

氏名(本(国)籍)	嶋本敬介(兵庫県)
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351号
学位授与年月日	平成24年3月13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	ラット肝二段階発がんモデルによる Indole-3-Carbinol (I3C)のラットにおける肝腫瘍プロモーション作用の解析
審査委員	主査 東京農工大学 教授 下田 尖 副査 帯広畜産大学 教授 古岡 秀文 副査 岩手大学 教授 御領 政信 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

Indole-3-carbinol (I3C)はブロッコリーやキャベツなど *Brassicaceae* (アブラナ科) の野菜に含まれるアルカロイドで、抗酸化作用による腫瘍抑制効果があるとして、米国ではサプリメントとして用いられている。その抑制メカニズムには、NF- κ B 経路, Akt 経路および MAPK 経路が関与していると考えられている。一方, I3C は、肝腫瘍プロモーション作用を示すとの報告があり、また, CYP1A 誘導剤としても知られている。興味深いことに β -naphthoflavone (BNF) やピペロニルブトキサイドなどの CYP1A 誘導剤のいくつかは、肝腫瘍プロモーション作用を有しており、その機序には活性酸素種 (ROS) の関与が報告されている。すなわち、これらの物質では、CYP1A 等の薬物代謝の過程で ROS が産生され、その ROS が細胞膜および遺伝子の傷害ないし各種のシグナルカスケードを活性化することで、肝腫瘍プロモーション作用を誘発するものと推察される。そこで、本研究では、ROS 産生という観点から、肝腫瘍プロモーション作用のメカニズムをラット肝二段階発がんモデルにより解析した。

第1章では、3種の CYP1A 誘導剤、すなわち I3C, BNF および Flutamide (FLU)を用いて、CYP1A の誘導能の差異による肝腫瘍プロモーション作用を比較検討した。6週齢雄性 F344 ラットに diethylnitrosamine でイニシエーション処置を施し、その2週間後から6週間にわたり各剤の投与を行い、さらに、投与一週間後には2/3部分肝切除を施した。投与経路は混餌投与を選択し、濃度はそれぞれ0.5%、1.0%ないし0.25%とした。全群の肝臓でラット前がん病変マーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P)の陽性細胞巢の発生が認められた。発生した GST-P 陽性巢の数および面積は BNF > I3C > FLU であり、その優劣は *Cyp1a1* の mRNA 誘導能と一致した。このことか

ら GST-P 陽性細胞巢の増加と CYP1A 誘導剤との関連が示唆され、また、I3C には肝腫瘍プロモーション作用があることが示された。

第2章では、CYP1A 誘導と腫瘍プロモーション作用との関係をより明確に示すため、I3C の濃度依存性を検討した。投与期間は9週間、投与濃度は0, 0.25, 0.5 ないし 1.0%としたことを除き、他は実験1と同様の実験系を用いた。GST-P 陽性巢の発生率は、濃度依存的に増加し、*Cyp1a1* の誘導作用も濃度依存的に増加した。さらに、*Gsta5*, *Gstm2* や *Ggt1* などの薬物第二相酵素に関連した所謂 Nrf2-gene batteries の誘導が濃度依存的に発現した。Nrf2-gene batteries は、ROS に起因する転写因子 NRF2 の核移行により、その下流の遺伝子群が活性化されることから、I3C 投与により ROS が生じている可能性が示唆された。そこで、CYP1A の主な局在場所であるミクロソーム画分における ROS を測定したところ、この画分において CYP1A 由来とする ROS 産生の増加が認められた。過酸化脂質の指標である TBARS や酸化 DNA マーカーである 8-OHdG はゲノム中での増加が認められた。さらに、DNA 損傷チェックポイント因子である *Chek1* の増加が認められた。これらのことから、I3C は CYP1A に起因した酸化ストレスを引き起こしていることが明らかとなった。増殖亢進を検討するため PCNA 染色を行ったところ、I3C 投与によって PCNA の陽性細胞数の増加が認められ、酸化ストレスにより細胞増殖活性も亢進していることが示唆された。

第3章では、さらに、酸化ストレスの亢進による肝腫瘍プロモーション作用を確認するため、I3C 投与に加え抗酸化物質を併用投与した場合の影響を検討した。抗酸化物質としては、N-acetyl-L-cystein (NAC) を使用した。NAC は、生体内抗酸化物質であるグルタチオンの前駆体である。投与方法としては、I3C は 0.5% の混餌投与で、NAC は 0.3% の飲水投与とした。併用投与の結果、GST-P 陽性細胞巢が I3C 単独群に比較し減少した。real time RT-PCR 解析により *Cyp1a1* の発現量を比較したところ、有意差は認められず、ミクロソーム画分の ROS 産生においても変化はみられなかった。しかしながら、Nrf2-gene batteries の *Nqo1*, *Gpx2* および *Me1* は NAC の投与により減少した。このことから、NAC 投与により ROS が捕捉され、減少したことが示唆された。しかしながら、ゲノム中の 8-OHdG は減少せず、対照群と比しても増加したままであった。したがって、NAC 投与による GST-P 陽性細胞の減少は、DNA への酸化損傷よりもむしろシグナルカスケードの減弱に起因しているものと考えられた。そこで、ROS によって活性化されると考えられる MAPK カスケードの各種因子について real time RT-PCR 解析を行ったところ、初期応答転写因子 *Myc* が減少し、*Fos* も減少したが、その他の上流遺伝子についての変動は認められなかった。

以上のように、I3C には肝腫瘍プロモーション作用があることが示され、その機序としては、ROS 産生により酸化ストレスが生じ、その結果としてシグナルカスケードの活性化、過酸化脂質の発生、DNA の酸化損傷が惹起され、肝腫瘍プロモーション作用が誘発されるものと推測された。一方、NAC は I3C の肝腫瘍プロモーション作用を抑制したが、その抑制作用には DNA へ酸化損傷よりもシグナルカスケードに対して抑制的に作用するものと考えられた。以上のことから、今回の実験成績は、I3C のような CYP1A 誘導剤の肝発癌機序を理解する上で、重要な知見を提供し得るものと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

Indole-3-carbinol (I3C)は、肝腫瘍プロモーション作用を示すとの報告があり、さらに CYP1A 誘導剤としても知られている。 β -naphthoflavone (BNF) やピペロニルブトキサイドのように CYP1A 誘導剤のいくつかは、肝腫瘍プロモーション作用を有し、その機序には活性酸素種 (ROS) の関与が報告されている。すなわち、これらの物質では、CYP1A 等の薬物代謝の過程で ROS が産生され、ROS が細胞膜および遺伝子の傷害ないし各種のシグナルカスケードを活性化することで、

肝腫瘍プロモーション作用を誘発すると推察される。本研究では、ROS 産生の観点から肝腫瘍プロモーション作用メカニズムをラット肝二段階発がんモデルにより分子病理学的に解析したものである。

第1章では、3種のCYP1A誘導剤、すなわちI3C、BNFおよびFlutamide (FLU)を用いて、CYP1Aの誘導能の差異による肝腫瘍プロモーション作用を比較検討した。その結果、全群の肝臓でラット前がん病変マーカーであるglutathione S-transferase placental form (GST-P)の陽性細胞巢の発生が認められた。発生したGST-P陽性巢の数および面積はBNF > I3C > FLUであり、その優劣は*Cyp1a1*のmRNA誘導能と一致した。このことからGST-P陽性細胞巢の増加とCYP1A誘導剤との関連が示唆され、また、I3Cに肝腫瘍プロモーション作用があることが示された。

第2章では、CYP1A誘導と腫瘍プロモーション作用との関係をより明確に示すため、I3Cの濃度依存性を検討した。GST-P陽性巢は濃度依存的に増加し、PCNA陽性細胞の増加も認められた。*Cyp1a1*の誘導は濃度依存的に生じ、またROSにより転写活性化される遺伝子群Nrf2-gene batteriesにおいて、薬物第二相酵素のmRNA誘導も濃度依存的に発現した。ミクロソーム画分ではCYP1A活性由来のROS産生の増加がみられ、さらに脂質の過酸化を示すTBARSや酸化型DNAである8-OhdGのゲノム中での増加が認められた。従って、I3CはCYP1Aに起因した酸化ストレスを引き起こし、細胞増殖活性も亢進していることが示唆された。

第3章では、酸化ストレスの亢進による肝腫瘍プロモーション作用を確認するため、I3C投与に加え抗酸化物質N-acetyl-L-cysteine (NAC)を併用投与した場合の影響を検討した。その結果、NAC投与によりGST-P陽性細胞巢がI3C単独群に比較し減少した。一方、*Cyp1a1*の発現量に変化は認められず、ミクロソーム画分のROS産生においても変化はみられなかった。しかしながら、Nrf2-gene batteriesの*Nqo1*、*Gpx2*および*Me1*はNAC投与により減少した。このことから、NAC投与により酸化ストレスの減少したことが示唆され、酸化ストレスが肝腫瘍プロモーションに関与していることが示された。

以上のように、I3Cには肝腫瘍プロモーション作用があることが示され、その機序としては、ROS産生により酸化ストレスが生じ、その結果としてシグナルカスケードの活性化、過酸化脂質の発生、DNAの酸化損傷が惹起され、肝腫瘍プロモーション作用が誘発されるものと推察された。一方、NACはI3Cの肝腫瘍プロモーション作用を抑制したが、その抑制作用には増殖活性に対して抑制的に作用するものと考えられた。以上のことから、今回の実験成績は、I3CのようなCYP1A誘導剤の肝発癌機序を理解する上で、重要な知見を提供し得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 : Indole-3-carbinol enhances oxidative stress responses resulting in the induction of preneoplastic liver cell lesions in partially hepatectomized rats initiated with diethylnitrosamine
著 者 名 : Shimamoto, K., Dewa, Y., Ishii, Y., Kemmochi, S., Taniai, E., Hayashi, H., Imaoka, M., Morita, R., Kuwata, K., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 283(2-3): 109-117, 2011
- 2) 題 目 : Relationship between CYP1A induction by indole-3-carbinol or flutamide and liver tumor-promoting potential in rats
著 者 名 : Shimamoto, K., Dewa, Y., Kemmochi, S., Taniai, E., Hayashi, H., Imaoka, M., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 85(9): 1159-1166, 2011
- 3) 題 目 : Antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) supplementation reduces reactive oxygen species (ROS)-mediated hepatocellular tumor promotion of indole-3-carbinol (I3C) in rats
著 者 名 : Shimamoto, K., Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Imaoka, M., Ishii, Y., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 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
卷・号・頁・発行年 : 72(3): 263-269, 2010
- 2) 題 目 : Induction of GST-P-positive proliferative lesions facilitating lipid peroxidation with possible involvement of transferrin receptor up-regulation and ceruloplasmin down-regulation from the early stage of liver tumor promotion in rats
著 者 名 : Mizukami, S., Ichimura, R., Kemmochi, S., Taniai, E., Shimamoto, K., Ohishi, T., Takahashi, M., Mitsumori, K. and Shibutani M.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 84(4): 319-331, 2010
- 3) 題 目 : Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats
著 者 名 : Saegusa, Y., Woo, GH., Fujimoto, H., Kemmochi, S., Shimamoto, K., Hirose, M., Mitsumori, K., Nishikawa, A. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 29(4): 407-414, 2010
- 4) 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
卷・号・頁・発行年 : 63(1-2): 17-24, 2011
- 5) 題 目 : Immunohistochemical analyses at the late stage of tumor promotion by oxfendazole in a rat hepatocarcinogenesis model
著 者 名 : Dewa, Y., Nishimura, J., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, Y., Kenmochi, S., Shimamoto, K., Harada, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 85(2): 155-162, 2011
- 6) 題 目 : Concomitant apoptosis and regeneration of liver cells as a mechanism of liver-tumor promotion by β -naphthoflavone involving TNF α -signaling due to oxidative cellular stress in rats
著 者 名 : Kuwata, K., Shibutani, M., Hayashi, H., Shimamoto, K., Hayashi, SM., Suzuki, K. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 283(1): 8-17, 2011
- 7) 題 目 : Suppressive effect of enzymatically modified isoquercitrin on phenobarbital-induced liver tumor promotion in rats
著 者 名 : Morita, R., Shimamoto, K., Ishii, Y., Kuwata, K., Ogawa, BI., Imaoka, M., Hayashi, SM., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 85(11): 1475-1484, 2011
- 8) 題 目 : Evaluation of in vivo genotoxic potential of fenofibrate in rats subjected to two-week repeated oral administration
著 者 名 : Tawfeeq, MM., Suzuki, T., Shimamoto, K., Hayashi, H., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 85(8): 1003-1011, 2011