

| | |
|------------|--|
| 氏名(本(国)籍) | 黒田 颯 (三重県) |
| 主指導教員氏名 | 岐阜大学 教授 柳井 徳 磨 |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 獣医博甲第436号 |
| 学位授与年月日 | 平成27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 | 岐阜大学 |
| 学位論文題目 | Studies on the Modes of Action Underlying Renal Carcinogenic Mycotoxins in Rodents (腎発がん性を有するマイコトキシンのげっ歯類における発がん機序に関する研究) |
| 審査委員 | 主査 岐阜大学 教授 海野 年 弘 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 |

学位論文の内容の要旨

食品汚染物質であるオクラトキシンA (OTA) およびシトリニン (CTN) は *Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の真菌が産生するマイコトキシンの一種であり、げっ歯類に腎細胞腺腫あるいは腎細胞癌を高頻度に誘発する。本研究では、OTA が誘発する遺伝子突然変異の詳細、およびその発生機序について検討した。

第一章では、*gpt delta* ラットに発がん用量 (5 ppm) の OTA を4週間投与し、発がん標的部位である腎臓髄質外層におけるレポーター遺伝子上の変異パターンを確認したところ、1キロ塩基対以上の欠失変異 (large deletion) が認められた。また、OTA を投与した *gpt delta* ラット腎臓を用いて、DNA 二重鎖切断 (DSB) マーカー γ -H2AX の免疫組織化学を実施したところ、 γ -H2AX 陽性細胞が腎臓髄質外層外帯近位尿細管に認められた。さらに、OTA 投与により DSB 修復系である相同遺伝子組み換え修復 (HR) 関連遺伝子 (*Rad51*, *Brip1*) の mRNA 発現量の増加が認められた。

第二章では、*p53*^{-/-}マウスおよびその野生型 (WT) に OTA を発がん用量 (5 mg/kg) で3日間あるいは4週間強制経口投与したところ、OTA 投与により腎臓のコメットアッセイは陽性となったが、その DNA 損傷の程度は遺伝子型間で変化なかった。また、OTA 投与により増加した腎臓髄質外層外帯の尿細管上皮細胞の γ -H2AX 陽性率は、WT との比較では、*p53*^{-/-}マウスで有意に高かったことから、*p53* は OTA が誘発する DNA 損傷には関与せず、DNA 損傷から DSB が誘発される過程を抑制していると考えられた。さらに、cDNA microarray による網羅的遺伝子発現解析および mRNA/タンパク質発現解析では、OTA 投与で WT マウスにおける G1/S 期停止遺伝子 *Cdkn1a* が増加したが、*p53*^{-/-}マウスでは変動はなかった。同時に、*p53*^{-/-}マウスでは細胞周期促進関連遺伝子 (*Ccn1*, *Ccnb1*) が認められ、さらに DSB 修復関連遺伝子 (*Rad51*, *Rad54l*) の mRNA 増加が

認められたことから、細胞周期促進が DSB 形成を促進していると考えられた。以上のことから、OTA 投与により、ラットおよびマウスの発がん部位に形成された DSB を起点とし、遺伝子突然変異が生じること、さらに p53 は DSB の形成を抑制することで、遺伝子突然変異を防いでいると考えられた。したがって、OTA の腎発がん機序に遺伝毒性メカニズムの関与が示唆された。

第三章では、CTN の発がん機序解明を目的として、*gpt delta* ラットを用いたレポーター遺伝子突然変異試験に加え、*in vivo* コメットアッセイおよび *in vivo* 小核試験を実施し、CTN の遺伝毒性の有無を確認したところ、陰性であった。さらに、ラット腎皮質を用いたコメットアッセイ、ラット骨髄細胞を用いた小核試験についても陰性であったことから、CTN の腎発がん過程に遺伝毒性メカニズムの関与の可能性は低かった。次いで、CTN を 4 週間投与した *gpt delta* ラット腎皮質を用いて、細胞増殖に関与する遺伝子/タンパク質の発現解析を実施したところ、20 mg/kg 以上で PCNA 陽性細胞数、Cyclin E1/A2/B1 およびその転写因子である E2f1 の mRNA 発現量、さらには ERK1/2 蛋白のリン酸化亢進が認められたことから、CTN により ERK 経路の活性化を介した細胞増殖促進が生じていると考えられ、本作用と CTN の発がん機序との関連性が示唆された。

審査結果の要旨

食品汚染物質であるオクラトキシン A (OTA) およびシトリニン (CTN) は *Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の真菌が産生するマイコトキシンであり、げっ歯類に腎細胞腺腫あるいは腎細胞癌を高頻度に誘発する。本研究では、これらの発がん機序を明らかにする一環として、マイコトキシンが誘発する遺伝子突然変異の特徴、およびその発生機序について検討した。

第一章では、*gpt delta* ラットに発がん用量 (5 ppm) の OTA を 4 週間投与し、発がん標的的部位である腎臓髄質外層におけるレポーター遺伝子上の変異パターンを確認したところ、1 キロ塩基対以上の欠失変異が認められた。さらに、OTA を投与した *gpt delta* ラット腎臓を用いて、DNA 二重鎖切断 (DSB) マーカー γ -H2AX の免疫組織化学を実施したところ、腎臓髄質外層外帯近位尿細管に陽性反応が認められ、次いで DSB 修復系の相同遺伝子組み換え修復 (HR) 関連遺伝子 (Rad51, Brip1) の mRNA 発現量の増加がみられた。

第二章では、p53^{-/-}マウスおよびその野生型 (WT) に OTA を発がん用量で経口投与したところ、腎臓コメットアッセイは陽性であったが、その DNA 損傷の程度に遺伝子型間で差はなかった。また、OTA 投与で増加した腎臓髄質外層外帯の尿細管上皮細胞の γ -H2AX 陽性率は、WT に比べ、p53^{-/-}マウスが有意に高かったことから、p53 は OTA 誘発の DNA 損傷には関与せず、DSB 誘発の過程を抑制すると考えられた。さらに、cDNA microarray 網羅的遺伝子および mRNA/タンパク質発現解析では、OTA 投与で WT マウスの G1/S 期停止遺伝子 *Cdkn1a* の増加が確認されたが、p53^{-/-}マウスには変化はなかった。同時に、p53^{-/-}マウスでは細胞周期促進関連遺伝子 (*Ccne1*, *Ccnb1*) が認められ、さらに DSB 修復関連遺伝子 (Rad51, Rad54l) の mRNA 増加が認められたことから、細胞周期促進が DSB 形成を促進していると考えられた。以上のことから、OTA 投与により、ラットおよびマウスの発がん部位に形成された DSB を起点とし、遺伝子突然変異が生じること、さらに p53 は DSB の形成を抑制することで、遺伝子突然変異を防いでいると考えられた。したがって、OTA の腎発がん機序に遺伝毒性メカニズムの関与が示唆された。

第三章では、CTN の発がん機序解明を目的として、*gpt delta* ラットを用いたレポーター遺伝子突然変異試験に加え、*in vivo* コメットアッセイおよび *in vivo* 小核試験を実施し、CTN の遺伝毒性の有無を確認したところ、陰性であった。さらに、ラット腎皮質を用い

たコメントアッセイ，ラット骨髄細胞を用いた小核試験についても陰性であったことから，CTNの腎発がん過程に遺伝毒性メカニズムの関与の可能性は低かった。次いで，CTNを4週間投与した *gpt delta* ラット腎皮質を用いて，細胞増殖に關与する遺伝子/タンパク質の発現解析を実施したところ，20 mg/kg 以上で PCNA 陽性細胞数，Cyclin E1/A2/B1 およびその転写因子である E2f1 の mRNA 発現量，さらには ERK1/2 蛋白のリン酸化亢進が認められたことから，CTNにより ERK 経路の活性化を介した細胞増殖促進が生じていると考えられ，本作用と CTN の発がん機序との関連性が示唆された。

これらの研究は両マイコトキシンの発がん機序に関して基礎的なデータを与えるものであり，毒性病理学ならびに公衆衛生学見地からも重要な知見であると思われる。

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 : Cell cycle progression, but not genotoxic activity, mainly contributes to citrinin-induced renal carcinogenesis
著 者 名 : Kuroda, K., Ishii, Y., Takasu, S., Kijima, A., Matsushita, K., Watanabe, M., Takahashi, H., Sugita-Konishi, Y., Sakai, H., Yanai, T., Nohmi, T., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 311(3):216-224, 2013

- 2) 題 目 : Ochratoxin A induces DNA double-strand breaks and large deletion mutations in the carcinogenic target site of *gpt delta* rats
著 者 名 : Kuroda, K., Hibi, D., Ishii, Y., Takasu, S., Kijima, A., Matsushita, K., Masumura, K., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Sakai, H., Yanai, T., Nohmi, T., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Mutagenesis
巻・号・頁・発行年 : 29(1):27-36, 2014

- 3) 題 目 : Role of p53 in the progression from ochratoxin A-induced DNA damage to gene mutations in the kidneys of mice
著 者 名 : Kuroda, K., Hibi, D., Ishii, Y., Yokoo, Y., Takasu, S., Kijima, A., Matsushita, K., Masumura, K., Kodama, Y., Yanai, T., Sakai, H., Nohmi, T., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : in press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Determination of lucidin-specific DNA adducts by liquid chromatography with tandem mass spectrometry in the livers and kidneys of rats given lucidin-3-*O*-primeveroside
著 者 名 : Ishii, Y., Inoue, K., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kuroda, K., Fukuhara, K., Nishikawa, A. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Chemical Research in Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 25 (5): 1112-1118, 2012
- 2) 題 目 : Reporter gene mutation in the livers of *gpt* delta mice treated with 5-(hydroxymethyl)-2-furfural, a contaminant of various foods
著 者 名 : Matsushita, K., Ishii, Y., Kijima, A., Jin, M., Takasu, S., Kuroda, K., Kodama, Y., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 37(5): 1077-1082, 2012
- 3) 題 目 : *In vivo* genotoxicity of methyleugenol in *gpt* delta transgenic rats following medium-term exposure
著 者 名 : Jin, M., Kijima, A., Hibi, D., Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Kuroda, K., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 131 (2): 387-394, 2013
- 4) 題 目 : Molecular mechanisms underlying ochratoxin A-induced genotoxicity: global gene expression analysis suggests induction of DNA double-strand breaks and cell cycle progression
著 者 名 : Hibi, D., Kijima, A., Kuroda, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Jin, M., Nakajima, M., Sugita-Konishi, Y., Yanai, T., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Umemura, T.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 38 (1): 57-69, 2013
- 5) 題 目 : The effects of long-term exposure to ozokerite mainly consisting of an aliphatic series of hydrocarbons using F344 rats
著 者 名 : Kuroda, K., Kijima, A., Jin, M., Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Nishikawa, A. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 55: 476-483, 2013
- 6) 題 目 : Development of a medium-term animal model using *gpt* delta rats to evaluate chemical carcinogenicity and

- genotoxicity
著者名： Matsushita, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Kuroda, K., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Nohmi, T., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名： Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年： 26 (1): 19-27, 2013
- 7) 題目： Flumequine enhances the *in vivo* mutagenicity of MeIQx in the mouse liver
著者名： Kuroda, K., Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Jin, M., Matsushita, K., Kodama, Y. and Umemura, T.
学術雑誌名： Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年： 87 (8): 1609-1619, 2013
- 8) 題目： Combined application of comprehensive analysis for DNA modification and reporter gene mutation assay to evaluate kidneys of *gpt* delta rats given madder color or its constituents
著者名： Ishii, Y., Takasu, S., Kuroda, K., Matsushita, K., Kijima, A., Nohmi, T., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名： Analytical and Bioanalytical Chemistry
巻・号・頁・発行年： 406 (9-10): 2467-2475, 2014
- 9) 題目： *In vivo* genotoxicity of *Ginkgo Biloba* extract in *gpt* delta nice and constitutive androstane receptor knockout mice
著者名： Maeda, J., Kijima, A., Inoue, K., Ishii, Y., Ichimura, R., Takasu, S., Kuroda, K., Matsushita, K., Kodama, Y., Saito, N., Umemura, T. and Yoshida, M.
学術雑誌名： Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年： 140 (2): 298-306, 2014
- 10) 題目： Improvement and validation of a medium-term *gpt* delta rat model for predicting chemical carcinogenicity and underlying mode of action
著者名： Matsushita, K., Kuroda, K., Ishii, Y., Takasu, S., Kijima, A., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Nohmi, T., Ogawa, K., Nishikawa, A. and Umemura, T.
学術雑誌名： Experimental and Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年： 66 (7): 313-321, 2014
- 11) 題目： No effect of high fat diet-induced obesity on spontaneous reporter gene mutations in *gpt* delta mice
著者名： Takasu, S., Ishii, Y., Matsushita, K., Kuroda, K., Kijima, A., Kodama, Y., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名： Asian Pacific Journal of Cancer Prevention

卷・号・頁・発行年： 15 (17)： 7149-7152, 2014

- 12) 題 目： Pathological findings in Equine Herpesvirus 9-induced abortion in rats
- 著 者 名： El-Habashi, N., El-Nahass, E., Haridy, M., Nayel, M., Abdelaziz, A. A., Fukushi, H., Kuroda, K., Sakai, H. and Yanai, T.
- 学術雑誌名： Journal of Comparative Pathology
- 卷・号・頁・発行年： 151:400-459, 2014