

Fig. 2. Increased mRNA expressions of phase I and phase II drug metabolizing enzymes, and Nrf2-regulated molecules confirmed by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR). Each column represents the mean + S.D. of the increased mRNA expression levels in the livers of 5 partially hepatectomized rats given 0% (white column) and 0.05% (black column) of OX after DEN initiation. * ** indicate significant differences from DEN control ($p < 0.05$, 0.01 respectively; Aspin-Welch's t -test).

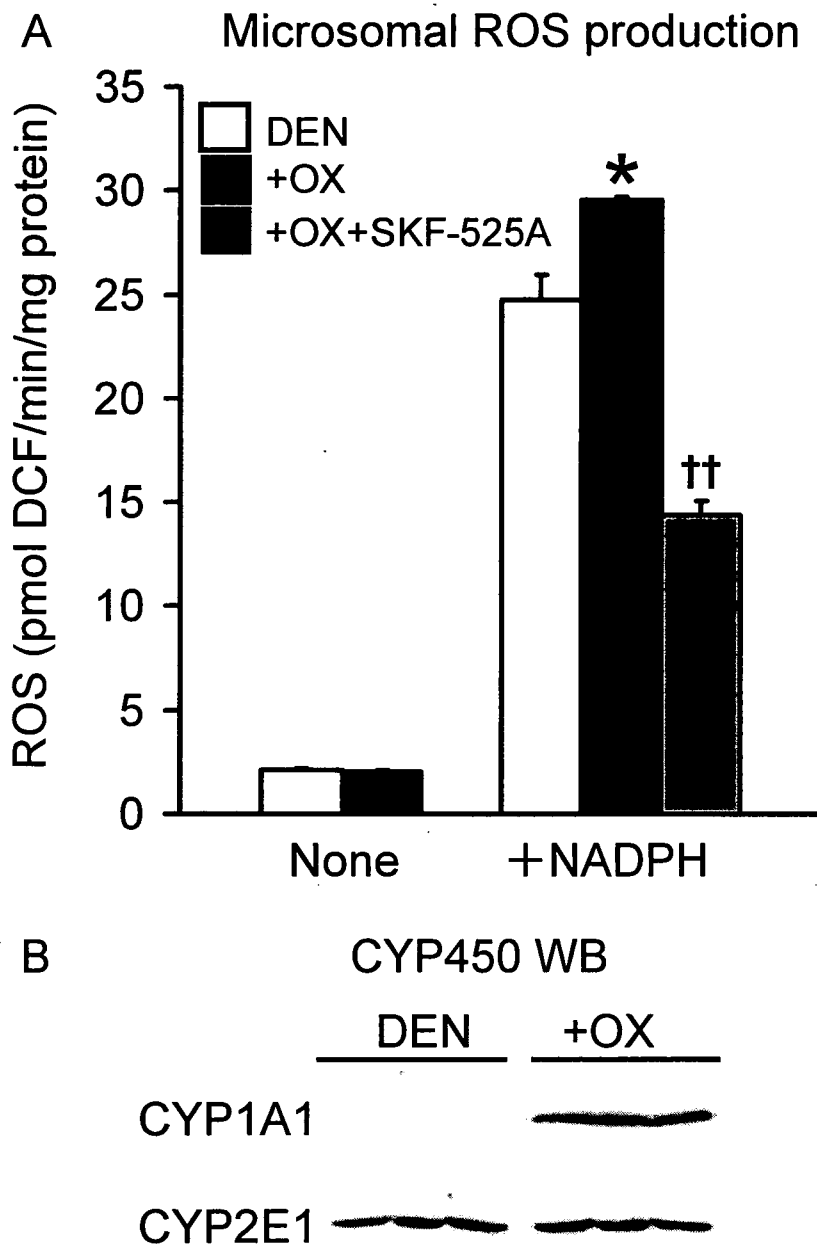


Fig. 3. Enhancement of ROS production and CYP1A1 protein expression in hepatic microsomes isolated from rats given OX.

(A) NADPH-dependent microsomal ROS production was measured by the fluorescent probe H₂DCFDA. Each column represents the mean + S.D. values of ROS production in the isolated microsomes of the livers of partially hepatectomized rats given 0% (white column) and 0.05% of OX (black column) after DEN initiation. The gray column shows the *in vitro* addition of SKF-525A (0.1 mmol/l) significantly suppressed ROS production in microsomes isolated from rats treated with 0.05% OX. * indicates significant differences from DEN control ($p < 0.05$; Aspin-Welch's *t* test). ## indicates significant suppression of ROS production by SKF-525A in rats treated with 0.01% OX ($p < 0.01$; Aspin-Welch's *t* test). (B) Western blot analysis for CYP1A1 and CYP2E1 protein expression for each microsome used in (A).

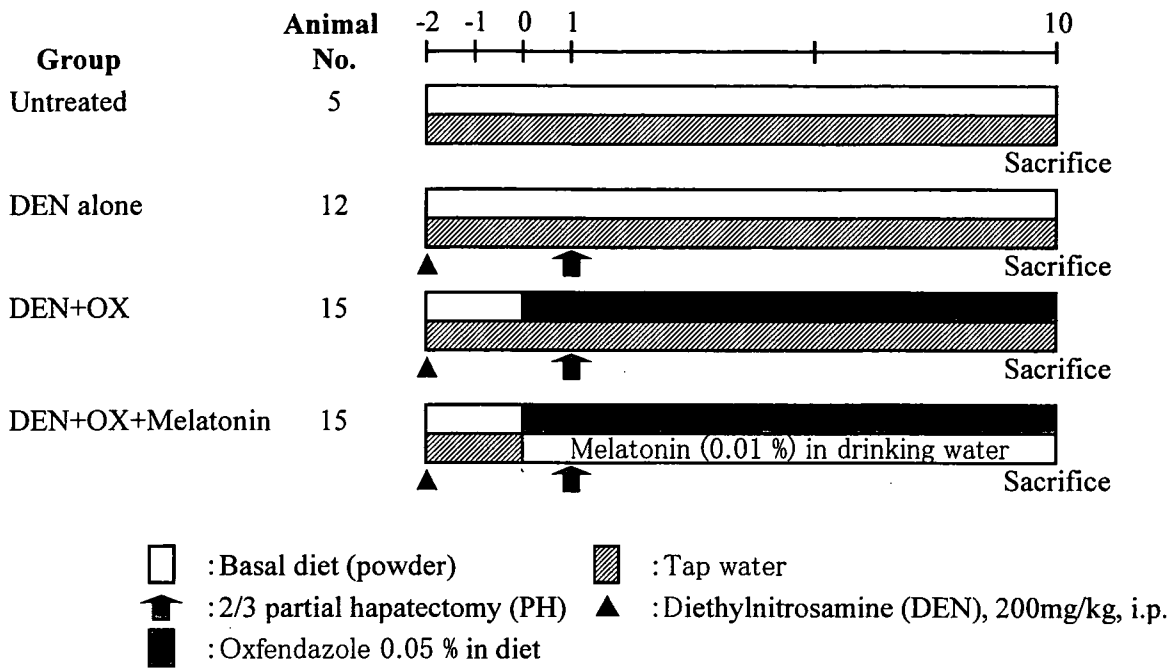


Fig. 4. Experimental design of concurrent administration study of OX and melatonin in a two-stage liver carcinogenesis model for 10 weeks

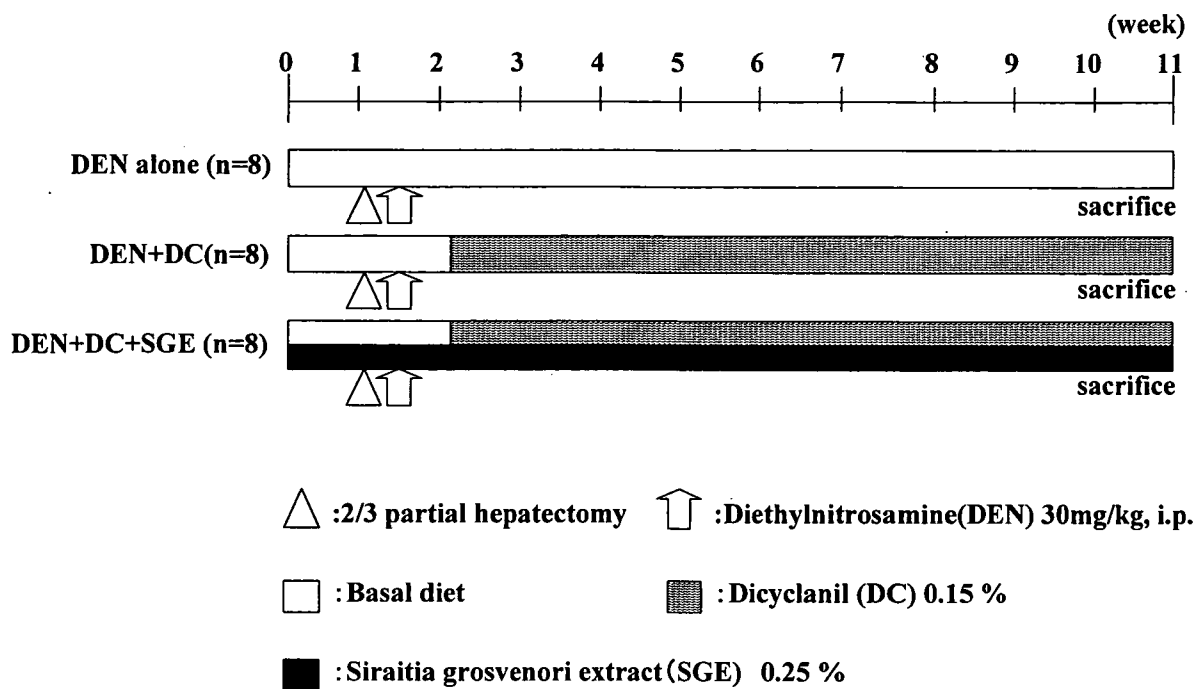


Fig. 5. Experimental design of concurrent administration study of DC and SGE in a two-stage liver carcinogenesis model for 9 weeks (experiment 1)

Table 2. Change in parameter for body weight and liver weight in mice administered DC for 9 weeks after DEN initiation in experiment 1

Group	DEN alone	DEN+DC	DEN+DC+SGE
Body weight(g)	43.4±2.1	41.9±3.6	40.2±2.2
Liver weight(g)	2.15±0.15	2.74±0.46*	2.32±0.37
Relative liver weight(g)	4.98±0.44	6.53±0.36*	5.77±0.57

* ; p<0.05 DEN alone vs DEN+DC (Student's t-test).

Data show mean ±S.D. values.

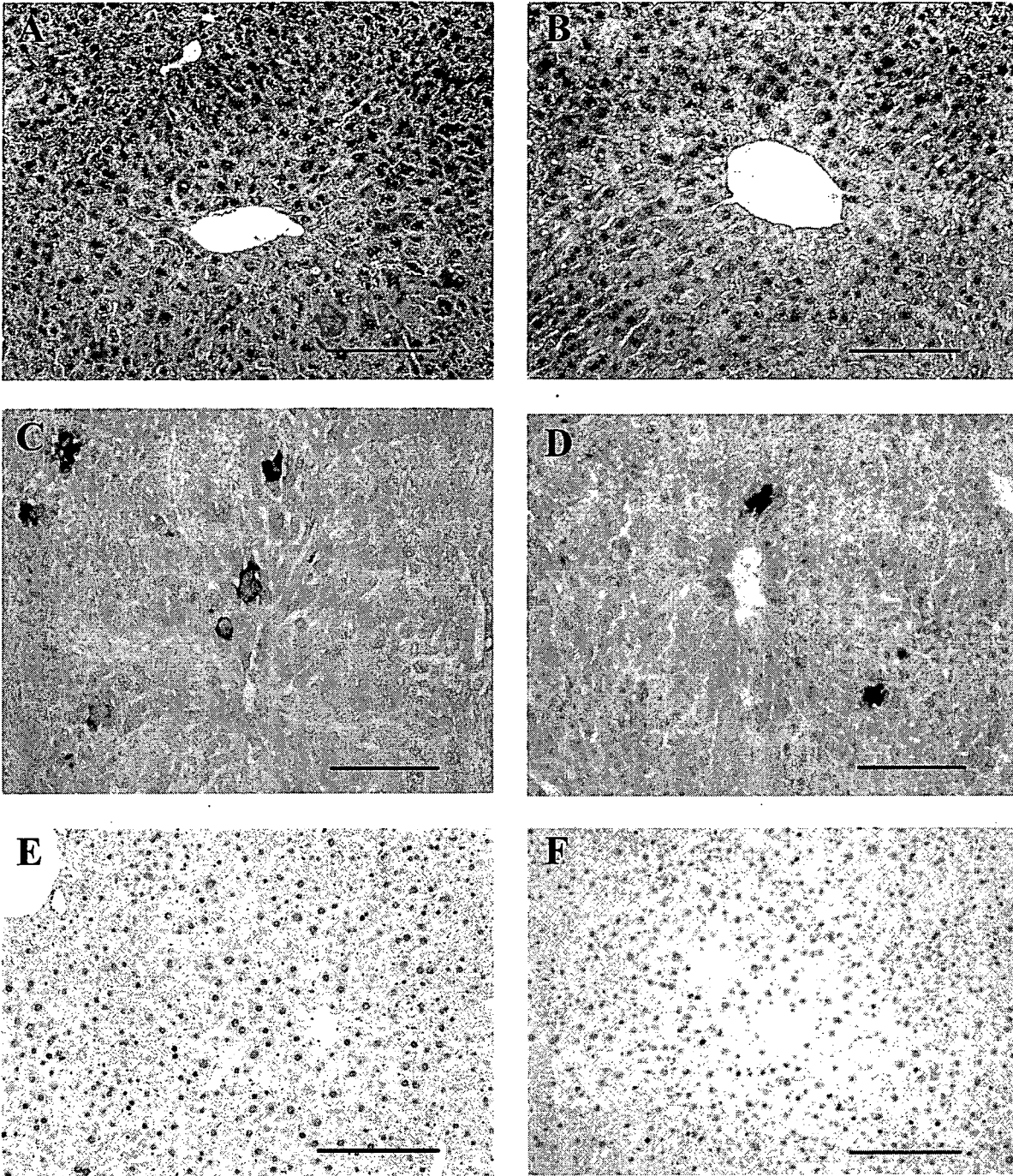


Fig.6. Light microscopic, histochemical and immunohistochemical photographs in the liver of mice administered DC for 9 weeks after DEN initiation in experiment 1. A) DEN+DC, B) DEN+DC+SGE, C) DEN+DC, D) DEN+DC+SGE, E) DEN+DC, F) DEN+DC+SGE. A and B) H-E staining($\times 100$, bar= $200\mu\text{m}$). C and D) GGT histochemistry ($\times 100$, bar= $200\mu\text{m}$). E and F) PCNA immunohistochemistry ($\times 100$, bar= $200\mu\text{m}$).

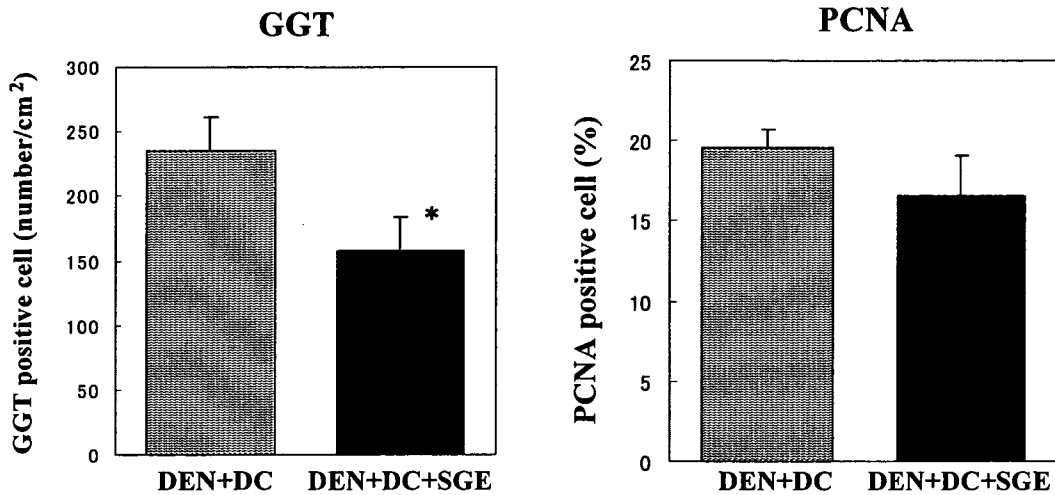


Fig. 7. Number of GGT positive cell and PCNA positive cell in the livers of mice administered DC for 9 weeks after DEN initiation in experiment 1. Columns represent the mean \pm S.D. of 5 mice. *; represent significant differences from the DEN+DC group at $p < 0.05$ (Student's t-test).

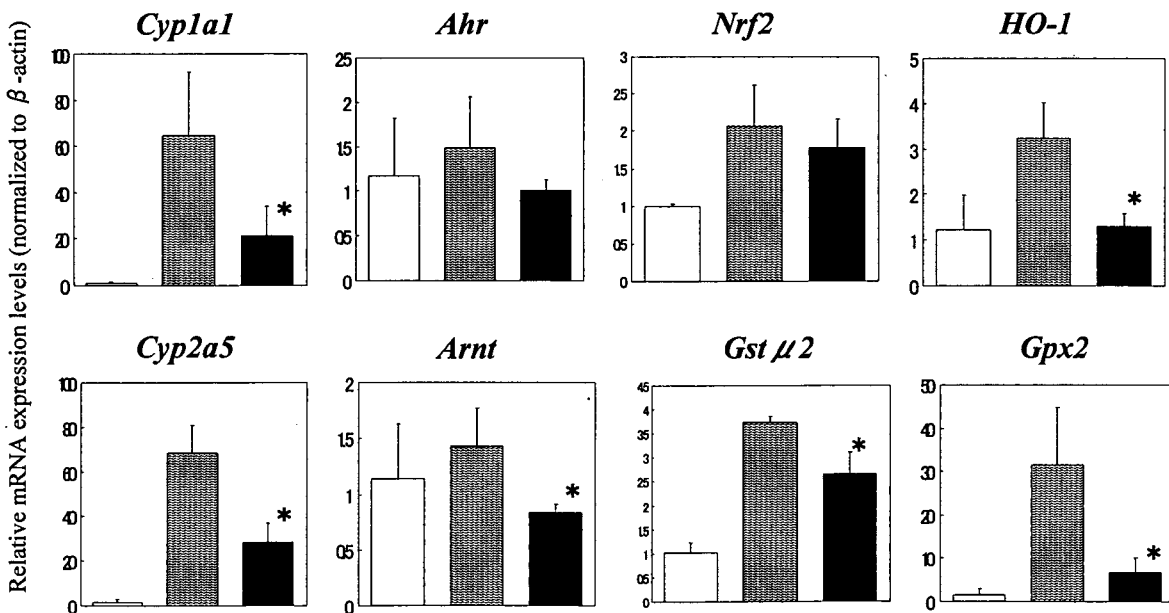




Fig. 8. mRNA expression analysis by real-time RT-PCR of the livers from mice in DEN alone group (open column), DEN+DC group ( column), DEN+DC+SGE group ( column) in experiment 1. Individual gene expression levels were normalized using beta actin. Bars represent the the mean \pm S.D. of 4 mice. *; represent significant differences from the DEN+DC group at $p < 0.05$ (Student's t-test).

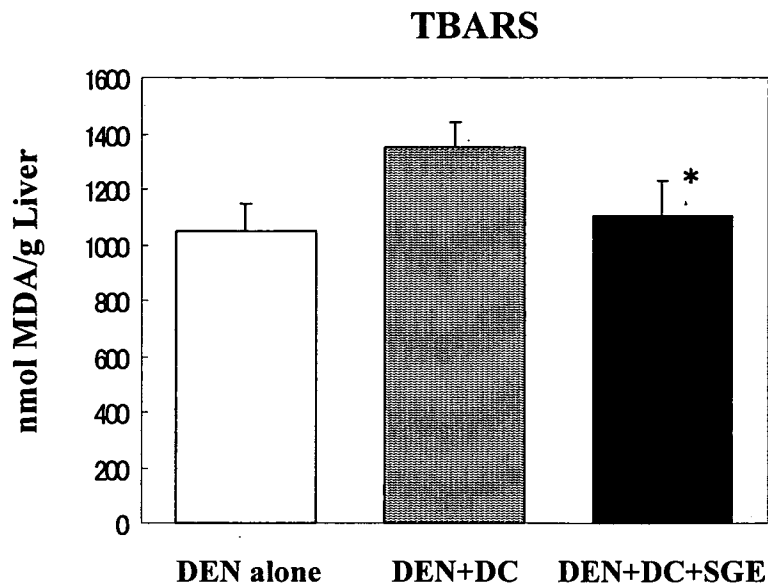


Fig. 9. Lipid peroxidation (TBARS) of the livers from mice in DEN alone group (open column), DEN+DC group (column), DEN+DC+SGE group (column) in experiment 1. Bars represent the the mean \pm S.D. of 4 mice. *; represent significant differences from the DEN+DC group at $p < 0.05$ (Student's t-test).

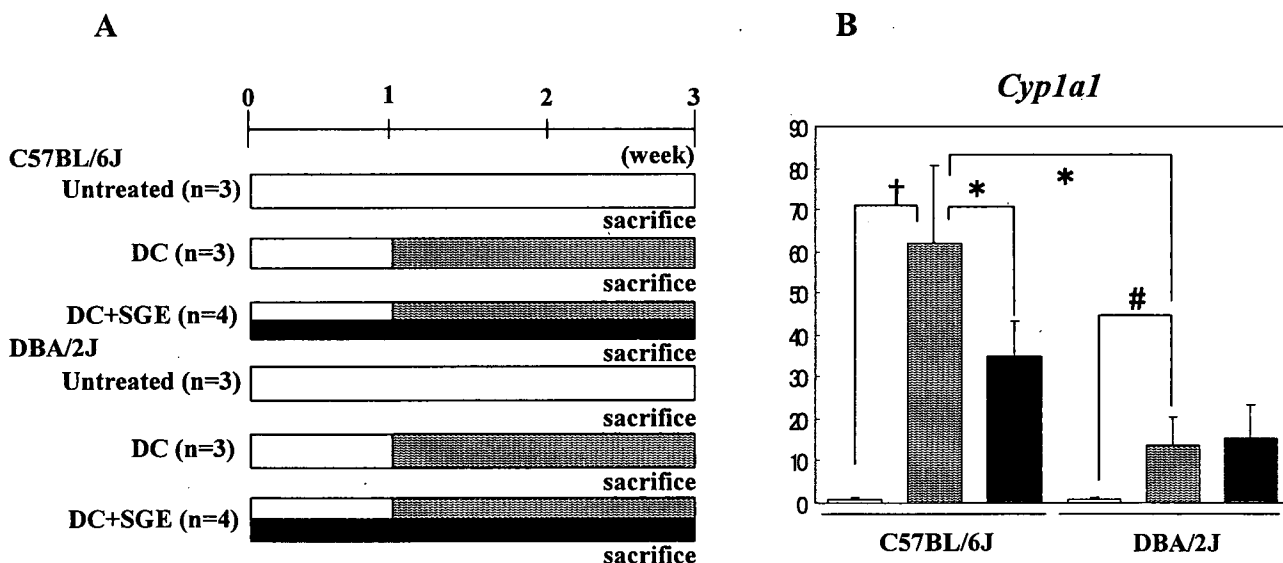


Fig. 10. A) Experimental design of short-term concurrent administration study of DC and SGE in experiment 2. B) mRNA expression of *Cyp1a1* in the liver of C57BL/6J and DBA/2J mice in the untreated group (open column), DC group (column), DC+SGE group (column). The gene expression levels were normalized using beta actin. Bars represent the the mean \pm S.D. of 3 mice. *; represent significant differences from the DC group of C57BL/6J mice at $p < 0.05$ (Student's t-test). †; represent significant differences from the untreated group of C57BL/6J mice at $p < 0.01$ (Student's t-test). #; significant difference from the untreated group in DBA/2J at $p < 0.01$ (Student's t-test).

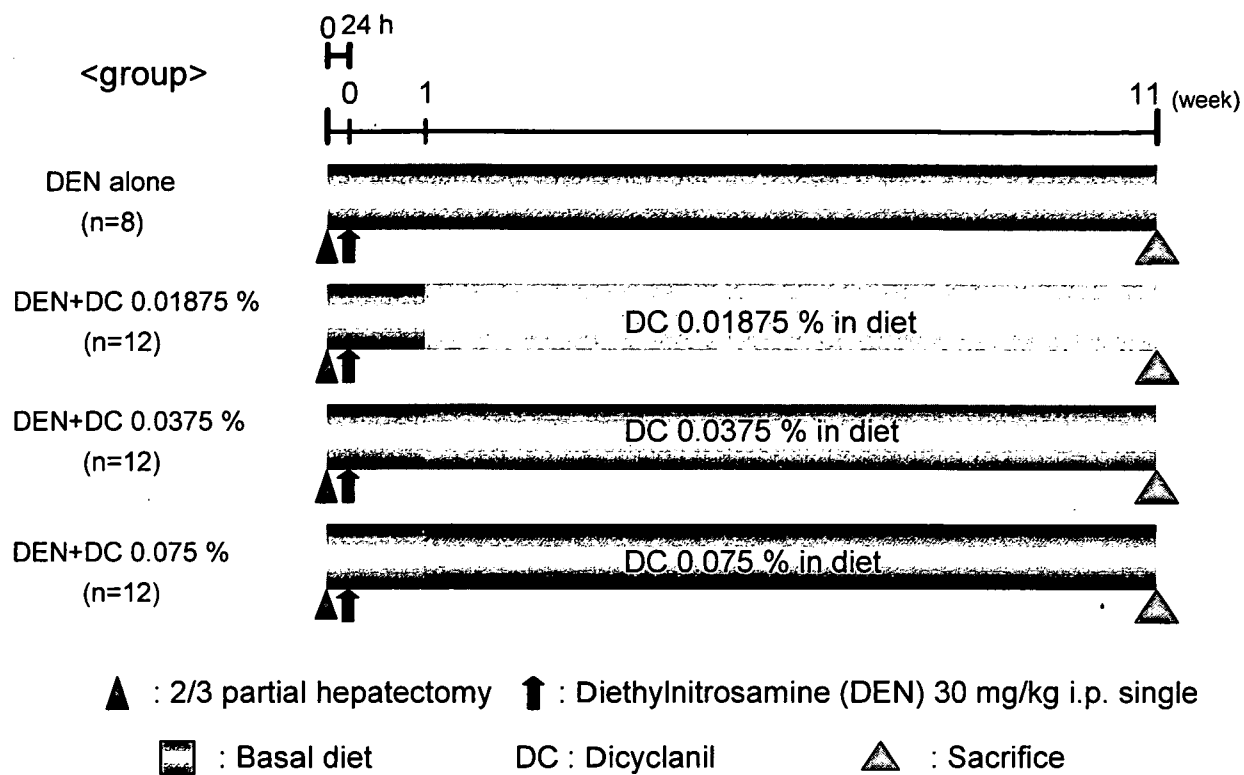


Fig. 11. Experimental design to determine the threshold dose of DC that induces hepatocellular tumor-promoting effects

動物用医薬品等に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究

DNA メチル化を指標とした発がん関連遺伝子の網羅的解析

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 動物生命科学部門 准教授

研究要旨

初年度である今年度は、DNA メチル化を指標とした *in vivo* 短期肝発がん指標遺伝子の探索を目的として、CpG アイランド(CGI)マイクロアレイを用いて、代表的な非発がん性肝毒性物質である acetaminophen (APAP)、非遺伝毒性肝発がん物質である phenobarbital (PB)、遺伝毒性肝発がん物質である 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ)によるマウス肝発がんプロモーション過程でのゲノムのメチル化プロファイルの網羅的解析を行った。即ち、B6C3F₁ マウスに DEN(90 mg/kg, i.p.)によるイニシエーション処置を施し、その2週間後から APAP (10,000 ppm)、PB (500 ppm) 及び IQ (100, 300 ppm) を各々混餌投与し、投与8及び16週間後の肝臓 (n=5/群)での DNA メチル化のプロファイルを CGI アレイ (UHN 製、7,262 スポット)により検討した。なお、PB と IQ については24週間投与を継続し、肝変異細胞数を測定した。PB と IQ 群の肝変異細胞数は、DEN 単独群と比較していずれも増加したので、PB は 500 ppm、IQ は 100 ppm 投与群のメチル化プロファイルを APAP 群及び DEN 単独群と比較した。8週目では APAP 群と PB、IQ 群を区別しえるグローバルなメチル化変動パターンは明らかではなかった。一方、16週目では APAP 群と PB ないし IQ 群との間でメチル化パターンに明らかに差のある CGI 群を認め、APAP でメチル化が変動しない、もしくは減少した CGI のうち、PB と IQ で増加したものが 39 個認められた。その中には、がん抑制遺伝子 *peg3* や細胞増殖抑制に関与する WDR6 遺伝子の 5' 上流に位置するものがみられた。以上より、今回プロモーション時期での 16 週間に及ぶ投与により、肝発がん物質と非発がん物質でメチル化パターンに分離の生じる CGI 群の出現する可能性が見出された。

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動物薬についての MRL の設定作業が進められており、その規格設定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、発がん性試験で陽性を示したが遺伝毒性試験で陰性であった動物薬については非遺伝毒性発がん物質と判定し、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。

動物薬など化学物質による毒性作用を予測する目的で、化学物質を暴露した時の発現遺伝子のゲノムワイドな解析によるトキシコゲノミクス手法が行われてきた。mRNA 発現の低下には、抑制性転写因子による転写制御や RNA 安定性の低

下が要因として考えられるが、エピジェネティックな遺伝子修飾 (DNA のメチル化やヒストン蛋白質の脱アセチル化) による転写抑制も考慮しなければならない。

ゲノム中には CpG-rich な領域 (CpG アイランド) が存在し、その多くはメチル化を免れている。この CpG アイランドのメチル化は、遺伝子転写のサイレンシングに作用し、発生過程での不活性化 X 染色体上の遺伝子やがん細胞でのがん抑制遺伝子の不活化に機能することが知られている。この直接遺伝子を傷害せずに転写のサイレンシングを起こすエピジェネティックな修飾作用は、各種の生物現象に関与する事が考えられるが、その意義やメカニズムについては、その関与を受ける生物現象の解明も含めて、これからの研究対象領域と考えられる。化学物質投与に関連した報告は数少ないが、発がん感受性の異なる 3 系統のマウスに代表的な非遺伝毒性肝発がん物質である PB を 14 日間投与した際に、発がん感受性に応じて肝臓でメチル化する CpG アイランドの数が増加するという報告 (Watson and Goodman, *Toxicol. Sci.* 68: 51-58, 2002) や、ラットに PB を 14 日間投与した結果、投与 3 日目にがん抑制遺伝子である *p16* 遺伝子のプロモーター領域のメチレーションが増加するという報告 (Kostka et al., *Toxicol.* 239: 127-135, 2007) がなされ、本申請研究の着想を一部裏付けるデータを提供している。

最近、マイクロアレイ法を利用したメチル化 CpG アイランドの網羅的解析が可能となり、これによりヒトのがんの進展に重要な役割を果たすがん抑制遺伝子が多数見出されてきている。網羅的解析手法を利用することによりクラスター分類が可能となるため、化学物質を動物に投

与した時の標的臓器における各種の生物作用の予測に利用できる可能性がでてきた。本研究では、発がんに向かう分子制御機構の破綻に関して、エピジェネティックなサイレンシングの役割を明らかにし、その網羅的パターンから発がん物質の分類が可能となれば、*in vivo* 突然変異評価系と組み合わせ、機能遺伝子の突然変異/サイレンシングを基盤とした化学物質発がんのリスク評価上の新たな重み付けが可能となる。

本年度は、マウスを用いて、代表的な遺伝毒性及び非遺伝毒性肝発がん物質による発がんプロモーション過程における DNA メチル化のプロファイルを CpG アイランドマイクロアレイにより網羅的に検索する。非発がん物質投与例でのメチル化変動遺伝子のプロファイルとの比較により、発がん物質特異的なメチル化遺伝子のクラスターを分類する。

B. 研究方法

実験デザインを Fig. 1 に示す。5 週齢の雄性 B6C3F₁ マウス (日本チャールズ・リバー株式会社) にイニシエーターである diethylnitrosamine (DEN) の 90 mg/kg を腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。2 週間無処置で飼育後、APAP 10,000 ppm、PB 500 ppm 及び IQ 100、300 ppm を 8 及び 16 週間暴露し、各群それぞれ 5 匹解剖を行った。また投与 24 週目では、全生存動物 (DEN 単独群: 13 匹、DEN + PB 500 ppm 群 11 匹、DEN + IQ 100 ppm 群 14 匹、DEN + IQ 300 ppm 投与群 14 匹) をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取し、臓器重量を測定後、肝組織の一部を採取し、RNA later 中に浸漬させて mRNA 抽出用に、一部を液体窒素に凍結させ DNA 抽出用に保存した。残りは、10 % 中性緩衝ホルマリン

にて48時間固定した。組織学的検索として、固定材料を常法に従いパラフィン包埋及び薄切後にヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製し、光学顕微鏡下にて肝変異細胞巢の数を測定した。DEN + PB 500 ppm、DEN + IQ 100 ppm 及び 300 ppm において、投与24週間の肝変異細胞巢数をDEN単独群と比較した結果、いずれも増加を示した(Table 4)ので、これらの群でプロモーション時期での投与8週目と16週目のDNAメチル化変動プロファイルをCGIマイクロアレイにより求め(n=5/群)、それぞれAPAP 10,000 ppm群及びDEN単独群と比較した。CGIマイクロアレイ用の組織サンプルは、DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN)を使用してゲノムDNAを抽出後、メチル化感受性制限酵素(AfuI)によるDNAの切断、除タンパク、抗5-methylcytosine monoclonal抗体(CALBIOCHEM)を用いた免疫沈降、Bio prime plus array GCH Indirect Genomic Labeling SystemによるDNAのラベル化(エンドラベル)を行った。ラベル化したDNAは、ハイブリダイゼーション後、CGIマイクロアレイ(Mouse CpG-island 7.3K Array (MCGI7.3K)、UHN microarray centre, カナダ)を用い、GenePix4000Aにてシグナルデータを取り込んで定量した。CGIメチル化データについては、マイクロアレイに搭載されているCGI群のうち、下流のプロモーター領域に位置する遺伝子が同定されている3,023個のCGIを対象とし、PB 500 ppmとIQ 100 ppm各群で、DEN単独群と比較して1.5倍以上メチル化が増加したCGI群を選別した。方法としては、GeneSpring GX (Silicon Genetics)を用いて、各データの per spot, per chip intensity-dependent (lowess)

normalization と global normalization を行い、シグナルの信頼性を示す flag が各群の5サンプル中3サンプルで present であった CGI を選択した。さらに、その中から各群のいずれかの群で、シグナルレベルが1以上である2,303個のCGIを選択した。それらのうち、DEN単独群と比較して、1.5倍以上のシグナルの増加が見られたCGIを選別した。

統計解析としては、DEN単独群と各投与群との間でBartlett検定を行い、等分散の場合はパラメトリックのDunnnett検定を、不等分散の場合はノンパラメトリックのDunnnett検定もしくは、Steel検定をそれぞれ実施し、有意水準5%以下を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、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抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、東京農工大学の利用規定及び米国国立衛生研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

投与8、16週目のDEN + APAP群及びDEN + IQ 300 ppm群では、DEN単独群と比較して、体重の有意な低値が認められた。またDEN + IQ 300 ppm群は、24週目にも体重の有意な低値を示した(Table 1)。肝臓重量は、DEN + APAP群の8週目に絶対値と相対値の有意な低値、DEN + IQ 100 ppm群では、24週目に絶対値、DEN + IQ 300 ppm群では、8、16と24週目の絶対値と8、24週目の相対値がそれぞれDEN単独群と比較して有意な低値を示した。一方DEN + PB 500 ppm群では、8、16週目の絶対値、

16と24週目の相対値がDEN単独群と比較して有意に高値を示した (Table 1)。

肝臓の病理組織学的検索では、投与24週目の観察で、DEN+PB 500 ppm群で肝細胞の変異増殖巣及び腺腫の数の増加が認められ、またIQは用量依存的に、変異増殖巣の数の増加を示した (Table 2)。

次に、投与8週目のCGIマイクロアレイによるDNAメチル化を検討した結果、DEN+APAP群とDEN+PB、DEN+IQ群を区別しえるグローバルなメチル化の変動パターンは明らかではなかった。一方、投与16週目では、DEN単独群と比較して、APAP群のDNAメチル化が変動しない、もしくは減少したCGIが657個認められた。逆に、PBとIQでDEN単独群と比較してDNAメチル化が1.5倍以上増加したCGIはそれぞれ145と130個認められた。これらのうち、DEN単独群と比較してシグナル強度がAPAP投与により変動しないか減少し、PBとIQに共通して増加を示したCGIは39個であった (Fig. 2)。これらのCGIの下流に位置する遺伝子について、発がんとの関連での報告の有無について文献検索したところ、がん抑制遺伝子 *paternally expressed 3 (peg3)* や細胞増殖抑制に關与する *WD repeat domain 6 (WDR6)* 遺伝子が見出された (Table 3)。

D. 考察

本研究においてマウス肝臓における発がんプロモーション過程でDNAメチル化のシグナル変動を検討したところ、8週間のプロモーションでは、肝発がん物質に特異的な変動パターンを示すCGIを見出せなかったが、16週間では非発がん物質のAPAPと分離して発がん物質であるPB及びIQでメチル化の増加したCGIを39個見出した。このことをエピジェネ

ティックな遺伝子発現制御の観点から考察すると、プロモーション8週目の時期には発がん物質で共通な制御を受ける遺伝子群は少ないものの16週間に及ぶと発がん物質に特有な制御機転の働く遺伝子群の出現する可能性が示唆される。言い換えると発がん過程に特異的な分子機能の起動する可能性を示唆している。

この選出された39CGIのなかには、プロアポプトティックな制御分子であるBAXのミトコンドリアへのトランスロケーションを制御 (Deng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97: 12050-12055, 2000) する *peg3* の上流に位置するものがあり、その高メチル化が認められた。この遺伝子は、がん抑制遺伝子として知られており、ヒトやマウスの腫瘍において高メチル化の状態であることがすでに報告されている (Kohda et al., Genes Cells. 6: 237-247, 2001; Michael et al., Cancer Res. 65: 3624-3632, 2005)。同様に高メチル化が見出されたGGIの下流に位置するWDR6は、セリン/スレオニンキナーゼLBK1と共発現をして、細胞周期のG1期の停止に關与する遺伝子 (Xie X., Mol. Cell Biochem., 301: 115-122, 2007) としてすでに報告されている。

今後は、これら選出された39CGIについて、メチル化変動の検証をメチル化特異的PCR等により行い、発現調節を受けると考えられる遺伝子の転写レベルをreal-time PCRにより検討すると共に、免疫染色による解析が可能なものについては、変異細胞巣での発現との關与について検討を加える。

E. 結論

マウス肝二段階発がんモデルを用いて、プロモーション時期での投与により、16週間で肝発がん物質と肝非発がん物質間

でメチル化パターンに分離の生じる CGI 群の出現する可能性が見出された。このことから、短期スクリーニング手法を開発するという当初の目的からは逸れるが、CGI マイクロアレイによるゲノム DNA のメチル化変動の検索は、発がん性に寄与するエピジェネティックな転写調節機転の解明に有用な手法であることが示唆された。

F. 健康危機情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi M., Shibutani M., Woo G-H., Inoue K., Fujimoto H., Igarashi K., Kanno J., Hirose M., Nishikawa A. Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the early stage of tumor promotion in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. Carcinogenesis (submitted).

2. 学会発表

渋谷 淳: 組織部位特異的な発現解析手法を利用した腫瘍形質のプロファイリング. シンポジウム II: 毒性病理学における網羅的解析の展開. 第 23 回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 第 23 回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 32 (S2-1), 1 月 30-31 日, 2007

禹 麻美, 渋谷 淳, 高橋美和, 井上 薫, 禹桂炯, 掛谷知志, 富士本仁, 広瀬雅雄: マウスに対する肝発がん物質の 28 日間投与に反応する DNA メチル化プロファイルの網羅的解析 (続報). 第 23 回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 第 23 回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 82 (P-62), 1 月 30-31 日, 2007

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, 第 23 回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 74 (P-46), 1 月 30-31 日, 2007

渋谷 淳, 井上 薫, 禹桂炯, 高橋美和, 広瀬雅雄: マイクロアレイ法を基盤とした発がん過程に寄与する分子の探索. 日本獣医病理学会シンポジウム. 形態学から分子病理学への展開. 第 143 回日本獣医学会総会, つくば, 第 143 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, p. 93 (BS-3), 4 月 3-5 日, 2007

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

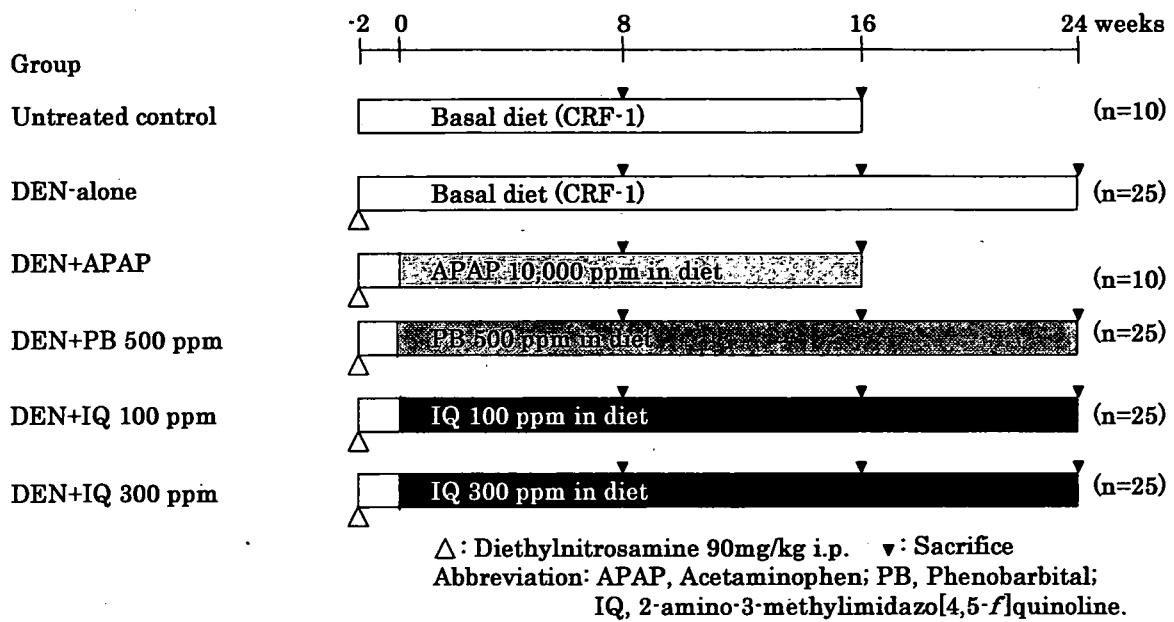


Figure 1. Experimental design

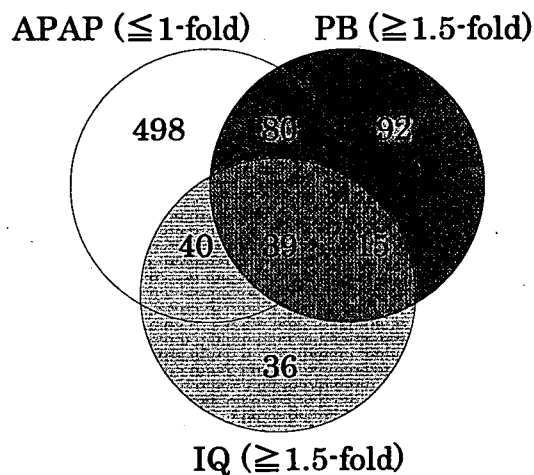


Figure 2. Venn diagram of CGIs showing increased methylation signals commonly to PB and IQ without increasing the signals with APAP in the liver of mice treated for 16 weeks during the post-initiation phase.

Table 1. Body and liver weights of mice treated with APAP, PB or IQ during the post-initiation phase after DEN-initiation

		Untreated control	DEN-alone	DEN + APAP	DEN + PB 500 ppm	DEN + IQ 100 ppm	DEN + IQ 300 ppm
Week 8	No. of animal:	5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)	30.20 ± 1.08 ^{a)}	29.60 ± 0.96	24.24 ± 1.84 **	28.86 ± 1.06	29.76 ± 1.81	23.78 ± 1.68 **
	Liver weight (g)	1.43 ± 0.05	1.50 ± 0.15	1.00 ± 0.04 **	1.73 ± 0.17 *	1.43 ± 0.17	0.91 ± 0.08 **
	(%/ 100g bw)	4.74 ± 0.15	5.08 ± 0.43	4.14 ± 0.25 **	5.99 ± 0.38 **	4.78 ± 0.36	3.83 ± 0.11 **
Week 16	No. of animals	5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)	33.72 ± 1.49	34.46 ± 3.35	27.86 ± 1.27 **	32.48 ± 1.58	32.34 ± 1.77	27.04 ± 0.79 **
	Liver weight (g)	1.49 ± 0.06	1.48 ± 0.10	1.23 ± 0.15	1.86 ± 0.06	1.36 ± 0.11	1.06 ± 0.02 *
	(%/ 100g bw)	4.42 ± 0.35	4.31 ± 0.39	4.41 ± 0.40	5.75 ± 0.43 **	4.21 ± 0.21	3.91 ± 0.15
Weeks 24	No. of animals	—	13	—	11	14	14
	Body weight (g)	—	36.88 ± 3.39	—	33.14 ± 1.79	33.79 ± 3.10	28.07 ± 1.64 **
	Liver weight (g)	—	1.68 ± 0.13	—	1.85 ± 0.20 *	1.51 ± 0.17 *	1.18 ± 0.11 **
	(%/ 100g bw)	—	4.58 ± 0.24	—	5.59 ± 0.45 **	4.46 ± 0.34	4.18 ± 0.20 *

a) mean ±SD, —; not examined, *, **; P<0.05, 0.01 vs. DEN-alone (Dunnett)

Table 2. Incidences of proliferative lesions in the liver of mice treated with PB or IQ during the post-initiation phase for 24 weeks after DEN-initiation

	DEN-alone	DEN + PB 500 ppm	DEN + IQ 100 ppm	DEN + IQ 300 ppm
No. of animals examined	13	11	14	14
No. of altered foci				
No.	2 ± 1 ^{a)}	22 ± 7 **	5 ± 2 *	20 ± 9 **
No./cm ²	0.75 ± 0.41	6.14 ± 2.05 **	1.47 ± 0.67 *	7.13 ± 2.98 **
No. of adenomas				
No.	0 ± 1	2 ± 2 *	0 ± 1	0 ± 1
No./cm ²	0.07 ± 0.19	0.54 ± 0.72	0.08 ± 0.21	0.12 ± 0.28

a) mean ±SD, *, **; P<0.05, 0.01 vs. DEN-alone (Steel)

Table 3. List of genes downstream of the CGIs selected to show increased methylation signals commonly to PB and IQ without increasing the signals with APAP.

Gene Name	Downstream Gene Symbol	Downstream GeneID	Description	Genome Location	Flag
UHNmmcp0005500	1810015C04Rik	66270	hypothetical protein LOC66270 isoform 1	chr15:25737413-25738368	-
UHNmmcp0000459	AK015306	114673	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930433N12 product:hypothetical protein, full insert sequence.	chr9:3001673-3011166	BLAT hit
UHNmmcp0002474	Txn1l	53382	thioredoxin-like 1	chr18:63300722-63301263	-
UHNmmcp0000473	AK015306	114673	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930433N12 product:hypothetical protein, full insert sequence.	chr9:3000482-3026321	BLAT hit
UHNmmcp0005091	Etv4	18612	ets variant gene 4 (E1A enhancer binding	chr11:101594245-101594772	-
UHNmmcp0005109	Trh	22044	thyrotropin releasing hormone	chr6:92164066-92164428	-
UHNmmcp0001302	Fgf20	80857	fibroblast growth factor 20	chr8:40978577-40978754	BLAT hit
UHNmmcp0002239	Gabra5	110886	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor,	chr7:64641760-64642488	-
UHNmmcp0001447	Tmtc3	237500	Mus musculus 9.5 days embryo parthenogenote cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B130008E12 product:weakly similar to LD47309P [Drosophila melanogaster], full insert	chr10:99606597-99606823	BLAT hit
UHNmmcp0000610	1700009P17Rik	75472	hypothetical protein LOC75472	chr1:173012950-173013413	BLAT hit
UHNmmcp0005973	AK006510	73937	Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700029M20 product:unclassifiable, full insert sequence.	chr4:135121762-135122056	-
UHNmmcp0006065	Tsnax	53424	translin-associated factor X	chr8:127437203-127437411	-
UHNmmcp0003998	4930534B04Rik	75216	hypothetical protein LOC75216	chr12:92493291-92493769	-
UHNmmcp0005525	Hal	15109	histidine ammonia lyase	chr10:92916339-92916870	-
UHNmmcp0007019	Msl2l1	77853	Msl2l1 protein (Fragment).	chr9:100935173-100935614	-
UHNmmcp0001449	Nosip	66394	nitric oxide synthase interacting protein	chr7:52309038-52310084	-
UHNmmcp0002650	B230118H07Rik	68170	hypothetical protein LOC68170	chr2:98506831-98507384	BLAT hit
UHNmmcp0000627	Irx3	16373	Iroquois related homeobox 3	chr8:93836756-93837617	-
UHNmmcp0000490	Amigo2	105827	amphoterin induced gene 2	chr15:96884766-96885651	-
UHNmmcp0002907	Wdr6	83669	WD repeat domain 6	chr9:108472011-108472285	-
UHNmmcp0001792	BC004022	80750	MKIAA0615 protein (Fragment).	chr8:89283889-89284515	-
UHNmmcp0001479	Rnf32	56874	ring finger protein 32	chr5:29239552-29240133	-
UHNmmcp0007051	Adam17	11491	a disintegrin and metalloprotease domain 17	chr12:21327205-21327637	-
UHNmmcp0002620	Sox4	20677	SR Y-box containing gene 4	chr13:28975919-28976179	-
UHNmmcp0000397	Pcsk7	18554	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	chr9:45675914-45676827	-
UHNmmcp0003391	Pygo2		pygopus 2	chr3:89233919-89234933	-
UHNmmcp0003237	Tbx4	21387	T-box 4 isoform a	chr11:85654019-85654613	-
UHNmmcp0000088	AK043869		Mus musculus 10 days neonate cortex cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A830044A12 product:unclassifiable, full insert sequence.	chr1:51535273-51535757	-
UHNmmcp0006400	Peg3	18616	paternally expressed 3	chr7:6648530-6649477	-
UHNmmcp0003346	Rgnef	110596	Rho-guanine nucleotide exchange factor	chr13:98582895-98583892	-
UHNmmcp0002841	AK131742		Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700055L12 product:unclassifiable, full insert sequence.	chr9:103610577-103611532	-
UHNmmcp0003563	Lrrc52	240899	leucine rich repeat containing 52	chr1:169324161-169324509	-
UHNmmcp0003686	Vldlr	22359	very low density lipoprotein receptor	chr19:27017494-27018098	-
UHNmmcp0003780	Pxn	19303	paxillin isoform beta	chr5:115939681-115940843	-
UHNmmcp0004935	AK169831	20660	Mus musculus adult male hippocampus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2900010L19 product:inferred: RIKEN cDNA 2900010L19 gene / gp250 precursor {Mus musculus},	chr9:41765735-41766475	-
UHNmmcp0007024	Tbc1d1	57915	TBC1 domain family, member 1	chr5:64483770-64485082	-
UHNmmcp0002806	Snx6	72183	sorting nexin 6	chr12:55810580-55811417	BLAT hit
UHNmmcp0002820	Pgk2	18663	phosphoglycerate kinase 2	chr17:39983399-39983876	-
UHNmmcp0007196	Arl5c	217151	ADP-ribosylation-like factor 12 protein	chr11:97849082-97849697	-

BLAST hit: More than one BLAT hit of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), -: No Blast hit

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

分担研究報告書

動物用医薬品に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究
動物用医薬品の発がん過程における酸化ストレスの関与

分担研究者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

研究要旨

昆虫成長調整剤のジサイクラニル（DC）は従来の変異原性試験は陰性ながら、雌マウスの肝臓に発がん性を有することが知られている。これまで、その発がん機序に酸化ストレスの関与の可能性が報告されてきた。今回、その酸化ストレスに対する生体内防御機構に転写因子 Nrf2 の関与の可能性を探る目的で、DC を 13 週間、0.075 あるいは 0.15% の濃度で雌の Nrf2 欠損マウスに混餌投与した。その結果、何れの投与群においても肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの有意な上昇が認められたが、その程度は Nrf2 蛋白量依存的であり、DC が引き起こす酸化ストレスに対する生体内防御機構に Nrf2 の関与が示唆された。一方、Nrf2 の転写制御を受けている glutamate-cysteine ligase (GCL)、その触媒により生成される glutathione (GSH) 量は DC 投与により増加したが、遺伝子型間で差異は認められなかった。従って、Nrf2 欠損マウスに認められた DC 誘発の酸化ストレスに対する高感受性の原因には、GSH 以外の Nrf2 関連酵素群の関与が考えられた。

A. 研究目的

昆虫成長調整剤のジサイクラニル（DC）は動物用医薬品として使用されている。これまで、*in vitro* での復帰突然変異試験、染色体異常試験、不定期 DNA 合成試験、*in vivo* での小核試験、Comet assay の何れもが陰性ながら、その長期投与により雌マウス肝臓に発がん性を有しており、その発がん機序が注目されている。近年、発がん用量を投与したマウス肝におけるマイクロアレイ解析の結果、酸化ストレスに関する遺伝子クラスターの発現誘導が報告された。さらに、イニシエーション処置後、肝部分切除し、DC を投与した肝臓での前腫瘍性マーカーの増加、脂質過酸化レベルならびに酸化

DNA 損傷の上昇が観察された。また、近年開発されたレポーター遺伝子導入マウス *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性アッセイを実施したところ、発がん性が報告されている雌マウス肝臓中の *gpt* 遺伝子の突然変異頻度が対照群に比して有意に増加し、その変異スペクトラムから酸化 DNA 損傷による突然変異誘発の可能性が示唆された。一方、生体内には外来化学物質に対する防御機構として、薬物代謝酵素や抗酸化酵素群の誘導を通して、代謝、排泄の促進、酸化ストレスの除去などを行う機能が備わっている。近年、これら酵素群の転写因子である Nrf2 遺伝子が発見され、その調節機構や Nrf2 蛋白の細胞内あるいは核内挙動が注目さ

れている。これまでの研究結果から、Nrf2 蛋白は細胞質内で Keap1 蛋白とヘテロダイマーを形成して存在し、親電子性物質や活性酸素などの酸化ストレスに反応して、Keap1 との結合はずれ、核内に移行して、種々の酵素群の転写を調節していると考えられている。Nrf2 に転写調節を受けている酵素群はこれまで glutathione-S-transferase (GST) や UDP-glucuronosyltransferase などの抱合酵素をはじめ、heme oxygenase-1 あるいは thioredoxin reductase などの抗酸化酵素などが報告されている。本研究目的は、Nrf2 欠損マウスを用いて、DC が引き起こす酸化ストレスに対する Nrf2 関与の可能性を探り、これまで明らかとされていなかった DC 誘発の酸化ストレス発現機序を明らかにすることである。

B. 研究方法

DC の発がん性は雌マウスのみ認められていることから、雌の Nrf2 欠損マウスを実験に供した。雌 6 週令の Nrf2 ホモ欠損、ヘテロ欠損、その同腹の野生型マウスそれぞれ各群 5 匹に、DC を 0、0.075、0.15% の濃度に混じた飼料を 13 週間自由に摂取させた。エーテル麻酔下で動物を解剖し、肝重量測定後、液体窒素により凍結保存した。肝臓の一部はホモジナイズ後、glutathione (GSH) 量ならびに GSH 合成の律速酵素でその発現が Nrf2 に制御されている glutamate-cysteine ligase (GCL) 活性を測定した。実際の測定は、GSH ならびに GCL が naphthalene dicarboxaldehyde と結合すると蛍光を発する性質を利用して、その蛍光強度を測定する方法により行った。また、肝から DNA を抽出し、HPLC-ECD 法により酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立医薬品食品衛生研究

所実験動物取り扱い指針に基づいて実施された。

C. 研究結果

何れの遺伝子型の DC 投与群においても体重減少が認められ、統計学的にはホモ欠損ならびに野生型マウスで有意な減少となった。また、肝比重量は用量相関性に増加し、何れの投与群においてもそれぞれの対照群に比して有意な変化となったが、遺伝子型間に差異は認められなかった (Table 1)。酸化的 DNA 損傷の指標である肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは何れの遺伝子型においても、DC 投与量依存的に上昇し、最高用量において有意の高値となった。また、対照群も含めた全ての群で Nrf2 蛋白量依存的に 8-OHdG 量は増加し、特にホモ欠損マウスの投与群の値は野生型の各投与群と比較して有意に高い値となった (Fig. 1)。GSH ならびに GCL の測定は野生型とホモ欠損マウスについて実施した。GSH レベルは両遺伝子型の高用量群で有意な増加が観察されたが、遺伝子型間では差異は認められなかった (Fig. 2)。GCL 活性についても DC 投与群で上昇が認められ、ホモ欠損の高用量群で有意な高値となったが、その傾向に遺伝子型間で差異は認められなかった (Fig. 3)。

D. 考察

DC はピリミジン骨格に 3 つのアミノ基と 1 つのシアノ基が付加した構造を有しており、生体内で電子供与体として働く可能性が考えられる。事実これまで、その投与によりマウス肝臓中の CYP1A1、thioredoxin reductase 1、superoxide dismutase 1 あるいは OGG1 などの酸化ストレス関連蛋白の mRNA レベルが上昇することが報告されている。また、発がん物質投与後、肝部分切除を施すと、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルが上昇することも明らかとなっている。また、発がん用量の DC を単独で 13 週間投与したと

ころ、雌雄のマウス肝 DNA 中の 8-OHdG が有意に上昇することも報告されている。一方、*gpt* 遺伝子導入マウスを用いた実験から、発がん性を示す雌マウスの肝 *gpt* 遺伝子の変異頻度が有意に上昇することが示された。その *gpt* 変異体のスペクトラムを解析したところ、GC:TA トランバージョン変異が高率に生じていることが明らかとなり、DC が引き起こす *in vivo* 変異原性には酸化的 DNA 損傷が大きく寄与している可能性が示唆されている。しかし、これまで DC が引き起こす酸化ストレスの詳細な機序については不明であった。また、先述のように DC 投与により上昇する mRNA には thioredoxin reductase や heme oxygenase-1 などが報告されており、これらの遺伝子転写調節機構に Nrf2 の関与が知られていることから、今回、*Nrf2* 欠損マウスに DC を投与して、DC が引き起こす酸化ストレスに対する Nrf2 の関与の可能性を検討した。DC 投与による酸化ストレスのエンドポイントとして酸化的 DNA 損傷の一つである 8-OHdG レベルを測定した。その結果、既報の通り、野生型において DC 投与量依存的に 8-OHdG レベルは上昇し、高用量群では対照群に比して統計学的有意な値となった。一方、*Nrf2* ヘテロ欠損、ホモ欠損マウスにおいても同様に、8-OHdG レベルの DC 投与量依存的な上昇が観察され、また、遺伝子型間で比較すると何れの投与量においてもその上昇レベルはホモ > ヘテロ > 野生型の順であり、DC 投与による 8-OHdG レベルの上昇が Nrf2 蛋白量に依存していることが明らかとなった。従って、DC が引き起こす酸化ストレスに対して Nrf2 を介した防御機構が働いていることが示唆された。GSH は酸化還元状態の制御、酸化ストレスに対する防御、GST による薬物抱合反応、GSH ペルオキシダーゼによる過酸化水素の解毒など多彩な生理作用を有し、細胞内のレドックス制御に

重要な役割を演じている。その生体内合成は 2 段階の ATP 依存性の反応によって行われ、グルタミンとシステインの結合は GCL が触媒し、さらにグリシンの結合には GSH 合成酵素が触媒する。合成の律速は最初の GCL の触媒反応であることが知られており、この GCL の転写調節に Nrf2 の関与が報告されている。そこで今回、DC を *Nrf2* 欠損マウスに投与して、GSH 量ならびに GCL 活性の変動を測定した。その結果、GSH 量は野生型、ホモ欠損マウスの何れの遺伝子型においても、高用量群において有意な高値を示した。従って、DC が引き起こす酸化ストレスに対して細胞内 GSH 量が反応的に増加したことが考えられた。そして、GSH 合成の律速酵素である GCL 活性も同様に上昇傾向を示した。しかし、何れも遺伝子型間に差異は認められなかった。GCL は前述のようにその転写の一部に Nrf2 の関与が知られているが、その転写調節因子は他にも多数知られており、*Nrf2* 欠損マウスで認められた GCL 活性の上昇とそれに続く GSH 量の増加には他の転写因子の関与が考えられた。何れにしても GSH レベルの変化はエンドポイントとしての酸化的 DNA 損傷の Nrf2 蛋白量依存的な上昇を説明することは出来なかった。今後は、Nrf2 の転写制御を受けていることが知られている抗酸化酵素の Heme oxygenase-1、Thioredoxin reductase 等の mRNA レベルあるいは蛋白レベルを測定し、今回明らかとなった *Nrf2* 欠損マウスの DC が引き起こす酸化ストレスに対する高感受性のメカニズムを解明し、DC の酸化ストレス機序の詳細を明らかにする予定である。また、Nrf2 制御下酵素群の中には、GST や NAD(P): quinone oxidoreductase (NQO1) など、ヒトにおいて遺伝子多型の存在が報告されているものが有り、*Nrf2* 欠損マウスはこれらヒト集団に対するモデル動物と考えられることから、そこから得ら

れるデータは、DC に対するより精度の高いヒト安全性の確保に寄与するものと考えられる。

E. 結論

DC を 0.075 あるいは 0.15% の濃度に混じた飼料を 13 週間、雌の *Nrf2* ホモ欠損、ヘテロ欠損、その野生型マウスに与えたところ、何れのマウスの肝 DNA 中の 8-OHdG レベルも投与量依存的に上昇したが、その程度は *Nrf2* 蛋白量依存的であり、*Nrf2* 欠損マウスは DC が引き起こす酸化ストレスに高感受性であることが明らかとなった。従って、その酸化ストレス防御機構に *Nrf2* の関与が考えられた。一方、一部が *Nrf2* 制御下にある GCL、さらにはそれを触媒として生成される GSH 量は DC 投与により上昇したが、遺伝子型間で差異は認められず、*Nrf2* 欠損マウスの DC に対する高感受性には GSH は関与していないことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Umemura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Ishii, Y., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Nishikawa, A., and Hirose, M.: Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and *in vivo* mutagenicity induced by dicyclanil, a nongenotoxic carcinogen, using *gpt* delta mice. *Mutat. Res.* 63:46-54. 2007.

2. 学会発表

岡村俊也、梅村隆志、黒岩有一、田崎雅子、児玉幸夫、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄：マウス肝発がん剤 dicyclanil による *in vivo* 変異原性誘発への酸化的 DNA 損傷および修復酵素の関与について、第 23 回日本毒性病理学会、2007 年 1 月、東京

Umemura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Kodama, Y., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Hirose, M.: Oxidative DNA damage and *in vivo* mutagenicity in the livers of *gpt* delta mice given dicyclanil. Society of Toxicology, 46th Annual Meeting, Charlotte, March, 2007.

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