

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：72703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460806

研究課題名(和文) 職業性胆管がん発症の原因となる究極発がん物質の究明

研究課題名(英文) Elucidation of the ultimate carcinogen associated with occupational cholangiocarcinoma

研究代表者

圓藤 吟史 (ENDO, Ginji)

公益財団法人大原記念労働科学研究所・研究部・客員研究員

研究者番号：20160393

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)：1,2,3-trichloropropane (TCP)の細胞毒性は1,2-dichloropropane (DCP)よりも強い。薬物代謝酵素の誘導は毒性に影響を与えなかった。TCP処理細胞のmRNA解析により、CYPおよびGSTよりもGSH再生系酵素蛋白のmRNA合成が高い。CYPの関与よりもGSHによる代謝活性化が毒性発現機構に深く関与している可能性が示唆された。

ヒト胎芽由来胆管細胞を用いた検討では、TNF 処理は体細胞超変異とクラススイッチ組み換えに関連する酵素およびNF- κ BのmRNAレベルを増加させた。同酵素の胆管細胞変異への関与の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cytotoxicity of 1,2,3-trichloropropane (TCP) is higher than that of 1,2-dichloropropane (DCP). Induction of drug-metabolizing enzymes did not affect toxicity. The mRNA synthesis of GSH-regenerating enzymes is higher than those of CYPs and GSTs in TCP treated cultured cells, suggesting that the metabolic activation by GSH may be deeply involved in the toxicity rather than that by CYPs.

The experiment using human fetal liver-derived cholangiocytes showed that treatment with TNF increased mRNA level of NF- κ B and an enzyme related with somatic cell hyper mutation and class switch recombination, suggesting the involvement of this enzyme with mutation of cholangiocytes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胆管がん 1,2-ジクロロプロパン ジクロロメタン ハロゲン化炭化水素 化学発がん グルタチオンS-トランスフェラーゼ 体細胞突然変異

1. 研究開始当初の背景

オフセット校正印刷会社労働者にみられた胆管がんは、ハロゲン化炭化水素類の高濃度曝露による業務上疾病とされた。代謝機序については、一般に、CYPによる酸化的代謝およびGSTによるグルタチオン抱合代謝に大別して理解されているが、個々の毒性についてはハロゲンの結合数や異性体で大きく異なり、代謝過程の定量的解析を含む詳細な発がん代謝活性化機構の解明が求められる。

それ故、我々は胆管がんとの因果関係を究明するために、ハロゲン化炭化水素類の代謝経路と発がん過程における活性体の生成を明らかにすることを目的に、細胞障害性、遺伝毒性を網羅的に検討し、原因物質の追究を試みる。本申請のメタボロミクス研究により胆管がん発症の原因となる未知の発がん物質とその発がん機序の解明が期待される。

2. 研究の目的

我々はハロゲン化炭化水素曝露と胆管がんとの因果関係を究明するために、曝露した可能性のあるハロゲン化炭化水素類をリストアップし、文献的に代謝や毒性機序を調査する。被疑ハロゲン化炭化水素類について、マイクロゾームおよびサイトソル中のGSTで反応させ、ヒト胆管上皮培養細胞を用いた *in vitro* 実験にて酸化ストレスを加味した細胞障害性およびDNA損傷性を網羅的に検討する。代謝過程で活性体が形成される可能性があることから、細胞レベルでの解析において被疑化学物質の漏れがないように、DNAアレイ解析により、酸化ストレスのみならずDNA修復系酵素、炎症メディエータ誘導、CYPやGSTなどの薬物代謝酵素、細胞再輸送蛋白などの発現量を検討する。それらの結果に基づき、被疑ハロゲン化炭化水素類および活性体をスクリーニングする。絞られた被疑物質・活性体を対象に、その他の遺伝毒性を検討する。

3. 研究の方法

ヒト肝腫瘍由来のHepaRG細胞を肝細胞様および胆管上皮様細胞に分化させ薬物代謝酵素群を誘導後、1,2-dichloropropane (DCP)および1,2,3-trichloropropane (TCP)を24時間曝露し、細胞生存性をWST-8法により評価した。TCP処理によるmRNAレベルの変化はDNAチップを用いて調べた。

不死化ヒト胆管由来細胞株 (MMNK-1細胞: DMEM + 5% FBS) にTNF α (100 ng/mL)を4, 6, 8, 10時間曝露した。曝露終了後、カラム抽出法で細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNA (5 mg)を合成した。このcDNAを使用してリアルタイムPCR法 (SYBR法) でNF κ B及び体細胞超変異とクラススイッチ組み換えに関連する酵素の発現量を測定した。インターナルコントロールとして β -Actinを用いた。

4. 研究成果

TCPの細胞毒性はDCPよりも強く、不純物として含まれる可能性のある前者の方が毒性への影響が大きい可能性が示された。また、薬物代謝酵素の誘導は毒性に影響を与えなかった。加えて、TCP処理細胞のmRNA解析により、CYPおよびGSTよりもGSH再生系酵素蛋白のmRNA合成が高いことが示された。すなわち、下図のようにCYPの関与よりもGSHによる代謝活性化が毒性発現機構に深く関与している可能性が示唆された。

TNF α 曝露はヒト胎芽由来胆管細胞においてNF κ Bおよび体細胞超変異とクラススイッチ組み換えに関連する酵素発現をmRNAレベルで亢進させることが示された。先行研究と合わせるとオフセット印刷工程で発生した胆管がん症例における胆管の慢性炎症と胆管がんを結び付ける因子として体細胞超変異とクラススイッチ組み換えに関連する酵素が存在する可能性を示唆する。

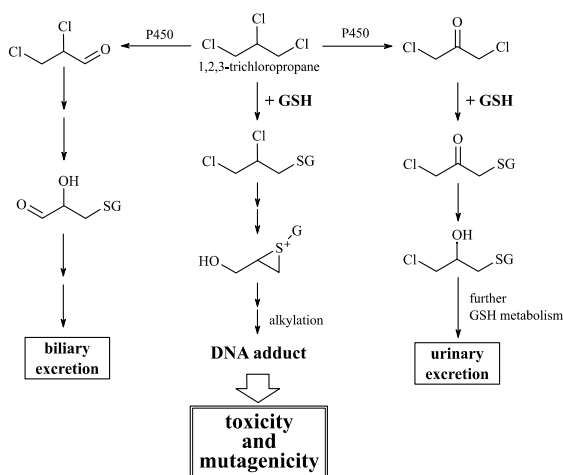


Fig. 1,2,3-trichloropropane の代謝活性化機構(推定)^{1,2}

Ref.

1. Toxicological Review of 1,2,3-trichloropropane (CAS No. 96-18-4), U.S. Environmental Protection Agency, 2007.
2. Transformation and biodegradation of 1,2,3-trichloropropane (TCP), Ghufrana Samin and Dick B. Janssen, Environ Sci Pollut Res (2012) 19:3067–3078.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 24 件)

1. Kumagai S, Sobue T, Makiuchi T, Kubo S, Uehara S, Hayashi T, Sato KK, **Endo G**. Relationship between cumulative exposure to 1,2-dichloropropane and incidence risk of cholangiocarcinoma among offset printing workers. Occup Environ Med. 2016 Aug;73(8):545-52. (査読有) doi: 10.1136/oemed-2015-103427.
2. Ito Y, Nakaya T, Ioka A, Nakayama T, Tsukuma H, Uehara S, Kogawa Sato K, **Endo G**, Hayashi T. Investigation of spatial clustering of biliary tract cancer incidence in Osaka, Japan: Neighborhood Effect of a Printing Factory. J Epidemiol. 2016 Sep 5;26(9):459-63. (査読有) doi: 10.2188/jea.JE20150116.
3. Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Ito T, Yamamoto T, Abue M, Aoki M, Nakagawa K, Hijioka S, Miyamoto A, Osaki Y, **Endo G**, Kumagai S. Screening and surveillance for occupational cholangiocarcinoma in workers exposed to organic solvents. Surg Today. 2016 Jun;46(6):705-12. (査読有) doi: 10.1007/s00595-015-1229-9. Epub 2015 Jul 31.
4. Sobue T, Utada M, Makiuchi T, Ohno Y, Uehara S, Hayashi T, Sato KK, **Endo G**. Risk of bile duct cancer among printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. J Occup Health. 2015;57(3):230-6. (査読有) doi: 10.1539/joh.14-0116-OA.
5. Yamada K, Kumagai S, Kubo S, **Endo G**. Chemical exposure levels in printing and coating workers with cholangiocarcinoma (third report). J Occup Health. 2015;57(6):565-71. (査読有) doi: 10.1539/joh.15-0170-OA.
6. Yamada K, Kumagai S, **Endo G**. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma (second report). J Occup Health. 2015;57(3):245-52. (査読有) doi: 10.1539/joh.14-0239-OA.
7. Kubo S, Matsuzaki K, Seki T, Ohsawa M, Kumagai S, **Endo G**. Severe acute hepatitis in a printing company worker: a case study. J Occup Health. 2015;57(1):87-90. (査読有)doi: 10.1539/joh.14-0122-CS.
8. Japan Society for Occupational Health **Endo G, Ichihara G** et al. Recommendation of Occupational Exposure Limits (2015-2016). J Occup Health. 2015;57(4):394-417. doi: 10.1539/joh.ROEL2015.
9. Yamada K, Kumagai S, Nagoya T, **Endo G**. Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma. J Occup Health. 2014;56(5):332-8. (査読有)
10. Kubo S, Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Abue M, Aoki M, Nakagawa K, Unno M, Hijioka S, Fujiyoshi T, Shimizu Y, Mizuguchi T, Shirabe K, Nishie A, Oda Y, Takenaka K, Kobarai T, Hisano T, Saiura A, Numao H, Toda M, Kuwae Y, Nakanuma Y, **Endo G**. Characteristics of printing company workers newly diagnosed with occupational cholangiocarcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014 Nov;21(11):809-17. (査読有) doi: 10.1002/jhbp.137.
11. Kubo S, Takemura S, Sakata C, Urata Y, Nishioka T, Nozawa A, Kinoshita M, Hamano G, Nakanuma Y, **Endo G**. Changes in laboratory test results and diagnostic imaging presentation before the detection of occupational

- cholangiocarcinoma. J Occup Health. 2014;56(4):317-22. (査読有)
12. Japan Society for Occupational Health **Endo G, Ichihara G** et al. Recommendation of Occupational Exposure Limits (2014-2015). J Occup Health. 2014;56(5):401-20.
 13. Zhang L, Zong C, Ichihara S, Naito H, Toyokuni S, Kumagai S, **Ichihara G**. A trial to find appropriate animal models of dichloropropane-induced cholangiocarcinoma based on the hepatic distribution of glutathione S-transferase. J Occup Health 2015; 57: 548-54. (査読有) 10.1539/joh.15-0085-OA
 14. Kumagai S, Kurumatani N, Arimoto A, **Ichihara G**. Time course of blood parameters in printing workers with cholangiocarcinoma. J Occup Health 2014; 56: 279-84. (査読有)
 15. 熊谷信二、**丸藤吟史**：印刷労働者における1,2-ジクロロプロパン累積曝露量と胆管がん罹患リスクの関係．労働の科学 2017; 72(1), 42-45.
 16. **丸藤吟史**：産業保健の最近の動向と新たな課題．公衆衛生 2016; 80(4): 238-242. DOI: <http://dx.doi.org/10.11477/mf.1401208396>
 17. **市原 学**、**丸藤吟史**ほか．許容濃度等の勧告（2015）産衛誌 2015; 57:146-172.
 18. **市原 学**、**丸藤吟史**ほか．発がん性分類暫定物質（2015）の提案理由．産衛誌 2015; 57:209-213.
 19. **市原 学**、張 靈逸、豊國伸哉、熊谷信二 IV 職業性胆管癌の原因物質解明のための動物実験 産業医学レビュー 2015; 28: 151-6.
 20. **市原 学** 特定化学物質障害予防規則等の改正について ファルマシア 2015; 51: 808-809.
 21. **丸藤吟史**：職業性胆管癌の疫学的解明（印刷会社で集団発生した胆管癌の最近の知見）産業医学レビュー 2015 Apr; 28(2), 147-150.
 22. **丸藤吟史**：オフセット印刷と胆管がん—新たな職業性疾患の発見. JIM 2014 Sep; 24(9): 826-827. DOI: <http://dx.doi.org/10.11477/mf.1414103337>
 23. **丸藤吟史**、**市原 学**ほか．許容濃度等の勧告（2014）産衛誌 2014; 56:162-188.
 24. **丸藤吟史**、**市原 学**ほか．発がん性分類暫定物質（2014）の提案理由．産衛誌 2014; 56:198-201.
- [学会発表] (計 18 件)
1. 熊谷信二、祖父江友孝、久保正二、林朝茂、佐藤恭子、上原新一郎、**丸藤吟史** . オフセット印刷労働者におけるジクロロプロパン累積曝露量と胆管癌罹患リスク . 第 89 回日本産業衛生学会 (2016-05-24 -27, 福島市)
 2. Takasu S, Sakurai T, Kimura Y, Ichihara S, Endo Y, **Endo G**, and **Ichihara G**. Exposure To 1,2-dichloropropane Enhances mRNA Expression Of Activation-induced Cytidine Deaminase In Human Cholangiocytes. Society of Toxicology 56th Annual Meeting (SOT2017). (2017.3.12-3.16, ボルチモア、米国)
 3. 木村 優介, 高巢 成惟, 櫻井 敏博, 市原 佐保子, **丸藤 陽子**, **丸藤 吟史**, **市原 学**. 1,2-ジクロロプロパンのヒト胆管細胞への曝露による遺伝子改変酵素 AID の mRNA 発現上昇. 第 87 回日本衛生学会学術総会(2017.3.26-28, フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎市)
 4. 張 驍, 宗 才, 張 靈逸, エドウィン ガーナー, 黄 晉彦, 吳 文亭, 常 杰, 桜井 敏博, 市原 佐保子, **市原 学**. ジクロロプロパン曝露マウスの胆管細胞増殖と肝臓毒性における P450 の役割. 第 87 回日本衛生学会学術総会(2017.3.26-28, フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎市)
 5. **市原 学**、近藤直登、木村雄介、高巢成惟、櫻井敏博、市原佐保子、丸藤陽子、**丸藤吟史**. ジクロロプロパンへの曝露はヒト胆管細胞において活性化誘導シチジンデアミナーゼ発現を誘導する. 第 16 回分子予防環境医学研究会(2017.2.3-4, 熊本市国際交流会館、熊本市)
 6. **市原 学**. 産業中毒の原因解明と予防のための症例・疫学・実験研究 - 科学の本質の一つである予見性を産業医学でどのように獲得するか. 第 26 回日本産業衛生学会全国協議会(2016.9.8-10, 京都テルサ、京都府)
 7. Zhang X, Zong C, Zhang L, Garner E, Huang C, Wu W, Chang J, Sakurai T, Ichihara S, **Ichihara G**. Role of P450 in Hepatotoxicity and Proliferation in Bile Duct Induced by Exposure to 1,2-Dichloropropane in Mice. 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (日本産業衛生学会). (2016.8.4-5, 東京理科大学 神楽坂キャンパス 森戸記念館、東京都)
 8. 張 驍, Cai ZONG, Lingyi ZHANG, Edwin GARNER, Chinyen HUANG, Wenting WU, Jie CHANG, 桜井 敏博, 市原 佐保子, **市原 学**. 1,2-ジクロロプロパン曝露マウスの肝毒性と胆管細胞の増殖における P450 の役割. 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29-7.1, 愛知県産業労働センター、名古屋市)

9. Ichihara G. Epidemiological and Toxicological Studies on the Carcinogenicity of 1,2-dichloropropane. ICCA-LRI and NIHS Workshop 2016(2016.6.15-16, 淡路夢舞台国際会議場、淡路市、兵庫県)
10. Xiao Zhang, Cai Zong, Lingyi Zhan, Edwin Garner, Chinyen Huang, Wenting Wu, Jie Chang, Toshihiro Sakurai, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Role of P450 in Hepatotoxicity and Proliferation in Bile Duct Induced by Exposure to 1,2-dichloropropane in Mice. The Society of Toxicology 55th Annual Meeting and ToxExpo. (2016.3.13-17, New Orleans, Louisiana, USA)
11. 櫻井 敏博, 市原 学, 高巢 成惟, 木村 優介, 圓藤 陽子, 圓藤 吟史. 胆管由来細胞を用いたハロゲン化炭化水素の遺伝毒性評価系の確立. 日本産業衛生学会 第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2015.10.2-10.3, まるは食堂旅館、知多郡南知多町、愛知県)
12. 宗 才, エドウィン ガーナー, 黄 晋彦, 張 靈逸, 張 堯, 豊國 伸哉, 櫻井 敏博, 市原 佐保子, 市原 学. P450 を阻害して肝臓毒性を減弱させることでマウス神経毒性モデルを確立する. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015.9.17-9.18, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパスB号館、神戸市)
13. 張 靈逸, 宗 才, 市原 佐保子, 内藤 久雄, 豊國 伸哉, 熊谷 信二, 市原 学. グルタチオン S-トランスフェラーゼ肝臓内分布はジクロロプロパンによる胆管癌誘導の種差を説明しない. フォーラム 2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2015.9.17-9.18, 神戸学院大学ポートアイランドキャンパスB号館、神戸市)
14. Lingyi Zhang, Cai Zong, Sahoko Ichihara, Hisao Naito, Shinya Toyokuni, Shinji Kumagai, Gaku Ichihara. Hepatic distribution of GST cannot explain the gap between humans and rodents for induction of cholangiocarcinoma following exposure to dichloropropane. 51st Congress of the European Societies of Toxicology Bridging Sciences for Safety (EUROTOX2015). (2015.9.13-9.16, Porto, Portugal)
15. Lingyi Zhang, Cai Zong, 市原 佐保子, 内藤 久雄, 豊國 伸哉, 熊谷 信二, 市原 学. グルタチオン S-トランスフェラーゼの肝臓内における分布は、1, 2-ジクロロプロパン曝露による胆管癌誘導作用におけるヒトとげっ歯類の違いを説明できない. 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6.29-7.1, 石川県立音楽堂他、金沢市)
16. Cai Zong, Edwin Garner, Chin-Yen Huang, Lingyi Zhang, Xiao Zhang, Shinya Toyokuni, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Establishment of mouse model for neurotoxicity of 1-bromopropane, an alternative to ozone-depleting solvents. 19th International Conference on Cytochrome P450. (2015.6.12.-15, 国立オリンピック記念青少年総合センター国際交流棟、渋谷区)
17. Lingyi Zhang, Shinji Kumagai, Shinya Toyokuni, Hisao Naito, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara. Animal models for cholangiocarcinoma induced by chemicals associated with the offset printing. SOT 54th Annual Meeting and ToxExpo (2015.3.22-26, San Diego, California, USA)
18. 市原 学. 1,2-ジクロロプロパンの発がん性 発症機序から. 第 42 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2014.10.25-26, 松本市中央公民館, 松本市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

environmental-toxicology.pha.nihon-u.ac.jp/member.html

https://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/index.php?6971

6. 研究組織

6. 研究組織

(1)研究代表者

圓藤吟史 (ENDO, Ginji)

公益財団法人大原記念労働衛生研究所・研究部・客員研究員

研究者番号: 20160393

(2)研究分担者

山中健三 (YAMANAKA, Kenzo)

日本大学薬学部・教授

研究者番号: 50182572

加藤孝一 (KATO, Koichi)

日本大学薬学部・准教授

研究者番号: 60246931

市原学 (ICHIHARA, Gaku)

東京理科大学薬学部薬学科・教授

研究者番号: 90252238

(3)連携研究者

(4)研究協力者

下田康代 (SHIMODA, Yasuyo)

日本大学薬学部・助教

研究者番号: 70779420