

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

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。我々はこれまでに、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、furan 誘発の GST-P 陽性細胞巢は休薬後に減少し、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。本研究では、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。続いて、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 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 RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を実施した。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を抽出した。さらに、DEN 及び furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の生物学的特徴が他の発がん物質に共通するかを明らかにする目的で、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone（IQ）誘発 GST-P 陽性細胞巢の休薬後動態を検討した。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。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群の中に 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 陽性細胞巣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 陽性細胞巣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 陽性細胞巣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

1．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

GST-P 陽性細胞巣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 抽出条件の検討を行った。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 (MBL ライフサイエンス) 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% トリ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。RNA は、得られた切除片から RNeasy Plus Micro kit (QIAGEN) を用いて抽出し、Agilent 2100 パイオアナライザ (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。

2．DEN 及び furan 誘発 GST-P 陽性細胞巣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（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 陽性細胞巢または GST-P 陰性領域（各3例づつ）について実施した。

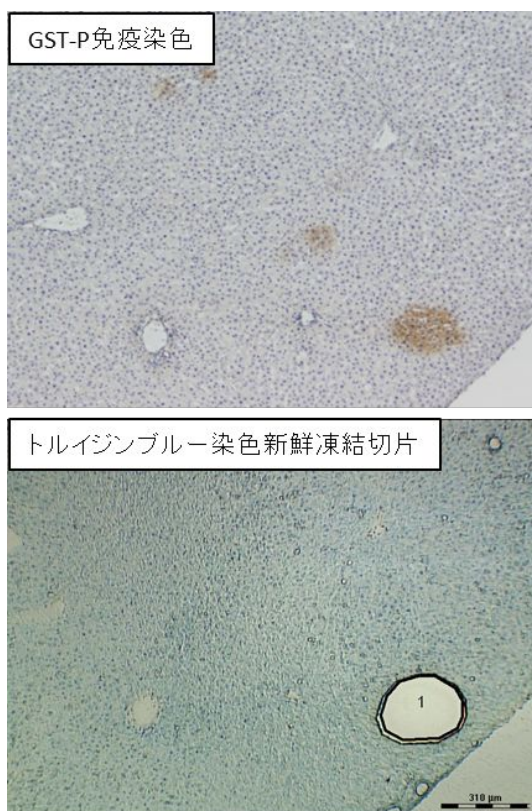


図1 レーザーマイクロダイセクション法によるサンプリング

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 バイオアナライザおよび Agilent RNA6000 ピコキットを用いて 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。

3 .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 . 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

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網羅的遺伝子発現解析が実施可能な高品質の 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 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。

2 . 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

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 陰性領域から採取したサンプルに関して、*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)。

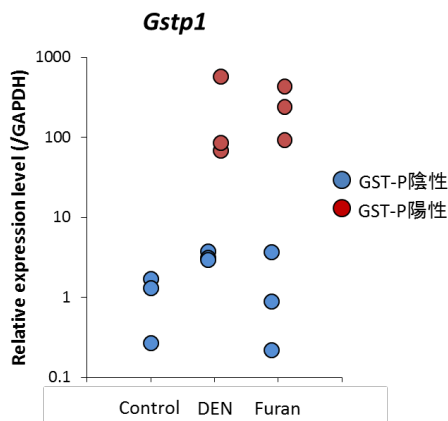


図2 リアルタイムPCR法によるGST-P陽性細胞巢及び陰性領域の*Gstp1*発現

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 陽性領域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 3)。

網羅的遺伝子発現解析の結果、DEN および 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。

3 .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 4 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。また、IQ 投与群における GST-P 陽性細胞巢の数及び面積を休薬後と比較すると、GST-P 陽性巢の数は顕著な変化は認められなかったものの、面積は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 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、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。

GST-P 陽性細胞巢における網羅的遺伝子発現解析を行うに先立ち、レーザーマイクロダイセクション法による切片切除からの 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、新鮮凍結切片における 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、0.05% 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、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。さらに、この方法により得られたサンプルに関して、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。加えて、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。

このような実験条件下のもと、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 陽性細胞巢の分子レベルで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。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。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た。また、DEN と furan とは異なる肝発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、本研究では網羅的遺伝子発現解析の結果、furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢の特異性が示唆されるとともに、DEN 又は furan 誘発 GST-P 陽性細胞巢で特異的に発現変動した複数の遺伝子を抽出した。これら遺伝子群に 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、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活用できるものと考えられる。

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変動した遺伝子を抽出した。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ることから、

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。

3. その他

該当なし

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

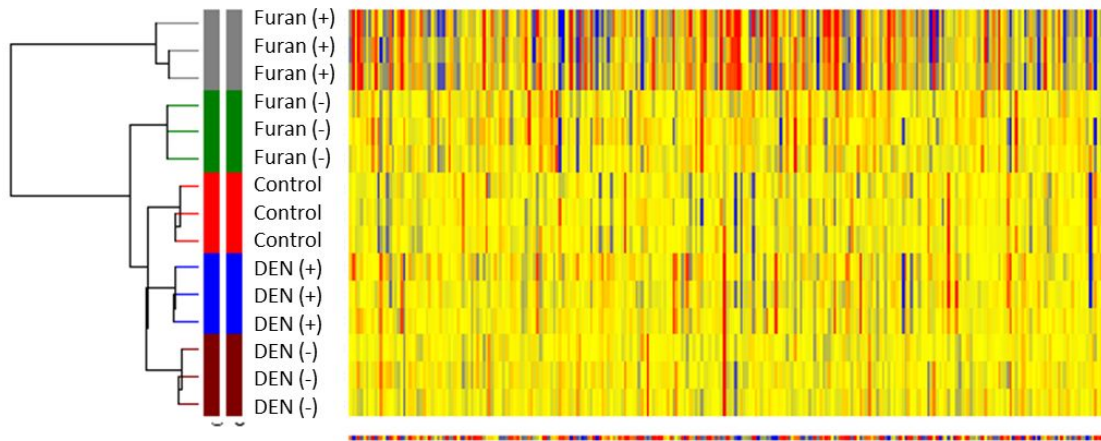


Figure 3. Hierarchical cluster analysis. DEN (+), GST-P positive foci induced by DEN; DEN (-), GST-P negative area (DEN treatment); Furan (+), GST-P positive foci induced by furan; Furan (-), GST-P negative area (furan treatment).

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 |

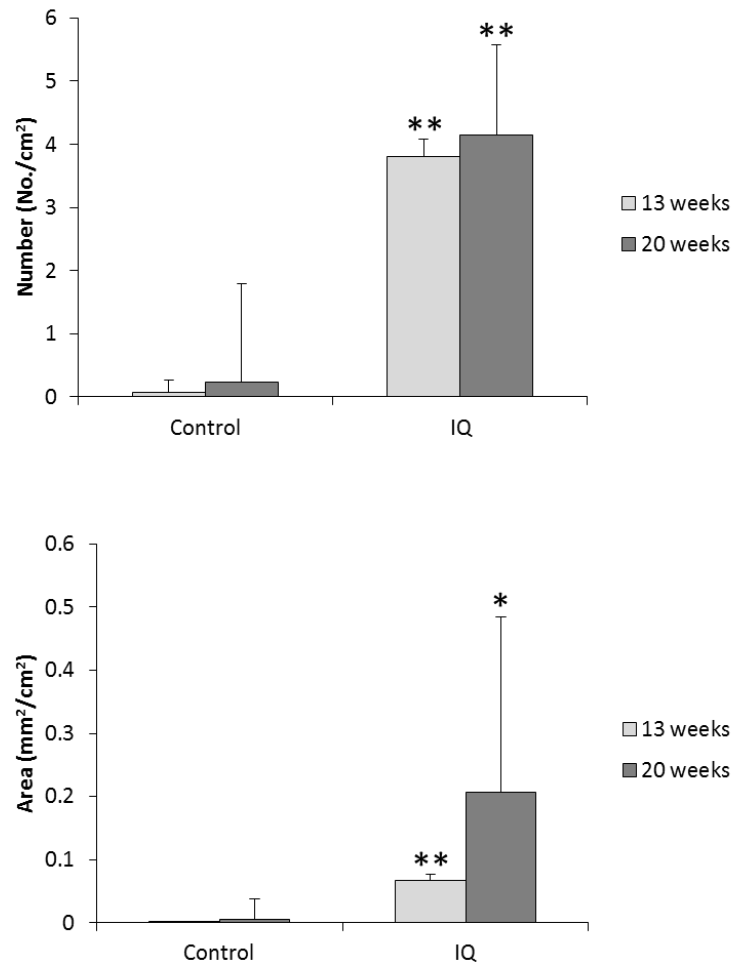


Figure 4. Number and area of GST-P positive foci after 7-week cessation of 13-week IQ treatment. $P < 0.05$ vs respective control groups.