

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06347・19K21430

研究課題名（和文）芳香族アミン取扱い化学工場で発生した職業性膀胱がんの発がん要因の究明

研究課題名（英文）Investigation of carcinogenic factors of occupational bladder cancer occurred at a chemical factory handling aromatic amines

研究代表者

行松 直 (Yukimatsu, Nao)

大阪市立大学・大学院医学研究科・医員

研究者番号：50823572

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、芳香族アミンacetoaceto-o-toluidide (AAOT) の膀胱発がん性、及びそのメカニズムを評価することを目的とした。その結果、AAOTが他の芳香族アミンと同様に膀胱発がん物質であることが初めて明らかとなった。AAOTの膀胱発がん性にはJUNとその下流標的遺伝子の発現亢進が関与しており、AAOTから代謝される既知の膀胱発がん物質であるo-toluidine (OTD) がAAOTの最終的な膀胱発がん物質であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

芳香族アミンによる職業性膀胱発がんはよく知られているが、acetoaceto-o-toluidide (AAOT) の膀胱発がん性についてはほとんど知られていない。本研究では、AAOTが他の芳香族アミンと同様に膀胱発がん物質であることを初めて明らかにした。AAOTの膀胱発がん性及びメカニズムを公開したことは、社会的意義が高く、芳香族アミンによる膀胱発がんの知見を深めることに貢献したと考える。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we aimed to evaluate the effects of aromatic amine acetoaceto-o-toluidide (AAOT) on urinary bladder carcinogenesis and the mechanisms of AAOT-mediated carcinogenicity. The results of the present studies demonstrate that AAOT, like other carcinogenic aromatic amines, is carcinogenic to the urinary bladder. Overexpressed of JUN and its downstream target genes involve the bladder carcinogenicity of AAOT, and o-toluidine (OTD), a known bladder carcinogen metabolized from AAOT, is the ultimate bladder carcinogen of AAOT.

研究分野：膀胱発がん

キーワード：芳香族アミン 膀胱発がん 職業性膀胱がん AAOT OTD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膀胱がんは、世界で9番目に有病率が高いがん種であり、世界で年間約15万人が膀胱がんを原因として死亡していると推定されている。芳香族アミンによる職業性膀胱がんはよく知られているが、その詳細な発生メカニズムについてはまだ十分に明らかとなっていない。近年、既知の膀胱がん物質である *o*-toluidine (OTD) を使用して acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) を製造する日本の化学工場に従事する複数の従業員が膀胱がんを発症した。OTD と類似構造を持つ芳香族アミンである AAOT による膀胱がんの可能性も否定できないが、AAOT の膀胱がん性についてはほとんど知られていない。

2. 研究の目的

これまでに我々は、短期毒性試験にて AAOT がラットの膀胱に対して、細胞増殖能の亢進、DNA 損傷を引き起こすことを明らかにしてきた。今回、AAOT の膀胱がん性、及びそのメカニズムを評価することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1. 6週齢の雄雌 F344 ラット 162 匹 (雄 81 匹、雌 81 匹) を雄雌それぞれ 4 群ずつ、計 8 群に群分けした。既知の膀胱がん物質である N-butyl-(-4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) を 4 週間飲水投与し、1 週間の休薬期間の後、AAOT を 0、0.167、0.5、1.5%濃度で 31 週間混餌投与した。BBN 投与開始後、36 週時に採尿を施行し尿中の AAOT、*o*-toluidine (OTD) 及び OTD 代謝物の濃度を測定した。BBN 投与開始後 36 週時に解剖を施行し、膀胱がんの発生頻度、発生数の比較を行った。

実験 2. 6週齢の雄 F344 ラット 18 匹を 3 群ずつに群分けした。AAOT を 0、0.167、1.5%の濃度で 4 週間単独で混餌投与し、解剖を施行した。ラットの膀胱上皮を採取し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を使用してマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析で得られた、1.5%投与群における発現変動遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems) を用いてパスウェイ解析を行った。そこで得られたネットワークに関わる 9 つの遺伝子の発現をリアルタイム定量的 PCR にて評価した。また、解剖時に採取しホルマリン固定を行ったラット膀胱組織に対して JUN、PTGS2 の免疫染色を行った。

4. 研究成果

実験 1. 解剖時の膀胱肉眼像では、雄雌ともに AAOT 投与群では用量に相関して結節性病変や腫瘤性病変の数、腫瘤径が増加していた (図 1)。病理組織学的に検討し、PN hyperplasia、papilloma、urothelial carcinoma 及び papilloma と urothelial carcinoma を合わせた total tumor として分類した。雄雌ともに 0.5%以上の AAOT 投与群で urothelial carcinoma の発生率が有意に増加しており、雄の 0.5%以上投与群と雌の 1.5%投与群で total tumor の発生率が有意に増加していた。また、雄の 1.5%投与群と雌の 0.5%以上の投与群で urothelial carcinoma と total tumor の発生数が有意に増加していた (表 1)。

36 週時のラット尿中 AAOT、OTD 及び OTD 代謝物の濃度を表 2 に示す。AAOT 投与群では、OTD が AAOT、OTD 代謝物よりも著明に高濃度で検出された。AAOT 投与群では、濃度依存性に AAOT、OTD 及び OTD 代謝物いずれも濃度上昇が認められた。

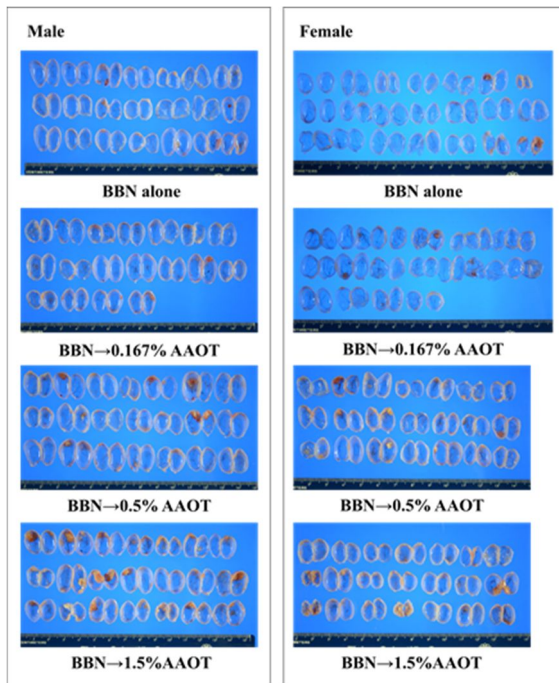


図1 解剖時の膀胱肉眼像 (実験1)

表1 膀胱腫瘍の発生率、発生数 (実験1)

| Group | AAOT (%) | No. of rats | Incidence(%) | | | Multiplicity | | | | |
|---------------|----------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------|-------------|-----------------------|--------------|
| | | | PN hyperplasia | Papillomas | Urothelial carcinomas | Total tumors | PN hyperplasia | Papillomas | Urothelial carcinomas | Total tumors |
| Male | | | | | | | | | | |
| G1 | 0 | 21 | 14(66.7%) | 8(38.1%) | 3(14.3%) | 10(47.6%) | 1.1 ± 1.1 | 0.5 ± 0.7 | 0.1 ± 0.4 | 0.6 ± 0.7 |
| G2 | 0.17 | 18 | 17(94.4%) ^a | 11(61.1%) | 4(22.2%) | 13(72.2%) | 2.7 ± 1.7* | 0.7 ± 0.8 | 0.2 ± 0.4 | 0.9 ± 0.8 |
| G3 | 0.5 | 21 | 21(100%) ^a | 14(66.7%) | 10(47.6%) ^a | 18(85.7%) ^a | 3.0 ± 1.6** | 0.8 ± 0.7 | 0.6 ± 0.8 | 1.4 ± 1.0 |
| G4 | 1.5 | 21 | 21(100%) ^a | 20(95.2%) ^a | 18(85.7%) ^a | 21(100%) ^a | 5.4 ± 3.0** | 2.0 ± 1.2** | 1.2 ± 0.9** | 3.2 ± 1.6** |
| Female | | | | | | | | | | |
| G5 | 0 | 21 | 16(76.2%) | 5(23.8%) | 3(14.3%) | 7(33.3%) | 1.2 ± 0.9 | 0.2 ± 0.4 | 0.1 ± 0.4 | 0.4 ± 0.6 |
| G6 | 0.17 | 18 | 16(88.9%) | 8(44.4%) | 5(27.8%) | 11(61.1%) | 2.3 ± 2.1 | 0.4 ± 0.5 | 0.3 ± 0.5 | 0.7 ± 0.7 |
| G7 | 0.5 | 21 | 21(100%) ^a | 8(38.1%) | 10(47.6%) ^a | 14(66.7%) | 3.5 ± 2.0** | 0.5 ± 0.7 | 0.5 ± 0.6* | 1.0 ± 1.0* |
| G8 | 1.5 | 21 | 21(100%) ^a | 11(52.4%) | 11(52.4%) ^a | 17(81.0%) ^a | 4.7 ± 3.0** | 0.9 ± 1.0 | 0.5 ± 0.8* | 1.4 ± 1.1** |

表2 尿中代謝物濃度 (実験1)

| Group | AAOT (%) | No. of rats | Urinary metabolites (µM) | | | |
|---------------|----------|-------------|--------------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| | | | AAOT ^a | OTD ^b | NAOTD ^c | 4AMC ^d |
| Male | | | | | | |
| G1 | 0 | 3 | 0.1 ± 0.1 | 0.5 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| G2 | 0.167 | 3 | 2.7 ± 0.3 | 69.6 ± 38.3 | 9.0 ± 2.0 | 1.2 ± 0.2 |
| G3 | 0.5 | 3 | 12.4 ± 5.1 | 392.7 ± 101.0 | 28.7 ± 7.5 | 18.1 ± 13.2 |
| G4 | 1.5 | 3 | 57.6 ± 37.7 | 3749.6 ± 580.0 | 44.9 ± 8.6 | 163.7 ± 65.8 |
| Female | | | | | | |
| G5 | 0 | 5 | 0.0 ± 0.0 | 0.4 ± 0.2 | 0.0 ± 0.0 | 0.4 ± 0.1 |
| G6 | 0.167 | 3 | 1.6 ± 0.3 | 17.0 ± 13.9 | 4.0 ± 1.9 | 0.9 ± 1.6 |
| G7 | 0.5 | 3 | 4.5 ± 1.1 | 106.8 ± 22.4 | 26.5 ± 6.0 | 13.5 ± 11.7 |
| G8 | 1.5 | 5 | 24.6 ± 19.4 | 1191.1 ± 674.0 | 39.1 ± 15.5 | 78.9 ± 45.8 |

^a acetoacetyl-toluidide
^b toluidide
^c N-acetyl-toluidide
^d 4-aminocresol

実験2. ラットの膀胱上皮から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、対照群と比較し発がん用量である 1.5% 投与群で、94 個の発現変動遺伝子が認められた。そのうち 65 個は発現亢進しており、29 個は低発現であった。これらの 94 個の発現変動遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis を用いて解析を行った結果「腫瘍の増生」に関するネットワークが検出された (図2)。このネットワークは、JUN、PTGS2 (COX2) を上流調節因子とし、9 つの発現亢進された遺伝子により形成されていた。

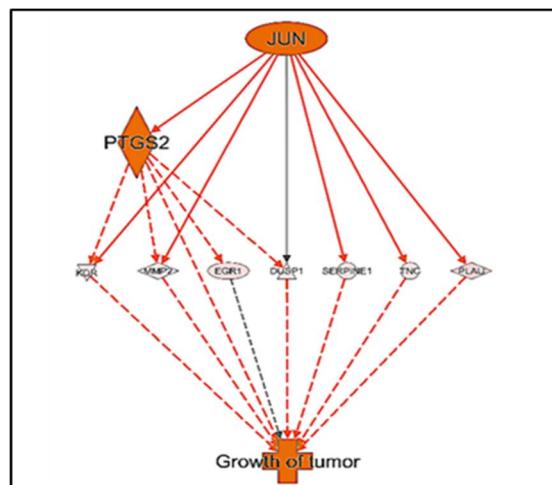


図2 「腫瘍の増生」に関するネットワーク (実験2)

ラット膀胱上皮から抽出した RNA を用いてリアルタイム定量的 PCR を施行した結果、上流調節因子である、JUN、PTGS2 および、PLAU、DUSP1、SERPINE1 の mRNA 発現は 1.5% 投与群で有意に亢進していた。また、「腫瘍の増生」に関する 9 つ全ての遺伝子の mRNA が AAOT 投与量に相関して発現亢進していた (図3)。ラット膀胱粘膜組織の JUN、PTGS2 免疫染色の結果、膀胱上皮細胞の JUN 陽性率は、1.5% 投与群で有意に上昇していた (図4)。PTGS2 は、1.5% 投与群の単純過形成を来した膀胱上皮の基底層の細胞質で染色され、対照群及び 1.5% 投与群の正常な膀胱上皮細胞では染色されなかった (図4)。

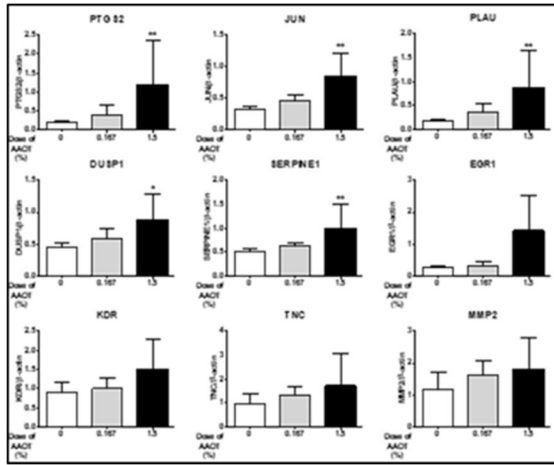


図3 ラット膀胱上皮における mRNA 発現 (実験 2)

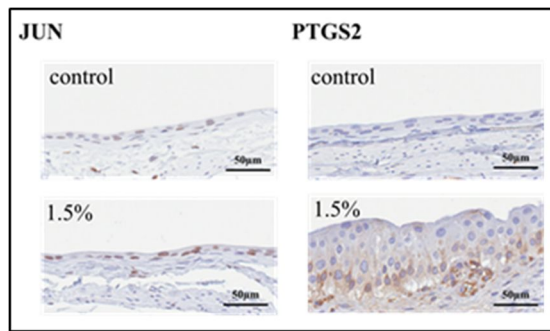


図4 ラット膀胱上皮における JUN,PTGS2 免疫染色像 (実験 2)

以上の結果より、AAOT が他の芳香族アミンと同様に膀胱発がん物質であることが明らかとなった。AAOT の膀胱発がん性には JUN とその下流標的遺伝子の発現亢進が関与しており、AAOT から代謝される OTD が AAOT の最終的な膀胱発がん物質であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nao Yukimatsu, Min Gi, Takahiro Okuno, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Yukie Yanagiba, Megumi Suda, Shigeaki Koda, Tatsuya Nakatani, Hideki Wanibuchi | 4. 巻 93(12) |
| 2. 論文標題 Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Archives of Toxicology | 6. 最初と最後の頁 3617 3631 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-019-02605-4. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takahiro Okuno, Min Gi, Masaki Fujioka, Nao Yukimatsu, Anna Kakehashi, Akito Takeuchi, Ginji Endo, Yoko Endo, Hideki Wanibuchi | 4. 巻 169(2) |
| 2. 論文標題 Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Toxicological Sciences | 6. 最初と最後の頁 456 464 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfz051 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 行松 直、魏 民、梯アンナ、鈴木周五、 鱈淵英機. |
| 2. 発表標題 ラットにおけるBBN誘発膀胱発がんに対するo-Acetoacetotoluidideの促進効果. |
| 3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 行松 直、奥野高裕、魏 民、梯アンナ、 鱈淵英機. |
| 2. 発表標題 Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on BBN-induced bladder carcinogenesis in rats. |
| 3. 学会等名 第78 回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 行松 直、奥野高裕、魏 民、藤岡正喜、 梯アンナ、 鰐淵英機. |
| 2. 発表標題 o-Acetoacetotoluidideによる膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討. |
| 3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥野高裕、行松 直、魏 民、藤岡正喜、 梯アンナ、 鰐淵英機. |
| 2. 発表標題 職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析. |
| 3. 学会等名 第18回分子予防環境医学研究会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |