

細胞周期移行時の分子発現異常を起点とした  
短期発がん予測系の開発に関する研究

2015 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
(東京農工大学)

木村 真之

## 目次

序論 .....	3
第 1 章 ラットの肝発がん物質投与早期から生じる細胞周期制御異常とその出現時期 の検討	
緒言 .....	7
材料および方法 .....	9
結果 .....	15
考察 .....	26
小括 .....	34
第 2 章 ラットの最大 90 日間反復投与例での肝発がん物質・肝発がんプロモーターの 細胞周期制御異常への関与の検討	
緒言 .....	36
材料および方法 .....	37
結果 .....	43
考察 .....	51
小括 .....	61
第 3 章 ラットの腎発がん物質投与早期から生じる細胞周期制御異常とその出現時期 の検討	

緒言.....	64
材料および方法 .....	65
結果.....	70
考察.....	78
小括.....	86
総合考察 .....	87
結論.....	93
謝辞.....	96
引用文献.....	97
要旨 .....	111
Abstract .....	115
図表 .....	121

## 序論

げっ歯類を用いた長期間がん原性試験は、化学物質の発がん性予測に広く用いられているが、投与が長期間に及ぶことから、コストや評価の効率性等で課題がある。これらの代替試験法として、トランスジェニック動物や遺伝子ノックアウト動物を用いた短期試験系 [14]、肝中期発がん性試験法や多臓器中期発がん性試験のような二段階発がんモデル [72] が開発されているが、これらもまた高コストで、多くの時間を必要とし、評価可能な標的臓器が限られている。現在、肝臓や腎臓で検討が進められているトキシコゲノミクスの解析による発がん性予測手法は多数の発がん標的に対して発がん性の予測が期待できるが [41, 42, 77]、この手法もまた高コストであり、さらに異なる研究機関でデータを共有するためには統合的方法が必要である。したがって、短期間で合理的に諸臓器全般にわたる発がん性を予測し得る指標の確立が求められている。

所属研究室の先行研究において、複数種類の発がん標的性を対象とした解析で、28 日間の反復投与により発がんの標的細胞に増殖活性の亢進を示す発がん物質は、細胞周期チェックポイント機構の活性化を反映するような細胞周期関連分子の発現増加およびアポトーシスを誘発することを見出した [73, 74, 82, 83]。さらに、肝臓と腎臓の発がん物質投与例で、M 期進行に関わる ubiquitin D (UBD) の G<sub>2</sub> 期からの異常発現を見出した [74]。以上の結果より、発がん物質はその標的性を問わず、短期間の投与により発がん標的細胞に対して M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発する可能性を

見出した。これらの結果から、細胞増殖活性を亢進する発がん物質が M 期進行に関わる分子の機能障害を含む細胞周期制御異常を誘発し、それが発がんメカニズムの早期過程に関与している可能性が示唆された。しかしながら、発がん物質特異的な細胞周期制御破綻の表現型の成立時期については未検討なままである。

本研究では、化学物質による発がんの主要な標的臓器である肝臓と腎臓を対象として、3 章立ての研究を実施した。第 1 章では、肝発がん物質投与初期に誘発される肝細胞増殖時に生じる、発がん物質特異的な細胞周期制御破綻の表現型の成立時期とその主要メカニズムの解明を目的とし、発がん標的である肝細胞を対象として、細胞増殖活性、細胞周期関連分子発現およびアポトーシスの変動を経時的に解析した。すなわち、ラットを用いて、肝発がん物質ないし非発がん性肝毒性物質を 3, 7 ないし 28 日間反復投与する群と、再生性肝細胞増殖を誘発する肝部分切除を行う群を設定し、実験終了後に、取り出した肝臓を用いて、免疫組織化学染色および *real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)* により解析した。第 2 章では、第 1 章で見出された反応が、細胞増殖誘発性に乏しい肝発がん物質や肝発がんプロモーターによっても生じるか否かを検討するために、ラットに、肝発がん物質、弱い肝発がん性が示唆されており細胞増殖誘発性が乏しいことが予想される物質、肝発がんプロモーターないし非発がん性肝毒性物質を 7, 28 ないし 90 日間反復投与した。実験終了後に、取り出した肝臓を用いて第 1 章と同様の解析を進め、経時的な観察により、発がん物質に特異的な指

標とその反応性の有無を検討した。第 3 章では、肝発がん物質で見出された経時的な反応が腎発がん物質でも生じるか否かを検討するために、ラットに、腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質を 3, 7 ないし 28 日間反復投与した。実験終了後に、取り出した腎臓を用いて第 1 章と同様の解析を進め、髓質外帯外層における尿細管上皮細胞を対象とした経時的な観察により、発がん物質に特異的な指標とその反応性の有無を検討した。

## 第 1 章

ラットの肝発がん物質投与早期から生じる細胞周期制御異常とその出現時期の検討

## 緒言

ラットへの発がん物質の反復投与早期から、遺伝毒性誘発性の有無を問わず標的細胞に巨大核の形成が誘発されることが報告されており [3, 4] , 肝臓および腎臓においてしばしば認められる。腎発がん物質は、尿細管性腎症を誘発するタイプと尿細管上皮細胞に巨大核を誘発するタイプの 2 つに分類されることが報告されている [73] 。腎発がん物質である ochratoxin A (OTA) は巨大核を誘発するが、この変化は核分裂の異常とそれに伴う染色体異数性を反映するものであり、細胞周期関連分子、特に G<sub>2</sub> 期および M 期関連分子の発現異常に随伴して生じることが示唆されている [3] 。また、がん原性試験の早期段階において肝発がん物質はしばしば、肝細胞の “巨大細胞/巨大核” を誘発することから [4] , 細胞周期異常が発がん過程の早期に生じる現象であることが推察された。細胞増殖過程で、DNA 損傷が蓄積している状態で G<sub>2</sub>/M チェックポイント機構からのすり抜けが生じることにより、染色体の不分離や細胞質分裂の異常が生じ、それにより “tetraploidy/aneuploidy” と引き続く染色体不安定性が誘発されることが示唆されている [26] 。これらの知見より、発がん物質の投与早期から生じる “巨大核” の誘発に関与する細胞周期制御異常が、発がんに関与しているという仮説が成立する。

上記の仮説を基に所属研究室では、先行研究において、28 日間の反復投与により標的

細胞に増殖活性の亢進を示す発がん物質は、標的臓器を問わず、細胞周期チェックポイントの活性化を反映する細胞周期関連分子の発現異常とアポトーシスを誘発することを見出した [73, 74, 82, 83]。さらに、腎尿細管上皮細胞を発がん標的とする OTA および肝細胞を発がん標的とする thioacetamide (TAA) が、M 期進行に関わる ubiquitin D (UBD) の G<sub>2</sub> 期からの異常発現に起因する、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発している可能性も見出している [74]。これらの結果から、細胞増殖を亢進する発がん物質は、発がんの標的臓器を問わず M 期進行に関わる分子の機能障害を含む細胞周期制御異常を誘発し、それが発がん機序の早期過程に関与していることが示唆された。しかしながら、発がん物質特異的な細胞周期制御異常の表現型の成立時期については明らかになっていない。

本章における研究では、発がん物質の反復投与の早期から生じる発がん物質特異的な細胞周期制御破綻の表現型の成立時期とその主要メカニズムの解明を目的とした。この目的のために、ラットへ肝発がん物質を最大 28 日間反復投与し、肝細胞の増殖活性、G<sub>1</sub>/S および M 期スピンドルチェックポイント関連分子の発現およびアポトーシスの経時的な変動を、免疫組織化学染色および real-time RT-PCR の解析によって検討した。また、比較として、肝細胞の再生性増殖を誘発する目的で、ラットに対し、部分肝切除ないし非発がん性肝毒性物質の反復投与を実施した。

## 材料および方法

### 化学物質

Methyleugenol (MEG) ,  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate (ANIT) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より, acetaminophen (APAP) はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) より, TAA, promethazine (PMZ) および methyl cellulose 400 は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。

### 供試動物

5 週齢の雄性 F344 ラットを日本エスエルシーより購入し, 温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 20\%$ , 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件, 粉末 CRF-1 (オリエンタル酵母工業, 東京) および飲料水の自由給水下で飼育し, 一週間の馴化期間の後, 異常が認められなかった動物を実験に供した。

### 実験デザイン

本実験として 2 つの動物実験を実施した。両実験においても, 動物に対して 2/3 部分肝切除, 肝発がん物質の反復投与ないし非発がん性肝毒性物質の反復投与を実施した。MEG および TAA は肝発がん物質として [6, 58], APAP, ANIT および PMZ は非発がん性

肝毒性物質として [51, 52, 64] 選定し実験に用いた。実験 1 として, 3 ないし 7 日間反復投与試験を行い, 実験 2 として, 28 日間反復投与試験を行った。いずれの実験においても, 肝細胞の増殖活性, 細胞周期関連分子の発現およびアポトーシスの経時的な変動を免疫組織化学染色および real-time RT-PCR により解析した。

## 実験 1

6 週齢の雄性 F344 ラットを初期体重に基づいて, 無処置対照群 (n = 20), 2/3 部分肝切除を行う群 (PH, n = 22), TAA (400 ppm, n = 20), APAP (10,000 ppm, n = 20) ないし ANIT (1,000, n = 20) の混餌投与を行う群, MEG (1,000 mg/kg 体重, n = 22) ないし PMZ (200 mg/kg 体重, n = 22) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分けた。MEG および PMZ の投与の際に, 溶媒として 0.5 % methyl cellulose 溶液を使用した。ANIT 群において, 投与開始後 3 日目で動物の健康状況の悪化が生じたため, 用量を 600 ppm に減少させた。PMZ 群において, 投与開始後 3 日目で動物の健康状況の悪化が生じたため, 用量を 100 mg/kg 体重に減少させた。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。投与開始後 3 日目および 7 日目に, 各群半数ずつの動物について, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> による深麻酔下で大動脈からの放血による安楽殺を実施し, 肝臓を採取した。

## 実験 2

6 週齢の雄性 F344 ラットを初期体重に基づいて、無処置対照群 (n=10) , 2/3 部分肝切除を行う群 (PH, n = 12) , TAA (400 ppm, n = 10) , APAP (10,000 ppm, n = 10) ないし ANIT (600, n = 10) の混餌投与を行う群, MEG (1,000 mg/kg 体重, n = 11) ないし PMZ (100 mg/kg 体重, n = 11) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分けた。MEG および PMZ の投与の際に、溶媒として 0.5% methyl cellulose 溶液を使用した。MEG 群において、投与開始後 10 日目に 1 個体で健康状況の悪化が生じたため安楽殺を実施し、その後用量を 800 mg/kg 体重に減少させた。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。投与開始後 28 日目に、全動物について CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> による深麻酔下で大動脈からの放血による安楽殺を実施し、肝臓を採取した。

MEG および TAA の投与用量は発がん用量ないし最大耐量を設定し [6, 58] , 投与用量の変更後においても発がん用量を下回らないように設定した。APAP, ANIT および PMZ の投与用量は、13 ないし 16 週間反復投与試験においてラットに肝毒性を誘発することが報告されている用量を設定した [51, 52, 64] 。

動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物の取り扱いについても、同大学の実験動物指針を遵守した。

#### 病理組織学的染色および免疫組織化学染色

パラフィン固定した肝臓を 3 μm の厚さに薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン

(HE) 染色および免疫組織化学染色に供した。肝臓切片を用いて、G<sub>1</sub> 期から M 期に細胞の核に発現する細胞増殖指標の Ki-67 [68] , アポトーシス過程の後期に発現するアポトーシス指標の cleaved caspase 3 [15] , G<sub>2</sub>/M 期に DNA デカテネーションに関与する topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A) [43] , M 期の初期にクロマチンの凝集に関与する phosphorylated histone H3 (p-Histone H3) [23] , M 期スピンドルチェックポイント蛋白質の mitotic arrest deficient 2 (MAD2) [34] , DNA 損傷に応答して発現する phosphorylated H2AX ( $\gamma$ H2AX) [9] , サイクリン依存性キナーゼ阻害因子の 1 つである p21<sup>Cip1</sup> [69] , G<sub>2</sub>/M 期において MAD2 などのチェックポイント蛋白質のキネトコア局在を減少させることで染色体不安定性を誘導する UBD [22, 37] , および p53 の下流分子の一つで p53 の分解を促進する phosphorylated MDM2 (p-MDM2) [40, 44] に対する一次抗体を用いて、免疫組織化学染色を実施した。用いた抗体、賦活化方法および抗体希釈条件は Table 1-1 に示した。シグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。

UBD の細胞周期内での出現時期を検討する目的で、UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との二重染色を行った。UBD のシグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視化し、TOP2A および p-Histone H3 のシグナル検出は、二次抗体以降の反応

は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC-AP kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い、免疫反応は VECTOR Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) を用いて可視化した。

### 免疫組織化学染色の定量解析

免疫組織化学染色により, Ki-67, TOP2A, p-Histone H3, UBD, MAD2,  $\gamma$ H2AX, p21<sup>Cip1</sup> および p-MDM2 に対して陽性を示す肝細胞数は, 200 倍の倍率で 1 個体当たりランダムに 10 視野選択し, cleaved caspase 3 に対して陽性を示す肝細胞数は, 100 倍の倍率で 1 個体当たりランダムに 5 視野選択し, カウントした。視野は, 血管や結合組織が入らないように選択した。門脈周辺に陽性細胞が多く分布するなど, 陽性細胞が肝臓組織全体に均一に分布しない場合は, 偏った領域を選択しないように, 隣接した 5 ないし 10 視野を選択した。陽性細胞数は視覚的にカウントし, 総細胞数は画像解析ソフト WinROOF (三谷商事, 東京) を用いて定量化し, 陽性細胞率を算出した。

### Real-time RT-PCR による解析

細胞周期関連遺伝子および DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現量を検討するために, SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い, Step One Plus<sup>™</sup> Real-time PCR System (Life Technologies) にて, 製造元のプロトコールに従って,

mRNA 発現の定量解析を実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Life Technologies) を用いて設計し, Table 1-2 に示した。各遺伝子の mRNA 発現量は, 無処置対照群での発現値に対する相対値として求め, 内因性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) の検量線を求め,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [39] にて算出した。

## 統計解析

全ての定量データについて平均値および標準偏差を求めた。数値データの多群間比較は, Bartlett 検定で等分散を確認した後, 一元配置分散分析を行った。Bartlett 検定で等分散であった場合には Dunnett 検定を行い, 等分散でなかった場合には Steel 検定を行った。全ての数値データは, 無処置対照群と比較した。

## 結果

### 体重および肝臓重量

3日目において、PH群、MEG群、TAA群、ANIT群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 1-3)。PH群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。MEG群およびAPAP群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

7日目において、全処置群で、無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 1-3)。PH群およびANIT群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。また、PH群において、6日目に動物1個体の死亡が確認された。

28日目において、MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群およびPMZ群では、無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 1-3)。PH群、TAA群およびANIT群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。PMZ群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。MEG群、TAA群、

APAP 群, ANIT 群および PMZ 群では無処置対照群に比較して, 相対肝重量の有意な増加が認められた。

### 病理組織学的変化

MEG 群では, 3 日目では組織学的な変化は認められず, 7 日目ではすりガラス状変性を伴う小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。またそれに加え, 28 日目では以前の報告と同様に, 核の大小不同を伴う “巨大細胞” が認められ, び漫性に分布が認められた [58]。TAA 群では, 3 日目および 7 日目で核小体の肥大を伴う肝細胞肥大が認められ, それに加え 7 日目では門脈周辺領域で肝細胞の空胞変性が認められた。28 日目では以前の報告と同様に, 核の大小不同, 有糸分裂異常およびアポトーシスと共に, “巨大細胞” が出現し, び漫性にその細胞の分布が認められた [11]。核小体の肥大を伴う “巨大細胞” の出現はこの時点において顕著に認められた。APAP 群では, 3 日目で明らかな組織所見は認められなかった。7 日目および 28 日目では, 以前の報告と同様に, 小葉中心性の肝細胞肥大が軽度に認められた [51]。ANIT 群では, 3 日目から門脈周辺領域で胆管増生が認められた。7 日目から, 以前の報告と同様に小塊状の肝細胞壊死が散在性に認められた [64]。PMZ 群では, 以前の報告と同様に小葉中心性にすりガラス状変性を伴う肝細胞肥大が認められた [52]。

## 細胞増殖活性およびアポトーシス変動

Ki-67 は肝細胞の核に局在していた (Fig. 1-1A, C および E) 。大部分の例では, Ki-67 陽性細胞は肝臓組織全体に均一に分布していたが, TAA 群の 3 および 7 日目, PMZ 群の 28 日目では門脈周囲の領域に多く分布していた。Cleaved caspase 3 は肝細胞の核と細胞質に局在していた (Fig. 1-1B, D および F) 。全投与群の全投与期間において, cleaved caspase 3 陽性細胞は門脈周囲の領域に多く分布していた。

3 日目において, Ki-67 陽性細胞率は PH 群, TAA 群, APAP 群および ANIT 群で, 無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, PMZ 群では有意な減少が認められた (Fig. 1-1A) 。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は, TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, PMZ 群では有意な減少が認められた (Fig. 1-1B) 。

7 日目において, Ki-67 陽性細胞率は, PH 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1-1C) 。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-1D) 。

28 日目において, Ki-67 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-1E) 。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は, MEG 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-1F) 。

## 細胞周期関連分子発現細胞の分布

TOP2A, p-Histone H3, MAD2,  $\gamma$ H2AX, p21<sup>Cip1</sup> および p-MDM2 は核に局在し, UBD は細胞質ないし有糸分裂紡錘体に局在していた (Fig. 1-2A–G)。大部分の例では, TOP2A, p-Histone H3, MAD2,  $\gamma$ H2AX および UBD 陽性細胞は肝臓組織全体に均一に分布していたが, TAA 群の 3 および 7 日目, PMZ 群の 28 日目では門脈周囲の領域に多く分布していた。全投与群の全投与期間において, p21<sup>Cip1</sup> および p-MDM2 陽性細胞は門脈周囲の領域に多く分布していた。

3 日目において, TOP2A 陽性細胞率は, PH 群, TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, MEG 群および PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 1-2A)。p-Histone H3 陽性細胞率は, PH 群, TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, MEG 群および PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 1-2B)。MAD2 陽性細胞率は, PH 群, TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, MEG 群および PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 1-2C)。UBD 陽性細胞率は, PH 群, TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 1-2D)。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞率は, PH 群, TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 1-2E)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群および APAP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-2F)。

p-MDM2 陽性細胞率は, MEG 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-2G)。

7 日目において, TOP2A 陽性細胞率は, PH 群, MEG 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1-3A)。p-Histone H3 陽性細胞率は, PH 群, MEG 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められ, PMZ 群で有意な増加が認められた (Fig. 1-3B)。MAD2 陽性細胞率は, PH 群, MEG 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1-3C)。UBD 陽性細胞率は, PH 群, MEG 群, TAA 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1-3D)。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞率は, PH 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1-3E)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群, APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-3F)。p-MDM2 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群, APAP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-3G)。

28 日目において, TOP2A 陽性細胞率は, PH 群, MEG 群, TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, APAP 群で有意な減少が認められた (Fig. 1-4A)。p-Histone H3 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-4B)。MAD2 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群お

および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-4C)。UBD 陽性細胞率は, PH 群, MEG 群, TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-4D)。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-4E)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は, MEG 群, TAA 群および APAP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-4F)。p-MDM2 陽性細胞率は, MEG 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-4G)。

28 日目において, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は, TAA 群および MEG 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1-5)。

#### **UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との共発現**

3 日目において, TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は, TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-6A)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は, 全処置群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は, PH 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1-6B)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は, PH 群および ANIT 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

7日目において、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、PH 群、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-6C)。

UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、全処置群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、全処置群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 1-6D)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、全処置群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった。

28日目において、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、TAA 群および MEG 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-6E)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、全処置群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、PMZ 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-6F)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

## mRNA 発現

28日目で増殖活性の亢進が認められた MEG 群、TAA 群および PMZ 群について、3, 7 および 28 日目の時点における、Table 1-2 に記載されている遺伝子の mRNA 発現量を

real-time RT-PCR 法によって定量し、無処置対照群における mRNA 発現量との相対値を算出した (Table 1-4)。

3 日目において、G<sub>1</sub>/S チェックポイント関連遺伝子のうち、*Cdkn1a* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ、PMZ 群において有意な減少が認められた。*Cdkn2a* および *Rb1* は MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rb12* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mdm2* および  *Tp53* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。

一方で、 *Tp53* は MEG 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka*, *Bub1* および *Plk1* は MEG 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Aurkb* は MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mad11l* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mad21l* は PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。DNA 損傷関連遺伝子のうち *Atm* および *Chek1* は PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。

*Brca1* は MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Brca2*, *Chek2* および *Esco1* は MEG 群および PMZ 群で無処置対照群

と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Brcc3* は TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Esco1* および *Rad17* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Gadd45a* は TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rad50* は全投与群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現変動は認められなかった。

7日目では、G<sub>1</sub>/S チェックポイント関連遺伝子のうち、*Cdkn1a* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ、PMZ 群で有意な発現減少が認められた。*Cdkn2a* および *Tp53* は MEG 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。一方で、*Tp53* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rb1* および *Rb12* は MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。

*Mdm2* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka* および *Mad2l1* は MEG 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Aurkb*, *Bub1* および *Plk1* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mad1l1* は MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。DNA 損傷関連遺伝子のうち、

*Brca1* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Brca2*, *Chek1* および *Chek2* は MEG 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Brcc3* は MEG 群, TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Escl1* および *Rad17* は MEG 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。一方で, *Escl1*, *Gadd45a* および *Rad17* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Gadd45a* は PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rad50* は MEG 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Atm* は全投与群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現変動は認められなかった。

28 日目において, G<sub>1</sub>/S チェックポイント関連遺伝子のうち, *Cdkn1a* および *Mdm2* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で, *Cdkn1a* は PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Cdkn2a* および *TP53* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rb12* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rb1* は TAA 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち, *Aurka* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増

加が認められた。*Aurkb*, *Mad2l1* および *Plk1* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mad1l1* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Bub1* は MEG 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。DNA 損傷関連遺伝子のうち, *Brcc3* および *Chek1* は MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Esco1*, *Gadd45a*, *Rad17* および *Rad50* は TAA 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Atm* および *Esco1* は MEG 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Esco1* および *Rad17* は PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Brca1*, *Brca2* および *Chek2* は全投与群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現変動は認められなかった。

## 考察

本章では、肝発がん物質特異的に誘発される細胞周期制御破綻の出現時期とその主要メカニズムを検討する目的で、肝発がん物質をラットに 3, 7 ないし 28 日間反復投与し、細胞周期関連分子の発現変動を免疫組織化学染色および real-time RT-PCR 法により経時的に解析した。その結果、7 日目において、肝発がん性に関係なくほとんどの化学物質によって、Ki-67 陽性細胞率が変化しないもしくは減少しており、それとともに p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率および cleaved caspase 3 陽性細胞率の増加が誘発された。その一方で、28 日目では、肝発がん物質のみが、細胞増殖活性の亢進とともに p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率および cleaved caspase 3 陽性細胞率の増加を誘発した。p21<sup>Cip1</sup> はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の 1 つで、DNA 損傷、酸化性ストレスやサイトカインなどの刺激に応答して活性化され、G<sub>1</sub> 期における細胞周期停止を誘発することから [1, 19, 66, 69]、核内に p21<sup>Cip1</sup> を発現する細胞の増加は、G<sub>1</sub> 期において細胞周期が停止している細胞の増加を示唆するものであることが推察された。また、28 日目で肝発がん物質により、Brca1 を活性化することで DNA 修復に関与する Brcc3 [10] および G<sub>2</sub>/M チェックポイント分子で DNA 損傷に応答する Chek1 [62] の mRNA 発現が増加した。それとは対照的に、3 および 7 日目では Brcc3 および Chek1 の mRNA 発現は増加しなかった。これらの結果から、肝発がん物質の投与開始後 28 日目に、DNA 損傷の蓄積が生じていることが考えられたが、それよ

りも短期間の投与によって生じるこれらの分子の反応性は DNA 損傷とは関連がないことが示唆された。また,  $p21^{Cip1}$  はアポトーシスの誘発に必要であることが報告されていることから [33, 38], 7 日目から肝発がん物質により生じたアポトーシスの亢進は,  $p21^{Cip1}$  の活性化に起因するものである可能性が推察された。一方で, 7 日目において非発がん性肝毒性物質の APAP および ANIT も  $p21^{Cip1}$  陽性細胞率およびアポトーシスの増加を誘発したことから, この時点での  $p21^{Cip1}$  の活性化は発がん物質特異的な反応ではなく, 化学物質の細胞毒性に対する反応である可能性が考えられた。28 日目において, 肝発がん物質と同様に非発がん性肝毒性物質の PMZ も Ki-67 陽性増殖細胞を増加させたが,  $p21^{Cip1}$  陽性細胞率, アポトーシスおよび DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の増加は誘発しなかった。これらの結果から,  $p21^{Cip1}$  陽性細胞率およびアポトーシスの増加は, 以前の報告と同様に [82], 細胞増殖活性の亢進を示す肝発がん物質に特徴的な反応であることが考えられた。したがって, 28 日間の投与期間は, 肝発がん物質とこの時点で増殖活性を亢進する非発がん性肝毒性物質とを区別するのに十分な期間であることが示唆された。

本研究において, 肝発がん物質は全投与期間で, RB ファミリー蛋白質の 1 つで  $G_1$  期から S 期への進行を制御する *Rbl2* 遺伝子の mRNA 発現を減少させた [12, 13]。しかしながら, 非発がん性肝毒性物質の PMZ も 7 日目で *Rbl2* の mRNA 発現を減少させており, 28 日間よりも早い段階での *Rbl2* の発現抑制は発がん物質特異的なものではないことが

示唆された。興味深いことに、PMZ は 28 日目において、増殖活性の亢進とともに、TOP2A, p-Histone H3, MAD2, UBD および  $\gamma$ H2AX 発現細胞を増加させたが、この時点における *Rbl2* の mRNA 発現変動は認められなかった。これらの結果より、肝発がん物質特異的に誘発される、肝細胞での G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻は G<sub>1</sub> 期における細胞周期の進行を促進し、それは投与開始後 28 日目より出現することが示唆された。

RBL2 の発現抑制は、人の乳癌や子宮内膜癌においても報告されている [48]。本研究の全投与期間において、肝発がん物質により、p53 の下流因子の 1 つでユビキチン化を促進することで p53 や RB 蛋白質の分解を促進する *Mdm2* [8, 24, 76] の mRNA の発現増加ないし増加傾向が認められた。さらに、肝発がん物質によって、MDM2 の活性化型で細胞質から核内に移動し p53 を分解する、166 位のセリン基がリン酸化された MDM2 (p-MDM2) [40, 44] 陽性細胞率の増加が *Mdm2* の mRNA 発現の増加とともに認められた。

所属研究室の先行研究において、細胞増殖活性を亢進する肝発がん物質は p53 発現細胞を増加させており、それによって *Mdm2* の転写促進が誘発されていることが推察された [82]。一方で、非発がん性肝毒性物質である APAP および PMZ も 7 日目で p-MDM2 陽性細胞率を増加させたが、28 日目では増加させなかった。これらのことから、肝発がん物質特異的な、*Mdm2* の mRNA 発現の増加および核内における p-MDM2 発現の増加は、プロテアソームを介した p53 および RB 蛋白質の分解促進を示唆するものであり、この反応は投与開始後 28 日目から出現することが示唆された。p53 は遺伝毒性ストレスに

応答して発現増加および活性化し、p21<sup>Cip1</sup>などの多くの遺伝子発現を誘導することで、G<sub>1</sub>期で細胞周期を停止させ、DNA修復を促すことが知られている [5, 71]。本研究で認められた、p21<sup>Cip1</sup>陽性細胞率の増加、*Cdkn1a*、*Brcc3* および *Chek1* 遺伝子の mRNA の発現増加は、DNA 損傷の蓄積を反映し、p53 の分解に関連して誘発されている可能性が推察された。

所属研究室の先行研究において既に考察している通り [74]、UBD の過剰発現により、M 期においてスピンドルチェックポイントとして機能する MAD2 のキネトコアにおける局在が抑制され [22, 37]、それによって染色体不安定性が誘発されるものと考えられた。所属研究室の先行研究において、増殖活性の亢進を示す発がん物質の 28 日間反復投与によって、UBD の G<sub>2</sub> 期からの異常発現が誘発されることを見出しており、これは M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を示唆するものであることが考えられた [74]。本研究での免疫二重染色による解析の結果、28 日目において MEG 群および TAA 群で、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合がわずかに増加した。TOP2A は G<sub>2</sub> 期および M 期に発現し [2, 36, 81]、p-Histone H3 は M 期に発現することが知られていることから [23]、以前の報告と同様に [74]、肝発がん物質によって UBD 陽性細胞の G<sub>2</sub> 期における割合のわずかな増加が誘発されていることが示唆された。一方で、MEG 群および TAA 群では、UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は変化しなかったが、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は大き

く減少した。UBD と MAD2 の相互作用が、増殖細胞の M 期に存在する割合の減少とともに染色体の構造および数の異常を誘発することが見出されており、これらの結果から M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が生じていることが示唆された [75]。

したがって、今回得られた結果から、肝発がん物質により UBD の G<sub>2</sub> 期からの異常発現が誘発され、それが M 期スピンドルチェックポイントの正常な時期よりも早い時期での UBD の過剰な機能亢進を誘発している可能性が考えられた。これらの反応は肝発がん物質特異的であり、非発がん性肝毒性物質の PMZ によっては誘発されなかった。さらに、肝発がん物質は 28 日目で p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を減少させたことから、増殖活性を亢進する肝発がん物質は M 期スピンドルチェックポイント機構を不完全なものとするすることで、増殖細胞の M 期からの早期の移行を誘発していることが推察され、またこの反応はラットへの反復投与開始後 28 日目で誘発されることが明らかになった。3 日目において、PH と ANIT は高い細胞増殖誘発性を示していたにも関わらず、UBD 陽性細胞のうち M 期に存在する割合を大きくは減少させなかったことから、増殖細胞の M 期からの早期の移行は、発がん物質により特異的に誘発されることが示唆された。

M 期スピンドルチェックポイントないし M 期関連遺伝子の発現に関して、MEG, TAA および PMZ は 3 日目および 7 日目において *Aurka*, *Aurkb*, *Bub1*, *Mad11l*, *Mad21l* および *Plk1* の mRNA 発現を減少させるか変動させなかった。28 日目では、MEG は *Aurkb*, *Bub1*,

*Mad2l1* および *Plk1* の mRNA 発現を, TAA は *Aurka*, *Aurkb*, *Mad2l1* および *Plk1* の mRNA 発現を増加させた。一方で, PMZ はこれらの遺伝子の mRNA 発現は増加させなかった。

M 期スピンドルチェックポイントは紡錘糸が接続されていないキネトコアが存在する際に活性化され, 各キネトコアが核分裂紡錘体に結合するまで核分裂を停止させ, 染色体異数性が生じることを防止している [79]。M 期関連遺伝子の過剰発現は, 乳癌や喉頭癌から作出された培養細胞や, 喉頭癌, 胃癌や膀胱癌組織において認められ, 染色体不安定性や腫瘍の悪性度に関与していることが報告されている [25, 84, 85, 86]。これらの結果から, 発がん物質の投与開始後 28 日目で誘発される M 期スピンドルチェックポイントないし M 期関連遺伝子の mRNA 発現の増加は, 染色体異常の発生を防止するために M 期スピンドルチェックポイント機構が活性化したことで, M 期で細胞周期が停止している肝細胞が増加していることを反映していることが推察された。また, これらの肝細胞は, M 期スピンドルチェックポイント機構が破綻している肝細胞とは別の細胞集団であることが推察された。

肝部分切除は, 処置後 2-4 日目に肝細胞の増殖活性を亢進し, その増殖活性は処置後 6 日目までに正常レベルに戻ることが報告されている [18, 35]。本研究では, 肝発がん物質の投与によって生じる細胞増殖活性の亢進時に誘発される細胞周期関連分子の発現変動と, PH 処置ないし非発がん性肝毒性物質の投与によって生じる再生性増殖時に誘発される発現変動の違いを経時的に検討した。本研究において, PH, 非発がん性肝毒

性物質の APAP および ANIT は 3 日目で、PMZ は 28 日目で肝細胞の増殖活性を亢進した。28 日目で肝発がん物質の MEG および TAA は細胞増殖活性の亢進とともに  $p21^{Cip1}$  の活性化を誘発したのに対し、これらの処置は 28 日目で  $p21^{Cip1}$  の活性化を伴う増殖活性の亢進は誘発しなかった。これらの結果より、肝発がん物質によって誘発される  $p21^{Cip1}$  の活性化を伴う細胞増殖活性の亢進は、*Rbl2* の mRNA 発現の減少とそれに伴う RBL2 蛋白質の発現減少に起因する発がん物質特異的な G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻が生じる際に認められる反応であることが推察された。対照的に、PH や非発がん性肝毒性物質は 28 日目において、 $p21^{Cip1}$  の活性化を伴わず、いくつかのフィードバック機構が働くことで細胞増殖活性が抑制されていることが推察された。例えば PH については、suppressor of cytokine signaling 3 がサイトカインのシグナルカスケードを負に制御することで、肝細胞の再生性増殖を抑制することが報告されている [65]。

結論として、肝発がん物質によって誘発される発がん物質特異的な反応は、投与開始後 28 日目から出現することが示唆された。*Rbl2* の mRNA 発現の減少、*Mdm2* の mRNA 発現および p-MDM2 発現細胞の増加による p53 および RB 蛋白質の不足とそれに引き続く G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻を誘発し、それが、肝発がん物質の反復投与開始後 28 日目で認められる細胞増殖活性の亢進に関与している可能性が推察された。UBD 陽性細胞の M 期における割合の減少は、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を示唆しており、増殖細胞の M 期における割合の減少は、増殖細胞の M 期からの早期の

移行を反映するものであることが推察された。DNA 損傷の蓄積は、おそらく MDM2 の活性化による p53 の分解促進に関連して生じており、それが p21<sup>Cip1</sup> の異常な活性化および引き続くアポトーシスの亢進に関与していることが推察された (Fig. 1-7)。

## 小括

第 1 章では、肝発がん物質投与初期に誘発される細胞周期制御破綻とその出現時期の検討を目的として、肝発がん物質をラットへ最大 28 日間反復投与した。その結果、投与開始後 28 日目で肝発がん物質は、細胞増殖活性の亢進とともに p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率、p-MDM2 陽性細胞率、cleaved caspase 3 陽性細胞率および DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の増加を誘発したことから、発がん物質特異的な反応は 28 日目から出現することが示唆された。肝発がん物質はさらに、*Rbl2* の mRNA 発現の減少、*Cdkn1a* および *Mdm2* の mRNA 発現の増加、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合の減少を誘発した。これらから、28 日目で肝発がん物質は、M 期における UBD の発現減少に起因する M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻とそれに伴う増殖細胞の M 期からの早期の移行を誘発することが推察された。また、*Rbl2* の mRNA 発現の減少、*Mdm2* の mRNA 発現および p-MDM2 発現細胞の増加によって、p53 および RB 蛋白質の不足と引き続く G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻が誘発され、それが肝発がん物質特異的な増殖活性亢進に寄与することが推察された。DNA 損傷の蓄積は、MDM2 の活性化に起因する p53 の分解促進に関連しており、それが p21<sup>Cip1</sup> の異常な活性化とそれに伴うアポトーシスを誘発していることが推察された。

## 第2章

ラットの最大 90 日間反復投与例での肝発がん物質・肝発がんプロモーターの

細胞周期制御異常への関与の検討

## 緒言

第1章の結果より、反復投与開始後28日目で肝発がん物質は、細胞増殖活性の亢進とともに *Rbl2* の mRNA 発現量の減少、*Mdm2* の mRNA 発現および phosphorylated-MDM2 (p-MDM2) 陽性細胞率を増加させたことから、G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻に起因した細胞周期進行の促進を誘発していることが推察された。さらに、ubiquitin D (UBD) のM期での発現を減少させることで、M期スピンドルチェックポイント機構の破綻とそれに伴う増殖細胞のM期からの早期の移行を誘発していることが推察された。しかしながら、本研究に先立つ先行研究において、piperonyl butoxide などの発がん物質はラットへの28日間の反復投与によっても、標的細胞の増殖活性の亢進を示さず、これらの物質によっては細胞周期制御異常を示唆するような反応は見出されなかった [74]。

本章では、第1章より、投与開始後28日目で肝発がん物質により誘発された細胞周期制御異常が、細胞増殖誘発性の低い肝発がん物質や肝発がんプロモーターによっても同様に誘発されるか否かを検討した。すなわち、ラットに肝発がん物質、弱い肝発がん性が示唆されており細胞増殖誘発性の低いことが想定される物質、肝発がんプロモーターないし非発がん性肝毒性物質を7, 28 ないし 90 日間反復投与し、第1章と同様に免疫組織化学染色および real-time RT-PCR 解析法を用いて検討した。

## 材料および方法

### 化学物質

Oxfendazole (OX) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より, acetaminophen (APAP) および methapyrilene (MP) はシグマアルドリッチ (St. Louis, MO, USA) より,  $\beta$ -naphthoflavone (BNF), carbadox (CRB), leucomalachite green (LMG), thioacetamide (TAA), promethazine (PMZ) および methyl cellulose 400 は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。

### 供試動物

5 週齢の雄性 F344 ラットを日本エスエルシーより購入し, 温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 20\%$ , 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件, 粉末 CRF-1 (オリエンタル酵母工業, 東京) および飲料水の自由給水下で飼育し, 一週間の馴化期間の後, 異常が認められなかった動物を実験に供した。

### 実験デザイン

動物に対して, 肝発がん物質, 肝発がんプロモーターないし非発がん性肝毒性物質を 7, 28 ないし 90 日間反復投与した。7 ないし 28 日間反復投与試験では, MP, CRB, LMG,

BNF, OX および PMZ を用い, 90 日間反復試験では, MP, TAA, CRB, LMG, BNF, OX, APAP および PMZ を用いた。投与終了後, 肝臓における細胞増殖活性, 細胞周期関連分子の発現およびアポトーシスの経時的な変動を免疫組織化学染色ないし real-time RT-PCR 法により解析した。

MP, TAA および CRB は肝発がん物質として選定した [6, 32, 57]。LMG は 2 年間のがん原性試験ではわずかに肝臓腫瘍の発生率を増加させるのみであることから, 弱い肝発がん性が示唆されている物質として選定した [59]。BNF および OX は肝発がんプロモーターとして選定し [49, 70], PMZ および APAP は非発がん性肝毒性物質として選定した [51, 52]。OX は長期間の反復投与試験で肝臓腫瘍を誘発せず [80], BNF は変異原性を示さず, また, ラットの肝臓に対して発がんイニシエーション作用を示さなかったことから単独投与では発がん性を示さない発がんプロモーターとみなされている [21, 45]。

7 および 28 日間投与試験では, 6 週齢の雄性 F344 ラットを初期体重に基づいて, 無処置対照群 (n = 20), MP (1,000 ppm; n = 20), CRB (300 ppm; n = 20), LMG (1,160 ppm; n = 20), BNF (10,000 ppm; n = 20) ないし OX (500 ppm; n = 20) の混餌投与を行う群, ないし PMZ (100 mg/kg 体重, n = 22) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分けた。PMZ の投与の際に, 溶媒として 0.5% methyl cellulose 溶液を使用した。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。投与開始後 7 日目および 28 日目に, 各群半数ずつの動物につ

いて、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>による深麻酔下で大動脈からの放血による安楽殺を行い、肝臓を採取した。

90日間投与試験では、6週齢の雄性F344ラットを初期体重に基づいて、無処置対照群 (n = 10) , TAA (400 ppm; n = 10) , MP (1,000 ppm; n = 10) , CRB (300 ppm; n = 20) , LMG (1,160 ppm; n = 10) , BNF (10,000 ppm; n = 10) , OX (500 ppm; n = 10) ないし APAP (10,000 ppm; n = 10) の混餌投与を行う群、ないし PMZ (100 mg/kg 体重, n = 11) の強制経口投与を行う群の9つの群に分け、反復投与を行った。PMZの投与の際に、溶媒として 0.5% methyl cellulose 溶液を使用した。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。投与開始後 90 日目に、全動物について、CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>による深麻酔下で大動脈からの放血による安楽殺を行い、肝臓を採取した。

MP, TAA および CRB の投与用量は発がん用量を設定した [6, 32, 57] 。BNF および OX の投与用量は、肝二段階発がんモデルラットを用いた 6 週間の反復投与後に glutathione S-transferase placental によって検出される前がん病変の形成を促進する用量を設定した [49, 70] 。LMG, APAP および PMZ の投与用量は、28 日間ないし 13 週間反復投与試験においてラットに肝毒性を誘発する用量を設定した [51, 52, 59] 。

動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物の取り扱いについても、同大学の実験動物指針を遵守した。

病理組織学的染色および免疫組織化学染色

パラフィン固定した肝臓を 3  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学染色に供した。肝臓切片を用いて、G<sub>1</sub> 期から M 期に存在する細胞の核に発現する細胞増殖指標の Ki-67 [68] , アポトーシス過程の後期に発現するアポトーシス指標の cleaved caspase 3 [15] , G<sub>2</sub>/M 期に DNA デカテネーションに関わる topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A) [43] , M 期の初期にクロマチンの凝集に関わる phosphorylated-histone H3 (p-Histone H3) [23] , サイクリン依存性キナーゼ阻害因子の 1 つである p21<sup>Cip1</sup> [69] , G<sub>2</sub>/M 期において mitotic arrest deficient 2 (MAD2) などのチェックポイント蛋白質のキネトコア局在を減少させることで染色体不安定性を誘導する ubiquitin D (UBD) [22, 37] , および p53 の下流分子の一つで p53 の分解を促進する phosphorylated-MDM2 (p-MDM2) [40, 44] に対する一次抗体を用いて、免疫組織化学染色を実施した。用いた抗体、賦活化方法および抗体希釈条件は Table 2-1 に示した。シグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。

UBD の細胞周期内での出現時期を検討する目的で、UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との二重染色を行った。UBD のシグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視化し、TOP2A および p-Histone H3 のシグナル検出は、二次抗体以降の反応

は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC-AP kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い、免疫反応は VECTOR Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) を用いて可視化した。

### 免疫組織化学染色の定量解析

免疫組織化学染色により、Ki-67, TOP2A, p-Histone H3, UBD, p21<sup>Cip1</sup> および p-MDM2 に対して陽性を示す肝細胞数は、200 倍の倍率で 1 個体当たりランダムに 10 視野選択し、cleaved caspase 3 に対して陽性を示す肝細胞数は、100 倍の倍率で 1 個体当たりランダムに 5 視野選択し、カウントした。視野の選択は、血管や結合組織が入らないように行った。門脈周辺に陽性細胞が多く分布するなど、陽性細胞が肝臓組織全体に均一に分布しない場合は、偏った領域を選択しないように、隣接した 5 ないし 10 視野を選択した。陽性細胞数は視覚的にカウントし、総細胞数は画像解析ソフト WinROOF (三谷商事, 東京) を用いて定量化し、陽性細胞率を算出した。

### Real-time RT-PCR による解析

細胞周期関連遺伝子の発現レベルを検討するために、SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い、Step One Plus<sup>™</sup> Real-time PCR System (Life Technologies) にて、製造元のプロトコールに従って、mRNA 発現の定量解析を実

施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Life Technologies) を用いて設計し, Table 2-2 に示した。各遺伝子の mRNA 発現は, 無処置対照群での発現値に対する相対値として求め, 内因性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) ないし actin, beta (*Actb*) の検量線を求め,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [39] にて算出した。

## 統計解析

全ての定量データについて平均値および標準偏差を求めた。数値データの多群間比較は, Bartlett 検定で等分散を確認した後, 一元配置分散分析を行った。Bartlett 検定で等分散であった場合には Dunnett 検定を行い, 等分散でなかった場合には Steel 検定を行った。全ての数値データは, 無処置対照群と比較した。

## 結果

### 体重および肝臓重量

7日目において、MP群、CRB群、LMG群、BNF群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 2-3)。LMG群、BNF群およびOX群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。全投与群で無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

28日目において、全投与群で無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 2-3)。MP群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。LMG群、BNF群およびOX群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。CRB群、LMG群、BNF群、OX群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

90日目において、MP群、TAA群、CRB群、LMG群、BNF群、APAP群およびPMZ群では、無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 2-3)。MP群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。LMG群、BNF群、OX群、APAP群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。全投与群で無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

## 病理組織学的変化

MP 群では、全投与期間で、核の大小不同、有糸分裂異常およびアポトーシスと共に、“巨大細胞” が出現し、び漫性にその細胞の分布が認められた [57]。28 日目および 90 日目で、胆管増生、間質の線維増生を伴う oval cell の増殖および色素沈着が、門脈周辺領域に顕著に認められた。さらに、90 日目で胆管線維症および好酸性肝細胞増殖巣が認められた。CRB 群では、全投与期間で、明らかな組織学的所見は認められなかった。

LMG 群では、全投与期間で、以前の報告と同様に、小葉中心性に肝細胞肥大が認められた [59]。さらに、90 日目において、肝細胞の脂肪変性が散在性に認められた。BNF 群では、7 日目で、明らかな組織学的変化は認められなかった。28 日目および 90 日目では、以前の報告と同様に、小葉中心性に肝細胞肥大が認められた [70]。さらに、90 日目において、肝細胞の脂肪変性が散在性に認められた。OX 群では、全投与期間で、以前の報告と同様に小葉中心性に肝細胞肥大と肝細胞の脂肪変性が認められた [49]。PMZ 群では、全投与期間で、以前の報告と同様に、小葉中心性に肝細胞肥大が認められた [52]。さらに、90 日目において、肝細胞の脂肪変性が散在性に認められた。TAA 群では、90 日目で、以前の報告と同様に、核の大小不同、有糸分裂異常およびアポトーシスと共に、“巨大細胞” が認められ、び漫性に分布が認められた [11]。また、胆管増生、間質の線維増生を伴う oval cell の増殖および色素沈着が、門脈周辺領域に顕著に認められた。さ

らに、線維性結合組織に区画された再生性結節の形成が認められた。APAP 群では、明らかな組織学的所見は認められなかった。

### 細胞周期関連分子発現細胞の分布

Ki-67, p-Histone H3, TOP2A, p21<sup>Cip1</sup> および p-MDM2 は核に局在し, cleaved caspase 3 は核および細胞質に局在し, UBD は細胞質ないし有糸分裂紡錘体に局在していた (Fig. 2-1A-G) 。大部分の例では, Ki-67, p-Histone H3, TOP2A および UBD 陽性細胞は肝臓組織全体に均一に分布していたが, TAA 群の 7 日目, PMZ 群の 28 日目では門脈周囲の領域に多く分布していた。全投与群の全投与期間において, p21<sup>Cip1</sup>, p-MDM2 および cleaved caspase 3 陽性細胞は門脈周囲の領域に多く分布していた。

7 日目において, Ki-67 陽性細胞率は, MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, CRB 群, LMG 群および OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-1A) 。 p-Histone H3 陽性細胞率は, CRB 群および OX 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 2-1B) 。 TOP2A 陽性細胞率は, MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, CRB 群および OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-1C) 。 UBD 陽性細胞率は, MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, CRB 群, LMG 群および OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-1D) 。 p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は, MP 群, CRB 群および LMG 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-1E) 。

p-MDM2 陽性細胞率は, MP 群, LMG 群, BNF 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-1F) 。cleaved caspase 3 陽性細胞率は, MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-1G) 。

28 日目において, Ki-67 陽性細胞率は, MP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-2A) 。p-Histone H3 陽性細胞率は, MP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-2B) 。TOP2A 陽性細胞率は, MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, CRB 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-2C) 。UBD 陽性細胞率は, MP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, CRB 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-2D) 。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は, CRB 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-2E) 。

p-MDM2 陽性細胞率は, MP 群および LMG 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-2F) 。cleaved caspase 3 陽性細胞率は, MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-2G) 。

90 日目において, Ki-67 陽性細胞率は, MP 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-3A) 。p-Histone H3 陽性細胞率は, MP 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, CRB 群および APAP 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-3B) 。TOP2A 陽性細胞率は, MP 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-3C) 。UBD 陽性細胞率は, MP 群および TAA

群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-3D) 。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は, TAA 群, CRB 群, LMG 群, OX 群, APAP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-3E) 。p-MDM2 陽性細胞率は, TAA 群および LMG 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-3F) 。cleaved caspase 3 陽性細胞率は, MP 群, TAA 群および OX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-3G) 。

#### **p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合**

増殖細胞のうち M 期に存在する細胞の割合を推定するために, 同一個体の肝臓から得られた別の組織スライドを用いて, p-Histone H3 ないし Ki-67 について免疫組織化学染色を実施し, 各分子における陽性細胞率をそれぞれ求めた後, 得られたデータを用いて, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を求めた。

7 日目において, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は, 全投与群で無処置対照群に比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 2-4A) 。28 日目において, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は, MP 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 2-4B) 。90 日目において, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は, MP 群, TAA 群および CRB 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 2-4C) 。

## UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との共発現

28 日目において, TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は, MP 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 2-5A)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は, 全処置群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は, MP 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められ, CRB 群で有意な減少が認められた (Fig. 2-5B)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は, MP 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

90 日目において, TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は, 全処置群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 2-5C)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は, MP 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は, OX 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 2-5D)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は, MP 群および CRB 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

## mRNA 発現

MEG 群, TAA 群および PMZ 群について, 28 日目および 90 日目の時点における, Table 2-2 に記載されている遺伝子の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法によって定量し, 無処置対照群における mRNA 発現との相対値を算出した (Table 2-4)。

28 日目において, *Cdkn1a* は, *Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ, CRB 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ, PMZ 群において有意な減少が認められた。*Chek1* は, *Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ, MP 群, OX 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mad2l1* は, *Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ, MP 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mad2l1* は, *Hprt1* によって相対値を求めたところ, OX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mdm2* は, *Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ, MP 群, CRB 群および OX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rbl2* は, *Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ, MP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rbl2* は, *Actb* によって相対値を求めたところ, CRB 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Tp53* は, *Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ, MP 群および OX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。

90 日目において, *Cdkn1a* は, *Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ, CRB

群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ、PMZ 群で有意な減少が認められた。*Chek1* および *Mad2l1* は、*Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方、*Chek1* は、*Hprt1* によって相対値を求めたところ、OX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mdm2* は、*Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群および CRB 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rbl2* は、*Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群および PMZ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Tp53* は、*Hprt1* によって相対値を求めたところ、MP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ、OX 群で有意な減少が認められた。

## 考察

第1章では、経時的な解析により、投与開始後28日目で、肝発がん物質特異的に増殖活性およびアポトーシスの増加とともに、G<sub>1</sub>/SおよびM期スピンドルチェックポイント機構の破綻を示唆する結果が得られ、一方で、これらの反応は3日目および7日目では認められなかった [30]。本研究では、肝発がん物質のMPにより7日目および28日目で増殖活性、細胞周期関連分子発現細胞率およびアポトーシスの増加が誘発された。しかしながら、7日目においては、p-Histone H3 陽性細胞率のKi-67 陽性細胞率に対する割合は減少せず、M期スピンドルチェックポイント機構の破綻を示唆する結果は得られなかった。また、7日目において、肝発がん物質および肝発がんプロモーターは p-MDM2 陽性細胞率を増加させたが、非発がん性肝毒性物質も同様に増加させたことから、この時点における p-MDM2 陽性細胞率の増加は発がんメカニズムには関与しない反応であることが推察された。これらの結果から、発がん物質特異的な反応が誘発されるには少なくとも28日間の投与期間を必要とする可能性が示唆された。

本研究では、Ki-67, p-Histone H3, TOP2A, UBD および cleaved caspase 3 陽性細胞率の増加は、MP 群の28日目および90日目およびTAA 群の90日目において認められた。所属研究室の先行研究において、28日間の反復投与によってTAAは、28日目のMP群で認められた結果と同様に、細胞増殖活性、細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシス

を増加させた [30, 74, 83]。これらより, TAA および MP は, 投与開始後 28 日目以降, 細胞増殖, p-Histone H3, TOP2A および UBD 陽性細胞率およびアポトーシスを持続的に増加させることが見出された。UBD は M 期スピンドルチェックポイント分子の MAD2 の機能を阻害することで細胞周期を進行させることを考慮すると [22, 37], TAA および MP はともに持続的に細胞増殖を促進し, それにより細胞周期の停止とアポトーシスの亢進を誘発している可能性が推察された。それとは対照的に, 非発がん性肝毒性物質の PMZ は, 28 日目で一時的に Ki-67, p-Histone H3 および UBD 陽性細胞率を増加させたことから, 短期発がん予測指標候補分子に対して偽陽性反応を示す物質であることが示唆された。しかしながら, PMZ は 90 日目ではこれらの反応を示さなかったことから, 偽陽性反応を示す物質は長期の投与期間においては細胞周期の進行を促進しない可能性が示唆された。これらのことから, 免疫組織化学染色による単一分子解析では, 28 日間の投与期間では発がん物質特異的な反応は検出することは難しいことが分った。一方で, CRB, LMG, BNF および OX は, 発がん性ないし発がんプロモーション活性を有するにも関わらず [32, 49, 59, 70], 90 日間の反復投与によっても, 細胞増殖活性, 細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシスの増加を誘発しなかった。これらの結果から, 28 日間の反復投与によって増殖活性を亢進しない肝発がん物質および肝発がんプロモーターは, 90 日間の反復投与後でも細胞増殖活性, 細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシスを増加させないことが示唆された。

第 1 章において、28 日間の反復投与により肝発がん物質特異的に、M 期スピンドルチェックポイント遺伝子の *Mad2l1* [79] および G<sub>2</sub>/M チェックポイント遺伝子で DNA 損傷に応答する *Chek1* [62] の mRNA 発現が増加し、肝発がん物質投与後に G<sub>2</sub> 期および M 期で細胞周期が停止している細胞の増加が誘発されていることが示唆された [30]。本研究においても同様に、肝発がん物質の MP は、28 日目と 90 日目で *Mad2l1* および *Chek1* の mRNA 発現を増加させた。しかしながら、28 日目で増殖活性および細胞周期の進行を促進した非発がん性肝毒性物質の PMZ も同様にこれらの遺伝子の mRNA 発現を増加させた。第 1 章においても、増殖活性を亢進する化学物質は発がん性の有無に関わらず、MAD2 および DNA 損傷指標の  $\gamma$ H2AX [9] を発現する肝細胞の増加を誘発した [30]。G<sub>2</sub>/M チェックポイントとして機能する checkpoint kinase 1 などの分子は、DNA 修復や細胞周期制御、減数分裂や核分裂などにも関与することが報告されている [61]。これらの結果から、28 日間反復投与によって増殖活性を亢進する化学物質に誘発される *Mad2l1* および *Chek1* の mRNA 発現の増加は、単に細胞増殖に伴う G<sub>2</sub>/M および M 期スピンドルチェックポイントの活性化を反映しているものであることが推察された。

サイクリン依存性キナーゼ阻害因子の 1 つの p21<sup>Cip1</sup> は、G<sub>1</sub> 期で細胞周期の停止を誘発する分子であり、その発現は通常 p53 によって制御されている [1]。所属研究室の先行研究において、ラットへの 28 日間反復投与後に肝発がん物質が特異的に p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率の増加を誘発したことから G<sub>1</sub>/S チェックポイントの活性化が生じていることが示

唆され、またこれにより、この分子の肝臓、甲状腺、膀胱および腺胃などの多臓器における短期発がん性予測指標としての有用性が期待された [82, 83]。しかしながら、本研究において肝発がん物質の MP は、28 日目および 90 日目では p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率を増加させなかった。一方で、非発がん性肝毒性物質の APAP および PMZ は 90 日目において p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率を増加させた。p21<sup>Cip1</sup> は、DNA 損傷、酸化性ストレスやサイトカインなどの様々な刺激により発現が誘導されることが知られている [1, 19]。また、APAP はラットへの投与急性期において肝臓に酸化性ストレスを誘発することも知られている [16]。しかしながら、げっ歯類を用いた亜急性投与試験において酸化性ストレスを誘発するという報告はない。PMZ はリポソーム内の鉄依存的脂質過酸化に対する抑制作用、有機ペルオキシラジカルの除去作用およびヘム蛋白／過酸化水素依存的なアラキドン酸の過酸化に対する抑制作用により抗酸化作用を示すことが知られている [28]。本研究において、PMZ は 28 日目および 90 日目で p21<sup>Cip1</sup> をコードする *Cdkn1a* の mRNA 発現を減少させたが、それとは対照的に 90 日目で p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率を増加させた。mRNA 発現の変動と免疫陽性細胞率の変動との間に相違が生じている理由は明らかではないが、*Cdkn1a* の mRNA 発現の減少は、この物質が有する抗酸化作用を反映している可能性が推察された。PMZ はラットの肝臓において蛋白質の分解を遅延させることが報告されている [17]。そのため、PMZ は多様な機序によって遺伝子の制御に影響を与えている可能性が推察された。90 日目で APAP および PMZ が、p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率の増加を誘

発した詳細な機序は明らかではないが、 $p21^{Cip1}$  陽性細胞率の増加は必ずしも肝発がん物質特異的な反応ではないことが示唆された。

第 1 章において、 $G_1/S$  期の進行の制御に関わる RB ファミリー蛋白質の 1 つをコードする *Rb12* [12, 13] の mRNA 発現の減少が、投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進を示す肝発がん物質により特異的に誘発された [30]。本研究においても、肝発がん物質の MP は、28 日目および 90 日目で同様の結果を示した。しかしながら、肝発がん物質の CRB は同じ投与期間において *Rb12* の mRNA 発現を変化させなかった。また、CRB は 90 日間の反復投与によっても細胞増殖活性、アポトーシスおよび細胞周期関連分子発現細胞の増加を誘発しなかったことから、*Rb12* の mRNA 発現の減少は発がん物質が誘発する細胞増殖の亢進に関与している可能性が考えられた。しかしながら、非発がん性肝毒性物質の PMZ は 90 日目において細胞増殖活性の亢進を示さなかったが、*Rb12* の mRNA 発現を減少させた。これらの結果から、*Rb12* の mRNA 発現の減少は肝発がん物質特異的な反応ではなく、また細胞増殖とも関連しない可能性が推察された。

本研究において、肝発がん物質の MP および CRB は 28 日目および 90 日目で、 $p53$  の下流分子でユビキチン化により  $p53$  および RB 蛋白質の分解を促進する *Mdm2* [8, 24, 76] の mRNA 発現を増加させた。CRB は遺伝毒性発がん物質に分類されている [7, 32]。MP はいくつかの遺伝毒性試験では陰性を示すが、マウスリンパ腫細胞やラット肝細胞を用いたいくつかの遺伝毒性試験では陽性を示すことが報告されている [57, 63]。第 1

章において、肝発がん物質は 28 日間反復投与によって特異的に *Mdm2* の mRNA 発現および p-MDM2 発現肝細胞も増加させたことから、肝発がん物質によりプロテアソームを介した p53 および RB 蛋白質の分解促進が誘発されていることが考えられた [30]。

本研究において、MP は投与開始後 28 日目から *Tp53* および *Mdm2* の mRNA 発現を増加させた。p53 は DNA 損傷に応答して発現が誘導されることがよく知られている [20]。そのため、本研究において、MP は p53 の発現上昇に関連して MDM2 の発現を上昇させていることが推察された。しかしながら、CRB は *Mdm2* の mRNA 発現を増加させたにも関わらず *Tp53* の mRNA 発現を増加させなかった。MDM2 の発現は、RAS やエストロゲンレセプター $\alpha$  や MYCN の活性化など、p53 非依存的な機序によっても発現が誘発されることが報告されている [87]。そのため、CRB による *Mdm2* の mRNA 発現の増加は p53 非依存的な機序によって誘発されていることが推察された。166 位のセリン基がリン酸化された MDM2 は、細胞質から核への移行が可能になり、p53 の分解を促進することが報告されている [40, 44]。本研究では MP 群の 28 日目および TAA 群の 90 日目において、増殖活性の亢進とともに核で p-MDM2 に陽性を示す細胞の増加が誘発された。弱い肝発がん性が示唆されている LMG も同様に、p-MDM2 陽性細胞率を増加させた。しかしながら、CRB 群の 28 日目および 90 日目と MP 群の 90 日目では、*Mdm2* の mRNA 発現は増加したにも関わらず p-MDM2 陽性細胞率は増加しなかった。CRB は、28 日目および 90 日目でアポトーシスを亢進しなかったことから、90 日間の反復投与後で

も CRB による DNA 損傷の蓄積は, *Tp53* の発現増加を誘発するには十分な程度ではないことが推察された。これらの結果から, 28 日目および 90 日目において, CRB によって転写量の増加は誘発されたが, MDM2 の活性化は誘発されなかったことが示唆された。一方で, DNA 損傷は MDM2 の分解を誘発することが報告されている [27]。そのため, MP の 90 日目において, *Tp53* の mRNA 発現が増加したにも関わらず, p-MDM2 陽性細胞率が増加しなかったのは, DNA 損傷に起因する MDM2 の分解促進が生じた可能性が推察された。対照的に, 7 日目において非発がん性肝毒性物質の PMZ は p-MDM2 陽性細胞率を増加させたが, 28 日目および 90 日目においては, 非発がん性肝毒性物質および肝発がんプロモーターは, *Mdm2* の mRNA 発現と p-MDM2 陽性細胞率のどちらも増加させなかった。これらの結果から, 28 日目から肝発がん物質により誘発される *Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率の増加は, p53 および RB 蛋白質の分解促進を反映するものであることが推察された。CRB および LMG が *Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率の増加を誘発したことを考慮すると, MDM2 の活性化は細胞増殖の亢進を直接誘発するものではないことが推察された。

UBD の過剰発現により, M 期においてスピンドルチェックポイント分子として機能する MAD2 のキネトコア局在が抑制され, それが染色体不安定性を誘発することが報告されている [22, 37]。所属研究室の先行研究において, 28 日間の反復投与によって細胞増殖活性の亢進を示す発がん物質は, UBD の G<sub>2</sub> 期からの異常発現を誘発しており,

この結果は M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を示唆するものであることが推察された [30, 74]。本研究では, 反復投与開始後 28 日目に細胞増殖活性の亢進を示す MP が, UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合の減少を 28 日目および 90 日目で誘発することを見出した。一方で, 90 日間の反復投与によっても増殖活性の亢進を示さなかった CRB も同様に, 90 日目で UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合を減少させた。それとは対照的に, 肝発がんプロモーターの OX および非発がん性肝毒性物質の PMZ は 90 日間の反復投与後でも同様の反応を示さなかった。p-Histone H3 は M 期に発現することが知られていることから [23], M 期における UBD 発現の減少は発がん物質特異的な反応であり, また, 発がん物質の細胞増殖誘発性に関係なく生じることが推察された。さらに, MP は 28 日目および 90 日目で p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を減少させており, CRB も 90 日目で同様の反応を示したことから, M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻とそれに伴う増殖細胞の M 期からの早期の移行が誘発されていることが推察された。UBD と MAD2 の相互作用が, 増殖細胞の M 期に存在する割合の減少とともに染色体の構造および数の異常を誘発することも報告されており [75], これらの結果から M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が生じていることが示唆された。そのため, 肝発がん物質が誘発する M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は, それ自体は細胞増殖活性を亢進しないが, 染色体不安定性を増加させることで発がん機序に関与すること

が推察された。それとは対照的に、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合ないし、p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合については、発がん物質特異的な反応は認められなかった。これらの結果から、本研究で解析したパラメーターの中で、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合が、化学物質の発がん性を予測するうえで最も信頼性があることが示唆された。

結論として、反復投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進を示す肝発がん物質は、90 日目においても細胞増殖、細胞周期関連分子の発現およびアポトーシスを増加することが見出された。免疫組織化学染色による単一分子解析では、28 日間の反復投与では増殖活性を亢進しない肝発がん物質ないし肝発がんプロモーターについては、90 日間の反復投与によっても、特異的な反応は認められなかった。*Cdkn1a*, *Mad2l1*, *Chek1* および *Rbl2* の mRNA 発現についても、肝発がん物質ないし肝発がんプロモーター特異的な反応は認められなかった。一方で、全肝発がん物質について、いくつかの物質は細胞増殖誘発性に乏しかったが、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 発現細胞の増加を誘発した。しかしながら、肝発がん物質の間でも *Tp53* の mRNA 発現パターンに違いが認められたことから、MDM2 活性化の機序は肝発がん物質間で異なることが推察された。一方で、肝発がん物質の MP および CRB は、細胞増殖誘発性に関係なく M 期における UBD 陽性細胞および M 期における増殖細胞の減少を誘発した。これらの結果から、肝発がん物質

は投与開始後 28 ないし 90 日目から M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発し、この反応は細胞増殖の亢進に先立って生じる可能性が推察された。

## 小括

第 2 章では、第 1 章で見出された細胞周期制御破綻が、増殖活性の亢進を示す肝発がん物質だけでなく、示さない肝発がん物質および肝発がんプロモーターによっても誘発されるか否かを検討した。すなわち、ラットに肝発がん物質、弱い肝発がん性が示唆されており細胞増殖誘発性の低いことが想定される物質ないし肝発がんプロモーターを最大 90 日間反復投与し、細胞周期関連分子発現の経時的な変動を免疫組織化学染色および real-time RT-PCR 法によって解析した。その結果、反復投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進を示す肝発がん物質は、同時に細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシスを増加させ、90 日目においても同様の反応を示した。一方で、増殖活性を亢進しない肝発がん物質および肝発がんプロモーター特異的な反応は、免疫組織化学染色による単一分子解析では最大 90 日間の反復投与によっても見出されなかった。*Cdkn1a*, *Mad2l1*, *Chek1* および *Rbl2* の mRNA 発現の肝発がん物質および肝発がんプロモーター特異的な変動は認められなかった。それとは対照的に、28 日目から、全ての肝発がん物質は、細胞増殖誘発性に関係なく、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率の増加を誘発した。しかしながら、*Tp53* の mRNA 発現が物質によって異なる変動パターンを示したことから、MDM2 発現の誘発および活性化には肝発がん物質間で、異なる機序が働いている可能性が推察された。一方で、肝発がん物質の MP および CRB は、細胞増

殖誘発性に関わらず, M 期に存在する UBD 陽性細胞および M 期に存在する増殖細胞を, 28 日目ないし 90 日目で減少させた。これらの結果から, 肝発がん物質は投与開始後 28 日目以降ないし 90 日目で M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発することが示唆され, それは細胞増殖活性の亢進に先立って生じる可能性が推察された。

### 第3章

ラットの腎発がん物質投与早期から生じる細胞周期制御異常とその出現時期の検討

## 緒言

第1章および第2章より、細胞増殖誘発性を問わず、投与開始後28日目から肝発がん物質特異的に、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率の増加が誘発され、p53 および RB 蛋白質の分解促進に起因する G<sub>1</sub>/S チェックポイント機能の破綻が生じている可能性が示唆された。さらに、28日目以降ないし90日目で肝発がん物質特異的に、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合が減少し、この反応は肝発がん物質の細胞増殖誘発性に関係なく誘発された。これらの結果から、肝発がん物質特異的な M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は、肝発がん物質の投与開始後28日目ないし90日目で誘発され、またこの反応は発がん過程において生じる増殖活性の亢進に先立って誘発されることが推察された。しかしながら、肝発がん物質に誘発されたこれらの経時的な反応が、他の発がん標的臓器についても同様に誘発されるかは明らかになっていない。

本研究では、肝発がん物質の反復投与によって誘発された経時的な反応が、腎発がん物質によっても同様に誘発されるか否かを検討した。すなわち、ラットに腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質の3, 7 ないし28日間反復投与試験を実施し、細胞周期関連分子発現の経時的な変動を、第1章および第2章と同様に、免疫組織化学染色および real-time RT-PCR 解析法を用いて検討した。

## 材料および方法

### 化学物質

Nitrofurantoin (NFT) および triamterene (TAT) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より, 1-amino-2,4-dibromoantraquinone (ADAQ), carboxin (CBX), 1-chloro-2-propanol (CP) および 1,2,3-trichloropropane (TCP) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より, コーンオイルは有限会社林ケミカル (Tokyo, Japan) より購入した。

### 供試動物

5 週齢の雄性 F344 ラットを日本エスエルシーより購入し, 温度  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 20\%$ , 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗条件, 粉末 CRF-1 (オリエンタル酵母工業, 東京) および飲料水の自由給水下で飼育し, 一週間の馴化期間の後, 異常が認められなかった動物を実験に供した。

### 実験デザイン

動物に対して, 腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質を 3, 7 ないし 28 日間反復投与した。投与終了後, 腎臓髓質外帯外層 (OSOM) 領域における尿細管上皮細胞の増殖活性, 細胞周期関連分子発現およびアポトーシスを免疫組織化学染色および real-time

RT-PCR 法を用いて解析した。

NFT, ADAQ および TCP は, 腎発がん物質として選定し [50, 54, 55], CP, TAT および CBX は, 非発がん性腎毒性物質として選定した [53, 56, 78]。

6 週齢の雄性 F344 ラットを初期体重に基づいて, 無処置対照群 ( $n = 30$ ), NFT (5,000 ppm;  $n = 33$ ), ADAQ (25,000 ppm;  $n = 33$ ), TAT (1,200 ppm;  $n = 30$ ) ないし CBX (2,000 ppm;  $n = 30$ ) の混餌投与を行う群, CP (3,300 ppm;  $n = 30$ ) の飲水投与を行う群, ないし TCP (125 mg/kg 体重,  $n = 33$ ) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分け, 3, 7 ないし 28 日間反復投与した。TCP の投与の際に, コーンオイルを溶媒として使用した。NFT は動物の健康状況の悪化に伴い, その後段階的に, 投与開始後 9 日目から 4,000 ppm へ, 14 日目から 3,000 ppm へと用量を減少させた。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。投与開始後 3, 7 ないし 28 日目に, 各群全動物の 1/3 ずつ,  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  による深麻酔下で大動脈からの放血による安楽殺を実施し, 腎臓を採取した。

NFT, ADAQ および TCP の投与用量は発がん用量を設定し [50, 54, 55], 投与用量の変更後においても発がん用量を下回らないように設定した。CP, TAT および CBX の投与用量は, 13 ないし 14 週間反復投与試験においてラットに腎毒性を誘発する用量を設定した [53, 56, 78]。

動物実験計画は, 国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け, 動物の取り扱いについても, 同大学の実験動物指針を遵守した。

## 病理組織学的染色および免疫組織化学染色

パラフィン固定した腎臓を 3  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学染色に供した。腎臓切片を用いて、 $G_1$  期から  $M$  期に細胞の核に発現する細胞増殖指標の Ki-67 [68] ,  $G_2/M$  期に DNA デカテネーションに関与する topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A) [43] ,  $M$  期の初期にクロマチンの凝集に関与する phosphorylated histone H3 (p-Histone H3) [23] ,  $G_2/M$  期において mitotic arrest deficient 2 (MAD2) などのチェックポイント蛋白質のキネトコア局在を減少させることで染色体不安定性を誘発する ubiquitin D (UBD) [22, 37] , および p53 の下流分子の一つで p53 の分解を促進する phosphorylated MDM2 (p-MDM2) [40, 44] に対する一次抗体を用いて、免疫組織化学染色を実施した。用いた抗体、賦活化方法および抗体希釈条件は Table 3-1 に示した。シグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/ $H_2O_2$  を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。

発がん物質投与早期のアポトーシス誘導性の有無を検討するために terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を実施した。シグナル検出は, ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Billerica, MA, USA) のプロトコールに従い、反応を進め、免疫組織化学染色と同様の手順で染色を施した。

また, UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との二重染色を行った。UBD のシグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い, 免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視化し, TOP2A および p-Histone H3 のシグナル検出は, 二次抗体以降の反応は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC-AP kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い, 免疫反応は VECTOR RED Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) を用いて可視化した。

#### 免疫組織化学染色の定量解析

所属研究室の先行研究において, 腎臓の髄質外帯外層 (OSOM) 領域での解析により使用した全ての腎発がん物質が, 短期発がん予測指標候補分子に反応を示したが, OSOM と皮質領域での解析では, 非発がん性腎毒性物質の *p*-nitrobenzoic acid も細胞周期関連分子発現細胞を増加させた [73, 74]。そのため本実験において免疫組織学的解析は, 偽陽性反応が生じることを避けるために, OSOM 領域に限定して行った。

免疫組織化学染色により, Ki-67, p-Histone H3, TOP2A, UBD および p-MDM2 に対して陽性を示す尿細管上皮細胞数および TUNEL 染色陽性細胞は, 400 倍の倍率で 1 個体当たりランダムに 10 視野 (左右腎臓で各 5 視野ずつ) 選択し, カウントした。視野の選択は, 血管や結合組織が入らないように行った。OSOM での近位および遠位尿細管における陽性細胞数は視覚的にカウントし, 総細胞数は画像解析ソフト WinROOF (三谷商事, 東

京) を用いて定量化し、陽性細胞率を算出した。

### Real-time RT-PCR による解析

OSOM 領域における細胞周期関連遺伝子の発現レベルを検討するために、SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い、Step One Plus<sup>™</sup> Real-time PCR System (Life Technologies) にて、製造元のプロトコールに従って、mRNA 発現の定量解析を実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Life Technologies) を用いて設計し、Table 3-2 に示した。各遺伝子の mRNA 発現量は、無処置対照群での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとして *actin*, *beta (Actb)* ないし *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* の検量線を求め、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [39] にて算出した。

### 統計解析

全ての定量データについて平均値および標準偏差を求めた。数値データの多群間比較は、Bartlett 検定で等分散を確認した後、一元配置分散分析を行った。Bartlett 検定で等分散であった場合には Dunnett 検定を行い、等分散でなかった場合には Steel 検定を行った。全ての数値データは、無処置対照群と比較した。

## 結果

### 体重および腎臓重量

3日目において、NFT群、TCP群およびCP群では、無処置対照群に比較して最終体重の有意な減少が認められた (Table 3-3)。CP群では無処置対照群に比較して、絶対腎重量の有意な減少が認められた。NFT群、ADAQ群、TCP群およびCP群で無処置対照群に比較して、相対腎重量の有意な増加が認められた。

7日目において、NFT群、TCP群およびCP群では、無処置対照群に比較して最終体重の有意な減少が認められた (Table 3-3)。NFT群、TCP群、CP群およびTAT群では、無処置対照群に比較して絶対腎重量の有意な減少が認められた。NFT群、TCP群およびCP群で、無処置対照群に比較して相対腎重量の有意な増加が認められた。

28日目において、NFT群、TCP群およびCP群では、無処置対照群に比較して最終体重の有意な減少が認められた (Table 3-3)。NFT群およびCP群では、無処置対照群に比較して絶対腎重量の有意な減少が認められた。NFT群、ADAQ群、TCP群、CP群およびCBX群で、無処置対照群に比較して相対腎重量の有意な増加が認められた。

### 病理組織学的変化

NFT群では、3日目から、以前の報告と同様に [50]、皮質において近位尿細管の硝子滴変性が認められた。また、28日目で、皮質およびOSOMにおいて再生尿細管が散在性

に認められた。ADAQ 群では、3 日目から、皮質において近位尿細管の硝子滴変性が認められた。また、28 日目で、OSOM において近位尿細管での色素沈着が認められ、皮質および OSOM において、再生尿細管が散在性に認められた。TCP 群では、3 日目から、以前の報告 [54] と同様に、OSOM 領域においてびまん性の近位尿細管上皮細胞の増数を伴う ”巨大核” の出現が認められた。CP 群では、以前の報告 [56] と同様に、28 日目で、皮質において近位尿細管の硝子滴変性がわずかに認められた。TAT 群では、以前の報告 [53] と同様に、28 日目で、皮質において近位尿細管の硝子滴変性が、皮質および OSOM において再生尿細管が散在性に認められた。CBX 群では、28 日目で、皮質および OSOM において、再生尿細管が散在性に認められ、また、ヘンレループ領域および集合管における硝子円柱、集合管の再生像がびまん性に認められた。

#### 細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシス細胞の分布

尿細管上皮細胞において、Ki-67, p-Histone H3, TOP2A および p-MDM2 は核に局在し、UBD は細胞質ないし有糸分裂紡錘体に局在していた (Fig. 3-1A-F) 。TUNEL 陽性アポトーシス細胞についても、尿細管上皮細胞の核に陽性反応を示した。Ki-67, p-Histone H3, TOP2A, UBD および TUNEL は、近位尿細管と遠位尿細管に均一に分布していた。P-MDM2 は、遠位尿細管上皮細胞に多く発現していた。

3 日目において、Ki-67 陽性細胞率は、NFT 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群に

比較して有意な増加が認められ, ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-1A) 。p-Histone H3 陽性細胞率は, NFT 群および TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-1B) 。TOP2A 陽性細胞率は, NFT 群, TCP 群, CP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-1C) 。UBD 陽性細胞率は, NFT 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-1D) 。p-MDM2 陽性細胞率は, NFT 群, ADAQ 群, TCP 群, CP 群および TAT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 3-1E) 。TUNEL 陽性細胞率は, 全投与群で無処置対照群に比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 3-1F) 。

7 日目において, Ki-67 陽性細胞率は, NFT 群および TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-2A) 。p-Histone H3 陽性細胞率は, NFT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, CP 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-2B) 。TOP2A 陽性細胞率は, TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-2C) 。UBD 陽性細胞率は, TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-2D) 。p-MDM2 陽性細胞率は, 全投与群で無処置対照群に比較して有意な変動は認められなかった (Fig.

3-2E)。TUNEL 陽性細胞率は, NFT 群および TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 3-2F)。

28 日目において, Ki-67 陽性細胞率は, NFT 群, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 3-3A)。p-Histone H3 陽性細胞率は, NFT 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 3-3B)。TOP2A 陽性細胞率は, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 3-3C)。UBD 陽性細胞率は, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 3-3D)。p-MDM2 陽性細胞率は, TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ, NFT 群および CP 群で有意な減少が認められた (Fig. 3-3E)。TUNEL 陽性細胞率は, CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 3-3F)。

#### **p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合**

増殖細胞のうち M 期に存在する細胞の割合を推定するために, 同一個体の腎臓から得られた別の組織スライドを用いて得られた各分子の陽性細胞率のデータを用いて, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を求めた。

3 日目において, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は, TCP 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 3-4A)。7 日目において,

p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は, TCP 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 3-4B) 。28 日目において, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は, ADAQ 群および TCP 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 3-4C) 。

### **UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との共発現**

3 日目において, UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は, 全投与群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 3-5A) 。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 3-5B) 。

7 日目において, UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は, TCP 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 3-5C) 。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は, TCP 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 3-5D) 。

28 日目において, UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は, 全投与群で無処置対照群と比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 3-5E) 。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は, ADAQ 群および TCP 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 3-5F) 。

## mRNA 発現

NFT 群, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群について, 28 日目および 90 日目の時点における, Table 3-2 に記載されている遺伝子の mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法によって定量し, 無処置対照群における mRNA 発現量との相対値を算出した (Table 3-4)。

3 日目において, *Cdkn1a* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Chek1* および *Mad2l1* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ, ADAQ 群で有意な減少が認められた。*Mdm2* は, *Actb* および *Gapdh* によって相対値を求めたところ, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で, *Mdm2* は, *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rbl2* は, *Actb* によって相対値を求めたところ, NFT 群および TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Tp53* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ, NFT 群で有意な減少が認められた。

7 日目において, *Cdkn1a*, *Chek1* および *Mad2l1* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を

求めたところ, NFT 群および TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Cdkn1a* および *Mad2l1* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, ADAQ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mdm2* は, *Actb* および *Gapdh* によって相対値を求めたところ, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*tp53* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rbl2* は, *Actb* によって相対値を求めたところ, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で, *Rbl2* は, *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。

28 日目において, *Cdkn1a* は, *Actb* および *Gapdh* によって相対値を求めたところ, TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ, ADAQ 群で有意な減少が認められた。*Chk1* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mad2l1* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mdm2* および *tp53* は, *Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ, ADAQ 群, TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で,

*Mdm2* は, *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rbl2* は, *Actb* によって相対値を求めたところ, TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で, *Rbl2* は, *Gapdh* によって相対値を求めたところ, NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。

## 考察

所属研究室の先行研究において、28 日間の反復投与により増殖活性の亢進を示す発がん物質は、標的臓器を問わず細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシスを増加させることを見出している [30, 73, 74, 82, 83]。本研究において、腎発がん物質の NFT および TCP は Ki-67 陽性増殖細胞および細胞周期関連分子発現細胞を 3 日目から増加させ、また腎発がん物質の ADAQ も 28 日目でこれらの発現細胞を増加させた。一方で、非発がん性腎毒性物質の CBX も 3 日目および 28 日目で同様の反応を示した。また、第 1 章および第 2 章より、非発がん性肝毒性物質の promethazine が、肝発がん物質の methyleugenol および thioacetamide (TAA) と同様に増殖活性の亢進とともに細胞周期関連分子発現細胞の増加を誘発することを見出している [30, 31]。さらに、TUNEL 陽性細胞率は、7 日目で NFT および TCP によって、28 日目で CBX によって一時的に増加していたことから、アポトーシスに関して発がん物質特異的な反応は見出せなかった。これらの結果から、細胞周期関連分子の発現およびアポトーシスの増加は、発がん物質特異的な反応ではないことが示唆され、免疫組織化学染色により単一分子解析では、3, 7 および 28 日間の反復投与による経時的な解析によっては、発がん物質特異的な反応を検出することが困難であることが考えられた。

第 1 章より、投与開始後 28 日目で肝発がん物質により、M 期スピンドルチェックポイント遺伝子の *Mad2l1* [79]、G<sub>2</sub>/M チェックポイント遺伝子の *Chk1* [62]、p21<sup>Cip1</sup> をコード

する *Cdkn1a* の mRNA 発現の増加および, RB ファミリー蛋白の 1 つで G<sub>1</sub>/S 期の進行を制御する遺伝子の *Rbl2* [12, 13] の mRNA 発現の減少が誘発されたことから, 肝発がん物質によって G<sub>2</sub>期および M 期で細胞周期が停止している肝細胞の増加および G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻が誘発されていることが示唆された [30]。しかしながら, ラットへの肝発がん物質ないし肝発がんプロモーターの最大 90 日間反復投与による経時的な解析の結果, *Mad2l1*, *Chek1*, *Cdkn1a* および *Rbl2* の mRNA 発現の発がん物質特異的な変動は認められなかった [31]。本研究において, 腎発がん物質についても, 全投与期間で, これらの遺伝子の mRNA 発現における発がん物質特異的な変動は認められなかった。これらの結果より, *Mad2l1*, *Chek1* および *Cdkn1a* の mRNA 発現の増加および *Rbl2* の mRNA 発現の減少は, 発がん物質反復投与の早期過程においては発がんに関与する変化ではないことが推察された。

本研究において, 腎発がん物質の ADAQ および TCP と, 非発がん性腎毒性物質の CBX は, ADAQ は 3 日目では *Tp53* の mRNA 発現を増加させなかったが, *Mdm2* および *Tp53* の mRNA 発現を 3 日目から増加させた。p53 は急性腎傷害に応答する多くの遺伝子の発現を制御することが知られており, また, MDM2 はユビキチン化による分解を促進するか, 細胞質に p53 の局在を保持することで p53 の機能を制御していることが知られている [46]。MDM2 は多岐にわたるリン酸化によって制御されており, リン酸化部位によってその機能が決定づけられている [47]。人の肝細胞癌および肺癌由来の細胞

株において、MDM2 の 166 位のセリン基におけるリン酸化は、増殖因子を介したシグナルにより誘発され、それにより MDM2 の細胞質から核内への移動が促進されることで、p53 を分解することが報告されている [40, 44]。さらに、人の乳がんにおいて、166 位のセリン基がリン酸化した MDM2 の高発現が、細胞増殖活性および予後不良に関連していることが報告されている [67]。第 1 章および第 2 章において、肝がん物質は特異的に、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率を増加させたことから、p53 の分解促進とそれに伴う G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻を誘発していることが推察された [30, 31]。しかしながら本研究においては、*Mdm2* の mRNA 発現は腎がん物質だけでなく非がん性腎毒性物質によっても 3 日目から増加し、また p-MDM2 陽性細胞率の発がん物質特異的な反応も認められなかった。これらの結果から、*Mdm2* の mRNA 発現の増加は、腎がん物質および非がん性腎毒性物質による腎毒性に反応して生じた *Tp53* の発現上昇に伴って生じたものと考えられた。腎がん物質の投与早期において、発がん物質特異的な p-MDM2 陽性細胞率の増加が認められなかったことから、肝がん物質とは異なり、腎がん物質に誘発される細胞増殖活性の亢進には MDM2 は関与していないことが推察された。

UBD の過剰発現により、M 期においてスピンドルチェックポイントとして機能する MAD2 のキネトコア局在が抑制され、それが染色体不安定性を誘発することが報告されている [22, 37]。UBD と MAD2 の相互作用が、増殖細胞の M 期に存在する割合の減

少とともに染色体の構造および数の異常を誘発することも報告されており [75] , これらの結果から M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が生じていることが示唆された。所属研究室の先行研究において、発がん物質を 28 日ないし 90 日間反復投与することで、発がん物質の細胞増殖誘発性に関係なく、UBD の G<sub>2</sub> 期からの異常発現および M 期における増殖細胞の割合を減少させていることから、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が誘発されていることが推察された [30, 31, 74] 。本研究において、腎発がん物質の ADAQ および TCP は 28 日目で増殖活性を亢進するとともに、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を減少させた。それとは対照的に、非発がん性腎毒性物質の CBX は 3 日目においてのみ一時的に UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合を減少させ、またその時点においても p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は減少させなかった。p-Histone H3 は M 期に発現することが知られていることから [23] , これらの結果より、腎発がん物質は特異的に UBD の M 期における発現不足を誘発し、それと同時に増殖細胞の M 期からの早期の移行が生じていることが推察された。したがって、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は、発がん物質の反復投与早期に生じ、発がん過程に関与する主要な機序の 1 つであり、また腎発がん物質がこの M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発するためには 28 日間の投与期間が必要であることが推察された。一方で、TCP は 7 日目においても、UBD 陽

性細胞のうち M 期に存在する細胞の割合を減少させたが, TCP 以外の腎発がん物質はこの時点において同様の反応を誘発しなかった。TCP はさらに, 増殖細胞の M 期における割合も減少させていたことから, 早ければ 7 日目から M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発する可能性が推察された。

ADAQ および TCP とは対照的に, 腎発がん物質である NFT は全投与期間で細胞増殖活性を亢進していたにも関わらず, UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合の減少は示さなかった。NFT は 2 年間のがん原性試験において, 通常通り左右腎臓において各 1 枚ずつ標本作製し評価した場合には有意な腎臓腫瘍の発生率の増加は認められなかったが, さらにもう 1 枚ずつ標本作製し再評価することで腎臓腫瘍の有意な発生率の増加が見出されており [50], このことから NFT は弱い腎発がん性を有することが示唆できる。

ADAQ および TCP はいずれも, 2 年間のがん原性試験において, 腎臓腫瘍の明らかな発生率の増加を誘発することが報告されている [54, 55]。第 2 章より, 弱い肝発がん性を示す leucomalachite green は最大 90 日間の反復投与によっても, p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を減少させなかった [31]。そのため, 発がん物質特異的な M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は, 弱い発がん性を示す発がん物質によっては誘発されないことが推察された。本研究での NFT による細胞周期進行の促進は, NFT の腎尿細管上皮に対する毒性影響を反映したものであることが推察された。

所属研究室における先行研究において、NTP により報告されているラットやマウスを用いた反復投与試験において見出された先行する病理変化に基づいて、腎発がん物質を、投与の比較的初期から腎尿細管上皮細胞に巨大核の形成を誘発するタイプと、尿細管性腎症を誘発するタイプの 2 つに分類している [73]。本研究で用いた腎発がん物質のうち、ADAQ と TCP はいずれも巨大核を誘発することが報告されており [54, 55]，NFT は尿細管性腎症を誘発することが報告されている [50]。本研究において、巨大核を誘発しない NFT は、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発しなかった。これらの結果から、標的臓器に対する巨大核誘発性は、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻と関連がある可能性が推察された。一方で、第 2 章より、90 日間の反復投与によっても巨大核を誘発しなかった肝発がん物質の carbadox も M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発した [31]。したがって、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は、腎尿細管上皮細胞に巨大核を誘発しない腎発がん物質の反復投与によっても誘発される可能性が推察された。

発がん物質は一般的に、遺伝毒性ないし酸化性ストレス誘発性に関連して、発がんを誘発することがあるため、これらの性質が M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻にも関与している可能性が考えられる。遺伝毒性に関して、以前の報告によると、NFT, ADAQ および TCP はいずれも遺伝毒性腎発がん物質に分類されている [50, 54, 55]。また、発がん用量の NFT をラットへ 28 日間強制経口投与することで、腎臓において酸化

性ストレスに起因する DNA 損傷が誘発されることが報告されている [29]。しかしながら、本研究において NFT は M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発しなかった。これらの結果から、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻の誘発と遺伝毒性との因果関係を判断することはできなかった。注目すべきことは、第 1 章および第 2 章により、非遺伝毒性肝発がん物質の TAA および methapyrilene が、28 日間の反復投与によって肝細胞に M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発することを見出した [30, 31, 60]。これらの結果より、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は発がん物質の遺伝毒性に関係なく誘発される可能性が推察された。

結論として、28 日間の反復投与によって、腎発がん物質および非発がん性腎毒性物質はともに、細胞増殖活性の亢進とともに細胞周期関連分子発現細胞の増加を誘発したことから、28 日間の毒性試験の枠組みでの、免疫組織化学染色による単一分子解析では、化学物質の発がん性を予測することは困難であることが示唆された。mRNA の発現解析の結果、肝発がん物質とは異なり、細胞周期制御関連遺伝子の mRNA 発現の発がん物質特異的な変動は、最大 28 日間の反復投与によっても誘発されなかった。それとは対照的に、腎発がん物質の ADAQ および TCP は、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を特異的に減少させたことから、UBD の M 期における発現不足および増殖細胞の M 期からの早期の移行が誘発されていることが推察された。一方で、発がん物質特異的なアポト

ーシスの増加は認められなかった。しかしながら、弱い発がん性を示す NFT は、これらの発がん物質特異的な反応を誘発しなかった。これらの結果より、腎発がん物質の反復投与により M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発するためには 28 日間の投与期間が必要であるが、アポトーシスの誘発はこの反応に不可欠なものではないことが推察された。それとは対照的に、弱い発がん物質は 28 日間の反復投与によっても十分な反応性を示さないことが示唆された。今後は、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発する機序の検討、特に発がん物質の反復投与による標的細胞での UBD とその他の制御因子との相互作用について検討していく必要があると考えられる。

## 小括

第 3 章では、肝発がん物質の反復投与によって誘発された経時的な反応が、腎発がん物質によっても誘発されるか否かを検討するために、ラットに腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質を 3, 7 ないし 28 日間反復投与した。その結果、免疫組織化学染色による単一分子解析および real-time RT-PCR 解析のいずれによっても、最大 28 日間の反復投与によっては、発がん物質特異的な細胞周期関連分子の発現変動は認められなかった。しかしながら、腎発がん物質の ADAQ および TCP は投与開始後 28 日目で特異的に、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および M 期における増殖細胞の割合を減少させたことから、これらの発がん物質は UBD の M 期における発現不足とそれに伴う増殖細胞の M 期からの早期の移行を誘発していることが推察されたが、この反応にはアポトーシスの亢進は伴わなかった。それとは対照的に、発がん性が弱いと判断される NFT はこれらと同様の反応は示さなかった。これらの結果から、腎発がん物質による M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は、誘発されるまでに 28 日間の投与期間を必要とするが、アポトーシスの誘発は必ずしも生じるものではないことが示唆された。また、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は発がん物質の発がん強度に依存して誘発され、発がん性の弱い発がん物質では 28 日間の反復投与によってもこれらの反応を誘発しないことが推察された。

## 総合考察

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、投与が長期に及ぶため、評価の効率性等の点で課題があり、より短期の検出系の確立が求められている。本研究では、発がん物質の投与初期から誘発される細胞周期制御異常に着目した短期発がん性予測系の開発を目指して、発がん物質特異的な細胞周期制御破綻の表現型の成立時期とその主要メカニズムを検討した。

本研究に先立つ先行研究において、ラットへの 28 日間反復投与により標的細胞に増殖活性の亢進を示す発がん物質は、標的臓器性を問わず、細胞周期チェックポイント機構の活性化を反映した細胞周期分子発現とアポトーシスの増加と共に、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発することを見出している [73, 74, 82, 83]。第 1 章では、肝発がん物質投与早期に誘発される細胞周期制御破綻とその出現時期の同定を目的として、肝発がん物質をラットへ最大 28 日間反復投与し、細胞周期関連分子の発現変動を、免疫組織化学染色および real-time RT-PCR 法の解析により経時的に検討した。その結果、反復投与開始後 28 日目で肝発がん物質は、細胞増殖活性の亢進とともに p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率, p-MDM2 陽性細胞率, cleaved caspase 3 陽性細胞率および DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の増加を誘発した。肝発がん物質はさらに、*Rbl2* の mRNA 発現の減少, *Cdkn1a*, *Mad2l1*, *Chk1* および *Mdm2* の mRNA 発現の増加, UBD 陽性細胞のうち

p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性増殖細胞率に対する割合の減少を誘発した。UBD の過剰発現により、スピンドルチェックポイント蛋白質の MAD2 の機能が阻害され、染色体不安定性が誘発されることが報告されている [22, 37]。また、所属研究室の先行研究において、28 日間反復投与によって増殖活性の亢進を示す発がん物質は、UBD の G<sub>2</sub> 期からの異常発現に起因する、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発することを見出した [74]。これらから、28 日目で肝発がん物質は、M 期における UBD 発現の減少に起因する M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻と、それに伴う増殖細胞の M 期からの早期の移行を誘発することが推察された。RBL2 は、RB ファミリー蛋白質の 1 つで、G<sub>1</sub>/S 期の進行を制御し [12, 13]、MDM2 は、p53 の下流因子の 1 つで、ユビキチン化により p53 や RB 蛋白質の分解を促進する [8, 24, 76]。したがって、28 日目で肝発がん物質により、p53 および RB 蛋白質の不足に起因する G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻が生じ、それが細胞増殖活性の亢進に関与していることが推察された。p53 は遺伝毒性ストレスに応答して、p21<sup>Cip1</sup> などの発現を誘導することで、G<sub>1</sub> 期で細胞周期を停止させ、DNA 損傷の修復を促す [5, 71]。また、p21<sup>Cip1</sup> はアポトーシスの誘発に必要であることが報告されている [33, 38]。したがって、DNA 損傷の蓄積は、おそらく MDM2 の活性化に起因する p53 の分解促進に関連して生じており、それが p21<sup>Cip1</sup> の異常な活性化とそれに引き続くアポトーシスを誘発している可能性が推察された。以上より、肝発がん物質特異的な細胞周期制御破綻は、

投与開始後 28 日目で明らかになることが判明した。

第 2 章では、第 1 章で見出された細胞周期制御破綻が、増殖活性の亢進を示さない肝発がん物質や肝発がんプロモーターの反復投与時においても誘発されるか否かを検討するために、ラットに肝発がん物質、弱い肝発がん性が示唆されており細胞増殖誘発性の低いことが想定される物質ないし肝発がんプロモーターを最大 90 日間反復投与した。その結果、投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進を示す肝発がん物質は、細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシスも増加させ、90 日目においても同様の反応を示した。しかしながら、増殖活性を亢進しない肝発がん物質および肝発がんプロモーターについては、免疫組織化学染色による単一分子解析では最大 90 日間の反復投与によっても、特異的な反応を検出することはできなかった。*Cdkn1a*, *Mad2l1*, *Chek1* および *Rbl2* の mRNA 発現に関しては、第 1 章の結果とは異なり、肝発がん物質および肝発がんプロモーター特異的な変動は認められなかった。それとは対照的に、28 日目から、全ての肝発がん物質は、細胞増殖誘発性に関係なく、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率の増加を誘発した。これらから、第 1 章と同様に、肝発がん物質特異的に、G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻が誘発されていることが示唆された。しかしながら、*Tp53* の mRNA 発現が物質によって異なる変動パターンを示したことから、MDM2 発現の誘発および活性化には肝発がん物質間で、異なる機序が働いている可能性が推察された。一方で、肝発がん物質の MP および CRB は、28 日目ないし 90 日目で、細胞増殖誘発性に関

わらず, M 期に存在する UBD 陽性細胞および M 期に存在する増殖細胞を減少させた。

これらの結果から, 肝発がん物質は投与開始後 28 日目以降ないし 90 日目で M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発し, この反応は増殖活性の亢進に先立って誘発されることが推察された。しかしながら, 本研究において, 肝発がんプロモーターについては, 特異的な反応を検出することができなかった。今後は, 本研究で用いた指標の発がん性予測性の確度を高めるために, ポストイニシエーション期における解析により, 本研究で特異的な反応を示さなかった肝発がんプロモーターの反応性を検討する必要があると考えられた。

第 3 章では, 肝発がん物質の反復投与によって誘発された経時的な反応が, 腎発がん物質によっても誘発されるか否かを検討するために, ラットに腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質を 3, 7 ないし 28 日間反復投与した。その結果, 免疫組織化学染色による単一分子解析および real-time RT-PCR 解析のいずれによっても, 最大 28 日間の反復投与によっては, 腎発がん物質特異的な反応は見出せなかった。それとは対照的に, 腎発がん物質の ADAQ および TCP は投与開始後 28 日目で, UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および M 期における増殖細胞の割合を減少させたことから, 肝発がん物質と同様に, M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発していることが推察されたが, この反応にはアポトーシスの亢進は伴わなかった。一方で, 発がん性が弱い腎発がん物質の NFT は同様の反応を示さなかった。これらから,

腎発がん物質による細胞周期制御破綻は投与開始後 28 日目で明らかになるが、アポトーシスの亢進は必ずしも伴うものではないことが示唆された。また、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は発がん物質の発がん強度に依存して誘発され、発がん性の弱い発がん物質は、少なくとも 28 日間では、これらの反応を誘発しないことが示唆された。今後は、M 期スピンドルチェックポイント機構破綻の詳細な機序、特に UBD とその他の制御分子との関連について検討していく必要があることが考えられた。

以上の結果より、投与開始後 28 日目以降ないし 90 日目で、標的臓器を問わず、発がん物質特異的に UBD の M 期における発現減少に起因する M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が誘発され、それが発がん早期過程に関与していることが推察された。一方で、mRNA 発現やアポトーシスの解析によっては肝臓および腎臓標的発がん物質特異的な反応は見出すことができなかったことから、少なくとも 90 日間の投与期間では、これらの解析による化学物質の発がん性予測は困難であることが示唆された。これらのことから、少なくとも 90 日間反復投与試験の枠組みにおいて、二重染色を組み合わせた免疫組織化学染色による Ki-67, p-Histone H3, TOP2A および UBD の発現分布解析によって、2 年間のがん原性試験で明らかに腫瘍を誘発する発がん物質については、発がん標的臓器および細胞増殖誘発性を問わず、化学物質の発がん性を予測できる可能性が示唆された。前述したように、ポストイニシエーション時期での反応性が有効であれば、検出までの時間短縮とともに、本システムでは検出が適わない発がんプロモ-

ターの検出性にも期待が持てる。将来的には、28 日間ないし 90 日間反復投与系と発がんプロモーションの系を組み合わせることで検出系の整備を図れば、発がん早期予測システムの可能となるであろう。

## 結論

本研究は、短期発がん性予測系への応用を目指し、肝臓ないし腎臓を標的とする発がん物質をラットへ反復投与し、発がん物質の投与早期から認められる細胞周期制御破綻の表現型の成立時期とその主要メカニズムの検討を行った。まず、肝発がん物質によって誘発される細胞周期関連分子の発現変動を経時的に検討し、次いで、増殖活性の亢進を示さない肝発がん物質ないし肝発がんプロモーターの反応性を検討した。最後に、腎発がん物質を用いて、肝発がん物質で認められた反応の標的臓器間での普遍性を検討した。

第1章では、ラットに肝発がん物質を3,7ないし28日間反復投与し、細胞周期関連分子の発現変動を経時的に解析した。その結果、投与開始後28日目から肝発がん物質特異的に、*Rbl2* の mRNA 発現の減少、*Mdm2* の mRNA 発現および p-MDM2 陽性細胞の増加が認められ、p53 および RB 蛋白質の不足に起因する G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻とそれに引き続く細胞周期進行の促進が誘発されていることが示唆された。肝発がん物質は、28日目でさらに UBD 陽性細胞の M 期における割合および増殖細胞の M 期における割合を減少させたことから、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻とそれに伴う増殖細胞の M 期からの早期の移行を誘発していることが推察された。したがって、肝発がん物質特異的な細胞周期制御破綻は、投与開始後28日目から出現することが示唆

された。

第 2 章では、第 1 章で認められた反応が、増殖活性の亢進を示さない肝発がん物質ないし肝発がんプロモーターでも生じるか否かを検討するために、ラットに肝発がん物質ないし肝発がんプロモーターを 7, 28 ないし 90 日間反復投与した。その結果、免疫組織化学染色による単一分子解析および *Cdkn1a*, *Mad2l1*, *Chek1* および *Rbl2* の mRNA 発現解析によっては、肝発がん物質・肝発がんプロモーター特異的な反応は見出せなかった。一方で、28 日目以降に全肝発がん物質で、細胞増殖誘発性に関わらず、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 発現細胞の増加が認められたことから、肝発がん物質特異的に p53 および RB 蛋白質の不足に起因する G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻が誘発されていることが推察された。さらに、肝発がん物質は 28 日目以降ないし 90 日目で、細胞増殖誘発性に関係なく M 期における UBD 陽性細胞および M 期における増殖細胞の減少を誘発したことから、肝発がん物質は投与開始後 28 日目ないし 90 日目から M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発し、この反応は細胞増殖の亢進に先立って誘発される可能性が推察された。

第 3 章では、肝発がん物質によって誘発された細胞周期制御破綻が、腎発がん物質によっても同様に誘発されるかを検討するために、ラットに腎発がん物質を 3, 7 ないし 28 日間反復投与した。その結果、免疫組織化学染色による単一分子解析および mRNA の発現解析によっては発がん物質特異的な反応は見出せなかった。一方で、投与開始後 28

日目で腎発がん物質の ADAQ および TCP は, UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を特異的に減少させたことから, 肝発がん物質と同様に, M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻とそれに伴う増殖細胞の M 期からの早期の移行を誘発していることが推察された。しかしながら, 弱い発がん性を示す NFT は, これらの発がん物質特異的な反応を誘発しなかった。これらのことから, 腎発がん物質による細胞周期制御破綻は投与開始後 28 日目から明らかになるが, 弱い発がん物質は 28 日間の反復投与によっても同様の反応を示さないことが示唆された。

以上より, 投与開始後 28 日目以降ないし 90 日目で, 標的臓器を問わず, 発がん物質特異的に M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が生じ, それが発がん早期過程に寄与していることが推察された。しかし, 発がん作用が弱い物質はこの反応を誘発しなかったことから, 発がん物質の発がん強度に依存して生じることが考えられた。また, *Mdm2* ないし p-MDM2 の発現上昇に起因する G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻は肝発がん物質特異的な反応であることが考えられた。これらのことから, 少なくとも 90 日間反復投与試験の枠組みにおいて, 二重染色を組み合わせた免疫組織化学染色による Ki-67, p-Histone H3, TOP2A および UBD の発現分布解析によって, 2 年間のがん原性試験で明らかに腫瘍を誘発する発がん物質については, 発がん標的臓器および細胞増殖誘発性を問わず, 化学物質の発がん性を予測できる可能性が示された。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始御指導、御鞭撻を賜りました岐阜大学大学院連合獣医学研究科ならびに東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 渋谷 淳 教授、東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 吉田 敏則 准教授ならびに東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 鈴木 和彦 准教授に深謝いたします。

本稿作成に際し、懇篤な御指導、御助言を賜りました、東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門 下田 実 教授、帯広畜産大学基礎獣医学研究部門病態予防学分野 古林 与志安 教授、岩手大学農学部共同獣医学科 御領 政信 教授、岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科 柳井 徳磨 教授に謹んで深謝の意を表します。

研究に際し、御指導・御協力賜り、実験にご協力くださいました、東京農工大学獣医病理学研究室 鈴木滋子 女史はじめ同教室の学生の皆様に心から感謝いたします。

## 引用文献

1. Abbas, T. and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9, 400–4014.
2. Adachi, N., Kobayashi, M. and Koyama, H. (1997). Cell cycle-dependent regulation of the mouse DNA topoisomerase II $\alpha$  gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 105–109.
3. Adler, M., Müller, K., Rached, E., Dekant, W. and Mally, A. (2009). Modulation of key regulators of mitosis linked to chromosomal instability is an early event in ochratoxin A carcinogenicity. *Carcinogenesis* 30, 711–719.
4. Allen, D.G., Pearce, G., Haseman, J.K. and Maronpot, R.R. (2004). Prediction of rodent carcinogenesis: an evaluation of prechronic liver lesions as forecasters of liver tumors in NTP carcinogenicity studies. *Toxicol. Pathol.* 32, 393–401.
5. Bartek, J. and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13, 738–747.
6. Becker, F.F. (1983). Thioacetamide hepatocarcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 553–558.
7. Beutin, L., Preller, E. and Kowalski, B. (1981). Mutagenicity of quinoxin, its metabolites, and two substituted quinoxaline-di-N-oxides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20, 336–343.

8. Bhattacharya, S. and Ghosh, M.K. (2014). HAUSP, a novel deubiquitinase for Rb - MDM2 the critical regulator. *FEBS. J.* 281, 3061–3078.
9. Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467.
10. Chen, X., Arciero, C.A., Wang, C., Broccoli, D. and Godwin, A.K. (2006). BRCC36 is essential for ionizing radiation-induced BRCA1 phosphorylation and nuclear foci formation. *Cancer Res.* 66, 5039–5046.
11. Clawson, G.A., Blankenship, L.J., Rhame, J.G. and Wilkinson, D.S. (1992). Nuclear enlargement induced by hepatocarcinogens alters ploidy. *Cancer Res.* 52, 1304–1308.
12. Cobrinik, D., Lee, M.H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R.A. and Jacks, T. (1996). Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* 10, 1633–1644.
13. Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796–2809.
14. Eastin, W.C. (1998). The U.S. National toxicology program evaluation of transgenic mice as predictive models for identifying carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 106, 81–84.
15. Eckle, V.S., Buchmann, A., Bursch, W., Schulte-Hermann, R. and Schwarz, M. (2004). Immunohistochemical detection of activated caspases in apoptotic hepatocytes in rat liver.

Toxicol. Pathol. 32, 9–15.

16. El-Shafey, M.M., Abd-Allah, G.M., Mohamadin, A.M., Harisa, G.I. and Mariee, A.D. (2015). Quercetin protects against acetaminophen-induced hepatorenal toxicity by reducing reactive oxygen and nitrogen species. *Pathophysiology* 22, 49–55.
17. Fernández, G., Villarruel, M.C., Bernacchi, A., de Castro, C.R. and Castro, J.A. (1981). Liver microsomal drug-metabolizing enzyme activity: enhancement by blockade of degradative processes in promethazine-treated rats. *Br. J. Exp. Pathol.* 62, 440–445.
18. Gerlach, C., Sakkab, D.Y., Scholzen, T., Dassler, R., Alison, M.R. and Gerdes, J. (1997). Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 26, 573–578.
19. Gorospe, M., Wang, X. and Holbrook, N.J. (1999). Functional role of p21 during the cellular response to stress. *Gene Expr.* 7, 377–385.
20. Gotz, C. and Montenarh, M. (1995). P53 and its implication in apoptosis (review). *Int. J. Oncol.* 6, 1129–1135.
21. Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Hayashi, M., Nakamura, D., Wakita, A., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K. (2012). Enhanced liver tumor promotion but not liver initiation activity in rats subjected to combined administration of omeprazole and  $\beta$ -naphthoflavone. *J. Toxicol. Sci.* 37, 969–985.

22. Herrmann, J., Lerman, L.O. and Lerman, A. (2007). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ. Res.* 100, 1276–1291.
23. Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H. and Peters, J.M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438, 1176–1180.
24. Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420, 25–27.
25. Honma, K., Nakanishi, R., Nakanoko, T., Ando, K., Saeki, H., Oki, E., Iimori, M., Kitao, H., Kakeji, Y. and Maehara, Y. (2014). Contribution of Aurora-A and -B expression to DNA aneuploidy in gastric cancers. *Surg. Today* 44, 454–461.
26. Ichijima, Y., Yoshioka, K., Yoshioka, Y., Shinohe, K., Fujimori, H., Unno, J., Takagi, M., Goto, H., Inagaki, M., Mizutani, S. and Teraoka, H. (2010). DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* 5, e8821.
27. Inuzuka, H., Tseng, A., Gao, D., Zhai, B., Zhang, Q., Shaik, S., Wan, L., Ang, X.L., Mock, C., Yin, H., Stommel, J.M., Gygi, S., Lahav, G., Asara, J., Xiao, Z.X., Kaelin, W.G. Jr., Harper, J.W. and Wei, W. (2010). Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF (beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 18,

147–159.

28. Jeding, I., Evans, P.J., Akanmu, D., Dexter, D., Spencer, J.D., Aruoma, O.I., Jenner, P. and Halliwell, B. (1995). Characterization of the potential antioxidant and pro-oxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 49, 359–365.
29. Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Kuroda, K., Hibi, D., Suzuki, Y., Nohmi, T. and Umemura, T. (2015). Chemical structure-related mechanisms underlying in vivo genotoxicity induced by nitrofurantoin and its constituent moieties in gpt delta rats. *Toxicology* 331, 125–135.
30. Kimura, M., Abe, H., Mizukami, S., Tanaka, T., Itahashi, M., Onda, N., Yoshida, T. and Shibutani, M. (2015). Onset of hepatocarcinogen-specific cell proliferation and cell cycle aberration during the early stage of repeated hepatocarcinogen administration in rats. *J. Appl. Toxicol.* (in press).
31. Kimura, M., Mizukami, S., Watanabe, Y., Hasegawa-Baba, Y., Onda, N., Yoshida, T. and Shibutani, M. (2015). Disruption of spindle checkpoint function ahead of facilitation of cell proliferation by repeated administration of hepatocarcinogens in rats. *J. Toxicol. Sci.* (in press).
32. King, T.O. (1976). Target Organ Toxicity of GS-6244 (carbadox) and CP-17,056 (desoxycarbadox) with Chronic Administration in Rats. Unpublished. Submitted to WHO

by Pfizer Central Research, Groton, CT, USA.

33. Kondo, S., Barna, B.P., Kondo, Y., Tanaka, Y., Casey, G., Liu, J., Morimura, T., Kaakaji, R., Peterson, J.W., Werbel, B. and Barnett, G.H. (1996). WAF1/CIP1 increases the susceptibility of p53 non-functional malignant glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* 13, 1279–1285.
34. Kops, G.J., Foltz, D.R. and Cleveland, D.W. (2004). Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8699–8704.
35. Kunitomo, K., Nojima, H., Yamazaki, Y., Yoshikawa, T., Okanoue, T. and Tsukita, S. (2009). Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development. *J. Cell. Physiol.* 220, 621–631.
36. Lee, C.G., Hague, L.K., Li, H. and Donnelly, R. (2004). Identification of toposome, a novel multisubunit complex containing topoisomerase II $\alpha$ . *Cell Cycle* 3, 638–647.
37. Lim, C.B., Zhang, D. and Lee, C.G. (2006). FAT10, a gene up-regulated in various cancers, is cell-cycle regulated. *Cell Div.* 1:20.
38. Lincet, H., Poulain, L., Remy, J.S., Deslandes, E., Duigou, F., Gauduchon, P. and Staedel, C. (2000). The p21<sup>cip1/waf1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* 161, 17–26.

39. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402–408.
40. Malmlöf, M., Roudier, E., Högberg, J. and Stenius, U. (2007). MEK-ERK-mediated phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in hepatocytes. Mdm2 is activated in response to inhibited Akt signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 2288–2296.
41. Matsumoto, H., Yakabe, Y., Saito, F., Saito, K., Sumida, K., Sekijima, M., Nakayama, K., Miyaura, H., Otsuka, M. and Shirai, T. (2011). New short term prediction method for chemical carcinogenicity by hepatic transcript profiling following 28-day toxicity tests in rats. *Cancer Inform.* 10, 259–271.
42. Matsumoto, H., Saito, F. and Takeyoshi, M. (2014). CARCINOscreen<sup>®</sup>: New short-term prediction method for hepatocarcinogenicity of chemicals based on hepatic transcript profiling in rats. *J. Toxicol. Sci.* 39, 725–734.
43. Mattila, R., Alanen, K. and Syrjänen, S. (2007). Immunohistochemical study on topoisomerase II $\alpha$ , Ki-67 and cytokeratin-19 in oral lichen planus lesions. *Arch. Dermatol. Res.* 298, 381–388.
44. Mayo, L.D. and Donner, D.B. (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem. Sci.* 27, 462–467.
45. McKillop, D. and Case, D.E. (1991). Mutagenicity, carcinogenicity and toxicity of

- beta-naphthoflavone, a potent inducer of P448. *Biochem. Pharmacol.* 41, 1–7.
46. McNicholas, B.A. and Griffin, M.D. (2012). Double-edged sword: a p53 regulator mediates both harmful and beneficial effects in experimental acute kidney injury. *Kidney Int.* 81, 1161–1164.
47. Meek, D.W. and Hupp, T.R. (2010). The regulation of MDM2 by multisite phosphorylation—opportunities for molecular-based intervention to target tumours? *Semin Cancer Biol.* 20, 19–28.
48. Milde-Langosch, K., Goemann, C., Methner, C., Rieck, G., Bamberger, A.M. and Löning, T. (2001). Expression of Rb2/p130 in breast and endometrial cancer: correlations with hormone receptor status. *Br. J. Cancer* 85, 546–551.
49. Mitsumori, K., Onodera, H., Shoda, T., Uneyama, C., Imazawa, T., Takegawa, K., Yasuhara, K., Watanabe, T. and Takahashi, M. (1997). Liver tumour-promoting effects of oxfendazole in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 35, 799–806.
50. NTP. (1989). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nitrofurantoin (CAS No. 67-20-9) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 341, 1–218.
51. NTP. (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acetaminophen (CAS No. 103–90-2) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl. Toxicol. Program Tech.*

- Rep. Ser. 394, 1–274.
52. NTP. (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Promethazine Hydrochloride (CAS No. 58-33-3) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 425, 1–272.
53. NTP. (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Triamterene (CAS No. 396-01-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 420, 1–367.
54. NTP. (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis of 1,2,3-Trichloropropane (CAS No. 96-18-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 384, 1–348.
55. NTP. (1996). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 1-Amino-2,4-Dibromoanthraquinone (CAS No. 81-49-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 383, 1–370.
56. NTP. (1998). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of 1-Chloro-2-propanol (Technical Grade) (CAS NO. 127-00-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Drinking Water Studies). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 477, 1–264.
57. NTP. (2000). Hepatotoxicity Studies of the Liver Carcinogen Methapyrilene Hydrochloride (CAS No. 135-23-9) Administered in Feed to Male F344/N Rats. Toxic. Rep. Ser. 46, 1-C7.

58. NTP. (2000). Toxicology and carcinogenesis studies of methyleugenol (CAS NO. 93–15-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser. 491, 1–412.
59. NTP. (2005). Toxicology and carcinogenesis studies of malachite green chloride and leucomalachite green. (CAS NOS. 569-64-2 and 129-73-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser. 527, 1–312.
60. Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T. (2014). Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocarcinogenesis study in rats. J. Toxicol. Sci. 39, 785–794.
61. O'Neil, N. and Rose, A. (2006). DNA repair. WormBook 13, 1–12.
62. Patil, M., Pabla, N. and Dong, Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. Cell. Mol. Life. Sci. 70, 4009–4021.
63. Priestley, C.C., Regan, S., Kevin, Park, B. and Williams, D.P. (2011). The genotoxic potential of methapyrilene using the alkaline Comet assay in vitro and in vivo. Toxicology 290, 249–257.
64. Rees, K.R., Rowland, G.F. and Ross, H.F. (1962). The metabolism of isolated rat-liver nuclei during chemical carcinogenesis. 2. 2-Acetylamidofluorene,  $\alpha$ -naphthyl

- isothiocyanate and 20, 40-dimethyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Biochem. J.* 82, 347–352.
65. Riehle, K.J., Campbell, J.S., McMahan, R.S., Johnson, M.M., Beyer, R.P., Bammler, T.K. and Fausto, N. (2008). Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J. Exp. Med.* 205, 91–103.
  66. Rodriguez, R. and Meuth, M. (2006). Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol. Biol. Cell* 17, 402–412.
  67. Schmitz, K.J., Grabellus, F., Callies, R., Wohlschlaeger, J., Otterbach, F., Kimmig, R., Levkau, B., Schmid, K.W. and Baba, H.A. (2006). Relationship and prognostic significance of phospho-(serine 166)-murine double minute 2 and Akt activation in node-negative breast cancer with regard to p53 expression. *Virchows Arch.* 448, 16–23.
  68. Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.
  69. Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes. Dev.* 9, 1149–1163.
  70. Shoda, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Toyoda, K., Uneyama, C., Takada, K. and Hirose, M. (2000). Liver tumor-promoting effect of beta-naphthoflavone, a strong CYP 1A1/2 inducer, and the relationship between CYP 1A1/2 induction and Cx32 decrease in its hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol. Pathol.* 28, 540–547.

71. Speidel, D. (2015). The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch. Toxicol.* (in press).
72. Tamano, S. (2010). Carcinogenesis risk assessment of chemicals using medium-term carcinogenesis bioassays. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 11, 4–5.
73. Taniai, E., Hayashi, H., Yafune, A., Watanabe, M., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2012). 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. *Arch. Toxicol.* 86, 1453–1464.
74. Taniai, E., Yafune, A., Hayashi, H., Itahashi, M., Hara-Kudo, Y., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani, M. (2012). Aberrant activation of ubiquitin D at G<sub>2</sub> phase and apoptosis by carcinogens that evoke cell proliferation after 28-day administration in rats. *J. Toxicol. Sci.* 37, 1093–1111.
75. Theng, S.S., Wang, W., Mah, W.C., Chan, C., Zhuo, J., Gao, Y., Qin, H., Lim, L., Chong, S.S., Song, J. and Lee, C.G. (2014). Disruption of FAT10-MAD2 binding inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E5282–5291.
76. Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H. and Kitagawa, M. (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* 24, 160–169.

77. Uehara, T., Minowa, Y., Morikawa, Y., Kondo, C., Maruyama, T., Kato, I., Nakatsu, N., Igarashi, Y., Ono, A., Hayashi, H., Mitsumori, K., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2011). Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 297–306.
78. USEPA. (2004). Reregistration Eligibility Decision for Carboxin. US. Environmental Protection Agency. Available at: [http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/0012red\\_carboxin.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/0012red_carboxin.pdf).
79. Weaver, B.A. and Cleveland, D.W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* 8, 7–12.
80. WHO. (1991). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Thirty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organ Tech. Rep. Ser.* 815, 1–64.
81. Woessner, R.D., Mattern, M.R., Mirabelli, C.K., Johnson, R.K. and Drake, F.H. (1991). Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ.* 2, 209–214.
82. Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Nakane, F., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani M. (2013). Expression patterns of cell cycle proteins in the livers of rats treated with

- hepatocarcinogens for 28 days. *Arch. Toxicol.* 87, 1141–1153.
83. Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Hayashi, H., Suzuki, K., Mitsumori, K. and Shibutani M. (2013). Aberrant activation of M phase proteins by cell proliferation-evoking carcinogens after 28-day administration in rats. *Toxicol. Lett.* 219, 203–210.
84. Yamamoto, Y., Matsuyama, H., Kawauchi, S., Matsumoto, H., Nagao, K., Ohmi, C., Sakano, S., Furuya, T., Oga, A., Naito, K. and Sasaki, K. (2006). Overexpression of polo-like kinase 1 (PLK1) and chromosomal instability in bladder cancer. *Oncology* 70, 231–237.
85. Yuan, B., Xu, Y., Woo, J.H., Wang, Y., Bae, Y.K., Yoon, D.S., Wersto, R.P., Tully, E., Wilsbach, K. and Gabrielson, E. (2006). Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin. Cancer Res.* 12, 405–410.
86. Zhang, H., Chen, X., Jin, Y., Liu, B. and Zhou, L. (2012). Overexpression of Aurora-A promotes laryngeal cancer progression by enhancing invasive ability and chromosomal instability. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 269, 607–614.
87. Zhao, Y., Yu, H. and Hu, W. (2014). The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 46, 180–189.

## 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、投与が長期に及ぶため、評価の効率性等の点で課題があり、より短期の検出系の確立が求められている。所属研究室の先行研究において、ラットへの 28 日間反復投与により標的細胞の増殖活性を亢進する発がん物質が M 期進行に関わる ubiquitin D (UBD) の G<sub>2</sub> 期からの異常発現に起因する、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発している可能性を見出しており、関連分子の短期発がん予測系への応用が期待される。本研究では、発がん物質特異的な細胞周期制御破綻の表現型の成立時期とその主要メカニズムの解明を目的とし、ラットに肝臓ないし腎臓を標的とした発がん物質を反復投与し、細胞周期関連分子の発現変動を経時的に検討した。

第 1 章では、肝発がん物質投与初期に生じる肝細胞増殖活性の変動に伴う、細胞周期関連分子発現およびアポトーシスの経時的な変化を解析し、発がん物質特異的な反応とその成立時期を検討した。すなわち、ラットを用いて、肝発がん物質 (methyleugenol [MEG], thioacetamide [TAA]) ないし非発がん性肝毒性物質 (acetaminophen [APAP],  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate, promethazine [PMZ]) を 3, 7 ないし 28 日間反復投与する群と、再生性肝細胞増殖を誘発する肝部分切除を行う群を設定した。実験終了後に肝臓を採取し、免疫組織化学および real-time RT-PCR 法による解析を行った。その結果、発がん物

質特異的な反応は実験開始後 28 日目で生じることが判明した。28 日目で増殖活性を亢進した物質のうち、発がん物質のみで、アポトーシスおよび細胞周期チェックポイント遺伝子の mRNA 発現が増加し、チェックポイント機構の活性化とそれに伴うアポトーシスの誘導が推察された。一方で、G<sub>1</sub>/S チェックポイントに関わるがん抑制遺伝子である *Rbl2* の mRNA の発現減少および G<sub>1</sub>/S チェックポイント蛋白質の分解を促進する *Mdm2* の mRNA 発現およびリン酸化 MDM2 (p-MDM2) 発現細胞の増加が生じ、発がん物質特異的に、G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻による G<sub>1</sub>→S 期進行の促進の生じていることが推察された。さらに、肝発がん物質により、UBD 陽性細胞および増殖細胞の M 期における割合が減少し、M 期スピンドルチェックポイント機構からのすり抜けを示唆する結果が得られた。

第 2 章では、第 1 章で見出された反応が、細胞増殖誘発性に乏しい肝発がん物質や肝発がんプロモーターを最長 90 日間投与した場合においても生じるか否かを検討する目的で、肝発がん物質 (methapyrilene [MP], carbadox [CRB])、発がん性が弱く細胞増殖誘発性が乏しいことが予想される肝発がん物質 (leucomalachite green [LMG])、肝発がんプロモーター ( $\beta$ -naphthoflavone, oxfendazole) ないし非発がん性肝毒性物質 (PMZ) をラットに 7, 28 ないし 90 日間反復投与した。90 日間投与群では、TAA および APAP の投与群を追加した。投与終了後肝臓を採取し、免疫組織化学および real-time RT-PCR による解析を行った。その結果、7 日目では、発がん物質特異的な反応は認められなかった。

28 日目で増殖活性を亢進した物質のうち肝発がん物質のみで、90 日目でも細胞増殖、アポトーシスおよび細胞周期関連分子発現細胞数が増加した。一方で、肝発がん物質の CRB と LMG および肝発がんプロモーターは、90 日間の反復投与によっても増殖活性を亢進しなかった。これらより、一部の肝発がん物質は、反復投与早期から持続的に増殖活性を亢進することで発がんを誘発していることが考えられた。第 1 章で見出された、発がん物質特異的な細胞周期チェックポイント遺伝子の発現変動は、今回検討した発がん物質では確認できなかった。一方で、28 日目以降で全ての肝発がん物質で、第 1 章と同様に *Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 発現細胞数の増加が確認でき、発がん物質特異的な G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻の誘発が示唆された。さらに、MP, TAA ないし CRB によって 28 日目ないし 90 日目で、第 1 章の結果と同様に、M 期スピンドルチェックポイント機構からのすり抜けを示唆する結果が得られ、この反応は細胞増殖誘発性に関係なく生じたことから、M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻は発がん過程における増殖亢進に先立って生じることが推察された。しかし、LMG では同様の結果は得られず、この物質の発がん作用の乏しいことを反映した結果と判断された。

第 3 章では、肝発がん物質で見出された経時的な反応が腎発がん物質でも生じるか否かを検討する目的で、腎発がん物質 (nitrofurantoin [NFT] , 1-amino-2,4-dibromoantraquinone [ADAQ] , 1,2,3-trichloropropane [TCP]) ないし非発がん性腎毒性物質 (1-chloro-2-propanol, triamterene, carboxin [CBX]) をラットに 3, 7 ないし

28 日間反復投与した。投与終了後腎臓を採取し、免疫組織化学および real-time RT-PCR 法による解析を行った。その結果、腎発がん物質においても発がん物質特異的な反応は 28 日目で生じることが明らかとなった。28 日目で増殖活性を亢進した物質のうち、腎発がん物質の ADAQ および TCP のみで、肝発がん物質と同様に M 期スピンドルチェックポイント機構からのすり抜けを示唆する結果が得られた。しかし、腎腫瘍誘発性の弱い NFT では同様の結果は得られず、肝臓と同様に発がん強度に依存した反応であることが推察された。一方で、肝発がん物質で確認された、アポトーシス、p-MDM2 発現細胞数と、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現の発がん物質特異的な変動は生じなかった。

以上より、投与開始後 28 日目以降ないし 90 日目で、標的臓器を問わず、発がん物質特異的に M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が生じ、それが発がん早期過程に寄与していることが推察された。しかし、発がん作用が弱い物質はこの反応を誘発しなかったことから、発がん物質の発がん強度に依存して生じることが考えられた。また、*Mdm2* ないし p-MDM2 の発現上昇に起因する G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻は肝発がん物質特異的な反応であることが考えられた。

## Abstract

Carcinogenicity assays using rodent animals are versatile for evaluating the carcinogenic potential of test compounds. However, they have several disadvantages, such as long duration, high costs and use of a large number of animals. Therefore, the development of new and rapid means for evaluation or prediction of the carcinogenic potential of chemicals applicable for all carcinogenic targets is necessary for efficient detection of carcinogens. In the previous studies of our laboratory, carcinogens facilitating cell proliferation activity to carcinogenic target cells induced aberrant expression of ubiquitin D (UBD) , a M-phase progression-related molecule, from G<sub>2</sub> phase, suggestive of cell cycle aberration involving spindle checkpoint functions, indicating the early cellular events responsible for the carcinogenicity. The present study was performed to identify the cellular onset time point of carcinogen-specific facilitation of aberrant cell cycle during the early time course of repeated carcinogen administration. For this purpose, rats were repeatedly administered hepatocarcinogens or renal carcinogens and were subjected to analysis of the temporal changes in expression of cell cycle-related molecules by means of immunohistochemical and real-time RT-PCR analyses.

In chapter 1, I performed repeated administration of hepatocarcinogens for up to 28

days using rats and examined the temporal changes in cell proliferation activity, apoptosis and expression of cell cycle-related molecules to determine the time response of the liver cells to undergo carcinogen-specific facilitation of cell cycle aberration. Rats were divided into groups of untreated controls, hepatocarcinogen-treated animals (thioacetamide [TAA] and methyleugenol [MEG]) , non-carcinogenic hepatotoxicant-treated animals (acetaminophen [APAP] ,  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate and promethazine [PMZ]) , or partially hepatectomized animals, which induce regenerative liver cell proliferation. Distribution of cells immunoreactive for markers of cell proliferation, apoptosis and cell cycle-related molecules and mRNA expression of cell cycle-related genes were examined in liver tissues at days 3, 7 and 28 after the start of treatment. As a result, carcinogen-specific liver cellular responses appeared at day 28. Hepatocarcinogens among the chemicals which facilitate cell proliferation at day 28 specifically increased apoptotic cells and mRNA expression of cell cycle checkpoint-related genes, reflecting activation of cell cycle checkpoint function and subsequent apoptosis. On the other hand, carcinogens suppressed mRNA expression of tumor suppresser gene *Rbl2*, functioning at G<sub>1</sub>/S checkpoint, and increased mRNA expression of *Mdm2*, which facilitates degradation of G<sub>1</sub>/S checkpoint-related molecules via ubiquitination, and cells immunoreactive with MDM2 phosphorylated at Ser 166 (p-MDM2) , an activated isoform of MDM2, suggesting disruption of G<sub>1</sub>/S checkpoint function and subsequent facilitation of cell cycle progression from G<sub>1</sub> to S

phase. Moreover, hepatocarcinogens also specifically reduced the ratios of liver cells at M phase within the total number of UBD<sup>+</sup> cells or proliferating cells, suggestive of early withdrawal from M phase spindle checkpoint.

In chapter 2, I performed repeated administration of hepatocarcinogens or hepatocarcinogenic promoters that do or do not facilitate cell proliferation after 28 days using rats for 90 days to clarify the possibility of the involvement of carcinogen-specific cellular responses found in chapter 1 after 90 days administration of hepatocarcinogens exerting marginal carcinogenic potential or hepatocarcinogenic promoters. For this purpose, rats were administered hepatocarcinogens (methapyrilene [MP] , carbadox [CRB]) , hepatocarcinogen exerting marginal carcinogenic potential which is expected to have weak ability to increase cell proliferation (leucomalachite green [LMG]) , hepatocarcinogenic promoters ( $\beta$ -naphthoflavone, oxfendazole), or non-carcinogenic hepatotoxicant (PMZ) for 7, 28 or 90 days. In the 90-day repeated administration study, TAA and APAP were also tested. After administration, distribution of cells immunoreactive for markers of cell proliferation, apoptosis and cell cycle-related molecules and mRNA expression of cell cycle-related genes were examined in liver tissues. As a result, carcinogen-specific responses were not observed at day 7. Hepatocarcinogens among the chemicals which facilitate cell proliferation at day 28 specifically increased proliferating cells, apoptotic cells and cells immunoreactive with cell cycle-related

molecules at day 90. On the other hand, hepatocarcinogen CRB and LMG did not induce these cellular responses even after 90 days of administration. These results suggest that some hepatocarcinogens may continuously increase cell proliferation activity from the early time point of administration that may lead to carcinogenesis. Carcinogen-specific mRNA expression changes of cell cycle checkpoint-related genes were not induced by carcinogens tested in the present study. On the other hand, all hepatocarcinogens increased mRNA expression of *Mdm2* gene and/or p-MDM2<sup>+</sup> cells from day 28 similarly to the results in chapter 1, reflecting carcinogen-specific disruption of G<sub>1</sub>/S checkpoint function. Moreover, MP, TAA and CRB induced carcinogen-specific cellular responses, suggestive of early withdrawal from M phase spindle checkpoint, at day 28 and/or day 90, irrespective of their potential to increase cell proliferation activity, similarly to the results in chapter 1. These results suggest that carcinogens may specifically induce disruption of spindle checkpoint function, which may be induced ahead of facilitation of cell proliferation activity. However, LMG did not induce these carcinogen-specific cellular responses, probably reflecting the marginal carcinogenic potential of this compound.

In chapter 3, I performed repeated administration of renal carcinogens for up to 28 days, aiming at clarifying the involvement of carcinogen-specific temporal cellular responses as observed with hepatocarcinogens in chapter 1 or 2. For this purpose, rats were repeatedly

administered renal carcinogens (nitrofurantoin [NFT] , 1-amino-2,4-dibromoantraquinone [ADAQ] , 1,2,3-trichloropropane [TCP]) or non-carcinogenic renal toxicants (1-chloro-2-propanol, triamterene, carboxin [CBX]) for 3, 7 or 28 days. After administration, distribution of cells immunoreactive for markers of cell proliferation, apoptosis and cell cycle related molecules and mRNA expression of cell cycle-related genes were examined in the renal tubules of the outer stripe of outer medulla. As a result, carcinogen-specific cellular responses by renal carcinogens appeared at day 28, similarly to hepatocarcinogens. Renal carcinogen ADAQ and TCP among the chemicals which facilitate cell proliferation activity at day 28 specifically induced cellular responses suggestive of early withdrawal from M phase spindle checkpoint similarly to hepatocarcinogens. However, renal carcinogen NFT did not induce these cellular responses, reflecting the marginal carcinogenic potential of NFT similarly to LMG as examined in the liver in chapter 2. On the other hand, carcinogen-specific increases of apoptosis, p-MDM2<sup>+</sup> cells and mRNA expression of cell cycle-related genes as observed with hepatocarcinogens were not induced by renal carcinogens.

Based on the series of results obtained in these studies, I could reveal that carcinogens specifically induce disruption of M phase spindle checkpoint function from day 28 or at day 90 after starting administration irrespective of target organs, which may contribute to the early stage of carcinogenesis. However, this kind of disruption may not be induced by carcinogens

exerting marginal carcinogenicity, suggestive of the cellular events depending on carcinogenic potential of carcinogens tested. On the other hand, disruption of G<sub>1</sub>/S checkpoint function evidenced by increase of mRNA expression of *Mdm2* or p-MDM2<sup>+</sup> cells may be a hepatocarcinogen-specific event at the early stage of carcinogenesis.

**Table 1-1. Antibodies used for immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clone name	Dilution	Antigen retrieval <sup>a</sup>	Manufacturer (City, State, Country)
Ki-67 antigen	Ki-67	Mouse	Monoclonal (MIB-5)	1:200	Autoclaving in citrate buffer	Dako (Glostrup, Denmark)
Cleaved caspase 3 (Asp175)	—	Rabbit	Polyclonal	1:500	Autoclaving in target retrieval solution	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
p21 <sup>Cip1</sup>	—	Mouse	Monoclonal (CP74)	1:1000	Microwaving in citrate buffer	Abcam (Cambridge, UK)
Ubiquitin D	UBD	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Proteintech Group, Inc. (Chicago, IL, USA)
Topoisomerase II alpha	TOP2A	Rabbit	Monoclonal (EP1102Y)	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Epitomics, Inc. (Burlingame, CA, USA)
Phosphorylated histone H3 (Ser10)	Phospho-Histone H3	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Histone H2AX (phospho Ser139)	γH2AX	Rabbit	Monoclonal (EP854(2)Y)	1:1000	Autoclaving in citrate buffer	Abcam
Mitotic arrest deficient-2	MAD2	Mouse	Monoclonal (48/MAD2)	1:400	Microwaving in citrate buffer	BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)
Phosphorylated Mdm2 (Ser166)	p-MDM2	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in target retrieval solution	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)

<sup>a</sup> Antigen retrieval was applied for immunohistochemistry. Retrieval conditions were either autoclaving at 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) or in target retrieval solution (3-in-1; pH 9, Dako), or microwaving at 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

**Table 1-2. Sequence of primers used for real-time RT-PCR**

Gene	Accession no.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
G <sub>1</sub> /S checkpoint-related genes			
<i>Cdkn1a</i>	NM_080782	ACCAGCCACA GGCACCAT	CGGCATACTT TGCTCCTGTG T
<i>Cdkn2a</i>	NM_031550	CAAACGCCCC GAACACTT	CACTTTGACG TTGCCCATCA
<i>Rb1</i>	NM_017045	CACCAGGCCT CCTACCTTGT C	AGGAATCCGC AAGGGTGAAC
<i>Rb12</i>	NM_031094	AAGTGAATCG CCTGCAAAAA G	CTCGGTCATT AGCTACATCT TGGA
<i>Mdm2</i>	NM_001108099	GAAGGAGGAC ACACAAGACA AAGA	ATGGCTCGAT GGC GTTCA
<i>Tp53</i>	NM_030989	CATGAGCGTT GCTCTGATGG T	GATTTCCTTC CACCCGGATA A
Spindle checkpoint and M phase-related genes			
<i>Aurka</i>	NM_153296	AAGAGAGTCA TCCACAGAGA CATCAA	CGATCTTCAA CTCCCCATTT G
<i>Aurkb</i>	NM_053749	CGGATGCATA ATGAGATGGT AGAT	TCCCCACCAT CAGTTCATAG C
<i>Bub1</i>	NM_001106507	CCCTAGCTCC CAGTCCTAAA AGT	TTGTGGAATG GTGTAGATGA AAGC
<i>Mad11l</i>	NM_001109387	TCCAGGAGTT CCGCAAGGT	GAGGCGGTAT TGGCTCTCAG T
<i>Mad21l</i>	NM_001106594	ACAGCCACTG TGACATTTCT ACCA	CCCGATTCTT CCCACTTTTC A
<i>Plk1</i>	NM_017100	TCCCACCAAG GTTTTCAATA GC	TGTGAGAGGC TTCCTGTTGC T
DNA damage-related genes			
<i>Atm</i>	NM_001106821	AGGCTGTCTGG CAGGTGTTT	TGGTGTACGG CGTATCTTTG C
<i>Brca1</i>	AF036760	TGATGTGGGA CTGGGTGTTG	CTGTACCAGG TAGGCATCCA GAT
<i>Brca2</i>	NM_031542	AGGCTTTCGG TTGGCAGAT	AGAGACCCAG ACGCTAGAAA TCA
<i>Brc3</i>	NM_001127300	CCACATCCAC TCGGTCATCA T	AAATCTCCAC GCGGTCCTT
<i>Chek1</i>	NM_080400	TGGCAGCTGG CAAAGGA	AATCCCAGTC TTCCACAAAA GG
<i>Chek2</i>	NM_053677	TTGCTTCGAT GGACCACTGT T	GATGCGAAAG TGCTTCTTGC T
<i>Esco1</i>	NM_001126299	CCAAATCCCA CTGCCGTTA	GCTGCCTCTT TTGCTCTTTC C
<i>Gadd45a</i>	NM_024127	CACCATAACT GTCGGCGTGT A	GGCACAGGAC CACGTTGTC
<i>Rad17</i>	NM_001024778	GACTGGGTAG ATCCGGCATT T	AAACGGTGAT GGTGGTGACA
<i>Rad50</i>	NM_022246	TGGCCCCTGG CAGTGA	AACTTCGCAC GCCCAGAGT
Housekeeping gene			
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC

Abbreviations: *Atm*, ATM serine/threonine kinase; *Aurka*, aurora kinase A; *Aurkb*, aurora kinase B; *Brca1*, breast cancer 1, early onset; *Brca2*, breast cancer 2, early onset; *Brc3*, BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3; *Bub1*, BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Cdkn2a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chek2*, checkpoint kinase 2; *Esco1*, establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1; *Gadd45a*, growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mad11l*, MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mad21l*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; *Plk1*, polo-like kinase 1; *Rad17*, RAD17 homolog (S. pombe); *Rad50*, RAD50 homolog (S. cerevisiae); *Rb1*, retinoblastoma 1; *Rb12*, retinoblastoma-like 2; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; *Tp53*, tumor protein p53.

**Table 1-3. Initial and final body weights and liver weight of rats after partial hepatectomy, or after treatment with hepatocarcinogens or hepatotoxics**

Group	Number of animals	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Liver weight	
				Absolute (g)	Relative (g/100g BW)
Day 3 (Experiment 1)					
CONT	10	123.8±3.8 <sup>a</sup>	147.7±5.1	6.40±0.31	4.33±0.13
PH	11	121.3±4.4	124.5±4.9**	3.91±0.38**	3.14±0.22
MEG	11	121.8±4.7	129.0±5.4**	6.92±0.36*	5.37±0.24**
TAA	10	123.0±6.7	134.3±4.9**	6.39±0.36	4.76±0.18**
APAP	10	122.2±2.7	142.1±4.5	6.94±0.54*	4.88±0.25**
ANIT	10	122.4±3.0	125.8±4.0**	6.28±0.43	4.99±0.27**
PMZ	11	121.2±4.4	118.3±9.0**	6.03±0.44	5.11±0.38**
Day 7 (Experiment 1)					
CONT	10	124.2±9.9	167.4±13.9	6.95±0.71	4.15±0.14
PH	10	121.1±10.4	141.8±9.0**	5.19±0.65**	3.66±0.34
MEG	11	122.7±10.0	139.4±5.8**	7.21±0.42	5.17±0.30**
TAA	10	122.7±7.4	141.5±8.0**	7.21±0.38	5.10±0.19**
APAP	10	123.3±8.4	150.4±12.0**	6.82±0.88	4.52±0.29*
ANIT	10	123.1±8.2	121.7±5.4*	5.71±0.36**	4.70±0.23**
PMZ	11	121.0±9.4	136.2±7.1**	7.22±0.42	5.30±0.29**
Day 28 (Experiment 2)					
CONT	10	128.0±7.8	250.8±10.5	10.20±0.48	4.07±0.14
PH	12	128.1±5.3	240.5±10.2	9.40±0.52*	3.91±0.07
MEG	10	128.3±5.8	186.0±16.3**	10.54±1.20	5.65±0.22**
TAA	10	126.9±7.3	152.4±10.4**	7.71±0.79**	5.05±0.30**
APAP	10	127.4±5.9	218.6±8.6**	9.48±0.62	4.33±0.13**
ANIT	11	126.3±7.2	162.8±11.3**	8.79±0.64**	5.40±0.16**
PMZ	11	126.7±6.8	212.4±13.2**	11.39±0.90**	5.36±0.20**

Abbreviations: ANIT,  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate; APAP, acetaminophen; CONT, untreated control; MEG, methyleugenol; PH, partial hepatectomy; PMZ, promethazine; TAA, thioacetamide.

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

**Table 1-4. Relative transcript levels in the liver of rats treated with MEG, TAA or PMZ for up to 28 days**

Gene	Day 3			Day 7			Day 28		
	MEG <sup>a</sup>	TAA <sup>a</sup>	PMZ <sup>a</sup>	MEG <sup>a</sup>	TAA <sup>a</sup>	PMZ <sup>a</sup>	MEG <sup>a</sup>	TAA <sup>a</sup>	PMZ <sup>a</sup>
G <sub>1</sub> /S checkpoint-related genes									
<i>Cdkn1a</i>	2.13±0.59 <sup>b,**</sup>	2.61±0.38 <sup>**</sup>	0.41±0.13 <sup>**</sup>	2.14±0.43 <sup>**</sup>	2.21±0.26 <sup>**</sup>	0.30±0.07 <sup>**</sup>	2.67±0.40 <sup>**</sup>	2.99±0.62 <sup>**</sup>	0.28±0.08 <sup>**</sup>
<i>Cdkn2a</i>	0.32±0.18 <sup>*</sup>	0.47±0.31 <sup>*</sup>	0.43±0.29 <sup>*</sup>	0.57±0.46 <sup>*</sup>	0.70±0.28	0.47±0.37 <sup>*</sup>	1.58±0.49	2.52±0.19 <sup>**</sup>	0.73±0.15
<i>Rb1</i>	0.54±0.33 <sup>*</sup>	0.52±0.10 <sup>**</sup>	0.30±0.09 <sup>**</sup>	0.49±0.09 <sup>**</sup>	0.52±0.07 <sup>**</sup>	0.55±0.04 <sup>**</sup>	0.79±0.05	0.40±0.06 <sup>**</sup>	0.57±0.15 <sup>**</sup>
<i>Rbl2</i>	0.55±0.28 <sup>*</sup>	0.33±0.06 <sup>**</sup>	0.65±0.32	0.42±0.07 <sup>**</sup>	0.30±0.04 <sup>**</sup>	0.70±0.15 <sup>*</sup>	0.55±0.06 <sup>**</sup>	0.33±0.04 <sup>**</sup>	0.82±0.14
<i>Mdm2</i>	2.86±1.65	3.36±0.64 <sup>**</sup>	0.86±0.35	4.55±0.76 <sup>**</sup>	3.75±0.67 <sup>**</sup>	0.85±0.14	3.74±1.13 <sup>**</sup>	3.20±0.36 <sup>**</sup>	0.90±0.14
<i>Tp53</i>	0.73±0.34 <sup>*</sup>	1.51±0.19 <sup>**</sup>	0.49±0.10 <sup>**</sup>	0.64±0.11 <sup>**</sup>	1.41±0.18 <sup>**</sup>	0.67±0.12 <sup>**</sup>	0.96±0.08	1.63±0.27 <sup>**</sup>	0.99±0.11
Spindle checkpoint and M phase-related genes									
<i>Aurka</i>	0.22±0.12 <sup>**</sup>	1.27±0.38	0.13±0.04 <sup>**</sup>	0.36±0.07 <sup>**</sup>	0.87±0.18	0.80±0.36	1.34±0.32	1.96±0.26 <sup>**</sup>	1.03±0.31
<i>Aurkb</i>	0.34±0.31 <sup>*</sup>	0.42±0.34 <sup>*</sup>	0.02±0.01 <sup>**</sup>	0.21±0.07 <sup>**</sup>	0.30±0.07 <sup>**</sup>	0.58±0.45	2.61±0.82 <sup>**</sup>	1.87±0.36 <sup>*</sup>	1.12±0.36
<i>Bub1</i>	0.17±0.10 <sup>**</sup>	0.79±0.31	0.08±0.02 <sup>**</sup>	0.23±0.08 <sup>**</sup>	0.38±0.09 <sup>**</sup>	0.75±0.42	2.16±0.52 <sup>**</sup>	1.50±0.15	1.22±0.36
<i>Mad1l1</i>	0.73±0.32	0.56±0.10 <sup>**</sup>	0.72±0.27	0.60±0.06 <sup>**</sup>	0.49±0.07 <sup>**</sup>	0.80±0.14 <sup>**</sup>	0.93±0.29	0.52±0.07 <sup>**</sup>	0.87±0.11
<i>Mad2l1</i>	0.75±0.57	0.69±0.47	0.16±0.05 <sup>**</sup>	0.43±0.07 <sup>**</sup>	0.95±0.17	0.66±0.32	2.18±0.64 <sup>**</sup>	2.68±0.43 <sup>**</sup>	1.25±0.34
<i>Plkl</i>	0.13±0.09 <sup>**</sup>	0.94±0.34	0.02±0.01 <sup>**</sup>	0.21±0.09 <sup>**</sup>	0.36±0.11 <sup>**</sup>	0.85±0.56	2.24±0.83 <sup>**</sup>	1.92±0.37 <sup>**</sup>	1.21±0.35
DNA damage-related genes									
<i>Atm</i>	0.79±0.32	0.92±0.18	0.67±0.22 <sup>*</sup>	0.71±0.07	0.78±0.09	0.94±0.11	0.76±0.10 <sup>*</sup>	0.95±0.08	0.88±0.11
<i>Brca1</i>	0.27±0.15 <sup>**</sup>	0.76±0.25 <sup>*</sup>	0.25±0.12 <sup>**</sup>	0.24±0.03 <sup>**</sup>	0.47±0.08 <sup>**</sup>	0.68±0.26	1.18±0.31	0.97±0.07	0.87±0.14
<i>Brca2</i>	0.48±0.26 <sup>*</sup>	1.19±0.39	0.26±0.09 <sup>**</sup>	0.54±0.12 <sup>**</sup>	1.03±0.25	0.91±0.37	0.73±0.06	0.72±0.06	0.86±0.13
<i>Brcc3</i>	0.78±0.41	0.76±0.10 <sup>**</sup>	0.70±0.25 <sup>*</sup>	0.62±0.09 <sup>**</sup>	0.67±0.09 <sup>**</sup>	0.57±0.12 <sup>**</sup>	1.87±0.37 <sup>*</sup>	3.17±0.86 <sup>**</sup>	1.37±0.40
<i>Chek1</i>	0.73±0.42	0.81±0.41	0.30±0.11 <sup>**</sup>	0.61±0.08 <sup>**</sup>	1.06±0.22	0.93±0.15	1.98±0.48 <sup>**</sup>	1.94±0.27 <sup>**</sup>	1.24±0.28
<i>Chek2</i>	0.45±0.22 <sup>**</sup>	1.28±0.36	0.36±0.16 <sup>**</sup>	0.46±0.03 <sup>**</sup>	1.27±0.26	0.84±0.17	0.84±0.29	1.29±0.11	0.70±0.13
<i>Esco1</i>	0.70±0.35 <sup>*</sup>	1.53±0.25 <sup>**</sup>	0.57±0.15 <sup>**</sup>	0.51±0.05 <sup>**</sup>	1.74±0.21 <sup>**</sup>	0.72±0.18 <sup>**</sup>	0.61±0.12 <sup>**</sup>	1.51±0.15 <sup>**</sup>	0.59±0.09 <sup>**</sup>
<i>Gadd45a</i>	1.88±1.31	3.18±0.61 <sup>**</sup>	1.97±0.11 <sup>**</sup>	1.10±0.25	2.35±0.46 <sup>**</sup>	0.47±0.14 <sup>**</sup>	1.83±0.56	3.07±0.50 <sup>**</sup>	1.18±0.63
<i>Rad17</i>	0.89±0.45	1.94±0.29 <sup>**</sup>	0.79±0.17	0.69±0.12 <sup>**</sup>	2.20±0.23 <sup>**</sup>	0.65±0.17 <sup>**</sup>	0.88±0.07	2.15±0.17 <sup>**</sup>	0.74±0.09 <sup>**</sup>
<i>Rad50</i>	0.94±0.50	1.18±0.26	0.62±0.22	0.71±0.15 <sup>**</sup>	1.00±0.13	0.80±0.22	0.85±0.08	1.27±0.14 <sup>**</sup>	0.95±0.10

Abbreviations: *Atm*, ATM serine/threonine kinase; *Aurka*, aurora kinase A; *Aurkb*, aurora kinase B; *Brca1*, breast cancer 1, early onset; *Brca2*, breast cancer 2, early onset; *Brcc3*, BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3; *Bub1*, BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Cdkn2a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Chek2*, checkpoint kinase 2; *Esco1*, establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1; *Gadd45a*, growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mad1l1*, MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mad2l1*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; MEG, methyleugenol; *Plkl*, polo-like kinase 1; PMZ, promethazine; *Rad17*, RAD17 homolog (S. pombe); *Rad50*, RAD50 homolog (S. cerevisiae); *Rb1*, retinoblastoma 1; *Rbl2*, retinoblastoma-like 2; TAA, thioacetamide; *Tp53*, tumor protein p53.

<sup>a</sup> n = 6.

<sup>b</sup> Values represent relative expression levels expressed as mean ± SD.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

**Table 2-1. Antibodies used for immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Cleaved caspase 3 (Asp175)	—	Rabbit	Polyclonal	1:500	Autoclaving in target retrieval solution	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
Ki-67 antigen	Ki-67	Mouse	Monoclonal (MIB-5)	1:200	Autoclaving in citrate buffer	Dako (Glostrup, Denmark)
Phosphorylated histone H3 (Ser10)	Phospho-Histone H3	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Phosphorylated MDM2 (Ser166)	p-MDM2	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in target retrieval solution	Cell Signaling Technology, Inc.
p21 <sup>Cip1</sup>	—	Mouse	Monoclonal (CP74)	1:1000	Microwaving in citrate buffer	Abcam (Cambridge, UK)
Topoisomerase II alpha	TOP2A	Rabbit	Monoclonal (EP1102Y)	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Epitomics, Inc. (Burlingame, CA, USA)
Ubiquitin D	UBD	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Proteintech Group, Inc. (Chicago, IL, USA)

Antigen retrieval was applied for immunohistochemistry. Retrieval conditions were either autoclaving at 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) or in target retrieval solution (3-in-1; pH 9.0, Dako), or microwaving at 90°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0).

**Table 2-2. Sequence of primers used for real-time RT-PCR**

Gene	Accession no.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Cdkn1a</i>	NM_080782	ACCAGCCACA GGCACCAT	CGGCATACTT TGCTCCTGTG T
<i>Chek1</i>	NM_080400	TGGCAGCTGG CAAAGGA	AATCCCAGTC TTCCACAAAA GG
<i>Mad2l1</i>	NM_001106594	ACAGCCACTG TGACATTCTT ACCA	CCCGATTCTT CCCACTTTTC A
<i>Mdm2</i>	NM_001108099	GAAGGAGGAC ACACAAGACA AAGA	ATGGCTCGAT GGC GTTCA
<i>Rbl2</i>	NM_031094	AAGTGAATCG CCTGCAAAAA G	CTCGGTCATT AGCTACATCT TGGA
<i>Tp53</i>	NM_030989	CATGAGCGTT GCTCTGATGG T	GATTTCCTTC CACCCGGATA A
Housekeeping genes			
<i>Actb</i>	NM_031144	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	AGAGCCACCAATCCACACAGA
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC

Abbreviations: *Actb*, actin, beta; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mad2l1*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; *Rbl2*, retinoblastoma-like 2; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; *Tp53*, tumor protein p53.

**Table 2-3. Initial and final body weight and liver weight of rats after treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic promoters or non-carcinogenic hepatotoxics**

Group	Number of animals	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Liver weight	
				Absolute (g)	Relative (g/100g BW)
Day 7					
CONT	10	119.1±4.7	161.9±6.8	7.26±0.35	4.49±0.10
MP	10	118.9±4.1	150.4±5.0**	7.39±0.43	4.91±0.14**
CRB	10	118.9±4.5	152.1±4.9**	7.17±0.34	4.72±0.20*
LMG	10	119.0±4.7	149.7±3.7**	8.76±0.35**	5.85±0.22**
BNF	10	117.4±2.9	154.6±6.9**	8.05±0.41**	5.21±0.28**
OX	10	120.1±4.2	162.8±4.6	8.71±0.40**	5.35±0.23**
PMZ	11	117.1±3.0	134.3±5.2**	6.89±0.41	5.13±0.25**
Day 28					
CONT	10	119.9±9.4	252.6±13.2	10.47±0.82	4.15±0.26
MP	10	119.4±8.6	176.2±9.1**	7.54±0.49**	4.28±0.20
CRB	10	120.4±7.3	230.7±10.6**	10.07±0.63	4.36±0.14**
LMG	10	119.1±7.9	216.4±9.0**	12.00±0.66**	5.55±0.25**
BNF	10	117.4±8.2	230.3±10.0**	11.37±0.76**	4.94±0.19**
OX	10	118.7±6.9	238.8±8.0**	12.41±0.71**	5.20±0.17**
PMZ	11	117.4±6.6	192.5±8.8**	10.16±0.54	5.28±0.18**
Day 90					
CONT	10	134.5±8.5	351.8±30.6	11.04±1.37	3.13±0.13
MP	10	134.3±8.0	236.2±18.2**	7.95±0.85**	3.36±0.14*
TAA	10	133.5±7.5	223.9±8.8**	11.18±0.81	4.99±0.23**
CRB	10	131.7±6.4	302.1±13.7**	11.43±0.50	3.79±0.16**
LMG	10	132.2±6.3	293.1±12.0**	13.04±0.70**	4.45±0.19**
BNF	10	133.6±7.0	324.7±8.9*	13.08±0.72**	4.03±0.14**
OX	10	132.4±6.7	348.9±14.0	14.84±0.96**	4.26±0.26**
APAP	10	131.2±6.4	327.1±12.6*	12.01±0.76*	3.67±0.18**
PMZ	11	131.6±6.9	277.8±8.6**	13.75±0.53**	4.95±0.22**

Abbreviations: APAP, acetaminophen; BNF,  $\beta$ -naphthoflavone; CONT, untreated controls; CRB, carbadox; LMG, leucomalachite green; MP, methapyrilene; OX, oxfendazole; PMZ, promethazine; TAA, thioacetamide.

Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

**Table 2-4. Relative transcript levels in the liver of rats treated with MP, CRB, OX or PMZ at day 28 and day 90**

Gene	Relative transcript level normalized to <i>Hprt1</i>				Relative transcript level normalized to <i>Actb</i>			
	MP <sup>a</sup>	CRB <sup>a</sup>	OX <sup>a</sup>	PMZ <sup>a</sup>	MP <sup>a</sup>	CRB <sup>a</sup>	OX <sup>a</sup>	PMZ <sup>a</sup>
Day 28								
<i>Cdkn1a</i>	0.77±0.13	1.88±0.36**	1.02±0.23	0.25±0.09**	1.05±0.13	2.23±0.55**	1.36±0.42	0.29±0.04**
<i>Chek1</i>	1.57±0.36*	0.81±0.28	1.34±0.23	1.51±0.05*	2.17±0.51**	0.95±0.34	1.73±0.20**	2.11±0.38**
<i>Mad2l1</i>	1.93±0.49**	0.82±0.13	0.79±0.16*	1.18±0.11*	2.64±0.63**	0.95±0.10	1.03±0.19	1.70±0.38**
<i>Mdm2</i>	1.80±0.27**	1.89±0.31**	1.39±0.18**	1.03±0.10	2.49±0.36**	2.22±0.44**	1.82±0.33**	1.26±0.31
<i>Rbl2</i>	0.45±0.13**	1.06±0.18	0.97±0.17	0.88±0.32	0.62±0.20**	1.24±0.20*	1.27±0.28	1.01±0.14
<i>Tp53</i>	1.38±0.25*	1.04±0.16	1.17±0.20	1.21±0.27	1.89±0.24**	1.24±0.28	1.53±0.33**	1.52±0.71
Day 90								
<i>Cdkn1a</i>	0.93±0.21	2.58±0.85**	0.76±0.27	0.20±0.05**	1.00±0.43	2.60±1.03**	0.81±0.32	0.23±0.03**
<i>Chek1</i>	2.05±0.25**	0.94±0.24	0.71±0.09*	1.10±0.20	2.13±0.46*	0.94±0.28	0.74±0.08	1.25±0.22
<i>Mad2l1</i>	3.03±0.38**	0.99±0.14	1.03±0.22	0.96±0.26	3.20±0.87**	1.00±0.23	1.07±0.19	1.07±0.14
<i>Mdm2</i>	1.69±0.37**	1.99±0.76*	1.18±0.13	1.03±0.22	1.70±0.18**	2.07±1.00	1.23±0.21	1.19±0.34
<i>Rbl2</i>	0.70±0.16**	0.92±0.07	1.04±0.11	0.82±0.15*	0.71±0.13**	0.92±0.12	1.08±0.12	0.93±0.13
<i>Tp53</i>	1.49±0.23**	0.93±0.25	0.76±0.14*	1.03±0.13	1.55±0.42	0.91±0.12	0.79±0.11	1.19±0.30

Abbreviations: *Actb*, actin, beta; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; CRB, carbadox; *Hprt1*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *Mad2l1*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; MP, methapyrilene; OX, oxfendazole; PMZ, promethazine; *Rbl2*, retinoblastoma-like 2; *Tp53*, tumor protein p53.

<sup>a</sup> n = 6.

Values represent relative expression levels expressed as mean ± SD.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

**Table 3-1. Antibodies used for immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clone name	Dilution	Antigen retrieval <sup>a</sup>	Manufacturer (City, State, Country)
Ki-67 antigen	Ki-67	Mouse	Monoclonal (MIB-5)	1:200	Autoclaving in citrate buffer	Dako (Glostrup, Denmark)
Phosphorylated histone H3 (Ser10)	Phospho-Histone H3	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Phosphorylated MDM2 (Ser166)	p-MDM2	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in target retrieval solution	Cell Signaling Technology, Inc.
Topoisomerase II alpha	TOP2A	Rabbit	Monoclonal (EP1102Y)	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Epitomics, Inc. (Burlingame, CA, USA)
Ubiquitin D	UBD	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Proteintech Group, Inc. (Chicago, IL, USA)

<sup>a</sup> Antigen retrieval was applied for immunohistochemistry. Retrieval conditions were either autoclaving at 121 °C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) or in target retrieval solution (3-in-1; pH 9.0, Dako).

**Table 3-2. Sequence of primers used for real-time RT-PCR**

Gene	Accession no.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Cdkn1a</i>	NM_080782	ACCAGCCACA GGCACCAT	CGGCATACTT TGCTCCTGTG T
<i>Chek1</i>	NM_080400	TGGCAGCTGG CAAAGGA	AATCCCAGTC TTCCACAAAA GG
<i>Mad2l1</i>	NM_001106594	ACAGCCACTG TGACATTCTT ACCA	CCCGATTCTT CCCACTTTTC A
<i>Mdm2</i>	NM_001108099	GAAGGAGGAC ACACAAGACA AAGA	ATGGCTCGAT GGC GTTCA
<i>Rbl2</i>	NM_031094	AAGTGAATCG CCTGCAAAAA G	CTCGGTCATT AGCTACATCT TGGA
<i>Tp53</i>	NM_030989	CCCTTCACTG CCTTTTCTTA CCT	GCCAGGAACC AGTTTGCATA G
Housekeeping genes			
<i>Actb</i>	NM_031144	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	AGAGCCACCAATCCACACAGA
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT

Abbreviations: *Actb*, actin, beta; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Mad2l1*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; *Rbl2*, retinoblastoma-like 2; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; *Tp53*, tumor protein p53.

**Table 3-3. Initial and final body weights and kidney weight of rats after treatment with renal carcinogens, or non-carcinogenic renal toxicants**

Group	Number of animals	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Kidney weight	Relative (g/100g BW)
				Absolute (g)	
Day 3					
CONT	10	131.7±8.7 <sup>a</sup>	150.6±10.1	1.22±0.09	0.81±0.03
NFT	11	131.1±9.9	122.8±11.7**	1.14±0.09	0.94±0.09**
ADAQ	11	130.2±9.8	143.9±9.2	1.25±0.07	0.87±0.04*
TCP	11	132.0±11.4	124.5±9.5**	1.19±0.10	0.96±0.04**
CP	10	131.9±7.0	124.8±7.9**	1.09±0.09**	0.87±0.05*
TAT	10	132.3±8.5	149.1±8.7	1.21±0.08	0.81±0.02
CBX	10	131.8±6.3	148.8±8.2	1.19±0.08	0.80±0.02
Day 7					
CONT	10	133.8±8.5	176.2±10.8	1.43±0.08	0.81±0.04
NFT	11	133.9±11.7	116.9±8.8**	1.12±0.10**	0.96±0.07**
ADAQ	11	133.3±9.6	168.8±11.6	1.40±0.14	0.83±0.03
TCP	11	134.7±8.2	133.9±10.7**	1.24±0.10**	0.93±0.03**
CP	10	135.6±8.2	130.4±7.0**	1.14±0.10**	0.87±0.04**
TAT	10	133.0±10.0	168.2±11.7	1.31±0.13*	0.78±0.03
CBX	10	132.6±7.8	171.2±11.3	1.35±0.07	0.79±0.03
Day 28					
CONT	10	118.6±6.8	240.9±5.7	1.66±0.08	0.69±0.03
NFT	11	119.5±6.2	131.0±9.7**	1.31±0.14**	1.00±0.10**
ADAQ	11	119.5±6.1	228.9±16.3	1.76±0.13	0.77±0.03**
TCP	11	121.0±6.6	173.4±6.4**	1.55±0.07	0.89±0.03**
CP	10	119.0±7.4	177.1±13.5**	1.54±0.09*	0.87±0.03**
TAT	10	119.5±6.4	234.8±10.8	1.61±0.12	0.68±0.03
CBX	10	118.9±8.8	230.1±13.3	1.71±0.13	0.74±0.02**

Abbreviations: ADAQ, 1-amino-2,4-dibromoantraquinone; CBX, carboxin; CONT, untreated controls; CP, 1-chloro-2-propanol; NFT, nitrofurantoin; TAT, triamterene; TCP, 1,2,3-trichloropropane.

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SD.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

**Table 3-4. Relative transcript levels in the OSOM of rats treated with NFT, ADAQ, TCP or CBX at day 3, day 7 and day 28**

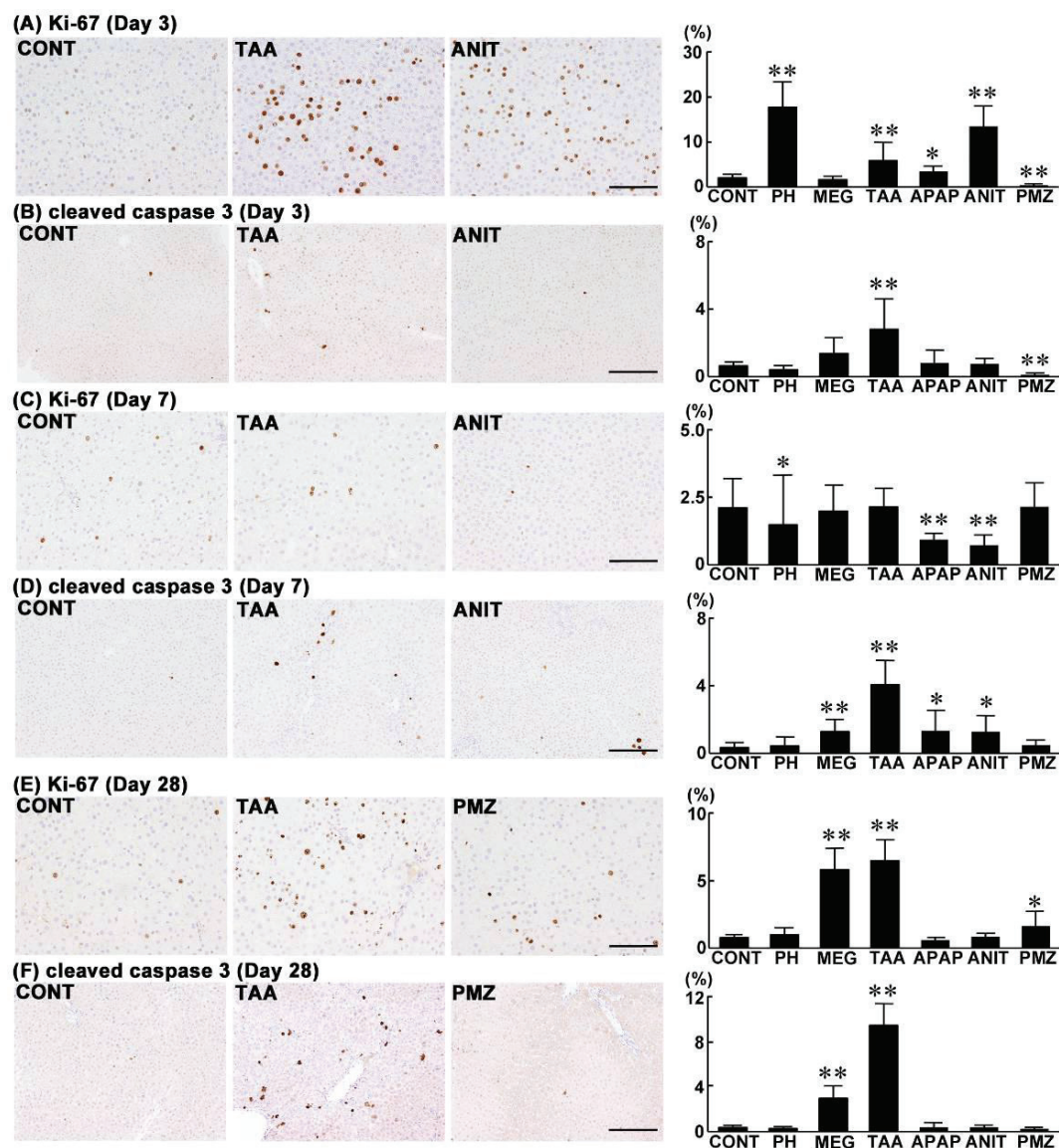
Gene	Relative transcript level normalized to <i>Actb</i>				Relative transcript level normalized to <i>Gapdh</i>			
	NFT <sup>a</sup>	ADAQ <sup>a</sup>	TCP <sup>a</sup>	CBX <sup>a</sup>	NFT <sup>a</sup>	ADAQ <sup>a</sup>	TCP <sup>a</sup>	CBX <sup>a</sup>
Day 3								
<i>Cdkn1a</i>	4.11±1.69*	1.35±0.35	4.79±0.69**	2.38±0.42*	2.60±0.95**	3.85±0.48**	4.25±0.54**	2.17±0.47**
<i>Chek1</i>	1.46±0.18**	0.71±0.12*	1.55±0.21**	1.42±0.19**	0.94±0.16	0.67±0.07**	1.25±0.19*	1.30±0.26*
<i>Mad2l1</i>	1.23±0.19*	0.77±0.17*	1.45±0.15**	1.27±0.11*	0.80±0.19	0.73±0.13	1.17±0.16	1.14±0.01
<i>Mdm2</i>	1.20±0.19	1.41±0.22**	2.13±0.21**	1.79±0.17**	0.78±0.18*	1.33±0.09*	1.71±0.12**	1.63±0.21**
<i>Rbl2</i>	1.27±0.21*	1.20±0.15	1.45±0.18**	1.20±0.07	0.85±0.31	1.13±0.03	1.17±0.14	1.09±0.13
<i>Tp53</i>	1.20±0.23	1.30±0.18	1.42±0.13*	1.79±0.35**	0.77±0.11*	1.24±0.20	1.15±0.16	1.64±0.43**
Day 7								
<i>Cdkn1a</i>	1.99±0.46*	0.45±0.16**	2.32±0.62*	0.89±0.10	1.49±0.34	0.38±0.13**	1.85±0.51*	0.83±0.12
<i>Chek1</i>	2.08±0.47**	0.89±0.13	2.22±0.28**	1.25±0.18	1.56±0.35**	0.76±0.13	1.78±0.30**	1.17±0.17
<i>Mad2l1</i>	1.37±0.18**	0.98±0.05	1.35±0.13**	1.13±0.14	1.03±0.14	0.83±0.05*	1.08±0.16	1.05±0.14
<i>Mdm2</i>	1.18±0.15	1.52±0.10**	1.98±0.23**	1.47±0.07**	0.89±0.10	1.29±0.11**	1.58±0.21**	1.37±0.11**
<i>Rbl2</i>	1.03±0.21	1.30±0.05**	1.45±0.10**	1.23±0.09*	0.77±0.12**	1.11±0.09	1.16±0.18	1.15±0.14
<i>Tp53</i>	1.50±0.26**	1.53±0.11**	1.68±0.18**	1.58±0.18**	1.13±0.21	1.30±0.08*	1.35±0.19**	1.47±0.18**
Day 28								
<i>Cdkn1a</i>	1.28±0.61	0.51±0.08**	4.30±1.16**	1.36±0.33	0.93±0.41	0.49±0.06**	4.27±1.31**	1.41±0.58
<i>Chek1</i>	1.44±0.48*	1.23±0.19	2.02±0.30**	1.84±0.25**	1.02±0.24	1.18±0.16	2.00±0.39**	1.89±0.57*
<i>Mad2l1</i>	1.17±0.32	1.25±0.11**	1.20±0.13*	1.38±0.09**	0.84±0.15	1.20±0.08	1.19±0.16	1.40±0.27**
<i>Mdm2</i>	0.96±0.16	1.40±0.11**	1.68±0.16**	1.38±0.09**	0.70±0.10*	1.36±0.14**	1.67±0.26**	1.40±0.27*
<i>Rbl2</i>	0.97±0.28	1.10±0.06	1.14±0.03*	0.99±0.12	0.70±0.17**	1.06±0.09	1.13±0.13	1.00±0.19
<i>Tp53</i>	1.10±0.13	1.24±0.12*	1.27±0.13**	1.50±0.09**	0.80±0.11	1.20±0.14	1.25±0.07*	1.52±0.27**

Abbreviations: *Actb*, actin beta; ADAQ, 1-amino-2,4-dibromoantraquinone; CBX, carboxin; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Mad2l1*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; NFT, nitrofurantoin; *Rbl2*, retinoblastoma-like 2; OSOM, outer stripe of the outer medulla; TCP, 1,2,3-trichloropropane; *Tp53*, tumor protein p53.

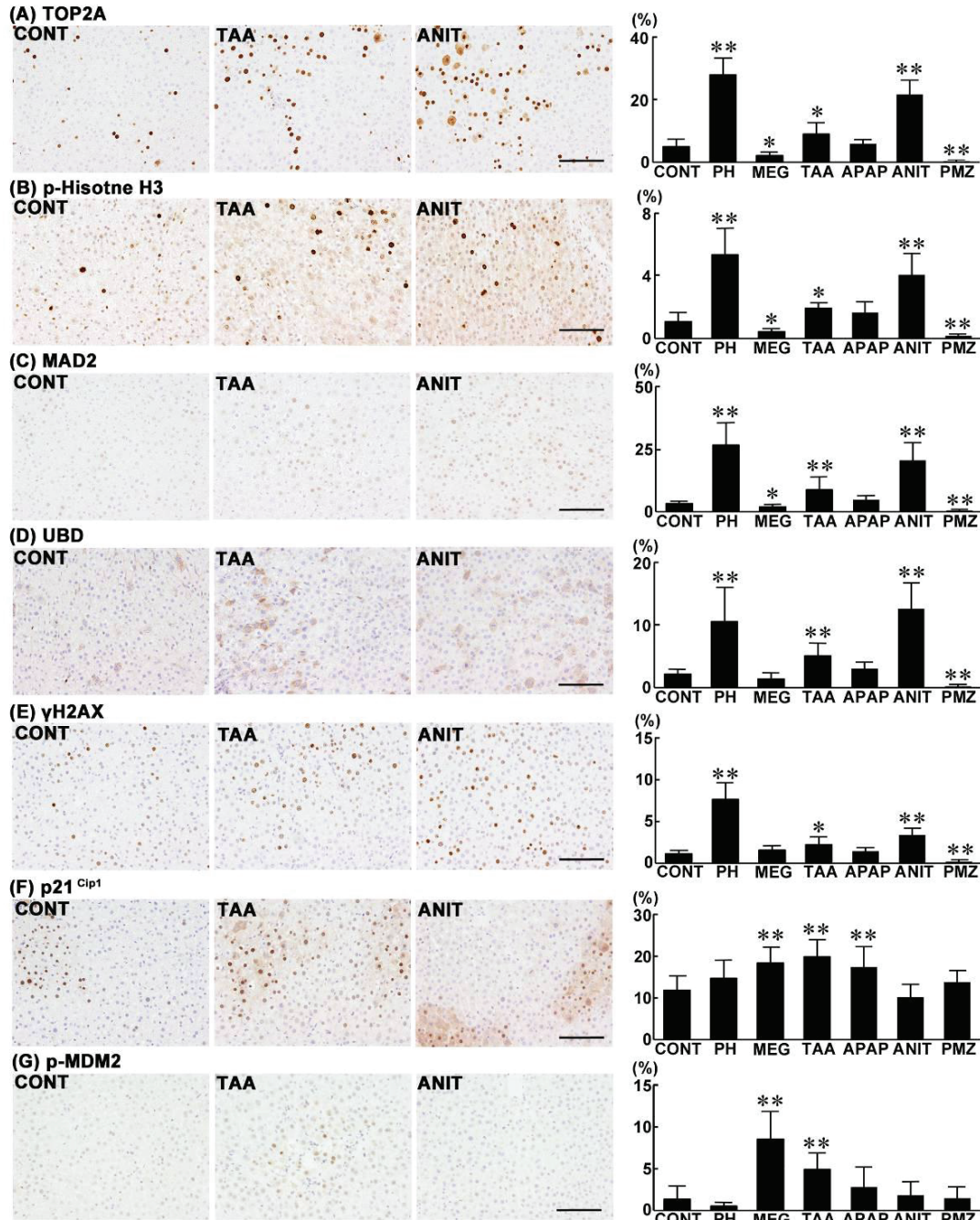
<sup>a</sup> n = 6.

<sup>b</sup> Values represent relative expression levels expressed as mean ± SD.

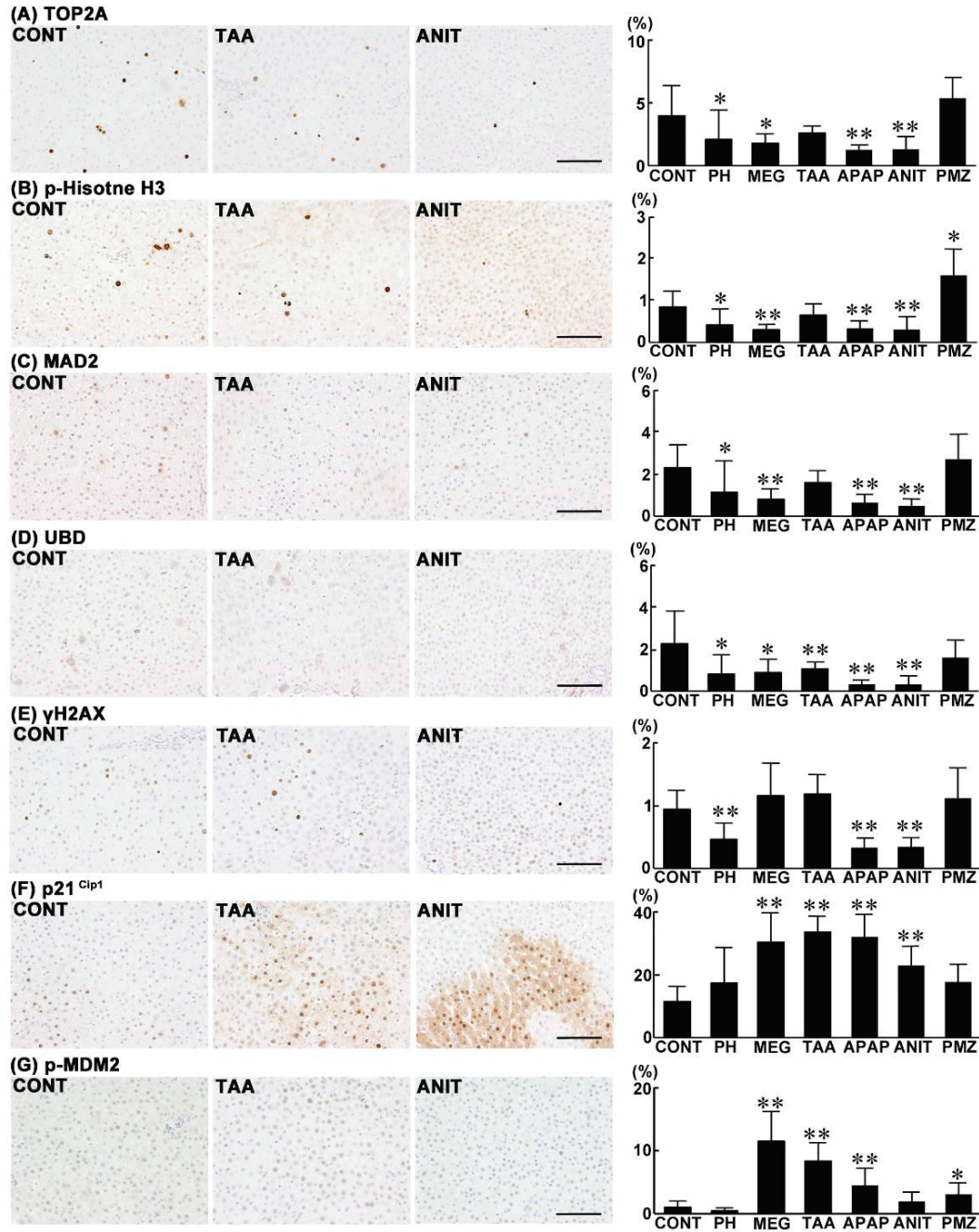
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



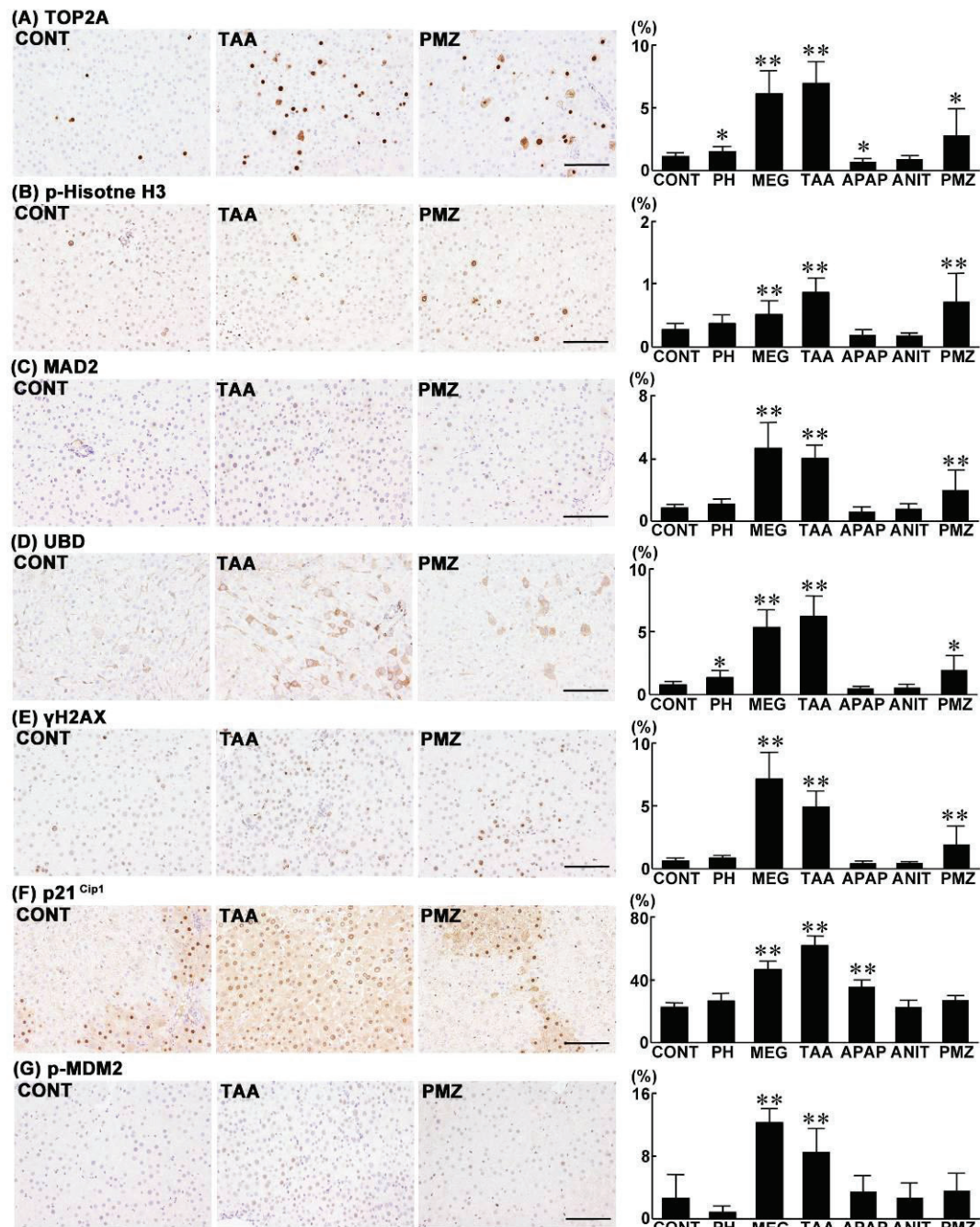
**Fig. 1-1.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of rats at day 3, 7 and 28 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxicants or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of Ki-67<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of representative cases from untreated controls (A–F), animals treated with TAA or ANIT (A, B, C, D), and animals treated with TAA or PMZ (E, F). The graphs show the positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67 (day 3), (B) cleaved caspase 3 (day 3), (C) Ki-67 (day 7), (D) cleaved caspase 3 (day 7), (E) Ki-67 (day 28), and (F) cleaved caspase 3 (day 28). Bar = 100  $\mu$ m (A, C and E) or 200  $\mu$ m (B, D and F). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



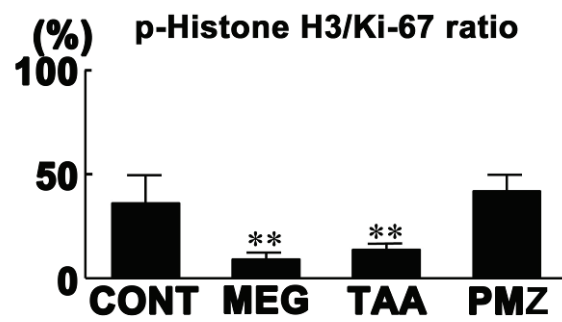
**Fig. 1-2.** Distribution of TOP2A<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, MAD2<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, γH2AX<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup> and p-MDM2<sup>+</sup> cells in the liver of rats at day 3 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxicants or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of TOP2A<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, MAD2<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, γH2AX<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup> and p-MDM2<sup>+</sup> cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) TOP2A, (B) p-Histone H3, (C) MAD2, (D) UBD, (E) γH2AX, (F) p21<sup>Cip1</sup>, and (G) p-MDM2. Bar = 100 μm. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



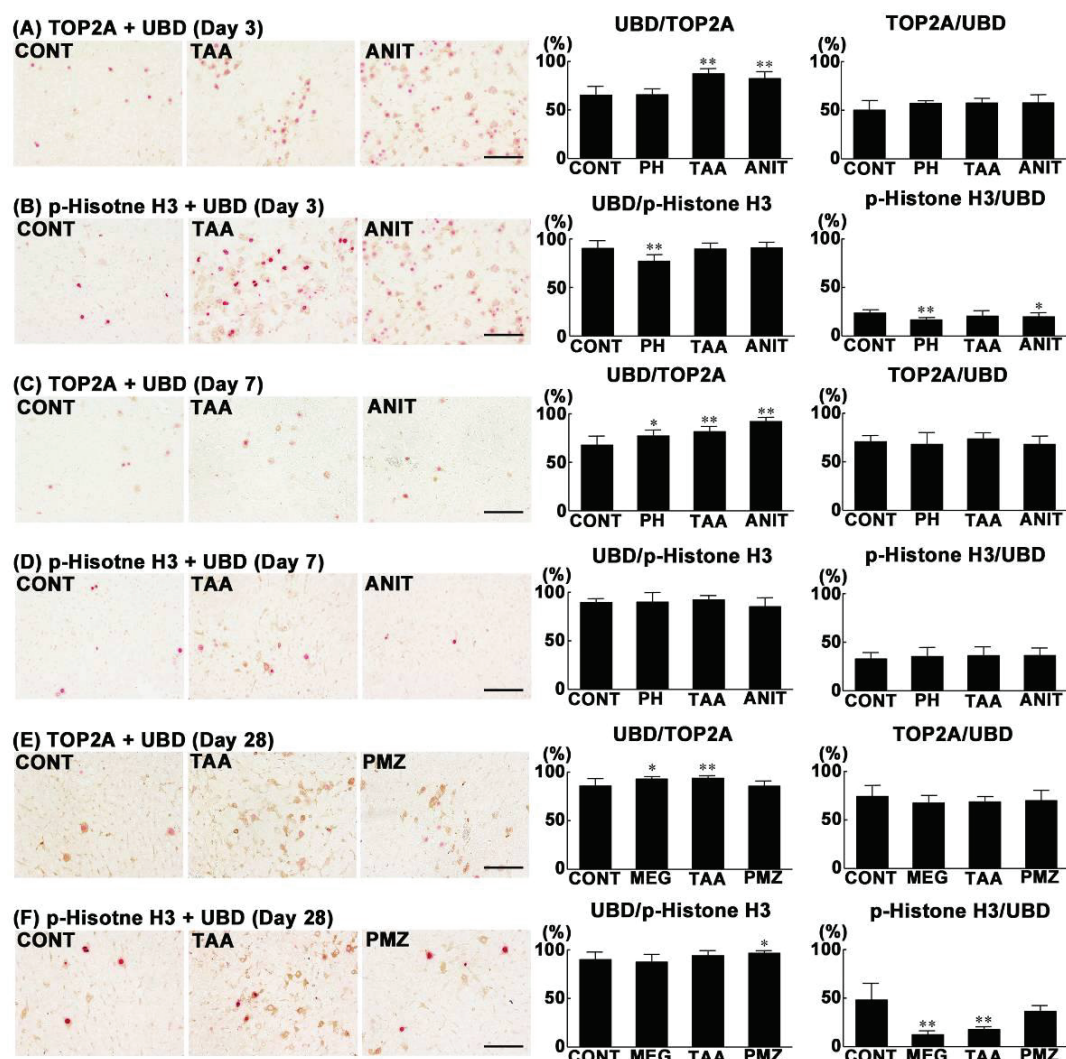
**Fig. 1-3.** Distribution of TOP2A<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, MAD2<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, γH2AX<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup> and p-MDM2<sup>+</sup> cells in the liver of rats at day 7 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxics or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of TOP2A<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, MAD2<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, γH2AX<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup> and p-MDM2<sup>+</sup> cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) TOP2A, (B) p-Histone H3, (C) MAD2, (D) UBD, (E) γH2AX, (F) p21<sup>Cip1</sup>, and (G) p-MDM2. Bar = 100 μm. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



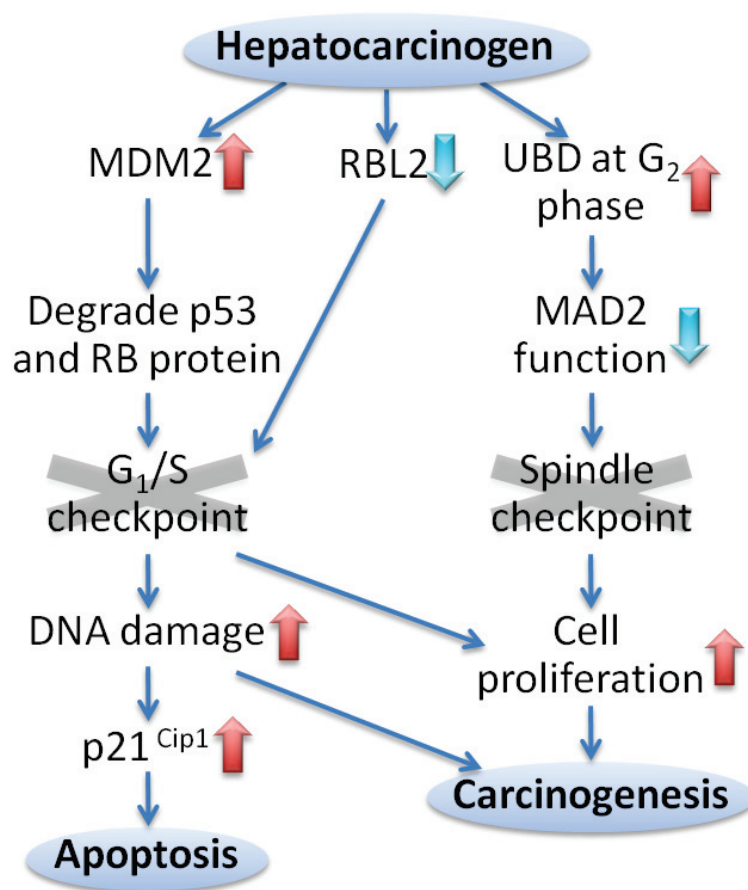
**Fig. 1-4.** Distribution of TOP2A<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, MAD2<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, γH2AX<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup> and p-MDM2<sup>+</sup> cells in the liver of rats at day 28 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxicants or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of TOP2A<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, MAD2<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, γH2AX<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup> and p-MDM2<sup>+</sup> cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or PMZ. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) TOP2A, (B) p-Histone H3, (C) MAD2, (D) UBD, (E) γH2AX, (F) p21<sup>Cip1</sup>, and (G) p-MDM2. Bar = 100 μm. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



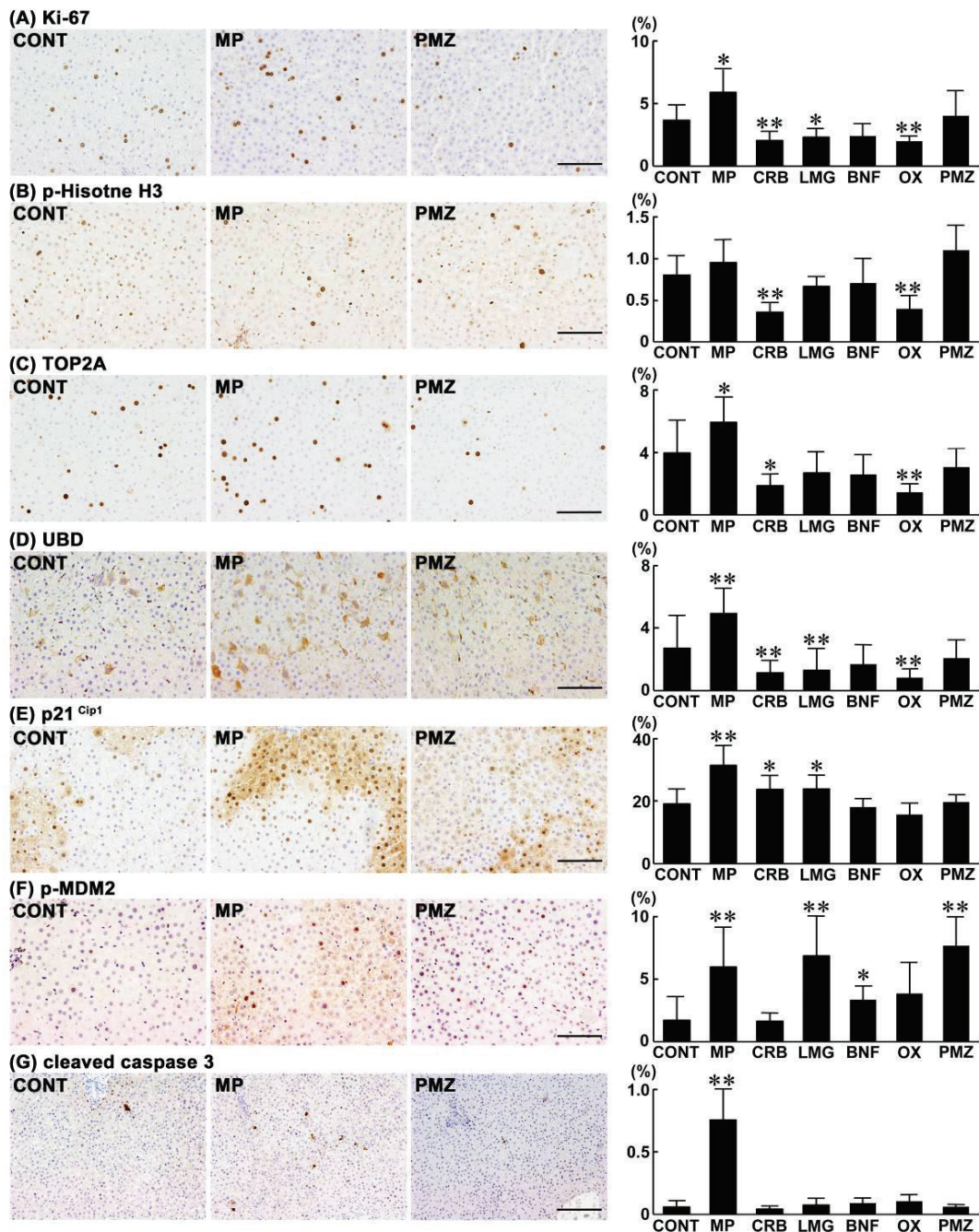
**Fig. 1-5.** p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio in the liver of rats at day 28 after treatment with MEG, TAA or PMZ. The graph shows p-Histone H3<sup>+</sup> cell ratio of hepatocytes per Ki-67<sup>+</sup> cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. \*\*  $P < 0.01$  vs. the untreated controls (Steel's test).



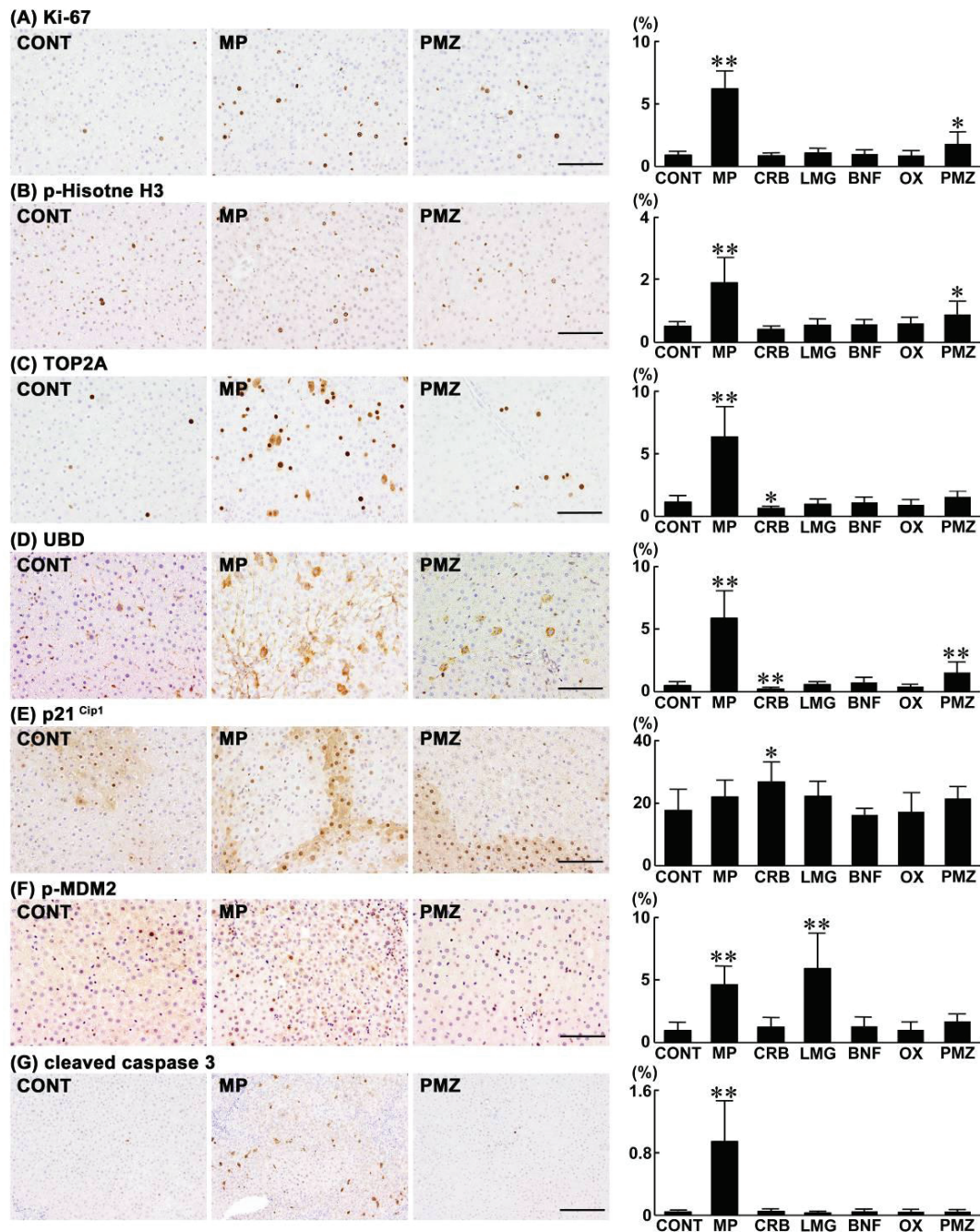
**Fig. 1-6.** Distribution of immunoreactive cell populations of TOP2A co-expressing UBD (UBD/TOP2A), UBD co-expressing TOP2A (TOP2A/UBD), p-Histone H3 co-expressing UBD (UBD/p-Histone H3) or UBD co-expressing p-Histone H3 (p-Histone H3/UBD) in the liver of rats at days 3, 7 and 28. Photomicrographs show the distribution of UBD/TOP2A, TOP2A/UBD, UBD/p-Histone H3, and p-Histone H3/UBD in the liver of untreated controls (A–F), animals treated with TAA or ANIT (A, B, C, D), and animals treated with TAA or PMZ (E, F). The immunoreactivity of UBD (cytoplasm), and p-Histone H3 (nucleus) or TOP2A (nucleus) is visualized as brown and red, respectively. The graphs show the UBD-positive cell ratio (%) per total liver cells immunoreactive with TOP2A or p-Histone H3, and the TOP2A or p-Histone H3-positive cell ratio (%) per total liver cells immunoreactive with UBD counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) UBD/TOP2A and TOP2A/UBD, (B) UBD/p-Histone H3 and p-Histone H3/UBD (day 3), (C) UBD/TOP2A and TOP2A/UBD (day 7), (D) UBD/p-Histone H3 and p-Histone H3/UBD (day 7), (E) UBD/ TOP2A and TOP2A/UBD (day 28), (F) UBD/p-Histone H3 and p-Histone H3/UBD (day 28). Bar = 100  $\mu$ m. \* \*\*  $P < 0.05, 0.01$ , respectively, vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



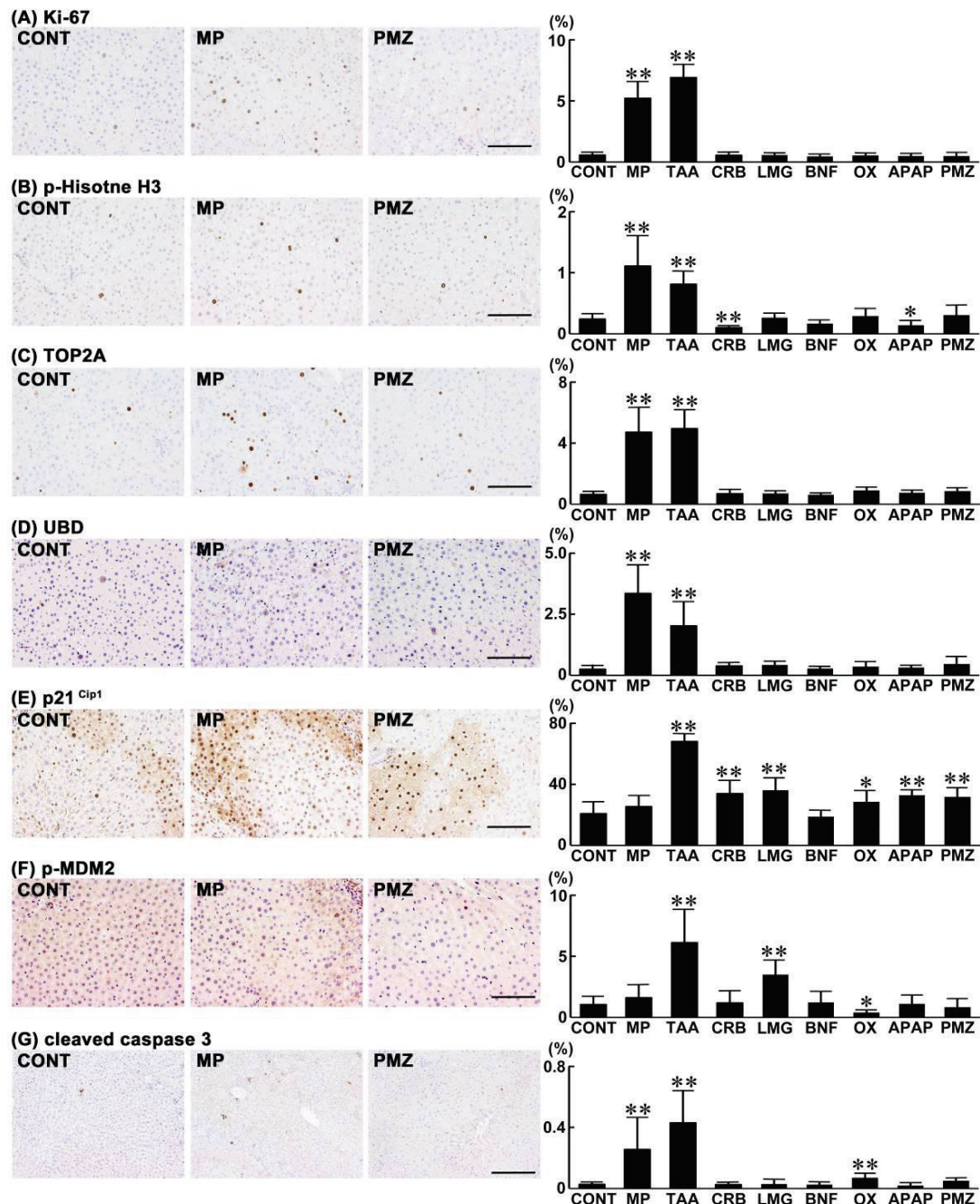
**Fig. 1-7.** Hypothetical model of aberrations in cell cycle regulation specific to hepatocarcinogens to facilitate cell proliferation at day 28 of repeated administration.



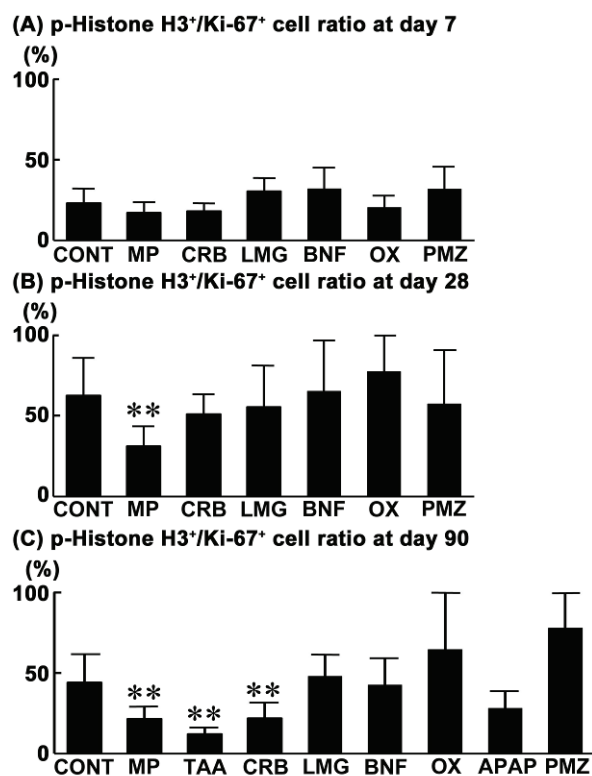
**Fig. 2-1.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of rats at day 7 after treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic promoters or non-carcinogenic hepatotoxics. Photomicrographs show the distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with MP or PMZ. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) p21<sup>Cip1</sup>, (F) p-MDM2, and (G) cleaved caspase 3. Bar = 100  $\mu$ m (A–F) or 200  $\mu$ m (G). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



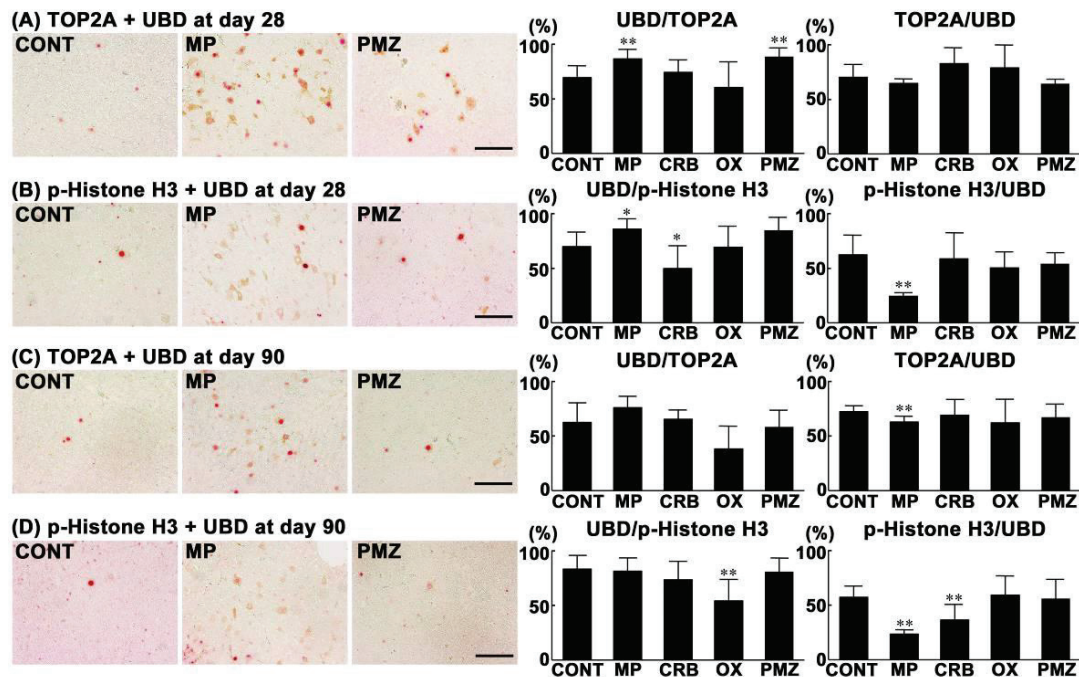
**Fig. 2-2.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of rats at day 28 after treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants. Photomicrographs show the distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with MP or PMZ. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) p21<sup>Cip1</sup>, (F) p-MDM2, and (G) cleaved caspase 3. Bar = 100  $\mu$ m (A–F) or 200  $\mu$ m (G). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



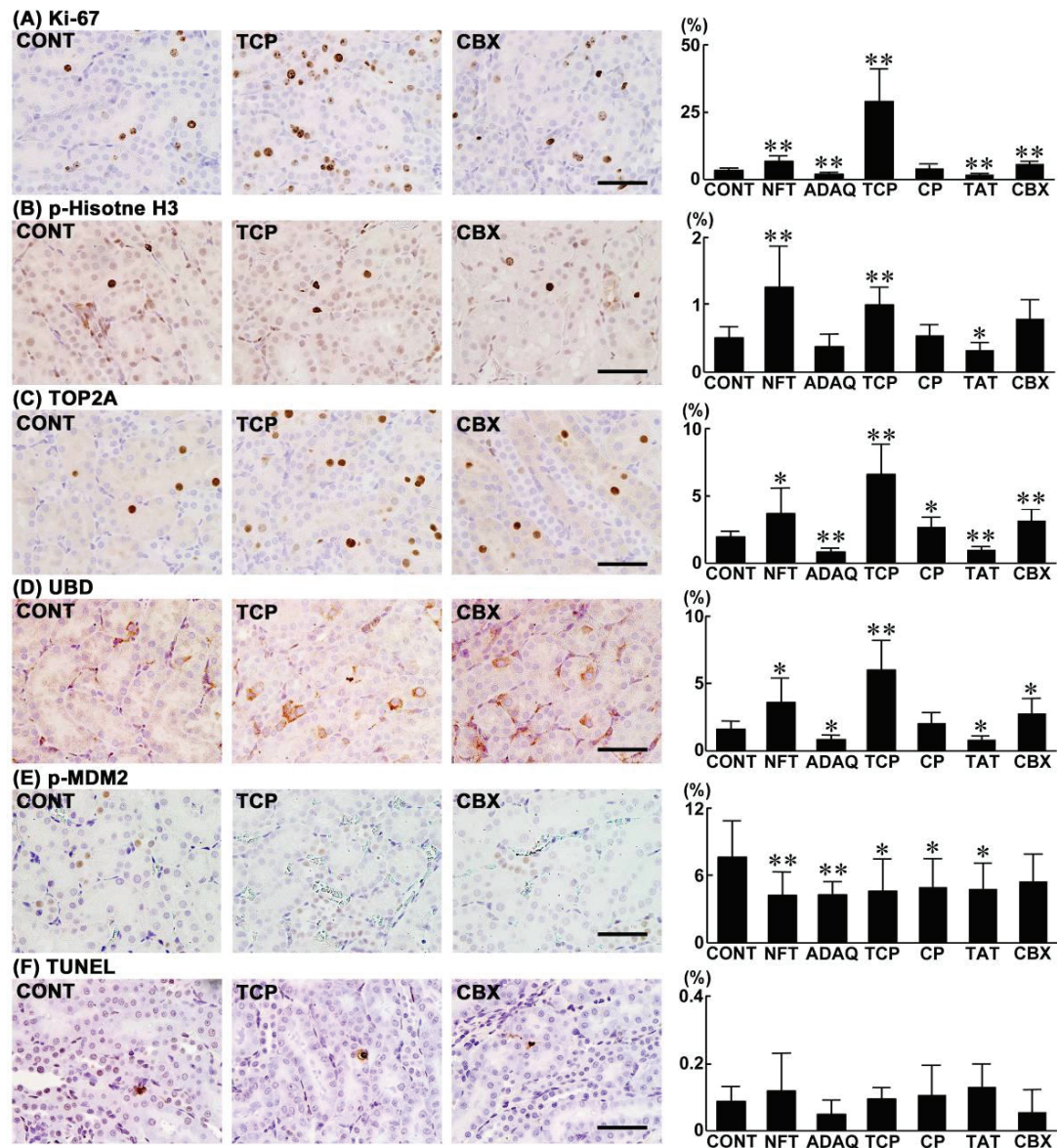
**Fig. 2-3.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of rats at day 90 after treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic promoters or non-carcinogenic hepatotoxics. Photomicrographs show the distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p21<sup>Cip1</sup><sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with MP or PMZ. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) p21<sup>Cip1</sup>, (F) p-MDM2, and (G) cleaved caspase 3. Bar = 100  $\mu$ m (A–F) or 200  $\mu$ m (G). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



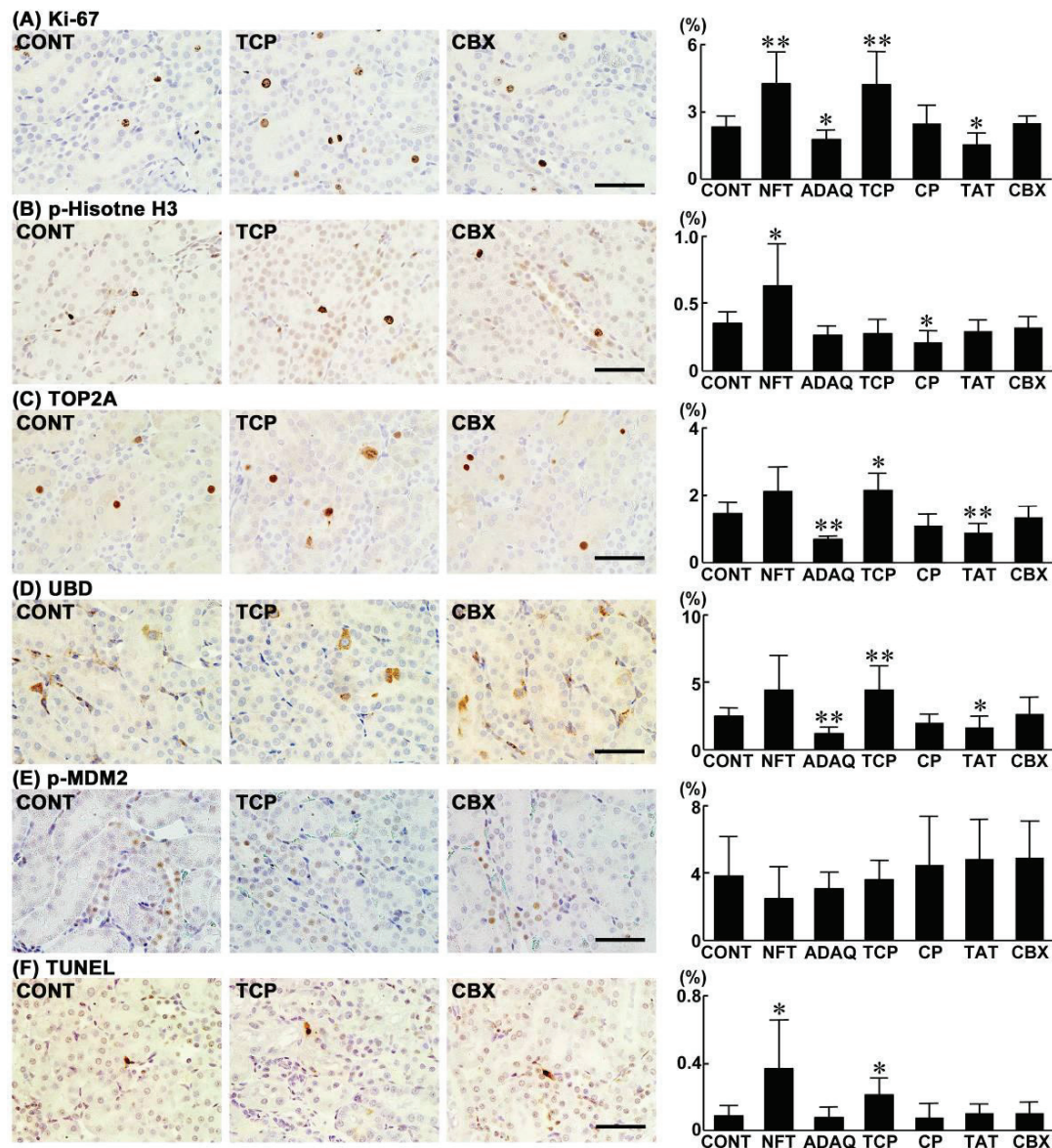
**Fig. 2-4.** p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio in the liver of rats at day 7, 28 and 90 after treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic promoters and non-carcinogenic hepatotoxins. The graphs show the p-Histone H3<sup>+</sup> cell ratio of hepatocytes per number of Ki-67<sup>+</sup> cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio at day 7, (B) p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio at day 28, and (C) p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio at day 90. \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Steel's test).



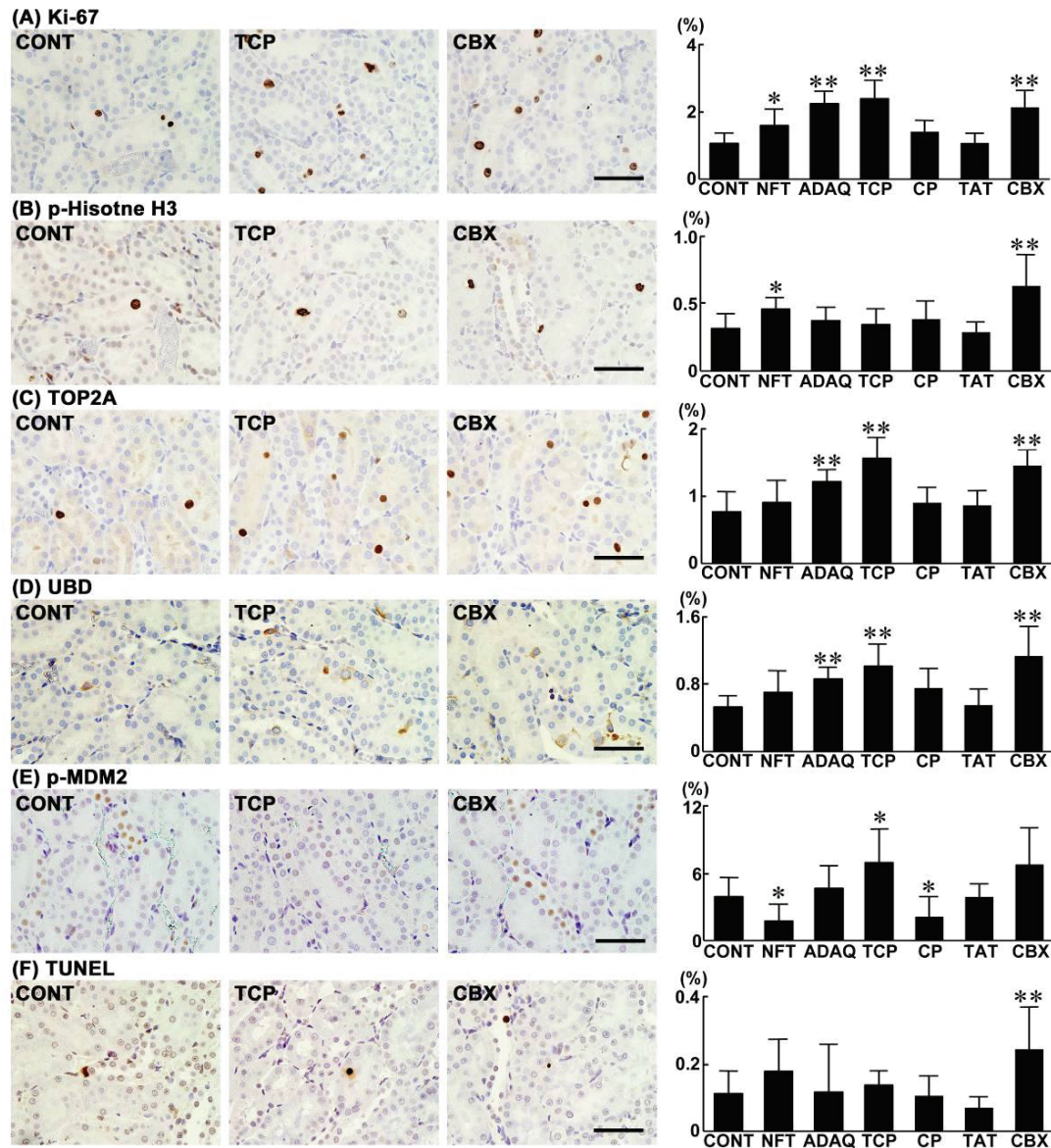
**Fig. 2-5.** Distribution of cell populations co-expressing TOP2A and UBD (UBD/TOP2A), UBD and TOP2A (TOP2A/UBD), p-Histone H3 and UBD (UBD/p-Histone H3), or UBD and p-Histone H3 (p-Histone H3/UBD) in the liver of rats at days 28 and 90. Photomicrographs show the distribution of UBD/TOP2A, TOP2A/UBD, UBD/p-Histone H3 and p-Histone H3/UBD in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with MP or PMZ. The immunoreactivity of UBD (cytoplasm), and p-Histone H3 (nucleus) or TOP2A (nucleus) is visualized as brown and red, respectively. The graphs show the UBD-positive cell ratio (%) per total liver cells immunoreactive to TOP2A or p-Histone H3, and the TOP2A or p-Histone H3-positive cell ratio (%) per total liver cells immunoreactive to UBD counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) UBD/TOP2A and TOP2A/UBD (day 28), (B) UBD/p-Histone H3 and p-Histone H3/UBD (day 28), (C) UBD/TOP2A and TOP2A/UBD (day 90), (D) UBD/p-Histone H3 and p-Histone H3/UBD (day 90). Bar = 100  $\mu$ m. \*, \*\*  $P < 0.05$ , 0.01, respectively, vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



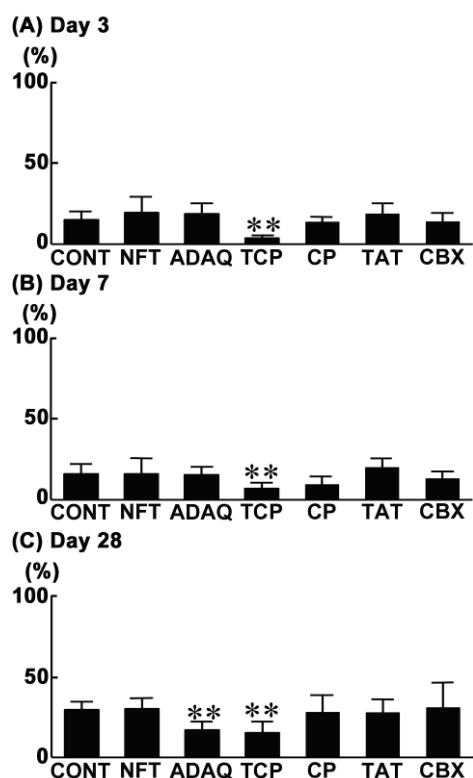
**Fig. 3-1.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup>, and TUNEL<sup>+</sup> cells in the OSOM of rats at day 3 after treatment with renal carcinogens or non-carcinogenic renal toxicants. Photomicrographs show the distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup>, and TUNEL<sup>+</sup> cells in the OSOM of representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The graphs show positive cell ratios of renal tubular epithelial cells per total cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) p-MDM2, and (F) TUNEL. Bar = 50  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



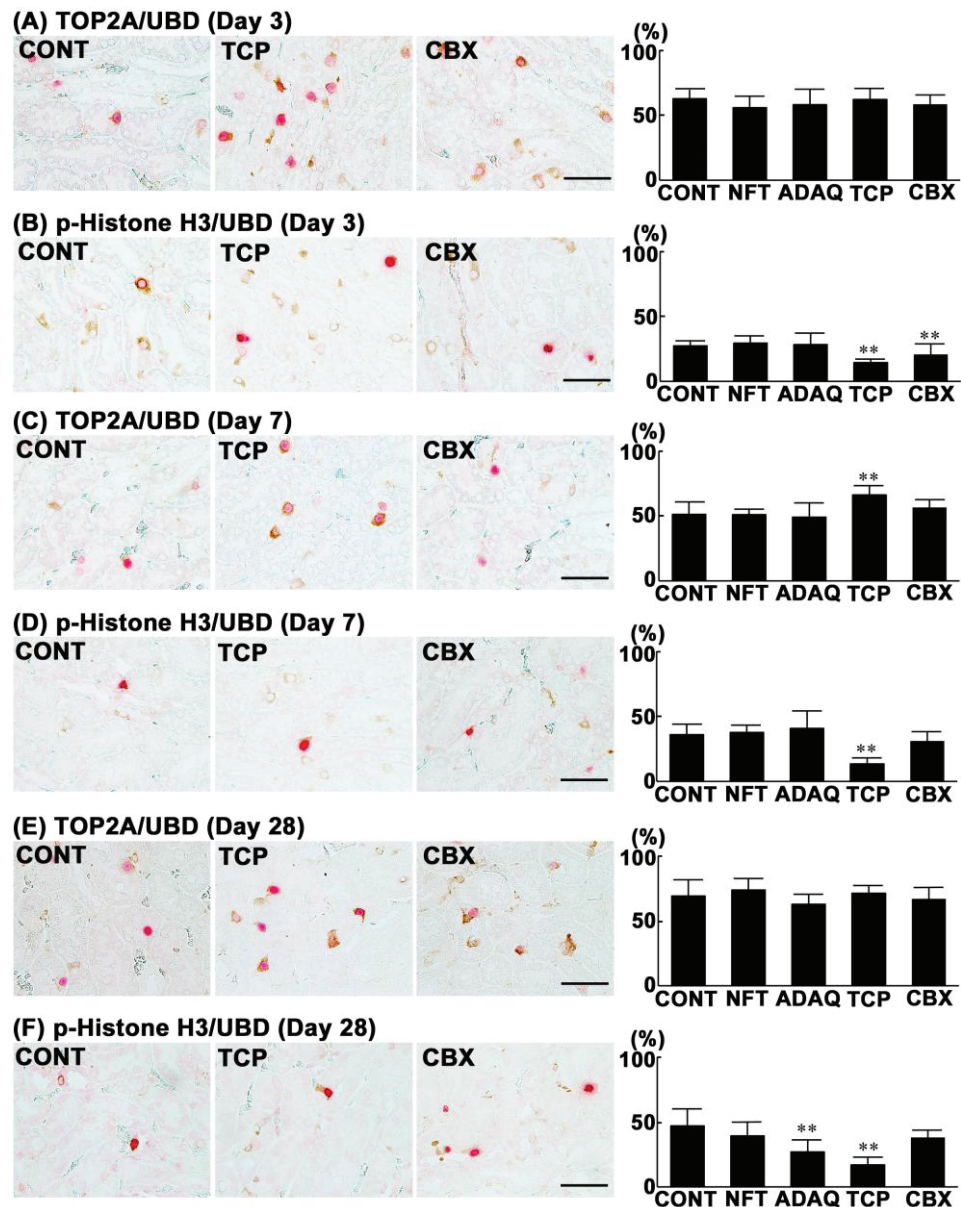
**Fig. 3-2.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup>, and TUNEL<sup>+</sup> cells in the OSOM of rats at day 7 after treatment with renal carcinogens or non-carcinogenic renal toxicants. Photomicrographs show the distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup>, and TUNEL<sup>+</sup> cells in the OSOM of representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The graphs show positive cell ratios of renal tubular epithelial cells per total cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) p-MDM2, and (F) TUNEL. Bar = 50  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Steel's test).



**Fig. 3-3.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup>, and TUNEL<sup>+</sup> cells in the OSOM of rats at day 28 after treatment with renal carcinogens or non-carcinogenic renal toxicants. Photomicrographs show the distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup>, p-MDM2<sup>+</sup>, and TUNEL<sup>+</sup> cells in the OSOM of representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The graphs show positive cell ratios of renal tubular epithelial cells per total cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) p-MDM2, and (F) TUNEL. Bar = 50  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).



**Fig. 3-4.** p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio in the OSOM of rats at day 3, 7, and 28 after treatment with renal carcinogens or non-carcinogenic renal toxicants. The graphs show the p-Histone H3<sup>+</sup> cell ratio of renal tubular epithelial cells per number of Ki-67<sup>+</sup> cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Day 3, (B) Day 7 and (C) Day 28. \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Steel's test).



**Fig. 3-5.** Distribution of cell populations co-expressing UBD and TOP2A (TOP2A/UBD) or UBD and p-Histone H3 (p-Histone H3/UBD) in the OSOM of rats at days 3, 7, and 28. Photomicrographs show the distribution of TOP2A/UBD and p-Histone H3/UBD in the OSOM of representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The immunoreactivity of UBD (cytoplasm), and TOP2A (nucleus) or p-Histone H3 (nucleus) is visualized as brown and red, respectively. The graphs show the TOP2A or p-Histone H3-positive cell ratio (%) per total renal tubular epithelial cells immunoreactive to UBD counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) TOP2A/UBD (day 3), (B) p-Histone H3/UBD (day 3), (C) TOP2A/UBD (day 7), (D) p-Histone H3/UBD (day 7), (E) TOP2A/UBD (day 28), and (F) p-Histone H3/UBD (day 28). Bar = 50  $\mu$ m. \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).