

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 2～4 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、0.3% AAOT 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 の尿中代謝物を、UPLC-Q-TOF-MS を用いて MOCA の尿中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 雄ラットに福井県の化学工場において取り扱いのあった 5 種の芳香族アミンや、OTD の尿中代謝物である芳香族アミン、OTD とともに内因性活性酸素誘導阻害剤 apocynin を 4 週間投与する実験を行った。4 週間後に屠殺・剖検し、膀胱を採取し、病理組織学的解析を行った。また、ラット粘膜尿路上皮から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を、DNA を抽出し LC-TOF MS に供し DNA 付加体の網羅解析を行なった。尿について LC-MS/MS を用いて OTD に関連した芳香族アミン代謝物を計測した。

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。OTD や AAOT 投与により、肝組織の代謝酵素 P450 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 や CYP1A2 の高発現を認めた。また、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。AAOT 投与では DNA 傷害を検証し、有意な増加を認めた。ヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれも OTD を投与したマウスの尿中の主な物質は OTD であった。MOCA 投与による肝組織の代謝酵素 P450 は、野生型マウスで Cyp2c29 の発現上昇を、ヒト化肝臓マウスでは CYP2B6 および CYP2C8 の発現上昇を認めた。また、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。MOCA を投与したマウスにおいて、尿中に MOCA およびその代謝物が検出された。さらに、ヒト化肝臓マウスと野生型マウスにおいて出現している MOCA 代謝物が異なることが確認出来た。

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

投与した芳香族アミンのうち、尿路上皮に過形成病変や細胞増殖活性促進を認めたのは、OTD、AAOT および aceto-o-toluidide (AOTD) だった。これらの芳香族アミンを投与したラットにおいて最も多い尿中芳香族アミンは OTD であることが確認された。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 OTD 群、AAOT 群および AOTD 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。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、OTD、AAOT および AOTD いずれにおいても、酸化ストレスに由来すると考えられるアダクトが存在した。そこで、OTD とともに内因性活性酸素誘導阻害剤 apocynin を 4 週間投与する実験を行った結果、OTD 投与群において見られた尿路上皮の過形成病変や細胞増殖活性、DNA 傷害、酸化ストレスが、apocynin により抑制された。

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 や AAOT、MOCA 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、尿中代謝物の生成にも関わる。MOCA においては代謝酵素発現の違いとともに、尿中にヒト肝臓による特異的な代謝物を確認した。この MOCA 代謝物は、ヒト膀胱発がんへの関与を示唆するとともに、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。また、OTD 関連の膀胱発がんにおいて、尿中の OTD が膀胱発がん性に寄与する重要な因子であることが示され、その膀胱発がん機序に関わる遺伝子が同定され、発がん機序の一つとして酸化ストレスが関与することが示された。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。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。