

## 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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380163

研究課題名（和文） 巨大核出現メカニズムを起点とした in vivo 短期発がん指標分子の探索研究

研究課題名（英文） Search for in vivo early prediction markers of carcinogenicity based on the induction mechanism of karyomegaly

研究代表者 渋谷 淳 (SHIBUTANI MAKOTO)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：20311392

研究成果の概要（和文）：発がん物質には、標的細胞に対して細胞周期異常を反映した巨大核を誘発するものがある。本研究では、ラットに 28 日間投与した際に発がんの標的臓器に細胞増殖活性の亢進を示す発がん物質は、アポトーシスと M 期の破綻を示唆する分子変化を生じることを見出し、それにより短期発がん性予測指標候補を得ることができた。また、巨大核を誘発する肝発がん物質による発がん促進早期から p16<sup>Ink4a</sup> のエピジェネティックな遺伝子修飾が生じ、それによる細胞周期制御の破綻が示唆された。

研究成果の概要（英文）：There are carcinogens that can induce karyomegaly reflecting cell cycle aberration in carcinogenic target cells. In this study, we found that carcinogens evoking facilitation of cell proliferation increased apoptosis and M phase-disrupting cells in the carcinogenic target organs after 28-day treatment in rats, and thus, we obtained candidates for early prediction markers of carcinogenicity. We also found that tumor promotion with karyomegaly-inducing hepatocarcinogens may cause disruption of cell cycle regulation through epigenetic gene modification of p16<sup>Ink4a</sup> in the carcinogenic process from the early stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：がん、病理学、発がん性評価、短期予測、巨大核、細胞増殖活性、細胞周期、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

実験的に動物に対して腎発がん物質を投与すると、その初期から尿細管上皮細胞に腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現という特徴的な変化がしばしば見出され、それは遺伝子に直接的に傷害を及ぼす遺伝毒性腎発がん物質のみならず、直接的な遺伝子傷害を示さない非遺伝毒性腎発がん物質によっても生じる。U.S. National Toxicology Program で実施されてきた 556 物質の発がん性試験を検索したところ、マウスないしラットで腎発がん性を示した 21 物質のうち 12 物質で早期に巨大核の出現が見出されている。残りの腎発がん物質の殆どが尿細管腎症を誘発しており、巨大核あるいは尿細管腎症が化学物質による腎発がんの背景にあるものと考えられる。核の巨大化はゲノムの異数性を反映し、発がん好発部位に一致して出現し、その数は発がん物質の投与期間と共に増加する。このことから、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆される。それを裏付けるように、巨大核内で染色体の不安定性を導くような細胞回転関連分子の発現変動が最近見出されているが、それらの分子の発がんに果たす役割はまだ検索されていない。一方、巨大核の出現が必ずしも発がんに結びつかないという主張もあるが、巨大核の出現があつて発がん性が陰性という報告事例はない。

## 2. 研究の目的

化学物質の発がん性評価手法であるゲッ歯類を用いた発がん性試験は、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な手法開発への要望は大きい。本研究では、発がんの初期過程を与える可能性の高い巨大核の出現に着目し、腎発がんをモデルとした組織部位特異的な網羅的分子解析を行い、複数の発がん標的に対する反応性による分子スクリーニングを経て、発がん性全般に対応可能な短期発がん性予測指標を確立する。これにより新概念の「がん予測・予防指標分子」が誕生する。

## 3. 研究の方法

### (1) 腎発がん物質のラット 28 日間反復投与例での腎発がん性予測指標の探索

腎発がん物質のラット 28 日間反復投与実験を実施し、近位尿細管上皮細胞において変動を認めた細胞周期関連分子群から、腎発がん

物質に共通して反応する分子の抽出を目指した。すなわち、代表的な巨大核誘発腎発がん物質 (鉄ニトリロ三酢酸、オクラトキシン A (OTA)、モノロン) および巨大核非誘発腎発がん物質 (リン酸トリス(2-クロロエチル)、臭素酸カリウム) を選択し、既に知られている主要な細胞周期関連分子と共に、マイクロアレイ発現解析の結果選別された分子群を主として免疫組織化学染色により検討した。

### (2) 標的臓器の異なる発がん物質のラット 28 日間反復投与例での短期発がん性予測指標の評価

(1) で得られた指標候補が、標的臓器を問わずに適用可能であるかを検証するため、標的臓器の異なる発がん物質のラット 28 日間反復投与実験を実施した。すなわち、肝臓 (チオアセタミド (TAA)、フェンベンダゾール、ピペロニルブトキサイド、メチルオイゲノール)、甲状腺 (スルファジメトキシン)、膀胱 (フェネチルイソチオシアネート)、前胃 (ブチルヒドロキシアニソール)、腺胃 (カテコール)、および大腸 (ケノデオキシコール酸、PhIP) を標的として、(1) の腎臓と同様に免疫組織化学染色と TUNEL 染色による検討を行った。

### (3) ラット発がん促進過程早期での短期発がん性予測指標の変動に関する検討

短期発がん性予測指標として得られた細胞増殖性、アポトーシス、topoisomerase II $\alpha$  (Topo II $\alpha$ ) および ubiquitin D (Ubd) の細胞周期機能分子が、発がん過程早期に関与するかどうかを明らかにするため、前がん病変ないし過形成病変を標的とした反応性を検討した。すなわち、肝臓、甲状腺、膀胱、前胃および腺胃を対象とし、二段階発がんモデルを用いて、促進過程早期に形成される前がん病変ないし過形成病変について、短期発がん性予測指標の反応性を免疫組織化学的染色および TUNEL 染色を用いて検討した。

### (4) OTA によるラット腎尿細管上皮での巨大核誘発と細胞周期制御異常に対する酸化的ストレスの関与の検討

OTA の巨大核形成とさらに発がん過程に酸化的ストレスが関与しているかどうかを明らかにするため、OTA のラット 28 日間反復投与実験を実施し、酵素処理イソクエルシトリン (EMIQ) ないし  $\alpha$ -リボ酸 (ALA) との併用投与群も設定した。実験後

得られた腎臓の髄質外帯 (OSOM) を用いて、酸化ストレス関連パラメーターや免疫組織化学染色を用いた細胞周期関連分子群、細胞増殖活性およびアポトーシス指標の変動を解析した。

(5) 巨大核誘発性肝発がん物質 TAA による発がん促進過程早期から誘発される細胞周期異常とエピジェネティックな遺伝子修飾の関与の検討

TAA による肝発がん過程早期からの細胞周期異常の寄与を解明するために、前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性巣について細胞周期関連分子の分布変動を解析した。次いで、TAA による発がん促進に伴い GST-P 陽性巣内で発現低下を示した p16<sup>Ink4a</sup> について、その他の発がん物質による短期発がん促進によって誘導される GST-P 陽性巣、ならびに長期発がん促進によって形成された腫瘍組織を用いて免疫組織化学染色による発現解析を行った。また、DNA メチル化解析を行い p16<sup>Ink4a</sup> の発現低下が発がん過程で不可逆的な反応かどうかを検討した。

(6) TAA の発がん促進作用により誘発されたラット肝前がん病変における細胞周期異常に対する抗酸化物質の影響

TAA によるラット肝二段階発がんモデルを用いて、肝発がん過程早期に関与する細胞周期異常のさらなる解明を目指した。すなわち、TAA による肝発がん促進過程早期における細胞周期異常の詳細について、発がん抑制作用が期待される抗酸化剤である EMIQ ないし ALA の併用投与による修飾作用の検討と共に、細胞周期関連分子を中心とした発現解析を行い、発がん促進作用と細胞周期異常、細胞増殖性やアポトーシスとの関連性を検討した。

4. 研究成果

(1) 腎発がん物質は、ラットに対する 28 日間の反復投与により、解析した近位尿管領域を問わず、更には巨大核誘発性の有無に関わらずに Ki-67 や Mcm3 の陽性細胞の増加で示される細胞増殖活性の亢進を示し、それには Topo IIα と共に細胞周期異常を反映する Ubd 発現細胞の増加およびアポトーシスの誘発を伴うことが見出された。このことより、Ki-67、Mcm3、Topo IIα、Ubd および TUNEL 陽性アポトーシスが腎発がん物質の 28 日間反復投与例に共通した反応性を示し、短期腎発がん性予測指標になり得る可能性が示唆

された。また、巨大核を誘発する腎発がん物質では、解析した近位尿管領域を問わず、Cdc2 の核内局在細胞、γH2AX、および p-Chk2 陽性細胞が増加したことより、DNA 損傷が巨大核誘発性を含む腎発がん機序に先立って生じ、M 期に留まる細胞の増加することが示唆された。

(2) 28 日間反復投与実験において細胞増殖活性の高い発がん物質では、標的臓器の違いを問わず、Topo IIα、Ubd 発現細胞の増加およびアポトーシスの誘導が示唆された。一方、細胞増殖活性を亢進しなかった発がん物質ではこれらの変化を引き起こさないことが見出された。さらに、OTA 投与後の腎尿管および TAA 投与後の肝細胞において Topo IIα と Ubd の共発現細胞が増加したことより (図 1)、発がん物質投与に起因した G<sub>2</sub> 期での Ubd の異常発現が見出された。

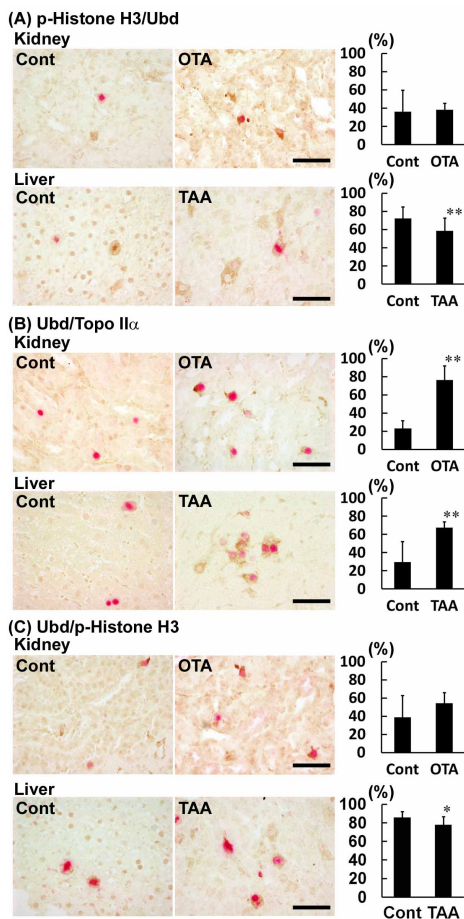


図 1. Ubd と Topo IIα および p-Histone H3 の共発現

これらの結果より、発がん物質投与により細胞増殖活性が高まった細胞集団の内、G<sub>2</sub> 期で Ubd の発現が高い細胞では、続く M 期のスピンドルチェックポイント監視

機構が破綻し、染色体不安定性に陥る一方で、M期破綻を免れた細胞の一部は、スピンドルチェックポイント監視機構によりアポトーシスに至る可能性が示唆された。以上のことより、発がん物質の28日間反復投与後に発がん標的細胞で細胞増殖活性が高い発がん物質では、Ki-67およびMcm3を含め、Topo II $\alpha$ 、Ubdおよびその2分子の共発現とTUNEL陽性アポトーシスが短期発がん性予測指標になり得る可能性の高いことが示唆された。

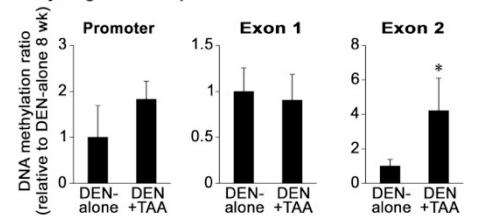
(3) 肝臓および甲状腺の前がん病変では細胞増殖とアポトーシスが増加したが、Ubdは変動を示さなかったことより、細胞増殖とアポトーシスは共に肝臓と甲状腺の前がん病変の形成過程に関与しているが、M期のスピンドルチェックポイント破綻はもはやこの過程には関与していないことが考えられた。一方、膀胱、前胃および腺胃での過形成病変ではUbd陽性細胞が増加し、それは細胞増殖およびアポトーシスと連動していることが見出された。これは(1)および(2)の28日間反復投与実験結果と同じであることから、M期スピンドルチェックポイントの破綻は過形成病変の形成過程には関与し、それは前がん病変の過程に入る以前の状態にあるものと示唆された。

(4) 抗酸化剤併用投与による、酸化ストレス指標およびOTAにより発現変動した指標候補の抑制は認められなかった。これらの結果より、OTAは巨大核形成や発がん標的部位であるOSOMにおいて、細胞周期異常を含む細胞増殖やアポトーシスを助長するが、それには酸化ストレスの関与はないことが示唆された。しかしながら、ALAはOSOMにおいてOTA単独群に比して細胞増殖指標の陽性細胞数を増加させたことから、OTAにより亢進された細胞増殖活性をさらに促進することが示唆された。

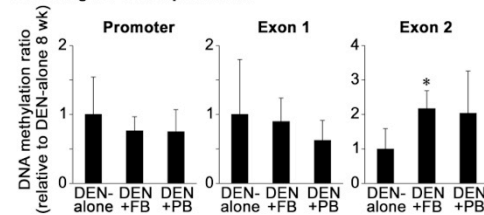
(5) G<sub>1</sub>/S期のサイクリンキナーゼ阻害剤であるp16<sup>Ink4a</sup>、p21<sup>Cip1</sup>、p27<sup>Kip1</sup>、G<sub>2</sub>/M期チェックポイント分子であるphospho-Chk1 (p-Chk1)、Cdc25c、Wee1がGST-P陽性巢内で発現増加ないし低下しており、特にほとんどのGST-P陽性巢でp16<sup>Ink4a</sup>の発現低下が認められた。これらの結果から、チェックポイント機構の破綻を進行させる多様な異常表現型の獲得が前がん病変細胞の選択的増殖を引き起こすことが示唆された。また、GST-P陽性巢内でTopo II $\alpha$ 、phospho-Histone H3 (p-Histone H3)、 $\gamma$ H2AXの発現増加が認められ、チェックポイ

ント機構の破綻下でDNA損傷と細胞周期進行の亢進が同時に生じ、これらの細胞応答が、DNA損傷の蓄積に起因する染色体不安定性の上昇につながる可能性が示唆された。また、TAAによる発がん促進過程の早期で*Cdkn2a*のエクソン領域におけるDNAのメチル化亢進の生じていることが確認され(図2)、さらにフェンベンダゾールおよびフェノバルビタールによる発がん促進の結果生じた腫瘍性病変においてもp16<sup>Ink4a</sup>の発現低下の生じていることが確認された。これらの結果から、*Cdkn2a*のエクソン領域のDNAメチル化によるエピジェネティックな遺伝子制御によるp16<sup>Ink4a</sup>の発現低下が肝発がんメカニズムの引き金となり、発がんプログレッションへとつながる可能性が示唆された。

(a) Methylation-specific quantitative PCR of *Cdkn2a*  
Early stage of tumor promotion



Late stage of tumor promotion



(b) Pyrosequencing analysis of exon 2 in *Cdkn2a*  
(Nucleotide No.: 339-370)

Sequence analyzed: Na-bisulfite converted (anti-sense)  
5'-TTTTGTAGTG YTG YAGYATG YTATAAATGY TA-3'

Original sequence: Before Na-bisulfite treatment

5'-GGGACATCAC GACGTCGTGC GGTATTTGCG GT-3'  
3'-CCCTGTAGTG CTGCAGCAGC CCATAAAGCG CA-5'

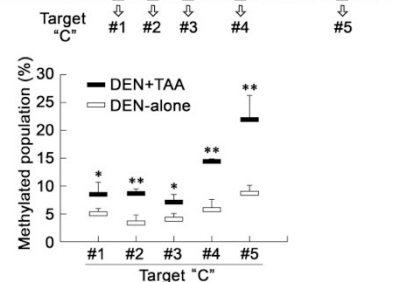


図2. *Cdkn2a*のCpG islandsにおけるDNAメチル化状態

(6) TAAの6週間反復投与による発がん促進作用によってGST-P陽性巢内におけるp16<sup>Ink4a</sup>の下方制御が生じ、それが前がん病変細胞の選択的増殖をもたらしていることが示唆された。しかし、この現象はEMIQ

および ALA によっては抑制されず、(5) で示している遺伝子のエピジェネティックな制御は抗酸化物質によっては抑制されないことが示唆された。また、TAA による発がん促進によって形成された GST-P 陽性巢内で、Topo II $\alpha$ 、p-Histone H3、Cdc2、 $\gamma$ H2AX、p-Chk1 とスピンドルチェックポイント分子である Mad2 の発現増加が認められ、これらは EMIQ および ALA の併用投与によって抑制された。これらの結果から、TAA による発がん促進によって、細胞周期進行の促進に一致した DNA 損傷の蓄積が生じており、それによって G<sub>2</sub>/M およびスピンドルチェックポイントの活性化による細胞周期の停止とそれに引き続く染色体不安定性が起こり、それが発がん過程早期の重要なメカニズムの 1 つであることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- ① Kimura, M., Fujii, Y., Yamamoto, R., Yafune, A., Hayashi, S-M., Suzuki, K., Shibutani, M.: Involvement of multiple cell cycle aberrations in early preneoplastic liver cell lesions by tumor promotion with thioacetamide in a two-stage rat hepatocarcinogenesis model. *Exp. Toxicol. Pathol.* (印刷中). doi:p11: S0940-2993(13)00027-4. 10.1016/j.etp.2013.01.012. 【査読有】
  - ② Taniai, E., Yafune, A., Kimura, M., Morita, R., Nakane, F., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Fluctuations in cell proliferation, apoptosis, and cell cycle regulation at the early stage of tumor promotion in rat two-stage carcinogenesis models. *J. Toxicol. Sci.* 37(6): 1113-1126, 2012. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1113>. 【査読有】
  - ③ Taniai, E., Yafune, A., Hayashi, H., Itahashi, M., Hara-Kudo, Y., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: 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(6): 1093-1111, 2012. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.37.1093>. 【査読有】
  - ④ Tsuchiya, T., Wang, L., Yafune, A., Kimura, M., Ohishi, T., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Disruptive cell cycle regulation involving epigenetic downregulation of *Cdkn2a* (p16<sup>Ink4a</sup>) in early-stage liver tumor-promotion facilitating liver cell regeneration in rats. *Toxicology* 299(2-3): 146-154, 2012. doi: 10.1016/j.tox.2012.05.018. 【査読有】
- ⑤ Taniai, E., Hayashi, H., Yafune, A., Watanabe, M., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: 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(9): 1453-1464, 2012. doi: 10.1007/s00204-012-0829-z. 【査読有】
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- ① 谷合枝里子、八舟宏典、盛田怜子、板橋 恵、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：ラット二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション過程早期における細胞増殖、アポトーシス及び細胞周期関連分子の局在変化。第 29 回日本毒性病理学会学術集会、つくば、第 29 回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集：P-61, p. 93, 1 月 31-2 月 1 日, 2013.
  - ② 木村真之、藤井雄太、山本龍一、谷合枝里子、八舟宏典、林 新茂、鈴木和彦、三森 国敏、渋谷 淳：チオアセタミドのラット肝発がん促進時に誘発される細胞周期以上に対する酸化性ストレスの関与。第 39 回日本毒性学会学術集会、仙台、第 39 回日本毒性学会学術集会講演要旨集：0-46, p.S147, 7 月 17-19 日, 2012.
  - ③ 谷合枝里子、八舟宏典、盛田怜子、赤根弘敏、林 仁美、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：発がん標的性の異なる発がん物質のラットに対する 28 日間投与時の各標的臓器でのラット腎発がん物質反応指標の変動。第 28 回日本毒性病理学会学術集会、東京、第 28 回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集：P-098, p.116, 2 月 2-3 日, 2012.
  - ④ 渋谷 淳：シンポジウム「オクラトキシン A のリスク評価最前線」、オクラトキシン A の毒性・発がん性に関する現在までの情報。第 70 回マイコトキシン学会。第 70 回マイコトキシン学会要旨集。P. 23(S-1), 東京, 1 月 6 日, 2012.
  - ⑤ Eriko Taniai, Hitomi Hayashi, Atsunori Yafune, Kazuhiko Suzuki, Kunitoshi Mitsumori, Makoto Shibutani: Search for rapid detection markers of renal

carcinogens based on the karyomegaly-induction mechanism in rats. 70<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Proceedings: p.476 (P-3087), 名古屋, 10月3~5日, 2011.

- ⑥ 土屋卓磨、谷合枝里子、八舟宏典、白木彩子、北条友理、鈴木和彦、三森国敏、渋谷淳: ラット thioacetamide (TAA)肝発がん促進過程で形成される前がん病変における細胞周期破綻の様式, 第152回日本獣医学会学術集会, 大阪, 第152回日本獣医学会学術集会講演要旨集: p.188 (B-29), 9月19~21日, 2011.
- ⑦ Eriko Taniai, Hitomi Hayashi, Atsunori Yafune, Liyun Wang, Kazuhiko Suzuki, Kunitoshi Mitsumori, Makoto Shibutani: Search for *in vivo* rapid screening markers of renal carcinogens based on the analysis of induction mechanism of karyomegaly. 9<sup>th</sup> European Congress of Toxicologic Pathology of the European Society of Toxicologic Pathology, Uppsala, Sweden, p.226 (TP12), 9月7~10日, 2011.
- ⑧ 谷合枝里子、中村憲彦、林 仁美、嶋本敬介、Wang Liyun、大石 巧、剣持 明、小西良子、鈴木和彦、三森国敏、渋谷淳: 腎発がん物質の28日間短期投与時でのラットの腎尿細管領域の細胞増殖性を考慮した細胞周期関連分子の発現解析, 第38回日本トキシコロジー学会学術集会, 横浜, 第38回日本トキシコロジー学会学術集会講演要旨集: p.128 (P-12), 7月11~13日, 2011.
- ⑨ 谷合枝里子、土屋卓磨、黒岩有一、林 仁美、鈴木和彦、三森国敏、渋谷淳: 巨大核出現を伴う腎発がん物質の28日間投与ラットの腎尿細管における細胞周期関連分子の発現変化、文部科学省科学研究費補助金がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動、「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ, 大津, 2月3-4日, 2011.
- ⑩ 谷合枝里子、土屋卓磨、黒岩有一、林 仁美、鈴木和彦、三森国敏、渋谷淳: 巨大核出現を伴う腎発がん物質の28日間投与時でのラット腎尿細管における細胞周期関連分子の発現挙動, 第27回日本毒性病理学会学術集会, 大阪, 第27回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集: P-093, p.135, 1月27-28日, 2011.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

渋谷 淳 (SHIBUTANI MAKOTO)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 20311392

### (2)研究分担者

三森 国敏 (MITSUMORI KUNITOSHI)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 10239296