

201524025A

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ラット前がん病変の生物学的特徴に基づいた
新たな肝発がんバイオマーカーの探索

(H27-化学-若手-010)

平成27年度 総括研究報告書

研究代表者 高須 伸二

平成28(2016)年 5月

別紙 2

目 次

I. 総括研究報告	
ラット前がん病変の生物学的特徴に基づいた新たな肝発がん バイオマーカーの探索	
高須伸二 (資料)	----- 1
I I. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 7

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

ラット前がん病変の生物学的特徴に基づいた
新たな肝発がんバイオマーカーの探索

研究代表者： 高須 伸二 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

化学物質の迅速なリスク評価を実現するうえで、動物個体を用いたハザード評価の迅速化・効率化は大変重要である。胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST-P)陽性細胞巢は、ラットにおける肝発がん性をよく反映する発がんマーカーである一方、発生するすべての GST-P 陽性細胞巢が腫瘍化するのではないことも知られている。我々はこれまでに、遺伝毒性発がん物質である diethylnitrosamine (DEN)誘発 GST-P 陽性細胞巢の多くは不可逆的な動態を示す一方、非遺伝毒性発がん物質である furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢は可逆的である可能性を見出したことから、本研究では GST-P 陽性細胞巢の可逆性・不可逆性の差異に着目し、GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴を考慮した新たな肝発がんバイオマーカー候補を検討する。今年度は、GST-P 陽性細胞巢における網羅的遺伝子発現解析を実施するために、レーザーマイクロディセクション法を用いた RNA 抽出法の検討を行い、その方法および有用性を確認した。また、GST-P 陽性細胞巢における遺伝子発現変動を比較するため、6週齢の雄性 F344 ラットに DEN を 10 ppm の濃度で 13 週間飲水投与またはコーン油に懸濁させた furan を 8 mg/kg 体重/日の用量で 1 日 1 回、週 5 日間の頻度で 13 週間強制経口投与し、GST-P 陽性細胞巢の発生をエンドポイントに肝臓のサンプリングを行い、GST-P 陽性細胞巢の発生を確認した。今後、これらサンプルに関してそれぞれの GST-P 陽性細胞巢を対象とした部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を実施し、発がん機序や生物学的特徴に基づいた発がん性を評価するための新たなバイオマーカー候補を探索する。

A. 研究目的

化学物質は国民生活に貢献している一方で、その有害影響について関心や懸念も高まっていることから、リスク評価をより迅速に推進する必要がある。このような背景のもと、化学物質のリスク評価に関して定量的構造活性相関やカテゴリーアプローチ、トキシコゲノミクスなどの新たな毒性評価法が提唱され、迅速なリスク評価の実現が期待されている。個体レベルのハザード評価、特に発がん性評価に関しても迅速化を目的とした短・中期試験法が開発され、現在では長期発がん実験の結果を短期間に予測で

き、発がん性を迅速に検出することができる中期発がん性試験等が確立されている。

このような短・中期的試験法では、毒性影響をよく反映する有用なバイオマーカーが重要である。胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST-P)陽性細胞巢の定量化は、ラットにおける化学物質の肝発がん性を反映することが知られている前がん病変マーカーであり、前述の試験系を含む多くの試験で利用されている。しかしながら、これまでの研究から発生するすべての GST-P 陽性細胞巢が腫瘍化するのではないことや、前がん病変の一部は可逆性を示すことが報告されている。さらに、形態学的

な特徴のみでは GST-P 陽性細胞巢の生物学的動態を把握することができないため、GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴や可逆性・不可逆性を規定するメカニズムの解析は十分になされておらず、未だ不明な点も多い。

我々はこれまでに、肝発がん物質を投与したラットにおいて、一定の休薬期間を設けて発がん物質投与終了直後と休薬期間終了後の肝臓における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行ったところ、遺伝毒性発がん物質である diethylnitrosamine (DEN) 誘発 GST-P 陽性細胞巢は休薬後に増加するのに対して、非遺伝毒性発がん物質である furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢は休薬後に減少し、なかでも大型の GST-P 陽性細胞巢が減少していることを見出した。このことから、GST-P 陽性細胞巢のなかでも発がんへの寄与の程度が異なる GST-P 陽性細胞巢がある可能性が考えられ、発がん性をより高精度に評価するには発がん機序や前がん病変の生物学的特徴に基づいたより発がんに寄与すると考えられる GST-P 陽性細胞巢を検出することが必要であると考えた。

本研究では、GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴、特に不可逆的動態を示す DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢と可逆的動態を示す furan 誘発の大型の GST-P 陽性細胞巢の生物学的動態の差異に着目し、DEN あるいは furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、GST-P 陽性細胞巢の可逆性・不可逆性を規定するメカニズムを検討することで、最終的に発がん機序や生物学的特徴に基づいた発がん性を評価するための新たなバイオマーカー候補を探索する。

B. 研究方法

GST-P 陽性細胞巢における部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を行うために、レーザーマイクロダイセクション法による切片切除および切除切片からの RNA 抽出の検討

を行った。抗 GST-P 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った切片からの RNA 抽出の可能性を検討するために、DEN または furan を投与した F344 ラット肝臓のホルマリン固定標本および新鮮凍結切片に対して、抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、レーザーマイクロダイセクション法による切片切除および切除切片からの RNA 抽出を行った。また、免疫組織化学染色を施した切片と連続した新鮮凍結切片を用いて RNA 抽出を行うため、0.05% トルイジンブルー染色新鮮凍結切片を用いてレーザーマイクロダイセクション法による切片切除および切除切片からの RNA 抽出を行った。

続いて、実際の DEN および furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢における部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を行うために、6 週齢の雄性 F344 ラット 20 匹に DEN を 10 ppm の濃度で 13 週間飲水投与した。また、同ラット 60 匹に対して、furan をコーン油に懸濁させ、8 mg/kg 体重/日の用量で 1 日 1 回、週 5 日間の頻度で 13 週間強制経口投与した。さらに、同ラット 10 匹を無処置群に配し、基礎食および蒸留水を自由摂取させた。投与終了後、それぞれの群の半数のラットに関しては、肝臓を摘出した。また残りのラットは、投与終了後 7 週間休薬させたのちに肝臓を摘出した。摘出した肝臓は各葉から 2 箇所を切り出し、それぞれホルマリン固定および OTC コンパウンドによる包埋に供した。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。

C. 研究結果

DEN または furan を投与した F344 ラット肝臓の新鮮凍結切片を用いて抗 GST-P 抗体を

用いた免疫組織化学染色を行ったところ、ホルマリン固定標本と同様の染色態度を示した。しかしながら、ホルマリン固定標本および新鮮凍結標本の何れもおいても、免疫染色を行った切片からは高品質の RNA は抽出できなかった。一方、0.05%トルイジンブルー染色を行った新鮮凍結切片からの RNA 抽出を行ったところ、遺伝子発現解析が可能な品質の RNA を抽出できた。

続いて、GST-P 陽性細胞巢の遺伝子発現変動を比較するために、6 週齢雄 F344 ラットに DEN または furan を 13 週間投与したところ、furan 投与群において投与 6 週目以降から無処置群に比して体重が有意に低下または低下する傾向が認められた (Fig. 1)。また、13 週間投与後に 7 週間休薬させた群においては、furan 投与群において投与 8 週目以降から無処置群に比して体重が有意に低下または低下する傾向が認められ、休薬後においても有意な体重減少または減少傾向が認められた (Fig. 3)。一方、DEN 投与群においては、基礎食群に比して、体重の有意な変化は認められなかった。また、相対肝重量は投与終了後ならびに回復期間終了後の何れの時期においても、有意な変化は認められなかった (Fig. 2、4)。

Furan を 13 週間投与したラット肝臓の新鮮凍結標本を用いて、GST-P 免疫組織化学染色を行ったところ、複数の大型の GST-P 陽性細胞巢が認められた。

D. 考察

本研究は、GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴を考慮した発がん性評価を行うため、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢と furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の生物学的動態の差異に着目し、GST-P 陽性細胞巢のなかでもより機能的に発がんに近い GST-P 陽性細胞巢を指標する因子を精査することで、発がん機序に基づいた新たなバイオマーカー候補を明らかにする研究である。

今回、GST-P 陽性細胞巢における網羅的

遺伝子発現解析を行うために、レーザーマイクロダイセクション法による切片切除および切除切片からの RNA 抽出の検討を行った。抗 GST-P 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った結果、新鮮凍結切片を用いた GST-P 陽性細胞巢は、従来行われているホルマリン切片を用いた免疫染色と同様の染色態度を示したことから、新鮮凍結切片に対しても GST-P 陽性細胞巢の検出は可能であると考えた。しかしながら、免疫染色を行った切片からは高品質の RNA は抽出できなかったことから、連続新鮮凍結切片に対して、トルイジンブルー染色を行い、RNA 抽出を行った。その結果、遺伝子発現解析が可能な品質の RNA を抽出できることが確認できたことから、本研究では、0.05%トルイジンブルー染色を施した連続切片を用いて解析を行うことが妥当であると考えた。

そこで、DEN および furan を投与した際に認められるラット肝臓の GST-P 陽性細胞巢における遺伝子発現変動を比較するために、F344 ラットに DEN または furan を 13 週間投与したところ、furan 投与群において有意な体重増加抑制が認められた。さらに、今回の肝臓サンプルにおいても GST-P 陽性細胞巢の発生を確認できた。今後、これらサンプルに関してそれぞれの GST-P 陽性細胞巢を対象とした部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を実施することにより、それぞれの GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴を明らかにすることで、発がん機序や生物学的特徴に基づいた発がん性を評価するための新たなバイオマーカー候補を探索する。

E. 結論

GST-P 陽性細胞巢における網羅的遺伝子発現解析を実施するために、レーザーマイクロダイセクション法を用いた RNA 抽出法の検討を行い、その方法および有用性を確認した。また、GST-P 陽性細胞巢における遺伝子発現変動を比較するため、GST-P 陽性細胞巢の発生をエンドポイントに DEN

および furan を F344 ラットに投与し、肝臓のサンプリングおよび GST-P 陽性細胞巢の発生を確認した。今後、これらサンプルに関して GST-P 陽性細胞巢を対象とした部位特異的な網羅的遺伝子発現解析を実施し、それぞれの GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴を明らかにすることにより、発がん機序や生物学的特徴に基づいた発がん性を評価するための新たなバイオマーカー候補を探索する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

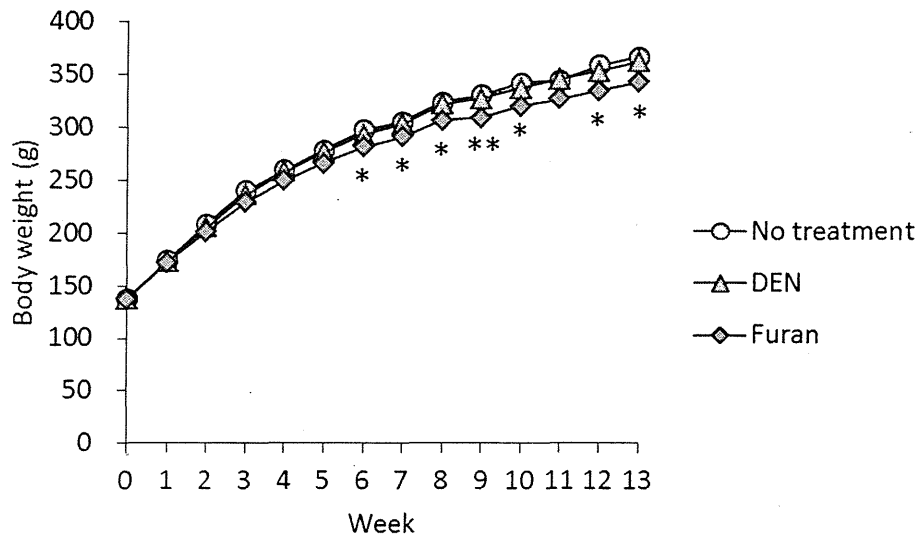


Fig. 1. DENまたはfuran13週間投与F344ラットにおける体重増加曲線
*, **p<0.05, 0.01 vs no treatment

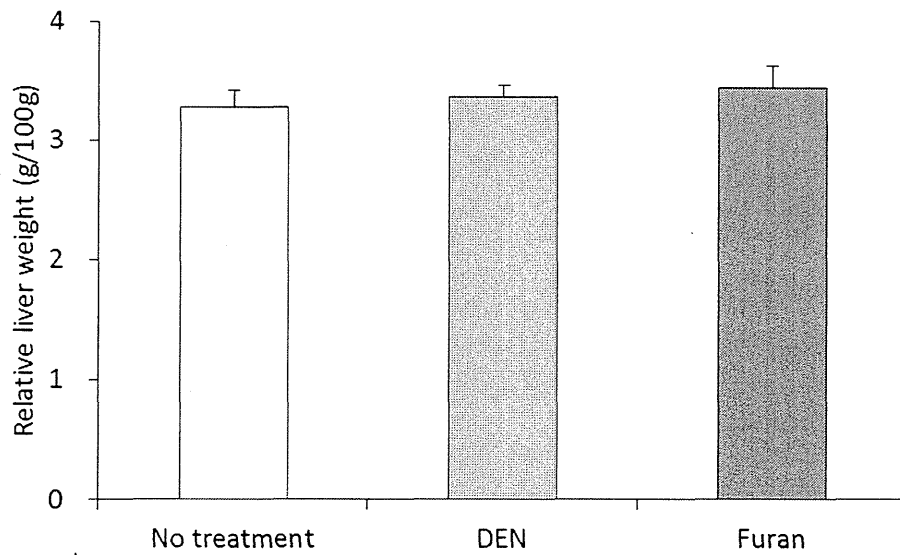


Fig. 2. DENまたはfuran13週間投与F344ラットにおける相対肝重量

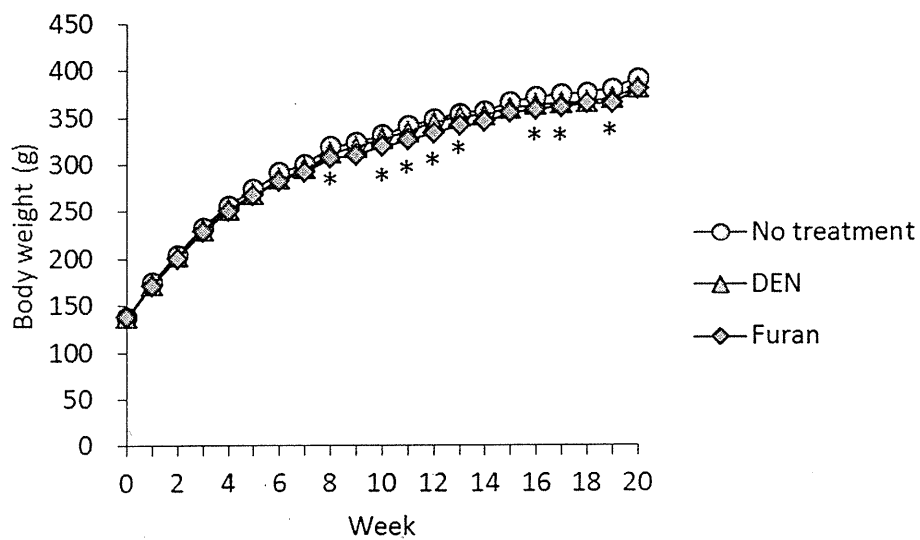


Fig. 3. DENまたはfuran13週間投与および7週間休薬F344ラットにおける
 体重増加曲線
 *, **p<0.05, 0.01 vs no treatment

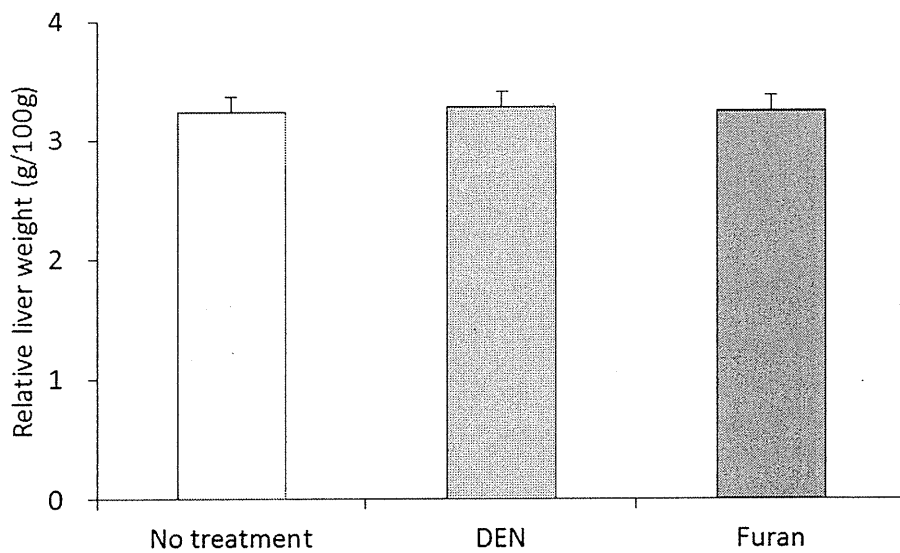


Fig. 3. DENまたはfuran投与13週間および7週間休薬
 F344ラットにおける相対肝重量

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当なし					

