

期間欠投与法」での発がん性を反映していると考えられる。

(2) 種々のHCAの「短期投与法」により発現変動する遺伝子群の網羅的解析

大腸発がん物質に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を観察するために、種々のHCAを「短期投与法」で投与し、投与開始後、3及び6週での大腸粘膜での遺伝子発現を網羅的に解析した。

①HCA投与群及び対照群の遺伝子発現のクラスター解析による全般的（ゲノムワイド）な遺伝子発現の変動、および②大腸発がん物質に特異的に発現変動する遺伝子について検討した。

① 投与開始後3週では、IQ、MeIQ、Glu-P-1、MeIQx、Trp-P-2投与群は、対照群と比較して、発現量が抑えられた遺伝子が多かった。これら5種のHCAはいずれも肝発がん性を示す物質であり、その肝毒性のために大腸粘膜での遺伝子発現が低下した可能性がある。投与開始後6週では、IQ投与群において、対照群と比較して全体に遺伝子発現が低い傾向が認められた。有意に1/2以下に発現が低下している遺伝子は、IQ投与開始後3及び6週で各々約500個あり、約3/4が共通していた。MeIQ、Glu-P-1、MeIQx、Trp-P-2投与群では、3週時に認められた顕著な遺伝子発現の低下は6週では認められなかった。PhIP投与群の遺伝子発現のパターンは、投与開始後3及び6週のいずれにおいても、他の5種のHCA投与群よりも対照群に類似したもので

あった。

② 大腸発がん物質に特異的に発現変動している遺伝子の探索を行った。今回、IQは解析から除外した。対照群と比較して有意に2倍以上遺伝子発現が変動している遺伝子について検討した。大腸発がん物質として、PhIP、MeIQ、Glu-P-1投与群の結果を検討したが、3種の化合物に共通して発現変動している遺伝子はなかった。PhIP投与群の遺伝子発現プロファイルは、MeIQ及びGlu-P-1投与群よりは対照群と類似していた。大腸発がん物質としては、MeIQ及びGlu-P-1投与群の結果を用いることにし、非大腸発がん物質としては、MeIQx及びTrp-P-2投与群の結果を用いた。対照群と比較して、有意に2倍以上発現が増加した遺伝子は、MeIQ、Glu-P-1、MeIQx、Trp-P-2投与群で各々33、78、111、106個であった。大腸発がん物質であるMeIQ及びGlu-P-1で共通だったのは22個、非大腸発がん物質であるMeIQx及びTrp-P-2で共通だったのは76個であった。大腸発がん物質投与群に特異的な遺伝子は1個(P450 oxidoreductase)のみであった。有意にかつ2倍以上発現が低下した遺伝子は、MeIQ、Glu-P-1、MeIQx、Trp-P-2で各々87、104、155、136個であった。大腸発がん物質であるMeIQ、Glu-P-1で共通だったのは42個、非大腸発がん物質であるMeIQx、Trp-P-2で共通だったのは87個であった。大腸発がん物質の投与群に特異的な遺伝子は10個で

あり、代謝関連遺伝子や転写因子、細胞増殖や炎症反応に関与している遺伝子であった。

(3) K-ras 遺伝子の変異を導入した培養細胞の IL-1 β 及び LPS 刺激による iNOS の発現の解析

ラット小腸上皮細胞由来 IEC-6 細胞では、IL-1 β や LPS 刺激をしても iNOS の発現はほとんど認められない。この細胞に、K-ras 遺伝子のコドン 12 番の変異体 (K-ras^{Asp12}) を導入し、IL-1 β や LPS 刺激時の iNOS の発現をイムノプロットにより調べた。その結果、iNOS が顕著に誘導されることが明らかとなった。また、K-ras^{Asp12} 導入による軟寒天培地でのコロニー形成は、IL-1 β や LPS 刺激により顕著に増加し、これは NOS 阻害剤によって減少した。

D. 考察

(1) 長期連続投与で大腸発がん性の報告されている PhIP、MeIQ、IQ、Glu-P-1のうち、PhIP、IQ、MeIQは「短期間欠投与法」により大腸がんが誘発されることを確認しており(未発表)、Glu-P-1も「短期間欠投与法」で大腸発がん性を示すと推測される。MeIQxは、長期連続投与で大腸発がん性を示さないが、「短期間欠投与法」で低率だが大腸がんが誘発されるので、「短期投与法」による ACF 誘発性は、「短期間欠投与法」の大腸発がん性と一致していると示唆された。

(2) 種々の HCA を「短期投与法」により

投与し、発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。投与開始後3週で、PhIP以外のHCAにおいて大腸粘膜における遺伝子発現が全般的に低下していた。PhIP以外の、他の5種のHCAはすべて肝発がん物質であり、肝毒性が大腸粘膜での遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。IQ投与群では、投与開始後6週 (IQ投与終了から4週後) でも全般的に発現低下が認められ、また約3/4の遺伝子が3週時と共通だったことから、IQでは、6週でも毒性による遺伝子発現の低下が持続している可能性が示唆された。

6週において、大腸発がん性物質である MeIQ、Glu-P-1において共通に発現が変動しているが、非発がん性物質で発現が変動していない遺伝子について検索したが、発現上昇した遺伝子が1個、低下が10個と少数であった。今回は、対照群と比較して有意にかつ2倍以上発現変動している遺伝子を検索したが、条件を緩和して検討する必要がある。また、対照群として普通食のみ投与した群を用いたが、このことは、HCAと高脂肪食の複合作用による遺伝子発現を解析したことを意味する。普通食2週投与後に高脂肪食4週投与群を対照群として用いればHCAのみの作用を解析可能であり、今後、この解析も検討する予定である。また、MeIQxは非大腸発がん物質としたが、低率であるが「短期間欠投与法」により大腸がんを誘発することから、大腸発がん物質に分類される可能性がある。その場合、非大腸発がん物質が Trp-P-2のみとなるので、

「短期投与方法」によりACF誘発性が認められなかったAαCやMeAαCについても遺伝子発現解析を行い、非大腸発がん物質の種類を複数にしての解析を検討している。

今回は、投与開始後3及び6週において解析を行ったが、「短期間欠投与方法」での18及び32週において大腸発がん物質 (PhIP, IQ, MeIQ) で共通に発現変動している遺伝子を網羅的に調べて、大腸発がん特異的な遺伝子の経時変化を検討することを計画している。また、今回は大腸粘膜組織全体の遺伝子発現について解析したが、大腸がんの前がん病変であるdysplastic ACFの簡便な検出法を開発したので、このような微小病変からのRNAの抽出を試み、GeneChipを用いて網羅的な遺伝子発現解析が可能かどうかを検討し、発がんに関与する遺伝子を探索する予定である。(3) *K-ras*遺伝子の変異がIL-1 β やLPS刺激存在下で*iNOS*の発現を誘導して、発がんに必要な役割を果たしている可能性が示唆された。

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、*K-ras*に遺伝子変異がある場合には、大腸発がん性に影響すると推測されている*iNOS*の誘導性が異なる可能性が示唆され、遺伝子変異の有

無により、遺伝子の発現様式が変化する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

- 1) Shibata, H., Iimuro, M., Uchiya, N., Kawamori, T., Nagaoka, M., Ueyama, S., Hashimoto, S., Yokokura, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Preventive effects of cladosiphon fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in mongolian gerbils. *Helicobacter*. (2003), 8: 59-65.
- 2) Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E₂ administration. *Carcinogenesis*. (2003), 24: 985-990.
- 3) Kitamura, T., Itoh, M., Noda, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K.

- Combined effects of prostaglandin E receptor subtype EP₁ and subtype EP₄ antagonists on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. *Cancer Sci.* (2003), 94: 618-621.
- 4) Mutoh, M., Matsui, H., Takahashi, M., Takamura-Enya, T., Wakabayashi, K. Suppression of transcriptional activity of gene promoter for cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in colon cancer cells. *American Chemical Society* (2003), 851: 100-121.
- 5) Niho, N., Takahashi, M., Kitamura, T., Shoji, Y., Itoh, M., Noda, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res.* (2003), 63: 6090-6095.
- 6) Matsubara, S., Shibata, H., Ishikawa, F., Yokokura, T., Takahashi, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003), 310: 715-719.
- 7) Takahashi, M., Mutoh, M., Shoji, Y., Kamanaka, Y., Naka, M., Maruyama, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Transfection of K-ras^{Asp12} cDNA markedly elevates IL-1 β -and lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase expression in rat intestinal epithelial cells. *Oncogene.* (2003), 22: 7667-7676.
- 8) Niho, N., Takahashi, M., Shoji, Y., Takeuchi, Y., Matsubara, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR γ ligand. *Cancer Sci.* (2003), 94:960-964.
2. 学会発表
- 1) 仁保直子、高橋真美、庄司 豊、杉村 隆、若林敬二。PPAR γ リガンドによる APC 欠損マウスの腸ポリープ形成の抑制。第10回日本がん予防研究会（札幌）、PW1(口演)。2003年6月25日。
- 2) 庄司 豊、渡部浩治、北村知宏、高橋真美、成宮周、杉村 隆、若林敬二。プロスタグランジン E2 受容体サブタイプ EP3 の AOM 誘発大腸発がんに及ぼす影響。第10回日本がん予防研究会（札幌）、PW2（口演）。2003年6月25日。
- 3) 仁保直子、高橋真美、北村知宏、庄司 豊、野田哲生、杉村 隆、若林敬二。PPAR γ リガンドによる APC1309 ノックア

ウトマウスの腸ポリープ形成抑制作用。

第 62 回日本癌学会総会（名古屋）、
1351-PA(示説). 2003 年 9 月 25 日。

4) 庄司 豊、高橋真美、渡部浩治、北
村知宏、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
E2 受容体 EP4 の役割。第 62 回日本癌学
会総会（名古屋）、1209-OP(口演). 2003
年 9 月 25 日。

5) 高橋真美、庄司 豊、仁保直子、杉
村 隆、若林敬二。iNOS 阻害剤 ONO-1714
のアゾキシメタン(AOM)誘発ラット大腸
aberrant crypt foci (ACF) に対する抑
制効果。第 62 回日本癌学会総会（名古
屋）、3241-OP(口演). 2003 年 9 月 27 日。

6) 若林敬二。がん化学予防のための
基礎研究。第 62 回日本癌学会。2003 年
9 月 26 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

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行った。まず、(1)恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析手法の確立とその検証に必要な生物学的基礎研究を行うことを目的とし、そのモデルとして circadian rhythm 及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群について研究を行った。また、応用系として、(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、(3)HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索、(4)老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索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、まず、ホルモンをはじめとする恒常性維持機構の標的で有ると同時に解毒代謝に関わる恒常性維持の中枢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

ロジェン受容体 α (ER α)系あるいはアрил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。また、組織間相互作用、細胞分化等、恒常性維持機構あるいはそれに深く関る制御系に関する系についても検討する。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の詳細を明らかにする。

(1) モデルとしての Circadian rhythm 及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群の解析に関する研究

現在、医薬品・食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、高濃度における生体反応から低濃度における反応を予測することが通常行われている。しかし、恒常性維持機構が働く系に外界から化学物質等の刺激が加わっても、そのフィードバックにより低濃度での生体への影響が捉えにくいことが多い。そして、影響が捕らえられないから障害性が全く無いと言い切れるわけではない。内分泌攪乱物質等、このような特徴を持つ化学物質の安全性を評価するためには、Phenotype が現れない状況での評価に値する情報を得る必要性がある。このためには網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、フィードバック機構に関与する遺伝子群の発現変動を検討する評価方法を開発する必要があり、それに必要な標準化手法・統計解析等の情報処理に関する新手法の開発・応用を行ってきた。本研究では、特に恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析手法の確立とその検証に必要な生物学的基礎研究を行うことを目的とし、導入ケースとして circadian rhythm 遺伝子群、及びモデルケースとして TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群について研究を行った。

(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

VEGF は、腫瘍による血管新生において主要な促進因子の一つであることはよく知られている。近年、VEGF に対する中和抗体やその受容体のチロシンキナーゼ阻害剤によりこの VEGF の signaling pathway を阻害することが、腫瘍の分子標的治療方法として注目されている。しかし、結果的に腫瘍が進行してしまうことから、一つの可能性

として、メジャーな VEGF pathway 以外に有効な血管新生 pathway (ex. Endocrine gland-derived VEGF) の存在が考えられる。腫瘍細胞が低酸素下に置かれると、その低酸素刺激によって発現が誘導された低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の作用により VEGF 遺伝子の発現が促進され、VEGF の産生が亢進する。また、外因性因子 (ホルモンや種々の成長因子) によっても、その発現が調整されているという報告がある。さらに、この低酸素刺激と外因性因子による刺激が同時に腫瘍細胞に加えられると、VEGF 産生を相乗的に亢進させる。このような VEGF 産生が亢進した腫瘍細胞では、1) VEGF 産生を相乗的に促進させる機構、もしくは 2) VEGF 産生亢進時に挙動を同じくする他の血管新生 pathway なども影響を受けて働いていることが考えられることから、それらの機構に関連した機能蛋白をコードする遺伝子群も影響を受けて著しく変動する可能性が高いことが予想できる。

本研究では、低酸素刺激と VEGF 産生促進効果を有するホルモンや成長因子を培養腫瘍細胞に同時に作用させることで VEGF の産生が亢進した状態、即ち血管新生が活発に起こっている状態を *in vitro* で再現し、その際に発現が変化する遺伝子群をマイクロアレイによって網羅的に探索することを試みる予定である。これによって、VEGF 産生を相乗的に促進させる機構や VEGF 以外に有効な血管新生 pathway に関連した遺伝子クラスターを同定できると考える。

以上の結果より、より効果的な分子標的治療薬の開発に展開できる分子情報を得ることが期待できる。

(3)HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索

血液幹細胞は様々な機能を持った血球細胞へと分化し、免疫系をはじめとして個体レベルでの恒常性を維持するために重要な働きをしている。この血球細胞の分化のコントロールは、生体の恒常性を保つ仕組みの中でも非常に重要なものである。そこで、ヒト培養細胞 HL60 細胞の分化モデルを用い、GeneChip を用いた遺伝子発現解析により、血球分化に働く重要な遺伝子を明らかにし、分化のコントロールのメカニズムに迫ることを目的とした。

分化誘導剤として、レチノイン酸及び DMSO で処理した時に、HL60 細胞はいずれも好中球へと分化する。薬剤処理により様々な遺伝子の発現が変化すると予想されるが、それらのうちどの遺伝子の変化が分化と直接的に関わっているのかを知ることが重要であり、今回、分化という同様の事象を引き起こす二つの薬剤を使うことにより両者に共通した変化としての分化に関わる遺伝子を調べるというアプローチをとった。即ち、レチノイン酸及び DMSO により共通して変化する遺伝子を検索することにより、血球分化に深く関与すると考えられる遺伝子群が同定できる。また、これらの遺伝子の動きを経時的に調べるため、薬剤処理時間を変えたサンプリングを行い、遺伝子発現データを解析するとともに、細胞膜のトランスフェリン受容体(Trf-R)の有無により分化した細胞と未分化な細胞を分離し、それぞれの遺伝子発現を比較することにより、さらに詳細な検討を行った。また、HL-60 細胞には、培養の過程でその増殖能が亢進した亜株である HL-60RG 細胞

が存在するが、この細胞は DMSO やレチノイン酸による分化誘導能を失っている。そこで、両細胞における遺伝子発現を比較することにより、分化誘導に重要な役割を果たす遺伝子を探ることができると考え、両細胞での定常レベルでの遺伝子発現の比較を行った。

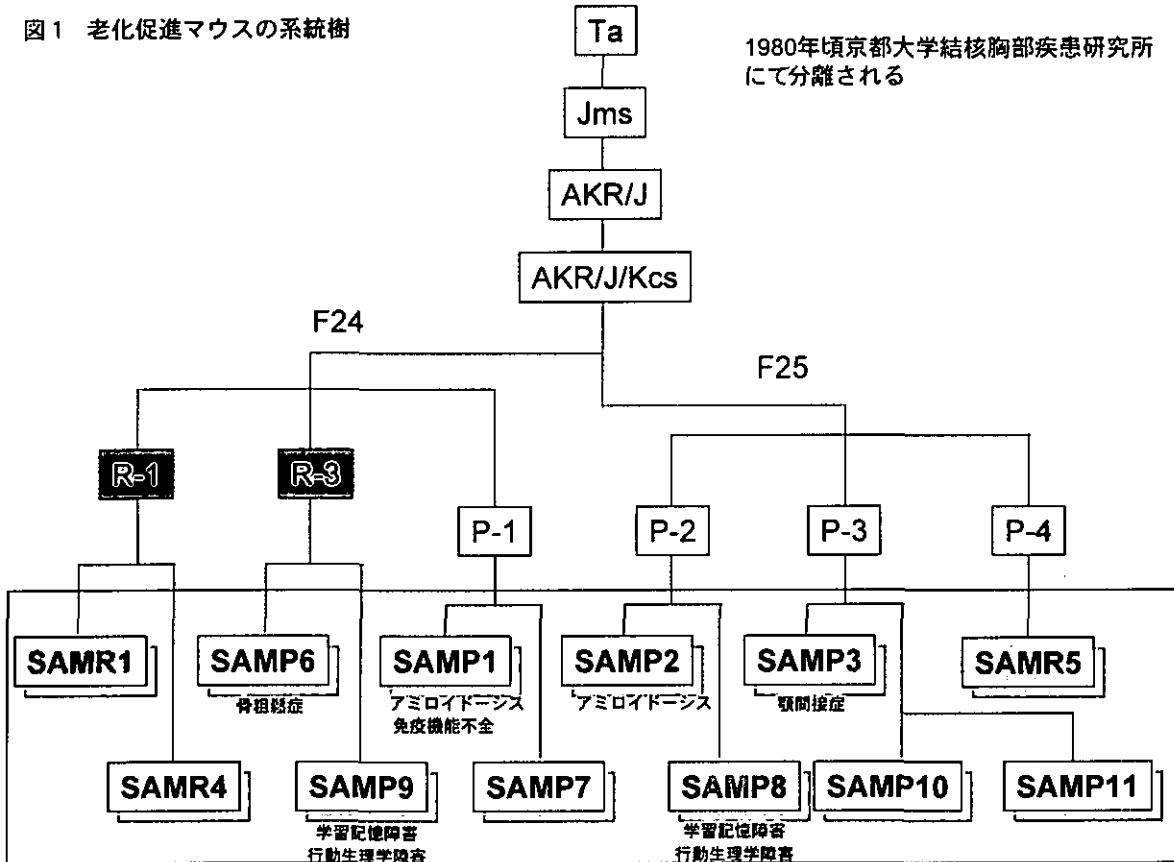
(4)老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索

個体の老化は、生体の恒常性維持機構の破綻として起こると考えられる。老化のメカニズムについては、活性酸素による傷害や、遺伝子変異の蓄積など様々な説があり、各組織において異なるメカニズムが働いている可能性もある。組織レベルでの老化、すなわち細胞機能の退化に伴い様々な遺伝子の発現が変化すると考えられる。また、これら老化の引き金となる遺伝子変化を調べることは、生体の機能維持、抗老化作用を考える上で重要である。これらの検討を行う上で、マウスにおける早期老化変異体である老化促進マウス (SAM マウス: Senescence Accelerated Mouse) の利用が有用であると考えた。SAM マウスは京都大学胸部疾患研究所の竹田教授らが AKR/J と不明の系統との交雑から偶発的に発生した老化が加速的に進行する個体同士をかけあわせて確立した系統である (図 1)。SAMP1-11 などの *subline* があり、いずれも早期に老化兆候を示すが、その主な症状は、骨粗鬆症や、学習記憶障害などの差がある。本研究では、学習記憶障害と行動生理学障害を示す SAMP-8 について、その対照となる正常系統である SAMR-1 との間で、同じ 8 週齢のマウス大脳の海馬における遺伝子

発現を GeneChip を用いて比較することにより、海馬での機能低下に関わる責任遺伝

子を同定することを目的とした。

図1 老化促進マウスの系統樹



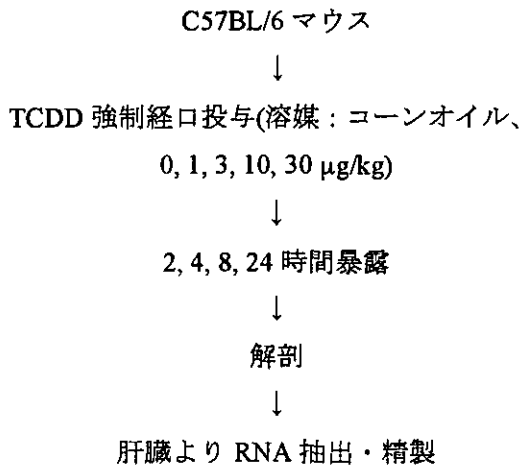
B. 研究の方法

(1) モデルとしての Circadian rhythm 及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群の解析に関する研究

本年度は、C57BL/6 マウスにおける濃度依存的、時間依存的に網羅的遺伝子発現解析を行い、恒常性維持機構に関連する遺伝子群、その中でも日内変動に関連して恒常性維持に働く遺伝子群及び AhR に関連した恒常性維持機構に働く遺伝子群を中心に検討した。

網羅的遺伝子発現解析は以下のプロト

コールにより行った (TCDD 投与を例に示す)。



↓
Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array

(Affymetrix Inc.)による
網羅的遺伝子発現解析

↓
「Percellome 絶対量化手法」による標準化

↓
Millefeuille data を用いた各種解析

(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

VEGF 産生亢進に伴って動く血管新生関連遺伝子の探索を行うために、本年度は *in vitro* VEGF 産生亢進モデルの確立を目指した。*In vitro* モデルは、株化されたヒトの培養腫瘍細胞を低酸素下で培養し、同時に VEGF 産生促進因子を添加することにより確立した。

(細胞培養)

培養細胞は、ヒトの乳癌から樹立された細胞株 MCF-7 を用いた。MCF-7 は、6 穴培養プレートでフェノールレッド・フリー・ダルベッコ改変イーグル培地 (10% ウシ胎児血清 (FBS) と 2mM Glutamine を含む) を用いて培養した。サブコンフルエント (90%~) の状態になった時に、Dextran-charcol 処理をした FBS を 0.2% 含む培地と交換した。

(血清の Dextran-charcol 処理)

血清は、56℃、30 分で非働化後、0.22μm フィルターで濾過滅菌したものをを用いた。はじめに、Charcol (1g、Norit A) と Dextran T-70 (0.1g、MW: 70400、Pharmacia) を 100ml の蒸留水に溶解した。これを 1000g で 10 分間遠沈した後、上清を捨て、沈殿した Charcol に 100ml

の血清を加えた後、これを 40℃ で 30 分間攪拌し、10000rpm で 15 分間遠沈した。この Charcol 処理をもう一度繰り返した後、10000rpm で 15 分間遠沈し、これを濾過滅菌して培地に加えた。処理済み培地は、使用するまで -20℃ で保管した。

(VEGF 産生亢進環境の準備)

Dextran-charcol 処理をした FBS を含んだ培地を用いて 48 時間培養後、低酸素環境下 (2%O₂、5%CO₂、37℃) と定常酸素環境下 (20%O₂、5%CO₂、37℃) に移し、VEGF 産生促進因子と 24 時間作用させた。VEGF 産生を低酸素下で相乗的に増加させる外因性因子としては、Estradiol 17β (E2) (SIGMA、10nM) と Transforming growth factor Beta 1 (TGF-β1) (R&D SYSTEMS、0.3ng/μl) を用いた。E2 は、1mg をエタノール 10ml に溶解し (367μM)、ストック溶液として 4℃ で、TGF-β1 は、4 mM HCl に 0.1% HSA を加えたもので 2μg/ml に希釈したものをストック溶液として -20℃ で使用時まで保存した。低酸素環境は、BINDER 社の CO₂ インキュベーター CB150 を用いて窒素を充填することにより準備した。

(VEGF mRNA の測定)

低酸素下、VEGF 産生促進因子を添加してから 24 時間後に QUIAGEN 社の RNeasy Mini Kit と QIAshreader カラムを用いて total RNA の抽出を行った。VEGF 産生のモニターは、ヒト VEGF mRNA の部分配列 (48-156、109 bp) を特異的に増幅するプライマーを設計し、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム

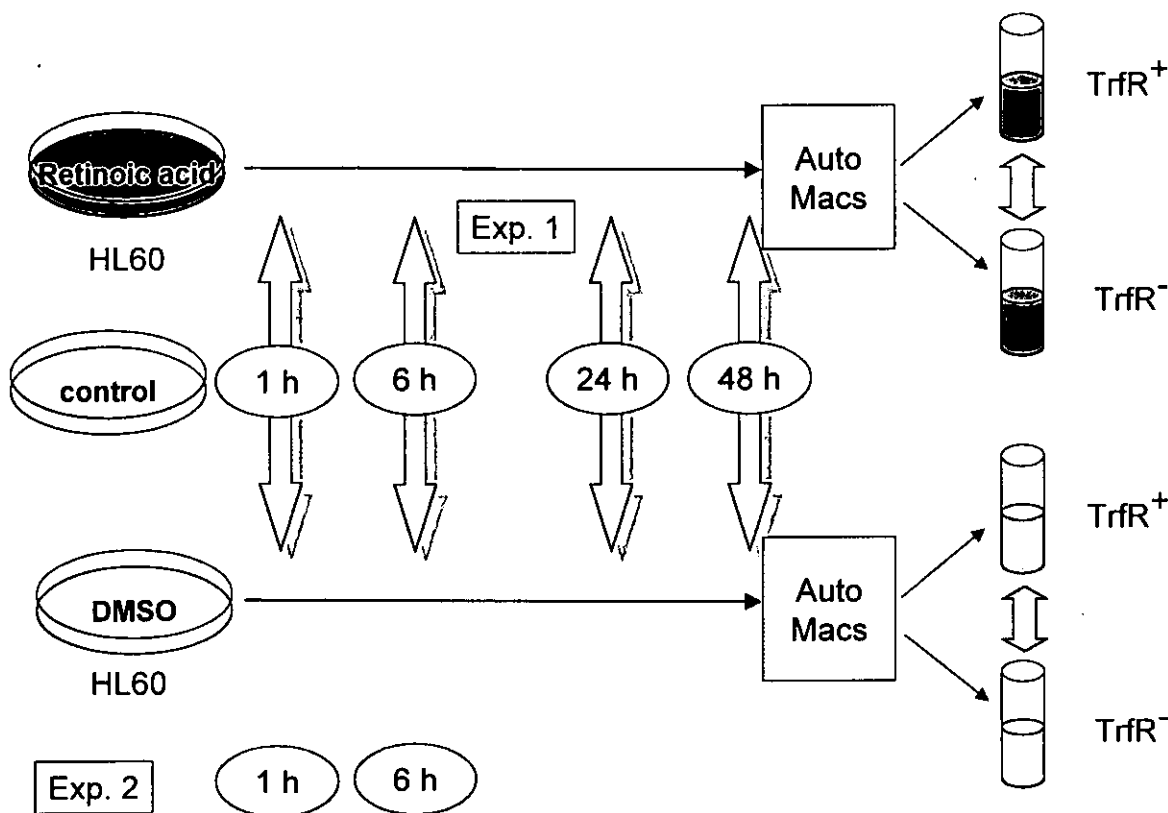
ム RT-PCR (Applied Biosystems 、 7000Sequence Detection System) によって行った。スタンダードは、標的配列を含んだヒト VEGF mRNA の部分配列 (38-391、354 bp) を RT-PCR により増幅し得られた PCR 産物をテンプレートとして希釈して用いた。抽出した total RNA 濃度は、RiboGreen RNA quantitation reagent (Molecular Probes) を用

いて測定し、各サンプルから 100ng の total RNA を用いて VEGF mRNA の発現量を測定した。

(3)HL60 細胞を使った分化に関する遺伝子の検索

実験のスキームを図 2 に示す。

図 2 レチノイ酸及びDMSOによるHL60細胞の分化誘導実験のスキーム



ヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL-60 細胞に DMSO 及びレチノイン酸を処理し、48 時間後に分化した細胞をトランスフェリン受容体(Trf-R)の有無を指標に、細胞分離装置 AutoMacs と抗体を用いて分離した。各サンプリング時点での細胞 1 時間後と 6 時間後のデータに関しては、独立した実験を繰り返して、再現性を確認した。また、HL-60 細胞とその亜株である HL-60RG 細胞の遺

伝子発現比較を行うため、対数増殖期及び定常期の各細胞より total RNA を抽出し、定法に従って GeneChip 解析を行った。チップデータの解析には、GeneSprig ソフトウェアを用い、遺伝子の発現強度に応じて漸次的に発現比の有意水準を設定することにより、ステップワイズに遺伝子の選択を行った。

(4) 老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索

8 ヶ月齢 SAMP8、SAMR1 各々5 匹から脳の海馬を摘出し 5 匹分をプールした。totalRNA を抽出し RT-PCR により cDNA とし、T7 プロモーターを用いた *in vitro* transcription 法によりピオンチンラベルされた cRNA を合成し、断片化した後 GeneChip MOE 430A アレイにハイブリダイズさせた。Fluidic Station にて洗浄、フィコエリスリンによる染色を行った後、専用の GeneChip スキャナーでターゲットのシグナルを検出した。得られたデータは解析ソフト GeneSpring を用いて解析した。その後、変化の見られた遺伝子について real time PCR によって遺伝子発現変化を確認した。

C. 研究結果

(1) モデルとしての Circadian rhythm 及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群の解析に関する研究

(1)-i 動物実験

TCDD をそれぞれ 0, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で強制経口投与(各群 3 匹、溶媒:コーンオイル)し、2, 4, 8, 24 時間暴露後に肝臓をサンプリングした。この時、肝臓重量は 2 時間から 4, 8 時間にかけて減少し、24 時間に元のレベルに戻った(図 3)。このサンプルから、total RNA を取得し、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix Inc.)により、45101 プローブセットについて網羅的遺伝子発現解析を行った。

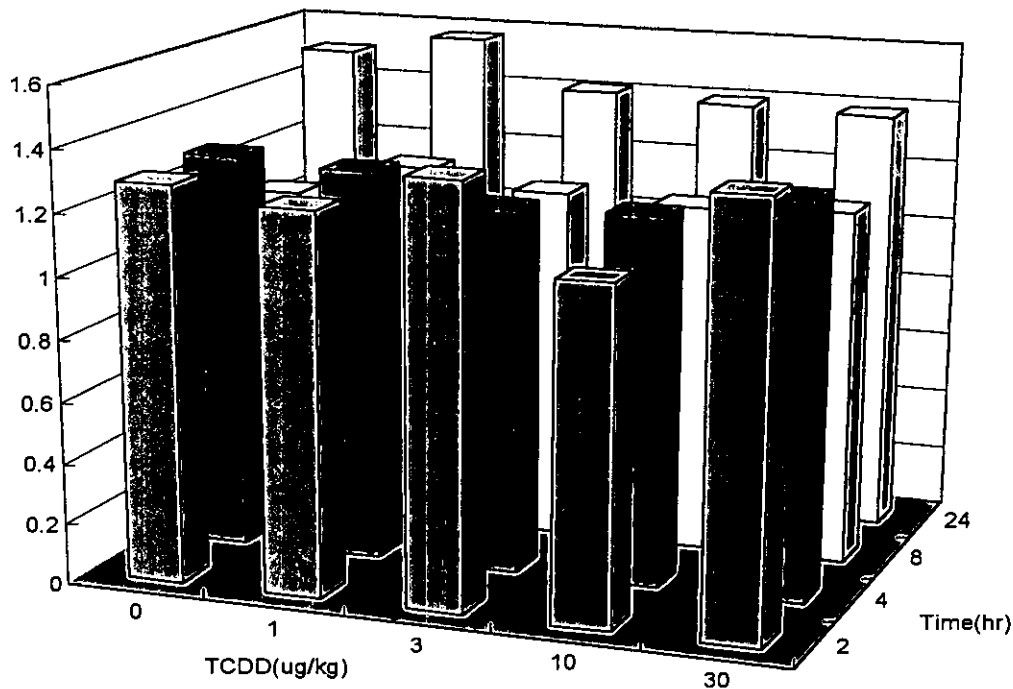


図3 TCDD投与マウスにおける肝臓実重量変化

(1)-ii 標準化

「絶対量化手法」により標準化を行った結果の一例を図4に示す。

3匹のマウス (No.11, 12, 13) の発現量をそれぞれ X, Y 軸にプロットすると「絶対量化手法」により標準化したデータは $y = x$ の直線上に分布し、非常によい再現性を示

した。他の 15 点についても同様の再現性が得られた。「絶対量化手法」による標準化を行うと、発現量を DNA microarray でよく用いられている「基準量に対する比」ではなく、「絶対量」で表すことができる。この「Percellome 絶対量化手法」で標準化したデータを以下の解析に使用した。

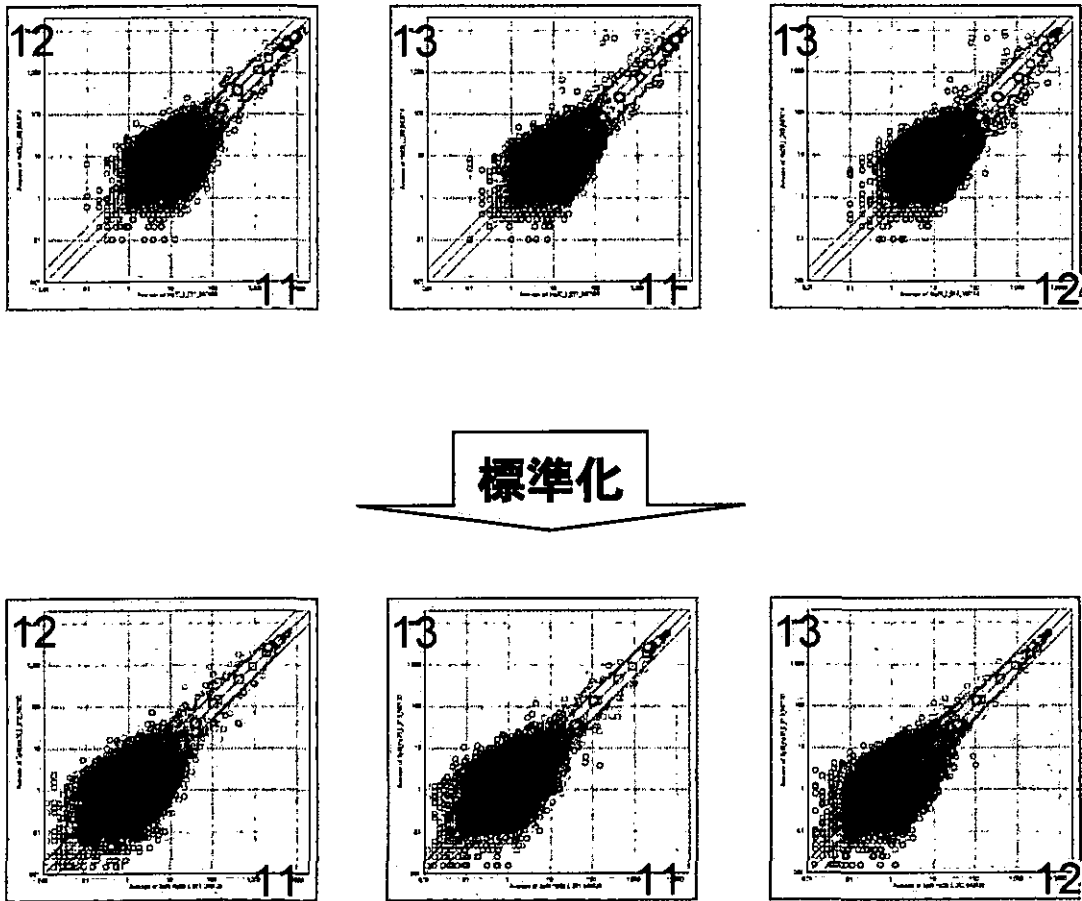


図4 「絶対量化手法」による標準化

(1)-iii Circadian rhythm

恒常性を維持する機構の一例として、化学物質投与などとは非依存的な circadian rhythm について解析を行った。哺乳類には視床下部の視交叉上核(SCN)に概日性リズムを発振する中枢が存在するが、肝臓等の末梢組織にも SCN での遺伝子発現調節と同様の現象がみられ、ローカルな時計として機能しているが知られている。この恒常性維持機構には、図5,6に示すように Bmal1, Clock, Per, Cry ファミリーなど多くの遺伝子が複雑に関連していることが報告されて

いる。これら、Circadian rhythm に関する代表的な遺伝子の発現パターンを検討した結果、TCDD 投与濃度に関係なく、8 時間に Dbp, Per, 及び Cry の発現上昇、Clock 及び E4bp4 の発現低下が観察された(図7 a)。しかし、「各時間における vehicle control に対する比」を用いて解析すると、circadian rhythm はみられなくなった(図7 b)。この他、同様の挙動を示す遺伝子が多数抽出されており(表1)、これらの制御様式についても検討を加える予定である。

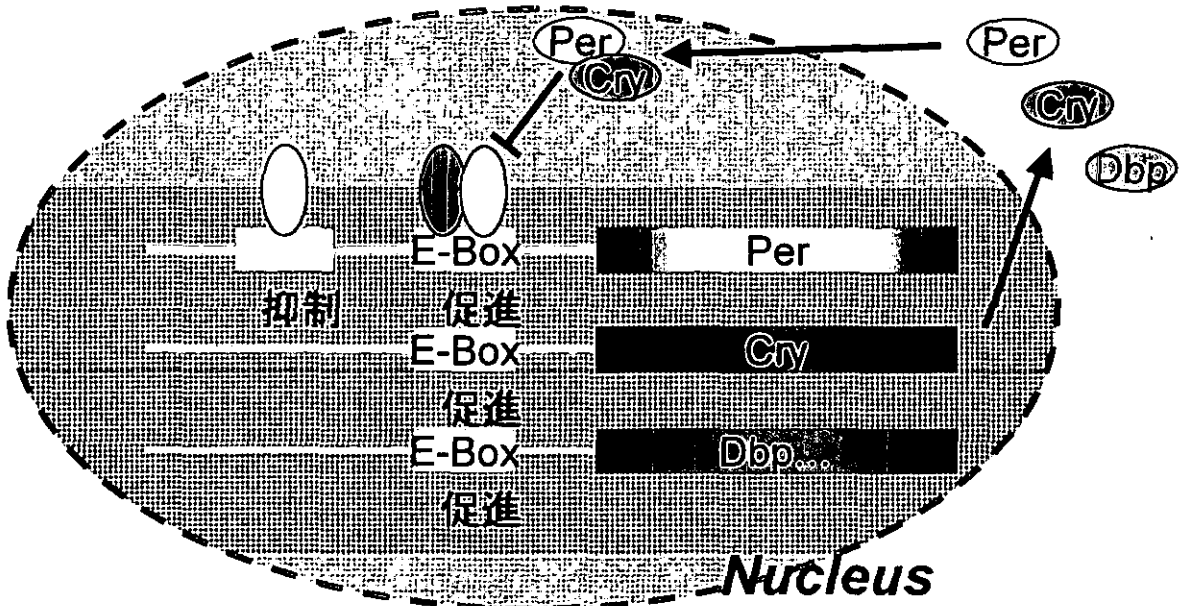


図 5 Circadian rhythmにおける恒常性維持機構

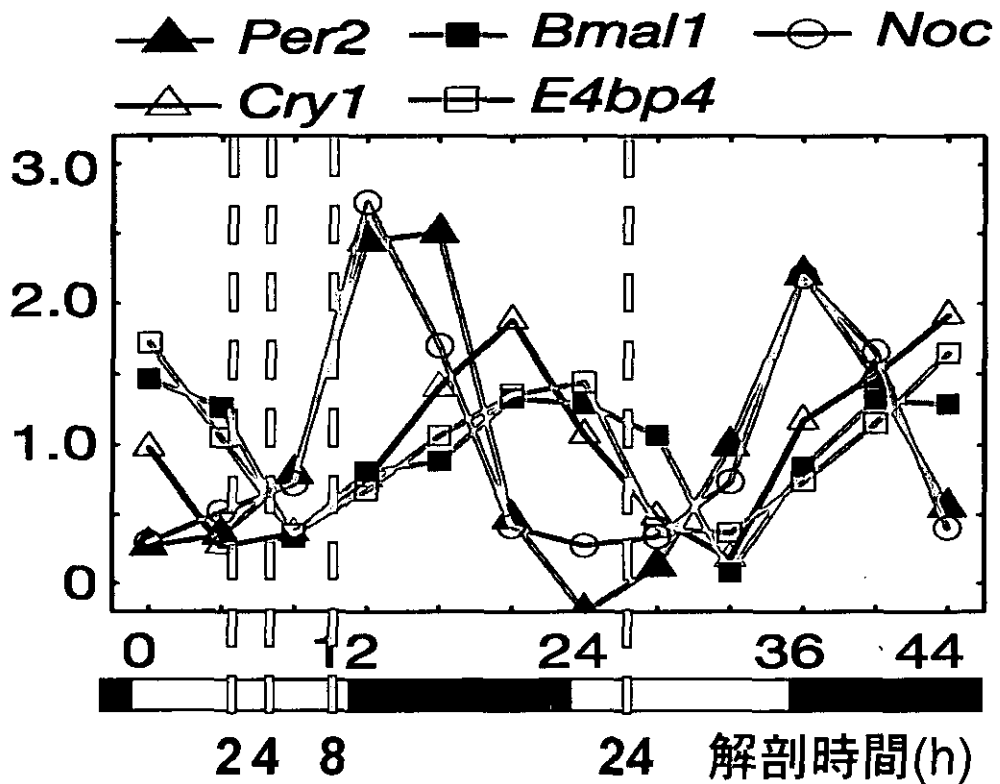
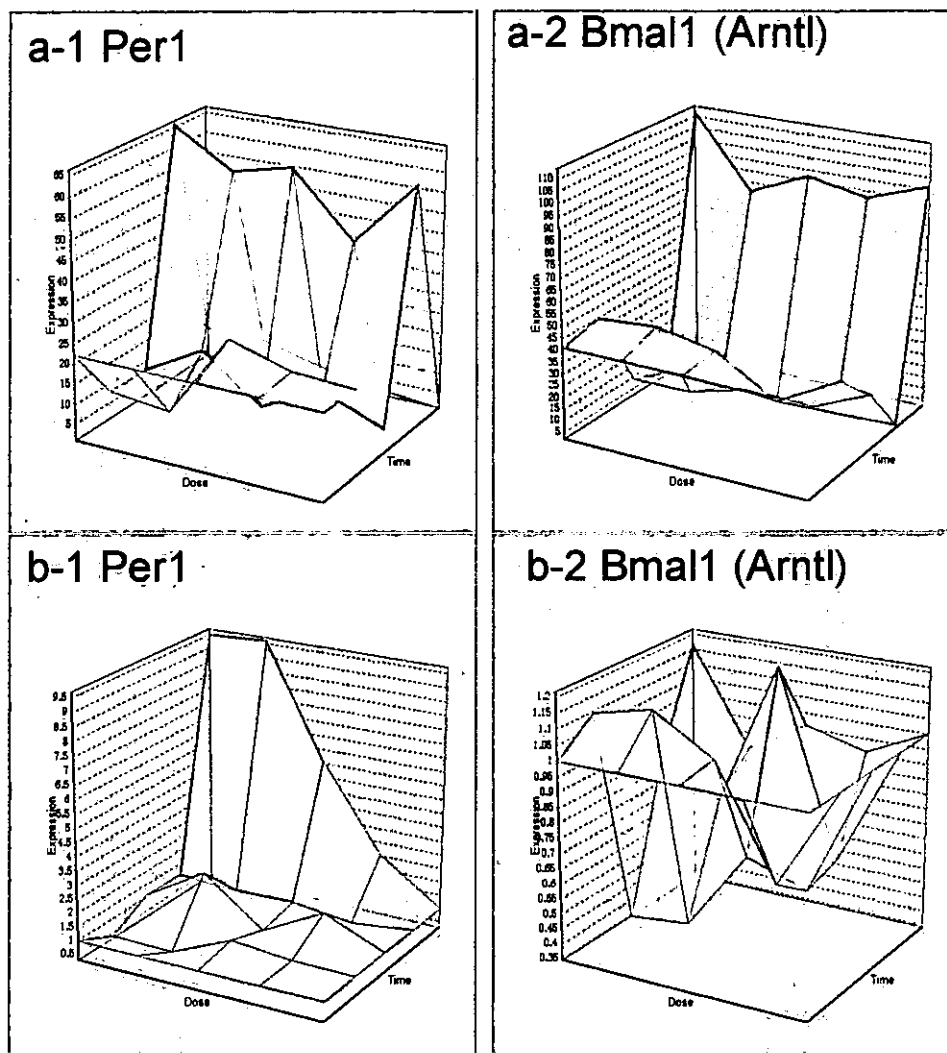


図 6 Circadian Rhythmに関連する既報遺伝子の経時的発現パターン (Nature 2002 Aug 1;418(6898):534)



a: 絶対量表示

b: 各時間におけるvehicle controlに対する比

図7 Circadian rhythmに関連する遺伝子群の発現パターン

表1 日内変動パターンを示した遺伝子群

GeneChip ID	Symbol	GenBank ID	Description
1415772_at	Ncl	BC005460	nucleolin
1416256_a_at	Tubb5	NM_011655	tubulin, beta 5
1416344_at	Lamp2	NM_010685	lysosomal membrane glycoprotein 2
1416816_at	Nek7	BQ175300	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 7
1416913_at	Es1	NM_007954	esterase 1
1416924_at	Br3	NM_018772	brain protein I3
1416933_at	Por	NM_008898	P450 (cytochrome) oxidoreductase
1416958_at	Nr1d2	BC008556	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1416959_at	Nr1d2	NM_011584	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1417166_a_at	Usp2	NM_016808	ubiquitin specific protease 2
1417169_at	Usp2	A1553394	ubiquitin specific protease 2
1417190_at	Pbaf-pending	BC018358	pre-B-cell colony-enhancing factor
1417339_a_at	Dncl1	NM_019682	dynein, cytoplasmic, light chain 1
1417602_at	Per2	NM_011066	period homolog 2 (Drosophila)
1417603_at	Per2	AF035830	period homolog 2 (Drosophila)
1417828_at	Aqp8	NM_007474	aquaporin 8
1418352_at	Hsd17b2	BC012682	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
1420342_at	Gdap10	NM_010268	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 10
1421829_at	Ak4	AB020239	adenylate kinase 4
1421830_at	Ak4	NM_009647	adenylate kinase 4
1421991_a_at	Igfbp4	NM_010517	insulin-like growth factor binding protein 4
1421992_a_at	Igfbp4	AA119124	insulin-like growth factor binding protein 4
1422568_at	Ndel1	AF323918	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)
1423086_at	Npc1	BB769209	Niemann Pick type C1
1423757_x_at	Igfbp4	BC019836	insulin-like growth factor binding protein 4
1423804_a_at	Idi1	BC004801	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
1424275_s_at	Trim41	BC020156	tripartite motif-containing 41
1425099_a_at	Arnt1	BC011080	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
1425456_a_at	Map2k3	D87115	mitogen activated protein kinase kinase 3
1425678_a_at	Snrk	BC020189	SNF related kinase
1425742_a_at	Tgfb14	AF201285	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1425792_a_at	Rorc	AF163668	RAR-related orphan receptor gamma
1425824_a_at	Pcsk4	D01093	proprotein convertase subtilisin/kexin type 4
1426441_at	Slc11a2	BB772362	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2
1427229_at	Hmgcr	BB123978	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
1427347_s_at	Tubb2	BC003475	tubulin, beta 2
1427838_at	Tubb2	M28739	tubulin, beta 2
1428381_a_at	2700038C09Rik	BG868450	RIKEN cDNA 2700038C09 gene
1434866_x_at	Cpt1a	BB021753	carntine palmitoyltransferase 1, liver
1435732_x_at	Atp6v0c	AV172216	ATPase, H+ transporting, V0 subunit C
1437932_a_at	Cldn1	AV227581	claudin 1
1438156_x_at	Cpt1a	BB119196	carntine palmitoyltransferase 1, liver
1439270_x_at	Ran	AV116470	RAN, member RAS oncogene family
1448202_x_at	2610524G07Rik	NM_025596	RIKEN cDNA 2610524G07 gene
1448276_at	Tm4sf7	NM_053082	transmembrane 4 superfamily member 7
1448346_at	Cf11	NM_007687	cofilin 1, non-muscle
1448390_a_at	Rsdrl-pending	NM_011303	retinal short-chain dehydrogenase/reductase 1
1448450_at	Ak2	BC008610	adenylate kinase 2
1448451_at	Ak2	NM_016895	adenylate kinase 2
1448607_at	Pbaf-pending	AV989410	pre-B-cell colony-enhancing factor
1448619_at	Dhcr7	NM_007856	7-dehydrocholesterol reductase
1448682_at	Dncl1	NM_019682	dynein, cytoplasmic, light chain 1
1448864_at	Snrk	NM_133741	SNF related kinase
1449029_at	Mknk2	NM_021462	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2
1450014_at	Cldn1	NM_016674	claudin 1
1450264_a_at	Chk	NM_013490	choline kinase
1450387_s_at	Ak4	NM_009647	adenylate kinase 4
1450982_at	Slc9a3r1	BG066200	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1
1451002_at	Aco2	AA034553	aconitase 2, mitochondrial
1451122_at	Idi1	BC004801	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
1451255_at	Lisch7-pending	BC004672	liver-specific bHLH-Zip transcription factor
1451371_at	1110025G12Rik	AY079153	RIKEN cDNA 1110025G12 gene
1451714_a_at	Map2k3	A1481780	mitogen activated protein kinase kinase 3
1452179_at	D530048A03Rik	BG066552	RIKEN cDNA D530048A03 gene
1452180_at	D530048A03Rik	BG065238	RIKEN cDNA D530048A03 gene
1452482_at	ErbB3	B1251855	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
1452555_at	---	AF037046	---
1452769_at	3732413I11Rik	AK014408	RIKEN cDNA 3732413I11 gene
1454758_a_at	Tgfb14	AU016382	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1454967_at	---	BM246522	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_001888.1
1454971_x_at	Tgfb14	BB357514	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1460409_at	Cpt1a	A1987925	carntine palmitoyltransferase 1, liver

(1)-iv TCDD 投与による遺伝子発現変動解析
 まず、ダイオキシン類のレセプターである aryl hydrocarbon receptor (Ahr)系についてさ

らに検討した。TCDD は Ahr を介して図 8 に示すような応答を示すことが報告されている。TCDD により発現が誘導される既知の遺伝子について発現パターンを解析した。

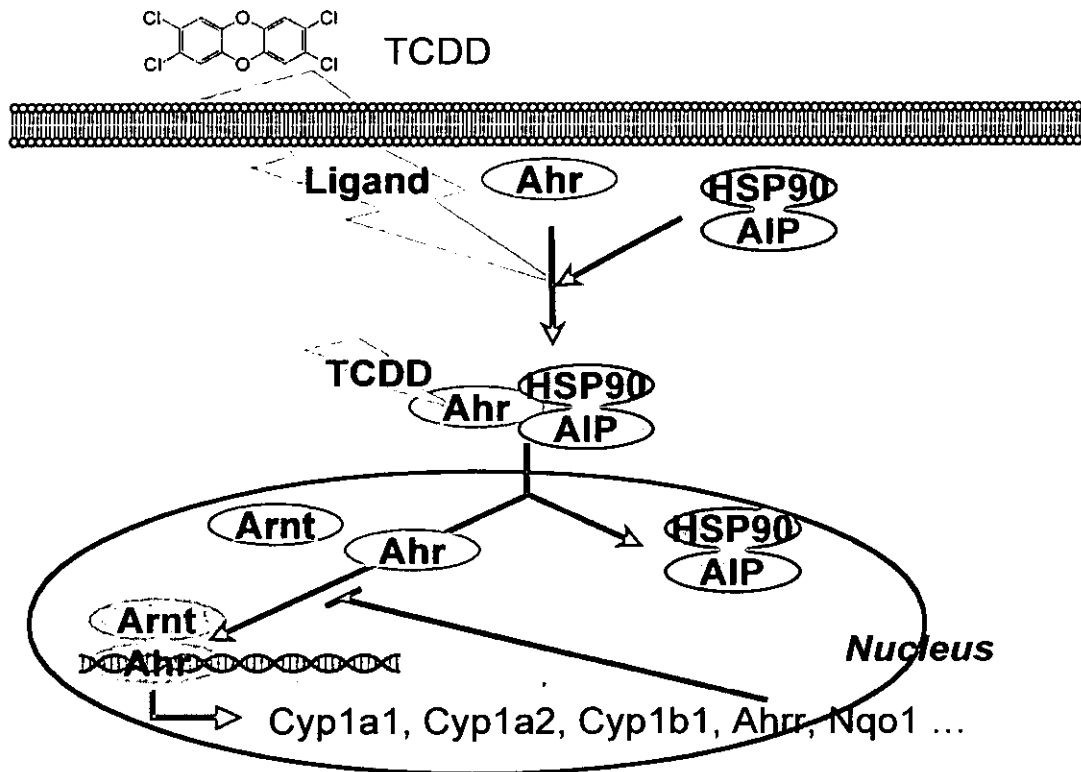


図8 Ahr pathway

Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1,は 2 時間から濃度依存的な誘導がみられ、8 時間後に発現量は低用量でも飽和に達したが、24 時間まで誘導が持続した。NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1

も同様に濃度・時間依存的に発現が誘導された。また、Cyp1b1, aryl-hydrocarbon receptor repressor を始め、多数の遺伝子が 24 時間に濃度依存的誘導を示した(図9) (表2)。

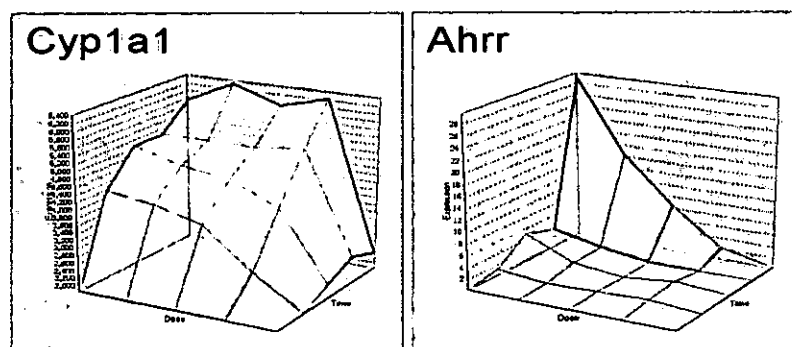


図9 TCDDにより誘導される既知遺伝子の発現パターン:

表2 TCDDによる、24hr目に誘導された遺伝子群

GeneChip ID	Symbol	GenBank ID	Description
1415879_a_at	Rplp2	BC012413	ribosomal protein, large P2
1416029_a_at	Rpl12	NM_009078	ribosomal protein L12
1416041_at	Sgk	NM_011361	serum/glucocorticoid regulated kinase
1416233_at	Elo2a	NM_018799	eucaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 (beta)
1416311_a_at	Tuba3	NM_009448	tubulin, alpha 3
1418453_x_at	Rpl12	NM_011295	ribosomal protein S12
1416548_a_at	Rpl6l	NM_011290	ribosomal protein L6
1416812_at	Cyp1b1	NM_008994	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1
1416813_at	Cyp1b1	BI251808	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1
1416750_at	Ours1	NM_011014	opioid receptor, sigma 1
1417185_at	Ly6a	BC002070	lymphocyte antigen 6 complex, locus A
1418358_at	Mcp	NM_008574	mitochondrial capsule selenoprotein
1419071_at	Cys1	BF468918	cystin 1
1418364_a_at	Rpl7	NM_011300	ribosomal protein S7
1419518_at	Tuba8	NM_017379	tubulin, alpha 8
1419743_at	Abcd2	NM_011094	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
1419812_a_at	D11Erit289e	C77389	DNA segment, Chr 11, ERATO Dcl 99, expressed
1420790_at	Ahr	NM_009644	aryl-hydrocarbon receptor repressor
1421971_a_at	Mips34	NM_023260	mitochondrial ribosomal protein S34
1422971_at	Gcn5l2	NM_020004	general control of amino acid synthesis-like 2 (yeast)
1423148_at	Skip1a	BI079132	S-phase kinase-associated protein 1A
1423723_a_at	Tardbp	BC012873	TAR DNA binding protein
1423759_a_at	1190006A08Rik	BC020698	RIKEN cDNA 1190006A08 gene
1425222_x_at	D63002G06	AB056443	hypothetical protein D63002G06
1425883_a_at	Fhit	AF055573	fragile histidine triad gene
1426102_a_at	Rpl7	M85235	ribosomal protein L7
1426364_a_at	Ywhaa	AK011612	tyrosine 3-monooxygenase/bryotphan 5-monooxygenase activation protein, epsilon p
1426418_at	4833425C05Rik	AK016909	RIKEN cDNA 4833425C05 gene
1427473_at	Gstm3	J03953	glutathione S-transferase, mu 3
1427960_at	AJ788959	BC028826	expressed sequence AJ788959
1428263_a_at	Tceb2	AK019181	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18 kDa, elongin B)
1428347_at	Cyfp2	AK005148	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
1428438_a_at	2700023B17Rik	BI662880	RIKEN cDNA 2700023B17 gene
1429399_at	4930553F04Rik	BB867823	RIKEN cDNA 4930553F04 gene
1430288_x_at	2410030A14Rik	AK007850	RIKEN cDNA 2410030A14 gene
1430832_at	6720480K08Rik	BB055339	RIKEN cDNA 6720480K08 gene
1431177_a_at	Rpl10a	AK002913	ribosomal protein L10A
1431423_a_at	2210021A15Rik	AK011080	RIKEN cDNA 2210021A15 gene
1431788_at	1700008G05Rik	AK005785	RIKEN cDNA 1700008G05 gene
1432033_at	2810018D08Rik	AK011411	RIKEN cDNA 2810018D08 gene
1432204_at	4830570B17Rik	AK0116281	RIKEN cDNA 4830570B17 gene
1432585_at	4831428A05Rik	AV272897	RIKEN cDNA 4831428A05 gene
1433818_a_at	—	—	—
1433708_at	2810024I03Rik	BG763207	Mus musculus cDNA clone MGC:87622 IMAGE:6410794, complete cds
1434097_at	Mhrp	AJ328252	RIKEN cDNA 2810024I03 gene
1434750_at	E430013E20Rik	BG089750	5,10-methyltetrahydrofolate reductase
1434877_at	Npat1	BE200383	RIKEN cDNA E430013E20 gene
1435170_at	2310007F12Rik	AH52800	neuronal pentraxin 1
1435475_at	—	—	—
1435524_at	2010108N14Rik	BQ177187	RIKEN cDNA 2310007F12 gene
1435712_a_at	Rpl18	BG089534	Mus musculus. Similar to hypothetical protein DKFZp564L2423, clone IMAGE:26542E
1435873_a_at	Rpl13a	AV030803	RIKEN cDNA 2010108N14 gene
1435897_at	Rpl32	AW907444	ribosomal protein S18
1436506_a_at	1110008H02Rik	AJ324938	ribosomal protein L13a
1436527_at	—	BB758431	ribosomal protein L32
1438038_x_at	—	AW889681	RIKEN cDNA 1110008H02 gene
1438379_x_at	2310007F21Rik	BC128493	Mus musculus transcribed sequence with strong similarity to protein pdb:1FUB (H.sap)
1438596_at	A630025O09Rik	BB748934	Mus musculus 12 days embryo embryonic body between diaphragm region and neck
1440210_at	9030012M21	AV330311	RIKEN cDNA 2310007F21 gene
1440210_at	—	AW114007	RIKEN cDNA A630025O09 gene
14403050_at	—	BB342913	Mus musculus cDNA clone IMAGE:6413224, partial cds
1444728_at	—	BB072270	hypothetical protein 9030012M21
1445015_at	—	BB203232	Mus musculus transcribed sequences
1445180_at	—	BG089286	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein pir158401
1445771_at	Tuba8	BF465195	Mus musculus transcribed sequences
1447839_x_at	Adm	BB047533	tubulin, alpha 8
1447899_a_at	2010108N14Rik	AV379441	adenomedullin
1448130_at	Fzd1	AV066512	RIKEN cDNA 2010108N14 gene
1448390_a_at	Redr1-pending	NM_010181	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1
1448405_a_at	Crl1	NM_011303	retinal short-chain dehydrogenase/reductase 1
1448449_at	Rplk3	NM_025613	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1
1448663_a_at	Mvd	NM_019955	receptor-interacting serine-threonine kinase 3
1448846_a_at	Rpl29	NM_138856	mevalonate (diphospho) decarboxylase
1449052_a_at	Dnm3b	NM_009082	ribosomal protein L29
1449231_at	Zfp296	NM_010068	DNA methyltransferase 3B
1449255_a_at	Rpl15	NM_022409	zinc finger protein 296
1449255_a_at	Cyfp2	NM_025588	ribosomal protein L15
1449525_at	Fmo3	NM_133769	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
144954_a_at	—	NM_008030	flavin containing monooxygenase 3
1450043_at	Fzd7	BG089597	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein pir158401 (M.mu)
1450220_a_at	Pae-pending	NM_008057	trizzed homolog 7 (Drosophila)
1450883_a_at	Cd38	NM_013891	prostate specific etc transcription factor
1450884_at	Cd38	BE307351	CD38 antigen
1451894_at	4833441J24Rik	BB534870	CD38 antigen
1452028_a_at	Pia2p12	BC006830	RIKEN cDNA 4833441J24 gene
1452044_at	2010015J01Rik	AY007382	phospholipase A2, group XII
1452439_a_at	Srs2	BG799960	RIKEN cDNA 2010015J01 gene
1452485_at	Phospho1	AF250135	splicing factor, arginine/serine-rich 2 (SC-35)
1453118_a_at	Rpl22	AJ457190	phosphatase, cythos 1
1453618_a_at	3830408C21Rik	BB859781	ribosomal protein L22
1453808_at	2210418O15Rik	BB279101	RIKEN cDNA 3830408C21 gene
1454107_a_at	Klzf2	AK008958	RIKEN cDNA 2210418O15 gene
1454859_a_at	Ral23	AK016720	dynamin family member 2A
1455350_at	B830008D23Rik	AV124394	ribosomal protein L23
1455787_x_at	Rpl21	BB067388	RIKEN cDNA B830008D23 gene
1456174_x_at	Ndr1	AV005827	ribosomal protein L21
1457729_at	Gprc12	AV309416	N-myc downstream regulated 1
1458260_at	—	AW482805	G-protein coupled receptor 12
1458732_at	—	BB283635	Mus musculus transcribed sequences
1460201_a_at	Rpl24	C85548	Mus musculus transcribed sequences
1460201_a_at	—	BC002110	ribosomal protein L24

次に早期に誘導・抑制が起こる遺伝子群に

ついて検討した結果、2, 4 時間と早期に発