

氏名（本籍） 木村優介（山口県）
学位の種類 博士（薬学）
学位記番号 甲第388号
学位授与の日付 2023年9月30日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目 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

論文審査委員 （主査）教授 市原 学
教授 月本 光俊 准教授 佐藤 聡
教授 秋本 和憲 教授 内海 文彰

論文内容の要旨

本研究は、職業性胆管がんの原因物質とされる1,2-ジクロロプロパン（1,2-DCP）の毒性機構の解明を動物と培養細胞を用いた実験により遂行し、がん発症機序の究明に役立てることを目的としている。職業性胆管がんとは2012年に印刷工場勤務者や元勤務者における胆管がんの集団発生として報告された職業性がんであり、有機溶剤である1,2-DCPが原因物質の1つとして疑われている。印刷工程における機器からのインク除去剤として使用されていたこれら有機溶剤が作業環境中に揮発し、換気も不十分であったため高濃度で吸入曝露していたことが発がんを引き起こしたと考えられる。

第1章では職業性胆管がんの病理所見において通常の胆管がんに比べ慢性的な胆管傷害像や前がん病変が高頻度に観察され発症における炎症性反応の関与が示唆されること、また炎症性発がんとの関連性が指摘される遺伝子編集酵素である活性化誘導シチジンデアミナーゼ（Activation-induced cytidine deaminase: AID）に着目し、細胞実験において1,2-DCPへの曝露が胆管細胞に引き起こす応答について研究をおこなった。その結果、ヒト胆管細胞を単独で培養した条件では1,2-DCPに曝露しても炎症性サイトカインやAIDの発現上昇は起こらないが、マクロファージ細胞を胆管細胞と共培養した条件においては胆管細胞にAIDの発現が誘導されることがわかった。また共培養により1,2-DCP曝露による胆管細胞内DNA損傷が増強されること、マクロファージ細胞の1,2-DCPへの曝露が炎症促進サイトカインの発現を誘導することも明らかとなった。すなわち、1,2-DCPへの曝露によりマクロファージが炎症促進サイトカインなどの液性因子を通して胆管細胞における遺伝子編集酵素の発現を異所性に亢進させ、体細胞変異を誘発する機構が1,2-DCP誘導性の

発がんに関与することが示唆された。

第2章ではマウスを用いた1,2-DCPへの経口曝露実験を実施し、1,2-DCPが肝臓や胆管に引き起こす毒性反応を明らかにするとともに、転写因子Nrf2(NF-E2-related factor2)が1,2-DCPの毒性に対して果たす役割を検討した。Nrf2は抗酸化遺伝子および炎症促進サイトカインの発現を制御し、化学物質への解毒応答の増強や炎症反応抑制に関与する重要な因子であるが、がん細胞の悪性化にも関与することから生体にとって利益と不利益の二面性を持つとされる。また、1,2-DCPのようなジハロゲン化炭化水素はグルタチオン抱合によって活性化されるという毒性学上の理論が存在することから、グルタチオン合成を上方制御するNrf2を欠損したマウスにおいて毒性が減少するとの仮説を立てることが可能であり、この仮説の検証も本研究の目的の一つである。

Nrf2ノックアウトマウス(ホモ欠損型)及び野生型遺伝子を持つマウスの2種類を用意し、5週間の1,2-DCP強制経胃投与による曝露を行い投与後の肝臓における反応を解析した。結果として、1,2-DCPに曝露したマウスでは肝細胞及び胆管細胞の増殖亢進や、肝臓におけるDNA損傷の指標タンパクである γ H2AXの発現亢進がみられた。1,2-DCP誘導性の細胞増殖亢進についてはNrf2の欠損は大きな影響を与えなかったが、Nrf2ノックアウトマウスにおいては γ H2AXの1,2-DCP曝露による上昇が抑制されていた。また1,2-DCP曝露によってNrf2の制御を受ける一部の遺伝子発現が著しく亢進しており、その亢進はNrf2ノックアウトマウスでは抑制されていた。曝露によるNrf2活性化が示唆される一方で、1,2-DCP曝露依存性の肝内グルタチオン量増加はNrf2ノックアウトマウスにおいても野生型と同様に発生していたため、今回の実験のみではグルタチオン抱合による1,2-DCP活性化を結論付けることはできなかった。近年Nrf2がDNAの相同組み換え修復を促進するなど、Nrf2のDNA修復機構への関与を示す報告が散見される。今回Nrf2欠損により1,2-DCP誘導性の γ H2AXシグナルが消失した理由が、Nrf2が持つDNA修復系への影響であるのか、もしくはグルタチオンによる1,2-DCPの代謝活性化がNrf2ノックアウトマウスでは発生していなかったのかという疑問が将来の研究課題として残った。本実験においては1,2-DCPがマウス肝に対して細胞増殖亢進とDNA損傷という化学物質発がんにおいて鍵となる事象を引き起こすこと、及びNrf2が1,2-DCP曝露誘導性の肝細胞のDNA損傷または修復に対して重要な役割を持つことを示した。

論文審査の結果の要旨

ヒト胆管細胞およびマクロファージを用いて1,2-ジクロロプロパン(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を処置した場合ではactivation-induced cytidine deaminase(AID)mRNAの発現上昇は観

察できなかったにも関わらず、ヒトTHP-1由来マクロファージ様細胞と共培養した場合では変化が見られた。発がん過程における炎症応答はそれ自体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。次に転写因子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。1,2-DCPへの曝露は、野生型マウスにおける肝臓組織におけるDNA二重鎖切断マーカである γ H2AX発現、NQO1, xCT, GSTM1, G6PDの遺伝子発現を上方制御したが、これらの変化はNrf2ノックアウトマウスにおいては見られなかった。一方、1,2-DCPはNrf2非依存的にグルタチオンレベルを増加させた。本研究は1,2-DCPがNrf2依存的に胆管細胞増殖を誘導するとともに胆管細胞アポトーシスを抑制すること、さらに肝臓組織におけるDNA二重鎖切断を誘導するとともに抗酸化遺伝子発現を上方制御することを明らかにした。本研究は発がん物質の鍵となる性質として認識されている1,2-DCPの細胞増殖、DNA損傷、抗アポトーシス作用におけるNrf2の役割を明らかにした。

審査では1) ヒトにおける前がん病変の病理組織学的特徴、2) 動物実験におけるDNA変異検出の可能性、3) 1,2-DCPのイニシエーター、プロモーターとしての作用、4) AIDを誘導する因子、5) TNF α 抗体を用いた阻害実験の可能性、6) 活性酸素がメディエーターになっている可能性、7) AIDの発がんへの寄与の程度、8) DCPがAIDを誘導する閾値、9) 高用量の1,2-DCP曝露におけるAID発現について、10) TNF α 発現誘導におけるRNA成熟の関与、11) Nrf2ノックアウトによる遺伝子発現の変化、12) TNF α の濃度設定の根拠、13) AIDタンパク量、14) DNA修復系酵素の発現変化、15) *in vivo*におけるアポトーシス確認の方法について質疑が行われ、申請者よりの確かな回答が得られた。

本論文は本邦において最近新しく発生した職業がんである1,2-ジクロロプロパンによる胆管がん誘導において免疫細胞であるマクロファージが必須の役割を果たすことを明らかにするとともに、胆管がん誘導メカニズムにおけるAIDの関与を示唆した。さらに本論文はDNAへの損傷作用がNrf2に依存することを明らかとした。以上より本論文は博士(薬学)の学位論文として十分に価値のあるものと認められる。