

Table 3 Changes in parameters for body and liver weight, and food and estimated OX intakes of rats treated with OX for 26 weeks after DEN initiation

Group	DEN alone	DEN + 0.05%OX
No. of Rats	9	9
Final body weight (g)	336.66 ± 12.46	334.37 ± 21.24
Absolute liver weight (g)	7.42 ± 0.56	9.26 ± 0.85**
Relative liver weight (g/% body weight)	2.20 ± 0.13	2.77 ± 0.13##
Average food intake (g/kg body weight /day)	13.96 ± 1.08	14.76 ± 1.47
Average OX intake (g/kg body weight /day)	N.E.	0.03 ± 0.01

Each quantitative data represents mean ± S.D. N.E.: Not examined. **: Significantly different from DEN alone ($p < 0.01$; Student's *t*-test).

##: Significantly different from DEN alone ($p < 0.01$; Aspin-Welch *t*-test).

Table 4 Changes in parameters for GST-P-positive foci, altered foci and hepatocellular adenomas

Group	Preneoplastic and neoplastic lesions					
	GST-P-positive foci		Altered foci		Adenomas	
	Numbers (No./cm ²)	Areas (mm ² /cm ²)	Incidence (%)	Multiplicity (No./animal)	Incidence (%)	Multiplicity (No./animal)
DEN alone	14.08 ± 3.27	0.72 ± 0.29	2/9 (22)	0.44 ± 0.88	2/9 (22)	0.22 ± 0.44
DEN + 0.05%OX	24.40 ± 4.12**	2.75 ± 1.24#	8/9 (89) ^{††}	1.56 ± 1.01 ^{††}	6/9 (67) [†]	1.22 ± 1.09 [†]

Each quantitative data represents mean ± S.D.

**#: Significantly different from DEN alone ($p < 0.01$, Student's *t*-test; $p < 0.05$, Aspin-Welch's *t*-test).

†: Significantly different from DEN alone ($p < 0.05$, $p < 0.01$; Wilcoxon test).

Table 5 Cell proliferation in GST-P-positive foci, altered foci, hepatocellular adenomas and the surrounding tissues in livers of rats treated with for 26 weeks after DEN initiation.

Regions in livers	DEN alone	DEN + 0.05% OX
Surrounding tissues	0.87 ± 0.45	2.04 ± 0.88*
Altered foci	N.E.	6.04 ± 0.91#
Adenomas	N.E.	10.55 ± 4.23##

The data represents mean ± S.D. N.E.: Not examined. *Significantly different from DEN control ($p < 0.05$; Student's *t*-test).

#, ## Significantly different from surrounding hepatocytes in the same group ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively; Aspin-Welch's *t*-test).

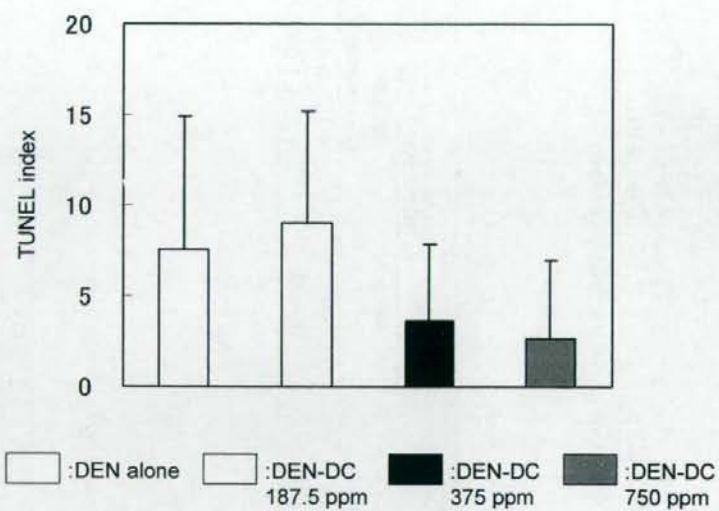


Figure 7 The effects of DC on apoptosis in the liver of mice given DC after DEN initiations. Values are expressed as mean \pm SD.

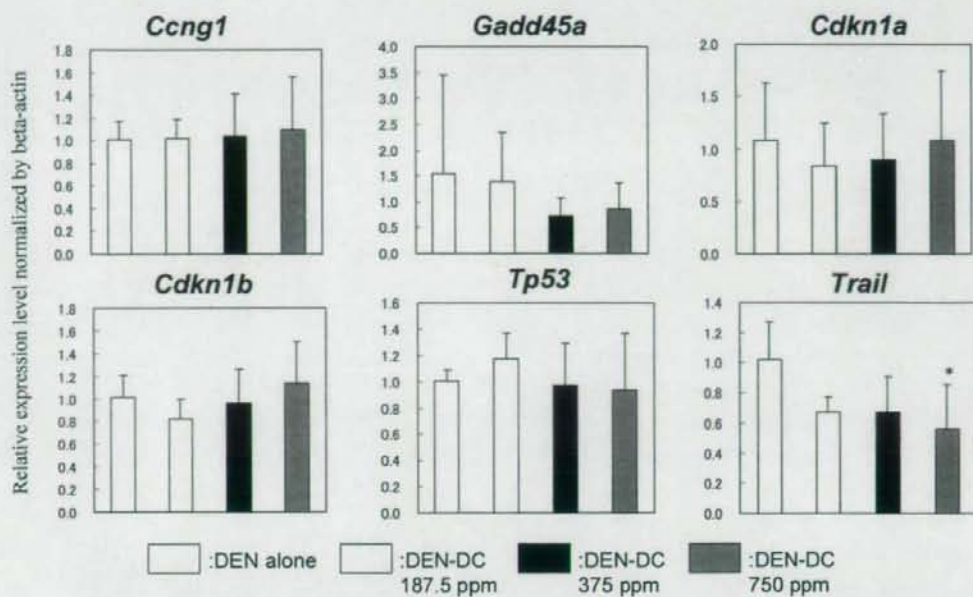


Figure 8 Gene expressions involved in apoptosis / cell cycle in the liver of mice given DC after DEN initiations. Values are expressed as mean \pm SD. The mRNA expression levels are calculated according to the 2-ddCt method and normalized by β -actin as an endogenous control. "*" represent the significant difference from the DEN alone group at $p < 0.05$.

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

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 群と IQ 群については24週間投与を継続し、肝変異細胞数を測定した。PB 群と 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。CGI アレイ解析の結果、8週目では APAP 群と PB 群、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 群ないし IQ 群との間でメチル化パターンに明らかに差のある CGI プローブ群が出現し、APAP 群でメチル化が変動しない、もしくは減少したプローブのうち、PB 群と IQ 群で増加したものが39個認められた。そのうち転写開始点近傍に存在するものとして、zinc finger, imprinted 1 (Zim1)、fat mass and obesity associated (FTO) 遺伝子等の上流に存在するものが12個見出された。逆に APAP 群でメチル化が変動しない、もしくは増加した CGI プローブのうち、PB 群と IQ 群で減少したものが55個認められた。そのうち、cyclin-dependent kinase-like 3 (Cdk13)、cysteine rich protein 61 (Cyr61) 遺伝子等のプロモーター領域に存在するものが11個見出された。以上より、今回16週間に及ぶプロモーションによって初めて、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 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: CGI) が存在し、その多くはメチル化を免れている。この CGI 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 CGI 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 CGI 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 CGI 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。またメチル化変動が得られた CGI 領域に接して遺伝子配列をもつ遺伝子の mRNA 発現レベルを Real-Time RT-PCR にて解析した。

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、RNAlater 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 週目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 (*Afu I*) 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、遺伝子情報が記載されている CGI プローブを対象として、PB 500 ppm と IQ 100 ppm 各群で、DEN 単独群と比較して 1.5 倍以上メチル化変動した CGI プローブ群を選別した。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 プローブを選別した。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 CGI プローブを選別した。それらのうち、DEN 単独群と比較して、1.5 倍以上のシグナル差 (増加及び減少) が見られた CGI プローブを選別した。さらにその選別されたプローブの CGI 領域が転写開始点から上流 100 bp 以内の領域に見出される遺伝子について Real-time RT PCR 法により定量的な遺伝子発現解析を実施した。つまり投与 16 週目の RNA 用凍結サンプルから各群 5 例の Total RNA (TRIzol[®] 試薬、Invitrogen, USA) を抽出後、SuperScriptIII[™] Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) により cDNA を合成した。合成した cDNA は、SYBR[®] Green Real-time PCR detection System (Applied Biosystems, USA) を用いて定量的解析を行った。なお内部標準遺伝子として GAPDH および β -actin を用い、発現値は GAPDH 発現量で補正した値を示した。

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 Dunnett 検定を、不等分散の場合はノンパラメトリック

クの Dunnett 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 群、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 プローブが 657 個認められた。逆に、DEN + PB 群と DEN + IQ 群で 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 プローブはそれぞれ 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、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して増加を示した CGI プローブは 39 個であった (Fig. 2, Table 3)。一方、DEN 単独群と比較して、DEN + APAP 群の DNA メチル化が変動しない、もしくは増加した CGI プローブが 355 個認められた。逆に、DEN + PB 群と DEN + IQ 群で DEN 単独群と比較して DNA メチル化が 1.5 倍以上減少した CGI プローブはそれぞれ 25 と 34 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 DEN + APAP 群で変動しないか増加し、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して減少を示した CGI プローブは 25 個であった (Fig. 2, Table 4)。

さらに DEN 単独群と比較してシグナル強度が DEN + APAP 群で変動しないか減少し、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して増加を示した CGI プローブのうち、CGI 領域が転写開始点から上流 100 bp 以内に一致して存在する遺伝子について Real-time RT-PCR 法による定量的な遺伝子発現解析を行った。その結果、DEN + APAP 群において、Zim1 遺伝子のみの有意な発現増加が認められた (Table 5)。

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 プロープ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 プロープを 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。言い換えるとこの時点で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 39 個の CGI プロープのなかには、慢性的なアルコールの消費により発現が上昇し、アルコール依存症のマーカーとして報告されている gamma-aminobutyric acid (GABA)A receptor (Gabrg3, Dick et al., 2004, Alcohol Clin Exp Res., 28, 4.) 遺伝子のプロモーター領域に位置するものなどが認められた。

また逆に、この時期で DEN + APAP 群と分離して DEN + PB 群と DEN + IQ 群でメチル化の減少した 55 個の CGI プロープの内、細胞回転や細胞増殖に関連する cyclin-dependent kinase-like 3 (Cdkl3, Jaluria et al., 2007, BMC Biotechnol., 7, 71) 遺伝子のプロモーター領域に位置するものなどが認められた。

一方、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して高メチル化変動を示した CGI プロープの内、CGI 領域が転写開始点から上流 100 bp 以内に存在する 12 個の遺伝子を選抜して、real-time RT-PCR 法により定量的遺伝子解析を行ったところ、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して発現が減少している遺伝子を見出す事はできなかつ

た。これらの事は、CGI アレイ解析により見出された弱いメチル化の変動は、転写制御には反映されていない可能性を示唆した。また Zim1 遺伝子は、DEN 単独群と比較して、DEN + APAP 群で有意な mRNA の発現増加が認められた。

E. 結論

マウス肝二段階発がんモデルを用いて、16 週間におよぶプロモーションで、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、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として期待が持てるものの、本研究では mRNA 発現に反映されるメチル化変動を見出せなかったため、プロモーター領域特異的な CGI オリゴヌクレオチドアレイの開発導入が必要と考えられた。

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 tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis*. 29(11): 2218-26, 2008.

Woo, G-H., Takahashi, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Igarashi, K., Kanno, J., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Cellular distributions of molecules with

altered expression specific to thyroid proliferative lesions developing in a rat thyroid carcinogenesis model. *Cancer Sci.* (in press).

Taniai, E., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Takahashi, M., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Crosstalk between PTEN/Akt2 and TGF β signaling involving EGF receptor downregulation during the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Cancer Sci.* (in press).

2. 学会発表

Kawai, M., Saegusa, Y., Jin, M., Nishimura, J., Dewa, Y., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Mechanistic study on hepatocarcinogenesis of piperonyl butoxide in mice. 47th Annual Meeting of Society of Toxicology (2008. 3. 16-20), Seattle, Washington, U.S.A., Program Description: Abstract # 113, P. 96.

川合正臣, 渋谷 淳, 禹 麻美, 高橋美和, 出羽康明, 西村次平, 三森国敏, 西川秋佳, 広瀬雅雄: マウス肝発がんプロモーション時期での DNA メチル化プロファイルの検討, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京, 2008 年 6 月 26~28 日, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 要旨集 S154 ページ(P-083)

谷合枝里子, 渋谷 淳, 高橋美和, 出羽康明, 西村次平, 島 智美, 吾郷恭平, 三森国敏: ラットの肝発がん過程早期からの PI3K/Akt 経路関連分子の免疫組織学的局在. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 日本獣医病理学会, 宮崎, 2008 年 9 月 24, 26 日, 第 146 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集 B-08 (p.155)

Kawai, M., Shibutani, M., Woo, G-H., Takahashi, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Hirose M.: DNA methylation profiling during the

promotion stage of mouse hepatocarcinogenesis. 45th Congress of the European Society of Toxicology (2008. 10. 5-8), Rhodes, Greece, Poster Number: O08, Abstracts/ Toxicology Letters 180S (2008) S122, O08, 2008.

渋谷 淳, 谷合枝里子, 出羽康明, 西村次平, 島 智美, 吾郷恭平, 高橋美和, 三森国敏: ラット肝発がんプロモーションにより生じる GST-P 陽性の変異肝細胞巣と腫瘍で特異的に発現変化を示す PTEN/Akt2 経路分子と TGF β 受容体. 第 25 回日本毒性病理学会学術集会, 浜松, 2009 年 1 月 27, 28 日, 第 25 回日本毒性病理学会 講演要旨集 p. 63 (O-3)

川合正臣, 三枝 由紀恵, 出羽康明, 金 美蘭, 西村 次平, 松本 明, 渋谷 淳, 三森国敏: マウス肝二段階発がんモデルを用いたピペロニル・ブトキサイドの肝発がん促進機序についての分子病理学的解析. 第 25 回日本毒性病理学会学術集会, 浜松, 2009 年 1 月 27, 28 日, 第 25 回日本毒性病理学会 講演要旨集, p. 74 (P-13)

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

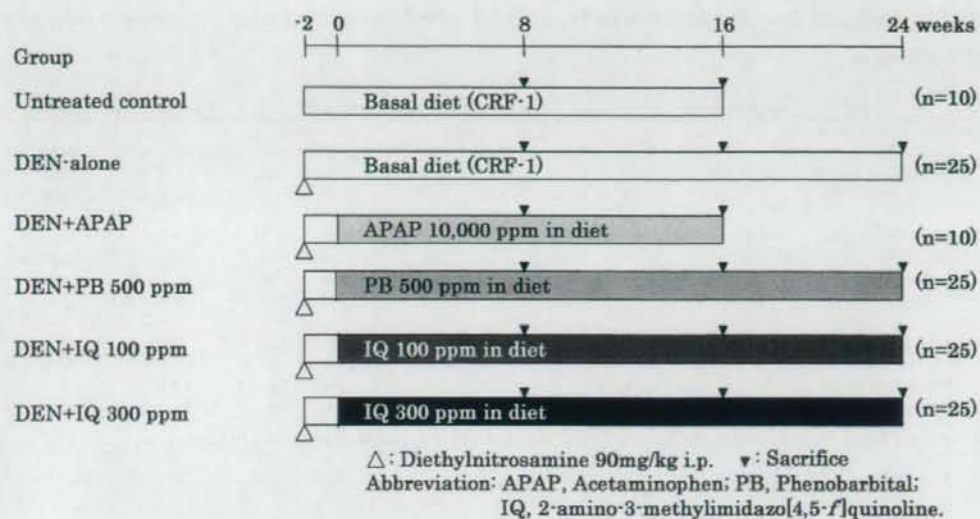


Figure 1. Experimental design

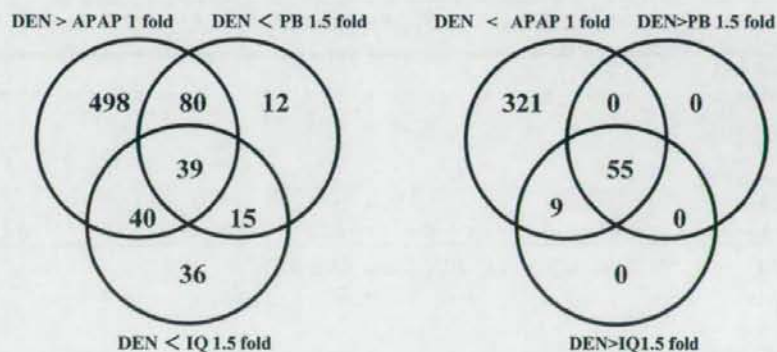


Figure 2. Venn diagram of CGIs showing increased methylation signals commonly to PB and IQ without increasing the signals with APAP in the liver of mice treated for 16 weeks during the post-initiation phase

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 10000ppm	DEN + PB 500 ppm	DEN + IQ 100 ppm	DEN + IQ 300 ppm
Week 8	No. of animals	5	5	5	5	5	5
	Body weight	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 **
	Absolute liver weight	1.43 ± 0.05	1.50 ± 0.15	1.00 ± 0.04 **	1.73 ± 0.17 *	1.43 ± 0.17	0.91 ± 0.08 **
	Relative liver weight	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	33.72 ± 1.49	34.46 ± 3.35	27.86 ± 1.27 **	32.48 ± 1.58	32.34 ± 1.77	27.04 ± 0.79 **
	Absolute liver weight	1.49 ± 0.06	1.48 ± 0.10	1.23 ± 0.15	1.86 ± 0.06	1.36 ± 0.11	1.06 ± 0.02 *
	Relative liver weight	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	-	36.9 ± 3.4	-	33.1 ± 1.8	33.8 ± 3.1	28.1 ± 1.6 **
	Absolute liver weight	-	1.7 ± 0.1	-	1.9 ± 0.2 *	1.5 ± 0.2 *	1.2 ± 0.1 **
	Relative liver weight	-	4.6 ± 0.2	-	5.6 ± 0.4 **	4.5 ± 0.3	4.2 ± 0.2 *

a) mean ±SD, -: non-examined, *, **, P<0.05, 0.01 vs. DEN-alone (Dunnett)

Table 2. Incidence and multiplicity 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
<u>No. of animals examined</u>	13	11	14	14
No. of altered foci				
Number	2 ± 1 ^{a)}	22 ± 7 **	5 ± 2 *	20 ± 9 **
Number/cm ²	0.75 ± 0.41	6.14 ± 2.05 **	1.47 ± 0.67 *	7.13 ± 2.98 **
No. of adenomas				
Number	0 ± 1	2 ± 2 *	0 ± 1	0 ± 1
Number/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 selected to show increase of methylation signals in the CGIs within the promotion region commonly to PB and IQ without increasing the signals with APAP

UHN clone No.	Genome Location	Gene Symbol	Description	mRNA accession
UHNmmcpG0003391	chr3:89233919-89234933	Pygo2	pygopus 2	NM_026869
UHNmmcpG0007024	chr5:64483770-64485082	Pgm1	phosphoglucomutase 1	NM_025700
UHNmmcpG0001449	chr7:52309038-52310084	Prrg2	proline-rich Gla (G-carboxyglutamic acid)	NM_022999
UHNmmcpG0002239	chr7:64641760-64642488	Gabrg3	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor	NM_008074
UHNmmcpG0006400	chr7:6648530-6649477	Zim1	zinc finger, imprinted 1	NM_011769
UHNmmcpG0000627	chr8:93836756-93837617	FTO	fat mass and obesity associated	NM_011936
UHNmmcpG0000627	chr8:93836756-93837617	Rpgrip1l	Rpgrip1-like	NM_173431
UHNmmcpG0002907	chr9:108472011-108472285	Dalrd3	DALR anticodon binding domain containing 3	NM_026378
UHNmmcpG0007019	chr9:100935173-100935614	Pccb	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta	NM_025835
UHNmmcpG0003237	chr11:85654019-85654613	Tbx2	T-box 2	NM_009324
UHNmmcpG0005091	chr11:101594245-101594772	Dhx8	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 8	NM_144831
UHNmmcpG0007051	chr12:21327205-21327637	Iah1	isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	AK014743

Table 4. List of genes selected to show decreased methylation signals in the CGIs within the promoter region commonly to PB and IQ without decreasing the signals with APAP

UHN clone No.	Genome Location	Gene Symbol	Description	mRNA accession
UHNmmcpG0006335	chr2:130493315-130494117	Itpa	inosine triphosphatase	AK139770
UHNmmcpG0001919	chr3:145312673-145313083	Cyr61	cysteine rich protein 61	NM_010516
UHNmmcpG0000619	chr5:137462966-137463959	Znhit1	zinc finger, HIT domain containing 1	NM_027318
UHNmmcpG0002130	chr6:135015148-135015835	Gprc5a	G protein-coupled receptor, family C, group 5,	NM_181444
UHNmmcpG0003294	chr7:86937902-86938705	Mesp1	mesoderm posterior 1	NM_008588
UHNmmcpG0002339	chr10:23516412-23517204	AK183134	Mouse-Transcript-ENST ENSMUST00000041635	AK183134
UHNmmcpG0003653	chr11:4604441-4604948	Zmat5	zinc finger, matrin type 5	AK013415
UHNmmcpG0000585	chr11:51817605-51818154	Cdkl3	cyclin-dependent kinase-like 3	AK186403
UHNmmcpG0004432	chr11:58120112-58120638	Zfp692	zinc finger protein 692	NM_001040686
UHNmmcpG0000634	chr16:8671589-8672621	Carhsp1	calcium-regulated heat-stable protein (24kD)	NM_025821
UHNmmcpG0003822	chr17:85189153-85190520	Lrpprc	leucine-rich PPR motif-containing protein	NM_028233

Table 5. Relative mRNA expression of genes showing increased methylation status in the CGI probes within the promoter region commonly to PB and IQ without decreasing the signals with APAP

Group Gene name	DEN-alone 5 ^{a)}	APAP 5	PB 100 ppm 5	IQ 500 ppm 5
PYGO2	1.01±0.13 ^{b)}	1.00±0.11	1.22±0.09	1.19±0.31
Pgm1	1.02±0.21	1.28±0.27	1.13±0.18	1.19±0.12
Prrg2	1.00±0.10	1.34±0.10**	1.17±0.16	1.36±0.16**
Gabrg3	1.01±0.14	0.89±0.52	1.59±2.09	0.85±0.66
Zim1	1.03±0.30	13.37±1.14**	1.18±0.93	1.28±0.61
FTO	1.10±0.56	1.63±0.20	1.30±0.68	1.70±1.02
Rpgrip11	1.05±0.36	1.47±0.13	1.30±0.51	1.55±0.78
Dalrd3	1.04±0.30	1.06±0.13	1.09±0.19	1.27±0.32
Pccb	1.01±0.16	0.89±0.14	0.96±0.24	1.08±0.30
Tbx2	1.01±0.18	1.28±0.04	1.21±0.17	1.29±0.26
Dhx8	1.07±0.44	1.06±0.15	1.03±0.51	1.43±0.90
Iah1	1.04±0.31	0.91±0.09	0.90±0.06	1.04±0.08

^{a)}Number of rats examined ^{b)} Values of mRNA expression levels (normalized by GAPDH) are expressed as mean ± S.D., *, **, P<0.05, 0.01 vs. DEN-alone (Dunnett)

The mRNA expression levels are calculated according to the 2-ddCt method and normalized by GAPDH as an endogenous control.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担研究報告書（平成20年度）

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

昨年度までに、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) を用いて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い、16週間のプロモーションによって初めて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 群の出現することを見出した。今年度は、非遺伝毒性肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO) について、同様のモデルで発がんプロモーション時期に、発がんを与える母地となる非がん部において変動するゲノムのメチル化プロファイルを、より高密度な CGI アレイを導入して網羅的に解析した。即ち、雄性 ICR マウスに 2/3 肝部分切除術を施し、その 24 時間後に肝発がん剤である DEN を 20 mg/kg の割合で腹腔内投与した。1 週後より、PBO を 0 ないし 0.6 % の濃度で餌に混ぜ 26 週間投与した。投与終了後の肝臓 (n=8~15/群) について病理組織学的な増殖性病変の発現個数の解析とともに DNAメチル化のプロファイルを CpG promoter アレイ (NimbleGen 製、10,825 スポット) により検討した。その結果 PBO 群によるプロモーションで腫瘍を含む増殖性病変数が増加した。また PBO のプロモーションにより、非がん部において転写開始点に位置するプローブや転写開始点より上方に 100 bp の間でメチル化変動パターンに差の生じたプロモーター配列断片群を認め、PBO でメチル化程度が 1.5 倍以上増加したものが 31 個認められた。その中には、細胞周期促進に関与する cell division cycle 34 (*cdc34*) や細胞増殖抑制に関与する WD repeat domain 6 (*wdr6*) 遺伝子のプロモーター配列が得られた。

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ぬ。

ゲノム中にはメチル化を受けやすいCpG-richな領域(CpG アイランド: CGI)が存在し、その多くはメチル化を免れている。このCGI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な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CGI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CGI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て、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。

昨年度、マウス肝二段階発がんモデルを用いた、既知発がん物質であるphenobarbital (PB)および2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)による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、16週間のプロモーションによって非発がん物質のAPAPと分離してメチル化の増加を示したCGIを39個見出し、この時期で発がん物質に特有な転写制御機構の働く遺伝子群の出現する可能性を示唆した。

本年度は、マウス肝二段階発がんモデルを用いて、動物用医薬品の非遺伝毒性肝発がん物質であるpiperonyl butoxide (PBO)による発がんプロモーション過程でのDNAメチル化のプロファイルを、CGIを含むプロモーター領域が搭載されたCpG Promoter アレイにより網羅的に検索する。

B. 研究方法

実験デザインをFig. 1に示す。6週齢の雄性ICRマウス(日本SLC株式会社)に再生性の肝細胞増殖を誘導させるためエーテル麻酔下で2/3肝部分切除術を施した。その24時間後に肝発がん剤であるdiethylnitrosamine (DEN)を20 mg/kgの割合で腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。1週間後より、PBOを0ないし0.6%の割合で飼料に混じて26週間投与した。投与26週目に全生存動物(DEN単独群: 8匹、DEN+PBO群: 15匹)をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取し、重量を測定後、肝組織の一部を採取し、メタカーン固定液にて、4°Cで24時間固定した。また残りの肝組織を10%中性緩衝ホルマリン固定液にて48時間固定し、常法に従いパラフィン包埋、薄切後にヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本作製し、光学顕微鏡下にて肝変異細胞巣、肝細胞腺腫および肝細胞癌の数を測定した。PBOプロモーション群において、投与26週間目における肝細胞腺腫および肝細胞癌の数をDEN単独群と比較した結果、いずれも増加を示した(Table 1)。PBOプロモーションによりDEN単独群と比較し

て、DNA メチル化変動を示したプロファイルを CpG promoter マイクロアレイにより求めた (n=5/群)。CGI マイクロアレイ用の組織サンプルとして、メタカーン固定パラフィン包埋した肝組織より薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色による観察の後に、非がん部をマイクロダイゼクションにより採取したものをを用いた。採取したサンプルより DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN, Germany) によりゲノム DNA を抽出後、制限酵素 (*MseI*, New England Biolabs, USA) による DNA の切断、除タンパクを行った。*MseI* 処理後 DNA の一部を Input DNA とした。残りの DNA を、抗 5-methyl cytidine monoclonal 抗体 (Abcam, USA) を用いた免疫沈降を行い immunoprecipitated (IP) DNA とした。Input および IP DNA は、WGA2 Kit (Sigma, USA) により DNA を増幅後、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、CpG promoter マイクロアレイ (MM8 CpG-island Pro, NimbleGene, USA) を用い、Innoscan700 (Inopsys, France) にてシグナルデータを取り込んで定量後、ChipMonk (Babraham Bioinformatics, France) を用いて解析を行った。方法としては、各データの per array lowess normalization と global normalization を行った。そしてマイクロアレイに搭載されているプロモーター領域プローブのうち、一つの遺伝子の転写開始点がいくつであっても、転写開始点を含むプローブ配列断片、もしくは上流 100 bp 以内に位置するプローブ配列断片の全てを選択した (178,730 probes)。各シグナルの値は、IP DNA と Input DNA の比 (IP DNA/Input DNA) をメチル化のシグナル値とし、DEN 単独群および PBO 各群のそれぞれ 5 サンプル中 3 サンプル以上で、メチル化が減少もしくは変化しないプローブ配列断片 (DEN 単独群: 67,995 probes, PBO 69,710 probes) およびメチル化が 1.5 倍以上増加したプローブ配列断片 (DEN 単独群: 12,128 probes, PBO 群 9,620 probes) を選出した。それら選出したプローブ配列断片をそれぞれ比較し選別した (Fig. 2)。

統計解析としては、DEN 単独群と PBO 群との間で Student-t test を行い、有意水準 5 % 以下を有意差ありとした。マイクロアレイの結果に対しては今回統計解析を実施しなかった。

(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およ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 26 週目の PBO 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 (Table 1)。肝臓重量は、PBO 群で絶対値と相対値がそれぞれ 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の結果、PBO プロモーションにより肝細胞腺腫および肝細胞癌の増加がそれぞれ認められた (Table 2)。

次に、CpG promoter マイクロアレイによる DNA メチル化を検討した。その結果、DEN 単独群でメチル化が変動もしくは低下したプローブ配列断片と、PBO 群で 1.5 倍以上メチル化が増加したプローブ配列断片を比較したところ、31 個が認められ、いずれも 100 bp 以内に mRNA 情報が含まれていた (Table 3)。逆に PBO 群でメチル化が変動もしくは低下したプローブ配列断片と、DEN 単独群で 1.5 倍以上メチル化が増加したプローブ配列断片を比較したところ、122 個が認められ (Fig. 2)、そのうち 100 bp 以内に mRNA 情報が含まれている 115 個を選出した (Table 4)。これらプローブ配列断片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、プローブ配列断片が高メチル化変動を示した遺伝子には、ユビキチン転移酵素ファミリーで細胞周期を促進することが知られている cell division cycle

34 (*cdc34*) や細胞増殖抑制に関与する WD repeat domain 6 (*wdr6*) 遺伝子が見出された。またプローブ配列断片が低メチル化変動を示した遺伝子には、線維芽細胞の増殖因子 (*fgf1*) が見出された (Table 3)。

D. 考察

本研究において肝二段階発がんモデルを用いたマウス肝発がんプロモーション時期に発がんを与える母地となる非がん部において変動するゲノムのメチル化プロファイルを検討したところ、PBO の 26 週間におよぶプロモーションにより、非がん部において特異的なメチル化変動パターンを示すプローブ配列断片群が 31 個認められた。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、PBO によりメチル化制御機構の働く遺伝子群の出現する可能性が示唆された。言い換えると PBO プロモーション過程において、特異的な分子機能の起動する可能性を示唆した。

この選出された 31 個のプローブ配列断片群の下流に位置する遺伝子には、ユビキチン転移酵素ファミリーであり、プロテインキナーゼ CK2 を介してリン酸化されることで、Cdc34-SCF^{Cdc4} をユビキチン化し、細胞周期を促進 (Sadowski M., et al., *Biochem J.* 405: 569-81, 2007) している Cdc34 の高メチル化が認められた。さらにこの遺伝子は、ヒトにおいて細胞周期抑制遺伝子 p27^{kip1} をユビキチン化し、細胞周期の促進に関与することがすでに報告されている (Block K., et al., *Cell Cycle.* 4: 1421-7, 2005)。また WDR6 遺伝子は、Hela 細胞においては、セリン/スレオニンキナーゼ LBK1 と共発現し、細胞周期の G1 期を停止して細胞増殖に関わる遺伝子としてすでに報告されている (Xie X., *Mol. Cell Biochem.*, 301: 115-122, 2007)。さらにこの WDR6 遺伝子は、発がん物質特異的に高メチル化変動する事をすでに昨年度報告している。また PBO プロモーションによって低メチル化変動が認められた *Fgf1* 遺伝子は、肝発がんの発生に関係している事が報告されている (Chow NH, et al.,

Dig Dis Sci. 43: 2261-6, 1998)。

また、その他にも機能が明らかにされていない遺伝子が選出されており、PBO 投与により高メチル化もしくは低メチル化が認められたこれら遺伝子の、発がん初期に与える影響については大変興味深い。

E. 結論

マウス肝二段階発がんモデルを用いて、イニシエーション後のプロモーション時期に、26 週間におよぶ PBO の投与により、DNA メチル化パターンに変動の生じるプロモーター配列断片群が見出された。このことから CGI promoter 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構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 tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis.* 29(11): 2218-26, 2008.

Woo, G-H., Takahashi, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Igarashi, K., Kanno, J., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Cellular distributions of molecules with altered expression specific to thyroid proliferative lesions developing in a rat thyroid carcinogenesis model. *Cancer Sci.* (in press).

Taniai, E., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada,

T., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Takahashi, M., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Crosstalk between PTEN/Akt2 and TGF β signaling involving EGF receptor downregulation during the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Cancer Sci.* (in press).

2. 学会発表

Kawai, M., Saegusa, Y., Jin, M., Nishimura, J., Dewa, Y., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Mechanistic study on hepatocarcinogenesis of piperonyl butoxide in mice. 47th Annual Meeting of Society of Toxicology (2008. 3. 16-20), Seattle, Washington, U.S.A., Program Description: Abstract # 113, P. 96.

川合正臣, 渋谷 淳, 禹 麻美, 高橋美和, 出羽康明, 西村次平, 三森国敏, 西川秋佳, 広瀬雅雄: マウス肝発がんプロモーション時期での DNA メチル化プロファイルの検討, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2008 年 6 月 26~28 日、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 要旨集 S154 ページ(P-083)

谷合枝里子, 渋谷 淳, 高橋美和, 出羽康明, 西村次平, 島 智美, 吾郷恭平, 三森国敏: ラットの肝発がん過程早期からの PI3K/Akt 経路関連分子の免疫組織学的局在. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 日本獣医病理学会、宮崎、2008 年 9 月 24、26 日、第 146 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集 B-08 (p.155)

Kawai, M., Shibutani, M., Woo, G-H., Takahashi, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Hirose M.: DNA methylation profiling during the promotion stage of mouse hepatocarcinogenesis. 45th Congress of the European Society of Toxicology (2008. 10. 5-8), Rhodes, Greece, Poster Number: O08, Abstracts/ Toxicology Letters 180S (2008) S122, O08, 2008.

渋谷 淳, 谷合枝里子, 出羽康明, 西村次平, 島 智美, 吾郷恭平, 高橋美和, 三森国敏: ラット肝発がんプロモーションにより生じる GST-P 陽性の変異肝細胞巣と腫瘍で特異的に発現変化を示す PTEN/Akt2 経路分子と TGF β 受容体. 第 25 回日本毒性病理学会学術集会、浜松、2009 年 1 月 27, 28 日、第 25 回日本毒性病理学会 講演要旨集 p. 63 (O-3)

川合正臣, 三枝 由紀恵, 出羽康明, 金 美蘭, 西村 次平, 松本 明, 渋谷 淳, 三森国敏: マウス肝二段階発がんモデルを用いたビペロニル・プトキサイドの肝発がん促進機序についての分子病理学的解析. 第 25 回日本毒性病理学会学術集会、浜松、2009 年 1 月 27, 28 日、第 25 回日本毒性病理学会 講演要旨集, p. 74 (P-13)

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

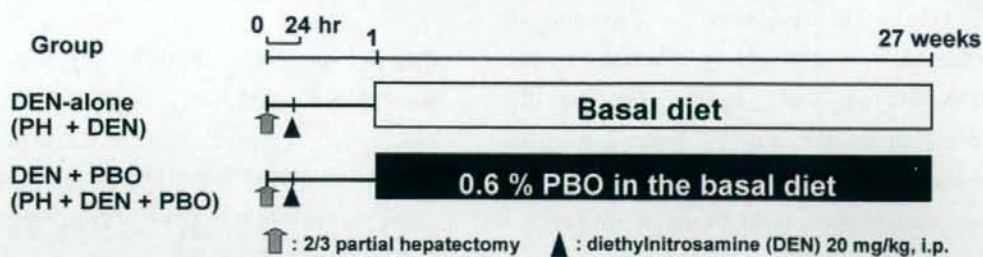


Fig. 1. Experimental design

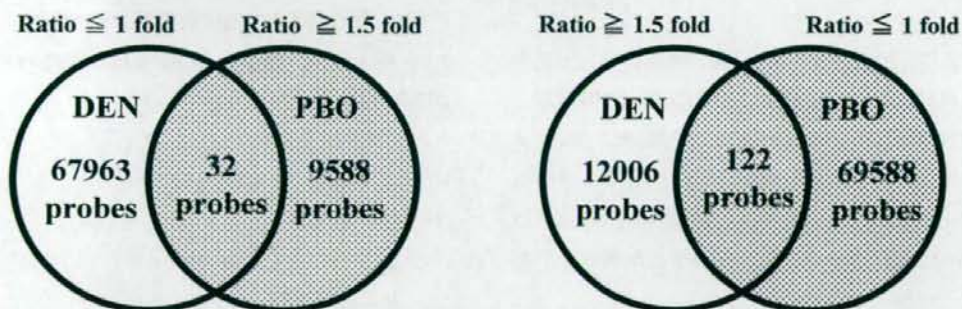


Fig. 2. Venn diagram of promoter sequence probes showing increased methylation signals only in DEN-alone group or DEN+PBO group at 26 weeks of tumor promotion