

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

分担研究報告書

化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究

分担研究者 遠藤 仁 杏林大学医学部・教授

研究要旨

トランスポーター(輸送体)は、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の輸送を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、あるいは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子である。ポストゲノムの研究手法に従い、将来的には、全遺伝子の網羅的解析の一貫として、トランスポーター遺伝子の解析が疾患解析の中に組み込まれ、病態との関わりが包括的に把握されていくものと思われる。そこに至るには、ゲノム上の機能未同定の遺伝子の機能を丹念に明らかにすることが先決である。その方向性に従い、研究初年度に当たる平成14年度は、腎における、薬物及び毒性化合物の輸送を担当する有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸等の細胞膜輸送体の分子同定を中心とした研究を行った。本年度の研究により、電位差駆動型の有機アニオントランスポーターOATv1、アミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となる輸送系Lアミノ酸トランスポーターLAT4、及び尿酸トランスポーターURAT1の3種の腎での薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送を担当する新規輸送体が同定された。

A. 研究目的:

生体内での腎の機能保持遺伝子の同定と化学物質により強く影響を受ける遺伝子を明確にする。最初に、腎に発現する遺伝子の網羅的解析と腎作用化学物質に特異的に反応する遺伝子を特定する。続いて機能が明確にされている遺伝子を選別し、腎機能における役割と、当該遺伝子産物の特異抗体による腎内及び細胞内局在を明らかにする。マウスホモログを単離し、この遺伝子欠失動物の作出を行って、当該遺伝子の生理的意義と諸種化学物質による生体影響の分子病態学的意義を明らかにする。ヒト遺伝子群の中から腎機能

維持に重要なメンバーを特定し、各個別遺伝子の機能と薬物や環境化学物質の腎作用と遺伝子変化を明らかにする。各遺伝子の生体内機能維持と化学物質の標的遺伝子同定をマウスホモログを用いた遺伝子欠失動物の作出により確認する。初年度に当たる平成14年度は、腎における、薬物及び毒性化合物の輸送を担当する有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸等の細胞膜輸送体の分子同定、及びそれらを修飾した時に生じる遺伝子変化を網羅的に解析するための解析系の立ち上げを行った。

B. 研究方法

(1) 薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送体の分子同定。

- 細胞膜輸送体の機能発現クローニング

機能発現クローニングは、タンパク質の機能を指標に cDNA ライブラリーのスクリーニングを行う遺伝子クローニング法であり、遺伝子配列情報に関する手がかりの全くないタンパク質の分子実体を明らかにするために有用な手法である。本年度は、腎での薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送を担当する輸送体を明らかにするために、2通りの機能発現クローニングを行った。第一は、未だに分子実体未同定の腎近位尿細管管腔側のアニオン性薬物、毒性化合物、代謝産物の尿中へ排泄の出口である、電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの同定を目指した発現クローニングであり、第二は、さらに未同定の分子種が存在すると予想される、アミノ酸型の薬物、毒性化合物の輸送経路となる輸送系 L アミノ酸トランスポーターの同定を目指した発現クローニングである。電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの機能発現クローニングは、ブタ腎皮質 poly(A)⁺RNA を、輸送系 L アミノ酸トランスポーターの機能発現クローニングは、既存の輸送系 L と異なった特性を示す、輸送系 L の活性をすでに同定しているヒト肝細胞腫細胞株 FLC4 の poly(A)⁺RNA を、出発材料として用いた。

機能発現クローニングにおいては、出発材料となる poly(A)⁺RNA を、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C-標識の基質の取り込みを検討した。基質の取り込みが検出されたため、分取ゲル電気泳動法により poly(A)⁺RN のサイズ分画を行ない、各画分をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C-

標識の基質の取り込みのピーク活性を示す画分を決定した。¹⁴C-標識の基質の取り込みピーク活性を示す画分から cDNA を合成し、発現プラスミドベクター pSPORT1 に組み込み、発現プラスミドライブラリーを作製した。得られたライブラリーから 500 クローンずつをプールし、各プールからプラスミドを抽出して cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、¹⁴C-標識の基質の取り込み活性を測定した。取り込み活性の得られたプールをさらに 500 クローンずつサブグループに分け、同様の検討を行なった。

単離した cDNA は、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。膜貫通部位の予想は、TopPred2、SOSUOI 等の膜貫通部位予想アルゴリズムによって行った。得られた cDNA のコードするトランスポーターに機能解析は、インビトロ転写により cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射能標識基質の取り込み活性を測定することにより行った。

- ゲノム情報を用いた細胞膜輸送体の同定

有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸に関する既存のトランスポーターの塩基配列を用いて、公開されたヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベースの BLAST 検索を行った。その結果得られた BLAST hit を用いて、全長 cDNA を単離した。全長 cDNA の単離は、ゲノム DNA から PCR により DNA 断片を増幅し、それをプローブとして cDNA ライブラリーを hybridization によりスクリーニングするか、あるいは全長 cDNA が、各種 EST (expressed sequence tag) プロジェクト等で入手可能な場合は、それを入手して利用した。

得られた全長 cDNA は、ダイターミネーターサイクルシーケンシング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。膜貫通部位の予想は、TopPred2、SOSUOI 等の膜貫通部位予想アルゴリズムによって行った。得られた cDNA のコードするトランスポーターに機能解析は、インビトロ転写により cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、放射能標識基質の取り込み活性を測定することにより行った。

- 遺伝子発現変動の解析

ヒト膀胱癌由来 T24 細胞を、 $2 \times 10^5 / 90$ mm plate の密度で蒔き、対数増殖期に達した後(プレーティング後 60 時間)、20 mM の BCH を培地に添加し、非添加群とともに、さらに 3 時間、あるいは 12 時間培養した。BCH 添加、非添加の T24 細胞から RNA を抽出し、DNA Chip (Affymetrix Human Genome U133A) を用いて遺伝子発現を測定した。Gene Array Scanner に取り込んだ DNA Chip 情報は、解析ソフト GeneSpring によって解析した。

(倫理面への配慮)

本年度は、ヒト個人を対象とした研究や、個人個人の遺伝子の解析等は含まない。本年度は、主にヒト由来のすでに確立された細胞株、及びアフリカツメガエル卵母細胞を実験に使用した。実験動物としては、アフリカツメガエルのみを用い、その使用にあたっては、麻酔下での操作を実施し、十分な配慮のもとに行った。

C. 研究結果

(1) 薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送体の分子同定。

- 電位差駆動型の有機アニオントランスポータ

一の同定

電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの同定に向けて、種々の動物種の腎臓から、刷子縁膜小胞を作製し、 ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込み能を測定することにより、ブタの腎皮質刷子縁膜小胞が最も高い ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込み活性を有することを明らかになった。この ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込みは、細胞外 K^+ 濃度を高めることによって上昇し、腎尿細管管腔側の膜電位駆動型有機アニオントランスポーターの性質と一致していた。従って、ブタの腎を発現クローニングの出発材料と決定し、ブタの腎皮質由来の $\text{poly(A)}^+\text{RNA}$ をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、 ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込みを測定したところ、刷子縁膜小胞で観察したのと同様な、 K^+ 感受性の ^{14}C -パラアミノ馬尿酸取り込み活性をアフリカツメガエル卵母細胞発現系で再現できた。続いて、新鮮ブタの腎皮質から、400 μg に及ぶ大量の $\text{poly(A)}^+\text{RNA}$ を採取し、分取ゲル電気泳動法によりサイズ分画を行ない、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、1.7~2.2 kb の画分に ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込みのピーク活性を検出した。この画分の $\text{poly(A)}^+\text{RNA}$ から cDNA を合成し、発現プラスミドベクター pSPORT1 に組み込み、発現プラスミドライブラリーを作製した。得られたライブラリーから 500 クローンずつをプールし、各プールの cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、 ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込み活性を測定した。16プールの解析を行い、対照と比較して有意な ^{14}C -パラアミノ馬尿酸の取り込み亢進を示すプールを見出し、そのプールから最終的に単一 cDNA クローンを単離した。

単離した cDNA は、ダイターミネーターサイ

クラーキング法により塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。その結果、得られたクローンは、1,867 bp の挿入 cDNA を含み、DNA シーケンシングの結果467アミノ酸 (OAT_{v1}; voltage-driven organic anion transporter 1 と命名)をコードすることが明らかとなった。OAT_{v1} は、12回膜貫通型のタンパク質であり、これまでに同定されたトランスポーターとの比較により、SLC17 ファミリーに属するトランスポーターと相同性を有するタンパク質であることが明らかになった。さらにアフリカツメガエル卵母細胞に発現させることにより機能解析を行い、OAT_{v1} がパラアミノ馬尿酸の他、尿酸、エストロン硫酸、エストラジオール-17β-グルクロナイド等を含んだ有機アニオンを広く輸送するトランスポーターであることが、明らかになった。さらに電気生理学的手法を用いて、OAT_{v1}を介する¹⁴C-パラアミノ馬尿酸の輸送は、促進拡散型であり、膜電位により駆動されるものであることを示された。

- アミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となる新規輸送系 L アミノ酸トランスポーターの同定。

輸送系 L アミノ酸トランスポーターの機能発現クローニングは、既存の輸送系 L と異なった特性を示す、輸送系 L の活性をすでに同定しているヒト肝細胞腫細胞株 FLC4 の poly(A)⁺RNA を、出発材料として用いて行った。FLC4 細胞は、薬物トランスポーターとしてのアミノ酸輸送系 L の特性が他の細胞と著しく異なっており、FLC4 細胞には他の培養細胞株とは異なる新規アミノ酸トランスポーターが存在することを示す結果をすでに得ていた。その分子実体を明らかにする目的で、機能発現クローニングを行った。

FLC4 細胞の大量培養を行い、400 μg の poly(A)⁺RNA を採取し、分取ゲル電気泳動法によりサイズ分画を行ない、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、1.5~2.5 kb の画分に¹⁴C-ロイシンの取り込みのピーク活性を検出した。上記の、電位差駆動型の有機アニオントランスポーターの機能発現クローニングと同様に、この画分の poly(A)⁺RNA から cDNA を合成し、cDNA ライブラリーを作製し、アフリカツメガエル卵母細胞へ機能発現させて、最終的に単一 cDNA クローンを単離した。

得られたクローンは、2,525 bp の挿入 cDNA を含み、DNA シーケンシングの結果559アミノ酸(LAT3; L-type amino acid transporter 3 と命名)をコードすることが明らかとなった。LAT3 は、12回膜貫通型のタンパク質であり、これまでに同定されたトランスポーター(全40ファミリー)との相同性を有しない、新たなトランスポーターファミリーを形成するものであった。さらにアフリカツメガエル卵母細胞に発現させることにより機能解析を行い、LAT3 が L-ドーパ等のアミノ酸類似薬物を含む中性アミノ酸を Na⁺非依存性に輸送する輸送系 L の特性を示すトランスポーターであることが明らかとなった。LAT3 の発見により、すでに明らかにされている輸送系 L アイソフォーム LAT1 及び LAT2とは構造が大きく異なる新たな輸送系 L が存在することが実証されたことになる。

- LAT3 類似の構造を持つ新規腎型アミノ酸トランスポーターの同定。

FLC4 を用いた機能発現クローニングにより、新規の特性を持つ輸送系 L アミノ酸トランスポーターLAT3 が明らかになったが、ノーザンブロットの結果、LAT3 は腎におけ発現は、弱いものであった。そこで、FLC4 の塩基配列を用

い、EST (expressed sequence tag) データベース、及び公開されたヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベースのBLAST検索を行った。その結果、LAT3類似の新規配列(LAT4と命名)が得られ、その全長 cDNA を入手し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させて機能解析を行った。LAT4 は、LAT3と 58%の相同性を示すタンパク質であり、LAT3とともに新たなトランスポーターファミリーを形成する。ノーザンブロットの結果、LAT4 は、腎臓、胎盤、脳、小腸において強く発現していることが明らかになり、免疫組織学的検討により、腎では近位尿細管の管腔側膜に存在することが示された。従って、LAT4 は、腎でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送に関わることが示唆される。

・尿酸トランスポーターの同定。

腎には、さらに機能同定の多くの有機アニオントランスポーター類似の構造を持つ遺伝子が発現している。その機能を明らかにすることを目的としてヒトゲノム及びマウスゲノムシーケンスデータベースのBLAST検索を行い、10種を越える新規塩基配列を見出した。その全長 cDNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させて機能解析を行った結果、そのうちの1つが、永年に渡りその実体解明の待たれていた、腎での尿酸の再吸収を担当する腎近位尿細管管腔側の尿酸トランスポーターであることが明らかとなった。

ヒト有機アニオントランスポーターOAT4 と相同性の高い配列として、12回膜貫通領域を有すると予想される555アミノ酸からなる新規タンパク質(URAT1: urate transporter 1と命名)が得られた。URAT1 は、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させることにより、¹⁴C-尿酸を取り込むことが示された。尿酸取り込みの K_m は 371

± 28 μ M で、輸送は Na^+ 濃度、膜電位、pH のいずれにも非依存的であった。Northern Blot 法による解析で、URAT1 発現は成人および胎児腎臓に局限していることが明らかにされ、また抗ヒトURAT1抗体を用いた免疫組織染色像の観察で、URAT1 は近位尿細管管腔側膜に存在することが確認された。URAT1 を介する尿酸の取り込みは、乳酸、nicotinate、pyrazinoicacid などの有機アニオンによって抑制されたが、OATの代表的基質であるPAHによっては抑制されなかった。尿酸排泄促進作用を持つ Probenecid なども尿酸の取り込みを抑制し、中でも Benzbromarone は最も強力な抑制効果を示した。これらの特徴はこれまでに報告されているヒト近位尿細管管腔側膜の尿酸輸送の特徴に一致していた。URAT1 発現アフリカツメガエル卵母細胞に注入された ³H-nicotinate の流出は、細胞外尿酸の存在により促進されたため、URAT1 の尿酸輸送は有機アニオンとの交換輸送により行われると考えられた。以上より、URAT1 はこれまでにその存在の推定されていた腎臓の尿酸再吸収に関わるurate/anion exchangerの分子実体であると思われた。

さらに、運動誘発性急性腎不全と慢性腎機能不全を症状とする突発性腎性低尿酸血症患者のURAT1をコードするゲノムDNAのPCR解析を行った所、W258stop、T217M、E298Dの変異を確認した。これらの変異cRNAを導入したアフリカツメガエル卵母細胞の尿酸輸送は著明に低下しており、URAT1の変異が突発性腎性低尿酸血症の一因であることが明らかにされた。

(2)トランスポーター抑制薬による遺伝子発現変動の解析

アミノ酸取り込み抑制薬 BCH (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid) による腫瘍細胞型アミノ酸トランスポーターLAT1 の抑制による細胞増殖抑制機構を明らかにするために、ヒト膀胱癌由来 T24 細胞を用い、BCH の処理による遺伝子発現変動を Affymetrix Human Genome U133A Chip を用いて解析した。T24 細胞の対数増殖期に BCH を培地に添加することにより、添加後 3 時間にはすでに有意な細胞数の相違が観察され、この条件下での遺伝子発現を、BCH 未処理群と比較した。その結果、癌遺伝子、癌抑制遺伝子を含んだ細胞増殖制御に関わる遺伝子群に発現量の変動が観察された。

D. 考察

トランスポーター(輸送体)は、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の輸送を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、あるいは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子である。従来その実体把握が困難であったため、特に病態との関わりに関しては一部を除いて詳細な研究はなされていなかった。しかし、公表されたヒトゲノム概要配列によると、トランスポーターと思われるタンパク質をコードする遺伝子は予想以上に多く、5~10%の疾患がトランスポーター異常を原因とすると推定されている。将来的には、全遺伝子の網羅的解析の一貫として、トランスポーター遺伝子の解析が疾患解析の中に組み込まれ、さらにトランスポーターの遺伝子多型とその表現型に関する情報が蓄積され、病態との関わりが包括的に把握されていくものと思われる。トランスポーターと病態と

の関わりは、二つの観点からの研究が必要とされる。第一は、トランスポーターの遺伝子異常あるいは遺伝子多型自体が疾患の誘因となる点であり、第二は、トランスポーターの機能自体が病態形成に積極的に関わる場合である。前者に関しては、トランスポーターの遺伝子型とその表現型に関する膨大な情報を今後蓄積していくことが要求され、後者に関しては、病態に伴うトランスポーター遺伝子の発現変動解析を全遺伝子の網羅的解析の一貫として行っていくとともに、トランスポーターの機能亢進状態、あるいは機能抑制に伴う、種々の遺伝子の発現変動を把握する必要がある。そこに至るには、従来の単発的な分子クローニングと機能解析の成果を手掛かりにして、ゲノム上の機能未同定の遺伝子の機能を丹念に明らかにしていくことから始めなければならない。その方向性に添って、研究初年度に当たる平成14年度は、腎における、薬物及び毒性化合物の輸送を担当する有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸等の細胞膜輸送体の分子同定を中心とした研究を行った。加えて、それらを修飾した時に生じる遺伝子変化を網羅的に解析するための解析系の立ち上げを行った。

本年度分子同定の対象としたのは、腎での薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送を担当する輸送体である。本年度は、機能発現クローニング及びゲノム情報のBLAST検索を行い、電位差駆動型の有機アニオントランスポーターOATv1、アミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となる新規輸送系Lアミノ酸トランスポーターLAT3 及び LAT4、尿酸トランスポーターURAT1 の4種の新規トランスポーターを同定した。このうちOATv1、LAT4、及びURAT1の3種が、腎尿細管での薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送を担当する輸送体として機能する

と考えられる。

電位差駆動型の有機アニオントランスポーターOATv1は、薬物及び外来性異物の腎排泄を担当する腎近位尿細管管腔側の有機アニオントランスポーターであり、この管腔側有機アニオントランスポーターのクローニングは、薬物や外来性異物の尿細管腔への排泄の直接の経路に位置する重要な分子の発見である。これにより、多くの研究者の永年の努力にも関わらず分子実体が明らかにされていなかった、薬物及び外来性異物の腎排泄を担当する腎近位尿細管管腔側の有機アニオントランスポーターの分子実体解明が実現されたことになる。

新規輸送系 L アミノ酸トランスポーターLAT3及びLAT4は、既知の系Lアミノ酸トランスポーターLAT1及びLAT2とは異なる構造と機能特性を有しているものであり、これにより新たなトランスポーターファミリー(SLC41: solute carrier family 41 申請中)を確立することができた。特にLAT4は、腎では近位尿細管の管腔側膜に存在するものであり、腎尿細管でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となると考えられる。

ヒト及び霊長類は、尿酸酸化酵素(ユリケース)を欠損しているため、有機酸である尿酸はプリン代謝の最終代謝産物となり、主に腎臓より排泄される。またヒト腎臓には尿酸の再吸収に働くurate/anion exchangerが存在するため、腎臓の尿酸輸送は再吸収優位であり、他の哺乳類と比べ血中尿酸値が高いことが知られている。このため尿酸排泄低下は高尿酸血症・痛風の原因となり、腎臓の尿酸排泄亢進が腎性低尿酸血症の成因となる。これらの病態に尿酸トランスポーターが深く関わっていると考えられていたが、これまでその分子実体は明らか

でなかった。本研究により、この腎臓の尿酸輸送の分子メカニズムの分子実体がURAT1として明らかにされた。

悪性腫瘍は、急速で持続的な増殖を行うが、その増殖維持のために糖やアミノ酸のトランスポーターの発現が亢進し、それらの栄養素の細胞への大量の取り込みを維持している。従って、これらの栄養素のトランスポーターは腫瘍細胞増殖の律速段階の一つとなっており、このため悪性腫瘍細胞は、細胞の生存維持におけるトランスポーターの役割を研究する上で、有用な材料とされている。また、こういった悪性腫瘍細胞のトランスポーターは、その機能抑制により細胞増殖抑制が得られる可能性が期待され、新しい観点からの抗腫瘍薬の標的としての可能性を有している。特に、腫瘍細胞の必須アミノ酸の輸送を担当するトランスポーターは、腫瘍細胞が自ら生合成できない必須栄養素の細胞への供給を担当するものであり、その抑制薬は、腫瘍細胞のいわゆる「兵糧攻め」を可能とすると考えられている。

本研究では、アミノ酸取り込み抑制薬 BCH (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid)による腫瘍細胞型アミノ酸トランスポーターLAT1の抑制による細胞増殖抑制機構を明らかにするために、ヒト膀胱癌由来T24細胞を用い、BCHの処理による遺伝子発現変動を解析、癌遺伝子、癌抑制遺伝子を含んだ細胞増殖制御に関わる遺伝子群に発現量の変動が観察されることを明らかにした。本研究で観察された変動遺伝子の情報を基に、トランスポーター阻害による細胞増殖抑制の細胞内機序を明らかにするとともに、既存の抗腫瘍薬や各種毒性化合物による細胞増殖抑制における遺伝子発現変動プロフィールとの比較を通して、トランスポーター阻害による細胞増殖抑制

の特異性を明確にしていくことが今後の課題となる。

E. 結論

本研究により、電位差駆動型の有機アニオントランスポーターOATv1、アミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となる輸送系Lアミノ酸トランスポーターLAT3及びLAT4、及び尿酸トランスポーターURAT1の4種の新規輸送体が同定された。このうち特に、OATv1、LAT4、及びURAT1は、腎近位尿細管に発現し、腎における、薬物及び毒性化合物の輸送を担当すると輸送体として機能していると考えられる。

F.健康危機情報

特記すべきこと無し。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Ichida K, Hosoyamada M, Kimura H, Takeda M, Utsunomiya Y, Hosoya T, Endou H, Urate transport via the human PAH transporter hOAT1 and its gene structure, *Kidney International* 63: 143-155, 2003.
Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, Endou H, Yamamoto T, Differential gene expression of organic anion transporters in male and female rats, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290: 482-487, 2002.

Uchino H, Kanai Y, Kim D.K, Wenpe M.F, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders M.W, Endou H, Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Insights into the mechanisms of substrate recognition, *Mol. Pharmacol.* 61:729-737, 2002.

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha S.H, Sekine T, Endou H, Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300(3): 918-924, 2002.

Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H, Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301(1):293-298, 2002.

Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha S.M, Suzuki Y, Endou H, Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2 and OAT3 in rat kidney, *J Am Soc Nephrol.*, 13:848-857, 2002.

Takeda M, Babau E, Narikawa S, Endou H, Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.*, 438: 137-142, 2002.

Hasegawa M, Kusuhara H, Sugiyama D, Ito K, Ueda S, Endou H, Sugiyama Y, Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOAT3; sic 22a8) in the renal uptake of organic anions, *J. Pharmacol. Exp Ther*, 300(3): 746-753, 2002.

Nagata Y, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y, Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (rOat3) in the choroid plexus, *Mol. Pharmacol*, 51(5): 982-988, 2002.

Enomoto A, Takeda M, Shimoa M, Narikawa S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Yamamoto T, Sekine T, Cha SH, Niwa T, Endou H, Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301(3): 797-802, 2002.

Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha S.H, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y. and Endou, H, Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417(6887): 447-452,2002.

Hosoya K, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, Saeki S, Kanai Y, Endou H, Naito M, Tsuruo T. and Terasaki T, Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl

maleate treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(1): 225-231, 2002.

Kobayashi Y, Ohshiro N, Shibusawa A, Sasaki T, Tokuyama S, Sekine T, Endou H, Yamamoto T, Isolation, characterization and differential gene expression of mutispecific organic anion transporter 2 n mice, *Mol. Pharmacol.* 62: 7-14, 2002.

Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Shkthisekaran D, Endou H, Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A, *Biochim Biophys. Acta.* 1590: 64-75, 2002.

Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T. and Endou H, Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(2): 666-671, 2002.

Enomoto A, Takeda M, Tojo A, Sekine T, Cha SH, Khamdang S, Takayama F, Aoyama I, Nakamura S, Endou H, Niwa T, Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity, *J. Am Soc Nephrol.* 13: 1711-1720, 2002.

Enomoto A, Michael F, Wempe, Tsuchida H, Shin HJ, Cha SH, Anzai N, Goto A, Sakamoto A, niwa T, Kanai Y, Anders MW, Endou H, Molecular identification of a novel carnitine transporter specific of human testis, *J. Biol. Chem.* 277(39): 36262-36271, 2002.

Khamdang S, Takeda M, Noshiro R, Narikawa S, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H, Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs.1, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303(2): 534-539, 2002.

Mukobata S, Hibino T, Sugiyama A, Urano Y, Inatomi A, Kanai Y, Endou H, Tashio R, M6a acts as a nerve growth factor-gated Ca²⁺ channel in neuronal differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297(4): 722-728, 2002.

Matsuo H, Kanai Y, Kim J.Y, Chairungdua A,

Kim D.K, Inatomi J, Shigeta Y, Ishimine H, Chekuntode S, Tachampa K, Choi H.W, Babu E, Fukuda J, Endou H, Identification of novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains, *J. Biol. Chem.* 277(3): 21017-21026, 2002.

2.学会発表

武田理夫, Suparat Khamdang, 成川新一, 遠藤 仁: ヒト有機アニオントランスポーター (hOAT)の cephalosphin 系抗生物質(CP)の尿中排泄と腎障害における役割. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

西堀由紀野¹, 楊 國昌¹, 佐藤一朗¹, 片岡佐依子¹, 清水マリ子¹, 東原英二², 細山田真³, 遠藤 仁³(¹杏林大学小児科, ²杏林大学泌尿器科, ³杏林大学薬理学): ヒトポドシンはネプリンの細胞内リガンドである. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

木村弘章¹, 武田理夫², 細山田真², 榎本篤², 市田公美¹, 大野岩男¹, 細谷龍男¹, 遠藤 仁²(¹東京慈恵会医科大学腎臓高血圧内科, ²杏林大学薬理学): ヒト有機アニオントランスポーター (hOAT)による xanthine (Xn), hypoxanthine (Hx)の腎輸送機構の解析. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

小野里マリステラリカ¹, 藤乗嗣泰¹, 武田理夫², 榎本 篤², 後藤淳郎¹, 藤田敏郎¹, 遠藤 仁²(¹東京大学腎臓内分泌内科, ²杏林大学薬理学): 糖尿病性腎症における有機アニオントランスポーター OAT1 の役割. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月25日.

中村桜子¹, 榎本 篤¹, 青山 功¹, 高山文夫¹, 遠藤 仁², 丹羽利充¹ (¹名古屋大学医学部附属病院予 防医療部, ²杏林大学薬理学): ヒト腎における human OAT3 (hOAT3)とインドキシル硫酸(IS)の局在に関する検討. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月25日.

木村弘章¹, 武田理夫², 成川信一², 榎本篤², 市田公美¹, 大野岩男¹, 細谷龍男¹, 遠藤 仁²(¹東京慈恵会医科大学腎臓高血圧内科, ²杏林大学薬理学): ヒト有機アニオン

とカチオントランスポーター (hOAT と hOCT) によるプロスタグランジン (PG) 腎排泄機構の解析. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

榎本 篤¹, 木村弘章², 茂田安弘³, Arthit Chairoungdua³, 車 碩鎬³, 細山田真³, 武田理夫³, 関根孝司⁴, 五十嵐 隆⁴, 松尾洋孝³, 菊池勇一⁵, 尾田高志⁶, 市田公美², 細谷龍男², 金井好克³, 丹羽利充¹, 遠藤仁³(¹ 名古屋大学医学部附属病院予防医療部, ² 東京慈恵会医科大学腎臓高血圧内科, ³ 杏林大学薬理学, ⁴ 東京大学小児科, ⁵ 防衛医科大学第二内科, ⁶ 自衛隊熊本病院): 血中尿酸値を調節する腎臓尿酸トランスポーター. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

細山田真, 遠藤 仁: Hela 細胞における尿酸取込みの薬理学的解析. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.
細山田真¹, 大久保正人², 柴崎敏昭², 遠藤仁¹(¹ 杏林大学医学部薬理学, ² 共立薬科大学薬物治療学講座): カドミウムトランスポーターとしてのヒト Nramp2. 第29回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成14年6月18日.

金井好克, 金 徒慶, 松尾洋孝, 遠藤 仁: メチル水銀の細胞毒性発現におけるアミノ酸トランスポーターの役割. 第29回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成14年6月18日.

榎本 篤¹, 武田理夫¹, 丹羽利光², 遠藤仁¹(¹ 杏林大学医学部薬理学, ² 名古屋大学医学部予防医療部): インドキシル硫酸による腎障害における有機アニオントランスポーターの役割. 第29回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成14年6月18日.

千葉正悦¹, 成川新一¹, 長濱 昇¹, 鈴木晃¹, 黒岩幸雄¹, 遠藤 仁²(¹ 富士バイオテックス, ² 杏林大学医学部薬理学教室): ヒト薬物トランスポーターを用いた薬物間相互作用の予測. 第29回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成14年6月18日.

金井好克, Ho Jung Shin, 永森静志, 遠藤仁: 硫酸抱合体を輸送する肝特異的新規有機アニオントランスポーターの同定. 第9回肝細胞研究会, 秋田, 平成14年7月13日.

Endou H.: Role of novel urate transporter,

URAT1 in hyper- and hypo-uricemia and urinary stone formation. 第5回アジア太平洋生理科学会議. マレーシア. 平成14年9月24日.

Endou H: A novel urate transporter that regulates blood urate levels. Transporters 2002 'Session IV: Amino acid/osmolyte transporters. Sept 3, 2002

黒田琢磨¹, Chairoungdua Arthit¹, 小林ゆかり², 寺岡秀朗², 金井好克¹, 呉屋朝幸², 遠藤 仁¹: アミノ酸トランスポーター抑制薬及びアンチセンスオリゴDNAの腫瘍増殖抑制効果の検討. 第107回日本薬理学会関東部会. 山梨. 平成14年10月3日.

Kanai Y, Endou H: Development of novel anti-cancer agents that selectively inhibit amino acid transporters upregulated in cancer cells. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Anzai N, Kim JY, Shin HJ, Choi BK, Kim JK, Jung KY, Baik YH, Kim MK and Endou H: Identification and characterization of a novel epithelial aromatic amino acid transporter TAT1. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Shin HJ, Enomoto A, Anzai N, Kim Dk, Choi HW, Kanai Y and Endou H.: Identification of a novel liver specific organic anion transporter selective for conjugated rugs and steroid hormones. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Miyazaki H, Anzai N, Hosoyamada M, Enomoto A, Chairoungdua A, Noshiro R, Kanai Y and Endou H.: Molecular mechanism of renal urate transport. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Endou H.: Special Lecture "Role of renal drug transporters in the evaluation of human pharmacokinetics". Workshop; "Kidney Pharmacology Revised: Current technologies and future perspectives". Sorat Hotel Berlin, Oct 31 2002.

遠藤 仁: 学術講演「尿酸トランスポーターと腎性尿酸血症」第 32 回日本腎臓学会東部学術大会, 新宿, 平成 14 年 10 月 18 日.

野城理絵, 武田理夫, 遠藤 仁: ヒトペプチドトランスポーター 1(hPEPT1)および hPEPT2 によるペプチド系薬物の基質認識. 第 17 回日本薬物動態学会年会, 江戸川, 平成 14 年 11 月 22 日.

Endou H: Prenary lecture “Membrane transporters and new drug development”. China-Japan Joint-congress on Toxicology and Pharmacology, Shenzhen, China, December 2, 2002.

Kanai Y, Kim DK, Endou H: Transport of methylmercury-cysteine conjugate by system L amino acid transporters and its transporter-mediated toxicity. China-Japan Joint-congress on Toxicology and Pharmacology, Shenzhen, China, December 2, 2002.

Endou H: Lecture “Molecular mechanisms of urate transport in the human kidney. The 9th Asian Pacific congress of Nephrology, Pattaya, February 19, 2003.

Asadi SA, Iribe Y, Kanai Y, Endou H: Investigation of effect of LAT1 inhibitors on gene expression profile in T24 cell. 第76回日本薬理学会年会, 福岡, 平成 15 年 3 月 26 日

Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M, Chairoungdua A, Iribe Y, and Endou H. Molecular cloning and characterization of a novel apical organic anion transporter in pig kidney. 第76回日本薬理学会年会, 福岡, 平成 15 年 3 月 26 日

Ellappan Babu, Arthit Chairoungdua, Nesar Ahmed, Nobuaki Matsumoto, Takuma Kuroda, Yoshikatsu Kanai and Hitoshi Endou: Expression cloning of a novel branched-chain amino acid transport. 第76回日本薬理学会年会, 福岡, 平成 15 年 3 月 26 日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予知を含む。)

1. 特許出願

酸性アミノ酸を輸送するナトリウム非依存性トランスポーター及びその遺伝子

特願 2002-40608

芳香族 L 型アミノ酸誘導体及び L 型アミノ酸トランスポーター阻害剤

特願 2002-31216

大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究

分担研究者 若林 敬二 国立がんセンター研究所がん予防研究部・部長

研究要旨

PhIP による遺伝子の発現誘導において、発がん高感受性を示す F344 系統と低感受性を示す ACI 系統間で特異的なパターンを示す遺伝子が、80-100 個前後認められた。一方、PhIP 或いは AOM 投与により発現変動する遺伝子を比較したところ、両者の共通性は低かった。又、AOM 誘発マウス及びラットの大腸発がんにおいて PGE₂ 受容体 EP_{1,4} が関与し、発がん過程により発現が変化することを見出した。

A. 研究目的

加熱調理した肉や魚に含まれるヘテロサイクリックアミン(HCA)類を始めとして、環境中に存在する種々の変異原・がん原性物質はヒトのがんの原因物質である可能性が考えられる。しかしながら、その詳細については未だ不明な点が多い。又、これら化合物による傷害に対する個体の感受性あるいは抵抗性を規定している遺伝的な要因の本態も殆ど解明されていない。本研究は、環境中の種々の変異原・がん原性物質により誘発される動物の発がんモデルを用いて、① 化合物特異的な遺伝子発現と遺伝子発現プロファイルの経時的変化、及び② その用量相関性、③ 発がん感受性の異なる動物系統における発現プロファイルの差異について GeneChip (Affymetrix) を用いた包括的解析を行い、各化合物に特徴的な遺伝子発現プロファイルや遺伝子変異に関するデータを集積する。

これにより、発がん重要な遺伝子変化の解明、既知化合物の低用量曝露による発がん性の予測、化合物曝露後の早期段階での発がん性予測が可能な遺伝的指標を明らかにできる。さらに、遺伝情報に基づいたヒトの発がんリスク評価や、発がん感受性を規定する遺伝的要因の解明による発がん高危険度群の掌握が可能となる。

B. 研究方法

(1)大腸発がん過程の組織学的解析

PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルを用い、発がん過程で発生する各種病変の遺伝子変異について解析した。また、F344 及び ACI ラット系統間での病変の誘発感受性の違いについても検討した。

(2)PhIP による多段階大腸発がん過程の組織学的解析と発現変動する遺伝子群の網羅的解析

PhIP 400 ppm 含有基礎食を 2 週間、高脂肪

食4週間投与を1クールとし、これを3クール繰り返した後、高脂肪食のみを投与する「短期間欠投与法」(Ubagai *et al.*, *Carcinogenesis*, 2002)により、ACF および大腸腫瘍を誘発させた。実験には、PhIP による大腸発がん性に高感受性を示す F344 ラットと低感受性を示す ACI ラットの2系統を用いた。投与開始後、6週、18週、25週、および32週において、大腸に誘発される病変を経時的に観察した。さらに、誘発された大腸病変(腫瘍あるいは ACF)および周辺の正常大腸組織より RNA を採取し、cDNA に転写したものを TALPAT 法により増幅した後、ビオチン標識して cRNA プローブを作成した。GeneChip (RG34A, Affymetrix 社)を用い、約 8800 個の遺伝子について、ゲノムワイドな網羅的遺伝子発現解析を行った。

(3) PhIP および AOM による短期曝露実験と発現遺伝子の化合物特異性の検討

化合物投与直後の遺伝子発現への影響についても解析するため、PhIP 及び大腸発がん性が認められているアルキル化剤である AOM (15mg/kg 体重/週 1 回の2回投与、*s.c.*)について、投与終了後 1 週および 4 週の早期段階において、大腸粘膜での発現遺伝子プロファイルの変化について検討した。がん原性物質投与直後における化合物特異的な遺伝子発現変化と、投与後長期経過後に認められる発現変化との関連性に関して情報を集積することとした。

(4) AOM, PhIP 単独および AOM+PhIP 複合投

与による ACF 誘発性および発がん性の検討

F344 ラットを用いて、① AOM 20 mg/kg 体重/週1回 *s.c.*の1回投与、② PhIP 400 ppm 含有基礎食の「短期間欠投与」(前述)、③ AOM(①)と PhIP (②)の併用、の3種類の投与方法による ACF および大腸がん誘発性(約 20 匹ずつ)の比較検討を行った。

(5) マウス及びラットの AOM 誘発大腸がんにおける PGE₂ 受容体 EP_{1,4} の発現の解析

AOM 投与によって誘発した C57BL/6J マウス及び F344 ラットの大腸がん及び周辺の非がん部大腸粘膜サンプルより RNA を抽出し、RT-PCR 法によって PGE₂ 受容体 EP_{1,4} の発現レベルを解析し、大腸発がんにおける PGE₂ 受容体の発現変化について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験については動物実験に関する規約を遵守し、実験に供する動物数も統計学的検定に必要な最小限の匹数を用いる。動物の苦痛に対する配慮も十分に払う。今後、動物遺伝子からヒトの原因遺伝子に到達した場合には、倫理審査委員会の承認を得て実施する予定である。

C. 研究結果

(1) 大腸発がん過程の組織学的解析

PhIP によるラット大腸発がんモデルを用いて、誘発病変の組織学的進展過程における遺伝子変異に関する研究を精力的に進めてきた。異型

な異常腺窩(ACF)では、既に β -catenin の細胞内蓄積を認め、一部では *Apc* や β -catenin 遺伝子の変異を認めることから、異型 ACF が大腸がんの前がん病変であることが判った。さらに、PhIP による ACF、異型 ACF、および大腸がんの誘発性にラット系統間で差があることを見出し、この感受性を規定する遺伝子座を決定した。現在、候補遺伝子の検索を進めている。

(2)ACF 誘発性或いは発がん感受性を規定する候補遺伝子の網羅的遺伝子発現解析による検索

F344 および ACI 系統間での、PhIP による大腸発がん性の差に寄与する遺伝的要因を検索するため、① PhIP 投与終了後 42 週目、および② PhIP 投与直後における大腸粘膜での遺伝子発現解析を行い、両系統間での差異を検討した。

① PhIP 投与終了後 42 週目において、大腸がん部では2系統間での差は軽微であったのに比べ、非がん部では有意な差を認めた。高感受性の F344 系統では、リボゾーム RNA、リボゾーム蛋白などの転写・翻訳に関わる遺伝子の発現が有意に高かった。さらに、脂肪の輸送に関わる *I-FABP*, *L-FABP*, *C-FABP*, α -Synuclein 遺伝子などの発現が有意に高かった。高カロリー・高脂肪食と大腸発がんとの関連性を考える上で興味ある結果と考えられる。逆に、低感受性の ACI 系統ではミスマッチ修復系の *Msh2* 遺伝子や、*Comt*, *Gst mul* などの一部の解毒・代謝関連遺伝子の有意な発現が認められた。これらの複

合的な作用により、発がんの感受性・抵抗性が規定されているものと考えられた。

② PhIP 400 ppm 含有基礎食2週+高脂肪食4週投与時における2系統間での発現遺伝子の差の検討では、F344 系統特異的に発現増加あるいは減少した遺伝子が 85 個、ACI 特異的な発現増加・減少を示すものが 97 個あった。このうち、PhIP 投与により発現が誘導される遺伝子として、F344 では *Pkb kinase* (染色体 13 番), *Ras GTPase-activating protein* (染色体 8 番) が、ACI では immediate early gene に属する *Yes1-2* (染色体 2 番), *NGFI-A* (染色体 18 番) などが同定された。これら遺伝子群の発現誘導の違いが、各系統での PhIP に対する感受性の高低を、発がんの初期段階で規定している可能性が考えられた。

(3)AOM および PhIP 単独投与によるラット大腸上皮での遺伝子発現解析

AOM の 20mg/kg 体重/週1回 s.c.を1回投与と、PhIP 短期間欠投与とはほぼ同程度の大腸がんを誘発することが、我々のこれまでの研究成果より判っている。しかしながら、AOM で誘発される ACF はラット一匹あたり約 135 個と極めて多く、PhIP 400 ppm 含有基礎食の短期間欠投与による平均 2.7 個の ACF 誘発数に比較して約 50 倍以上であった。PhIP 或いは AOM 投与により発現変動する遺伝子を比較したところ、両者の共通性は低かった。さらに特徴的な変化として、PhIP では投与終了後 1 週目に比較して、4 週目では発現変化していた遺伝子数が減少していた

が、AOM では逆に 4 週目で発現変化している遺伝子数が数倍～数十倍多かった。このことは、種々の大腸発がん物質による発がん過程において、化合物に特異的な遺伝子変異スペクトラムや発現プロファイルの存在を強く示唆する。

(4) AOM, PhIP 単独、および AOM+PhIP による ACF 誘発性および大腸発がん性の比較

AOM と PhIP 投与により発現変化をうける遺伝子のプロファイルに大きな違いが見られたことから、AOM+PhIP の複合投与による発がん性において、両者の相乗的或いは相反的な効果が見られる可能性を考えた。現在、F344 ラットを用いて、①AOM 単独投与、② PhIP 400 ppm 単独投与、③ AOM と PhIP の併用投与による ACF および大腸がん誘発性への影響について実験を継続中である。

(5) マウス及びラットの AOM 誘発大腸がんにおける PGE₂ 受容体 EP_{1,4} の発現の解析

マウス及びラットの AOM 誘発大腸がんにおいて、EP₁ 及び EP₂ の発現は、非がん部粘膜に比べ、顕著に上昇していた。EP₄ の発現は正常粘膜、大腸がんともにみられ、明らかな変化は認められなかった。EP₃ の発現については現在、検討中である。

D. 考察

(1) PhIP による大腸発がん性の異なる F344 と ACI の 2 系統のラットを用いた実験から、PhIP 投与直後および PhIP 投与終了後 42 週時におい

て、発現遺伝子の系統特異性が認められた。このうち幾つかの遺伝子に関しては、投与直後および 42 週時に共通に変化が認められた。これらの遺伝子が、PhIP による発がん性予測の、早期段階での指標となる可能性があり、さらに詳細に検討する必要がある。

(2) PhIP による遺伝子の発現誘導において、発がん高感受性を示す F344 系統と低感受性を示す ACI 系統間で特異的なパターンを示す遺伝子が、80～100 個前後認められた。今後、発がん性の異なる他のラット系統についても同様の解析を行うことにより、PhIP による大腸発がん性に重要な役割を果たす遺伝子群や、各ラット系統の大腸発がん感受性の予測に重要な遺伝子群(或いは発現様式)を同定できる可能性がある。

(3) アルキル化剤である AOM と HCA 類の PhIP による大腸発がんに関しては、誘発される大腸がんの組織学的性状や遺伝子変異の様式においては類似した点が多い。しかしながら、ACF の誘発性や誘導遺伝子の違いを考慮すると、その発がんプロセスは大きく異なる可能性がある。遺伝子発現という観点から、両者の違いをさらに詳細に解析することにより、AOM および PhIP による大腸発がんの分子機構の相違点を解明する手掛かりが得られると期待される。

(4) 今回、がん原性物質による大腸発がん性の用量依存性に関しては、解析することが出来なかった。PhIP の場合には、PhIP 100～400 ppm 含

有飼料の連続投与では発がん性が確認できているものの、25 ppm では確認できていない。ヒトへのリスク評価の際には、この用量依存性の解明は重要である。今回得られた遺伝子発現情報をもとに、低用量曝露下での遺伝子発現の特徴を詳細に解析し、リスク評価のための基礎的資料を蓄積していくことが重要である。

(5) PGE₂ 受容体のノックアウトマウス及びアンタゴニストを用いたこれまでの研究から、EP₁ 及び EP₄ が大腸発がんの初期過程に関与することが分かっている。また、EP₂ も腸ポリープ形成に関与していることが報告されている。今回、EP₁ 及び EP₂ の発現が AOM 誘発大腸がんで上昇していることがわかった。EP₁ 及び EP₂ の発現が上昇することが大腸発がんに関与していると考えられ、今後、その発現上昇メカニズムについて検討する必要がある。

E. 結論

種々のがん原性化合物を用いて大腸組織における遺伝子発現プロファイルへの影響をゲノムワイドに解析することにより、これまでとは全く異なった視点から、これら化合物による大腸発がんの分子機構について解析する手掛かりを得ることができた。さらに、個体間の発がん感受性の違いや、化合物間での発がん性の差異に関しても、遺伝子の発現様式、発現遺伝子の特異性という観点から、客観的数値化の可能性が示唆された。今後さらにデータを集積することにより、既知および未知の環境中化合物について、それら

の大腸発がん性の予測やヒトへのリスク評価が短期間の曝露実験で可能にできると期待される。

F. 健康危機情報
特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M., Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K, Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP₄ in colon carcinogenesis, *Cancer Res.*, 62:28-32, 2002.

Kitamura T, Kawamori T, Uchiya N, Itoh M, Noda T, Matsuura M, Sugimura T, Wakabayashi K, Inhibitory effects of mofezolac, a cyclooxygenase-1 selective inhibitor, on intestinal carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 23:1463-1466, 2002.

Sasahara Y, Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Tanaka N, Sugimura T, Wakabayashi K, Suppression of promoter-dependent transcriptional activity of inducible nitric oxide synthase by sodium butyrate in colon cancer cells *Cancer Lett.*, 177:155-161, 2002.

Ohe T, Takata T, Maeda Y, Totsuka Y,

Hada N, Matsuoka A, Tanaka N, Wakabayashi K. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured mammalian cells treated with aminophenylnorharman formed by norharman with aniline, *Mutat. Res.*, 515:181-188, 2002.

Nagao T, Yoshimura S, Totsuka Y, Wakabayashi K. Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline, *Human Exp. Toxicol.*, 21:147-151, 2002.

Totsuka Y, Takamura-Enya T, Kawahara N, Nishigaki R, Sugimura T, Wakabayashi K. Structure of DNA adduct formed with aminophenylnorharman, being responsible for the comutagenic action of norharman with aniline, *Chem. Res. Toxicol.*, 15:1288-1294, 2002

2. 学会発表

Wakabayashi, K., Mutoh, M., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Maruyama, T., Narumiya, S., Sugimura, T. Enhancement of intestinal carcinogenesis through prostaglandin E receptor subtype EP4 in rodents. The 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 3321 (oral). San Francisco, CA, USA. March, 2002.

庄司 豊、武藤倫弘、渡部浩治、北村知宏、高橋真美、川森俊人、丸山隆幸、成宮周、杉

村 隆、若林敬二。大腸発がんにおけるプロスタグランジン受容体の役割。第9回日本がん予防研究会(熊本)、O-16(口演)。2002年7月16日

若林敬二。動物を用いた大腸がんの化学予防研究。第61回日本癌学会、2002年10月1日

庄司 豊、武藤倫弘、渡部浩治、北村知宏、高橋真美、川森俊人、成宮 周、杉村 隆、若林敬二。プロスタグランジン E2 レセプター EP4 の大腸発がんにおける役割。第61回日本癌学会総会(東京)、2596(口演)。2002年10月2日

H. 知的財産権の出願/登録状況

1. 特許取得

無

2. 実用新案登録

無

3. その他

特に無し

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告書

恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究に関する課題として、特に恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析方法の開発手法の確立と、その検証に必要な生物学的基礎研究を開始した。まず、1)形質の現れない低濃度での内分泌かく乱等に効果を示す化合物による遺伝子発現データを解析するためのモデルとして、TCDD、TCDFを投与した2種類のヒトがん由来培養細胞株及びマウスの肝臓における遺伝子発現変動を、GeneChipを用いて網羅的に解析した。また、応用系として、2)血管新生抑制物質の有効性や副作用を予測する *in vitro* システムの構築に関する研究についても検討を進めた。

A. 研究の目的

恒常性維持機構が働く系に外界から化学物質等の影響が加わっても、そのフィードバック機構により Phenotype が容易に得られないことが多い。このような場合に網羅的遺伝子発現解析を用いることで少なくともフィードバック機構に関わる遺伝子群の発現変動という形で化学物質影響のモニターが可能であり、毒性予測の指標とする事ができる。本研究では、(1)ホルモンをはじめとする恒常性維持機構の標的であると同時に解毒代謝に関わる恒常性維持の中核であり再生能力に富む肝臓、及び恒常性維持機構の上位中枢であり非分裂細胞臓器である脳を対象とする。そして、恒常性に関わる核内受容体-転写因子系のうち、エストロゲン受容体 α (ER α)系とアリル炭化水素受容体(AhR)系を介する影響を網羅的遺伝子発現により解析する。その際に今まで困難であった低発現レベ

ル遺伝子の解析は「絶対値測定」手法、及び「Null 発現系」利用法を適応して実施し、もってそれらの分子機構を詳細に明らかにする。(2)恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討を行う。成熟個体では通常、血管新生を抑制している機構、即ち恒常性を維持する機構が働いているために不必要な血管新生は起こらない。血管新生が関わる毒性病変には、組織修復過程に関わるものや、その恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる現象と捉えることができるものが挙げられる。血管新生抑制機構を検討する上では、最終的にこの恒常性維持機構が働く環境である *in vivo* におけるメカニズム解析が必須である。そのための手段としては、前段階として腫瘍細胞の特性に応じた血管新生抑制の分子標的を明らかにした後、血管新生機構への直接的な制御機構の検討が

可能である *in vitro* のアッセイ系を用いて修復病変や腫瘍の特性に応じた血管新生制御の新たな *in vivo* 分子標的を見いだす方法を探る。現在、生活関連化学物質・医薬品等の安全性評価方法として、動物実験モデルを用いた方法が広く行われている。この方法では、高濃度に於ける生体反応をよりどころに、低濃度での反応を予測することが通常行われる。しかし、恒常性維持機構が働くため、低濃度での生体影響が従来法では捕らえにくい標的に関わる安全性を評価する為には、表現系が現れずとも評価に資すべき情報を得る方策を検討する必要がある。ここでは、化合物による遺伝子発現の変化を DNA chip を用いて網羅的に解析することにより、上記のような場合にも利用可能な化合物安全性の評価の為の方法、および、安全性評価方法を開発する上での標準化・統計解析等の情報処理に関する応用・新手法の開発を目指している。

B. 研究の方法

ヒトがん由来培養細胞株及びマウスの肝臓における遺伝子発現変動の網羅的解析：恒常性維持機構が働くため、低濃度での生体影響が従来法では捕らえにくい内分泌かく乱化学物質などの作用点としての核内受容体を介する生体作用のモデルとして、今年度はアリルハイドロカーボン受容体を対象とし、ダイオキシン類のうち 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 及び、2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) を投与したヒトがん由来培養細胞株及びマウスにおける遺伝子発現変動の解析を行った。

B-1. ヒトがん由来培養細胞株を用いた TCDD、TCDF の増殖阻害に与える影響の検討

ダイオキシン類暴露によりどのような応答を

示すかを検討するために「文部科学省がん特定 総合がん スクリーニング委員会」において実施されているヒトがん細胞パネルを用いた抗がん剤スクリーニングを応用し、これらの化合物のプロファイリングを行った。このスクリーニング系は肺がん 7 系、胃がん 6 系、大腸がん 5 系、卵巣がん 5 系、脳腫瘍 6 系、乳がん 5 系、腎がん 2 系、前立腺がん 2 系およびメラノーマ 1 系からなるヒトがん由来培養細胞株 39 系を用いて、各細胞株において 48 時間の化合物処理の前後におけるスルホローダミン B (SRB) による比色定量により測定した総タンパク量の変化を指標として 50% 増殖阻害濃度を算出し、細胞の増殖阻害を評価する系である。ダイオキシン類より、TEF (Toxic equivalence factor, WHO) 値が 0.1 以上であり、現実的に 2,3,7,8-TCDD との比較投与実験が可能と考えられる数種類の PCDD、PCDF を検討したところ、TCDF が特異的反応を惹起することが判明したため、ヒトがん由来培養細胞株 (TCDD 非感受性, TCDF 感受性) およびヒトがん由来培養細胞株 (TCDD 非感受性, TCDF 非感受性) における感受性の差の要因となっている遺伝子を検索する目的で Affymetrix GeneChip (Hu133A) を用いた包括的発現遺伝子解析を実施した。標準化したデータにより実験サンプルに対して、ピアソン相関係数を距離とし、平均連結法による階層的クラスタリングを行った。また、各細胞株における TCDD、TCDF 処理による遺伝子発現変動に関して解析を行った。

B-2. C57BL/6 マウスにおける TCDD、TCDF 処理による遺伝子発現変動の検討

ダイオキシン類の受容体として核内受容体である aryl hydrocarbon receptor (AhR) が知られ

ている。ダイオキシン類による遺伝子発現変動の検討として、上記のごとく遺伝子発現作用の異なる2化合物を選び、比較を行った。マウスは C57L/6 を用い、TCDD(TEF=1、30 μ g/kg/day) 及び TCDF(TEF=0.1、300 μ g/kg/day)を各2匹に皮下投与した。溶媒は10%アセトン含有コーンオイルとした。肝臓を、投与後24時間目にサンプリングし、Affymetrix GeneChip(MU74V2)における遺伝子発現の変化を、溶媒対照群と比較した。得られた発現データについては、標準化した後、実験サンプルに対して、ピアソン相関係数を距離とし、平均連結法による階層的クラスタリングを行った。

B-3. 種間(ヒト及びマウス)における遺伝子発現の共通性

GeneSpringソフトウェア(Silicon genetics Inc.)を用いて Mouse Genome MU74Av2 set と Human Genome U133A set で相同性のある遺伝子のホモロジーテーブルを作製した。このホモロジーテーブルを用いて、B-1、B-2で解析した遺伝子について種間の共通性を検討した。

(2) 血管新生抑制物質の有効性や副作用を予測する *in vitro* システムの構築に関する研究: 第一に、血管新生の際に生じる腫瘍細胞と血管内皮細胞間の相互作用を *in vitro* で再構築するため、幾つかの表現型の異なる腫瘍細胞と HUVECs(正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)の共培養系を確立する。次にこの共培養系へ作用機序の異なるいくつかの血管新生抑制物質を各々作用させて、各腫瘍細胞の特性に応じた血管新生抑制効果に関連する遺伝子クラスターを、microarray を用いて明らか

にする。これによって腫瘍の遺伝子発現特性に応じた血管新生抑制物質の治療選択についての検討が可能になると考える。これらの結果を癌治療に適用していくためには、*in vitro* 血管新生モデルにおいて選別された腫瘍細胞と化合物の組み合わせについて、さらに癌浸潤モデルや遠隔転移モデルといった *in vivo* 評価系でその有効性を確認する必要がある。また、この *in vivo* 評価系には、血管内皮細胞と腫瘍細胞間の相互作用以外の各種のフィードバックループの存在が推定される。そのため、*in vitro* 評価系では効果が認められた化合物が、*in vivo* ではその効果が減弱するなど、抑制効果に変化が生じる可能性がある。この抑制効果に変化が生じた腫瘍細胞と化合物の組み合わせの系に網羅的遺伝子発現解析手法を適用することで、血管新生抑制に対して生体内修飾作用を示す遺伝子クラスターを同定する。これにより、腫瘍細胞の特性に応じた血管新生抑制の新たな *in vivo* 分子標的を見出すことができると考える。具体的な方法として、ヒトの悪性腫瘍から樹立された数種類の細胞株(MCF-7、RERF-LC-KJ、T24等)の各々と HUVECs(正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)をそれぞれの増殖培地で分けて培養し、サブコンフルエントの状態になったものを Transwell cell culture chamber (Costar)を用いて37℃、5%CO₂下で共培養した。細胞増殖アッセイには、細胞周期のS期を経た細胞に thymidine の類似体として取り込まれる BrdU (bromodeoxyuridine)を用いた。共培養系においてBrdUを両細胞に取り込ませて24時間後に、4%パラホルムアルデヒド固定液により固定を行った。検出は抗BrdU抗体(Dakc)を用いた免疫染色により行い、免疫陽性反応を示す細胞(分裂した細胞)をカウントした。またネ