

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590139

研究課題名（和文）糖尿病モデル系による新規内因性化学発がん要因の検索及びそのリスク

研究課題名（英文）Identification and risk assessment of novel mutagens isolated from diabetes model

研究代表者

渡辺 徹志 (WATANABE TETSUSHI)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90182930

研究成果の概要（和文）：グルコース、L-トリプトファン、フェントン試薬の反応物から変異原性物質を単離し、その物質を新規化合物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体 (ABAQ) と同定した。Ames 試験、チャイニーズハムスター肺細胞を用いる小核試験、マウス個体を用いるコメットアッセイ及び小核試験により、ABAQ が *in vitro* 及び *in vivo* で遺伝毒性を示すことを明らかにした。また、ABAQ が糖尿病モデルラット尿中に含まれていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A novel mutagen, aminobenzoazepinoquinolinone derivative (ABAQ), was isolated and identified from a reaction mixture of glucose, L-tryptophan and the Fenton reagent. By the Ames test, micronucleus test using Chinese hamster lung cells, the Comet assay and micronucleus test using mice, ABAQ was showed to be genotoxicity *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, ABAQ was detected in urine from diabetic model rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：栄養化学

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病患者数は年々増加し、2007年の調査結果では糖尿病患者と糖尿病予備軍と合わせると約2,210万人にのぼると推定された。疫学研究の結果、糖尿病は肝臓、膀胱、大腸及び子宮内膜等の発がんと有意な関係があることが明らかにされ、糖尿病が発がんリスクを高める原因の解明が急がれていた。一方、糖尿病のような高血糖状態においては、グルコースなどの還元糖と生体内のタ

ンパク質が反応するメイラード反応が起こり、種々の変異・がん原性物質が生成すると予想されたが、それらに関してほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

糖尿病患者あるいは糖尿病にいたる過程で生体内で亢進すると考えられるメイラード反応を種々の生理的条件下で行い、それら糖尿病モデル系において生成する主要な変

異原性物質の構造を明らかにする。また、それら変異原性物質の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝子毒性を明らかにするとともに糖尿病モデル動物を用い、糖尿病状態及びそれに行たる過程におけるそれら変異原性物質の生体内での生成状況及び生成にともなう生じる遺伝子損傷等について明らかにする。

### 3. 研究の方法

グルコースと各種 L-アミノ酸を糖尿病モデル系で反応させ、反応物のネズミチフス菌に対する変異原性をラット肝代謝系 (S9 mix) 存在下及び非存在下で試験した。強い変異原性を示した反応系について、反応生成物を Sephadex LH-20 カラムを用いたクロマトグラフィにより分離後、さらに YMC-Pack ODS-AM324 カラムを用いた高速液体クロマトグラム (HPLC) で分離した。さらに、TSKgel CN-80Ts カラム及び SUMICHIRAL OA-7100 カラムを用いた HPLC により精製し、主要な変異原性物質を単離した。その化合物について、UV 吸収スペクトル、ESI マススペクトル、高分解能 APCI マススペクトル、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル、<sup>13</sup>C-NMR スペクトル、IR スペクトルなどの各種スペクトル分析を行い、それらを解析することでその変異原性物質の構造を推定した。また、その化合物の別途合成法について検討し、標準品を合成した。合成標準品とメイラード反応系より単離した変異原性物質の各種スペクトルデータ及び YMC-Pack ODS-A303 カラムを用いた HPLC における保持時間などを比較しその変異原性物質を同定した。合成標準品を用いて、*in vitro* 遺伝子毒性としてネズミチフス菌 TA98 株、TA100 株、YG1024 株、YG1029 株に対する変異原性、チャイニーズハムスター肺 (CHL/IU) 培養細胞に対する小核誘発性を試験した。また、*in vivo* 遺伝子毒性としてマウスの各臓器に対する DNA 損傷性をコメットアッセイにより試験するとともに末梢血を用いる小核試験を行った。さらに生体試料中のそれら変異原性物質の分析法を確立し、糖尿病モデルマウスを用い、尿についてその物質の定量を行った。

### 4. 研究成果

グルコースと各種アミノ酸をリン酸緩衝液 (pH7.0) に溶解して 37°C で保温し、1 週間後に反応液の変異原性を Ames 法により試験した。その結果、グルコースとトリプトファンとのメイラード反応物が変異原性を示すようになることがわかった。またその反応液にフェントン試薬を加えて反応させることにより、フェントン試薬を加えない時より顕著に強い変異原性を示すようになることがわかった。フェントン試薬を加えた大規模な反応液から反応生成物を分離精製するため

の試料を調製し、反応生成物を S9 mix 存在下 YG1024 菌株に対する変異原性を指標として各種カラムを用いて分画した。その結果、はじめの反応液の変異原性の 18% に相当する変異原性物質を単離することができた。各種スペクトルデータを測定、解析し、その物質を 5-amino-6-hydroxy-8H-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ) と推定した。そこで、ANAQ の合成法について検討し、1-(3-bromoprop-1-ynyl)-2-nitrobenzene と 5-amino-2-methoxyisophthalic acid dimethyl ester から得られた propargylamine 誘導体を基質に用い、Larock のキノリン合成法により鍵中間体となるキノリン誘導体を合成し、その後、種々官能基を変換することで ABAQ を得る合成法を確立した。ABAQ の合成標準品とメイラード反応物の各種スペクトルデータ及び高速液体クロマトグラフィ (HPLC) における保持時間の一致によりそのメイラード反応物を ABAQ と同定することができた。

別途合成した ABAQ の変異原性を Ames 法により試験し、ABAQ が TA98 株、TA100 株及びそれらの *O*-アセチルトランスフェラーゼ高産生株である YG1024 株、YG1029 株に対して S9 mix 存在下で変異原性を示し、その強さが代表的な変異・がん原性ヘテロサイクリックアミンである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) のそれと同程度であることを明らかにした。ABAQ の *in vitro* における遺伝毒性をチャイニーズハムスター肺 (CHL/IU) 細胞を用いた小核試験により調べた結果、ABAQ が 0.2~50 µg/ml の範囲で用量依存的に小核を誘発することがわかった。また、ABAQ の *in vivo* における遺伝毒性を末梢血小核試験を用いて調べた結果、ABAQ を 25 及び 50 mg/kg 体重で投与することで、投与 48 時間後まで小核発生頻度は経時的に有意に増加することがわかった。また、いずれの採血時間でも ABAQ は用量依存的に小核を誘発した。コメットアッセイにより、ABAQ が 25 及び 50 mg/kg 体重で投与することで、各種臓器に対して DNA 損傷性を示すことがわかった。以上の結果、ABAQ が *in vivo* 及び *in vitro* において哺乳類細胞に対し、遺伝毒性を示すことが明らかになった。

ABAQ の生体内での生成について明らかにするため、尿中の ABAQ の分析法について検討した。尿試料からの分析の前処理法として、液-液抽出法と固相抽出法について検討した。クロロホルムを用いた液-液抽出による ABAQ の回収率は 58.1~80.1% で、平均値は 70.1% (標準偏差 8.3) であった。また、Sep Pak classic C18 カートリッジを用いた固相抽出における ABAQ の回収率は 64.3~74.5% で、平均値は 70.4% (標準偏差 4.4) であった。そこで、これらの方法を組み合わせて尿を前処

理したのち、LC/MS/MS法により ABAQ を分析こととした。尿試料として、標準飼料を与えた正常ラット、標準飼料を与えたⅡ型糖尿病モデルラット及びトリプトファン高含有飼料を与えたⅡ型糖尿病モデルラットについて、24 時間尿を採取し、ABAQ の分析を行った。その結果、いずれのラット尿からも ABAQ が検出され、ABAQ の尿中含量はトリプトファン高含有飼料摂取Ⅱ型糖尿病モデルラット>標準飼料摂取Ⅱ型糖尿病モデルラット>標準飼料摂取正常ラットであった。以上の結果から、正常ラット体内においても ABAQ が生成し、糖尿病状態の生体内におけるメイラード反応の亢進により ABAQ の生成量が増加すると考えられた。ABAQ の生体試料からの検出は本研究が初めてであり、今後、糖尿病状態の進行と ABAQ の生成量の関係並びに ABAQ の生成と糖尿患者における遺伝子損傷の関係について明らかにする必要があると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Rena Nishigaki, Tetsushi Watanabe, Tetsuya Kajimoto, Atsuko Tada, Takeji Takamura-Enya, Shigeki Enomoto, Haruo Nukaya, Yoshiyasu Terao, Atsushi Muroyama, Minoru Ozeki, Manabu Node, Tomohiro Hasei, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Isolation and Identification of a Novel Aromatic Amine Mutagen Produced by the Maillard Reaction, Chemical Research in Toxicology, 査読有, 22, 2009, 1588-1593.

② Minoru Ozeki, Atsushi Muroyama, Tetsuya Kajimoto, Tetsushi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Manabu Node, Synthesis of a New Mutagenic Benzoazepinoquinolinone Derivative, Synlett, 査読有, 11, 2009, 1781-1784.

[学会発表] (計 13 件)

① 岡崎美帆、細田成美、田村有香、クウリバリ、スレイマン、長谷井友尋、渡辺徹志、新規メイラード反応生成物 ABAQ の *in vivo* 遺伝毒性、生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究成果発表会、2012 年 2 月 18 日、京都市

② 長谷井友尋、竹中信絵、宮崎千尋、隆杉桃子、岡崎美帆、細田成美、田村有香、増田修一、戸塚ゆかり、若林敬二、渡辺徹志、新規遺伝毒性物質 ABAQ の糖尿病ラットにおける

生成、生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究成果発表会、2012 年 2 月 18 日、京都市

③ 大塚久美、戸塚ゆかり、若林敬二、布柴達男、渡辺徹志、中釜 斉、トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物 ABAQ の *in vivo* 変異原性、第 40 回日本環境変異原学会、2011 年 11 月 22 日、東京都千代田区

④ 山田昌徳、島村裕子、戸塚ゆかり、稲葉直之、クウリバリ・スレイマン、田村友佳、長谷井友尋、若林敬二、渡辺徹志、増田修一、メイラード反応由来新規変異原性物質 ABAQ の生体内生成に関する研究、第 40 回日本環境変異原学会、2011 年 11 月 22 日、東京都千代田区

⑤ 岡崎美帆、西崎真理奈、細田成美、長谷井友尋、渡辺徹志、新規メイラード反応生成物 ABAQ の *in vivo* 遺伝毒性、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011 年 10 月 22 日、神戸市

⑥ 戸塚ゆかり、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、トリプトファンとグルコースのメイラード反応で生成されるアミノベンゾアゼピノキノリノンの遺伝毒性、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋市

⑦ 小林沙衣、西崎真理奈、岡崎美帆、クウリバリ・スレイマン、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、戸塚ゆかり、川西優喜、八木孝司、若林敬二、渡辺徹志、メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性、静岡市、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日

⑧ 小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、戸塚ゆかり、若林敬二、渡辺徹志、メイラード反応生成物アミノアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価、第 39 回日本環境変異原学会、2010 年 11 月 17 日、つくば市

⑨ 小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、戸塚ゆかり、若林敬二、渡辺徹志、メイラード反応生成物アミノアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010 年 10 月 30 日、枚方市

⑩ 小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、戸塚ゆかり、若林敬二、渡辺徹志、新規メイラード反応生成物アミノ

アゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山市

⑪小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、川西優喜、八木孝司、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺徹志、生体内モデルメイラード反応による新規化合物 ABAQ の生成とその遺伝毒性、難病克服を目指した分子基盤創薬科学の開拓成果発表会、2010 年 3 月 15 日、京都市

⑫小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、渡辺徹志、戸塚ゆ加里、若林敬二、メイラード反応生成物アミノアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性評価、第 38 回日本環境変異原学会、2009 年 11 月 26 日、静岡市

⑬小林沙衣、西崎真理奈、小関稔、梶本哲也、野出學、長谷井友尋、戸塚ゆ加里、若林敬二、渡辺徹志、メイラード反応生成物アミノアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性評価、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2009 年 10 月 24 日、東大阪市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 徹志 (WATANABE TETSUSHI)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90182930

### (2) 研究分担者

長谷井 友尋 (HASEI TOMOHIRO)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10388027

### (3) 連携研究者

小関 稔 (OZEKI MINORU)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40465597

戸塚 ゆ加里 (TOTSUKA YUKARI)

国立がん研究センター・研究所及・室長

研究者番号：40373401