

- (invited) 13th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2004.7.2, Osaka
7. Kiyoshi Takeda, Innate immune recognition by Toll-like receptors (Organizer) Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 1st Meeting 「Innate Immunity at Mucosal Surface」 2004. 7. 9-10, Tokyo
 8. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors (Invited) The 3rd Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2004.8.29-9.2, Hyogo, Japan
 9. Kiyoshi Takeda, Evolution and integration of innate immune recognition systems: The Toll-like receptors (Symposium; Invited) The 8th conference of the International Endotoxin Society, 2004.11.15-18, Kyoto, Japan
 10. Kiyoshi Takeda, Involvement of Toll-like receptor-mediated activation of innate immunity in mycobacterial infection. 40th anniversary of Japan-US, Program for Tuberculosis and Leprosy panel, 2004. 12.9, Kyoto, Japan
 4. 竹田潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会、2005.4.4-6、東京
 5. 竹田潔, Toll-like receptorと結核感染(シンポジウム) 第80回日本結核病学会、2005.5.12-13、埼玉
 6. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構(ワークショップ、招待講演) 第5回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡
 7. 竹田潔, Toll-like receptorを介した自然免疫系の制御(特別講演) 第45回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
 8. 竹田潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患(シンポジウム、招待講演) 第42回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
 9. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 10. 桑田啓貴、竹田潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 11. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 12. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 13. 竹田潔, Toll-like receptorによる自然免疫応答の制御, 第2回九州大学生体防御医学研究所・東京大学医科学研究所, 「感染・免疫・ゲノム」合同シンポジウム, 2004.7.6、東京
 14. 山本雅裕、竹田潔、審良静男, Toll-like receptorを介した細胞内シグナル伝達機構と遺伝子発現制御, 第25回日本炎症・再生医学学会, 2004.7.13、東京
 15. 竹田潔, Toll-like receptorによる自然免疫系の活性化機構(シンポジウム、招待講演) 第17回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2004.11.25、北九州
 16. 竹田潔, 遺伝子改変による免疫系シグナル伝達機構の解析(免疫学会受賞講演) 第34回日本免疫学会学術集会、2004. 12.1-3、札幌
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

子どもに対する化学物質暴露影響の内分泌的観点からの解明

分担研究者 渡邊 肇 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター 助教授

研究要旨

性ホルモンなどに対する感受性は、子供と大人で大きく異なることが知られており、胎児期を含む子どもへのホルモン様物質の暴露は不可逆的な影響を及ぼす事が知られている。本研究では、マウスをモデルとして新生仔期にホルモン様作用を有する化学物質の曝露を行い、その内分泌学的影響について遺伝子発現制御の変化から解析を進めている。

A. 研究目的

子どもへの化学物質暴露による疾患の発生、成長・発達に及ぼす影響を内分泌的な観点から解明することを目的とする。新生仔期のホルモン作用による悪影響はよく知られているが、その発現作用機序はいまだ不明であり、的確なリスク評価ができない。マウスを用いて胎仔期、新生仔期のホルモン影響の作用機序を解明することにより、化学物質によるリスクに関して、総合的な評価をするための知見を得る。

B. 研究方法

マウス(C57BL/6J)を動物実験に関する指針に従い飼育し交配したのち、新生仔マウスを得た。これらを用いて新生仔期(出生直後から5日間)、成熟期(生後10週間)に化学物質としてジエチルstilbestロール(DES)曝露を行った。DESは1g体重あたり3 μ g、5日間投与した。曝露による組織学的な変化に

ついて解析を進めると同時に、エストロゲンの主要な標的機関である子宮と膣からRNAを調製し遺伝子発現プロファイルの解析を進めた。新生仔期の曝露により恒久的に発現が変化する遺伝子の探索を行った。またDES投与後、通常1-6時間で子宮及び膣を摘出しRNAを調製し、その遺伝子発現状態を解析した。対照群にはごま油を用いた。生後70日のマウスの解析にあたっては、その2週間前に卵巣摘出を行った。

調製したRNAを精製した後、cDNA合成、ラベル化cRNAプローブの合成を行い、合成した15 μ gのcRNAプローブを用いて、DNAマイクロアレイ(Mouse U74Av2またはMOE430A; Affymetrix社)にハイブリダイゼーションを行い、規定の方法に従い約1万-2万遺伝子の発現について解析を行った。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験においては、自然科学

研究機構動物実験委員会の「自然科学研究機構における動物実験に関する指針」に準拠した。(使用する動物の屠殺にあたっては、頸椎脱臼法を用いた。)

C. 研究結果

様々な生育段階にあるマウスにエストロゲンを投与し、雌性生殖器官における応答遺伝子について解析を行った。その結果、出生後、DES を 5 日間暴露した場合に新生仔期 (5 日) と成熟期 (70 日) で応答遺伝子が大きく異なることが明らかになった。

新生仔にエストロゲンを暴露したマウスにおいて、膺における遺伝子発現変化を解析したところ、解析した遺伝子のうちおよそ 600 遺伝子が対照に比べ発現上昇し、500 遺伝子の発現が抑制されており、遺伝子発現のプロファイルが大きく変化していることが明らかになった。興味深いことに、成熟後に大きく遺伝子発現が変化している遺伝子 (倍率変化 5 倍以上) は、およそ 75 遺伝子見出されたが、これらのうち 4 割近くに相当する 228 遺伝子については、新生仔期の暴露直後 5 日でも発現の誘導が見られることがわかった。これら、新生仔期から成熟期にいたるまで恒久的に発現が変化している遺伝子は、新生仔期のエストロゲン暴露の応答において重要な働きをしている可能性も考えられ現在解析を進めている。

D. 考察

エストロゲン受容体は胎仔期から発現していることが知られているが、実際にエス

トロゲンを産生するのは思春期以降である。思春期以前のエストロゲン受容体が機能しているのかについては、いまだ明確になっていない。しかし本研究の結果、新生仔期にエストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていることが示された。すなわち、新生仔期の雌性生殖器官はその時点でエストロゲンに適切に応答するシステムが出来上がっていないともいえる。臨界期が終了する生後 5 日では、エストロゲンにより誘導される遺伝子数はさらに遺伝子の種類も異なっていた。したがって臨界期 (出生 5 日以内) においてのみエストロゲンに応答する遺伝子を明らかにすることは、臨界期について分子レベルで明らかにする上でも重要であると考えられ、これにより、最終的に引き起こされる不可逆的な影響の発現メカニズムを解明できると思われる。

マウスの新生仔期によるエストロゲン影響は既に多くの報告があるが、不可逆的な影響を受けるのは、出生後一定の期間に限定される。こうした感受性の高い期間は臨界期とよばれ、膺上皮のエストロゲン非依存的な増殖は、出生後 5 日以内にエストロゲン曝露があると誘発される。本研究により、いくつかの遺伝子についてエストロゲン曝露により初期に引き起こされる遺伝子発現変化が、成熟時まで恒久的継続していることが示唆された。

E. 結論

マウス雌性生殖器官のエストロゲン応答遺伝子は個体の発育につれ大きく変化することが明らかになった。すなわち、エストロゲンが不可逆的な影響を及ぼしうる出生直後の臨界期では、発現が変動する遺伝子は限られており、成獣で応答する遺伝子群とも異なっていた。これら新生仔期特異的にエストロゲンに応答する遺伝子は、エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発に関与している可能性が高く、現在その遺伝子機能の解析を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Grun, F., H. Watanabe, Z. Zamanian, L. Maeda, K. Arima, R. Chubacha, D.M. Gardiner, J.Kanno, T. Iguchi and B. Blumberg: Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol. Endocrinol.*, (in press).
2. Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates. *Environ. Health Perspect.*, (in press).
3. Watanabe, H. and T. Iguchi: Using ecotoxicogenomics to evaluate the impact of chemicalson aquatic organisms. *Marine Biol.*, (in press).
4. Oda, S., N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*, (in press).
5. Kato, H., T. Furuhashi, M. Tanaka, Y. Katsu, H. Watanabe, Y. Ohta and T. Iguchi: Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod. Toxicol.*, (in press).
6. Watanabe H, Takahashi E, Kobayashi M, Goto M, Krust A, Chambon P, Iguchi T. (2006) The estrogen-responsive adrenomedullin and receptor-modifying protein 3 gene identified by DNA microarray analysis are directly regulated by estrogen receptor. *J Mol Endocrinol.*, 36:81-89.
7. Oda, S., N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Production of male neonates in 4 cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. *Chemosphere*, 60: 74-78, 2005.
8. 渡邊 肇・井口泰泉: トキシコゲノミクスのニューパラダイム. *医学のあゆみ*, 213: 237-241, 2005.
9. Sone, K., M. Hinago, M. Itamoto, Y. Katsu, H. Watanabe, H. Urushitani, O. Tooi, L.J. Guillette, Jr. and T. Iguchi: Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 143: 151-160, 2005.
10. Watanabe, H., N. Tatarazako, S. Oda, H. Nishide, I. Uchiyama, M. Morita and T. Iguchi: Analysis of expressed sequence tags of the waterbfrea *Daphnia magna*. *Genome*, 48: 606-609, 2005.

11. Oda, S., N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere*, 61: 1168-1174, 2005.
12. Oda S, Tatarazako N, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. (2005) *Chemosphere*, 60:74-78.
13. Watanabe H., Suzuki A., Goto M., Ohsako S., Tohyama C., Handa H. and Iguchi T. (2004) Comparative uterine gene expression analysis after dioxin and estradiol administration. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33:763-71
14. Sone K., Hinago M., Kitayama A., Morokuma J., Ueno N., Watanabe H. and Iguchi T. (2004) Effects of 17 β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *General and Comparative Endocrinology* 138: 228-36.
15. Okada A., Ohta Y., Brody S.L., Watanabe H., Krust A., Chambon P. and Iguchi T. (2004) Role of foxj1 and estrogen receptor alpha in ciliated epithelial cell differentiation of the neonatal oviduct. *Journal of Molecular Endocrinology*, 32: 615-25.
16. Miyagawa S., Suzuki A., Katsu Y., Kobayashi M., Goto M., Handa H., Watanabe H. and Iguchi T. Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Journal of Molecular Endocrinology* 32:663-677
17. Watanabe H., Suzuki A., Kobayashi M., Lubahn D., Handa H. and Iguchi T. (2004) Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *Journal of Molecular Endocrinology* 33: 243-252
18. Kato H., Iwata T., Katsu Y., Watanabe H., Ohta Y., Iguchi T. (2004) Evaluation of Estrogenic Activity in Diets for Experimental Animals Using in Vitro Assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52:1410-1414.
19. Endoh M., Zhu W., Hasegawa J., Watanabe H., Kim D.-k., Aida M., Inukai N., Narita T., Yamada T., Furuya A., Sato H., Yamaguchi Y., Mandal S.S., Reinberg D., Wada T. and Handa H. (2003) Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *Molecular and Cellular Biology* 24:3324-3336.
20. Inui M., Adachi T., Takenaka S., Inui H., Nakazawa M., Ueda M., Watanabe H., Mori C., Iguchi T. and Miyatake K. (2003) Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Olyzias latipes*). *Toxicology*, 194:43-50.
21. Han S.-i., Kawano M., Ishizu K.-i., Watanabe H., Hasegawa M., Kaneshashi S.-n., Kim Y.-s., Nakanishi A., Kataoka K. and Handa H. (2004) Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 interacts with 14-3-3 proteins depending on phosphorylation at serine 535. *Virology*, 320: 144-155
22. Miyagawa, S., Katsu, Y., Watanabe, H. and Iguchi T. (2003) Estrogen-Independent

- Activation of ErbBs Signaling and Estrogen Receptor in the Mouse Vagina Exposed Neonatally to Diethylstilbestrol. *Oncogene*, 23: 340-349
23. Watanabe H., Suzuki A., Kobayashi M., Lubahn D., Handa H. and Iguchi T. (2003) Similarity and differences in uterine gene expression patterns caused by treatment with physiological and non-physiological estrogens. *Journal of Molecular Endocrinology*, 31: 487-497
24. Tatarazako N., Oda S., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T. (2003) Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere*, 53: 827-833
25. Watanabe H., Suzuki A., Kobayashi M., Lubahn D., Handa H. and Iguchi T. (2003) Analysis of temporal changes in the expression of estrogen regulated genes in the uterus. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30:347-358.
26. Kanesashi S.-n., Ishizu K.-i., Kawano M.-a., Han S.-i., Tomita S., Watanabe H., Kataoka K. and Handa H. (2003) Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. *Journal of General Virology*, 84:1899-1905.
- USA.
2. Watanabe, H.: Ecotoxicogenomics. Annual Meeting and International Conference on Toxicogenomics-2005. Promising Next Generation Technology of Toxicogenomics in Drug and Food Safety, and Environmental Health. Oct. 30-Nov. 1, 2005, KIST, Korea.
3. Watanabe, H.: Toxicogenomics approach on endocrine disruptor issue. Toxicogenomics. Nov. 2-5, 2005, Hotel Tirol, Muju, Korea.
4. Watanabe, H. and Iguchi, T.: Tissue dependent effects of estrogenic chemicals estimated by gene expression profile. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
5. Iguchi, T. and Watanabe, H. Focused array for evaluation of estrogenic effect of chemicals on mice. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
6. Watanabe, H.: Evaluation of chemical contaminants by gene expression profiling of *Daphnia magna*. SETAC, May, 2005,
7. Watanabe, H. Evaluation of estrogenic chemicals by gene expression profile. The endocrine society's 87th annual meeting (ENDO2005), Jun. 4-7, 2005, San Diego Endocrine Society

2. 学会発表

1. Oda, S. N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita, and T. Iguchi Genetic differences in production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. The SETAC North America 26th Annual Meeting Nov. 13-17, 2005. Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland,
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究-ガルシニアを例題に-

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部長

研究要旨

化学物質の毒性評価を進める過程で、成熟個体(成人)と未成熟個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。本研究ではそのような化学物質の具体例として、我々が実際に毒性評価を進め成熟個体に対し精巣毒性を有することを見出したヒドロキシクエン酸(Hydroxycitric acid: HCA)をモデルとして、離乳直後個体の精巣に対する影響を検討し、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界を明らかにする。

今年度は、離乳直後個体へのHCA暴露影響(3週齢暴露)を網羅的遺伝子発現解析により検討した。暴露期間は4週間とした。これと、5週齢、12週齢からの暴露結果とを比較検討し、成熟個体への影響との比較実験とした。その結果、3週齢暴露の方で精巣重量減少がより大きい傾向が得られ、組織学的にも未成熟個体がHCAに対し高い感受性を有することが確認された。網羅的遺伝子発現解析の結果、HCAの標的分子であるATP citrate lyaseの発現上昇に加え、脂肪酸合成系遺伝子群の発現上昇、分解系遺伝子群の発現低下、補体系分子(C1, C2, C3)、GST(GSTM1, 2, 6, 7, GSTA3, GSTA4)、エストロゲン合成系酵素(HSD17b12)の発現上昇が認められた。未成熟個体が高い感受性を示す背景に、脂肪酸代謝を始めとする複数の遺伝子群が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

化学物質の毒性評価を進める過程で、成熟個体(成人)と未成熟個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。本研究ではそのような化学物質の具体例として、我々が実際に毒性評価を進め成熟個体に対し精巣毒性を有することを見出したHCAをモデルとして取り上げ、離乳直後個体の精巣に対する影響を検討し、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界を明らかにする。

B. 研究方法

HCA 暴露

C57BL/6CrSlc 雄を日本エスエルシーから4週齢(5週齢暴露群)及び11週齢(12週齢暴露群)で購入。3週齢暴露群については、妊娠14日母親を購入し分娩させ、3週時に雄20匹を選抜した。各群1週間の馴化期間を設け、1群10匹ずつ28日間混餌(飼料CRF-1、投与量3.31%)暴露した。コントロール群とHCA群を合わせて6群となった。

解剖、臓器採取

エーテル麻酔下で、腋下動脈放血により屠殺し剖検を実施する。精巣(左右別)、精巣上体(左右別、固定後)及び肝臓について臓器重量を測定し、左精巣を RNA 用(RNAlater 保存)、右精巣を病理組織用(ブアン液固定)、精巣上体は病理組織用にリン酸緩衝 10%ホルマリン溶液固定し、肝臓は RNA 用(RNAlater 保存)、Protein 用、病理組織用(リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液固定)を採取した。

Total RNA の分離精製

各群 3 匹を RNA 解析に用いることとした。精巣病理切片像を検討し、ヒドロキシクエン酸の影響が認められる 3 匹を選別した。組織は採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)に 4°C 一晩浸漬し、RNase を不活化した。精巣は左精巣全体を、肝臓は 5mm 径の生検トレパンにより 3ヶ所を各々別チューブに採取した。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNAlater を除いた後、RNeasy キット(キアゲン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、あらかじめ臓器毎に設定した割合で Spike cocktail(Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

精巣、肝臓の全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーター

が付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ(ENZO 社キット)を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0(マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、国立医薬品食品衛生研究所が定める動物実験に関する指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験に関する指針(平成 9 年 7 月版))

C. 研究結果

HCA 投与による臓器重量変化

離乳直後個体への暴露影響(3週齢暴露)を網羅的遺伝子発現解析により検討した。暴露方法は混餌とし、用量は 3.31%とした。1群当たりの匹数は 10 匹とした。暴露期間は 4週間とし、5週齢、12 週齢からの暴露(5 週齢暴露、12 週齢暴露)についても検討し、成熟個体への影響と比較した。

その結果、3週齢暴露で精巣重量減少がより大きく(Fig.1)、組織学的にも未成熟個体がヒドロキシクエン酸に対し高い感受性を有するこ

とが確認された。

HCA 投与による遺伝子発現変化

上記の条件で精巣、肝臓について網羅的遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現解析に供する固体として、精巣の病理組織像を確認し、ヒドロキシクエン酸の影響が認められる3匹を選別した。

まず、コントロール群に対し、HCA 投与群を plot した scatter plot を検討したところ、精巣において3週齢暴露群で発現が変化した遺伝子が多いことが明らかとなった。肝臓ではそのような傾向は認められず、むしろ発現変化が少なかった (Fig.2)。

次に、個々の遺伝子の発現変化を解析した。横軸に実験群を、3週齢暴露群、5週齢暴露群、12週齢暴露群、予備検討5週齢 28 日間暴露中影響群、予備検討5週齢 28 日間暴露高影響群、予備検討5週齢 90 日間暴露 CAC 群、予備検討5週齢 90 日暴露 HCA 群の順で7群を置き、縦軸に Percellome 変換した発現コピー数をプロットしたグラフを描いた。予備検討の結果から注目されたのは、脂肪酸合成・分解系遺伝子群、補体系遺伝子群、GST 遺伝子群、エストロジェン合成系遺伝子の発現変動である。これら変動が認められた遺伝子は3週齢暴露群と予備検討5週齢 28 日間暴露高影響群で同様の変動を示す傾向にあった。以下、個々について記す。

脂肪酸合成・分解系遺伝子群

HCA の標的分子は Acly(ATP Citrate Lyase)である。Acly は糖質を脂肪酸に変換する過程でクエン酸をアセチル CoA に変化させる反応を担う (Fig.3)。HCA 暴露により、3週齢暴露群で Acly 自身の遺伝子発現が精巣にお

いて上昇していた (Fig.4)。一方、肝臓では発現上昇は認められなかった。他の脂肪酸合成系遺伝子については、AMPK beta1, Datty Acid Synthase, Thiolase, 3-Hydroxyaxyl-CoA Dehydrogenase, Enoyl-CoA Hydratase, Acyl-CoA Desaturase1, 2 の発現が上昇しており、Acly 以降の経路を担うほとんどの遺伝子で発現上昇を認めた。

分解系遺伝子群については、Glycerol-3-PO4 Dehydrogenase, Triosephosphate isomerase, Fatty Acid CoA Ligase2, 5, Carnitine Acetyltransferase, Carnitine Palmitoyltransferase I, II の発現が減少しており、脂肪酸分解が抑えられていることが示唆された (Fig. 5)。

補体系遺伝子群

発現変動を示した遺伝子群で、補体系の遺伝子発現が変動していた。発現が上昇した遺伝子として、C1r, C1s, C1qa, C1qb, C1qc, C2, C3 が、発現が減少した遺伝子として Daf1, Daf2 が同定された (Fig.6)。

GST 遺伝子群

GST について、Gstm1, Gstm2, Gstm6, Gstm7, Gsta3, Gstm4 の発現上昇が認められた。

エストロジェン合成系遺伝子

エストロジェン合成系の中で、Estron と Estradiol の間の変換を担う Hydroxysteroid (17-beta)dehydrogenase12 (HSD17b12)の発現上昇が認められた。

D. 考察

ヒドロキシクエン酸暴露に伴い、精巣の遺伝

子発現が脂肪酸合成を促進する方向に変化していることが明らかとなった。また、その傾向は3週齢暴露群でより顕著であった。これは、未成熟個体が成熟個体に比べ、新規合成に依存した脂肪酸代謝を行っている可能性を示しているおり、今後の検討が必要である。

E. 結論

成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究を進めるための題材として選んだヒドロキシエン酸が、未成熟個体精巣に対し、より強い作用を示すことが、精巣重量変化の観点及び、遺伝子発現変化の観点から実際に証明された。今後は、発達段階の精巣が脂肪酸新規合成により強く依存する背景、すなわち、子ども期の特性について検討を進め、成人・子ども間リスク評価結果の外挿に役立てたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Differential contribution of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development*, 132, 787-796, 2005

2. 学会発表

◎菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、第15回環境ホルモン学会講演会、2005年6月2日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Per cell" mRNA

normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference "Toxicogenomics", Jun 5-10, 2005, NH, USA

◎菅野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害の Percellome トキシコゲノミクス研究、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

◎五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、相賀裕美子、菅野 純、Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the "Percellome" system as a model for molecular developmental toxicity、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋聡、斉藤実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract : Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、児玉幸夫、菅野純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1~3日、東京

菅野純、WHO Children's Program の概説と本邦での現状と取り組みについて、第17回神経行動毒性研究会、2005年8月5日、東京

◎Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide

Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives”, August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, “Percellome” mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、菅野純、Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 64 回日本癌学会学術総会、2005 年 9 月 14-16 日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、飼料中の植物エストロジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおける視床下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現の Percellome 解析、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

◎Jun Kanno, Approaches by Basic Biology to Reinforce the Screening and Testing Strategy for the Endocrine Disruptors, KFDA/NITR International Symposium, Oct 11-12, 2005, Korea

菅野純、ナノマテリアルの安全性確認に関する課題、三菱安全化学研究所講演会、

2005 年 12 月 1 日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data, The 16th International Conference on Genome Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野純、Diethylnitrosamine 及び N-ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、菅野純、マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイクロアレイ解析、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

北嶋聡、Glenn I. Fishman、富田幸子、井上達、菅野純、相賀裕美子、転写因子 Mesp1 非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に寄与する、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

安彦 行人、原口 清輝、高橋 雄、菅野純、相賀 裕美子、Notch シグナルは Tbx6 依存的に Mesp2 発現を活性化する、第 28 回日本分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

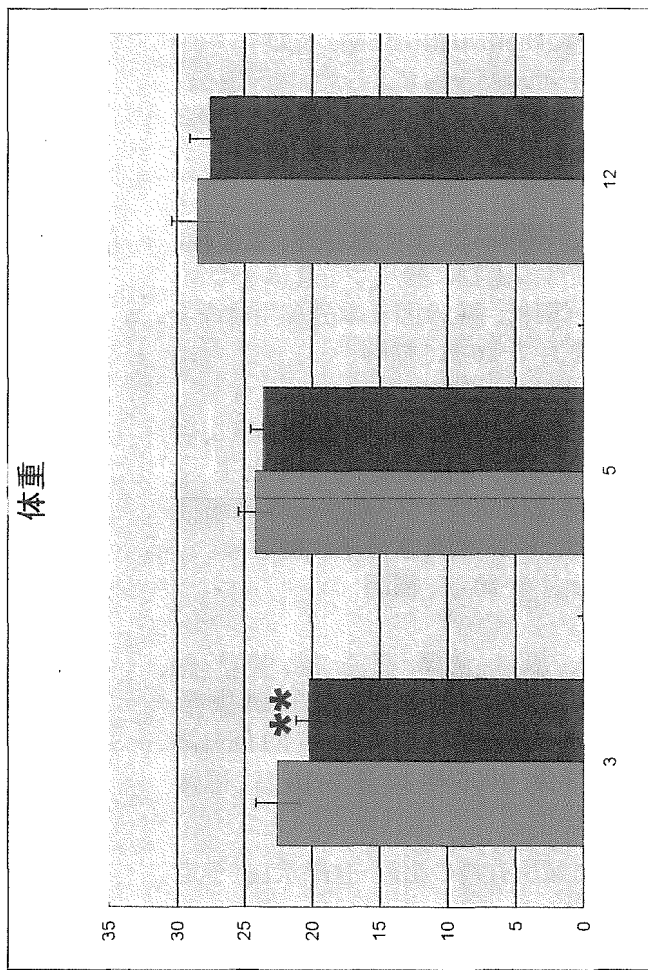
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



Control
HCA

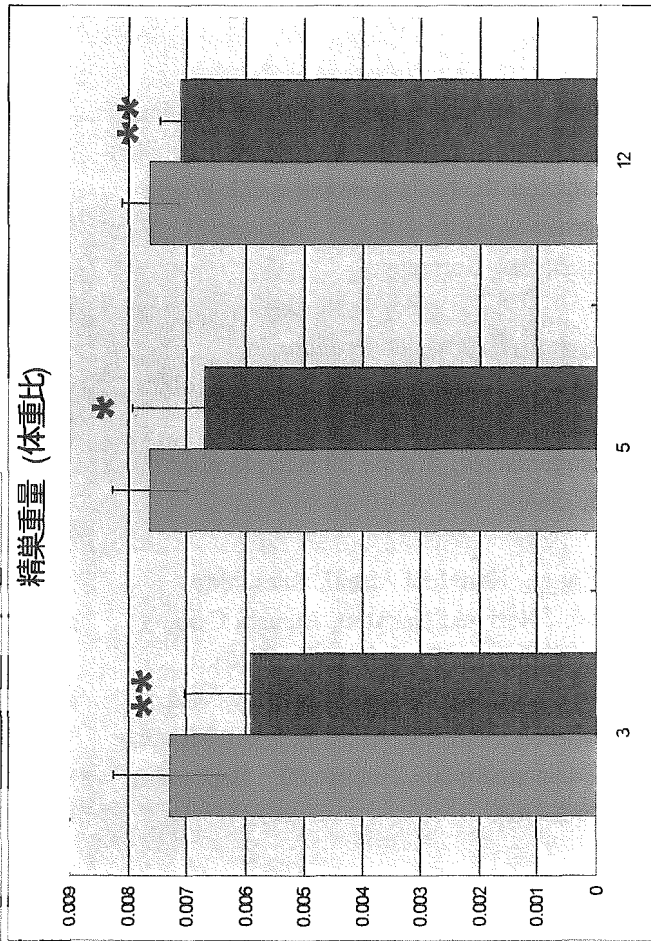
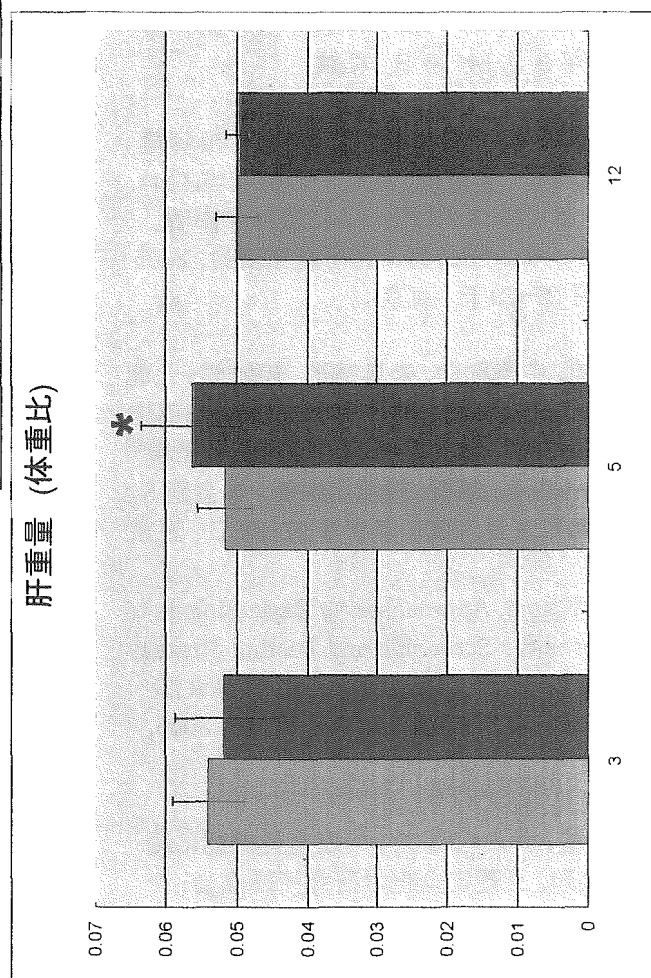
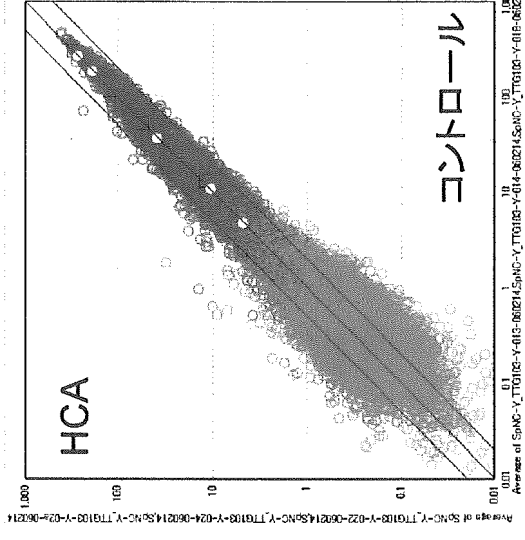
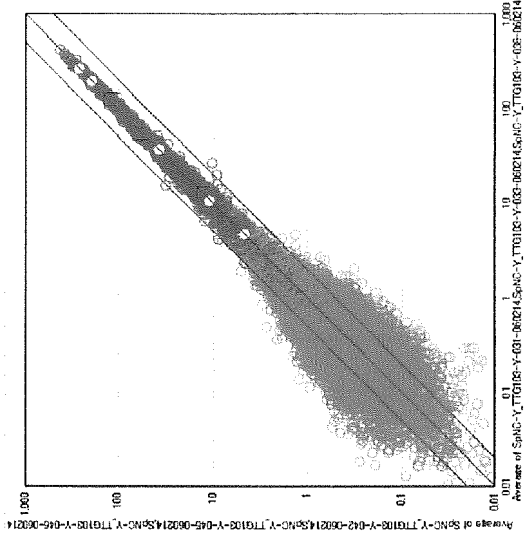
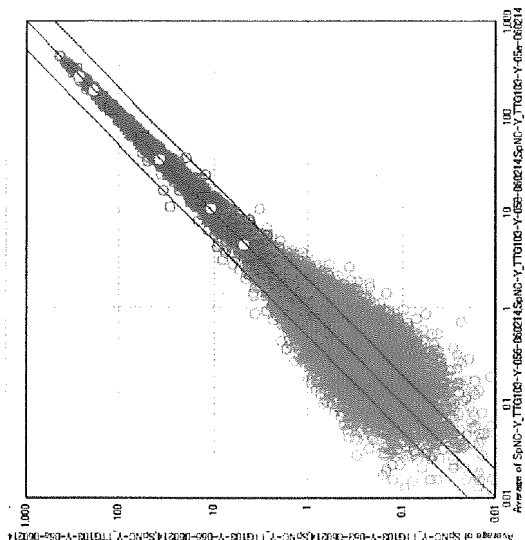


Fig.1 HCA暴露による臓器重量変化

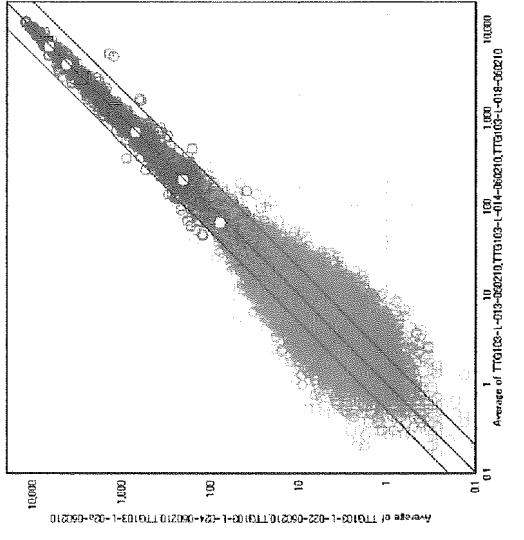
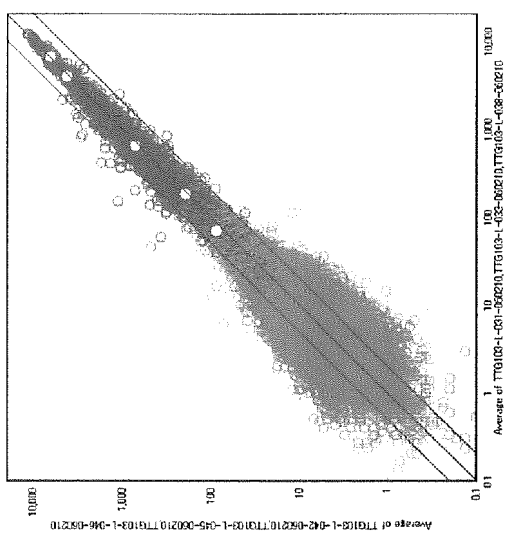
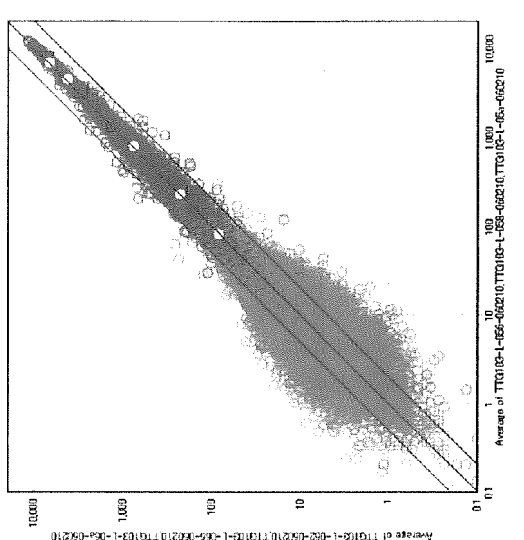
12週齢

5週齢

3週齢



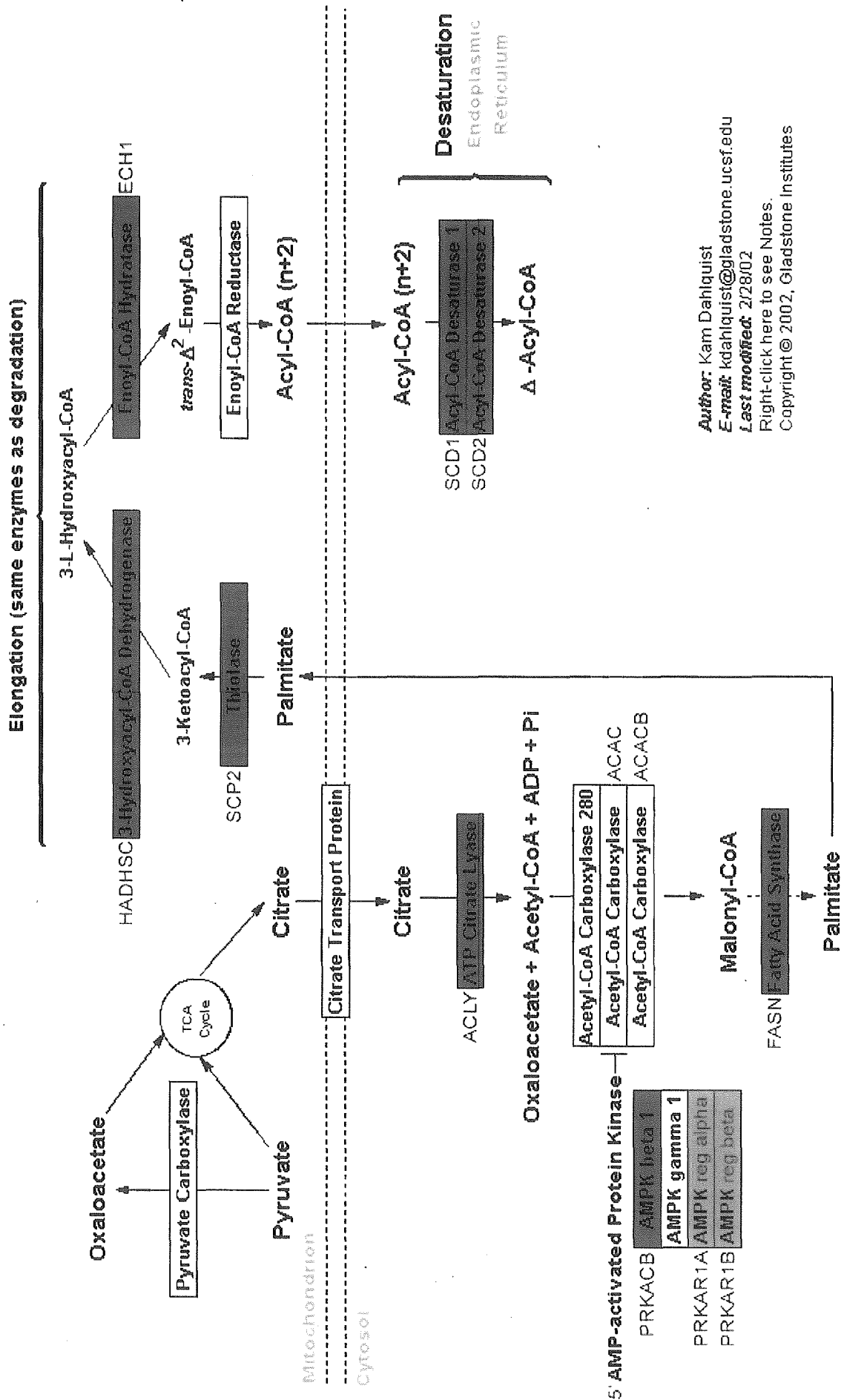
精巣



肝臓

Fig.2 HCA暴露による遺伝子発現変化

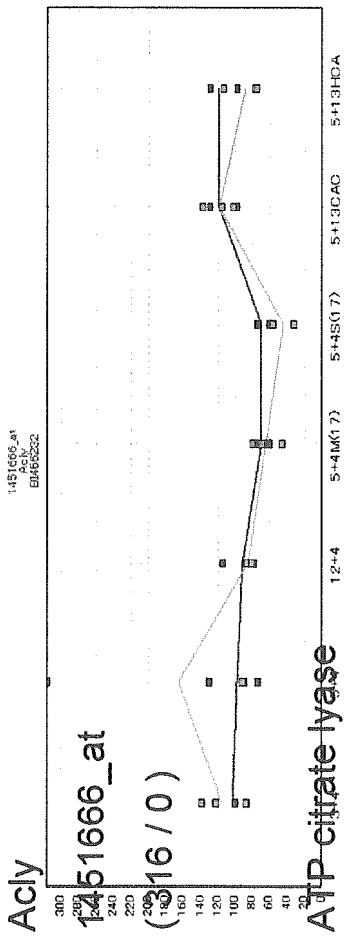
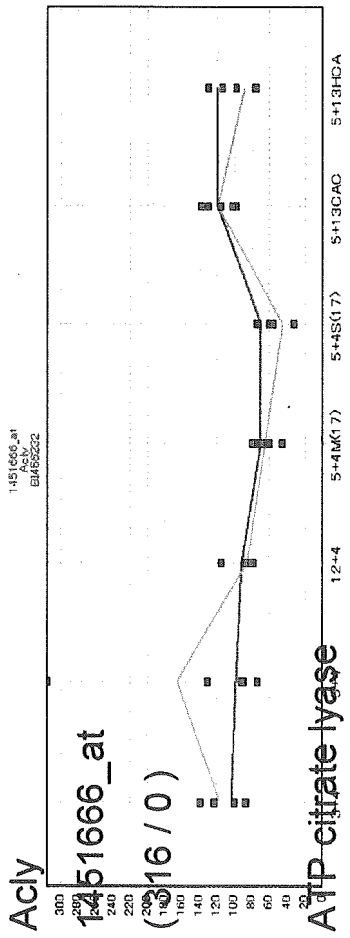
Fatty Acid Synthesis (TTG17 Testis, $p < 0.05$ (v+m / s))



Author: Kam Dahlquist
 E-mail: kdahlquist@gladstone.ucsf.edu
 Last modified: 2/28/02
 Right-click here to see Notes.
 Copyright © 2002, Gladstone Institutes

■ 発現上昇
 □ 発現減少

Fig.3 HCA暴露により変化した脂肪酸合成系遺伝子



Liver

Testis

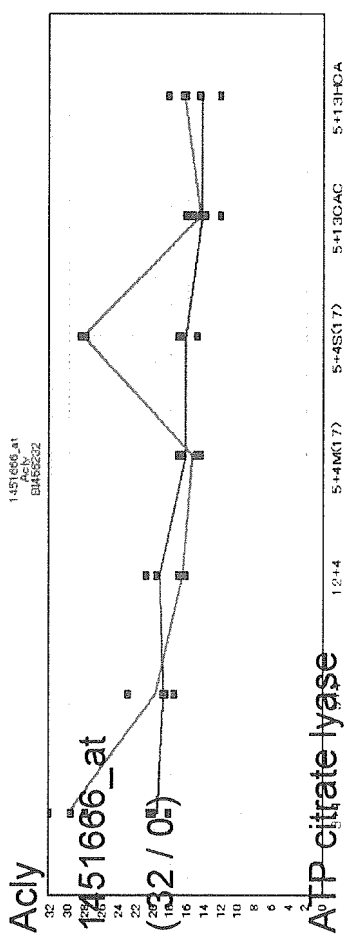
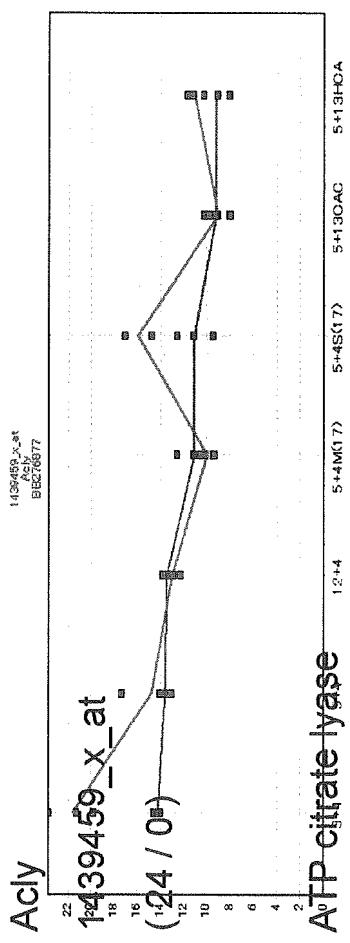
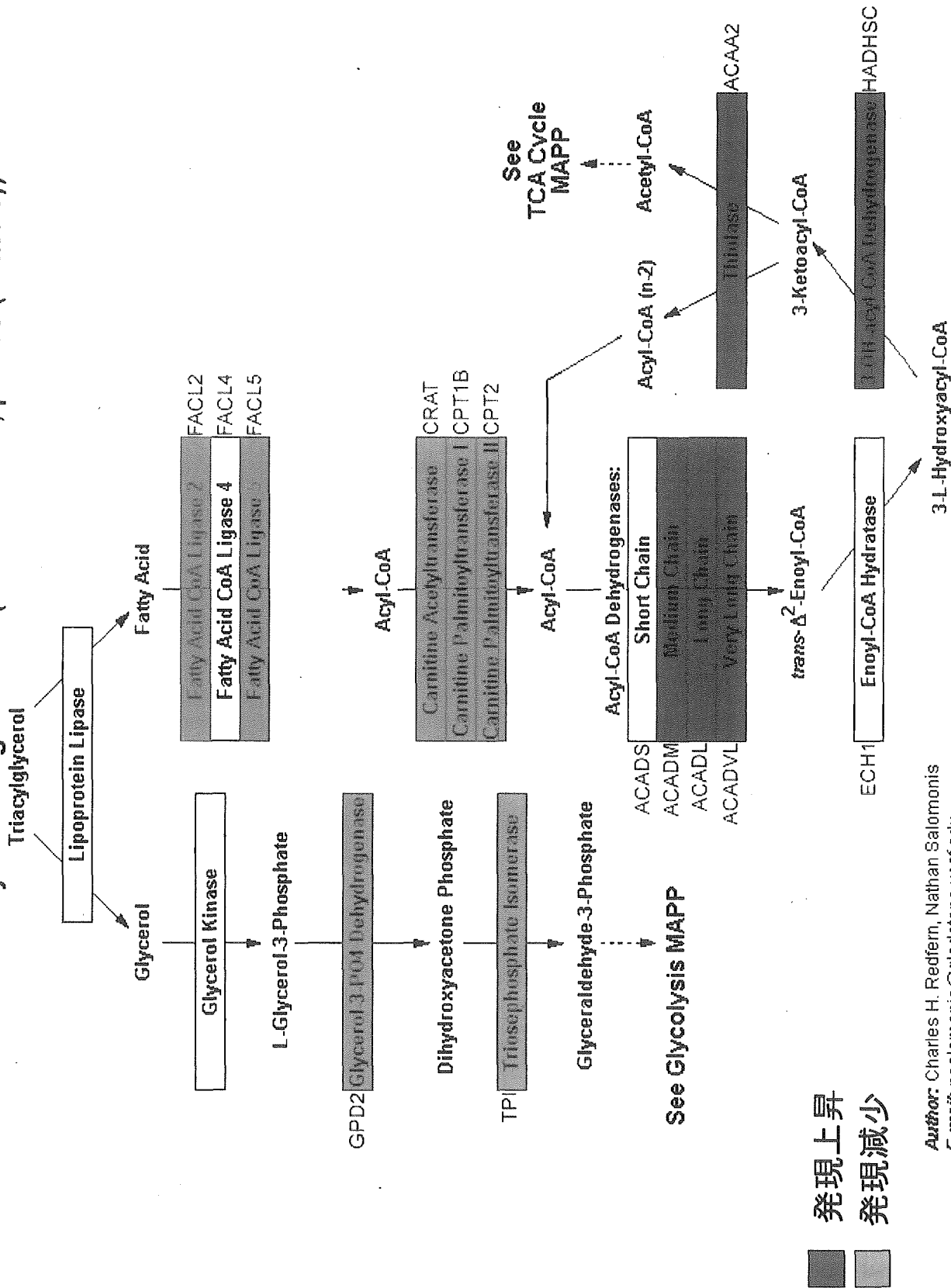


Fig.4 HCA暴露に伴うAcly遺伝子発現変化

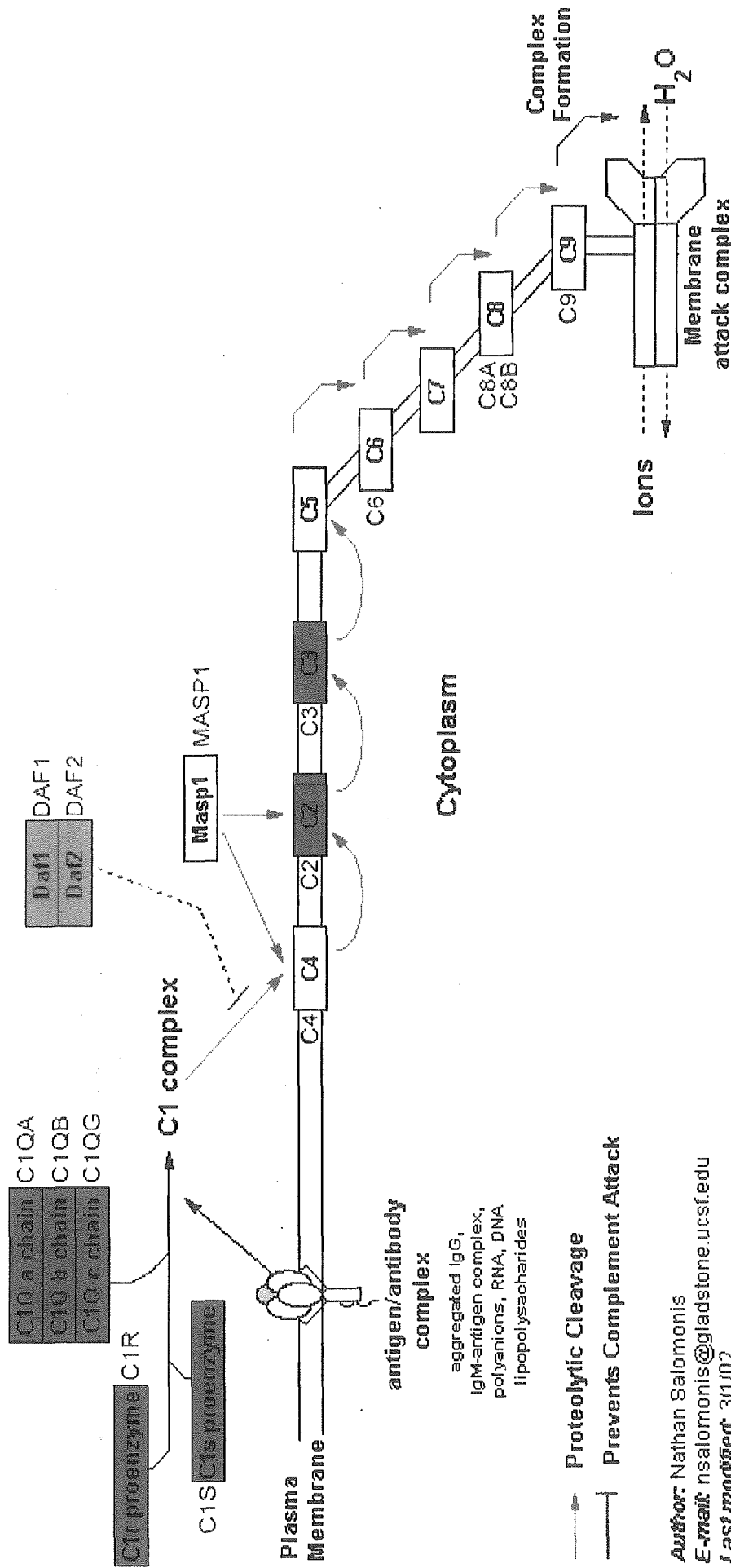
Fatty Acid Degradation (TTG17 Testis, p<0.05 (v+m / s))



Author: Charles H. Redfern, Nathan Salomonis
 E-mail: nsalomonis@gladstone.ucsf.edu
 Last modified: 2/12/02
 Copyright © 2000, Gladstone Institutes

Fig.5 HCA暴露により変化した脂肪酸分解系遺伝子

Complement Activation, Classical Pathway (TTG17 Testis, p<0.05 (v+m / s))



Author: Nathan Salomonis
 E-mail: nsalomonis@gladstone.ucsf.edu
 Last modified: 3/1/02
 Adapted from <http://www.biocarta.com>

Fig.6 HCA暴露により変化した補体系遺伝子

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

小児白血病・小児腫瘍の発生における母体を介した化学物質・発ガン物質・薬物等による
影響及び、ES細胞を用いた化学物質影響解析

分担研究者 田上 昭人 国立成育医療センター研究所 薬剤治療研究部 部長

研究要旨

マウス胚性幹細胞(ES細胞)を用いた Embryonic Stem Cell Test (EST)法にて、薬物の毒性評価を行った。抗ガン剤の 5FU, AraC は強毒性と評価された。抗けいれん剤のバルプロ酸、カルバマゼピンは弱毒性と判定され、これらの評価は動物を用いた評価と一致した。これに対して動物を用いた毒性評価では、安全と考えられている抗うつ剤のパロキセチンについては、EST法では、強毒性との評価が得られた。

A. 研究目的

これまで化学物質・薬物の毒性評価試験には、種々の細胞や動物が用いられてきた。近年、薬物毒性試験(特に embryotoxicity に関して)としてこれまで行われてきた評価系にかわって、胚性幹細胞(ES細胞)が用いられるようになりその有用性が報告されている。Spielmannらにより開発された Embryonic Stem Cell Test (EST法)は、マウスES細胞の分化障害を指標とした *in vitro* 毒性試験方法で、すでにヨーロッパ各国の研究機関 (EU Center for Validation of Alternative Methods; ECVAM)にてバリデーションテストが終了し、その有用性が証明されている。マウスES細胞を用いたEST法は、従来の動物実験を用いる方法と比較して、短時間で原因物質の特定やその解析を行うことが可能であり、さらに動物実験代替法の観点からも Russel and Burch

による 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement)の提唱に沿ったものであると考えられる。しかしながら、マウスES細胞を用いたEST法は、ヒトの発生毒性データとの高い相関性や再現性について認められているものの、種差の問題は残されており、ヒトに適応できない場合もある。その種差の問題を克服するために、手術などで得られるヒト献体組織(主に肝臓、腎臓)を用いた薬物評価も試みられているが、充分量の献体を得ることは非常に困難である。マウス由来ES細胞に替わってヒト由来ES細胞を用いたEST法も今後期待されているが、細胞の入手の問題、倫理的問題など、一般的に普及させるためには課題が多く残されている。

以上に述べた薬物毒性評価方法の問題点を解決する方法の一つとして、ヒト由来組織幹細胞の利用が注目されている。これまでに、

血球系幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞など種々の組織に由来する幹細胞が同定されており、その中でも胎盤及び胎盤に付随する組織(臍帯、羊膜)は胎児由来ゆえ、血球形、間葉系、神経系いずれにも胚葉を超えて分化する「多能性幹細胞」が含まれているという報告がなされている。

本研究では、マウスES細胞を用いたEST法に加えて、ヒト組織細胞を用いた毒性試験方法の開発を目指す。さらに、従来のEST法で用いられている評価の指標(細胞生存率、心筋細胞分化障害を指標とする形態学的評価)に加えて、幹細胞の分化増殖に及ぼす化学物質・薬物の影響を分子生物学的手法(細胞表面マーカー、DNAチップ解析による網羅的遺伝子発現プロファイル等)を用いて解析を行う。17年度はマウスES細胞を用いたEST法を確立し、薬物の評価を行った。

B. 研究方法

マウスES細胞を用いたEST法による化学物質・薬物の毒性評価を以下に示す。

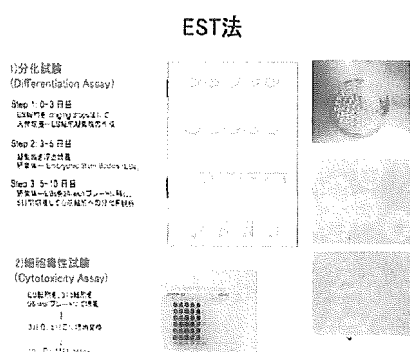


図 EST法の方法

EST法は、ES細胞が特別な誘導を行うことなく自然に心筋細胞に分化するという特性を利用した評価方法である。ES細胞を培養する際、薬物を加えることにより、心筋細胞への分化障害を指標としている。薬物によるES細胞分化抑制効果は、マウスES細胞株を用いて行う。解析を行う化学物質・薬物を添加した試験液にES細胞を調整し、ディッシュの蓋の内面に700細胞/20 μ lの懸濁滴を。蓋を裏返してディッシュに被せ、湿潤状態で37 $^{\circ}$ Cで3日間懸滴培養する。その後、液滴内に形成された胚様体-embryoid bodies (EBs)をさらに浮遊培養してEBsをさらに成熟させる。2日後、24穴マルチプレートにEBsを各ウエルに1個ずつ移し、各試験液で静置培養する。5日間経過後に倒立位相差顕微鏡にて各ウエル毎の心筋細胞の鼓動の有無を調べる。ES細胞の分化度は、細胞の鼓動を認めるウエル数の割合をすべてのウエル数の百分率から算出し、各濃度段階のウエル数の百分率からID₅₀を求めている。さらに、ES細胞と3T3細胞の薬物による細胞毒性数値EC₅₀求め、ID₅₀とともにモデル計算式に挿入して、薬物の毒性の指標としている。さらに、新たな指標として分子生物学的手法を用いた分子レベルでの評価方法を開発し、より感受性・特異性の高い試験方法の開発を行う。

(倫理面への配慮)

直接ヒト検体の解析を行う場合には研究機関での倫理委員会に申請を行い承認が得られ

た後研究を行う。動物実験に関しては動物愛護法を遵守し、研究施設の動物実験指針に従い、実験動物の使用、飼養及び保管の改善にも最大限努力する。

C. 研究成果

マウス胚性幹細胞 (ES細胞) を用いた Embryonic Stem Cell Test (EST) 法により、薬剤の毒性評価を行った結果、抗ガン剤の 5FU, AraC は従来の報告通り、強毒性と評価された。また新規に試験を行った抗けいれん剤のバルプロ酸、カルマバゼピン、フェニトイン、バルプロミドは全て弱毒性と判定された。更に抗うつ剤のパキシル (パロキセチン) は、強毒性と判定された (表)。

マウス胚性幹細胞を用いたEST法

	IC ₅₀ ES (μ g/ml)	IC ₅₀ 3T3 (μ g/ml)	ID ₅₀ (μ g/ml)	Class (Embryotoxicity)	Reference
抗がん剤					
5-FU	0.07	0.09	0.05	3: Strong	Class 3 Spermann et al. 1997
Cytosine arabinoferenoside	0.16	0.07	0.05	3: Strong	Class 3 Spermann et al. 1997
抗てんかん薬					
Valproic acid	81.58	540.81	132.15	2: Weak	-
Carbamazepine	51.74	39.70	29.24	2: Weak	-
Valpromide	409.51	308.22	252.64	2: Weak	-
Phenytoin	38.45	40.04	6.57	2: Weak	-
抗うつ剤					
Paroxetine (Paxil)	3.10	3.28	1.71	3: Strong	-

表 EST法を用いた薬物の毒性評価。

D. 考察

抗ガン剤の強毒性、抗てんかん薬のバルプロ酸、カルマバゼピン、フェニトインの弱毒性の結果は動物実験やヒトでの臨床データで以前から報告されている催奇形性などの毒性の結果とほぼ一致し、マウスES細胞のEST法

の有用性が改めて認められた。しかしながら、バルプロ酸の非催奇形性アナログであるバルプロミドや抗うつ剤-パキシルの評価は今までの動物実験や臨床データの低い毒性の結果に比較して明らかに毒性を強く検知してしまっている傾向にあり、in vitro の結果を in vivo へ外装することの難しさを示す結果となった。ただし、パキシルは副作用の少ない抗うつ剤の第一選択薬として使われてきたが、症例は少ないながらも妊娠初期の服用により産まれてきた新生児に心毒性が認められ、最近話題となっている薬であり、そのことなどを考慮すると、マウスの EST 法が非常に高い感受性を持った試験法であるとも考えられる。

E. 結論

マウス胚性幹細胞を用いたEST法は高い確率で動物実験やヒト臨床で得られた毒性結果と一致する、感受性、迅速性に優れた毒性試験法であることが認められた。しかしながら、一部動物実験やヒトの臨床結果と異なる判定もあり、更に検討が必要である。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表