

称号及び氏名 博士（獣医学） 豊沢 かおる

学位授与の日付 平成 17 年 9 月 20 日

論 文 名 「Molecular Pathological Studies on Carcinogenesis and Mechanism Underlying

Hepatocellular Adenomas Induced by Di(2-ethylhexyl)phthalate in rasH2 Mice 」(rasH2 マウスに

おける di(2-ethylhexyl)phthalate による肝細胞腺腫の誘発と発癌機序に関する分子病理学的研究)

論文審査委員 主査 小谷 猛夫

副査 松尾 三郎

副査 久保 喜平

副査 山手 丈至

## 論文要旨

医薬品の発癌性評価において、非臨床試験の *in vivo* 試験はこれまで2種のげっ歯類（通常はラットおよびマウス）を用いた長期癌原性試験（通常1年半～2年投与）が行われてきた。しかし、マウスは非発癌物質に対しても肝発癌の感受性が高く、ヒトの発癌性を検証するには適していないことが分かってきた。そこで、マウスの長期癌原性試験の代替法としてトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた短期試験（通常26週間投与）が考案され、rasH2, TG/AC, p53 ノックアウトマウスなどの有用性が検討されている。

rasH2 マウスは、3個のヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子とそのプロモーターを導入したトランスジェニックマウスで、遺伝子を導入した C57BL/6J 雄と正常な BALB/cByJ 雌の F<sub>1</sub> として得られ、polymerase chain reaction (PCR)法により導入遺伝子が確認されている。遺伝子が導入されてい

い F<sub>1</sub> は野生型 (non-Tg) マウスとなる。N-methyl-N-nitrosourea などの遺伝毒性物質の短期試験では、rasH2 マウスは non-Tg マウスより発癌物質に対する感受性が高いことが示された。rasH2 マウスでは腫瘍および正常組織のどちらにも導入遺伝子が発現しているが、正常組織では導入遺伝子の変異は見いだされていない。しかし、rasH2 マウスにおける自然発生性および化合物誘発性腫瘍に導入遺伝子の変異が常に見つかるわけではなく、その易発癌性の機序については不明な点が多い。一方、プラスチック可塑剤である di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)は、ペルオキシゾーム増生剤として知られる化合物の一つで、非遺伝毒性物質である。F344 ラットおよび B6C3F<sub>1</sub> マウスの長期癌原性試験では、DEHP により肝腫瘍が誘発されるが、肝腫瘍誘発の機序については未だ明らかになっていない。

本研究は、rasH2 マウスに非遺伝毒性物質である DEHP および遺伝毒性物質である ethylnitrosourea (ENU)を投与することにより誘発される腫瘍の特性を病理学的に解析するとともに、導入遺伝子における発癌機序の違いを明らかにし、さらに、DEHP 投与により好発した肝細胞腺腫について、その発癌機序を分子病理学的に明らかにすることを目的として行った。

## 第 1 章 rasH2 マウスにおける DEHP 混餌投与による発癌性の病理学的解析

rasH2 マウスにおける DEHP の発癌性を評価するため、1 群雌雄各 15 匹の rasH2 マウスに DEHP を 1,500, 3,000 および 6,000 ppm の濃度で 26 週間混餌投与した。また、1 群雌雄各 15 匹の non-Tg マウスに DEHP を 6,000 ppm の濃度で 26 週間混餌投与する群も設けた。

rasH2 および non-Tg マウスとも、生存率および摂餌量については、DEHP 投与による影響は認められなかった。DEHP 6,000 ppm 群では対照群と比較して投与期間終了時に 10%程度の体重増加抑制が認められ、最高用量として適切な投与量であることが示された。DEHP 投与により、すべての DEHP 投与群で好酸性顆粒を伴った肝細胞腫大が認められた。また、肝細胞腺腫が雄の rasH2 マウスに発生し、その発生率は 1,500, 3,000 および 6,000 ppm 群で、それぞれ 7, 13 および 27%と用量相関性に増加し、DEHP 投与により rasH2 マウスに肝腫瘍が誘発されることが示された。しかし、肝腫瘍における導入遺伝子において、PCR 法によりホットスポットであるコドン 12 および 61 に変異は認められなかった。

## 第 2 章 rasH2 マウスにおける ENU 誘発腫瘍の導入遺伝子の変異および過剰発現の解析

本章では、遺伝毒性物質である ENU を単回腹腔内投与した rasH2 マウスに誘発された腫瘍(肺腺癌、皮膚・前胃の扁平上皮癌)について導入遺伝子の変異とその発現量を解析した。PCR-RFLP 法を用いた導入遺伝子のコドン 12 における検査では、いずれの腫瘍においても変異は認められなかった。しかし、PCR-SSCP 法を用いた導入遺伝子のコドン 61 における検査では、すべての腫瘍で変異が認められた。さらにリアルタイム半定量 PCR 法を用いた導入遺伝子の発現量の測定では、肺腺癌、皮膚および前胃の扁平上皮癌において、それぞれ、正常肝組織の 1.71~4.77

倍, 3.04~5.18 倍および 3.00~5.67 倍であった。このように, 遺伝毒性物質である ENU 誘発腫瘍において導入遺伝子の変異および過剰発現することが示され, これらが rasH2 マウスにおける ENU による発癌機序の一因であることを明らかにした。

### 第 3 章 rasH2 マウスにおける DEHP 誘発肝細胞腺腫の発癌機序

#### 第 1 節 rasH2 マウスにおける DEHP 誘発肝細胞腺腫の導入遺伝子および peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$ 遺伝子の過剰発現の解析

第 1 章では, DEHP 誘発肝腫瘍において導入遺伝子の変異を見いだすことはできなかった。そこで, 発癌の原因遺伝子として最も可能性が高いと考えられた導入遺伝子と PPAR  $\alpha$  遺伝子の発現量について, リアルタイム半定量 PCR 法を用いて検討した。細胞増殖活性の指標である抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色による陽性核数は肝腫瘍の方が周囲正常肝組織より明らかに多いにも拘わらず, 導入遺伝子および PPAR  $\alpha$  遺伝子の発現量は肝腫瘍と周囲正常肝組織で差がなかった。これらの結果から, rasH2 マウスの DEHP の肝腫瘍誘発に導入遺伝子および PPAR  $\alpha$  遺伝子の過剰発現は関与していないことが明らかとなった。

#### 第 2 節 rasH2 マウスにおける DEHP 誘発肝細胞腺腫の DNA マイクロアレイ解析

本節では DEHP の発癌に関連する遺伝子を見いだすため, DNA マイクロアレイを用いた遺伝子解析を実施した。肝腫瘍と周囲正常肝組織を比較すると, 細胞周期と細胞増殖に関連した 24 の遺伝子の発現が増加していた。これらのうち, cyclin D1, endothelial cell-specific molecule 1 および insulin-like growth factor binding protein 1 の 3 つの遺伝子は 4 倍以上の著しい発現増加を示し, 発癌に関連している可能性が高いと考えられた。

細胞周期と細胞増殖に関連した 24 の遺伝子のうち, R-ras 遺伝子の発現も増加しており, 免疫染色により肝腫瘍の細胞質に Ras 蛋白が認められた。数種類ある ras 遺伝子はいずれも Ras 蛋白を産生するが, 導入遺伝子だけでなく, 内因性の ras 遺伝子も加わり, 総計として Ras 蛋白が過剰に産生され, 肝腫瘍の発生に係っている可能性が考えられる。DNA マイクロアレイおよび病理組織学的検査により, 肝腫瘍と周囲正常肝組織での脂肪代謝の違いも明らかにされた。すなわち, DEHP は PPAR  $\alpha$  を介して遊離脂肪酸の  $\beta$  酸化を促進させるが, DEHP により誘発された肝腫瘍ではむしろ  $\beta$  酸化が減退しており, これらの違いも発癌性に一役かっているのかもしれない。

### 総括

発癌性試験の代替法として利用され始めている rasH2 マウスを用いて, 非遺伝毒性物質である DEHP (ペルオキシゾーム増生剤) および遺伝毒性物質である ENU を投与することによる発癌性の評価と, その際に好発した肝細胞腺腫の発癌機序について分子病理学的な解析を行い, 以下

の成績を得た。

1. DEHP を 26 週間混餌投与することにより、雄 *rasH2* マウスにおいて肝細胞腺腫が用量相関性に増加した。しかし、肝腫瘍での導入遺伝子のホットスポットであるコドン 12 と 61 に変異は認められなかった。
2. 一方、遺伝毒性物質である ENU を *rasH2* マウスに投与し誘発した肺腺癌、皮膚・前胃の扁平上皮癌においては、導入遺伝子の変異と過剰発現が生じ、これらが遺伝毒性物質の発癌性の一因であることを明らかにした。
3. *rasH2* マウスの DEHP 誘発肝腫瘍の発癌機序を解明するために、導入遺伝子と、ペルオキシゾーム増生剤の生物学的作用を仲介する PPAR $\alpha$  遺伝子を解析したが、これらの過剰発現はみられなかった。
4. そこで、DEHP 誘発肝腫瘍の DNA マイクロアレイを用いた遺伝子解析では、細胞周期と細胞増殖に関連した遺伝子、特に *cyclin D1*, *endothelial cell-specific molecule 1* および *insulin-like growth factor binding protein 1* が著しく高発現することを明らかにし、これらの遺伝子が DEHP の肝腫瘍発癌に関与していることが示唆された。
5. これに加え、DEHP 誘発肝腫瘍では *R-ras* 遺伝子の発現増加および Ras 蛋白の過剰産生がみられ、肝発癌への関与が示唆された。さらに、肝腫瘍と周囲正常肝組織での脂肪代謝の違いを明らかにし、この違いも発癌性に関与している可能性が示された。
6. これら一連の研究成果は、肝腫瘍の発癌機序の一端を明らかにするとともに、*rasH2* マウスを用いた非遺伝毒性物質の癌原性試験を行う上で、有用で基礎的な情報を提示している。

## 審査結果の要旨

医薬品の発癌性評価において、非臨床試験の *in vivo* 試験はこれまで2種のげっ歯類（通常はラットおよびマウス）を用いた長期癌原性試験（1.5〜2年）が行われてきた。しかし、マウスは非発癌物質に対しても肝発癌の感受性が高く、ヒトの発癌性を検証するには適していないことが分かってきた。そこで、マウスの長期癌原性試験の代替法として遺伝子改変マウスを用いた短期試験（26週間）が考案され、*rasH2*, *TG/AC*, *p53* ノックアウトマウスなどの有用性が検討されている。

*rasH2* マウスは、3個のヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子とそのプロモーターを導入されたトランスジェニックマウスで、*N-methyl-N-nitrosourea* などの遺伝毒性物質の短期試験では、発癌物質に対する感受性が高いことが示されている。導入遺伝子は腫瘍および正常組織のどちらにも発現しているが、正常組織では導入遺伝子の変異は見いだされていない。しかし、*rasH2* マウスの自然発生および化合物誘発腫瘍に導入遺伝子の変異が常に見つかるわけではなく、その易発癌性の機序については不明な点が多い。一方、プラスチック可塑剤である *di(2-ethylhexyl)phthalate* (DEHP) は、ペルオキシゾーム増生剤として知られる化合物の一つで、非遺伝毒性物質である。従来の長期癌原性試験では DEHP により肝腫瘍が誘発されるが、肝腫瘍誘発の機序については未だ明らかになっていない。

本研究は、*rasH2* マウスに非遺伝毒性物質である DEHP および遺伝毒性物質である *ethylnitrosourea* (ENU)を投与することにより誘発される腫瘍の特性を病理学的に解析するとともに、導入遺伝子における発癌機序の違いを明らかにし、さらに DEHP 投与により好発した肝細胞腺腫について、その発癌機序を分子病理学的に明らかにすることを目的として行い、以下の成績を得た。

1) DEHP を 26 週間混餌投与することにより、雄 *rasH2* マウスにおいて肝細胞腺腫が用量相関性に増加した。しかし、肝腫瘍での導入遺伝子のホットスポットであるコドン 12 と 61 に変異は認められなかった。

2) 一方、遺伝毒性物質である ENU を *rasH2* マウスに投与し誘発した肺腺癌、皮膚・前胃の扁平上皮癌においては、導入遺伝子の変異と過剰発現が生じ、これらが遺伝毒性物質の発癌性の一因であることを明らかにした。

3) *rasH2* マウスの DEHP 誘発肝腫瘍の発癌機序を解明するために、導入遺伝子と、ペルオキシゾーム増生剤の生物学的作用を仲介する *peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$*  遺伝子を解析したが、これらの過剰発現はみられなかった。

4) そこで、DEHP 誘発肝腫瘍の DNA マイクロアレイを用いた遺伝子解析では、細胞周期と細

胞増殖に関連した遺伝子，特に cyclin D1, endothelial cell-specific molecule 1 および insulin-like growth factor binding protein 1 が著しく高発現することを明らかにし，これらの遺伝子が DEHP の肝腫瘍発癌に関与していることが示唆された。

5) これに加え，DEHP 誘発肝腫瘍では R-ras 遺伝子の発現増加および Ras 蛋白の過剰産生がみられ，肝発癌への関与が示唆された。さらに，肝腫瘍と周囲正常肝組織での脂肪代謝の違いを明らかにし，この違いも発癌性に関与している可能性が示された。

以上のように本研究では，発癌性試験の代替法として利用され始めている rasH2 マウスを用いて，非遺伝毒性物質である DEHP および遺伝毒性物質である ENU による発癌性の機序について分子病理学的解析を行い，rasH2 マウスを用いた癌原性試験代替法を行う上で，有用で基礎的な情報を提示している。これらの成果は，毒性病理学や実験動物医学の発展に大きく貢献するものであり，本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて，申請者に対し、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。