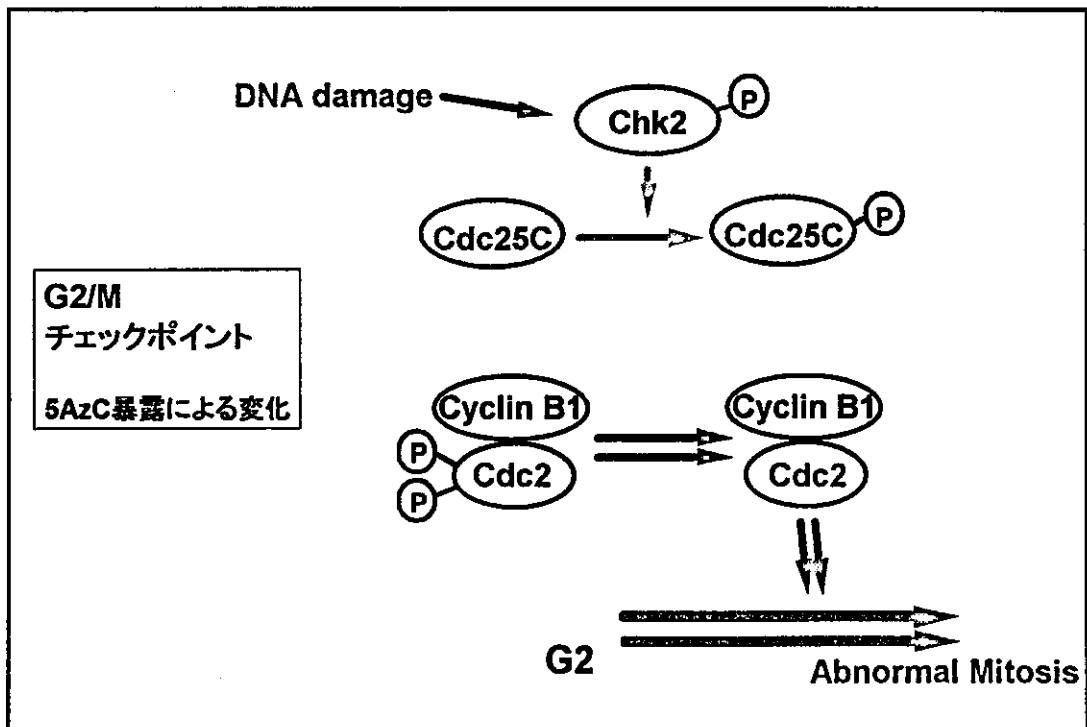
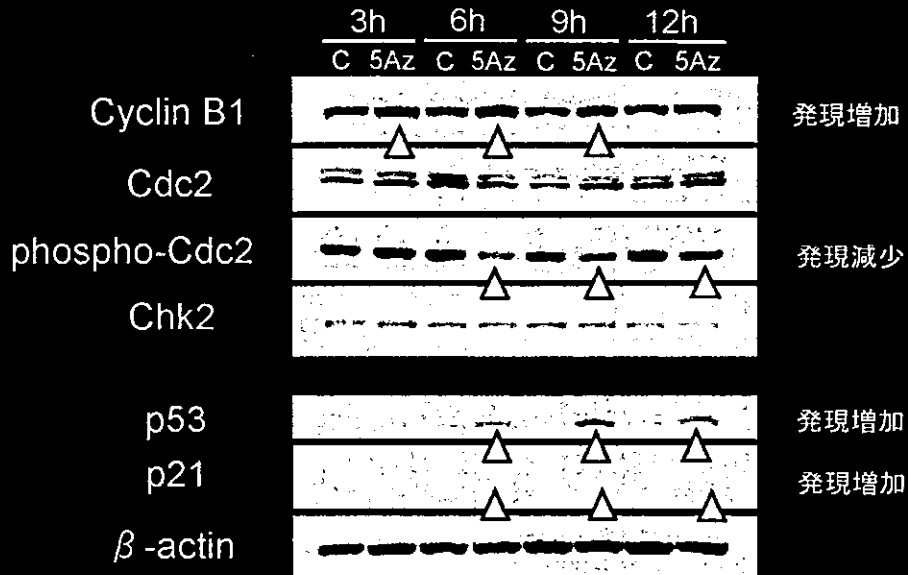
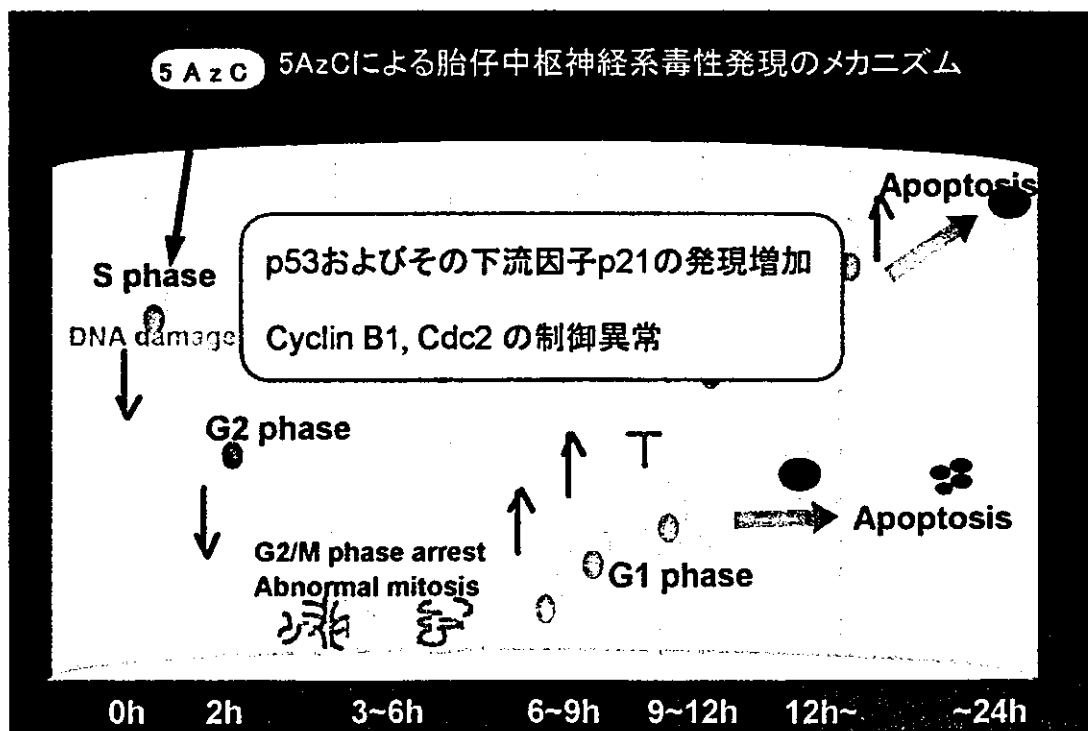
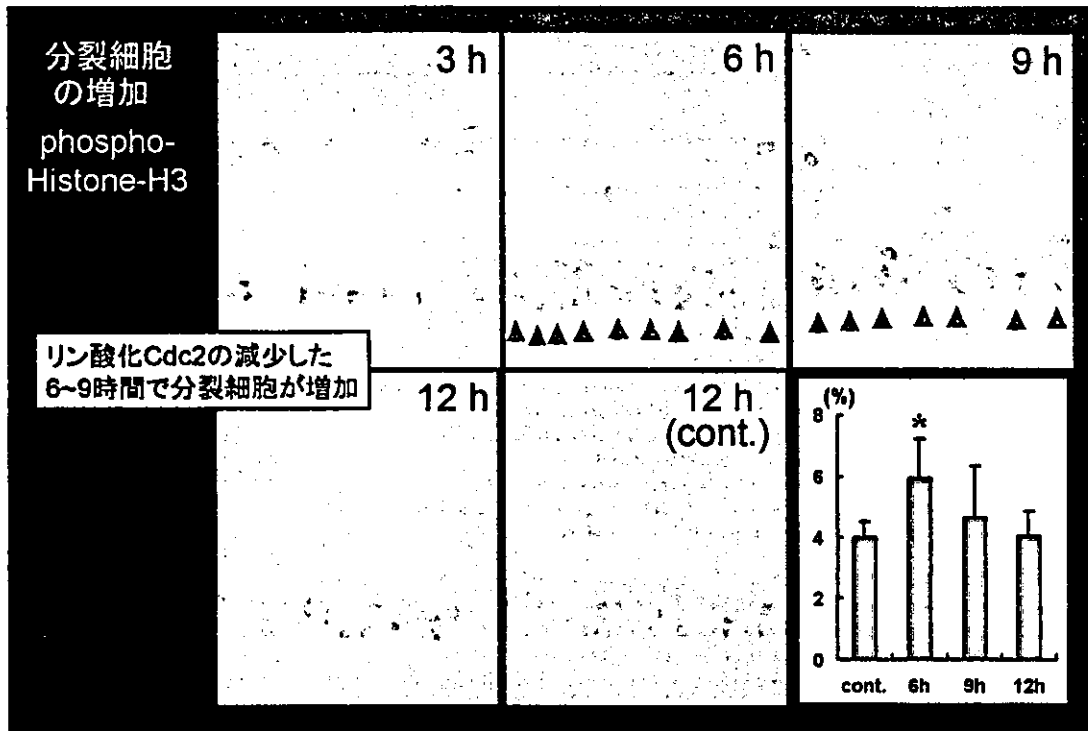


Western Blotting (p53関連およびG2/M制御因子)

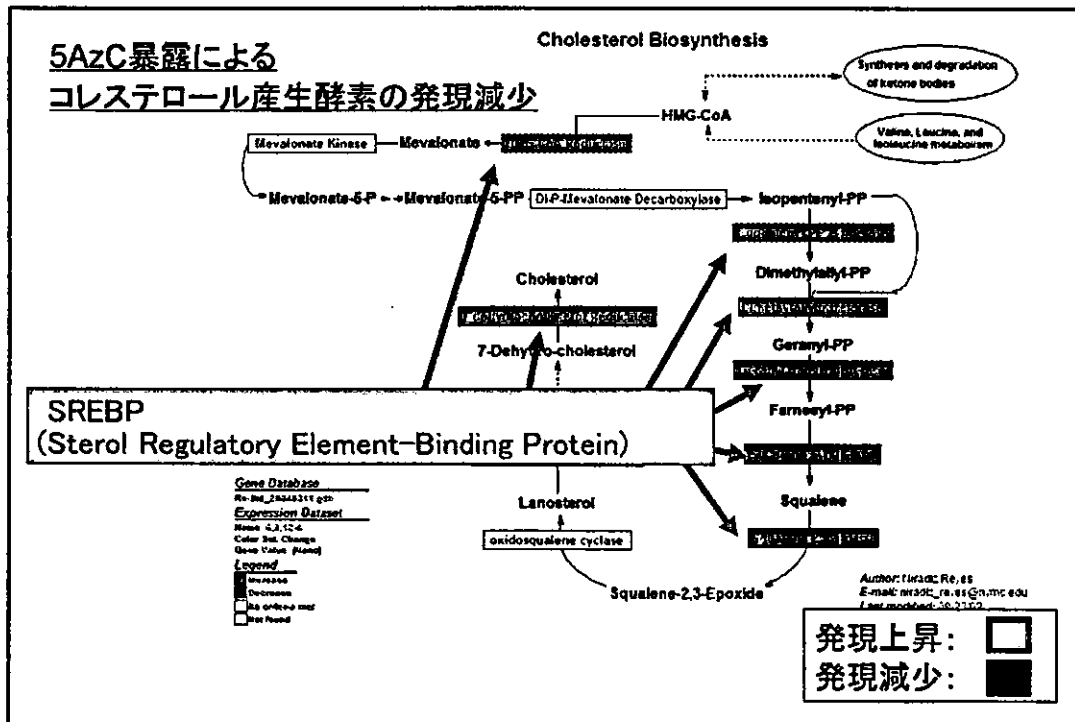




5AzC暴露によるその他の因子の変動

Accession No.	Gene	Fold change				
		6h	8h	12h Cluster		
Chaperone						
M14050.1	heat shock 70kD protein 5 (Hspa5) / immunoglobulin heavy chain binding protein 1	-1.8	-2.0	B		
NM_022399.1	calreticulin (Calr)	-1.4	-1.8	B		
AA12322	t-complex 1 (Tcp1) / chaperonin-containing t-complex polypeptide 1 (CCT)	-1.4	-1.3	B		
B128495	calcium binding protein 1 (Cabp1)		-1.4	B		
NM_053849.1	protein disulfide isomerase related protein (calcium-binding protein, intestinal-related) 1	-1.7	-1.8	B		
NM_017319.1	ER-60 protease (ER60) / glucose regulated protein, 58 kDa (Grp58) / oxidoreductase ERp57	-1.5	-1.5	B		
Cholesterol synthesis						
NM_022389.1	7-dehydrocholesterol reductase (Dhcr7)		-1.5	B		
NM_017138.1	squalene epoxidase (Sqle)		-1.4	B		
NM_019238.1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1 (Fdft1) / squalene synthase	-1.4	-1.3	B		
NM_090888.1	sterol-C4-methyl oxidase-like (Sc4mol) / neurorep 1	-1.3	-1.5	B		
NM_013134.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (Hmgcr)		-1.5	B		
NM_022392.1	growth response protein (CL-6) / Inaig1	-1.7	-2.3	-1.8	B	
NM_017268.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (Hmgcs1)	-1.4	-1.8	-1.7	B	
NM_031840.1	farnesyl diphosphate synthase (Fdps) / dimethylallyltransferase / geranyl-trans tran	-1.4	-1.8	-1.8	B	
NM_053539.1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase (Idi1)	-1.3	-1.7	-1.8	B	
Amino acid metabolize						
NM_024403.1	activating transcription factor ATF-4 (Atf4)		1.9	E		
NM_013111.1	solute carrier family 7 member A1 (amino acid transporter cationic 1) (Slc7a1)		1.8	E		
NM_017353.1	tumor-associated protein 1 (TA1) / Slc7a5		2.9	1.9	E	
NM_019283.1	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), mem		1.9	1.6	E	
U07202.1	asparagine synthetase (Asns)		3.1	3.1	2.7	D

5AzC暴露による コレステロール産生酵素の発現減少

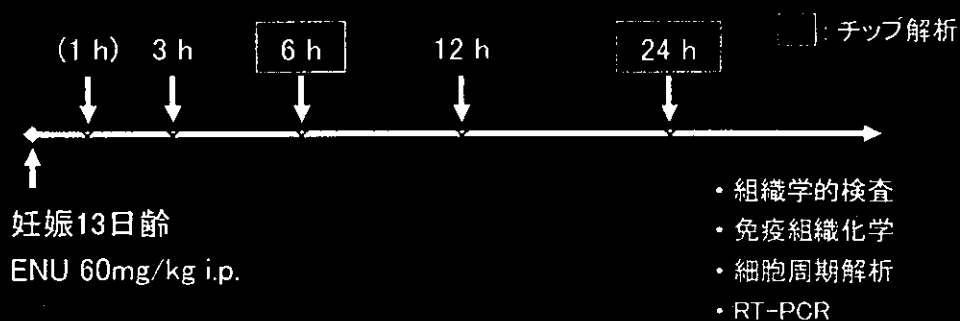


EthylNitrosourea (ENU) 暴露ラット胎仔脳での 毒性発現過程における遺伝子発現の解析

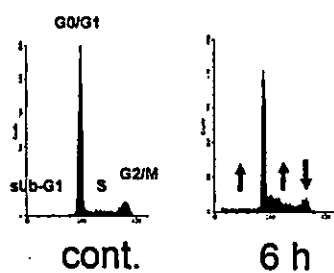
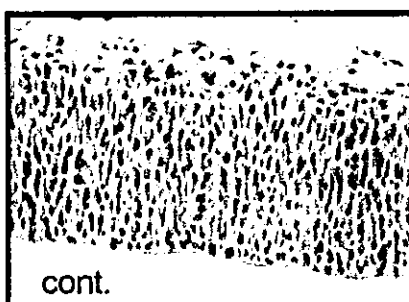
EthylNitrosourea (ENU) : DNAアルキル化剤

投与条件 : F344/jcl rat (妊娠13日齢, n=2), 60 mg/kg i.p.

チップ解析 : GeneChip (Rat Genome U34A, AFFYMETRIX)



ENUによるアポトーシス、細胞周期停止誘導

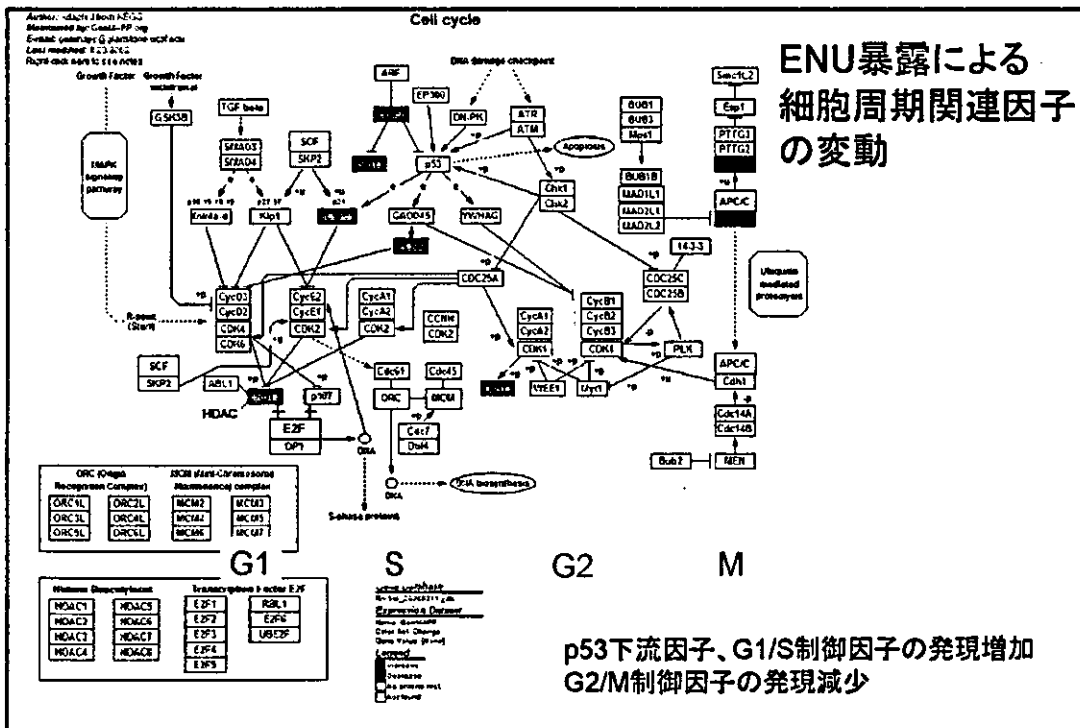


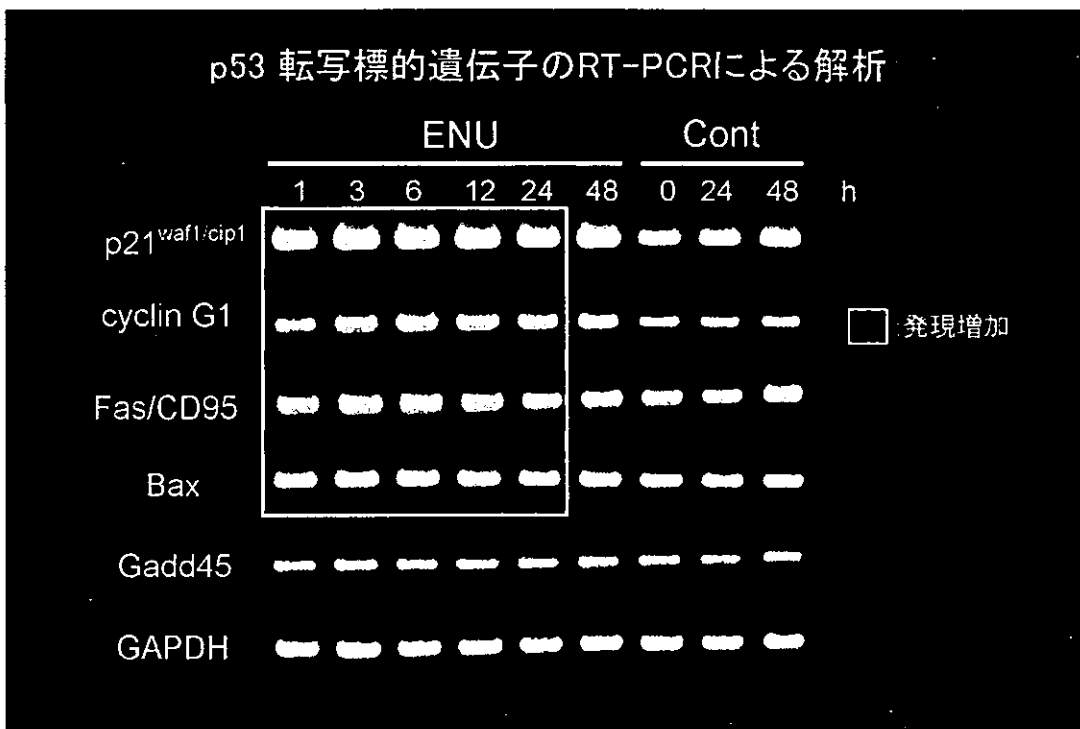
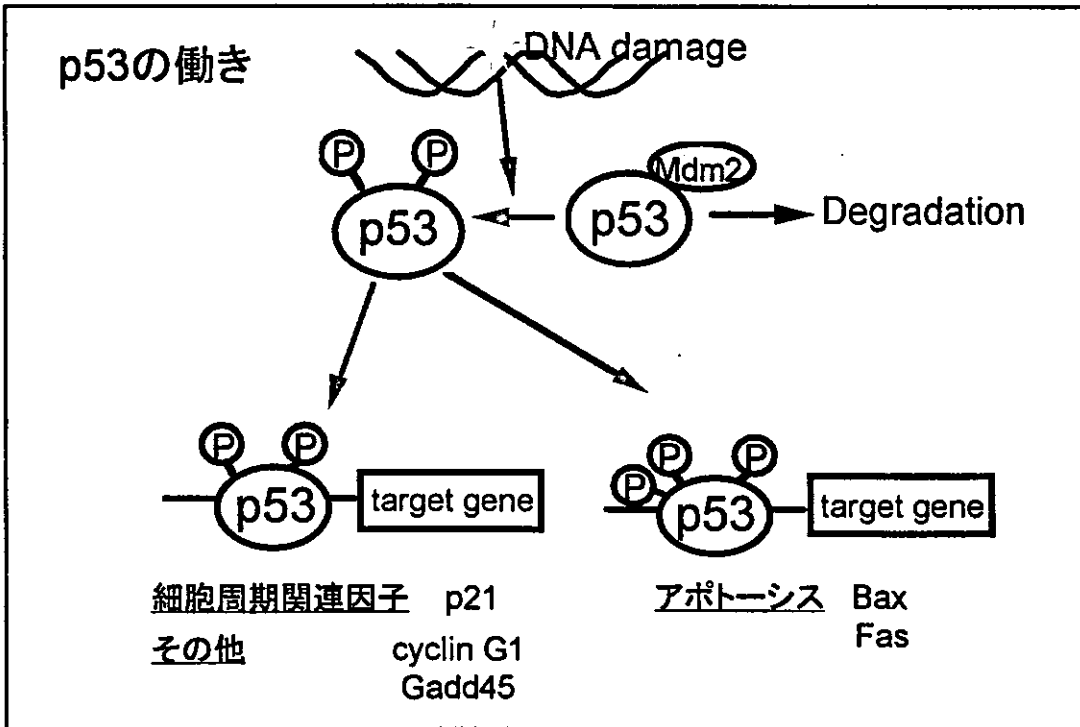
sub G1	1.0±0.4 (%)	6.6±0.3
G0/G1	73.9±1.5	55.2±3.2
S	12.6±1.0	29.0±3.1
G2/M	12.5±1.2	9.2±1.0

S期細胞数の増加
M期細胞数の減少

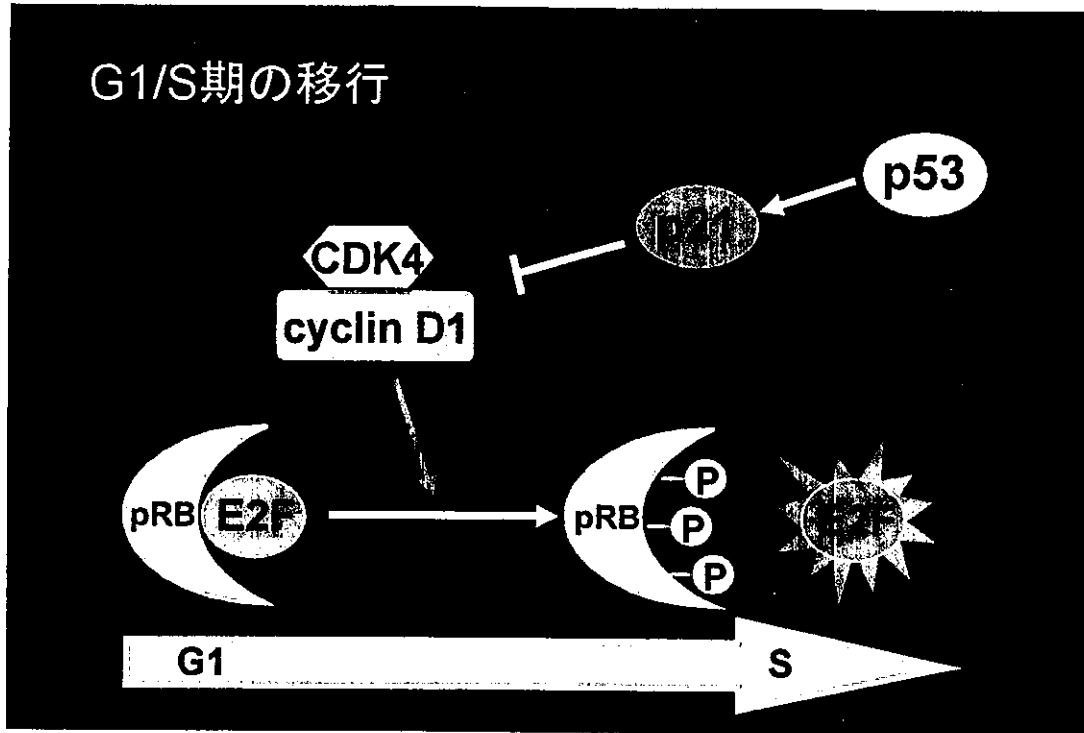
ENU暴露による細胞周期・アポトーシス関連因子の変動

Up-regulated	Function	Fold change	
		6 h	24 h
p21	cell cycle / p53 target gene	10.05	
Cyclin G1	cell cycle / p53 target gene	6.41	4.24
Mdm2	cell cycle / p53 target gene	1.93	
Retinoblastoma protein	cell cycle	1.54	
cyclin D1	cell cycle		1.52
PCNA	DNA replication	1.64	
Bax	apoptosis / p53 target gene	1.66	
rBax alpha	apoptosis	1.65	

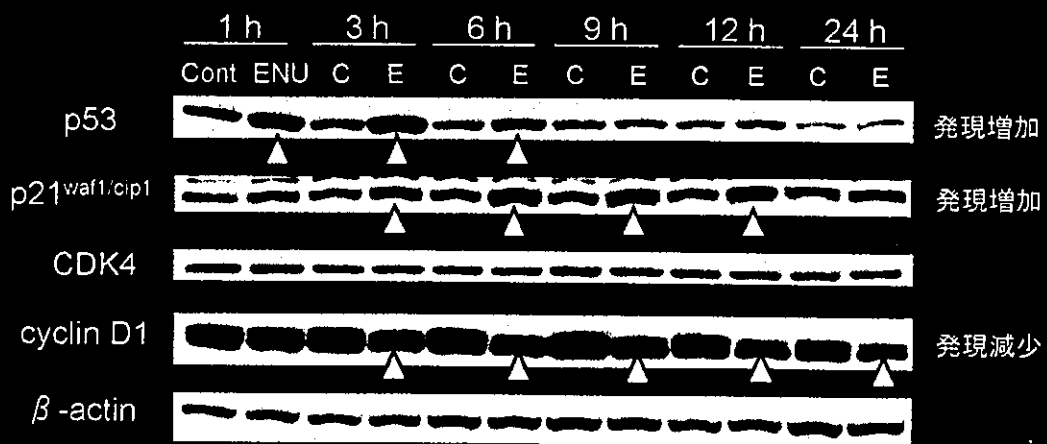




G1/S期の移行

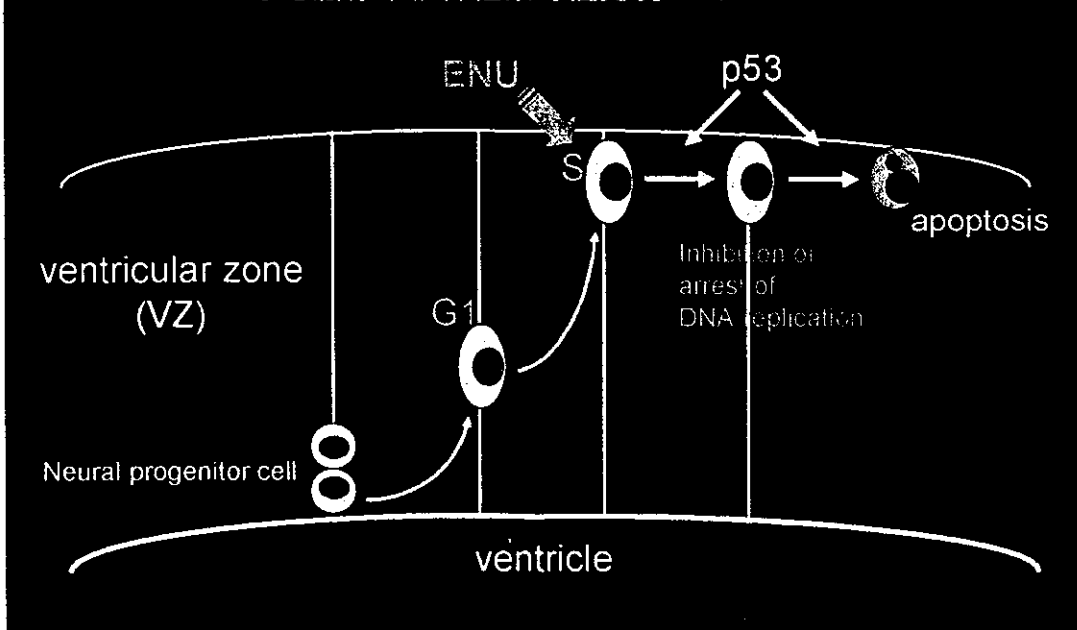


Western blot (p53関連およびG1/S制御因子)

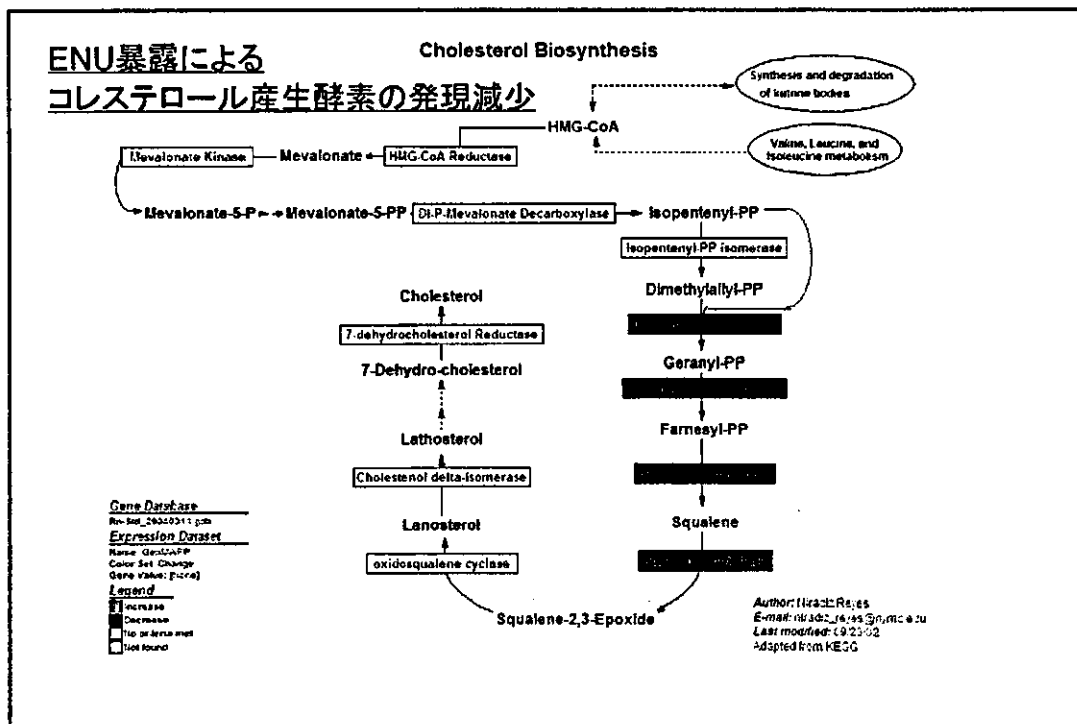


G1→Sの移行が阻害されていることが示唆された。

ENUによる胎仔中枢神経系毒性発現のメカニズム



ENU暴露による コレステロール産生酵素の発現減少

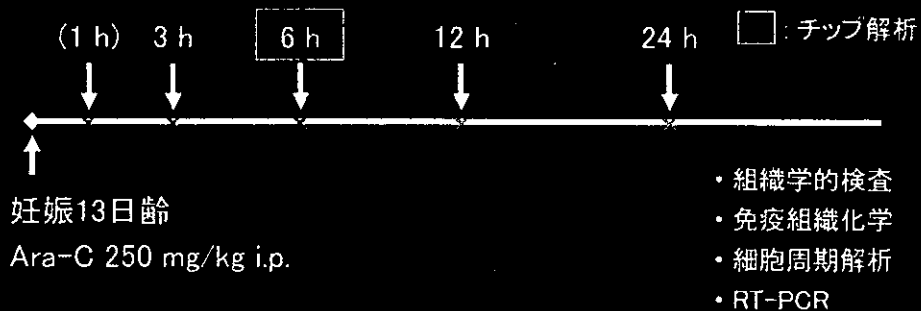


Cytosine arabinoside (Ara-C) 暴露ラット胎仔脳での 毒性発現過程における遺伝子発現の解析

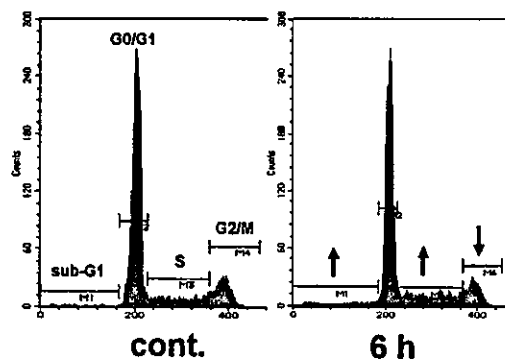
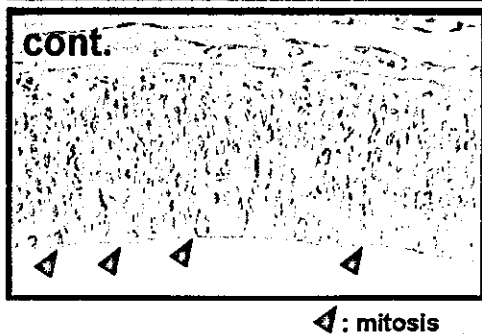
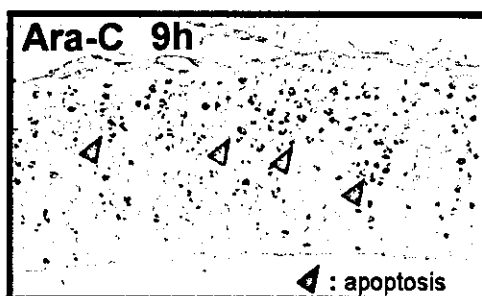
Cytosine arabinoside (Ara-C) : DNA合成阻害

投与条件 : Wistar rat(妊娠13日齢, n=2), 250 mg/kg i.p.

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



Ara-Cによるアポトーシス、細胞周期停止誘導



sub G1	0.55 (%)	6.93
G0/G1	74.06	62.30
S	11.84	19.58
G2/M	13.80	11.54

S期細胞数の増加
M期細胞数の減少

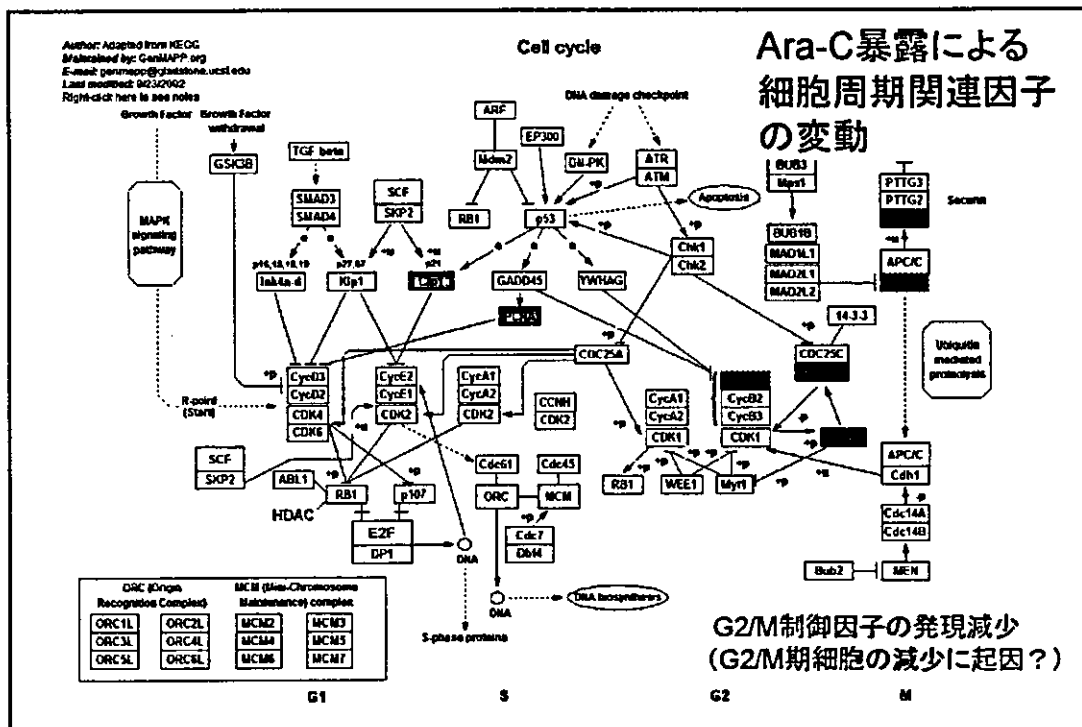
Ara-C暴露による細胞周期・アポトーシス関連因子の変動

Cell cycle

		Fold change (Log2)
NM_080782.1	p21 (WAF1)	2.6
NM_022381.1	Proliferating cell nuclear antigen (Pcna)	0.4
U05341	p55CDC mRNA	-1.5
L11995.1	cyclin B	-1.3
NM_022391.1	Pituitary tumor transforming gene (Pttg1)	-1.3
U10188.1	polo like kinase (plk)	-1.1
AA944180	ESTs, Highly similar to CKS2 MOUSE CYCLIN-DEPENDENT KINASES REGULATORY SUBUNIT 2	-1.0
NM_133572.1	cell division cycle 25B (Cdc25b)	-0.9
NM_022392.1	growth response protein (CL-6)	-0.6
BE111697	ESTs, Highly similar to RB6K MOUSE RABKINESIN-6	-0.6
BM385445	topoisomerase (DNA) II alpha	-0.3

Apoptosis

NM_022548.1	p53-activated gene 608 (PAG608)	1.0
NM_017059.1	Bax protein splice variant k mRNA	0.7
NM_012922.1	ICE-related protease CPP32 (Caspase-3)	0.5
NM_031135.1	TGFB inducible early growth response (Tieg)	0.4



Ara-C暴露によるDNA傷害修復因子の変動

Sensing DNA damage		Fold change (Log2)
NM_022622.1	BRCA1-associated RING domain protein 1 (Bard1)	0.9
NM_012514.1	breast cancer 1 (Brca1)	0.7
NM_031058.1	mismatch repair protein (Msh2)	0.6
BF283113	replication factor C (RFC, activator 1) 2 (40kD)	0.6
DNA repair (DNA replication)		
NM_053480.1	DNA polymerase alpha subunit II (Pola2)	0.9
BM385924	p32-subunit of replication protein A	0.7
AB066102.1	G22p1 (Ku70)	0.7
NM_053430.1	Flap structure-specific endonuclease 1 (Fen1)	0.6
NM_030855.1	DNA ligase I (Lig1)	0.6
BE101140	ESTs, Highly similar to DPOE_MOUSE DNA polymerase epsilon, catalytic subunit A (DNA polymerase II subunit A) (M.musculus)	0.5
NM_021662.1	DNA polymerase delta, catalytic subunit (Pold1)	0.5
BE108911	DNA primase small subunit mRNA	0.5
BM392229	ESTs, Highly similar to RFA1_HUMAN REPLICATION PROTEIN A 70 KD DNA-BINDING SUBUNIT (H.sapiens)	0.5
NM_022381.1	Proliferating cell nuclear antigen (Pcna)	0.4
AI102751	ESTs, Highly similar to DPD2_MOUSE DNA POLYMERASE DELTA SMALL SUBUNIT	0.4
NM_022391.1	Pituitary tumor transforming gene (Pttg1)	-1.3

DNA傷害物質を暴露したラット胎仔脳での修復過程における遺伝子発現の解析

目的 : 胎児中枢神経毒性の全容の解明

投与物質 : 1. 5-Azacytidine (5AzC; 10 mg/kg i.p.)
2. Cytosine arabinoside (Ara-C; 250 mg/kg i.p.)

動物 : 妊娠13日齢ラット (n=2)

チップ解析 : GeneChip (AFFYMETRIX)

↓: 投与

胎仔脳組織の傷害
(胎齢13~14日)

胎仔脳組織の再生・修復
(胎齢14~16日)

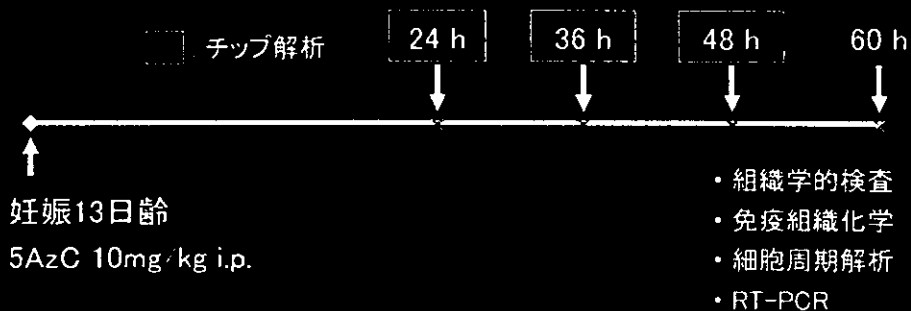
出生後の神経障害
(生後0日~)

5-Azacytidine (5AzC) 暴露ラット胎仔脳での再生・修復過程における遺伝子発現の解析

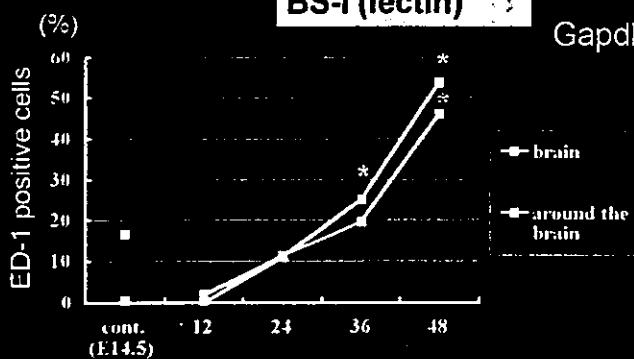
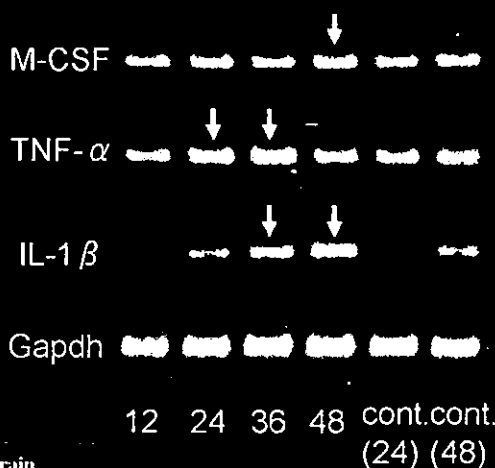
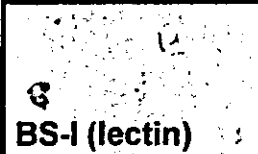
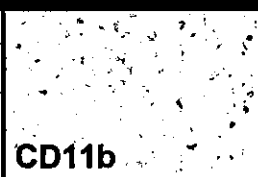
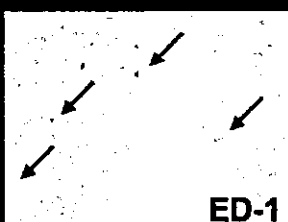
5-Azacytidine (5AzC) : cytidine のアナログ、脱メチル化・DNA傷害作用

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

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



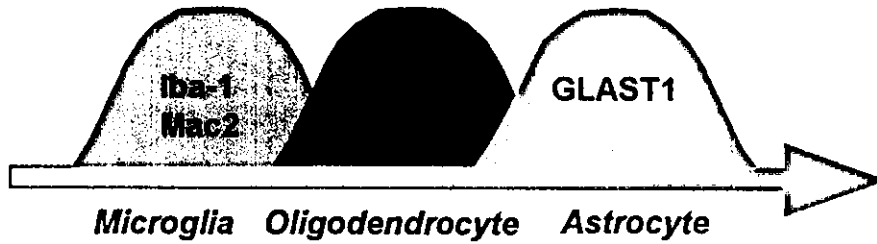
胎仔脳組織の修復期 (5AzC暴露) におけるミクログリアの浸潤



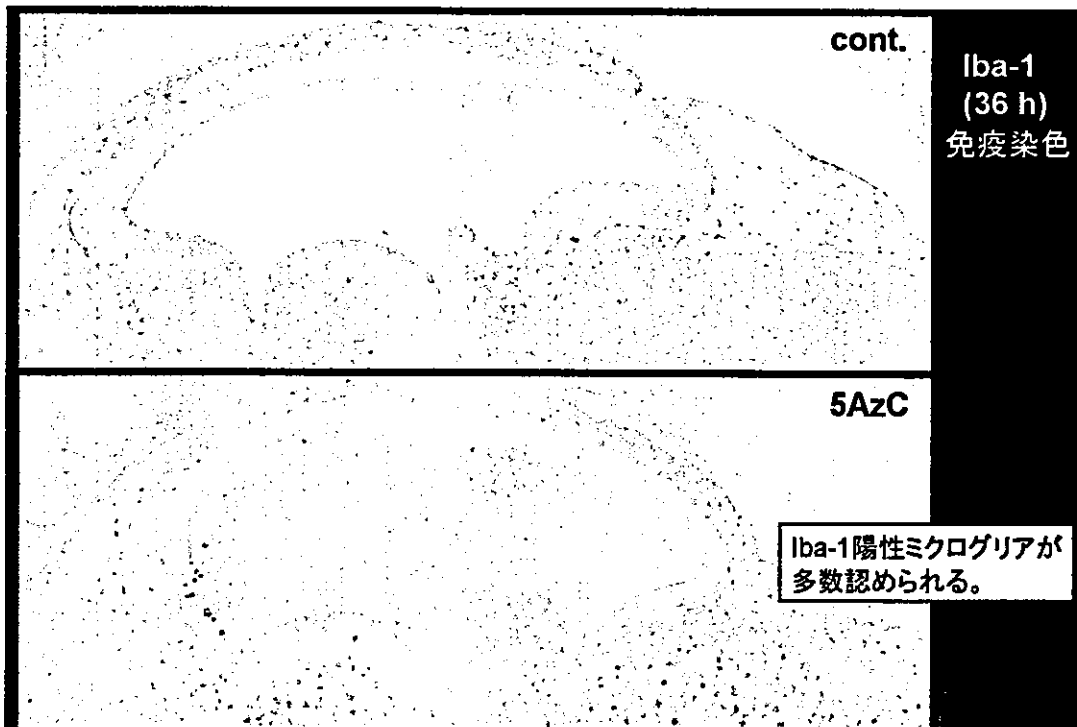
ミクログリア関連サイトカインの発現増加

グリア細胞 修復期における遺伝子変動 (5AzC暴露)

Accession No.	Genes	24 h	36 h	48 h
Glial Cell				
NM_017196.1	allograft inflammatory factor 1 (Aif1) / Iba-1 / mrf-1	1.9		
NM_031832.1	lectin, galactose binding, soluble 3 (Lgals3) / MAC2	1.9	3.4	
NM_021770.2	oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1)		1.8	
AF265360.1	Slc1a3 /GLAST-1a		1.8	1.6
NM_033352.1	solute carrier family 1. member 3 (Slc1a3)/EAAT1/GLAST1			1.9

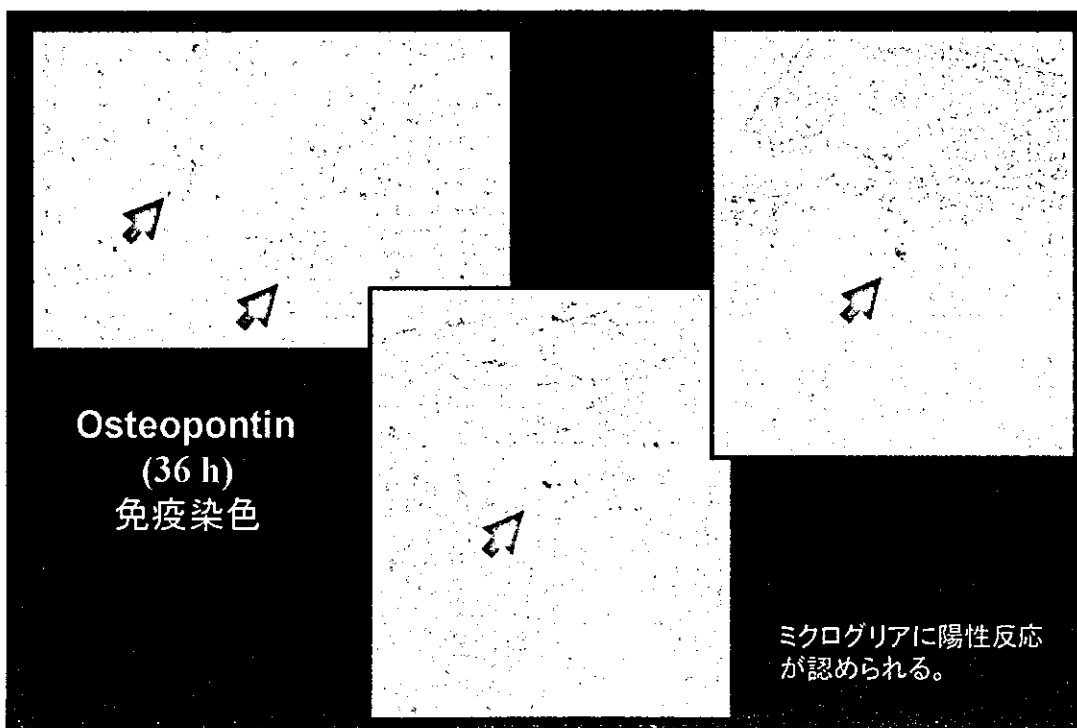
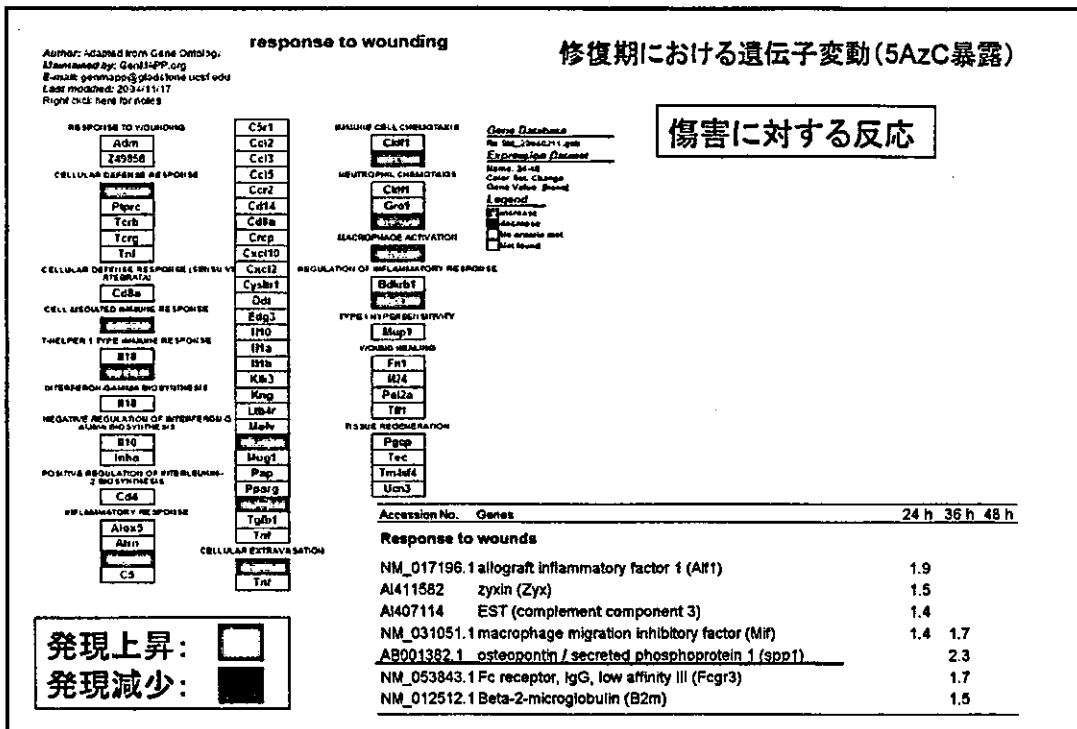


生理的意義は今の所不明だが、ミクログリアの浸潤には対応している

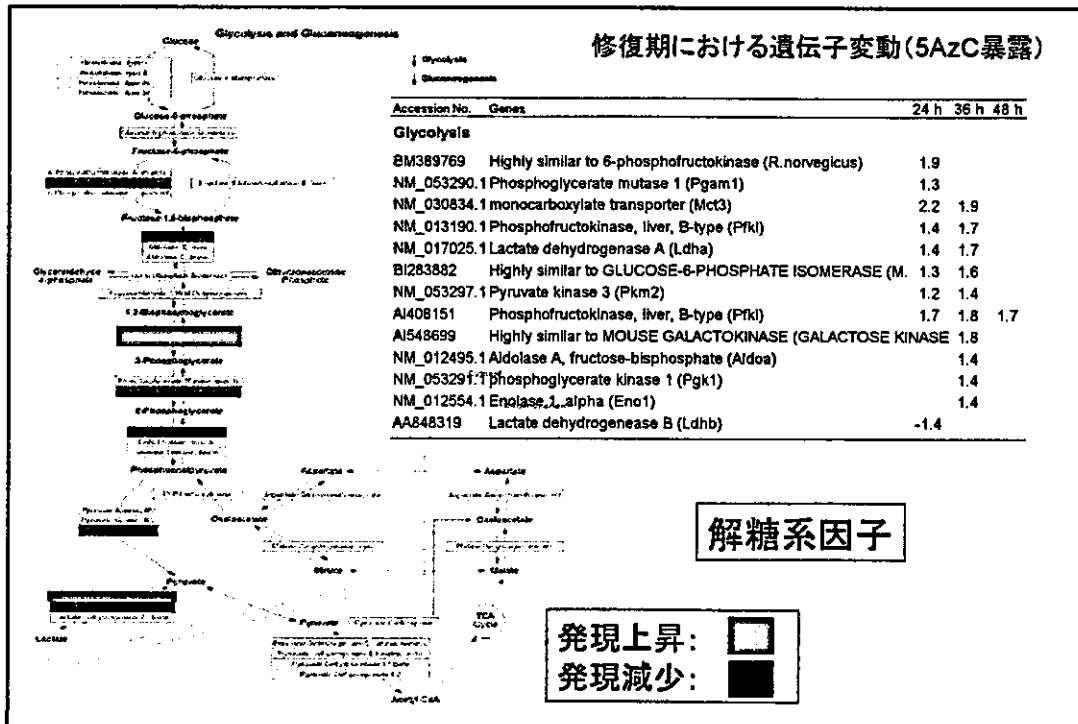


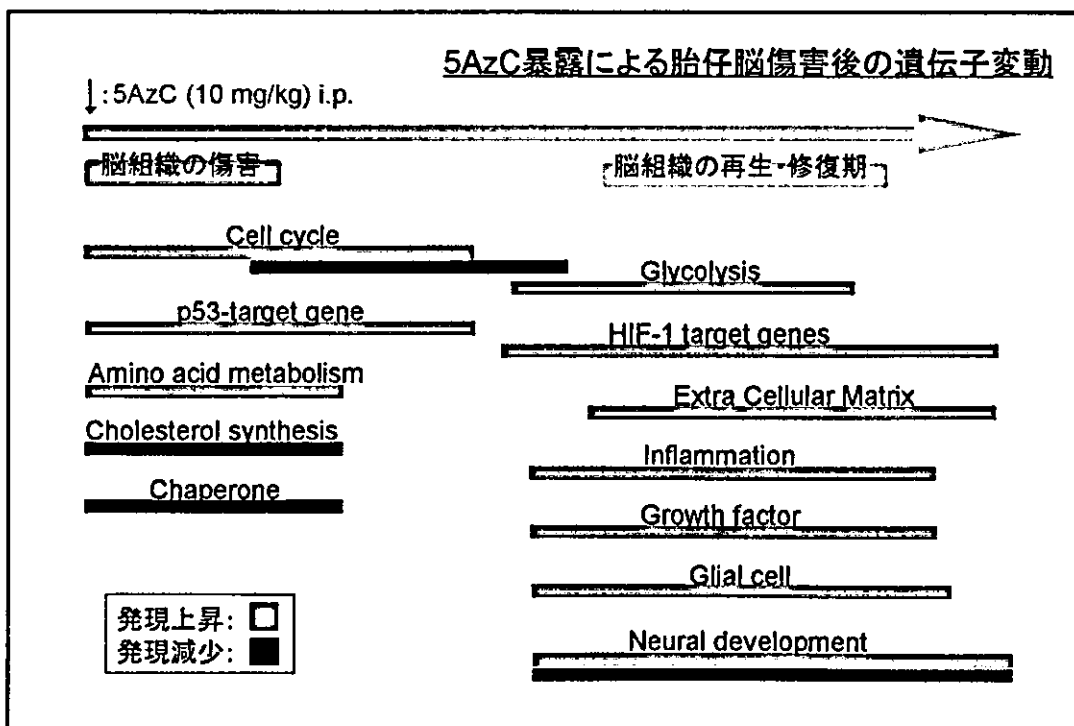
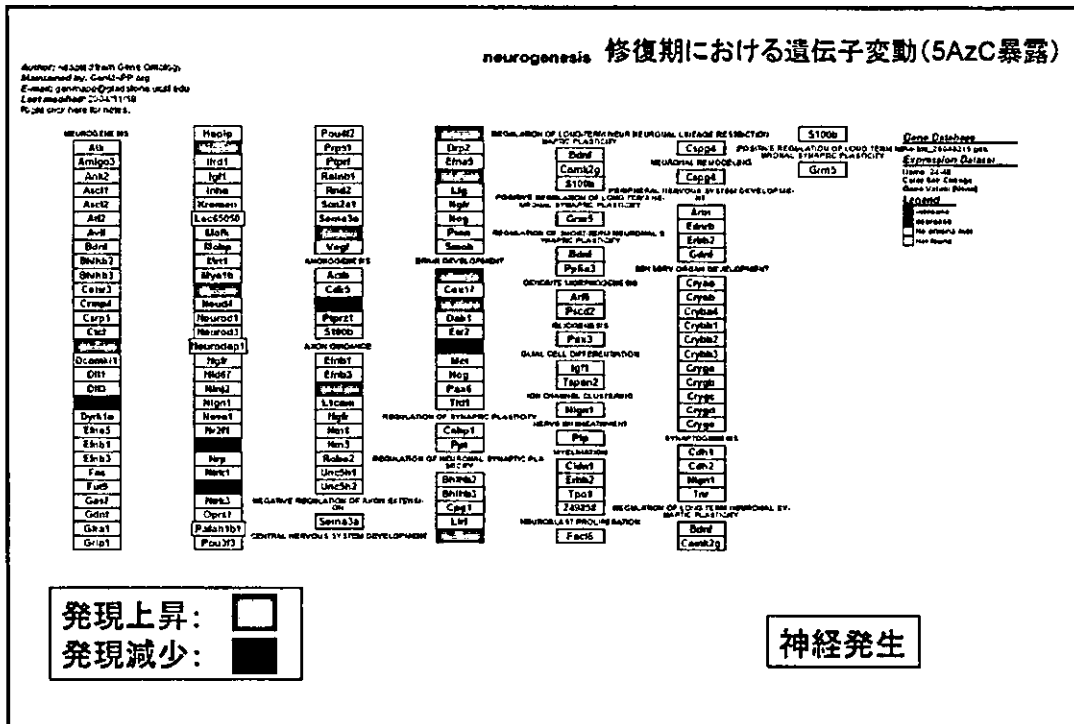
Iba-1
(36 h)
免疫染色

Iba-1陽性ミクログリアが
多数認められる。

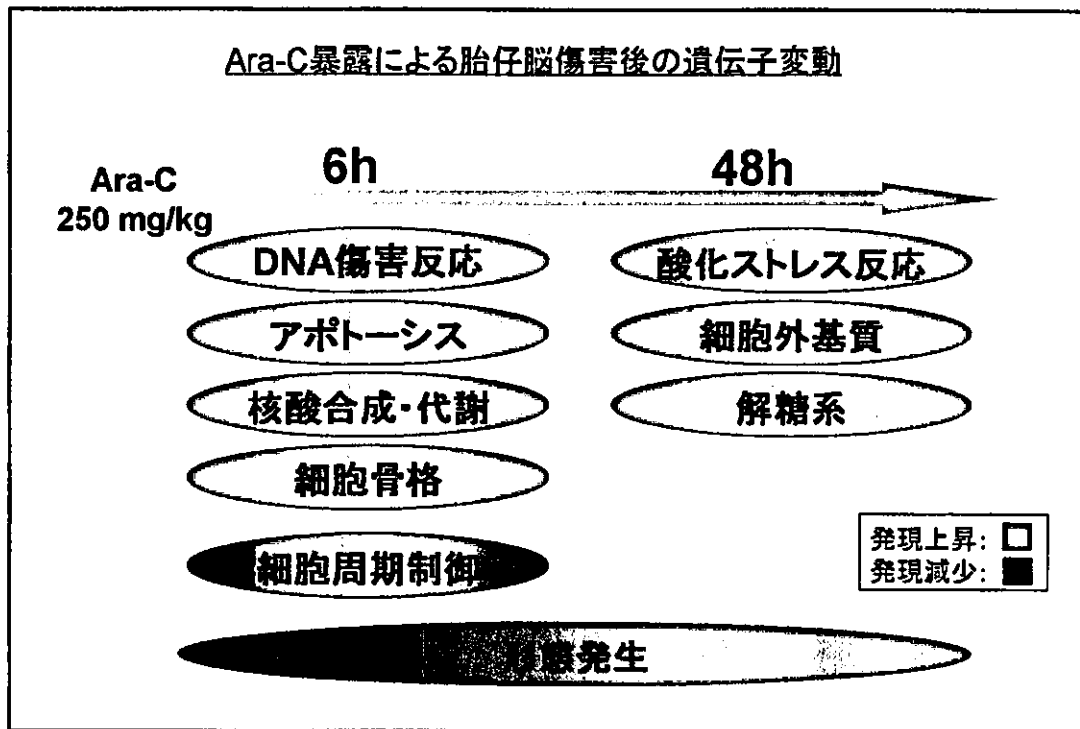


細胞外基質		修復期における遺伝子変動(5AzC暴露)		
Accession No.	Genes	24 h	36 h	48 h
Extra Cellular Matrix				
BM390457	TGF-beta masking protein large subunit (Ltp1)	2.0		
AI169104	platelet factor 4 (PF4) / SCYB4	1.7		
NM_024400.1	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin r	1.7		
BI275624	laminin, gamma 1 (Lamc1)	1.3		
BM388837	procollagen, type I, alpha 2 (Col1a2)	1.3		
BI285575	procollagen, type I, alpha 1 (Col1a1)	1.2		
BI274401	proyl 4-hydroxylase alpha subunit (P4ha1)	1.5	1.4	
AB001382.1	osteopontin / secreted phosphoprotein 1 (spp1)	2.3		
Z78279.1	collagen alpha1 type I (Col1a1)	1.3		
NM_012656.1	Secreted acidic cystein-rich glycoprotein (osteonectin) (Sparc)	1.2		
AF305418.1	type II collagen (Col2a1)	1.4	1.7	
BE111752	ESTs, Highly similar to PROCOLLAGEN ALPHA 1(IV) PRECURSOR	1.6		
AI171185	Hyaluronan mediated motility receptor (Hmnr/RHAMM)	1.5		
BI275716	Col3a1 /procollagen, type III, alpha 1	1.4		
AI179127	Small proteoglycan I (biglycan (Bgn))/bonecartilage proteclycan 1 prec	-1.5		
L38247.1	synaptotagmin IV		-1.3	
L20468.1	cerebroglycan/Glypican-2 (Gpc2)		-1.3	
NM_019907.1	postsynaptic protein Cript (Cript)		-1.2	





Ara-C暴露による胎仔脳傷害後の遺伝子変動



胎仔脳の修復・再生機序に関する考察

- ・神経発生関連因子
→ 大幅な組織発生のリモデリング
- ・解糖系酵素・細胞外基質
→ 傷害組織に対する細胞の適応
- ・炎症・グリア関連因子
→ ミクログリアの浸潤・その役割は？

まとめ

脳の発生過程において神経上皮(幹)細胞は、DNA傷害といった外因性の刺激に対して高い感受性を示す。

神経上皮細胞は、多様な細胞周期制御やアポトーシスによる異常細胞の排除を行い、更に、脳組織の修復機構の働きにより脳発生の恒常性の維持に努めると考えられた。

また、それに伴って生じる傷害の程度により、新生仔には構成細胞の減少や構築異常を伴う種々の程度の中樞神経障害が発生する。

研究報告書

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 金井 好克

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、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、病態との関わりが将来的には包括的に把握されるようになると予想されるが、そこに至るにはゲノム上の機能未同定の全遺伝子の機能を明らかにすることが先決である。腎には、広い基質選択性を有し異物排除や薬物やその代謝産物の排泄に関わる一群のトランスポーター（多選択性トランスポーター）が存在する。しかし、その広い基質選択性のために毒性物質の細胞内侵入の経路となるため、そのようなトランスポーターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の重要な因子となる。本年度の研究は、化学物質の腎毒性発現に関わるトランスポーターの全体像を明らかにすることを目的として、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行った。本年度の研究により、プロスタグランジン系化合物を輸送する腎特異的な有機アニオントランスポーターUST6、腎、脳に発現する広い基質選択性を示す有機アニオントランスポーターOAT10、精巣に発現する有機アニオントランスポーターOAT11、腎、脳を中心とした発現を示す有機アニオントランスポーターOAT12、及びアミノ酸類似構造を持つ毒性化学物質の輸送経路となる多選択性のアミノ酸トランスポーターBAT1の5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、腫瘍細胞増殖抑制効果を有する構造の異なるアミノ酸トランスポーター阻害物質による増殖抑制効果のDNAマイクロアレイ解析により、化合物の効果発現の細胞内機序の一端が明かとなった。

A. 研究目的：

本研究では、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ため、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し、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。それらのマウスホモログを単離し遺伝子欠失動物の作出により、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における毒性学的意義を明らかにする。

腎毒性の発現には、腎毒性物質の細胞内への侵入が第一のステップとなるが、特

に尿細管細胞は異物排泄のための多くのトランスポーターを備えているため、腎毒性発現にこれらのトランスポーターが重要な寄与をする。これらの代謝産物(有機酸等)や外来性異物の排出を担当するトランスポーターは、一般に特異性が低く多選択性トランスポーターと呼ばれ、多くの代謝産物や未知の外来性異物等にも対応できるようになっており、生体防御に適した特性を有している。しかし、その広い基質選択性のために毒性物質の細胞内侵入の経路となるため、そのようなトランスポーターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の重要な因子となる。従って、DNA マイクロアレイ解析による化学物質の腎毒性の評価において、化学物質の腎毒性発現に関わるトランスポーターの全遺伝子の機能と化学物質の腎毒性発現における役割に関する情報が必須のものとなる。そこで本研究においては、腎型多選択性トランスポーターのファミリーである SLC22 の機能未同定の遺伝子の機能解析を先行させている。本年度は、SLC22 ファミリーが多選択性有機アニオントランスポーター 4 遺伝子の機能を新たに明らかにし、アミノ酸類似構造を持つ毒性化学物質の輸送経路となる多選択性のアミノ酸トランスポーター 1 種を同定した。加えて DNA マイクロアレイ解析による化合物作用の細胞内機序の解析を行った。

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トランスポーター

遺伝子の同定

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、それを入手して使用した。

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。

広い基質選択性を示すアミノ酸輸送系 B⁰ の分子同定の目的で、Hartnup 病遺伝子座 5p15 においてトランスポーター遺伝子の BLAST 検索を行い、この領域においてトランスポーター遺伝子を探索した。得られた候補遺伝子の cDNA を腎由来の poly(A)⁺RNA を用いた RT-PCR により取得し、発現プラスミドベクター pcDNA3.1 にサブクローニングした。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。

- 新規トランスポーターの機能及び発現