



遺伝子の発現量測定に基づいた 発がん性スクリーニング手法について

短期発がん性予測システム: CARCINOscreen®

一般財団法人化学物質評価研究機構
安全性評価技術研究所
齋藤 文代

短期発がん性予測システム 研究開発の背景

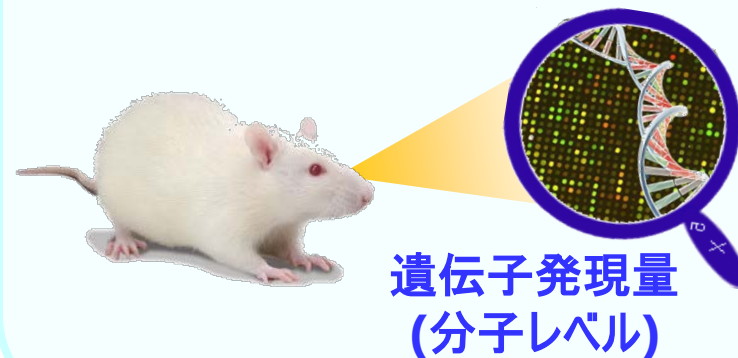
現行のがん原性試験

- × 長期間
- × 高コスト
- × 多数の動物
- × 大量の化合物



新規の発がん性スクリーニング法

- ✓ 短期間
- ✓ 低コスト
- ✓ 動物数の削減
- ✓ 化合物量の削減



遺伝子は病態 / 毒性が現れる以前に発現量が変わるため、
より早期かつ分子レベル(=メカニズムベース)に発がん性をスクリーニングできるのではないか？

DNA ⇒ RNA ⇒ タンパク質 ⇒ 表現型(病態 / 毒性)

発がん性試験(げっ歯類)では化学物質の約45% *が肝臓を標的⇒肝臓に着目

*NTPデータベース

短期発がん性予測システム システム開発時の実験デザイン

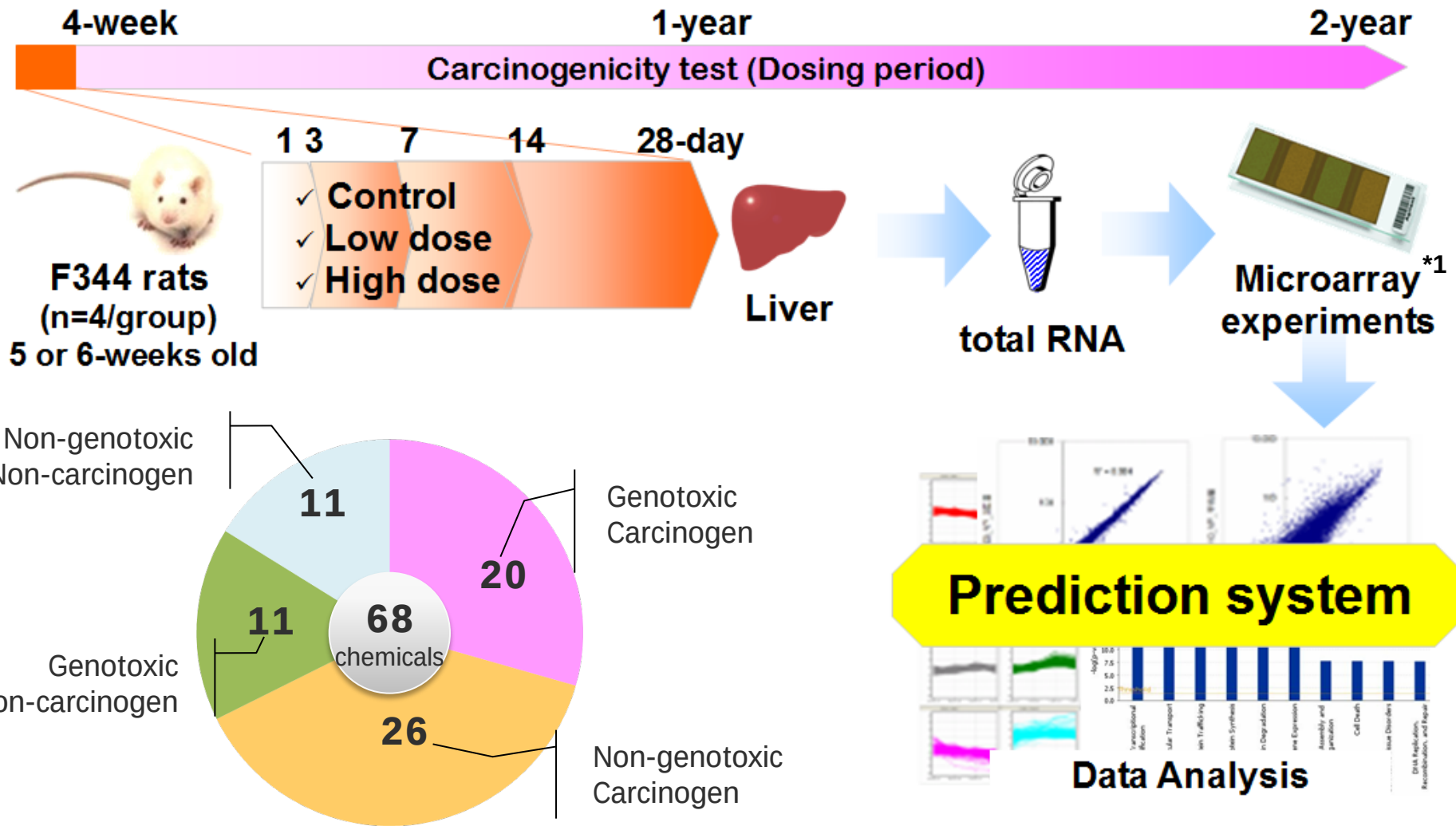


Fig. The number of compounds for training data

*1: マイクロアレイ; 多数の遺伝子の発現量を一度に測定できるツール(本実験系では約7,000種類)

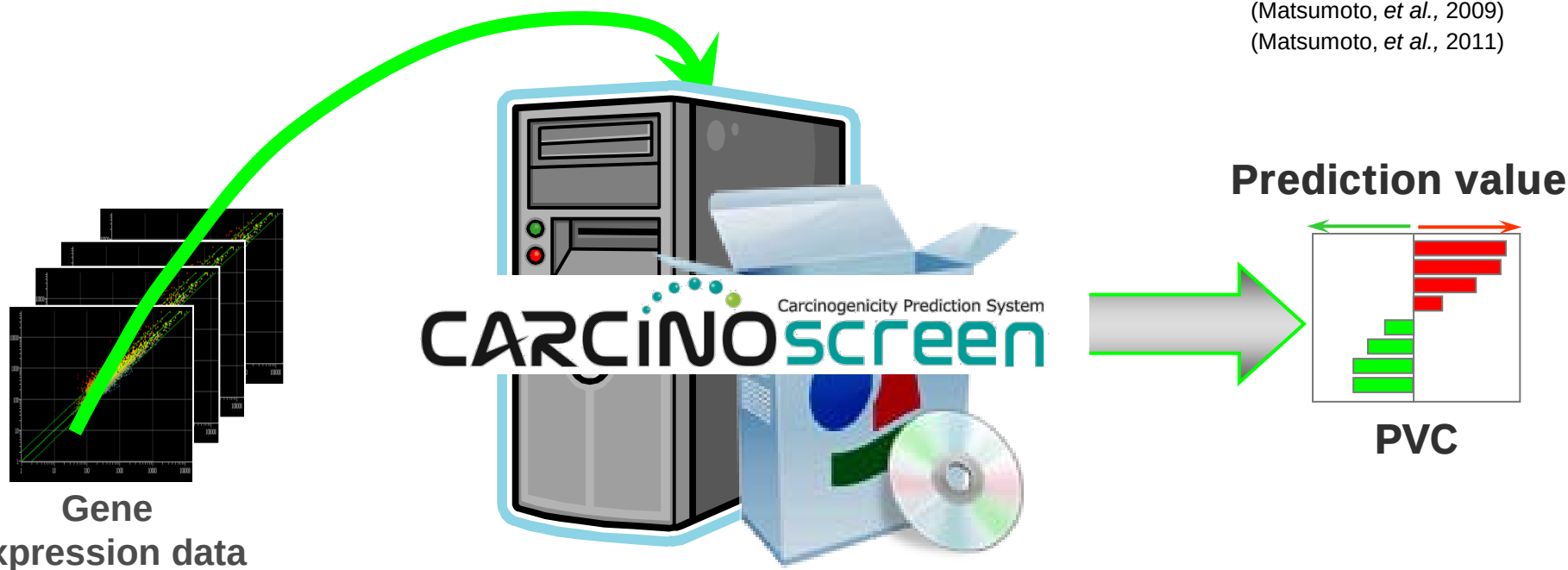
短期発がん性予測システム 予測システムの構築

予測システム構築の条件

- ・トレーニングデータ: 68化合物(F344ラット〔雄〕、肝臓、4匹/群、二色法)
- ・化合物分類: 階層的クラスタリング ⇒ 3つの化合物グループ
- ・予測遺伝子の選定: Welch's t-test
- ・予測式の構築: SVM (Support Vector Machine)
- ・予測式の最適化: ランダム計算法

(Matsumoto, et al., 2009)

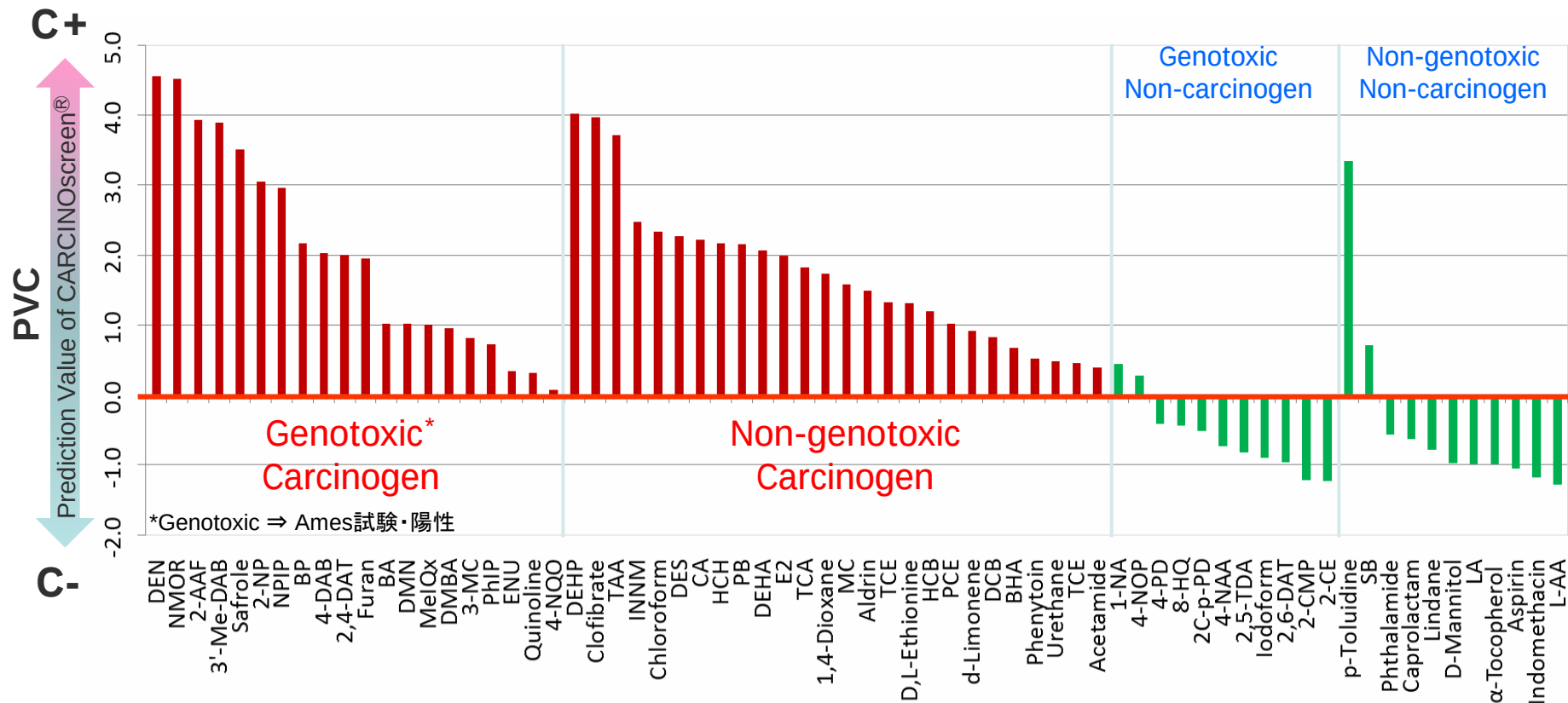
(Matsumoto, et al., 2011)



3種の予測式を用いてフロー形式で化合物の発がん性を予測

CARCINOscreen® 予測結果(68物質; 投与28日目)

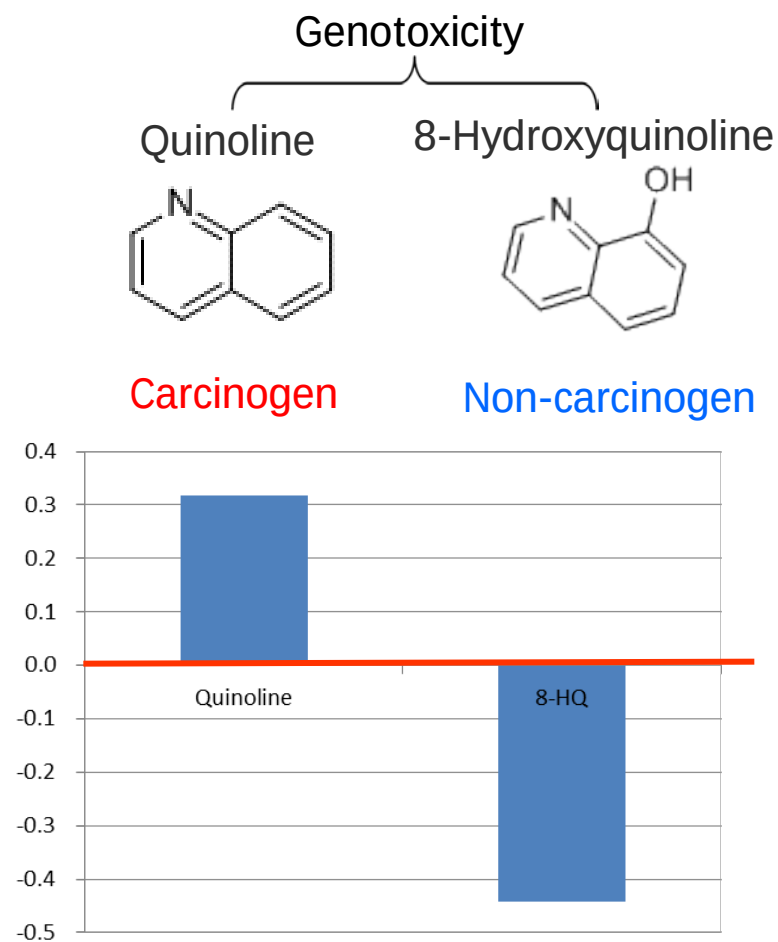
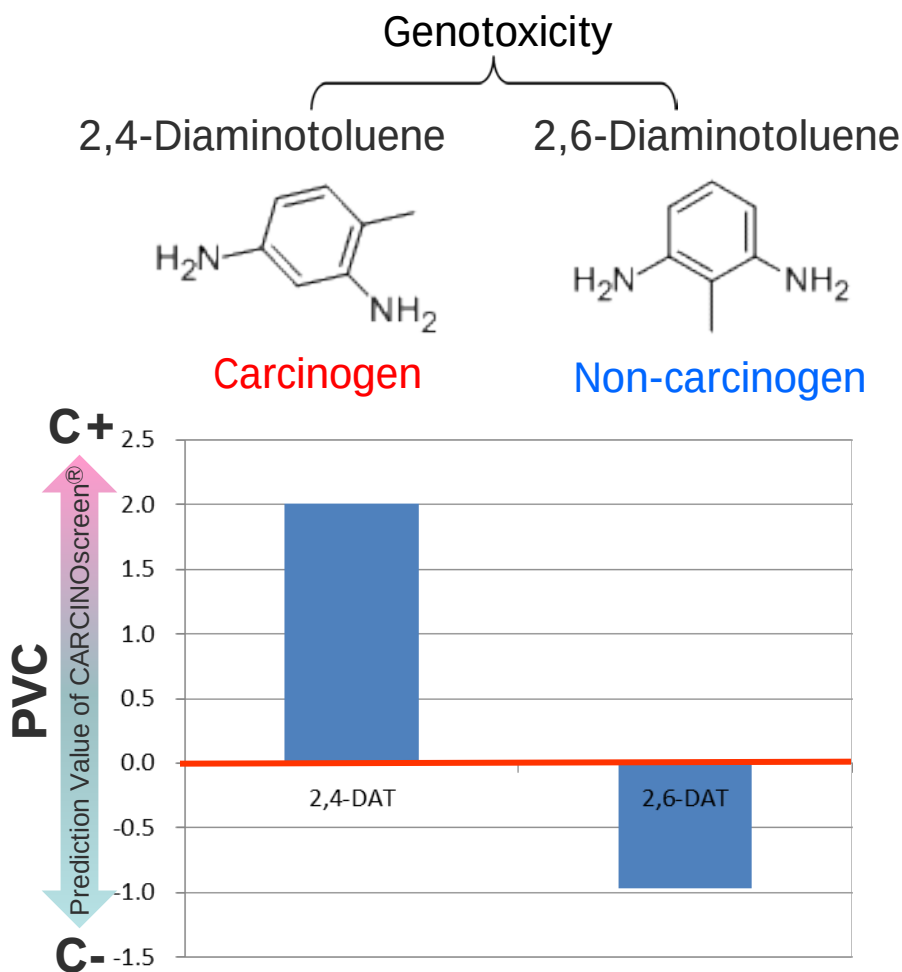
✓ CARCINOscreen®では非変異発がん性物質を高精度に予測可能



Total accuracy: 94% (64/68 chemicals)

- Sensitivity (true positive rate): 100% (46/46 chemicals)
- Specificity (true negative rate): 82% (18/22 chemicals)
- False positive rate: 18% (4/22 chemicals)
- False negative rate: 0% (0/46 chemicals)

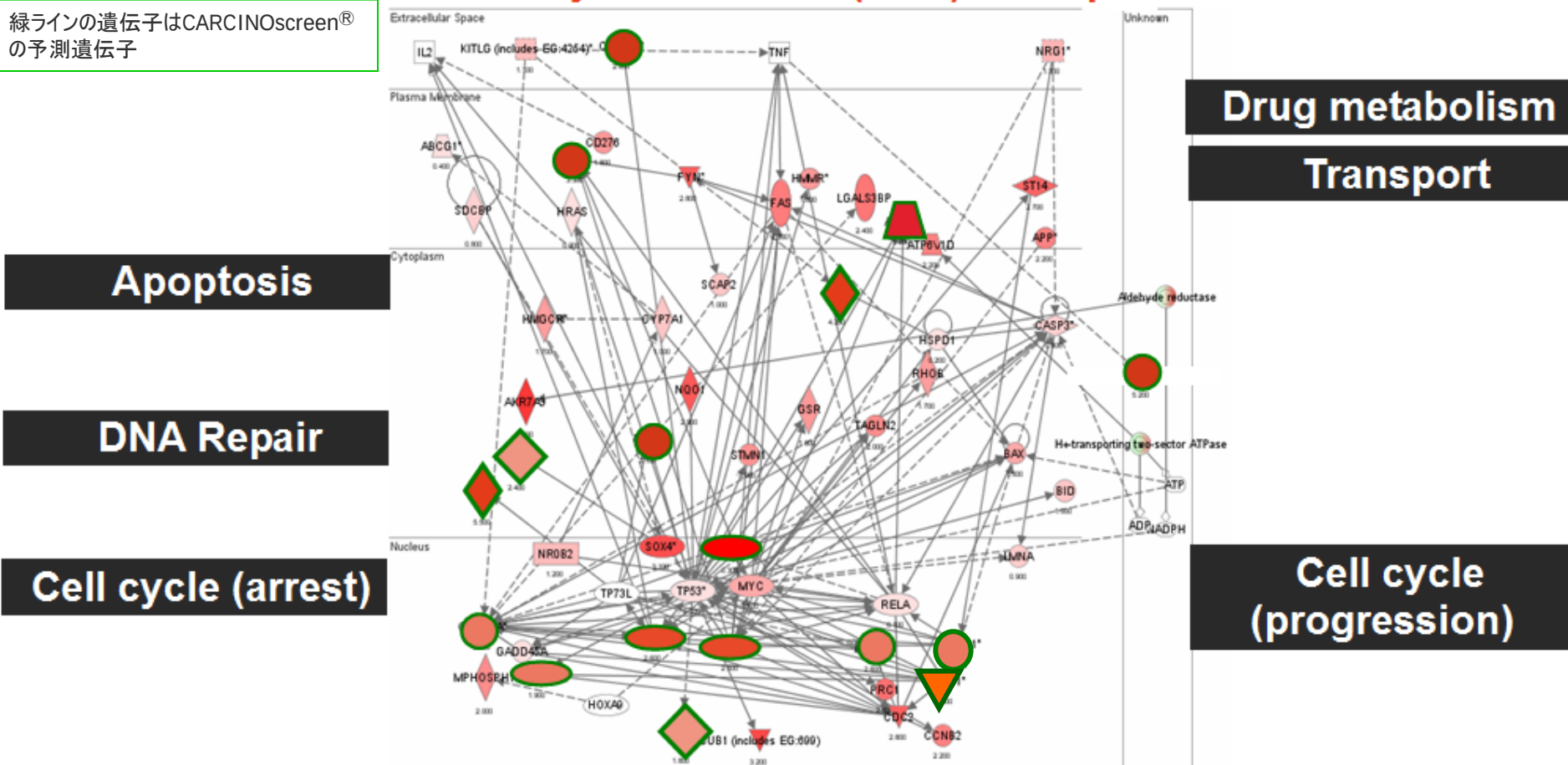
CARCINOscreen® 構造異性体の予測精度(投与28日目)



CARCINOscreen® can detect accurately carcinogen or non-carcinogen of structural isomer.

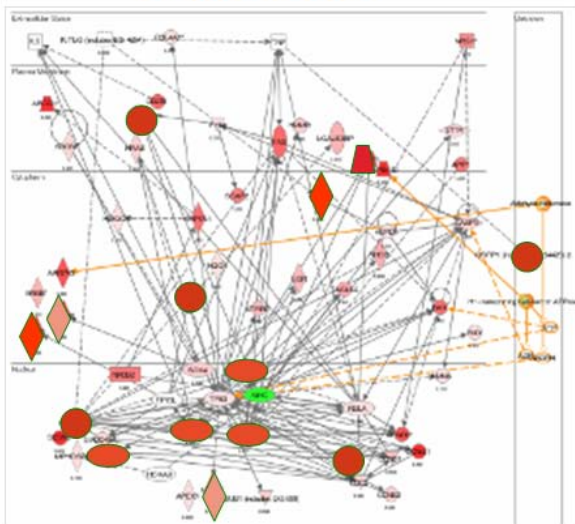
緑ラインの遺伝子はCARCINOscreen®
の予測遺伝子

Diethylnitrosamine (DEN): Group A

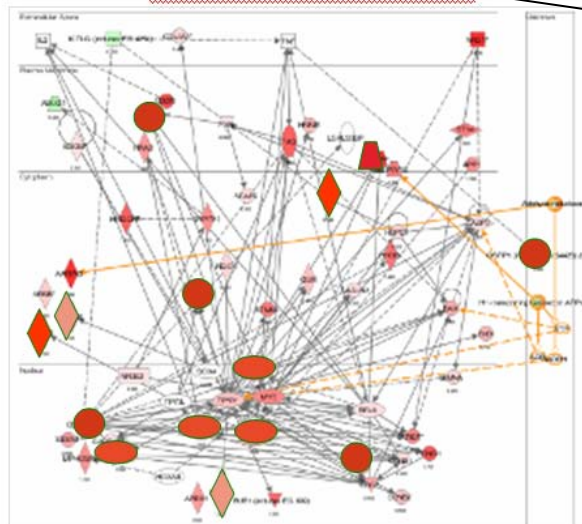


Key genes used in the Group-A of CARCINOscreen® showed a gene network (e.g. toxicity pathway) contained tumor suppressor gene, **p53 concerned with cell cycle, DNA repair, and apoptosis**. (Key gene looks like a “Hub” gene of each pathways)

3'-Me-DAB



Thioacetamide

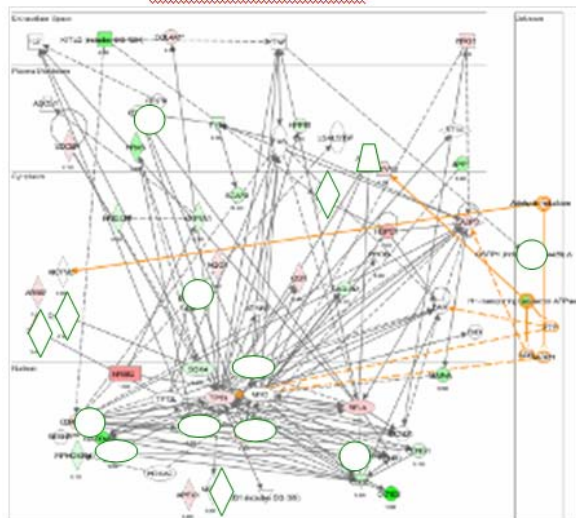


Non-genotoxic carcinogen

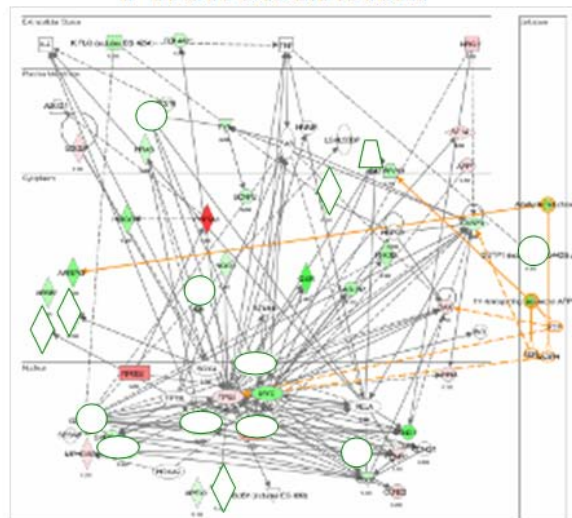
Carcinogen group-A

Expression pattern is different !!

Clofibrate



Phenobarbital



Carcinogen group-B or -C

化合物グループごとに特徴的な遺伝子パスウェイ/ネットワークを持つ
(発がん性メカニズムが異なる)

検証①: 施設間バリデーション

- ・3機関で同一プロトコルを用い、同一物質を複数機関で動物実験からアレイ実験までを実施
- ・4化合物(各物質カテゴリーから1物質ずつ選定)、F344ラット(雄)、28日間反復経口投与

検証②: 適用性拡大の検討(系統差)A

- ・トレーニングデータに含まれる化合物(16化合物)を予測して系統差を比較
- ・SDラット(雄)、28日間反復経口投与

検証③: 適用性拡大の検討(系統差)B

- ・トレーニングデータに含まれる化合物(4化合物)を予測して系統差を比較
- ・Wistar-Hannoverラット(雄)、28日間反復経口投与

検証④: 外部バリデーションA

- ・トレーニングデータに含まれない化合物(18化合物)を予測
- ・F344ラット(雄)、28日間反復経口投与

検証⑤: 外部バリデーションB *14日間投与(GeneChip)予測式を用いた

- ・厚労省TGP (Toxicogenomics Project)で取得されたデータ(発がん性情報が明らかな36化合物)を予測
- ・SDラット(雄)、14日間反復経口投与、GeneChipデータ

検証⑥: その他の発がん性スクリーニング法との予測精度の比較

- 1) 中期発がん性試験
- 2) 培養細胞を用いた発がん性スクリーニング試験(Bhas42細胞形質転換試験: Bhas42試験)

CARCINOscreen® 検証①: 施設間バリデーション

	#	Chemicals	C* ¹	Cr* ²	Muta* ³	CARCINOscreen®	Concordance
Site-A	1	2-Acetylaminofluorene	C+	Cr+	+	+	True
	2	Safrole	C+	Cr+	-	+	True
	3	p-Phenylenediamine 2HCl	-	-	+	-	True
	4	Aspirin	-	-	-	-	True
Site-B	1	2-Acetylaminofluorene	C+	Cr+	+	+	True
	2	Safrole	C+	Cr+	-	+	True
	3	p-Phenylenediamine 2HCl	-	-	+	-	True
	4	Aspirin	-	-	-	-	True
Site-C	1	2-Acetylaminofluorene	C+	Cr+	+	+	True
	2	Safrole	C+	Cr+	-	+	True
	3	p-Phenylenediamine 2HCl	-	-	+	-	True
	4	Aspirin	-	-	-	-	True

*1) C: Carcinogenicity in rodents, *2) Cr: Carcinogenicity in rat liver, *3) Muta: Mutagenicity (Ames test)

All experimental laboratories accurately detected each compound by CARCINOscreen®

■ Applicability of CARCINOScreen® (SD rats)

#	Chemicals	C*1	Cr*2	Muta*3	Prediction	Concordance
1	2,4-Diaminotoluene	C+	Cr+	M+	+	True
2	N-Nitrosodimethylamine	C+	Cr+	M+	+	True
3	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	—	False
4	Clofibrate	C+	Cr+	M-	+	True
5	Di(2-ethylhexyl)phthalate	C+	Cr+	M-	+	True
6	Methyl carbamate	C+	Cr+	M-	—	False
7	Thioacetamide	C+	Cr+	M-	+	True
8	Urethane	C+	Cr+	M-	+	True
9	D,L-Ethionine	C+	Cr+	M-	+	True
10	Chlorendic acid	C+	Cr+	M-	+	True
11	3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea	C+	Cr+	M-	+	True
12	2,6-Diaminotoluene	C-	Cr-	M+	—	True
13	2-Chloromethylpyridine HCl	C-	Cr-	M+	—	True
14	Iodoform	C-	Cr-	M+	—	True
15	Caprolactam	C-	Cr-	M-	—	True
16	Sodium benzoate	C-	Cr-	M-	—	True



Sprague Dawley

Concordance: 87.5%

(14/16 chemicals)

- Sensitivity : 81.8%
- Specificity : 100.0%
- False positive rate: 18.2%
- False negative rate: 0.0%

*1) C: Carcinogenicity in rodents, *2) Cr: Carcinogenicity in rat liver, *3) Muta: Mutagenicity (Ames test)

CARCINOscreen® 検証③: 適用性拡大の検討(系統差)B

■ Applicability of CARCINOscreen® (Wistar-Han rats)

#	Chemicals	C* ¹	Cr* ²	Muta* ³	Prediction	Concordance
1	2,4-Diaminotoluene	C+	Cr+	M+	+	True
2	Thioacetamide	C+	Cr+	M-	+	True
3	2,6-Diaminotoluene	C-	Cr-	M+	—	True
4	Sodium benzoate	C-	Cr-	M-	—	True

*1) C: Carcinogenicity in rodents, *2) Cr: Carcinogenicity in rat liver, *3) Muta: Mutagenicity (Ames test)



Wistar-Hannover

Concordance: 100.0%

(4/4 chemicals)

- Sensitivity : 100.0%
- Specificity : 100.0%
- False positive rate: 0.0%
- False negative rate: 0.0%

F344ラットの遺伝子発現量データをトレーニングデータとして構築した本システムに、別系統であるSDラット及びWistar-Hanラットの遺伝子発現量データは適用可能

CARCINOscreen® 予測システムの検証(まとめ1)

検証①: 施設間バリデーション

- ・3機関で同一プロトコルを用い、同一物質を複数期間で動物実験からアレイ実験までを実施
- ・4化合物(各物質カテゴリーから1物質ずつ選定)、F344ラット(雄)、28日間反復経口投与

検証②: 適用性拡大の検討(系統差)A

- ・トレーニングデータに含まれる化合物(16化合物)を予測して系統差を比較
- ・SDラット(雄)、28日間反復経口投与

検証③: 適用性拡大の検討(系統差)B

- ・トレーニングデータに含まれる化合物(4化合物)を予測して系統差を比較
- ・Wistar-Hannoverラット(雄)、28日間反復経口投与

検証①: 施設間バリデーション

【結果】3機関で個別に動物実験からアレイ実験までを実施し、CARCINOscreen®で予測した結果、**全て正しく予測**することができた

⇒動物実験からアレイ実験までのプロトコルには特に問題はない

検証②: 適用性拡大の検討(系統差)A

【結果】16化合物について**87.5%**の精度で予測可能

検証③: 適用性拡大の検討(系統差)B

【結果】4化合物について**100%**の精度で予測可能

F344ラット以外の
系統にも適用可能

CARCINOscreen® 検証④: 外部バリデーションA

Table Prediction of carcinogenicity by CARCINOscreen® : External validation (F344 rats)

#	Chemicals	C ^{*1)}	Cr ^{*2)}	Muta ^{*3)}	Predic- tion	Concor- dance
1	o-Nitrotoluene	C+	Cr+	M-	+	True
2	Dieldrin	C+	Cr-	M-	+	True
3	Carbon tetrachloride	C+	Cr+	M-	+	True
4	DDT	C+	Cr+	M-	+	True
5	Hexachloroethane	C+	Cr-	M-	+	True
6	1-Amino-2-methylantraquinone	C+	Cr+	M+	+	True
7	Methyleugenol	C+	Cr+	M-	+	True
8	3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea	C+	Cr+	M-	+	True
9	1-Nitropyrene	C+	Cr-	M+	+	True
10	4-AAB	C+	Cr+	M+	+	True
11	1,2,3-Trichloropropane	C+	Cr-	M+	+	True
12	2-Nitro-p-phenylenediamine	C+	Cr-	M+	+	True
13	Tris(2-chloroethyl)phosphate	C+	Cr-	M-	-	False
14	1,2-Dichlorobenzene	C-	Cr-	M-	+	False
15	4-AAF	C-	Cr-	M+	+	False
16	Quercetin	C-	Cr-	M+	-	True
17	Tetracycline hydrochloride	C-	Cr-	M-	-	True
18	Glutaraldehyde	C-	Cr-	M+	-	True

Concordance: 83.3%
(15/18 chemicals)

- Sensitivity : 92.3%
- Specificity : 60.0%
- False positive rate: 40.0%
- False negative rate: 7.7%

*1) C: Carcinogenicity in rodents, *2) Cr: Carcinogenicity in rat liver, *3) Muta: Mutagenicity (Ames test)

トレーニングデータに含まれない化合物のデータ(外部データ)に対して、
80%以上の精度で予測可能

■ TGPデータの予測結果 (SDラット、14日間投与、肝臓、GeneChipデータ)

* 発がん性について明確な情報が得られた36化合物*(発がん性;11化合物, 非発がん性; 25化合物)

	CARCINOscreen®による予測結果		
	低用量	中用量	高用量
Concordance	91.7% (33/36)	97.2% (35/36)	94.4% (34/36)
Sensitivity	72.7% (8/11)	90.9% (10/11)	100% (11/11)
Specificity	100% (25/25)	100% (25/25)	92.0% (23/25)
False Positive	0% (0/25)	0% (0/25)	8.0% (2/25)
False Negative	7.3% (3/11)	9.1% (1/11)	0% (0/11)

*36化合物のうち、8化合物はCARCINOscreen®のトレーニングデータに用いた物質と共通していた

いずれの投与量でも90%以上の精度で発がん性を予測することができた

CARCINOscreen® 検証⑥: 予測精度の比較(中期発がん性試験)

■ 中期発がん性試験との予測結果の比較(20化合物)

#	Chemicals	C* ¹	Cr* ²	Muta* ³	中期発がん	CARCINO
1	Quinoline	C+	Cr+	M+	True	True
2	Safrole	C+	Cr+	M+	True	True
3	MelQx	C+	Cr+	M+	True	True
4	Phenobarbital	C+	Cr+	M-	True	True
5	Hexachlorobenzene	C+	Cr+	M-	True	True
6	α-Hexachlorocyclohexane	C+	Cr+	M-	True	True
7	Thioacetamide	C+	Cr+	M-	True	True
8	Urethane	C+	Cr+	M-	True	True
9	Chlorendic acid	C+	Cr+	M-	True	True
10	DDT	C+	Cr+	M-	True	True
11	PhIP	C+	Cr-	M+	False	True
12	7,12-Dimethylbenz [a]anthracene	C+	Cr-	M+	False	True
13	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	True	True
14	Aldrin	C+	Cr-	M-	True	True
15	Di(2-ethylhexyl)adipate	C+	Cr-	M-	False	True
16	d-Limonene	C+	Cr-	M-	True	True
17	Trichloroacetic acid	C+	Cr-	M-	False	True
18	Diethylstilbestrol	C+	Cr-	M-	True	True
19	Dieldrin	C+	Cr-	M-	True	True
20	Caprolactam	C-	Cr-	M-	True	True

*1) C: Carcinogenicity in rodents, *2) Cr: Carcinogenicity in rat liver, *3) Muta: Mutagenicity (Ames test)
 中期発がん性試験 (Hasegawa R. *et al.*, 1992), CARCINOscreen® ToxIII, 投与28日目

■ 中期発がん性試験との予測結果の比較(20化合物)

	中期発がん性試験	CARCINOscreen®
Concordance	80.0% (16/20)	100% (20/20)
Sensitivity	78.9% (15/19)	100% (19/19)
Specificity	100% (1/1)	100% (1/1)
False Positive	0% (0/1)	0% (0/1)
False Negative	21.1% (4/19)	0% (0/19)

両試験で共通した20化合物について、
CARCINOscreen®では100%の精度で予測できた

■ Bhas42試験(*in vitro*)との予測結果の比較(22化合物)

#	Chemicals	C*1	Cr*2	Muta*3	Bhas42	CARCINO
1	2,4-Diaminotoluene	C+	Cr+	M+	True	True
2	2-Acetylaminofluorene	C+	Cr+	M+	True	True
3	1,4-Dioxane	C+	Cr+	M-	False	True
4	Methyl carbamate	C+	Cr+	M-	False	True
5	Urethane	C+	Cr+	M-	False	True
6	Benz[a]anthracene	C+	Cr-	M+	True	True
7	3-Methylcholanthrene	C+	Cr-	M+	True	True
8	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	True	True
9	Quercetin	C+	Cr-	M+	True	False
10	MNNG	C+	Cr-	M+	True	False
11	d-Limonene	C+	Cr-	M-	True	True
12	Diethylstilbestrol	C+	Cr-	M-	False	True
13	2,6-Diaminotoluene	C-	Cr-	M+	True	True
14	8-Hydroxyquinoline	C-	Cr-	M+	False	True
15	2-Chloroethanol	C-	Cr-	M+	True	True
16	p-Phenylenediamine 2HCl	C-	Cr-	M+	True	True
17	4-Acetylaminofluorene	C-	Cr-	M+	True	False
18	D-Mannitol	C-	Cr-	M-	True	True
19	Caprolactam	C-	Cr-	M-	True	True
20	Tetracycline hydrochloride	C-	Cr-	M-	False	True
21	Benzoin	C-	Cr-	M-	True	True
22	Tetracycline hydrochloride	C-	Cr-	M-	False	True

*1) C: Carcinogenicity in rodents, *2) Cr: Carcinogenicity in rat liver, *3) Muta: Mutagenicity (Ames test)

Bhas42 assay (Sakai A. *et al.*, 2010)のInitiation assay若しくはPromotion assayの何れかでPositiveであれば発がん性あり、両assayでNegativeであれば発がん性なし、CARCINOscreen® ToxIII, 投与28日目

CARCINOscreen® 検証⑥: 予測精度の比較(Bhas42試験)

■ Bhas試験との予測結果の比較(22化合物)

	Bhas42 assay	CARCINOscreen®
Concordance	68.2% (15/22)	86.4% (19/22)
Sensitivity	66.7% (8/12)	83.3% (10/12)
Specificity	70.0% (7/10)	90.0% (9/10)
False Positive	30.0% (3/10)	10.0% (1/10)
False Negative	33.3 (4/12)	16.7% (2/12)

両試験で共通した22化合物について、CARCINOscreen®では86.4%の精度で予測できた
(ラット肝臓で発がん性を示さない物質において、予測が正答しないものがあった)

検証④: 外部バリデーションA

【結果】18化合物について、**83.3%**の精度で予測可能

検証⑤: 外部バリデーションB *14日間投与(GeneChip)予測式を用いた

【結果】36化合物について、低、中、及び高用量で**91.7~97.2%**の精度で予測可能

外部データに対しても高い予測結果を示した。

*ただし、ラット肝臓で発がん性を示さない物質や肝毒性が非常に強い非発がん性物質に対して予測が外れる傾向にある

検証⑥: その他の発がん性スクリーニング法との予測精度の比較

1) 中期発がん性試験

【結果】20化合物について、**100%**の精度で予測可能(中期発がん性試験では80%)

2) 培養細胞を用いた発がん性スクリーニング試験(Bhas42試験)

【結果】22化合物について、**86.4%**の精度で予測可能(Bhas42試験では68.2%)

その他の発がん性スクリーニング法と比較しても高い予測精度を示した

Training Data



Fischer 344
68 chemicals

Accuracy: 94%

Inter-lab. Vali.



Fischer 344
4 chemicals, 3 sites

Accuracy: 100%

Applicability

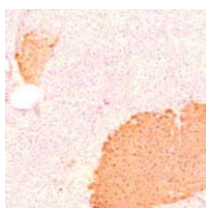
External Vali.



Fischer 344
18 chemicals

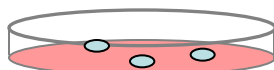
Accuracy: 85%

その他の発がん性スクリーニング試験との比較



中期発がん性試験
20 chemicals

Accuracy: 100%



Bhas42試験(*in vitro*)
22 chemicals

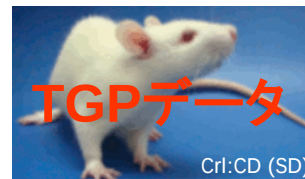
Accuracy: 86.4%

*現在もデータを蓄積中



Sprague Dawley
16 chemicals*

Accuracy: 88%



TGPデータ

Crl:CD (SD)

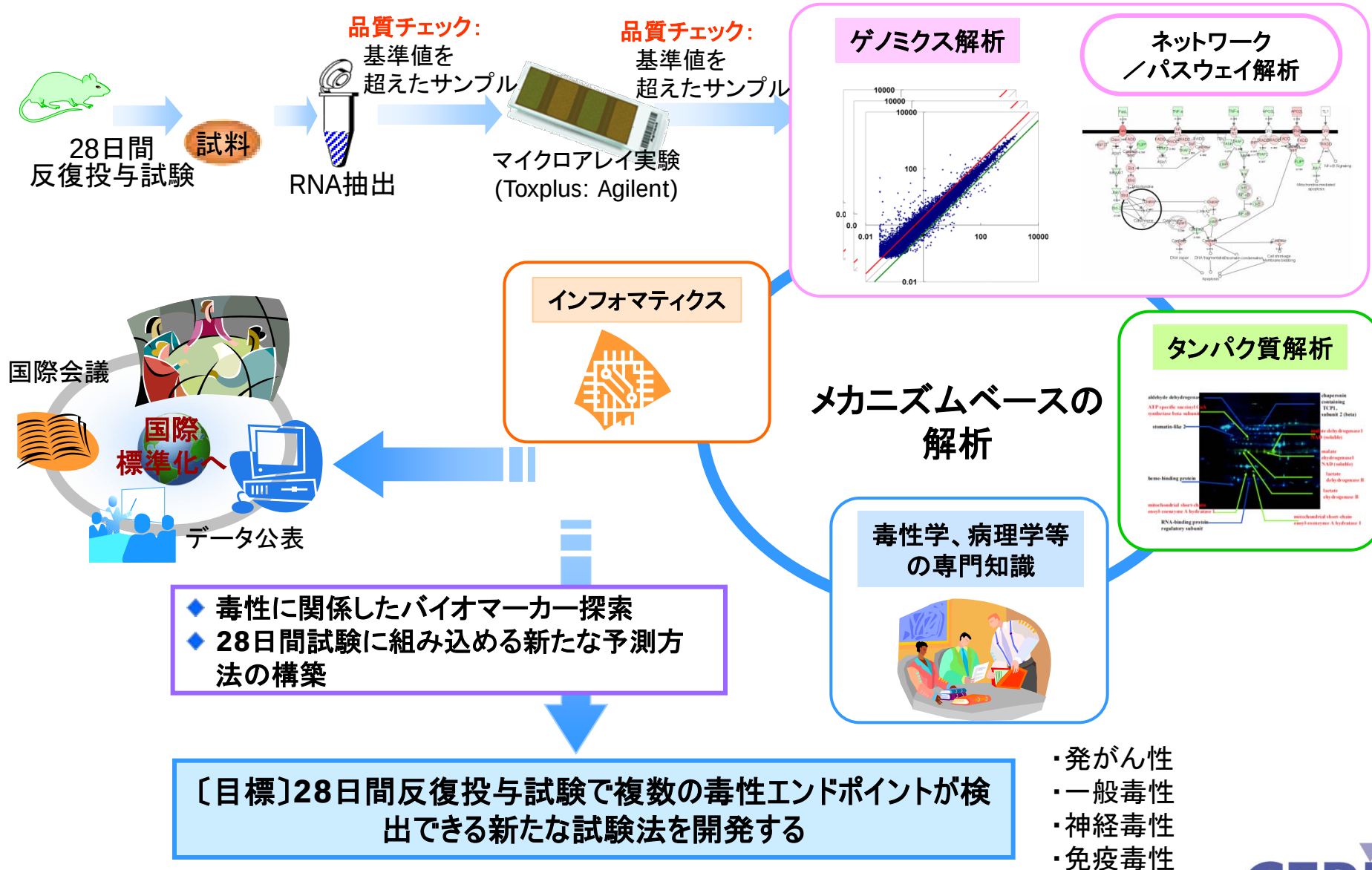
Sprague Dawley
36 chemicals

Accuracy: ~97%

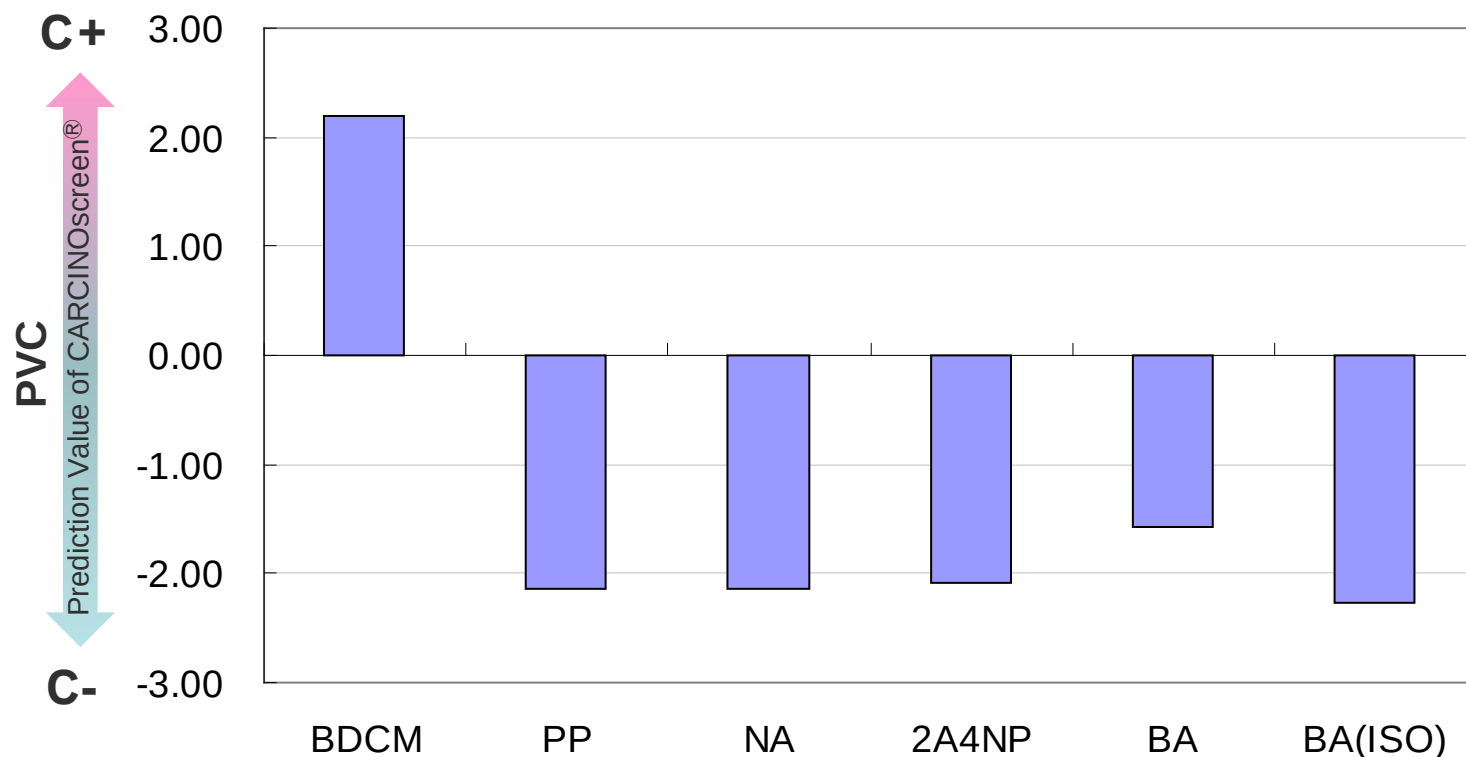


Wistar-Han
4 chemicals

Accuracy: 100%



■ CARCINOscreen®による発がん性予測結果(SDラット, 雄, 肝臓, 28日間投与)

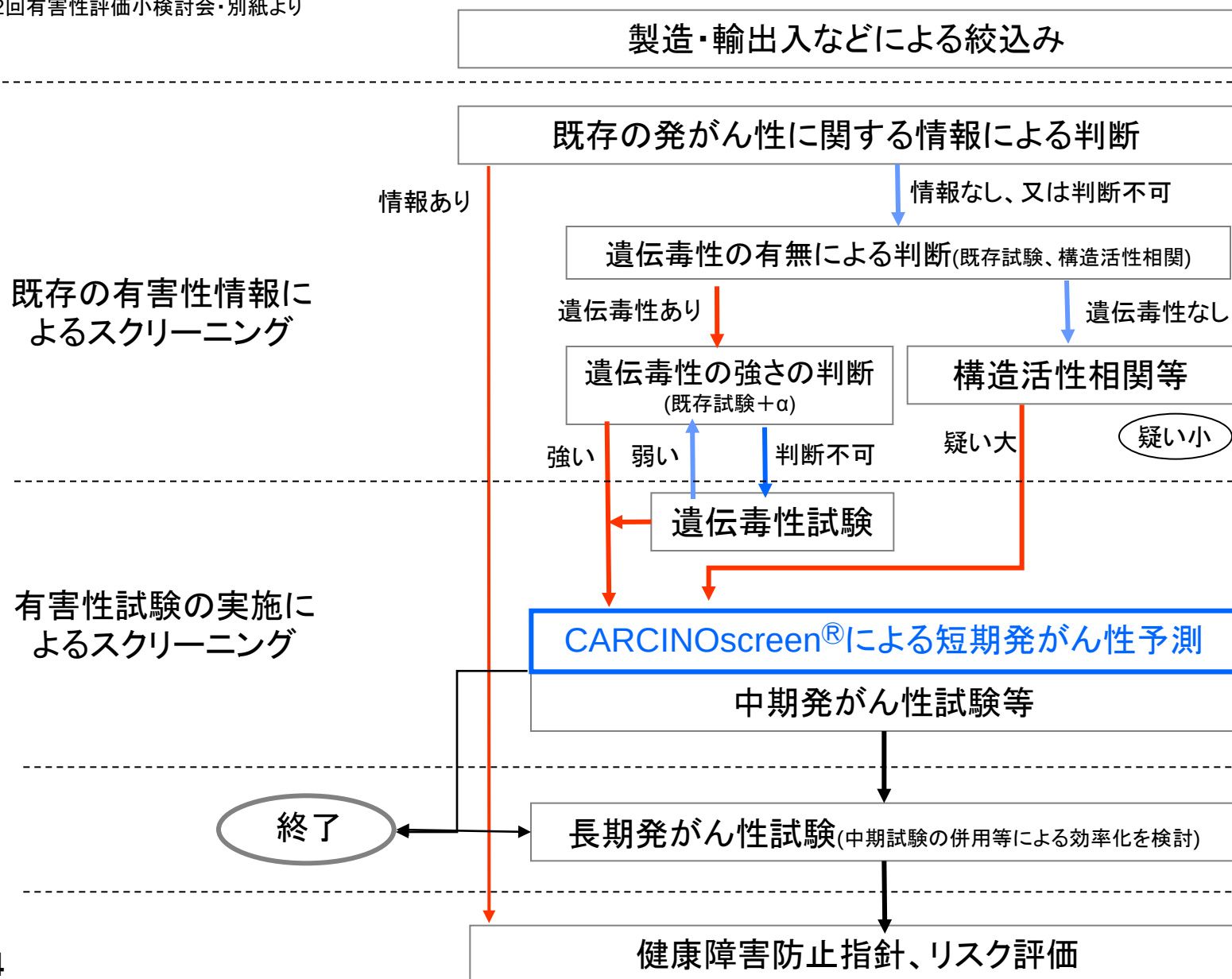


既知の2年間投与/発がん性試験(NTP)では全て陰性⇒**BDCMのみ陽性と判定**

- ✓ BDCMはブロモジクロロメタン(Bromodichloromethane, CAS; 75-27-4)
- ✓ BDCMはマウス肝臓(雌)で発がん性を示す
- ✓ BDCMはF344ラット(雄)においても高用量で4/50例の肝発がんの所見(有意性なし)

化学物質の発がん性評価 構想図素案+α

第2回有害性評価小検討会・別紙より





參考資料

短期発がん性予測システム 実験条件

- ・動物 : Fischer344 or Crl:CD (SD)ラット、雄
- ・化合物 : 68物質(トレーニングデータ、F344ラット)
- ・標的臓器 : 肝臓
- ・投与期間 : 28日間反復投与(強制経口投与)
- ・投与群 : 媒体対照、低用量、高用量 (4匹/群)
- ・測定項目 : 体重、組織重量、血液生化学的検査、病理組織学的検査

- ・マイクロアレイ : - NEDO ToxArrayIII (6,709遺伝子、二色法)
- GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix)
- **Whole Rat Genome Toxplus (Agilent)**
- ・データ解析 : - GeneSpring GX (Agilent)
- Ingenuity Pathways Analysis (IPA)
- ・予測式構築 : - SVM (Support Vector Machine)

仮説

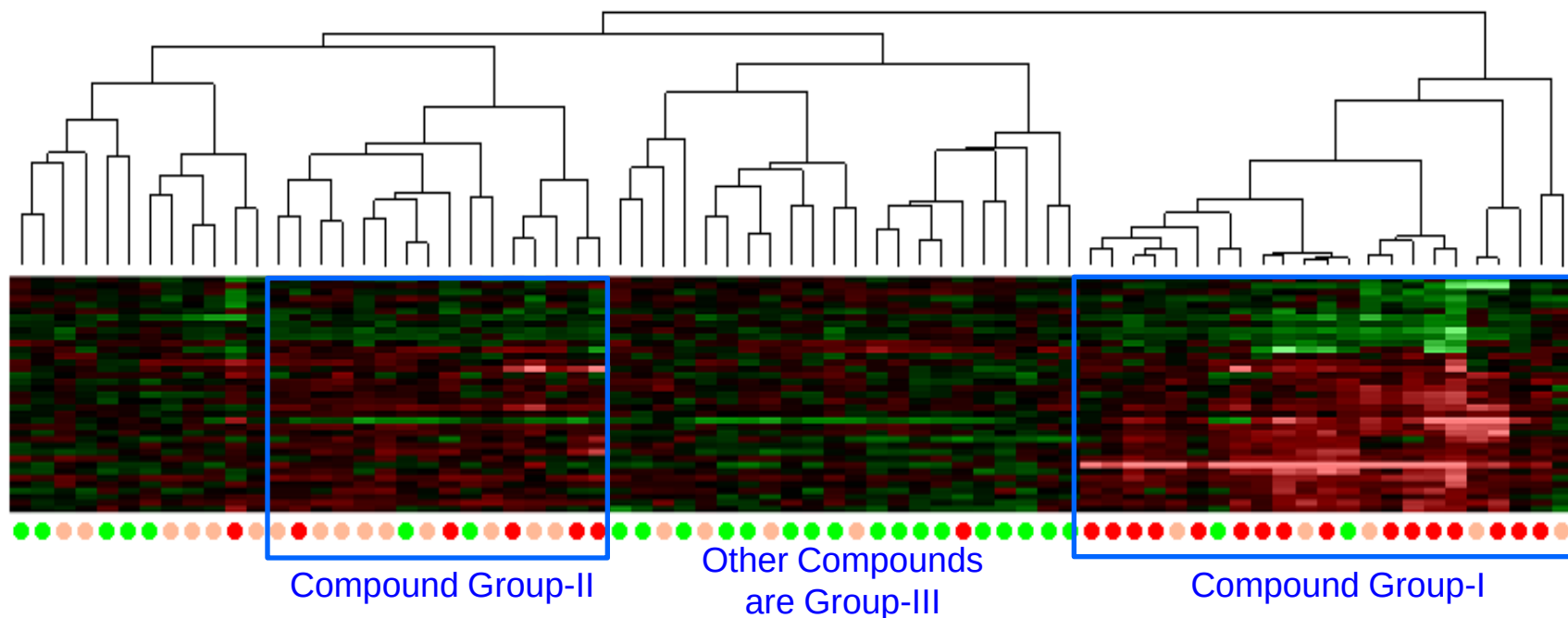
化合物の種類によって様々な発がん性メカニズムが存在する

遺伝子発現量データから階層的クラスタリングを行い、68化合物を
グループ分類 ⇒ **Group-I, II, III***

•Matsumoto et al., *Cancer Inform.* 2009, 253-69.

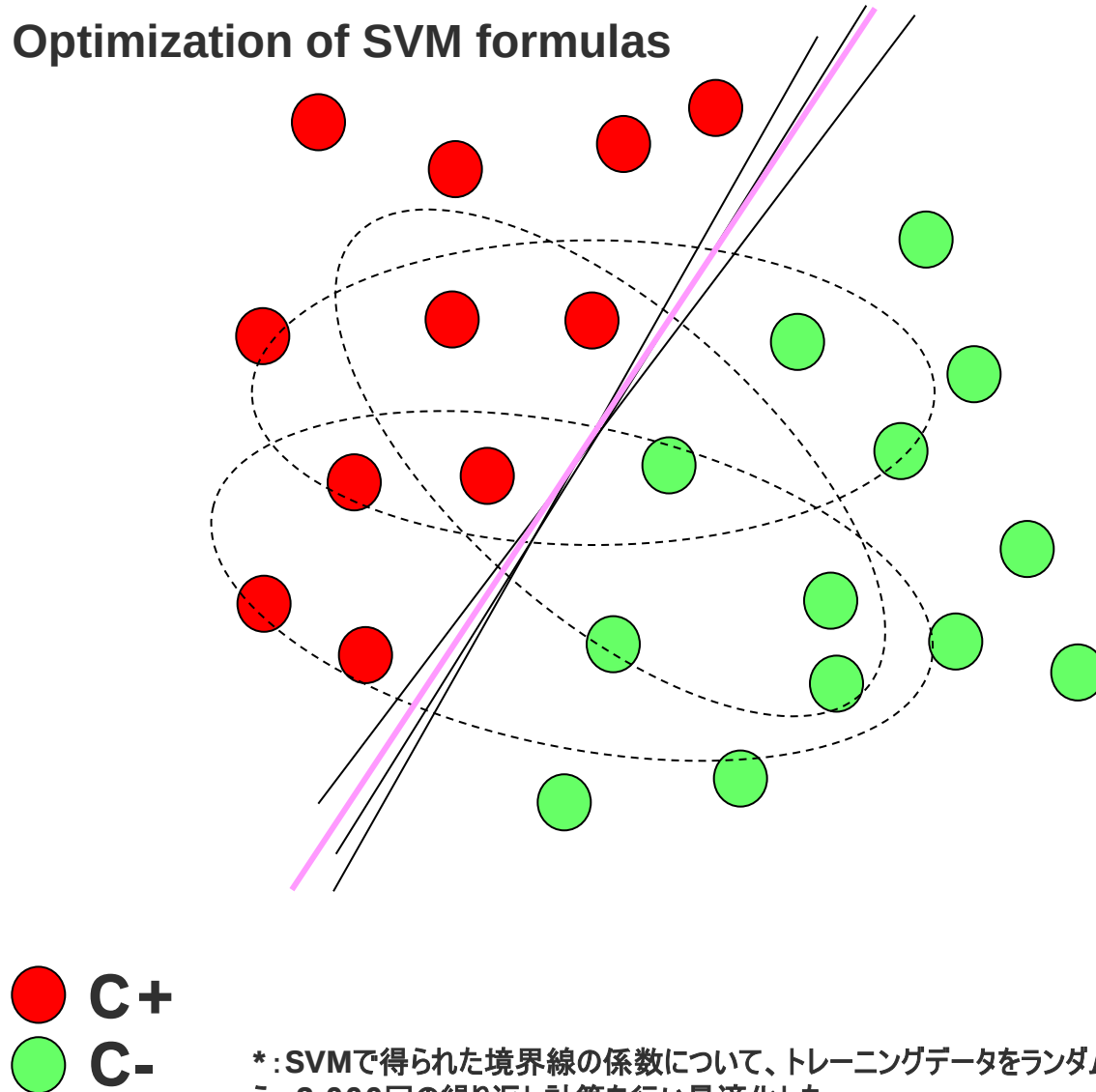
•Matsumoto et al., *Cancer Inform.* 2011, 259-71.

● Rat liver cancer, ● Rodent cancer, ● Non-cancer



各化合物グループは変異原性の有無に関係なく形成された(生体内でのがん化に関連したMode of Actionに依存している可能性)

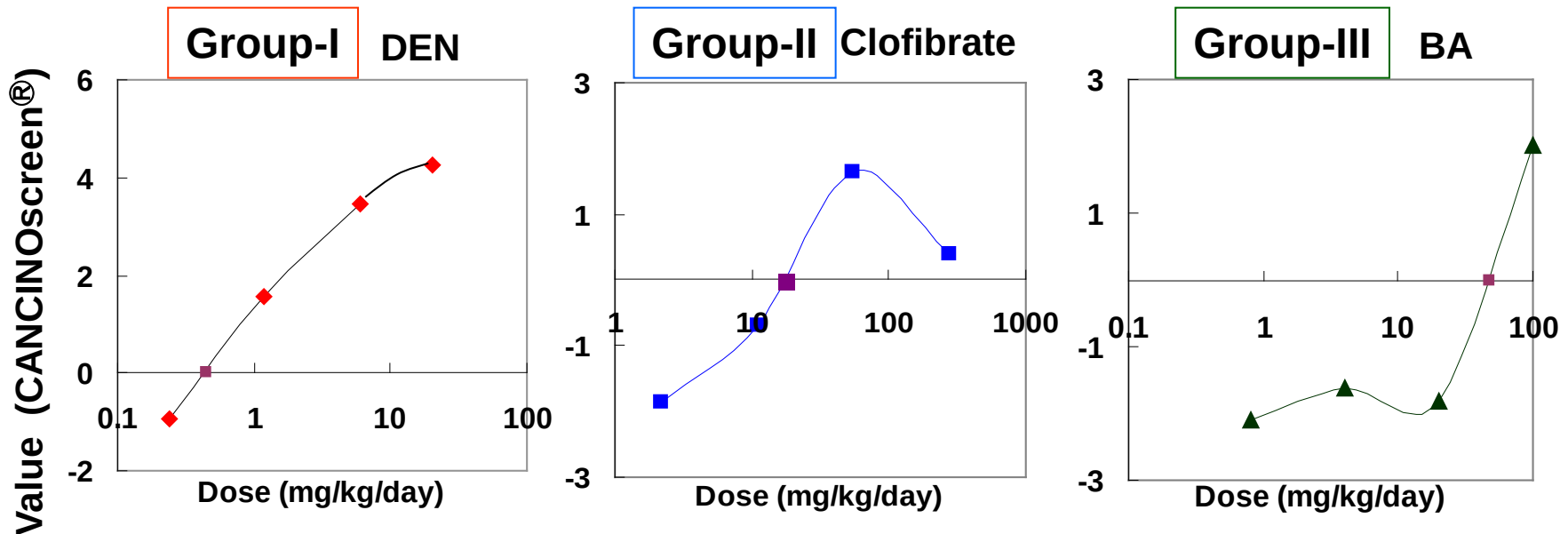
Optimization of SVM formulas



*: SVMで得られた境界線の係数について、トレーニングデータをランダムに入れ替え、3,000回の繰り返し計算を行い最適化した

Dose dependency of the CARCINOscreen® value

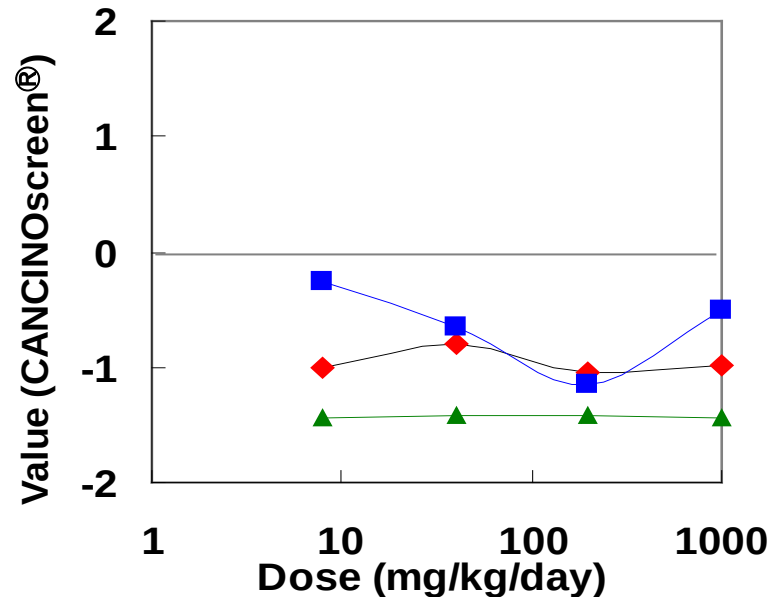
Evaluate the association between the score of CARCINOscreen® and dosage level of animal experiment.



- CARCINOscreen® value of each compounds exhibited minus level in lower dose, and increase in a dose dependent manner.
- CARCINOscreen® value will be compared with TD50 from a 2-year carcinogenicity test.

Dose dependency of the CARCINOscreen® value

Non-carcinogen
(L-Ascorbic acid)



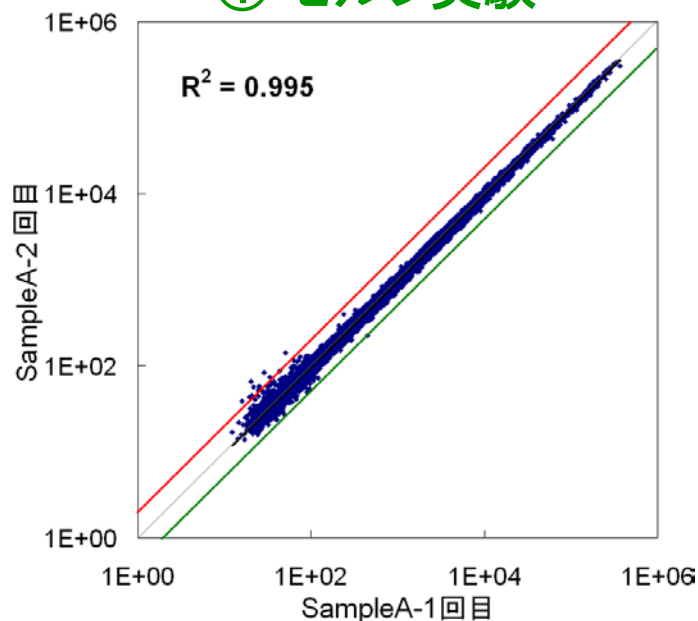
• CARCINOscreen® values of non-carcinogen are minus level (i.e negative value) in all three formulas.

In the future, we tried to calculate a cancer NOEL or NOAEL of CARCINOscreen® values in order to apply to regulatory sciences.

CARCINOscreen[®] マイクロアレイデータ取得において必要な要素

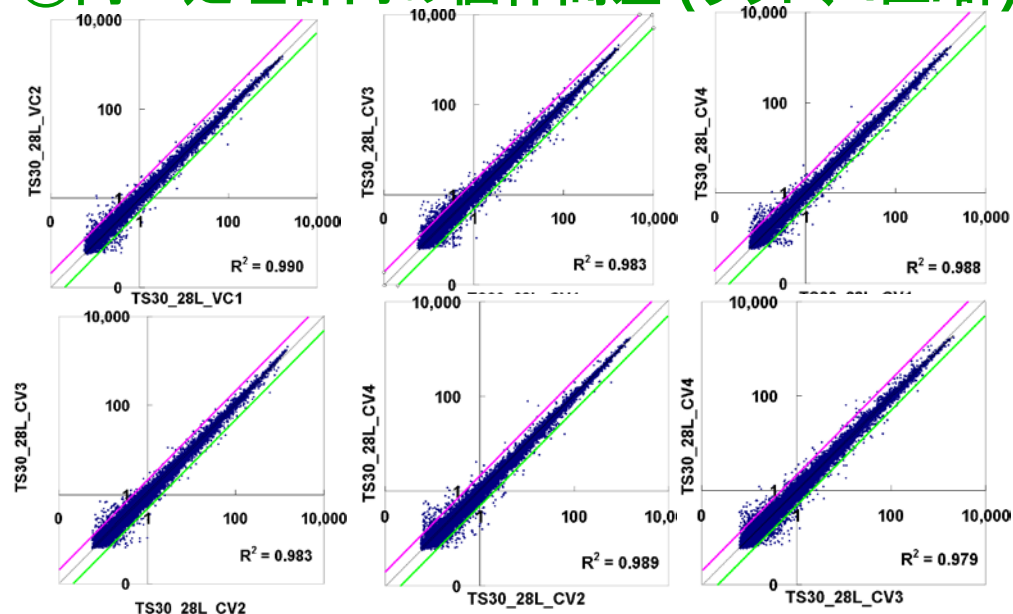
- ✓十分にデザインされた実験系
- ✓品質の高いRNA⇒バイオアナライザの活用
- ✓高精度のアレイ実験

① セルフ実験



⇒高精度のアレイ実験

② 同一処理群内の個体間差 (ラット、4匹/群)



決定係数(R^2): 0.978~0.990

⇒個体間のばらつきを考慮した高精度のデータ