like receptorにリガンドとして作用することも知られている。今回のデータでは、HMGB1がX線照射によって減少するが、遺伝子障害に対するHMGB1の役割の更なる解明が必要と考えられた。

ERMファミリータンパクは、細胞膜直下に存在して、リン酸化を受けることにより、helical domainがはずれて、N末のFERMというドメインを介して、ICAM, CD44等の接着分子に結合し、細胞外刺激をアクチンフィラメント伝達する働きをしている。ヒト骨肉腫細胞を用いた解析では、非リン酸化ezrinは細胞質に存在するが、Tyr354がリン酸化されると細胞質および核に移行し、Thr567がリン酸化されると細胞質から細胞膜に移行することが知られており、ezrinが高発現する腫瘍では予後不良であると報告されている。X線照射に対する反応については、不明な点が多いが、本研究では、核への強い集積が見られており、遺伝子障害に対する応答とERMの核移行について、更なる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

マウス大腸分離腺管を用いて、遺伝子障害刺激に対する応答を検出できるマーカーとして、HMGB1とERMが同定できた。今後、化学物質による遺伝子損傷刺激後の胃および大腸消化管上皮細胞における反応を、幹細胞領域と分化した腺開口部領域に分けて解析する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsubara, S., Takasu, S., Tsukamoto, T., Mutoh, M., Masuda, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y. Induction of glandular stomach cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. Int J Cancer 130: 259-266, 2012.
- 2) Jiang, J., Cao, D., Tsukamoto, T., Wang, G., Jia, Z., Suo, J., Cao, X. Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. Oncol Lett 5: 1562-1566, 2013.
- 3) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M. Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models. Semin Immunopathol 35: 177-190, 2013.

2. 学会発表

- 1) 塚本徹哉, 水谷泰嘉, 下條尚志, 広川佳史, 熊澤文久, 桐山諭和, 浦野誠, 叶春霖, 黒田誠. 放射線照射によるマウス大腸陰窩幹細胞領域特異的な遺伝子発現変動. 第101回病理学会総会. 2012年4月. 東京.
- 2) 塚本徹哉. 放射線照射によるマウス大腸陰窩幹細胞領域特異的な遺伝子発現変動. 第31回分子病理学研究会. 2012年7月. 恵那市.
- 3) 塚本徹哉, 下條尚志. 遺伝子損傷刺激に対するマウス大腸陰窩上皮の応答: X線照射に対する反応. 第27回発癌病理研究会. 2012年8月. 伊豆市.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

大腸前癌病変を構成する細胞の起源に関する研究

研究分担者 久野壽也 岐阜大学大学院医学研究科腫瘍病理学 准教授

研究要旨

大腸上皮幹細胞である *Lgr5* 発現細胞の lineage tracing system を用いて、*Apc*^{Min/+}マウスの大腸腫瘍において *Lgr5* 発現細胞が幹細胞として機能する可能性を探った。その結果、*Apc*^{Min/+}マウスの大腸 microadenoma、macroscopic tumor において *Lgr5* 発現細胞が腫瘍組織の供給源となり幹細胞として機能する可能性が示唆された。また、azoxymethane 誘発マウス大腸腫瘍モデルを用いて二次胆汁酸の一つである deoxycholate 摂取による発癌促進リスクを評価し、distal colon において発癌プロモーション作用を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

化学発癌物質は体内に取り込まれた後、主に肝臓で代謝され、最終発癌物質となって標的臓器の遺伝子に修飾を加える。基底部に存在する大腸上皮幹細胞以外は transient な存在であることを考えると、遺伝子修飾の標的は組織幹細胞であると推察される。今回、*Lgr5* 発現細胞の lineage tracing system を *Apc*^{Min/+}マウスに導入して、*Lgr5* 発現細胞が大腸腫瘍の幹細胞として機能する可能性を探った。また、化学物質リスク研究の観点から、azoxymethane 誘発マウス大腸前癌病変に対し、二次胆汁酸である deoxycholate の修飾作用を検討した。

B. 研究方法

(実験 1) *Lgr5-GFP-IRES-creERT2* knock-in; *Rosa26-LacZ* reporter mice と *Apc*^{Min/+} mice を交配し、tamoxifen 投与により *Lgr5* 発現細胞に -galactosidase を発現する *Apc*^{Min/+} mice を作製した。30 週齢時に 2 mg の tamoxifen を 3 日間腹腔内投与し *Lgr5* 発現細胞に標識を行った。Tamoxifen 投与終了から 1 週間後に犠牲死させ、大腸を摘出し、病理組織標本作製した。粘膜内病変に X-gal 染色、HE 染色を行い、染色性と染色パターンを評価した。

(実験 2) 8 週齢の雄性 C57BL6 マウスに対し azoxymethane (10 mg/kg 体重) を 1 回/週、4 週腹腔内投与し、終了 1 週間後からそれぞれ 0.04, 0.2, 0.5% の濃度で deoxycholate を混餌投与した。実験開始後 24 週で大腸を摘出し、en face に病理組織標本作成して網羅的に大腸前癌病変を評価した。また、deoxycholate 摂取により盲腸に腫瘍発生の報告があることから盲腸病変の病理標本作製し、ki-67, -catenin の免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

実験は実験動物を対象にしたものであり、動物の取り扱いに関しては生命倫理に配慮し、岐阜大学動物実験指針に沿って行った。また、レポーターマウスを用いた実験は岐阜大学組み換え DNA 実験委員会に申請承認後に行った。

C. 研究結果

(実験 1) マウス大腸 microadenoma 及び macroscopic tumor の一部に *LacZ* 発現細胞の出現が見られた。*LacZ* 発現細胞はいずれの病変においても腫瘍全体を占めることはなく、巣状に出現していた。

(実験 2) 0.04, 0.2, 0.5% 摂取群の大腸あたりの microadenoma 数、adenocarcinoma 数はそれぞれ 1.7 ± 1.5 , 0 ; 3.0 ± 2.5 , 0.2 ± 0.4 ; 6.1 ± 1.5 , 0.9 ± 1.1 であり、AOM 単独群の 0.7 ± 0.7 , 0 と比較していずれも 0.5% 摂取群において有意に増加していた ($p < 0.01$, 0.05)。また、deoxycholate 摂取により、盲腸に隆起性病変の発生が見られたが、いずれの病変も表層部に ki-67 陽性細胞は見られず、-catenin の胞体内蓄積や核内移行もないことから腫瘍ではなく反応性病変であると考えられた。

D. 考察

実験 1 の結果から、大腸 microadenoma の段階において、*Lgr5* 発現細胞が存在し、細胞の供給源として機能していることが明らかになった。今回の実験ではすべての腫瘍細胞が *LacZ* 陽性を示す病変は見られず、*Lgr5* 発現細胞に *Apc* の LOH が起こって腫瘍が形成されるとする直接の証左は得られなかった。

実験 2 の結果からは deoxycholate が大腸腫瘍性病変のプロモーターとして作用することが示された。また、盲腸病変に関しては、潰瘍を伴うことから再生腺管が不整形となり腫瘍様に見えるものの、ki-67, -catenin の染色態度からは大腸腫瘍とはいえず、反応性変化と考えられた。

E. 結論

マウス大腸前癌病変及び大腸腫瘍中に幹細胞として機能する可能性がある細胞を確認した。また、実験期間 24 週で deoxycholate の混餌投与は AOM 誘発大腸前癌病変、大腸腺癌の発生を促進することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A, Mori H, Terasaki M, Matsuda S, Tanaka T. Organoamnesium suppress inflammation-associated

- colon carcinogenesis in male Crj:CD-1 mice. Carcinogenesis. 34:361-9. 2013
2. Binh NH, Satoh K, Kobayashi K, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Hara A. Galectin-3 in preneoplastic lesions of glioma. J Neurooncol. 111:123-32. 2013
3. Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. J Biophysical Chemistry. 3: 2012
4. Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T, Hara A, Hirose Y. Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis. Carcinogenesis. 33: 702-707. 2012
5. Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M, Kuno T. Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of β -cryptoxanthin and hesperidin. J Biomed Biotechnol. 2012: 516981. 2012
6. Takamatsu M, Aoki H, Hirose Y, Kobayashi K, Tomita H, Kuno T, Koumura H, Hara A. Teratoma showing the features of retinal structure: A case of sacrococcygeal teratoma. Oncology Letters. 3: 1023-26. 2012

2. 学会発表

1. 4-nitroquinoline 1-oxide induced pulmonary tumorigenesis in TSOD mice. 久野壽也、田中卓二、廣瀬善信、原明；第28回毒性病理学会学術集会，平成24年2月，東京
2. Fenofibrateの4NQO誘発肥満、高脂血症マウス肺増殖性病変に及ぼす影響；久野壽也、田中卓二、廣瀬善信、平田暁大、原明；がん予防学会 in 岐阜 2012，平成24年6月，岐阜
3. A PPAR α agonist, fenofibrate suppress 4NQO-induced pulmonary proliferative lesions in obese and hyperlipidemic mice. Kuno T, Tanaka T, Takamatsu M, Hatano Y, Tomita H, Hirose Y, Hirata A, Hara A; 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 2012, Sapporo

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発に関する研究

研究分担者： 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

化学物質の遺伝毒性と発がん性を包括的に検出可能な新しい中期肝発がんリスク評価法の開発を目的とし、既知遺伝毒性肝発がん物質である 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を用いて、*in vivo* 変異原性の検索が可能な *gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験法の有用性を検討した。その結果、肝臓における前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の数および面積が対照群に比較して 2-AAF 投与群で有意に増加し、2-AAF の肝発がん促進作用が認められた。また、*gpt* アッセイと Spi アッセイでは対照群に比較して 2-AAF 投与群で点突然変異頻度および欠失変異頻度の有意な増加が認められ、2-AAF の *in vivo* 変異原性が確認された。これらの結果がこれまでの 2-AAF の肝発がん性および変異原性に関する報告と一致しており、*gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験法は化学物質の肝発がん性と *in vivo* 変異原性を包括的に検出できる発がんリスク評価法として有用であることが示唆された。

また、印刷工場における職業性胆管がんの原因物質として疑われている dichloromethane (DCM) 及び dichloropropane (DCP) について、雄性 B6C3F1 マウスおよび雄性シリアンハムスターを用いた短期毒性試験を行った。B6C3F1 マウスおよびシリアンハムスターに DCM および DCP を 500 mg/kg BW の用量で 1 日 1 回、3 日間強制胃内投与した結果、マウスおよびハムスターの DCM 投与群で異常所見は認められなかった。DCP 投与群では、マウスの 5 例中 4 例に、ハムスターの 5 例中全例に小葉中心性肝細胞壊死が認められたが、いずれの群においても胆管上皮毒性は認められなかった。DCM の代謝酵素である GSTT1 の免疫組織化学染色解析の結果、マウスの肝細胞および胆管上皮の細胞質で GSTT1 の発現が認められたが、DCM および DCP 投与による発現増強は認められなかった。一方、ハムスターでは、胆管上皮細胞では GSTT1 の発現は認められず、投与による発現変動は認められなかったが、肝細胞における GSTT1 発現において、DCP 投与群においてのみ明らかな増強が認められた。以上より、マウスおよびハムスターにおいて、DCP の肝毒性が明らかとなった。さらに、ヒトと異なって、ハムスターの胆管上皮細胞には GSTT1 が発現していない可能性が示唆された。本実験は DCM および DCP の胆管発がんリスク評価モデルの開発に有用な基礎データを提供できたものと考えられる。

A. 研究目的

化学物質の安全性を評価するためには、発がん性と変異原性の評価は必要不可欠である。しかし、現行の発がん性試験法と変異原性試験法にはそれぞれ問題点が存在している。標準の発がん性評価法の問題点として、動物試験だけでも 2 年間という長期的検討が必要であることと、莫大な経費および多数の動物数を要するため、多くの化学物質に対応することが困難であることなどがあげられる。一方、変異原性は *in vitro* 変異原性試験により決められてきたが、*in vitro* での試験が臓器特異性や代謝能を反映していないことが原因となって判定結果の不確実性を生じていることも事実であり、化学物質の変異原性を評価するためには *in vivo* 検出系が必要であると考えられる。よって、安全性評価に適した期間でかつ発がん性および遺伝毒性を包括的に評価できる試験法の確立が待たれている。そこで、本研究では、化学物質の遺伝毒性と発がん性を包括的に検出可能な新しい中期肝発がんリスク評価法の開発を目的とし、既知遺

伝毒性肝発がん物質を用いて、*in vivo* 変異原性の検索が可能な F344 系 *gpt delta* ラット（以下 *gpt delta* ラットと略す）を用いた中期肝発がん性試験法（伊東法）の発がん性および変異原性の包括評価における有用性を検討する。本年度では、遺伝毒性肝発がん物質である 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を用いて *gpt delta* ラットおよびその野生型であり、発がん性試験に汎用されている F344 ラットにおける肝発がん感受性を比較検討した。さらに、*gpt delta* ラットにおいて *in vivo* 変異原性試験である *gpt* アッセイと Spi アッセイを施行し、2-AAF の変異原性を検討した。

近年、大阪の印刷工場労働者において胆管がんが多発しており、既知の胆管がん発症機序であるウイルス感染、膵・胆管合流異常、結石や肝吸虫による発がん機序と異なる化学物質による発がん機序の可能性が示唆されている。現在、dichloromethane (DCM) 及び dichloropropane (DCP) などを含む有機溶剤への高濃度・長期間曝露が胆

管がん発症の原因として疑われている。しかし、マウスおよびラットを用いた動物発がんモデルにおいて DCM および DCP の化合物の胆管発がん性は認められていない。DCM の代謝経路は、げっ歯類およびヒトで 2 種類あることが知られている。一つは CYP2E1 による酸化代謝経路であり、もう一つは GSTT1 によるグルタチオン抱合経路である。しかし、DCM のばく露による肝臓におけるこれらの代謝酵素の発現量の変動に関する報告はほとんどない。DCP に関しては、P450 酵素及び GST を介して代謝活性を受けることが示唆されたが、その詳細に関する報告はまたなされていない。そこで、本研究では、B6C3F1 マウス及びシリアンハムスターに DCM および DCP の短期経口投与を行い、これらの化学物質の肝・胆道系および代謝活性化酵素に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1. 遺伝毒性と発がん性を包括的に検出できる肝発がんリスク評価法の開発

5 週齢の雄性 *gpt delta* ラット 30 匹および雄性 F344 ラット 20 匹（日本エスエルシー株式会社）を用いた。実験動物納入より 7 日間は、環境に適応させる期間とし、8 日目より実験を開始した。その間の飲料水は水道水とし、基礎飼料として MF 粉末（オリエンタル酵母）を使用した。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリヤーステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24 ± 2 度、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。

実験プロトコルを図 1 に示す。第 1、2、5 および 6 群は *gpt delta* ラット 10 又は 5 匹ずつ、第 3 および第 4 群は F344 ラット 10 匹ずつ分けた。第 1 群から第 4 群に実験開始日に diethylnitrosamine（東京化成、以下 DEN と略記）を 200 mg/kg の用量で単回腹腔内投与し、2 週間後より 0 あるいは 50 ppm の 2-AAF 添加飼料を 6 週間与えた。さらに、実験開始 3 週目に 2/3 部分肝切除を行った。第 5 および 6 群には実験開始後 2 週間は基礎飼料を与え、その後 0 あるいは 50 ppm の 2-AAF 添加飼料を 6 週間与えた。なお、第 5 および 6 群には 2/3 部分肝切除を行わなかった。

全動物は、一般状態を毎日観察し、週 1 回体重、飲水量および摂餌量を測定した。実験開始より 8 週間後に、全動物を麻酔下で、腹部大動脈から採血後に脱血致死させ、屠殺・剖検を行い、肝臓を摘出し、重量を測定した。全群において肝臓のホルマリン固定パラフィン標本作製し、病理組織学的検討ならびに胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) の免疫組織化学的検討を行った。GST-P 陽性細胞巢の個数および面積を病理標本画像解析装置 IPAP-WIN [住化テクノサービス株式会社] を用いて計測し、肝臓切片 1cm^2 当りの GST-P 陽性細胞巢（直径 0.2mm

以上）の個数および面積を算出し、定量的解析を行った。また、*gpt delta* ラット群においては、点突然変異を検出する *gpt* アッセイ および欠失変異を検出する Spi-アッセイを行った。

gpt アッセイでは、肝臓凍結組織から RecoverEase™ DNA Isolation Kit を用いて DNA を抽出する。*in vivo* パッケージングには、Transpack Packaging Extract を用いて、抽出した DNA からトランスジーン EG10 をファージ粒子として回収した。Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株の菌液に回収したファージを加え、37 20min（静置）の後、37 20min（振とう）にて回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。感染後の YG6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37 で 2 日間培養行い、*gpt* 遺伝子が不活化している変異体のコロニーを得た。また、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数は 6-TG を含まない M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数によって求めた。突然変異数は、6-TG を含む寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数で除して算出した。

Spi-アッセイでは、*in vivo* パッケージングによりファージを回収するまでの手法は *gpt* アッセイと同様に行った。P2 溶原菌に回収したファージを加え、37 20min（静置）により回収したファージを P2 溶原菌に感染させた後、トリプティケース寒天培地にまいて 37 で一晩培養し、Spi 変異体プラークを得た。また、非溶原菌に感染させ、全ファージが溶菌してプラーク作ることにより回収プラーク数を求めた。突然変異体頻度は変異プラーク数を回収ファージ数で除して算出した。

2. DCM 及び DCP のマウスおよびハムスターの肝胆道系に及ぼす影響の検討

被検物質として DCM（和光純薬、純度 > 99.5%）、および DCP（和光純薬、1,2-dichloropropane dichloromethane、以下 DCP と略記、純度：> 98%）を使用した。

7 週齢雄性シリアンハムスター 15 匹を日本エスエルシー株式会社より購入した。7 週齢雄性 B6C3F1 マウス 15 匹を日本チャールス・リバー株式会社より購入した。マウスとハムスターとも、1 週間の馴化飼育の後、各群 5 匹ずつ 3 群に分けた。被検物質投与群にそれぞれに DCM または DCP を 500 mg/kg bw の用量で 1 日 1 回、3 日間強制胃内投与を行った。溶媒対照群にはコーン油（和光純薬）を投与した。投与液量は、3ml/kg bw とし、投与直前に測定した体重を基に算出した。全動物は、一般状態を毎日観察し、体重、飲水量および摂餌量を測定した。実験開始より 3 日間後に、全動物を麻酔下で、腹部大動脈から採血後に脱血致死させ、屠殺・剖検を行い、肝臓を摘出し、重量を測定した。全群において肝臓

のホルマリン固定パラフィン標本を作製し、病理組織学的検討ならびに Glutathione S-transferase T1(GSTT1)の免疫組織化学的検討を行った。また、マウスの肝臓凍結サンプルから RNA を抽出し、quantitative RT-PCR を用いて薬物代謝酵素であるシトクローム P450 1-4 各分子種の mRNA 発現を検討した。

4. 統計学的解析

体重、摂餌量、臓器重量、GST-P 陽性細胞巢の個数および面積、遺伝子の変異頻度および P450 各分子種の発現量の平均値について F 検定による等分散検定を行う。等分散の場合は Student's t-test 検定を行い、不等分散の場合は Welch t-test 法による両側検定を行う。

5. 倫理面への配慮

動物実験は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設において行われ、動物実験の開始前には実験計画書を大阪市立大学実験動物委員会に提出し、その承諾を得た上で動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施する。

C. 研究結果

1. 遺伝毒性と発がん性を包括的に検出できる肝発がんリスク評価法の開発

1.1 一般状態

実験期間中、第 1 群で 1 匹、第 3 群で 1 匹、第 4 群で 2 匹、部分肝切除の影響により死亡した。2-AAF 投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。

1.2 最終体重、肝臓重量および 2-AAF 摂取量

最終体重、肝臓重量および 2-AAF 摂取量を表 1 に示す。最終体重について、部分肝切除実施群(第 1~4 群)において、F344 ラットおよび *gpt delta* ラットともに対照群(第 1,3 群)と比較して 2-AAF 投与群(第 2, 4 群)で有意な体重減少が認められた。しかし、*gpt delta* ラット 2-AAF 単独投与群(第 6 群)では、無処置群(第 5 群)と比較して有意な変化は認められなかった。

肝臓重量について評価した結果、部分肝切除実施群において、F344 ラットおよび *gpt delta* ラットともに、対照群と比較して 2-AAF 投与群で有意な肝臓の絶対・相対重量の増加が認められた。また、F344 ラット、*gpt delta* ラット間で有意な変化は認められなかった。一方、*gpt delta* ラット 2-AAF 単独投与群において無処置群と比較した結果、肝臓の絶対・相対重量の増加傾向がみられた。

実験期間中における 1 日あたりの平均 2-AAF 摂取量について、ラットにおける体重当たりの 1 日平均

摂取量 (mg/kg b.w./day) は、第 2 群では 15.04 mg、第 4 群では 13.88 mg であり、F344 ラットと *gpt delta* ラット間で 2-AAF の摂取量に有意な差はなかった。また、第 6 群(*gpt delta* ラット)では 16.28 mg であった。

1.3 GST-P 陽性細胞巢の定量解析

GST-P 陽性細胞巢(直径 0.2mm 以上)の肝臓切片の総面積あたりの発生個数ならびに面積について評価した結果を図 2 に示す。F344 ラットおよび *gpt delta* ラットにおいて、部分肝切除実施群では対照群と比較して、2-AAF 投与群で GST-P 陽性細胞巢の発生個数および面積の有意な増加が認められた。また *gpt delta* ラット、F344 ラット間で有意な差は認められなかった。

無処置群および 2-AAF 単独投与群(いずれも *gpt delta* ラット)では GST-P 陽性細胞巢(直径 0.2 mm 以上)が認められなかったが、GST-P 陽性の細胞数について比較を行った結果、2-AAF 投与によって有意な GST-P 陽性細胞の増加が認められた。

1.4 *gpt* アッセイ

肝臓における *gpt* 遺伝子の変異体頻度を表 2 に示す。部分肝切除実施群において、対照群($455.6 \pm 111.8 \times 10^{-6}$)と比較して、2-AAF 投与群($973.1 \pm 232.8 \times 10^{-6}$)で有意な変異体頻度の増加が認められた。また 2-AAF 単独投与群($11.4 \pm 2.8 \times 10^{-6}$)について無処置群($67.9 \pm 35.6 \times 10^{-6}$)と比較した結果、有意な変異体頻度の増加が認められた。

1.5 Spi-アッセイ

肝臓における red/gam 遺伝子の変異体頻度を表 3 に示す。部分肝切除実施群において、対照群($141.4 \pm 39.8 \times 10^{-6}$)と比較して、2-AAF 投与群($259.4 \pm 68.7 \times 10^{-6}$)で有意な変異体頻度の増加が認められた。また 2-AAF 単独投与群($9.6 \pm 5.9 \times 10^{-6}$)について無処置群($79.7 \pm 22.9 \times 10^{-6}$)と比較した結果、有意な変異体頻度の増加が認められた。

2 DCM および DCP のマウスおよびハムスターの肝胆道系に及ぼす影響の検討

2.1 一般状態

最終体重、生存率、絶対および相対肝重量を表 4 に示す。マウスの DCM 投与群で死亡例は認められなかったが、DCP 投与群で実験開始後の 2 日目に 1 例死亡が認められた。最終体重、絶対および相対肝重量が各投与群の間に有意な差は認められなかった。

ハムスターにおいて、DCP 投与群で実験開始後の 3 日目に 1 例死亡が認められた。最終体重が対照群に比較して DCM 投与群で有意な差は認められなかったが、DCP 投与群で有意に低下した。絶対および相対肝重量が各群の間に有意な差は認められなかった。

2.2. 肝臓における病理学的所見

マウスにおいて、DCM 投与群で異常所見は認められなかった。DCP 投与群では、5 例中 4 例に小葉中心性肝細胞壊死が認められたが、胆管上皮には投与による変化は認められなかった(表 5、図 3)。

ハムスターにおいて、DCM 投与群の異常所見は認められなかった。DCP 投与群では、5 例中全例に肝臓の小葉中心性壊死が認められた。しかし、胆管上皮には投与による変化は認められなかった(表 5、図 4)。

2.3. 肝臓における GSTT1 の発現

マウスの肝細胞および胆管上皮の細胞質で GST-T1 の発現が認められた。DCM および DCP 投与群で対照群に比較して、GSTT1 の発現の増強は認められなかった(表 5、図 5)。

ハムスターの肝臓においては、肝細胞の細胞質に GSTT1 の発現が認められ、その発現が対照群に比較して DCM 投与で変化は認められなかったが、DCP 投与群では明らかな増強が認められた。一方、胆管上皮細胞ではいずれの群においても GSTT1 の発現は認められなかった(表 5、図 6)。

2.4. マウス肝臓における各 P450 分子種の mRNA 発現

マウス肝臓における CYP1A1、CYP1A2、CYP2A4、CYP2C29、CYP2E1、CYP3A11、CYP4A10、CYP4A14 の発現を図 7 に示す。DCM 投与群で対照群と比較していずれの P450 分子種においても、有意な差は認められなかった。DCP 投与群で肝細胞壊死が高頻度に認められたため、P450 の mRNA 発現の解析は行わなかった。

D. 考察

gpt delta ラットを用いて 2-AAF の肝発がん性を検討した結果、ラット肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の数および面積が対照群に比較して 2-AAF 投与群で有意に増加し、2-AAF の肝発がん促進作用が認められた。また、*gpt* アッセイと Spi アッセイでは対照群に比較して 2-AAF 投与群で点突然変異頻度および欠失変異頻度の有意な増加が認められ、2-AAF の *in vivo* 変異原性が確認された。これらの結果がこれまでの 2-AAF の肝発がん性および変異原性に関する報告と一致しており、*gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験法は化学物質の肝発がん性と *in vivo* 変異原性を包括的に検出できる発がんリスク評価法として有用であることが示唆された。今後、本試験法の有用性をさらに検証するために、種々の肝発がん物質を検討する必要があると考えられる。

DCM および DCP のマウス肝・胆道系に及ぼす影響を検討した実験で、DCM 投与群で毒性変化が認められなかったことに対して、同投与量の DCP 投与群では高頻度に肝細胞壊死が認められたことから、DCM よ

り DCP の肝毒性が強いことが明らかとなった。また、免疫組織化学染色解析により、ヒトと同様にマウスの肝細胞および胆管上皮の細胞質に GSTT1 が発現することが明らかとなった。しかし、いずれの投与群においても、投与による GSTT1 発現の増強および肝内胆管上皮傷害が認められなかった。また、DCM 投与による CYP2E1 を含める各 P450 酵素分子種の mRNA レベルの発現上昇は認められなかった。一般的に、DCM および DCP の代謝は、低濃度ばく露の場合は CYP 経路で行われるが、高濃度ばく露になると、CYP 経路による代謝が飽和するため、GST 経路が活性化し、GST 経路による代謝が行われるとされている。さらに、GST による代謝活性化を受けた究極発がん物質をイニシエーターとしたこの 2 物質の化学発がん機序にかが推測される。したがって、今後、より長期間の投与試験を行うことにより、DCP および DCM による代謝酵素誘導および肝・胆管系障害の用量相関性を明らかにする必要があると考えられる。さらに、CYP2E1 欠損マウスを用いて DCP および DCM の胆道系に対する毒性を検討する必要があると考えられた。

ハムスターにおいて、DCM 投与群で毒性変化が認められなかったことに対して、同投与量の DCP 投与群では高頻度に肝細胞壊死が認められたことから、マウスと同様に DCM より DCP の肝毒性が強いことが明らかとなった。また、免疫組織化学染色解析では、DCP 投与群で肝細胞における GSTT1 の発現が対照群に比較して増強されてことから、GSTT1 が DCP の代謝に関与することが強く示唆された。一方、本試験条件下では、DCM による GSTT1 発現の増強が認められなかったため、ハムスターにおいては GSTT1 が DCM の代謝に関与するか否かを明らかにするためには、より長期間の投与による検討が必要と考えられる。また、今後 CYP2E1 を含めた P450 酵素の発現を検討する必要もあると考えられる。さらに、今回の検討では、ヒトと異なって、ハムスターの胆管上皮細胞には GSTT1 の発現は認められないことが判明した。したがって、ハムスターを用いた実験で得られた DCM および DCP の胆管発がん性に関する結果をヒトに外挿する際に、GSTT1 の局在の違いによる影響を考察する必要がある。

E. 結論

in vivo 変異原性の検索が可能な *gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験では、遺伝毒性肝発がん物質である 2-AAF の肝発がん性および変異原性が認められたことから、本試験法が化学物質の遺伝毒性と発がん性を包括的に検出可能な新しい中期肝発がんリスク評価法として有用であることが示唆された。

DCM および DCP のマウスおよびハムスターの肝・胆道系に及ぼす影響を検討した実験で、マウスおよびハムスターにおいては、DCM より DCP の肝毒性が強いことが明らかとなった。さらに、ヒ

トと異なって、ハムスターの胆管上皮細胞にはDCMおよびDCPの代謝酵素であるGSTT1が発現しない可能性が示唆された。本実験はDCMおよびDCPの胆管発がんリスク評価モデルの開発に有用な基礎データを提供できたものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kato M, Wei M, Yamano S, Kakehashi A, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. DDX39 acts as a suppressor of invasion for bladder cancer. *Cancer Sci*, 103, 1363-1369, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.

Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Tamano S, Shirai T, Wanibuchi H, Fukushima S.: Lack of Hepatocarcinogenicity of Combinations of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats: Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol*, 25, 209-214, 2012.

Xie XL, Wei M, Yunoki T, Kakehashi A, Yamano S, Kato M, Wanibuchi H.: Long-term treatment with l-isoleucine or l-leucine in AIN-93G diet has promoting effects on rat bladder carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, 50, 3934-3940, doi: 10.1016/j.fct.2012.07.063. 2012.

Xie XL, Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Okabe K, Tajiri M, Wanibuchi H.: Dammar resin, a non-mutagen, induces oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of gpt delta transgenic mouse which is different from a mutagen, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Mutat Res*, 748, 29-35, 2012.

Chung K, Nishiyama N, Wanibuchi H, Yamano S, Hanada S, Wei M, Suehiro S, Kakehashi A.: AGR2 as a potential biomarker of human lung adenocarcinoma. *Osaka City Med J*, 58, 13-24, 2012.

2. 学会発表

梯アンナ、謝 暁利、山野莊太郎、魏 民、鰐淵英機：ヒト肝臓癌のプロテオーム解析を用いた新規バイオマーカー候補分子の検討。第101回日本病理学会総会，東京（2012年4月）

Okabe K, Yamano S, Wei M, Kato M, Fujioka M, Xie X, Wanibuchi H. Identification of novel biomarkers of rat renal carcinogenesis. Society of Toxicologic Pathology 31st Annual Symposium, Boston(2012年6月)

Wanibuchi H, Wei M, Kakehashi A, Yamano S: Animal model for arsenic carcinogen. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 仙台（2012年7月）

藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、奥村真衣、鰐淵英機：gpt delta ラットを用いた遺伝毒性・発がん性の包括的リスク評価モデルの確立。第27回発癌病理研究会，伊豆（2012年8月）

山野莊太郎、魏 民、田尻正喜、梯アンナ、岡部恭子、奥村真衣、多胡善幸、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌の発がん過程早期における気管支肺胞幹細胞の関与。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、奥村真衣、武下正憲、鰐淵英機：gpt delta ラットを用いた膀胱粘膜における in vivo 変異原性の評価法の確立。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

小松弘明、西山典利、山野莊太郎、花田庄司、井上英俊、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：プロテオーム解析による新規肺神経内分泌癌のバイオマーカー検索。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

桑江優子、梯アンナ、魏 民、若狭研一、鰐淵英機：FFPE 標本を用いたヒト浸潤性膵管癌のプロテオーム解析。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、加藤 実、田尻正喜、謝 暁利、鰐淵英機：マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

梯アンナ、桑江優子、山野莊太郎、魏 民、謝 暁利、若狭研一、鰐淵英機：ヒト幹細胞癌における特異的候補分子のピンポイントターゲティング。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

加藤 実、魏 民、田尻正喜、山野莊太郎、梯アンナ、仲谷達也、鰐淵英機：Steroid Sulfatase は膀胱癌の予後予測因子である。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、神吉将之、謝 暁利、鰐淵英機：BBN 誘発マウス膀胱発がん過程におけるがん幹細胞関連タンパク質の発現。第71回日本癌学会学術総会，札幌（2012年9月）

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、藤岡正喜、梯アンナ、神吉将之、鰐淵英機：膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討。第29回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013年1月）

神吉将之、魏 民、梯アンナ、山野莊太郎、鰐淵英

機：ラットにおける非遺伝毒性肝発がん物質と毒性フェノタイプを予測できる遺伝子マーカーセットの探索．第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

奥村真衣、魏 民、山野莊太郎、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、鰐淵英機：gpt delta ラットを用いた 2-AAF の肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討．第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、梯アンナ、岡部恭子、武下正憲、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌モデルにおける気管支肺胞幹細胞の cancer initiating cell としての可能性．第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 2 月）

梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、魏 民、長野嘉介、福島昭治、鰐淵英機：ラットにおける 2-エトキシ-2-メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明．第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

岡部恭子、山野莊太郎、魏 民、藤岡正喜、謝 暁利、串田昌彦、鰐淵英機：マウス肺発がん過程におけるロサルタンの修飾作用の検討．第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 1 月）

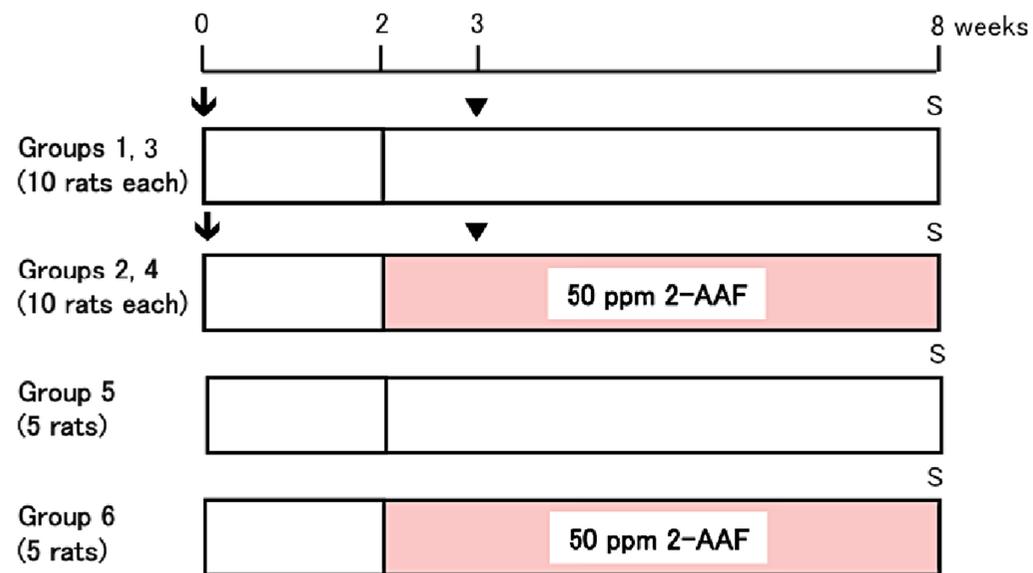
藤岡正喜、魏 民、山野莊太郎、岡部恭子、福永賢輝、謝 暁利、鰐淵英機：ラット膀胱発がん物質 DMA(V) の in vivo 変異原性の検討．第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会，つくば（2013 年 2 月）

魏 民、山野莊太郎、加藤 実、梯アンナ、鰐淵英機：膀胱発がん物質の早期検出 microRNA マーカーの検討．平成 24 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ，大津（2013 年 2 月）

山野莊太郎、岡部恭子、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける NADPH oxidase 阻害による効果．平成 24 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ，大津（2013 年 2 月）

G . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



Animals: 6-week-old, 30 male gpt delta rats (groups 1, 2, 5, 6)

6-week-old, 20 male F344 rats (groups 3, 4)

Test chemical: 50 ppm 2-AAF in the diet

↓, 200mg/kg DEN or 0.9% saline, i.p.

▼, 2/3 partial hepatectomy; S, sacrifice.

図1 実験デザイン

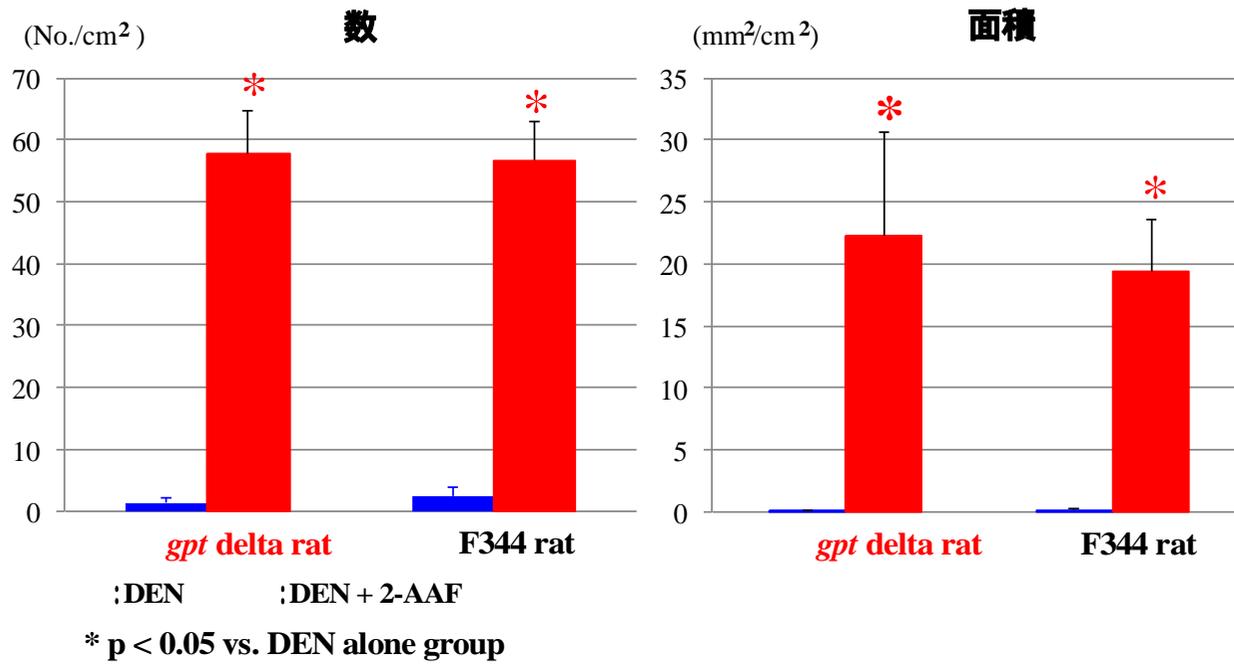


図2 ラット肝臓における GST-P 陽性細胞巣の発生

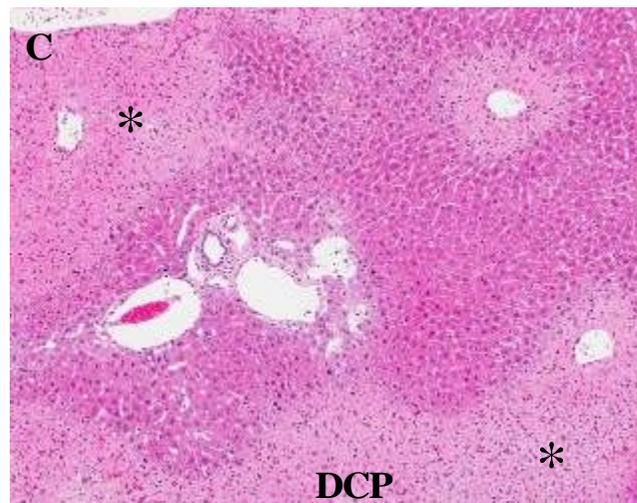
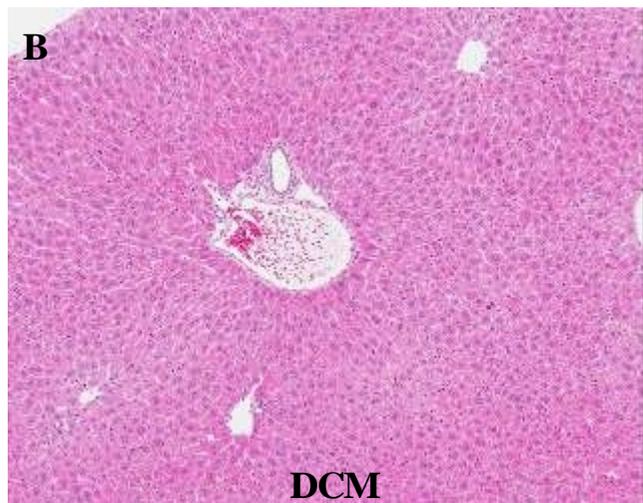
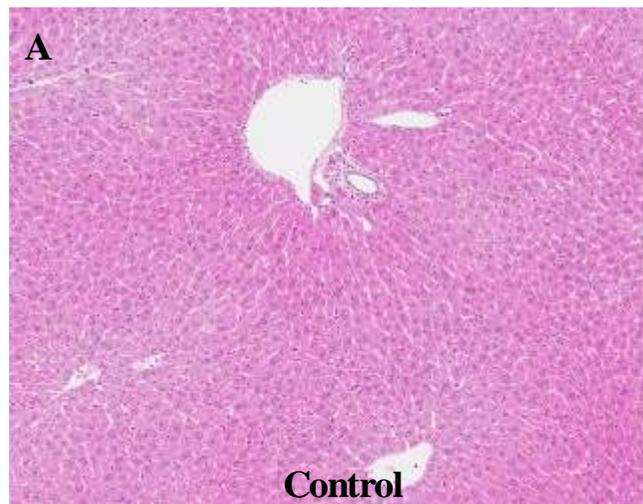


図3 マウスの肝組織像 (H.E.) A:無処置群 ; B:DCM 投与群 ; C:DCP 投与群 ; * 壊死部

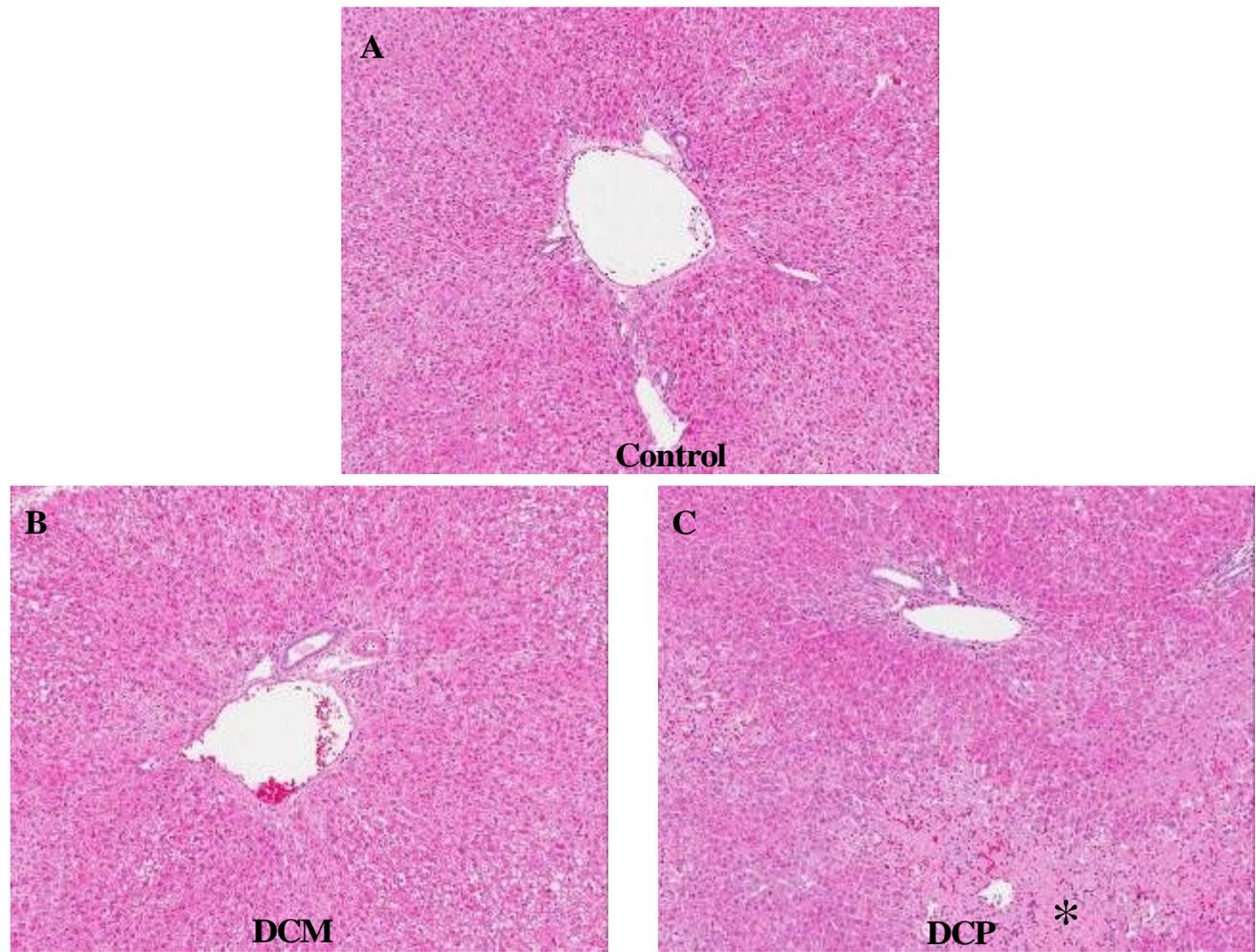


図4 ハムスターの肝組織像 (H.E.) A:無処置群 ; B:DCM 投与群 ; C:DCP 投与群 ; * 壊死部

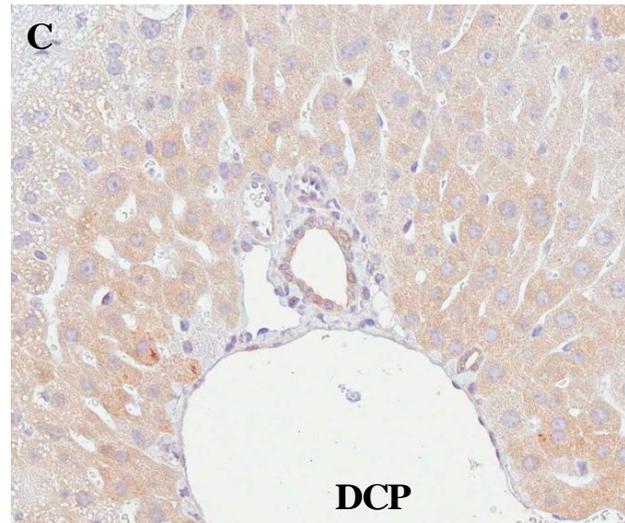
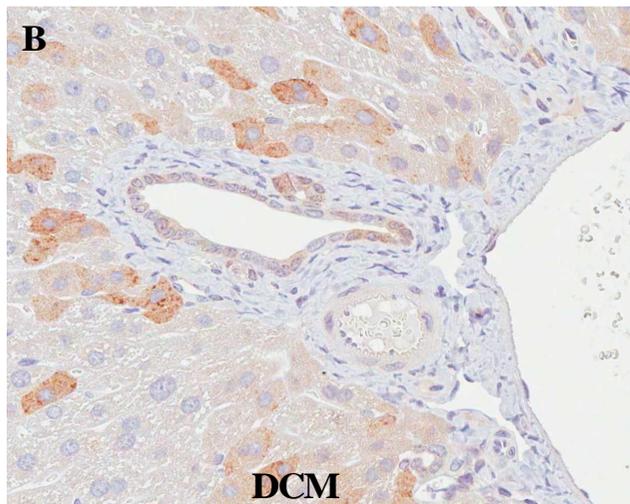
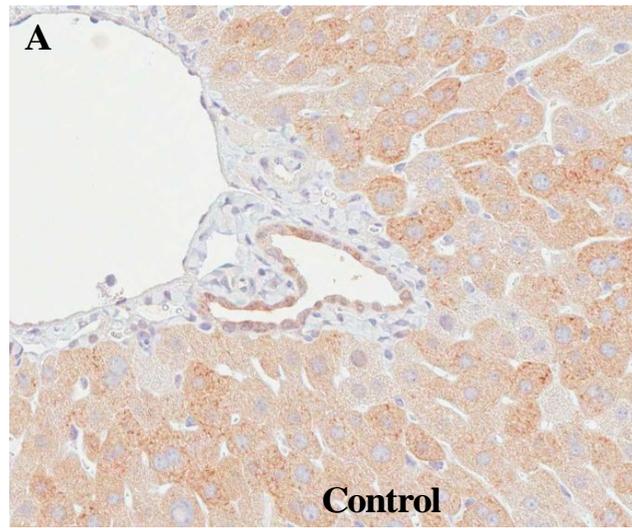


図5 マウス肝臓における GSTT1 の発現 A:無処置群 ; B:DCM 投与群 ; C:DCP 投与群

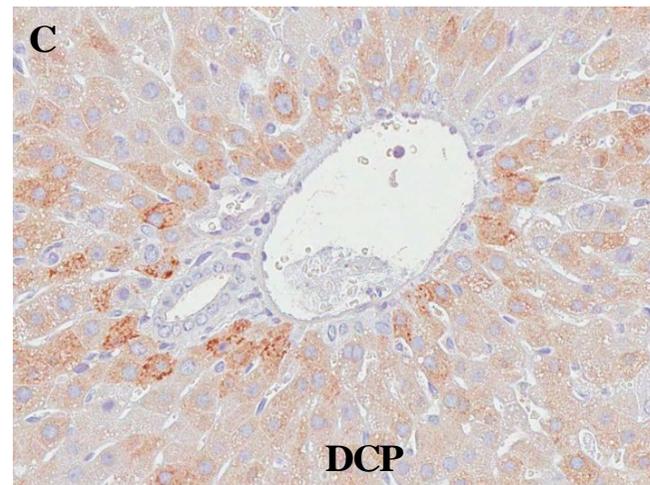
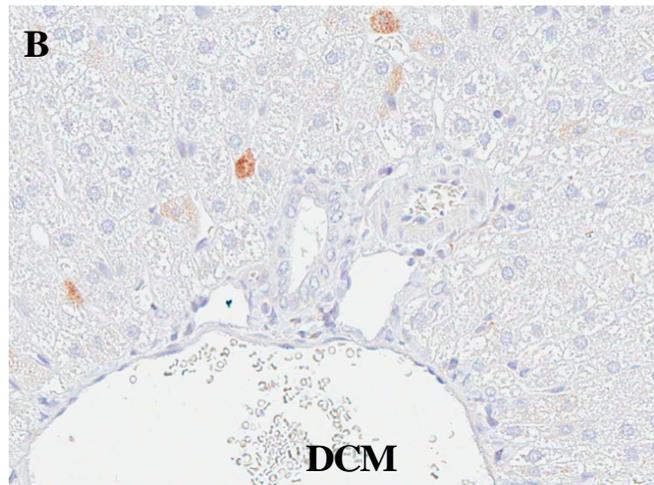
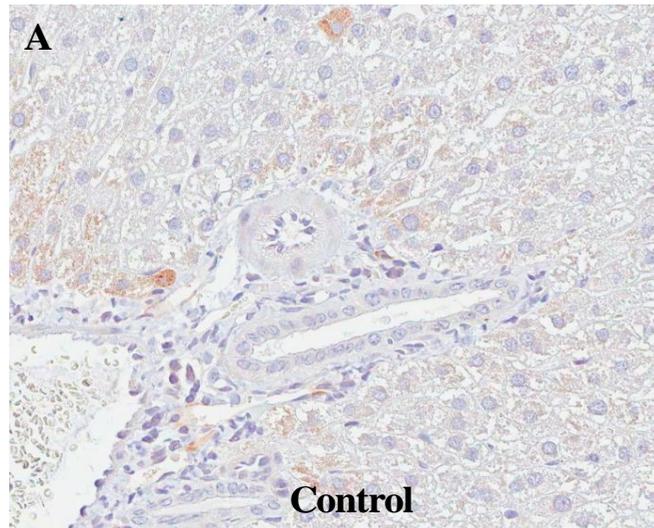


図6 ハムスター肝臓における GSTT1 の発現 A:無処置群 ; B:DCM 投与群 ; C:DCP 投与群

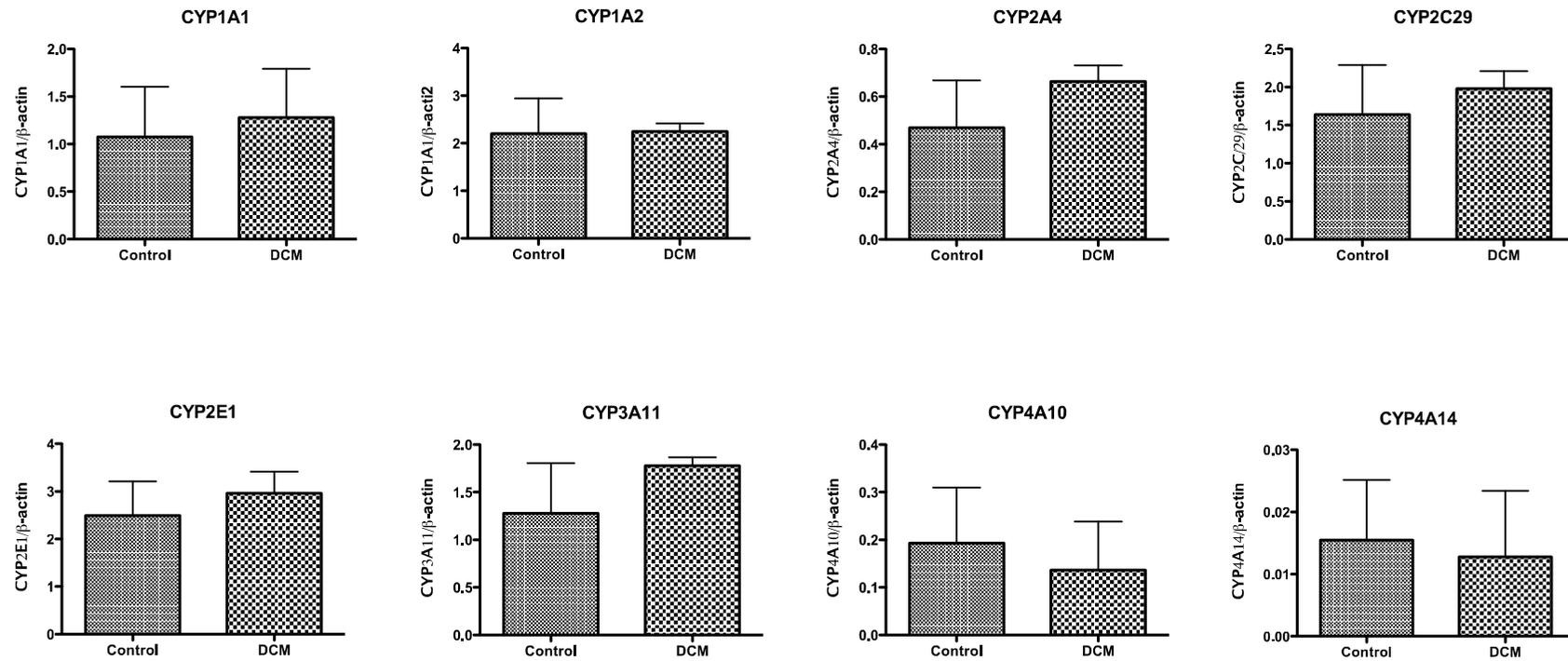


図7 DCM 投与マウス肝臓における P450 各分子種の mRNA 発現 (Real time Q-PCR)

表 1 最終体重、肝重量および2-AAFの摂取量

Group	Patial hepatectomy	Treatment	2-AFF intake (mg/kg bw/day)	Final body weight (g)	Liver weight		
					Absolute (g)	Relative(%)	
1	gpt delta	+	DEN	0	270 ± 17	7.4 ± 0.8	2.8 ± 0.3
2	gpt delta	+	DEN+2-AAF	15.0 ± 0.8	248 ± 18*	8.3 ± 0.9*	3.3 ± 0.4*
3	F344	+	DEN	0	280 ± 10	7.3 ± 0.5	2.6 ± 0.2
4	F344	+	DEN+2-AAF	13.9 ± 0.7	264 ± 12*	8.8 ± 1.1*	3.4 ± 0.4*
5	gpt delta	-	Non-treatment	0	278 ± 18	8.0 ± 0.5	2.9 ± 0.1
6	gpt delta	-	2-AAF	16.3 ± 0.3	271 ± 7	8.6 ± 1.1	3.2 ± 0.2

*significantly different DEN alone group

表2 肝臓における *gpt* assay の結果 (点突然変異の頻度)

Treatment	Animal ID	Total number of colonies	Number of 6TGr mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Average mutant frequency ($\times 10^{-6}$)
Non-treatment	511	738,000	12	16.3	11.4 \pm 2.8
	512	216,000	2	9.3	
	513	646,000	7	10.8	
	521	489,000	5	10.2	
	522	283,000	3	10.6	
50 ppm 2-AAF	611	131,000	16	122.1	67.9 \pm 35.6 **
	612	622,000	51	82	
	613	200,000	7	35	
	621	712,000	43	60.4	
	622	651,000	26	39.9	

* significantly different from Non-treatment group

表3 肝臓における *Spi*⁻ assayの結果 (欠失変異の頻度)

Treatment	Animal ID	Total number of plaques	Number of <i>Spi</i> ⁻ mutants	Mutant frequency ($\times 10^{-6}$)	Average mutant frequency ($\times 10^{-6}$)
Non-treatment	511	852,600	7	8.2	9.6 \pm 5.9
	512	527,000	8	15.2	
	513	986,400	1	1	
	521	364,500	5	13.7	
	522	615,250	9	14.6	
50 ppm 2-AAF	611	270,000	25	92.6	79.7 \pm 22.9**
	612	300,625	18	59.9	
	613	360,100	27	75	
	621	346,800	19	54.8	
	622	119,250	14	117.4	

* significantly different from Non-treatment group

表4 マウスおよびハムスターの生存率、最終体重および肝臓重量

Treatment	Initial no. of animal	Final no. of animal	Final body weight (g)	Absolute liver weight (g)	Relative liver weight (%)
B6C3F1 mice					
Control	5	5	28.2 ± 1.5	1.20 ± 0.12	4.25 ± 0.25
DCM	5	5	27.9 ± 0.5	1.17 ± 0.02	4.17 ± 0.12
DCP	5	4 ^a	27.3 ± 1.9	1.23 ± 0.05	4.53 ± 0.51
Hamster					
Control	5	5	119.9 ± 7.2	5.24 ± 0.19	4.37 ± 0.14
DCM	5	5	125.0 ± 4.7	5.45 ± 0.31	4.36 ± 0.21
DCP	5	4 ^b	106.6 ± 5.5*	5.19 ± 0.96	4.91 ± 1.17

^a one mouse died at day 2

^b one hamster died at day 3

* significantly different from control hamster group

表5 マウスおよびハムスターの肝臓における病理学的所見と GSTT1 の発現

	Treatment	No. of animal	Centrilobular necrosis	Expression of GSTT1		
				Hepatocyte		Bile duct epithelial
				Centrilobular	Periportal	
B6C3F1 mouse						
	Control	5	0	+	+++	+++
	DCM	5	0	+	++/+++	+++
	DCP	5	4 (80%)	+	++	+++
Hamster						
	Control	5	0	+	+	-
	DCM	5	0	+	+	-
	DCP	5	5 (100%)	+ / ++	++ / +++	-

-: negative; +: weak; ++: moderate; +++: strong

肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発に関する研究

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 助教

研究要旨

本研究はマウスおよびラットの肺腫瘍モデルにおける早期病変について、将来の腫瘍化の推定が可能なマーカーの同定を目的とした。腺系腫瘍は、Pulmonary Surfactant Protein C (SP-C)抗体陽性の型肺胞上皮由来、扁平上皮異型細胞はClara cell secretory protein (CCSP)抗体陽性のクララ細胞由来であることが判明した。また、肺早期病変である過形成病変において、Napsin Aの肺胞壁内細胞への高発現の有無により、腫瘍化の判別が可能であることが明らかになった。肺発がんの早期病変における組織型および潜在腫瘍化の判別に有用と期待される。

A. 研究目的

ラットの肺腫瘍誘発物質としては、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) (2週間の飲水投与)が知られている。しかし、肺腫瘍発生までには約30週間と長期を要する。マウスでは、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)の腹腔内投与による肺腫瘍モデルが存在するが、これも肺腫瘍発生までに最短で12週間を要する。

これらのモデルにおいて、早期に過形成病変が出現するが、将来、軽快するものと悪性化するものが混在している。本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化を予想することが可能なマーカーの検索を目的とした。このマーカーにより、物質の発癌修飾作用についての評価をより短期間で行うことができると期待される。さらに、早期病変で起こる悪性化のメカニズムについて、新たな病理組織学的知見を得られる可能性がある。

実験1として、肺増殖性病変の起源に着目し、クララ細胞のマーカーであるClara cell secretory protein (CCSP)と型肺胞上皮細胞のマーカーであるPulmonary Surfactant Protein C (SP-C)の発現を、NNK誘発マウス肺腫瘍(腺系)、N-nitrosotris-(2-chloroethyl) urea (NTCU)腹腔内投与により誘発された肺扁平上皮異形成、およびDHPN誘発ラット肺腫瘍(腺系)について検討を行った。

実験2では肺の早期腫瘍性病変の同定に有用なマーカーの候補についての検索を目的とした。NNKはマウスには腫瘍を誘発する代表的物質である。

しかし、F344雄ラットに投与した時には、早期に過形成を誘発するが、その後、徐々に病変は消失してしまう。一方、DHPNにより誘発された過形成は経時的に腺腫、腺癌へ進展する。DHPN投与により肺に生じた代表的な腫瘍性病変について、複数の抗体を検討し、候補となるマーカーの検索を行った。検討した複数の抗体はCyclin D1、Napsin A、p27、Thyroid transcription factor 1 (TTF-1)、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 E12、CK 5/6、surfactant proteins-A (SP-A)、

p53、Endothelial growth factor receptor (EGF-R)、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、carcinoembryonic antigen1 (CEA)、p16、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、chromogranin Aおよびsynaptophysinの19種類である。

実験3では実験2の結果から候補として絞ったマーカーについて、NNK誘発過形成(将来消失する過形成)およびDHPN誘発過形成(将来腫瘍化する過形成)に対して比較検討を行った。特に、将来消失する過形成病変と腫瘍化する過形成病変で染色性に相違が認められるかという点に着目した。なお、実験2から絞られた候補マーカーは、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1およびERの5種類である。

実験4は、ラット肺の炎症性変化におけるNapsin Aの発現を確認するための実験を行った。各種微粒子2mgを気管内投与後、28日目のラット肺を用いて、Napsin Aの発現を検討した。炎症を誘発する微粒子としては、quartz、NiOおよびCuOの3種類を用いた。

B. 研究方法

(実験1) NNK誘発A/J雌マウス肺腫瘍(腺系腫瘍、16週)およびN-nitroso-tris-chloroethylurea (NTCU)誘発A/J雌マウス肺扁平上皮異形成(20週)、DHPN誘発F344雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)の固定標本を用い、SP-C(sc-1379, Santa Cruz, CA, USA, 1:50)およびClara cell secretory protein (CCSP, CC10) (sc-9773, Santa Cruz, CA, USA, 1:2000)について二重免疫染色を行い評価した。

(実験2) DHPN誘発F344雄ラット肺腫瘍(腺系腫瘍、30週)の固定標本を用い、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 E12、CK 5/6、SP-A、p53、EGF-R、ER、PR、CEA、p16、PCNA、chromogranin Aおよびsynaptophysinについて免疫染色を行い評価した。用いた抗体の情報および希釈倍率等に関しては表1に示す。

(実験3) DHPN誘発F344雄ラット肺腫瘍(過形成、腺系腫瘍、12週および30週)およびNNK誘発F344雄ラ

ット肺過形成病変(12週および30週、NNK単独群30週では病巣がほぼ見られないので、NNK投与後に2mg quartz微粒子/0.2ml生理的食塩水の懸濁液を気管内投与したNNK+quartz群について検討した)の固定標本を用い、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1およびERについて免疫染色を行い評価した。

(実験4)微粒子の気管内投与後28日後のF344雄ラット肺の固定標本を用い、Napsin Aについて免疫染色を行い評価した。微粒子はquartz、NiOおよびCuOの3種類であり、いずれも2mg/0.2ml生食の用量で被験微粒子を気管内投与した。

(倫理面への配慮)

いずれの実験も動物実験に先立ち、香川大学、総合生命科学センター、動物実験部門の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

(実験1)NNK誘発A/J雌マウス肺およびDHPN誘発F344雄ラット肺ではいずれも肺胞上皮過形成病変、腺腫、腺癌が見られた。DHPN誘発F344雄ラット肺では腺癌の結節の一部に扁平上皮化生が見られた。マウスおよびラットともに、肺胞上皮過形成性病変、腺腫、腺癌のいずれもSP-Cに強く陽性を示した(図1,図3)。肺胞上皮過形成性病変および腺系腫瘍部にCCSPの発現は見られなかった。

一方、NTCU誘発A/J雌マウス扁平上皮異形成(図2)および、DHPN誘発F344雄ラット肺腺癌中の扁平上皮化生成分(図3)ではいずれもCCSPに陽性を示していた。

(実験2)DHPN誘発の肺過形成病変および腺腫に関して、良好に染色された抗体は、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER、CK34 E12およびCK5/6の7種類であった(図4)。このうち、CK34 E12およびCK5/6に関しては扁平上皮化生を示す部分に陽性像を示していた。しかし、これらは、過形成病変の鑑別には適さないと判断した。以上より、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1およびERが、さらに詳細な検討を行うべきマーカーの候補として挙げられた。

(実験3)NNKおよびDHPN誘発F344雄ラット肺病変に対して、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ERのいずれも病変部が良好に染色された(図5)。

一方で、DHPN誘発過形成病変とNNK誘発過形成病変を比較すると、その発現に差が見られたのはNapsin AおよびTTF-1であった。いずれも、DHPN誘発過形成病変においては、肺胞壁を構成する細胞に強く発現を示したが、NNK誘発過形成性病変では肺胞壁の細胞の発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内の成分では発現が見られた。また、Napsin AはTTF-1と比べて染色性が良好であった。以上から、Napsin Aのラットの肺胞壁内細胞への高発現はmalignant potentialを示唆すると考えられた。

実験3におけるその他の所見は以下の通りである。Napsin Aは腫瘍において、悪性度が高いと発現が低下していた。一方で、ERは悪性度が上昇すると発現が

上昇する傾向が見られた。TTF-1は悪性度の違いによる発現の変化は見られなかった。

(実験4)炎症により発生する過形成病変は、発癌物質によって誘発される過形成と比べて腫瘍化する可能性は低いと推測される。この炎症性過形成について、Napsin Aの肺胞壁内細胞への発現が乏しいのか検討を行った。Quartz、NiOおよびCuOをF344雄ラットに気管内投与すると、28日目には肺に炎症性過形成病変が認められる。Napsin Aはこれらの部に実験3でのNNK誘発過形成性病変とほぼ同様の染色性を示した(図6)。すなわち、肺胞壁内細胞への発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内成分への高発現が認められた。

D. 考察

マウスおよびラットにおいて、発癌物質により誘発される肺腫瘍はほとんどが肺胞上皮の過形成を経た腺系腫瘍である。実験1によって、この起源が型肺胞上皮であることが示唆された。今回、動物における肺扁平上皮癌の材料の入手が困難であったために扁平上皮癌についての検討は行うことが出来なかった。しかし、今回、NTCU誘発の扁平上皮異形成はクララ細胞起源であることが示唆された。NTCUによる肺扁平上皮癌の発生はすでに報告されており、この異形成病変は扁平上皮癌の早期病変と考えられる。

以上より、SP-Cは型肺胞上皮由来の腺系腫瘍、CCSPはクララ細胞由来の扁平上皮系腫瘍のマーカーである可能性が示唆された。さらに、肺における過形成病変および腺腫、腺癌の本態も型肺胞上皮の増殖であることが明らかになった。

実験2,3の結果、Napsin Aは型肺胞上皮で発現し、染色性も最も良好であった。線維化や炎症細胞浸潤による肺胞壁の増大は型肺胞上皮の増殖に起因しない変化と考えられる。今回、増殖性変化を示唆するマーカー(細胞増殖、細胞周期)の検討も行ったが、炎症性過形成病変およびDHPNによる腫瘍性の過形成性病変のいずれにも類似した発現を示し、過形成病変の鑑別には有効性が乏しいと考えられた。

実験4では、炎症に起因する過形成病変について、NNK誘発過形成病変と同様の染色性を示すことを確認した。NNKはマウスでは肺がん物質として知られている。F344雄ラットでは、NNKにより発生した過形成病変が経時的に消失するとはいえ、潜在的に腫瘍化する可能性がないのかという点について否定出来ない。実験4の結果で、NNK誘発過形成病変と炎症性過形成が類似した染色を示したことは、今回認められた過形成病変が可逆性であり、潜在腫瘍化能については乏しいという可能性を示唆する。

今回の実験結果からの過形成病変の捉え方と鑑別を図7にまとめた。正常肺胞上皮細胞は発癌物質や炎症性化合物の影響により、いわゆる肺胞上皮過形成を生じる。この肺胞上皮過形成には、可逆性のものと非可逆性のものがあると推測される。可逆性の過形成は炎症に伴う、「炎症性可逆性過形成」といえる。非可逆性の過形成は将来、腺腫、腺癌と腫瘍化していく可能性が高い、「潜在腫瘍性過形成」といえる。これらの鑑別にNapsin Aは有効であり、肺胞上皮を構成する細胞の

陽性率が高い場合は潜在腫瘍性過形成である可能性が高いと言える。

以上、Napsin A は動物肺発がんモデルなどで早期に発生する過形成病変が将来腫瘍化する可能性を判別するマーカーとして有用であることが明らかとなった。肺に過形成病変が出現した際に、その将来的な影響を確認するためにも肺胞壁内細胞のNapsin A の高発現を確認することは重要である。また、化学物質等の肺へのがん原性等をスクリーニング評価する際に、肺胞壁内細胞のNapsin A 高発現を示す過形成病変を指標とすることも有用と考えられる。

E . 結論

ラット及びマウスに誘発される腺系腫瘍については、SP-C 陽性の 型肺胞上皮由来、マウスの扁平上皮異型細胞はCCSP 陽性のクララ細胞由来であることが明らかとなった。Napsin A は、肺に発生する過形成病変の、将来腫瘍化する可能性についての判別に有用であることが判明した。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Yokohira M, Nakano Y, Hashimoto N, Yamakawa K, Ninomiya F, Klshi S, Saoo K, Imaida K. Toxicity of nicotine by repeated intratracheal instillation to F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 25:257-263, 2012.

2 . 学会発表

横平政直；山川けいこ；木内茂巳；中野裕子；二宮芙美子；岸宗佑；竿尾光祐；今井田克己、Immunohistochemical characteristics of the lung proliferative lesions in F344 rats.、第71回日本癌学会総会、2012.09

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

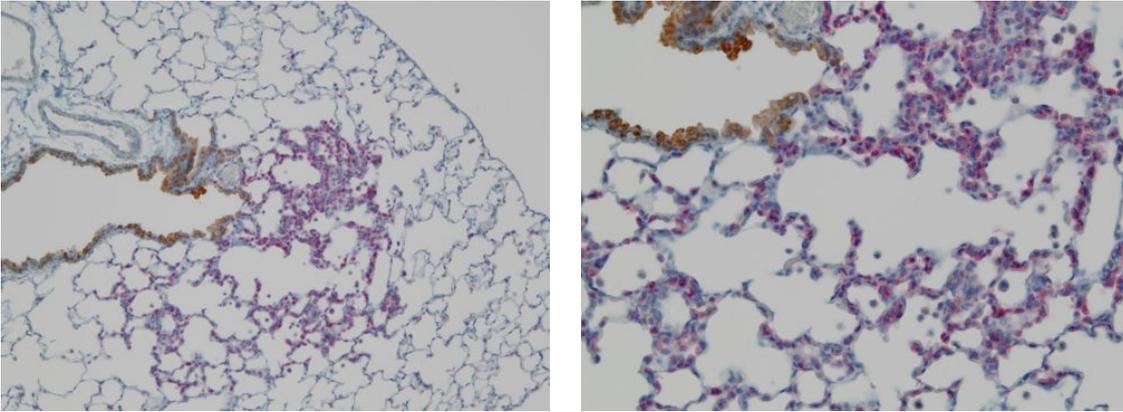
なし

表1、実験2および3で用いた抗体

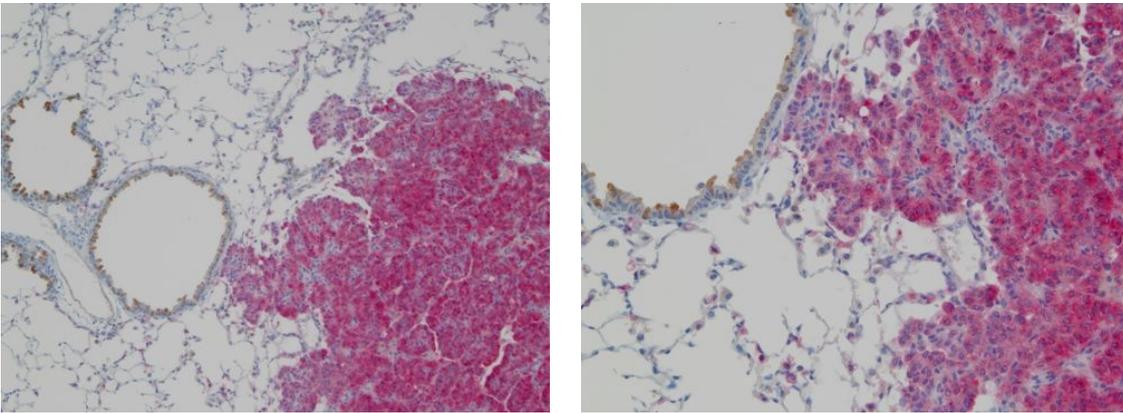
Antibody	Product code	Dilution	Company
(Cell proliferation)			
PCNA(PC10)	sc-56	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
Ki67	NCL-Ki67p	1:2000	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
EGF-R	M 3563	1:200	Dako North America, Inc., CA, USA
(Cell cycle)			
Cyclin D1	413531	1:100	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
p27	M 7202	1:400	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
p53	M 7001	1:50	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
p16	CINtec p16	fully diluted	Roche mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany
(Tumor producing)			
CEA	A 115	1:100	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
(Alveolar epithelium)			
Napsin A	NCL-L-Napsin A	1:100	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
TTF-1	M 3575	1:200	Dako North America, Inc., CA, USA
SP-A	M 4501	1:500	Dako Japan Co., Ltd., Kyoto, Japan
(Cell membrane)			
Cytokeratin 7	NCL-CK7-OVTL	1:500	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
Cytokeratin 20	NCL-CK20	+	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
(Endocrine receptor)			
Estrogen receptor	NCL-ER-6F11	1:100	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
Progesterone receptor	NCL-PGR-312	1:600	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
(Neuroendocrine)			
Chromogranin A	A 0430	1:100	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Synaptophysin	NCL-SYNAP-299	1:100	Leica Microsystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
(Squamous cell)			
Cytokeratin 34 E12	M 0630	1:50	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Cytokeratin 5/6	M 7237	1:50	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark

図1, NNK誘発マウス肺におけるCCSPとSP-Cの発現

Hyperplasia

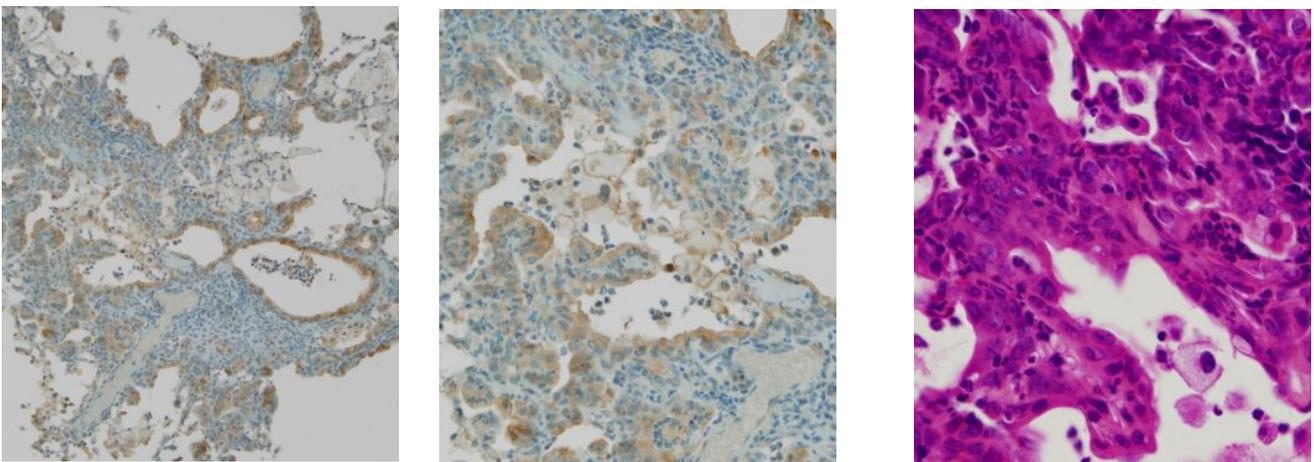


Adenoma



CCSP+SP-C (brown;CCSP, red; SP-C)

図2, NTCU誘発マウス肺扁平上皮異形成におけるCCSPとSP-Cの発現

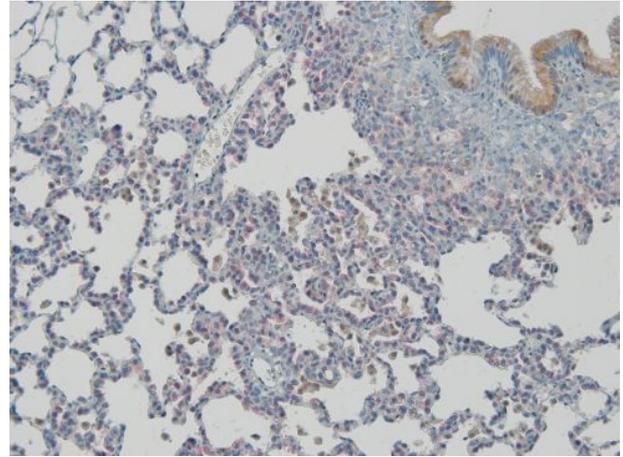
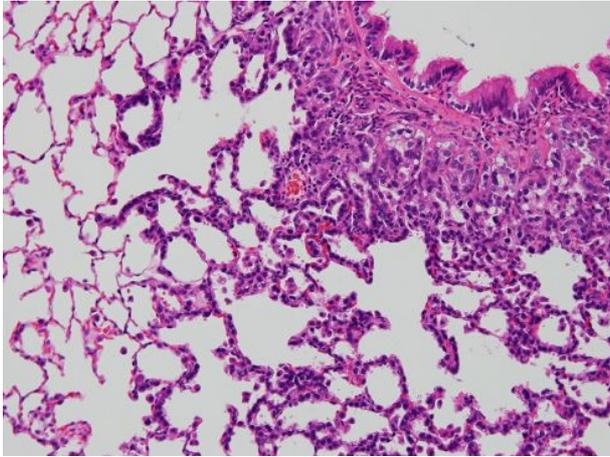


CCSP+SP-C (brown;CCSP, red; SP-C)

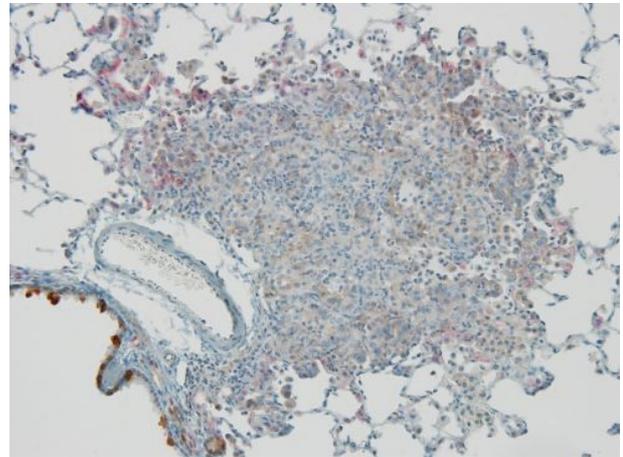
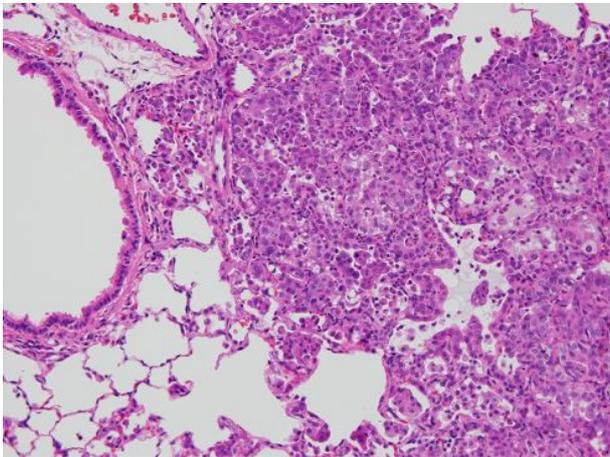
H. E.

図3, DHPN誘発ラット肺におけるCCSPとSP-Cの発現

Hyperplasia



Adenocarcinoma

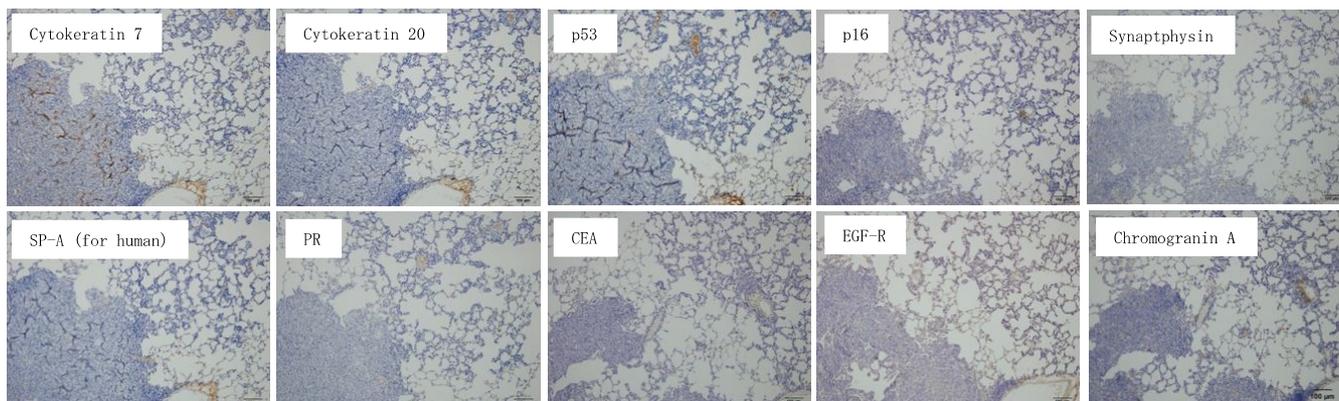


H. E.

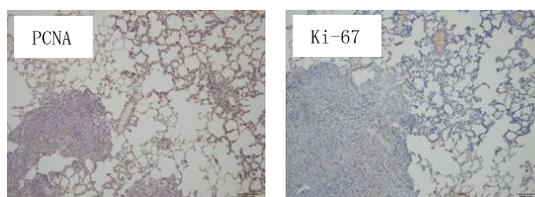
CCSP+SP-C
(brown;CCSP, red; SP-C)

図4, DHPN誘発ラット肺における各種マーカー発現の検討
(候補マーカーの選定)

Negative

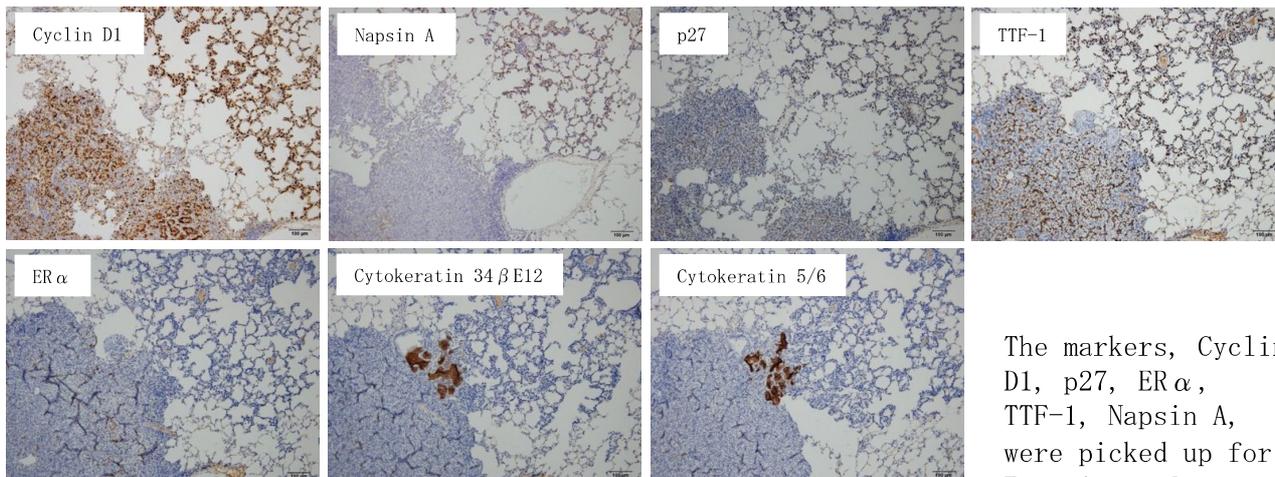


Useless



No difference between tumors and non-tumors.

Positive



The markers, Cyclin D1, p27, ER α , TTF-1, Napsin A, were picked up for Experiment 3.

図5, DHPNおよびNNK誘発ラット肺における候補マーカーの検討

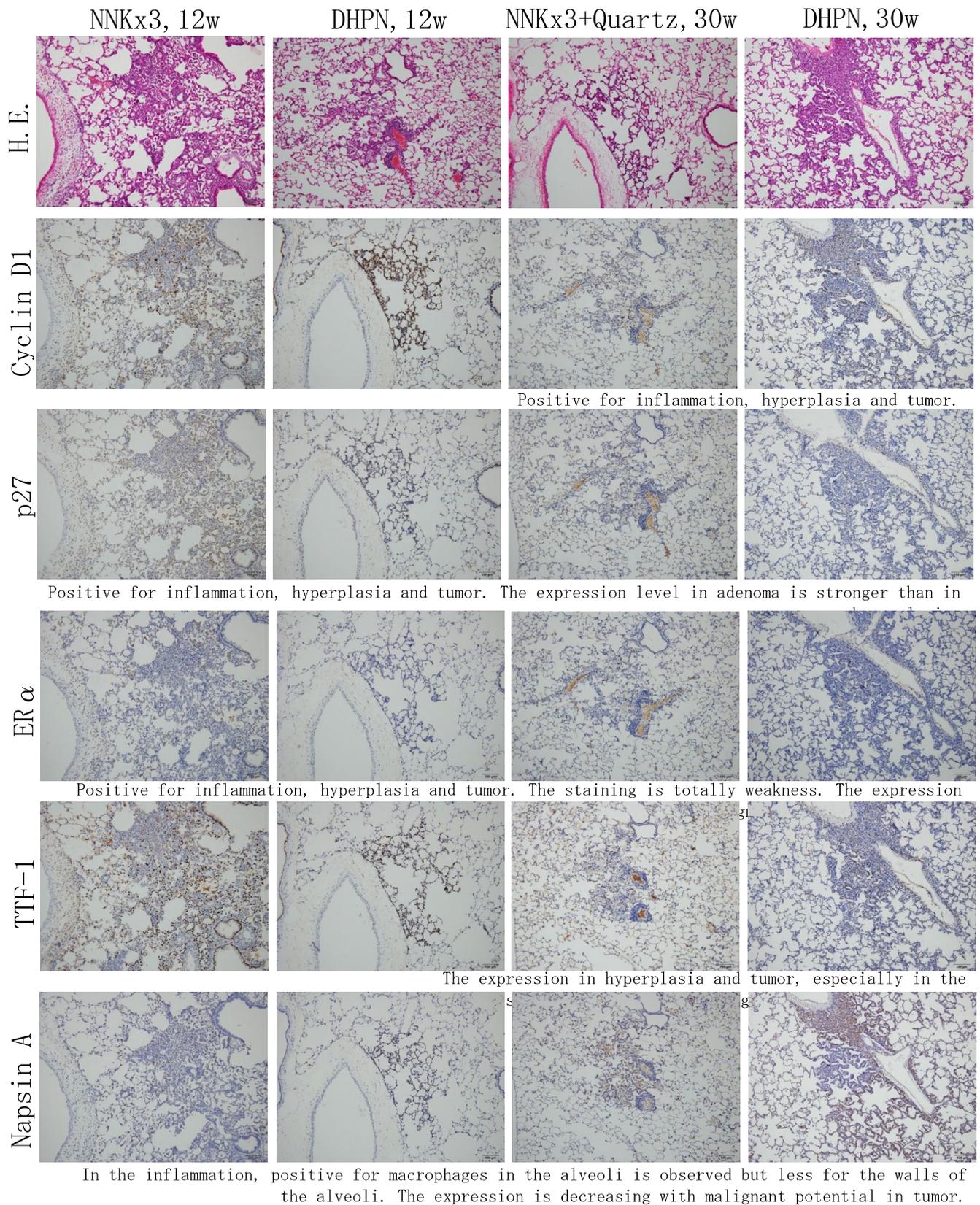


図6, 微粒子気管内投与ラット肺 (炎症性変化) におけるNapsin Aの検討

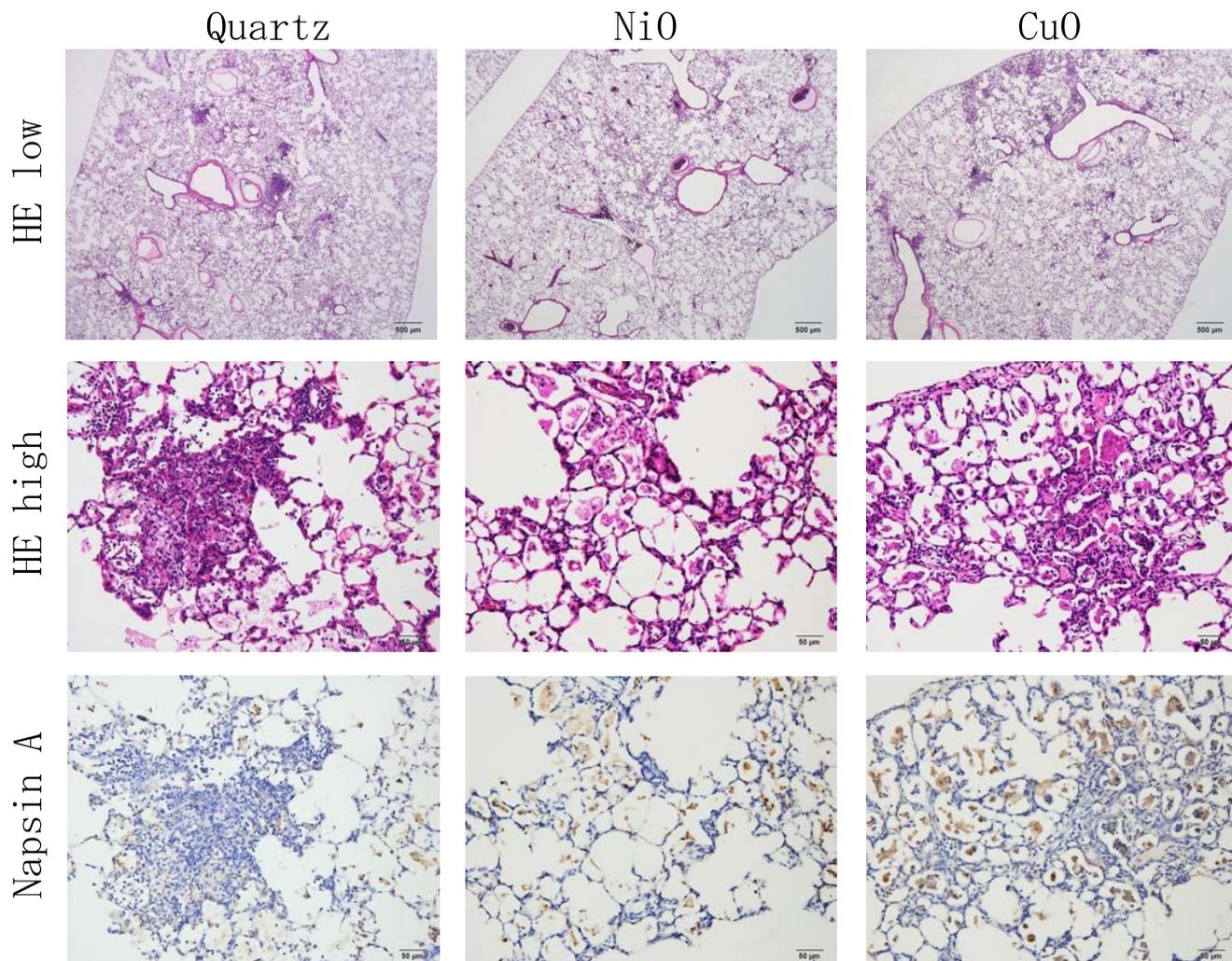
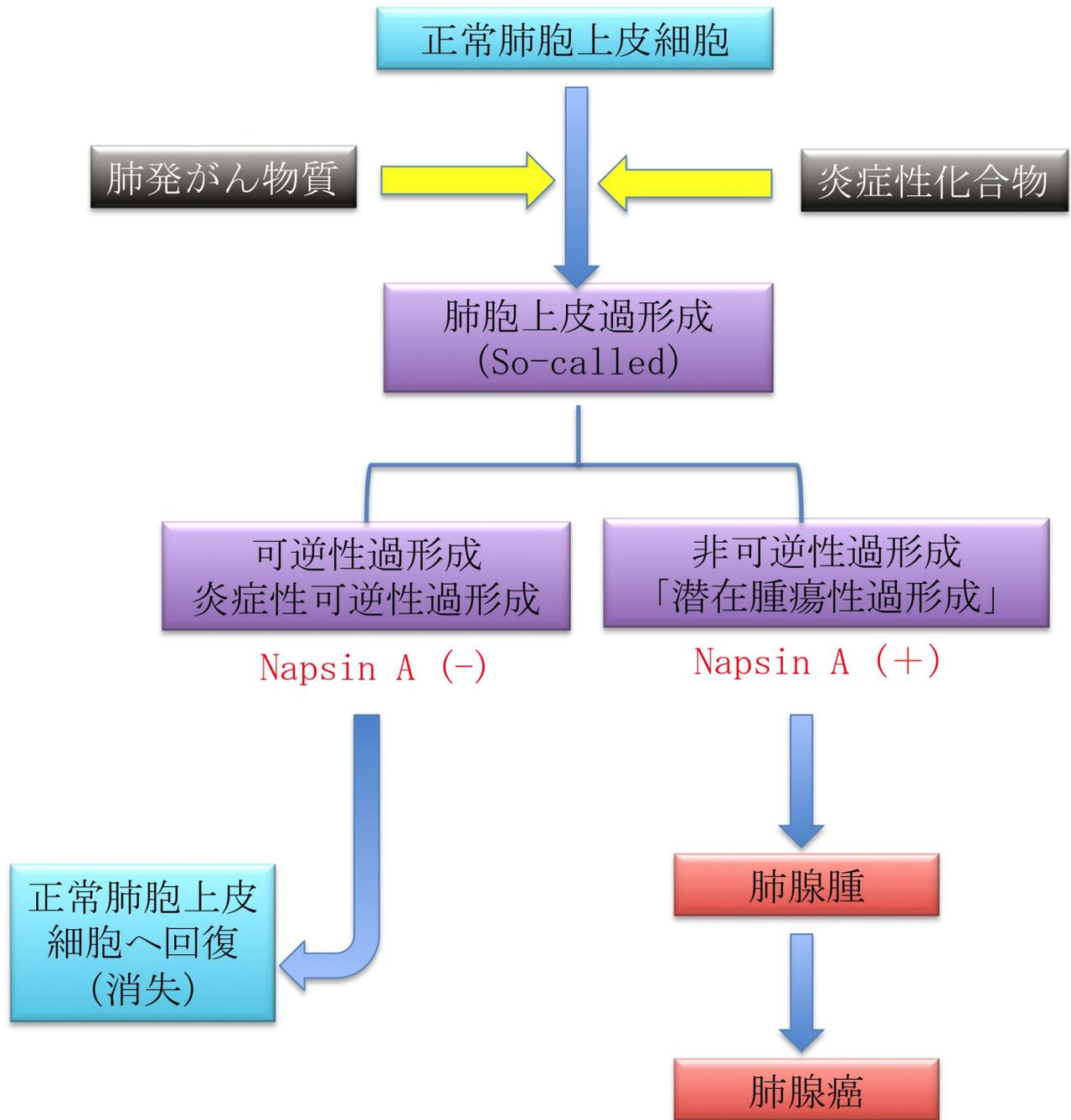


図7, 過形成病変の捉え方と鑑別



膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

研究分担者 小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

短・中期に遺伝毒性を予測できる指標の検索を目的とし、既知の遺伝毒性物質 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) 投与ラット膀胱粘膜の正常様粘膜、過形成粘膜および悪性腫瘍組織における各種 DNA 損傷修復関連マーカーの発現を免疫組織化学的に無処置ラット膀胱粘膜と比較検討した。無処置粘膜においても複数の DNA 損傷修復酵素の発現が見られた一方で、2 重鎖切断のマーカーである γ -H2AX については、無処置粘膜には認められず、BBN 投与ラットの増殖性病変のみならず、正常様粘膜上皮においても核内に顆粒状陽性巣が観察された。このことから、 γ -H2AX は BBN 等の遺伝毒性物質の暴露指標となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

化学物質のリスク評価において、個体における遺伝毒性の有無は最も重要な因子の 1 つである。そこで今回我々は、ラット膀胱について、遺伝毒性物質による腫瘍誘発を早期に検出できる系の確立を目的とし、BBN 投与ラット膀胱について、複数の DNA 損傷修復酵素の発現様式を検討した。

B. 研究方法

種々の DNA 損傷修復関連マーカーの発現動態について、F344 ラットに遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) を投与した膀胱の正常様組織～過形成粘膜および癌組織、ならびに、無処置ラット膀胱粘膜において比較検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、2 重鎖切断のマーカーである γ -H2AX, MRE11, XRCC1、直接損傷修復に関わる MGMT、ミスマッチ修復に関わる MLH1, MSH6、塩基除去修復に関わる APE1、ヌクレオチド除去修復に関わる DDB1, ERCC1、校正修復に関わる TREX1、細胞周期チェックポイントのマーカーである SMC1 および複製後修復に関わる RAD18 について、免疫組織化学染色を行い、発現様式について検討した。(表 1, 2)

C. 研究結果

免疫組織化学染色の結果、1) 本研究で検索した DNA 修復酵素の多くは、無処置ラットの膀胱粘膜上皮にも恒常的に発現しており、BBN 投与による変化は見られなかった。2) MGMT は BBN 投与後の正常様～過形成性粘膜で発現が認められる一方、癌細胞では陰性であった。3) γ -H2AX は対照動物では陰性であるのに対し、BBN 投与後の膀胱では、癌組織や過形成粘膜など増殖性細胞のみならず、正常様粘膜上皮においても核内に顆粒状陽性巣がみられた。以上の結果から、BBN による膀胱発がん機序には MGMT および γ -H2AX 発現が関与する可能性が示唆された。(図 1-4)

D. 考察

DNA 損傷は、最大で 50 万回/細胞/日おこり、その損傷パターンも 100 種類以上あるとされている。その損傷に対応する修復機序は特異的であり、複数の経路が知られている。なかでも、2 本鎖損傷は特に重大な損傷であり、修復時に変異の原因となりうるかとされている。今回、ヒストン H2AX タンパクセリン 139 のリン酸化型である γ -H2AX が BBN 投与ラット膀胱粘膜の核において、広く発現が見られたことから、遺伝毒性の指標としての可能性が示唆された。今後、非遺伝毒性物質暴露膀胱における発現様式との比較が必要と考える。

E. 結論

γ -H2AX は BBN 等の遺伝毒性物質の暴露指標となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Toyoda T, Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I, Ogawa K. Detection of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats. J Toxicol Pathol, in press.

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表 1. 使用した抗体と染色条件

Antigen	Clonality (clone)	Host species	Dilution	Supplier
γ -H2AX	Poly	Rabbit	1:10	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
MRE11	Poly	Rabbit	1:500	Cell Signaling Technology
XRCC1	Mono (33-2-5)	Mouse	1:100	Abcam, Cambridge, MA
MGMT	Mono (SPM287)	Mouse	Ready-to-use	Abcam
MLH1	Mono (EPR3894)	Rabbit	1:250	Abcam
MSH6	Mono (44)	Mouse	1:100	Abcam
APE1	Mono (13B8E5C2)	Mouse	1:5000	Abcam
DDB1	Mono (EPR6089)	Rabbit	1:250	Abcam
ERCC1	Mono (8F1)	Mouse	1:500	Abcam
TREX1	Poly	Rabbit	1:100	Abcam
SMC1	Mono [EPR2879(2)]	Rabbit	1:500	Abcam
RAD18	Mono	Mouse	1:1000	Abcam

表 2. DNA 損傷マーカーの発現様式

Class	Proteins	Control group		BBN-treated group	
		Urothelium	Mesenchymal cells	Normal-appearing and hyperplastic urothelium	Carcinoma
Double-strand breaks	γ -H2AX	-	-	+	+
	MRE11	+	+	++	++
	XRCC1	+	+	+	+
Direct damage reversal	MGMT	-	-	+	-
Mismatch repair	MLH1	±	±	+	+
	MSH6	+	±	+	+
Base excision repair	APE1	++	++	++	++
Nucleotide excision repair	DDB1	++	++	++	++
	ERCC1	±	-	+	+
Proof-reading repair	TREX1	+	++	++	++
Cell cycle checkpoint	SMC1	++	++	++	++
Post replication repair	RAD18	++	++	++	++

-, Almost negative; ±, scattered positive; +, occasionally positive; ++, extensively positive.

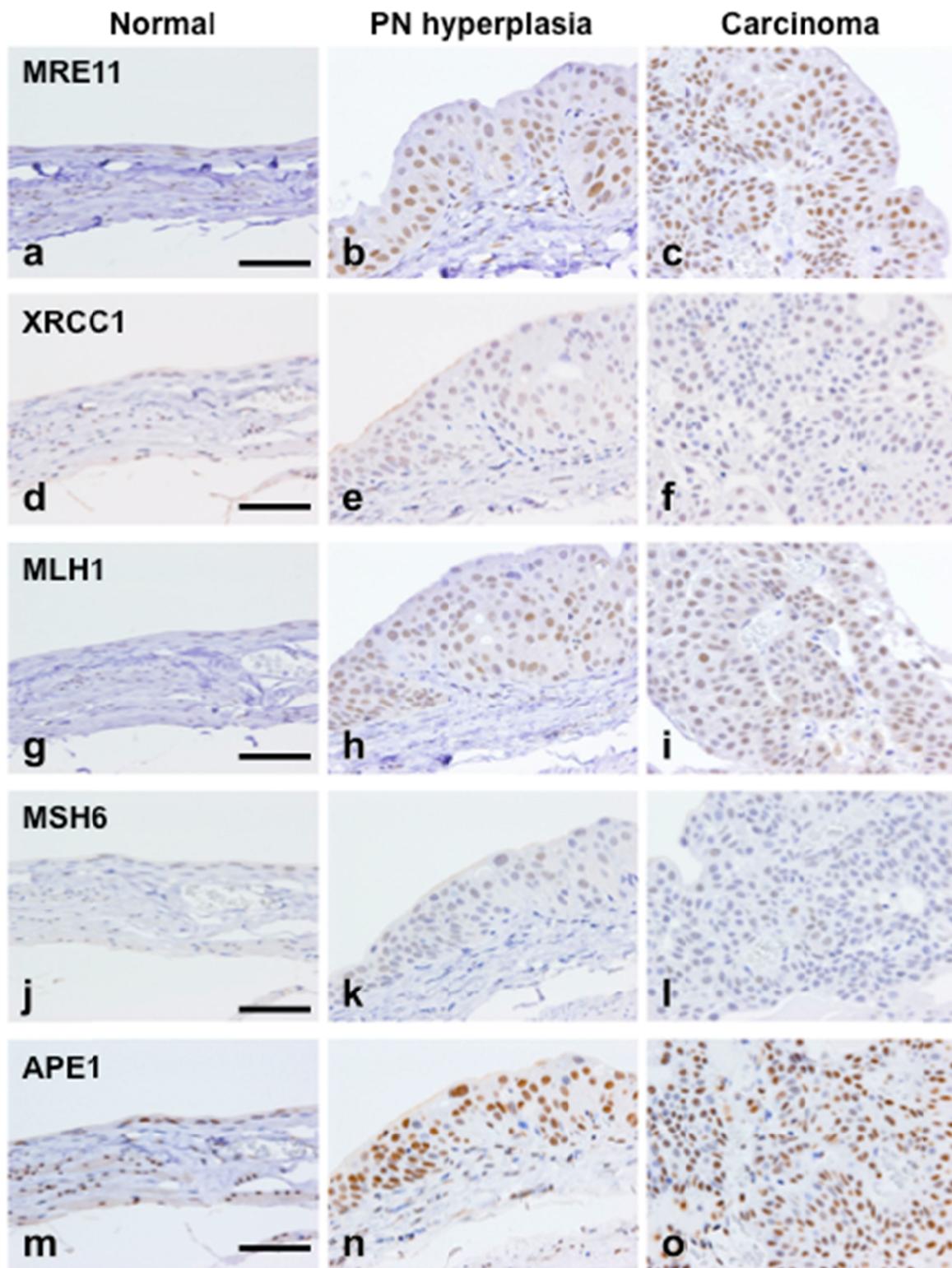


図1 . DNA 二重鎖切断、ミスマッチ修復、塩基除去修復に関する DNA 損傷修復酵素の免疫組織化学染色像. (a, d, g, j, m) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b, e, h, k, n) BBN 投与ラットの PN 過形成および (c, f, i, l, o) BBN 投与ラットの移行上皮癌. (a-c) MRE11. (d-f) XRCC1. (g-i) MLH1. (j-l) MSH6. (m-o) APE1. Bars = 50 μ m.

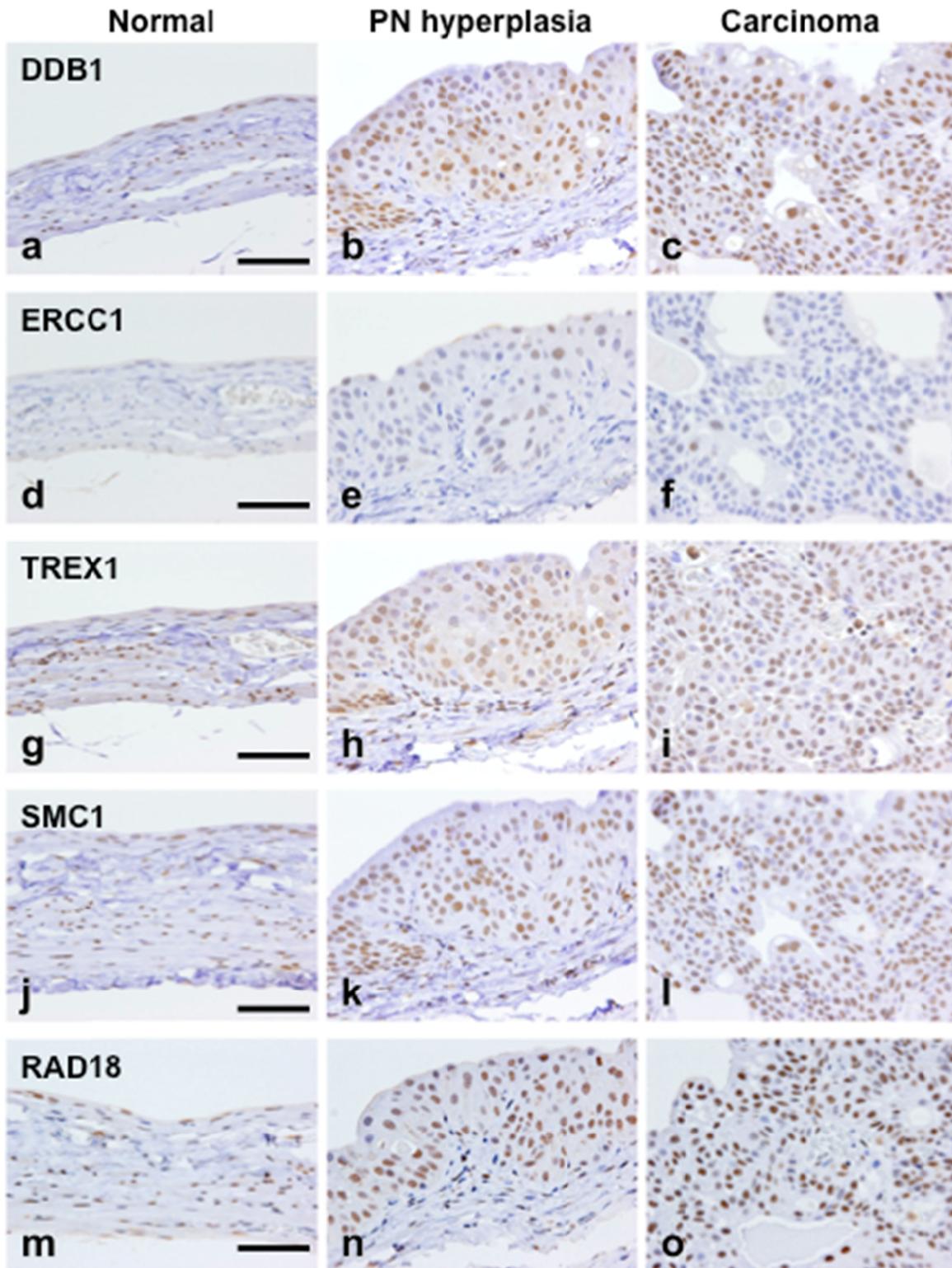


図2 .ヌクレオチド除去修復、校正修復、細胞周期チェックポイントおよび複製後修復に関する DNA 損傷修復酵素の免疫組織化学染色像. (a, d, g, j, m) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b, e, h, k, n) BBN 投与ラットの PN 過形成および (c, f, i, l, o) BBN 投与ラットの移行上皮癌. (a-c) DDB1. (d-f) ERCC1. (g-i) TREX1. (j-l) SMC1. (m-o) RAD18. Bars = 50 μ m.

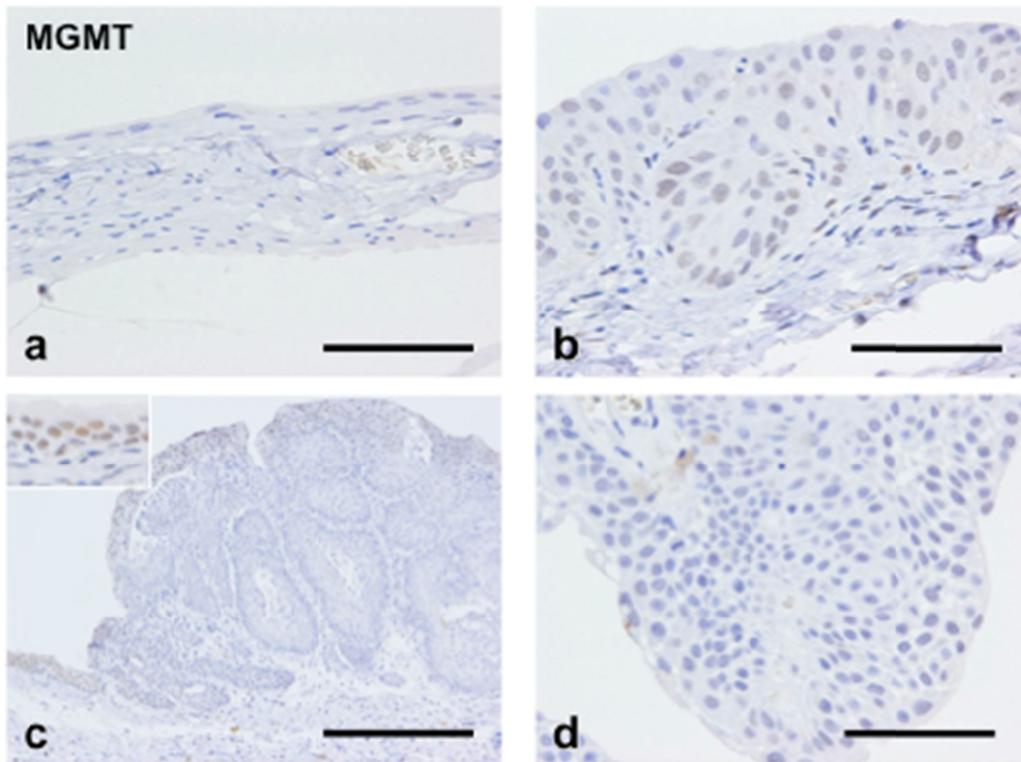


図3 . MGMT の免疫組織化学染色像 . (a) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b) BBN 投与ラットのPN 過形成および (c,d) BBN 投与ラットの移行上皮癌 . 過形成 (b) や表層の上皮細胞 (c,挿入図) は陽性を示すが、癌組織 (c,d) においてはほぼ陰性である . Bars = 50 (a,b and d) or 200 (c) μm

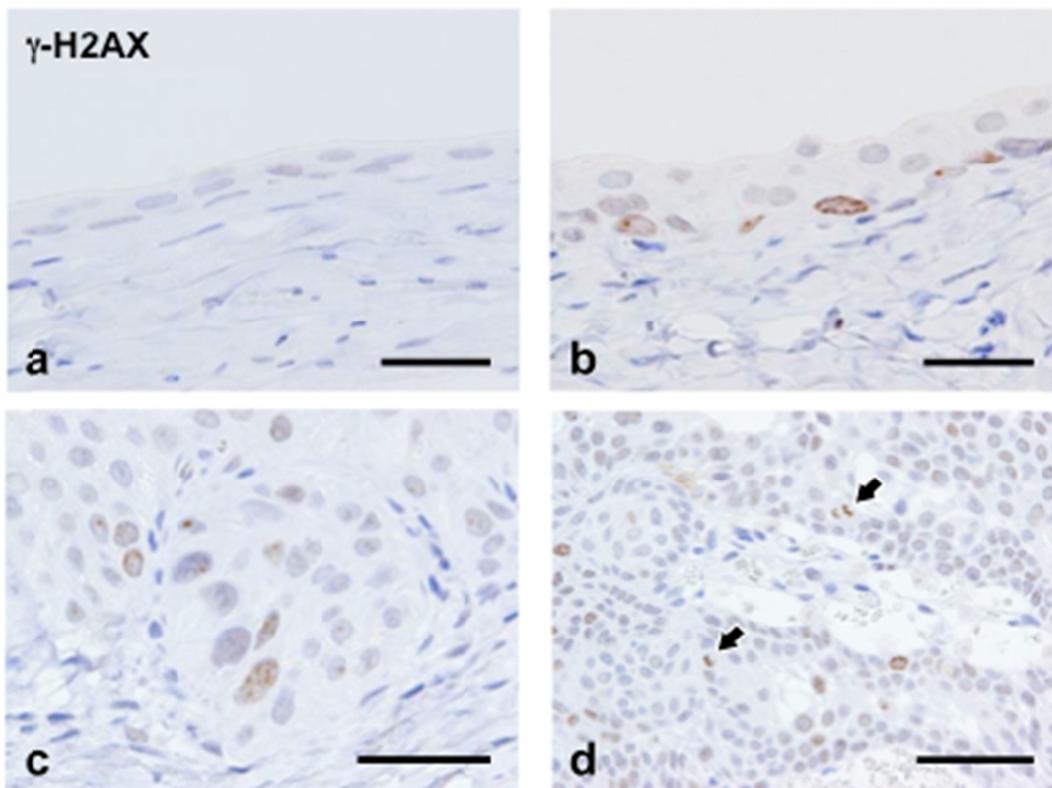


図4 . $\gamma\text{-H2AX}$ の免疫組織化学染色像 . (a) 無処置対照ラット膀胱粘膜、(b) BBN 投与ラットの正常様膀胱粘膜 (c) BBN 投与ラットのPN 過形成および (d) BBN 投与ラットの移行上皮癌 . 無処置ラットでは陰性であるが、BBN 投与ラットの正常様粘膜上皮には陽性細胞が観察される . また、分裂期細胞 (矢印) においても陽性を示している . Bars = 25 (a, b and c) or 50 (d) μm .

網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究代表者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨

既存 *in vitro* 遺伝毒性試験を用いた方法では化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要である。本研究は、*in vitro* 系による遺伝毒性物質あるいは毒性の有無が分からない化学物質の DNA 損傷性を試験する新しい評価法の提案を目標としている。ジクロロメタンなどのハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素(GST T1-1)によりグルタチオン(GSH)が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。ヒト胆道がん発生におけるジクロロメタンの関連を明らかにする目的で、別途合成した既報のジクロロメタン代謝活性化体と DNA あるいは各種デオキシリボヌクレオシドを反応し、生成される DNA 付加体 GSCH₂-dG などの LC-MS/MS による分析系を確立した。また、ジクロロメタンと GST T1-1 を含むヒト肝サイトソル、GSH、dG を混合した系からも同じ DNA 付加体が生成されることを確認した。しかしながら、GSCH₂-dG はアルカリ性で不安定であることから、安定性の高い、新たなジクロロメタンによる DNA 付加体を探索する必要がある。そこで、昨年本研究で開発した、LC-MS による DNA 付加体の網羅的解析法（DNA アダクトーム解析法）を用い、ジクロロメタンにより誘発される DNA 損傷の評価を行った。その結果、未知の DNA 付加体を 2 つ見出した。さらに、それらの付加体から MS/MS フラグメント解析によりジクロロメタン由来のメチル基を含む修飾 dG 由来のフラグメントイオンが検出されたため、ジクロロメタン由来の新規な DNA 付加体であることが示唆された。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ（DNA 損傷試験）、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考えられる。そこで昨年は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめた。本年は、昨年度に確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、ヒトが曝露しうる化学物質が誘発する DNA 損傷性の評価ならびに新規 DNA 付加体の解析を行う。

最近、ジクロロメタンや 1,2-ジクロロプロパン等のハロゲン系炭化水素は職業性胆道がんの原因物質であることが示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。そのため、これらヒト胆道がんの発生とジクロロメタン、1,2-ジクロロプロパンなどのハロゲン系炭化水素の関与を判断しうる、安定性が高く、診断に用いることが出来るような信頼性の高い診断マーカーが必要となる。本研究では、遺伝子変異の基となり、バイオマーカーになりうるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析を、*in vitro* 反応系を用いて試みた。本年度はジクロロメタンにより生成される DNA 付加体の解析から行った。

B. 研究方法

ハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素(GST T1-1)により GSH が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。DNA-アルキル-GSH 付加体の生成を *in vitro* 系を検討するために、以下のように研究を実施した。

- 1) ジクロロメタン由来の DNA 付加体の標準品を化学合成し、分析条件の確立を LC-ESI-MS/MS を用いて行った。
- 2) これら付加体がハロゲン系炭化水素と GSH の共存下で GSTT1-1 の作用により生成するかについて検討をおこなった。
- 3) 既報の DNA-アルキル-GSH 付加体以外の未報告の DNA 付加体の生成について、LC-TOF-MS を用いた網羅的解析法（アダクトーム法）により検討した。

各項目における実験条件を以下に示す。

- 1) ジクロロメタンの活性化体である S-アセトキシメチルグルタチオン (GSCH₂OAc) とウシ胸腺 DNA (CT-DNA) あるいは 4 種のデオキシリボヌクレオシド [2'-デオキシグアノシン (dG)、2'-デオキシシチジン (dC)、2'-デオキシアデノシン (dA)、チミジン (dT)] を 37°C で 1 時間反応させた。CT-DNA サンプルについては反応後 DNA 消化酵素でヌクレオシドレベルまで分解し、LC-ESI-MS/MS (Quattro Ultima Pt) に供した。
- 2) マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画分である肝 cytosol 存在下で、ジクロロメタン、GSH 及び 4 種のデオキシリボヌクレオシド (dG、dC、dA、dT) を

HEPES バッファー (pH 7.0) 中で 37 °C で 1 時間インキュベートした。限界ろ過膜に通し、LC-ESI-MS/MS に供した。

3) 1) のサンプルのうち GSCH₂OAc と dG 反応液を LC-TOF-MS に供し、DNA アダクトーム解析法(詳細な解析方法は前年度分担研究報告書を参照)により解析した。また、検出された未知の DNA 付加体について MS/MS フラグメント解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

各実験項目の結果を以下のように示す。

1) CT-DNA との反応で生成させたジクロロメタン由来の 4 種の GSCH₂-DNA 付加体 (GSCH₂-dG, GSCH₂-dC, GSCH₂-dA, GSCH₂-dT) の生成について調べたところ、GSCH₂-dG がその他の塩基由来の付加体と比べ 40 - 1400 倍も多く生成することがわかった。

2) マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画分である肝 cytosol 存在下で、ジクロロメタン、GSH 及び 4 種のデオキシリボヌクレオシドを反応させたところ、反応混液中に GSCH₂-dG に相当するピークのみが観察され、dC, dA および dT に由来する付加体は検出されなかった。このことから、ジクロロメタン由来の GSH 付加体は GSCH₂-dG がメジャーな付加体であることが示唆された。

3) 1) のサンプルの GSCH₂OAc と dG 反応液を LC-TOF-MS を用いた網羅的解析法 (アダクトーム法) により解析したところ、GSCH₂-dG が検出されただけでなく、他にも多数の DNA 付加体が観察されたことから、GSCH₂-dG 付加体以外にも多くの未報告の DNA 付加体が生成されていることがわかった (図1)。それらのうち、図1の arrowhead の DNA 付加体について MS/MS フラグメント解析を行った。その結果、メチル基 + dG に由来するものと思われるフラグメントイオンが検出された。

D. 考察

本研究では、動物モデルにおいて胆管がんを誘発する可能性のあるジクロロメタンについて、グルタチオン抱合型の活性化体ならびに GSTT1-1 存在下での DNA 付加体の生成について、LC-MS を用いて解析した。それにより、未報告の DNA 付加体を見出すことが出来た。しかしながら、それらが GSCH₂OAc と dG の反応産物であることがわからなければ、診断マーカーとしての信頼性は低くなってしまふ。そのため、図1で見出した未知の DNA 付加体の構造解析を行う必要があった。既報の GSCH₂-dG の MS/MS フラグメント解析を行うと、m/z 308 や m/z 471 など、構造情報と矛盾の無いフラグメントイオンが検出される。GSCH₂-dG に由来するフラグメントイオンは他にも数多く生成されるが、その中にメチル基 + dG を示す、未報告の DNA 付加体から検出されたフラグメントイオンと同一のフラグメントイオンが検出された。このことからメチル基はジクロロメタン由来のメチル基と推測され、

DNA adductome analysis

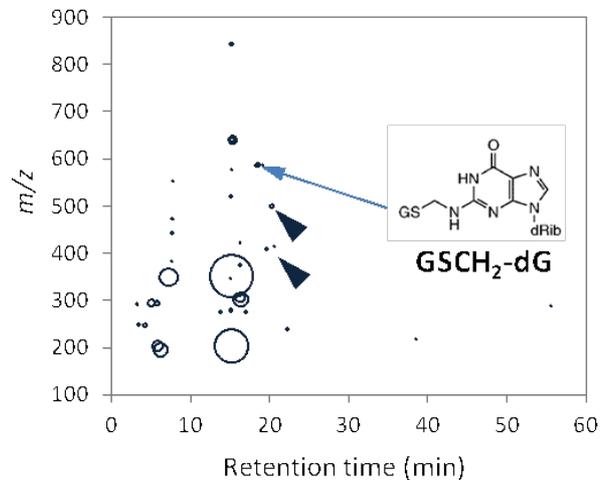


図1. GSCH₂OAc と dG 反応液の DNA アダクトーム解析

図1の arrowhead で示した DNA 付加体はジクロロメタンに由来する付加体である可能性が示唆された。また、これら未報告の DNA 付加体は、2) のサンプルのヒト肝サイトゾルとの反応サンプルからも検出されたことから、ジクロロメタンに曝露したヒトの生体中においても生成している可能性が示された。

また、バイオマーカーとして用いられる化合物は、化学的に安定かどうかが重要である。GSCH₂-dG はアルカリ条件下で大変不安定であることがわかっており、組織サンプルや細胞から DNA を抽出する過程がアルカリ性条件下で行われるため、抽出過程で壊れてしまうことが危惧される。今後、未知の DNA 付加体がサンプル処理の条件下で不安定でないかを調べる必要がある。

E. 結論

本研究では、GSCH₂OAc と DNA あるいは各種デオキシリボヌクレオシドの *in vitro* 反応サンプルを、DNA アダクトーム法を用いて分析し、既知の DNA 付加体以外に生成される DNA 付加体の探索を行った。その結果、GSCH₂-dG に加え、未知の DNA 付加体が複数検出された。未知の DNA 付加体のうち、MS/MS フラグメント解析を行うことで、検出された未知の DNA 付加体がジクロロメタンに由来する DNA 付加体であることが示唆された。このように、*in vitro* 系での既知および未知付加体の解析により、職業性胆管癌の原因候補物質である八口ゲン系炭化水素への曝露状況の把握が可能になることが期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay system. *Nanotoxicology*, 2013 7: 452-61.

2). Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M,

Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y. ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*, *Toxicon* 2012, *in press*.

3). Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H. Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2012, *in press*.

4). Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H. Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. *J Epidemiol*. 2012, *in press*.

5). Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y. Induction of Glandular Stomach Cancers in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer*, 130: 259-266, 2012.

2. 学会発表

1). Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Genotoxicity induced by nanomaterials, The 6th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (ドーハ、カタール、26-29, March, 2012).

2). 戸塚ゆ加里、石野孔祐、若林敬二、渡辺哲志、中釜 斉；メイラード反応生成物、アミノベンゾアゼピノキノリノン(ABAQ)の *in vivo* 変異原性と生体内における生成、第71回日本癌学会学術総会(札幌、9月19-21日)

3). 石野孔祐、戸塚ゆ加里、武藤倫弘、中釜 斉；ヒト白血球を用いた肥満関連 DNA 付加体の網羅的解析、第71回日本癌学会学術総会(札幌、9月19-21日)

4). Ishino K, Sekine A, Goto S, Nakagama H, Totsuka Y ; Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis), 3rd Asian Conference on environmental mutagens (杭州、中国、10月23-26日)

5). Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Watanabe T, Masuda S, Nakagama H ; *In vivo* mutagenicity and formation of a Maillard reaction product, aminobenzoazepinoquinoline derivative (ABAQ), (杭州、中国、10月23-26日)

6). 戸塚ゆ加里；ナノマテリアルの遺伝毒性発言メカニズム、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)

7). 戸塚ゆ加里、石野孔祐、松島芳隆、中釜 斉；ハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)

8). 石野孔祐、関根彬弘、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里；DNA 付加体の網羅的解析による新規付加体の探索、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、1

1月29-30日)

9). 堺澤絢、後藤純雄、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、戸塚ゆ加里；トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の *in vivo* 変異原性、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)

10). 大野絢、中野毅、中釜 斉、松島芳隆、布柴達男、戸塚ゆ加里；ゲノム中に存在する DNA 付加体の免疫沈降法を用いた濃縮法、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)

11). 関根彬弘、石野孔祐、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里；マグネタイト(MGT)により誘発される DNA 付加体のアダクトーム解析、第41回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月29-30日)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ヒストン修飾を指標とした *in vitro* 発がんリスク評価系の開発

研究分担者 伊吹裕子 静岡県立大学環境科学研究所 准教授

研究要旨

本研究ではヒストンの化学修飾に焦点をあてた新規 *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、最終的に本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系との対比検討を行うことにより、その有用性を確認することを目標としている。化学物質によるヒストン修飾変化の基礎データを蓄積し、評価に使用するヒストン修飾パターンを決定するために、本年度は、昨年度の予備的検討において評価項目候補となった、ヒストン H2AX(Ser139)、H3(Ser 10)リン酸化を中心に、タバコ副流煙、ホルムアルデヒド作用後の修飾変化と発がんへの関与について検討した。その結果、H2AX リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3 リン酸化により proto-oncogene の発現制御を捉えることが可能であり、本評価系は、化学物質のイニシエーション活性と、プロモーション活性を同時に検出できる系であることが示された。

A. 研究目的

近年、多岐にわたる化学物質が開発されているが、その使用は幾つかの毒性試験により規制されている。発がん性予測の第一スクリーニング法として、Ames試験、小核試験等の遺伝毒性試験は有用であるが、それらの遺伝毒性試験では陰性でも発がん性を示す化学物質の存在が報告される等、最終的には動物における長期の発がん試験が必要とされる。動物愛護の観点から、その代替法の開発が望まれており、新しい観点からの新規 *in vivo*, *in vitro* 評価法の構築が期待されている。

本研究では新しい *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、構築した手法について、本研究事業での中心課題である中・短期動物実験系の結果と対比させながらその実用性の可能性について検証を行う。評価法としては、化学物質作用後のヒストンの修飾変化に焦点をあてる。これまでの遺伝毒性評価では不可能であった DNA 変異に基づかない毒性や、その誘導機構の予測について検討する。

B. 研究方法

ヒト培養細胞株 (A549 肺上皮細胞) に化学物質を作用させ、その後、時間依存的なヒストン修飾変化を western blotting により検出した。ヒストン修飾としては、DNA 損傷マーカーであるヒストン H2AX(Ser139)リン酸化、細胞増殖マーカーであるヒストン H3(Ser10, Ser28)リン酸化、H3 アセチル化 (global, Lys9, Lys14) を対象とした。化学物質としては、タバコ副流煙、その中に含まれるホルムアルデヒドを対象とした。タバコ副流煙は 5 本のタバコの燃焼煙を 100ml の培地(DMEM)にトラップした。ホルムアルデヒドは、発がん性物質であるが、変異原性試験で判定が難しいとされ、ヒストンに対して高い反応性を有することが知られている。

ヒストン修飾に伴う前がん遺伝子(*c-fos*, *c-jun*) 発現制御はヒストン修飾部位に対するクロマチン免疫沈降

法 (ChIP) により検討した。

また、印刷工場における胆管がん誘発の原因物質と考えられている 1,2-ジクロロプロパンのヒストン修飾変化についても、ヒト正常肝細胞 WRL-68 並びに、ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 に作用させ、同様に検討した。

C. 研究結果

1) タバコ副流煙、ホルムアルデヒド作用後のヒストン修飾パターン変化

タバコ副流煙、ホルムアルデヒド作用後のヒストン修飾変化について検討した (図 1, 2)。

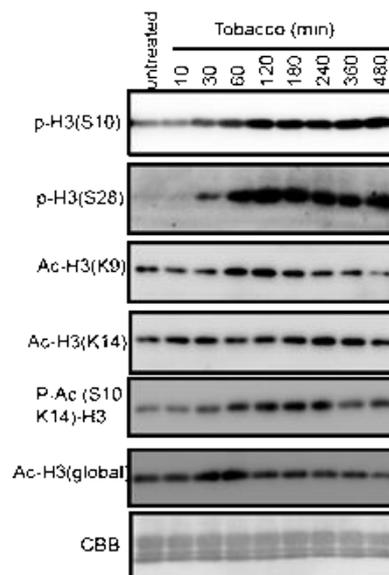


図 1 タバコ副流煙作用後のヒストン修飾パターン

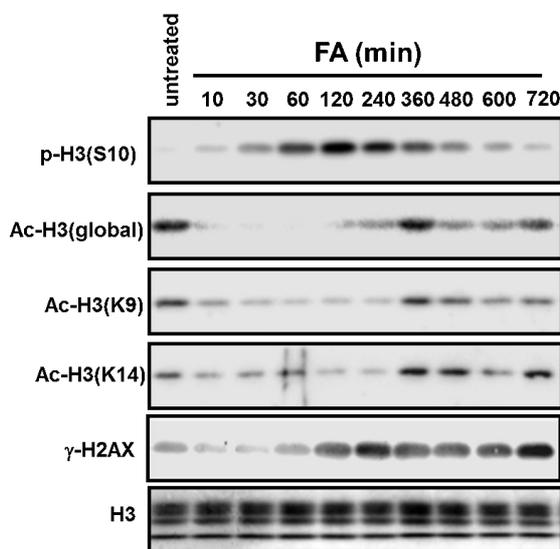


図2 ホルムアルデヒド (1mM) 作用後のヒストン修飾パターン

ヒストン H3 リン酸化、アセチル化パターンは、それぞれの誘導因子で異なっていた。タバコ副流煙作用後のヒストン修飾パターンを図1に示す。作用後、顕著なヒストン H3(Ser10, Ser28)のリン酸化が示された。一方、ホルムアルデヒド作用後にはヒストン H3(Ser10)リン酸化は同様に誘導されたが、その誘導は2時間をピークに一時的であり、タバコ作用程継続しなかった(図2:昨年度報告書で示したが、対比のために掲載)。ヒストンアセチル化は、タバコ副流煙ではほとんど変化が認められなかったが、ホルムアルデヒド作用では一時的に(~6時間)アセチル化が低下し、その後回復するパターンを示した。

ヒストン H2AX(Ser139)リン酸化は両作用により、時間依存的に増加した(図2)。タバコ副流煙による H2AX(Ser139)リン酸化については既に報告している(Mutat. Res. 676, 34-40 (2009))。この H2AX のリン酸化は、それぞれの化学物質により DNA 損傷が生成し、それが起因となって DNA 複製、修復時に誘導されたものと考えられた。

2) 1,2-ジクロロプロパン作用後のヒストン修飾変化

1,2-ジクロロプロパンのヒストン修飾変化について、ヒト正常肝細胞 WRL-68 並びに、ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 に作用させ検討した。短期間曝露(~24時間)では、上述したタバコ副流煙やホルムアルデヒドのような顕著なヒストン修飾変化は認められなかった(データ示さず)。

3) ヒストン H3 リン酸化機構の解析

ホルムアルデヒド作用後のヒストン H3 (Ser10)リン酸化メカニズムについて検討した。ヒストン H3 リン酸化並びに H2AX リン酸化を二重免疫染色したところ、DNA 損傷の誘導を示す H2AX のリン酸化と H3 のリン

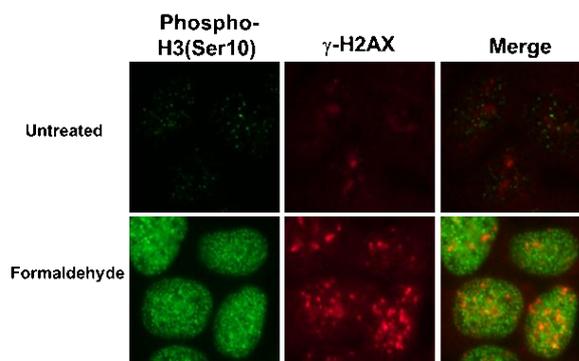


図3 ホルムアルデヒド作用後のヒストン H3 リン酸化と H2AX リン酸化の局在
左(緑): H3 リン酸化、中央(赤): H2AX リン酸化、右: マージ

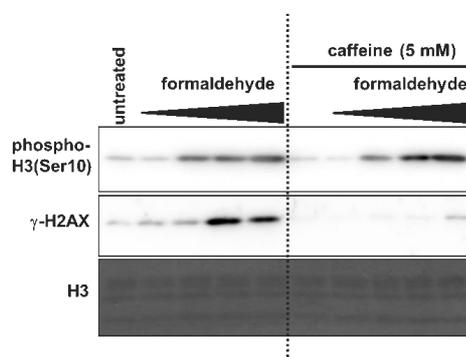


図4 ヒストン H3 リン酸化と DNA 損傷応答

ATM 阻害剤 caffeine を作用後、ホルムアルデヒド (~3mM) 加え、2時間培養後細胞を回収した。

酸化は、細胞内局在が異なっていた(図3: H3 リン酸化部位は H2AX リン酸化を示すフォーカスと一致していない)。

また、DNA 損傷に基づき活性化される ATM 阻害剤により H2AX のリン酸化は抑制されるが、H3 のリン酸化は抑制されなかったことから、H3 のリン酸化は DNA 損傷に依存せず、それとは異なる経路によることが示された。

一方、ヒストン H3 のリン酸化は MAPK カスケードに依存することが報告されているので、MAPK の阻害剤を使用して、ホルムアルデヒド作用後のヒストン H3 リン酸化を検討した(図5)。

ホルムアルデヒドによるヒストンリン酸化は MAPK カスケードの JNK 経路阻害剤で阻害される(図5A)ことから、JNK 経路を介していることが示唆された。また、JNK の siRNA を用いた検討においてもそれが確認された(図5B)。

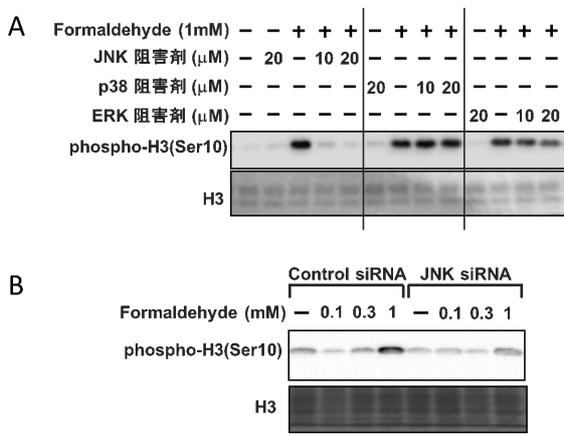


図5 MAPK 経路によるヒストン H3 (Ser10)リン酸化
 A. MAPK 阻害剤各種を作用後、ホルムアルデヒド (1mM) 加え、2 時間培養後細胞を回収した。
 B. JNK を siRNA により knock-down し、ホルムアルデヒド (~1mM) 加え、2 時間培養後細胞を回収した。

4) ヒストン H3 (Ser10)リン酸化によるがん遺伝子発現制御の検討

ヒストン修飾に伴う前がん遺伝子(*c-fos*, *c-jun*) 発現制御はヒストン H3(Ser10)リン酸化部位に対するクロマチン免疫沈降法(ChIP)により検討した。各遺伝子の転写開始点を基準として-1000~3000bp 地点のプライ

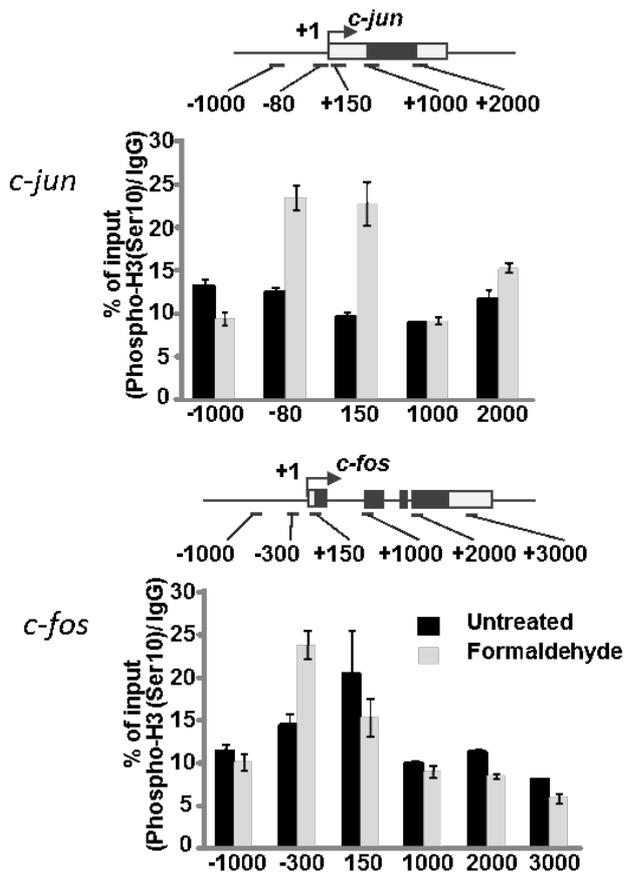


図6 *c-fos*, *c-jun* 遺伝子領域におけるヒストン H3 (Ser10)リン酸化

マーを使用して検討した(図6)。その結果、*proto-oncogene*である *c-fos*, *c-jun* プロモーター領域で H3 (Ser10)のリン酸化は上昇していることから、このヒストン修飾が発がんプロモーションに繋がることが示唆された。

D. 考察

本研究により、タバコ副流煙、ホルムアルデヒドはヒストンのリン酸化・アセチル化状態変化をダイナミックに変化させること、そのパターンは化学物質の種類に応じて異なることが明らかになった。ヒストン H3(Ser10)のリン酸化については、時間的変化はあるものの、両作用で誘導され、また、*proto-oncogene* の発現を制御していることが明らかとなったことから、H3(Ser10)のリン酸化を検出すれば、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験では捉えることが出来ない発がんプロモーション作用を捉えることができると考えられた。DNA 損傷生成を反映する H2AX(Ser139)リン酸化と同時に測定することにより、イニシエーション、プロモーション両者を同時に解析することが可能な評価方法であることが示唆された(図7)。

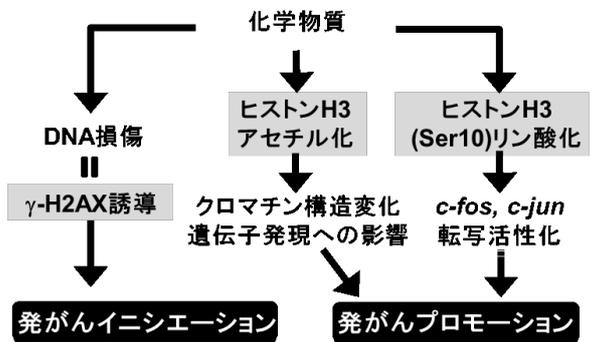


図7 ヒストン修飾を指標とした発がんイニシエーション、プロモーション同時評価

ホルムアルデヒドのアセチル化の変動については、アルデヒドとリジン残基の反応によるアセチル化の妨害がはじめのアセチル化の低下を反映していたと考えられる。今回は、高濃度・短期曝露の変化を検討したが、今後、低濃度・長期曝露の変化を検討したいと考える。

1,2-ジクロロプロパンの短期曝露によるヒストン修飾変化については変化が認められなかったが、発がん性を示すためには代謝が必要と考えられるので、長期曝露検討の必要性があると思われる。

化学物質によるヒストン修飾変化に関する研究については、未だ基礎実験段階であり、さらに多くの化学物質について検証する必要がある。今回は、タバコ副流煙とホルムアルデヒドを選択したが、明らかに変異によって、H2AXのリン酸化とH3のヒストン修飾を評価することにより、別経路で誘導されるイニシエーション、プロモーション過程をそれぞれ評価できると考えられる。

E . 結論

ヒストン H2AX(Ser139)リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3(Ser10)リン酸化により前がん遺伝子の発現制御を捉えることが可能であることが明らかになり、in vitro 新規発がんリスク評価指標候補としてさらに多種の化学物質について検証していくこととした。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y: Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutat. Res.* 741, 57-64 (2012)
- 2) Toyooka T, Amano T, Ibuki Y: Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat. Res.* 742, 84-91 (2012)
- 3) Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y: Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and ROS-mediated fluorescence -correlation with genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46,7629-7636 (2012)
- 4) Toyooka T, Shinmen T, Arts J.M., Ibuki Y: Dual effects of N-acetyl-L-cysteine dependent on NQO1 activity: suppressive or promotive of 9,10-phenanthrenequinone-induced toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264, 404-412 (2012)
- 5) Ibuki Y, Toyooka T: Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 46, 7629-7636 (2012)
- 6) Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y. UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenolpolyethoxylates-- remarkable generation of -H2AX with degradation of chemical structure. *Mutagenesis.* 28(1):7-14 (2013).

2 . 学会発表

- 1) 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化と前がん遺伝子発現制御. 環境エピゲノム研究会第7回定例会(東京) pp.2, 2012年5月.
- 2) 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによる発がんヒストン修飾変化の関連性について. 第25回変異機構研究会(愛知) pp.8, 2012年6月
- 3) 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化とがん原遺伝子発現制御. 第39回日本毒性学会学術年会(仙台) pp.232, 2012年7月
- 4) Ikuma Yoshida, Tatsushi Toyooka, Yuko Ibuki: Formaldehyde-induced histone modifications and expression of proto-oncogenes. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (Sendai) pp.232, Jul. 2012.
- 5) 伊吹裕子, 豊岡達士: たばこ副流煙によるヒスト

ン修飾変化. 第39回日本毒性学会学術年会(仙台) pp.232, 2012年7月

- 6) 伊吹裕子, 四方真理子, 吉田唯真, 豊岡達士, 若林敬二: 化学物質によるヒストン修飾変化とそれを指標とした毒性評価系の構築. 第27回発癌病理研究会(修善寺) pp.31, 2012年8月
- 7) 豊岡達士, 伊吹裕子: ヒストン H2AX のリン酸化を指標とした化学物質の遺伝毒性検出. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.156, 2012年11月
- 8) 四方真理子, 豊岡達士, 伊吹裕子: タバコ煙中発がん性物質 NNK によるヒストン修飾変化と発がんプロモーション活性. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.91, 2012年11月
- 9) 吉田唯真, 豊岡達士, 伊吹裕子: , -不飽和アルデヒドによるヒストン修飾変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.119, 2012年11月
- 10) 松下実理, 豊岡達士, 伊吹裕子: 17- -estradiol によるヒストンアセチル化と紫外線感受性変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.113, 2012年11月
- 11) 趙曉旭, 豊岡達士, 伊吹裕子: 銀は紫外線誘導ヒストン H2AX のリン酸化を増強する. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.110, 2012年11月
- 12) 久保田徹, 豊岡達士, 伊吹裕子: 非イオン界面活性剤の紫外線分解とその遺伝毒性変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.98, 2012年11月

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yokohira M, Nakano Y, Hashimoto N, Yamakawa K, Ninomiya F, Kishi S, Saoo K, Imaida K.	Toxicity of nicotine by repeated intratracheal instillation to F344 rats.		J. Toxicol. Pathol.			2012	25: 257-263
Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K.	Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay system.		Nanotoxicology			2012	in press
Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y.	ADP-ribosylation of guanosine by SC05461 protein secreted from Streptomyces coelicolor.		Toxicon			2013	63: 55-63
Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H.	Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer.		Cancer Lett			2012	in press

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H.	Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and		J Epidemiol.			2012	in press
Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y	Induction of Glandular Stomach Cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian		Int J Cancer,			2012	130:259-266,
Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y	Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX.	R.A. Baan, P.D. Josephy and T. Nohmi	Mutat. Res.	Elsevier	The Netherlands	2012	741, 57-64
Toyooka T, Amano T, Ibuki Y	Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent	R.A. Baan, P.D. Josephy and T. Nohmi	Mutat. Res.	Elsevier	The Netherlands	2012	742, 84-91
Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y	Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scatter	Jerald Schnoor	Environ. Sci. Technol.	ACS Publications	USA	2012	46,7629-7636
Toyooka T, Shinmen T, Arts J.M., Ibuki Y	Dual effects of N-acetyl-L-cysteine dependent on NQO1 activity:	Scott W. Burchiel	Toxicol. Appl. Pharmacol.	Elsevier	The Netherlands	2012	264, 404-412

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ibuki Y, Toyooka T: Nanoparticle uptake measured by flow cytometry.	Nanoparticle uptake measured by flow cytometry.	J. Reineke	Methods Mol. Biol.	Springer	The Netherlands	2012	46, 7629-7636
Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y.	UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenol polyethoxylat	David Phillips	Mutagenesis	Oxford Journal	UK	2013	28(1):7-14

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai E, <u>Yoshimi N</u> et al.	Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer.	Cancer Science	103	144-149	2012
Cui C, <u>Yoshimi N</u> et al.	The pre-neoplastic lesion, mucin-depleted foci, reveals as de novo high-grade dysplasia in rat colon carcinogenesis.	Oncology Reports	27	1365-1370	2012
Naiki, T., <u>Takahashi, S.</u> et al	Organ-specific Gsta1 expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice.	Prostate	72	533-541	2012
<u>Takahashi, S.</u> et al	Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer.	Prostate	72	1559-1572	2012
Long, N., <u>Takahashi, S.</u> et al	Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways.	Cancer Science	104	298-303	2013
Kobayashi, D., <u>Takahashi, S.</u> et al	Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model.	Prostate			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tang, D., <u>Takahashi, S.</u> et al	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-DNA adducts in benign prostate and subsequent risk for prostate cancer.	Int. J. Cancer			in press
Matsubara, S., Takasu, S., <u>Tsukamoto, T.</u> , Mutoh, M., Masuda, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y.	Induction of glandular stomach cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile.	Int J Cancer	130	259-266	2012
Jiang, J., Cao, D., <u>Tsukamoto, T.</u> , Wang, G., Jia, Z., Suo, J., Cao, X.	Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells.	Oncol Lett	5	1562-1566	2013
Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mizoshita, T., <u>Tatematsu, M.</u>	Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models.	Semin Immunopathol	35	177-190	2013
<u>Kuno T</u> , Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A, Mori H, Terasaki M, Masuda S, Tanaka T.	Organomagnesium suppresses inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj: CD-1 mice.	Carcinogenesis	34	361-9	2013
Binh NH, Satoh K, Kobayashi K, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, <u>Tomita H</u> , <u>Kuno T</u> , Hara A	Galectin-3 in preneoplastic lesions of gliomas	J Neurooncol	111	123-32	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T.	Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds.	J Biophysiol Chem	3	156-173	2012
Hata K, Kubota M, Shimizu M, Moriwaki H, Kuno T, Tanaka T, Hara A, Hirose Y.	Monosodium glutamate-induced diabetic mice are susceptible to azoxymethane-induced colon tumorigenesis.	Carcinogenesis	33	702-7	2012
Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M, Kuno T.	Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of -cryptoxanthin and hesperidin.	J Biomed Biotechnol	2012	516981	2012
Takamatsu M, Aoki H, Hirose Y, Kobayashi K, Tomita H, Kuno T, Koumura H, Hara A.	Teratoma showing the features of retinal structure: A case of sacrococcygeal teratoma.	Oncol Lett	3	1023-26	2012
Kato M, Wei M, Yamano S, Kakehashi A, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H.	DDX39 acts as a suppressor of invasion for bladder cancer.	Cancer Sci	103	1363-1369	2012
Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Tamano S, Shirai T, Wanibuchi H, Fukushima S.	Lack of Hepatocarcinogenicity of Combination of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats: Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens.	J Toxicol Pathol	25	209-214	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Xie XL, <u>Wei M</u> , Yunoki T, Kakehashi A, Yamano S, Kato M, Wanibuchi H.	Long-term treatment with l-isoleucine or l-leucine in AIN-93G diet has promoting effects on rat bladder carcinogenesis.	Food Chem Toxicol	50	3934-3940	2012
Xie XL, <u>Wei M</u> , Kakehashi A, Yamano S, Okabe K, Tajiri M, Wanibuchi H.	Dammar resin, a non-mutagen, induces oxidative stress and metabolic enzymes in the liver of gpt delta transgenic mouse which is different from a mutagen, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline.	Mutat Res	748	29-35	2012
Chung K, Nishiyama N, Wanibuchi H, Yamano S, Hanada S, <u>Wei M</u> , Suehiro S, Kakehashi A.	AGR2 as a potential biomarker of human lung adenocarcinoma.	Osaka City Med J	58	13-24	2012
Takeshi Toyoda, Jun-ichi Akagi, Young-Man Cho, Yasuko Mizuta, Saeko Onami, Isamu Suzuki and <u>Kumiko Ogawa</u>	Detection of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of <i>Mus musculus</i> treated with <i>N</i> -(4-hydroxybutyl)- <i>N</i> -(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats	J. Toxicol. Pathol.	26	in press	2013