

2021年11月30日

## 論文の内容の要約

氏名	中村 賢志
学位の種類	博士 (獣医学)
学府又は研究科・専攻	大学院農学府 共同獣医学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文名	Studies on the Modes of Action Underlying Acetamide-induced Hepatocarcinogenesis in Rats

## 【論文の内容の要約】

食品香料として用いられていた acetamide は、ラットに肝発がん性を示すことから FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) において食品添加物としての使用は不相当と判断された。しかし近年, acetamide が牛乳や牛肉等の食品やたばこ煙に含まれていることが報告され, ヒトへの健康影響が懸念される。一方, これまでに種々の遺伝毒性試験が実施されているがほとんど全ての結果が陰性であり, その肝発がん機序は未だ明らかとなっていない。したがって, acetamide のラット肝発がんメカニズムを明らかにすることは, ヒトへのリスク評価をする上で重要と考えられる。そこで本研究では, ラット肝臓における acetamide の *in vivo* 変異原性及び染色体異常誘発性の評価, 並びにそれらのラット肝発がんへの関与について検討を行った。

第1章では, レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性試験を実施し, 発がん標的臓器である肝臓における acetamide の変異原性を評価した。F344 *gpt delta* ラット (雄, 6 週齢, 10 匹/群) に acetamide を 0.625%, 1.25% 及び 2.5% の濃度で 13 週間混餌投与し, 肝臓における病理組織学的検査, 前がんマーカーである GST-P 抗体を用いた免疫組織化学検索, 並びに *gpt* 及び Spi アッセイを実施した。その結果, 病理組織学的検査において, 1.25% 以上から単細胞壊死や肝細胞空胞化に加え, 肝細胞の異常分裂像及び異常形態核も認められた。また, 肝細胞に細好塩基性の細胞質内封入体が高頻度に観察され, これは核酸染色である Feulgen 反応に陽性を示した。免疫組織化学検索では, 発がん用量である 1.25% 以上において, GST-P 陽性細胞巢の数及び面積の有意な増加が認められた。一方, 肝臓における *gpt* 及び Spi アッセイでは, いずれの濃度においてもそれら変異体頻度に有意な変化は認められなかった。以上より, acetamide は発がん用量においても肝臓に変異原性を有しないことが明らかとなり, acetamide のラット肝発がんにおける *in vivo* 変異原性の関与は乏しいことが示された。一方, 肝細胞において核成分に由来する細胞質内封入体が高頻度に観察され, さらに異常分裂像や異常形態核も認められたことから, acetamide 投与による染色体異常の誘発が疑われた。

次に第2章では、ラットを用いた *in vivo* 小核試験及び肝臓コメットアッセイを実施し、acetamide の染色体異常及び DNA 損傷誘発性について評価した。F344 ラット（雄，6 週齢，5 匹/群）に acetamide を第1章と同様の濃度で4週間混餌投与し，肝臓及び骨髄における小核試験を実施した。また，同系統ラットに acetamide を0，200，600 及び2000 mg/kg の用量で3日間強制経口投与し，肝臓におけるコメットアッセイを実施した。併せて，染色体異常誘発メカニズムについて主に免疫組織化学的手法を用いて検討した。*In vivo* 小核試験の結果，骨髄小核試験は陰性であったのに対し，肝臓では発がん用量である1.25%以上で小核を有する肝細胞の有意な増加が認められた。また，0.625%以上から大型の小核を有する肝細胞の有意な増加が認められ，これは形態的に細胞質内封入体と一致していた。一方，肝臓のコメットアッセイでは，いずれの用量においても DNA 損傷の指標である% tail DNA の増加は認められなかった。以上より，acetamide は非 DNA 損傷メカニズムによりラット肝臓特異的に染色体異常を誘発することが明らかとなった。また，acetamide 投与により肝細胞において emerin や BAF (Barrier-to-autointegration factor) といった核膜関連タンパク質の発現異常が投与3日から認められた。核膜の完全性は正常な有糸分裂に必須であることから，acetamide による染色体異常は核膜関連タンパクの発現異常に伴う染色体分離の異常に起因して生じている可能性が考えられた。さらに，大型の小核が細胞質内封入体として病理組織学的に検出されることも明らかとなった。

続いて第3章では，acetamide により誘発される染色体異常と肝発がんとの関連性について，病理組織学的に検出可能な大型の小核に着目して詳細に検索した。第2章で得られた，2000 mg/kg の acetamide を3日間経口投与した肝臓 (day 3) 又は1.25%の濃度で4週間混餌投与した肝臓 (week 4) について，核膜関連タンパク質の lamin B1, lamin A/C, emerin 及び BAF (Barrier-to-autointegration factor) ，クロマチンマーカーの H3K9me3 及び H4K8ac, DNA 損傷マーカーの  $\gamma$ -H2AX 及び 53BP1 の蛍光免疫染色並びに電子顕微鏡観察を実施した。その結果，大型の小核において核膜関連タンパク質の発現異常が認められ，その発現異常部位に一致して DNA 色素である DAPI の蛍光強度が増加した。また，大型の小核において，電子顕微鏡観察で高電子密度構造物が認められ，これに一致して H3K9me3 及び H4K8ac の発現異常が認められた。さらに， $\gamma$ -H2AX 及び 53BP1 の二重蛍光染色では，大型の小核において  $\gamma$ -H2AX と 53BP1 の共発現が認められた。これら分子病理学的特徴は，day 3 から week 4 にかけて進行した。これらより，acetamide により誘発される大型の小核において，核膜やクロマチン構造の異常，DNA 損傷の蓄積が進行性に認められた。Acetamide により誘発される大型小核で認められたこれら特徴は，chromoanagenesis\* といった染色体再構成に関与する小核の特徴に一致していたことから，chromoanagenesis 様の染色体再構成が acetamide の肝発がんに関与する可能性が示された。

\*：小核において損傷した染色体 DNA が再構成を引き起こし，その後有糸分裂を経て主核に取り込まれることで生じる染色体再構成。

次に第4章では，acetamide により誘発したラット肝臓腫瘍について変異解析を行い，肝

発がんにおける染色体再構成の関与について検討した。F344 ラット（雄，6 週齢，25 匹）に acetamide を 2.5% の濃度で 26-30 週間混餌投与し，肝臓の剖検及び病理組織学的検査を実施した。また，肝臓腫瘍から DNA を抽出後，Novaseq 6000（Illumina 社）を用いて全ゲノム解析を実施し，コピー数変異及び構造変異などの遺伝子変異について解析を行った。全ゲノム解析の比較対照として diethyl nitrosamine（DEN）及び phenobarbital（PB）投与の 2 段階発がんモデルラットの肝臓腫瘍を用いた。剖検及び病理組織学的検査の結果，22/25 個体に腫瘍形成が認められ，それらは肝細胞腺腫あるいは肝細胞癌であった。腫瘍の multiplicity は 3.7 個/匹と多発性で，肝細胞腺腫に比べて肝細胞癌の比率が高かった。Acetamide 投与及び DEN/PB 投与 2 段階発がんモデルのラット肝臓腫瘍について全ゲノム解析を実施した結果，2 段階発がんモデルに比べて acetamide 投与群の肝臓腫瘍で広範なコピー数変異が多数の染色体に渡って認められた。また，このコピー数の変異パターンは個体間あるいは同一個体の腫瘍間で大きく異なっていた。さらに，DEN/PB 投与 2 段階発がんモデルに比べて acetamide 投与群の肝臓腫瘍で挿入や逆位といった構造異常の増加傾向が認められた。これら変異パターンの特徴から，acetamide 誘発肝臓腫瘍において chromoanagenesis 様の染色体再構成が生じていることが強く示唆され，acetamide のラット肝発がん過程における染色体再構成の関与が示された。

以上，本研究により acetamide がラット肝臓特異的に染色体異常を誘発すること，その肝発がんには染色体異常による小核形成を介した染色体再構成が寄与することが明らかとなった。本研究は，食品汚染物質である acetamide のリスク評価に資するデータを提供することに加え，*in vivo* 化学発がん過程における染色体異常の関与を明らかにした点で非常に有用であると思われた。