

分子レベルでの毒性発現機構の種差を踏まえたより精緻な安全性評価を目指して！

山田 智也

## Reliable Safety Assessment Depends on Species Differences in Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation

Tomoya YAMADA

*Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Company Ltd.,  
3-1-98 Kasugade-naka, Konohana-ku, Osaka 554-8558, Japan*

(Received September 12, 2006)

The potential carcinogenic hazard of chemical agents to humans is presently based primarily on the results of long-term animal bioassays. The validity of this toxicologic approach to human risk assessment depends on two fundamental assumptions. First, the results of an animal bioassay are directly applicable to humans (interspecies extrapolation). Second, the doses used in an animal bioassay are relevant for estimating risk at known or expected human exposure levels (dose extrapolation). Although progress has been made over the past four decades in understanding the mode of action of chemical carcinogens, it is increasingly important to determine mechanistically the relevance of these modes of action in humans. There is now evidence that *M6P/IGF2R* functions as a novel tumor-suppressor gene in a variety of human and rodent cancers. *M6p/Igf2r* is imprinted in rodents and expressed only from the maternal allele after embryonic implantation. In contrast, both alleles are functional in humans. This marked species difference in *M6P/IGF2R* imprinting has important implications for human carcinogen risk assessment since only one rather than two alleles needs to be mutated in rodents to completely inactivate the function of this tumor suppressor gene. This striking species difference in the imprint status of *M6P/IGF2R* clearly demonstrates that we need to understand better variations in epigenetic mechanisms of gene regulation between rodents and humans to perform accurately chemical safety assessments.

**Key words**—epigenetics; imprinting; M6P/IGF2R; carcinogenicity; risk assessment; species differences

### 1. はじめに

化学物質はその有用性や代替品の有無などを考慮し、利益 (benefit)/危険性 (risk) の比について考察され、その危険性の許容度が決められる。毒性学は化学物質の危険性を科学的に明らかにする学問領域である。特に、ヒトへの危険性を評価する場合、始めからヒトに直接投与することができないため、実験動物を用いた毒性試験のデータに基づいて、ヒトにおける有害性の種類や安全摂取量を推定する。毒性試験として評価する項目は、一般毒性、遺伝毒性、発癌性、生殖発生毒性、内分泌毒性、神経行動毒性、免疫毒性等々、広範囲に渡る。これらの毒性は、適正実施規範 (Good Laboratory Practice: GLP)

の規制の下、国際的な試験実施基準 (ガイドライン) に従って試験されている。さらに、近年の分子生物学の進歩により、分子生物学的アプローチも応用されつつある。毒性発現機構の解明や短期試験での長期毒性発現予測 (例えば発癌性予測) において、遺伝子の網羅的発現解析を用いる、いわゆるトキシコゲノミクスに関して多くのデータが出されつつあり、その有用性が検討されている。<sup>1)</sup> このほか、メチル化を主とした DNA 修飾の解析 (トキシコエピジェネティクス)、あるいは標的遺伝子の機能の特異的に阻害する RNA 干渉技術の応用など、最先端の分子生物学的アプローチを適用した Molecular Toxicology の進展が期待される。今回、最も時間と労力を要する発癌性評価を題材に、実験動物とヒトとの種差を考慮した上で安全性評価を行う重要性について述べ、この種差をより明らかにする研究がさらに進められることを期待して以下にまとめてみた。

住友化学(株)生物環境科学研究所 (〒554-8558 大阪市此花区春日出中 3-1-98)

e-mail: yamadat8@sc.sumitomo-chem.co.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S16 で発表したものを中心に記述したものである。

## 2. 発癌性評価における発癌機構解明研究の重要性

実験動物を用いた発癌性試験は、ヒトでの発癌性を予知する目的で実施される。通常、最大耐量（腫瘍発生以外の毒性で生存率に影響しない最大量、Maximum Tolerated Dose: MTD）を最高用量に設定し、主としてラット及びマウスに対して1.5—2年間に渡って被験物質が投与される。その後、病理組織学的検査が実施され、腫瘍発生の頻度、時期、悪性度の変化でもって発癌性が評価される。化学物質の発癌性は、実験動物もヒトも質的には差がなく、実験動物で認められた発癌性はヒトでも認められるという前提に基づいて評価されている。<sup>2-5)</sup> ヒトに対する発癌性評価を動物で試験する妥当性は、国際癌研究機関（International Agency for Research on Cancer: IARC）の評価によって、ヒトへの発癌性が明らかにされた化学物質のほとんどが、動物でも同様に発癌性を有することが証明されているという事実に基づいている。

実験動物を用いた毒性試験の情報でもって、化学物質のヒトへの有害影響はおおむね評価できていると考えられるが、偽陽性や偽陰性が生じている可能性も残る。発癌性を示す化学物質は、遺伝毒性の有無により遺伝毒性発癌物質（genotoxic carcinogen）と非遺伝毒性発癌物質（non-genotoxic carcinogen）に大別される。古くよりヒトで発癌性が知られている化学物質の多くは遺伝毒性発癌物質である。しかし、近年、GLP規制の下、国際的な発癌性試験実施基準に従って、種々の化学物質の発癌性が検討された結果、試験での陽性結果がかならずしもヒトにおける発癌性を真に反映しているとは言えないことが分かってきた。<sup>2-5)</sup> 特に、種々の薬理作用を有する医薬品でそのような例がみられ、それらの多くは遺伝子変異を誘発しない非遺伝毒性物質である。それゆえ、発癌性リスク評価に当たっては、発癌性試験の結果が単に陽性・陰性という判定だけでなく、ヒトへの外挿の観点からの踏み込んだ評価がより重要となってきた。<sup>2-5)</sup> 米国環境保護庁（US, EPA）などの規制当局からも、発癌メカニズムを明らかにすることを推進するガイドラインが発行されている。<sup>6)</sup>

科学的根拠がかならずしも万全ではなく、依然、議論の中にあるものもあるが、げっ歯類での結果が

かならずしもヒトに外挿できないと考えられる事例がいくつか知られている。佐渡敏彦先生、福島昭治先生、甲斐倫明先生らが最近執筆された「放射線及び環境化学物質による発がん 本当に微量でも危険なのか？」（医療科学社、平成17年10月）の中には、げっ歯類におけるペルオキシゾーム増生作用と肝腫瘍、薬物代謝酵素誘導剤と肝腫瘍、プロラクチンと乳腺腫瘍、 $\alpha 2u$  グロブリンと雄ラット腎腫瘍、抗甲状腺剤とラット甲状腺腫瘍、H2拮抗剤やプロトンポンプ阻害剤のような胃酸分泌抑制物質とラット腺胃カルチノイド、 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激剤とラット卵巣間膜腫瘍、高カルシウム血症とラット副腎髄質細胞腫、トリプシンインヒビターとラット膵腺房細胞腫瘍などの事例が取り上げられている。ゆえに、化学物質のヒトでの発癌リスクを予測する際、げっ歯類における発癌性の作用様式（Mode of Action: MOA）を明らかにし、その作用様式がヒトにも当てはまるかどうかを明らかにすることが重要と考える。最近、International Life Sciences Institute's Risk Sciences Institute (ILSI/RSI)<sup>3,5)</sup>やInternational Programme on Chemical Safety (IPCS)<sup>7)</sup>によって、げっ歯類における発癌性の作用様式がヒトにも当てはまるかどうかを評価するフレームワークが開発された。このフレームワークの開発に深く係わられたNebraska大学Cohen教授によると、重要な評価ポイントはTable 1のよう

Table 1. The Human Relevance Framework

- |      |   |
|------|---|
| I.   | Introduction  |
| II.  | Is the weight of evidence sufficient to establish the MOA (Mode of Action) in animals?  |
| A.   | Postulated MOA  |
| B.   | Key events  |
| C.   | Dose-response relationship  |
| D.   | Temporal association  |
| E.   | Strength, consistency, and specificity of association of key events and tumor response  |
| F.   | Biological plausibility and coherence   |
| G.   | Other MOA   |
| H.   | Assessment of postulated MOA  |
| I.   | Uncertainties, inconsistencies, and data gaps   |
| III. | Are key events in the animal MOA plausible in humans?                                   |
| IV.  | Taking into account kinetic and dynamic factors, is the animal MOA plausible in humans? |
| V.   | Statement of confidence, analysis, and implications                                     |

になる。動物試験で認められた発癌性に関し、ヒトでも起こり得るのか否かを科学的根拠に基づいて適切に見抜くことはトキシコロジストの使命の1つと考える。そのためには、発癌の分子機構解明研究においては、種差を考慮した研究を進展させる必要があると考える。なお、実際にこのフレームワークに従って、評価された事例については別の総説を参照されたい。<sup>2-5,7)</sup>

### 3. 分子生物学の安全性評価への応用

真核生物ゲノム DNA のメチル化修飾は、遺伝情報の発現を抑制する機構として進化を遂げてきた。発生・分化の過程において遺伝子の発現はゲノム DNA の塩基配列だけでなく、エピジェネティックな要因によっても制御されている。エピジェネティクス (epigenetics) とは、ゲノムに書かれた遺伝情報を変更することなく、個体発生や細胞分裂の過程において、遺伝子発現を制御する現象の総称として使われている。<sup>8)</sup> 哺乳類の発生では体細胞は1つの受精卵に由来しているため、体内のどの組織のどの細胞もゲノム配列は、免疫細胞などの特殊な場合を除きどれも同じである。しかし、同じゲノム情報を持ちながら、細胞によって形質・機能が異なり、遺伝子発現パターンも異なる。この形質は細胞分裂を経ても維持されていく。このような細胞特異的な形質、すなわち細胞特異的な遺伝子発現の制御・記憶を司るメカニズムがエピジェネティック機構である。その主な分子機構は、DNA のメチル化とクロマチンを構成するヒストンの修飾 (メチル化, アセチル化, リン酸化, ユビキチン化, スモイル化など) である。<sup>9,10)</sup> 真核生物では一部の生物の例外を除いてゲノム DNA のシトシン塩基 (C) の5位がメチル化修飾を受ける。このメチル化はシトシン塩基の次にグアニン塩基が続く CpG 配列中のシトシン塩基に付加され、CpG 配列の約70%がメチル化修飾を受けていると言われている。<sup>10)</sup> メチル基は DNA トランスフェラーゼの働きでアデノシル-L-メチオニンから転移される。一般に転写されている遺伝子のプロモーター領域は低メチル化状態にあり、不活性な遺伝子は高度にメチル化されている。<sup>10,11)</sup> プロモーター領域に存在する転写因子の結合モチーフがメチル化されると、ほとんどの転写因子は DNA に結合できなくなる。また、メチル化された DNA を特異的に認識して結合するタンパク質

が存在し、このメチル化 DNA 結合タンパク質とヒストン修飾を介して転写が阻害される。したがって、DNA メチル化は長期的に遺伝子をサイレンシング (不活化) するための一種のしるし付けである。

DNA メチル化による遺伝子発現制御の1つの事例としてインプリンティング (ゲノム刷り込み) が挙げられる。<sup>9,10)</sup> 哺乳動物のゲノム上に存在する遺伝子の大部分は、父親に由来しても母親に由来しても等しく発現し機能する。しかし一部の遺伝子では、どちらか一方の親に由来する遺伝子のみが転写されて発現するものが存在することが分かってきた。このような現象をゲノムインプリンティングと称する。前核移植実験において、受精直後のマウス卵から融合前の雌性前核と雄性前核を交換した人工的な発生胚が作製され、母親由来のゲノムのみを持つ雌性単体発生胚と父親由来のゲノムのみを持つ雄性単体発生胚が完全な個体発生能力を持つか否かを調べることにより、父親、母親由来のゲノム機能が解析された (Fig. 1)。<sup>12,13)</sup> その結果、父親、母親由来のゲノムが揃った正常受精胚は正常に発育するが、雌性単体発生胚では胎児は小さいが胎児期10日目までは発生は一見正常に進むが胎盤形成はほとんど起こらない。一方、雄性単体発生胚では胎盤は過剰に形成されるが、胎児の発育が著しく遅延する。このように、哺乳類において父親、母親由来のゲノムの機能的差異が存在していることが明らかになった。<sup>12,13)</sup> このように遺伝子型が同じでも、親由来の違いが表現型の違いとなって現れることから、ゲノムには遺伝子の配列情報以外にも子供に伝わる情報が含まれていることが分かる。現在までに、哺乳動物において70種類を上回るインプリンティング遺伝子がみついていると言われている。<sup>14)</sup>

ゲノム的なエピジェネティック解析により最も大きな成果を上げてきたのが癌研究である。<sup>11,15)</sup> CpG 配列の集合体である CpG アイランド (CGI) は遺伝子のプロモーター領域にも非プロモーター領域にもあり、正常細胞では、ほとんど CGI は脱メチル化状態に保たれているが、癌細胞では特定の CGI のメチル化が認められていることがある。<sup>15)</sup> 特に、プロモーター領域がメチル化された場合、下流の遺伝子の転写は抑制され、遺伝子が不活化される。従来、癌抑制遺伝子の不活化機構として突然変異と染色体欠失が広く知られてきた。しかし、最近、RB,

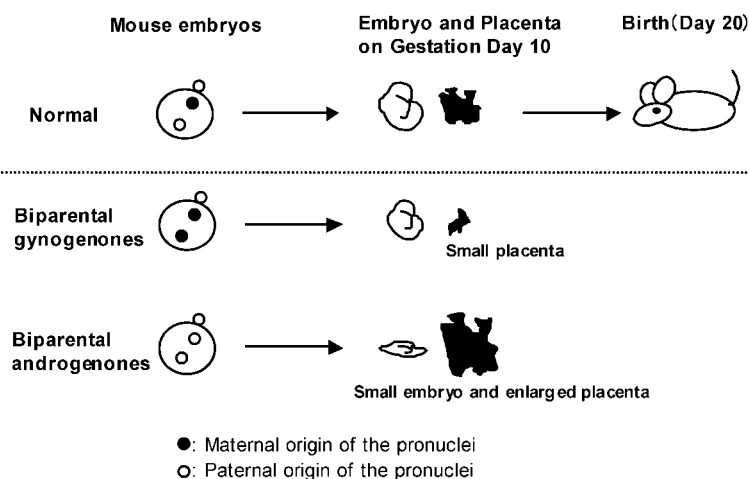


Fig. 1. Maternal and Paternal Contribution to the Zygote

Single pronuclei were transplanted between one-cell-stage embryos using a nuclear-transplantation technique. The results show that diploid biparental gynogenetic and androgenetic embryos do not complete normal embryogenesis, whereas control nuclear transplant embryos do. These findings demonstrated that the maternal and paternal contributions to the embryonic genome in mammals are not functionally equivalent and that both are essential to complete embryogenesis.

p16, VHL, BRCA1, CDH1 など重要な癌抑制遺伝子において DNA メチル化による不活化が報告されてきている。<sup>11,16</sup> 化学発癌領域においては、ニッケルや砒素,<sup>17</sup> あるいは diethylstilbesterol<sup>18</sup> によって DNA メチル化状態が変化することが近年注目されている。

#### 4. Mannose 6-phosphate/insulin-like Growth Factor 2 Receptor (M6P/IGF2R)

次に、癌抑制遺伝子であり、かつ、種によってはインプリンティングされているという興味深い遺伝子について紹介したい。ヒト Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) の cDNA は 9090 bp であり、染色体 6q26 に位置する。<sup>19,20</sup> これは 147 bp の 5' non-coding 配列、7473 bp の大きな open reading frame、及び 1470 bp の 3' non-coding 配列からなる。この open reading frame は 2491 個のアミノ酸からなる蛋白をコードしている。2264 アミノ酸からなる細胞外ドメインが大部分を占め、これは 15 個の repeat regions (平均 147 個のアミノ酸、16 から 38% の相同アミノ酸配列) からなる。このほか、23 残基からなる transmembrane region、164 残基からなる cytoplasmic domain からなる (Fig. 2)。300 kDa の M6P/IGF2R 蛋白は様々な組織において発現しており、その細胞内分布については全体の 90% は細胞内に、残りが細胞表面に存在する。<sup>21</sup> また循環血中には不完全型蛋白が存在することが知られている。<sup>22</sup>

哺乳動物並びに有袋動物では、M6P/IGF2R は M6P 含有糖蛋白 (例えばライソゾームエンザイムなど) 及び Insulin-like growth factor 2 (IGF2) に対してそれぞれ異なる結合部位を有する。<sup>23</sup> このレセプターの Repeats 3 及び 9 は M6P moieties の結合に必須であり、Repeat 11 は IGF2 の結合に必須である。M6P/IGF2R は G 蛋白と関係する可能性を示唆する報告もあるが、<sup>24</sup> IGF2 による情報伝達は主として Insulin-like growth factor 1 (IGF1) あるいはインスリンのレセプターを介して行われると考えられている。<sup>25</sup> IGF2 の M6P/IGF2R への結合は、情報伝達のためではなく、IGF2 の細胞内への取り込み、並びにその後のライソゾームでの分解をもたらすためのものである。また、M6P/IGF2R は新たに合成されたライソゾームエンザイムのソーティングや、細胞外のリン酸化されたライソゾームエンザイムの細胞内への輸送を司る。<sup>26</sup> 一方で、M6P/IGF2R は細胞増殖抑制因子 Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) の細胞外での活性化をも促進する。TGF $\beta$  は、M6P moieties を有する不活性型 (latent complex) として産生され、細胞外においてプラスミンにより不要な蛋白が取り除かれ、活性化される。このプラスミンによる TGF $\beta$  の活性化は、不活化 TGF $\beta$  が M6P/IGF2R に結合することによって促進されることから、M6P/IGF2R は TGF $\beta$  の活性化に促進的に関与することとなる。したがって、M6P/IGF2R の機能が消失すると、細胞外の IGF2

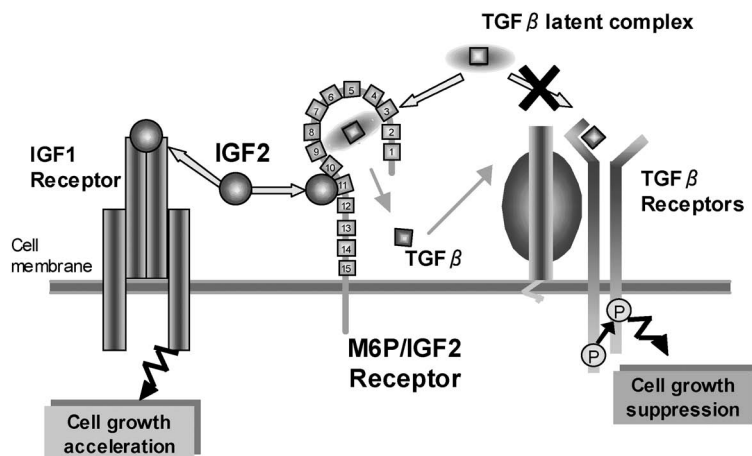


Fig. 2. Scheme Showing the Role of the M6P/IGF2 Receptor in Regulating the Cellular Availability of IGF2 and Active TGF $\beta$

IGF2 can bind to the IGF2 receptor to stimulate cell growth and protect the cell from apoptosis formation. Alternatively, IGF2 can bind to the M6P/IGF2 receptor for internalization and degradation in the lysosomes. The TGF $\beta$  latent complex cannot bind to the TGF $\beta$  receptors. Activation of the TGF $\beta$  latent complex by plasmin is facilitated by binding of the TGF $\beta$  latent complex to the M6P/IGF2 reporter. Upon activation, active TGF $\beta$  is able to bind to the TGF $\beta$  receptors and either inhibits growth or stimulates apoptosis formation. Therefore, the M6P/IGF2 receptor can functionally considered to be a tumor suppressor gene.

の上昇, 活性型 TGF $\beta$  の低下, 蛋白分解酵素の増加となる。その結果, 細胞増殖の亢進, アポトーシスの低下, 局所における細胞浸潤・転移の亢進をもたらされるものと考えられる。このことから, *M6P/IGF2R* 遺伝子は癌抑制遺伝子として機能していると考えられた。<sup>23,27,28)</sup>

##### 5. ヒトの発癌における *M6P/IGF2R* 遺伝子の関与

*M6P/IGF2R* 遺伝子が癌抑制遺伝子であることを支持する証左として, 当初, ヒトの肝癌<sup>29-32)</sup>あるいは乳癌<sup>33,34)</sup>において *M6P/IGF2R* 遺伝子の欠失あるいは変異が確認された。これらの変異は有意なアミノ酸の変化をもたらし, 機能面での変化が示唆された。実際, *M6P/IGF2R* の免疫組織染色によって, 本受容体は細胞内には存在しないことが判明し(正常細胞では約 90% は細胞内に分布している<sup>21)</sup>), 正常機能が消失していることが確認された (Fig. 3).<sup>29,30)</sup> また, *M6P/IGF2R* は poly-G region を有し, ミスマッチ修復欠損が直腸癌, 子宮内膜癌, 胃癌においても認められた。<sup>35,36)</sup> その後, 肺癌,<sup>37,38)</sup> 頭頸部癌,<sup>39)</sup> 副腎腫瘍,<sup>40)</sup> 前立腺癌,<sup>41)</sup> 卵巣癌<sup>42)</sup> においても *M6P/IGF2R* アレルの欠失や変異が報告され, 日本人においても肝癌に *M6P/IGF2R* の変異が発見された。<sup>43,44)</sup>

さらに興味あることに, 肝炎ウイルスの感染患者において, 癌や前癌病変の周辺にあるみかけ上正常な組織で *M6P/IGF2R* アレルの欠失が見出されて

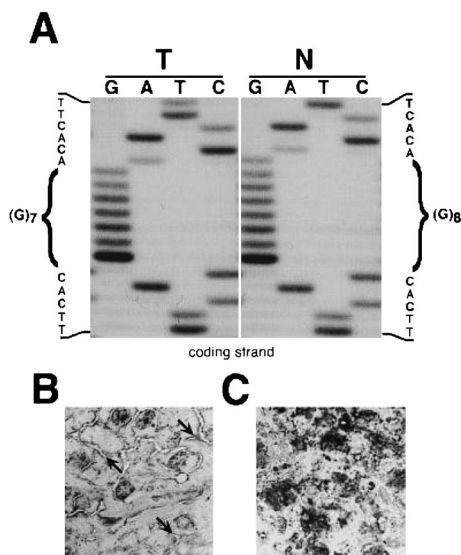


Fig. 3. Deoxyguanosine (G) Deletion in a (G)<sub>8</sub> Repeat of the *M6P/IGF2* Reporter Gene in an Human Hepatocellular Carcinomas (HCC) with LOH<sup>29)</sup>

(A) Direct sequencing of the PCR template derived from tumor (T) and normal stromal tissue (N) shows a single G deletion in exon 28 (based on the mouse gene) of the tumor. (B) Human HCC cells with LOH and a G deletion are immunohistochemically negative for the M6P/IGF2R protein; however, the extracellular spaces are positively stained (arrows). (Counterstained with hematoxylin; x275). (C) Immunohistochemical staining for the M6P/IGF2R in normal hepatocytes demonstrates a high concentration of intracellular receptors. (Counterstained with hematoxylin; x275). Copyright (1997) National Academy of Sciences, U.S.A.

いる。<sup>29,44)</sup> 筆者らは, 癌結節とその周辺に存在する複数の肝硬変結節について, *M6P/IGF2R* 遺伝子のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity: LOH) の分布を調べたところ, 癌結節とその隣接の肝硬変

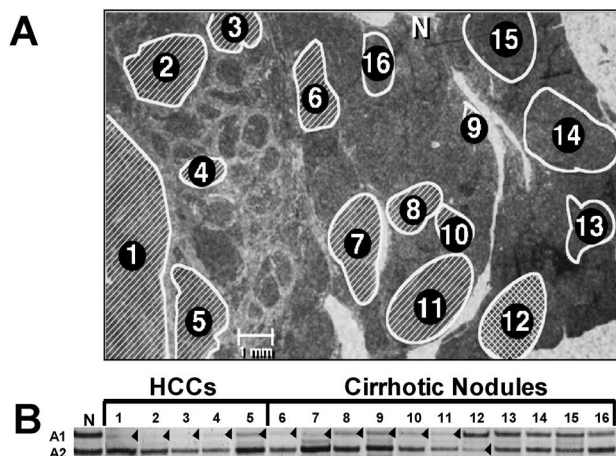


Fig. 4. LOH at the *M6P/IGF2R* Locus in an HCC and Adjacent Cirrhotic Nodules of an Informative Patient with a History of HBV and HCV Infection<sup>29)</sup>

(A) LOH at the *M6P/IGF2R* locus is mapped in an HCC and adjacent cirrhotic nodules. (Mason's stain; X8) Hatched and crosshatched areas have LOH at the *M6P/IGF2R* locus, while both alleles are present in those enclosed areas without hatch marks. (B) Autoradiograph shows both allele 1 (A1) and allele 2 (A2) at the *M6P/IGF2R* locus in normal stromal tissue (N). On contrast, allele A1 is lost in HCC regions 1–5 and cirrhotic nodules 6–11. Allele A2 is lost in cirrhotic nodule 12, while cirrhotic nodules 13–16 have both alleles present. Arrowheads mark the lost alleles; faint bands are due to contaminating normal stromal tissue. Copyright (1997) National Academy of Sciences, U.S.A.

結節において2本の遺伝子対のうち同じ側のアレルが欠失していることが判明した (Fig. 4).<sup>29)</sup> この結果は、癌結節と隣接する複数の肝硬変結節はクローナルであること、すなわち、複数の結節は同じ1つの細胞から生じた可能性を示唆するものである。<sup>27–29)</sup> また、これまで病理組織学的に肝硬変結節を前癌病変と捉えているが、遺伝子レベルでもそれを確認できたものと考えられる。

さらに、ヒト乳癌細胞 MCF-7 cell や絨毛癌 JEG-3 cell を用いて M6P/IGF2R の発現を抑制すると細胞増殖が亢進すること、<sup>45,46)</sup> 乳癌細胞 MDA-MB-231 cell や JEG-3 cell に M6P/IGF2R を高発現させると腫瘍細胞の増殖が抑制されること<sup>47,48)</sup> が報告され、機能面においても細胞増殖抑制作用を示すことが確認されている。

#### 6. げっ歯類の化学発癌における *M6p/Igf2r* 遺伝子の関与

一方、実験動物における化学発癌においても *M6p/Igf2r* 遺伝子の関与が報告されている。発癌物質 *N*-nitrosodiethylamine (DEN) をラットに投与して発現した肝癌において、*M6p/Igf2r* 遺伝子に欠失が生じていることが明らかにされた。<sup>49,50)</sup> さらに

コリン欠乏食により誘発されたラット肝癌においては *M6p/Igf2r* 遺伝子の変異あるいは欠失が認められた。<sup>50)</sup> これらの結果は、exogenous 並びに endogenous な肝臓発癌において *M6p/Igf2r* 遺伝子の癌抑制遺伝子としての関与を示唆している。さらに *N*-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine (BHP) を投与して誘発されたラット肺癌においても *M6p/Igf2r* 遺伝子の欠失が報告されている。<sup>51)</sup> このように、げっ歯類における化学発癌においても *M6p/Igf2r* 遺伝子の関与が示されている。

#### 7. M6P/IGF2R 遺伝子のインプリンティングの種差

Barlow らによって、マウスにおいて *M6p/Igf2r* 遺伝子はインプリンティングされていることが明らかにされた。<sup>52)</sup> つまり、*M6p/Igf2r* 遺伝子の父親由来のアレルはサイレンシングを受けていて発現せず、母親由来のアレルのみ発現する。その後、ヒトを含めて様々な動物種で M6P/IGF2R 遺伝子のインプリンティング状態が調べられている (Fig. 5).<sup>14,53–57)</sup> *M6p/Igf2r* 遺伝子のインプリンティングはハリモグラやカモノハシという単孔類 (monotremes) では認められないが、オポッサムのような有袋類 (marsupials) では認められることから、約1億5千万年前にインプリンティングされたものと考えられている。また、ブタ、ウシ、ヒツジ、シカネズミ、ラット、マウスでも *M6p/Igf2r* 遺伝子のインプリンティングが確認されているが、<sup>14,53,54)</sup> 一方、ヒトでは基本的に両親由来のアレルが等しく発現していると考えられている (一部、多型を示すことも報告されている)。<sup>55–57)</sup> このように、ヒトとげっ歯類においては、*M6P/IGF2R* 遺伝子のインプリンティング状態、つまりアレルの発現状態が異なっている。この事実は、実験動物のデータをヒトに外挿する場合にたいへん興味深い。

通常、癌抑制遺伝子の場合、一对の対立遺伝子のうち、一方が正常であれば十分に癌抑制機能を発揮できる。したがって、癌抑制遺伝子の活性が完全に失われるためには、一对の対立遺伝子の両方にその機能を消失させるような変異あるいは遺伝子発現の抑制が起こる必要がある。いわゆる「発癌の2ヒット説」である (Fig. 6)。*M6P/IGF2R* 遺伝子の場合、大部分のヒトはインプリンティングされておらず、両方の遺伝子が発現し得る。<sup>55–57)</sup> したがって、ヒ

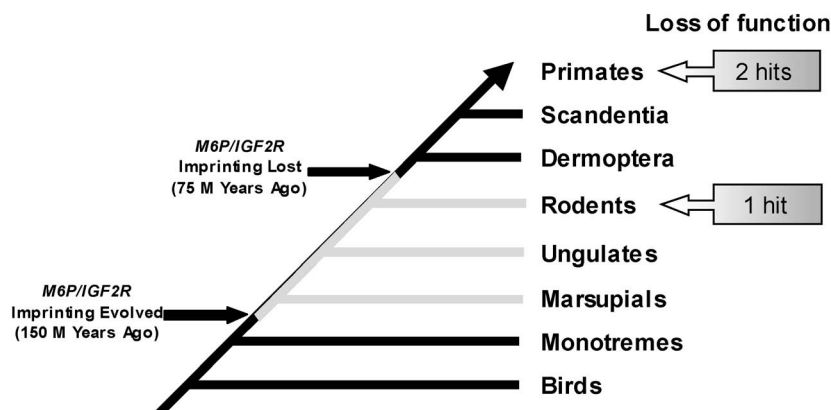


Fig. 5. Imprinting Evolution of *M6P/IGF2R*

*M6P/IGF2R* is clearly imprinted in Marsupials (opossum), Ungulates (pig, cow and sheep) and Rodents (rat and mouse), but that is no imprinted in Birds (chicken), Monotremes (platypus, echidna), Dermoptera (colugo), Scandentia (tree shrew) and Primates (ringtail lemurs, humans). In accord with the two-hit model of tumor suppressor gene inactivation, only a single mutation is required to negate *M6P/IGF2R* tumor suppressor function in rodents, since one allele is already inactivated by the epigenetic phenomenon of imprinting. In contrast, two mutational events are required to inactivate this gene in humans (see Fig. 6).

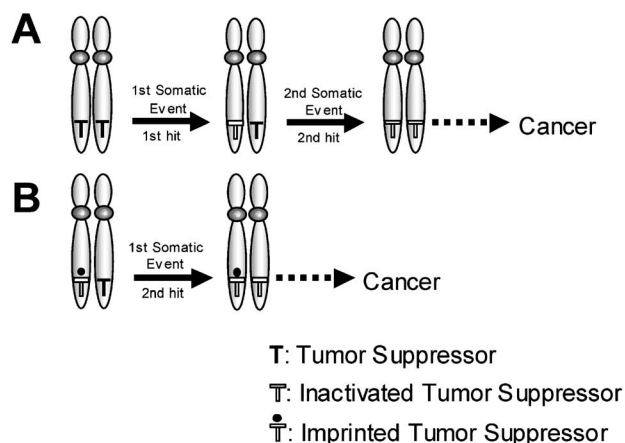


Fig. 6. Tumor Suppressor Gene Inactivation for a Two-hit Model of Carcinogenesis

(A) The genome initially contains two normal alleles of a tumor suppressor gene (T). The 1st and 2nd somatic events are gene inactivating mutations, and they correspond to the 1st and 2nd hits in this model of carcinogenesis. (B) The genome initially contains one alleles of a tumor suppressor gene that is inactive because of genomic imprinting and normal allele. The 1st somatic event is an inactivating gene mutation in T. This is the 2nd hit in this model of carcinogenesis because the 1st hit was the inactivation of the tumor suppressor by genomic imprinting.

トの場合、*M6P/IGF2R* 遺伝子の両方が変異あるいは不活化されないと *M6P/IGF2R* の癌抑制機能は消失しない (すなわち 2 ヒットを要する)。一方、げっ歯類ではインプリンティングされていることから、父親由来の遺伝情報は不活化されている。<sup>49,52)</sup> したがって、母親由来の遺伝子に変異が生じるだけで *M6p/Igf2r* の機能が消失するものと考えられる (すなわち 1 ヒットで十分)。 *M6P/IGF2R* の不活化を介して発癌する機構の場合、上記のような種差か

ら、ヒトに比べラットやマウスでは発癌し易いものと考えられる。<sup>23,28)</sup>

## 8. おわりに

通常、癌の発生過程は大きくイニシエーション、プロモーション、プログレッションの 3 つの段階に分けられ、それぞれの段階で異なる因子が関与する、いわゆる多段階発癌と考えられている。もし、それら複数の因子の遺伝子発現制御に *M6P/IGF2R* の場合のような種差があれば、発癌感受性には種による大きな差異が生じる可能性がある。先述したように、主として疫学的なデータに基づき、一部の化学発癌においては種差があると考えられているものの、多くの場合、動物実験における発癌はヒトでも起こり得るという前提で評価されている。昨今、農薬や医薬品の開発においてはそのほとんどは遺伝毒性を有さない化合物を開発することから、毒性発現の本質は遺伝毒性でなく、非遺伝毒性すなわちエピジェネティクス機構を介したものである可能性が高い。そのエピジェネティクス機構には種による差異が認められる場合もある。したがって、安全性評価に携わるに当たっては、ラットやマウスはおおむねヒトで発現する毒性を予測可能ではあるが、一部、正しく予測していない場合もあり得ることを理解しておく必要もある。実験動物の結果からヒトのリスクを予測する限り、実験動物で認められた発癌の分子機構を明らかにし、その分子機構における実験動物とヒトとの差異を十分に考慮した上で発癌リスクを予測することが重要かと考える。

ヒトにおける安全性確保の観点から、種差や個人差を考慮し、毒性試験における無毒性量の通常100倍以下の量しかヒト暴露量として許容されない。発現する毒性徴候の不確実性によっては、さらに10倍低い1000倍以下の量しか許容されない場合もある。動物試験で認められた毒性が例えば実験動物のみで発現する影響（すなわち偽陽性の影響）であった場合でも、その毒性発現機構を明らかにしヒトに当てはまらないことを示さない限り、基本的にはヒトでもその毒性は発現するものと考え、動物試験での毒性発現用量のヒトへの暴露は許容されない。この場合、その化学物質の使用制限が大きくなり本来持つ有用性を活用しきれない。偽陰性・偽陽性を可能な限り少なくし、より適切な安全性評価を行うことがわれわれトキシコロジストの使命と考える。上述したように、より精緻な安全性評価を行うには、実験動物とヒトとの生理的な種差の理解は必須である。ラットやマウスはかならずしも小さなヒトではないということを念頭に置き、評価する必要がある。近年、ヒトのみならずラットやマウスのゲノムが明らかにされ、今後ポストゲノムとして各遺伝子の機能解析が体系的に進められるであろう。それらの研究が種の比較を念頭に進められ、その知見が毒性学領域において活用されることを期待したい。

**謝辞** 貴重なご助言を賜りました米国 Nebraska 大学 Dr. Cohen, 米国 Duke 大学 Dr. Jirtle, 米国 Baylor 医科大学 Dr. Waterland に厚くお礼申し上げます。また、このような発表の機会をいただきました大阪大学大学院薬学研究所中西 剛先生、東北大学大学院薬学研究所黄 基旭先生に感謝申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Boverhof D. R., Zacharewski T. R., *Toxicol. Sci.*, **89**, 352–360 (2006).
- 2) Cohen S. M., Meek M. E., Klaunig J. E., Patton D. E., Fenner-Crisp P. A., *Crit. Rev. Toxicol.*, **33**, 581–589 (2003).
- 3) Cohen S. M., Klaunig J., Meek M. E., Hill R. N., Pastoor T., Lehman-McKeeman L., Bucher J., Longfellow D. G., Seed J., Delarco V., Fenner-Crisp P., Patton D., *Toxicol. Sci.*, **78**, 181–186 (2004).
- 4) Holsapple M. P., Pitot H. C., Cohen S. H., Boobis A. R., Klaunig J. E., Pastoor T., Delarco V. L., Dragan Y. P., *Toxicol. Sci.*, **89**, 51–56 (2006).
- 5) Meek M. E., Bucher J. R., Cohen S. M., Delarco V., Hill R. N., Lehman-McKeeman L. D., Longfellow D. G., Pastoor T., Seed J., Patton D. E., *Crit. Rev. Toxicol.*, **33**, 591–653 (2003).
- 6) U.S. Environmental Protection Agency, Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001F, Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC. (2005).
- 7) Sonich-Mullin C., Fielder R., Wiltse J., Baetcke K., Dempsey J., Fenner-Crisp P., Grant D., Hartley M., Knaap A., Kroese D., Mangelsdorf I., Meek E., Rice J. M., Younes M., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, 146–152 (2001).
- 8) Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P. A., *Nature*, **429**, 457–463 (2004).
- 9) Niemitz E. L., Feinberg A. P., *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 599–609 (2004).
- 10) Rakyan V. K., Preis J., Morgan H. D., Whitelaw E., *Biochem. J.*, **356**, 1–10 (2001).
- 11) Miyamoto K., Ushijima T., *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **35**, 293–301 (2005).
- 12) McGrath J., Solter D., *Cell*, **37**, 179–183 (1984).
- 13) Surani M. A., Barton S. C., Norris M. L., *Nature*, **308**, 548–550 (1984).
- 14) Murphy S. K., Jirtle R. L., *Bioessays*, **25**, 577–588 (2003).
- 15) Feinberg A. P., Tycko B., *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 143–153 (2004).
- 16) Ushijima T., Okochi-Takada E., *Cancer Sci.*, **96**, 206–211 (2005).
- 17) Sutherland J. E., Costa M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **983**, 151–160 (2003).
- 18) Li S., Hursting S. D., Davis B. J., McLachlan J. A., Barrett J. C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **983**, 161–169 (2003).
- 19) Morgan D. O., Edman J. C., Standring D. N., Fried V. A., Smith M. C., Roth R. A., Rutter W. J., *Nature*, **329**, 301–307 (1987).
- 20) Rao P. H., Murty V. V., Gaidano G., Hauptschein R., Dalla-Favera R., Chaganti R. S., *Cytogenet. Cell Genet.*, **66**, 272–273



- (1994).
- 21) Kornfeld S., *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 307–330 (1992).
  - 22) MacDonald R. G., Tepper M. A., Clairmont K. B., Perregaux S. B., Czech M. P., *J. Biol. Chem.*, **264**, 3256–3261 (1989).
  - 23) De Souza A. T., Yamada T., Mills J. J., Jirtle R. L., *FASEB J.*, **11**, 60–67 (1997).
  - 24) Ikezu T., Okamoto T., Giambarella U., Yokota T., Nishimoto I., *J. Biol. Chem.*, **270**, 29224–29228 (1995).
  - 25) Morrione A., Valentini B., Xu S. Q., Yumet G., Louvi A., Efstratiadis A., Baserga R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 3777–3782 (1997).
  - 26) Ludwig T., Ovitt C. E., Bauer U., Hollinshead M., Remmler J., Lobel P., Ruther U., Hoflack B., *EMBO J.*, **12**, 5225–5235 (1993).
  - 27) Falls J. G., Pulford D. J., Wylie A. A., Jirtle R. L., *Am. J. Pathol.*, **154**, 635–647 (1999).
  - 28) Pulford D. J., Falls J. G., Killian J. K., Jirtle R. L., *Mutat. Res.*, **436**, 59–67 (1999).
  - 29) Yamada T., De Souza A. T., Finkelstein S., Jirtle R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 10351–10355 (1997).
  - 30) De Souza A. T., Hankins G. R., Washington M. K., Orton T. C., Jirtle R. L., *Nat. Genet.*, **11**, 447–449 (1995).
  - 31) De Souza A. T., Hankins G. R., Washington M. K., Fine R. L., Orton T. C., Jirtle R. L., *Oncogene*, **10**, 1725–1729 (1995).
  - 32) Piao Z., Choi Y., Park C., Lee W. J., Park J. H., Kim H., *Cancer Lett.*, **120**, 39–43 (1997).
  - 33) Hankins G. R., De Souza A. T., Bentley R. C., Patel M. R., Marks J. R., Iglehart J. D., Jirtle R. L., *Oncogene*, **12**, 2003–2009 (1996).
  - 34) Chappell S. A., Walsh T., Walker R. A., Shaw J. A., *Br. J. Cancer*, **76**, 1558–1561 (1997).
  - 35) Souza R. F., Appel R., Yin J., Wang S., Smolinski K. N., Abraham J. M., Zou T. T., Shi Y. Q., Lei J., Cottrell J., Cymes K., Biden K., Simms L., Leggett B., Lynch P. M., Frazier M., Powell S. M., Harpaz N., Sugimura H., Young J., Meltzer S. J., *Nat. Genet.*, **14**, 255–257 (1996).
  - 36) Ouyang H., Shiwaku H. O., Hagiwara H., Miura K., Abe T., Kato Y., Ohtani H., Shiiba K., Souza R. F., Meltzer S. J., Horii A., *Cancer Res.*, **57**, 1851–1854 (1997).
  - 37) Kong F. M., Anscher M. S., Washington M. K., Killian J. K., Jirtle R. L., *Oncogene*, **19**, 1572–1578 (2000).
  - 38) Gemma A., Hosoya Y., Uematsu K., Seike M., Kurimoto F., Yoshimura A., Shibuya M., Kudoh S., *Lung Cancer*, **30**, 91–98 (2000).
  - 39) Jamieson T. A., Brizel D. M., Killian J. K., Oka Y., Jang H. S., Fu X., Clough R. W., Vollmer R. T., Anscher M. S., Jirtle R. L., *B. M.C. Cancer*, **3**, 4 (2003).
  - 40) Leboulleux S., Gaston V., Boulle N., Le Bouc Y., Gicquel C., *Eur. J. Endocrinol.*, **144**, 163–168 (2001).
  - 41) Hu C. K., McCall S., Madden J., Huang H., Clough R., Jirtle R. L., Anscher M. S., *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **9**, 62–67 (2006).
  - 42) Huang Z., Wen Y., Shandilya R., Marks J. R., Berchuck A., Murphy S. K., *Nucleic Acids Res.*, **34**, 555–563 (2006).
  - 43) Oka Y., Waterland R. A., Killian J. K., Nolan C. M., Jang H. S., Tohara K., Sakaguchi S., Yao T., Iwashita A., Yata Y., Takahara T., Sato S., Suzuki K., Masuda T., Jirtle R. L., *Hepatology*, **35**, 1153–1163 (2002).
  - 44) Kishimoto Y., Morisawa T., Kitano M., Shioita G., Horie Y., Suou T., Ito H., Kawasaki H., Hasegawa J., *Hepatol. Res.*, **20**, 68–83 (2001).
  - 45) Chen Z., Ge Y., Landman N., Kang J. X., *B.M.C. Cancer*, **2**, 18 (2002).
  - 46) O’Gorman D. B., Costello M., Weiss J., Firth S. M., Scott C. D., *Cancer Res.*, **59**, 5692–5694 (1999).
  - 47) O’Gorman D. B., Weiss J., Hettiaratchi A., Firth S. M., Scott C. D., *Endocrinology*, **143**, 4287–4294 (2002).
  - 48) Lee J. S., Weiss J., Martin J. L., Scott C. D., *Int. J. Cancer*, **107**, 564–570 (2003).
  - 49) Mills J. J., Falls J. G., De Souza A. T., Jirtle R. L., *Oncogene*, **16**, 2797–2802 (1998).
  - 50) Tsujiuchi T., Sasaki Y., Oka Y., Kuniyasu H., Konishi Y., Tsutsumi M., *Mol. Carcinog.*, **39**, 199–205 (2004).
  - 51) Tsujiuchi T., Sasaki Y., Tsutsumi M., Konishi Y., *Mol. Carcinog.*, **36**, 32–37 (2003).
  - 52) Barlow D. P., Stoger R., Herrmann B. G., Saito K., Schweifer N., *Nature*, **349**, 84–87

- (1991).
- 53) Killian J. K., Buckley T. R., Stewart N., Munday B. L., Jirtle R. L., *Mamm. Genome*, **12**, 513–517 (2001).
- 54) Killian J. K., Nolan C. M., Wylie A. A., Li T., Vu T. H., Hoffman A. R., Jirtle R. L., *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1721–1728 (2001).
- 55) Kalscheuer V. M., Mariman E. C., Schepens M. T., Rehder H., Ropers H. H., *Nat. Genet.*, **5**, 74–78 (1993).
- 56) Ogawa O., McNoe L. A., Eccles M. R., Morrison I. M., Reeve A. E., *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 2163–2165 (1993).
- 57) Xu Y., Goodyer C. G., Deal C., Polychronakos C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 747–754 (1993).