

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) 陽性細胞巢の定量解析は、ラットにおける化学物質の肝発がん性予測に非常に有効な手段である。しかし我々はこれまでに、diethylnitrosamine (DEN) 誘発 GST-P 陽性細胞巢は DEN 休薬後に増加するのに対して、furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢は furan 休薬後に減少し、それは大型の GST-P 陽性細胞巢の減少が大きく寄与していることを見出した。本研究では、発がん性評価のための GST-P 陽性細胞巢定量化解析の精緻化を目的として、動態の異なる GST-P 陽性細胞巢に対し網羅的遺伝子発現解析を行い、生物学的特徴からの両者の峻別法を確立する。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 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た。投与終了後、肝臓を摘出し、それぞれの GST-P 陽性細胞巢ならびに GST-P 陰性領域をレーザーマイクロダイセクション法により採取した。採取したサンプルから total RNA を抽出し、RNA 増幅を行った後に網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、DEN を投与した肝臓の GST-P 陰性領域に対して DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した遺伝子として 4 遺伝子が抽出された。同様に furan に関しては 35 遺伝子が抽出された。今後、発現変動が認められた遺伝子に関して発現変動のパターン及び程度を精査するとともに、発がん過程における遺伝子の役割を考慮して、新たな肝発がんバイオマーカーの候補対象となる分子を同定する。

A. 研究目的

化学物質は国民生活に貢献している一方、有害影響についての関心や懸念が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、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。動物個体を用いたハザード評価、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、長期発がん実験の結果を短期間に予測できる中期発がん性試験等が確立されている。

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、ラットの肝発がん性を非常によく反映することが知られている前がん病変マーカーであることから、その定量化は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、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、つまり、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。このように GST-P 陽性細胞巢には異なる細胞集団が含まれている可能性が示唆されているが、形態学的な特徴から GST-P 陽性細胞巢の動態を把握することができないため、その生物学的特徴の解析は十分になされていない。

これまでに、当研究室では遺伝毒性発が

ん物質である diethylnitrosamine (DEN) はレポーター遺伝子導入ラットの肝臓において、レポーター遺伝子変異頻度の上昇とともに GST-P 陽性細胞巣が増加することを明らかにしている。一方、furan 投与は肝臓中のレポーター遺伝子突然変異頻度に影響を与えないにも関わらず、GST-P 陽性細胞巣を顕著に増加させることを報告している。このことから、我々は発生する GST-P 陽性細胞に質的な違いがある可能性を検討してきた。その中で、肝発がん物質を投与したラットに一定の休薬期間を設け、GST-P 陽性細胞巣の動態を検討した結果、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巣は休薬後に増加する一方、furan 誘発の GST-P 陽性細胞巣は休薬後に減少し、なかでも大型の GST-P 陽性細胞巣が減少していることを見出した。

以上のことから、GST-P 陽性細胞巣のなかには異なる生物学的特徴を示すものがあり、発がん物質や発がん機序によって GST-P 陽性細胞巣の挙動が異なっている可能性が考えられた。従って、GST-P 陽性細胞巣を指標に肝発がん性をより高精度に評価するためには、GST-P 陽性細胞巣の生物学的特徴を考慮することが重要であると考えた。

本研究では、それぞれの GST-P 陽性細胞巣の動態の差異に着目し、DEN あるいは furan 誘発 GST-P 陽性細胞巣の網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、異なる生物学的特徴を有する GST-P 陽性細胞巣の存在を明らかにする。そして、得られた知見から、生物学的特徴に基づく GST-P 陽性巣の峻別のための新たな肝発がんバイオマーカー候補を探索する。

## B . 研究方法

6 週齢の雄性 F344 ラット (日本エスエルシー) 20 匹に DEN (東京化成工業) 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 (和光純薬工業) をコーン油 (和光純薬工業) 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 匹を対照群に配し、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。13 週間投薬直後の肝臓から、未固定新鮮凍結サンプルを作成し、連続切片を用いて GST-P 免疫組織化学的染色および 0.05% トルイジンブルー染色を行った。GST-P 免疫組織化学染色標本を参照に、0.05% トルイジンブルー染色標本から GST-P 陽性細胞巣または GST-P 陰性領域に相当する部位をレーザーマイクロダイセクション法により切除した (Figure 1)。サンプリングは無処置群の GST-P 陰性領域ならびに DEN 投与群および furan 投与群の GST-P 陽性細胞巣または GST-P 陰性領域 (各 3 例ずつ) について実施した。

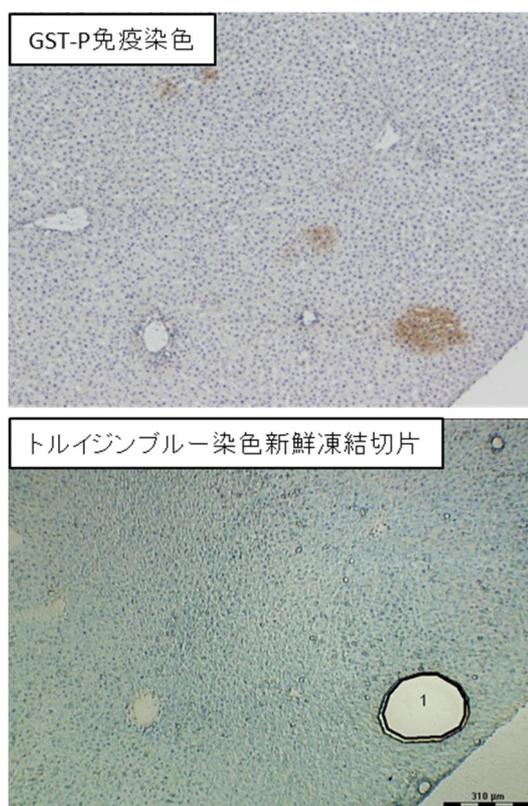


図1 レーザーマイクロダイセクション法によるサンプリング

得られたサンプルから RNeasy Plus Micro kit を用いて total RNA を抽出し、Agilent 2100 バイオアナライザ( Agilent Technology ) および Agilent RNA6000 ピコ キット ( Agilent Technology )を用いて RNA の収量および品質チェックを行った。解析可能な品質および収量が確認されたサンプルについて、Ovation PicoSL WTA System V2 ( NuGEN )を用いて RNA 増幅を行った。RNA 増幅後、リアルタイム PCR 法による *Gstp1* 発現解析および Whole Rat Genome ( 4x44K ) マイクロアレイキット ( Agilent Technology )による網羅的遺伝子発現解析を実施した。網羅的遺伝子発現解析から得られたデータは GeneSpring ( Agilent Technology )により解析し、2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子を抽出した。

(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

*Gstp1* の発現をリアルタイム PCR 法により検討したところ、DEN および furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢における *Gstp1* の発現は、GST-P 陰性領域に対して高値を示した ( Figure 2 )。

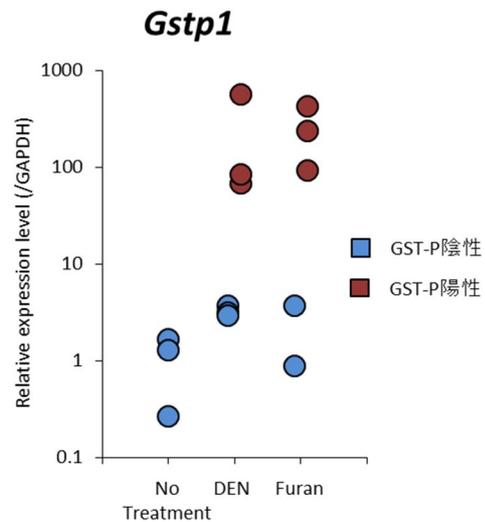


図2 リアルタイムPCRによる GST-P陽性細胞巢および陰性領域の*Gstp1*発現

網羅的遺伝子発現解析の結果、DEN を投与した肝臓の GST-P 陰性領域に対して GST-P 陽性細胞巢で発現上昇したプローブとして 16 個が抽出された。Furan 投与肝臓では 52 個が抽出された。これらプローブの内、DEN および furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢に共通して発現上昇したプローブは 11 個であった ( Figure 3 )。

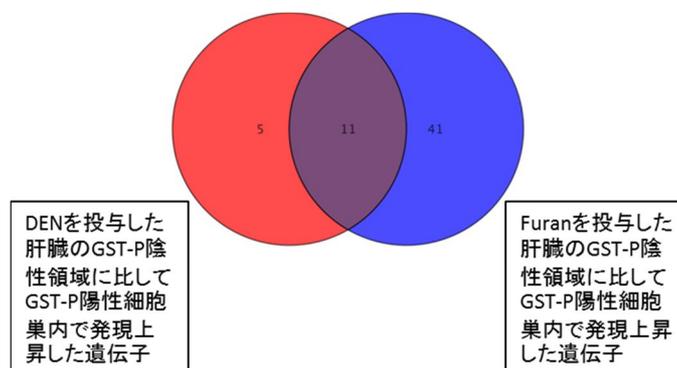


図3 DENおよびfuran誘発GST-P陽性細胞巢で発現上昇した遺伝子数

発現変動を示したプローブのうち、遺伝子名が明らかになっているものとして9遺伝子が抽出され、なかには *Gstp1* が含まれていた (Table 1)。DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現変動したプローブのうち、遺伝子名が明らかになっている遺伝子として4遺伝子が抽出された (Table 2)。同様に furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現変動した遺伝子として35個が抽出された (Table 3)。

なお、furan 投与群の GST-P 陰性領域1例に関して、網羅的遺伝子発現解析の結果、全体の遺伝子発現が他のサンプルと著しく異なっていたため、当該サンプルを除外して解析を行った。

#### D . 考察

今回、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢と furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢のそれぞれの生物学的特徴を明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析を実施した。

網羅的遺伝子発現解析に先立ち、リアルタイム PCR 法により *Gstp1* の発現を検討した。その結果、DEN および furan 投与群の何れも *Gstp1* の発現は GST-P 陰性領域に対して GST-P 陽性細胞巢で高値を示した。さらに、網羅的遺伝子発現解析の結果、DEN および furan 両者の GST-P 陽性細胞巢で共通して発現上昇した遺伝子に *Gstp1* が含まれていた。これらの結果から、今回実施したサンプル採取方法の妥当性が確認された。一方、今回の解析条件下では、これまでに GST-P 陽性細胞巢の形成に関係することが知られている Nrf2 経路等の関与が明らかにならなかったことから、今後さらに広範囲の遺伝子発現解析を実施し、GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴を明らかにする必要があると考えられた。

*Gstp1* を含む9遺伝子が DEN および furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢に共通して発現上昇した一方で、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した遺伝子として4遺伝子が

認められた。また、35遺伝子が furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した。今回実施した遺伝子発現解析は、被験物質を投与した肝臓の GST-P 陰性領域に対する GST-P 陽性細胞巢の変動を対象としている。従って、今回抽出した遺伝子発現の変動には被験物質投与の影響は関与していないものと考えられる。このことから、DEN 誘発と furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢では異なる遺伝子発現を示すことが示された。従って、それぞれの GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した遺伝子は GST-P 陽性細胞巢の峻別のためのマーカー候補になりうる可能性が考えられた。

しかし、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した4遺伝子に関し、これまでに発がん過程における役割、特にラット肝発がん過程における関与は明らかになっていない。また、furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した遺伝子には細胞外マトリックス (*Coll1a1*) や凝固・線溶系 (*Fb1n1*)、脂質代謝 (*Lpl*) に関与する遺伝子が含まれていた。今後、それぞれの生物学的特徴を考慮した GST-P 陽性細胞巢峻別のためのマーカー候補を選別するうえで、これらの遺伝子の機能、特にラット肝発がん過程における役割を考慮し検討することが重要であると考えられる。従って、今後は今回認められた遺伝子発現変動のパターンや程度に加えて、これまでに報告されている遺伝子の機能及び発がん過程における関与を考慮し、詳細な検討を行うことで異なる生物学的特徴を有する GST-P 陽性細胞巢峻別のための新たな肝発がんバイオマーカーとなり得る候補分子を同定する必要があると考えられた。

#### E . 結論

生物学的特徴が異なる GST-P 陽性細胞巢の峻別による発がん性評価の精緻化を達成するため、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢と furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢の網羅的遺伝子発

現解析を行った結果、それぞれの GST-P 陽性細胞巢で特異的に発現上昇した遺伝子を抽出した。今後、発現変動のパターンや程度、遺伝子の機能を考慮し、生物学的特徴が異なる GST-P 陽性巢峻別のためのバイオマーカーとなり得る候補分子を同定する。

#### 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

Table 1. Genes extracted from cDNA microarray analysis that were up-regulated in DEN-induced and furan-induced GST-P positive foci.

Gene symbol	Description	DEN GST-P negative vs positive	Furan GST-P negative vs positive
Bex1	Rattus norvegicus brain expressed, X-linked 1 (Bex1), mRNA [NM_001037365]	2.4	368.8
Map3k6	Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 (Map3k6), mRNA [NM_001107909]	2.3	7.1
LOC100910127	PREDICTED: Rattus norvegicus cytochrome P450 2B15-like (LOC100910127), mRNA [XM_003749091]	6.6	34.3
Gstp1	Rattus norvegicus glutathione S-transferase pi 1 (Gstp1), mRNA [NM_012577]	19.0	152.3
-	BF282476 EST447067 Rat Gene Index, normalized rat, Rattus norvegicus cDNA Rattus norvegicus cDNA clone RGIDN81 3' sequence, mRNA sequence [BF282476]	2.2	44.8
Phgdh	Rattus norvegicus phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh), mRNA [NM_031620]	3.3	5.7
Gstp1	Rattus norvegicus glutathione S-transferase pi 1 (Gstp1), mRNA [NM_012577]	10.6	102.1
-	AA955668 UI-R-E1-fc-g-07-0-UI.s1 UI-R-E1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E1-fc-g-07-0-UI 3' similar to gi [AA955668]	9.0	84.5
Ddit4l	Rattus norvegicus DNA-damage-inducible transcript 4-like (Ddit4l), mRNA [NM_080399]	51.7	211.7
Rbms3	Uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F1LYR6] [ENSRNOT00000039904]	6.7	5.8
	AA894027 EST197830 Normalized rat placenta, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RPLAO72 3' end, mRNA sequence [AA894027]	2.2	25.5

Table 2. Genes extracted from cDNA microarray analysis that were up-regulated in DEN-induced GST-P positive foci.

Gene symbol	Description	DEN GST-P negative vs positive
Secisbp2l	Rattus norvegicus SECIS binding protein 2-like (Secisbp2l), mRNA [NM_001168527]	2.3
-	AA892545 EST196348 Normalized rat kidney, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RKIAS70 3' end, mRNA sequence [AA892545]	2.5
-	BP483794 Rattus norvegicus pancreatic islet Rattus norvegicus cDNA clone RBC08739 5', mRNA sequence [BP483794]	3.0
Olr588	Rattus norvegicus olfactory receptor 588 (Olr588), mRNA [NM_001000329]	4.0

Table 3. Genes extracted from cDNA microarray analysis that were up-regulated in furan-induced GST-P positive foci.

Gene symbol	Description	Furan GST-P negative vs positive
Col1a1	Rat alpha-1 type I collagen mRNA, segment 3. [M12199]	15.8
-	BF284120 EST448711 Rat Gene Index, normalized rat, Rattus norvegicus cDNA Rattus norvegicus cDNA clone RGIEL24 3' sequence, mRNA sequence [BF284120]	2.8
LOC100912411	PREDICTED: Rattus norvegicus uncharacterized LOC100912411, transcript variant 2 (LOC100912411), misc_RNA [XR_145788]	3.3
-	Rattus norvegicus TL0ACA47YE20 mRNA sequence. [FQ215661]	4.7
-	AI100812 EST210101 Normalized rat brain, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RBRBB09 3' end, mRNA sequence [AI100812]	104.2
Lpl	Rattus norvegicus lipoprotein lipase (Lpl), mRNA [NM_012598]	21.4
Col1a1	Rattus norvegicus collagen, type I, alpha 1 (Col1a1), mRNA [NM_053304]	345.6
Stmn1	Rattus norvegicus stathmin 1 (Stmn1), mRNA [NM_017166]	92.6
Bcl3	Rattus norvegicus B-cell CLL/lymphoma 3 (Bcl3), mRNA [NM_001109422]	2.1
Rwdd2a	Rattus norvegicus RWD domain containing 2A (Rwdd2a), mRNA [NM_001108773]	2.2
Clic5	Rattus norvegicus chloride intracellular channel 5 (Clic5), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_053603]	19.3
Slc15a1	Rattus norvegicus solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1 (Slc15a1), transcript variant 1, mRNA [NM_057121]	19.3
-	UI-R-FF0-cpa-f-07-0-UI.s1 UI-R-FF0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-FF0-cpa-f-07-0-UI 3', mRNA sequence [BQ781861]	23.5

Table 3. Genes extracted from cDNA microarray analysis that were up-regulated in furan-induced GST-P positive foci.

Gene symbol	Description	Furan GST-P negative vs positive
Pvr14	Rattus norvegicus poliovirus receptor-related 4 (Pvr14), mRNA [NM_001109076]	6.0
-	AI579422 UI-R-AG0-wy-c-07-0-UI.s1 UI-R-AG0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-AG0-wy-c-07-0-UI 3', mRNA sequence [AI579422]	79.0
Aldh1a1	Rattus norvegicus aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (Aldh1a1), mRNA [NM_022407]	2.4
Mat2a	Rattus norvegicus methionine adenosyltransferase II, alpha (Mat2a), mRNA [NM_134351]	2.8
-	AW532618 UI-R-BS0-amp-e-09-0-UI.s1 UI-R-BS0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BS0-amp-e-09-0-UI 3', mRNA sequence [AW532618]	93.2
Fbln1	Rattus norvegicus fibulin 1 (Fbln1), mRNA [NM_001127547]	7.8
-	BE113115 UI-R-BJ1-awb-g-02-0-UI.s1 UI-R-BJ1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BJ1-awb-g-02-0-UI 3', mRNA sequence [BE113115]	7.6
Vwa3a	Rattus norvegicus von Willebrand factor A domain containing 3A (Vwa3a), transcript variant 2, mRNA [NM_001079885]	2.2
-	AA955553 UI-R-E1-fa-h-06-0-UI.s1 UI-R-E1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E1-fa-h-06-0-UI 3' similar to gi [AA955553]	38.5
Pdpx	Rattus norvegicus pyruvate dehydrogenase complex, component X (Pdpx), mRNA [NM_001044242]	2.7
Sox9	Protein LOC100361122 [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F1LYL9] [ENSRNOT00000003511]	20.7

Table 3. Genes extracted from cDNA microarray analysis that were up-regulated in furan-induced GST-P positive foci.

Gene symbol	Description	Furan GST-P negative vs positive
Trip13	Rattus norvegicus thyroid hormone receptor interactor 13 (Trip13), mRNA [NM_001011930]	4.2
-	AW143833 EST294129 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGICB09 5' end, mRNA sequence [AW143833]	2.0
-	BE097770 UI-R-BO1-aqb-e-08-0-UI.s1 UI-R-BO1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BO1-aqb-e-08-0-UI 3', mRNA sequence [BE097770]	3.3
-	BQ211620 UI-R-DZ1-cog-b-16-0-UI.s1 NCI_CGAP_DZ1 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7348242 3', mRNA sequence [BQ211620]	34.0
-	UI-R-FF0-cpj-n-03-0-UI.s1 UI-R-FF0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-FF0-cpj-n-03-0-UI 3', mRNA sequence [BQ782274]	7.5
-	AGENCOURT_118863828 NIH_MGC_252 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:9112120 5', mRNA sequence [EX490534]	10.1
A3galt2	Rattus norvegicus alpha 1,3-galactosyltransferase 2 (A3galt2), mRNA [NM_138524]	3.4
-	AI231472 EST228160 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMDK57 3' end, mRNA sequence [AI231472]	32.3
LOC100911353	PREDICTED: Rattus norvegicus uncharacterized LOC100911353 (LOC100911353), mRNA [XM_003748847]	2.7
RGD1309079	Rattus norvegicus similar to Ab2-095 (RGD1309079), mRNA [NM_001134472]	8.6
-	AI071307 UI-R-C1-ko-e-02-0-UI.s2 UI-R-C1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C1-ko-e-02-0-UI 3', mRNA sequence [AI071307]	3.5
-	AA963075 UI-R-E1-fx-a-09-0-UI.s1 UI-R-E1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E1-fx-a-09-0-UI 3', mRNA sequence [AA963075]	3.0