

氏名(本(国)籍)	伊藤優子(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)
学位記番号	獣医博甲第559号
学位授与年月日	令和2年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	発がん物質の遺伝毒性の有無に着目した <i>in vivo</i> 短期 発がん予測指標に関する研究
審査委員	主査 東京農工大学 准教授 佐々木 一 昭 副査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 岩手大学 教授 佐藤 洋 副査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 岐阜大学 准教授 酒井 洋 樹

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発がん性試験は、動物実験が長期に及ぶため、評価の効率性等の点で課題があり、より短期の検出系ないし予測系の確立が求められている。また、所属研究室の先行研究において、肝発がん物質をラットに28日間反復投与した際に、肝臓での発がん性に関連した細胞周期分子の反応性が発がん物質の遺伝毒性の有無により異なることを見出している。そこで、本研究では、肝臓を標的とする遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質を弁別可能な *in vivo* 短期予測指標の探索とその発現特性解明を目的として、エピゲノム発現制御機序の一つであるDNAのメチル化と、がん細胞における代謝リプログラミングの2つの側面から検討を行った。

第1章では、DNAのメチル化に着目して、遺伝毒性肝発がん物質の *N*-nitrosodiethylamine と非遺伝毒性肝発がん物質の carbon tetrachloride (CCl₄) の発がん用量をラットに28日ないし84日間反復経口投与した。28日間投与後に得られた肝臓を用いてメチル化次世代シーケンシングと発現マイクロアレイを組み合わせた解析を実施した結果、CCl₄ 特異的にプロモーター領域で過メチル化し、且つ mRNA 発現の下方制御を示した遺伝子として *Ldlrad4*, *Proc*, *Cdh17*, *Nfia* を選出した。さらに、これら4遺伝子の mRNA 発現は、ラットに他の非遺伝毒性肝発がん物質を発がん用量で最長90日間反復投与した後の肝臓においても減少していた。免疫組織化学的解析により、選出した4つの遺伝子の翻訳産物について、肝前がん病変である GST-P 陽性巣における発現分布解析を実施した結果、非遺伝毒性肝発がん物質では遺伝毒性肝発がん物質に比べて、LDLRAD4 ないし PROC 陰性巣数が増加することを見出した。一方、CDH17 及び NFIA の発現は、肝発がん物質の遺伝毒性の有無で差は認められなかった。加えて、ラットに腎発がん物質を発がん用量で28日間投与した腎臓の遺伝子発現解析では、非遺伝毒性腎発がん物質に特異的な反応性はみられなかった。以上より、本研究で選出した *Ldlrad4*, *Proc*, *Cdh17*, *Nfia* は、肝臓を標的とする非遺伝毒性

発がん物質のエピゲノム *in vivo* 短期予測指標となりうる可能性が見出され、さらに、LDLRAD4 及び PROC は非遺伝毒性肝発がん物質による発がん性に寄与する可能性を示した。エピゲノム発現制御機序の一つである DNA のメチル化に着目し、網羅的手法を利用して、非遺伝毒性発がん物質特異的なエピゲノム *in vivo* 短期予測指標を獲得した点は、特筆すべきである。

第2章では、第1章で得られた分子のうち、transforming growth factor (TGF) β シグナリングの負の制御因子である LDLRAD4 の肝発がん過程における機能を明らかにするため、非遺伝毒性肝発がん物質をラットに最長 90 日間反復投与した肝臓を用いて、TGF β シグナリングに関連した遺伝子発現を解析するとともに、GST-P 陽性巣における LDLRAD4 と TGF β シグナリングに関連した分子の発現分布解析を実施した。さらに、ラットの二段階肝発がんモデルを用い、非遺伝毒性肝発がん物質の発がんプロモーションにより誘発された肝増殖性病変における LDLRAD4 の発現分布を検討した。その結果、非遺伝毒性肝発がん物質を反復投与したラットの肝臓において、LDLRAD4 が発現減少した GST-P 陽性巣では、LDLRAD4 の発現増加を示す GST-P 陽性巣に比べて、TGF β 1, リン酸化 EGFR, リン酸化 AKT2 の陽性巣数、さらに PTEN 陰性巣数が増加することを見出した。また、LDLRAD4 が発現減少した GST-P 陽性巣では、caveolin-1 ないし TACE/ADAM17 の陽性巣数が増加したことから、非遺伝毒性肝発がん物質による発がん過程において、LDLRAD4 の消失による TGF β シグナリングの活性化が生じることによって、caveolin-1 依存性の TACE/ADAM17 の活性化を介した EGFR 及び PTEN/AKT 経路の亢進が誘発された可能性を見出した。さらに、LDLRAD4 の発現減少を示す GST-P 陽性巣では、細胞増殖活性の亢進とアポトーシスの減少が認められ、LDLRAD4 の発現減少によって前がん病変の細胞が増殖に向かった可能性を明らかにできた。長期間の非遺伝毒性肝発がん物質による発がん促進によって誘発された GST-P 陽性増殖性病変では、LDLRAD4 の発現減少が変異肝細胞巣に比べて肝細胞腺腫及び肝細胞腺癌で顕著に認められたことから、LDLRAD4 の発現減少は腫瘍化とその進展の過程にも関与している可能性が示唆された。以上より、GST-P 陽性巣を形成する前から LDLRAD4 の発現減少による TGF β シグナリングの活性化を生じることが細胞のがん化の引き金となり、前がん病変形成、更には腫瘍化へと導くことを示した。ラットへの投与 28 日目という早期から LDLRAD4 の発現減少と TGF β シグナリングの活性化の関連性を示し、LDLRAD4 が GST-P 陽性巣を形成する非遺伝毒性肝発がん物質の発がん性予測指標になり得る可能性を見出したことは、新たながん抑制遺伝子の可能性を開いた点で特筆すべき成果である。

第3章では、がん細胞における代謝リプログラミングに着目して、遺伝毒性ないし非遺伝毒性肝発がん物質をラットに反復投与した肝臓を用いて、細胞増殖に必要なエネルギー代謝として知られる酸化的リン酸化、解糖系及びグルタミン代謝に関連した分子の反応性を比較・検討した結果、非遺伝毒性肝発がん物質では、遺伝毒性肝発がん物質に比べて、ミトコンドリア ATP 合成酵素 (ATPB) 陰性巣数は増加しており、発がんの初期に酸化的リン酸化が抑制されていることを見出した。また、非遺伝毒性肝発がん物質では、代謝調節因子である c-MYC の発現増加と *Tp53* の発現減少により、発がんに向かう標的細胞のエネルギー代謝シフト及び細胞増殖活性の増加が生じた可能性を見出した。一方、糖輸送担体 (GLUT1) 及びグルタミン輸送担体 (SLC1A5) 陽性巣数は、遺伝毒性の有無に関わらず増加することを見出した。以上より、肝発がん物質の遺伝毒性の有無により、発がん物質投与の初期段階から発がんに向かう代謝リプログラミングのパターンが異なることを明らかにした。この結果は、遺伝毒性ないし非遺伝毒性肝発がん物質による発がんの特異的な代謝リプログラミングの機序解明の一助となると考えられる。

以上より、非遺伝毒性発がん物質特異的に過メチル化及び発現減少がみられた *Ldlrad4*, *Proc*, *Cdh17*, *Nfia* は、肝臓を標的とする非遺伝毒性発がん物質のエピゲノム *in vivo* 短

期予測指標となりうる可能性が見出され、さらに、LDLRAD4 及び PROC は非遺伝毒性肝発がん物質投与による発がん性に寄与し、それは遺伝毒性発がん反応と弁別可能であることを初めて示した。さらに、LDLRAD4 の発現特性解析により、GST-P 陽性巣を形成する前から LDLRAD4 が発現減少することで TGF β シグナリングの活性化を生じて細胞の発がん過程へのエントリーを促すことを明らかにした。また、肝発がん物質の遺伝毒性の有無により、発がんに向かう代謝リプログラミングのパターンが異なることを明らかにした。本研究成果は、ラットを用いた一般毒性試験の枠組みで遺伝毒性肝発がん物質と非遺伝毒性肝発がん物質の反応性を簡便に弁別できる、短期発がん予測系の今後の進展に寄与する新たな知見であり評価に値する。

審査結果の要旨

本研究では、肝臓を標的とする遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質を弁別可能な *in vivo* 短期予測指標の探索とその発現特性解明を目的として、エピゲノム発現制御機序の一つである DNA のメチル化と、がん細胞における代謝リプログラミングの2つの側面から検討を行った。

第1章では、DNA のメチル化に着目して、遺伝毒性ないし非遺伝毒性肝発がん物質をラットに反復投与した肝臓についてメチル化次世代シーケンシングと発現マイクロアレイを組み合わせた解析を実施することで、肝臓を標的とする非遺伝毒性発がん物質特異的なエピゲノム *in vivo* 短期予測指標として、*Ldlrad4*, *Proc*, *Cdh17*, *Nfia* の4遺伝子を選出した。さらに、LDLRAD4 及び PROC は、非遺伝毒性肝発がん物質をラットに最長90日間投与することで形成された、肝前がん病変である GST-P 陽性巣に一致して発現減少したことから、これらの分子が非遺伝毒性肝発がん物質の発がん性に寄与する可能性を明らかにした。

第2章では、第1章で選出した、transforming growth factor (TGF) β シグナリングの負の制御因子である LDLRAD4 の発現減少と TGF β シグナリングとの関連性を検討し、非遺伝毒性肝発がん物質による肝発がん過程において、LDLRAD4 の消失による TGF β シグナリングの活性化が生じることによって、caveolin-1 依存性の TACE/ADAM17 の活性化を介した EGFR 及び PTEN/AKT2 経路の亢進が誘発される可能性を明らかにした。

第3章では、がん細胞における代謝リプログラミングに着目して、遺伝毒性ないし非遺伝毒性肝発がん物質をラットに反復投与した肝臓を用いて、細胞増殖に必要なエネルギー代謝として知られる酸化リン酸化、解糖系及びグルタミン代謝に関連した分子の反応性を比較・検討した結果、非遺伝毒性肝発がん物質では、遺伝毒性肝発がん物質に比べて、ミトコンドリア ATP 合成酵素 (ATPB) 陰性巣数が増加しており、非遺伝毒性機序に従う発がん初期過程で酸化リン酸化が抑制されることを見出した。また、非遺伝毒性肝発がん物質では、代謝調節因子である c-MYC の発現増加と *Tp53* の発現減少により、発がんに向かう標的細胞のエネルギー代謝シフト及び細胞増殖の促進が生じた可能性が示唆された。一方、糖輸送担体 (GLUT1) 及びグルタミン輸送担体 (SLC1A5) 陽性巣数は、遺伝毒性の有無に関わらず増加することを見出した。

以上の結果から、非遺伝毒性発がん物質特異的に過メチル化及び発現減少がみられた *Ldlrad4*, *Proc*, *Cdh17*, *Nfia* は、肝臓を標的とする非遺伝毒性発がん物質のエピゲノム *in vivo* 短期予測指標となりうる可能性が見出され、さらに、LDLRAD4 及び PROC は非遺伝毒性肝発がん物質投与による発がん性に寄与し、それは遺伝毒性発がん反応と弁別可能であることを初めて示した。さらに、LDLRAD4 はその発現減少によって TGF β シグナリングの活性化を生じて細胞の発がん過程へのエントリーを促すことを明らかにした。また、肝発がん物質の遺伝毒性の有無により、発がん物質投与の初期段階から発がんに向かう代謝リプ

プログラミングのパターンが異なることを明らかにした。

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

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Expression characteristics of genes hypermethylated and downregulated in rat liver specific to nongenotoxic hepatocarcinogens
著 者 名 : Ito, Y., Nakajima, K., Masubuchi, Y., Kikuchi, S., Saito, F., Akahori, Y., Jin, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 169 (1) : 122-136, 2019
- 2) 題 目 : Differential responses on energy metabolic pathway reprogramming between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in rat liver cells
著 者 名 : Ito, Y., Nakajima, K., Masubuchi, Y., Kikuchi, S., Saito, F., Akahori, Y., Jin, M., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 32 (4) : 261-274, 2019

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Downregulation of UBE2E2 in rat liver cells after hepatocarcinogen treatment facilitates cell proliferation and slowing down of DNA damage response in GST-P-expressing preneoplastic lesions
著 者 名 : Mizukami, S., Watanabe, Y., Saegusa, Y., Nakajima, K., Ito, Y., Masubuchi, Y., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology and Applied Pharmacology
巻・号・頁・発行年 : 334 : 207-216, 2017
- 2) 題 目 : Developmental exposure of citreoviridin transiently affects hippocampus neurogenesis targeting multiple regulatory functions in mice
著 者 名 : Nakajima, K., Masubuchi, Y., Ito, Y., Inohana, M., Takino, M., Saegusa, Y., Yoshida, T., Sugita-Konishi, Y. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 120 : 590-602, 2018
- 3) 題 目 : Developmental exposure of mice to T-2 toxin increases astrocytes and hippocampal neural stem cells expressing metallothionein
著 者 名 : Nakajima, K., Tanaka, T., Masubuchi, Y., Ito, Y., Kikuchi, S., Woo, G.H., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Neurotoxicity Research
巻・号・頁・発行年 : 35 (3) : 668-683, 2019

- 4) 題 目 : Aberrant epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis of mouse offspring following maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile
著 者 名 : Tanaka, T., Nakajima, K., Masubuchi, Y., Ito, Y., Kikuchi, S., Ideta-Ohtsuka, M., Woo, G.H., Yoshida, T., Igarashi, K. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
卷・号・頁・発行年 : 44 (2) : 93-105, 2019
- 5) 題 目 : Lack of preventive effect of maternal exposure to α -glycosyl isoquercitrin and α -lipoic acid on developmental hypothyroidism-induced aberrations of hippocampal neurogenesis in rat offspring
著 者 名 : Masubuchi, Y., Tanaka, T., Okada, R., Ito, Y., Nakahara, J., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Yoshida, T., Maronpot, R.R., Koyanagi, M., Hayashi, S. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 32 (3) : 165-180, 2019
- 6) 題 目 : Twenty-eight-day repeated oral doses of sodium valproic acid increases neural stem cells and suppresses differentiation of granule cell lineages in adult hippocampal neurogenesis of postpubertal rats
著 者 名 : Watanabe, Y., Nakajima, K., Ito, Y., Akahori, Y., Saito, F., Woo, G.H., Yoshida, T. and Shibutani, M.
学術雑誌名 : Toxicology Letters
卷・号・頁・発行年 : 312 : 195-203, 2019