

Fig. 3. Gene expressions in the livers of mice treated with DC after DEN initiation. Symbols represent each mouse with tumors (closed circles), altered foci (open circles), and no proliferative lesions (squares). Bars represent the mean of each group. “*” or “**” represent the significant difference from the DEN group at $p < 0.05$ or 0.01 , respectively (t-test).

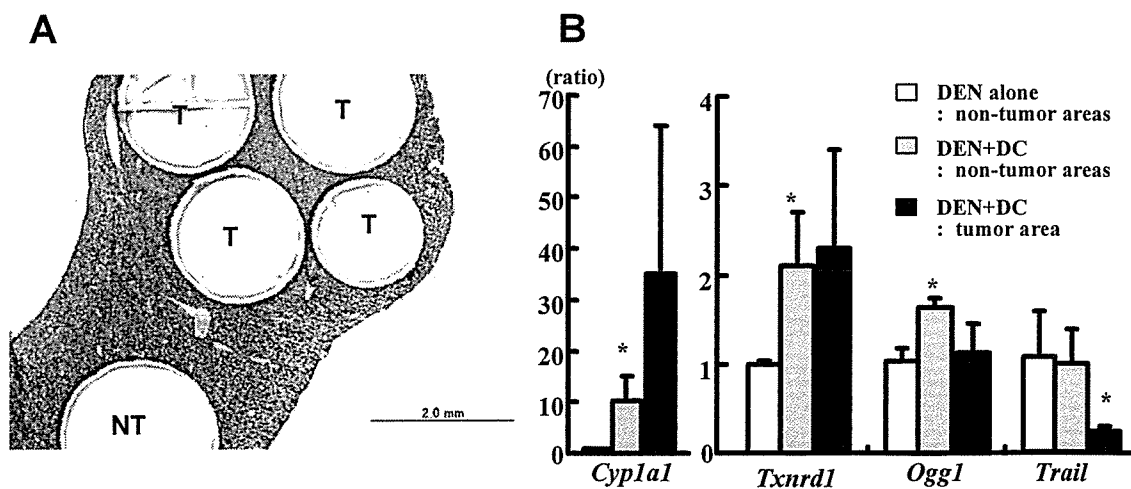


Fig. 4. Gene expressions in the hepatocellular tumor areas of mice treated with DC after DEN initiation. (A) Total RNA was purified from the sections microdissected from the tumor areas (T) and non-tumor areas (NT) in the frozen liver slices of the mice. (B) Gene expressions in each area. The tumor areas (closed columns) and non-tumor areas (dark columns) in the DEN + DC group were collected from the liver of the same mouse. Columns represent the mean \pm SD of the three mice. “*” represents significant difference from the DEN group at $p < 0.05$ (t-test).

畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究

—網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析—

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨

動物用医薬品による発がん性機序を解明する目的で、網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析を行った。最終年度である本年度は、sulfadimethoxine (SDM) によるラット甲状腺発がんにおいて、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を行うため、マイクロダイセクション法を利用した病変部位特異的なマイクロアレイ解析を実施した。その結果、限局性濾胞上皮過形成 (FFCH) + 腺腫、腺がん、FFCH + 腺腫及び腺がんに通ずる発現変動遺伝子を同定し、real-time RT-PCR によるデータ検証も終了した。さらに免疫染色解析の結果、SDM による甲状腺腫瘍の進展過程には、cyclin B1 及び cdc2 の発現増加による増殖活性の増強、Pvrl3 の発現減少による細胞間接着の消失、ceruloplasmin の発現増加による細胞内ホメオスタシス変動の関与が示唆された。また、fenbendazole (FB) による肝発がんについて、ラット肝二段階発がんモデルでのプロモーション過程の早期 (6 週目) での発現プロファイルと、典型的ラット肝発がんプロモーターである phenobarbital (PB) のプロファイルとの共通成分を探索し、免疫組織化学的解析が可能な遺伝子産物の発現局在解析を行った結果、GST-P 陽性肝細胞巢の中に transferrin receptor、Nr0B2、TGF β RI の共発現・発現増強を示すものが見出され、このような前がん病変の多様性が腫瘍への進展過程に関与する可能性が推察された。

協力研究者：高橋美和 国立医薬品食品衛生研究所 病理部研究員

A. 研究目的

国際食糧農業機関 (FAO) と世界保健機構 (WHO) 合同食品規格委員会では、畜産食品中に残留する動物用医薬品 (動物薬) の毒性学的評価に基づく残留基準値 (MRL) の策定が進行中である。我が国においても、この FAO/WHO の勧告を考慮し、輸入食品に含まれるこれらの動物薬についての MRL の設定作業が進められている。その規格設定のための基本となる安全性に関する情報として、それらの毒性上問題となっている毒性・発がん性に関する知見の集積が不可欠である。

現在までのところ、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) において、

発がん性試験では陽性を示したが、遺伝毒性試験では陰性であった動物薬について、非遺伝毒性発がん物質と判定して許容一日摂取量 (ADI) を設定している事例がある。しかし、その発がん機序は必ずしも明確ではないため、消費者への食の安全は完全に担保されているとはみなしがたい。

本分担研究では、動物用医薬品による発がん性機序を解明する目的で、ラット二段階発がんモデルを用いて、sulfadimethoxine (SDM) による甲状腺発がん及び fenbendazole (FB) による肝発がんの発がんプロモーション過程に特異的に変動する遺伝子を同定し、さらに免疫組織化学的解析が可能な遺伝子産物について、その発現局在についても検討を加えた。

鶏コクシジウム症等に用いられるサルファ剤である SDM や、それと同様の構造を有する物質 (sulfamonomethoxine など) は、抗甲状腺作用を示し、その作用は甲状腺ペルオキシダーゼの抑制に起因した甲状腺ホルモンの合成抑制によることが報告されている。また、本剤はラット甲状腺に対し発がん性を示し、ラット甲状腺二段階発がんモデルでは、イニシエーターとして N-bis(2-hydroxypropyl)-nitrosamine (DHPN) を投与した後、本剤の連続投与により、4 週目から甲状腺濾胞上皮細胞の過形成や腺腫が、8 週から腺がんが誘発され、その進展には血清中の高い甲状腺刺激ホルモン (TSH) レベルが重要な役割を果たすが、その進展過程での分子機序はほとんど解明されていない。昨年の本分担研究では、SDM による発がん過程の早期 (4 週) に特異的な発現変動遺伝子のプロファイリングを実施し、さらに候補遺伝子産物の免疫組織学的検索を行った結果、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、SDM による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。今年度は、SDM による腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を行うため、我々が既に確立しているメタカーン固定パラフィン包埋切片を用いたマイクロダイセクション法を利用して、病変部位特異的なマイクロアレイ解析を実施した。さらに、候補遺伝子の mRNA 発現の検証と共に、抗体による局在解析が可能な遺伝子産物については、甲状腺増殖性病変における発現状況を解析し、発がん過程への関与の有無を検討した。

ベンズイミダゾール系駆虫薬である FB は、非遺伝毒性肝発がん物質と評価されているが、本研究課題の主任研究者らの研究によりラット肝臓において

CYP1A2 を誘導し、肝二段階発がんモデルではコネキシン 32 の発現低下を見出されたものの、具体的な発がんメカニズムは不明なままである。

そこで本研究では昨年に引き続き、FB による発がん性機序を探るため、ラット肝二段階発がんモデルを用いて、発がんプロモーション過程の早期 (6 週目) に特異的に発現変動する遺伝子群を同定し、免疫組織化学的解析が可能な遺伝子産物については、その発現局在解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

SDM 実験：

DHPN を 2800 mg/kg 体重の割合で単回皮下注射後、一週後から SDM1000 ppm を飲水投与し、10 ないし 15 週後に甲状腺を摘出して、頭側半分をホルマリン固定、尾側半分をメタカーン固定 (4 °C、2h) にて採取した。メタカーン固定材料について、パラフィン包埋切片を作製し、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)、腺がん (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 づつ) 混合して、非がん部、FFCH + 腺腫、腺がんについてそれぞれ 5 例をマイクロアレイ解析用サンプルとして調製した。混合した全量について MessageAmp™ 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み定量した。遺伝子発現データについては、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、非がん部に比べてFFCH+腺腫、腺がんにおいて、あるいはFFCH+腺腫及び腺がんに共通して2倍以上の増減を示す遺伝子を選出後、発現の信頼性を示すflagが比較する全てのサンプルにおいてpresentである遺伝子を発現変動遺伝子として選択した。さらに統計学的に有意な発現変動を示す遺伝子を同定するために、One-way ANOVAによる比較を行った。

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(発現増加8遺伝子、chitinase 3-like 1 (Chi3l1); ceruloplasmin; solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)、member 3 (Slc2a3); solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)、member 6 (Slc16a6); glucagon; prolactin receptor; phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha (Pi4KII); actinin、alpha 1: 発現減少3遺伝子、poliovirus receptor-related 3 (Pvrl3); retinoic acid induced-3; glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1、core 2 (Gcnt1))について、ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems Japan Ltd.)を使用してreal-time RT-PCR解析を行った。マイクロアレイ解析用に調製したサンプルのうち、MessageAmp™ II aRNA kit を用いて1回増幅したaRNA 100ngを用い、全量 100µlの反応液中で、High-Capacity cDNA Archive kit (ABI) による逆転写反応を実施した。Ceruloplasmin、glucagon、Gcnt1に特異的なprimer及びTaqMan® MGB

probe (6-FAM™-dye-labeled)は、Assay-on-Demand™ Gene Expression Products (Applied Biosystems Japan Ltd.)により提供されているものを使用した。TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Japan Ltd.) 25µl、primer and MGB probe mix 2.5µl及びcDNA 5µlを加え全量 50µlに調製した反応液中で、real-time PCRを行った。その条件は、50°C、2 min; 95°C、10 minの後、95°C、15 sec→60°C、1 minを50サイクルとした。Chi3l1、Slc2a3、Slc16a6、prolactin receptor、Pi4KII、actinin、alpha 1、Pvrl3、retinoic acid induced-3の発現定量については、各遺伝子に特異的なprimerをPrimer Express® software (Version 2.0; Applied Biosystems Japan Ltd.)を用いて作製した。SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems Japan Ltd.) 25µl、primer mix 2µl、cDNA 5µlを加えて全量 50µlに調製した反応液中で、real-time PCRを実施した。その条件は、50°C、2 min; 95°C、10 minの後、95°C、15 sec→60°C、1 minを50サイクル繰り返し、最後に95°C 15 sec; 60°C 1 min; 95°C 15 sec反応させた。各遺伝子の発現量は、非がん部由来のaRNAサンプルを用いて作製した標準曲線より算出した。また、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)の発現量も合わせて求めた。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。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、非がん部と FFCH+腺腫あるいは腺がんの間で比較した。

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は、甲状腺増殖性病変部における発現状況を DAB 発色の ABC 法 (Vector; Elite kit、DAKO; StreptABComplex/HRP Kit) により検討した。SDM 投与 10 及び 15 週で採取したホルマリン固定材料及び同週齢の無処置、DEN 単独投与甲状腺組織について評価を行った。検索した遺伝子産物とその抗体は、ceruloplasmin (Mouse IgG₁、x50 dilution: BD Transductional Laboratories)、cyclin B1 (Clone V152、Mouse IgG₁、x100 dilution: Lab Vision)、cell division cycle 2 homolog A (Cdc2) (Mouse IgG_{2a}、x200 dilution: GeneTex, Inc.)、Pvrl3 (Goat IgG、x100 dilution: R&D Systems, Inc.)、decorin (Goat IgG、x50 dilution: R&D Systems, Inc.)、inhibitor of DNA binding 3 (Id3) (Rabbit polyclonal antibody、x100 dilution: ProteinTeck Group, Inc.)、thyroglobulin (Mouse IgG₁、x250 dilution: Spring Bioscience) とした。抗原抗体反応前の抗原賦活化処置として、cyclin B1、Pvrl3 についてはオートクレーブ処置を 120°C、10 分、ceruloplasmin、Cdc2、Decorin、Id3 についてはオートクレーブ処置を 120°C、20 分を行った。各遺伝子産物の発現強度あるいは分布については、無処置正常甲状腺組織、非がん部、FFCH+腺腫、腺がんについて、400 倍視野で鏡検し、0~3 のスコアをつけて評価した。

FB 実験 :

動物実験及び肝臓サンプルの採取については昨年報告した。無処置群、DEN 単

独投与群、FB 単独投与群、DEN+FB400、1200、3600 ppm 群の 6 群について、各 4 例の肝臓 RNA サンプルを調製し、GeneChipRat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。発現変動遺伝子の解析では、FB による発がんプロモーション過程に特異的に変動する遺伝子群の同定を試みた。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 により行った後、DEN 単独投与群に対して DEN+FB 3600 ppm 群において 2 倍以上の増減を示す遺伝子群のうち、無処置群に対して DEN 単独投与群で 2 倍以上の増減を示す遺伝子群 (イニシエーター単独による遺伝子変動) と、無処置群に対して FB 単独投与群で 2 倍以上の増減を示す遺伝子群 (FB 単独による遺伝子変動) を除外した。次に、残った遺伝子について発現の信頼性を示す flag が、比較する 2 群 (DEN 単独投与群及び DEN+FB3600 ppm 群) のうち高い発現値を示す群において、4 サンプル中 3 サンプル以上で present であった遺伝子を選択した。さらに、DEN+FB400 ppm 群、DEN+FB 1200 ppm 群についても、DEN+FB3600 ppm 群と同様の方法で遺伝子を選択し、DEN+FB400 ppm 以上あるいは DEN+FB1200 ppm 以上の群で DEN+FB3600 ppm 群と共通に変化する遺伝子群を選択した (FB の用量に関連して発現変動した遺伝子)。

別プロジェクトにおいて同様のプロトコールにより phenobarbital (PB) による発がんプロモーション過程に特異的に変動する遺伝子群が同定されており、これと比較することによって、FB と PB に共通して変動する遺伝子群を得た (FB 及び PB で共通の発現変動を示した遺伝子)。

マイクロアレイ法により得られた発現量の検証については昨年既に報告した。

今年度は、得られた遺伝子プロファイルに基づき、免疫組織化学的解析が可能な遺伝子産物について、発現局在の解析を加えた。免疫染色はDAB発色のABC法 (Vector; Elite kit、DAKO; Strept ABCComplex/HPR Kit)により、無処置群、DEN単独投与群、DEN+FB3600 ppm群及び別プロジェクトで実施したDEN+PB500 ppm群について各群 8 例ずつ実施した。検索した遺伝子産物とその抗体は、transferrin receptor (Mouse IgG₁, x200 dilution: Zymed Laboratories)、nuclear receptor subfamily 0、group B、member 2 (Nr0B2) (Rabbit polyclonal antibody, x200 dilution: MBL)、MCM6 (Rabbit IgG, x200 dilution: GeneTex, Inc.)、PCNA (Mouse IgG2a、x100 dilution: DAKO)、TGF β receptor type I (TGF β RI) (Rabbit polyclonal antibody, x100 dilution: Santa Cruz Biotechnology, Inc.)とした。抗原抗体反応前の抗原賦活化の処置として、PCNAについてはオートクレーブ処置を 120°C、10 分、MCM6 及びTGF β RIについてはオートクレーブ処置を 120°C、20 分、transferrin receptor及びNr0B2 についてはマイクロウェーブ処置を 90°C、10 分行った。Transferrin receptorの発現強度及びNr0B2 の発現分布については、200 倍視野で 1 個体につきランダムに 5 ヶ所観察し、0~3 のスコアをつけて評価した。PCNA及びMCM6 については、200 倍視野で 1 個体につき 5 ヶ所 (肝細胞 1000 個以上) 計測し陽性細胞の割合を算出した。TGF β RIについては単位面積当たりの陽性細胞巢の数を求めた。

SDM 実験において、real-time RT-PCR による遺伝子発現値の統計学的解析は、

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。SDM 実験、FB 実験ともに、免疫組織化学的解析結果については、発現強度あるいは分布スコアについて Mann-Whitney U 検定を行って比較した。TGF β RI 陽性細胞巢の数、MCM6 あるいは PCNA 陽性細胞の割合については、等分散が認められなかったため、Welch's t 検定により DEN 単独投与群と比較した。(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：

甲状腺増殖病変に特異的な変動遺伝子として、FFCH+腺がんでは 60 遺伝子 (発現増加 40 遺伝子、発現減少 20 遺伝子)、腺がんでは 211 遺伝子 (発現増加 69 遺伝子、発現減少 142 遺伝子)、FFCH+腺がん及び腺がんに共通して発現変動を示す遺伝子としては 146 遺伝子 (発現増加 93 遺伝子、発現減少 53 遺伝子) が同定された (Fig. 1、Tables 1-3)。得られたプロファイルの概要として、FFCH+腺腫では cyclin 関連遺伝子の発現増加が、腺がんでは G 蛋白関連シグナル分子の発現減少が比較的多く認められた。

マイクロアレイ解析の結果を検証する

ために、代表的な発現増減遺伝子について real-time RT-PCR により発現値の検討を行った結果、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、3)。

次に免疫組織学的な局在解析が可能であった遺伝子産物について、増殖性病変部における発現状況を検討した。

Ceruloplasmin の発現は非がん部では陰性であるのに対して、FFCH+腺腫及び腺がんではコロイドに面する細胞膜が強く陽性を示し、マイクロアレイ解析及び real-time RT-PCR 解析の結果と一致した傾向を示した (Fig. 4)。Cyclin B1 は細胞質ないし核が陽性を示し、マイクロアレイ解析の結果と同様に、腺腫を主体とする増殖性病変部において陽性細胞が集中して観察され、Cdc2 についても同様の結果が得られた (Fig. 5、6)。Pvrl3 は非がん部では細胞膜に発現が認められたが、FFCH+腺腫及び腺がんでは発現減少あるいは消失を示し、マイクロアレイ解析及び real-time RT-PCR 解析の結果と同様の傾向を示した (Fig. 7A)。一方、細胞間に局在する decorin は、マイクロアレイ解析では腺がんにおいて発現減少を示したが、免疫染色では非がん部、FFCH+腺腫及び腺がんのいずれにおいても同程度の発現が観察され、増殖性病変部における発現減少は認められなかった (Fig. 7B)。Id3 は核に陽性を示し、マイクロアレイ解析の結果と同様に、FFCH+腺腫及び腺がんでは発現減少傾向を示した (Fig. 7C)。Thyroglobulin は非がん部、増殖性病変ともに種々の程度に細胞質が陽性を示し、マイクロアレイ解析では腺がんでは発現増加が認められたが、免疫染色では染色強度のばらつきが大きく、腺がんでは発現減少傾向を示した (Fig. 7D)。

FB 実験：

変動遺伝子の選出については Fig. 8 に示す。FB の用量に関連して発現増加した遺伝子は、400 ppm 以上で 4 個、1200 ppm 以上で 9 個認められ、一方、FB の用量に関連して発現減少を示した遺伝子は 400 ppm 以上で 2 個、1200 ppm 以上で 3 個認められた (Table 4)。FB 及び PB で共通の発現変動を示した遺伝子としては、発現増加遺伝子 15 個及び発現減少遺伝子 18 個が同定された (Table 5)。選出された遺伝子群の中には、細胞増殖抑制に関わる遺伝子が比較的多く見出された。これらのプロファイルのうち代表的な遺伝子については、昨年度の報告において real-time RT-PCR による発現レベルの検証を行い、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すことを確認している。

免疫組織学的な局在解析の結果を Fig. 9 に示す。Transferrin receptor はマイクロアレイ解析では FB 及び PB に共通して発現増加が認められたが、免疫染色では肝細胞の細胞質を主体に陽性を示し、無処置群、DEN 単独投与群では肝小葉全体にわたりびまん性に弱く発現しているのに対して、DEN+FB3600ppm 群では全体に染色性が増強した。また、一部の変異肝細胞巣においては、周囲組織と比較して強い発現を認めた (Fig. 9A)。Nr0B2 はマイクロアレイ解析では FB 及び PB に共通して発現減少が認められ、無処置群及び DEN 単独投与群では、ほぼ全ての肝細胞の細胞質が陽性を示したが、DEN+FB3600 ppm 群、DEN+PB500 ppm 群では、発現減少を示す細胞が増加した。一方、変異肝細胞巣に一致して強い発現を示す肝細胞も観察された (Fig. 9B)。PCNA と MCM6 はいずれも増殖細胞の核に陽性を示し、DEN+FB3600 ppm 群において、肝細胞再生部位を主体とし

て陽性細胞が増加した (Fig. 9C)。マイクロアレイ解析では DEN+FB 3600ppm 群において MCM6 の発現増加が認められており、免疫染色の結果と一致した。マイクロアレイ解析において細胞増殖抑制に向かう発現変動が認められたため、細胞増殖抑制に関わる分子の一例として TGF β RI の免疫染色を実施した。その結果、TGF β RI は変異肝細胞巣に一致して細胞質に発現が認められ、TGF β RI 陽性巣の数は、DEN 単独投与群と比較して、DEN+FB 3600 ppm 群で有意に増加した (Fig. 9D、E、Table 6)。連続切片で GST-P の発現と比較した結果、TGF β RI 陽性巣は全て GST-P 陽性を示した。また、GST-P 陽性巣のうち TGF β RI の共発現が認められたものは、DEN 単独投与群では 51%、DEN+FB3600 ppm 群では 80%、DEN+ PB500 ppm 群では 42%であった。

D. 考察

SDM 実験においては、マイクロダイセクション法を利用して甲状腺増殖性病変部位に特異的なマイクロアレイ解析を行った結果、FFCH+腺腫では 60 個、腺がんでは 211 個、FFCH+腺腫および腺がんに共通するものとしては 146 個の発現変動遺伝子が同定され、これらは腫瘍性増殖形質の獲得に関与する候補遺伝子と考えられた。また、選別された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。

免疫組織化学的な局在解析を行った遺伝子産物のうち、ceruloplasmin、cyclin B1、Cdc2、Pvrl3、Id3 については、マイクロアレイや real-time RT-PCR の結果を反映した所見が得られた。一方、decorin、thyroglobulin については、マイクロアレイの結果と一致せず、これらの

遺伝子では転写後での発現制御の関与が推察された。

Cyclin B1 の発現については、昨年の報告において、SDM 投与初期 (4 週) から腫瘍前駆病変である濾胞上皮の過形成に発現増加が観察され、発がん過程早期の標的遺伝子である可能性を見出した。Cyclin B1 は cdc2 と共に M 期促進因子を形成し、細胞周期の G1/S と G2/M の移行に重要な役割を果たす。今回のマイクロアレイ解析では FFCH+腺腫において cyclin B1 及び cdc2 の発現増加が認められ、免疫染色においても増殖性病変に集中して陽性細胞が観察された。FFCH+腺腫では細胞増殖や細胞周期制御に関する遺伝子の発現増加が比較的多く見出されており、腫瘍の進展過程の初期に細胞増殖活性の増強が重要な役割を果たすことが推測された。Pvrl3 は上皮細胞においてカドヘリンを介した細胞接着結合に関与することが知られているが、FFCH+腺腫および腺がんにおいて発現減少あるいは消失が認められた。これまでに、Pvrl3 について腫瘍に関連する報告はないが、同じファミリー分子である Pvrl1/nectin-1 では、発現減少に伴う細胞接着の消失が扁平上皮がんの浸潤に関与することが示唆されている (Guzman et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 2006, 130 (8): 1193-5)。Ceruloplasmin は銅原子を持つ糖蛋白質で、血清中で銅の運搬にあずかるほか、貯蔵鉄の動員、活性酸素のスカベンジャー等の機能を有している。ヒトの消化管や肺腫瘍において血清 ceruloplasmin レベルの上昇が認められているほか、ヒト甲状腺では濾胞状腺がんおよび乳頭状腺がんにおいて ceruloplasmin の発現が報告されている (Kondi-Pafiti et al., Acta. Oncol., 2000, 39(6):753-6)。以上のマイクロアレイ解析

及び発現局在解析の結果より、SDM による甲状腺腫瘍の進展過程には、Cyclin B1 および cdc2 の発現増加による増殖活性の増強、Pvrl3 の発現減少による細胞間接着の消失、ceruloplasmin の発現増加による細胞内ホメオスタシスの変動が関与することが示唆された。

FB 実験においては、発がんプロモーション過程に特異的に変動する遺伝子の選出を試みた。昨年報告した GST-P 陽性巣の形態計測結果から、肝臓に対する FB による発がんプロモーション作用は 1200 ppm 以上で認められており、用量依存性の観点から、FB の用量に関連して発現変動を示す遺伝子として 18 遺伝子(発現増加 13 遺伝子、発現減少 5 遺伝子)を選出した。また、典型的なラット肝発がんプロモーターである PB と比較し選別された 33 遺伝子(発現増加 15 遺伝子、発現減少 18 遺伝子)は、非遺伝毒性発がん物質による肝発がんプロモーション過程に関与する遺伝子群と考えられる。選出された遺伝子群の中に細胞増殖抑制に関わる遺伝子が比較的多く見出されたことは、プロモーション過程の早期では変異肝細胞の割合は少なく、今回得られた遺伝子プロファイルはイニシエートされていない肝細胞を主体とする肝臓全体の変化を反映することに起因すると考えられた。

免疫組織化学的解析の結果、GST-P 陽性細胞巣の中に transferrin receptor、Nr0B2、TGF β RI の共発現を示すものが認められた。GST-P は肝前がん病変の有用なマーカーとして確立されているが、GST-P 陽性肝細胞巣のうち一部のみが腫瘍に進展すると考えられ、最近の報告では GST-P と TGF α の共発現が腫瘍への進展に関与することが示された (Kitano et al., Cancer Sci. 2006, 97(6):478-83)。Transferrin receptor は鉄輸送蛋白質で

ある transferrin に対する受容体で、細胞内への鉄取り込みに関与する。過去に、肝前がん病変では transferrin receptor の発現が増加する一方、鉄の蓄積や代謝に変化を生じていることが示唆されている (Eriksson et al., Carcinogenesis, 1986, 7(9):1467-74)。Nr0B2 は核内オーファン受容体の一種で、肝臓では胆汁酸やコレステロールの代謝に関与するとともに、Cyp7a1 や G6Pase の遺伝子発現を抑制的に制御することが知られている (Kim et al., Mol Endocrinol. 2004, 18(12):2880-94)。今回、変異肝細胞巣に一致して Nr0B2 の強い発現を示す肝細胞が観察されたが、変異肝細胞巣の特性の一つに G6Pase の減少が知られていることから、前がん病変形成に寄与している可能性がある。TGF β は肝細胞に対して増殖抑制作用を示すが、TGF β 受容体の突然変異や発現減少は、TGF β による増殖抑制作用への抵抗性をもたらすことで腫瘍形成に促進的に作用することが報告されている (Reisenbichler et al., Carcinogenesis, 1994, 15(12):2763-7)。今回の検索では、多くの GST-P 陽性肝細胞巣が TGF β RI 陽性を示したが、一部に認められた TGF β RI 陰性肝細胞巣が増殖抑制作用への抵抗性を示して腫瘍へ進展する可能性が推測される。以上の結果より、GST-P 陽性肝細胞巣では transferrin receptor、Nr0B2、TGF β RI の共発現・発現増強を示すものが認められ、このような前がん病変の多様性が腫瘍への進展過程に関与する可能性が推察された。

E. 結論

SDM 実験においては、甲状腺増殖性病変部位に特異的なマイクロアレイ解析の結果、SDM による甲状腺腫瘍の進展過程

には、Cyclin B1 および cdc2 の発現増加による増殖活性の増強、Pvrl3 の発現減少による細胞間接着の消失、ceruloplasmin の発現増加による細胞内ホメオスタシスの変動の関与が示唆された。

FB による肝発がんプロモーション過程早期のプロファイリングの結果、GST-P 陽性肝細胞巢の中に transferrin receptor、Nr0B2、TGF β RI の共発現・発現増強を示すものが見出され、このような前がん病変の形質の多様性が腫瘍への進展過程に関与する可能性が推察された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Shibutani, M., Lee, K-Y., Igarashi, K., Woo, G-H., Inoue, K., Nishimura, T., Hirose, M.: Hypothalamus region-specific global gene expression profiling in early stages of central endocrine disruption in rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. *Dev. Neurobiol.* 67(3): 253-269, 2007.

2. 学会発表

井上 薫、渋谷 淳、禹 桂炯、禹 麻美、富士本 仁、高橋 美和、菅野 純、五十嵐 勝秀、広瀬 雅雄：Kojic acid (KA)によるラット甲状腺発がん過程に特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月

高橋 美和、渋谷 淳、禹 桂炯、井上 薫、禹 麻美、富士本 仁、広瀬 雅雄：Sulfadimethoxine (SDM)によるラット甲状腺発がんプロモーション過程で発生した腫瘍特異的な発現変動遺伝子のプロファイリング、第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月

高橋 美和、渋谷 淳、禹 桂炯、井上 薫、禹 麻美、富士本 仁、広瀬 雅雄：ラット肝発がん促進過程に特異的な遺伝子発現プロファイルの免疫組織化学的検討、第 23 回日本毒性病理学会学術集会、東京、2007 年 1 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

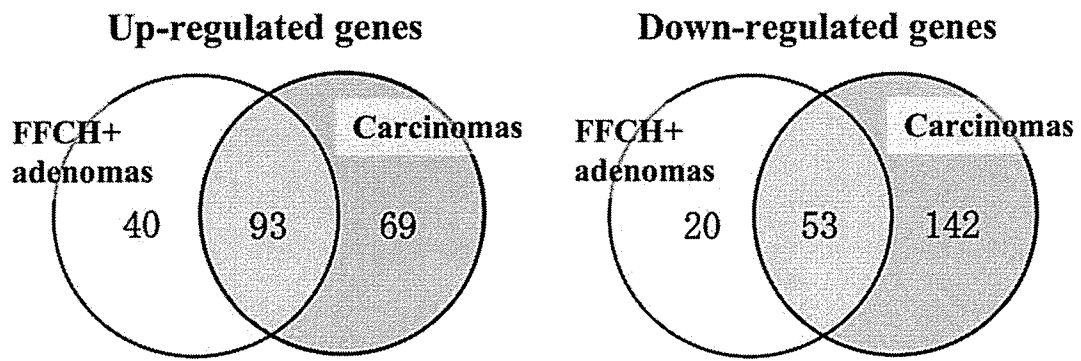


Figure 1. Venn diagram of genes showing up- or down-regulation among the focal follicular cell hyperplasias (FFCHs), adenomas and carcinomas of rats treated with SDM for 10 or 15 weeks after DHPN-initiation (≥ 2 -fold, $p < 0.05$)

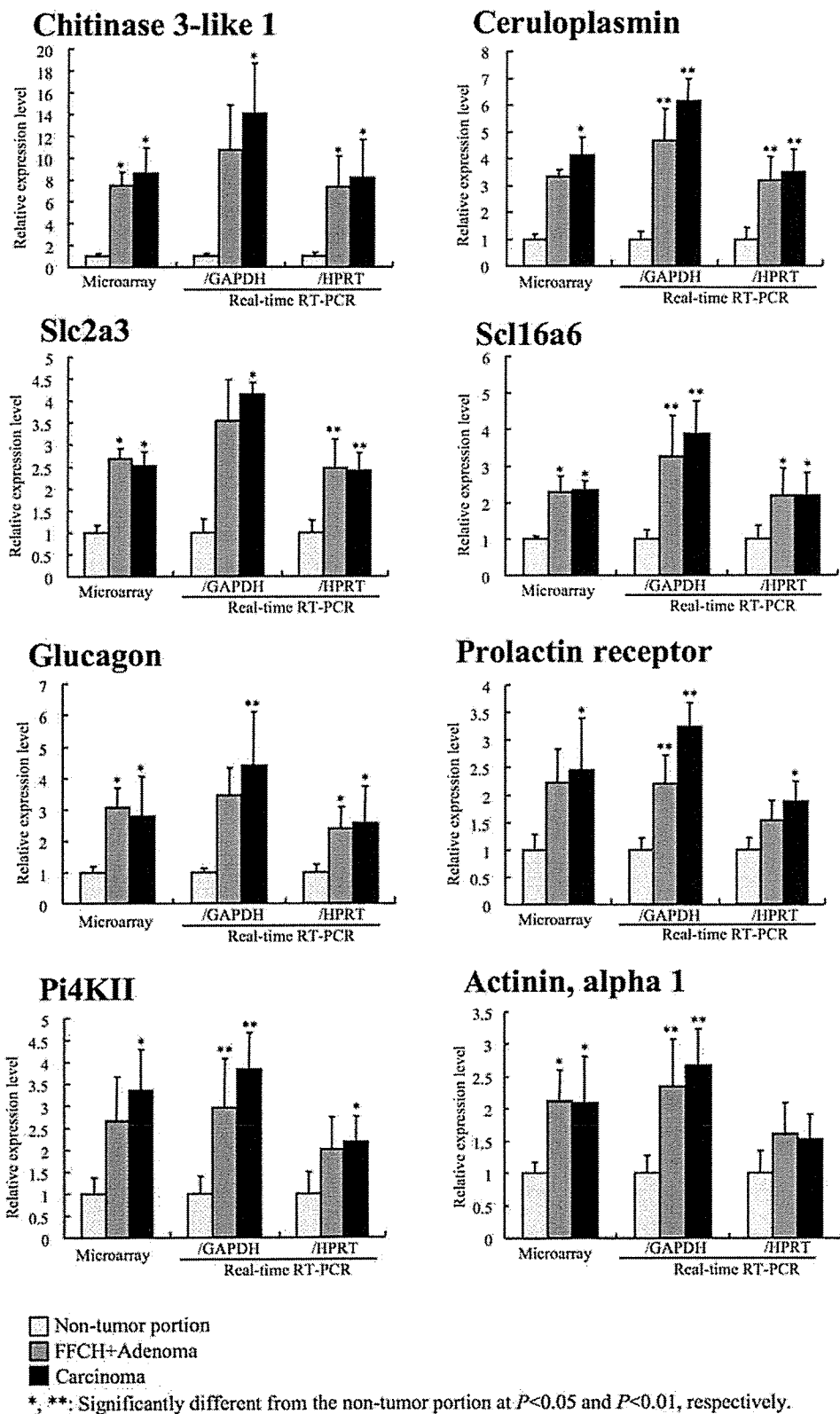


Figure 2. Validation of microarray data of the proliferative lesions by real-time RT-PCR in the SDM study (up-regulated genes).

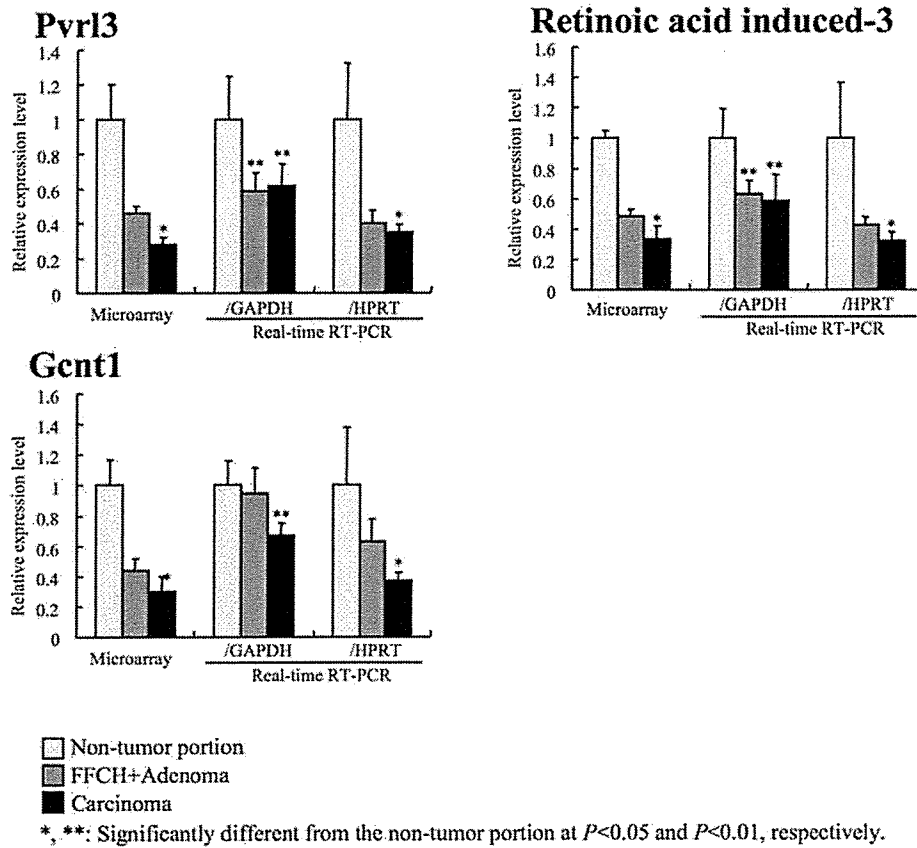


Figure 3. Validation of microarray data of the proliferative lesions by real-time RT-PCR in the SDM study (down-regulated genes).

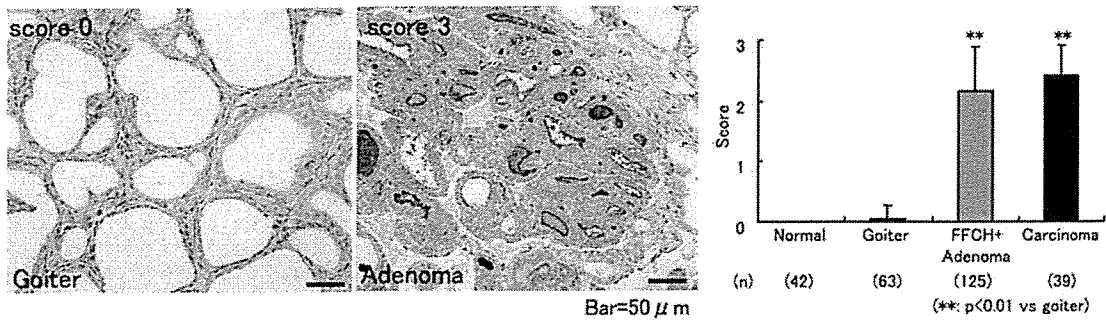


Figure 4. Immunohistochemical distribution of ceruloplasmin-positive cells in the thyroid lesions. SDM study.

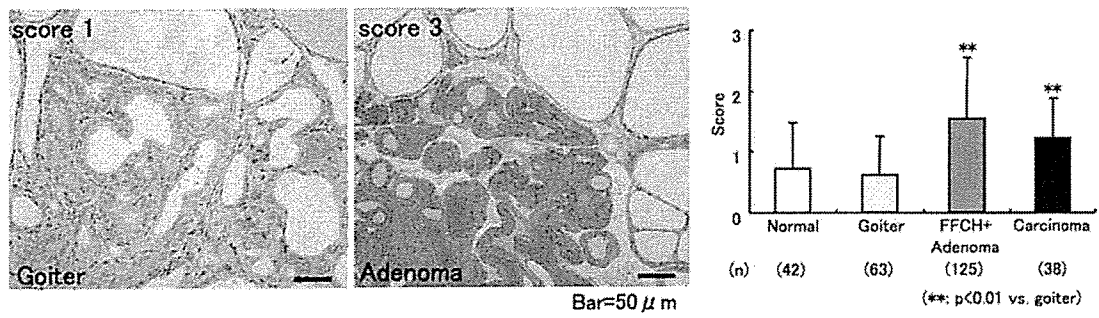


Figure 5. Immunohistochemical distribution of cyclin B1-positive cells in the thyroid lesions. SDM study.

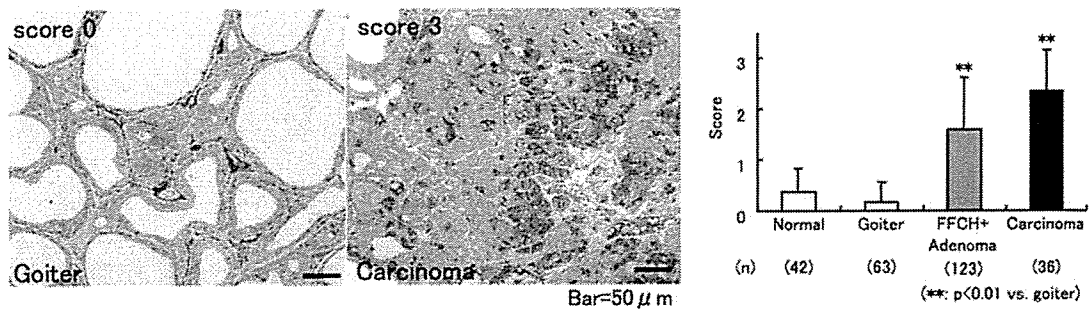
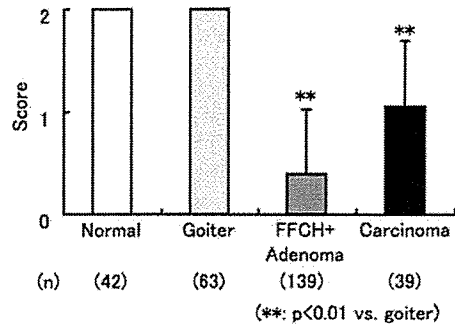
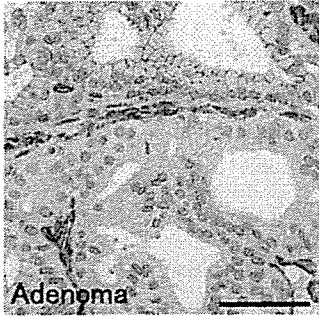
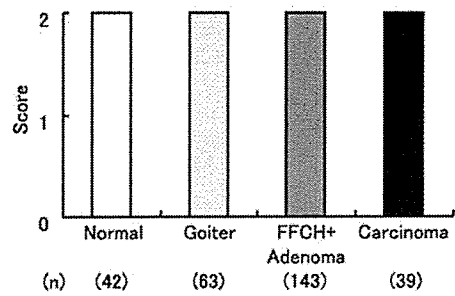
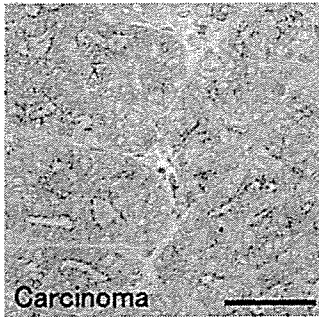


Figure 6. Immunohistochemical distribution of cdc2-positive cells in the thyroid lesions. SDM study.

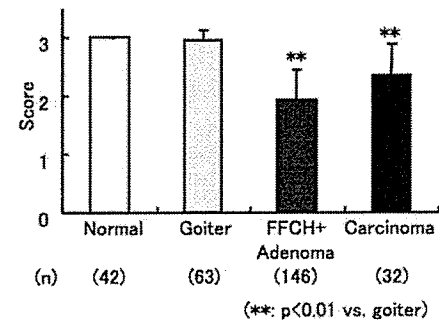
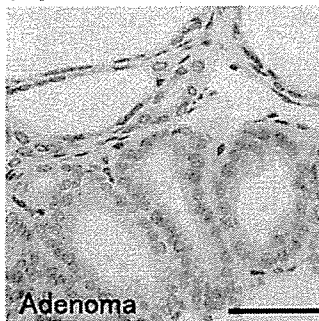
(A) Pvr13



(B) Decorin



(C) Id3



(D) Thyroglobulin

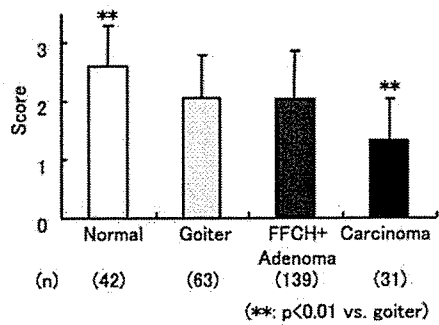
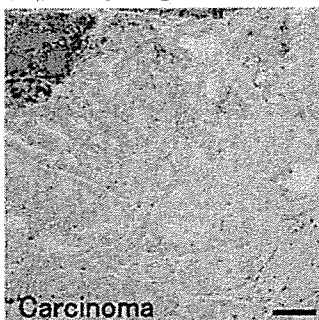


Figure 7. Immunohistochemical distribution of Pvr13-, decorin-, Id3- and thyroglobulin-positive cells in the thyroid lesions. SDM study.

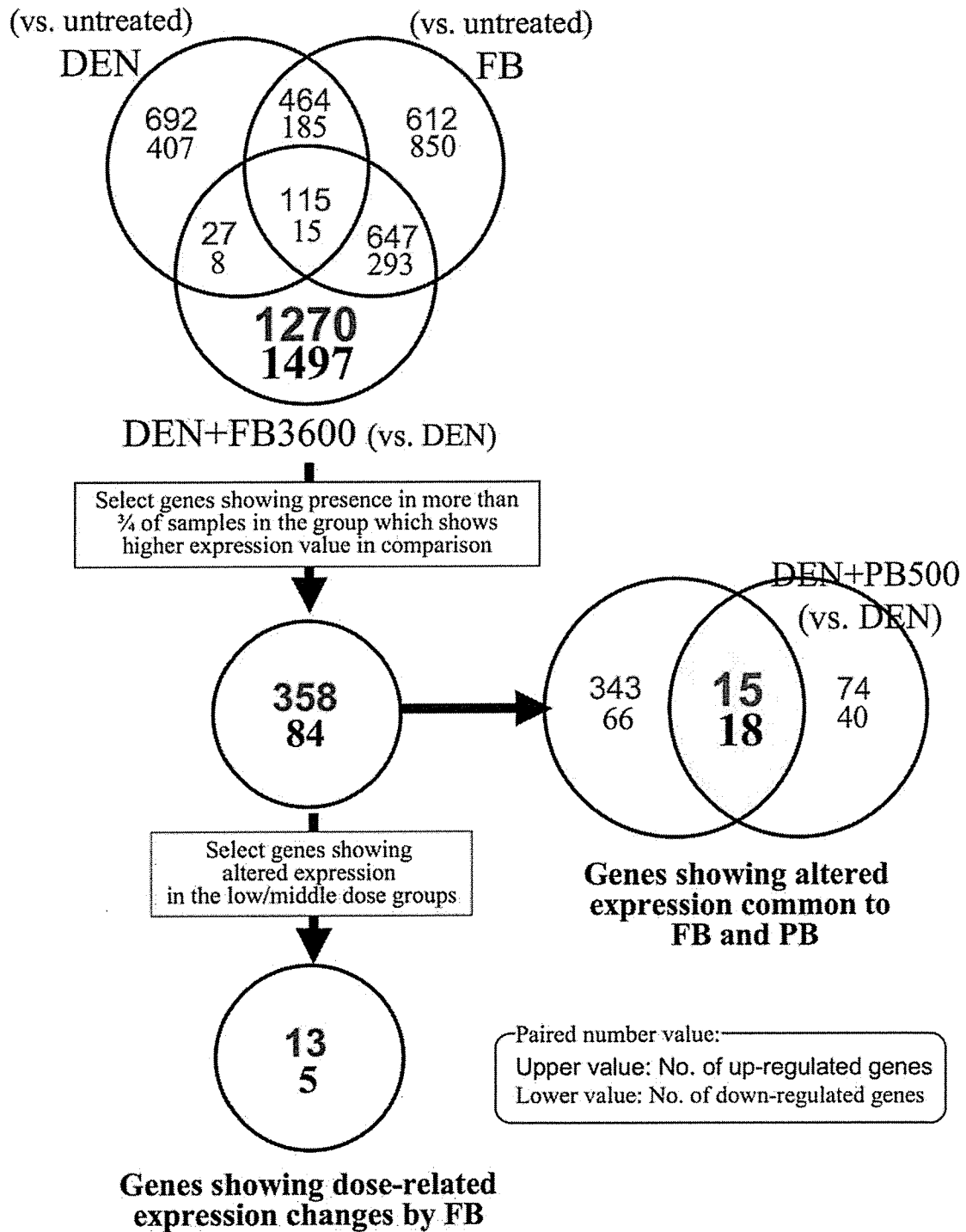


Figure 8. Selection scheme of genes showing dose-related up- or down-regulation by FB and those showing up- or down-regulation common to FB and PB in the two-stage hepatocarcinogenesis model.

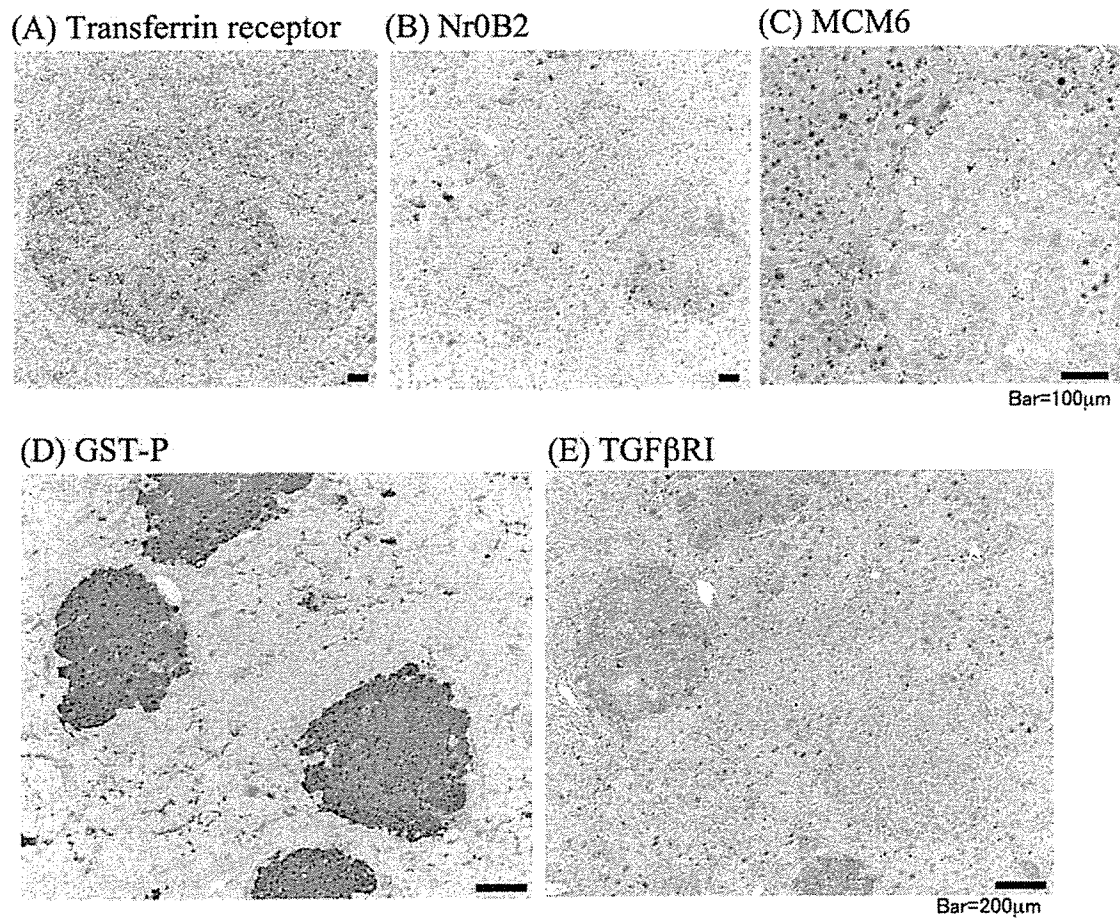


Figure 9. Immunohistochemical distribution of transferrin receptor, Nr0B2, MCM6, GST-P and TGFβRI in the liver treated with DEN+FB 3600 ppm. FB-study.

Table 1-1. List of up-regulated genes only in the focal follicular cell hyperplasias (FFCHs) + adenomas of rats treated with SDM for 10 weeks after DHPN-initiation (≥ 2 -fold: 40 genes).

Accession No.	Gene title	Symbol	FFCH+Adenoma	Carcinoma
BM385282	Lamimin, gamma 2	Lamc2	2.90*	1.25
AI072459	Similar to Eph receptor A4	---	2.78*	1.84
AW531477	Similar to FLJ00022 protein (predicted)	---	2.63*	1.92
NM_012676	Troponin T2, cardiac	Tnnt2	2.54*	1.58
BE098732	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	Uhrf1	2.43*	1.81
NM_053963	Matrix metalloproteinase 12	Mmp12	2.42*	1.06
BF390754	EST	---	2.36*	1.57
BG379338	Ribonucleotide reductase M2	Rrm2	2.31*	1.50
BM389026	Periostin, osteoblast specific factor (predicted)	Postn_predicted	2.28	0.52
BI292028	Guanine deaminase	Gda	2.22*	1.87
AF307302	RT1 class II, locus Ba	RT1-Ba	2.21*	1.88*
AI176034	EST, strongly similar to NP_035737.1 tenascin C [Mus musculus]	---	2.20	0.67
BE113443	Kinesin family member 23 (predicted)	Kif23_predicted	2.20*	1.09
AA893484	Fibronectin 1	Fn1	2.16*	1.40
AA998516	Cyclin A2	Ccna2	2.13*	1.29
BM385445	Topoisomerase (DNA) 2 alpha	Top2a	2.12*	1.37
BF407347	---	---	2.11*	1.69
BE110723	M-phase phosphoprotein 1 (predicted)	Mphosph1_predicted	2.09*	1.35
BG663837	PDZ binding kinase (predicted)	---	2.09*	1.31
BI291927	Similar to T-cell receptor alpha chain	---	2.08*	1.27
BF397554	EST	---	2.06*	1.66
BF391129	Progressive ankylosis homolog (mouse)	Ank	2.05*	1.50
AI103440	EST	---	2.04*	1.92*
NM_019296	Cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	Cdc2a	2.04*	1.45
AI136670	Similar to claudin-18A1.2	RGD:1359696	2.01*	1.56
BF392911	Wingless-related MMTV integration site 5B	RGD:628850	2.01*	1.69
X64589	Cyclin B1	Ccnb1	2.01*	1.40
BF281153	Ns5atp9 protein	RGD:1303041	2.00*	1.52
BF398091	CDNA clone IMAGE:7374368	---	2.00*	1.56
AF177430	Heparin sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	Hs3st1	1.97*	1.55
BE113362	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (predicted)	Cdkn3_predicted	1.97*	1.18
NM_013026	Syndecan 1	Sdc1	1.96*	1.46
AI028874	EST	---	1.95*	1.09
BE106083	Protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like (predicted)	---	1.90*	1.26
(BF401577)	(Protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like (predicted))	(---)	(1.81)*	(1.42)
BF288109	EST, moderately similar to XP_576460.1 PREDICTED: similar to hypothetical protein PB402898.00.0 [Rattus norvegicus]	---	1.90*	1.66
BF281987	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Cxcl11	1.88*	1.41
AI045321	Class II, major histocompatibility complex, transactivator	C2ta	1.85*	1.81*
AI171966	Major histocompatibility complex, class II, DM beta	RGD:735096	1.81*	1.83*
NM_019280	Gap junction membrane channel protein alpha 5	Gja5	1.80	1.59
AW535897	Autism susceptibility candidate 2 (predicted)	---	1.78*	1.58

a: the value is fold-change when the expression level in the non-tumor portions was calculated as 1.

*: $p < 0.05$ vs. non-tumor portions (ANOVA)

Table 1-2. List of down-regulated genes only in the focal follicular cell hyperplasias (FFCHs) + adenomas of rats treated with SDM for 10 weeks after DHPN-initiation (≤ 0.5 -fold: 20 genes).

Accession No.	Gene title	Symbol	FFCH+Adenoma	Carcinoma
NM_016996	Calcium-sensing receptor	Casr	0.33 ^a	0.49
AA996810	EST	---	0.37 [*]	0.39
NM_053573	Olfactomedin 1	Olfm1	0.40 [*]	0.52
AI169140	EST, moderately similar to NP_112520.1 cytochrome P450, family 8, subfamily b, polypeptide 1 [Rattus norvegicus]	---	0.43 [*]	0.55
AI716196	Similar to EG2RVC	LOC501625	0.46 [*]	0.59
BE117767	Immunoglobulin superfamily, member 4A (predicted)	Igsf4a_predicted	0.46 [*]	0.73
BI273954	EST	---	0.46 [*]	0.52 [*]
BI294552	Similar to RIKEN cDNA 2310011J03	MGC94198	0.47 [*]	0.58
AW251317	Transmembrane 4 superfamily member 9	RGD:1303176	0.47 [*]	0.53
AI112395	Similar to hypothetical protein	LOC304280	0.47 [*]	0.47
BE105131	LOC500719	---	0.48 [*]	0.66
AI228548	S100 calcium binding protein A1	S100a1	0.48 [*]	0.55
AI716449	EST	---	0.49 [*]	0.94
BF410297	EST	---	0.49 [*]	0.51 [*]
BE108158	---	---	0.49 [*]	0.53 [*]
AI104913	Tropomodulin 1	Tmod1	0.49 [*]	0.56
AI501394	Peptidylprolyl isomerase B	Ppib	0.49 [*]	0.71
BG666709	N-myc downstream regulated 4	Ndr4	0.50 [*]	0.51 [*]
AI716500	Transcribed locus	---	0.51 [*]	0.54 [*]
BG380826	Similar to downregulated in renal cell carcinoma (predicted)	RGD1306327_predicted	0.51 [*]	0.57

a: the value is fold-change when the expression level in the non-tumor portions was calculated as 1.

*: p<0.05 vs. non-tumor portions (ANOVA)

Table 2-1. List of up-regulated genes only in the follicular carcinomas of rats treated with SDM for 15 weeks after DHPN-initiation (≥ 2 -fold: 69 genes).

Accession No.	Gene title	Symbol	FFCH+Adenoma	Carcinoma
AW435415	EST	---	0.69 ^a	8.83
AI231438	Similar to carnosinase 1	RGD:1359493	1.95	4.43 [*]
BM383531	---	---	1.65	3.44 [*]
AI169367	Similar to RIKEN cDNA 5730469M10 (predicted)	RGD1309676_predicted	1.97	2.83 [*]
BI290053	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase	Idi1	2.00	2.69 [*]
(NM_053539)	(Isopentenyl-diphosphate delta isomerase)	(Idi1)	(1.81)	(2.30) [*]
AI500952	Thyroglobulin	Tg	1.72	2.65 [*]
BI284420	Similar to retinoic acid-responsive protein; STRA6 (predicted)	RGD1307551_predicted	1.36	2.56 [*]
(BI284420)	(Similar to retinoic acid-responsive protein; STRA6 (predicted))	(RGD1307551_predicted)	(1.45)	(2.35) [*]
(AI030451)	(Similar to retinoic acid-responsive protein; STRA6 (predicted))	(RGD1307551_predicted)	(1.29)	(2.16) [*]
NM_080698	Fibromodulin	Fmod	1.66	2.52 [*]
BI289110	EST	---	1.78	2.52 [*]
NM_053591	Dipeptidase 1 (renal)	Dpep1	1.91	2.45 [*]
AF202115	Ceruloplasmin	Cp	1.99	2.45 [*]
BE109256	EST	---	2.15	2.44 [*]
M57668	Prolactin receptor	Prlr	1.78	2.42 [*]
AI111456	Similar to hypothetical protein A830048P05	---	1.88	2.40 [*]
D14480	Calpain 8	Capn8	1.57	2.39 [*]
AI555053	Monooxygenase, DBH-like 1 (predicted)	Moxd1_predicted	1.73	2.35 [*]
BF411331	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 1a (predicted)	Serpinb1a_predicted	2.01	2.34 [*]
AI171987	---	---	1.50	2.33 [*]
AW534837	FK506 binding protein 5 (predicted)	Fkbp5_predicted	1.22	2.32 [*]
BG380122	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 6b (predicted)	Serpinb6b_predicted	1.64	2.29 [*]
BE120894	Ng35 pseudogene	RGD:1302958	1.56	2.28 [*]
BF549971	EST, moderately similar to XP_574280.1 PREDICTED: similar to Ab2-143 [Rattus norvegicus]	---	1.59	2.26 [*]
(BF549971)	(EST, moderately similar to XP_574280.1 PREDICTED: similar to Ab2-143 [Rattus norvegicus])	(---)	(1.54)	(2.24) [*]
NM_012811	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	Mfge8	1.74	2.23 [*]
BE109202	Similar to GTP-binding protein NGB	LOC498786	1.59	2.23 [*]
NM_024368	Fyn-related kinase	Frk	1.90	2.23 [*]
BG379394	EST, weakly similar to NP_060312.1 hypothetical protein FLJ20489 [Homo sapiens]	---	1.75	2.23 [*]
NM_053336	Advanced glycosylation end product-specific receptor	Ager	1.66	2.21 [*]
BF404357	Collagen, type XVIII, alpha 1	Col18a1	1.70	2.21 [*]
(BE108058)	(Collagen, type XVIII, alpha 1)	(Col18a1)	(2.07) [*]	(1.94) [*]
AI410976	---	---	1.26	2.19 [*]
BF289368	Lipopolysaccharide binding protein	Lbp	1.67	2.18 [*]
BM385311	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide	Atp1b2	1.84	2.18 [*]
BF406606	EST	---	1.50	2.17 [*]
NM_017074	CTL target antigen	Cth	1.76	2.15 [*]
BI286077	Similar to LOC284861 protein	LOC499659	1.62	2.14 [*]
AW521201	poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1 (predicted)	Pnlcd1_predicted	1.53	2.13 [*]
BF408444	Similar to RIKEN cDNA E430021N18	---	1.55	2.13 [*]
AW525194	Ceramide kinase (predicted)	Cerk_predicted	1.69	2.12 [*]
NM_019622	Espin	Espn	1.64	2.10 [*]
BE117174	EST	---	1.79 [*]	2.10 [*]
BM390809	Mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/gastric	---	1.85	2.10 [*]
BM390663	Dystrobrevin, beta (predicted)	Dtmb_predicted	1.61	2.09 [*]