

氏名（本（国）籍）	川 合 正 臣（愛知県）
主 指 導 教 員 名	東京農工大学 教授 三 森 国 敏
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第303号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	マウスにおける piperonyl butoxide の肝発がん機序に関する分子病理学的研究
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 下 田 実 副査 帯広畜産大学 教授 松 井 高 峯 副査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 東京農工大学 教授 三 森 国 敏 副査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨

論 文 の 内 容 の 要 旨

家庭用殺虫剤として広く使用されているピペロニルブトキシサイド (PBO) は、ラットやマウスに対する非遺伝毒性肝発がん性物質として知られている。PBO によるラット肝発がん機序には、代謝経路を介した活性酸素種 (ROS) の産生と、それに伴う酸化損傷がラット肝発がんに関与する可能性が示唆されている。しかし、PBO のマウス肝発がん機序に、この酸化損傷が関与するか否かは明らかにされていない。そこで本研究では、酸化ストレスと細胞周期調節に関わる遺伝子発現と生化学的変化に着目して、マウスにおける PBO の肝発がんメカニズムの解析を行った。さらに、マウスにおける PBO の肝腫瘍促進効果を明らかにするため、非がん部におけるゲノムのメチル化プロファイルの網羅的解析を行った。

第一に、酸化ストレスが PBO の肝発がん形成の初期に関与するか否かを明らかにするため、雄マウスに 2/3 肝部分切除術を施し、その後 *N*-diethylnitrosamine (DEN) を投与した。さらに 0 (DEN 単独群) ないし 0.6 % (DEN+PBO 群) の PBO を 8 週間混餌投与した。前がん病変指標である γ -glutamyl transpeptidase (GGT) 陽性細胞巣および Cytokeratin8/18 (CK8/18) 陽性細胞巣、ならびに細胞増殖活性の指標である増殖細胞核抗原 (PCNA) 陽性細胞率は、DEN 単独群と比較して DEN+PBO 群で有意に増加した。PBO 投与では単離肝ミクロソームからの ROS 産生量に有意な増加が認められたが、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) に変化は認められなかった。DEN+PBO 群における real-time RT-PCR 解析の結果、薬物代謝酵素遺伝子 (チトクローム P450 (*Cyp*) *1a1*, *2b10*) の発現上昇、代謝性ストレス関連遺伝子 (*Por*, *Nqo1*, *Nrf2*) の有意な発現増加が認められた。また、MAPK 経路の下流に存在する初期応答遺伝子 (*c-Fos*, *c-Jun* や *c-Myc*) や転写因子である ATF3 遺伝子も DEN+PBO 群において有意に発現増加した。ATF3 の免疫組織化学染色では、DEN+PBO 群の非がん部は、ATF3 にびまん性に染色された。一方、増殖性病変では、ATF3 の発現は陰性もしくは弱陽性を示した。ATF3 陰性細胞巣における肝細胞の核は、サイクリン D に陽性を示した。これらの結果から、PBO により誘発されたマウス肝発がん初期においては、PBO は酸化ストレスの誘導に伴い MAPK 経路を活性化させ、さらに増殖巣以外の肝細胞において ATF3 の転写レベルを増加させることが明らかとなった。

第2に、PBOの肝発がんにおける酸化ストレスの関与をさらに検討するため、雄マウスに肝部分切除術を施し、DENを投与後、0（DEN単独群）ないし0.6%（DEN+PBO群）のPBOを25週間混餌投与した。CK8/18陽性増殖巣は、DEN単独群に比較してDEN+PBO群において、腫瘍を含む増殖性病変で有意に増加した。real-time RT-PCRの結果、PBOは薬物代謝酵素（*Cyp1a1*, *2a5*）や代謝性ストレス関連遺伝子（*Por*, *Nqo1*）の発現増加が認められたが、DNA修復関連遺伝子（*Xrcc5*, *Ogg1*）の発現は減少した。PBOは過剰なROS産生によってMAPK経路に属する初期応答遺伝子（*c-Myc*）やG1/S期細胞増殖に関わる遺伝子（*E2f1*, *CyclinD1*）の発現増加を誘導した。以上のように、PBOは、酸化的DNA損傷の誘導なしに、代謝経路を経てROS産生から細胞増殖に関わる*c-Myc*や*E2f1*遺伝子の発現を増加させ、マウス肝発がんに対して腫瘍促進因子として作用することが示唆された。

さらに、PBOのマウス肝発がん促進作用におけるDNAメチル化の影響を明らかにする目的で、前章の実験で使用したマウス肝の非がん部から抽出したゲノムDNAを用いて解析を行った。ゲノムDNAを抗5-methylcytosine抗体により免疫沈降した後、NimbleGen Mouse oligo nucleotideプロモーターアレイを用いてDNAメチレーションの網羅的解析を実施した。DNAメチレーションマイクロアレイ解析により、PBO投与マウスの非がん部とDEN単独群の非がん部を比較した結果、転写開始点より上方に100bpの間で、1.5倍以上メチル化が増加したものが31個認められた。その中には、細胞周期G1/S期進行に関与する*Cdc34*や*Gspt1*遺伝子のプロモーター配列が認められた。real-time RT-PCRの解析では、*Tnfrsf26*や*Serpina3m*のプロモーター領域に位置する遺伝子の発現レベルの減少が確認された。さらに、免疫組織化学染色では、WDR6とCmtm4は、変異増殖巣、肝細胞腺腫および肝細胞癌において陽性を示したが、DEN+PBO群の非がん部ではその発現はみられなかった。

以上の実験結果から、PBOは、マウス肝において代謝経路を経てROSを産生する可能性が示唆されたが、それに伴う酸化的DNA損傷は発現しないことが示唆され、PBOによる過剰なROS産生は、*c-Myc*や*E2F1*が関与する細胞増殖を活性化し、DEN誘発マウス肝発がんにおける腫瘍促進効果を増強していることが示唆された。さらに、DNAメチル化プロファイルの解析結果から、非がん部ないし増殖性病変部におけるプロモーター領域のメチル化変動が、細胞周期関連遺伝子の変調を引き起こす可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

ピペロニルブトキサイド（PBO）は、非遺伝毒性肝発がん物質として知られている。そのラット肝発がん機序には、代謝経路を介した活性酸素種（ROS）の産生とそれに伴う酸化的DNA損傷が関与している可能性が示唆されているが、マウスにおいてこの酸化的損傷が関与するか否かは明らかではない。本研究では、PBOの代謝過程において生じると考えられる酸化ストレスと細胞周期調節に関わる遺伝子発現及びゲノムのメチル化プロファイルの変動に着目して以下の実験を行った。

第1章では、酸化ストレスがPBOの肝発がん形成の初期に関与するか否かを明らかにするため、二段階肝発がんモデルを用いて実験を行った。その結果、肝前がん病変巣の増加と共に抗酸化酵素の遺伝子発現や酸化ストレス指標の増加、細胞増殖活性の上昇がみられたが、ラットとは異なり、酸化ストレス増大に伴う酸化的DNA損傷は認められなかった。これらのことから、PBOの肝発がん促進機序には、酸化ストレス及び細胞増殖亢進の関与が示唆された。

第2章では、確認された酸化ストレス応答・細胞増殖亢進の腫瘍形成への関与を検討するため、PBO投与により腫瘍を形成させた肝臓において、これら分子の発現変動及び酸化的DNA損傷を解析した。その結果、PBO誘発肝発がんには、酸化的DNA損傷は関与しないことが明かとなった。一方、増殖活性の亢進も認められ、これらの変化による肝発がん機序への関与が示唆された。

第3章では、PBO投与によるDNAメチル化変動と肝発がんの影響を明らかにする目的で、PBO投与により腫瘍を形成させた肝臓の非がん部におけるプロモーター領域のメチル化変動及び転写制御をうける分子の発現変動を解析した。その結果、PBO投与によりメチル化状態の変動が、細胞周期関連遺伝子などの発現に影響し、肝発がんに寄与することが示唆された。

以上の結果から、PBOのマウス肝発がん促進機序は、その代謝過程に関連した酸化ストレスの誘発及び細胞増殖の亢進が寄与することが示唆されたが、ラットとは異なり、酸化ストレスに起因する酸化的DNA損傷は発現しないことが示唆された。さらに、DNAメチル化プロファイルの解析結果から、非がん部ないし増殖性病変部におけるプロモーター領域のメチル化変動が、細胞周

期関連遺伝子の変調を引き起こす可能性が示唆された。本研究成果は、酸化ストレスを誘発する非遺伝毒性肝発がん物質の機序解明の一助となるものと考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Mechanistic study on hepatocarcinogenesis of piperonyl butoxide in mice
著 者 名 : Kawai, M., Saegusa, Y., Jin, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 37(6): 761-769, 2009
- 2) 題 目 : Elevation of cell proliferation via generation of reactive oxygen species by piperonyl butoxide contributes to its liver tumor promoting effects in mice
著 者 名 : Kawai, M., Saegusa, Y., Dewa, Y., Nishimura, J., Kemmochi, S., Harada, T., Ishii, Y., Umemura, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : In Press
- 3) 題 目 : Cytokeratin 8/18 is a useful immunohistochemical marker for hepatocellular proliferative lesions in mice
著 者 名 : Kawai, M., Saegusa, Y., Kemmochi, S., Harada, T., Shimamoto, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Hepatocarcinogenic susceptibility of fenofibrate and its possible mechanism of carcinogenicity in a two-stage hepatocarcinogenesis model of rasH2 mice
著 者 名 : Kawai, M., Jin, M., Nishimura, J., Dewa, Y., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Taniai, E., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 36(7): 950-957, 2008
- 2) 題 目 : Role of Nrf2 and oxidative stress on fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats
著 者 名 : Nishimura, J., Dewa, Y., Okamura, T., Jin, M., Saegusa, Y., Kawai, M., Umemura, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 106(2): 339-349, 2008
- 3) 題 目 : Threshold dose of piperonyl butoxide that induces reactive oxygen species-mediated hepatocarcinogenesis in rats
著 者 名 : Muguruma, M., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Saegusa, Y., Yasuno, H., Jin, M., Matsumoto, S., Takabatake, M., Arai, K. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 83(2): 183-193, 2009
- 4) 題 目 : Crosstalk between PTEN/Akt2 and TGF β signaling involving EGF receptor down-regulation during the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model
著 者 名 : Taniai, E., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Takahashi, M., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Cancer Science
巻・号・頁・発行年 : 100(5): 813-820, 2009

- 5) 題 目 : Involvement of oxidative stress in hepatocellular tumor-promoting activity of oxfendazole in rats
 著 者 名 : Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Umemura, T. and Mitsumori, K.
 学術雑誌名 : Archives of Toxicology
 巻・号・頁・発行年 : 83(5): 503-511, 2009

- 6) 題 目 : Molecular expression analysis of β -Naphthoflavone-induced hepatocellular tumors in rats
 著 者 名 : Dewa, Y., Nishimura, J., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, Y., Harada, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
 学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
 巻・号・頁・発行年 : 37(4): 446-455, 2009

- 7) 題 目 : Involvement of glycogen synthase kinase-3 β signaling and aberrant nucleocytoplasmic localization of retinoblastoma protein in tumor promotion in a rat two-stage thyroid carcinogenesis model
 著 者 名 : Ago, K., Saegusa, Y., Nishimura, J., Dewa, Y., Kemmochi, S., Kawai, M., Harada, T., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology
 巻・号・頁・発行年 : In press

- 8) 題 目 : Modification of dietary copper levels on the early stage of tumor-promotion with propylthiouracil in a rat two-stage thyroid carcinogenesis model
 著 者 名 : Shima, T., Nishimura, J., Dewa, Y., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Kawai, M., Harada, T., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Chemico-Biological Interactions
 巻・号・頁・発行年 : 180(2): 267-270, 2009

- 9) 題 目 : Rapid deposition of glomerular IgA in BALB/c mice by nivalenol and its modifying effect on high IgA strain (HIGA) mice
 著 者 名 : Dewa, Y., Kemmochi, S., Kawai, M., Saegusa, Y., Harada, T., Shimamoto, K., Mitsumori, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology
 巻・号・頁・発行年 : In press