Bull. Natl Inst. Health Sci., **137**, 6-14（2019） **Special Report**

ペルオキシソーム増殖剤による肝発がん

高木篤也

Studies on the mechanisms of hepatocarcinogenesis by peroxisome proliferators

Atsuya Takagi

Peroxisome proliferators that induce hepatomegaly and peroxisome proliferation in the livers of rodents form a novel class of non-genotoxic carcinogens. Since they show no genotoxicity and no direct interaction with DNA, the mechanisms underlying hepatocarcinogenesis induced by peroxisome proliferators remain poorly understood. The study focused on the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine（8-OHdG）, which is induced by oxidized DNA damages, following exposure to peroxisome proliferators. Furthermore, novel experimental animal models of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis were introduced.

Keywords: Peroxisome proliferator, PPAR α , hepatocarcinogenesis, 8-hydroxydeoxyguanosine

1. はじめに

抗脂血症薬であるクロフィブレートやプラスチック可塑剤であるジエチルヘキシルフタレート（di（2-ethylhexyl）phthalate; DEHP）をラット，マウスなどのげっ歯類に投与するとペルオキシソーム誘導を伴って肝細胞が肥大し，肝発がん作用を有することが知られている[1,2]．このような化学物質はペルオキシソーム増殖剤と呼ばれ，一般に非変異原性か非常に弱い変異原性化合物と考えられている[3]．DEHPや同じくペルオキシソーム増殖剤であるWy-14,643にはイニシエーション作用も無いことが報告されている[4,5]．これらの化合物の化学構造は大きく異なっているが，共通して肝肥大を起こし，肝細胞中のペルオキシソームの数及び大きさの増加が電顕的に確認され，同時にペルオキシソーム酵素活性の増加を起こすことが知られている[6]．ペルオキシソームは真核細胞に広く分布する大きさ1–1.5 μm，一層の限界膜に囲まれた細胞内小器官の一つであり，その内部には脂肪酸酸化酵素，尿酸酸化酵素，アミノ酸酸化酵素など過酸化水素を生成する各種オキシダーゼと過酸化水素を分解するカタラーゼが含まれている[7]．1990年に核内受容体であるperoxisome proliferator-activated receptor（PPAR）が発見され[8]ペルオキシソーム増殖剤はPPARに結合して作用することが明らかとなった．PPARには三つのアイソフォームがあり，α，β/δ，γが同定され，中でもPPARαは脂質の恒常性維持に重要であり，細胞増殖，分化にも重要な役割を果たしている[9]．本論文ではペルオキシソーム増殖剤によるげっ歯類の肝発がん研究として，酸化的DNA傷害の実験結果を紹介すると共に，近年実施された遺伝子改変マウスを用いた研究，ペルオキシソーム増殖剤による肝発がんのリスク評価の現状について紹介する．

To whom correspondence should be addressed:
Atsuya Takagi: Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan Tel+81-44-270-6639; Fax +81-44-270-6706; E-mail:takagi@nihs.go.jp

2. 肝発がん機序

2.1 酸化的DNA損傷

ペルオキシソーム増殖剤投与により，主たる過酸化水素生成系である脂肪酸酸化酵素活性は20–30倍に増加するが，カタラーゼは2倍程度にしか増加しないことが知られている[10]．そこで，ペルオキシソーム増殖剤の肝発がん機序としてペルオキシソームより過剰に産生され，ペルオキシソーム外に漏出した過酸化水素に起因する酸化的DNA傷害の関与が考えられた．また，ペルオキシソーム増殖剤投与により，老化色素で活性酸素と脂質，タンパク質の反応産物と考えられているリポフスチンが肝臓中に蓄積し，その蓄積量と肝発がんの強さが相関すること[11]，抗酸化剤の同時投与でペルオキシソーム

による肝発がんが抑制されることが報告されている[12]．これらの実験事実は活性酸素による酸化的DNA傷害の発がんへの関与を示唆するものである．1984年に酸素ラジカルによりin vitroでDNA中に損傷塩基の一つである8-hydorxy-deoxyguanosine（8-OHdG）が生成することが国立がんセンターの葛西宏先生（現，産業医科大学名誉教授）により見出された[13]（Fig.1）．そこで，8-OHdGを酸化的DNA傷害の指標とし，各種ペルオキシソーム増殖剤の短期あるいは長期投与試験を実施し，臓器DNA中の8-OHdG測定を行い，ペルオキシソーム増殖と酸化的DNA傷害及び発がんとの関連性について検討した．

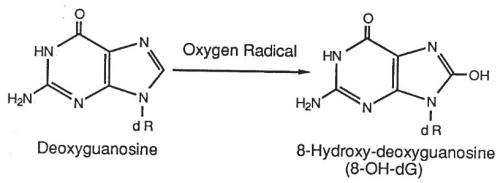

Fig.1. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position

2.1.1　単回投与試験：

雄F-344ラットにペルオキシソーム増殖剤であるaluminium clofibrateを0.5 g/kg体重，simfibrateを2.0 g/kg体重，及びDEHP（Fig.2）を30 g/kg体重の用量で単回経口投与したところ，投与48時間後にaluminium clofibrate，simfibrateで有意に肝8-OHdGが増加した．一方，DEHPでは有意な8-OHdGの増加は認められず，また，３物質とも腎8-OHdGの増加は起こさなかった（未発表データ）．

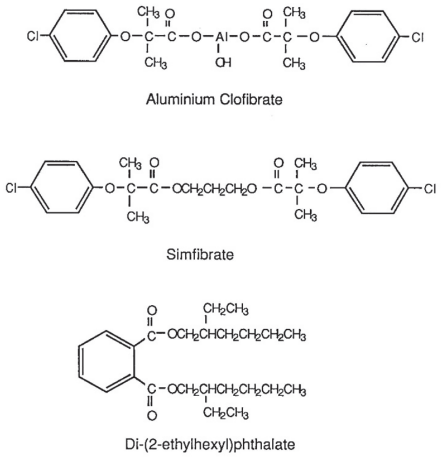

Fig.2. Chemical structures of aluminium clofibrate, simfibrate and di (2-ethylhexyl) phthalate

2.1.2　８日間連続投与試験：

雄F-344ラットにaluminium clofibrateを2.5 g/kg体重，simfibrateを1.0 g/kg体重，及びDEHPを7.5 g/kg体重の用量で８日間連続経口投与したところ，３種の化合物とも有意に肝8-OHdGが増加した．一方，３物質とも腎8-OHdGの増加は起こさなかった[14]．

2.1.3　12カ月間混餌投与試験：

雄F-344ラットにaluminium clofibrate, simfibrateをそれぞれ，飼料中に0.5%の濃度で添加，DEHPを発がん用量である1.2%の濃度[15]で添加し，12カ月間混餌投与したところ，３種の化合物とも投与１カ月後で有意に肝8-OHdGが増加し，その後も有意な増加あるいは増加傾向を示した．一方，３物質とも腎8-OHdGの増加は投与１～９カ月の間は起こさなかったが，12カ月では有意な8-OHdGの増加がみられた[16]．

2.1.4　フタル酸類のDEHPとDEHAの２週間混餌投与試験

雄F-344ラットにペルオキシソーム増殖剤で肝発がん作用があるDEHP，di（2-ethylhexyl）adipate（DEHA）[17]を飼料中にそれぞれ発がん用量である1.2%，2.5%，とペルオキシソーム増殖作用が無く，肝発がん作用が無いphthalic anhydride（PA）（無水フタル酸）を1.5%の濃度で添加し，２週間混餌投与したところ，DEHP，DEHAともに投与１及び２週後で有意に肝8-OHdGが増加したが，PAでは肝8-OHdGの増加はみられなかった．また，３物質とも腎8-OHdGの増加は起こさなかった[18]．

2.1.5　フッ素系脂肪酸の単回及び２週間混餌投与試験

Perfluorooctanoic acid（PFOA），perfluorodecanoic acid（PFDA）は直鎖パーフルオロ脂肪酸で防水剤，床のワックスなどに用いられている[19,20]．また，これら化合物はペルオキシソーム誘導能があることが知られている[21]．そこでPFOA，PFDAとその構造類似体でペルオキシソーム誘導能のないperfluorobutyric acid（PFBA）とperfluorooctane（PFO）をラットに短期間投与し，ペルオキシソーム誘導と8-OHdG生成との関係について調べた（Fig.3）．

Perfluorodecanoic acid (PFDA)	$CF_3(CF_2)_8COOH$
Perfluorooctanoic acid (PFOA)	$CF_3(CF_2)_6COOH$
Perfluorobutyric acid (PFBA)	$CF_3(CF_2)_2COOH$
Perfluorooctane (PFO)	$CF_3(CF_2)_6CF_3$

Fig.3. Chemical structures of PFDA, PFAO, PFBA and PFO

・PFOA，PFBAおよびPFOを6週齢のF-344雄ラットに100 mg/kgの用量で単回腹腔内（ip）投与した．肝臓重量は投与，1，3，5，8日目に有意に増加し，肝臓DNAにおける8-OHdGレベルは投与3，5，8日目に有意な増加がPFOAにおいて観察された．PFBA，PFOでは肝重量増加，肝8-OHdG増加とも認められなかった．

・ラット0.02% PFOAまたは0.1%PFDAを含有する粉末飼料を2週間混餌投与すると，両化学物質を投与したラットにおいて肝臓重量および肝臓DNA中の8-OHdGレベルが有意に増加した．一方，腎臓DNA中の8-OHdGレベルの増加はどちらの化学物質でも見られなかった．この結果は，他のペルオキシソーム増殖剤（フタル酸エステル可塑剤および脂質低下薬）と同様に，PFOAおよびPFDAが誘発するペルオキシソーム増殖が，臓器特異的酸化的DNA損傷をもたらすことを示唆するものである[22]．

2.2 遺伝子改変マウスを用いた肝発がん研究

2.2.1 PPARα欠損マウスを用いたWy-14,643の発がん性試験

ペルオキシソーム増殖剤Wy-14,643による肝発がんがPPARαを介しているか調べるためPPARα欠損マウスを用いて，複製DNA合成および肝発がんに対するWy-14,643の影響が調べられている．野生型およびPPARα欠損雄マウスに，Wy-14,643を含まない，または0.1%Wy-14,643を含む飼料のいずれかを1週間，5週間または11カ月間混餌投与した．1週間または5週間Wy-14,643を与えた野生型マウスは，対照群と比較して肝臓での複製DNA合成が増加したが，PPARα欠損マウスでは，複製DNA合成の増加は認められなかった．11カ月後，Wy-14,643を与えられた野生型マウスでは腺腫および肝細胞がんを含む複数の肝腫瘍を100%発生したが，Wy-14,643を与えられたPPARα欠損マウスでは肝腫瘍は見られず，肝の変異細胞巣にも影響が見られなかった．この結果，複製DNA合成および肝発がんに対するWy-14,643の効果がPPARαによって媒介されることが明らかとなった[23]．

2.2.2 PPARα欠損マウスを用いたDEHPの発がん性試験

可塑剤であるDEHPによる肝発がんがPPARαを介して誘導されるかどうかを明らかにするために，野生型SV/129マウスとSV/129のPPARα欠損マウスを用いた発がん性試験が実施された[24]．野生型及びPPARα欠損マウスに，それぞれDEHPを0，0.01または0.05%の濃度で飼料に添加し，22カ月間混餌投与した．その結果，0.05% DEHP投与群での肝腫瘍（肝細胞腺腫，肝細胞がん，胆管細胞がんを含む）の発生率は，同様にばく露された野生型マウス（10.0%）よりもPPARα-欠損マウス（25.8%）の方が高かった．この結果は，PPARα非依存性のDEHP誘発肝腫瘍発生の経路の存在を示唆していると著者らは結論した．また，肝臓の8-OHdGのレベルは両遺伝子型のマウスでDEHPの用量依存的に増加したが，増加の程度は野生型マウスよりもPPARα-欠損マウスで高かった．NFκBレベルもまた，PPARα欠損マウスにおいて用量依存的に有意に増加した．プロトオンコジーンc-jun-mRNAとc-fos-mRNAが0.05% DEHP含有飼料を与えたPPARα-欠損マウスで有意に誘導された．一方，0.01% DEHP含有飼料を与えた野生型マウスでもこれらの遺伝子が誘導されたが用量相関性は見られなかった．これらの結果は，DEHP曝露によって誘発される酸化ストレスの増加が炎症の誘発および/またはプロトオンコジーンの発現をもたらし，その結果PPARα-欠損マウスにおいて腫瘍形成の発生率が高くなる可能性があることを示唆していると結論した．

2.2.3 PPARα欠損マウスにおけるトリクロロエチレン3週間投与試験

トリクロロエチレンを1,500 mg/kgの用量で野生型およびPPARα欠損マウスに3週間強制経口投与したところ，PPARα欠損マウスで瀕死状態になったが，野生型マウスではそのようなことは無かった．このことは，PPARαを介さない毒性作用が存在することを示唆するものである．また，トリクロロエチレンの代謝産物であるジクロロ酢酸を2 g/Lの濃度で飲水投与したところ，野生型マウスで肝比重量増加が認められ，同様にPPARα欠損マウスでも肝比重量増加が認められた．このことも同様にジクロロ酢酸による肝比重量増加がPPARαを介していないことを示唆するものであると結論した[25]．

2.2.4 肝細胞限局構成的活性型PPARα発現トランスジェニックマウス

肝細胞に限局したPPARαの活性化が肝細胞がんを誘発するのに十分であるかどうかは明らかでない．このために，強力なウイルス転写活性化因子VP16をマウスPPARα cDNAに融合させて，リガンドの非存在下でPPARα応答遺伝子を構成的に活性化する転写因子を作製し，これを導入した活性型PPARαを肝細胞に特異的に発現するトランスジェニックマウス（LAP-VP16PPARαマウス）が作製された．トランスジェニックマウスは，血清脂肪酸の有意な減少，PPARα標的遺伝子の脂肪酸酸化酵素の誘導を含む，ペルオキシソーム増殖剤で処置された野生型マウスを模倣する様々な応答を示した．しかしながら，1年以上飼育したトランスジェニックマウスは，ペルオキシソーム増殖および肝細胞増殖を示したにもかかわらず肝細胞がんを発症しなかった．このことはPPARαの肝細胞での活性化が肝がんを誘発するのに十分ではないことを示すものであると結論した．このトランスジェニックマウスとは対照的に，野生型マウスではペルオキシソーム増殖剤は肝非実質細胞（NPC）の増殖を活性化した．したがって，肝臓NPCの活性化および/または関連する分子事象は，ペルオキシソーム増殖因子誘発性の肝発がんに関連しているかもしれないと考察した[26]．

2.2.5 PPARα欠損マウス，NADPHオキシダーゼ欠損マウス

DEHPはラットにおいて肝臓のクッパー細胞中のNADPHオキシダーゼを介してOHラジカルを生成することが報告されている[27]．しかしながら，ペルオキシソーム増殖剤によるマウス肝臓でのα-（4-ピリジル-1-オキシド）-N-tert-ブチルニトロン（POBN）ラジカル付加物の持続的形成はPPARαに依存するが，NADPHオキシダーゼには依存しないことが以下に報告された[28]．マウスにペルオキシソーム増殖剤のWy-14,643（0.05%W/W）またはDEHP（0.6% W/W）のいずれかを含有する飼料を3週間まで混餌投与した．電子スピン共鳴を用いてPOBNラジカル付加物を測定することにより，肝臓由来ラジカル生成を胆汁サンプル中で評価した．その結果，Wy-14,643及びDEHPともマウス肝臓においてPOBNラジカル付加物の持続的増加を引き起こし，その作用はWy-14,643がDEHPのそれよりも大きかった．これらのラジカルの発生源を明らかにするために，NADPHオキシダーゼ欠損（p47phox-null）およびPPARα-欠損マウスにWY-14,643を投与してその影響を調べた．WY-14,643で3週間投与したPPARα欠損マウスではラジカルの増加は観察されなかったが，p47phox欠損マウスでの応答は野生型マウスと類似していた．これらの結果は，NADPHオキシダーゼではなく，PPARαが，げっ歯類の肝臓におけるペルオキシソーム増殖剤によって引き起こされるPOBNラジカル産生の持続的な増加にとって重要であることを示しており，クッパー細胞におけるペルオキシソーム増殖剤誘導性POBNラジカル産生は，マウス肝臓におけるこれらの化合物に対する急性応答に限定されるかもしれないと結論した．なおDEHPについてはPPARα欠損マウス，NADPHオキシダーゼ欠損マウスを用いて調べられていないので，Wy-14,643で認められた所見がDEHPにも当てはまるのかは不明である．

2.2.6 PPARα欠損マウスを用いたマイクロアレイ解析

PPARαを介した肝臓の細胞増殖の促進や発がんに係わる経路を同定するため，マイクロRNA（miRNA）について網羅的に検索された．野生型及びPPARα欠損マウスに0.1%の濃度のWy-14,643を飼料に添加して2週間投与した．肝におけるmiRNAの発現をマイクロアレイ法により調べたところ，がん抑制能を有するlet-7Cが減少していることが明らかとなった．この減少はPPARα欠損マウスでは認められなかった．さらに，let-7Cがc-mycの3'-UTRを介してRNAを分解することを明らかにした．また，miRNAのプロファイルはc-Mycにより制御されることが知られているmiRNA（mir-106a，mir-106b，mir-17-5p，mir-20a，mir-20b）を増加させた．これらの中で，mir-17-92ポリシストロン性クラスターに属するmiRNAであるmir-17-5pは細胞増殖において重要であることが示されている[29–31]．また，このmir17-92ポリシストロンは細胞周期の亢進，腫瘍細胞のアポトーシスの阻害，血管新生の増加に関与することが知られている[29–31,32]．ChIPアッセイの結果から，mir-17-92ポリシストロンがPPARαを介したc-Mycにより直接制御されることが示された．さらに，let-7Cはヒト型化PPARαマウスではwy-14,643により減少しなかった．結論として，PPARαによって調節される新規シグナル伝達カスケードが提案された．Wy-14,643は，let-7Cの発現を阻害し，その後c-mycの増加が観察される．c-mycの増加に続いて，mir-17-92ポリシストロニッククラスターのレベルが増加する．これらのことから，この経路は肝細胞増殖から腫瘍形成に至らす可能性があると結論した[33]．

2.2.7 ヒト型PPARα導入トランスジェニックマウス

PPARαによって媒介されるペルオキシソーム増殖剤に対するげっ歯類とヒトとの反応の種差を調べるために，PPARα-ヒト化トランスジェニックマウスがP1ファージ人工染色体（PAC）ゲノムを用いて作製され，

このトランスジェニックマウスは，hPPARα^{PAC}と命名され，PPARα 欠損マウスと少なくとも4世代にわたって交配させた．このhPPARα^{PAC}マウス（マウスPPARα欠損，以後省略）において，ヒトPPARα遺伝子（hPPARα）は，野生型マウスにおけるマウスPPARαと同様に，高脂肪酸異化作用を有する組織において発現し，絶食時に誘導された．ペルオキシソーム増殖剤であるフェノフィブラートを投与すると，hPPARα^{PAC}マウスは，ペルオキシソーム増殖，血清トリグリセリドの低下，ならびに肝臓，腎臓，および心臓における脂肪酸代謝に関与する酵素をコードするPPARα標的遺伝子の誘導を含む，野生型マウスと同様の応答を示した．hPPARαは，脂肪酸代謝を調節し血清トリグリセリドを低下させることにおいてマウスPPARαと同じように機能する．しかしながら，hPPARα^{PAC}マウスにフェノフィブラートを投与しても有意な肝肥大および肝細胞増殖は引き起こさなかった．このことは，マウスPPARαによって誘導される肝細胞増殖応答のメカニズムは，PPARαの脂質代謝への影響とは異なることを示すものである．さらに，Wy-14,643投与によりlet-7C miRNAの減少とc-mycの増加が野生型マウスで見られたのに対して，hPPARα^{PAC}マウスではこれらの変化は見られなかった[34]．

2.2.8　肝細胞特異的Mycコンディショナルノックアウトマウス

マウスの肝細胞増殖および肝発がんにおけるMycの関与を調べるために，肝細胞特異的Myc欠損マウスを血清アルブミンプロモーターの制御下でタモキシフェン誘導性Cre-ER（T2）リコンビナーゼ系を使用して作製した．肝細胞増殖は，ペルオキシソーム増殖剤Wy-14,643を投与することによって評価した．肝がん形成におけるMycの役割を評価するために，ジエチルニトロソアミン（DEN）誘発肝がんモデルを使用した．タモキシフェン投与は，Myc$^{fl/fl,ERT2\text{-}Cre}$マウスの肝細胞特異的にMycの欠損を誘導した．Myc$^{fl/fl,ERT2\text{-}Cre}$マウスは，既知の肝細胞増殖刺激作用のあるWy-14,643で処置した場合，Myc$^{fl/fl}$マウスと比較して低い肝臓／体重比を示し，肝細胞増殖を抑制した．細胞周期制御遺伝子，DNA修復遺伝子，およびMyc標的遺伝子miRNAの肝臓での発現は，Wy-14,643処理Myc$^{fl/fl}$マウス肝臓では増加したが，Myc$^{fl/fl}$，ERT2-Creマウスでは見られなかった．しかしながら，Myc$^{fl/fl,ERT2\text{-}Cre}$マウスとMyc$^{fl/fl}$マウスとの間でWy-14,643の脂質低下効果に差は観察されなかった．これは脂質低下に関与するいくつかのPPARα標的遺伝子の発現に差がないことと一致する．脂肪酸β酸化．さらに，DEN肝がん実験では，このMyc$^{fl/fl,ERT2\text{-}Cre}$マウスはMyc$^{fl/fl}$マウスと比較して腫瘍形成の発生率が著しく低かった[35]．なお，この研究ではWy-14,643による肝発がんに対するMyc$^{fl/fl,ERT2\text{-}Cre}$マウスについては報告されていない．

2.2.9　PPARα欠損マウスの肝発がん性

PPARαリガンドは卵巣がん，大腸がん，肝細胞がん等の多くのがんの増殖を抑制することが報告されている[36–38]．しかしながら，肝発がんにおけるPPARαの役割は不明のままである．肝細胞がん（HCC）におけるPPARαの機能的意義を調べた．PPARα欠損マウスは，野生型同腹児と比較して6カ月でDEN誘導HCCに対してより感受性が高かった（80％対43％，P<0.05）．HCC細胞では，TUNEL陽性アポトーシス細胞は，野生型マウスよりもPPARα 欠損マウスにおいて有意に少なかった（P<0.01）．これは，活性型カスパーゼ-3およびカスパーゼ-7タンパク質発現の減少と相関していた．Ki-67染色により，PPARα欠損マウスにおいて細胞増殖が増加したことを明らかにし（P<0.01），それに付随してサイクリンD1の増加およびp15の低下がみとめられた．さらに，ヒト肝がん培養細胞（HepG2，Huh-7）におけるPPARαの異所性発現は細胞増殖を有意に抑制し，アポトーシスを誘導した．PPARαの抗腫瘍機能は，NF-κBプロモーター活性の阻害，リン酸化p65，リン酸化p50およびBCL2レベルの減少，ならびにIkBαタンパク質の増強によって示されるように，NF-κBによって媒介された．また，クロマチン免疫沈降により，PPARαがIkBαプロモーターに直接結合することが確認された．結論として，PPARα欠損はDENによりイニシエートされたHCCに対する感受性を増強する．PPARαは，細胞増殖を阻害し，IkBαおよびNF-κBシグナル伝達経路を直接標的とすることによってアポトーシスの誘導と細胞増殖の抑制により腫瘍細胞増殖を抑制すると結論された[39]．

2.2.10　PBP／MED1の肝臓特異的ノックアウトマウス

核内受容体コアクチベーター（peroxisome proliferator-activated receptor binding protein（PBP）/mediator subunit 1（MED1））は転写複合体の重要なコンポーネントであり，マウスにおいてこの遺伝子をノックアウトすると胚の致死率が高まることが知られている．このPBP/MED1の肝臓特異的ノックアウトマウスにより（PBP/MED1（DeltaLiv）マウス），PBP／MED1が肝再生及びPPARαリガンドWy-14,643誘導肝発がんに必須であることが明らかにされた．遺伝毒性化学発がん物質であるジエチルニトロソアミン（DEN）によるイニシエーションとフェノバルビタール（PB）によるプロモーション肝発がんモデルにおけるPBP/

MED1の役割を調べた．1，4および12週目のプロモーション過程にPBP/MED1$^{\Delta Liv}$欠損マウスにおいて，CreによるPBP/MED1遺伝子の欠失を回避したわずかな残存PBP/MED1陽性肝細胞では著しい増殖が認められたが，PBP/MED1欠損肝細胞では増殖は認められなかった．肝細胞がん（HCC）は，PBによるプロモーションの1年後，DENでイニシエーションしたPBP/MED1$^{fl/fl}$およびPBP/MED1$^{\Delta Liv}$マウスに発生した．興味深いのは，PBP/MED1$^{\Delta Liv}$マウスにおいて発生した全てのHCCがPBP/MED1陽性であったことである．どの腫瘍もPBP/MED1陰性ではなく，PBP/MED1が欠損している肝細胞はがん化に感受性ではないことを意味していた．これらの結果は，PBP/MEDがマウスにおけるHCCの発生に必須であることを示している[40]．

3. 発がん性評価の現状

3.1 DEHPのPPARαを介した肝発がんに関するGuytonらの論文

Guyton KZら（2009）はPPARα欠損マウスにおいてDEHP投与により肝がんが発生すること．及び，Yang et al.（2007）の活性型PPAR-αトランスジェニックモデルにおいて，肝細胞増殖とペルオキシソームの増殖は起こるが，それ自体では肝腫瘍形成を引き起こすのに不十分であることから，PPARα活性化によるmode of action（MOA；作用機序）がげっ歯類肝発がんに必要または十分であるかどうかについて疑問を投げかけた[41]．

3.2 Guytonらの論文に反対するCortonらの論文

Corton JCら（2018）は多くのPPARα活性化物質に関連するMOAで特定されている重要な事象（KE；Key Event）は，PPARα活性化（KE1），細胞増殖経路の変化（KE2），肝細胞の増殖と生存の刺激（KE3），および前がん細胞の選択的クローン拡大（KE4）であり，それらが，肝細胞腺腫およびがんの増加（KE5）に至らし，また，調節因子としては酸化ストレスの増加およびNF-κBの活性化が含まれるとした．さらにPPARα活性化剤は，PPARα活性化の下流のKEの応答における生物学的差異のために，ヒトにおいて肝臓腫瘍を誘発する可能性は低いとした．Guytonらが，DEHPはPPARα欠損マウスにおいて肝腫瘍が誘発されたことから，野生型マウスにおいて生じた肝腫瘍（他の研究からの）はPPARα非依存性であると主張したことに対してCortonらは，PPARα欠損マウスにおける肝腫瘍が，その背景となる脂肪肝および炎症の増強，またはCARの活性化を介して起こることを示し，これらは両方ともDEHPを投与した野生型マウスには関係ないとした．次いで，活性型PPARαトランスジェニックマウスで肝細胞増殖が誘発されるが肝腫瘍は誘発されなかったことについては，活性型PPARαトランスジェニックマウスにおけるPPARαの活性化が肝細胞増殖をもたらすメカニズムは，野生型マウスにおけるPPARα増殖剤ばく露によって活性化されるメカニズムと同じではないとCortonらは主張した．また，野生型マウスは，がん原遺伝子c-Mycを含む経路の活性化およびNPCの増殖を必要とし，これらはいずれもVP16PPARα融合タンパク質を発現するマウスでは起こらない．したがって，VP16PPARα融合タンパク質によって引き起こされる細胞増殖が肝がんを引き起こさないことは驚くことではないとして反論した[42]．

3.3 IARCによるDEHPの評価

IARCのモノグラフ77（2000）では，ラットやマウスの反復投与試験でみられるペルオキシソームの誘導が，霊長類では必ずしも生じないこと等から，Group 3（ヒトに対する発がん性について分類できない）に分類していた．しかしモノグラフ101（2012）では，PPARαがDEHPによるラットやマウスへの作用において重要な役割を果たすが，動物のモデルやヒトのデータから，DEHPによるラットやマウスの肝臓腫瘍発生のメカニズムには，多数のシグナルや経路が関与していることが示唆されることから，ヒトとの関係が除外できないとされ，Group 2B（ヒトに対する発がんの可能性がある）と分類された[43]．

3.4 日本の食品安全委員会によるDEHPの評価

日本の食品安全委員会では，げっ歯類におけるDEHPによる肝発がんの主なメカニズムはPPARαを介した経路によるものと考えられているが，げっ歯類とヒトでの種差が大きく，この経路を介した発がんをヒトに外挿することは困難であるとしている．一方，最近PPARα以外にもDEHPによる肝発がんには複数の作用経路が提唱されている．しかし，そのうちどの経路がどのようにげっ歯類の発がんに関与しているかは現時点では不明であるため，これらの経路を介したげっ歯類の発がんをヒトに外挿できるか否かは不明である．また，ヒトではDEHPによる発がん作用が現時点では認められていない．したがって，ヒトの食品健康影響評価においてげっ歯類のデータから発がん性を指標としたNOAELをヒトに適用してTDI設定に用いることは難しいとしている[44]．

3.5 日本の食品安全委員会によるトリクロロエチレン，テトラクロロエチレン，トリクロロ酢酸，ジクロロ酢酸の評価

有機溶剤であるトリクロロエチレン，テトラクロロエチレン並びにそれらの代謝物でもあるトリクロロ酢酸，ジクロロ酢酸はラットあるいはマウスで肝がんを発生させ，その機序の一つとしてペルオキシソーム増殖との関連が指摘されている．しかしながら，日本の食品安全委員会ではこれらの有機溶剤の発がん性には変異原性やペルオキシソーム増殖以外の経路の存在も否定できないため，TDI設定根拠として肝がんが採用されている．なお，テトラクロロエチレンについては，マウス経口投与試験で肝細胞がんの発生率増加が見られたが，データの信頼度が低いため，TDI設定根拠に採用されていない[45-48]．

4. まとめ

本論文ではペルオキシソーム増殖剤による発がん研究として，酸化的DNA傷害に加え，遺伝子改変マウスを用いた研究，ペルオキシソーム増殖剤による肝発がんのリスク評価の現状について紹介した．ペルオキシソーム増殖剤による発がんメカニズムとして現在考えられているのは，PPARαを介した細胞増殖が変異細胞のクローナルな増殖を誘発し肝細胞腺腫，肝がんに至らせると解釈されている．酸化的ストレスについては，いくつのペルオキシソーム増殖剤では肝で8-OHdGの増加を示し，発がんへの関与が示唆されているが修飾要因として位置づけられている．１年間のペルオキシソーム誘導剤投与試験で，投与12カ月目に肝のみならず腎の8-OHdGも増加したことは興味深い．加齢によりペルオキシソーム増殖剤による酸化的ストレスが増強されてくる可能性がある．ペルオキシソーム増殖剤による肝発がんについては遺伝子改変マウスを用いた研究が多くなされている．PPARα欠損マウスではWy-14,643の発がん性が認められなかったことから，この物質による肝発がんがPPARαを介していることが証明された．一方，DEHPの場合はPPARα欠損マウスで肝発がんがみられた．このことからGuytonらはPPARα活性化が肝発がんに必要または十分であるかどうかについて疑問を投げかけた．これに対して，PPARα欠損マウスでの肝発がん感受性が増加することを根拠としてCortonらは反論した．事実，PPARα欠損マウスではDENによる肝発がん感受性が亢進した．また，PPARα欠損マウスでのDEHP投与実験において，検体未投与のPPARα欠損マウスにおいて肝8-OHdGが野生型より高く，DEHP投与によりさらに上昇したことから，PPARα欠損マウスでは酸化的ストレスが亢進していることが考えられた．ペルオキシソーム増殖剤によるPPARαを介した肝発がんの分子メカニズムについてはlet-7Cの減少によるmycの増加が原因とされている．また，mycの増加により，下流のmir-17-92ポリシストロニッククラスターの増加が関与する可能性がある．なお，Mycの肝特異的欠損マウスを用いた試験ではDENによる肝発がんが低下することが報告されたが，肝心のペルオキシソーム増殖剤の肝発がん性については報告されていなかった．これは，あくまで推測であるが，CreによるmycのDNA欠損を回避した細胞がペルオキシソーム増殖剤の長期投与により選択的に増殖したことが考えられる．発がん性の評価については日本の食品安全委員会はDEHPの肝発がんについてはヒトへの外挿性が不明であるためTDI設定に採用していない．一方，有機溶剤のトリクロロエチレン，テトラクロロエチレン，トリクロロ酢酸，ジクロロ酢酸の肝発がんについてはペルオキシソーム増殖以外の経路も考えられるため，TDI設定のエンドポイントとして肝発がんが採用されている．以上述べたように，ペルオキシソーム増殖と肝発がんについてのヒトへの外挿性についてはケースバイケースで判断されている現状である．最後に，酸化的DNA傷害と発がんとの関連についての知識は，その後，アスベストと良く似た形状の多層カーボンナノチューブによる中皮腫発がんの研究を行った際に大いに役立ち，当時ご指導いただいた元毒性部長の黒川雄二先生（のちに安全性生物試験研究センター長）に改めて感謝し，著者の特論をここで終わりとしたい．

5. 引用文献

1）Reddy JK, Qureshi SA: Tumorigenicity of the hypolipidemic peroxisome proliferator ethyl-alpha-p-chlorophenoxyisobutyrate(clofibrate)in rats. *Br J Cancer*. 1979; 40: 476-482.

2）National Toxicology Program(NTP), Carcinogenesis bioassay of di(2-ethyl-hexyl)phthalate in F344 rats and B6C3F1 mice. Publication No.(NIH)81-1773, 1982.

3）Stott WT: Chemically induced proliferation of peroxisomes: implications for risk assessment. *Regl Tox Pharm*. 1988; 8: 125-159.

4）Williams GM, Maruyama H and Tanaka T: Lack of rapid initiating, promoting or sequential syncarcinogenic effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate in rat liver carcinogenesis. Carcinogenesis. 1987; 8: 875-880.

5）Cattley, RC, Marsman DS and Popp JA: Failure of the peroxisome proliferator Wy-14,643 to initiate growth-selective foci in rat liver. *Toxicology*. 1989; 56: 1-7.

6）Reddy JK, Warren JR, Reddy MK et al.: Hepatic and renal effects of peroxisome proliferators: biological implications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982; 386: 81-110.
7）Hawkins JM, Jones WE, Bonner FW et al.: The effects of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. *Drug. Metabolism Rev.* 1987; 18: 441-515.
8）Issemann I, Green S.: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990; 347: 645-650.
9）Shearer BG, Hoekstra WJ: Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science. *Curr Med Chem.* 2003; 10: 267-280.
10）Lazarow PB and DeDuve C: A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci.* 1976; 73: 2043-2046.
11）Conway JG, Tomaszewski TE, Olson MJ et al.: Relationship of oxidative damage to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl) phthalate and Wy-14,643. *Carcinogenesis.* 1989; 10: 513-519.
12）Rao MS, Lalwani ND, Watanabe TK: Inhibitory effect of antioxidants ethoxyquin and 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on hepatic tumorigenesis in rats fed ciprofibrate, a peroxisome proliferator, *Cancer Res.* 1984; 44: 1072-1076.
13）Kasai H, Nishimura S: Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 1984; 12: 2137-2145.
14）高木篤也，佐井君江，梅村隆志ら，ペルオキシソーム増殖剤経口投与によるラット肝DNA中の8-ヒドロキシデオキシグアノシンの生成，*医学の歩み*，1989; 149: 65.
15）National Toxicology Program(NTP), Carcinogenesis bioassay of di(2-ethyl-hexyl)adipate in F344 rats and B6C3F1 mice. Publication No.(NIH)81-1768, 1981.
16）Takagi A, Sai K, Umemura T et al.,:Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators; di(2-ethylhexyl)phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate, *Cancer Lett.* 1990; 53: 33-38.
17）National Toxicology Program(NTP), Carcinogenesis bioassay of di(2-ethyl-hexyl)phthalate in F344 rats and B6C3F1 mice. Publication No.（NIH)81-1773, 1982.
18）Takagi A, Sai K, Umemura T et al.: Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate. *Jpn J Cancer Res.* 1990; 81: 213-215.
19）Bryce HG: Industrial and utilitarian aspects of fluorine chemistry. In: Fluorine Chemistry, vol. V, pp.297-498. Editors: Simons, JH, New York Academic Press., 1964.
20）Shinoda K, Nomura T: Miscibility of fluorocarbon and hydrocarbon surfactants in micelles and liquid mixtures: Basic studies of oil repellent and fire extinguishing agents. *J Phys Chem.* 1980; 84: 365-369.
21）Kkeda T, Aiba K, Fukuda K et al., The induction of peroxisome proliferation in rat liver by perfluorinated fatty acids, metabolically inert derivatives of fatty acids. *J Biochem.* 1985; 98: 475-782.
22）Takagi A, Sai K, Umemura T et al.:Short-term exposure to the peroxisome proliferators, perfluorooctanoic acid and perfluorodecanoic acid, causes significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats. *Cancer Lett.* 1991; 57: 55-60.
23）Peters JM, Cattley RC, Gonzalez FJ.: Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 2029-2033.
24）Ito y, Yamanoshita O, Asaeda N, et al.: Di(2-ethylhexyl) phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor α -independent pathway. *J Occup Health.* 2007; 9: 172-182.
25）Laughter AR, Dunn CS, Swanson CL：Role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)in responses to trichloroethylene and metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate in mouse liver, Toxicology, 2004; 203:83-98.
26）Yang Q, Ito S, Gonzalez FJ: Hepatocyte-restricted constitutive activation of PPAR α induces hepatoproliferation but not hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2007; 28: 1171-1177.
27）Rusyn I, Kadiiska MB, Dikalova A et al.: Phthalates rapidly increase production of reactive oxygen species in vivo: Role of Kupffer cells. *Mol Pharmacol.* 2001; 59:

744-750.

28）Woods CG, Burns AM, Maki A et al.,: Sustained formation of POBN radical adducts in mouse liver by peroxisome proliferators is dependent upon PPAR α , but not NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42: 335-342.

29）Dews MA, Homayouni A, Yu D., et al.,: Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*. 2006; 38: 1060-1065.

30）Hayashita Y, Osada H, Tatematsu H et al.,: A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92 is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*. 2005; 65: 9628-9632.

31）He L, Thomson JM, Hermann MT et al., A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005; 435: 828-833.

32）O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI et al., c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005; 435: 839-843.

33）Shah YM, Morimura K, Yang Q et al., :Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation. Mol Cell Biol, 2007;4238-4247.

34）Yang Q, Nagano T, Shah Y et al.: The PPAR α -humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR α .*Toxicol Sci*. 2008; 101: 132-139.

35）Qu A, Jiang C, Cai Y et al.: Role of Myc in hepatocellular proliferation and hepatocarcinogenesis. *J.Hepatol*. 2014; 60: 331-338.

36）Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T et al.: Clofibric acid, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand, inhibits growth of human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6: 1379-1386.

37）Grau R, Punzon C, Fresno M et al.: Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition if activator protein-1. *Biochem J*. 2006; 395: 81-88.

38）Yamasaki D, Kawabe N, Nakamura H et al., :Fenofibrate suppresses growth of the human hepatocellular carcinoma cell via PPAR α -independent mechanisms. *Eur J Cell Biol*. 2011; 90: 657-664.

39）Zhang N, Chu ESH, Zhang J et al.: Peroxisome proliferator activated receptor alpha inhibits hepatocarcinogenesis through mediating NF-κB signaling pathway. *Oncotarget*. 2014; 5: 8330-8340.

40）Matsumoto K, Huang J, ViswakarmaN et al: Transcription coactivator PBP/MED1-deficient hepatocytes c cv not susceptible to diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 318-325.

41）Guyton KZ, Chiu WA, Bateson TF et al.: A reexamination of the PPAR-alpha activation mode of action as a basis for assessing human cancer risks of environmental contaminants, *Environ Health Perspect*. 2009; 117: 1664-72.

42）Corton JC, Peters JM, Klaunig JE: The PPAR α -dependent rodent liver tumor response is not relevant to humans: Addressing misconceptions, *Arch Toxicol*. 2018; 92:83-119.

43）IARC Monograph Volume 101, 2013 : Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water

44）食品安全委員会器具・容器包装評価書　フタル酸ビス（２―エチルヘキシル）DEHP，2013年２月

45）食品安全委員会清涼飲料水評価書トリクロロエチレン，2008年11月

46）食品安全委員会清涼飲料水評価書テトラクロエチレン，2008年11月

47）食品安全委員会清涼飲料水評価書トリクロロ酢酸，2002年５月

48）食品安全委員会清涼飲料水評価書ジクロロ酢酸，2013年４月