

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460808

研究課題名(和文) プラスチック可塑剤DEHPの肝発がんにおけるヒトPPAR 関与の解明とリスク評価

研究課題名(英文) Involvement of human PPAR $\alpha$  in plasticizer DEHP-induced hepatic tumor

## 研究代表者

伊藤 由起 (Ito, Yuki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80452192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)は、ポリ塩化ビニル製品の主要な可塑剤として汎用されている。一方、DEHPのヒトでの発がんリスクについてはたびたび議論されてきた。DEHPの代謝物は核内に存在する受容体のアゴニストとなるため、その受容体の発現が低く、機能も異なるヒトでは発がん作用はみられないとされてきた。しかし、ヒトと同じ機能を有する受容体を持っているマウスにおいてもDEHP投与により肝腫瘍の形成が見られた。しかし、腫瘍形成経路に違いが見られた。

研究成果の概要(英文)：Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is a major plasticizer for polyvinyl chloride products and used widely. On the other hand, carcinogenicity of DEHP has been drawn attentions for the last two decades. Functional species differences exist in the nuclear receptor to which metabolites of DEHP bind, therefore the hepatocarcinogenic response is thought to be not relevant to humans. Our experiments showed that DEHP induced hepatic tumors in humanized transgenic mice but the mode of action may differ from that in wild-typed mice.

研究分野：衛生学

キーワード：フタル酸ジ-2-エチルヘキシル

## 1. 研究開始当初の背景

フタル酸ジ - 2 - エチルヘキシル( DEHP )はポリ塩化ビニル製品の主要な可塑剤として汎用されている。一方、動物実験においてこれまでに様々な毒性が報告されており、中でもヒトでの発がんリスクについてはたびたび議論されてきた(文献)。DEHPの代謝物は核内受容体ペルオキシゾーム活性化受容体(PPAR)のアゴニストとなる。PPARは脂質代謝や抗炎症作用の調節の重要な転写因子である一方、ペルオキシゾーム増殖による肝肥大といった毒性に関与することが知られている。2000年に国際がん研究機関(IARC)は、ヒトでのPPARの発現が低いこと、機能的にもPPARアゴニストの典型所見であるペルオキシゾームの増殖作用が霊長類では観察されていないことを理由に発がんリスクを引き下げた。

しかし我々は *Ppar*<sup>-/-</sup>マウスを用いて約2年間のDEHP発がん実験を行った結果、野生型(*mPpar*<sup>+/+</sup>)マウスに比べ *Ppar*<sup>-/-</sup>マウスで高頻度に肝腫瘍が形成され、PPARを介した従来想定されていた経路に加え、PPAR非依存的な炎症持続による発がん機構の可能性が示された(文献)。さらに、*Ppar*<sup>-/-</sup>と *mPpar*<sup>+/+</sup>マウスで見られた肝腫瘍では、細胞周期やアポトーシス関連遺伝子変化が異なることを明らかにした(文献)。この結果から、DEHPによる肝腫瘍形成にはPPARが必須であるというこれまでの見解が覆され、その後のDEHPの発がんリスクの再引き上げにつながった。

次にヒトのPPARを介した経路について検討をした。霊長類ではPPARのアゴニストを投与した際にペルオキシゾーム増殖が見られないことから、ヒトのPPARは機能的に肝腫瘍形成に関与しないと考えられていたが、まだ証明されていない。

そこで、PPARのヒトとげっ歯類間の機能差が肝腫瘍形成に与える影響の違いを検討するため、*mPpar*<sup>+/+</sup>、*Ppar*<sup>-/-</sup>に加え、ヒトのPPARを持つヒト *Ppar*<sup>+/+</sup>マウスを用いて、同様の2年間発がん実験を行った。病理学的検討の結果、DEHP投与(0~0.4%)により全ての遺伝子型マウスで肝腫瘍が観察された。

## 2. 研究の目的

そこで、DEHPによる肝腫瘍形成にはPPAR依存的な経路とPPAR非依存的な経路の両方が関与しており、ヒト *Ppar*<sup>+/+</sup>マウスで観察された腫瘍には、ペルオキシゾーム増殖は関与しない新たなヒトPPAR依存的な経路と、PPAR非依存的な経路の両方が関与するとの仮説を立て、これらの機序を解明することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 病理学的所見

4%パラホルムアルデヒド固定後、3µmのパラフィン切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色して鏡検した。腫瘍の診断は毒性病理の専門家に依頼した。

### (2) DNAマイクロアレイ

RNAはRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて肝臓から抽出した。抽出したRNAは、ナノドロップで収量、波形を確認した後、バイオアナライザー(Agilent)で電気泳動を行った。DNAマイクロアレイ解析は東レ株式会社に委託し実施した。

1µgのtotal RNAを用いてaRNAの増幅を行った後、10µgの増幅RNAを用いてCyDye標識及び精製を行った。各1µgを用いて37℃で16時間ハイブリダイゼーションをおこなった。高感度DNAチップ3D-Geneを用いて、1色法で解析を行った。グローバルノーマライゼー

ションによるデータの標準化の後、変動比2倍を閾値にして発現変動のある遺伝子を同定した。抽出された遺伝子はGenMAPPを用いてパスウェイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組織病理学的検討

DEHPによる肝腫瘍の肉眼所見にはマウスの遺伝子型による違いは見られなかった(図1)。しかし、*mPpar* +/+マウスにおいて腫瘍数が増加する傾向にあった。*mPpar* +/+マウスでは、DEHP投与依存的に肝臓が茶色になっていた。ペルオキシゾーム増殖によるものかもしれない。

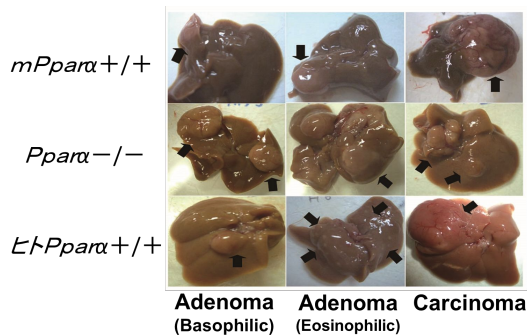


図1 各遺伝子型マウスで観察された肝腫瘍の肉眼所見

PPARの遺伝子型により肝腫瘍の形成の仕方が異なり、*mPpar* +/+マウスやヒト*Ppar* +/+マウスではDEHPの曝露用量依存的に個体あたりの肝腫瘍の数が増加するが、*Ppar* -/-やヒト*Ppar* +/+マウスでは肝細胞腺腫の発生率のみが上昇するという結果であった。また、ヒト*Ppar* +/+マウスは*mPpar* +/+マウスと*Ppar* -/-マウスの両方の結果を有し、新たにヒトのPPARはマウスのPPARに比べると機能的に弱いが発がんに関与する可能性が示唆された。我々の以前行った研究でDEHPの投与後、構成的アンドロスタン受容体(CAR)の転写活性化がヒト*Ppar* +/+マウスや

*par* -/-マウスで強く促進されることが明らかになっているため(文献)、PPAR非依存的な経路としてCARを介した作用を想定した。CARを介した作用が報告されているフェノバルビタール等は好酸性腫瘍の形成が考えられたため、好酸性肝腺腫とDEHP曝露の関係を検討したが、関係は見られなかった。前腫瘍病変も加えて解析をしたところ、むしろ好塩基性腫瘍とDEHP曝露の可能性が示された。マウスの遺伝子型による違いは見られなかった。

##### (2) DEHP曝露による肝腫瘍形成経路の検討

各遺伝子型の0.4%DEHP群の個体のうち、以下3群に分けた。

腫瘍無: 鏡検で腫瘍病変及び前腫瘍病変が見られなかった0.4%DEHP群曝露マウス(各遺伝子型マウス4-5匹)の肝臓由来RNAを遺伝子型ごとにプールしたもの、

腫瘍有: 肝細胞腺腫(塩基性)と判定されたDEHP高濃度曝露マウスの剖検時非腫瘍部位の肝臓由来のRNAを遺伝子型ごとにプールしたもの(各遺伝子型マウス4-5匹)

腫瘍部位: DEHP高濃度曝露マウスの肝細胞腺腫(塩基性)部位の肝臓由来のRNA

この3つで比較をし、パスウェイ解析を行った結果、肝腫瘍に直接関与が考えられる経路ではなく、無数の代謝経路等の変化が上位に観察された。そこで、過去の研究でDEHPによる肝腫瘍形成への関与が示唆された細胞周期、アポトーシスに絞り、肝腫瘍病変を用いて3種類の遺伝子型マウス(ヒト*Ppar* +/+, *Ppar* -/-, *mPpar* +/+)ごとに解析した。その結果、肝腫瘍の有無によるアポトーシス関連遺伝子発現の違いにおいて、PPARの遺伝子型の違いは認められなかった。細胞周期関連遺伝子では、ヒト*Ppar* +/+マウスと

*ar* - / - マウスにおいてのみ、担腫瘍個体で細胞周期に係わる遺伝子が低下しており、腫瘍形成の違いに影響している可能性が示唆された。

また、ヒト *Ppar* + / +、*Ppar* - / -、*mPpar* + / + の間で、DEHP の代謝が異なることが示され、これにより DEHP の内部負荷量が異なったことも、腫瘍形成の違いに影響した可能性が示唆された。

#### <引用文献>

Ito Y, Nakajima T. PPAR alpha- and DEHP-induced cancers. *PPAR Res* 2008: 759716 (2008)

Ito Y, et al. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -independent pathway. *J Occup Health* 49: 172-182 (2007)

Takashima K, Ito Y et al. Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and *Ppar* alpha-null mice. *J Occup Health* 50(2):169-80 (2008)

Ito Y, et al. Plasticizers may activate human hepatic peroxisome proliferator-activated receptor less than that of a mouse but may activate constitutive androstane receptor in liver. *PPAR Res*.2012:201284 (2012)

#### 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 1 件)

- 1) ItoY, Kamijima M, Hasegawa C, Tagawa M, Kawai T, Miyake M, Hayashi Y, Naito H, Nakajima T. Species and inter-individual differences in metabolic capacity of di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)

between human and mouse livers.

*Environ Health Prev Med* 19:117-125

(2014) 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) 伊藤由起、上島通浩、柳場由絵、林由美、内藤久雄、那須民江. フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) による肝腫瘍形成機序における PPAR の機能差. 第 84 回日本衛生学会学術総会 2014/5/25-27 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 由起 (ITO, Yuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：80452192

##### (2) 研究分担者

那須 民江 (NAKAJIMA, Tamie)

中部大学・生命健康科学部・教授  
研究者番号：10020794