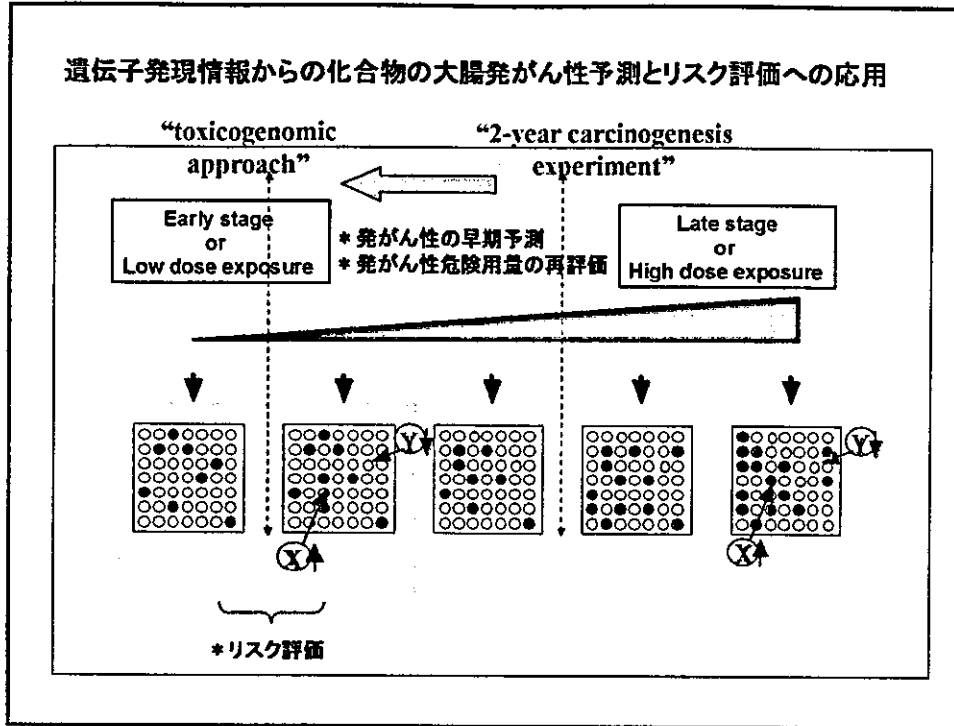
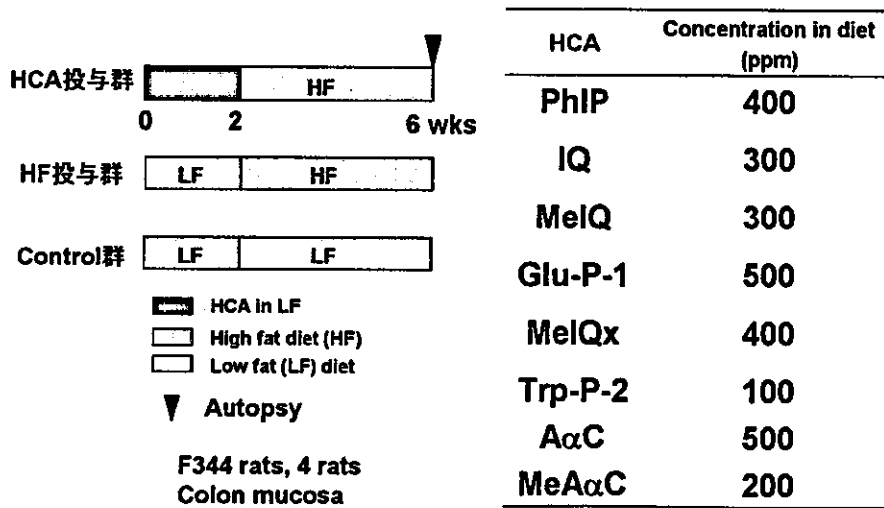


遺伝子発現情報からの化合物の大腸発がん性予測とリスク評価への応用



Experimental Protocol

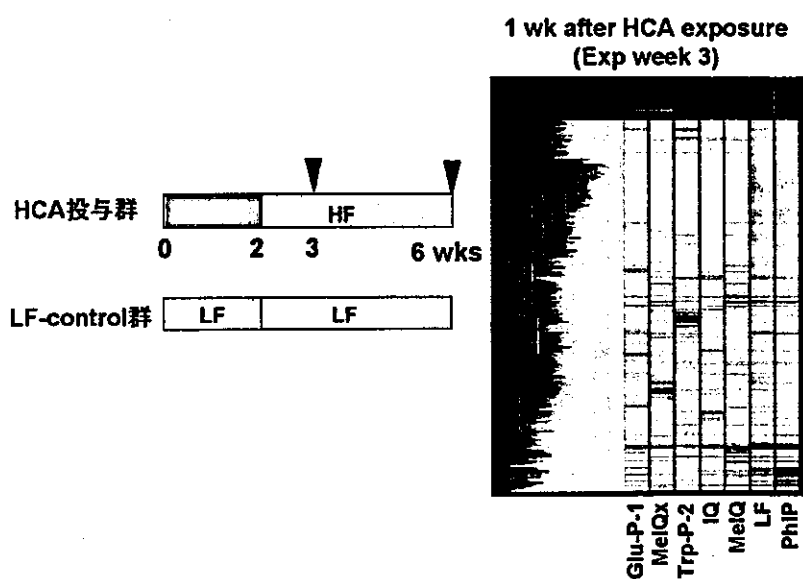


Induction of ACF and Tumors Treated with Various HCAs

HCAs	No. of ACF/rat	Colon carcinogenicity	
		Continues	Intermittent
PhIP	2.7 ± 1.5	++	++
IQ	1.8 ± 0.8	++	+
MeIQ	5.6 ± 2.3	+	++
Glu-P-1	1.8 ± 1.3	++	N.T.
MeIQx	1.6 ± 1.1	-	+ (low)
Trp-P-2	0	-	N.T.
AαC	0	-	N.T.
MeAαC	0.4 ± 0.5	-	N.T.

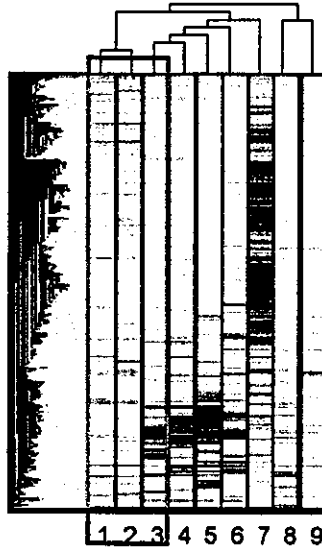
N.T. ; Not tested

Clustering Analysis of Gene Expression Profiles of Various HCAs



Hierarchical Clustering Analysis of Genes Induced by HCAs

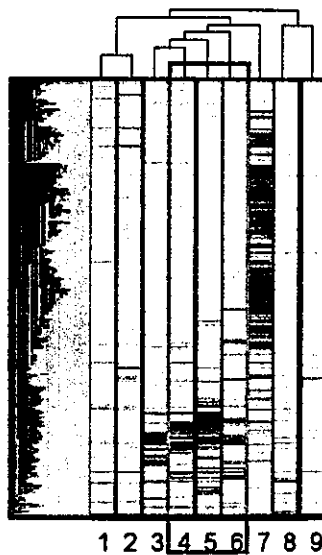
1. A α C
2. MeA α C
3. Trp-P-2
4. MeIQx
5. Glu-P-1
6. MeIQ
7. IQ
8. PhIP
9. Low-fat control



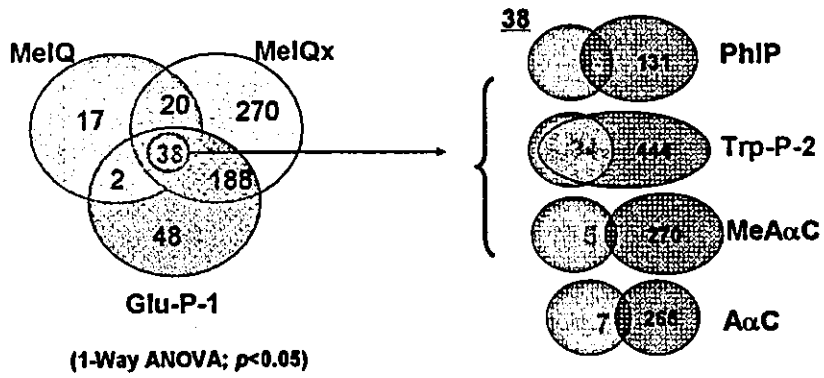
(Exp week 6)

Hierarchical Clustering Analysis of Genes Induced by HCAs

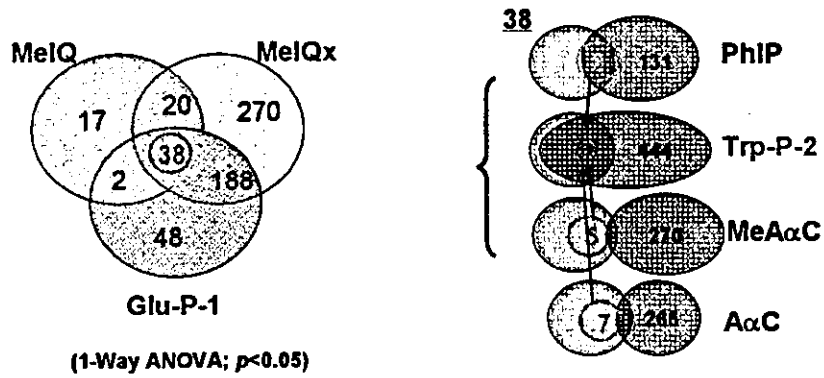
1. A α C
2. MeA α C
3. Trp-P-2
4. MeIQx
5. Glu-P-1
6. MeIQ
7. IQ
8. PhIP
9. Low-fat control



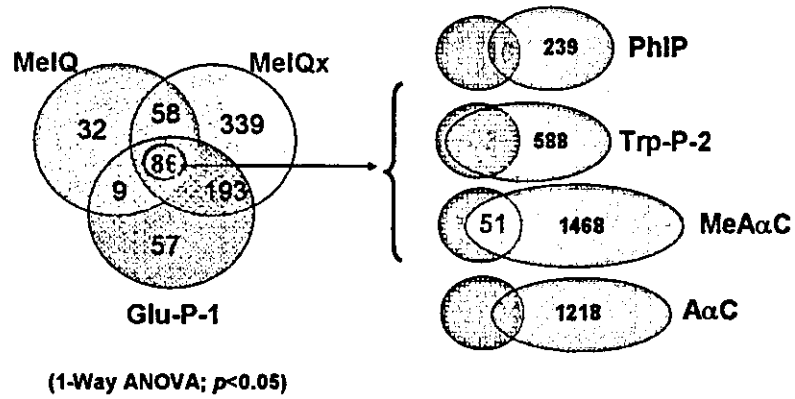
Genes Commonly Up-regulated by HCA Treatment



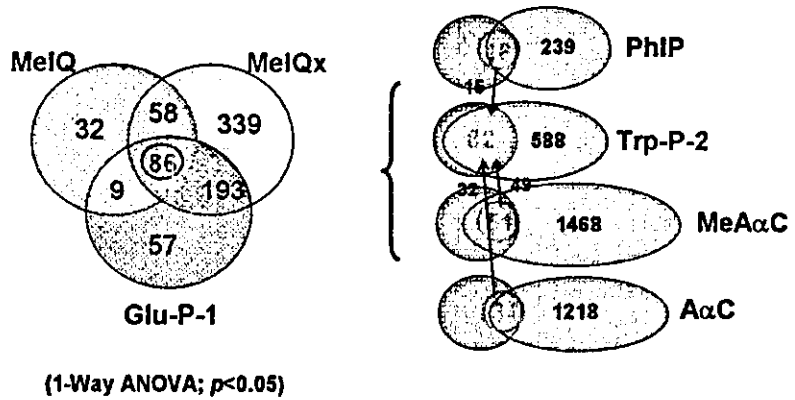
Genes Commonly Up-regulated by HCA Treatment



Genes Commonly Down-regulated by HCA Treatment

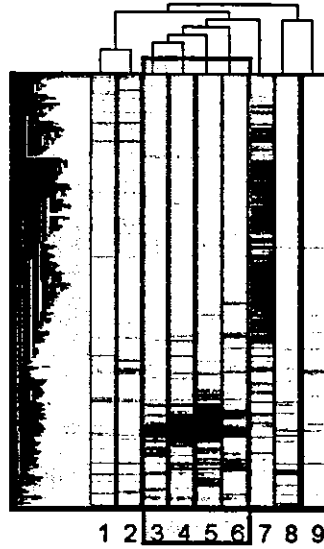


Genes Commonly Down-regulated by HCA Treatment

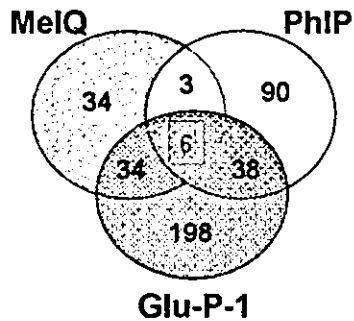


Hierarchical Clustering Analysis of Genes Induced by HCAs

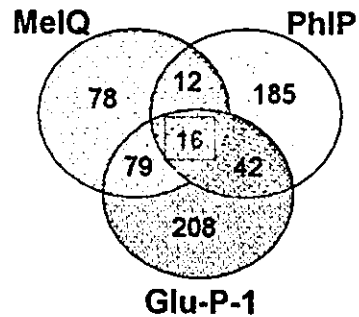
1. AαC
2. MeAαC
3. Trp-P-2
4. MeIQx
5. Glu-P-1
6. MeIQ
7. IQ
8. PhIP
9. Low-fat control



Number of Genes Commonly Up- or Down-regulated by PhIP, MeIQ and Glu-P-1



HCA \uparrow > LF-control



HCA \downarrow > LF-control

(1-Way ANOVA; $p < 0.05$)

PhIP, Glu-P-2, MeIQ投与により共通に発現変化する遺伝子リストを用いた発がん性予測の検討



発現遺伝子のプロファイルから、Trp-P-2の大腸発がん性が予測される



今後、Trp-P-2の「短期間欠投与方法」を用いた大腸発がん性の検討が必要と考えられる

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

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)モデルとしてのアリルハイドロカーボン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作動性化学物暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究、そして応用篇として (2) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究を実施し、更に (3) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析にかかる検討に着手した。

A. 研究の目的

(1) モデルとしてのアリルハイドロカーボン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作動性化学物質暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

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。内分泌かく乱化学物質等、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、評価に値する情報を表

現型が現れない状況で取得する必要がある。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の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、昨年度まで、日内変動遺伝子群、及びモデルケースとして Ahr 作動性化学物質である 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てきた。本年度は、TCDD と同様に Ahr を介した作用メカニズムを持つ化学物質に暴露されたときの遺伝子発現プロファイルとの比較検討を行った。

(2) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

個体を構成する細胞はその種類に応じて異なる特性を示すが、ゲノム DNA は同じである。特性の違いは異なる遺伝子発現パターンによって生じ、エピジェネティック制御機構がその基盤となる。エピジェネティック制御機構には、ゲノム DNA の修飾を介するものや、クロマチンを構成するヒストン蛋白質の修飾を介するものがあり、どちらも化学物質による影響を受けることが知られている。よって、個体が恒常性を維持するためには、このエピジェネティック制御機構が適切に機能し、細胞の特性が維持されることが必須である。

エピジェネティック制御機構の中でも、ゲノム DNA の修飾を介する制御は、遺伝子発現のオンオフを恒久的に制御する特に重要性の高い制御機構であり、シトシン塩基のメチル化修飾を介することが知られている。このシトシン塩基のメチル化修飾は、臓器の形成・機能に必要な異なる特性の細胞を生み出す「幹細胞」の機能制御にとって必須である。殊に、神経幹細胞にこの異常が誘発されると、適切な神経系細胞の供給が行えなくなり、中枢神経系に恒久的な影響が残る可能性がある。しかし、メチル化修飾を攪乱する化学物質は、その毒性学的な重要性にもかかわらず、分子メカニズムの詳細は不明な点が多く、分子毒性基盤の整備は未だなされていない。

我々は、マウス胎児由来の神経幹細胞をモデルとして用い、シトシン塩基脱メチル化剤として知られる 5-アザシチジン

(AzaC) を神経幹細胞に暴露することで、神経幹細胞の機能制御における DNA メチル化の役割を、我々の開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析の結果を通して検討して来た。

(3) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析

医薬品として開発された化学物質の中にはしばしば見受けられる発がん物質は、各種遺伝毒性試験で明らかな遺伝子傷害性を示さず、その機序が殆ど不明な非遺伝子傷害性のものが多い。

発がんの初期過程は、イニシエートされた細胞が組織臓器の構成成分としての恒常性を破綻させて、自律性の増殖形質を獲得することを起点としているが、この過程は背景を成す細胞環境から多大な影響を受ける。変異原性の知られていない医薬品等の動物に対する長期投与でしばしばみられる発がん性は、このような恒常性の破綻によって生じるものが殆どであると考えられているが、化学物質固有の生体反応性から、がん化に至る反応性を弁別するのは、初期病変と発がんの母地を区別して解析する必要があるため、現在まで殆ど研究が進んでいない。

そこで本研究では、がん病変とその発生母地での網羅的遺伝子発現解析を行い、投与された化学物質による発がん過程特異的に誘起される遺伝子群の同定を行う。標的臓器は肝臓と甲状腺とし、それぞれについて強力な発がん促進作用を示す phenobarbital、kojic acid(KA)を用いる。部位特異的な発現解析手法として、独自に開発したパラフィン包埋切片中の微量組織からの定量的 RNA 発現解析を可能とするメ

タカーン固定法を用い、マイクロダイセクション法によりがん病変（あるいは前がん病変）と非がん部を分けてマイクロアレイ解析を行う。

B. 研究の方法

(1) モデルとしてのアリルハイドロカーボン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作動性化学物質暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

B-1. 動物実験

12 週齢雄の C57BL/6 マウスに 4 種類の Ahr 作動性化学物質を下記に示す濃度で強制経口投与(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。

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$

2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF)

1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$

3-methylcholanthrene (3-MC)

10, 30, 100 mg/kg

Indigo

30, 100, 300 mg/kg

B-2. RNA の分離精製

当部が開発した“Percellome”手法に基づき検体を処理した。すなわち、組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)により RNase を不活化した。RNAlater 除去後、RLT buffer (Qiagen 社)を用いて組織破砕液を調製した。DNA 定量用蛍光試薬 Picogreen を用いて破砕液中の DNA 量を測定し、DNA 量に応じて Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の Mix)を添加した。TRIzol を用いて粗抽出し、RNeasy Kit により精製し、Total RNA を得た。精製した total RNA は

本年度は、KA 投与後 4 週目の病理組織学的検索と、KA 投与によって甲状腺に発現変動する遺伝子群の予備的な解析を行った。

電気泳動により品質を確認した。

B-3. GeneChip 解析

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、total RNA 5 μg を T7 プロモーターが付加されたオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し、cDNA を調製した。この cDNA を基に第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA polymerase (Enzo 社)によりピオチン化 CTP, UTP の存在下 cRNA を合成した。二本鎖 DNA 及び cRNA 精製には GeneChip sample cleanup module (アフィメトリクス社)を使用した。得られた cRNA を 300-500bp になるように断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し、GeneChip ターゲット溶液とした。GeneChip は Mouse Genome 430 2.0 Array を使用した。45°C、18 時間のハイブリダイゼーション後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーで測定した。測定したデータの標準化は Spike RNA の測定値を基に各遺伝子のシグナル値を細胞 1 個当たりのコピー数に変換する“Percellome”手法を用いて行った。解析は主に当部で開発した MF software を用いて行った。

(2) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

胎生 14.5 日のマウス胎児の終脳の細胞を分離し、DNA の脱メチル化剤である AzaC

の存在下、低接着プレート上で培養し、浮遊細胞凝集塊（ニューロスフェア）を形成させた（図 2-1）。ニューロスフェアは単一の細胞が分裂を繰り返して形成する、神経幹細胞を豊富に含む細胞塊である。形成したニューロスフェアは、マーカーを用いた免疫染色（図 2-2）、Percellome 手法を適用した GeneChip 解析による網羅的遺伝子発現解析に供した。

図 2-1 Procedure for embryonic neurosphere culture

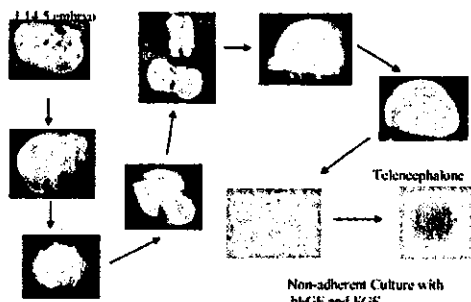
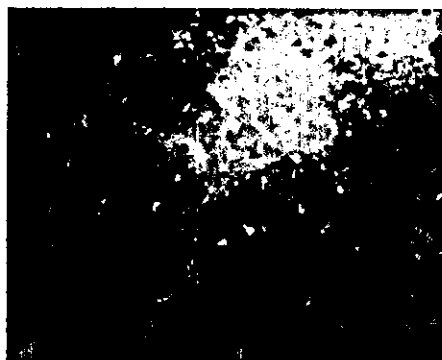


図 2-2 Cells in NS can differentiate into neuron, astrocyte & oligodendrocyte



Green: MAP2, Red: GFAP, Light blue: O4

(3) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析

動物は、5週齢の雄性 F344 ラット（日本 SLC）を用い、無処置群、DHPN 単独投与群については一群 20 匹ずつ、その他の

群については一群 8 匹ずつ計 6 群に群分けした（図 3-1）。

図 3-1:

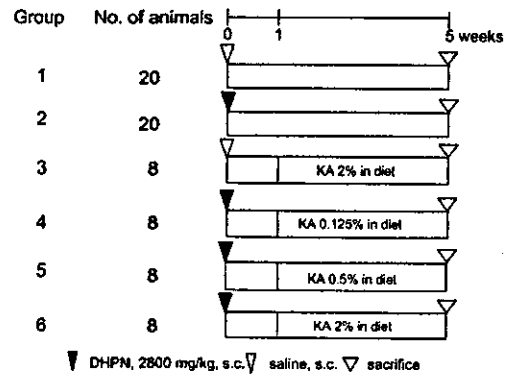


Fig. 1. Experimental design of the KA-induced thyroid carcinogenicity in the two-stage model using DHPN as an initiator.

一週間馴化した後、DHPN 単独投与群と二段階発がんモデル群には DHPN を 2800 mg/kg、無処置群と KA 単独投与群には生理食塩水を相当量単回皮下注射した。DHPN 投与一週後、KA 単独投与群と二段階発がんモデル群には KA を各々 2.0% (KA 単独投与群)、0.125, 0.5, 2.0% (DHPN+KA 群) の用量で基礎飼料 CRF-1（オリエンタル酵母）に混じて投与した。KA 投与 4 週後に全動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、両側の甲状腺を採取した。甲状腺の重量を測定後、無処置群、DHPN 単独投与群については 4 個体分の両側甲状腺をまとめ、計 4 サンプルを遺伝子解析用として RNA later（Ambion）に浸漬させ、残り 4 個体の両側甲状腺を形態観察用にホルマリン固定した。その他の群については、各個体の両側の甲状腺を頭側、尾側に二分し、頭側をホルマリン固定、尾側を RNA later に浸漬し個体ごとに採材した。ホルマリン固定材料は、病理組織学的検索を実施した。Total RNA 抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen)

を用いて行い、各群から4サンプルを用意し、マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用い、発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、本年度は予備的に2.0%KA投与に起因する遺伝子発現プロファイルについて検討した。方法としては、GeneSpring ver.5.1 (Silicon Genetics)を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、2.0% KA 群、DHPN+2.0% KA 群に共通して5倍以上、あるいは1/5倍以下に変動した遺伝子について同定を行った。

C. 研究結果

(1) モデルとしてのアリルハイドロカーボン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作動性化学物質暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

(1)-i Ah r 作動性化学物質投与マウス肝臓の遺伝子発現データの取得

Ahr 作動性化学物質を強制経口投与(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。サンプリングした肝臓から、total RNA を取得し、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (アフィメトリックス社)により、45,101 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。当部で開発した SCal3 を用いて、"Perccellome"手法に基づき、標準化を行った。これに伴い、バックグラウンドの蛍光値、コントロール遺伝子の発現値、total RNA を増幅する際の増幅効率、遺伝子発現値の頻度分布

等、各種にわたるクオリティーコントロールを行っている。また、遺伝子発現データの再現性をスキッタープロットにより検討した。結果の一例を図1-1に示すように、同一群に属する2匹のマウスの発現量をそれぞれ X, Y 軸にプロットすると"Perccellome"手法により標準化したデータは $y = x$ の直線上に分布し、非常によい再現性が得られた。

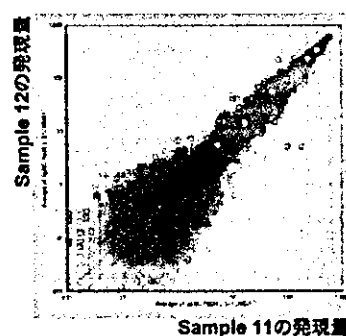


図1-1. 同一群内での再現性の検討

遺伝子発現解析の再現性をスキッタープロットにより検討した。TCDD、溶媒対照、2時間群の例を示した。n=3で取得したうち2つのサンプルの遺伝子の発現量をそれぞれX, Y軸にプロットするとPerccellome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。

本研究で施行した4種類のAhr作動性化学物質の実験は、それぞれ異なる時期に行っている。同じ暴露時間の溶媒群に属する3匹のマウスの遺伝子の発現量の平均値をとり、各々の化学物質の遺伝子の発現量をX, Y軸にプロットすると $y = x$ の直線上に分布する(図1-2)。これは、異なる時期に実験を行っても同一条件での遺伝子発現は同様の値をとっていることを示しており、4種類の化学物質間の比較が可能であることを示していると考えられた。このような"Perccellome"手法による標準化を行うと、発現量を通常用いられている「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' 手法で標準化したデータを以下の解析に使用した。

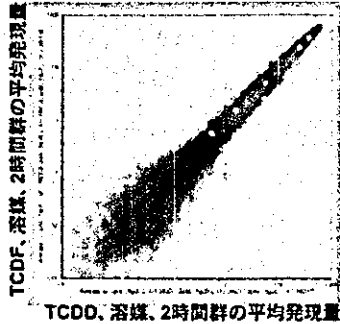


図 1-2 異なる化学物質を投与した際の溶媒対照群の再現性の検討
遺伝子発現解析の再現性をスカッタープロットにより検討した。TCDDおよびTCDFを投与した際の溶媒対照、2時間群の例を示した。n=3で取得したサンプルの遺伝子の発現量の平均をそれぞれX, Y軸にプロットするとxの直線上に分布し異なる化学物質を投与したときにも、溶媒対照群の発現量は非常に高い再現性を示した。

(1)-ii 日内変動を示す遺伝子群

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ことが知られている。昨年度、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に日内変動を示す遺伝子について解析を行った(表 1-1)。これらの遺伝子は、4 種類の化学物質いずれにおいても、日内変動を示した(図 1-3)。一部の遺伝子については、日内変動を示しながら、化学物質による発現誘導を示していた。

表 1-1

Gene ID	Symbol	Accession	Description
1415772_at	Ncl	BC0205460	nucleolin
1416296_at	Tubb6	NM_011655	tubulin, beta 5
1416344_at	Lamp2	NM_010685	lysosomal membrane glycoprotein 2
1416616_at	Hek7	SQ175300	H6HA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 7
1416913_at	Est1	NM_007584	esterase 1
1416924_at	Brc3	NM_018172	brn1 protein 13
1416933_at	Por	NM_008998	P450 (cytochrome) oxidoreductase
1416958_at	Nrf1d2	BC008956	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1416959_at	Nrf1d2	NM_011584	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1417168_at	Usp2	NM_016808	ubiquitin specific protease 2
1417169_at	Usp2	AI553394	ubiquitin specific protease 2
1417190_at	Pbaf-pending	BC018358	pre-B-cell colony-enhancing factor
1417339_at	Dncl1	NM_019682	dynein, cytoplasmic, light chain 1
1417602_at	Per2	NM_011068	period homolog 2 (Drosophila)
1417603_at	Per2	AF035830	period homolog 2 (Drosophila)
1417828_at	Agp8	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_at	Igf1bp4	NM_010517	insulin-like growth factor binding protein 4
1421992_at	Igf1bp4	AA119124	insulin-like growth factor binding protein 4
1422568_at	Ndel1	AF323916	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)
1422986_at	Hpc1	BB765209	Kiemann Pick1 type C1
1423757_at	Igf1bp4	BC019836	insulin-like growth factor binding protein 4
1423804_at	Igf1	BC004801	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
1424275_at	Tiam1	BC020156	inositol methyl-lysine 41
1425099_at	Arnt	BC011080	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
1425456_at	Map2k3	D87115	mitogen activated protein kinase kinase 3
1425678_at	Snrk	BC020189	SNF related kinase
1425742_at	Tgfb14	AF201284	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1425792_at	Rorc	AF163668	RAR-related orphan receptor gamma
1425824_at	Cpsk4	D01095	proprotein convertase subtilisin/kexin type 4
1425941_at	Sic11a2	BB772362	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters)
1427229_at	Hmgcr	BB123978	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
1427347_at	Tubb2	BC003475	tubulin, beta 2
1427838_at	Tubb2	M28739	tubulin, beta 2
1428381_at	2700038C09Ra	BG684450	RIKEN cDNA 2700038C09 gene
1434866_at	Cpt1a	BB021753	carnitine palmitoyltransferase 1, liver
1435732_at	Alpb0c	AV172216	ATPase, H+ transporting, V0 subunit C
1437932_at	Cldn1	AV227581	claudin 1
1438156_at	Cpt1a	BB119196	carnitine palmitoyltransferase 1, liver
1439270_at	Ran	AV116470	RAN, member RAS oncogene family
1448202_at	2610524G07Ra	NM_025596	RIKEN cDNA 2610524G07 gene
1448276_at	Trnaif7	NM_053082	transmembrane 4 superfamily member 7
1448346_at	Ctfl	NM_007687	cofilin 1, non-muscle
1448390_at	Radh1-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	AIW880410	pre-B-cell colony-enhancing factor
1448619_at	Dhcr7	NM_007856	7-dehydrocholesterol reductase
1448682_at	Dncl1	NM_019682	dynein, cytoplasmic, light chain 1
1448684_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_at	Chk	NM_013490	choline kinase
1450387_at	Ak4	NM_009647	adenylate kinase 4
1450982_at	Slc9a3r1	BG086200	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator
1451002_at	Aco2	AA034563	aconitase 2, mitochondrial
1451122_at	Irs1	BC004801	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
1451255_at	Lsch7-pending	BC004672	liver-specific bHLH-Zip transcription factor
1451371_at	1110025G12Ra	AY079153	RIKEN cDNA 1110025G12 gene
1451714_at	Map2k3	AA481780	mitogen activated protein kinase kinase 3
1452179_at	0530048A03Ra	BG066552	RIKEN cDNA D530048A03 gene
1452180_at	0530048A03Ra	BG066528	RIKEN cDNA D530048A03 gene
1452482_at	Erb3	BI251835	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
1452559_at	—	AF037046	—
1452769_at	3732413H11Ra	AK014409	RIKEN cDNA 3732413H11 gene
1454758_at	Tgfb14	AK016382	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1454967_at	—	BN246522	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein ref1
1454971_at	Tgfb14	BB357514	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1460409_at	Cpt1a	AJ987925	carnitine palmitoyltransferase 1, liver

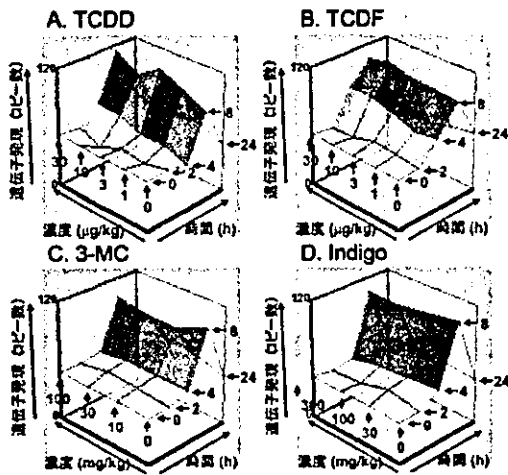


図1-3 日内変動遺伝子 TCDD (A), TCDF (B), 3-MC (C), Indigo (D)投与時の adenylate kinase 2 (Ak2)遺伝子の発現パターンを示す。右方向は時間軸を、左方向が濃度軸を、上方が遺伝子の発現量(コピー数)を表している。投与後、0-2時間の約50コピーから、8時間後の約120コピーまで、化学物質非依存的に発現が上昇し、24時間後には0-2時間後のレベルに戻っており、日内変動を示している。

(1)-iii Ahr を介して発現が誘導される遺伝子群

TCDD, TCDF, 3-MC, 及び Indigo は Ahr を介して、生体に影響を与える。TCDD を例に示すと、Ahr を介して図1-4 に示すような応答を示すことが報告されている。

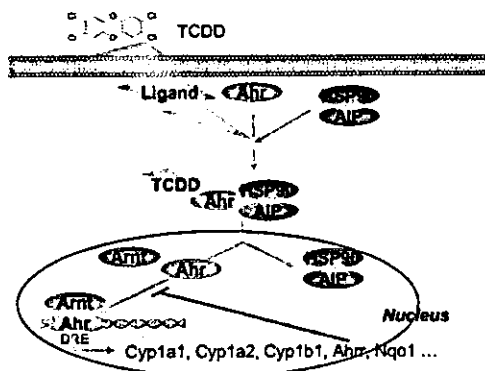


図1-4 Ahr Pathway TCDD, TCDF, 3-MC, IndigoはAhrを介してシグナルを伝達することが知られている。TCDDを例に示すが、Ahrリガンドが結合することにより、Ahrは核内に移行し、dioxin response element (DRE)を介してCyp1a1等の下流遺伝子の発現を誘導する。

Ahr を介して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。

Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1)は TCDD により、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。ダイオキシン類の毒性は TCDD を 1 とした毒性等価係数(TEF)で評価されており、例えば、TCDF の TEF は 0.1 である。この TCDF の Cyp1a1 の誘導を検討したところ、AB に示すように、TEF にほぼ従った発現誘導差がみられた。3-MC は TCDD と同様に 2 時間から濃度依存的な誘導がみられたが、8 時間後に発現はピークを示し、24 時間後には発現の低下がみられ始めた。Indigo は 4~8 時間後に発現のピークを示し、24 時間後には元のレベルに戻った (図1-5)。

さらに、Cyp1a1 同様、Ahr を介して発現が誘導される Cyp1a2 (図1-6), Cyp1b1 (図1-7)についても 4 種類すべてで誘導が確認された。昨年度、TCDD により早期に誘導・抑制が起こる遺伝子群について検討した結果、2, 4 時間と早期に発現のピークを迎える遺伝子として Serpine1, EST (AW558171), Hnf4, Oncogene-related (OR), Rassf1, Sap30, Txnip, Zfp3611, Gadd45b, Nfe2l2 の 10 遺伝子を報告した。これらの遺伝子の多くが、他の 3 種類の Ahr 作動性化学物質においても同様に誘導されることが観察された。

(2) 恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究

AzaC を暴露し、ゲノム DNA 中のシトシン塩基のメチル化程度を非特異的に低下させることによって、神経幹細胞にどのような変化が生じるかを検討した。その結果、1 uM AzaC の存在下では、未分化状態を維持できず付着してニューロン様の突起を有する細胞を含むニューロスフェアの割合が増加した (図 2-3)。

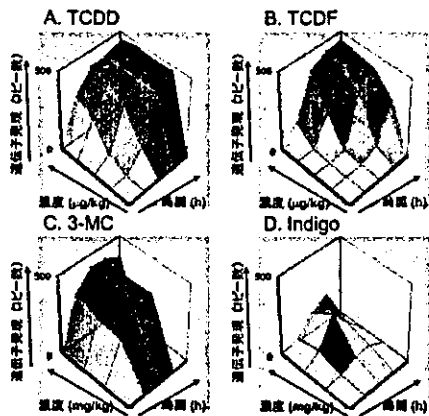


図1-5. Cyp1a1遺伝子の発現パターン
TCDD (A), TCDF (B), 3-MC (C), Indigo (D)投与時の Cyp1a1遺伝子の発現パターンを示す。グラフの濃度軸と時間軸とは図1-3と同様である。遺伝子発現は、細胞1個あたりに発現しているコピー数で表しており、発現軸は4物質ともに0コピーから500コピーに固定している。

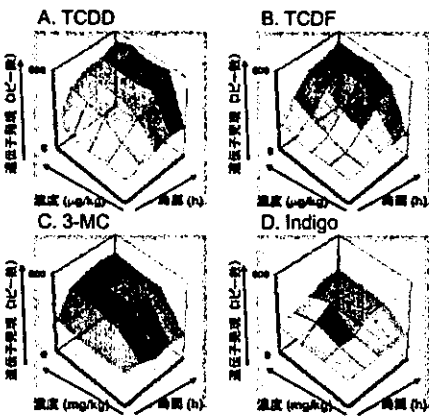


図1-6. Cyp1a2遺伝子の発現パターン
TCDD (A), TCDF (B), 3-MC (C), Indigo (D)投与時の Cyp1a2遺伝子の発現パターンを示す。グラフの濃度軸と時間軸とは図1-3と同様である。遺伝子発現は、細胞1個あたりに発現しているコピー数で表しており、発現軸は4物質ともに0コピーから500コピーに固定している。

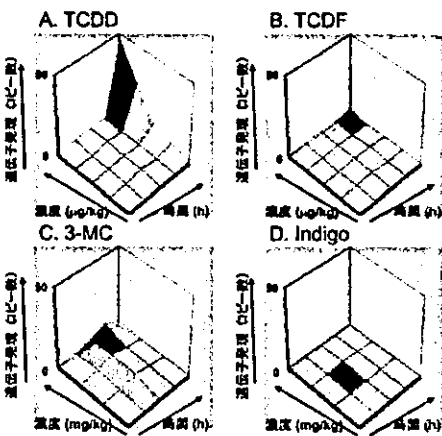
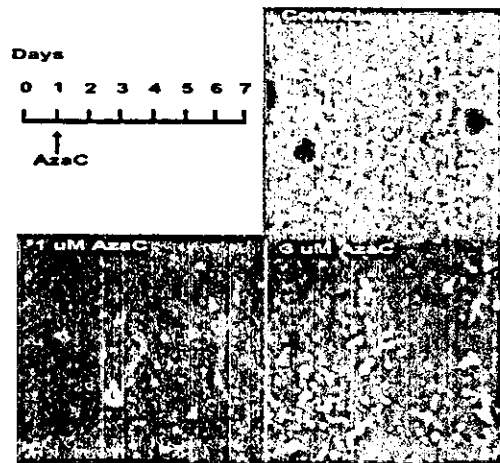


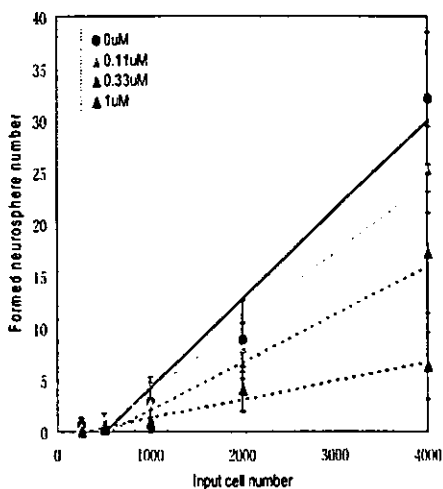
図1-7. Cyp1b1遺伝子の発現パターン
TCDD (A), TCDF (B), 3-MC (C), Indigo (D)投与時の Cyp1b1遺伝子の発現パターンを示す。グラフの濃度軸と時間軸とは図1-3と同様である。遺伝子発現は、細胞1個あたりに発現しているコピー数で表しており、発現軸は4物質ともに0コピーから50コピーに固定している。

図2-3: Effects of AzaC on Morphology of Neurosphere



これらの突起を有する細胞はニューロンのマーカー蛋白質である MAP2 に対する免疫染色に陽性であった。また、形成されるニューロスフェアの数 (未分化状態維持に関係する) は、AzaC の濃度依存的に低下した (図 2-4)。よって、脱メチル化が神経幹細胞の未分化性維持能を抑制し、ニューロンへの分化を促進する方向に遺伝子発現を変化させることが示唆された。

図 2-4 : Decrease in Number of Neurosphere by AzaC



次に、AzaC が神経幹細胞の遺伝子発現パターンに及ぼす変化を、Percellome 手法を適用した GeneChip 解析により検討した。その結果、神経幹細胞の未分化性を維持するために必要な Hes5 の発現が、AzaC の濃度依存的に低下することが示された。Hes5 と同等の機能を持つとされる Hes1 の発現にはほとんど変化が見られなかったが、Hes1 の機能を抑制し、細胞の未分化性を失わせる Hes6 の発現が上昇した(図 2-5)。これら Hes 遺伝子群は、神経幹細胞の未分化性を維持するのに必須な Notch シグナルによって発現が制御される遺伝子であり、AzaC は Notch シグナル系を抑制する作用を持つことが示唆された。

図 2-5 : Down-regulation of Notch Signaling in Neurosphere Treated with AzaC

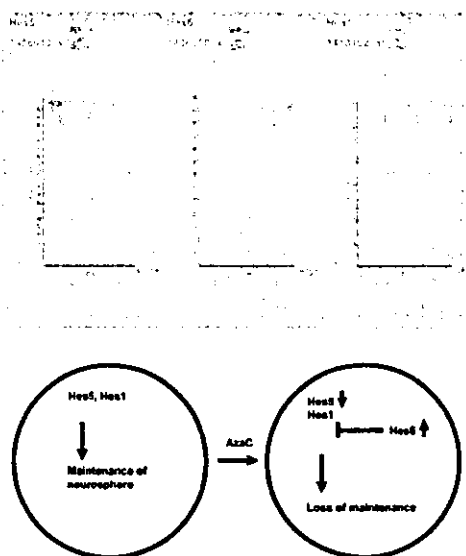
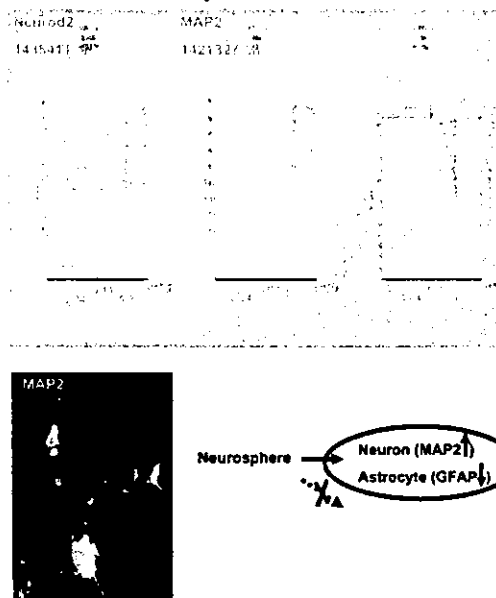


図 2-6 : AzaC-dependent Differentiation of Neurosphere to Neuron

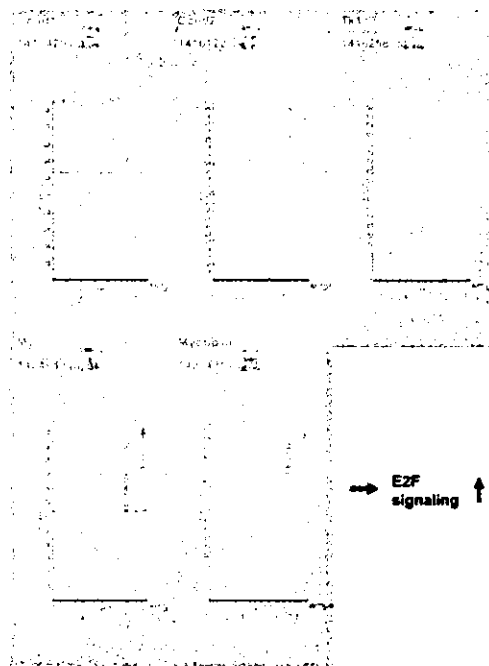


その一方で、神経幹細胞がニューロンへ分化する際に発現が上昇し、ニューロン分化に必要な転写因子 NeuroD の発現が AzaC によって上昇していた。さらに、上述のニューロンマーカーMAP2 の発現上昇も確認された(図 2-6)。従って、Percellome 解析

からも AzaC はニューロンへの分化を誘導していることが推測された。

AzaC 処理ではゲノムを非特異的に脱メチル化しているため、いくつかのシグナルが交錯している可能性がある。AzaC により、サイクリン D1、サイクリン D2、DNA ポリメラーゼ、Myb などの、細胞周期を回転させる遺伝子群の発現も上昇していることが明らかとなった (図 2-7)。これらの遺伝子は、転写因子 E2F の標的遺伝子である。

図 2-7: Up-regulation of Cell Growth Signaling



E2F の結合配列はメチル化を受ける可能性のある CpG 配列を含んでいる。また、E2F の標的遺伝子のプロモーター近傍には、CpG アイランドが存在している。従って AzaC は、E2F の結合配列やプロモーター近傍の CpG アイランドのシトシン塩基を脱メチル化し、E2F 標的遺伝子群の発現を上昇させ、細胞周期回転を促進している可能性が示唆された。形態的には依然として

スフェアとして浮遊培養条件にあるものが、AzaC の影響により総体としてみると、未分化性維持を抑制し、ニューロンへの分化を促進し、かつ増殖促進作用を示すことが示唆され興味深い。ニューロスフェアへの総体的 BrdU の取り込みは、概して AzaC により変化しないことから、幹細胞の枯渇に関わる調節機構の存在も示唆される所見であると考えられる。

(3) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析

実験期間中の体重の変動を図 3-2 に示した。

図 3-2:

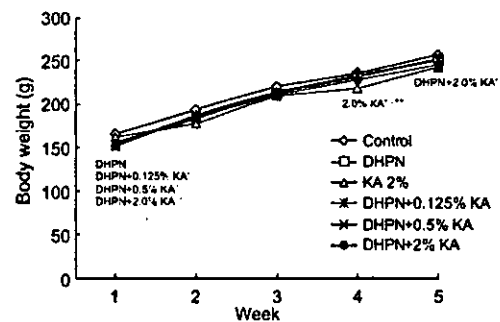


Fig. 2. Growth curve of male F344 rats treated with SDM in the two-stage thyroid carcinogenesis model using DHPN as an initiator.
.: Significantly different from the untreated group ($P < 0.05$, ** $P < 0.01$).
**.: Significantly different from the DHPN group ($P < 0.01$).

実験開始後 1 週目において対照群と比べて DHPN を投与した各群で有意な低値を示した。第 4 週目では 2.0% KA 群においては対照群ないし DHPN 群と比較して、第 5 週目では DHPN+2.0% KA 群において対照群と比較して、有意な低値を示した。

解剖時の甲状腺重量は、2.0% KA 群と DHPN+0.5% KA 以上の群において、無処置対照群あるいは DHPN 単独群に比べて、絶対、相対重量ともに有意な増加が認められた (表 3-1)。

甲状腺の病理組織学的検索の結果を表3-2に示した。2.0% KA 群においては、全例に軽度から高度のびまん性濾胞上皮肥大を認めた。

表3-1 Final body, absolute and relative thyroid weights of male F344 rats after 4-week KA-treatment in the two-stage thyroid carcinogenesis model using DHPN as an initiator.

	Group					
	Control	DHPN	KA 2%	DHPN+KA 2%	KA 2%	2
Final body weight (g)	257.1 ± 16.6	246.7 ± 16.2	257.0 ± 9.5	244.4 ± 10.9	246.2 ± 9.9	241.1 ± 7.8
Thyroid weight (mg)	9.6 ± 2.2	9.9 ± 2.4	13.2 ± 6.2**	13.7 ± 2.1	21.3 ± 13.7**	43.7 ± 13.1**
Relative thy. wt. (%)	3.8 ± 1.0	4.0 ± 1.0	5.2 ± 2.4**	5.6 ± 0.8	8.7 ± 6.6**	18.0 ± 4.9**

Mean ± SD.
** Significantly different from the untreated group (P < 0.01).
** Significantly different from the DHPN group (P < 0.01).

表3-2 Incidence of histopathological lesions in the thyroid of male F344 rats treated with Kojic acid for 4 weeks after initiation with DHPN.

	Control		2% KA	DHPN+KA 2%	
	n	%		n	%
No. of animals evaluated	8	8	8	8	
DHPN-induced cell hyperplasia	0	0	4 (50%)*	6 (75.0)**	
Leaf-like follicular cell hyperplasia	0	0	0	4 (50.0)**	

* Grade of the lesion is minimal to slight, moderate to severe.
** Grade of the lesion was classified as the total number of lesions observed in 2 (40%), 3 (37.5%), 4 (50.0%), 5 (62.5%), 6 (75.0%) animals.
* Significantly different from the control (P < 0.01).
** Significantly different from the DHPN group (P < 0.01).

マイクロアレイによる遺伝子発現解析については現在遂行中であるが、予備的に2.0% KA 群と DHPN+2.0% KA 群で共通に発現変動する遺伝子群 (2 倍以上、あるいは 1/2 以下)、即ち発がん過程に寄与せず甲状腺機能低下に関連して発現変動する遺伝子は、増加遺伝子として2.0% KA 群で245 個、DHPN+2.0% KA 群で959 個得られ、その内 200 遺伝子が両群で共通に増加を示した。発現減少遺伝子として2.0% KA 群で433 個、DHPN+2.0% KA 群で693 個得られ、その内 258 遺伝子が両群で共通に低下を示した。これらの遺伝子群の機能クラスターを表3-3に示した。分類されたカテゴリーは、発現増加・低下遺伝子ともに Biological process のうち、Cellular process や Physiological process に関わる遺伝子が、同様に Cellular component のうち、Cell や Extracellular matrix 関わる遺伝子が、Molecular function のうち Binding 関連遺伝子が多く見られた。

2.0% KA 群と DHPN+2.0% KA 群で共通に発現変動する遺伝子群のうち、両者で5 倍以上、あるいは 1/5 倍以下の発現変動した遺伝子を示す。

表3-3 Functional analysis of genes up- or down-regulated in response to 2% KA-treatment. Common genes between DHPN-initiated and uninitiated groups.

Gene function	≥ 2-fold (200 genes)	≤ 0.5-fold (258 genes)
Biological process	50.5%	57.4%
Cellular process	50	71
Development	10	16
Regulation of biological process	7	6
Physiological process	34	54
Behavior	0	1
Cellular component	35.0%	39.9%
Cell	37	63
Extracellular matrix region	5	1
Protein complex	2	6
Molecular function	42.0%	40.3%
Catalytic activity	9	17
Structural molecule activity	5	5
Transporter activity	8	12
Binding	44	45
Motor activity	1	0
Transcription regulator activity	0	1
Signal transducer activity	15	18
Enzyme regulator activity	2	6

まず、発現増加遺伝子 (表3-4) として、mu-Crystallin は thyroid hormone-binding protein の一つである。Napsin A は Cathepsin D に似た aspartic proteinase の一つで、肺と腎臓に発現が知られており、肺では surfactant の産生に関与しているが、甲状腺機能低下に関連した発現変動に関する報告はない。Vanin 1 は発達期の精巣で高発現し、精巣発達に関連することが知られているが、フタル酸エステルを投与したマウスの肝臓で発現上昇することが知られるのみで、甲状腺あるいは甲状腺機能低下との関連の報告はない。Apelin は最近見出された蛋白質で、心臓や脾臓で発現し、機能的にはされていない部分が多いが、体液恒常性や血圧の調節に関与することが指摘されている。最近、reptile の甲状腺の血管内皮細胞に強く発現することが報告されたり、内分泌との関連では、insulin と肥満に反応して

発現増加する adipokine としての機能が報告されている。

表 3-4 List of genes showing up-regulation by KA common to the 2% KA and DHPN+2% KA groups (25 fold)

Accession No.	Gene title	Gene symbol	2% KA	DHPN+2% KA
NM_053953.1	crystallin, mu	RGD:629943	12.0	27.1
NM_019371.1	FS1		6.9	13.9
NM_011670.1	raspin A aspartic peptidase	Naspi	15.8	16.6
RG17485	Transcribed locus, moderately similar to XP_356694 (hypothetical gene supported by NM_022837 (Rattus norvegicus))		5.5	5.3
U018030	Ctose 13-R-FK-prim-14-GIT1 tandem mRNA		5.0	5.8
A155093	Transcribed locus		5.0	9.8
B120040	Transcribed locus		27.4	22.4
B120085	scalin 1 (predicted)	RGD:1510074	5.0	11.6
A117207	apelin, NGLRL2 ligand	Apln	8.5	8.4
BC063710	Transcribed locus		5.4	5.1
B1138725	Transcribed locus		6.9	8.2
B109457	Transcribed locus		5.7	10.1

* 4 fold vs. untreated group

† 4 fold vs. DHPN group

表 3-5 List of genes showing down-regulation by KA common to the 2% KA and DHPN+2% KA groups (4.62 fold)

Accession No.	Gene title	Gene symbol	2% KA	DHPN+2% KA
NM_012549	sumatstatin	Sst	0.17	0.08
NM_019279.1	pro-protein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	Psk1a	0.17	6.5
NM_019249.1	transcript endonuclease specific domain 18	Rept8	0.16	6.3
NM_019248.1	sumatstatin 2	Sst2	0.08	0.20
NM_019251.1	sumatstatin (actin 1)	Sst1	0.13	0.13
NM_019252.1	pro-protein convertase 1	Psk1	0.17	6.7
NM_019253.1	pro-protein convertase 2	Psk2	0.11	0.18
NM_019254.1	pro-protein convertase 3	Psk3	0.05	0.04
NM_019255.1	pro-protein convertase 4	Psk4	0.05	0.04
A291475.1	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 4	RGD:52985	0.11	0.07
NM_021843	adiponectin receptor 1 (AdipoR1)	AdipoR1	0.14	0.08
BC565.1	transcript endonuclease specific domain 18	Rept8	0.16	0.07
M17596.1	calcitonin-related polypeptide beta	Calcrl	0.11	0.29
A117546	transcribed locus		0.26	0.70
M128044	persephin	RGD:52867	0.09	0.20
A199972	transcribed locus		0.12	0.46
A169270	uterine sensitization-associated protein 1 (Uterin)	Uterin	0.15	0.4
B120213	FS1		0.20	0.4
A155096	receptor-like tyrosine kinase 2 (receptor)	RLK110096	0.16	0.46
A172876	transcribed locus		0.16	0.8
B111948	GLI3 (Gli3, protein)	Gli3	0.16	0.05
A199120	FS1		0.04	0.01
B112204	transcribed locus		0.14	0.12

* 4 fold vs. untreated group

† 4 fold vs. DHPN group

次に、2.0% KA 群と DHPN+2.0% KA 群に共通して、1/5 倍以下に強く発現減少した遺伝子群 (表 3-5) として、Somatostatin は脳の視床下部、膵臓のランゲルハンス島、消化管の内分泌細胞等に広く分布し、甲状腺機能低下状態で視床下部において somatostatin の発現低下が報告されており、この受容体もまた thyroid hormone に発現制御を受けることが知られている。Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 は furin という endocytosis や exocytosis の際の蛋白質分解に関与する endoprotease であるが、今回、その inhibitor と共に発現低下を示したが、甲状腺あるいは甲状腺機能低下との関連の報告はない。Regulated endocrine specific protein 18 は末梢内分泌器官の広く分布する 18 kDa の蛋白質である。甲状腺では、

C-cell に分布することが知られており、膵臓ではインシュリン、グルカゴン、ソマトスタチンと共発現し、内分泌顆粒の放出への関与が指摘されているが、甲状腺あるいは甲状腺機能低下との関連の報告はない。Secretogranin II は前駆体蛋白質で、脳、小腸、ラ氏島、甲状腺、下垂体神経葉などでプロセッシングを受け secretoneurin となる。また、橋本病の C-cell で発現増加することが知られているが、甲状腺機能低下との関連の報告はない。FGF に関しては、FGF2 が TGFβ1 と共に、甲状腺機能低下に伴う甲状腺での血管新生に関与するとの報告や、甲状腺機能低下により心室での FGF2 の up-regulation が知られているが、甲状腺機能低下との関連で、この因子の発現低下に関する報告はない。Nociceptin は下垂体からの thyrotropin の分泌を亢進させることが報告されている。Calcium-sensing receptor は calcitonin 放出に関連し、今回、無処置対照群あるいは DHPN 群で上皮小体を完全に採りきれなかったことに起因する発現変化と考えられる。Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) family receptor alpha 4 は内分泌臓器に広く分布し、persephin の受容体として知られ、正常の甲状腺や甲状腺の medullary carcinoma で強く発現することが報告されているが、甲状腺機能低下との関連での報告はない。Achaete-scute complex homolog-like 1 は神経あるいは内分泌細胞での発現が知られているが、甲状腺機能低下との関連の報告はない。Calcitonin-related polypeptide β は C-cell 由来であるが、甲状腺機能低下との関連の報告はない。Uterine sensitization-associated gene 1 は bone morphogenetic protein に拮抗

する蛋白質であり、子宮内膜や腎臓で高発現するとの報告があるが、甲状腺あるいは甲状腺機能低下との関連での報告はない。Complement receptor 2 は protein family を形成し、甲状腺濾胞上皮細胞細胞膜に発現する蛋白質であるが、甲状腺機能低下との関連の報告はない。GATA-binding protein family は、各種造血系細胞に発現し、遺伝子プロモーターの GATA モチーフに結合する転写因子である。GATA-3 は、全ステージの T リンパ球に高発現しており、T 細胞特異的遺伝子の転写活性化因子であると考えられている。また、神経系の発達に関与することも示唆されているが、甲状腺やその機能低下症に関する報告は知られていない。G-protein coupled receptors (GPCR) は、7 つの膜貫通 spanning ドメインを持ち、GTP-binding protein に関わる大きなスーパーファミリーに属する蛋白質であり、GPCR の変異により、小人症や先天性甲状腺機能亢進または低下症などが生じることが報告されている。また、甲状腺刺激ホルモン (TRH) レセプター (TRHR) は、GPCR ファミリーに属する。今回の検索で GPCR 64 の発現減少が確認された。この遺伝子が TRHR そのものであるという報告はないが、KA による甲状腺機能低下と GPCR64 の発現低下は関連している可能性がある。Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, PDZ domain containing 1, G-substrate, contactin-1 等については、甲状腺あるいは甲状腺機能低下との関連での報告はない。

D. 考察

(1) モデルとしてのアリルハイドロカーボン受容体 (Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作

動性化学物質暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

まず、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日内変動を示す遺伝子について解析を行った。ヒトやマウスには、1 日を一周期とするリズムが認められる。この現象は光等、外界からの時間的な刺激がない定常状況下でも認められることから、生体内には自立的にリズムを発振する機能が存在していると考えられている。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し、遺伝子発現調節を通し、ホルモン分泌や代謝等多くの生体機能の日周リズムを制御している。また、末梢組織にも同様の遺伝子発現調節がみられ、ローカルな時計として機能している。このような恒常性維持機構は肝臓でも働いていることが報告されている。例えば、上田らは網羅的遺伝子発現解析により肝臓で周期的な遺伝子発現パターンを示す遺伝子群について報告した (Nature 2002 Aug 1;418(6897):534-9)。これらの遺伝子群のうち、表 1-1 の遺伝子が我々の系でも日内変動を示すことを昨年度報告したが、これらの遺伝子は異なる時期に行った 4 種類の化学物質の実験においても確認された。また、このほかにも日内変動を示す約 400 遺伝子を抽出している。Ahr 作動性化学物質で誘導される遺伝子の中には、日内変動を示す遺伝子があり、化学物質に対する恒常性維持機構を検討する際に、通常の生体活動で行われている恒常性維持機構による日内変動遺伝子とのネットワークの解析は重要であり、現在、更にプロモーター解析を含めて検討中である。

次に、ダイオキシン類のレセプターであ