

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

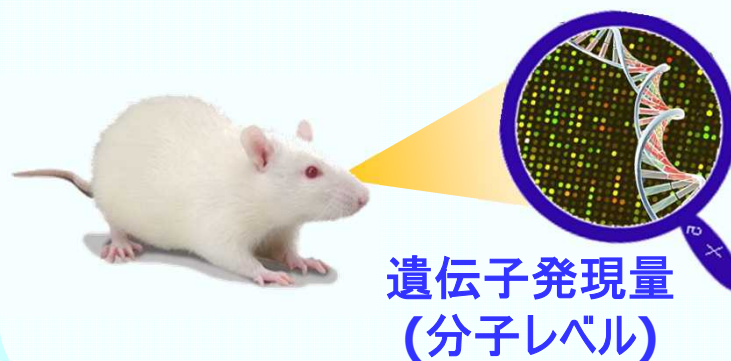
現行のがん原性試験

- × 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と？

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

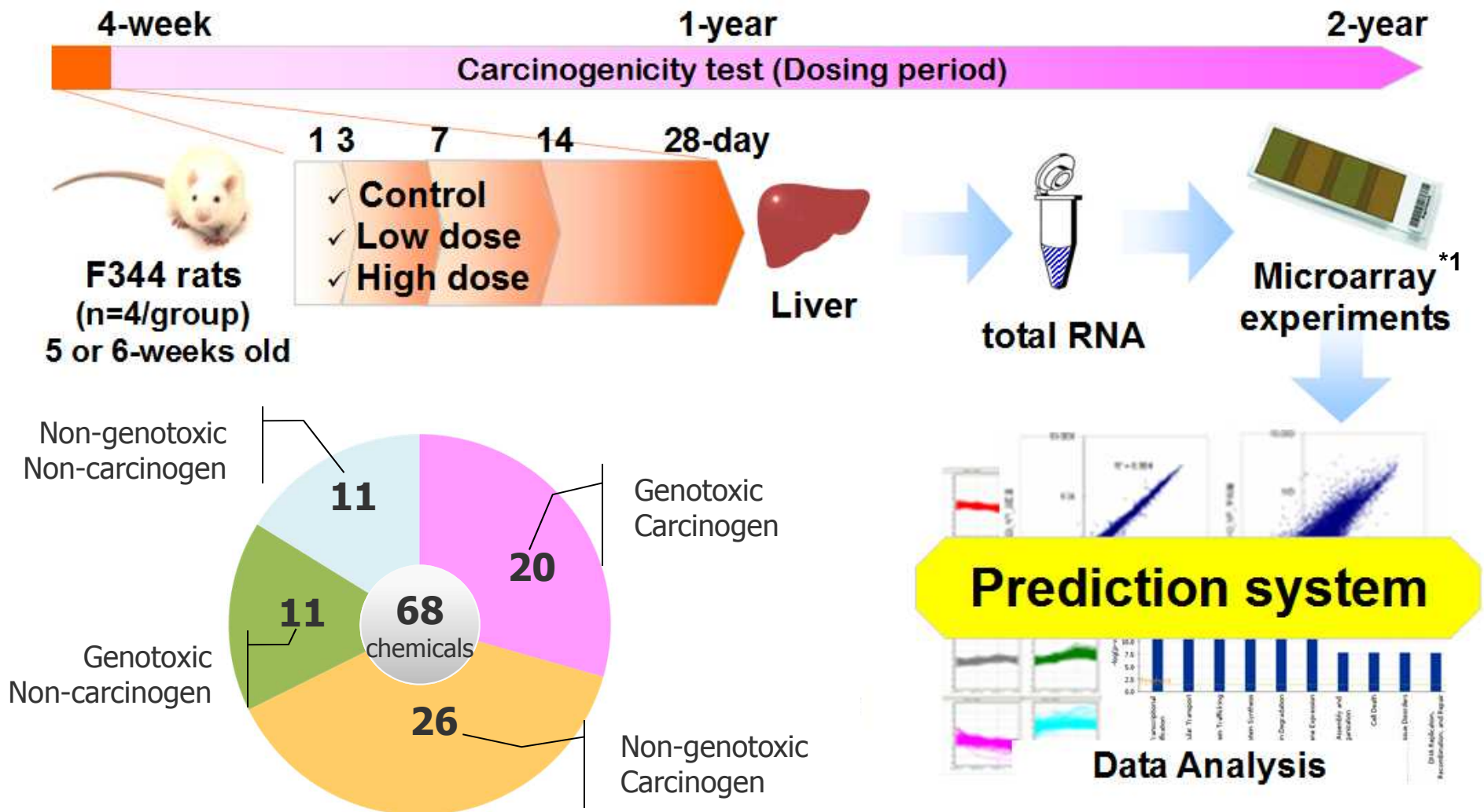


Fig. The number of compounds for training data

*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**

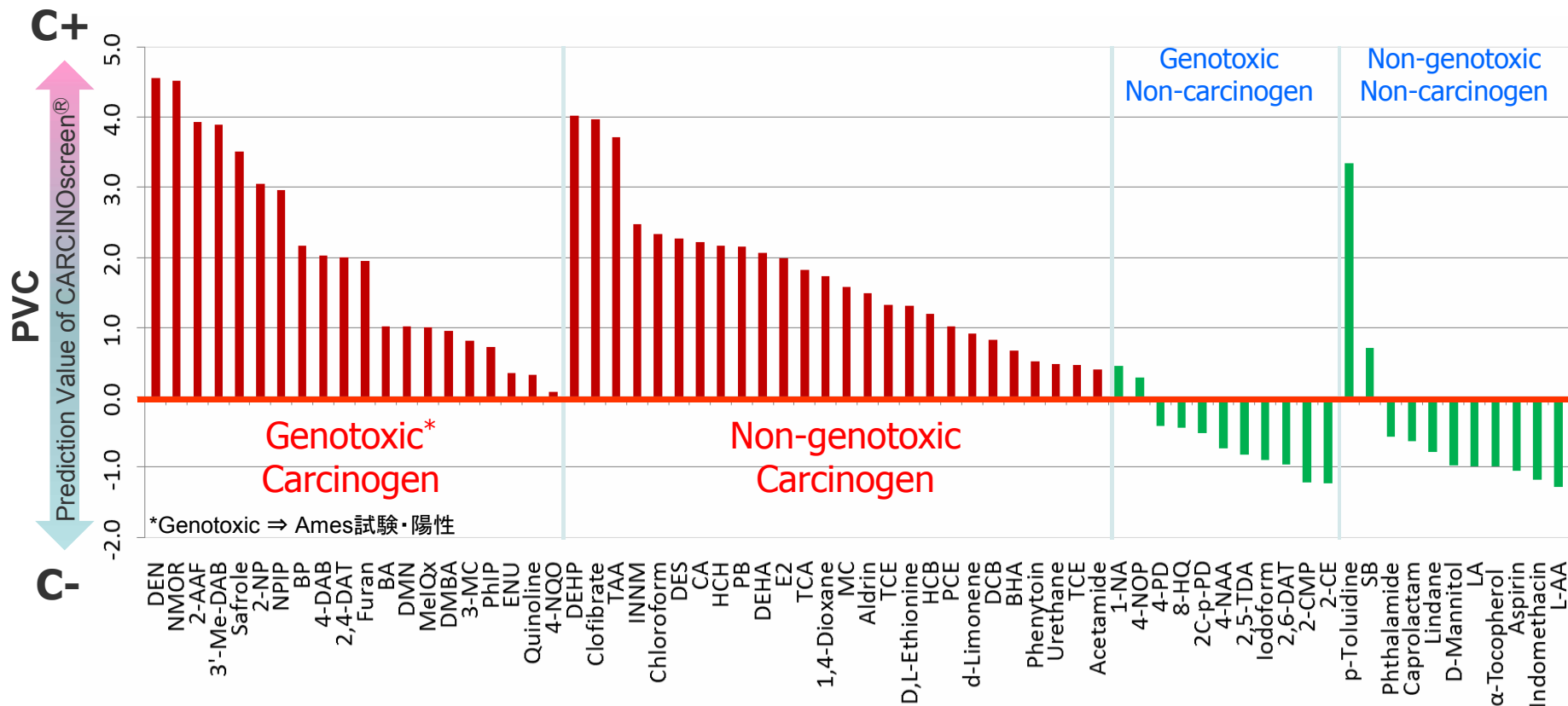
(Matsumoto, *et al.*, 2009)

(Matsumoto, *et al.*, 2011)



CARCINOscreen[®] 予測結果(68物質;投与28日目)

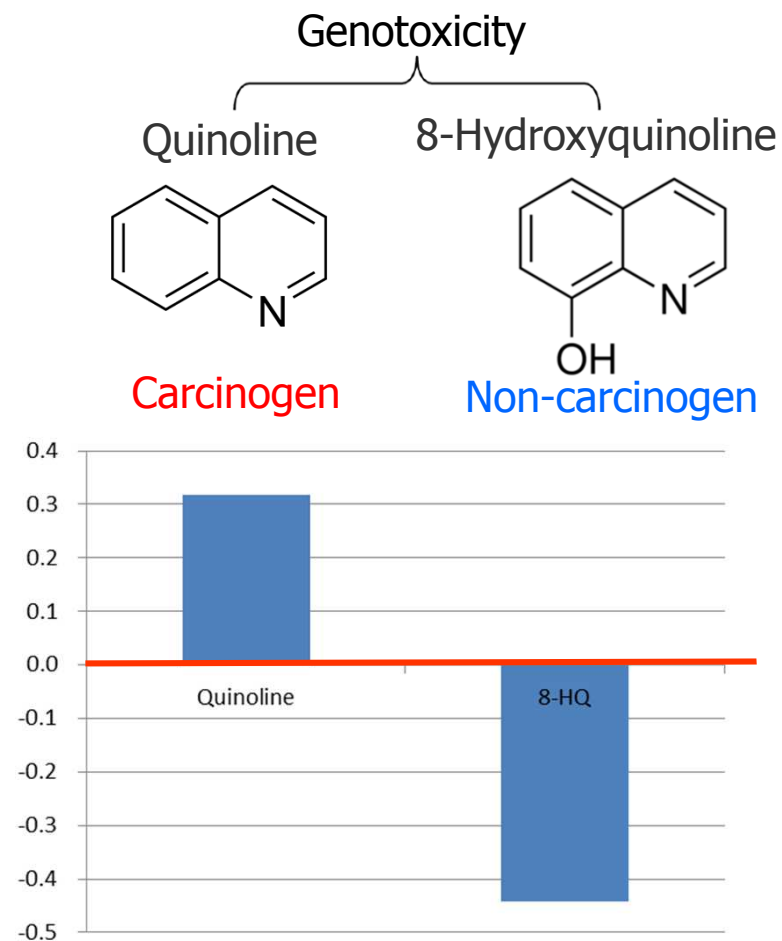
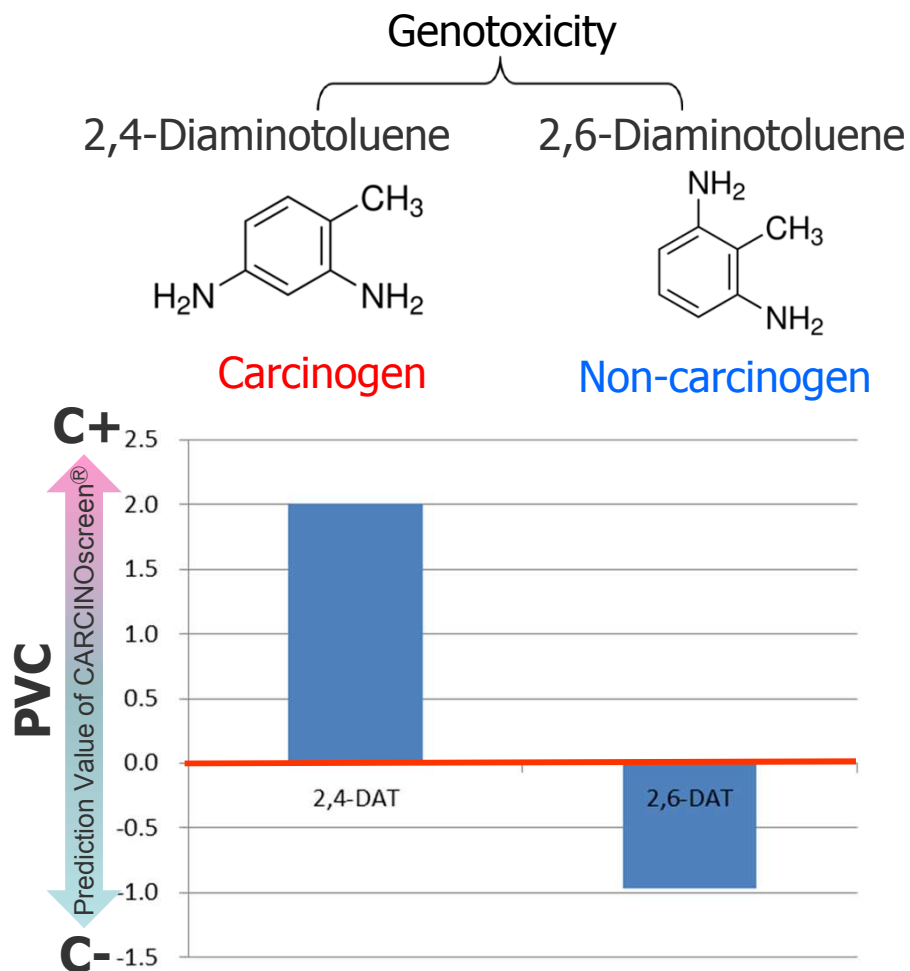
✓ CARCINOscreen[®]では非変異発がん性物質を高精度に予測可能



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)

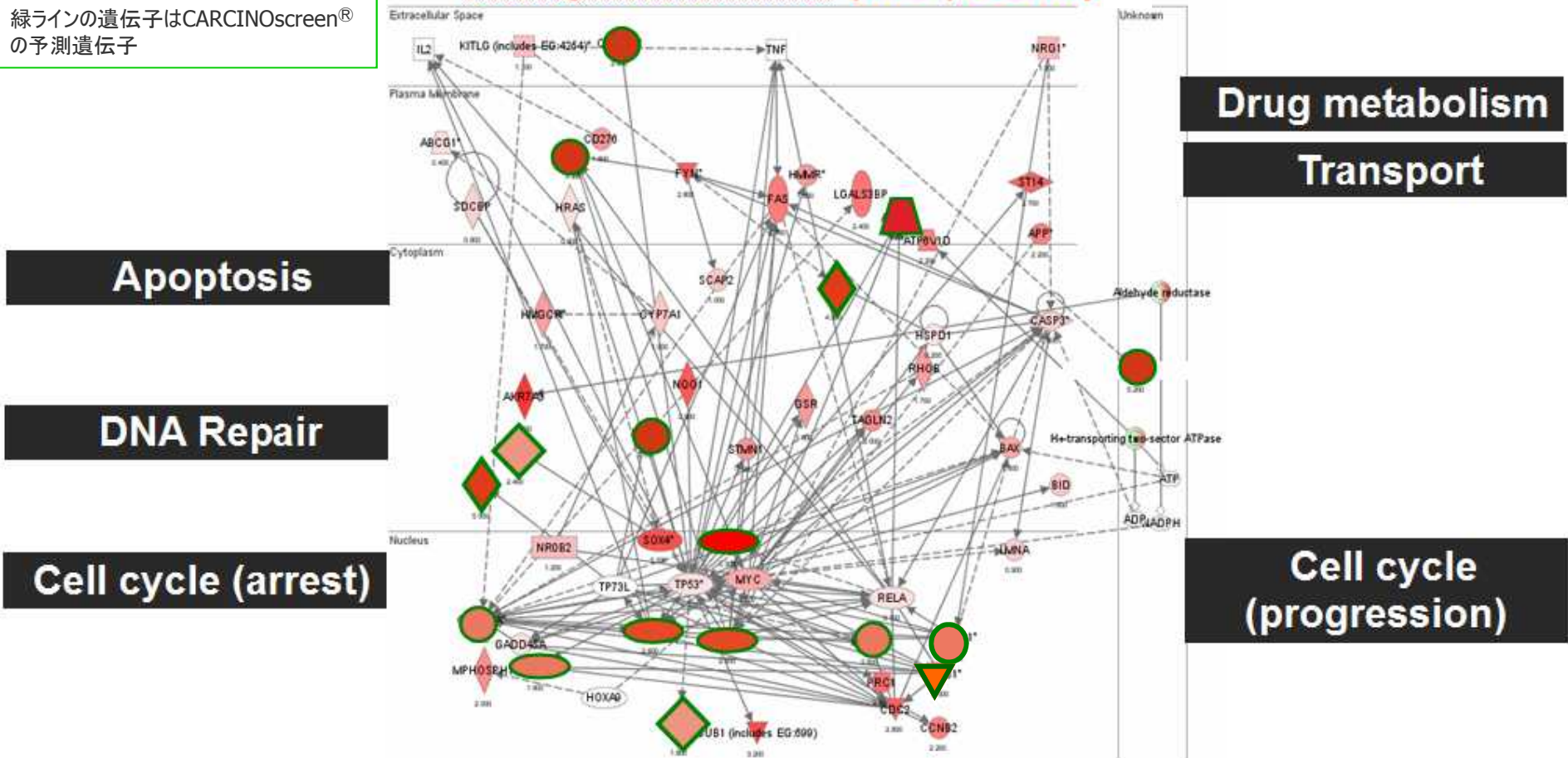


CARCINOscreen[®] can detect accurately carcinogen or non-carcinogen of structural isomer.

CARCINOscreen[®] 予測遺伝子周辺の遺伝子ネットワーク-1

緑ラインの遺伝子はCARCINOscreen[®]の予測遺伝子

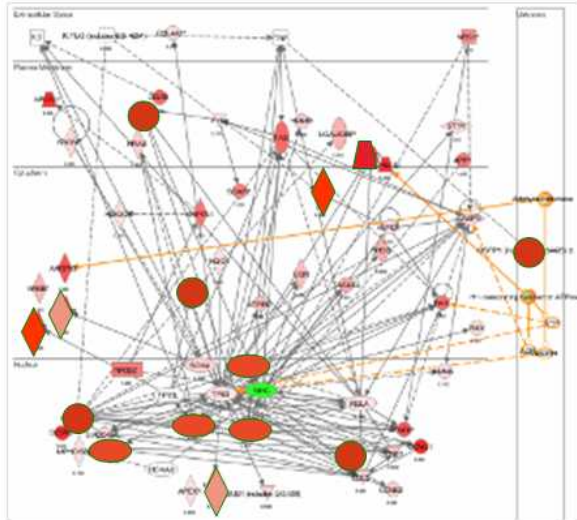
Diethylnitrosamine (DEN): Group A



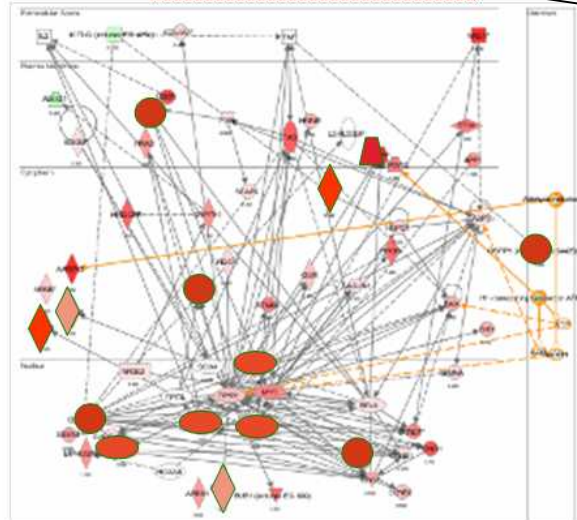
Key genes used in the Group-A of CARCINOscreen[®] showed a gene network (e.g. toxicity pathway) contained tumor suppressor gene, **p53 concerned with cell cycle, DNA repair, and apoptosis**. (Key gene looks like a “Hub” gene of each pathways)



3'-Me-DAB



Thioacetamide

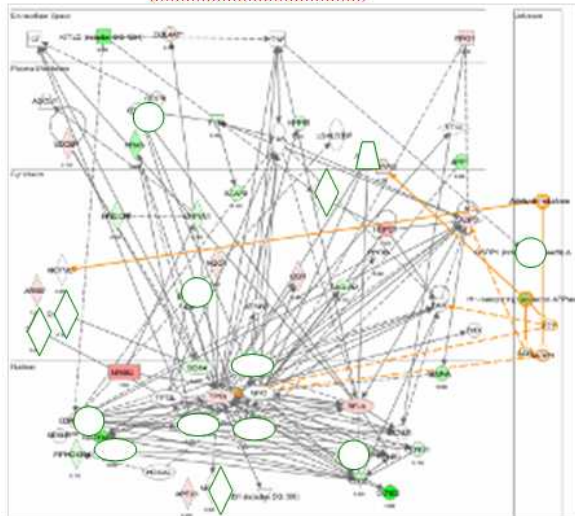


Non-genotoxic carcinogen

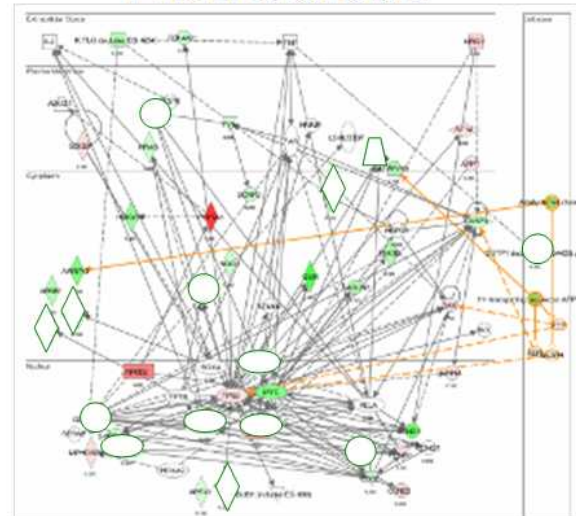
Carcinogen group-A

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)

予測システム構築において、開発に用いたデータ自身に対する予測結果は、良い数値を示す傾向にある(ある意味、“当たり前”の結果)

- ・他の施設でも実施可能か？
- ・F344ラット以外の系統にも適用可能か？
- ・外部データに対してどの程度の予測精度を示すのか？
- ・その他の発がん性スクリーニング法と比較して予測精度はどの程度か？

CARCINOscreen[®] 予測システムの検証

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); SDラット

- ・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); Wistar-Hanラット

- ・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



Cr:CD (SD)

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)

■ 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-Han

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[®] 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

CARCINOscreen[®] 検証⑤: 外部バリデーションB

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

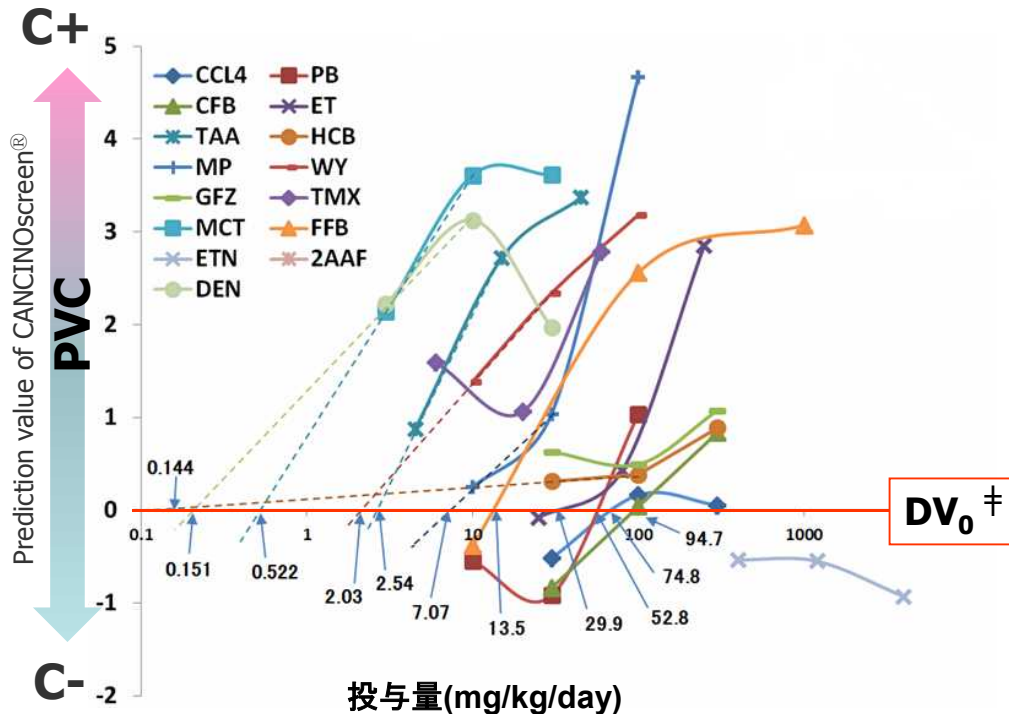
* 発がん性について明確な情報が得られた40化合物*(発がん性;15化合物, 非発がん性; 25化合物)

	CARCINOscreen [®] による予測結果		
	低用量	中用量	高用量
Concordance	85.0% (34/40)	95.0% (38/40)	92.5% (37/40)
Sensitivity	60.0% (9/15)	86.7% (13/15)	93.3% (14/15)
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	40.0% (6/15)	13.3% (2/15)	6.7% (1/15)

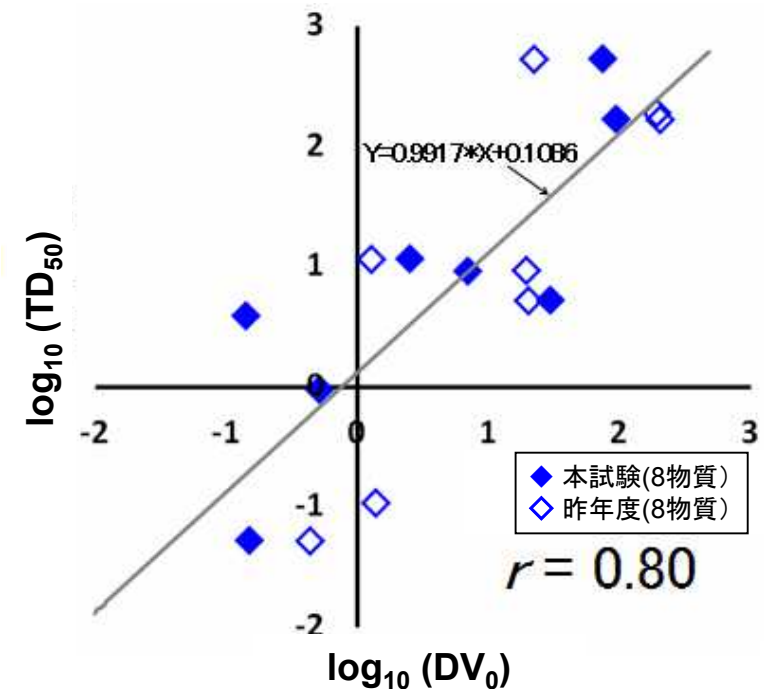
中用量以上で90%以上の精度で発がん性を予測することができた

CARCINOscreen[®] 検証⑤: 外部バリデーションB (用量相関性)

■ 発がん性予測結果(PVC)と用量との関係性



■ DV0‡とTD50(既報)との相関性



- ・ 発がん性予測値(PVC)は用量依存的な増加を示す傾向(低用量では陰性を示す物質もある)
- ・ TD₅₀値との相関性も高く、PVCによる定量的評価ができる可能性が示唆された

■ 中期発がん性試験との比較(11+9化合物/両試験で情報があつたもの)

#	Chemicals	C*1	Cr*2	Muta*3	発がん性予測結果		
					中期発がん*4	CARCINO*4	
1	Quinoline	C+	Cr+	M+	+	+	
2	Safrole	C+	Cr+	M+	+	+	
3	MeIQx	C+	Cr+	M+	+	+	
4	Phenobarbital	C+	Cr+	M-	+	+	
5	Hexachlorobenzene	C+	Cr+	M-	+	+	
6	α-Hexachlorocyclohexane	C+	Cr+	M-	+	+	
7	Thioacetamide	C+	Cr+	M-	+	+	
8	Urethane	C+	Cr+	M-	+	+	
9	Chlorendic acid	C+	Cr+	M-	+	+	
10	DDT	C+	Cr+	M-	+	+	
11	Caprolactam	C-	Cr-	M-	—	—	
参考データ	1	PhIP	C+	Cr-	M+	—	+
	2	7,12-Dimethylbenz [a]anthracene	C+	Cr-	M+	—	+
	3	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	+	+
	4	Aldrin	C+	Cr-	M-	+	+
	5	Di(2-ethylhexyl)adipate	C+	Cr-	M-	—	+
	6	d-Limonene	C+	Cr-	M-	+	+
	7	Trichloroacetic acid	C+	Cr-	M-	—	+
	8	Diethylstilbestrol	C+	Cr-	M-	+	+
	9	Dieldrin	C+	Cr-	M-	+	+

*1 C: げっ歯類における発がん性でC+が陽性、C-が陰性。 *2 Cr: ラット肝臓における発がん性でCr+が陽性、Cr-が陰性。 *3 Muta: 変異原性(Ames test)でM+が陽性、M-が陰性。 *4: 予測結果を示しており、発がん性ありと判定されたものは「+」、発がん性なしと判定されたものは「-」。 中期発がん性試験はHasegawa R. *et al.*, 1992より引用。 CARCINOscreen®はToxIII, 投与28日目の結果を示す。

CARCINOscreen® 検証⑥: 予測精度の比較(Bhas42試験)

■ Bhas42試験(*in vitro*)との比較(22化合物/両試験で情報があつたもの)

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

*1 C: げっ歯類における発がん性でC+が陽性、C-が陰性, *2 Cr:ラット肝臓における発がん性でCr+が陽性、Cr-が陰性, *3 Muta: 変異原性(Ames test)でM+が陽性、M-が陰性, *4 :予測結果を示しており、発がん性ありと判定されたものは「+」、発がん性なしと判定されたものは「-」.
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®はToxIII, 投与28日目の結果を示す.

CARCINOscreen® 検証⑥: 予測精度の比較

	中期発がん性試験 (ラット肝発がん物質のみ)		Bhas42 assay	
	中期発がん性試験*	CARCINOscreen®	Bhas42 assay †	CARCINOscreen®
Concordance	100% (11/11)	100% (11/11)	68.2% (15/22)	86.4% (19/22)
Sensitivity	100% (10/10)	100% (10/10)	66.7% (8/12)	83.3% (10/12)
Specificity	100% (1/1)	100% (1/1)	70.0% (7/10)	90.0% (9/10)
False Positive	0% (0/1)	0% (0/1)	30.0% (3/10)	10.0% (1/10)
False Negative	0% (0/10)	0% (0/10)	33.3% (4/12)	16.7% (2/12)

* 中期発がん性試験 (Hasegawa R. *et al.*, 1992), CARCINOscreen® ToxIII, 投与28日目

† 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、

- ✓ラット肝臓で発がん性を示す物質、特に非変異発がん性物質の検出力は高い
- ✓非発がん性物質の検出力も比較的高い
- ✓一方で、本予測システムでは他生物種(例; マウス)や他臓器(腎臓等)で発がん性を示す物質の検出力が低い

⇒今後も外部データを蓄積し、既存スクリーニングとの比較を継続して行う

CARCINOscreen® 予測システムの検証(結果のまとめ)

Training Data



F344/DuCrIcrIj

Fischer 344
68 chemicals

Accuracy: 94%

Inter-lab. Vali.



F344/DuCrIcrIj

Fischer 344
4 chemicals, 3 sites

Accuracy: 100%

Applicability

External Vali.

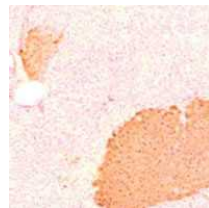


F344/DuCrIcrIj

Fischer 344
18 chemicals

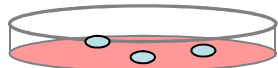
Accuracy: 85%

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
11 chemicals

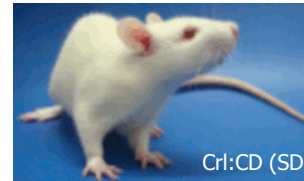
Accuracy: 100%



Bhas42試験(*in vitro*)
22 chemicals

Accuracy: 86.4%

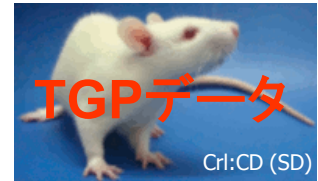
*現在もデータを蓄積中



CrI:CD (SD)

Sprague Dawley
16 chemicals*

Accuracy: 88%



CrI:CD (SD)

TGPデータ
Sprague Dawley
36 chemicals

Accuracy: ~95%



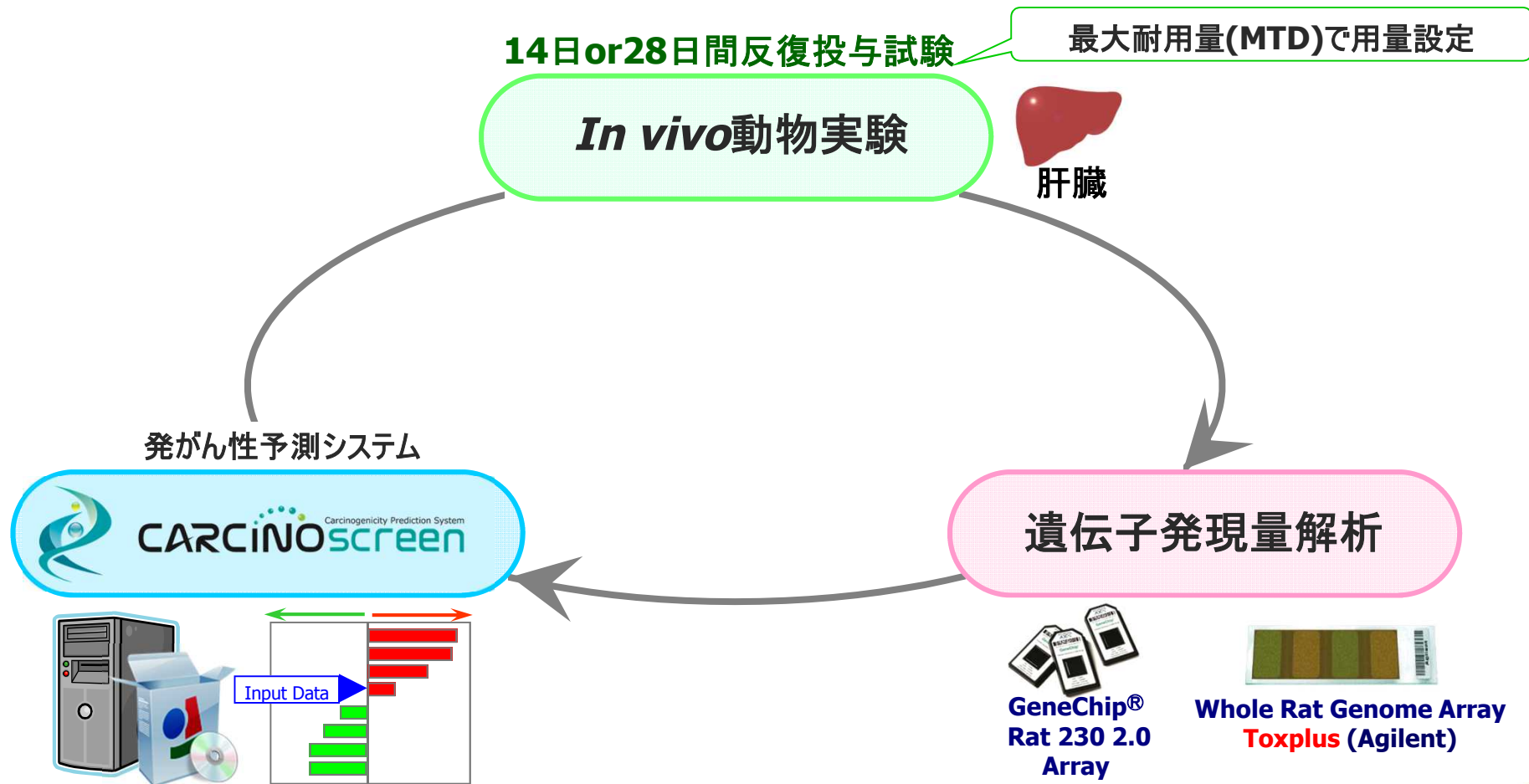
CrI:WI (Han)

Wistar-Han
4 chemicals

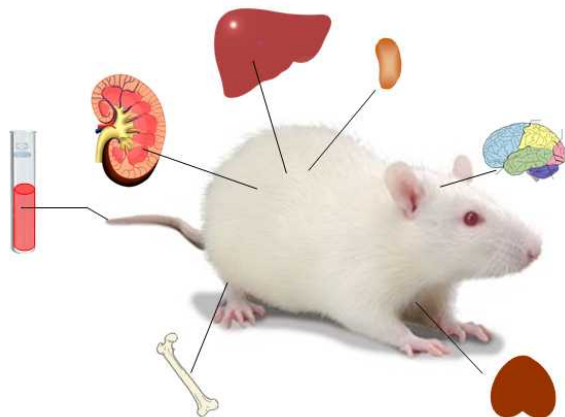
Accuracy: 100%

CARCINOscreen[®] 全体のまとめ

2年間投与が必要な発がん性試験を、肝臓の遺伝子発現量データから最短14日間で予測可能なシステム



本研究では、**遺伝子発現量解析**等の最新技術を活用し、**化学物質の有害性評価**を高度化し、**迅速かつ効率的な試験**の実施に貢献することを目的とする



①主要臓器における一般毒性

②発がん性

③神経毒性

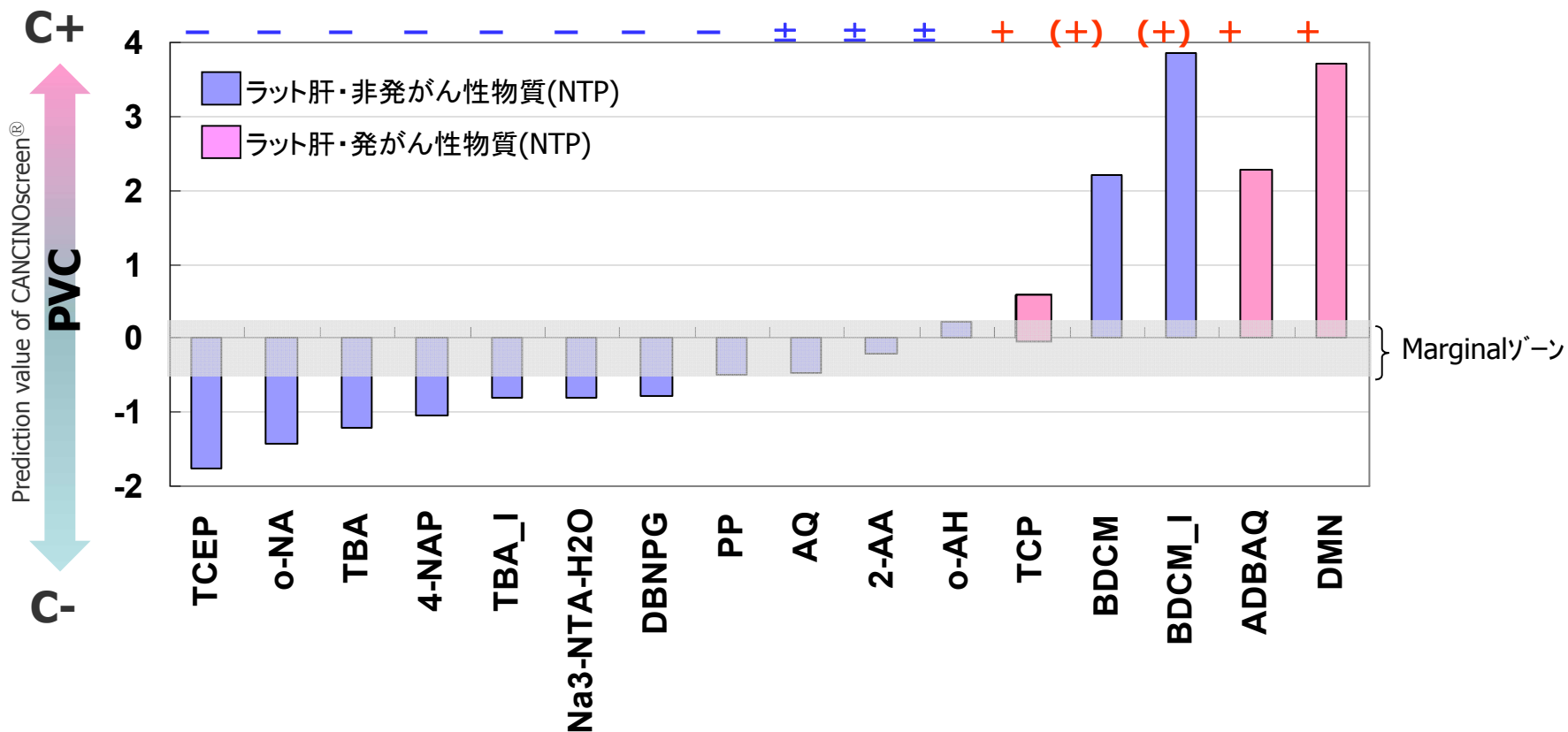
④免疫毒性

【期待されるメリット】

- ✓ **動物数削減/費用削減**;一つの動物実験で複数の毒性を検出/予測できる
- ✓ **毒性メカニズム(i.e. Mode of Action)**に基づいた毒性評価
- ✓ **定量性の向上/高精度化**;遺伝子発現量による客観的かつ定量的な評価

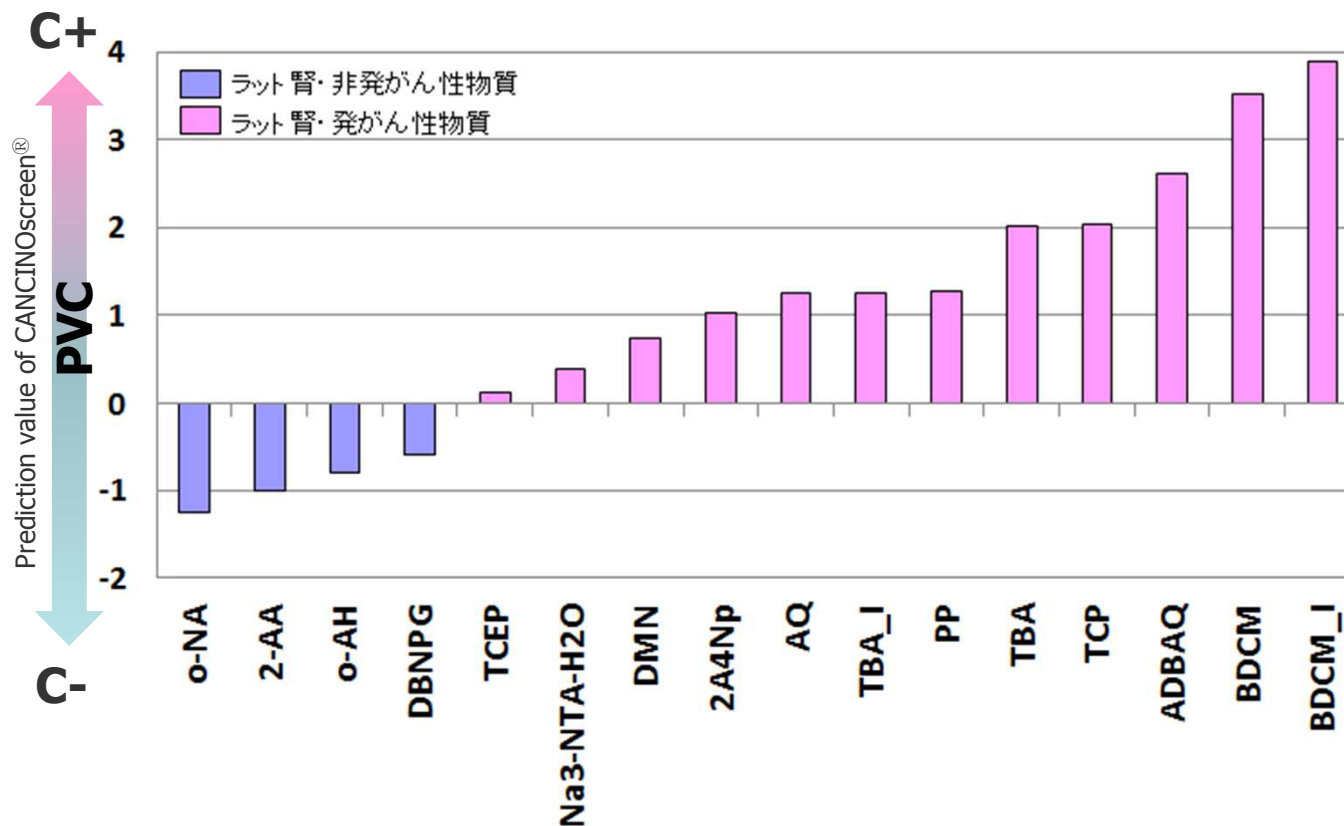
CARCINOscreen® 参考データ(H23-24年度成果 Tox-omicsプロジェクト)

■ CARCINOscreen®による発がん性予測(14+2物質、28日投与、肝臓)



- ・発がん性物質は3物質とも正答し、非発がん性物質は-若しくは±と判定された
- ・BDCMの類縁体であるジクロロメタンはヒト胆管がんを誘発することが報告(BDCMはラット雌・肝で発がん性有)

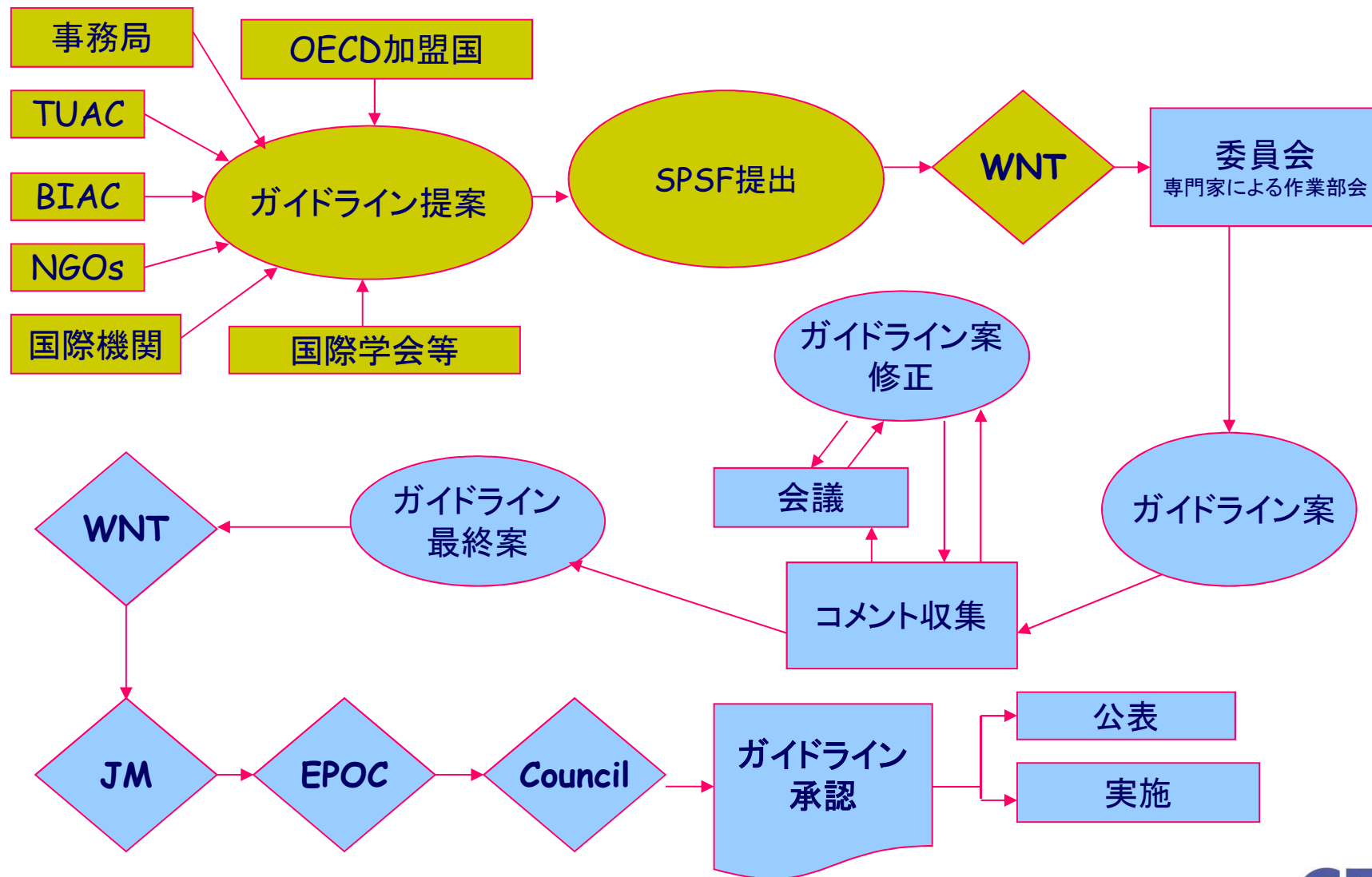
■ 腎尿細管がんの予測結果(14+2物質、28日投与、腎臓)



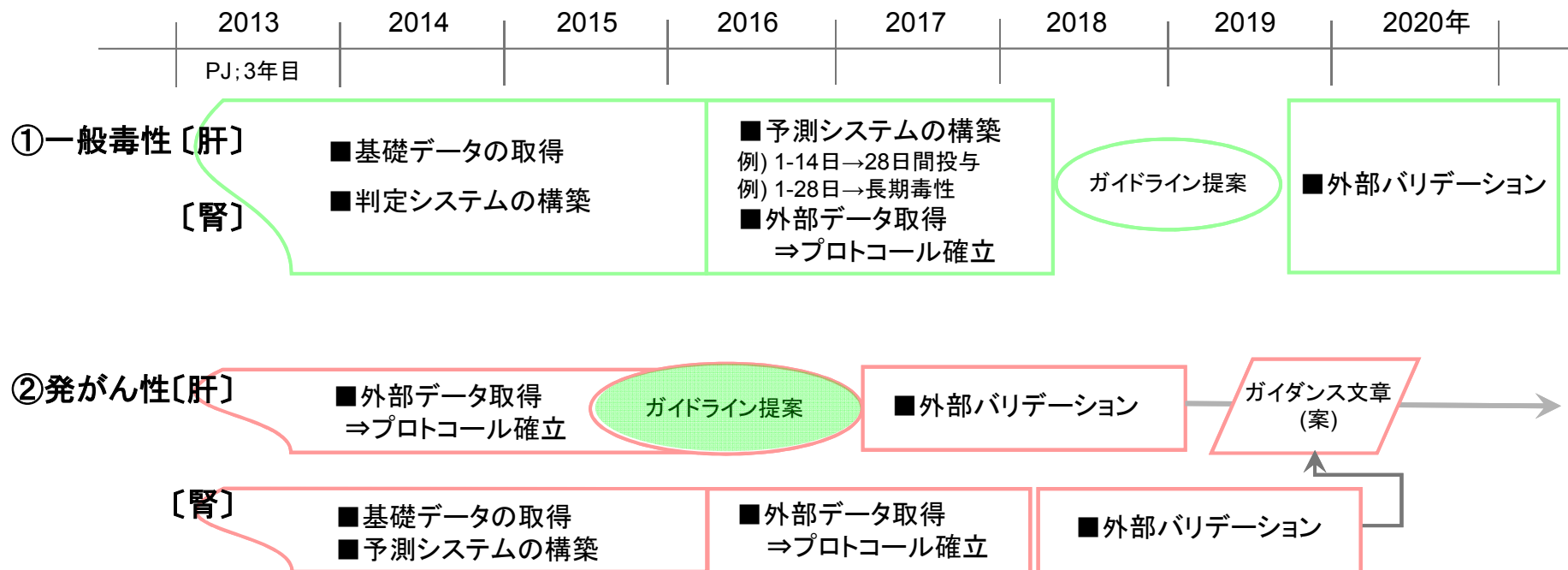
・14物質(16データ)全て、腎尿細管がんの有無を正しく予測できた

- ⇒ 今後も遺伝子発現量データを蓄積し、幅広い腎発がん性物質を検出できるシステムにする
- ⇒ 腎臓の部位別データを活用し、毒性メカニズムに基づいた予測遺伝子を抽出する

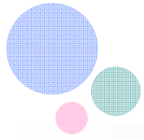
CARCINOscreen® 参考データ(ガイドライン化へのプロセス) 例; OECD



CARCINOscreen[®] 参考データ(ガイドライン化へのロードマップ)



2015年下半期のガイドライン提案の目標に向けて作業進行中



参考資料

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

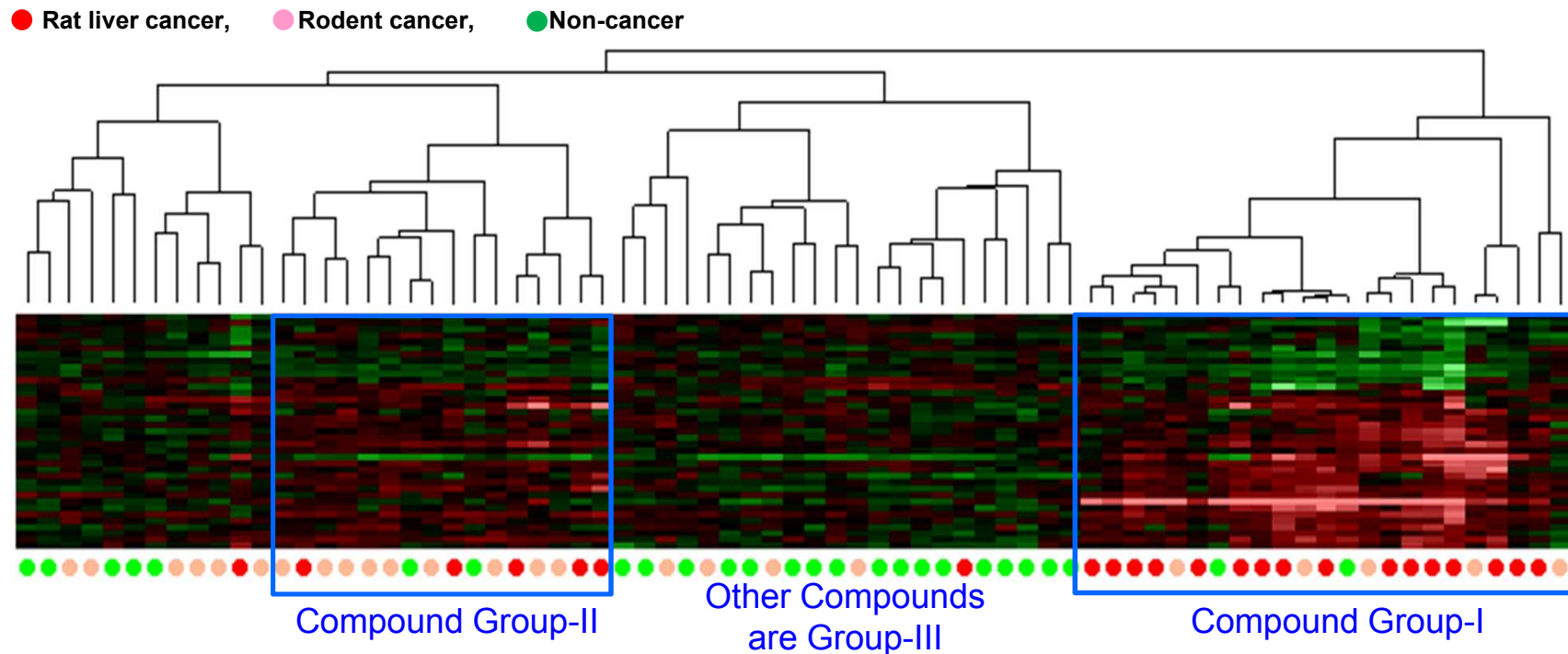
- ・マイクロアレイ : - NEDO ToxArrayIII(6,709遺伝子、二色法)
- GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix)
- **Whole Rat Genome Toxplus (Agilent)**
- ・データ解析 : - GeneSpring GX (Agilent)
- Ingenuity Pathways Analysis (IPA)
- ・予測式構築 : - SVM (Support Vector Machine)

CARCINOscreen[®] 階層的クラスタリング(68化合物)

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***

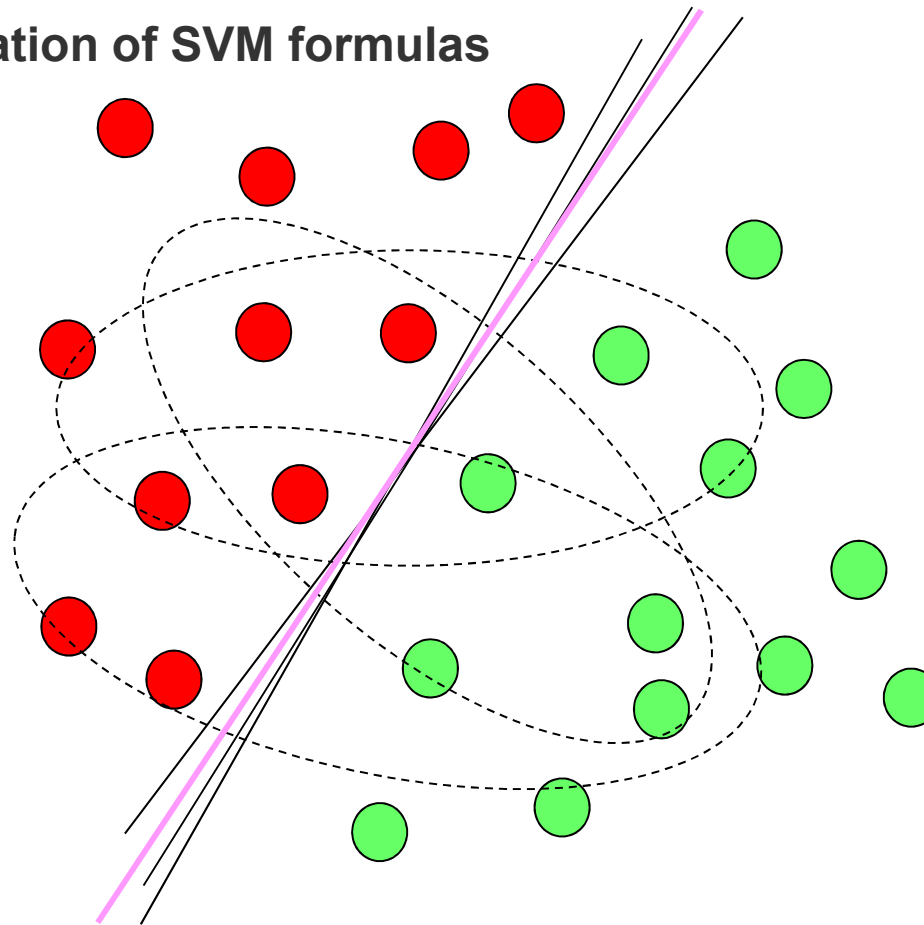
•Matsumoto et al., *Cancer Inform.* 2009, 253-69.
•Matsumoto et al., *Cancer Inform.* 2011, 259-71.



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)

CARCINOscreen[®] SVMによる予測式構築と最適化

Optimization of SVM formulas

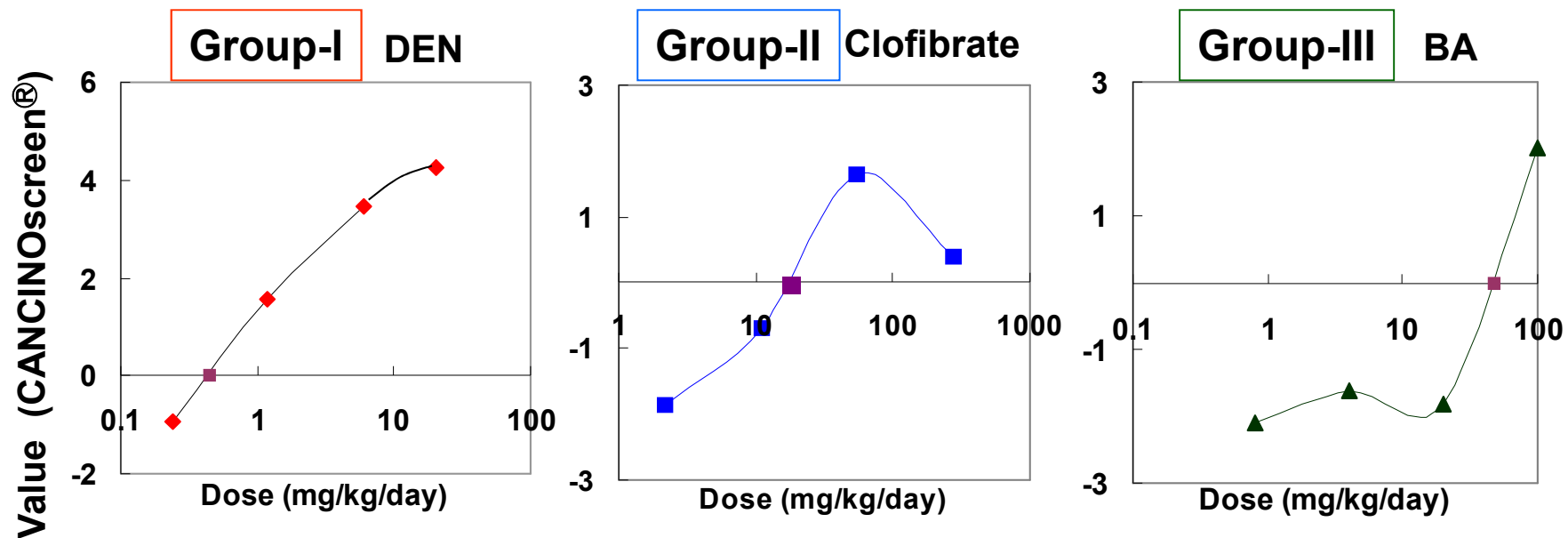


● C+
● C-

*: 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

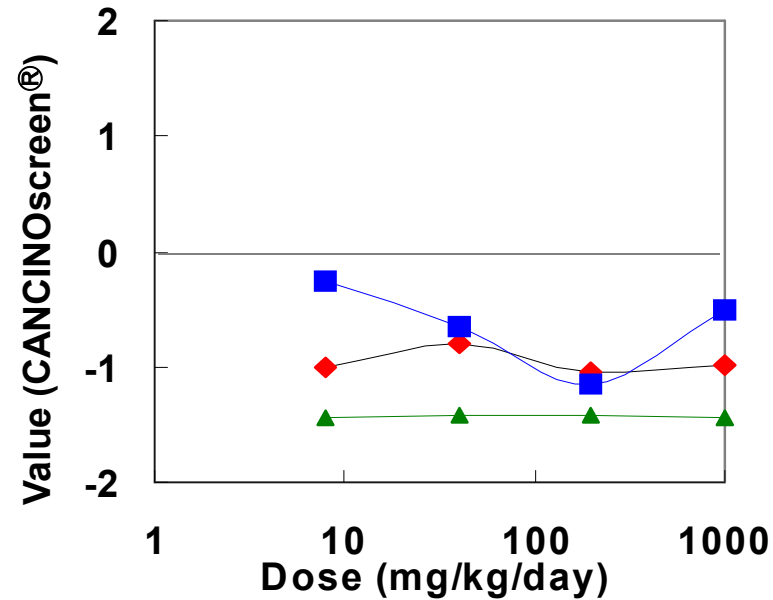
Evaluate the association between the score of CARCINOscreen[®] and dosage level of animal experiment.



- 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)



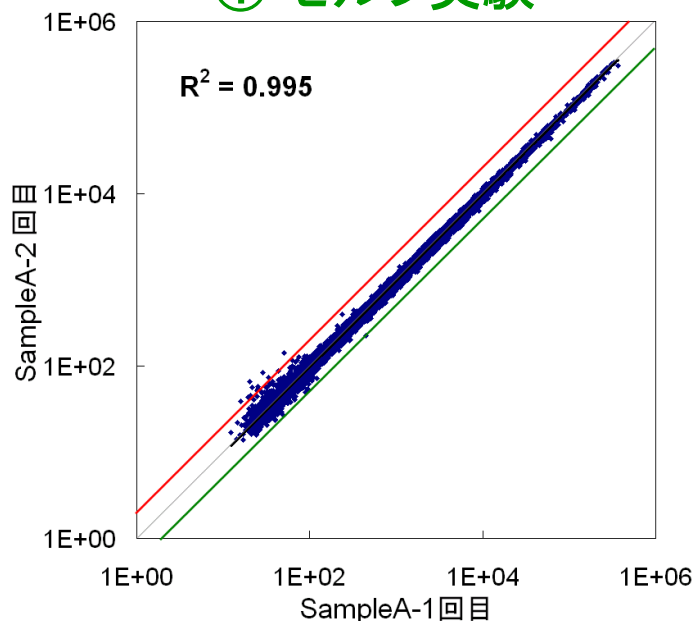
• CARCINOscreen[®] values of non-carcinogen are minus level (i.e negative value) in all three formulas.

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

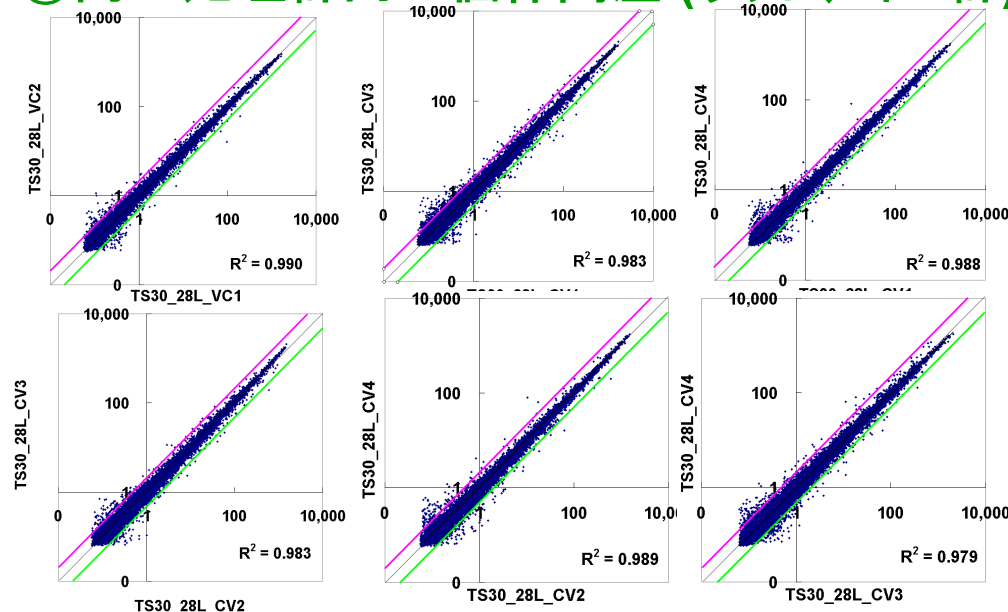
- ✓十分にデザインされた実験系
- ✓品質の高いRNA⇒バイオアナライザの活用
- ✓高精度のアレイ実験

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