

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

遺伝毒性肝発がん物質の発がん性を短期で高精度に検出する *in vivo* スクリーニング系の確立を目的とした研究を実施した。まず初めに官民共同プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクト（TGP）で取得されたラット単回投与後 24 時間までの肝臓における遺伝子発現データを用いて、遺伝毒性肝発がん物質で共通して発現変化を示す遺伝子（遺伝子マーカー群）を探索した。結果、5 化合物の遺伝毒性肝発がん物質で共通して発現変化を示す 10 遺伝子（G1rx3, Phlda3, Mok, Aen, Mybl1, RGD1308114, Cdkn1a, Fam49a, Atp6v1f, Nudt5）が得られた。次に抽出された 10 遺伝子マーカーセットをもとに、遺伝毒性肝発がん物質を検出できる数理的予測モデルの構築を試みた。結果、遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を区別できる予測モデルとして、感度 100%、特異度 96.3%、正答率 91.7%の精度を保持する予測モデルが構築できた。最後に構築した数理的予測モデルの検証として、5 種の既知遺伝毒性肝発がん物質について、ラット単回投与動物試験を行い、qPCR 法にて、遺伝子マーカーセットの発現データを取得し、構築した予測モデルに発がん性を予測させた結果、全ての物質について、陽性判定が得られた。本研究で確立した遺伝毒性肝発がん物質の検出系は、従来の肝発がん性評価系と比較して、短期間かつ安価に評価できる新規評価系としての活用が期待される。

A．研究目的

化学物質の発がん性リスクは *in vitro* 及び *in vivo* で評価される。*In vivo* ではげっ歯類を用いた2年間のがん原生試験または代替法である中期発がん性試験やトランスジェニックマウスを用いた6ヵ月反復投与試験によって評価される。これらの試験の実施には多大な費用及び時間、動物数を必要とするため、より短期で簡便に発がん性リスクを評価できる手法の開発が求められている。また *in vitro* では、変異原性を調べる Ames 試験、染色体異常を調べる小核試験があるが、これらの評価系は高い偽陽性率が課題とされている。さらに発がん性を検索すべき化学物質は膨大な数であり、それらを既存の発がん試験法（がん原性試験や短期・中期の代替試験など）で検索することは現実的に不可能である。これらのことから、より短期間かつ包括的に、遺伝毒性発がん物質をスクリーニングできる手法の開発が必要である

本研究では上記の課題を解決するため、遺伝毒性肝発がん物質の発がん性をより短期で高精度に検出する *in vivo* スクリーニング系の確立を目的として、下記の3つの検討を行った。

検討 1 では、官民共同プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクト（TGP）で取得されたラット単回投与24時間までの肝臓における遺伝子発現データを用いて、遺伝毒性肝発がん物質で共通して発現変化を示す遺伝子（遺伝子マーカー群）を探索した。検討 2 では、検討 1 で抽出された遺伝子マーカー群をもとに遺伝毒性肝発がん物質を高感度かつ高特異度で検出できる数理的予測モデルの構築を試みた。検討 3 では、構築した数理的予測モデルの検証

として、複数の既知遺伝毒性肝発がん物質及び非遺伝毒性肝発がん物質について、ラット単回投与試験を行い、遺伝子マーカー群の発現データを取得後に、構築した予測モデルに発がん性を予測させ、その結果の妥当性を検証した。

B．研究方法

検討 1 では、公的データベースである Open TG-GATEs に格納されている 5 種の遺伝毒性肝発がん物質（DEN, AAF, 2-nitrofluorene, N-nitrosomorpholine, Aflatoxin B1）のラット単回投与 24 時間後の肝臓における遺伝子発現データを用いて、共通して発現変化を示す遺伝子群を探索した。

検討 2 では、検討 1 で得られた遺伝子マーカーセットと Open TG-GATEs に格納されている遺伝子発現データを用いて、遺伝子解析ソフト（GeneSpring）で利用できるサポートベクターマシン（SVM）によって、遺伝毒性肝発がん物質（5 物質）とそれ以外の物質（53 物質）を区別できる予測モデルの構築を試みた。

検討 3 では、Open TG-GATEs に含まれていない既知の遺伝毒性肝発がん物質（2-Aminoanthraquinone, 2-Nitropropane, 2,4-Diaminotoluene, MeIQx 及び IQ の計 5 種）について、ラット単回投与 24 時間試験を実施し、10 遺伝子マーカーセットを qPCR で測定し、予測モデルで判定させてモデルの妥当性を検証した。

（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

検討 1 では、5 化合物で共通して発現変化を示す 10 遺伝子 (Glr3, Phlda3, Mok, Aen, Mybl1, RGD1308114, Cdkn1a, Fam49a, Atp6v1f, Nudt5) が得られた。RGD1308114 は発現量が減少していたが、これ以外の遺伝子は全て発現量が増加していた。

次に検討 2 では、ラット単回投与 24 時間後の 10 遺伝子の発現変化を算出し、SVM による遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を区別できる予測モデルとして、感度 100%、特異度 96.3%、正答率 91.7%の精度を保持する予測モデルが構築できた。

最後に、検討 3 では Open TG-GATEs に含まれていない既知の遺伝毒性肝発がん物質 (計 5 種) について、ラット単回投与 24 時間後の肝臓における 10 遺伝子の発現変化を qPCR 法で測定し、構築した予測モデルで肝発がん性を予測させた結果、全ての物質について、陽性判定が得られた。

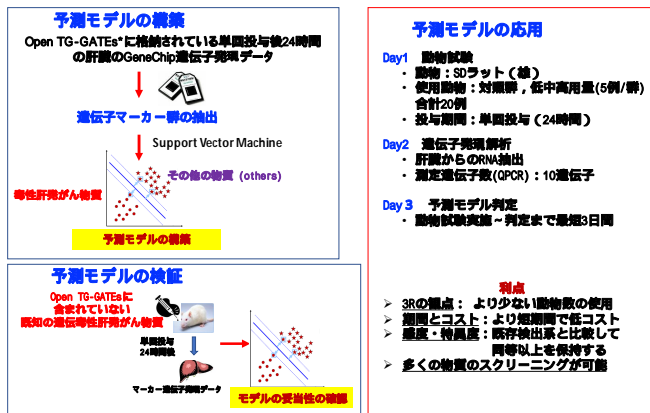


図 1 遺伝毒性肝発がん物質検出予測モデル

D. 考察

の検討において、遺伝毒性肝発がん物質を単回投与した肝臓においては、共通した遺伝子群での発現変化が認められたことから、これら物質を投与されたラット肝臓では、極早期に共通した肝臓での影響が生じていることが推測された。本検討で得られた 10 遺伝子には、肝発がんとの関連が報告されている遺伝子 (Glr3, Mok, Cdkn1a) や DNA 修復に関与することが報告されている Nudt5 などが含まれていたことから、得られた遺伝子マーカーセットは肝発がんに関与するマーカーセットとして考えられた。

の検討において、遺伝毒性肝発がん物質とそれ以外の物質を区別し得る予測モデルが構築できた。これは、の検討で得られた遺伝子マーカーセットが、遺

伝毒性肝発がん物質では共通で変化する一方、それ以外の物質では変化しない、または遺伝毒性肝発がん物質とは異なった発現変化を示すためと考えられた。正答率が約 90%であることから、高い精度で遺伝毒性肝発がん物質を検出できる可能性が示唆された。

の検討において、新たに 5 種の遺伝毒性肝発がん物質について、qPCR で取得したデータをもとに構築した予測モデルで肝発がん性を予測させた結果、全ての物質について陽性判定が得られた。本結果より、今回構築した予測モデルは、GeneChip データだけでなく、qPCR 法で取得したデータも活用できる可能性、及び、新規物質についても適用できる可能性が示唆された。

E. 結論

遺伝毒性肝発がん物質をラットに単回投与した際、共通して発現変化を示す 10 遺伝子を同定し、これら遺伝子セットについて qPCR 法での測定と数理的予測モデルによる予測により、高い精度で遺伝毒性肝発がん物質を検出できる手法を確立した (図 1)。本手法は、従来の肝発がん性評価系と比較して、短期間かつ安価に評価できる新規評価系としての活用が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanki M., Gi M. et al. Detection of non-genotoxic hepatocarcinogens and prediction of their mechanism of action in rats using gene marker sets. J Toxicol Sci 41: 281-292, 2016.
- 2) Kakehashi A, Gi M, et al. Ethanol-Extracted Brazilian Propolis Exerts Protective Effects on Tumorigenesis in Wistar Hannover Rats. PLoS One 11: e0158654, 2016.

2. 学会発表

- 1) 魏 民 他 遺伝毒性・発がん性をスクリーニングする in vivo 短期検索法。第 43 回日本毒性学会学術年会, 2016 年, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし