

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 化学物質誘発性胆管がんのリスク評価基盤：  
胆管がん発症機構の解明と関連バイオマーカーの探索  
(英語) Investigation of the organic solvent-mediated carcinogenic  
mechanisms in cholangiocarcinoma and relating biomarkers

研究開発担当者 (日本語) 東京大学・医学部附属病院薬剤部・講師／第一副部長・高田龍平  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pharmacy, The University of Tokyo Hospital  
Associate Professor & Vice Director, Tappei Takada

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 化学物質誘発性胆管がんのリスク評価基盤：  
開発課題名： 胆管がん発症機構の解明と関連バイオマーカーの探索  
(英語) Investigation of the organic solvent-mediated carcinogenic  
mechanisms in cholangiocarcinoma and relating biomarkers

研究開発分担者 (日本語) 東京大学・医学部附属病院薬剤部・特任助教・豊田優  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pharmacy, The University of Tokyo Hospital  
Project Assistant Professor, Yu Toyoda

## II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究は、工業用化学物質などの外的危険因子への曝露や胆汁成分の変動が胆管がん発症リスクに与える影響を評価し、関連する分子機構を同定することを通じて、胆管がんの発症・進展に関わる分子基盤を解明することを目的とした3年研究（平成26年度～28年度）である。研究開発代表者・高田龍平講師（東京大学医学部附属病院薬剤部）は、研究開発分担者・豊田優特任助教（東京大学医学部附属病院薬剤部）とともに、種々の *in vivo*・*in vitro* 試験結果を統合することで、塩素系有機溶剤に対する大量曝露と職業性胆管がんの発症とを結びつける重要な知見を得ることに成功した。

平成24年、塩素系有機洗浄剤を長年使用してきた印刷工場で、職業性胆管がんの発生が報告された。疫学調査の結果、有機洗浄剤に最も多く含まれていた1,2-ジクロロプロパン(DCP)への長期間曝露が、本職業がん問題の主要な原因のひとつであると疑われている。しかし、1,2-DCPへの大量曝露と胆管がん発症とを結びつける分子機序については不明な点が多い。研究開発代表者らは、肝臓で代謝されたハロゲン化炭化水素(1,2-DCP)が胆管側膜輸送体を介した胆汁排泄を受け、胆管内に蓄積する結果、胆管がん発症に至るとする仮説のもと、当該化学物質への大量曝露と胆管がん発症の因果関係・裏付けとなる分子機構の解明に取り組んだ。

まず、1,2-DCPに由来する物質が胆汁中に排泄されるかどうかを調べるために、1,2-DCPを実験動物に投与し、メタボロミクス手法を用いて胆汁中成分を網羅的に分析・解析した。その結果、1,2-DCPがグルタチオンと結合して生じた代謝物と、そこからさらに代謝された物質とが見出された。また、見出された1,2-DCP代謝物には、2つの塩素のうちひとつが分子構造中に残ったままの、反応性の高いグルタチオン抱合体が含まれていた。そのため、この代謝物が胆汁排泄される有力な発がん性候補物質であると考えられた。次に、見出された発がん性候補物質を胆汁中に排泄する分子機構を調べることを目的とした *in vivo* 胆汁排泄試験・*in vitro* 輸送実験を行い、生体におけるグルタチオン抱合型DCPの胆汁排泄の大部分が胆管側膜輸送体タンパク質ABCC2によるものであることを見出した。さらに、ヒト肝細胞キメラマウスにおいても1,2-DCPに由来する上述の代謝物の多くが胆汁排泄されていたため、ヒトにおいても同様の現象が起きていたことが強く示唆された。以上の結果は、英国科学誌 **Scientific Reports**, Apr 18;6:24586, 2016 に発表した。

また、1,2-DCPとともに、もうひとつの職業性胆管がん原因物質として疑われているジクロロメタン(DCM)のグルタチオン抱合機構に関する *in vitro* 検討を行った。その結果、DCMの場合と比べて、1,2-DCPは非酵素的にグルタチオンと反応しやすいのみならず、両ハロゲン化炭化水素の代謝において重要であると推測されていたGSTT1の寄与が小さいことが明らかとなった。このことは、1,2-DCPとDCMとでは主要な代謝活性化機構が異なる可能性に加え、少なくとも1,2-DCPの場合には非酵素的なグルタチオン抱合が職業性胆管がんリスクに関与している可能性を示唆している。以上の結果は、オープンアクセス誌 **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017 *in press* に発表した。

本成果は、塩素系有機溶剤に対する大量曝露と職業性胆管がんの発症とを結びつける重要な発見である。胆管がんの発がん機序が解明されたわけではないものの、肝臓で生じた反応性代謝物が胆汁に排泄される結果、胆管での発がんリスクが高まる可能性を新たに提唱するという点で、本報告は将来のがん研究に貢献する重要な成果である。治療成績の向上と予後改善のために、胆管がんリスク因子や発症機構に関する情報集積が焦眉の急であることを踏まえると、本研究がさらに発展することで、新規胆管がん発症機構のみならず、胆管がんの早期診断に資する技術開発につながることを期待される。

(英文)

The objective of this research is to understand the latent mechanisms of occupational cholangiocarcinoma related to the exposure to halogenated solvents and to explore the candidates of serum biomarkers relating to the mechanisms. In this project, we (PI, Tappei Takada; Associate Professor, Department of Pharmacy, the University of Tokyo Hospital; Co-I, Yu Toyoda; Project Assistant Professor, Department of Pharmacy, the University of Tokyo Hospital) have successfully revealed that the potentially carcinogenic metabolites derived from 1,2-dichloropropane (1,2-DCP) were excreted into bile, which would contribute to the deeper understanding of cholangiocarcinoma biology.

In 2014, the International Agency for Research on Cancer issued a warning about the carcinogenicity of 1,2-DCP to humans based on an epidemiological study suggesting a relationship between the incidence of cholangiocarcinoma and occupational exposure to halogenated hydrocarbon solvent comprised mostly of 1,2-DCP. Although this dihaloalkane has been used in various industrial fields, there has been no biological evidence explaining the cholangiocarcinoma latency, as well as little understanding of general cholangiocarcinoma risk. In this project, we explored the biliary excretion of 1,2-DCP metabolites by an untargeted metabolomics approach and the related molecular mechanism with *in vitro* and *in vivo* experiments. We hypothesized that the biliary excretion of carcinogens derived from 1,2-DCP contribute to the increased cholangiocarcinoma risk. We found that 1,2-DCP was conjugated with glutathione (GSH) in the liver, and that the GSH-conjugated forms of 1,2-DCP (GS-DCPs), including a potential carcinogen that contains a chloride atom, were excreted into bile by the bile canalicular membrane transporter, ABCC2. This biliary secretion of potential carcinogens was also confirmed in humanized-liver mice, supporting the extrapolation of our results to humans. In addition, in order to identify the candidates for biomarkers related to the exposure to 1,2-DCP, we analyzed the metabolic changes in serum. Although most of them were mostly excreted into bile, we also found that some metabolites of 1,2-DCP were detectable in blood. Such metabolites might be good serum biomarker candidates. These results may reflect a risk in the backfiring of biliary excretion as connatural detoxification systems for xenobiotics. Our findings would contribute to uncover the latent mechanism by which the chronic exposure to 1,2-DCP increases cholangiocarcinoma risk and future understanding of cholangiocarcinoma biology. These results were published in *Scientific Reports*, Apr 18;6:24586, 2016.

As described above, by using 1,2-DCP-administered animal models, we found biliary excretion of potentially oncogenic metabolites consisting of GS-DCPs; however, the GS-DCP-production pathway remains unknown. To enhance the understanding of 1,2-DCP-related risks to human health, we examined the reactivity of GSH with 1,2-DCP *in vitro* and compared it to that with dichloromethane (DCM), the other putative substance responsible for occupational cholangiocarcinoma. Our results showed that 1,2-DCP was spontaneously conjugated with GSH, whereas this spontaneous reaction was hardly detected between DCM and GSH. Further analysis revealed that glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) exhibited less effect on the 1,2-DCP reaction as compared with that observed for DCM. Although GSTT1-mediated bioactivation of dihaloalkanes could be a plausible explanation for the production of reactive metabolites related to carcinogenesis based on previous studies, this catalytic pathway might not mainly contribute to 1,2-DCP-related occupational cholangiocarcinoma. Considering the higher catalytic activity of GSTT1 on DCM as compared with 1,2-DCP, our findings suggested differences in the activation processes associated with 1,2-DCP and DCM metabolism. These results were published in *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017 *in press*.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 2件）

1. Yu Toyoda, Tappei Takada, and Hiroshi Suzuki. Spontaneous production of glutathione-conjugated forms of 1,2-dichloropropane: comparative study on metabolic activation processes of dihaloalkanes associated with occupational cholangiocarcinoma.  
*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017 in press.
2. Yu Toyoda, Tappei Takada, and Hiroshi Suzuki. Halogenated hydrocarbon solvent-related cholangiocarcinoma risk: biliary excretion of glutathione conjugates of 1,2-dichloropropane evidenced by untargeted metabolomics analysis.  
*Scientific Reports*, 2016, 6:24586.  
本論文は、東京大学ならびに日本医療研究開発機構（AMED）よりプレスリリースされ、読売新聞および共同通信、Yahoo ニュースや日経プレスリリース、The Science News（株式会社科学新聞社）などをはじめとする各種 Web サイトで取り上げられました。本論文の内容は、多様で卓越した研究成果を広く紹介すると同時に、専門的な情報への窓口としての役割を果たすことを目的として東京大学が運営する国際広報サイト：UTokyo Research においても紹介されています—『職業性胆管がんに関連する、発がん性の候補物質を発見 発がん性の候補物質は胆汁に排泄されていた』。また、東京大学医学部附属病院が発行する広報誌：東大病院だより（No.88, 2016.10.31 発行）の「東大病院の今：最新の研究」（pp.6-7）で本研究の内容が紹介されています。
3. 豊田 優, 高田 龍平, 鈴木 洋史. 胆管がんにかかわる発がん性候補物質の胆汁排泄を発見  
*化学* 株式会社化学同人, 2016, 71(6):73.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ABCC2-mediated biliary excretion of glutathione conjugates of 1,2-dichloropropane evidenced by untargeted metabolomics, 口頭（招待講演）, Yu Toyoda, Tappei Takada, and Hiroshi Suzuki. *Gordon Research Conference 2017 "Multi-Drug Efflux Systems" Integrated Approaches to Understanding the Role of Multi-Drug Efflux Systems in Health and Disease*, 2017/3/28, 国外.
2. Halogenated hydrocarbon solvent-related cholangiocarcinoma risk: ABCC2-mediated biliary excretion of glutathione conjugates of 1,2-dichloropropane evidenced by untargeted metabolomics analysis, ポスター, Yu Toyoda, Tappei Takada, and Hiroshi Suzuki. *Gordon Research Conference 2017 "Multi-Drug Efflux Systems" Integrated Approaches to Understanding the Role of Multi-Drug Efflux Systems in Health and Disease*, 2017/3/26-3/31, 国外.
3. 有機溶剤による職業性胆管がんリスクの分子背景の探索, ポスター, 豊田 優, 高田 龍平, 鈴木 洋史. *第2回AMED がん若手研究者ワークショップ*, 2016/11/29, 国内.
4. メタボローム解析を活用した職業性胆管がんリスクに関する研究, ポスター, 豊田 優, 高田 龍平, 鈴木 洋史. *第10回メタボロームシンポジウム*, 2016/10/19-10/21, 国内.

5. 塩素系有機洗浄剤成分による胆管がんリスク：ジクロロプロパン代謝物の胆汁排泄と関連分子機構，ポスター，豊田 優，高田 龍平，鈴木 洋史．第 11 回トランスポーター研究会年会，2016/7/2-7/3，国内．優秀発表賞受賞
6. 有機溶剤成分 1,2-ジクロロプロパンに起因する胆管がんリスクと胆汁排泄機構，口頭およびポスター，豊田 優，高田 龍平，鈴木 洋史．**第 43 回日本毒性学会学術年会**，2016/6/29，国内．優秀研究発表賞受賞
7. 膜輸送体機能に着目した病態生理学研究：職業がん事例から見出された、胆汁排泄と胆管がんリスク，口頭（招待講演），豊田 優．**2016 年度 中部大学 応用生物学部 研究・教育交流会 33rd O-say Open Seminar**，2016/6/28，国内．
8. メタボロミクスを活用した、有機溶剤成分に起因する胆管がんリスクに関する研究，口頭（シンポジウム講演），豊田 優，高田 龍平，鈴木 洋史．**医療薬学フォーラム 2016／第 24 回クリニカルファーマシーシンポジウム**，2016/6/26，国内．
9. メタボロミクスを活用した、トランスポーター関連疾患の研究，口頭（招待講演），豊田 優，**生化学若い研究者の会 2016 春のセミナー**，2016/4/29，国内．

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし