

厚生科学研究費補助金  
生活安全総合研究事業

「DNA マイクロアレイ技術を応用した有害物  
質による健康障害発生の種差の評価法および  
遺伝子毒性の総合評価法の開発」

(H12 - 生活 - 002)

平成12年度研究報告書

主任研究者：大前和幸

(慶應義塾大学医学部教授)

平成13年(2001年)3月

## 目 次

I. 研究報告書	
I - 1. 本研究全体について-----	1
I - 2. 「種差」-----	9
I - 3. 「変異原」	
I - 3 - 1. ブレオマイシンによる遺伝子発現の研究-----	72
I - 3 - 2. 紫外線による遺伝子発現の研究-----	106
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	110
(資料1) HumanGenomeU95A 収載遺伝子	

## I - 1. 本研究全体について

**要旨** 化学物質の有害性研究において、外挿は重要なテーマであるが、外挿では種差の問題を避けて通れない。また、変異原性は発がんや次世代への影響から重要である。本研究では、種差や変異原性の評価法としての DNA チップから得られた発現プロファイルの有用性を検討するため、既知の化学物質、物理要因を用いて知見を集積している。平成 12 年度は、種差については、トリクロロエチレン (TCE) について、発がん性が明かなマウスを用いて検討した。変異原については紫外線、プレオマイシンについてヒトリンパ球を使って検討している。DNA チップから得られた発現プロファイルの有用性が証明されれば、実験動物データのヒトへの外挿の際の危険性を大幅に小さくすることができ、健康リスクアセスメント、マネージメントに貢献できることが期待される。また、変異原の検討では、変異原性の有無やタイプについての情報が得られることも期待され、新たな変異原性試験に発展することも考えられる。本研究の特色、次年度以降の計画についても述べる。

### 研究の背景

今日では有害化学物質によるヒト毒性情報が得られることは稀であり、動物や細胞実験による毒性評価試験に頼らざるを得ない。しかしこの種の試験は、その成果がヒトに外挿できなければ医学研究の意味を持たない。例えば、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」では、遺伝子毒性評価にサルモネラ菌・大腸菌による復帰突然変異試験とチャイニーズハムスター細胞株等による染色体異常試験を実施し、ラット 28 日間反復投与毒性試験で最大無作用量を求めることが決められているが、試験成績がヒトに直接外挿できるかどうかについては何の評価も判断もされない。

動物や細胞を用いた実験で得た有害性情報をヒトに外挿する場合、種

間で大差がある場合には、外挿は危険を伴うか、あるいは逆に、過剰な安全を担保することになる。これらの乖離を小さくするために、種差を客観的かつ迅速に評価する手法を開発する必要がある。

また、変異原性は毒性のなかでも発がんや次世代への影響といった点から重要であり、前述の化審法における復帰突然変異試験や染色体異常試験についての規定も、この趣旨によるものと考えられる。

### DNA チップ

生体が有害化学物質に曝露された際には、代謝酵素も含めて遺伝子の発現には変化がみられる。多数の遺伝子の発現状態は発現プロファイルと呼ばれるが、近年、多数の遺伝子の発現を同時に観察する手法として

DNA マイクロアレイまたは DNA チップが発展してきた。

DNA マイクロアレイ技術は中毒学の分野においても応用性があると考えられ、1999 年 7 月には“Application of Microarrays to Toxicology”と題するワークショップが合衆国環境保護庁の後援により開かれた。予見的レビューもあり、一例を挙げると、中毒における遺伝子ネットワークの研究や曝露評価、環境モニタリングに応用可能であるとしている<sup>1)</sup>。

実際に DNA マイクロアレイによって得られたデータを掲載する文献も散見されるようになり、四塩化炭素をヒトの肝腫瘍由来の HepG2 細胞に曝露させた実験ではインターロイキン 8 遺伝子が upregulate されていた<sup>2)</sup>。また、砒素によるヒトの肝がんの研究<sup>3)</sup>では、砒素に曝露され、肝に変性変化を有する人で、細胞周期、アポトーシス関連遺伝子を含む 60 程度の遺伝子の発現が正常者と異なっていたという。電離放射線照射による biomarker の検索では、被照射リンパ球で NER 関連遺伝子 DDB2 その他の発現が up regulate され照射量に比例したという<sup>4)</sup>。

## 研究の目的、概要

本研究では、既に種差が明かである化学物質について、発現プロファイルのデータを取り、種差についての知見と比較検討する。DNA チップを用いて、同一の化学物質に対するヒトおよびげっ歯類の遺伝子の発現プ

ロファイルを得る。数種の化学物質に関するデータを集積し、種差の検討における発現プロファイルの有用性を検証する。種差の評価方法としての発現プロファイルの有用性を検討することを目的とする（以下、「種差」）。実験はトリクロロエチレン（以下、TCE）から開始された。

近年、ゲノム損傷に対する修復機構の解明が進み、ヌクレオチド除去修復（以下、NER）、組換え修復、塩基除去修復（以下、BER）などに関与する遺伝子が同定されている。実際の変異が修復機構で修復しきれなかった結果であるかについては議論があるが、本研究では、修復機構の発動を変異原性の指標と考え、発現プロファイルによりその発動を知を試みる。「種差」と同様に、性格が既知の変異原について、ヒトの発現プロファイルを得る。性格の異なった変異原についてデータを集積し、発現プロファイルが変異原性の有無および変異原の性格の情報をもたらすか検証する。発現プロファイルの検討が新たな変異原性試験に成り得るかについて検証することが二番目の目的である。（以下、「変異原」）。実験は研究者自身のリンパ球を使って紫外線（UVA、UVB、UVC）、ブレオマイシンから開始された。

当初、実験材料については培養細胞を予定していたが、その後の検討により変更することとなった。「種差」については、代謝を重視し、肝由来の細胞を主として用いる。in vivo

では、マウスとラットの肝 RNA 及び、マウス、ラット、ヒトのリンパ球 RNA、*in vitro* では、マウス、ラット、ヒトの初代培養肝細胞から抽出した RNA を使用する。リンパ球については、チトクローム P450 その他の薬物代謝酵素、転送蛋白が末梢血中の（リンパ球を含む）単核細胞で発現していることが DNA アレイを使って明らかになる<sup>5)</sup>など、薬物代謝研究にリンパ球も用いられるようになってきたため対象に加えられた。「変異原」についてはヒトのリンパ球を用いている。

#### 期待される成果

「種差」では、① 化審法の対象となる新規化学物質や毒性情報の不足している既存化学物質については、どの種の動物や細胞を用いて毒性実験を実施すれば、ヒトに外挿可能な情報が得られるか、② 情報の豊富な既存化学物質について、一日許容摂取量や一日耐用摂取量等を検討する際には、どの種の動物・細胞実験の毒性情報を採用すれば、ヒトに対して妥当な数値を決定できるか、の判断の科学的根拠を与えることとなり、無駄のない実験や情報の収集に寄与し、規制値精度の格段の向上が期待できる。既存化学物質でのデータを採用すべき動物種、新規化学物質等での実験を実施すべき動物種の科学的裏付けのある意志決定が可能となり、データのヒトへの外挿の際の危険性を大幅に小さくすることができ、健康リスクアセスメント、マネーজে

ントに貢献できることが期待される。具体例として、①化審法による 28 日間亜急性毒性試験については、本法の結果によりヒトに近い動物種を選択使用することができる、②IARC 等が公表している発がん物質分類で、ヒトでの発がんの証拠がない IARC の 2A、2B に相当する物質のヒトに対する発がん性評価を再評価・再分類することができると考えられる。

「変異原」の成果により、新規化学物質による発現プロファイルをみることにより、当該化学物質が変異原であるか否かだけでなく、変異原である場合にはその性格まで予測できる可能性があり、新たな変異原性試験へ発展することが期待される。

#### 本研究の特色

本研究の特色は、特定の要因を負荷した場合の個々の遺伝子の変動について研究するのに止まらず、種差や変異原性の評価を視野に入れた研究であるという点である。

また、Affimetrix 社 GeneChip システムの採用も特色の一つである。当初、DNA チップまたは DNA マイクロアレイとして、スライドガラス上に数百塩基のヌクレオチドをスポットしたタイプのものを使用する予定であった。その後、学内の他の研究室に Affimetrix 社 GeneChip システムが導入されており、これの利用が可能となったので、DNA チップとして GeneChip を使用することとした。GeneChip は、現在までに知られてい

る遺伝子あるいは、遺伝子の一部と考えられている expression sequence tag (EST) を半導体製造技術を応用して基盤上に合成したもので、使い捨てで高価であるが、疑陽性率が低い点で他のマイクロアレイと比べて優れており、多くの製薬会社に納入されている。

単一の cDNA クローン (長さ数百塩基対) をガラス上にスポットする方式に比べて、GeneChip probe array では 1 遺伝子当たり 16 対の特異的なオリゴヌクレオチドプローブ (長さ 20 ~ 30 塩基対) を基盤上に合成し、転写産物を測定している。対になったオリゴヌクレオチドプローブを採用することにより非特異的ハイブリダイゼーションを容易に検出でき、その影響を小さくすることが可能とされている。これによって、バックグラウンドレベルの影響も同時に抑えられている。また、ジーンファミリーやスプライシングバリエーションであっても、それらのなかの個々の転写産物の発現を検出することが可能である (Figure 1)。GeneChip probe array は 2 倍以上の変化を検出でき、1 細胞あたり数コピーから数十万コピーまでの mRNA レベルの変化に対応できるとされている。

目的とする遺伝子にハイブリダイズする能力によって、どのようなオリゴヌクレオチドプローブを合成すべきかを定める。プローブの塩基配列の情報をもとに、GeneChip アレイを作製するためのフォトリソグラフ

マスクが作製される。半導体産業で採用されているフォトリソグラフィック技術を応用して基盤上にオリゴヌクレオチドプローブを合成していく (Figure 2)。生産時には大きなガラス基盤の上に多数のアレイを同時に合成していくので、GeneChip アレイには再現性がある。合成が終わった後で、個々のアレイは切り離されてハイブリダイゼーションを行い易くするためにカートリッジに入れて出荷されている。

GeneChip システムに早く慣れ、円滑に研究を勧めたいとの考えから、代理店であるアマシャム・ファルマシア社に技術講習会を依頼し、技術の研鑽に努めた。GeneChip システムでは膨大な数の遺伝子がチップ上に載っている。一例を挙げると、ヒトの遺伝子を収載した HumanGenomeU95A では 12,000 ものプローブ (遺伝子) が基盤上に合成されている (資料 1)。結果の解析には専用のソフトウェアの支援が必要であり、データマイニング用ソフトとして一般的なシリコンジェネティクス社 GeneSpring を購入し、講習会でその使用法の説明を聞いた。

#### 今後の予定

「種差」平成 12 年度は、in vivo でマウスに TCE を腹腔内投与し、肝から抽出した RNA を曝露前後で DNA チップにハイブリダイゼーションさせる実験を進行させている。13 年度はラット、ヒトについても比較検討す

る。in vivo の肝臓でのヒトに対する実験に代わる手段としてリンパ球及び、初代培養肝細胞を用いて in vitro で実験をする予定である。マウスとラットに対しては in vivo の肝臓で実験が可能であるので、これを行い発現プロファイルを得る。マウス、ラットの in vivo 肝細胞と in vitro リンパ球及び初代培養肝細胞の発現プロファイルの比較検討では、TCE に留まらず、リンパ球、もしくは初代培養肝細胞が in vivo の実験系の代用となり得るか否かの妥当性を評価する。また、発がん性の異なる種間での発現遺伝子の比較は、いまだに明確にされていないペルオキシソームの増殖を介する発がんのメカニズムを解明する手掛かりを与えてくれることが期待される。TCE に引き続き、化学物質に対する種差がある HCFC-123、ジクロロメタン、1,3-ブタジエン、テトラクロロエチレン等の曝露による発現プロファイルを得、比較検討していく予定である。数種の物質について実験が終了したところで、種間の差異についての既知の知見と発現プロファイルの種間の差異の異同について検討する。この検討を通じて種差の評価方法としての発現プロファイルの有用性について考察する。

「変異原」 平成 13 年度は前年度に引き続き、異なった性格を有する変異原について検討する。ゲノム中の塩基をメチル化し、障害が direct reversal によって修復されるアルキ

ル化剤、架橋を形成するマイトマイシン C を対象とする。架橋形成に対する修復機構は不明な点も多いが、組換え修復関連遺伝子が変異した細胞株は感受性が高いとされている<sup>6)</sup>。リンパ球にこれらの物質を曝露させ前年度と同様に発現プロファイルを得る。また、UVA、UVB、UVC、bleomycin について実際のゲノムへの障害を確認するべく、comet assay、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine、ピリミジンダイマーの測定を行う。1年目に予定していた 1,2-エポキシブテンと 1,2:3,4-ジエポキシブタンは沸点が低く、実験者の安全確保の点から問題があり、労働衛生学的対応を検討中である。

多くの発がん性のある化学物質は DNA との間に「かさ高い」付加体を形成する。その除去は NER が担当している。平成 14 年度には、「かさ高い」付加体のできる化学物質の検討を考慮している。タバコ中の発がん物質、benzo(a)pyrene の例にみられるように、化学物質が発がん性を獲得する上で、代謝活性化の問題は重要であるので、代謝活性化を考慮に入れた実験を検討している。前述したようにリンパ球では種々の薬物代謝酵素が発現しているので、適当な実験系と考えられる。数種類の性格を異にする変異原についての発現プロファイルが蓄積したところで遺伝子の発現パターンと変異原の性格との関連の定式化を試みる。

## 参考文献

- 1) Rockett JC, Dix DJ. Application of DNA arrays to toxicology. *Environ Health Perspect* 1999;107:681-685.
- 2) Holden PR, James NH, Brooks AN, Roberts RA, Kimber I, Pennie WD. Identification of a possible association between carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and interleukin-8 expression. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14:283-290.
- 3) Lu T, Liu J, LeCluyse EL, Zhou YS, Cheng ML, Waalkes MP. Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 2001;59:185-192.
- 4) Amundson SA, Do KT, Shahab S, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 2000;154:342-346.
- 5) Nguyen LT, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Dole K, Miller C, Planter M, Patrick K, Brownschidle C, Jacobs LD. Detection of cytochrome P450 and other drug-metabolizing enzyme mRNAs in peripheral blood mononuclear cells using DNA arrays. *Drug Metab Dispos* 2000;28:987-993.
- 6) Cui X, Brenneman M, Meyne J, Oshimura M, Goodwin EH, Chen DJ. The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat Res* 1999;434:75-88.



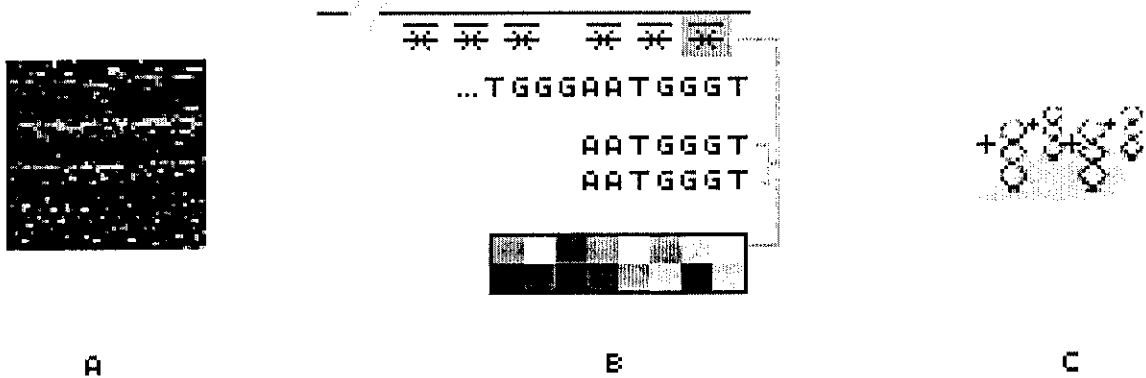
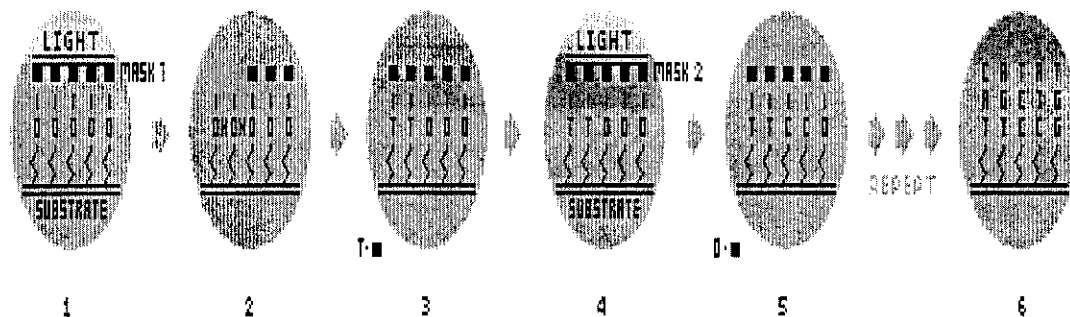


Figure 1.

A. GeneChip® expression arrays simultaneously and quantitatively interrogate thousands of mRNA transcripts (genes or ESTs), simplifying large genomic studies.

B. Each transcript is analyzed on a probe array by multiple probe pairs so that you can differentiate among closely related members of gene families.

C. Each probe feature contains millions of copies of a specific oligonucleotide probe, permitting the accurate and sensitive detection of abundance mRNA transcripts.



GENECHIP® PROBE ARRAY SYNTHESIS PROCESS

Figure 2.

1. A photo-protected glass substrate is selectively illuminated by light passing through a photolithographic mask.
2. Deprotected areas are activated.
3. With nucleoside incubation, chemical coupling occurs at activated positions.
4. A new mask pattern is applied.
5. The coupling step is repeated.
6. This process is repeated until the desired set of probes is obtained.

## I-2. 「種差」

要旨 DNA チップにハイブリダイゼーションさせる最初の物質としてはトリクロロエチレン (TCE) を選択した。TCE は産業界では重要な化学物質であり、その汎用性のために自然環境中に汚染物質としてしばしば見出されている。TCE を選択した生物学的理由としては、①TCE の曝露による、マウス、ラット、及びヒトでの発癌に対する種差が明らかであること、②ペルオキシソームの増殖がマウスの肝臓の発症に関与しているといった、発癌のメカニズムに対する研究が進められていること、③発癌のメカニズムに強く関与していると思われる遺伝子のノックアウトマウスが存在していることが挙げられる。

TCE を曝露物質とした実験では、DNA チップにハイブリダイゼーションさせるサンプルは以下の実験系から得る。

1. in vivo: ①マウスとラットの肝臓の RNA。②マウス、ラット、ヒトのリンパ球の RNA。

2. in vitro: マウス、ラット、ヒトの初代培養肝細胞から抽出した RNA。

初代培養肝細胞及び、リンパ球はヒト検体を用いる観点から選んだ。初代培養肝細胞は今後最も多用していく予定の実験系であるが、in vivo の実験系の代替になりうるかの検証を DNA チップを用いて行なう必要がある。又、リンパ球では数種類の薬物関連酵素遺伝子が肝臓と同様の発現を示したという報告 (Nakamoto T et al. 2000) があり、この整合性を DNA チップを用いて確認しなくてはならない。現在我々は in vivo でマウスの肝臓を用いた実験を主に進行させている。マウスに TCE を 3 段階の曝露濃度で腹腔内投与し、24 時間後に TCE の代謝産物であるトリクロロ酢酸 (TCA) の血中及び、尿中濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したところ、TCE の投与量とこの TCA 値は曝露濃度群間では相関していることが確認された。このマウスの肝臓から抽出した RNA を、現在までに同定されている全てのマウスの遺伝子が基板上に配列している Affymetrix 社の Chip にハイブリダイゼーションさせ、各 TCE 曝露前後のマウス遺伝子発現のプロファイルを得、このプロファイルの比較検討していく実験を進行させている。まず、TCE によって発現の誘導が既に確認されている数種類の遺伝子に対して、定量 PCR 法を用いて曝露前後での RNA の発現レベルの変化を半定量し、曝露濃度の適正化と DNA チップで得られる情報の裏付け実験を行なった。ペルオキシソーム酵素 (catalase, Aox 遺伝子) 及び、細胞増殖の際に発現が増加する Cdc25A 遺伝子は 2000mg/kg 体重の TCE 曝露で明らかな mRNA の発現増加を示し、ペルオキシソーム増殖活性化受容体遺伝子 (Ppar  $\alpha$  遺伝子)、TCE の肝臓内の代謝経路で重要な役割を果たすチトクローム 2E1 (Cyp2e1 遺伝子)、及び細胞増殖、アポトーシスに関与し、protooncogene であ

る c-myc 遺伝子は 1000、2000mg/kg 体重の曝露で mRNA の発現増加が観察された。よって、マウスに 1000、2000mg/kg 体重の TCE を腹腔内に単回曝露させ、24 時間後にその mRNA の発現を観察するという実験系は DNA チップにハイブリさせる実験系として妥当であることが確認された。更に我々は、in vitro の実験系で使用する初代培養肝細胞の分離、及び培養方法の確立も進行させている。

## 研究方法

### 動物：

雄の 8 週齢 B6C3F1 マウスを用いた (Japan Charles River)。

温度 23~25°C、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクル下で 1 週間馴化した。

通常の餌、水は自由に与えた。

### 曝露方法：

マウスを各群 6 匹ずつ 3 群に分け、以下の如く trichloroethylene (TCE : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.、Purity 99.5%) をコーン油に溶解させて腹腔内に投与した。

- (1) 2000mg/kg TCE in corn oil
- (2) 1000mg/kg TCE in corn oil
- (3) corn oil のみ (コントロール)

曝露量はこれまでの知見を参考とし、肝障害を引き起こすのに十分と思われる量を選択した。Soni らは、250、500、1250、2500mg/kg の TCE をラットに腹腔内投与したところ、250mg/kg 投与では 24 時間後には肝細胞の壊死が観察され、この壊死の程度は dose-dependent であったと述べている。(Soni et al. 1999)

曝露後直ちに代謝ケージに入れ、24 時間蓄尿した。また、曝露後 24 時間にエーテル麻酔下で右心房より心臓採血 (0.5~1.0ml) を施行し、ただちに臓器 (肝、腎) 摘出を行った。

TCE の生物学的曝露指標として、血中 TCE、トリクロロ酢酸 (TCA)、ジクロロ酢酸 (DCA)、トリクロロエタノール (TCOH)、尿中 TCE、TCA、DCA、TCOH を測定した。測定は Muralidhara と Bruckner (Muralidhara and Bruckner, 1999) の方法により、一部変更した。即ち、血液、尿採取後 4°C に冷やし、6 時間以内に各検体のうち 200 $\mu$ l を 10ml ガラスバイアルに加え、そこに蒸留水 : 硫酸 : メタノール = 6 : 5 : 1 溶液を 100 $\mu$ l 加え即座に密閉した。その後 85°C、30 分間反応させた後、ヘッドスペースサンプラー (HP7694 Head space sampler Hewlett Packard, Willmington, DE, USA) により 1ml を質量分析計型検出器付きガスクロマトグラフ (GC-MS) (G1800B GCD system Hewlett Packard, Willmington, DE, USA) に導入し、TCE を含む 4 代謝物を同時測定した。カラムは HP-WAX キャピラリーカラム

(30 m long, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$  m film thickness, Crosslinked Polyethylene, Hewlett Packard, Willmington, DE, USA)を用いた。インジェクター200°C、検出器 250°Cで、カラム条件はオープン温度 40°Cから180°Cまで毎分 10°Cで昇温させた。カラム内キャリアーガスはヘリウムで毎分 1ml であった。各代謝物の測定は Selected Ion Mode により測定した。イオンレンジは TCE130m/z、TCA59、119m/z、DCA83m/z、TCOH113m/z にて測定を行った。各代謝物測定時のリテンションタイムはTCE2.7分、TCA6.8分、DCA7.1分、TCOH11.3分であった。各代謝物クロマトグラムを Fig.1 A-D に示す。検出限界値は TCE300ng/l、TCA1000ng/ml、DCA300ng/ml、TCOH1000ng/ml であった。

各臓器は重量測定後、

(1)直ちに TRIzol にて homogenize 後に-80°Cにて保存、

(2)液体窒素にて直ちに凍結し、-80°Cにて保存、

(3)ホルマリン固定（病理所見用検体）

の3通りに保存した。

以下のmRNA 抽出は、(1) で保存した肝組織より行った。

#### RNAの精製、cDNA合成：

肝臓から tRNA を抽出し、cDNA を合成、DNA チップへハイブリダイゼーションするプロセスは以下の通りに行なった。プロトコールの詳細を

Reference 1 に示す。

(1) totalRNA の抽出 (Fig4)

(2) Poly(A)+mRNA の抽出



(3) 逆転写酵素による cDNA の合成



(4) ビオチン標識化 cRNA の合成 (In Vitro transcription)・精製



(5) 標識 cRNA の断片化



(6) DNA チップへのハイブリダイゼーション

#### 定量 PCR：

##### リアルタイム PCR の概説

RT-PCR はわずかな転写産物や微量検体中の mRNA を検出する技術であるが、PCR 産物は初期鋳型 DNA 量を反映していない。この点を解決する方法が種々提案されているが、本実験で採用したリアルタイム PCR は簡便であり、初期鋳型 DNA 量をリアルタイムに自動検出できるという利点がある。

その原理は PCR のカイネティクスを利用している。つまり、PCR 生成物の量は反応初期にほぼ指数関数的に増加し、ある程度蓄積したところでプラトーに達して増加が停止するが、初期濃度は立ち上がりのサイクル数だけに依存するという特性を活かしている。SYBR Green という蛍光色素は二重鎖 DNA に高い親和性を示し、二重鎖 DNA がない時は背景傾向が非

常に低くなる。この SYBR Green の蛍光強度を測定することにより初期鋳型 DNA 量を絶対的、もしくは相対的に定量する。

蛍光シグナルの増加は PCR プロダクト量の増加に比例しているが、この値には各ウェル間の光学系の感度差や、ウェルに PCR 反応液を分注する際に生じるピペティングの誤差が含まれる可能性があるため補正が必要である。この補正した値は標準化リポーター蛍光シグナル (Rn) と呼ばれ、SYBR PCR Buffer に添加されている蛍光リファレンスで標準化することにより得られる。Rn から PCR 初期サイクルのリポーター蛍光シグナル (ベースライン) を差し引いた値は  $\Delta Rn$  と呼ぶ。

増幅曲線は X 軸にサイクル数、Y 軸に  $\Delta Rn$  をプロットして得られる。この増幅曲線上で、PCR プロダクトの指数関数的増幅に相当する蛍光シグナル ( $\Delta Rn$ ) の増加を始めて検出したサイクル数は Threshold Cycle (Ct) と呼ばれ、Ct 値が小さい程 PCR スタート時の鋳型コピー数は大きい。

#### プロトコール

定量 PCR を施行する遺伝子はこれまでの知見を元に、TCE 曝露前後で mRNA の発現が変動することが予測される遺伝子を選択した。選択した遺伝子は以下の 8 遺伝子である。 $\beta$ -actin, Aox (acyl-CoA oxidase) Ph (peroxisome bifunctional protein) Catalase, Cyp2e1 (Cytochrome P450 2E1), c-myc,

Ppar  $\alpha$  (Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$ ), Cdc25A (Cell division cycle25A) ここで、 $\beta$ -actin は TCE 曝露の影響を受けず、endogeneous gene としての役割を果たす遺伝子として選択した。

曝露定量 PCR に用いるプライマーはプライマーダイマーの形成を最小限に抑えることを配慮して GENETYX-WIN Version3.2 (Software Development Co., Ltd.) を用いてデザインをした。GENETYX-WIN Version 3.2 から得られたプライマーペアの候補を各々 Blast search して遺伝子特異性が高いペアを選択した。また、Affymetrix 社の DNA チップ上のオリゴマーは各遺伝子の 3'末端を主にデザインされていること、及び種特異性を考慮して、プライマーデザインの元となる塩基配列は定量する遺伝子の 3'UTR 領域を用いた。(Table 3)

PCR 反応の条件設定はまず、アニーリング温度の設定を行い、続いてプライマー濃度の最適化を行なった。

アニーリング温度の設定は以下の反応を行なった。

#### 反応組成

10X PCR Buffer	2.5 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 $\mu$ l
10mM dNTPs	0.5 $\mu$ l
10 $\mu$ M Forwarded Primer	1.25 $\mu$ l
10 $\mu$ M Reverse Primer	1.25 $\mu$ l
genomicDNA	0.25 $\mu$ l

(3 $\mu$ g)	
Taq polymerase	0.15 $\mu$ l
Deionized Water	17.6 $\mu$ l
total	25
$\mu$ l	

反応条件

前熱変性：95°C、3分

熱変性：95°C、30秒

アニーリング：58°C, 60°C, 62°C 45秒

伸長反応：72°C

X35 サイクル

最終伸長反応：72°C、3分

PCR 産物は3%のアガロースゲル上に電気泳動し SYBRGreen (FMC) で染色、ゲルは EDAS290 (Kodak) で読み取り、非特異的バンド及び、プライマーダイマーの形成が見られない条件をアニーリング温度とした。

また、イントロンを挟むプライマーペアを ZP3(zona pellucida glycoprotein 3) 遺伝子に対してデザインをし、genomicDNA と cDNA を PCR で増幅後、アガロースゲル上に電気泳動させて genomicDNA の混入の有無を確認した。(Fig 5)

定量PCRは Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) を使用し、Reagents は SYBR Green PCR core Kit (PE Applied Biosystems) を用いた。サンプルの定量に先立ち、15  $\mu$ g の genomicDNA を template とし、PCR 反応のプライマー濃度の最適化を行なった。プライマー濃度の最適化に用いた各濃度ペアを下記に示す。

プライマー濃度最適化に用いたプライマー濃度希釈系列

Forward primer 最終濃度 ( $\mu$ M)	0.05	0.05	0.05	0.3	0.3	0.3	0.9	0.9	0.9
Reverse primer 最終濃度 ( $\mu$ M)	0.05	0.3	0.9	0.05	0.3	0.9	0.05	0.3	0.9

定量PCR反応は以下の反応を行なった。

### 反応組成

10X SYBR PCR Buffer	5.0 $\mu$ l
2.5mM MgCl <sub>2</sub>	6.0 $\mu$ l
dNTP Blend	4.0 $\mu$ l
2 ng cDNA	5.0 $\mu$ l
AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
AmpErase UNG (1U/ $\mu$ l)	0.50 $\mu$ l
5 $\mu$ M Forwarded Primer	0.5, 3.0, 9.0 $\mu$ l
5 $\mu$ M Reverse Primer	0.5, 3.0, 9.0 $\mu$ l
Deionized Water	up to 50 $\mu$ l
total	50 $\mu$ l

### 反応条件

AmpErase UNG 反応 : 50°C 2分  
 前熱変性 : 95°C、10分  
 熱変性 : 95°C、15秒  
 アニーリング及び伸長反応 : 60°C ( $\beta$ -actine, Cyp2e1, Ppar  $\alpha$ , Cdc25a), 62°C (Aox, C-myc, Catalase), 1分  
 X35 サイクル  
 解離相 : 60°C~95°C

PCR産物は3%のアガロースゲル上に電気泳動し SYBRGreen (FMC)で染色、ゲルは EDAS290 (Kodak)で読み取り、DNAサイズマーカーと比較して当該遺伝子の増幅の有無を確認した。(Fig 6-A, 6-B)

定量PCR反応は再現性を高める目的で、それぞれの遺伝子に対して3回ずつ行い、各遺伝子の平均値をその遺伝子のCt値とした。

### 結果と考察

#### TCE 血中、尿中濃度

コントロール群の血液、尿中の各代謝物、曝露群の各代謝物のうち血液中では TCE、DCA、TCOH、尿中では TCE は測定下限以下であった。血液中、尿中の TCE の各代謝物濃度を Table 1 に示す。各 TCE 曝露群における、TCA(トリクロロ酢酸)の血液中濃度

と尿中濃度の平均値と信頼区間を Fig. 2, 3 に示した。低曝露群と高曝露群の間には、TCA 濃度の明らかな差が見られた。

また、Table 2 に、マウスの体重、体重変化、臓器重量を示す。

アニーリング温度の設定 (Table 5, Fig5)  $\beta$ -actin, c-myc, Ppar  $\alpha$ , Cyp2e1, Ph, Catalase, Cdc25A は 60°C で特異的バンドが得られたので、これをアニーリング温度とした。また、Aox は 62°C で特異的バンドが得られたので、これをアニーリング温度とした。

Zp3 遺伝子は genomicDNA, でも cDNA でも 60°C で特異的バンド得られたのでこれをアニーリング温度とした。Zp3 遺伝子はサンプル 11 番の cDNA を template とし、PCR 反応を行なったが、1.3 Kb の genomicDNA の増幅は認められず (Zp3 遺伝子 1~3 レーン)、216 bp の cDNA の増幅のみ見られた (Zp3 遺伝子 レーン 4) のので、今回マウスから、抽出し、逆転写、精製した cDNA に genomicDNA は混入していないことが確認された。(Fig 5)

Table 4: PCR 産物の長さ及びアニーリング温度

遺伝子	PCR 産物の長さ (bp)	アニーリング温度 (°C)
Zp3	216	60
$\beta$ -actin	170	60
c-myc	177	60
Ppar $\alpha$	137	60
Cyp2e1	201	60
Aox	86	62
Catlase	88	60
Cdc25a	218	60
Ph	248	60

#### プライマー濃度の最適化 (Fig6, 7)

定量 PCR の解離曲線及び、増幅曲線を Fig 7A-D に示す。Ph 遺伝子はいずれのプライマー濃度でも解離曲線にプライマーダイマーの形成による曲線への影響が見られたが、Ph 遺伝子以外の遺伝子はいずれのプライ



マー濃度でも、特異的な PCR 産物の曲線が得られた。よって定量 PCR に用いるプライマー濃度は最終濃度を  $0.3 \mu\text{M}$  とした。

cDNA サンプルを用いて、PCR 反応を行なったところ、Aox 遺伝子の全て、c-myc 遺伝子のサンプル 6 番以外の全て、catalse 遺伝子の 8 番及び 13 番にプライマーダイマーの形成もしくは、非特異的バンドによる解離曲線への影響が見られた。よって、この 3 つの遺伝子と各遺伝子の cDNA 初期量補正のために用いる endogeneous gene である  $\beta$ -actin 遺伝子に対して最終プライマー濃度を  $0.05 \mu\text{M}$  として PCR 反応を行なった。解離曲線、増幅曲線、および PCR 産物を 3% のアガロースゲル上に電気泳動し、SYBRGreen (FMC) で染色した画像を Fig. 6A-B に示す。プライマー濃度を下げることで、非特異的バンドとプライマーダイマーの形成が抑えられており、Aox 遺伝子、c-myc 遺伝子、catalse 遺伝子に対しては定量 PCR の最終プライマー濃度を  $0.05 \mu\text{M}$  として行なうこととした。

#### 定量 PCR

各遺伝子に対して上記のアニーリング温度、及びプライマー濃度で定量 PCR を行なって得られた解離曲線、増幅曲線を Fig 8 に示す。どのサンプル、どの遺伝子においても、プライマーダイマー、非特異バンドの影響は見られていない。

定量 PCR は各遺伝子、各サンプル毎に 3 回ずつ行ない、それぞれの Ct 値を算出した。各遺伝子の各サンプルにおける平均 Ct 値と検量サンプルの平均 Ct 値の差をとり、Ct diff. (遺伝子名) として表に示した。ここでは、コントロールマウスの 1 匹から抽出、逆転写、精製したサンプル 17 番を検量サンプルとしている。次に各サンプルにおける Ct diff. (遺伝子名) と内因性コントロール遺伝子である  $\beta$ -actin 遺伝子 (Ct diff. ( $\beta$ -actin)) との差、Ct ciff. (遺伝子名) - (Ct diff. ( $\beta$ -actin)) を取り、各サンプル間の総 cDNA 初期量の標準化を行な

った。更に、検量サンプル 17 番を 1 とした際の相対的定量値を relative quantity として表に示した。(Table 5A-G) 全てのサンプル及び、遺伝子の相対的定量値を Table 6 にまとめて表示した。また、各遺伝子毎にコントロール、低曝露群、高曝露群毎の相対的定量値 (relative quantity) (Fig. 9A-G) に図示した。

#### Cyp2e1 遺伝子 :

高、低曝露群 (2000, 1000mg/kg 体重) で、明らかな mRNA の発現増幅が見られた。トリクロロエチレン (TCE) はチトクローム P450 (CYP) と GSH S-transferase が関与する 2 つの代謝経路がある。CYP による酸化反応は TCE の主要な代謝経路で、TCE は酸化的代謝を受けて抱水クロラール (CH) となる。CH はアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) とアルコール脱水素酵素 (ADH) によりそれぞれトリクロロ酢酸とトリクロロエタノールとなって尿中に排出される。CYP には多数のアイソザイムがあるが、TCE の主要な代謝酵素は CYP 2E1 (Nakajima et al. 1992) であるとされている。

雄性 Wistar ラットに 400-1200mg/kg の TCE を 4 日間連続で腹腔内投与し、24 時間後の CYP タンパクの誘導を観察した実験では、Cyp2e1 の増加が免疫生化学的方法により確認されている。(Hanioka et al. 1997) また、野生型 Sv/129 マウスに 750mg/kg の TCE を 2 週間経口投与した実験では、Cyp 2e1 タンパクの誘導が免疫生化学的方法により観察されている。(Nakajima et al. 2000)

これらの知見より、Cyp2E1 の mRNA の発現増幅は十分に予測される結果である。

#### c-myc 遺伝子 :

高曝露群 (2000mg/kg 体重) で、明らかな mRNA の発現増加が見られたが、低曝露群 (1000mg/kg 体重) では mRNA の発現増加は見られなかった。

雌の B6C3F1 マウスに 1000mg/kg の TCE を 5 日間、経口投与し、30 分後にメチオニン (遺伝子のメチレーションを維持させる効

果をもつ)を投与し、TCE 最終投与の 100 分後にマウスから肝臓を摘出して、protooncogene である c-jun, c-myc 遺伝子のプロモーター領域におけるメチレーションの程度、及び mRNA の発現レベルを観察した。(Tao et al. 1999, 2000) TCE の曝露により、この 2 つの protooncogene のプロモーター領域におけるメチレーションの程度は減少し、mRNA の発現は増加するが、メチオニン投与によりメチレーションの程度は回復し、mRNA の発現は減少することが観察された。このことより、c-myc 遺伝子の発現増加したことは十分予測される結果である。また、protooncogene 遺伝子の発現は 24 時間後には曝露前の発現レベルに戻るといふ報告もあり、低曝露群では mRNA 発現の増加が見られず、高曝露群では発現が増加していたことの一因かもしれない。曝露時間、曝露濃度に関しては今後の課題事項の 1 つである。

#### c dc25A 遺伝子 (Entre)

高、低曝露群 (2000, 1000mg/kg 体重) で、明らかな mRNA の発現増幅が見られた。TCE 曝露が細胞増殖を引き起こすという報告があり、(Bull et al., 1990; Pereira, 1996; Channel et al., 1998) 細胞増殖の際に発現増幅が見られる遺伝子である cdc25A の発現増幅は十分予測され得る。

#### Ppar $\alpha$ 遺伝子

高、低曝露群 (2000, 1000mg/kg 体重) で、mRNA の発現増幅が見られたが、コントロールとの相対的定量値では 1.04-2.22 と発現の増加は顕著ではない。ペルオキシゾーム増殖活性化受容体 (Ppar) は種々の化学物質により細胞内のペルオキシゾーム含有量を増大させるタンパクで、核内転写調節作用を有し、30 種以上の遺伝子の転写調節に関与している。また、TCE による肝癌発生にはペルオキシゾーム増殖の関与が示唆されており、このペルオキシゾーム増殖の制御を Ppar  $\alpha$  遺伝子が強く関与しているという報告がある。(Nakjima et al. 2000) Ppar  $\alpha$  遺伝子の発現は 2 週

間後にピークが見られるという報告より、本実験で TCE 曝露による Ppar  $\alpha$  遺伝子の発現が顕著でなかったことは十分に予測されうる。

#### Catalase 遺伝子, Aox 遺伝子

高曝露群 (2000mg/kg 体重) で、明らかな mRNA の発現増加が見られたが、低曝露群 (1000mg/kg 体重) では mRNA の発現増加は明らかではない。

TCE は Peroxisome Proliferator (ペルオキシゾーム増殖薬) であり、本実験の TCE 曝露でペルオキシゾームが誘導され、ペルオキシゾーム関連酵素である Catalase 遺伝子及び、Aox 遺伝子の発現増加は十分に予測される結果である。

#### 結論

以上の結果より、9 週齢の B6C3F1 マウスに 1000、2000mg/kg 体重の TCE をコーン油に溶解させて腹腔内に単回投与し、24 時間後に肝臓を摘出、mRNA を抽出、精製、逆転写させ、その発現レベルを見るという実験系は、TCE 曝露によって引き起こされる代謝の活性化、及び誘導、細胞増殖、ペルオキシゾーム増殖といった生体反応を観察するのに適当な実験系であることが示され、DNA チップにハイブリダイゼーションさせる実験系として妥当であることが確認された。

#### c DNA チップハイブリダイゼーション

上記の実験系で得られた cDNA を現在までに同定されている全てのマウスの遺伝子が基板上に配列している Affymetrix 社の DNA チップにハイブリさせると、これまでは予測が困難であった新たな TCE 曝露による生体反応を遺伝子の発現として捉えることが出来る。これにより、マウスの発肝がんのメカニズムの解明に大きく貢献すると思われる。

前述した方法に従い、cDNA を in vitro で cRNA に転写し、ビオチンでラベリングして、更に cDNA チップのハイブリ効

率を高めるように cRNA を断片化して、ハイブリダイゼーションさせる準備を整えたが、平成 13 年 2 月に Affymetrix 社から DNA チップの生産を一時中止し、再構築を行なった後に、生産を再開するとの連絡があり、ハイブリダイゼーションは施行していない。Affymetrix 社から DNA チップを再構築せざるを得なくなった理由は、Affymetrix 社が cDNA チップに乗せるオリゴマー配列の情報を得ている Research Genetics のクローンセットに誤りが見つかったことである。これは Research Genetics が NCBI の Unigene Set は定常なものではなく、常に変動していることへの認識が無かったことが原因の一つである。しかし、これはクローンそのものの誤りではなく、情報の誤りであるので破滅的な誤りではない。Affymetrix 社はこれらの誤りを訂正して、新しい DNA チップを生産、販売するまでに最低 2 ヶ月を要すると我々に連絡してきた。現在のところ、Affymetrix 社の DNA チップが持つ高い再現性、特異性、感受性を凌駕する DNA チップは見当たらず、マウスの in vivo 実験系に関しては新しい DNA チップの生産を待っているのが現状である。

#### 今後の予定

ラットに対しても in vivo でマウスと同様の実験を行ない、遺伝子発現プロファイルを得ていく実験を進めている。ラットとマウスの遺伝子発現プロファイルと比較することにより、TCE の曝露による生体反応の種差のメカニズム解明が大きく前進する。ヒトに対しては in vivo の実験が不可能であるので、ヒトとげっ歯類をはじめとする実験動物の種差を明らかにするためには、in vitro の実験系の確立が不可避である。この実験系としては初代培養肝細胞を用いる予定であり、この実験系の確立させる準備も現在進行させている。

#### 健康危害情報

なし

#### 研究発表

未

#### 知的財産権の出願・登録状況

未

Fig.1-A

File : D:\DATA\NOMIYAMA\130228\B.D  
Operator :  
Acquired : 28 Feb 101 12:54 pm using AcqMethod TTC2 TIC  
Instrument : GCD Plus  
Sample Name: B  
Misc Info :  
Vial Number: 3

