

平成 27 年度経済産業省委託

平成 27 年度化学物質安全対策
(分子機序に基づいた発がんのインビトロ予測手法の開発に関する調査)
調査報告書

平成 28 年 3 月

静岡県立大学

目次

1. 目的	1
2. 概要	2
3. 実施内容	4
4. 実施体制	5
5. 結果及び考察	6
(1) 試験化合物の選出と PPAR α /CAR 作用評価	
(2) マイクロアレイ解析による新規 MoA と関連するマーカー遺伝子の探索	
6. 今後の展望と課題	17
7. 調査結果の公表	18
8. 参考文献	18

1. 目的

発がんの分子機序は未だ明確でなく、その機序に基づく発がん性の予測は困難を極める。したがって、反復投与毒性と共に発がん性の動物実験代替法（インビトロ・インシリコ手法）の開発はほとんど進んでいない。これまでに、発がん過程の細胞の悪性転換を指標とする Bhas 42 形質転換試験法などが知られているのみである。

発がん物質は遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質に大別される。前者では、インビトロ試験（Ames 試験や小核試験等）やインシリコ解析（DEREK や MultiCASE 等のソフトウェア）で評価や予測が可能になっている。一方、後者では代替試験法の開発は進んでおらず、その評価は多大なコストと時間を要するインビボ試験に依存している。

近年、毒性の予測・評価においては mode of action (MoA) や adverse outcome pathway (AOP) などの分子機序に基づいた考察が重要とされている。非遺伝毒性肝発がんでは様々な MoA が示唆されているが、多くの発がん物質での寄与が認められている MoA に核内受容体 PPAR α 又は CAR の活性化がある (*Cancer Res* 64: 7197, 2004; *Carcinogenesis* 18: 2029, 1997)。代表的な非遺伝毒性肝発がん物質のフィブラート類及び phenobarbital (PB) は、それぞれ PPAR α 及び CAR の活性化物質である。さらに、これら核内受容体が関与する肝発がんには種差があり、種差の分子機序は不明であるが、疫学調査などの結果からヒトではフィブラートや PB は発がん性を示さないとされている。したがって、PPAR α や CAR 活性化作用の評価は、肝発がん性予測だけでなく、齧歯動物での肝発がんのヒト外挿性を評価する上でも有用である。一方、PPAR α や CAR の活性化物質の全てが齧歯動物で肝発がん性を示すわけではない。したがって、非遺伝毒性肝発がん物質が発がん作用を示すには、PPAR α /CAR 活性化という MoA に加えてさらなる細胞内シグナル (MoA) が関与する推察される (Fig. 1)。

本研究の最終目標は非遺伝毒性発がん性のインビトロ予測系を構築することである。本年度の調査研究では、化学物質の毒性の主要標的臓器である肝臓に焦点をあて、ラット肝細胞を用いて、発がん性 PPAR α /CAR 活性化物質と非発がん性 PPAR α /CAR 活性化物質の遺伝子発現変動を比較し、両者を区別する新たな MoA の指標（マーカー遺伝子群）を同定することを目的とする。

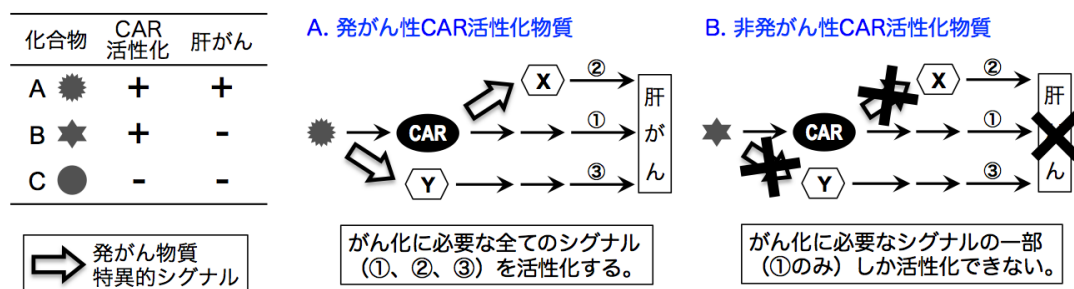


Fig. 1. 本研究の作業仮説

2. 概要

化学物質の発がん性を、遺伝子発現変動を基にインフォマティクス手法を利用して予測する試みはいくつか行われているが、機序の考察が十分でなく、実用レベルには至っていない(*PLoS One* 9, e102579; *Toxicology* 250:15, 2008)。非遺伝毒性発がんの過程は複雑であるにも関わらず、これまでの試みでは発がん性の有無だけで学習用化合物が選択され、使用されている。そのため、そのような予測系はいくら予測精度が高かったとしても、機序に基づくものではないことから、広く受け入れられにくいと推察される。そこで本研究では、発がん性・非発がん性だけに基づいて学習用化合物を選択するのではなく、非遺伝毒性肝発がんの主要な MoA である核内受容体 PPAR α 又は CAR の活性化(以下 MoA#1)を考慮して学習用化合物を分類する。そして、このカテゴリー化を利用して、肝発がん過程において MoA#1 に加えてさらに必要な MoA(以下 MoA#2)と関連する遺伝子群を同定し、2つの MoA に基づいた発がん性予測を目指す。

本研究では、私達が構築を進めている農薬の毒性試験結果成績データベースを利用する。本データベースの構築においては、食品安全委員会から毒性試験データが公開されている約 200 農薬について、ラットの 90 日間及び2年間の反復投与毒性試験結果ならびに発がん性試験結果の全毒性所見を収集している(第 41 回 日本毒性学会学術年会(2014 年 7 月、神戸)、日本動物実験代替法学会第 27 回大会(2014 年 12 月、横浜)、日本薬学会第 135 年会(2015 年 3 月、神戸))。本データベースの特徴及び本データベースを本調査研究で利用する上での有用性は以下の通りであると考えている。

- ① 各毒性試験が、信頼度・均一性の高い基準(GLP)で実施され、化合物間での比較が比較的容易である。
- ② 肝発がん性を示す 19 の農薬が含まれ、これらは全て非遺伝毒性機序による。
- ③ PPAR α や CAR の活性化は、インビボにおいて肝肥大や中心性肝細胞肥大を誘発することが多い。本データベースにはこれら所見も収載されていることから、PPAR α /CAR 活性化物質を高確率で同定可能である。
- ④ 毒性試験の投与量情報が含まれており、発がん性等の毒性発現用量を照会可能である。

以上の優位性に加えて、農薬は典型的化学物質として利用するものであり、本研究で目標とする予測・評価手法は、その特性から考えると、農薬だけでなく、化審法対象化学物質を始めとする多くの化学物質に適応可能である。具体的には以下の流れで研究を行う。

- ① ラット反復投与毒性試験結果データベースに基づき、非遺伝毒性肝発がん物質と非発がん物質を選出する。
- ② これら化合物の PPAR α 及び CAR 活性化作用を、レポータージーンアッセイ及びラット肝細胞の遺伝子発現変動解析により判別する。
- ③ これら結果から、PPAR α 又は CAR 活性化作用陽性の肝発がん物質(発がん性陽性/MoA#1 陽性)と PPAR α 又は CAR 活性化作用陽性の非肝発がん物質(発がん性陰性/MoA#1 陽性)を選出する。
- ④ これら2群の化合物をラット肝細胞に曝露してマイクロアレイ解析を行い、MoA#1 陽性化合物における発がん性特異的な遺伝子群を同定する。
- ⑤ 検証用化合物(既知の肝発がん・非肝発がん物質:Open TG-GATEs を利用予定)を②同様の試験に付し、PPAR α 又は CAR 活性化作用の有無を判定し、グループ化する。

過去の研究とは異なる本研究の大きな特徴は、申請者らの核内受容体研究基盤を利用して、発がん過程をいくつかのステップに分け、各ステップの MoA に基づいたマーカー遺伝子の探索や化学物質の発がん性評価を実施することである。

3. 実施内容

本研究では、発がん・非発がん性だけでなく、非遺伝毒性肝発がんの主要な MoA である核内受容体 PPAR α 又は CAR の活性化 (以下 MoA#1) を考慮して学習用化合物を分類する。このカテゴリー化を利用して、肝発がん過程において MoA#1 に加えてさらに別の MoA (以下 MoA#2) と関連する遺伝子群を同定し、2つの MoA に基づいた発がん性予測を目指す。

(1) 試験化合物の選出と PPAR α /CAR 作用評価

- ① 上記毒性試験データベースから、非遺伝毒性肝発がん性物質と PPAR α /CAR 活性化作用を示す可能性が高い化合物を選択する。
- ② 培養細胞を用いたレポータージーンアッセイを実施し、各化合物のラット PPAR α 及び CAR 活性化作用を評価する。
- ③ 各化合物を初代培養ラット肝細胞に曝露し、定量的逆転写 PCR 法により PPAR α /CAR の標的遺伝子の発現変動を解析し、肝細胞におけるラット PPAR α 及び CAR 活性化作用を評価する。陽性対照として、PPAR α 活性化物質の bezafibrate (BZF) 及び CAR 活性化物質の PB について同様の解析を行う。
- ④ 2 及び 3 の結果を基に、使用した化合物を以下の6つのグループに分類する。

グループ	非遺伝毒性 肝発がん性	PPAR α 活性化	CAR 活性化	典型的化合物
1	—	—	—	
2	—	+	—	
3	—	—	+	
4	+	—	—	
5	+	+	—	bezafibrate 等
6	+	—	+	phenobarbital

(2) マイクロアレイ解析による新規 MoA と関連するマーカー遺伝子の探索

- ① グループ 2、3、5、6 に分類された化合物ならびにグループ5及び6の典型的化合物 (BZF 及び PB) について、ラット肝細胞から調製した RNA を用いて、マイクロアレイ解析を実施する。
- ② グループ2と5の比較、グループ3と6の比較から、発現変動が共通している遺伝子群とグループ5又はグループ6で特異的に発現変動した遺伝子群を選別する。さらに、グループ5又は6で特異的に発現変動した遺伝子群の中から、グループ5及び6に共通する遺伝子群ならびにグループ5またはグループ6に特異的な遺伝子群を選別する。
- ③ グループ1から6の全ての被験薬物の RNA を用いて、同定した遺伝子群の発現を逆転写 PCR により測定し、新規 MoA (MoA#2) 関連マーカーとして利用可能な遺伝子群を絞り込む。

(3) 検証試験

- ① 医薬基盤・健康・栄養研究所から公開されている Open TG-GATEs から、文献情報を基に、非遺伝毒性肝発がん性物質を選別する。
- ② これら化合物のラット肝細胞及びラット個体を用いて実施されたマイクロアレイ解析結果を抽出し、(2) で同定したマーカー遺伝子の発現変動を解析する。
- ③ 他方、これら化合物について、(1) ②と同様に PPAR α /CAR のレポーターアッセイを実施し、両受容体の活性化作用を評価する。

- ④ Open TG-GATEs のラット肝細胞におけるマイクロアレイ解析結果から、PPAR α /CAR 標的遺伝子の発現変動データを抽出する。
- ⑤ 3 及び4の結果から、Open TG-GATEs 化合物の PPAR α /CAR 活性化作用を判定する。
- ⑥ 5 により化合物を分類し、2 の結果から、グループ化と MoA#2 マーカー遺伝子の発現変動の一致率を統計学的に評価する。

4. 実施体制

吉成浩一（静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野・教授）

担当：研究の計画、実施、データ解析

保坂卓臣（静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野・助教）

担当：インビトロ試験の実施、データ解析

5. 結果及び考察

本研究では、当研究室で既に構築した農薬のラット90日間及び2年間反復投与毒性試験ならびに発がん試験の試験結果データベースを利用して研究を行った。本データベースでは各農薬に固有の番号をつけている。本報告書内で言及される農薬の一覧を下表に示し、以下は全て番号で記載した。

A. 肝がん陽性		B. 肝がん陽性	
番号	農薬名	番号	農薬名
#8		#1	
#12		#5	
#31		#10	
#33		#14	
#56		#41	
#67		#68	
#103		#110	
#130		#118	
#159		#147	
#163		#191	
#171		#197	
#179		#260	
#180			
#212			
#229			

(1) 試験化合物の選出と PPAR α /CAR 作用評価

レポーターアッセイ

上記毒性試験結果データベース中の農薬については、当研究室でラットの4つの核内受容体 (CAR、PPAR α 、PXR、AHR) に対する作用の1次スクリーニングを実施している (Table 1、data not shown)。そこでそれらデータを基に、CAR 又は PPAR α 活性化作用を有し、PXR や AHR 活性化作用が少ないと思われる農薬を選出し、2次スクリーニングとして CAR 及び PPAR α レポーターアッセイを実施した。

Table 1. 農薬の核内受容体活性化作用

農薬	CAR			PPAR α			AHR			PXR		
	3 μ M	10 μ M	30 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M
#8	84.0	136.6	173.3	-6.4	6.4	117.2	75.7	155.1	152.2	-4.2	42.5	69.6
#12	14.2	10.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	35.5	61.9
#171	0.0	-8.9	-2.2	0.0	-3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7	23.6	40.9
#31	0.0	0.0	-50.4	0.0	0.0	-13.6	57.9	72.6	182.0	7.2	4.4	21.8
#33	9.8	20.5	20.3	0.0	5.0	10.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-35.0
#56	0.0	0.0	104.3	5.8	21.5	41.9	-20.3	-23.8	-29.9	17.1	17.2	37.0
#67	-22.5	-50.1	-57.6	-10.2	-5.3	-11.3	0.0	-21.5	-112.4	23.6	38.1	9.0
#103	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-2.8	3.1
#130	25.4	-41.1	-35.9	-6.2	-6.5	-10.6	-26.1	-22.4	0.0	0.0	0.0	0.0
#159	0.0	0.0	-26.4	-4.5	-4.6	0.0	-32.2	-16.2	0.0	4.4	16.1	40.8
#163	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-7.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	26.5
#179	2.2	32.8	18.7	4.8	-3.2	-11.3	-74.3	-89.6	-78.8	43.8	46.4	60.0
#180	0.0	0.0	0.0	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0	-39.1	18.1	14.6	-3.3
#212	-16.0	-20.6	-34.4	-4.4	-28.4	-33.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
#229	21.3	15.7	12.2	0.0	0.0	-3.7	0.0	0.0	22.4	11.2	31.9	60.6

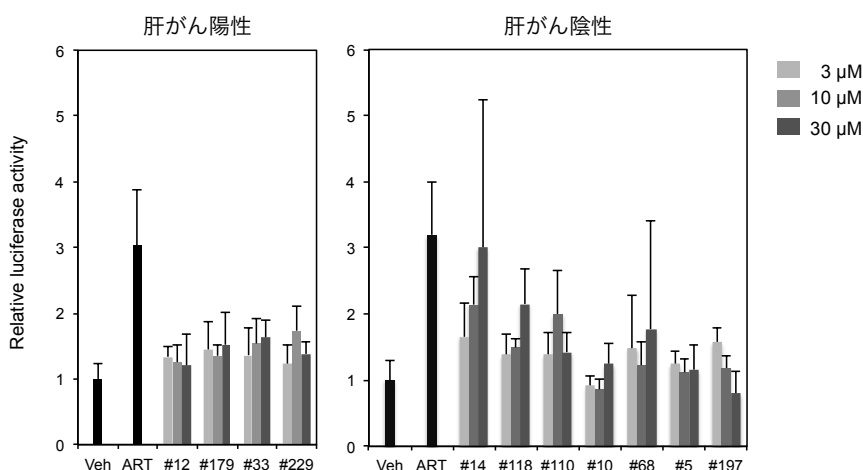
各農薬の活性化作用は、陽性対照物質の活性化作用を 100%とした時の相対値として表した。

COS-1 細胞にラット CAR 又は PPAR α 発現プラスミド、CAR 又は PPAR α 応答配列を含むレポータープラスミドを一過性に導入し、被験農薬を 3、10、30 μ M で 24 時間処置してレポーター活性を測定した (Fig. 2)。CAR レポータープラスミドは、ヒト *CYP2B6* の CAR 結合配列である NR1 を 5 つタンデムに連結したもの、PPAR α レポータープラスミドはラット *Aox1* 遺伝子の PPRE を 3 つ連結したものを、TK プロモーターと併せて luciferase 遺伝子上流に組み込んだプラスミド (Promega 社の pGL3-Basic プラスミドを使用) を作製して利用した。ラット CAR の陽性対照としては 30 μ M artemisinin (ART) を、PPAR α の陽性対照としては、100 μ M BZF を用いた。

レポーターアッセイの結果、肝がん陽性物質では、顕著な CAR 活性化作用を示す農薬は認められず、#33 や #229 で 1.5 倍程度の活性化が認められたのみであった。一方、肝がん陰性農薬では、#14 が濃度依存的な CAR 活性化作用を示した。#118 や #110 でも 2 倍程度の活性化が認められた。

PPAR α の活性化に関しても、陽性対照の BZF では 2-3 倍の転写活性化が認められたが、肝がん陽性物質から PPAR α 活性化物質を見出すことはできなかった。肝がん陰性農薬では、#40 や #260 が用量依存的に PPAR α 活性化作用を示した。

A. CAR活性化



B. PPAR α 活性化

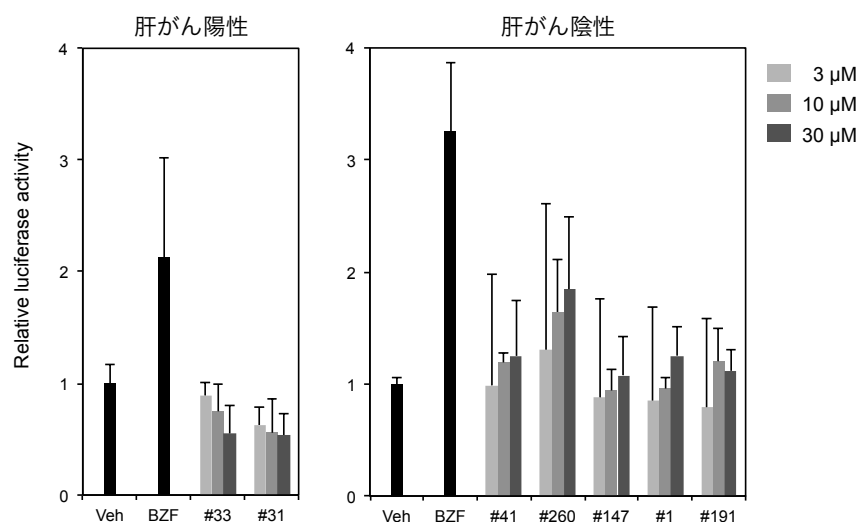


Fig. 2. 肝発がん性及び非発がん性農薬のラット CAR 及び PPAR α 活性化作用

農薬評価書の試験結果

食品安全委員会で公開されている農薬評価書には、酵素誘導試験や肝細胞肥大の所見など、インビボにおけるこれら農薬の CAR 及び PPAR α 活性化作用に関連すると思われる情報が記載されている。そこで、それら情報を精査したところ、Table 2 の情報を得ることができた。これらの情報によると、#33 及び#229 は齧歯動物の肝で CYP2B を誘導する可能性が示された。また、#1 と#41 は PPAR α を活性化する可能性が考えられた。

Table 2. 農薬評価書におけるインビボ酵素誘導作用に関する情報

農薬	試験	結果
#1	マウス肝におけるペルオキシゾーム誘導試験	光学顕微鏡観察では、最高用量投与群の雌雄で肝小葉中心部におけるペルオキシゾームの増加が、電子顕微鏡観察では、350 ppm 以上投与群でペルオキシゾームの数及び大きさの用量相関性のある増加が認められたことから、#1ナトリウム塩は弱いペルオキシゾーム増殖剤であることが示唆された。
	マウス肝における酵素誘導試験	350 ppm 以上投与群の雌雄で、ペルオキシゾームの脂肪酸代謝に関するシアン非感受性/パルミトイル CoA オキシダーゼ (PALCoA) 活性の用量相関性のある有意な増加 (雄で58~576%、雌で3~707%増加) が認められた。最高用量群では、PALCoA 活性の増加とともにGSH 濃度が減少した (雄で9%、雌で15%減少)。
	食品健康影響評価	肝腫瘍の発生機序検討試験では、マウスの肝臓においてペルオキシゾームの増加、BrdU の有意な取り込み及びPALCoA 活性増加が認められた。
#12	肝薬物代謝酵素に対する影響 (ラット)	10 mg/kg 体重/日以上投与群でチトクロームP450 の増加が認められた。ラウリン酸11 ヒドロキシラーゼ (11-LAOH)、ラウリン酸12 ヒドロキシラーゼ (12-LAOH) 及びEROD の活性増加は認められたが、これらの活性を全P450 含量に対する比活性で表すと有意な増加は認められなかった。一方、全投与群でPROD 及びBROD の全P450 含量に対する比活性は増加していた。
	肝薬物代謝酵素に対する影響 (マウス)	全投与群でPROD及びBRODの活性増加が認められた。また、PROD及びBRODの全P450 含量に対する比活性は、BROD は全投与群で、PROD は700 ppm 以上投与群で増加した。EROD、11-及び12-LAOH 並びにMROD の活性増加は認められたが、これらの活性を全P450 含量に対する比活性で表すと有意な増加は認められなかった。
	肝薬物代謝酵素に対する影響 (マウス)	700 ppm 以上投与群で、用量相関性に肝絶対及び比重量増加並びにチトクロームP450 の増加が認められた。全投与群でPROD及びBRODの活性増加が認められた。また、PROD及びBRODの全P450 含量に対する比活性は、BROD は全投与群で、PROD は700 ppm 以上投与群で増加した。EROD、11-及び12-LAOH の活性増加は認められたが、これらの活性を全P450 含量に対する比活性で表すと有意な増加は認められなかった。
	甲状腺に対する影響 (ラット)	#12及びPB 投与群で、肝ミクロソームタンパク、CYP 濃度、PROD 及びUGT 増加が認められた。いずれの変化についても、#12投与群でPB 投与群より変化がやや大きいことが認められた。
#33	マウスを用いた2 週間肝薬物代謝酵素誘導能試験	800 ppm 投与群でP-450 含量増加、P-450 アイソザイムCYP1A 増加、150 ppm 以上投与群において肝細胞肥大、ペルオキシゾーム蛋白含量増加、パルミトイルCoA 酸化酵素活性減少、P-450 アイソザイムのCYP2B、CYP3A、CYP4A 増加が見られたので、無影響量は10 ppm (1.54 mg/kg 体重/日) であると考えられた。
	2 週間肝薬物代謝酵素誘導能試験	本試験において、2,500 ppm 以上投与群でP-450 含量増加及びP-450 アイソザイムCYP2B1 含量増加、500 ppm 以上投与群においてミクロソーム蛋白量及びベントキリゾルフィンO-脱アルキル化酵素活性が上昇したので、無毒性量は50 ppm (2.90 mg/kg 体重/日) であると考えられ、同酵素誘導には閾値があることが確認された。#33はフェノバルビタール系薬剤と比較的類似した肝薬物代謝酵素誘導を示すと考えられた。
	マウスを用いた2 週間肝薬物代謝酵素誘導能試験	本試験において800 ppm 投与群でP-450 含量増加、P-450 アイソザイムCYP1A 増加、150 ppm 以上投与群において肝細胞肥大、ペルオキシゾーム蛋白含量増加、パルミトイルCoA 酸化酵素活性減少、P-450 アイソザイムのCYP2B、CYP3A、CYP4A 増加が見られたので、無影響量は10 ppm (1.54 mg/kg 体重/日) であると考えられた。#33はラットと同様にマウスにおいても、フェノバルビタール系薬剤と比較的類似した酵素誘導を示すと考えられた。
#41	2 年間慢性毒性/発がん性併合試験 (ラット)	肝臓の電子顕微鏡検査により、750 ppm 以上投与群の雌雄で、ペルオキシゾームの有意な増加が認められた。
#118	ラットにおける肝腫大に関する生化学的及び電子顕微鏡学的検索	肝臓のミクロゾーム分画を調製後、酵素活性等について測定した。その結果、200 ppm 以上投与群でミクロゾーム蛋白量、P450 量、ECOD (CYP1酵素) 及びPROD (CYP2 酵素) 活性が増加した。ECOD 及びPROD 活性の増加率は陽性対照群 I (PB 投与群) と同程度であったが、ECOD 活性の増加率は陽性対照群 II (3-MC 投与群) の約20%であったことから、検体の酵素誘導のタイプはPB 型であると考えられた。いずれの投与群においても、ペルオキシゾーム活性を示す検査項目 (FAOS及びCAT) の増加は認められなかった。
#229	肝臓における遺伝子転写物の定量的PCR 解析	C57BL/6J マウスに2,000 ppm の#229を3 日間混餌投与し、又は80 mg/kg 体重/日の用量でフェノバルビタールを3 日間強制経口投与し、肝臓における甲状腺ホルモン無活性化に関わる遺伝子転写物の定量的PCR 解析を行い、検体投与の影響が検討された。マウス肝臓における遺伝子転写物の定量結果は以下の通り。 シトクロームP-450 #229 PB Cyp1a 372** 93 Cyp2b 330* 143 Cyp3a 2,880** 513**
	ラットを用いた肝薬物代謝酵素誘導、肝肥大及び増殖活性に関する試験	#229が誘導する肝薬物代謝酵素活性のうちBROD やPROD の顕著な誘導が認められる。本剤は、一般にCYP1A の寄与が大きいと考えられるERODも誘導し、誘導倍率はフェノバルビタールのそれよりも高い。これらを総合すると、#229の肝薬物代謝酵素誘導、肝細胞肥大及び肝細胞増殖能には、フェノバルビタールと類似した点があると考えられた。

ラット肝細胞における遺伝子発現変動解析

レポーターアッセイの結果および農薬評価書からの情報に基づき、#14、#33 及び #118 を CAR 活性化物質候補として、#1、#41、#118 及び #260 を PPAR α 活性化物質候補として、ラット肝細胞における遺伝子発現変動解析に付した。

市販の凍結ラット肝細胞 (Life Technologies、ロット Rs850 及び Rs881) を、5% FBS 及び Hepatocyte Plating Supplement Pack (Life Technologies) を加えた William's E 培地に懸濁し、コラーゲンコート 24-ウェルプレート (BD Bioscience) に $3.2\text{--}3.5 \times 10^5$ cells/well になるように細胞を播種した (500 μ l/well、n=3-4)。播種 4~6 時間後に、溶媒 (0.1% DMSO)、1 mM PB、100 μ M BZF、又は各種農薬 (10 μ M) を含む無血清 William's E 培地に交換し、24 時間後に細胞を回収し、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を使用して総 RNA を抽出した。各群の総 RNA を一定量ずつプールし、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) を使用して cDNA を合成し、GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用いて定量的 PCR を行った。使用したプライマーの配列は以下の通り。なお、各 mRNA レベルは、18S rRNA レベルで補正した。

遺伝子	プライマー配列
<i>Cyp2b1</i>	5'-ACCAGGACCATGGAGCCCCAGTATCT-3'、5'-CCACAGGCCTTGGTCCCAGGTG-3'
<i>Cyp3a1</i>	5'-TGCAGGAGGAGATCGACAGGGCT-3'、5'-GTGCTGTGGATCACGGTGAAGAGC-3'
<i>Cyp4a1</i>	5'-TCTGCACTGAGCTCCACC-3'、5'-GTGCTGGAACCACGGTTG-3'
18S rRNA	5'-ACCGCGTTCTATTTTGTG-3'、5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'

本研究では、CAR の標的遺伝子として *Cyp2b1* 及び *Cyp3a1* を、PPAR α の標的遺伝子として *Cyp4a1* の mRNA レベルを測定したところ、Fig. 3 の結果が得られた。*Cyp2b1* 及び *Cyp3a1* については、陽性対照の PB と #33 及び #118 は同程度に mRNA レベルを上昇させたが、#14 ではそのような上昇は認められなかった。*Cyp2a1* に関しては、BZF で顕著な誘導が認められたが、#41 で上昇傾向が認められた程度であった。ただし、本実験において、溶媒対照群の 18S rRNA レベルが他のサンプルに比べて高く、18S で補正せずに *Cyp4a1* mRNA レベルの比較を行うと、BZF で約 17 倍、#41 で約 7 倍、#260 及び #1 で約 2.5 倍となった。

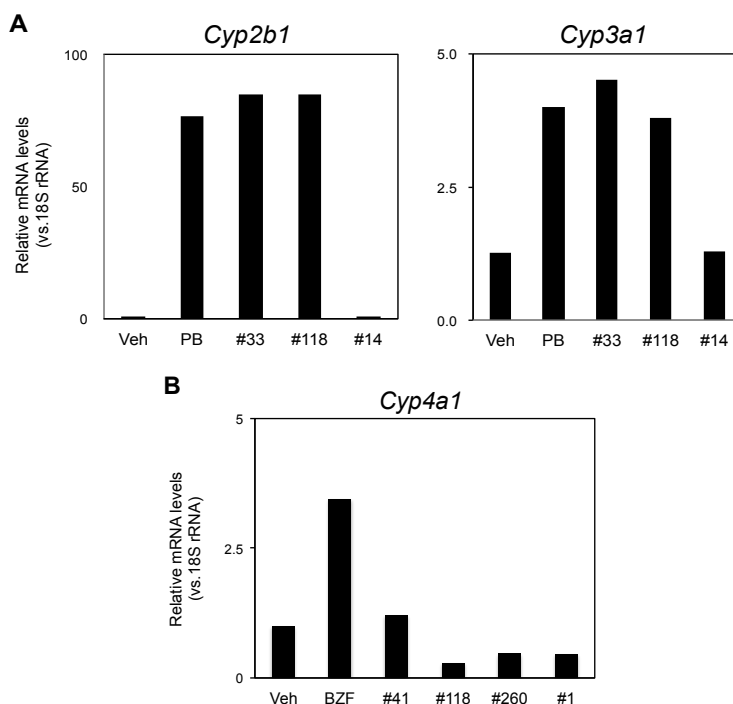


Fig. 3. 肝発がん性及び非発がん性農薬のラット肝細胞における CYP 誘導作用

(2) マイクロアレイ解析による新規 MoA と関連するマーカー遺伝子の探索

ラット CAR 及び PPAR α のレポーターアッセイならびにラット肝細胞における CAR 及び PPAR α 標的遺伝子 (*Cyp2b1/Cyp3a1/Cyp4a1*) の発現変動解析の結果より、発がん性 CAR 活性化物質 (グループ 6) として #33 及び PB を、非発がん性 CAR 活性化物質 (グループ 3) として #118 を、非発がん性 PPAR α 活性化物質 (グループ 2) として #41 及び #260 を、発がん性 PPAR α 活性化物質 (グループ 5) として BZF を選択した (Table 3)。これらの薬物を処置したラット肝細胞、ならびに CAR 関連実験の溶媒群と PPAR α 関連実験の溶媒群から調製した総 RNA を用いて、マイクロアレイ解析を実施した。

Table 3. マイクロアレイ解析に使用した化合物

グループ	非遺伝毒性肝発がん	PPAR α 活性化	CAR 活性化	使用化合物
1	—	—	—	溶媒 (0.1% DMSO)
2	—	+	—	#41、#260
3	—	—	+	#118
5	+	+	—	BZF
6	+	—	+	#33、PB

各ウェル (n=3-4) の RNA を等量ずつプールして、1 群のサンプルとした。解析は北海道システムサイエンス社の委託試験として実施した。実験の概要は以下の通りである。調製した総 RNA を利用して Cyanine 3 ラベル化 cRNA を調製し、Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を使用して SurePrint G3 Rat 8x60K ver. 2.0 (Agilent Technologies) とハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、Agilent Technologies 社の Microarray Scanner を用いて Scan Resolution; 3 μ m、TIFF file dynamic rang; 20 bit でスキャンした。Agilent Feature Extraction 12.0.3.1 を用いて各スポットの数値化を行った後、GeneSpring にデータをインポートして 75% パーセンタイルシフトでノーマライゼーションを行った。

得られたデータを用いて、まず、CAR 関連遺伝子に関して、以下の基準で標的候補遺伝子を探索した。

- ① 溶媒群に対して、#33、PB 又は #118 処置により 2 倍以上の発現増加または発現低下が認められた遺伝子
- ② 上記①の遺伝子のうち、機能や名称が同定又は推定されている遺伝子
- ③ 上記②の遺伝子のうち、#33、PB 又は #118 の処置で共通して同方向に発現変動した遺伝子 (肝発がん非特異的 CAR 標的候補遺伝子)
- ④ 上記②の遺伝子のうち、#33 及び PB の処置では発現変動が認められたが、#118 処置では変動が認められなかった遺伝子 (肝発がん特異的 CAR 標的候補遺伝子)

その結果、肝発がん非特異的 CAR 標的候補遺伝子として 44 種 (発現亢進 12 種、発現低下 32 種)、肝発がん特異的 CAR 標的候補遺伝子として 23 種 (発現亢進 8 種、発現低下 15 種) を見出した (Table 4 及び 5)。

次に、PPAR α 関連遺伝子に関して、以下の基準で標的候補遺伝子を探索した。

- ① 溶媒群に対して、BZF、#41 又は #260 処置により 2 倍以上の発現増加または発現低下が認められた遺伝子
- ② 上記①の遺伝子のうち、機能や名称が同定又は推定されている遺伝子
- ③ 上記②の遺伝子のうち、BZF、#41 又は #260 の処置で共通して同方向に発現変動した遺伝子

(肝発がん非特異的 PPAR α 標的候補遺伝子)

④ 上記②の遺伝子のうち、BZF 処置では発現変動が認められたが、#41 および#260 処置では変動が認められなかった遺伝子(肝発がん特異的 PPAR α 標的候補遺伝子)

その結果、肝発がん非特異的 PPAR α 標的候補遺伝子として 269 種(発現亢進 109 種、発現低下 160 種)、肝発がん特異的 PPAR α 標的候補遺伝子として 347 種(発現亢進 280 種、発現低下 67 種)を見出した(Table 6 及び 7)。

なお、肝発がん非特異的 CAR 標的候補遺伝子には、CAR の標的遺伝子として知られている CYP2B 及び CYP3A サブファミリー遺伝子が含まれており(Table 4)、#33 及び#118 が CAR 活性化作用を有することが確認された。また、肝発がん非特異的 PPAR α 標的候補遺伝子には CYP4A サブファミリー遺伝子や *Acox1* が含まれており、#41 及び#260 が PPAR α 活性化作用を有することが確認された(Table 6)。

本年の研究では、市販のラット肝細胞を購入して遺伝子発現解析を行ったが、当初購入した肝細胞の培養プレートへの接着率が悪く、遺伝子発現解析を適切に実施することができなかった。そのため、販売代理店と連絡を取り、新たなロットを購入して再実験を行う必要が生じ、研究計画に遅れが生じた。また、マイクロアレイ解析の結果、当初予想を遥かに超える数の候補遺伝子が同定された。以上のことから、同定した候補遺伝子群の発現変動の検証を研究期間内に実施するに至らなかった。

Table 4. 肝発がん非特異的 CAR 標的候補遺伝子

A. Up-regulated

Gene name	Accession #	PB	#33	#118
		2.9	2.4	3.1
		2.5	2.0	3.1
		2.2	2.2	2.4
		2.2	2.2	2.1
		39.9	42.2	36.7
		11.8	12.1	11.7
		3.3	2.8	2.6
		3.2	2.4	2.3
		4.8	4.9	2.7
		2.5	2.8	2.2
		2.0	2.3	2.2
		2.1	2.2	3.2
		4.3	3.5	3.4

B. Down-regulated

Gene name	Accession #	#118	#33	PB
		0.33	0.36	0.32
		0.05	0.06	0.06
		0.15	0.18	0.19
		0.36	0.48	0.50
		0.43	0.30	0.41
		0.16	0.19	0.21
		0.34	0.38	0.50
		0.17	0.20	0.22
		0.14	0.16	0.18
		0.45	0.40	0.43
		0.18	0.20	0.22
		0.42	0.44	0.35
		0.29	0.25	0.21
		0.16	0.19	0.20
		0.13	0.25	0.17
		0.36	0.12	0.27
		0.28	0.31	0.37
		0.17	0.20	0.21
		0.08	0.10	0.10
		0.13	0.16	0.17
		0.04	0.04	0.05
		0.12	0.14	0.15
		0.05	0.06	0.07
		0.14	0.17	0.18
		0.12	0.14	0.15
		0.12	0.15	0.16
		0.10	0.05	0.15
		0.06	0.08	0.08
		0.18	0.22	0.23
		0.10	0.19	0.13
		0.18	0.21	0.23
		0.30	0.24	0.27

数値は変化倍率を表す。

Table 5. 肝発がん特異的 CAR 標的候補遺伝子

A. Up-regulated

Gene name	Accession #	PB	#33	#118
		5.6	15.0	nc
		2.0	2.2	nc
		2.3	2.1	nc
		8.4	10.8	nc
		2.9	2.4	nc
		2.3	2.3	nc
		3.1	3.1	nc
		2.3	2.2	nc

B. Down-regulated

Gene name	Accession #	PB	#33	#118
		0.40	0.46	nc
		0.33	0.44	nc
		0.46	0.20	nc
		0.44	0.46	nc
		0.43	0.47	nc
		0.21	0.46	nc
		0.39	0.44	nc
		0.42	0.44	nc
		0.30	0.44	nc
		0.22	0.49	nc
		0.48	0.36	nc
		0.45	0.43	nc
		0.30	0.23	nc
		0.34	0.37	nc
		0.25	0.46	nc

数値は変化倍率を表す。n.c.: not changed.

Table 6. 肝発がん非特異的 PPAR α 標的候補遺伝子

A. Up-regulated

Gene name	Accession #	BZF	#41	#260	Gene name	Accession #	BZF	#41	#260	Gene name	Accession #	BZF	#41	#260
		6.5	8.2	7.2			3.6	2.4	3.0			2.4	4.4	2.9
		2.7	3.1	2.7			3.6	2.1	3.0			3.0	2.5	3.4
		4.6	4.0	2.8			3.9	3.0	3.8			3.3	3.1	3.6
		3.1	4.9	5.5			3.1	5.8	3.2			2.3	2.3	2.0
		3.1	2.3	3.2			4.1	2.8	3.4			3.6	4.3	5.3
		3.1	2.3	3.2			4.1	2.1	3.4			2.3	2.1	2.5
		2.1	2.6	2.4			5.3	5.5	4.8			2.3	2.1	2.5
		5.9	7.0	6.1			5.3	2.8	4.8			2.3	2.0	2.5
		5.9	6.1	6.1			5.3	2.6	4.8			2.3	2.0	2.5
		5.9	5.3	6.1			5.3	2.4	4.8			2.2	10.5	3.2
		5.9	3.8	6.1			5.3	2.4	4.8			4.5	2.2	2.3
		5.9	3.6	6.1			5.3	2.1	4.8			6.1	4.4	4.6
		5.9	2.9	6.1			4.4	4.4	7.7			3.9	4.5	5.1
		5.9	2.7	6.1			2.4	2.0	3.0			2.2	2.3	2.5
		5.9	2.7	6.1			2.7	5.4	3.8					
		5.9	2.5	6.1			2.2	2.7	2.6					
		5.8	2.0	7.6			2.3	4.5	2.3					
		8.0	2.0	9.5			3.8	3.6	3.6					
		2.4	4.0	2.6			2.9	2.8	3.3					
		2.0	2.5	2.7			3.5	3.1	2.7					
		3.1	4.6	4.3			3.5	2.8	2.7					
		4.7	3.8	4.7			3.4	2.8	2.8					
		4.7	3.5	4.7			5.0	6.5	9.9					
		4.7	3.3	4.7			2.9	3.1	3.4					
		4.7	3.3	4.7			2.6	2.7	2.5					
		4.7	3.0	4.7			2.2	2.4	2.9					
		4.7	2.7	4.7			3.7	3.6	2.4					
		4.7	2.6	4.7			2.3	2.1	3.5					
		4.7	2.3	4.7			4.8	4.2	3.1					
		4.7	2.2	4.7			5.2	2.6	3.9					
		4.7	2.2	4.7			3.7	4.7	7.0					
		3.6	2.6	3.2			3.7	4.3	7.0					
		3.6	2.5	3.2			4.7	2.8	2.5					
		3.6	2.5	3.2			3.8	4.6	5.2					
		3.6	2.5	3.2			3.8	2.5	5.2					
		3.6	2.4	3.2			2.1	3.3	2.2					
		3.6	2.4	3.2			2.1	2.0	2.2					
		3.6	2.3	3.2			4.9	2.9	3.8					
		3.6	2.3	3.2			14.2	7.3	5.5					
		3.6	2.3	3.2			14.2	7.2	5.5					
		3.6	2.3	3.2			14.2	6.6	5.5					
		4.8	3.9	4.6			14.2	6.3	5.5					
		4.4	4.0	8.3			14.2	6.2	5.5					
		6.6	5.3	7.3			14.2	5.4	5.5					
		6.6	4.7	7.3			14.2	3.0	5.5					
		6.6	4.4	7.3			14.2	2.9	5.5					
		6.6	4.2	7.3			3.1	3.7	3.9					
		6.6	3.3	7.3			2.7	3.8	5.1					
		6.6	3.2	7.3			5.0	4.3	5.5					
		6.6	2.8	7.3			3.5	3.5	3.4					
		6.6	2.4	7.3			3.0	6.5	7.5					
		7.3	9.0	7.6			4.7	6.2	7.0					
		8.3	31.1	12.1			2.7	2.0	2.4					
		8.3	29.1	12.1			5.3	2.9	3.1					
		8.3	28.8	12.1			2.7	2.2	2.7					
		8.3	28.4	12.1			2.9	2.7	2.7					
		8.3	28.2	12.1			2.9	2.5	2.7					
		8.3	28.0	12.1			2.9	2.5	2.7					
		8.3	28.0	12.1			2.9	2.5	2.7					
		8.3	27.3	12.1			2.9	2.5	2.7					
		8.3	27.0	12.1			2.9	2.4	2.7					
		8.3	25.3	12.1			2.9	2.4	2.7					
		8.3	24.8	12.1			2.9	2.3	2.7					
		2.8	2.2	2.7			2.9	2.3	2.7					
		2.8	2.1	2.7			2.9	2.3	2.7					
		2.9	4.6	3.8			2.7	4.5	3.2					
		14.6	11.5	11.3			2.2	2.5	2.7					
		14.6	11.1	11.3			6.5	3.9	6.1					
		14.6	10.7	11.3			6.5	3.3	6.1					
		14.6	9.8	11.3			3.8	2.8	2.7					
		14.6	9.0	11.3			5.1	4.8	4.7					
		14.6	7.6	11.3			3.6	3.0	3.1					
		14.6	7.5	11.3			2.5	2.8	2.1					
		14.6	7.0	11.3			2.5	2.0	2.1					
		14.6	6.8	11.3			3.5	3.3	4.6					
		14.6	3.9	11.3			3.5	2.6	4.6					
		3.2	2.3	3.8			2.3	3.6	3.2					
		3.2	2.1	3.8			2.5	2.2	2.3					
		4.9	4.2	5.6			2.5	2.1	2.3					
		2.2	4.0	2.1			3.6	2.7	4.8					
		5.1	3.7	3.3			4.5	5.1	5.3					
		3.8	2.9	3.4			3.0	2.5	2.8					
		5.4	5.8	5.6			4.8	3.2	3.2					
		2.9	3.3	3.4			2.6	2.0	2.9					
		2.3	3.5	3.6			2.2	4.9	2.2					
		3.4	2.8	3.6			2.2	3.4	5.0					
		6.0	3.9	3.8			8.9	2.2	3.5					
		2.3	16.9	5.7			8.9	2.1	3.5					
		2.3	15.9	5.7			3.6	2.4	2.7					
		2.2	4.8	2.1			4.3	5.2	5.6					
		5.7	4.0	7.3			4.3	4.9	5.6					
		5.7	3.0	7.3			4.3	4.7	5.6					
		2.7	2.4	3.1			4.3	3.9	5.6					
		2.1	2.6	3.0			4.3	2.4	5.6					
		5.1	8.5	6.1			4.3	2.4	5.6					
		3.6	4.6	3.0			2.3	2.5	2.7					
		3.6	3.1	3.0			2.3	2.3	2.7					
		3.6	3.0	3.0			4.7	3.0	3.0					
		3.6	2.8	3.0			3.5	4.5	2.7					
		3.6	2.7	3.0			2.4	5.0	2.9					

B. Down-regulated

Gene name	Accession #	BZF	#41	#260
		0.12	0.19	0.32
		0.11	0.12	0.13
		0.43	0.42	0.42
		0.41	0.38	0.42
		0.41	0.41	0.42
		0.41	0.41	0.42
		0.41	0.42	0.42
		0.41	0.42	0.42
		0.41	0.43	0.42
		0.41	0.46	0.42
		0.41	0.46	0.42
		0.41	0.46	0.42
		0.41	0.48	0.42
		0.07	0.17	0.09
		0.45	0.30	0.41
		0.02	0.03	0.05
		0.45	0.34	0.41
		0.06	0.07	0.08
		0.42	0.38	0.40
		0.03	0.02	0.02
		0.12	0.13	0.30
		0.12	0.14	0.20
		0.03	0.02	0.02
		0.14	0.15	0.16
		0.30	0.34	0.48
		0.17	0.15	0.08
		0.17	0.16	0.08
		0.17	0.16	0.08
		0.17	0.19	0.08
		0.17	0.20	0.08
		0.17	0.21	0.08
		0.17	0.21	0.08
		0.17	0.23	0.08
		0.17	0.23	0.08
		0.23	0.21	0.18
		0.30	0.13	0.14
		0.15	0.18	0.14
		0.36	0.34	0.35
		0.23	0.41	0.35
		0.14	0.24	0.16
		0.14	0.16	0.17
		0.44	0.49	0.46
		0.11	0.12	0.13
		0.26	0.20	0.22
		0.26	0.19	0.22
		0.02	0.02	0.03
		0.05	0.08	0.06
		0.05	0.10	0.05
		0.04	0.05	0.05
		0.35	0.12	0.19
		0.10	0.20	0.28
		0.10	0.12	0.12
		0.07	0.07	0.07
		0.36	0.26	0.35
		0.36	0.44	0.35
		0.09	0.12	0.09
		0.14	0.16	0.17
		0.09	0.10	0.11
		0.04	0.11	0.04
		0.32	0.25	0.27
		0.32	0.08	0.31
		0.27	0.25	0.15
		0.43	0.38	0.42
		0.43	0.41	0.42
		0.09	0.10	0.11
		0.09	0.10	0.11
		0.36	0.27	0.30
		0.11	0.14	0.44
		0.04	0.15	0.14
		0.37	0.44	0.40
		0.14	0.15	0.16
		0.08	0.09	0.09
		0.13	0.12	0.14
		0.11	0.05	0.27
		0.11	0.45	0.27
		0.09	0.11	0.11
		0.18	0.07	0.07
		0.41	0.46	0.50
		0.27	0.48	0.42
		0.26	0.39	0.27
		0.27	0.28	0.21
		0.49	0.47	0.48
		0.43	0.48	0.48
		0.11	0.13	0.13
		0.34	0.33	0.45
		0.23	0.20	0.14
		0.33	0.16	0.19
		0.14	0.16	0.16
		0.06	0.07	0.07
		0.11	0.13	0.13
		0.05	0.05	0.05
		0.01	0.02	0.04
		0.11	0.13	0.24
		0.07	0.08	0.08
		0.21	0.15	0.16
		0.14	0.16	0.17
		0.44	0.49	0.39
		0.34	0.35	0.39
		0.37	0.24	0.31
		0.34	0.41	0.35

Gene name	Accession #	BZF	#41	#260
		0.37	0.41	0.31
		0.40	0.40	0.20
		0.05	0.05	0.06
		0.05	0.14	0.13
		0.34	0.10	0.18
		0.28	0.21	0.39
		0.28	0.30	0.33
		0.12	0.13	0.14
		0.30	0.45	0.31
		0.31	0.19	0.37
		0.31	0.47	0.37
		0.13	0.18	0.09
		0.14	0.03	0.03
		0.37	0.47	0.46
		0.32	0.17	0.35
		0.18	0.21	0.06
		0.11	0.37	0.22
		0.16	0.16	0.13
		0.16	0.20	0.13
		0.16	0.20	0.13
		0.16	0.21	0.13
		0.16	0.23	0.13
		0.16	0.24	0.13
		0.16	0.24	0.13
		0.16	0.28	0.13
		0.16	0.29	0.13
		0.16	0.35	0.13
		0.16	0.46	0.13
		0.34	0.35	0.30
		0.33	0.41	0.38
		0.09	0.10	0.11
		0.14	0.15	0.16
		0.15	0.17	0.17
		0.12	0.13	0.14
		0.05	0.06	0.06
		0.39	0.32	0.40
		0.12	0.22	0.19
		0.10	0.31	0.22
		0.07	0.08	0.08
		0.05	0.05	0.05
		0.10	0.11	0.12
		0.36	0.13	0.13
		0.09	0.10	0.10
		0.21	0.28	0.24
		0.08	0.09	0.09
		0.35	0.50	0.35
		0.08	0.09	0.09
		0.11	0.12	0.13
		0.14	0.18	0.05
		0.17	0.22	0.18
		0.46	0.43	0.44
		0.19	0.24	0.21
		0.35	0.14	0.29
		0.35	0.17	0.29
		0.44	0.23	0.24
		0.43	0.38	0.49
		0.43	0.41	0.49
		0.43	0.41	0.49
		0.43	0.41	0.49
		0.43	0.42	0.49
		0.43	0.42	0.49
		0.43	0.43	0.49
		0.43	0.45	0.49
		0.43	0.45	0.49
		0.17	0.17	0.15
		0.09	0.10	0.10
		0.04	0.05	0.05
		0.27	0.17	0.40
		0.14	0.13	0.14
		0.14	0.14	0.14
		0.14	0.16	0.14
		0.09	0.10	0.10
		0.08	0.09	0.09
		0.47	0.28	0.39
		0.47	0.36	0.39
		0.10	0.11	0.11
		0.21	0.33	0.32
		0.30	0.15	0.37
		0.12	0.26	0.12
		0.03	0.03	0.04
		0.39	0.14	0.17
		0.39	0.17	0.17
		0.26	0.23	0.37
		0.30	0.42	0.47
		0.07	0.03	0.05
		0.07	0.03	0.05
		0.07	0.04	0.05
		0.07	0.05	0.05
		0.07	0.05	0.05
		0.07	0.06	0.05
		0.07	0.06	0.05
		0.07	0.08	0.05
		0.39	0.12	0.18
		0.39	0.15	0.18
		0.39	0.15	0.18
		0.39	0.24	0.18
		0.39	0.25	0.18
		0.39	0.25	0.18

Gene name	Accession #	BZF	#41	#260
		0.39	0.38	0.18
		0.49	0.37	0.40
		0.11	0.14	0.19
		0.12	0.14	0.15
		0.29	0.20	0.31
		0.29	0.41	0.31
		0.45	0.43	0.38
		0.10	0.11	0.11
		0.21	0.14	0.31
		0.08	0.09	0.10
		0.11	0.12	0.13
		0.06	0.11	0.07
		0.28	0.29	0.33
		0.37	0.36	0.42
		0.38	0.42	0.27
		0.11	0.13	0.13
		0.13	0.15	0.15
		0.28	0.35	0.36
		0.03	0.04	0.04
		0.15	0.28	0.34
		0.20	0.29	0.18
		0.22	0.45	0.37

数値は変化倍率を表す。

Table 7. 肝発がん特異的 PPAR α 標的候補遺伝子

A. Up-regulated											
Gene name	Accession #	BZF	Gene name	Accession #	BZF	Gene name	Accession #	BZF	Gene name	Accession #	BZF
		2.6			3.0			2.4			5.0
		4.3			4.3			2.5			2.0
		4.2			4.5			2.3			2.3
		4.9			4.1			2.1			7.0
		2.3			19.9			5.1			2.2
		2.0			14.3			9.7			2.0
		2.3			6.0			2.2			2.3
		2.1			2.2			2.9			2.2
		4.3			2.1			2.0			2.1
		4.9			13.6			8.6			2.2
		3.2			2.3			2.3			2.0
		2.5			7.0			3.1			2.1
		3.5			6.0			2.6			2.4
		2.8			4.1			7.9			2.3
		2.9			11.6			2.9			2.3
		7.5			6.3			2.0			2.6
		9.9			2.0			3.4			2.4
		8.0			2.5			7.3			7.0
		2.7			2.1			2.7			2.3
		4.6			5.0			4.4			2.6
		6.0			2.3			2.4			3.2
		2.1			3.0			2.9			2.2
		3.2			2.0			2.9			11.0
		2.1			2.5			4.8			2.0
		3.3			2.1			3.7			4.5
		2.3			4.4			4.5			7.3
		10.1			3.1			8.7			4.0
		7.5			4.6			6.0			7.0
		2.0			2.0			3.6			3.0
		4.4			2.4			3.0			2.4
		2.7			2.2			3.7			2.9
		2.2			7.2			2.3			12.9
		2.5			3.2			2.2			3.1
		6.4			2.0			2.1			10.2
		2.1			2.7			5.0			6.2
		3.3			2.3			2.5			10.6
		2.6			6.0			4.4			2.4
		2.2			2.3			2.4			4.3
		2.2			4.1			2.3			5.0
		5.3			4.0			2.2			14.2
		2.9			4.4			2.4			9.9
		3.9			4.4			2.0			2.5
		2.2			2.5			16.2			5.9
		2.2			2.1			4.5			2.1
		2.0			2.1			7.3			4.7
		5.4			2.0			4.0			2.3
		2.1			2.4			5.1			2.2
		2.2			2.3			2.1			13.8
		4.5			2.3			4.9			2.9
		2.7			3.8			4.0			2.4
		2.4			3.8			5.1			3.2
		2.1			3.7			5.0			2.2
		2.5			2.3			4.4			2.3
		4.6			2.6			6.7			2.1
		4.5			2.5			2.1			4.4
		4.4			4.4			4.8			4.0
		2.2			2.7			10.1			5.3
		2.1			3.7			2.0			2.0
		2.0			6.8			2.1			11.2
		3.6			11.5			2.1			2.2
		5.4			2.6			2.1			2.1
		4.5			3.6			2.1			2.6
		2.2			3.6			2.1			4.4
		2.6			2.0			5.6			5.2
		2.5			5.3			5.8			2.2
		10.7			4.1			8.0			2.6
		2.7			2.5			4.9			15.5
		2.7			2.3			2.2			12.8
		2.3			2.2			2.4			4.2
		3.5			4.3			2.2			2.6
		2.5			2.7			2.2			2.1
		2.2			2.3			2.1			2.0
		2.3			7.0			4.3			4.1
		2.5			2.4			2.4			2.1
		2.9			3.0			2.9			
		2.6			3.3			3.2			
		2.6			2.0			4.7			
		2.5			2.2			5.0			
		2.2			2.2			2.3			
		2.1			2.2			2.2			

B. Down-regulated

Gene name	Accession #	BZF
		0.49
		0.47
		0.47
		0.42
		0.17
		0.30
		0.38
		0.44
		0.48
		0.41
		0.49
		0.45
		0.50
		0.49
		0.34
		0.47
		0.46
		0.19
		0.31
		0.46
		0.44
		0.47
		0.48
		0.50
		0.46

Gene name	Accession #	BZF
		0.36
		0.46
		0.43
		0.43
		0.43
		0.44
		0.44
		0.44
		0.45
		0.45
		0.46
		0.46
		0.32
		0.48
		0.49
		0.49
		0.44
		0.28
		0.43
		0.47
		0.43
		0.44
		0.45
		0.46

Gene name	Accession #	BZF
		0.46
		0.47
		0.48
		0.48
		0.48
		0.49
		0.48
		0.41
		0.47
		0.43
		0.45
		0.38
		0.47
		0.34
		0.34
		0.22
		0.44
		0.42
		0.40
		0.34
		0.29
		0.37
		0.44
		0.48
		0.49

Gene name	Accession #	BZF
		0.40
		0.37
		0.39
		0.40
		0.46
		0.44
		0.50
		0.48
		0.49
		0.49
		0.48
		0.44
		0.28
		0.31
		0.33
		0.34
		0.35
		0.35
		0.35
		0.36
		0.49
		0.48
		0.42

数値は変化倍率を表す。

6. 今後の展望と課題

今回の調査研究では、Fig. 1の仮説に基づき、肝発がん性及び非発がん性農薬を試験化合物として用いることで、CAR 及び PPAR α が介在する肝発がんに関連する遺伝子群を多数同定できた。特に、CAR 又は PPAR α 依存的な肝発がん標的候補遺伝子として同定した遺伝子群はほとんどオーバーラップしておらず、CAR と PPAR α がラットにおいては異なる機序により肝発がんを引き起こす可能性が示された。本研究で同定した遺伝子群は、CAR や PPAR α 依存的な肝発がんの分子機序の解明や予測評価系の構築に有用と思われる。

しかしながら、今年度の研究により、本調査研究における作業仮説を実験的に証明するには、多くの課題と解決すべき問題点があることが明らかになった。

第1に、今回は当研究室で過去に構築していた農薬評価書データベースから肝がんを誘発する農薬を選出したが、その数は19農薬に過ぎず、2年間反復投与毒性試験データがある174農薬の11%である。この数は当初は十分であると考えていたが、後述のようにスクリーニングを行うには十分とは言えないことが明らかとなった。したがって、肝発がん陽性のスクリーニング物質を多く準備することができるよう、比較的最近の農薬評価書のデータを参照すること、また他の発がん性データベース等を利用することなどが必要と考えられた。

さらに、発がん性陽性物質のレポーターアッセイ及びラット肝細胞を用いた遺伝子発現解析の結果、PPAR α を強く活性化する農薬は存在せず、また CAR 活性化物質もそれほど多くないことが明らかになった。特に CAR に関しては、レポーターアッセイで陽性であっても、遺伝子発現解析では陽性を示さない農薬も存在したこと、また農薬評価書で CYP2B 誘導が起こることが推測されても CAR レポーターアッセイでは陰性となった農薬も存在した。これらの結果は、代謝による親化合物の構造変換が被験農薬の CAR 活性化作用に影響を及ぼしている可能性を示している。当研究室では、S9代謝を考慮したレポーターアッセイ系を構築しており(論文投稿準備中)、今後はこれらの試験系を利用して代謝の影響を考慮したスクリーニングを行う必要がある。あるいは、コストと時間を要するが、ラット肝細胞やラット個体を用いて遺伝子探索前のスクリーニングを行う必要があると考えられる。

今回の調査研究では、研究期間が短いこと、また、動物実験に使用可能な量の農薬を入手可能か否か不明であったことから、ラット肝細胞を利用した CAR 又は PPAR α による肝発がん関連遺伝子の探索を行った。これら核内受容体を介した肝発がんの機序は現時点で不明であるが、肝実質細胞以外の肝臓内の細胞(Kupffer 細胞などの非実質細胞)が関与するのであれば、ラット個体を用いたスクリーニングや肝細胞と非実質細胞(Kupffer 細胞等)の共培養系を用いた遺伝子探索が必要かもしれない。

以上のような課題はあるが、本研究ではこれまでの発がん性予測手法とは異なり、機序に基づいて被験物質を探索することで新規発がん性予測システムの確立を目指して研究を行い、作業仮説に基づいた遺伝子探索が可能であることを明らかにすることができた。今回の成果は、これまで確立されていない分子機序(MoA)を考慮した発がん性予測システムの構築に向けた貴重な知見を提供するものと期待され、研究を継続していきたいと考えている。

7. 調査結果の公表

今回マイクロアレイで得られた結果について、ラット肝細胞を用いた遺伝子発現解析試験で検証すると共に、上記6. 今後の課題で述べたように、マイクロアレイ解析に付することができる化学物質を増やして、今回の標的候補遺伝子の妥当性を検証する。これらの検証が終了後、国内の関連学会（日本毒性学会、日本動物実験代替法学会等）の学術大会で報告してディスカッションを重ねた上で、学術論文として投稿する予定である。

8. 参考文献

D Gusenleitner, SS Auerbach, T Melia, HF Go´mez, DH Sherr, S Monti. Genomic models of short-term exposure accurately predict long-term chemical carcinogenicity and identify putative mechanisms of action. *PLoS One* 9, e102579, 2014.

JM Peters, RC Cattley, FJ Gonzalez. Role of PPAR α in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 18: 2029, 1997.

T Uehara, M Hirode, A Ono, N Kiyosawa, K Omura, T Shimizu, Y Mizukawa, T Miyagishima, T Nagaoa, T Urushidani. A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology* 250:15, 2008.

Y Yamamoto, R Moore, TL Goldsworthy, M Negishi, RR. Maronpot. The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res* 64: 7197, 2004.