

研究課題名：芳香族アミン代謝に着目した膀胱発がん評価法の開発

研究代表者：鈴木周五

研究年度：令和3年度

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。この結果は、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するため、2つの課題「ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割」および「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」を設定し、それぞれ検討した。

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において、ガンシクロビルの投与条件や移植に適した肝細胞ロットの選抜を行った。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（野生型マウス）に、0.3% OTD もしくは 0.05% 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA) を混餌投与した。投与第4週および屠殺時に尿を採取するとともに、屠殺・剖検時に肝臓および膀胱、血清を採取し、病理組織学的解析を行った。肝臓において DNBSEQ-G400RS FAST を用いた RNA-seq や免疫組織化学染色により遺伝子および蛋白発現変化を検討した。LC-MS/MS を用いて、OTD 投与マウスの尿中 OTD とその代謝物について検討した。

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、2,4-dimethylaniline hydrochloride (2,4-DMA)、4-amino-*m*-cresol (4AMC)、2-amino-*m*-cresol (2AMC) および aceto-*o*-toluidide (AOTD) を4週間投与する実験を行った。投与第4週目に新鮮尿を採取した。4週間後に屠殺・剖検し、肝臓および膀胱、血清を採取し、病理組織学的解析を行った。膀胱については、粘膜尿路上皮から RNA を抽出し、Microarray を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。また、去年度行った実験のラット粘膜尿路上皮から DNA を抽出・精製を行い、LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行なった。

結論

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

改良型 TK-NOG マウスによる安定したヒト化肝臓マウス作成方法が確認出来た。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 発現を亢進を認め、ヒトとマウスで異なることを確認出来た。一方で、尿中の芳香族アミンおよび代謝物について、最も認められたのはいずれも OTD であり、代謝物の量について差がなかった。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 投与によりいずれのマウスでも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、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

4 種の芳香族アミンのうち、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。DNA 付加体の網羅的解析から、AAOT および OTD ばく露による特徴的なアダクトを確認したところ、8-OH-dA、8-OH-dG および 5-OH-dG が検出され、その発がん性に酸化ストレスが関与している可能性が示された。これらの結果は、OTD 関連膀胱発がんには細胞増殖活性や酸化ストレスが重要である可能性を示し、発がん機序解明に重要なデータである。

今後の展望

ヒトにおける芳香族アミンの代謝を検討するにあたり、OTD 投与による代謝酵素 P450 発現の亢進される分子種が異なることはヒトへの外挿に重要な所見であり、MOCA を投与した実験においても検討する予定である。また、MOCA を投与したヒト化肝臓マウスにおける肝臓および尿中の MOCA およびその代謝物について検討する事で、膀胱発がんの特異的な物質の検出を目指す。

また、ラットを用いた動物実験により、多数の芳香族アミン類について、その膀胱への発がん影響および尿中代謝物を検索することで、膀胱への発がん性を評価検討可能な試験法の確立を目指す。今後は OTD に関連性の高い発がん性を示す芳香族アミンとして、AAOT や AOTD について OTD とともに着目し、その発がん機序の解明を目指す。

これらの成果を基に、国民を取り巻く生活環境内に存在し、職業的にも用いられる芳香族アミン類に対して、発がん性評価と国のがん予防施策に貢献し、社会への還元を目指す。