

| | |
|---------------|---|
| 氏名（本（国）籍） | 谷 合 枝里子（東京都） |
| 主 指 導 教 員 名 | 東京農工大学 教授 渋谷 淳 |
| 学 位 の 種 類 | 博士（獣医） |
| 学 位 記 番 号 | 獣医博甲第381号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成25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 | 巨大核出現メカニズムを基盤としたin vivo 短期発がん 性予測指標の探索に関する研究 |
| 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 古 林 与志安 副査 岩 手 大 学 教 授 御 領 政 信 副査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いたがん原性試験は、長期間に及ぶ投与のため、コスト、評価の効率性や動物愛護の面等で課題があり、短期検出系の確立が求められている。一方、実験的に動物に対して腎発がん物質を投与すると、その初期より腎尿細管上皮細胞に巨大核をしばしば誘発することが報告されている。この巨大核の誘発性には、染色体不安定性を引き起こす細胞周期異常を介した発がん機序への関与が推定されている。そこで本研究では、巨大核出現メカニズムを基盤として発がん物質のラット 28 日間反復投与試験の枠組みでの短期発がん性予測指標の探索を行った。

第1章では、腎臓を標的とした腎発がん物質の28日間反復投与実験を行い、短期腎発がん性予測指標候補を抽出した。巨大核誘発腎発がん物質として ferric nitrilotriacetic acid, ochratoxin A (OTA), monuron, 巨大核誘発非発がん物質として *p*-nitrobenzoic acid を用いた。また巨大核非誘発腎発がん物質として tris(2-chloroethyl) phosphate, potassium bromate, 巨大核非誘発非発がん物質として acetaminophen (APAP) を用い、発がん物質は発がん用量を、非発がん物質は毒性用量を投与した。解剖後採材した腎臓を対象として主要な細胞周期関連分子と共にマイクロアレイ発現解析の結果選別された分子群の免疫組織化学的な発現分布解析を行った。その結果、巨大核誘発腎発がん物質では、DNA 損傷により活性化する γ H2AX および phosphorylated Chk2 の陽性細胞と、M 期異常を反映する Cdc2 の核内局在細胞が増加を示し、DNA 損傷後に M 期に留まる細胞の増加が示唆された。一方、巨大核誘発の有無に関わらず、腎発がん物質に共通して、細胞増殖指標である Ki-67 および minichromosome maintenance 3 (Mcm3), G₂/M 移行期に機能し、細胞増殖指標としても知られる

topoisomerase II α (Topo II α), M 期スピンドルチェックポイントの破綻に機能する ubiquitin D (Ubd) およびアポトーシス指標である TUNEL 陽性細胞の増加が示され、これらが短期発がん性予測指標候補として見出された。

第2章では、第1章で得られた指標候補を短期の発がん性予測指標候補として、標的臓器の異なる発がん物質にも広く対応可能か検討した。発がん物質は、肝臓では thioacetamide (TAA), fenbendazole, piperonyl butoxide (PBO) および methyleugenol, 甲状腺では sulfadimethoxine (SDM), 膀胱では phenylethyl isothiocyanate (PEITC), 前胃では butylated hydroxyanisole, 腺胃では catechol, 大腸では chenodeoxycholic acid および 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine を用い、各々発がん用量ないし発がん促進用量のラット 28 日間反復投与実験を行った。また、非発がん物質として肝臓では APAP と α -naphthyl isothiocyanate の毒性用量、それ以外の臓器では, caprolactam の発がん性の知られていない最大用量を投与した。その結果、肝発がん物質である PBO および大腸の二つの発がん物質を除いた全ての発がん物質で細胞増殖活性の亢進を見出し、それらは Topo II α , Ubd およびアポトーシスも同様に高い反応性を示した。また、OTA および TAA 投与例では、Topo II α と Ubd の共発現細胞の増加が認められ、G₂ 期での Ubd の異常な発現と、続く M 期でのスピンドルチェックポイントの破綻から染色体の不安定性、あるいはアポトーシスを導く可能性が示唆された。以上のことより、投与後 28 日目で細胞増殖活性を亢進した発がん物質では、Ki-67 および Mcm3 を含め、Topo II α , Ubd およびその 2 分子の共発現とアポトーシスが短期発がん性予測指標になり得ることが示唆された。

第3章では、第1章および第2章で得られた短期発がん性予測指標と、発がん過程早期との関連性を明らかにするため、発がんプロモーション過程早期に形成される前がん病変ないし過形成病変を標的とした指標候補の反応性を検討した。ラット二段階発がんモデルを用いて、プロモーターとして肝臓では PBO, methapyrilene, 甲状腺では SDM, 膀胱では PEITC, そして前胃および腺胃では catechol を選択し、それぞれ標的臓器のイニシエーション処置後に投与した。その結果、Ki-67, Mcm3, Topo II α , そしてアポトーシスは、前がん病変指標分子である肝臓の glutathione S-transferase placental form (GST-P) ないし甲状腺の phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (p-Erk1/2) 陽性前がん病変内で陽性細胞数が増加した。また、前がん病変指標の存在が知られていない膀胱、前胃および腺胃の過形成病変内でも同様の反応性を示し、さらに Ubd へも高い反応性を示した。その結果、指標候補のうち Ubd にのみ反応性を示さなかった肝臓の GST-P ないし甲状腺の p-Erk1/2 陽性前がん病変では、この過程にもはや Ubd による M 期破綻は関与しておらず、Ubd を含む指標候補全てに反応性を示した膀胱、前胃および腺胃の過形成病変では、28 日間投与例と同様の反応性であることから、前がん病変の過程に入る以前の状態にあり、前がん病変としての細胞の特性をまだ有していないと考えられた。

以上のことより、ラット 28 日間反復投与時に増殖活性亢進を反映して Ki-67 および Mcm3 陽性細胞の増加を示した発がん物質では、Topo II α , Ubd およびその共発現と TUNEL 陽性アポトーシスが化学物質の短期発がん性予測指標になり得る可能性が示唆された。また、発がんプロモーション早期過程で、これらの指標候補のうち Ubd にのみ反応性を示さなかった前がん病変では、この病変形成過程に Ubd による M 期破綻が関与しておらず、Ubd を含む指標候補全てに反応性を示した過形成病変では、28 日間試験と同様の反応性であることから、前がん病変形成以前の過程を反映しているものと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究では、現行のがん原性試験の問題点を解決し、短期間に化学物質の発がん性を検出し得る系の確立のために、巨大核出現メカニズムを基盤とした短期発がん性予測指標の探索を行った。

第1章では、腎臓を標的とする腎発がん物質のラット28日間反復投与実験より、巨大核誘発腎発がん物質では、巨大核を誘発するような腎発がん性に先立ちDNA損傷が生じ、続いてM期に留まる細胞が増加することを見出した。一方、巨大核誘発性の有無に関わらず、腎発がん物質に共通して細胞増殖指標のKi-67およびminichromosome maintenance 3 (Mcm3), G₂/M移行期に機能し、細胞増殖指標としても知られるtopoisomerase II α (Topo II α), M期スピンドルチェックポイント破綻に機能するubiquitin D (Ubd) およびTUNEL陽性アポトーシスが高い反応性を示し、これらを腎発がん性予測指標候補として見出した。

第2章では、標的臓器の異なる発がん物質のラット28日間反復投与例に対する第1章の指標候補の反応性より、細胞増殖活性が高い細胞集団の中で、Topo II α とUbdの高い共発現はG₂期でのUbdの過剰発現を意味し、M期破綻から染色体の不安定性、ないしアポトーシスを導く可能性を示唆した。それゆえ、標的臓器を問わず、投与後28日目で増殖活性の高い発がん物質では、Topo II α , Ubdおよびその共発現とアポトーシスが短期発がん性予測指標になり得ることを示した。

第3章では、ラット二段階発がんモデルを用いて、標的臓器の異なる発がん物質の発がんプロモーション過程早期に誘発される病変と第2章までで得られた指標との関連性を検討した。その結果、指標候補のうちUbdにのみ反応性を示さなかった前がん病変では、この過程にもはやM期破綻は関与しておらず、Ubdを含む指標候補全てに反応性を示した過形成病変では、28日間投与例と同様の反応性であることから、前がん病変の過程に入る以前の状態にあることを示した。

以上の結果から、発がん物質のラット28日間反復投与実験で、増殖活性を亢進した発がん物質では、Topo II α , Ubdおよびその共発現とアポトーシスが化学物質の短期発がん性予測指標になり得る可能性を示した。また、指標候補の反応性より前がん病変にはもはやM期破綻が関与しておらず、過形成病変は前がん病変の過程に入る以前の状態であることを示唆した。

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 : Cellular distribution of cell cycle-related molecules in the renal tubules of rats treated with renal carcinogens for 28 days: relationship between cell cycle aberration and carcinogenesis
著 者 名 : Taniai, E., Hayashi, H., Yafune, A., Watanabe, M., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 86 (9) : 1453-1464, 2012
- 2) 題 目 : Aberrant activation of ubiquitin D at G₂ phase and apoptosis by carcinogens that evoke cell proliferation after 28-day administration in rats
著 者 名 : Taniai, E., Yafune, A., Hayashi, H., Itahashi, M., Hara-Kudo, Y., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 37 (6) : 1093-1111, 2012

- 3) 題 目 : Fluctuations in cell proliferation, apoptosis, and cell cycle regulation at the early stage of tumor promotion in rat two-stage carcinogenesis models
著 者 名 : Taniai, E., Yafune, A., Kimura, M., Morita, R., Nakane, F., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 37 (6) : 1113-1126, 2012

既発表学術論文

- 1) 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
巻・号・頁・発行年 : 84 (4) : 319-331, 2010
- 2) 題 目 : Tumor promotion by copper-overloading and its enhancement by excess iron accumulation involving oxidative stress responses in the early stage of a rat two-stage hepatocarcinogenesis model
著 者 名 : Mizukami, S., Ichimura, R., Kemmochi, S., Wang, L., Taniai, E., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Chemico-Biological Interactions
巻・号・頁・発行年 : 185 (3) : 189-201, 2010
- 3) 題 目 : Disruption of Smad-dependent signaling for growth of GST-P-positive lesions from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model
著 者 名 : Ichimura, R., Mizukami, S., Takahashi, M., Taniai, E., Kemmochi, S., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 246 (3) : 128-140, 2010
- 4) 題 目 : A neuroendocrine carcinoma of undetermined origin in a dog
著 者 名 : Kuwata, K., Shibutani, M., Kenmochi, Y., Taniai, E., Morita, R., Ogawa, B. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : Journal of Toxicological Pathology
巻・号・頁・発行年 : 23 (3) : 151-155, 2010
- 5) 題 目 : No effect of sustained systemic growth retardation on the distribution of Reelin-expressing interneurons in the neuron-producing hippocampal dentate gyrus in rats
著 者 名 : Ohishi, T., Wang, L., Ogawa, B., Fujisawa, K., Taniai, E., Hayashi, H., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Reproductive Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 30 (4) : 591-599, 2010
- 6) 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

- 7) 題 目 : Neuroendocrine carcinoma of the apocrine glands of the anal sac in a dog
 著 者 名 : Ogawa, B., Taniai, E., Hayashi, H., Imaoka, M., Machida, N., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation
 卷・号・頁・発行年 : 23 (4) : 852-856, 2011
- 8) 題 目 : Disruptive neuronal development by acrylamide in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure in rats
 著 者 名 : Ogawa, B., Ohishi, T., Wang, L., Takahashi, M., Taniai, E., Hayashi, H., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Archives of Toxicology
 卷・号・頁・発行年 : 85 (8) : 987-994, 2011
- 9) 題 目 : Spermatocytic seminoma with neuroectodermal differentiation and sertoli cell tumor in a dog
 著 者 名 : Saegusa, Y., Hayashi, H., Taniai, E., Imaoka, M., Ohishi, T., Wang, L., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Veterinary Pathology
 卷・号・頁・発行年 : 48 (5) : 1024-1028, 2011
- 10) 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
 卷・号・頁・発行年 : 85 (9) : 1159-1166, 2011
- 11) 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
 卷・号・頁・発行年 : 36 (6) : 775-786, 2011
- 12) 題 目 : Reversible aberration of neurogenesis targeting late-stage progenitor cells in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to acrylamide
 著 者 名 : Ogawa, B., Wang, L., Ohishi, T., Taniai, E., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Archives of Toxicology
 卷・号・頁・発行年 : 86 (5) : 779-790, 2012
- 13) 題 目 : Protective effect of *Stachybotrys microspora* triphenyl phenol-7 on the deposition of IgA to the glomerular mesangium in nivalenol-induced IgA nephropathy using BALB/c mice
 著 者 名 : Kemmochi, S., Hayashi, H., Taniai, E., Hasumi, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Mitsumori, K. and Shibutani, M.
 学術雑誌名 : Journal of Toxicological Pathology
 卷・号・頁・発行年 : 25 (2) : 149-154, 2012
- 14) 題 目 : Liver tumor promoting effect of omeprazole in rats and its possible mechanism of action
 著 者 名 : Hayashi, H., Shimamoto, K., Taniai, E., Ishii, Y., Morita, R., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
 学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
 卷・号・頁・発行年 : 37 (3) : 491-501, 2012

- 15) 題 目 : Threshold dose of liver tumor promoting effect of β -naphthoflavone in rats
著 者 名 : Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Yafune, A., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 37 (3) : 517-526, 2012
- 16) 題 目 : Enhanced liver tumor promotion but not liver initiation activity in rats subjected to combined administration of omeprazole and β -naphthoflavone
著 者 名 : Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Hayashi, M., Nakamura, D., Wakita, A., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 37 (5) : 969-985, 2012