

氏名（本（国）籍）	木 村 真 之（東京都）
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 渋谷 淳
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第456号
学位授与年月日	平成28年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	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
審査委員	主査 東京農工大学 教授 下 田 実 副査 帯広畜産大学 教授 古 林 与志安 副査 岩 手 大 学 教授 御 領 政 信 副査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 岐 阜 大 学 教授 柳 井 徳 磨

学位論文の内容の要旨

化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いたがん原性試験は、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、短期発がん予測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G2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、肝臓ないし腎臓を標的とした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、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] , α -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。その結果、発がん物質特異的な反応は投与開始後28日目で生じた。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、G1/Sチェックポイントに関わるがん抑制遺伝子であるRb12のmRNAの発現減少およびG1/Sチェックポイント蛋白質の分解を促進するMdm2のmRNA発現上昇およびリン酸化MDM2 (p-MDM2) 発現細胞数の増加が生じ、発がん物質特異的に、G1/Sチェックポイント機構の破綻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、M期におけるUBD陽性細胞および増殖細胞の割合が減少し、M期スピンドル

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た。

第2章では、第1章で見出した反応が、細胞増殖誘発性に乏しい肝発がん物質・プロモーターによっても生じるか否かを検討した。すなわち、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（ β -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。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日目でも細胞増殖活性およびアポトーシスが亢進した。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では、反復投与早期から生じる持続的な増殖活性の亢進が発がんに関与していることが推察された。第1章で見出した細胞周期チェックポイント機構の活性化を反映する遺伝子発現の変動は、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 発現上昇ないし p-MDM2 発現細胞数の増加を検出し、発がん物質特異的な G1/S チェックポイント機構の破綻が誘発されたものと考えられた。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の破綻を示唆する結果が得られ、細胞増殖誘発性に関係なく生じたことから、増殖亢進に先立って生じる反応であ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、本物質の発がん作用が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した経時的な反応が、腎発がん物質でも生じるか否かを検討した。すなわち、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）をラットに3, 7ないし28日間反復投与した。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が28日目で生じた。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の破綻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、肝発がん物質とは対照的に、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推察された。また、G1/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推察された。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、M期スピンドルチェックポイント機構の制御破綻を基盤とした短期発がん予測指標候補分子群によって、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。

審 査 結 果 の 要 旨

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、ラットへの肝臓ないし腎臓を標的とした発がん物質投与時に生じる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、ラットに肝発がん物質ないし非発がん性肝毒性物質を最大28日間反復投与した。その結果、投与開始後28日目で増殖活性を亢進した物質のうち、発がん物質のみでG₁/Sチェックポイント遺伝子である*Rb12*のmRNAの発現減少とともにG₁/Sチェックポイント蛋白質の分解を促進する*Mdm2*のmRNA発現上昇及びリン酸化MDM2 (p-MDM2) 発現細胞の増加が生じ、G₁/Sチェックポイント機構の破綻を示唆する結果が得られた。さらに、肝発がん物質により、M期におけるubiquitin D陽性細胞および増殖細胞の割合が減少し、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た。

第2章では、細胞増殖誘発性に乏しい肝発がん物質・プロモーターをラットに最大90日間反復投与した。その結果、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発現上昇ないしp-MDM2発現細胞数が増加し、発がん物質特異的なG₁/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、肝発がん物質投与の28ないし90日目で、第1章と同様に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、増殖亢進に先立って生じる反応であると推察された。しかし、腫瘍誘発性の弱い肝発がん物質・プロモーターでは同様の結果は得られず、発がん強度に依存した反応であることが推察された。

第3章では、腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質をラットに最大28日間反復投与した。その結果、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の破綻の誘発が示唆された。しかし、腫瘍誘発性の弱い腎発がん物質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と推察された。一方で、肝発がん物質とは異なりG₁/Sチェックポイント機構の破綻は生じなかった。

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。一方で、G₁/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推察された。これらより、少なくとも90日間反復投与試験の枠組みにおいて、M期スピンドルチェックポイント機構の制御破綻を基盤とした短期発がん予測指標によって、2年間のがん原性試験で明らかな発がん性を示す発がん物質については、標的臓器および細胞増殖誘発性を問わず、発がん性を予測できる可能性が示された。

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

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Disruption of spindle checkpoint function ahead of facilitation of cell proliferation by repeated administration of hepatocarcinogens in rats

著 者 名 : Kimura, M., Mizukami, S., Watanabe, Y., Hasegawa-Baba, Y., Onda, N., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences

巻・号・頁・発行年 : 40 (6) : 855-871, 2015

- 2) 題 目 : Onset of hepatocarcinogen-specific cell proliferation and cell cycle aberration during the early stage of repeated hepatocarcinogen administration in rats

著 者 名 : Kimura, M., Abe, H., Mizukami, S., Tanaka, T., Itahashi, M., Onda,

N., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Journal of Applied Toxicology

巻・号・頁・発行年 : 36 (2) : 223-237, 2016

- 3) 題 目 : Disruption of spindle checkpoint function in rats following 28 days of repeated administration of renal carcinogens

著 者 名 : Kimura, M., Mizukami, S., Watanabe, Y., Hasegawa-Baba, Y., Onda, N., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences

巻・号・頁・発行年 : 41 (1) : 91-104, 2016

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Global DNA methylation screening of liver in piperonyl butoxide-treated mice in a two-stage hepatocarcinogenesis model

著 者 名 : Yafune, A., Kawai, M., Itahashi, M., Kimura, M., Nakane, F., Mitsumori, K. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology Letters

巻・号・頁・発行年 : 222 (3) : 295-302, 2013

- 2) 題 目 : Immunohistochemical cellular distribution of proteins related to M phase regulation in early proliferative lesions induced by tumor promotion in rat two-stage carcinogenesis models

著 者 名 : Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Akane, H., Kimura, M., Mitsumori, K. and Shibutani M.

学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 66 (1) : 1-11, 2014

- 3) 題 目 : A non-joint tissue biphasic synovial sarcoma in a dog

著 者 名 : Takimoto, N., Suzuki, K., Ogawa, T., Segawa, R., Hara, S., Itahashi, M., Kimura, M., Iwasaki, N., Nishifuji, K. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology

巻・号・頁・発行年 : 150 (2-3) : 204-207, 2014

- 4) 題 目 : Promoter-region hypermethylation and expression downregulation of Yy1 (Yin yang 1) in preneoplastic liver lesions in a thioacetamide rat hepatocarcinogenesis model

著 者 名 : Abe, H., Ogawa, T., Wang, L., Kimura, M., Tanaka, T., Morita, R., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology

巻・号・頁・発行年 : 280 (3) : 467-474, 2014

- 5) 題 目 : Maternal exposure to hexachlorophene targets intermediate-stage progenitor cells of the hippocampal neurogenesis in rat offspring via dysfunction of cholinergic inputs by myelin vacuolation

著 者 名 : Itahashi, M., Abe, H., Tanaka, T., Mizukami, S., Kimura, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名 : Toxicology

巻・号・頁・発行年 : 328 : 123-134, 2015

- 6) 題 目 : Developmental hypothyroidism abolishes bilateral differences in sonic hedgehog gene control in the rat hippocampal dentate gyrus

著 者 名: Tanaka, T., Wang, L., Kimura, M., Abe, H., Mizukami, S., Yoshida, T. and Shibutani M.

学術雑誌名: Toxicological Sciences

巻・号・頁・発行年: 144 (1) : 128-137, 2015

- 7) 題 目: Developmental exposure to cuprizone reduces intermediate-stage progenitor cells and cholinergic signals in the hippocampal neurogenesis in rat offspring

著 者 名: Abe, H., Tanaka, T., Kimura, M., Mizukami, S., Imatanaka, N., Akahori, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名: Toxicology Letters

巻・号・頁・発行年: 234 (3) : 180-193, 2015

- 8) 題 目: Induction of duodenal mucosal tumors of intestinal epithelial cell origin showing frequent nuclear β -catenin accumulation similar to the concurrently induced colorectal tumors in rats after treatment with azoxymethane

著 者 名: Kikuchihara, Y., Onda, N., Kimura, M., Kangawa, Y., Mizukami, S., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名: Experimental and Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年: 67 (5-6) : 349-353, 2015

- 9) 題 目: Cuprizone decreases intermediate and late-stage progenitor cells in hippocampal neurogenesis of rats in a framework of 28-day oral dose toxicity study

著 者 名: Abe, H., Tanaka, T., Kimura, M., Mizukami, S., Saito, F., Imatanaka, N., Akahori, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.

学術雑誌名: Toxicology and Applied Pharmacology

巻・号・頁・発行年: 287 (3) : 210-221, 2015