

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 21 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、農薬/動物薬・殺虫剤相乗剤で非遺伝毒性肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO) について、マウス二段階肝発がんモデルを用いた発がん促進による腫瘍形成時期（25 週目）に、発がんの基礎環境となる非がん部でメチル化の変動するゲノムプロファイル（CpG プロモーターマイクロアレイ）の網羅的解析により検討した。その結果、転写開始点からその 5' 側に 100 bp の間でメチル化変動パターンに差が生じたプロモーター配列断片群を複数認めた。本年度は、これらのプロモーター配列断片群の下流遺伝子のうち、メチル化の亢進した遺伝子に注目して、部位特異的 real-time RT-PCR ならびに免疫組織学的解析を行った。その結果、real-time RT-PCR 解析により、PBO の発がん促進によって *Serpina3m* は非がん部のみならず、増殖性病変でも更に発現低下を示し、好中球の活性化による発がん促進作用への関与が示唆された。*WD repeat domain 6 (wdr6)* は real-time RT-PCR 解析や免疫染色により、PBO による発がん促進により非がん部で発現低下を示したことから、この遺伝子産物は発がん促進過程での非がん部の肝細胞の G₁ 停止の維持に機能し、前がん病変や腫瘍細胞の選択的な増殖への寄与が示唆された。*WDR6* と同様の免疫組織学的局在を示した分子機能の不明な *CMTM6* は、今後発がんとの関連で機能解析が必要な分子と考えられた。また、*WDR6* 及び *CMTM6* は、PBO による 8 週間の発がん促進をした肝臓においても、前がん病変と非がん部で 25 週目と同様の発現パターンを示し、発がん促進初期からの関与が示唆された。

以上の結果から、PBO の発がん促進によりメチル化制御機転の働く遺伝子群の出現が見出され、これらの PBO による肝発がんへの寄与が示唆された。

A. 研究目的

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、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、農薬/動物薬・殺虫剤相乗剤で非遺伝毒性肝発がん物質であることが知られている piperonyl butoxide (PBO)による肝腫瘍形成期において、DNA メチル化のシグナル変動を検討したところ、25週間の発がん促進によって発がんの基礎環境(発生母地)となる非がん部において、対照群の非がん部と比較して、メチル化の増加を示したプローブ配列断片群を31個見出した。

本年度は、これらメチル化変動を示したプローブ配列断片群をプロモーター領域に持つ遺伝子の発現解析を行った。さらに8ないし25週間にわたり PBO により発がん促進した肝臓について、これら遺伝子の発現局在も検索した。

B. 研究方法

動物実験

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 25 週間投与し

た。投与 25 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 発がん促進群において、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 による発がん促進で、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 プロモーターマイクロアレイにより求めた (n=5/群)。

マイクロダイセクション

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 (HE) 染色による観察の後に、HE 染色切片と照らし合わせながら、非がん部組織 (DEN+PBO 群および DEN 単独群)、変異肝細胞巣 (DEN+PBO 群)、肝細胞腺腫 (DEN+PBO 群) ならびに肝細胞癌 (PBO 投与群) をそれぞれマイクロダイセクション装置 (Leica Microsystems Japan) を用いて採取した。採取した組織は、使用時まで -80°C で保存した。

DNA メチル化網羅的解析

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 プロモーターマイクロアレイ (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)。

Real-time RT-PCR 解析

マイクロダイセクションで組織部位特異的に採取した DEN 単独群の非がん部 (non-tumour tissue)、DEN+PBO 群の非がん部 (non-tumour tissue)、変異肝細胞巣 (foci)、肝細胞腺腫 (adenoma) および肝細胞癌 (carcinoma) から RNA Micro kit (Quiagen、Germany) を用いて total RNA をそれぞれ抽出し、real-time RT-PCR を行った。抽出した total RNA は、吸光度計を用いて定量し、得られた total RNA 10 ng について QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Quiagen) を用いて増幅を行うと同時に、cDNA を合成した。全ての PCR 反応は Power SYBR Green I

chemistry (Applied Biosystems Japan、Tokyo) を用い、50°C、2 分のインキュベーション後、95°C、10 分および 95°C、15 秒、45 サイクルおよび 60°C、1 分の条件下、Step one Plus (Applied Biosystems Japan) にて行った。各遺伝子のプライマーリストを Table 1 に示す。各プライマーは Primer Express 3.0 Software (Applied Biosystems Japan) を用い、製造元の手順書に従って設計を行った。各遺伝子の mRNA 発現は、対照群の非がん部組織での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である GAPDH の検量線を求め、相対定量法にて算出した。

免疫組織学的検索

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓の一部を 4%パラフォルムアルデヒド固定後、エタノール系列で脱水、パラフィン包埋した後、薄切し、一部は HE 染色を施した。免疫組織学的解析については、以下の手順で行った。サイトケラチン 8/18 (CK8/18) については、脱パラフィン処理した肝組織切片を、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、マイクロウエーブにて 30 分間低出力で反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3%過酸化水素を含む PBS 液で 20 分間処理した後、正常ヤギ血清でブロッキングし、モルモット抗 CK8/18 抗体 (100 倍希釈; ROGEN Biotechnik GmbH、ドイツ) を用いて 4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、モルモット 2 次抗体 (Fitzgerald Industries International Inc.、MA、USA) で室温 30 分処理した後、3、3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。さらに WD Repeat Domain 6 (WDR6) 抗体及び CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6 (Chemokine-like factor superfamily member 6 (CMTM6) の免疫組織学的解析については、以下の手順で行った。脱パラフィン処

理した肝組織切片を内因性ペルオキダーゼ処理として0.3%過酸化水素を含むPBS液で20分間処理した後、正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体として、ウサギ抗WDR6抗体(200倍希釈; LifeSpan BioSciences, UK)およびウサギ抗CMTM6抗体(100倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA)を用いて4°Cで一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応はVectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories; 米国)を用い、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

統計解析

統計解析としては、DEN単独群とDEN+PBO群との間でStudent's/Welch's 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

PBOによる発がん促進作用

投与8及び25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 2)。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 2)。

肝臓におけるCK8/18免疫組織学的検索の結果、PBO 25週間における発がん促進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 3)。

DNAメチル化遺伝子の同定

次にCpGプロモーターマイクロアレイによるDNAメチル化を検討した結果、DEN単独群でメチル化が不変か、もしくは低下したプローブ配列断片中にDEN+PBO群において1.5倍以上メチル化が増加したものが31個認められ、いずれも下流に向かって100bp以内にmRNA情報が含まれていた(Table 4, Fig. 3)。逆にDEN+PBO群でメチル化が不変か、もしくは低下し、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は122個認められ、そのうち下流に100bp以内にmRNA情報が含まれている113個を選出した(Table 5, Fig. 3)。

増殖性病変の内外でのmRNA発現

CpGプロモーターマイクロアレイ解析によって選出されたプローブ配列断片に相当する遺伝子について、real-time RT-PCRによるmRNAの発現解析を実施した。実施したものの中で、実際に発現変動が認められたものについてTable 5に示す。

DEN単独群の非がん部と比較して、DEN+PBO群の非がん部では、Epb4.1、Tnfrsf26、Wdr6、Cdc32、Serpina3mなどの遺伝子の発現低下傾向が認められた。また、Serpina3mは、DEN単独群の非がん部に比較して、PBO発がん促進によって生じた肝変異細胞巣、肝細胞腺腫および肝細胞癌で、有意にmRNA発現の減少を示した。Tnfrsf26は、肝変異細胞巣および肝細胞癌において有意な発現減少を示した。さらにWdr6は、肝細胞癌において有意な発現増加を示した。

候補分子の局在解析

WDR6およびCMTM6免疫組織染色の結果、いずれもDEN単独群の非がん部において弱く構成的な発現を示し、逆に多くの肝変異細胞巣および肝細胞腺腫においては陰性を示した。一方、DEN+PBO群の非がん部においてはWDR6

および CMTM6 は陰性を示し、肝変異細胞巢、腺腫および肝細胞癌においては逆に陽性を示し、この陽性レベルは、DEN 単独群の非がん部よりも強かった。さらに、より短期間の PBO の発がん促進を行った肝臓での発現分布を検討する目的で、PBO の 8 週間の発がん促進を行ったマウスの肝臓において、非がん部に WDR6 および CMTM6 の弱陽性を示す部位と陰性部位が混在した。さらに肝変異細胞巢では、WDR6 および CMTM6 の陽性巢が多く認められた (Fig. 3)。

D. 考察

本研究で、マウス肝二段階発がんモデルを用いた PBO の 25 週間におよび発がん促進により、発がんの基礎環境となる非がん部でのメチル化の変動するゲノムプロファイルを検討したところ、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、これらの中に PBO による発がん促進によりメチル化制御機転の変化する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 発がん促進過程において、エピジェネティックな分子発現制御により細胞機能が変化する可能性を示唆した。

選出された 31 個のメチル化亢進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-SCFCdc4 をユビキチン化し、細胞周期を促進している Cdc34 遺伝子が見出された。さらにこの遺伝子は、ヒトにおいて細胞周期抑制遺伝子 p27kip1 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。また、同様に見出された Wdr6 遺伝子は、Hela 細胞において、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既に報告されている。

近年、ROS 誘導性の酸化ストレスが DNA メチル化の亢進を引き起こし、さらに遺伝子発現制御にも影響を及ぼすことで、肝発がんに関与

する事が報告されている。これらのことを考えると、PBO 投与によって誘発される肝細胞の酸化ストレスが、DNA メチル化の変動に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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ついて real-time RT-PCR 解析を行い、DNA メチル化制御による遺伝子サイレンシングが誘導されているかの確認を行った。その結果、一部の遺伝子で DEN 単独群の非がん部と比較して、DEN+PBO 群の非がん部で mRNA の発現低下傾向が認められたことから、DNA メチル化制御による遺伝子サイレンシングの生じている可能性が示唆された。さらに PBO による発がん促進で非がん部における mRNA 発現の減少傾向が認められた *Serpina3m* については、変異肝細胞巢、腺腫および肝細胞癌においても有意な発現低下が認められた。この遺伝子産物は serpin peptidase inhibitor、clade A (α -1 antiproteinase, antitrypsin) であり、好中球の elastase の阻害因子である。好中球 elastase が過剰になると組織傷害により発がんし易くなることが報告されている。また、WDR6 は、PBO の発がん促進により、肝細胞癌部位において有意な mRNA 発現上昇が認められたことから免疫組織化学染色を行った結果、発がん促進により肝変異細胞巢、腺腫および肝細胞癌において陽性を示し、このことより、細胞周期の G₁ 停止にあった細胞が発がんに伴って解除されたため、細胞分裂能を獲得するものと考えられた。また CMTM6 はケモカイン様の分子であるが、生物学的な機能が知られていない。本研究において、その免疫染色結果から、CMTM6 は WDR6 とほぼ同じ染色性を示し、PBO による肝発がんメカニズムに重要な働きをもつ可能性が示唆された。

以上、マウス肝二段階発がんモデルにおいて、25 週間に及ぶ PBO の発がん促進により、非がん部で 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。殊に、本研究で得られたメチル化亢進している遺伝子

の中に、細胞増殖性や発がんとの関連が示唆されているものが見いだされ、WDR6 は発がん促進によって非がん部の肝細胞の G₁ 停止の維持に機能し、前がん病変や腫瘍細胞の選択的な増殖に寄与していることが示唆された。Serpina3m は好中球の反応性を反映し、PBO による発がん促進に好中球による炎症と組織破壊の関与が示唆された。CMTM6 は、今後発がんとの関連で機能解析の必要な分子と考えられた。

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発がん促進時期に、25 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。特に肝細胞や好中球などの多様な機能のエピジェネティックなメカニズムによる変調が、PBO による発がんに関与している可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawai, M., Saegusa, Y., Kemmochi, S., Harada, T., Shimamoto, K., Shibutani, M., Mitsumori, K.:
Cytokeratin 8/18 Is a Useful Immunohistochemical Marker for Hepatocellular Proliferative Lesions in Mice. J. Vet. Med. Sci. (in press).

2. 学会発表

川合正臣、三枝由紀恵、剣持 明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷 淳、三森国敏：ピペロニルブトキサイドのマウス肝発がん機序，第 24 回発癌病理研究会，金沢，2009 年 8 月

川合正臣、三枝由紀恵、剣持 明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷 淳、三森国敏：マウスにおけるピペロニルブトキサイドの肝発が

ん機序. 第 26 回日本毒性病理学会学術集会.

2010 年 2 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

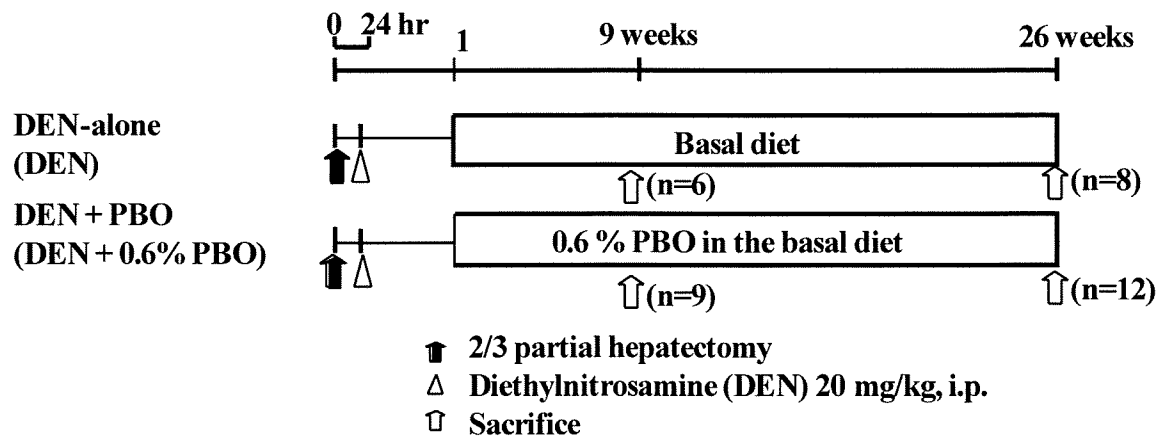


Fig. 1. Experimental design

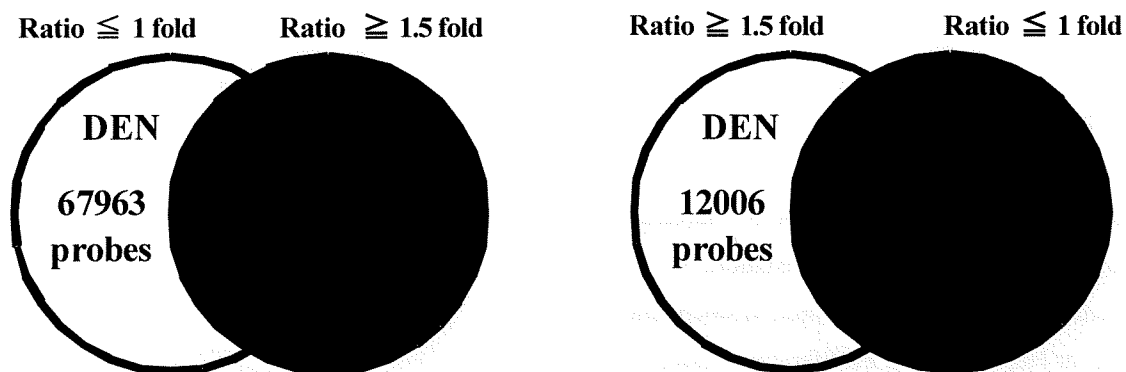
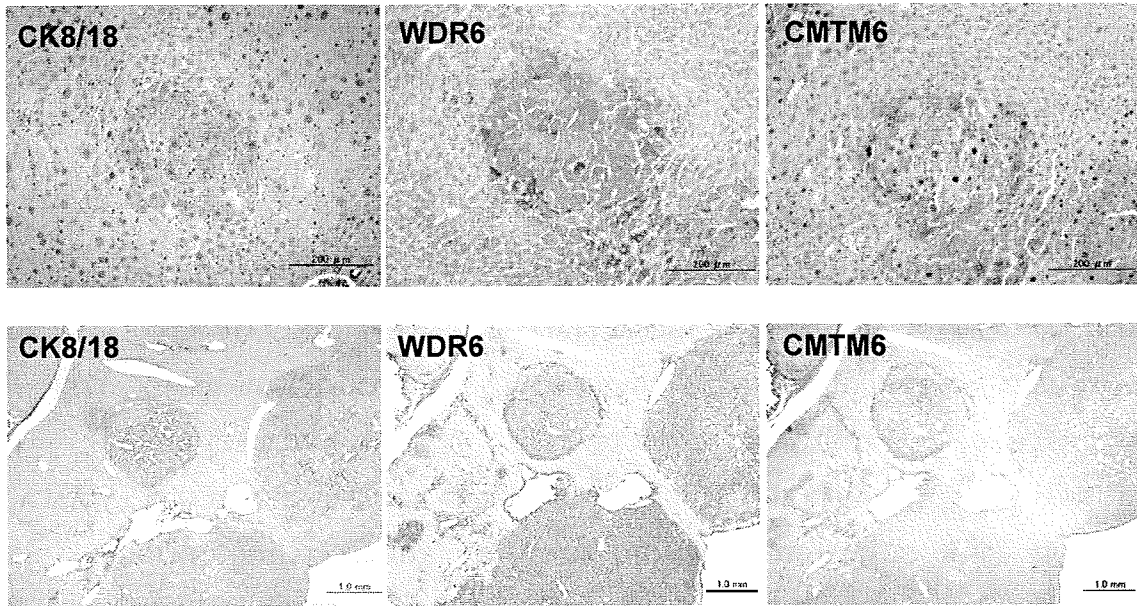


Fig. 2. Venn diagram of promoter sequence probes showing increased methylation signals only in DEN-alone group or DEN+PBO group at 26 weeks of tumor promotion

(A)



(B)

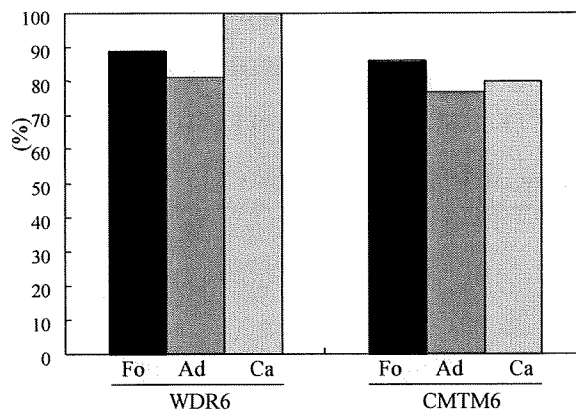


Fig.3 (A) Immunohistochemical localization of WDR6 and CMTM6 in CK8/18-positive foci of alteration and hepatocellular adenoma after promotion by PBO for 8 weeks (upper) and 25 weeks (lower). Increased expression of WDR6 and CMTM6 in comparison with surrounding liver cells was found in most of CK8/18-positive foci of alteration and hepatocellular adenoma and hepatocellular carcinoma. (B) Immunohistochemical expression patterns of WDR6 and CMTM6 in CK8/18-positive liver cell foci after promotion by PBO for 25 weeks. Numbers of lesions examined: Fo 64, Ad 47, Ca 5. Fo, foci of alteration; Ad, hepatocellular adenoma; Ca, hepatocellular carcinoma.

Table 1. Sequence of primers used for real-time RT-PCR analysis.

Accession no.	Symbol	Forward primer	Reverse primer
NM_016973	<i>St6galnac6</i>	CGCTGGCCTCTACCCTTCA	CGCTGCTCTTTGTTGCTACTCA
NM_001045523	<i>Bahd1</i>	GCATGAGCCTTTGCAGAATGA	CAATGCAGGCCACACTGTTC
NM_029985	<i>Lrrc42</i>	GTGCGGCAGCGGAAAG	GAGCTCGATTCTGGTAGAAGTATTGA
NM_183428	<i>Epb4.1</i>	CCATTGCAGCTCCTGAACCT	AGCTGGCTGTGTCTCTATACTGCTT
NM_175649	<i>Tnfrsf26</i>	CAATGTTCTGCTGGCACTTACC	ATGGAGCACATTCACTCTTATTATGGT
NM_007456	<i>Ap1m1</i>	CGTTTCATGTGGATTAAGCACAA	CACCAGTGACACACAAGCATTCT
NM_139272	<i>Galnt2</i>	TGGAGAGTGACAAGCTGCACAT	CTTGCCTGACACTGGTCAT
NM_176935	<i>F730015K02Rik</i>	AACTCTGTGATGGAAGATGATTGAAG	AATGTCAGTTAAGCCTGCTACAACA
NM_031392	<i>Wdr6</i>	CCATGTGACAGGCGTCAAGA	GTCAGCCGCTGGTCTATGGA
NM_026036	<i>Cmtm6</i>	CTGCTGGCATCTATCATTTTTGTC	GCCAAACACAATTGCAGCAA
NM_177613	<i>Cdc34</i>	CCAGTTGACGACCCACAGAGT	TCAGGAGGATGGTTCTGACATTC
NM_012030	<i>Sle9a3r1</i>	CCAGAATGAGGCCGAAAAGA	TAGACTTGTGCTGTGCAGGTT
NM_009253	<i>Serpina3m</i>	CTTCTCAAACAAGCTGACCTATCT	TGTGGACCACCTGAGACACACT
NM_146066	<i>Gspt1</i>	CCATCTGCCTGGAGACCTTTAA	TGCAATGGTCTTACCCTCATCTCT
NM_027937	<i>Caskin1</i>	CACGGAGAGAGTTTCCTTTTGAA	ATAGATTACTGCACCGAGGTTGGT
NM_030700	<i>Maged2</i>	AAGAGCTGCGAAGCTACAGTCA	CCAAGTCATTTGCCCTTCCTT

Table 2. Body and liver weights of mice treated with PBO after DEN-initiation

	8 weeks		25 weeks	
	DEN-alone	DEN+PBO	DEN-alone	DEN+PBO
No of animal	6	9	8	15
Final body weight (g)	47.38±5.03 ^{a)}	42.32±3.12	51.43±6.37	46.38±2.84*
Absolute liver weight (g)	2.07±0.15	3.87±0.54**	2.91±0.92	8.12±2.52**
Relative liver weight (% body weight)	4.38±0.31	9.13±0.99**	5.60±1.54	17.42±4.99**

The data represents mean±S.D., a) mean ±SD,

*, **, P<0.05, 0.01 vs. DEN-alone (Student's-t test)

Table 3. Incidences and multiplicitis of proliferative lesions in the liver of mice treated with PBO after DEN-initiation

Duration of administration (week)	HE stain		CK8/18				Total	
	8	25	Positive		Negative		8	25
			8	25	8	25		
Incidence (%)								
Foci of alteration	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	0 (0)	5 (83)	6 (100)	6 (100)
Hepatocellular adenoma	0 (0)	6 (100)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	4 (67)	0 (0)	6 (100)
Hepatocellular carcinoma	0 (0)	3 (50)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (50)
Multiplicity (No./mouse)								
Foci of alteration	10.17±7.83 ^{a)}	4.47±2.31	18.50±3.45	19.67± 8.98	0	3.50±3.45	18.50±3.45	23.17±11.21
Hepatocellular adenoma	0	11.17±3.66	0	9.83± 3.06	0	1.33±1.51	0	11.17±3.54
Hepatocellular carcinoma	0	1.50±2.08	0	1.50± 1.97	0	0	0	1.50±1.97

The data represents mean±S.D., a) mean ±SD

Table 4. List of probes that showed increased hypermethylation (1.5-fold or more) in non-tumor portion of DEN+PBO group in contrast to the unchanged methylation or increased hypomethylation (1.5-fold or more) in the corresponding portion of DEN-alone group.

Probe No.	Genome Location	Symbol	Description	Accession No.
CHR01FS122434416	Chr1: 122434416-122434465	<i>En1</i>	engrailed 1	NM_001025310
CHR02FS032434346	Chr2: 32434346-32434395	<i>St6galnac6</i>	ST6(alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6	NM_016973
CHR02FS118593175	Chr2: 118593175-118593224	<i>Bahd1</i>	bromo adjacent homology domain containing 1	NM_001045523
CHR04FS106750569	Chr4: 106750569-106750618	<i>Lrrc42</i>	leucine rich repeat containing 42	NM_029985
CHR04FS131320681	Chr4: 131320681-131320730	<i>Epb4.1</i>	erythrocyte protein band 4.1	NM_183428
CHR05FS031728995	Chr5: 31728995-31729044	<i>Zfp512</i>	zinc finger protein 512	NM_172993
CHR05FS111079836	Chr5: 111079836-111079885	<i>Hscb</i>	HscB iron-sulfur cluster co-chaperone homolog(E. coli)	NM_153571
CHR06FS003448611	Chr6: 3448611-3448660	<i>Ccdc132</i>	coiled-coil domain containing 132	NM_024260
CHR07FS029435360	Chr7: 29435360-29435409	<i>1700067C01Rik</i>	RIKEN cDNA 1700067C01 gene	NM_029714
CHR07FS142278313	Chr7: 142278313-142278373	<i>Lsp1</i>	lymphocyte specific 1	NM_019391
CHR07FS143426694	Chr7: 143426694-143426743	<i>Tnfrsf26</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 26	NM_175649
CHR08FS013870120	Chr8: 13870120-13870176	<i>Zfp828</i>	zinc finger protein 828	NM_181854
CHR08FS075169137	Chr8: 75169137-75169186	<i>Ap1m1</i>	adaptor-related protein complex AP-1, musubunit 1	NM_007456
CHR08FS127118305	Chr8: 127118305-127118354	<i>Galnt2</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptideN-acetylgalactosaminyltransferase 2	NM_139272
CHR09FS064609389	Chr9: 64609389-64609438	<i>F730015K02Rik</i>	RIKEN cDNA F730015K02 gene	NM_176935
CHR09FS108436470	Chr9: 108436470-108436519	<i>Wdr6</i>	WD repeat domain 6	NM_031392
CHR09FS114580016	Chr9: 114580016-114580065	<i>Cntm6</i>	CKLF-like MARVEL transmembrane domaincontaining 6	NM_026036
CHR10FS041499044	Chr10: 41499044-41499093	<i>Sesn1</i>	sestrin 1	NM_001013370
CHR10FS079090972	Chr10: 79090972-79091021	<i>Cdc34</i>	cell division cycle 34 homolog (S.cerevisiae)	NM_177613
CHR11FS114980153	Chr11: 114980153-114980202	<i>Slc9a3r1</i>	solute carrier family 9 (sodium/hydrogenexchanger), isoform 3 regulator 1	NM_012030
CHR12FS071371758	Chr12: 71371758-71371807	<i>Tmx1</i>	thioredoxin-related transmembrane protein 1	NM_028339
CHR12FS102684134	Chr12: 102684134-102684183	<i>Rin3</i>	Ras and Rab interactor 3	NM_177620
CHR12FS104739680	Chr12: 104739680-104739729	<i>Serpina3m</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor,clade A, member 3M	NM_009253
CHR13FS095040997	Chr13: 95040997-95041056	<i>Arsb</i>	arylsulfatase B	NM_009712
CHR16FS011167882	Chr16: 11167882-11167931	<i>Gspt1</i>	G1 to S phase transition 1 (Gspt1), transcript variant 1	NM_146066
CHR17FS006095443	Chr17: 6095443-6095492	<i>Tulp4</i>	tubby like protein 4	NM_054040
CHR17FS024233973	Chr17: 24233973-24234022	<i>Caskin1</i>	CASK interacting protein 1	NM_027937
CHR17FS084177453	Chr17: 84177453-84177502	<i>Thada</i>	thyroid adenoma associated	EF222207
CHR19FS025572722	Chr19: 25572722-25572771	<i>Dmrt1</i>	doublesex and mab-3 related transcription factor 1	NM_015826
CHRXFS146153853	ChrX: 146153853-146153902	<i>Maged2</i>	melanoma antigen, family D, 2	NM_030700
CHRYFS002115571	ChrY: 2115571-2115629	<i>Rbmyl1a1</i>	RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A1	NM_011253

Table 5. List of probes that showed unchanged methylation or increased hypomethylation (1.5-fold or more) in non-tumor portion of DEN+PBO group in contrast to the increased hypermethylation in the corresponding portion of DEN-alone group.

Probe No.	Genome Location	Symbol	Description	Accession No.
CHR01FS074884653	Chr1: 74884653-74884702	Ihh	Indian hedgehog	NM_010544
CHR01FS094426839	Chr1: 94426839-94426888	Olfrl1411	Mus musculus olfactory receptor 1411 (Olfrl1411), mRNA	NM_146490
CHR01FS095167483	Chr1: 95167483-95167532	Pask	PAS domain containing serine/threonine kinase	NM_080850
CHR01FS133571875	Chr1: 133571875-133571924	Slc26a9	solute carrier family 26, member 9	NM_177243
CHR01FS154718339	Chr1: 154718339-154718388	Nmnat2	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase	NM_175460
CHR01FS169303357	Chr1: 169303357-169303406	Lrrc52	leucine rich repeat containing	NM_001013382
CHR01FS174165641	Chr1: 174165641-174165690	Kcnj9	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9	NM_00842
CHR01FS174318892	Chr1: 174318892-174318941	Igsf9	Mus musculus immunoglobulin superfamily, member 9	NM_033608
CHR01FS175372333	Chr1: 175372333-175372383	BC094916	cDNA sequence BC094916	BC094916
CHR01FS175887051	Chr1: 175887051-175887100	Olfrl432	olfactory receptor	NM_146716
CHR01FS180701274	Chr1: 180701274-180701332	Kif26b	kinesin family member	BC056349
CHR02FS018594687	Chr2: 18594687-18594736	Commd3	COMM domain containing 3	NM_147778
CHR02FS025401053	Chr2: 25401053-25401102	Gm996	gene model 996, (NCBI)	NM_001005424
CHR02FS032035919	Chr2: 32035919-32035968	Bat2l	HLA-B associated transcript 2-like	NM_001159634
CHR02FS090919021	Chr2: 90919021-90919070	Mybpc3	myosin binding protein C,	NM_008653
CHR02FS124759585	Chr2: 124759585-124759634	Slc24a5	solute carrier family 24, member 5	NM_175034
CHR02FS148087386	Chr2: 148087386-148087435	Sstr4	somatostatin receptor 4	NM_009219
CHR02FS153635767	Chr2: 153635767-153635816	Gm1006	gene model 1006, (NCBI)	NM_001034875
CHR02FS172150622	Chr2: 172150622-172150680	2410001C21Rik	RIKEN cDNA 2410001C21 gene	NM_025542
CHR03FS088452136	Chr3: 88452136-88452185	Paqr6	progesterone and adipoQ receptor family member VI	NM_198410
CHR03FS089402303	Chr3: 89402303-89402352	Efn3	ephrin A3	NM_010108
CHR03FS094864583	Chr3: 94864583-94864632	Cgn	cingulin	NM_001037711
CHR03FS096081265	Chr3: 96081265-96081314	Plekho1	pleckstrin homology domain containing, family O member 1	NM_023320
CHR03FS102142038	Chr3: 102142038-102142087	Nhlh2	nescient helix loop helix	NM_178777
CHR03FS108172863	Chr3: 108172863-108172912	Gstm4	Mus musculus glutathione S-transferase, mu 4	NM_026764
CHR04FS122691107	Chr4: 122691107-122691156	Hpcal4	hippocalcin-like 4	NM_174998
CHR04FS125664952	Chr4: 125664952-125665001	1700029G01Rik	RIKEN cDNA 1700029G01 gene	NM_025856
CHR04FS136568411	Chr4: 136568411-136568460	Wnt4	wingless-related MMTV integration site 4	NM_009523
CHR04FS138091192	Chr4: 138091192-138091241	Pla2g5	phospholipase A2, group V	NM_011110
CHR04FS138346852	Chr4: 138346852-138346901	Htr6	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	NM_021358

Table 5. Continued

Probe No.	Genome Location	Symbol	Description	Accession No.
CHR04FS140750724	Chr4: 140750724-140750773	Spen	SPEN homolog, transcriptional regulator(Drosophila)	NM_021358
CHR05FS097632432	Chr5: 97632432-97632481	Ard1b	ARD1 homolog B (S. cerevisiae)	NM_001033191
CHR05FS137166978	Chr5: 137166978-137167027	Emid2	EMI domain containing 2	NM_024474
CHR05FS137252516	Chr5: 137252516-137252565	Cldn15	claudin 15	NM_021719
CHR05FS137273570	Chr5: 137273570-137273619	Plod3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate5-dioxygenase 3	NM_011962
CHR05FS139659081	Chr5: 139646237-139646286	3110082I17 Rik	RIKEN cDNA 3110082I17 gene	NM_028469
CHR05FS140776716	Chr5: 140776716-140776765	Chst12	carbohydrate sulfotransferase 12	NM_021528
CHR06FS054873953	Chr6: 54873953-54874002	Nod1	nucleotide-binding oligomerization domaincontaining 1	NM_172729
CHR06FS072479359	Chr6: 72479359-72479408	Capg	capping protein (actin filament),gelsolin-like	NM_007599
CHR06FS129741545	Chr6: 129741545-129741604	Gm156	predicted gene 156	NM_001014997
CHR07FS004529254	Chr7: 4529254-4529303	A430110N23Rik	RIKEN cDNA A430110N23 gene	NM_173008
CHR07FS005735465	Chr7: 5735465-5735514	Zfp787	zinc finger protein 787	NM_001013012
CHR07FS024841137	Chr7: 24841137-24841186	Pou2f2	POU domain, class 2, transcription factor 2	NM_011138
CHR07FS024934929	Chr7: 24934929-24934978	Zfp526	zinc finger protein 526	NM_175436
CHR07FS026544322	Chr7: 26544322-26544371	Cyp2a5	cytochrome P450, family 2, subfamily a,polypeptide 5	NM_007812
CHR07FS027035161	Chr7: 27035161-27035210	Ltbp4	latent transforming growth factor betabinding protein 4	NM_175641
CHR07FS044420509	Chr7: 44420509-44420558	Nr1h2	nuclear receptor subfamily 1, group H, member2	NM_009473
CHR07FS045106499	Chr7: 45106499-45106548	Cd37	CD37 antigen	NM_007645
CHR07FS045195243	Chr7: 45195243-45195292	Trpm4	transient receptor potential cation channel,subfamily M, member 4	NM_007645
CHR07FS101267533	Chr7: 101267533-101267582	Centd2	centaurin, delta 2	NM_027180
CHR07FS101980550	Chr7: 101980550-101980599	Art1	ADP-ribosyltransferase 1	NM_009710
CHR07FS103820599	Chr7: 103820599-103820648	Olfir633	olfactory receptor	NM_146354
CHR07FS127235365	Chr7: 127235365-127235414	Zfp689	zinc finger protein 689	NM_175163
CHR07FS127921026	Chr7: 127921026-127921075	Itgax	integrin alpha X	NM_021334
CHR07FS140053611	Chr7: 140053611-140053660	Olfir524	olfactory receptor	NM_001011814
CHR07FS142253205	Chr7: 142253205-142253254	Tnni2	troponin I, skeletal, fast 2	NM_009405
CHR07FS142301096	Chr7: 142286913-142286962	Lsp1	lymphocyte specific 1	NM_019391
CHR07FS142704815	Chr7: 142704815-142704864	Th	tyrosine hydroxylase	NM_009377
CHR07FS142850591	Chr7: 142850591-142850640	R74862	expressed sequence R74862	NM_133790
CHR07FS143203802	Chr7: 143128613-143128662	Kcnq1	potassium voltage-gated channel, subfamily Q,member 1	NM_008434

Table 5. Continued

Probe No.	Genome Location	Symbol	Description	Accession No.
CHR07FS143288403	Chr7: 143288403-143288452	Slc22a18	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18	NM_008767
CHR07FS143381706	Chr7: 143381706-143381755	Cars	cysteinyl-tRNA synthetase	NM_013742
CHR08FS027250459	Chr8: 27250459-27250508	Bag4	BCL2-associated athanogene 4	NM_026121
CHR08FS073843410	Chr8: 73843410-73843459	Mtap1s	microtubule-associated protein	
CHR08FS074606932	Chr8: 74606932-74606981	Ins3	Janus kinase 3	NM_010589
CHR08FS122512155	Chr8: 122512155-122512204	Kcng4	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 4	NM_025734
CHR09FS020778685	Chr9: 20778685-20778743	Icam1	intercellular adhesion molecule	NM_010493
CHR09FS026780236	Chr9: 26780236-26780285	Ncapd3	non-SMC condensin II complex, subunit	
CHR09FS057900034	Chr9: 57900034-57900083	Ccdc33	coiled-coil domain containing 33	NM_029212
CHR09FS107457343	Chr9: 107457343-107457392	Sema3b	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	NM_009153
CHR09FS107909977	Chr9: 107909977-107910026	Rnf123	ring finger protein 123	NM_032543
CHR10FS005977662	Chr10: 5977662-5977711	Zbtb2	zinc finger and BTB domain containing 2	NM_001033466
CHR10FS075818488	Chr10: 75818488-75818537	Pcnt	pericentrin (kendrin)	NM_008787
CHR10FS079142355	Chr10: 79142355-79142404	Polrmt	polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)	NM_172551
CHR10FS079538519	Chr10: 79538519-79538568	Dos	downstream of Stk11	NM_015761
CHR10FS080009499	Chr10: 80009499-80009548	Scamp4	secretory carrier membrane protein 4	NM_019575
CHR11FS035851671	Chr11: 35851671-35851720	Odz2	odd Oz/ten-m homolog 2	NM_011856
CHR11FS053478126	Chr11: 53478126-53478175	Il13	Mus musculus interleukin 13	NM_008355
CHR11FS059387549	Chr11: 59387549-59387598	Olfir222	olfactory receptor 222	NM_001001808
CHR11FS064336586	Chr11: 64336586-64336635	Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine)3-O-sulfotransferase 3A1	NM_178870
CHR11FS075324993	Chr11: 75324993-75325042	Prpf8	pre-mRNA processing factor 8	NM_138659
CHR11FS076417696	Chr11: 76417696-76417745	Abr	active BCR-related gene	NM_198895
CHR11FS078213996	Chr11: 78213996-78214045	Slc13a2	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2	NM_022411
CHR11FS106165084	Chr11: 106165084-106165133	Scn4a	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha	NM_133199
CHR12FS099090122	Chr12: 99090122-99090171	Ptpn21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21	NM_133199
CHR12FS111747618	Chr12: 111747618-111747667	Cdc42bpb	Cdc42 binding protein kinase beta	NM_183016
CHR12FS113127430	Chr12: 113127430-113127479	Zbtb42		NM_001100460
CHR13FS030955247	Chr13: 30955247-30955296	Exoc2	exocyst complex component 2	NM_025588
CHR13FS050442342	Chr13: 50442342-50442391	Fbxw17	F-box and WD-40 domain protein 17	NM_175401
CHR13FS055006265	Chr13: 55006265-55006314	Unc5a	unc-5 homolog A (C. elegans)	NM_153131
CHR14FS030005279	Chr14: 30005279-30005328	Nisch	nischarin	NM_153131
CHR14FS050957960	Chr14: 50957960-50958009	Olfir221	olfactory receptor 221	NM_001001808

Table 5. Continued

Probe No.	Genome Location	Symbol	Description	Accession No.
CHR14FS061952411	Chr14: 61952411-61952462	Defb41	defensin beta 41	NM_183124
CHR15FS010896986	Chr15: 10896986-10897035	C1qtnf3	Mus musculus C1q and tumor necrosis factor related protein 3	NM_030888
CHR15FS076033996	Chr15: 76033996-76034050	Plec1	plectin 1	NM_011117
CHR15FS084546977	Chr15: 84546977-84547026	Prr5	proline rich 5 (renal)	NM_153131
CHR15FS088895567	Chr15: 88895567-88895616	Panx2	pannexin 2	NM_001002005
CHR15FS098284261	Chr15: 98284261-98284310	Olfir281	Mus musculus olfactory receptor 281 (Olfir281), mRNA	NM_146280
CHR15FS101630178	Chr15: 101630178-101630227	Krt73	keratin 73	NM_212485
CHR15FS103142419	Chr15: 103142419-103142468	Zfp385	zinc finger protein 385	NM_013866
CHR16FS088662690	Chr16: 88662690-88662739	2310057N15Rik	RIKEN cDNA 2310057N15 gene	NM_027170
CHR17FS023491207	Chr17: 23491207-23491256	Flywch1	FLYWCH-type zinc finger 1	NM_153791
CHR17FS025573640	Chr17: 25573640-25573689	Wdr90	WD repeat domain 90	NM_001163766
CHR17FS032128598	Chr17: 32128598-32128647	Rasal3	RAS protein activator like 3	NM_178785
CHR17FS034764518	Chr17: 34764518-34764567	Bat2	HLA-B associated transcript 2	NM_177634
CHR17FS035114411	Chr17: 35114411-35114460	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	NM_013633
CHR17FS036070382	Chr17: 36070382-36070438	H2-M10.4	histocompatibility 2, M region locus 10.4	NM_177634
CHR18FS039017348	Chr18: 39017348-39017397	Fgf1	fibroblast growth factor 1	NM_010197
CHR18FS061089035	Chr18: 61089035-61089084	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinaseII alpha	NM_177407
CHR19FS004868067	Chr19: 4868067-4868116	Actn3	actinin alpha 3	NM_010197
CHR19FS007172220	Chr19: 7172220-7172269	D930010J01Rik	RIKEN cDNA D930010J01 gene	NM_134147
CHRXFS011285618	ChrX: 11285618-11285667	Bcor	Bcl6 interacting corepressor	NM_175046
CHRXFS034146197	ChrX: 34146197-34146246	Rhox9	reproductive homeobox 9	NM_023894

Table 6. Real-time RT-PCR analysis of hypermethylated genes in the livers of male ICR mice given PBO for 25 weeks after DEN initiation

Accession No.	Downstream Gene Symbol	DEN-alone		DEN+PBO		
		Non-tumor	Non-tumor	Altered Foci	Adenoma	Carcinoma
		5	6	6	13	5
NM_016973	St6galnac6	1.00 ± 1.21 ^{a)}	1.41 ± 1.64	0.99 ± 1.98	40.27 ± 118.28	0.69 ± 1.30
NM_001045523	Bahd1	1.00 ± 1.84	0.85 ± 1.77	0.33 ± 0.10	1.72 ± 2.31	0.15 ± 0.15
NM_029985	Lrrc42	1.00 ± 1.59	5.88 ± 12.94	4.83 ± 7.54	4.01 ± 11.50	1.82 ± 3.08
NM_183428	Epb4.1	1.00 ± 0.83	0.29 ± 0.38	0.90 ± 0.74	1.30 ± 1.40	0.83 ± 1.43
NM_175649	Tnfrsf26	1.00 ± 0.63	0.32 ± 0.39	0.20 ± 0.13 #	1.11 ± 1.39	0.11 ± 0.07 #
NM_007456	Ap1m1	1.00 ± 2.04	1.13 ± 1.92	1.19 ± 2.82	17.46 ± 52.81	1.18 ± 2.56
NM_139272	Galnt2	1.00 ± 1.02	0.59 ± 0.94	0.23 ± 0.28	2.61 ± 3.19	0.25 ± 0.17
NM_176935	F730015K02Rik	1.00 ± 0.77	1.12 ± 1.71	4.90 ± 7.26	8.73 ± 27.58	3.15 ± 6.07
NM_031392	Wdr6	0.80 ± 1.66	0.43 ± 0.62	1.51 ± 1.26	1.15 ± 1.63	7.61 ± 6.70 **
NM_026036	Cmtm6	1.00 ± 0.88	0.40 ± 0.76	3.07 ± 3.75	1.24 ± 1.67	0.06 ± 0.05
NM_177613	Cdc34	1.00 ± 2.19	0.23 ± 0.22	1.13 ± 1.83	3.73 ± 9.82	0.50 ± 0.34
NM_012030	Slc9a3r1	1.00 ± 2.20	16.35 ± 32.41	128.32 ± 198.81	0.06 ± 0.13	1.21 ± 1.46
NM_009253	Serpina3m	1.00 ± 0.60	0.44 ± 0.23	0.33 ± 0.25 *	0.35 ± 0.35 **	0.17 ± 0.17 **
NM_146066	Gspt1	1.00 ± 0.98	2.10 ± 2.91	3.96 ± 5.42	5.78 ± 15.34	1.51 ± 1.59
NM_027937	Caskin1	1.00 ± 1.09	2.58 ± 5.60	1.99 ± 2.10	3.92 ± 5.88	1.30 ± 1.74
NM_030700	Maged2	1.00 ± 1.07	3.18 ± 6.01	13.27 ± 31.46	12.65 ± 23.70	2.49 ± 4.18

Each quantitative value represents mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

#: Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05$ (Student's-*t* test).

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

ピレトリン系殺虫剤の共力剤のピペロニルブトキサイド (PBO) は従来の変異原性試験は陰性ながら、マウスの肝臓に腫瘍を誘発することが知られている。これまで、その発がん機序に代謝過程で生じる酸化ストレスの関与の可能性が報告されてきた。今回、種々の抗酸化酵素群の転写因子と知られる *nrf2* 遺伝子欠損マウス (ICR 系) を用いて、PBO の標的臓器肝臓の酸化ストレスに対する生体内防御機構への *nrf2* の関与の可能性について検討した。PBO を *nrf2* 欠損マウスならびにその野生型マウスに投与した結果、野生型マウスでは高用量群のみ有意な 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの上昇が認められたが、*nrf2* 欠損マウスでは低用量を含む投与群すべてで有意な上昇が認められた。一方、肝薬物代謝酵素 Cyp1A1 の mRNA レベルに群間ならびに遺伝子型間で差異は認められなかったが、Cyp1A2 レベルは何れの遺伝子型においても高用量群で有意な上昇が認められた。*Nrf2* の転写調節を受けている NAD (P): quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の mRNA レベルにはいずれの投与群においても変化は認められなかった。その他、肝重量、肝障害を示唆する血清生化学的検査マーカーに遺伝子型間で差異は認められなかった。*Nrf2* 欠損マウスで PBO 投与による 8-OHdG 生成に対する感受性が高い傾向が認められたが、高用量群での比較ではむしろ *nrf2* 欠損マウスで低く、その他のパラメーターに遺伝子型間で差異は認められなかったことから、PBO 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* の関与の可能性は低いことが示唆された。

A. 研究目的

ピレトリン系殺虫剤の共力剤として作用することから、食品添加物や動物用医薬品として使用されているピペロニルブトキサイド (PBO) は、げっ歯類の肝臓に腫瘍を誘発する。しかしこれまで、*in vitro* での復帰突然変異試験、染色体異常試験、不定期 DNA 合成試験の何れもが陰性を示し、いわゆる非遺伝毒性発がん物質と考えられてきた。一方、PBO をラットに投与すると薬物代謝酵素 CYP1A1/2 が誘導されることが知られており、代謝過程において生じる酸化ストレスの関与が示唆されている。また、DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析の結果、上述の代謝関連遺伝子に加えて、抗酸化酵素関連遺伝子の mRNA レベルの上昇が認められた。特に転写因子 *Nrf2* の制御を受けるキノンオキシドリダクターゼ (NAD (P): quinone oxidoreductase 1 ; NQO1) の上昇が認められたことから、PBO が引き起こす酸化ストレスへの *Nrf2* の関与の可能性が示唆されている。*Nrf2* 蛋

白は細胞質内で Keap 1 蛋白と複合体を形成し、親電子性物質や酸化ストレスにより Keap 1 蛋白と解離すると核内に移行し、抗酸化剤応答配列を制御配列に有する第 2 相解毒化酵素群の転写因子として働く。*Nrf2* に転写制御される酵素群としては、NQO1 のほか、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼ、チオレドキシンリダクターゼ、ヘムオキシナーゼ 1 など細胞内抗酸化機能を担う酵素群が多数知られている。また、グルタチオン *S*-トランスフェラーゼや NQO1 にはヒトにおいて遺伝子多型が報告されており、化学物質が誘発する酸化ストレスへの生体内防御機構への *Nrf2* の関与を明らかにすることはその化学物質に対するヒト危険度評価にとって重要である。そこで本研究では、*nrf2* 欠損マウスに PBO を投与して、PBO が引き起こす酸化ストレスに対する *Nrf2* の関与の可能性を探った。

B. 研究方法

雄の *nrf2* ホモ欠損 (*nrf2*^{-/-}) マウスならびにその野生型 (*nrf2*^{+/+}) マウスを実験に供した。雄6週令の *nrf2*^{+/+}とその同腹の *nrf2*^{-/-}マウスそれぞれ各群5匹に、PBOを0.3ならびに0.6%の濃度に混じた飼料を8週間自由に摂取させた。エーテル麻酔下で眼下静脈叢より採血した血液から血清を分離し、アルカリフォスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) ならびにアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性を測定した。動物は解剖後、肝重量を測定し、一部を液体窒素により凍結保存し、残りはホルマリン固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、病理組織学的検索を実施した。凍結保存後の肝から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。また、RNAを抽出し、RT-PCR法により、*Cyp 1A1*、*Cyp 1A2* ならびに *NQO1* の mRNA レベルを測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

C. 研究結果

体重および肝重量の結果を Table 1 および Figure 1 に示す。*nrf2*^{+/+}マウスでは、PBO 投与量依存的な体重増加抑制が投与初期から認められたが、最終体重を含めて投与期間内に有意な減少とはならなかった。肝重量は PBO 投与量依存的な増加が認められ、投与群の肝比重量は有意な高値となった。*nrf2*^{-/-}マウスでは、野生型

同様、PBO 投与群で顕著な体重増加抑制が認められたが有意な低値とはならなかった。肝重量についても同様の変化を示し、PBO 高用量群の肝重量ならびに PBO 投与群の肝比重量が有意の高値となった。病理組織学的検査では、PBO 投与群で小葉中心性の肝細胞肥大が認められたがその程度に遺伝子型による差異は認められなかった。血清生化学的検査結果を Figure 2 に示す。*nrf2*^{+/+}マウスでは、ALP、ALT ならびに AST レベルに群間の差異は認められなかった。*nrf2*^{-/-}マウスでは、PBO 高用量群の AST レベルが有意な高値を示したが、その値は小さく、他の検査項目では群間に差は認められず、血清生化学的肝障害マーカーに遺伝子型間で差異は認められなかった。肝 DNA 中の 8-OHdG レベルを Fig. 3 に示す。*nrf2*^{+/+}マウスの PBO 投与群において、用量相関性の増加が認められ、高用量群で対照群と比して有意な増加が認められた。一方、*nrf2*^{-/-}では、用量相関性は認められないものの PBO 低用量投与群から有意な高値となった。*Cyp 1A1*、*1A2* ならびに *NQO1* の mRNA レベルを Figures 4~6 に示す。*Cyp 1A1* は、*nrf2*^{+/+}マウスでは高用量群で高値を示すものの有意な変化とはならなかった。また、*nrf2*^{-/-}マウスでは PBO 投与による変化は認められなかった。一方、*Cyp 1A2* は、*nrf2*^{+/+}マウスでは用量相関性に増加し、高用量群で有意な高値となった。また、*nrf2*^{-/-}マウスでも高用量群で有意な高値を示した。*NQO1* レベルは群間、遺伝子型間に差異は認められなかった。

D. 考察

PBO を ICR 系マウスに投与すると、マウス肝薬物代謝酵素の *CYP1A1*、*2A5*、*2B9*、*2B10* などの mRNA レベルを誘導することが知られている。今回、*nrf2*^{+/+}マウス (ICR 系) では、高用量群で *Cyp 1A1* の mRNA レベルは有意とはならなかったものの、対照群に比して約 2.5 倍の高値を示し、*Cyp 1A2* は約 4 倍の有意な高値を示した。一方、*nrf2*^{-/-}マウスでは、*Cyp 1A1* レベル

に群間の差異はなく、Cyp 1A2 レベルは高用量群で約 2 倍の有意な高値となった。一方、酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベルは *nrf2*^{+/+}マウスでは高用量群で、*nrf2*^{-/-}マウスでは低用量群から有意な上昇が認められた。従って、今回認められた酸化 DNA 損傷には Cyp 1A1 から生じる酸化ストレスの関与の可能性は低いと考えられた。また前年度、C57BL/c 系統マウス (*p53*^{+/+}ならびに *p53*^{-/-gpt delta} マウス) に PBO を同様に投与したところ、8-OHdG レベルに変化は認められなかったことから、PBO が引き起こす酸化ストレスさらには酸化 DNA 損傷には系統差があることが示された。8-OHdG レベルは確かに *nrf2*^{-/-}マウスで低用量から有意な上昇が認められたものの、高用量群間で比較すると *nrf2*^{+/+}マウスでむしろ高値を示した。また、PBO による肝重量の増加に遺伝子型間で差異はなかった。さらに、血清中の AST 活性が *nrf2*^{-/-}マウスでのみ有意な変化となったが値は低く、その他の項目では遺伝子型間で差異は認められなかった。これらの事実から、PBO が産生する酸化ストレスに対する生体内防御機構への Nrf2 蛋白の関与は低いことが示唆された。*NQO1* の mRNA レベルは *nrf2*^{+/+}マウスならびに *nrf2*^{-/-}マウスでいずれも変化は認められなかったこともそれを支持する結果であった。ラットにおいては *NQO1* を含む種々の Nrf2 制御下酵素が PBO 投与により誘導されることが報告されており、また、8-OHdG レベルもマウスに比べて顕著に上昇することから、PBO の産生する酸化ストレスはラットに比べてマウスでは低いことが考えられた。

E. 結論

PBO を 0.3 ならびに 0.6% の濃度に混じた飼料を 8 週間、雄の *nrf2*^{+/+}ならびに *nrf2*^{-/-}マウスに与えたところ、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは *nrf2*^{+/+}マウスの高用量群ならびに *nrf2*^{-/-}マウスの低用量群から有意な上昇が認められたが、高用量群間での比較ではむしろ *nrf2*^{+/+}マウスで

高く、明らかな遺伝子型間による差異は認められなかった。従って、PBO が誘発する酸化ストレスに対する生体内防御機構への Nrf2 蛋白の関与は低いことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

田崎雅子、井上知紀、岡村俊也、石井雄二、増井則夫、能美健彦、梅村隆志、西川秋佳：CYP 誘導能を有する非遺伝毒性ラット肝発がん物質による酸化 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性、第 26 回日本毒性病理学会、2010 年 2 月、金沢

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

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
—牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究—

研究分担者 九郎丸 正道 東京大学 教授

研究要旨 BSE（牛海綿状脳症）の特定危険部位である牛の背根神経節について、その完全除去がと畜場において可能か否か検討するため、除去率の算定を試みた。同時に、牛の品種別及び牝牝別に除去率に差があるか否かも検討した。今年度の調査結果では、平均して全背根神経節の85%の除去がと畜場で可能となっているが、100%の除去は現時点の技術では依然として困難であるといわざるを得ない。と畜場での背根神経節の完全除去を達成するためには、今後さらなる技術の改良が必要である。また、牛の品種別及び牝牝別の除去率に差は認められなかった。

A. 研究目的

BSEの特定危険部位である牛の背根（脊髄）神経節は、脊柱に密着して存在し、脊柱からの分離が困難なことから、本来安全な脊柱も現在、背根神経節とともに廃棄されている。本研究では、と畜場において背根神経節を脊柱から完全に分離する手法を確立し、牛の脊柱を資源として再活用をはかることを目的としている。具体的作業としては、と畜場において脊髄除去後に脊柱に残る硬膜とこれに付随する脊髄神経を、断面となった脊柱管の内側から、背根神経節ができるだけ脊柱に残らないように特殊なナイフで引き剥がし、背根神経節がどの程度硬膜側に残存しているかを算出することによって、脊柱から背根神経節がどの程度除去されているか（除去率）を調べた。さらに、品種別及び牝牝別の除去率についても比較し、除去率に差があるか否か検討した。

B. 研究方法

1. 牛の脊柱からの背根神経節の除去

牛の背根神経節は1頭あたり、頸椎部8対16個、胸椎部13対26個、腰椎部6対12個、及び仙骨部5対10個の計32対64個（背割り後の枝肉〔半頭分〕では32個）である（尾骨部はこれに含まれていない）。ここでは、第1頸神経から第5仙骨神経までの脊髄神経・背根神経節の、脊柱からのそれぞれの除去率を調べた。

硬膜周辺から脂肪を除去して、付随する背根神経節を明らかにし、頸椎部（C）、胸椎部（T）、腰椎部（L）、及び仙骨部（S）について、脊柱からの背根神経節の除去率を算出した。算出に用いた牛の硬膜は2009年3月から2010年2月までの計222検体である。算出方法は、背根神経節の全体が付随しているものを1とし、背根神経節の大部分が付随しているものを2/3、背根神経節の半分程度が付随しているものを1/2、背根神経節の一部が付随しているものを1/3、背根神経節が全く付随していないものを0として合計し、C1からS5までの背根神経節の数32（枝肉当たり：半頭分）に対する割合を求めた。背根神経節の大きさの判定は、目視によるから必ずしも厳密なものではなく、また、約1/3個分が除去率の百分率の1%分に相当する。したがって、除去率は小数点以下の数値に意味はないと考え、有効数字は1の位までとした。

2. 牛の品種別及び牝牝別の脊柱からの背根神経節の除去率

1.と同じ試料、方法を用いて、牛の品種別及び牝牝別の除去率を比較検討した。牛の品種別及び牝牝別では、「交雑種（黒毛♂×ホルスタイン♀）去勢牝」、「交雑種牝」、「ホルスタイン去勢牝」、及び「和牛（黒毛、褐毛和種）去勢牝、ホルスタイン牝、etc.」の4グループに区分した。