

論文審査の結果の要旨

氏名：田 崎 雅 子

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：酸化ストレス発生系を有する非遺伝毒性発がん物質の発がん機序解明に関する研究

審査委員：（主 査） 教授 丸 山 総 一

（副 査） 教授 湯 川 眞 嘉 教授 佐 藤 常 男

准教授 壁 谷 英 則

現在、日本における死因の第1位はがんで、我々の周囲に存在する膨大な数の化学物質の約80%が発がんとの関連性が疑われている。従って、種々の化学物質の発がんリスクを適切に評価し、管理することが、我々が健全な生活を営む上で重要であるといえる。

現在、げっ歯類に発がん性が確認された化学物質のうち、遺伝毒性試験で陰性を示した物質は、非遺伝毒性発がん物質（non-genotoxic carcinogen, 非遺伝毒性発がん物質）に分類されている。非遺伝毒性発がん物質の発がん機序の1つとして、解毒・代謝過程等で生じる酸化還元反応や活性酸素消去系酵素の枯渇等により生じる酸化ストレスが、細胞に増殖刺激を与えることで発がん性を示すことが考えられている。また、酸化ストレスはDNAにも傷害を与え、遺伝子突然変異を生じることから、非遺伝毒性発がん物質の酸化ストレスによる遺伝子傷害が、発がんに関与している可能性も示唆されている。

本研究では、非遺伝毒性発がん物質の生体に与える酸化ストレスが、発がんを惹起するメカニズムを解明することを目的に、酸化ストレス発生系が異なる3種の非遺伝毒性発がん物質であるピペロニルブトキシド（PBO）、フェノバルビタール（PhB）、ペンタクロロフェノール（PCP）を遺伝子改変動物にそれぞれ投与し、標的臓器である肝臓における酸化的DNA損傷、遺伝子変異（*in vivo*変異原性）の発生、ならびに発がん過程における酸化ストレスの作用点について解析した。

第1章 チトクロムP450誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の酸化的DNA損傷ならびに*in vivo*変異原性の検討

薬物代謝酵素であるチトクロムP450（CYP）のうち、CYP1Aと2Bは、薬物を代謝する過程で効率的に活性酸素を発生することから、これらの酵素誘導能をもつ非遺伝毒性発がん物質は、酸化ストレスを発生させDNAに傷害を与えて発がんを惹起することが示唆されている。本章では、レポーター遺伝子を導入した*gpt delta*ラットを用い、CYP誘導能を有するPBOあるいはPhBが肝臓に酸化的DNA損傷をもたらすか、また*in vivo*において変異原性を有するかについて検討した。

6週齢雄のF344系*gpt delta*ラット（1群5匹）に、発がん用量である20,000ppmのPBOあるいは500

ppm の PhB をそれぞれ 4 週間ないし 13 週間混餌投与した。投与期間終了後、ラットの肝臓中の、*CYP 1A1*、*1A2*、*2B1* の mRNA レベルを RT-PCR 法により測定するとともに、酸化 DNA 損傷マーカーである 8-OHdG 量を HPLC-ECD 法により測定した。また、点突然変異を検出する *gpt* ならびに欠失変異を検出する *red/gam* 遺伝子の突然変異体頻度 (mutant frequency; MF)、免疫染色により細胞増殖活性マーカーである proliferation cell nuclear antigen (PCNA) の陽性肝細胞率を、さらに肝前がん病変のマーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) の陽性細胞巢の定量解析を行った。

解析の結果、PBO 投与群で *CYP 1A1*、*1A2*、*2B1* の、PhB 投与群で *CYP 2B1* の mRNA レベルの上昇が確認された。一方、8-OHdG 量の有意な上昇は、PBO 投与群のみに認められた。PBO、PhB 投与群のいずれにおいてもレポーター遺伝子の MF に有意な変化は認められなかった。PCNA 陽性肝細胞率は、PBO の 4 週間投与群で有意に増加したが、GST-P 陽性細胞巢の定量解析では、何れの投与群においても変化は見られなかった。

PBO 投与群では、*CYP 1A1*、*1A2* の mRNA レベルを顕著に上昇させるとともに、8-OHdG 量の増加をもたらしたことから、CYP1A ファミリーが発生する酸化的ストレスは、DNA を酸化させることが示唆された。しかしながら、PBO ならびに PhB 投与群で、*in vivo* 変異原性ならびに肝前がん病変の増加は認められなかったことから、CYP 代謝で生じる酸化ストレスが、発がん過程において遺伝毒性的に作用する可能性は低いことを明らかにすることができた。

第 2 章 キノン体生成能・チトクロム P450 誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の酸化的 DNA 損傷と *in vivo* 変異原性の検討

p53 遺伝子は DNA 修復やアポトーシスに関わるがん抑制遺伝子として知られており、近年では、その発現蛋白質が抗酸化酵素群の転写因子として働くことも報告されている。従って *p53* 遺伝子が欠損したマウスは、酸化ストレス発生系を有する発がん物質に対して高感受性を示すことが予想される。そこで本章では、*p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを用い、キノン体となって酸化ストレスを発生する PCP ならびに CYP 誘導能を有する PBO と PhB が、標的臓器である肝臓において酸化的 DNA 損傷をもたらすか、また、*in vivo* において変異原性を有するかについて検討した。

7 週齢雄 C57BL/6 系 *gpt delta* の *p53* 遺伝子欠損型およびその野生型マウス (1 群 5 匹) に、発がん用量である PCP の 600 ppm、PBO の 6,000 ppm、PhB の 500 ppm をそれぞれ 13 週間混餌投与した。投与期間終了後、第 1 章と同様の方法でマウス肝臓中の *CYP1A1*、*1A2*、*2B10* の mRNA レベルならびにキノン還元酵素 (NAD (P) H:quinone oxidoreductase 1; NQO1) をコードする遺伝子の mRNA レベル、8-OHdG 量を測定するとともに、*gpt* ならびに *red/gam* の MF を解析した。

PCP を投与した野生型マウスでは、*NQO1* の mRNA レベルの有意な上昇、ならびに 8-OHdG 量の有意な増加が認められたが、*gpt* ならびに *red/gam* の MF の上昇は認められなかった。一方、*p53* 遺伝子欠損型のマウスでは、これらの結果に野生型との差は認められなかった。

PBO ならびに PhB を投与された野生型マウスでは、*CYP2B10* の mRNA レベルが上昇し、PBO 投与群では、*CYP1A1*、*1A2* に加え *NQO1* の mRNA レベルの上昇も観察された。8-OHdG 量は、PBO 投与群のみで有意に増加した。一方、*p53* 遺伝子欠損型マウスでは、いずれの投与群においても野生型と同様に各 mRNA の発現レベルが上昇したが、8-OHdG 量に有意な変化はなかった。*gpt* ならびに *red/gam* の MF は、野生型、*p53* 遺伝子欠損型マウスのいずれにおいても変化は認められなかった。

以上から、PCP および PBO は野生型マウスの肝臓に酸化 DNA 損傷を誘発することが明らかとなった。また、PBO は、*NQO1* の mRNA レベルの有意な上昇を起こしたことから、肝臓における PBO の酸化ストレス発生源には、CYP 誘導とキノン体の形成が関与している可能性が考えられた。しかしながら、いずれの非遺伝毒性発がん物質投与群においても、肝臓における変異原性は認められず、また *p53* 遺伝子欠損型 *gpt* delta マウスにおいても MF が上昇しなかったことから、キノン体の酸化還元サイクルや CYP 誘導により生じる酸化ストレスは、核内 DNA を酸化するものの、遺伝子変異を引き起こさないことを明らかにした。

第 3 章 PCP および PBO の腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点の解析

Nrf2 は、酸化ストレスにより活性化される抗酸化酵素群の転写因子であり、生体内で生じる酸化を防御する重要な因子と考えられている。本章では、8-OHdG の増加をもたらすことが明らかとなった PCP および PBO について *nrf2* 遺伝子欠損マウスを用いて、腫瘍発生過程における酸化ストレスの作用点について検討した。

7 週齢、雄の ICR 系 *nrf2* 遺伝子の欠損型および野生型マウス（1 群 15～20 匹）に、PCP の 600 ppm あるいは 1,200 ppm を 60 週間混餌投与し、肝臓の病理組織学的解析を行った。さらに同系のマウスに、PBO の 3,000 ppm あるいは 6,000 ppm を混餌投与し、8 週間投与した個体（1 群 5 匹）については、血清中の肝障害マーカー（ALT、AST、ALP）と 8-OHdG 量の測定を、52 週間投与した個体（1 群 25～30 匹）については肝臓の病理組織学的解析を行った。

PCP の投与により胆管線維症（cholangiofibrosis; CF）が野生型および *nrf2* 遺伝子欠損型マウスに高頻度に認められた。同病変は、600 ppm 投与群の *nrf2* 遺伝子欠損型マウスにおいてのみ有意な頻度で観察された。一方、胆管がん（cholangiocarcinoma; CC）の発生頻度は、*nrf2* 遺伝子欠損型マウスの 1,200 ppm 投与群のみで有意に増加した。

本研究において、PCP の低濃度を投与した *nrf2* 遺伝子欠損型マウスで CF が観察されたこと、また、PCP の短期投与で 8-OHdG が増加することが報告されていることから、PCP の胆管障害の発生機序に酸化ストレスが関与していることが考えられた。さらに、高濃度の PCP を投与した *nrf2* 遺伝子欠損型マウスでは、CC を生じた個体の発生頻度が野生型マウスに比べ有意に高かったことから、前がん病変である CF から CC への進展にも酸化ストレスが深く関与していることが明らかとなった。

PBO を投与したマウスでは、8 週間後の血清中の肝障害マーカーに顕著な変化は認められなかった。8-OHdG 量は、野生型および *nrf2* 遺伝子欠損型マウスの 6,000 ppm 群で有意に増加し、*nrf2* 遺伝子欠損型マウスでは 3,000 ppm の投与でも有意な増加を示した。PBO 投与 52 週間後の肝臓では、再生性肝細胞過形成（regenerative hepatocellular hyperplasia; RHH）が野生型および *nrf2* 遺伝子欠損型マウスに認められたが、その発生頻度に差は見られなかった。一方、肝細胞腺腫（hepatocellular adenoma; HCA）は、6,000 ppm を投与した *nrf2* 遺伝子欠損型マウスで高頻度に認められ、特に RHH 内に HCA を生じた個体の発生頻度は、野生型と比べて有意に高かった。

PBO を投与したマウスでは、血清中の肝障害マーカーの変動と慢性的な肝障害に続いて形成される RHH の発生頻度に、野生型と *nrf2* 遺伝子欠損型で差異は認められなかったことから、PBO の肝障害に至るまでの初期過程に酸化ストレスは関与していないと考えられた。一方、PBO の長期投与で、RHH 内に HCA を生じた個体の発生頻度が、*nrf2* 遺伝子欠損型マウスで有意に高かったことから、PBO の投与により発生する酸

化ストレスは、前がん病変から腫瘍形成に至る過程に作用していることが明らかとなった。

本研究では、非遺伝毒性発がん物質の CYP 誘導により生体内で生じた酸化ストレスや、キノン体の酸化還元反応サイクルにより生じた酸化ストレスは、核内 DNA に酸化的傷害を与えるものの、遺伝子変異を引き起こす可能性は低いことを明らかにした。また、腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点は、非遺伝毒性発がん物質の種類により異なっていることを証明した。

生体における酸化ストレスの発生系に着目し、3 種の非遺伝毒性発がん物質の発がん機序について、酸化的 DNA 損傷と発がんの関連性を遺伝子改変動物を用いて明らかにした本研究成果は、環境中に広く存在する非遺伝毒性発がん物質のリスクを評価し、その管理をする上で重要な新知見を多く含んでいる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成26年 1月31日