

物実験については、大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリヤーシステムの動物室にて、室内の環境条件は温度 22 ± 2 度、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。また、紙の床敷を入れたプラスチック製ケージに、3 匹に分けて飼育し、ケージおよびチップを週 1 回交換した。屠殺までの実験期間中は、体重、摂餌量、摂水量を週 1 回測定した。

[サンプルの採取]

飼育期間終了後、麻酔下にて腹部大動脈切断による安楽殺を行い、直ちに肝臓を採取して液体窒素で凍結させた。

[遺伝子網羅的発現量解析]

DNA メチル化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな修飾による遺伝子発現変化を評価するために、マイクロアレイによる遺伝子網羅的発現量解析を行い、得られたデータについて Ingenuity Pathway analysis (IPA) software にて遺伝子パスウェイ解析を行った。

[酸化ストレスの指標である 8-OHdG の定量的評価]

得られた凍結肝臓より DNA Extractor WB kit (Wako) を用いて、ビーズ破碎した凍結肝約 500mg から genomic DNA を抽出し、Nuclease P1 にて DNA を消化処理後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて 8-OHdG 値および dG 値の測定を行

い、8-OHdG 値を dG 値で除して定量的評価に供した。

[定量的遺伝子発現量解析]

得られた凍結肝臓より Trizol (invitrogen) にて mRNA を抽出して 200 ng/ul に調整後、RT-for-PCR Kit (clontech) にて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA を quantitative RT-PCR 法 (qPCR 法) にて P450 関連遺伝子 (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A1, 2B1, 2E1, 2A2, 2C2, 2C6, 2C7, 3A2, 3A3) の発現変動について検討した。なお、各種 CYPs 及び内在性コントロールとして使用した b-actin および gapdh のプライマープローブは TaqMan Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems) を使用し、遺伝子発現量の定量的解析には standard curve 法を用いて検量線を作成し、相対的定量評価を行った。

4. 統計学的解析

統計学的解析に、StatLight2000 (C) の多群の検定を用い、各検定の有意水準は 5% とした。剖検時における最終体重、肝臓の絶対重量および相対重量、GST-P 陽性細胞巢および BrdU 標識率について、統計学的検定法については、まず各群の分散比を Bartlett 検定で検定し、等分散の場合は Dunnett 検定 (両側検定) により、不等分散の場合は Steel 検定により比較した。mRNA 発現量については、まず各群の分散比を F 検定で検定し、等分散の場合は Student' s t 検定 (両側検定) によ

り、不等分散の場合は Welch's t 検定により比較した。

5. 倫理面への配慮

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

1. 1,4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性の検討

剖検時における最終体重、肝臓重量、試験期間中の 1,4-ジオキサンの 1 日平均摂取量およびトータル摂取量および GST-P 様細胞巢の数を表 1 に示す。最終体重について、無処置群と比較して 1,4-ジオキサン 5000 ppm 投与群で有意な減少がみられ、肝臓の絶対、相対重量については有意な変化はみられなかった。また、肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢(2 cell 以上)の単位面積あたりの数について定量的評価を行った結果、無処置群と比較して 200 ppm 投与群より有意な増加が用量相関的にみられた。また、細胞増殖能の指標である BrdU の標識率について定量的評価を行った結果、5000 ppm 投与群で有意な増加がみられ、またそのほかの用量についても用量相関的な増加傾向を示した (図 2)。

2. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

[実験 1] マイクロアレイ解析の結果、

BBN 誘発膀胱がん と DMA 誘発膀胱がん で共通に発現量が 2 倍以上の差を示した遺伝子が 139 種類認められた。これらのうち、過剰発現量上位 10 遺伝子 (表 2) と Ingenuity パスウェイ解析によりがん発生に重要な役割を担っていると思われる 13 遺伝子 (3 遺伝子が共通であった) (図 3)、合計 20 遺伝子を膀胱発がん早期検出マーカー候補として選抜した。

[実験 2] 実験 1 で選抜した 20 遺伝子の発現量を検討した結果、BBN 投与 2 週から連続して発現量が有意に上昇した 12 種類の遺伝子を膀胱発がん早期検出マーカー候補遺伝子とした。

[実験 3 および 4] 12 種類の遺伝子のうち 2 種類 (Oncomodulin、MMP3) の mRNA 発現量は無処置膀胱粘膜に比較して全ての発がん物質において有意に増加した (図 5)。一方、すべての膀胱発がん促進物質では Oncomodulin の有意な増加が認められたが、MMP3 の異常発現は認められなかった (図 6)。さらに、非膀胱発がん物質である DEN (肝発がん物質)、ENEN (腎発がん物質) および DMH (大腸発がん物質) をそれぞれ 4 週間投与した膀胱粘膜における Oncomodulin と MMP3 の mRNA 発現量を検索したところ、MMP3 の発現量は ENEN および DMH の投与により有意に増加したが、Oncomodulin の発現量はいずれの投与群においても有意な変動はみられなかった (図 7)。

3. エピジェネティック異常を誘発す

る化学物質の検出法の開発

マイクロアレイによる網羅的発現量解析の結果、ダンマル樹脂投与によって発現量比(log 比)が 2 倍以上および以下のものを表 3 に示した。また、IPA softwear によって cancer relate gene において発現減少がみられた 19 遺伝子を DNA メチル化異常候補遺伝子として選定した(表 4)。ダンマル樹脂投与による酸化的ストレスの評価のために 8OHdG を測定した結果、無処置群と比較してダンマル樹脂投与による有意な変化はみられなかった(図 8)。また、qPCR 法による CYP 関連遺伝子の定量的発現量解析を行った結果、無処置群と比較して *cyp1a1*, *2b1*, *2e1*, *3a2*, *3a3* で有意な発現上昇がみられた(図 9)。また、マイクロアレイ解析において log 比 2 倍差のなかにはないものの、de novo メチル化関連遺伝子である *dnmt3b* およびヒストン脱アセチル化酵素 *hdac* がダンマル樹脂投与群で発現減少がみられたため、*dnmt1*, *3a*, *3b* および *hdac1*, *2*, *3* について qPCR 法にて遺伝子発現量を評価した結果、*dnmt1*, *hdac1*, *2* で減少傾向が、*dnmt3b* で有意な減少がみられた(図 10)。IPA softwear を用いた遺伝子パスウェイ解析の結果、異物代謝酵素誘導系、PXR/RXR activation および Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 誘導系が有意に誘導されていることが示された(図 11)。

D. 考察

1,4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性の検討において、肝臓の前が

ん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢(2 cell 以上)の単位面積あたりの数について評価した結果、200ppm 投与群より有意な増加を示した。また、細胞増殖能について BrdU 標識率にて評価した結果、用量相関的な増加傾向を示した。以上のことから、1,4-ジオキサンの肝発がん性には細胞増殖の異常な亢進が関与することが示唆された。

膀胱発がんの早期前がん病変マーカーの開発試験では、BBN および DMA 誘発膀胱がんサンプルと、様々の膀胱発がん物質、膀胱発がん促進物質および非膀胱発がん物質をそれぞれ 4 週投与したラット膀胱粘膜サンプルにおける mRNA 発現を検索した結果、*oncomodulin* (OCM) と *matrix metalloproteinase-3* (MMP3) 両者ともすべての膀胱発がん物質で誘発した膀胱病変において共通に過剰発現を示した。さらに、OCM だけがすべての膀胱発がん促進物質における膀胱粘膜サンプルでの過剰発現を認めた。加えて、すべての非膀胱発がん物質では OCM の異常発現は認められなかった。以上より、OCM と MMP3 を組み合わせて使用することにより、化学物質の膀胱発がん性を予測できる可能性が強く示唆された。

遺伝毒性を有さないが肝発がん性を有するダンマル樹脂の発がんメカニズムについて検討した結果、酸化的ストレスの指標である 8OHdG に有意な変化はみられなかった。しかし、異物代謝酵素誘導系である *cyp1a1* の発現がダンマル樹脂投与群で有意に上昇していることが qPCR、マ

マイクロアレイ双方で確認できた。また、パルスウェイ解析によってダンマル樹脂投与群で異物代謝誘導系、PXR/RXR activation および AhR 関連誘導系が有意に誘導されていることが示され、qPCR 法の結果においても *cyp1a1*, *3a2*, *3a3* の発現上昇がみられることから、ダンマル樹脂による発がんメカニズムには異物代謝誘導系の異常が関与している可能性が示唆された。IPA pathway analysis によって、ヒストン脱アセチル化酵素である Hdac の有意な発現減少が IPA によって予測されたため、qPCR 法で Hdac および DNA メチル化に関与する Dnmt の発現について解析した結果、Hdac1, 2 および Dnmt1 では減少傾向が、Dnmt3b では有意な減少がみられた。したがって、ヒストン修飾や DNA メチル化によって本来発現が抑制されるべき遺伝子の発現誘導が起きていることが示唆され、がん遺伝子の過剰な発現誘導が起きている可能性が考えられる。DNA メチル化異常候補遺伝子として選定した 19 遺伝子について今後検討する予定である。

E. 結論

これまでに我々は食品中に含まれる各種化学物質の遺伝毒性や発がん性といったリスクの評価を数多く行ってきた。今回の 1,4-ジオキサンは水道水中に微量に存在する化学物質であり、その安全性の評価が急務である。F344 ラットを用いた肝発がん性の評価において、200 ppm 投与群より有意な増加が用量相関的にみられ

た。さらに我々は、1,4-ジオキサンの変異原性についても評価を行っている(魏分担報告)。本研究成果は 1,4-ジオキサンのリスク評価・管理に寄与するものであると考えられた。

Oncomodulin と MMP3 は膀胱がん性の早期検出マーカーとして有用であるから、これらを利用することにより、膀胱発がん物質検出のスクリーニングシステム確立に有用であると考えられた。

増粘多糖類であるダンマル樹脂の発がんメカニズムについて、これまでの我々の研究で非遺伝毒性機序の関与が強く疑われたため、各種解析を行った。ダンマル樹脂による肝発がん機序には酸化ストレスの関与はほとんどみられないものの、異物代謝酵素誘導系や芳香族炭化水素受容体誘導系の関与が疑われ、シトクロム P450 による水酸化で発がん性が生じている可能性が示唆された。また、マイクロアレイによる網羅的解析によって、ヒストン脱アセチル化酵素、DNA メチル基転移酵素がダンマル樹脂投与によって発現減少がみられたことから、がん遺伝子のような通常抑制されるべき遺伝子(がん遺伝子など)の発現が結果的に誘導されている可能性が示唆された。今後、ゲノム全体のメチル化率の変動を評価し、がん関連遺伝子の発現パラメータを明らかにする必要がある。今回得られた研究成果はダンマル樹脂のような変異原性を有さないものの、発がん性を有する化学物質の発がんメカニズムの解析における基礎データの蓄積に寄与する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, 42, 1034-1039, 2013.
2. Xie XL, Kakehashi A, Wei M, Yamano S, Takeshita M, Yunoki T, Wanibuchi H. l-Leucine and l-isoleucine enhance growth of BBN-induced urothelial tumors in the rat bladder by modulating expression of amino acid transporters and tumorigenesis-associated genes. *Food Chem Toxicol*, 59, 137-144, 2013.
3. Hanada S, Nishiyama N, Mizuguchi S, Yamano S, Kakehashi A, Wei M, Inoue H, Komatsu H, Chung K, Suehiro S, Wanibuchi H. Clinicopathological significance of combined analysis of cytokeratin19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma. *Osaka City Med J*, 59, 35-44, 2013.
4. Komatsu H, Kakehashi A, Nishiyama N, Izumi N, Mizuguchi S, Yamano S, Inoue H, Hanada S, Chung K, Wei M, Suehiro S, Wanibuchi H. Complexin-2 (CPLX2) as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors. *Cancer Biomark*, 13, 171-180, 2013.
5. Wei M, Yamada T, Yamano S, Kato M, Kakehashi A, Fujioka M, Tago Y, Kitano M, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 1-9, 2013.
6. Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Nagano K, Nishimaki F, Banton M, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: Evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 390-400, 2013.
7. Tago Y, Yamano S, Wei M, Kakehashi A, Kitano M, Fujioka M, Ishii N, Wanibuchi H. Novel medium-term carcinogenesis model for lung

- squamous cell carcinoma induced by N-nitroso-tris-chloroethylurea in mice. *Cancer Sci*, 104, 1560-1566, 2013.
8. Hanada S, Kakehashi A, Nishiyama N, Wei M, Yamano S, Chung K, Komatsu H, Inoue H, Suehiro S, Wanibuchi H. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*, 13, 289-298, 2013.
 9. Takahashi K, Tanaka M, Inagaki A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Nagayama K, Shiota M, Iwao H. Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. *Int J Oncol*, 43, 1985-1991, 2013.
 10. Kakehashi A, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers*, 5, 1332-1354, 2013.
 11. Kato M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Evaluation of the modifying effect of inhalation of mainstream cigarette smoke on mouse bladder carcinogenesis. *J Toxicol Pathol*, 26, 447-451, 2013.
 12. Takada J, Hoshi M, Oebisu N, Ieguchi M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Nakamura H. A Comparative Study of Clinicopathological Features Between Simple Bone Cysts of the Calcaneus and the Long Bone. *Foot Ankle Int*, 35, 374-382, 2014.
 13. Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Nakamura Y, Wei M, Wanibuchi H, Iwao H, Yoshiyama M. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 445, 327-333, 2014.
 14. 藤岡正喜、山野荘太郎、魏 民、鰐
 淵英機. 免疫組織染色の定量法. 細胞工学, 学研メディカル秀潤社, 33(3), 316-322, 2014.
2. 学会発表
 1. 鰐淵英機 : 膀胱癌の病理診断の基礎知識. 第 101 回泌尿器科学会総会「卒後教育プログラム」, 札幌 (2013 年 4 月)
 2. Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Wanibuchi H, Inaba M. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. the 50th ERA-EDTA Congress, Istanbul, Turkey (2013 年 5 月)
 3. 鰐淵英機、桑江優子、魏 民、若狭研一、梯アンナ : ヒト肝細胞癌における特異的候補分子の機能解析. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌 (2013

- 年 6 月)
4. 鰐淵英機、魏 民、梯アンナ、山野 莊太郎、藤岡正喜：ヒ素発がん性の機序の解明. 第 20 回日本がん予防学会, 東京 (2013 年 7 月)
 5. 梯アンナ、萩原昭裕、今井則夫、長野嘉介、西牧富久美、魏 民、福島昭治、鰐淵英機：ラットにおける 2 - エトキシ - 2 - メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明. 第 28 回発癌病理研究会, 沖縄県南城市 (2013 年 8 月)
 6. Okumura M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in F344 rats. The European Cancer Congress 2013, Amsterdam, the Netherlands (2013 年 9~10 月)
 7. 魏 民、山野 莊太郎、藤岡正喜、加藤 実、武下正憲、梯アンナ、鰐淵英機：1, 2 - ジクロロプロパンのマウスおよびハムスターの肝臓における代謝および毒性発現機序の検討. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 8. 藤岡正喜、魏 民、山野 莊太郎、奥村真衣、下村衣里、梯アンナ、鰐淵英機：gpt delta ラットを用いた DMA(V), iAs(III) の変異原性および遺伝子変化の検討. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 9. 梯アンナ、桑江優子、加藤 実、山野 莊太郎、神吉将之、魏 民、若狭研一、鰐淵英機：ヒト肝細胞癌における新規特異的候補分子ターゲットの機能解析. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 10. 山野 莊太郎、魏 民、藤岡正喜、多胡善幸、北野光昭、三島胡桃、鰐淵英機：内因性 NADPH オキシダーゼインヒビターであるアポサイニン はラット腎臓がんにおいて発がん抑制作用を有する. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 11. 奥村真衣、藤岡正喜、山野 莊太郎、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：ラット中期多臓器発がん性試験法を用いた DPAA(diphenyl arsenic acid) の発がん修飾作用の検討. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 12. 鰐淵英機、奥村真衣、藤岡正喜、魏 民：多臓器発がん性試験法を用いたラットにおけるジフェニルアルシン酸の発がん性の検討. 第 19 回ヒ素シンポジウム, 福岡 (2013 年 11 月)
 13. Yamano S, Wei M, Wanibuchi H. Cancer initiating cell of lung squamous cell carcinoma in mice might be derived from of the bronchiolar alveolar stem cell. 第 18 回日韓がんワークショップ, 岐阜 (2013 年 11 月)
 14. 魏 民、山野 莊太郎、藤岡正喜、梯アンナ、下村衣里、神吉将之、鰐淵英機：シリアンハムスターにおける

- 1, 2 - dichrolopropan の強制経口投与による肝毒性とその発現機序の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
15. 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機：肝発がんにおける LC-Ms/Ms 及び *in vitro* 機能解析を用いた新規特異的候補分子の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
 16. 山野荘太郎、尾崎清和、武田周二、串田昌彦、井澤武史、山手丈至、平田暁大、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機：EHEN 投与ラットの前腸由来臓器への分化多能性を示す肝芽腫の一例. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
 17. 藤岡正喜、魏民、山野荘太郎、下村衣里、三島胡桃、福永賢輝、鰐淵英機：ラット膀胱におけるプロポリスの発がん促進作用及びその機序の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
 18. 奥村真衣、藤岡正喜、魏民、山野荘太郎、三島胡桃、多胡善幸、鰐淵英機：ラット中期多臓器発がんモデルを用いた DPAA(diphenyl arsenic acid) の発がん修飾作用の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
 19. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏民、北野光昭、鰐淵英機：EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
 20. 下村衣里、藤岡正喜、魏民、山野荘太郎、梯アンナ、串田昌彦、鰐淵英機:DMA^vおよび iAs^{III}ラット膀胱、肝臓における変異原性の解析. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
 21. 梯アンナ、魏民、福島昭治、鰐淵英機：ラット肝発がんにおける Valerian の予防効果. 第 13 回分子予防環境医学研究会, 和歌山 (2014 年 1~2 月)
 22. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機：EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する. 第 13 回分子予防環境医学研究会, 和歌山 (2014 年 1~2 月)
 23. Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H：Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. 平成25年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ, 大津 (2014年2月)
 24. 山野荘太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける NADPH oxidase (NOX) の役割.

平成 25 年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ，大津
(2014 年 2 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

ラット膀胱がんにおける遺伝子発現解析

BBN誘発ラット膀胱がん

0 動物: 6週齢、雄性F344ラット 48週

無処置

0.05% BBN 飲水投与

雄性ラット膀胱がん: 12例

無処置雄性ラット膀胱粘膜: 4例

DMA誘発ラット膀胱がん

0 動物: 10週齢、雄性および雌性F344ラット 104週

無処置

0.02% DMA 飲水投与

ラット膀胱がん: 11例 (雄: 5例、雌: 6例)

無処置ラット膀胱粘膜: 9例 (雄: 5例、雌: 4例)

GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (アフィメトリクス社)

図1 ラット膀胱がんにおける遺伝子発現解析

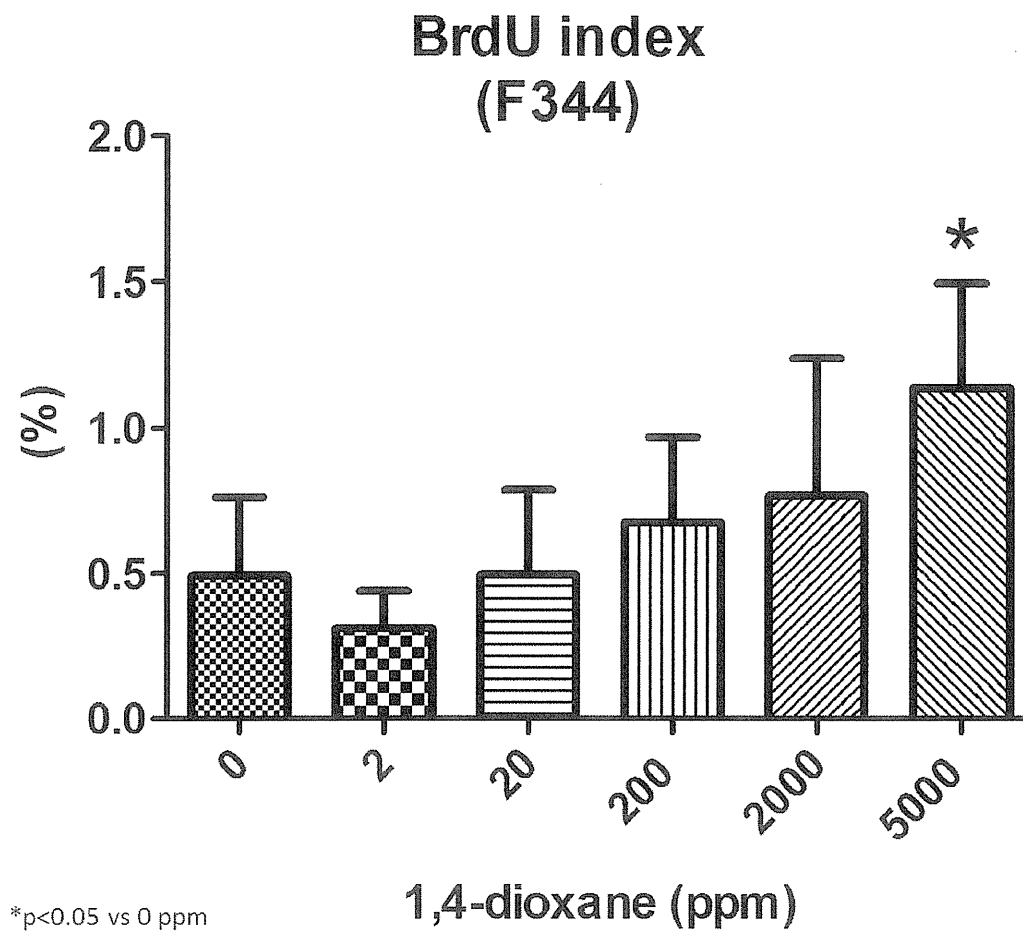


図2 1,4-dioxane 投与ラット肝臓における BrdU 標識率

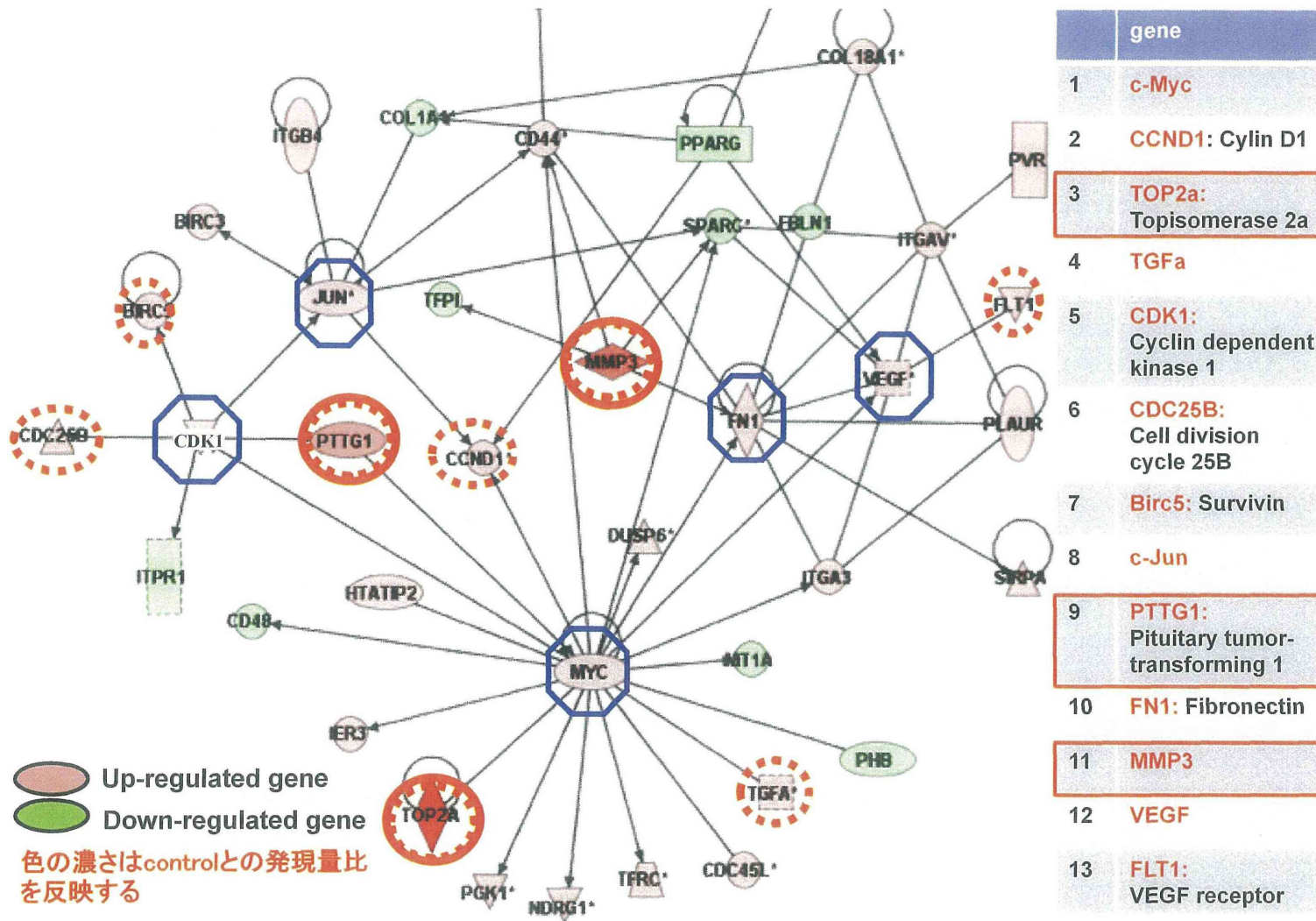



図3 がん関連遺伝子の相互作用ネットワーク

Gene	W2	W4	W8	Cancer	Gene	W2	W4	W8	Cancer
No.	6	6	6	12	No.	6	6	6	12
FGFBP1	13.4	17.5	35.6	383.7	Kcen3	0.7	0.5	2.2	14.3
CD133	13.2	15.7	14	34.2	c-Jun	1.4	1.6	2.4	2.7
Aldh1a3	8.2	12.0	15.5	23.0	Fibronectin1	1.5	1.3	0.9	5.5
Oncomodulin	4.8	9.7	29.1	18.8	VEGF	1.1	1.3	1.4	2.9
Gpx2	3.7	5.0	10.3	29.4	c-Myc	0.8	0.8	1.1	2.2
Gro1	2.3	3.5	6.0	23.3	Cdc25b	1.5	1.2	1.3	2
MMP3	7.2	6.2	5.4	23.2	FLT1	0.5	0.3	0.3	0.9
Top2a	5.7	4.8	2.9	27.8	TGFa	1	1.1	1.2	1.7
Pttg1	3.9	3.2	2.7	16					
Survivin	4.4	4.3	3.5	17.4					
Cyclin D1	2.1	2.1	2.0	4.6					
CDK1	2.1	2	2.0	5					

 p<0.05, v.s. control


 早期検出マーカーの候補

図4 BBNで誘発した早期増殖性病変およびがんにおけるマーカー遺伝子候補のmRNA発現量

	DMA	2-AAF	PEITC	BITC	OPP-Na	Uracil	BBN	Sensitivity
No. of rats	7	7	7	7	7	7	7	
Oncomodulin	2.0	3.8	4.2	6.5	7.4	3.8	5.7	7/7
MMP3	2.9	5.4	4.3	5.5	5.4	8.7	7.9	7/7
Gpx2	2.5	1.3	10.5	9.5	2.5	3.0	4.9	6/7
CD133	2.7	3.3	1.3	2.4	7.7	15.1	15.7	6/7
Top2a	6.4	9.0	2.0	2.8	8.6	5.7	5.1	6/7
Pttg1	5.7	4.4	1.7	2.0	3.9	4.6	3.3	6/7
Aldh1a3	1.3	2.2	2.0	2.8	2.6	11.6	9.3	6/7
Survivin	4.8	3.6	1.5	2.0	3.6	6.4	4.7	5/7
Gro1	1.0	2.0	2.2	3.5	1.0	38	5.1	5/7
Cdc2a	2.9	1.6	0.8	0.9	1.7	3.1	2.1	3/7
FGFBP1	2.7	0.1	0.7	0.6	0.2	77	11.2	3/7
Cyclin D1	1.1	1.1	1.3	1.4	1.7	2.7	2.0	2/7
No. of differentially changed genes	9/12	8/12	5/12	8/12	9/12	12/12	12/12	

 v.s. control, p<0.05

図5 膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子のmRNA発現量(4週)

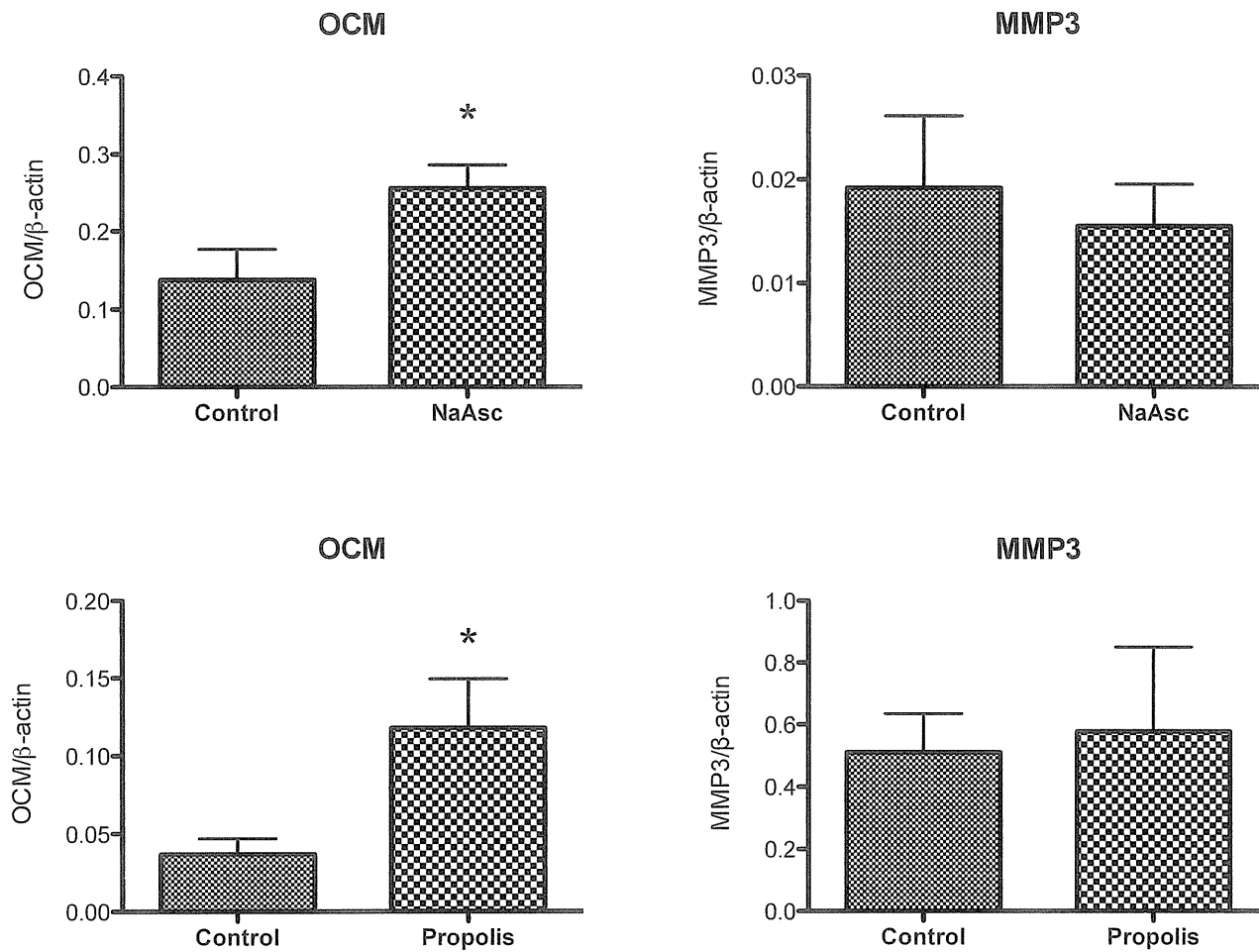


図6 膀胱発がん促進物質を投与したラット膀胱粘膜における OCM 及び MMP3 の mRNA 発現量

0 4 weeks

Test chemicals

Animals: 6-week-old, male F344 rats

Diethylnitrosamine (DEN): 100 ppm in drinking water
 N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (ENEN): 500 ppm in drinking water
 1.2-dimethylhydrazine (DMH): 40 mg/kg b.w. once/week

発癌物質 (標的臓器)	DEN (肝)	EHEN (腎)	DMH (大腸)
遺伝子	Folds (v.s. Con.)		
Oncomodulin	0.9	1.1	1.0
MMP3	1.3*	1.4*	1.4*
Gpx2	1.1	1.0	1.0
CD133	0.7	0.8	0.9
Top2a	1.0	1.4	1.3
Pttg1	1.0	1.3	1.2
Aldh1a3	0.9	0.9	1.0
Survivin	1.0	1.2	1.4
Gro1	0.9	0.7	0.9
Cdc2a	1.2	1.1	1.0
FGFBP1	1.8	0.7	0.5
Cyclin D1	1.1	0.9	1.0

*: significantly different from Control

図7 膀胱を標的にしない発がん物質を投与したラット膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子のmRNA 発現量

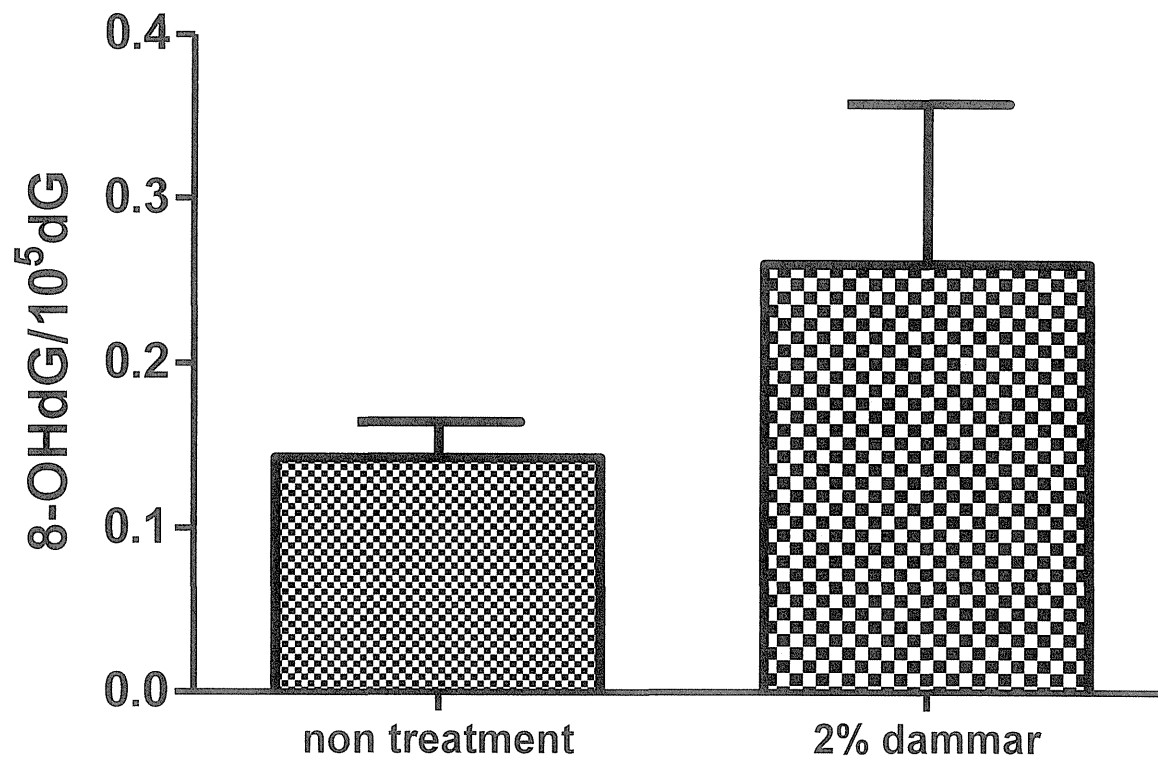


図8 ダンマル樹脂投与ラット肝臓における 8OHdG 形成レベル

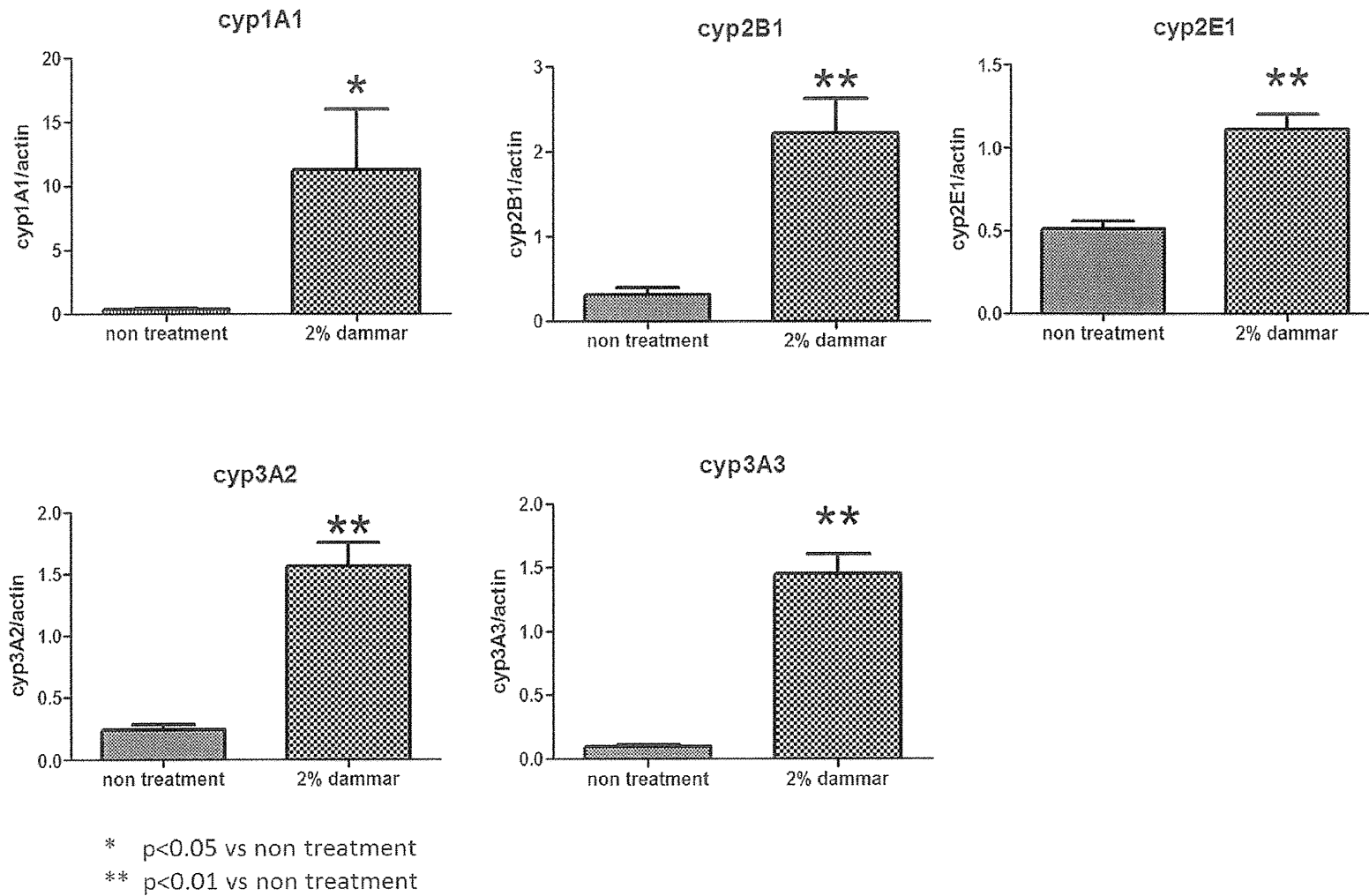
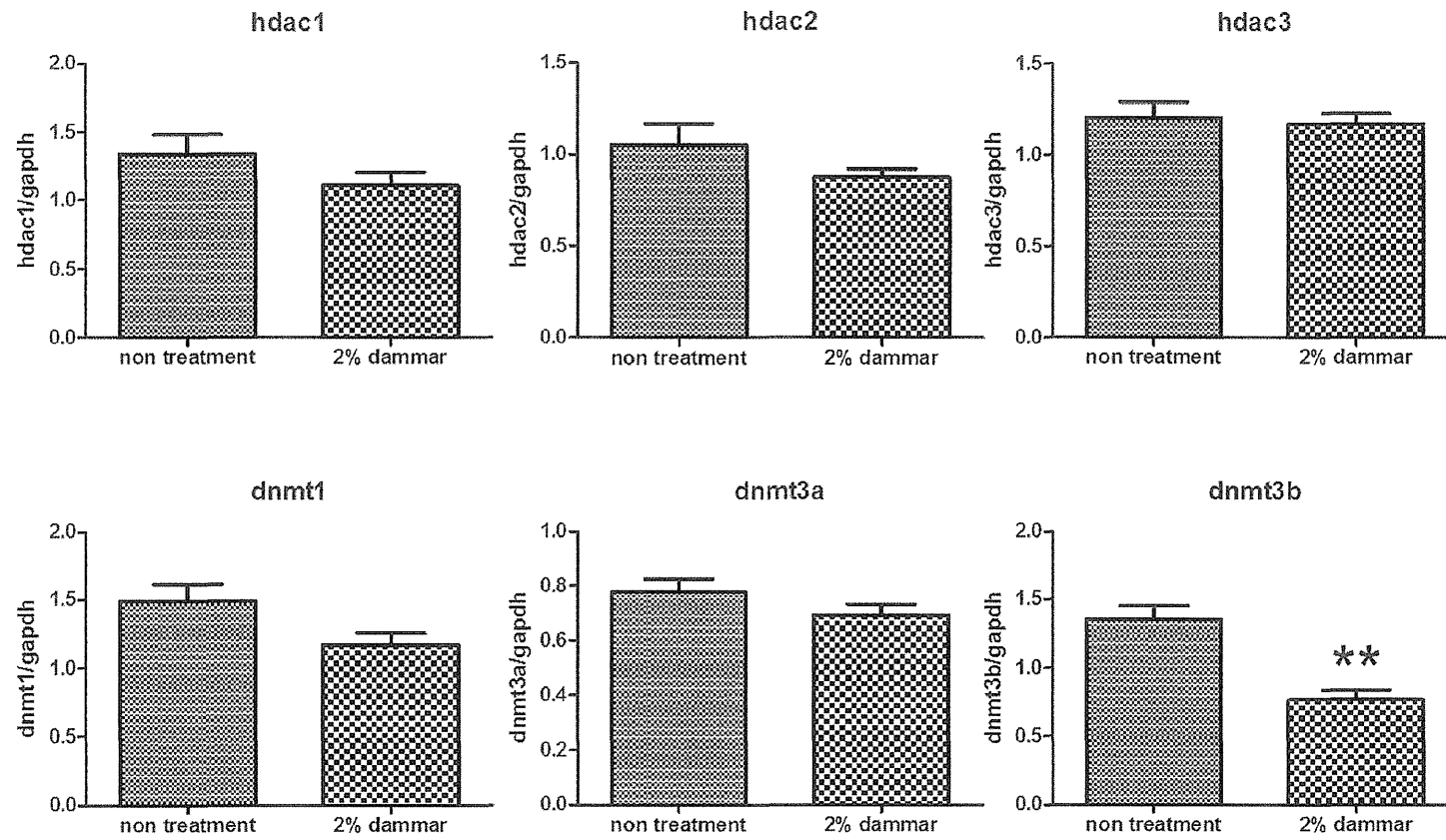


図9 ダンマル樹脂投与ラット肝臓における P450m の発現



** p<0.01 vs non treatment

図10 ダンマル樹脂投与ラット肝臓におけるメチル化関連酵素の発現

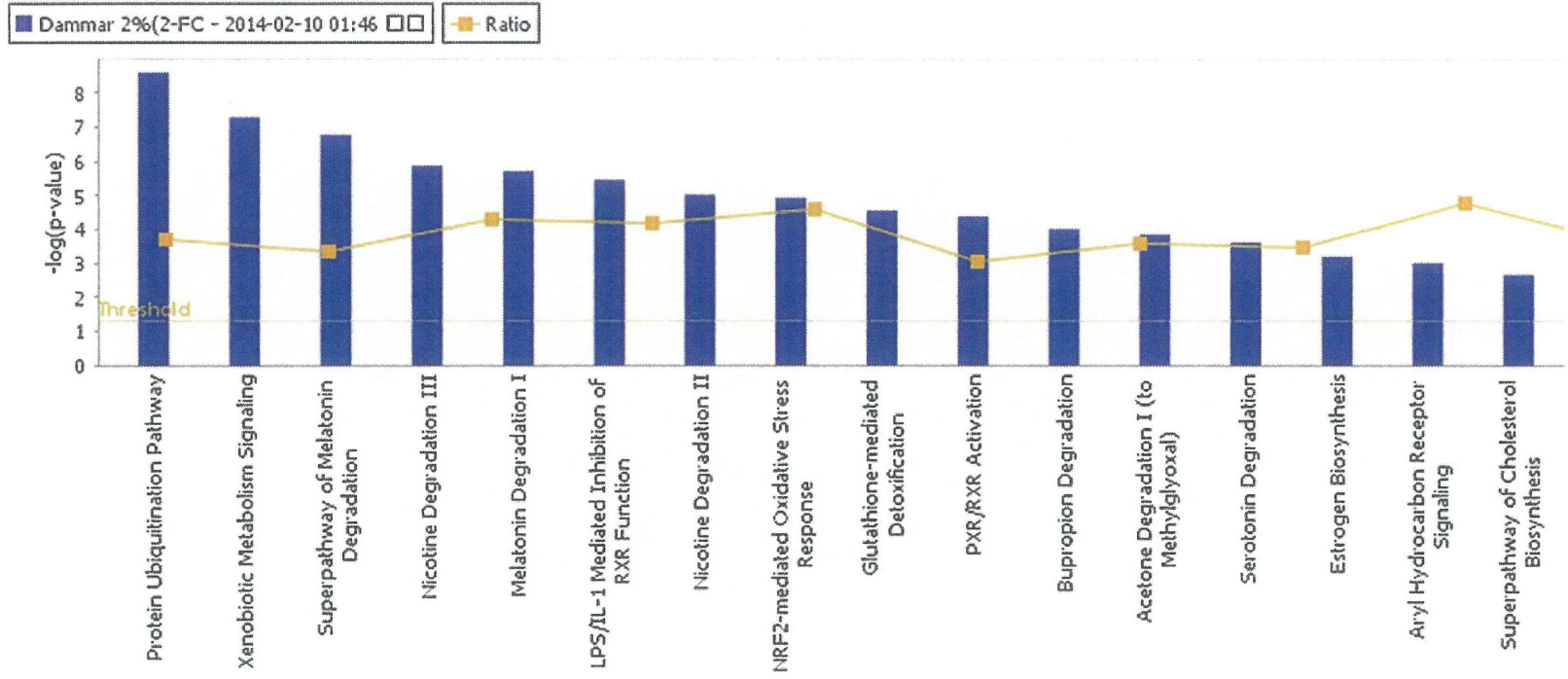


図 1 1 IPA パスウェイ解析