

化学発がんの非遺伝毒性的メカニズムの解明に関する最近の動向

山岡聖典, 花元克巳, 稲 恭宏¹⁾, 片岡隆浩²⁾,

川辺 睦²⁾, 佐野正展²⁾, 氏福亜矢子²⁾

要 約

本総説は、筆者らが進めている「低線量放射線の健康への影響と医療への応用」に関する研究に資するために調査した、化学発がんの非遺伝毒性的メカニズムの解明に関する最近の動向の概要についてまとめたものである。即ち、非遺伝毒性的発がんにおける細胞増殖、シトクロム P450 誘導、酸化ストレス、および遺伝子発現のそれぞれの役割、並びに量的な応答性について言及した。また、後成的発がんにおけるアポトーシス、およびギャップ結合による情報伝達のそれぞれの役割についても触れた。その結果、非遺伝毒性的な発がん物質の作用の様式とメカニズムやこれによる後成的な影響などについては解明されつつあり、特に、これらの発がん物質がゲノム DNA に対し直接的な相互作用、突然変異、修飾などを行う発がん物質とは機能的に異なった作用をすることが明らかになった。また、これらは放射線発がんなど低線量放射線の健康への影響などについて研究する上で、重要な知見となっていることもわかった。

キーワード：化学発がん, 非遺伝毒性, 後成説, 酸化ストレス, ギャップ結合

緒 言

化学物質と発がんの関係は、げっ歯類を用いた研究によってかなり明らかにされてきた。即ち、がんの進行には多段階のプロセスがあり、細胞や分子のレベルにおいて様々な化学的作用により、がんが誘発される可能性がわかってきた。Weisburger や Williams は、がんを誘発する化学的物理的作用を「遺伝毒性的 (genotoxic)」と「後成的 (epigenetic)」という用語で表した¹⁾。「後成的」という用語はある意味で「非遺伝毒性的 (nongenotoxic)」に置き換えられ、化学発がん物質の分類はしばしば遺伝毒性または非遺伝毒性のどちらかに分類された。

表 1 に示すように、遺伝毒性と非遺伝毒性の定義に従い、おおまかな属性を決めることができる。遺伝毒性に分類される発がん物質の作用としては直接 DNA を損傷させ結果として突然変異を生じさせたり、細胞内で起こるいくつかの活性化反応にも関与している。遺伝毒性に係る発がんにはしきい値はないと仮定できる。表 2 に遺伝毒性に分類される肝臓

の発がん物質の例を示す。これらの多くは投与条件に依存するが、真核細胞と原核細胞に突然変異を生じさせ、しばしばがん遺伝子を刺激する。また、これらは標的器官において、しばしば新陳代謝やその活性化に関与している。

他方、近年 DNA と直接関係しない反応により作用する非遺伝毒性に分類される発がん性物質が、いくつか同定されている。表 2 に非遺伝毒性に分類される肝臓の発がん物質の例についても示す。これらは細胞の成長や細胞死を制御し、腫瘍の形態に関与している。また、がん化の過程においてこれらの正確な作用のメカニズムは明らかにされておらず、遺伝子の発現や細胞の成長のパラメータの変化が明らかにされているだけである。がん遺伝子を発現するには、しばしば非遺伝毒性的な発がん物質による長時間の処置が必要であり、時間の閾値が生じる。これらの多くは後述するがん化の促進の段階に関与している。

図 1 に示すように、発がんの 3 つの段階、即ち、

岡山大学医学部保健学科放射線技術科学専攻

1) 電力中央研究所低線量放射線研究センター

2) 岡山大学大学院保健学研究科保健学専攻修士課程

開始 (initiation), 促進 (promotion), 進行 (progression) はいくつかの特徴に分けられる。開始の段階では、突然変異により生じる前腫瘍性細胞の形態が含まれる。また、この段階は開始細胞の形態に不可逆な変化を生じ、遺伝毒性的な過程でもある。促進の段階には細胞分裂による増加、またはアポトーシスによる減少を通して前腫瘍性細胞の選択的なクローン増殖が含まれる。この段階は発がん物質の投与条件に依存し、腫瘍促進は可逆的であり、非遺伝毒性的な過程でもある。進行の段階では腫瘍になる前から腫瘍になるまでの不可逆的な変化があり、遺伝毒性的な過程でもある。

正常細胞は、組織に細胞を供給する細胞(幹細胞)を除いて、生体内外で限られた回数しか分裂しない。がん化すれば無限増殖能を獲得するが、この無限増殖能獲得ががん細胞の最大の特徴である。また、正常細胞は、他の細胞と接触すると互いに重なり合うことなく、それ以上の増殖が阻害される。この際、接触した細胞同士の間で、双方の細胞膜を貫く小孔(ギャップ結合)を通して低分子物質を直接交換さ

せる細胞間の連絡が行われる。がん化した細胞は細胞間の連絡がなくなるため、細胞間の情報伝達が遮断される。その結果、がん細胞は正常細胞のもつ接触増殖阻止能を喪失し、無秩序に重なり合った増殖形態を特徴とする細胞の塊(フォーカス)を作るのである。このように、がん細胞は周囲の細胞と情報伝達のできない孤立した存在と言える。従って、発がんの原因は体細胞のがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子が突然変異を起こすことによって正常な増殖制御ができなくなることにありと考えられる。

他方、活性酸素や酸化ストレスにより抗酸化酵素や各種蛋白質において遺伝子発現することから、活性酸素が情報伝達に関与することが指摘できる。この活性酸素(種)は、細胞内で酸素分子の存在下、酵素であるシトクロム P450 による代謝などを通じて生じる。また、細胞の自殺を意味するアポトーシスにも活性酸素の関与が示唆されている。このアポトーシスは細胞のがん化と表裏一体の関係にあり、この両者に p53 がん抑制遺伝子が関与している。即ち、p53 は細胞増殖の抑制とアポトーシスの両面から細胞集団を監視し、異常増殖(がん化)した細胞の除去に働いていることが示唆される。

本総説は、以上の研究背景を踏まえ、筆者らが進めている「低線量放射線の健康への影響と医療への

表1 遺伝毒性的、非遺伝毒性的な発がん物質の生物学的特性の比較

遺伝毒性的な発がん物質	非遺伝毒性的な発がん物質
直接的に DNA に作用 突然変異の誘発あり 投与反応のしきい値なし 系統差・種差に非特異性 発がんの開始・進行段階に作用 不可逆的变化	間接的に DNA に作用 突然変異の誘発なし 投与反応のしきい値あり 系統差・種差に特異性 発がんの促進段階に作用 可逆的变化

表2 遺伝毒性的、非遺伝毒性的な肝臓発がん物質の例

遺伝毒性における例	非遺伝毒性における例
ニトロソアミン (ジエチルニトロソアミン, ジメチルニトロソアミン)	塩素化合物 (四塩化炭素, クロロホルム)
多環の芳香族炭化水素 マイコトキシン (アフラトキシン B1)	有機塩素殺虫剤 (ディールドリン, DDT, クロデン)
芳香族アミン (2-AAF, 4-アミノビフェニル)	ペルオキシゾーム増殖剤 (DEHP, クロフィブレート)
ニトロソ尿素 (エチルニトロソ尿素)	他の有機塩素化合物 (TCDD, PCBs)
	ホルモン (エストラジオール, ジエチルstilbestrol)
	催眠薬 (フェノバルビタール, ナトリウムバルビタール)

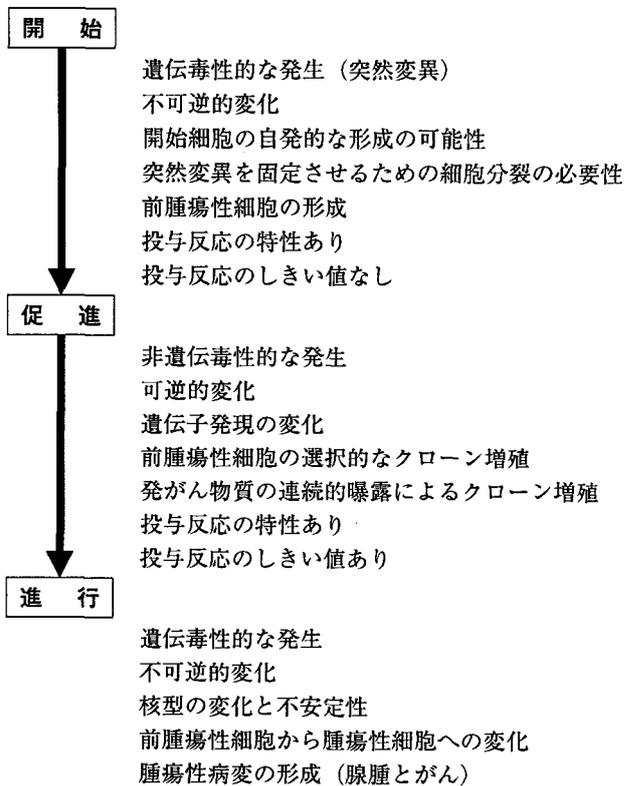


図1 発がんの各段階の生物学的特性

応用」に関する研究に資するために調査した化学発がんの非遺伝毒性的メカニズムの解明に関する最近の動向の概要について、次の内容を中心にまとめたものである。即ち、非遺伝毒性的発がんにおける細胞増殖、シトクロム P450 誘導、酸化ストレス、および遺伝子発現のそれぞれの役割、並びに量的な応答性について言及した。また、後成的発がんにおけるアポトーシス、およびギャップ結合による情報伝達のそれぞれの役割についても触れた。

1. 非遺伝毒性的発がんにおける細胞増殖の役割

多くの非遺伝毒性的な発がん物質が明らかにされてきたが、これらによる発がんの決定的なメカニズムはわかっていない。これら物質の多くにみられる1つの共通した作用は標的器官において細胞増殖を誘導することである。この細胞増殖は有糸分裂とDNA合成、アポトーシスの抑制を通して起こる。

表2に示す非遺伝毒性的な発がん物質によって引き起こされる細胞における反応としては、細胞受容体との相互作用、成長要因の調節、細胞の分裂、アポトーシスのそれぞれが抑制されることが挙げられる²⁾。また、細胞増殖の誘導は有糸分裂のメカニズムを通じての作用と細胞死へと導く作用とに分けられる³⁾。例えば、クロロホルムはマウス肝臓のネクローシス(壊死)を誘導し、がん化する。また、フェノバルビタールは細胞のネクローシスなどを増やさない。受容体を介した変化は部分的には報告されているが、有糸分裂やDNA合成による細胞増殖のメカニズムの多くは明らかにされていない。

複製型のDNA合成と次の細胞分裂の増加は発がん過程のそれぞれの段階に関係し、多くの非遺伝毒性的な発がん物質が腫瘍を誘発するメカニズムとして考えられている(図2)³⁻⁵⁾。DNA合成の増加に伴うがん誘発に関して2つの仮説が示されている。1つは非遺伝毒性的な発がん物質によるDNA合成や有糸分裂による規則性の少ない増加は

誤修復となり、細胞分裂で突然変異を誘発するとする仮説である。即ち、細胞分裂により前腫瘍から腫瘍まで拡大する細胞増殖を通して突然変異を生じる可能性がある。また、DNA合成や有糸分裂の誘発は自発的な前腫瘍性細胞の選択的なクローン増殖を起こさせることが考えられる⁶⁻⁸⁾。2つ目は、非遺伝毒性的な発がん物質は前腫瘍性細胞を増殖させるとする仮説である⁹⁾。さらに腫瘍促進は細胞再生の誘発に関与している^{10,11)}。例えば、フェノバルビタールなどの継続的な投与に依存してがん細胞は増殖し、腫瘍促進の下で多くの前腫瘍性のfociが増加している^{12,13)}。これらの仮説によると、開始細胞の形成や前腫瘍性細胞のクローン増殖が明らかに持続し、発がん促進のための細胞増殖やDNA合成が始まることになる。

興味深いことに、非遺伝毒性的な発がん物質による細胞増殖の多くは後成的な発がん物質による細胞増殖としても実証されてきた。まず、多くの場合、DNA合成能がわずかに増加し維持されたり、細胞の個体群(肝臓の中間体の細胞など)が増加し維持されたりすることが示された。また、非遺伝毒性的な発がん物質のいくつかは正常な肝臓でDNA合成の一時的な増加を起こさせるが、DNA合成のより増加したものが前腫瘍性細胞で見出された^{14,15)}。

前腫瘍性細胞に見られる非遺伝毒性的な発がん物質による細胞分裂として、有糸分裂の抑制効果がある。肝細胞におけるこの有糸分裂の抑制は正常細胞の反転の現象、*in vivo*, *in vitro*で分裂するための刺激の許容範囲にあることが特徴としてある^{16,17)}。ただ、非遺伝毒性的な発がん物質による有糸分裂の制御のメカニズムは不明である。例えば、フェノバルビタールを継続的に投与した後に観察される有糸分裂の抑制は、増加を変える成長因子(transforming growth factor β ; TGF β)や成長因子レセプター(マンノース6リン酸; TGF β の摂取を含む)に関係している可能性がある¹⁸⁾。しか

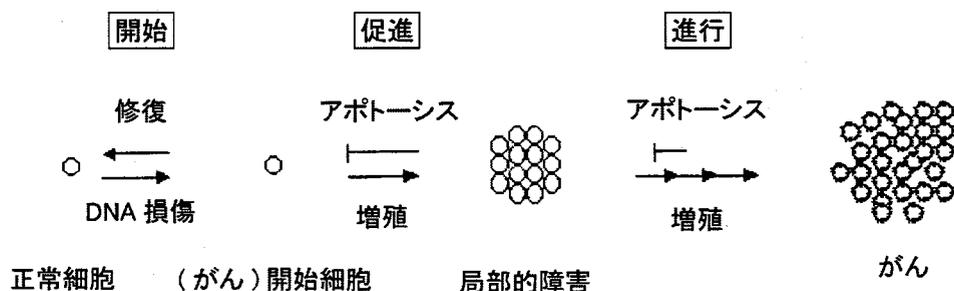


図2 肝臓における発がんの多段階説

し、種々の成長因子が肝細胞のDNA合成を刺激することにもなる。エピネフィレン、エストロゲン、インスリン、グルカゴンのような他の成長因子は直接、有糸分裂の成長に対し刺激効果を高めることから、コミットジェンと名づけられた¹⁹⁾。肝臓の成長抑制剤には成長因子であるTGF β やインターロイキン1 (IL-1) などを含む。非遺伝毒性的な発がん物質による肝細胞の分裂にこれらの成長因子や成長因子レセプターが含まれるかどうかについては、今後の研究が待たれる。さらに、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor α ; TGF α) などが肝障害を促進するが、これはこれらがマクロファージであるクッパー細胞を産生することと関係している。即ち、クッパー細胞は一酸化窒素 (NO) を産生し、がん転移を阻止したり肝細胞の蛋白質合成を抑制する作用などがある。

多くの研究者は細胞分裂の誘導は化学発がんによくことのできない要素であり、非遺伝毒性的発がんを正確に予言できるとしている。他方、非遺伝毒性的な発がん物質が細胞分裂を高め、がんの進行の主な役割を果たしているという前提を疑問視している研究者もいる^{20,21)}。細胞分裂の誘導と発がんの進行との関係は後成的発がんにおいては明らかだが、細胞分裂の増加や非遺伝毒性的な発がん物質による前腫瘍性細胞の選択的クローン増殖のメカニズムについては正確にはわかっていない。非遺伝毒性的な発がん物質にさらすことは他の細胞にも影響するし、アポトーシスの抑制、酸化ストレスの誘発なども充分検討されていないためである。

2. 後成的発がんにおけるアポトーシスの役割

アポトーシスは、修復不可能な損傷を受けた細胞などが選択的に組織から切り離されるという正常な生体防御の過程である。組織内の細胞の数を維持する際に、有糸分裂とアポトーシスが機能的なバランスを保つように現れる。一般的に発がんは細胞の成長とその死の間のバランスが崩れた結果である。従って、アポトーシスは細胞の異常な分裂増殖に対する細胞防御メカニズムとして考えられる。また、アポトーシスの抑制は生体内の腫瘍の促進に関与することになる。発がん促進を始めたラット肝臓において、フェノバルビタールを含む非遺伝毒性的な発がん物質による継続的な処理によって、病巣の数が増加する²²⁾。これは主に肝臓の病巣においてアポトーシスが抑制された結果起こる²³⁾。このアポトーシスの抑制は、電離放射線や腫瘍促進剤である

12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) などによって生体外からでも生じる²⁵⁾。いくつかの腫瘍促進剤は開始段階にある細胞のアポトーシスに対して抑制作用を示す^{2,14,15,25)}。

がん開始段階の細胞は優先的にアポトーシスにより除去される。肝腫瘍促進剤による細胞増殖の増加と同時にしばしば見られるアポトーシスの増加は、遺伝学的に細胞を修復するよりも損傷した細胞を除去するために働く保護的なメカニズムと言える。この方法は、食餌制限によりさらに有効に働く。即ち、発がんの促進段階にあるモデルマウスにおいて、食餌制限は肝細胞の細胞増殖を抑制し、病巣でのアポトーシスの割合を高めることが認められた²⁶⁻²⁸⁾。食餌制限の効果は発がんの腫瘍促進の段階で最も効果的である。食餌制限を受けた動物がエネルギーやそれを助ける因子を維持するのは、食餌制限を受けていない動物と比較して充分ではなく、この結果、アポトーシスが増加するという仮説が立てられた。開始段階の細胞は優先的にアポトーシスにより除去されるが、食餌制限もその細胞の除去を助けることになり、これが食餌制限がなぜ腫瘍促進を抑制するかの理由になるかもしれない。

これらの考えは、アポトーシスが変異した細胞や潜在的に変異を起こしがちな細胞を除去することによって発がんを抑制することと一致する。ろ胞性Bリンパ腫の転座に関連して発見されたがん遺伝子 *bcl-2* は細胞増殖に直接関与するのではなく、アポトーシスによる細胞死を抑制することにより細胞を不死化させる²⁹⁾。がん抑制遺伝子 *p53* は、細胞のG₁期とS期の過程における遺伝子発現を制御する^{30,31)}。*p53* 遺伝子の変異あるいは除去による遺伝子機能の損失あるいは不活性化は人間の細胞の50%以上で示され³²⁾、アポトーシスの抑制に関与している。

さらに、腫瘍細胞に入れられた野生型の *p53* 遺伝子をトランスフェクション、過剰発現することで、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する³³⁾。また、*p53* 遺伝子の機能を失うと遺伝上の損傷に対してアポトーシスを抑制することとなり、前段階の細胞を突然変異しやすくする可能性がある³⁴⁾。従って、*p53* 遺伝子が欠乏すると、アポトーシスにより変異細胞が除去されることが妨げられる可能性がある。様々ながん遺伝子はウイルスに感染した細胞の成長を促すが、これらにはアデノウイルスである *E1A* と *E1B* のがん遺伝子も含まれる。*E1A* は *E1B* が欠乏している時にアポトーシスを活性化す

る。従って、*E1B*は*E1A*により誘導されたアポトーシスを抑制する³⁵⁻³⁶⁾。

3. 後成的発がん細胞におけるギャップ結合による情報伝達の役割

多細胞の有機体の中には、ある細胞から隣接する細胞へシグナルを発する分子（例としてホルモン）により、あるいはギャップ結合的に隣接する細胞同士で情報伝達が行なわれる^{37,38)}。ギャップ結合は細胞膜に埋め込まれたコネクソンのヘミチャネルで形成され、細胞膜外のチャネルのプラークから構成されている³⁹⁾。ある細胞のヘミチャネルは隣接する細胞のヘミチャネルと関係しており、2つの隣接した細胞の間に膜内外の経路を作る。この経路により細胞間でイオンや低分子量水溶性物質（1 kD 以下）を交換している。カルシウム、cAMP、イノシトールリン脂質を含む成長調節シグナル伝達物質、また、細胞周期や細胞成長、細胞死の調節に必要な物質はギャップ結合を通過できる⁴⁰⁻⁴²⁾。従って、ギャップ結合を通じて、細胞間において低分子量のメッセンジャー分子のやりとりが一定レベル維持されるのである。

発がんの過程でギャップ結合による細胞間の情報伝達が調節されているのが示された⁴³⁾。動物や人間の悪性腫瘍組織から得られた細胞株では、ギャップ結合による細胞間の情報伝達量が減少していることがわかった。事実、ラット肝の発がんの各段階において、ギャップ結合による細胞間の情報伝達は次第に減少することが示されている。さらに、がん患者から切除した肝臓の悪性腫瘍も隣接する細胞と情報伝達する能力が減少していた⁴⁴⁻⁴⁷⁾。細胞間での情報伝達の阻害は特に化学的な発がんの促進段階において現れており、発がんのメカニズムとして提案された⁴⁷⁻⁵²⁾。培養細胞における細胞間の情報伝達を阻害する発がん物質の作用と、げっ歯動物における非遺伝毒性的なメカニズムによる腫瘍の誘発作用の関係も明らかにされた^{53,54)}。さらに、以下の抗腫瘍促進剤を用いた実験でギャップ結合による細胞間の情報伝達の抑制に種差や系統差による化学的な感受性に違いのあることがわかった⁵⁵⁻⁵⁷⁾。発がんの過程でのギャップ結合による細胞間の情報伝達の改善は、抗腫瘍促進剤あるいはがん予防剤の試験・研究により明らかにされている。抗酸化物質のビタミンE、緑茶に含まれる少量のポリフェノールなどを含む多くのがん予防剤が、非遺伝毒性的な肝臓抗腫瘍促進剤を用いた治療で観察されたギャップ結合による細胞間

情報伝達の抑制を止めることが報告された⁵⁸⁾。

発がん過程におけるギャップ結合による細胞間情報伝達に関するメカニズムとして、ギャップ結合が隣接するがん細胞間同士での成長を調節する可能性が考えられる。即ち、正常細胞と前腫瘍細胞の間でのギャップ結合による細胞間情報伝達を阻害することによって、前腫瘍細胞が周りを取り囲んでいる正常細胞の成長調節因子と分離される環境を作り出すのである⁴⁹⁾。

4. 非遺伝毒性的発がんにおけるシトクロム P450 誘導の役割

げっ歯類において多くの生体異物は肝腫瘍を産生するが、これに関して人に対する重要性も検討されてきた。しかし、そのメカニズムは未だ解明されていない。生体異物の代謝が発がんの過程に関係があるかも知れない。その代謝は反応中間体を形成し、それがDNAと結びつき変化させる。また、異常代謝などによりDNAの転写や細胞受容体との相互作用が誘発されて、がん遺伝子が活性化され、DNA複製や有糸分裂さらには細胞増殖を引き起こす。これらの作用の中心に活性酸素ラジカルの産生がある。即ち、代謝の賦活化やシトクロム P450 による活性酸素種の産生は化学発がんを含む多くの慢性疾患に関係し、DNA 損傷、protein kinase C (PKC) の賦活化、過形成（子孫の個体発生が祖先の個体発生の終端を越えて延長されること）、転移の過程などに関与する⁵⁹⁾。活性酸素種は、酸素分子の存在下での酸化還元サイクル、シトクロム P450 の空転サイクル（ある物質の生合成および分解にそれぞれ関与する酵素が共存して形成するエネルギーの浪費をおこすような回路）など多くの代謝を通じて供給される。シトクロム P450 の空転サイクルにより、活性酸素種であるスーパーオキシドアニオンや過酸化水素が多く産生する⁶⁰⁾。シトクロム P450 の空転サイクルは、特にシトクロム P450 2E1 に着目するとよくわかる。この酵素はエタノールを含む基質を酸化させることが難しい酸素処理に関わりがあり、基質のすぐ近くに活性酸素種を生じさせる^{61,62)}。2E1 蛋白質の安定化は活性酸素種産生の持続的な妨害となり、結果として組織のネクローシス、突然変異、悪性転化をもたらす。

シトクロム P450 の誘導は活性酸素種産生の増大に関係し、化学発がんの前兆マーカーとして考えられる。化学物質によりマウス肝が腫瘍化したものとラット肝のフォーカスに予めそれを投与し増殖させ

たものには、シトクロム P450 2B を誘導するという共通の特徴がある^{63,64}。肝腫瘍の促進剤であるフェノバルビタールは P450 2B により誘導され代謝性酸素を生じるが、他方、触媒回路が分離したりスーパーオキシドアニオンが遊離したりする難しさも見られる⁶⁵。このように、シトクロム P450 2B の誘導と腫瘍の促進の間には相関性があり、次のフェノバルビタール曝露が空転サイクルや活性酸素種産生と関係している⁶³。ペルオキシソーム増殖剤のような他の化学物質は、シトクロム P450 4 族の誘導体に影響する。ペルオキシソーム増殖剤への曝露の後、過酸化物質や続いて起こる活性酸素種の増加も示唆される^{66,67}。生体異物によるシトクロム P450 の酸化はラットやヒトよりもマウスのほうが高い⁶⁸。発がん物質である 7,12-ジメチルベンズアントラセンの代謝する能力は、様々な種差間の体重差や寿命差に逆の相関性がある⁶⁹。これは慢性疾患における活性酸素種産生に依存した代謝の仕組みを示唆する。鉄の存在下、スーパーオキシドアニオンや過酸化水素が・OH に変化し (Fenton と Haber Weiss 反応)、DNA を損傷させることで活性酸素種はがんの過程に関与している。酸化的な DNA 損傷として DNA は一本鎖または二本鎖に切断され、修復または再配列という結果をもたらす。活性酸素種は遺伝子発現を調節し、結果としてがん成長を制御するのである⁷⁰⁻⁷³。

5. 非遺伝毒性的発がんにおける酸化ストレスの役割

好気性の哺乳動物には、組織や細胞において内因性や外因性の潜在的な有害効果のある活性酸素種を産生する。1年に2kgのスーパーオキシドがヒト体内に生じると推測されている。また、これらの酸化損傷に対する抗酸化剤や酸化修復酵素などの防御システムは、哺乳動物に見いだされた⁷⁵。活性酸素種が体内に過剰に生じた場合、酸化ストレスがかかることになる⁷⁶。がんを含む多くの疾患の病因論を考える上で、この酸化ストレスは重要である⁷⁷⁻⁸⁰。活性酸素種は内因性 (好気性代謝、シトクロム P450 代謝、貪食作用) あるいは外因性 (生体異物、低酸素症など) により細胞内に生じる (図3)。体内に取り込まれた多くの酸素分子は二酸化炭素と水に変わるが、酸素分子の約5%が正常な代謝プロセスを通じて活性酸素種に変わる⁸¹。生体異物は細胞内に直接的に活性酸素種を生じさせるか、間接的に活性酸素種を誘導させる。活性酸素種の内因性産生

とこれらラジカルの解毒能力は、遺伝や生活習慣の因子により制御される。

げっ歯類の種差・系統差により、自然腫瘍発生率や化学発がんに対する感受性に相違点があることがわかった^{82,83}。これらの相違点について遺伝的メカニズムは明らかでないが、酸化ストレスの誘導の結果、酸化損傷が生じることが考えられる。活性酸素種の産生、抗酸化力、DNA の修復能力、遺伝子発現の活性酸素による制御などは遺伝学的にそれぞれ異なる⁸⁴。哺乳動物において、活性酸素種の産生が抗酸化機能により緩和されることは実証されている。この緩和システムは外因性または内因性により活性酸素種の産生を増加させるまでの機能であり、発がん性刺激に対する宿主の感受性で決まる。酸化ストレスのレベルが高い種は低い種と比べ生体異物から酸化攻撃を受けるといふ大きなリスクもっている。酸化ストレスのこの種の特異性は加齢によっても見られ、ミトコンドリアや P450 酵素による活性酸素種の誘導はげっ歯類の寿命に逆相関する^{85,86}。これに関連して、酸化 DNA 損傷のレベルと TPA の皮膚発がん促進作用に対する感受性との関係が、多くの種類のマウスについて明らかにされている⁸⁷。非遺伝毒性的な発がん物質は細胞内で直接的に作用したり、間接的に活性酸素種の産生を誘導する⁸⁸。ペルオキシソームの増殖剤、有機塩素剤、放射線、金属イオン、バルビツール塩、ホルボールエステルなどを含む多くの後成的な発がん促進剤は *in vivo* と *in vitro* において酸化ストレスの誘導を示している⁸⁹。完全に確認されたわけではない

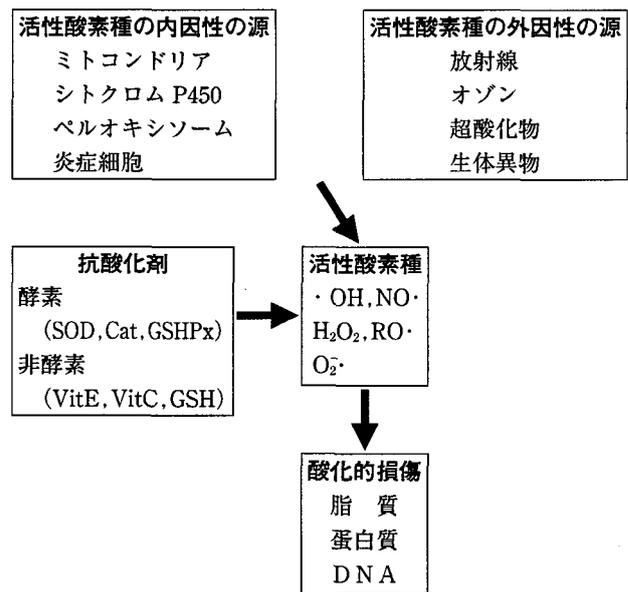


図3 活性酸素種の生成と細胞恒常性の破綻例

が、発がん物質の多くは何らかの活性酸素種を生み出すのである⁸⁶⁾。

げっ歯類動物の肝臓において発がん物質による酸化ストレスの作用をするのはペルオキシソームと考えられる。酸化還元反応に伴い増大した過酸化水素は、新しく生成したペルオキシソームの外側に漏出し細胞を攻撃する^{35,90,91)}。この仮説は実証されておらず、酸化的な DNA 損傷の増加がペルオキシソームの増殖に伴うことはわかっているが、この酸化的損傷の増加はペルオキシソームの増殖能力と相関しないこともわかっている。非遺伝毒性的な発がん物質により誘導された酸化ストレスは、酸化的損傷と遺伝子発現制御により細胞の生理的プロセスを障害する可能性がある。酸化的損傷は DNA、脂質、蛋白質の中で起こり得る。酸化的 DNA 損傷で遺伝子突然変異を誘導する大きな変化が起こるとすれば発がんする危険となり得る。しかしながら、酸化ストレスの誘導は、直接的に遺伝子転写の活性化、あるいは間接的に低メチル化を通じて遺伝子発現を制御する可能性がある。

遺伝毒性的あるいは非遺伝毒性的な発がん物質が活性酸素種を産生し、DNA に酸化的損傷をもたらす⁸⁹⁾。8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシンは遺伝子の突然変異や細胞の形質転換に関与している^{92,93)}。活性酸素種の発生剤、後成的・非遺伝毒性的な発がん物質による酸化ストレスの誘導は突然変異のない変容した遺伝子発現をもたらす可能性もある。

6. 非遺伝毒性的発がんにおける遺伝子発現の役割

非遺伝毒性的な発がん物質はキナーゼ、酸化窒素のような細胞内シグナル伝達物質などのシグナリング経路を通じて細胞内にその効果を顕現させると考えられる⁹⁴⁾。それらの修飾により、細胞増殖の増大、もしくは細胞死の選択（アポトーシスまたはネクロトーシス）のいずれかに帰着する^{89,95,96)}。カルシウムは、細胞増殖、分化、アポトーシスなどの過程を広範囲に制御するシグナリング因子である^{97,98)}。カルシウムの解離の結果、PKC のようなキナーゼを活性化する^{99,100)}。PKC の活性化は、TPA などの発がん物質との反応により明らかにされてきた¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾。

転写因子は遺伝子のプロモーター部分と結合し、順次、転写を制御することのできる低分子量の蛋白質である¹⁰⁵⁾。Nuclear factor kappa-B (NF κ B) と activator protein-1 (AP-1) の 2 つの転写因子について、非遺伝毒性的な化学物質による制御の研究が

されている。即ち、NF κ B は 50kD と 65kD のサブユニットから成る。NF κ B の活性化は細胞外からの刺激、即ち、熱ショックなどのストレス、金属イオン、石綿、アルコールなどで誘導され¹⁰⁶⁻¹¹⁰⁾、細胞の増殖やアポトーシスにより現れる¹⁰⁶⁾。同様に、細胞の酸化還元能力により、これらの転写因子は制御されることが明らかにされた^{111,112)}。細胞内の活性酸素の増加や NF κ B から I κ B の解離により、NF κ B が細胞核へ転座し得る^{113,114)}が、NF κ B の活性と結合した DNA を標的遺伝子に変化させるかもしれない¹¹⁵⁾。また、熱ショック転写因子の活性化において同様の効果が観察されている¹¹⁶⁾。四塩化炭素、フェノバルビタール、カドミウム、アルコール、石綿、TPA などの非遺伝毒性的な化学物質に曝露された細胞において、AP-1 の活性化が報告されている^{107-110,117-119)}。酸化剤と抗酸化剤の両者が AP-1 の活性化に影響していることは興味深い¹²⁰⁾。

細胞のメチル化状態も非遺伝毒性的な発がん物質に曝露することで観察される。DNA のメチル化は遺伝子発現へと変わる。DNA のシトシン 5 位をメチル化した 5-メチルシトシン (5mC) は、高等真核生物で唯一自然に起こる DNA 変化である。脊椎動物において、ゲノム中のシトシン残基の約 4% が 5mC へと変化する¹²¹⁾。DNA 中の 5mC が発生、分化などの過程に影響することは一般的に認められており、5mC の存在が発がん発現に関与することも実証されている¹²²⁾。腫瘍細胞において種々の遺伝子のメチル化パターンは、過度のメチル化か軽度のメチル化により、しばしば変わる¹²³⁾。同様に、発がんの過程で普通メチル化されない領域において、過度のメチル化と同じくゲノムの広範囲な軽度のメチル化が見られる^{123,125)}。遺伝子内のメチル化の程度はその発現と逆比例の関係にあり、過度のメチル化は遺伝子発現の減少などにつながる^{126,127)}。がん発生過程において重要なことは、がん抑制遺伝子が過度にメチル化すること、不活性化することである。即ち、発がん物質がメチル化の際にエラーを起こし、細胞形成において発がんの可能性を増加させる恐れのあることが示唆される¹²⁸⁾。逆に、軽度のメチル化は遺伝子発現の増加を導き、突然変異率の増加に関係する¹²⁹⁾。がん遺伝子は軽度にメチル化されると自らの発現を増大させる^{123,130)}。肝がん誘発物質、もしくは腫瘍形成を引き起こすことが知られている食餌を与えられたラットでは、肝臓の S-adenosylmethionine (SAM) レベルが減少することが示されている¹³¹⁾。このコファクターの減少は、

結果的に軽度のメチル化を促進させ、その後、がん遺伝子を発現させる。コリンもしくはメチル供与基の欠乏した食餌を与えられたラットにおいて、*c-myc*, *c-fos*, *c-H-ras* の各がん原遺伝子の軽度のメチル化が見られ、肝臓の発がんに関係していた¹³²⁾。また、発がんの過程におけるメチル化の役割として、SAMの投与による肝がんの抑制が明らかにされている。遺伝子発現における変化に加え、メチル化もまた染色体の安定性を制御する。DNAのメチル化パターンの変化によりクロマチンの構造が変わり、その結果、染色体の欠失、逆位、損失が起こる¹³³⁾。

発がん過程におけるメチル化や遺伝子発現の変化について次のことが明らかにされている。即ち、腫瘍の促進段階での軽度のメチル化の関係について、C3H, C57Bl/6, B6C3F1のそれぞれのマウスでのメチル化の研究によって示された。これらのマウスは*in vivo*での肝臓の腫瘍形成に対して特異な感受性を示し、C57Bl/6はC3H, B6C3F1に比べ肝がんに対する耐性を持つ。これより、C3HとB6C3F1ではC57Bl/6よりも*c-myc*, *c-fos*, *c-H-ras*のがん原遺伝子のメチル化が少ないことが明らかにされた¹³⁴⁾。このように、マウスの系統差により、がん遺伝子発現(メチル化の程度)はがんの感受性と直接関係している。また、これらの知見は、系統差による特異性と発がんとの間に関連性のあることを示唆する。さらに、肝がん誘発物質はメチル化パターンの変化に伴い誘導された異常型の遺伝子の発現によりがんを顕現化させる。

7. 非遺伝毒性的発がんにおける量的な応答性

非遺伝毒性的な発がん物質によるがんの誘導は、しきい値や作用量に伴う応答特性に見られるような非DNA反応のメカニズムを通じて現れる。非遺伝毒性的な発がん物質が正常細胞に及ぼす影響は幾度かの修飾を伴い、それぞれの発がん過程で変化させていく。細胞の増殖、酸化ストレスの誘導、細胞間情報伝達の修飾、遺伝子発現の制御に伴って見られるがん化の状態により、細胞の発がんの各過程におけるそれらのしきい値がわかる。非遺伝毒性的な発がん物質による細胞での後成的な影響は可逆変化である。また、同様に見られる細胞での変化の多くは、細胞内の防御システムの誘導をもたらす細胞内標的として含まれる。例えば、細胞や組織が少量の酸化ストレスに曝露されると、DNA修復酵素や抗酸化系酵素が誘導される。非遺伝毒性的な発がん物質による遺伝子発現の誘導は、非遺伝毒性を防御

するための細胞の無毒化システムを刺激する。このことは、肝臓の正常細胞において見られるいくつかの同種の物質による有糸分裂の抑制作用により示されている。さらに、シトクロムP450酵素の誘導は非遺伝毒性的な発がん物質が多量の場合、有毒な効果を示すが、少量の場合では解毒剤の効果を示す。非遺伝毒性的な発がん物質による後成的な影響が、人体におけるリスク評価を行う上で様々なカテゴリーのメカニズムに関係することは既に報告されている。げっ歯類に見られた非遺伝毒性的な発がん物質による後成的な影響の多くは、その影響を示す作用量、作用形態、標的組織の応答性が人体とは異なっている。このため、げっ歯動物実験で得られた結論をヒトに適用できるか否かについての検討は、医生態学的手法による確認実験により行われている。

結 言

以上の知見より、非遺伝毒性に分類される発がん物質の作用の様式とメカニズムやこれによる後成的な影響については解明されつつあり、特に、これらの発がん物質がゲノムDNAに対し直接的な相互作用、突然変異、修飾などを行う発がん物質とは機能的に異なった作用をすることが明らかになった。また、これらは放射線発がんなど低線量放射線の健康への影響などについて研究¹³⁵⁾する上で、重要な知見となっていることもわかった。

謝 辞

本総説を作成するにあたり、価値ある資料と情報をお与え戴いたIndiana大学医学部教授のJames E. Klauniges博士をはじめ、関係各位に感謝します。

文 献

- 1) Weisberger, J.H., Williams, G.M.: The distinct health risk analyses required for genotoxic carcinogens and promoting agents. *Environ. Health Persp.*, 50: 233-45, 1983.
- 2) Bursch, W., Lauer, B., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Schuppler, J., Schulte-Hermann, R.: Controlled cell death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis*, 5: 453-458, 1984.
- 3) Butterworth, B.E.: Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. *Mutat. Res.*, 239: 117-132, 1990.
- 4) Pitot, H.C., Goldsworthy, T., Moran, S.: The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.*, 17: 133-

- 146, 1981.
- 5) Marsman, D.S., Cattley, R.C., Conway, J.C., Popp, J.A.: Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio]-acetic and [4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio]-acetic acid (Wy-14643) in rats. *Carcinogenesis*, 48: 6739-6744, 1988.
 - 6) Stott, W.T., Reita, R.H., Schumann, A.M., Watanabe, P.G.: Genetic and non-genetic events in neoplasia. *Food Cosmet Toxicol.*, 19: 567-576, 1988.
 - 7) Ames, B.N., Gold, L.S.: Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science*, 249: 970-971, 1990.
 - 8) Columbano, A., Endoh, T., Denda, A., Noguchi O., Nakae, D., Hasgawa, K., Ledda-Cloumbano, G.M., Zedda, A.I., Konshi, Y.: Effects of cell proliferation and cell death (apoptosis and necrosis) on the early stages of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 17: 395-400, 1996.
 - 9) Farber, E.: Clonal adaption during carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 39: 1837-1846, 1990.
 - 10) Slaga, T.J.: Overview of tumor promotion in animals. *Environ. Health Persp.*, 50: 3-14, 1983.
 - 11) Slaga, T.J.: Can tumour promotion be effectively inhibited?. *IARC Sci. Pub.*, 56: 497-506, 1984.
 - 12) Schulte-Hermann, R.S., Timmermann-Trosnier, I. and Schupper, J.: Promotion of spontaneous preneoplastic cells in rat liver as a possible explanation of tumor production by nonmutagenic compounds. *Can. Res.*, 43: 839-844, 1983.
 - 13) Schulte-Hermann, R.S.: Tumor promotion in the liver. *Archiv. Toxicol.*, 57: 147-158, 1987.
 - 14) Kolaja, K.L., Stevenson, D.E., Walborg, E.F.Jr., Klaunig, J.E.: Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis. *Carcinogenesis*, 17: 947-954, 1996.
 - 15) Kolaja, K.L., Stevenson, D.E., Walborg, E.F.Jr., Klaunig, J.E.: Selective dieldrin promotion of hepatic focal lesions in mice. *Carcinogenesis*, 17: 1243-1250, 1996.
 - 16) Eckl, P.M., Meyer, S.A., Whitcombe, W.R., Jirtle, L.: Phenobarbital reduces EGF receptors and the ability of hysiological concentrations of calcium to suppress hepatocyte proliferation. *Carcinogenesis*, 9: 479-483, 1988.
 - 17) Tsai, W.-H., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K.: Long-term treatment with hepatic tumor promoter inhibits mitogenic responses of hepatocytes to acidic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor. *Cancer Letts.*, 59: 1-3-108, 1991.
 - 18) Jirtle, R.L., Hankins, G.R., Reisenbichler, H., Boyer, I.J.: Regulation of mannose-6-phosphatensulin-like growth factor II receptors and transforming growth factor b during liver tumor promotion with phenobarbital. *Carcinogenesis*, 15: 1473-1478, 1994.
 - 19) Michalopoulos, G.K.: Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.*, 4: 176-187, 1990.
 - 20) Melnick, R.L., Huff, J., Barrett, J.C., Maronpot, R.R., Lucier, G., Portier, C.J.: Cell proliferation and chemical carcinogenesis: symposium overview. *Environ. Health Persp.*, 101: 149-152, 1992.
 - 21) Melnick, R.L. and Huff, J.: Liver carcinogenesis is not a predicted outcome of chemically induced hepatocyte proliferation. *Toxicol. Ind. Health*, 9: 415-438, 1993.
 - 22) Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiner, I., Barthel, G.: DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion. *Cancer Res.*, 50: 5127-5135, 1990.
 - 23) Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., Bursch, W.: Tumor development and apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 105: 363-367, 1994.
 - 24) Tomei, L.D., Kanter, P., Wenner, C.E.: Inhibiton of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 155: 324-331, 1988.
 - 25) Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Mullauer, L., Ruttkay-Nedecky, B.: Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. *Mutat. Res.*, 333: 81-87, 1995.
 - 26) Grasl-Kraupp, B., Bursch, W., Ruttkay-Nedecky, B., Wagner, A., Lauer, B., Schulte-Hermann, R.: Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9995-9999, 1994.
 - 27) Kolaja, K.L., Bunting, K.A., Klaunig, J.E.: Inhibition of tumor promotion and hepato-cellular growth by dietary restriction in mice. *Carcinogenesis*, 17: 1657-1664, 1996.
 - 28) Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M.: Mechanisms of cancer chemoprevention in hepatic carcinogenesis: Modulation of focal lesion growth in mice. *Toxicol. Sci.*, 52: 101-106, 1999.
 - 29) Cory, S.: Activation of cellular oncogenes in hematopoietic cells by chromosome translocation. *Adv. Cancer Res.*, 47: 189-234, 1986.
 - 30) Levine, A.J., Perry, M.E., Chang, A.: The role of p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, 69: 409-416, 1994.
 - 31) Levine, A.J., Monand, J., Finlay, C.A.: The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 352: 453-456, 1991.
 - 32) Hollstein, M., Sidransry, D., Vogelstein, B.: P53 mutations in human cancer. *Science*, 253: 49-53, 1991.
 - 33) Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S.: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4495-4499, 1992.
 - 34) Korsmeyer, S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J.: Bcl2/bax: A rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer Biol.*, 4: 327-332, 1993.
 - 35) Rao, M.S., Reddy, J.K.: An overview of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 93: 205-209, 1991.
 - 36) Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P.: The adenovirus E1A proteins induce apoptosis which is inhibited

- by the E1B 19kDa and bcl-2 proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 7742-7746, 1992.
- 37) Loewenstein, W.R.: The cell-to-cell channel of gap junctions. Cell, 48: 725-726, 1987.
 - 38) Pitts, J.D., Finbow, M.E.: The gap junction. J. Cell Sci., 4: 239-266, 1986.
 - 39) Revel, J.P., Karnovsky, M.J.: Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. J. Cell Biol., 33: C7-C12, 1967.
 - 40) Tsien, R.W., Weingart, R.: Ionotropic effects of cyclic AMP I calf ventricular muscle studied by a cut end method. J. Physiol., 260: 117-141, 1976.
 - 41) Pitt, J.S., Simms: Permeability of junctions between animal cells. Intercellular transfer of nucleotides but not macromolecules. Exp. Cell Res., 104: 153-163, 1977.
 - 42) Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., Smith, S.J.: Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: Long-range glial signaling. Science., 247: 470-473, 1990.
 - 43) Trosko, J.E., Ruch, R.: Cell-cell communication and carcinogenesis. Front. Biosci., 3: 208-236, 1998.
 - 44) Yamasaki, H.: Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. Carcinogenesis., 11: 1051-1058, 1990.
 - 45) Krutovskikh, V., Yamasaki, H.: The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. Histol. Histopath., 12: 761-768, 1997.
 - 46) Mesnil, M., Yamasaki, H.: Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: evidence and hypothesis. Mol. Carcinogenesis., 7: 14-17, 1993.
 - 47) Trosko, J.E., Chang, C.C.: Nongenotoxic mechanisms in carcinogenesis: Role in inhibited intercellular communication. Bangurg Report 31. Carcinogen Risk Assessment: New directions in the Qualitative and Quantitative Aspects, 139-170, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
 - 48) Klaunig, J.E.: Alterations in intercellular communication during the stage of promotion. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 198: 688-692, 1991.
 - 49) Klaunig, J.E., Ruch, R.J.: Biology of disease: Role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. Lab. Invest., 62: 135-146, 1990.
 - 50) Williams, G.M.: Liver carcinogenesis: The role for some chemicals of an epigenetic mechanism of liver-tumor promotion involving modification of the cell membrane. Fd. Cosmet. Toxicol., 19: 577-581, 1981.
 - 51) Budunova, I.V., Williams, G.M.: Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. Cell Biol. Toxicol., 10: 71-116, 1984.
 - 52) Yamasaki, H.: Aberrant expression and function of gap junctions during carcinogenesis. Environ. Health Persp., 93: 191-197, 1991.
 - 53) Klaunig, J.E., Ruch, R.J.: Strain and species effects on the inhibition of hepatocyte intercellular communication by liver tumor promoters. Cancer Lett., 36: 161-168, 1987.
 - 54) Trosko, J.E., Yotti, L.P., Warren, S.T., Tsushimoto, G., Chang, C.: Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters. Carcinogenesis; a Comprehensive Survey., 7: 565-85, 1982.
 - 55) Diwan, B.A., Rice, J.M., Ohshima, M., Ward, J.M., Dove, L.F.: Comparative tumor-promoting activities of phenobarbital, amobarbital, barbital sodium, and barbituric acid on livers and other organs of male F344/NCr rats following initiation with N-nitrosodiethylamine. J. Nat. Cancer Inst., 74: 509-516, 1985.
 - 56) Klaunig, J.E., Hartnett, J.A., Ruch, R.J., Weghorst, C.M., Hampton, J.A., Schafer, L.D.: Gap junctional intercellular communication in hepatic carcinogenesis. Progr. Clin. Biol. Res., 340D: 165-174, 1990.
 - 57) Ruch, R.J., Klaunig, J.E.: Kinetics of phenobarbital inhibition of intercellular communication in mouse hepatocytes. Cancer Res., 48: 2519-2523, 1988.
 - 58) Trosko, J.E.: Challenge to the simple paradigm that 'carcinogens' are 'mutagens' and to the *in vitro* and *in vivo* assays used to test the paradigm. Mutat. Res., 373: 245-249, 1997.
 - 59) Parke, D.V.: The cytochromes P450 and mechanisms of chemical carcinogenesis. Environ. Health Persp., 102: 852-853, 1994.
 - 60) Parke, D.V., Ioannides, C.: Role of cytochrome p-450 in mouse liver tumor production. Progr. Clin. Biol. Res., 331: 215-230, 1990.
 - 61) Eksrom, G., Ingleman-Sundberg, M.: Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol inducible cytochrome P-450. Biochem. Pharmacol., 38: 1313-1319, 1989.
 - 62) Kukielka, E., Cederbaum, A. I.: The effect of chronic ethanol on consumption on NADH-anDNADPH-dependent generation of reactive oxygen intermediates by isolated rat liver nuclei. Alcohol Alcoholism, 27: 233-239, 1992.
 - 63) Rice, J.M., Diwan, B.A., Hu, H., Ward, J.M., Nims, R.W., Lubet, R.A.: Enhancement of hepatocarcinogenesis and induction of specific cytochrome P450-dependent monooxygenase activities by the barbiturates allobarbitol, aprobarbitol, pentobarbitol, secobarbitol, and 5-phenyl- and 5-ethylbarbituric acids. Carcinogenesis, 15: 395-402, 1994.
 - 64) Lubet, R.A., Nims, R.W., Ward, J.M., Rice, J.M., Diwan, B.A.: Induction of cytochrome P-450 and its relationship to liver tumor promotion. J Am Coll Toxicol, 8: 259-268, 1989.
 - 65) Ingelman-Sundberg, M., Hagbjork, A.L.: On the significance of cytochrome P450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. Xenobiotica, 12: 673-686, 1982.
 - 66) Lake, B.G., Gray, T.J.B., Pels Rijcken, W.R., Beaman, J.A., Gangoli, S.D.: The effect of hypolipidaemic agents on peroxisomal β -oxidation and mixed-function oxidase activity in primary cultures of rat hepatocytes: Relationship between induction of palmitoyl-CoA oxidation and lauric acid hydroxylation. Xenobiotica, 14: 269-276, 1984.
 - 67) Reddy, J.K., Lalwani, N.D., Reddy, M.K., Quershi, S.A.: Excessive accumulation of auto-fluorescent

- lipofuscin in the liver during hepatocarcinogenesis by methyl clofenipate and other hypolipidaemic peroxisome proliferators. *Cancer Res.*, 42: 259-266, 1982.
- 68) Lornez, J., Glatt, H.R., Fleishman, R., Ferlinz, R., Oesch, F.: Drug metabolism in man and its relationship to that in three rodent species: Monooxygenase, epoxide hydrolase, and glutathione-S-transferase activities in subcellular fractions of lung and liver. *Biochem. Med.*, 32: 43-56, 1984.
- 69) Schwartz, A.G., Moore, C.J.: Inverse correlation between species life-span and capacity of cultured fibroblasts to metabolize polycyclic hydrocarbon carcinogens. *Fed. Proc.*, 38: 1989-1992, 1979.
- 70) Hsie, A.W., Recio, L., Katz, D.S., Lee, C.Q., Wagner, M., Schenley, R.L.: Evidence for reactive oxygen species inducing mutation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9616-9620, 1986.
- 71) Troll, W., Weisner, R.: The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Ann. Rev. Toxicol.*, 25: 509-528, 1985.
- 72) Kensler, T.W., Taffe: Free radicals in tumour promotion. *Adv. Free. Rad. Biol. Med.*, 2: 347-387, 1986.
- 73) Kensler, T.W., Trush, M.A.: The role of oxygen radicals in tumour promotion. *Environ. Mutagen.*, 6: 593-616, 1984.
- 74) Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, 52: 253-265, 1994.
- 75) Hochstein, P., Atallah, A.S.: The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutat. Res.*, 202: 363-375, 1988.
- 76) Sies, H. (ed.): Oxidative stress: Introductory remarks.: *Oxidative Stress. I*, Academic Press Inc., 1985
- 77) Guyton, K.Z., Kensler, T.W.: Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Med. Buletin*, 49: 523-544, 1993.
- 78) Trush, M.A., Kensler, T.W.: An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Rad. Biology and Med.*, 10: 201-209, 1991.
- 79) Vuillaume, M.: Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat. Res.*, 186: 43-72, 1987.
- 80) Witz, G.: Active oxygen species as factors in multistage carcinogenesis. *Proc. Society Exp. Biol. Med.*, 198: 675-682, 1991.
- 81) Barber, D.A., Harris, S.R.: Oxygen free radicals and antioxidants: A review. *Am. Pharmacy*, NS34: 26-35, 1994.
- 82) Drinkwater, N.R., Bennett, L.M.: Genetic control of carcinogenesis in experimental animals: Ito, N., Sugano, H. (eds): Modification of Tumor Development in Rodents. *Prog. Exp. Tumor Res.*, Basel, Karger, 33: 1-20, 1991.
- 83) Diwan, B.A., Ward, J.M., Rice, J.M.: Modification of liver tumor development in rodents In: Ito, N. and Sugano, H. (eds) Modification of Tumor Development in Rodents, *Prog. Exp. Tumors Res.*, Basel, Karger, 33: 76-107, 1991.
- 84) Burcham, P.C.: Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat Res*, 443: 11-36, 1999.
- 85) Ku, H.H., Brunk, U.T., Sohal, R.S.: Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol. Med.*, 15: 621-627, 1993.
- 86) Parke, D.V., Sapota, A.: Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Intern J. Occup. Med. Environ. Health*, 9: 331-340, 1996.
- 87) Wei, L., Wei, H., Frenkel, K.: Sensitivity to tumor promotion of SENCAR and C57BL/6J mice correlates with oxidative events and DNA damage. *Carcinogenesis*, 14: 841-847, 1993.
- 88) Rice-Evans, C., Burdon, R.: Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.*, 32: 71-110, 1993.
- 89) Klaunig, J.E., Xu, Y., Bachowski, S., Jiang, J.: Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. In Wallace KB Ed. *Free Radical Toxicology*. 375-400, Taylor and Francis Pub., 1997.
- 90) Tamura, H., Iida, T., Watanabe, T., Suga, T.: Long-term effects of peroxisome proliferators on the balance between hydrogen peroxide-generating and scavenging capacities in the liver of Fischer-344 rats. *Toxicol*, 63: 199-213, 1990.
- 91) Wade, N., Marsman, D.S., Popp, J.A.: Dose related effects of hepatocarcinogen Wy 14,623 on peroxisomes and cell replication. *Fundam Appl Toxicol*, 18: 149-154, 1992.
- 92) Kamiya, H., Miura, K., Isikawa, H., Inoue, H., Nishimura, S., Ohtsuka, E.: c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions. *Cancer Res*, 52: 3484-3485, 1992.
- 93) Shibutani, S., Takeshita, M., Grollman, A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349: 431-434, 1991.
- 94) Kerr, L.D., Inoue, J., Verma, I.M.: Signal transduction: the nuclear target. *Current Opinion in Cell Biology*, 4: 496-501, 1992.
- 95) Timblin, C.R., Janssen, Y.M.W., Mossman, B.T.: Free-radical-mediated alterations of gene expression by xenobiotics. In Wallace KB Ed. *Free Radical Toxicology*. 325-349, Taylor and Francis Pub., 1997.
- 96) Kass, G.E.N.: Free-radical-induced changes in cell signal transduction. In Wallace KB Ed. *Free Radical Toxicology*. 349-374, Taylor and Francis Pub., 1997.
- 97) Berridge, M.J.: The biology and medicine of calcium signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 98(2): 119-124, 1994.
- 98) Whitfield, J.F.: Calcium signals and cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 3: 55-90, 1992.
- 99) Larsson, R., Cerutti, P.: Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C following exposure in mouse epidermal cells to oxidants. *Cancer Rtes.*, 49: 5627-5632, 1989.
- 100) Brawn, M.K., Chiou, W.J., Leach, K.L.: Oxidant-induced activation of protein kinase C in UC11MG

- cells. *Free Radical Research*, 22: 23-37, 1995.
- 101) Zorn, N.E., Zorn, N.E., Russell, D.H., Buckley, A. R., Sauro, M.D.: Alterations in splenocyte protein kinase C (PKC) activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. *Toxicology Letters*, 78: 93-100, 1995.
 - 102) Kass, G.E.N., Duddy, S.K., Orrenius, S.: Alteration in splenocyte protein kinase C (PKC) activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vivo. *Toxicol Lett*, 78: 93-100, 1989.
 - 103) Jirtle, R.L., Meyer, S.A.: Liver tumor promotion: effect of phenobarbital on EGF and protein kinase C signal transduction and transforming growth factor-beta 1 expression. *Digestive Diseases and Sciences*, 36: 659-68, 1991.
 - 104) Brockenbrough, J.S.: Reversible and phorbol ester-specific defect of protein kinase C translocation in hepatocytes isolated from phenobarbital-treated rats. *Cancer Res.*, 51(1): 130-136, 1991.
 - 105) Vellanoweth, R.L., Suprakar, P.C., Roy, A.K.: Transcription factors in development, growth, and aging. *Lab. Invest.*, 70: 784-799, 1994.
 - 106) Martin, R.D., Schmid, J.A., Hofer-Warbinek, R.: The NF-kB/Rel family of transcription factors in oncogenic transformation and apoptosis. *Mutat Res*, 437: 231-243, 1999.
 - 107) Hart, B.A., Lee, C.H., Shukla, G.S., Shukla, A., Osier, M., Eneman, J.D., Chiu, J.F.: Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicol*, 133: 43-58, 1999.
 - 108) Lu, S.C., Huang, Z.Z., Yang, J.M., Tsukamoto, H.: Effect of ethanol and high-fat feeding on hepatic gamma-glutamylcysteine. *Hepatology*, 30: 209-214, 1999.
 - 109) Radler-Pohl, A., Gebel, S., Sachsenmaier, C., Konig, H., Kramer, M., Oehler, T., Streile, M., Ponta, H., Rapp, U., Rahmsdorf, H.J.: The activation and activity control of AP-1 (fosun). *Ann New York Acad Sci*, 684: 127-148, 1993.
 - 110) Gilmour, P.S., Brown, D.M., Beswick, P.H., MacNee, W., Rahman, I., Donaldson, K.: Free radical activity of industrial fibers: role of iron in oxidative stress and activation of transcription factors. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 5: 1313-1317, 1997.
 - 111) Hutter, D.E., Till, B.G., Greene, J.J.: Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Exper. Cell Res.*, 232: 435-438, 1997.
 - 112) Demple, B.: Study of redox-regulated transcription factors in prokaryotes. *Methods*, 11: 267-278, 1997.
 - 113) Baeuerle, P.A., Baltimore, D.: Ikb: a specific inhibitor of the NF-kB transcription factor. *Science*, 242: 540-546, 1988.
 - 114) Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A.: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *The EMBO J.*, 10: 2247-2258, 1991.
 - 115) Sun, Y., Oberley, L.W.: Redox regulation of transcriptional activators. *Free Rad. Biol. Med.*, 21: 335-348, 1996.
 - 116) Jacquier-Sarlin, M.R., Polla, B.S.: Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin. *Biochem. J.*, 318: 187-193, 1996.
 - 117) Zawaski, K., Gruebele, A., Kaplan, D., Reddy, S., Mortensen, A., Novak, R.F.: Evidence for enhanced expression of c-fos, c-jun, and the Ca²⁺-activated neutral protease in rat liver following carbon tetrachloride administration. *Biochem. and Biophysical Res. Commun.*, 197: 585-590, 1993.
 - 118) Puga, A., Nebert, D.W., Carrier, F.: Dioxin induces expression of c-fos and c-jun pro-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA and Cell Biology*, 11: 269-81, 1992.
 - 119) Pinkus, R., Bergelson, S., Daniel, V.: Phenobarbital induction of AP-1 binding activity mediate activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Biochem. J.*, 290: 637-640, 1993.
 - 120) Muller, J.M., Cahill, M.A., Rupee, R.A., Baeuerle, P.A., Nordheim, A.: Antioxidants as well as oxidants activate c-fos via Ras-dependent activation of extracellular-signal-regulated kinase 2 and Elk-1. *Eur. J. Biochem.*, 244: 45-52, 1997.
 - 121) Ehrlich, M., Gama, S.M., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., Gehrke: Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues and cells. *Nucleic Acid Res.*, 10: 2709-2721, 1982.
 - 122) Liard, P.W., Jaenisch, R.: The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Ann. Rev. Genet.*, 30: 441-464, 1997.
 - 123) Counts, J.L., Goodman, J.I.: Hypomethylation of DNA: a nongenotoxic mechanism involved in tumor promotion. *Toxicol. Lett.*, 82/83: 663-672, 1995.
 - 124) Baylin, S.B., Makos, M., Wu, J.J., Yen, R.W., de Bustros, A., Vertino, P., Nelkin, B.D.: Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells*, 3: 383-390, 1991.
 - 125) Counts, S.L., Sarmiento, J.I., Harbison, M.L., Downing, J.C., McClain, R.M., Goodman, J.I.: Cell proliferation and global methylation status after phenobarbital and/or choline-devoid, methionine-deficient diet administration. *Carcinogenesis*, 17: 1251-1257, 1996.
 - 126) Costello, J.F., Futscher, B.W., Tano, K., Graunke, D.M., Peiper, R.O.: Graded methylation in the promoter and body of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *J. Biol. Chem.*, 269: 17228-17237, 1994.
 - 127) Boyes, J., Bird, A.: DNA methylation inhibits transcription directly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, 64: 1123-1134, 1991.
 - 128) Boehm, T.L., Drahovsky, D.: Alteration in enzymatic methylation of DNA cytosines by chemical carcinogenSAMechanism involved in the initiation of carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71: 429-433, 1983.
 - 129) Chen, R.Z., Peterson, U., Beard, Jackson-Grusby, L., Jaenisch, R.: DNA hypomethylation leads to ele-

- vated mutation rate. *Nature*, 395: 89-93, 1998.
- 130) Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Palmisano, W. A., Michels, R., Saccomanno, G., Cabrielson, E., Baylin, S. B., Herman, J. G.: Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 95: 11891-11896, 1998.
- 131) Griffin, S., Karran, P.: Incision at DNA G: T mispairs by extracts of mammalian cells occurs preferentially at cytosine methylation sites and is not targeted by a separate G:T binding reaction. *Biochem.*, 32: 13032-13039, 1993.
- 132) Wainfen, E., Poirier, L. A.: Ethyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. *Cancer Res.*, 52: 2071-2077, 1992.
- 133) Pogribny, I. P., Basnakian, A. G., Miller, B. J., Lopatina, N. G., Poirier, L. A., James, S. J.: Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folateethyl-deficient rats. *Cancer Res.*, 55: 1894-1901, 1995.
- 134) Counts, J. L., McClain, R. M., Goodman, J. I.: Comparison of effect of tumor promoter treatments on DNA methylation status and gene expression in B6C3F1 and C57B1/6 mice and in B6C3F1 mouse liver tumors. *Mol. Carcinogenesis*, 18: 97-106, 1997.
- 135) Yamaoka, K.: Induction of endogenous antioxidant system by low dose radiation and its applicable possibility for treatment of active oxygen species related diseases. *Bull Fac Health Sci, Okayama Univ Med Sch*, 11: 1-15, 2000.

Recent trend of research on the nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis

Kiyonori YAMAOKA, Katsumi HANAMOTO, Yasuhiro INA¹⁾, Takahiro KATAOKA²⁾,
Atsusi KAWABE²⁾, Masanobu SANO²⁾ and Ayako UJIFUKU²⁾

Abstract

To elucidate the health effects by low dose radiation, we reviewed the recent trend of research on the epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. The following view were obtained. It has become apparent that chemical and physical agents that induce cancer may do so through different cellular and molecular mechanisms. Investigators, recognizing the apparent differences in the ways compounds participate in the carcinogenesis process, coined the phrases "genotoxic" and "epigenetic" in describing activities of chemicals and physical agents that induced cancer. The term "nongenotoxic" has to some extent replaced "epigenetic" and thus, classification of chemical carcinogens has been frequently delegated to either the genotoxic or nongenotoxic categories. Moreover, while much work remains in the understanding of the modes and mechanisms of action of nongenotoxic carcinogens and the epigenetic effects of these agents, it is apparent that this category of chemicals are functionally different than those compounds which directly interact, mutate, and modify genomic DNA.

Key Words : chemical carcinogenesis, nongenotoxicity, epigenesis, oxidative stress, gap junction

Department of Radiological Technology, Faculty of Health Sciences, Okayama University Medical School

1) Low Dose Radiation Research Center, Central Research Institute of Electric Power Industry

2) Student of Graduate School of Health Sciences, Okayama University