

(3) (OECD 対応等試験開発部門)

1.2. 臓器特異的ハイスループット検出系開発のための網羅的な遺伝子発現解析

分担研究者 高木 篤也

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部 主任研究官

研究要旨 本研究では、様々な臓器に対する内分泌かく乱化学物質のホルモンかく乱作用をとりこぼしなく解析するハイスループット検出系を構築することを目的に、子宮、視床下部を始めとする5種類の臓器を選び、内分泌かく乱化学物質による遺伝子発現変動パターンを網羅的に解析する。今年度は、Bisphenol A (BPA)、Genistein (GEN)を選び、5種類の臓器における遺伝子発現変動について検討した。その結果、BPA、GENが子宮において多数の遺伝子の発現変化を引き起こすこと、それらの遺伝子にはエストロゲンによって早期に変動する遺伝子群が含まれていることが明かとなった。また、子宮以外の臓器ではこれらの物質による発現変動は比較的少数に留まった。以上より、対象とする臓器によってはサンプリング部位の検討等が必要ではあるが、網羅的遺伝子発現変化解析を化学物質の内分泌かく乱作用の有無の判定に用いることが実際に可能であることが示された。

A. 研究目的

極低用量の内分泌かく乱化学物質の生体影響は、明確な症状として捉えにくいと予想される。一方で、内分泌かく乱化学物質は核内レセプターを介した遺伝子発現変動を引き起こすことから、遺伝子発現変動を測定し、内分泌かく乱化学物質の生体影響を把握する試験系の開発が可能である。内分泌かく乱化学物質の影響は全身に渡る可能性があることを考慮すると、そのような試験系は、様々な臓器への影響の予測が可能であることが理想的である。そのため

には各臓器における性ホルモンによる遺伝子発現変動の基礎データが必要である。

そこで本研究では、子宮、肝臓、腎臓、視床下部、海馬等において、性ホルモン依存的に発現変動する遺伝子群を網羅的に拾い出し、各臓器における性ホルモンの影響の有無を評価する遺伝子群として選択、分類する。それらの情報を元に、化合物の内分泌かく乱作用をとりこぼしなく解析するハイスループット検出系の構築を目指す。

B. 研究方法

化学物質 in vivo 暴露

17 β -estradiol (E₂) はコーンオイルに溶解し、卵巣摘出術後 2 週間経過した後、体重 1kg 当たり 0.3 μ g を皮下投与した。BPA、GEN は DMSO とコーンオイルの混液に溶解し、同様に各々体重 1kg 当たり 70mg、25mg を皮下投与した。2、24 時間後に各臓器を採取した。溶媒対照群としてコーンオイル投与群、DMSO とコーンオイル混液群を置いた。また、動物の飼育には、植物性エストロジェンを除去した飼料 (PLD 飼料) を用いた。

マウス組織からの RNA の分離精製

組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化した。4°C、一晩静置した後、RNA 抽出操作まで -80°C にて保存した。RNAlater を除いた後、RNeasy kit (キアゲン社) 添付の RLT buffer を用いて組織破砕液を調製し、DNA 定量用蛍光試薬である Picogreen を用いて、破砕液中の DNA 量を測定した。DNA 量に応じて、Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の mix) を添加し、TRIzol を用いて粗抽出した液を RNeasy kit を用いて全 RNA 精製した。得た全 RNA の 0.5 μ g を電気泳動し品質を確認した。

GeneChip 解析

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、全 RNA 5 μ g を T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製した。得た cDNA

をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (アフィメトリクス社) を用い、ビオチン化 CTP, UTP を共存させつつ cRNA を合成した。二本鎖 DNA および cRNA 精製にはアフィメトリクス社の GeneChip sample cleanup module キットを用いた。得られた cRNA を 300-500bp となるよう断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し GeneChip ターゲット液とした。GeneChip は MOE430A を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 16-18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンして発現値データを得た。データ解析に際しては、Spike RNA のシグナル値を元に、各遺伝子のシグナル値を DNA 当たりの値に変換し絶対値化した値を用いた解析を行った。

C. 研究結果

昨年度まで、E₂ による子宮、肝臓、腎臓、視床下部、海馬の遺伝子発現変動について検討した。今年度は、他の化合物について、臓器毎に遺伝子発現変化を検討した。目的は、(1) 網羅的遺伝子発現解析によるエストロジェン様作用判定の可否：子宮を対象に検討、(2) 子宮以外の臓器に対する化合物による遺伝子発現変動の比較、に絞った。化合物としては、BPA、GEN を選び、投与濃度は各々 70mg/kg、25mg/kg とし、DMSO を 10% 含むコーンオイルを溶媒として用い、皮

下投与した。この濃度は E_2 0.3 μ g/kg と同等の子宮肥大反応を示す濃度として選んだ。投与後のサンプリング時間は2時間、24時間とし、投与後早期と後期のパターンを解析した。

1) 子宮における BPA、GEN の遺伝子発現変動比較

子宮における BPA、GEN による遺伝子発現変動を検討した。両化合物共に2時間、24時間で多数の遺伝子に発現変動を示した。特に、24時間では RNA 合成が全体的に亢進していることを示す結果（大多数の遺伝子発現シグナル値が上昇）が得られた。また、昨年度までの検討で明らかになった E_2 によって子宮で早期に発現が変動する遺伝子群（VEGF、c-Fos 様の反応）が、2時間で発現変動を示した遺伝子群に多数含まれており、BPA、GEN はエストロゲン様作用を子宮で発揮していることが遺伝子発現プロファイルの面からも示唆された。ただし、発現変動が BPA、GEN の間で異なる遺伝子も見いだされ、これらの遺伝子が BPA、GEN 特有の作用を担う可能性もあり注目された。

2) 子宮以外の臓器における BPA、GEN による遺伝子発現変化

次に、他の臓器、肝臓、腎臓、視床下部、海馬、での遺伝子発現変動解析を行った。その結果、BPA、GEN は今回の実験条件においては肝臓、腎臓に対してほとんど発現変化を引き起こさないことが明らかとなった。海馬、視床下部に対しては少

数の遺伝子の発現変化を引き起こした。特に海馬では BPA、GEN ともに Transthyretin の発現上昇が24時間で見いだされた。以下で、各臓器についての解析結果を補足する。

I) 肝臓

BPA、GEN ともに2時間、24時間で大きく発現変動する遺伝子は見いだされなかった。BPA の24時間で少数の遺伝子群の発現が上昇していた。これらには、thyroid hormone responsive SPOT14 homolog、serum amyloid A2、cytochrome P450 3a41、lipocalin 2、orosomucoid 2、fatty acid binding protein 5、methionine adenosyltransferase II alpha 等が含まれていた。なお、GEN の24時間でも cytochrome P450 3a41 の発現は上昇していた。この遺伝子の発現制御については、growth hormone による制御についての報告があるのみである。

II) 腎臓

肝臓同様、BPA、GEN ともに大きな発現変動は引き起こさなかった。少数見いだされた発現が変動した遺伝子は EST が多く、それらの遺伝子群から化合物の腎臓に対する作用を予測するのは現状では困難であると思われた。

III) 視床下部

肝臓や腎臓よりは変動した遺伝子数は多かったが、少数に留まっていた。変動した遺伝子は EST がほとんどで、それらの遺伝子群から化合物の視床下部に対する作用を予測するのは現状では困難であると思われた。

IV) 海馬

子宮以外の臓器では最も多くの遺伝子の発現が見られた臓器であった。それらは、Transthyretin、Folate receptor1、Klotho、ATPase H⁺ transporting lysosomal V0 subunit a1、angiotensin converting enzyme、claudin 2、Phosphodiesterase 2、ABCI、Rho GTPase activating protein 6 等であった。この中で、Transthyretin は甲状腺ホルモンの担体であり、これらの化合物が海馬において Transthyretin の発現を上昇させ、甲状腺ホルモン作用をかく乱する可能性が示唆され、注目される。

D. 考察

E₂ と同等の子宮肥大反応を示す用量の BPA、GEN による 5 種類の臓器の網羅的遺伝子発現変動解析を行った。子宮では BPA、GEN とともに多数の遺伝子発現変動を引き起こし、それら遺伝子群に E₂ 投与後早期に発現変動する遺伝子群が含まれていたことから、子宮を用いれば BPA、GEN のエストロゲン様作用を網羅的遺伝子発現解析手法によって判定可能であることが示されたと考えられる。他の臓器では子宮とは異なり、BPA、GEN で発現変動する遺伝子は少数に留まった。海馬ではより多くの遺伝子が発現変動し、Transthyretin のような甲状腺ホルモンとの関連を示唆する遺伝子群が含まれていたが、多くは EST であり、遺伝子名から機能に関する情報を得ることができなかった。今後世界的に遺伝子機能に関する

情報の整備が進めば、これら遺伝子の名称から、各臓器での作用を推測することが可能になる可能性があるが、現状では困難である。また、子宮以外の臓器ではエストロゲン様化合物に反応して遺伝子発現変動を示す細胞群が小範囲に局限している可能性が考えられ、今後の検討課題である。

E. 結論

網羅的遺伝子発現解析手法は子宮におけるエストロゲン様作用予測に有効に用いることが可能であることが本研究で示された。一方、他の臓器では、臓器全体を用いた解析では化合物によって発現変動を示す遺伝子数が少ないことがわかり、作用予測に用いるには測定対象とする部位を限定するなどの工夫が必要であることが示唆された。いずれにしても、網羅的遺伝子発現解析手法によるハイスループット検出系の構築は可能であることが確認された。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1) 書籍

高木篤也、ヒト全 MHC 遺伝子導入マウス、ヒト型モデル動物、pp79-82、井上達、野田哲生、野本明男編集、シュプリンガーフェアラーク社、2002。

2) 雑誌

Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A.,

Takeda H., Inoue T. and Saga Y.,
Transcriptional regulation of Mesp 1
and Mesp 2 genes: differential usage
of enhancers during development,
Mechanisms of Development, 108 59-
69, 2001. Takahashi. Y.,

2. 学会発表

Assessment of the cleft palate
induction by seven PCDD/F congeners in
the mouse fetus.

Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko
Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto Ema
and Jun Kanno, The 23rd International
Symposium on halogenated
Environmental Organic Pollutants
and POPs. USA, August 2003

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

特になし

1.3. 子宮肥大および Hershberger 試験に関する研究

分担研究者 ○小野 宏、太田 亮、宮原 敬、丸茂秀樹
(財)食品薬品安全センター秦野研究所 常務理事・所長

研究要旨：OECD バリデーションプロトコールに従い、エストロゲン様作用の疑われる化学物質について、卵巢摘出マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。その結果、20 物質中 10 物質でエストロゲン作用または抗エストロゲン作用を示す結果が得られた。また、bisphenol A のマウス子宮肥大試験を実施した結果、bisphenol A はエストロゲン存在下では抗エストロゲン作用を示すことが明らかとなった。今回の試験結果から OECD が提唱したプロトコール案は、マウスを用いた場合でも有効であり、子宮肥大試験では、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方を検査する必要があると結論された。

A. 研究目的

子宮肥大試験についての国際的なバリデーションは、ラットを用いて実施されてきた。昨年度は、マウスを用いる子宮肥大試験の検証を目的として、エチニルエストラジオール（以下、EE と略記）による子宮重量増加の用量依存性を、幼若マウスおよび卵巢摘出マウスを用いて実施し、ラットを用いた試験結果と比較検討した。その結果、EE に対する感度の差は殆ど認められなかった。そこで、今年度は、OECD バリデーションプロトコールに沿って、エストロゲン作用の疑われる既存化学物質について、卵巢摘出マウスを用いた子宮肥大試験を実施した。

B. 研究方法

B.1. 被験物質の投与量は、毒性予備試験の結果から設定した。すなわち、C57BL/6J 系雌マウスを用いて 100、300 お

よび 1000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、3 日間反復投与し、死亡が認められなかった最高用量を子宮肥大試験の最高用量とした。100 mg/kg/day でも死亡が認められた場合は、さらに低い用量を設定して、死亡が認められない用量を求めた。子宮肥大試験は、卵巢摘出した C57BL/6J 系マウスを用いた。エストロゲン作用を調べる目的で 5 用量の被験物質投与群（溶媒対照群を含む）、陽性対照群、さらには抗エストロゲン作用を調べる目的で EE を投与し、同時に 5 用量の被験物質を投与した群（溶媒対照群を含む）を設定した。投与量の公比は約 3 とした。投与経路は、経口と皮下の 2 種類を実施した。被験物質の投与は、1 日 1 回、7 日間にわたり反復して行い、最終投与の約 24 時間後に屠殺し、子宮の重量を測定した。

B.2. 卵巢摘出した C57BL/6J 系マウスに、

bisphenol A を皮下投与して、エストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用を示すか否かを検討した。エストロゲン作用を調べる目的で、10~300 mg/kg/day を単独投与した群、陽性対照として 0.2 μ g/kg/day の EE を皮下投与した群、さらには抗エストロゲン作用を調べる目的で 0.6 μ g/kg/day の EE を皮下投与し、同時に 10~300 mg/kg/day の bisphenol A を併用投与した群を設けた。投与期間は 7 日間とし、最終投与の 24 時間後に致死させ、子宮重量を測定した。

B. 3. B. 1. のマウス子宮肥大試験では、子宮重量を変化させる最小有効用量が求まらなかった 2-[bis(4-hydroxyphenyl)methyl]benzyl alcohol(以下、BHPMBA)について、さらに用量を下げ、子宮肥大試験の追加実験を行った。エストロゲン作用を調べる目的で、1~30 mg/kg/day を単独投与した群、陽性対照として 0.2 μ g/kg/day の EE を皮下投与した群、さらには抗エストロゲン作用を調べる目的で 0.6 μ g/kg/day の EE を皮下投与し、同時に 1~30 mg/kg/day の BHPMBA を併用投与した群を設けた。投与期間は 7 日間とし、最終投与の 24 時間後に致死させ、子宮重量を測定した。

C. 研究結果

C. 1. 化学物質について、マウス子宮肥大試験を実施した結果、エストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用のいずれかを示した物質は、20 物質中 10 物質 (50%) であった。そのうち、抗エストロゲン作用のみを示した物質は 10 物質中 6 物質

(60%)、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方を示した物質は 4 物質 (40%)、エストロゲン作用のみを示した物質はなかった。投与経路では、経口と皮下の両方で反応がみられた物質は 10 物質中 5 物質 (50%)、皮下のみが 3 物質 (30%)、経口のみが 2 物質 (20%) であった。子宮重量を変化させる最小有効用量は、30 mg/kg 以下が 3 物質 (30%)、100 mg/kg が 4 物質 (40%)、300 mg/kg 以上が 3 物質 (30%) であった。

C. 2. bisphenol A について、マウス子宮肥大試験を実施した結果、単独投与群 (Fig. 1) では用量が増加するに従って子宮重量が増加し、100 mg/kg 以上で溶媒対照群と比較して有意差が認められた。EE 併用投与群 (Fig. 2) では、100 mg/kg 以上の投与群において、子宮重量が溶媒対照群より有意に低下した。

C. 3. BHPMBA のマウス子宮肥大試験では、BHPMBA を単独投与した群の子宮重量 (Fig. 3) は、用量に依存して増加し、10 mg/kg 以上で溶媒対照群と比較して有意差が認められた。また、BHPMBA と EE を併用投与した群の子宮重量 (Fig. 4) は、10 mg/kg 以上の投与群において有意に低下した。子宮肥大試験における BHPMBA のエストロゲンアゴニストおよびエストロゲンアンタゴニストとしての最小有効用量は、いずれも 10 mg/kg であった。

D. E 考察・結論

化学物質について、マウス子宮肥大試験を実施した結果、約半数に子宮重量の変化

がみられたが、そのうち、エストロゲン作用のみを示した物質はなかった。このことから、子宮肥大試験は、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方がみられるように群構成を設定することが望ましいと考えられた。また、投与経路についても、皮下のみ、あるいは経口のみで子宮重量に変化がみられた物質が約半数あったことから、経口と皮下の両方を選択することが必要と考えられた。子宮重量を変化させる最小有効用量は、比較的高用量であったことから、LD50 値が低い毒物質などは、むしろ、子宮肥大試験を実施しても陽性反応は得られ難いと考えられた。

bisphenol A の単独投与群では、用量に依存して子宮重量が増加したことから、bisphenol A のエストロゲン作用がマウスにおいても確認された。また、同物質を卵巣摘出ラットに皮下投与した際の最小有効用量とほぼ一致したことから、エストロゲン作用の程度にラット—マウス間の差はほとんどないと考えられた。bisphenol A と EE との併用投与群で、子宮重量が低下したことから、bisphenol A は内因性エストロゲンの存在下では抗エストロゲン作用も示すものと考えられた。

BHPMBA のマウス子宮肥大試験では、子宮重量が 10 mg/kg 以上の単独投与群で有意に増加し、10 mg/kg 以上の BHPMBA と EE の併用投与群で有意に低下した。子宮肥大試験における BHPMBA のエストロゲン作用および抗エストロゲン作用を示す最小有効用量 (10 mg/kg) は、bisphenol A の最小有効用量 (100 mg/kg) の 1/10 に相当した。

F. 健康危険情報

無し

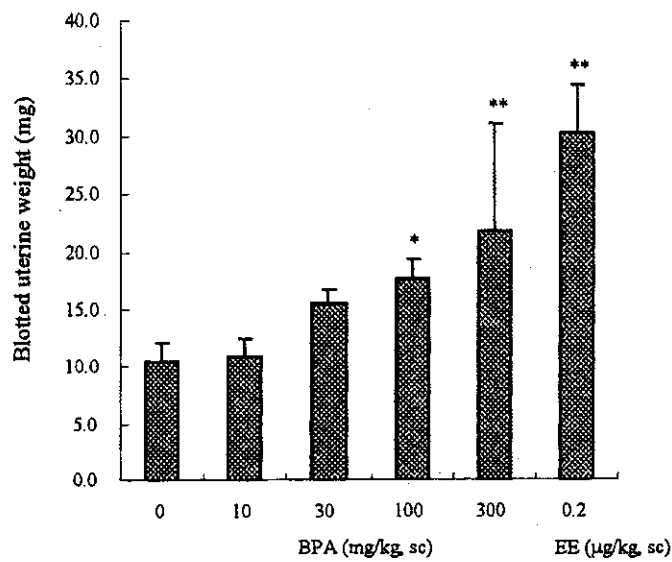


Fig. 1 Uterotrophic assay of BPA for estrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

BPA, bisphenol A
 EE, ethinylestradiol
 *, **, Significant difference from 0 mg/kg group (p<0.05, p<0.01)
 Bar, S.D.

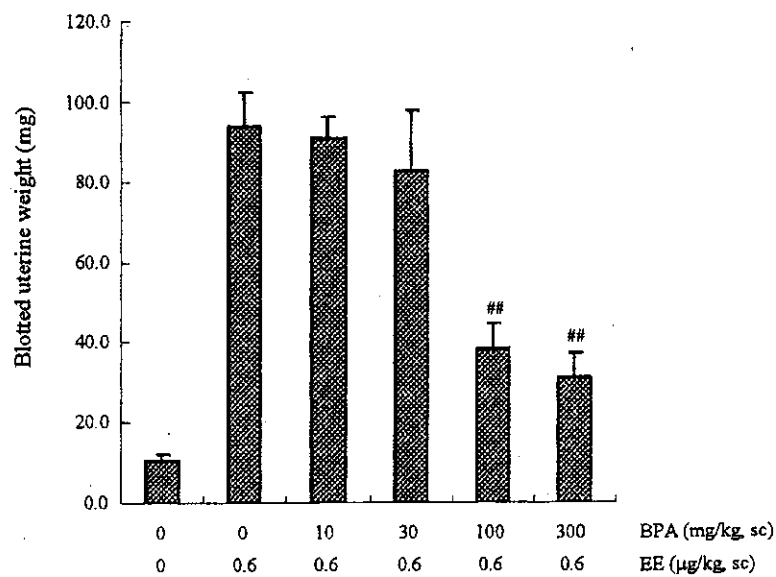


Fig. 2 Uterotrophic assay of BPA for antiestrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

BPA, bisphenol A
 EE, ethinylestradiol
 ##, Significant difference from 0 mg/kg & EE 0.6 µg/kg group (p<0.01)
 Bar, S.D.

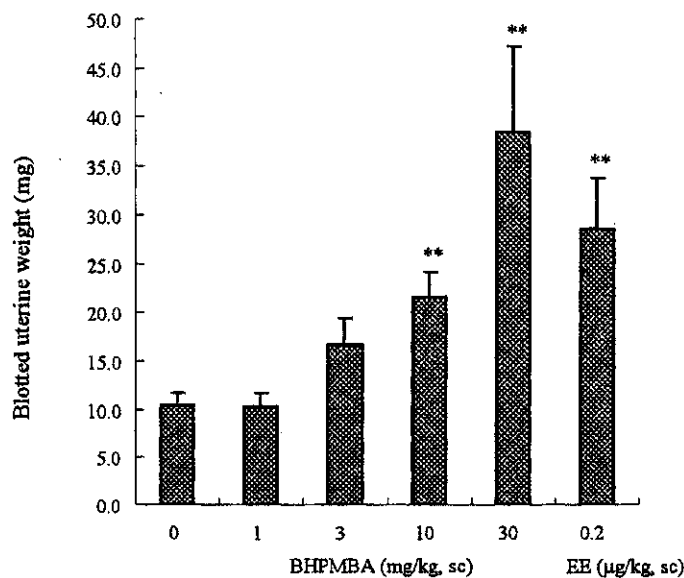


Fig. 3 Uterotrophic assay of BHPMBA for estrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

BHPMBA, 2-[bis(4-hydroxyphenyl)methyl]benzyl alcohol
 EE, ethinylestradiol
 **, Significant difference from 0 mg/kg group ($p < 0.01$)
 Bar, S.D.

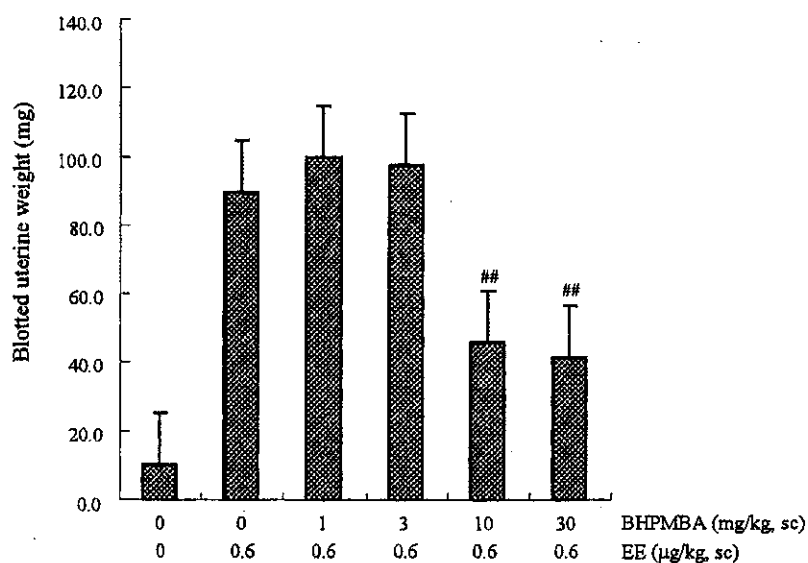


Fig. 4 Uterotrophic assay of BHPMBA for antiestrogenic activity detection in ovariectomized C57BL/6J mice

BHPMBA, 2-[bis(4-hydroxyphenyl)methyl]benzyl alcohol
 EE, ethinylestradiol
 ##, Significant difference from 0 mg/kg & EE 0.6 µg/kg group ($p < 0.01$)
 Bar, S.D.

1 4. OECD ガイドライン 407:28 日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

分担研究者 広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 部長

研究要旨：“OECD テストガイドライン 407, enhanced”において、内分泌かく乱作用を高感度に検出する新規パラメータの導入を目的として、内分泌かく乱化学物質を成熟動物に一定期間投与した時の投与動物の肝臓で発現の変動する遺伝子の網羅的解析を行った。昨年度は、エストロゲン作用検出パラメータの探索を目的として、ethinylestradiol (EE) を 0.01, 0.1, 1.0 ppm の割合で 28 日間混餌投与した雌雄の SD:IGS ラットで、CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 I Microarray による 3774 遺伝子の網羅的発現解析を行い、用量依存性、個体間の発現のばらつき、構成的な発現量の観点から候補遺伝子の抽出を行ったところ、雌で用量依存的に発現の上昇する遺伝子を 24 個見出した。そのうち 14 遺伝子はエストロゲン作用との関連で既に報告されているものであり、また、病理組織所見や性周期回帰では 1.0 ppm のみで変動を認めたことと比較すると、これらはエストロゲン作用の高感度検出指標になりうるものと考えられた。今年度はこの結果を基に、genistein (GEN) を 120, 400, 1000 mg/kg, methoxychlor (MXC) を 20, 100, 500 mg/kg, nonylphenol (NP) を 10, 50, 250 mg/kg の割合でラットに 28 日間強制経口投与したそれぞれの実験において、用量依存的に発現の変動する遺伝子を分類し、EE 投与例から得られた発現クラスターと比較を行った。その結果、最高用量で対照群に比べて 5 倍以上の発現変動を示し、かつ用量依存的に変動した遺伝子を抽出したところ、GEN では発現上昇を示す遺伝子はなく、発現低下を示すものが雌雄で各 1 遺伝子認めただけであった。MXC では発現上昇する遺伝子は雄で 1 個、雌では 12 個であったが、いずれも低発現の遺伝子であった。MXC で用量依存的に発現低下する遺伝子は雄で 20 個、雌で 13 個であったが、雄の発現低下遺伝子の全ては構成的発現量が低いものであった。NP では発現上昇遺伝子は雄で 19 個、雌で 8 個であったが、雄の発現上昇遺伝子は全て構成的発現量が低かった。また、発現低下遺伝子は雄で 40 個、雌で 3 個認められた。EE 投与により雌で発現上昇した 24 遺伝子につき、GEN, MXC, NP 投与例の雌の各用量での発現変動を検討した結果、GEN, MXC では用量に依存した発現増加する遺伝子は認められなかったが、NP 投与例では EE と同様な発現上昇を示すものが多く認められた。最後に、雌雄の各物質投与群の各用量間でクラスター解析を行ったところ、雌では EE の 0.1 ppm と 1.0 ppm, NP の 50 と 250 mg/kg, GEN の各用量, MXC の各用量がそれぞれ近似した階層に分類された。化学物質間では、EE と NP が最も近似した階層に分類された。雄では EE の 0.1 ppm と 1.0 ppm, GEN の各用量, NP の 50 と 250

mg/kg, MXC の各用量がそれぞれ近似した階層に分類されたが, EE と類似したプロファイルを示す化合物はなかった。以上の結果は, ER サブタイプに対する親和性, 他のステロイド受容体との親和性, あるいは化学物質固有の細胞毒性など, 各化合物に特異的な反応性に留意すべきことを指し示しており, 今後は, 内分泌かく乱作用に関する発現プロファイリングに関しては, 受容体親和性も含めた化学物質固有の影響を弁別しながら, 肝臓におけるプロファイルを細分類してゆく方向性が必要であると考えられる。

A. 研究目的

“OECD テストガイドライン 407, enhanced” において, 内分泌かく乱作用を高感度に検出する新規パラメータの導入を目的として, 一期目の本研究担当課題で, 代表的化合物投与例でラット雄特異的に発現する α_{2u} -globulin の肝・腎における発現量を検索し, いずれもホルモン作用に起因した用量依存性の変動を示さないが, いくつかの物質で低用量投与による肝 mRNA 発現の個体間のバラツキを見い出した。

Microarray 法の技術の確立に伴い, 一度に多数の遺伝子の RNA 発現挙動を検出する網羅的解析手法の導入により, 遺伝子指標の探索と同時にその用量依存性の検討が可能となってきた。内分泌かく乱化学物質 (EDCs) の投与に起因した用量依存性の反応を高感度に検出する系として, この遺伝子発現の網羅的解析手法が注目を浴びてきており, この手法を利用して EDCs 特異的な発現クラスターを見出すことは, 本研究課題の最終目標である。一方, mRNA 発現の場合, 用量に依存せずに, かつ蛋白質発現に反映されないような転写産物の発現変動を認める可能性がある。その生物学的な意義を検討することは重要な課題であるが, その前段階として EDCs の投与に起因して変動を示す遺伝子クラスターを解析・整理する必要がある。本研究では, 成熟動物に対して EDCs を一定期間投与した時の生体影響を検出する目的で, 肝臓を標的として投与動物で発現の変動する遺伝子を genome

wide にスクリーニングする。

B. 研究方法

今年度は, まず, 前年度解析を行った ethinylestradiol (EE) 投与例で得られた発現データについて, Silicon Genetics 社の Gene Spring ver. 4.0 で分析し, 発現の増減する遺伝子を用量依存性の有無で抽出・分類を行った。次いで, 雌雄各群 5 匹の SD:IGS ラットに genistein (GEN) を 120, 400, 1000 mg/kg, methoxychlor (MXC) を 20, 100, 500 mg/kg, nonylphenol (NP) を 10, 50, 250 mg/kg の割合で 28 日間, 強制経口投与し, 雄は 28 日目に屠殺し, 雌は投与 22 日目から性周期を観察して 28 日目から発情休止期を示す日に屠殺・剖検した。次いで, RNA later に保存した肝組織から total RNA を抽出し, 各群 3 匹につき CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 I Microarray による解析を行った。解析データについて, 発現の増減する遺伝子を用量依存性の有無で抽出・分類し, 前年度解析を行った EE 投与例のデータと比較を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として, 動物投与実験は経口投与により行い, 動物の苦痛を最小限にとどめた。また, 動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺したため, 動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

C. 研究結果

EE 投与により 2 倍以上の発現の増減する遺伝子数は雄より雌で多く、雌では EE の用量に応じて変動遺伝子数が多く、発現上昇遺伝子では 0.01 ppm より変動するものも多かった (Table 1)。雄では発現減少遺伝子は用量に応じた数の増加を認めず、発現増加遺伝子の数は用量の増加とともに増加した。無処置対照に較べ最高用量 (1.0 ppm) で 5 倍以上の発現変動を示し、かつ用量依存性に変動するものを選択した結果、発現上昇遺伝子は、雄で 4 個、雌では 24 個得られた (Table 2)。発現低下遺伝子は、雄で 1 個、雌では 4 個であった。雄で用量依存的に発現上昇を示した 4 遺伝子は相対発現量が非常に低く、サンプル間のばらつきを変動係数 (CV) で見たところ、CV 値が 100 以上と高かった。雌で用量依存性に発現低下した 1 遺伝子 (proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase) も投与群で CV 値が 100 以上を示した。雌で発現上昇を示した遺伝子の多くは相対発現量が高く (全遺伝子の平均発現量は 26.5)、特に、p53-activated gene 608, mitochondrial malate dehydrogenase, GTP-binding protein, and ras guanine nucleotide-releasing factor-1 の相対発現量は 100 以上を示した。

MXC, GEN, NP の 3 化合物の各用量で発現変動する遺伝子数を集計した結果、MXC では発現上昇する遺伝子は雌で多いものの、雌雄とも用量依存的な上昇遺伝子数の増加を認めず、発現低下する遺伝子数は、雌雄とも用量依存的に増加していた (Table 1)。NP では、用量依存的な変動遺伝子数の増加は、雌雄で発現上昇するものと雄で発現低下するものに認められた。3 化合物中 GEN 投与により変動する遺伝子数は最も少なく、増減の幅も少なかった。

次に、各化合物で、最高用量で対照群に比べて 5 倍以上の発現上昇を示し、かつ用量依存的に変動した遺伝子を抽出したところ、GEN では発現増加を示す遺伝子はなく、発現低下を示すものが雌雄で各 1 遺伝子認められたの

みであった (雄: B-myc transforming protein; 雌: lost on transformation 1; Table 3)。MXC では発現上昇する遺伝子は雄で 1 個、雌では 12 個であったが、いずれも発現量が全遺伝子の平均発現量より低かった (Table 4)。また、発現低下する遺伝子は雄で 20 個、雌で 13 個であったが、雄の発現低下遺伝子の全ては構成的発現量が低いものであった。NP では発現上昇遺伝子は雄で 19 個、雌で 8 個であったが、雄の発現上昇遺伝子は全て構成的発現量が低かった (Table 5)。NP による発現低下遺伝子は雄で 40 個、雌で 3 個であった。

EE 投与により雌で発現上昇した 24 遺伝子につき、GEN, MXC, NP 投与例の雌の各用量での発現変動を検討した結果、GEN, MXC では用量に依存した発現増加する遺伝子は認められなかったが、NP 投与例では EE と同様な発現上昇を示すものが多く認められた (Table 6)。次いで、雌雄の各物質投与群の各用量間でクラスター解析を行ったところ、雌では EE の 0.1 ppm と 1.0 ppm, NP の 50 と 250 mg/kg, GEN の各用量, MXC の各用量がそれぞれ近似した階層に分類された (Fig. 1)。その中で、EE と NP が最も近似した階層を形成していた。雄では EE の 0.1 ppm と 1.0 ppm, GEN の各用量, NP の 50 と 250 mg/kg, MXC の各用量がそれぞれ近似した階層に分類されたが、EE と近似した階層を形成する化合物はなかった (Fig. 2)。

D. 考察

EE 投与群の雄で、用量依存性に発現増加していることが確認された 4 遺伝子はいずれも相対発現量が 1 以下と低く、CV 値も高くサンプル間のばらつきも大きいことから、EE による生物学的反応性を反映した変化と考えられなかった。一方、雄に比較して雌において用量依存性に発現上昇した遺伝子の殆どは、相対発現量も高く、ばらつきも少なかったため、EE による生物学的反応を反映し

た変動であると考えられた。その 24 遺伝子中、以下にあげる 14 遺伝子で、その遺伝子産物そのもの、あるいはそのファミリーに属する遺伝子産物がエストロゲンに反応して発現や活性状態が変動する事が報告されている。その遺伝子は、 δ -opioid receptor (dor1), B-myc transforming protein, transforming growth factor (TGF) β , secretory carrier membrane protein (SCAMP) 37, connexin31.1 (CXN-311), hypocretin (orexin) neuropeptide precursor, mitochondrial malate dehydrogenase, preoptic regulatory factor (porf)-2, peripherin 2, Ras guanine nucleotide-releasing factor 1 (RasGRF1), apolipoprotein A5 (ApoA5), M-Ras, heat shock protein 27 (hsp27), 及び GTP-binding protein α 。である。

ラットに対して EE を連続投与することにより、肝細胞は最初の 1 週目で一過性の増殖亢進を起こした後、28 日目以降で増殖抑制を示すことが報告されている (Yager et al., 1994)。また、TGF β はトランスフォームしていない上皮細胞に対して増殖抑制を生じさせることが知られており (Bhowmick et al., 2003), 雌ラットに対する EE の曝露により 42 日目で肝臓における TGF β 1 の発現上昇が起こり、TGF β が肝細胞の増殖抑制に役割を果たすことが示唆されている (Chen et al., 1996)。また、卵巣摘出したマウスに対して 17 β -estradiol (E_2) を投与すると骨における TGF β の mRNA レベルが上昇することが報告されており (Lindberg et al., 2002), エストロゲン作用に関連した TGF β シグナリングのあることが示唆される。また、B-myc は最近同定された *myc* ファミリーに属する遺伝子であるが、卵巣や子宮といったホルモン関連臓器に特異的に発現し、その細胞増殖抑制に機能することが知られている (Gregory et al., 2000)。これらの結果は TGF β や B-myc が EE によって誘発される肝細胞の増殖抑制に機能していることを示唆している。

Connexins は細胞間の小分子の拡散などに機能する膜チャンネルを構成するギャップジャンクション蛋白質であり、多くの細胞は複数の isotype を発現しており、細胞の分化、増殖などに機能することが知られている (Lo et al., 1999)。CXN-311 に関してはその機能に関する報告はほとんどないが、他の isotype, 例えば connexin-26, -36, -43 等は E_2 投与により内分泌関連臓器で発現上昇することが知られている (Di et al., 2001; Shinohara et al., 2001; Heikaus et al., 2002)。

Hsp 27 は hsp ファミリーに属するシャペロン蛋白質であり、熱などの細胞を取り巻く環境ストレスにより急激に誘導されることが知られている (Ciocca et al., 1993)。この蛋白質は成人では内分泌関連臓器にも発現しており、元々エストロゲン受容体 (ER) 関連蛋白質として同定されている (Coffer et al., 1985; Ciocca and Luque, 1991; King et al., 1987)。ER を発現しているヒト乳ガン由来の MCF-7 細胞において、 E_2 投与により hsp 27 の誘導の生じることが報告されている (Edwards et al., 1980; Adams et al., 1980; Bemedix et al., 1994; Dunn et al., 1993) だけではなく、この遺伝子のプロモーター領域に estrogen response element のあることが知られている (Porter et al., 1996; Oesterreich et al., 1997)。

G 蛋白質は α , β , γ のサブユニットから構成されヘテロトリマーを形成し、G 蛋白質共役受容体の刺激により、 α と β γ に別れる。G α サブユニットは 4 つのサブファミリーに分類され、G α_o は G α_i ファミリーに属する (Ram and Iyengar, 2001)。いくつかの G α_i ファミリー蛋白質は ER や他の膜受容体などの刺激に応じてエストロゲンによる急速な 'nongenomic' な反応を媒介することが知られている (Wyckoff et al., 2001; Razandi et al., 2003; Doolan and Harvey, 2003)。興味深いことに、G α_o は、今回の EE 投与群の

雌で用量依存的に発現上昇する事が確認された δ -opioid receptor と選択的に結合することが知られている(Alves et al., 2003)。また、mRNA 発現が影響を受けるかどうかはわからないが、卵巣摘出した動物で E_2 投与により δ -opioid receptor の親和性の減少と結合能の増加が強く生じることが報告されている (Shen et al., 1995)。

Porf-1 and porf-2 はラット脳から同定された遺伝子であるが、精巣でも発現していることが報告されている (Nowak et al., 1997)。脳では性分化に役割を果たすことが考えられ、卵巣摘出したラットに E_2 を投与すると、視床下部視索前野でこれらの遺伝子の発現上昇が生じると言われている (Nowak et al., 1999)。

Malate dehydrogenases (MDH, L-malate:NAD oxidoreductase) は、NAD/NADH 依存性のマレイン酸やオキサロ酢酸の相互変換を触媒する事が知られている (Minárik et al., 2002)。この酵素は細胞質に存在するものとミトコンドリアに存在するものに分けられ (Patnaik, 1990)、細胞質 MDH は卵巣摘出によりラット脳で発現減少することが知られている (Patnaik et al., 1990)。一方、淡水エビを E_2 処置することにより、肝臓で細胞質 MDH の発現が用量依存性に上昇するとの報告がある (Ghosh and Ray, 1993)。

Peripherin は末梢神経の細胞骨格を構成する中間型フィラメントのひとつで (Portier et al., 1984)、ラット褐色細胞種由来の PC 12 細胞に $ER\alpha$ の強制発現により peripherin の mRNA の発現上昇が生じ、NGF の投与によりこの発現は強く増強されるという報告がある (Gollapudi and Oblinger, 2001)。

Hypocretin (orexin) にはオーファン G 蛋白質共役受容体に対する内因性リガンドとして2つのサブタイプが存在するが (Sakurai et al., 1998)、両者は同一の前駆蛋白質 (prepro-hypocretin) に由来している (de

Lecea et al., 1998)。また、prepro-hypocretin は視床下部外側領域に選択的に発現しこの領域は摂食行動を制御している (Sakurai et al., 1998; de Lecea et al., 1998)。これらのポリペプチドの発現レベルについては検索されていないが、エストロジェンは hypocretin/orexin の作用を調節している。例えば、orexin によるパルス型の LH 分泌に対して抑制的に作用する (Furuta et al., 2002)。一方、下垂体や副腎などに検出される末梢の hypocretin/orexin 受容体は雄のラットに強く発現し、雌のラットでは卵巣摘出により発現が上昇し E_2 投与により発現が元に戻るということが知られている (Jöhren et al., 2003)。

ApoA5 はラットの再生肝組織から同定され (van der Vliet et al., 2001)、リポ蛋白の代謝や脂質の恒常性維持に役割を果たしている。ApoA5 は肝臓に強く発現し HDL や VLDL 分子に結合している (Pennacchio et al., 2001; van der Vliet et al., 2001)。ApoA5 の発現にエストロジェンがどのように作用するかについての報告はないが、他の apolipoprotein ではエストロジェン作用に関連した発現変化が報告されている。例えば、ニワトリ肝がん細胞株で E_2 処理による ApoA1 の発現低下や (Hermann et al., 2003)、ニワトリ肝臓で E_2 投与により ApoVLDL-II の発現上昇の生じること (Zhu and Evans, 2001) が報告されている。

SCAMP ファミリー蛋白質は、分泌やエンドサイトーシスのキャリアーとなる膜輸送蛋白質として同定された 37kDa までの大きさの蛋白質である (Hubbard et al., 2000)。これらの蛋白質の機能については殆ど分かっていないが SCAMP1 は脳に豊富に存在し、他の SCAMP ファミリーは全身の色々な細胞に分布することが知られている (Singleton et al., 1997)。また SCAMP4 の mRNA レベルは E_2 でプライミングした後 progesterone を投与した雌のラットの視床下部腹内側核で強い発現低下を示

すことが報告されている (Krebs and Pfaff, 2001)。

Ras guanine nucleotide-releasing factor 1 (RasGRF1)はHa-Rasの上流に存在しM-Rasの活性をも制御することが知られている (Quilliam et al., 1999)。M-Rasは骨格筋から同定されたRasファミリーに属する蛋白質であるが (Matsumoto et al., 1997)、その生理作用については殆ど報告がない。今回の研究でM-RasとRasGRF1は共に雌で用量依存性に発現上昇を示していることから、EEは雌のラット肝臓でM-Rasのシグナリングを促進している可能性が示唆される。

GEN, MXC, NPの各実験において、用量依存的に発現の変動する遺伝子を分類した結果、GENでは発現上昇を示す遺伝子はなく、発現低下を示すものが雌雄で各1遺伝子認めただのみであった。GENは我々の研究で400 mg/kg以上で膈上皮に病理変化、肝比重量の増加や肝臓での病理変化を認めている (Okazaki et al., 2002)。今回選別した遺伝子は最高用量で5倍以上の発現の増減を示したものであるが、2倍以上の発現の増減で検索しても、全般に発現変動を示す遺伝子数は少なかった。PhytoestrogenはER α よりも β に対する親和性が強く (An et al., 2001)、GENもER β を介した転写抑制を選択的に活性化することが知られている (Patisaul et al., 2001)。肝臓におけるER α と β の構成的な発現や活性化状況に関する報告は未だないが、ER β はER α を介した転写を抑制することが知られており (Lindberg et al., 2003)、今回のmicroarray解析で発現変動する遺伝子が少なかったことの説明になるかも知れない。

MXCでは発現上昇する遺伝子は雄で1個、雌では12個であったが、いずれも低発現の遺伝子であり、生物学的な意義は低いと考えられた。用量依存的に発現低下する遺伝子は雄で20個、雌で13個であったが、雄の発現低下遺伝子の全ては構成的発現量が低いものであった。EE投与例で用量依存的に反応す

る遺伝子は雌の発現上昇遺伝子であったため、両化合物間で共通して変動する遺伝子は少ないと考えられる。MXCはエストロゲン作用の他に抗アンドロゲン作用を示すことが知られており (Maness et al., 1998)、この物質により性ステロイド受容体を介した転写制御は複雑であると考えられる。また、肝障害が中間用量 (100 mg/kg)より出現しているため (Okazaki et al., 2001)、MXCにより誘発された肝毒性が、この物質により誘起されるエストロゲン作用をマスクしている可能性も指摘できる。

NP投与例ではEEと同様な発現上昇を示すものが多く認められ、クラスター解析によっても、EEとNPが最も近似した階層に分類され、EEに類似した作用を雌の肝臓に誘起することが示唆された。

以上、EEの28日間投与により雌ラット肝臓で用量依存性に発現上昇する遺伝子を見出した。これらの遺伝子の多くはエストロゲン作用との関連で報告されているものであった。病理組織や性周期における変化が1.0 ppmで認められたことと比較すると、これらの遺伝子の発現は最低用量から上昇しており、これらの遺伝子の発現レベルの測定は成熟動物におけるエストロゲン影響を検出するのに感度の高い指標になることが示唆された。しかし、GEN, MXC, NP投与例での発現プロファイルとの比較では、NP以外に近似する発現プロファイルが得られなかった。このことは、肝臓におけるERサブタイプに対する親和性、他のステロイド受容体との親和性、あるいは化学物質固有の細胞毒性など、各化合物に特異的な反応性に留意すべきことを指し示しており、今後は、内分泌かく乱作用に関する発現プロファイリングに関しては、受容体親和性も含めた化学物質固有の影響を弁別しながら、プロファイルを細分類してゆく方向性が必要であると考えられる。

[参考文献]

- Adams DJ, Edwards DP, McGuire WL (1980) Estrogen regulation of specific messenger RNA's in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 97: 1354-1361
- Alves ID, Salamon Z, Varga E, Yamamura HI, Tollin G, Hruby VJ (2003) Direct observation of G-protein binding to the human d-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 278: 48890-48897
- An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC (2001) Estrogen receptor β -selective transcription activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem* 276:17808-17814
- Benedix MG, Krieg S, Weng CN, Chamness GC, Oesterreich S (1994) Constitutive overexpression of the 27,000 dalton heat shock protein in late passage human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 32: 177-186
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL (2003) TGF β -induced RhoA and p16^{ROCK} activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15548-15553
- Chen J, Schwartz DA, Young TA, Norris JS, Yager JD (1996) Identification of genes whose expression is altered during mitosuppression in livers of ethinyl estradiol-treated female rats. *Carcinogenesis* 17: 2783-2786
- Ciocca DR, Luque EH (1991) Immunological evidence for the identity between the hsp27 estrogen-regulated heat shock protein and the p29 estrogen receptor-associated protein in breast and endometrial cancer. *Breast Cancer Res Treat* 20: 33-42
- Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SA (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* 85: 1558-1570
- Coffer AI, Lewis KM, Brockas AJ, King RJ (1985) Monoclonal antibodies against a component related to soluble estrogen receptor. *Cancer Res* 45: 3686-3693
- Di WL, Lachelin GC, McGarrigle HH, Thomas NS, Becker DL (2001) Oestriol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin43 protein expression in human myometrium. *Mol Hum Reprod* 7: 671-679
- Doolan CM, Harvey BJ (2003) A G_s protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on [Ca²⁺]_i in female rat distal colon. *Mol Cell Endocrinol* 199: 87-103
- Dunn DK, Whelan RD, Hill B, King RJ (1993) Relationship of HSP27 and oestrogen receptor in hormone sensitive and insensitive cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46: 469-479
- Edwards DP, Adams DJ, Savage N, McGuire WL (1980) Estrogen induced synthesis of specific proteins in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 93: 804-812
- Furuta M, Funabashi T, Kimura F (2002) Suppressive action of orexin A on pulsatile luteinizing hormone secretion is potentiated by a low dose of estrogen in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 75: 151-157.
- Ghosh D, Ray AK (1993) Subcellular action

- of estradiol-17 β in a freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen Comp Endocrinol* 90: 274-281
- Gollapudi L, Oblinger MM (2001) Estrogen effects on neurite outgrowth and cytoskeletal gene expression in ER α -transfected PC12 cell lines. *Exp Neurol* 171: 308-316
- Gregory MA, Xiao Q, Cornwall GA, Lutterbach B, Hann SR (2000) B-Myc is preferentially expressed in hormonally-controlled tissues and inhibits cellular proliferation. *Oncogene* 19: 4886-4895
- Heikaus S, Winterhager E, Traub O, Grummer R (2002) Responsiveness of endometrial genes Connexin26, Connexin43, C3 and clusterin to primary estrogen, selective estrogen receptor modulators, phyto- and xenoestrogens. *J Mol Endocrinol* 29: 239-249
- Hermann M, Foisner R, Schneider WJ, Ivessa NE (2003) Regulation by estrogen of synthesis and secretion of apolipoprotein A-I in the chicken hepatoma cell line, LMH-2A. *Biochim Biophys Acta* 1641: 25-33
- Hubbard C, Singleton D, Rauch M, Jayasinghe S, Cafiso D, Castle D (2000) The secretory carrier membrane protein family: structure and membrane topology. *Mol Biol Cell* 11: 2933-2947
- Jöhren O, Brüggemann N, Dendorfer A, Dominiak P (2003) Gonadal steroids differentially regulate the messenger ribonucleic acid expression of pituitary orexin type 1 receptors and adrenal orexin type 2 receptors. *Endocrinology* 144: 1219-1225
- King RJ, Finley JR, Coffey AI, Millis RR, Rubens RD (1987) Characterization and biological relevance of a 29-kDa, oestrogen receptor-related protein. *J Steroid Biochem* 27: 471-475
- Krebs CJ, Pfaff DW (2001) Expression of the SCAMP-4 gene, a new member of the secretory carrier membrane protein family, is repressed by progesterone in brain regions associated with female sexual behavior. *Brain Res Mol Brain Res* 88: 144-154
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:322-327
- Lindberg MK, Moverare S, Eriksson AL, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2002) Identification of estrogen-regulated genes of potential importance for the regulation of trabecular bone mineral density. *J Bone Miner Res* 17: 2183-2195
- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2003) Estrogen receptor (ER)- β reduces ER α -regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ER α and ER β in mice. *Mol Endocrinol* 17:203-208

- Lo CW (1999) Genes, gene knockouts, and mutations in the analysis of gap junctions. *Dev Genet* 24: 1-4
- Maness SC, McDonnell D, Gaido KW (1998) Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 151: 135-142
- Matsumoto K, Asano T, Endo T (1997) Novel small GTPase M-Ras participates in reorganization of actin cytoskeleton. *Oncogene* 15: 2409-2417
- Minárik P, Tomáková N, Kollárová M, Antalík M (2002) Malate dehydrogenases—structure and function. *Gen Physiol Biophys* 21: 257-265
- Nowak FV, Torres G, Golden J, Hu SB (1997) Expression of the preoptic regulatory factor-1 and -2 genes in rat testis. Developmental and hormonal regulation. *Endocrine* 6: 65-72
- Nowak FV, Torres GE, Hu SB (1999) Differential gene expression response to gonadal hormones by preoptic regulatory factors-1 and -2 in the female rat brain. *Neuroendocrinology* 69: 191-201
- Oesterreich S, Lee AV, Sullivan TM, Samuel SK, Davie JR, Fuqua SA (1997) Novel nuclear matrix protein HET binds to and influences activity of the HSP27 promoter in human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 67: 275-286
- Okazaki K, Okazaki S, Nishimura S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Nakamura A, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M (2001) A repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol* 75:513-521.
- Okazaki K, Okazaki S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Wakabayashi S, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M (2002) A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol* 76: 553-559
- Patisaul HB, Dindo M, Whitten PL, Young LJ (2001) Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor α - and β -dependent gene expression in the brain. *Endocrinology*. 142: 2946-2952.
- Patnaik SK (1990) Differential regulation of malate dehydrogenase isoenzymes by estradiol in the brain of rats of various ages. *Biochem Int* 20: 633-639
- Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294: 169-173
- Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S (1996) Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol* 10: 1371-1378
- Portier MM, de Nechaud B, Gros F (1984) Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Dev Neurosci* 6: 335-344

- Quilliam LA, Castro AF, Rogers-Graham KS, Martin CB, Der CJ, Bi C (1999) M-Ras/R-Ras3, a transforming ras protein regulated by Sos1, GRF1, and p120 Ras GTPase-activating protein, interacts with the putative Ras effector AF6. *J Biol Chem* 274: 23850-23857
- Ram PT, Iyengar R (2001) G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3 pathway: role in proliferation and transformation. *Oncogene* 20: 1601-1606
- Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER (2003) Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278: 2701-2712
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-585
- Shinohara K, Funabashi T, Nakamura TJ, Kimura F (2001) Effects of estrogen and progesterone on the expression of connexin-36 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neurosci Lett* 309: 37-40
- Singleton DR, Wu TT, Castle JD (1997) Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions. *J Cell Sci* 110: 2099-2107
- van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA (2001) Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 276: 44512-44520
- Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW (2001) Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Gα_i. *J Biol Chem* 276: 27071-27076
- Yager JD, Zurlo J, Sewall CH, Lucier GW, He H. : Growth stimulation followed by growth inhibition in livers of female rats treated with ethinyl estradiol. *Carcinogenesis*. 1994 ;15: 2117-23.
- Zhu Y, Evans MI (2001) Estrogen modulates the expression of L-arginine:glycine amidinotransferase in chick liver. *Mol Cell Biochem* 221: 139-145

E. 結論

成熟動物に対して内分泌かく乱作用の疑われている化合物を一定期間投与した時の、肝臓を標的とした高感度な内分泌かく乱指標遺伝子の同定を目的として、EE を reference drug として GEN, MXC, NP を 28 日間ラットに投与した時における網羅的遺伝子発現解析を行った。EE においては、雌で用量依存的に発現上昇する遺伝子を多く見出した。その用量依存性は 0.01 ppm から変動するものが多く、病理組織や性周期回帰の検索では 1.0 ppm のみで変化を認めたことを考慮すると、これらの遺伝子発現変化はエストロゲン作用の高感度検出指標になりうる可能性が示唆