

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 1 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590662

研究課題名（和文）

A I D の発現を指標とした非変異原性発がん物質のスクリーニングに関する研究

研究課題名（英文）

Screening for non-genotoxic carcinogens based on induction of AID

研究代表者

立道 昌幸（TATEMICH I MASAYUK I）

昭和大学医学部・衛生学・准教授

研究者番号：00318263

研究成果の概要（和文）：

発がん性は変異原性テストによってスクリーニングされるが、変異原性陰性でありながら発がん性をもつ物質（非変異原性発がん物質）は多数存在し、その発がんメカニズムは不明である。近年 AID (activation-induced cytidine deaminase) が B 細胞以外の体細胞にて異所性に発現誘導され遺伝子変異を誘発することが報告された。本研究では、非変異原性発がん物質の中で、異所性に AID を発現誘導するものがあるかどうかを検討し、AID 発現を指標とした非変異原性発がん物質の *in vitro* でのスクリーニング系を確立できるか確認した。既知の非変異原性発がん物質について、AID の発現誘導能をスクリーニングした結果、Cadmium や o-phenyl phenol (OPP) が AID 誘導能を持つことが判明した。この発見は非変異原性発がん物質の新たな発がんメカニズムとして重要であると考えられ、AID を指標としたスクリーニングが有用である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanisms underlying the carcinogenic activity of non-genotoxic (Ames mutagenicity test-negative) carcinogens are not fully understood. Given recent findings that ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in somatic cells play a critical role in carcinogenesis, we investigated whether several of the established non-genotoxic carcinogens induce AID expression. We examined the AID promoter activity of the established non-genotoxic carcinogens; Results showed that o-phenyl phenol and cadmium chloride (Cd) increased the promoter activity of AID in a dose-dependent manner, and actually induced AID mRNA expression. Our study demonstrated several non-genotoxic carcinogens including Cd have the potential to induce the AID gene, suggesting that this may represent a novel molecular mechanism of carcinogenesis of non-genotoxic carcinogens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：衛生学

科研費の分科・細目：産業中毒

キーワード：非変異原性発がん物質

1. 研究開始当初の背景

化学物質の発がんリスクは、変異原性を指標にされているが、変異原性を持たないにもかかわらず、実際には発がん性をもつことが実証された化学物質・金属類は多数知られている（非変異原性発がん物質）。これらは主に発がんプロモーターとしての役割を持つと考えられてきたが、具体的なメカニズムは不明のままである。

AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) は抗原刺激後の B リンパ球に特異的に発現する分子として発見され、B 細胞において免疫グロブリンのクラススイッチと体細胞突然変異に必須の遺伝子であり、免疫グロブリンに遺伝子変異を生じさせ抗体の多様性を獲得する働きを持っている。一方で、AID が B 細胞以外の体細胞で異所性に発現した場合は、高頻度に p53 をはじめとする癌抑制遺伝子に変異を誘発することが実証され、新たな発がん機構として注目されている。

AID は、体細胞においても様々な機序により異所性に発現誘導される可能性があり、化学物質が変異原性を持たなくとも、直接的に体細胞に AID を発現誘導することによって DNA の変異を誘発し、恒常的に DNA へ変異を起こしその変異が蓄積することで発がんに至る機構の可能性を検討した。

2. 研究の目的

非変異原性発がん物質の中に、AID を B 細胞以外の体細胞にて異所性に発現誘導するものがあるかどうかを検討し、AID 発現を指標とした非変異原性発がん物質の *in vitro* のスクリーニング系を樹立することが目的である。

3. 研究の方法

ヒト AID のプロモーターにルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を連結したプラスミド (pGL4.14) を作成し、Panc-1 にリポフェクション遺伝子導入法を用いて導入し、TK/NEO で選択後、安定発現株を得た。コントロールとして RLuc を用い、プロモーター活性は、Luc/RLuc の比にて評価した。これまで Ames 試験陰性にてラット肝中期発がん試験陽性となった o-phenyl phenol (OPP), butyrate hydroxyanisole (BHA), butyl benzyl phthalate (BBP), bisphenol A (BHA), di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), cadmium chloride (Cd) などの既知の非変異原性発がん物質について、AID の発現活性を測定した。AID のプロモーター活性を持つ物質については AID が実際に細胞株で誘導されるか数種の細胞株を用いて、RT-PCR 法を用いて確認した。

4. 研究成果

1) ヒト AID のプロモーター領域 1.6Kbp を含む reporter plasmids pGL4.14 を作成し、遺伝子導入にて安定発現株を得た。まず、この細胞株が機能するかを検証した。AID を誘導することが確認されている TNF- α を用いて、実際、検出可能かどうか確認した。図 1 に TNF- α 処理 24 時間後の活性の上昇を示した。また、先行研究により AID は IL-4 により増強されることが報告されていることから、IL-4 による増強効果を確認したところ、IL-4 による増強効果

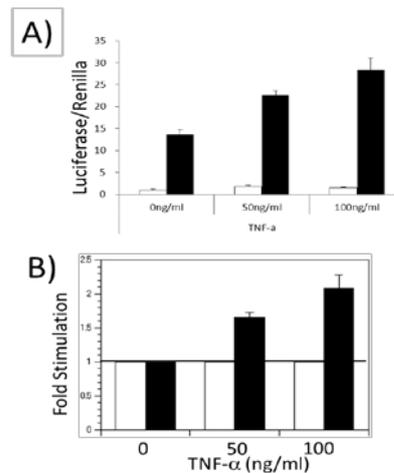


図1 TNF- α によるAIDプロモーター活性の誘導

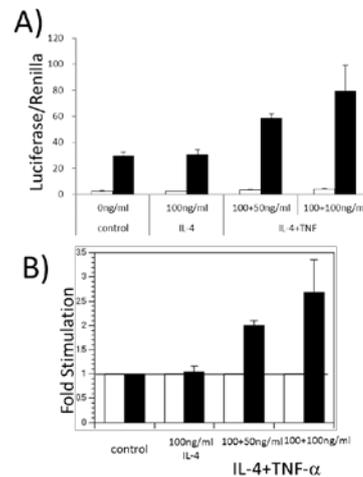


図2 IL-4によるAIDプロモーター活性の増強

を認めた。(図 2) これらの結果から、この安定発現株は使用可能であることを確認された。

2) 次に既知の発がん物質である o-phenyl OPP, BPA, DEHP, BBP, BHA, and Cd. について、検討した。至適濃度は内性コントロールである RLuc の活性が減じない、すなわち細胞障害が生じない濃度を最大濃度として、濃度勾配を用いて検討した。この結果、OPP と Cd が濃度依存性に AID プロモーター活性の上昇を認めた。(図 3)

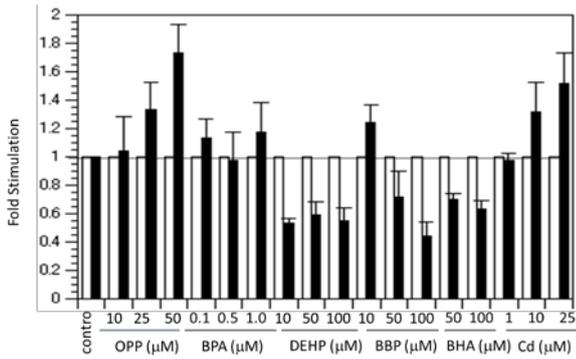


図3 非変異原性発がん物質によるAIDプロモータ活性の誘導

3) これらをpanc-1細胞に添加した結果、実際のmRNAが濃度依存性に誘導されることを確認した。(図4A, 図5) Cdについては、肺がん細胞株であるA549細胞においても誘導が確認され、さらにTNF- α によって増強されることが示された。(図4B)

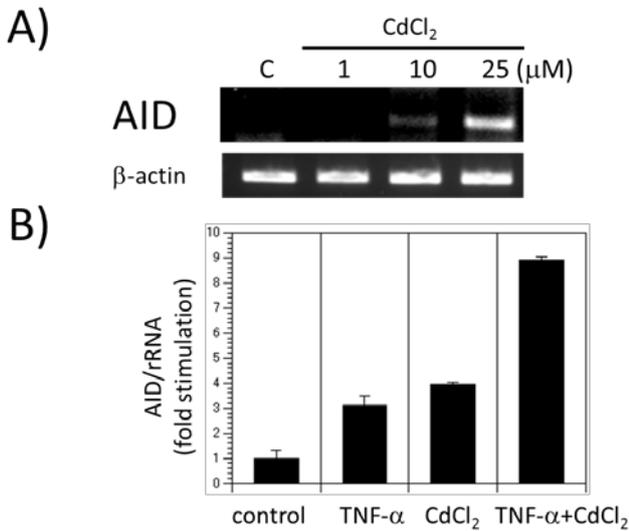


図4 カドミウムによるAID mRNAの発現誘導

A) Panc-1細胞を用いたRT-PCR

B) A549細胞を用いたreal-time PCR

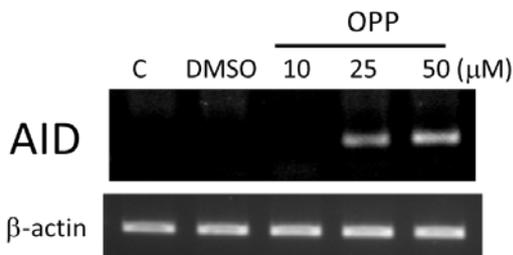


図5 OPPによるAID mRNAの誘導(Panc-1細胞)

4) 次に、OPP、CdがAIDを発現誘導するメカニズムについて検討した。NF- κ Bの阻害剤であるMG-132を前処置したところ、Cdによる発現誘導が抑制された(図6)。しかし、OPPではその抑制作用は認められなかった。

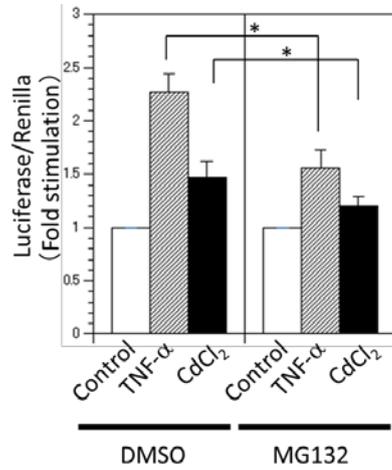


図6 NF- κ B阻害剤(MG-132)によるAID誘導の抑制

本細胞株においてエストロゲンによる誘導が認められるか検討したが、本細胞株ではエストロゲンによる誘導は認められなかった(図7)。

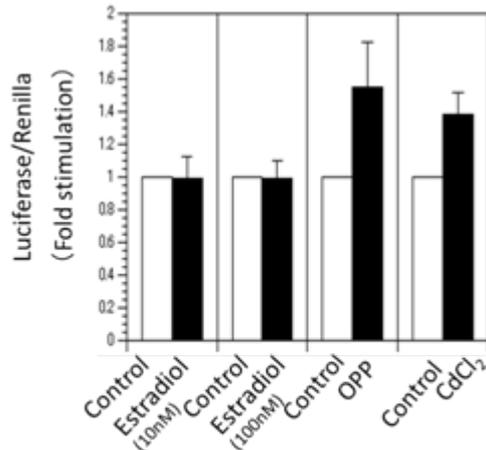


図7 エストロゲンのAID誘導能

また、エストロゲン受容体ブロッカーである、ICI182,780を前処置したが、OPP、Cdとも抑制効果は認められなかった(図8)。これらの結果よりCdについては、NF- κ Bの活性化によりAIDが誘導されることが示唆された。

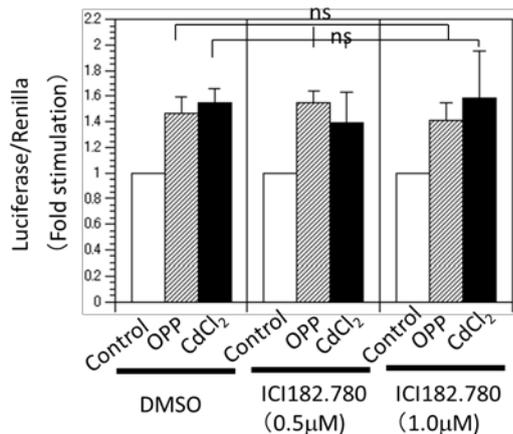


図8 エストロゲン受容体阻害剤(ICI182.780)によるAID誘導の阻害

5) 以上の結果から、非変異原性発がん物質の中にAIDを誘導する化学物質・重金属があることが明らかになり、これらの物質は直接DNA障害は来さないものの、AID誘導を介してDNAに変異を惹起し発がん作用している可能性が示唆された。

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7件)

1. Tatemichi M, Ogura T, Esumi H: Impact of inducible nitric oxide synthase on cancer progression. *Eur. J. Cancer Prev* 18 : 1-8, 2009
2. Mizuki A, Tatemichi M, Tsukada N, Nagamatsu, R, Kawaguchi M, Itoshima T, Maruyama S, Satou A, Imari Y, Kawatoko T, Shimono J and Nagata H. Addition of transcatheter arterial chemoembolization decreased local recurrence but had no survival benefit to percutaneous ethanol injection therapy for patients with small hepatocellular carcinoma: A multicenter randomized control study. *Oncology Lett* 1: 855-859, 2010
3. Kikuchi M, Nagata H, Watanabe N, Watanabe H, Tatemichi M, Hibi T: Altered expression of a putative progenitor cell marker DCAMKL1 in the rat gastric mucosa in regeneration, metaplasia and dysplasia. *BMC Gastroenterol.* 10: 65, 2010
4. Tatemichi M, Hiromi Hata, Nakadate: Ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase by modification of epigenetics. *Oncology Rep.* 25:153-8, 2010
5. Miyoshi N, Wakao Y, Tomono S, Tatemichi M, Yano T, Ohshima H. The enhancement of the oral bioavailability of γ -tocotrienol in mice by γ -cyclodextrin inclusion. *J Nutr Biochem* 22 1121-6, 2011
6. Nishinoue N, Tatemichi M, Aratake M,

Yamazaki A, Fukuda H, Sugita M Effect of a group health education program in the workplace at the age of 35: a population approach. *J UOEH.* 33:23-34, 2011

7. Izumu K, Tatemichi M, Nakadate T.

Expression of RAE-1, a NKG2D receptor ligand, in mice adipocyte. *Showa Univ. J. Med* 23:151-159, 2011

[学会発表] (計6件)

1. 立道昌幸: 発がんがん悪性化における一酸化窒素の役割. 第9回分子予防環境医学研究会, 東京, 2010. 1
2. 立道昌幸, 畑晴実, 飯泉恭一, 山野優子, 中館俊夫: 一酸化窒素による Epigenetic mutagenとしての作用. 第80回日本衛生学会総会, 仙台, 2010. 5
3. 山野優子, 立道昌幸, 宮川三平, 中館俊夫: 学童における酸化ストレスマーカーと生活習慣について. 第80回日本衛生学会総会, 仙台, 2010. 5
4. 畑晴実, 立道昌幸, 中館俊夫: 膀胱癌細胞における AnnexinA8 の役割. 第80回日本衛生学会, 仙台, 2010. 5
5. 飯泉恭一, 立道昌幸, 今井常彦, 中館俊夫: 飲酒が乳がん発生や増殖に関わる分子機構の検討. 第80回日本衛生学会総会, 仙台, 2010. 5
6. Hata H, Tatemichi M. Roles of Annexin A8 in pancreatic cancer cell lines; 膀胱癌における Annexin A8 の役割. 第69回日本癌学会学術総会大阪 2010. 9. 22-24

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.showa-u.ac.jp/sch/med/major/hpmed/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立道昌幸 (TATEMICHl MASAYUKl)

昭和大学医学部衛生学・准教授

研究者番号：00318263

(2) 研究分担者

畑春実 (HATA HARUMI)

昭和大学医学部衛生学・助教

研究者番号：00396441

(3) 連携研究者

()

研究者番号：