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3年度　総括･分担研究報告書

研究代表者　鈴木　周五

令和４（２０２２）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 ---------- 10
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 ---------- 15
鰐渕英機

３．ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割 ---------- 18
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 ---------- 21
戸塚ゆ加里

III．研究成果の刊行に関する一覧表 ---------- 24

労災疾病臨床研究事業費補助金
令和３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（200601-01）

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、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 (OTD)および4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA)の投与試験を行った。その結果、肝組織の代謝酵素P450について、OTDは野生型マウスにおいてCYP2C9/19グループの発現を、ヒト化肝臓マウスにおいてCYP3A4発現を亢進した。尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、ヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれも尿中の主な物質はOTDであった。OTD投与により膀胱尿路上皮に増殖活性傾向を認めたものの、いずれの群でも有意な差が見られなかった。一方で、MOCA投与によりヒト化肝臓マウスの膀胱尿路上皮のみ過形成病変や細胞増殖活性、アポトーシスの促進を認めた。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、OTDの尿中代謝物として検出された芳香族アミンを主体にラットに対して4週間混餌投与実験を行った結果、aceto-*o*-toluidide (AOTD)投与群において尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性亢進を認めた。IPAパスウェイ解析により、尿路上皮に過形成病変を認めたAOTD群、OTD群およびAAOT群において、共通して異常発現を示すがんや細胞増殖に関わる遺伝子群を同定した。また、アダクトーム解析を行ったところ、AAOTおよびOTDばく露によるラット膀胱尿路上皮への影響に酸化ストレスが関与している可能性が示された。以上より、OTDの肝代謝についてヒトとマウスでの相違を確認したとともに、OTD関連芳香族アミンにおける尿中代謝物と膀胱発がんの関係性やその発がん機序が明らかになった。また、MOCAによる膀胱発がん性にはヒト肝臓による特異的な代謝が重要である可能性を示し、ヒト化肝臓マウスがヒトへの外挿を検討するには非常に有用であることを示した。

研究分担者
鰐渕　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　日本大学　薬学部　教授

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3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および4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA)を投与し検討した。

また、ラットに対しては、OTDの尿中代謝物である4-amino-m-cresol (4AMC)、2-amino-m-cresol (2AMC)およびaceto-o-toluidide (AOTD)や、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2,4-dimethylaniline hydrochloride (2,4-DMA)について投与し検討を行った。さらに、去年度行ったAAOTやOTDを加えた膀胱発がん機序解明を試みた。

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雌マウスについて、HSV thymidine kinase変異型遺伝子を肝細胞特異的に発現する超免疫不全NOD/*scid-IL-2rgc* (NOG-TKm30 F1)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。血中コリンエステラーゼ活性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（ロットA：12歳女性、ロットC：35歳男性、ロットD：6歳男性）。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として、ガンシクロビル製剤のデノシン（点滴静注用）とバリキサ（シロップ）を検討した。

作成したヒト化肝臓マウスおよび非移植群のF1-TKm30雌マウスに、0.3% *o*-toluidine hydrochloride (OTD)もしくは、0.05% MOCA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。凍結肝組織からRNAを抽出し、DNBSEQ-G400RS FASTを用いたRNA-seqにより肝臓での遺伝子発現解析を行った。肝臓におけるP450の発現を検討するため、CYP2C19、CYP3A4およびCYP2E1抗体を用いた免疫組織化学染色にて検討した。採取した膀胱は、腔内にホルマリンを注入して固定し、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、対照群3匹ずつ、OTD投与群4匹ずつ採取した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、OTD (0.117 nmol/mL)、N-Acetyl-o-toluidine (NAOT; 0.031 nmol/mL)、4-Amino-m-cresol (4AMC; 0.505 nmol/mL)、2-Amino-m-cresol (2AMC; 0.148 nmol/mL)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

6週齢F344雄ラットに、0.6% 2,4-DMA、0.6% 4AMC、0.6% 2AMCもしくは0.6% AOTD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、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。去年度行ったaniline (ANL)、*p*-toluidine(PT)、AAOT、OTD投与群の凍結保存した膀胱組織について、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。DNAを抽出後、DNaseI、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った。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チ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(PDA-DA)により解析した。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験にあたっては、大阪市立大学を含む各施設における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

〈ヒト化肝臓マウス作成の成果〉

肝傷害を誘導するガンシクロビルについて、デノシンでは30～40 mg/kg（単回、腹腔内投与）、バリキサでは0.2 mg/mL（72時間飲水投与）においてヒト肝細胞移植に適した血中ALTレベル（600～1,500 U/L）を呈することがわかった。これらの条件で肝傷害を誘導したマウスにロットCおよびDヒト肝細胞を移植し、高キメラマウス作製能力を検証した。その結果、ロットC移植群では血中コリンエステラーゼ活性が最高435 U/L、ロットD移植群では630 U/Lであり、いずれの細胞も推定ヒト化率90%以上のヒト化肝臓マウスを作製しうる能力を持つことが確認できた。また、芳香族アミン類の実験に使用したロットAおよびC細胞移植によるヒト化肝臓マウス15匹の平均血中コリンエステラーゼ活性は 415U/Lと高値であり、これらの肝臓切片を抗ヒトミトコンドリア抗体で染色して求めたヒト細胞占有率は平均82%であった。

表1. ヒト化肝臓マウスにおけるコリンエステラーゼ(ChE)による推定置換率および免疫染色での置換率測定

ロット	動物番号	ChE(U/I)	ChEによる置換率(%)	免疫染色での置換率（%）
A	421	540	110	84
A	221	535	109	86
A	422	425	87	87
A	423	405	83	83
A	222	485	99	死亡
A	424	690	141	91
C	801	425	87	90
C	802	425	87	86
C	601	475	97	84
C	803	350	72	87
C	602	325	66	75
C	804	335	69	81
C	603	195	40	71
C	604	305	62	71
C	805	315	64	73
平均		415	85	82

〈OTD 投与実験〉

ヒト化肝臓マウスのOTD投与群において試験開始時に比べ屠殺・剖検時の体重減少を認めた。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（表2）。

表2. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

	Treatment	No. of mice	Body weight (g)		Liver	
			Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
Wild	Control	3	28.0 ± 3.0	28.9 ± 3.5	1.39 ± 0.22	4.8 ± 0.2
Wild	OTD	5	27.9 ± 1.9	28.9 ± 2.1	1.35 ± 0.12	4.7 ± 0.2
Human	Control	1	25.7	26.3	2.62	10.0
Human	OTD	4	25.5 ± 2.5	24.1 ± 2.6	2.59 ± 0.17	10.2 ± 1.5

肝臓における代謝酵素P450の発現についてRNA-seqを用いて検討した結果、野生型マウスにおいてOTD投与によりヒトCYP2C9/19グループに属するP450が、Cyp2c29を主体に発現の上昇を認めた。一方、ヒト化肝臓マウスにおいては、OTD投与によりCYP3A4の発現上昇を認めた（表3）。

表3. 肝臓における主なP450の発現変動

Gene name	野生型マウス		Gene name	ヒト化肝臓マウス	
	Control (CPM)	OTD (CPM)		Control (CPM)	OTD (CPM)
Cyp1a1	1	1	**CYP1A1**	128	217
Cyp1a2	480	560	**CYP1A2**	829	1186
CYP2C9/19 Group			**CYP2C9/19 Group**		
Cyp2a5	317	574	CYP2A6	729	785
Cyp2c29	1357	4033	CYP2C9	1262	1037
Cyp2c37	795	1012	CYP2C19	403	361
Cyp2c50	959	1441			
Cyp2e1	6152	4858	**CYP2E1**	7961	8086
CYP3A4 Group			**CYP3A4 Group**		
Cyp3a11	4268	4754	CYP3A4	1105	2337
Cyp27a1	369	399	**CYP27A1**	478	444

各肝臓におけるP450発現を確認するため、免疫染色を行った結果、CYP2C19は野生型マウスの小葉中心で染色され、OTD投与によりその発現範囲が広がった。一方、ヒト化肝臓マウスでは殆ど発現を認めなかった。CYP3A4は野生型マウスでは小葉中心を主体に発現を認め、OTD投与による変化は乏しかった。一方、ヒト化肝臓マウスにおいては、OTD投与により発現範囲が広がっていた。CYP2E1は野生型マウスの小葉中心で染色され、OTD投与による変化は見られなかった。ヒト化肝臓マウスでは殆ど発現を認めなかった（図1）。以上より、P450の免疫染色結果は、遺伝子発現変化を反映した染色性を示した。

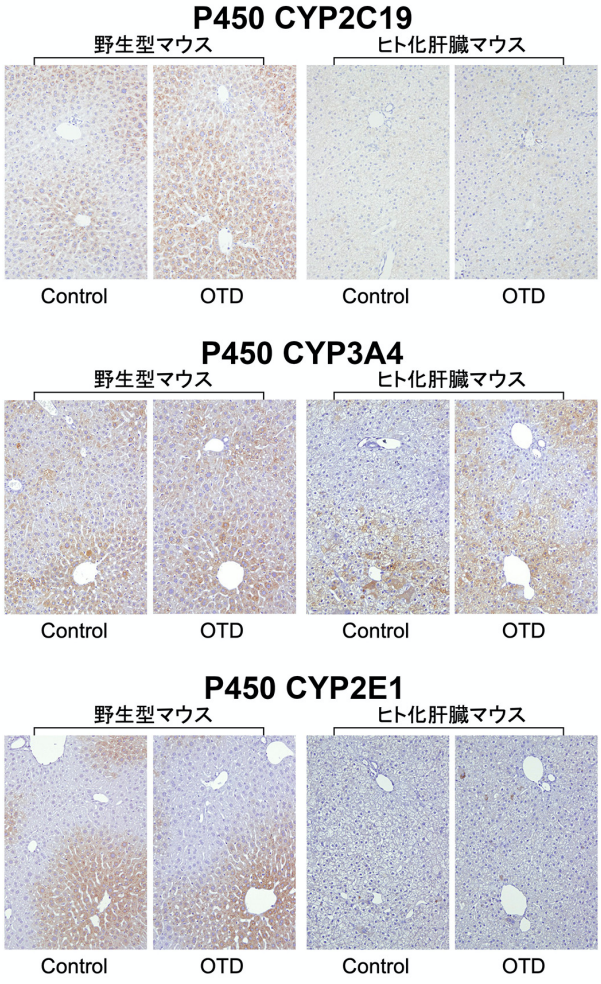

図1. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスのP450免疫染色

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4に示す。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、尿中に存在する芳香族アミンの大半はOTDであった。加えて、野生型マウスにおいて、OTDはヒト化肝臓マウスよりも多く存在した。一方、NAOTDや4AMCは野生型マウスとヒト化肝臓マウスで差が見られなかった。2AMCはいずれの群においても検出限界以下だった。

表4. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Type	Treatment	No. of mice	OTD (μM)	NAOTD (μM)	4AMC (μM)	2AMC (μM)	Total (μM)
Wild	Control	3	1.4 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	1.4 ± 0.3
Wild	OTD	4	183.5 ± 128.4	0.2 ± 0.2	6.9 ± 4.5	N.D.	190.8 ± 132.8
Human	Control	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Human	OTD	4	51.0 ± 21.1	0.2 ± 0.1	8.0 ± 7.9	N.D.	59.3 ± 25.0

OTD: o-Toluidine; NAOTD: N-Acetyl-o-toluidine; 4AMC: 4-Amino-m-cresol; 2AMC: 2-Amino-m-cresol; N.D.: not detected

膀胱組織を検討した結果、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、病変として診断しえる組織学的な変化は見られなかった（図2）。また、

去年度行った実験サンプルも含めて、細胞増殖活性の指標であるKi67の陽性率を検討した結果、野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスいずれもOTD投与により陽性率の上昇傾向を認めたものの有意差は見られなかった(図3)。

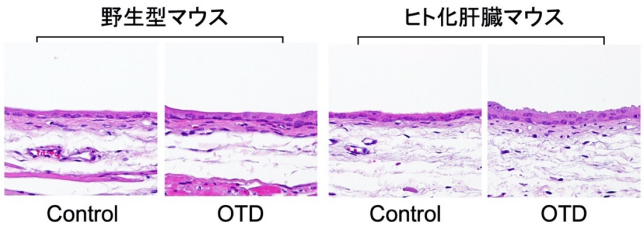

図2. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

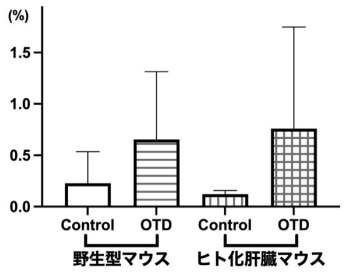

図3. 膀胱尿路上皮のKi67陽性率

<MOCA 投与実験>

両群ともにMOCA投与による体重抑制は認められなかった。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。さらに、ヒト化肝臓マウスにおいて、MOCA投与により肝重量の有意な増加と認めた（表5）。

表5. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

Treatment		No. of mice	Body weight (g)		Liver	
			Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
Wild	Control	4	27.6 ± 0.5	28.4 ± 1.2	1.17 ± 0.04	4.1 ± 0.1
Wild	MOCA	4	27.7 ± 2.1	29.1 ± 2.0	1.37 ± 0.12	4.7 ± 0.2
Human	Control	4	22.7 ± 1.8	25.6 ± 0.6	2.37 ± 0.20	9.3 ± 0.8
Human	MOCA	5	24.9 ± 1.0	25.7 ± 1.6	2.62 ± 0.13*	10.2 ± 0.6*

* P < 0.05 compared to each Control

膀胱組織を検討した結果、ヒト化肝臓マウスのMOCA投与群において、単純過形成病変を認めた（図4、表6）。また、細胞増殖活性の指標であるKi67の陽性率や、アポトーシスの指標であるTUNEL染色で検討した結果、ヒト化肝臓マウスのMOCA投与群においてのみ、有意な陽性率の上昇を認めた（表6）。

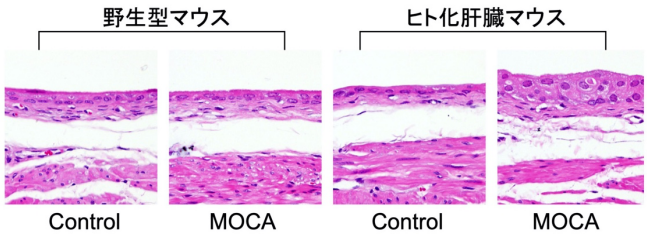

図4. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

表6. 膀胱尿路上皮病変、Ki67およびTUNEL陽性率

Treatment		No. of mice	Simple hyperplasia	Ki67 (%)	TUNEL (%)
Wild	Control	4	0	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1
Wild	MOCA	4	0	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1
Human	Control	4	0	0.8 ± 0.6	0.1 ± 0.1
Human	MOCA	5	5**	5.9 ± 0.5***	0.4 ± 0.2*

P< 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

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。また、2,4-DMAおよびAOTD投与群において、肝重量の増加を認めた。AOTD群で平均摂餌量が対照群に比べ少ない一方で、飲水量はいずれも対照群と差が見られなかった（表7）。

表7. 体重、肝重量および摂餌・飲水量

Treatment	Body weight (g)	Liver		Consumption	
		Absolute (g)	Relative (%)	Food (g/day)	Water (g/day)
Control	251.1 ± 20.7	9.4 ± 0.6	3.8 ± 0.1	15.1 ± 0.6	20.9 ± 1.3
2,4-DMA	218.2 ± 17.2 ***	15.0 ± 0.8***	7.0 ± 0.1***	14.0 ± 0.9	22.7 ± 1.4
2AMC	239.7 ± 19.6 **	10.2 ± 0.4	4.2 ± 0.1**	14.5 ± 0.5	20.1 ± 0.6
4AMC	240.0 ± 19.2 **	9.4 ± 0.8	3.9 ± 0.2	14.5 ± 0.3	19.7 ± 1.0
AOTD	186.9 ± 10.6 ***	12.2 ± 0.9***	6.4 ± 0.2***	11.8 ± 0.7	20.8 ± 1.0

**, ***: P< 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

膀胱を組織学的に検討した結果、AOTD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。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、AOTD投与群において陽性率の有意な増加を認めた。一方、他の芳香族アミン投与群では対照群と差がなかった。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8）。

表8. 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	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.8
2,4-DMA	6	0	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.4
2AMC	6	0	1.3 ± 0.2	1.3 ± 1.4
4AMC	6	0	1.2 ± 0.4	1.7 ± 1.2
AOTD	6	6***	4.2 ± 1.7***	1.2 ± 0.7

***: P< 0.001 vs Control

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、AOTD投与群では804遺伝子存在し、他の投与群（2,4-DMA：447遺伝子、2AMC：295遺伝子、4AMC：248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137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9）。

表9. 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	-	-	-
2,4-DMA	281	166	447
2AMC	213	82	295
4AMC	163	85	248
AOTD	584	220	804
All aromatic amines	78	59	137

今回の実験でラット膀胱に増殖性病変を認めたAOTD投与群とともに、去年解析したAAOTおよびOTD投与群において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10）。

表10. 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**
Organismal Injury and Abnormalities	3.93E-03 - 1.73E-07	43
Cancer	3.93E-03 - 1.18E-06	43
Skeletal and Muscular Disorders	3.93E-03 - 1.18E-06	18
Molecular and Cellular Functions	**p-value range**	**# Molecules**
Drug Metabolism	3.96E-03 - 6.41E-08	11
Cellular Growth and Proliferation	3.60E-03 - 2.46E-06	24
Cellular Development	3.60E-03 - 3.52E-06	22
Physiological System Development and Function	**p-value range**	**# Molecules**
Connective Tissue Development and Function	3.96E-03 - 2.46E-06	13
Tissue Development	3.96E-03 - 2.46E-06	18
Skeletal and Muscular System Development and Function	1.98E-03 - 2.69E-06	9

DNA付加体の網羅的解析結果によりPCA解析を行ったところ、AAOT群、OTD群およびそれ以外（コントロール、ANL、PT）の3つにクラスタリングされた（図5）。

クラスタリングされた中から、AAOT、OTDのクラスタリングに特徴的なアダクトを抽出し、MS/MSフラグメントを確認したところ、酸化ストレスにより増加すると考えられている8-OH-dA、8-OH-dGおよび5-OH-dGと類似した*m/z*値及びフラグメントパターンを示した（図6）。

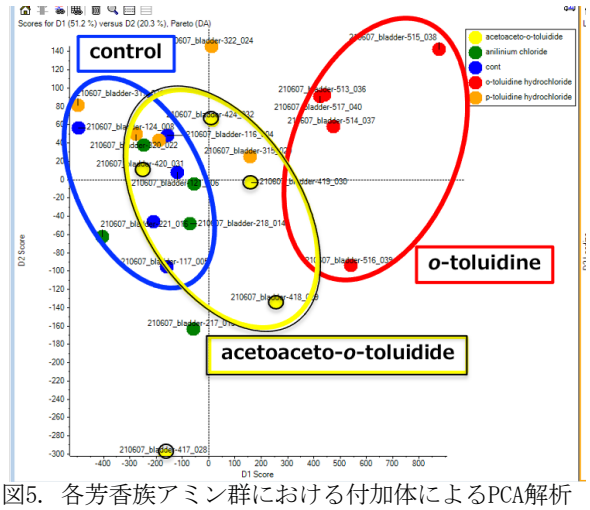

図5. 各芳香族アミン群における付加体によるPCA解析

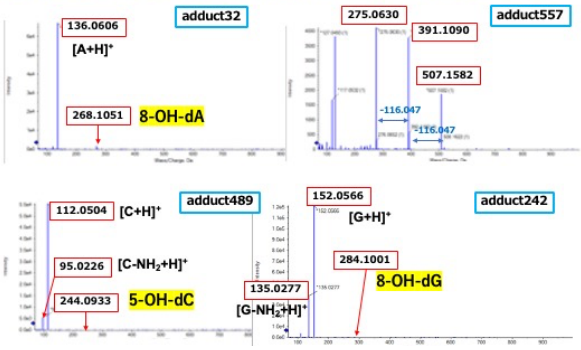

図6. AAOTおよびOTD群に特徴的なアダクトの同定

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、OTDを投与したヒト化肝臓マウスでのみ体重減少を来したことから、OTDによる毒性が野生型マウスよりも強く存在する可能性を示した。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一方で、肝組織における代謝酵素発現を検討した結果、P450の発現分子種が野生型マウスとヒト化肝臓マウスにおいて異なることが示された。この結果は、げっ歯類を用いたOTD投与による影響を検討するにあたり、ヒトへの外挿を考える際に重要なデータになると考えられる。

尿中の芳香族アミンおよびその代謝物を検討した結果、一番多く存在した物質はOTDであり、令和2年度にラットにOTDを投与した結果と類似していた。一方で、野生型マウスにおいて、ヒト化肝臓マウスよりも多くの尿中OTDを確認したことに加え、ヒト化肝臓マウスでは体重低下を確認したことから、ヒト化肝臓マウスにおいてOTDが肝臓で多く代謝され毒性を示した可能性がある。

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、組織学的な変化は見られず、細胞増殖活性の亢進傾向を認めるものの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。また、これまでの報告結果から膀胱尿路上皮におけるヒトとマウスの感受性の違いが存在する可能性も存在する。

今回、ヒト化肝臓マウスにおいてのみ、MOCA投与による膀胱粘膜上皮の単純過形成病変形成と、細胞増殖活性やアポトーシスの誘導を認めた。この結果は、MOCAのヒト肝臓における代謝がマウスとは異なり、膀胱発がん要因となる代謝物を尿中に排泄している可能性を示した。また、MOCAがラットおよびマウスにおいては膀胱への発がん性影響が見られず、ヒトにおいて発がん性が疑われている状況に合致した成果であり、ヒト化肝臓マウスモデルがヒトのMOCAの膀胱発がん性を検討する良いモデルであることが示された。今後、本モデルを用いて膀胱発がん代謝物を同定するとともに、その機序解明を進める予定である。

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

ラットにOTDを投与した際の尿中に検出される代謝物である2AMC、4AMCおよびAOTDのうち、AOTD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。この結果は、OTDばく露による膀胱発がん性に、その尿中代謝物であるAOTDが重要である可能性を示した。一方で、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、AOTDは肝臓で代謝され尿中に多くのOTDを排泄している可能性も存在する。今後、本実験の尿中代謝物を検討する事で、OTD関連の膀胱発がん性に重要な尿中代謝物について検証を行う予定である。

また、本年度のAOTD投与群とともに、去年度行ったAAOTおよびOTD群に共通した遺伝子発現変化を検討した結果、Cancerや細胞増殖に関わる遺伝子を同定した。OTD関連発がん機序解明に重要な結果が得られ、他の膀胱への影響がなかった芳香族アミンによる遺伝子発現変化との相違から、膀胱発がん特異的な遺伝子変化を同定する予定である。

DNA付加体の網羅的解析において、AAOTおよびOTDに特徴的なアダクトを抽出し、MS/MSフラグメントを確認したところ、酸化ストレスに関連する8-OH-dA、8-OH-dGおよび5-OH-dGと同定され、AAOTおよびOTD曝露によるラット膀胱尿路上皮への影響に酸化ストレスが関与している可能性が示された。

E．結論

OTDの肝代謝についてヒトとマウスでの相違を確認したとともに、マウスおよびヒト肝臓におけるOTDの尿中代謝物と、生体への毒性影響を検証できた。また、OTD関連芳香族アミンにおける尿中代謝物と膀胱発がんの関係性が明らかになった。その発がん機序には細胞増殖活性や酸化ストレスの関与が示された。これらの成果は、OTD関連膀胱発がん機序解明に繋がるものと考えられた。また、MOCAによる膀胱発がん性にはヒト肝臓による特異的な代謝が重要である可能性を示し、ヒト化肝臓マウスがヒトへの外挿を検討するのに非常に有用であることを示した。

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) Shiode Y, Kodama T, Shigeno S, Murai K, Tanaka S, Newberg JY, Kondo J, Kobayashi S, Yamada R, Hikita H, Sakamori R, Suemizu H, Tatsumi T, Eguchi H, Jenkins NA, Copeland NG, Takehara T. TNF receptor-related factor 3 inactivation promotes the development of intrahepatic cholangiocarcinoma through NF-kappaB-inducing kinase-mediated hepatocyte transdifferentiation. Hepatology. in press.

2) Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. PLoS One. 2022; 17: e0263895.

3) Fukutomi K, Hikita H, Murai K, Nakabori T, Shimoda A, Fukuoka M, Yamai T, Higuchi Y, Miyakawa K, Suemizu H, Ryo A, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Capsid Allosteric Modulators Enhance the Innate Immune Response in Hepatitis B Virus-Infected Hepatocytes During Interferon Administration. Hepatol Commun. 2022; 6: 281-96.

4) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities and their expression levels in liver microsomes of chimeric TK-NOG mice with humanized livers. Drug Metab Pharmacokinet. 2022; 44: 100454.

5) Uehara S, Shimizu M, Ple K, Routier S, Yoneda N, Higuchi Y, Suemizu H, Yamazaki H. Probe drug T-1032 N-oxygenation mediated by cytochrome P450 3A5 in human hepatocytes in vitro and in humanized-liver mice in vivo. Drug Metab Pharmacokinet. 2022; 44: 100453.

6) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. In Vivo. 2022; 36: 628-34.

7) 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.

8) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. Cell Rep. 2021; 37: 109988.

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) Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. Carcinogenesis. 2021; 42: 940-50.
11) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 3613.
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: 1216.
13) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I. Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism. Neuropathology. 2021; 41: 387-95.
14) Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca2+ entry. J Biochem. 2021; 170: 483-8.
15) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2021; 259: 3127-36.
16) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Oxidative metabolism and pharmacokinetics of the EGFR inhibitor BIBX1382 in chimeric NOG-TKm30 mice transplanted with human hepatocytes. Drug Metab Pharmacokinet. 2021; 41: 100419.
17) 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.
18) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, Suemizu H. UDP-glucuronosyltransferase 1A4-mediated N2-glucuronidation is the major metabolic pathway of lamotrigine in chimeric NOG-TKm30 mice with humanised-livers. Xenobiotica. 2021; 51: 1146-54.
19) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kawai K, Yamamoto M, Kamimura H, Iida Y, Oshimura M, Kazuki Y, Yamazaki H, Hikita H, Takehara T, Suemizu H. An improved TK-NOG mouse as a novel platform for humanized liver that overcomes limitations in both male and female animals. Drug Metab Pharmacokinet. 2022; 42: 100410.
20) 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.
21) Sueyoshi K, Komura D, Katoh H, Yamamoto A, Onoyama T, Chijiwa T, Isagawa T, Tanaka M, Suemizu H, Nakamura M, Miyagi Y, Aburatani H, Ishikawa S. Multi-tumor analysis of cancer-stroma interactomes of patient-derived xenografts unveils the unique homeostatic process in renal cell carcinomas. iScience. 2021; 24: 103322.
22) 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.
23) 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.
24) Ogawa M, Jiang JX, Xia S, Yang D, Ding A, Laselva O, Hernandez M, Cui C, Higuchi Y, Suemizu H, Dorrell C, Grompe M, Bear CE, Ogawa S. Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2021; 12: 6504.
25) 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.
26) 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.
27) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Suemizu H,

Yamazaki H. Pharmacokinetics of primary oxidative metabolites of thalidomide in rats and in chimeric mice humanized with different human hepatocytes. J Toxicol Sci. 2021; 46: 311-7.

28) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Suemizu H, Yamazaki H. Roles of human cytochrome P450 1A2 in coumarin 3,4-epoxidation mediated by untreated hepatocytes and by those metabolically inactivated with furafylline in previously transplanted chimeric mice. J Toxicol Sci. 2021; 46: 525-30.

29) 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.

30) 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: 1-7.

31) 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.

32) 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.

33) Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids. Front Genet. 2021; 12: 768781.

34) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. In Vivo. 2021; 35: 2107-14.

35) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 2021; 34: 912-9.

36) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. Cancer Sci. 2021; 112: 7-15.

2. 学会発表

1) 鈴木周五、魏民、鰐渕英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京（2021年4月）
2) 戸塚ゆ加里. 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法（DNAアダクトーム）の現状と将来展望. 第81回分析化学討論会、Web開催（2021年5月）
3) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐渕英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催（2021年6月）
4) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催（2021年6月）
5) 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析手法（DNAアダクトーム）の現状と将来展望. 第144回日本薬理学会関東支部会、Web開催（2021年6月）
6) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）
7) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）
8) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催（2021年9月）
9) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐渕英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年9月）
10) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
11) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
12) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10

月）

13) 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
14) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価. 第50回 環境変異原学会、横須賀（2021年11月）
15) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
16) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 1,4-ジオキサンの*in vivo*変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
17) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
18) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐渕英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
19) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐渕英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/βカテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
20) 梯アンナ、鰐渕英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
21) 戸塚ゆ加里. ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する. 第95回日本薬理学会、福岡（2022年3月）
22) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規*in vitro*生体模倣評価系の開発. 日本薬学会 第142年会、Web開催（2022年3月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

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３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（200601-01）
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 (OTD)および4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA)を4週間投与した。その結果、肝組織の代謝酵素P450について、OTDは野生型マウスにおいてCYP2C9/19グループの発現を、ヒト化肝臓マウスにおいてCYP3A4発現を亢進した。また、MOCA投与により、ヒト化肝臓マウスの膀胱のみ過形成病変や細胞増殖活性、アポトーシスの促進を認めた。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、OTDの尿中代謝物として検出された芳香族アミンを主体にラットに対して4週間混餌投与実験を行った結果、aceto-o-toluidide (AOTD)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。IPAパスウェイ解析により、尿路上皮に過形成病変を認めたAOTD群、OTD群およびAAOT群において、共通して異常発現を示すがんや細胞増殖に関わる遺伝子群を同定した。以上より、OTDの肝代謝についてヒトとマウスでの相違を確認したとともに、OTD関連芳香族アミンにおける尿中代謝物と膀胱発がんの関係性やその発がん機序が明らかになった。また、MOCAによる膀胱発がん性にはヒト肝臓による特異的な代謝が重要である可能性を示し、ヒト化肝臓マウスがヒトへの外挿を検討するには非常に有用であることを示した。

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、「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3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および4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA)を投与し検討した。

また、ラットに対しては、OTDの尿中代謝物である4-amino-m-cresol (4AMC)、2-amino-m-cresol (2AMC)およびaceto-o-toluidide (AOTD)や、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2,4-dimethylaniline hydrochloride (2,4-DMA)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、0.3% o-toluidine hydrochloride (OTD)もしくは、0.05% MOCA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。凍結肝組織からRNAを抽出し、DNBSEQ-G400RS FASTを用いたRNA-seqにより肝臓での遺伝子発現解析を行った。肝臓におけるP450の発現を検討するため、CYP2C19、CYP3A4およびCYP2E1抗体を用いた免疫組織化学染色にて検討した。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。

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% 2,4-DMA、0.6% 4AMC、0.6% 2AMCもしくは0.6% AOTD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、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

<OTD投与実験>

ヒト化肝臓マウスのOTD投与群において試験開始時に比べ屠殺・剖検時の体重減少を認めた。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（表1）。

表1. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

	Treatment	No. of mice	Body weight (g)		Liver	
			Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
Wild	Control	3	28.0 ± 3.0	28.9 ± 3.5	1.39 ± 0.22	4.8 ± 0.2
Wild	OTD	5	27.9 ± 1.9	28.9 ± 2.1	1.35 ± 0.12	4.7 ± 0.2
Human	Control	1	25.7	26.3	2.62	10.0
Human	OTD	4	25.5 ± 2.5	24.1 ± 2.6	2.59 ± 0.17	10.2 ± 1.5

肝臓における代謝酵素P450の発現についてRNA-seqを用いて検討した結果、野生型マウスにおいてOTD投与によりヒトCYP2C9/19グループに属するP450が、Cyp2c29を主体に発現の上昇を認めた。一方、ヒト化肝臓マウスにおいては、OTD投与によりCYP3A4の発現上昇を認めた（表2）。

各肝臓におけるP450発現を確認するため、免疫染色を行った結果、CYP2C19は野生型マウスの小葉中心で染色され、OTD投与によりその発現範囲が広がった。一方、ヒト化肝臓マウスでは殆ど発現を認めなかった。CYP3A4は野生型マウスでは小葉中心を主体に発現を認め、OTD投与による変化は乏しかった。一方、ヒト化肝臓マウスにおいては、OTD投与により発現範囲が広がっていた。CYP2E1は野生型マウスの小葉中心で染色され、OTD投与による変化は見られなかった。ヒト化肝臓マウスでは殆ど発現を認めなかった（図1）。以上より、P450の免疫染色結果は、遺伝子発現変化を反映した染色性を示した。

表2. 肝臓における主なP450の発現変動

Gene name	野生型マウス Control (CPM)	野生型マウス OTD (CPM)	Gene name	ヒト化肝臓マウス Control (CPM)	ヒト化肝臓マウス OTD (CPM)
Cyp1a1	1	1	**CYP1A1**	128	217
Cyp1a2	480	560	**CYP1A2**	829	1186
CYP2C9/19 Group			**CYP2C9/19 Group**		
Cyp2a5	317	574	CYP2A6	729	785
Cyp2c29	1357	4033	CYP2C9	1262	1037
Cyp2c37	795	1012	CYP2C19	403	361
Cyp2c50	959	1441			
Cyp2e1	6152	4858	**CYP2E1**	7961	8086
CYP3A4 Group			**CYP3A4 Group**		
Cyp3a11	4268	4754	CYP3A4	1105	2337
Cyp27a1	369	399	**CYP27A1**	478	444

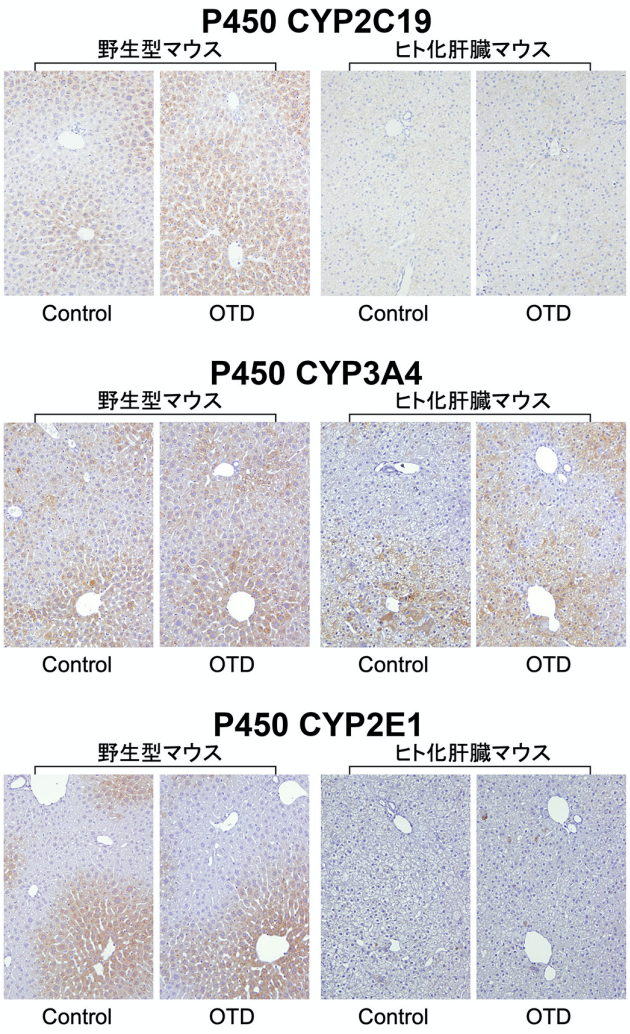

図1. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスのP450免疫染色

膀胱組織を検討した結果、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、病変として診断しえる組織学的な変化は見られなかった（図2）。また、去年度行った実験サンプルも含めて、細胞増殖活性の指標であるKi67の陽性率を検討した結果、野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスいずれもOTD投与により陽性率の上昇傾向を認めたものの有意差は見られなかった（図3）。

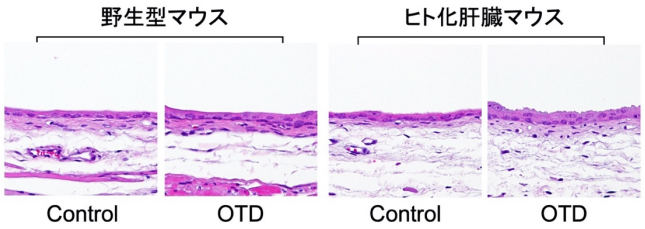

図2. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

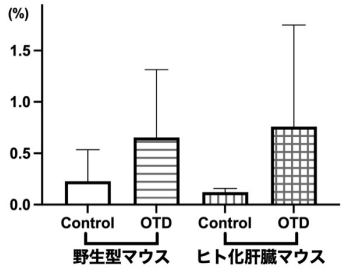

図3. 膀胱尿路上皮のKi67陽性率

〈MOCA 投与実験〉

両群ともにMOCA投与による体重抑制は認められなかった。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。加えてヒト化肝臓マウスにおいて、MOCA投与により肝重量の有意な増加と認めた（表3）。

表3. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

	Treatment	No. of mice	Body weight (g)		Liver	
			Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
Wild	Control	4	27.6 ± 0.5	28.4 ± 1.2	1.17 ± 0.04	4.1 ± 0.1
Wild	MOCA	4	27.7 ± 2.1	29.1 ± 2.0	1.37 ± 0.12	4.7 ± 0.2
Human	Control	4	22.7 ± 1.8	25.6 ± 0.6	2.37 ± 0.20	9.3 ± 0.8
Human	MOCA	5	24.9 ± 1.0	25.7 ± 1.6	2.62 ± 0.13*	10.2 ± 0.6*

* P < 0.05 compared to each Control

膀胱組織を検討した結果、ヒト化肝臓マウスのMOCA投与群において、単純過形成病変を認めた（図4、表4）。また、細胞増殖活性の指標であるKi67の陽性率や、アポトーシスの指標であるTUNEL染色で検討した結果、ヒト化肝臓マウスのMOCA投与群においてのみ、有意な陽性率の上昇を認めた（表4）。

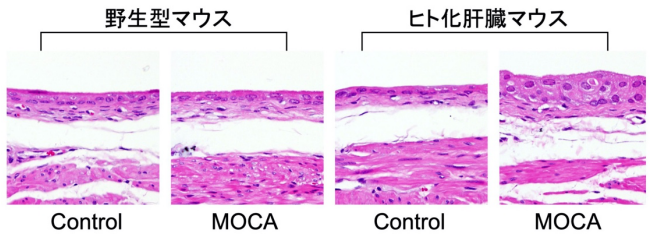

図4. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

表4. 膀胱尿路上皮病変、Ki67およびTUNEL陽性率

	Treatment	No. of mice	Simple hyperplasia	Ki67 (%)	TUNEL (%)
Wild	Control	4	0	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1
Wild	MOCA	4	0	0.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1
Human	Control	4	0	0.8 ± 0.6	0.1 ± 0.1
Human	MOCA	5	5**	5.9 ± 0.5***	0.4 ± 0.2*

P< 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

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。また、2,4-DMAおよびAOTD投与群において、肝重量の増加を認めた。AOTD群で平均摂餌量が対照群に比べ少ない一方で、飲水量はいずれも対照群と差が見られなかった（表5）。

表5. 体重、肝重量および摂餌・飲水量

Treatment	Body weight (g)	Liver		Consumption	
		Absolute (g)	Relative (%)	Food (g/day)	Water (g/day)
Control	251.1 ± 20.7	9.4 ± 0.6	3.8 ± 0.1	15.1 ± 0.6	20.9 ± 1.3
2,4-DMA	218.2 ± 17.2 ***	15.0 ± 0.8***	7.0 ± 0.1***	14.0 ± 0.9	22.7 ± 1.4
2AMC	239.7 ± 19.6 **	10.2 ± 0.4	4.2 ± 0.1**	14.5 ± 0.5	20.1 ± 0.6
4AMC	240.0 ± 19.2 **	9.4 ± 0.8	3.9 ± 0.2	14.5 ± 0.3	19.7 ± 1.0
AOTD	186.9 ± 10.6 ***	12.2 ± 0.9***	6.4 ± 0.2***	11.8 ± 0.7	20.8 ± 1.0

**, ***: P< 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

膀胱を組織学的に検討した結果、AOTD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。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、AOTD投与群において陽性率の有意な増加を認めた。一方、他の芳香族アミン投与群では対照群と差がなかった。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6）。

表6. 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	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.8
2,4-DMA	6	0	1.3 ± 0.4	0.6 ± 0.4
2AMC	6	0	1.3 ± 0.2	1.3 ± 1.4
4AMC	6	0	1.2 ± 0.4	1.7 ± 1.2
AOTD	6	6***	4.2 ± 1.7***	1.2 ± 0.7

***: P< 0.001 vs Control

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、AOTD投与群では804遺伝子存在し、他の投与群（2,4-DMA：447遺伝子、2AMC：295遺伝子、4AMC：248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137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7）。

表7. 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	-	-	-
2,4-DMA	281	166	447
2AMC	213	82	295
4AMC	163	85	248
AOTD	584	220	804
All aromatic amines	78	59	137

今回の実験でラット膀胱に増殖性病変を認めたAOTD投与群とともに、去年解析したAAOTおよびOTD投与群において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同定されていた（表8）。

表8. 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**
Organismal Injury and Abnormalities	3.93E-03 - 1.73E-07	43
Cancer	3.93E-03 - 1.18E-06	43
Skeletal and Muscular Disorders	3.93E-03 - 1.18E-06	18
Molecular and Cellular Functions	**p-value range**	**# Molecules**
Drug Metabolism	3.96E-03 - 6.41E-08	11
Cellular Growth and Proliferation	3.60E-03 - 2.46E-06	24
Cellular Development	3.60E-03 - 3.52E-06	22
Physiological System Development and Function	**p-value range**	**# Molecules**
Connective Tissue Development and Function	3.96E-03 - 2.46E-06	13
Tissue Development	3.96E-03 - 2.46E-06	18
Skeletal and Muscular System Development and Function	1.98E-03 - 2.69E-06	9

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。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一方で、肝組織における代謝酵素発現を検討した結果、P450の発現が野生型マウスとヒト化肝臓マウスにおいて異なることが示された。この結果は、げっ歯類を用いたOTD投与による影響を検討するにあたり、ヒトへの外挿を考える際に重要なデータになると考えられる。

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、組織学的な変化は見られず、細胞増殖活性の亢進傾向を認めるものの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。また、これまでの報告結果から膀胱尿路上皮におけるヒトとマウスの感受性の違いが存在する可能性も存在する。

今回、ヒト化肝臓マウスにおいてのみ、MOCA投与による膀胱粘膜上皮の単純過形成病変形成と、細胞増殖活性やアポトーシスの誘導を認めた。この結果は、MOCAのヒト肝臓における代謝がマウスとは異なり、膀胱発がん要因となる代謝物を尿中に排泄している可能性を示した。また、MOCAがラットおよびマウスにおいては膀胱への発がん性影響が見られず、ヒトにおいて発がん性が疑われている状況に合致した成果であり、ヒト化肝臓マウスモデルがヒトのMOCAの膀胱発がん性を検討する良いモデルであることが示された。今後、本モデルを用いて膀胱発がん代謝物を同定するとともに、その機序解明を進める予定である。

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

ラットにOTDを投与した際の尿中に検出される代謝物である2AMC、4AMCおよびAOTDのうち、AOTD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。この結果は、OTDばく露による膀胱発がん性に、その尿中代謝物であるAOTDが重要である可能性を示した。一方で、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、AOTDは肝臓で代謝され尿中にOTDを排泄している可能性も存在する。今後、本実験の尿中代謝物を検討する事で、OTD関連の膀胱発がん性に重要な尿中代謝物について検証を行う予定である。

また、本年度のAOTD投与群とともに、去年度行ったAAOTおよびOTD群に共通した遺伝子発現変化を検討した結果、Cancerや細胞増殖に関わる遺伝子を同定した。OTD関連発がん機序解明に重要な結果が得られ、他の膀胱への影響がなかった芳香族アミンによる遺伝子発現変化との相違から、膀胱発がん特異的な遺伝子変化を同定する予定である。

E．結論

OTDの肝代謝についてヒトとマウスでの相違を確認した。また、OTD関連芳香族アミンにおける尿中代謝物と膀胱発がんの関係性が明らかになった。その発がん機序には細胞増殖活性の関与が示された。これらの成果は、OTD関連膀胱発がん機序解明に繋がるものと考えられた。また、MOCAによる膀胱発がん性にはヒト肝臓による特異的な代謝が重要である可能性を示し、ヒト化肝臓マウスがヒトへの外挿を検討するのに非常に有用であることを示した。

G．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) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination

controls MCL1 protein stability. Cell Rep. 2021; 37: 109988.

3) 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.
4) Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. Carcinogenesis. 2021; 42: 940-50.
5) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 3613.
6) 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.
7) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I. Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism. Neuropathology. 2021; 41: 387-95.

2. 学会発表

1) 鈴木周五、魏民、鰐渕英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京（2021年4月）
2) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）
3) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）
4) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催（2021年9月）
5) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐渕英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年9月）
6) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
7) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
8) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
9) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
10) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 1,4-ジオキサンの*in vivo*変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
11) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
12) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐渕英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
13) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐渕英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/βカテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

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３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（200601-01）
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　鰐渕　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o-toluidide (OTD)を用いてヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスに4週間投与する実験を行った。その結果、ヒト化肝臓マウスのOTD投与群において試験開始時に比べ屠殺・剖検時の体重減少を認めた。また、尿中の芳香族アミンおよび代謝物を検討した結果、ヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれも尿中の主な芳香族アミンおよび代謝物はOTDであった。一方で、野生型マウスにおいて、ヒト化肝臓マウスよりも多くの尿中OTDを確認した。これらの結果から、げっ歯類よりもヒトにおいて、OTDは肝臓でより代謝され膀胱粘膜への影響は少ない可能性を示した。一方で肝臓での代謝を介したOTDの毒性がヒトにおいて強く存在する可能性を示した。

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3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。

B．研究方法

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、0.3% 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。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、対照群 3 匹ずつ、OTD 投与群 4 匹ずつ採取した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、OTD (0.117 nmol/mL)、N-Acetyl-o-toluidine (NAOT; 0.031 nmol/mL)、4-Amino-m-cresol (4AMC; 0.505 nmol/mL)、2-Amino-m-cresol (2AMC; 0.148 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

ヒト化肝臓マウスのOTD投与群において試験開始時に比べ屠殺・剖検時の体重減少を認めた。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（表1）。

表1. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

	Treatment	No. of mice	Body weight (g)		Liver	
			Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
Wild	Control	3	28.0 ± 3.0	28.9 ± 3.5	1.39 ± 0.22	4.8 ± 0.2
Wild	OTD	5	27.9 ± 1.9	28.9 ± 2.1	1.35 ± 0.12	4.7 ± 0.2
Human	Control	1	25.7	26.3	2.62	10.0
Human	OTD	4	25.5 ± 2.5	24.1 ± 2.6	2.59 ± 0.17	10.2 ± 1.5

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。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、尿中に存在する芳香族アミンの大半はOTDであった。加えて、野生型マウスにおいて、OTDはヒト化肝臓マウスよりも多く存在した。一方、NAOTDや4AMCは野生型マウスとヒト化肝臓マウスで差が見られなかった。2AMCはいずれの群においても検出限界以下だった。

表2. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Type	Treatment	No. of mice	OTD (μM)	NAOTD (μM)	4AMC (μM)	2AMC (μM)	Total (μM)
Wild	Control	3	1.4 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	1.4 ± 0.3
Wild	OTD	4	183.5 ± 128.4	0.2 ± 0.2	6.9 ± 4.5	N.D.	190.8 ± 132.8
Human	Control	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Human	OTD	4	51.0 ± 21.1	0.2 ± 0.1	8.0 ± 7.9	N.D.	59.3 ± 25.0

OTD: o-Toluidine; NAOTD: N-Acetyl-o-toluidine; 4AMC: 4-Amino-m-cresol; 2AMC: 2-Amino-m-cresol; N.D.: not detected

D．考察

今回、OTD投与したヒト化肝臓マウスでのみ体重減少を来したことから、野生型マウスよりもOTDによる毒性が強く存在した可能性を示した。尿中の芳香族アミンおよびその代謝物を検討した結果、一番多く存在した物質はOTDであり、令和2年度にラットにOTDを投与した結果と類似していた。一方で、野生型マウスにおいて、ヒト化肝臓マウスよりも多くのOTDを確認したことに加え、ヒト化肝臓マウスでは体重低下を確認したことから、ヒト化肝臓マウスにおいてOTDが肝臓で多く代謝され毒性を示した可能性がある。この結果は、げっ歯類よりもヒトにおいて、OTDは肝臓で代謝され膀胱粘膜への影響は少ない可能性を示した。一方で肝臓での代謝を介して毒性が強く存在する可能性を示した。

E．結論

マウスおよびヒト肝臓におけるOTDの尿中代謝物と、生体への毒性影響を検証できた。これらの成果は、げっ歯類での成果をヒトに反映するための重要な結果と考えられた。

G．研究発表

1. 論文発表

1) Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. PLoS One. 2022; 17: e0263895.
2) 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.
3) 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.
4) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 3613.
5) Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca2+ entry. J Biochem. 2021; 170: 483-8.
6) 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.
7) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2021; 259: 3127-36.

2. 学会発表

1) 鈴木周五、魏民、鰐渕英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京（2021年4月）
2) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐渕英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催（2021年6月）
3) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催（2021年6月）
4) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）
5) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸（2021年7月）
6) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催（2021年9月）
7) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学

術総会、横浜（2021年10月）
8) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
9) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
10) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、鰐渕英機. ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年9月）
11) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
12) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. 1,4-ジオキサンの*in vivo*変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
13) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
14) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐渕英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
15) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐渕英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/βカテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
16) 梯アンナ、鰐渕英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

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３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（200601-01）
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

本研究では、発がん性に影響を与える肝薬物代謝酵素の種差を考慮し、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。雄性不妊を回避したHSV thymidine kinase変異型遺伝子を肝細胞特異的に発現する免疫不全NOG（NOG-TKm30 F1)マウスを用いて効率よく「ヒト化肝臓マウス」を作製する方法を検討した。新たに２ロット（ロットC：35歳男性、ロットD：6歳男性）について生着性評価を実施した。ヒト肝細胞移植8～9週後の血中コリンエステラーゼ活性を比較したところ、ロットC細胞移植群では435 U/L、D細胞移植群では630 U/Lと高値を示し、ヒト化肝臓マウス作製に適することが確認できた。本年度、芳香族アミン類の実験に使用したロットA及びC細胞移植によるヒト化肝臓マウス15匹の平均血中コリンエステラーゼ活性は415 U/Lと高値であり、これら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てヒト細胞の占有率を求めたところ平均82.1%と高いヒト化率であることが確認できた。

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る。芳香族アミン類の発がん性に関わるN-水酸化を触媒する薬物代謝酵素CYP1A2のげっ歯類とヒトとの動物種差を勘案し、ヒト肝細胞により再構成された「ヒト化肝臓」を保有するヒト化肝臓マウスを作製する。

B．研究方法

HSV thymidine kinase変異型遺伝子を肝細胞特異的に発現する超免疫不全NOD/*scid-IL-2rgc*（NOG-TKm30 F1)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。血中コリンエステラーゼ活性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（ロットA：12歳女性、ロットC：35歳男性、ロットD：6歳男性）。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。

（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

肝傷害を誘導するガンシクロビルとして、製剤であるデノシン（点滴静注用）とバリキサ（シロップ）を検討した。その結果、デノシンでは30-40 mg/kg（単回、腹腔内投与）、バリキサでは0.2 mg/mL（72時間飲水投与）においてヒト肝細胞移植に適した血中ALTレベル（600-1,500 U/L）を呈することがわかった。これらの条件で肝傷害を誘導したマウスにロットCおよびDヒト肝細胞を移植し、高キメラマウス作製能力を検証した。その結果、ロットC移植群では血中コリンエステラーゼ活性が最高435 U/L、ロットD移植群では630 U/Lであり、いずれの細胞も推定ヒト化率90%以上のヒト化肝臓マウスを作製しうる能力を持つことが確認できた。また、芳香族アミン類の実験に使用したロットA及びC細胞移植によるヒト化肝臓マウス15匹の平均血中コリンエステラーゼ活性は415 U/Lと高値であり、これらの肝臓切片を抗ヒトミトコンドリア抗体で染色して求めたヒト細胞占有率は平均82%であった。

表1. ヒト化肝臓マウスにおけるコリンエステラーゼ(ChE)による推定置換率および免疫染色での置換率測定

ロット	動物番号	ChE(U/I)	ChEによる置換率(%)	免疫染色での置換率（%）
A	421	540	110	84
A	221	535	109	86
A	422	425	87	87
A	423	405	83	83
A	222	485	99	死亡
A	424	690	141	91
C	801	425	87	90
C	802	425	87	86
C	601	475	97	84
C	803	350	72	87
C	602	325	66	75
C	804	335	69	81
C	603	195	40	71
C	604	305	62	71
C	805	315	64	73
平均		415	85	82

D．考察

NOG-TKm30 F1マウスにおけるヒト肝細胞生着性はロットC細胞（35歳由来）、ロットD細胞（6歳由来）とも遜色なく、高キメラマウスが作製できた。類似の実験モデルでは若齢のみが使われるのに対し、本モデルは広範なヒト肝細胞が利用可能である。より在庫数の大きなヒト肝細胞を選択することにより同一条件での実験が可

能となる。

E．結論

NOG-TKm30 F1マウスは従来モデルよりもヒト肝細胞の受容性性が高く、ヒト化率の高いヒト化肝臓マウスの作製が可能となり、ヒト外挿性を高めた発がん実験系の確立に近づいた。

G．研究発表

1. 論文発表

1) Fukutomi K, Hikita H, Murai K, Nakabori T, Shimoda A, Fukuoka M, Yamai T, Higuchi Y, Miyakawa K, Suemizu H, Ryo A, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Capsid Allosteric Modulators Enhance the Innate Immune Response in Hepatitis B Virus-Infected Hepatocytes During Interferon Administration. Hepatol Commun. 2022; 6: 281-96.
2) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities and their expression levels in liver microsomes of chimeric TK-NOG mice with humanized livers. Drug Metab Pharmacokinet. 2022; 44: 100454.
3) Uehara S, Shimizu M, Ple K, Routier S, Yoneda N, Higuchi Y, Suemizu H, Yamazaki H. Probe drug T-1032 N-oxygenation mediated by cytochrome P450 3A5 in human hepatocytes in vitro and in humanized-liver mice in vivo. Drug Metab Pharmacokinet. 2022; 44: 100453.
4) Shiode Y, Kodama T, Shigeno S, Murai K, Tanaka S, Newberg JY, Kondo J, Kobayashi S, Yamada R, Hikita H, Sakamori R, Suemizu H, Tatsumi T, Eguchi H, Jenkins NA, Copeland NG, Takehara T. TNF receptor-related factor 3 inactivation promotes the development of intrahepatic cholangiocarcinoma through NF-kappaB-inducing kinase-mediated hepatocyte transdifferentiation. Hepatology. in press.
5) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Oxidative metabolism and pharmacokinetics of the EGFR inhibitor BIBX1382 in chimeric NOG-TKm30 mice transplanted with human hepatocytes. Drug Metab Pharmacokinet. 2021; 41: 100419.
6) 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.
7) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, Suemizu H. UDP-glucuronosyltransferase 1A4-mediated N2-glucuronidation is the major metabolic pathway of lamotrigine in chimeric NOG-TKm30 mice with humanised-livers. Xenobiotica. 2021; 51: 1146-54.
8) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kawai K, Yamamoto M, Kamimura H, Iida Y, Oshimura M, Kazuki Y, Yamazaki H, Hikita H, Takehara T, Suemizu H. An improved TK-NOG mouse as a novel platform for humanized liver that overcomes limitations in both male and female animals. Drug Metab Pharmacokinet. 2022; 42: 100410.
9) 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.
10) Sueyoshi K, Komura D, Katoh H, Yamamoto A, Onoyama T, Chijiwa T, Isagawa T, Tanaka M, Suemizu H, Nakamura M, Miyagi Y, Aburatani H, Ishikawa S. Multi-tumor analysis of cancer-stroma interactomes of patient-derived xenografts unveils the unique homeostatic process in renal cell carcinomas. iScience. 2021; 24: 103322.
11) 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.
12) 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.
13) Ogawa M, Jiang JX, Xia S, Yang D, Ding A, Laselva O, Hernandez M, Cui C, Higuchi Y, Suemizu H, Dorrell C, Grompe M, Bear CE, Ogawa S. Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2021; 12: 6504.
14) 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.
15) 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.
16) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Suemizu H, Yamazaki H. Pharmacokinetics of primary oxidative metabolites of thalidomide in rats and in chimeric mice humanized with different human hepatocytes. J Toxicol Sci. 2021; 46: 311-7.
17) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Suemizu H, Yamazaki H. Roles of human cytochrome P450 1A2 in coumarin 3,4-epoxidation mediated by untreated hepatocytes and by those metabolically inactivated with furafylline in previously transplanted chimeric mice. J Toxicol Sci. 2021; 46: 525-30.
18) 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.
19) 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: 1-7.
20) 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.
21) 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.

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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３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（200601-01）
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　日本大学　薬学部　教授

研究要旨

芳香族アミンによる職業性膀胱がん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がんが発生している。芳香族アミン類の膀胱発がんメカニズムの解明及び毒性の予測が喫緊の課題となっている。本研究では、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うことで、芳香族アミン類の有害性の評価と膀胱発がんメカニズムを解析することを目的とした。Aniline(ANL)、*p*-Toluidine (PT) 、Acetoaceto-*o*-toluidine(AAOT)、*o*-Toluidine(OTD)を 4 週間、混餌投与を行なったラット膀胱上皮より DNA を抽出し、アダクトームによる解析を行ったところ、主成分解析から AAOT 投与群、OTD 投与群がクラスタリングされた。AAOT、OTD のクラスタリングに特徴的なアダクトを抽出したところ、*m/z* 値と開裂パターンから酸化ストレスに関連する 8-OH-dA、8-OH-dG 及び 5-OH-dG と同定され、AAOT 及び OTD 曝露によるラット膀胱粘膜毒性には酸化ストレスが関与している可能性が示された。

A．研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱がん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

F344ラットに芳香族アミン（aniline (ANL)、*p*-toluidine (PT)、Acetoaceto-*o*-toluidine (AAOT)、OTD)を4週間混餌投与し、屠殺・剖検を行い、膀胱を回収した。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。

DNAを抽出後、DNaseI、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った。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チ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(PDA-DA)により解析した。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験にあたっては、日本大学、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C．研究結果

昨年度、コントロール(N = 12)、ANL (N = 12)、PT (N = 12)、AAOT (N = 12)、OTD (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。ほとんどの個体から総量20 μg以上のDNAが回収できていたことから、各グループ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した。

PCA解析を行ったところ、AAOT群、OTD群およびそれ以

外（コントロール、ANL、PT）の3つにクラスタリングされた（図1）。クラスタリングされた中から、AAOT、OTDのクラスタリングに特徴的なアダクトを抽出し、MS/MSフラグメントを確認したところ、酸化ストレスにより増加すると考えられている8-OH-dA、8-OH-dGおよび5-OH-dGと類似した*m/z*値及びフラグメントパターンを示した（図2）。

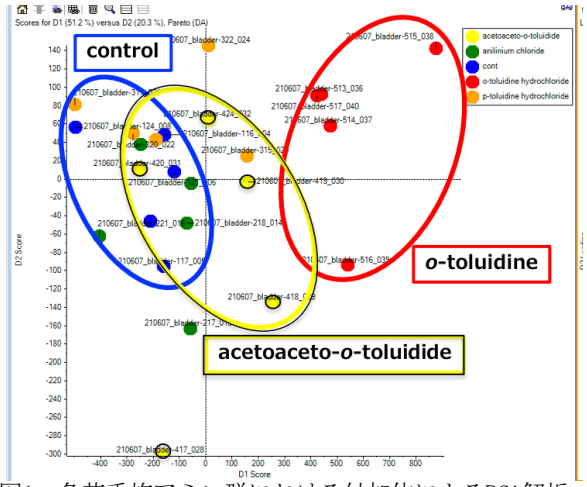

図1. 各芳香族アミン群における付加体によるPCA解析

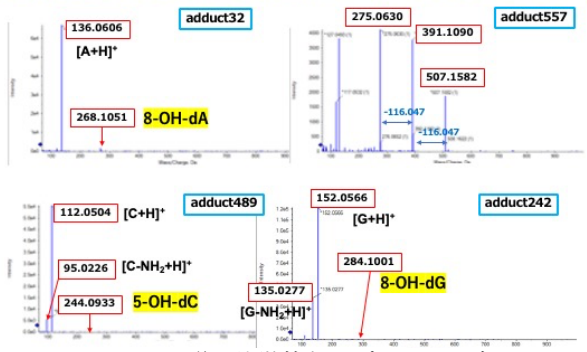

図2. AAOTおよびOTD群に特徴的なアダクトの同定

D. 考察

OTDの曝露により、dGの8位にOTDが結合したDNA付加体が生成すると考えられているが、生体内において同付加体が検出されたという報告は今のところ無い。今回のラットサンプルのアダクトーム解析においても、C8-OTD-dG付加体は検出されなかった。

一方、AAOT、OTDに特徴的なアダクトを抽出し、MS/MSフラグメントを確認したところ、酸化ストレスに関連する8-OH-dA、8-OH-dG及び5-OH-dGと同定され、AAOT及びOTD曝露によるラット膀胱粘膜毒性には酸化ストレスが関与している可能性が示された。

E. 結論

各グループ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したところ、主成分解析により、AAOT群、OTD群およびそれ以外（コントロール、ANL、PT）の3つにクラスタリングされることが明らかとなった。AAOT、OTDのクラスタリングに特徴的なアダクトを抽出し、MS/MSフラグメントを確認したところ、酸化ストレスにより増加すると考えられている8-OH-dA、8-OH-dGおよび5-OH-dGと類似した*m/z*値及びフラグメントパターンを示したことにより、AAOT及びOTD曝露によるラット膀胱粘膜毒性には酸化ストレスが関与している可能性が示された。

今後、OTDの代謝物で同様の実験を行い、芳香族アミン類による毒性の評価と予測、及び発がんの機序の解明を目指す。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. In Vivo. 2022; 36: 628-34.
2) Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y. Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids. Front Genet. 2021; 12: 768781.
3) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. In Vivo. 2021; 35: 2107-14.
4) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N(4)-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 2021; 34: 912-9.
5) Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. Cancer Sci. 2021; 112: 7-15.

2. 学会発表

1) 戸塚ゆ加里. 質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析手法（DNAアダクトーム）の現状と将来展望. 第81回分析化学討論会、Web開催（2021年5月）
2) 戸塚ゆ加里. DNA付加体の網羅的解析手法（DNAアダクトーム）の現状と将来展望. 第144回日本薬理学会関東支部会、Web開催（2021年6月）
3) 戸塚ゆ加里. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
4) 戸塚ゆ加里. 生体を模倣したin vitro遺伝毒性評価. 第50回 環境変異原学会、横須賀（2021年11月）

5) 戸塚ゆ加里. ゲノムおよびDNA付加体の網羅的解析により環境因子とがん発生との関連を解明する. 第95回日本薬理学会、福岡（2022年3月）
6) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルに特化した新規*in vitro*生体模倣評価系の開発. 日本薬学会 第142年会、Web開催（2022年3月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

別紙４

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書　籍　名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shiode Y, Kodama T, Shigeno S, Murai K, Tanaka S, Newberg JY, Kondo J, Kobayashi S, Yamada R, Hikita H, Sakamori R, Suemizu H, Tatsumi T, Eguchi H, Jenkins NA, Copeland NG, Takehara T	TNF receptor-related factor 3 inactivation promotes the development of intrahepatic cholangiocarcinoma through NF-kappaB-inducing kinase-mediated hepatocyte transdifferentiation	Hepatology	in press		
Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S	FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment	PLoS One	17	e0263895	2022
Fukutomi K, Hikita H, Murai K, Nakabori T, Shimoda A, Fukuoka M, Yamai T, Higuchi Y, Miyakawa K, Suemizu H, Ryo A, Yamada R, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T	Capsid Allosteric Modulators Enhance the Innate Immune Response in Hepatitis B Virus-Infected Hepatocytes During Interferon Administration	Hepatol Commun	6	281-96	2022

Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H	Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities and their expression levels in liver microsomes of chimeric TK-NOG mice with humanized livers	Drug Metab Pharmacokinet	44	100454	2022
Uehara S, Shimizu M, Ple K, Routier S, Yoneda N, Higuchi Y, Suemizu H, Yamazaki H	Probe drug T-1032 N-oxygenation mediated by cytochrome P450 3A5 in human hepatocytes in vitro and in humanized-liver mice in vivo	Drug Metab Pharmacokinet	44	100453	2022
Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, Totsuka Y, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M	Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactin-producing Escherichia coli, Isolated from a Patient with Colorectal Cancer	In Vivo	36(2)	628-34	2022
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	336	32-8	2021
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)	13	1216	2021
Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H	Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis	Cancers (Basel)	13	3613	2021
Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y	ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca2+ entry	J Biochem	170	483-8	2021

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	112	1746-57	2021
Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S	Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	259	3127-36	2021
Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H	Oxidative metabolism and pharmacokinetics of the EGFR inhibitor BIBX1382 in chimeric NOG-TKm30 mice transplanted with human hepatocytes	Drug Metab Pharmacokinet	41	100419	2021
Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H	Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability	Cell Rep	37	109988	2021
Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S	DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer	Carcinogenesis	42	940-50	2021
Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I	Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism	Neuropathology	41	387-95	2021
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	51	582-9	2021

Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, Suemizu H	UDP-glucuronosyltransferase 1A4-mediated N2-glucuronidation is the major metabolic pathway of lamotrigine in chimeric NOG-TKm30 mice with humanised-livers	Xenobiotica	51	1146-54	2021
Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kawai K, Yamamoto M, Kamimura H, Iida Y, Oshimura M, Kazuki Y, Yamazaki H, Hikita H, Takehara T, Suemizu H	An improved TK-NOG mouse as a novel platform for humanized liver that overcomes limitations in both male and female animals	Drug Metab Pharmacokinet	42	100410	2021
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	51	316-23	2021
Sueyoshi K, Komura D, Katoh H, Yamamoto A, Onoyama T, Chijiwa T, Isagawa T, Tanaka M, Suemizu H, Nakamura M, Miyagi Y, Aburatani H, Ishikawa S	Multi-tumor analysis of cancer-stroma interactomes of patient-derived xenografts unveils the unique homeostatic process in renal cell carcinomas	iScience	24	103322	2021
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	37	100369	2021
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	131		2021

Ogawa M, Jiang JX, Xia S, Yang D, Ding A, Laselva O, Hernandez M, Cui C, Higuchi Y, Suemizu H, Dorrell C, Grompe M, Bear CE, Ogawa S	Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells	Nat Commun	12	6504	2021
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	160	1741-54 e1716	2021
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	70	355-63	2021
Miura T, Uehara S, Shimizu M, Suemizu H, Yamazaki H	Pharmacokinetics of primary oxidative metabolites of thalidomide in rats and in chimeric mice humanized with different human hepatocytes	J Toxicol Sci	46	311-7	2021
Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Suemizu H, Yamazaki H	Roles of human cytochrome P450 1A2 in coumarin 3,4-epoxidation mediated by untreated hepatocytes and by those metabolically inactivated with furafylline in previously transplanted chimeric mice	J Toxicol Sci	46	525-30	2021
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	34	522-8	2021

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	51	636-42	2021
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	53	102252	2021
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	36	782-9	2021
Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, Totsuka Y	Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids	Front Genet.	Nov 18;12:	768781.	2021
Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, Totsuka Y, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M	Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice.	In Vivo.	35(4):	2107-14.	2021
Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N.	o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol.	34(3):	912-19.	2021
Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci.,	112,	7-15.	2021