

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 鈴木 周五 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 准教授

研究要旨

本研究は、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」の有用性を検証する。本年度は、陽性対照物質である Thioacetamide とともに、非遺伝毒性肝発がん物質3種と、非発がん物質1種類を、OECD テストガイドラインの TG407：げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。採取した肝組織から RNA を抽出、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法を用いて、それぞれの物質の発がん性検出を行った。結果、Thioacetamide を含む2物質については発がん物質と判定し、非発がん物質1種類は非発がん物質と判定された。しかしながら1物質は、発がん物質ながら非発がん物質と判定された。以上の結果から、化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した肝臓から得られた RNA を用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念を評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質を全て長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。そこで、化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に評価できる試験法および試験スキームの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、国民生活の安全・安心を保証する。

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。平成29年度～令和元年度「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」（鱒淵班）で開発した「遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法」では、解決できない非遺伝毒性肝発がん物質に対する試験法確立を目指す。

非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を確立したが、その検出力を動物実験を行い検証する。令和2年度は既知の非遺伝毒性肝発がん物質を主体に、その検出法の有用性を検証する。

B. 研究方法

OECD テストガイドラインの TG407：げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。6週齢SD雄ラットに被験物質を28日間投与後

に屠殺剖検を行い肝臓を採取した。肝臓から RNeasy mini kit（キアゲン）を用いて total RNA を抽出・精製し、microarray を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。得られた遺伝子発現変化のうち、以前に非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出（サポートベクターマシンのような数論的アルゴリズムによるモデル）及び発がん機序に基づいた分類を行い、検出法の特異性及び感受性について検証した。

大阪市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種：Thioacetamide（TAA；0.5 g/kg）、11-Aminoundecanoic acid（AUDA；15 g/kg）、di(2-Ethylhexyl)phthalate（DEHP；12 g/kg）と、非肝発がん物質1種：Quercetin dihydrate（QDH；50 g/kg）を摂餌投与した。

（倫理面への配慮）

大阪市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

実験経過中にTAA投与群において、対照群に比べ摂餌量が少なく体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には対照群に比べ有意な体重減少を認めた（表1）。また、DEHP投与群においては肝臓の絶対および相対重量いずれも対照群に比べ有意な増加を認めた（表1）。一方、AUDA群やQDH群において、体重や肝重量、摂餌・飲水量に対照群との差は見られなかった（表1）。

表1. 体重および肝重量、摂餌・飲水量

Treatment	Rat No	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Food consumption	Water consumption
				Absolute (g)	Relative (%)		
Control	101-104	4	414.6 ± 48.1	16.6 ± 3.3	4.0 ± 0.4	23.4 ± 1.4	36.8 ± 2.5
TAA	201-204	4	291.5 ± 11.4 ***	13.5 ± 1.2	4.6 ± 0.3	16.5 ± 2.2	32.9 ± 1.8
AUDA	301-304	4	401.1 ± 18.6	16.4 ± 1.6	4.1 ± 0.3	23.3 ± 1.2	39.8 ± 3.1
DEHP	401-404	4	388.8 ± 34.5	22.7 ± 3.9*	5.8 ± 0.6***	24.1 ± 1.8	38.5 ± 3.1
QDH	501-504	4	416.6 ± 32.1	16.5 ± 0.7	4.0 ± 0.3	23.8 ± 1.0	34.6 ± 1.4

*. ***: P< 0.05 and 0.001 vs Control, respectively
TAA: thiocetamide; AUDA: 11-aminoundecanoic acid; DEHP: di(2-ethylhexyl)phthalate; QDH: quercetin dihydrate

肝臓の組織学的検討した結果、TAA投与群においてZone 1で細胞質の淡明化とともに、Zone 3での肝細胞腫大と好酸性化が存在し、核小体も目立った。AUDA投与群においては、Zone 1で細胞質の淡明化が存在した。また、DEHP投与群においては、びまん性肝細胞肥大が存在した。QDH投与群では、投与群との差がはっきりしなかった(図1)。

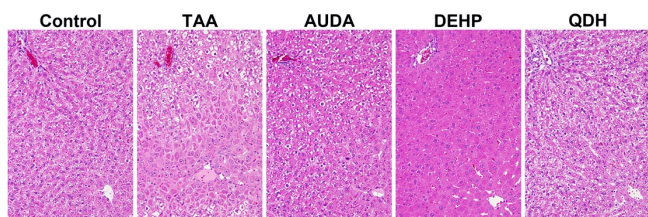


図1. 各物質を投与したラット肝組織像

各肝組織からRNAを抽出した結果、平均67.7 ± 20.4 μgのtotal RNAを回収し、A260/A280吸光度比が平均2.11 ± 0.01と良い状態だった。マイクロアレイ解析を行った結果、対照群に対してZ scoreが2倍以上、発現比が1.5倍以上変動した遺伝子は、TAA投与群においては上昇475、低下390、AUDA投与群では上昇132、低下240、DEHP投与群では上昇313低下239、QDH投与群では上昇191、低下157の遺伝子を認めた。

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済の非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、非遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った結果、TAAおよびDEHPは陽性と判定され、QDHは陰性と判定された一方で、AUDAは陰性と判断された。

D. 考察

今回、発がん物質として同定できたTAAおよびDEHPは、強い肝組織像の変化が存在し、対照群との遺伝子発現が変化した遺伝子数も多く認められた。TAA投与群においては体重抑制が存在し、DEHP投与群においては肝重量増加を認めたことから、化学物質の強い影響は反映される状況だったと推察する。一方、AUDA投与群においては、体重や肝重量については対照群を差が認められず、肝組織像で軽度の変化があるものの、発現の変化した遺伝子数は非発がん物質であるQDH投与群と同程度であり、がん原性試験の投与量を4週間投与した場合には、その影響が弱く発がん物質として検出が困難であった可能性がある。

E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において抽出した肝臓から得られたRNAを用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujioka M, [Suzuki S](#), Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.
- 2) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, [Suzuki S](#), Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. Cancer Sci. 2020; 111: 1165-79.
- 3) Kakehashi A, [Suzuki S](#), Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. Int J Mol Sci. 2020; 21: 7746.
- 4) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, [Suzuki S](#), Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. Pathol Int. 2020; 70: 835-43.
- 5) Mapoung S, [Suzuki S](#), Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. Molecules. 2020; 25: 2737.
- 6) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, [Suzuki S](#), Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. Arch Toxicol. 2020; 94: 4085-97.
- 7) Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagayasu Y, [Suzuki S](#), Yamashita Y, Inaguma S, Onishi M, Tanaka Y, Yasui T, Takahashi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibits androgen receptor splice variant 7 expression in castration-resistant prostate cancer. Carcinogenesis. 2020; 41: 1145-57.
- 8) [Suzuki S](#), Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induces cell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. Toxicology. 2020; 429: 152325.

- 9) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
- 10) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12: 558.
- 11) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett.* 2021; 336: 32-8.
- 12) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2021; 13: 1216.

2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催（2020年8月）
- 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖

はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催（2020年10月）

- 3) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催（2020 年 4 月）
- 4) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催（2020 年 6 月）
- 5) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催（2020 年 10 月）
- 6) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. LuteolinはSTAT3経路とDPD発現を低下させ膀胱癌を抑制する. 第109回日本病理学会総会、福岡（2020年4月）
- 7) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase阻害剤apocyninによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第37回日本毒性病理学会総会、Web開催（2020年1月）

G. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。