

分担研究報告書

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

とくに胸腺毒性(免疫毒性)に関わる分子メカニズムの研究

分担研究者 山中すみへ 東京歯科大学・客員教授

研究協力者 吉江紀夫 中村康則(日本歯科大学・新潟学部)

太田 薫 野村登志夫(東京歯科大学・衛生学講座)

研究要旨

化学物質の生体影響の1つとして免疫毒性があり、その標的臓器として胸腺が大きく関わっている。そこで微量で免疫毒性を有するといわれているダイオキシンを中心として、*in vivo* 投与による胸腺細胞への影響と併せて、*in vitro* におけるリンパ球T細胞への影響を調べた。マウスへのダイオキシン 5  $\mu$ g/kg 及び 20  $\mu$ g/kg、あるいは塩化第二水銀 100  $\mu$ g/kg の単回腹腔内投与で胸腺の萎縮がみられ、特に20  $\mu$ g/kg 投与では10日目に顕著な萎縮を認め、組織像でも皮質のリンパ球に変性や消失がみられた。また免疫染色でも皮質のリンパ球や髄質の一部の幼弱リンパ球で CD-4 及び CD-8  $\alpha$  の陽性細胞の増加がみられた。さらに胸腺の GeneChip 解析でもダイオキシン投与で Ahrr, Cypla1, Cyplb1 などの遺伝子発現に変化があった。

一方、正常リンパT細胞やヒト急性リンパ芽球性白血病T細胞の MOLT-3 を用いた *in vitro* の検索では、水銀との接触で CD-25(インターロイキン-2 レセプター(IL-2R))陽性細胞の増加や、ダイオキシンとの接触で CD-8 陽性細胞の増加がみられた。またダイオキシンの低濃度・長期接触後に水銀と接触で水銀の影響が増強されるなどダイオキシンの免疫機能への影響や修飾作用を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

化学物質の生体毒性の1つとして、アレルギーの発現など免疫毒性がある。とくに近年、花粉症や食物アレルギー、薬物アレルギー、金属アレルギーなど多様なアレルギーの発症が増加傾向にあり、

化学物質の免疫毒性の評価が求められている。

また環境汚染物質として問題となっているダイオキシンは、動物実験では、他の臓器にはほとんど影響のみられない低濃度でも胸腺の萎縮や、T細胞の減少あるいは増加という免疫毒性があることが

わかっている。ヒトの免疫系に対する影響については、疫学調査でリンパ球分布の変化や細胞膜抗原レベルの変動を示す報告もみられる。

このような化学物質の潜在的な免疫毒性が、花粉症などのアレルギー発現のような免疫機能や宿主の感受性に修飾的に影響している可能性がありうることから重要である。

そこで今回、免疫毒性(胸腺毒性)に関わる分子メカニズムから毒性指標を見いだすことを目的として、*in vivo* では免疫毒性の標的臓器としての胸腺に対する毒性影響を免疫組織化学的手法で評価するとともに、*in vitro* ではリンパT細胞表面抗原のCD-4 や CD-8、CD-25(インターロイキン-2 レセプター(IL-2R))などの免疫指標に対する影響について検討した。

## B. 研究方法

### ◆*in vivo* での検索方法

9 週齢の BALB/c 雌性マウスを用いて、Wellington 社より入手したダイオキシン(2,3,7,8-TCDD; tetra chlorodibenzo -p- dioxin) (50  $\mu$ g/ml in octane) 及び水銀(塩化第二水銀)100  $\mu$ g/kgをコーン油で希釈して腹腔内注射(投与容量;0.04 ml/10g)により単回投与した。投与後の肉眼的変化を観察するとともに、3~16 日目にエーテル麻酔下にて安楽死させたのち胸腺を摘出した。胸腺の臓器重量を測定後、直ちに凍結し、スライドグラス上でアセトン固定した。そして CD-4 及び CD-8  $\alpha$  のモノクローナル抗体(RD System 社・USA より入手)を用いて CD-4 及び CD-8  $\alpha$  の胸腺細胞の表面抗原を蛍光抗体間接法により免疫染色を行った。さらにダイオキシン及び水銀投与マウスの胸腺細胞について DNA マイクロアレイを用い

た GeneChip 解析を国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター毒性部の五十嵐主任研究官に依頼し、遺伝子発現の変化を検討した。

### ◆*in vitro* での検索方法

被験物質としては、水銀(塩化第二水銀)とダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)、PHA(フィトヘマグルチニン)を用いた。また用いた細胞は健常な成人から採血した後 Lymphoprep を用いて分離した末梢リンパ球T細胞と、大日本製薬(株)より入手したヒト急性リンパ芽球性白血病T細胞の MOLT-3 である。被験物質の各濃度(ダイオキシン;2~300ppb, 水銀;1~5ppm, PHA;2 ppm)を含む培養液中で2日~7日間培養した後、モノクローナル抗体(BD Bioscience 社より入手)を用いて蛍光発色させ細胞表面の CD-4、CD-8、CD-25(インターロイキン-2 レセプター; IL-2R)抗原発現を、フローサイトメリーにより検索した。

(倫理面への配慮)

本研究では、①ヒトの臨床検体、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、を含んでいない。実験動物の飼育・屠殺にあたっては、研究会内規定に則り適切に行った

## C. 研究結果

### ◆*in vivo* での結果

雌性マウスにおける体重変化は図1に示した。水銀投与での影響はみられないが、ダイオキシン投与群では、初期に体重減少が認められ、5 日目以降は回復傾向がみられた。また水銀・ダイオキシン投与による胸腺や脾臓の臓器重量は表1に示し

たが、胸腺の萎縮が著しく、とくにダイオキシンによる明らかな胸腺の萎縮の継続が観察された。正常 BALB/c 雌性マウスにおける免疫組織化学染色の所見を図2に示したが、皮質にリンパ球が密に分布し、CD-4 および CD-8 alpha 陽性細胞は髄質よりも皮質に多く、とくに細胞膜に強い活性が認められた。胸腺髄質においては、CD-4 および CD-8  $\alpha$  の両抗体の陽性反応は一部の細胞(細胞型は不明)のみみられた。

ダイオキシンや水銀の投与で胸腺の萎縮がみられたマウスでの組織像や CD-4 および CD-8  $\alpha$  の免疫染色の変化を図 3~5 に示した。組織像では胸腺皮質のリンパ球に変性や消失がみられるとともに、免疫染色でも皮質のリンパ球や髄質の幼弱細胞に CD-4 および CD-8  $\alpha$  の陽性細胞の増加が認められた。

さらにダイオキシンおよび水銀投与のマウス胸腺について、DNA マイクロアレイを用いた GeneChip 解析の結果は、表 2 に示すような遺伝子発現に変化がみられた。ダイオキシンによって最も変化が多い遺伝子発現は Ahrr(ダイオキシン受容体レプレッサー)であり、これは水銀ではみられず、ダイオキシンに特異的であった。

#### ◆ *in vitro* での結果

正常リンパ球T細胞と白血病T細胞における CD-4 陽性および CD-8 陽性、CD-25(IL-2R)陽性の抗原発現をフローサイトメトリーで検索し、その変化を図7~9 に示した。いずれもヒトのリンパ球T細胞ではあるが、鏡頭でも白血病T細胞(Molt-3)は、正常細胞に比べて細胞サイズが大きく、またフローサイトメトリー・パターンも異なるものであった。非特異的マイトーゲン作用の強い PHA との接触では、正常T細胞および白血病 T 細胞ともに CD-4 およ

び CD-8、IL-2Rのいずれも陽性細胞が明らかに増加したが、水銀やダイオキシンとの接触ではそれらの変化は少なかった。しかし水銀との接触では CD-25 陽性細胞の増加や、またダイオキシンの低濃度との接触で CD-8 陽性細胞の増加が認められた。またダイオキシンの低濃度・長期接触後に水銀を接触させると、水銀による CD-25 陽性細胞の増加がより増強されることを示した。

#### D. 考察

ダイオキシンの毒性は、免疫毒性とともに、生殖・発生毒性、肝毒性、内分泌系への影響など広範囲であるが、ダイオキシンが最も感受性の高い標的臓器は胸腺とリンパ組織であるといわれている。そこで今回はダイオキシンの免疫毒性(胸腺毒性)に関わる分子メカニズムを検討した。ダイオキシンの *in vivo* 暴露による胸腺の萎縮は顕著であり、今回の9週齢雌性マウスの結果でも 20  $\mu$ g/kgの投与で肉眼的にもまた臓器重量でも明らかであった。T細胞の分化にも影響するといわれていることから、胸腺細胞のT細胞表面抗原の CD-4 および CD-8  $\alpha$  の発現を免疫蛍光染色により検討したが、胸腺の萎縮の影響が認められた。これらの胸腺の萎縮や皮質リンパ球の変性や消失、さらに髄質の一部のリンパ球に CD-4 や CD-8  $\alpha$  陽性細胞の増加が観察された。皮質での成熟リンパ球の変性や消失を補うために髄質での CD 陽性細胞が増加するものと考えられた。

また萎縮や変性のみられる胸腺細胞について、DNA マイクロアレイを用いた GeneChip 解析の結果、多くの遺伝子に発現の変化がみられた。ダイオキシン投与により肝で応答する Ahrr(ダイオキシン受容体レプレッサー)や Cypla1, Cyplb1 などの遺伝子

発現は、胸腺でも変化していた。またその他胸腺に特異的に変化した遺伝子発現も認められたことから、今後これらの遺伝子発現と免疫毒性との関係について検索していかなければならない。

一方、正常T細胞や白血病T細胞のような免疫細胞を用いて *in vitro* でダイオキシンと接触し、CD-4 および CD-8、CD-25(IL-2R)の陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで検討した。PHA は、非常に強い非特異的なマイトゲン作用を有することから、T細胞の幼若化や増殖作用は鏡頭的に観察されたとともに、フローサイトメトリーでも明らかであり、CD-4 および CD-8、CD-25 陽性細胞のいずれも増加がみられた。水銀やダイオキシンとの *in vitro* 接触では、PHA に比べて弱いものであるが、水銀による CD-25 陽性細胞の増加やダイオキシンによる CD-8 陽性細胞の増加など免疫細胞に対する影響がみられた。とくにダイオキシンでは 2~5ppb のほとんど細胞死がみられない低濃度で CD-8 陽性細胞の増加がみられたことや、さらにダイオキシンの低濃度・長期接触後に水銀との接触で、水銀の免疫影響が増強されたことはダイオキシンの低濃度影響や修飾作用を示すものとして今後さらに検討が必要である。ダイオキシンとの接触で、CD-4 陽性細胞の減少傾向や CD-8 陽性細胞の増加は、CD-4 / CD-8 の比率にもつながり、免疫機能の低下をもたらすことにもなると考えられる。ヒトにおける疫学調査で、ダイオキシンの暴露によりリンパ球分布や細胞膜抗原レベルの変動を示唆する報告もあることから、今回の *in vitro* の結果との関係を検討し、免疫機能や宿主感受性との関係、さらには遺伝子発現の変化との関係なども今後の課題である

## E: 結論

環境汚染物質として生体影響が問題となるダイオキシンを中心として、今回免疫毒性影響を *in vivo* と *in vitro* の両面から検討した。ダイオキシンあるいは水銀の単回投与で胸腺の明らかな萎縮が認められるとともに皮質のリンパ球の変性や消失、さらに髄質リンパ球の CD 陽性細胞の増加がみられた。またこの際の胸腺細胞の GeneChip 解析では、Ahrr や Cypl1, Cyplb1 などの遺伝子発現に変化が認められた。

さらに正常T細胞や急性リンパ芽球性白血病T細胞 MOLT-3 を用いた *in vitro* におけるダイオキシンの接触では、低濃度で CD-8 陽性細胞の増加や CD-4 陽性細胞の減少がみられ、免疫機能の低下の影響を示すものであった。また低濃度の長期接触で水銀の免疫影響を増強させる修飾作用もみられた。したがって今回の *in vivo* および *in vitro* の結果を考え合わせると、ダイオキシンによる免疫毒性の影響はかなり低濃度であり、水銀などのアレルギー発現に修飾的に作用している可能性を示唆するものであった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- ① 野村登志夫、山中すみへ、太田 薫;特殊環境ストレス下における唾液中 Cortisol および S-IgA の変動、第 53 回口腔衛生学会、日本口腔衛生学会誌、2004

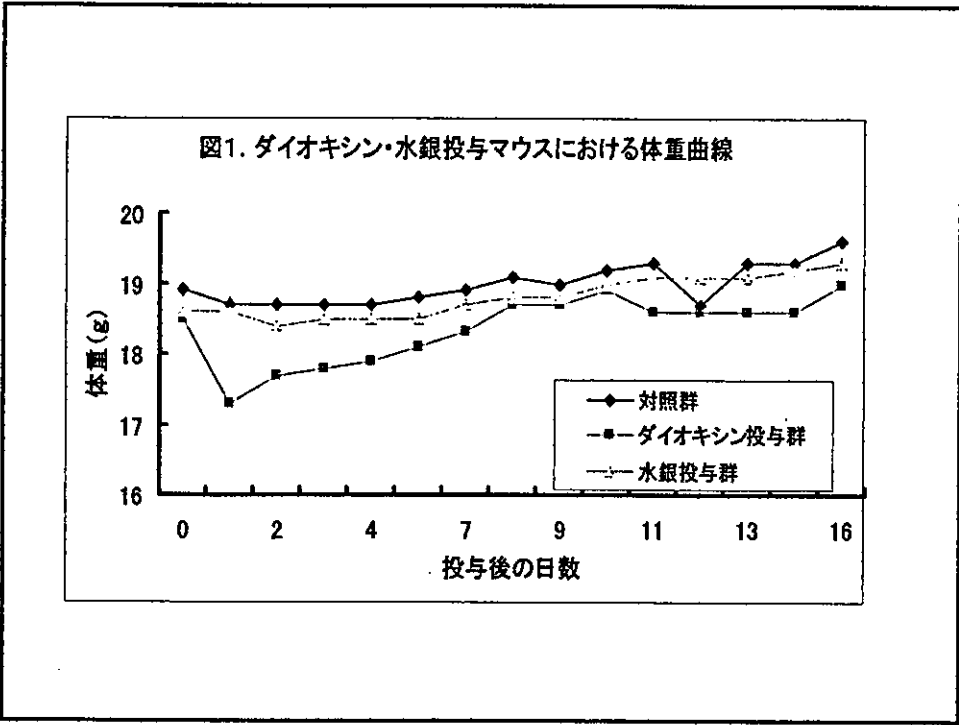


表1. ダイオキシシ・水銀投与マウスにおける胸腺および脾臓重量の変化

群	胸腺(mg) (比体重,%)				脾臓(mg) (比体重,%)	
	投与3日後	投与9日後	投与10日後	投与16日後	投与10日後	投与16日後
対照群	49(0.25)	51(0.28)	50(0.26)	52(0.26)	114(0.59)	108(0.55)
ダイオキシシ5ug/kg	35(0.19)	40(0.22)				
20ug/kg	32(0.18)	18(0.10)	30(0.16)	28(0.15)	115(0.61)	104(0.53)
水銀100ug/kg			33(0.17)	55(0.28)	98(0.51)	96(0.50)

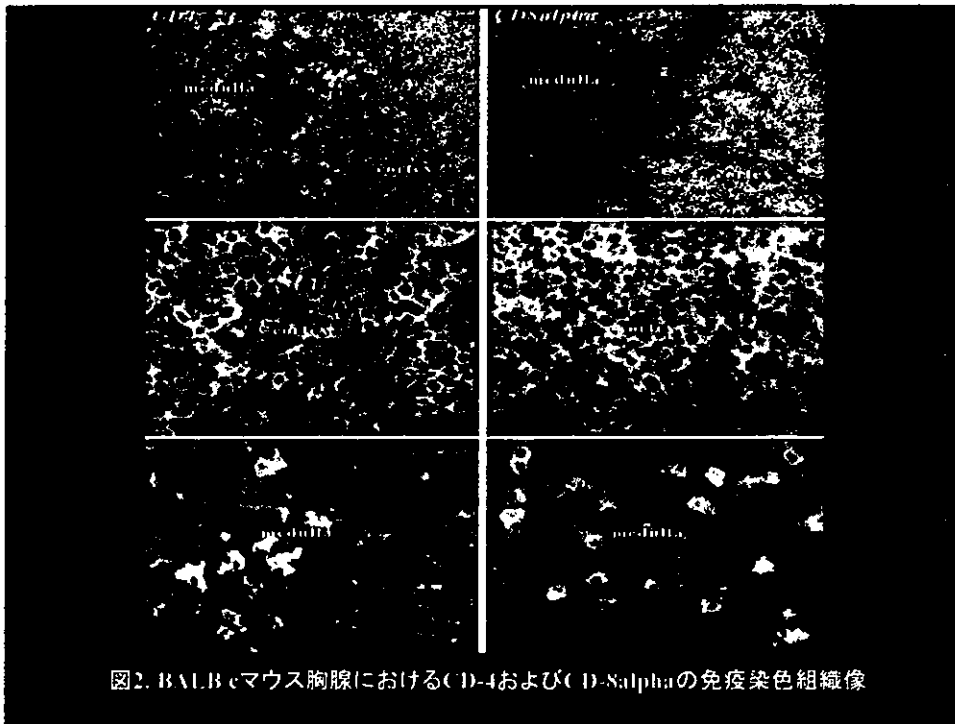


図2. BALB/cマウス胸腺におけるCD-4およびCD-8alphaの免疫染色組織像

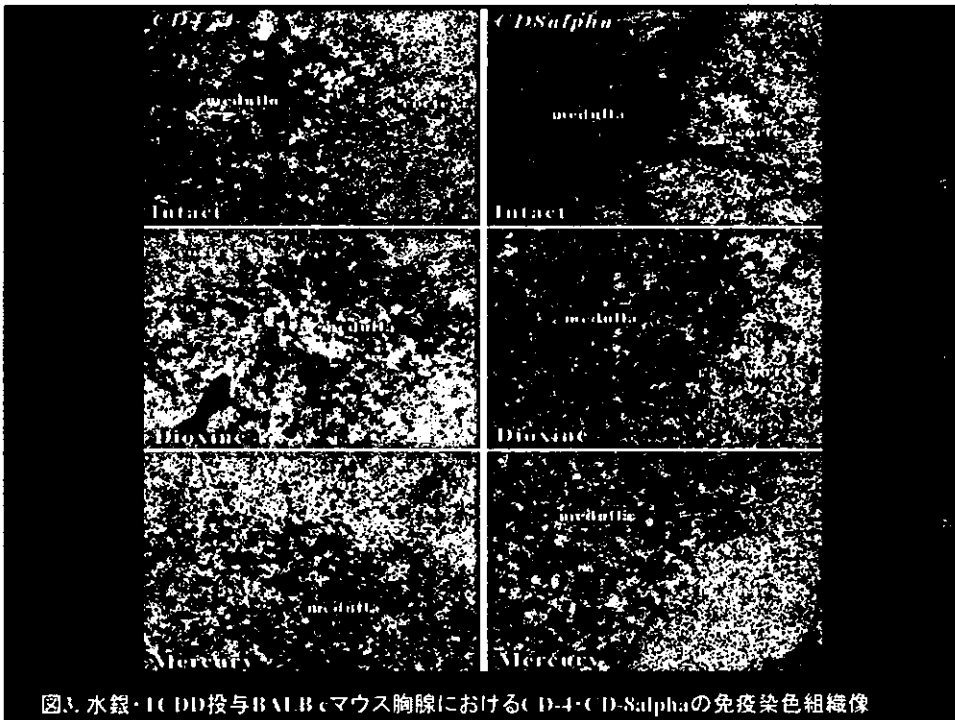


図3. 水銀・TCDD投与BALB/cマウス胸腺におけるCD-4・CD-8alphaの免疫染色組織像

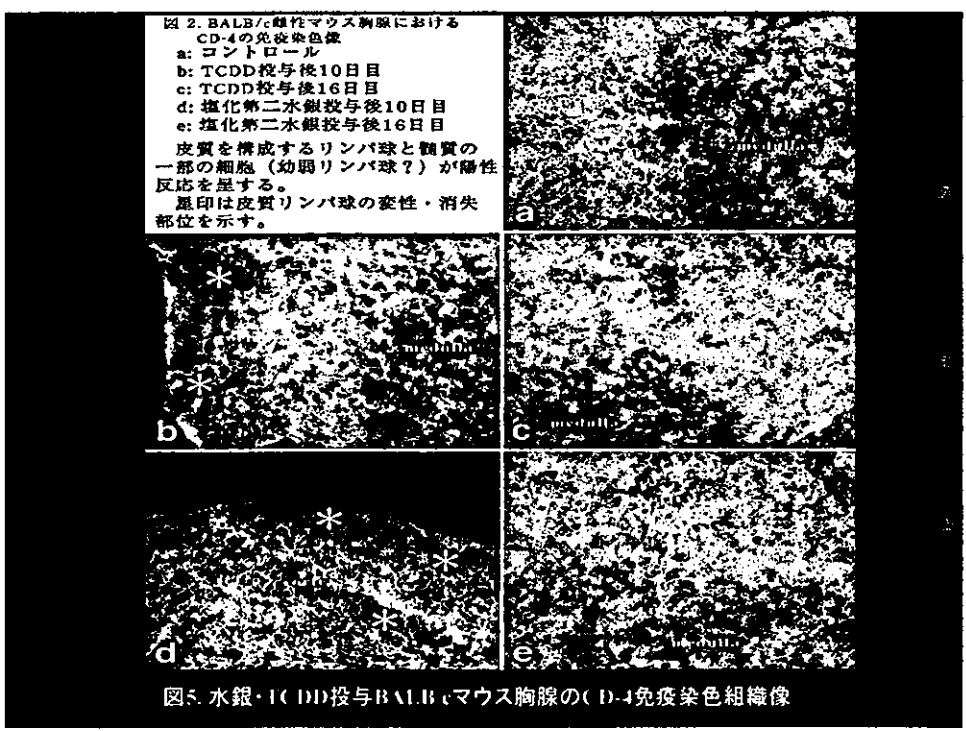
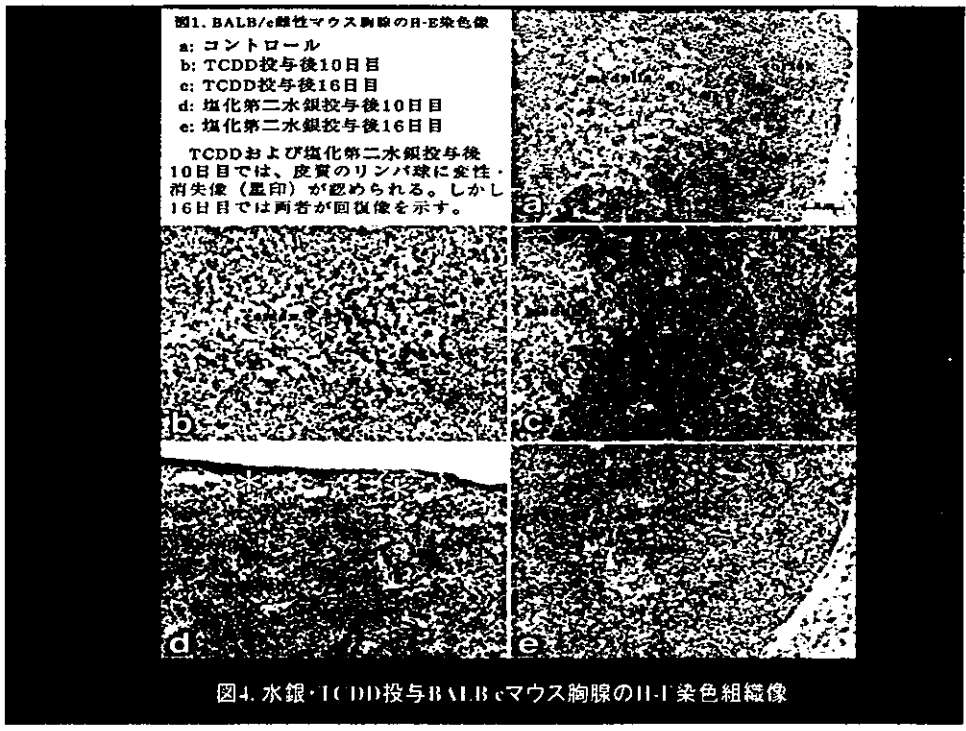


図 3. BALB/c 雌性マウス胸腺における  
 CD-8 $\alpha$  の免疫染色像  
 a: コントロール  
 b: TCDD 投与後 10 日目  
 c: TCDD 投与後 16 日目  
 d: 塩化第二水銀投与後 10 日目  
 e: 塩化第二水銀投与後 16 日目  
 皮質を構成するリンパ球と髄質の  
 一部の細胞 (幼弱リンパ球?) が陽性  
 反応を呈する。  
 星印は皮質リンパ球の変性・消失  
 部位を示す。

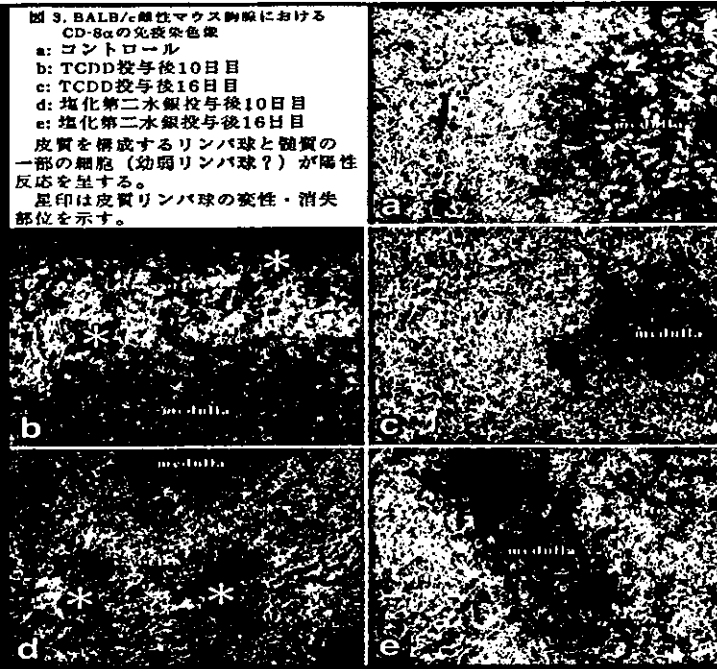


図 6. 水銀・TCDD 投与 BALB/c マウス胸腺の CD-8 alpha 免疫染色組織像



表2. ダイオキシンの投与で変化した遺伝子

Ahrr  
 Crip3  
 Cul4a  
 Cyp1a1  
 Cyp1b1  
 Gpnm  
 Hsp105  
 Hspa1b  
 Krt1-18  
 Krt2-8  
 Scin  
 Xdh

図7. 正常リンパ細胞に対するin vitro 刺激での免疫活性の変化

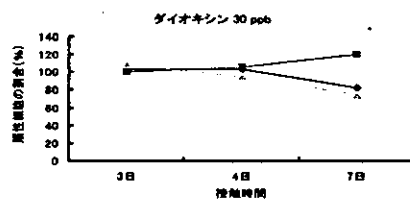
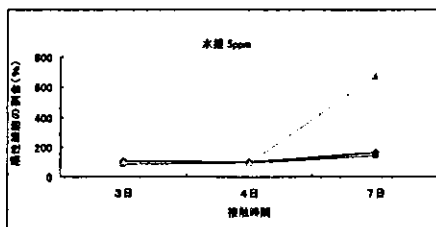
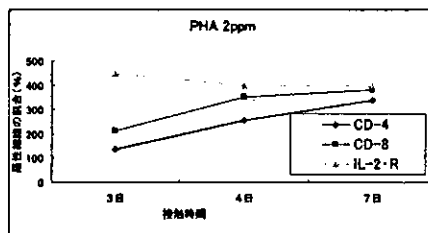


図8.Molt-3 細胞に対するin vitro 刺激での免疫活性の変化

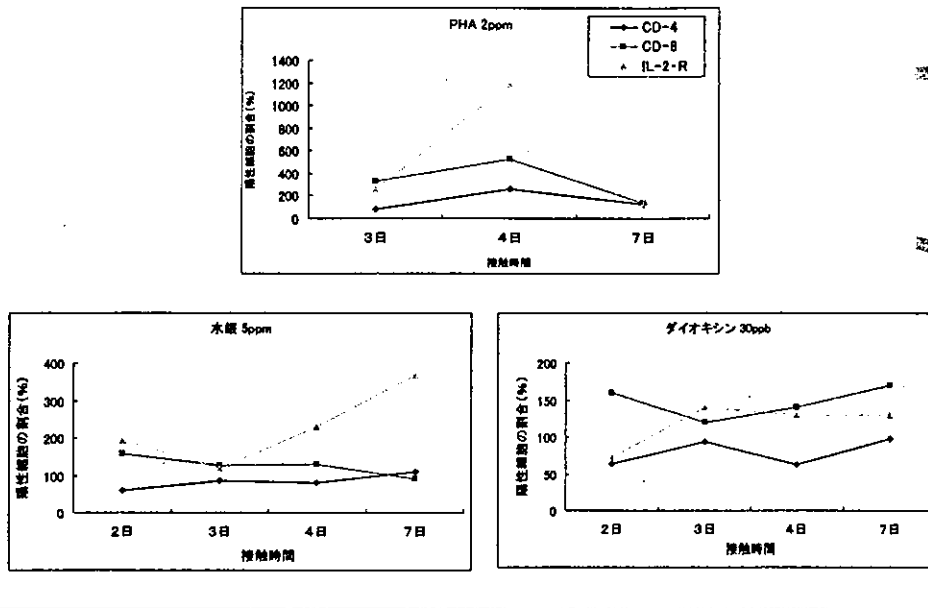
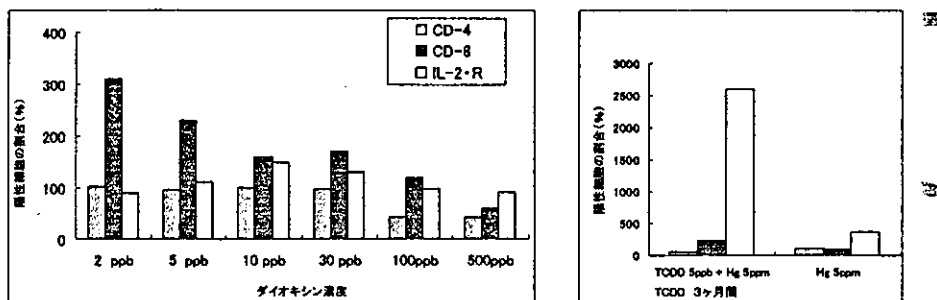


図9.Molt-3 細胞に対するダイオキシンによる免疫活性の変化



ダイオキシン濃度を変えて7日間の接触

水銀の免疫毒性に対するダイオキシン  
長期低濃度接触の影響

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究

分担研究者 北川 昌伸 東京医科歯科大学 助教授

研究要旨

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析するための手掛かりとして、胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているコルチコステロイドの影響を検討した。薬剤はマウスに *in vivo* 腹腔内投与し、投与マウスの胸腺細胞における遺伝子発現プロファイルの投与後早期における変化を経時的に解析した。T 細胞機能の低下が宿主個体に与える全体的影響をみる指標として、リステリア感染に対する宿主反応についても検討した。

A. 研究目的

細菌感染に対する感受性を左右する薬剤について、宿主細胞(とくに胸腺などの免疫系臓器)に及ぼす影響を網羅的に解析する。今回は胸腺の萎縮とT細胞の著明な減少を誘導することが知られているコルチコステロイドの投与による変化を観察した。

B. 研究方法

【マウス、細菌、薬剤】

- C57BL/6 マウス: 6 週齢 子を搬入し、8 週齢で実験を行った。
- リステリア菌: 感染後 7 日程度で約半数死亡する dose の *Listeria monocytogenes* を organism として  $7 \times 10^6$  腹腔内に接種した。
- コルチコステロイド(ヒドロコルチゾン) 処理: 2.5 あるいは 10 mg/mouse を腹腔内投与(胸腺は2日後くらいでかなり縮小するが、その後正常に復する)した。

【実験プロトコール】

- 経過観察群: ステロイド投与 → 1 日あるいは 3 日後 → リステリア菌感染 → 経過観察
- sacrifice 群: ステロイド投与後 1hr, 6hr, 1 日で sacrifice

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて東京医科歯科大学実験動物委員会の定める倫理基準に準拠して行うものとし、同委員会に申請して承認された方法(承認番号 0050015)に則って行う。

C. 研究結果

1. ステロイド投与によって胸腺は著明な萎縮を示し、10 mg/mouse 投与では24時間後までに重量にして約3分の1にまで低下し、アポトーシス細胞が著明に増加した。変化は可逆的で、約3日で元に復した。
2. 脾の重量もステロイド投与後24時間まで軽度の減少を示したが、アポトーシス細胞の比率

には大きな変化は認められなかった。

3. フローサイトメトリーによる解析では、ステロイド投与後、胸腺中の CD4/8 double positive T 細胞の比率が減少し、CD4 あるいは CD8 single positive T 細胞の比率が相対的に増加していた。脾の T 細胞については、分画の構成に変化は認められなかった。
4. リステリア菌接種によって、ステロイド投与群では致死率が上昇し、生存日数も短縮した。
5. ステロイド投与後早期における胸腺、脾の遺伝子発現プロファイルを検索する。

#### D. 考察

胸腺に明らかな毒性を有するステロイドをマウスの腹腔内に投与して、*in vivo*における胸腺細胞の変化を検討した。アポトーシスの著明な増加とともに、CD4/8 single positive のT細胞の比率が相対的に増加した。宿主に対する T 細胞機能低下の影響として、リステリア菌による致死率が上昇することを示した。胸腺細胞における遺伝子発現プロファイルの検索では、アポトーシスやT細胞分化に関与するシグナル系の活性化や阻害などの修飾が予想される。

薬剤の胸腺毒性を試験する際に、一つのパターン(アポトーシス誘導)を示す薬剤の代表としてステロイド投与の影響を検討した。種々の薬剤が胸腺細胞に及ぼす影響を遺伝子発現プロファイルのパターンの上から分類し、発現型としての細菌感染に対する感受性の増強を対照して検討する系を構築したい。

#### E. 結論

胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導する薬剤であるコルチコステロイドの作用機構を、遺伝子発現プロファイルの上から明らかにすることにより、

様々な薬剤の胸腺毒性を評価するための基礎データを得ることができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表(2003-2005)

##### 【原著論文】

Hasegawa M, Yamaguchi S, Aizawa S, Ikeda H, Tatsumi K, Noda Y, Hirokawa K, Kitagawa M. Resistance against Friend leukemia virus-induced leukemogenesis in DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) deficient *Scid* mice associated with defective viral integration to the *Spi-1* and *Fli-1* site. *Leukemia Res*, 2005, in press.

Nakagawa Y, Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Abe S, Takemura T, Hirokawa K, Suzuki K, Kitagawa M. Expression of IAP family proteins in adult acute mixed lineage leukemia (AMLL). *Am J Hematol*, 2005, in press.

Yamaguchi S, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka K, Yoshida K, Noda Y, Tatsumi K, Hirokawa K, Kitagawa M. DNA-dependent protein kinase enhances DNA damage-induced apoptosis in association with Friend gp70. *Leukemia Res* 29:307-316, 2005.

Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, Hirokawa K, Kitagawa M. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Res* 28:487-494, 2004.

Yamamoto K, Abe S, Nakagawa Y, Suzuki K, Hasegawa M, Inoue M, Kurata M, Hirokawa K, Kitagawa M. Expression of IAP family

proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. *Leukemia Res* 28:1203-1211, 2004.

Seidler HBK, Utsuyama M, Nagaoka S, Takemura T, Kitagawa M, Hirokawa K. Expression level of Wnt signaling components possibly influence the behavior of colorectal cancer in different age groups. *Exp Mol Pathol* 76:224-233, 2004.

Nemoto T, Kitagawa M, Hasegawa M, Akashi T, Takizawa T, Hirokawa K, Koike M. Expression of IAP family proteins in esophageal cancer. *Exp Mol Pathol* 76:253-259, 2004.

Endo T, Abe S, Seidler HBK, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, Kitagawa M, Hirokawa K. Expression of IAP family proteins in colorectal cancer in different age groups. *Cancer Immunol Immunotherapy* 53:770-776, 2004.

Tanaka K, Watanabe K, Yamaguchi S, Hasegawa M, Kitagawa M, Aizawa S. Cytological basis for enhancement of radiation-induced mortality by Friend leukaemia virus infection. *Int J Radiat Biol* 80:673-681, 2004.

#### 【総説・著書】

Kitagawa M, Utsuyama M, Kurata M, Yamamoto K, Yuasa Y, Ishikawa Y, Arai T, Hirokawa K. Cancer and aging: symposium of the 27<sup>th</sup> annual meeting of the Japan society for biomedical gerontology, Tokyo. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, in press.

#### 2. 学会発表(2003-2005)

北川昌伸、長谷川真紀、田中 薫、吉田和子、野田攸子、巽 紘一、廣川勝昱、相沢志郎. レトロウイルス感染に伴う放射線誘発アポトーシス

増強作用について. *Cancer Science* 95 巻 Suppl.:222, 2004.

北川昌伸、宇津山正典、廣川勝昱. Host aging effects on carcinogenesis. *基礎老化研究* 28 巻 2 号:19, 2004.

北川昌伸、長谷川真紀、山口修一、野田攸子、巽 紘一、廣川勝昱、相沢志郎. レトロウイルス感染による放射線誘発アポトーシス増強効果. *日本病理学会会誌* 93 巻:240, 2004.

北川昌伸、山口修一、長谷川真紀、田中 薫、吉田和子、野田攸子、巽 紘一、廣川勝昱、相沢志郎. レトロウイルス感染による放射線誘発アポトーシス増強効果. *日本癌学会総会記事* 62:135, 2003.

北川昌伸、中川靖章、山口修一、長谷川真紀、根本哲生、鈴木憲史、廣川勝昱. リンパ性白血病骨髓細胞における IAP ファミリータンパクの発現. *日本病理学会会誌* 92 巻:213, 2003.

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

なし。

#### 2. 実用新案登録

なし。

#### 3. その他

なし。

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

分担研究者 矢守 隆夫 (財)癌研究会 癌化学療法センター 分子薬理部  
(分担研究課題:ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究)

研究要旨

がん細胞パネルは、被験化学物質の細胞増殖阻害データをもとにしたフィンガープリントからその作用機作や分子標的を推定する抗がん物質評価系である。本年度、約 20 種類の毒性化学物質を加えた合計約 140 をデータベース化し、Cancer Cell Informatics なる手法によるクラスター分析を行った。機能が殆ど知られていない ziram が酸化ストレス関連毒性化学物質を含むクラスターに属しており、生化学的な解析の結果、ziram が活性酸素発生に関与する可能性が示された。このことから Cancer Cell Informatics が毒性化学物質の作用機作予測に有効である可能性が認められた。Tributyltin (TBT) の分子メカニズム解析にはがん細胞パネルの中の前立腺癌 PC-3 細胞株をモデル系として用いた。GeneChip 解析により TBT により発現変化する遺伝子が多数抽出された。この情報に基づく TBT の分子メカニズム解析を展開したい。

A. 目的

がん細胞パネルは、化学物質の細胞増殖阻害データを標準化学物質感受性データベースと比較し、インフォマティクスの手法によりその作用機作や分子標的を推定する抗がん物質評価系である。このがん細胞パネルを応用し、毒性化学物質の評価、特にその細胞増殖への影響の分子メカニズムを調べるためのツールとして活用する。本年度は毒性分子機構の解析を行う毒性化学物質選択の目的で、既にデータを取得した約 120 種類の毒性化学物質に加えて新たに約 20 種類の毒性化学物質のデータを取得し、データベースの拡充を行った。得られたデータベースを

用いたクラスター解析による酸化ストレス関連物質の機能予測、また GeneChip による核内受容体上作動性物質の機能解析を試みた。

B. 方法

FingerPrint は、インフォマティクスのための、がん細胞パネル(ヒトがん細胞 39 種よりなる)に様々な化学物質を 48 時間暴露させ、得られる 50%細胞増殖阻害濃度(GI50 値)のパターンのことであり、このパターンは化学物質それぞれに固有の特徴を示す。毒物に関する FingerPrint データベースを約 140 種類にまで拡充させ、クラスター解析(Gene Spring ソフトウェア)を行いその作用機

作を推定した。クラスター解析の結果、ziram が酸化的ストレスに関与する可能性の高いことが示された。そこで細胞に ziram を暴露後、APF (Amino Phenyl Fluoresen) を用いて活性酸素の検出を試みた。また、内分泌かく乱化学物質である Tributyltin (TBT) を前立腺がん細胞に曝露した際の遺伝子発現を GeneChip を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では、①ヒトの臨床検体、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、を含んでいない。実験動物の飼育・屠殺にあたっては、研究会内規定に則り適切に行った。

### C. 研究結果

毒性化学物質の中でがん細胞の増殖を阻害しないものは Finger Print が得られないため評価不能であるが、約 6 割の毒物で FingerPrint を得ることができた。フィンガープリントの比較 (COMPARE) 解析の結果、多くの毒性化学物質が既存の抗がん剤とは異なる Finger Print を示した。これは、毒性化学物質の多くが薬物である抗がん剤とは作用機作や分子標的を異にすることを示唆している。さらに、クラスター解析によって毒性化学物質のグループ分けを行った。ジギタリス剤である Digoxin や Ouabain は緊密なクラスターを形成し、また酸化的ストレスに関与する paraquat、carbon tetrachloride、thalidomide が同一クラスターを形成した。このクラスターに ziram が含まれており、これが活性酸素を発生させる可能性が示唆された。ziram をヒトがん細胞に暴露した後、活性酸素検出試薬である APF を添加し測定を試みた

ところ、陽性反応が認められた。また内分泌かく乱化学物質 TBT に着目し、ヒト前立腺癌培養細胞株 PC-3 への TBT 暴露による遺伝子発現変動を検討した。濃度、時間依存的な発現変動を示す遺伝子が多数抽出された。その中には 3T3-L1 細胞で TBT による発現誘導が報告されている aP2 遺伝子も含まれていた。TBT 処理 24 時間後に発現変化の見られた遺伝子は VEGF などの血管新生関連遺伝子や、RHO 関連シグナル伝達遺伝子などをはじめ 300 以上にのぼった。

### D. 考察

がん細胞パネルを用いた「Cancer Cell Informatics」解析の結果、少なくとも毒性化学物質の特定のポピュレーションを Finger Print により分類しし得ることが示された。以前から示唆されてきたように、作用機作や分子標的が明らかな毒性化学物質の Finger Print を数多くデータベース化することにより毒性評価の新手法となる可能性が考えられる。さらに多くの毒性化学物質をこの系で評価して有用性の検証を行う必要がある。酸化的ストレス関連化学物質である paraquat 等と同一クラスターに属した ziram が、実際に酸化的ストレスへの関与している可能性が示された。また TBT が、がん細胞パネルでは強い増殖阻害活性を示したため、その分子メカニズムを調べ、生体内作用様式との関連を考察するという方針で、GeneChip による遺伝子発現解析を行った。その結果、既に変動することが報告されている遺伝子がヒト前立腺癌 PC-3 細胞においても同様の変動を示したことから、この系は TBT の作用メカニズムのモデル解析系として使える可能性がある。変動が確認された数 100 の遺伝子の文献調査をす

め TBT の作用メカニズムに関連する可能性のある遺伝子を絞り込み、RNAi 等でその機能解析を進めてゆきたい。

#### E. 結論

現在まで種々の毒性化学物質をがん細胞パネルにかけ Fingerprint をデータベース化した。今後被験化合物をさらに増やして検討する。ziram の例から Cancer Cell Informatics を用いた毒性化学物質のクラスター解析による機能予測が有効である可能性が示唆された。TBT の分子メカニズム解析にがん細胞パネルの中の前立腺癌 PC-3 細胞株がモデル系として使える見込みがあり、引き続きこの系と細胞生物学的解析を併用し分子メカニズム解析を行う。

#### F. 研究発表(2002-05)

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

なし

###### 2) 雑誌

1. Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y., and Yamori, T. Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining the chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol Cancer Ther*, in press, 2005.
2. Lai, Y. Y., Huang, L. J., Lee, K. H., Xiao, Z., Bastow, K. F., Yamori, T., and Kuo, S. C. Synthesis and biological relationships of 3',6-substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives as antimetabolic agents. *Bioorg Med Chem*, 13: 265-275, 2005.
3. Tanaka, R., Wada, S., Aoki, H., Matsunaga, S., and Yamori, T. Spiromarienols A and B: two new 7(8→9)abeo-lanostane-type triterpene lactones from the stem bark of *Abies mariesii*. *Helvetica Chimica Acta*, 87: 240-249, 2004.
4. Mimaki, Y., Yokosuka, A., Hamanaka, M., Sakuma, C., Yamori, T., and Sashida, Y. Triterpene Saponins from the Roots of *Clematis chinensis*. *J Nat Prod*, 67: 1511-1516, 2004.
5. Park, H. R., Tomida, A., Sato, S., Tsukumo, Y., Yun, J., Yamori, T., Hayakawa, Y., Tsuruo, T., and Shin-ya, K. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J Natl Cancer Inst*, 96: 1300-1310, 2004.
6. Saito, H., Honma, T., Minamisawa, T., Yamazaki, K., Noda, T., Yamori, T., and Shiba, K. Synthesis of functional proteins by mixing peptide motifs. *Chem Biol*, 11: 765-773, 2004.
7. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene*, 2004.
8. Sakai, K., Fukuda, Y., Matsunaga, S., Tanaka, R., and Yamori, T. New Cytotoxic Oleanane-Type Triterpenoids from the Cones of *Liquidambar styraciflua*. *J Nat Prod*, 67: 1088-1093, 2004.
9. Hama, K., Aoki, J., Fukaya, M., Kishi, Y., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Yamori, T., Watanabe, M., Chun, J., and Arai, H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem*, 279: 17634-17639, 2004.
10. Mizui, Y., Sakai, T., Iwata, M., Uenaka, T.,



Okamoto, K., Shimizu, H., Yamori, T., Yoshimatsu, K., and Asada, M. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. III. In vitro and in vivo antitumor activities. *J Antibiot* (Tokyo), 57: 188-196, 2004.

11. Bai, J., Kitabatake, M., Toyozumi, K., Fu, L., Zhang, S., Dai, J., Sakai, J., Hirose, K., Yamori, T., Tomida, A., Tsuruo, T., and Ando, M. Production of Biologically Active Taxoids by a Callus Culture of *Taxus cuspidata*. *J Nat Prod*, 67: 58-63, 2004.
12. Rengifo-Cam, W., Konishi, A., Morishita, N., Matsuoka, H., Yamori, T., Nada, S., and Okada, M. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis. *Oncogene*, 23: 289-297, 2004.

(総説)

1. 中津則之, 矢守隆夫 ヒトがん細胞パネルによる化合物の分子薬理の評価と抗がん剤感受性関連遺伝子. *がん分子標的治療*, 2: 54-60, 2004.
2. 矢守隆夫 *Cancer Cell Informatics* -抗がん剤探索とポストゲノム研究への応用. *バイオサイエンスとインダストリー* 62: 445-449, 2004.
3. 矢守隆夫 癌分子標的と創薬スクリーニング. *現代医療*, 36: 1339-1346, 2004.

2. 学会発表

1. 山崎佳波、中津則之、菅野純、矢守隆夫. *Cancer Cell Informatics* による毒性物質の評価. 日本癌学会 第63回学術総会, 福岡, 2004.
2. 中津則之、吉田陽子、山崎佳波、且慎吾、中村知己、関万里子、福井泰久、菅野純、矢守隆夫. ヒトがん細胞パネルによる化合物の分子薬理・分子毒性の評価および抗癌剤

感受性関連遺伝子の同定. 日本癌学会 第62回学術総会, 名古屋, 2003.

G. 知的財産所有権の出願状

1. 特許出願状況

1) 血清アポリポタンパク質 A-II 量変化の検出方法

- (1) 発明者: 矢守隆夫、西村由美子、志和美重子、若田部るみ、有國尚
- (2) 出願日: 2003年5月7日
- (3) 出願番号: 特願2003-129028
- (4) 出願人: 財団法人癌研究会、サイファージェン・バイオシステムズ株式会社

2) 腫瘍細胞の抗癌剤に対する感受性を判定する方法

- (1) 発明者: 矢守隆夫、吉田陽子
- (2) 出願日: 2003年4月25日
- (3) 出願番号: 特願2003-122338
- (4) 出願人: 財団法人癌研究会

3) 大腸癌細胞の測定方法

- (1) 発明者: 矢守隆夫、西村由美子、志和美重子、府川愛、有國尚
- (2) 出願日: 2003年2月7日
- (3) 出願番号: 特願2003-031049
- (4) 出願人: 財団法人癌研究会、サイファージェン・バイオシステムズ株式会社

2. 実用新案登録

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

#### マウス培養細胞による毒性メカニズム研究

分担研究者：小野 宏(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

研究協力者：佐々木澄志、田中憲穂(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

#### 研究要旨

マウス培養細胞において、動物の系統による遺伝子発現の違いがあるかどうか、マイクロアレイ法で分析する前に、C3H/He マウス( $\text{Cd}^{2+}$ 感受性、AHH 誘導性)と DBA/2 マウス( $\text{Cd}^{2+}$ 抵抗性、AHH 非誘導性)の全胎児細胞を用いて、*in vitro* でも感受性の差が観察されるかどうか細胞毒性試験を用いて検討した。

細胞を硝酸カドミウムまたは 3-methylcholanthrene (MCA) で 3 日間処理し、相対細胞増殖率を算出した。 $\text{Cd}^{2+}$ 処理における  $\text{IC}_{50}$  値は、C3H/He 細胞では  $4.1 \mu\text{M}$ 、DBA/2 細胞では  $5.7 \mu\text{M}$  であった。一方、MCA 処理では、両細胞において細胞増殖の阻害は観察されず、逆に約 20%の細胞数の増加が  $5\sim 20 \mu\text{g/ml}$ 、において認められた。

#### A. 研究目的

マウス培養細胞を用いたマイクロアレイ法による遺伝子発現のデータベースを構築するには、まずどの系統および組織を使うかを決定しなければならない。そこで、*in vitro* においても、*in vivo* と同様に感受性の違いが観察されるのかどうか、系統による遺伝子発現の違いを調べる。

マウスは系統によって、化学物質による毒性や酵素誘導などが異なることが知られている。そこで C3H/He マウス( $\text{Cd}^{2+}$ 感受性、AHH 誘導性)と DBA/2 マウス( $\text{Cd}^{2+}$ 抵抗性、AHH 非誘導性)の全胎児細胞を  $\text{Cd}^{2+}$  または MCA で処理し、マイクロ

アレイ法で分析する。

#### B. 研究方法

妊娠 12~14 日目の C3H/He または DBA/2 マウス全胎児細胞を 96 ウェルプレートに 103 個播種した。翌日、硝酸カドミウムまたは MCA を添加し、3 日間処理した( $\text{Cd}^{2+}$ :  $0.5\sim 30 \mu\text{M}$ 、MCA:  $2\sim 20 \mu\text{g/ml}$ 、培地量:  $0.2 \text{ ml/ウェル}$ )。20  $\mu\text{L}$  のアラマーブルー溶液を各ウェルに添加し、8 時間培養後、相対蛍光強度を測定し、相対細胞増殖率を算出した。

(倫理面への配慮)

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、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

#### C. 研究結果

*In vivo* における毒性作用の違いが、*in vitro* においても再現されるかどうか、またマイクロアレイ法を行うにあたり、最適処理濃度を設定するために、細胞毒性作用を観察した。

その結果、 $Cd^{2+}$  は用量に依存して細胞増殖を阻害し、 $IC_{50}$  値は、C3H/He 細胞では  $4.1 \mu M$ 、DBA/2 細胞では  $5.7 \mu M$  であった。

一方 MCA では、両細胞共に細胞増殖の阻害は観察されず、逆に約 20% の細胞数の増加が  $5-20 \mu g/ml$  において認められた。また、わずかに DBA/2 細胞の方が高い増殖促進作用を示した。

なお、今回はまだマイクロアレイ法で分析するまでには至っていない。

#### D. 考察

化学物質に対する感受性を調べるにあたり、細胞は単一臓器由来の細胞を用いると特定の遺伝子しか働いていない可能性があるため、全胎児細胞を用いた。

$Cd^{2+}$  において、 $IC_{50}$  値を用いて比較すると、C3H/He 細胞は DBA/2 細胞の約 1.4 倍高い感受性を示した。このことから、*in vitro* では *in vivo* と同様、C3H/He 細胞の方が高い感受性を示すこと

が分かった。

また MCA においては、細胞毒性作用は全く見られなかった。MCA のような芳香族炭化水素物では、代謝活性化された場合に細胞毒性作用を示すことが知られている。細胞増殖を促進させた機構は分からないが、細胞増殖を阻害しなかったのは、胎児細胞では CYP などの酵素がまだ発現していないためと考えられた。

#### E. 結論

細胞毒性試験の結果から、C3H/He 細胞と DBA/2 細胞では、 $Cd^{2+}$  と MCA に対する反応が異なることが分かった。以上の結果から、マイクロアレイ法において、 $Cd^{2+}$  は  $5 \mu M$ 、MCA は  $10 \mu g/ml$  で処理することとした。

#### F. 研究発表

無し

#### G. 知的所有権の取得状況

無し

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

変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究

分担研究者: 本間正充  
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

協力研究者: 鈴木孝昌  
国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

### 研究要旨

日本環境変異原学会MMS研究会における共同研究として、アルキル化剤および多環芳香族化合物などの遺伝子傷害性物質7化合物、非遺伝子傷害性物質としてフェノバルビタールとエタノールをマウスに投与し、肝臓における遺伝子発現変化を経時的に GeneChip を用いて解析した。遺伝子傷害性物質にのみ共通して発現変化する遺伝子群を絞り込み、約 30 種類の遺伝子を抽出できた。これらは、遺伝子傷害性をスクリーニングするための候補遺伝子としての有用性が期待される。

#### A. 研究目的

動物個体における遺伝子傷害性物質に対する遺伝子発現変化を解析することにより、遺伝子傷害に対する生体防御機構のメカニズムを解析する。また、化合物の遺伝子傷害性のメカニズムに特異的な遺伝子発現変化を調べることにより、作用機序のよくわからない化合物に対する、メカニズムの予測につながることを期待される。遺伝子傷害は外見上の形質として観察されにくいいため、その検出は容易ではないが、遺伝子発現を指標として化合物の遺伝子傷害性をスクリーニングできれば、簡便な試験系として有効性が期待できる。

#### B. 研究方法

遺伝子傷害性物質として、アルキル化剤である

diethylnitrosamine (DEN), dimethylnitrosamine, ethyl nitrosoarea, dipropylnitrosamine, 芳香族化合物として dimethylbenzo- anthracene, *o*-amin oazotoluene, dibenzo[*a*,*f*]pyrene, 非遺伝子傷害性物質として, ethanol, phenobarbital、の計9化合物を用い、薬物投与したマウス肝臓を、4時間、20時間、14日、28日後に回収し、5匹分をまとめて、TRIzol 溶液中にてホモジネートした。ここから total RNA を抽出し、定法に従って Affymetrix GeneChip による遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用し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、本研究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