

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890217
 研究課題名（和文） 多環芳香族化合物類による発ガンプロモーションに関する
 プロテオミクス研究
 研究課題名（英文） Proteomics Research about tumor promotion activity of polycyclic
 aromatic compounds
 研究代表者
 三崎 健太郎（MISAKI KENTARO）
 順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員
 研究者番号：40468591

研究成果の概要（和文）：

20 種の多環芳香族化合物のうち、ベンゾ[*k*]フルオランテン (B[*k*]FA)、ベンゾ[*b*]フルオランテン (B[*b*]FA)、ベンゾピレノン (BPO) が特に高い腫瘍プロモーション活性を示すことを始めて見出し、B[*b*]FA、B[*k*]FA には AhR 活性や活性酸素種 (ROS) が、BPO では ROS の寄与が示唆された。B[*k*]FA のマイクロアレイ解析で AhR を介する遺伝子の増加や複数の遺伝子の増減が顕著に見られた。プロテオミクス解析によるプロモーション活性に関わるタンパク質の同定、シグナル機構の解明を進めたい。

研究成果の概要（英文）：

Benzo[*k*]fluoranthene (B[*k*]FA), benzo[*b*]fluoranthene (B[*b*]FA) and benzopyrene (BPO) showed significantly high promoting activity among 20 polycyclic aromatic compounds. It is suggested that AhR and reactive oxygen species (ROS) contribute to this activity for B[*b*]FA and B[*k*]FA, and ROS for BPO. In microarray analysis for B[*k*]FA, the increase of AhR-related mRNA and the change of several mRNAs were found. It is scheduled to identify proteins associated with promotion activity and elucidate the activity mechanism for these compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：発ガンプロモーション活性、多環芳香族化合物類、プロテオミクス、シグナル伝達、遺伝子、環境、衛生

1. 研究開始当初の背景

(1) 昨今日本のガン患者における肺ガンの割合が増加し、ディーゼル排気ガス中の粒子状物質などの環境因子との関連が指摘され、ベンゾ[*a*]ピレン (B[*a*]P) などの多環芳香族

化合物類の寄与が強く指摘されている。また膀胱ガン発症とディーゼル排気ガス暴露との関連も疫学的に指摘されており、多環芳香族化合物の寄与が予想される。大都市圏では排出規制などにより SPM 発生が低減されてき

ているが、大陸からの黄砂に含まれる内燃機
関由来 SPM の寄与も懸念され始めている。

(2) 多環芳香族炭化水素 (PAHs) や含酸素
PAHs (oxy-PAHs)、nitro-PAHs のプロモーション
過程における誘導遺伝子やタンパク質、
その発現機構の詳細に関する研究は少ない。
また、B[a]P や 3-メチルコランテン (3-MC)
はイニシエーション活性を示すがプロモーション
活性は見られず、ベンゾ[e]ピレン
(B[e]P) や 1-ニトロピレン (1-NPy) ではそ
の逆である、といったプロモーション活性の
物質特異性が報告されている (S. Asada et al.
Mutat. Res. **588**, 7-21, 2005)。このプロモ
ーション活性の物質特異性が、化合物の構造
やレセプター結合活性、あるいは何らかのシ
グナル伝達経路に由来するものかどうかは
不明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではマウスの胚線維芽細胞
(BALB/c 3T3 由来) を用いて、様々な PAHs
や oxy-PAHs、nitro-PAHs の中でプロモーション
活性の高い化合物を見出す。

(2) 得られた顕著なプロモーション活性を
示す化合物に対して、多環芳香族炭化水素レ
セプター (AhR) 活性や ROS 生成との関連性
があるのかどうかを調べる。

(3) 特に顕著なプロモーション活性を示す
化合物に対して、物質特異的な発ガンプロモ
ーション過程に関わる遺伝子やタンパク質
の同定、その誘導機構解明を目指す。接着や
細胞増殖など多くの遺伝子やタンパク質は
マウスとヒトの間で保存されているため、さら
にヒト肺細胞や膀胱細胞における役割
を見出すことを目指す。

3. 研究の方法

(1) プロモーション作用をもつ多環芳香族
化合物の探索

入手可能なマウス胚線維芽細胞 (Bhas42 細胞、
BALB/3T3 に H-ras を組み込んだ細胞) を用いて
(S. Asada et al. *Mutat. Res.* **588**,
7-21, 2005)、ディーゼル排気ガス中に多く
存在することが知られている PAHs や
oxy-PAHs、nitro-PAHs に対しプロモーション
活性試験 (計 21 日間のアッセイ) を行い、
活性の高い化合物を探索した。これらの化合
物に対して MTS assay を用いた細胞毒性試験
(計 7 日間のアッセイ) も行った。

PAHs は B[a]P、B[e]P、クリセン (Chr)、
ベンゾ[b]フルオランテン (B[b]FA)、ベンゾ
[k]フルオランテン (B[k]FA)、ジベンゾ[a, I]
ピレン (DB[a, I]P) の 6 種、oxy-PAHs は 1, 2-
ナフトキノン (NphQ)、フェナントレンキノ
ン (PhQ)、7, 12-ベンゾ[a]アントラセンキノ
ン (BAQ)、5, 12-ナフタセンキノ
ン (NCQ)、ベンゾ[a]フルオレノン (B[a]FO)、ベンゾ[b]

フルオレノン (B[b]FO)、ベンゾピレノン
(BPO) の 7 種、nitro-PAHs は 1-NPy、1, 6-
ジニトロピレン (1, 6-DNPy)、1, 8-ジニトロ
ピレン (1, 8-DNPy)、3-ニトロフルオランテ
ン (3-NFA)、8-ニトロフルオランテン (8-NFA)、
6-ニトロクリセン (6-NChr)、3-ニトベンズ
アントロン (3-NBAO) の 7 種を調べた。

(2) 遺伝子発現とプロモーション活性との
関連性に対する考察

今回見出されたプロモーション活性の高
い化合物のうち、2 種の PAHs (B[b]FA、B[k]FA)
と 3 種の oxy-PAHs (NphQ、B[b]FO、BPO)、比
較のために B[a]P と TPA を Bhas42 細胞に 24
時間曝露した際に誘導される mRNA をリアル
タイム PCR によって測定した。mRNA は、AhR
活性との関連が高い CYP1A1 と抗酸化応答と
の関連が高い HO-1 について調べた。

また B[k]FA に対するプロモーション活性
試験の際に、抗酸化剤 (N-アセチルシステイ
ン (N-AC))、CYP 阻害剤 (SKF-525A) を同時
曝露してその影響を調べた。

(3) プロモーション活性化合物による誘導
遺伝子の網羅的解析

プロモーション活性の高かった B[k]FA を
Bhas42 細胞に 24 時間曝露した際に誘導され
る mRNA のマイクロアレイ解析を行った。本
研究ではプロテオミクス解析を行うことを
予定していたが、より多くの遺伝子の検出が
可能であるマイクロアレイ解析を進めた。

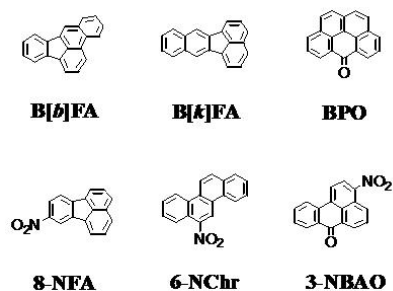
4. 研究成果

(1) プロモーション作用をもつ多環芳香族
化合物の探索

Bhas42 細胞を用いて 20 種の多環芳香族化
合物のプロモーション活性を測定したところ、
B[k]FA や B[b]FA、BPO が特に高い活性を、
6-NChr、3-NBAO、8-NFA などが高い活性を示
すことを見出した (図 1)。他にも 1, 6-DNPy、
1, 8-DNPy、3-NFA、B[b]FO、NphQ、B[a]FO、
BAQ、NCQ も活性を示すことが新たに見出され
た。DB[a, I]P や PhQ は活性を示さず、B[a]P
では活性がはっきりと認められなかった。これ
らの化合物のプロモーション活性を測定
した濃度には、高い細胞毒性が認められた
ため、活性が示されなかったり、はっきりと
認められないのは、細胞毒性や、p21 などの
細胞増殖阻害作用によることが予想される。

今回、新たにかなりプロモーション活性の
高い化合物が見つかったことで、ディーゼル
排気微粒子や大気浮遊粒子の中には、遺伝子
損傷性 (イニシエーション活性) によりこれ
らの発ガン性に寄与するもの (B[a]P) のほ
かに、遺伝子発現によりプロモーション過程
に関与する化合物が多く含まれている可能
性が示唆された。

図1 高プロモーション活性が認められた多環芳香族化合物類



(2) 遺伝子発現とプロモーション活性との関連性に対する考察

Bhas 細胞への曝露 24 時間後の CYP1A1 の mRNA に対しては、100 ng/ml の B[a]P、B[b]FA、B[k]FA では特に強い誘導（それぞれ control の 30 倍前後）が、100 ng/ml の NphQ、200 ng/ml の B[b]FO では強い誘導（それぞれ control の 5 倍前後）が認められ、この胚線維芽細胞においても、成体マウスやヒトの肝臓ガン細胞、肺細胞、膀胱ガン細胞などと同様に AhR が活性化されることが見出された。HO-1 の mRNA 誘導は、B[a]P、B[b]FA、B[k]FA、BPO で認められ、これらの化合物により抗酸化応答が誘導されることが示唆された。これら AhR、抗酸化応答を介した遺伝子誘導の化合物による違いの傾向は、以前行ったヒト肝臓ガン (HepG2) 細胞における傾向に類似していた (K. Misaki et al. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 277-283, 2007)。また、Bhas42 細胞への BPO (50 ng/ml)、TPA (50 ng/ml) 曝露においても CYP1A1 の誘導増加が認められた（それぞれ control の約 2 倍）(図 2)。

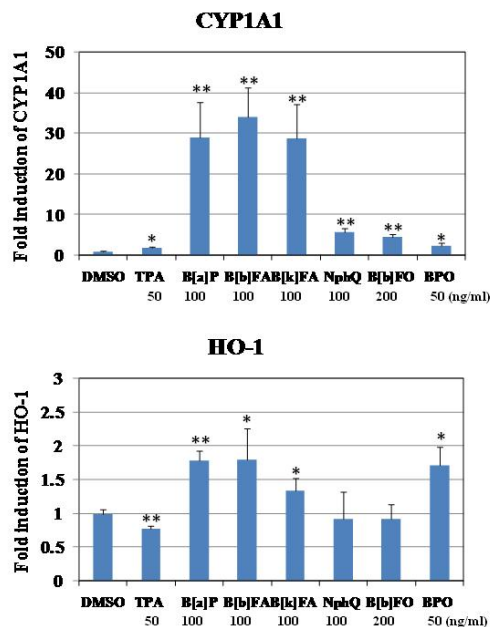
さらに、B[k]FA に対するプロモーション活性試験の際に、抗酸化剤 (N-AC、1 mM) や CYP 阻害剤 (SKF-525A、5 μM) を同時曝露すると、いずれも活性が低減する傾向が認められ、活性酸素種 (ROS) 生成や、CYP による代謝の寄与が示唆された。今後、AhR 阻害剤 (siRNA の使用) による影響も調べていく予定である。HO-1 の誘導から、BPO のプロモーション活性に対する ROS の寄与が考えられるが、阻害剤による実験などでさらに詳細を調べていきたい。

本研究で高いプロモーション活性が認められた化合物は、変異原性の高いものが多く、その関連性も今後考慮していきたい。

(3) プロモーション活性化合物による誘導遺伝子の網羅的解析

B[k]FA のマイクロアレイ解析では、リアルタイム RT-PCR での CYP1A1 や HO-1 の mRNA 誘導増加と同様、AhR (CYP1A1、CYP1B1、Ier3、Ier5 など) や抗酸化応答を介した遺伝子 (HO-1、Txnrd など) の誘導

図 2 多環芳香族化合物類による代表的な代謝酵素の mRNA 誘導 (PCR による測定)



Bhas42細胞への曝露24 h後のmRNA誘導。
 **: p < 0.01, *: p < 0.05(student's t test).

増加が認められた。そのほかマイクロアレイ解析では、いくつかの DNA リボシル化に関わる遺伝子の増加、細胞周期やタンパク質輸送に関わる遺伝子の増減が顕著に認められた。今後、マイクロアレイ解析で認められたいくつかの遺伝子に対して、リアルタイム RT-PCR で同様の誘導変化が認められるか確認してさらに検討を進める。本研究ではプロテオミクス解析を予定していたが今回はそこまで進めることができなかった。今後、細胞抽出液を小器官ごとに分離して、特徴的な遺伝子が特に局在すると思われる小器官に対してプロテオミクス解析を行い、増減が顕著でプロモーション活性に関連するタンパク質を見出したい。さらに、どのようなシグナル機構が働いているのかをさらに明らかにしていきたい。

また、プロモーション活性の高かった BPO や nitro-PAH に対しても、マイクロアレイ解析を進めて、プロモーション活性に関わる遺伝子を見出し、さらにこれらの化合物によるプロモーション活性にどのようなタンパク質やシグナル機構が働いているのかを明らかにしていきたい。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 三崎健太郎, 小川秀興, 高森建二, 柳田光昭, 多環芳香族化合物類の発ガンプロモーション活性、日本環境変異原学会第 38 回大会、2009 年 11 月 26 日、清水テル

サ (静岡)

- ② Kentaro Misaki, Hideoki Ogawa, Kenji Takamori, Mitsuaki Yanagida, Tumor promoting activity of polycyclic aromatic compounds and the investigation about the mode of action, The Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Asia/Pacific Joint Conference, 1st International Conference on Environmental Pollution, Restoration, and Management, March 5, 2010, Hotel Equatorial, Ho Chi Minh, Vietnam

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三崎 健太郎 (MISAKI KENTARO)

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号 : 40468591

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし