

の用量で飲水投与した。発がん過程早期の遺伝子発現のプロファイリングとその検証実験(real-time RT-PCR と免疫組織学的解析)では、SDM 投与 4 週後に動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、RNase 除去した器具で上皮小体や結合組織など甲状腺周囲組織を除去した後、両側の甲状腺を採取し、遺伝子発現解析用及び形態観察と免疫組織学的解析のためのサンプリングを実施した(昨年度報告)。マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、5 つの代表的な発現増減遺伝子(発現増加: aurora kinase B、cyclin B1、glucagon; 発現減少: bone morphogenic protein-4、vitamin D receptor)について real-time RT-PCR 解析を実施した。方法としては、まず、前述の方法により得た total RNA を 1 μ g ずつ、無処置群、DHPN 単独群については各 4 サンプル、DHPN+1000 ppm SDM 群については 6 サンプル用意し、High-Capacity cDNA Archive kit (ABI)を用いて逆転写反応を実施した。得られた cDNA サンプルを 25 倍希釈したものを 5 μ l 用いて、ABI 社の PRISM7000 により real-time PCR を実施した。各遺伝子特異的な primer、probe と TaqMan Universal PCR Master Mix はいずれも Gene Expression Assay (ABI)によった。発現値のノーマライゼーションコントロールとして、ハウスキーピング遺伝子である hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現量を求めたが、これらの primer、probe については、HPRT は以前実施した別の実験で用いたものを (Toxicol Appl Pharmacol. 208(2):127-136, 2005)、GAPDH については TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (ABI)を用いた。TaqMan Probe Detection system に従った PCR 条件は、50°C、2 min; 95°C、10 min の後、95°C、15 sec \rightarrow 60°C、1 min を 50 サイクルとした。各遺伝子の発現量を、ABI 社の User Bulletin #2 の Standard Curve Method に従って解析し、各遺伝子と 2 種のハウスキ

ーピング遺伝子との相対値を求め、それぞれについて無処置群、DHPN 単独群と DHPN+1000 ppm SDM 群間で比較した。

免疫組織化学的な発現局在の解析が可能な遺伝子産物について、本実験の各群の甲状腺(病変)での発現状況を DAB 発色の ABC 法(Vector; Elite kit)により検討した。検索した遺伝子産物とその抗体は、Aurora kinase B (Rabbit polyclonal antibody、x100 dilution: Abcam Ltd.)、Cyclin B1 (Clone V152、Mouse IgG1、x100 dilution: Lab Vision)、Vitamin D receptor (Mouse IgG2b、x100 dilution: Chemicon International)、BMP4 (Mouse IgG2b、x100 dilution: Chemicon International)とした。抗原抗体反応前の抗原賦活化の処置として、Aurora kinase B についてはオートクレーブ処置を 105°C、1 min、cyclin B1 に関してはオートクレーブを 120°C、10 min、BMP4 に関してはマイクロウェーブ処置を 30 sec 行った。

マイクロダイセクション法による腫瘍性病変などでのマイクロアレイ解析には、サテライトグループとして DHPN+1000 ppm SDM 群の動物を 25 匹準備し、SDM 投与 10 ないし 15 週後に、それぞれ 10 匹、12 匹屠殺し(3 匹途中死亡)、左右の甲状腺について尾側を 4°C、2 時間メタカーン固定(頭側をホルマリン固定)し、パラフィン包埋後、16 μ m 厚の切片を 1 個体(左右)につき 20 枚作製し、マイクロダイセクション用サンプルとした。切片は脱パラフィン後に Cresyl violet stain (Ambion)で染色し、Laser Microdissection System (Leica)を用いて、個体ごとに限局性濾胞上皮過形成(FFCH)+腺腫(10 週サンプル)、非がん部(goiter: 10 週サンプル)、がん(15 週サンプル)に切り分け、採取した。次いで、total RNA 抽出を RNAqueous-Micro (Ambion)にて行い、回収量は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。各画分につき 2 個体分の total RNA を等量(100 ng ずつ)混合して、マイクロアレイ解析用サンプルとした。混合した全量について MessageAmpTM II aRNA kit (Ambion)

を用いて2回増幅した。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、FFCH+腺腫、がん部位で非がん部に比較して有意に2倍以上または0.5倍以下の発現の増減している遺伝子群を選別した。方法としては、GeneSpring ver.7.2 (Silicon Genetics)を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、発現の信頼性を示す flag が比較する非がん部とFFCH+腺腫、あるいはがん部位の10サンプル全てにおいて absent であった遺伝子を除外し、さらに、非がん部に比べ2倍以上、あるいは0.5倍以下の発現がみられる遺伝子についてはFFCH+腺腫、あるいはがんサンプルの5サンプル中4サンプルの flag が present であったものを選択した。次いで、flag で選抜されたFFCH+腺腫、あるいはがん部位の遺伝子について One-way ANOVA による比較を行い、非がん部との間に有意差が認められた遺伝子群を選抜した。

FB 実験 :

動物は、5週齢の雄性 F344 ラット (日本チャールズ・リバー) を用い、一群12匹ずつ計6群に群分けした (Fig. 1)。一週間馴化した後、DEN を投与する全群には DEN を 200 mg/kg、無処置群とFB単独投与群には生理食塩水を相当量単回腹腔内注射した。DEN 投与2週後、FB単独投与群と二段階発がんモデル群には FB を各々3600 ppm (FB単独投与群)、400、1200、3600 ppm (DEN+FB群)の用量で混餌投与した。DEN あるいはFB単独投与群、DEN+FB投与各群は、実験開始3週目に2/3部分肝切除を実施し、無処置群には sham operation を実施した。無処置群とDEN単独投与群には基礎飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母) を自由摂取させた。FB投与6週後に全動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、RNase 除去した器具で肝臓を採取した。肝臓の重量を測定

後、無処置群については内側葉の肝組織を、肝部分切除を施した他の群では切除残余肝組織の一部を遺伝子解析用として RNA later (Ambion)に浸漬させた。DEN を投与した二段階発がんモデル各群で、肝発がんの発指標である glutathione-S-transferase, placental form (GST-P)陽性細胞巢の免疫組織染色用に肝臓の2スライスを、定法に従いホルマリン固定・パラフィン包埋した。GST-Pの免疫染色はMBL社のウサギ抗血清を用いて、ストレプトABC法で行い、DAB発色し、陽性肝細胞の数および面積の定量解析をIPAP (住化テクノサービス)にて行った。遺伝子解析用サンプルは、4°C一晚RNA laterに浸漬した後、-80°Cで保存した。Total RNA抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて行い、回収量はRiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。さらに、RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies)を用いて、回収した total RNA のクオリティーを確認した。各群から4サンプルを用意し、回収した5 μ gの total RNA について BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling kit (Enzo)を用いて1回増幅とラベリングを行った。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、FBによる発がんに寄与しない遺伝子発現を除外するために、DENによるイニシエーション特異的な遺伝子発現プロファイルおよびFB投与のみに起因するプロファイルと比較し、発がん過程に特異的な遺伝子群を同定した。方法としては、GeneSpring ver.7.2 (Silicon Genetics)を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、明らかなFBの発がん用量を投与したDEN+3600 ppm FB群特異的に変化する遺伝子群を、イニシエーション単独あるいは3600 ppm FB単独投与特異的に変化する遺伝子群と区別し、DEN群に比し有意に2倍以上また

は0.5倍以下の発現がみられる遺伝子群を選別した。具体的には、DEN+3600 ppm FB群で変化する遺伝子群のうち、DENあるいはFB群でも同様の発現変化を示す遺伝子群を除外した。次いで、DEN+3600 ppm FB群で有意に発現変化した遺伝子群を検索するために、発現の信頼性を示すflagがDENを投与した全群の16サンプル全てにおいてabsentであった遺伝子を除外し、さらに、DEN+3600 ppm FB群でDEN単独投与に比べ2倍以上、あるいは0.5倍以下の発現がみられる遺伝子については、DEN+3600 ppm FB群の4サンプル中3サンプルのflagがpresentであったものを選択した。次いで、flagで選ばれたDEN+3600 ppm FB群の遺伝子についてOne-way ANOVAによる多群比較を行い、DEN群との間に有意差が認められた遺伝子群を選別した。さらにDEN+400 ppm FB群、DEN+1200 ppm FB群について、DEN+3600 ppm FB群と同様の方法で遺伝子を選別し、DEN+3600 ppm FB群と共通に変化する遺伝子群、または無関係に変動する遺伝子群を選別した。発現がDEN+3600 ppm FB群と共通に変化するもののうち、DEN+400 ppm FB以上の群またはDEN+1200 ppm FB以上の群で有意に変化する遺伝子群を同定した。

マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、代表的な発現増減遺伝子についてABI社のPRISM7900を用いてreal-time RT-PCRを実施した。発現増加したものとして、Serine protease inhibitor, kanzal type 1 (Spink1)、TGF- β making protein large unit (Ltbp1)、Pregnancy-induced growth inhibitor (Ok138)、Axin2の4遺伝子、発現減少したものとしてNuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2)、V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (Mafb)の2遺伝子を選別した。Ltbp1、MafbについてはSYBR Green detection systemにて、50°C、2 min; 95°C、10 minの後、95°C、15 sec→60°C、1 min→95°C、15 sec→60°C、15 sec→95°C、15 secを50サイク

ル行った。Spink1、Ok138、Axin2、Nr0b2についてはTaqMan Probe detection systemを利用して解析を行い、PCR条件はSDMによる甲状腺発がんの実験のものと同じとした。発現値のノーマライゼーションはハウスキーピング遺伝子であるHPRTないしGAPDHの発現値で行った(方法前述)。

遺伝子発現の解析結果も含め統計学的解析は、各群の分散をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不当分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合、その多重比較はDunnettの方法で無処置群またはDEN群とDEN+FB各群の間で有意差検定を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は飲水ないし混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

SDM 実験:

マイクロアレイ解析の結果得られた、5つの代表的な発現増減遺伝子(発現増加: aurora kinase B、cyclin B1、glucagon; 発現減少: bone morphogenic protein-4、vitamin D receptor)についてreal-time RT-PCRにより発現値の検討を行った結果、一部統計学的有意差はつかなかったものの、いずれの転写産物においても概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示した(Fig. 2)。

次に、免疫組織学的な局在解析が可能であった4つの遺伝子産物について、本実験で用いた甲状腺病変でのそれらの陽性所見とその分布状況を検討した。まず、マイクロアレイではSDMによる発がん過程で発現増加を示したaurora kinase Bは濾胞上皮の核及び有糸分裂像に陽性を示し、SDMにより肥大した濾胞上皮に散在性に

陽性を示した他、FFCHの細胞核に陽性像が集中した(Fig. 3、Table 1)。同様にマイクロアレイで発現増加を示した cyclin B1は、細胞質ないし核で陽性を示し、aurora kinase Bと同様に、SDMにより肥大した濾胞上皮に散在性に陽性を示した他、濾胞上皮過形成を構成する細胞の細胞質に集中した陽性像が見出された (Fig. 4、Table 2)。一方、マイクロアレイで発現減少を示した BMP-4 と vitamin D receptor は、いずれも SDMにより肥大した濾胞上皮の細胞核にびまん性の陽性を示し、その陽性の程度は SDM 濃度に比例していた。さらに、FFCHの核にもびまん性に陽性を示し、マイクロアレイ解析結果とは逆の染色態度を示した (Fig. 5、6、Tables 3、4)。

次に、マイクロダイセクション法を利用して、限局性過形成病変+腺腫、がんの特異的な発現変動を示す遺伝子を非がん部との比較で行ったところ、まだ解析途上であるが、発現増加・減少とも複数の遺伝子がそれぞれ、限局性過形成病変+腺腫、がん、及びこれら全てに共通するものとして得られた(Fig. 7、8、Tables 5、6)。

FB 実験 :

実験期間中の体重の変動を Fig. 9 に示した。二段階発がん実験群 (DEN 投与各群) 間では有意差はないものの、FB 投与により体重の低値傾向を認めた。対照群との比較では、DEN 投与により 1、2 週目で体重は低値を示したが DEN+3600 ppm FB 群では 3 週目以降でも継続して有意に低値を示した。また、有意ではないものの、3600 ppm FB 群でも 3 週目より体重の低値傾向を示した。摂餌量は DEN 投与により 1 週目で低下を示したが、3 週から 7 週目まで DEN+3600 ppm FB 群で摂餌量の低値が継続した (Fig. 10)。

実験終了時の最終体重は、二段階発がん実験群では DEN+3600 ppm FB 群で有意な低値を示したが、無処置対照との比較では DEN+400 ppm FB 群以外の二段階発がん実験群で有意に低値を示し、3600 ppm FB 単独投与によっても低値を示した (Table 7)。肝臓重量は、相対重量が DEN

の有無に関わらず、3600 ppm FB 投与により軽度の増加を示した。二段階発がん実験群間では、3600 ppm FB 投与で相対値の増加を認めた。

二段階発がん実験群間での GST-P 陽性細胞巢の形態計測の結果、数、面積とも 400 ppm FB では DEN 単独群と同等で差は認められなかったが、1200 ppm 以上で有意な増加を示し、いずれも用量依存的であった (Table 8)。

肝臓において発現の増減する遺伝子を検討した結果、Venn diagram の結果から、DEN 単独、3600 ppm FB 単独、DEN+3600 ppm FB 群のいずれにおいても変動する遺伝子が多数認められ、その中で DEN+3600 ppm FB 群と共通に変動する遺伝子は DEN 群よりも FB 群で優勢であった (Fig. 11)。DEN+3600 ppm FB 群のみで発現変動した遺伝子のうち、DEN を投与した全群の 16 サンプル全てにおいて absent であった遺伝子を除外した結果、増加遺伝子は 520、減少遺伝子は 252 となり、その中で DEN+3600 ppm FB 群の 3/4 例が presence を示した遺伝子数がそれぞれ 359、114 となった。さらにその中で統計的な有意差を示した遺伝子数はそれぞれ 310、100 であった。FB の用量に依存した発現増加遺伝子は 400 ppm 以上で 5 個、1200 ppm 以上で 10 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は seine protease inhibitor、kazal type 1 (Spink1)、TGF- β masking protein large unit (Ltbp1)、pregnancy-induced growth inhibitor (Okl38)、mini chromosome maintenance deficient 6 (Mcmd6)、alcohol dehydrogenase 1 (Adh1)、Axin 2 の 6 つであった (Table 9)。一方、FB の用量に依存した発現減少遺伝子は 400 ppm 以上で 1 個、1200 ppm 以上で 5 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2)、v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (Mafb)、Secreted frizzled-related protein 4 (Sfrp4) の 3 つであった。

発現の増減した 6 つの代表的遺伝子 (発

現増加 : Okl38、Spink1、Ltbp1、Axin2 ; 発現減少 : Nr0b2、Mafb) について real-time RT-PCR により発現レベルの検証を行った結果、一部統計学的有意差はつかなかつたものの、いずれの転写産物においても概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示した (Fig. 12)。

D. 考察

SDM 実験においては、マイクロアレイ解析の結果選別された5つの代表的な発現増減遺伝子は、概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示し、データは検証されたものと考えられた。

免疫組織学的な局在解析が可能であった4つの遺伝子産物について、本実験で用いた甲状腺病変でのそれらの陽性所見とその分布状況を検討した結果、まずマイクロアレイでSDMによる発がん過程で発現増加を示した aurora kinase B と cyclin B1 の陽性所見はマイクロアレイデータを反映するものと考えられ、特に腫瘍前駆病変である濾胞上皮の過形成に発現が集中してみられたことから、発がん過程早期の標的遺伝子である可能性が示唆された。一方、マイクロアレイで発現減少を示した BMP-4 と vitamin D receptor は、いずれもSDMにより肥大した濾胞上皮の細胞核にびまん性の陽性を示し、FFCHの核にもびまん性に陽性を示す結果となり、マイクロアレイ結果と一致しなかつたことから、これらの分子の機能発現に、転写後の発現制御の関与が考えられた。

次に、マイクロダイセクション法を利用して、それぞれ、FFCH+腺腫、がん病変に特異的な発現変動を示す遺伝子を非がん部との比較で行ったところ、増加・減少遺伝子ともがん病変で変動する遺伝子が多く、FFCH+腺腫とがん病変で共通に発現変化を示す遺伝子も多数認められた。詳細については、現在解析中であるが、今後は、遺伝子の機能解析も含めて、SDMによる腫瘍性増殖形質の獲得とその進展を促進する細胞内経路の特定を中心に解析を進める。

FB 実験においては、肝臓に対する発が

んプロモーション作用は1200 ppm以上で認められ、用量依存性の観点から、発がん過程特異的に発現変動した遺伝子を選別したところ、発現増加遺伝子のうち、機能既知のものは Spink1、Ltbp1、Okl38、Mcmd6、Adh1、Axin 2 の7つであった。Spink1 は膵臓のトリプシノーゼンの過剰な活性化に対して保護的に作用することが知られ、先天性膵炎や、一部の膵がんの標的遺伝子として知られている。Ltbp1 は TGF β シグナリングの下流で細胞増殖抑制に作用することが報告されている。Okl38 は妊娠時の乳腺上皮の増殖制御と分化に機能することが知られ、乳腺発がんへの関与も指摘されている。Mcmd6 は DNA 複製の際の DNA をほどく helicase であり、ヒトのリンパ腫などで生存率を規定する悪性化の指標としての利用が考えられており、他の isoform は悪性甲状腺腫瘍に強く発現することが報告されている。Adh1 は alcohol の代謝酵素で、細胞増殖などの関連での報告はない。Axin2 は β カテニンの分解を促進することで Wnt 経路のシグナリングを抑制することが知られている。一方、発現減少遺伝子のうち、機能既知のものは Nr0b2、Mafb、Sfrp4 で3つのみであった。Nr0b2 は nuclear orphan receptor のひとつで機能は不明な部分が多いが、日本人の肥満に関与することが報告されている。Maf にはいくつかの isoform が存在し、細胞の terminal differentiation に関与するが、細胞の状況に応じて、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子として機能することが考えられている。Sfrp4 は Wnt シグナル経路の抑制制御因子であるが、ヒト慢性リンパ球性白血病で、この遺伝子のメチレーションとサイレンシングが報告されている。以上の検索結果から、FB による肝発がんの早期過程では、細胞増殖に関して、正負、両方向に進行する細胞機能が推定される遺伝子発現プロファイルが得られ、その中には Wnt 経路や TGF β シグナリングを介するものがあつた。このことは、ラット肝中期発がん性試験法のエンドポイントとして設定されている8週目では、増殖活性の高いイ

ニシエートされた細胞は肝臓の一部分を構成するのみで、比較的増殖活性の低い肝細胞が大部分を占めていることに起因するのかもしれない。

以上、SDMによる甲状腺発がん、およびFBによる肝発がん過程の早期に関与すると考えられる遺伝子を複数得ることができ、それぞれの物質による非遺伝毒性発がんメカニズムを解明する端緒を開いた。さらに、SDMによる甲状腺発がんに関して、腺腫、がん特異的な遺伝子発現プロファイルから、腫瘍性増殖形質の獲得に関与すると考えられる遺伝子群を見出し、現在、機能を含めて解析を進めている。

E. 結論

ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、SDMによる発がん過程特異的な発現変動遺伝子のプロファイリング結果を基に、候補遺伝子産物の免疫組織学的検索を行った結果、発がん過程の早期より、細胞回転、細胞分裂に関与する遺伝子産物が前がん病変に集中して発現し、その発がん過程早期の標的遺伝子である可能性が示唆された。また、組織部位特異的な発現解析から、腫瘍性増殖形質の獲得に関与すると考えられる遺伝子群の取り出しに成功し、現在、機能を含めて解析を進めている。FBによる肝発がん過程の早期での遺伝子発現プロファイルを求めたところ、細胞増殖に関して正負、両方向に進行する細胞機能が推定される遺伝子発現プロファイルが得られ、その中にはWnt経路やTGF β シグナリングを介するものが得られた。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 投稿論文

Lee, K-Y., Shibutani, M., Inoue, K., Kuroiwa, K., U.M., Woo., G.H., Hirose, M.: Methacarn fixation - Effects of tissue processing and storage conditions on detection of mRNAs and proteins in paraffin-embedded tissues. *Anal. Biochem.* 351: 36-43, 2006.

2. 学会発表

渋谷淳、井上薫、禹桂炯、禹麻美、黒岩敬子、五十嵐勝秀、広瀬雅雄：Sulfadimethoxineによるラット甲状腺発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第64回日本癌学会学術総会、札幌、9月、2005

井上薫、渋谷淳、禹桂炯、禹麻美、黒岩敬子、菅野純、五十嵐勝秀、広瀬雅雄：Kojic acidによるラット甲状腺発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第64回日本癌学会学術総会、札幌、9月、2005

禹桂炯、渋谷淳、井上薫、禹麻美、黒岩敬子、五十嵐勝秀、富士本仁、広瀬雅雄：Gene expression profiling specific to the tumor promotion process of rat hepatocarcinogenesis induced by fenbendazole、第22回日本毒性病理学会学術集会、鹿児島、1月、2006

渋谷淳、禹桂炯、井上薫、禹麻美、五十嵐勝秀、富士本仁、広瀬雅雄：肝中期発がん性試験法を用いたphenobarbitalによるラット肝発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第22回日本毒性病理学会学術集会、鹿児島、1月、2006

Makoto Shibutani, Kaoru Inoue, Gye-Hyeong Woo, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno, Masao Hirose.: Gene expression profiling specific to the tumor promotion process of rat thyroid carcinogenesis induced by sulfadimethoxine or kojic acid. 45th Annual Meeting of Society of Toxicology, San Diego, California, U.S.A., May, 2006

渋谷淳、井上薫、禹桂炯、富士本仁、禹麻美、五十嵐勝秀、菅野純、広瀬雅雄：甲状腺機能低下に起因する甲状腺発がんプロモーション過程早期に特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第141回日本獣医学会総会、つくば、3月、2006

禹桂炯、渋谷淳、井上薫、禹麻美、五十嵐勝秀、富士本仁、広瀬雅雄：Gene expression profiling specific to the tumor promotion process of rat hepatocarcinogenesis induced by fenbendazole or phenobarbital、第141回日本獣医学会総会、つくば、3月、2006

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

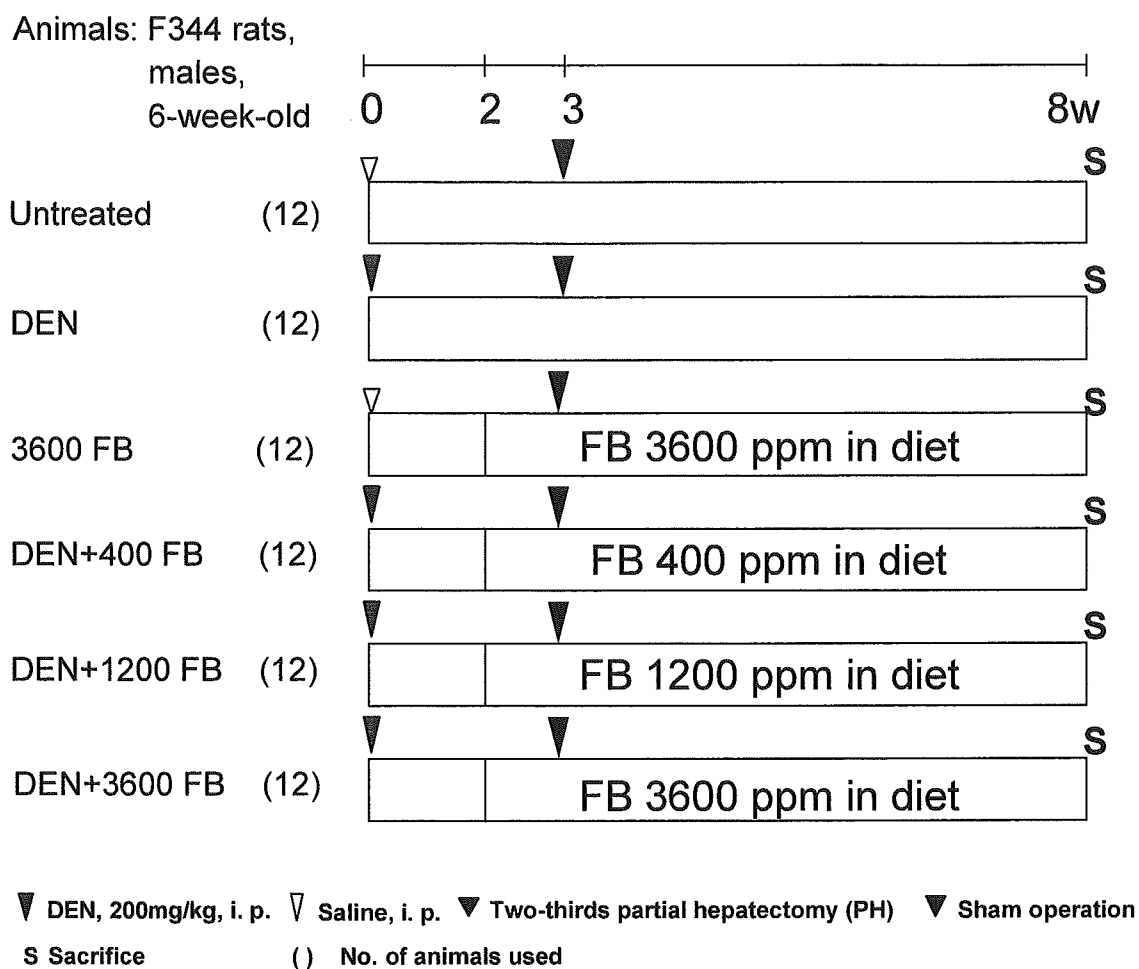


Fig. 1.

Promotion of hepatocarcinogenesis by FB in a medium-term liver bioassay using rats. Experimental design

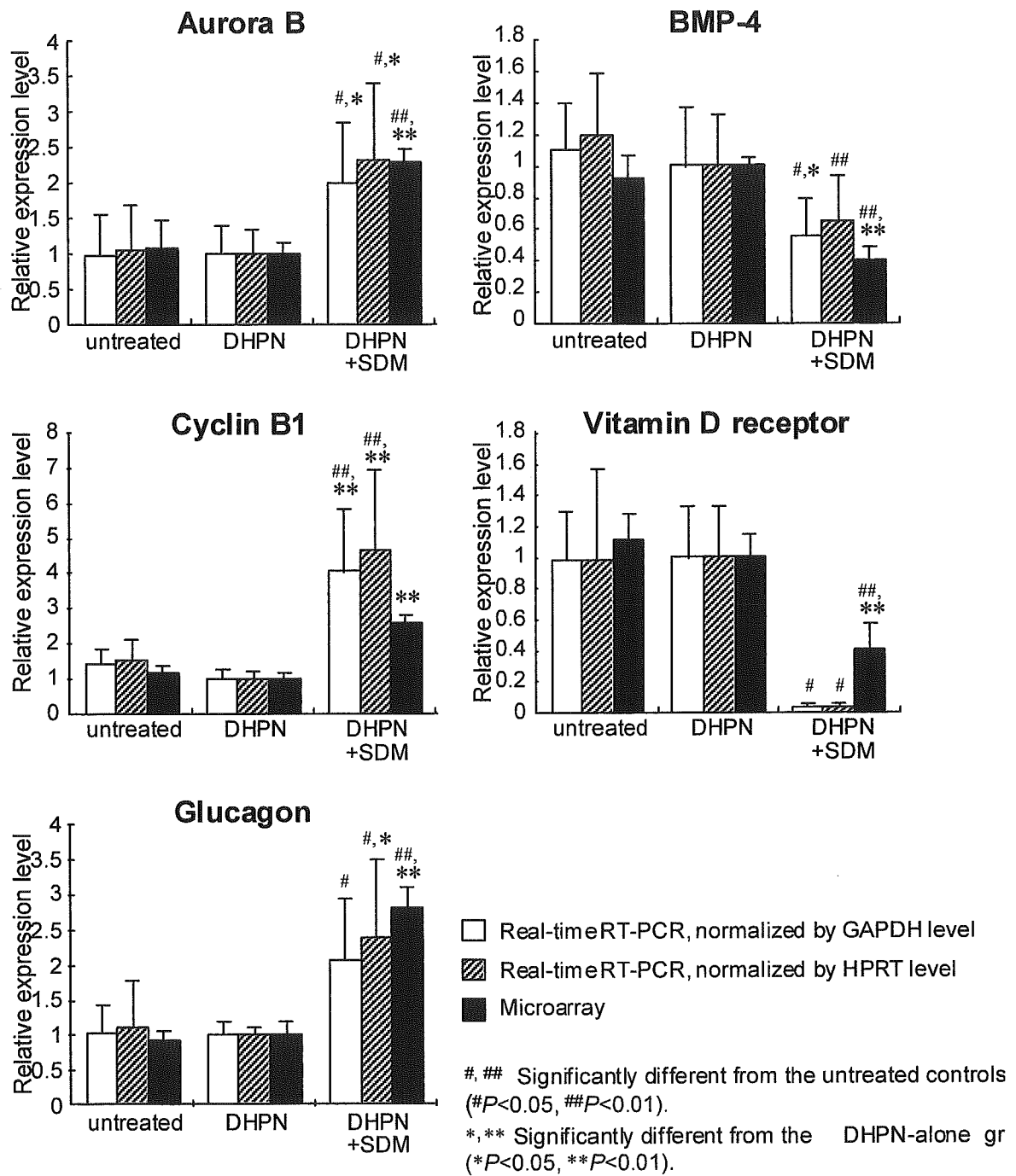


Fig. 2. Validation of microarray data by real-time RT-PCR. SDM study

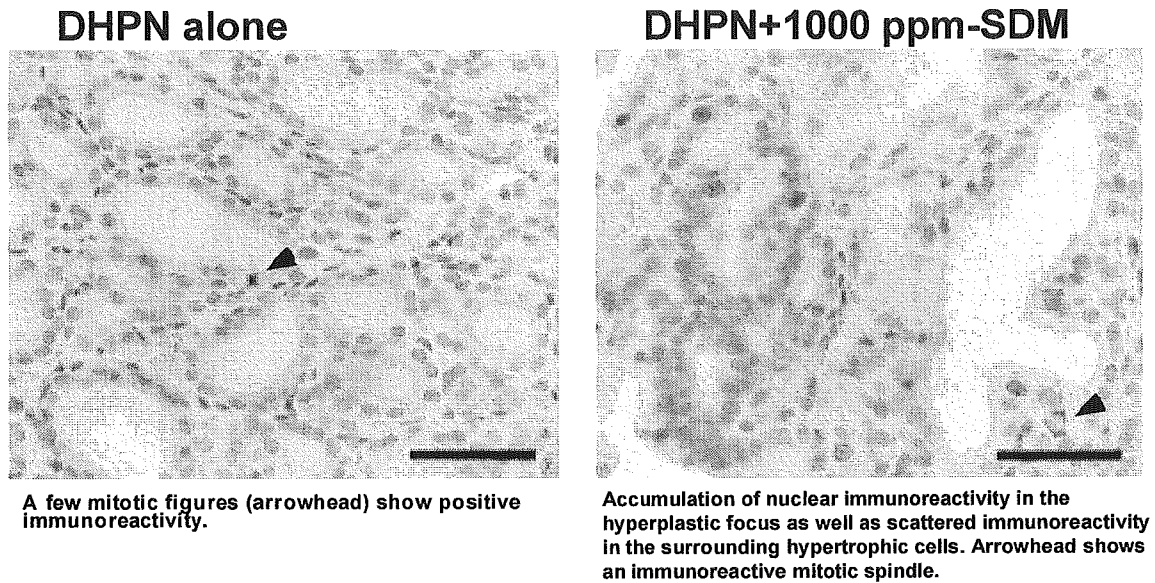


Fig. 3. Immunohistochemical distribution of aurora kinase B-positive cells in the thyroid lesions

Table 1. Incidence and degree of the distribution of aurora kinase B-positive cells in the thyroid lesions

Nuclear staining pattern. Mitotic figures also showed immunoreactivity (Katayama et al., Cancer Metastasis Rev. 2003; 22: 451-464).

Localization/group	Control	DHPN	1000 ppm-SDM	DHPN+SDM (ppm)		
				62.5	250	1000
No. of animals	4	4	8	8	8	8
Follicular cell (±/+/++)	0	0	8(0/8)	1(1/0)	8(2/5/1)	8(0/8/0)
Focal follicular cell hyperplasia (+/++)	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	6 ^a (1/5)	8(0/8)

^a Hyperplastic lesions were found in 6 cases.
I.n.f.: lesion, not found.

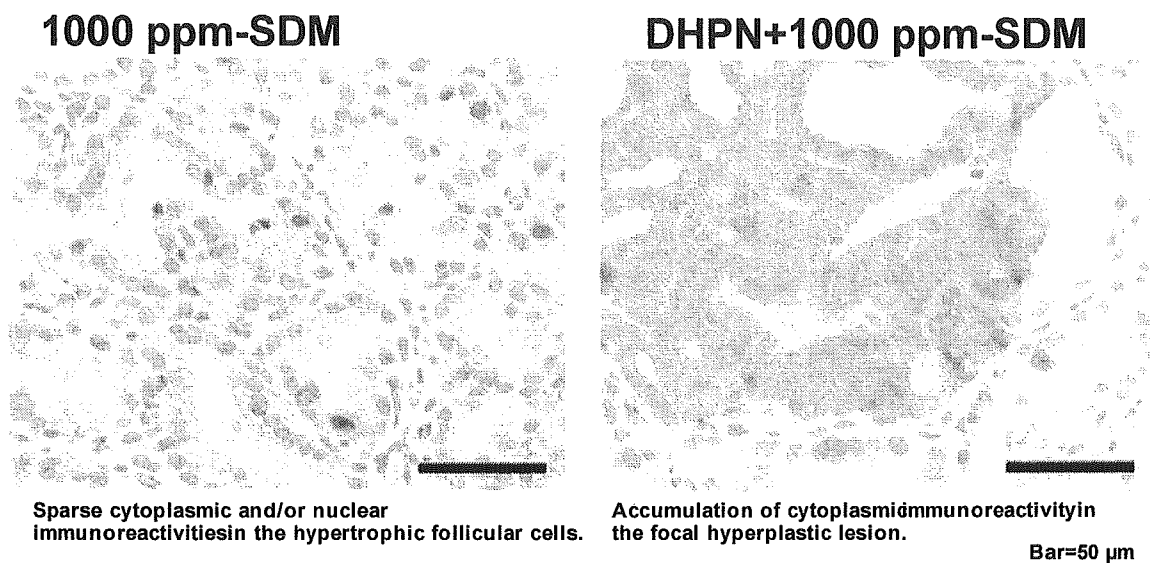


Fig. 4. Immunohistochemical distribution of cyclin B1-positive cells in the thyroid lesions

Table 2. Incidence and degree of the distribution of cyclin B1-positive cells in the thyroid lesions

Nuclear and/or cytoplasmic staining pattern (Kikino et al., 1996; Cytometry 24: 49-54).

Localization/group	Control	DHPN	1000 ppm-SDM	DHPN+SDM (ppm)		
				62.5	250	1000
No. of animals	4	4	8	8	8	8
Follicular cell (±/+)	0	0	8(8/0)	0	8(4/4)	8(3/5)
Focal follicular cell hyperplasia (±/+/++)	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	6 ^a (1/3/2)	8(0/0/8)

^a Hyperplastic lesion was developed in 6 cases.
I.n.f.: lesion, not found.

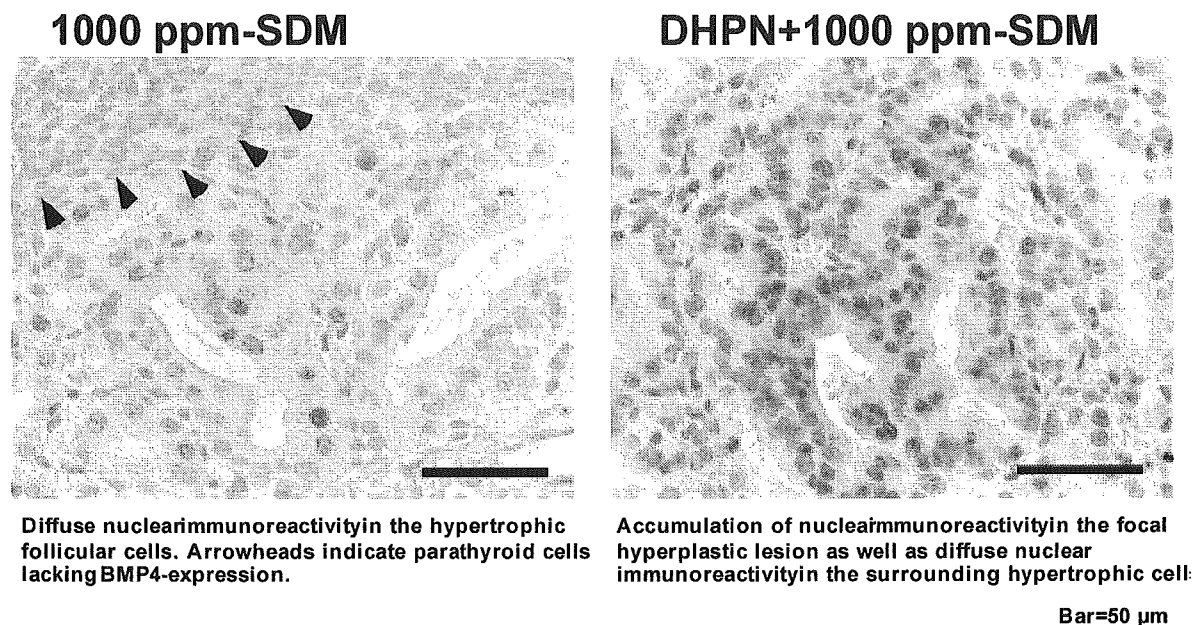


Fig. 5. Immunohistochemical distribution of BMP4-positive cells in the thyroid lesions

Table 3. Incidence and degree of the distribution of BMP4-positive cells in the thyroid lesions

Nuclear staining pattern (Rothhammer et al., Cancer Res. 2005; 65: 448-456).

Localization/group	Control	DHPN	1000 ppm-SDM	DHPN+SDM (ppm)		
				62.5	250	1000
No. of animals	4	4	8	8	8	8
Follicular cell (±/+/++)	0	0	8(0/8)	1(1/0)	8(2/5/1)	8(0/8/0)
Focal follicular cell hyperplasia (+/++)	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	6 ^a (1/5)	8(0/8)

^aHyperplastic lesions were found in 6 cases.

I.n.f.: lesion, not found.

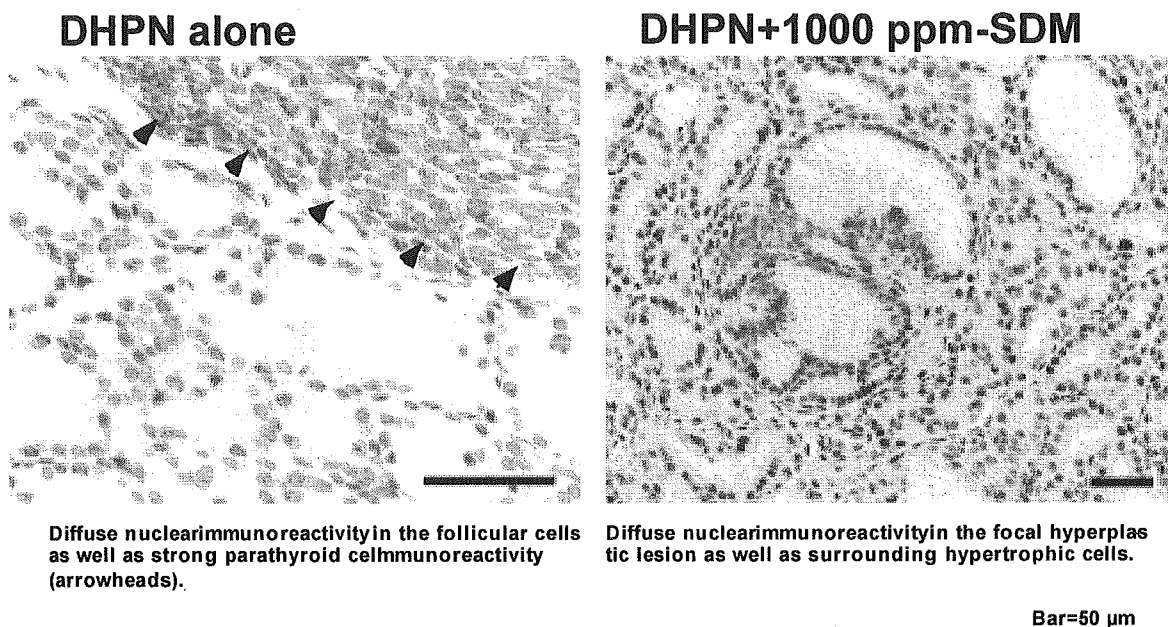


Fig. 6. Immunohistochemical distribution of vitamin D receptor-positive cells in the thyroid lesions

Table 4. Incidence and degree of the distribution of vitamin D receptor-positive cells in the thyroid lesions

Nuclear staining pattern (Berger *et al.*, J Clin Endocrinol Metab. 1988; 67: 607-613).

Localization/group	Control	DHPN	1000 ppm-SDM	DHPN+SDM (ppm)		
				62.5	250	1000
No. of animals	4	4	8	8	8	8
Follicular cell (+/+++)	4(0/4)	4(1/3)	8(0/8)	8(1/7)	8(1/7)	8(0/8)
Focal follicular cell hyperplasia (+/+++)	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	I.n.f.	8 (2/6)	8(0/8)

I.n.f.: lesion, not found.

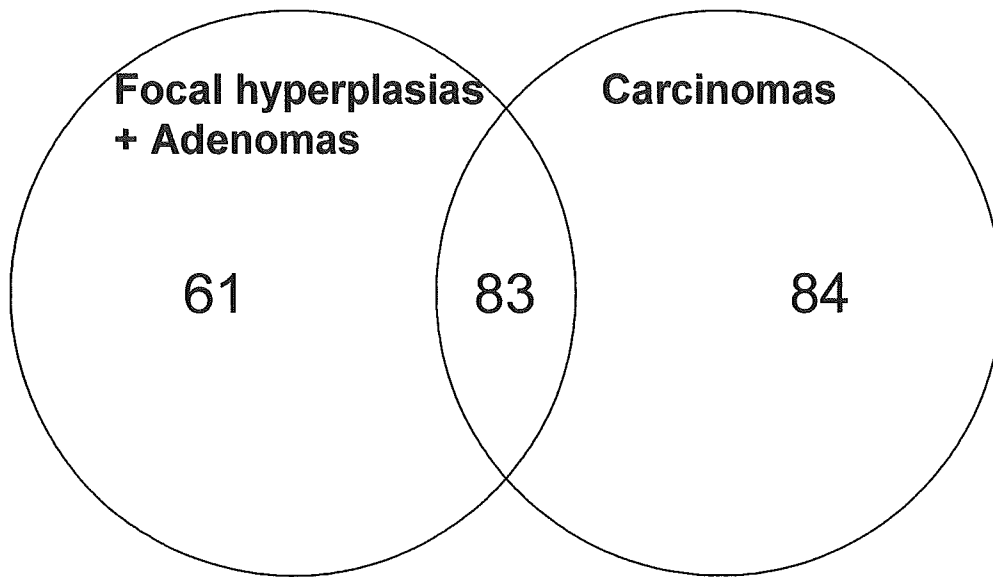


Fig. 7.
Venn diagram of genes showing up-regulation in adenoma and carcinoma developed after SDM treatment (≥ 2 -fold, $p < 0.05$)

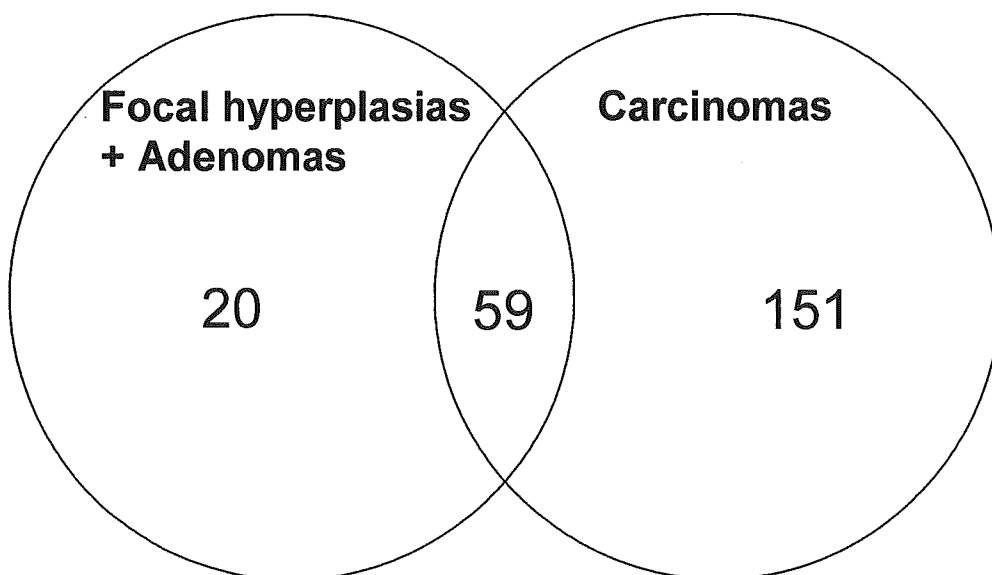


Fig. 8.
Venn diagram of genes showing down-regulation in adenoma and carcinoma developed after SDM treatment (≤ 0.5 -fold, $p < 0.05$)

Table 5. List of genes showing up-regulation commonly to adenomas and carcinomas developed under promotion with SDM

Accession	Gene symbol	Gene title	Fold increase	
			Adenoma	Carcinoma
BF283924	Lamp3_predict	Lysosomal-associated membrane protein 3 (predicted)	16.71	21.58
X14778.1	Sftpb	Surfactant associated protein	11.92	14.47
A1043627		EST	7.63	9.78
AA945643	Chi311	Chitinase 3-like 1	7.4	8.67
BE096731	Noxo1_predict	NADPH oxidase organizer 1 (predicted)	7.14	6.97
NM_031732	Sult1a2	Sulfotransferase family 1A, member 2	7.48	6.87
NM_130741	Lcn2	Lipocalin 2	3.67	4.83
AW917217		EST	2.97	4.78
BI278687	Pltp_predicted	Phospholipid transfer protein (predicted)	4.26	4.67
BF562962		EST	3.63	4.63
A1227829		Similar to cerebellin 1 precursor protein	2.43	4.42
NM_053388	Gjb6	Gap junction membrane channel protein beta 6	3.09	4.38
A1234119		EST	4.31	4.35
L07316.1	Dpep1	Dipeptidase 1 (renal)	3.58	4.28
A1407487		EST	3.82	4.21
NM_012532	Cp	Ceruloplasmin	3.29	4.12
AW523029		EST	4.04	3.85
A1044529		EST	2.7	3.77
AA799832	Foxd4	Forkhead box D4	2.44	3.76
AW522858		Dystrophin-related protein 2 A-form splice variant hypothetical gene supported by	5.25	3.71
NM_022278	Glxr1	Glutaredoxin 1 (thioltransferase)	3.64	3.69
A1555464	Wnt2b	Wingless-type MMTV intergation site family, member 2B	3.31	3.63
NM_012522	Cbs	Cystathionin beta synthase	2.39	3.53
AA925026	Trmpss8	Transmembrane protease, serine 8 (intestinal)	3.09	3.46
A1764437		EST	3.14	3.38
BE097981	Pi4KII	Phosphatidylinositol 4-kinase type2 alpha	2.67	3.3
A1070944		EST	2.73	3.28
U46118.1	Cyp3a13	Cytochrome P450 family 3, subfamily a, polypeptide 13	2.78	3.2
AW528265		Protein kinase C binding protein 1 (predicted)	2.87	3.2
BF400615	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	3.18	3.14
BE113272		EST	2.83	3.08
NM_024352	Mst1	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	2.88	3.06
A1716125	C2	Complement component 2	2.31	3.02
AW521711		RIM binding protein 2	2.24	3
NM_012707	Gcg	Glucagon	3.07	2.96
A1639457	Gch	GTP cyclohydrolase 1	2.22	2.96
BF392753		EST	2.8	2.95
A1712997		EST	2.95	2.88
NM_024157	Cfi	Complement factor 1	3.44	2.86
NM_013080	Ptprz1	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1 hypothetical gene supported by	2.94	2.8
	Igfbp2	Insulin-like growth factor binding protein 2	2.48	2.76
BE112451		Similar to PACRG	2.02	2.75
A1169837	RGLD1305679	Similar to 9530008L14 Rik protein (predicted)	2.21	2.74
AW523444	Capns1	Calpain, small subunit 1	2.76	2.65
BE109305		EST	2.3	2.58
NM_133309	Capn8	Calpain 8	2.04	2.54
AA901341	Slc2a3	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	2.66	2.52
A1070144	Auts2_predicte	Autism susceptibility candidate 2 (predicted)	2.6	2.52
AW142962	Prlr	Prolactin receptor	2.22	2.51
BF409196	Zfp469_predict	Zinc finger protein (predicted)	2.43	2.48
	Cd74	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility class II antigen-associated)	2.35	2.46
BF399385		EST	2.54	2.46
BF394142	C2	Complement component 2	2.71	2.46
AA997873	Gjb3	Gap junction membrane channel protein beta 3	3.53	2.43
A1555805	Adam19	SRY-box containing gene 30 (predicted)	2.22	2.42
BI279526	R11-Db1	R11 class II, locus Db1	2.86	2.41
BF398196		EST	2.16	2.4
A1715202	R11-Bp	R11 class II, locus Bb	2.46	2.39
BF411904		Similar to Eph receptor A4	3.49	2.39
BI279526	R11-Db1	R11 class II, locus Db1	2.45	2.37
A1535104		EST	2.5	2.36
A1576602		Ring-box 1 (predicted)	2.4	2.34
M25143.1	Cyp2d9	Cytochrome P450 family 2, subfamily d, polypeptide 9		
	Cyp2d10	Cytochrome P450 family 2, subfamily d, polypeptide 10	2.07	2.31
A1179953	Gjb2	Gap junction membrane channel protein beta 2	2.25	2.3
BE107556		EST	2.08	2.29
BE102969	Etv4_predicted	Ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF) (predicted)	2.62	2.28
BM389807	Ggta1	Gamma-glutamyltransferase-like activity 1	2.28	2.28
BE102826	Rimbp2	RIM binding protein 2	2.19	2.25
AF245172.1	Gda	Guanine deaminase	2.43	2.25
BE105713		EST	2.36	2.23
BG372184	Slc16a6	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	2.29	2.23
BM386541	Fgl1	fibronogen-like protein 1	2.28	2.22
BF420311		Autism susceptibility candidate 2 (predicted)	2.28	2.22
A1233855	Sftpb	Surfactant associated protein B	2.12	2.21
BI292917		EST	2.15	2.2
BF290699		Similar to claudin-18A1.2	2.91	2.19
AA893688		EST	2.64	2.18
BE119221	Actn1	Actinin, alpha 1	2.13	2.17
BF400869	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	2.41	2.17
BF410275		EST	2.2	2.13
NM_021744	Cd14	CD14 antigen	2.55	2.1
BF561079	Klf5	Kruppel-like factor 5	2.14	2.09
A1549022		Similar to Hypothetical protein MGC57096	2.24	2.02

Table 6. List of genes showing down-regulation commonly to adenomas and carcinomas developed under promotion with SDM

Accession No.	Gene symbol	Gene title	Fold decrease	
			Adenoma	Carcinoma
AA963228		EST	0.20	0.17
NM_053856.1	Scg3	Secretogranin III	0.17	0.18
AW526088		Plasticity related gene 1	0.23	0.18
NM_022407.2	Aldh1a1	Aldehyde dehydrogenase family a, member A1	0.34	0.19
AA818900		Similar to cysteine and tyrosine-rich protein 1	0.48	0.21
NM_053594.1	Ptprr	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	0.38	0.23
NM_017338.1	Calca	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	0.22	0.23
BG673169		EST	0.25	0.23
AA894210		EST	0.33	0.24
BG662710		EST	0.50	0.24
A1454612	Syt4	Synaptotagmin 4	0.24	0.25
NM_012935.1	Cryab	Crystallin, alpha B	0.39	0.26
BM389214		Similar to EF hand domain containing 1	0.50	0.26
NM_019278.1	Resp18	Regulated endocrine-specific protein 18	0.25	0.27
A1176041		Pirn	0.45	0.27
BI294788		EST	0.47	0.28
BF393275		EST	0.40	0.28
NM_022384.1	Ascl1	Achaete-scute complex homolog-like 1 (Drosophila)	0.32	0.29
BE110277	Trmem22_predicted	Transmembrane protein 22 (predicted)	0.40	0.29
NM_021653.1	Dio1	Deiodinase, iodothyronine, type 1	0.35	0.30
NM_022276.1	Gcnt1	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	0.44	0.31
BG377887	Gfra3	Gfra1 cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3	0.39	0.31
BE109132		EST	0.49	0.31
BI279587		EST	0.46	0.31
BG375354		Similar to hypothetical protein FLJ14146 (predicted)	0.45	0.31
A1103913	Pvrl3_predicted	Poliovirus receptor-related 3 (predicted)	0.44	0.31
AA860047		EST	0.30	0.33
NM_012526.1	Chgb	Chromogranin B	0.37	0.34
BI276110	Rai3_predicted	Retinoic acid induced 3 (predicted)	0.48	0.34
NM_053314.1	Kcnj16	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	0.46	0.35
AA963085		Similar to putative pheromone receptor	0.45	0.35
BM385358		EST	0.40	0.35
BE116820		EST	0.38	0.35
AW523490		EST, moderately similar to NP_666195.1 splicing factor, arginine/serine-rich 7 [Mus	0.47	0.35
AW526095		EST	0.45	0.35
AW533083		EST	0.31	0.36
BE328961		EST	0.38	0.36
A1237035		EST	0.44	0.36
AA926037		EST	0.33	0.36
NM_031796.1	Galnt5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase	0.44	0.36
BF386692		EST	0.28	0.37
BF285611		Similar to teratocyte-specific carboxylesterase	0.44	0.37
BE100811	Epb4.414a_predicte	Erythrocyte protein band 4.1-like 4a (predicted)	0.50	0.38
A1603408		Serum deprivation response protein	0.42	0.38
NM_024141.1	Duox2	Dual oxidase 2	0.46	0.40
NM_013219.1	Cadps	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion	0.47	0.41
A1228404	Gsbs	G substrate	0.23	0.41
BG671264	Abca8a_predicted	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8a (predicted)	0.37	0.41
NM_053428.1	Fgfl3	Fibroblast growth factor 13	0.35	0.42
A1232784	Dhrs6_predicted	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 6 (predicted)	0.44	0.43
A1102382		EST	0.40	0.43
NM_017338.1	Calca	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	0.45	0.44
BF420110	Picl2_predicted	Phospholipase C-like 2 (predicted)	0.48	0.44
BG379237		EST	0.46	0.44
U03415.1	Olfm1	Olfactomedin 1	0.31	0.44
A1236229	Cap2	RNA binding motif protein 24 (predicted)	0.47	0.48
AF019973.1	Eno2	Enolase 2, gamma	0.48	0.49
M11597.1	Calca	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	0.37	0.49
AA819250		Similar to Hypothetical protein MGC30714	0.49	0.49

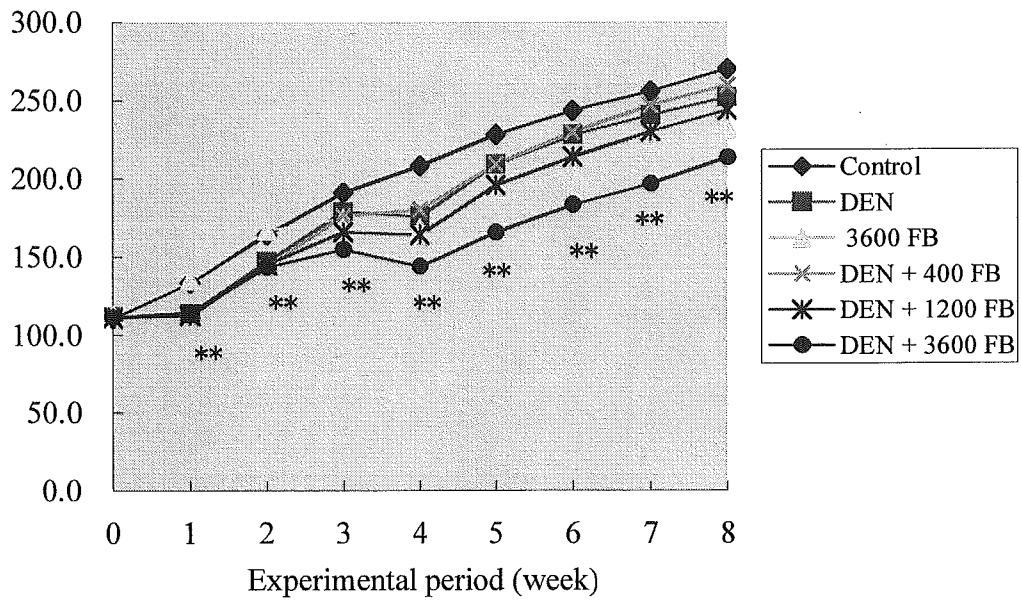


Fig. 9.
Growth curves for animals in the tumor promotion study by FB using medium-term liver bioassay

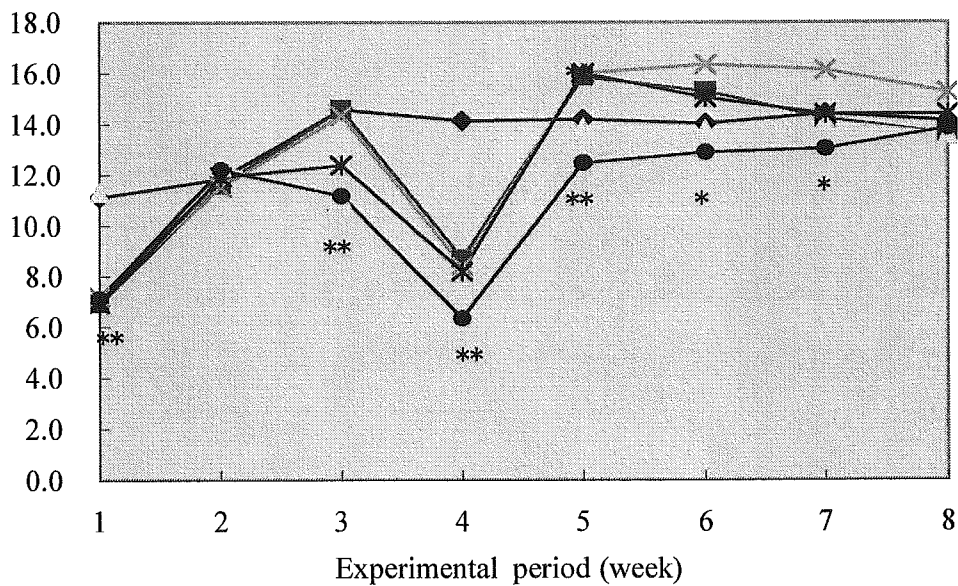


Fig. 10.
Food intakes of animals in the tumor promotion study by FB using medium-term liver bioassay

Table 7. Final body and liver weights of animals after promotion with FB using medium-term liver bioassay

Group	No. of effective animals	BW	Liver weight	
			Absolute (g)	Relative (g/100g BW)
Control	12	267.1±7.4 ^a	8.35±0.47	3.12±0.13
DEN	11	249.0±10.6 ^{**}	7.36±0.59 ^{**}	2.96±0.27
3600 FB	7	230.3±9.8 ^{**,##}	7.70±0.38	3.34±0.10 ^{##}
DEN+400 FB	8	257.2±10.4	8.37±1.14	3.25±0.37
DEN+1200 FB	12	240.4±10.3 ^{**}	7.49±0.49 [*]	3.11±0.14
DEN+3600 FB	12	210.6±17.7 ^{**,##}	7.87±0.68	3.74±0.18 ^{**,##}

^a Mean ± SD.

^{*} p<0.05, ^{**} p<0.01, vs. control.

^{##} p<0.01, vs. DEN group.

Table 8. Quantitative data for glutathione-S-transferase placental form (GST-P)-positive liver cell foci in animals after promotion with FB using medium-term liver bioassay

	DEN	DEN + FB (ppm)		
		400	1200	3600
Number (No./cm ²)	3.85±2.04	3.06±1.67	8.04±3.60 ^{##}	22.09±11.62 ^{##}
Area (mm ² /cm ²)	0.22±0.13	0.21±0.12	0.68±0.44 ^{##}	5.93±4.40 ^{##}

^{##} p<0.01, vs. DEN group.

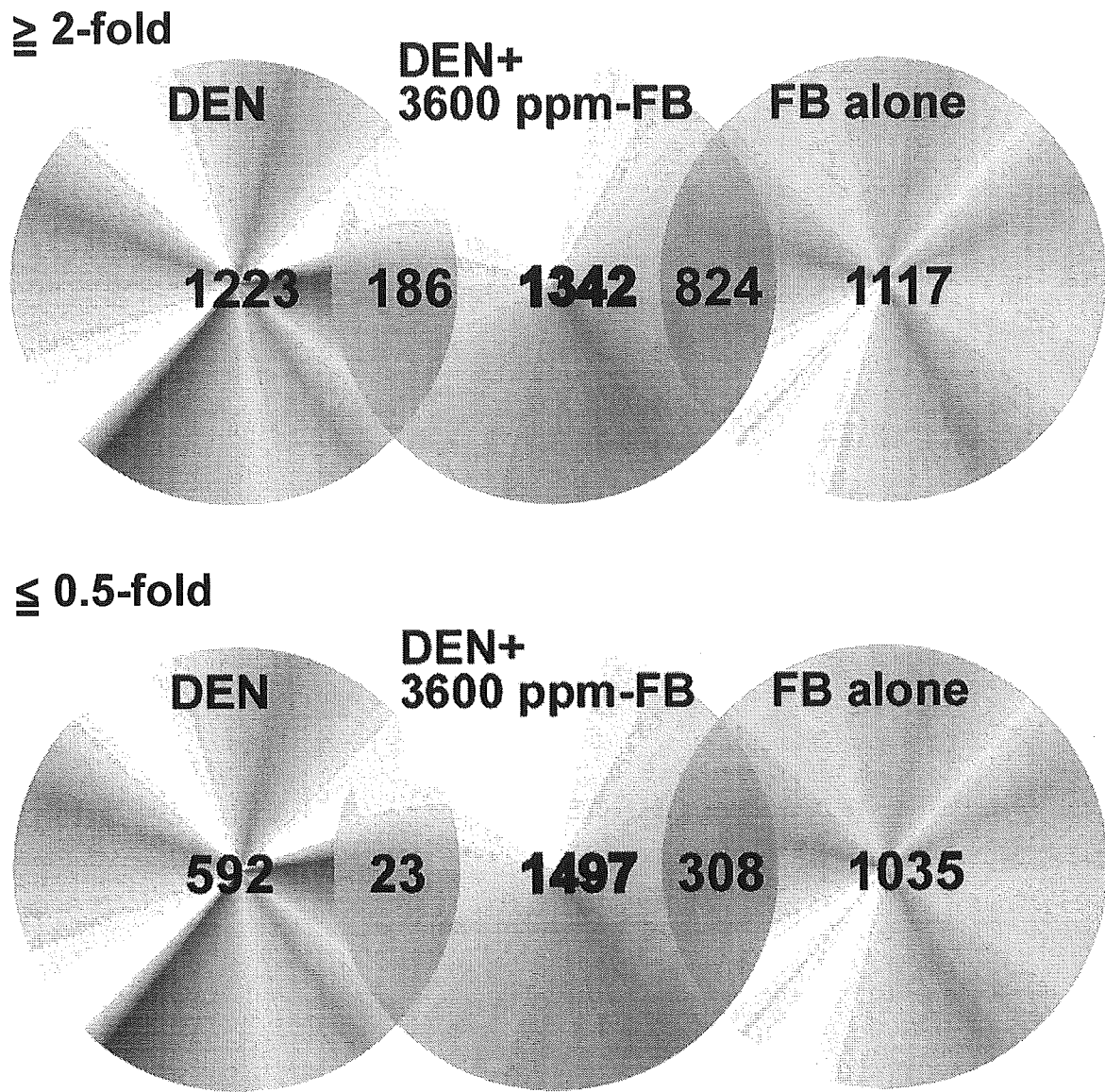


Fig. 11.
Venn diagram of genes showing altered expression in the groups
of DEN-alone, DEN+360 ppm FB, and FB-alone

Table 9. List of genes showing dose-related up-regulation by FB in the two-stage hepatocarcinogenesis model using medium-term liver bioassay (?2-fold, p<0.05).

Accession No.	Gene Symbol	Gene title	DEN+FB (ppm)		
			400	1200	3600
From 400 ppm					
M35300.1	Spink (Pst1)	Seine protease inhibitor, kazal type 1 Pancreatic secretory trypsin inhibitor-like protein)	2.04	2.36	2.85
BM390457	Ltp1	TGF- β masking protein large unit EST: 3 genes	2.37	2.37	3.21
From 1200 ppm					
AY081218.1	Ok138	Pregnancy-induced growth inhibitor	1.17	2.62	3.20
U17565.1	Mcnd6	Mini chromosome maintenance deficient 6	1.22	2.05	2.02
AA817761	Adh1	Alcohol dehydrogenase 1	1.46	2.31	3.65
NM_024355.1	Axin2	Axin 2 EST: 6 genes	1.67	2.02	2.33

Table 10. List of genes showing dose-related down-regulation by FB in the two-stage hepatocarcinogenesis model using medium-term liver bioassay (?2-fold, p<0.05).

Accession No.	Gene Symbol	Gene title	DEN+FB (ppm)		
			400	1200	3600
From 400 ppm					
BI291457		EST	0.50	0.49	0.45
From 1200 ppm					
NM_057133.1	Nr0b2	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	0.62	0.48	0.42
AA900536	Mafb	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	0.51	0.39	0.37
AF220608.1	Sfrp4	Secreted frizzled-related protein 4 EST: 2 genes	0.63	0.42	0.45