

厚生労働行政推進調査事業費補助金

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 H26-化学-指定-001)

平成28年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉見 直己

平成29(2017)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 | 1-11  |
| 吉見 直己                                 |       |
| ・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               | 12-13 |
| 吉見 直己                                 |       |
| 2．胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発                | 14-16 |
| 塚本 徹哉                                 |       |
| 3．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  | 17-18 |
| 魏 民                                   |       |
| 4．肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発                 | 19-24 |
| 横平 政直                                 |       |
| 5．膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発             | 25-29 |
| 小川 久美子                                |       |
| 6．前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発               | 30-32 |
| 鈴木 周五                                 |       |
| 7．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      | 33-35 |
| 戸塚 ゆ加里                                |       |
| 8．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    | 36-38 |
| 伊吹 裕子                                 |       |
| ・研究成果の刊行に関する一覧表                       | 39-41 |
| ・研究班名簿                                | 42    |

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 試験等の変異原試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの危険性の確認が必要であるものの、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、行政的な化学物質の安全対策の観点において、本研究では化学物質の発がん性検証に病理組織診断法を利用する短・中期のバイオアッセイ系の開発を目的とした。大腸と肺臓モデルでの病理組織学的なバイオマーカーであるそれぞれ aberrant crypt foci (ACF) と NapsinA は、短・中期発がん予測モデルへ提唱できる準備が整ってきた。加えて、新たに DNA 損傷依存的ヒストン修飾蛋白である H2AX が膀胱癌の早期病巣同定の予測マーカーとして有用である可能性を見いだした。本年度は、本研究班で検討してきた多施設共同での動物臓器供与システムを利用して検討し、H2AX が他臓器においても発がん性化学物質暴露における早期マーカーとしての可能性を見いだした。また、新たに化学物質に暴露された動物系における発がん予測モデルを遺伝子マーカーの利用により超短期に検出できる可能性を認め、今後の検証の必要性をみた。さらに、マウス肝臓 DNA アダクトーム解析により遺伝性発がん物質と非遺伝性発がん物質を区別できる可能性が示唆された。

| 研究分担者  | 所属機関                                 | 職名    |
|--------|--------------------------------------|-------|
| 吉見 直己  | 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学                   | 教授    |
| 塚本 徹哉  | 藤田保健衛生大学・病理学                         | 准教授   |
| 魏 民    | 大阪市立大学大学院医学研究科・分子病理学                 | 准教授   |
| 横平 政直  | 香川大学医学部・病理学                          | 准教授   |
| 小川 久美子 | 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター 病理部・実験病理学 | 部長    |
| 鈴木 周五  | 名古屋市立大学大学院医学研究科・実験病態病理学              | 研究員   |
| 戸塚 ゆ加里 | 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野             | ユニット長 |
| 伊吹 裕子  | 静岡県立大学食品栄養科学部・環境生命科学科                | 教授    |

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、培養細胞での方法論は、生体での変化を確認することは困難である。そのため、動物モデルでの評価法はいまだに必要不可欠と考えられるが、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る我々研究者も当然考慮すべきものである。このため、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はその一つの解決策と考えている。実際、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、ヒトのがんの診断に病理組織診断が利用されるようになった 150 年ほどの間に、生検標本での病理診断技術の発達は、内視鏡的にも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組織を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機序の視点でのものであり、微小な病理組織での判定はなされていなかった。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、その肉眼的な腫瘍形成に拘わらず、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものを

A．研究目的

本研究では、短・中期発がん予測バイオアッセイ系の開発と検証が目的であり、化学物質の安全評価の迅速化、高度化、標準化を目指している。特に発がん予測評価手法の標準化を目標とする。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は、法的に動物実験系ができなくなるため、代替実験法の開発が急がれ、最近で

指標とする試験法の検証を目指すことにした。

加えて、動物使用数を減少させるため、臓器専門性を有する多施設間での動物の共有システムの検討を目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 多施設共同システム構築

一昨年度(26年度)の多施設共同評価のために作成した動物処理マニュアルの若干の修正を各施設に要請した。多施設間で臓器を担当施設に搬送し、その分野での病理組織学的変化を呈する病変を検討した。今年度は特に、H2AXとin vitro系実験に利用して、検討された。

### 2) 中・短期バイオアッセイ系

#### 胃

#### 1. ラット胃粘膜における H2AX の発現

多施設共有システムにおいて名古屋市立大学がラットで行った実験の胃組織を用いて胃発がん性の検討を行った。すなわち、6週齢オスF344ラットに、15 mg/kg 体重 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、5 mg/kg 体重 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、10 mg/kg 体重 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)、5 mg/kg 体重 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を週5回×4週間強制胃内投与した。MNNGは直接発がん物質であり、DMAB、DMN、DMHは間接発がん物質である。また、対照群には水を投与した。実験第28日に屠殺し、胃組織を採取し、胃体部前庭部境界部の一部より total RNA を抽出し、残りをホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。Hematoxylin eosin (HE)染色および H2AX (抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology)免疫染色を施行し、胃底腺、幽門腺領域に関して、腺管あたりの H2AX 陽性細胞数をカウントした。また、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)を内部標準にヒストン H2AX (h2afx)、p53 に応答する分子として p21waf1、幽門腺領域の pepsinogen として pepsinogen c (pgc)、胃底腺領域の pepsinogen として pepsinogen a5 (pga5)の遺伝子発現の変化を SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kits, QIAGEN) を用いて定量的 RT-PCR 法により検討した。PCR primer の配列は以下の通りである。gapdh (forward: CTAAGTGGGCTCTCCACCCAT; reverse: TTGTCATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT)、h2afx (forward: GGGCCTAGCTATCCCTCTCCCT; reverse: CTGCAAAAGTTCCAGTTCAGAAGCCAGA)、p21waf1 (forward: CACACAGGAGCAAAGTATGCCGTCGTC; reverse: TGGCGAAGTCAAAGTTCACCGTT)、pgc (forward: GTGCCACCCACCGCCTTGCCAG; reverse:

TGCCACCGTTAGACCCCTG)、pga5 (forward: ACCTACCCAGTGCCAGCCAGT; reverse: ATCAAACACGGTGAAGTACAGCCTCAGGA)。数値は Kruskal-Wallis test および Dunn's multiple comparisons test により統計学的に解析した。

#### 大腸

#### 1) 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

多施設共有システムにより、香川大の検体に関して検討した。

肺臓発がんモデルに使用される N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を飲料水として処理された30週の雄F344ラット大腸粘膜を観察した。

#### 2) 大腸粘膜における H2AX の発現変動

5週齢の雄F344ラット18匹にAOM(15 mg/kg BW)を腹腔内投与し、その1週間後に同量のAOMを再度腹腔内投与した。2回目の投与から3日後、1週間後、2週間後にそれぞれ6匹ずつ屠殺し、大腸をホルマリン固定後、スイスロール状に包埋してパラフィン切片を作成した。H2AX 免疫染色(抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology)を試行し、全長が確認できる crypt 内の細胞数をカウントし、その中の陽性細胞数をカウントして陽性率を算出した。

#### 肝臓

#### 1. 超短期発がん性予測モデルの開発

公的データベースである Open TG-GATEs 遺伝子発現データベースを用いて、遺伝子マーカー群の探索と抽出を行った。約150化合物のうち既知の遺伝毒性肝発がん物質(5物質)についての遺伝子発現データがあり、これら5物質のラット単回投与24時間後で共通して発現変化を示す遺伝子群を探索した。

次に単回投与24時間後における抽出した遺伝子マーカー群の遺伝子発現データを使用し、遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質(14物質)を区別できる予測モデルの構築を行った。

#### 2. モデル精度検証

公的データベースである Open TG-GATEs 遺伝子 Open TG-GATEs には含まれていない遺伝毒性肝発がん物質(計5物質)について、新たにラット単回投与試験を行い、投与24時間後の肝臓を摘出し、10遺伝子マーカー群の遺伝子発現変化を qPCR にて測定した。

## 肺臓

2006年～2014年に香川大で実施した6週齢または7週齢で開始したF344ラットによる実験の肺ブロック標本を用いて検討を行った。用いた肺ブロック材料は14実験群で、発がん物質はN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)、urethane, DMN, benzo[a]pyren (B(a)P), NNKである。検討した週齢は13週から30週と幅がある。各群、3匹ずつの肺について検討した。

## 免疫組織学的検討

H2AXの染色に関して、抗体は、Phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody (Cell Signaling, MA, USA)を用いた。すべての染色行程はベンタナ自動免疫染色装置 (VENTANA Discovery XT system, VENTANA medical Systems, AZ, USA)を使用した。クエン酸buffer (CC2 extended (90分))で抗原賦活化を行い、1次抗体は10倍希釈で60分、2次抗体 (rabbit) は30分反応させた。形態的に変化の見られない肺胞上皮について、細胞1000個以上あたりのH2AX陽性細胞数を計測し、その割合 (%) を算出した。

## 膀胱

- 6週齢の雄B6C3F1マウスに、0.05% BBN、0.6% 2-NA、0.025% 2-AAF、1% *p*-Cresidine、0.125% BMP、0.1% PEITC、0.01% DMA、0.45% Melamine、3% Uracil、0.04% Glycidol、0.001% DENおよび0.005% AAを4週間混餌または飲水投与し、投与終了時または2週間の休薬後に各群5匹を解剖し、膀胱上皮でのH2AX/Ki67発現を免疫組織化学的に検索した。
- 多施設共同システムを利用して、名古屋市立大学 (F344ラットに遺伝毒性発がん物質8種を週5日、4週間強制経口投与) および国立がん研究センター研究所 (F344ラットにノルハルマン代謝物2種を4週間混餌投与) から提供された膀胱を用いて、H2AX/Ki67発現を検索した。

## 前立腺

6週齢F344雄ラットに、PhIPを15 mg/kg、BOP、7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を5 mg/kg、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) を10 mg/kgで週に5回強制胃内投与し、4週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。肝臓、大腸、膀胱および血液を各分担研究者に要望された状態 (凍結およびホルマリン固定) で送付した。前立腺組織については免疫組織染色を行い、H2AX, HMGB2 および Ki67 の

標識率を前立腺腹葉、側葉および背葉において検討した。

## 3) 新規 in vitro 発がん性予測試験

### 網羅的なDNA付加体解析法

雄性F344ラット (各群それぞれ5匹) にDEN(0.001%)、*o*-Tolidine-2HCl(0.015%)、COP(1.0%)、ENU(0.001%)、DEHP(1.2%)、DO(0.5%)を4週間飲水投与を行った後、肝臓を摘出した。DNAを抽出後、各種ヌクレアーゼによりDNAをモノヌクレオシドに分解し、DNA付加体を、質量分析機器を用いて解析した。

得られたデータを主成分解析により解析し、それぞれの化学物質投与に相関する付加体の抽出を実施した。

### ヒストン修飾を指標とした評価法

#### 1. 界面活性剤NPE0による-H2AX誘導機構の検討

ヒト培養細胞株 (MCF7 ヒト乳がん細胞) に界面活性剤 (nonylphenol polyethoxylate (NPE0)) 作用を行い、一定時間で培養した後、ウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法により、H2AX、deoxyribonuclease I (DNase I)、actin変化を解析した。

#### 2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾の解析法

Methylnitrosourea (MNU), 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), dimethylnitrosamine (DMN), dimethylhydrazine (DMH) を4週間投与したF344ラットから採取した肝臓を多施設共有システムにより各市大から供給を受けた。各組織50-80mgからヒストンを抽出し、ウェスタンブロット法により解析を行った。

## 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。特に動物試験における3R (代替法活用、使用数削減、苦痛軽減) の原則を遵守した。

## C. 研究結果

### 1) 多施設共同システム構築

図1のように、各施設でのマニュアル (図2) に沿う形で摘出された臓器を一部施設間ないし一方向で搬送した。

図1 今回実施した多施設の関連図

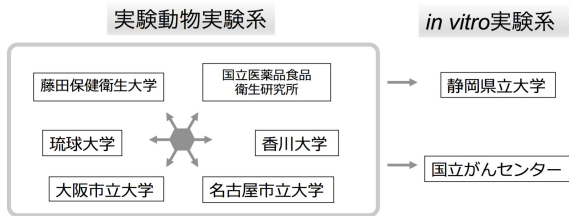
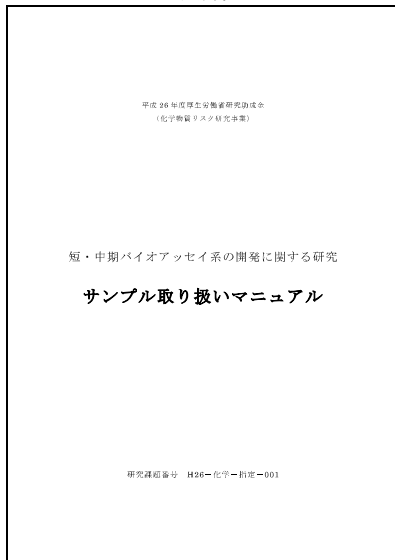


図2 マニュアル表紙



## 2) 中・短期バイオアッセイ系

### 胃

ラット胃底腺、幽門腺の増殖帯における1腺管あたりの-H2AX陽性細胞数を計測した。Control群、PhIP群、BOP群、MNNG群、DMBA群それぞれで、幽門腺領域では、 $2.57 \pm 0.48$ 、 $3.86 \pm 0.38$ 、 $2.73 \pm 0.50$ 、 $4.82 \pm 0.55$ 、 $3.33 \pm 0.38$  個/腺管 (AVE $\pm$ SD)とPhIP群 ( $P < 0.05$ )で-H2AX陽性細胞数の有意な上昇があった。胃底腺領域では、 $2.18 \pm 0.25$ 、 $4.12 \pm 0.83$ 、 $2.85 \pm 0.44$ 、 $3.28 \pm 0.69$ 、 $3.23 \pm 0.42$  個/腺管 (AVE $\pm$ SD)と、PhIP群とMNNG群 ( $P < 0.05$ )で-H2AX陽性細胞数の有意な上昇が見られた。表層のアポトーシス細胞は、それぞれ、 $0.18 \pm 0.12$ 、 $0.52 \pm 0.50$ 、 $0.23 \pm 0.05$ 、 $3.58 \pm 1.30$ 、 $0.28 \pm 0.13$  個とMNNG群で有意な増加が見られた ( $P < 0.005$ )。各種遺伝子発現の検討では、Control群を1とすると、PhIP (  $\text{Log}_2 = -0.51 \pm 0.17$ ,  $P < 0.01$ )、BOP ( $-0.71 \pm 0.67$ , NS)、MNNG ( $-0.65 \pm 0.50$ ,  $P < 0.05$ )、DMBA ( $-0.71 \pm 0.23$ ,  $P < 0.01$ ) 群でh2afx mRNAの発現が有意に低下した。また、p21 mRNAの発現をみるとControl群1に対し

て、それぞれ、 $\text{Log}_2 = 0.18 \pm 0.48$ 、 $0.39 \pm 0.26$ 、 $0.52 \pm 0.26$ 、 $0.13 \pm 0.17$ とMNNG群での発現が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。Pepsinogen CおよびAについては、各群で有意な変動は見られなかった。

### 大腸

#### 1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認

多施設共有システムにおける香川大の検体のうち、0.1%DHPNを2週間飲水投与した大腸粘膜に、ACFを $53.5 \pm 18.3$ を観察し、4個以上の腺管を有するもの $24.7 \pm 11.0$ 観察された。一部その組織像も確認したが、明らかな異型腺管増生を認め、微少腺腫と考えられ、対象物質の主なる標的臓器ではないために、顕在化しないまでも、物質の発がん性の可能性が示唆された。

#### 2. 大腸粘膜におけるH2AXの発現変動

F344雄ラット大腸粘膜のH2AX陽性率は、3日後群で $1.66 \pm 0.6$  (対照群:  $0.85 \pm 0.3$ )、1週後群で $0.13 \pm 0.1$  (対照群:  $0.11 \pm 0.1$ )、2週後群で $0.08 \pm 0.1$  (対照群:  $0.00 \pm 0.2$ )であり、極めて早期での3日後群では増加傾向を認めた。

### 肝臓

#### 1. 超短期発がん性予測モデルの開発

計10遺伝子が抽出され、これらを次の予測モデル構築で使う遺伝子マーカー群として同定できた。

構築した予測モデルを用いて、Open TG-GATEsにある遺伝毒性肝発がん物質 (計5物質)とそれ以外の物質 (計53物質)について判定した結果、高い正答率(91%)で遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を判別できることを確認した。

#### 2. モデル精度検証

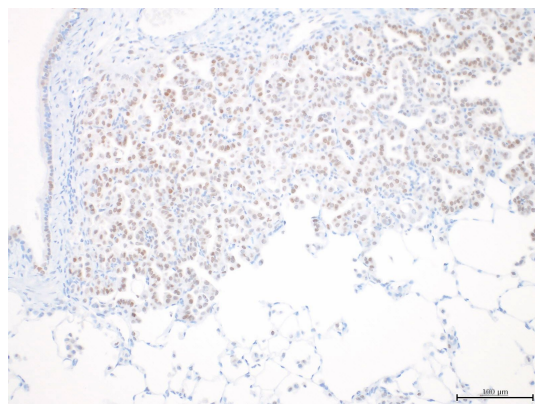
投与24時間後の肝臓を摘出し、10遺伝子マーカー群の遺伝子発現変化をqPCRにて測定した。その結果を予測モデルに当てはめた結果、全ての物質について陽性判定が得られ、単回投与24時間後の遺伝子マーカー群の遺伝子発現変化を測定し、構築した予測モデルを使うことで、遺伝毒性肝発がん物質を検出できる可能性が示唆された(図3)。

図 3

遺伝毒性肝発がん物質検出予測モデル開発



図 4 ラット、気管支肺胞腺腫における H2AX の発現 (14EX DHPN, 16w)



肺臓

気管支肺胞腺腫においては、H2AX 発現細胞が多く認められた(図4)。一方、正常肺胞上皮については陽性細胞が散見されるのみであった。これらの陽性細胞数を集計したものが表1である。今回の12週以降の検討では、発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。一部の実験は経時的な変化を検討するものであり、DHPN 投与後、H2AX の経時的発現変化についての結果が期待された。しかしながら、その発現率に変化は認められなかった。また、実験ごとに、H2AX の発現に差が見られた。

表 1 正常肺胞上皮における H2AX 発現率

| 実験群 | 化学物質名     | H2AX 発現率(%, 週齢)   |
|-----|-----------|-------------------|
| 1   | Untreated | 1.4 ± 0.5 (13W)   |
| 2   | Untreated | 6.4 ± 2.8 (23W)   |
| 3   | DHPN      | 24.6 ± 10.4 (16W) |
| 3   | urethane  | 21.6 ± 2.1 (16W)  |
| 3   | DMN       | 25.7 ± 1.9 (16W)  |
| 3   | B(a)P     | 22.4 ± 2.8 (16W)  |
| 4   | DHPN      | 5.0 ± 2.4 (12W)   |
| 4   | DHPN      | 7.5 ± 3.1 (16W)   |
| 4   | DHPN      | 3.1 ± 4.1 (23W)   |
| 4   | DHPN      | 3.7 ± 2.9 (30W)   |
| 5   | NNK       | 1.4 ± 0.5 (12W)   |
| 5   | NNK       | 4.1 ± 1.3 (16W)   |
| 5   | NNK       | 2.3 ± 1.7 (23W)   |
| 5   | NNK       | 1.9 ± 0.7 (30W)   |

膀胱

- 4週時の検討において、遺伝毒性膀胱発がん物質であるBBN、2-AAF、および*p*-Cresidineを投与したマウスでは、ラットと同様にH2AXの有意な発現上昇が認められた。一方、マウスに対し膀胱発がん性のない2-NA、Glycidol、DENおよびAA投与群では、対照群と同じ発現レベルにとどまった。この結果から、H2AXは遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として、マウスモデルにおいても有効である可能性が示唆された。しかし、2-AAF投与マウスにおけるH2AX陽性細胞は、ラットと異なりumbrella cellが主体で、Ki67発現の上昇は伴わなかった。2-AAF代謝における種差により、細胞傷害の標的が異なる可能性が考えられた。また、PEITCおよびUracil投与群においても、H2AX/Ki67発現の有意な上昇が認められたことから、細胞増殖活性に伴うH2AXの誘導を考慮する必要があると思われる。
- 名市大サンプル: H2AX発現はDMABおよびBOP投与群で有意に増加し、MNU投与群でも増加傾向が認められた。Ki67陽性細胞の割合は、いずれの投与群でも対照群と有意な差はみられなかった。DMABおよびBOPはそれぞれハムスターとラットへの皮下投与、BOPとMNUはカテーテルを用いたラット膀胱内投与による膀胱発がん性が報告されていることから、H2AX発現は遺伝毒性物質による潜在的な膀胱発がん性の指標になり得る可能性が示された。国がんサンプル: 4週間のAPNH(アニリンのノルハルマン代謝物)投与により、膀胱粘膜でのH2AX発現は有意に増加した。2週間の休薬後には減少したが、対照群よりも高いレベルを維持していた。AMPNH(オトルイジンのノルハルマン代謝物)投与群にお

いても、統計学的有意差はないものの、H2AX 発現の増加傾向が認められ、6 週後の発現レベルは対照群よりも有意に高かった。AMPNH/APNH はともに、4 週時点での Ki67 発現を増加させた。APNH は遺伝毒性およびラット膀胱への発がん性が報告されており、遺伝毒性膀胱発がん物質検出指標としての H2AX の有用性を示唆する結果と考えられた。

### 前立腺

4 週間の経口投与と実験において、PhIP 投与による H2AX の有意な標識率上昇は見られなかったものの、他は H2AX、HMGB2 および Ki67 いずれにおいても 2 日間投与と実験と同様の結果が得られた。特に HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質をいずれかの葉で有意な標識率上昇を認め、検出することが可能だった。

去年および今年度の結果から、HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質によりいずれかの葉で有意な標識率上昇を認めた一方で、前立腺に標的性のない発がん物質についてはいずれも対照群と差がなかった。特に、皮下投与や腹腔内投与といった通常の前立腺発がんモデルで用いる投与方法ではなく、経口投与を用いても検出することが確認された。また、各物質の投与濃度も Lethal Dose, 50% (LD50) の約 1/20 で用いており、これらの結果から、28 日間反復経口投与毒性試験で得られた前立腺組織において、HMGB2 および Ki67 の免疫組織化学染色による核陽性率が、前立腺特異的発がん物質の検出法として有用である可能性を示せた。

### 3) 新規 in vitro 発がん性予測試験

#### 網羅的な DNA 付加体解析法

各種化学物質を投与したマウス肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった結果を図に示す。主成分 (PCA) 解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の 3 つのグループに分離されることがわかった (図 5)。一方、遺伝毒性発がん物質とコントロールとの比較では、肝発がん性の有無で 2 つのクラスターとして分離されることがわかった (図 6)。また、非遺伝毒性発がん物質の分離に寄与している DNA 付加体をデータベースとの比較により探索した結果、抽出された付加体は酸化ストレスに起因する付加体が多いことが推測された。現在、これら投与化学物質に由来する付加体以外の付加体の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索している。

図 5 遺伝性および非遺伝性発がん物質のアダクトーム解析と PCA 解析

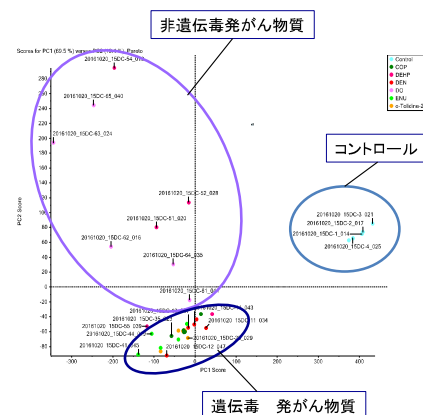
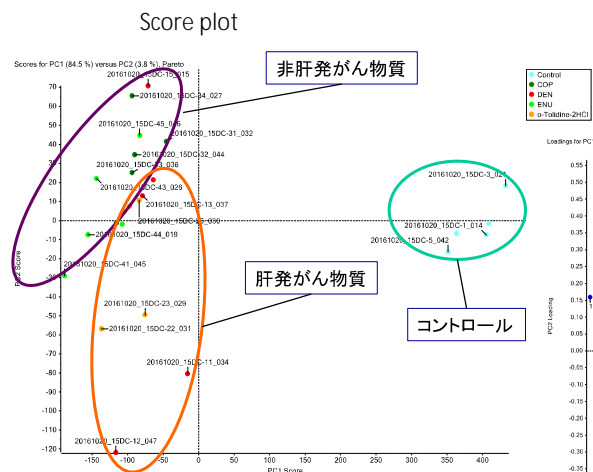


図 6 遺伝毒性発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価 (PCA 解析による)



#### ヒストン修飾を指標とした評価法

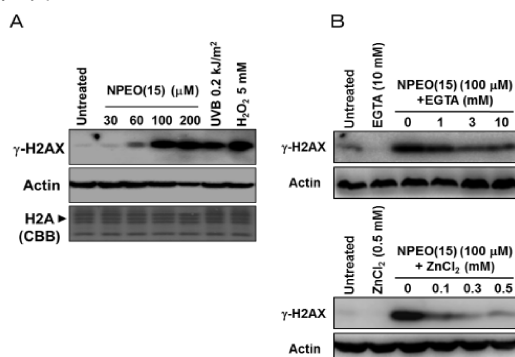
##### 1. 界面活性剤 NPEO による H2AX 誘導機構の検討

昨年度までに、陰イオン界面活性剤 (linear alkylbenzene sulfonates : LAS) 作用により、濃度依存的に H2AX が誘導されることを明らかにし、その機構について検討してきた。本年度は、非イオン界面活性剤である NPEO による H2AX の誘導とその機構について解析した。NPEO により H2AX が誘導され、この誘導は、ZnCl<sub>2</sub> や EGTA の前作用により阻害された (図 7)。一方、一般的な DNA 損傷剤である UVB や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による H2AX は ZnCl<sub>2</sub> や EGTA では抑制されなかった。ZnCl<sub>2</sub> や EGTA は、DNase I の阻害剤であることが知られている。そこで、DNase I の挙動を免疫蛍光染色法により確認したところ、通常細胞質に存在する DNase I が、NPEO 作用と共に核に移行すること、その際、H2AX が誘導



されることが示された。同時に、細胞骨格を構成し、DNase I と共存しているアクチンの崩壊が観察された。

図7 NPEO 作用後の H2AX の誘導。 A: NPEO(1)作用後、B: EGTA, ZnCl<sub>2</sub> による誘導阻害



## 2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

化学物質投与ラットから採取した肝臓からヒストンを抽出し、Western blotting により、H2AX、ヒストン H3 アセチル化 (global, K9, K14) の解析を行った。

一部の化学物質で H2A が上昇する傾向が認められたが有意ではなかった。DMN, DMH 投与により、ヒストン H3 アセチル化の変化が認められたが、化学物質の肝臓がん性や傷害性との相関は不明であった。この変化の意義についてはさらなる検討が必要である。

## D. 考察

2011 年度からの 6 年間(実質 5 年間)に班全体で臓器特異的な発がん物質を含め 50 種類を越える化学物質を検討した成果を踏まえて、考察する。

前年度までに、多施設間共有システム構築のための共有臓器摘出できる動物処理マニュアル(図2)を作成し、実際に運用し、大腸の前がん病変である ACF や肺がんバイオマーカーである NapsinA 及び H2AX の発がんバイオマーカーとしての有用性について検討した。

本研究班で検討した化学物質での ACF 発現を、改めて表 2 にまとめたが、大腸発がん物質に特異的に発現していることが判った。さらに、ACF と発がん性との関連や ACF をバイオマーカーとした大腸発がん抑制に関する論文数は極めて多く(参考 下図 8 & 9、2013 年度の本研究班での調査結果より)、今回、多施設間での検討された物質のうち、上述の DHPN 除き、大腸への発がん性を見いだしていない物質での発現は認めていない(表 2)。ACF 検出とその病理組織学的な検討は、毒性病理専門の技術を要

するものの、大腸発がん物質の評価手法として OECD ガイドラインに提唱する必要性を有し、具体的な準備体制になったと考えられた。

表 2 多施設由来の大腸(ラットおよびマウス)での ACF の発現度合い

| 標的臓器が検討臓器と一致する化学物質の陽性率 | 標的臓器が検討臓器と一致しない、ないし不明の化学物質の陽性率 |
|------------------------|--------------------------------|
| 2 / 2<br>(AOM & DMH)   | 1 / 33<br>(DHPN)               |

図 8 ACF と大腸発がん性に関連する論文数の年次推移

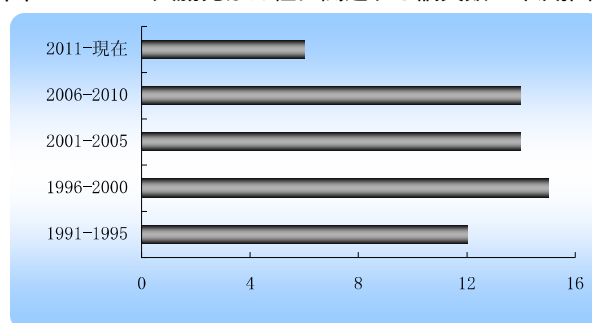
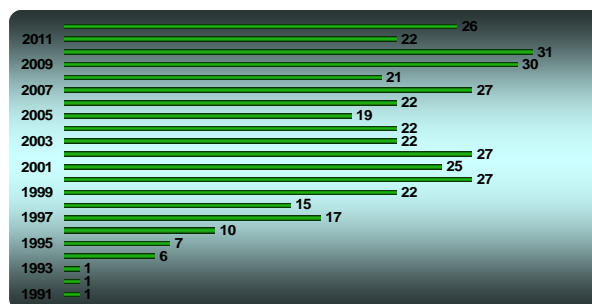
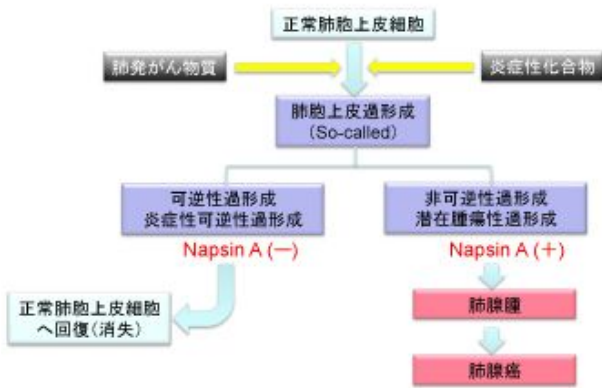


図 9 ACF をバイオマーカーとした大腸発がん抑制に関する論文数の年次推移



肺がんモデルでは、ラットにおいて DHPN、DMN、Urethane 誘発の過形成病変には NapsinA の肺胞壁内における高発現が認められ、またマウスにおいても Urethane, NNK, B[a]P で誘発された過形成病変において、Napsin A の肺胞壁内における高発現が認められた。このため、図 10 のように、NapsinA の免疫組織化学による早期病変の同定により発がん性予測が可能と考えられ、今後、同様にガイドラインの設定に向けて多施設共同による研究の推進が必要であると考えられた。

図 10 肺がんモデルにおける NapsinA 発現の予測



本研究班のなかで、提唱された新規のバイオマーカー H2AX の発現を多施設共有システムの臓器を利用して検討し、その成果を表 3 にまとめた。当初、膀胱でその有用性が示され、論文化されたが、表 3 のように、膀胱以外の各臓器における早期発現を認め、発がん物質の標的臓器に必ずしも特異的に発現していないものの、H2AX の早期の発現は各臓器での発がん予測の可能性があるものと考えられ、今後の更なる検証が必要である。しかしながら、本研究班での H2AX に関する in vitro 系の実験成果から、遺伝毒性を呈する物質が関与するだけでなく、一部遺伝毒性を有しない物質でも、DNaseI が遊離することで、DNA を切断して誘導される可能性が示され、今後、こうした視点を踏まえた動物系での発現解析も、新規マーカーとしての検証と平行して、実施する必要がある。

さらに、二つの化学物質暴露動物系を利用した迅速評価方法の新展開が示された。一つは肝臓担当者から、化学物質への動物暴露 24 時間後で、遺伝子マーカーの利用により発がん性予測の可能性を示すモデルが提唱された。今後、より多くの検証が必要と考えられるが、化学物質の評価手法の迅速化に貢献できる可能性が考えられた。二つ目として、肝臓における DNA 付加体の網羅的な解析により、遺伝毒性化学物質と非遺伝毒性化学物質を区別できる可能性を見いだした。両者ともに今後の検証研究が不可欠ではあるが、化学物質の評価手法の迅速化への新たな展開と期待される。

表 3 H2AX の各種臓器における発現のまとめ

| 検討臓器 | 検討臓器で H2AX 発現陽性を示す化学物質のうち、発がん標的臓器と一致する物質数 | 検討臓器が発がん標的臓器でない化学物質のうち、H2AX 発現陽性を示す物質数 |
|------|---|--|
| 胃    | 2 (MNU & MNNG) / 2                        | 1 (PhIP) / 6                           |
| 大腸   | 1 (AOM) / 1                               | not examined                           |
| 肝臓   | 1 (2-AAF) / 3                             | 1 (DMH) / 6                            |
| 肺臓   | 5 (DHPN, urethane, DMN, B(a)P, NNK) / 5   | not examined                           |
| 膀胱   | 4 (BBN, 2-AAF, p-cresidine, uracil) / 4   | 0 / 7                                  |
| 前立腺  | 3 (DMAB, PhIP, MNU) / 4                   | 0 / 4                                  |

#### E. 結論

今回、短・中期発がん性予測モデルとして、大腸発がん性に関しては前がん病変である ACF、肺発がん性には NapsinA が有用であり、さらに、H2AX が種々の臓器において、発がん物質による早期に誘導されるバイオマーカーとなり得ると考えられた。特に、従来からの顕在化による腫瘍形成を、毒性専門家による病理組織学的な検索での短・中期での発がん性予測は、動物実験に対する 3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)にも合致し、OECD ガイドラインとして推奨されたと考えられた。そのためには、多施設共同システムの構築を含めた毒性病理学専門家集団の育成・確立も必要であると考えられる。

さらに、本班の本年度の新たな成果であるが、ふたつの化学物質の評価手法の迅速化への新たな展開の可能性も示された。次年度以降での新たな検証が必須である。

## F. 研究発表

### 1. 著書発表

- 1) 高橋智、鈴木周五、他 前立腺がん化学予防の現状、菅原隆 編、次世代のがん治療薬・診断のための研究開発. pp27-31、技術情報協会、東京、2016.
- 2) 吉見直己、他 小腸・大腸 毒性病理組織学 (日本毒性病理学会編)、pp188-215、西村書店、東京、2017
- 3) Tsukamoto T., et al., *Helicobacter*, Laboratory Models for Foodborne Infections (Ed : Liu, D), CRC Press, London, in press

### 2. 論文発表

- 1) Cao D, Tsukamoto T., et al., 18beta-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling. *Oncotarget*. 7: 71960-71973, 2016.
- 2) Kiriya Y, Tsukamoto T., et al., Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia is irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori*. *Open J Pathol*. 6: 93-104, 2016.
- 3) Toyoda T, Tsukamoto T., et al., Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter*. 21: 131-142, 2016.
- 4) Toyoda T, Ogawa K., Tsukamoto T. et al. Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on *Helicobacter pylori*-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 21: 131-142, 2016.
- 5) Kanki M, Gi M., et al., Detection of non-genotoxic hepatocarcinogens and prediction of their mechanism of action in rats using gene marker sets. *J Toxicol Sci*. 41: 281-92, 2016.
- 6) Kakehashi A, Gi M., et al., Ethanol-Extracted Brazilian Propolis Exerts Protective Effects on Tumorigenesis in Wistar Hannover Rats. *PLoS One*. 11: e0158654, 2016.
- 7) Kato H, Suzuki S., et al., Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget*. 7: 2009-2021, 2016.
- 8) Kuno T, Suzuki S., et al., Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients*. 8: 421, 2016.

- 9) Sato S, Suzuki S., et al., Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Res*. 76: 4192-4204, 2016.
- 10) Tanaka M, Suzuki S., et al., Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget*. 7: 47242-47251, 2016.
- 11) Suzuki S., et al., Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 17: 2071, 2016.
- 12) 鈴木周五、他：前立腺発癌と炎症. 別冊 BIO Clinica、5巻、84-88, 2016.
- 13) Suzuki I, Ogawa K., et al., 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*. 29: 237-246, 2016.
- 14) Toyoda T, Ogawa K., et al., Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1,2-diol. *J Toxicol Sci*. 42: 1-11, 2017.
- 15) Suzuki I, Ogawa K., et al., Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. *J Appl Toxicol*, 37: 485-494, 2017.
- 16) Nonaka M, Ogawa K., et al., Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 86, 199-201, 2017.
- 17) Matsushita K, Ogawa K., et al., Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat. *J Toxicol Pathol*, 30 :57-62, 2017.
- 18) Cho YM, Ogawa K., et al., Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water. *J Appl Toxicol*. in press
- 19) Hirata T, Ogawa K., et al., Lack of in vivo mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of gpt delta rats administered singly or in combination. *J Appl Toxicol*. in press
- 20) Mimaki S, Totsuka Y., et al., Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis*. 37: 817-26, 2016.
- 21) Zhao X, Ibuki Y., et al., Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation

of histone H2AX. J Photochem Photobiol B. 162: 213-222, 2016.

- 22) 伊吹裕子, 化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性、Bio Clinica 31: 93-96, 2016.

### 3. 学会発表

- 1) Nakachi S, Yoshimi N. 他: The Modifying Effects of the Extract from Okinawan Sweet Potato Leaves in Mouse Colon Carcinogenesis. AACR Annual Meeting 2016, 2016年4月, ニューオリンズ
- 2) 鱒淵英機、魏 民、他. 遺伝毒性・発がん性をスクリーニングする *in vivo* 短期検索法. 第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月、名古屋
- 3) 藤岡正喜、魏 民、他. 非遺伝毒性ラット肝発がん物質ダンマル樹脂の発がん機序の検討. がん予防学術大会 2016 名古屋、2016年7月、名古屋
- 4) 藤岡正喜、魏 民、他. ラット腎癌肺高転移株を用いた転移亢進に寄与する分子生物学的特性の検討. 第13回日本病理学会カンファレンス、2016年7月、神戸
- 5) 平山幸良、魏 民、他. mTOR 阻害剤 everolimus と抗 PD-L1 抗体の併用療法による抗腫瘍効果. 第31回発癌病理研究会、2016年8月、長野
- 6) 河内聡子、魏 民、他. 1,2-DCP および DCM 複合曝露がマウス肝発がんを促進する. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 7) 魏 民、辰己久美子、他. ハムスター二段階発がんモデルにおける 1,2-DCP の発がん修飾作用. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 8) 岡田諭志、魏 民、他. EGFR・ALK 陰性原発性肺腺癌を用いた網羅的リン酸化プロテオーム解析. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 9) 横平政直、他. A possible predictable marker, napsin A, for the tumorigenic potential of lung bronchio-alveolar hyperplasia in rodents. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 10) 鈴木周五、他. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝発がん抑制効果. 第105回日本病理学会総会、2016年5月、仙台
- 11) 鈴木周五、他. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝発がん抑制効果. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 12) 加藤寛之、鈴木周五、他. 前立腺癌細胞株の同種同所移植モデルの確立. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 13) 鈴木周五、他. 前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立. 第33回日本毒性病理学会総会および学術集会、2017年1月、堺
- 14) 曾根瑞季、小川久美子、他. H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット肝臓にお

ける検討 - . 第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月、名古屋

- 15) 豊田武士、小川久美子、他. 化学物質の膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性および発がん性の短期評価系開発. 第2回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2016年9月、東京
- 16) 桐山諭和、豊田武士、小川久美子、塚本徹哉. ヒト胃癌における H2AX と p53 の免疫組織学的解析. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 17) 赤木純一、小川久美子、他. Pol I、Pol II、および Pol III の欠損はさまざまな化学物質に対して異なる感受性を示し、遺伝毒性のスクリーニングに有用である. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 18) 豊田武士、鈴木周五、小川久美子、他. 遺伝毒性膀胱発がん物質によるラット膀胱粘膜における H2AX 発現. 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017年1月、大阪
- 19) 曾根瑞季、小川久美子、他. H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット腎臓における検討 - . 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017年1月、大阪
- 20) Totsuka Y, Lin Y, et al., Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 50th Anniversary Conference IARC, 2016年6月、リヨン
- 21) Totsuka Y, Watanabe M, et al., Development of a novel *in vitro* mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials, 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 2016年8月、コペンハーゲン
- 22) 戸塚ゆ加里、林 櫻松、他. DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 23) 伴野 勲、戸塚ゆ加里、他. 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 24) 三牧幸代、戸塚ゆ加里、他. 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月、横浜
- 25) 戸塚ゆ加里. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索. 第59回日本放射線影響学会、2016年10月、広島
- 26) 佐藤 春菜、戸塚ゆ加里、他. 多層カーボンナノチューブの繊維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば
- 27) 前迫裕也、戸塚ゆ加里、他. 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析. 第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば

- 28) 戸塚ゆ加里、善家 茜、他. 次世代シーケンサーとDNAアダクトーム解析の統合による発がん要因の探索、第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば G. 知的財産権の出願・登録状況  
1. 特許取得  
該当なし
- 29) 楊光、伊吹裕子. たばこ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延、日本光医学光生物学会第38回年会、2016年7月、京都 2. 実用新案登録  
該当なし
- 30) 楊光、伊吹裕子. タバコ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延とカルボニル類の関与、第29回変異原機構研究会、2016年9月、京都 3. その他  
該当なし
- 31) 趙曉旭、伊吹裕子. 各種金属ナノ粒子によるヒストン修飾変化とその誘導メカニズムの検討、第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば
- 32) 楊光、伊吹裕子. 飽和/不飽和アルデヒド類によるヌクレオチド除去修復の阻害、第45回日本環境変異原学会、2016年11月、つくば

## 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

本研究の目的の一つは、多施設で実施される動物実験の共有化であり、大腸だけでなく、専門にしていな施設での臓器特有病変の検索のためのマニュアルの修正した。そのマニュアルを用いて、他施設で得られた大腸粘膜の検討を実施し、従来、大腸発がんの報告がなされていない化学物質の一部に、当施設で提唱するラット大腸前がん病変を少数確認した。また、本研究班における膀胱発がんモデルのグループによる新たに DNA 損傷依存的ヒストン修飾蛋白である予測マーカー候補 H2AX の発現を大腸粘膜で観察し、発癌剤投与後、比較的早い3日後で増加と、一週間後には減少していた。今後、大腸での精査が必要であった。

### 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。動物モデルでみられる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) を多施設での専門領域別エキスパート診断による発がん性予測検査法の開発の可能性の検証を、昨年度に作成した臓器摘出マニュアルを用いて、多施設での動物実験から得られる大腸粘膜で検討するとともに、本研究班における膀胱発がんモデルのグループによる新たに DNA 損傷依存的ヒストン修飾蛋白である予測マーカー候補 H2AX の発現を大腸粘膜で観察・検討した。

### B. 研究方法

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認  
多施設共有システムにより、香川大の検体に関して検討した。  
肺臓発がんモデルに使用される N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を飲料水として処理された 30 週の雄 F344 ラット大腸粘膜を観察した。
2. 大腸粘膜における H2AX の発現変動  
5 週齢の雄 F344 ラット 18 匹に AOM (15 mg/kg BW) を腹腔内投与し、その 1 週間後に同量の AOM を再度腹腔内投与した。2 回目の投与から 3 日後、1 週後、2 週後にそれぞれ 6 匹ずつ屠殺し、大腸をホルマリン固定後、スイスロール状に包埋してパラフィン切片を作成した。H2AX 免疫染色 (抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology) を試行し、全長が確認できる crypt 内の細胞数をカウントし、その中の陽性細胞数をカウントして陽性率を算出した。

(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て、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

### C. 研究結果

1. 多施設共有システムでの大腸粘膜の早期病変の確認  
香川大の検体のうち、0.1%DHPN2 週間飲水投与大腸粘膜に、ACF を  $53.5 \pm 18.3$  を観察し、4 個以上の腺管を有するもの  $24.7 \pm 11.0$  観察された。一部その組織像も確認したが、明らかな異型腺管増生を認め、微小腺腫と考えられ、対象物質の主なる標的臓器ではないために、顕在化しないまでも、物質の発癌性の可能性が示唆された。
2. 大腸粘膜における H2AX の発現変動  
F344 雄ラット大腸粘膜の H2AX 陽性率は、3 日後群で  $1.66 \pm 0.6$  (対照群:  $0.85 \pm 0.3$ )、1 週後群で  $0.13 \pm 0.1$  (対照群:  $0.11 \pm 0.1$ )、2 週後群で  $0.08 \pm 0.1$  (対照群:  $0.00 \pm 0.2$ ) であり、極めて早期での 3 日後群では増加傾向を認めた。

### D. 考察

昨年度までに、懸案であった多施設間共有システム構築のための共有臓器摘出マニュアルを作成したが、実際に、多施設における動物実験で得られた大腸粘膜での検討において、肺がんモデルで利用される DHPN や BP において、従来、大腸は標的臓器としての文献的な報告はみられないものの、今回、大腸粘膜で ACF および微小腺腫と考え

られる小巢が多数認められた。従来の発がん試験では、顕在化した腫瘍性病変のみでの検索であったことを考えると、臓器特異的な専門家による病理組織学的検索の重要性を示唆したものと思われる。本研究班での目的でもある病理組織学的な早期病変の同定の重要性が示されるとともに、発がん性未知の化学物質を検討する上で、こうした多施設での共同試験システムにより、精度を高く維持しながら、相対的に動物数の軽減につなげられると考えられた。

尚、マウス二段階大腸発がんモデルでは期待していたMDFの発現は特定できず、ACFでの予測にのみが可能と思われ、動物種の違いを改めて確認した。

## E. 結論

マウスモデルでの大腸に関する発がん性予測はACFにより可能と考えられた。また、新規化学物質リスク予測に、多施設共同システムの構築とそのエキスパートによる病理組織診断により、発がん予測を模索できると思われた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Morioka T, Yoshimi N et al. Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in Mlh1-deficient mice. Cancer Sci, 106: 217-226, 2015.

### 2. 学会発表

- 1) Nakachi S, Yoshimi N et al. The modifying effects of the extract from Okinawan sweet potato leaves in mouse colon carcinogenesis. AACR Annual Meeting 2016, 2016年4月, ニューオーリンズ

## H. 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

## 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

胃を標的とした化学発がん物質の検出のため、F344 ラットに直接あるいは間接発がん物質を強制胃内投与し、胃粘膜の  $\gamma$ -H2AX の応答を免疫組織学的に検討し、h2afx、p21、幽門腺型 pepsinogen C (pgc)、胃底腺型 pepsinogen A (pga5) mRNA 発現変動を gapdh を内部標準に定量的に解析した。その結果、直接発がん物質である MNNG のみならず、間接発がん物質である PhIP でも胃粘膜増殖帯での  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の有意な増加が確認された。MNNG 投与群では、胃粘膜表層のアポトーシス細胞の有意な増加が見られた。また、MNNG、PhIP 投与群で h2afx mRNA の発現量の有意な低下、MNNG により p21 mRNA の有意な増加を認めた。これらの変化は、DNA 損傷応答と細胞周囲の停止反応によるものと考えられ、それを利用した統計学的解析により、被験化学物質の DNA 損傷性や発がん性を推測できるモデルを構築できる可能性が示唆された。

また、ヒトでは、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染による慢性萎縮性胃炎によって、腸上皮化生の発生の未だ見られない早期から、腸上皮化生の見られる時期まで、 $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数が有意に増加した。また、進行胃がんを Stage 別に検討すると、より進行した Stage III 症例で  $\gamma$ -H2AX の発現の低下した症例で予後不良である事を明らかにした。

### A．研究目的

胃発がんにおいて *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染とそれに伴う慢性萎縮性胃炎は重要なリスクファクターである。活性酸素による DNA 損傷や異所性の activation-induced cytidine deaminase (AID) 等の発現が重要な要因と考えられている。DNA 損傷によって、Ser139 がリン酸化されたヒストン H2AX ( $\gamma$ -H2AX) が二重鎖切断点周囲にフォーカスを形成するが、発がん初期応答から発がんに至る過程における  $\gamma$ -H2AX の役割は十分解明されていない。本研究では種々の発がん物質を暴露したラット胃粘膜上皮での  $\gamma$ -H2AX の免疫染色性と  $\gamma$ -H2AX あるいはその他の遺伝子の発現の変化を検討した。また、*H. pylori* 感染ヒト胃非がん部粘膜での  $\gamma$ -H2AX の発現および進行胃がんを用いて予後を検討した。

### B．研究方法

#### 【実験1：ラット】

平成28年度吉見班多施設共同研究において名古屋市立大学・鈴木周五博士がラットで行った実験の胃組織を用いて胃発がん性の検討を行った。すなわち、6週齢オス F344 ラットに、15 mg/kg 体重 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、5 mg/kg 体重 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、10 mg/kg 体重 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)、5 mg/kg 体重 7,12-

dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を週5回×4週間強制胃内投与した。MNNGは直接発がん物質であり、PhIP、BOP、DMBAは間接発がん物質である。また、対照群には水を投与した。実験第28日に屠殺し、胃組織を採取し、胃体部前庭部境界部の一部より total RNA を抽出し、残りをホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。Hematoxylin eosin (HE)染色および  $\gamma$ -H2AX (抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology)免疫染色を施行し、胃底腺、幽門腺領域に関して、腺管あたりの  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数をカウントした。また、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)を内部標準にヒストン H2AX (h2afx)、p53 に応答する分子として p21waf1、幽門腺領域の pepsinogen として pepsinogen c (pgc)、胃底腺領域の pepsinogen として pepsinogen a5 (pga5)の遺伝子発現の変化を SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kits, QIAGEN) を用いて定量的 RT-PCR 法により検討した。PCR primer の配列は以下の通りである。gapdh (forward: CTACTGGCGTCTTCACCACCAT; reverse: TTGTCATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT), h2afx (forward: GGGCCTAGCTATCCCTCTCCCT; reverse: CTGCAAAGTTCCAGTTCAGAAGCCAGA), p21waf1 (forward: CACACAGGAGCAAAGTATGCCGTCGTC; reverse: TGGCGAAGTCAAAGTTCACCGTT),



pgc (forward: GTGCCACCACCGCCTTGACAG;  
reverse: TGCCCACCGTTAGACCCCTG)、pga5  
(forward: ACCTACCCAGTGCCAGCCAGT;  
reverse:  
ATCAAACACGGTGAAGTACAGCCTCAGGA)。数  
値は Kruskal-Wallis test および Dunn's multiple  
comparisons test により統計学的に解析した。  
P<0.05 を有意と判断した。

#### 【実験 2 : ヒト胃での検討】

*H. pylori* 非感染および感染ヒト非がん部胃粘膜  
について、炎症のない 10 例、炎症はあるが腸上皮化  
生のない 8 例、炎症があり腸上皮化生のある症例の  
腸上皮化生腺管 17 例と胃型腺管 12 例について 10  
腺窩あたりの  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数をカウントした。

ヒト胃がん 137 例について、Stage 別に  $\gamma$ -H2AX  
の発現と予後を検討した。 $\gamma$ -H2AX は、腫瘍の 10%  
以上が陽性的の場合 : expressed (正常)、10%未満の  
場合 : suppressed (異常 : 反応性低下) と判定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究に関しては、藤田保健衛生大学医学部倫理  
審査委員会の承認を得、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。

動物実験は、動物の適正な実施に向けたガイドラ  
イン (日本学術会議、2006 年) 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

#### 【実験 1 : ラット】

ラット胃底腺、幽門腺の増殖帯における 1 腺管あ  
たりの  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数を計測した。Control 群、  
PhIP 群、BOP 群、MNNG 群、DMBA 群それぞれ  
で、幽門腺領域では、 $2.57 \pm 0.48$ 、 $3.86 \pm 0.38$ 、  
 $2.73 \pm 0.50$ 、 $4.82 \pm 0.55$ 、 $3.33 \pm 0.38$  個/腺管 (AVE $\pm$ SD)  
と PhIP 群 (P<0.05) で  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数の有意な  
上昇があった。胃底腺領域では、 $2.18 \pm 0.25$ 、  
 $4.12 \pm 0.83$ 、 $2.85 \pm 0.44$ 、 $3.28 \pm 0.69$ 、 $3.23 \pm 0.42$  個/腺  
管 (AVE $\pm$ SD) と、PhIP 群と MNNG 群 (P<0.05) で  
 $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数の有意な上昇が見られた。表層  
のアポトーシス細胞は、それぞれ、 $0.18 \pm 0.12$ 、  
 $0.52 \pm 0.50$ 、 $0.23 \pm 0.05$ 、 $3.58 \pm 1.30$ 、 $0.28 \pm 0.13$  個と  
MNNG 群で有意な増加が見られた (P<0.005)。

各種遺伝子発現の検討では、Control 群を 1 とす  
ると、PhIP (  $\text{Log}_2 = -0.51 \pm 0.17$ , P<0.01)、BOP  
( $-0.71 \pm 0.67$ , NS)、MNNG ( $-0.65 \pm 0.50$ , P<0.05)、  
DMBA ( $-0.71 \pm 0.23$ , P<0.01) 群で h2afx mRNA の発  
現が有意に低下した。また、p21 mRNA の発現をみ  
ると Control 群 1 に対して、それぞれ、  
 $\text{Log}_2 = 0.18 \pm 0.48$ 、 $0.39 \pm 0.26$ 、 $0.52 \pm 0.26$ 、 $0.13 \pm 0.17$   
と MNNG 群での発現が有意に上昇した (P<0.05)。  
Pepsinogen C および A については、各群で有意な

変動は見られなかった。

#### 【実験 2 : ヒト胃粘膜】

ヒト非がん部胃粘膜では、炎症のない症例、炎症  
はあるが腸上皮化生のない症例、炎症があり腸上皮  
化生のある症例の腸上皮化生腺管と胃型腺管の  
 $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数は、それぞれ  $2.03 \pm 1.33$ 、  
 $6.01 \pm 4.21$ 、 $7.91 \pm 4.80$ 、 $8.44 \pm 5.00$  個/腺管であり、  
*H. pylori* 感染による慢性萎縮性胃炎の発生ととも  
に有意に増加することが明らかとなった (P<0.05)。

予後の検討では、Stage III の症例では  $\gamma$ -H2AX  
suppressed (反応性低下) の方が expressed より予  
後が悪かった (Log rank test, P<0.05)。一方、Stage  
I, II では有意な差は見られなかった。

### D . 考察

#### 【実験 1 : ラット】

既知の胃発がん物質 MNNG (直接発がん物質) お  
よび大腸あるいは乳腺発がん物質である PhIP によ  
り胃腺管増殖帯で  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の増加が見られ  
た。一方、胃発がん性の報告されていない BOP、  
DMBA では  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の有意な増加はなく  
予想通りの結果であった。胃発がん性の報告されて  
いない PhIP で  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞数増加が確認され  
たことから、その胃発がん性の検討を要すると考え  
られた。遺伝子発現の解析では、組織学的に  $\gamma$ -H2AX  
陽性細胞数を定量的に計測することで、化学物質の  
DNA 損傷性さらにその発がん性の推測が可能であ  
り、未知の胃発がん性物質のスクリーニングが可能  
となることが示唆された。

遺伝子発現の検討では、PhIP、MNNG、DMBA  
群で h2afx mRNA の有意な低下が見られ、MNNG  
群で p21 mRNA の有意な上昇が観察された。DNA  
損傷に伴う細胞周囲の停止が関与している可能性が  
示唆された。

#### 【実験 2 : ヒト胃粘膜】

非がん部では、*H. pylori* 感染とそれによる慢性胃  
炎の発症とともに  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞が有意に増加  
した。炎症に伴う活性酸素等の産生や AID の異所性  
発現が DNA 損傷を誘発し、胃発がんに寄与する可  
能性が示唆された。

一部の白血病や頭頸部扁平上皮がん H2AX 遺伝  
子 (*H2AFX*) の存在する染色体 11q23 領域の変異  
や欠失が起こるとの報告や *H2afx*(-/-) マウスでは  
DNA 二重鎖切断の修復に障害があるとの報告もあ  
り、がん抑制遺伝子としての側面を持つと考えられ  
る。今回の進行胃がんの検討においても、Stage III  
などのより進行した症例で  $\gamma$ -H2AX 発現低下症例  
の予後が悪い結果であり、発がん後期でのその重要  
性が示唆された。

### E . 結論

実験動物を用いた  $\gamma$ -H2AX の免疫組織学的定量的解析、h2afx および p21 mRNA 遺伝子発現変動を利用した統計学的解析を行う事で、被験化学物質の DNA 損傷性や発がん性を推測できるモデルが有用である可能性が示唆された。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Cao, D, Jiang, J, You, L, Jia, Z, Tsukamoto, T, Cai, H, Wang, S, Hou, Z, Suo, YE, Cao, X. The protective effects of 18beta-glycyrrhetic acid on Helicobacter pylori-infected gastric mucosa in Mongolian gerbils. Biomed Res Int 2016: 4943793, 2016.
- 2) Cao, D., Jia, Z., You, L., Wu, Y., Hou, Z., Suo, Y., Zhang, H., Wen, S., Tsukamoto, T., Oshima, M., Jiang, J., Cao, X. 18beta-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling. Oncotarget 7: 71960-71973, 2016.
- 3) Jiang, J, Cao, D, Jia, Z, You, L, Tsukamoto, T, Hou, Z, Suo, Y, Wang, S, Cao, X. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. Int J Clin Exp Med 9: 2479-2485, 2016.
- 4) Kiriya, Y, Tahara, T, Shibata, T, Okubo, M, Nakagawa, M, Okabe, A, Ohmiya, N, Kuroda, M, Sugioka, A, Ichinose, M, Tatematsu, M, Tsukamoto, T. Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia is irreversible point with eradication of Helicobacter pylori. Open J Pathol 6: 93-104, 2016.
- 5) Shimoda, M, Horiuchi, K, Sasaki, A, Tsukamoto, T, Okabayashi, K, Hasegawa, H, Kitagawa, Y, Okada, Y. Epithelial Cell-Derived a Disintegrin and Metalloproteinase-17 Confers Resistance to

Colonic Inflammation Through EGFR Activation. EBioMedicine 5: 114-124, 2016.

- 6) Toyoda, T, Shi, L, Takasu, S, Cho, YM, Kiriya, Y, Nishikawa, A, Ogawa, K, Tatematsu, M, Tsukamoto, T. Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. Helicobacter 21: 131-142, 2016.
- 7) Tsukamoto, T, Kiriya, Y, Tatematsu, M. Chapter 22. Helicobacter. In: Liu, D, ed. Laboratory Models for Foodborne Infections. London, UK: Taylor and Francis, CRC Press, 2017 (in press).

### 2. 学会発表

- 1) Kiriya, Y., Tsukamoto, T. Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia as an irreversible point with eradication of Helicobacter pylori in the human stomach. 10th AACR-JCA Joint Conference, Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics (Maui, HI, USA) 10: 105, 2016.
- 2) 桐山諭和, 立松正衛, 塚本徹哉 H pylori除菌によってどのような病変が改善するのか 胃腺管単位での検討. 日本毒性病理学会講演要旨集 32回: 83, 2016.

## H.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。

## 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

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

遺伝毒性肝発がん物質の発がん性を短期で高精度に検出する *in vivo* スクリーニング系の確立を目的とした研究を実施した。まず初めに官民共同プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクト（TGP）で取得されたラット単回投与後 24 時間までの肝臓における遺伝子発現データを用いて、遺伝毒性肝発がん物質で共通して発現変化を示す遺伝子（遺伝子マーカー群）を探索した。結果、5 化合物の遺伝毒性肝発がん物質で共通して発現変化を示す 10 遺伝子（G1rx3, Phlda3, Mok, Aen, Mybl1, RGD1308114, Cdkn1a, Fam49a, Atp6v1f, Nudt5）が得られた。次に抽出された 10 遺伝子マーカーセットをもとに、遺伝毒性肝発がん物質を検出できる数理的予測モデルの構築を試みた。結果、遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を区別できる予測モデルとして、感度 100%、特異度 96.3%、正答率 91.7%の精度を保持する予測モデルが構築できた。最後に構築した数理的予測モデルの検証として、5 種の既知遺伝毒性肝発がん物質について、ラット単回投与動物試験を行い、qPCR 法にて、遺伝子マーカーセットの発現データを取得し、構築した予測モデルに発がん性を予測させた結果、全ての物質について、陽性判定が得られた。本研究で確立した遺伝毒性肝発がん物質の検出系は、従来の肝発がん性評価系と比較して、短期間かつ安価に評価できる新規評価系としての活用が期待される。

### A．研究目的

化学物質の発がん性リスクは *in vitro* 及び *in vivo* で評価される。*In vivo* ではげっ歯類を用いた2年間のがん原生試験または代替法である中期発がん性試験やトランスジェニックマウスを用いた6ヵ月反復投与試験によって評価される。これらの試験の実施には多大な費用及び時間、動物数を必要とするため、より短期で簡便に発がん性リスクを評価できる手法の開発が求められている。また *in vitro* では、変異原性を調べる Ames 試験、染色体異常を調べる小核試験があるが、これらの評価系は高い偽陽性率が課題とされている。さらに発がん性を検索すべき化学物質は膨大な数であり、それらを既存の発がん試験法（がん原性試験や短期・中期の代替試験など）で検索することは現実的に不可能である。これらのことから、より短期間かつ包括的に、遺伝毒性発がん物質をスクリーニングできる手法の開発が必要である

本研究では上記の課題を解決するため、遺伝毒性肝発がん物質の発がん性をより短期で高精度に検出する *in vivo* スクリーニング系の確立を目的として、下記の3つの検討を行った。

検討 1 では、官民共同プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクト（TGP）で取得されたラット単回投与24時間までの肝臓における遺伝子発現データを用いて、遺伝毒性肝発がん物質で共通して発現変化を示す遺伝子（遺伝子マーカー群）を探索した。検討 2 では、検討 1 で抽出された遺伝子マーカー群をもとに遺伝毒性肝発がん物質を高感度かつ高特異度で検出できる数理的予測モデルの構築を試みた。検討 3 では、構築した数理的予測モデルの検証

として、複数の既知遺伝毒性肝発がん物質及び非遺伝毒性肝発がん物質について、ラット単回投与試験を行い、遺伝子マーカー群の発現データを取得後に、構築した予測モデルに発がん性を予測させ、その結果の妥当性を検証した。

### B．研究方法

検討 1 では、公的データベースである Open TG-GATEs に格納されている 5 種の遺伝毒性肝発がん物質（DEN, AAF, 2-nitrofluorene, N-nitrosomorpholine, Aflatoxin B1）のラット単回投与 24 時間後の肝臓における遺伝子発現データを用いて、共通して発現変化を示す遺伝子群を探索した。

検討 2 では、検討 1 で得られた遺伝子マーカーセットと Open TG-GATEs に格納されている遺伝子発現データを用いて、遺伝子解析ソフト（GeneSpring）で利用できるサポートベクターマシン（SVM）によって、遺伝毒性肝発がん物質（5 物質）とそれ以外の物質（53 物質）を区別できる予測モデルの構築を試みた。

検討 3 では、Open TG-GATEs に含まれていない既知の遺伝毒性肝発がん物質（2-Aminoanthraquinone, 2-Nitropropane, 2,4-Diaminotoluene, MeIQx 及び IQ の計 5 種）について、ラット単回投与 24 時間試験を実施し、10 遺伝子マーカーセットを qPCR で測定し、予測モデルで判定させてモデルの妥当性を検証した。

（倫理面への配慮）

大阪市立大学の動物飼育施設における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した。

### C. 研究結果

検討 1 では、5 化合物で共通して発現変化を示す 10 遺伝子 (Glr3, Phlda3, Mok, Aen, Mybl1, RGD1308114, Cdkn1a, Fam49a, Atp6v1f, Nudt5) が得られた。RGD1308114 は発現量が減少していたが、これ以外の遺伝子は全て発現量が増加していた。

次に検討 2 では、ラット単回投与 24 時間後の 10 遺伝子の発現変化を算出し、SVM による遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を区別できる予測モデルとして、感度 100%、特異度 96.3%、正答率 91.7%の精度を保持する予測モデルが構築できた。

最後に、検討 3 では Open TG-GATEs に含まれていない既知の遺伝毒性肝発がん物質 (計 5 種) について、ラット単回投与 24 時間後の肝臓における 10 遺伝子の発現変化を qPCR 法で測定し、構築した予測モデルで肝発がん性を予測させた結果、全ての物質について、陽性判定が得られた。

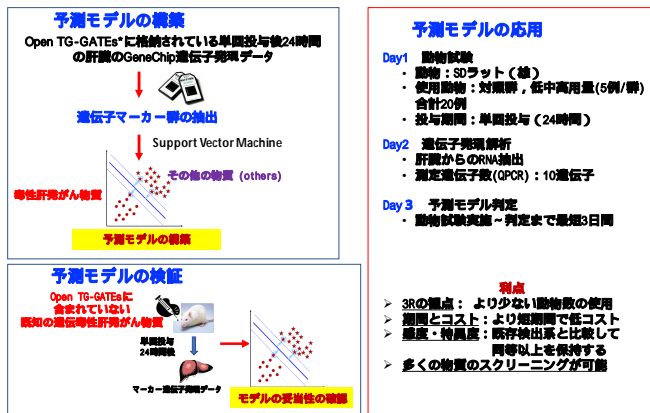


図 1 遺伝毒性肝発がん物質検出予測モデル

### D. 考察

の検討において、遺伝毒性肝発がん物質を単回投与した肝臓においては、共通した遺伝子群での発現変化が認められたことから、これら物質を投与されたラット肝臓では、極早期に共通した肝臓での影響が生じていることが推測された。本検討で得られた 10 遺伝子には、肝発がんとの関連が報告されている遺伝子 (Glr3, Mok, Cdkn1a) や DNA 修復に関与することが報告されている Nudt5 などが含まれていたことから、得られた遺伝子マーカーセットは肝発がんに関与するマーカーセットとして考えられた。

の検討において、遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を区別し得る予測モデルが構築できた。これは、の検討で得られた遺伝子マーカーセットが、遺

伝毒性肝発がん物質では共通で変化する一方、それ以外の物質では変化しない、または遺伝毒性肝発がん物質とは異なった発現変化を示すためと考えられた。正答率が約 90%であることから、高い精度で遺伝毒性肝発がん物質を検出できる可能性が示唆された。

の検討において、新たに 5 種の遺伝毒性肝発がん物質について、qPCR で取得したデータをもとに構築した予測モデルで肝発がん性を予測させた結果、全ての物質について陽性判定が得られた。本結果より、今回構築した予測モデルは、GeneChip データだけでなく、qPCR 法で取得したデータも活用できる可能性、及び、新規物質についても適用できる可能性が示唆された。

### E. 結論

遺伝毒性肝発がん物質をラットに単回投与した際、共通して発現変化を示す 10 遺伝子を同定し、これら遺伝子セットについて qPCR 法での測定と数理的予測モデルによる予測により、高い精度で遺伝毒性肝発がん物質を検出できる手法を確立した (図 1)。本手法は、従来の肝発がん性評価系と比較して、短期間かつ安価に評価できる新規評価系としての活用が期待される。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kanki M., Gi M. et al. Detection of non-genotoxic hepatocarcinogens and prediction of their mechanism of action in rats using gene marker sets. J Toxicol Sci 41: 281-292, 2016.
- 2) Kakehashi A, Gi M, et al. Ethanol-Extracted Brazilian Propolis Exerts Protective Effects on Tumorigenesis in Wistar Hannover Rats. PLoS One 11: e0158654, 2016.

#### 2. 学会発表

- 1) 魏 民 他 遺伝毒性・発がん性をスクリーニングする in vivo 短期検索法。第 43 回日本毒性学会学術年会, 2016 年, 名古屋

### H. 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

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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 准教授

**研究要旨**

本研究は動物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ている。ラットにおいて、肺早期病変である過形成病変に対する Napsin A の肺胞壁内細胞への高発現の有無により、腫瘍化リスクの判別の可能性が明らかになった。さらに、DHPN 以外にも種々の発がん物質により誘導されたラットおよびマウスの肺過形成病変について、Napsin A の肺胞壁内細胞への高発現が確認された。また、他の分担研究者が注目している H2AX について、これまでの実験での材料を用いて肺での発現に関する検討を行った。しかしながら、発癌物質投与による H2AX の発現率の差は認められなかった。

**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 週間と長期間を要する。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、早期に気管支肺胞上皮過形成（以下、過形成）が出現するが、将来、その病変が消失するものと悪性化するものが混在している。特に、最近のナノテクノロジーの発展によって、ナノ粒子の吸入毒性が問題となっている。ナノ粒子の種類によっては時に過形成病変が発生する場合があります、この病変が、将来に腫瘍化するリスクが高いのか否かを判別する方法も期待されている。

以上より、本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化リスクを予想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、上記の期待に添えるのみでなく、早期病変での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。

これまでに、肺の早期腫瘍性病変の同定に有用なマーカーの候補の検索を目的とした研究を行ってきた。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。その結果、染色性から Napsin A が最有力候補として絞られた。

Napsin A は肺胞サーファクタント B の成熟に関与していることから、その発現機序解明を目的として、サーファクタントプロテイン (SP) の分子種である SP-A、B、C、D について染色を行い、Napsin A の発現と比較検討を行った。用いた材料は DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍（腺系腫瘍、30 週）及び quartz 誘発 F344 雄ラット肺（炎症性変化、28 日目）の固定標本である。

以上の実験から、Napsin A は、肺に発生する過形成病変の将来の腫瘍化リスクについての判別に有用であることが判明した。また、Napsin A の発現は肺サーファクタントプロテイン-B の発現に若干の相同性を示した。

さらに、Napsin A の有用性に関する検証の実験も行った。ラットにおける多種の肺発がん物質（DHPN、Urethane、N-Nitrosodimethylamine(DMN)、Benzo[a]pyrene(B[a]P)）により誘導された肺過形成病変、およびマウスにおける Urethane、NNK、B[a]P に誘発された肺過形成病変のいずれも、Napsin A の肺胞壁内高発現が確認された。以上より、ラットおよびマウスの過形成性病変における Napsin A の高発現は将来の腫瘍化を示唆することが明らかになった。早期肺病変としての可逆性過形成と潜在腫瘍性過形成の鑑別が可能であり、肺動物モデル試験系において有用なマーカーと期待された。

今回は、他の分担研究者が早期の腫瘍マーカーとして期待している H2AX についての実験を行った。形態的な変化は見られないが、腫瘍化の可能性が高い実験早期の肺に H2AX の発現上昇が見られる可能性がある。これまでにを行った実験の肺標本を用いて、形態的に異常の見られない肺胞上皮における H2AX の発現について検討を行った。

## B . 研究方法

2006年～2014年に当教室で実施した6週齢または7週齢で開始したF344ラットによる実験の肺ブロック標本を用いて検討を行った。用いた肺ブロック材料の実験内容の要旨を表1に示す。各群、3匹ずつの肺について検討した。

### 免疫組織学的検討

H2AXの染色に関して、抗体は、Phospho-Histone H2A.X (Ser139) antibody (Cell Signaling, MA, USA)を用いた。すべての染色行程はペントナ自動免疫染色装置 (VENTANA Discovery XT system, VENTANA medical Systems, AZ, USA)を使用した。クエン酸buffer (CC2 extended (90分))で抗原賦活化を行い、1次抗体は10倍希釈で60分、2次抗体 (rabbit) は30分反応させた。

形態的に変化の見られない肺胞上皮について、細胞1000個以上あたりのH2AX陽性細胞数を計測し、その割合 (%) を算出した。

### (倫理面への配慮)

いずれの動物実験も実験に先立ち、香川大学、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総合生命科学研究センター、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

気管支肺胞腺腫 (adenoma) においては、H2AX発現細胞が多く認められた (図1)。一方、正常肺胞上皮については陽性細胞が散見されるのみであった。これらの陽性細胞数を集計したものが表2である。今回の12週以降の検討では、発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。06CB2の実験は経時的な変化を検討するものであり、DHPN投与後、H2AXの経時的発現変化についての結果が期待された。しかしながら、その発現率に変化は認められなかった。また、実験ごとに、H2AXの発現に差が見られた。特に、2014年の実験である14EX1は、2006年の実験である06CB2に比べてH2AX発現細胞率が高い。それらの2つの実験は、DHPNの投与期間および投与方法、実験期間、採取組織の固定時間および切片作成方法は同様であった。

## D . 考察

今回、発癌物質投与後のラット正常肺胞上皮におけるH2AXの発現率に関する検討を行った。発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。これは、H2AXがかなり早期に発現し、今回検

討した12週以降には発現がすでに低下している可能性が推測される。今後はより早期に評価する動物実験を計画し検討する必要があると考えられた。

また、同内容の実験でも実験を行ったタイミングでH2AX陽性細胞率に変化が見られた。これは古い実験ほどH2AXの発現率に低下が見られ、ブロックの保存期間が発現に影響を与える印象であった。

## E . 結論

今回、発癌物質投与後のラット正常肺胞上皮におけるH2AXの発現率に関する検討を行ったが、発癌物質の有無や種類、実験期間によって、その発現に差は認められなかった。今後はより早期に評価する動物実験を計画し検討する必要があると考えられた。

また、H2AXの発現率の検討には、ブロックの保存期間も重要であることが判明した。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

1) Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K., Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66: 117-123, 2014.

2) Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 27(3-4):175-182, 2014.

### 2 . 学会発表

1) 横平政直; 成澤裕子; 山川けいこ; 蟹江尚平; 橋本希; 今井田克己、A possible predictable marker, napsin A, for the tumorigenic potential of lung bronchio-alveolar hyperplasia in rodents.、第75回日本癌学会学術総会、2016.10

2) 中野裕子; 横平政直; 山川けいこ; 岸宗佑; 蟹江尚平; 塩岡忠夫; 竿尾光祐; 今井田克己、ラット肺およびヒト tissue microarray におけるH2AXの発現、第73回日本癌学会学術総会、2014.9

- 3) 横平政直; 山川けいこ; 中野裕子; 沼野琢旬; 岸宗佑; 二宮英美子; 竿尾光祐; 今井田克己、  
Immunohistochemical characteristics of surfactant protein A, B, C and D in the lung of F344 rats.、  
第72回日本癌学会学術総会、2013.10
- 4) 横平政直; 山川けいこ; 木内茂巳; 中野裕子; 二宮英美子; 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

### 1 . 特許取得

なし

### 2 . 実用新案登録

なし

### 3 . その他

なし

表1 今回の検討で用いた肺ブロック材料についての情報

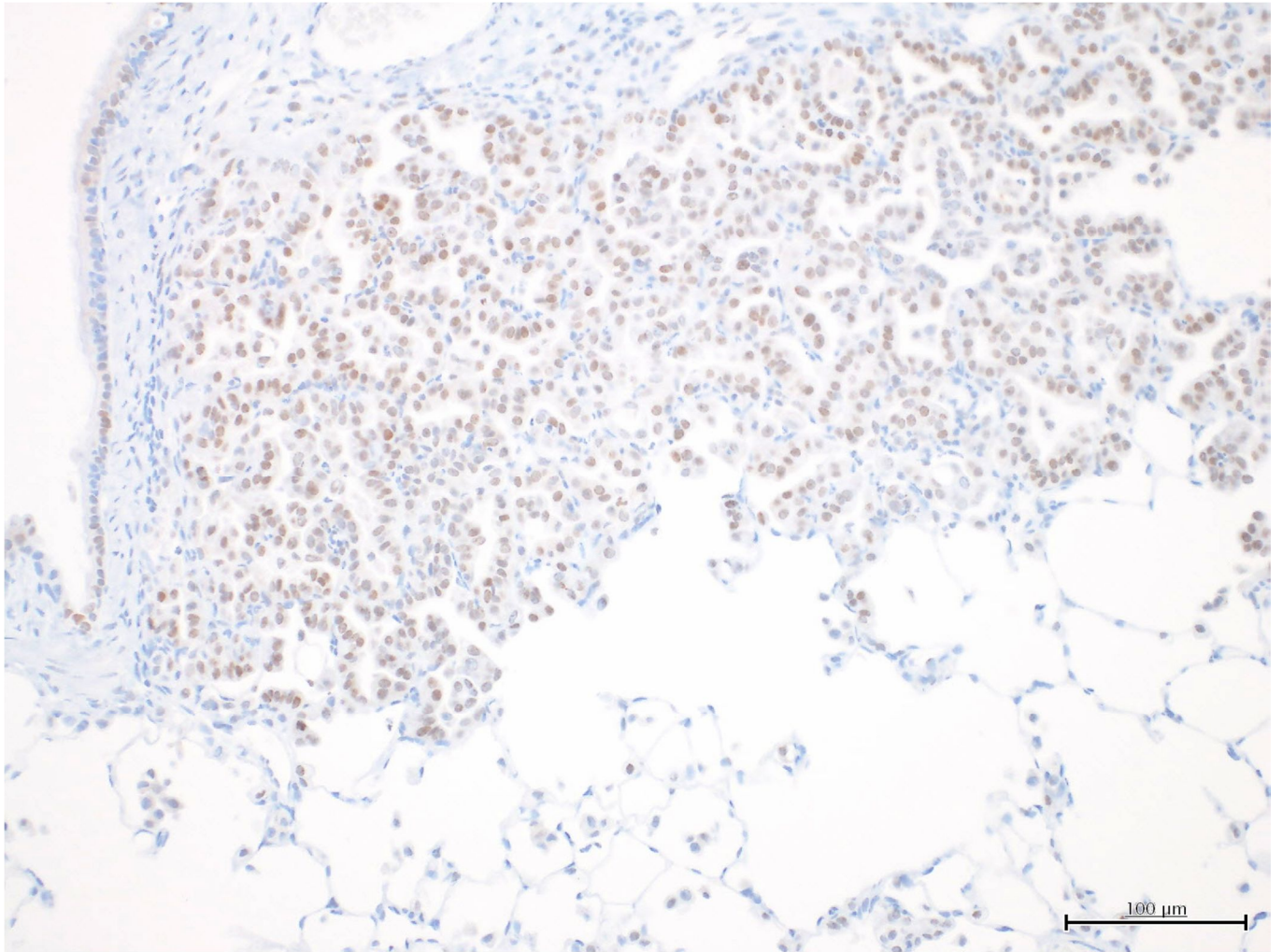
| Exp. Code | Year | Animal  | Age     | Experiment                      | Used animals |     |                  |
|-----------|------|---------|---------|---------------------------------|--------------|-----|------------------|
|           |      |         |         |                                 | Treatment    | No. | Exp. period      |
| 06CJ      | 2006 | F344, F | 7 weeks | Toxicity study of asperagine    | Untreated    | 3   | 90days (13weeks) |
| 06CB3     | 2006 | F344, M | 6 weeks | Promotion study of nanoparticle | Untreated    | 3   | 23 weeks         |
| 14EX      | 2014 | F344, M | 6 weeks | DHPN, Urethane, DMN, B[a]P      | DHPN         | 3   | 16 weeks         |
| 14EX      | 2014 | F344, M | 6 weeks | DHPN, Urethane, DMN, B[a]P      | Urethane     | 3   | 16 weeks         |
| 14EX      | 2014 | F344, M | 6 weeks | DHPN, Urethane, DMN, B[a]P      | DMN          | 3   | 16 weeks         |
| 14EX      | 2014 | F344, M | 6 weeks | DHPN, Urethane, DMN, B[a]P      | B[a]P        | 3   | 16 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30 weeks        | DHPN         | 3   | 12 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30weeks         | DHPN         | 3   | 16 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30weeks         | DHPN         | 3   | 23 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30weeks         | DHPN         | 3   | 30 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30weeks         | NNK          | 3   | 12 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30weeks         | NNK          | 3   | 16 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30weeks         | NNK          | 3   | 23 weeks         |
| 06CB2     | 2006 | F344, M | 6 weeks | DHPN or NNK, 12~30weeks         | NNK          | 3   | 30 weeks         |



表2 正常肺胞上皮における H2AX の発現率

| Exp. Code                      | Treatment              | No. | $\gamma$ H2AX Index (%)* |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
|--------------------------------|------------------------|-----|--------------------------|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|
|                                |                        |     | 12w                      | 13w | 16w | 23w | 30w |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CJ                           | Untreated (Asperagine) | 3   | 1.4 $\pm$ 0.5            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB3                          | Untreated              | 3   | 6.4 $\pm$ 2.8            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 14EX                           | DHPN                   | 3   | 24.6 $\pm$ 10.4          |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 14EX                           | Urethane               | 3   | 21.6 $\pm$ 2.1           |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 14EX                           | DMN                    | 3   | 25.7 $\pm$ 1.9           |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 14EX                           | Benzo                  | 3   | 22.4 $\pm$ 2.8           |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | DHPN                   | 3   | 5 $\pm$ 2.4              |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | DHPN                   | 3   | 7.5 $\pm$ 3.1            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | DHPN                   | 3   | 3.1 $\pm$ 4.1            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | DHPN                   | 3   | 3.7 $\pm$ 2.9            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | NNK                    | 3   | 3.4 $\pm$ 2.3            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | NNK                    | 3   | 4.1 $\pm$ 1.3            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | NNK                    | 3   | 2.3 $\pm$ 1.7            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| 06CB2                          | NNK                    | 3   | 1.9 $\pm$ 0.7            |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |
| * Counted at least 1000 cells. |                        |     |                          |     |     |     |     |  |  |  |  |  |  |  |

図1 ラット、気管支肺胞腺腫における  $\gamma$ H2AX の発現 (14EX DHPN, 16w)



## 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 部長

### 研究要旨

本研究は、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を早期に検出できる指標の探索を目的としている。ラットを用いた昨年度までの検討により、DNA 二重鎖切断マーカーである H2AX が、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。平成 28 年度は H2AX に関して、種差を検討するためのマウスを用いた動物実験、多施設共同研究に基づく提供膀胱サンプルを用いた解析、他臓器（肝・腎）への応用可能性について検討を行った。遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN、2-AAF および *p*-cresidine を投与したマウスでは、ラットと同様に H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、マウスに対して膀胱発がん性のない 2-NA、glycidol、DEN および AA 投与群では、対照群と同じ発現レベルにとどまった。この結果から、H2AX は遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として、マウスモデルにおいても有効である可能性が示された。また、皮下あるいは膀胱内投与による膀胱発がん性が知られる 3 物質（DMBA、BOP、MNU）を経口投与したラットにおいても H2AX の発現増加が認められ、潜在的な膀胱発がん性の指標になり得る可能性が示唆された。一方で、肝・腎に対する遺伝毒性発がん物質早期検出への応用には、細胞増殖活性に関連した H2AX 発現誘導など、検討すべき課題があると考えられた。

### A. 研究目的

近年、発がん過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識されている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種である H2AX が速やかにリン酸化され、H2AX を形成する。H2AX は DNA 修復因子の結合標的となり、二重鎖切断修復に必須の役割を果たすことが知られている。H2AX は損傷部位から離れた領域まで広範囲に集積する特徴があり、特異抗体によって核内の小型点状巣として検出することが可能となっている。

本研究は、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を、化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに追加することで早期に検出できる病理組織学的指標の探索を目的としている。ラットを用いた昨年度までの検討により、DNA 二重鎖切断のマーカーである H2AX が、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。平成 28 年度はこの H2AX について、発現の種差を検討するためのマウスを用いた動物実験、多施設共同研究に基づく提供膀胱サンプルを用いた発現解析、他臓器（肝・腎）への応用可能性について検討を行った。

### B. 研究方法

6 週齢の雄 B6C3F<sub>1</sub> マウスに、0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)、0.6% 2-nitroanisole (2-NA)、0.025% 2-acetamidofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.125% 2,2-bis(bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、0.01%

dimethylarsinic acid (DMA)、0.45% melamine、3% uracil、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN) および 0.005% acrylamide (AA) を 4 週間混餌または飲水投与し、投与終了時または 2 週間の休薬後に各群 5 匹を解剖し、膀胱上皮での H2AX/Ki67 発現を免疫組織化学的に解析した。H2AX 陽性細胞を、その局在から basal/intermediate/umbrella cell の 3 種に分類した。2-AAF 投与群については、膀胱表層に位置する umbrella cell のマーカーである uroplakin III (UpkIII) 発現の検索も実施した。

名古屋市立大学 (F344 ラットに遺伝毒性発がん物質 8 種：3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), *N*-nitroso-*N*-methylurea (MNU), dimethylnitrosamine (DMN)、1,2-dimethylhydrazine (DMH)、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)、*N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) および 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を週 5 日、4 週間強制経口投与) および国立がん研究センター研究所 (F344 ラットにノルハルマン代謝物 2 種：aminomethylphenylnorharman (AMPNH) および aminophenylnorharman (APNH) を 4 週間混餌投与) から提供された膀胱を用いて、H2AX/Ki67 発現を検索した。

6 週齢の雄 F344 ラットに、肝臓検索用として遺伝毒性肝発がん物質：0.001% DEN および 0.015% 3,3'-dimethylbenzidine (DMB)、遺伝毒性非肝発がん物質：1% 4-chloro-*o*-phenylenediamine (COP) および 0.001% *N*-nitroso-*N*-ethylurea (ENU)、非遺伝毒性肝発がん物質：1.2% di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)

および0.5% 1,4-dioxane (D0)を、腎臓検索用として遺伝毒性腎癌がん物質：0.00625% *N*-nitrosomorpholine (NMOR), 0.01% tris(2,3-dibromopropyl)phosphate (TBPP)および0.05% potassium bromate (KBrO<sub>3</sub>)、非遺伝毒性腎癌がん物質：2% trisodium nitrilotriacetic acid monohydrate (NTA)および150 mg/kg *d*-Limonene、非癌がん性腎毒性物質：2% carboxin (CBX)を4週間経口投与し、投与終了時または2週間の休薬後に解剖し、それぞれ肝細胞と腎尿管上皮細胞における H2AX 発現を解析した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

### C. 研究結果

マウス膀胱における H2AX 発現：4 週投与終了時の検討において、遺伝毒性膀胱癌がん物質である BBN、2-AAF および *p*-cresidine を投与したマウスでは、ラットと同様に H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた (図 1、2)。一方、マウスに対し膀胱癌がん性のない 2-NA、glycidol、DEN および AA 投与群では、対照群と同じ発現レベルにとどまった。2 週間の休薬後においても、BBN および *p*-cresidine 投与群の H2AX 発現レベルは対照群と比較して有意に高かった。

Ki67 発現の検索では、BBN、*p*-cresidine、PEITC および uracil 投与群で有意な増加がみられた (図 3)。2-AAF 投与マウスにおける H2AX 陽性細胞は、ラットと異なり umbrella cell が主体で、Ki67 発現の上昇もみられなかった (図 4)。2-AAF 投与ラットの Upk III 発現は対照群と変化がなかったのに対し、マウスでは Upk III 陽性 umbrella cell の減少と配列の乱れが観察された。

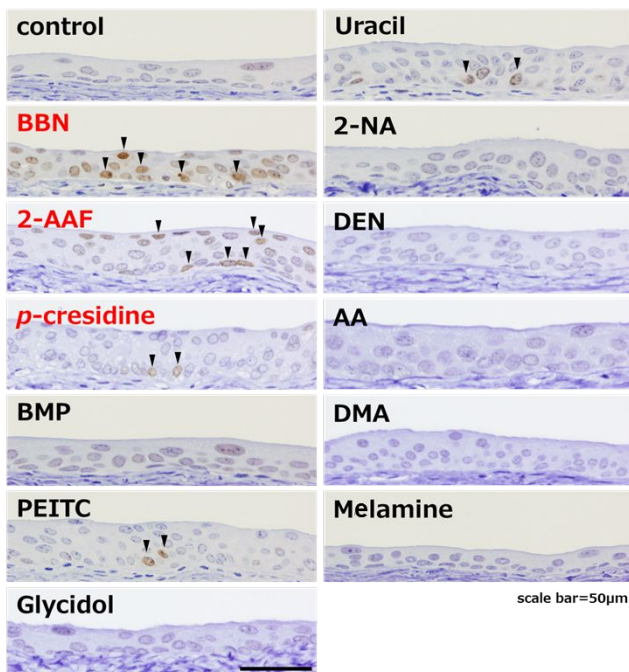


図 1. マウス膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 発現 (矢頭： H2AX 陽性細胞)

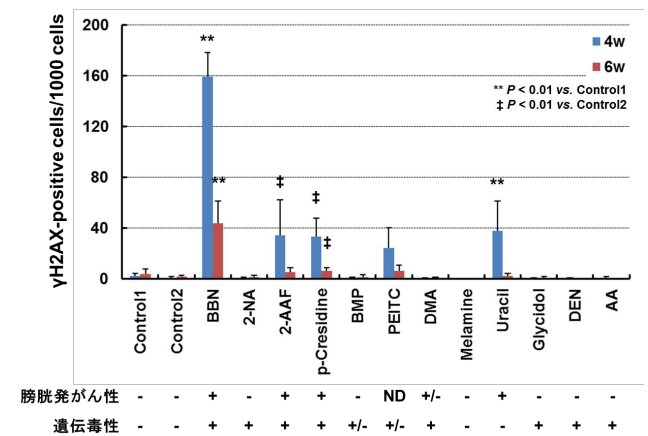


図 2. マウス膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析

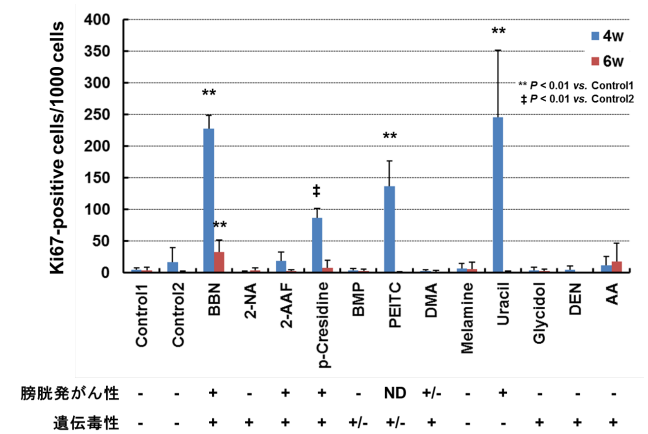


図 3. マウス膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析

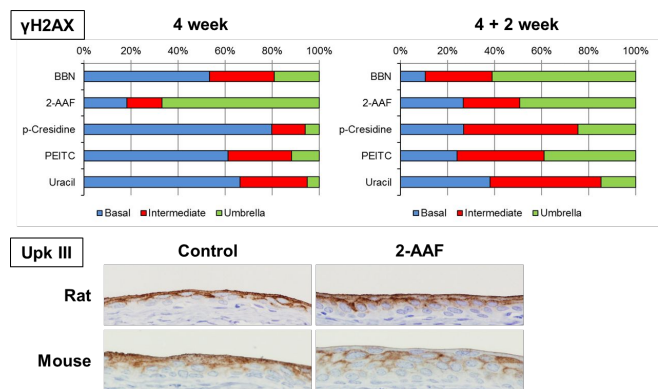


図 4. (上) マウス膀胱粘膜の H2AX 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合 (下) 2-AAF 投与ラットおよびマウス膀胱における Upk III 発現

他施設提供膀胱サンプルにおける H2AX 発現：8 種の遺伝毒性癌がん物質を投与したラット膀胱における H2AX 発現は、DMAB および BOP 投与群で有意に増加

し、MNU 投与群でも増加傾向が認められた(図5)。Ki67 陽性細胞の割合は、いずれの投与群でも対照群と有意な差はみられなかった (data not shown)。

4 週間の APNH (アニリンのノルハルマン代謝物) 投与により、膀胱粘膜における H2AX 陽性細胞は有意に増加した(図6)。2 週間の休薬後には減少したが、対照群よりも高い発現レベルを維持していた。AMPNH (オトルイジンのノルハルマン代謝物) 投与群においても、統計学的有意差はないものの、4 週時点で H2AX 発現の増加傾向が認められ、6 週後の発現レベルは対照群よりも有意に高かった。AMPNH/APNH はともに、4 週時点での Ki67 発現を増加させた。

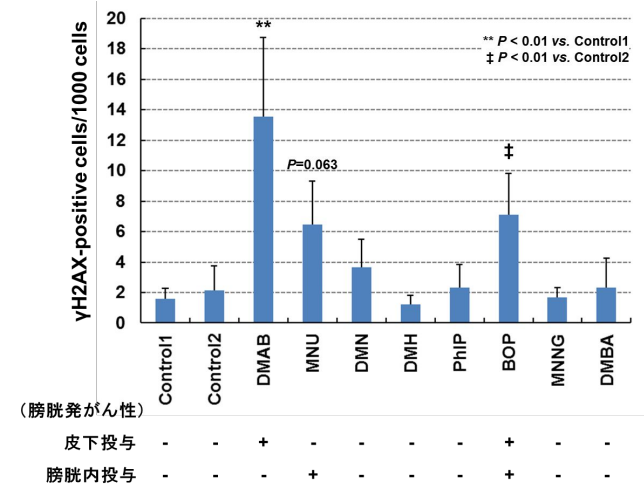


図5. ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析 (名古屋市立大学提供サンプル)

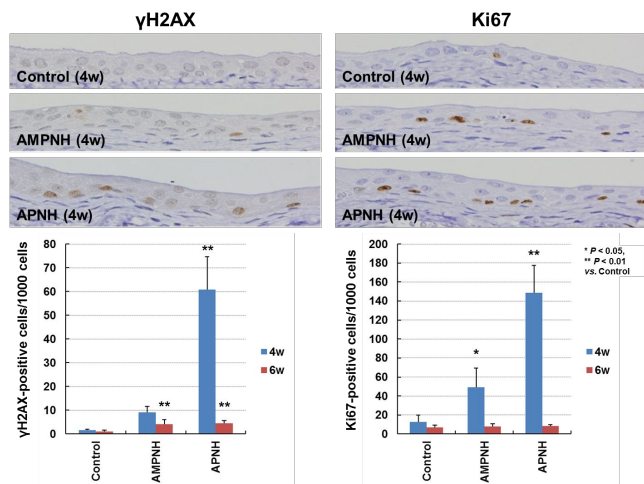


図6. ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX/Ki67 発現および定量解析 (国立がん研究センター研究所提供サンプル)

肝・腎における H2AX 発現: 遺伝毒性肝発がん物質 (DEN/DMB) のうち、DEN 投与群では核内の点状陽性巣である H2AX foci 発現細胞の有意な増加が認められた一方、DMB 投与群では対照群と同じレベルであった(図7)。肝臓を標的としない遺伝毒性発がん物質

(COP/ENU)、非遺伝毒性肝発がん物質 (DEHP/DO) を投与した群では、H2AX foci の増加はみられなかった。

遺伝毒性腎発がん物質 (NMOR/TBPP/KBrO<sub>3</sub>) のうち、NMOR および KBrO<sub>3</sub> 投与群では H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められ、TBPP 群では増加傾向がみられた(図8)。一方で、非遺伝毒性腎発がん物質 (NTA/d-Limonene) のうち d-Limonene 投与群において、再生尿細管を除外した検索においても H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。

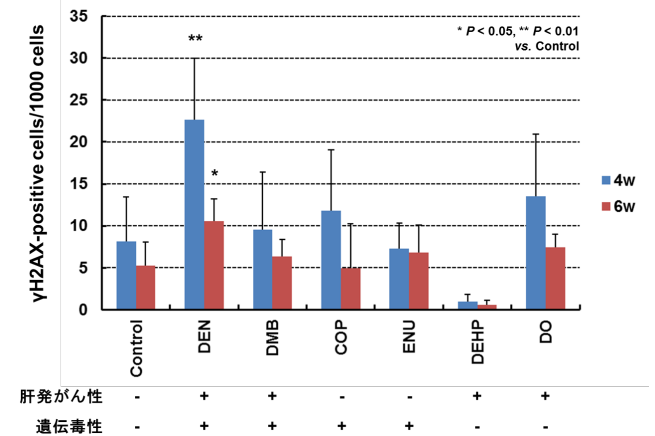


図7. ラット肝細胞における H2AX (foci) 陽性細胞の定量解析

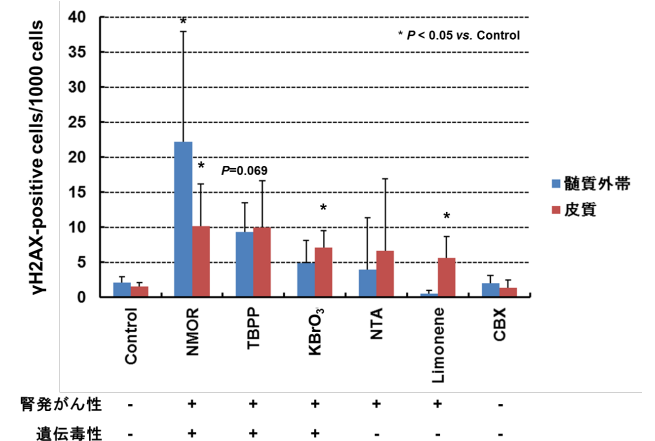


図8. ラット腎尿細管上皮細胞 (再生尿細管を除く) における H2AX 陽性細胞の定量解析

#### D. 考察

マウス膀胱における H2AX 発現: 今回の結果から、H2AX は遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として、マウスモデルにおいても有効である可能性が示唆された。2-AAF 投与群にみられた H2AX 陽性細胞は、ラットでは基底層の basal cell に多かったのに対し、マウスでは表層の umbrella cell が主体であった。2-AAF はマウス膀胱の umbrella cell に細胞傷害を誘導するとの報告があり (Frith et al., Invest Urol, 1981)、2-AAF 代謝における種差によって、細胞傷害の標的が異なる可能性が考えられた。また、PEITC および uracil 投与群においても、過形成を伴った H2AX/Ki67 陽性細胞

胞の有意な増加が認められたことから、細胞増殖活性に関連した H2AX 発現を考慮する必要があると思われる。

他施設提供膀胱サンプルにおける H2AX 発現：DMAB および BOP は、それぞれハムスターとラットへの皮下投与、BOP と MNU はカテーテルを用いたラット膀胱内投与による膀胱発がん性が報告されていることから、

H2AX は遺伝毒性物質による潜在的な膀胱発がん性の指標になり得る可能性が示された。

APNH は遺伝毒性およびラット膀胱への発がん性が報告されており (Kawamori et al., *Carcinogenesis*, 2004) 遺伝毒性膀胱発がん物質検出指標としての H2AX の有用性を示唆する結果と考えられた。AMPNH 投与群においても、休薬後に対照群と比較して高い H2AX 発現レベルを維持しており、膀胱発がんに寄与する可能性があると思われる。

肝・腎における H2AX 発現：肝細胞における H2AX foci 陽性細胞は、DEN 投与群で有意に増加した一方、DMB 投与群では対照群と同じレベルであった。遺伝毒性肝発がん物質早期検出指標としての H2AX の応用には、これら 2 物質による肝発がん機序の差異等、検討すべき課題があると考えられた。

腎近位尿細管上皮細胞における H2AX 発現は、遺伝毒性腎発がん物質の投与によって増加した。一方で、非遺伝毒性腎発がん物質や腎毒性物質を投与した群においても、再生尿細管に一致した H2AX 発現が認められた。腎臓に対する H2AX の応用には、細胞増殖活性に関連した H2AX 発現を考慮する必要があると考えられた。

## E. 結論

本研究の結果から、H2AX 免疫染色によって、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間(4週間)の投与で検出し得る可能性が示唆された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Cho YM, Hasumura M, Imai T, Takami S, Nishikawa A, Ogawa K. Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water. *J Appl Toxicol*, in press
- 2) Hirata T, Cho YM, Toyoda T, Akagi J, Suzuki I, Nishikawa A, Ogawa K. Lack of *in vivo* mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of gpt delta rats administered singly or in combination. *J Appl Toxicol*, in press
- 3) Nonaka M, Amakasu K, Saegusa Y, Naota M, Nishimura T, Ogawa K, Nishikawa A. Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 86: 199-204, 2017
- 4) Matsushita K, Toyoda T, Inoue K, Morikawa T, Sone M, Ogawa K. Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat. *J Toxicol Pathol*, 30: 57-62, 2017
- 5) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J,

Nakamura Y, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K. Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity. *J Appl Toxicol*, 37: 485-494, 2017

- 6) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1,2-diol. *J Toxicol Sci*, 42: 1-11, 2017

- 7) Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Park EY, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*, 29: 237-246, 2016

### 2. 学会発表

- 1) 曾根瑞季、豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子：H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット肝臓における検討 - . 第 43 回日本毒性学会学術年会、名古屋、2016 年 6 月 29 日
- 2) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、松下幸平、西川秋佳、小川久美子 . 化学物質の膀胱に対する *in vivo* 遺伝毒性および発がん性の短期評価系開発 . 第 2 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京、2016 年 9 月 17 日
- 3) 桐山諭和、豊田武士、小川久美子、塚本徹哉 . ヒト胃癌における -H2AX と p53 の免疫組織学的解析 . 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 6 日
- 4) 赤木純一、横井雅幸、豊田武士、曹永晩、花岡文雄、小川久美子 . Pol<sup>+</sup>、Pol<sup>+</sup>、および Pol<sup>+</sup> の欠損はさまざまな化学物質に対して異なる感受性を示し、遺伝毒性のスクリーニングに有用である . 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 8 日
- 5) 豊田武士、鈴木周五、加藤寛之、曾根瑞季、松下幸平、曹永晩、赤木純一、井上薫、高橋智、西川秋佳、小川久美子 . 遺伝毒性膀胱発がん物質によるラット膀胱粘膜における H2AX 発現 第 33 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪、2017 年 1 月 26 日
- 6) 曾根瑞季、豊田武士、松下幸平、森川朋美、曹永晩、赤木純一、水田保子、西川秋佳、小川久美子 . H2AX を指標とした *in vivo* 遺伝毒性評価系の構築 - ラット腎臓における検討 - . 第 33 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪、2017 年 1 月 26 日
- 7) Toyoda T, Sone M, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. H2AX expression is a biomarker of genotoxic carcinogen in the urinary bladder of rodents. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, 2017.3.14

8) Sone M, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Nishikawa A, Ogawa K. Detection of *in vivo* genotoxicity in rat liver and kidney using H2AX expression. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, 2017.3.14

#### H.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

## 前立腺を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

分担研究者 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 研究員

### 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 を投与したラットにおいて、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki67 発現が有意に上昇することを見いだした。発がん物質投与 2 日後に、前立腺組織において  $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki67 の標識率が前立腺発がん物質で上昇する一方で、前立腺に標的性のない発がん物質では対照群と差がないことを確認した。一昨年は腫瘍形成後の発がん後期においても発現が存在するかを検討した結果、PhIP および DMAB により発生した腫瘍で、HMGB2、Ki-67 標識率が周囲正常上皮よりも有意に高いことを示した。また、ヒト前立腺癌においても、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2、Ki-67 標識率の有意な上昇を確認した。去年から今年にかけて、28 日間反復経口投与毒性試験への応用を目標として、4 週間の PhIP、DMAB、MNU および BOP を主体とする発がん物質の経口投与実験を行った結果、HMGB2 および Ki67 において前立腺発がん物質特異的に有意な標識率上昇を認める一方で、前立腺に標的性のない発がん物質においては対照群との差が見られなかった。 $\gamma$ -H2AX は前立腺発がん物質での発現上昇傾向を認めたものの、DMAB 以外は有意な差がなかった。以上の結果から、28 日間反復経口投与毒性試験で採取された前立腺組織を用いて前立腺発がん物質を検出できる可能性を示し、その検出マーカー候補タンパクとして HMGB2 および Ki67 を同定した。

### 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) および 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) で、発現上昇を認めた3つの遺伝子、リン酸化ヒストンH2AX ( $\gamma$ -H2AX)、High mobility group box 2 (HMGB2) およびKi67について、前立腺発がん物質に対する特異性を検討した結果、HMGB2およびKi67で比較的良好な結果が得ら

れた。一方、 $\gamma$ -H2AXは標識率が0.02%と低いことから値変動が大きく、検出力が相対的に低く、検出マーカーとして使用するには不適當である可能性が示された。

また、一昨年度は、これら3つの遺伝子発現について腫瘍性病変が形成された時期においても、上昇しているかをラット及びヒト前立腺腫瘍組織を用いて検討し、 $\gamma$ -H2AXはラットにおいて染色問題が生じたものの、ヒト $\gamma$ -H2AXおよび、ラット・ヒトHMGB2やKi67は腫瘍病変で有意な上昇を認めた。

去年度は、上記発がん指標となる3つの遺伝子発現について、既存の毒性試験などで得られた臓器において検討可能であるかを解析した。その際に、28日間反復経口投与毒性試験への応用を目標として実験を行った。去年度は、前立腺発がん物質のDMAB および N-Methyl-N-nitrosourea(MNU) で、HMGB2やKi67の有意な標識率上昇を認める一方で、 $\gamma$ -H2AXはDMABのみ有意な標識率上昇が存在した。前立腺に標的性のない発がん物質である Dimethylnitrosamine (DMN) や 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) については対照群と差がなかった。

今年度は、残り2つの前立腺発がん物質PhIPと、N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)を主体に同様の実験を行った。また、当実験において他の分担研究者が所望する各臓器を採取し、各施設へ送付した。



## B . 研究方法

6週齢 F344 雄ラットに、PhIP を 15 mg/kg、BOP、7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)を 5 mg/kg、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)を 10 mg/kg で週に 5 回強制胃内投与し、4 週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。肝臓、大腸、膀胱および血液を各分担研究者に要望された状態（凍結およびホルマリン固定）で送付した。前立腺組織については免疫組織染色を行い、 $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki67 の標識率を前立腺腹葉、側葉および背葉において検討した。

## C . 研究結果

4週間の経口投与実験において、PhIP投与による  $\gamma$ -H2AX の有意な標識率上昇は見られなかったものの、他は  $\gamma$ -H2AX、HMGB2 および Ki67 いずれにおいても 2 日間投与実験と同様の結果が得られた。特に HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質をいずれかの葉で有意な標識率上昇を認め、検出することが可能だった。

去年および今年度の結果から、HMGB2 および Ki67 は、前立腺発がん物質によりいずれかの葉で有意な標識率上昇を認めた一方で、前立腺に標的性のない発がん物質についてはいずれも対照群と差がなかった。特に、皮下投与や腹腔内投与といった通常の前立腺発がんモデルで用いる投与方法ではなく、経口投与を用いても検出出来ることが確認された。また、各物質の投与濃度も Lethal Dose, 50% (LD50) の約 1/20 で用いており、これらの結果から、28 日間反復経口投与毒性試験で得られた前立腺組織において、HMGB2 および Ki67 の免疫組織化学染色による核陽性率が、前立腺特異的発がん物質の検出法として有用である可能性を示せた。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

外国語論文

- 1) Kato H, Naiki-Ito A, Naiki T, Suzuki S, Yamashita Y, Sato S, Sagawa H, Kato A, Kuno T and Takahashi S: Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget* 7: 2009-2021, 2016.
- 2) Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Suzuki S, Mori H and Takahashi S: Preventive effects of fermented brown rice and rice bran

against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients* 8: 421, 2016.

- 3) Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaka A, Ohka F, Suzuki S, Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S and Kondo Y: Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer research* 76: 4192-4204, 2016.
- 4) Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Sawada T, Akashi H, Inoue M, Suzuki S, Inagaki Y, Hayashi N, Nishie H, Shimura T, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, Joh T: Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin). *Oncotarget* 7: 47242-47251, 2016.
- 5) Suzuki S, Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M, Kuno T and Takahashi S: Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 17: 2071, 2016.
- 6) 高橋智、鈴木周五、佐藤慎哉、内木綾、久野壽也：前立腺がん化学予防の現状、菅原隆 編、次世代のがん治療薬・診断のための研究開発、技術情報協会、pp27-31, 2016.
- 7) 鈴木周五、内木綾、加藤寛之、早川将史、高橋智：前立腺発癌と炎症、別冊 B10 Clinica、5 巻、84-88, 2016.

### 2 . 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝発がん抑制効果、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月、仙台。
- 2) 鈴木周五、他、NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるラット肝発がん抑制効果、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月、横浜。
- 3) 加藤寛之、鈴木周五、他、前立腺癌細胞株の同種同所移植モデルの確立、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月、横浜。
- 4) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第 33 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2017 年 1 月、堺。

## H. 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。

## 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

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がん・予防研究分野 ユニット長

### 研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム法)の構築に取り組んできた。本年度は、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、LC-MS を用いたアダクトーム解析（付加体の網羅的解析）により検討した。

遺伝毒性ラット肝発がん物質として、N-Nitrosodiethylamine (DEN)及び3,3'-Dimethylbenzidine 塩酸塩 (o-Tolidine-2HCl)、遺伝毒性ラット非肝発がん物質として、4-Chloro-o-phenylenediamine (COP)、N-Nitroso-N-ethylurea (ENU)、非遺伝毒性ラット肝発がん物質として、Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、1,4-Dioxane (DO)をそれぞれラットに4週間投与し、肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。得られたデータを PCA 解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのグループに分離できた。非遺伝毒性発がん物質の分離に寄与している DNA 付加体をデータベースとの比較により探索した結果、抽出された付加体は酸化ストレスに起因する付加体が多いことが推測された。

今後、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう予定である。

### 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。これまで我々は、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てきた。また、昨年度までに確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、非遺伝毒性発がん物質のリスク評価をラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、DNA アダクトーム法で行う事の妥当性について検討する。今年度は、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質の肝臓における DNA 損傷性の評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、LC-MS を用いたアダクトーム解析（付加体の網羅的解析）により検討した。

### B．研究方法

雄性 F344 ラット（各群それぞれ5匹）に DEN(0.001%)、o-Tolidine-2HCl(0.015%)、COP(1.0%)、ENU(0.001%)、DEHP(1.2%)、DO(0.5%)を4週間飲水投与を行った後、肝臓を摘出した。DNA を抽出後、各種ヌクレアーゼによ

り DNA をモノヌクレオシドに分解し、DNA 付加体を質量分析機器を用いて解析した。

得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、それぞれの化学物質投与に相関する付加体の抽出を実施した。

（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

各種化学物質を投与したマウス肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。主成分 (PCA) 解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのグループに分離されることがわかった。一方、遺伝毒性発がん物質とコントロールとの比較では、肝発がん性の有無で2つのクラスターとして分離されることがわかった（図2）。また、非遺伝毒性発がん物質の分離に寄与しているDNA付加体をデータベースとの比較により探索した結果、抽出された付加体は酸化ストレスに起因する付加体が多いことが推測された。現在、これら投与化学物質に由来する付加体以外の付加体の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索している。

図1 遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価 (PCA解析による)

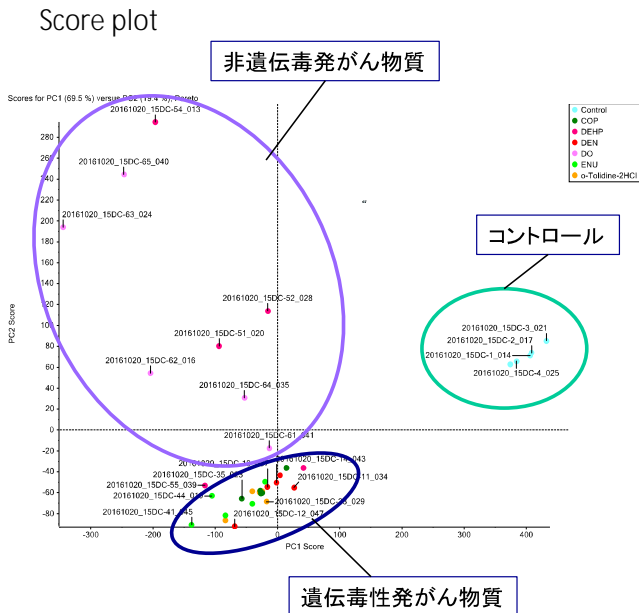
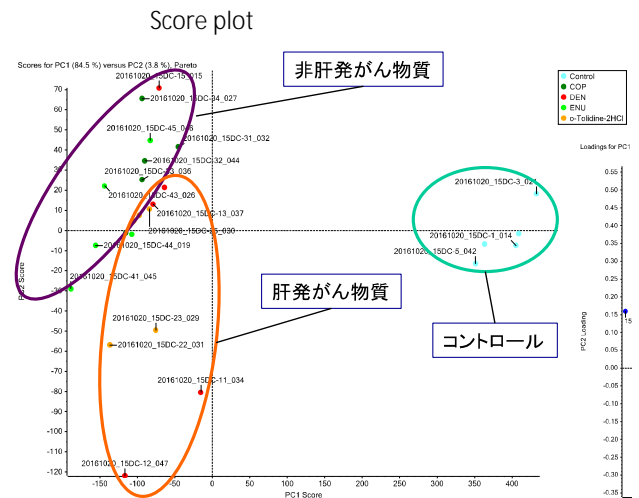


図2 遺伝毒性発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)



#### D. 考察

遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質を投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の解析を行なった。主成分(PCA)解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのクラスターに分離されることがわかった。非遺伝毒性肝発がん物質(DEHP, DO)投与に相関するものとして、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。したがって、これら非遺伝毒性肝発がん物質投与により、ラット肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質の発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後、本解析で抽出された非遺伝毒性肝発がん物質に相関する付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても更に検討を行なう必要がある。一方、遺伝毒性発がん物質(DEN, o-Tolidine-2HCl, COP, ENU)とコントロールとの比較では、肝発がん性の有

無で2つのクラスターとして分離されることがわかった。現在、肝発がん性の有無の分離に寄与している特徴的なDNA付加体の探索を行っている。

アダクトーム法の化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性については、更に複数の化学物質について検討をすることが必要である。

表1 非遺伝毒性発がん物質に相関する付加体リスト

| Adduct | M/Z [M+H] | RT (min) | データベースとの比較 [M+H]                                     | 付加体の由来         |
|--------|-----------|----------|--|----------------|
| 3292   | 374.2284  | 3.91     | BeMedC(K)  | 炎症(脂質過酸化)      |
| 1720   | 279.0977  | 1.48     | 5-Cl-dC(NH <sub>3</sub> ), N <sup>4</sup> -Cl-dC     | 炎症(次亜塩素酸)      |
| 3469   | 386.2264  | 0.95     | HNE-dC   | 炎症(脂質過酸化)      |
| 2298   | 315.1746  | 2.87     | Tg(K), Croton-dC(NH <sub>3</sub> )                   | 酸化、アルデヒド       |
| 1476   | 263.1027  | 1.87     | Cyanuric acid(dY, CA)(NH <sub>3</sub> )              | 酸化             |
| 3664   | 395.2262  | 2.20     | HeMedC(NH <sub>3</sub> )                             | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3513   | 388.1844  | 3.30     | HedA, CPPdA  | 炎症(脂質過酸化)、酸化脂質 |
| 2458   | 324.1803  | 3.08     | FapyG(K)   | 酸化             |
| 3572   | 391.1623  | 1.96     | CEPdA(NH <sub>3</sub> )                              | 酸化脂質           |
| 1689   | 277.1179  | 1.63     | Tg   | 酸化             |
| 3097   | 362.2174  | 2.55     | 8-OH-PdG(8-OH-ACR-dG)(K)                             | アルデヒド          |
| 3461   | 386.2004  | 2.88     | HNE-dC, Propanone-edG(K)                             | 炎症(脂質過酸化)      |
| 2832   | 346.1717  | 1.56     | BedA   | 炎症(脂質過酸化)      |
| 4276   | 437.2387  | 2.66     | CHPdC(NH <sub>3</sub> )                              | 酸化脂質           |
| 3573   | 391.1766  | 4.90     | CEPdA(NH <sub>3</sub> )                              | 酸化脂質           |
| 4838   | 477.2370  | 2.36     | CHPdG(NH <sub>3</sub> )                              | 酸化脂質           |
| 4115   | 425.2533  | 5.95     | HNE-dA(NH <sub>3</sub> )                             | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3189   | 368.1453  | 2.35     | BedA(Na)   | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3486   | 408.2291  | 4.13     | HNE-dA, HNE-dC(Na)                                   | 炎症(脂質過酸化)      |
| 1808   | 285.1343  | 2.31     | 8-OH-dA(NH <sub>3</sub> ), 2-OH-dA(NH <sub>3</sub> ) | 酸化             |
| 2437   | 323.1795  | 5.68     | MDA-dA(NH <sub>3</sub> )                             | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3188   | 368.1441  | 1.28     | BedA(Na)   | 炎症(脂質過酸化)      |
| 2792   | 344.2006  | 2.54     | 5,6-dihydro-M1dG(K), MDA-dA(K)                       | 炎症(脂質過酸化)      |
| 2898   | 350.1337  | 2.35     | CEPdC  | 酸化脂質           |
| 2285   | 314.2074  | 2.09     | edA(K)   | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3112   | 363.1845  | 3.36     | BedA(NH <sub>3</sub> )                               | 炎症(脂質過酸化)      |
| 2900   | 350.1377  | 1.16     | CEPdC  | 酸化脂質           |
| 1236   | 247.1287  | 1.49     | Oz   | 酸化             |
| 3869   | 410.1743  | 1.99     | HedA(Na)   | 炎症(脂質過酸化)      |
| 1811   | 285.1457  | 3.46     | 8-OH-dA(NH <sub>3</sub> ), 2-OH-dA(NH <sub>3</sub> ) | 酸化             |
| 4574   | 460.2396  | 2.97     | CHPdG  | 酸化脂質           |
| 1548   | 268.1193  | 3.44     | 8-OH-dA, 2-OH-dA                                     | 酸化             |
| 1899   | 291.1459  | 3.75     | Gh(NH <sub>3</sub> )                                 | 酸化             |
| 3399   | 381.1761  | 1.63     | CPPdC(NH <sub>3</sub> )                              | 酸化脂質           |
| 3294   | 374.2295  | 2.65     | BeMedC(K)  | 炎症(脂質過酸化)      |
| 4315   | 441.2243  | 3.01     | HNE-dG(NH <sub>3</sub> )                             | 炎症(脂質過酸化)      |
| 2836   | 346.1970  | 1.82     | Propanone-edC(K)                                     | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3377   | 379.1999  | 1.03     | BedG(NH <sub>3</sub> )                               | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3797   | 405.2271  | 1.17     | HedA(NH <sub>3</sub> )                               | 炎症(脂質過酸化)      |
| 3025   | 358.1963  | 2.43     | 6-oxo-M1dG(K)  | 炎症(脂質過酸化)      |
| 1493   | 264.1453  | 2.86     | Oz(NH <sub>3</sub> )                                 | 酸化             |
| 4673   | 466.1928  | 2.09     | CHPdA(Na)  | 酸化脂質           |
| 4061   | 422.2207  | 2.38     | CPPdG(K)   | 酸化脂質           |
| 3669   | 396.1396  | 4.46     | CEPdA(Na)  | 酸化脂質           |

#### E. 結論

遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質をラットに投与し、肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。付加体の網羅解析により得られたデータの生物統計解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのクラスターに分離されることがわかった。非遺伝毒性肝発がん物質の投与に相関する付加体として、酸化ストレスや炎症由来の複数のDNA付加体がスクリーニングされた。これらの結果から、

非遺伝毒性肝発がん物質投与により、ラット肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質の発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後は、本解析で抽出された非遺伝毒性肝発がん物質に相関する付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても更に検討を行なう事が必要である。一方、遺伝毒性発がん物質(DEN, *o*-Tolidine-2HCl, COP, ENU) とコントロールとの比較では、肝発がん性の有無で2つのクラスターとして分離されることがわかった。今後は、肝発がん性の有無の分離に寄与している特徴的なDNA付加体の探索を行なう予定である。アダクトーム法を化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性については、更に複数の化学物質について検討をすることが必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and Unique Mutational Signatures of Occupational Cholangiocarcinoma in Printing Workers Exposed to Haloxylon. *Carcinogenesis* 2016 37:817-26.

### 2. 学会発表

1. Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (リヨン、2016年6月)
2. Totsuka Y, Watanabe M, Hayashi K, Nakae D: Development of a novel in vitro mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (コペンハーゲン、2016年8月)
3. 戸塚ゆ加里, 林 櫻松、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、松島芳隆、中釜 斉: DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する 第75回日本癌学会学術総会(横浜

2016年10月)

4. 伴野 勸、山地太樹、岩崎 基、成島大智、加藤 護、戸塚ゆ加里、三好規之、今井俊夫: 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性 第75回日本癌学会学術総会(横浜 2016年10月)
5. 三牧幸代、中森正二、久保正二、木下正彦、戸塚ゆ加里、中釜 斉、落合淳志、江角浩安、土原一哉: 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較 第75回日本癌学会学術総会(横浜 2016年10月)
6. 戸塚ゆ加里: ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索 第59回日本放射線影響学会。(広島 2016年10月)
7. 佐藤 春菜、坂本義光、中江 大、戸塚ゆ加里: 多層カーボンナノチューブの繊維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響 第45回日本環境変異原学会(つくば、2016年11月)
8. 前迫裕也、善家 茜、古川英作、加藤 護、椎崎一宏、中釜 斉、戸塚ゆ加里: 職業性胆管がん発生に關与する1,2-ジクロロプロパンのDNA付加体の網羅的な解析(アダクトーム解析) 第45回日本環境変異原学会(つくば、2016年11月)
9. 戸塚ゆ加里、善家 茜、古川 英作、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 次世代シーケンサーとDNAアダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第45回日本環境変異原学会(つくば、2016年11月)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 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 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科 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。これまでに、中・短期動物発がん実験系において、各組織でヒストン H2AX のリン酸化（-H2AX）の検出が可能であることが示されている。ヒストン修飾変化を発がんリスク評価系としてさらに推し進めるために、これまでに偽陽性検出の可能性が示唆されている化学物質による -H2AX 誘導について明らかにすることが必要である。そこで DNA 損傷を誘導しない界面活性剤による -H2AX 誘導機構について昨年度に引き続き検討を行った。その結果、界面活性剤による -H2AX 誘導は、細胞骨格アクチンからの deoxyribonuclease I (DNase I) の遊離、核移行による DNA 切断に起因することが確認された。また、DNase I の核内移行を視覚化することができた。さらに、界面活性剤だけでなく、熱ストレスも同様に DNase I の遊離、核移行による -H2AX を誘導する可能性が示された。また、昨年度に引き続き、複数のヒストン修飾を指標とした *in vitro* 評価系構築の可能性を探るために、既に -H2AX の組織免疫化学的解析が行われている各種化学物質を投与したラット組織（肝臓）からヒストンを抽出し、-H2AX ならびにヒストン H3 アセチル化を解析した。一部の化学物質で -H2AX、ヒストン H3 アセチル化の変化が認められたが、化学物質の肝発がん性や傷害性との相関は不明であった。これについては継続検討が必要である。

### A. 研究目的

本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系において、化学物質を作用した動物の各組織でヒストン H2AX のリン酸化（-H2AX）の検出が可能であることが示されている。-H2AX が高感度な DNA 損傷マーカーであることは、*in vitro* の実験で証明されているが、*in vivo* において -H2AX の検出を発がんリスクマーカーとして推し進めるためには、本来の化学物質による DNA 損傷を原因とする -H2AX の誘導と、偽陽性を含めたそれ以外の原因による誘導を区別して評価できるようにする必要がある。-H2AX は DNA 損傷に対する細胞応答であるため、DNA 損傷を起因としない偽陽性検出の可能性がある。本年度は、これまでの検討において偽陽性検出の可能性が示唆された DNA 損傷を誘導しない界面活性剤ならびに熱ストレスによる -H2AX 誘導機構について検討し、-H2AX の偽陽性出現の一機構について明らかにすることを目的とした。また、既に -H2AX の組織免疫化学的解析が行われている各種化学物質を投与したラット組織（肝臓）からヒストンを抽出し、-H2AX とヒストン H3 アセチル化を解析し、-H2AX の確認と同時に解析可能な他のヒストン修飾についての模索を継続検討した。

### B. 研究方法

B-1. 界面活性剤 NPEO による -H2AX 誘導機構の検討  
ヒト培養細胞株（MCF7 ヒト乳がん細胞）に界面活

性剤 (nonylphenol polyethoxylate (NPEO)) 作用を行い、一定時間で培養した後、Western blotting および免疫蛍光染色法により、-H2AX、deoxyribonuclease I (DNase I)、actin 変化を解析した。

Western blotting：細胞を回収後、ヒストン（核画分）を抽出、15% ゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。一次抗体は、Rabbit anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG (Merck Millipore Co.) を用いた。二次抗体を反応後、ECL+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて検出した。

免疫蛍光染色法：35mm ガラス底ディッシュに細胞を播種し、培養後、各種化学物質等を作用した。6% ホルマリンで固定、2% Triton X-100 で透過処理した。一次抗体に Mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG, (Merck Millipore Co.)、Rabbit anti-DNase I polyclonal IgG を使用した。アクチンは、Anti-stain TM555 fluoresceine phalloidin (Cytoskeleton Inc.) で染色し、蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus Co., Japan) で撮影を行った。

B-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾の解析法

同班の鈴木博士より、methyl nitrosourea (MNU), 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), dimethyl nitrosoamine (DMN), dimethyl hydrazine (DMH) を 4 週間投与した F344 ラットから採取した肝

臓を譲り受けた。各組織 50-80mg からヒストンを抽出し、Western blotting により解析を行った。検出バンドの解析には Image J 1.46 (Broken Symmetry Software, USA) を使用した。使用したヒストンアセチル化検出抗体は以下のとおりである。

- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (global) IgG
- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (lys9) IgG
- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (Lys14) IgG
- (いずれも Merck Millipore Co.)

## C. 研究結果

### C-1. 界面活性剤 NPEO による $\gamma$ -H2AX 誘導機構

昨年度までに、陰イオン界面活性剤 (linear alkylbenzene sulfonates : LAS) 作用により、濃度依存的に  $\gamma$ -H2AX が誘導されることを明らかにし、その機構について検討してきた。本年度は、非イオン界面活性剤である NPEO による  $\gamma$ -H2AX の誘導とその機構について解析した。NPEO により  $\gamma$ -H2AX が誘導され、この誘導は、 $ZnCl_2$  や EGTA の前作用により阻害された (図 1)。一方、一般的な DNA 損傷剤である UVB や  $H_2O_2$

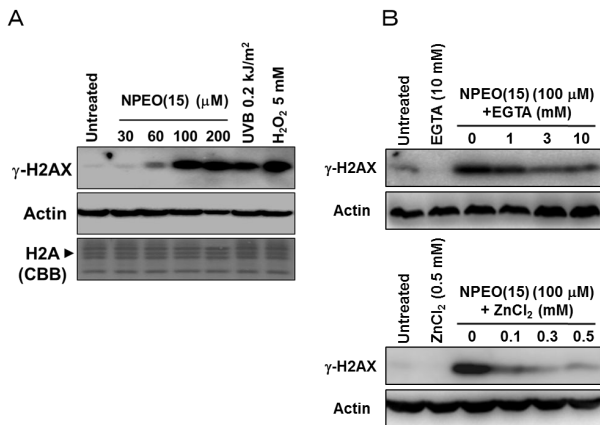


図1 NPEO作用後の $\gamma$ -H2AXの誘導  
A: NPEO(15)作用後の $\gamma$ -H2AXの誘導  
B: EGTA,  $ZnCl_2$ による $\gamma$ -H2AXの誘導の阻害

による  $\gamma$ -H2AX は  $ZnCl_2$  や EGTA では抑制されなかった。 $ZnCl_2$  や EGTA は、DNase I の阻害剤であることが知られている。そこで、DNase I の挙動を免疫蛍光染色法により確認したところ、通常細胞質に存在する DNase I が、NPEO 作用と共に核に移行すること、その際、 $\gamma$ -H2AX が誘導されることが示された (図 2)。同時に、細胞骨格を構成し、DNase I と共存しているアクチンの崩壊が観察された。

また、熱ストレス作用後の  $\gamma$ -H2AX 誘導機構についても検討を行った。データは示さないが、界面活性剤作用による DNase I 遊離と同様のメカニズムで、熱ストレス作用後の  $\gamma$ -H2AX が誘導されることが明らかになりつつある。

### C-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

化学物質投与ラットから採取した肝臓からヒストンを抽出し、Western blotting により、 $\gamma$ -H2AX、ヒストン H3 アセチル化 (global, K9, K14) の解析を行

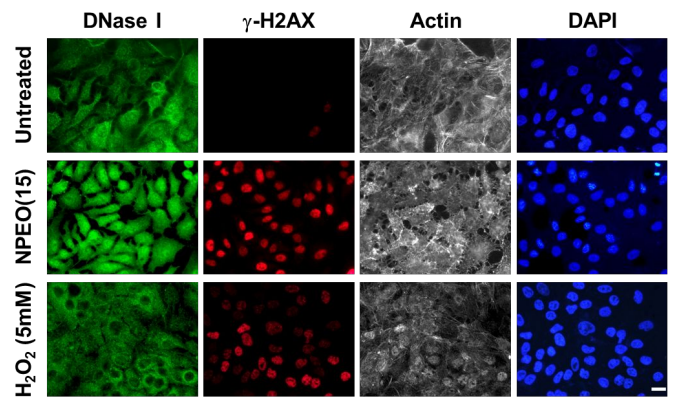


図2 NPEO作用後のDNase Iの核移行

った。

一部の化学物質で  $\gamma$ -H2A が上昇する傾向が認められたが有意ではなかった。DMN, DMH 投与により、ヒストン H3 アセチル化の変化が認められたが、化学物質の肝発がん性や傷害性との相関は不明であった。この変化の意義についてはさらなる検討が必要である。

## D. 考察

### D-1. 界面活性剤 NPEO や熱ストレスによる $\gamma$ -H2AX 誘導機構と DNA 損傷性

昨年度示した LAS と同様に NPEO により、DNase I がアクチンから遊離し、核移行することが判明した。細胞核内に入った DNase I は、DNA を切断し、 $\gamma$ -H2AX を誘導すると考えられ、界面活性剤は、その種類には依存せず、DNase I の遊離が  $\gamma$ -H2AX 誘導を引き起こすことが示された。これまで、 $\gamma$ -H2AX 誘導は、放射線や化学物質等により直接誘導される DNA 損傷に基づくとしてきたが、本研究で明らかになった  $\gamma$ -H2AX 誘導は、化学物質による直接的な DNA 損傷を反映していない。細胞骨格の損傷による DNase I 遊離による DNA 損傷、そして  $\gamma$ -H2AX 誘導であり、これまで明らかになっていなかった機構である。同じように、DNA 損傷性を有していない熱ストレスも同様の機構で  $\gamma$ -H2AX 誘導を引き起こすことも予備的データではあるが示唆され、新しい DNA 損傷機構が明らかになりつつある。

### D-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

肝臓において、化学物質投与後にヒストン H3 アセチル化変化が観察された。特に、肝発がん物質である DMN 作用後の高アセチル化は興味深い。その理由づけにまでは至らなかった。さらに、 $\gamma$ -H2AX が誘導されると考えた化学物質において、それが検出できないなど、不明な点が多く残されている。今回のヒストン抽出方法では、肝臓の採取部分を限定していないため、クリアなデータが得られなかったのではと考えられる。今後、さらに化学物質の種類を増やして解析していくことと、採取部位を制限することが必要と考えられた。

## E . 結論

本研究班では、中・短期動物発がん評価の標的として、-H2AXの可能性を検討している。我々は、*in vitro*の実験において、これまで -H2AXがDNA損傷を起因としない別の要因により検出される可能性を示唆してきた。本検討により、昨年度明らかにした細胞骨格の崩壊によりDNAを切断する酵素が遊離し、DNA切断が起こり -H2AXが検出される系の存在を確定することができた。本結果は、-H2AX検出において、そのメカニズムを考慮の上で *in vivo*, *in vitro* の両検討を行う必要があることを示唆している。

*in vivo*の組織解析では、発がんとの相関が認められるデータは得られていないため、今後の継続検討が必要である。

## F . 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] X. Zhao, F. Takabayashi, Y. Ibuki. Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation of histone H2AX. J. Photochem. Photobiol. B 162, 213-222 (2016).
- [2] 伊吹裕子 化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性 Bio Clinica 31(5) 93-96 (2016).

### 2. 学会発表

- [1] 楊光, 伊吹裕子: たばこ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延. 日本光医学光生物学会 第38回年会(京都) 2016年7月.
- [2] 楊光, 伊吹裕子: タバコ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延とカルボニル類の関与. 第29回変異原機構研究会(愛知) 2016年9月.
- [3] 趙曉旭, 伊吹裕子: 各種金属ナノ粒子によるヒストン修飾変化とその誘導メカニズムの検討. 第45回日本環境変異原学会(つくば) 2016年11月.
- [4] 楊光, 伊吹裕子: 飽和/不飽和アルデヒド類によるヌクレオチド除去修復の阻害. 第45回日本環境変異原学会(つくば) 2016年11月.

## H . 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      |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------|--|-------------------------------|--------|------|----------|
| 高橋智、鈴木周五、他                           | 前立腺がん化学予防の現状            | 菅原隆       | 次世代のがん治療薬・診断のための研究開発                       | 技術情報協会                        | 東京     | 2016 | 27-31    |
| 田中卓二、吉見直己、西川秋佳                       | 小腸・大腸                   | 日本毒性病理学会編 | 毒性病理組織学                                    | 西村書店                          | 東京     | 2017 | 188-215  |
| Tsukamoto T., Kiriya Y., Tatematsu M | Chapter 22 Helicobacter | Liu, D.   | Laboratory Models for Foodborne Infections | Taylor and Francis, CRC Press | London |      | in press |

雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名           | 巻  | ページ         | 出版年  |
|---|--|----------------|----|-------------|------|
| Cao, D., Jia, Z., You, L., Wu, Y., Hou, Z., Suo, Y., Zhang, H., Wen, S., Tsukamoto, T., Oshimura, M., Jiang, J., Cao, X.            | 18beta-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling.                            | Oncotarget.    | 7  | 71960-71973 | 2016 |
| Kiriya Y, Tahara T, Shibata T, Okubo M, Nakagawa M, Oikabe A, Ohmiya N, Kuroda M, Sugioka A, Ichinose M, Tatematsu M, Tsukamoto, T. | Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia is an irreversible point with eradication of Helicobacter pylori.       | Open J Pathol. | 6  | 93-104      | 2016 |
| Toyoda, T, Shi, L, Takasu, S, Cho, YM, Kiriya Y, Nishikawa, A, Ogiwara, K, Tatematsu, M, Tsukamoto, T.                              | Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. | Helicobacter.  | 21 | 131-142     | 2016 |
| Kanki M, Gi M, Fujioka M, Wanibuchi H   | Detection of non-genotoxic hepatocarcinogens and prediction of their mechanism of action in rats using gene marker sets.   | J Toxicol Sci. | 41 | 281-292     | 2016 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名             | 巻  | ページ         | 出版年  |
|--|--|------------------|----|-------------|------|
| Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Doi K, <u>Gi M</u> , Wanibuchi H  | Ethanol-Extracted Brazilia<br>n Propolis Exerts Protective<br>Effects on Tumorigenesis<br>in Wistar Hannover Rats.           | PLoS One.        | 11 | e0158654    | 2016 |
| Kato H, Naiki-Ito A, Naiki T, <u>Suzuki S</u> , Yamashita Y, Sato S, Sagawa H, Kato A, Kuno T and Takahashi S.   | Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis.                      | Oncotarget       | 7  | 2009-2021   | 2016 |
| Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , Mori H and Takahashi S.   | Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats.                       | Nutrients        | 8  | 421         | 2016 |
| Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaka A, Ohka F, <u>Suzuki S</u> , Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S and Kondo Y.  | Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor.            | Cancer Research  | 76 | 4192-4204   | 2016 |
| Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Sawada T, Akashi H, Inoue M, <u>Suzuki S</u> , Inagaki Y, Hayashi N, Nishie H, Shimura T, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Takahashi S, | Immunogenic cell death due to a new photodynamic therapy (PDT) with glycoconjugated chlorin (G-chlorin).                     | Oncotarget       | 7  | 47242-47251 | 2016 |
| <u>Suzuki S</u> , Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M, Kuno T and Takahashi S.  | Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, suppresses rat prostate carcinogenesis.            | Int J Mol Sci    | 17 | 2071        | 2016 |
| 鈴木周五、内木綾、加藤寛之、早川将史、高橋智   | 前立腺発癌と炎症   | 別冊BIO Clinica    | 5  | 84-8        | 2016 |
| Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Park EY, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, <u>Ogawa K</u> .                     | 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats. | J Toxicol Pathol | 29 | 237-246     | 2016 |

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                       | 巻   | ページ     | 出版年      |
|---|--|----------------------------|-----|---------|----------|
| Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, <u>Ogawa K.</u>   | Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1, 2-diol.                          | J Toxicol Sci              | 42  | 1-11    | 2017     |
| Suzuki I, Cho YM, Hirata T, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Sasaki A, Nakamura T, Okamoto S, Shirota K, Suetome N, Nishikawa A, <u>Ogawa K.</u>  | Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (Raphasatin) in the rat urinary bladder without genotoxicity.                           | J Appl Toxicol             | 37  | 485-494 | 2017     |
| Nonaka M, Amakasu K, Saegusa Y, Naota M, Nishimura T, <u>Ogawa K.</u> , Nishikawa A.  | Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats.                                       | Regul Toxicol Pharmacol    | 86  | 199-204 | 2017     |
| Matsushita K, Toyoda T, Inoue K, Morikawa T, Sone M, <u>Ogawa K.</u>  | Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat.   | J Toxicol Pathol           | 30  | 57-62   | 2017     |
| Cho YM, Hasumura M, Imai T, Takami S, Nishikawa A, <u>Ogawa K.</u>  | Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water.                                  | J Appl Toxicol             |     |         | in press |
| Hirata T, Cho YM, Toyoda T, Akagi J, Suzuki I, Nishikawa A, <u>Ogawa K.</u>   | Lack of in vivo mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of gpt delta rats administered singly or in combination. | J Appl Toxicol             |     |         | in press |
| Mimaki S, <u>Totsuka Y.</u> , Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. | Hypermutation and Unique Mutational Signatures of Occupational Cholangiocarcinoma in Printing Workers Exposed to Haloalkanes.                  | Carcinogenesis             | 37  | 817-26  | 2016     |
| Zhao X, Takabayashi F, <u>Ibuki Y.</u>  | Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation of histone H2AX.                             | J. Photochem. Photobiol. B | 162 | 213-222 | 2016     |
| 伊吹裕子  | 化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性   | Bio Clinica                | 31  | 93-96   | 2016     |

**平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 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**

**研究班員名簿**

| 区分    | 名前     | 所属                                     | 職名    |
|-------|--------|--|-------|
| 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                      | 教授    |
| 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   |
| 研究分担者 | 魏 民    | 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学                    | 准教授   |
| 研究分担者 | 横平 政直  | 香川大学医学部腫瘍病理学                           | 准教授   |
| 研究分担者 | 小川 久美子 | 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター<br>ー病理部実験病理学 | 部長    |
| 研究分担者 | 鈴木 周五  | 名古屋市立大学大学院医学研究科・実験病態病理学                | 研究員   |
| 研究分担者 | 戸塚 ゆ加里 | 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野               | ユニット長 |
| 研究分担者 | 伊吹 裕子  | 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科                   | 教授    |