

令和元年6月21日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18927

研究課題名(和文) 突然変異誘発過程におけるPP2Aリン酸化の役割とその機序

研究課題名(英文) Role and mechanism of PP2A phosphorylation in mutagenic pathway

研究代表者

石井 雄二 (Ishii, Yuji)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長

研究者番号：70544881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アリルアルコキシベンゼン類のオイゲノール、メチルオイゲノール及びエストラゴールを投与したラット肝臓では、変異原性の有無にかかわらずPP2Aのリン酸化と細胞増殖活性の上昇が認められた。また、DNAマイクロアレイの結果、細胞増殖活性に関連する遺伝子(Myb12及びE2f8)の発現増加が3剤に共通して認められたことから、肝細胞の増殖活性の上昇はアリルアルコキシベンゼン骨格に起因する可能性が示唆された。一方、PP2A阻害剤が突然変異誘発性に及ぼす影響を検討したものの、今回の実験条件下において顕著な影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アリルアルコキシベンゼンは食品等を介してヒトが非意図的に暴露される可能性のある物質であり、その健康影響が懸念されている。本研究で明らかになったPP2Aリン酸化と細胞増殖がエストラール、メチルオイゲノール、オイゲノールの3剤に共通して見られた事実は、これらの変化がこれらの共通骨格に由来する可能性を示すものであり、他のアリルアルコキシベンゼン類の安全性を考えるうえでも有用な知見である。

研究成果の概要(英文)：PP2A phosphorylation at Tyr307 and hepatocyte proliferation were observed in the liver of rats treated with allylalkoxy benzene compounds, eugenol, methyleugenol and estragole, regardless of mutagenicity. In addition, DNA microarray analysis revealed that expression of cell proliferation-related genes, Myb12 and E2f8, was commonly upregulated in those treated rats. Therefore, hepatocyte proliferation might be attributed to allylalkoxy benzene structure. On the other hand, the effects of PP2A inhibitor on mutagenicity in the livers of gpt delta rats treated with estragole were not clearly demonstrated under current experimental condition.

研究分野：衛生学

キーワード：PP2A 変異原性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アリルアルコキシベンゼン類はハーブやスパイスに含まれる香気成分であり、その一部であるエストラゴール (ES)、メチルオイゲノール (MEG)、サフロールはげっ歯類において肝発がん性を有する。我々はこれまでに、これらの物質が代謝された後、活性化体となり DNA と共有結合することで DNA 付加体を形成し、突然変異を誘発することを明らかにしてきた。さらに、エストラゴールの突然変異誘発過程において、肝細胞の増殖活性が重要な役割を担っていることを明らかにし、その原因としてプロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) が寄与していることを見出した。

PP2A は様々なシグナル経路の調節に寄与しているセリン・スレオニンの脱リン酸化酵素であり、細胞周期、増殖、分化等の細胞内プロセッシングに関わる生体内シグナル伝達に重要な役割を果たしている。しかし、近年、乳癌、肺癌、膵臓癌、大腸癌、胃癌といったさまざまなヒトのがん組織において、PP2A の内因性インヒビターである Cancerous Inhibitor of PP2A (CIP2A)、SET または PME-1 が高率に過剰発現していることが明らかにされた。これら内因性インヒビターが過剰発現した組織では、PP2A の阻害により Akt 及び ERK といった MAP kinase が活性化しており、PP2A の阻害が腫瘍細胞の増殖、形質転換、浸潤の原因であることが明らかにされている。それ故、PP2A は腫瘍抑制因子の一つと考えられており、現在、PP2A 又は内因性 PP2A インヒビターをターゲットとした新たな癌治療の開発が注目を集めている。

一方、我々は、発がん用量 (300 mg/kg) の ES を *gpt delta* ラットに 4 週間投与すると、肝臓における DNA 付加体形成に加えて細胞増殖活性が顕著に増加していることを明らかにした。さらに、同動物では MEK/ERK 経路の活性化と PP2A のリン酸化 (不活性化) が生じられたことから、PP2A の不活性化により細胞増殖シグナルの抑制が破綻したことが細胞増殖活性亢進の原因であることを突き止めた⁵⁾。このことから、PP2A はイニシエーション期においては変異抑制因子としての役割を有しており、ES を含むある種の化学発がん物質は、DNA 損傷に加えて PP2A を不活性化することで突然変異を誘発すると考えられるが、その機序と役割の詳細は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究ではイニシエーション期に生じる PP2A のリン酸化機序とその役割を明らかにすることを目的として、【実験 1】では、アリルアルコキシベンゼン類の中から、ラット肝発がん性を有する ES と MEG、非発がん性のオイゲノール (EG) を投与したラット肝臓を用いて、PP2A リン酸化と細胞増殖活性について化学構造、遺伝毒性との関連を検討した (図 1)。また、DNA マイクロアレイ法により PP2A リン酸化と共通して認められるシグナル経路の探索を試みた。【実験 2】では、PP2A 阻害剤として知られるマイクロシスチン (MC)

と ES を *gpt delta* ラットに併用投与し、PP2A 不活性化により生じた細胞増殖が ES の突然変異誘発性に及ぼす影響を検索し、変異誘発過程における PP2A 不活性化の影響を検討した。

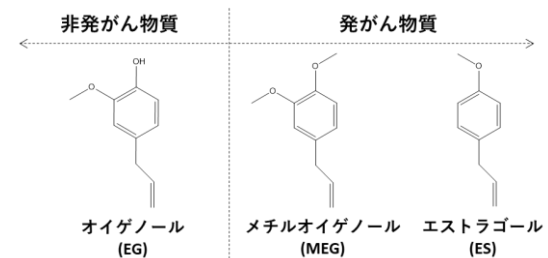


図 1 アリルアルコキシベンゼン類

3. 研究の方法

3-1. 【実験 1】PP2A リン酸化と構造活性相関の検討

3-1-1. 材料及び試薬

EG、MEG 及び ES をそれぞれ 300、100 及び 300 mg/kg/day の用量で 28 日間強制経口投与した *gpt delta* ラットの肝臓の病理組織標本及び凍結組織を解析に供した。

3-1-2. PP2A タンパクのリン酸化状態の解析

ウエスタンブロッティング法によるリン酸化 PP2A (Tyr307) の検出では、肝臓 100 mg を RIPA buffer 1 ml でホモジネート後、10,000 rpm、20 分、4°C で遠心分離し、上清のタンパク濃度を BCA protein assay により算出した。10 mg/ml に調整したサイトゾル画分は Bio Rad 社製ミニプロティアン TGX ゲルを用いて電気泳動後、MILLIPORE 社製イモビロン-P メンブレンにブロッティングし、一次抗体として Santa Cruz Biotechnology 社製抗 p-PP2A C 抗体を用い、4°C で終夜インキュベートした。二次抗体には Cell Signaling Technology 社製抗 Rabbit IgG 又は抗 Mouse IgG 抗体を用いて室温で 1 時間インキュベート後、GE healthcare 社製 ECL Prime Western Blotting Detection System を用いて、Bio Rad 社製 ChemDoc™ XRS+ システムにより検出した。

3-1-3. 細胞増殖活性の評価

PCNA の免疫組織化学染色は、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋された肝組織標本を用いて切片を作成した。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンの後、3% H₂O₂ にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1 次抗体として DAKO 社製抗 PCNA マウスモノクローナル抗体をそれぞれ用い、4°C で終夜インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄の後、2 次抗体としてニチレイバイオサイエン社製ヒストファイン シンプルステイン (マウス第一抗体用) にて 30 分間インキュベートした。発色には diaminobenzidine を用いた。

遺伝子発現解析では、ニッポンジーン社製 Isogen® を用いて RNA の単離を行い、アガロースゲル電気泳動による確認と、吸光度測定による濃度の算出を行った。得られた RNA は

0.02 ng/ μ L に調整した後、Thermo Fisher Scientific 社製 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[®]を用いた逆転写反応により cDNA 合成を行った。リアルタイム RT-PCR は TaqMan[®] Gene Expression Assay (Thermo Fisher scientific 社製) を用いて、7900HT Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific 社製) により解析を行った。遺伝子発現は *Ccna2* (Rn01493715_m1)、*Ccnb1* (Rn01494177_m1)、及び *Ccne1* (Rn01457762_m1) について検索した。

3-1-4. cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

RNA

単離したトータル RNA を Agilent Technologies 社製 Quick Amp Labeling Kit を用いて Cyanine-3 でラベル化し、RNA 濃度、色素の取り込み量及び品質は UV-Vis 吸光度計及び Agilent 2100 バイオアナライザーを用いて測定した。蛍光ラベル化 cRNA を Agilent 4x44K whole mouse genome microarray gene expression chips にハイブリダイゼーションした後、Agilent 社製 Microarray Scanner (Model G2565BA) でスキャンした。得られたデータは Agilent Technologies 社製 Feature Extraction ソフトウェアを用いてイメージ解析とデータ抽出を行い、発現遺伝子データの正規化、発現レベルのフィルタリングには Agilent Technologies 社製 Gene Spring ソフトウェアを用いた。

(統計学的処理方法)

PCNA 陽性細胞率、遺伝子発現レベルの統計学的処理は、Tukey の多重範囲検定により各群の有意差を解析した。

3-2. 【実験 2】PP2A 阻害剤が突然変異誘発性に及ぼす影響

3-2-1. 材料及び試薬

ES は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。マイクロシスチン (MC) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。

3-2-2. 動物実験操作

MC の投与量を設定するため、予備試験を実施した。雄性 5 週令の F344 系ラット 12 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、実験に供した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。F344 ラット 12 匹を各群 3 匹に配し、MC を 50、75 又は 100 mg/kg/day の用量で週 3 回、2 週間腹腔内投与した。対照群には被験物質の溶媒として生理食塩水を投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重の

測定は週 1 回行った。2 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓について肉眼的に観察後摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を施し、病理組織学的検索を行った。

本試験では、雄性 5 週令の F344 系 *gpt delta* ラット 30 匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、対照群 (Control)、低用量の ES 投与群 (LD-ES)、高用量の ES 投与群 (HD-ES)、MC 投与群 (MC)、低用量の ES と MC の併用投与群 (MC+LD-ES) 及び高用量の ES と MC の併用投与群 (MC+HD-ES) の計 6 群に配した。ES はコーン油に溶解し、4 週間強制経口投与し、MC は生理食塩水に溶解し週 3 回、4 週間腹腔内投与した。なお、Control 群にはそれぞれの溶媒であるコーン油と生理食塩水を投与した。投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓について肉眼的に観察後摘出し、一部を 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。また、一部は液体窒素にて凍結した後、 -80°C で保存し、変異原性の検索に供した。

3-2-3. 細胞増殖活性の評価

Ki67 の免疫組織化学染色は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋された肝臓組織標本を用いて切片を作成した。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンの後、 $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1 次抗体として Abcam 社製抗 Ki67 ラビットモノクローナル抗体をそれぞれ用い、 4°C で終夜インキュベートした。Phosphate-buffered saline にて洗浄の後、2 次抗体としてニチレイバイオサイエン社製ヒストファイン シンプルステイン (ウサギ第一抗体用) にて 30 分間インキュベートした。発色には diaminobenzidine を用いた。

3-2-3. *gpt* assay による変異原性の検索

gpt assay では回収したファージ粒子を大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離した。単離したコロニーについては、再度、6-TG と Cm を含むプレートにストリークして生育することを確認した。また、ファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数 (あるいは回収した総トランスジーン数) を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* 変異体頻度 (MF) を算出した。

(統計学的処理方法)

gpt MF の統計学的処理は、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は

Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合は Dunnet の多重比較検定により各群の有意差を解析した。また、MC 併用投与の影響は Tukey の多重範囲検定により ES 単独投与群との有意差を解析した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組み換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

4. 研究成果

4-1. 【実験 1】PP2A リン酸化と構造活性相関の検討

ウェスタンブロット法によるタンパク質発現解析の結果、PP2A のリン酸化タンパクの発現は全ての投与群で上昇した (図 2)。

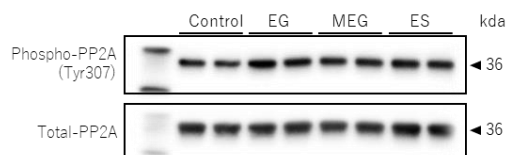


図 2 リン酸化 PP2A タンパクの検出

細胞増殖関連因子を検索した結果、PCNA 陽性細胞数は全ての投与群で対照群に比して有意 ($p < 0.01$) に上昇した。一方、Cyclin A2、B1 及び E1 をコードする遺伝子 *Ccna2*、*Ccnb1* 及び *Ccne1* の発現は ES 投与群で有意 ($p < 0.01$) に上昇したものの、EG 及び MEG 投与群において顕著な変化は認められなかった (図 3)。以上より、ES に加えて MEG 及び EG は遺伝毒性及び発がん性の有無にかかわらず、弱いながらも PP2A リン酸化を介した細胞増殖増強作用を有することが示唆された。

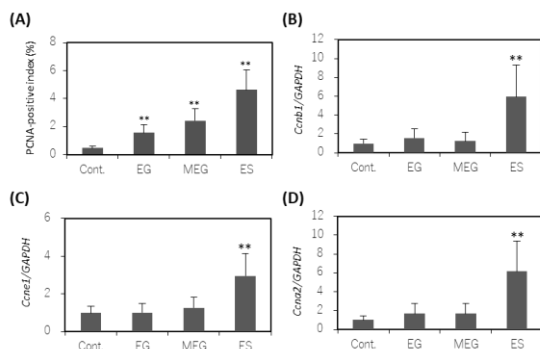


図 3 細胞増殖活性関連因子の発現解析 (A) PCNA 陽性細胞率と (B) *Ccnb1*、(C) *Ccne1* 及び (D) *Ccna2* の遺伝子発現レベル

DNA マイクロアレイ解析の結果、対照群に比して 2 倍以上の変動を示した遺伝子のうち、ES と MEG で共通して発現上昇した遺伝子は

134 個、発現低下した遺伝子は 74 個、ES と EG で共通して発現上昇した遺伝子は 30 個、発現低下した遺伝子は 20 個、MEG と EG で共通して発現上昇した遺伝子は 5 個、発現低下した遺伝子は 2 個、ES、MEG 及び EG で共通して発現上昇した遺伝子は 39 個、発現低下した遺伝子は 32 個であった (図 4)。

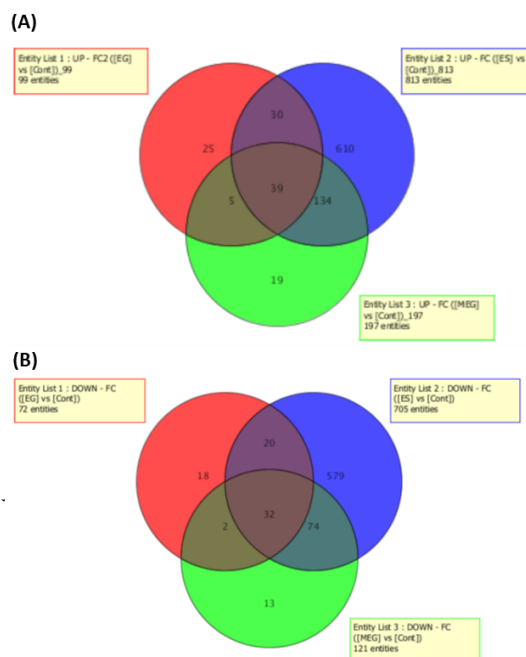


図 4 EG、MEG 及び ES で発現上昇がみられた遺伝子 (A) と発現減少がみられた遺伝子 (B)

ES、MEG 及び EG で共通して変動した 71 個の遺伝子のうち、細胞周期に関連する遺伝子として *Myb12* 及び *E2f8* の発現上昇が認められた。*Myb12* によってコードされる Myb-related protein B (MYBL2) は細胞周期の進行に必要な核タンパク質で、細胞周期の S 期において cyclin A/cyclin-dependent kinase 2 によってリン酸化を受け、細胞周期の活性化と抑制の両方に働く。*E2f8* によってコードされる E2F transcription factor 8 (E2F8) は細胞周期の進行に必要な遺伝子の転写調節因子で、G1 から S 期への進行の調節に寄与する。これらはいずれも PP2A リン酸化の結果、発現が上昇した遺伝子と考えられた。一方、PP2A のリン酸化に寄与する遺伝子の発現変動については明らかにはならなかった。

4-2. 【実験 2】PP2A 阻害剤が突然変異誘発性に及ぼす影響

MC の用量設定試験の結果、50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群から Ki67 陽性細胞数の増加が認められたことから、50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を至適濃度とした。

本試験における肝臓の HE 染色を図 5 に示す。LD-ES 群において変化は認められなかったものの、HD-ES 群では有糸分裂像が散見された。一方、MC 群では小用中心性に肝細胞のアポトーシス、有糸分裂像及び空胞変性と軽度の線維化が認められ、同様の変化 LD-ES+MC 群及び HD-ES+MC 群でも見られた。

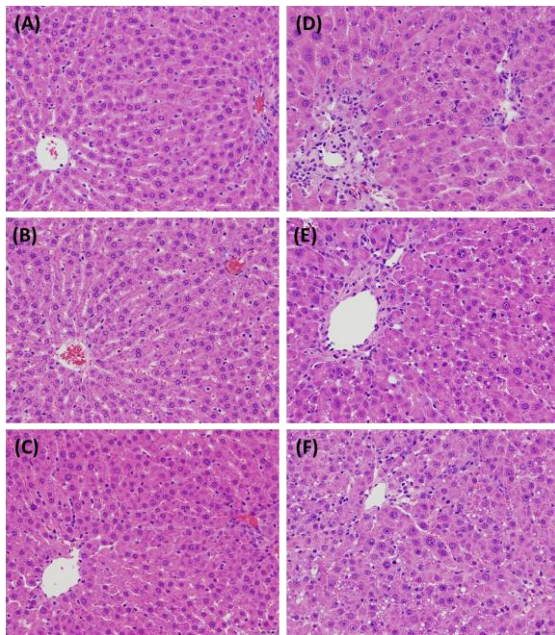


図5 HE染色 (A) Control群、(B) LD-ES群 (C) HD-ES群、(D) MC群、(E) LD-ES+MC群、(F) HD-ES群

Ki67の免疫組織化学染色の結果、HD-ES群では陽性相細胞の増加傾向が見られ、MC群、LD-ES+MC群及びHD-ES+MC群では明らかな増加が認められた(図6)。

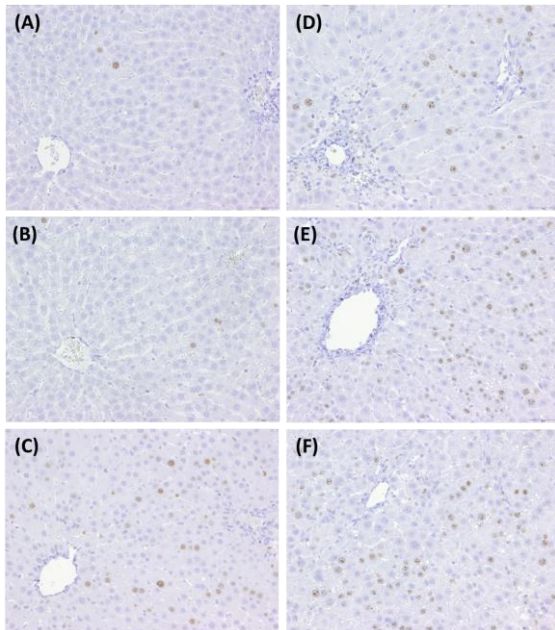


図6 免疫組織化学染色によるKi67の検出 (A) Control群、(B) LD-ES群 (C) HD-ES群、(D) MC群、(E) LD-ES+MC群、(F) HD-ES群

gpt assayによる変異原性の検索の結果、肝臓におけるMFsはHD-ES群においてControl群に比して有意($p < 0.05$)な高値を示した。一方、MCの併用投与によるMFsの変化は認められず、本実験条件下においてPP2Aの阻害が突然変異誘発性に及ぼす影響は明らかにならなかった(図7)。また、MC単独投与群では有意な差はみられなかったものの、対照群に比して2倍以上の上昇傾向が認められた。本結果はMCが弱いながらも突然

変異誘発性を有する可能性を示すものと考えられた。

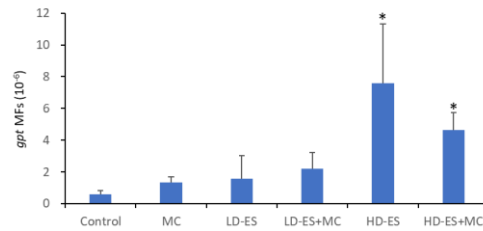


図7 *gpt* assayによる肝臓における突然変異頻度の検出

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[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:

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:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名: