

令和5年度経済産業省化学物質規制対策  
「大学・公的研究機関と連携した化学物質管理高度化推進事業  
(非遺伝毒性肝発がん性の核内受容体活性化プロファイルに基づく  
評価の有用性検討)」  
報告書

令和6年3月  
静岡県公立大学法人

## 目次

1. 概要	2
2. 目的	2
3. 実施内容	3
4. 実施体制	3
5. 実験材料及び実験操作	4
5.1. 培養細胞を用いたレポーターアッセイ	4
5.2. 哺乳動物ワンハイブリッドアッセイ	4
5.3. ラット初代培養肝細胞の播種及び薬物処置	4
5.4. 総 RNA 抽出、cDNA 合成及び定量的 PCR	4
5.5. 多項目同時解析装置を用いた mRNA レベルの測定	5
6. 結果及び考察	6
6.1. ラット AHR 活性化評価系	6
6.2. ラット PPAR $\alpha$ 活性化評価系	6
6.3. ラット CAR 活性化評価系の構築	7
6.4. ラット CAR 活性化評価系を用いたラット CAR 活性化評価	9
6.5. 被験物質の核内受容体活性化作用	10
6.6. Open TG Gate を用いた各核内受容体活性化依存的な肝発がんにおける 肝がん特異的に変動する遺伝子の探索	14
6.7. 各核内受容体活性化陽性の肝発がん陽性化合物を用いた ROC 解析	16
6.8. 核内受容体 CAR 依存的な肝細胞増殖誘導メカニズムの解明 (GADD45 $\beta$ 発現増加に注目した解析)	24
7. 成果のまとめと今後の展望	28

## 1. 概要

本研究では、非遺伝毒性肝発がん性化学物質を核内受容体 CAR、PPAR $\alpha$  及び AHR の活性化に基づいて分類し、さらに各核内受容体依存的な肝発がんにおける遺伝子発現変動の結果を利用して、肝発がんプロモーション作用の AOP の理解と、発がん性試験で認められる肝がんをインビトロで予測可能なマーカー遺伝子の同定を目指した。遺伝子発現情報のデータベース Open TG gate のラット初代肝細胞およびラット反復投与試験の肝の遺伝子発現結果から、CAR、PPAR $\alpha$ 、AHR 活性化物質を選定した。これら化学物質を文献調査に基づき、肝発がん陽性物質と陰性物質に分類し、ラット 28 日間反復投与試験の肝の遺伝子発現データを用いて ROC 解析を行い、曲線下面積 (AUC) の高値であった遺伝子を得た。

他方、本研究では各核内受容体の活性化評価系を確立し、ラットにおける肝発がん陽性物質を用いて核内受容体活性化評価を行った。その結果、肝発がん陽性物質の約 8 割が CAR 活性化物質であった。CAR 活性化依存的な肝発がんの毒性発現経路 (AOP) の解明が、多種多様な化学肝発がんの予測に有用であると考えられたため、本研究ではさらに、CAR 活性化依存的な肝発がんの AOP 解明も目標とした。その結果、CAR 活性化依存的な細胞周期の G1/S 移行に関わる因子 GADD45 $\beta$  の発現増加を見出し、さらに CAR による GADD45 $\beta$  の転写調節機序の一端を解明した。

## 2. 目的

現在、医薬品、食品添加物、農薬、化粧品などの新規化学物質のヒトでの安全性評価は、反復投与毒性試験などの動物実験の結果をもとに評価される。発がん性試験は、1.5~2 年間にわたって実験動物に化学物質を投与し、その物質が発がん性を有するか否かを判断する毒性試験である。現在もなお、医薬品開発においては主にラットに被験物質を 1~2 年間投与する方法が標準的に用いられている。そのため動物愛護や動物福祉、開発の経費削減や効率化の観点から早期に発がん性試験結果を予測できる手法及び動物実験代替法の開発が望まれている。

化学物質による発がん性には遺伝毒性 (発がんイニシエーション) 及び非遺伝毒性 (発がんプロモーション) が存在する。発がんイニシエーション作用は Ames 試験等の動物実験代替法による評価が可能であるが、発がんプロモーション作用はその機序の多様さ、複雑さから簡便な評価法が存在しないため、2 年間の発がん性試験により初めて評価されている。近年、代替法の試験結果の妥当性や透明性を担保するため、動物実験代替法の開発においては、毒性の分子機序 (Mode of Action : MOA) 及び毒性発現経路 (Adverse Outcome Pathway : AOP) に基づいた試験系の開発が重要視されている。

本研究では、げっ歯類における発がんプロモーション作用を介した肝発がんの Molecular Initiating Events (MIEs) として同定されている異物応答性核内受容体である Constitutive androstane receptor (CAR) 、 Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) 及び Aryl hydrocarbon receptor (AHR) に着目し、これら受容体の活性化を用いた評価により肝がんの予測が可能ではないかと考え、評価の有用性を明らかにすることを目的とした。

他方、非遺伝毒性肝発がん物質において、肝発がんプロモーション作用を示す AHR、PPAR $\alpha$  及び CAR、肝発がんプロモーション作用を増強する PXR の活性化作用を体系的に評価することで、肝発がん作用と核内受容体活性化作用との関連性を明らかにすることが出来ると考えられる。当研究室では、培養細胞を用いたレポーターアッセイによるラット AHR 活性化評価系及び哺乳動物ワンハイブリッドアッセイによるラット PXR 及びラット PPAR $\alpha$  活性化評価系を確立している。しかし、ラット CAR 活性化を予測するインビトロ評価系は確立されていいため、ラット CAR 活性化評価系を構築し、構築したラット CAR 活

性化評価系、ラット AHR 活性化評価系及びラット PPAR $\alpha$  活性化評価系を用い、非遺伝毒性肝発がんを誘発する物質について CAR、AHR 及び PPAR $\alpha$  の核内受容体の活性化評価を行い、各転写因子の活性化プロファイルで分類することで、核内受容体による毒性の影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 実施内容

公共遺伝子発現データベースの Open TG gate を利用してラット 28 日間反復投与試験の肝遺伝子発現変動情報を取得し、CAR、PPAR $\alpha$  及び AHR 活性化作用に基づいて化学物質をグループ化する。各グループの化学物質について、各受容体の標的遺伝子の発現誘導情報とともに、肝発がん陽性物質特異的に変動する遺伝子セットを得る。これにより、28 日間反復投与試験結果から、肝がんが発現するか否かを推測可能なマーカー遺伝子セットを同定する。

次に、2 年間ラット発がん性試験における肝発がん性の有無が報告されている農薬を対象として、3 種の核内受容体活性作用を評価する。PPAR $\alpha$  及び AHR は、ラット PPAR $\alpha$  及びラット AHR 発現プラスミドとそれぞれの応答配列を用いたレポーターアッセイにより評価する。ラット CAR の活性化評価は、レポーターアッセイでは困難であるため、ラット CAR 活性化評価系を確立し各受容体活性化評価する。

### 4. 実施体制

志津怜太（静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野・講師）  
担当：研究計画、データの取得・解析

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：アドバイザー

学部学生 2 名、研究補助員 1 名

## 5. 実験材料及び実験操作

### 5.1. 培養細胞を用いたレポーターアッセイ

96-well plate に H4IIE 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM 条件で  $1.5 \times 10^4$  cell/well で播種した。24 時間後に遺伝子導入を行った。遺伝子導入は Lipofectamine 3000 Transfection Reagent

(Thermo Fisher Scientific) を用いたリポフェクション法を用いた。遺伝子導入の 24 時間後にアルテミシニン (10、100  $\mu$ M) 及びクロトリマゾール (0.1、1  $\mu$ M) を添加し、その 24 時間後に 1xPassive Lysis Buffer (Promega) を 50  $\mu$ L/well 添加し、細胞溶解液とした。酵素反応の基質には Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega) を用い、GloMax Navigator System (Promega) を用いて Firefly ルシフェラーゼ活性及び *Renilla* ルシフェラーゼ活性を測定した。

### 5.2. 哺乳動物ワンハイブリッドアッセイ

96-well plate に COS1 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM 条件で  $1.5 \times 10^4$  cell/well で播種した。Lipofectamine 3000 を用いたリポフェクション法により遺伝子導入を行った。導入したプラスミドは、PPAR $\alpha$  リガンド結合領域 (LBD) と酵母由来の転写因子 GAL4 の DNA 結合領域 (DBD) を結合させたキメラタンパク質の発現プラスミドを使用した。

### 5.3. ラット初代培養肝細胞の播種及び薬物処置

雄性 SD ラット (6.4 週齢) 又は雄性 Wistar ラット (7 週齢) から standard methods によって調製されたラット初代培養肝細胞 (Batch:HEP134046 または 137007) をコラーゲンコートされた 24-well plate に  $2.0 \times 10^5$  cell/well で播種した。24 時間後に 0.1 及び 1 mM フェノバルビタール、10  $\mu$ M アルテミシニン及び 1  $\mu$ M クロトリマゾールを添加した。

### 5.4. 総 RNA 抽出、cDNA 合成及び定量的 PCR

薬物処置 24 時間後に ReliaPrep<sup>TM</sup> RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いて総 RNA 抽出を行った。cDNA 合成は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems<sup>TM</sup>) を使用し、37°C で 120 分間インキュベーションし、逆転写反応を行った。定量的 PCR には Go Taq qPCR Master Mix (Promega) を使用し、StepOnePlus (Applied Biosystems<sup>TM</sup>) を用いて行った。反応は、95°C で 2 分間処理後、変性を 95°C で 15 秒間、アニーリングおよび伸長反応を 60°C で 1 分間とし、これを 40 サイクル行った。核内受容体 CAR の標的遺伝子 *Cyp2b1* の mRNA レベルを測定し、*Actb* mRNA レベルで補正した。

### 5.5. 多項目同時解析装置を用いた mRNA レベルの測定

薬物処置 24 時間後に、細胞に Lysis buffer を添加し 37°C で 30 分インキュベーションし細胞溶解液を得た。96well プレートにて、Working Bead Mix 20  $\mu$ L と細胞溶解液 80  $\mu$ L を混合し、600 rpm、20 時間、54°C $\pm$ 1°C で振とうした。振とう終了後、全量を Magnetic Separation Plate に移し、Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 分間静置して溶液をデカンテーションで除去した。1 $\times$ Wash Buffer を 100  $\mu$ L ずつ加え、15 秒間静置後、デカンテーションを除去した。これを 3 回繰り返した。その後、Pre-Amplifier Solution を 100  $\mu$ L ずつ添加し、600 rpm、1 時間、50°C $\pm$ 1°C で振とうした。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 $\times$ Wash Buffer で 3 回洗浄した。Amplifier Solution を 100  $\mu$ L ずつ添加し、600 rpm、1 時間、50°C $\pm$ 1°C で振とうした。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 $\times$ Wash Buffer で 3 回洗浄した。Label Probe Solution を 100  $\mu$ L ずつ添加し 600 rpm、1 時間、50°C $\pm$ 1°C で振とうした。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け 1 $\times$ Wash Buffer で 3 回洗浄した。SAPE Working Reagent を 100  $\mu$ L ずつ添加して、600 rpm、30 分間、室温で振とうした。Handheld Magnetic Plate Washer に取り付け SAPE Wash Buffer で 3 回洗浄した。MAGPIX (Luminex)を用いて *cyp2b1*、*Cyp3a1*、*Cyp4a1*、*Hprt1* の mRNA レベルを測定した。

## 6. 結果及び考察

### 6.1. ラット AHR 活性化評価系

ラット AHR 活性化作用評価は、ラット肝がん由来 H4IIE 細胞を用いたレポーターアッセイによって評価した。ラット *Acox1* 遺伝子プロモーターの AHR 応答配列である XRE の 3 回連続配列と、TK プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド (3xXRE-TK-pGL4.10) を遺伝子導入し、溶媒 (0.1%DMSO)、AHR 活性化物質である 3-methylcholanthrene (3-MC) を濃度 3 点 (0.01  $\mu$ M、0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M) で処置し、24 時間後のレポーター活性を測定した。3-MC での濃度依存的なレポーター活性の増加が認められた (Fig. 1)。

### 6.2. ラット PPAR $\alpha$ 活性化評価系

ラット PXR 及びラット PPAR $\alpha$  活性化作用評価は、核内受容体活性化における細胞内因性の他の転写因子の影響を排除するために、リガンド依存的な活性化をより感度良く評価可能な哺乳動物細胞ワンハイブリッドアッセイを用いて評価を行った。核内受容体リガンド結合領域 (LBD) と酵母由来の転写因子 GA4 の DNA 結合領域 (DBD) を結合させたキメラタンパク質の発現プラスミド (ラット PXR-pFN26A またはラット PPAR $\alpha$ -pFN26A)、並びにルシフェラーゼレポータープラスミドをヒト肝がん由来 HepG2 細胞に導入し、溶媒 (0.1% DMSO)、PPAR $\alpha$  活性化物質である bezafibrate (BZF) (1、10、100  $\mu$ M) を処置し、24 時間後のレポーター活性を測定した。BZF での濃度依存的なレポーター活性の増加が認められた (Fig. 2)。

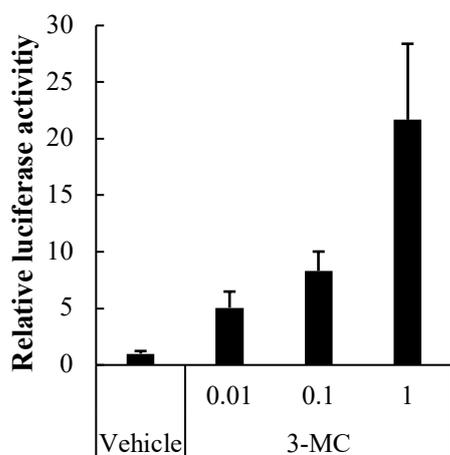


Fig. 1 ラット AHR のレポーターアッセイ

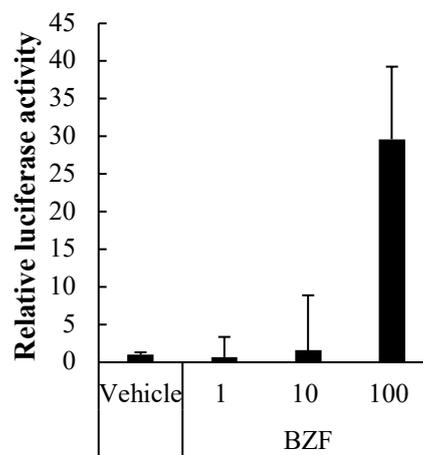


Fig. 2 ラット PPAR $\alpha$  の哺乳動物細胞ワンハイブリッドアッセイ

### 6.3. ラット CAR 活性化評価系の構築

培養細胞に一過性に発現させたラット CAR は恒常的活性化状態であり、リガンド非存在化においてもその転写を誘導してしまう。不死化培養細胞である COS-1 細胞にラット CAR を発現させたところ、レポーター活性値は上昇し、ラット CAR 活性化物質である Artemisinin (Art) あるいは Clotrimazole (CLZ) の処置によるレポーター活性値の上昇は認められなかった (Fig. 3)。すなわち、既存の培養細胞を用いたラット CAR のレポーターアッセイ系では、リガンド依存的な CAR 活性化を評価することは困難である。そこで、ラット CAR の活性化により誘導される標的遺伝子 *Cyp2b1* の mRNA レベルの増加を調べることで CAR 活性化の評価を行った。SD ラット及び Wistar ラットの初代肝細胞に CAR 活性化薬 phenobarbital 及び artemisinin を処置し、*Cyp2b1* mRNA レベルの増加を調べ、両細胞で明らかな *Cyp2b1* mRNA レベルの増加を確認した (Fig. 4)。したがって本手法で CAR 活性化を評価可能であると思われた。

定量的逆転写 PCR 法を用いた mRNA レベルの解析は、RNA 抽出、逆転写、特異的プライマーの設計、リアルタイム PCR と手技が煩雑であり、スループット性が著しく低い。そこで、*Cyp2b1* mRNA に対する特異的プローブと蛍光ビーズを用いたタンパク質/遺伝子多項目同時解析装置 (MAGPIX) を用いて *Cyp2b1* mRNA レベルを測定した。ラット CAR 活性化薬を処置したラット初代培養肝細胞において *Cyp2b1* の mRNA レベルの増加を確認した (Fig 5)。

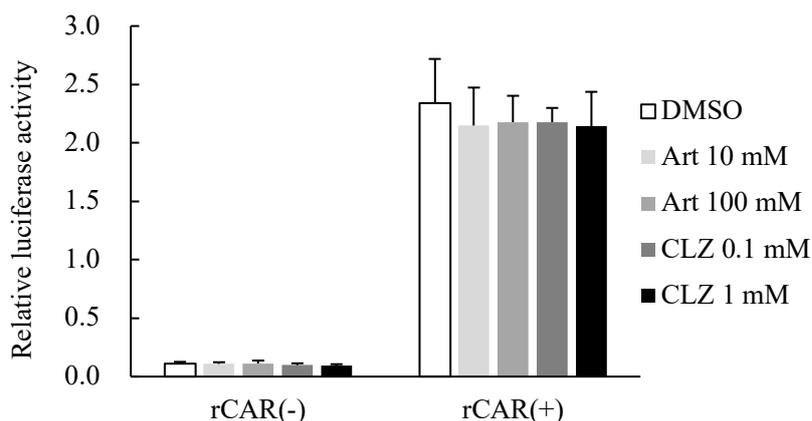
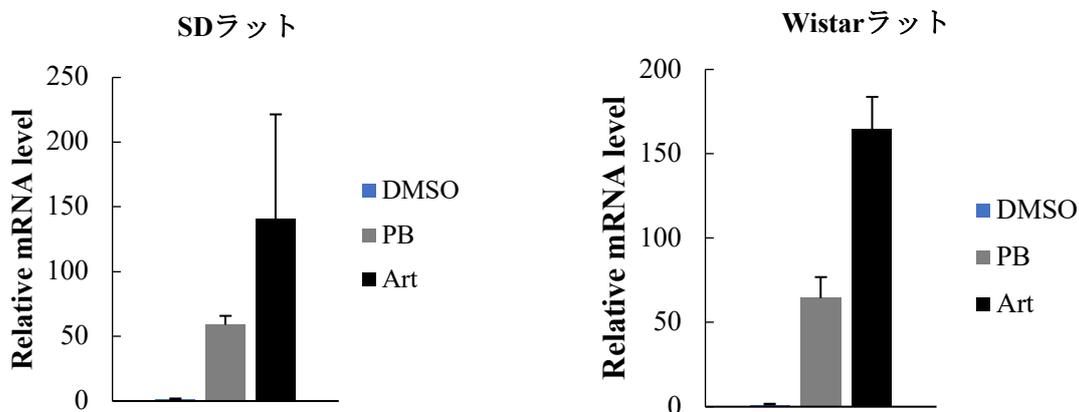


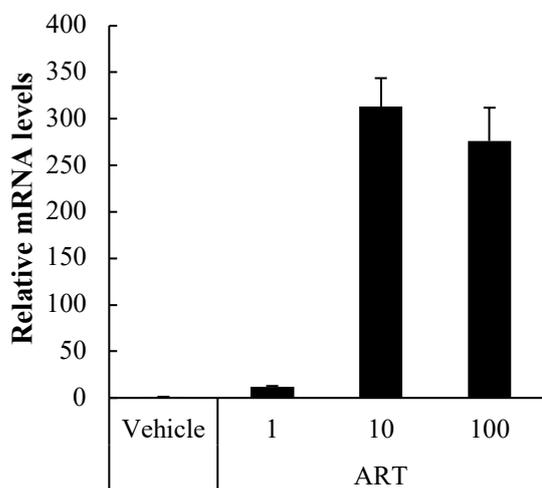
Fig. 3. 培養細胞を用いたラット CAR 活性化物質処置時のレポーターアッセイ

96-well plate に COS-1 細胞を 10%FCS 含有 D-MEM 条件で  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、発現プラスミド及びレポータープラスミドを導入し、その 24 時間後にラット CAR 活性化物質である Clotrimazole (CLZ) 及び Artemisinin (Art) を処置しレポーター活性を調べた。



**Fig. 4. SD ラット (左) 及び Wistar ラット (右) を用いた *Cyp2b1* mRNA レベルの測定**

SD 又は Wistar ラット初代培養肝細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間後にラット CAR 活性化物質である Phenobarbital (PB)、Artemisinin (Art) を処置した。24 時間後に RNA を回収し qRT-PCR 法により、*Cyp2b1* の mRNA レベルの測定を行った。*Actb* をハウスキーピング遺伝子として溶媒対照群の mRNA レベルを 1 とした相対的な *Cyp2b1* の mRNA レベルを算出した。



**Fig. 5. タンパク質/遺伝子多項目同時解析装置 (を用いたラット CAR 活性化評価)**

ラット初代培養肝細胞を播種し、rCAR 活性化薬物である Artemisinin (0.1、1 または 10  $\mu$ M) を処置した 24 時間後に *Cyp2b1* の mRNA レベルをタンパク質/遺伝子多項目同時解析装置を用いて測定した。溶媒対照群を 1 とした相対 mRNA レベルを示した。

#### 6.4. ラット CAR 活性化評価系を用いたラット CAR 活性化評価

ラット初代培養肝細胞の RNA を用いた CAR 活性化の評価において、*Cyp2b1* は CAR だけでなく、PXR 及び PPAR $\alpha$  の活性化によっても誘導されることから、これらによる CAR の CAR 活性化の偽陽性を考慮し、ラット初代培養肝細胞に CAR 活性化薬である phenobarbital 及び Artemisinin、PXR 活性化薬である PCN 及び PPAR $\alpha$  活性化薬である bezafibrate を処置し、ハウスキーピング遺伝子の *Hprt1* とラット CAR 標的遺伝子 *Cyp2b1* に加え、ラット PXR 標的遺伝子の *Cyp3a1* 及びラット PPAR $\alpha$  の標的遺伝子の *Cyp4a1* を同時に測定した。Table 1 に結果を示す。以上の解析により得られた結果から、PXR 及び PPAR $\alpha$  活性化の影響を除外した純粋なラット CAR 活性化薬の条件として、①*Cyp2b1* の mRNA レベルが 1.5 倍以上を示したものの、②*Cyp2b1/cyp3a1* の値が 1 以上を示したものの、③*Cyp4a1* が 1.5 倍以上増加していないものを満たすものとした。

Table 1. ラット CAR 活性化評価

No.	Name	<i>Cyp2b1</i>	<i>Cyp3a1</i>	<i>Cyp2b1</i> / <i>Cyp3a1</i>	<i>Cyp4a1</i>	CAR 活性化 の判定
	phenobarbital	38.5 ± 12.3	3.4 ± 0.2	11.4	0.6 ± 0.0	1
	Artemisinin	114.1 ± 14.5	10.3 ± 4.0	11.9	0.8 ± 0.1	1
	PCN	1.3 ± 0.2	8.0 ± 2.2	0.2	0.6 ± 0.1	
	bezafibrate	29.0 ± 2.7	2.5 ± 0.5	11.93	79.6 ± 8.5	

溶媒対照群に対する倍率を示す。CAR 活性化の判定 1 は CAR 活性化陽性と判断された。1.5 倍以上の陽性判断基準を満たした値を網掛けで示す。

## 6.5. 被験物質の核内受容体活性化作用

食品安全委員会で公開されている 383 農薬の農薬評価書からラット 2 年間慢性毒性試験・発がん性併合試験において、肝細胞腺腫または肝細胞癌を示す農薬数は全 40 種であった。これらの農薬のうち、入手可能であった 32 種を被験物質とした。被験物質は DMSO を溶媒として 100  $\mu\text{M}$  に調製した。シヘキサチン及びメタアルデヒドは DMSO への溶解性が低いため、シヘキサチンはエタノールを溶媒として 100  $\mu\text{M}$  に調製、メタアルデヒドは DMSO を溶媒として 10  $\mu\text{M}$  に調製した。以上より、35 種の被験物質のうち、5 種がラット AHR 活性化作用を、2 種がラット PPAR $\alpha$  活性化作用を、18 種がラット CAR 活性化作用を示した。また、いずれの核内受容体も活性化しなかった物質は 2 種であった。肝がん陰性農薬 94 種も同様に調べたところ、CAR 活性化陽性と肝がん陽性の Fisher の正確確立検定の p 値は 0.038 と関連性が認められた。これらの結果から、非遺伝毒性肝発がん物質による非遺伝毒性肝がんを引き起こす農薬は、多くがラット CAR 活性化作用を有し、CAR 活性化と肝発がんとの関連性が示された。

**Table 2. 本試験で使用した肝発がん誘発性農薬**

No.	試薬名	販売元
1	1,3-dichloropropene	東京化成工業
2	acetochlor	富士フィルム和光純薬工業
3	ametryn	富士フィルム和光純薬工業
4	amisulbrom	富士フィルム和光純薬工業
5	benfluralin	富士フィルム和光純薬工業
6	benthiavalicarb-isopropyl	富士フィルム和光純薬工業
7	carbaryl	富士フィルム和光純薬工業
8	cyclanilide	富士フィルム和光純薬工業
9	cyhexatin	富士フィルム和光純薬工業
10	dichlobenil	富士フィルム和光純薬工業
11	fluacrypyrim	富士フィルム和光純薬工業
12	fluopyram	富士フィルム和光純薬工業
13	flupyrimin	富士フィルム和光純薬工業
14	fluxapyroxad	富士フィルム和光純薬工業
15	isopyrazam	富士フィルム和光純薬工業
16	isoxaflutole	富士フィルム和光純薬工業
17	kresoxim-methyl	富士フィルム和光純薬工業
18	mepanipyrim	富士フィルム和光純薬工業
19	metaldehyde	富士フィルム和光純薬工業
20	metolachlor	富士フィルム和光純薬工業
21	metominostrobin	富士フィルム和光純薬工業
22	oxadiazon	富士フィルム和光純薬工業
23	oxaziclomefone	富士フィルム和光純薬工業
24	propyzamide	富士フィルム和光純薬工業
25	pymetrozine	富士フィルム和光純薬工業
26	pyraziflumid	富士フィルム和光純薬工業
27	pyriminobac-methyl	富士フィルム和光純薬工業
28	quizalofop P tefuryl	富士フィルム和光純薬工業
29	simeconazole	富士フィルム和光純薬工業
30	sulfoxaflor	関東化学工業
31	tebufenpyrad	富士フィルム和光純薬工業
32	tepraloxydim	富士フィルム和光純薬工業

**Table 3. ラット PPAR $\alpha$  活性化評価の結果**

No.	試薬名	AHR 活性化	PPAR $\alpha$ 活性化
1	1,3-dichloropropene	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3
2	acetochlor	1.8 $\pm$ 0.3	ND
3	ametryn	0.8 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
4	amisulbrom	ND	ND
5	benfluralin	1.1 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.5
6	benthiavalicarb-isopropyl	0.9 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1
7	carbaryl	4.3 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.4
8	cyclanilide	3.0 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.8
9	cyhexatin	ND	ND
10	dichlobenil	1.1 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3
11	fluacrypyrim	ND	0.9 $\pm$ 0.3
12	fluopyram	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.3
13	flupyrimin	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2
14	fluxapyroxad	0.6 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2
15	isopyrazam	ND	0.8 $\pm$ 0.3
16	isoxaflutole	0.8 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1
17	kresoxim-methyl	ND	1.2 $\pm$ 0.5
18	mepanipyrim	14.4 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.3
19	metaldehyde	1.2 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1
20	metolachlor	1.4 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.6
21	metominostrobin	ND	0.6 $\pm$ 0.2
22	oxadiazon	1.4 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 1.0
23	oxaziclomefone	1.0 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.3
24	propyzamide	0.7 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2
25	pymetrozine	1.0 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1
26	pyraziflumid	2.5 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.2
27	pyriminobac-methyl	0.8 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1
28	quizalofop P tefuryl	1.1 $\pm$ 0.1	21.2 $\pm$ 7.7
29	simeconazole	0.7 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
30	sulfoxaflor	0.9 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.3
31	tebufenpyrad	ND	ND
32	tepraloxydim	1.2 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1

溶媒対照群に対する倍率を示す。ND は細胞毒性により測定不能であった。2 倍以上の陽性判断基準を満たした値を網掛けで示す。

**Table 4. ラット CAR 活性化評価**

No.	Name	<i>Cyp2b1</i>	<i>Cyp3a1</i>	<i>Cyp2b1</i> / <i>Cyp3a1</i>	<i>Cyp4a1</i>	CAR 活性化の判定
1	1,3-dichloropropene	1.1 ± 0.8	0.9 ± 0.2	1.2	0.5 ± 0.1	
2	acetochlor	ND	ND	-	ND	
3	ametryn	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.3	0.9 ± 0.1	
4	amisulbrom	ND	ND	-	ND	
5	benfluralin	23.9 ± 3.4	8.9 ± 1.2	2.7	0.8 ± 0.1	1
6	benthiavalicarb isopropyl	4.2 ± 0.1	8.0 ± 1.8	0.5	0.5 ± 0.0	
7	carbaryl	276.7 ± 39	2.9 ± 0.2	96.9	1.2 ± 0.1	1
8	cyclanilide	6.0 ± 0.7	1.5 ± 0.2	4.0	5.1 ± 0.8	
9	cyhexatin	ND	ND	-	ND	
10	dichlobenil	7.7 ± 1.9	2.1 ± 0.8	3.9	0.9 ± 0.1	1
11	fluacrypyrim	ND	ND	-	ND	
12	Fluopyram	33.0 ± 13.5	8.5 ± 0.9	4.0	1.1 ± 0.1	1
13	flupyrimin	136.2 ± 64	6.1 ± 2.3	21.9	0.8 ± 0.0	1
14	fluxapyroxad	9.7 ± 4.7	8.0 ± 2.2	1.3	0.7 ± 0.1	1
15	isopyrazam	3.0 ± 4.0	7.0 ± 2.8	0.3	0.5 ± 0.3	
16	isoxaflutole	41.6 ± 11	1.7 ± 0.2	24.6	0.9 ± 0.1	1
17	kresoxim methyl	15.7 ± 2.2	2.5 ± 0.3	6.5	1.1 ± 0.0	1
18	mepanipyrim	0.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.2	0.3 ± 0.0	
19	metaldehyde	2.1 ± 0.5	0.9 ± 0.1	2.3	1.1 ± 0.0	1
20	metolachlor	0.7 ± 0.1	2.6 ± 0.2	0.3	0.4 ± 0.1	
21	metominostrobin	1.1 ± 0.2	3.5 ± 0.7	0.3	0.7 ± 0.2	
22	oxadiazon	1.9 ± 0.3	10.5 ± 3.0	0.2	0.8 ± 0.2	
23	oxaziclomefone	25.3 ± 2.9	14.1 ± 4.6	2.0	0.8 ± 0.0	1
24	propyzamide	8.8 ± 2.6	8.8 ± 2.3	1.0	1.0 ± 0.2	1
25	pymetrozine	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.7	1.0 ± 0.2	
26	pyraziflumid	16.3 ± 2.0	11 ± 0.9	1.5	0.6 ± 0.0	1
27	pyriminobac methyl	17.2 ± 5.0	12.8 ± 6.8	1.5	0.8 ± 0.1	1
28	quizalofop P tefuryl	15.9 ± 4.0	1.6 ± 0.1	10	74.2 ± 6.3	
29	simeconazole	2.1 ± 0.8	8.0 ± 1.8	0.3	0.7 ± 0.2	
30	sulfoxaflor	6.5 ± 4.8	1.5 ± 0.2	4.4	0.8 ± 0.1	1
31	tebufenpyrad	ND	ND	-	ND	
32	tepraloxydim	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.0	1.8 ± 0.3	1

溶媒対照群の mRNA レベルを 1 とした相対値で示す。CAR 活性化の判定 1 は CAR 活性化陽性と判断された。陽性判断基準を満たした値を網掛けで示す。

## 6.6. Open TG Gate を用いた各核内受容体活性化依存的な肝発がんにおける、肝がん特異的に変動する遺伝子の探索

Open Toxicogenomics Project-Genomics Assisted Toxicity Evaluation system (Open TG-GATEs) は、官民共同プロジェクトである Toxicogenomics Project (TGP) 及び TGP2 の成果として公開されたトキシコゲノミクスデータベースである。肝及び腎障害を引き起こすことが知られている医薬品を中心に選定された 170 化合物をラット個体及びヒト・ラット肝細胞に曝露させた際の DNA マイクロアレイ解析データを収載している。さらに、ラット個体で観測された生化学及び病理所見を収載しており、遺伝子発現変動情報と個体で生じた毒性情報とを紐つけることが可能である。化学物質間の比較だけでなく、ヒトとラットのデータを比較して種特異性の研究や、ラット個体とラット肝細胞のデータを比較してインビボとインビトロの橋渡しなど、様々な用途に利用できるデータベースである。タイムポイントの異なるデータも豊富に取り揃えており、反復投与試験では、3 用量の 3 日、7 日、14 日及び 28 日間投与での DNA マイクロアレイデータを収載している。本研究ではラット 28 日間反復投与時の肝、及びラット初代肝細胞 2、8、24 時間処置時における DNA マイクロアレイデータが存在する 150 物質を対象とし (Table 5)、CAR 及び PPAR $\alpha$  及び AHR 活性化作用を有する物質の選出、各活性化物質について肝発がん性の有無による遺伝子発現変動の解析から、肝発がん特異的に変動する遺伝子群の同定を目的とした。本研究では ROC 解析によりラット 28 日間反復投与試験における肝マイクロアレイデータを用いて肝発がん性及び非肝発がん性を分類した。Open TG-GATEs に収載されている肝発がん物質 23 種類、及び非肝発がん物質 127 種類のラット 28 日間反復投与時の肝マイクロアレイデータを用いた ROC 解析の結果、肝発がん性物質及び非発がん性物質処置時の遺伝子発現変動倍率に差がある遺伝子の指標となる曲線化面積 (AUC) の最大値が 0.84 であった。

Table 5. 解析対象とした化合物

acarbose	cycloheximide	ketoconazole	ranitidine
acetamidofluorene	cyclophosphamide	labetalol	rifampicin
acetaminophen	cyclosporine A	lomustine	simvastatin
acetazolamide	danazol	lornoxicam	sulfasalazine
adapin	dantrolene	mefenamic acid	sulindac
ajmaline	diazepam	meloxicam	sulpiride
allopurinol	diclofenac	metformin	tacrine
allyl alcohol	diethyl maleate	methapyrilene	tamoxifen
amiodarone	diltiazem	methimazole	tannic acid
amitriptyline	disopyramide	methyldopa	terbinafine
aspirin	disulfiram	methyltestosterone	tetracycline
azathioprine	doxorubicin	mexiletine	theophylline
benzazac	enalapril	monocrotaline	thioacetamide
benzbromarone	erythromycin ethylsuccinate	moxisylyte	thioridazine
benziodarone	ethambutol	naphthyl isothiocyanate	ticlopidine
bromobenzene	ethanol	naproxen	tiopronin
bromoethylamine	ethinylestradiol	nicotinic acid	TNF $\alpha$
bucetin	ethionamide	nifedipine	tolbutamide
buthionine sulfoximine	ethionine	nimesulide	triamterene
caffeine	etoposide	nitrofurantoin	triazolam
captopril	famotidine	nitrofurazone	trimethadione
carbamazepine	fenofibrate	nitrosodiethylamine	tunicamycin
carbon tetrachloride	fluphenazine	omeprazole	valproic acid
carboplatin	flutamide	papaverine	vitamin A
cephalothin	furosemide	pemoline	WY-14643
chloramphenicol	galactosamine	penicillamine	1% cholesterol + 0.25% sodium cholate
chlormadinone	gemfibrozil	perhexiline	2,4-dinitrophenol
chlormezanone	gentamicin	phalloidin	acetamide
chlorpheniramine	glibenclamide	phenacetin	amphotericin B
chlorpromazine	griseofulvin	phenobarbital	butylated hydroxyanisole
chlorpropamide	haloperidol	phenylanthranilic acid	desmopressin acetate
cimetidine	hexachlorobenzene	phenylbutazone	fluoxetine hydrochloride
ciprofloxacin	hydroxyzine	phenytoin	methylene dianiline
cisplatin	ibuprofen	phorone	propranolol
clofibrate	imipramine	promethazine	rosiglitazone maleate
clomipramine	indomethacin	propylthiouracil	rotenone
colchicine	iproniazid	puromycin aminonucleoside	
coumarin	isoniazid	quinidine	

## 6.7. 各核内受容体活性化陽性の肝発がん陽性化合物を用いた ROC 解析

150 化合物のうち、核内受容体 CAR、PPAR $\alpha$  及び AHR 活性化の指標となる代表的な標的遺伝子の遺伝子発現変動データを用いて、両核内受容体活性化物質を抽出した。CAR 活性化物質の抽出条件は、代表的な標的遺伝子である *Cyp2b1* の発現変動倍率が底を 2 とした対数値 (Log2FC) で 0.75 以上増加していること、PPAR $\alpha$  の代表的な標的遺伝子である *Cyp4a1* の Log2FC の値が 0.75 以上増加していないこと、PXR の代表的な標的遺伝子である *Cyp3a1* の Log2FC の値が *Cyp2b1* の Log2FC の値を超えていないこととした。PPAR $\alpha$  活性化物質の抽出条件は、代表的な標的遺伝子である *Cyp4a1* の Log2FC の値が 0.75 以上増加していること、AHR 活性化物質の抽出条件は、代表的な標的遺伝子である *Cyp1a1* 及び *Cyp1a2* の Log2FC の値が 0.75 以上増加していることとした。

抽出した各核内受容体活性化物質を肝発がん性物質及び非肝発がん性物質に分類した。米国 NTP (National Toxicology Program) が公開する CPDB (The Carcinogenic Potency Database) においてラットで肝発がん性が認められた物質、米国ノースカロライナ州立大学が公開する CTD (The Comparative Toxicogenomics Database) 及び、その他文献調査において齧歯動物で肝発がんプロモーション作用が認められた物質を肝発がん物質と定めた。その結果、Table6 に示すように化合物が分類され、CAR 活性化物質は 11 物質 (肝発がん物質 6 種類、非肝発がん物質 5 種類)、PPAR $\alpha$  活性化物質は 15 物質 (肝発がん物質 7 種類、非肝発がん物質 8 種類) 及び AHR 活性化物質は 21 物質 (肝発がん物質 4 種類、非肝発がん物質 17 種類) を得た。

選定した両核内受容体肝発がん物質及び非肝発がん物質をラットに 28 日間反復投与した際の肝マイクロアレイデータを用いて、ROC 解析を行い、肝発がん物質及び非肝発がん物質処置時の遺伝子発現変動倍率に差がある遺伝子を探索した。各遺伝子の変動倍率 (連続変数) と肝がん陽性及び陰性の二分変数の関係の強さを曲線化面積 (AUC) から算出した。Cut-off 値の算出には Youden Index 法を用いて、AUC が 0.5 となる 45 度の直線から最も離れている点とした。ROC 解析の結果、CAR、PPAR $\alpha$  及び AHR 活性化物質で AUC が 0.9 以上であった遺伝子は、それぞれ 7 遺伝子、81 遺伝子及び 28 遺伝子で、0.8 以上であった遺伝子はそれぞれ 130 遺伝子、657 遺伝子及び 257 遺伝子であった。PPAR $\alpha$  及び AHR における AUC0.9 以上の遺伝子群で 5 遺伝子の重複が見られた。CAR における AUC が 0.9 以上の遺伝子群はいずれの核内受容体とも重複していなかった。

CAR 活性化物質において最も大きな AUC を示した遺伝子は、*Rif1* で、AUC は 0.981、カットオフ値は Log2FC が -0.24 であった。RIF1 はグアニン四重鎖を介して DNA に結合し、DNA 複製を広範囲に制御する因子として知られ、がん細胞の増殖との関連も示されている。また肝がんの増殖に不可欠な Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルにも関与する。CAR 活性化物質において抽出された遺伝子の特徴を調べるため、AUC が 0.8 以上であった 130 種の遺伝子を用いた GO エンリッチメント解析および KEGG 解析をおこなったが、特異テクに抽出された GO ターム、KEGG pathway は認められなかった ( $p < 0.01$ )。マンホイットニーの U 検定で肝発が

んと関連性が示された( $p < 0.01$ ) 141 遺伝子を用いた解析でも同様に抽出された GO ターム、KEGG pathway はなかった。PPAR $\alpha$  活性化物質で、最も大きな AUC を示した遺伝子は *Cidea* であり、AUC は 0.994、カットオフ値は 1.49 であった。*Cidea* は PPAR $\alpha$  の標的遺伝子である。*Cidea* 以外にも AUC 上位 10 遺伝子のうち 4 種が PPAR $\alpha$  標的遺伝子であったため、肝発がん性が PPAR $\alpha$  の活性化の強さにより評価されてしまっている可能性が考えられた。一方で、AUC が 0.979 であった *Pdcl3* はアポトーシス促進因子であり、PPAR $\alpha$  依存的な肝がんの予測に有用である可能性がある。AUC が 0.8 以上であった YY 種の遺伝子を用いた GO エンリッチメント解析および KEGG 解析をおこなった結果、PPAR $\alpha$  活性化関連の GO ターム、KEGG pathway が上位に認められた。AHR 活性化物質で、最も大きな AUC を示した遺伝子は *Grin2c* であり、AUC は 0.998、カットオフ値は 1.49 であった。一方で、各核内受容体活性化物質の中で、肝がん陽性物質及び陰性物質を（陽性陰性の比率を一定で）ランダムに分類し、各組み合わせにおいて ROC 解析を 50 万回繰り返し行なったが、もっとも AUC が高値であった条件においても ROC 解析による AUC が高値であった遺伝子の 0.97 以下であったため、本 ROC 解析において、CAR 活性化薬、PPAR $\alpha$  及び AHR 依存的な肝がんプロモーション作用のマーカー候補遺伝子群を得ることができたと考えられる。

Table 6. 解析対象とした核内受容体活性化物質一覧

	CAR	PPAR $\alpha$	AHR
肝発がん	acetamidofluorene	benzbromarone	acetamidofluorene
	hexachlorobenzene	clofibrate	hexachlorobenzene
	omeprazole	ethionine	omeprazole
	phenobarbital	fenofibrate	
	phenylbutazone	gemfibrozil	
	phenytoin	simvastatin WY-14643	
非肝発がん	chlormezanone	aspirin	bucetin
	sulindac	benziodarone	caffeine
	ticlopidine	enalapril	chlorpromazine
	tolbutamide	ibuprofen	cimetidine
	trimethadione	nitrofurazone	dantrolene
		phenylanthranilic acid	disulfiram
		sulfasalazine	isoniazid
		valproic acid	methimazole
			mexiletine
			nifedipine
			nitrofurantoin
			papaverine
			promethazine
			sulfasalazine
			sulindac
			tacrine
			terbinafine
		theophylline	

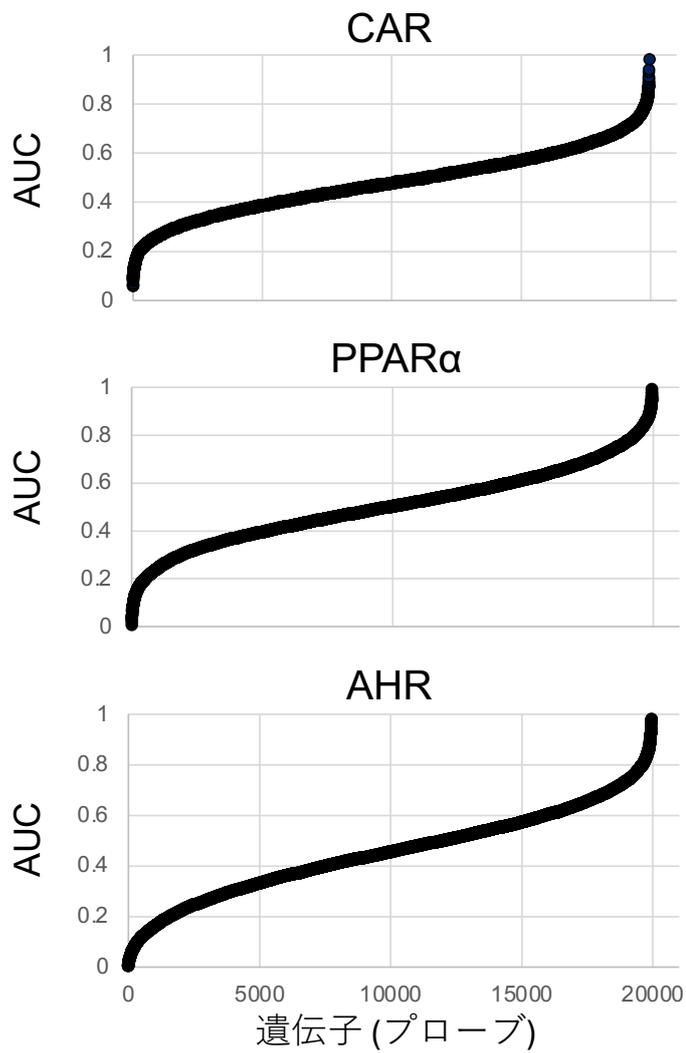


Fig. 6. 両核内受容体活性化肝発がん物質及び非肝発がん物質をラットに 28 日間反復投与した際の肝マイクロアレイデータを用いた ROC 解析の結果

**Table 7. CAR 活性化物質を用いた ROC 解析における肝発がん陽性関連遺伝子**

gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off
Rif1	0.981	-0.245	Appl1	0.837	0.290	Rnf113a2	0.811	-0.095
Zfp612	0.941	0.171	Tmem11	0.837	0.192	Aldh1a1	0.811	3.830
H4f16	0.930	-0.078	Mir351	0.837	-0.133	Slbp	0.811	0.028
Fam118b	0.911	0.134	Tox	0.837	-0.737	Neurod2	0.811	-0.236
Prlr	0.907	-0.474	Ctrc	0.837	0.155	Map6d1	0.811	0.541
Ppan	0.900	0.136	Efcab2	0.833	0.294	Zswim8	0.811	-0.091
Cemip	0.900	0.756	Gria3	0.833	0.028	Sema3c	0.811	0.413
Mapkapk3	0.889	0.262	Klk1c4	0.833	0.372	Kif2a	0.811	0.150
Smn1	0.889	0.150	Cyp3a23-3a1	0.833	0.508	Trmt61a	0.811	-0.006
Gpcpd1	0.885	-0.326	Relch	0.833	-0.335	Myog	0.811	0.085
Lgi1	0.885	1.114	Fxr2	0.830	-0.012	Cst6	0.811	0.767
Prlr	0.878	0.553	Tra2a	0.830	-0.101	Irx4	0.811	0.067
Wee1	0.874	0.096	Trps1	0.830	0.224	Sftpa1	0.807	-0.201
RGD1306556	0.874	0.211	Sfswap	0.830	-0.076	Pde7a	0.807	-0.006
Brf2	0.874	0.090	Unc5b	0.830	-0.132	Usp1	0.807	-0.066
Rnf208	0.874	0.331	Acs15	0.826	-0.017	Tedc1	0.807	0.212
Fam76a	0.870	0.131	Apba1	0.826	0.635	Lef1	0.807	0.162
Fem1a	0.870	-0.267	Carmil1	0.826	0.586	Pex3	0.807	-0.072
Alg2	0.870	-0.094	Zfand2a	0.826	0.164	Cfap107	0.807	0.702
Nifk	0.870	-0.041	Enah	0.826	0.658	Abhd13	0.807	-0.146
Rnf138	0.870	-0.446	Slc17a3	0.826	0.473	Nol8	0.807	0.003
Pter	0.867	0.316	Cyth1	0.826	0.488	Cpm	0.804	0.023
Nop58	0.867	-0.141	Chmp2b	0.822	0.268	Lingo2	0.804	-0.195
Cutc	0.867	-0.014	Mocs1	0.822	-0.327	Stox2	0.804	0.024
Edn2	0.867	-0.259	Pcnt	0.822	0.294	Nip7	0.804	-0.148
Gdf15	0.863	0.501	Brix1	0.822	-0.014	Akirin1	0.804	-0.357
Abtb2	0.859	-0.023	Efhc1	0.822	-1.353	Trim27	0.804	0.062
Foxf1	0.859	-0.746	Zxdc	0.822	-0.180	Fbxw9	0.804	-0.178
Zbtb11	0.859	-0.215	Kcnd2	0.822	0.330	Ccdc174	0.804	-0.170
Ppm1n	0.859	0.682	Kat7	0.822	0.068	Cnmd	0.804	0.476
Dst	0.856	-0.062	Ints6l	0.822	-0.201	Cdk13	0.804	0.310
Musk	0.852	0.139	Klhl23	0.822	-0.369	Ddx60	0.800	-0.378
Grin2c	0.852	1.187	Pnp	0.822	0.210	Spdef	0.800	0.167
Isg20l2	0.848	-0.252	Spata5	0.822	-0.047	A1bg	0.800	-0.631
Mob4	0.848	-0.140	Lyzl6	0.819	0.098	Bloc1s4	0.800	-0.125
Fas	0.844	0.449	Ccdc86	0.819	-0.011	Med17	0.800	-0.117
Herc6	0.844	0.174	Ccdc102a	0.819	0.581	LOC103692988	0.800	-1.025
Asip	0.844	0.453	Aimp1	0.819	-0.232	Aldh3a1	0.800	1.509
Prlr	0.844	-0.362	Mutyh	0.815	0.048	Arl2bp	0.800	0.106
Cryaa	0.841	-0.071	Igd	0.815	-0.202	Aldh1a7	0.800	3.974
Invs	0.841	-0.502	Rps6ka3	0.815	0.477	Zfp612	0.800	0.033
Ap1m2	0.841	0.468	Wdr17	0.815	-0.924	Uckl1	0.800	0.059
Ghdc	0.837	0.042	Rtn4	0.815	0.288			
Pdx1	0.837	0.272	Bdnf	0.811	-1.053			

AUC が 0.8 以上の遺伝子を示す。

**Table 8. PPAR $\alpha$  活性化物質を用いた ROC 解析で得られた肝発がん陽性関連遺伝子**

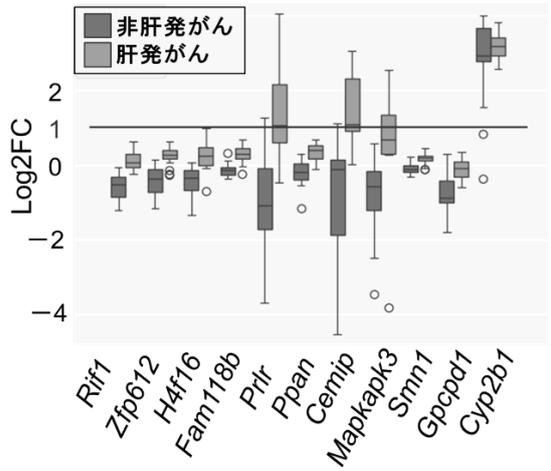
gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off
Cidea	0.994	1.493	Cracc2b	0.890	0.024	Cox20	0.863	0.230	Tmem11	0.845	0.366	Pdcl	0.830	0.051	Emc1	0.818	0.233
Stx4	0.992	0.064	Hdh2	0.890	0.372	Mrgp3	0.863	0.157	Gfra3	0.845	0.632	LOC691135	0.830	0.592	Gpm6a	0.818	0.151
Pak3	0.979	0.580	Krt23	0.888	1.007	Uba3	0.863	0.172	Atgf5f1c	0.845	0.211	Thcc2	0.830	-0.195	Zmynd11	0.816	0.277
Acsl3	0.977	0.727	Ica1	0.888	1.094	Rtk3	0.863	0.107	Nap1l1	0.845	0.683	Tjp2	0.828	0.193	Dhb2	0.816	0.156
Aap7	0.975	1.287	Blm	0.888	0.320	Obplf	0.863	0.744	Pehb	0.845	-0.102	Rsl1	0.828	-0.154	Cd276	0.816	0.929
Cpt1b	0.967	0.291	Arf6	0.888	0.234	Klk1b3	0.863	-0.037	Hff1a	0.845	0.089	Pygm	0.828	0.352	Gale	0.816	0.746
Nimlk	0.965	0.779	Fzd6	0.888	0.788	Hsd2	0.863	1.324	Abitram	0.845	0.050	Gosr1	0.828	0.146	Surf2	0.816	0.170
Hibch	0.965	0.877	Mbd2	0.888	0.114	Pex16	0.861	0.386	Nbn	0.845	0.471	Hscb	0.828	0.319	Npdc1	0.816	0.664
Prrt2	0.959	0.502	Cipc	0.888	0.187	Acot2	0.861	1.856	Fam13c	0.845	0.639	Spink1	0.828	2.189	Picx2	0.816	0.374
Diablo	0.957	0.261	Sor1	0.886	1.032	Tsr1	0.861	0.167	Psmg2	0.845	0.224	Nup98	0.828	0.338	Tyro3	0.816	0.718
Mterf4	0.952	0.215	Sor1	0.886	0.375	Vci	0.861	0.152	Mfn2	0.845	0.238	Ndufb3	0.828	0.157	Pitrm1	0.816	0.276
No3	0.952	0.993	Hmgnc3	0.886	0.160	Tsfm	0.861	0.261	Abhd18	0.845	0.316	Cap70	0.828	0.240	Prp4b	0.816	0.206
Vci	0.952	0.428	Stard3nl	0.886	0.306	Cyca-ps9	0.861	0.166	Acot2	0.845	4.666	Slc22a3	0.828	-0.355	Perp	0.816	-0.018
Mpl30	0.950	0.331	Slc25a20	0.886	0.966	Pgam1	0.861	0.096	Polr2e	0.845	0.125	Ubrd2	0.828	0.006	Upf3a	0.816	0.081
Tnfr1	0.948	0.241	Sor1	0.886	0.625	Thumpd3	0.861	0.183	Hmgcs2	0.845	0.410	Cfap298	0.828	0.310	Tor1ap1	0.816	-0.023
Ears2	0.948	0.497	Anxa7	0.886	0.621	Gln2	0.861	0.225	Rtn4	0.843	1.081	Alp2	0.828	-0.063	Ddx20	0.816	0.129
Polg	0.948	0.390	Cox15	0.886	0.269	Gnl1	0.861	0.031	Scd2	0.843	0.297	Echl	0.826	0.069	Chchd213	0.816	0.170
Nipal2	0.948	1.022	Pncr2	0.884	0.112	Acot2	0.861	1.969	Nudt2	0.843	0.262	Tmbim1	0.826	0.105	Zpr1	0.816	0.366
Idh3b	0.948	0.266	Emc2	0.884	0.264	Cert1	0.861	-0.215	Atf5f1a	0.843	0.139	C1qbp	0.826	0.659	Abcg2	0.816	0.551
Cyp17a1	0.944	1.063	Scd2	0.882	1.052	Oma1	0.861	0.304	Cbr1	0.843	0.989	Slc6a20b	0.826	0.654	Abhd1	0.814	-0.578
RGD1302996	0.942	0.373	Grin2c	0.882	0.640	Mdfic	0.861	0.518	Gpat4	0.843	-0.029	Hmgnc1	0.826	-0.030	Fitm2	0.814	-0.004
Ndufs1	0.940	0.265	Reep5	0.880	0.190	Lpcat3	0.859	0.559	Acadvl	0.843	0.616	Timm21	0.826	0.314	Tmem192	0.814	0.144
Dhrs7	0.940	0.268	Fbp2	0.880	2.243	Orc4	0.859	0.034	Ap1g1	0.843	-0.095	Impa2	0.826	0.872	Cmss1	0.814	0.276
Srp19	0.938	0.139	LOC100911177	0.880	0.169	Hadh	0.859	0.450	Ugt1a7c	0.841	0.465	Fam8a1	0.826	0.068	Mtg1	0.814	0.154
Rhof	0.938	1.273	Clpp	0.880	0.321	Borcs7	0.859	0.193	Srn1	0.841	-0.035	Pla2g1b	0.826	0.075	Pdbr8	0.814	0.288
Prg4	0.936	0.908	Tmem184c	0.880	0.788	Dag1	0.859	0.290	Fam89a	0.841	-0.400	Tgfr1	0.826	0.031	Casp9	0.814	0.295
Casp4	0.936	0.387	Ube2b	0.880	0.022	Sh3bgrl2	0.859	0.200	Ecm1	0.841	2.149	Klf21a	0.826	0.177	Piga	0.814	0.596
Ugqc1	0.936	0.259	Hsd17b12	0.880	0.165	Niban1	0.859	0.653	Ftbp1	0.841	0.000	Vwa8	0.826	1.063	Vwa8	0.814	0.789
Tex49	0.936	0.261	Khdcd4	0.880	-0.029	Hectd1	0.859	0.007	Ubxm6	0.841	0.279	Ank1	0.826	-0.253	Nr2c2ap	0.814	0.289
Lpl	0.936	0.804	Pex11a	0.880	1.672	Ddx24	0.859	-0.027	Cops8	0.841	0.086	Hf4ebp1	0.826	0.629	Pdk2	0.814	0.051
Hspd1	0.936	0.343	Tufm	0.880	0.315	Pev19	0.859	0.068	Xos8a	0.841	0.230	Klfh31	0.826	-0.717	Agmo	0.814	0.255
Timm10b	0.934	0.306	Cox15	0.880	0.359	Gnatp	0.859	0.178	RGD1359127	0.841	0.238	Tm2	0.826	0.299	Crot	0.812	0.701
Sorbs1	0.932	1.493	Hspa9	0.878	0.356	Osgpel1	0.859	0.498	Gbi10	0.841	0.638	Echl	0.826	2.104	Agpat3	0.812	0.569
Sor1	0.932	0.470	Asap3	0.878	0.172	Acaa2	0.859	0.645	Pcpt	0.841	0.363	Pccc	0.826	0.675	Lin37	0.812	0.144
Cr1	0.930	0.214	Mpl16	0.878	0.450	Larp7	0.859	0.382	Rad23a	0.841	0.422	Fam136a	0.826	0.414	Zfp655	0.812	-0.002
Aldoa	0.930	0.266	Slc3a2	0.878	0.620	Rampb2	0.859	0.046	C19h1orf131	0.841	0.148	Ap3	0.826	2.579	Rhob	0.812	0.023
Cds1	0.930	0.209	Acat1	0.878	1.110	Zpr1	0.859	0.135	Pev2	0.841	0.425	Aifm1	0.826	0.103	Tufm	0.812	0.246
Sucgl1	0.928	0.482	Banf1	0.878	0.365	Eprs1	0.859	-0.036	Dhrs4	0.841	0.471	Arpc51	0.824	0.156	Httatip2	0.812	0.390
Oga	0.928	0.240	Lepr	0.878	1.667	Arhgap5	0.859	0.099	Denn2d2	0.839	0.140	Map7	0.824	0.328	Pigrm2	0.812	0.477
Vnn1	0.925	3.184	Trappc4	0.876	0.255	Pold3	0.859	-0.068	Zfp161	0.839	0.011	Rp1	0.824	0.188	Dbdd2	0.812	0.032
Phb1	0.923	0.499	Tmem168	0.876	-0.038	Map7	0.857	0.308	Ltpprc	0.839	0.477	Mrfp50	0.824	0.283	Blicap	0.812	0.131
Mospd2	0.923	0.198	Tyms	0.876	0.171	Cyc1	0.857	0.326	Adig	0.839	3.045	Gca	0.824	0.713	Rnf138	0.812	0.126
Epcam	0.921	0.743	Ywhaq	0.876	0.258	Cyp20a1	0.857	0.091	UZsurp	0.839	0.017	Emc9	0.824	0.112	Gf3c3	0.812	0.462
Ac3p	0.921	0.328	Pmpcb	0.876	0.290	Phla2	0.857	0.315	Parvb	0.839	0.484	Mtrf1	0.824	0.090	Mrt4a	0.812	0.388
S100a10	0.919	0.318	Hectd1	0.876	0.000	Id1	0.857	0.138	Ube2b	0.839	0.005	Spcs1	0.824	0.252	Zfp655	0.812	-0.005
Tpm1	0.919	0.379	Vdac2	0.876	0.399	Bcdl1	0.857	0.384	Zfp672	0.839	0.021	Col4a5	0.824	0.298	Slc25a17	0.812	0.254
Tmem14c	0.919	0.608	Ergic2	0.876	0.225	Pkc13	0.857	0.147	Nf5c3b	0.839	0.027	Ythdf2	0.824	-0.095	Slain2	0.812	0.282
Immt	0.917	0.297	C5h1orf50	0.876	0.428	Stk3	0.857	0.279	Dut	0.839	0.088	Ankrd17	0.824	0.001	Hac1	0.812	0.494
Tomm5	0.917	0.141	LOC100911946	0.874	0.753	RGD1306063	0.857	0.187	Slc25a3	0.839	0.304	Pppl14c	0.824	0.406	Tfpt	0.812	0.271
Acot8	0.917	0.847	Hpf1	0.874	0.067	Zdhc3	0.855	0.281	Steap2	0.839	-0.495	Rab43	0.824	0.318	LOC100294508	0.810	0.119
Srx10	0.917	1.401	Ndufs2	0.874	0.238	Hadh	0.855	1.116	Igdcc3	0.839	0.059	Ddx39b	0.824	0.491	Imp4	0.810	0.299
Bbs2	0.917	0.960	Rassf1	0.874	0.005	RGD1565685	0.855	0.285	Did	0.839	0.354	Supt3h	0.824	0.298	Crot	0.810	1.218
Atp5f1b	0.915	0.242	Rtn4	0.874	1.374	Yars2	0.855	0.598	Cap2	0.839	0.920	Serpina7	0.822	2.605	Ddx28	0.810	0.788
Chchd6	0.913	0.720	Acot1	0.874	0.608	Cyb5b1	0.855	0.187	Zmynd11	0.836	-0.005	Rab9a	0.822	-0.069	Lias	0.810	0.340
Acot3	0.913	1.826	Zbtb44	0.874	0.225	Mgme1	0.855	0.396	Cd276	0.836	0.003	Plin5	0.822	1.327	Ube4b	0.810	0.218
Cyp27a	0.911	1.083	Nudt7	0.874	1.034	Myli2a	0.855	0.304	Nsmc1	0.836	0.361	Blicap	0.822	-0.006	LOC100912041	0.810	-0.014
Uqcrc2	0.911	0.236	Eif5b	0.874	0.189	Cox6a1	0.855	0.386	Cdhr2	0.836	0.132	Cluh	0.822	0.395	Ar13b	0.810	0.177
Pnn	0.911	0.021	Map4k4	0.874	0.008	Lepr	0.855	0.848	Fus	0.836	0.200	Senp2	0.822	0.359	Parp1	0.810	0.268
Crat	0.909	0.214	Timm17a	0.872	0.068	Ugt1a7c	0.853	0.712	Trfb3	0.836	0.586	Pkib	0.822	1.702	Enc1	0.810	0.608
Acot2	0.909	0.523	Lsm6	0.872	0.373	Rars2	0.853	0.261	Adgrg2	0.836	1.518	Fam136a	0.822	0.518	Coq5	0.810	0.386
Acot9	0.909	0.379	Tmem199	0.872	0.171	Ndufa1	0.853	0.481	Tm1	0.836	0.191	Hf122	0.822	0.214	Arhgef11	0.810	0.110
Uqcrc1	0.909	0.287	Smndc1	0.872	0.088	Thap12	0.853	-0.025	Mrlp49	0.836	0.406	Etfhd	0.822	0.416	Ywhag	0.810	0.205
Lomp2	0.909	0.329	Gca	0.872	0.728	Prkaa1	0.853	0.252	Alg8	0.836	0.420	Tg11	0.822	0.082	Elovl1	0.810	0.177
Srs5	0.909	0.404	Sgtb	0.872	-0.263	Mel2a	0.853	-0.071	Pdhx	0.836	0.247	Ucp3	0.822	1.130	Pthr2	0.810	0.267
Cacna2d3	0.909	1.487	Cul2	0.872	0.034	Miox	0.853	0.918	Tomm6	0.836	0.430	Cebpg	0.822	0.214	Cpt1a	0.810	0.510
Pex11a	0.907	1.115	Tp53	0.872	0.374	Gatch4	0.853	0.417	Uqcrc1	0.836	0.309	Acaca	0.822	0.403	Plekhh1	0.810	0.449
Sgcb	0.907	1.181	Srsf6	0.872	0.345	Coa5	0.853	0.141	Pcca	0.836	0.052	Sme5	0.822	-0.086	Edr11	0.810	0.073
Nap1l1	0.907	0.740	Cd47	0.872	0.344	Abhd12	0.853	0.291	Chrna2	0.836	2.506	Pkdc	0.822	0.321	Cdca7	0.810	0.990
Hmnrp8	0.905	1.118	Pdcd7	0.870	0.204	Mel2a	0.851	0.052	Lpcat3	0.836	0.696	Polr3d	0.822	0.174	Adprt	0.810	0.304
Sgcb	0.905	0.843	Gpd2	0.870	-0.050	Uqcrc1	0.851	0.191	Swsap1	0.836	-0.144	Mmp24	0.822	0.162	LOC500028	0.807	0.284
RGD																	

Table 9. AHR 活性化物質を用いた ROC 解析で得られた肝発がん陽性関連遺伝子

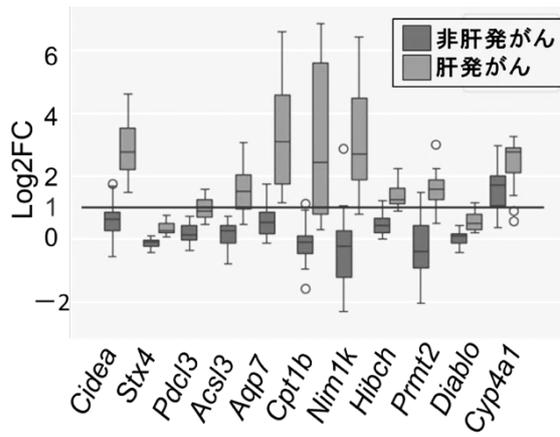
gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off	gene_name	score	cut_off
Grin2c	0.998	1.481	Cyp1a2	0.863	1.709	Ablim1	0.830	0.436	Cln3	0.812	0.309
Acad9	0.988	0.483	Ufd1	0.863	0.288	Cdhr2	0.830	0.276	Cidea	0.811	1.577
Anxa7	0.969	1.046	Atp5if1	0.863	0.453	Pef1	0.830	0.319	Fam8a1	0.811	0.101
Snx10	0.965	1.539	Col4a5	0.863	0.406	Spsb4	0.830	0.647	Arl10	0.811	0.308
Zwint	0.964	0.765	Gsta4	0.861	0.377	Creg1	0.830	0.583	Opcml	0.811	0.444
Ugt1a7c	0.960	0.804	Por	0.859	0.635	Kcnj3	0.830	0.470	Ptgfrn	0.811	0.150
Raph1	0.960	0.757	Zdhhc2	0.859	0.751	Ubd	0.830	0.874	Slc30a6	0.811	0.284
Dhdds	0.953	0.720	Tnfrsf21	0.859	0.825	Car2	0.828	1.099	Akr7a3	0.811	0.897
Pdcl3	0.944	0.624	Cyp1a1	0.859	5.891	Mfhas1	0.828	0.655	Gadd45a	0.811	0.440
Nipal2	0.941	0.640	Nck2	0.859	0.112	Carmil1	0.828	0.075	Setd4	0.811	0.314
Tusc3	0.929	0.563	Chek1	0.859	0.251	Vps26a	0.828	0.302	Phgr1	0.811	0.490
Abhd4	0.925	0.533	Map1lc3a	0.858	0.249	Dgat1	0.828	0.205	Acsf5	0.811	0.266
Snurf-ps2	0.924	0.835	Cd276	0.856	0.273	Manba	0.828	0.501	Svop	0.811	1.124
Adgrg2	0.924	1.768	Togaram1	0.856	0.137	Cdh15	0.828	0.198	Pitpnm2	0.811	0.566
Calr3	0.924	0.757	Kifc3	0.854	0.985	Kcmf1	0.828	0.390	Slc45a4	0.809	0.149
App	0.918	0.888	LOC100911946	0.852	0.324	Asns	0.826	1.409	Coq5	0.809	0.277
Nol3	0.918	1.039	Cyp2b1	0.851	2.583	Pip4p2	0.826	0.277	Tmod1	0.809	0.271
Msln	0.917	0.391	LOC100362109	0.851	1.085	Aco7	0.825	0.557	Fam168a	0.809	0.186
Lymr2	0.913	0.287	Syt15	0.849	0.742	Psmb5	0.825	0.341	Ano9	0.809	0.797
Por	0.913	0.783	Csn1s1	0.849	0.591	Tshb	0.825	1.006	Usp11	0.809	0.342
Tpd52	0.910	0.258	Epb41l1	0.849	0.597	Ggt1	0.825	0.576	Chchd6	0.809	0.524
Gsr	0.910	0.873	Tfpi	0.849	0.302	Cetn4	0.823	0.965	Myh14	0.809	0.380
Gng7	0.908	0.217	Mpp7	0.849	-0.345	Gpx2	0.823	3.689	LOC100360846	0.809	0.189
Trim37	0.906	0.258	Nhp2	0.849	0.723	Rasip1	0.823	-0.109	Pnp	0.809	0.302
App	0.905	0.796	Myo5c	0.847	0.321	Tcea2	0.823	0.051	Edn1	0.807	0.391
Tmem184c	0.903	0.359	Stox2	0.847	-0.160	Rhob	0.823	0.199	Pdpr	0.807	0.504
Aldh3a1	0.903	1.701	Cd24	0.847	0.054	Lao1	0.823	0.314	Ogfr1	0.807	0.344
Anxa7	0.901	0.712	Ctf1	0.847	0.620	Polr3g	0.823	0.388	Mgst2	0.807	0.799
Rhbdd2	0.899	0.491	Agtpbp1	0.845	0.623	Wfdc21	0.823	0.903	Fcer1a	0.807	1.020
Htatip2	0.899	0.955	Ugt1a7c	0.845	0.797	Sdhaf4	0.823	0.264	Cd276	0.807	0.529
Gsta3	0.896	4.438	Stk39	0.844	0.325	Mrps18b	0.821	0.553	Reep6	0.807	0.884
Nherf4	0.896	0.113	Usp14	0.844	0.260	Acaa1b	0.821	0.447	Mpped1	0.806	0.375
Odc1	0.894	0.244	Psm13	0.844	0.446	Psmb3	0.821	0.410	Serpine1	0.806	-0.334
Cbr1	0.894	1.018	Ddit4l	0.844	1.777	Ddx27	0.821	0.207	Slc28a3	0.806	0.197
Adrm1	0.889	0.505	LOC685203	0.842	0.313	Creg1	0.819	0.686	En2	0.804	0.744
Sema3c	0.889	0.878	Selenbp1	0.842	0.203	Clip1	0.819	0.105	Vezt	0.804	0.191
App	0.885	1.114	Btbd10	0.842	0.231	Ipo5	0.819	0.241	Cndp2	0.804	0.067
Flnc	0.885	0.365	Trim16	0.842	0.440	Dus2	0.819	0.228	Mns1	0.804	-0.342
Cystm1	0.884	0.607	App1	0.840	0.426	Sbds	0.819	0.232	Gca	0.804	0.608
RGD1559459	0.884	1.866	Cab39l	0.840	0.393	Tmem198b	0.818	0.115	Sgcb	0.804	-0.138
Aldh1a1	0.884	3.853	Suds3	0.840	0.134	Nagk	0.818	0.296	Aco2	0.804	0.320
Creld1	0.884	0.573	Ralb	0.840	0.137	Agtpbp1	0.818	0.584	Psmb4	0.804	0.435
Flot2	0.882	0.151	Paps1	0.839	0.462	Camk2g	0.818	-0.027	Adgrg6	0.804	0.236
Cd36	0.882	1.368	LOC102551133	0.839	0.221	Cltb	0.818	0.541	Psmc1	0.804	0.264
RGD1562726	0.880	1.137	Rrp12	0.839	0.784	Krt8	0.816	0.473	Ift43	0.804	0.170
Abcc3	0.880	4.497	Nbeal2	0.839	0.772	Trmt5	0.816	0.065	Il1rl2	0.802	0.210
Snurf-ps2	0.880	0.467	Rexo2	0.837	0.587	Rnaseh2b	0.816	0.380	Reep6	0.802	0.734
Srxn1	0.877	0.877	Slc4a4	0.837	1.012	Enc1	0.816	1.515	Pdhx	0.802	0.353
Rangap1	0.877	0.473	Htr1b	0.837	0.361	Ran	0.816	0.372	Epn3	0.802	0.404
Prss8	0.877	0.350	Flywch1	0.835	0.424	Epcam	0.814	0.304	Speg	0.802	-0.187
Sri	0.875	0.375	Adamts5	0.835	0.234	Nfx1	0.814	0.296	Ufd1	0.802	0.434
Npdc1	0.875	0.516	Mmgt1	0.835	0.386	Perp	0.814	0.012	Nipal3	0.802	0.253
Exosc1	0.875	0.196	Irgb3bp	0.835	0.046	Dusp2	0.814	-0.261	Nphp1	0.802	0.218
Rnf208	0.873	0.331	Clip1	0.833	0.373	Pex19	0.814	0.103	Tmem138	0.802	0.024
Slc39a10	0.872	0.425	Hip1r	0.833	0.460	Pmm1	0.814	0.774	Vps26a	0.802	0.093
Zfp618	0.872	0.311	Kat7	0.833	0.073	Enc1	0.813	0.955	Pgam2	0.802	-0.235
Zfp296	0.872	0.263	P4htm	0.833	0.714	Tmem245	0.813	0.286	Ankrd40	0.802	0.099
Eci1	0.870	-0.119	Polr3a	0.832	0.440	Gprc5a	0.813	0.828	Nfasc	0.800	1.103
Egln3	0.870	0.351	Plscr3	0.832	0.146	Hspa12b	0.813	0.433	Lrpprc	0.800	0.214
F2r1	0.870	0.217	Avp1	0.832	0.264	Osgepl1	0.813	0.332	Bptf	0.800	1.018
Tpm3	0.868	0.286	Sri	0.832	0.393	Clic2	0.813	0.534	Dynll2	0.800	0.203
Stard3nl	0.868	0.417	Tmbim1	0.832	0.105	Cyp26a1	0.813	0.587	Dclre1a	0.800	0.134
Slc3a2	0.868	0.571	Mphosph6	0.832	0.232	Abo3	0.813	0.785			
Srd5a3	0.866	0.350	Slc48a1	0.830	0.203	Fam118a	0.812	0.367			
Thop1	0.865	0.558	Susd4	0.830	0.693	Aldoa	0.812	0.330			

AUC が 0.8 以上の遺伝子を示す。

**CAR**



**PPAR $\alpha$**



**AHR**

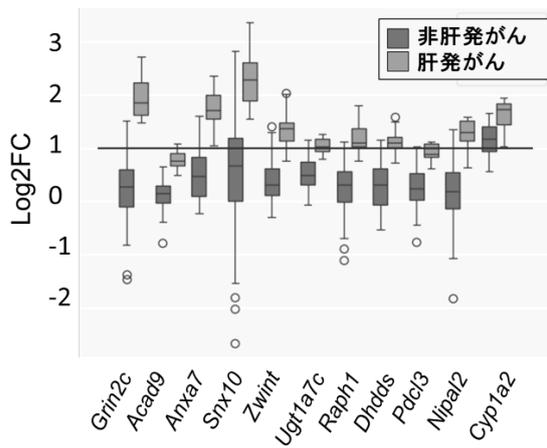


Fig. 7. ROC 解析において AUC が上位 10 遺伝子と各受容体標的遺伝子の Log2FC の値を用いた箱ひげ図

## 6.8. 核内受容体 CAR 依存的な肝細胞増殖誘導メカニズムの解明 (GADD45β 発現増加に注目した解析)

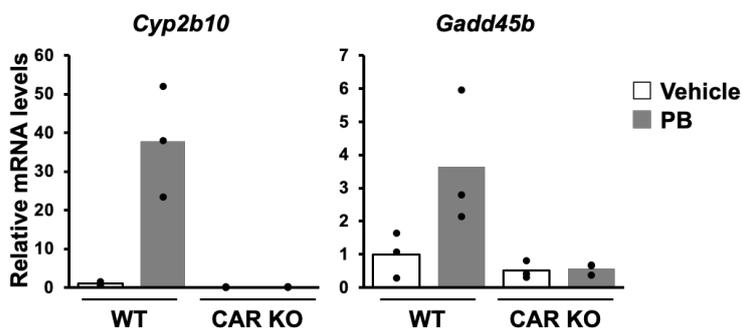
非臨床の発がん性試験において認められる肝がんは、CAR 活性化を介することが多いことが示唆された。したがって、CAR 依存的な肝発がんプロモーション作用の機序解明は、肝化学発がんの理解と予測系の構築に有用である。最近我々は、マウス肝において、肝がん誘導タンパク質である YAP と CAR が相互作用し、YAP の核局在を促進させ、YAP/TEAD 依存的な転写を促進させることで、肝発がんプロモーション作用を引き起こすことを明らかにした (Toxicol Sci (2018), 165, 408-419)。さらに CAR の YAP との相互作用部位 (Pro147-Tyr150) を見出し、この領域の変異 (CARY150H 変異) は CAR と YAP の相互作用を抑制し、CAR 依存的な肝細胞増殖を抑制することも、CARY150H 変異導入マウスを用いた解析から明らかにした (Toxicol Sci (2024), in press)。すなわち、CAR 活性化に加えて YAP 活性化が、化学物質による肝発がんの Key Event となると考えられる。一方で、本マウスでは、CAR による YAP の活性化は完全に抑制されるのに対し、細胞増殖は抑制されるものの増殖細胞が一部残ることが示され、CAR 依存的な肝発がんの経路は、YAP の活性化だけではないことも明らかとなった。本研究室で行なった野生型マウス及び CARY150H 変異マウス肝 RNA を用いたトランスクリプトーム解析の結果、肝細胞増殖が抑制された CARY150H 変異マウスにおいて、細胞周期の G1/S 期移行関連の遺伝子が野生型マウス同様に増加していることが示された。さらに G1/S 期移行に関与し、細胞増殖、アポトーシス誘導を担うタンパク質 GADD45β 及びその関連シグナルがする CAR 活性化による著しく亢進していることが見出された。GADD45β ノックアウトマウスでは、CAR 依存的肝発がんが抑制されることも報告されている (Front Oncol (2023), 13, 1217847.)。すなわち CAR 活性化依存的な GADD45β の発現増加が、YAP を介さない CAR 依存的な肝発がんプロモーション作用の経路である可能性が高く、本研究では GADD45β の CAR 依存的な発現制御に注目し解析を行なった。野生型および CAR 欠損マウスに CAR 活性化薬の Phenobarbital を 24 時間間隔で 2 回腹腔内投与し、最終投与 3 時間後に肝を採取し、*Gadd45b* の mRNA レベルを定量的逆転写 PCR 法で調べたところ野生型において Phenobarbital 処置依存的な *Gadd45b* の mRNA の増加が認められた (Fig 8)。マウス初代肝細胞に CAR 活性化薬 Phenobarbital あるいは TCPOBOP を処置すると、CAR 標的遺伝子である *Cyp2b10* の mRNA レベルは増加したが、GADD45β mRNA レベルは増加せず (Fig 8)、インビボで認められた遺伝子発現制御とは異なっていた。GADD45β 遺伝子のプロモーターの CG 配列 (CpG アイランド) のメチル化レベルを調べるため、野生型及び CAR 欠損型マウスに Phenobarbital を 24 時間間隔で 2 回腹腔内投与し、最終投与 3 時間後に肝ゲノム DNA を抽出した。HpaII を用いて非メチル化 CCGG 配列を切断した後、定量的 PCR により CpG 周辺領域の増幅量を定量した。この結果、マウス肝における CpG メチル化レベルが CAR 依存的に低下することが明らかとなった (Fig 9)。以上の結果から、齧歯動物の肝において、CAR は CpG アイランドの脱メチル化を誘導することにより、間接的

に GADD45 $\beta$  の転写活性化を引き起こすことが示唆された。他方、マウス Gadd45b 遺伝子プロモーター領域 (-3000 bp~+225 bp) をルシフェラーゼ遺伝子上流に組込んだレポータープラスミドを用い、HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイにより CAR 活性化の影響を調べた。Gadd45b 遺伝子プロモーターにより構成的なレポーター活性の増加が認められ、CAR 活性化依存的にレポーター活性はさらに増加した (Fig 10)。本レポータープラスミドを CpG 配列メチル化酵素 M.sssI で処置し、CpG 配列をメチル化させたところ、構成的なレポーター活性は著しく抑制され、CAR 依存的なレポーター活性のさらなる増加も見られなかった (Fig 10)。本結果より、CAR は DNA に直接結合せず、CpG 配列メチル化により結合が制御される転写因子との相互作用を介して Gadd45b の転写を調節すると考えられた。

DNA の配列情報から転写因子を予測するアルゴリズムである JASPER (<https://jaspar.elixir.no>)を用いて Gadd45b 遺伝子プロモーターの転写因子を調査し、スコアが高値であった転写因子を抽出した。CAR と相互作用し Gadd45b を発現増加させる可能性が高い転写因子として HNF4 $\alpha$  や CEBP $\alpha$  等の肝特異因子転写因子、炎症関連の転写因子として NF- $\kappa$ B、がん関連の転写因子 p53 が得られた。これら転写因子発現レベルが低い培養細胞を用いて、これら転写因子の関与を調べたが、いずれの細胞でも構成的なレポーター活性の増加と CAR 依存的なその増強作用が認められた。NF- $\kappa$ B の阻害薬である BAY-11-7082 の処置でも、構成的なレポーター活性の増加は変化しなかった。

CAR 依存的な肝発がんプロモーション作用の分子機序として、Wnt/ $\beta$  カテニン経路、TEAD/YAP 経路、GADD45 $\beta$  シグナルの活性化が、我々および他の研究グループにより報告されているが、本研究および我々のこれまでの研究結果から、これらの活性化メカニズムは CAR による DNA への結合を介した標的遺伝子の転写ではなく、転写因子間の相互作用あるいはエピジェネティックな制御を介していると考えられる。CAR 活性化物質において肝発がんを誘導するものとしらないものが存在する理由は、このような CAR による遺伝子発現制御の様式の違いによると思われる。本結果からも、核内受容体標的遺伝子以外の肝発がん予測に有用な遺伝子マーカーの必要性が示されていると考えられる。

マウス肝を用いた解析



マウス初代肝細胞を用いた解析

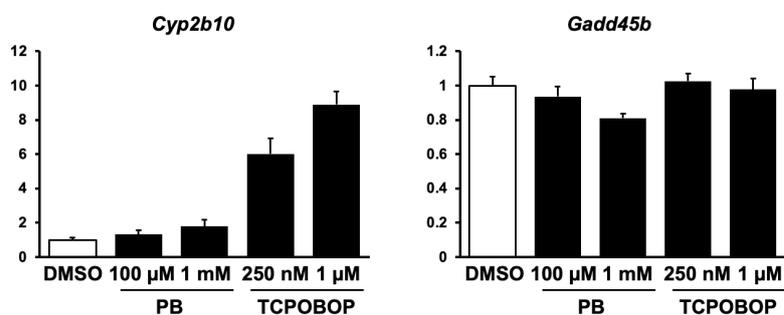


Fig. 8. CAR 活性化依存的な Gadd45b mRNA 発現増加のマウス肝またはマウス初代肝細胞を用いた解析

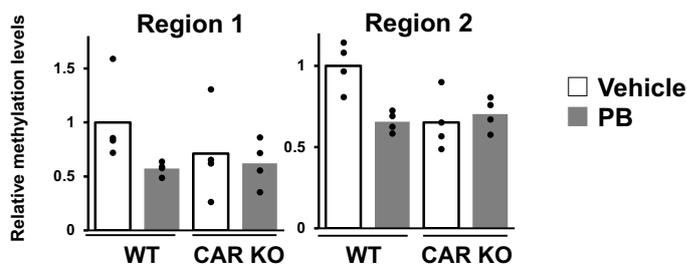
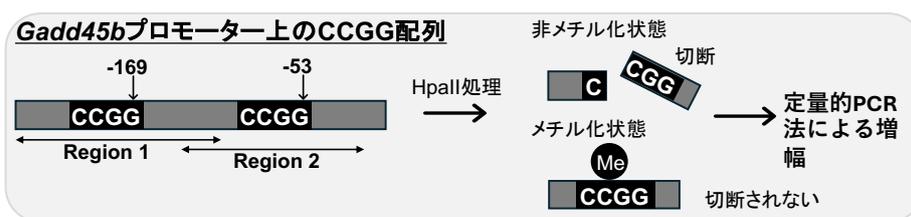


Fig. 9. マウス肝における CAR 活性化依存的 Gadd45b プロモーターの脱メチル化の解析

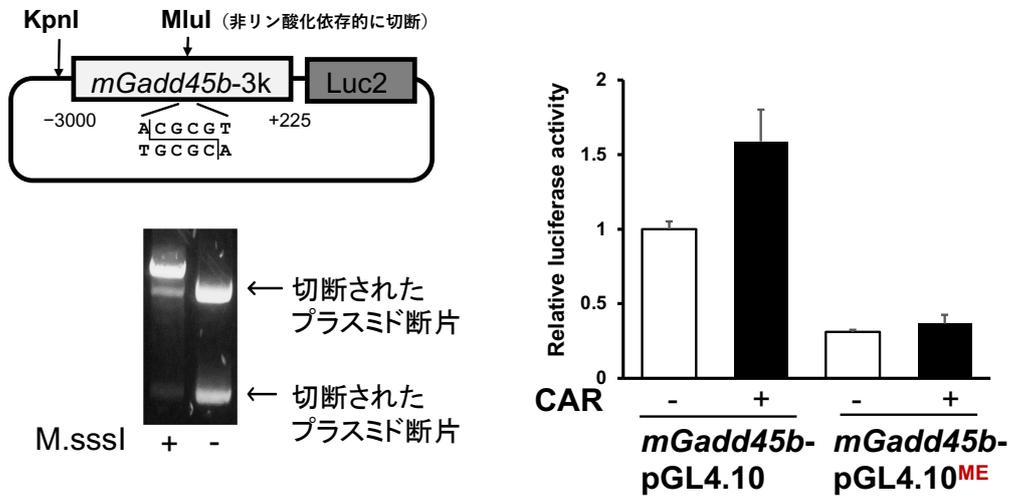


Fig. 10. マウス *Gadd45b* プロモーターを用いたレポーターアッセイにおけるメチル化の影響解析

## 7. 成果のまとめと今後の展望

発がん性は、現状では2年間のラット発がん性試験においてのみ評価可能であり、長い試験期間と多くの実験動物、多大なコストを要して明らかになる。そのため、化審法対象化学物質などで実施される短期間の反復投与毒性試験の結果だけでは、発がん性情報を得ることができない。また、既存の化学物質の発がん性情報は限られており、今後の著しい増加も期待できないため、インシリコ手法による発がん性予測は困難である可能性がある。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、複数のマーカー遺伝子候補を見出した。近年、動物愛護、開発経費削減や効率化の観点から発がん性試験結果を予測可能な短期間でのインビボ試験、インビトロ試験及びインシリコ手法を利用した評価系の構築が求められている。反復投与毒性試験や発がん性試験に関しては毒性の複雑さから予測根拠が不明瞭になりやすいため、生体内反応や毒性発現の機序を理解した上で、インビトロ試験等を利用した毒性予測手法の開発が必要である。本成果は、分子機序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と期待される。

本検討では、化合物を各核内受容体活性化薬に分類し、各化合物が単独の核内受容体活性化作用における肝がん特異的な遺伝子発現変動を調べたが、実際は多くの化学物質が複数の核内受容体を同時に活性化し、複数の核内受容体活性化を介して肝発がんプロモーション作用を示す。本検討においても、農薬を用いた核内受容体活性化評価では、CAR活性化作用とAHR活性化作用を同時に有する化合物が複数認められた。またOpen TG GATEを用いた解析でもCAR活性化物質とAHR活性化物質に重複が認められた。齧歯動物を用いた発がん性試験において、非遺伝毒性肝発がんが認められた化学物質は、ラット肝における*Cyp2b1* mRNAの誘導作用が調べられる。*Cyp2b1* mRNAの誘導が見られた場合は、発がん性試験で認められた肝発がんはCAR活性化に伴う肝発がんであり、そのヒト齧歯動物間の種差の解釈から、ヒト外挿性はないと判断される。一方で、AHR依存的な肝発がんプロモーション作用に種差はない。したがって、CARとAHRを複合的に活性化する化学物質は、ヒトで肝がんを引き起こす可能性もある。このように核内受容体複合的活性化の影響やヒト外挿性の理解について、今後のより詳細な検討が必要と考えられる。

核内受容体活性化を起こす物質が必ずしも肝発がんを起こすわけではない。核内受容体活性化マーカーに加えて、本検討で見出した肝がん陽性物質特異的に変動する遺伝子を利用することは、化合物の肝がん予測に有用と思われ、またこれら変動遺伝子の情報は各核内受容体依存的な肝発がんプロモーションの機序解明に向けた研究の足掛かりとなると思われる。一方で、当研究で用いた肝がん陽性物質は、農薬では32種、Open TG GATEを用いた解析では23種と全化合物中の10%程度であり、学習用のデータセットとするには十分とは言えない可能性がある。したがって、複数の発がん性データベース等から統合的に化合物を選択することが求められ、今後、より多くの肝発がん陽性物質を収集し同様に肝がん特異的に変動する遺伝子を調査する予定である。