

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）
分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立

研究分担者 塚本徹哉 藤田医科大学医学部病理診断学 教授

研究要旨

ヒトを取り巻く環境中の様々な化学物質の曝露は発がん要因の1つとして重要であり、その発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性肝発がん性を判定できる24時間ラット超短期動物試験系を用い、化学物質の肝発がん性の評価法を検討した。遺伝毒性肝発がん物質（2-Nitropropane、Nitrosoheptamethyleneimine、Ethylene thiourea、Benzidine、Auramine-O、Hydrazine）およびその他の化学物質（Furosemide、Chlorpheniramine、Chlorpropamide、Methyldopa）を含めた種々の化学物質10種類について、6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験を行い、24時間後に肝から total RNA を抽出後、real time RT-PCR 法により10遺伝子（1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114）の発現データを取得した。対照群を0としたときの Ct 値を用いて、サポートベクターマシーン (SVM)による肝発がん性予測数理学的モデルを用いて解析した結果、概ね、遺伝毒性肝発がん物質とその他の化学物質の分離が可能であった。しかし、従来の知見と異なる評価となった物質に関しては化学物質特異的な代謝等、今後更なる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

ヒトを取り巻く環境中の様々な化学物質の曝露は発がん要因の1つとして重要であり、その発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、トキシコゲノミクス手法から得た遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性・発がん性を判定できるラット超短期動物試験系を用い、化学物質の遺伝毒性・発がん性評価法の確立を目指す。

B. 研究方法

0.5% Methyl cellulose (MC)を溶媒として、11種類の化学物質を用いた。

陽性対照として既知の Group 1 (G1): 180 mg/kg BW 2-Nitropropane と G2: 240 mg/kg 体重 (body weight, BW) 2-Nitropropane を用いた。今回5種類の遺伝毒性肝発がん物質として、G3: 90 mg/kg BW Nitrosoheptamethyleneimine, G4: 610 mg/kg BW Ethylene thiourea、G5: 100 mg/kg BW Benzidine、G6: 500 mg/kg BW Auramine-O、G7: 20 mg/kg BW Hydrazine を使用した。その他の化学物質として、G8: 870 mg/kg BW Furosemide (FUR)、G9: 40 mg/kg BW Chlorpheniramine (CHL)、G10: 720 mg/kg BW Chlorpropamide (CPP)、G11: 1670 mg/kg BW Methyldopa (MDP)を用いた。また、G12として0.5% Methyl cellulose (MC)投与群を設けた。

DIMS 医科学研究所において、以上の群について、6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験（各群5匹）を行い、24時間後に剖検を行い、得られた肝組織の一部を凍結保存した。藤田医科大学にて、肝組織から total RNA を抽出 (RNeasy mini kit, QIAGEN) 後、cDNA を作製 (SuperScript IV VILO Mater Mix, ThermoFisher) した。18S rRNA を内部

標準として (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, ThermoFisher) 昨年と同様の10遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) について、ABI PRISM-7900HT を用いて、標識した Roche Universal Primer を使い、real time RT-PCR 法により遺伝子発現データを取得した。結果は、対照群を0としたときの Ct 値で表した。その値を、大阪市大で構築済の肝発がん性予測モデル (サポートベクターマシーン (SVM)による数理学的アルゴリズムによるモデル) に入力し、遺伝毒性肝発がん性の評価を行った。

C. 研究結果

G12 を0とした時の10遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の Ct 値は、それぞれ以下の通りであった。

G12 を0とした時の10遺伝子の $\Delta\Delta Ct$ 値は、Groups : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 について、それぞれ以下の通りであった。

1385132_at : 5.55, 4.41, 3.24, -0.24, 0.36, 1.94, 0.53, -0.38, 0.07, 0.14, 0.06
Aen : 4.43, 4.92, 2.92, 0.66, 0.96, 1.75, 1.38, 1.41, 1.5, 1.2, 1.57
Atp6v1f : 2.49, 2.13, 1.22, 0.94, 0.76, 1.29, 1.17, 0.69, 0.89, 1, 0.87
Cdkn1a : 5.65, 5.39, 3.55, 1.84, 0.47, 0.96, 1.18, 1.06, 1.35, 0.43, 2.02
Fam49a : 2.82, 2.75, 1.92, 0.71, 0.78, 1.3, 1.25, 1.14, 1.38, 0.95, 1.16
Glrx3 : 3.55, 3.22, 1.79, 0.79, 0.77, 1.28,

1.15, 0.84, 1.02, 1.03, 0.82
Nudt5: 2.95, 2.4, 1.39, 0.68, 0.73, 1.23, 1.32,
0.68, 0.91, 0.77, 0.44
Phlda3: 4.11, 4.28, 2.65, 0.66, 0.76, 1.23,
1.11, 0.83, 1.41, 1.08, 1.18
RGD1308114: -4.02, -3.46, 0.01, 0.12, 0.4,
-1.61, 0.72, 0.98, 1.22, 1.27, 1.09
Rage: 4.96, 5.05, 2.73, 1.02, 0.96, 1.09, 1.29,
0.91, 1.24, 0.25, -0.27

SVMによる解析の結果では、G3-7の被験物質のうち、2物質は陽性判定となったが、3物質は陰性判定となった。

D. 考察

SVMによる予測モデルによる解析の結果、陽性対照の2群、180と240mg/kg BW群では、各遺伝子のCt値に大きな差はなく、良好な再現性が得られた。他の5つの遺伝毒性肝発がん物質のうち2物質は予測通り陽性の判定となったが、3物質は陰性の判定であった。real-time PCRデータのバラツキは最小限と考えられたため、遺伝毒性肝発がん性とともに、化学物質自体の代謝特異性による変化も考えられた。

非遺伝毒性肝発がん物質予測通りに陰性と評価された。

E. 結論

24時間という超短期間で、10遺伝子の発現量の変動を解析することにより、概ね遺伝毒性肝発がん性の予測が可能なモデルの構築が可能と判断されたが、化学物質代謝特異性等、今後の検証が必要なデータも得られ、今後更なる検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagawa, M., Sakai, Y., Kiriyama, Y., Tahara, T., Horiguchi, N., Okabe, A., Tahara, S., Shibata, T., Ohmiya, N., Kuroda, M., Sugioka, A., Tsukamoto, T. Eradication of *Helicobacter pylori* Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas. *Pathobiology*: 2019 [Epub ahead of print]
- 2) Okabe, A., Kiriyama, Y., Suzuki, S., Sakurai, K., Teramoto, A., Kato, H., Naiki-Ito, A., Tahara, S., Takahashi, S., Kuroda, M., Sugioka, A., Tsukamoto, T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. *J Toxicol Pathol.* 2019; 32: 91-99.
- 3) Tahara, S., Tahara, T., Horiguchi, N., Kato, T., Shinkai, Y., Yamashita, H., Yamada, H., Kawamura, T., Terada, T., Okubo, M., Nagasaka, M., Nakagawa, Y., Shibata, T., Yamada, S., Urano, M., Tsukamoto, T., Kurahashi, H., Kuroda, M., Ohmiya, N. DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after

Helicobacter pylori eradication. *Int J Cancer.* 2019; 144: 80-88.

2. 学会発表

- 1) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、フアインチューニングした Deep Convolutional Neural Networks によるヒト肺癌細胞像の自動分類. 第107回日本病理学会総会、札幌(2018年6月)

G. 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。