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~令和4年度 総括·分担研究報告書

研究代表者 鈴木 周五

令和5 (2023) 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
 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	- 19
2. 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 鰐渕英機	- 29
3. ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割	- 35
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 戸塚ゆ加里	- 39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	- 44

労災疾病臨床研究事業費補助金 総合研究報告書

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 大阪公立大学 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。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、福井県の化学工場において取り扱いのあった のtoluidide (OTD)や acetoaceto-の toluidine (AAOT)、ヒトで膀胱発がん性が疑われている芳香族アミン 4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA)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、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 Cyp2c29 の発現を、ヒト化肝臓マウスにおいて CYP3A4 発現を亢進した。AAOT では野生型マウスで Cyp2c29 の、ヒト化肝臓マウスで CYP3A4 および CYP1A2 の高発現 を認め、OTD と類似した発現変化を示した。OTD や AAOT 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。AAOT 投与では DNA 傷害を検証し、有意な増加を認めた。 OTD を投与したマウスの、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。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。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5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 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。また、OTDの尿中代謝物として検出された芳香族アミンをラッ トに対して 4 週間混餌投与実験を行った結果、 $aceto-\sigma$ -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。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、AAOT および AOTD 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。 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。以上より、OTD や AAOT、MOCA の肝代謝についてヒトとマウスでの相違を確認 し、MOCA においてはヒト化肝臓マウスのみ膀胱尿路上皮への過形成病変や細胞増殖活性を認めた。また、尿 中にヒト肝臓による特異的な MOCA 代謝物を確認し、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には非常に有用であることを示した。0TD 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、その発がん機序に重要ながんや細胞増 殖に関わる遺伝子群を同定した。また、DNA アダクトーム解析により OTD 関連の膀胱発がん機序に酸化ストレ スが関わる結果が得られ、内因性活性酸素誘導阻害剤 apocynin を用いた実験で証明した。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。

研究分担者

鰐渕 英機 大阪公立大学 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の発生は社会的な 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(0TD)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*-toluidine(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の解明を試みた。

ヒト化肝臓マウスに、福井県の化学工場において取り 扱いのあったOTDやAAOT、ヒトで膀胱発がん性が疑われ ている芳香族アミン4,4'-Methylenebis(2chloroaniline) (MOCA)を投与し、ヒト肝臓での代謝酵 素発現変化や膀胱への影響について検討した。また、OTD およびMOCAを投与したマウスの尿を用いて、尿中の投与 芳香族アミンおよび代謝物について検討した。

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、ptoluidine, 2, 4-dimethylaniline hydrochloride (2, 4-DMA)について投与し検討を行った。また、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)を投与 し検討した。これらの芳香族アミンによる膀胱への影響 とともに尿中の芳香族アミンと代謝物、そして膀胱にお 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った。さ らに、膀胱に過形成病変を促したOTD関連芳香族アミン における共通した遺伝子発現変化を解析し、膀胱発がん 機序を検証した。0TDの膀胱発がん機序として酸化スト レスの関与を検証するため、内因性の活性酸素誘導酵素 であるNADPH oxidaseに着目し、その阻害剤apocyninを 用いて、OTDによる膀胱上皮への影響に対するapocynin の抑制効果を検証した。

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

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。ガンシクロビル腹 腔内投与、あるいはバルガンシクロビル経口投与によ 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。研究期間中6ロッ ト(12歳a、11ヶ月齢、35歳、6歳、12歳b、31 歳)について生着性評価を行い、研究期間中、動物実 験が安定して実施できる体制づくりと移植したヒト肝 細胞が増殖しやすい肝傷害条件の検討を行った。 上記の方法で作製したヒト化肝臓マウスおよび非移 植群のF1-TKm30 雌マウス(野生型マウス; NOG)に、 0.6%(0.3%に変更) ~toluidine hydrochloride (OTD)、0.05% MOCA もしくは0.3% AAOT 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。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 での網羅的遺伝子発現解析を行った。MOCA および AAOT については、一部の遺伝子発現について、Super Script VI VILO Maste Mix(Thermo Fisher

Scientific) で cDNA を作成し、リアルタイム PCR (qPCR) にて検討した。OTD については、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、病理組織学的検討 とともに、Ki67、γ-H2AXの免疫組織染色や 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)、AOTD (0.031 nmol/mL)、4AMC (0.505 nmol/mL)、2AMC (0.148 nmol/mL)である。

また、高性能液体クロマトグラフィー四重極飛行時 間型質量分析(UPLC-Q-TOF-MS)を用いて、対照群4匹 ずつ、野生型 MOCA 投与群4匹、ヒト化肝臓マウス MOCA 投与群5匹から採取した尿中における MOCA およ びその代謝物を検討した。

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

令和2年度は、6週齢F344雄ラットに、0.6% anilinium chloride (ANL), 0.6% p-toluidine hydrochloride (PT)、1.5% AAOT および 0.6% OTD を混 餌投与した。令和3年度は、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、4週間投与実験で単純 過形成を惹起した OTD、AAOT および AOTD について、 マイクロアレイ解析を行い、その共通する遺伝子発現 変動を同定し、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を用いて膀胱発がん機序について検討した。

尿中の芳香族アミンおよびその代謝物を解析するた め、Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)を用いて、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、AAOT (0.047 nmol/mL)、OTD (0.051 nmol/mL)、AOTD (0.023 nmol/mL)、4AMC (0.127 nmol/mL)、2AMC (0.046 nmol/mL)である。

DNAアダクトーム解析については、採取した膀胱について、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。

令和4年度は、6週齢F344雄ラットに対して、0も しくは0.6%のOTDを混餌投与および、0、250、500 mg/Lのapocyninを飲水投与した。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。膀胱組織は、Ki67、 γ -H2AX および 8-OHdG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。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、大阪公立大学 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。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

研究期間を通じ、肝傷害誘導の最適化を行なった。ガ

ンシクロビル製剤であるデノシン(点滴静注用)、バリ キサ(経口投与用ドライシロップ)、および試薬バルガ ンシクロビル(経口投与用)を検討した。その結果、メ スのNOG-TKm30 F1マウスを用い、0.15-0.2 mg/mLのバリ キサドライシロップ溶液を72時間飲水投与するのが最 も効率よいヒト肝細胞移植条件(血中ALT 600-1,500U/L) の誘導法であることがわかった。これら肝傷害を誘導し たマウスに6ロットの肝細胞を移植し、高キメラマウス 作製能力を検証した。その結果、12歳aドナー由来の肝 細胞以外では血中コリンエステラーゼ活性が高値 (400U/L以上)となった。各年度、これらの細胞を使用 して作製したヒト化肝臓マウスを研究代表者の施設に 移動し、芳香族アミン類投与の実験を実施した。

研究期間中に実施した3回の試験で使用したヒト化肝 臓マウスの平均血中コリンエステラーゼ活性はそれぞ れ、423 U/L、415 U/L、445 U/Lといずれも高値であっ た。2年度目の試験に使用したヒト化肝臓マウスの肝臓 組織を病理解析のため採取し病理標本を作成して抗ヒ トミトコンドリア抗体で染色した。ヒト細胞の占有率を 測定したところ平均 93.8%であった。これらヒト肝細胞 置換率の高い動物を用いて芳香族アミン類の実験を実 施することができた。

<OTD 投与実験>

初回の実験において、試験開始1週間後にヒト化肝臓 マウスの0.6% 0TD投与群において体重減少(平均18.8 g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)。2回目の実験においても、ヒト化肝臓 マウスの0TD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

Mouse	Trootmont	No. of Body weight (g)			Liver		
wouse	rreaunem	mice	Initail	Final	Absolute (g)	Relative (%)	
Experiment 1							
NOG	0	3	26.0 ± 1.3	26.5 ± 1.7	1.06 ± 0.14	4.0 ± 0.3	
NOG	0.6→0.3%OTD	5	26.0 ± 1.4	26.2 ± 1.8	1.23 ± 0.09	4.7 ± 0.3*	
Humanized	0	2	20.3 ± 4.8	23.3 ± 1.3	2.41 ± 0.07	10.4 ± 0.9	
Humanized	0.6→0.3%OTD	3	18.8 ± 4.2	16.7 ± 2.6*	1.97 ± 0.32	11.8 ± 0.3	
Experiment 2							
NOG	0	3	28.0 ± 3.0	28.9 ± 3.5	1.39 ± 0.22	4.8 ± 0.2	
NOG	0.3%OTD	5	27.9 ± 1.9	28.9 ± 2.1	1.35 ± 0.12	4.7 ± 0.2	
Humanized	0	1	25.7	26.3	2.62	10.0	
Humanized	0.3%OTD	4	25.5 ± 2.5	24.1 ± 2.6	2.59 ± 0.17	10.2 ± 1.5	

肝臓を病理組織学的に検討した結果、0TD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

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)。

表2	肝臓における主かP450の発現変動	
1× 4.		

	野生型	マウス		ヒト化肝	ヒト化肝臓マウス		
Gene name	Control (CPM)	OTD (CPM)	Gene name	Control (CPM)	OTD (CPM)		
Cyp1a1	1	1	CYP1A1	128	217		
Cyp1a2	480	560	CYP1A2	829	1186		
CYP2C9/19 G	Froup		CYP2C9/19 G	iroup			
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 Grou	чр		CYP3A4 Grou	qu			
Cyp3a11	4268	4754	CYP3A4	1105	2337		
Cyp27a1	369	399	CYP27A1	478	444		



図2. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスのP450免疫染色

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2)。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。 マウス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3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、AOTD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3. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Turne	Taxataraat	No. of	OTD	AOTD	4AMC	2AMC	Total		
туре	Treatment	mice	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)		
NOG	Control	3	1.4 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	1.4 ± 0.3		
NOG	OTD	4	183.5 ± 128.4	0.2 ± 0.2	6.9 ± 4.5	N.D.	190.8 ± 132.8		
Humanized	Control	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		
Humanized	OTD	4	51.0 ± 21.1	0.2 ± 0.1	8.0 ± 7.9	N.D.	59.3 ± 25.0		
OTD: o-Toluidine	OTD: orToluidine: NAOTD: N-AcetyLo-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0TD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3)。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いずれも0TD 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4)。



図3. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像



図4. 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

表4. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

	Treatment No. of		Body we	eight (g)	Liv	Liver		
	ireatment	mice	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 c	* P < 0.05 compared to each Control							

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MOCA投与に よりヒトCYP2C9/19グループに属する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、MOCA投与によりCYP2B6および2C8の発現上昇を認め た(表5)。

表5. MOCA投与による肝臓の主なP450発現変動

Gono	Mouso gono	N	UG	Human	Hun	nan
groups	name	Control (CPM)	MOCA (CPM)	gene name	Control (CPM)	MOCA (CPM)
CYP1A2	Cyp1a2	418 ± 50	406 ± 45	CYP1A2	1395 ± 249	1277 ± 104
CYP2A6	Cyp2a4 Cyp2a5	<mark>300 ± 116</mark> 340 ± 127	<mark>619 ± 289</mark> 396 ± 97	CYP2A6	642 ± 167	803 ± 38
CYP2B6	Cyp2b9 Cyp2b13	603 ± 44 308 ± 41	586 ± 115 292 ± 44	CYP2B6	222 ± 23	608 ± 119
CYP2C8	Cyp2c37 Cyp2c50	676 ± 90 857 ± 92	774 ± 101 1082 ± 68	CYP2C8	925 ± 150	1487 ± 168
CYP2C9	Cyp2c29 Cyp2c38	1321 ± 307 462 ± 72	3190 ± 154 427 ± 50	CYP2C9	1220 ± 188	1429 ± 145
CYP2C19	<mark>Сур2с29</mark> Сур2с38 Сур2с39	1321 ± 307 462 ± 72 1051 ± 81	3190 ± 154 427 ± 50 1024 ± 103	CYP2C19	136 ± 31	201 ± 17
CYP2D6	Cyp2d22 Cyp2d26	389 ± 48 837 ± 117	359 ± 16 793 ± 61	CYP2D6	1059 ± 152	1107 ± 77
CYP2E1	Cyp2e1	5988 ± 301	5055 ± 518	CYP2E1	8475 ± 1853	8651 ± 752
CYP2F1	Cyp2f2	1414 ± 204	1400 ± 137	CYP2F1	-	-
CYP3A4	Cyp3a11	4548 ± 818	4595 ± 1050	CYP3A4	2287 ± 1030	2409 ± 802
CYP3A43	Cyp3a41a	331 ± 287	1251 ± 1215	CYP3A43	3 ± 2	5 ± 3
CYP4A11	Cyp4a10	1647 ± 134	1464 ± 396	CYP4A11	600 ± 137	594 ± 159



図5. MOCAによる野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの肝 遺伝子発現変動

肝臓における遺伝子発現について、qPCR により検証 した結果、MOCA 投与により野生型マウスで Cyp2c29 の、ヒト化肝臓マウスでの CYP2B6 および CYP2C8 の有 意な発現上昇を認めた。一方、野生型マウスの Cyp2a4 は上昇傾向を認めるものの有意差は見られなかった。 また、もう一つの代謝酵素 *N*-acetyltransferase (NAT)は一部で上昇傾向を示すものの、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有意な差は 見られなかった(図5)。

マウスの尿中代謝物に対する解析結果を図6に示す。 尿中には多数の物質が検出され、MOCAを投与したヒト 化肝臓マウスおよび野生型マウスいずれにおいても MOCAの存在が確認出来た。また、対照群に存在しない MOCA代謝物を考えるピークも確認した。また、MOCA投与 群に着目してピークを検討した結果、ヒト化肝臓マウ スと野生型マウスで異なるピークが存在し、異なる MOCA代謝物と推察された(図7)。



図6. 尿中のMOCAおよび代謝物解析



図7. 上記解析のうち、MOCA投与群でのみ認めたピーク部分

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(表6、図8)。 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)。

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***	$0.4 \pm 0.2^*$
D< 0.05 0	01 and 0 001	ve Cont	rol rospostivolu		

P< 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively



図8. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

<AAOT 投与実験>

実験期間中にいずれの群においても、体重減少など毒 性を示す所見は見られなかった。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。野生型マウスのAAOT投与群では、相対肝重量 が、ヒト化肝臓マウスのAAOT投与群では、絶対および相 対肝重量の有意な増加を認めた(表7)。

表7. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

	Treatment No. of		Body we	eight (g)	Liv	Liver	
	meaunem	mice	Start	End	Absolute (g)	Relative (%)	
NOG	Control	3	28.7 ± 2.0	30.0 ± 1.0	1.15 ± 0.12	3.8 ± 0.3	
NOG	AAOT	3	28.4 ± 0.9	29.5 ± 0.6	1.35 ± 0.11	4.6 ± 0.3*	
Humanized	Control	3	23.3 ± 1.4	26.9 ± 0.4	2.59 ± 0.07	9.6 ± 0.3	
Humanized	AAOT	3	23.2 ± 0.5	26.1 ± 1.3	2.90 ± 0.17*	11.1 ± 0.2**	
* P < 0.05 compared to each Control							

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AAOT投与に よりヒトCYP2C9/19グループに属する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、AAOT投与によりCYP1A2および2C8の発現上昇を認め、 OTDで発現上昇したCYP3A4は上昇傾向を示すものの発現 差は大きくなかった(表8)。

表8. AAOT投与による肝臓の主なP450発現変動

lo of orm	Maura	NC)G	Human	Huma	nized
groups	gene name	Control (TPM)	AAOT (TPM)	gene name	Control (TPM)	AAOT (TPM)
CYP1A2	Cyp1a2	407	772	CYP1A2	952	2862
CYP2A6	Cyp2a5	298	1375	CYP2A6	718	894
CYP2C8	Cyp2c29 Cyp2c38 Cyp2c39	1324 305 777	<mark>10859</mark> 370 930	CYP2C8	1055	1443
CYP2C9/19	Cyp2c29 Cyp2c37 Cyp2c39 Cyp2c50	<mark>1324</mark> 658 777 915	<mark>10859</mark> 1364 930 1701	CYP2C9 CYP2C19	1457 62	1847 105
CYP2E1	Cyp2e1	7633	5603	CYP2E1	8660	10945
CYP2F1	Cyp2f2	1183	1271	CYP2F1	0	0
СҮРЗА4	Cyp3a11 Cyp3a13 Cyp3a25 Cyp3a41a	4785 26 675 212	7253 38 654 399	CYP3A4	2537	3043



図9. AAOTによる野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの肝 遺伝子発現変動 肝臓における遺伝子発現について、qPCRにより検証した結果、AAOT投与により野生型マウスでCyp2c29および Cyp3a11の有意な発現上昇を認めた。一方、ヒト化肝臓 マウスにおいてはCYP1A2の有意な発現上昇を認めた一 方で、CYP3A4は上昇傾向を認めるものの有意差は見られ なかった。また、もう一つの代謝酵素であるNATは一部 で上昇傾向を示すものの、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有意な差は見られなかった (図9)。

膀胱組織を検討した結果、いずれのマウス群において もAAOT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10)。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いずれもAAOT 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。一方、DNA傷害の指標であるγ-H2AXの 陽性率は野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスいずれ も0TD投与により有意な上昇を認めた(図11)。







図11. 膀胱尿路上皮におけるKi67およびγ-H2AXの陽性率

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

令和2年度のANL、PT、AAOTもしくはOTDを投与した実 験において、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9)。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9)。

表9. 体重および摂餌・飲水量

Trootmont	Body weight	Consumptio	n (1st week)	Consumption (2 to 4 weeks)	
Heathent	(g)	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。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。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10)。

表10. 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

ANL、PT、AAOTもしくはOTDを投与したラットの尿中芳 香族アミンおよび代謝物について解析した結果を、表 11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11. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Treatment	No. of rat	ANL	AAD	AAP	PT	6AMC
Control	5	N.D.	N.D.	14.3 ± 6.5	N.D.	N.D.
ANL	5	816.4 ± 350.9	3.6 ± 1.2	1908.4 ± 736.7	N.D.	N.D.
PT	5	N.D.	N.D.	N.D.	644.1 ± 366.6	6.5 ± 2.9
AAOT	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OTD	5	3.7 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment	AAOT	OTD	AOTD	4AMC	2AMC	Total AAs
Control	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ANL	N.D.	3.7 ± 0.7	N.D.	N.D.	N.D.	2733.9 ± 975.9
PT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	658.1 ± 370.0
AAOT	63.9 ± 28.9	1562.7 ± 636.6	55.8 ± 12.2	214.2 ± 212.4	67.4 ± 28.7	1967.4 ± 872.5
OTD	N.D.	7955.9 + 1704.8	19.8 + 9.7	519.1 + 802.0	103.5 ± 22.9	8603.4 ± 1953.2

令和3年度の2,4-DMA、2AMC、4AMCもしくはAOTDを投与 した実験において、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12)。

表12. 体重、肝重量および摂餌・飲水量

Troatmont	Body weight	Liv	er	Consumption	
rreatment	(g)	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 an	d 0 001 vs Control, respecti	velv			

, *: 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13)。

表13. 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

2,4-DMA、2AMC、4AMCもしくはAOTDを投与したラット の尿中芳香族アミンおよび代謝物について解析した結 果を、表14に示す。単純過形成病変を認めたAOTD投与群 において、尿中にOTDが高い濃度割合で検出された。一 方、2AMCでは尿中に多量の2AMCが存在した。また、4AMC では他のOTD関連芳香族アミンに比べ、検出できた芳香 族アミンは少なかった。2,4-DMA投与群では、OTD関連芳 香族アミンの尿中排泄は見られなかった。

表14. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Treatment	No. of rat	AAOT	OTD	AOTD	4AMC	2AMC	Total
Control	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2AMC	5	N.D.	N.D.	0.2 ± 0.0	1.0 ± 0.8	11812.1 ± 2730.2	11813.9 ± 2730.4
4AMC	5	N.D.	N.D.	0.2 ± 0.1	356.2 ± 160.3	12.2 ± 2.1	369.3 ± 161.7
AOTD	5	N.D.	7757.3 ± 1648.7	215.9 ± 37.6	120.3 ± 115.5	35.5 ± 9.3	8129.0 ± 1761.9
AAOT N ALLER	and the second second	TD Tableton	AOTO N Assets a laboration	(ANIO) (Anio)		and here and determined	

ANL、PT、AAOTもしくはOTDを投与したラットの膀胱粘 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12)。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-OHdG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13)。



図12. 各芳香族アミン群における付加体によるPCA解析



図13. AA0TおよびOTD群に特徴的なアダクトの同定

芳香族アミン2, 4-DMA、2-AMC、4-AMC、AOTDを投与し たラット膀胱上皮粘膜より抽出したDNAを酵素消化後に LC-HRAM-MSにて付加体の網羅的解析を実施し、PCA解析 を行ったところ、各群にクラスタリングされたが、中で もラット膀胱粘膜に高頻度でsimpe hyperplasiaが観察 されたAOTDが、コントロールと大きく離れてクラスタリ ングされた(図14)。クラスタリングに寄与するアダク トの探索を行ったところ、前年度の研究で見出された酸 化ストレスに由来するアダクト(8-OH-dA)の寄与が大き いことがわかった(図15、16)。









図16. AOTD群に特徴的なアダクトの同定

上記の結果を踏まえて、OTDの膀胱発がん機序とし て酸化ストレスの関与を検証するため、OTDと apocyninを投与する実験を行った結果、試験期間中、 OTDを投与した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、OTDを投与した群いずれも有対 肝重量の増加を認めた。一方、apocynin 投与による体 重や肝重量に対する影響は見られなかった。摂餌量や 飲水量に群間で大きな差は見られなかった(表 15)。

表15. 体重、肝重量および摂餌・飲水量

Treatment	No. of rot	Body weight	Liver (No. = 6)		Consumption	
rreatment	NO. OF TAL	(g)	Absolute (g)	Relative (%)	Food (g/day)	Water (g/day)
OTD	12	215.1 ± 5.9 **	8.9 ± 0.5	4.1 ± 0.2***	11.5 ± 2.0	20.1 ± 2.0
OTD+APOL	12	214.1 ± 8.9 ***	9.0 ± 0.7	4.1 ± 0.1***	11.8 ± 1.7	20.5 ± 1.8
OTD+APOH	12	213.1 ± 6.7 ***	9.0 ± 0.2	4.2 ± 0.1***	11.7 ± 1.9	19.1 ± 2.0
Control	6	232.0 ± 11.3	8.5 ± 0.5	3.7 ± 0.1	12.9 ± 1.4	20.1 ± 1.0
APOH	6	237.2 ± 8.5	8.8 ± 0.3	3.7 ± 0.0	13.3 ± 1.3	20.1 ± 0.6
		Law and a strength				

OTD: o-toluidide; APO: apocynin; L: low dose (250 mg/L); H: high dose (500 mg/L)

膀胱を組織学的に検討した結果、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。特にOTD単独投与群では、異型の 強い中等度以上の過形成病変を認めるラットが多く存 在した。一方、OTD投与とともにapocyninを投与した群 では、濃度依存性に軽度過形成病変までに留まるラット が増えた。また、OTD投与で細胞増殖活性の指標である Ki67、DNA傷害の指標であるγ-H2AXおよび酸化ストレス の指標である8-OHdGの陽性率が、いずれも対照群に比べ 有意に増加していた。その増加に対して、apocyninの投 与で、Ki67は500 mg/L投与群で、γ-H2AXおよび8-OHdG は250、500 mg/L投与群いずれにおいても有意な抑制を 認めた。アポトーシスについて検証するため、TUNEL陽 性率を検討したが、いずれの群間でも有意な差が見られ なかった(表16)。

表16. 膀胱尿路上皮病変、Ki67、TUNEL、γ-H2AXおよび8-OHdG 陽性率

Trootmont	No. of rot	Simple hyperplasia ^{a,#}		KIG7 (%)	TUNEL (%)	V H2AY (%)	
meannenn	NO. OFTAL	Mild	Moderate	KI07 (78)	TONLE (70)	Y=112AAX (70)	0=01100 (78)
OTD	12	2	10	2.1 ± 0.7^{a}	0.7 ± 0.3	1.7 ± 0.7^{a}	1.7 ± 0.3 ^a
OTD+APOL	12	3	9	1.5 ± 0.9	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.4**	1.2 ± 0.2***
OTD+APOH	12	6	5	0.9 ± 0.4***	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3***	0.9 ± 0.2***
Control	6	0	0	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.6	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
APOH	6	0	0	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
B-R<0.001 vo Contro	F Pho = 0.27	B< 0.05: ** **	* Bc 0.01 and 0.00	1 up OTD respectively			

これまでに芳香族アミンを4週間投与した実験の膀胱

上皮について、ラット膀胱に増殖性病変を認めたOTD、 AAOTおよびAOTD投与群に着目し網羅的遺伝子発現解析 を行った結果、その3群に共通して発現変動を認めた遺 伝子として、上昇遺伝子47、低下遺伝子33の合計80遺伝 子が同定された(表17)。

表17. 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 Down-regulated genes genes		Total genes
AAOT	309	239	548
OTD	413	428	841
AAOT	723	458	1181
All aromatic amines	47	33	80

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18)。

そのうち、「Cancer」や「Organismal Injury and Abnormalities」 に属する腫瘍関連因子として

「Invasive tumor」や「Advanced malignant tumor」、「Metastasis」が選出された。それらの因子に共通する 12遺伝子が確認され、膀胱発がんに関与する可能性を 示した(表19)。

表18. OTD、AAOTおよびAOTD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

表19. 膀胱発がんに関与する因子

Onternation	Disease of Franking Association		Predicted	Activation	Malandan	
Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Activation State	edicted Activation M tion State z-score AC reased 2.765 KF PC reased 2.586 IG PC AC AC	Molecules	
	Invasive tumor	2.82E-05	Increased	2.765	AQP1, EIf5, FHIT, FN1, FSCN1, HPSE, KRT20, MMP13, NQO1, PDGFRA, POSTN, RGS4, RRM2, VCAN	
Organismal Injury	Advanced malignant tumor	5.17E-05	Increased	2.586	AQP1, EIf5, FN1, FSCN1, HPSE, IGFBP4, KRT20, NQO1, PDGFRA, POSTN, RGS4, RRM2, VCAN	
and Abnormanities	Metastasis	0.0001	Increased	2.586	AQP1, Elf5, FN1, FSCN1, HPSE, KRT20, NQO1, PDGFRA, POSTN, RGS4, RRM2, VCAN	

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、0TD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、0TD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0TD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。

MOCA投与実験において、ヒト化肝臓マウスにのみ、 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。その発 がん性に関わると考えられる肝臓の代謝酵素について 検討した結果、野生型マウスにおいてはOTDと同様に MOCA投与によりヒトCYP2C9/19グループに属する Cyp2c29を主体に発現の上昇を認めた。一方でヒト化肝 臓マウスにおいては、MOCA投与によりCYP2B6および2C8 の発現上昇を認め、OTDで見られたCYP3A4の発現上昇は 見られず、MOCA特異的な酵素発現変動を認めた。

また、MOCAを投与したヒト化肝臓マウスおよび野生 型マウスの尿中MOCAおよび代謝物について検討したが、 MOCAおよび代謝物のピークが存在するとともに、ヒト 化肝臓マウスと野生型マウスで異なる代謝物のピーク を確認出来たことは、MOCA投与による膀胱への影響が 異なった結果を反映する有益なデータである。ヒト化 肝臓マウスで検出できたMOCA代謝物に着目し、膀胱発 がん物質の同定および機序の解明していきたい。

AAOT投与による肝臓の代謝酵素について検討した結 果、野生型マウスにおいてはOTDと同様にMOCA投与によ りヒトCYP2C9/19グループに属するCyp2c29を主体に発 現の上昇を認めた。一方でヒト化肝臓マウスにおいては、 OTDで見られたCYP3A4の発現上昇は見られたものの有意 差は見られなかった。NATについてはOTDと同様に有意な 発現上昇は見られなかった。

また、膀胱への影響を検証した結果、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組織学的な変 化は見られないものの、細胞増殖活性の上昇傾向ととも に、DNA傷害の指標であるγ-H2AXの有意な増加を認めた。 ラット膀胱よりも感受性は低いものの、AAOT投与による 膀胱への発がん影響が推察される結果で、DNA傷害が細 胞増殖活性よりも感受性が高い可能性を示した。今後、 尿中代謝物も含め、ヒト肝臓による代謝の特異性や影響 をまとめ、ヒトへの外挿に取り組みたい。

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、2,4-DMA、AAOTおよびOTDの5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、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。

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、今回の実験においても確認された。 また、AOTD投与群においてもラット尿中の主な代謝物は OTDであることを確認出来たことから、いずれの膀胱発 がんも尿中のOTDが重要な役割を果たし、OTDに関連した 共通の膀胱発がん機序を介していると考える。一方、 2AMCでは尿中に多くの2AMCが存在し、代謝されずに尿 中排泄されていると考えられた。また、4AMCでは他の OTD関連芳香族アミンに比べ、検出できた芳香族アミン は少なく、抱合体を形成し尿中排泄されている可能性 を示した。

そこで、OTD、AAOTおよびAOTD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、腫瘍関連因子として「Invasive tumor」や 「Advanced malignant tumor」、「Metastasis」が選出 された。その共通する12遺伝子に着目し、OTD関連膀胱 発がん機序解明を行っていく予定である。

また、膀胱粘膜より抽出したDNAを用いアダクトーム 解析を行ったところ、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。加えて、AOTD群においても酸化ストレス由来 のアダクト8-OH-dAの生成が確認された。以上より、OTD、 AAOTおよびAOTDのラット膀胱への発がん機序に酸化ス トレスが関与する可能性が示された。

そのOTDによる膀胱発がんに対する酸化ストレスの 関与について検証した結果、ラットにOTDを投与した際 の膀胱上皮に発生する単純過形成病変や、細胞増殖活 性、DNA傷害、酸化ストレスに対して、内因性活性酸素 誘導酵素NADPH oxidase阻害剤apocyninが濃度依存性に 抑制したことは、OTDによる膀胱発がん機序には酸化ス トレスの関与が存在することが示された。

E. 結論

OTDやAAOT、MOCAの肝代謝についてヒトとマウスでの 相違を確認し、MOCAにおいてはヒト化肝臓マウスのみ膀 胱尿路上皮への過形成病変や細胞増殖活性を認めた。ま た、尿中にヒト肝臓による特異的なMOCA代謝物を確認し、 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には非常に有用で あることを示した。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、その発がん機序に重要ながんや細胞増殖 に関わる遺伝子群を同定した。また、DNAアダクトーム 解析によりOTD関連の膀胱発がん機序に酸化ストレスが 関わる結果が得られ、内因性活性酸素誘導阻害剤 apocyninを用いた実験で証明した。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。

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
- Yokota Y, <u>Suzuki S</u>, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, <u>Suemizu H</u>, <u>Wanibuchi H</u>. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanizedliver mice. Toxicology. 2023; 488: 153483.
- Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kato H, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. The Unique Human N10-Glucuronidated Metabolite Formation from Olanzapine in Chimeric NOG-TKm30 Mice with Humanized Livers. Drug Metab Dispos. 2023; 51: 480-91.
- 3) Shiode Y, Kodama T, Shigeno S, Murai K, Tanaka S, Newberg JY, Kondo J, Kobayashi S, Yamada R, Hikita H, Sakamori R, <u>Suemizu H</u>, 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. 2023; 77: 395-410.
- 4) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. 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, <u>Suemizu H</u>, 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) Uehara S, Murayama N, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. Comparison of mouse and human cytochrome P450 mediated-drug metabolising activities in hepatic and extrahepatic microsomes. Xenobiotica. 2022; 52: 229-39.
- 7) Uehara S, Iida Y, Ida-Tanaka M, Goto M, Kawai K, Yamamoto M, Higuchi Y, Ito S, Takahashi R, Kamimura H, Ito M, Yamazaki H, Oshimura M, Kazuki Y, <u>Suemizu H</u>. Humanized liver TK-NOG mice with functional deletion of hepatic murine cytochrome P450s as a model for studying human drug metabolism. Sci Rep. 2022; 12: 14907.
- 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,

<u>Suemizu H</u>. 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) Tamaki Y, Shibata Y, Hayakawa M, Kato N, Machii A, Ikeda Y, Nanizawa E, Hayashi Y, <u>Suemizu H</u>, Ito H, Ishikawa T. Treatment with hepatocyte transplantation in a novel mouse model of persistent liver failure. Biochem Biophys Rep. 2022; 32: 101382.
- 10) Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 11) <u>Suzuki S</u>, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, <u>Wanibuchi H</u>. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. J Toxicol Pathol. 2022; 35: 247-54.
- 12) Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, Hady R, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, <u>Suzuki S</u>, Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. Part Fibre Toxicol. 2022; 19: 30.
- 13) Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, <u>Wanibuchi</u> <u>H</u>, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. Cell Death Dis. 2022; 13: 694.
- 14) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, <u>Totsuka</u> <u>Y</u>, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA Damage in Mouse Colorectum by Administration of Colibactinproducing Escherichia coli, Isolated from a Patient With Colorectal Cancer. In Vivo. 2022; 36: 628-34.
- 15) Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Naher S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, <u>Wanibuchi H</u>, Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K. Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype.

Brain Commun. 2022; 4: fcac220.

- 16) Murai K, Kodama T, Hikita H, Shimoda A, Fukuoka M, Fukutomi K, Shigeno S, Shiode Y, Motooka D, Higuchi Y, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u>, Ryo A, Tahata Y, Makino Y, Yamada R, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Inhibition of nonhomologous end joining-mediated DNA repair enhances anti-HBV CRISPR therapy. Hepatol Commun. 2022; 6: 2474-87.
- 17) Miura T, Uehara S, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Forward and reverse dosimetry for aniline and 2,6-dimethylaniline in humans extrapolated from humanized-liver mouse data using simplified physiologically based pharmacokinetic models. J Toxicol Sci. 2022; 47: 531-8.
- 18) Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, <u>Suzuki</u> <u>S</u>, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, <u>Wanibuchi H</u>. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. Cancer Sci. 2022; 113: 2642-53.
- 19) Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, <u>Suzuki S</u>, Eto F, Kikushima K, <u>Wanibuchi H</u>, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M. Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation. Sci Rep. 2022; 12: 8718.
- 20) Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, <u>Totsuka Y</u>, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic Homo- and Hetero-Dimers of otoluidine, o-anisidine, and Aniline Formed by In Vitro Metabolism. Chem Res Toxicol. 2022; 35: 1625-30.
- 21) Kabbani M, Michailidis E, Steensels S, Fulmer CG, Luna JM, Le Pen J, Tardelli M, Razooky B, Ricardo-Lax I, Zou C, Zeck B, Stenzel AF, Quirk C, Foquet L, Ashbrook AW, Schneider WM, Belkaya S, Lalazar G, Liang Y, Pittman M, Devisscher L, <u>Suemizu H</u>, Theise ND, Chiriboga L, Cohen DE, Copenhaver R, Grompe M, Meuleman P, Ersoy BA, Rice CM, de Jong YP. Human hepatocyte PNPLA3-148M exacerbates rapid nonalcoholic fatty liver disease development in chimeric mice. Cell Rep. 2022; 40: 111321.
- 22) Fukutomi K, Hikita H, Murai K, Nakabori T, Shimoda A, Fukuoka M, Yamai T, Higuchi Y, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u>, 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.

- 23) Deguchi S, Tanaka H, <u>Suzuki S</u>, Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, <u>Wanibuchi H</u>, Ohira M. Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2022; 22: 699.
- 24) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. 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.
- 25) 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.
- 26) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. UDP-glucuronosyltransferase 1A4mediated N2-glucuronidation is the major metabolic pathway of lamotrigine in chimeric NOG-TKm30 mice with humanised-livers. Xenobiotica. 2021; 51: 1146-54.
- 27) <u>Totsuka Y</u>, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. Cancer Sci. 2021; 112: 7-15.
- 28)Toda A, Shimizu M, Uehara S, Sasaki T, Miura T, Mogi M, Utoh M, Suemizu H, Yamazaki H. concentrations Plasma and hepatic 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.
- 29) Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, <u>Totsuka Y</u>, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. In Vivo. 2021; 35: 2107-14.
- 30) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 31) <u>Suzuki S</u>, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Wanibuchi</u> <u>H</u>, 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.

- 32) Sueyoshi K, Komura D, Katoh H, Yamamoto A, Onoyama T, Chijiwa T, Isagawa T, Tanaka M, <u>Suemizu H</u>, Nakamura M, Miyagi Y, Aburatani H, Ishikawa S. Multi-tumor analysis of cancerstroma interactomes of patient-derived xenografts unveils the unique homeostatic process in renal cell carcinomas. iScience. 2021; 24: 103322.
- 33) Shimizu M, Uehara S, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 34) Shimizu K, Gi M, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 35) 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, <u>Suemizu H</u>, Cao H. Identification of human long noncoding RNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic homeostasis. J Clin Invest. 2021; 131.
- 36) Ogawa M, Jiang JX, Xia S, Yang D, Ding A, Laselva O, Hernandez M, Cui C, Higuchi Y, <u>Suemizu H</u>, Dorrell C, Grompe M, Bear CE, Ogawa S. Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2021; 12: 6504.
- 37) 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, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 38) Morita H, Yasuda M, Yamamoto M, Tomiyama Y, Uchida R, Ka Y, Ogura T, Kawai K, <u>Suemizu H</u>, Hayashimoto N. Pathogenesis of murine astrovirus in experimentally infected mice. Exp Anim. 2021; 70: 355-63.
- 39) Mori T, Tanaka H, <u>Suzuki S</u>, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, <u>Wanibuchi H</u>, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. Cancer Sci. 2021; 112: 1746-57.
- 40) Miura T, Uehara S, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, 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.

- 41) Miura T, Kamiya Y, Uehara S, Murayama N, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Hepatotoxicological potential of P-toluic acid in humanised-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models. Xenobiotica. 2021: 1-7.
- 42) Miura T, Uehara S, Shigeta K, Yoshizawa M, Kamiya Y, Murayama N, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 43) Miura T, Kamiya Y, Uehara S, Murayama N, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Hepatotoxicological potential of P-toluic acid in humanised-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models. Xenobiotica. 2021; 51: 636-42.
- 44) Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, <u>Totsuka Y</u>, 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.
- 45) Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, <u>Totsuka Y</u>. Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids. Front Genet. 2021; 12: 768781.
- 46) 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, <u>Totsuka Y</u>, 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.
- 47) Kishimoto K, Shimada A, Shinohara H, Takahashi T, Yamada Y, Higuchi Y, Yoneda N, <u>Suemizu H</u>, 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.

- 48) Kawata K, Baba A, Shiota M, <u>Wanibuchi H</u>, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca2+ entry. J Biochem. 2021; 170: 483-8.
- 49) Kato H, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 50) Kanbe A, Ishikawa T, Hara A, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 51) Kakehashi A, <u>Suzuki S</u>, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u>. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 3613.
- 52) Kakehashi A, Chariyakornkul A, <u>Suzuki S</u>, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, <u>Wanibuchi H</u>. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 1216.
- 53) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 54) Ito R, Katano I, Otsuka I, Takahashi T, <u>Suemizu H</u>, Ito M, Simons PJ. Bovine betalactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/hGM-CSF transgenic mice. Int Immunol. 2021; 33: 183-9.
- 55) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, <u>Suzuki</u> <u>S</u>, 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.
- 56) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. Metabolism of desloratadine by chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. Xenobiotica. 2020; 50: 733-40.
- 57) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. Human Aldehyde Oxidase 1-Mediated Carbazeran Oxidation in Chimeric TK-NOG Mice

Transplanted with Human Hepatocytes. Drug Metab Dispos. 2020; 48: 580-6.

- 58) Udagawa C, Sasaki Y, Tanizawa Y, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 59) <u>Totsuka Y</u>, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 60) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, <u>Wanibuchi H</u>, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatinresistant bladder cancer. Cancer Lett. 2020; 479: 89-99.
- 61) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, <u>Totsuka Y</u>, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 2020; 33: 1907-14.
- 62) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa Κ, Takahashi S, Wanibuchi Role gamma-H2AX Н. of as a for of biomarker detection bladder carcinogens in F344 rats. J Toxicol Pathol. 2020; 33: 279-85.
- 63) <u>Suzuki S</u>, 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.
- 64) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 65) Ruan X, Li P, Chen Y, Shi Y, Pirooznia M, Seifuddin F, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 66) Ogawa SI, Uehara S, Tsunenari Y, Kawai H,

<u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Prediction of circulating human metabolites of pemafibrate, a novel antidyslipidemic drug, using chimeric mice with humanized liver. Xenobiotica. 2020; 50: 769-75.

- 67) Ogawa SI, Shimizu M, Kamiya Y, Uehara S, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 68) Nakayama K, Kamimura H, <u>Suemizu H</u>, 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 humanizedliver mouse plasma data. Drug Metab Pharmacokinet. 2020; 35: 389-96.
- 69) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 70) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. А novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominantnegative transgenic rats. Arch Toxicol. 2020; 94: 4085-97.
- 71) Murai K, Hikita H, Kai Y, Kondo Y, Fukuoka M, Fukutomi K, Doi A, Yamai T, Nakabori T, Fukuda R, Takahashi T, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 72) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Utoh M, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 73) Miura T, Shimizu M, Uehara S, Yoshizawa M, Nakano A, Yanagi M, Kamiya Y, Murayama N, <u>Suemizu H</u>, 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.

- 74) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. A, occupational Multifocal origin of cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. Carcinogenesis. 2020; 41: 368-76.
- 75) 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, <u>Suemizu H</u>, Schneider WM, Shlomai A, Meuleman P, Bhatia SN, Rice CM, de Jong YP. Expansion, in vivoex vivo cycling, and genetic manipulation of primary human hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020; 117: 1678-88.
- 76) Mapoung S, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 77) Kawanishi M, Yoneda R, <u>Totsuka Y</u>, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. Genes Environ. 2020; 42: 16.
- 78) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 79) Kamimura H, Uehara S, <u>Suemizu H</u>. A novel Css-MRTpo 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.
- 80) Kakehashi A, <u>Suzuki S</u>, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u>. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, Larginine 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.
- 81) Jiang C, Li P, Ruan X, Ma Y, Kawai K, <u>Suemizu</u> <u>H</u>, Cao H. Comparative Transcriptomics Analyses in Livers of Mice, Humans, and

Humanized Mice Define Human-Specific Gene Networks. Cells. 2020; 9.

- 82) Ito S, Kamimura H, Yamamoto Y, Chijiwa H, Okuzono T, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Human plasma concentration-time profiles of troglitazone and troglitazone sulfate simulated by in vivo experiments with chimeric mice with humanized livers and semiphysiological pharmacokinetic modeling. Drug Metab Pharmacokinet. 2020; 35: 505-14.
- 83) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 84) Fujioka M, <u>Suzuki S</u>, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, <u>Wanibuchi H</u>. 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
- <u>鈴木周五</u>、加藤寛之、内木綾、<u>鰐渕英機</u>、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)
- <u>鈴木周五</u>、加藤寛之、内木綾、魏民、<u>鰐渕英機</u>、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)
- 魏民、<u>鈴木周五</u>、行松直、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.芳 香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀 脱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)
- 魏民、行松直、<u>鈴木周五</u>、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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, <u>Suzuki Shugo</u>, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, <u>Wanibuchi Hideki</u>. 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)
- 加藤寛之、内木綾、<u>鈴木周五</u>、山下依子、稲熊真悟、 高橋 智. LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下さ せ膵発癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、 福岡(2020年4月)
- 7) <u>鰐渕英機</u>、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) <u>鈴木周五</u>、加藤寛之、内木綾、魏民、<u>鰐渕英機</u>、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) <u>鰐渕英機</u>.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、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 梯アンナ、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>.
 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) <u>末水洋志</u>. 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) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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) <u>戸塚ゆ加里</u>.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) <u>戸塚ゆ加里</u>. Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach、広島、第79回癌学会 (2020年10月)
- 「<u>万塚ゆ加里</u>.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) <u>戸塚ゆ加里</u>.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) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- 20) <u>鈴木周五</u>、魏民、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 21) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- 22) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 23) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 24) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)

- 25) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 26) 魏民、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 27)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、大石裕司、梯アンナ、 <u>鰐渕英機</u>. 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)
- 28)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、大石裕司、山口貴嗣、 松江泰佑、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 29) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 30) 魏民、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 31) 梯アンナ、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>.
 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)
- 32) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- 33) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- 34) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 35)魏民、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 36)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、梯アンナ、大石裕司、 山口貴嗣、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 37) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、 <u>鰐渕英機</u>. 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)

- 38) 松江泰佑、魏民、塩田正之、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、 梯アンナ、内田潤次、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 39) 梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 40) <u>戸塚ゆ加里</u>.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)
- <u>
 「塚ゆ加里</u>.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)
- 42) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 職業性膀胱がん関連芳香族アミン類の尿中代謝物 と膀胱尿路上皮への影響.第111回日本病理学会総 会、神戸(2022年4月)
- 43) 梯アンナ、<u>鈴木周五</u>、魏民、<u>鰐渕英機</u>. 肝発がんに おける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 44) <u>戸塚ゆ加里</u>. 集学的アプローチによる化学物質の 遺伝毒性評価の現状と将来展望. 第49回日本毒性 学会学術年会、札幌(2022年6月)
- 45) <u>鰐渕英機</u>. ヒ素による発がん機序の解明. 第49回日 本毒性学会学術年会、札幌(2022年6月)
- 46) <u>鰐渕英機</u>. 有機ヒ素化合物の長期毒性・発がん性 機序の研究. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 47) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 職業性ばく露を認めた*o*-toluidineの尿中代謝物 と膀胱尿路上皮への影響.第49回日本毒性学会学 術年会、札幌(2022年7月)
- 48)魏民、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 1,4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発 がんリスク評価.第49回日本毒性学会学術年会、札 幌(2022年7月)
- 49) 小宮雅美、<u>鈴木周五</u>、魏民、<u>鰐渕英機</u>、<u>戸塚ゆ加里</u>.
 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析.第29
 回日本がん予防学術大会、京都(2022年7月)
- 50) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸 平、赤根弘敏、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、 <u>戸塚ゆ加里</u>、若林敬二、三好規之. 細胞毒性を有 する o-Toluidine と o-Anisidine の尿中代謝物は ラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する. 第 29 回 日本がん予防学術大会、京都(2022 年 7 月)
- 51) <u>Yukari Totsuka</u>. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. 13th ICEM, Ottawa, Canada (2022年8月)
- 52) Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, <u>Totsuka Y</u>, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for psemidine-type homo- and hetero-dimerization

of monocyclic aromatic amines. 13th ICEM, Ottawa, Canada (2022年8月)

- 53) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第81回日本 癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 54) <u>戸塚ゆ加里</u>、小宮雅美、松田知成、加藤護. Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 第81回日本癌学 会学術総会、横浜(2022年9月)
- 55) 小宮雅美, 落合雅子, 今井俊夫, <u>戸塚ゆ加里</u>. Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues. 第81回日本癌学会学 術総会、横浜(2022年9月、横浜)
- 56) 帶金明日香、小宮雅美、<u>鈴木周五</u>、魏民、<u>鰐渕英機</u>、 <u>戸塚ゆ加里</u>. 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術 総会、横浜(2022年9月)
- 57)魏民、<u>鈴木周五</u>、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山 本与毅、邱桂ユウ、<u>鰐渕英機</u>.遺伝子セットを用 いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法.第81回 日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 58)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、大石裕司、邱桂ユウ、 梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.マウス経胎盤曝露モデルに おけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネ ティック修飾異常を介した肝発がんの亢進.第81 回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 59) 藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、大石裕司、梯アンナ、 邱桂鈺、芝野佳奈、<u>鰐渕英機</u>. マウス経胎盤ばく 露による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機 序.第 35 回発癌病理研究会、湯沢(2022年11月)
- 60) <u>戸塚ゆ加里、</u>小宮雅美、永井桃子、加藤護、松田 知成.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35回発癌病理研究会、新潟 (2022年11月)
- 61)帯金明日香、小宮雅美、<u>鈴木周五、魏民、鰐渕英機、 戸塚ゆ加里</u>.職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析.第51回環境変異原学会、 広島(2022年11月)
- 62) 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、 佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川 悠子、椙村春彦、<u>戸塚ゆ加里</u>、若林敬二、渡辺賢二、 川西優喜. DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリ バクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価. 第51回環境変異原学会、広島(2022年11月)
- 63) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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1回包括的がん緩和 病態生理医療薬学研究会、東京(2022年11月)
- 64) <u>Yukari Totsuka</u>. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association between environmental factors and human cancer development. 12th AACR-JCA Joint Conference, Maui, HI, USA (2022年12月)
- 65) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、<u>鈴木周</u> 五、<u>鰐渕英機</u>. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおけ

る尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第 27回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12月)

- 66) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明. 第27回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12月)
- 67)魏民、藤岡正喜、<u>鈴木周五</u>、山本与毅、 Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. ヒ 素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常 の関与.第27回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12 月)
- 68) 道場彩乃、魏民、櫻井映子、寺本 篤司、桐山諭和、 山田 勢至、<u>鰐渕英機</u>、塚本徹哉. γH2AXとKi-67 を用いた遺伝毒性肝発がん物質の早期検出:機械 学習による自動判定の試み.第39回日本毒性病理 学会総会、東京(2023年1月)
- 69) 山本与毅、魏民、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、 梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.ジメチルアルシン酸誘発ラ ット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常.第39回日 本毒性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 70) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, <u>Shugo Suzuki</u>, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells. 第39回日本毒性 病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 71) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、<u>鈴木周五</u>、藤 岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>. ヒト浸潤性膵管癌の新規

バイオマーカー候補の解析.第39回日本毒性病理 学会総会、東京(2023年1月)

- 72) Guiyu Qiu、梯アンナ、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、<u>鰐渕</u>
 <u>英機</u>. ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3 の機能解
 明.第39回日本毒性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 73) 藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、芝野佳奈、Guiyu Qiu、 Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、 大石裕司、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.マウス経胎盤曝露 モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエ ピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢 進.第39回日本毒性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 74) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、 <u>鈴木周五、鰐渕英機</u>. ヒト化肝臓マウスにおける 無機ヒ素の体内動態及び毒性.第39回日本毒性病 理学会総会、東京(2023年1月)
- 75) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 職業性ばく露を認めた*o*-toluidineの尿中代謝物 による膀胱尿路上皮への影響.第39回日本毒性病 理学会総会、東京(2023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 総合分担研究報告書

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 大阪公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。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 ーtoluidide (OTD)や acetoaceto-ー toluidine (AAOT)、ヒトで膀胱発がん性が疑われている芳香族アミン 4.4'-Methylenebis (2-chloroaniline) (MOCA)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、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 Cyp2c29 の発現を、ヒト化肝臓マウスにおいて CYP3A4 発現を亢進した。AAOT では野生型マウスで Cyp2c29 の、ヒト化肝臓マウスで CYP3A4 および CYP1A2 の高発現 を認め、OTD と類似した発現変化を示した。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。膀胱については、 OTD や AAOT 投与によるヒト化肝臓マウスおよび野生型マウスへの影響は変わらなかったものの、MOCA 投与で ヒト化肝臓マウスでのみ膀胱に増殖性病変を認め、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、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。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芳香族アミンや OTD の尿中代謝物を用いて、ラットに 4 週間混餌投与実験 を行った結果、OTD、AAOT および 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。また、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、OTD による膀胱発がん機序に酸化ストレスが関与する事が示唆された。IPA パスウ ェイ解析により、上記の尿路上皮に過形成病変を認めた3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。これらの結果から、OTD 関連芳香族アミンによる膀胱発がん機序には細胞 増殖や酸化ストレスが重要であることが示され、ヒトの OTD および関連芳香族アミンによる膀胱発がん機序 解明に寄与すると考えられた。

A. 研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱癌の発生は社会的な 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*-toluidine(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の解明を試みた。

令和2~4年度にかけて、ヒト化肝臓マウスに動物実験 モデルで、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)、そしてラットにおいて高 濃度の尿中OTDを認めたAAOTを投与し、ヒト肝臓での代 謝酵素発現変化や膀胱への影響について検討した。

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、2,4-dimethylaniline(2,4-DMA)、OTDの尿 中代謝物である4-amino-m-cresol (4AMC)、2-amino-mcresol (2AMC)およびaceto-o-toluidide (AOTD)につい て投与し検討を行った。加えて、OTDの膀胱への発がん 機序として酸化ストレスの関与を検証するため、内因性 の活性酸素誘導酵素であるNADPH oxidaseに着目し、そ の阻害剤apocyninを用いて、OTDによる膀胱上皮への影 響に対するapocyninの抑制効果を検証した。

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(野生型マウス; NOG) に、0.6% (0.3%に変更) *o*-toluidine hydrochloride (OTD)、 0.05% MOCA もしくは 0.3% AAOT 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。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 網羅的遺伝子発現解析を行った。MOCA および AAOT に ついては、一部の遺伝子発現について、Super Script VI VILO Maste Mix(Thermo Fisher Scientific) で cDNA を作成し、リアルタイム PCR (qPCR) にて検討し た。0TD については、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、病理組織学的検討 とともに、Ki67、γ-H2AXの免疫組織染色や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

令和2年度は、6週齢F344雄ラットに、0.6% anilinium chloride (ANL), 0.6% p-toluidine hydrochloride (PT)、1.5% AAOT および 0.6% OTD を混 餌投与した。令和3年度は、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。

令和4年度は、6週齢F344雄ラットに対して、0も しくは0.6% OTDを混餌投与および、0、250、500 mg/Lのapocyninを飲水投与した。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。膀胱組織は、Ki67、 γ -H2AX および8-OHdG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。

(倫理面への配慮)

大阪公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>

初回の実験において、試験開始1週間後にヒト化肝臓 マウスの0.6% 0TD投与群において体重減少(平均18.8 g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)。2回目の実験においても、ヒト化肝臓 マウスの0TD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

Maura	Trootmont	No. of	Body we	eight (g)	Liver	
wouse	rreatment	mice	Initail	Final	Absolute (g)	Relative (%)
Experiment 1						
NOG	0	3	26.0 ± 1.3	26.5 ± 1.7	1.06 ± 0.14	4.0 ± 0.3
NOG	0.6→0.3%OTD	5	26.0 ± 1.4	26.2 ± 1.8	1.23 ± 0.09	4.7 ± 0.3*
Humanized	0	2	20.3 ± 4.8	23.3 ± 1.3	2.41 ± 0.07	10.4 ± 0.9
Humanized	0.6→0.3%OTD	3	18.8 ± 4.2	16.7 ± 2.6*	1.97 ± 0.32	11.8 ± 0.3
Experiment 2						
NOG	0	3	28.0 ± 3.0	28.9 ± 3.5	1.39 ± 0.22	4.8 ± 0.2
NOG	0.3%OTD	5	27.9 ± 1.9	28.9 ± 2.1	1.35 ± 0.12	4.7 ± 0.2
Humanized	0	1	25.7	26.3	2.62	10.0
Humanized	0.3%OTD	4	25.5 ± 2.5	24.1 ± 2.6	2.59 ± 0.17	10.2 ± 1.5
-						

肝臓を病理組織学的に検討した結果、0TD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

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)。

実 2	肝臓 におけ	ス主たP15(の発現変動
18/1-		() + / L F 4 ()	ハノノーナー アンク 単川

	野生型マウス Control OTD (CPM) (CPM)			ヒト化肝	業マウス
Gene name			Gene name	Control (CPM)	OTD (CPM)
Cyp1a1	1	1	CYP1A1	128	217
Cyp1a2	480	560	CYP1A2	829	1186
CYP2C9/19 G	iroup		CYP2C9/19 G	iroup	
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 Grou	qu		CYP3A4 Grou	qu	
Cyp3a11	4268	4754	CYP3A4	1105	2337
Cyp27a1	369	399	CYP27A1	478	444



図2. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスのP450免疫染色

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2)。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。

膀胱組織を検討した結果、いずれのマウス群において も0TD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3)。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いずれも0TD 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4)。







図4. 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)。

	澰開始および屠殺時体重および 朋	扦重量
--	-------------------------	-----

	Treatment No. of		Body we	Body weight (g)		Liver	
	meaunem	mice	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*	

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MOCA投与に よりヒトCYP2C9/19グループに属する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、MOCA投与によりCYP2B6および2C8の発現上昇を認め た(表4)。 肝臓における遺伝子発現について、qPCRにより検証 した結果、MOCA 投与により野生型マウスで Cyp2c29 の、ヒト化肝臓マウスでの CYP2B6 および CYP2C8 の有 意な発現上昇を認めた。一方、野生型マウスの Cyp2a4 は上昇傾向を認めるものの有意差は見られなかった。 また、もう一つの代謝酵素 *N*-acetyltransferase (NAT)は一部で上昇傾向を示すものの、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有意な差は 見られなかった(図 5)。

表4. MOCA投与による肝臓の主なP450発現変動

Gene Mouse gene		N	OG	Human	Hun	nan
groups	name	Control (CPM)	MOCA (CPM)	gene name	Control (CPM)	MOCA (CPM)
CYP1A2	Cyp1a2	418 ± 50	406 ± 45	CYP1A2	1395 ± 249	1277 ± 104
CYP2A6	Cyp2a4	300 ± 116	619 ± 289	CYP2A6	642 ± 167	803 ± 38
	Cyp2a5	340 ± 127	396±97			
CYP2B6	Cvp2b9	603 + 44	586 + 115	CYP2B6	222 + 23	608 + 119
	Cyp2b13	308 ± 41	292 ± 44			
CYP2C8	Cyp2c37	676 ± 90	774 ± 101	CYP2C8	925 ± 150	1487 ± 168
	Cyp2c50	857 ± 92	1082 ± 68			
CYP2C9	Cyp2c29	1321 ± 307	3190 ± 154	CYP2C9	1220 ± 188	1429 ± 145
	Cyp2c38	462 ± 72	427 ± 50			
CYP2C19	Cyp2c29	1321 ± 307	3190 ± 154	CYP2C19	136 ± 31	201 ± 17
	Cyp2c38	462 ± 72	427 ± 50			
	Cyp2c39	1051 ± 81	1024 ± 103			
CVP2D6	Cup2d22	380 ± 48	350 ± 16	CVP2D6	1050 ± 152	1107 + 77
CIFZDU	Cyp2d22	837 + 117	793 ± 10	CTF2D0	1033 ± 132	1107 ± 77
	0302020	007 ± 117	100101			
CYP2E1	Cyp2e1	5988 ± 301	5055 ± 518	CYP2E1	8475 ± 1853	8651 ± 752
CYP2F1	Cyp2f2	1414 ± 204	1400 ± 137	CYP2F1	-	-
CYP3A4	Cvp3a11	4548 + 818	4595 + 1050	CYP3A4	2287 + 1030	2409 + 802
	-)			2	1000	2
CYP3A43	Cyp3a41a	331 ± 287	1251 ± 1215	CYP3A43	3 ± 2	5 ± 3
CYP4A11	Cyp4a10	1647 ± 134	1464 ± 396	CYP4A11	600 ± 137	594 ± 159
CYP4A11 NOG: NOG-T	Cyp4a10 Km30 mice; Hu	1647 ± 134 man: humani	1464 ± 396 zed-liver mice;	CYP4A11 CPM: Counts	600 ± 137 per million	594 ± 159





図5. MOCAによる野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの肝 遺伝子発現変動

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(表5、図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5)。

表5. 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***	$0.4 \pm 0.2^*$			
P< 0.05, 0.	P< 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively							



図6. 野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの膀胱組織像

<AAOT 投与実験>

実験期間中にいずれの群においても、体重減少など毒 性を示す所見は見られなかった。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。野生型マウスのAAOT投与群では、相対肝重量 が、ヒト化肝臓マウスのAAOT投与群では、絶対および相 対肝重量の有意な増加を認めた(表6)。

表6. 実験開始および屠殺時体重および肝重量

	Treatment No. of		Body weight (g)		Liver	
	meatment	mice	Start	End	Absolute (g)	Relative (%)
NOG	Control	3	28.7 ± 2.0	30.0 ± 1.0	1.15 ± 0.12	3.8 ± 0.3
NOG	AAOT	3	28.4 ± 0.9	29.5 ± 0.6	1.35 ± 0.11	$4.6 \pm 0.3^*$
Humanized	Control	3	23.3 ± 1.4	26.9 ± 0.4	2.59 ± 0.07	9.6 ± 0.3
Humanized	AAOT	3	23.2 ± 0.5	26.1 ± 1.3	2.90 ± 0.17*	11.1 ± 0.2**
* D < 0.05 com	ared to each C	ntrol				

* P < 0.05 compared to each Control

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AAOT投与に よりヒトCYP2C9/19グループに属する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、AAOT投与によりCYP1A2および2C8の発現上昇を認め、 OTDで発現上昇したCYP3A4は上昇傾向を示すものの発現 差は大きくなかった(表7)。

表7. AAOT投与による肝臓の主なP450発現変動

leoform	Mouse	N	JG	Human	Humanized	
groups	gene name	Control (TPM)	AAOT (TPM)	gene name	Control (TPM)	AAOT (TPM)
CYP1A2	Cyp1a2	407	772	CYP1A2	952	2862
CYP2A6	Cyp2a5	298	1375	CYP2A6	718	894
CYP2C8	Cyp2c29	1324	10859	CYP2C8	1055	1443
	Cyp2c38 Cyp2c39	305 777	370 930			
CYP2C9/19	Cyp2c29	1324	10859	CYP2C9	1457	1847
	Cyp2c37 Cyp2c39	658 777	1364 930	CYP2C19	62	105
	Cyp2c50	915	1701			
CYP2E1	Cyp2e1	7633	5603	CYP2E1	8660	10945
CYP2F1	Cyp2f2	1183	1271	CYP2F1	0	0
CYP3A4	Cyp3a11	4785	7253	CYP3A4	2537	3043
	Cyp3a13	26	38			
	Cyp3a25	675	654			
	Cyp3a41a	212	399			
NOG: NOG-T	Km30 mice: Hu	manized: hu	manized-live	er mice: TPM: trar	nscripts per r	nillion

肝臓における遺伝子発現について、qPCRにより検証し

た結果、AAOT投与により野生型マウスでCyp2c29および Cyp3a11の有意な発現上昇を認めた。一方、ヒト化肝臓 マウスにおいてはCYP1A2の有意な発現上昇を認めた一 方で、CYP3A4は上昇傾向を認めるものの有意差は見られ なかった。また、もう一つの代謝酵素であるNATは一部 で上昇傾向を示すものの、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有意な差は見られなかった (図7)。



図7. AAOTによる野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスの肝 遺伝子発現変動

膀胱組織を検討した結果、いずれのマウス群において もAAOT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8)。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いずれもAAO T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。一方、DNA傷害の指標であるy-H2AXの 陽性率は野生型マウスおよびヒト化肝臓マウスいずれ もOTD投与により有意な上昇を認めた(図9)。



図9. 膀胱尿路上皮におけるKi67および y-H2AXの陽性率

AAOT

AAOT

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

trol AAOT

NOG

Ĩ.

Control AAOT

L

令和2年度の実験において、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。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8)。

表8 体重および摂餌・飲水量

T	Body weight	Consumptio	Consumption (1st week)		Consumption (2 to 4 weeks)	
reatment	(g)	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	

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。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。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9)。

表9. 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

令和3年度の実験において、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10)。

表10. 体重、肝重量および摂餌・飲水量

Treatment	Body weight	Liv	er	Consumption				
rreatment	(g)	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			

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11)。

表11. 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 Con	trol			

令和4年度の実験において、試験期間中、0TDを投与し た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、 0TDを投与した群いずれも相対肝重量の増加を認めた。 一方、apocynin投与による体重や肝重量に対する影響は 見られなかった。摂餌量や飲水量に群間で大きな差は見 られなかった(表12)。

表12. 体重、肝重量および摂餌・飲水量

Treatment	No of rat	Body weight	Liver (N	lo. = 6)	Consu	umption		
meduneni	NO. OFTAL	(g)	Absolute (g)	Relative (%)	Food (g/day)	Water (g/day)		
OTD	12	215.1 ± 5.9 **	8.9 ± 0.5	4.1 ± 0.2***	11.5 ± 2.0	20.1 ± 2.0		
OTD+APOL	12	214.1 ± 8.9 ***	9.0 ± 0.7	4.1 ± 0.1***	11.8 ± 1.7	20.5 ± 1.8		
OTD+APOH	12	213.1 ± 6.7 ***	9.0 ± 0.2	4.2 ± 0.1***	11.7 ± 1.9	19.1 ± 2.0		
Control	6	232.0 ± 11.3	8.5 ± 0.5	3.7 ± 0.1	12.9 ± 1.4	20.1 ± 1.0		
APOH	6	237.2 ± 8.5	8.8 ± 0.3	3.7 ± 0.0	13.3 ± 1.3	20.1 ± 0.6		
* **** Bc 0.05 and 0.001 vs Control respectively								

OTD: o-toluidide; APO: apocynin; L: low dose (250 mg/L); H: high dose (500 mg/L)

膀胱を組織学的に検討した結果、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。特にOTD単独投与群では、異型の 強い中等度以上の過形成病変を認めるラットが多く存 在した。一方、OTD投与とともにapocyninを投与した群 では、濃度依存性に軽度過形成病変までに留まるラット が増えた。また、OTD投与で細胞増殖活性の指標である Ki67、DNA傷害の指標であるγ-H2AXおよび酸化ストレス の指標である8-OHdGの陽性率が、いずれも対照群に比べ 有意に増加していた。その増加に対して、apocyninの投 与で、Ki67は500 mg/L投与群で、γ-H2AXおよび8-OHdG は250、500 mg/L投与群いずれにおいても有意な抑制を 認めた。アポトーシスについて検証するため、TUNEL陽 性率を検討したが、いずれの群間でも有意な差が見られ なかった(表13)。

表13. 膀胱尿路上皮病変、Ki67、TUNEL、γ-H2AXおよび8-OHdG 陽性率

Treatment	No. of rat	Simple hyperplasia ^{a,#}		Ki67 (%)	TUNEL (%)	v-H2AX (%)	8-OHdG (%)		
ricatificiti	No. of fat	Mild	Moderate	1407 (70)	TONLE (70)	¥-112/00 (70)	0-01100 (70)		
OTD	12	2	10	2.1 ± 0.7 ^a	0.7 ± 0.3	1.7 ± 0.7 ^a	1.7 ± 0.3 ^a		
OTD+APOL	12	3	9	1.5 ± 0.9	0.6 ± 0.3	1.0 ± 0.4**	1.2 ± 0.2***		
OTD+APOH	12	6	5	0.9 ± 0.4***	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3***	0.9 ± 0.2***		
Control	6	0	0	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.6	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1		
APOH	6	0	0	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1		
*:P<0.001 vs Contro	*.P<0.001 vs Control: *. Rho = -0.37. P< 0.05: ** **** P< 0.01 and 0.001 vs OTD respectively.								

これまでに芳香族アミンを4週間投与した実験の膀胱 上皮について、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、ラ ット膀胱に増殖性病変を認めたOTD、AAOTおよびAOTD投 与群において共通して発現変動を認めた遺伝子として、 上昇遺伝子47、低下遺伝子33の合計80遺伝子が同定さ れた(表14)。

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15)。 そのうち、「Cancer」や「Organismal Injury and Abnormalities」 に属する腫瘍関連因子として 「Invasive tumor」や「Advanced malignant tumor」、 「Metastasis」が選出された。それらの因子に共通する 12遺伝子が確認され、膀胱発がんに関与する可能性を 示した(表16)。

表14.	芳香族ア	30	ン投与によ	ŋ	発現変動を認めた遺伝子数	
L T T T		· · ·		_		

Up-regulated genes	Down-regulated genes	Total genes
309	239	548
413	428	841
723	458	1181
47	33	80
	Up-regulated genes 309 413 723 47	Up-regulated genes Down-regulated genes 309 239 413 428 723 458 47 33

表15. OTD、AAOTおよびAOTD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

表16. 膀胱発がんに関与する因子

Categories	Diseases or Functions Annotation	p-value	Predicted Activation State	Activation z-score	Molecules
	Invasive tumor	2.82E-05	Increased	2.765	AQP1, Elf5, FHIT, FN1, FSCN1, HPSE, KRT20, MMP13, NQO1, PDGFRA, POSTN, RGS4, RRM2, VCAN
Organismal Injury	Advanced malignant tumor	5.17E-05	Increased	2.586	AQP1, Elf5, FN1, FSCN1, HPSE, IGFBP4, KRT20, NQO1, PDGFRA, POSTN, RGS4, RRM2, VCAN
and Abnormalities	Metastasis	0.0001	Increased	2.586	AQP1, Elf5, FN1, FSCN1, HPSE, KRT20, NQO1, PDGFRA, POSTN, RGS4, RRM2, VCAN

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、0TD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、0TD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0TD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。

MOCA投与実験において、ヒト化肝臓マウスにのみ、 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。

その発がん性に関わると考えられる肝臓の代謝酵素 について検討した結果、野生型マウスにおいてはOTDと 同様にMOCA投与によりヒトCYP2C9/19グループに属する Cyp2c29を主体に発現の上昇を認めた。一方でヒト化肝 臓マウスにおいては、MOCA投与によりCYP2B6および2C8 の発現上昇を認め、OTDで見られたCYP3A4の発現上昇は 見られず、MOCA特異的な酵素発現変動を認めた。今後、 CYP2B6および2C8により代謝されたと推察する尿中代謝 物に着目して、ヒトで危惧されているMOCAの膀胱発がん 性を検証していきたい。

AAOT投与による肝臓の代謝酵素について検討した結 果、野生型マウスにおいてはOTDと同様にMOCA投与によ りヒトCYP2C9/19グループに属するCyp2c29を主体に発 現の上昇を認めた。一方でヒト化肝臓マウスにおいては、 OTDで見られたCYP3A4の発現上昇は見られたものの有意 差は見られなかった。NATについてはOTDと同様に有意な 発現上昇は見られなかった。

また、膀胱への影響を検証した結果、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組織学的な変 化は見られないものの、細胞増殖活性の上昇傾向ととも に、DNA傷害の指標である y-H2AXの有意な増加を認めた。 ラット膀胱よりも感受性は低いものの、AAOT投与による 膀胱への発がん影響が推察される結果で、DNA傷害が細 胞増殖活性よりも感受性が高い可能性を示した。今後、 尿中代謝物も含め、ヒト肝臓による代謝の特異性や影響 をまとめ、ヒトへの外挿に取り組みたい。

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、2,4-DMA、AAOTおよびOTDの5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。また、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。

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、また、令和3年度の結果か ら、AOTD投与群においてもラット尿中の主な代謝物は OTDであることを確認出来たことから、いずれの膀胱発 がんも尿中のOTDが重要な役割を果たし、OTDに関連した 共通の膀胱発がん機序を介していると考える。

そこで、OTD、AAOTおよびAOTD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、腫瘍関連因子として「Invasive tumor」や 「Advanced malignant tumor」、「Metastasis」が選出 された。その共通する12遺伝子に着目し、OTD関連膀胱 発がん機序解明を行っていく予定である。

また、令和3年度にDNAアダクトームでOTDによる膀胱 発がんに酸化ストレスが関与する結果が得られたので、 内因性活性酸素誘導酵素NADPH oxidase阻害剤である apocyninを用いて検証した結果、apocyninがOTDによる 増殖促進作用を有意に抑制した。この結果より、OTD膀 胱発がん機序には酸化ストレスが関与する事が示唆さ れた。

E. 結論

OTDおよびAAOT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、MOCAによる肝代 謝酵素の発現について、ヒトとマウスでの相違を確認し た。これらの成果は、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

- Yokota Y, <u>Suzuki S</u>, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanizedliver mice. Toxicology. 2023; 488: 153483.
- Deguchi S, Tanaka H, <u>Suzuki S</u>, Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2022; 22: 699.
- 3) Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, <u>Suzuki S</u>, Eto F, Kikushima K, Wanibuchi H, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M. Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation. Sci Rep. 2022; 12: 8718.
- Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, <u>Suzuki</u> <u>S</u>, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. Cancer Sci. 2022; 113: 2642-53.
- 5) Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M,

Tomono S, Hady R, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, <u>Suzuki S</u>, Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. Part Fibre Toxicol. 2022; 19: 30.

- 6) <u>Suzuki S</u>, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. J Toxicol Pathol. 2022; 35: 247-54.
- 7) <u>Suzuki S</u>, 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.
- Shimizu K, Gi M, <u>Suzuki S</u>, 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, <u>Suzuki S</u>, 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, <u>Suzuki S</u>, 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, <u>Suzuki S</u>, 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, <u>Suzuki S</u>, 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, <u>Suzuki S</u>, 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) Fujioka M, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 15) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 16) Kakehashi A, <u>Suzuki S</u>, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8hydroxydeoxyguanosine, 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.
- 17) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, <u>Suzuki S</u>, 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.
- Mapoung S, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 19) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u>, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominantnegative transgenic rats. Arch Toxicol. 2020; 94: 4085-97.
- 20) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 21) <u>Suzuki S</u>, 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.

- 22) <u>Suzuki S</u>, 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.
- 23) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, <u>Suzuki S</u>, 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.
- 2. 学会発表
- <u>鈴木周五</u>、加藤寛之、内木綾、鰐渕英機、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)
- <u>鈴木周五</u>、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐渕英機、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)
- 魏民、<u>鈴木周五</u>、行松直、梯アンナ、鰐渕英機.芳 香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀 脱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)
- 魏民、行松直、<u>鈴木周五</u>、梯アンナ、鰐渕英機. 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, <u>Suzuki Shugo</u>, 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、<u>鈴木周五</u>、山下依子、稲熊真悟、 高橋 智.LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下さ せ膵発癌を抑制する.第109回日本病理学会総会、 福岡(2020年4月)
- 7) <u>鈴木周五</u>、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐渕英機、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、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 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)
- 梯アンナ、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機.
 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)

- 10) <u>鈴木周五</u>、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)
- 11) <u>鈴木周五</u>、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)
- 12) 魏民、<u>鈴木周五</u>、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)
- 13)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、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)
- 14)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、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)
- 15) 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)
- 16)魏民、<u>鈴木周五</u>、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)
- 17) 梯アンナ、<u>鈴木周五、</u>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)
- 18) <u>鈴木周五</u>、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)
- 19)魏民、<u>鈴木周五</u>、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)
- 20)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、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)
- 21) 西土井悠作、<u>鈴木周五</u>、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)
- 22) 松江泰佑、魏民、塩田正之、<u>鈴木周五</u>、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)

- 23) 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類の尿中代謝物 と膀胱尿路上皮への影響.第111回日本病理学会総 会、神戸(2022年4月)
- 24) 梯アンナ、<u>鈴木周五</u>、魏民、鰐渕英機. 肝発がんに おける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 25) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露を認めた*o*-toluidineの尿中代謝物 と膀胱尿路上皮への影響.第49回日本毒性学会学 術年会、札幌(2022年7月)
- 26)魏民、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 1,4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発 がんリスク評価.第49回日本毒性学会学術年会、札 幌(2022年7月)
- 27) 小宮雅美、<u>鈴木周五</u>、魏民、鰐渕英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析.第 29 回日本がん予防学術大会、京都(2022年7月)
- 28) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第81回日本 癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 29) 帶金明日香、小宮雅美、<u>鈴木周五</u>、魏民、鰐渕英機、 戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術 総会、横浜(2022年9月)
- 30) 魏民、<u>鈴木周五</u>、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、鰐渕英機. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法. 第81回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 31)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、大石裕司、邱桂ユウ、 梯アンナ、鰐渕英機.マウス経胎盤曝露モデルに おけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネ ティック修飾異常を介した肝発がんの亢進.第81 回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 32)藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、大石裕司、梯アンナ、 邱桂鈺、芝野佳奈、鰐渕英機.マウス経胎盤ばく露 による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機序. 第 35 回発癌病理研究会、湯沢(2022年11月)
- 33)帯金明日香、小宮雅美、<u>鈴木周五</u>、魏民、鰐渕英機、 戸塚ゆ加里.職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析.第51回環境変異原学会、 広島(2022年11月)
- 34) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、<u>鈴木周</u> 五、鰐渕英機. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおけ る尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第 27 回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12月)

- 35) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明. 第27回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12月)
- 36)魏民、藤岡正喜、<u>鈴木周五</u>、山本与毅、 Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、鰐渕英機. ヒ 素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常 の関与.第27回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12 月)
- 37) 山本与毅、魏民、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、 梯アンナ、鰐渕英機. ジメチルアルシン酸誘発ラ ット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常.第39回日 本毒性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 38) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, <u>Shugo Suzuki</u>, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells. 第39回日本毒性 病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 39) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、<u>鈴木周五</u>、藤 岡正喜、魏民、鰐渕英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規 バイオマーカー候補の解析. 第39回日本毒性病理 学会総会、東京(2023年1月)
- Guiyu Qiu、梯アンナ、<u>鈴木周五</u>、藤岡正喜、鰐渕 英機. ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3 の機能解 明.第39回日本毒性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 藤岡正喜、魏民、<u>鈴木周五</u>、芝野佳奈、Guiyu Qiu、 Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、 大石裕司、梯アンナ、鰐渕英機.マウス経胎盤曝露 モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエ ピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢 進.第39回日本毒性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 42) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、 <u>鈴木周五</u>、鰐渕英機. ヒト化肝臓マウスにおける 無機ヒ素の体内動態及び毒性.第39回日本毒性病 理学会総会、東京(2023年1月)
- 43) <u>鈴木周五</u>、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 職業性ばく露を認めた*o*-toluidineの尿中代謝物 による膀胱尿路上皮への影響.第39回日本毒性病 理学会総会、東京(2023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 総合分担研究報告書

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 鰐渕 英機 大阪公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。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のtoluidide (OTD)もしくは、ヒトで膀 胱発がん性が疑われている芳香族アミン4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA)を用いてヒト化肝臓マ ウスおよび野生型マウスに投与し、投与4週目に新鮮尿を回収し尿中代謝物の解析を行った。その結果、OTDを投 与した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、ヒト肝臓でよりOTDが代謝されている可 能性を示した。また、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存在することが確認出来 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を確認し、膀胱発 がんへの関与を示唆するデータが得られた。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5種の芳香族アミンおよび、3種の0TDの尿中代謝物 を用いてラットに4週間投与する実験を行った結果、単純過形成病変を認めたOTD、acetoaceto-*o*-toluidide (AAOT)およびaceto-*o*-toluidide (AOTD)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。 これらの結果から、MOCAはヒトとマウスで尿中の代謝物が異なることが、膀胱発がんに重要であることを示し、 ヒト化肝臓マウスがヒトへの外挿に重要な役割を示すことが確認出来た。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た。

A. 研究目的

芳香族アミンによる職業性膀胱癌の発生は社会的な 問題の一つであり、最近でも福井県の化学工場において、 っ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 ん機序の解明を試みた。

今回、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、 ヒト膀胱に発がん性を疑われているものの、マウスでは 膀胱発がん性を示さない4,4'-Methylenebis(2chloroaniline) (MOCA)を投与した尿を用いて、尿中の MOCAおよびその代謝物について検討した。

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、2,4-dimethylaniline hydrochloride (2,4-DMA)および、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)についてOTD関連の尿中代謝物につ いて検討した。

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(野生型マウス; NOG) 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。

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)、AOTD (0.031 nmol/mL)、4AMC (0.505 nmol/mL)、2AMC (0.148 nmol/mL)である。

また、高性能液体クロマトグラフィー四重極飛行時 間型質量分析(UPLC-Q-TOF-MS)を用いて、対照群4匹 ずつ、野生型 MOCA 投与群4匹、ヒト化肝臓マウス MOCA 投与群5匹から採取した尿中における MOCA およ びその代謝物を検討した。

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)、0.3% *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% AAOT、0.6% OTD、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。

Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)を用いて、各群5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、AAOT (0.047 nmol/mL)、OTD (0.051 nmol/mL)、 AOTD (0.023 nmol/mL)、4AMC (0.127 nmol/mL)、2AMC (0.046 nmol/mL)である。

(倫理面への配慮)

大阪公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を投与した実験におけるマウス尿中の芳香族ア ミンおよび代謝物について解析した結果を、表1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、AOTD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1. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Туре	Taxatasaat	No. of	OTD	AOTD	4AMC	2AMC	Total
	Treatment	mice	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)	(µM)
NOG	Control	3	1.4 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	1.4 ± 0.3
NOG	OTD	4	183.5 ± 128.4	0.2 ± 0.2	6.9 ± 4.5	N.D.	190.8 ± 132.8
Humanized	Control	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Humanized	OTD	4	51.0 ± 21.1	0.2 ± 0.1	8.0 ± 7.9	N.D.	59.3 ± 25.0

MOCAを投与したマウスの尿中代謝物に対する解析結 果を図1に示す。尿中には多数の物質が検出され、MOCA を投与した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MOCAの存在が確認出来た。また、対照群に 存在しないMOCA代謝物を考えるピークも確認した。ま た、MOCA投与群に着目してピークを検討した結果、ヒト 化肝臓マウスと野生型マウスで異なるピークが存在し、 異なるMOCA代謝物と推察された(図2)。



図1. 尿中のMOCAおよび代謝物解析



図2. 上記解析のうち、MOCA投与群でのみ認めたピーク部分

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

ANL、PT、AAOTもしくはOTDを投与したラットの尿中芳 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	ANL	AAD	AAP	PT	6AMC
Control	5	N.D.	N.D.	14.3 ± 6.5	N.D.	N.D.
ANL	5	816.4 ± 350.9	3.6 ± 1.2	1908.4 ± 736.7	N.D.	N.D.
PT	5	N.D.	N.D.	N.D.	644.1 ± 366.6	6.5 ± 2.9
AAOT	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OTD	5	3.7 ± 0.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Treatment	AAOT	OTD	AOTD	4AMC	2AMC	Total AAs
Control	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ANL	N.D.	3.7 ± 0.7	N.D.	N.D.	N.D.	2733.9 ± 975.9
PT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	658.1 ± 370.0
						40074 . 070 5
AAOT	63.9 ± 28.9	1562.7 ± 636.6	55.8 ± 12.2	214.2 ± 212.4	67.4 ± 28.7	1967.4 ± 872.5

2,4-DMA、2AMC、4AMCもしくはAOTDを投与したラット の尿中芳香族アミンおよび代謝物について解析した結 果を、表3に示す。単純過形成病変を認めたAOTD投与群 において、尿中にOTDが高い濃度割合で検出された。一 方、2AMCでは尿中に多量の2AMCが存在した。また、4AMC では他のOTD関連芳香族アミンに比べ、検出できた芳香 族アミンは少なかった。2,4-DMA投与群では、OTD関連芳 香族アミンの尿中排泄は見られなかった。

表3. 尿中の芳香族アミンおよび代謝物の量

Treatment	No. of rat	AAOT	OTD	AOTD	4AMC	2AMC	Total
Control	5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2AMC	5	N.D.	N.D.	0.2 ± 0.0	1.0 ± 0.8	11812.1 ± 2730.2	11813.9 ± 2730.4
4AMC	5	N.D.	N.D.	0.2 ± 0.1	356.2 ± 160.3	12.2 ± 2.1	369.3 ± 161.7
AOTD	5	N.D.	7757.3 ± 1648.7	215.9 ± 37.6	120.3 ± 115.5	35.5 ± 9.3	8129.0 ± 1761.9

D. 考察

ヒト化肝臓マウスを用いた芳香族アミン代謝の役割 において、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、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 を確認したことから、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。MOCAを投与したヒト化肝 臓マウスおよび野生型マウスの尿中に存在するMOCAお よび代謝物について検討し、MOCAおよび代謝物のピー クを検出するとともに、ヒト化肝臓マウスと野生型マ ウスで異なる代謝物のピークが存在することを確認出 来たことは、MOCA投与による膀胱への影響が異なった 結果を反映する有益なデータである。ヒト化肝臓マウ スで検出できたMOCA代謝物に着目し、膀胱発がん物質 の同定および機序の解明していきたい。

ラットを用いた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において、芳香族アミンのうち、 OTD、AAOTおよび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。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、AAOTやAOTDが肝臓で代謝され、 OTDが発生したと推察する。このように膀胱に過形成病 変を認めた群ではいずれも尿中に高濃度のOTDが確認 され、尿中OTDが膀胱発がんに重要な物質である可能性 が示された。

E. 結論

マウスおよびヒト肝臓におけるMOCAの尿中代謝物が 異なることが確認され、膀胱発がんに寄与する可能性が 示された。ラットにおいて尿中OTDが膀胱発がんの重要 な物質であることを示した。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

- Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, <u>Wanibuchi H</u>. *o*-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanizedliver mice. Toxicology. in press.
- Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, <u>Wanibuchi</u> <u>H</u>, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and

reactive oxygen species-associated cell death pathways. Cell Death Dis. 2022; 13: 694.

- 3) Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Naher S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, <u>Wanibuchi H</u>, Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K. Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype. Brain Commun. 2022; 4: fcac220.
- Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 5) Deguchi S, Tanaka H, Suzuki S, Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, <u>Wanibuchi H</u>, Ohira M. Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2022; 22: 699.
- 6) Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, Suzuki S, Eto F, Kikushima K, <u>Wanibuchi H</u>, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M. Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation. Sci Rep. 2022; 12: 8718.
- 7) Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, <u>Wanibuchi H</u>. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. Cancer Sci. 2022; 113: 2642-53.
- Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, <u>Wanibuchi H</u>. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. J Toxicol Pathol. 2022; 35: 247-54.
- 9) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Wanibuchi</u> <u>H</u>, 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.
- 10) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, <u>Wanibuchi H</u>. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-

Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 1216.

- Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u>. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. Cancers (Basel). 2021; 13: 3613.
- 12) Kawata K, Baba A, Shiota M, <u>Wanibuchi H</u>, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca2+ entry. J Biochem. 2021; 170: 483-8.
- 13) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, <u>Wanibuchi H</u>, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. Cancer Sci. 2021; 112: 1746-57.
- 14) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 15) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 16) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, <u>Wanibuchi H</u>, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatinresistant bladder cancer. Cancer Lett. 2020; 479: 89-99.
- 17) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, <u>Wanibuchi H</u>. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. J Toxicol Pathol. 2020; 33: 279-85.
- 18) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, <u>Wanibuchi H</u>, 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.
- 19) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u>. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, Larginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic

Features of Metabolic Syndrome and Non-
AlcoholicSteatohepatitis-AssociatedHepatocarcinogenesis.Int J Mol Sci. 2020; 21.

- 20) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, <u>Wanibuchi H</u>. 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
- 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、<u>鰐渕英機</u>、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)
- (1) <u>鰐渕英機</u>、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)
- 6) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, <u>Wanibuchi Hideki</u>. 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) <u>鰐渕英機</u>. 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)
- 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、<u>鰐渕英機</u>、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、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- ・梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>.
 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)
- 11) 鈴木周五、魏民、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 12) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、<u>鰐渕英機</u>. 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)

- 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 14) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 15) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 16)藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、 <u>鰐渕英機</u>. 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)
- 17) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 18)魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 19) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>.
 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)
- 20)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、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 21) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 22) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 23)藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、 山口貴嗣、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 24) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、 <u>鰐渕英機</u>. 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)

- 25) 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、<u>鰐渕英機</u>.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)
- 26) 梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 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)
- 27) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 職業性膀胱がん関連芳香族アミン類の尿中代謝物 と膀胱尿路上皮への影響.第111回日本病理学会総 会、神戸(2022年4月)
- 28) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、<u>鰐渕英機</u>. 肝発がんに おける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
- 29) <u>鰐渕英機</u>. ヒ素による発がん機序の解明. 第49回日 本毒性学会学術年会、札幌(2022年6月)
- 30) <u>鰐渕英機</u>. 有機ヒ素化合物の長期毒性・発がん性 機序の研究. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
- 31) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 職業性ばく露を認めた*o*-toluidineの尿中代謝物 と膀胱尿路上皮への影響.第49回日本毒性学会学 術年会、札幌(2022年7月)
- 32) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 1,4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発 がんリスク評価.第49回日本毒性学会学術年会、札 幌(2022年7月)
- 33) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、<u>鰐渕英機</u>、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析.第 29 回日本がん予防学術大会、京都(2022年7月)
- 34) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第81回日本 癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 35) 帶金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、<u>鰐渕英機</u>、 戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術 総会、横浜(2022年9月)
- 36)魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、<u>鰐渕英</u>機. 遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法. 第81回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 37)藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱桂ユウ、 梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.マウス経胎盤曝露モデルに おけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネ ティック修飾異常を介した肝発がんの亢進.第81 回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 38)藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、 邱桂鈺、芝野佳奈、<u>鰐渕英機</u>.マウス経胎盤ばく露 による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機序. 第 35 回発癌病理研究会、湯沢(2022年11月)
- 39) 带金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐渕英機、

戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA 付加体の網羅的解析. 第51回環境変異原学会、 広島(2022年11月)

- 40) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、鈴木周五、<u>鰐渕英</u>機. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第27 回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12月)
- 41) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明. 第27回ヒ素シンポジウム、今治(2022年12月)
- 42) 道場彩乃、魏民、櫻井映子、寺本 篤司、桐山諭和、 山田 勢至、<u>鰐渕英機</u>、塚本徹哉. γH2AXとKi-67 を用いた遺伝毒性肝発がん物質の早期検出:機械 学習による自動判定の試み.第39回日本毒性病理 学会総会、東京(2023年1月)
- 43)山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一 希、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.ジメチルアルシン酸誘 発ラット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常.第39 回日本毒性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 44) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, <u>Hideki Wanibuchi</u>. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells.第39回日本毒性 病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 45) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤 岡正喜、魏民、<u>鰐渕英機</u>. ヒト浸潤性膵管癌の新 規バイオマーカー候補の解析. 第39回日本毒性病

理学会総会、東京(2023年1月)

- 46) Guiyu Qiu、梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、<u>鰐渕</u> <u>英機</u>. ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3 の機能解 明.第39回日本毒性病理学会総会、東京(2023年1 月)
- 47) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、 Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、 大石裕司、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>.マウス経胎盤曝 露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)の エピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの 亢進.第39回日本毒性病理学会総会、東京(2023年 1月)
- 48) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、鈴木周五、<u>鰐渕英機</u>. ヒト化肝臓マウスにお ける無機ヒ素の体内動態及び毒性. 第39回日本毒 性病理学会総会、東京(2023年1月)
- 49) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、<u>鰐渕英機</u>. 職業性ばく露を認めた*o*-toluidineの尿中代謝物 による膀胱尿路上皮への影響.第39回日本毒性病 理学会総会、東京(2023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 総合分担研究報告書

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 異的に発現する超免疫不全 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。各年度につき 2 ロットを入手し、研究期間中に6 ロット(ドナー年齢 12 歳 a、 11 ヶ月齢、35 歳、6 歳、12 歳 b、31 歳)について生着性評価を実施した。ヒト肝細胞移植 8~10 週後 の血中コリンエステラーゼ活性最高値はそれぞれ、30,675,435,630,480,580 U/L であり、ドナー年齢 12 歳 a 以外は良好な生着性を示した。これらの細胞を用いて各年度ヒト化肝臓マウスを作製し、対照 マウスと合わせて一群 12~15 匹のマウスにて芳香族アミン類の実験を研究代表者の施設にて実施し 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。ガンシクロビル腹 腔内投与、あるいはバルガンシクロビル経口投与によ 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。研究期間中6ロッ ト(12歳a、11ヶ月齢、35歳、6歳、12歳b、31 歳)について生着性評価を行い、研究期間中、動物実 験が安定して実施できる体制づくりと移植したヒト肝 細胞が増殖しやすい肝傷害条件の検討を行った。

(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

研究期間を通じ、肝傷害誘導の最適化を行なった。ガ ンシクロビル製剤であるデノシン(点滴静注用)、バリ キサ(経口投与用ドライシロップ)、および試薬バルガ ンシクロビル(経口投与用)を検討した。その結果、メ スのN0G-TKm30 F1マウスを用い、0.15-0.2 mg/mLのバリ キサドライシロップ溶液を72時間飲水投与するのが最 も効率よいヒト肝細胞移植条件(血中ALT 600-1,500U/L) の誘導法であることがわかった。これら肝傷害を誘導し たマウスに6ロットの肝細胞を移植し、高キメラマウス 作製能力を検証した。その結果、12歳aドナー由来の肝 細胞以外では血中コリンエステラーゼ活性が高値 (400U/L以上)となった。各年度、これらの細胞を使用 して作製したヒト化肝臓マウスを研究代表者の施設に 移動し、芳香族アミン類投与の実験を実施した。

研究期間中に実施した3回の試験で使用したヒト化 肝臓マウスの平均血中コリンエステラーゼ活性はそれ ぞれ、423 U/L、415 U/L、445 U/Lといずれも高値であ った。2年度目の試験に使用したヒト化肝臓マウスの肝 臓組織を病理解析のため採取し病理標本を作成して抗 ヒトミトコンドリア抗体で染色した。ヒト細胞の占有率 を測定したところ平均 93.8%であった。これらヒト肝細 胞置換率の高い動物を用いて芳香族アミン類の実験を 実施することができた。

D. 考察

改良型TK-NOG肝傷害マウス(NOG-TKm30 F1)のヒト肝 細胞生着性は旧型TK-NOG肝傷害マウスよりも優れてい ることがわかった。しかし、本研究にて検討した6ロッ トのヒト肝細胞のうち1つのロットでは生着性が極め て低度であった。このことから、ヒト化肝臓マウス作製 はある程度、ヒト肝細胞のロットに依存すると考えられ た。また、ガンシクロビル投与により誘導した肝傷害の 程度もヒト化肝臓マウス作製を左右する要因であり、本 研究で得られた誘導条件(0.15-0.2 mg/mL バリキサド ライシロップ溶液 72時間飲水投与)は、今後、基本プ ロトコールとして活用される。一般に、若齢ドナー肝細 胞の方が生着性が高いと考えられているが、本研究では 31歳、35歳ドナー由来の肝細胞を用いてもヒト肝細胞置 換率の高いヒト化肝臓マウスの作製が可能であった。 NOGマウスは重度な免疫不全であり、異種細胞の受容性 を高めていると考えられた。

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, <u>Suemizu H</u>, Wanibuchi H. o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanizedliver mice. Toxicology. 2023; 488: 153483.
- 2) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kato H, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. The Unique Human N10-Glucuronidated Metabolite Formation from Olanzapine in Chimeric NOG-TKm30 Mice with Humanized Livers. Drug Metab Dispos. 2023; 51: 480-91.
- Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. 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.
- 4) Uehara S, Shimizu M, Ple K, Routier S, Yoneda N, Higuchi Y, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 5) Uehara S, Murayama N, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. Comparison of mouse and human cytochrome P450 mediated-drug metabolising activities in hepatic and extrahepatic microsomes. Xenobiotica. 2022; 52: 229-39.
- 6) Uehara S, Iida Y, Ida-Tanaka M, Goto M, Kawai K, Yamamoto M, Higuchi Y, Ito S, Takahashi R, Kamimura H, Ito M, Yamazaki H, Oshimura M, Kazuki Y, <u>Suemizu H</u>. Humanized liver TK-NOG mice with functional deletion of hepatic murine cytochrome P450s as a model for studying human drug metabolism. Sci Rep. 2022; 12: 14907.
- 7) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kawai K, Yamamoto M, Kamimura H, Iida Y, Oshimura M, Kazuki Y, Yamazaki H, Hikita H, Takehara T, <u>Suemizu H</u>. 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.
- 8) Tamaki Y, Shibata Y, Hayakawa M, Kato N, Machii A, Ikeda Y, Nanizawa E, Hayashi Y,

<u>Suemizu H</u>, Ito H, Ishikawa T. Treatment with hepatocyte transplantation in a novel mouse model of persistent liver failure. Biochem Biophys Rep. 2022; 32: 101382.

- 9) Shiode Y, Kodama T, Shigeno S, Murai K, Tanaka S, Newberg JY, Kondo J, Kobayashi S, Yamada R, Hikita H, Sakamori R, <u>Suemizu H</u>, 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. 2022.
- 10) Murai K, Kodama T, Hikita H, Shimoda A, Fukuoka M, Fukutomi K, Shigeno S, Shiode Y, Motooka D, Higuchi Y, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u>, Ryo A, Tahata Y, Makino Y, Yamada R, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T. Inhibition of nonhomologous end joining-mediated DNA repair enhances anti-HBV CRISPR therapy. Hepatol Commun. 2022; 6: 2474-87.
- 11) Miura T, Uehara S, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Forward and reverse dosimetry for aniline and 2,6-dimethylaniline in humans extrapolated from humanized-liver mouse data using simplified physiologically based pharmacokinetic models. J Toxicol Sci. 2022; 47: 531-8.
- 12) Kabbani M, Michailidis E, Steensels S, Fulmer CG, Luna JM, Le Pen J, Tardelli M, Razooky B, Ricardo-Lax I, Zou C, Zeck B, Stenzel AF, Quirk C, Foquet L, Ashbrook AW, Schneider WM, Belkaya S, Lalazar G, Liang Y, Pittman M, Devisscher L, <u>Suemizu H</u>, Theise ND, Chiriboga L, Cohen DE, Copenhaver R, Grompe M, Meuleman P, Ersoy BA, Rice CM, de Jong YP. Human hepatocyte PNPLA3-148M exacerbates rapid nonalcoholic fatty liver disease development in chimeric mice. Cell Rep. 2022; 40: 111321.
- 13) Fukutomi K, Hikita H, Murai K, Nakabori T, Shimoda A, Fukuoka M, Yamai T, Higuchi Y, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 14) 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 chimeric TK-NOG in mice transplanted with human hepatocytes. Xenobiotica. 2021; 51: 582-9.
- 15) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. Oxidative metabolism and

pharmacokinetics of the EGFR inhibitor BIBX1382 in chimeric NOG-TKm30 mice transplanted with human hepatocytes. Drug Metab Pharmacokinet. 2021; 41: 100419.

- 16) Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. UDP-glucuronosyltransferase 1A4mediated N2-glucuronidation is the major metabolic pathway of lamotrigine in chimeric NOG-TKm30 mice with humanised-livers. Xenobiotica. 2021; 51: 1146-54.
- 17) Toda A, Shimizu M, Uehara S, Sasaki T, Miura T, Mogi M, Utoh M, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Plasma and hepatic concentrations of acetaminophen and its primary conjugates after administrations determined oral in experimental animals humans and and extrapolated by pharmacokinetic modeling. Xenobiotica. 2021; 51: 316-23.
- 18) Sueyoshi K, Komura D, Katoh H, Yamamoto A, Onoyama T, Chijiwa T, Isagawa T, Tanaka M, <u>Suemizu H</u>, Nakamura M, Miyagi Y, Aburatani H, Ishikawa S. Multi-tumor analysis of cancerstroma interactomes of patient-derived xenografts unveils the unique homeostatic process in renal cell carcinomas. iScience. 2021; 24: 103322.
- 19) Shimizu M, Uehara S, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 20) 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, <u>Suemizu H</u>, Cao H. Identification of human long noncoding RNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic homeostasis. J Clin Invest. 2021; 131.
- 21) Ogawa M, Jiang JX, Xia S, Yang D, Ding A, Laselva O, Hernandez M, Cui C, Higuchi Y, <u>Suemizu H</u>, Dorrell C, Grompe M, Bear CE, Ogawa S. Generation of functional ciliated cholangiocytes from human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2021; 12: 6504.
- 22) 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.
- 23) Morita H, Yasuda M, Yamamoto M, Tomiyama Y, Uchida R, Ka Y, Ogura T, Kawai K, <u>Suemizu H</u>,

Hayashimoto N. Pathogenesis of murine astrovirus in experimentally infected mice. Exp Anim. 2021; 70: 355-63.

- 24) Miura T, Uehara S, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 25) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Roles of human cytochrome P450 1A2 in coumarin 3,4epoxidation mediated by untreated hepatocytes and by those metabolically inactivated with furafylline in previously transplanted chimeric mice. J Toxicol Sci. 2021; 46: 525-30.
- 26) Miura T, Uehara S, Shigeta K, Yoshizawa M, Kamiya Y, Murayama N, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 27) Miura T, Kamiya Y, Uehara S, Murayama N, Shimizu M, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Hepatotoxicological potential of P-toluic acid in humanised-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models. Xenobiotica. 2021; 51: 636-42.
- 28) Kishimoto K, Shimada A, Shinohara H, Takahashi T, Yamada Y, Higuchi Y, Yoneda N, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 29) Kanbe A, Ishikawa T, Hara A, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 30) Ito R, Katano I, Otsuka I, Takahashi T, <u>Suemizu H</u>, Ito M, Simons PJ. Bovine betalactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/hGM-CSF transgenic mice. Int Immunol. 2021; 33: 183-9.
- 31) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>. Metabolism of desloratadine by chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes. Xenobiotica. 2020; 50: 733-40.
- 32) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H,

<u>Suemizu H</u>. Human Aldehyde Oxidase 1-Mediated Carbazeran Oxidation in Chimeric TK-NOG Mice Transplanted with Human Hepatocytes. Drug Metab Dispos. 2020; 48: 580-6.

- 33) Udagawa C, Sasaki Y, Tanizawa Y, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 34) Ruan X, Li P, Chen Y, Shi Y, Pirooznia M, Seifuddin F, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 35) Ogawa SI, Uehara S, Tsunenari Y, Kawai H, <u>Suemizu H</u>, Yamazaki H. Prediction of circulating human metabolites of pemafibrate, a novel antidyslipidemic drug, using chimeric mice with humanized liver. Xenobiotica. 2020; 50: 769-75.
- 36) Ogawa SI, Shimizu M, Kamiya Y, Uehara S, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 37) Nakayama K, Kamimura H, <u>Suemizu H</u>, 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 humanizedliver mouse plasma data. Drug Metab Pharmacokinet. 2020; 35: 389-96.
- 38) Murai K, Hikita H, Kai Y, Kondo Y, Fukuoka M, Fukutomi K, Doi A, Yamai T, Nakabori T, Fukuda R, Takahashi T, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u>, 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.
- 39) Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Utoh M, <u>Suemizu H</u>, 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.

- 40) 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, 1,4-Dibromobenzene in and Humanized-Liver Mice Predicted Using Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Models as Putative Markers of Toxicological Potential. Chem Res Toxicol. 2020; 33: 3048-53.
- 41) 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, <u>Suemizu H</u>, Schneider WM, Shlomai A, Meuleman P, Bhatia SN, Rice CM, de Jong YP. Expansion, in vivoex vivo cycling, and genetic manipulation of primary human hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020; 117: 1678-88.
- 42) Kamimura H, Uehara S, <u>Suemizu H</u>. A novel Css-MRTpo 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.
- 43) Jiang C, Li P, Ruan X, Ma Y, Kawai K, <u>Suemizu</u> <u>H</u>, Cao H. Comparative Transcriptomics Analyses in Livers of Mice, Humans, and Humanized Mice Define Human-Specific Gene Networks. Cells. 2020; 9.
- 44) Ito S, Kamimura H, Yamamoto Y, Chijiwa H, Okuzono T, <u>Suemizu H</u>, 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
- <u>末水洋志</u>. 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

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録

該当なし 3.その他

5. その他 該当なし

労災疾病臨床研究事業費補助金 総合分担研究報告書

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 脱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、*p*-Toluidine、Acetoaceto-*o*-toluidine (AAOT)、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 が同定され、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。

さらに、2,4-Dimethylaniline や OTD の尿中代謝物である、2-Amino-*m*-cresol、4-Amino-*m*-cresol、AAOT と OTD の中間体である *o*-Acetotoluidine(AOTD)を用いて同様の実験を行い、DNA アダクトーム解析を行な った。その結果、各群それぞれがクラスタリングされた。クラスタリングに寄与するアダクトを検索したと ころ、前年度の研究で見出された酸化ストレスに由来すると考えられるアダクトと同じアダクトが検出され た。先行実験で OTD、AAOT、AOTD 投与により、ラット膀胱粘膜に高頻度で simple hyperplasia が観察され ているが、OTD、AAOT 曝露群と同様、AOTD 曝露によるラット膀胱粘膜毒性にも酸化ストレスが関係している ことが示唆された。

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

実験1

F344 ラットに芳香族アミン (aniline (ANL)、 ptoluidine (PT)、Acetoaceto- σ -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。

実験 2

F344 ラットに芳香族アミン2,4-Dimethylaniline (2,4-DMA)、OTDの尿中代謝物2-Amino-*m*-cresol(2-AMC)、 4-Amino-*m*-cresol(4-AMC)、AAOTとOTDの中間体である *o*-Acetotoluidine (AOTD)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、 実験1と同様にDNA抽出を行なった後、DNA付加体の網羅 的解析を実施した。

(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

<u>実験1</u>

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-OHdG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2. AAOTおよびOTD群に特徴的なアダクトの同定

実験2

芳香族アミン2,4-DMA、2-AMC、4-AMC、AOTDを投与し たラット膀胱上皮粘膜より抽出したDNAを酵素消化後に 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、各群にクラスタリングされたが、中 でもラット膀胱粘膜に高頻度でsimpe hyperplasiaが観 察されたAOTDが、コントロールと大きく離れてクラスタ リングされた(図3)。クラスタリングに寄与するアダ クトの探索を行ったところ、前年度の研究で見出された 酸化ストレスに由来するアダクト(8-OH-dA)の寄与が大 きいことがわかった(図4、5)。







図4. 酸化ストレス由来付加体(8-0H-dA)の存在量の比較



図5. AOTD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。

さらに、4種類の芳香族アミン類(2,4-DMA、2-AMC、 4-AMC、AOTD)を曝露したラットの膀胱粘膜より抽出し たDNAを用い、アダクトーム解析を行ったところ、実験 1で抽出された酸化ストレス由来のアダクト(8-OH-dA) の生成がAOTD曝露群においても確認された。このこと から、OTD、AAOTと同様にOTD-AAOTの中間体であるAOTD のラット膀胱粘膜毒性にも酸化ストレスが寄与する可 能性が示唆された。

E. 結論

芳香族アミン類を曝露したラット膀胱上皮粘膜より 抽出したDNAを酵素消化後にLC-HRAM-MSにて付加体の網 羅的解析を実施した。その結果、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。さらに、4種類の芳香族アミン類(2,4-DMA、 2-AMC、4-AMC、AOTD)を曝露したラットの膀胱粘膜より 抽出したDNAを用い、アダクトーム解析を行ったところ、 実験1で抽出された酸化ストレス由来のアダクト(8-OH-dA)の生成がAOTD曝露群においても確認され、AOTD 曝露群のラット膀胱に多く存在することが明らかとな った。このことから、OTD、AAOTと同様にOTD-AAOTの中 間体であるAOTDのラット膀胱粘膜毒性にも酸化ストレ スが寄与する可能性が示唆された。

今後さらに、AOTD特有のアダクトの検索を行うと同時 に、次世代シーケンサーによる解析を行い、変異シグネ チャーを同定することにより、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

 Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, <u>Totsuka Y</u>, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of otoluidine, o-anisidine, and aniline formed by in vitro metabolism. Chem Res Toxicol. 2022; 35: 1625-30.

- 2) Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, <u>Totsuka</u> <u>Y</u>, Terasaki M, Watanabe K, Wakabayashi K, Mutoh M. Induction of DNA damage in mouse colorectum by administration of colibactinproducing escherichia coli, isolated from a patient with colorectal cancer. In Vivo. 2022; 36: 628-34.
- Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, <u>Totsuka Y</u>. Establishment of Novel Genotoxicity Assay System Using Murine Normal Epithelial Tissue-Derived Organoids. Front Genet. 2021; 12: 768781.
- Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, <u>Totsuka Y</u>, Hagio M, Tashiro K, Komiya M, Mutoh M. Complex Modulating Effects of Dietary Calcium Intake on Obese Mice. In Vivo. 2021; 35: 2107-14.
- 5) 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, <u>Totsuka Y</u>, 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.
- <u>Totsuka Y</u>, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. Cancer Sci. 2021; 112: 7-15.
- 7) Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, <u>Totsuka Y</u>, 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.
- 8) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, <u>Totsuka Y</u>, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. Chem Res Toxicol. 2020; 33: 1907-14.
- Kawanishi M, Yoneda R, <u>Totsuka Y</u>, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. Genes Environ. 2020; 42: 16.

- 10) Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, <u>Totsuka Y</u>, 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.
- 11) <u>Totsuka Y</u>, 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.
- 2. 学会発表
- <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- <u>戸塚ゆ加里</u>.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)
- <u>戸塚ゆ加里</u>. Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach、広島、第79回癌学会 (2020年10月)
- <u>戸塚ゆ加里</u>.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) <u>戸塚ゆ加里</u>.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) <u>戸塚ゆ加里</u>.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)
- <u>戸塚ゆ加里</u>.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)
- <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- 9) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- 12) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)
- 13) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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)

- 14) <u>戸塚ゆ加里</u>. 集学的アプローチによる化学物質の 遺伝毒性評価の現状と将来展望. 第49回日本毒性 学会学術年会、札幌(2022年6月)
- 15) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐渕英機、<u>戸塚ゆ加里</u>. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析. 第29 回日本がん予防学術大会、京都(2022年7月)
- 16)小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸 平、赤根弘敏、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、 <u>戸塚ゆ加里</u>、若林敬二、三好規之.細胞毒性を有す るo-Toluidineとo-Anisidineの尿中代謝物はラッ ト膀胱上皮でALDH1A1を誘導する.第29回日本が ん予防学術大会、京都(2022年7月)
- Yukari Totsuka. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. 13th ICEM, Ottawa, Canada (2022年8月)
- 18) Kobayashi T, Yoshioka Y, Kishimoto S, Watanabe K, <u>Totsuka Y</u>, Wakabayashi K, Miyoshi N. In vitro metabolic dynamics for p-semidine-type homo- and hetero-dimerization of monocyclic aromatic amines. 13th ICEM, Ottawa, Canada (2022年8月)
- 19) <u>戸塚ゆ加里</u>、小宮雅美、松田知成、加藤護. Next generation sequencing technology elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 第81回日本癌学 会学術総会、横浜(2022年9月)
- 20) 小宮雅美, 落合雅子, 今井俊夫, <u>戸塚ゆ加里</u>. Establishment of novel genotoxicity assay system using organoids derived from murine normal epithelial tissues. 第81回日本癌学会学 術総会、横浜(2022年9月、横浜)
- 21) 帶金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐渕英機、 <u>戸塚ゆ加里</u>. 職業性膀胱がん候補化学物質による DNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術 総会、横浜(2022年9月)
- 22) <u>戸塚ゆ加里、</u>小宮雅美、永井桃子、加藤護、松田 知成.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35回発癌病理研究会、新潟 (2022年11月)
- 23)帯金明日香、小宮雅美、鈴木 周五、魏民、鰐渕 英 機、<u>戸塚 ゆ加里</u>.職業性膀胱がん候補化学物質に よるDNA付加体の網羅的解析.第51回環境変異原 学会、広島(2022年11月)
- 24) 坪井理、植嶋亜衣、久富優太、小田美光、恒松雄太、 佐藤道大、平山裕一郎、三好規之、岩下雄二、吉川 悠子、椙村春彦、<u>戸塚ゆ加里</u>、若林敬二、渡辺賢二、 川西優喜. DNA鎖間架橋修復欠損細胞を用いたコリ バクチン産生大腸菌の細胞毒性と遺伝毒性の評価. 第51回環境変異原学会、広島(2022年11月)
- 25) <u>戸塚ゆ加里</u>. 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1回包括的がん緩和 病態生理医療薬学研究会、東京(2022年11月)
- 26) <u>Yukari Totsuka</u>. Comprehensive analyses of genome and DNA adducts elucidate association

between environmental factors and human cancer development. 12th AACR-JCA Joint Conference, Maui, HI, USA (2022年12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

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
該当なし									

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	卷号	ページ	出版年
Yokota Y, <u>Suzuki S,</u> Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, <u>Suemizu H</u> , <u>Wanibuchi</u> <u>H</u>	o-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice	Toxicology	488	153483	2023
Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kato H, Yamazaki H, <u>Suemizu</u> <u>H</u>	The Unique Human N10- Glucuronidated Metabolite Formation from Olanzapine in Chimeric NOG-TKm30 Mice with Humanized Livers	Drug Metab Dispos	51	480–91	2023
Shiode Y, Kodama T, Shigeno S, Murai K, Tanaka S, Newberg JY, Kondo J, Kobayashi S, Yamada R, Hikita H, Sakamori R, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , 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	77	395-410	2023
Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>	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, Murayama N, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>	Comparison of mouse and human cytochrome P450 mediated-drug metabolising activities in hepatic and extrahepatic microsomes	Xenobiotica	52	229–39	2022

Uehara S, Shimizu M, Ple K, Routier S, Yoneda N, Higuchi Y, <u>Suemizu H</u> , 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
Uehara S, Iida Y, Ida-Tanaka M, Goto M, Kawai K, Yamamoto M, Higuchi Y, Ito S, Takahashi R, Kamimura H, Ito M, Yamazaki H, Oshimura M, Kazuki Y, <u>Suemizu</u> <u>H</u>	Humanized liver TK-NOG mice with functional deletion of hepatic murine cytochrome P450s as a model for studying human drug metabolism	Sci Rep	12	14907	2022
Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Kawai K, Yamamoto M, Kamimura H, Iida Y, Oshimura M, Kazuki Y, Yamazaki H, Hikita H, Takehara T, <u>Suemizu H</u>	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	2022
Tamaki Y, Shibata Y, Hayakawa M, Kato N, Machii A, Ikeda Y, Nanizawa E, Hayashi Y, <u>Suemizu H</u> , Ito H, Ishikawa T	Treatment with hepatocyte transplantation in a novel mouse model of persistent liver failure	Biochem Biophys Rep	32	101382	2022
Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama- Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, <u>Wanibuchi H</u> , 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
<u>Suzuki S</u> , Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, <u>Wanibuchi H</u>	Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung	J Toxicol Pathol	35	247-54	2022

Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El- Gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, Hady R, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, <u>Suzuki S</u> , Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H	Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study	Part Fibre Toxicol	19	30	2022
Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, <u>Wanibuchi H</u> , Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F	OTUD1 deubiquitinase regulates NF-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways	Cell Death Dis	13	694	2022
Narita T, Tsunematsu Y, Miyoshi N, Komiya M, Hamoya T, Fujii G, Yoshikawa Y, Sato M, Kawanishi M, Sugimura H, Iwashita Y, <u>Totsuka Y</u> , 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	628-34	2022
Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Naher S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, <u>Wanibuchi H</u> , Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K	Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype	Brain Commun	4	fcac220	2022
Murai K, Kodama T, Hikita H, Shimoda A, Fukuoka M, Fukutomi K, Shigeno S, Shiode Y, Motooka D, Higuchi Y, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u> , Ryo A, Tahata Y, Makino Y, Yamada R, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T	Inhibition of nonhomologous end joining-mediated DNA repair enhances anti-HBV CRISPR therapy	Hepatol Commun	6	2474-87	2022

Miura T, Uehara S, Shimizu M, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , Yamazaki H	Forward and reverse dosimetry for aniline and 2,6-dimethylaniline in humans extrapolated from humanized-liver mouse data using simplified physiologically based pharmacokinetic models	J Toxicol Sci	47	531-8	2022
Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, <u>Suzuki S</u> , Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, <u>Wanibuchi</u> <u>H</u>	The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling	Cancer Sci	113	2642-53	2022
Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, <u>Suzuki S</u> , Eto F, Kikushima K, <u>Wanibuchi H</u> , Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M	Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation	Sci Rep	12	8718	2022
Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, <u>Totsuka Y</u> , Wakabayashi K, Miyoshi N	Cytotoxic homo- and hetero-dimers of o- toluidine, o-anisidine, and aniline formed by in vitro metabolism	Chem Res Toxicol	35	1625-30	2022

Kabbani M, Michailidis E, Steensels S, Fulmer CG, Luna JM, Le Pen J, Tardelli M, Razooky B, Ricardo- Lax I, Zou C, Zeck B, Stenzel AF, Quirk C, Foquet L, Ashbrook AW, Schneider WM, Belkaya S, Lalazar G, Liang Y, Pittman M, Devisscher L, <u>Suemizu H</u> , Theise ND, Chiriboga L, Cohen DE, Copenhaver R, Grompe M, Meuleman P, Ersoy BA, Rice CM, de Jong YP	Human hepatocyte PNPLA3- 148M exacerbates rapid non-alcoholic fatty liver disease development in chimeric mice	Cell Rep	40	111321	2022
Fukutomi K, Hikita H, Murai K, Nakabori T, Shimoda A, Fukuoka M, Yamai T, Higuchi Y, Miyakawa K, <u>Suemizu H</u> , 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
Deguchi S, Tanaka H, <u>Suzuki S</u> , Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi <u>H</u> , Ohira M	Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma	BMC Cancer	22	699	2022
Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>	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, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>	Oxidative metabolism and pharmacokinetics of the EGFR inhibitor BIBX1382 in chimeric NOG-TKm30 mice transplanted with human hepatocytes	Drug Metab Pharmacokinet	41	100419	2021

Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>	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
<u>Totsuka Y</u> , Watanabe M, Lin Y.	New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci.,	112,	7–15.	2021
Toda A, Shimizu M, Uehara S, Sasaki T, Miura T, Mogi M, Utoh M, <u>Suemizu H</u> , 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
Takahashi M, Hamoya T, Narita T, Fujii G, <u>Totsuka Y</u> , 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
Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama- Yoshikawa A, <u>Wanibuchi H</u> , 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
<u>Suzuki S</u> , Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Wanibuchi H</u> , 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
Sueyoshi K, Komura D, Katoh H, Yamamoto A, Onoyama T, Chijiwa T, Isagawa T, Tanaka M, <u>Suemizu H</u> , 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, <u>Suemizu H</u> , 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
Shimizu K, Gi M, <u>Suzuki S</u> , 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
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, <u>Suemizu H</u> , 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, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , 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, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , Eguchi H, Kokudo N, Mizokami M, Takehara T	Hepatic Stellate Cells in Hepatocellular Carcinoma Promote Tumor Growth Via Growth Differentiation Factor 15 Production	Gastroenterolo gy	160	1741-54 e1716	2021
Morita H, Yasuda M, Yamamoto M, Tomiyama Y, Uchida R, Ka Y, Ogura T, Kawai K, <u>Suemizu H</u> , Hayashimoto N	Pathogenesis of murine astrovirus in experimentally infected mice	Exp Anim	70	355-63	2021

Mori T, Tanaka H, <u>Suzuki S</u> , Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, <u>Wanibuchi H</u> , Ohira M	Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer	Cancer Sci	112	1746-57	2021
Miura T, Uehara S, Shimizu M, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , 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, <u>Suemizu H</u> , 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, <u>Suemizu H</u> , 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, <u>Suemizu H</u> , Yamazaki H	Hepatotoxicological potential of P-toluic acid in humanised-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models	Xenobiotica	51	636-42	2021

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.SJapan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim	Virology	555	71-7	2021
Komiya M, Ishigamori R, Naruse M, Ochiai M, Miyoshi N, Imai T, <u>Totsuka Y</u>	Establishment of novel genotoxicity assay system using murine normal epithelial tissue-derived organoids	Front Genet.	Nov 18;12:	768781.	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, <u>Totsuka Y</u> , 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
Kishimoto K, Shimada A, Shinohara H, Takahashi T, Yamada Y, Higuchi Y, Yoneda N, <u>Suemizu H</u> , 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
Kawata K, Baba A, Shiota M, <u>Wanibuchi</u> <u>H</u> , Baba Y	ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca2+ entry	J Biochem	170	483-8	2021

Kato H, Naiki-Ito A, <u>Suzuki S</u> , 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
Kanbe A, Ishikawa T, Hara A, <u>Suemizu H</u> , 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
Kakehashi A, Chariyakornkul A,_ <u>Suzuki S</u> , Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, <u>Wanibuchi H</u>	Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis- Associated Hepatocarcinogenesis	Cancers (Basel)	13	1216	2021
Kakehashi A, <u>Suzuki</u> <u>S</u> , Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u>	Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis	Cancers (Basel)	13	3613	2021
Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, <u>Suzuki S</u> , 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
Ito R, Katano I, Otsuka I, Takahashi T, <u>Suemizu H</u> , Ito M, Simons PJ	Bovine beta- lactoglobulin-induced passive systemic anaphylaxis model using humanized NOG hIL-3/hGM- CSF transgenic mice	Int Immunol	33	183-9	2021
Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, <u>Suzuki S</u> , 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	22	558	2020

Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>	Human Aldehyde Oxidase 1-Mediated Carbazeran Oxidation in Chimeric TK-NOG Mice Transplanted with Human Hepatocytes	Drug Metab Dispos	48	580-6	2020
Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, <u>Suemizu H</u>	Metabolism of desloratadine by chimeric TK-NOG mice transplanted with human hepatocytes	Xenobiotica	50	733–40	2020
Udagawa C, Sasaki Y, Tanizawa Y, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , 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	15	e0239614	2020
<u>Totsuka Y</u> , Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, <u>Wanibuchi H</u> , Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H	Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane	Ser B Phys Biol Sci	96	180-7	2020
Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, <u>Wanibuchi H</u> , Nakatani T	Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin- resistant bladder cancer	Cancer Lett	479	89–99	2020
Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, <u>Totsuka Y</u> , Wakabayashi K, Miyoshi N	Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis	Chem Res Toxicol	33	1907-14	2020
<u>Suzuki S</u> , Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi <u>H</u>	Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats	J Toxicol Pathol	33	279–85	2020

<u>Suzuki S</u> , 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	429	152325	2020
Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, <u>Wanibuchi H</u> , 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	15	e0238120	2020
Ruan X, Li P, Chen Y, Shi Y, Pirooznia M, Seifuddin F, <u>Suemizu H</u> , 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	11	45	2020
Ogawa SI, Uehara S, Tsunenari Y, Kawai H, <u>Suemizu H</u> , Yamazaki H	Prediction of circulating human metabolites of pemafibrate, a novel antidyslipidemic drug, using chimeric mice with humanized liver	Xenobiotica	50	769–75	2020
Ogawa SI, Shimizu M, Kamiya Y, Uehara S, <u>Suemizu H</u> , 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	35	354–60	2020
Nakayama K, Kamimura H, <u>Suemizu H</u> , 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	35	389–96	2020

Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u> , 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	41	1145-57	2020
Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, <u>Suzuki S</u> , Inaguma S, Takahashi S	A novel model of non- alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant- negative transgenic rats	Arch Toxicol	94	4085-97	2020
Murai K, Hikita H, Kai Y, Kondo Y, Fukuoka M, Fukutomi K, Doi A, Yamai T, Nakabori T, Fukuda R, Takahashi T, Miyakawa K, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , 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	10	941	2020
Miura T, Uehara S, Shimizu M, Murayama N, Utoh M, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , 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	33	634-9	2020
Miura T, Shimizu M, Uehara S, Yoshizawa M, Nakano A, Yanagi M, Kamiya Y, Murayama N, <u>Suemizu</u> <u>H</u> , 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	33	3048-53	2020

Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, <u>Totsuka Y</u> , 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	41	368–76	2020
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, <u>Suemizu H</u> , 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	117	1678-88	2020
Mapoung S, <u>Suzuki S</u> , 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	25	2737	2020
Kawanishi M, Yoneda R, <u>Totsuka Y</u> , Yagi T	Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts	Genes Environ	42	16	2020
Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, <u>Suzuki S</u> , 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	70	835-43	2020

Kamimura H, Uehara S, <u>Suemizu H</u>	A novel Css-MRTpo 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	50	761–8	2020
Kakehashi A, <u>Suzuki</u> <u>S</u> , Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, <u>Wanibuchi H</u>	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	21	7746	2020
Jiang C, Li P, Ruan X, Ma Y, Kawai K, <u>Suemizu H</u> , Cao H	Comparative Transcriptomics Analyses in Livers of Mice, Humans, and Humanized Mice Define Human- Specific Gene Networks	Cells	9	2566	2020
Ito S, Kamimura H, Yamamoto Y, Chijiwa H, Okuzono T, <u>Suemizu H</u> , 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	35	505-14	2020
Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, <u>Suzuki</u> 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	111	1165-79	2020

Fujioka M, <u>Suzuki S</u> ,	Dimethylarsinic acid	Arch Toxicol	94	927-37	2020
Gi M, Kakehashi A,	(DMA) enhanced lung				
Oishi Y, Okuno T,	carcinogenesis via				
Yukimatsu N,	histone H3K9				
Wanibuchi H	modification in a				
	transplacental mouse				
	model				