

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)
分担研究報告書

遺伝子改変動物を用いた内分泌かく乱物質の発がんリスク評価に関する研究

分担研究者 津田洋幸 国立がんセンター研究所 化学療法部 部長

研究要旨 内分泌かく乱物質の発がん修飾作用を乳腺発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いて評価した。食品中のエストロゲン作用物質の genistein および環境中に存在する nonylphenol について検索した。陽性対照に 17 β -estradiol (E2) を選んだ。50 日齢時に 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を胃内投与し、翌日より genistein または nonylphenol をそれぞれ 0、25 および 250ppm 基礎食中加えて雌は 12 週、雄は 20 週まで投与した。その結果、E2 は用量依存的に腫瘍発生の抑制作用を示し、genistein も程度は弱いと同様の抑制作用を示した。対照の野生型でも抑制傾向は見られたが有意では無かった。nonylphenol は現在実験経過中である。以上から、この動物において E2 と genistein は発がん抑制要因として作用した。またこのモデルがエストロゲン作用物質の中期評価系としてと有用である可能性が示された。

A. 研究目的

内分泌環境のかく乱物質への曝露は発がんの重要なリスク因子であるが、内分泌かく乱物質の発がん性あるいは発がん修飾作用の証明されている物質はごく少数にすぎない。その理由は被検物質の発がん性を低容量でも鋭敏に検出し得る *in vivo* 実験系がないことが一因である。本研究では、我々が作成した乳腺発がん高感受性トランスジェニックラットを用いて食品中の内分泌かく乱物質等の乳腺に対する発がん・発がんプロモーションあるいは発がん抑制作用を明らかにし、さらに内分泌環境のかく乱物質の発がん修飾作用を確実に評価出来る鋭敏な実験系を確立することにある。

B. 研究方法

50 日齢の雌雄の Tg ラットに 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を 25mg/kg 胃内投与し、翌日および 60 日目に陽性対照として 17 β -estradiol (E2) を一匹あたり 0、0.01、0.1 および 1mg の用量で背部皮下に挿入し 12 週にて終了した。雄は 18 週で再度ペレットの挿入を行い 20 週にて終了した。genistein の実験

についても 50 日齢の雌雄ラットに DMBA を 25mg/kg 胃内投与し、翌日より genistein または nonylphenol を 0、25 および 250ppm の用量にて基礎食に加えて雌は 12 週まで、雄は 20 週まで投与した。野生型にも感度の対照とした同様の実験を行った。

C. 研究結果

E2 投与では、乳腺腫瘍(腺腫+腺がん)の個数/ラットは、雌で 0mg で 7.5、0.01mg で 5.8、0.1mg で 1.8、1mg で 0.5 であり、用量に相関した減少がみられた(傾向検定で有意)。野生型でも弱い抑制傾向がみられた。また雄でも 0mg で 2.1、0.01mg で 4.5、0.1mg で 1.0、1mg で 1.6 であり抑制された(傾向検定で有意)。以上から、本トランスジェニックラットでは E2 は乳腺発がんを抑制することが明らかとなり、このラットはエストロゲン作用物質の *in vivo* アッセイ系として応用出来る可能性が見いだされた。さらに genistein では、雌で 0ppm で 6.8、25ppm で 4.8、250ppm で 4.3 であり、用量に相関した有意の抑制がみられた(傾向検定で有意)。野生型では 0ppm で 1.4、25ppm で 0.8、250ppm で 0 であり、同様の抑制傾向がみられた。したがって genistein は乳腺発がんを抑制する事が明らかとなった。Nonylphenol についても同様のプロトコールで実験経過中である。

D. 考察

我々の作成したヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットは生後 50 日齢雌に MNU や DMBA の 1 回投与後、僅か 8 ~ 12 週間で全例に乳がんが多発し発がん高感受性が極めて高いことが分かってきた。このラットを用いれば低用量であっても、比較的短期間に種々の物質の乳腺発がん修飾作用についても検索できると考えた。本研究によってエストロゲン作用物質の陽性対照として選んだ E2 は、本 トランスジェニックラットの乳腺発がんを強力に抑制することが明らかとなり、このラットはエストロゲン作用物質の発がん修飾作用の *in vivo* アッセイ系として応用出来ることが明らかとなった。さらに被検物質の genistein は E2 より弱いと同様に抑制作用を示した。genistein はほかの実験系にて乳腺や他の臓器に発がん抑制作用を示すことが見いだされているが、この結果がエストロゲン作用に起因するかについては、今後他のいくつかの環境内分泌かく乱物質について検証が必要である。

E. 結論

本トランスジェニックラットの乳腺発がんは E2 によって抑制することが明らかとなり、この傾向は野生型でも見られたものの、程度は遙かに弱く有意ではなかった。したがってこのラットはエストロゲン作用物質の発がん修飾作用の *in vivo* アッセイ系として応用出来ることが明らかとなった。被検物質の genistein は E2 より弱いが、同様に抑制作用を示した。Genistein によるこの結果がエストロゲン作用に起因するかについては、今後他のいくつかの環境内分泌かく乱物質について検証する予定である。

F. 健康危険情報

エストロゲンと genistein の乳腺発がん抑制作用が示された。前者は促進することが予測されたが逆の結果であった。野生型でも同様の結果であることから、高用量では乳腺発がんを抑制する可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Krutovskikh, V. K., Troyanovsky, S. M., Piccoli, C., Tsuda, H., Asamoto, M. and Yamasaki, H.

Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth *in vivo*. *Oncogene*, 19: 505-513 (2000).

- 2) Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T., Terada, M. and Tsuda, H. Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to *N*-methyl-*N*-nitrosourea mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(2):243-249 (2000).
- 3) Ota, T., Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Yamamoto, F., Matsuoka, Y., Ochiya, T., Sekiya, T., Terada, M., Akaza, H. and Tsuda, H. Transgenic rats carrying copies of the human c-Ha-ras proto-oncogene exhibit enhanced susceptibility to *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(7):1391-1396 (2000).
- 4) Tsuda, H., Sekine, K., Takasuka, N., Toriyama-Baba, H. and Iigo, M. Prevention of colon carcinogenesis and carcinoma metastasis by orally administered bovine lactoferrin in animals. Flohé, L., Niki, E., Whelan, J. (eds.) In: *Bio Factors*, IOS Press, Amsterdam, vol: 12, pp: 83-88 (2000).
- 5) Tsuda, H., Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T. and Terada, M. High susceptibility or transgenic rats carrying the human c-Ha-ras proto-oncogene to chemically-induced mammary carcinogenesis. *Mut. Res.*, 9120: 1-10 (2001).

2. 学会発表

- 1) 鳥山—馬場弘靖、山本扶美、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける初期変化について、第 89 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)
- 2) 内藤暁宏、鳥山-馬場弘靖、朝元誠人、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける自然発生腫瘍の頻度と ras 遺伝子の突然変異、第 89 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)
- 3) 深町勝巳、高須賀信夫、松岡洋一郎、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける DMBA-TPA 皮膚塗布二段階発がんモデル、第 89 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)

- 4) 鳥山—馬場弘靖、山本扶美、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける初期変化について、第 47 回日本実験動物学会総会、徳島、(2000 年 5 月)
- 5) 津田洋幸、深町勝巳、内藤暁宏、高須賀信夫、鳥山—馬場弘靖、松岡洋一郎、ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いたがん化学予防物質の早期検索法の試み、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
- 6) 内藤暁宏、鳥山—馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける大腸、前立腺、乳腺に対する発がん感受性の解析、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
- 7) 深町勝巳、松岡洋一郎、高須賀信夫、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラット (Hras128) における 17 estradiol および 4-*n*-Octylphenol の乳腺発がんへの影響、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
- 8) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山—馬場弘靖、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離と機能解析、第 10 回乳癌基礎研究会、倉敷、(2000 年 8 月)
- 9) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山—馬場弘靖、北中千史、口野嘉幸、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離と機能解析、第 15 回発がん病理研究会、穂高郡、(2000 年 8 月)
- 10) 深町勝巳、松岡洋一郎、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 NLR-3 の単離、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
- 11) 内藤暁宏、鳥山—馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける乳腺部上皮・肉腫腫瘍の組織発生の解析、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
- 12) 鳥山—馬場弘靖、太田智則、落谷孝広、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの MNU による膀胱発がん感受性について、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
- 13) Tsuda, H. Establishment of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats for short-term screening of carcinogens and chemopreventive agents. International Congress of the International Academy of Pathology, Nagoya, (October 2000)
- 14) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山—馬場弘靖、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離、第 53 回日本細胞生物学会、福岡、(2000 年 10 月)
- 15) 内藤暁宏、鳥山—馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸、雄ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける乳腺、大腸、前立腺発癌感受性の解析、第 17 回日本疾患モデル学会、東京、(2000 年 11 月)
- 16) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山—馬場弘靖、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離、第 17 回日本疾患モデル学会、東京、(2000 年 11 月)
- 17) Tsuda, H. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats to short-term environmental carcinogen detection method. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP), Pataya, (November 2000)
- 18) 大西隆仁、韓範錫、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras transgenic (Hras128)ラットにおける乳癌非標的発がん物質による乳腺発がん、第 17 回日本毒性病理学会、淡路島、(2001 年 1 月)
- 19) Han, B. S., Takasuka, N., Kunimoto, T., Takahashi, T. and Tsuda, H. Inhibitory effect of genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. 第 17 回日本毒性病理学会、淡路島、(2001 年 1 月)
- 20) 鳥山—馬場弘靖、山本扶美、外岩戸尚美、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの経胎盤発がん感受性、第 17 回日本毒性病理学会、淡路島、(2001 年 1 月)
- 21) 松岡洋一郎、鳥山—馬場弘靖、深町勝巳、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性についての解析、第

17回日本毒性病理学会、淡路島、(2001年1月
)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

