

こうしたグリア系の細胞と神経上皮細胞との相互作用により、胎児脳傷害の修復・再生が起こるものと推察される。こうした胎児中枢神経組織の再生機構の解明は、再生医療に有用な情報をもたらすものと考えられる。

T-2 toxin による胎児脳傷害（神経上皮細胞のアポトーシス）の発現機構については、今回の検索結果から、T-2 toxin のよりまず活性酸素種が発生し、この活性酸素種による酸化ストレスが原因となり、MAPK シグナル伝達系 (MEKK1, c-jun) を会して神経上皮細胞のアポトーシスが誘導されるものと考えられる。しかし、他のアポトーシス関連経路 (IGF-BP3, caspase-2 etc.) の遺伝子の発現も認められているところから、発現機構の詳細を解明するにはさらなる検討が必要である。

E. 結論

本年度はまず2種類のCYP誘導剤(PCN, PB)投与ラットの母体肝・胎盤・胎児肝における薬物代謝関連遺伝子の発現プロファイルを明らかにし、CYP isozymes については蛋白の発現と組織内分布についても検索した。ついで、5AzC および T-2 toxin によるラット胎児中枢神経毒性（アポトーシス、細胞周期停止）の発現機構を、病変の推移に伴う遺伝子発現プロファイルの変動の面から解析した。

今後は、CYP 誘導剤以外の化学物質についても母体肝・胎盤・胎児肝における薬物代謝関連遺伝子の発現プロファイルを検索し、特に胎盤における薬物代謝の特性を明らかにしたい。また、胎児中枢

神経毒性に関しては、神経組織の再生医療との関連で、傷害の修復機構を主に遺伝子発現プロファイルの解析を通じて明らかにしていきたい。さらに、これまでの2年間で手掛けてきた化学物質を用い、胎盤毒性の発現機構と胎児毒性との関連について検討を行いたい。

E. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

Sehata S., Teranishi M., Yamoto T., Matsunuma N. and Doi K. T-2 toxin-induced toxicity in pregnant rats - Histopathology and gene expression profiles - *Mycotoxins*, 54, in press, 2004.

Yamauchi H., Katayama K., Ueno M., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. Involvement of p53 in 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-induced trophoblastic cell apoptosis and impaired proliferation in rat placenta. *Biol. Reprod.*, 70, in press, 2004.

Sehata S., Kiyosawa N., Sakuma K., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. Gene expression profiles in pregnant rats treated with T-2 toxin. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55, in press, 2004.

Woo G. H., Katayama K., Bak E. J., Ueno M., Yamauchi H., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. Effects of prenatal hydroxyurea-treatment on mouse offsprings. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55, in press, 2004.

Woo G.H., Katayama K., Jung J.Y., Uetsuka K., Bak E.J., Nakayama H. and Doi K. Hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in the mouse fetal tissues. *Histol. Histopathol.*, 18, 387-392, 2003.

Ejiri N., Katayama K. and Doi K. Induction of CYP3A1 by dexamethasone and pregnenolone-16 α -carbonitrile in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 54, 273-280, 2003.

Takai H., Katayama K., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp. Mol. Pathol.*, 75, 89-94, 2003.

Takai H., Katayama K., Yasoshima A., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. NMDA-induced apoptosis in the developing rat brain. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55, 33-37, 2003.

Michishita M., Ikeda T., Nakashiba T., Ogawa M., Tashiro K., Honjo T., Doi K., Itohara S. and Endo S. A novel gene,

Btcl1 containing CUB and LDLA domains is expressed in restricted areas of mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 306, 680-686, 2003.

Yamauchi H., Katayama K., Yasoshima A., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. 1- β -Darabinofuranosylcytosine (Ara-C)-induced apoptosis in the rat fetal tissues and placenta. *J. Toxicol. Pathol.*, 16, 223-230, 2003.

Ito K., Kajikawa S., Nii A., Hanada T. and Doi K. Antioxidants suppress nitrofurazone-induced proliferation of hepatocytes. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55, 247-250, 2003.

Okada T., Uetsuka K., Yamauchi H., Tani Y., Endo K., Nakayama H. and Doi K. Effects of exogenous growth hormone (GH)-treatment on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury in GH-deficient Mini rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 16, 49-57, 2003.

Suzuki K., Kanabayashi T., Nakayama H. and Doi K. Kinetics of chemokines and their receptors in mercuric chloride-induced tubulo-interstitial lesions in Brown Norway rats. *Exp. Mol. Pathol.*, 75, 58-67, 2003.

(1) 学会発表

山内啓史・片山圭一・八十島 昭・上塚浩司・中山裕之・土井邦雄 : Ara-C の胎

児・胎盤毒性に関する形態学的研究：第135回日本獣医学会、平成15年3月、東京

片山圭一・土井邦雄：化学物質による胎児中枢神経毒性の発現メカニズム：第30回日本トキシコロジー学会教育講演、平成15年7月20日、神奈川

白井真人・上塚浩司・山内啓史・中山裕之・土井邦雄：db/db マウスにおける肝再生障害のメカニズム—アレイ解析からのアプローチ—：第136回日本獣医学会、平成15年10月、青森

Sehata S., Teranishi M., Yamoto T., Matsunuma N. and Doi K. T-2 toxin-induced toxicity in pregnant rats—Histology and gene expression profile— International Symposium of Mycotoxicology, Nov.3-5, 2003, Kagawa

Ueno M., Katayama K., Nakayama H. and Doi K. Analysis of cell cycle, migration and apoptosis of neuronal stem cells in the 5-azacytidine (5AzC)-treated rat fetal brain. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

Woo G.H., Bak E.J., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. Hydroxyurea (HU)-induced apoptosis and changes in

apoptosis-related genes expression in the mouse fetal lung. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. Porcine-serum-induced hepatic fibrosis in Brown Norway rats. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

Takai H., Ito T., Tatsuyama K., Suzuki M., Katayama K. and Doi K. Neuronal cell death in the fetal rat spinal cord following NMDA-treatment to dams. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

Sehata S., Kiyosawa N., Makino T., Atsumi F., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Manabe S., Uetsuka K., Nakayama H. and Doi K. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I. 特許出願
なし

妊娠ラットにおける薬物代謝酵素誘導剤投与 による遺伝子発現の変化

動物 : F344妊娠ラット (n=3)

投与条件:

1. Pregnenolone-16-alpha-carbonitrile (PCN: 50mg/kg, vehicle: Corn Oil)

2. Phenobarbital (PB: 80mg/kg, vehicle; Saline)

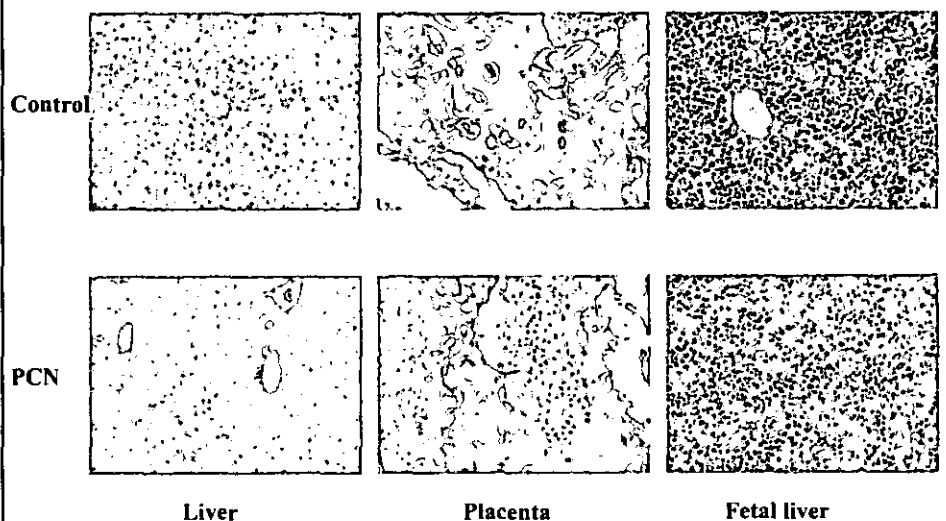
妊娠13日目より4日間 i.p. 投与

→ 妊娠17日目に剖検、母体肝臓、胎盤、胎児肝臓を採材

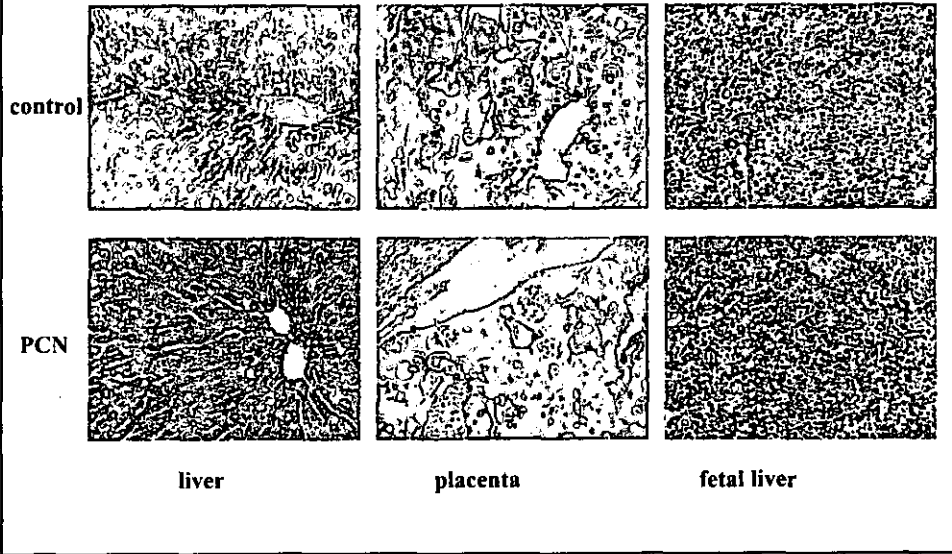
チップ解析: Affymetrix Rat Expression Array 230A

(第I相・第II相の薬物代謝酵素に着目)

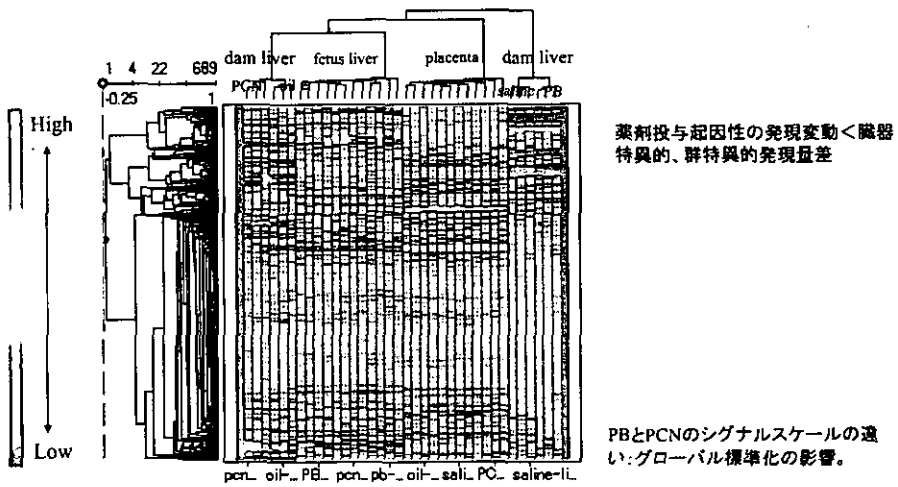
Histology of the mother's liver, placenta and fetal livers



Immunohistochemistry for CYP3A1 in the mother's liver, placenta and fetal liver



クラスター解析の結果



689プローブ: $p < 0.05$ (t-test)かつ $\text{Fold change} \geq 1.5$ を満たすプローブの全集合

PCN投与群における第 I 相薬物代謝酵素 (CYP) の変動

PCN 投与群

		Genes	Fold change
induced			
母体肝臓		cytochrome P450, 3a18(Cyp3a18), mRNA	16.276
	3A	cytochrome P-450PCN(PNCN inducible)(Cyp3A1), mRNA	2.019
		cytochrome P450 3A9 (CYP3A9), mRNA	1.21
	2B	cytochrome P-450e (phenobarbital-inducible) gene, 3' end	5.608
		cytochrome P450IIB3	1.075
	2A	Cytochrome P450 IIA1	1.676
		Cytochrome P450 IIA1	1.573
	2F	cytochrome P450, subfamily 2F, polypeptide 1	1.453
	2C	p450Md mRNA for cytochrome p-450	1.332
4F	cytochrome P450 4F4 (CYP4F4), mRNA	1.352	
胎児肝臓	3A	pregnenolone 16-alpha-carbonitrile-inducible CYP	21.486
		cytochrome P-450PCN(PNCN inducible) (Cyp3A1)	21.361
	2C	p450Md mRNA for cytochrome p-450	3.893
	2A	Cytochrome P450IIA1	1.433
suppressed			
母体肝臓	4A	cytochrome P450, 4A1(Cyp4a1), mRNA	0.504
	1A	cytochrome P-450 ISF/BNF-G mRNA	0.308

胎盤では有意差のついたものはない。

PB投与群における第 I 相薬物代謝酵素 (CYP) の変動

PB 投与群

		Genes	Fold change
induced			
母体肝臓	2B	cytochrome P-450e (phenobarbital-inducible) gene, 3' end	12.975
	3A	Cytochrome P-450PCN (PNCN inducible)(Cyp3A1)	2.006
	2F	cytochrome P450, subfamily 2F, polypeptide 1	1.403
	2A	Cytochrome P450 IIA1	1.347
		Cytochrome P450 IIA1	1.344
	2D	Cytochrome P450, subfamily IID2	1.235
	2C	cytochrome P450 PB1(PB1-2 allele)	1.086
胎盤	3A	cytochrome P-450PCN (PNCN inducible)(Cyp3A1)	24.784
胎児肝臓	2B	cytochrome P-450e (phenobarbital-inducible) gene, 3' end	6.703
	3A	cytochrome P-450PCN (PNCN inducible)(Cyp3A1)	1.664
	2A	Cytochrome P450 IIA1	1.146
suppressed			
母体肝臓	2E	cytochrome P450, subfamily 2E, polypeptide 1	0.802
	1A	cytochrome P-450 ISF/BNF-G mRNA	0.651
胎児肝臓	4A	similar to Cytochrome P450 4A3	0.542

PCN投与群における第II相薬物代謝酵素
(GST & UDPGT) の変動

PCN投与群

		Genes	Fold change
induced			
母体肝臓	μ	glutathione S-transferase, mu 1 (Gstm1), mRNA	8.416
		Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2) (Gstm2), mRNA	4.482
	α	glutathione S-transferase Yc2 subunit [rats, fetal liver, mRNA, 1129 nt]	6.472
		glutathione S-transferase mRNA, complete cds	3.152
		Rattus norvegicus similar to GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 8 (GST 8-8) (CHAIN 8) (GST CLASS-ALPHA) (LOC300850), mRNA	1.965
		glutathione S-transferase Yc1 subunit [rats, fetal liver, mRNA, 1052 nt]	1.286
	UDPGT-1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (Ugt1a1), mRNA	3.958
		UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (Ugt1a1), mRNA	4.637
	UDPGT-2	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide A1 (Ugt2a1), mRNA	2.472
		UDP-glucuronosyltransferase, phenobarbital-inducible form (UDP-GTR-2), mRNA	3.231
UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B12) mRNA, complete cds		1.806	
?	Rattus norvegicus similar to Microsomal glutathione S-transferase 2 (Microsomal GST-2) (Microsomal GST-1) (LOC295037), mRNA	1.943	
胎児肝臓	α	glutathione S-transferase mRNA, complete cds	4.791
		Rattus norvegicus similar to GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 8 (GST 8-8) (CHAIN 8) (GST CLASS-ALPHA) (LOC300850), mRNA	1.293
	π	glutathione S-transferase, pi 1 (Gstp1), mRNA	1.469
	UDPGT-2	UDP-glucuronosyltransferase, phenobarbital-inducible form (UDP-GTR-2), mRNA	2.353
		UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B12) mRNA, complete cds	1.842
UDPGT-1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (Ugt1a1), mRNA	1.437	
suppressed			
母体肝臓	?	Rattus norvegicus similar to microsomal glutathione S-transferase 3 [Mus musculus] (LOC289197), mRNA	0.277

胎盤では有意差のついたものはない

PB投与群における第II相薬物代謝酵素 (GST & UDPGT) の変動

PB投与群

		Genes	Fold change
induced			
母体肝臓	μ	glutathione S-transferase, mu 1 (Gstm1), mRNA	5.769
		Glutathione-S-transferase, mu type 2 (Yb2) (Gstm2), mRNA	2.124
	α	glutathione S-transferase Yc2 subunit [rats, fetal liver, mRNA, 1129 nt]	4.493
		glutathione S-transferase mRNA, complete cds	2.712
		Rattus norvegicus similar to GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 8 (GST 8-8) (CHAIN 8) (GST CLASS-ALPHA) (LOC300850), mRNA	1.516
		glutathione S-transferase Yc1 subunit [rats, fetal liver, mRNA, 1052 nt]	1.214
	θ	Glutathione S-transferase 1 (theta) (Gst1), mRNA	1.708
	?	Rattus norvegicus similar to Microsomal glutathione S-transferase 2 (Microsomal GST-2) (Microsomal GST-1) (LOC295037), mRNA	1.686
	UDPGT-2	UDP-glucuronosyltransferase, phenobarbital-inducible form (UDP-GTR-2), mRNA	3.047
		UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B12) mRNA, complete cds	1.594
Rattus norvegicus UDP-glucuronosyltransferase (LOC295039), mRNA		1.575	
UDPGT-1	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (Ugt1a1), mRNA	1.654	
	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (Ugt1a1), mRNA	1.704	
胎児肝臓	μ	Rattus norvegicus glutathione S-transferase, mu 5 (Gstm5), mRNA	1.239
	UDPGT-2	UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B12) mRNA, complete cds	1.358

胎盤では有意差のついたものはない
有意にsuppressedのものはない

5-Azacytidine (5AzC) 暴露ラット胎仔脳での 毒性発現および修復過程における遺伝子発現の解析

5-Azacytidine (5AzC): cytidine のアナログ、脱メチル化・DNA傷害作用

投与条件 : 妊娠13日齢 Jcl:Wistar rat (n=2), 10 mg/kg i.p.

チップ解析 : Gene Chip (Rat Expression Array 230A, AFFYMETRIX)

↓ : 5AzC (10 mg/kg) i.p.

脳組織の傷害期 (胎齢13~14日)

1. アポトーシスの発現機構
2. 細胞周期とその制御機構の動態

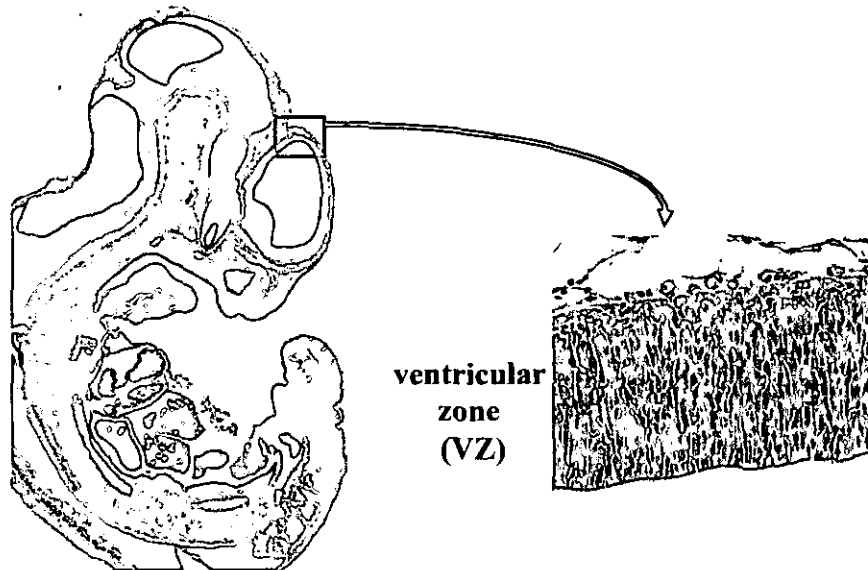
脳組織の再生・修復期 (胎齢14~16日)

1. 修復・再生過程における分子機構
2. 胎仔中枢神経系の発生・分化とメチル化

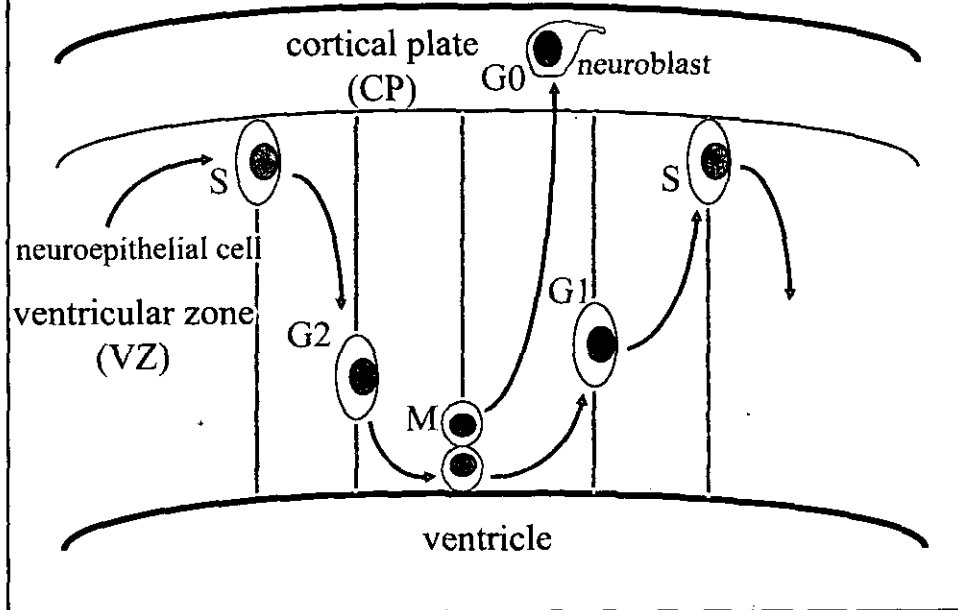
出生後の神経障害期 (生後0日~)

1. 出生仔における神経障害

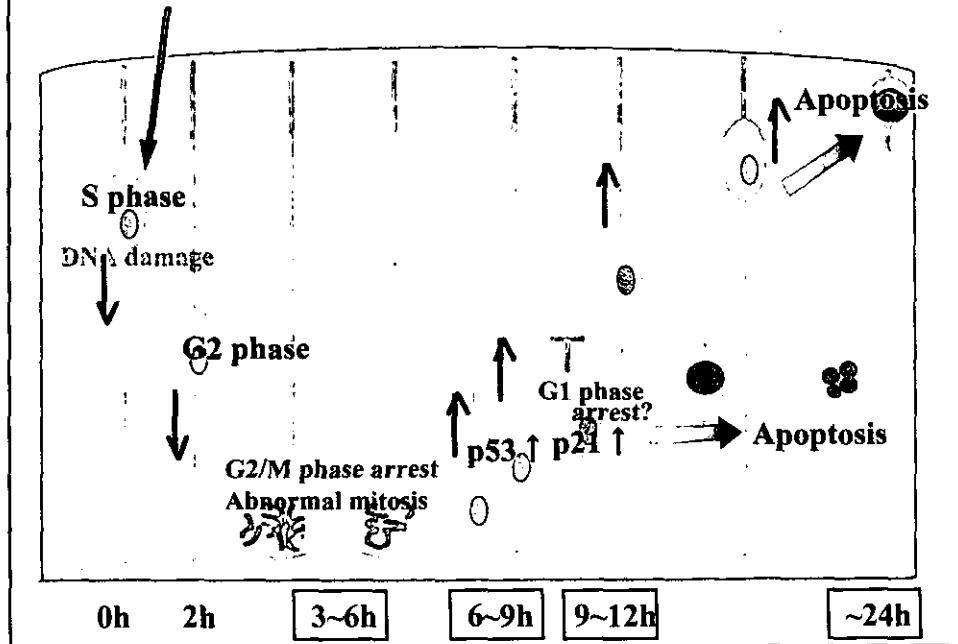
正常ラット胎仔中枢神経系(胎齢13~14日)



正常胎仔中枢神経系における神経上皮細胞の動態



5AzC 5AzCによる胎仔中枢神経系毒性発現のメカニズム



投与6時間後における
遺伝子発現

G2/M phase arrest
Abnormal mitosis



H.E. stain



p53

Up-regulated

asparagine synthetase
tumor-associated protein 1 (TA1)
solute carrier family 3, member 2 (Slc3a2)
activating transcription factor ATF-4 (Atf4)
Solute carrier family 7 member A1 (Slc7a1)

Function

amino acid metabolism
amino acid metabolism
amino acid metabolism
amino acid metabolism
amino acid metabolism

Log ratio

0.67
0.6
0.42
0.35
0.34

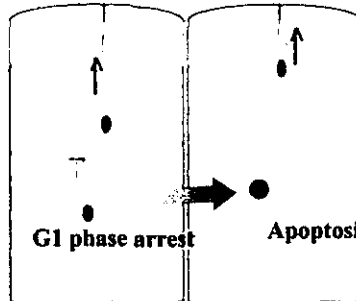
Down-regulated

Myosin heavy chain 11
Map1b /microtubule-associated protein 5 (MAP5)
Tcp1, T-complex 1/chaperonin-containing t-complex polypeptide 1 (cct)
clathrin, heavy polypeptide (Hc)
lamin B1
adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit /Rat beta adaptin

cytoskeleton
cytoskeleton
chaperone
endocytosis
nuclear lamina
endocytosis/mitotic checkpoint

-0.24
-0.22
-0.2
-0.2
-0.18
-0.11

投与12時間後における
遺伝子発現



TUNEL

Up-regulated

cyclin B
p55CDC
cyclin G1
Insulin-like growth factor-binding protein 3

Function

cell cycle
cell cycle
cell cycle / p53 target gene
apoptosis / p53 target gene

Log ratio

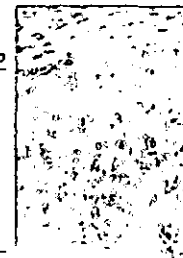
0.48
0.61
1.69
0.89

Down-regulated

B-cell translocation gene 1 (Btg1)
DNA polymerase delta, catalytic subunit
(p125)

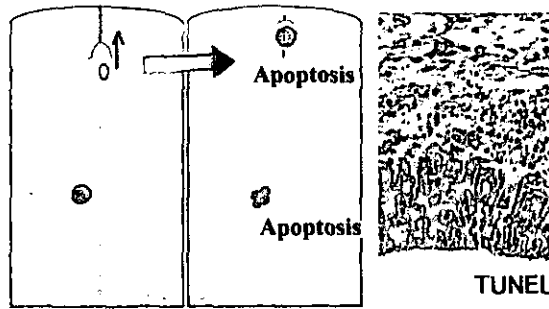
cell cycle / anti-proliferation
DNA replication

-0.44
-0.6



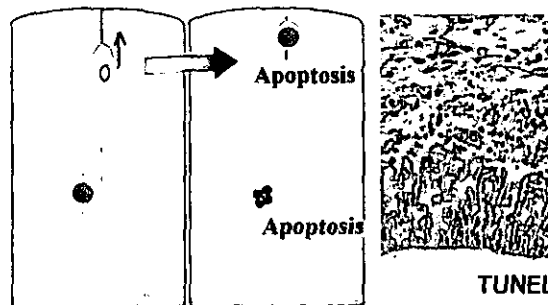
p21

投与24時間後における
遺伝子発現



<i>Up-regulated</i>	<i>Function</i>	<i>Log ratio</i>
cyclin D1	cell cycle	0.59
cyclin G1	cell cycle / p53 target gene	1.68
Insulin-like growth factor-binding protein (IGF-BP3)	apoptosis / p53 target gene	1.19
fibroblast growth factor 15 (Fgf15)	growth factor / brain development	0.89
allograft inflammatory factor 1 (Aif1)/Iba-1	activation of macrophage / inflammation	0.86
platelet factor 4 (PF4) gene/CXCL4	immunity / angiogenesis	0.77
macrophage migration inhibitory factor (Mif)	cytokine / immunity	0.45
delta-like homolog (Dlk1)	differentiation / brain development	0.68
procollagen, type 1	extra cellular matrix	0.33
brain glucose-transporter protein	glucose transporter / HIF-1 target gene	0.36
Lactate dehydrogenase A	glycolysis / HIF-1 target gene	0.48
prolyl 4-hydroxylase alpha subunit	collagen production / HIF-1 target gene	0.59
hypoxia induced gene 1 (Hig1)	upregulated in hypoxia / HIF-1 target gene?	0.4

投与24時間後における
遺伝子発現



<i>Down-regulated</i>	<i>Function</i>	<i>Log ratio</i>
neural receptor protein-tyrosine kinase (trkB)	neurotrophins receptor / brain development	-0.64
hairy and enhancer of split 5 (Hes5)	differentiation / brain development	-0.62
Olf-1EBF associated Zn finger protein Roaz	differentiation / brain development	-0.46
Distal-less homeobox (Dlx5)	differentiation / brain development	-0.44
Forkhead-like transcription factor BF-1 (Fkhr)	differentiation / brain development	-0.42
Proliferating cell nuclear antigen (Pcna)	DNA replication/ proliferation	-0.41
B-cell translocation gene 2 (BTG2)	cell cycle / p53 target gene?	-0.36
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (Ddah1)	NO production / angiogenesis	-0.36
Vascular cell adhesion molecule 1 (Vcam1)	adhesion molecule / inflammation	-0.83

細胞周期関連因子の発現の時間的推移

Gene	6h	9h	12h	24h
cyclin B	0.23	0.2	0.5 ↑↑	0.05
cyclin D1	-0.1	-0.5	0.05	0.6 ↑↑
cyclin E1(highly similar to)	0	-0.1	-0.3 ↓	-0.1
cyclin G1	0.83 ↑↑	1.56 ↑↑	1.69 ↑↑	1.68 ↑↑
cyclin-dependent kinase 4	-0.03	-0.05	-0.2	-0.15
p55 cdc	0.2	0.3	0.6 ↑↑	-0.2
p21 / WAF1	2.17 ↑	2.65 ↑↑	0.75 ↑	2.35 ↑
p27 / Kip1	0.03	0.5 ↑	-0.25	-0.1
p16 / Ink4a	0.03	1.4	0.05	-1.45
p18	0.13	0.1	0.05	-0.15
PCNA	-0.03	-0.1	-0.35 ↓	-0.4 ↓↓
BTG-1	0.1	-0.15	-0.45 ↓↓	-0.25
BTG-2	-0.03	0.1	-0.25	-0.35 ↓↓

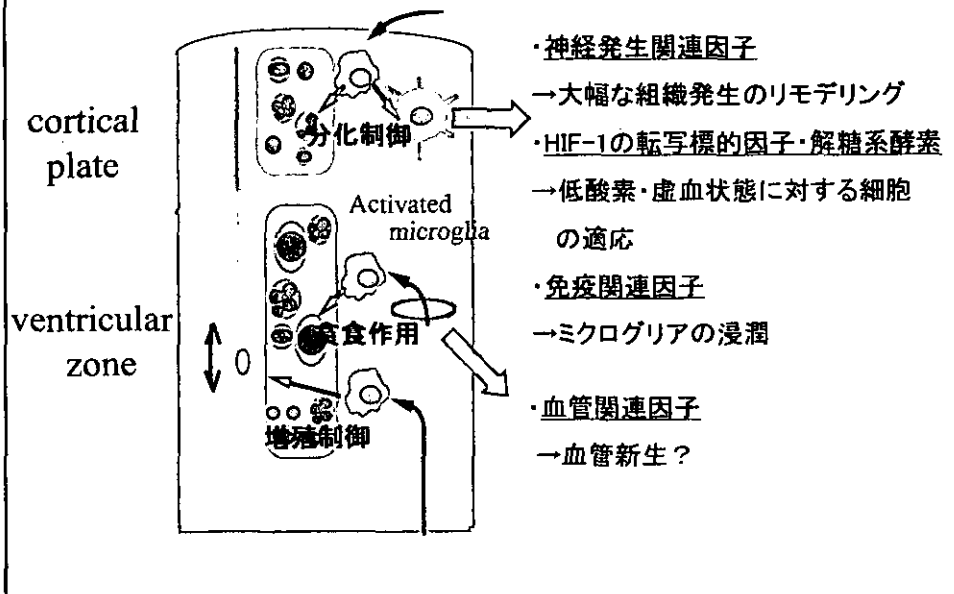
発現の増加した遺伝子のカテゴリー分け および その時間的推移

	6h	12h	24h		6h	12h	24h
細胞周期関連因子	2	6	3	解糖系因子	0	0	6
p53の転写標的因子	1	3	2	脂肪酸生成関連蛋白	0	2	1
増殖関連因子	3	5	5	アミノ酸関連因子	5	1	1
アポトーシス	0	2	2	防御機構	0	0	1
growth factor	0	4	4	血管関連蛋白	0	0	4
分化制御因子	1	2	5	MAPK signaling/シグナル伝達	0	0	3
翻訳/蛋白合成経路	0	0	1	機能不明	0	1	3
神経発生関連蛋白	0	2	9	抗酸化作用	2	2	2
接着因子	0	0	4	免疫系因子	1	3	9
extra cellular matrix (ECM)	0	2	5	細胞骨格	1	0	1
転写因子	1	0	0	methylationが関与	0	1	3
HIFの転写標的因子	1	3	5	total	21	69	116
HIFの転写標的因子に相同	0	0	6	identified	9	27	52
低酸素時に発現、HIF非依存性	0	2	2	EST	6	24	38
				EST, similar to	5	18	25
				unknown	1	0	1

発現の減少した遺伝子のカテゴリー分け および その時間的推移

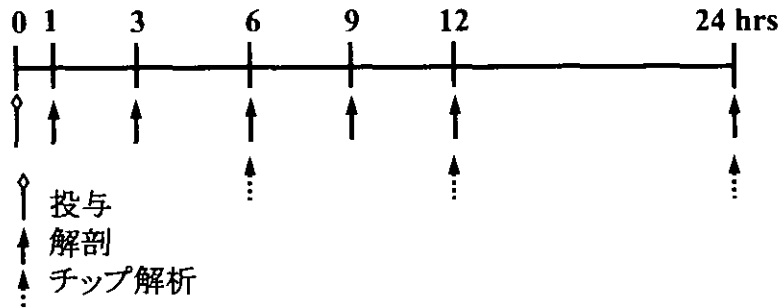
	6h	12h	24h		6h	12h	24h
細胞周期、アポトーシス、増殖関連因子	8	7	9	免疫系因子	0	1	2
mitosis関連蛋白	6	0	0	血管関連蛋白	0	2	2
神経発生関連蛋白	10	6	16	炎症作用	3	3	3
翻訳/蛋白合成経路	0	1	2	機能不明	1	2	1
シャペロン	3	0	0	防御機構	3	3	1
小胞体局在蛋白	5	4	0	抗酸化作用	0	0	2
エンドサイトーシス	2	0	0	シグナル伝達系	1	0	6
エクソサイトーシス	1	0	0				
コレステロール産生酵素	8	5	0	total	57	47	78
脂肪産生酵素	2	3	1	identified	29	27	29
細胞呼吸系		2	0	EST	17	15	34
解糖系酵素	1	1	1	EST, similar to	11	5	12
アミノ酸関連因子	0	1	1	unknown	0	0	3
ATP生成	2	2	2				
Ca ²⁺ 代謝関連蛋白	2	1	0				
細胞構築蛋白	4	0	0				

5AzC傷害後の胎仔脳の再生～修復期



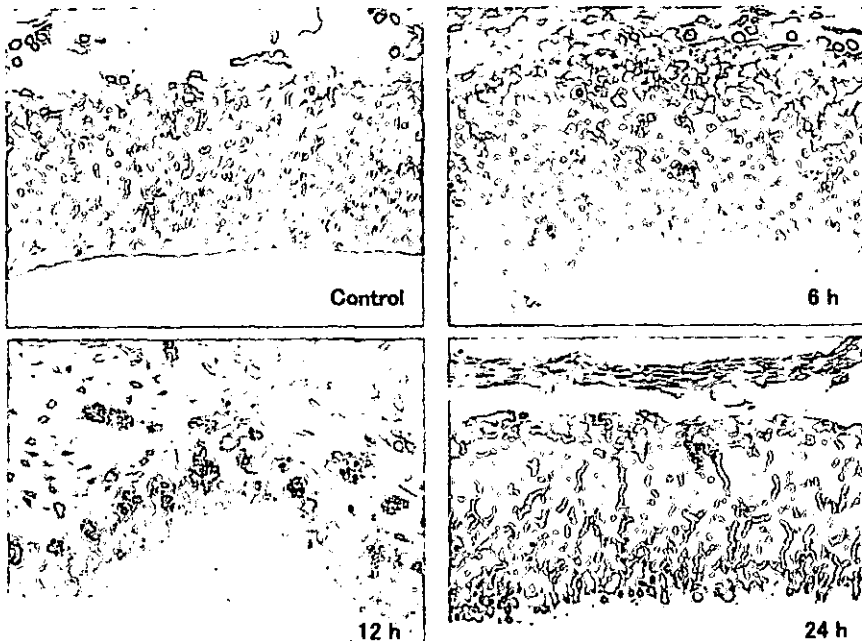
T-2トキシシン投与による胎仔脳における形態学的検索 および遺伝子発現解析

動物：Slc:Wistar rat (Day 13 of gestation, GD13)
 用量：0 (Corn oil), 2 mg/kg, single p.o.
 動物数：3 rats/group

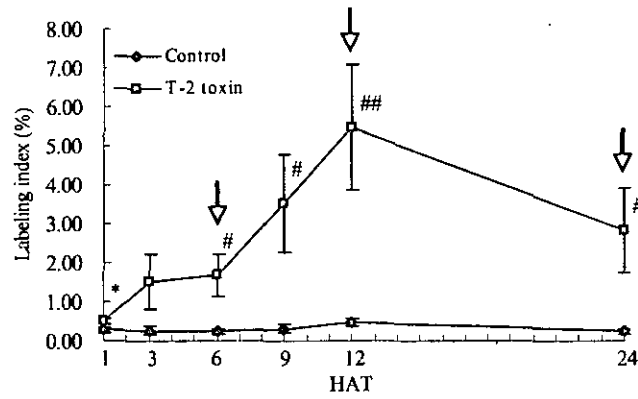


チップ解析: Chip;Affymetrix Rat Genome U34A

TUNEL 染色

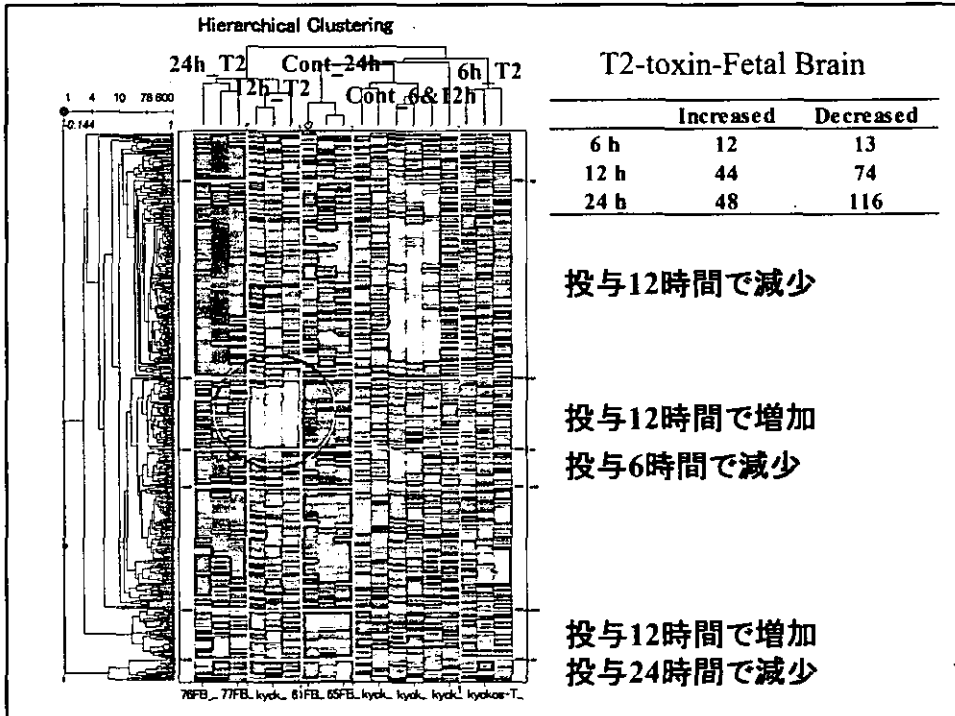


TUNEL Labeling Index in Telencephalon



↓ チップ解析ポイント

*p<0.05 (Student's t-test)
#p<0.05, ##p<0.01 (Welch's t-test)



<結果>

投与6時間後

Gene	Function	GenBank#	Fold change
<i>Up-regulated</i>			
RNA helicase	RNA processing	U25746	1.75
GTPase Rab8b	Signal transduction	U53475	1.63
RAC protein kinase gamma	Signal transduction	D49836	1.61
cDNA clone rx028263 (CED-6 Protein homolog)	Signal transduction	AI639037	1.51
<i>Down-regulated</i>			
liver stearyl-CoA desaturase	Metabolism	J02585	-1.73
lysyl oxidase	Metabolism	S66184	-1.55

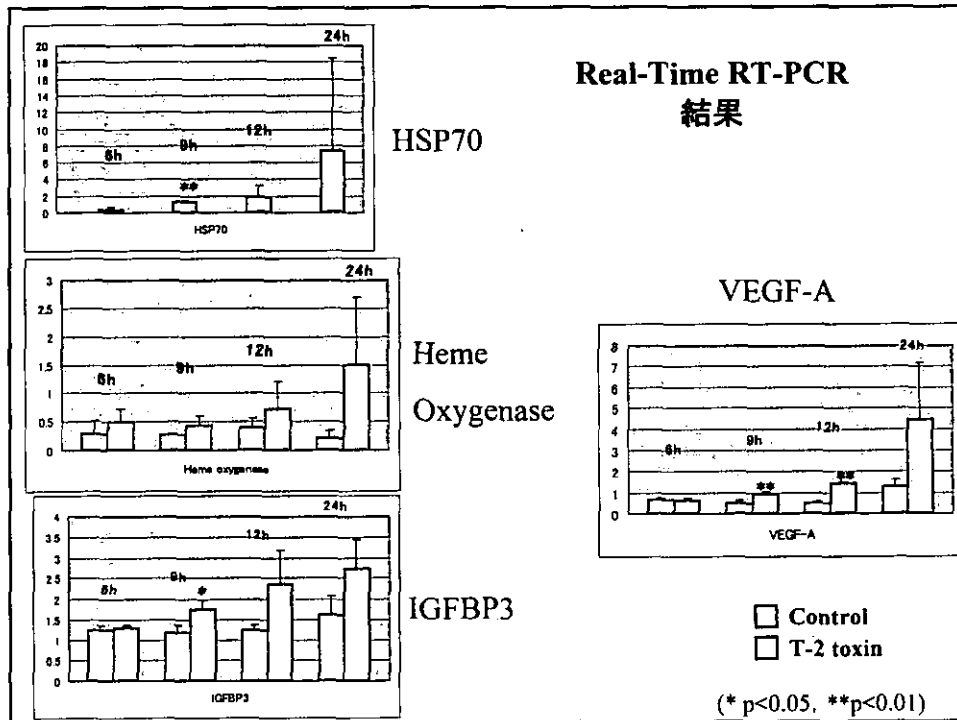
<結果> 投与12時間後

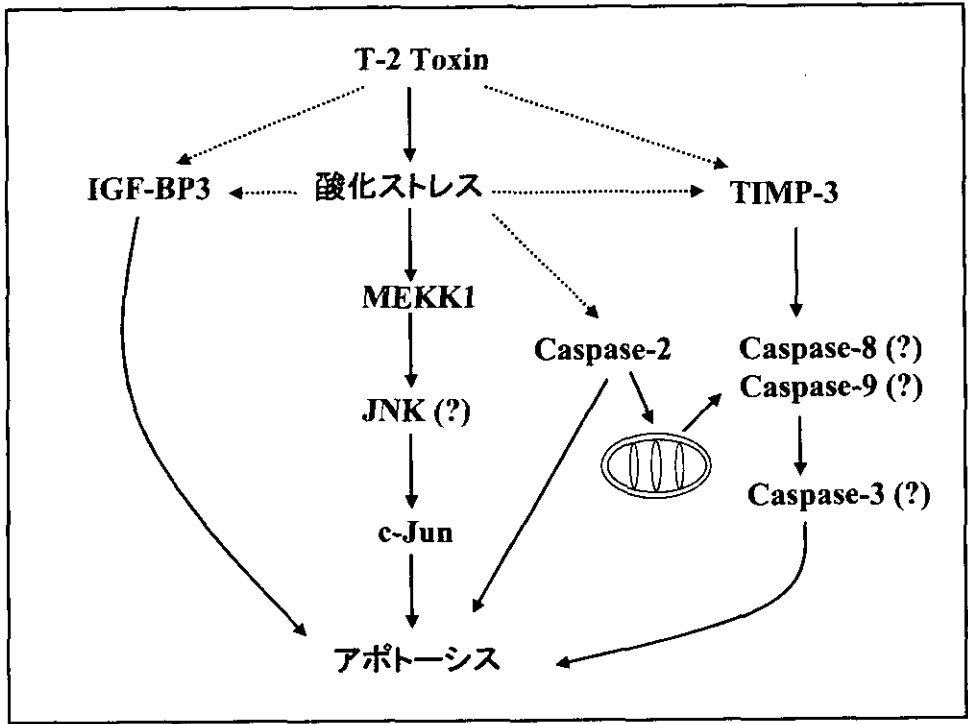
Gene	Function	GenBank#
<i>Up-regulated</i>		
heat shock protein 70	Stress	Z27118
EST220041 (metallothionein-2 and metallothionein-1 genes)	Stress	AI176456
heme oxygenase gene	Stress	J02722
EST203856 (insulin-like growth factor binding protein 3)	Cell growth	AI009405
EST193502 (vascular endothelial growth factor A)	Cell growth	AA850734
EST194815 (c-Ha-ras proto-oncogene mechanism sequence)	Cell growth	AA852046
tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP-3)	Signal transduction	U27201
MAP kinase kinase kinase 1 (MEKK1)	Signal transduction	U48596
type II hexokinase gene	Metabolism	D26393
<i>Down-regulated</i>		
PMF16	Transcription	AB006880
EST218488 (TGFB inducible early growth response)	Immediate early gene	AI172476
EST196362 (ciliary neurotrophic factor)	Cell growth	AA892559
EST226942 (selenoprotein P)	Stress	AI230247
EST195497 (thioredoxin-like 32kD)	Stress	AA891694
Janus protein tyrosine kinase 2 (JAK2)	Signal transduction	AJ000557
phosphatidylinositol 3-kinase p85 beta subunit	Signal transduction	D64046
5-aminolevulinic acid synthase	Metabolism	J03190
S-adenosylmethionine synthetase	Metabolism	J05571
liver stearyl-CoA desaturase	Metabolism	J02585
farnesyl diphosphate synthase	Metabolism	M89945

<結果>

投与24時間後

Gene	Function	GenBank#	Fold change
<i>Up-regulated</i>			
adrenomedullin precursor	Cell growth	D15069	7.07
vascular endothelial growth factor form 3	Cell growth	L20913	2.05
EST219534 (RJK-9 gene for c-jun)	Transcription	A1175959	1.84
MAP kinase kinase kinase 1 (MEKK1)	Signal transduction	U48596	1.69
caspase 2 (Ich1)	Signal transduction	AF025671	1.62
GTPase Rab6b (Rab6b)	Signal transduction	U53475	1.56
copper-zinc containing superoxide dismutase	Stress	M21060	1.50
hexokinase II	Metabolism	S56464	1.86
glycogen synthase kinase 3 beta	Metabolism	X53428	1.84
<i>Down-regulated</i>			
mitochondrial NADH-dehydrogenase (ND1)	Metabolism	M35826	-5.06
mitochondrial cytochrome oxidase subunits I,II,III genes	Metabolism	J01435	-3.48
S-adenosylmethionine synthetase	Metabolism	J05571	-3.00
lysyl oxidase	Metabolism	S66184	-1.92
fructose 6-phosphate,2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase	Metabolism	S67900	-1.69
glutathione S-transferase Yrs-Yrs	Metabolism	D10026	-1.62
liver stearyl-CoA desaturase	Metabolism	J02585	-1.59
hepatic squalene synthetase	Metabolism	M95591	-1.54
apolipoprotein E (rApoE)	Metabolism	S76779	-1.53
cytosolic retinol-binding protein (CRBP)	Metabolism	M19257	-1.54
fatty acid synthase	Metabolism	M76767	-1.52
GAS-7 protein	Cell growth	AJ131902	-1.64
cDNA (TGFB inducible early growth response)	Immediate early gene	A071299	-2.14
EST190205 (ribosomal protein L4)	Translation	AA800708	-2.00
pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit	Translation	AF096835	-1.59
interferon gamma receptor	Signal transduction	U68272	-1.94
EST229913 (guanylate cyclase 1, soluble, beta 3)	Signal transduction	AZ33225	-1.82
EST225364 (GABA transporter protein)	Signal transduction	A1228669	-1.70
interleukin-1beta-converting enzyme-related protease	Signal transduction	U84410	-1.51
ras-related mRNA rah3	Signal transduction	X06889	-1.51
RAC protein kinase beta	Signal transduction	D30041	-1.52





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

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、平成15年度は、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機能解析を中心とした研究を平成14年度に引き続き行った。本年度の研究により、硫酸抱合体を輸送する有機アニオントランスポーターOAT7及び腎、胎盤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輸送系Lアミノ酸トランスポーターLAT4の2種の新規トランスポーターが同定された。また、本研究により、腫瘍細胞特異必須アミノ酸トランスポーターLAT1の抑制に抗腫瘍効果があることが示され、LAT1の抑制は既存の抗腫瘍薬とは異なる機序で増殖抑制作用を示すことが、DNAマイクロアレイ解析により明かとなった。

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。平成15年度は、平成14年度に引き続き、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機能と発現

の解析、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。

- 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及び EST (expressed sequence tag) 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。

- 新規トランスポーターの機能及び発現の解析

プラスミドベクター pSPORT1 に挿入されている cDNA を発現プラスミドベクター pcDNA 3.1 にサブクローニングし、挿入部の 3'-末端外側を制限酵素で切断して、直線化した。これから、T7 RNA ポリメラーゼを用いて、Cap analogue の存在下で in vitro 転写を行い、Cap 化された cRNA を合成した。エタノール沈澱にて精製後、マイクロピペットを用いてアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入 (50 nl/oocyte) することにより、発現させた。

2~3日間培養の後、放射能標識基質を培地中に添加し、卵母細胞への取り込みを測定することにより、機能活性を評価した。放射能標識基質の卵母細胞内への取り込みは、卵母細胞を界面活性剤で溶解後、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

トランスポーターの組織発現は、得られた cDNA を ^{32}P -dCTP でラベルし、ノーザンブロットを行うことにより評価した。また、予想されるペプチド配列に対するペプチド抗体を作製し、ウェスタンブロット、及び免疫組織化学的検討を行った。