

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670073

研究課題名(和文)胆管側膜輸送体による胆汁排泄を介した胆管がん発症分子機構の研究

研究課題名(英文) Investigation of organic solvent-mediated carcinogenic mechanisms of bile duct cancer

研究代表者

高田 龍平 (TAKADA, Tappei)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90376468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：2012年、印刷事業所における塩素系有機溶剤曝露に関連した職業性胆管がんの発症が社会問題となった。ハロゲン化炭化水素への大量曝露が胆管がん発症の原因であると強く疑われているが、これを裏付ける作用機序は見出されていない。本研究は、ハロゲン化炭化水素によるヒト胆管がん発症リスクの評価およびその分子機構の解明を目的として企画された。本研究により、肝臓中で生じた発がん性候補物質が胆管側膜輸送体ABCC2を介して胆汁中へ排出されることが見出された。本成果は塩素系有機溶剤への大量曝露と職業性胆管がんの発症とを結びつける重要な発見であり、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Some young employees who had a long history of exposure to halogenated hydrocarbon solvents, composed mostly of 1,2-dichloropropane, developed occupational cholangiocarcinoma. Although this dihaloalkane has been used in various industrial fields, there has been no biological evidence explaining the cholangiocarcinoma latency, as well as little understanding of general cholangiocarcinoma risk. In the present study, we explored the biliary excretion of 1,2-DCP metabolites by an untargeted metabolomics approach and the related molecular mechanisms with in vitro and in vivo experiments. We found that 1,2-DCP was conjugated with glutathione in the liver, and that the glutathione-conjugated forms of 1,2-DCP, including a potential carcinogen that contains a chloride atom, were excreted into bile by the bile canalicular membrane transporter, ABCC2. Our findings would contribute to uncover the latent mechanism by which the chronic exposure to 1,2-DCP increases cholangiocarcinoma risk.

研究分野：医療系薬学

キーワード：胆汁排泄 トランスポーター 胆管側膜輸送体

## 1. 研究開始当初の背景

2012年、1,2-ジクロロプロパンを主成分とする塩素系有機洗浄剤を大量に使用する印刷工場の従業員が高頻度で胆管がんを発症していることが報告され、ハロゲン化炭化水素への大量曝露がその原因であると強く疑われた。これまでに、マウスへの1,2-ジクロロプロパン投与が肝細胞腺腫・肝細胞がんの発生率を増加させたことが報告されているものの、発がん機構に関する報告はなされておらず、ヒトにおける胆管がん発症を説明するには至っていない(「印刷事業場で発生した胆管がんの業務上外に関する検討会」報告書, 厚生労働省, 2013年3月)。

研究代表者らは、膜輸送体分子による胆汁酸・リン脂質・コレステロール等の胆汁分泌に着目し、生理的な胆汁形成や各種化合物の胆汁排泄に関する研究に取り組んできた(*Molecular Pharmacology*, 2013; *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013; *Biochemical Pharmacology*, 2012; *Hepatology*, 2012; *Gastroenterology*, 2011など)。これらの研究における経験に基づき、肝臓で代謝された1,2-ジクロロプロパンが胆管側膜輸送体を介して胆汁排泄され、胆管内に蓄積する結果、胆管がん発症に至るのではないかと考え、本研究を計画した。

ハロゲン化炭化水素のげっ歯類への継続投与は肝がんの発症を誘導することが知られている。原因物質として、各種グルタチオン抱合体の可能性が示唆されている(*Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002)。胆管がん発症を説明するには至っていない。その大きな理由の一つとして、肝臓と胆管という異なる組織間の物質移動が考慮されていないという点が挙げられる。そこで、本研究においては、胆管側膜輸送体を介した物質

輸送が当該分子機構の重要な因子であるという仮説を立て、特に排泄型輸送体(ATP-binding cassette transporter C2 (ABCC2) / multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) および ABCG2 / breast cancer resistance protein (BCRP)) に着目した解析を行うことにした。(1) 体内に吸収された生体外異物には肝臓において水溶性の高い物質へと代謝された後に胆汁中に排泄されるものが多く知られていることから、胆管がん発症をもたらす胆管上皮の異常は血液中よりも胆汁中からの発がん性物質曝露に強く影響されると考えられたこと、(2) 予備検討において1,2-ジクロロプロパンを投与した実験動物の胆汁中にジクロロプロパン代謝物が見出されていたことなどから、この仮説は妥当性が高いものであると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、肝臓内で生じたハロゲン化炭化水素由来代謝物が胆管側膜輸送体を介して胆汁中へ排出され、胆管側から胆管上皮細胞に作用することで発がん性を示すという仮説に基づき、ハロゲン化炭化水素によるヒト胆管がん発症リスクの評価およびその分子機構の解明を目指して計画された。本研究は、本邦で高い社会的関心を集めた職業がん事例における胆管がん発症機構を、肝臓-胆道における物質動態に着目しながら解明する研究であり、社会的要求が高くも未解決であった課題の科学的解決を目指したものである。

### 3. 研究の方法

#### **(1) ハロゲン化炭化水素 (1,2-ジクロロプロパン) の代謝経路および体内動態に対する網羅的理解**

塩素系有機溶剤の主成分であり、胆管がん発がんとの関連が強く疑われていた 1,2-ジクロロプロパンに着目した研究を進めた。本研究で対象とする胆管がんの発症には「胆汁に排出されやすく、胆管内に蓄積しやすい化合物」が関与している可能性が高い。そこで、ハロゲン化炭化水素を実験動物に投与し、肝臓や胆汁に含まれる各代謝物の同定を行うとともに、胆汁に濃縮される関連代謝物を選別した。回収した胆汁を高速液体クロマトグラフィーで分離した後に、胆汁中に含まれる成分をオービトラップ型質量分析計を用いて網羅的に分析した。得られた結果を用いてメタボローム差異解析を行い、1,2-ジクロロプロパンを投与した個体の胆汁特異的に含まれる成分を同定するとともに、MS/MS 解析を行うことで化学構造を推定し、発がん性候補物質の探索を進めた。

#### **(2) 見出された発がん性候補物質の胆汁排泄を制御する胆管側膜輸送体分子の同定**

(1) で見出された発がん性候補物質を胆汁へ排出する胆管側膜輸送体分子を同定するための実験を行った。肝細胞胆管側膜に局在する排出型輸送体の多くは既知であり、ABCC2/MRP2 もしくは ABCG2/BCRP の寄与が特に想定された。これらの分子が候補物質の胆汁排泄に関与する可能性を検討するために、ABCC2/MRP2 機能欠損ラット (Eisai Hyperbilirubinemia Rat) および ABCG2/BCRP 遺伝子欠損マウスに 1,2-ジクロロプロパンを投与し、各遺伝子の機能欠損が候補物質の胆汁排泄に与える影響を評価した。

#### **(3) 見出された発がん性候補物質の生成に関わる分子機構の探索**

1,2-ジクロロプロパンに由来する発がん性候補物質として見出された塩素含有グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物の生成に関わる分子機構を検討することを目的として、*in vitro* 代謝実験を行った。

### 4. 研究成果

1,2-ジクロロプロパンを投与した個体から回収した胆汁と非投与群から回収した胆汁を用いて網羅的成分分析、メタボローム差異解析を行った。その結果、1,2-ジクロロプロパンがグルタチオンと結合して生じた代謝物と、そこからさらに代謝された物質が複数見出された。また、見出されたジクロロプロパン代謝物の中には、1,2-ジクロロプロパンに由来する塩素が2つともはずれるのではなく、2つの塩素のうち1つが分子内に残存したままのグルタチオン抱合体が含まれており、この代謝物が有力な発がん性候補物質であると考えられた。また、ABCC2/MRP2 機能欠損ラットにおけるグルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物の胆汁排泄は、野生型ラットと比較して顕著に低下していた。一方、ABCG2/BCRP 遺伝子欠損マウスにおけるグルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物の胆汁排泄は野生型マウスと同程度であった。さらに、*in vitro* 輸送実験の結果、グルタチオン抱合ジクロロプロパン代謝物がヒト ABCC2 によって輸送されることが見出された。以上の結果は、見いだされた発がん性候補物質の胆汁排泄の大部分が ABCC2 によるものであることを示すものである。また、*in vitro* 代謝実験の結果、1,2-ジクロロプロパンに対するグルタチオンの抱合反応は、グルタチオン抱合酵素非依存的にも進行することが見出された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)(査読有)

(1) Yu Toyoda, Tappei Takada, Hiroshi Suzuki. Halogenated hydrocarbon solvent-related cholangiocarcinoma risk: biliary excretion of glutathione conjugates of 1,2-dichloropropane evidenced by untargeted metabolomics analysis. *Scientific Reports*. 2016 (in press).

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 豊田優、高田龍平、鈴木洋史. Biliary excretion of glutathione-conjugates of 1,2-dichloropropane: potential influence on the cholangiocarcinoma risk. 第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 熊本 2014年11月15日～16日

(2) 豊田優、高田龍平、鈴木洋史. 有機溶剤成分に起因する胆管癌リスクの検討. 日本薬学会第135年会 神戸 2015年3月25日～28日

(3) Yu Toyoda, Tappei Takada, Hiroshi Suzuki. Biliary excretion of glutathione-conjugates of 1,2-dichloropropane: potential influence on the cholangiocarcinoma risk induced by the exposure to halogenated hydrocarbon solvent. Gordon-Kenan Research Seminar 2015 “Multi-Drug Efflux Systems” Lucca (Italy) 2015年4月25日～26日 (1<sup>st</sup> Place Poster Presentationを受賞)

(4) 豊田優、高田龍平、鈴木洋史. 有機溶剤成分に起因する胆管癌リスク: 胆管側膜輸送体を介したジクロロプロパン代謝物の胆汁排泄. 第10回トランスポーター研究会年会 東京 2015年6月20日～21日

(5) 豊田優、高田龍平、鈴木洋史. Halogenated

hydrocarbon solvent-related cholangiocarcinoma risk: biliary excretion of glutathione conjugates of 1,2-dichloropropane. 第9回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 千葉 2015年11月7日～8日 (優秀発表者賞を受賞)

(6) 豊田優、高田龍平、鈴木洋史. 有機溶剤成分に起因する胆管がんリスクに関するヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討. BMB2015 神戸 2015年12月1日～4日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

自己紹介 (研究室ホームページ内)

[http://plaza.umin.ac.jp/~todayak/t\\_takada.php](http://plaza.umin.ac.jp/~todayak/t_takada.php)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 龍平 (TAKADA, Tappei)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 9 0 3 7 6 4 6 8

(2)研究分担者

豊田 優 (TOYODA, Yu)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号: 8 0 6 5 0 3 4 0

(3)連携研究者

該当なし