

厚生労働科学研究費 化学物質リスク研究事業
H14年度～16年度総合 分担研究報告書

ダイオキシン曝露によりアカゲザルの臓器に発現障害性がみられた遺伝子群の
DNA マイクロアレイ製作およびヒトの発癌における共通性の検討

分担研究者	浅岡 一雄	京都大学霊長類研究所
共同研究者	福里 利夫	帝京大学
共同研究者	村田 宣夫	帝京大学
共同研究者	久保田 俊一郎	東京大学

研究要旨

サルはヒトに類似するとして、なかでも中型で数 kg の体型をもつマカクサルは実験に多く用いられている。ヒトに対するダイオキシンの健康影響として器官の機能障害、発癌や奇形など体内影響が懸念されている。ヒトに対する健康影響はヒトに最も近い実験動物の研究からの外挿が望まれるためサルを用いて研究を行った。

ダイオキシンのサル成体および胎児への移行に関する研究を記述する。ダイオキシンを 30ng および 300ng/kg 体重で妊娠マカクサルに単回投与した。投与後 7 日目において、両群ともに臍帯血および胎児血に母体血と同程度のダイオキシンの移行が検出された。臓器組織へのダイオキシンの移行は血液より高濃度に濃縮していた。臓器への移行量は投与量に並行して増加がみられた。胎児肝臓には血液に比べて低曝露群で 10 倍、高曝露群で 100 倍のダイオキシンの検出があり、経胎盤によりダイオキシンが胎児へ透過することが確認された。母体では胎盤、肝臓、脂肪および乳腺への移行がみられた。現行ダイオキシンの TDI、4pgTEQ/kg/day、は妊娠ラットの胎児生殖器系への LOAEL が 86ng TCDD/kg 体重であることから算出されている。妊娠マカクサルにおいては、より低曝露群、30ng/kg 体重、においても胎児への移行がみられることから、ダイオキシンのより慎重な社会的な取り組みが望まれる。

また、ダイオキシンのサルの諸臓器における遺伝子発現に及ぼす障害性について記述する。マカクザルに対して 30ng-300ng/kg 体重で単回投与した。投与 49 日目の CYP1A1 の mRNA 発現量増加は、30 ng/kg 曝露において対照サル器官に較べて乳腺 3.1 倍、皮膚 2.7 倍、腎臓 2.5 倍、脾臓 1.4 倍に増加した。300 ng/kg 曝露では乳腺 3.8 倍、皮膚 3.3 倍、肝臓 1.8 倍、脳 1.6 倍に増加した。心臓では CYP1A1 の小増加が見られた。肺、甲状腺、卵巣での変化は見られなかった。さらに、約 100 の遺伝子発現変動を解析し、8 のパターンに分類できた。乳腺で、細胞死関連遺伝子の変動が見られた。

発現変動はダイオキシンの臓器移行量に並行して増加していた。ダイオキシン移行の大きい乳腺においては、ダイオキシンの投与量に応じて 16 個の遺伝子に発現量の増加が検出され、17 個の遺伝子に投与量に応じて発現量の減少が検出された。発現遺伝子においてサルがヒトと極めて類似していることを考慮すると、サルで見られたダイオキシン影響はヒトにおいても同様の発現プロファイルで生じる可能性が高いと外挿される。30ng TCDD /kg体重 の投与において遺伝子発現に変動が認められた。妊娠ラットの LOAEL の 86ng TCDD /kg体重 から算出された現行のダイオキシンの TDI はサルを用いた研究から更に解明をはかる必要がある。

母体に 2, 3, 7, 8-TCDD (30, 300 ng/kg) を皮下投与し母体と F1 での影響を遺伝子解析の観点から実施した。TCDD (30ng および 300ng/kg) 曝露により変動がみられた遺伝子群について解析用 DNA マイクロアレイを作成し、ヒト正常乳腺と癌部の mRNA を蛍光標識 cDNA として解析したところ一部に共通した陽性ハイブリダイズが認められた。この結果は、ヒトの疾病要因として懸念されているダイオキシンの曝露影響および発癌の間において遺伝子発現の攪乱に共通の基盤がある可能性を示している。遺伝子解析の結果からは、30ng/kg の影響もあると考えられる結果であった。TDI の妥当性は、マクロレベルでの解析結果も含めて総合的な判断が必要と考えられる。

A. 研究目的

ダイオキシン類(TCDD)を妊娠アカゲザルに投与した時の母動物(F0)および出生児(F1aおよびF1b)に投与し、臓器における遺伝子変化を解析した。この研究によりダイオキシンの最も妥当なTDIの設定に有用な結果を提供し、厚生労働行政に貢献することが目的である。

B. 研究方法

1. ダイオキシンの調整および投与

TCDDは、Wellington Lab.あるいは関東化学で30及び300 ng/mLに調製済みの2, 3, 7, 8-TCDDを使用した。投与量は、0, 30 ng/ml (0.1 ml/kg), 300ng/ml (1ml/kg)で、サルの背部皮下に投与した。対照群は、トルエン/DMSO (1:2 v/v) 1ml/kgをTCDD投与群と同様の方法で背部皮下に投与した。妊娠20日から分娩後90日まで、初回投与後30日毎に初回投与量の5%量を追加した。

F1bの投与量は、F1aの実験のTCDDの母体蓄積を考慮し、

妊娠20日にTCDD 20 ng/kg(低投与量群)または200 ng/kg(高投与量群)を皮下投与した。その後はF1aと同様にTCDDを投与した。

2. 試験動物

アカゲザルは、China National Scientific Instruments & Materials Import/Export Corporationから購入し、株式会社新日本科学で検疫、予備飼育を行った。一般状態の観察、摂餌量測定、体重測定、血液生化学検査を行い、異常のないアカゲザル(年齢:5〜7歳, 体重:4〜6 kg)を用いた。妊娠動物の実験は、約20匹/群, 計約60匹を用いた。妊娠動物は、自然分娩させて、児(F1)を哺育させた。

3. 遺伝子解析

ペントバルビタールナトリウムを静脈注射し、放血安楽死させ、器官および組織の肉眼的観察および遺伝子解析用に標本を採取した。−80 度に保存した。Total RNA を抽出し、RT-PCR, マイクロアレイ作製、解析を行った。CYP1A のPCRによる定量

(1) プライマー配列 CYP1A1、
146bp

5' primer :
TAGACACTGATCTGGCTGCAG

3' primer :
GGGAAGGCTCCATCAGCATC
プライマー配列 β Actin、
153bp

5' primer :
CCTCTATGCCAACACAGT

3' primer :
AGCCACCAATCCACACAG

(2) RT-PCR 増幅条件
Perkin Elmer/GeneAmp
RNA-PCR Kit を使用した。
mRNA 1 μ g を Reverse
Transcriptase により cDNA を
作製後、各 0.15 μ M のプライ
マーを加えて PCR を実施した。
PCR 増幅条件
Pre x1, 94°C 10 秒
Cycle x40, 57°C 30 秒、72°C
60 秒、94°C 5 秒
Post x1, 72°C 90 秒

(3) CYP1A の定量
PCR 産物を電気泳動後、バン
ドをデンシトメーターにより
スキャンニングして数値化し
た。各臓器中の CYP1A 量は β
Actin 量を基準にして補正し

た。

(4) 遺伝子クローニング法
肝臓由来の mRNA を用いた。
RT-PCR により生成した PCR 産
物を電気泳動により分離後、
TA ベクターに組み込んだ。コ
ンピテント大腸菌に形質転換
し、クローニングした。プラ
スミドを精製し、上記プライ
マーで PCR を行ない、キャピ
ラリー DNA 配列解析装置を用
いて塩基配列を決定した。全
長の遺伝子を約 100 個クロ
ーニングし、ヒト遺伝子と比
較解析を行った。その目的は、
ヒトとアカゲザルの遺伝子の
ホモロジーの率を算出し、ダ
イオキシンのヒトへ影響をサ
ルで実験する根拠を示し、優
位性を明らかにすることであ
る。さらに、RT-PCR 法で、2,
3, 7, 8-TCDD 投与により発現
が変動する遺伝子を解析した。

(倫理面への配慮)

サルは愛護的に扱い、サルを
麻酔下で、放血安楽死させた。
実験関係者に TCDD の影響が
及ばないように十分に注意を
はらった。

C. 研究結果

遺伝子解析

マカクザルに対して 30ng-300ng/kg 体重で単回投与した。投与 49 日目の臓器において分子の発現変動が検出された。

CYP1A1 遺伝子の PCR 法による増幅定量結果

CYP1A1 遺伝子の mRNA 発現量は、30 ng/kg 曝露サルの群は、対照サルに較べて乳腺 3.1 倍、皮膚 2.7 倍、腎臓 2.5 倍、脾臓 1.4 倍に増加した。300 ng/kg 曝露では乳腺 3.8 倍、皮膚 3.3 倍、肝臓 1.8 倍、脳 1.6 倍に増加した。心臓では僅かな増加が見られた。肺、甲状腺、卵巣での有意の変化は見られなかった。

CYP1A1 遺伝子以外の約 100 のサル遺伝子の発現変動を解析し、8つのパターンに分類できた(図を参照。Up は増加、down は減少、even は不変を意味する)。

発現変動はダイオキシンの臓器移行量に並行して増加していた。ダイオキシン移行の大きい乳腺においては、ダイオキシンの投与量に応じて 16

個の遺伝子に発現量の増加が検出され、17 個の遺伝子に投与量に応じて発現量の減少が検出された。発現遺伝子においてサルがヒトと極めて類似していることを考慮すると、サルで見られたダイオキシン影響はヒトにおいても同様の発現プロファイルで生じる可能性が高いと外挿される。

30ng TCDD /kg サル体重の投与において遺伝子発現に変動が認められた。妊娠ラットの LOAEL の 86ng TCDD /kg 体重から算出された現行のダイオキシンの TDI はサルを用いた研究から更に解明をはかる必要がある。

本研究で開発した DNA マイクロアレイはこれらの研究に有用と考えられる。

(1) ダイオキシン曝露による組織影響の発現遺伝子分析

サルにおいてダイオキシンを皮下に曝露した場合に多くの組織への移行が検出された。なかでも乳部の取り込みは大きかったため、この組織を用いて発現遺伝子の変動を分析した。ダイオキシンの曝露量 (30ng/kg および 300ng/kg) に

依存して Cyp1A1 の発現が増加した。その他多くの遺伝子分析はヒトの約 1 万個遺伝子分析用の DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、約 100 種の遺伝子に変動が認められ、8 つの変動パターンに分類された (8 つのパターンを示す図および表 1、ダイオキシン曝露によりサル乳部組織で変動する遺伝子リスト)。

(2) 発現変動が検出された遺伝子の塩基構造決定

ダイオキシン曝露によりサル組織の発現量の変動が検出された遺伝子について RT-PCR により増幅したのちベクターに組み込み大腸菌にトランスフォームして遺伝子のクローニングをおこなった。

(3) ダイオキシン影響検出用の DNA マイクロアレイの作製

TCDD 曝露によりサルに発現の攪乱がみられた遺伝子群について解析用 DNA マイクロアレイを製作した。これを用いて、ヒト乳部の正常および癌 mRNA を蛍光標識 cDNA として、開発

した DNA マイクロアレイで解析したところ一部に共通した陽性ハイブリダイズが認められた。これは、ヒトの疾病要因として懸念されているダイオキシンの曝露影響および発癌の間において遺伝子発現の攪乱に共通の基盤がある可能性を示している (図を参照)。

D. 考察

サルの未同定の遺伝子をクローニングし明らかにする実験で、ヒトとサルの遺伝子の比較解析を行った結果から、ヒトとサルの遺伝子のホモロジーは、96%で (ヒトとマウスの遺伝子のホモロジーは 80%) TCDD の影響をマウスではなく、サルで行っている本研究の大きな意義が裏付けられた。TCDD 曝露により変動がみられた遺伝子群について解析用 DNA マイクロアレイを作成し、ヒト正常乳腺と癌部の mRNA を蛍光標識 cDNA として解析したところ一部に共通した陽性ハイブリダイズが認められた。これは、ヒトの疾病要因として懸念されているダイオキシンの曝露影響および

発癌の間において遺伝子発現の攪乱に共通の基盤がある可能性を示している。遺伝子解析の結果、TCDD30ng/kg でも遺伝子変化が認められており、この結果からは、TDI 設定の際に考慮して、総合的判断をする必要がある。

E. 結論

ダイオキシンの影響を多数回検出するために、簡便な DNA マイクロアレイの作製をすすめた。サル乳腺組織においてダイオキシン曝露により発現が変動した遺伝子からプローブを設計した。約 60 個のプローブを配置したガラスアレイが得られた。今後のダイオキシン研究に有用なツールとなろう。サル遺伝子のクローニングの結果から、ヒトとサルの遺伝子のホモロジーは 96%で(ヒトとマウスの遺伝子のホモロジーは 80%) TCDD の影響をマウスではなく、サルで行った本研究の大きな意義が裏付けられた。遺伝子解析の結果、TCDD30ng/kg でも遺伝子変化が認められており、この結果からは、TDI 設定の際に考慮して、総合的判断を

する必要がある。

F. 研究発表

論文発表

- (1) Asaoka, K., Iida, H., Suzuki, J., Watanabe, K., Inoue, M., Fukusato, T., Murata, N., Nomizu, M., Nagata, R., Kubota, S. Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin via subcutaneous single injection. Organohalogen Compounds 64: 423-426, 2003
- (2) Korenaga, T., Kubota, S., Ohta, M., Asaoka, K., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., and Fukusato, T.: Liver injury in Rhesus monkeys subcutaneously injected with 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin. Organohalogen Compounds 66:3315-3320, 2004
- (3) Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, T., Murata, N., Nomizu, M., Arima, A., and Kubota, S.: Effects of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin (TCDD) on

- signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of Rhesus monkey. Organohalogen Compounds 66:3299-3304, 2004
- (4) Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M., Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka, K., Murata, N., Arima, A., and Kubota, S. (2005) Long-term Effects of 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in precentral gyrus, amygdaroid body and liver of rhesus monkey. (submitted to Chemosphere)
- (5) Korenaga, T., Fukusato, T., Ohta, M., Asaoka, K., Murata, N., Arima, A., and Kubota, S. (2005) Long-term effects of 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin on the liver of rhesus monkeys. (submitted to Chemosphere)
- (6) Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Takasuga, T., Tsuga, K., and kagawa, Y. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in Rhesus monkeys. Organohalogen Compounds 66:3321-3325, 2004
- (7) Yasuda, I., Yasuda, M., Sumida, H., Tsusaki, H., Arima, A., Ihara, T., Kubota, S., Asaoka, K., Tsuga, K., and Akagawa, Y. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in Rhesus monkeys. Reproductive Toxicology in press
- (8) Asaoka, K., Iida, H., Watanabe, K., Miyaji, K., Goda, H., Ihara, T., Yasuda, M., and Kubota, S. Contamination of dioxins in free ranging and breeding monkeys in Japan and relationship analysis between limb malformations and administration with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on macaque monkeys. (submitted to Chemosphere)

K. Asaoka, H. Iida, Y. Kamanaka, T. Nishimura, M. Wakita, J. Suzuki, K. Watanabe, Y. Ishikawa, S. Kawashima, C. Mori, M. Yasuda, S. Kubota

Gene expression resemblance between *Macaca* monkey and human, and its application for environmental toxicogenomics. The 5th Asia Federation for Medical Chemistry (AFMC) International Medical Chemistry Symposium (October 14-17, 2003, Kyoto, Japan) Abstracts p.179

K. Asaoka, H. Iida, J. Suzuki, K. Watanabe, M. Inoue, T.

Fukusato, N. Murata, M. Nomizu, R. Nagata and S. Kubota Gene expression disorder in various tissues in rhesus monkeys treated with

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin via subcutaneous single injection. Dioxin 2003

Conference. The 23rd

International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and

Persistent Organic Pollutants (PoPs) (August 24-29, 2003.

Boston, Massachusetts, USA)

Abstracts p.423

K. Asaoka, H. Iida, J. Suzuki, T. Nishimura, M. Wakita, M. Ohba, H. Okamura, S. Kubota Comprehensive analysis of gene expression in monkey tissues and development of DNA microarray for the detection of environmental chemical affection. The 5th International workshop on advanced genomics (June 26-27, 2003. Yokohama, Japan) Abstracts p.119

24th International Symposium on Halogenated Organic & Persistent Organic Pollutants. The Technical University In Berlin, Germany September 5 -11, 2004

(1) M. Ohta, S. Akema, M. Tsuzuki, T. Korenaga, T. Fukusato, K. Asaoka, N. Murata, M. Nomizu, A. Arima, S. Kubota. Effects of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on signal transduction pathway-related protein expression in liver and cerebrum of rhesus monkey.

(2) T. Korenaga, S. Kubota, M. Ohta, K. Asaoka, N. Murata, M. Nomizu, A. Arima, and T. Fukusato. Liver injury in rhesus monkeys subcutaneously injected with 2, 3, 7, 8-tetra

chlorodibenzo-p-dioxin.

(3) K. Asaoka, H. Iida, K. Watanabe, K. Miyaji, H. Goda, T. Ihara, R. Nagata, M. Yasuda, S. Kubota: No effects of dioxin singly on limb malformations in Macaque monkeys through epidemiological and treated studies.

(4) I. Yasuda, M. Yasuda, H. Sumida, A. Arima, T. Ihara, S. Kubota, K. Asaoka, T. Takasuga, K. Tsuga, Y. Akagawa. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affects tooth development in Rhesus monkeys.

国内学会

飯田景子、釜中慶朗、鈴木樹理、脇田真清、西村剛、渡辺邦夫、森千里、浅岡一雄(2003) ヒトとマカクサルに発現する遺伝子の類似性を用いたエコトキシコゲノミックス. 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会(平成15年12月2-3日、仙台市) 講演要旨集 p. 428

浅岡一雄、飯田景子、釜中慶朗、鈴木樹理、西村剛、脇田真清、渡辺邦夫、石川雄一郎、森千里、安田峯生、久保田俊一郎 (2003) マカクサルの発現遺

伝子マイクロアレイを用いたダイオキシン影響解析. 日本分子生物学会第26回年会(平成15年12月10-13日、神戸市) 講演要旨集 p. 680

S. Kubota, T. Ihara, Y. Nishida, T. Fukusato, N. Murata, M. Nomizu, H. Iida, K. Asaoka (2003) Effect of 2,3,7,8-TCDD on gene expression in tissues in rhesus monkeys. 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会(平成15年12月2-3日、仙台市) 講演要旨集 p. 334

浅岡一雄、飯田景子、釜中慶朗、渡辺邦夫、鈴木樹理、西村剛、脇田真清、大場光芳、岡村浩、久保田俊一郎(2004) 環境化学物質の乳部に与える影響と乳部疾患の検査用マイクロアレイの開発. 日本薬学会第124年会(平成16年3月29-31日、大阪市) 講演要旨集 p29[P2]II-376

浅岡一雄、飯田景子、釜中慶朗、鈴木樹理、西村剛、脇田真清、渡辺邦夫 ニホンザルの胎生初期に高頻度で発現している遺伝子群の網羅的解析. 第20回日本霊長類学会年会(2004年7月2日-4日、犬山市) 講演要旨集 p43

浅岡一雄、飯田景子、森千里、

久保田俊一郎 マカクサルの胎生
初期に発現している遺伝子群の網
羅的解析. 第27回日本分子生物学
会年会(2004年12月8日-11日, 神
戸市)

Fukusato, T., Korenaga, T., Ohta, M.,
Asaoka, K., Sumida, H., Yasuda, M.,
Arima, A., Murata, N., Kubota, S.,
Prenatal and lactational exposure
to 2,3,7,8-
tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)
induces renal injury in rhesus
monkeys. 第7回日本内分泌攪乱化学
物質学会大会(2004年12月14日-15
日, 名古屋市) 講演要旨集 p114.

Ohta, M., Akema, S., Tsuzuki, M.,
Korenaga, T., Fukusato, T., Asaoka,
K., Murata, N., Nomizu, M., Arima,
A., Yasuda, M., Kubota, S. Long term
effects of
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-diox
in (TCDD) on signal transduction
pathway-related protein expression
in liver and cerebrum of
TCDD-treated rhesus monkeys during
pregnancy. 第7回日本内分泌攪乱化
学物質学会大会(2004年12月14日
-15日, 名古屋市) 講演要旨集 p316

Korenaga, T., Kubota, S., Ohta, M.,
Asaoka, K., Toida, S., Murata, N.,
Nomizu, M., Arima, A., Fukusato, T.
Hepatic injury in rhesus monkeys
injected with low doses of
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-diox
in during gestation and lactation.
第7回日本内分泌攪乱化学物質学会大
会(2004年12月14日-15日, 名古屋
市) 講演要旨集 p350

Asaoka, K., Iida, H., Kamanaka, Y.,
Suzuki, J., Wakita, M., Watanabe, K.,
Mori, C., Inouye, M., Kubota, S.
Phylogenic characteristics of genes
expressed in macaque monkeys and the
Application for ecotoxicogenomics
of dioxin disorder. 第77回日本生
化学会大会(2004年10月13日-16日,
横浜市)

G 知的所有権の取得状況
なし

TCDD発現による遺伝子の発現変動パターン(8パターン)
(乳腺)

パターンを構成するスポットの個数

Down-Even 23個

Down-Down 13個

Even-Down 13個

Even-Up 13個

Up-Even 10個

Up-Up 2個

Up-Down 4個

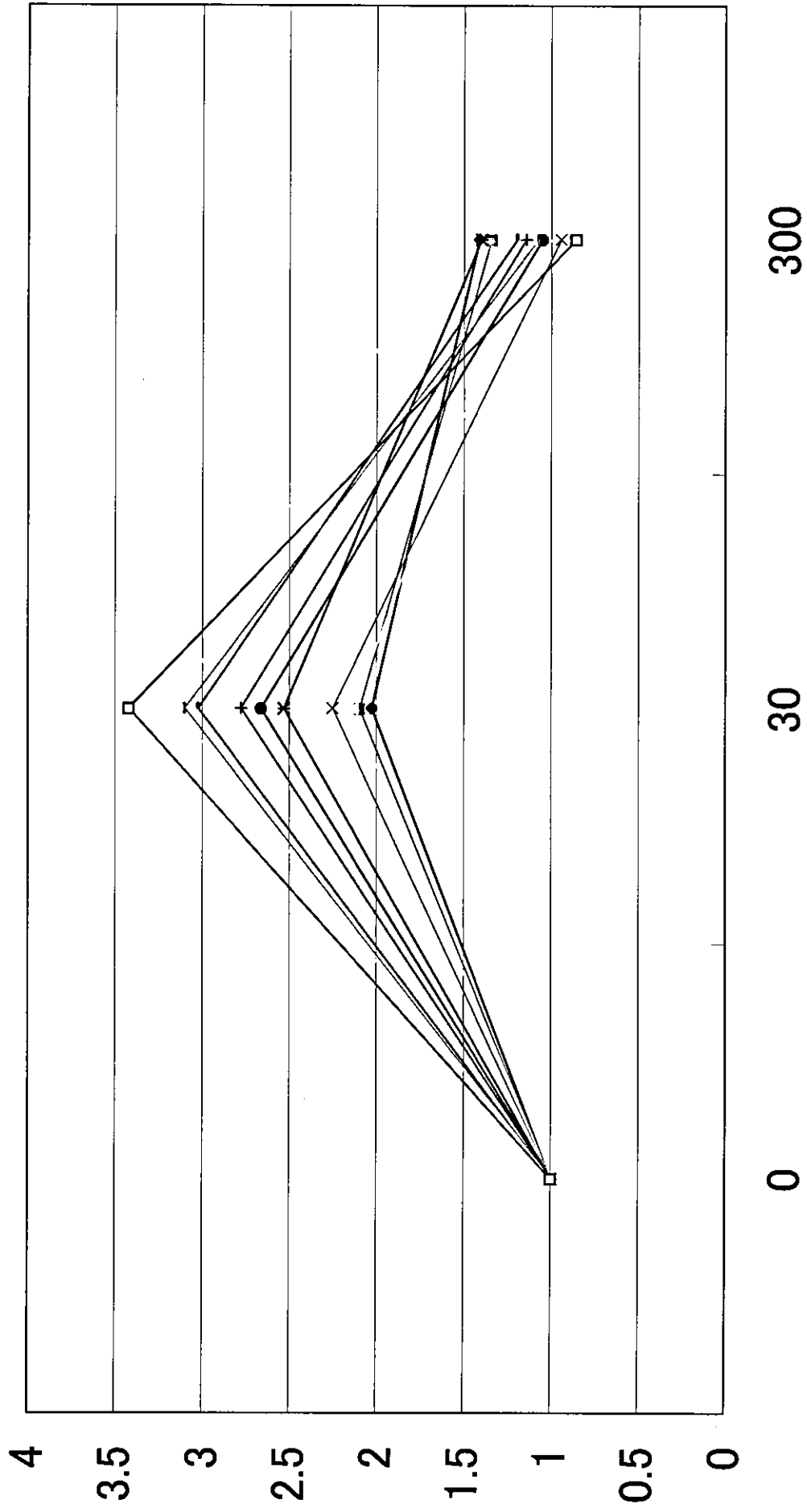
Down-Up 5個

合計 83個

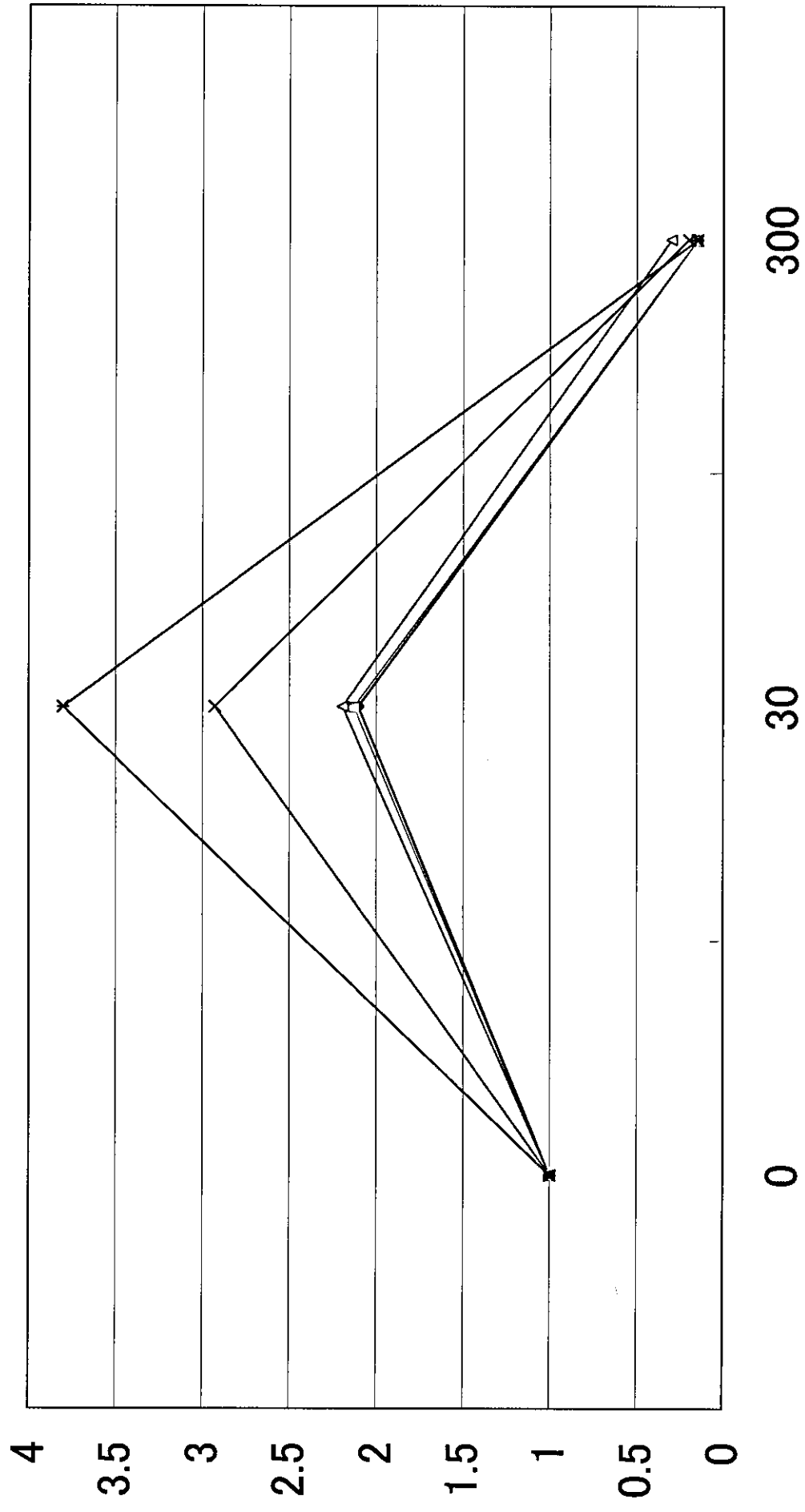
Up-Up



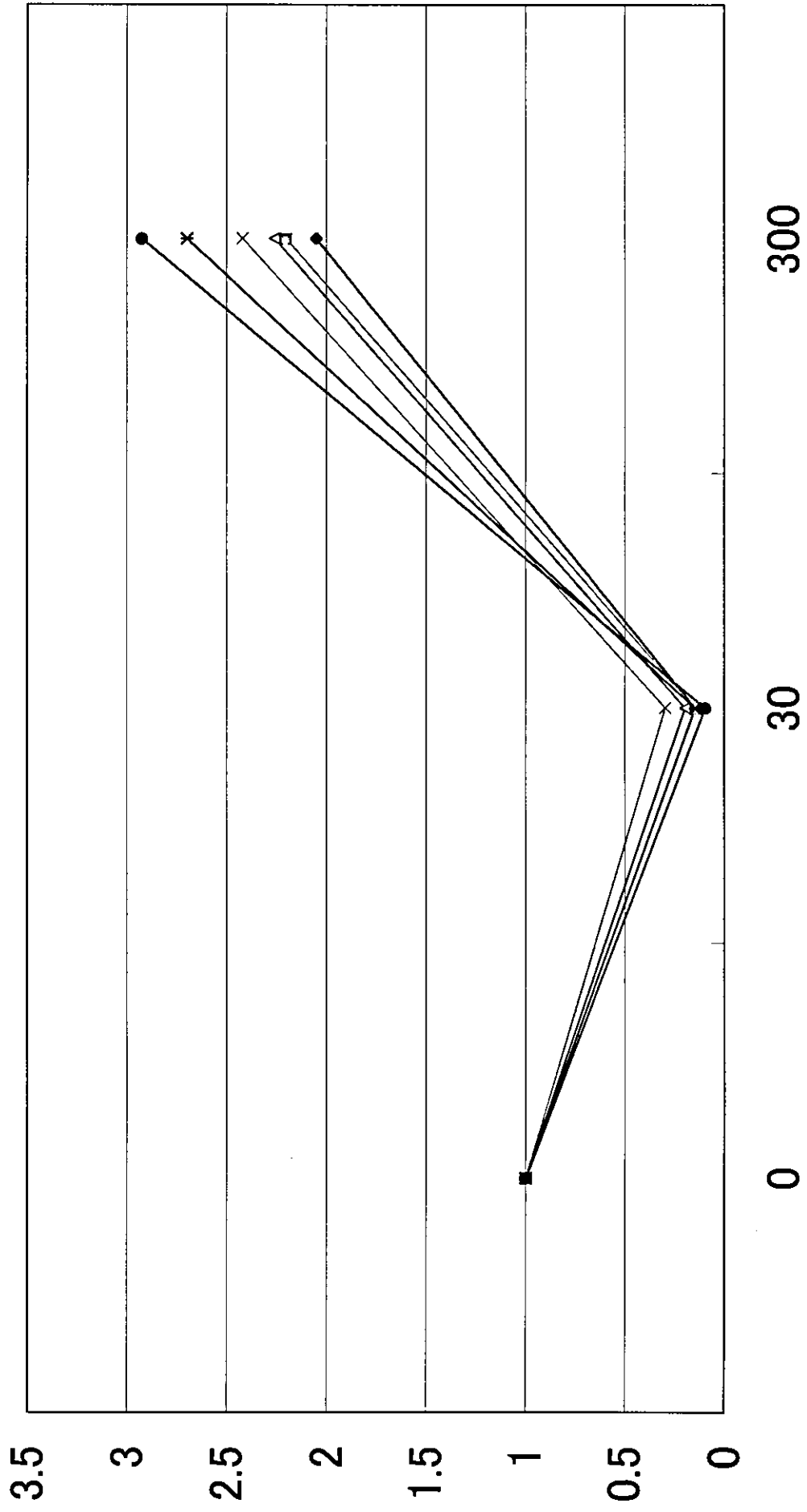
Up-Even



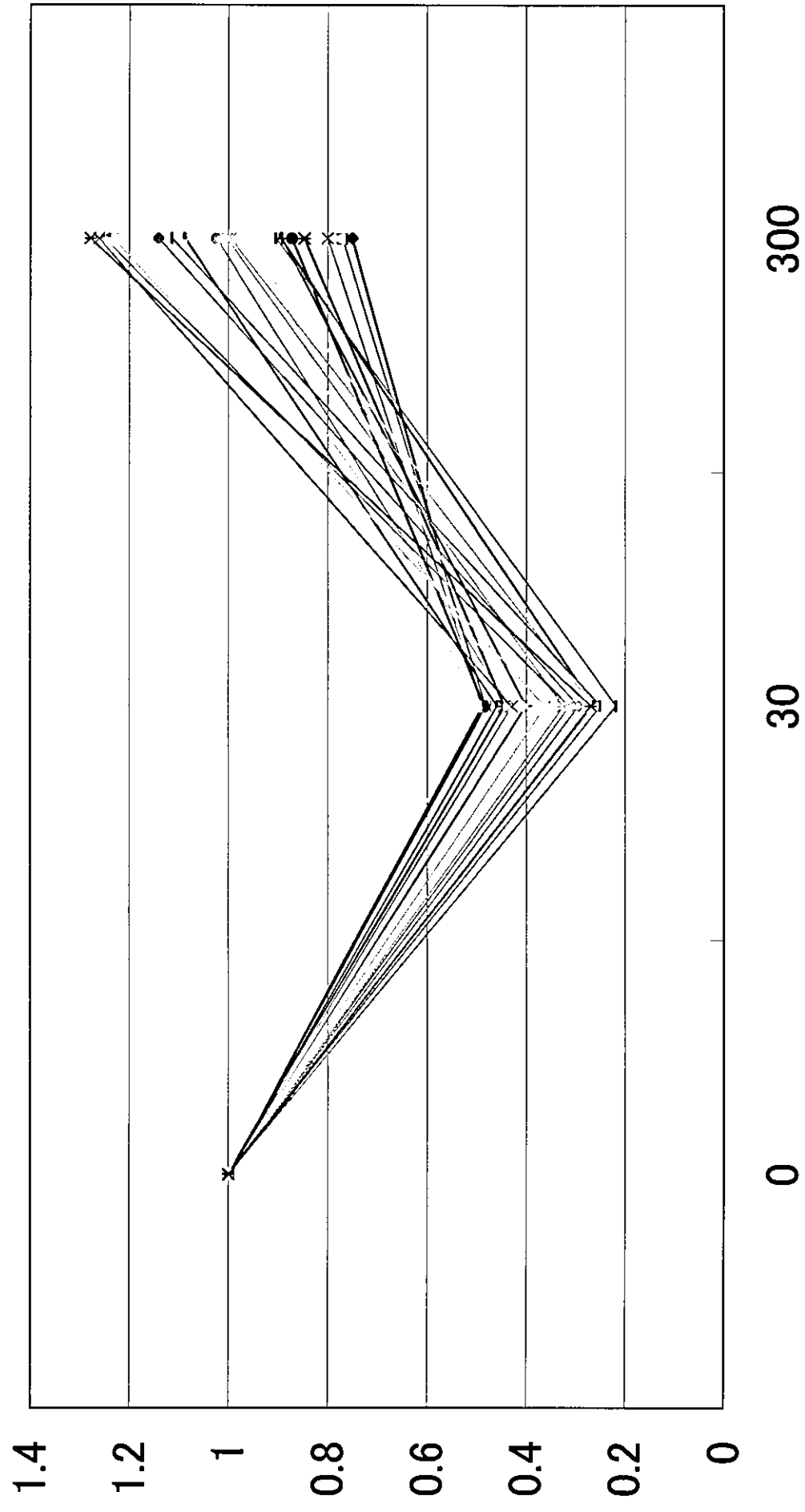
Up-Down



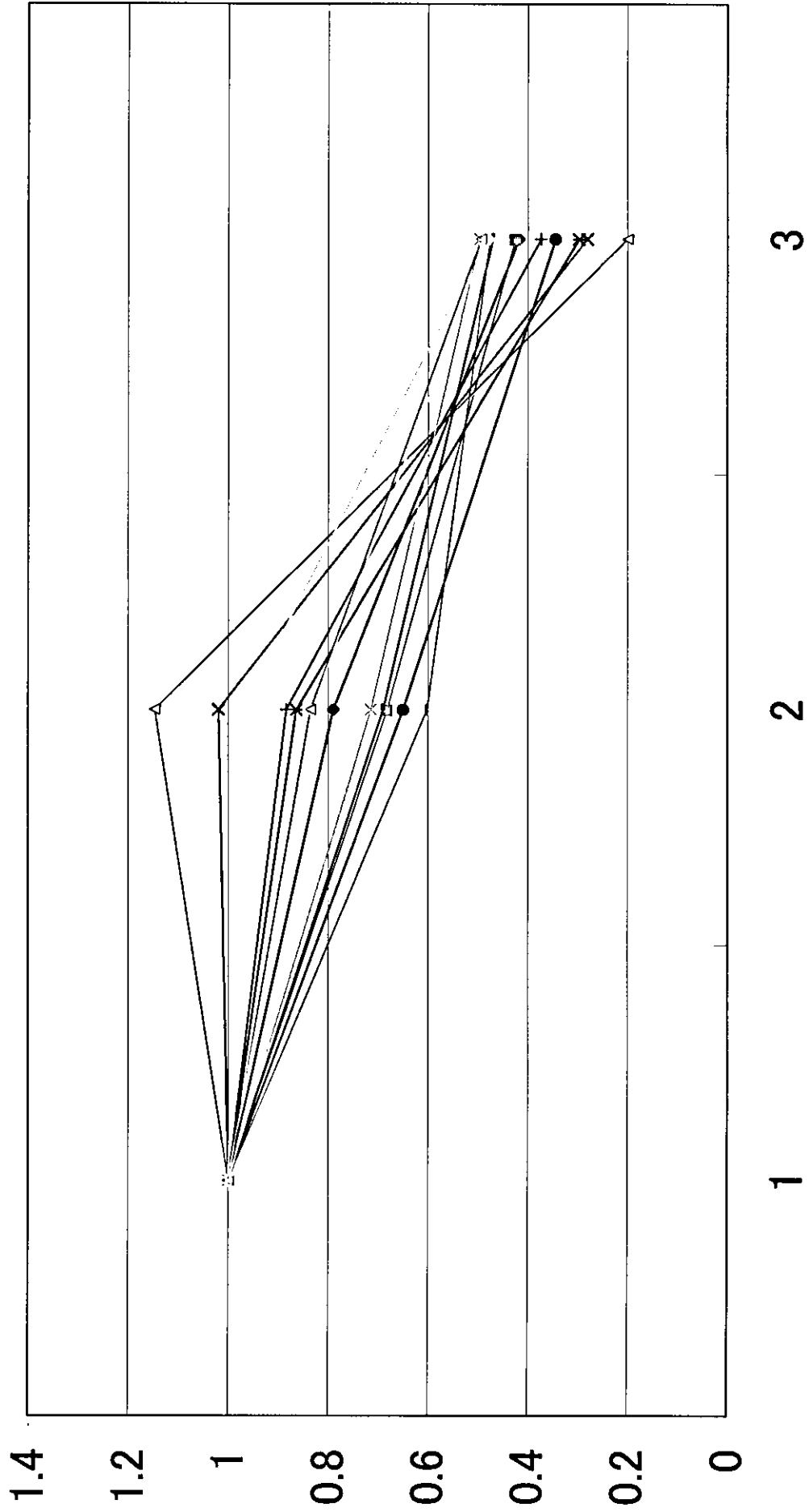
Down-Up



Down-Even



Even-Down



Even-Up

