

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501323

研究課題名(和文) ヒドロキシラジカルの選択的除去による発癌予防

研究課題名(英文) The study of prevention of carcinogenesis by the selective scavenger of hydroxy radical species

研究代表者

仲谷 和記(Nakatani, Kazuki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60295699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：人体に有害な活性酸素種であるヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)類は、発がんの原因の一つとして注目されてきた。本研究では、 $\cdot\text{OH}$ 類の選択的除去物質である水素分子による発がん予防効果を明らかにすることを目的とする。ヒトウイルソン病のモデル動物であるLECラットは肝臓に蓄積した銅から生じる $\cdot\text{OH}$ 類により、生後6ヶ月齢までに急性肝炎を発症し、生存した個体では生後1年半までに肝臓がんを発症する。予備的実験群での検討ではあるが、71週齢で死亡した対照群のLECラットにおいては肝臓に著名な腫瘍形成が認められたのに対して、71週齢で犠牲死させた水素分子投与LECラットでは肝臓における腫瘍形成が著しく抑えられていた。

研究成果の概要(英文)：For purposes of proposing the therapeutic strategy for prevention of carcinogenesis, we did the study using saturated molecular hydrogen water, the selective scavenger of hydroxy radical species. In this study, we used Long-Evans Cinnamon (LEC) rats that are the model animals of human copper metabolic disease, Wilson disease. Until six month old, many of them have an attack of acute hepatitis caused by hydroxy radical species, and 20-30% of male LEC rats die. It was reported that the almost survivals get liver cancers until a half and one year old. We administered saturated molecular hydrogen water or de-hydrogen water to LEC rats and Long-Evans Agouti (LEA) rats as negative controls. We made de-hydrogen water by degassing molecular hydrogen water. In the preliminary experiment, we found that liver carcinogenesis was prevented in the LEC rat drinking saturated molecular hydrogen water every day, although the LEC rat drinking de-hydrogen water had many tumors in the liver.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・がん疫学・予防

キーワード：酸化ストレス がん 組織・細胞 動物

1. 研究開始当初の背景

細胞内における酸化ストレスは、慢性炎症や発がんの原因の一つとして古くから注目され、有害な酸化ストレスを制御すべく様々な研究が進められてきた。我々も、酸化的 DNA 障害や脂質過酸化が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) などのヒト肝疾患病態に深く関与することを明らかにしてきた (Seki, Nakatani, et al. *Histopathol*, 2003; *J Hepatol*, 2002; *Histopathol*, 2002)。また我々は、肝細胞内における酸化ストレスの原因として細胞内遊離鉄の存在が重要であり、鉄の摂取を制限することにより肝障害が軽減されることを明らかにした (Otogawa, Nakatani, et al. *Am J Physiol*, 2008; *Am J Pathol*, 2007)。

細胞内では種々の活性酸素種が生成されるが、NO の様に重要な細胞機能を担うものも多い。有害な酸化ストレスの主因となるのは、酸化力が極めて強いヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) 類であるが、従来の抗酸化物質では $\cdot\text{OH}$ を選択的に除去することは出来ない。

連携研究者の日本医大・太田成男らは、水素分子 (H_2) が $\cdot\text{OH}$ 類のみを選択的に除去し、NO など他の活性酸素種に影響を与えないことを報告した (Ohsawa, Ohta. Et al. *Nature Med*, 2007)。我々も平成 21 年末より研究を始め、チオアセトアミド (thioacetamide; TAA) によるラット肝障害モデルにおいて水素分子が肝線維化を抑制することを明らかにした (第 29 回分子病理学研究会にて発表)。

2. 研究の目的

本研究では、ラットの発がんモデルを用いて、水素分子による発がん抑制効果を明らかにするとともに、水素分子による発がん予防の分子機構を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 先行する「TAA 惹起肝線維化を水素分子

投与によって抑制する研究」で得られた試料

(Wistar 系雄ラットの肝組織無固定新鮮凍結標本と 10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本および PLP 固定凍結標本) の組織内における酸化ストレスの状態を評価する目的で、酸化的 DNA 障害のマーカー分子である 8-オキシデオキシグアノシン (8OHdG) と脂質過酸化物である 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4HNE) の免疫組織化学染色を行った。さらに、4HNE を含む 4-ヒドロキシアルケナール (4HNA) とマロンジアルデヒド (MDA) の両者を定量的に検出できる LP0586 キット (Bioxytech 社製) を用いた解析を行った。

(2) 「水素分子の発がん予防効果の評価に関する研究」では、当初、脂肪肝炎モデルを用いることを予定していたが、先行する他の複数の研究グループと競合することが明らかとなったため、他のモデル動物を使用することとした。肝臓がんの発がんモデルとして広く用いられているものはジエチルニトロサミン投与モデルであるが、同モデルを用いて当該研究期間直前に行った予備実験において、水素分子による有意な発がん抑制効果が認められなかった。そのため、発がんまでに長期間を必要とするが、ヒトの銅代謝異常疾患ウイルソン病の疾患モデル動物である Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットを用いて実験を行った。

LEC ラットは肝臓に蓄積した銅から生じる活性酸素種 (主に $\cdot\text{OH}$ 類) による肝細胞障害のため、生後 4~6 ヶ月齢で急性肝炎を発症し、雄では 2~3 割が、雌では約 8 割が死亡するとされる。そして生存した個体も慢性肝障害のために、生後 1 年~1 年半の間に大部分が肝臓癌を発症すると報告されている。

LEC ラットとその対照系統である Long-Evans Agouti (LEA) ラットに対して、飽和水素水と脱水素水を自由飲水により投与した。LEC ラット、LEA ラットとも高価であるため、それぞれを交配させて殖やし、実験に用いた。

飽和水素水は当初、ブルーマーキュリー社から購入していたが、工場の製造ラインの不具合から供給が不安定となったため、研究期間の途中から、エコモ・インターナショナル社製の飽和水素水発生装置アキュエラ・ブルーを購入（自費）し用時調製を行ったものに変更した。飽和水素水を調製するために用いた水は、装置の制約により純水やイオン交換水が使用できなかったため、施設の水道水を東レ社製の PT502V フィルターで処理して残存塩素等を除いたものを用いた。脱水素水は、飽和水素水を 10 分間、吸引下で超音波処理した後、震盪器にて 30 分以上震盪したものをオートクレーブして調製した。脱水素水の残存水素の有無は、エコモ・インターナショナル社より供給させた溶存水素濃度判定試薬とトラストレックス社製ポータブル溶存水素計 ENH-1000 を用いて評価した。飽和水素水は毎日交換し、脱水素水は隔日交換した。試料を採取する際は麻酔下にて犠牲死させ、血清と液体窒素を用いて無固定で凍結させた臓器標本（分子生物学的検討用）、ブアン固定液にて固定したパラフィン包埋標本（組織化学染色用）を作製した。その際、適宜写真撮影を行った。

(3) 7,12-ジメチルベンズアントラセン (DMBA) 投与ラット乳腺腫瘍モデルに対する水素分子の腫瘍発生抑制効果を検討した。発癌性物質である DMBA を 8 週齢の雌 Sprague-Dawley (SD) ラットに約 116mg/kgBW となるように経口投与し、飽和水素水投与群と脱水素水投与群間で腫瘍発生数を比較した。飽和水素水はブルーマーキュリー社製のものを用い、脱水素水は上記(2)の記載に準じて調製した。

飽和水素水および脱水素水は DMBA 投与の 1 週間前より自由飲水を開始し、DMBA 投与 19 週後に評価を行った。ラットを犠牲死させた後、発生腫瘍数と大きさを測定し、腫瘍部の無固定新鮮凍結標本と 10%ホルマリン固定

パラフィン包埋標本を作製した。合わせて写真撮影も行った。

4. 研究成果

(1) TAA 惹起肝線維化モデル（肝障害モデル群、肝障害モデルに飽和水素水を投与した群、および両者の対照群）より採取したパラフィン包埋標本および PLP 固定凍結標本を用いて 80HdG と 4HNE の免疫組織染色を行ったが、検討した全ての群において有意な染色が得られなかった。陽性対照群としてシスプラチン投与腎障害モデルの標本を用いたが、そちらでは予想していたよりは少ないものの染色像が得られた。TAA 投与実験群で染色像が得られなかった原因として、組織中の酸化ストレスによる影響が検出感度以下であった可能性や固定法が適切でなかったことが考えられる。以下の LEC・LEA ラットを用いた実験では 80HdG 検出により適したブアン固定液を用いることとした。

次いで、LP0586 キットを用いて、脂質過酸化物である 4HNA と MDA の両者の総和を定量的に解析した。その結果、対照群と比較して TAA 惹起線維化肝組織中には過酸化脂質が有意に増加しており、飽和水素水投与によって有意に抑制されることが明らかとなった。

(2) LEC・LEA ラットを用いた実験では、当初、飽和水素水を投与することによって、肝細胞内に異常蓄積した銅由来の・OH 類が除去されるため、急性肝障害による死亡数が減少すると予想していたが、それに反して、雌雄とも死亡率の減少が認められなかった。生後 1 年（52 週齢）を超えて生存した個体数の割合を比較したところ、雄では、飽和水素水投与群の方が脱水素水投与群に比較してかえって生存率が低い傾向が認められたが、実験期間中に供給業者の都合によって飽和水素の調製方法を変更したことや比較している個体数が少ないことなどを考慮し、現在、引き続き慎重に検討している。しかし、生後 1 年を

超えて生存している個体は103週齢（生後約2年：平成26年3月31日現在）を最長に寿命の延長が認められている。また、LECラットではヒトのウイルソン病同様、脳神経核に銅が蓄積することによる神経症状として、ケージ交換などによる刺激に反応して痙攣を起こす個体が多数認められるが、飽和水素水投与群では発生率が非常に低い印象を持っている（ビデオカメラによる観察等を行っていないため、定量的なデータは得られていない）。

水素水の発がん予防効果に関しては、検討できる個体数が少ないため予備的実験としてのデータではあるが、71週齢で死亡した脱水素水投与LECラットにおいて肝臓に著名な腫瘍形成が認められたのに対して、71週齢で犠牲死させた飽和水素水投与LECラットでは肝臓における腫瘍形成が著しく抑えられていた、という実験結果を得ることができた。

(3) DMBA投与ラット乳腺腫瘍モデルに対する検討では、飽和水素水投与群では脱水素水投与群と比較して腫瘍の発生数が有意に減少し、飽和水素水によって腫瘍の発生が抑制されることが明らかとなった。しかし発生した腫瘍の大きさに関しては、両群間で明らかな差が認められなかった。

本実験は研究代表者の専門（肝臓の形態学）外のもので、薬剤の調製方法や投与方法など改良すべき点がいくつかあるため、本研究成果を予備的実験結果とし、本実験を今後進めていく予定である。

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23件）

① Kakehashi A, Wei M (9人中7番目), et al. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat:

evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 査読あり, 2013, 273(2), 390-400

doi: 10.1016/j.taap.2013.09.016.

② Wei M (9人中1人目), et al. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 査読あり, 2013, 273(1), 1-9

doi: 10.1016/j.taap.2013.08.022.

③ Kakehashi A, Wei M (4人中3番目), et al. Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers (Basel).* 査読あり, 2013, 5(4), 1332-1354

doi: 10.3390/cancers5041332.

④ 仲谷和記、池田一雄、肝星細胞研究の変遷とその成果、日本医事新報、査読なし、2013、4660号、66-67

http://www.jmedj.co.jp/article/detail.php?article_id=16856

⑤ Wei M (7人中1人目), et al. Lack of hepatocarcinogenicity of combinations of low doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline and diethylnitrosamine in rats: indication for the existence of a threshold for genotoxic carcinogens. *J Toxicol Pathol.* 査読あり, 2012, 25(3), 209-14

doi: 10.1293/tox.25.209.

〔図書〕（計1件）

① 仲谷和記、学際企画、モノグラフ病気の分子形態学、2011、370（内44-47を担当）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲谷 和記 (NAKATANI, Kazuki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：60295699

(2) 研究分担者

魏 民 (WEI, Min)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70336783

(3) 連携研究者

太田 成男 (OHTA, Shigeo)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00125832