

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

「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14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15年(2003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」	
I - 2 - 1. トリクロロエチレン腹腔内投与実験-----	8
I - 2 - 2. トリクロロエチレン経口投与実験-----	57
I - 2 - 3. トリクロロエチレン in vitro 予備実験-----	118
I - 2 - 4. トリクロロエチレン in vitro 実験-----	152
I - 2 - 5. ジクロロメタンによる遺伝子発現の研究-----	176
I - 3. 「変異原」	
I - 3 - 1. マイトマイシンCによる遺伝子発現の研究-----	190
I - 3 - 2. メチルニトロソウレアによる遺伝子発現の研究-----	213
I I. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	220

1 - 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は、ヒト以外の動物や細胞・細菌から得られた実験結果の外挿の妥当性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 14 年度は、種差については、初代培養肝細胞の実験系を確立、マウスでトリクロロエチレン (TCE) を初代培養肝細胞に曝露させ、チトクローム P450 遺伝子の発現が亢進する実験条件を見出した。この情報に基づき、TCE 曝露の際の初代培養肝細胞における遺伝子発現プロファイルを DNA チップを使って得た。ジクロロメタンについてもラットの *in vivo* 発現プロファイルを得た。変異原についてはマイトマシン C、N-メチルニトロソウレア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卵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¹⁾。

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²⁾。また、砒素によるヒトの肝がんの研究³⁾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⁴⁾。

研究の目的、概要

本研究では、既に種差が明ら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」）。14 年度は初代培養肝細胞の実験系を確立し、TCE 曝露による初代培養肝細胞の遺伝子発現プロファイルについて検討した。

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」)。14年度は、マイトマイシン C、N-メチルニトロソウレアについて検討した。

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 を使用している。「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

メ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とどまらず、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決定する。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。合成が終了した後、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 HumanGenome U95A では 12,626 ものプローブ（遺伝子）が基盤上に合成されている。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 を使用している。

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.

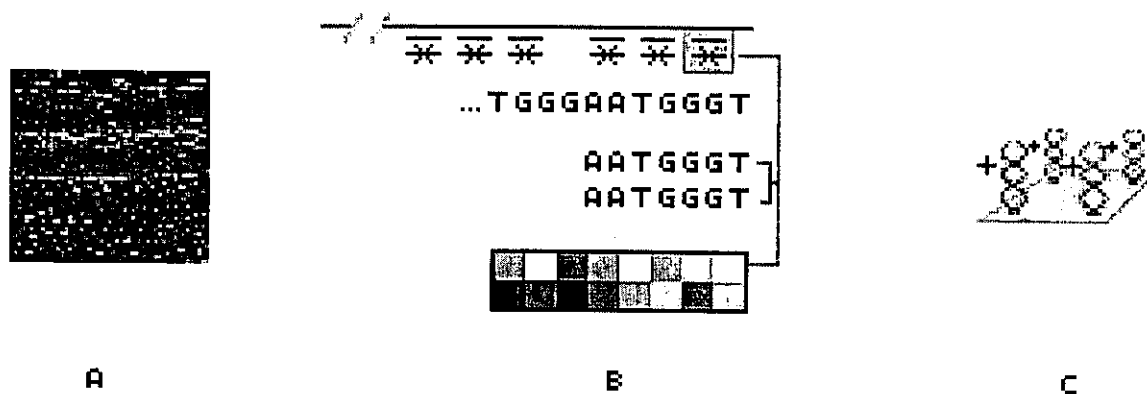
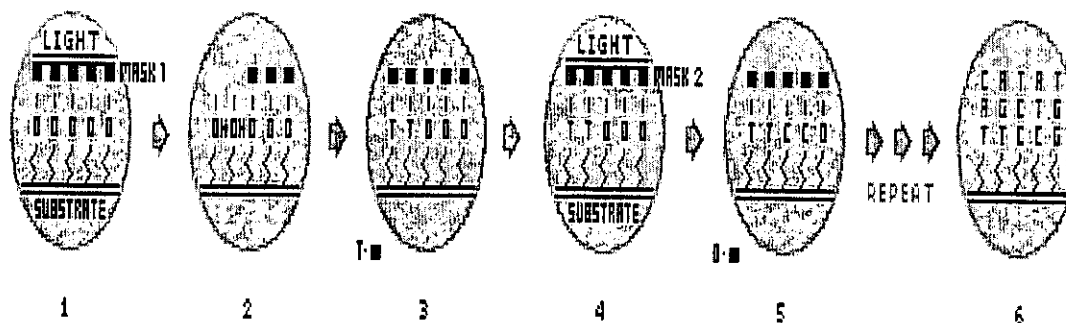


Figure 1.

A. GeneChipR 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-2-1. トリクロロエチレン腹腔内投与実験

要旨 トリクロロエチレン(以下、TCE)をそれぞれ3群(高曝露群:2000mg/kg TCE、低曝露群:1000mg/kg TCE、コントロール群:コーン油のみ)に分けたマウスとラットの腹腔内へ単回投与した。曝露後24時間の時点で肝臓を摘出し、抽出したmRNAをDNAチップ(Affymetrix社のDNAチップにはマウスは12488個のプロンプ(既知遺伝子6062個とEST6426個)が含まれており、ラットは8799個のプロンプ(既知遺伝子5334個とEST3465個)が含まれている。)へハイブリダイゼーションし遺伝子発現プロファイルを得た。また代表的な遺伝子発現変化を示した遺伝子に対しては、定量的PCR法によってDNAチップにハイブリダイゼーションしたものと同一mRNAを半定量し、DNAチップの精度を確認した。DNAチップで得られた遺伝子発現プロファイルをクラスター解析したところ、マウス、ラット共に一部のサンプルを除くとコントロール群、低曝露群、高曝露群の群分けがほぼ可能であった。このことはDNAチップは曝露濃度を反映した遺伝子発現の変化を検出出来ることを意味し、遺伝子発現を全体として捉えるという観点からはDNAチップの有用性が示された。しかし、曝露濃度によって明らかな群分けが出来なかったことは、曝露濃度による差よりも個体差の方が大きい可能性を窺わせる。よって出来るだけn数を多くして実験を行うことの重要性が示唆された。個々の遺伝子発現の変化を見てみると、以下の点が観察された。1) アポトーシス関連の遺伝子はマウスでは抑制されていた。この反応は曝露濃度が高い程、顕著に現れていた。一方ラットではアポトーシスに関わる遺伝子は亢進する方向に変化を示した。2) 細胞増殖関連の遺伝子はマウスで増加していた。この反応は曝露濃度が高い程、顕著に現れていた。一方ラットでは細胞増殖に関わる遺伝子に明らかな変化は見られなかった。3) 肝癌発生のメカニズムに大きく関与するであろうPPAR α はマウスで発現増加していた。4) 脂質代謝に関わる遺伝子は、ペルオキシゾームの β 酸化関連の遺伝子はマウスでもラットでも明らかな変化は見られなかった。5) ミトコンドリアや細胞質内などで脂肪酸代謝に関わる遺伝子はラットでその発現の増加が観察された。6) TCEのCYPを介する主要代謝経路の遺伝子には明らかな発現の増加は見られなかったが、マイナー代謝経路であるグルタチオン抱合に関わる遺伝子は発現の増加がマウスとラットで観察された。総合的に見て、マウスとラットにおけるTCEによる遺伝子の発現変化は異なっていた。マウスでは、細胞増殖制御機構への変調が生じている兆しが見えたが、ラットでは脂質代謝の活性化が見えたに過ぎなかった。これらの結果は、これまでの知見を十分に裏付けるものであり、また、マウスとラットのTCE曝露による種差を浮き彫りにしたと言える。

トリクロロエチレン腹腔内投与実験の結果
については平成13年度に報告したが、解析
方法の変更等があったので再掲する。

トリクロロエチレン (TCE):

TCEは金属機器部品の脱脂洗浄剤、塗料や

シンナーのリムーバ、ドライクリーニングなど、産業界では幅広く使用されている化学物質であり、その汎用性のために自然界中に汚染物質としてしばしば見出されている。

TCE は IARC では Groupe 2 A に分類されている発癌物質であるが、その発癌性には種差が存在する。つまり、TCE の曝露によりマウスでは肝細胞癌の発生が報告されているが、ラットとヒトでは肝細胞癌の発生は報告されていない。また、ラットでは腎細胞癌の発生が報告されているが、マウスでは報告されていない。

TCE はペルオキシゾーム増殖薬である。ペルオキシゾーム増殖薬は一般的に発癌のイニシエータではないがプロモーターになり得るため、非変異原性化学発癌物質と言われている。このペルオキシゾーム増殖薬の発癌のメカニズムはまだ解明されていないが、細胞増殖、ペルオキシゾーム増殖薬受容体、癌遺伝子などの関与についての検討が進んでいる。

腹腔内投与実験

○曝露方法

●動物、曝露条件

B6C3F1 マウス (8 週齢、雄)、及び SD ラット (8 週齢、雄) (Japan Charles River) を温度 23~25℃、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクル下で 1 週間馴化し、体重が群によってばらつかないように均等に 6 匹ずつを 3 群に分け、トリクロロエチレン (TCE : Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Purity 99.5%) をコーン油に溶解させて腹腔内への単回投与を行い、24 時間後にエーテル麻酔下で肝臓を摘出した。

曝露濃度は以下の通りである。

- 1) 2000mg/kg 体重 TCE in corn oil (高曝露群)
- 2) 1000mg/kg 体重 TCE in corn oil (低曝露群)
- 3) corn oil のみ (コントロール群)

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)

なお、この動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン (平成 9 年改正) に基き計画を立案し、慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施したものである。

●代謝産物測定、生化学的肝機能検査

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し、次いで肝臓の摘出を行った。

TCE の生物学的曝露指標として、TCE と TCE の代謝産物であるトリクロロ酢酸 (TCA)、ジクロロ酢酸 (DCA)、トリクロロエタノール (TCOH) の血液中濃度、及び、24 時間尿総排泄量を測定した。

この TCE 代謝産物血中濃度、24 時間尿中総排泄量及び、生化学的肝機能データ (GOT, GPT, LDH, ラットのみ)を用いて

各群から4匹ずつを選択し、DNAチップへハイブリダイゼーションをさせるサンプル個体とした。このサンプル個体の選択は、基本的には尿中へのTCAの24時間総排泄量が各群における最高値と最低値を取った個体を取り除くことで得た。

●臓器

肝臓は重量測定後、液体窒素で直ちに凍結し、total RNAの抽出を行うまで-80℃で保存した。

ODNAチップハイブリダイゼーション

●RNAの精製、cDNA合成：

肝臓から抽出したRNAを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った。プロトコルの詳細を参照1に示す。

- (1) total RNA の抽出
- ↓
- (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 c RNA の合成(In Vitro transcription)・精製
- ↓
- (5) 標識 c RNA の断片化
- ↓
- (6) DNA チップへのハイブリダイゼーション

ODNAチップ解析方法

MicroArray Suite ver.5.0(Affymetrix社)でハイブリダイゼーションで得られたイメー

ジデータをシグナル値に変換し、得られたシグナルデータをDNAチップ解析ソフトであるGene Spring Ver.5.0.2(Silicon Genetics社)に読み込ませ以下の解析を行った。

(1) (1) Normalization

DNAチップ間の比較のためには標準化(Normalization)が必要となる。ここでは有効な全ての遺伝子発現量の中央値を用いた。すなわち、各DNAチップ上のPresent CallおよびMarginal Call(これらの分類はAffymetrix社が独自に採用している)と判定されたプローブのSignal値の中央値を算出し、その中央値で全てのプローブのSignal値を除すことによりDNAチップ間の標準化(Normalization)を行った。すなわち、各DNAチップ上のPresent CallおよびMarginal Callと判定された遺伝子のSignal値の中央値を算出し、その中央値で全ての遺伝子のSignal値を除すことによりDNAチップ間の標準化(Normalization)を行った。

次にPresent CallもしくはMarginal Callの数が12個(コントロール群 n=4、低暴露群 n=4、高暴露群 n=4)のうち8個以上含まれているプローブを抽出した。なお、この中でコントロール群：低暴露群：高暴露群が4：4：0、もしくは4：2：2(順不同)のプローブは除外し遺伝子発現プロファイルを作成した。

(2) 有意差のある遺伝子の検出

(1)で作成したプロファイルの遺伝子に対しCross Gene Error Modelを用いて曝露濃度によって有意差のある遺伝子発現変化を示したプローブを検出した。(p<0.1、

ANOVA)。同時に Multiple Testing Correction を Benjamini and Hochber False Discovery Rate とした。

(3) 相同遺伝子の検索、新たな遺伝子発現ファイルの構築

我々は NCBI の BLAST プログラムをベースとする相同遺伝子検索プログラムを独自に開発した。プログラムの特徴は遺伝子の相同性を塩基配列によらず、アミノ酸配列で決定した点である。Affymetrix 社の DNA チップ上のプローブは遺伝子の 3'end をターゲットとして選択されており、3'end は種保存性が高いので塩基配列でのホモロジー検索では相同性が低く見積られる可能性がある。よってコーディング領域でのホモロジー検索をする目的でアミノ酸配列での相同遺伝子検索を行った。このとき Affymetrix 社の DNA チップ上に存在している遺伝子プローブの中で $e\text{-value}(<0.05)$ が最も小さく、かつ score が最も高い遺伝子プローブを相同遺伝子プローブと決定した。ただし Affymetrix 社の cDNA チップでは一つの遺伝子に対してプローブのデザインをする遺伝子上の場所の違いによって、複数個のプローブが存在するケースがあり、この場合は一つの遺伝子に対して同じ相同遺伝子が繰り返し選択されている。これらの相同遺伝子検索により、マウス 12488 個の遺伝子プローブ (11922 個の遺伝子) に対し、ラットにおいて相同遺伝子が見つかり、かつ Affymetrix 社の DNA チップ上にのっていた遺伝子の数は 6867 個であり、相同遺伝子が現段階では見つからなかった遺伝子が 3455 個、相同遺伝子は見つかったが Affymetrix 社の DNA チップ上に乗っていなかった遺伝子が 1600

個であった。一方ラット 8508 個のプローブ (7682 個の遺伝子) に対して、マウスにおいて相同遺伝子が見つかり、かつ Affymetrix 社の DNA チップ上にのっていた遺伝子の数は 5192 個であり、相同遺伝子が現段階では見つからなかった遺伝子が 294 個、相同遺伝子は見つかったが Affymetrix 社の DNA チップ上に乗っていなかった遺伝子が 2196 個であった。

上記のシステムを用いて、マウス (ラット) の DNA チップ上のプローブに対するラット (マウス) の相同遺伝子を検索し、マウスとラットの DNA チップ上のプローブを対応させた。これによりマウスとラットの DNA チップが比較可能となった。

(4) クラスタリング解析

1) 全てのプローブもしくはコントロール群と曝露群で有意差のあったプローブ (マウスでは 88 個、ラットでは 429 個であった。)を用いて、同種内で階層的クラスタリング解析を行った。(Standard Correlation)。図 1A (マウス 全てのプローブ), 図 1B (マウス 有意差のあったプローブ), 図 1C (ラット 全てのプローブ), 図 1D (ラット 有意差のあったプローブ)

2) (3) で得られた新たな遺伝子発現プロファイル (マウス $n=12$, ラット $n=12$) を用いて異種間での階層的クラスタリング解析を有意差があった遺伝子に対して行った。

図 2A

また、各群 ($n=4$) における各遺伝子のシグナル値の算術平均をその群における代表値とし、階層的クラスタリング解析を行った。図 2B

3) 各曝露濃度群 ($n=4$) の各遺伝子のシグナル値の算術平均をコントロール群

(n=4)のシグナル値の算術平均で除して Exposed/Control の値を算出した。このデータセットを用いて2)と同様に全てのデータセット(マウス n=8,ラット n=8)を使用した場合と、各群の代表値(算術平均値)を用いた場合とで異種間での階層的クラスタリング解析を行った。尚、除した結果が ∞ などになったプローブに関しては解析の計算から除外してある。図 3A, 図 3B

(5) 機能別遺伝子発現変化の解析

主に既知の知見に基づき、TCE 曝露によって遺伝子発現変化が見られると予測される遺伝子を個々に、その機能別に検討した。

○定量 PCR 法:

DAN チップで得られた遺伝子シグナルが、正確に遺伝子発現量を反映しているか否かを確認する目的と、遺伝子の発現が低く、DNA チップで十分なシグナルが得られなかった一部の遺伝子に対する遺伝子発現の定量をする目的の為に定量 PCR を行った。DNA チップへのハイブリダイゼーションから得られた結果のうち、mRNA の発現がコントロールと比較して 2 倍以上の変化を示した遺伝子と、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から定量的 PCR を行う遺伝子を選択した。選択した遺伝子は以下の遺伝子である。

マウス: β -actin, Aox (acyl-CoA oxidase)、Ph(peoxisome bifunctional protein)、Catalase, Cyp2e1(Cytochrome P450 2E1), c-myc, Ppar α (Peroxisome proliferator activated receptor α), Cdc25A(Cell division cycle25A) ここで、 β -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。

ラット: β -actin, c-jun, kid1(kidney ischemia and developmentally regulated gene 1), Cyp2e1, UDP(UDP glucuronyltransferase), DPM2(Dolichol phosphate-mannose)

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った。

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。

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 μ l
1.5 mM MgCl ₂	6.0 μ l
dNTP Blend	4.0 μ l
2 ng cDNA	5.0 μ l
AmpliTaq Gold (5U/ μ l)	0.25 μ l
5 μ M Forward Primer	0.5, 3.0, 9.0 μ l
5 μ M Reverse Primer	0.5, 3.0, 9.0 μ l
Deionized Water	
total	50 μ l

反応条件

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

or 62°C 1 分

X35 サイクル

解離相：60℃～95℃

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、平均値をその遺伝子のCt値（増幅曲線において閾値を越えるサイクル数）とした。

DNAチップで得られた遺伝子発現変化と定量PCRで得られた遺伝子発現変化の整合性の評価は、それぞれの遺伝子の遺伝子発現を β -actinで補正した値を用い、Spearmanの順位相関で相関係数を算出して行った。

結果と考察

OTCE代謝産物濃度、総排泄量、生化学的肝機能データ

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が、尿中ではTCEが測定下限以下であった。血液中、24時間尿中のTCEの各代謝物濃度及び総排泄量を（表1～表3）に示す。

マウスでは、TCAの24時間尿中総排泄量の低曝露群4匹の平均値は0.057mol/Kg、高曝露群では0.300mol/Kgであった。また、TCOHの24時間尿中総排泄量の低曝露群4匹の平均値は0.725mol/Kg、高曝露群では1.275mol/Kgであった。

TCOHはUDPglucuronosyltransferaseによりTCOHグルクロン酸抱合体を形成し、尿中に主要代謝物として排泄されるが、一部はCYPによりCH(Chloral hydrate)を経由してTCAとして尿中に排泄される。低曝露群のTCAの尿中排泄量は、高曝露群に比べて5倍少なかったが、主要な尿

中代謝物であるTCOHは、高曝露群が低曝露群のほぼ2倍の排泄量を示し、曝露量を反映した結果であった。

ラットではTCAの24時間尿中総排泄量の低曝露群4匹の平均値は0.006mol/Kg、高曝露群では0.008mol/Kgであった。また、TCOHの24時間尿中総排泄量の低曝露群4匹の平均値は0.427mol/Kg、高曝露群では0.610mol/Kgであった。

TCA、TCOHとも、マウスに比べて代謝産物量は少なかった。このことは、TCEからTCAやTCOHへの代謝kineticには種差があり、ラットはマウスより代謝が低濃度で飽和するという事実に反していない。

○クラスタリング解析

マウス、ラットそれぞれの種における階層的クラスタリング解析では、マウス、ラット共に一部のサンプルを除くとコントロール群、低曝露群、高曝露群の群分けがほぼ可能であった。このことはDNAチップは曝露濃度を反映した遺伝子発現の変化を検出出来ることを意味し、遺伝子発現を全体として捉えるという観点からはDNAチップの有用性が示された。しかし、各曝露濃度群のn=4のうち1つもしくは2つのサンプルは別の曝露濃度群とクラスターを形成するといった分かれ方であり、曝露濃度による明らかな分かれ方ではなかった。この結果は動物の生体影響の個体差の方が曝露濃度による差よりも大きいためであると解釈し得るが、RNA抽出やcDNA合成、DNAチップへのハイブリダイゼーションといった実験手技的誤差の可能性もある。このことは曝露群のn

数が少ないと、誤った解析結果を得る可能性を示唆している。よって出来るだけ多くの n 数で解析することが望まれる。異種間での階層的クラスタリング解析では、マウスとラットは 2 つに大きく分かれた。マウスのプロファイルに相関性がより強かったのはラットの低曝露群であり、ラットの高曝露群は相関性が最も弱かった。

○定量 PCR

方法の項に記した各遺伝子に対して定量 PCR を行い、増幅曲線と解離曲線を得、各遺伝子の mRNA 発現量を半定量した。DNA チップと定量 PCR 法における、コントロール群内の一つの個体を 1 とした時の各遺伝子の相対的变化を図 4A (マウス)、図 4B (ラット) に示す。定量 PCR の結果と DNA チップの結果はそれぞれ、endogenous control gene である β -actin を用いて normalization を行った。またこれらの相対値を用いて、DNA チップと定量 PCR 法の各遺伝子における相関性を検討した。相関係数は Spearman の順位相関を用いて算出した。(表 5 A、表 5 B) マウスにおいて、catalase 遺伝子と Urate oxidase 遺伝子では相関性が悪かったが、その他の遺伝子では相関性は高く、DNA チップで得られた遺伝子発現シグナルは定量 PCR 法で半定量した結果とほぼ一致していたと言える。

○機能別遺伝子発現変化

発癌のイニシエータにはならないが、プロモータ作用を有すると言われているペルオキシゾーム増殖薬による肝癌の発生は、以

下のようなメカニズムによって起ると考えられている。

1) 肝実質細胞における脂質代謝にペルオキシゾーム増殖薬が影響を与え酸化ストレスの原因を作る。2) 細胞周期調節因子に影響を与え、細胞増殖を促進、及びアポトーシスを抑制する。3) 非実質細胞 (クッパー細胞) でのサイトカイン類の産生に影響を与え、肝実質細胞の細胞増殖を促進する。4) これらの反応は PPAR α を介する。5) こうした PPAR α を介した細胞増殖制御機構への変調が、イニシエートした細胞の腫瘍へのプロモーション、プログレッションを促進する。

このような知見から、我々は TCE 曝露によって遺伝子発現プロファイルは以下のような変化を示すであろうと予測した。

- 1) ペルオキシゾームにおける β 酸化及び、ペルオキシゾームの増殖に関与する遺伝子は発現が増加する。
- 2) アポトーシスに関わる遺伝子は発現が低下する。
- 3) 細胞増殖に関わる遺伝子は発現が増加する。
- 4) これらの遺伝子発現変化はラットよりもマウスで顕著に現れる。

このことを検証するために、個々の遺伝子の変化を遺伝子の機能ごとに観察し、考察していく。

○個々の遺伝子発現変化の解析

各曝露濃群でコントロール群と比較して有意差がある遺伝子発現変化を示した遺伝子のリストを表 4A (マウス)、表 4B (ラット) に示す。なお、表中の値は DNA チップ解析方法の (2) で記した各群の代表値

(算術平均)である。機能別にみた各遺伝子の発現変化について以下で述べる。

(1) 細胞増殖関連の遺伝子

● L36435:Kreiser (maf-related) leucine zipper protein /cds=(169,1140) /gb=L36435 /gi=625043

v-maf は protooncogene であり、gene の product は FOS,JUN,MYC と共通の leucine zipper motifeを持つ。マウスにおいては TCE の高曝露でこの遺伝子の発現増加が観察された。

● X62940:Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4 /cds=(186,617) /gb=X62940 /gi=54928

● U79748:MAD homolog 4 (Drosophila) /cds=(320,1975) /gb=U79748 /gi=1724090

● D78382:Mouse DNA for tob family, complete cds /cds=(0,1091) /gb=D78382 /gi=1469158

TGF-beta は細胞の増殖、分化等をコントロールする多様な機能を持つ peptide である。

TGF-beta signaling は tumor suppression と cancer progression に関与する。

SMAD(SMA and MAD(mothers against decapentaplegic)-related protein 1) は mediator として、TGFB signaling を介する細胞増殖や細胞分化に関与する。

TOB1 は細胞の増殖を調節する作用を持つ。また、TOB は SMAD4 と相互作用して、IL2 の転写を阻害する。

マウスでは、TCE 曝露により TGFB1 遺伝子は量反応的な発現の減少、SMAD は量反

応的な発現の増加、TOB1 は高曝露群で 2 倍以上の発現増加が観察された。

SMAD の増加は TGFB signaling を介する細胞増殖が促進されていることが推測される。一方、TGFB signaling は SnoN を介する negative feedback で調整されていることが知られており(Stroschein et al. 1999)、TGFB 遺伝子の発現の減少は negative feedback が掛かった可能性を示唆する。これらの結果は TCE が細胞増殖を誘導するという仮説と矛盾しない結果である。

● AF038995:Mus musculus putative RNA helicase RCK mRNA, partial cds /cds=(0,1359) /gb=AF038995 /gi=2745893

● D50494:D-E-A-D (aspartate-glutamate-alanine-aspartate) box polypeptide 6 /cds=(258,1709) /gb=D50494 /gi=940407

DEAD box proteins は Asp-Glu-Ala-Asp(DEAD)box を有する 54-KD の RNA helicase(p54)、oncogene RCK である。(Akao et al. 1991)

この両方のプローブは TCE 曝露によりマウスで量反応的な発現増加を示した。このことは細胞増殖が促進していることを示唆する。

● AF041054:Mus musculus E1B 19K/Bcl-2-binding protein homolog (Nip3) mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds /cds=(83,646) /gb=AF041054 /gi=2773344
Nip3 は protooncogene である BCL2 と相互作用する。Nip3 遺伝子はマウスにおいて量反応的な遺伝子の発現増加を示した。

● AB015652:Mus musculus gene for DJ-1, complete cds /cds=(0,521) /gb=AB015652 /gi=3256342

● AJ007291 RNO7291 Rattus norvegicus CAP1 gene

DJ-1: この遺伝子は HRAS や MYC と共同して働く oncogene である。

マウスでは高曝露 2 倍以上の発現低下が観察されたが、ラットでは変化はなかった。

● D11445exon#1-4 RATGROS Rat gene for gro; complete cds

GRO1 は Chemokines group に属し、melanoma growth stimulatory activity alfa(MGSA)とも言われている oncogene である。構造的には IL8 と同じ superfamily に属する。

GRO I 遺伝子はラットにおいて、低、高曝露で 1/2 以下に発現が低下した。

この遺伝子発現の変化は、少なくともラットにおいては、マウスで見られたような oncogene の発現増加は観察されていないことをサポートする好例として挙げられる。

一方、遺伝子の発現量が低いために、有意なシグナルとして検出されなかった遺伝子で、定量 PCR 法によりその発現を観察した細胞増殖関連の遺伝子を下記に示す。

● L00039:Myelocytomatosis oncogene /cds=(15,1334) /gb=L00039 /gi=19262

c-myc: protooncogene であるこの遺伝子は、マウスの高曝露群で発現増加が観察された。

● Cell division cycle 25A:cdc25A

CDC25A は細胞分裂を促進する機能を持つことから、oncogene である可能性が高い。CDC25A は G1 から S 期への細胞周期を早める作用を示す phosphatase である。CDC25A が overexpress すると、cell cycle arrest の checkpoint 機能をスキップし、DNA 損傷を強調してしまう。(Maidland et al.2000)

マウスでは高、低曝露群で発現増加が定量 PCR で観察された。これはマウスにおいて細胞分裂が促進、すなわち細胞増殖が進んでいることを示唆する所見である。

● X12761:Jun oncogene /cds=(354,1358) /gb=X12761 /gi=52758

● X17163cds RSJUNAP1 Rat c-jun oncogene mRNA for transcription factor AP-1

c-jun: oncogene であるこの遺伝子は、ラットでは発現変化が見られなかった。

(2) アポトーシス関連の遺伝子

● X01756:Cytochrome c, somatic /cds=(0,317) /gb=X01756 /gi=50618

cytochrome c が消失している細胞では、細胞質内でのアポトーシスのカスケードの最終産物である caspase-3 遺伝子の 1/2 以下の減少が見られた。これに反して、cytochrome c が消失している Embryo cell では、TNF(Tumor necrosis factor)が引き金となって起る細胞死シグナルへの感受性を高める。(Li et al. 2000)

cytochrome C 遺伝子はマウスでは TCE 曝露により、量反応的にその発現が減少した。

このことは、TCE がアポトーシスを抑制していることを示唆する。なお、ラットにおいては低曝露群で遺伝子発現の 1/2 以下の低下が観察されたが、高曝露群では発現の変化は見られなかった。

● D84196: Mouse strain NOD tumor necrosis factor alpha (TNFA) gene /cds=(0,707) /gb=D84196 /gi=1944347

ペルオキシゾーム増殖薬曝露によって、肝臓の Kupffer 細胞から TNF- α が産生され、paracrine signaling を介して S 期を誘導し、アポトーシスを抑制すると言われている。(Rolfe et al. 1997)

この遺伝子はマウスにおいては、発現レベルが DNA チップの検出感度以下であり、遺伝子変化を捉えることは出来なかった。

● U57325: Mus musculus PS-2short mRNA, complete cds /cds=(124,579) /gb=U57325 /gi=2315275

Presenilins2 遺伝子は早発性のアルツハイマー病 early-onset Alzheimer's disease の責任遺伝子の一つであると言われている。この遺伝子は pro-apoptotic action を有しており、この作用は突然変異により増大される。

この遺伝子はマウスでは TCE 曝露により、量反応的にその発現が 1/2 以下に減少した。このことは、TCE がアポトーシスを抑制していることを示唆する。

● X81627: M.musculus 24p3 gene /cds=(53,655) /gb=X81627 /gi=1478201

Lipocalin-2 は好中球 gelatinase である。oncogenic lipocalin 24p3 は Leukocyte に

おいては autocrine pathway でアポトーシスを誘発する。(Devireddy et al 2001)

この遺伝子はマウスでは TCE 曝露により、高曝露群でのみその発現が 1/2 以下に減少した。このことは、TCE がアポトーシスを抑制していることを示唆する。

なお、アポトーシスの感受性は 24p3 cell surface receptor が関与しており、24p3 によるアポトーシスの誘導は leukocyte のみで報告がされている。肝細胞に 24p3 cell surface receptor が存在している可能性がある。

● U88327: Mus musculus suppressor of cytokine signalling-2 (SOCS-2) mRNA, complete cds /cds=(222,818) /gb=U88327 /gi=2245385

SOCS(suppressor of cytokine signaling) proteins は SSI(STAT-induced STAT inhibitor) proteins とも言われている。この proteins は JAK/STAT pathway を介する cytokine receptor signaling を負に調節している。この遺伝子の発現は cytokine により刺激されて増加し、LIF によるアポトーシスへの作用を抑制する。(Minamoto et al. 1997)

この遺伝子はマウスでは TCE 曝露により、高曝露群でのみ発現の 2 倍以上の増加が見られた。このことは、高濃度 TCE 曝露は LIF によるアポトーシスへの作用を抑制していることを示唆する。

興味深いことに、ラットではマウスと逆の反応を示し、低曝露と高曝露で遺伝子の発現が 1/2 以下に低下した。このことより、ラットではアポトーシスは活性される方向に動くことが推測される。なお、

SOCS2^{-/-}mouse は体重の増加等が見られたこと、SOCS 2 protein が activated IGF1R と強く相互作用することより、SOCS2は growth hormone/IGF1 pathway の負の調節作用を有していると言われている。(Metcalf et al. 2000)

●M20658:Interleukin 1 receptor, type I /cds=(224,1954) /gb=M20658 /gi=198300

STAT は transcription factor で、IL-1 receptor を介して Acute phase protein の transcription activity をコントロールしている。IL-1receptor 遺伝子は TCE 曝露により、マウスで量反応的にその発現が増加している。このことは上記の SSI protein の JAK/STAT pathway を介する cytokine receptor signaling の負の調節への何らかの関与を示唆する。

一方、IL-1 beta converting enzyme (ICE) プロテアーゼファミリーはアポトーシスの誘導に必須である。IL-1 の除去のによりアポトーシスは誘導される。

● U92437:Phosphatase and tensin homolog /cds=(948,2159) /gb=U92437 /gi=1916329

tumor suppressor である PTEN は P13-kinase/Akt signaling pathway を負に調節することで、G 1 phase における Cell cycle progression をブロックし、growth activity を抑制する。(Li and Sun 1998)
また、PTEN 遺伝子上流に p53-binding element が存在しており、PTEN は p53 を介するアポトーシスに必要であるとされている。(Stambolic et al. 2001)

この遺伝子はマウスで量反応的な遺伝子発

現の増加が観察された。

●U03279:Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide /cds=(0,3206) /gb=U03279 /gi=414994

PIK3CA は ovarian cancer で oncogene として、細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制する役割を果たす。(Shayesteh et al 1999)

PIK3CA は TCE 高濃度曝露で 2 倍以上の増加を示した。このことは TCE が細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制している可能性を示唆する。

なお、PIK3CA の major product である PIP3 は PTEN により脱リン酸化される。

● M64755 Rattus norvegicus cysteine sulfinic acid decarboxylase mRNA, complete cds /cds=(67,1503) /gb=M64755 /gi=847652

この遺伝子のマウスの homologous gene である deoxyribonuclease II alpha(DNase II) はアポトーシスに関与している。ラットにおいて、この遺伝子は TCE の曝露により量反応的に発現の増加を示した。このことはラットにおいてはアポトーシスが増加したことを示唆する。

● L22472:Bcl2-associated X protein /cds=(0,578) /gb=L22472 /gi=388191

●RRU49729 Rattus rattus rBax alpha mRNA, complete cds

BAX はアポトーシスの accelerator である。この遺伝子はラットでは検出限界以下であったがマウスでは高曝露群で減少する傾向を見せ、アポトーシスの抑制を示唆した。