

ている ER $\beta$  mRNA は1分子種のみであると考えられた。転写開始点は、翻訳開始点の上流-515bp があると推定され、未知領域を含む構造を決定した。さらに、それを起点に遺伝子上流域を検索し約 0.7kbp の構造を決定した (Fig. 4)。配列解析の結果この領域中は TATA、AML-1a、p300 結合サイト等の既知のプロモーターに相同性の高い領域を含んでいた。また、既報のマウス ER $\beta$  プロモーターとも高い相同性を示した。

#### C-4. *In vitro* プロモーター活性

クローニングした ER $\beta$  遺伝子上流域の全長および一部配列をルシフェラーゼ (luc) レポータープラスミドに挿入し細胞導入実験をおこなったところ、それらが遺伝子転写活性を持つことが示された (Fig. 5)。さらに、アンドロゲン受容体発現遺伝子を同時に導入した NIH/3T3 の系では、T による ER $\beta$  の発現誘導が観察された (Fig. 6)。

#### D. 考察

エストロゲン作用を持つ内分泌かく乱化学物質の低用量作用メカニズムには、その受容体の発現変化が関与していると考えられる。そこで、本研究では、低用量作用の基礎要因として ER の発現変化とその調節機構を明らかにすることを目指している。前年度の研究で、ラット前立腺 *in vivo* での調節様式を定量的に検討した。その結果、ER の mRNA 発現は、成長過程を通じて $\alpha$ 型から $\beta$ 型へ動的に発現移行していること、および、 $\beta$ 型発現は T 依存して調節されており、逆に $\alpha$ 型の発現は T により抑制的に調節されていることが明らかになった。また、それらの調節には直接的な ER 転写調節が関与していることが示唆された。そこで、一般にプロモーター活性が想定される、構造遺伝子上流を解析した。また、*in vivo* での受容体調節様式についても引き続き検討した。

マウスおよびラット前立腺の ER 発現：我々が示してきたラットの前立腺における ER の T による調節は、マウスモデルにおいても普遍的にみられることが示された。すなわち、ER $\alpha$  発現は去勢で増加し T 処理で低下したが、 $\beta$ 型の発現は逆の

調節を受けていた。さらに今回クローニングしたラット ER $\beta$  の上流域が転写活性化能をもつことおよびその構造がマウスとの間で高度に保存されていたことから、ラットとマウスで共通の ER $\beta$  の調節がこのプロモーター活性によっている可能性が示唆された。さらに、現在マウスで進めているプロモーター *in vivo* 解析モデルが一般性をもちうることも示された。

T と E の相乗作用：前立腺細胞増殖において、E は単独では抑制的に働くが、T と同時に投与したときには相乗的に前立腺肥大を誘導しさらに前立腺癌化にも関係することが示されてきた。ER 発現の解析の結果、そのときに ER $\alpha$  の発現上昇がみられることが示された。これは、E により ER 発現が修飾されていることを示し興味深い。さらに前立腺癌化への ER $\alpha$  発現の関与が指摘されているが、E による発癌修飾においても ER $\alpha$  発現が役割を果たしていることを示唆した。

ラット ER $\beta$  プロモーター：ラットにおける ER $\alpha$  の発現調節は、少なくとも2つの独立したプロモーター領域により調節されていることが知られる。ラット ER $\beta$  に関して、複数の組織からの cDNA の5'端の解析を行ったが、基本的に同一であり、そのプロモーターは単一であることが推定された。今回その遺伝子上流域を約 0.7kbp クローニングしプロモーター活性が同定できた。マウスとの相同性や *in vitro* 実験の発現調節様式から、この領域が実際の遺伝子発現で役割を果たしていると考えられた。

#### E. 結論

内分泌かく乱物質の低用量作用機構に関わると考えられる ER 発現調節とそのメカニズムについて検討した。1) ラットおよびマウスの前立腺において ER の mRNA 発現は、成長過程を通じて $\alpha$ 型から $\beta$ 型へ動的に発現移行しており、 $\beta$ 型発現は T 依存的に調節されていた。また、その発現がエストロゲンにより修飾されることも明らかになった。前立腺での ER $\beta$  mRNA は基本的には1分子種のみであり、その遺伝子上流域にプロモーター活性のあることが見いだされた。ER $\beta$  の発現には少なくとも部分的にはこの領域の転写活性が関与すると考えられた。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

- 1) ○ Kitamura S., Suzuki T., Fujimoto, N., Ohta S. Antiandrogenic activity of the organophosphorus pesticide fenthion and related compounds, and the effect of metabolism. *Env. Health Persp.*, In press (2003).
- 2) ○ Asano, K., Maruyama, S., Usui, T., Fujimoto, N. Regulation of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  expression by testosterone in the rat prostate gland. *Endocrine J.* In press (2003)
- 3) Kitamura, S., Ohmegi, M., Sanoh K., Sugihara K., Yoshihara, S., Fujimoto, N., Ohta, S. Estrogenic Activity of Styrene Oligomers after Metabolic Activation by Rat Liver Microsomes. *Env. Health Persp.*, In press (2002).
- 4) ○ Kitamura S., Jinno N. Ohta, S., Kuroki H. Fujimoto N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 554-559 (2002).
- 5) Imai T., Yasuhara, K., Matsui H., Maruyama S., Fujimoto N., Mitsumori, K., Hirose M. Iron lactate induction of pancreatic and endometrial proliferative lesions and a lack of increased tumors in a 104 week carcinogenicity study in F344 rats *Food Chem. Toxicol.* 40, 1441-1448 (2002).
- 6) 藤本成明 放射線の内分泌影響 放射線生物研究 37, 243-250 (2002).

### F-2. 学会発表

- 1) 北村繁幸, 鈴木智晴, 藤本隆志, 神野敬将, 幸田龍紀, 杉原数美, 黒木広明, 藤本成明, 太田 茂 内分泌攪乱化学物質の代謝とその活性変動 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会 広島 2002 (要旨集 B-2-1)
- 2) 加藤 輝久, 大野 研, 荒木 直比呂, 北村 繁之, 太田 茂, 黒木 広明, 藤本 成明 甲状腺ホルモン受容体応答性レポータージーンアッセイ法による内分泌攪乱化学物質のスクリーニング 環境ホルモン

学会第 5 回研究発表会 広島 2002 (要旨集 PB33)

- 3) 幸田龍紀, 北村繁幸, 杉原数美, 佐能正剛, 藤本成明, 大和田智彦, 太田 茂 フタル酸エステル類の代謝とエストロゲン活性 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会 広島 2002 (要旨集 PB42)
- 4) 藤本成明, 本田浩章 AP1 および PTTG プロモーターを介したエストロゲン応答と内分泌攪乱物質の作用 フォーラム 2002: 衛生薬学環境トキシコロジー, 広島 (抄録集 P212)
- 5) 神野敬将, 北村繁幸, 太田茂, 黒木広明, 藤本成明 甲状腺ホルモン機能攪乱物質のスクリーニング フォーラム 2002: 衛生薬学環境トキシコロジー, 広島 (抄録集 P214)
- 6) 鈴木智晴, 北村繁幸, 太田 茂, 藤本成明 環境中からの抗アンドロゲン物質のスクリーニングとその代謝的活性変動 フォーラム 2002: 衛生薬学環境トキシコロジー, 広島 (抄録集 P215)
- 7) 藤本成明, 本田浩章 ラット前立腺癌化とエストロゲン受容体発現 第 61 回日本癌学会総会, 横浜, 2002 (日本癌学会総会記事, 69, 2002)
- 8) Fujimoto, N., Maruyama, S. Regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat prostate - the involvement in prostate carcinogenesis 18th UICC International Cancer Congress, Oslo, 2002 (*Int. J. Cancer, suppl.* 13, 145, 2002)
- 9) 北村繁幸, 佐能正剛, 神野敬将, 鈴木智晴, 杉原数美, 藤本成明, 太田茂 DDT およびその関連化合物の構造と内分泌攪乱作用 日本薬学会 第 122 回年会, 千葉, 2002 (PII-281)
- 10) 神野敬将, 佐能正剛, 北村繁幸, 杉原数美, 吉原新一, 黒木広明 ビスフェノール類のエストロゲンおよび甲状腺ホルモン攪乱作用における構造活性相関 日本薬学会 第 122 回年会, 千葉, 2002 (PII-282)

Fig.1 ER  $\alpha$  and ER  $\beta$  mRNA expression in the prostate gland in mice

A. Effects of castration on ER mRNA levels (BDF1 at 6 week old)

Treatment	ER $\alpha$ (fg/pg G3PDH)	ER $\beta$ (fg/pg G3PDH)
C	5.8 $\pm$ 1.1	98.0 $\pm$ 22.0
Cast	5.1 $\pm$ 0.7	33.3 $\pm$ 3.8*
Mean $\pm$ SE (n=5)		

B. Age dependent changes

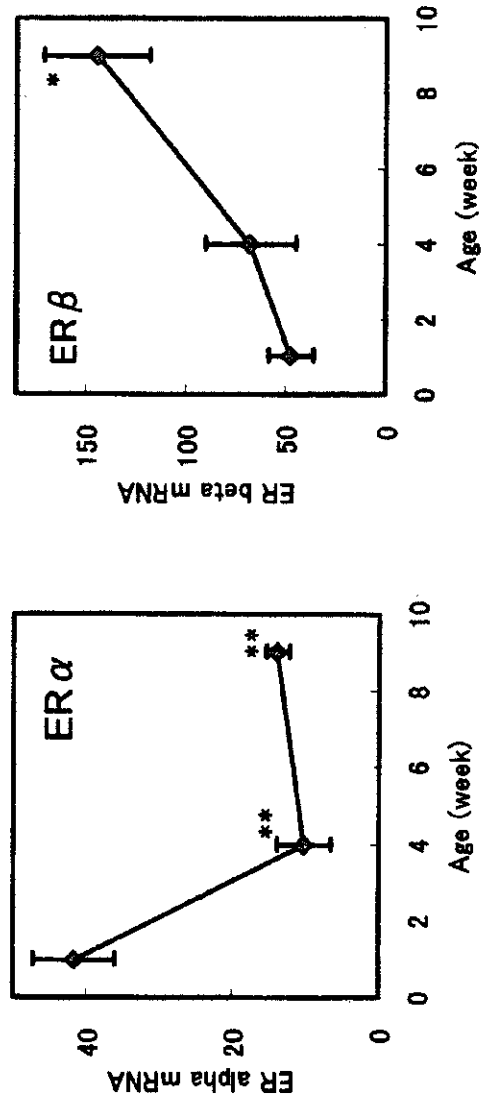
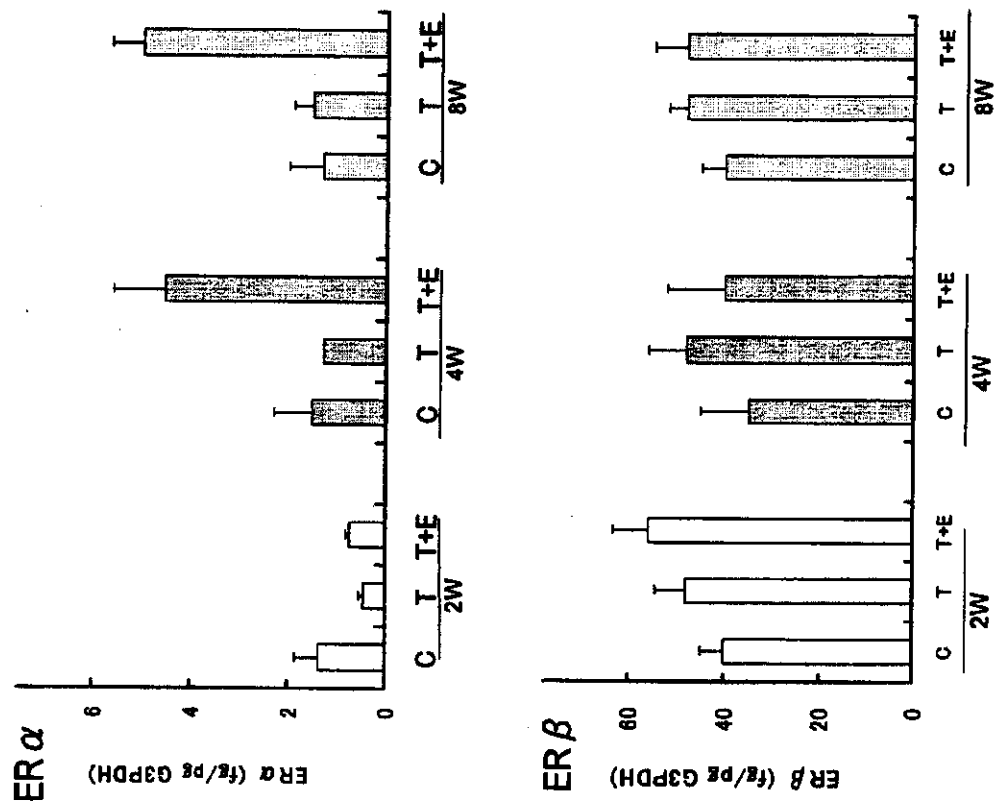
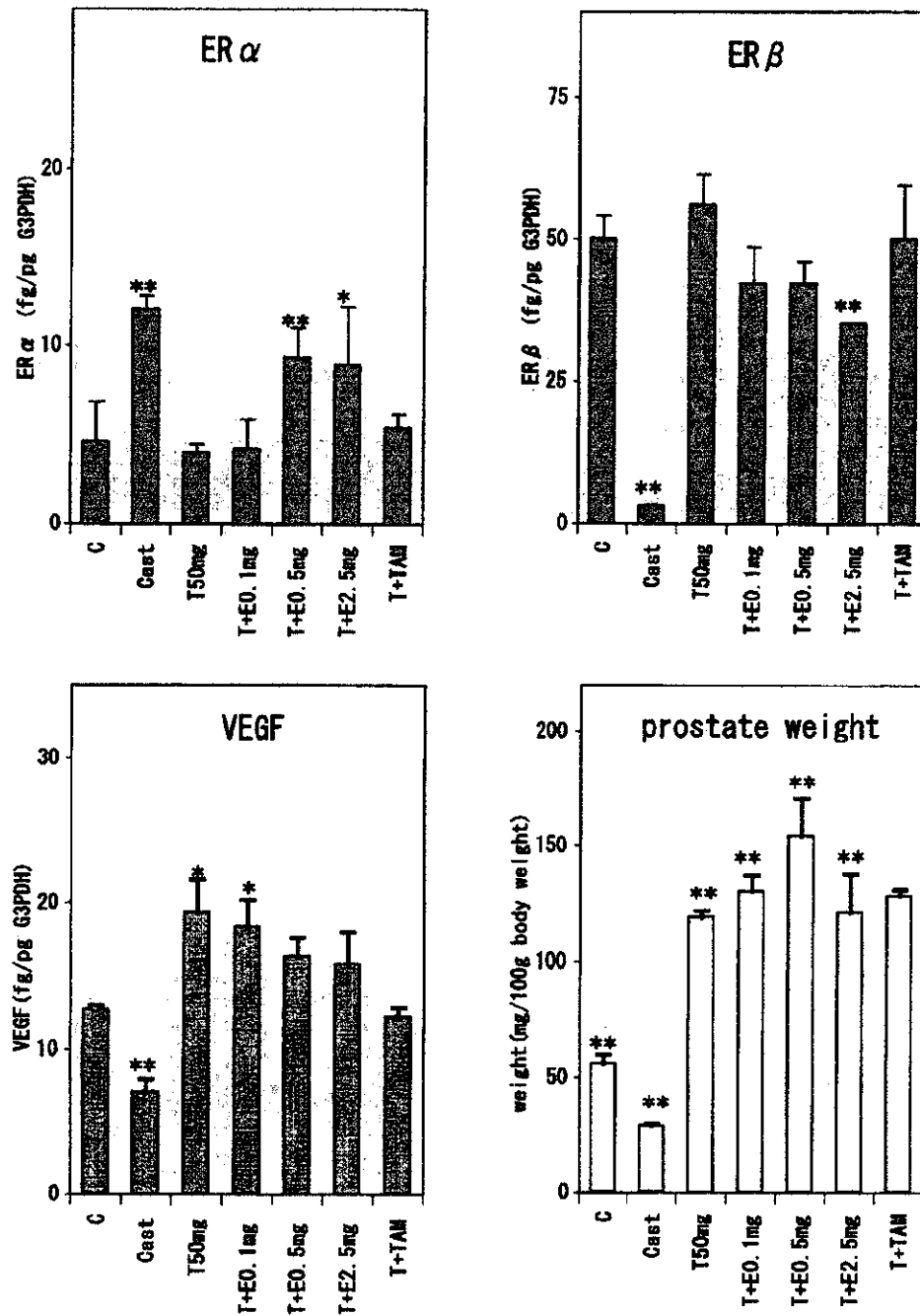


Fig.2 Effects of testosterone (T) and estradiol (E) on ER mRNA levels in the rat prostate gland



T: testosterone, 50 mg in pellet, s.c.  
 E: estradiol, 2.5 mg in pellet, s.c.

Fig. 3 Effects of testosterone (T) and estradiol (E) on ER and VEGF mRNA levels and weights in the prostate gland in rats



T: testosterone in pellet, E: estradiol in pellet administered s.c. for 4 weeks

Fig.4. The structure of the 5' flanking region of the rat ER  $\beta$  gene

A. Nucleotide sequence

-694  
 CTGCAGGAGCTGAACCCCTCATGCACTGGCTGGTGCCAGACCAGGCCCCCTGCAGATCCGAGCTGCCATCAGGG  
 GGCGCCAGAGACGCTTTGGGACAAGGAAGAGAGAGCCCTGTAAAAGCGCAGGCAGATTTTTCCAGGTGAATTC  
 CCTCGTTTTTTTTTTCTCTCCACTCCATCGCCAGCCGCTGGTAGACACGCATTCAAACCTCCGCCTCCAGCC  
 CTTGCCTTTCTGGGGCTCAAGCTAACACTCCCTGAAAAGGGATCTGATTTTCATTACTCCGTTATTACTGCTTATT  
 TCGGTGCTATTACCAAACCCGGGGCTGCCCCATGCTTCTTAAGGAGAGTTTCAGACCTAAGCATTAAATGACA  
 CGCGCGTGGTCAAAGTATGAAACAAGATGAAGTGTGGTCCCTGGACGCAGCAGTCAAGTCCAGAATTCCTGG  
 GGATCTGGTCAGAAATCCCATCCCGGGCTCCATCTCGGTTCTCCATCGTCACTCTTGGAAAGGGGGTGTCC  
 CTAGTGGATGACTGTGAAGAGGCTGGAGGTGACATCCAGTGGATCCGGTTGCGCGGGCGGGAGTGCCTGAAAT  
 CTCGGCTCCGGTTTGTGGTCACGTGAACCTCTTAGCTACCTCCACACTCTTTTCTAGGTCTTTAAAAGAGC  
 CGACTAACATCCGTTAGTCgtgggtaatctttgcagcttctcc

↑  
 (+1) the transcription starting site

B. Promoter motifs in the 5'f-region of rER  $\beta$  gene and the comparison with the mouse gene

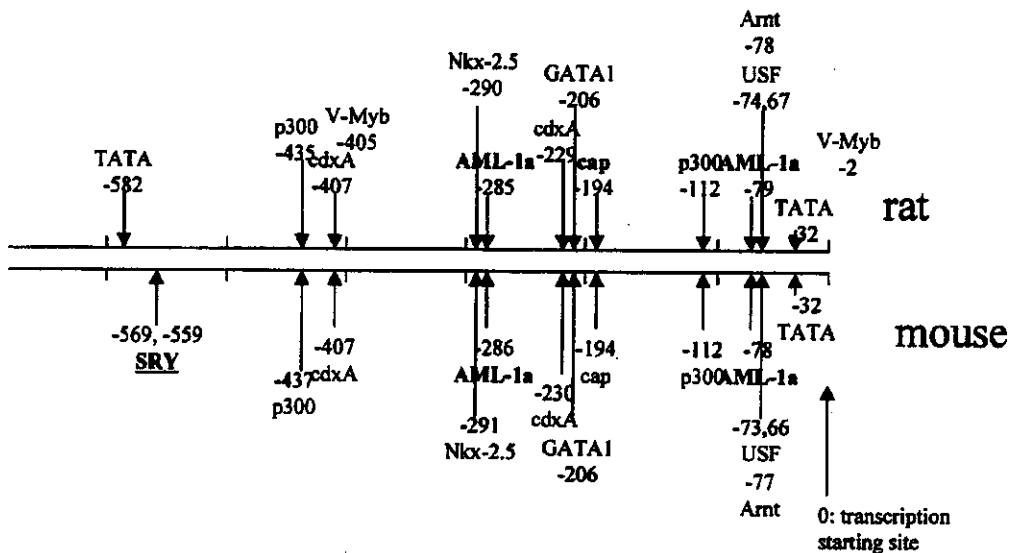
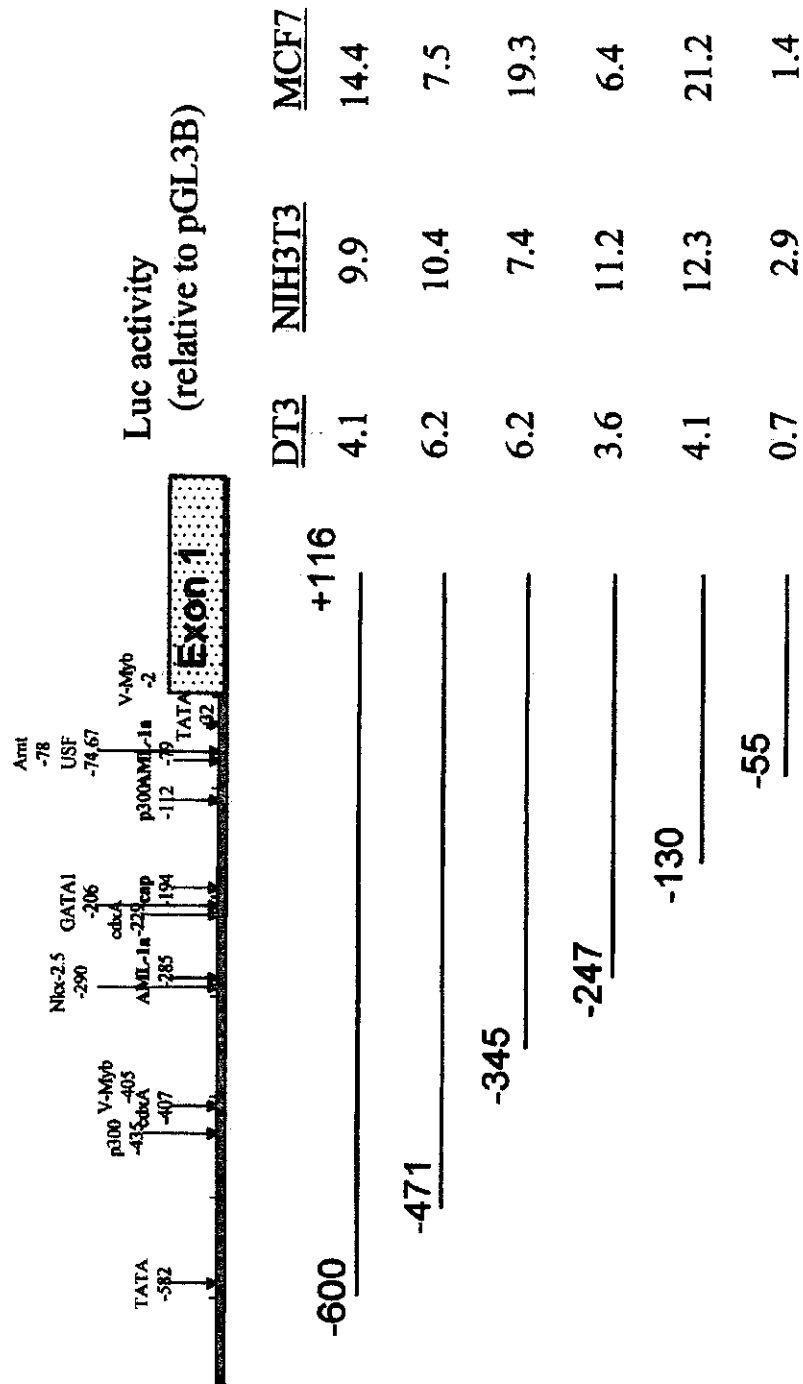
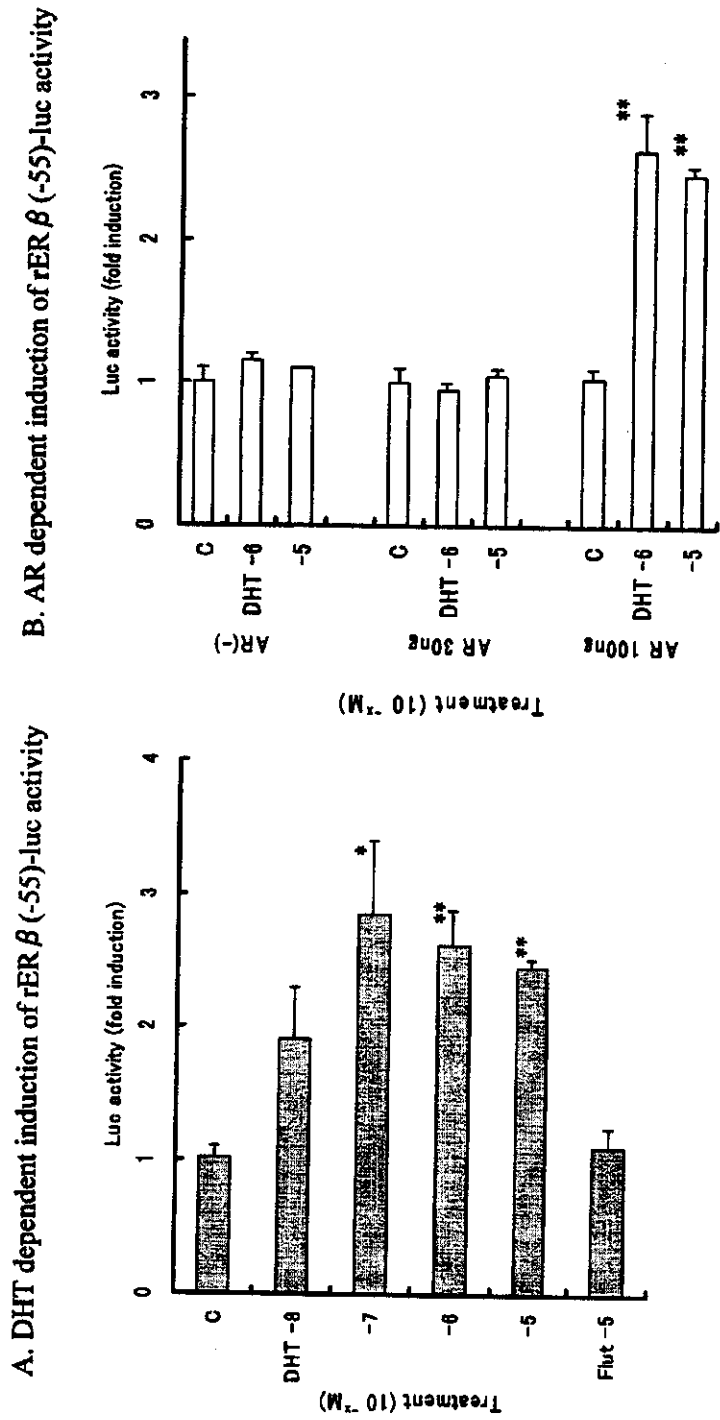


Fig.5 Promoter activities of 5' flanking regions of rat ER  $\beta$  gene



**Fig.6 Testosterone and the receptor dependent transactivation of the rER  $\beta$  promoter**



\* NIH3T3 cells were transfected with rER  $\beta$  (-55)-luc with an AR expression vector.  
DHT: Dihydrotestosterone, Flut: flutamide



研究課題名=[マイクロアレイ基盤整備]

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立

分担研究者 五十嵐 勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨

本研究は、当研究班での幅広い研究対象に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することを目指している。昨年度は、当班への DNA マイクロアレイ解析技術の導入を完了し、Affymetrix 社の Genechip システムによる解析が可能になったことを報告した。今年度はこのシステムを用い、具体的に各班員の研究サポートを開始した。今年度実施したサポート研究は、(1) 笹野公伸班員とヒト血管平滑筋細胞に対するエストロジェン作用、(2) 井口泰泉班員とマウス新生児視床下部に対する DES 影響、(3) 藤本成明班員とラット下垂体細胞株に対するエストロジェン作用、の 3 テーマである。また、本システムを高次系解析の中心である脳神経系発生への影響解析に適用する目的で、分担者はマウス脳性分化の確立する時期における視床下部領域の遺伝子発現変化の網羅的解析を実施した。すなわち、新生児期の視床下部を出生後 0 日目から 10 日目、19 日目、35 日目について雌雄別に経時的にサンプリングし、雌雄の遺伝子発現を比較し、性により異なる発現を示す遺伝子群の候補を同定した。

今後は、各班員の研究サポートおよび視床下部発達に伴う遺伝子発現変化解析を継続すると同時に、今年度得られたデータについてホルモン作用メカニズムの詳細を解析する。

A. 研究目的

ホルモン受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・発達段階により多種多様であると考えられている。例えば、ホルモン活性物質の *in vivo* 試

験として従来から行われている 子宮肥大試験 や Hershberger 試験における比較的単純な endpoint できえ、幾重かの反応カスケードの結果であると考えられる。このカスケードの解析は容易ではないが、近年進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方法が開けてきた。

そこで本研究では、当班へ DNA マイクロアレイ技術を導入し、各班員が実施中の研究を網羅的遺伝子発現解析という側面からサポートする体制を整えることとした。さらに、本技術を高次系影響研究の中心である脳神経系発生への影響解析に適用し、脳の性分化に対する内分泌かく乱候補化学物質の影響を網羅的遺伝子発現解析の観点から解明することも目指す。

## B. 研究方法

### 各班員からの検体からの RNA の分離精製

マウス組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが 5mm 以下となるように細切した。その後、RNA 抽出操作まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存し、RNAlater を除いた後、ISOGEN (日本ジーン社) を用いて全 RNA を抽出した。得た全 RNA は、キアゲン社の RNeasy キットを用いて精製し、 $1\mu\text{g}$  を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。各実験の詳細は各班員の報告書に譲る。

### マウス視床下部領域の遺伝子発現変化の網羅的解析

マウス C57BL/6 出生後 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 19, 35 日目の新生児より、視床下部領域を分離し、すみやかに RNA later に浸漬した。 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 晩置いた後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で RNA 抽出まで保存した。同時に胎児組織 (尾部) を分離し、

ProteinaseK 処理した後、Y 染色体特異的遺伝子を PCR 検出することにより性別を判定した。視床下部組織を性毎にプールし全 RNA を分離精製した。

### Genechip 解析

全 RNA  $5\mu\text{g}$  を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社キット) を用い、ビオチン化 CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はキアゲン社の RNeasy キットにて精製後、 $300\text{--}500\text{bp}$  となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip には MGU74Av2 (マウス)、RGU34A (ラット)、HGU95A もしくは HGU133A (ヒト)、を用いた。ハイブリダイゼーションは  $45^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、スキャンしてデータを得た。結果はシリコンジェネティクス社の Genespring を用いて解析した。

## C. 研究結果

### 各班員の研究サポート

今年度は、(1) 笹野公伸班員とヒト血管平滑筋細胞に対するエストロジェン作用、(2) 井口泰泉班員とマウス新生児視床下部に対する DES 影響、(3) 藤本成明班員とラット下垂体細胞株に対するエストロジェン作用、について、Genechip システムを用いて網羅的遺伝子発現解析サポートを実施した (Fig.1)。具体的には、各班員より送られた細胞もしくは組織サンプルから当方で RNA を抽出し、Genechip システム解析に必要な反応を行い、データを得、得られたデータを各班員と共同で解析した。以下に各々の研究サポートについて説明する。

#### (1) 笹野公伸班員：ヒト血管平滑筋細胞に対するエストロジェン作用

笹野班員による、動脈におけるエストロジェン局所作用検討をサポートするために、ヒト血管平滑筋細胞におけるエストロジェン応答遺伝子の網羅的遺伝子発現解析を行っている。

笹野班員によりエストロジェンレセプター (Estrogen receptor: ER) の発現が確認された血管平滑筋細胞株に対し、エストロジェン刺激後一定時間経過後に細胞から RNA を抽出し、Genechip HGU95A もしくは HGU133A を用いて解析した。用いた細胞は ER $\alpha$  陽性細胞として ATCC の human umbilical vein 由来の血管平滑筋細胞、ER $\beta$  陽性細胞として、ATCC の

human thoracic aorta 由来の血管平滑筋細胞 (CRL) である。エストロジェン濃度は 10nM, 1 $\mu$ M、刺激時間は 8, 48 時間である。その結果、エストロジェン刺激に伴う血管平滑筋増殖抑制現象を引き起こす遺伝子の候補が数種類選別された。これらの遺伝子の詳細な発現変化、発現制御のメカニズムの検討が笹野班員によって進められており、新たなホルモン作用メカニズムの同定につながる可能性がある。

#### (2) 井口泰泉班員：マウス新生児視床下部に対する DES 影響

本研究の目的は、DES による連続発情の作用機序の解明を網羅的遺伝子発現解析によって行うことである。特に、DES 暴露直後に誘導される遺伝子発現変化に注目し、DES 処理後 6 時間での発現変化の解析を実施した。具体的には、井口班員により、マウス出生後 0 日の新生児に対し、DES を 3 $\mu$ g 投与し、雌雄毎に視床下部を分離し、当方に送付していただき、当方で RNA を抽出した後、Genechip MGU74Av2 によって解析した。現在得られたデータの解析を進めているところである。

#### (3) 藤本成明班員：ラット下垂体細胞株に対するエストロジェン作用

本研究の目的は、ラット下垂体系細胞 (GH3、MtT/E-2 等) でエストロジェンにより発現が変

動する遺伝子を選択し、ER を介するものと介さないものを区別することにより、エストロジェン下垂体への作用について新たな知見を得ることにある。さらに、BPA 等の内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変化も測定し比較し、エストロジェン作用との相違を明らかにし、内分泌かく乱候補化学物質の下垂体への作用予測を試みる。本年度実施した項目は、

(1) GH3 細胞に対し、エストロジェン 1nM, エストロジェン阻害物質 ICI 100nM 処理後 1 時間、24 時間、(2) MtT/E-2 細胞に対し、エストロジェン 1nM 処理後 24 時間、(3) GH3 細胞に対し、BPA 10nM, 10 $\mu$ M 処理後 24 時間、の 3 種類についての、Genechip RGU34A を用いた網羅的遺伝子発現解析である。その結果、エストロジェン応答性の増殖と関連が深いとされる c-myc や c-fos 関連遺伝子がエストロジェン処理により発現変動していることを確認し、藤本班員により他の発現変動が見られた遺伝子について定量 RT-PCR による検討が進み、Genechip で得られた結果を概ね確認した。BPA 処理による遺伝子発現変動検討により、GH3 細胞の増殖を誘発しない低濃度の BPA でも遺伝子発現は変動すること、変動する遺伝子にはエストロゲン応答遺伝子、非応答遺伝子があることを示す結果が得られた。

マウス脳性分化確立時期における雌雄遺伝

## 子発現変化の網羅的解析

発生期の脳は、極低用量の内分泌かく乱候補化学物質が影響を与えることが示唆されている標的臓器である。ほ乳類の脳性分化は雌型がデフォルトであり、雄胎児自身の精巣から分泌されるテストステロンが脳内でエストロジェンに変換され作用し、雄型脳が形成されと考えられている。よって、脳の性分化にはエストロジェンにより制御される一連の遺伝子発現カスケードが存在すると考えられ、内分泌かく乱候補化学物質によりそのカスケードがかく乱される可能性がある。そこで、本研究ではマウスを材料に、脳性分化過程に関わる遺伝子群の同定およびそれら遺伝子群の内分泌かく乱候補化学物質による発現変化の検討を開始した。

本年度は、昨年度実施した胎生 17 日前後の時期に加え、出生後 0 日から 10 日、及び血中エストロジェン濃度の増減が始まる前後の代表的時期 2 点（出生後 19 日および 35 日）を検討時期に選び、マウス C57BL/6 新生児の視床下部領域を分析の標的として全 RNA を分離精製し、性別は Y 染色体特異的な遺伝子の有無を PCR 法にて特定した。得られた雌雄の RNA を用い、Genechip MGU74A version2 (既知遺伝子 6,000、EST6,000、合計 12,000) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。経時的遺伝子発現変化を検討した結果を Fig. 2 に示す。雌雄とも

に出生後0日を基準とし、変動比をプロットした (Fig. 2A) 雌雄特異的な発現変動パターンを示す遺伝子群を同定するために、クラスター解析を行い、分類された20グループの発現変化をFig2Bに示した。全体的に見た場合には経時的な遺伝子発現変化は雌雄間で非常に似ており、著しい違いを示すグループを特定することは困難であった。しかし、雌の出生後1日目における発現変動が比較的大きい点に注目し、雌の出生後1日目に2倍以上の発現変動を示す遺伝子群を抽出し (2倍以上: Fig. 2C, 0.5倍以下: Fig. 2D)、個々の遺伝子について、機能に関する情報のある遺伝子を表(Table1)にまとめた。2倍以上が31ヶ、0.5倍以下が12ヶであった。EST等の機能に関する情報の無い遺伝子は、2倍以上が48ヶ (42%)、0.5倍以下が16ヶ (55%)であった。これらの遺伝子群は、出生後1日目で雌に比較的特異的な発現を示す視床下部性二系性形成に必要な遺伝子群である可能性がある。

#### D. 考察

本年度は、当班基盤研究へのcDNAマイクロアレイ技術の導入および各班員の研究サポートを計画し、各班員が実施中の研究をサポートする体制を整えることを第一目的とした。あわせて、高次系解析の中心である脳神経系発生への影響解析に本技術を適用する目的で、マウス

脳性分化に伴う網羅的遺伝子発現解析とその内分泌かく乱候補化学物質による変動の解析を実施した。その結果、3人の班員の方と共同研究を進めることができ、各々重要遺伝子の選択の段階に到っている。来年度も本研究サポートを継続し、網羅的遺伝子発現解析による未知のホルモン作用メカニズムの同定を行う予定としている。特に、藤本班員との共同研究により、低濃度のBPAの影響が目に見えて明らかでない状態でも、GH3細胞に対し、エストロゲン誘発遺伝子群の一部の発現変動を引き起こすことが明らかとなったことは、今後の低用量影響を解明する上で重要な知見となると考えられる。次年度はこの結果の追試、検証を行い、結論を得たい。

視床下部発達に伴う雌雄網羅的遺伝子発現変化解析の結果から、出生後1日目の雌で比較的发現変動が大きいことに注目し、遺伝子群を抽出したところ、40ヶ程度の遺伝子リストが得られた。今後これら遺伝子の機能と性的二系性形成に関して検討したい。また、機能に関する情報の無い遺伝子群が同じリストの半数を占めていたことから、視床下部発達に伴い雌雄で異なる発現パターンを示す遺伝子は、機能未知の遺伝子が多い可能性があり、次年度は機能未知の遺伝子発現変化の網羅的解析も考慮したい。

#### E. 結論

本年度は昨年度導入した網羅的遺伝子発現変化解析システムである Genechip システムを用いた 班員の研究のサポートを実質的に開始した。

網羅的遺伝子発現解析技術は、数万以上のマーカーを対象に内分泌かく乱候補化学物質の影響を迅速に検討できる有効な技術である。この技術はスクリーニングとして用いることも可能であるが、むしろ、そのメカニズムに立ち入って解析する際に本領を発揮するものと期待される。本技術の各班員の研究への適用を継続し、低用量で変動する遺伝子を特定することで、低用量影響を解析する基盤となる重要な知見が得られるものと考えられる。

### 3. 知的所有権の取得状況

#### A. 特許取得

なし

#### B. 実用新案登録

なし

#### C. その他

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1: Kimura N, Takizawa M, Okita K, Natori O, Igarashi K, Ueno M, Nakashima K, Nobuhisa I, Taga T. Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse foetal haematopoietic tissues. Genes Cells. 7, 435-446 (2002).

### 2. 学会発表

## (1) 網羅的遺伝子発現解析システム

Genechipシステム (Affymetrix社) : 25merのオリゴDNAが高密度に配置

対象種

ヒト HGU94 or 133: 60,000以上の既知遺伝子、ESTクラスター

ラット RGU34: 24,000以上の既知遺伝子、ESTクラスター

マウス MGU74: 36,000以上の既知遺伝子、ESTクラスター

## (2) 各班員との共同研究

- 1) 笹野公伸班員 ヒト血管平滑筋細胞に対するエストロゲン作用
- 2) 井口泰泉班員 マウス新生児視床下部に対するDES影響
- 3) 藤本成明班員 ラット下垂体細胞株に対するエストロゲン作用

Fig. 1 Summary of microarray support

本年度実施した共同研究についてまとめた。(1)に用いた網羅的遺伝子発現解析システムを、(2)に各班員との共同研究の一覧を示した。

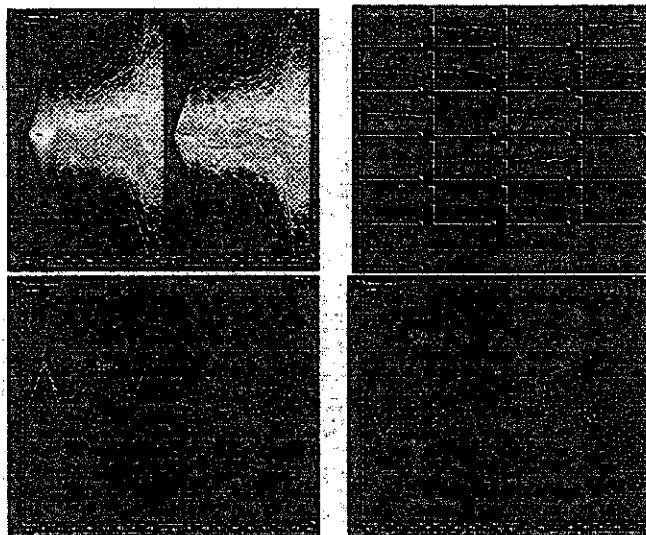


Fig. 2 視床下部遺伝子発現変化解析

Genechip MGU74Av2にて得た網羅的遺伝子発現データをGenespringにて解析した。A: FlagがPの遺伝子に限った全遺伝子の経時変化。Left: Female, Right: Male, B: Cluster解析結果。K-means法により20グループに分類し、各グループの平均値を表示した。C: 出生後1日の早で2倍以上の遺伝子群の経時変化。D: 出生後1日の早で0.5倍以下の遺伝子群の経時変化

0.5倍以下	2倍以上			
C1 inhibitor	glycoprotein-related protein	DSD-1, proteoglycan	promoter region; NF receptor	ZIP-kinase
complement component C2	ADAM22	E1 gene	procrero-related homeobox 1	
modifier 2 protein	edestin-gamma	ek1 gene	prostaglandin E receptor subtype EP2	
nigf gene; nIGF protein	etkts-2 adrenergic receptor	ELKL box	protocadherin cadase	
paired box protein; Pax-6 gene	etvren B; ANK3 gene	FGF-6	putative DNA methyltransferase	
PERCD3	epitopes signal-regulating kinase 1	Gprotein beta 3b subunit	Ret-binding protein GUR6	
Pig-1	etkts 16kngcass; gene mutated in human benign melanin; noogen	GCH2	reductase; nonheme heme reductase	
prohormone cleavage enzyme		germ line; Igh; immunoglobulin	regulator of G-protein signaling7	
mRCKP56	B-cell receptor-associated protein 37	glutamate receptor	retinoblastoma-related protein pRb26130	
nucleolar protein 511	block of proliferation 1	Ig3 receptor; transmembrane protein	RNA polymerase II large subunit	
serine/threonine kinase	B-rel oncogene; T18 oncogene	iron-responsive element-binding protein	serpinthrom P; serf gene	
So1 gene	branched-chain amino acid aminotransferase	Lac	Shc	
	NF-1A	MAP1B gene	stromelysin-3	
	CMK kinase IV	MPTPbeta	synaptophysin	
	cathepsin	MT4-MMP	TDAG51	
	cell adhesion molecule	nuclear protein, NP220	troponin	
	cellular degeneration-related 2	pskGTA protein kinase	ubiquitinating enzyme E2-290	
	CNR3	ps7	ucl-lyg-sensitive calcium channel etkts 1 A	
	decarboxylase	perinuclear binding protein	WD-repeat protein	
	decay accelerating factor	prolyl dipeptidase	zinc finger protein 80	

Table1

♀出生後1日目で0.5倍以下もしくは2倍以上の発現変化を示した遺伝子群のうち、蛋白質機能情報の存在するものを抽出した



## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Inoue T</u> , <u>Igarashi K</u> , <u>Sekizawa J</u>	Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoint of their mechanism of action.	Japan Med Assoc J.	46	97-102	2003
Katoh C, Kitajima S, Saga Y, Kanno J, Horii I, <u>Inoue T</u>	Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclophosphamide- and ethinyl-estradiol-treated rats.	J Toxicol Sci	27	87-96	2002
Hirabayashi Y, Matsuda M, Aizawa S, Kodama Y, Kanno J, <u>Inoue T</u>	Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential.	Exp Biol Med (Maywood)	227	474-9	2002
Hirabayashi Y, Miyajima A, Yokota T, Arai K, Li GX, Yoon BI, Kanno J, Kaneko T, <u>Inoue T</u>	Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd) on b cell differentiation in mouse pre-b colonization model regulated by artificially introduced human il-3 receptors.	Organohalogen Compounds	55	359-62	2002
<u>Sekizawa J</u> , Suter G, Bimbaum L,	Integrated human and ecological risk assessment : a case study of tributyltin and triphenyltin compounds.	J. Human and Eco. Risk Assess.	9		2003 (in press)
関澤 純	内分泌攪乱化学物質のリスクアセスメントとリスクコミュニケーション	最新医学	57	273-8	2002
Hamajima N, Matsuo K, Iwata H, Shinoda M, Yamamura Y, Kato T, Hatooka S, Mitsudomi T, Suyama M, Kagami Y, Ogura M, Ando M, <u>Sugimura Y</u> , Tajima K	NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism and the risk of eight cancers for Japanese.	Int J Clin Oncol	7	103-8	2002
Takahashi S, Suzuki S, Inaguma S, Cho YM, Ikeda Y, Hayashi N, Inoue T, <u>Sugimura Y</u> , Nishiyama N, Fujita T, Ushijima T, Shirai T	Down-regulation of Lsm1 is involved in human prostate cancer progression.	Br J Cancer	86	940-6	2002
Takahashi S, Suzuki S, Inaguma S, Ikeda Y, Cho YM, Nishiyama N, Fujita T, Inoue T, Hioki T, <u>Sugimura Y</u> , Ushijima T, Shirai T	Down-regulation of human X-box binding protein 1 (hXBP-1) expression correlates with tumor progression in human prostate cancers.	Prostate	50	154-61	2002
Iguchi K, Usui S, Inoue T, <u>Sugimura Y</u> , Tatematsu M, Hirano K	High-level expression of zinc transporter-2 in the rat lateral and dorsal prostate.	J Androl	23	819-24	2002

<u>Fukushima S</u> , Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nakae D, Konishi Y, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F, Wakabayashi K, Totsuka Y	Lack of a dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline or <i>N</i> -nitrosodiethylamine.	Jap J Cancer Res	93	1076-82	2002
Sukata T, Uwagawa S, Ozaki K, Ogawa M, Nishikawa T, Iwai S, Kinoshita A, Wanibuchi, H, Imaoka S, Funae Y, Okuno Y, <u>Fukushima S</u>	Detailed low-dose study of 1,1-bis( <i>p</i> -chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane carcinogenesis suggests the possibility of a hormetic effect.	Int J Cancer	99	112-8	2002
Iwai S, Karim R, Kitano M, Sukata, T., Wei, M., Morimura K, Wanibuchi H, <u>Fukushima S</u>	Role of oxidative DNA damage caused by carbon tetrachlorede-induced liver injury- enhancement of MeIQx-induced glutathione S-transferase placental form-positive foci in rats.	Cancer Lett	179	15-24	2002
Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Ogawa M, Masuda C, Morimura K, Funae Y, <u>Fukushima S</u>	Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> , cyclin D1 and Ogg1.	Carcinogenesis	23	341-9	2002
Seike N, Wanibuchi H, Morimura K, Nishikawa T, Kishida H, Nakae D, Hirata K, <u>Fukushima S</u>	Lack of promoting effect due to oral administration of dimethylarsinic acid on rat lung carcinogenesis initiated with <i>N</i> -bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine.	Cancer Lett	175	113-9	2002
<u>Kato Y</u> , Haraguchi K, Yamazaki T, Ito Y, Miyajima S, Nemoto K, Koga N, Kimura R, Degawa M	Effects of polychlorinated biphenyls, Kanechlor-500, on serum thyroid hormone level in rats and mice.	Toxicol Sci			2003 (in press)
<u>Kato Y</u> , Haraguchi K, Yumoto S, Yamazaki T, Nagano Y, Koga N, Masuda Y, Kimura R	Metabolite of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, 3-methylsulphonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a potent inducer of CYP2B1/2 in rat.	Xenobiotica	32	289-303	2002
<u>Kato Y</u> , Kimura R	The contribution of 2,3,5-trichlorophenyl methyl sulfone, a metabolite of 1,2,4-trichlorobenzene, to the $\alpha$ -aminolevulinic acid synthetase induction by 1,2,4-trichlorobenzene in rat liver.	Chemosphere	47	1-7	2002
<u>Kato Y</u> , Ito Y, Haraguchi K, Yamazaki T, Kimura R	The induction of hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase by the methylsulfonyl metabolites of 2,2',4',5-tetrabromobiphenyl in rats.	J Toxicol Sci (proceedings)	27	346	2002
<u>Kato Y</u> , Yamazaki T, Ikushiro S, Ito Y, Haraguchi K, Iyanagi T, Kimura R, Degawa M	Relation between the increase in hepatic UDP-GT and the decrease in serum thyroxine level in Kanechlor-500-treated rats.	J Toxicol Sci (proceedings)	27	346	2002
<u>Kato Y</u> , Ito Y, Yasuoka K, Yamazaki T, Degawa M,	Effects of PCBs and organochlorine pesticides extracted from cetacean	Environ Sci	9	177	2002

Kimura R, Haraguchi K	products on serum biochemical parameters and hepatic drug-metabolizing enzyme activities in mice.	(proceedings)			
Kato M, Akita M, Haraguchi K, Yasuoka K, Endo T, <u>Kato Y</u> , Yokoyama A	Effects of organohalogen contaminants extracted from small cetacean products on cultured rat embryos.	Environ Sci (proceedings)	9	177	2002
Haraguchi K, Endo T, Yasuoka K, Araki Y, <u>Kato Y</u> , Cipriano F	Contamination by mercury, PCBs and organochlorine pesticides in small cetacean products purchased in Japan.	Environ Sci (proceedings)	9	228	2002
Miyagawa S., BuchananDL, Sato T, Ohta Y, Nishina Y, <u>Iguchi T</u>	Characterization of diethylstilbestrol-induced hypospadias in female mice.	Anat Rec	266	43-50	2002
Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H, <u>Iguchi T</u>	Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice.	Reprod Toxicol	16	107-16	2002
Buchanan DL, Ohsako S, Tohyama C, Cooke PS, <u>Iguchi T</u>	Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor- $\beta$ expression.	Toxicol Sci	66	62-8	2002
Okada A, Ohta Y, Buchanan DL, Sato T, Inoue S, Hori H, Muramatsu M, <u>Iguchi T</u>	Changes in ontogenetic expression of estrogen receptor $\alpha$ and not of estrogen receptor $\beta$ in the female rat reproductive tract.	J Mol Endocrinol	28	87-97	2002
Uchida D, Yamashita M, Kitano T, <u>Iguchi T</u>	Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish.	J Exp Biol	205	711-8	2002
Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, <u>Iguchi T</u>	Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction.	Reprod. Toxicol	16	117-22	2002
Shimamura M., Kodaira K, Hino K, Ishimoto Y, Tamura H, <u>Iguchi T</u>	Comparison of antiandrogenic activities of vinclozolin and d,l-camphorquinone in androgen receptor gene transcription assay in vitro and mouse in utero exposure assay in vivo.	Toxicology	174	97-107	2002
Watanabe H, Suzuki A, Mizutani T, Kohno S, Lubahn DB, Handa H <u>Iguchi T</u>	Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by estrogen.	Genes Cells	7	497-507	2002
<u>Iguchi T</u> , Watanabe H, Katsu Y, Mizutani T, Miyagawa S, Suzuki A, Sone K, Kato H	Developmental toxicity of estrogenic chemicals on rodents and other species.	Congen Anorm	42	94-105	2002
<u>Iguchi T</u>	Endocrine disrupters and sexual differentiation.	Clin Pediatr Endocrinol	11 (S18)	51-8	2002
Tatarazako N, Takao Y, Kishi K, Onikura K, Arizono K, <u>Iguchi T</u>	Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnia (Ceriodaphnia dubia).	Chemosphere	48	597-601	2002

Ishibashi H, Kobayashi M, Koshiishi T, Moriawaki T, Tachibana K, Tsuchimoto M, Soyano K, <u>Iguchi T</u> , Mori C, Arizono K	Induction of plasma vitellogenin synthesis by the commercial fish diets in male goldfish ( <i>Carassius auratus</i> ) and dietary phytoestrogens.	J. Health Sci	48	427-34	2002
Adachi T, Komiyama M, Ono Y, Koh K-B, Sakurai K, Shibayama T, Kato M, Yoshikawa T, Seki N, <u>Iguchi T</u> , Mori C	Toxicogenomic effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol on mouse testicular gene expression in the long term: a study using cDNA microarray analysis.	Mol. Reprod. Devel.,	63	17-23	2002
Katsu Y, Takasu E, <u>Iguchi T</u>	Estrogen-independent expression of neuropsin, a serin protease in the vagina of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol.	Mol. Cell. Endocrinol.,	195	99-107	2002
Urushitani H, Shimizu A, Katsu Y, <u>Iguchi T</u>	Early estrogen exposure induces abnormal development of <i>Fundulus heteroclitus</i>	J. Exp. Zool	293	693-702	2002
Okada A, Ohta Y, Buchanan DL, Sato T, <u>Iguchi T</u>	Effect of estrogens on ontogenic expression of progesterone receptor in the fetal female rat reproductive tract.	Mol. Cell. Endocrinol	195	55-64	2002
Uchida K, Suzuki A, Kobayashi Y, Buchanan DL, Sato T, Watanabe H, Katsu Y, Suzuki J, Asaoka K, Mori C, Arizono K, <u>Iguchi T</u>	Bisphenol-A administration during pregnancy results in fetal exposure in mice and monkeys.	J. Health Sci	48	579-82	2002
Ura K, Kai T, Sakata S, <u>Iguchi T</u> , Arizono K	Aquatic acute toxicity testing using the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> .	J. Health Sci.,	48	583-6	2002
Matsuno T, Ura K, Sonoda R, Kohara Y, Uesugi H, Arizono K, <u>Iguchi T</u> , Tominaga N	Sensing of chemical substances using gene expression patterns in <i>C. elegans</i> .	Sensors Materials			2003 (in press)
<u>Iguchi T</u> , Watanabe H	Developmental effects of hormonally active agents on animals: from daphnia to humans.	Environ. Sci.	10	Supple	2003 (in press)
Guillette LJ, <u>Iguchi T</u>	Contaminant-induced endocrine and reproductive alterations in reptiles.	SCOPE/IPCS			2003 (in press)
Adachi T, Matsuno Y, Sugimura A, Takano K, Koh K-B, Sakurai K, Shibayama T, <u>Iguchi T</u> , Mori C, Komiyama M	ADAM7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to diethylstilbestrol.	Mol. Reprod. Develop.			2003 (in press)
Inoue T, Akahira JI, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Takahashi K, Hatori M, Shirane R, Kumabe T, Kurokawa Y, Satomi S, <u>Sasano H</u>	Progesterone Production and Actions in the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors.	J Clin Endocrinol Metab	87	5325-31	2002
Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, Hidaka K, Shiotsu Y, Kusaka H, <u>Sasano H</u>	Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues.	J Clin Endocrinol Metab	87	5760-8	2002