

学位論文

1,2-ジクロロプロパンによる職業性胆管がん発症機序の研究

2023年9月

木村 優介

## 目次

緒言	……2
第1章 胆管細胞およびマクロファージ共培養系を用いた1,2-ジクロロプロパンによる毒性発現機構と遺伝子編集酵素発現との関連	
1.1 背景・目的	……5
1.2 実験方法	……6
1.3 結果	……10
1.4 考察	……17
1.5 小括	……21
第2章 1,2-ジクロロプロパン投与がマウス肝臓に引き起こす生体応答および転写因子Nrf2が果たす役割	
2.1 背景・目的	……22
2.2 実験方法	……23
2.3 結果	……30
2.4 考察	……48
2.5 小括	……55
総括	……56
謝辞	……57
参考文献	……58

## 緒言

われわれは生活するうえであらゆる化学物質に曝露されており、医薬品、食品やその添加物、残留農薬や容器を介した曝露、大気汚染、廃棄物などによる土壤汚染を介した影響など様々な経路が存在する。その健康リスクを回避するためには、曝露可能性の存在を認識すると共に化学物質の毒性を評価し、有害性によってはヒトが曝露する可能性を排除または低減するための対策を講じなければならない。

がんは化学物質に起因する疾患の中でもその致死性から最も恐れるべきものの1つである。すべてのがんの中でも職業性曝露に起因するものは 5.3-8.4%と言われる (Takala, 2015)。職業性のがんの報告は、18 世紀にイギリスの外科医であった Percivall Pott が煙突掃除夫において陰嚢がんの発生が多いとしたことが最初とされ、この場合は煙突内の煤が該当する (Peters and Gonzalez, 2018, Walker, 1982)。染料工業にて使用される芳香族アミンの曝露による膀胱がんなどは現在の日本でも患者が発生しており (Nakano *et al.*, 2018)、またアスベスト曝露による中皮腫は工場に勤務していた作業員だけでなく、周辺住民にも発生していることが兵庫県尼崎市の例からわかっている (Furuya and Takahashi, 2017; Zha *et al.*, 2019)。このような化学物質曝露によるがん発症を防ぐためには産業において使用される化学物質のリスクアセスメントが適正に行われる必要がある。

有機溶剤が原因とされる職業性胆管がんは、大阪にあったオフセット印刷工場の労働者において胆管がんが多く起こっているものとして2012年の日本産業衛生学会において産業医科大学の熊谷らにより初めて報告された (熊谷ら, 2012)。オフセット印刷とは版のインクを直接紙に転写するのではなく、ブランケットという樹脂やゴム製のローラーを介して転写する方法であるが、このブランケットのインク洗浄剤と使用されていた有機溶剤である 1,2-ジクロロプロパン (1,2-DCP) ががんの原因とされた (Kumagai *et al.*, 2013)。若くしてがんと診断された患者が多く、2013 年に出版された報告では、校正印刷業務に従事していた 51 名中、11 名の発症者 (診断時の年齢が 25-45 歳、うち 6 名が死亡していた) について、標準化罹患比 (standardized incidence ratio : SIR) は 1171、標準化死亡比 (standardized mortality ratio : SMR) は 2900 とされ (Kumagai *et al.* 2013)、2015 年の報告では、106 名の労働者のうち 17 名の発症者について SIR が 1132.5 とされており (Sobue *et al.*, 2015)、一般的な罹患とは明らかに異なることがわかる。大阪だけでなく、ほかの地域においても 1,2-DCP に曝露していたと考えられる胆管がん発症者が報告されている (Kubo *et al.*, 2016a; Kumagai, 2014; Ogawa *et al.*, 2020)。国際がん研究機関 (IARC) はこの大阪での報告をもとに 1,2-DCP の発がん分類を Group 1 (carcinogenic to human) に分類した (IARC, 2017)。元々はマウスを用いた長期試験での肝細胞腫瘍の増加やネズミチフス菌を用いた Ames 試験における陽性判定など一部の発がん性が疑われるようなデータの集積もあったがヒトにおける疫学データがなく、証拠不十分として Group 3 (not classifiable as to its carcinogenicity to humans) に分類されていた (IARC, 1999)。

日本では 1,2-DCP は 2013 年に労働安全衛生法における特定化学物質に指定され、作業環境中の管理濃度の厳格化など使用に関する規制がなされた。現在はインク除去剤としての使用は日本では絶滅したと考えられる。PRTR 制度によっても排出量、移動量の届け出がなさされているが、近年は化学工業分野の事業所からの届け出のみとなっている。韓国においても 2019 年に特別管理物質に指定され曝露リスク低減が図られている (Park *et al.*, 2020)。近年では電子電気機器廃棄物 (E-waste) に関連した重金属や有機汚染物質などの有害物質への曝露が特にアフリカやアジアで問題となっている (Lebbie *et al.*, 2021; Priyashantha *et al.*, 2022) が、この E-waste をリサイクルする際に放出されるガスに 1,2-DCP を検出報告も存在する (Chen *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2017)。中国広東省における E-waste 解体作業場での 1,2-DCP を含む揮発性有機化合物 (VOCs) の濃度は  $1.6 \times 10^3$  から  $6.7 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  と報告される (Liu *et al.*, 2017)。これは多くともおよそ 1 ppm 程度であるので、日本の職業性胆管がんの発生につながった 100~670 ppm や最大 620 ppm といわれる高濃度での曝露 (Kumagai *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2014) と比べると微々たるものかもしれないが、様々な有害物質の複合的曝露であり健康に及ぼす影響ははかり知れない。

職業性胆管がんでの組織病理的な所見は主に大阪市立大学から研究報告がなされている。職業性胆管がんでは肝内胆管がん、肝外胆管がんのどちらも報告されているが、肝内胆管がんは形態学的に腫瘤形成型 (mass-forming)、胆管浸潤型 (periductal infiltrating)、肝内発育型 (intraductal growth) の 3 つに分類されているなか (Banales *et al.*, 2020)、職業性胆管がんでは腫瘤形成型、肝内発育型が報告される (Kubo *et al.*, 2014)。肝外胆管がんは結節型 (nodular)、平坦型 (sclerosing)、乳頭型 (papillary) に分けられるが (Chung *et al.*, 2009)、職業性胆管がんの肝外胆管型では乳頭型が主に報告されている (Kubo *et al.*, 2014)。通常胆管がんでは腺がんが一般的とされており (Nakanuma and Kakuda, 2015)、職業性胆管がんにおいても腺がんが主に報告されている (Kubo *et al.*, 2014)。胆管がんでは「先行病変を伴わずに発症することがほとんど」(日本肝胆膵外科学会、2019) とされている一方、職業性胆管がんでは浸潤性のがんのほかに前がん病変として biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) や intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB) が観察され、原発性胆管硬化炎に似た病変や炎症細胞の増殖、局所的な胆管組織の欠損などの慢性胆管障害像が見られる (Sato *et al.*, 2014; Kinoshita *et al.*, 2016 and 2019)。胆管傷害を示す  $\gamma$  GTP の上昇もがんの診断の数年前からみられると報告される (Kubo *et al.*, 2016b)。また腫瘍による胆管狭窄を伴わない胆管拡張が通常胆管がんと比べて多いこと (Hamano *et al.*, 2016) や、肝外・肝内といった腫瘍の部位においても肝内の胆管がんが職業性胆管がんでは多いとされている (Kaneko *et al.*, 2015)。職業性胆管がん組織では DNA 損傷マーカーである  $\gamma$ -H2AX が過剰発現していること (Sato *et al.*, 2014; Kinoshita *et al.*, 2016 and 2019) や、体細胞変異が通常胆管がんと比較しても約 30 倍と多い (Mimaki *et al.*, 2016) ことも報告される。これらの特徴から職業性胆管がんは広範囲の胆管障害から前がん病変を経て、浸潤がんへと至る多段階発がんであると推察されている。

薬物治療の面では、職業性胆管がんの患者ではフルオロウラシルやゲムシタビン、S-1（テガフル・ギメラシル・オテラシル合剤）による治療（術後補助化学療法含む）が行われたとのことである（Kubo *et al.*, 2016a, Ogawa *et al.*, 2020）。また、職業性胆管がんにおいてはがん細胞に対する免疫応答の抑制にも働いてしまう programmed death-ligand 1（PD-L1）の発現が通常胆管がんと比較して高く（Sato *et al.*, 2017 and 2020; Tanaka *et al.*, 2022）、また腫瘍間質への免疫細胞の浸潤も多いことが免疫組織化学染色を用いた結果からも報告されている（Sato *et al.*, 2020）。前述した職業性胆管がんにおける体細胞突然変異の多さ（Mimaki *et al.*, 2016）についても、PD-L1 標的治療への高感受性と関連すると考えられている（Yi *et al.*, 2018）。これらの理由からニボルマブなどの免疫チェックポイント阻害剤が職業性胆管がんに対して奏功する可能性が示唆されている。

尚、胆管がん発症のリスクとなる他の化学物質としては放射線造影剤として使用されていたトトラスト（Fukumoto, 2014）や、アスベスト（Brandi *et al.*, 2022）、殺虫剤などを含む内分泌かく乱物質（Seeherunwong *et al.*, 2022）、酒やタバコ（Palmer and Patel, 2012）などがあるとされる。特にアスベストや内分泌かく乱物質については職業性曝露の可能性もあり、これらが原因の胆管がんについても職業性胆管がんと呼ぶことができると考えられるが、本稿において職業性胆管がんは 1,2-ジクロロプロパンなどの有機溶剤曝露により発症した胆管がんを指すものとする。

# 第1章

## 胆管細胞およびマクロファージ共培養系を用いた 1,2-ジクロロプロパンによる 毒性発現機構と遺伝子編集酵素発現との関連

### 1. 1 背景・目的

がん細胞は遺伝子変異の結果として、増殖能の獲得や生体の異物排除システムをかいくぐる能力を得る。この遺伝子変異が化学物質によって引き起こされるメカニズムとして、古典的には DNA に付加体を形成することによって DNA 複製の際にエラーが発生し、オリジナルとは異なる塩基対が DNA に組み込まれるというものがある。しかし近年元来生体に存在する内因性の DNA や RNA の編集酵素の異所性発現により体細胞変異が引き起こされるという仕組みが明らかになりつつある。

Activation-induced cytidine deaminase (AID) はマウス B 細胞リンパ腫由来細胞株 CH12F3-2A に対して免疫グロブリンの IgM から IgA へのクラススイッチ組換えを誘発する刺激を加えたのちに得た cDNA からクローニングされた (Muramatsu *et al.*, 1999)。クラススイッチ組換えのほか、抗体の親和性成熟にかかわる体細胞超変異を制御すると報告されている (Muramatsu *et al.*, 2000; Okazaki *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2002)。

AID は apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide (APOBEC) ファミリーに属する。転写反応の際に生成した DNA の一本鎖に作用し、シトシンをウラシルへと変換すると考えられており、ウラシルはチミンへと複製反応の中で変換されることで C to T の変異が起こる (Liu and Schatz, 2009)。AID の役割は B 細胞の免疫グロブリン遺伝子に対する変異作用が研究されてきたが、AID 遺伝子を導入したマウスではリンパ腫だけでなく肝臓や肺、胃などの上皮細胞がんを発症すること (Morisawa *et al.*, 2008) や、ヒトにおいても肝臓、胆管、直腸、胃や口腔のがんなどにおいて AID の過剰発現が確認され (Chan-On *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2007 and 2008; Komori *et al.*, 2008; Kou *et al.*, 2007; Matsumoto Y *et al.*, 2007; Miyazaki *et al.*, 2012)、発がんにおける役割も注目されている。

職業性胆管がん組織を用いたエクソーム解析では、GpCpY to GpTpY (Y=C or T) という変異が主要に起こっていると報告され (Mimaki *et al.*, 2016 and 2020)、また、AID トランスジェニックマウス胚由来線維芽細胞を用いた変異の研究では、GpCp(A/C/T) to GpTp(A/C/T) という変異が主要なものとして観察された (Olivier *et al.*, 2014)。これら 2 つの研究結果から得られる変異パターンに一部の共通性を見出し、また免疫組織化学による職業性胆管がん組織における AID の発現確認の報告 (Mimaki *et al.*, 2016) をもとに、職業性胆管がん原因物質である 1,2-DCP による発がん機構において AID が役割を果たしているという仮説を立て、今回研究計画を立てた。

## 1. 2. 実験方法

### 1. 2. 1 細胞培養

ヒト不活化胆管由来細胞株 (MMNK-1、接着細胞) は JCRB 細胞バンク (大阪) より購入した。Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, low glucose, Wako pure chemical, 大阪) に 5% の非動化済み牛胎児血清 (FBS, Biowest, lot. No. S10265S1560, Riverside, MO) を添加したものを培地とし、37°C、5% CO<sub>2</sub> 濃度で培養した。MMNK-1 細胞はシャーレまたはフラスコ内でコンフルエントにならないように適宜アクターゼ (Innovative Cell Technologies, San diego, CA) を用いて細胞を剥がし継代した。ヒト急性単球性白血病由来細胞株 (THP-1、浮遊細胞) は ATCC (Manassas, VA) から購入したものを、10% FBS 添加 Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, Wako) に Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100X) (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA) を 100 倍希釈し、2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を 50 μM となるように加えた培地 (以下、THP-1 基本培地と呼ぶ) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 濃度で培養した。THP-1 細胞は 2、3 日おきに新鮮な培地と細胞懸濁培地を 5 : 1 の割合になるように継代した。THP-1 のマクロファージへの分化は、162 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) を培地に添加し、36 時間培養することにより実施した。

MMNK-1 細胞及び THP-1 由来マクロファージ細胞との共培養は、(1) THP-1 細胞を 0.4 μm 孔径膜付きトランスウェル (353090, Corning, Kennebunk, ME) 上 162 nM PMA 添加 THP-1 基本培地で培養 (播種数 : 3 × 10<sup>5</sup> cell, 液量 2 mL) し 36 時間後に、播種後 24 時間経過させた MMNK-1 (播種数 : 1 ~ 1.5 × 10<sup>5</sup> cell, 液量 2 mL) と 6 well plate 上で共培養を開始した (図 1-1)。共培養の際は、5% FBS 添加 DMEM と THP-1 基本培地とを 1 : 1 で混合したものを培地として用いており、また、分化し接着した THP-1 のトランスウェルは共培養直前に PMA を除去する目的で PBS により数回洗浄をおこなった。

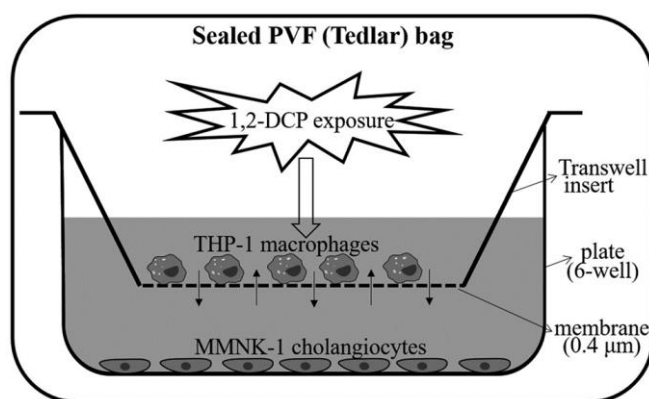


図 1-1. トランスウェルを用いた MMNK-1 ヒト胆管細胞および THP-1 ヒト単球様細胞由来マクロファージの共培養の図示。

### 1.2.2 細胞への 1,2-DCP 処置

1,2-DCP (純度 99%、Sigma-Aldrich) は始めにジメチルスルホキシド (DMSO、Sigma-Aldrich) に溶解後、培地に添加し、直前まで培養に使用していた培地を除去し、1,2-DCP 含有培地に置き換えるという形で処置をおこなっている。また、1,2-DCP 処置に使用した培地は、DMEM または RPMI 1640 の既製品 + DMSO (+1,2-DCP) で構成されており FBS 等は添加していない (コントロール群も含む)。DMSO 濃度は 1,2-DCP 非処置のグループも含めて 0.05% で統一している。

今回の実験では、1,2-DCP 処置 (コントロール群も含む) の際は 1,2-DCP の培地からの揮発を抑えるため、培養細胞入り 6-well plate をテドラーバッグ (ポリフッ化ビニル製) に封入し、37°C の条件で所定の処置時間インキュベートした。

### 1.2.3 細胞増殖、細胞死測定

1,2-DCP を処置した際の細胞毒性を評価するために、MTS アッセイを CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI) を用いて実施した。MMNK-1 細胞については 96 ウェルプレート (平底) 上に  $5 \times 10^3$  cell/well 播種し、37°C 5%CO<sub>2</sub> の条件で 24 時間培養後、1,2-DCP 処置をおこなった。THP-1 細胞は PMA 処置 36 時間後のマクロファージ細胞に分化させた際に 1,2-DCP の処置をおこなった。1,2-DCP の処置時間は 24 時間として、処置濃度は 1  $\mu$ M ~ 5 mM の間で振り分けた。処置後は培地を除去し、MTS アッセイ用試薬をフェノールレッドフリーの DMEM または RPMI1640 (044-33555 または 183-02165、Wako) に 1:5 の割合で希釈した溶液と入れ替え、37°C、5%CO<sub>2</sub> 濃度で 2 時間インキュベート後、プレートリーダー (PowerWaveXS2, Biotek, Winooski, Vermont) を用いて 490 nm の吸光度を測定した。

### 1.2.4 リアルタイム PCR による遺伝子発現定量

1,2-DCP 処置後に細胞 RNA を ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いて抽出した。BL バッファー (グアニジンチオシアン酸塩) にチオグリセロールを添加した溶液を加え、細胞を溶解した。ミニカラムに RNA を補足させ、DNase による DNA 分解処理などを添付のプロトコルの通り進め、Nuclease-free water に RNA を溶出したものを逆転写に使用した。逆転写は Super Script III RT、Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer、dNTP Mix、RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (18318-012, 18427-013, 18080-044, 10777-019; Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、製品プロトコルの通りに mRNA から cDNA 合成をおこなった。合成に用いた Total RNA 量は 20  $\mu$ l 反応系において 5  $\mu$ g である。リアルタイム PCR による定量は、機器は AriaMX Real-time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA) を用いた。 $\beta$ -アクチン、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B の mRNA 定量は THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, JP) を用いたインターカーレーター法を用いており、初期変性 95°C 1 分の後に変性 95°C 15 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸



長反応 72°C 1 分の増幅反応を 45 サイクルおこなった。融解曲線分析もおこない、非特異的反応が起こっていないことを確認した。AID mRNA の定量では TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA) を用いたプローブ法を用いており、UNG 反応 50°C 2 分、初期変性 95°C 10 分の後、増幅反応として変性 95°C 15 秒、アニーリング・伸長反応 60°C 1 分の 50 サイクルでおこなった。実験に使用したプライマー及びプローブの配列は表 1-1 に示す。定量は cDNA 段階希釈液を用いた検量線法によりおこなっているが、AID に関しては MMNK-1 細胞においては mRNA 発現が非常に低いと考えられるため、AID 発現量が高いヒトバーキットリンパ種・B リンパ球様由来の Raji 細胞 (JCRB) から抽出し合成した cDNA を用いた。各サンプルの遺伝子発現量はハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -アクチンを用いて補正している。

表 1-1. PCR 実験に用いたプライマー

Gene (Alias)	Sequence (5'–3')	PCR product length (bp)
<i><math>\beta</math>-Actin</i>	F : CAAGAGATGGCCACGGCTGCT R : TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA	275
<i>TNF-<math>\alpha</math> (TNF)</i>	F : CTGGGGCCTACAGCTTTGAT R : GGCCTAAGGTCCACTTGTGT	126
<i>NF-<math>\kappa</math>B (NFKB1)</i>	F : GCAGATGGCCCATACCTTCA R : TGCTGGTCCCACATAGTTGC	165
<i>I<math>\kappa</math>B (NFKBA)</i>	F : AAGTGATCCGCCAGGTGAAG R : GCAATTTCTGGCTGGTTGGT	106
<i>AID (AICDA)</i>	Probe : TCGGCGTGAGACCTACCTGTGCTAC F : AAATGTCCGCTGGGCTAAGG R : GGAGGAAGAGCAATTCCACGT	140

※AID のプライマー及びプローブに関しては Kou *et al.*, 2007 の配列を使用している。

### 1.2.5 蛍光免疫染色

THP-1 由来マクロファージ細胞に対する TNF- $\alpha$  の蛍光免疫染色は以下のようにおこなった。6-well plate の 1 ウェルあたりに  $6 \times 10^5$  cell の THP-1 を PMA にと共に播種し、36 時間かけてマクロファージ細胞へ分化させた。1,2-DCP 処置は 0, 5, 50, 500  $\mu$ M の濃度でおこない、処置 9 時間後に -20°C に冷やしておいたメタノールと室温 5 分、次に 4% パラホルムアルデヒド/PBS (pH 7.4) と室温 10 分おくことにより細胞固定をおこなった。0.1% Triton X-100 / PBS と室温 10 分インキュベートし透過処理をおこない、1% BSA および 22.52 mg/mL のグリシンを含む PBS-T (0.1% Tween20) で室温 45 分の条件でブロッキングをおこなった。抗 TNF- $\alpha$  抗体 (ab6671, Abcam, Cambridge, UK) はブロッキングと同様の組成の溶液に 250 倍希釈し、overnight、4°C の条件でインキュベートした。二次抗体は Donkey Anti Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 647, ab150075, Abcam) をブロッキング溶液に 500 倍希釈し室温、遮光で 1 時間インキュベートした。核対比染色には DAPI を用いた。細胞固定後の各操作間の洗浄には PBS-T を用いている。最後に蛍光顕微鏡

(Leica DMI 6000B, Leica, Wetzlar, DE) を用いて細胞における TNF- $\alpha$  のシグナルを観察した。

#### 1.2.6 統計解析

データはグループにおける平均±標準偏差としてグラフに記載している。統計解析は、一元分散分析を行い、その後ダネットの多重比較検定をおこない 1,2-DCP 処置による影響をコントロール群と比較した。P 値<0.05 を統計学的有意差ありと判定した。統計解析には SPSS 統計解析ソフト v17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) を用いた。

### 1.3 結果

#### 1.3.1 1,2-DCP の細胞毒性および細胞増殖能への影響

MTS アッセイにより 1,2-DCP 処置が MMNK-1 胆管細胞または、THP-1 由来マクロファージ細胞におよぼす影響を評価した。試薬は細胞内で還元され、ホルマジン色素を生成するテトラゾリウム塩の 1 種であり、その変換は生細胞でのみ行われると考えられ、細胞の生存率や増殖を検討する際に用いられる (Cory *et al.*, 1991; Berridge and Tan, 1993)。

1,2-DCP 処置は濃度 1  $\mu$ M – 5 mM の範囲において MMNK-1 細胞または THP-1 由来マクロファージ細胞の活性を減少させなかった。MMNK-1 細胞においては、10  $\mu$ M–5 mM の濃度において 1,2-DCP 処置はコントロール群と比べ有意に細胞活性が増加していた (図 1-2)。

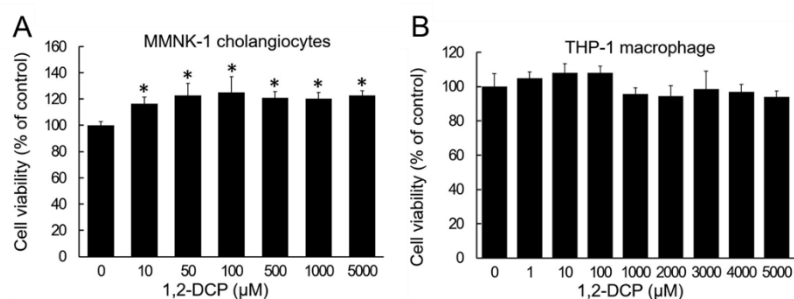


図 1-2. 細胞活性への 1,2-DCP 処置による影響

(A) MMNK-1 胆管細胞または(B) THP-1 由来マクロファージに対し 1,2-DCP 処置を行ない 24 時間後の細胞生存率を MTS アッセイにより評価した。棒グラフおよびエラーバーは平均 $\pm$ 標準偏差を表す (N=3)。\* $p$ <0.05 ダネットの多重比較によりコントロール (1,2-DCP 0  $\mu$ M) と比較。

### 1.3.2 MMNK-1 単独培養下での 1,2-DCP 処置の AID 発現への影響

1,2-DCP への直接的曝露が胆管細胞において AID の発現上昇を引き起こすかについて検討した。今回処置時間を 9 時間と置いている理由は、AID の発現はがん細胞を含む上皮細胞由来細胞株において TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$  の処置により上昇するが、その遺伝子発現上昇は主に 12 時間以内に誘導され、24 時間後には減少していく途中となるような挙動を示す報告 (Chan-On *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2007 and 2008; Komori *et al.*, 2008; Kou *et al.*, 2007) が多かったことが理由である。今回の単独培養下の条件では 1,2-DCP 処置は MMNK-1 細胞において AID の mRNA 発現上昇を引き起こさなかった。また TNF- $\alpha$  の mRNA においても 1,2-DCP 処置による誘導は起こっていなかった (図 1-3)。

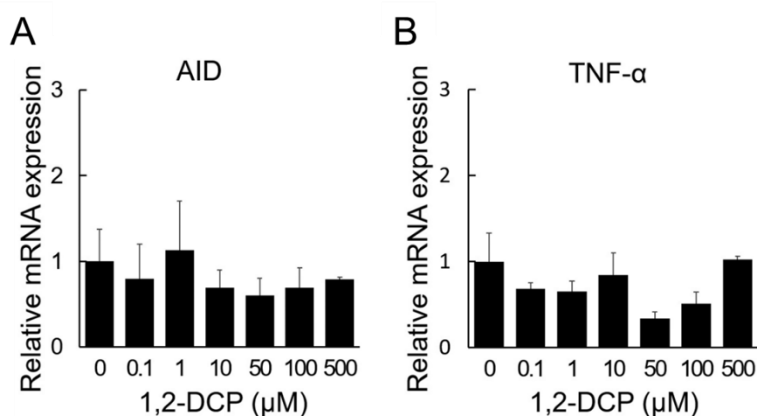


図 1-3. MMNK-1 単独培養下での 1,2-DCP 処置後 AID と TNF- $\alpha$  の発現

1,2-DCP 処置 9 時間後の AID (A) および TNF- $\alpha$  (B) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で調べた。補正には  $\beta$  アクチンの発現量を用いた。棒グラフおよびエラーバーは平均  $\pm$  標準偏差を表す (N=3)。

### 1.3.3 MMNK-1 単独培養下での TNF- $\alpha$ 処置の AID 発現への影響

前述のように上皮細胞株において AID は TNF- $\alpha$  の処置により引き起こされること、またその発現は NF- $\kappa$ B の働きを介しているということが報告されている (Endo *et al.*, 2007 and 2008; Komori *et al.*, 2008)。当研究室で用いている MMNK-1 ヒト胆管細胞株においても同様に AID の発現上昇が引き起こされるか、また、細胞培養から RNA 抽出、PCR による定量までの実験系が AID の発現上昇を捉える目的に適合しているかを確認するという目的も兼ねて TNF- $\alpha$  の MMNK-1 細胞への処置実験をおこなった。100 ng/ml の TNF- $\alpha$  (300-01A, Peprotech, Cranbury, NJ) の処置後 4, 6, 8, 10, 12 時間の AID 遺伝子発現の変化を確認したところ、10 時間の時点でコントロール群と比べて有意に上昇していた (図 1-4 A)。また TNF- $\alpha$  の処置により NF- $\kappa$ B およびその抑制因子である I $\kappa$ B の mRNA 発現量が上昇していた (図 1-4 B 及び C)。NF- $\kappa$ B の阻害剤である SN50 (145-06761, Wako) の前処置は有意に TNF- $\alpha$  処置による AID の発現上昇を抑制していた (図 1-5 A)。

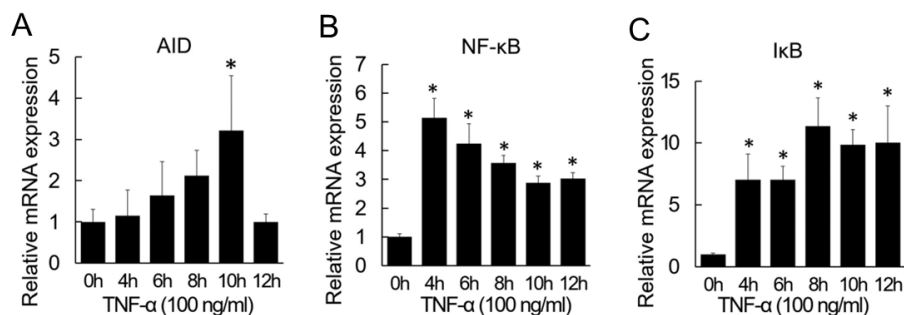


図 1-4. TNF- $\alpha$  処置の MMNK-1 細胞への影響

TNF- $\alpha$  を 100 ng/ml の濃度で MMNK-1 細胞に処置し、0 (TNF- $\alpha$  非処置)、4, 6, 8, 10, 12 時間後の AID (A), NF- $\kappa$ B (B), I $\kappa$ B (C) の mRNA 量変化をリアルタイム PCR 法により調べた。補正には  $\beta$  アクチンの発現量を用いた。棒グラフおよびエラーバーは平均  $\pm$  標準偏差を表す (N=3)。\* $p$ <0.05 ダネットの多重比較によりコントロール (1,2-DCP 非処置、0 時間) と比較。

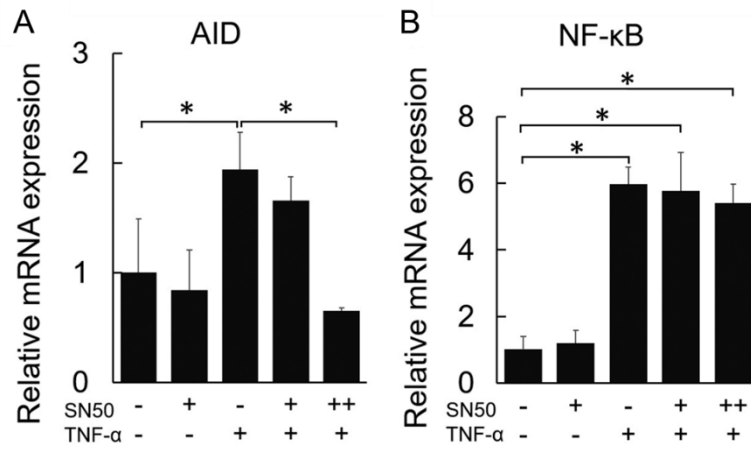


図 1-5. TNF- $\alpha$  処置による AID 発現への NF- $\kappa$ B 阻害剤の影響

MMNK-1 細胞に SN50 (NF- $\kappa$ B 阻害剤) の前処置を 2 時間おこなった。PBS で洗浄し、TNF- $\alpha$  を処置し 10 時間後の AID (A) および NF- $\kappa$ B (B) の mRNA 発現量への変化。補正には  $\beta$  アクチンの発現量を用いた。棒グラフおよびエラーバーは平均  $\pm$  標準偏差を表す (N=3)。\* $p$ <0.05 ダネットの多重比較によりコントロール (1,2-DCP 非処置) と比較。SN50+ : 250 ng/ml, SN50++ : 500 ng/ml。TNF- $\alpha$  + : 100 ng/ml。

#### 1.3.4 マクロファージ細胞における 1,2-DCP 処置の TNF- $\alpha$ 発現への影響

THP-1 由来マクロファージ細胞へ 1,2-DCP を処置した際の TNF- $\alpha$  の発現の変化を mRNA 量について検討した。50  $\mu$ M の 1,2-DCP 処置 4, 6, 9, 12 時間後の TNF- $\alpha$  遺伝子発現は、6 時間の時点で有意に増加していた (図 1-6)。また 6 時間処置において 5, 50, 500  $\mu$ M と複数の 1,2-DCP 濃度を処置した際の発現量変動を確認したところ、50  $\mu$ M において有意に TNF- $\alpha$  の遺伝子発現が増加していた (図 1-6)。また 1,2-DCP 処置 9 時間後のマクロファージ細胞に対して抗 TNF- $\alpha$  抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、細胞における TNF- $\alpha$  のシグナルが投与群では増加しており (図 1-7)、1,2-DCP の処置はマクロファージ細胞において TNF- $\alpha$  の産生を促すことが示唆された。

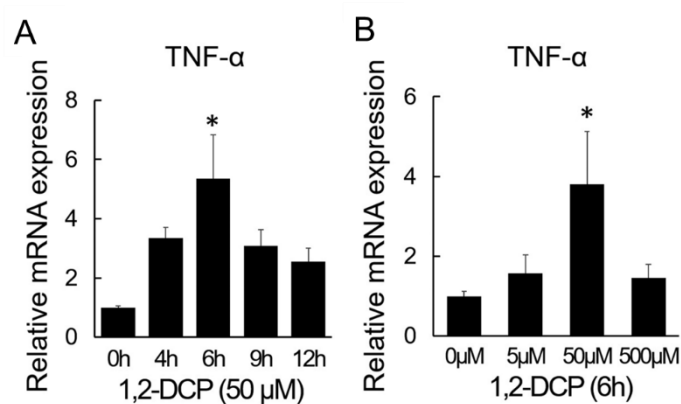


図 1-6. THP-1 由来マクロファージ細胞に対する 1,2-DCP 処置の影響

THP-1 細胞に PMA を処置し、36 時間かけてマクロファージへ分化させた後に 1,2-DCP を処置し、0, 4, 6, 9, 12 時間後の TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量変化 (A)、および 0, 5, 50, 500  $\mu$ M の 1,2-DCP 処置後 6 時間後の TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量変化 (B) を RT-PCR 法により調べた。補正には  $\beta$  アクチンの発現量を用いた。棒グラフおよびエラーバーは平均  $\pm$  標準偏差を表す (N=3)。\* $p$ <0.05 ダネットの多重比較によりコントロール (1,2-DCP 非処置、0 時間または 0  $\mu$ M) と比較。

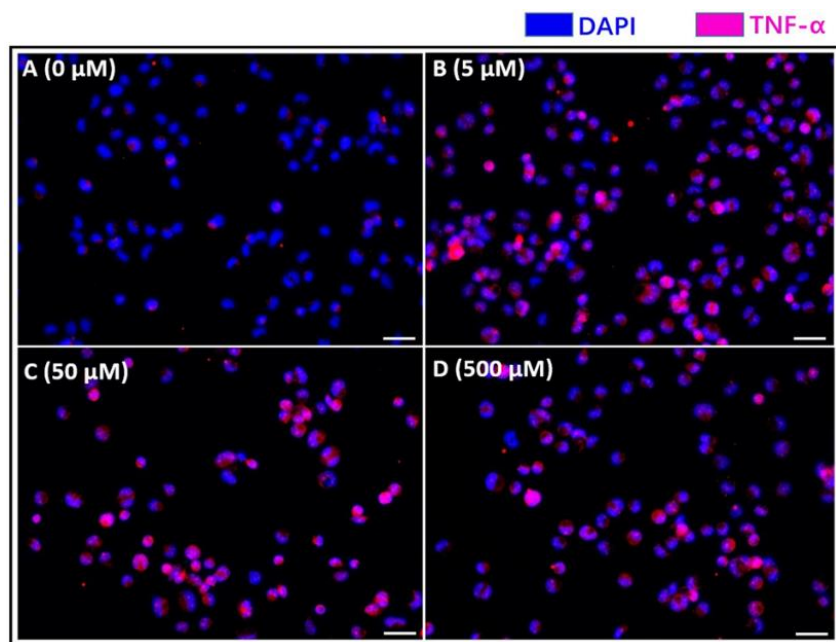


図 1-7. 1,2-DCP 処置による THP-1 由来マクロファージ細胞での TNF- $\alpha$  タンパク発現への影響

THP-1 由来マクロファージ細胞に 1,2-DCP を 0, 5, 50, 500  $\mu$ M の濃度で 9 時間処置した。処置後に PFA による固定を行い、蛍光免疫染色で TNF- $\alpha$  を可視化した。核対比染色には DAPI を用いた。赤：TNF- $\alpha$ 、青：DAPI。スケールバー：50  $\mu$ m。



### 1.3.5 胆管細胞とマクロファージ細胞共培養下における 1,2-DCP 処置の AID 発現への影響

胆管細胞単独培養では 1,2-DCP 処置は AID 発現を誘導しなかった。しかしながら、NF- $\kappa$ B を介するような炎症性反応は胆管細胞のみではなく、他の好中球、単球やマクロファージなどの非実質細胞の参加によって成り立っている。肝臓ではクッパー細胞という肝臓特異的なマクロファージが肝の非実質細胞の最大 35%を占めているとされる (Bilzer *et al.*, 2006)。今回 MMNK-1 細胞を THP-1 由来マクロファージ細胞を共培養しながら 1,2-DCP 処置後の AID 発現量を経時的变化および、1,2-DCP 濃度依存の変化を確認した。9 時間および 12 時間において 50  $\mu$ M の 1,2-DCP 処置は有意に AID の発現をコントロール群に比べて上昇させていた。また、5, 50, 500  $\mu$ M の濃度別における 9 時間処置では、5  $\mu$ M および 50  $\mu$ M において AID の発現は有意に上昇していた (図 1-8 A 及び B)。

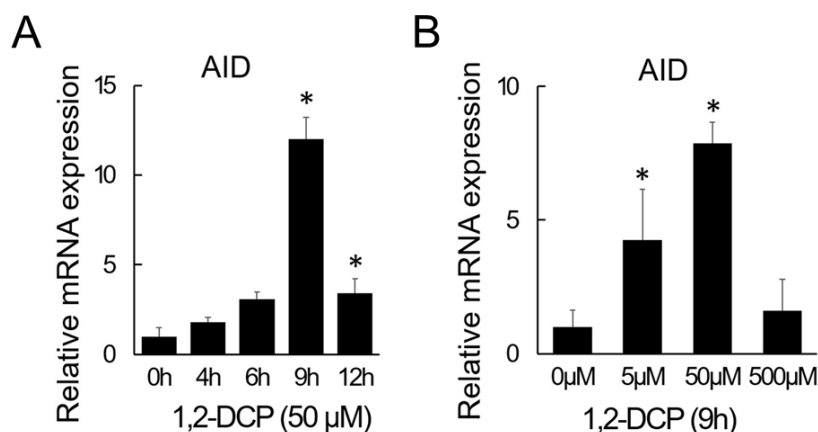


図 1-8. 胆管細胞およびマクロファージ共培養下における 1,2-DCP 処置後の AID 発現  
THP-1 から分化させたマクロファージをトランスウェルインサート上で培養し、MMNK-1 胆管細胞とは 0.4  $\mu$ m の孔で区切られた状態で共培養を 12 時間おこない、その後 1,2-DCP 処置をおこなった。(A) 1,2-DCP 処置 0, 4, 6, 9, 12 時間後の MMNK-1 細胞における AID 発現量の変化。(B) 濃度 0, 5, 50, 500  $\mu$ M の 1,2-DCP 処置 9 時間後の MMNK-1 細胞における AID 発現の変化。補正には  $\beta$  アクチンの発現量を用いた。棒グラフおよびエラーバーは平均  $\pm$  標準偏差を表す (N=3)。\* $p$ <0.05 ダネットの多重比較によりコントロール (1,2-DCP 非処置、A では 0 時間) と比較。

## 1.4 考察

### 1.4.1 今回の共培養系における結果について

この研究は 1,2-DCP の曝露が引き起こす職業性胆管がんに AID の異所性の発現に関わる可能性について検討したものである。職業性胆管がんでは、前がん病変と考えられる BillIN や IPNB の観察される頻度の高いことが通常胆管がんとの違いの一つである (Hamano *et al.*, 2016; Kubo *et al.*, 2014ab) が、これら前がん病変はしばしば炎症性の胆道疾患の結果として発生するとされている (Nakanuma *et al.*, 2009)。また胆管上皮の損傷、管腔や辺縁の硬化性病変、炎症性の細胞浸潤などの胆管傷害像についても職業性胆管がんの特徴として報告され (Kubo *et al.*, 2014ab)、職業性胆管がんの発症には炎症が深くかかわっていることが推定される。今回 1,2-DCP の処置はヒトマクロファージ細胞に TNF- $\alpha$  の発現を促進し、1,2-DCP の炎症性反応誘導能が示唆される。クッパー細胞を含むマクロファージや単球は TNF- $\alpha$  の主な供給源と考えられており (Vassalli, 1992; González-Amaro *et al.*, 1994)、特にクッパー細胞は肝臓の常在マクロファージとして肝臓の類洞に遍在している。また胆管細胞は肝動脈からの血液供給を受けており (Gaudio *et al.*, 2006)、経肺曝露を通して肝動脈から流入した 1,2-DCP が胆管細胞だけでなくクッパーマクロファージに影響を及ぼした結果炎症応答が亢進した可能性は十分考えられる。

我々の実験において、1,2-DCP の胆管細胞単独培養条件での処置は AID の発現を誘導しなかった。しかし胆管細胞への TNF- $\alpha$  処置、または胆管細胞およびマクロファージ細胞との共培養の条件で 1,2-DCP 処置をおこなうことにより、胆管細胞における AID 遺伝子発現が増加した。また TNF- $\alpha$  の処置により起こる AID 発現の増加は NF- $\kappa$ B の阻害剤である SN50 の前処置により抑えられたことから、この AID 誘導には NF- $\kappa$ B シグナルが関与していることが示唆される。がんと炎症のとの関係は深く、潰瘍性大腸炎による大腸がん、逆流性食道炎による食道がんなど慢性的な炎症は発がんに結びつくことがわかっている。胃がんにおいてはヘリコバクターピロリ菌の感染は胃粘膜の持続的な炎症を誘発し胃がんのリスクを上昇させる。肝臓においても B 型肝炎、C 型肝炎などのウイルス性肝炎や、アルコールの多量摂取による肝炎、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) などは肝臓がんを引き起こしうる。

マクロファージは通常組織損傷の後、死細胞の貪食によって組織再生や、変異細胞の除去にかかわるとされる (Mosser and Edwards, 2008) が、その一方で、炎症性サイトカイン放出による損傷増悪にもかかわるとされる。特に肝臓のクッパー細胞含むマクロファージにおいては、塩化ガドリニウムやクロドロン酸内包リポソームによってマクロファージを枯渇させる手法がマクロファージの機能を明らかにする目的に昔から使用されてきた。DNA に架橋を形成するアルキル化剤であるメルファランを投与した実験において、TNF シグナルの阻害は細胞障害を減少させ、またその TNF の由来はクッパー細胞であると報告された (Kresse *et al.*, 2005)。四塩化炭素、塩化カドミウム、チオアセタミドや、マイコトキシンの 1 種であるフモニシン B の投与による肝障害においてクッパー細胞の枯渇

は障害を軽減させた (Andrés *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 1993; Harstad and Klaassen, 2002; He *et al.*, 2005)。動物実験でマクロファージ介在性の DNA 損傷に関して調べた報告は少ないが、このようなマクロファージの組織傷害への関与を考えると我々の生体における DNA の障害や変異についても大きな役割を持っていることが推測される。

#### 1.4.2 AID 以外の発がん寄与因子について

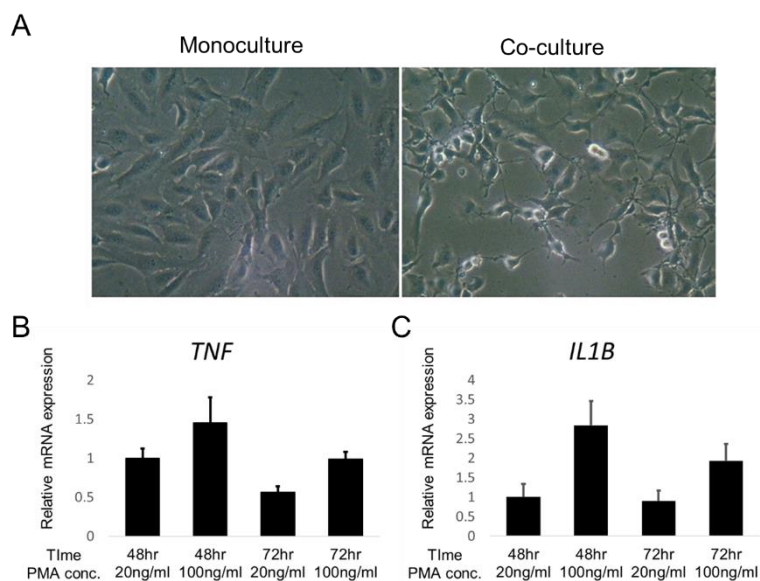
今回の研究によりマクロファージが介在する炎症性シグナル亢進が胆管細胞に遺伝子編集酵素を発現させ、職業性胆管がんのようながん発生に関与する可能性を示した。しかしながら、職業性の胆管がんの発がん過程を考察する上では AID の変異作用だけでは不十分である。職業性胆管がんにおけるがん組織の変異パターンを調べた報告では、DNA 二本鎖のうち、RNA などの転写に利用される転写鎖 (アンチセンス鎖) に変異が片寄っているというストランドバイアスが見られる。生体には転写に伴い DNA が修復される機構 (transcriptional coupled repair: TCR) があるが、このような機構により転写鎖の変異がより選択的に修復するということや、親電子性化学物質の DNA 鎖への到達性に偏りがあるといったことがストランドバイアスの原因ではないかと考えられている (Hainaut and Pfeifer, 2001; Hollstein *et al.*, 1991)。例えばグアニンなどの塩基に化学物質由来の付加体が形成され、DNA 複製の際にもう一方の DNA 鎖に誤った塩基対が生成されてしまうタイプの変異機構において、転写鎖に付加反応が起こった場合は通常の修復に加えて TCR が働くため相補鎖となる非転写鎖には比較的変異が起こりにくいというような変異の偏りが生じる。職業性胆管がんにおいてこのようなストランドバイアスが発生している原因は解明されていない。類縁のジハロゲンアルカンである 1,2-ジブromoエタンは G:C→A:T トランジションを主に非転写鎖で起こすということがチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた実験で報告されている (Ballering *et al.*, 1998; Foster *et al.*, 1988; Kalapila and Pegg, 2010)。より強い手掛かりとして、1,2,3-トリクロロプロパンの長期毒性試験の中でマウスの前胃に発生した腫瘍における変異パターンが、ストランドバイアスを含め職業性胆管がんと類似性があることが近年報告された (Riva *et al.*, 2020)。同解析結果では前胃腫瘍でのみ類似のパターンが認められ、肝臓腫瘍においてはまた異なる変異パターンが観察されていることが不思議ではあるが、このマウス前胃腫瘍と職業性胆管がんの形成過程には類似性があると考えられる。AID 強制発現モデルによる変異パターンでは、特に有意なストランドバイアスは確認されておらず (Olivier *et al.*, 2014)、職業性胆管がんで見られるような転写鎖優位な変異の発生は AID 以外の要因によるものではないかと推察される。

#### 1.5.3 今回用いた共培養系の課題と展望

この共培養は単独の細胞の培養実験から、免疫系の細胞を組み込むことにより様々な細胞種が混在する生体環境に 1 つ近づけたモデルではあるが、課題も存在している。第一に今回の THP-1 由来マクロファージとの共培養条件そのものが MMNK-1 細胞に与え

る影響が過酷となっている可能性がある。今回実施した共培養の条件下においては、MMNK-1細胞の形態において通常より細長く見え脚が生えているように見える変化や、細胞間接着の乱れが観察された (Supplementary Figure 1A)。この形態の変化は、(1) 細胞が障害を受け、細胞膜の構造変化が起こった (2) TNF- $\alpha$ などのサイトカインの影響により上皮間葉転換のような形質変化が発生していたという 2通りの仮説で考えているが、今回の研究では深く検討はしていない。上皮間葉転換に関しては、AID が脱メチル化により転写因子を制御することによって上皮間葉転換に促進的に働いているとする報告 (Muñoz *et al.*, 2013) があることや、MMNK-1細胞を単独培養した場合よりもマクロファージ細胞と共培養した場合のほうが 1,2-DCP 処置の有無に関わらず AID 遺伝子転写産物の発現が高く検出されるということが理由となる。

この課題の解決策として、共培養に THP-1細胞由来マクロファージを使用する際は分化条件を再度検討する必要があるかもしれない。マクロファージへの分化にはこの実験では PMA を 162 nM 処置し、36 時間置くという手法を用いた。この 162 nM (100 ng/ml) は、様々な濃度設定がおこなわれている PMA を用いた THP-1 の分化条件の中でも比較的多くの研究者が用いている濃度に近い設定である。おそらく、初めて PMA による THP-1 のマクロファージへの分化誘導を示した報告 (Tsuchiya *et al.*, 1982) において 0.16, 1.6, 16, 160 nM の濃度を検討しており、この 160 nM が流用されてきたのではないかと考えられる。しかし一方で他の PMA 濃度を採用する研究も少なくなく、PMA 濃度が分化に及ぼす影響に関する報告では、PMA の濃度依存的に TNF- $\alpha$ や IL-8 といった炎症性の液性因子放出が盛んとなっている (Lund *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2007)。また PMA 処置直後の TNF- $\alpha$ 放出が盛んであり、その後時間を経て落ち着いていくという PMA 刺激後の炎症性動態も伺える (Lund *et al.*, 2016)。当研究室においても、PMA 処置 48 時間、72 時間および PMA 濃度 32 nM、162 nM の条件を検討したことがあるが、TNF- $\alpha$ および IL-1 $\beta$  の mRNA 発現に関して同様の濃度、処置時間依存性の挙動が観察された (補足図 1 B 及び C)。100 ng/ml などの高濃度による処置では PMA による影響が他の LPS などによる刺激をマスクしてしまうのではないかと懸念もされている (Maeß *et al.*, 2014)。PMA を用いた分化の後に、PMA を含まない培地に交換し馴化期間を設けることも THP-1 由来マクロファージの“過”活性化を抑えるために効果的と考えられる。実際、PMA による分化後の THP-1 由来マクロファージを M0 のサブタイプとし、M1 に分化させる場合は LPS および IFN $\gamma$ 、M2 への分化の場合は IL-4 や IL-13 を処置することで表現型をコントロールする実験系も報告されているが、このような系においては、PMA による分化後 PMA を含まない培地で 24 時間以上培養してから M1 または M2 への分化刺激を加えるプロトコルが採用されている (Baxter *et al.*, 2020; Chanput *et al.*, 2013; Genin *et al.*, 2015; Surdziel *et al.*, 2017)。今回共培養条件において胆管細胞で見られた外観の変化についてもマクロファージ細胞から放出される液性因子の影響が過多であるために起こったものと予想されるため、今後の課題としてここに記述する。



補足図 1. 共培養における細胞形態の変化、および PMA 処置条件が THP-1 細胞に及ぼす影響

(A) PMA を 36 時間処置してマクロファージに分化させた THP-1 細胞と MMNK-1 を 0.4  $\mu$ m 孔径トランスウェルで仕切り共培養した後の MMNK-1 細胞の形態変化。比較として MMNK-1 単培養による画像も載せている。

(B, C) THP-1 細胞に PMA を 20 ng/ml (32 nM) または 100 ng/ml (162 nM) 処置し、48 時間または 72 時間培養しマクロファージへ分化させた。その後培地を FBS 及び PMA 非含有のものに交換し 6 時間後に RNA を抽出した。RT-PCR 法により *TNF* (B)、*IL1B* (C) 発現量を定量した。補正には *ACTB* の発現を用いている。データは平均±標準偏差で表す (N=3)。

第二の課題は 1,2-DCP が揮発性の化学物質であることを考慮し、細胞培養プレートを手ドラーバッグというポリフッ化ビニル製の袋に封入（袋の外、内部で空気の交換はなくなる）していることである。封入後 37°C に維持された培養インキュベーター内で、今回の実験では MTS アッセイでは 24 時間、リアルタイム PCR による実験では 4~12 時間の 1,2-DCP 処置をおこなった。袋に封入されるのは通常の外気であるため、インキュベーター中の CO<sub>2</sub> 濃度をコントロールして培地の pH を安定化させるということができていない。通常細胞培養の培地には炭酸水素塩 (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) が加えられており、 $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  のように平衡反応が起こる。多量の CO<sub>2</sub> の存在下では反応において H<sup>+</sup>が増加し、培地の pH 低下させるのだが、外気の CO<sub>2</sub> が 0.03% 程度しかない状態ではこの緩衝作用がはたらかず、pH は通常よりもアルカリ性に傾く。これは長時間のインキュベーションを行う場合、細胞に大きな負荷をかけてしまう。そのため手ドラーバッグの内部に CO<sub>2</sub> を通常培養と同じ濃度条件で封入するなど条件改善のための対策が必要となる。

## 1.5 小括

職業性胆管がんの発症機序における内因性遺伝子編集酵素である AID の発現誘導に関して細胞培養系を用いて研究をおこなった。職業性胆管がんでは胆管組織の繊維化や損傷など胆管組織において炎症を示す所見が確認されており、発がんに関して AID による遺伝子変異が関係していた可能性は十分考えられる。

今回の実験では胆管細胞の単独培養の条件では 1,2-DCP を処置しても AID の発現は誘導されず、一方マクロファージと胆管細胞を共培養した条件で AID 遺伝子発現の上昇が起こった。この結果の違いは単一の培養系を用いた毒性評価系の課題とも捉えられる。現在は毒性評価において動物実験を削減して細胞培養系など生命の消費を伴わない実験系への代替が進められている。勿論単純な反応を見るうえで細胞培養系は有用であるが、単純化しすぎたことによるリスクの見落としにも注意する必要がある。胆管の炎症反応が 1,2-DCP への曝露により直接的に誘導されたのか、最初の刺激に伴う胆管細胞変異や肝臓内の恒常性の破綻による二次的な誘導であるのかは不明であるが、このような炎症反応を介した DNA 変異誘導機構が詳細に解明されていくということは、化学物質の毒性評価の将来のためにも重要なことである。今後は今回の共培養系を用いて AID の発現上昇をタンパクレベルで検出すること、細胞内での AID の一時的な発現が実際にどれほど DNA に変異をもたらすのかについて検討する必要がある。

AID だけでなく他の Apobec ファミリーに関してもがんにおける変異との関連が報告されており、The Cancer Genome Atlas (TCGA) グループによる研究では、調査した約 7000 のがんについて 17% に Apobec の関連が疑われる変異パターンがあると報告されている (Alexandrov *et al.*, 2013)。そのため、今回の実験で AID に限らず Apobec ファミリーについて網羅的に評価することも必要だったと考えている。

また、遺伝子編集酵素の発がんへの寄与について着目したが、他にも肺がんの治療に EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) を用いた際の薬剤耐性を引き起こす変異に AID が関わっていると報告 (Kadi *et al.*, 2019; Yeo *et al.*, 2022) や、遺伝子編集技術である CRISPR-Cas9 にヌクレアーゼの代わりに AID を作用させて遺伝子の編集を行う技術 (Nishida *et al.*, 2016) など研究の展開は多岐にわたるため、将来 AID の生体内における役割や制御方法の解明や産業技術への応用がどのように進むのかということは大変興味深い。

## 第2章

1,2-ジクロロプロパン投与がマウス肝臓に引き起こす生体応答および転写因子

Nrf2 が果たす役割

### 2.1 背景・目的

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は塩基性領域ロイシンジッパー (bZIP) 構造をもつ転写因子であり、ヘミン誘導 K562 (慢性白血病由来) 細胞由来の mRNA と  $\lambda$ gtII による cDNA ライブラリから得られ名づけられた (Moi *et al.*, 1994)。通常 Nrf2 は細胞質においてアミノ末端の Neh2 ドメインを介して Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein1) と結合し、プロテアソームによる分解を受けているため核内への移行が抑制されている (Itoh *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2004; McMahon *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2003)。酸化ストレスや親電子性物質の存在下ではシステイン残基の修飾により Keap1 のコンホメーションが変化し、ユビキチン化を介したプロテアソームによる Nrf2 分解が阻害され、Keap1 による補足からのがれた過剰 Nrf2 が核内へと移行するとされる (Kobayashi *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2008)。核内に移行した Nrf2 は小 Maf 群因子と呼ばれるタンパクとヘテロダイマーを形成した状態で抗酸化応答配列 (ARE) に結合することで NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (キノン) 1、ヘムオキシゲナーゼ、またグルタチオン S-トランスフェラーゼやグルタチオンレダクターゼなど第 II 相反応にかかわる酵素の制御をおこなっている (Ishii *et al.*, 2002; Itoh *et al.*, 1997; Venugopal and Jaiswal, 1996)。Nrf2 は基本的に生体にとって保護的に働くと考えられており、当研究室においてもアクリルアミドの神経毒性や、以前フロン代替物質として工業使用されていた 1-ブロモプロパンの肝毒性に対して Nrf2 が防御的な役割を果たすことを報告してきた (Davuljigari *et al.*, 2021; Ekuban *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2010)。

Nrf2 は発がんにおいては防御的な役割とともに促進的な役割の両面の作用を持つとされる。動物を用いた発がん実験に関しては Nrf2 を欠損したマウスでは化学物質曝露による肝臓、前胃、膀胱での腫瘍の発生率が増加するという報告がある (Iida *et al.*, 2004; Kitamura *et al.*, 2007; Ramos-Gomez *et al.*, 2001 and 2003)。その一方で、Nrf2 を欠損したマウスやラットでは腫瘍や前がん病変の発生が抑えられたという報告も存在する (Ngo *et al.*, 2017; Orrù *et al.*, 2018)。ヒトのがん症例においても Nrf2 を過剰発現するがんは多く報告されており、Nrf2 活性化による解毒機構の強化ががん細胞にとって有利に働いているのではないかとされている (Singh *et al.* 2006; Wang *et al.*, 2008)。今回 1,2-DCP がマウスに対してどのような毒性をもたらすのか、さらに Nrf2 がその毒性においてどのような役割を果たしているのかということを検討した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 実験動物の飼育と 1,2-DCP 曝露

今回の動物実験は東京理科大学動物実験倫理委員会の承認を得ておこなった。*Nrf2* ノックアウト C57BL/6Jcl マウスの作製および維持については先行研究にて述べられているため割愛する (Ekuban *et al.*, 2021)。今回の実験に使用した *Nrf2* ノックアウトマウスは、*Nrf2* ヘテロノックアウト (+/-) マウス同士で交配させて得た第一世代の仔を用いており、離乳後に切除した耳から抽出した DNA を用い PCR 反応後、2%アガロースゲル中で電気泳動後増幅 DNA のバンドを蛍光検出し、ホモノックアウト (-/-) であることを確認した個体 (*Nrf2*<sup>-/-</sup>) を用いている。*Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスの対照群となる野生型 *Nrf2* 遺伝子を持つ C57BL/6Jcl マウス (Wild-type) は、*Nrf2* ノックアウトマウスの戻し交配が実施された日本クレアから購入している。

Wild-type および *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスはナノ棟で曝露開始の約 1 週間前から飼育を開始した。飼育環境は室内照明 AM8:00~PM20:00 の間が点灯となる 12 時間サイクルとなっており、温度は 23±1 度、湿度 40±10% にコントロールされた。マウスはステンレス製の 3 連ケージにて個体それぞれが金網で隔てられるように飼育し、自由飲水、自由摂食できる環境においた。薬学部動物舎より抵抗された動物飼育用ろ過水を飲用水、CRF-1 を餌として使用した。マウスは体重を投与開始の 2~3 日前に測定した体重をもとにグループを振り分け、Wild-type、*Nrf2*<sup>-/-</sup> それぞれで 4 つのグループに分けた。

曝露はマウスが 9~12 週齢の時期に開始した。1,2-DCP はコーンオイルを溶媒とし投与体積が 5 ml/kg とした場合に 1,2-DCP 投与量が 83、167、250 mg/kg となるように希釈している。投与方法はシリンジと鉄製ゾンデを用いた強制経胃投与であり、コントロール群ではコーンオイルのみを投与した。1 日 1 回の投与を 5 日間行い、2 日休みを取るサイクルを 5 週間繰り返した。投与の日及びマウスの解剖当日の体重を測定し記録した。

今回の実験では組織学的解析と生化学的解析に用いる場合でマウスの解剖方法が異なる (飼育条件、1,2-DCP の投与方法及び期間は同じである)。組織学的解析に用いる場合、50 mg/kg ペントバルビタール腹腔内注射による深麻酔下、左心室及び大動脈を介した 4%パラホルムアルデヒド (PFA) /リン酸緩衝液の還流固定を行い、肝臓を含む臓器を摘出し、後のパラフィン包埋処理までは PFA 中 4°Cにて保存した。また、この還流固定の 1 時間前に 100 mg/kg の 5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与している。生化学的検査に用いる場合は、断頭による脱血の後、摘出した臓器を使用まで-80°Cにて保存した。組織学的解析、生化学的解析いずれも解剖は最後の 1,2-DCP 投与から 22~32 時間後となった。

生化学用マウスの脱血の際回収した全血はヘパリンと混合後遠心し、血漿サンプルを使用まで-80°Cにて保存、SRL 株式会社に検査項目解析を委託した。



### 2.2.2 組織病理的解析

組織学的サンプルの左葉および中葉をパラフィン包埋し用いた。すなわち固定液から 70%エタノール (EtOH)、80%EtOH、90%EtOH、99.5%EtOH、100%EtOH の順に置換し脱水した後、キシレンに置換し透徹を行い、その後パラフィンに浸漬した後にパラフィン包埋器を用いてブロックを作成した。切片は 4~5  $\mu\text{m}$  となるようにマイクロトームを用いて作成しスライドガラスに張り付け、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い核と細胞質を染め分け、病理的变化の有無を確認した。また肝繊維化の有無を調べるため、ゴモリトリクローム染色についても行った。

### 2.2.3 免疫組織化学

組織学的サンプルの左葉の切片を染色し BrdU、Ki67、TUNEL 陽性細胞の解析に用いた。これらの実験に用いた切片は Poly-L-Lysine でコーティングしたスライドガラスに張り付けてある。またパラフィン伸展は 55°C で 3~6 時間と必要以上に加温しないように注意を払い、伸展後のスライドは使用するまで 4°C または長期の場合は -20°C に乾燥状態で保管した。

BrdU に対する染色は BrdU Immunohistochemistry Kit (ab125306; Abcam, Cambridge, UK) を用いたが、一部修正を加えている。脱パラフィン後のトリプシンと塩酸を用いた処理の代替として 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) 中 121°C、20 分加熱し抗原賦活処理をおこなった。その後、内因性ペルオキシダーゼ不活化のため 20 分間の 3% 過酸化水素/メタノールでの処理、Blocking Solution による 10 分のブロッキング操作をおこなった。抗 BrdU 抗体である Detector Antibody とのインキュベーションは 4°C、overnight の条件で行い、Streptavidin-HRP conjugate を PBS で 3 倍希釈した溶液と 30 分反応させた後、DAB solution 1 と DAB solution 2 を 1:29 の割合で混ぜた発色液と 5 分反応させた。各々の操作の間では PBS による洗浄をおこなっている。核対比染色はヘマトキシリン溶液と 5~10 分ほどインキュベーションしおこなった。その後エタノールとキシレンを用いた脱水を行い、Entellan を用いて封入した。

Ki67 に対する免疫染色は、脱パラフィン後に 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) 中 121°C、20 分加熱し 3% 過酸化水素/メタノールによるペルオキシダーゼ不活化処理後、抗 Ki67 抗体を TBT-T で 1000 倍希釈した溶液と室温 1 時間反応させた。horse anti-rabbit secondary antibody (BP-1100, Vector Laboratories) と 30 分、Streptavidin-HRP conjugate と 30 分反応後、ImmPACT DAB peroxidase substrate (SK-4105, Vector Laboratories) で 10 分間発色反応を行い、ヘマトキシリンを 5~10 分反応させ核対比染色をおこなった。各操作間の洗浄には TBS-T を用いた。

TUNEL 法は DeadEnd™ Colormetric TUNEL System (G7130, Promega) の添付プロトコルを一部変更し用いた。脱パラフィンの途中 100%EtOH からジエチルピロカーボネート (DPEC) を 4% 含む EtOH 溶液へと移し、4°C で 30 分インキュベーションした。

この操作は内因性の DNase による DNA 分解が引き起こす擬陽性に DPEC 処理が有効であるとする報告を参考に実施した (Stähelin *et al.*, 1998)。その後 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K/TE buffer (pH 7.5)により後の試薬の浸透性を高めた。0.9%過酸化水素/PBS で 20 分処理し、Equilibration buffer と 10 分インキュベート後に Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) および Biotinylated Nucleotide Mix を Equilibration Buffer にそれぞれ 1:100 の割合で溶解した反応液と 1 時間、37 度湿潤の環境でインキュベート後、34 mM クエン酸ナトリウム, 300 mM 塩化ナトリウム溶液中で反応を停止させた。その後 Streptavidin HRP を PBS に 500 倍希釈した溶液と 30 分インキュベートし、ImmPACT DAB peroxidase substrate (SK-4105, Vector Laboratories) で 10 分間発色反応をおこなった。各操作間の洗浄には PBS を用いた。核対比染色には 1%メチルグリーン液を用い、事前に 65°Cに温めた染色液を切片に乗せ 10 分反応させ、その後手早くエタノールとキシレンを用いた脱水を行い封入した。

$\gamma$ -H2AX の免疫染色は、脱パラフィン後に 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6) 中 121°C、20 分加熱し 3%過酸化水素/メタノールによるペルオキシダーゼ不活化処理後、10%BSA/TBS-T で 30 分ブロックした後に、抗 H2AX 抗体 (sc-517348, 1:4000, Santa Cruz Biotechnology) を TBT-T で 8000 倍希釈した溶液と 4°C、overnight で反応させた。horse anti-rabbit secondary antibody (BP-1100, Vector Laboratories) と 30 分、Streptavidin-HRP conjugate と 30 分反応後、ImmPACT DAB peroxidase substrate (SK-4105, Vector Laboratories) で 2 分間発色反応を行い、ヘマトキシリンを 5~10 分反応させ核対比染色をおこなった。各操作間の洗浄には TBS-T を用いた。

陽性細胞数の解析は切片上陽性核の数を数え、その後染色した切片の面積を QuPath-0.3.0 画像解析ソフトにより算出し、陽性細胞数 (個)  $\div$  切片の面積 ( $\text{cm}^2$ ) を各個体の計測値として扱った。

#### 2.2.4 ウェスタンブロット法を用いたタンパク質発現量の解析

生化学用サンプル、左葉の凍結肝を用いた。約 20  $\mu\text{g}$  ほどのサンプルを RIPA バッファー中でビーズとともにホモジナイズし、14000 $\times$ g で 20 分遠心した。上清をタンパク質溶液として分取し、タンパク質濃度を Pierce 660nm Protein Assay Reagent で測定した。タンパク質溶液はサンプルバッファー (最終濃度: 100 mM Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、0.0075% ブロモフェノールブルー、5%  $\beta$ -メルカプトエタノール) と混合し、1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度に合わせ、95°Cで 5 分加熱し、冷却した後使用した。SDS-PAGE はポリアクリルアミドゲル (分離ゲル最終濃度: 12% アクリルアミド/ビス 37.5 : 1 混液、0.75 M Tris-HCl pH 8.8、0.1% SDS、0.025~0.05% TEMED, 0.05% APS、濃縮ゲル最終濃度: 4%アクリルアミド/ビス 37.5 : 1 混液、0.125 M Tris-HCl pH 6.8、0.1% SDS、0.05~0.1% TEMED、0.05% APS) を低分子量である  $\gamma$ -H2AX 用、他のタンパク質は 4-20% ミニプロテイン TGX™ プレキャストゲル (4561096, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules,

CA) 用いて分離し、メタノールで親水化した PVDF メンブレンに転写した。ブロッキング操作は BlockPRO Blocking Buffer (BF01-1L, Visual Protein, Taiwan) を  $\gamma$ -H2AX 用、他のタンパクは 3% スキムミルク/TBS-T を用いて室温にて 30 分間おこなった。1 次抗体は anti- $\beta$ -Actin Rabbit mAb (4970S, 1:5000, Cell Signaling Technology)、anti- $\gamma$ -H2AX mouse mAb Ser139 (sc-517348, 1:4000, Santa Cruz Biotechnology)、anti-NQO1 rabbit pAb (11451-1-AP, 1:5000; Proteintech Group, Inc, Rosemont, IL), anti-HO-1 rabbit pAb (ab13243, 1:3000; Abcam), anti-GSTM1 rabbit pAb (12412-1-AP, 1:5000; Proteintech), anti-GSTP1 rabbit pAb (A5691, 1:4000; ABclonal, Woburn, MA), anti-G6PD rabbit pAb (25413-1-AP, 1:5000; Proteintech), anti-Ferritin Heavy Chain (FTH1) rabbit mAb (ab183781, 1:5000; Abcam) を用いており、1% BSA/TBS-T に希釈し、4°C で overnight の条件でインキュベートした。二次抗体は goat anti-mouse IgG-Peroxidase Ab (1:80000, Sigma, A9309) または goat anti-rabbit IgG-peroxidase Ab (1:40000, Sigma, A0545) を 1% BSA/TBS-T に希釈して用いており、バンドは ImmunoStar Zeta (Wako) および Fusion Solo S (VILBER LOURMAT, Collégien, FR) を用いて化学発光を検出した。

#### 2.2.5 グルタチオン定量

Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical company, Ann Arbor, MI) を用いた。約 20  $\mu$ g の凍結肝左葉サンプルを 5% メタリン酸/1 mM EDTA 中でビーズと共にホモジナイズし、3000  $\times$ g で 10 分遠心し脱タンパク処理をおこなった。総グルタチオン量は MES 溶液 (50 mM MES、25 mM リン酸、1 mM EDTA) に希釈し、Assay Cocktail (組成は製品プロトコル参照、DTNB、グルタチオンレダクターゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、NADP<sup>+</sup>を含む) と反応させ吸光度を測定した。酸化型グルタチオンの測定は、2-ビニルピリジンと 2 時間反応させて還元型グルタチオンをマスクしたあとに Assay cocktail による発色反応をおこなった。キットに付属の濃度既知の酸化型グルタチオン溶液を用いて検量線を作成し、肝サンプル由来のグルタチオン濃度を定量した。総グルタチオン、酸化型グルタチオン共に反応開始 25 分後の吸光度を定量に用いた。メタリン酸による沈殿させたタンパクは GSH 定量に使用した上清の除去後 Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 7.2 に懸濁し、15000  $\times$ g、20°C で 15 分遠心して得たペレットを、1% SDS を含む MES buffer に再度懸濁、18000  $\times$ g、20°C で 30 分遠心した上清の 280nm の吸光度を NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) で測定した。吸光度からのタンパク質濃度算出は次の式を用いた: Protein concentration (mg/ml) = 1.55A<sub>280</sub> - 0.76A<sub>260</sub> (Stoscheck, 1990)。

#### 2.2.6 遺伝子発現の定量

肝組織からの RNA 抽出には RiliaPrep RNA Tissue Mniprep System (Promega, Madison, WI) を用いた。約 20  $\mu$ g の凍結肝左葉サンプルを LBA+TG バッファー中でビーズによりホモジナイズし、ミニカラムに RNA を補足させ、DNase による DNA 分解処

理などを添付のプロトコルの通り進め、Nuclease-free water に RNA を溶出したものを逆転写に使用した。逆転写は、本稿第 1 章と同様に Super Script III RT、Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer、dNTP Mix、RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor を用いて、製品プロトコルの通りに mRNA から cDNA 合成をおこなった。合成に用いた Total RNA 量は 20  $\mu$ l 反応系において 4  $\mu$ g である。リアルタイム PCR による定量は、機器は AriaMX Real-time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA) を用いた。今回リアルタイム PCR による検出はすべてインターカーレーター法を用いており、試薬は THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, JP) を用いた。初期変性 95°C 30~60 秒の後に変性 95°C 5~10 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長反応 72°C 30 秒の増幅反応を 40 サイクルおこなった。融解曲線分析もおこない、非特異的反応が起こっていないことを確認した。用いたプライマー配列は表 2-1 に示す。

#### 2.2.7 DNA 結合 ELISA を用いた Nrf2 活性化の検出

肝組織からのタンパク質核分画の抽出には NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) を用いた。TransAM®Nrf2 (Active Motif, Carlsbad, CA) キットを用い、96-well plate 上の固定オリゴヌクレオチド (抗酸化応答配列; 5'-GTCACAGTGA CT CAGCAGAATCTG-3') に結合する活性 Nrf2 を ELISA 様反応により検出した。1 ウェル当たり 15  $\mu$ g の抽出核タンパク質を添加した。製品プロトコルの通りに抗 Nrf2 抗体、HRP 標識抗体を作用させた後に発色反応を行い、プレートリーダー (PowerWaveXS2, Biotek) を用いて 450 nm の波長を検出し Nrf2 活性化の指標とした。

#### 2.2.7 統計解析

一元配置分散分析 (ANOVA) により wild-type または *Nrf2*<sup>-/-</sup>におけるグループ間の平均の差を検定し、有意差があった場合にダネットの多重比較検定を行い、各遺伝子型におけるコントロール群と 1,2-DCP 曝露グループとの差を検定した。免疫組織化学染色の結果に対しては単回帰分析をおこない、BrdU、Ki67、TUNEL 陽性細胞を用いた各指標値に対する 1,2-DCP 曝露濃度の影響を各遺伝子型において検討した。

表 2-1. PCR 実験に用いたプライマー配列

Gene (Alias)	Sequence (5' - 3')	PCR product length (bp)	Reference
<i>Gapdh</i>	F: GCCTGGAGAAACCTGCCAA R: TGAAGTCGCAGGAGACAACC	117	Mandolesi <i>et al.</i> , 2013, Zhong <i>et al.</i> , 2015
<i>Gclm</i>	F: TCACAATGACCCGAAAGAACTG R: ACCCAATCCTGGGCTTCAAT	90	Noh <i>et al.</i> , 2015
<i>Gclc</i>	F: GGAAGGAGGCGCATCAAAGT R: CCTTTTCTCCTCTCCGATGCC	107	Hotta <i>et al.</i> , 2020
<i>Gsr</i>	F: CAGTTGGCATGTCATCAAGCA R: CGAATGTTGCATAGCCGTGG	116	Meling <i>et al.</i> , 2020
<i>Gss</i>	F: GGGCCTGAATCGCTCAGATTA R: CAGGACATTGAGAACGTGTCG	148	ID* <sup>1</sup> : 6680116c3
<i>xCT (Slc7a11)</i>	F: GATGGTCTAAATAGCACGAGTG R: GGGCAACCCCATAGACTTGT	181	ID: 80861466c3
<i>Gstm1</i>	F: GGAAGTGCACACCCGATCC R: GCGTCACCCATGGTGTATCT	80	Primer-BLAST* <sup>2</sup>
<i>Gstt1</i>	F: CTGTCGCGCCATTTATATCTTCG R: GTACCAGTGGTCAGGAACCTT	217	ID: 160298218c1
<i>Gstp1</i>	F: CTGTCTACGCAGCACTGAAT R: CCCTCGAACTGGGAAGTAGAC	74	Primer-BLAST
<i>Atf4</i>	F: ATGGGTTCTCCAGCGACAAG R: CCGGAAAAGGCATCCTCCTT	100	Primer-BLAST
<i>Mthfd2</i>	F: GCAAAGCCCAAATTGGTTGG R: GGACGGGAGTGATATAACCAGC	73	Primer-BLAST
<i>Psat1</i>	F: CGGTGCTGGTCTGTGACAT R: GCACCAGCGAAAATCACACC	82	Primer-BLAST
<i>Cbs</i>	F: GGAAAATTGGGAACACCCCTAT R: CCACCCGCATTGAAGAACTCA	103	ID: 118130577c2
<i>Cth</i>	F: TACATGAATGGCCACAGCGA R: AGCCGACTATTGAGGTCATCA	71	Primer-BLAST
<i>Asct2 (Slc1a5)</i>	F: TACCGCAATCCTGTATCCAGC R: CACCAAAGACGATAGCGAAGAC	111	ID: 114326473c2
<i>Asns</i>	F: TGACCCGCTGTTTGGAAATG R: CTGTAGCGCCTTGTGGTTGTA	97	ID: 146134364c2
<i>H2ax</i>	F: ATGTGAACCCAGTTTCTCTAGG R: CGGCAGGTATAGAACTCTTGTC	87	Junghans <i>et al.</i> , 2022
<i>Atm</i>	F: ATAGACGTAGGCTGGGAAGTG R: CGGGTTGTAATCTGTAGCCAAG	89	Primer-BLAST
<i>Atr</i>	F: CTTATGCGGCTCAAGTCTGATT R: TCTGAACTCCAAGAGCGTCTAC	160	ID: 189339265c2
<i>p53 (Trp53)</i>	F: CACAGCACATGACGGAGGTC R: TCCTTCCACCCGGATAAGATG	101	ID: 187960038c2

※1 ID は PrimerBank ID を示す (Spandidos *et al.*, 2010)

※2 National Center for Biotechnology Information (NCBI) が提供する Primer-BLAST ツール(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)を用いて配列を設計した。

表 2-1. PCR 実験に用いたプライマー配列 (続き)

Gene (Alias)	Sequence (5' - 3')	PCR product length (bp)	Reference
<i>Nrf2 (Nfe2l2)</i>	F: CAGCATAGAGCAGGACATGGAG R: GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG	107	Sun <i>et al.</i> , 2016
<i>Keap1</i>	F: CAGCAGCGTGGAGAGATATGA R: TACAGCAAGCGTTGAGCA	108	Primer-BLAST
<i>Nqo1</i>	F: GCAGGATTTGCCTACACATATGC R: AGTGGTGATAGAAAGCAAGGTCTTC	81	Akino <i>et al.</i> , 2019
<i>Ho-1 (Hmox1)</i>	F: AGGCTAAGACCGCCTTCCT R: TGTGTTCCCTCTGTCAGCATCA	72	Yamamoto <i>et al.</i> , 2019
<i>Sod1</i>	F: ATGGCCGTACAATGGTGGT R: ATCCCAATCACTCCACAGGC	116	Qi <i>et al.</i> , 2020
<i>Nfkb1</i>	F: ATCCGCTATGTGTGTGAAGG R: GTGACCAACTGAACGATAACC	135	Hosokawa <i>et al.</i> , 2020
<i>IκB (Nfkbib)</i>	F: TAGTCTTTGGCTACGTCACTGA R: AAATCCAGGAAGGGCTCATGC	82	ID: 118130180c2
<i>Tnf</i>	F: CCACCACGCTCTTCTGTCTA R: AGGGTCTGGGCCATAGAACT	103	Carl <i>et al.</i> , 2004
<i>Il1b</i>	F: TAACCTGCTGGTGTGTGACG R: TGTCGTTGCTTGTTCTCCT	182	Peng <i>et al.</i> , 2020
<i>Il6</i>	F: TCTATACCACTTCAAGTCGGA R: GAATTGCCATTGCACAACCTTTT	88	ID: 13624310c2
<i>G6pd (G6pdx)</i>	F: CACAGTGGACGACATCCGAAA R: AGCTACATAGGAATTACGGGCAA	103	ID: 6996917a1
<i>Pgd</i>	F: ATGCCCCGTCACCCTCATTG R: AAGCCTTGGGCGTAGGAGAT	191	ID: 124486894c3
<i>Tkt</i>	F: GGCATCCTGTCCCGAAACAA R: TGCAATAGACTCGGTAGCTGG	129	ID: 158508663c2
<i>Taldo1</i>	F: GTGGGCGCATCCTTGATT R: TGGTCTTGTAGCCGAACTTCT	127	ID: 291291015c3
<i>Ppat</i>	F: TTCAGGGTGCATAAGGGAATGG R: GCGTACCTCGTATGTCCGA	104	ID: 247301190c1
<i>Mki67 (Ki67)</i>	F: AGAAGTAAGCGGACTGGAAACA R: GCAACTATCTTGGCAACATCCTC	77	ID: 224809383c2
<i>Pcna</i>	F: TTGCACGTATATGCCGAGACC R: GGTGAACAGGCTCATTCACTCT	183	ID: 118130232c1
<i>Igf1</i>	F: CACATCATGTCGTCTTACACC R: GGAAGCAACACTCATCCACAATG	220	ID: 163659888c1
<i>Notch1</i>	F: GATGGCCTCAATGGGTACAAG R: TCGTTGTTGTTGATGTCACAGT	74	ID: 13177625a1
<i>Jag1</i>	F: AATCGCATCGTACTGCCTTTC R: GTGTCATTAAGGAATCCCAGG	83	ID: 326439085c2

## 2.3 結果

### 2.3.1 マウスの行動、体重および組織重量の変化

今回の実験で用いたマウスの数は表 2-2 に示した。5 週間の曝露期間において、83 mg/kg 投与群の 1 匹が途中で死亡したことを除いて、1,2-DCP 処置により弱るような行動異常は観察されなかった。死亡の 1 匹に関しては解剖した肺や胸腔に油のような液体がたまっており、経口投与の失敗が原因ではないかと考えられる。この死亡個体については解析対象外とした。

本研究の曝露期間中のマウスの体重変動を図 2-1 に示す。体重の投与初日と解剖日との差に関して、野生型マウスの 250 mg/kg 投与群においてはコントロール群と比較して有意に体重が増加していた (表 2-2)。Wild-type および *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウス両者ともに肝臓、脾臓、腎臓に関して臓器重量の投与群とコントロール群との間に有意な重量変化は観察されなかった (表 2-3)。副腎、肺、心臓、胸腺、精巣、精巣上体、精嚢および前立腺においても同様に投与による有意な重量変化は観察されなかった。肝絶対重量において 1,2-DCP の投与と共に増加する傾向が観察されたが ANOVA において各グループ間の統計学的有意差はなかった。

表 2-2. 本実験に使用したマウスの匹数および体重の変化

遺伝子型	1,2-DCP (mg/kg)	マウス匹数			投与初日 体重 (g)	解剖日 体重 (g)	体重変化 (g)
		組織病理 免疫染色	組織重量 生化学	計			
Wild-type ( <i>Nrf2</i> <sup>+/+</sup> )	0	7	6	13	24.7±1.6	25.4±1.1	0.69±1.6
	83	7	5	12	24.8±1.9	25.7±1.7	0.89±1.0
	167	7	5	12	24.3±2.0	25.7±2.2	1.48±1.1
	250	8	6	14	24.5±1.7	26.9±1.5	2.41±1.2**
<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	0	8	5	13	25.1±2.1	25.9±2.3	0.77±1.0
	83	7	5	12	24.9±2.6	26.3±2.0	1.43±1.6
	167	7	5	12	24.7±2.1	26.5±1.8	1.78±1.6
	250	7	5	12	25.3±2.0	26.7±1.8	1.38±1.2

データは各グループの平均値±標準偏差。

\*\*p<0.01, ダネットの多重比較によりコントロール (1,2-DCP 非処置、溶媒のみの投与) と比較。

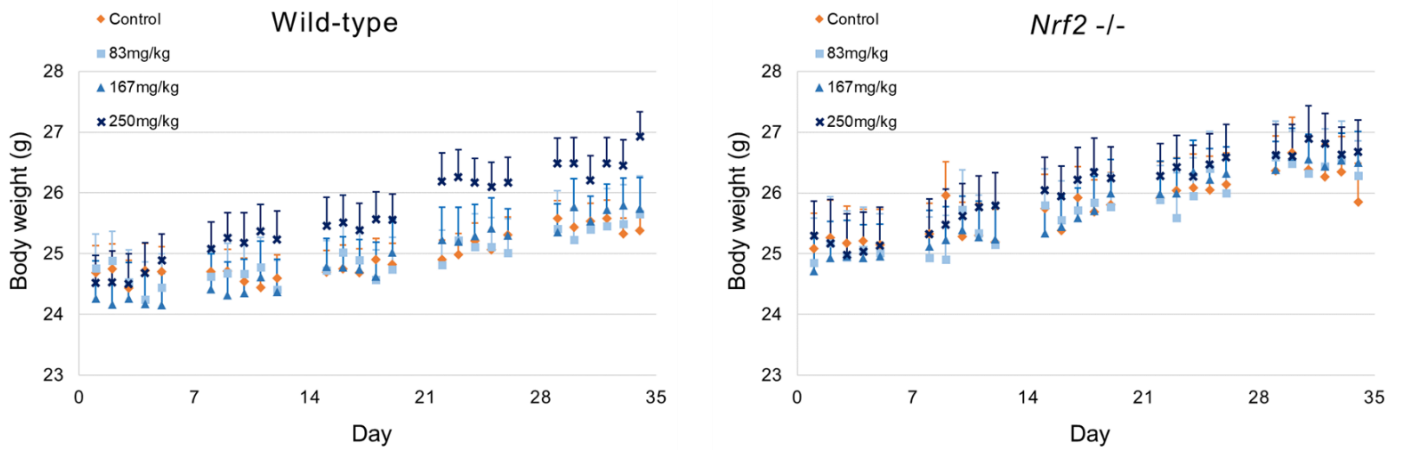


図 2-1 本実験における各グループの体重推移

野生型 (A) および *Nrf2*<sup>-/-</sup> (B) マウスの体重は 1,2-DCP の投与日 (Day 1) および解剖日 (Day 34) のみ測定した。プロット及びエラーバーは各グループの平均値±標準誤差を示す。

表 2-3. 解剖時の組織重量

		組織絶対重量 (mg)				組織相対重量 (%) <sup>a</sup>			
		1,2-DCP dose (mg/kg/day)							
		0	83	167	250	0	83	167	250
マウス 匹数	Wild-type	6	5	5	6	6	5	5	6
	<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	5	5	5	5	5	5	5	5
肝臓	Wild-type	1062±127	1137±127	1154±255	1292±105	4.24±0.45	4.47±0.60	4.75±1.12	4.75±0.38
	<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	804±155	812±86	908±134	937±106	3.36±0.60	3.18±0.40	3.51±0.50	3.65±0.54
腎臓	Wild-type	172±11	165±24	173±14	177±15	0.690±0.018	0.646±0.033	0.710±0.026	0.652±0.019
	<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	153±13	170±24	153±20	165±25	0.640±0.027	0.661±0.022	0.592±0.024	0.639±0.031
脾臓	Wild-type	52.9±5.9	61.9±16.8	57.5±11.1	60.8±11.7	0.212±0.009	0.242±0.026	0.248±0.016	0.223±0.016
	<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	57.5±12.3	66.7±11.0	71.0±21.3	72.2±20.1	0.240±0.021	0.260±0.013	0.273±0.033	0.279±0.033

データは各グループの平均値±標準偏差。

<sup>a</sup> 組織絶対重量を解剖日の体重で除した値とする。



### 2.3.2 マウス血漿サンプルにおける生化学マーカーの変化

解剖日にマウスより回収した血漿を用いて、血液学的検査を行った。肝障害のマーカーとして用いられる ALT は wild-type マウスにおいて 83、167、250 mg/kg 投与群いずれもコントロール群と比べて有意に増加していたが、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいては 1,2-DCP 投与によって上昇する傾向はみられたものの、バラつきが大きく、統計学的有意な差とはならなかった。AST は wild-type、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウス共に投与群とコントロール群に有意な差はなかったが、これは全血を採取する際に断頭という衝撃や異物混入が起りやすい方法を用いたためにほぼすべてのサンプルに溶血が多少なりとも起り、血漿に赤血球成分が混入した結果バラつきが大きくなったためと考えられる (ALT と比べて AST は肝特異性が低く、溶血の影響を受けやすい)。他、コリンエステラーゼやアルブミンについて wild-type マウスにおいて 1,2-DCP 投与群とコントロール群と比べて有意な上昇が観察された。

表 2-4. 血漿サンプルの解析結果

遺伝子型	1,2-DCP		ALT	AST	ALP	ChE	ビリルビン	アルブミン	A/G 比
	(mg/kg/day)	N	(IU/L)	(IU/L)	(IU/L)	(IU/L)	(10 <sup>-1</sup> mg/dL)	(g/dL)	
Wild-type									
	0	6	11.2±2.7	102±20	258±47	29.4±2.8	1.00±0.39	2.88±0.21	1.60±0.18
	83	5	19.2±3.8*	137±11	312±38	31.0±3.2	0.83±0.17	3.11±0.31	1.58±0.27
	167	5	21.8±2.9**	142±26	263±80	32.2±4.4	1.73±1.46	3.40±0.14**	1.66±0.47
	250	6	20.6±6.8**	150±71	264±65	35.4±2.2*	1.32±0.57	3.33±0.26*	1.81±0.25
<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>									
	0	5	15.8±6.5	156±19	356±33	32.1±3.0	1.60±1.04	3.07±0.30	1.65±0.17
	83	5	16.5±5.1	177±72	338±47	32.9±2.8	2.30±0.56	3.24±0.38	1.85±0.19
	167	5	19.6±3.8	163±26	342±43	31.6±2.4	1.91±0.86	3.35±0.31	1.98±0.13
	250	5	34.9±34.6	237±130	343±33	35.6±5.0	3.58±2.04	3.00±0.37	1.86±0.28

データは各グループの平均値±標準偏差。\*p<0.05 \*\*p<0.01, ダネットの多重比較検定によりコントロールと比較。ALT, アラニントランスアミナーゼ; AST, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ; ALP, アルカリフォスファターゼ; ChE, コリンエステラーゼ; A/G, アルブミン/グロブリン

### 2.3.3 組織病理的所見

ヘマトキシリン・エオシン染色をおこなった肝切片を用いた解析において、今回の実験では1,2-DCP依存性の有意な変化は観察されなかった。今回病理医のかたに依頼して血管拡張、類洞拡張、水腫、リンパ球浸潤、膿瘍、胆管拡張、胆管増生についてスコア化をおこなわれた（表 2-5）が、血管拡張などは心臓からの還流固定を行ったことにより発生していると考えられる。

表 2-5 ヘマトキシリン・エオシン染色における各所見のスコア

	1,2-DCP (mg/kg /day)							
	Wild-type				<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>			
	0	83	167	250	0	83	167	250
血管拡張	2.08 (0.72)	2.62 (0.59)	2.90 (0.30)	2.88 (0.34)	2.29 (0.75)	2.50 (0.69)	2.15 (0.75)	2.08 (0.72)
類洞拡張	0.42 (0.58)	0.65 (0.49)	0.76 (0.54)	0.71 (0.46)	0.79 (0.78)	0.60 (0.60)	0.43 (0.51)	0.67 (0.66)
水腫	0.46 (0.51)	0.66 (0.48)	0.57 (0.51)	0.50 (0.51)	1.38 (0.65)	1.10 (0.31)	0.71 (0.46)	0.62 (0.59)
リンパ球浸潤	0.33 (0.48)	0.29 (0.46)	0.19 (0.40)	0.50 (0.59)	0.75 (0.44)	0.65 (0.49)	0.57 (0.60)	0.24 (0.44)
膿瘍 (大)	0	0	0	0	0.21 (0.41)	0	0	0
膿瘍 (中)	0.04 (0.20)	0	0	0.08 (0.28)	0.42 (0.58)	0.10 (0.31)	0.29 (0.46)	0.24 (0.44)
膿瘍 (小)	0.33 (0.56)	0.29 (0.64)	0.19 (0.40)	0.54 (1.06)	0.58 (0.65)	0.50 (0.69)	0.67 (1.06)	0.48 (0.60)
膿瘍 (合計)	0.38 (0.63)	0.29 (0.64)	0.19 (0.40)	0.58 (0.58)	1.38 (0.77)	0.62 (0.86)	0.95 (1.24)	1.00 (1.04)
胆管拡張	0	0.14 (0.36)	0	0	0.46 (0.51)	0.15 (0.37)	0.10 (0.30)	0
胆管増生	0.08 (0.28)	0	0	0.04 (0.20)	0	0	0	0

データは各グループの平均値（標準偏差）。スコアは 1: 軽度、2: 中程度、3: 重度として記載。

#### 2.3.4 細胞増殖マーカー陽性細胞数の変化

1,2-DCP を5週間投与した後の肝臓での細胞増殖に関する変化について、BrdU を取り込んだ細胞またはKi67を発現する細胞を免疫組織化学による標識し、陽性の細胞核を数えて評価した。BrdU は細胞周期のS期に取り込まれるため、解剖の前に腹腔内投与を行うことでDNA複製中の細胞を標識できる。Ki67は細胞増殖期の休止期であるG0期を除く細胞に発現し、今回はこの2つの細胞増殖マーカーを選択した。

Wild-type、または *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスそれぞれにおいて増殖マーカー陽性細胞数に対する1,2-DCP投与量の影響をANOVAおよびダネットの多重比較検定により各群の平均を比較した。BrdU陽性肝細胞は *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの167 mg/kg投与群においてコントロール群と比べて有意に上昇していたが、wild-typeでは有意な変化は観察されなかった (Figure 2A, C)。Ki67陽性肝細胞はwild-type、*Nrf2*<sup>-/-</sup>共に167 mg/kg投与群において有意に上昇していたが、250 mg/kgにおいては有意な変化とはならなかった (図2-2 B及びD)。BrdU陽性胆管細胞は、*Nrf2*<sup>-/-</sup>の167 mg/kg投与群のみでコントロール群と比べて有意な変化がみられた (図2-3 A及びC)。Ki67陽性胆管細胞はwild-typeの250 mg/kg投与群のみでコントロール群と比べて有意な変化がみられた (図2-3 B及びD)。

単回帰分析の結果ではwild-typeにおいては4つの指標 (BrdU陽性またはKi67陽性の肝細胞または胆管細胞) とともに1,2-DCP投与量が有意な正の影響を与えていたが、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスではBrdU陽性の肝細胞のみが1,2-DCPの有意な正の影響を与えていた (表2-6)。

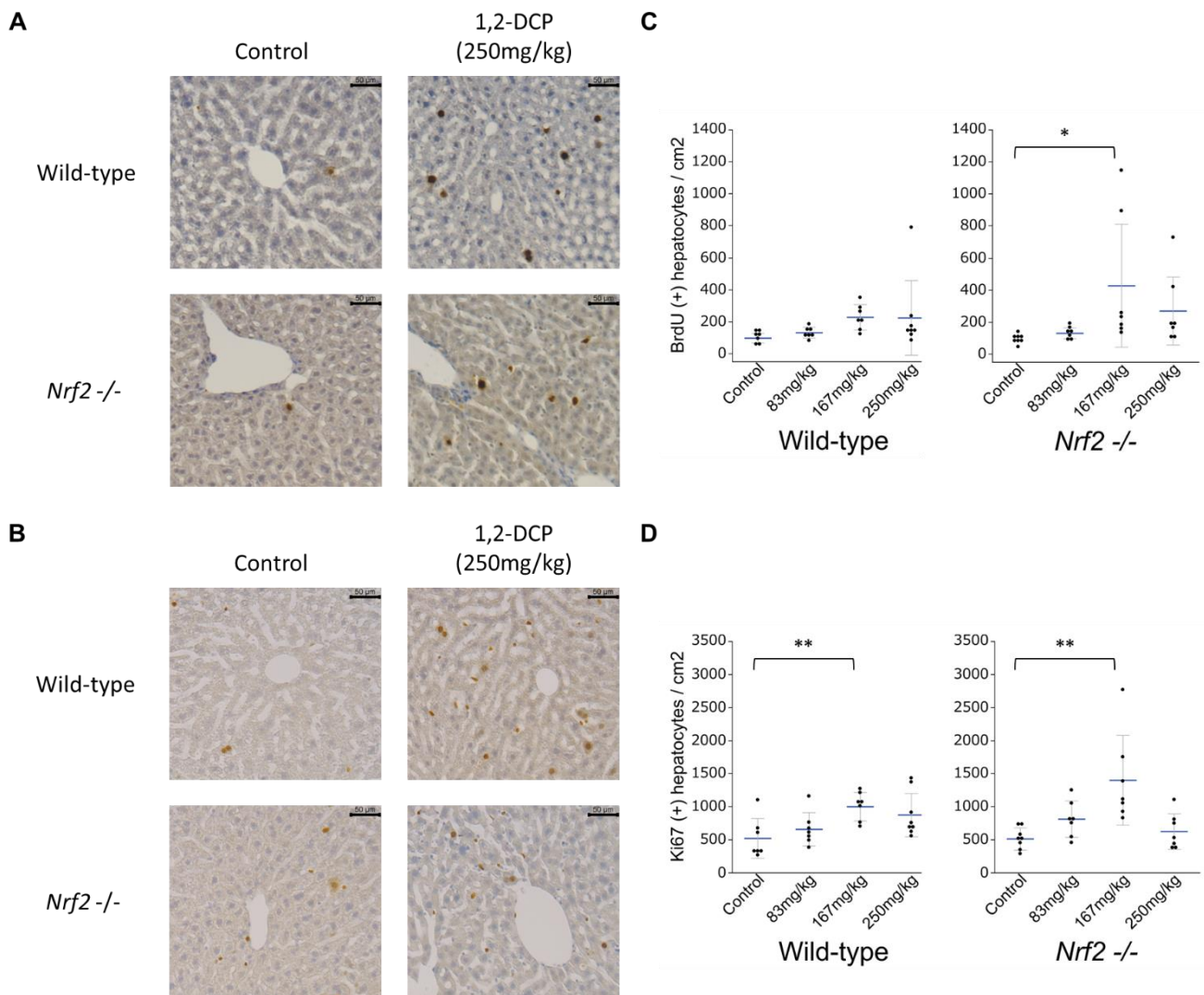


図 2-2. 肝細胞における細胞増殖マーカー (BrdU、Ki67) に対する免疫組織化学染色

A, B. BrdU、Ki67 に対する免疫組織化学をおこなった肝切片の光学顕微鏡像。陽性核は 3,3'-ジアミノベンジジンによる茶色、核対比染色はヘマトキシリンによる青で染色。倍率：×20

C, D. 細胞増殖指標には BrdU、Ki67 陽性細胞肝細胞数を肝切片の面積 (cm<sup>2</sup>) で除した値を用いた。ドットは各マウスの数値を表す。横棒およびエラーバーはそれぞれ平均、標準偏差を表す。

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , ダネットの多重比較検定によりコントロールと比較。

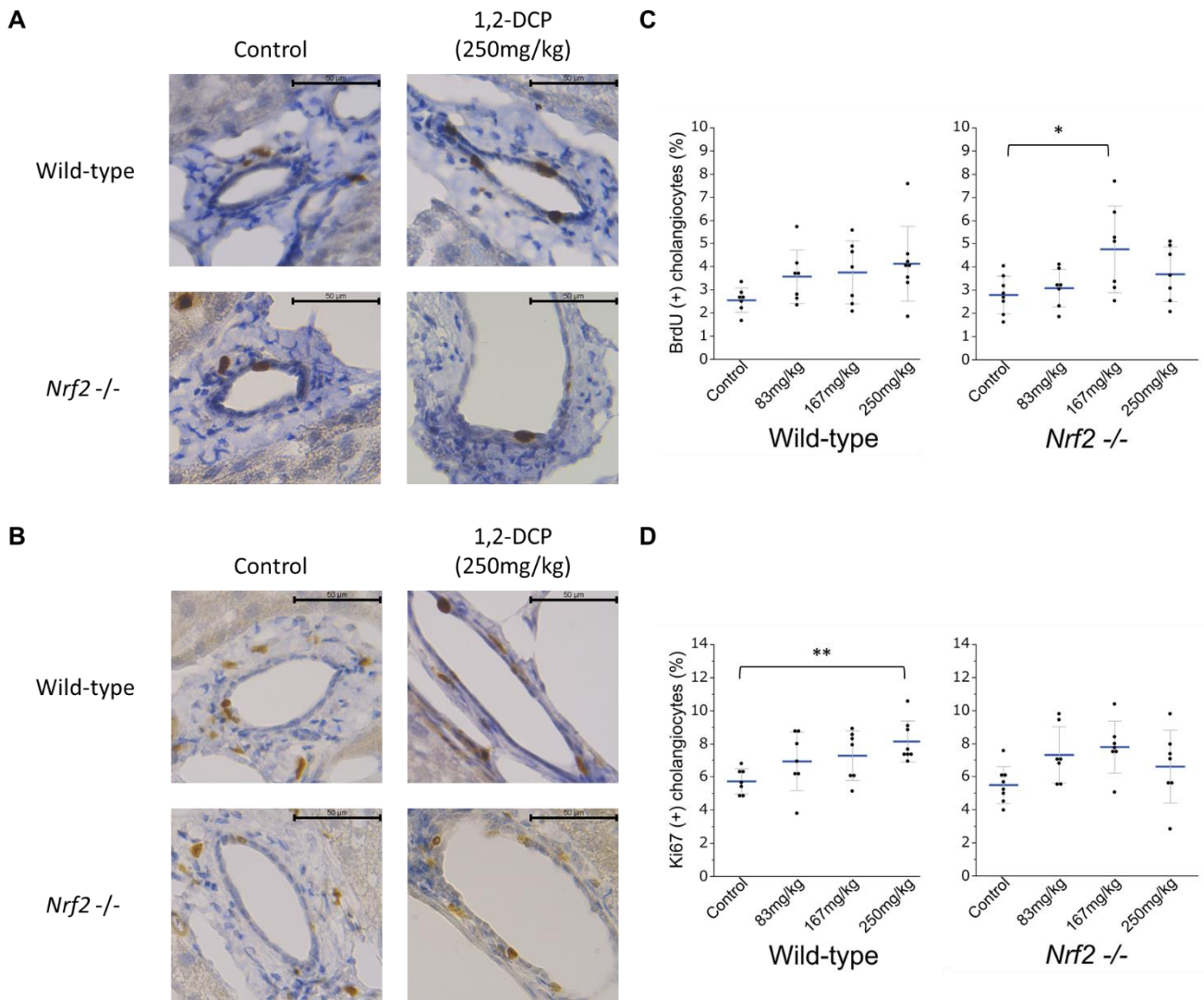


図 2-3. 胆管細胞における細胞増殖マーカー (BrdU、Ki67) に対する免疫組織化学染色

A, BrdU、Ki67 に対する免疫組織化学後の肝切片内胆管組織、光学顕微鏡像。陽性核は 3,3'-ジアミノベンジジンによる茶色、核対比染色はヘマトキシリンによる青で染色。倍率：×60

B, 細胞増殖指標には胆管細胞数における BrdU、Ki67 陽性細胞数の割合を用いた。ドットは各マウスの数値を表す。横棒およびエラーバーはそれぞれ平均、標準偏差を表す。

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , ダネットの多重比較検定によりコントロールと比較。

表 2-6. 免疫組織化学指標値に対する回帰分析の結果

		Genotype	Simple regression Regression coefficient of 1,2-DCP (p value)
Hepatocytes	BrdU	Wild-type	0.56 (p = 0.034)
		<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	0.99 (p = 0.048)
	Ki67	Wild-type	1.6 (p = 0.0074)
		<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	1.2 (p = 0.24)
	TUNEL	Wild-type	0.028 (p = 0.83)
		<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	-0.20 (p = 0.44)
Cholangiocytes	BrdU	Wild-type	0.0058 (p = 0.022)
		<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	0.0053 (p = 0.052)
	Ki67	Wild-type	0.0091 (p = 0.0017)
		<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	0.0050 (p = 0.17)
	TUNEL	Wild-type	-0.0038 (p = 0.0048)
		<i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup>	-0.0015 (p = 0.13)

### 2.3.5 アポトーシス陽性細胞数の変化

1,2-DCP を 5 週間投与した後の肝臓でのアポトーシス陽性細胞数の変化は TUNEL 法によって細胞死の過程の DNA 断片化末端を標識して陽性細胞数のカウントをおこなった。一部の *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて著しいアポトーシス陽性細胞の増加がみられたが、全体として 1,2-DCP 依存性の有意なアポトーシスの増加は観察されなかった。Wild-type の胆管細胞ではアポトーシス陽性数に対する 1,2-DCP の有意な負の影響が観察され、ダネットの多重比較検定においても 250 mg/kg 投与群はコントロール群に比べて有意に減少していた。

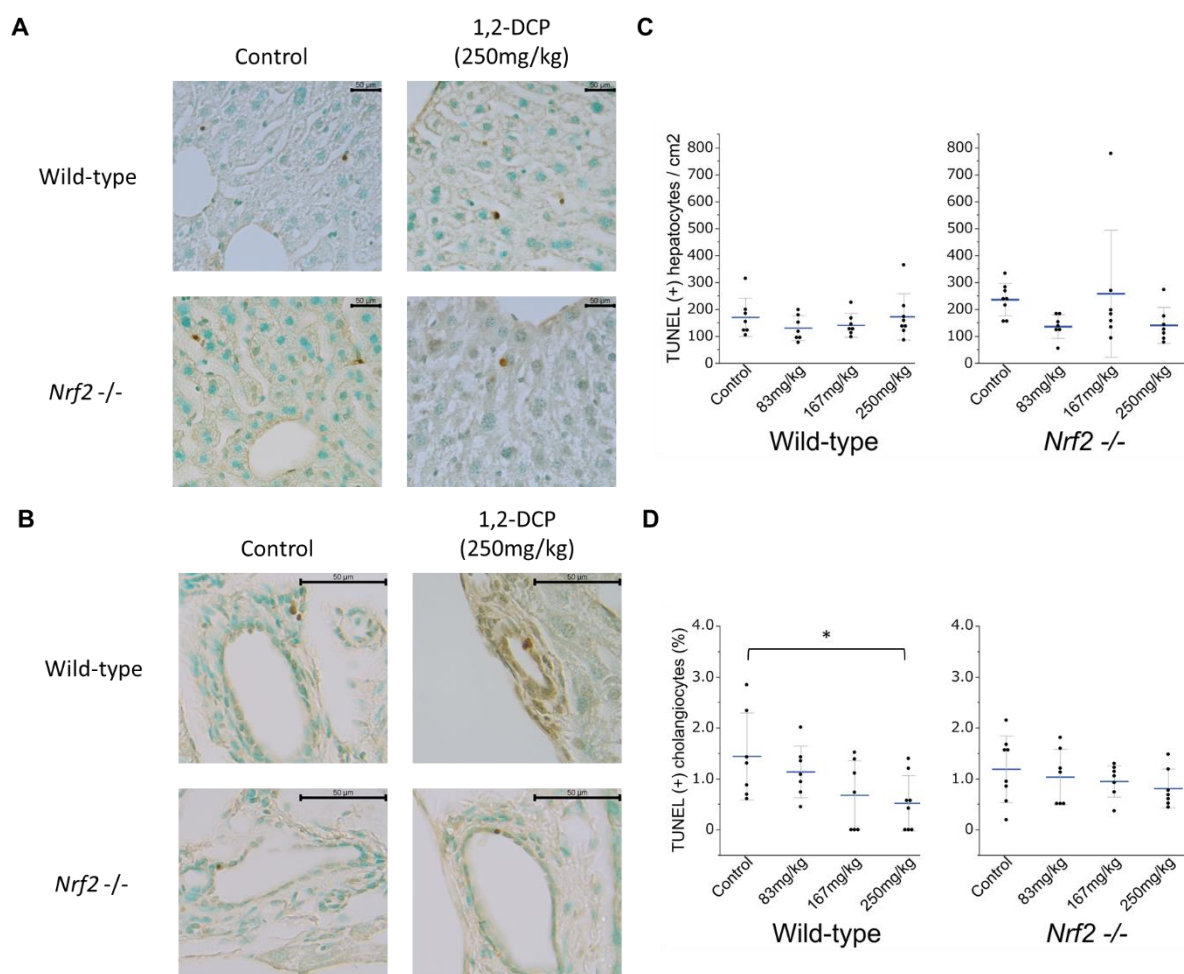


図 2-4. TUNEL 法を用いたアポトーシス陽性肝・胆管細胞の標識

A, B. TUNEL 法による染色をおこなった肝切片 (A) および肝内胆管 (B) 光学顕微鏡像。陽性核は 3,3'-ジアミノベンジジンによる茶色、核対比染色はメチルグリーンにより緑に染色。倍率: ×20 (A)、×60 (B)

C, D. アポトーシスの指標には陽性肝細胞数を肝切片の面積 (cm<sup>2</sup>) で除した値 (C) および TUNEL 陽性胆管細胞の割合 (D) を用いた。ドットは各マウスの数値を表す。横棒およびエラーバーはそれぞれ平均、標準偏差を表す。

\**p*<0.05,ダネットの多重比較検定によりコントロールと比較。

### 2.3.6 肝におけるグルタチオン量、および関連遺伝子量の変化について

グルタチオンにはスルフヒドリル基を持ち活性酸素種や親電子性化学物質からの防御に働く還元型と、電子供与に働いたことで二つのグルタチオンがジスルフィド結合でつながった酸化型が存在する。還元型と酸化型を合わせたものを総グルタチオンとし、総グルタチオンの量、還元型グルタチオン量をタンパク質量で補正した値、および還元型と総グルタチオンの比をグラフに示した (図 2-5 A, B 及び C)。

250 mg/kg 投与群においては野生型、*Nrf2*<sup>-/-</sup>共にコントロール群と比べて総グルタチオン量が有意に増加していた。酸化型グルタチオンに関しては *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて増加傾向がみられたが ANOVA において有意な差は見られなかった。還元型と総グルタチオンの比に関しては 1,2-DCP 投与に依存した有意な変化は観察されなかった。

グルタチオンの生成や維持に関与する酵素として、グルタミン酸システインリガーゼの catalytic サブユニット (*Gclc*) および modifier サブユニット (*Gclm*)、グルタチオン合成酵素 (*Gss*)、グルタチオン還元酵素 (*Gsr*)、シスチン・グルタミン酸トランスポーター (*Slc7a11*: xCT) の mRNA 発現量を RT-PCR 法により検討した (Fig 9B)。これら 5 種類の遺伝子発現は *Nrf2* によって制御されているという報告がある (Chan *et al.*, 2001; Rangasamy *et al.* 2004; Sasaki *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 1999)。またグルタチオン抱合を促進するグルタチオン S-トランスフェラーゼ (*Gstm1*, *Gstp1*, *Gstt1*) を制御する遺伝子の発現に関しても同様に検討をおこなった (Figure 5D)。野生型マウスにおいてはグルタチオン合成や還元型グルタチオンの維持に働く *Gclc*, *Gclm*, *Gss*, *Gsr* の 1,2-DCP 依存性の発現上昇は観察されなかったが、*Slc7a11* の発現量が 250 mg/kg 群において有意に増加していた。一方、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいては *Gss* および *Gsr* が 1,2-DCP 250 mg/kg 投与群においてコントロール群と比べて有意に上昇していた。転移酵素関連遺伝子 (図 2-5 E) については *Gstm1* については両遺伝子型において 1,2-DCP の投与依存的な発現増加がみられた。また *Gstp1* においては *Nrf2*<sup>-/-</sup> の 250 mg/kg 投与群において有意にコントロール群と比べて減少していた。*Gstt1* については両遺伝子型ともに 1,2-DCP 投与による有意な変化は観察されなかった。



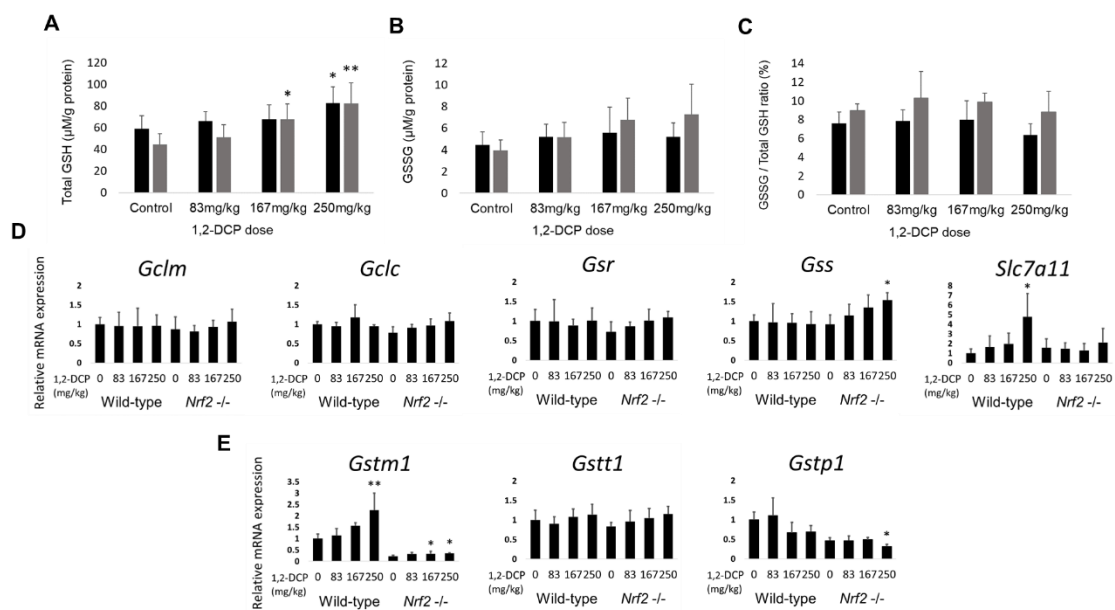


図 2-5. 肝におけるグルタチオン量および関連遺伝子の発現

A, B, C, 酵素リサイクリング法により肝臓におけるグルタチオン量を酸化型と還元型を合わせた総グルタチオン (A)、酸化型 (B) を定量し、タンパク質量で補正した。総グルタチオンに対する酸化型の比 (C) も求めた。黒色：野生型、灰色：*Nrf2*<sup>-/-</sup>

D, グルタチオン生成に関連する遺伝子 (*Gclm*, *Gclc*, *Gsr*, *Gss*, *Slc7a11*) の相対的発現を RT-PCR 法により定量した。

E, グルタチオン転移酵素に関連する遺伝子 (*Gstm1*, *Gstt1*, *Gstp1*) の相対的発現を RT-PCR 法により定量した。

棒グラフおよびエラーバーは平均±標準偏差を表す。

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , ダネットの多重比較検定により遺伝子型ごとのコントロールと比較。

### 2.3.7 Nrf2 に依存しないグルタチオン合成関連遺伝子量の変化について

前述のグルタチオン合成に関しては、主に Nrf2 によって制御されているが、それだけではない部分もある。ATF4 という小胞体ストレスなどによって活性化する転写因子によって制御されるメチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ 2 (Mthfd2)、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ (Psat1)、シスタチオニンβシクターゼ (Cbs)、シスタチオニンγリアーゼ (Cth)、アラニン-セリン-システイントランスポーター 2 (Asct2)、アスパラギンシクターゼ (Asns) はグルタチオンの合成に間接的に働いている (Kasai *et al.*, 2020)。これらの遺伝子発現について制御因子である ATF4 の遺伝子発現と共に検討した (図 2-6)。

*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいては Mthfd2 の発現が 1,2-DCP 250 mg/kg 投与群において有意に亢進していた。Psat1 の発現は、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスだけでなく野生型マウスにおいても 250mg/kg 投与群において有意に亢進していた。

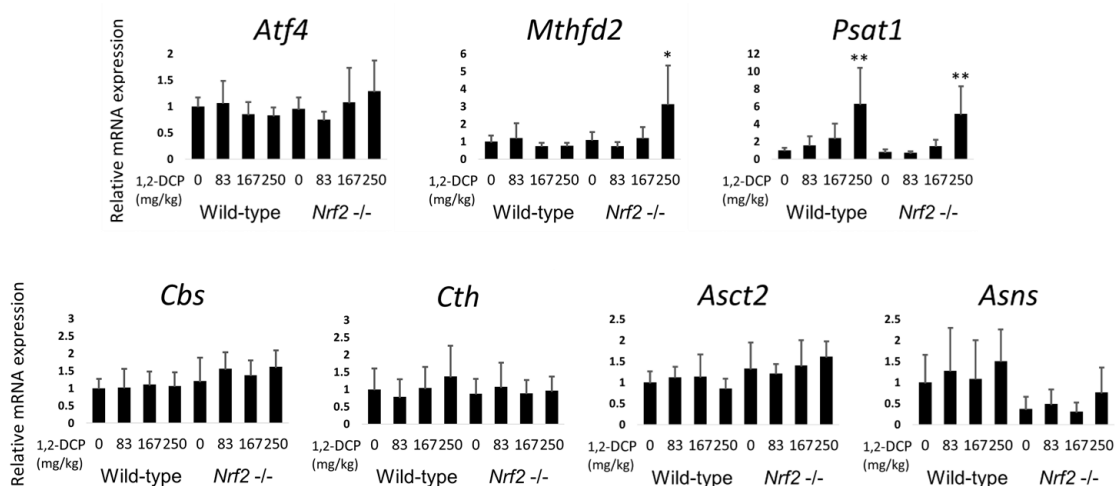


図 2-6. 肝における Nrf2 非依存性グルタチオン合成関連遺伝子の発現

グルタチオン生成に関連する遺伝子の中でも ATF4 に依存し、Nrf2 には依存しないと考えられる遺伝子 (Atf4, Mthfd2, Psat1, Cbs, Cth, Asct2, Asns) の相対的発現を RT-PCR 法により定量した。

棒グラフおよびエラーバーは平均±標準偏差を表す。

\**p*<0.05 \*\**p*<0.01, ダネットの多重比較検定により遺伝子型ごとのコントロールと比較。

### 2.3.8 肝における DNA 損傷マーカーの変化

肝臓における DNA 損傷の指標として、ヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) を用いた。ウエスタンブロットにより肝サンプル中のタンパク発現を定量し、野生型マウスにおいては 167, 250 mg/kg 投与群においてはコントロール群と比べて有意に  $\gamma$ -H2AX が誘導されていた (図 2-6 A 及び B)。Nrf2<sup>-/-</sup>マウスでは 1,2-DCP 投与依存性の有意な変化は観察されなかった。免疫組織化学染色においても同様の傾向が観察できた (図 2-6 C)。陽性細胞は主に肝細胞において確認され、胆管細胞においては 1,2-DCP 投与群も含めて陽性反応を観察することは困難であった。

また H2AX のタンパクをコードする遺伝子や、H2AX のリン酸化にかかわるリン酸化酵素である ATM、ATR や、DNA 損傷の際に細胞周期の停止や修復に関わる p53 の遺伝子発現について RT-PCR によって確認した。今回の結果では、野生型、Nrf2<sup>-/-</sup>マウス共に 1,2-DCP 依存性の有意な変化は観察できなかった。

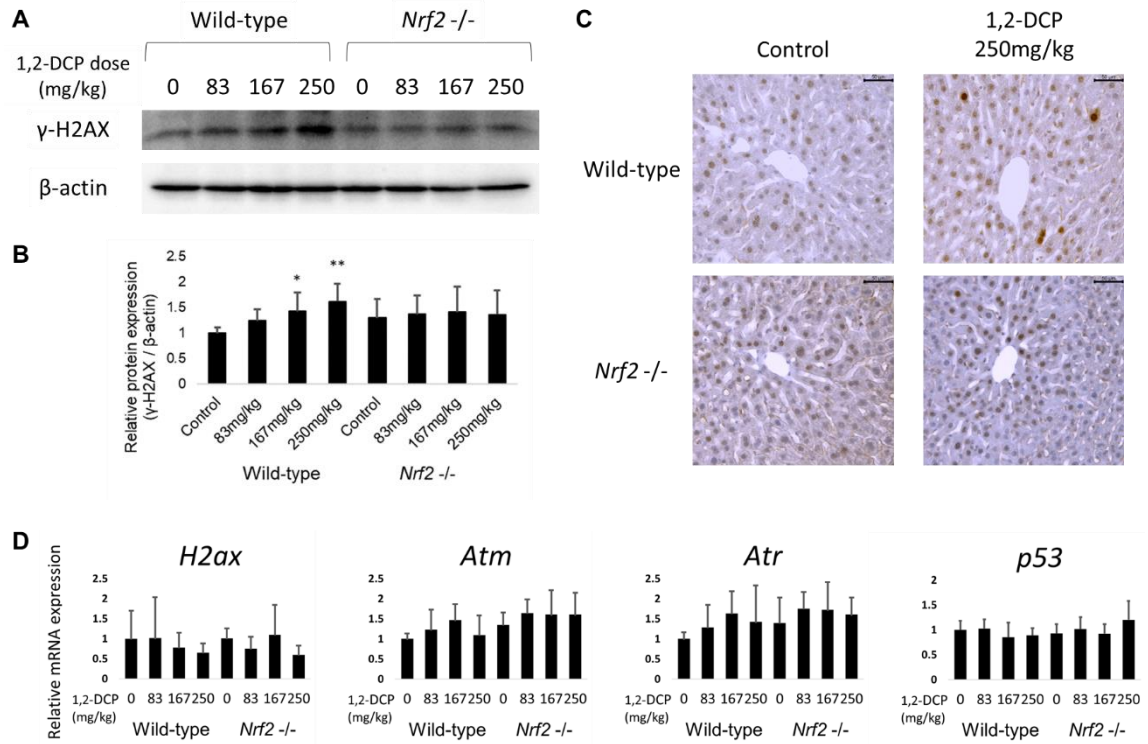


図 2-7 DNA 損傷マーカーの肝臓における発現

5 週間の曝露終了後の肝臓における  $\gamma$ -H2AX の発現をウエスタンブロットにより検出した。

A. 野生型および *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおける  $\beta$ -Actin (45 kDa) および  $\gamma$ -H2AX (15 kDa) の発現。

B.  $\gamma$ -H2AX の発現量は  $\beta$ -Actin の発現量を用いて補正した。

C.  $\gamma$ -H2AX に対する免疫組織化学をおこなった肝切片の光学顕微鏡像。陽性核は 3,3'-ジアミノベンジジンによる茶色、核対比染色はヘマトキシリンによる青で染色。

D. DNA 損傷応答に関連する遺伝子 (H2ax, Atm, Atr, p53) の相対的発現を RT-PCR 法により定量した。

棒グラフおよびエラーバーは平均±標準偏差を表す。

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , ダネットの多重比較検定により遺伝子型ごとのコントロールと比較。

### 2.3.9 肝臓における抗酸化、炎症シグナル、およびペントースリン酸回路、その他細胞増殖・分化に関わる遺伝子発現変化

Wild-type マウス肝臓における Nrf2 の活性化を抗酸化応答配列 (ARE) への結合を利用した ELISA を用いて検出し、またリアルタイム PCR を用いた遺伝子発現定量により、Nrf2 によって発現が制御されている抗酸化因子である NAD(P)H デヒドロゲナーゼ (キノン)1 (*Nqo1*)、ヘムオキシゲナーゼ 1 (*Hmox1*)、スーパーオキシドジスムターゼ (*Sod1*) をコードする遺伝子の発現量変化を検討した (図 2-7 A 及び B)。Nrf2 自身の活性化や遺伝子発現、及び抑制タンパク質である KEAP1 の遺伝子発現量は 1,2-DCP 投与によって変化していなかったものの、*Nqo1* においては wild-type マウスにおいて 1,2-DCP 曝露による有意な発現の増加がみられた。*Hmox1*、*Sod1* については有意な変化は得られなかった。

細胞増殖や DNA 複製において必要な核酸の合成にかかわるペントースリン酸回路にかかわる酵素をコードする遺伝子についても着目した。Nrf2 の制御を受けているペントースリン酸回路関連遺伝子 (Mitsuishi *et al.*, 2012) として、酸化的経路にかかわる酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD、*G6pdx*) およびホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (*Pgd*)、非酸化的経路にかかわる酵素であるトランスケトラーゼ (*Tkt*)、トランスアルドラーゼ 1 (*Taldo1*) をコードする遺伝子を調べ、またホスホリボシルニリン酸からプリンヌクレオチドの前駆体であるホスホリボシルアミンを生成する酵素であるアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (*Ppat*) をコードする遺伝子について検討した (図 2-7 C)。今回グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *G6pdx* は野生型マウスにおいて 1,2-DCP 投与による有意な発現上昇がみられたが、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは有意な変化は観察されなかった。*Pgd* は *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでのみ 1,2-DCP 投与により有意に増加していた。*Ppat* はプリン生成においてペントースリン酸回路の下流に当たる酵素であるが今回 1,2-DCP 投与による有意な影響は見られなかった。

1,2-DCP 投与の結果としての炎症性反応については、NF- $\kappa$ B (*Nfkb1*) および NF- $\kappa$ B の活性抑制に働く I $\kappa$ B (Inhibitor  $\kappa$ B、*IkB*) の mRNA 発現、および炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現を検討した (図 2-7 D)。Nrf2 は炎症応答にも抑制的に働くとされる。これは抗酸化経路の活性化を介した二次的な炎症抑制以外に、炎症性サイトカインである IL-6 や、NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 の遺伝子への結合を介した直接的な発現制御があるとされる (Bao *et al.* 2021; Kobayashi *et al.* 2016)。今回の実験ではいずれの遺伝子に関しても 1,2-DCP 依存性の有意な変化は観察されなかった。

また細胞増殖マーカーである Ki67 (*Mki67*)、PCNA (proliferating cell nuclear antigen, *Pcna*) や、細胞周期の調節を行い DNA 損傷修復応答にも関与する p53 (*Trp53*) (Lakin and Jackson, 1999)、細胞増殖を促進するインスリン様成長因子 1 (*Igf1*)、また細胞の分化を制御する Notch1 およびそのリガンドである Jag1 の遺伝子発現を検討した (図

2-7 E)。Igf1、Notch1、Jag1 に関しては Nrf2 の制御下にあると報告されている (Kim *et al.*, 2014; Malhotra *et al.*, 2010; Wakabayashi *et al.*, 2010)。細胞増殖に関連する遺伝子発現は 1,2-DCP の投与により野生型と *Nrf2*<sup>-/-</sup>共に誘導されなかった。Notch1 に関しては *Nrf2*<sup>-/-</sup>において 1,2-DCP の 250 mg/kg 投与群で有意に遺伝子発現が亢進していたが、Jag1 は 1,2-DCP 曝露依存性の変化は見られなかった。

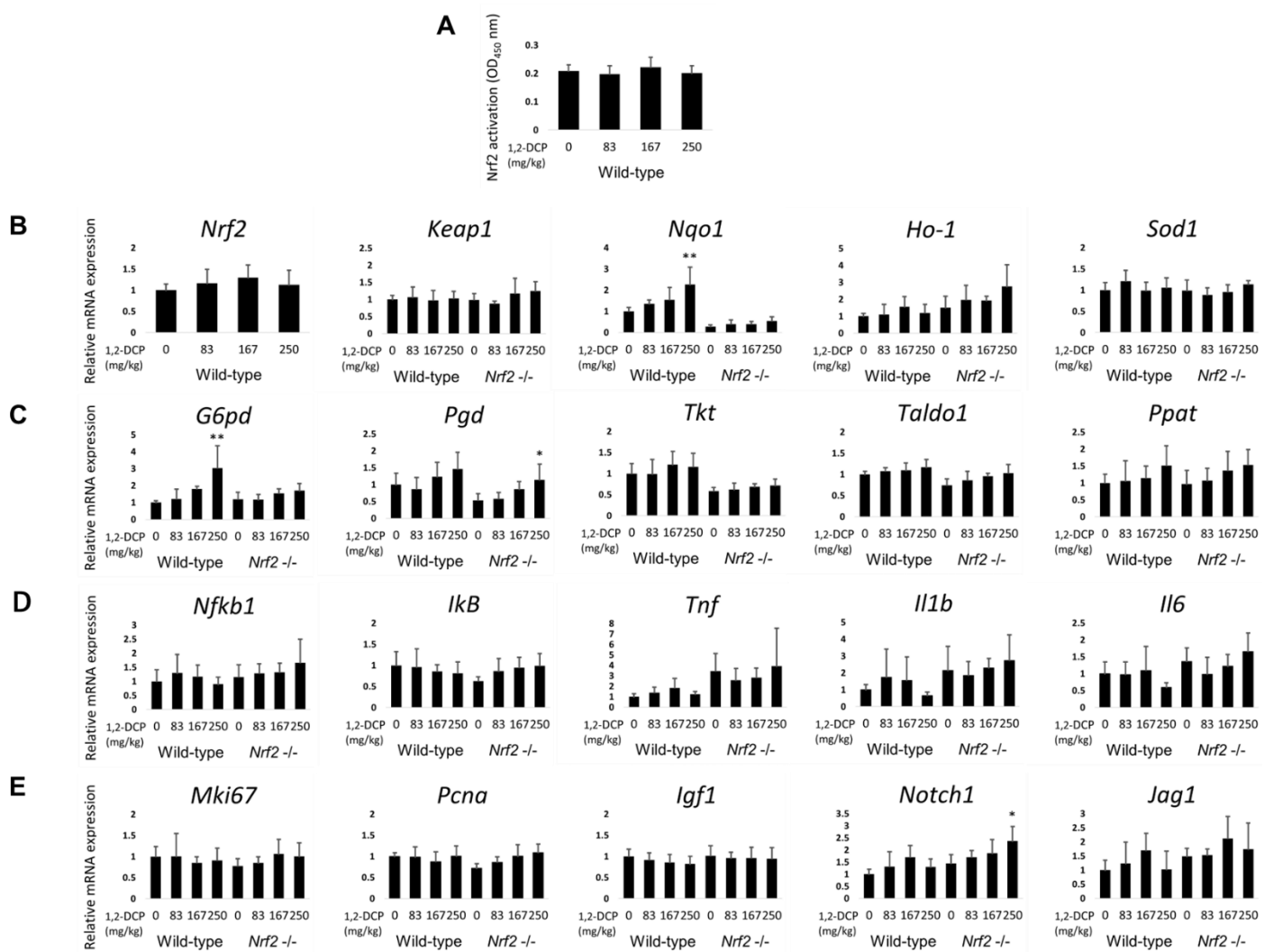


図 2-8. 抗酸化、ペントースリン酸回路、炎症シグナル、その他細胞増殖・分化に関与する遺伝子発現変化

5 週間の曝露終了後の肝臓における Nrf2 活性化を ELISA 法、及び mRNA 発現量を RT-PCR 法により定量した。

A. ARE 配列への Nrf2 の結合を検出する ELISA における吸光度。

B. 抗酸化関連遺伝子 (*Nrf2*, *Keap1*, *Nqo1*, *Ho-1*, *Sod1*) の相対的発現量。

C. ペントースリン酸回路に関わる遺伝子 (*G6pd*, *Pgd*, *Tkt*, *Taldo1*, *Ppat*) の相対的発現量。

D. 炎症性反応にかかわる遺伝子 (*Nfkb1*, *Ikb*, *Tnf*, *Il1b*, *Il6*) の相対的発現量。

E. 細胞増殖マーカー関連遺伝子 (*Mki67*, *Pcna*, *Igf1*) および細胞分化に関連する遺伝子 (*Notch1*, *Jag1*) の相対的発現量。

棒グラフおよびエラーバーは平均±標準偏差を表す。

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , ダネットの多重比較検定により遺伝子型ごとのコントロールと比較。

### 2.3.10 肝臓におけるタンパク質発現量変化

肝臓における Nrf2 制御下タンパクとして、NQO1、HO-1、FTH1、GSTM1、GSTP1、G6PD の発現をウエスタンブロット法により検討した。NQO1、GSTM1 のタンパク発現は野生型の 1,2-DCP 投与群において有意に上昇していたが、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて誘導は抑制されており、これは mRNA レベルと同様の傾向であった。一方 HO-1 は遺伝子発現レベルでは野生型、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウス共に 1,2-DCP 投与による誘導はかかっていなかったが、タンパク発現においては野生型で投与による有意な増加が観察された。GSTP1 は mRNA の結果と同様に *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて 1,2-DCP 250mg/kg 投与群においてコントロールと比べ有意に発現が低くなっていた。G6PD は mRNA が野生型において 1,2-DCP 投与により誘導されていたが、タンパクでは有意な変化は観察されなかった。

鉄貯蔵タンパクであるフェリチン (Heavy chain、FTH1) の発現は過去の 1,2-DCP 吸入曝露マウスの肝臓を用いたプロテオミクス解析の研究において曝露により上昇する因子として特定された (Zhang *et al.*, 2020)。また FTH1 は Nrf2 によって発現が調節されているという報告もある (Pietsch *et al.*, 2003)。今回の研究でも発現を検討し、FTH1 は野生型マウスでは有意に上昇していたが、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスではバラつきが大きかったため、上昇する傾向はあったものの投与による変化は統計学的有意ではなかった。

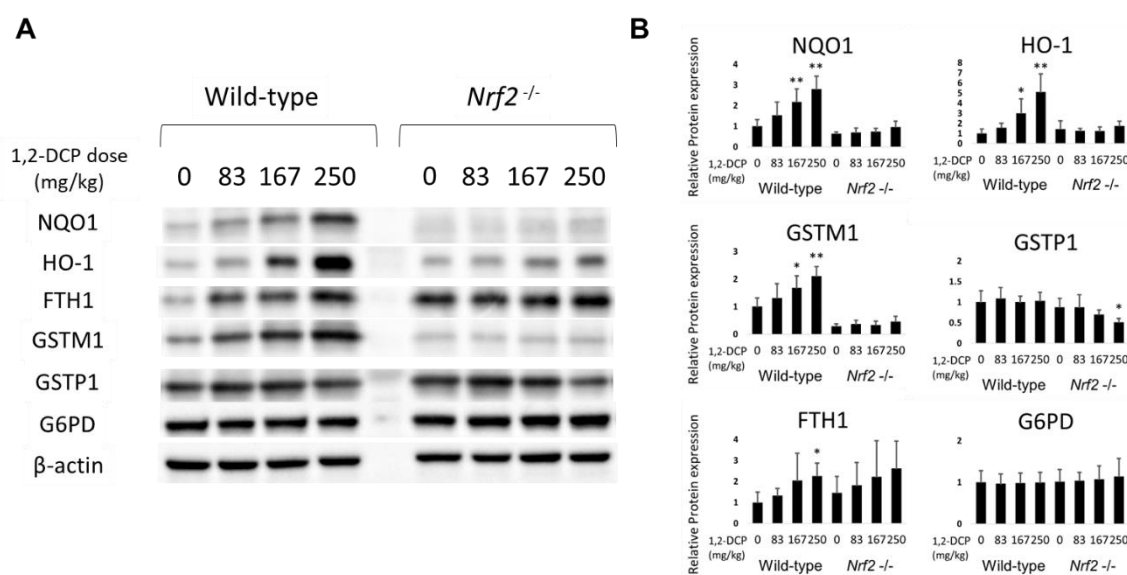


図 2-9. Nrf2 関連タンパク発現変化

5 週間の曝露終了後の肝臓におけるタンパク発現量をウエスタンブロット法により定量した。NQO1 (31kDa)、HO-1 (32kDa)、FTH1 (21kDa)、GSTM1 (27kDa)、GSTP1 (23kDa) 及び G6PD (59kDa) のバンド (A) 及び各タンパク質の相対的発現量 (B)。β-actin をローディングコントロールとして補正している。

棒グラフおよびエラーバーは平均±標準偏差を表す。

\*p<0.05 \*\*p<0.01, ダネットの多重比較検定により遺伝子型ごとのコントロールと比較。



## 2.4 考察

### 2.4.1 実験に用いた 1,2-DCP 曝露濃度について

この研究では職業性胆管がん原因物質である 1,2-DCP への生体応答に対する Nrf2 の役割を検討した。5 週間の投与において wild-type、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウス共に 1,2-DCP 投与による死亡はみられず、肝臓における組織学的変化も遺伝子型間で大きな変化は見られなかった。今回投与量を 83、167、250 mg/kg、および投与方法を強制経口投与に設定したことはマウスを用いた 2 年間の 125 および 250 mg/kg の 1,2-DCP 強制経口投与によって肝臓における腫瘍の増加が起こったという過去の報告 (NTP, 1986) を参考にしている。今回の 83~250 mg/kg の投与量は、過去に示された空気中の濃度より曝露量を推定する計算方法 (Lewis *et al.*, 1990) を参考にすると 1 日 6 時間、週 5 日吸入させたとして、マウスにおいては 70~210 ppm の濃度での曝露に該当することになる。実際に職業性胆管がんの発生に関わったのは吸入による肺を通じた曝露であると考えられるが、その曝露濃度は 100~670 ppm や最大 620 ppm であると推定されている (Kumagai *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2014)。げっ歯類では体重に対する呼吸により取り込む空気量がヒトに比べて多いことも加味すると体内取り込み量という点で今回の濃度は胆管がん発症者が曝露していた濃度と大きな乖離はないと考えられる。1,2-DCP をマウスやラットに 2 年間と長期にわたって吸入曝露した試験では肝や胆管における発がん促進作用は確認されておらず、かわりにマウスでは肺、ラットにおいては鼻腔における腫瘍が増加したと報告される (Matsumoto *et al.*, 2013; Umeda *et al.*, 2010)。同じハロゲン化炭化水素である 1,2-ジクロロエタンの吸入曝露試験においても代謝経路を阻害する一部の実験系を除き肝腫瘍増加は報告されていないが、経口投与においては雄で肝腫瘍が増加している (Cheever *et al.*, 1990; NTP, 1978b)

### 2.4.2 実験に用いた強制経口投与方法について

強制経口投与による曝露の特徴として、投与後の局所的な濃度の急速な増加が起こることがあり、過剰な反応性代謝物による細胞障害につながりやすい (Haseman, 1985; Monro, 1992)。そのような体内動態の特徴もハロゲン化炭化水素の経口投与試験と吸入曝露試験の結果の違いに関与していると考えられる。またジクロロメタンのようなジハロゲンメタンでは CYP による酸化的代謝がグルタチオン経路に比べ親和性が高いとされる (Gargas *et al.*, 1986)。そのため 1,2-DCP のような化合物のグルタチオン抱合による代謝活性化説が正しいと仮定した場合、CYP 経路が飽和する条件でない限りグルタチオン抱合の影響は観察されづらいと考えられる。経口投与では消化管より吸収され、門脈を通じて肝臓に化学物質が流入するのに対し、吸入曝露では肝動脈を通じて肝臓に流入するという点についても気を付けなければならない。しかしながら胆管がんの発生原因を検討するという点で特に肝臓における 1,2-DCP の毒性発現を検討する必要があることを考えると、長期投与で肝腫瘍の増加が報告されているマウスへの経口投与の形式をとったことは 1,2-DCP による発がんメカニズムを検討するうえで意義があったと考える。

表 2-6. ハロゲン化炭化水素のげっ歯類肝臓への発がん性および投与形態比較

	強制経口投与					吸入曝露				
	マウス		ラット			マウス		ラット		
	投与量 (mg/kg)	判定	投与量 (mg/kg)	判定	投与量 (ppm)	判定	投与量 (ppm)	判定		
1,2-ジクロロプロパン 	125,250	♂ ○ ♀	62, 125 125,250	♂ × ♀	32 ~200	♂ × ♀	80 ~500	♂ × ♀		
ジクロロメタン 					2000 ~4000	♂ ○ ♀	1000 ~4000	♂ × ♀		
1,2-ジブロモエタン 	60, 120	♂ ×(M) ♀	40, 80	♂ ×(M) ♀ ○	10~40	♂ × ♀	10~40	♂ × ♀		
1,2-ジクロロエタン 	75,150 125,250	♂ ○ ♀ ×	50, 100	♂ × ♀			50	♂ ※1 ♀		
1,2,3-トリクロロプロパン 	6~60	♂ ○ ♀	3~30	♂ × ♀						

Cheever *et al.*, 1990; NTP, 1978ab, 1982, 1986, and 1993 を参照して記載。

※1 ジスルフィラムを併用した場合のみ、neoplastic nodule および cholangioma が曝露により発生 (Cheever *et al.*, 1990)。

○：肝腫瘍の発生が投与により有意に増加したと記載されているもの。

×：肝腫瘍の有意な増加が認められないもの。

×(M)：肝における腫瘍は認められるものの、多臓器からの転移 (Metastasis) と考えられるもの。

#### 2.4.3 1,2-DCP 曝露がマウス肝における細胞増殖マーカー、アポトーシスに及ぼした影響

細胞増殖の変化は BrdU の取り込みおよび Ki67 の核内発現を指標に検討した。今回の実験では回帰分析による結果では野生型マウスにおいては BrdU および Ki67 陽性細胞は肝細胞、胆管細胞のいずれも有意に 1,2-DCP 用量依存的に増加していたが、*Nrf2*<sup>-/-</sup>では BrdU 陽性肝細胞のみ有意な相関がみられた。この原因として *Nrf2*<sup>-/-</sup>では 167 mg/kg 投与群に比べると 250 mg/kg 投与群では増殖マーカーの増加が抑えられていたことが挙げられる。化学物質毒性において高用量では細胞死など有害な影響を与えるのに対して低用量では生理活性を刺激し場合によっては有益な影響を与えることをホルミシス (Hormesis) と呼ぶ (Mattson, 2008) が、今回の実験においても似た影響として 250 mg/kg 投与においては増殖促進的影響と同時に増殖に抑制的な影響も発生していたのかもしれない。回帰分析

による検定結果では野生型において多くの項目で有意な相関がみられたが、一部の *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスでは肝細胞における著しい細胞増殖マーカーの上昇がみられた。今回の実験において *Nrf2* の欠損が細胞増殖にとって著しく影響を与えているかを判定することは困難ではあったが少なくとも 1,2-DCP がマウス肝にとって細胞増殖に促進的な影響を与えていることはわかった。細胞増殖は化学物質発がんにおいて重要な要素の 1 つであり、発がん過程のイニシエーションにおいて、DNA 付加体などは細胞増殖によって生まれた娘細胞において DNA の変異として蓄積する。また増殖中の細胞は DNA 修復にかかる時間が少なくなるともいわれている (Oliveira *et al.*, 2007)。mRNA レベルの変化の検討では、毒性病理において細胞増殖の指標で汎用される Ki67 や PCNA をコードする遺伝子の発現は 1,2-DCP の投与によって増加していなかった。他の研究データ (Orrù *et al.*, 2018) より Ki67 の mRNA 発現量も組織における細胞増殖の程度を反映するものとは考えられたが、今回の 5 週間投与の条件は、毒性に対する馴化が起こっているためか TUNEL 染色の結果を見てもわかるように細胞死はほとんど起こらない条件であり、細胞死を補うための著しい細胞増殖が促されるような条件ではない。胆管細胞においても非投与と投与の間の細胞増殖マーカー陽性細胞数の差はわずか数パーセント程度であり、そのため mRNA レベルでは変化が確認できなかったと考える。TUNEL 染色の結果においては、一匹の *Nrf2*<sup>-/-</sup> マウスで著しい数のアポトーシス陽性細胞が観察されたが、wild-type マウス胆管細胞で有意に 1,2-DCP 投与量依存的に減少していたことなど、全体的に見れば 1,2-DCP の投与はアポトーシスに対して抑制的に働いているのではないかと考えられた。アポトーシスは異常な細胞の除去機構としてがんの発生にも抑制的に働き、抗アポトーシス作用は非遺伝毒性発がん物質の作用としても考えられている (Lima and Van der Laan, 2000; Mally A and Chipan JK, 2002; Roberts *et al.*, 1995)。今回の実験において観察された 1,2-DCP の持つ細胞増殖促進能および抗アポトーシス作用は 1,2-DCP の腫瘍促進的作用を反映しているのではないかと考えている。

#### 2.4.4 1,2-DCP 曝露がマウス肝内グルタチオン量に与えた影響

グルタチオンはハロゲン化炭化水素の解毒および代謝活性化においてよく議論的になる。代謝活性化に関して、1,2-ジブromoエタンや 1,2-ジクロロエタンのようなジハロゲン化炭化水素ではグルタチオンが DNA への結合活性や細菌への変異原性を増強する (Guengerich *et al.*, 1980; Inskeep and Guengerich., 1984; Rannug *et al.*, 1978 and 1979; Working *et al.*, 1986)。そのメカニズムとして、グルタチオン抱合の結果エピスルホニウムと呼ばれる不安定な三員環イオン構造を介する、タンパクや DNA への反応性増強が挙げられている (Guengerich, 2003; Anders, 2004)。1,2-DCP と同様に職業性胆管がんの原因に挙げられたジクロロメタンについてもグルタチオン抱合が DNA への反応性を増強させるという報告は多い (Akiba *et al.*, 2017; Their *et al.*, 1993)。今回、総グルタチオン濃度については wild-type と *Nrf2*<sup>-/-</sup> 共に 1,2-DCP 投与により上昇する傾向があった。また ANOVA

で有意な差はでなかったが酸化型グルタチオンについては *Nrf2*<sup>-/-</sup>で 1,2-DCP 曝露により上昇する傾向がみられた。*Nrf2* を欠損することで 1,2-DCP の投与により引き起こされる酸化ストレスが数値として可視化された結果であると考えられる。*Nrf2* はグルタチオン産生に働く酵素を制御しているため (Chan *et al.*, 2001; Rangasamy *et al.* 2004; Sasaki *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 1999)、*Nrf2*<sup>-/-</sup>においてはグルタチオンのアップレギュレーションは発生することはないのではないかとこの予想にかかわらず、今回の実験においては総グルタチオン量の上昇が 1,2-DCP を投与した *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいてみられた。また mRNA レベルであるが、*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスではグルタチオン合成酵素 (*Gss*) や ATF4 の下流遺伝子である *Psat* や *Mthfd2* が 1,2-DCP 投与により有意な発現上昇を引き起こしていた。PSAT はセリンの合成に関わり、セリンはグルタチオン構成アミノ酸であるシステインへ変換される経路もある。MTHFD2 は葉酸サイクルを促進し、グルタチオンの構成アミノ酸であるグリシンの供給に間接的に貢献する。この他にもグルタチオン合成は *Nrf2* だけでなく NF- $\kappa$ B などの因子のかかわりも報告されている (Meng *et al.*, 2010)。今回 1,2-DCP 投与の結果として *Nrf2* 以外の因子を介した合成促進も発生し、肝内グルタチオン量の増加が起こったと考えられる。今回野生型マウスでは *Gclm* や *Gclc* などの遺伝子発現には変動は見られなかったものの、細胞外のシスチンをグルタミン酸と交換に取り込むトランスポーターである xCT をコードする遺伝子の発現が野生型マウスにおいて増加していたことは 1,2-DCP 投与によるグルタチオン誘導の原因の 1 つと考えられる。xCT は *Nrf2* により制御を受け、がん細胞においても抗酸化ストレスからの防御機構に役割を持っているとされ、特にがん幹細胞マーカーである CD44v による xCT の安定化機構が議論されている (Ishimoto *et al.*, 2011; Thanee *et al.*, 2016)。*Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは 1,2-DCP 投与による xCT 発現上昇は抑えられており、野生型と *Nrf2*<sup>-/-</sup>の間におけるグルタチオン産生機構は遺伝子レベルでは反応性に異なる部分が存在していた。いずれにせよ細胞内でのグルタチオンの増加は必然的に細胞内ストレスの減少やアポトーシスの減少とも結びつけられ、このような 1,2-DCP 投与に対する適応反応ががん細胞の発生や生存にとって都合のよい環境を生み出しているのではないかと推測される。

#### 2.4.5 1,2-DCP 曝露がマウス肝内グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現に与えた影響

グルタチオン転移酵素に関しては、今回 *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* の発現量について検討した。*GSTM1* は *Nrf2* による制御を受けているもの (Chanas *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2012) として選定した。今回の結果では *GSTM1* は野生型マウスにおいて遺伝子発現、タンパク量共に 1,2-DCP 投与による誘導がかかっていたが、*Nrf2* 欠損では誘導は抑制されていた。1,2-DCP をマウスに吸入曝露したプロテオミクス解析の結果からも *GSTM1* タンパク量の上昇が確認されており (Zhang *et al.*, 2020)、*GSTM1* は経口、吸入の投与経路に関わらず 1,2-DCP に対する防御反応に関与していることが示唆される。

*GSTT1* はヒトの肝臓において胆管細胞の核に特に強く分布し、マウスでは中心静

脈域の肝細胞の核において特に分布していることが免疫組織化学染色による検討から報告され、さらにジクロロメタンの抱合にも関与している (Sherratt *et al.*, 2002)。そのため GSTT1 は職業性胆管がんの研究においても度々調査の標的とされている。しかしながら 1,2-DCP を用いた細菌への変異原性試験において DCM と比べ GSTT1 依存性の変異増強が起こらないこと (Akiba *et al.*, 2017) や、1,2-DCP とグルタチオンの抱合反応に関しても GSTT1 はほとんど増強しなかったことも報告されている (Toyoda *et al.*, 2017)。今回の結果では GSTT1 の遺伝子発現は 1,2-DCP 投与によって有意に変動していなかった。

GSTP1 はマウスでは胆管細胞に比べて肝細胞において強く発現するが、ヒトでは肝細胞よりも胆管細胞やクッパー細胞に局在してみられるという免疫組織化学を用いた報告があり (Vaughn *et al.*, 2011)、GSTT1 と同様にげっ歯類とヒトとの発がん性の種差にかかわるのではないかと考え今回調査した。また GSTP1 はラットにおける肝臓前がん病変に強く発現するマーカー (Tatematsu *et al.*, 1987) として化学物質の発がん性研究に汎用されている。今回 GSTP1 は遺伝子発現量、タンパク量共に *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの肝では 1,2-DCP 250mg/kg 投与によって有意に減少しており、野生型マウスでも遺伝子発現レベルでは抑制されている傾向が見られた。GSTP1 はマウスの肝細胞において発現するタンパク質の中でも特に量的に多いタンパク質の 1 つとされ (Azimifar *et al.*, 2014)、今回マウス肝臓中の GSTP1 をウエスタンブロットで検出する際も少ない照射時間で強いバンドが観察されたことから実際に量は多いタンパク質なのではないかと伺える。そのため GSTP1 の発現減少は肝細胞の生体異物への抵抗性に大きく影響を与えるのではないかと考えられる。例えば、肝臓の障害につながる内因性の因子として腸内細菌の影響を受け生成される二次胆汁酸があるが、GSTP1 は大腸の前がん病変につながりうる異常陰窩巣を二次胆汁酸刺激による細胞死から保護する働きがあるとされる (Nobuoka *et al.*, 2004)。職業性胆管がんでは 1,2-DCP など有機溶剤への曝露が疑われる期間が終わってから 9 年後や 18 年後、22 年後などにがんを診断された患者もおり (Kinoshita *et al.*, 2019; Kubo *et al.*, 2014; Ogawa *et al.*, 2020)、有機溶剤曝露だけでは完結しない何か別の因子もがんの発症に関与したことが推定される。そのため GSTP1 など生体防御因子の攪乱や、胆汁酸など内因性のプロモーター刺激を介した 2 次的な肝や胆道の障害機構についての検討もがん発症機序について新たな知見をもたらす可能性がある。

#### 2.4.6 1,2-DCP 曝露がマウス肝内 $\gamma$ -H2AX 発現に与えた影響

今回発がん物質の遺伝毒性を検討するうえで重要である DNA 損傷の指標としては  $\gamma$ -H2AX を用いた。この指標は職業性胆管がんの病理組織を用いた免疫組織化学において、浸潤がんだけでなく前がん病変である BilIN や IPNB からも高度に検出されている (Sato *et al.*, 2014; Kinoshita *et al.*, 2016 and 2019)。今回ウエスタンブロットの結果が示すように  $\gamma$ -H2AX の発現は野生型マウスにおいて 1,2-DCP の投与依存的に増加しており、1,2-DCP がもつ遺伝毒性の存在、およびそれが引き起こす肝臓における腫瘍発生の初期段

階の変化を示しているのではないかと考えられる。一方 *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいては  $\gamma$ -H2AX の 1,2-DCP 投与による有意な上昇は見られなかった。実験計画を立てた当初では、(1) ジハロゲン化炭化水素のグルタチオン抱合による代謝活性化説が正しいとすると、*Nrf2* の欠損により DNA 損傷性は減少する、ただし、(2) 酸化ストレスを介した DNA 損傷性を考える場合、これは *Nrf2* の欠損により増強されるという2種類の影響を考えていた。しかしながら、グルタチオン定量の結果では、野生型では酸化型グルタチオンの量は増加しておらず、5週間の反復投与の実験条件において 1,2-DCP は酸化ストレスを強くは誘導しないのではないかと考えられた。今回 *Nrf2* により制御される NQO1 や HO-1、G6PD、GSTM1, xCT の遺伝子発現またはタンパク発現が野生型で有意に誘導されており、1,2-DCP の *Nrf2* を介した抗酸化因子増強によって酸化ストレスが抑え込まれた可能性もある。そのため今回 1,2-DCP の投与で増加した DNA 損傷マーカーは酸化ストレスよりも別の代謝活性化物などの影響によるものではないかと考える。しかしながら、グルタチオンの量は *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいても投与により野生型と同程度に増加していたという今回の実験結果及び、1,2-DCP に対するグルタチオンの抱合は GST の活性なしにも起こりうるという報告 (Toyoda *et al.*, 2017) を考慮すると、今回 *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて DNA 損傷が発生起こっていないと考えた場合グルタチオン抱合活性化説を強調することはできない。

近年では *Nrf2* が相同組換修復などの DNA 修復因子の制御をおこなうという報告が散見されるため (Jayakumar *et al.*, 2015; Khalil and Deeni, 2015; Kim *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2020)、このような *Nrf2* の DNA 修復系への影響も  $\gamma$ -H2AX の結果の解釈には必要となる。他にも、慢性的な酸化ストレスによって H2AX 自身が分解されることによって H2AX のリン酸化および DNA 修復も同時に低下しうるとされている (Gruosso *et al.*, 2016)。ただし *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて酸化ストレスが亢進し、H2AX の分解を介して  $\gamma$ -H2AX の発現低下が起こっていたと考える場合、1,2-DCP 投与は DNA 損傷の蓄積に伴うアポトーシスを誘発すると考えられる一方、TUNEL の結果ではアポトーシス陽性細胞の増加は *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて明確ではなかった。

#### 2.4.7 1,2-DCP 曝露がマウス肝内ペントースリン酸回路関連遺伝子に与えた影響

今回細胞増殖および DNA 複製の際の核酸の供給に関与するペントースリン酸回路 (Horecker, 2002; Kowalik *et al.*, 2017; Stincone *et al.*, 2015) についても mRNA 量から 1,2-DCP の投与がもたらす影響を検討した。今回調べた遺伝子である *G6pdx*、*Pgd*、*Tkt*、*Taldo1*、*Ppat* に関しては *Nrf2* の制御を受けているとされる (Mitsuishi *et al.*, 2012)。ペントースリン酸回路の酸化的反応にかかわり、律速酵素でもある *G6PD* の mRNA 量は野生型で 1,2-DCP 投与依存性の発現上昇がみられ、同じく酸化的反応にかかわる *Pgd* の mRNA 発現量は *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意な上昇が観察された。*G6PD* と *Pgd* に関しては NADPH の産生にもかかわるためグルタチオンの還元状態の維持にも働く (Bolaños and Almeida, 2010)。今回は酵素活性に関しては検討していないものの、1,2-DCP の投与が引

きおこすこれら遺伝子発現の上昇は、細胞増殖や、DNA 損傷誘導、及び酸化還元状態の維持と協調する生体応答であると考えられる。今回のリアルタイム PCR の結果では特に Ppat では解剖の時間帯が遅くなるほど mRNA の発現量が多くなるという傾向が観察された。リアルタイム PCR のサンプルを入手した個体においては解剖時間が最大で9時間ほどずれる場合もあったため、解剖に要した時間もデータの正確性に影響を与えてしまっていたと考えられ、今後の実験を計画するうえでの課題である。

#### 2.4.8 今回の実験系における問題点、課題

この実験では Nrf2 をノックアウトした C57BL/6J マウスを用いたが、このノックアウトマウスの表現型として注意しなければならないことがある。それは先天的な奇形として、Intrahepatic Shunt と記される血管のシャントが3分の2ほどの Nrf2 ノックアウトマウスに形成されるということである (Skoko *et al.*, 2014)。この先天的血管の異常は、門脈から肝臓ではなく直接下大静脈へつながる経路をもたらし、肝臓における門脈血と肝動脈血のバランスが変化することにより肝内における低酸素状態の減少が起こること、中心静脈域に存在する CYP2E1 の分布がシャントのあるマウスでは狭まることなどが報告されている。最も重要であるのは毒性物質に対する肝臓の感受性も血流の異常により変化するということであり、Skoko らの論文においてはアセトアミノフェンの肝毒性がシャント形成を伴う Nrf2 ノックアウトマウスでは弱まるとされている。ICR マウスの Nrf2 ノックアウトにおいては Skoko らが検討した8匹においてはそのようなシャントは認められないということであるが、C57BL/6J マウスでは野生型においても6% (2/34 匹) の頻度でシャントが認められたと報告される。別の報告 (Cudalbu *et al.*, 2013) では C57BL/6J マウスにおいて野生型、遺伝子改変型関係なしに脳内グルタミン濃度の上昇や myo-イノシトールの減少といった異常がしばしば観察されることを発端として研究が行われ、そのような神経伝達物質の異常が門脈体循環シャント (当該論文では portosystemic shunting と表記) に由来するとされた。Cudalbu らの報告では25%ものマウスにそのような異常が観察されており、近親交配を原因としている。経口投与の方法は吸入曝露や腹腔内投与に比べても肝毒性の評価においてこの血管奇形の影響を受けやすいと考えられるため、今回の 1,2-DCP を経口投与した *Nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおける結果の解釈には注意が必要である。

## 2.5 小括

今回の研究から5週間の1,2-DCP経口投与がマウス肝臓における(1)細胞増殖、(2)DNA損傷マーカーの上昇、(3)グルタチオン量の上昇、および(3)Nrf2制御下の遺伝子発現の上昇を引き起こすことがわかった。NTPにより実施された2年間の経口投与実験では肝腫瘍の増加が引き起こされることと合わせて、今回確認されたこれら生体応答が1,2-DCPの発がんのメカニズムの一端を担っているのではないかと推測される。またグルタチオン合成や抱合促進酵素の制御をつかさどるNrf2を欠損しているマウスではDNA損傷マーカーの蓄積が抑えられていたことから、ジハロゲン化炭化水素の代謝活性化メカニズムであるグルタチオン抱合の1,2-DCP誘導性DNA損傷への関与も推測されるが、今回の実験では突き詰められていないため、更なる研究で詳細なメカニズムを明らかにする必要がある。

野生型マウスにおけるグルタチオン量の増加は酸化型グルタチオンの増加を伴っておらず、Nrf2関連遺伝子の上昇と合わせて肝臓における酸化ストレスは逆に抑えされる方向に働いているのではないかと解釈できる。酸化ストレスはDNA損傷能もあることから発がんに促進的に働くとされる一方、がん細胞を殺傷する作用もあるため、このような酸化ストレスを抑えることがかえって腫瘍の成長を促進するという逆説的な研究結果も動物モデル(Harris *et al.*, 2015; Sayin *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 2021)や臨床試験の結果(Klein *et al.*, 2011; Nouraie *et al.*, 2005; Zhao and Jin, 2022)に散見される。このような酸化ストレス抑制反応とDNA損傷マーカーの併発的な増加が発がん性評価のカギとなる可能性もある。

今回野生型マウスにおけるNQO1、HO-1、xCT、GSTM1、G6PDの遺伝子またはタンパク発現の上昇はNrf2ノックアウトにおいて抑えられており、1,2-DCPがNrf2経路を活性化していることが示唆される。ただしNrf2の活性上昇をELISA法で調べた際にコントロールと曝露群で変化は見られなかった。この理由として1,2-DCP曝露によるNrf2の核内移行、活性化が一過性であり、最終投与から解剖の間に核内でのNrf2転写制御活性が消失したということがあるのではないかと考えている。いずれにせよ1,2-DCP曝露がNrf2経路を活性化することを示唆する報告は私の知る限りこれが初めてである。Nrf2に関しても、正の側面である抗酸化応答による生体防御とは別に、がんにおいて過剰発現し抗がん治療の妨げになるなど負の側面も存在する。職業性胆管がんの治療や発症機構においてもNrf2をターゲットにした研究が展開されることを期する。



## 総括

第1章ではヒト胆管細胞およびマクロファージを用いて1,2-DCPの毒性を検討した。細胞実験は、1種類の細胞を用いて化学物質を処置した際の反応を観察することが多いが、実際の生体においては、多種の細胞の集団として毒物への反応性を含むシステムが構築されている。今回の実験ではMMNK-1細胞のみの培養下で1,2-DCPを処置した場合はAID遺伝子の発現上昇は観察できなかったにも関わらず、THP-1由来マクロファージ細胞と共培養した場合には変化が見られた。発がん過程における炎症応答はそれ自身が遺伝子編集酵素の発現を促すと考えられ、AIDなど内因性遺伝子編集酵素がもたらす影響や炎症性反応の寄与に注意することでより適切な化学物質が有する発がん性のアセスメントが可能になるのではないかと考えられる。

第2章においては、Nrf2ノックアウトマウスを用いて、1,2-DCPの経口投与が引き起こす肝臓への毒性評価をおこなった。今回は5週間の投与であるが、NTPの2年間の長期にわたる1,2-DCP投与実験における肝腫瘍発生の報告と合わせて、今回得られた知見は1,2-DCP曝露によってマウスの肝腫瘍が形成されていく初期の段階の変化を明らかにするものである。1,2-DCP投与による抗酸化遺伝子やタンパク発現の上昇はNrf2のノックアウトによって抑制されたことから、1,2-DCP曝露がNrf2を活性化することが示唆された。職業性胆管においてもNrf2の過剰発現が起こっている可能性も今回の実験から仮説として生じるのではないかと考えられ、Nrf2に関与する新たな職業性胆管がんの治療戦略などのヒントになることを期待する。

2023年現在、化学物質規制に関する労働安全衛生法の大規模な法制改革が進められている。ある程度の危険性が確認される化学物質に関してはすべて取り扱う企業が自律的に曝露による危害のリスク管理を行わなければならない。これは、有害性の確認により規制が厳しくなった化合物を企業が使用することを忌避し、その代替としてリスクの不明瞭な化合物を使用することで新たに労働災害が発生するといういたちごっこを打破するための施策である。企業の化学物質危険性のアセスメントが適正に行われるためにも有害性を評価する実験系の発展が社会にとって重要になってくる。もともと1,2-DCPはIARCの発がん性分類ではグループ3とされていることなど発がん性の根拠が薄いとされたために、産業における使用が漫然と行われ、職業性胆管がんの発生を引き起こしてしまったという側面もあると考えられる。今後毒性評価技術を発展させていくことで、さらなる産業曝露被害の抑制を図っていかなければならない。

## 謝辞

この研究を遂行するにあたり、学士を取得する以前より多大なご支援や助言をいただきました東京理科大学薬学部環境労働衛生学分野教授 市原学先生に深く感謝を申し上げます。また第1章の共培養の研究を主導していただき、また第2章の動物実験を用いた研究においても様々な面からご助力いただいた市原研究室助教 宗才先生にも多大なご恩があります。研究活動において様々な面より助けていただいた同研究室秘書 新井聡子様にも感謝を申し上げます。また当研究は実験系を含むものであり、当時全くの初心者で知識がない状態であった私が実験を遂行するため必要な基本的な知識や心構えを得ることができたのは、元東京理科大学の櫻井敏博先生および Frederick Adams Ekuban 博士のご助力が大きかったと考えており、この場を借りて感謝を申し上げます。

本論文審査にあたり、副査として当研究の発展のための貴重なご助言をいただきました分子医科学研究室 秋本和憲先生、遺伝子制御学研究室 内海文彰先生、生化学研究室 佐藤聡先生、放射線生命科学教室 月本光俊先生に深く御礼申し上げます。

最後に、一人では到底完遂できなかった私の研究活動を補助してくださった修士、学士の方々を含め、市原研究室の皆様に感謝申し上げます。

## 参考文献

- Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. (2017). Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*. 32(4):455-462.
- Akino N, Wada-Hiraike O, Isono W, Terao H, Honjo H, Miyamoto Y, Tanikawa M, Sone K, Hirano M, Harada M *et al.* (2019). Activation of Nrf2/Keap1 pathway by oral dimethylfumarate administration alleviates oxidative stress and age-associated infertility might be delayed in the mouse ovary. *Reprod Biol Endocrinol*. 17(1):23.
- Alexandrov L, Nik-Zainal, Wedge D, Aparicio S, Behjati S, Biankin A, Bignell G, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale A-L *et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 500:415-421.
- Anders MW. (2004). Glutathione-dependent Bioactivation of Haloalkanes and Haloalkenes. *Drug Metab Rev*. 36(3-4):583-94.
- Andrés D, Sánchez-Reus I, Bautista M, Cascales M. (2003). Depletion of Kupffer cell function by gadolinium chloride attenuates thioacetamide-induced hepatotoxicity. Expression of metallothionein and HSP70. *Biochem Pharmacol*. 66(6):917-26.
- Azimifar SB, Nagaraj N, Cox Juergen, Mann M. (2014). Cell-type-resolved quantitative proteomics of murine liver. *Cell Metab*. 20(6):1076-87.
- Ballering LA, Vogel EW, Vrieling H, Nivard MJ. (1998). Strand-specific mutation induction by 1,2-dibromomethane at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus of Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis*. 13(1):61-5.
- Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, Cardinale V, Carpino G, Andersen JB, Braconi C *et al.* (2020). Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 17(9):557-588.
- Bao H, Qu Q, Zhang W, Wang X, Fang J, Xue J, Liu Z, He S. (2021). NRF2 exerts anti-inflammatory effects in LPS-induced gEECs by inhibiting the activation of the NF- $\kappa$ B. *Mediators Inflamm*. 2021: 9960721.
- Baxter EX, Graham AE, Re NA, Carr IM, Robinson JI, Mackie SL, Morgan AW. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN $\gamma$ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods*. 478:112721.
- Berridge MV, Tan AS. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 303(2):474-82.
- Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. (2006). Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*. 26(10):1175-86.

- Bolaños JP, Almeida A. (2010). The pentose-phosphate pathway in neuronal survival against nitrosative stress. *IUBMB Life*. 62(1):14-8.
- Brandi G, Straif K, Mandrioli D, Curti S, Mattioli S, Tavolari S. (2022). Exposure to Asbestos and Increased Intrahepatic Cholangiocarcinoma Risk: Growing Evidences of a Putative Causal Link. *Ann Glob Health*. 88(1):41.
- Chan K, Han XD, Kan YW. (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: Detoxification of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(8): 4611-4616.
- Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K *et al.* (2002). Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J*. 365(Pt 2):405-16.
- Chang J, Ma JZ, Zeng Q, Cechova S, Gants A, Nievergelt C, O'Connor D, Lipkowitz M, Le TH. (2012). Loss of GSTM1, a NRF2 target, is associated with accelerated progression of hypertensive kidney disease in the African American Study of Kidney Disease (AASK). *Am J Physiol Renal Physiol*. 304(4): F348–F355.
- Chan-On W, Kuwahara K, Kobayashi N, Ohta K, Shimasaki T, Sripa B, Leelayuwat C, Sakaguchi N. (2009). Cholangiocarcinomas associated with long-term inflammation express the activation-induced cytidine deaminase and germinal center-associated nuclear protein involved in immunoglobulin V-region diversification. *Int J Oncol*. 35(2):287-95.
- Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HFJ, Wichers HJ. (2013). Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct*. 4(2):266-76.
- Carl VS, Gautam JK, Comeau LD, Smith Jr MF. (2004). Role of endogenous IL-10 in LPS-induced STAT3 activation and IL-1 receptor antagonist gene expression. *J Leukoc Biol*. 76(3):735-42.
- Cheever KL, Cholakis JM, el-Hawari AM, Kovatch RM, Weisburger EK. (1990). Ethylene dichloride: the influence of disulfiram or ethanol on oncogenicity, metabolism, and DNA covalent binding in rats. *Fundam Appl Toxicol*. 14(2):243-61.
- Chen D, Liu R, Lin Q, Ma S, Li G, Yu Y, Zhang C, An T. (2021). Volatile organic compounds in an e-waste dismantling region: From spatial-seasonal variation to human health impact. *Chemosphere*. 275:130022.
- Chung YE, Kim MJ, Park YN, Choi J-Y, Pyo JY, Kim YC, Cho HJ, Kim KA, Choi SY. (2009). Varying appearances of cholangiocarcinoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 29(3):683-700.
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*. 3(7):207-12.
- Cudalbu C, McLin VA, Lei H, Duarte JMN, Rougemont A-L, Oldani G, Terraz S, Toso C, Gruetter R.

- (2013). The C57BL/6J mouse exhibits sporadic congenital portosystemic shunts. *PLoS One*. 8(7):e69782.
- Davuljigari CB, Ekuban FA, Zong Cai, Fergany AAM, Morikawa K, Ichihara G. (2021). Nrf2 Activation Attenuates Acrylamide-Induced Neuropathy in Mice. *Int J Mol Sci*. 22(11):5995.
- 日本肝胆膵外科学会. (2019). エビデンスに基づいた胆道癌診療ガイドライン 改訂第3版.
- Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. (1993). The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 119(2):275-9.
- Ekuban FA, Zong C, Takikawa M, Morikawa K, Sakurai T, Ichihara S, Itoh K, Yamamoto M, Ohsako S, Ichihara G. (2021). Genetic ablation of Nrf2 exacerbates neurotoxic effects of acrylamide in mice. *Toxicology*. 456:152785.
- Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K, Morisawa T, Sakurai T, Okazaki I-M, Watashi K, Shimotohno K, Honjo T, Chiba T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene*. 26(38):5587-95.
- Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T. (2008). Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology*. 135(3):889-98, 898.e1-3.
- Foster PL, Wilkinson WG, Miller JK, Sullivan AD, Barnes WM. (1988). An analysis of the mutagenicity of 1,2-dibromoethane to *Escherichia coli*: influence of DNA repair activities and metabolic pathways. *Mutat Res*. 194(3):171-81.
- Fukumoto. (2014). Radiation pathology: from thorotrast to the future beyond radioresistance. *Pathol Int*. 64(6):251-62.
- Furuya S, Takahashi K. (2017). Experience of Japan in Achieving a Total Ban on Asbestos. *Int J Environ Res Public Health*. 14(10):1261.
- Gargas ML, Clewell 3<sup>rd</sup> HJ, Andersen ME. (1986). Metabolism of inhaled dihalomethanes in vivo: differentiation of kinetic constants for two independent pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 82(2):211-23.
- Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, Carpino G, Alpini G, Francis H, Glaser S, Alvaro D, Onori P. (2006). Cholangiocytes and blood supply. *World J Gastroenterol*. 12(22):3546-52.
- Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 15:577.
- González-Amaro R, García-Monzón C, García-Buey L, Moreno-Otero R, Alonso JL, Yagüe E, Pivel JP, López-Cabrera M, Fernández-Ruiz E, Sánchez-Madrid F. (1994). Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J Exp Med*. 179(3):841-8.
- Gruosso T, Mieulet V, Cardon M, Bourachot B, Kieffer Y, Devun F, Dubois T, Dutreix M, Vincent-Salomon A, Miller KM *et al.* (2016). Chronic oxidative stress promotes H2AX protein degradation

- and enhances chemosensitivity in breast cancer patients. *EMBO Mol Med.* 8(5):527-49.
- Guengerich FP, Crawford WM, Domoradzki JY, Macdonald TL, Watanabe PG. (1980). In vitro activation of 1,2-dichloroethane by microsomal and cytosolic enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 55(2):303-17.
- Guengerich FP. (2003). Activation of Dihaloalkanes by Thiol-dependent Mechanisms. *J Biochem Mol Biol.* 36(1):20-7.
- Hamano G, Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Kinoshita M, Ito T, Yamamoto T, Wakasa K, Shibata T. (2016). Comparison of clinicopathological characteristics between patients with occupational and non-occupational intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 23(7):389-96.
- Hainaut P and Pfeifer GP. (2001). Patterns of p53 G-->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis.* 22(3):367-74.
- Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC, Yung KY, Brenner D, Knobbe-Thomsen CB, Cox MA *et al.* (2015). Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell.* 27(2):211-22.
- Harstad EB and Klaassen CD. (2002). Gadolinium Chloride Pretreatment Prevents Cadmium Chloride-Induced Liver Damage in Both Wild-Type and MT-Null Mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 180(3):178-85.
- Haseman JK. (1985). Issues in carcinogenicity testing: dose selection. *Fundam Appl Toxicol.* 5(1):66-78.
- He Q, Kim J, Sharma RP. (2005). Fumonisin B1 hepatotoxicity in mice is attenuated by depletion of Kupffer cells by gadolinium chloride. *Toxicology.* 207(1):137-47.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science.* 253(5015):49-53.
- Horecker BL. (2002). The pentose phosphate pathway. *J Biol Chem.* 277(50):47965-71.
- Hosokawa K, Tanaka T, Sugihara T, Matono T, Koda M, Kanda T, Taniguchi S, Ida A, Mae Y, Yamamoto M *et al.* (2020). Ipragliflozin ameliorates endoplasmic reticulum stress and apoptosis through preventing ectopic lipid deposition in renal tubules. *Int J Mol Sci.* 21(1): 190.
- Hotta S, Uchiyama S, Ichihara K. (2020). Brazilian red propolis extract enhances expression of antioxidant enzyme genes in vitro and in vivo. *Biosci Biotechnol Biochem.* 84(9):1820-1830.
- Iida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H, Yamamoto M. (2004). Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* 64(18):6424-31.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1999). 1,2-Dichloropropane. In: Some chemicals used as solvents and in polymer manufacture. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 71: 1393–1400.

- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2017). 1,2-Dichloropropane, Some Chemicals Used as Solvents and in Polymer Manufacture. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 110:141-175.
- Inskeep PB, Gunegerich FP. (1984). Glutathione-mediated binding of dibromoalkanes to DNA: specificity of rat glutathione S-transferases and dibromoalkane structure. *Carcinogenesis.* 5(6):805-8.
- Ishii T, Itoh K, Yamamoto M. (2002). Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. *Methods Enzymol.* 348:182-90.
- Ishimoto T, Nagano O, Yae T *et al.* (2011). CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell.* 2011. 19(3):387-400.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H *et al.* (1997). An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 236(2):313-22.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatakeyama I *et al.* (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13(1): 76–86.
- Jayakumar S, Pal D, Sandur SK. (2015). Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. *Mutat Res.* 779:33-45.
- Junghans M, John F, Cihankaya H, Schliebs D, Winklhofer KF, Bader V, Matschke, Theiss C, Matschke V. (2022). ROS scavengers decrease  $\gamma$ H2ax spots in motor neuronal nuclei of ALS model mice in vitro. *Front Cell Neurosci.* 16:963169.
- Kadi NE, Wang L, Davis A, Korkaya H, Cooke A, Vadnala V, Brown NA, Betz BL, Cascalho M, Kalemkerian GP *et al.* (2018). The EGFR T790M mutation is acquired through AICDA-mediated deamination of 5-methylcytosine following TKI treatment in lung cancer. *Cancer Res.* 78(24): 6728–6735.
- Kaneko R, Kubo S, Sato Y. (2015). Comparison of Clinical Characteristics between Occupational and Sporadic Young-Onset Cholangiocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 16(16):7195-200.
- Kalapila AG and Pegg AE. (2010). Alkyltransferase-mediated toxicity of bis-electrophiles in mammalian cells. *Mutat Res.* 684(1-2):35-42.
- Kasai S, Shimizu S, Tatara Y, Mimura J, Itoh K. (2020). Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules.* 10(2):320.
- Khalil HS, Deeni Y. (2015). NRF2 inhibition causes repression of ATM and ATR expression leading to aberrant DNA damage response. *BioDiscovery.* 15:e8964.

- Kim JH, Thimmulappa RK, Kumar V, Cui W, Kumar S, Kombairaju P, Zhang H, Margolick J, Matsui W, Macvittie T *et al.* (2014). NRF2-mediated Notch pathway activation enhances hematopoietic reconstitution following myelosuppressive radiation. *J Clin Invest.* 2014. 124(2):730-41.
- Kim SB, Pandita RK, Eskiocak U, Ly Peter, Kaisani A, Kumar R, Cornelius C, Wright WE, Pandita TK, Shay JW *et al.* (2012). Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(43):E2949-55.
- Kinoshita M, Kubo S, Nakanuma Y, Sato Y, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Ito T, Terajima H, Yamada T *et al.* (2016). Pathological spectrum of bile duct lesions from chronic bile duct injury to invasive cholangiocarcinoma corresponding to bile duct imaging findings of occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 23(2):92-101.
- Kinoshita M, Sato Y, Nebiki H, Tamamori Y, Ishii N, Inoue T, Hamano G, Kanazawa A, Kubo S. (2019). Occupational cholangiocarcinoma diagnosed 18 years after the end of exposure to 1,2-dichloropropane and dichloromethane at a printing company: a case report. *Surg Case Rep.* 5(1):65.
- Kitamura Y, Umemura T, Kanki K, Kodama Y, Kitamoto S, Saito K, Itoh K, Yamamoto M, Masegi T, Nishikawa A *et al.* (2007). Increased susceptibility to hepatocarcinogenicity of Nrf2-deficient mice exposed to 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Cancer Sci.* 98(1):19-24.
- Klein EA, Thompson Jr IM, Tangen CM, Crowley JJ, Lusia MS, Goodman PJ, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM *et al.* (2011). Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* 306(14):1549-56.
- Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 24(16):7130-9.
- Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. (2006). Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 26(1):221-9.
- Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K *et al.* (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.* 7:11624.
- Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, Kinoshita K, Kou T, Haga H, Ikai I, Umemoto S, Chiba T. (2008). Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 47(3):888-96.
- Kou T, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Okazaki I, Ueda Y, Kodama Y, Haga H, Ikai I, Chiba T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer.* 120(3):469-76.
- Kowalik MA, Columbano A, Perra A. (2017). Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol.* 7: 87.



- Kresse M, Latta M, Künstle G, Riehle H-M, van Rooijen N, Hentze H, Tiegs G, Biburger M, Lucas R, Wendel A. (2005). Kupffer cell-expressed membrane-bound TNF mediates melphalan hepatotoxicity via activation of both TNF receptors. *J Immunol.* 175(6):4076-83.
- Kubes P and Jenne C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol.* 36:247-277.
- Kubo S, Nakanuma Y, Takemura S, Sakata C, Urata Y, Nozawa A, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Terajima H *et al.* (2014). Case series of 17 patients with cholangiocarcinoma among young adult workers of a printing company in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 21(7):479-88.
- Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Shinkawa H, Kinoshita M, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Yamamoto T *et al.* (2016a). Outcomes after resection of occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 23(9):556-64.
- Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Ito T, Yamamoto T, Abue M *et al.* (2016b). Screening and surveillance for occupational cholangiocarcinoma in workers exposed to organic solvents. *Surg Today.* 46(6):705-12.
- 熊谷信二, 車谷典男. (2012). オフセット校正印刷労働者に多発している肝内・肝外胆管癌. 第 85 回日本産業衛生学会; 5 月 30 日-6 月 2 日, 名古屋, 297.
- Kumagai S, Kurumatani N, Arimoto A, Ichihara G. (2013). Cholangiocarcinoma among offset colour proof-printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. *Occup Environ Med.* 70(7):508-10.
- Kumagai. (2014). Two Offset Printing Workers with Cholangiocarcinoma. *J Occup Health.* 56:164-168.
- Lakin ND, Jackson SP. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene.* 13;18(53):7644-55.
- Lebbie TS, Moyebi OD, Asante KA, Fobil J, Brune-Drisse MN, Sly PD, Gorman J, Carpenter DO. (2021). E-Waste in Africa: A Serious Threat to the Health of Children. *Int J Environ Res Public Health.* 18(16):8488.
- Lewis SC, Lynch JR, Niliforov AI. (1990). A new approach to deriving community exposure guidelines from "no-observed-adverse-effect levels" *Regul Toxicol Pharmacol.* 11(3):314-30.
- Lima BS and Van der Laan JW. (2000). Mechanisms of nongenotoxic carcinogenesis and assessment of the human hazard. *Regul Toxicol Pharmacol.* 32(2):135-43.
- Liu F, Ichihara S, Valentine WM *et al.* (2010). Increased susceptibility of Nrf2-null mice to 1-bromopropane-induced hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 115(2):596-606.
- Liu M, Schatz DG. (2009). Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol.* 30(4):173-81.
- Liu R, Chen J, Li G, An T. (2017). Using an integrated decontamination technique to remove VOCs and attenuate health risks from an e-waste dismantling workshop. *Chem Eng J.* 318(15):57-63.
- Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate

- differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 430:64-70.
- Maeß MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. (2014). Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods*. 402(1-2):76-81.
- Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Singh A, Srivastava S, Arenillas S, Happel C, Shyr C, Wakabayashi N, Kensler TW, Wasserman WW *et al.* (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res*. 38(17): 5718–5734.
- Mandolesi G, Musella A, Gentile A, Grasselli G, Haji N, Sepman H, Fresegna D, Bullitta S, De Vito F, Haji N *et al.* (2013). Interleukin-1 $\beta$  alters glutamate transmission at Purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neurosci*. 33(29): 12105–12121.
- Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki I, Honjo T, Chiba T. (2007). Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med*. 13(4):470-6.
- Mally A, Chipman JK. (2002). Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology*. 180(3):233-48.
- Matsumoto M, Umeda Y, Take M, Nishizawa T, Fukushima S. (2013). Subchronic toxicity and carcinogenicity studies of 1,2-dichloropropane inhalation to mice. *Inhal Toxicol*. 25(8): 435–443.
- Mattson MP. (2008). Hormesis defined. *Ageing Res Rev*. 7(1):1-7
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*. 278(24):21592-600.
- Meling DD, Warner GR, Szumski JR, Gao L, Gonsioroski AV, Rattan S, Flaws JA. (2020). The effects of a phthalate metabolite mixture on antral follicle growth and sex steroid synthesis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 388: 114875.
- Meng Q, Peng Z, Chen L, Si J, Dong Z, Xia Y. (2010). Nuclear Factor- $\kappa$ B Modulates Cellular Glutathione and Prevents Oxidative Stress in Cancer Cells. *Cancer Lett*. 299(1): 45–53.
- Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y *et al.* (2016). Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis*. 37(8):817-826.
- Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T *et al.* (2020). Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 41(3):368-376.
- Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, Motohashi H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 22(1):66-79.

- Miyazaki Y, Inoue H, Kikuchi K, Ochiai K, Kusama K. (2012). Activation-induced cytidine deaminase mRNA expression in oral squamous cell carcinoma-derived cell lines is upregulated by inflammatory cytokines. *J Oral Sci.* 54(1):71-5.
- Muñoz DP, Lee EL, Takayama S, Coppé J-P, Heo S-J, Boffelli D, Noia JMD, Martin DIK. (2013). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is necessary for the epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(32):E2977-86.
- Monro A. (1992). What is an appropriate measure of exposure when testing drugs for carcinogenicity in rodents? *Toxicol Appl Pharmacol.* 112(2):171-81.
- Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki I, Honjo T, Chiba T. (2008). Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer.* 123(12):2735-40.
- Mosser DM, Edwards JP. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8(12):958-69.
- Muramatsu M, Sankaranand VS, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, Honjo T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem.* 274(26):18470-6.
- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Honjo T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 102(5):553-63.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Kan YW. (1994). Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(21):9926-30.
- Nakano M, Omae K, Takebayashi T, Tanaka S, Koda S. (2018). An epidemic of bladder cancer: ten cases of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine. *J Occup Health.* 60(4):307-311.
- Nakanuma Y, Kakuda Y. (2015). Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 29(2):277-93.
- Nakanuma Y, Sasaki M, Sato Y, Ren X, Ikeda H, Harada K. (2009). Multistep carcinogenesis of perihilar cholangiocarcinoma arising in the intrahepatic large bile ducts. *World J Hepatol.* 1(1): 35–42.
- National Toxicology Program. (1978a). Bioassay of 1,2-dibromoethane for possible carcinogenicity. *Natl Cancer Inst Carcinog Tech Rep Ser.* 86:1-129.
- National Toxicology Program. (1978b). Bioassay of 1,2-dichloroethane for possible carcinogenicity. *Natl Cancer Inst Carcinog Tech Rep Ser.* 55:1-103.
- National Toxicology Program. (1982). Carcinogenesis Bioassay of 1,2-Dibromoethane (CAS No. 106-93-4) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Study). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.*

210:1-163.

- National Toxicology Program. (1986). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Dichloromethane (Methylene Chloride) (CAS No. 75-09-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 306:1-208.
- National Toxicology Program. (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis of 1,2,3-Trichloropropane (CAS No. 96-18-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 384:1-348.
- Ngo HKC, Kim DH, Cha YN, Na H-Y, Surh Y-J. (2017). Nrf2 Mutagenic Activation Drives Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 77(18):4797-4808.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Huang H-C, Yang CS, Pickett CB. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 278(7):4536-41.
- Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabara M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY *et al.* (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 353(6305):aaf8729.
- Nobuoka A, Takayama T, Miyanishi K, Sato T, Takanashi K, Hayashi T, Kukitsu T, Sato Y, Takahashi M, Okamoto T *et al.* (2004). Glutathione-S-transferase P1-1 protects aberrant crypt foci from apoptosis induced by deoxycholic acid. *Gastroenterology.* 127(2):428-43.
- Noh J-R, Kim Y-H, Hwang JH, Choi D-H, Kim K-S, Oh W-K, Lee C-H. (2015). Sulforaphane protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 80:193-200.
- Nourai M, Pietinen P, Kamangar F, Dawsey SM, Abnet CC, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR. (2005). Fruits, vegetables, and antioxidants and risk of gastric cancer among male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(9):2087-92.
- Okazaki I, Kinoshita K, Muramatsu M, Yoshikawa K, Honjo T. (2002). The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature.* 416(6878):340-5.
- Ogawa D, Hayashi H, Kitamura F, Uemura N, Miyata T, Okabe H, Imai K, Yamasita Y, Kubo S, Baba H. (2020). Multiple cholangiocarcinomas in the intrahepatic and extrahepatic biliary tree due to dichloromethane exposure: a case report. *Surg Case Rep.* 6(1):79.
- Olivier M, Weninger A, Ardin M, Huslova H, Castells X, Vallée MP, McKay J, Nedelko T, Muehlbauer K-R, Marusawa H *et al.* (2014). Modelling mutational landscapes of human cancers in vitro. *Sci Rep.* 4:4482.
- Oliveira PA, Colaço A, Chaves R Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P LF, Lopes C. (2007). Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc.* 79(4):593-616.
- Orrù C, Szydłowska M, Taguchi K, Zavattari P, Perra A, Yamamoto M, Columbano A. (2018). Genetic inactivation of Nrf2 prevents clonal expansion of initiated cells in a nutritional model of rat hepatocarcinogenesis. *J Hepatol*

. 69(3):635-643.

- Palmer WC, Patel T. (2012). Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol.* 57(1):69-76.
- Park CS, Kim HS, Ahn YS, Jeong KS. (2020). Validation of urinary 1,2-dichloropropane concentration as a biological exposure index for workers exposed to 1,2-dichloropropane. *Ann Occup Environ Med.* 32:e24.
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim KS. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res.* 56(1):45-50.
- Peng X, Li C, Yu W, Liu S, Cong Y, Fan G, Qi S. (2020). Propofol attenuates hypoxia-induced inflammation in BV2 microglia by inhibiting oxidative stress and NF- $\kappa$ B/Hif-1 $\alpha$  signaling. *Biomed Res Int.* 2020: 8978704.
- Peters JM, Gonzalez FJ. (2018). The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 165(2):272-276.
- Pietsch EC, Chan JY, Torti FM, Torti SV. (2003). Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dichiolethiones. *J Biol Chem.* 278(4):2361-2369.
- Priyashantha AKH, Pratheesh N, Pretheeba P. (2022). E-waste scenario in South-Asia: an emerging risk to environment and public health. *Environ Anal Health Toxicol.* 37(3): e2022022.
- Qi L, Jiang J, Zhang J Wang T. (2020). Maternal curcumin supplementation ameliorates placental function and fetal growth in mice with intrauterine growth retardation. *Biol Reprod.* 102(5):1090-1101.
- Ramos-Gomez M, Kwak M K, Dolan P M, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6):3410-5.
- Ramos-Gomez M, Dolan M, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. (2003). Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene–DNA adducts and tumor yield in mice. *Carcinogenesis.* 24(3):461-7.
- Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, Biswal S. (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest.* 114(9):1248-59.
- Rannug U, Sundvall A, Ramel C. (1978). The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on Salmonella typhimurium I. Activation through conjugation with glutathion in vitro. *Chem Biol Interact.* 20(1):1-16.
- Rannug U, Bejie B. (1979). The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on Salmonella typhimurium. II. Activation by the isolated perfused rat liver. *Chem Biol Interact.* 24(3):265-85.
- Riva L, Pandiri AR, Li YR, Droop A, Hewinson J, Quail MA, Lyer V, Shepherd R, Herbert RA, Campbell PJ *et al.* (2020). The mutational signature profile of known and suspected human

- carcinogens in mice. *Nat Genet.* 52(11):1189-1197.
- Roberts RA, Soames AR, Gill JH, James NH, Wheeldon EB. (1995). Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis.* 16(8):1693-8.
- Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maebara K, Wang H, Tamba M, Itoh K, Yamamoto M, Bannai S. (2002). Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem.* 277(47):44765-71.
- Sato Y, Kubo S, Takemura S, Sugawara Y, Tanaka S, Fujikawa M, Arimoto A, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. (2014). Different carcinogenic process in cholangiocarcinoma cases epidemically developing among workers of a printing company in Japan. *Int J Clin Exp Pathol.* 7(8):4745-54.
- Sato Y, Kinoshita M, Takemura S, Tanaka S, Hamano G, Nakamori S, Fujikawa M, Sugawara Y, Yamamoto T, Arimoto A *et al.* (2017). The PD-1/PD-L1 axis may be aberrantly activated in occupational cholangiocarcinoma. *Pathol Int.* 67(3):163-170.
- Sato Y, Tanaka S, Kinoshita M, Takemura S, Shinkawa H, Kokubo T, Hasegawa K, Tanaka H, Yoshimoto H, Mori A *et al.* (2020). Immunosuppressive tumor microenvironment in occupational cholangiocarcinoma: Supportive evidence for the efficacy of immune checkpoint inhibitor therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 27(11):860-869.
- Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, Nilsson JA, Lindahl P, Bergo MO. (2014). Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med.* 6(221):221ra15.
- Seeherunwong A, Chaiear N, Khuntikeo N, Ekpanyaskul C. (2022). Cholangiocarcinoma Attributed to Occupation: A Systematic Reviews. *Asian Pac J Cancer Prev.* 23(6):1837-1845.
- Sherratt PJ, Williams S, Foster J, Kernohan N, Green T, Hayes JD. (2002). Direct comparison of the nature of mouse and human GST T1-1 and the implications on dichloromethane carcinogenicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 179(2):89-97.
- Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E *et al.* (2006). Dysfunctional KEAP1–NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS Med.* 3(10): e420.
- Skoko JJ, Wakabayashi N, Noda K, Kimura S, Tobita K, Shigemura N, Tsujita T, Yamamoto M, Kensler TW. (2014). Loss of Nrf2 in mice evokes a congenital intrahepatic shunt that alters hepatic oxygen and protein expression gradients and toxicity. *Toxicol Sci.* 141(1):112-9.
- Sobue T, Utada M, Makiuchi T, Ohno Y, Uehara S, Hayashi T, Kogawa-Sato K, Endo G,. (2015). Risk of bile duct cancer among printing workers exposed to 1,2-dichloropropane and/or dichloromethane. *J Occup Health.* 57(3):230-6.
- Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. (2010). PrimerBank: A resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* 38: D792-9.
- Stähelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J. (1998). False positive staining in the

- TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol Pathol*. 51(4):204-8.
- Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, Olin- Sandoval V, Grüning N-M, Krüger A, Alam MT *et al.* (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 90(3):927-63.
- Stoscheck MC. (1990). Quantification of protein. *Methods Enzymol*. 182:50-68.
- Sun X, Ou Z, Chen R, Niu X, Chen D, Kang R, Tang D. (2016). Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 63(1):173-84.
- Sun X, Wang Y, Ji K, Liu Y, Kong Y, Nie S, Li N, Hao J, Xie Y, Xu C *et al.* (2020). NRF2 preserves genomic integrity by facilitating ATR activation and G2 cell cycle arrest. *Nucleic Acids Res*. 48(16):9109-9123.
- Surdziel E, Clay I, Nigsch F, Thiemeyer A, Allard C, Hoffman G, Reece-Hoyes JS, Phadke T, Gambert R, Keller CG *et al.* (2017). Multidimensional pooled shRNA screens in human THP-1 cells identify candidate modulators of macrophage polarization. *PLoS One*. 12(8):e0183679.
- Takala J. (2015). Eliminating occupational cancer. *Ind Health*. 53(4):307-9.
- Tanaka S, Umemoto K, Kubo S, Sato Y, Mimaki S, Tsuchihara K, Takemura S, Shinkawa H, Mori A *et al.* (2022). Nivolumab for treating patients with occupational cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 29(11):1153-1155.
- Tatematsu M, Tsuda H, Shirai T, Masui T, Ito N. (1987). Placental glutathione S-transferase (GST-P) as a new marker for hepatocarcinogenesis: in vivo short-term screening for hepatocarcinogens. *Toxicol Pathol*. 15(1):60-8.
- Thanee M, Loilome W, Techasen A, Sugihara E, Okazaki S, Abe S, Ueda S, Masuko T, Namwat N, Khuntikeo N *et al.* (2016). CD44 variant-dependent redox status regulation in liver fluke-associated cholangiocarcinoma: A target for cholangiocarcinoma treatment. *Cancer Sci*. 107(7): 991–1000.
- Toyoda Y, Takada T, Suzuki H. (2017). Spontaneous Production of Glutathione-Conjugated Forms of 1,2-Dichloropropane: Comparative Study on Metabolic Activation Processes of Dihaloalkanes Associated with Occupational Cholangiocarcinoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:9736836.
- Their R, Taylor JB, Pemble SE, Humphreys WG, Persmark M, Ketterer B, Guengerich FP. (1993). Expression of mammalian glutathione S-transferase 5-5 in Salmonella typhimurium TA1535 leads to base-pair mutations upon exposure to dihalomethanes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(18): 8576–8580.
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nake S, Konno T, Tada K. (1982). Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester. *Cancer Res*. 42 (4): 1530-1536.
- Umeda Y, Matsumoto M, Aiso S, Nishizawa T, Nagano K, Arito H, Fukushima S. (2010). Inhalation carcinogenicity and toxicity of 1,2-dichloropropane in rats. *Inhal Toxicol*. 22(13):1116-26.

- Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 10:411-52.
- Vaughn MP, Shinohara DB, Castagna N, Hicks JL, Netto G, De Marzo AM, Speed TJ, Reichert ZR, Kwabi-Addo B, Henderson CJ *et al.* (2011). Humanizing  $\pi$ -class glutathione S-transferase regulation in a mouse model alters liver toxicity in response to acetaminophen overdose. *PLoS One.* 6(10):e25707.
- Venugopal R, Jaiswal AK. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(25):14960-5.
- Wakabayashi N, Shin S, Slocum SL, Agoston ES, Wakabayashi J, Kwak M-K, Misra V, Biswal S, Yamamoto M, Kensler TW. (2010). Regulation of Notch1 signaling by Nrf2: Implications for tissue regeneration. *Sci Signal.* 3(130): ra52.
- Walker B. (1982). Occupational Cancer. *J Environ Health.* 44(4): 176-179.
- Wang X-J, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, Chen W, Yi X, Zheng W, Wondrak GT *et al.* (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis.* 29(6):1235-43.
- Wild AC, Moinova HR, Mulacahy RT. (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem.* 274(47):33627-36.
- Working PK, Smith-Oliver T, White RD, Butterworth BE. (1986). Induction of DNA repair in rat spermatocytes and hepatocytes by 1,2-dibromoethane: the role of glutathione conjugation. *Carcinogenesis.* 7(3):467-72.
- Yamada K, Kumagai S, Nagoya T, Endo G. (2014). Chemical exposure levels in printing workers with cholangiocarcinoma. *J Occup Health.* 56(5):332-8.
- Yamamoto H, Saito M, Goto T, Ueshima K, Ishida M, Hayashi S, Ikoma K, Mazda O, Kubo T. (2019). Heme oxygenase-1 prevents glucocorticoid and hypoxia-induced apoptosis and necrosis of osteocyte-like cells. *Med Mol Morphol.* 52(3):173-180.
- Yamamoto T, Suzuki T, Kobayashi A, Wakabayashi J, Maher J, Motohashi H, Yamamoto M. (2008). Physiological Significance of Reactive Cysteine Residues of Keap1 in Determining Nrf2 Activity. *Mol Cell Biol.* 28(8): 2758–2770.
- Yeo MK, Kim Y, Lee DH, Chung C, Bae GE. (2022). Cosuppression of NF- $\kappa$ B and AICDA Overcomes Acquired EGFR-TKI Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 14(12): 2940.
- Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, Wu K. (2018). Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer.* 17(1):129.
- Yoshikawa K, Okazaki I, Eto T, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Honjo T. (2002). AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science.* 2002. 296(5575):2033-6.
- Zha L, Kitamura Y, Kitamura T, Liu R, Shima M, Kurumatani N, Nakaya T, Goji J, Sobue T. (2019).



- Population-based cohort study on health effects of asbestos exposure in Japan. *Cancer Sci.* 110(3):1076-1084.
- Zhang X, Morikawa K 1, Mori Y, Zong C, Zhang L, Garner E, Huang C, Wu W, Chang J, Nagashima D *et al.* (2020). Proteomic analysis of liver proteins of mice exposed to 1,2-dichloropropane. *Arch Toxicol.* 94(8):2691-2705.
- Zhao H, Jin X. (2022). Causal associations between dietary antioxidant vitamin intake and lung cancer: A Mendelian randomization study. *Front Nutr.* 9: 965911.
- Zhong Q, Zhao S, Yu B, wang X, Matyal R, Li Y, Jiang Z. (2015). High-density lipoprotein increases the uptake of oxidized low density lipoprotein via PPAR $\gamma$ /CD36 pathway in inflammatory adipocytes. *Int J Biol Sci.* 11(3): 256–265.
- Zou ZV, Gal KL, Zowalaty AEE, Pehlivanoglu LE, Garellick V, Gul N, Ibrahim MX, Bergh P-O, Henricsson M, Wiel C *et al.* (2021). Antioxidants promote intestinal tumor progression in mice. *Antioxidants (Basel).* 10(2):241.