

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09048

研究課題名(和文) デオキシコール酸を用いた胆道癌リスク評価法の確立と発癌メカニズムの検索

研究課題名(英文) Establishment of the biliary cancer risk assessment system using a deoxycholic acid-induced gallbladder carcinogenesis mouse model.

研究代表者

久野 壽也 (Kuno, Toshiya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：00345779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胆道発癌候補物質のリスク評価のため、胆嚢発癌マウスモデルの作成を行った。実験の結果、N-methyl-N-formylhydrazine(MFH)は雄性ICRマウス胆嚢・胆管上皮において増殖能とDNA損傷を誘導することが明らかになり、胆嚢発癌イニシエーション能力を有すると考えられた。ついでICRマウスにMFHを強制胃内投与した後、胆嚢発癌プロモーション作用を有するデオキシコール酸を飲水投与する2段階発癌実験を行ったが、病理組織学的に胆嚢・胆管に腫瘍の発生は見られなかった。以上より、ICRマウスを用いたMFH-デオキシコール酸の中期連続投与は胆嚢発癌効果を有しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to establish a gallbladder carcinogenesis mouse model for the risk assessment of the biliary tract carcinogen candidate. In short term experiment, N-methyl-N-formylhydrazine (MFH) increased proliferative activity and the DNA damage in male ICR mouse gallbladder/biliary tract epithelium. Then, two-step gallbladder carcinogenesis experiment using MFH and deoxycholic acid administration to male ICR mice were performed. At the termination, no tumor was observed in the gallbladder/biliary tract histopathologically. Thus, it was revealed that the meddle term MFH-deoxycholic acid exposure to ICR mouse did not have a gallbladder carcinogenic effect.

研究分野：実験病理学

キーワード：化学発癌 胆嚢 胆管

1. 研究開始当初の背景

日本国内における胆嚢・胆管癌の罹患者数は国立がん研究センターの報告によると2万2千人を超えており、死亡数は1万8千人に及ぶ(国立がん研究センターがん情報サービスホームページ“がん登録・統計”より)。近年になってやや減少傾向となつてはいるものの、早期発見が難しく治癒切除困難例が多い疾患であることから、発症制御に向けて発癌メカニズムの解明やリスク要因の同定は急務である。しかしながら、ヒト胆道癌を反映したモデル動物が確立されていないこともあり、印刷産業等における職業性暴露の危険性がある1,2-ジクロロプロパンやジクロロメタンにおいても十分なリスク評価ができていないのが現状である。これまで我々は数々の発癌促進物質、及び抑制物質の候補を検討してきたが、その中でも内因性発癌促進物質とされる2次胆汁酸に着目してきた。胆汁酸はステロイド誘導体で、脂肪吸収のために利用されており、主としてコール酸とケノデオキシコール酸からなる。これらは腸内細菌の作用により、それぞれ2次胆汁酸であるデオキシコール酸、リトコール酸に変換される。デオキシコール酸は化学発癌物質で誘発したげっ歯類の大腸腫瘍に対して促進的に働くことが知られているが、食餌性の肥満状態が腸内細菌叢を劇的に変化させ、新たに定着した細菌群が産生するデオキシコール酸により、肝臓発癌が促進されることも報告された(Yoshimoto S et al. Nature, 2013)。我々はこの2次胆汁酸に着目し、preliminaryな実験ではあるが20週間のデオキシコール酸の摂取がマウス胆嚢を腫大させ、胆嚢内に増殖性病変を形成することを見出した。その腫瘍発生メカニズムを理解し、動物モデルとして利用するためには、より感受性の高い動物種の選定、長期間暴露による病変の進行度や別の危険要因が付加された際に起こる分子病理学的変化をヒト病変と照らし合わせ

て最適モデルを開発していく必要がある。この研究を通して、胆嚢上皮に対してさらなるイニシエーション作用を有する物質を明らかにし、イニシエーションプロモーションによる胆嚢2段階発癌モデルを確立することを計画した。

2. 研究の目的

胆嚢・胆管上皮に対して発癌イニシエーション作用を有する候補物質の報告は多くない。また、実験動物に胆嚢癌を誘発する物質の報告は少なく、胆嚢発癌モデルの報告も極めて稀である。従って、ヒト胆道癌を反映したモデル動物は確立されておらず、職業暴露の可能性のある物質のリスク評価が困難であった。我々はこれまで環境中の化学物質と大腸癌の関係を動物モデルで明らかにしてきたが、2次胆汁酸であるデオキシコール酸をマウスに混餌投与すると、化学物質誘発大腸腫瘍の発生が促進され、従来腫瘍の発生がほとんど見られなかった近位部大腸にも腫瘍発生が見られることを明らかにした。この系において、胆嚢にも上皮性腫瘍が散発することから、胆嚢発癌モデルを確立できる可能性を見出した。デオキシコール酸単独では胆嚢癌までには至らないと考えられるため、本研究ではこれをサポートできるイニシエーション物質と感受性を考慮した適切な動物種の選定、および至適実験期間を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)2種類のマウス種におけるN-methyl-N-formylhydrazine (MFH)とN-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)の胆嚢発癌イニシエーション効果を検討した。6週齢の雄性C57BL/6JおよびICRマウスをそれぞれ2群に分け、一方には100mg/kg体重のMFHを経口投与し、もう一方には160mg/kg体重のBOPを皮下注射した。2日後に胆嚢を含めて各臓

器を摘出し、病理組織学的に評価した。

(2) ICR マウスと MFH 投与の組み合わせで中長期の実験が可能かを検討した。6 週齢の雄性 ICR マウスを 3 群に分け、1 群には 100mg/kg 体重の MFH を day 0 に 1 回、2 群には 50mg/kg 体重の MFH を day 0, 3 の 2 回強制胃内投与した。3 群は生理食塩水を胃内投与し、コントロール群とした。2 日後に 1, 3 群の一部を、7 日後に残るすべてのマウスを安楽死させ、胆嚢、肝臓を摘出し、病理組織学的に評価を行った。

(3) 短期実験での結果を踏まえ、6 週齢雄性 ICR マウスを 3 群に分け、1 群には day 0 に 100 mg/kg 体重の MFH を、2 群には 50mg/kg 体重の MFH を day 0, 3 の 2 回、3 群には生理食塩水を強制胃内投与した。Day 7 よりいずれの群にも 0.5% デオキシコール酸を飲水投与した。実験開始 25 週目に胆嚢および肝臓、膵臓、脾臓、肺、胃、小腸、大腸を摘出し、病理組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) C57BL マウスは BOP に対して忍容性が低く、ICR マウスも耐性があるものの、いずれのマウス種も肝臓に出血壊死を起こして全例死亡し、最終的に評価困難であった。MFH に対しては、いずれの種も耐性があり、評価可能であった。MFH の強制胃内投与により ICR マウスにおける胆嚢上皮細胞の Ki-67, H2AX 陽性細胞率は有意に増加したが、C57BL/6J マウスにおいて変化は明らかでなかった(図 1, 2)。

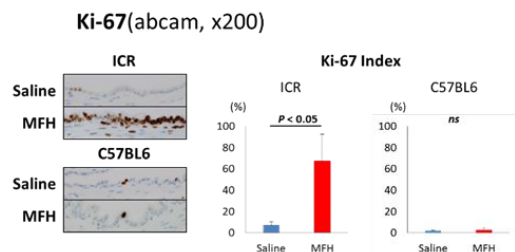


図 1 胆嚢上皮の増殖活性(Ki-67 免疫染色)。

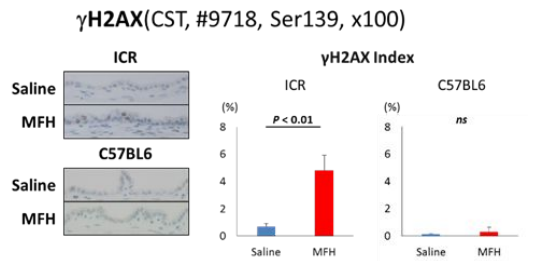


図 2 胆嚢上皮の DNA 障害(H2AX 免疫染色)。

(2) 実験終了時まで MFH による死亡例は見られなかった。100mg/kg 体重の MFH を投与したマウスの胆嚢上皮はコントロール群と比較して投与 2 日目で Ki-67, H2AX 陽性細胞率の有意な増加が観察されたが、7 日目にはいずれも非投与群レベルにまで回復していた。また、アポトーシス誘導の指標である TUNEL 陽性細胞率はコントロール群と比較して MFH 投与後 2, 7 日目のいずれにおいても有意な変化は見られなかった(図 3)。

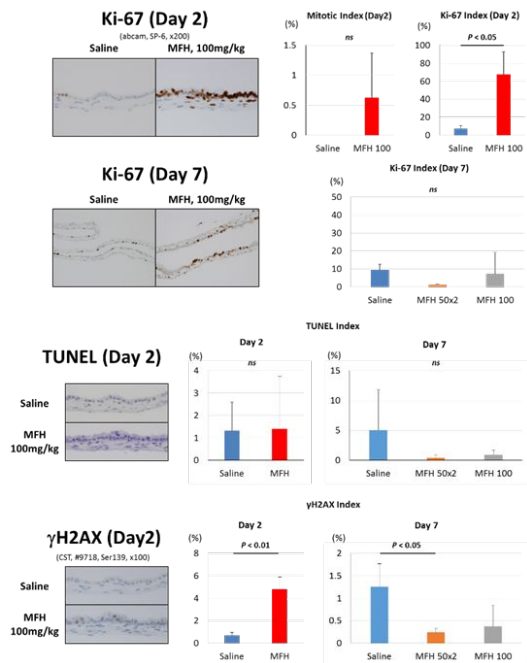


図 3 胆嚢上皮の増殖活性(Ki-67)、アポトーシス(TUNEL)、DNA 障害(H2AX)。

(3)散発的な死亡例は見られたが、死亡率に群間差は見られなかった。1,2,3 群とも胆嚢に明らかな隆起性病変の形成は見られず、壁の肥厚も明らかでなかった。病理組織学的にも in situ 病変や悪性像は観察されなかった。また、肝内および肝外胆管、膵臓、肺にも腫瘤の形成は見られなかった。

以上の結果から、MFH 強制胃内投与後の ICR マウスにデオキシコール酸を飲水投与しても、胆嚢を含めた胆道に腫瘍は発生しないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

久野壽也, 早川将史, 内木綾, 鈴木周五, 山下依子, 高橋智. N-メチル-N-フォルミルヒドラジンのマウス胆嚢発がんイニシエーション作用と系統間感受性の検討. 第 106 回日本病理学会総会. 2017 年 4 月 27-29 日. 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

久野壽也, 早川将史, 不二哲, 内木綾, 鈴木周五, 高橋智. マウス胆嚢における N-メチル-N-フォルミルヒドラジンの発がんイニシエーション作用と系統間における感受性の検討. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会. 2017 年 1 月 26-27 日. ビッグ・アイ(大阪府・堺市)

久野壽也, 加藤寛之, 内木綾, 鈴木周五, 高橋智. マウス胆嚢における N-メチル-N-フォルミルヒドラジンの発がんイニシエーション効果の検討. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年 10 月 6-8 日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

:なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

久野 壽也(KUNO, Toshiya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号:00345779

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし