

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

組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物の
スクリーニングシステムの構築および核内受容体の同定

(H14-トキシコ-013)

平成 15 (2003) 年度 総括研究報告書

主任研究者 大迫 誠一郎

(独立行政法人国立環境研究所環境健康研究領域 主任研究員)

平成 16 (2004) 年 4 月 10 日

研究課題名	組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物のスクリーニングシステムの構築および核内受容体の同定
研究費の名称	厚生労働科学研究費補助金
研究事業名	萌芽的先端医療技術推進研究事業
国庫補助金精算所要額	4,500,000 円
研究期間	平成 14 (2002) 年度～平成 16 (2004) 年度
主任研究者名	大迫 誠一郎
分担研究者名	

目次

I 総括研究報告書

A 研究目的	-----	5
B 研究方法	-----	9
C 研究結果と考察	-----	11
D 結論	-----	13
☒	-----	14
E 参考文献	-----	19
F 健康危機情報	-----	19
G 研究発表	-----	19
H 知的所有権の取得状況	-----	20

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）

総括研究報告書

組換え胎盤培養細胞を用いた新規作用を有する化合物のスクリーニング
システムの構築および核内受容体の同定

主任研究者 大迫 誠一郎 独立行政法人国立環境研究所 主任研究員

研究要旨

本研究では、ラット胎盤由来の Rcho-1 細胞を用い、分化を指標として、影響のある化合物およびそれが結合する新規核内受容体を明らかにすることを目的とする。昨年度の解析から、先ず Rcho-1 細胞はエストロゲン（E2）に対して不応性かつ E2 受容体（ER）が発現していないことを明らかにした。さらに、P450 側鎖切断（P450_{scc}）酵素のプロモーターを用いたリポーターシーアッセイを利用して、約 30 種の化合物について分化に及ぼす影響を検討した。その結果、とくにレチノイン酸（RA）、Diethylstilbestrol（DES）、ICI182,780（ICI）、フタル酸類や Permethrin が Rcho-1 細胞の分化に影響を与えることを見出した。本年度では、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin を代表化合物として DNA アレイ解析を行い、各化合物が、レチノイン酸受容体や DES 受容体を介して作用しているのか、それとも別の核内受容体を介して作用している可能性があるのかを予測した。各化合物を Rcho-1 細胞の分化開始時から 6 日間曝露し、RNA を回収して DNA チップに供した。クラスタリング解析を行った結果、ICI と Carbaryl が最も類似した遺伝子の発現パターンを示し、DES さらには RA の作用とは最も相違していることが明らかになった。DES は ERR β に結合することが知られている。また来年度は、Rcho-1 細胞の核タンパクを二次元電気泳動法により分離し、化合物によって特異的な細胞内分布を呈するタンパク質の同定を行い新規核内

受容体の同定を行う予定である。本年度の結果は、Carbaryl および Permethrin は、レチノイン酸受容体や $ERR\beta$ 以外の核内受容体に結合して作用し、細胞の分化に影響を与えている可能性が高いことを示しており、来年度の研究の展開のペースを築くことかできた。

A 研究目的

近年、医薬品候補化合物などは膨大な数にのぼり、これらのほとんどはエストロゲン受容体 (ER) やアントロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体等のいわゆる核内受容体との相互作用か考えられている。特にエストロゲン (E2) 様あるいは抗 E2 様の作用を有すると考えられている医薬品化合物は、避妊や乳癌治療等を含め多岐にわたり応用性か考えられていることから、その数は多くのぼる。厚生労働行政に關与する内分泌攪乱作用を有する物質をみても、E2 攪乱作用を有すると考えられるものが大半である。これら E2 様の化合物の有害性を見分けるために、ER を介したリポーターシーケンアッセイシステム等を用いて、簡便に安全性か評価されている。

しかし、これらの化合物は ER を介した作用だけではないことか近年の研究から明らかとなってきた。Diethylstilbestrol (DES)

は、従来 ER とのみ相互作用すると考えられていたが、リガントか不明な核内受容体 (オーファン受容体) である Estrogen receptor related (ERR) に結合し、胎盤の幹細胞である Trophoblast stem (TS) 細胞の分化を變調させることか明らかにされた (Tremblay et al, 2001)。かつて流産防止薬として使用された DES は、実際は流産の増加を促していることが發覚し使用中止となった経緯をもつが、この流産増加の原因かオーファン受容体を活性化して胎盤細胞の分化を異常にしたことか明らかになったのである。このことから ER と相互作用すると考えられている化合物も、従来の ER との作用を検討するだけでは不充足であり、あらたな核内受容体との相互作用を想定する必要性か示された。今日、オーファン受容体の研究は、新たな薬剤を發見する可能性があることかから、創薬研究の一角をなしている。またトキンコゲノミクス研究にお

いても、各化合物に特有な遺伝子発現プロファイリングを整備するだけでなく、オーファン受容体との相互作用の解析が期待されているであろう。E2様の作用を有すると考えられている化合物の安全基準を定める上で、既知の受容体だけでなく、オーファン受容体を含めたあらゆる反応系を考慮に入れたメカニズム解析が不可欠である。

本研究は、Rcho-1細胞を用いて、新たな化合物の同定および新規核内受容体を介した新たな作用メカニズムを明らかにしていく。Rcho-1細胞はラット胎盤の迷路部から樹立された細胞株である (Faria et al, 1991)。分化能を有しており未分化細胞から巨核を有する巨細胞に分化を誘導することができ、ラットの胎盤から分泌されるプロラクチンファミリーはRcho-1細胞においても分化依存的に発現が誘導されることが知られている (Hamlin et al, 1994)。その発現様が胎盤の各妊娠ステーションのそれと類似していることから、*in vivo*の性質を反映している細胞株として知られている。DESかERRの結合により分化に影響を与えることが明らかにされた細胞は、TS細胞である。TS細胞

は胎盤細胞の全能細胞である (Tanaka et al, 1998)。TS細胞も同様に培養条件下で巨核細胞に分化し、分化依存的にプロラクチンファミリーを分泌する。このことからRcho-1細胞は全能性を有さないもののTS細胞とほぼ同じ遺伝子サブセットを有していると考えられる。胎盤細胞が生理活性物質の宝庫ともいえる一面を有していること、またTS細胞を用いてERRの存在が発見された実績を有すること、またTS細胞よりも取り扱いが簡便である利点から、Rcho-1細胞は、新規核内受容体を探索するには最良の細胞株であると考えられる。本研究ではRcho-1細胞を用いて、細胞の分化を指標に影響のある化合物を選別していくという独特のスクリーニングシステムを用いる。

本研究では、先ずERが発現していない胎盤の培養細胞 (Rcho-1) を用いて、様々な化合物をその作用様式により細分類化できるスクリーニングシステムの構築を行う。第一年次において、ルンフェラーゼ (Luc) を利用し細胞の分化を簡易に検出できる組換えRcho-1細胞の構築を行い、一度に多くの化合物を対照とし、分化に影響を与える

化合物の選定を行う。第二年次では、選定された化合物において DNA マイクロアレイ法を用いて特異的に誘導される遺伝子を明らかにする。遺伝子の発現変化のパターンをもとに、どの化合物が類似したメカニズムを介して作用しているのかを明らかにする。第三年次では、化合物に結合した核内受容体の多くは細胞内分布を変化させるという性質に着目して研究を行う。Rcho-1 細胞の核タンパクを二次元電気泳動法により分離し、化合物によって特異的な細胞内分布を呈するタンパク質の同定を行う。当初の計画では、第三年次にはアフィニティークロマトグラフィー法や共鳴プラスモン相互作用解析を用いて新規核内受容体の同定を行う予定であったが、研究方法の変更の理由は、本研究の主旨にのっとりかつ確実にデータを得られる研究の展開を行うためである。

昨年度である平成 14 年度には、Rcho-1 細胞の分化に影響を与える化合物の選定を行った。先ず組換え Rcho-1 細胞を樹立する目的で、ゲノミクウォーカー（クローンテック社）を用いて P450scc のプロモータ

一配列をクローニングし、それぞれ GFP のヘクターである pEGFP(クローンテック社) および Luc のヘクターである pGL3(プロメガ社) に組み込んだ。これらの組換えプラスミドを Rcho-1 に形質導入し、Rcho-1 の分化の測定に可能かどうかを検討した。その結果、P450scc が組み込まれた pGL3 (P450scc-Luc) か、Rcho-1 細胞の分化を鋭敏に捉えられることか明らかとなった。次に Rcho-1 細胞には ER が発現していないことを明らかにした。まず RT-PCR 法により Rcho-1 細胞には ER が発現していないことを確認した。次に P450scc-Luc を Rcho-1 細胞に形質導入し、そこから様々な化合物を 6 日間曝露し続けた後、プロモーターの活性を測定した。DMSO 溶媒液に比べ、10 nM のエストラジオール(E2)では影響は見られず、不応答性であることを確認した。Rcho-1 細胞はレチノイン酸 (RA) によって分化が誘導されることか知られているか、P450scc プロモーター活性を用いて分化の促進を調べると、RA によって約 2 倍上昇していることか確認された。同様に、この系を用いて様々な化合物の影響を調べた。人工の化合

物として、ノエチルステロイド（DES）、タモキシフェン（Tam）、ICI182,786（ICI）を、工業過程で生産される化合物として、フタル酸類である DEP、DBP、DPP、DOP、DINP、DCHP、BBP を、フェニルフェノール類である 2-PP、3-PP、4-PP を、また E2 様の作用を有すると考えられているビスフェノール A（BPA）、オクチルフェノール（OP）、ノニルフェノール（NP）を、農薬として 2,4-D、TCTP、DCPA、PBO を、殺虫剤として Carbaryl、Benomyl、Permethrin を用いた。その結果、DES、ICI、Carbaryl、フタル酸類や Permethrin が Rcho-1 細胞の分化に影響を与えることが明らかとなった。

本年度（平成 15 年度）は、化合物の中でも、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin を代表化合物として選定し、DNA アレイ解析を行う。RA は、レチノイン酸受容体を介して、Rcho-1 細胞の分化を誘導することが明らかとなっている。また DES は、ERR 受容体を介することが明らかとなっている。アレイ解析を通して発現変動する遺伝子をプロファイルすることにより、各化合物が、レチノイン酸受容体や DES 受容体を介して

作用しているのか、それとも別の核内受容体を介して作用している可能性があるのかを予測することが可能である。

B 研究方法

Rcho-1 細胞の培養

Rcho-1 細胞の培養は、基本的に以前の報告 (Faria et al, 1991, Ishimura et al, 2001) に従った。20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) を含む NCTC-135 (Sigma Chemical, St Louis, MO)、pH7.2 (50 μ M 2-mercaptoethanol、1mM sodium pyruvate、100U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin) で、95% air-5% CO₂、37°Cの湿気条件下で培養した。細胞は2日に1度継代し、100mmのティンシュ (Nunc Brand Products, Roskilde, Denmark) で、10ml のメEDIUM、10⁴/100mm の細胞密度の subconfluent の条件で維持した。分化を誘導する際には、10⁶/100mm (Nunc ティンシュ) または 1 x から 3.5 x 10⁴/10mm (Falcon 24 ウェルプレート) の細胞密度になるようにまき、この日を分化後 0 日目 (d0) と定めた。

化合物の種類および Rcho-1 細胞への曝露

本研究で用いた化合物は、RA, Retinoic acid, DES, Diethylstilbestrol, ICI, ICI182,780, Carbaryl, Permethrin である。それぞれの化合

物は、DMSOに20 mMになるように融解し、それを 2000 倍希釈になるように培地に添加し最終濃度が 10 μ M になるようにして曝露をおこなった。

Total RNA の精製

胎盤から Total RNA 分画を Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) により精製した。吸光度を測定し、Abs260/Abs280 の比率が 1.7~2.1 の RNA サンプルを使用した。

蛍光標識 cDNA の作製

本実験では比較したい検体 RNA を鋳型とし、逆転写反応により Cy3 または Cy5 を取り込ませ、蛍光標識 cDNA を合成した。蛍光標識 cDNA の作製には CyScript™ First Strand cDNA Labelling Kit (Amersham Biosciences 社製) を使用した。mRNA (0.5–2 μ g) に oligo (dT) primer、random nonamers、dUTP or dCTP nucleotide mix、CyDye™ –dUTP or –dCTP、および CyScript reverse transcriptase を加え、42°C、90 分間 インキュベートし、蛍光標識させた。その後、鋳型である mRNA を 2.5 M NaOH を加えて分解させた。CyDye labeled cDNA を CyScribe GFX Purification Kit) を用いて精製した。

ハイブリダイゼーション

DNA チップは、Rat 5K cDNA Microarray (日本レーザ電子(株)社製)を用いた。スライトガラス (DNA チップ) を 5×SSC 0.1%SDS、10mg/mL BSA で 42°C 0.5-1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。蛍光標識 cDNA 溶液 (15μL) に、5×SSC、0.1%SDS、50%Formamide を加え、DNA チップとハイブリダイゼーションを行った。その後、DNA チップを 42°C の 1×SSC、0.2% SDS 溶液および 0.1×SSC 溶液で洗浄を行った。DNA チップを GTMAS Scanα (日本レーザ電子(株)社製) でスキャンを行い、Array - Pro ANALYZER Ver4.0 (Media Cybernetics 社製) もしくは GCOS (アフィメトリクス社製) で解析を行った。

RT-PCR

Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて Rcho-1 細胞から Total RNA を抽出した。Total RNA 4 μg に 400 ユニットの SuperScript™ 逆転写酵素 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) と 10 μg の Oligo(dT)12-18 Primer を加え 20μl とし、42°C、

50min 逆転写反応をおこなった。0.5 μl の cDNA 産物に、1.25unit の Ex Taq™ ポリメラーゼ (Takara Bio Inc, Otsu, Japan)、1 x Ex Taq™ buffer、0.2 mM dNTP mixture、0.5 μl ずつの 20 pM forward primer と reverse primer を 25 μl の液量として PCR をおこなった。PCR の条件は以下のようにした。Initial denaturation step 94°C、5min、次に Denaturation 94°C、30min、Annealing 30sec、Extension 72°C、1min を所定のサイクル行い、Final extension step 72°C、7分間行なった。それぞれの遺伝子の mRNA 量を判定量化するための至適サイクル数は、ラットの胎盤全 RNA を使用した予備実験によって決定した。PCR 産物は 2%アガロースゲルで分離後、312-nm UV ランプ (ATTO Bioinstruments, Tokyo, Japan) を用いて画像として取りこんだ。

C 研究結果と考察

昨年度の解析から、様々な化合物の中でも DES、ICI、Carbaryl、フタル酸類や Permethrin が Rcho-1 細胞の分化に影響を与えることが明らかとなった。本研究では、Rcho-1 細胞の分化に影響を与える化合物か、同一の核内受容体を介して反応しているのかどうかを DNA チップを用いて明らかにすることを目的とする。Rcho-1 細胞に曝露する化合物は、昨年度の実験結果に基づき、DMSO (対照群)、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin を用いた。Rcho-1 細胞の分化開始日に、各種化合物を曝露させ、分化 6 日目に細胞を回収し、トータル RNA 画分を精製した。対照群として化合物を溶解させた DMSO を用いた。DMSO の対照群を Cy5 で、化合物を曝露した検体を Cy3 で標識し、アレイ解析を行った。アレイの画像解析結果を図 1 に示す。対照群より発現量の増加している遺伝子は、緑色に、減少している遺伝子は赤色に、発現量の変化しない遺伝子は黄色に検出された。

各化合物曝露により、発現量が増加している遺伝子および減少している遺伝子が確

認され、その代表的な遺伝子と、そのアレイスポットを図 2 に示した。例えば、Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric は、RA では緑色で発現量が増加していることを意味するか、その他の化合物では黄色で発現量に変化がないことを意味している。また Rat mRNA for CRP2 (cysteine-rich protein 2), complete cds は逆に、RA では赤色で発現量が減少していることを意味しており、他の化合物では変化がなかった。これらの遺伝子のうち、Rattus norvegicus DAD-1 gene、Rat mRNA for 140-kD NCAM polypeptide、Catalase、Rattus norvegicus purine specific Na⁺ nucleoside cotransporter (SPNT) mRNA、Rat mRNA for CRP2 (cysteine-rich protein 2)、Rattus norvegicus vascular endothelial growth factor mRNA、Rat low molecular weight fatty acid binding protein mRNA について、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin 以外に他の化合物 (TAM、BisA、NP、DBP、BBP) の曝露影響を含めて、RT-PCR 解析を行った。様々な反応のパターンが確認されたが、例えば Rattus norvegicus purine specific Na⁺ nucleoside cotransporter (SPNT) mRNA や Rat

mRNA for CRP2 (cysteine-rich protein 2)は、他の化合物が反応していないのに対し RA のみで反応していた。RA はレチノイン酸受容体を介して反応するか、この結果は、他の化合物がレチノイン酸受容体を介していない可能性が大きいことを示唆している。

図 4 には、化合物の投与により発現量の変化した遺伝子を発現変化の大きい遺伝子からリストアップした。ここでは、ICI により発現変化をするものを中心に示し、ICI 以外の RA、DES、Carbaryl、Permethrin の化合物により発現変化をする遺伝子を併記した。

各化合物における遺伝子発現のクラスタリング解析を行った。ICI と Carbaryl は、類似した発現パターンを示すことか明らかとなり、DES および RA のパターンとは異なることか示された。Rcho-1 細胞には、ER が発現していない (昨年度結果)。また DES は、オーファン受容体である Estrogen receptor related (ERR) に結合することか明らかにされた (Tremblay et al, 2001)。異常の結果は、ICI と Carbaryl による作用は、レチノイン酸受容体や ERR β 受容体を介さない

可能性が考えられた。

来年度は、ICI と Carbaryl に特異的におきるタンパク質の変化を明らかにし、新規核内受容体の同定に挑む。多くの核内受容体はリガントに結合後、細胞質から核内へなと、細胞内分布を変化させることか知られている。来年度は、RA、DES、ICI および Carbaryl に曝露した Rcho-1 細胞の核画分のタンパクを精製し、二次元電気泳動で ICI および Carbaryl に特異的に増減を示すスポットのタンパク質を検出し、同定することを目的とする。

D 結論

本研究では、RA、DES、ICI、Carbaryl、Permethrin の化合物を用いて、それぞれの化合物が Rcho-1 細胞に影響を与える際に、同一の核内受容体を介しているかどうかについて、DNA チップを用いて解析を行った。クラスタリング解析を行ったところ、ICI と Carbaryl は、類似した発現パターンを示すことが明らかとなり、DES および RA のパターンとは異なることが示された。すなわち、ICI と Carbaryl による作用は、レチノイン酸受容体やERR受容体を介さない可能性が高いことが明らかとなった。

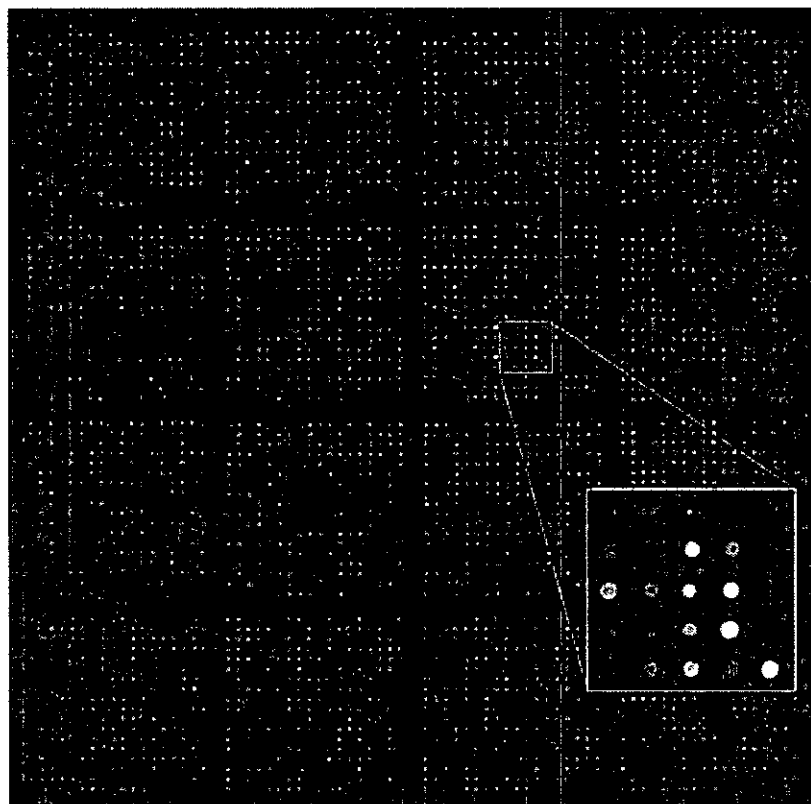


図1
アレイチップ画像。対照群のRNAはCy5(赤色)で、化合物曝露群のRNAはCy3(緑色)で標識を行った。ここでは、RAの例を示す。また一部のエリアを拡大した。スポットの色が、赤、黄色、緑で標識されており、それぞれ遺伝子の発現が、減少、無変化、増加していることがわかる。

Spot location	A	B	C	D	E	Gene name
1- 5- 1						Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
1- 9- 4						Rattus norvegicus C4 complement protein mRNA,
2- 3- 4						Rattus norvegicus DAD-1 gene
3-17- 1						Catalase
5- 5- 1						Rat mRNA for CRP2 (cysteine-rich protein 2), complete cds
5-14- 5						Rat low molecular weight fatty acid binding protein mRNA, complete cds
5-17- 6						Rat mRNA for 140-kD NCAM polypeptide
6-10- 6						ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1 polypeptide
6-14- 5						Rattus norvegicus purine specific Na+ nucleoside cotransporter (SPNT) mRNA, complete cds
7- 5- 4						R norvegicus mRNA for C-CAM2a isoform
7-13- 4						Dynamin 2
8-10- 4						Peroxisomal membrane protein 1
8-11- 1						Rattus norvegicus vascular endothelial growth factor mRNA, partial cds
8-15- 2						Rat testis-specific farnesyl pyrophosphate synthetase mRNA, complete cds
9- 1- 2						Rat alpha-tropomyosin 2 mRNA, complete cds
10-10- 5						Rattus norvegicus frizzled related protein frpAP mRNA, complete cds
10-17- 2						R norvegicus 3 2 3 antigen protein mRNA, complete cds
13- 6- 5						Rat nucleoside diphosphate kinase mRNA, complete cds
14- 1- 3						O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
14- 1- 5						Phospholipase C (BETA4)
16- 2- 1						Rat thymosin beta-4 mRNA, complete cds
16- 4- 4						Annexin 1 (p35) (Lipocortin 1)

A RA B DES C ICI D Carbaryl E Permethrin

図2

各種化合物の曝露により発現変化のあった代表的な遺伝子およびアレイチップ画像。スポットの色が赤は遺伝子の発現が増加していること、緑色は減少していること、黄色は変化がないことを意味している。

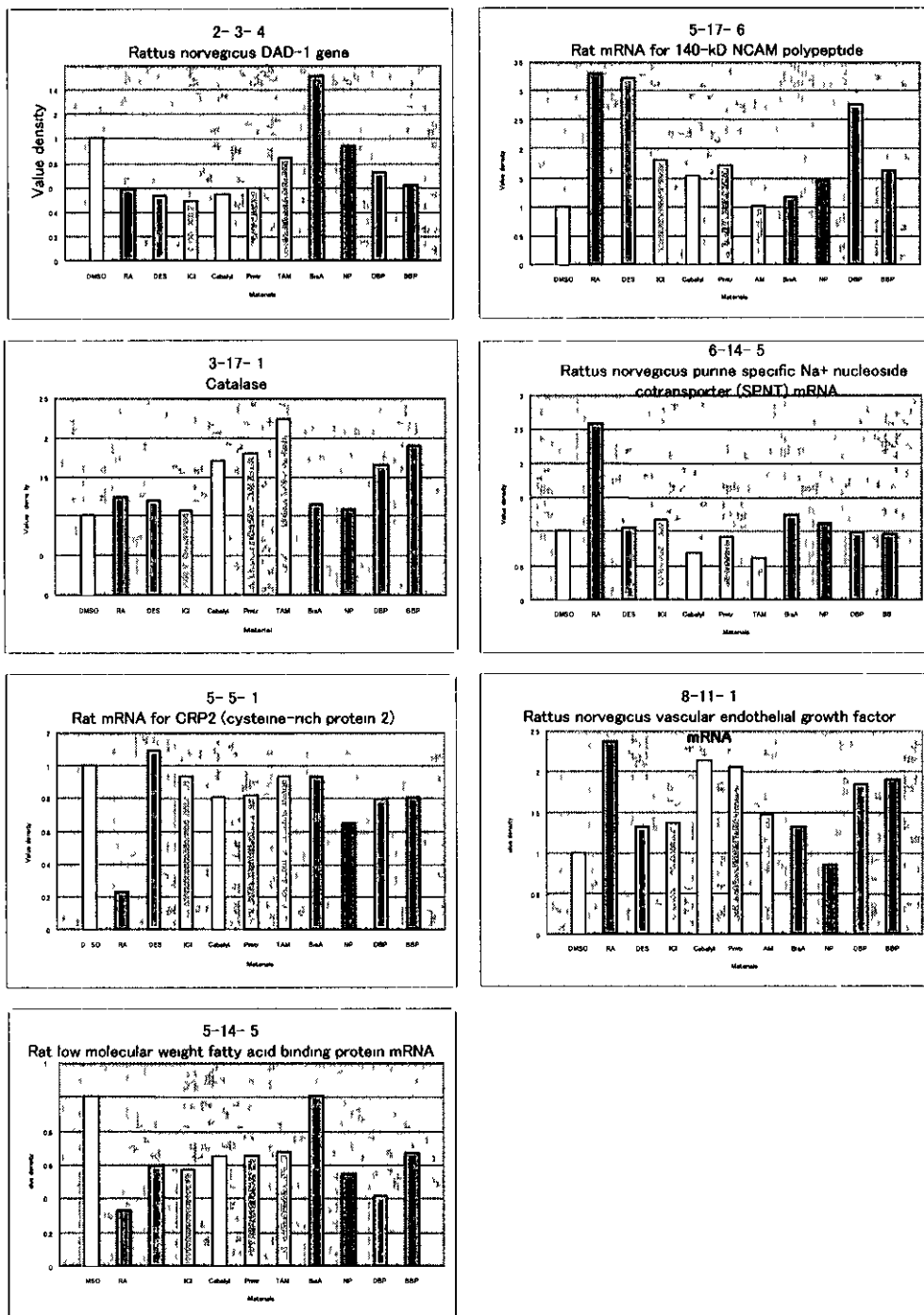


図3
 各種化合物の曝露により発現変化のあった代表的な遺伝子について、他の化合物()の曝露を含めてmRNAの変化についてRT-PCR解析を行った。Rcho-1細胞の分化開始時から化合物を6日間曝露し、mRNAを回収してPCRを行った。アガロース電気泳動後、画像を取り込みデンストメーターでバンドの相対濃度を測定し、グラフ化した。

Bioc	Colu	Row	Name	Accession	RA	DEG	ICI	Carb	Phn
4	10	2	Benzodiazepin receptor (peripheral)	AA875456	3461685	4602753	5463024	4685393	4008853
16	9	1	Rattus norvegicus mRNA for class I beta-	AA859888	3808355	4999965	5321049	4244003	3246013
8	4	8	ESTs Weakly similar to Similarity to h	AA818212	3630740	4430943	4720166	4178113	3547265
10	5	3	Rat mRNA for ribosomal protein S10	AA825325	3428709	4855303	4701555	4528095	3862517
2	7	3	Rattus norvegicus mRNA for DPM2 complet	AA875349	3024394	3781887	4308927	4125406	3450647
1	4	2	Rat GTP cyclohydrolase I mRNA, comple	AA859496	3490154	3404211	4188865	4557082	3917493
7	11	4	Rattus norvegicus syntasin 5 mRNA compl	AA896882	3096239	3258854	4054213	3484196	296638
2	5	2	Rat mRNA for ribosomal protein L5	AA900622	3445965	3676741	3862429	4301004	3739032
2	12	9	ESTs	AA818810	2337417	3273977	3694362	3717038	3192931
10	9	1	ESTs Highly similar to 40S RIBOSOMAL PR	AA818840	291223	3709182	3575013	3585136	3111501
10	1	13	EST	AA901179	2531991	3398993	3384406	3029257	2931186
10	11	8	Rattus norvegicus cytokeletin-18 mRNA p	A072634	2004517	2715535	3346148	3059376	2671125
7	9	10	ESTs	AA818715	4602324	3331489	3319859	214514	2819746
3	1	8	R norvegicus mRNA for histone H3.3	A070100	1772981	2287221	3300215	2989532	2692034
8	12	1	Rat PYBP2 mRNA for pyrimidine binding pr	AA818247	2164803	1779048	2483224	2430583	2342836
5	18	2	afatoxin B1 aldehyde reductase	AA823866	4282221	2728158	318849	2761428	2480429
16	1	6	EST	A1145709	2719882	2843528	3157887	3390015	302257
5	10	4	Parathyroid like peptide	AA996947	2817547	3000375	3116966	2995123	2524892
6	16	8	ESTs	AA818658	2899854	3369778	308909	2851845	2793689
6	2	2	Rat mRNA for polyubiquitin (four repeti	AA875068	2581672	2816403	2990559	2752211	2418541
4	18	8	EST	AA818632	194519	238392	2989346	2499027	205408
15	6	2	Heme oxygenase	AA874884	3492987	279461	2977525	1934532	1802708
12	13	12	ESTs	AA899304	350397	2976646	2946331	1854365	1907824
16	1	2	Rattus norvegicus tropomyosin non-muscle	AA859305	3277742	3010431	2929832	2094897	2624646
16	4	9	EST	AA818819	3117971	2466852	2882827	2895469	2364993
11	7	12	ESTs Weakly similar to (define not ava	AA875541	2052547	2505559	2877034	2820749	2361447
16	14	18	ESTs	AA924495	3128134	1248018	2851011	2399005	2139135
4	14	13	EST	AA899809	1869881	1492383	2804246	2225369	1677032
12	8	4	Rattus norvegicus ovalbumin upstream pro	AA997437	2174326	2225226	28008	2607933	1808272
14	5	12	EST	AA875647	2589773	289697	271002	260217	2380072
3	6	3	R norvegicus (Sprague Dawley) ribosomal	AA924882	1594914	2289176	2634795	2292469	1844341
15	13	1	Rattus norvegicus mRNA for thiol-specific	AA859864	2184325	2063882	2622004	2053843	1784787
2	2	2	R norvegicus (Sprague Dawley) ribosomal	AA859756	185555	2445579	2591915	2758864	1939843
14	8	6	R norvegicus mRNA for coupling factor 6	A1145606	2515131	2387268	2664513	2728492	2163512
1	5	1	Actin gamma 2 smooth muscle enteric	AA817767	2117121	2164889	2558976	2243972	1958269
10	1	5	Nestin	A1030685	4100068	3518258	254881	1688506	1742418
9	10	12	ESTs	AA899076	2934027	1723987	2546096	1591535	1380631
13	11	2	R norvegicus insulin-like growth factor	AA899788	206143	2094961	2541739	2915226	232183
11	4	7	ESTs Highly similar to MEK binding part	AA900195	3007323	2065529	2533673	1798258	1843504
2	2	18	ESTs	AA855252	2858251	2698862	2532806	2047314	2047119
15	5	6	Rat mitochondrial ATP synthase beta subu	A1146173	1754592	2090469	2511231	247885	2245418
14	10	5	Rattus norvegicus interferon inducible p	A1059807	1904376	2600478	2508429	2690863	232531
7	6	13	EST	AA900901	2262475	2085275	2506771	2015928	2003634
4	3	15	ESTs	AA923834	2091589	2724289	249193	2534002	2162136
3	9	18	EST	AA926300	1358881	1849408	2485215	1681757	1589237
3	8	1	Rat mRNA for phosphonitide-specific p	AA819818	3528443	2216966	2474339	2016738	2134414
3	6	18	ESTs	AA855237	2561972	2784103	2457961	2051637	2083794
9	12	1	ESTs Highly similar to ADENYL CYCLAST	AA875550	2544952	2523838	2422319	2920681	2263122
1	9	4	Rattus norvegicus C4 complement protein	AA965125	3194132	2608869	2419768	1759794	1754805
7	18	1	Rat ferritin light chain subunit, mRNA	AA818472	1587855	2066805	2409832	1984889	1742358
8	6	1	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-m	AA858857	2258309	1845782	2388993	2141696	1856039
12	14	14	EST	AA923998	1915649	1842565	2366795	2382375	2165808
12	7	1	R norvegicus mRNA for ribosomal protein	AA818709	1708875	2128978	2363085	2471247	1989555
6	13	2	Rattus norvegicus Tolone4 mRNA	AA823884	2461149	2280331	2380012	2046155	1988443
16	13	3	Rattus norvegicus brain-enriched guanya	AA857534	2329285	2311649	2356654	1989551	181912
16	3	8	ESTs Weakly similar to (define not ava	AA859035	2343269	2008611	2356412	2624	2245425
16	12	11	ESTs	AA875314	2028828	2094501	2352122	2027248	2065765
7	2	13	EST	AA900084	1535181	2229572	2349373	2410372	1990021
11	1	2	Rat testis-specific farnesyl pyrophospha	AA859192	1703941	1851423	234777	2154254	1753032
9	11	16	EST	A117940	0870322	0861962	2342691	0849302	1024937
12	9	12	EST	AA899067	2408811	189236	2321082	1315314	1522506
11	8	3	Rattus norvegicus Sprague-Dawley lipid-b	AA955423	0753745	1248548	2313983	1794244	185328
1	1	5	R norvegicus mRNA for (S)-2-hydroxy acid	A1029336	1598876	2388318	2274112	2059307	1821824
12	2	2	Rat mRNA for ribosomal protein S8	AA874997	2140672	2324723	2266043	2544387	2161179
4	7	3	Delta - aminolevulinic acid dehydratase	AA925996	1965302	1729753	2257281	1607352	1736769
15	17	12	ESTs	AA899243	2218013	2355689	2256321	1806651	207108
9	18	12	ESTs	AA899309	2712155	2136426	2250119	2186552	2083271
3	4	13	ESTs	AA899771	1727351	1358483	2244261	1636125	1409188
1	15	12	ESTs	AA899136	095937	0853305	224159	1011568	080384
12	9	2	Rattus norvegicus transcription factor (AA901168	2168669	237073	2236789	2104709	228437
8	5	2	Rat gene encoding cytoplasmic beta-actin	AA859846	1730648	2260489	2230062	1835599	1580447
8	1	6	Rat insulinoma nig mRNA, encoding a puta	A1029368	1514724	2111298	2220235	2098681	184885
13	10	13	ESTs	AA899699	2148856	2348999	2215018	2552018	2198918
16	8	18	ESTs Moderately similar to JTY-1 PROTEI	AA825155	1518889	1727909	221089	1879401	2020459
1	5	9	ESTs	AA819707	0608414	0521085	2207851	0959276	0742667
3	3	2	Cathepsin L	AA859498	349516	2396825	220516	1439779	1492369
15	7	11	ESTs	AA900391	1506837	1789532	220334	2671673	2363386
10	13	1	ESTs Highly similar to TUBULIN BETA CHA	AA899219	2138252	2612678	219698	1874919	1710586
9	18	7	ESTs	AA818078	0724404	1184645	2196328	1711572	1735204
15	14	7	ESTs	AA817976	1638329	2223399	218815	2182155	1761735
16	6	12	ESTs	AA875660	2215831	2338124	2188221	2118696	1887844
14	9	11	ESTs	AA875312	1990964	2239959	2166606	2187585	2008394
8	15	3	Early growth response 1	AA956793	1620636	1542828	2164602	1632191	1438703
5	5	4	R norvegicus mRNA for calpastin I heavy	AA964578	2254045	2765249	2162401	2522897	23303
10	2	1	Rattus norvegicus Sprague Dawley protein	AA859083	1639696	2123724	2158881	2128089	1778679
3	18	12	ESTs	AA899160	1404539	1303325	2155015	201311	144666
5	15	14	ESTs	AA901378	2278458	1939525	2145732	1631663	160146
13	6	10	ESTs	AA818768	2151747	1651167	2137472	2188469	1889892
2	3	2	Rat lung beta-galactoside-binding lectin	AA859689	3008302	3231745	137108	1940133	1470082
16	7	4	Rat mRNA for MRC OX-45 surface antigen	AA897842	154758	1395809	136016	182377	182975
15	11	2	Lysosomal associated membrane protein 1	AA899808	0487339	0388271	2122624	0355668	0424687
12	18	12	ESTs	AA899331	2392288	1896096	2122316	1835291	1876204
3	9	4	Organic cation transporter	AA865127	1600139	2091221	211501	2283995	1942778
1	7	1	Basigin (Ox47 antigen or CE-9) (EMMPRN	AA819719	1419728	183219	2108919	2417653	2089472
2	12	18	ESTs	AA926327	4047126	3505948	2090587	1244135	1555791
1	9	2	Rattus norvegicus mRNA for 41-kDa phosph	AA899376	1499188	2145824	206774	2393588	2100524
7	6	1	Rat mRNA for cytochrome c oxidase subuni	AA818226	1931927	2132403	2082807	1669286	1997824
10	17	17	EST	AA925031	1608973	18593	2042974	208309	1582545
4	8	8	Rat ras-related protein mRNA, clone NTRA	A1070818	2002701	1444606	2030902	1416262	1550385
4	12	16	ESTs	AA824569	1416746	1347697	2028714	1265656	1758334
2	10	1	Rattus norvegicus cyclophilin B mRNA co	AA818487	2364897	2006455	2024504	1491608	1487888
11	15	16	ESTs Highly similar to Wdr1 protein [M	AA925703	1593563	1767623	2002853	1889135	1731009
12	7	13	ESTs	AA899578	2487721	1791291	2000297	1344947	1265032
8	10	14	EST	AA901085	1861783	1823409	2000285	2128889	1982816

図4

化合物の曝露により発現変化のあった遺伝子のリスト。ここでは、ICIの曝露により2倍以上に発現量が変化した遺伝子をリストし、他の化合物での発現変化との比較表示を行った。

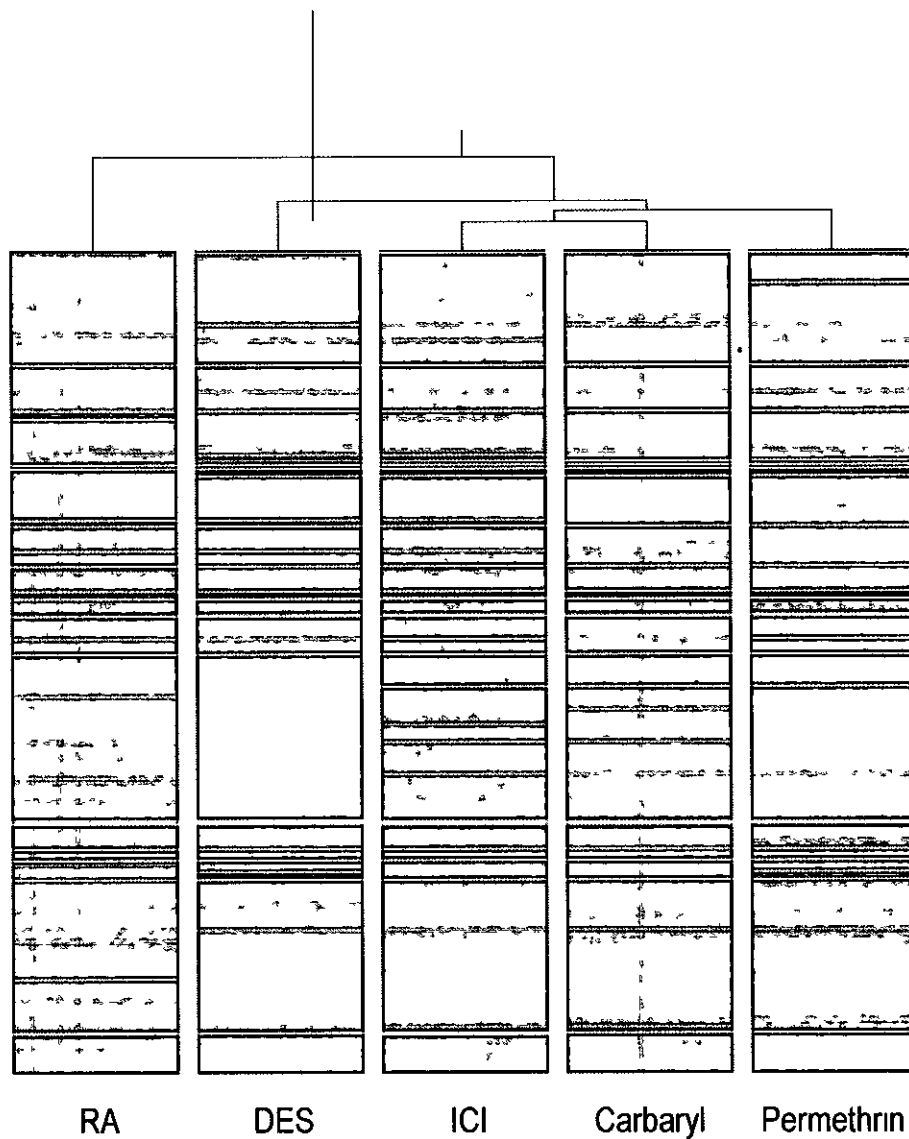


図5
 各種化合物に曝露した検体のDNAチップ解析のクラスタリング解析。ICIとCarbarylが最も類似した遺伝子発現変化のパターンを示し、次にPermethrin、そしてDESの順に類似性を示し、最もRAと

E 参考文献

Faria, T N, and Soares, M J (1991)

Trophoblast cell differentiation establishment, characterization, and modulation of a rat trophoblast cell line expressing members of the placental prolactin family *Endocrinology* **129**, 2895-906

Hamlin, G P, Lu, X J, Roby, K F, and Soares, M J (1994)

Recapitulation of the pathway for trophoblast giant cell differentiation in vitro stage-specific expression of members of the prolactin gene family *Endocrinology* **134**, 2390-6

Ishimura, R, Yoshida, K, Kimura, H, Dohmae, N, Takio, K, Ogawa, T, Tanaka, S, and Shiota, K (2001)

Stage-specific modification of G protein beta subunits in rat placenta *Mol Cell Endocrinol* **174**, 77-89

Tanaka, S, Kunath, T, Hadjantonakis, A K, Nagy, A, and Rossant, J (1998)

Promotion of

trophoblast stem cell proliferation by FGF4

Science **282**, 2072-5

Tremblay, G B, Kunath, T, Bergeron, D,

Lapointe, L, Champigny, C, Bader, J A,

Rossant, J, and Giguere, V (2001)

Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR beta *Genes Dev* **15**, 833-8

F 健康危機情報

なし

G 研究発表

誌上発表

Ishimura R, Ohsako S, Kawakami T, Sakaue M,

Aoki Y, Tohyama C

Altered protein

profile and possible hypoxia in the

placenta of

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed rats *Toxicol Appl Pharmacol*

- 2002,185(3) 197-206
 Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Ishimura R,
 Kakeyama M, Izumi H, Yonemoto J,
 Tohyama C Developmental
 stage-specific effects of perinatal
 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
 exposure on reproductive organs of male
 rat offspring Toxicol Sci
 2002,66(2) 283-292
- Ishimura R, Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M,
 Kawakami T, Aoki Y, Yonemoto J,
 Tohyama C Increased glycogen content
 and glucose transporter 3 (GLUT3)
 mRNA level in the placenta of Holtzman
 rats after exposure to
 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
 Toxicol Appl pharmacol
 2002,178 161-171
- Sakaue M, Ishimura R, Kurosawa S, Fukuzawa
 HN, Kurohmaru M, Hayashi Y, Tohyama
 C, Ohsako S Administration of
 estradiol-3-benzoate down-regulates the
 expression of testicular steroidogenic
 enzyme genes for testosterone production
 in the adult rat J Vet Med Sci
 2002,64(2) 107-113
- H. 知的所有権の取得状況
 なし