

労災疾病臨床研究事業費補助金

芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 周五

令和3（2021）年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発	-----	1
鈴木周五		
II. 分担研究報告		
1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割		
尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明	-----	9
鈴木周五		
2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明	-----	13
鰐淵英機		
3. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割	-----	16
末水洋志		
4. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明	-----	19
戸塚ゆ加里		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	22

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和2年度総括研究報告書

芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発 (200502-01)

研究代表者 鈴木 周五 大阪市立大学 分子病理学 准教授

研究要旨

本研究は、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価することを目標として、ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割を検討し、尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明を行う。本年度は、改良型 TK-NOG マウスを用いて、11ヶ月齢ヒト由来の肝細胞を移植したマウスにおいて、ヒト肝細胞比率が平均 93.8%と高いヒト化肝臓マウスの作成が出来た。そのヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割を検証する実験として、*o*-toluidine hydrochloride (OTD) を4週間投与した。その結果、OTD は野生型マウスよりもヒト化肝臓マウスで体重抑制などの毒性が強く認められたが、いずれのマウス群においても OTD 投与によるマウス尿路上皮への影響について対照群との差は見られなかった。尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がん性の関係および機序の解明を検証する実験として、福井県の化学工場において取り扱いのあった4種の芳香族アミンを用いて、ラットに4週間の投与実験を行った結果、OTD および acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) 投与群において尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めた。がんや細胞増殖に関わる遺伝子発現変動が、OTD および AAOT 投与群に共通して認められた。また、尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、膀胱に増殖性病変を示した OTD および AAOT 投与群において検出された主な尿中の芳香族アミンは OTD であった。膀胱尿路上皮への影響は、AAOT 群よりも OTD 群において強いことから、OTD 群で尿中濃度がより高い OTD や 4-amino-*m*-cresol、2-amino-*m*-cresol が、膀胱増殖性に対して影響する代謝物である可能性が示された。以上より、ヒト肝細胞比率の高いヒト化肝臓マウス作成法が確立され、OTD の代謝や尿中排泄への影響を検証可能となった。また、OTD を主体とした芳香族アミンおよび代謝物が、ラット膀胱尿路上皮に発がん性影響を与えることが判明し、がんや細胞増殖に関わる遺伝子の発現変動が確認出来た。

研究分担者

鰐淵 英機 大阪市立大学 分子病理学 教授
末水 洋志 実験動物中央研究所 研究部門 部門長
戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所
ユニット長

A. 研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱癌は社会的な問題の一つであり、最近でも福井県の化学工場において、*o*-toluidine (OTD) 等の芳香族アミンを取り扱う従事者から膀胱癌が発生しており、今後も類似の芳香族アミン類による職業膀胱癌発生の危険性が存在する可能性は高い。

我々は福井県の化学工場において取り扱いのあった acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) に着目して、その毒性や発がん性を検討した結果、動物実験により膀胱発がん促進作用を確認するとともに、尿中に OTD および OTD 代謝物を検出した。これらの結果は、AAOT が既知の膀胱発がん物質 OTD に代謝され尿中に排泄されることが、膀胱発がん促進作用に関与している可能性を示した。この成果は、化学物質の有害性評価において、異なる物質でも類似の代謝経路を通る化学物質が共通の有害性を持ち、包括的な評価手法を確立出来る可能性を示した。

そこで、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価できるかを検証した。方法として、「ヒト化肝臓マウス」を用いて、ヒトでの芳香族アミン代謝を実現し、芳香族アミンの代謝および膀胱発がん性につい

て検討を行った。また、ラットに種々の芳香族アミンを投与し、尿中代謝物とその膀胱発がん性を種々の方法で検討し、膀胱に対する発がん原因となる芳香族アミン代謝物の同定とともにその発がん機序を解明を試みた。

令和2年度は、「ヒト化肝臓マウス」に対して、ヒト膀胱には発がん性を示すものの、マウスでは発がん性を示さない OTD を投与し検討した (末水、鈴木、鰐淵)。また、ラットに対しては、福井県の化学工場において取り扱いのあった芳香族アミン OTD や AAOT、anilinium、*p*-toluidine について投与し検討を行った (鈴木、鰐淵、戸塚)。

B. 研究方法

課題 1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

ヒト化肝臓マウスの作成のため、Herpes simplex virus thymidine kinase 遺伝子を肝細胞特異的に発現する超免疫不全 NOD/*scid*-*IL-2rgc* (TK-NOG) マウスを交配により作出した。ガンシクロビル投与によりマウス肝細胞を選択的に破壊した後、脾臓門脈経路でヒト肝細胞を移植した。血中ヒトアルブミン濃度の上昇によりヒト肝細胞の生着を確認し、移植に適した肝細胞ロットの選抜を行う目的で、異なるロット (A 細胞; 12 歳由来、B 細胞; 11ヶ月齢由来) のヒト肝細胞を移植した。実験に安定供給できる体制づくりと移植したヒト肝細胞に増殖性の良い肝傷害条件を検討した。

また、作成したヒト化肝臓マウスおよび非移植群の F1-TKm30 マウスに、0.6% *o*-toluidine hydrochloride (OTD)を混餌投与した。投与第4週目および解剖時に新鮮尿を採取し、凍結保存を行った。4週間後に麻酔下採血により屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。血液は血漿を分離し凍結保存した。肝臓は主な葉を切り出し標本を作製するとともに、一部を凍結保存した。肝組織標本に対して抗ヒトミトコンドリア抗体で免疫組織化学染色を行い、肝組織内のヒト肝細胞比率を計測した。膀胱は、膀胱腔内にホルマリンを注入固定し、標本を作製した。膀胱組織については、Ki67の免疫組織染色を行い、標識率を検討した。

課題2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

6週齢 F344 雄ラットに、0.6% anilinium chloride (ANL)、0.6% *p*-toluidine hydrochloride (PT)、1.5% acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT)および0.6% *o*-toluidine hydrochloride (OTD)を混餌投与した。投与第4週目に新鮮尿を採取し、凍結保存を行った。4週間後に麻酔下採血により屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。血液は血漿を分離し凍結保存した。肝臓は主な葉を切り出し標本を作製するとともに、一部を凍結保存した。膀胱は、膀胱腔内にホルマリンを注入固定し、標本を作製した。膀胱組織については、Ki67の免疫組織染色および ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit で TUNEL 染色を行い、それぞれの標識率を検討した。網羅的遺伝子発現解析用に、膀胱粘膜上皮を ISOGEN により剥離し total RNA を抽出・精製した。Microarray を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。また、芳香族アミンを投与した尿路上皮で変動した遺伝子について、Ingenuity Pathways Analysis (IPA)を用いて関連する機能について検討した。DNA 採取用に、膀胱組織を粘膜面を外側にして凍結保存した。また、DNA を用いた解析の対照臓器として、尾および心臓を採取し、凍結保存した。

採取した尿は、各群5匹ずつ Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)を用いて、尿中における芳香族アミンおよび代謝物を測定した。測定した物質およびその測定限界値は、それぞれ、ANL (3.4 nmol/mL)、Acetanilide (AAD; 1.5 nmol/mL)、Acetaminophen (AAP; 5 nmol/mL)、PT (1.8 nmol/mL)、6-Amino-*m*-cresol (6AMC; 2.0 nmol/mL)、AAOT (1.8 nmol/mL)、OTD (2.5 nmol/mL)、N-Acetyl-*o*-toluidine (NAOT; 1.2 nmol/mL)、4-Amino-*m*-cresol (4AMC; 5.4 nmol/mL)、2-Amino-*m*-cresol (2AMC; 2.2 nmol/mL)である。

膀胱粘膜上皮から DNA を回収するため、Tissue Lysis Buffer を入れたすり面付き 1.5mL チューブ (バイオマッシャーII) 内で膀胱粘膜上皮を剥離し、Proteinase K および SDS を加えて 37°C一晩反応させ、フェノール・クロロホルム法により DNA 抽出を行なった。イソプロパノール沈殿後に適量の TE に溶解し、分光光度計により DNA 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

各施設の動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。本研究で使用したヒト肝細胞は全て一般市場から購入した細胞で患者個人情報に結びつくものは無く、個人の人権、利益に支障を及ぼさない手続きがなされている。

C. 研究結果

課題1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

本年度は、ヒト肝臓マウス作成に、雄性が不妊にならない改良型TK-NOGを使用した。25mg/kgガンシクロビル投与群6匹と37.5mg/kgガンシクロビル投与群6匹の血中ALTレベルを比較すると37.5mg/kg投与群が全体的に高値を示した。ヒト肝細胞・ロットA移植群では移植4週後も血中ヒトアルブミン濃度が1 mg/mLに達しなかったのに対し、ロットB移植群では6匹中4匹が移植4週後に2 mg/mLを越えていた。移植後約10週のヒトアルブミン濃度はロットA移植群で最高3.3 mg/mLであったのに対し、ロットB移植群では16 mg/mLに達した。

ロットB移植群については、OTDを混餌投与する実験に供した。代表的な肝組織像および抗ヒトミトコンドリア抗体による免疫組織化学染色を図1に示す。大半の肝細胞がやや小型なヒト肝細胞で構成され、抗体陽性となることが確認出来た。合計5匹のヒト細胞の占有率を求めたところ、平均93.8%であった。

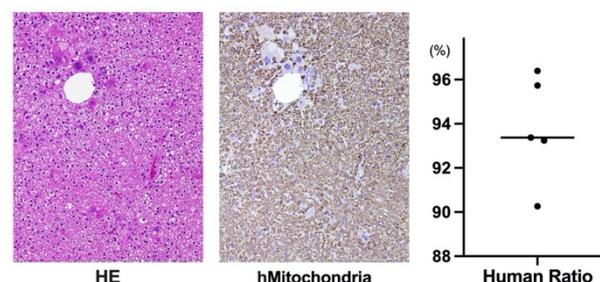


図1. 肝組織像、ヒトミトコンドリア抗体による免疫組織化学染色およびヒト肝細胞比率

芳香族アミン投与試験の開始1週間後にヒト化肝臓マウスの0.6% OTD投与群において体重減少 (平均18.8gから15.9gに低下) を来したため、以降は0.3%に濃度変更を行った。その結果、体重は増加傾向を認め途中死亡することなく実験は終了した (表1)。また、ヒト化肝臓マウスでは、野生型マウスに比べ肝の絶対および相対重量が高かった。いずれのマウス群においても、OTD投与により肝重量増加傾向が見られた (表1)。

表1. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

Liver	OTD	No. of mice	Body weight (g)		Liver	
			Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
野生型	-	3	26.0 ± 1.3	26.5 ± 1.7	1.06 ± 0.14	4.0 ± 0.3
ヒト化肝臓	-	2	20.3 ± 4.8	23.3 ± 1.3	2.41 ± 0.07	10.4 ± 0.9
野生型	+	5	26.0 ± 1.4	26.2 ± 1.8	1.23 ± 0.09	4.7 ± 0.3
ヒト化肝臓	+	3	18.8 ± 4.2	16.7 ± 2.6	1.97 ± 0.32	11.8 ± 0.3

肝臓を病理組織学的に検討した結果、OTD投与による組織学的な変化はヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれにおいても見られなかった (図1)。

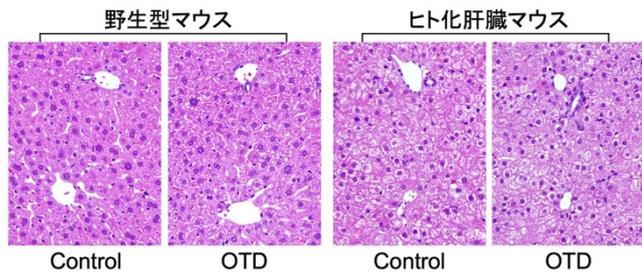


図1. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの肝組織像

膀胱組織を検討した結果、ヒト化肝臓マウスのOTD投与群において、1匹のみ軽度肥厚傾向を認めたものの、いずれのマウス群においてもOTD投与による単純過形成病変など、病変として診断しうる組織学的な変化は見られなかった (図2)。細胞増殖活性の指標であるKi67の陽性率を検討した結果、野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスそれぞれ1匹のみ高い陽性率を示す個体が存在したが、OTD投与による有意な上昇は見られなかった (図3)。

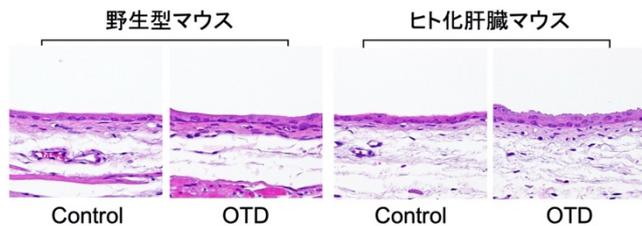


図2. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

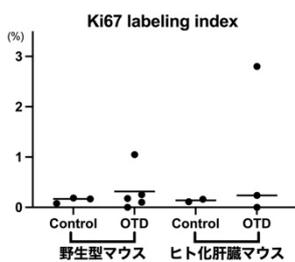


図3. 膀胱尿路上皮のKi67陽性率

課題 2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

試験開始1週間後に0.6% PT投与群が体重減少を来したため、以降は0.3%に濃度変更を行った。試験期間中、芳香族アミン投与群いずれも対照群に比べ、体重増加抑制傾向を認めた。屠殺・剖検時の体重は、芳香族アミン投与群において、いずれも有意に抑制された (表2)。また、実験開始1週目は、芳香族アミン投与群いずれにおいても摂餌や飲水量は対照群に比べ低かった。一方、2週目以降は、対照群と差が見られなかった (表2)。

表2. 体重および摂餌・飲水量

Treatment	Body weight (g)	Consumption (1st week)		Consumption (2 to 4 weeks)	
		Food (g/day)	Water (g/day)	Food (g/day)	Water (g/day)
Control	228.2 ± 8.3	12.3 ± 0.4	18.7 ± 0.8	13.4 ± 0.5	20.0 ± 0.9
ANL	214.7 ± 6.5 ***	10.0 ± 0.3	17.9 ± 0.9	13.0 ± 0.6	20.9 ± 0.8
PT	200.2 ± 8.0 ***	5.0 ± 0.4	12.6 ± 1.3	12.8 ± 0.5	20.2 ± 1.3
AAOT	207.5 ± 10.1 ***	11.3 ± 0.7	18.0 ± 1.5	13.2 ± 0.7	19.2 ± 1.2
OTD	210.2 ± 8.2 ***	8.7 ± 0.6	16.2 ± 0.9	12.8 ± 0.3	20.3 ± 1.0

***: 0.001 vs Control, respectively

膀胱を組織学的に検討した結果、AAOTおよびOTD投与群において単純過形成病変 (simple hyperplasia) が対照群に比べ有意に増加していた (表3)。加えて、膀胱尿路上皮における細胞増殖活性の指標であるKi67陽性率を検討した結果、AAOTおよびOTD投与群において陽性率の有意な増加を認めた一方で、ANLやPTでは対照群と差がなかった (表3)。アポトーシスについてTUNEL陽性率を用いて検討した結果、いずれの群間でも差がなかった (表3)。

表3. 膀胱尿路上皮病変、Ki67およびTUNEL陽性率

Treatment	No. of rat	Simple hyperplasia	Ki67 (%)	TUNEL (%)
Control	6	0	1.7 ± 0.4	0.6 ± 0.4
ANL	6	0	2.0 ± 0.5	0.4 ± 0.3
PT	6	1	1.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2
AAOT	6	5*	3.6 ± 0.7***	0.5 ± 0.3
OTD	6	6**	4.9 ± 1.3***	0.6 ± 0.2

P < 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

Microarrayにより網羅的遺伝子発現解析を行った結果、対照群と比較し大きな発現変動を認めた遺伝子数が、OTD投与群では576遺伝子存在し、他の投与群 (ANL: 262遺伝子、PT: 253遺伝子、AAOT: 283遺伝子) に比べ多く認めた。また、4つの芳香族アミン投与群において共通した遺伝子発現変動を認めた遺伝子が103遺伝子存在し、発がん性とは別に芳香族アミン投与による影響が存在することが明らかとなった (表4)。

表4. 芳香族アミン投与により発現変動を認めた遺伝子数

Treatment	Up-regulated genes	Down-regulated genes	Total genes
Control	-	-	-
ANL	132	130	262
PT	134	119	253
AAOT	172	111	283
OTD	262	314	576
All aromatic amines	35	68	103

今回の実験でラット膀胱に増殖性病変を認めたAAOTおよびOTD投与群に共通して発現変動を認めた遺伝子について、IPAを用いて機能について解析を行った結果、「Cancer」や「Cellular Growth and Proliferation」など、膀胱発がんに関連する可能性がある遺伝子群が選出されていた (表5)。

表5. AAOTおよびOTD投与群で共通して変動する遺伝子の機能に基づいた分類

Diseases and Disorders	p-value range	# Molecules
Cancer	3.04E-03 - 1.03E-08	51
Organismal Injury and Abnormalities	3.04E-03 - 1.03E-08	56
Reproductive System Disease	3.04E-03 - 1.03E-08	26
Molecular and Cellular Functions	p-value range	# Molecules
Cellular Growth and Proliferation	3.04E-03 - 6.21E-08	35
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	3.04E-03 - 2.67E-07	18
Protein Synthesis	1.19E-05 - 2.69E-07	13
Physiological System Development and Function	p-value range	# Molecules
Tissue Development	3.04E-03 - 6.21E-08	26
Hematological System Development and Function	3.04E-03 - 2.67E-07	26
Immune Cell Trafficking	3.04E-03 - 2.67E-07	16

尿中の芳香族アミンおよび代謝物について解析した結果を、表6に示す。尿中に含まれる芳香族アミンおよび代謝物の総量は、OTD群において他の芳香族アミン投与群に比べ著しく高いことが確認出来た。特に投与濃度を加味して換算すると、OTD群は、ANL群に比べ約3倍、PT群に比べ約7倍、AAOT群に比べ約11倍も高い濃度割合で検出されている。

また、尿中の主な物質を検討した結果、ANL群は大半がAAPに代謝されていることが確認された。一方、PT群およびOTD群では代謝されていない投与物質であるPTおよびOTDが大半を占めていた。AAOT群では、大半が代謝されOTDが多く存在し、AAOTはわずかであった。

ラット尿路上皮への影響に基づいて、尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、膀胱に増殖性病変を示したAAOT群およびOTD群において検出された主な尿中の芳香族アミンはOTDであった。その尿路上皮への影響は、AAOT群よりもOTD群において強いことから、尿中濃度が高いOTDや4AMC、2AMCが、膀胱増殖性に対して影響がある代謝物の可能性が示された。

表6. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Treatment	No. of rat	Total AAs	ANL	AAD	AAP	PT	6AMC
Control	5	N.D.	N.D.	N.D.	14.3 ± 6.5	N.D.	N.D.
ANL	5	2733.9 ± 975.9	816.4 ± 350.9	3.6 ± 1.2	1908.4 ± 736.7	N.D.	N.D.
PT	5	658.1 ± 370.0	N.D.	N.D.	N.D.	644.1 ± 366.6	6.5 ± 2.9
AAOT	5	1957.4 ± 872.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OTD	5	8603.4 ± 1953.2	3.7 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Treatment	No. of rat	AAOT	OTD	NAOTD	4AMC	2AMC
Control	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ANL	5	N.D.	3.7 ± 0.7	N.D.	N.D.	N.D.
PT	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AAOT	5	63.9 ± 28.9	1562.7 ± 636.6	55.8 ± 12.2	214.2 ± 212.4	67.4 ± 28.7
OTD	5	N.D.	7955.9 ± 1704.8	19.8 ± 9.7	519.1 ± 802.0	103.5 ± 22.9

AA: acetaminophen; ANL: Aniline; AAD: Acetanilide; AAP: Acetaniliphen; PT: p-Toluidine; 6AMC: 6-Amino-m-crestol; AAOT: N-Acetoacetyl-o-toluidine; OTD: o-Toluidine; NAOTD: N-Acetyl-o-toluidine; 4AMC: 4-Amino-m-crestol; 2AMC: 2-Amino-m-crestol; N.D.: not detected

各群12匹ずつのラット尿路上皮から抽出したDNAの質および量について検討した結果を表7に示す。ほとんどの個体から総量20 μg以上のDNAが回収可能であることが確認出来た。また、260/280および260/230の比についても2に近いもしくは2以上の値であり、回収したDNAの質についても問題ないことが確認出来た。この結果は、高分解能精密質量分析装置を用いたDNA付加体の網羅的解析手法 (HRAM-アダクトーム) において、今回のDNA抽出・精製法により、個体ごとに解析を実施できるDNA量を回収可能なことが示された。

表7. ラット尿路上皮より抽出したDNA濃度と総量

	Sample Name	Concentration	Units	A260	260/280	260/230	Volume(μL)	(ug)	
Control	113	206.766	ng/μL	4.1353	1.91	2.20	45	9.3	
	114	167.467	ng/μL	3.3493	1.89	2.24	45	7.5	
	115	312.29	ng/μL	6.2458	1.96	2.16	45	14.1	
	116	496.831	ng/μL	9.9366	1.93	2.16	45	22.4	
	117	593.614	ng/μL	11.8723	1.96	2.15	45	26.7	
	118	666.822	ng/μL	13.3364	1.96	1.54	45	30.0	
	119	636.296	ng/μL	12.7259	1.94	2.20	45	28.6	
	120	815.979	ng/μL	16.3196	1.92	2.23	45	36.7	
	121	485.313	ng/μL	9.7063	2.04	2.18	45	21.8	
	122	872.206	ng/μL	17.4441	1.99	2.25	45	39.2	
	123	1109.056	ng/μL	22.1811	1.99	2.30	45	49.9	
	124	414.552	ng/μL	8.2910	2.00	2.18	45	18.7	
	ANL	213	631.45	ng/μL	12.6290	2.00	2.19	45	28.4
		214	889.765	ng/μL	17.7953	2.03	2.24	45	40.0
215		778.508	ng/μL	15.5702	2.01	2.24	45	35.0	
216		879.524	ng/μL	17.5905	2.04	2.17	45	39.6	
217		555.424	ng/μL	11.1085	1.98	2.15	45	25.0	
218		688.131	ng/μL	13.7626	1.98	2.19	45	31.0	
219		685.743	ng/μL	13.7149	1.98	2.23	45	30.9	
220		803.266	ng/μL	16.0653	1.96	2.28	45	36.1	
221		562.778	ng/μL	11.2556	2.02	2.18	45	25.3	
222		506.005	ng/μL	10.1201	1.99	2.16	45	22.8	
223		601.576	ng/μL	12.0315	2.04	2.16	45	27.1	
224		670.599	ng/μL	13.4120	2.00	2.22	45	30.2	
PT		313	486.624	ng/μL	9.7325	2.00	2.21	45	21.9
		314	736.835	ng/μL	14.7367	2.00	2.21	45	33.2
	315	874.751	ng/μL	17.4950	2.06	2.22	45	39.4	
	316	789.667	ng/μL	15.7933	2.04	2.16	45	35.5	
	317	798.845	ng/μL	15.9769	2.03	2.19	45	35.9	
	318	839.136	ng/μL	16.7827	2.02	2.20	45	37.8	
	319	798.307	ng/μL	15.9661	2.01	2.24	45	35.9	
	320	842.373	ng/μL	16.8475	2.02	2.25	45	37.9	
	321	825.72	ng/μL	16.5144	2.06	2.21	45	37.2	
	322	1204.04	ng/μL	24.0808	2.09	2.24	45	54.2	
	323	526.552	ng/μL	10.5310	2.05	2.20	45	23.7	
	324	979.544	ng/μL	19.5909	2.01	2.27	45	44.1	
	AAOT	413	882.03	ng/μL	17.6406	1.99	2.25	45	39.7
		414	787.68	ng/μL	15.7536	2.02	2.12	45	35.4
415		795.522	ng/μL	15.9104	1.99	2.22	45	35.8	
416		672.859	ng/μL	13.4572	2.00	2.19	45	30.3	
417		369.924	ng/μL	7.3995	1.95	2.14	45	16.6	
418		881.498	ng/μL	17.6300	2.02	2.23	45	39.7	
419		1040.424	ng/μL	20.8085	2.08	2.21	45	46.8	
420		773.625	ng/μL	15.4725	2.03	2.24	45	34.8	
421		572.066	ng/μL	11.4413	1.97	2.23	45	25.7	
422		676.079	ng/μL	13.5216	2.04	2.19	45	30.4	
423		584.041	ng/μL	11.6808	2.04	2.22	45	26.3	
424		808.083	ng/μL	16.1617	2.07	2.19	45	36.4	
OTD		513	1447.504	ng/μL	28.9501	2.04	2.02	45	65.1
		514	1938.769	ng/μL	38.7754	2.00	2.01	45	87.2
	515	1799.839	ng/μL	35.9968	2.05	2.09	45	81.0	
	516	1638.81	ng/μL	32.7762	1.94	1.87	45	73.7	
	517	1185.343	ng/μL	23.7069	1.88	2.03	45	53.3	
	518	940.735	ng/μL	18.8147	2.08	2.19	45	42.3	
	519	1559.078	ng/μL	31.1816	1.97	2.06	45	70.2	
	520	1979.162	ng/μL	39.5832	2.04	2.06	45	89.1	
	521	1367.069	ng/μL	27.3414	1.97	1.98	45	61.5	
	522	1277.515	ng/μL	25.5503	2.02	1.92	45	57.5	
	523	1332.5	ng/μL	26.6500	1.98	1.99	45	60.0	
	524	1947.156	ng/μL	38.9431	2.05	2.08	45	87.6	

*黄色マーカーは20 μg以上回収できているサンプル

D. 考察

課題1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

今回のヒト化肝臓マウス作成にあたり、改良型TK-NOG肝傷害マウスにおける生着性はロットA細胞 (12歳由来) よりもロットB細胞 (11ヶ月齢由来) の方がすぐれていることがわかった。より若齢の方が高い生着性を示すように見えるが、移植時のALTレベルがB細胞移植群の方が高かったことから、肝傷害の重症度が生着性に寄与する可能性も示唆された。

芳香族アミンOTDの混餌投与実験のヒト化肝臓マウスにおいて、OTD投与による毒性影響が野生型マウスよりも強く存在したことは、ヒト肝細胞においてより代謝が行われている可能性が推察される。一方、剖検屠殺時の肝組織においては、OTD投与による組織学的な変化が野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスいずれにおいても認められなかった。今後、肝組織における代謝酵素発現を検討し、ヒト肝細胞とマウス肝細胞におけるOTD代謝への代謝酵素発現の相違について検討予定である。

また、OTD投与による膀胱組織への影響を検討した結果、ヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれにおいても、組織学的な影響や細胞増殖活性への変化は有意な差が見られなかった。ラットで認められるOTD投与による過形成病変が、マウスにおいて認められない原因は、肝臓における代謝だけでなく、OTDおよびその代謝物に対する膀胱尿路上皮の感受性が、ラットとマウスで異なることに起因する可能性がある。今後、尿中や血清中のOTDおよび代謝物測定とともに、肝組織代謝酵素発現を検討する事で、ヒトへの外挿可能なデータを取得する予定である。

課題 2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

福井県の化学工場において取り扱いのあった芳香族アミンANL、PT、AAOTおよびOTDの4種についてラットを用いた動物実験を行った結果、OTDおよびAAOT投与群においてのみラット尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めた。その尿中の芳香族アミンおよび代謝物として一番多く認められた物質はOTDであり、OTDに関連した膀胱発がん作用が考えられた。興味深いことに、1.5%投与したAAOT群よりも、0.6% OTD投与群の方が尿中のOTDが高いことから、肝組織での代謝割合に大きな違いが予想される。また、AAOT群よりもOTD群で検出量の高いOTD代謝物である4AMCや2AMCが、膀胱尿路上皮への影響に寄与する可能性が存在する。

AAOT群およびOTD群の尿路上皮で、共通してみられた遺伝子発現変化は、がんや細胞増殖に関わる遺伝子が選出されていることが確認され、OTD関連発がん機序解明に重要な結果が得られた。今後は、代謝されOTDが発生する芳香族アミンや、OTDの代謝物など、OTD関連の芳香族アミンおよび代謝物に着目して、発がん性やその発がん機序解明への研究を行う予定である。加えて、各芳香族アミン投与による尿路上皮のDNA損傷をHRAM-アダクトームにより解析し、DNA付加体の生成を指標とした有害性評価について検討する予定である。

E. 結論

ヒト肝細胞比率の高いヒト化肝臓マウス作成法が確立され、OTDの代謝や尿中排泄への影響を検証可能となった。また、OTDを主体とした芳香族アミンおよび代謝物が、ラット膀胱尿路上皮に発がん性影響を与えることが判明し、がんや細胞増殖に関わる遺伝子の発現変動が確認出来た。

F. 健康危険情報

今回の研究において得られた成果の中で、健康危険情報に該当する情報は得られなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Methyl-hydroxylation and subsequent oxidation to produce carboxylic acid is the major metabolic pathway of tolbutamide in

chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica*. 2021; 51: 582-9.

- 2) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*. 2021; 112: 7-15.
- 3) Toda A, Shimizu M, Uehara S, Sasaki T, Miura T, Mogi M, Utoh M, Suemizu H, Yamazaki H. Plasma and hepatic concentrations of acetaminophen and its primary conjugates after oral administrations determined in experimental animals and humans and extrapolated by pharmacokinetic modeling. *Xenobiotica*. 2021; 51: 316-23.
- 4) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett*. 2021; 336: 32-8.
- 5) Shimizu M, Uehara S, Suemizu H, Yamazaki H. In vivo drug interactions of itopride and trimethylamine mediated by flavin-containing monooxygenase 3 in humanized-liver mice. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2021; 37: 100369.
- 6) Ruan X, Li P, Ma Y, Jiang CF, Chen Y, Shi Y, Gupta N, Seifuddin F, Pirooznia M, Ohnishi Y, Yoneda N, Nishiwaki M, Dumbovic G, Rinn JL, Higuchi Y, Kawai K, Suemizu H, Cao H. Identification of human long noncoding RNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic homeostasis. *J Clin Invest*. 2021; 131.
- 7) Myojin Y, Hikita H, Sugiyama M, Sasaki Y, Fukumoto K, Sakane S, Makino Y, Takemura N, Yamada R, Shigekawa M, Kodama T, Sakamori R, Kobayashi S, Tatsumi T, Suemizu H, Eguchi H, Kokudo N, Mizokami M, Takehara T. Hepatic Stellate Cells in Hepatocellular Carcinoma Promote Tumor Growth Via Growth Differentiation Factor 15 Production. *Gastroenterology*. 2021; 160: 1741-54 e16.
- 8) Morita H, Yasuda M, Yamamoto M, Tomiyama Y, Uchida R, Ka Y, Ogura T, Kawai K, Suemizu H, Hayashimoto N. Pathogenesis of murine astrovirus in experimentally infected mice. *Exp Anim*. 2021.
- 9) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2021; 112: 1746-57.
- 10) Miura T, Uehara S, Shigeta K, Yoshizawa M, Kamiya Y, Murayama N, Shimizu M, Suemizu H, Yamazaki H. Metabolic Profiles of Tetrabromobisphenol A in Humans Extrapolated from Humanized-Liver Mouse Data Using a

- Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *Chem Res Toxicol.* 2021; 34: 522-8.
- 11) Miura T, Kamiya Y, Uehara S, Murayama N, Shimizu M, Suemizu H, Yamazaki H. Hepatotoxicological potential of P-toluic acid in humanised-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models. *Xenobiotica.* 2021; 7: 1-7.
 - 12) Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley FG, Bernabe KG, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I. U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. *Virology.* 2021; 555: 71-7.
 - 13) Kishimoto K, Shimada A, Shinohara H, Takahashi T, Yamada Y, Higuchi Y, Yoneda N, Suemizu H, Kawai K, Kurotaki Y, Hanazawa K, Takashima Y, Sasaki E. Establishment of novel common marmoset embryonic stem cell lines under various conditions. *Stem Cell Res.* 2021; 53: 102252.
 - 14) Kanbe A, Ishikawa T, Hara A, Suemizu H, Nanizawa E, Tamaki Y, Ito H. Novel hepatitis B virus infection mouse model using herpes simplex virus type 1 thymidine kinase transgenic mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021; 36: 782-9.
 - 15) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1216.
 - 16) Ito R, Katano I, Otsuka I, Takahashi T, Suemizu H, Ito M, Simons PJ. Bovine beta-lactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/hGM-CSF transgenic mice. *Int Immunol.* 2021; 33: 183-9.
 - 17) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12: 558.
 - 18) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Human Aldehyde Oxidase 1-Mediated Carbazeren Oxidation in Chimeric TK-NOG Mice Transplanted with Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2020; 48: 580-6.
 - 19) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Metabolism of desloratadine by chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica.* 2020; 50: 733-40.
 - 20) Udagawa C, Sasaki Y, Tanizawa Y, Suemizu H, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tokino T, Zembutsu H. Whole-exome sequencing of 79 xenografts as a potential approach for the identification of genetic variants associated with sensitivity to cytotoxic anticancer drugs. *PLoS One.* 2020; 15: e0239614.
 - 21) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2020; 96: 180-7.
 - 22) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020; 479: 89-99.
 - 23) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 2020; 33: 1907-14.
 - 24) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
 - 25) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology.* 2020; 429: 152325.
 - 26) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment. *PLoS One.* 2020; 15: e0238120.
 - 27) Ruan X, Li P, Chen Y, Shi Y, Pirooznia M, Seifuddin F, Suemizu H, Ohnishi Y, Yoneda N, Nishiwaki M, Shepherdson J, Suresh A, Singh K, Ma Y, Jiang CF, Cao H. In vivo functional analysis of non-conserved human lncRNAs

- associated with cardiometabolic traits. *Nat Commun.* 2020; 11: 45.
- 28) Ogawa SI, Uehara S, Tsunenari Y, Kawai H, Suemizu H, Yamazaki H. Prediction of circulating human metabolites of pemaflibrate, a novel antidyslipidemic drug, using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica.* 2020; 50: 769–75.
 - 29) Ogawa SI, Shimizu M, Kamiya Y, Uehara S, Suemizu H, Yamazaki H. Increased plasma concentrations of an antidyslipidemic drug pemaflibrate co-administered with rifampicin or cyclosporine A in cynomolgus monkeys genotyped for the organic anion transporting polypeptide 1B1. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2020; 35: 354–60.
 - 30) Nakayama K, Kamimura H, Suemizu H, Yoneda N, Nishiwaki M, Iwamoto K, Mizunaga M, Negoro T, Ito S, Yamazaki H, Nomura Y. Predicted values for human total clearance of a variety of typical compounds with differently humanized-liver mouse plasma data. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2020; 35: 389–96.
 - 31) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 1145–57.
 - 32) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 4085–97.
 - 33) Murai K, Hikita H, Kai Y, Kondo Y, Fukuoka M, Fukutomi K, Doi A, Yamai T, Nakabori T, Fukuda R, Takahashi T, Miyakawa K, Suemizu H, Ryo A, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Hepatitis C virus infection suppresses hepatitis B virus replication via the RIG-I-like helicase pathway. *Sci Rep.* 2020; 10: 941.
 - 34) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Utoh M, Suemizu H, Yamazaki H. Different Roles of Human Cytochrome P450 2C9 and 3A Enzymes in Diclofenac 4'- and 5-Hydroxylations Mediated by Metabolically Inactivated Human Hepatocytes in Previously Transplanted Chimeric Mice. *Chem Res Toxicol.* 2020; 33: 634–9.
 - 35) Miura T, Shimizu M, Uehara S, Yoshizawa M, Nakano A, Yanagi M, Kamiya Y, Murayama N, Suemizu H, Yamazaki H. Different Hepatic Concentrations of Bromobenzene, 1,2-Dibromobenzene, and 1,4-Dibromobenzene in Humanized-Liver Mice Predicted Using Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Models as Putative Markers of Toxicological Potential. *Chem Res Toxicol.* 2020; 33: 3048–53.
 - 36) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 368–76.
 - 37) Michailidis E, Vercauteren K, Mancio-Silva L, Andrus L, Jahan C, Ricardo-Lax I, Zou C, Kabbani M, Park P, Quirk C, Pyrgaki C, Razooky B, Verhoye L, Zoluthkin I, Lu WY, Forbes SJ, Chiriboga L, Theise ND, Herzog RW, Suemizu H, Schneider WM, Shlomai A, Meuleman P, Bhatia SN, Rice CM, de Jong YP. Expansion, in vivo-ex vivo cycling, and genetic manipulation of primary human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117: 1678–88.
 - 38) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovattarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25: 2737.
 - 39) Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 2020; 42: 16.
 - 40) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2020; 70: 835–43.
 - 41) Kamimura H, Uehara S, Suemizu H. A novel C_{ss}-MRT_{po} approach to simulate oral plasma concentration-time profiles of the partial glucokinase activator PF-04937319 and its disproportionate N-demethylated metabolite in humans using chimeric mice with humanized livers. *Xenobiotica.* 2020; 50: 761–8.
 - 42) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 7746.

- 43) Jiang C, Li P, Ruan X, Ma Y, Kawai K, Suemizu H, Cao H. Comparative Transcriptomics Analyses in Livers of Mice, Humans, and Humanized Mice Define Human-Specific Gene Networks. *Cells*. 2020; 9: 2566.
- 44) Ito S, Kamimura H, Yamamoto Y, Chijiwa H, Okuzono T, Suemizu H, Yamazaki H. Human plasma concentration-time profiles of troglitazone and troglitazone sulfate simulated by in vivo experiments with chimeric mice with humanized livers and semi-physiological pharmacokinetic modeling. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2020; 35: 505-14.
- 45) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Sci*. 2020; 111: 1165-79.
- 46) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol*. 2020; 94: 927-37.
2. 学会発表
- 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
- 3) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto- σ -toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第93回産業衛生学会、Web開催 (2020年4月)
- 4) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto- σ -toluidide の膀胱発がん促進作用. 第47回日本毒性学会学術年会、Web開催 (2020年6月)
- 5) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
- 6) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋智. LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下させ膀胱癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、福岡 (2020年4月)
- 7) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開. 第27回がん予防学会総会、Web開催 (2020年9月)
- 8) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第37回日本毒性病理学会総会、Web開催 (2021年1月)
- 9) 鰐淵英機. 日本毒性病理学会のグローバル戦略. 第37回日本毒性病理学会総会、Web開催 (2021年1月)
- 10) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第37回日本毒性病理学会総会、Web開催 (2021年1月)
- 11) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第37回日本毒性病理学会総会、Web開催 (2021年1月)
- 12) 末水洋志. TK-NOG ヒト肝キメラマウスおよびその単離肝細胞を利用した創薬研究. 第27回肝細胞研究会. Web開催 (2020年12月)
- 13) 戸塚ゆ加里. NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望. 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム、Web開催 (2020年6月)
- 14) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. がん予防学術大会、Web開催 (2020年9月)
- 15) 戸塚ゆ加里. Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach、広島、第79回癌学会 (2020年10月)
- 16) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによりがんの要因を解明する. 第2回三陸包括的緩和医療研究会、Web開催 (2020年10月)
- 17) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. 第49回環境変異原学会、静岡 (2020年9月)
- 18) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望. 第37回日本毒性病理学会、Web開催 (2021年1月)
- 19) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望. 第12回JBFシンポジウム、Web開催 (2021年3月)
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和2年度分担研究報告書

芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発 (200502-01)
分担研究項目：ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割
尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

研究分担者 鈴木 周五 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 准教授

研究要旨

本研究は、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価することを目標として、ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割を検討し、ラットに種々の芳香族アミンを投与し尿中代謝物とその膀胱発がん性の関係および機序の解明を試みる。本年度は、ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割を検証する実験として、*o*-toluidine hydrochloride (OTD)を4週間投与した。その結果、OTDは野生型マウスよりもヒト化肝臓マウスで体重抑制などの毒性が強く認められた。また、いずれのマウス群においてもOTD投与によるマウス尿路上皮への影響について対照群との差は見られなかった。尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がん性の関係および機序の解明を検証する実験として、福井県の化学工場において取り扱いのあった4種の芳香族アミンを用いて、ラットに対して4週間混餌投与実験を行った結果、OTDおよびacetoaceto-*o*-toluidide (AAOT)投与群において尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めた。OTD群およびAAOT群により共通してみられた遺伝子発現変化は、がんや細胞増殖に関わる遺伝子が選出されていることが確認された。以上より、OTDを主体とした芳香族アミンおよび代謝物による尿路上皮を主体とする影響が、ヒト化肝臓マウスモデルおよびラットモデルにおいて確認出来た。

A. 研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱癌は社会的な問題の一つであり、最近でも福井県の化学工場において、*o*-toluidine (OTD)等の芳香族アミンを取り扱う従事者から膀胱癌が発生しており、今後も類似の芳香族アミン類による職業膀胱癌発生の危険性が存在する可能性は高い。

我々は福井県の化学工場において取り扱いのあったacetoaceto-*o*-toluidide (AAOT)に着目して、その毒性や発がん性を検討した結果、動物実験により膀胱発がん促進作用を確認するとともに、尿中にOTDおよびOTD代謝物を検出した。これらの結果は、AAOTが既知の膀胱発がん物質OTDに代謝され尿中に排泄されることが、膀胱発がん促進作用に関与している可能性を示した。この成果は、化学物質の有害性評価において、異なる物質でも類似の代謝経路を通る化学物質が共通の有害性を持ち、包括的な評価手法を確立出来る可能性を示した。

そこで、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価できるかを検証した。方法として、「ヒト化肝臓マウス」を用いて、ヒトでの芳香族アミン代謝を実現し、芳香族アミンの代謝および膀胱発がん性について検討を行った。また、ラットに種々の芳香族アミンを投与し、尿中代謝物とその膀胱発がん性を種々の方法で検討し、膀胱に対する発がん原因となる芳香族アミン代謝物の同定とともにその発がん機序を解明を試みた。

令和2年度は、ヒト化肝臓マウスに対して、ヒト膀胱には発がん性を示すものの、マウスでは発がん性を示さないOTDを投与し検討した。また、ラットに対しては、福井県の化学工場において取り扱いのあった芳香族ア

ミンOTDやAAOT、anilinium、*p*-toluidineについて投与し検討を行った。

B. 研究方法

課題1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

F1-TKm30 雌マウスに、ヒト肝細胞移植9~10週後のヒト化肝臓マウスを用いた。ヒト化肝臓マウスおよび非移植群のF1-TKm30 雌マウスに、0.6% *o*-toluidine hydrochloride (OTD)を混餌投与した。投与第4週目および解剖時に新鮮尿を採取し、凍結保存を行った。4週間後に麻酔下採血により屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。血液は血漿を分離し凍結保存した。肝臓は主な葉を切り出し標本を作製するとともに、一部を凍結保存した。膀胱は、膀胱腔内にホルマリンを注入固定し、標本を作製した。膀胱組織については、Ki67の免疫組織染色を行い、標識率を検討した。

課題2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

6週齢F344雄ラットに、0.6% anilinium chloride (ANL)、0.6% *p*-toluidine hydrochloride (PT)、1.5% acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT)および0.6% *o*-toluidine hydrochloride (OTD)を混餌投与した。投与第4週目に新鮮尿を採取し、凍結保存を行った。4週間後に麻酔下採血により屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。血液は血漿を分離し凍結保存した。肝臓は主な葉を切り出し標本を作製するとともに、一部を

凍結保存した。膀胱は、膀胱腔内にホルマリンを注入固定し、標本を作製した。膀胱組織については、Ki67の免疫組織染色およびApoTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection KitでTUNEL染色を行い、それぞれの標識率を検討した。網羅的遺伝子発現解析用に、膀胱粘膜上皮をISOGENにより剥離しtotal RNAを抽出・精製した。Microarrayを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。また、DNA採取用に、膀胱組織を凍結保存した。また、DNAを用いた解析の対照臓器として、尾および心臓を採取し、凍結保存した。また、芳香族アミンを投与した尿路上皮で変動した遺伝子について、Ingenuity Pathways Analysis (IPA)を用いて関連する機能について検討した。

(倫理面への配慮)

大阪市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

課題1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

試験開始1週間後にヒト化肝臓マウスの0.6% OTD投与群において体重減少(平均18.8gから15.9gに低下)を来したため、以降は0.3%に濃度変更を行った。その結果、体重は増加傾向を認め実験は終了した(表1)。また、ヒト化肝臓マウスでは、野生型マウスに比べ肝の絶対および相対重量が高かった。いずれのマウス群においても、OTD投与により肝重量増加傾向が見られた(表1)。

表1. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

Liver	OTD	No. of mice	Body weight (g)		Liver	
			Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
野生型	-	3	26.0 ± 1.3	26.5 ± 1.7	1.06 ± 0.14	4.0 ± 0.3
ヒト化肝臓	-	2	20.3 ± 4.8	23.3 ± 1.3	2.41 ± 0.07	10.4 ± 0.9
野生型	+	5	26.0 ± 1.4	26.2 ± 1.8	1.23 ± 0.09	4.7 ± 0.3
ヒト化肝臓	+	3	18.8 ± 4.2	16.7 ± 2.6	1.97 ± 0.32	11.8 ± 0.3

肝臓を病理組織学的に検討した結果、OTD投与による組織学的な変化はヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれにおいても見られなかった(図1)。

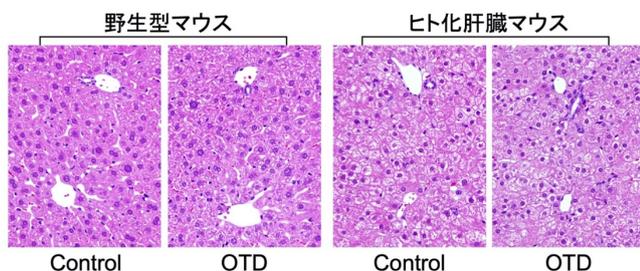


図1. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの肝組織像

膀胱組織を検討した結果、ヒト化肝臓マウスのOTD投与群において、1匹のみ軽度肥厚傾向を認めたものの、いずれのマウス群においてもOTD投与による単純過形成

病変など、病変として診断しうる組織学的な変化は見られなかった(図2)。また、細胞増殖活性の指標であるKi67の陽性率を検討した結果、野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスそれぞれ1匹のみ高い陽性率を示したが、OTD投与による有意な上昇は見られなかった(図3)。

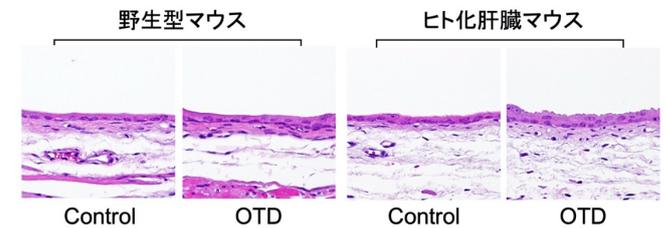


図2. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

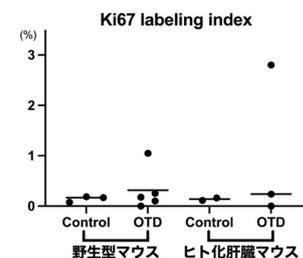


図3. 膀胱尿路上皮のKi67陽性率

課題2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

試験開始1週間後に0.6% PT投与群が体重減少を来したため、以降は0.3%に濃度変更を行った。試験期間中、芳香族アミン投与群いずれも対照群に比べ、体重増加抑制傾向を認めた。屠殺・剖検時の体重はいずれも有意に抑制された(表2)。また、実験開始1週目は、芳香族アミン投与群いずれにおいても摂餌や飲水量は対照群に比べ低かった。一方、2週目以降は、対照群と差が見られなかった(表2)。

表2. 体重および摂餌・飲水量

Treatment	Body weight (g)	Consumption (1st week)		Consumption (2 to 4 weeks)	
		Food (g/day)	Water (g/day)	Food (g/day)	Water (g/day)
Control	228.2 ± 8.3	12.3 ± 0.4	18.7 ± 0.8	13.4 ± 0.5	20.0 ± 0.9
ANL	214.7 ± 6.5 ***	10.0 ± 0.3	17.9 ± 0.9	13.0 ± 0.6	20.9 ± 0.8
PT	200.2 ± 8.0 ***	5.0 ± 0.4	12.6 ± 1.3	12.8 ± 0.5	20.2 ± 1.3
AAOT	207.5 ± 10.1 ***	11.3 ± 0.7	18.0 ± 1.5	13.2 ± 0.7	19.2 ± 1.2
OTD	210.2 ± 8.2 ***	8.7 ± 0.6	16.2 ± 0.9	12.8 ± 0.3	20.3 ± 1.0

***: 0.001 vs Control, respectively

膀胱を組織学的に検討した結果、AAOTおよびOTD投与群において単純過形成病変(simple hyperplasia)が対照群に比べ有意に増加していた(表3)。加えて、細胞増殖活性の指標であるKi67の陽性率を検討した結果、AAOTおよびOTD投与群において陽性率の有意な増加を認めた一方で、ANLやPTでは対照群と差がなかった(表3)。また、アポトーシスについてTUNEL陽性率を検討した結果、いずれの群間でも差がなかった(表3)。

表3. 膀胱尿路上皮病変、Ki67およびTUNEL陽性率

Treatment	No. of rat	Simple hyperplasia	Ki67 (%)	TUNEL (%)
Control	6	0	1.7 ± 0.4	0.6 ± 0.4
ANL	6	0	2.0 ± 0.5	0.4 ± 0.3
PT	6	1	1.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2
AAOT	6	5*	3.6 ± 0.7***	0.5 ± 0.3
OTD	6	6**	4.9 ± 1.3***	0.6 ± 0.2

P < 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

Microarrayにより網羅的遺伝子発現解析を行った結果、対照群と比較し大きな発現変動を認めた遺伝子数が、OTD投与群では576遺伝子存在し、他の投与群 (aniline: 262遺伝子、p-toluidine: 253遺伝子、AAOT: 283遺伝子) に比べ多く認めた。また、4つの芳香族アミン投与群において共通した遺伝子発現変動を認めた遺伝子が103遺伝子存在し、発がん性とは別に芳香族アミン投与による影響が存在することが明らかとなった (表4)。

表4. 芳香族アミン投与により発現変動を認めた遺伝子数

Treatment	Up-regulated genes	Down-regulated genes	Total genes
Control	-	-	-
ANL	132	130	262
PT	134	119	253
AAOT	172	111	283
OTD	262	314	576
All aromatic amines	35	68	103

今回の実験でラット膀胱に増殖性病変を認めたAAOTおよびOTD投与群に共通して発現変動を認めた遺伝子について、IPAを用いて機能について解析を行った結果、「Cancer」や「Cellular Growth and Proliferation」など、膀胱発がんに関連する可能性がある遺伝子群が選出されていた (表5)。

表5. AAOTおよびOTD投与群で共通して変動する遺伝子の機能に基づいた分類

Diseases and Disorders	p-value range	# Molecules
Cancer	3.04E-03 - 1.03E-08	51
Organismal Injury and Abnormalities	3.04E-03 - 1.03E-08	56
Reproductive System Disease	3.04E-03 - 1.03E-08	26
Molecular and Cellular Functions	p-value range	# Molecules
Cellular Growth and Proliferation	3.04E-03 - 6.21E-08	35
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	3.04E-03 - 2.67E-07	18
Protein Synthesis	1.19E-05 - 2.69E-07	13
Physiological System Development and Function	p-value range	# Molecules
Tissue Development	3.04E-03 - 6.21E-08	26
Hematological System Development and Function	3.04E-03 - 2.67E-07	26
Immune Cell Trafficking	3.04E-03 - 2.67E-07	16

D. 考察

課題1. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

ヒト化肝臓マウスにおいて、OTD投与による毒性影響が強く存在したことは、ヒト肝細胞においてより代謝が行われている可能性が推察される。一方、剖検屠殺時の肝組織においては、OTD投与による組織学的な変化が野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスいずれにおいても認められなかった。今後、肝組織における代謝酵

素発現を検討し、ヒト肝細胞とマウス肝細胞におけるOTD代謝への代謝酵素発現の相違について検討予定である。

また、OTD投与による膀胱組織への影響を検討した結果、ヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれにおいても、組織学的な影響や細胞増殖活性への変化は有意な差が見られなかった。ラットで認められるOTD投与による過形成病変が、マウスにおいて認められない原因は、肝臓における代謝だけでなく、膀胱尿路上皮におけるラットとマウスの感受性の違いに起因する可能性がある。今後、尿中や血清中OTDおよび代謝物測定とともに、肝組織代謝酵素発現を検討する事で、ヒトへの外挿可能なデータを取得する予定である。

課題2. 尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

OTDおよびAAOT投与群においてのみラット尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めた。我々は、AAOT投与したラット尿中の主な代謝物はOTDであることを報告しており、この2群においてはOTDに関連した膀胱発がん作用と考えている。それら芳香族アミン投与により共通してみられた遺伝子発現変化は、Cancerや細胞増殖に関わる遺伝子が選出されていることが確認され、OTD関連発がん機序解明に重要な結果が得られた。今後は、代謝されOTDが発生する芳香族アミンや、OTDの代謝物など、OTD関連の芳香族アミンおよび代謝物に着目して、発がん性やその発がん機序解明への研究を行う予定である。

E. 結論

OTDを主体とした芳香族アミンおよび代謝物による尿路上皮を主体とする影響が、ヒト化肝臓マウスモデルおよびラットモデルにおいて確認出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.
- 2) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. Cancer Sci. 2020; 111: 1165-79.
- 3) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. Int J Mol Sci. 2020; 21.

- 4) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2020; 70: 835-43.
- 5) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25.
- 6) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 4085-97.
- 7) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2020; 41: 1145-57.
- 8) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. *Toxicology.* 2020; 429: 152325.
- 9) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
- 10) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12.
- 11) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 12) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
2. 学会発表
- 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
- 3) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催 (2020年4月)
- 4) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020年6月)
- 5) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020年10月)
- 6) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下させ膀胱癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、福岡 (2020年4月)
- 7) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2020年1月)
- 8) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021年1月)
- 9) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021年1月)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和2年度分担研究報告書

芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発 (200502-01)
分担研究項目：尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

研究分担者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授

研究要旨

本研究は、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価することを目標として、尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明を行った。本年度は、尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明を検証する実験として、福井県の化学工場において取り扱いのあった4種の芳香族アミンを用いてラットに4週間投与する実験を行った結果、OTDおよびacetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) 投与群において尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めた。尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、尿に含まれる芳香族アミンおよび代謝物の総量は、OTD群において他の芳香族アミン投与群に比べ高いことが確認出来た。また、膀胱に増殖性病変を示したAAOT群およびOTD群において検出された主な尿中の芳香族アミンはOTDであった。膀胱尿路上皮への影響は、AAOT群よりもOTD群において強いことから、OTD群で尿中濃度がより高いOTDや4AMC、2AMCが、膀胱増殖性に対して影響がある代謝物である可能性が示された。以上より、OTDを主体とした芳香族アミンおよび代謝物が、ラット膀胱尿路上皮に発がん性影響を与える可能性を示した。

A. 研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱癌は社会的な問題の一つであり、最近でも福井県の化学工場において、*o*-toluidine (OTD) 等の芳香族アミンを取り扱う従事者から膀胱癌が発生しており、今後も類似の芳香族アミン類による職業膀胱癌発生の危険性が存在する可能性は高い。

我々は福井県の化学工場において取り扱いのあったacetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) に着目して、その毒性や発がん性を検討した結果、動物実験により膀胱発がん促進作用を確認するとともに、尿中にOTDおよびOTD代謝物を検出した。これらの結果は、AAOTが既知の膀胱発がん物質OTDに代謝され尿中に排泄されることが、膀胱発がん促進作用に関与している可能性を示した。この成果は、化学物質の有害性評価において、異なる物質でも類似の代謝経路を通る化学物質が共通の有害性を持ち、包括的な評価手法を確立出来る可能性を示した。

そこで、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価できるかを検証した。方法として、ラットに種々の芳香族アミンを投与し、尿中代謝物とその膀胱発がん性を種々の方法で検討し、膀胱に対する発がん原因となる芳香族アミン代謝物の同定とともにその発がん機序を解明を試みた。

令和2年度は、福井県の化学工場において取り扱いのあった芳香族アミンOTDやAAOT、anilinium、*p*-toluidineについてラットを用いた動物実験により検討を行った。

B. 研究方法

6週齢F344雄ラットに、0.6% anilinium chloride (ANL)、0.3% *p*-toluidine hydrochloride (PT; 体重低下のため2週目より0.6%から0.3%へ変更)、1.5% acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) および0.6%

o-toluidine hydrochloride (OTD) を混餌投与した。投与第4週目に新鮮尿を採取し、凍結保存を行った。4週間後に麻酔下採血により屠殺・剖検し、膀胱は、膀胱腔内にホルマリンを注入固定し、標本を作製した。膀胱組織については、Ki67の免疫組織染色およびApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection KitでTUNEL染色を行い、それぞれの標識率を検討した。

Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いて、各群5匹ずつ採取した尿における芳香族アミンおよび代謝物を測定した。測定した物質およびその測定限界値は、それぞれ、ANL (3.4 nmol/mL)、Acetanilide (AAD; 1.5 nmol/mL)、Acetaminophen (AAP; 5 nmol/mL)、PT (1.8 nmol/mL)、6-Amino-*m*-cresol (6AMC; 2.0 nmol/mL)、AAOT (1.8 nmol/mL)、OTD (2.5 nmol/mL)、N-Acetyl-*o*-toluidine (NAOT; 1.2 nmol/mL)、4-Amino-*m*-cresol (4AMC; 5.4 nmol/mL)、2-Amino-*m*-cresol (2AMC; 2.2 nmol/mL) である。

(倫理面への配慮)

大阪市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

各芳香族アミンを4週間投与したラットの膀胱を組織学的に検討した結果、AAOTおよびOTD投与群において単純過形成病変 (simple hyperplasia) が対照群に比べ有意に増加していた (表1)。加えて、細胞増殖活性の指標であるKi67による免疫組織化学染色の結果、AAOTおよびOTD投与群において陽性率の有意な増加を認めた、一方で、ANLやPTでは対照群と差がなかった (表1)。また、

アポトーシスについてTUNEL陽性率を検討した結果、いずれの群間でも差がなかった(表1)。

表1. 膀胱尿路上皮病変、Ki67およびTUNEL陽性率

Treatment	No. of rat	Simple hyperplasia	Ki67 (%)	TUNEL (%)
Control	6	0	1.7 ± 0.4	0.6 ± 0.4
ANL	6	0	2.0 ± 0.5	0.4 ± 0.3
PT	6	1	1.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2
AAOT	6	5*	3.6 ± 0.7***	0.5 ± 0.3
OTD	6	6**	4.9 ± 1.3***	0.6 ± 0.2

P < 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

尿中の芳香族アミンおよび代謝物について解析した結果を、表2に示す。尿中に含まれる芳香族アミンおよび代謝物の総量は、OTD群において他の芳香族アミン投与群に比べ著しく高いことが確認出来た。特に投与濃度を加味して換算すると、OTD群は、ANL群に比べ約3倍、PT群に比べ約7倍、AAOT群に比べ約11倍も高い濃度割合で検出されている。

また、尿中の主な物質を検討した結果、ANL群は大半がAAPに代謝されていることが確認された。一方、PT群およびOTD群では代謝されていない投与物質であるPTおよびOTDが大半を占めていた。AAOT群では、大半が代謝されOTDが多く存在し、AAOTはわずかであった。

ラット尿路上皮への影響に基づいて、尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、膀胱に増殖性病変を示したAAOT群およびOTD群において検出された主な尿中の芳香族アミンはOTDであった。その尿路上皮への影響は、AAOT群よりもOTD群において強いことから、尿中濃度が高いOTDや4AMC、2AMCが、膀胱増殖性に対して影響がある代謝物の可能性が示された。

表2. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Treatment	No. of rat	Total AAs	ANL	AAD	AAP	PT	6AMC
Control	5	N.D.	N.D.	N.D.	14.3 ± 6.5	N.D.	N.D.
ANL	5	2733.9 ± 975.9	816.4 ± 350.9	3.6 ± 1.2	1908.4 ± 736.7	N.D.	N.D.
PT	5	658.1 ± 370.0	N.D.	N.D.	N.D.	644.1 ± 366.6	6.5 ± 2.9
AAOT	5	1967.4 ± 872.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OTD	5	8603.4 ± 1953.2	3.7 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Treatment	No. of rat	AAOT	OTD	NAOTD	4AMC	2AMC
Control	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ANL	5	N.D.	3.7 ± 0.7	N.D.	N.D.	N.D.
PT	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AAOT	5	63.9 ± 28.9	1562.7 ± 636.6	55.8 ± 12.2	214.2 ± 212.4	67.4 ± 28.7
OTD	5	N.D.	7955.9 ± 1704.8	19.8 ± 9.7	519.1 ± 802.0	103.5 ± 22.9

AA: acetaminophen; ANL: Aniline; AAD: Acetanilide; AAP: Acetaminophen; PT: p-Toluidine; 6AMC: 6-Amino-m-crestol; AAOT: N-Acetoacetyl-o-toluidine; OTD: o-Toluidine; NAOTD: N-Acetyl-o-toluidine; 4AMC: 4-Amino-m-crestol; 2AMC: 2-Amino-m-crestol; N.D.: not detected

D. 考察

今回用いた芳香族アミンのうち、OTDおよびAAOT投与群においてのみラット尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めた。その尿中の芳香族アミンおよび代謝物として一番多く認められた物質はOTDであり、OTDに関連した膀胱発がん作用が考えられた。興味深いことに、1.5%投与したAAOT群よりも、0.6% OTD投与群の方が尿中のOTDが高いことから、肝組織での代謝割合に大きな違いが予想される。また、AAOT群よりもOTD群で検出量の高いOTD代謝物である4AMCや2AMCが、膀胱尿路上皮への影響に寄与する可能性が存在する。

今後は、代謝されOTDが発生する芳香族アミンや、OTD

の代謝物など、OTD関連の芳香族アミンおよび代謝物に着目して、発がん性やその発がん機序解明への研究を行う予定である。

E. 結論

ラット尿路上皮への影響および尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、OTDを主体とした芳香族アミンおよび代謝物が、ラット膀胱尿路上皮に発がん性影響を与える可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 2) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2021; 112: 1746-57.
- 3) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuangphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
- 4) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagawa H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2020; 96: 180-7.
- 5) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020; 479: 89-99.
- 6) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
- 7) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the

association with prognosis and treatment. PLoS One. 2020; 15: e0238120.

- 8) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. Int J Mol Sci. 2020; 21.
- 9) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.

2. 学会発表

- 1) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開. 第 27 回がん予防学会総会. Web 開催 (2020 年 9 月)
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
- 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
- 4) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催 (2020 年 4 月)

- 5) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)
- 6) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 7) 鰐淵英機. 日本毒性病理学会のグローバル戦略. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 8) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 9) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 10) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和2年度分担研究報告書

芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発 (200502-01)
分担研究項目：ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割

研究分担者 末水洋志 公益財団法人実験動物中央研究所 研究部門 部門長

研究要旨

本研究は、芳香族アミンの代謝経路および代謝物を検討するとともに、膀胱への発がん性の有無およびその発がん機序を検討する事で、芳香族アミンの膀胱発がん性を包括的に評価することを目標として、ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割を検討する。そこで発がん性に影響を与える肝代謝酵素発現の種を考慮し、よりヒトへの外挿性を高めた発がん実験系の確立をめざす。Herpes simplex virus thymidine kinase遺伝子を肝細胞特異的に発現する超免疫不全NOD (TK-NOG)マウスは雄性不妊であるため、回避した改良型TK-NOGマウスを用いた。芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価に資する「ヒト化肝臓マウス」を効率よく作製するため、移植用ヒト肝細胞2種類 (A細胞; 12歳由来、B細胞; 11ヶ月齢由来) について生着性評価を実施した。ヒト肝細胞移植10週後の血中ヒトアルブミン濃度を比較したところ、A細胞移植群では最高3.3 mg/mLであったのに対し、B細胞移植群では16mg/mLに達するマウスが見られた。B細胞移植群では6匹中5匹のマウスでヒト肝細胞置換率が90%以上と推定された。これら5匹のマウスの肝臓切片を抗ヒトミトコンドリア抗体で染色しヒト細胞の占有率を求めたところ、平均93.8%であり、高いヒト化率であることを確認した。以上より、改良型TK-NOGを用いることによりヒト率が極めて高いヒト化肝臓マウスを作製することが可能となり、ヒトへの外挿性を高めた発がん実験系の確立に近づいた。

A. 研究目的

一般的に肝臓における代謝は発がんに重要であるが、その肝代謝酵素発現は種によって異なり発がん性に影響を与える。そこで、よりヒトへの外挿性を高めた発がん実験系の確立をめざし、ヒト肝細胞をマウスに移植した「ヒト化肝臓マウス」を作製する。

B. 研究方法

Herpes simplex virus thymidine kinase 遺伝子を肝細胞特異的に発現する超免疫不全NOD/*scid-IL-2rgc* (TK-NOG)マウスを交配により作出した。ガンシクロビル投与によりマウス肝細胞を選択的に破壊した後、脾臓門脈経由でヒト肝細胞を移植した。血中ヒトアルブミン濃度の上昇によりヒト肝細胞の生着を確認し、移植に適した肝細胞ロットの選抜を行った。実験に安定供給できる体制づくりと移植したヒト肝細胞に増殖性の良い肝傷害条件を検討した。

作成したヒト化肝臓マウスおよび非移植マウスに、*o*-toluidine hydrochloride (OTD)を混餌投与する実験に供与した。屠殺・剖検後に肝臓を採取し、主な葉を切り出し標本を作製した。抗ヒトミトコンドリア抗体で免疫組織化学染色を行い、肝組織内のヒト肝細胞比率を計測した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト肝細胞は全て一般市場から購入した細胞で患者個人情報に結びつくものは無く、個人の人権、利益に支障を及ぼさない手続きがなされている。動物実験については当研究所の「動物実験委員

会」に本研究内容を申請し、承認を得たうえで3Rに十分配慮して実施した。

C. 研究結果

本年度、雄性が不妊にならない改良型TK-NOGを使用した。25mg/kgガンシクロビル投与群6匹と37.5mg/kgガンシクロビル投与群6匹の血中ALTレベルを比較すると37.5mg/kg投与群が全体的に高値を示した。それぞれの群に異なるロット (A細胞; 12歳由来、B細胞; 11ヶ月齢由来) のヒト肝細胞を移植した。ロットA移植群では移植4週後も血中ヒトアルブミン濃度が1 mg/mLに達しなかったのに対し、ロットB移植群では6匹中4匹が移植4週後に2 mg/mLを越えていた。移植後約10週のヒトアルブミン濃度はロットA移植群で最高3.3 mg/mLであったのに対し、ロットB移植群では16mg/mLに達した。

ロットB移植群については、OTDを混餌投与する実験に供した。代表的な肝組織像および抗ヒトミトコンドリア抗体による免疫組織化学染色を図1に示す。大半の肝細胞がやや小型なヒト肝細胞で構成され、抗体陽性となることが確認出来た。合計5匹のヒト細胞の占有率を求めたところ、平均93.8%であった。

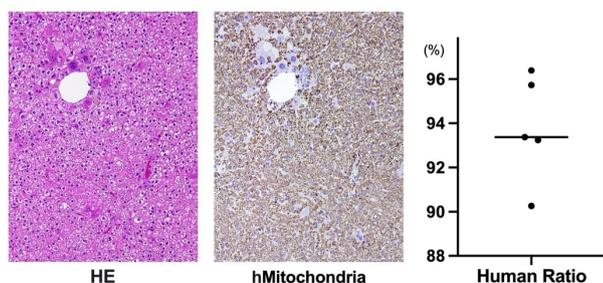


図1. 肝組織像、ヒトミトコンドリア抗体による免疫組織化学染色およびヒト肝細胞比率

D. 考察

改良型TK-NOG肝傷害マウスにおける生着性はロットA細胞(12歳由来)よりもロットB細胞(11ヶ月齢由来)の方がすぐれていることがわかった。より若齢の方が高い生着性を示すように見えるが、移植時のALTレベルがB細胞移植群の方が高かったことから、肝傷害の重症度が生着性に寄与する可能性も示唆された。

E. 結論

改良型TK-NOGを用いることによりヒト率が極めて高いヒト化肝臓マウスを作製することが可能となり、ヒトへの外挿性を高めた発がん実験系の確立に近づいた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Methyl-hydroxylation and subsequent oxidation to produce carboxylic acid is the major metabolic pathway of tolbutamide in chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica*. 2021; 51: 582-9.
- 2) Toda A, Shimizu M, Uehara S, Sasaki T, Miura T, Mogi M, Utoh M, Suemizu H, Yamazaki H. Plasma and hepatic concentrations of acetaminophen and its primary conjugates after oral administrations determined in experimental animals and humans and extrapolated by pharmacokinetic modeling. *Xenobiotica*. 2021; 51: 316-23.
- 3) Shimizu M, Uehara S, Suemizu H, Yamazaki H. In vivo drug interactions of itopride and trimethylamine mediated by flavin-containing monooxygenase 3 in humanized-liver mice. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2021; 37: 100369.
- 4) Ruan X, Li P, Ma Y, Jiang CF, Chen Y, Shi Y, Gupta N, Seifuddin F, Pirooznia M, Ohnishi Y, Yoneda N, Nishiwaki M, Dumbovic G, Rinn J L, Higuchi Y, Kawai K, Suemizu H, Cao H. Identification of human long noncoding RNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic homeostasis. *J Clin Invest*. 2021; 131.
- 5) Myojin Y, Hikita H, Sugiyama M, Sasaki Y, Fukumoto K, Sakane S, Makino Y, Takemura N, Yamada R, Shigekawa M, Kodama T, Sakamori R, Kobayashi S, Tatsumi T, Suemizu H, Eguchi H, Kokudo N, Mizokami M, Takehara T. Hepatic Stellate Cells in Hepatocellular Carcinoma Pro-

- 6) Morita H, Yasuda M, Yamamoto M, Tomiyama Y, Uchida R, Ka Y, Ogura T, Kawai K, Suemizu H, Hayashimoto N. Pathogenesis of murine astrovirus in experimentally infected mice. *Exp Anim*. 2021.
- 7) Miura T, Uehara S, Shigeta K, Yoshizawa M, Kamiya Y, Murayama N, Shimizu M, Suemizu H, Yamazaki H. Metabolic Profiles of Tetrabromobisphenol A in Humans Extrapolated from Humanized-Liver Mouse Data Using a Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model. *Chem Res Toxicol*. 2021; 34: 522-8.
- 8) Miura T, Kamiya Y, Uehara S, Murayama N, Shimizu M, Suemizu H, Yamazaki H. Hepatotoxicological potential of p-toluic acid in humanized-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models. *Xenobiotica*. 2021: 1-7.
- 9) Kishimoto K, Shimada A, Shinohara H, Takahashi T, Yamada Y, Higuchi Y, Yoneda N, Suemizu H, Kawai K, Kurotaki Y, Hanazawa K, Takashima Y, Sasaki E. Establishment of novel common marmoset embryonic stem cell lines under various conditions. *Stem Cell Res*. 2021; 53: 102252.
- 10) Kanbe A, Ishikawa T, Hara A, Suemizu H, Nanzawa E, Tamaki Y, Ito H. Novel hepatitis B virus infection mouse model using herpes simplex virus type 1 thymidine kinase transgenic mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021; 36: 782-9.
- 11) Ito R, Katano I, Otsuka I, Takahashi T, Suemizu H, Ito M, Simons PJ. Bovine beta-lactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/hGM-CSF transgenic mice. *Int Immunol*. 2021; 33: 183-9.
- 12) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Metabolism of desloratadine by chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. *Xenobiotica*. 2020; 50: 733-40.
- 13) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Human Aldehyde Oxidase 1-Mediated Carbazepine Oxidation in Chimeric TK-NOG Mice Transplanted with Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2020; 48: 580-6.
- 14) Udagawa C, Sasaki Y, Tanizawa Y, Suemizu H, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tokino T, Zembutsu H. Whole-exome sequencing of 79 xenografts as a potential approach for the identification of genetic variants associated with sensitivity to cytotoxic anticancer drugs. *PLoS One*. 2020; 15: e0239614.
- 15) Ruan X, Li P, Chen Y, Shi Y, Pirooznia M, Seifuddin F, Suemizu H, Ohnishi Y, Yoneda N, Nishiwaki M, Shepherdson J, Suresh A, Singh K, Ma Y, Jiang CF, Cao H. In vivo functional analysis of non-conserved human lncRNAs associated with cardiometabolic traits. *Nat Commun*. 2020; 11: 45.
- 16) Ogawa SI, Uehara S, Tsunenari Y, Kawai H, Su-

- emizu H, Yamazaki H. Prediction of circulating human metabolites of pemafibrate, a novel antidyslipidemic drug, using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica*. 2020; 50: 769-75.
- 17) Ogawa SI, Shimizu M, Kamiya Y, Uehara S, Suemizu H, Yamazaki H. Increased plasma concentrations of an antidyslipidemic drug pemafibrate co-administered with rifampicin or cyclosporine A in cynomolgus monkeys genotyped for the organic anion transporting polypeptide 1B1. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2020; 35: 354-60.
- 18) Nakayama K, Kamimura H, Suemizu H, Yoneda N, Nishiwaki M, Iwamoto K, Mizunaga M, Negoro T, Ito S, Yamazaki H, Nomura Y. Predicted values for human total clearance of a variety of typical compounds with differently humanized-liver mouse plasma data. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2020; 35: 389-96.
- 19) Murai K, Hikita H, Kai Y, Kondo Y, Fukuoka M, Fukutomi K, Doi A, Yamai T, Nakabori T, Fukuda R, Takahashi T, Miyakawa K, Suemizu H, Ryo A, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Hepatitis C virus infection suppresses hepatitis B virus replication via the RIG-I-like helicase pathway. *Sci Rep*. 2020; 10: 941.
- 20) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Uehoh M, Suemizu H, Yamazaki H. Different Roles of Human Cytochrome P450 2C9 and 3A Enzymes in Diclofenac 4'- and 5-Hydroxylations Mediated by Metabolically Inactivated Human Hepatocytes in Previously Transplanted Chimeric Mice. *Chem Res Toxicol*. 2020; 33: 634-9.
- 21) Miura T, Shimizu M, Uehara S, Yoshizawa M, Nakano A, Yanagi M, Kamiya Y, Murayama N, Suemizu H, Yamazaki H. Different Hepatic Concentrations of Bromobenzene, 1,2-Dibromobenzene, and 1,4-Dibromobenzene in Humanized-Liver Mice Predicted Using Simplified Physiological Based Pharmacokinetic Models as Putative Markers of Toxicological Potential. *Chem Res Toxicol*. 2020; 33: 3048-53.
- 22) Michailidis E, Vercauteren K, Mancio-Silva L, Andrus L, Jahan C, Ricardo-Lax I, Zou C, Kabbani M, Park P, Quirk C, Pyrgaki C, Razoooky B, Verhoye L, Zoluthkin I, Lu WY, Forbes SJ, Chiriboga L, Theise ND, Herzog RW, Suemizu H, Schneider WM, Shlomain A, Meuleman P, Bhatia SN, Rice CM, de Jong YP. Expansion, in vivo-ex vivo cycling, and genetic manipulation of primary human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117: 1678-88.
- 23) Kamimura H, Uehara S, Suemizu H. A novel C_{ss}-MRT_{po} approach to simulate oral plasma concentration-time profiles of the partial glucose kinase activator PF-04937319 and its disproportionate N-demethylated metabolite in humans using chimeric mice with humanized livers. *Xenobiotica*. 2020; 50: 761-8.
- 24) Jiang C, Li P, Ruan X, Ma Y, Kawai K, Suemizu H, Cao H. Comparative Transcriptomics Analyses in Livers of Mice, Humans, and Humanized Mice Define Human-Specific Gene Networks. *Cells*. 2020; 9.
- 25) Ito S, Kamimura H, Yamamoto Y, Chijiwa H, Okuzono T, Suemizu H, Yamazaki H. Human plasma concentration-time profiles of troglitazone and troglitazone sulfate simulated by in vivo experiments with chimeric mice with humanized livers and semi-physiological pharmacokinetic modeling. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2020; 35: 505-14.
2. 学会発表
- 1) 末水洋志. TK-NOG ヒト肝キメラマウスおよびその単離肝細胞を利用した創薬研究. 第27回肝細胞研究会. Web開催(2020年12月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
記載なし

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和2年度分担研究報告書

芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発 (200502-01)
分担研究項目：尿中芳香族アミン代謝物と膀胱発がんおよび機序の解明

研究分担者 戸塚ゆ加里 国立がん研究センター研究所 がんモデル開発部門 ユニット長

研究要旨

分担研究者らは高分解能精密質量分析装置 (HRAM) を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (HRAM-アダクトーム) を用いた化学物質の安全性評価法の開発をおこなっている。本研究では、この手法を膀胱発がん予測へと応用することを目的に、既存の膀胱発がん物質を含む複数の化学物質を投与したラットの膀胱における DNA 損傷を HRAM-アダクトームにより解析し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価について検討する。F344 雄ラットに、芳香族アミン (acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT)、*o*-toluidine (OTD)、aniline (ANL)、*p*-toluidine (PT)) を 4 週間混餌投与し、屠殺・剖検後、膀胱を回収した。HRAM-アダクトーム法はゲノム DNA 中に存在する DNA 付加体をそのまま解析するため、遺伝子変異解析などと異なり、通常は μg オーダーの DNA が必要となる。また、腫瘍は粘膜上皮から発生することから、膀胱組織全体からゲノム DNA を抽出すると目的とする発がん重要な DNA 付加体の存在レベルが希釈されてしまうことが懸念される。実験動物の膀胱は非常に小さく、1 個体からはアダクトーム解析に十分な量の DNA を回収することが困難であると予測していたため、各投与群を 12 匹として実験を行ない、個体ごとの DNA 量が解析に満たない場合はグループ毎に pool した DNA サンプルを用いて解析することを考えた。今年度は、コントロールおよび芳香族アミン投与群 (AAOT、OTD、ANL、PT) いずれも 12 匹から回収した膀胱粘膜の DNA について、HRAM-アダクトームに供する十分量の DNA が回収できるか検討を行なった。回収量の向上を考え、すり面付き 1.5mL チューブ (バイオマッシャーII) 内で膀胱粘膜上皮を剥離し、Proteinase K および SDS を加えて 37°C 一晩反応させ、フェノール・クロロホルム法により DNA 抽出する方法を用いた。その結果、ほとんどの個体から総量 20 μg 以上の良質な DNA が回収できていたことから、グループ毎に DNA サンプルを pool することなく、個体ごとにアダクトーム解析を実施できると考えた。今後は、各グループ毎に 5 サンプルを抽出し、酵素消化後に LC-HRAM-MS にて付加体の網羅的解析を実施する。

A. 研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱癌は社会的な問題の一つであり、最近でも福井県の化学工場において *o*-toluidine (OTD) 等の芳香族アミンを取り扱う従事者から膀胱癌が発生している。日本で発がん性物質として規制されている芳香族アミン類は benzidine や 2-naphthylamine など 7 種類と少ないが、今後も類似の芳香族アミンによる職業膀胱癌発生の危険性が存在する可能性は高い。発がん予測試験として、遺伝毒性試験が挙げられるが、既存の遺伝毒性試験としては、Ames 試験 (変異原性試験)、コメットアッセイ (DNA 損傷試験)、小核試験 (染色体異常試験) などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これら試験のみでは化学物質の発がん性の予測や有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway, AOP) の解析は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を開発することが必要であると考えられる。

我々は、高分解能精密質量分析装置 (HRAM) を用いた DNA 付加体の網羅的解析手法 (HRAM-アダクトーム) を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて検討してきた。最近、アダクトーム法を用いたラット肝臓をターゲットとした化学物質の安全性評価法の開発

を目的とし、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なったところ、高い正答率が得られることがわかった。

本研究では、この手法を膀胱発がん予測へと応用することを目的に、既存の膀胱発がん物質を含む複数の化学物質を投与したラットの膀胱における DNA 損傷を HRAM-アダクトームにより検討し、DNA 付加体の生成を指標とした有害性評価の検証を行なう。

B. 研究方法

6週齢 F344 雄ラットに、0.6% anilinium chloride (ANL)、0.3% *p*-toluidine hydrochloride (PT)、1.5% acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT) および 0.6% *o*-toluidine hydrochloride (OTD) を 4 週間混餌投与し、麻酔下採血により屠殺・剖検し、膀胱組織を尿路上皮粘膜を表向きにして、凍結保存した。

全てのサンプルについて、Tissue Lysis Buffer を入れたすり面付き 1.5mL チューブ (バイオマッシャーII) 内で膀胱粘膜上皮を剥離し、Proteinase K および SDS を加えて 37°C 一晩反応させ、フェノール・クロロホルム法により DNA 抽出を行なった。イソプロパノール沈殿後に適当量の TE に溶解し、分光光度計により DNA 濃度を測定した。

DNA を抽出後、DNase I、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデ

オキシリボヌクレオシドに消化した後、LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行なう。得られたデータは SCIEX 社が提供するバイオインフォマティクス解析ソフトウェアを用い、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス (-116.04736) 及び各種核酸に特異的なニュートラルロス (-152.0572; dG, -136.0623; dA, -112.0511; dC, -127.0508; dT) を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系をデザインした。得られたデータを主成分判別分析 (PCA-DA) により解析する予定である。

C. 研究結果

今年度は、コントロール(N=12)、ANL ((N=12)、PT(N=12)、OTD(N=12)、AAOT(N=12)から回収した膀胱粘膜からのDNA抽出について検討した。ラットの膀胱は非常に小さく、そこから回収できる粘膜組織も微量であることから、HRAM-アダクトームに供する十分量のDNAが回収できるかについて検討を行なった。各個体ごとのDNA回収量を表1に示す。ほとんどの個体から総量20 ug以上のDNAが回収できていることがわかった。今後は、各グループ毎に5サンプルを抽出し、酵素消化後にLC-HRAM-MSにて付加体の網羅的解析を実施する。

表1 抽出したDNA濃度と総量

	Sample Name	Concentration	Units	A260	260/280	260/230	Volume(μL)	(ug)	
Control	113	206.766	ng/μL	4.1353	1.91	2.20	45	9.3	
	114	167.467	ng/μL	3.3493	1.89	2.24	45	7.5	
	115	312.29	ng/μL	6.2458	1.96	2.16	45	14.1	
	116	496.831	ng/μL	9.9366	1.93	2.16	45	22.4	
	117	593.614	ng/μL	11.8723	1.96	2.19	45	26.7	
	118	666.822	ng/μL	13.3364	1.96	1.54	45	30.0	
	119	636.296	ng/μL	12.7259	1.94	2.20	45	28.6	
	120	815.979	ng/μL	16.3196	1.92	2.23	45	36.7	
	121	485.313	ng/μL	9.7063	2.04	2.18	45	21.8	
	122	872.206	ng/μL	17.4441	1.99	2.25	45	39.2	
	123	1109.056	ng/μL	22.1811	1.99	2.30	45	49.9	
	124	414.552	ng/μL	8.2910	2.00	2.18	45	18.7	
	ANL	213	631.45	ng/μL	12.6290	2.00	2.19	45	28.4
		214	889.765	ng/μL	17.7953	2.03	2.24	45	40.0
215		778.508	ng/μL	15.5702	2.01	2.24	45	35.0	
216		879.524	ng/μL	17.5905	2.04	2.17	45	39.6	
217		555.424	ng/μL	11.1085	1.98	2.15	45	25.0	
218		688.131	ng/μL	13.7626	1.98	2.19	45	31.0	
219		685.743	ng/μL	13.7149	1.98	2.23	45	30.9	
220		803.266	ng/μL	16.0653	1.96	2.28	45	36.1	
221		562.778	ng/μL	11.2556	2.02	2.18	45	25.3	
222		506.005	ng/μL	10.1201	1.99	2.16	45	22.8	
223		601.576	ng/μL	12.0315	2.04	2.16	45	27.1	
224		670.599	ng/μL	13.4120	2.00	2.22	45	30.2	
PT		313	486.624	ng/μL	9.7325	2.00	2.21	45	21.9
		314	736.835	ng/μL	14.7367	2.00	2.21	45	33.2
	315	874.751	ng/μL	17.4950	2.06	2.22	45	39.4	
	316	789.667	ng/μL	15.7933	2.04	2.16	45	35.5	
	317	798.845	ng/μL	15.9769	2.03	2.19	45	35.9	
	318	839.136	ng/μL	16.7827	2.02	2.20	45	37.8	
	319	798.307	ng/μL	15.9661	2.01	2.24	45	35.9	
	320	842.373	ng/μL	16.8475	2.02	2.25	45	37.9	
	321	825.72	ng/μL	16.5144	2.06	2.21	45	37.2	
	322	1204.04	ng/μL	24.0808	2.09	2.24	45	54.2	
	323	526.552	ng/μL	10.5310	2.05	2.20	45	23.7	
	324	979.544	ng/μL	19.5909	2.01	2.27	45	44.1	
	AAOT	413	882.03	ng/μL	17.6406	1.99	2.25	45	39.7
		414	787.68	ng/μL	15.7536	2.02	2.12	45	35.4
415		795.522	ng/μL	15.9104	1.99	2.22	45	35.8	
416		672.859	ng/μL	13.4572	2.00	2.19	45	30.3	
417		369.924	ng/μL	7.3985	1.95	2.14	45	16.6	
418		881.498	ng/μL	17.6300	2.02	2.23	45	39.7	
419		1040.424	ng/μL	20.8085	2.08	2.21	45	46.8	
420		773.625	ng/μL	15.4725	2.03	2.24	45	34.8	
421		572.066	ng/μL	11.4413	1.97	2.23	45	25.7	
422		676.079	ng/μL	13.5216	2.04	2.19	45	30.4	
423		584.041	ng/μL	11.6808	2.04	2.22	45	26.3	
424		808.083	ng/μL	16.1617	2.07	2.19	45	36.4	
OTD		513	1447.504	ng/μL	28.9501	2.04	2.02	45	65.1
		514	1938.769	ng/μL	38.7754	2.00	2.01	45	87.2
	515	1799.839	ng/μL	35.9968	2.05	2.09	45	81.0	
	516	1638.81	ng/μL	32.7762	1.94	1.87	45	73.7	
	517	1185.343	ng/μL	23.7089	1.88	2.03	45	53.3	
	518	940.735	ng/μL	18.8147	2.08	2.19	45	42.3	
	519	1559.078	ng/μL	31.1816	1.97	2.06	45	70.2	
	520	1979.162	ng/μL	39.5832	2.04	2.06	45	89.1	
	521	1367.069	ng/μL	27.3414	1.97	1.98	45	61.5	
	522	1277.515	ng/μL	25.5503	2.02	1.92	45	57.5	
	523	1332.5	ng/μL	26.6500	1.98	1.99	45	60.0	
	524	1947.156	ng/μL	38.9431	2.05	2.08	45	87.6	

*黄色マーカーは20 ug以上回収できているサンプル

D. 考察

HRAM-アダクトーム法はゲノムDNA中に存在するDNA付加体をそのまま解析するため、遺伝子変異解析などと異なり、通常はμgオーダーのDNAが必要となる。また、腫瘍が発生するのは粘膜上皮からであることから、組織全体からゲノムDNAを抽出すると目的とする発がん重要なDNA付加体の存在レベルが希釈されてしまうことが懸念される。実験動物の膀胱は非常に小さく、1個体からはアダクトーム解析に十分な量のDNAを回収することが困難であると予測していた。そこで各投与群を12匹として実験を行なったが、今回の膀胱粘膜からのDNA抽出方法を用いれば、質の良いDNAが回収率よく得られることがわかった。グループ毎にDNAサンプルをpoolすることなく、個体ごとにアダクトーム解析を実施できると考えた。

E. 結論

膀胱粘膜からのDNA抽出方法を用いれば、質の良いDNAが回収率よく得られることがわかった。グループ毎にDNAサンプルをpoolすることなく、個体ごとにアダクトーム解析を実施できると考えた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putscharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabekjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE, Kurane I. (2021) U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Virology, 555, 71-77.
- Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. (2021) New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. Cancer Sci., 112, 7-15.
- Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. (2020) Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 96, 180-187.
- Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. (2020) Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 33, 1907-1914.
- Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. (2020) Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. Genes Environ. 42, 1-6.
- Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. (2020) Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multiles

ion mutational profiles. Carcinogenesis. 41, 368-37

2. 学会発表

- 1) 戸塚ゆ加里. NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望. 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム、Web開催 (2020年6月)
- 2) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. がん予防学術大会、Web開催 (2020年9月)
- 3) 戸塚ゆ加里. Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach、広島、第79回癌学会 (2020年10月)
- 4) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによりがんの要因を解明する. 第2回 三陸包括的緩和医療研究会、Web開催 (2020年10月)
- 5) 戸塚ゆ加里. 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望. 第49回 環境変異原学会、静岡 (2020年9月)

6) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望. 第37回 日本毒性病理学会、Web開催 (2021年1月)

7) 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望. 第12回 JBFシンポジウム、Web開催 (2021年3月)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし