

表 1 DBT 投与により 1.5 倍以上有意に誘導された遺伝子

妊娠マウス			
Fold change	Probe Set ID	UniGene ID	Gene Title
1.50	1456890_at	Mm.86382.1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
1.57	1440604_at	Mm.214668.1	Transcribed sequences
1.57	1445808_at	Mm.214726.1	---
1.57	1424688_at	Mm.171397.1	cAMP responsive element binding protein 3-like 3
1.58	1455528_at	Mm.19314.1	Transcribed sequence with moderate similarity to protein pir:S14234 (M.musculus) S14234 hypothetical protein - mouse
1.79	1431573_at	Mm.50508.1	RIKEN cDNA 4930404K22 gene
1.87	1458003_at	Mm.166739.1	zinc finger protein 398
1.92	1455926_at	Mm.28694.2	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
2.06	1460256_at	Mm.300.1	carbonic anhydrase 3
2.07	1415994_at	Mm.21758.1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1
2.17	1423491_at	Mm.143768.1	F-box only protein 3
2.24	1417023_a_at	Mm.582.1	fatty acid binding protein 4, adipocyte
2.59	1422651_at	Mm.3969.1	adipocyte, C1Q and collagen domain containing
2.66	1446130_at	Mm.218691.1	Transcribed sequence with strong similarity to protein pir:S12207 (M.musculus) S12207 hypothetical protein
2.66	1449434_at	Mm.300.1	carbonic anhydrase 3
2.82	1417867_at	Mm.4407.1	adipsin
5.83	1447305_at	Mm.152254.1	Transcribed sequences
偽妊娠マウス			
Fold change	Probe Set ID	Transcript ID	Gene Title
1.5	1439233_at	Mm.132676.1	Transcribed sequences
1.5	1440582_at	Mm.208286.1	RIKEN cDNA 8030492O04 gene
1.5	1451403_at	Mm.219662.1	cDNA sequence BC024868
1.5	1430118_at	Mm.71287.1	RIKEN cDNA A330042I05 gene
1.5	1419378_a_at	Mm.22742.1	FXFD domain-containing ion transport regulator 2
1.5	1459677_at	Mm.215348.1	---
1.5	1447037_at	Mm.132762.2	pleckstrin homology domain interacting protein
1.6	1459249_at	Mm.186017.1	Transcribed sequences
1.6	1445526_at	Mm.26887.1	Transcribed sequences
1.6	1449720_at	Mm.218186.1	Transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_083358.1 (M.musculus) RIKEN cDNA 5830411J07 [Mus musculus]
1.7	1433018_at	Mm.219778.1	RIKEN cDNA 4930560O18 gene
1.7	1419231_s_at	Mm.4201.1	keratin complex 1, acidic, gene 12
1.8	1439056_at	Mm.87679.1	Adult retina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A930017G19 product:hypothetical protein, full insert
1.9	1444025_at	Mm.209030.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
1.9	1454242_at	Mm.158296.1	RIKEN cDNA 2310079G19 gene
2.0	1440060_at	Mm.145294.1	8 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5730539D01 product:unclassifiable, full insert sequence
2.0	1444781_at	Mm.161023.1	XPA binding protein 1
2.1	1442786_s_at	Mm.195906.1	DNA segment, Chr 5, Brigham & Women's Genetics 0860
2.2	1437640_at	Mm.44182.1	RIKEN cDNA 6430704M03 gene

表 2 DBT 投与により 1.5 分の 1 以下に有意に抑制された遺伝子

妊娠マウス			
Fold change	Probe Set ID	UniGene ID	Gene Title
0.317	1445526_at	Mm.26887.1	Transcribed sequences
0.367	1447123_at	Mm.221072.1	---
0.388	1438981_at	Mm.132109.1	Transcribed sequences
0.389	1454296_at	Mm.178176.1	RIKEN cDNA 4631402F24 gene
0.410	1421316_at	Mm.158107.1	RIKEN cDNA 1110058A15 gene
0.423	1446451_at	Mm.182743.1	Transcribed sequences
0.427	1437713_x_at	Mm.28647.3	RIKEN cDNA 1500010J02 gene
0.427	1460126_at	Mm.17000.1	---
0.438	1419245_at	Mm.58771.1	RAB14, member RAS oncogene family
0.467	1423124_x_at	Mm.3655.1	RAD54 like ( <i>S. cerevisiae</i> )
0.473	1456729_x_at	Mm.11333.3	expressed sequence AW540478
0.495	1437623_x_at	Mm.19082.2	kinesin 2
0.503	1443369_at	Mm.208281.1	cDNA sequence BC052055
0.506	1460607_at	Mm.151375.1	immunoglobulin superfamily, member 11
0.507	1423929_at	Mm.34257.1	phosphoglycerate dehydrogenase like 1
0.514	1447154_at	Mm.209748.1	16 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9630033O20 product:unknown EST, full insert sequence
0.519	1442567_at	Mm.124159.1	cDNA sequence BC055367
0.521	1447049_at	Mm.171661.1	Transcribed sequences
0.526	1417262_at	Mm.3137.1	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
0.528	1450168_at	Mm.58321.1	RIKEN cDNA 2900001A12 gene
0.531	1457977_at	Mm.33247.1	RIKEN cDNA 2310005N01 gene
0.532	1454159_a_at	Mm.141936.2	insulin-like growth factor binding protein 2
0.536	1458541_at	Mm.101932.1	dynactin 4
0.536	1453616_at	Mm.133867.1	RIKEN cDNA 3830408C21 gene
0.538	1453385_at	Mm.57689.1	RIKEN cDNA 1110015C02 gene
0.539	1445204_at	Mm.136996.1	Transcribed sequences
0.542	1453345_at	Mm.38884.1	RIKEN cDNA 3830408G10 gene
0.547	1446222_at	Mm.182815.1	Transcribed sequences
0.556	1426076_at	Mm.131057.1	cell division cycle 27 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
0.556	1417993_at	Mm.118769.1	seminal vesicle secretion 3
0.560	1456343_at	Mm.132397.1	solute carrier family 35, member F1
0.561	1449900_at	Mm.5120.1	galactosylceramidase
0.567	1435789_x_at	Mm.38261.3	Transcribed sequences
0.568	1420119_s_at	Mm.198140.1	expressed sequence AU020177
0.578	1446875_at	Mm.173939.1	---
0.578	1420923_at	Mm.396.1	ubiquitin specific protease 9, X chromosome
0.579	1417859_at	Mm.3257.1	growth arrest specific 7
0.582	1460104_at	Mm.215338.1	vacuolar protein sorting 4b (yeast)
0.582	1419127_at	Mm.154796.1	neuropeptide Y
0.583	1423573_at	Mm.86611.1	steroid 5 alpha-reductase 2-like

0.584	1457733_at	Mm.138491.1	Adult male diencephalon cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9330152O10 product:unknown EST, full insert sequence
0.584	1457070_at	Mm.41676.1	Transcribed sequences
0.592	1440582_at	Mm.208286.1	RIKEN cDNA 8030492O04 gene
0.594	1454737_at	Mm.16479.3	dual specificity phosphatase 9
0.595	1455770_at	Mm.30146.1	tryptophan 2,3-dioxygenase
0.596	1427006_at	Mm.149978.1	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
表 2 DBT 投与により 1.5 分の 1 以下に有意に抑制された遺伝子 (続き)			
妊娠マウス			
Fold change	Probe Set ID	UniGene ID	Gene Title
0.598	1416342_at	Mm.980.1	tenascin C
0.599	1419943_s_at	Mm.195316.1	cyclin B1
0.603	1445253_at	Mm.138043.1	Adult retina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A930010D20 product:syntaxin 3, full insert sequence
0.603	1455586_at	Mm.217250.1	RIKEN cDNA 3110001H15 gene
0.603	1446308_at	Mm.207320.1	RIKEN cDNA 1700106J16 gene
0.605	1455203_at	Mm.35159.1	RIKEN cDNA A930003A15 gene
0.608	1443484_at	Mm.214535.1	---
0.609	1432747_at	Mm.56320.1	RIKEN cDNA 4933403J19 gene
0.611	1445556_at	Mm.138929.1	Transcribed sequences
0.611	1455152_at	Mm.28818.1	Hypothetical LOC225897 (LOC225897), mRNA
0.612	1452698_at	Mm.29900.1	RIKEN cDNA 2310050B20 gene
0.613	1427886_at	Mm.28399.1	nuclear pore membrane protein 121
0.613	1458870_x_at	Mm.173297.1	pam, highwire, rpm 1
0.613	1425749_at	Mm.220297.1	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
0.614	1454157_a_at	Mm.71913.2	phospholipase A2, group IID
0.617	1431491_at	Mm.118233.1	RIKEN cDNA 9430087N24 gene
0.618	1441761_at	Mm.37451.1	Transcribed sequences
0.618	1450087_a_at	Mm.78861.1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1
0.619	1439624_at	Mm.100151.1	hypothetical protein C730031G17
0.620	1450677_at	Mm.16753.1	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)
0.620	1458012_at	Mm.130056.1	dachshund 2 (Drosophila)
0.621	1437848_x_at	Mm.22456.2	RIKEN cDNA 2610017G09 gene
0.622	1457145_at	Mm.32034.1	RIKEN cDNA 4931414L13 gene
0.622	1454873_at	Mm.117042.1	RIKEN cDNA C130032F08 gene
0.623	1432069_at	Mm.158982.1	RIKEN cDNA 1700023G09 gene
0.627	1449207_a_at	Mm.196638.1	kinesin family member 20A
0.627	1423463_a_at	Mm.11516.1	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
0.628	1451913_a_at	Mm.116721.2	hypoxia up-regulated 1
0.629	1447363_s_at	Mm.200255.1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S.
0.630	1448000_at	Mm.180845.1	cell division cycle associated 3
0.630	1447081_at	Mm.172797.1	---
0.630	1416558_at	Mm.4674.1	maternal embryonic leucine zipper kinase
0.631	1424856_at	Mm.44101.1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 3 polypeptide

0.632	1438170_x_at	Mm.181562.8	adhesion regulating molecule 1
0.633	1444975_at	Mm.12301.1	Transcribed sequences
0.634	1436723_at	Mm.34903.1	FSH primary response 1
0.635	1439676_at	Mm.182845.1	Transcribed sequences
0.636	1443537_at	Mm.133719.1	RIKEN cDNA C130009A20 gene
0.636	1432212_at	Mm.87538.1	RIKEN cDNA 1810073H04 gene
0.636	1432447_a_at	Mm.36000.2	RIKEN cDNA 2310005N01 gene
0.637	1431956_at	Mm.159669.1	RIKEN cDNA 5830453K13 gene
0.639	1437173_at	Mm.136736.1	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled
0.640	1436035_at	Mm.154541.1	RIKEN cDNA 3830431G21 gene
0.640	1418589_a_at	Mm.10414.1	myeloid leukemia factor 1
0.641	1422668_at	Mm.45371.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 9b
0.644	1420816_at	Mm.29717.1	3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation
0.647	1456134_x_at	Mm.44202.2	Yip1 interacting factor homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )

表 2 DBT 投与により 1.5 分の 1 以下に有意に抑制された遺伝子 (続き)

妊娠マウス

Fold change	Probe Set ID	UniGene ID	Gene Title
0.649	1452924_at	Mm.85162.1	RIKEN cDNA 2310007D09 gene
0.649	1452042_a_at	Mm.46635.1	RIKEN cDNA 5730537D05 gene
0.649	1424610_at	Mm.35564.1	RIKEN cDNA G430055L02 gene
0.651	1423592_at	Mm.35815.1	Rho-associated coiled-coil forming kinase 2
0.651	1444024_at	Mm.209443.1	cDNA sequence BC004701
0.651	1426744_at	Mm.38016.1	sterol regulatory element binding factor 2
0.651	1444199_at	Mm.45087.1	ELK4, member of ETS oncogene family
0.651	1436711_at	Mm.27747.1	RIKEN cDNA B430109J19 gene
0.652	1420544_at	Mm.4799.1	germinal center expressed transcript
0.652	1419058_at	Mm.130322.1	RNA polymerase I associated factor
0.653	1432261_at	Mm.219777.1	RIKEN cDNA 2310039D24 gene
0.653	1435114_at	Mm.2718.2	RIKEN cDNA D630024B06 gene
0.653	1450506_a_at	Mm.34109.1	RIKEN cDNA 2700083B06 gene
0.653	1431349_at	Mm.24.2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
0.653	1421641_at	Mm.57040.1	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2
0.654	1441135_at	Mm.131890.1	RIKEN cDNA 4930488P06 gene
0.654	1431697_at	Mm.30717.8	synaptojanin 2
0.655	1442031_at	Mm.27025.1	RIKEN cDNA D130073L02 gene
0.655	1457385_at	Mm.214504.1	Transcribed sequences
0.657	1443493_at	Mm.216296.1	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 37
0.657	1430540_at	Mm.45133.1	RIKEN cDNA 5330414O08 gene
0.659	1449478_at	Mm.4825.1	matrix metalloproteinase 7
0.660	1429216_at	Mm.133714.1	cDNA sequence AY424292
0.660	1431963_at	Mm.159485.1	RIKEN cDNA 4930556A20 gene
0.661	1446126_at	Mm.182857.1	Transcribed sequence
0.662	1423774_a_at	Mm.27529.1	protein regulator of cytokinesis 1
0.663	1427041_at	Mm.97514.1	cDNA sequence BC013712

0.663	1448187_at	Mm.16549.1	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit
0.663	1452314_at	Mm.42203.1	kinesin family member 11
0.665	1450157_a_at	Mm.116997.1	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)
0.665	1447820_x_at	Mm.182243.1	carnitine palmitoyltransferase 2
0.666	1438624_x_at	Mm.131817.1	RIKEN cDNA 6430516N12 gene

偽妊娠マウス

Fold change	Probe Set ID	Transcript ID	Gene Title
0.126	1436593_at	Mm.35212.1	Unknown (protein for MGC:58818)
0.427	1455282_x_at	Mm.19143.2	aminolevulinic acid synthase 1
0.449	1459612_at	Mm.208696.1	---
0.507	1416539_at	Mm.196345.1	yolk sac gene 2
0.513	1426919_at	Mm.4712.1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
0.522	1437244_at	Mm.11982.1	RIKEN cDNA 8430435B07 gene
0.527	1437116_at	Mm.127777.1	RIKEN cDNA 1110019O13 gene
0.534	1448626_at	Mm.74138.1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1
0.536	1435285_at	Mm.24207.1	expressed sequence AV354767
0.536	1453277_at	Mm.149413.1	RIKEN cDNA 3021401N23 gene
0.538	1419532_at	Mm.1349.1	interleukin 1 receptor, type II

表 2 DBT 投与により 1.5 分の 1 以下に有意に抑制された遺伝子(続き)

偽妊娠マウス

Fold change	Probe Set ID	UniGene ID	Gene Title
0.540	1444849_at	Mm.172604.1	expressed sequence C76872
0.544	1432547_at	Mm.160091.1	RIKEN cDNA C030005H24 gene
0.546	1445759_at	Mm.210657.1	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130019L09 product:unknown EST, full
0.546	1442911_at	Mm.218423.1	RIO kinase 2 (yeast)
0.551	1454434_at	Mm.158716.1	RIKEN cDNA 9030607J07 gene
0.552	1428480_at	Mm.28038.1	DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 421, expressed
0.552	1437906_x_at	Mm.19169.5	thioredoxin-like 1
0.560	1459226_at	Mm.194760.1	Transcribed sequences
0.564	1437160_at	Mm.126932.1	neuroligin 1
0.566	1455635_at	Mm.136419.1	RIKEN cDNA 4732460I02 gene
0.569	1450194_a_at	Mm.1202.1	myeloblastosis oncogene
0.576	1437464_at	Mm.23357.1	expressed sequence A1661438
0.577	1451418_a_at	Mm.33268.1	SPRY domain-containing SOCS box 4
0.579	1445298_at	Mm.85388.1	11 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6230408M08 product:unknown EST, full insert sequence
0.579	1454767_at	Mm.36529.1	DNA segment, Chr 2, Brigham & Women's Genetics 1423
0.584	1456973_at	Mm.214730.1	Adult female vagina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9930108O06 product:hypothetical protein, full insert sequence
0.586	1443667_at	Mm.191440.1	expressed sequence C79407
0.589	1425349_a_at	Mm.18535.1	myelin basic protein expression factor 2, repressor

0.592	1446389_at	Mm.182718.1	Transcribed sequences
0.599	1456997_at	Mm.209879.1	16 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C130022G24 product:unclassifiable, full insert sequence
0.599	1426193_at	Mm.219545.1	otospiralin
0.601	1430784_a_at	Mm.24372.1	RIKEN cDNA 4932417H02 gene
0.602	1444129_at	Mm.35196.1	expressed sequence AW742635
0.604	1427852_x_at	Mm.157783.12	immunoglobulin heavy chain (J558 family)
0.609	1450161_at	Mm.12967.1	inhibitor of kappaB kinase gamma
0.610	1455234_at	Mm.32526.2	RIKEN cDNA 6330417G03 gene
0.618	1440477_at	Mm.37223.1	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630022L15 product:unknown EST, full insert sequence
0.624	1440759_at	Mm.101554.1	Transcribed sequence with strong similarity to protein sp:P00722 (E. coli) BGAL_ECOLI Beta-galactosidase
0.629	1431476_at	Mm.84915.1	RIKEN cDNA 4933407I05 gene
0.629	1440754_at	Mm.193602.1	---
0.630	1458069_at	Mm.215480.1	Transcribed sequences
0.633	1440332_at	Mm.129546.1	Transcribed sequences
0.633	1441178_at	Mm.96010.1	RIKEN cDNA 1190002H09 gene
0.635	1444769_at	Mm.147464.1	testis expressed gene 9
0.635	1427307_a_at	Mm.18527.2	disabled homolog 1 (Drosophila)
0.636	1450643_s_at	Mm.28962.1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
0.636	1443988_at	Mm.35598.1	RIKEN cDNA B330012G18 gene
0.641	1446167_at	Mm.207152.1	13 days embryo forelimb cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5930417E23 product:unknown EST, full insert sequence
0.644	1456427_at	Mm.20365.2	glycoprotein Ib, beta polypeptide
0.647	1429445_at	Mm.87320.1	RIKEN cDNA 4921510J17 gene
0.648	1459791_at	Mm.70400.1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1
0.648	1459951_at	Mm.210108.1	RIKEN cDNA 4732464A07 gene
0.649	1424725_at	Mm.35581.1	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 472, expressed
0.651	1452459_at	Mm.168523.1	calmodulin binding protein 1
0.651	1435504_at	Mm.141984.1	RIKEN cDNA 1700024K14 gene
0.652	1430987_s_at	Mm.174860.1	WW domain binding protein 11
0.654	1449207_a_at	Mm.196638.1	kinesin family member 20A

表 2 DBT 投与により 1.5 分の 1 以下に有意に抑制された遺伝子 (続き)

妊娠マウス

Fold change	Probe Set ID	UniGene ID	Gene Title
0.655	1447966_a_at	Mm.215610.3	hypothetical protein A630048M13
0.655	1442280_at	Mm.207430.1	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
0.655	1425932_a_at	Mm.7526.2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1
0.657	1457385_at	Mm.214504.1	Transcribed sequences
0.657	1444663_at	Mm.211202.1	0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E130309P07 product:unknown EST, full
0.660	1426263_at	Mm.178322.1	immunoglobulin superfamily, member 4C
0.663	1427277_at	Mm.4645.1	sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila)

0.664	1457797_at	Mm.37805.1	expressed sequence AI605517
0.665	1452772_at	Mm.23207.1	RIKEN cDNA 5430432P15 gene

表3 妊娠で10倍以上誘導された遺伝子のうちDBT投与により1.5分の1以下に有意に抑制された遺伝子

妊娠での増加率	妊娠マウスのDBT投与での減少率	Probe set ID	Gene Title
364.7	0.595	1455770_at	tryptophan 2,3-dioxygenase
102.0	0.598	1419943_s_at	cyclin B1
85.9	0.641	1422668_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 9b
61.7	0.532	1454159_a_at	insulin-like growth factor binding protein 2
39.2	0.622	1457145_at	RIKEN cDNA 4931414L13 gene
31.8	0.63	1416558_at	maternal embryonic leucine zipper kinase
27.9	0.627	1423463_a_at	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
25.9	0.66	1429216_at	cDNA sequence AY424292
23.8	0.665	1450157_a_at	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)
20.7	0.627	1449207_a_at	kinesin family member 20A
18.2	0.662	1423774_a_at	protein regulator of cytokinesis 1
14.0	0.629	1447363_s_at	budding uninhibited by benzimidazoles I homolog, beta (S. cerevisiae)
11.8	0.526	1417262_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
11.4	0.506	1460607_at	immunoglobulin superfamily, member 11
10.6	0.663	1452314_at	kinesin family member 11
8.7	0.651	1444024_at	cDNA sequence BC004701
8.6	0.649	1452924_at	RIKEN cDNA 2310007D09 gene
5.9	0.542	1453345_at	RIKEN cDNA 3830408G10 gene
5.8	0.64	1418589_a_at	myeloid leukemia factor 1
5.0	0.613	1425749_at	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
4.9	0.582	1419127_at	neuropeptide Y
4.9	0.579	1417859_at	growth arrest specific 7
4.7	0.653	1431349_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
4.6	0.653	1435114_at	RIKEN cDNA D630024B06 gene
4.5	0.427	1460126_at	---
4.1	0.644	1420816_at	3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation
3.8	0.556	1426076_at	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)
3.7	0.598	1416342_at	tenascin C
3.4	0.41	1421316_at	RIKEN cDNA 1110058A15 gene

化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究 分担研究報告書

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析

分担研究者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨

今年度は、催奇形性物質の投与による胎児影響についてのマウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験の技術基盤として、無処置マウス胎生 7.5-9.5 日のステージに焦点を絞り、1)各ステージの胚 1 匹当たりの DNA 量、total RNA 量の算出、2) 遺伝子発現量の絶対値化に必要な spike factor の決定、3)モデル遺伝子改変マウス胚を用いた、そのマイクロアレイ解析の妥当性の検証、及び、4)各ステージの各遺伝子の網羅的な経時変化のデータを得ること、を目的に検討した。上記全ての項目は基本的には成功し、催奇形性物質の投与によるマウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験に向けた技術基盤は整備できたものと考えられた。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、いくつかの催奇形性物質に焦点をあて、毒性発現メカニズムに支えられた新たな発生毒性評価系を確立することにある。この実験動物を用いた新たな発生毒性評価系の確立を通して、ヒトに於ける発生毒性評価を、より正確に詳細に、また迅速・安価に予測できるシステム構築を目指す。

今年度の目的は、上記遂行の技術基盤として、器官形成初期にあたり、初期中胚葉誘導が活発なマウス胎生 7.5-9.5 日胚に焦点を絞り、以下の 4 点、1)マイクロアレイ解析に必要な胚の数の算出、すなわち各ステージの胚 1 匹当たりの DNA 量、total RNA 量の算出、2) 遺伝子発現量の絶対値化に必要な spike factor の決定、3) 胎生 7.5 日のモデル遺伝子改変マウス胚を用いた、マウス胚を用いるマイクロアレイ解析の妥当性の検討、4) 化学物質非投与の全胚 pool サンプルを用い、各ステージの各遺伝子の網羅的な経時変化のデータを得、また発現の経時変化をもとに遺伝子群としてカテゴライズすること、にある。このことを通しては

じめて、催奇形性物質の投与によるマウス胚を用いたマイクロアレイ解析実験の検討開始ができるものと考えられた。

B. 研究方法

C57BL/6CrSlc マウスを実験に用いた。基本的には本プロジェクトの研究方法に則したかたちで、経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した)を、ステージ毎に pool した RNA サンプルを用い、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて、網羅的遺伝子発現プロファイリングを検討した。マウス胚は、1% 2-メルカプトエタノール含有 RLT バッファー(QIAGEN 社)に変性・溶解させた。なおマイクロアレイ解析に向けてのサンプル数に関しては、予備的検討により、胎生 7.5 日胚においては、およそ 20 匹の胚 pool サンプルが必要と考えられたため、全てのステージにつき、25 匹 pool したものを 1 サンプルと考えた。なお妊娠マウスは、前日 16 時より交配し、翌日 9 時に plug check(これを妊娠 0.5 日とした)を通過した母動物を購入し、



胎生 6.5 日目で入荷させた。

(倫理面への配慮)

本研究所の「動物実験に関する指針」に準拠して行い、妊娠マウスは頸椎脱臼により致死させた。

### C. 研究結果

1) マウス胚胎生 7.5 日、8.5 日、9.5 日各ステージに於ける 1 匹当たりの DNA 量は、 $2.5 \pm 0.4$ 、 $13.7 \pm 2.7$ 、 $105.6 \pm 3.3$  ng (平均値±標準偏差、n=3 pool [総計各 75 匹])、他方、total RNA 量はそれぞれ、 $364.4 \pm 114.3$ 、 $1896.7 \pm 1195.2$ 、 $11074.8 \pm 273.6$  ng (平均値±標準偏差、n=3 pool [総計各 75 匹])と求めることができた。マイクロアレイ解析には、1 枚当たり 5  $\mu$ g の total RNA 量が必要となる。したがって、胎生 7.5 日、8.5 日、9.5 日各ステージにおいて解析に最低限必要な匹数は、14、3、0.5 と求めることが出来た。

2) spike factor は、胎生 7.5-9.5 日のステージで、「0.015」microL / ng DNA [単位????]と求めることが出来た。

3) 心臓中胚葉形成に必須である転写因子 *Mesp1*、*Mesp2* のダブル欠損胚(dKO 胚)(胎生 7.5 日)を、モデル胚として用い、マイクロアレイ解析の妥当性を、その野生型胚との比較により検討したところ、dKO 胚で発現が減少している遺伝子群の多くは、*Aldh1a2* など、心筋細胞あるいは血管内皮細胞に関与する遺伝子であった。

4) 胎生 7.5-9.5(全胚)において、各遺伝子につき網羅的に経時変化のデータを得ることができた。

また、各ステージ特異的な遺伝子群など、発現の経時変化をもとに遺伝子群としてカテゴライズすることも出来た。

### D. 考察

1) 結果に示した各ステージにおけるマイクロア

レイ解析に要する胚数は、あくまでも最小値であり、採取した RNA の質のチェック、RT-PCR による再現性のチェックなど、他の用途を考慮すると実際には、おおよそこれらの 2 倍量は必要と考えられた。

2) spike factor の決定により、マイクロアレイ解析上、発現 RNA 量の絶対値化が可能となった。このことにより、細胞一個当たりの増殖・分化が旺盛な発生初期のステージ間における、各遺伝子発現の比較が正確に行えるものと考えられた。

3) モデル遺伝子改変マウス胚を用い、「胚を用いたマイクロアレイ解析」の妥当性を検証することができたが、興味深いことに、発現量の比からリストアップされてくる遺伝子群の上位には、従来用いられてきている分子マーカー遺伝子は存外少なく、この点、留意する必要があるものと考えられた。

4) 各ステージ特異的な遺伝子群などのカテゴライズは、各種シグナルカスケードを考える際に有用となるだけでなく、催奇形性物質投与を考慮した場合、標的分子の遺伝子発現変化を考慮した投与のタイミングの設定、あるいは逆に、当該物質の標的分子の推定にも役立つものと考えられた。なお本実験では、全胚を用いて検討しており、少なくとも本実験でのステージ(胎生 7.5-9.5 日)を用いる限り、標的性が不明な催奇形性物質投与の場合でも、全胚にわたる解析が可能ははずである。

### E. 結論

今年度のマウス胎生 7.5-9.5 日胚(全胚)を用いた実験により、マイクロアレイを用いた催奇形性物質投与によるマウス胚の網羅的な遺伝子発現変化を解析できる基本的な技術基盤が確立されたものと考えられた。来年度は、実際に催奇形性物質を妊娠マウスに投与した際の胚に於ける網羅的遺伝子発現プロファイリングを検討する予定である。被検物質は、標的分子が明らかなもの、及び催奇形性上の種差が明らかな催奇形性物質を

モデル化合物として選ぶ予定である。このことにより、催奇形性バイオマーカーの発見や発生毒性評価を、より正確・迅速・鋭敏に行えるようになることが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

なし

#### 2) 雑誌

1. Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y., Differential contributions of *Mespl* and *Mesp2* to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development* 132: 787-796, 2005.
2. Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y., Mouse *Nkd1*, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev* 121: 1443-1453, 2004.
3. Nakazawa T, Kai S, Kawai M, Maki E, Sagami F, Onodera H, Kitajima S, Inoue T., "Points to consider" regarding safety assessment of biotechnology-derived pharmaceuticals in non-clinical studies (English translation). *J Toxicol Sci* 29: 497-504, 2004.
4. Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S, Sasaoka Y, Nomura-Kitabayashi A, Kurokawa K, Saga Y., *nanos1*: a mouse *nanos* gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development. *Mech Dev* 120: 721-731, 2003.

### 2. 学会発表

1. 北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 井

上 達, 菅野 純, 相賀裕美子: 転写因子 *MesP1* および *MesP2* はマウス心臓細胞の分化に必要である

「第 27 回日本分子生物学会」2PA-457 (2004. 12)

2. Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y., *MesP1* and *MesP2* genes are essential for the cardiomyocyte-differentiation in mice.

「Cold Spring Harbor Meeting 2004- Mouse Molecular Genetics-」(2004.9)

3. Takahashi Y, Kitajima S, Kanno J, Saga Y., A Notch ligand *Dll3* substitutes for roles of *Mesp2* in establishing rostral half properties in somite segmentation.

「Cold Spring Harbor Meeting 2004- Mouse Molecular Genetics-」p166 (2004.9)

4. 喜井 勲, 網塚憲生, 李 敏哲, 竹内亀一, 前田健康, 北嶋 聡, 菅野 純, 井上 達, 相賀裕美子, 工藤 明: ペリオスチンノックアウトマウスではメカニカルストレスによる歯根膜リモデリングが破綻している

「第 22 回日本骨代謝学会」(2004. 8)

5. 高橋 雄, 北嶋 聡, 菅野 純, 相賀裕美子: Notchリガンド *Dll3* は *Mesp2* の欠損による体節形成の異常を回復する

「第 37 回日本発生生物学会」2A1500 (2004. 6)

6. 北嶋 聡, 富田幸子, 菅野 純, 井上 達, 相賀裕美子: シンポジウム「心臓大動脈を形づくる細胞の起源とその細胞分化」: マウス心臓中胚葉形成に必須な転写因子 *MesP1*, *MesP2*

「第 26 回日本分子生物学会」S1E-1(2003. 12)

7. 石川亜紀, 北嶋 聡, 小久保博樹, 相賀裕美

- 子:マウス体節形成過程において機能する新規遺伝子の探索およびその発現解析  
「第 26 回日本分子生物学会」3PB-108 (2003.12)
8. 安彦行人, 原口清輝, 北嶋 聡, 菅野 純, 相賀裕美子: 体節形成に関わる転写因子 *Mesp2* の発現制御機構の解析  
「第 26 回日本分子生物学会」3PB-110(2003.12)
9. 小川幸男, 関田清司, 北嶋 聡, 斉藤 実, 内田雄幸, 松島裕子, 川崎 靖, 井上 達, 菅野純: ガルシニア抽出物の安全性に関する研究 I-ガルシニア抽出物のラットによる 52 週間投与毒性試験-  
「第 30 回日本トキシコロジー学会」P-010 (2003.7)
10. 関田清司, 小川幸男, 北嶋 聡, 斉藤義明, 永田伴子, 井上 達, 菅野 純: ガルシニア抽出物の安全性に関する研究 II-主成分ヒドロキシクエン酸のラットにおける精巣毒性の検討-  
「第 30 回日本トキシコロジー学会」P-011 (2003.7)
11. 北嶋 聡, 富田幸子, 高橋 雄, 井上 達, 菅野 純, 相賀裕美子: 転写因子 *MesP1* および *MesP2* の心臓中胚葉における役割  
「第 36 回日本発生生物学会」(2003. 6)
12. 高橋 雄, 北嶋 聡, 井上 達, 菅野 純, 相賀裕美子: 転写因子 *Mespl*, *Mesp2* は体節中胚葉の上皮化に細胞自律的に関与する  
「第 36 回日本発生生物学会」(2003. 6)
13. Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Takahashi Y, Inoue T, Kanno J, Saga Y., *MesP1* and *MesP2* are essential for the cardiogenesis in mice.  
「The 1<sup>st</sup> International Symposium on Developmental Biology and Tissue Engineering」(2003.3)
- G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得
1. 特許
- 1)「セルソーターを用いる精子形成過程の解析・分取法」  
公開中。  
発明者:北嶋 聡、井上 達、菅野 純、相賀裕美子、堀井郁夫、加藤千明  
出願日:平成 14 年 11 月 12 日  
出願番号:特願 2002-328644  
公開日:平成 16 年 6 月 10 日  
公開番号:特開 2004-159554  
出願人:北嶋 聡、国立医薬品食品衛生研究所 長
- 2)「ラット精子細胞の部分分画を標識するモノクローナル抗体」公開中。  
発明者:北嶋 聡、井上 達、菅野 純、相賀裕美子、赤池雅司、中塚大策  
出願日:平成 14 年 11 月 12 日  
出願番号:特願 2002-328677  
公開日:平成 16 年 6 月 10 日  
公開番号:特開 2004-161657  
出願人:北嶋 聡、国立医薬品食品衛生研究所 長
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究  
分担研究報告書

造血系における生体異物応答機構に関する研究

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 井上 達

研究要旨

造血系における生体の異物応答に関する普遍性のある指標を得るために、主として酸化ストレス物質を取り上げて、トキシコゲノミクス手法の演繹的利用モデルの確立を目標として研究をおこなった。昨年に引き続き、ベンゼン暴露マウスの造血器系で発現する造血前駆細胞特異的プロファイリングに注目し、これらの中からバイオマーカーとしての robustness のある候補遺伝子の組合せの試行的な抽出を行った。また、それらの遺伝子の p53 欠失(p53-KO)マウスにおける発現態様についても比較検討した。酸化ストレス消去系としてのチオレドキシシン(Trx) 遺伝子の遺伝子改変動物における遺伝子発現背景については基礎的検討を終了した。

A.研究目的

本研究は、外来異物と造血系細胞との相互作用を末梢血から骨髄に至る反応の統一的な理解に資するため、関連した細胞生物学的背景実験と比較しつつ、これに対応する発現遺伝子のプロファイルを明らかにし、もってストレス・バイオマーカー遺伝子群の抽出の展望を明らかにすることを目的としている。

B.研究方法

造血系細胞と外来異物との相互作用のうち、代表的な分子標的として酸化ストレス反応に注目しつつ以下の実験と検討を進めた。モデル実験として、ヒトに対する白血病原性をもち、試験管内試験では酸化ストレス誘導物質としても知られるベンゼンを用い、これまでの細胞生物学的蓄積データに対応するマイクロアレイデータの採取を Incyte(Mouse GEM I) 並びに Affymetrix(Murine Genome U74Av2)の系を用いて試行した。細胞生物学的蓄積データとして、プリンストン大学のレミ

シユカ博士のグループがかつて造血幹細胞の分画から得た cDNA ライブラリーの発現プロファイリングや、最近になって各方面から報告されている胚幹細胞や神経幹細胞特異的とされる遺伝子発現プロファイリングデータベースについても新たな視点にたつて比較検討の対象とすることとした。これまでに得られている野生型並びに p53-KO 動物における引き続くデータ解析とともに、Trx 遺伝子発現動物における背景データの把握を目的として、その発現データの解析を進め、ベンゼン暴露の体制の整い次第、速やかに実験が進められるよう準備を整えた。

(倫理面への配慮)

本申請には、①ヒトの遺伝子解析研究、②相手方の同意・協力や社会的コンセンサスを必要とする研究課題又はアンケート調査等を行う研究課題、③生命倫理・安全対策に関して留意すべき研究、を含まない。実験動物の飼育・屠殺にあたっては、所内規定に則り関連法規制定の精神に基づいて適切に取り扱ってきた。

## C. 研究結果

【要約】造血器における発現を、造血幹細胞分画の特異性およびその変化として把握すべく既存のデータの分析と、新規データ採取のための技術的対応を検討し、基盤を整備した。p53-KO 動物を対象とする結果の解析とともに、Trx 遺伝子改変動物における定常状態での検討を進めることにより、実験条件の設定を終了した。

造血器系における生体異物応答機構の解析を支援する基盤研究として以下の3点にそって、若干の研究方針の修正を含めて、必要な検討を行い、所期の成果をみた。

### 1. 造血幹細胞特異的遺伝子発現プロファイリングと、ベンゼン暴露を含むこれまでの発現データとの比較検討:

造血器系は、造血幹細胞や前駆細胞から、末梢血液中にみられる分化型諸血球に至るまで単一の細胞群ではなく、分化序列に沿った多様な細胞群によって構成されており、それぞれの系列とレベルで異なった造血刺激因子の支配を受ける(医薬品の安全性、長尾拓、南山堂、p.146-160)。結果的に、生体相互作用として骨髄細胞一般からは抽出されがたい注目すべきプロファイリングは造血幹細胞特異的なそれと考えられ、また、それらは幹細胞特異性と造血器におけるそれらの特異性との認識を分別する視点から、胚幹細胞や神経幹細胞などの既存の cDNA ライブラリーを用いた発現データとの比較検討が重要である。この点に着目して、手元の生データの再検討を行い、その結果を国際性のある出版物に総説としてまとめた(Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology In: Borlak J (ed), Handbook of Toxicogenomics 参照)。

### 2. 造血幹細胞分画の既存技術による簡便な分取とその遺伝子発現効率の技術的検討:

造血幹細胞は、致死線量照射マウスへの移植による長期再建能を指標に、分化に関連して発現したり、逆に発現しなくなったり、といったことが知られている特異的表面抗原を利用したセルソーターでの分取が一般に行われる。例えばマウスでは、分化抗原と呼ばれる、赤芽球系マーカーとして TER119、骨髄球系マーカーとして Gr1、単球系のマーカーとして Mac1、リンパ球系のマーカーとして CD4、CD8、及び B220 などを発現していない分画(Lin<sup>negative</sup>)でかつ、幹細胞マーカーとして、c-kit 及び Sca-1 が陽性の分画が相当する。これらの分画を短時間内に分取するために、あらかじめ密度勾配法で単核球分画を採取し、分化抗原陰性分画を磁気標識抗体を用いた分離ののち、セルソーターにてさらに精度の高い分離をおこなう戦略をとり、磁気カラムでの採取の結果、幹細胞と平行して動くと考えられる分化型の培養性幹細胞数で 50-100 倍の濃縮に成功しているが、回収効率が悪かった。このため、磁気ビーズを使った方法に切換えてさらに検討中である。

### 3. 種々の遺伝子改変動物における恒常状態並びにベンゼン暴露条件下での遺伝子発現とマイクロアレイ法による結果の比較検討:

対象として、p53-KO マウス、AhR-KO マウス、並びに、その酸化的ストレス消去機構を当該研究者らが明らかにしたところの Trx 発現修飾マウスを、それらに対応する野生型マウスとともに検討することとして、研究を進めている。昨年引き続き、p53-KO 動物でのベンゼン暴露結果を参照することによって、既存の遺伝子データベースの annotation から酸化的ストレスに関与するものと、強く、もしくは推測的に、発現の判断される遺伝子のリストを、検討対象の仮説的設定として抽出した。また、1.で述べた造血幹細胞特異的遺伝子発現プロファイリングとの照合をすすめ、Weel 及び Mph1/Rae28/Edr1 が抽出された。Trx 遺伝子については、その half allele knockout から、その遺伝

子機能がほぼ相同であることの知られているヒト遺伝子の過剰発現(恒常的過剰発現)にいたるモデル系を対象としており、ここでの恒常的過剰発現系の非生理性なども念頭に置きつつ、もっぱら Trx 遺伝子機能による酸化ストレスの消去モデルとしての有用性に注目することとして、今後の研究を進めることとした。その結果既存の遺伝子発現データ中より、重要性の認められる p53 遺伝子の動きを見いだした。以上に基づいて、ベンゼン暴露の条件が整うまでの暫定的検討として、非暴露条件下での種々 Trx 動物での遺伝子発現を GeneChip® Mouse Genome 430A 2.0 Array (Affymetrix)を用いて検討した。

#### D. 考察

ベンゼンの毒性発現研究の目的は、惹起される病態(生体異物応答)を、主な応答標的組織としての血液系の幹細胞や支持細胞の機能発現によって理解する事にある。ベンゼンはヒトでの白血病誘発性が知られている。マウスにおける白血病誘発は多年の苦心の末、成功を見た。しかし、ベンゼンもその代謝物も Ames 試験陰性が知られ、それはこれらの疎水性に基づくとされている。そこで注目される点が、ベンゼンの代謝過程での活性酸素種(ROS)生成であり、ベンゼンや hydroquinone(HQ)、catechol、trans-trans muconic acid などの代謝物に認められる顕著な染色体破砕性(clastogenesis)もこれによるものと信じられ、ベンゼンの genotoxicity の根拠と考えられている。ところがベンゼンの白血病誘発は低用量では観察されず、先のベンゼン以外の clastogen ではベンゼンと異なり少なくともマウスでの白血病誘発性は認められない(但し、HQのみラットで自然発生単核白血病の頻度が上昇する)。従って、ベンゼンの白血病のユニークな酸化ストレス説も不明にとどまり、その白血病誘発性が genotoxicity と epigenetic carcinogenicity のいずれによるかさえ

明らかとはいえない。このような複雑な背景をもつベンゼンの血液毒性に対して、詳細な細胞生物学的な分析的データを参照しつつ、マイクロアレイによる、酸化ストレス傷害に焦点をあてた毒性予知システム構築モデルの確立実験は、将来的な演繹的トキシコゲノミクス解析研究の重要な基礎となるものである。今年度の研究によって、結果の項でも明らかにしたとおり、造血幹細胞特異的生体異物応答遺伝子プロファイリングの抽出に向けての新たな認識とそのための技術的な検討の進展並びに酸化ストレス消去系における ROS の蛍光強度の定量を含む細胞生物学的基礎的検討の進展などにより、当研究の目指すところで全般的な進展が得られた。

Trx 遺伝子発現の種々に改変させた動物でのマイクロアレイ法による発現基礎データを採取することにより、ベンゼン暴露によるデータ採取の基礎条件も整えることができた。

#### E. 結論

造血系における生体の異物応答に関する普遍性のある指標を得るために、主として酸化ストレス物質を取り上げて、トキシコゲノミクス手法の演繹的利用モデルの確立を目的として研究をすすめる。1.造血幹細胞特異的遺伝子発現プロファイリングと、ベンゼン暴露を含むこれまでの発現データとの比較検討、2.造血幹細胞分画の既存技術による簡便な分取とその遺伝子発現効率の技術的検討、3.種々の遺伝子改変動物における恒常状態並びにベンゼン暴露条件下での遺伝子発現とマイクロアレイ法による結果の比較検討、の3点にわたって研究をすすめた。

#### F. 研究発表

論文発表  
原著

1. Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J and Inoue T: Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 2: 12-6, 2004.

著書・総説など

2. Hirabayashi Y and Inoue T: Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology In: Borlak J (ed), *Handbook of Toxicogenomics*, pp583-608. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

学会発表

1. Inoue T: The Use of Toxicogenomics data in risk assessment- Potential applications of Toxicogenomics in risk assessment-. The 5<sup>th</sup> Princess Chulabhorn International Science Congress (2004.8.22)[Bangkok, Thailand, 2004]

2. Inoue T: Toxicogenomics as a tool of predictive toxicology. 10<sup>th</sup> International Congress of Toxicology. (2004.7.13) [Tampere, Finland, *Toxicology and Applied Pharmacology* 197 (3): 265, 2004]

3. Hirabayashi Y, Yoon BI, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Li GX, Kim DY, Kanno J, Inoue T: Hematological toxicogenomics addressing the mechanisms of benzene-induced epigenetic/genotoxic changes. (2004.7.13) [Tampere, Finland, *Toxicology and Applied Pharmacology* 197 (3): 277, 2004]

4. Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T: Aryl-hydrocarbon-receptor-signaling keeps stem cell kinetics dormant. *International Society for Stem Cell*

Research 2<sup>nd</sup> Annual Meeting (2004.6.11) [Boston MA, Final Program p104; 2004]

5. Inoue T: Symposium 5. Pharmacology- & Toxicogenomics Symposium: S5-3. Strategy of predictive Toxicogenomics a reverse toxicogenomics. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology The 61<sup>st</sup> Annual Meeting 2004 (2004.5.27) [Seoul, Korea, Meeting abstract 100; 2004]

G.知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得:  
該当しない
2. 実用新案登録  
該当しない
3. その他  
該当しない

ストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズムに関する研究

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所医薬基盤研究施設プロジェクト長  
 漆谷徹郎

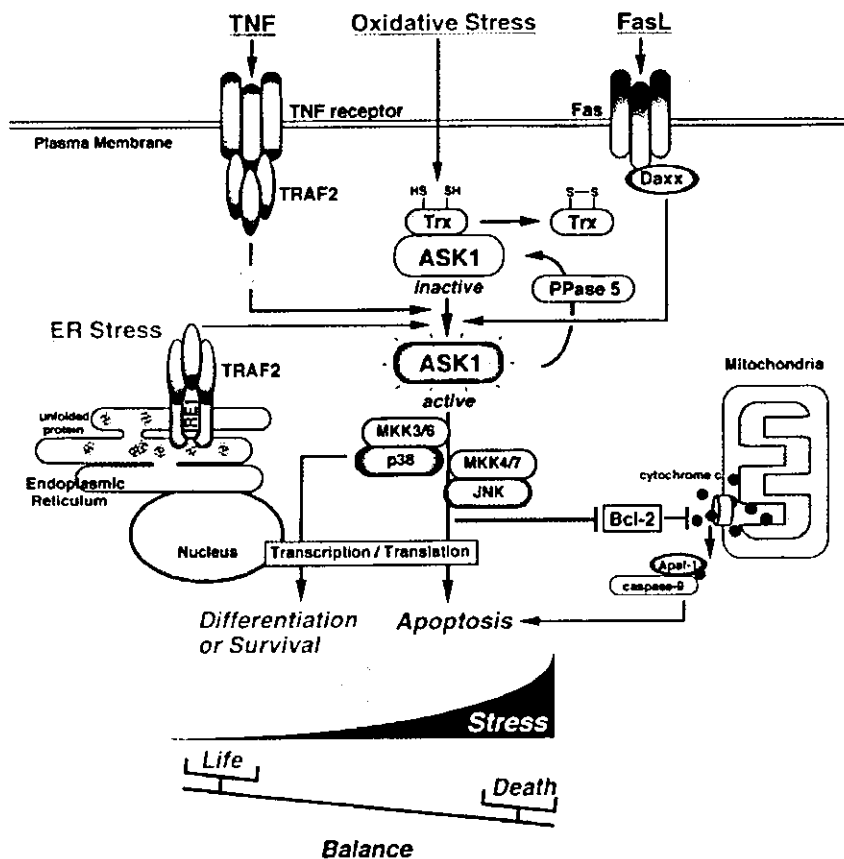
研究要旨

本研究は酸化ストレス応答の鍵となる分子であるASK1 欠損マウスを用いて、酸化ストレスシグナルを解析しようとするものである。GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、肝臓および脳においてASK1 欠損マウスと野生型マウス間に発現の差のある遺伝子群が抽出された。また、MPTP 投与による実験的 Parkinson 病の感受性がASK1 欠損マウスと野生型マウス間で異なる可能性が見いだされ、この現象と関連する遺伝子候補を抽出した。

A. 研究目的

本研究の目的は、細胞のストレス応答に関係する細胞内情報伝達系を解析することにある。このため、ストレス応答の鍵となる遺伝子を欠損したマ

ウスの遺伝子発現応答を正常マウスのそれと比較することによって、当該遺伝子の下流のシグナルを一気に解明しようとするものである。





本研究で注目している分子 ASK1 は、各種のストレスやサイトカインのシグナルを受けてこれを生存側かアポトーシス側に振り分ける鍵となるキナーゼである(上図)。細胞がストレスを受けたとき、ある程度まではこれを解消して生き延びようとする機構を働かせるが、ある程度以上の障害を受けると、アポトーシスの形で積極的に死を選ぶ、という防御機構が生体には備わっている。毒性物質や病態によって生じる細胞死の機構解明には、最も重要な分子の一つといえよう。

現在、ASK1 のノックアウトマウスが作成されており、この分野の研究が進んでいる。このマウスは、通常に誕生・成熟し、生殖能力にも殆ど問題がなく、正常な状態では ASK1 は殆ど重要な働きをしていないことが分かる。言い換えれば、正常な発生・分化に伴うアポトーシスには、この酵素活性は寄与していないか、他の分子で代替されるといえる。しかしながら、このマウスから得た細胞は、毒性物質によるアポトーシスに抵抗性を示す。In vivoにおける最も興味深い知見は、ポリグルタミン病モデルマウスや SOD 変異による ALS モデルマウスの神経変性が、ASK1 欠損によって軽減されることである。従って、少なくともERストレスによる神経変性疾患の発症には ASK1 が重要な役割を果たしていることが想像できる(上図)。

更に、種々の実験から、ASK1 がチオレドキシンをセンサーとして酸化ストレス応答を受容し、以後のストレス応答を制御していることが明らかとなっている。近年の研究から、種々の物質の毒性発現機序が、酸化ストレスに関係していることが分かってきており、毒性パスウェイとして最も重要なものの一つと考えられるに至っている。この鍵分子のあるなしの状態、それ以降の応答を比較できれば、毒性シグナルの解明に大きく寄与することが期待される。

## B. 研究方法

### 動物と遺伝子解析

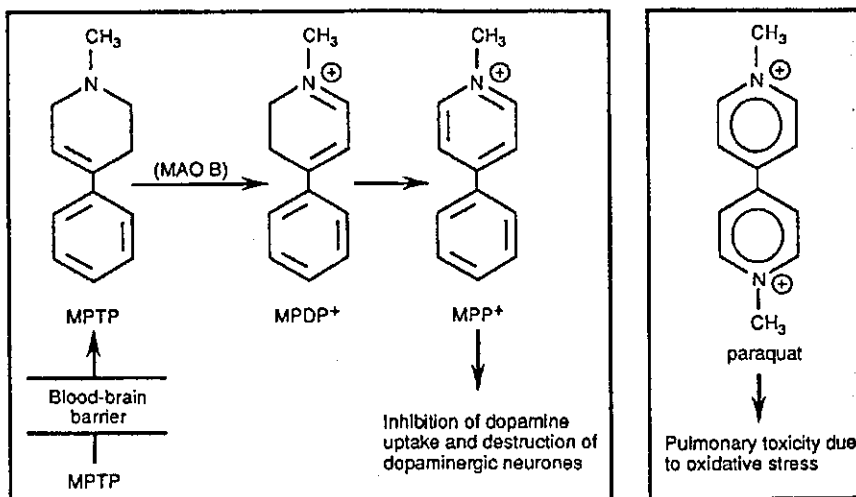
ASK1 ノックアウトマウスは、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室一條秀憲教授より供与された。このマウスを実験動物中央研究所においてSPF化し、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター動物施設に導入し、B57BL/6 ヘテロ体として維持繁殖させた。実験は、ヘテロ体の掛け合わせによって誕生した野生型、及び ASK1 ノックアウトマウスを用いた。

マウスに被験物質を投与し、各組織について mRNA を調製し、Affymetrix 社 GeneChip により遺伝子発現を網羅的に解析した。このとき、Spike による mRNA 絶対量化システムを用いて定量化を行った。組織としては、主要な毒性発現のある肝臓と、独自のストレス応答反応が予想される脳神経細胞を対象とした。

脳神経細胞としては黒質を対象とした。予試験として、マウス脳を RNA later で1晩固定した状態でスライスし、tyrosine hydroxylase (TH)の免疫染色を行い、黒質全体を含む切片を切り出せる条件を設定した。この条件下では、1匹のマウス黒質含有切片から1枚の GeneChip 解析に必要な RNA が得られた。

### 薬物投与

本年度はパラコートの構造類似体である MPTP の作用を主に検討した。MPTP は脳黒質ドパミンニューロンを選択的に破壊する Parkinson 病モデル作成ツールとして興味深い物質である(下図)。野生型・ノックアウト各3匹のマウスに MPTP 30mg/kg を4時間おきに2回皮下投与し、第2回目の投与24時間後に肝臓及び黒質を摘出し、GeneChip 解析に供した。また、両マウス各4匹に、MPTP 投与1週間前から投与1週間後まで1日1回ポールテストを行い、Parkinsonism の症状の定量化を行った。ポールテストは、マウスを高さ50cmの金属棒の上に上向きに載せ、下を向くまでの時間(T-turn)と下に降りるまでの時間(T-total)を測定し、その時間の延長の程度から Parkinsonism を評価するものである。



### (倫理面への配慮)

本研究は国立医薬品食品衛生研究所の安全性生物試験研究センターで行われたが、使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。

## C. 研究結果

### 1. マウスの繁殖

ASK1 ノックアウトマウスを恒常的に維持・使用するため、実験動物中央研究所において人工授精・帝王切開によりマウスを SPF 化し、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動物施設に導入した。ジェノタイピング法を確立し、ノックアウトマウス、および対照としての野生型マウスを繁殖させた。ASK1 ノックアウトマウスは、若干繁殖率が低く、予想外に時間を要したが、実験に使用できる数の動物が獲られるに至った。

### 2. 正常マウスの比較

まず、野生型及び ASK1 ノックアウトマウスにおける正常時の ASK1 関連遺伝子量を、肝臓、および黒質で測定した。意外にも、野生型・ASK1 ノックアウトマウスとも、同程度の ASK1 mRNA が検出

された。これは、ノックアウトに伴い人工的なスプライシングがおき、C末部分の一部の RNA が発現しているためと考えられるが、蛋白として発現しておらず、解析には影響ないと考えられた(一條, 私信)。

肝臓および黒質における遺伝子発現を野生型と ASK1 ノックアウトマウス間でスキッター解析により比較したところ、殆ど変化が見られなかった。すなわち、ASK1 欠如は、両組織における遺伝子発現に全体として大きな変化を及ぼしていないことが分かった。また、ASK1 に関連すると思われる遺伝子群、各種ストレスシグナルに関係する遺伝子群を個々に比較してみても、特段に大きな差を示すようなものは見いだせなかった。生体にストレス負荷がかかっていない状態では、ASK1 は殆ど役割を果たしていないという、生理機能解析から得られている知見を、トランスクリプトームの面からも確認できたことになる。従って、薬物投与の効果を、ASK1 ノックアウトと野生型の間で単純に比較することができると考えられる。

### 3. MPTP 投与の影響

次に、野生型及び ASK1 ノックアウトマウスに対して MPTP を投与し、実験的 Parkinsonism を誘起したところ、ASK1 ノックアウトマウスは野生型に比べ、抵抗性である傾向を示した。ASK1 ノックアウトマウス4例の内、投与3日目に1例が死亡したのみ

であったが、野生型マウスでは、4例中3例が死亡した。勿論、この例数では統計的に有意な差とはいえないが、以後例数を追加し、これを確認したい。

Parkinsonism の程度を比較するためにポールテストを行ったが、死亡例の発生、特に症状の重い動物から死亡していくために、ASK1 遺伝子の有無による差を検出するには至らなかった。

両動物で、肝臓、および黒質の遺伝子発現変化を GeneChip により網羅的に解析した。まず最初に、黒質における TH の mRNA 量を比較したところ、MPTP によって全く変化していなかった。従って、MPTP による黒質のドパミンニューロン死は、投与24時間後ではまだ生じておらず、遺伝子発現変化が起こったとすれば、それは選択的な細胞死の「結果」ではないことを意味する。

変化を示した遺伝子の数は、黒質に比べ肝臓において遙かに多かった。黒質で変化している遺伝子が肝臓で発現していれば、肝臓でも同様な変化を示している場合が多かった。

肝臓、黒質の両組織において、MPTP により両マウスで差が認められる遺伝子が多数抽出できたが、一方のマウスのみを選択的に変化が認められる遺伝子がそれぞれ幾つか抽出できた。例えば、肝臓においてCYP2B20やCEPT1などは野生型のみで、SLC25a15やCCT3などはノックアウトのみで誘導されていた。

#### D. 考察

ASK1 ノックアウトマウスが野生型に比べて MPTP に対する抵抗性を示したことは、MPTP による毒性発現に ASK1 が関与している可能性を示唆しており、興味深い。実験の性質上、多くの動物数での実験が困難なため、以後例数を追加してこれを確認したい。また、黒質で認められた変動遺伝子の多くは肝臓でも変動しており、毒性発現メカニズム解析に臓器を越えた普遍的なパスウェイを利用できる可能性が示された。更に、

ASK1 ノックアウトマウスと野生型の間で MPTP に対する応答性が全く異なる遺伝子のリストが得られた。以後、これを詳細に検討することによって、MPTP の毒性発現機序を解析していきたい。

今回遺伝子発現解析は投与24時間後に行った。THのmRNA量が低下していなかったのも、この時点でのドパミンニューロン死はまだ生じていないと解釈したが、ポールテストの結果からは、この時点で既にマウスに明らかな不動態が観察された。すなわちこの時点で既にドパミンニューロンの機能不全が生じていると考えられるので、ニューロンの機能不全が生じる以前の初期変化をとらえるため、もっと前の時点での解析が必要であろう。また、黒質の組織は異種細胞、特に多くのグリア細胞を含むため、抽出された遺伝子の局在性を検討することも考慮せねばなるまい。

#### E. 結論

神経細胞の酸化ストレスによる障害機構の解明に関して、本戦略は非常に有望であると考えられた。今回の予備的知見を更なる研究で確認できれば、Parkinson 病の予防・治療に新たな可能性を提示するものである。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

T. Urushidani and T. Nagao. Toxicogenomics: Japanese Initiative. Handbook of Toxicogenomics. Ed. by J. Borlak, Wiley-VCH, 2004, p.623-631.

###### 2) 雑誌

##### 2. 学会発表

H. Ueda, T. Kasahara, H. Totsuka, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Extraction of genes with stable expression in rat liver treated with various compounds - Analysis of the data in the Toxicogenomics Project In Japan - Society of Toxicology, 44th Annual

Meeting (Mar. 6-10, 2005, New Orleans, USA)

T. Matsushita, T. Urushidani, T. Miyagishima, and T. Nagao. Gene expression profiling in rat liver and hepatocytes treated with ethionine - Analysis of the data in the Toxicogenomics Project In Japan -

Society of Toxicology, 44th Annual Meeting (Mar. 6-10, 2005, New Orleans, USA)

K. Tamura, T. Urushidani, T. Miyagishima, and T. Nagao. Gene expression profiling in rat liver and hepatocytes treated with fibric acids - Analysis of the data in the Toxicogenomics Project In Japan - Society of Toxicology, 44th Annual Meeting (Mar. 6-10, 2005, New Orleans, USA)

H. Nitta, H. Totsuka, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Evaluation of the background data obtained in the Toxicogenomics Project In Japan- Society of Toxicology, 44th Annual Meeting (Mar. 6-10, 2005, New Orleans, USA)

Y. Mizukawa, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Thioacetamide and methapyrilene showed a unique gene expression profile among the chemicals in the Toxicogenomics Project In Japan. - Society of Toxicology, 44th Annual Meeting (Mar. 6-10, 2005, New Orleans, USA)

T. Urushidani. Toxicogenomics Project in Japan: Present and Beyond. Toxicogenomics International Forum, Oct. 12-13, 2004, Kyoto.

漆谷徹郎 トキシコゲノミクスプロジェクトの現状と展望 日本トキシコロジー学会第31回学術年会 2004年7月

森下克美, 笠原利彦, 奥山学, 高島佳代子, 鳥塚尚樹, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓 アセトアミノフェン単回経口投与後のラット肝臓における遺

伝子発現変化の週令差 日本トキシコロジー学会第31回学術年会 2004年7月

奥山学, 笠原利彦, 高島佳代子, 森下克美, 鳥塚尚樹, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 長尾拓 フェノバルビタール暴露後の遺伝子発現の in vivo と in vitro 間での比較 日本トキシコロジー学会第31回学術年会 2004年7月

笠原利彦, 鳥塚尚樹, 奥山学, 高島佳代子, 森下克美, 鈴木孝昌, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓 血清含有及び無血清培地で培養したラット初代肝細胞における経時的遺伝子発現変化のDNAマイクロアレイによる解析 日本トキシコロジー学会第31回学術年会 2004年7月

鳥塚尚樹, 笠原利彦, 森下克美, 奥山学, 高島佳代子, 鈴木孝昌, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 長尾拓 ラット初代培養肝細胞における遺伝子発現に対する細胞毒性の影響のDNAマイクロアレイによる解析 日本トキシコロジー学会第31回学術年会 2004年7月

高島佳代子, 森下克美, 奥山学, 笠原利彦, 鳥塚尚樹, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 長尾拓 投与媒体の差による遺伝子発現への影響についてのDNAマイクロアレイによる解析 日本トキシコロジー学会第31回学術年会 2004年7月

T. Urushidani, J. Kanno, T. Miyagishima, and T. Nagao. TOXICOGENOMICS PROJECT IN JAPAN - OBJECTIVE AND PROPOSAL. Society of Toxicology, 43rd Annual Meeting (Mar. 21-25, 2004, Baltimore, USA)

G 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

なし