

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) 陽性細胞巢の定量的解析は、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。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に用いる 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 陽性細胞巢を峻別するためのバイオマーカーを探索する。昨年度までに、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。今年度は、網羅的遺伝子発現解析の精査を行った結果、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 11 遺伝子が、furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した遺伝子として 57 遺伝子が抽出された。一方、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現低下した遺伝子として 20 遺伝子が、furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現低下した遺伝子として 98 遺伝子が抽出された。また、DEN 又は furan と異なる肝発がん物質における GST-P 陽性細胞巢の休薬後の動態を検討する目的で、2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) を用いて GST-P 陽性細胞巢の動態するための動物実験を実施した。その結果、IQ 誘発の GST-P 陽性細胞巢では休薬後の減少は認められなかったことから、休薬後に減少する GST-P 陽性細胞巢は furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の特徴である可能性が考えられた。以上より、DEN 又は furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢で特異的に発現変動した遺伝子の中に GST-P 陽性細胞巢の異なる動態を規定している分子が含まれていると考えられることから、これら分子が生物学的特徴から GST-P 陽性細胞巢を峻別するためのマーカー候補になりうる可能性が考えられた。

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

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 陽性細胞巢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 陽性細胞巢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 陽性細胞巢の動態を検討した結果、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢は休薬後に増加する一方、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。

以上のことから、GST-P 陽性細胞巢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 陽性細胞巢の挙動が異なっている可能性が考えられた。従って、GST-P 陽性細胞巢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 陽性細胞巢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 陽性細胞巢の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、動態の異なる GST-P 陽性細胞巢を峻別するためのバイオマーカーを探索する。本年度は、昨年度に引き続き網羅的遺伝子発現解析の精査を行い、特異的に発現変動が認められる遺伝子を抽出した。加えて、DEN 又は furan と異なる肝発がん物質における GST-P 陽性細胞巢の休薬後の動態を検討する目的で、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) 誘発の GST-P 陽性細胞巢の休薬後動態を検討した。

B . 研究方法

1 . DEN 及び furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の為の網羅的遺伝子発現解析

6 週齢の雄性 F344 ラット (日本エスエルシー) 10 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 30 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 5 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、肝臓を摘出した。摘出した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 陽性細胞巢または 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。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 陽性細胞巢または GST-P 陰性領域 (各 3 例づつ) について実施した。

得られたサンプルから RNeasy Plus Micro kit (QIAGEN) 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。

2 .IQ 誘発 GST-P 陽性細胞巢の休薬後動態の解析

6 週齢の雄性 F344 ラット (日本エスエルシー) 20 匹 に 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ) (Tronto Research Chemicals) を 100 ppm の濃度で 13 週間混餌投与した。また、同ラット 20 匹を対照群に配し、基礎食を自由摂取させた。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。摘出した肝臓を用いて GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施した。

(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

1 . DEN 及び furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の為の網羅的遺伝子発現解析

網羅的遺伝子発現解析で発現変動が認め

られた遺伝子に関して、階層的クラスタリング解析を実施した結果、furan 投与群における GST-P 陽性細胞巢における遺伝子発現は、GST-P 陰性領域、DEN 投与群の各領域および対照群と異なる変動を示した (Figure 1)。

具体的な遺伝子発現変動を検討した結果、DEN 及び furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢で共通して発現上昇した遺伝子として 14 遺伝子が抽出された。これら遺伝子のうち遺伝子名が明らかになっている主な遺伝子を Table 1 に示す。また、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、11 遺伝子、furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現上昇した遺伝子として 57 遺伝子が抽出された。それぞれで発現変動がみられた遺伝子のうち、遺伝子名が明らかになっている主な遺伝子を Table 2 及び 3 に示す。同様に、DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現低下した遺伝子として 20 遺伝子、furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢のみで発現低下した遺伝子として 98 遺伝子が抽出された。主な遺伝子を Table 4 及び 5 に示す。

2 .IQ 誘発 GST-P 陽性細胞巢の休薬後動態の解析

GST-P 陽性細胞巢の定量的解析結果を Figure 2 に示す。IQ 投与終了後並びに 7 週間休薬後の GST-P 陽性細胞巢の数及び面積は、何れもそれぞれの対照群に比して有意に増加した。IQ 投与群における GST-P 陽性細胞巢の数及び面積を休薬前後で比較すると、GST-P 陽性巢の数に顕著な変化は認められなかったものの、面積は休薬後において増加する傾向が認められた。

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 誘発と furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢の生物学的動態の差異に着目し、生物学的

特徴からの両者の峻別法を確立することを目的とする。

網羅的遺伝子発現解析で発現変動が認められた遺伝子に関して、階層的クラスタリング解析を実施した結果、furan 投与群の GST-P 陽性細胞巢における遺伝子発現は、GST-P 陰性領域、DEN 投与群の各領域および対照群と異なる変動を示した。このことから、furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢の特異性が示唆された。さらに、具体的な遺伝子レベルでの変動を検討した結果、複数の遺伝子が furan 誘発あるいは DEN 誘発のそれぞれの GST-P 陽性細胞巢で特異的に変動していた。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ことから、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。従って、これら分子の中に GST-P 陽性細胞巢の異なる動態を規定している分子が含まれている可能性が考えられ、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。

また、DEN と furan とは異なる肝がん機序を有すると考えられる別の発がん物質に関して GST-P 陽性細胞巢の生物学的動態を検討する目的で、IQ 誘発 GST-P 陽性細胞巢の休薬後動態を検討した結果、IQ 誘発の GST-P 陽性細胞巢では furan で認められたような休薬後の減少は認められなかったことから、休薬後に減少する GST-P 陽性細胞巢は furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の特徴である可能性が考えられた。

以上より、DEN 又は furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢で特異的に発現変動した遺伝子の中に GST-P 陽性細胞巢の異なる動態を規定している分子が含まれていると考えられることから、これら分子が生物学的特徴から GST-P 陽性細胞巢を峻別するためのマーカー候補になりうる可能性が考えられた。本研究成果は発がん性評価のための GST-P 陽性細胞巢定量的解析に関して、生物学的特徴も考慮した発がん性予測を可能にし、リ

スク予測法の精緻化に貢献できるものと考えられる。

E . 結論

動態の異なる GST-P 陽性細胞巢の峻別による発がん性評価の精緻化を目的に、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精査した。その結果、それぞれの GST-P 陽性細胞巢で特異的に発現変動した遺伝子群が認められ、これらの中に GST-P 陽性細胞巢の異なる動態を規定している分子が含まれている可能性が考えられた。

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

1. 高須伸二，石井雄二，木島綾希，小川久美子，梅村隆志：異なる挙動を示す Furan 及び DEN 誘発 GST-P 陽性細胞巢の網羅的遺伝子発現解析：第34回日本毒性病理学会学術集会．2017

2. 高須伸二，石井雄二，木島綾希，小川久美子，梅村隆志：Furan及びDEN投与により誘発されるGST-P陽性細胞巢の生物学的差異：第32回発癌病理研究会．2017

3. Takasu S, Ishi Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T. Comprehensive Gene Expression Analysis for Two Different Types of GST-P Positive Foci in Terms of Their Kinetics after Cessation of Carcinogen Treatment. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2018

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

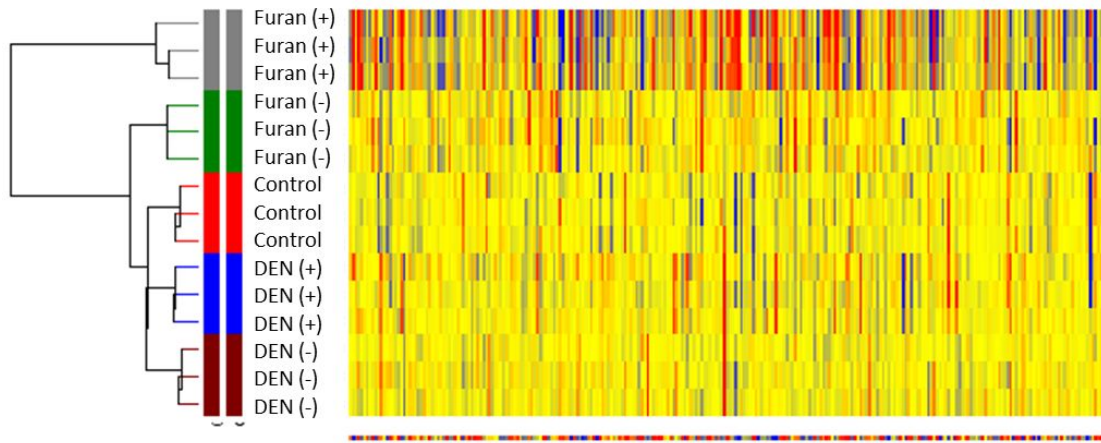


Figure 1. Hierarchical cluster analysis. DEN (+), GST-P positive foci induced by DEN; DEN (-), GST-P negative area (DEN treatment); Furan (+), GST-P positive foci induced by furan; Furan (-), GST-P negative area (furan treatment).

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
<i>Gstp1</i>	Rattus norvegicus glutathione S-transferase pi 1 (Gstp1), mRNA [NM_012577]	19.04	101.40
<i>Bex1</i>	Rattus norvegicus brain expressed, X-linked 1 (Bex1), mRNA [NM_001037365]	2.41	539.00
<i>Ddit4l</i>	Rattus norvegicus DNA-damage-inducible transcript 4-like (Ddit4l), mRNA [NM_080399]	51.69	231.76
<i>LOC100910127</i>	PREDICTED: Rattus norvegicus cytochrome P450 2B15-like (LOC100910127), mRNA [XM_003749091]	6.64	36.38
<i>Rbms3</i>	Uncharacterized protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F1LYR6] [ENSRNOT00000039904]	6.65	5.43
<i>Akr7a3</i>	Rattus norvegicus aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase) (Akr7a3), mRNA [NM_013215]	5.92	7.03
<i>Phgdh</i>	Rattus norvegicus phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh), mRNA [NM_031620]	3.29	6.03
<i>Wbp5</i>	Rattus norvegicus WW domain binding protein 5 (Wbp5), mRNA [NM_001127502]	3.52	5.34
<i>Map3k6</i>	Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6 (Map3k6), mRNA [NM_001107909]	2.31	8.91
<i>Pxdn</i>	Rattus norvegicus peroxidasin homolog (Drosophila) (Pxdn), mRNA [NM_001271261]	7.75	2.15

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
<i>Morc2</i>	Rattus norvegicus MORC family CW-type zinc finger 2 (<i>Morc2</i>), mRNA [NM_001106016]	5.17
<i>Osgep</i>	Rattus norvegicus O-sialoglycoprotein endopeptidase (<i>Osgep</i>), mRNA [NM_001100510]	3.48
<i>Cdh23</i>	Rattus norvegicus cadherin-related 23 (<i>Cdh23</i>), mRNA [NM_053644]	2.60
<i>Secisbp2l</i>	Rattus norvegicus SECIS binding protein 2-like (<i>Secisbp2l</i>), mRNA [NM_001168527]	2.32
<i>Ccl7</i>	Rattus norvegicus chemokine (C-C motif) ligand 7 (<i>Ccl7</i>), mRNA [NM_001007612]	2.21
<i>Fam20c</i>	Rattus norvegicus family with sequence similarity 20, member C (<i>Fam20c</i>), mRNA [NM_001012238]	2.13
<i>Il11ra1</i>	Rattus norvegicus interleukin 11 receptor, alpha chain 1 (<i>Il11ra1</i>), mRNA [NM_139116]	2.00

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
<i>Col1a1</i>	Rattus norvegicus collagen, type I, alpha 1 (Col1a1), mRNA [NM_053304]	186.32
<i>Lpl</i>	Rattus norvegicus lipoprotein lipase (Lpl), mRNA [NM_012598]	32.96
<i>Slc15a1</i>	Rattus norvegicus solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1 (Slc15a1), transcript variant 1, mRNA [NM_057121] Protein LOC100361122	26.08
<i>Sox9</i>	[Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:F1LYL9] [ENSRNOT00000003511]	16.79
<i>Cd24</i>	Rattus norvegicus CD24 molecule (Cd24), mRNA [NM_012752]	16.13
<i>Kif12</i>	Rattus norvegicus kinesin family member 12 (Kif12), mRNA [NM_001012102]	11.29
<i>Acaa1b</i>	Rattus norvegicus acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B (Acaa1b), mRNA [NM_001040019]	9.13
<i>Pvr14</i>	Rattus norvegicus poliovirus receptor-related 4 (Pvr14), mRNA [NM_001109076]	9.07
<i>Kif11</i>	Rattus norvegicus kinesin family member 11 (Kif11), mRNA [NM_001169112]	8.82
<i>Fbln1</i>	Rattus norvegicus fibulin 1 (Fbln1), mRNA [NM_001127547]	7.48

Table 4. Genes extracted from cDNA microarray analysis that were down-regulated in DEN-induced GST-P positive foci.

Gene symbol	Description	DEN GST-P negative vs positive
<i>Mat2a</i>	Rattus norvegicus methionine adenosyltransferase II, alpha (Mat2a), mRNA [NM_134351]	-12.46
<i>Gatad2a</i>	Rattus norvegicus GATA zinc finger domain containing 2A (Gatad2a), mRNA [NM_001013881]	-8.21
<i>Ccl19</i>	Rattus norvegicus chemokine (C-C motif) ligand 19 (Ccl19), mRNA [NM_001108661]	-4.34
<i>Exo5</i>	Rattus norvegicus exonuclease 5 (Exo5), mRNA [NM_001107973]	-4.06
<i>Cd24</i>	Rattus norvegicus CD24 molecule (Cd24), mRNA [NM_012752]	-3.79
<i>Spon1</i>	Rattus norvegicus spondin 1, extracellular matrix protein (Spon1), mRNA [NM_172067]	-2.56
<i>Lpl</i>	Rattus norvegicus lipoprotein lipase (Lpl), mRNA [NM_012598]	-2.23
<i>Sri</i>	Shultzomica03806 Rat lung airway and parenchyma cDNA libraries Rattus norvegicus cDNA clone Contig3374 5', mRNA sequence [CF110555]	-2.10

Table 5. Genes extracted from cDNA microarray analysis that were down-regulated in furan-induced GST-P positive foci.

Gene symbol	Description	Furan GST-P negative vs positive
<i>Prkd3</i>	Rattus norvegicus protein kinase D3 (Prkd3), mRNA [NM_001024263]	-31.23
<i>Slc27a5</i>	Rattus norvegicus solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5 (Slc27a5), mRNA [NM_024143]	-25.35
<i>Luc7l2</i>	Rattus norvegicus LUC7-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>) (Luc7l2), mRNA [NM_001107853]	-14.40
<i>Arih1</i>	Rattus norvegicus ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (<i>Drosophila</i>) (Arih1), mRNA [NM_001013108]	-12.76
<i>Pp3111</i>	Rattus norvegicus PP3111 protein (Pp3111), mRNA [NM_172018]	-12.41
<i>Exosc4</i>	Rattus norvegicus exosome component 4 (Exosc4), mRNA [NM_001134860]	-10.98
<i>Spop</i>	Rattus norvegicus speckle-type POZ protein (Spop), mRNA [NM_001100496]	-9.68
<i>Pias2</i>	Rattus norvegicus protein inhibitor of activated STAT, 2 (Pias2), mRNA [NM_053337]	-9.36
<i>Osgep</i>	Rattus norvegicus O-sialoglycoprotein endopeptidase (Osgep), mRNA [NM_001100510]	-8.54
<i>Il11ra1</i>	Rattus norvegicus interleukin 11 receptor, alpha chain 1 (Il11ra1), mRNA [NM_139116]	-6.32

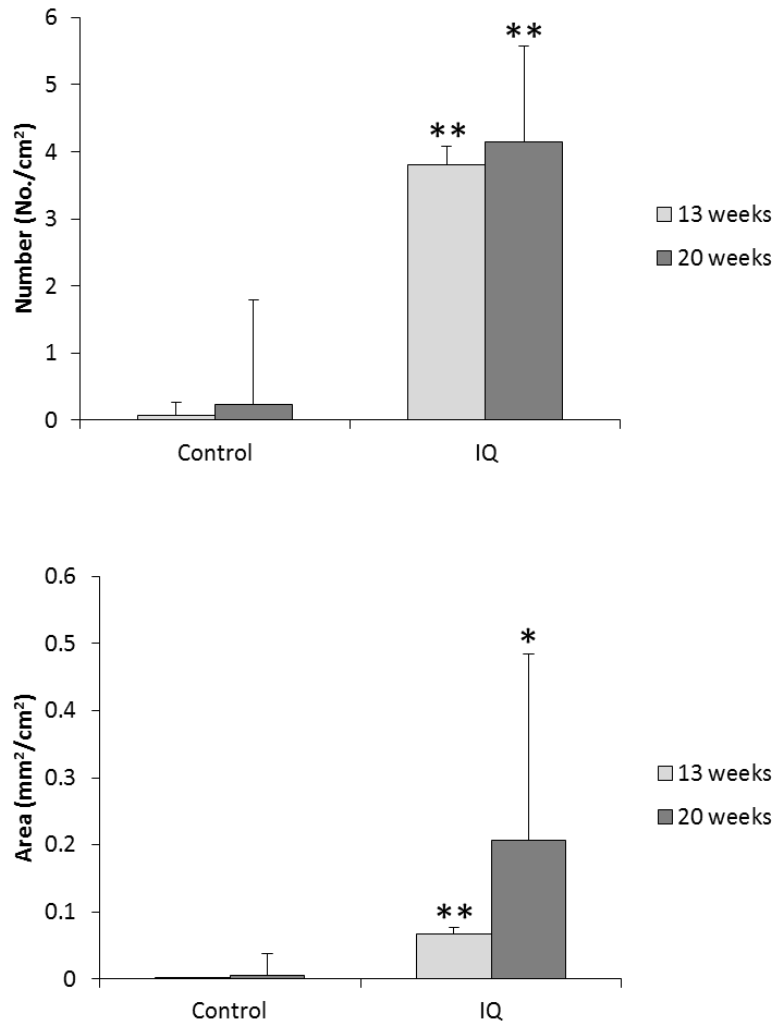


Figure 2. Number and area of GST-P positive foci after 7-week cessation of 13-week IQ treatment. *, **P<0.05, 0.01 vs respective control groups.