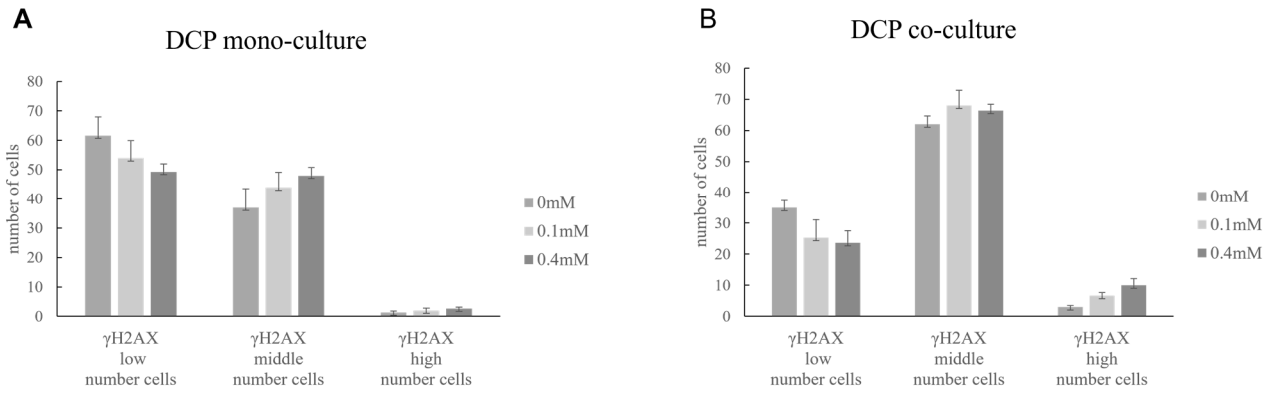
3　免疫細胞が介在する職業性胆管がん誘導シグナルの解明	市原　学

【目的】2013 年、大阪におけるオフセット校正印刷工場において、20 代の若年者を含む多数の労働者が胆管がんに罹患していることが報告された。労働者は共通して有機溶剤 1,2-ジクロロプロパン（1,2-DCP）に曝露されていた。本研究では 1,2-DCP による胆管がん誘導における免疫細胞の役割、DNA 障害を誘導するシグナルを解明する。

【方法】ヒト胆管細胞株 MMNK-1 細胞の単培養、および MMNK-1 細胞とヒト THP-1 単球由来マクロファージとの共培養を用いた。1,2-DCP および比較のために同じ濃度の DCP、TCP 曝露群も作製した。胆管細胞の DNA 損傷度合の評価ため DNA 二重鎖切断マーカーγ-H2AX 陽性 Foci、γ-H2AX 汎核陽性細胞の数も数えた。動物実験では TNFαノックアウト（TNFα-KO）マウスおよび野生型マウスをそれぞれ無作為に 4 群に分け、1,2-DCP に 0、125、250、500 mg/kg 体重、1 日 1 回、週 5 日、13 週間、強制経口投与した。曝露終了後、肝臓切片を作製し、HE、鉄染色および免疫組織化学による病理組織学的検索を行った。

【結果】MTS アッセイの結果、1,2-DCP を曝露した共培養胆管細胞では対照群と比較すると各濃度において細胞生存率が増加していたのに対し、0.8 mM の 1,2,3-TCP を曝露した共培養で細胞生存率が減少していた。DCM では単培養、共培養ともに変化を確認できなかった。γ-H2AX 陽性 Foci 数では、0.4 mM の 1,2-DCP、DCM、1,2,3-TCP を曝露した共培養胆管細胞で Foci 高度発現細胞が対照群と比較すると顕著に増加していた。Foci 高度発現細胞における重回帰分析の結果では、有意な交互性を確認できた。γ-H2AX 汎核陽性細胞の発現数では 1,2-DCP を曝露した共培養胆管細胞でγ-H2AX 汎核陽性細胞が濃度依存的に減少していたが、他の物質では確認できなかった。動物実験では野生型マウスにおいては 500 mg/kg 投与群において一時的な体重減少がみられたが、TNFα-KO マウスにおいては影響が抑えられた。肝重量は Wild-type と TNFα$^{-/-}$どちらにおいても増加が見られた。野生型、TNFα-KO マウス共に Ki67 陽性肝細胞数が 1,2-DCP 投与量依存的な増加を示した。Wild-type、TNFα$^{-/-}$共にγ-H2AX 陽性肝細胞数が 1,2-DCP 投与量依存的な増加を示した。ベルリンブルー染色を行うと 1.2-DCP を曝露したグループでは、組織障害部位だけでなく、通常に見える細胞にも微弱な鉄陽性の反応が見られた。

MMNK-1 胆管細胞の 1,2-ジクロロプロパン曝露後のγ-H2AX 陽性 foci 頻度別細胞率



3. 免疫細胞が介在する職業性胆管がん誘導シグナルの解明

市原　学

東京理科大学 薬学部 薬学科 環境労働衛生学分野

Key words：職業がん，胆管がん，自然免疫，シグナル

緒　言

2013 年、大阪におけるオフセット校正印刷工場において、20 代の若年者を含む多数の労働者が胆管がんに罹患していることが報告された。労働者は共通して有機溶剤 1,2-ジクロロプロパン（1,2-DCP）に曝露されていた。1,2-DCP に曝露した後に胆管がんを発症した労働者から手術によって得られたがん組織の病理組織学的解析によると、胆管がん周囲の非がん組織において広範な炎症細胞の浸潤、線維化、増殖性変化が観察された［1］。これらは一般的な胆管がんの周囲組織に見られない所見であるとともに 1,2-DCP が炎症を介して胆管がんを誘導することを示唆している。本研究では 1,2-DCP による胆管がん誘導における免疫細胞の役割を解明することを目的とする。本研究は直接的な DNA 障害性を調べている現在のがん原性試験を見直し、免疫細胞を介してがんを誘導する環境化学物質に対するスクリーニング系を確立することに貢献する。本研究では 1,2-DCP への曝露がマクロファージの共存下で胆管細胞の DNA 障害を誘導するシグナルを解明する。

方　法

1. 細胞培養

以前の研究に従い、ヒト胆管細胞株 MMNK-1 細胞の単培養、および MMNK-1 細胞とヒト THP-1 単球由来マクロファージとの共培養を用いた［2〜5］。

2. 細胞生存率の評価

0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mM の 1,2-DCP を曝露した後、を曝露した後、細胞生存率を確認するため、MTS アッセイを行った。比較対照として同濃度のジクロロメタン（DCM）、1,2,3-トリクロロプロパン（1,2,3-TCP）に曝露し、同様のアッセイを行った。

3. DNA 損傷度合の評価

0、0.1、0.4 mM の 1,2-DCP、DCM、1,2,3-TCP を曝露した後、DNA 損傷度合の評価ため、100 個の胆管細胞における DNA 二重鎖切断マーカーγ-H2AX 陽性 Foci を数えた。Foci 数 0〜4 個（低度発現）、5〜54 個（中等度発現）、≧55 個（高度発現）の 3 つの階級に分類した。

4. γ-H2AX 汎核陽性細胞の評価

0、0.1、0.4 mM の 1,2-DCP、DCM、1,2,3-TCP を曝露した後、γ-H2AX 汎核陽性細胞の数も数えた。評価には単回帰分析を行った。

5. TNFαノックアウト（TNFα-KO）マウス実験

以前の研究に従い、1,2-DCP 曝露による肝臓の細胞増殖および DNA 損傷を調べた［6，7］。

9～11 週齢の TNFα-KO マウスおよび野生型マウスをそれぞれ無作為に 4 群に分け、1,2-DCP に 0、125、250、500 mg/kg 体重を 1 日 1 回、週 5 日、13 週間、強制経口投与した。曝露終了後、ペントバルビタールによる深麻酔下、肝臓を剖出し、一部は 4%パラフォルムアルデヒド中性緩衝液で固定するとともに、一部は生化学解析用に急速凍結保存を行い、解析時まで−80℃保存した。肝臓のパラフィンブロックを作製し、HE 染色による病理組織学的検索を行った。さらに細胞増殖マーカーKi67 および DNA 二重鎖切断マーカーγ-H2AX の免疫組織化学を行い、それぞれの単位面積あたりの陽性細胞数を定量した。以前の研究においてマウスの 1,2-DCP 曝露により肝臓における ferritin heavy chain, ferritin light chain タンパク発現が増加していたことから、ベルリンブルー染色による肝臓内鉄蓄積を調べた［8］。また、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）がジハロゲン化炭化水素の活性化に貢献するとの仮説があることから［9］、GSTP1 タンパク発現量をウェスタンブロットで定量した。

動物実験については、動物愛護管理法、文部科学省告示「研究機関等における適正な動物実験等の実施に向けた基本的な考え方について」、東京理科大学動物実験指針を遵守するとともに、事前に東京理科大学動物実験委員会による実験計画の承認を受け、動物への苦痛を最小限にした条件で実験を行う。遺伝子改変動物を使用する際、事前に組換え DNA 実験計画申請をして、承認を受けた。

6. 統計検定

各濃度群間をダネットによる多重比較検定、単培養と共培養の交互性の確認のため重回帰分析を行った。

結　果

1. 細胞生存率の評価結果

MTS Assay の結果、1,2-DCP を曝露した共培養胆管細胞では対照群と比較すると各濃度において細胞生存率が増加していたのに対し、0.8 mM の 1,2,3-TCP を曝露した共培養で細胞生存率が減少していた。DCM では単培養、共培養ともに変化を確認できなかった（図 1）。

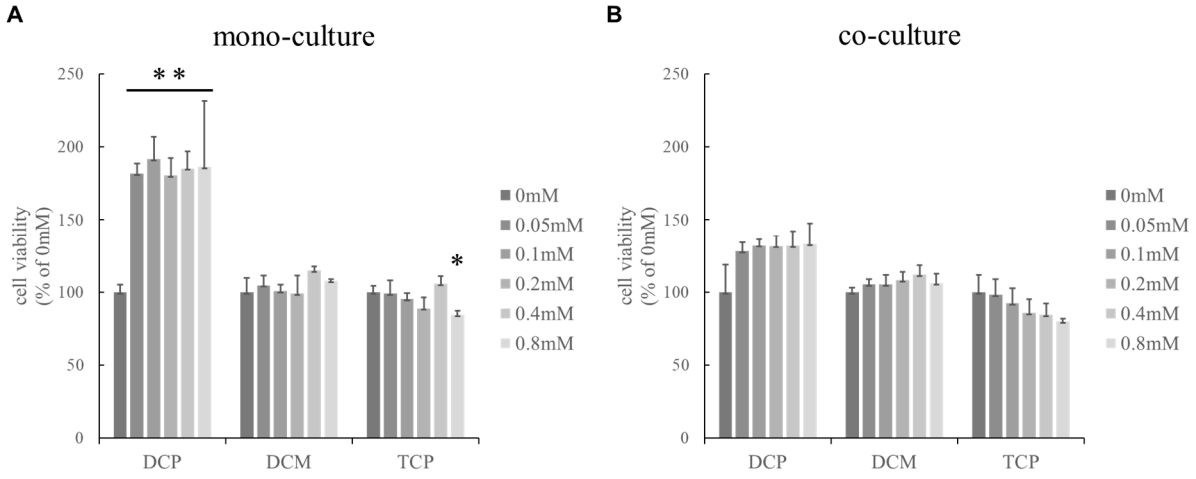


図 1. 単培養および THP-1 単球由来マクロファージとの共培養した MMNK-1 胆管細胞の 1,2-DCP 曝露後の MTS 活性

A） 単培養 MMNK-1 胆管細胞。

B） THP-1 単球由来マクロファージとの共培養した MMNK-1 胆管細胞。

*P＜0.05、**P＜0.01（ANOVA 後のダネット多重比較）。

2. DNA 損傷度合の評価結果

γ-H2AX 陽性 Foci の発現数では、0.4 mM の 1,2-DCP、DCM、1,2,3-TCP を曝露した共培養胆管細胞で Foci 高度発現細胞がコントロール群と比較すると顕著に増加していた（図 2）。また、Foci 高度発現細胞における重回帰分析の結果では、交互性を確認できた。

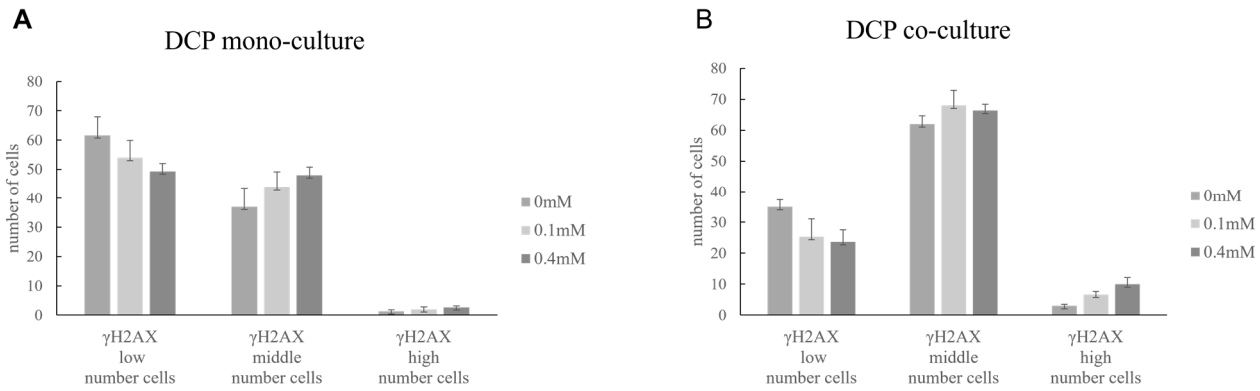


図 2. 単培養および THP-1 単球由来マクロファージとの共培養における MMNK-1 胆管細胞の 1,2-DCP 曝露後のγ-H2AX 陽性 foci 頻度別細胞率

A） γ-H2AX 陽性 foci 数頻度で分類した単培養 MMNK-1 細胞の百分率。

B） γ-H2AX 陽性 foci 数頻度で分類した THP-1 単球由来マクロファージと共培養した MMNK-1 胆管細胞の百分率。

3. γ-H2AX 汎核陽性細胞の評価結果

γ-H2AX 汎核陽性細胞の発現数では、1,2-DCP を曝露した共培養胆管細胞でγ-H2AX 汎核陽性細胞が濃度依存的に減少していたが、他の物質では確認できなかった。

4. TNFαノックアウト（TNFα-KO）マウス実験結果

野生型マウスにおいては 500 mg/kg 投与群において一時的な体重減少がみられたが、TNFα-KO マウスにおいては影響が抑えられた。肝重量は野生型マウスと TNFα-KO マウスどちらにおいても増加が見られた。回帰分析では野生型マウス、TNFα-KO マウス共に Ki67 陽性肝細胞数が 1,2-DCP 投与量依存的な増加を示した。回帰分析では野生型マウス、TNFα-KO マウス共にγ-H2AX 陽性肝細胞数が 1,2-DCP 投与量依存的な増加を示した（図 3）。1,2-DCP の投与によって zone1（門脈域）、zone2（中間域）における細胞の空砲変性が野生型マウス、TNFα-KO マウス共に増加した。1,2-DCP の高用量投与群では細胞死、炎症反応を示唆する組織像が得られた。ベルリンブルー染色を行うと 1,2-DCP を曝露したグループでは、組織障害部位だけでなく、通常に見える細胞にも微弱な鉄陽性の反応が見られた。GSTP1 はグルタチオン-S-トランスフェラーゼの中でもマウス肝では一番量に富むサブタイプの 1 つであるが、1,2-DCP の曝露によって減少する傾向があった。

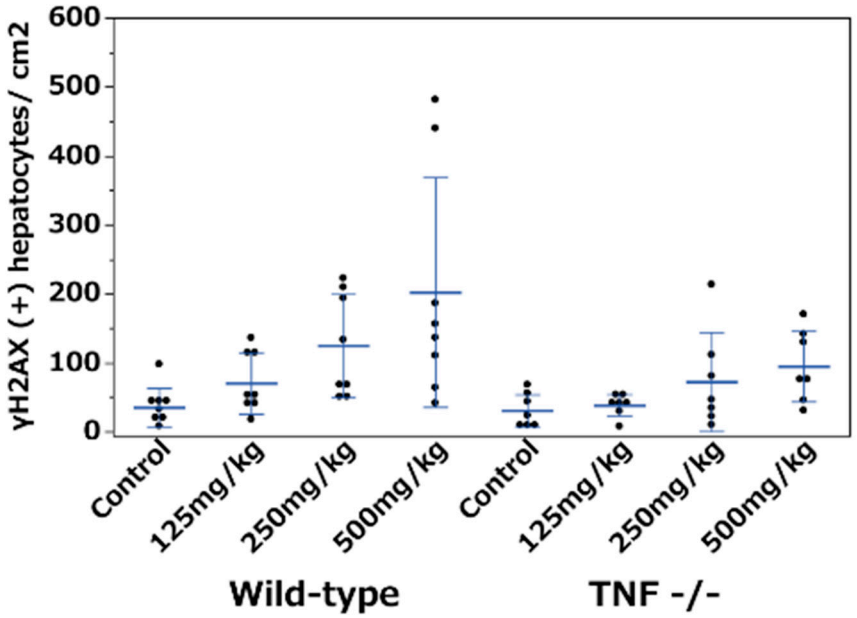


図 3. 1,2-DCP に曝露された野生型および TNFα-KO におけるγ-H2AX 陽性肝細胞密度
野生型および TNFα-KO マウスの両方で 1,2-DCP 曝露量依存的な肝細胞 DNA 二重鎖切断マーカーγ-H2AX 陽性細胞の増加が見られたが、両マウスの間の違いは明瞭ではなかった。

考　察

1,2-DCP が単培養胆管細胞の細胞生存率を増加させた結果は、1,2-DCP の細胞増殖作用を示した *in vivo* ［6, 7］、*in vitro* ［3］の先行研究と一致している。1,2-DCP、DCM、1,2,3-TCP を曝露した共培養胆管細胞で Foci 高度発現細胞を増加させ、有意な交互作用を確認できたことから、検討したすべての塩素化炭化水素への曝露が、THP-1 マクロファージが胆管細胞における DNA 損傷を増強させていることが明らかとなった。一方、共培養胆管細胞における 1,2-DCP による、カスパーゼ依存的なγ-H2AX 汎核陽性細胞の減少は、我々の最近の動物実験が示した 1,2-DCP による抗アポトーシス作用と一致している。γ-H2AX 汎核陽性細胞は前期アポトーシスを誘導している細胞と考えられている［10］。1,2-DCP のみが共培養下における DNA 損傷の増強、γ-H2AX 汎核陽性細胞の減少を示したことから、1,2-DCP が他物質と区別される発がんメカニズムとして抗アポトーシス作用を有することを示唆している。

動物実験では、TNFα-KO マウスおよび野生型マウスの両方で 1,2-DCP 曝露量依存的な肝細胞増殖、肝細胞 DNA 二重鎖切断マーカーγ-H2AX 陽性細胞の増加が見られたが、両マウスの間の違いは明瞭ではなかった。同様の検討を胆管細胞で行う必要がある。本研究では鉄イオン染色陽性細胞が野生型マウス 1,2-DCP 500 mg/kg 体重曝露群で増加していることを観察したが、野生型マウス、TNFα-KO マウスとの間の比較検討は行っていない。1,2-DCP 曝露量依存的な上昇が野生型マウスで以前行ったプロテオミクス研究では 1,2-DCP 曝露されたマウス肝臓において Ferritin heavy chain および Ferritin light chain の発現が上昇していていたことから、フェリチンタンパクが胆管細胞 DNA 損傷に果たす影響および胆管誘導作用シグナルとしての役割についてさらなる研究が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、自治医科大学医学部環境予防医学研究室の木村優介、市原佐保子、東京理科大学大学院薬学研究科の草ケ谷京士郎、宗才である。

文　献

1) Kubo S, Nakanuma Y, Takemura S, Sakata C, Urata Y, Nozawa A, Nishioka T, Kinoshita M, Hamano G, Terajima H, Tachiyama G, Matsumura Y, Yamada T, Tanaka H, Nakamori S, Arimoto A, Kawada N, Fujikawa M, Fujishima H, Sugawara Y, Tanaka S, Toyokawa H, Kuwae Y, Ohsawa M, Uehara S, Sato KK, Hayashi T, Endo G. Case series of 17 patients with cholangiocarcinoma among young adult workers of a printing company in Japan. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014 Jul;21(7):479-88. doi: 10.1002/jhbp.86. Epub 2014 Jan 13. PMID: 24420816

2) Ekuban A, Shichino S, Zong C, Ekuban FA, Kinoshita K, Ichihara S, Matsushima K, Ichihara G. Transcriptome analysis of human cholangiocytes exposed to carcinogenic 1,2-dichloropropane in the presence of macrophages in vitro. Sci Rep. 2022 Jul 2;12(1):11222. doi: 10.1038/s41598-022-15295-3. PMID: 35780190

3) Ekuban A, Zong C, Ekuban FA, Kimura Y, Takizawa R, Morikawa K, Kinoshita K, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Role of Macrophages in Cytotoxicity, Reactive Oxygen Species Production and DNA Damage in 1,2-Dichloropropane-Exposed Human Cholangiocytes In Vitro. Toxics. 2021 Jun 1;9(6):128. doi: 10.3390/toxics9060128. PMID: 34205922

4) Takizawa R, Ichihara S, Zong C, Kinoshita K, Sakurai T, Ikegami A, Mise N, Ichihara G. 1,2-Dichloropropane induces γ-H2AX expression in human cholangiocytes only in the presence of macrophages. Toxicol Lett. 2021 Oct 1;349:134-144. doi: 10.1016/j.toxlet.2021.06.009. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34153406

5) Zong C, Kimura Y, Kinoshita K, Takasu S, Zhang X, Sakurai T, Sekido Y, Ichihara S, Endo G, Ichihara G. Exposure to 1,2-Dichloropropane Upregulates the Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) in Human Cholangiocytes Co-Cultured With Macrophages. Toxicol Sci. 2019 Mar 1;168(1):137-148. doi: 10.1093/toxsci/kfy280. PMID: 30452740

6) Kimura Y, Ekuban FA, Zong C, Sugie S, Zhang X, Itoh K, Yamamoto M, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Role of Nrf2 in 1,2-dichloropropane-induced cell proliferation and DNA damage in the mouse liver. Toxicol Sci. 2023 Aug 29;195(1):28-41. doi: 10.1093/toxsci/kfad059. PMID: 37326970

7) Zhang X, Zong C, Zhang L, Garner E, Sugie S, Huang C, Wu W, Chang J, Sakurai T, Kato M, Ichihara S, Kumagai S, Ichihara G. Exposure of Mice to 1,2-Dichloropropane Induces CYP450-Dependent Proliferation and Apoptosis of Cholangiocytes. Toxicol Sci. 2018 Apr 1;162(2):559-569. doi: 10.1093/toxsci/kfx272. PMID: 29228347

8) Zhang X, Morikawa K, Mori Y, Zong C, Zhang L, Garner E, Huang C, Wu W, Chang J, Nagashima D, Sakurai T, Ichihara S, Oikawa S, Ichihara G. Proteomic analysis of liver proteins of mice exposed to 1,2-dichloropropane. Arch Toxicol. 2020 Aug;94(8):2691-2705. doi: 10.1007/s00204-020-02785-4. Epub 2020 May 20. PMID: 32435916

9) Zhang L, Zong C, Ichihara S, Naito H, Toyokuni S, Kumagai S, Ichihara G. A trial to find appropriate animal models of dichloropropane-induced cholangiocarcinoma based on the hepatic distribution of glutathione S-transferases. J Occup Health. 2015;57(6):548-54. doi: 10.1539/joh.15-0085-OA. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26423826

10) Solier S, Sordet O, Kohn KW, Pommier Y. Death receptor-induced activation of the Chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathways. Mol Cell Biol. 2009 Jan;29(1):68-82. doi: 10.1128/MCB.00581-08. Epub 2008 Oct 27. PMID: 18955500