

的に解析し構築したものである。具体的には、神経幹細胞を優先的に培養系に移し、維持するニューロスフェア法を適用し、胎生 11.5 日から 14.5 日まで連日胎児終脳から神経幹細胞をニューロスフェア初代培養系として取り出し、Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

In utero AzaC 暴露の胎児終脳に対する影響の Percellome 解析

化学物質による DNA メチル化変化に伴う遺伝子発現変動を解析するために、胎生 10.5 日の胎児に AzaC を経胎盤的(経母体)に投与した。胎児終脳サンプルの採取は、無処置群において DNA メチル化率が高く神経幹細胞がニューロンにしか分化しない胎生 11.5 日、及び、脱メチル化が進み、神経幹細胞がニューロンのみならずグリア細胞への分化能を獲得する胎生 14.5 日に行い、その Percellome 解析を実施した。AzaC の投与量は、投与に伴う apoptosis 誘導が起こらない最大量 (0.3mg/kg/day) を事前に設定し、その量をはさんだ前後を含む 3 段階 (0.1, 0.3, 1mg/kg/day) を用いた。

網羅的発現データ解析

解析は主に当部で開発した MF software を用いて行った。特に、2 群間の発現差を検討する MF Scatter、及び、遺伝子発現データを時間、投与量、発現コピー数の 3 次元グラフに可視化し、その 3D パターンから類似性等を計算する MF Surface システムを活用した。遺伝子プロモーター解析は

Genomatix Suite(CTC ラボラトリーシステムズ)を用いた。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

KA 実験:

動物は、5 週齢の雄性 F344 ラット(日本 SLC)を用い、無処置群、DHPN 単独投与群については一群 20 匹ずつ、SDM 単独投与群と二段階発がんモデルの低・中用量群については一群 8 匹ずつ、最高用量群については 33 匹、計 6 群に群分けした。一週間馴化した後、DHPN 単独投与群と二段階発がんモデル群には DHPN を 2800 mg/kg、無処置群と KA 単独投与群には生理食塩水を相当量、単回皮下注射した。DHPN 投与一週後、KA 単独投与群と二段階発がんモデル群には KA を各々 2.0% (KA 単独投与群)、0.125, 0.5, 2.0% (DHPN+KA 群)の用量で基礎飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母)に混じて投与した。実験期間中、動物の体重は週一回、飼料摂取量の測定は週 1 回実施した。KA 投与 4 週後に最高用量群の一部を除く全動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、甲状腺のマイクロアレイ解析を行った(昨年度までに報告)。更に、DHPN+2.0% KA 群の残りの動物を KA 投与 10 週、15 週後に各々 10 匹、15 匹、ジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、両側の甲状腺を採取した。甲状腺は頭側、尾側に二分し、頭側をホルマリン固定、尾側を氷上で 2 時間、メタカーン液で固定した。ホルマリン固定材料はパラフィン包埋後、病理組織

学的検索に供した。また、メタカーン固定した組織は、固定後の脱水操作として、RNase free の 99% 冷エタノールに 4°C、1 時間ずつ、計 2 回浸漬し、3 回目の液交換後、4°C で一晩浸漬した。脱水後、RNase free のキシレンに室温で 1 時間浸漬し、その後、30 分毎に 3 回、キシレン交換して置換した。そして、60°C で 1 時間毎に新しいパラフィンに 3 回浸漬させ、パラフィン包埋ブロックを作製した。ブロックは、マイクロダイセクションに使用するまで 4°C で保管し、マイクロダイセクションを実施する前日に、各個体の 15 μ m 厚のメタカーン固定・パラフィン包埋切片を 1 個体につき 4~5 枚/スライド、4~5 枚の PEN フォイル付きスライドグラス (Leica) に用意し、37°C の孵卵器内で一晩乾燥させた。切片は、マイクロダイセクションの実施直前に LCM staining kit (Ambion) を用いてクレシルバイオレット液で染色し、風乾した。染色した切片から増殖性病変部位とその周囲組織を区別して採取するために、Laser Microdissection System (Leica) を用いて、顕微鏡下で各部位をレーザーで切り取り、回収した。増殖性病変は、限局性濾胞上皮過形成 (FFCH)、腺腫、腺がんとし、FFCH と腺腫は区別せずに採取した。即ち、KA によるプロモーション 10 週後の 10 個体から、「非腫瘍部」(周囲組織) と「FFCH+腺腫」をそれぞれ採取し、「腺がん」は投与 15 週後の 10 個体から採取した。全ての切片からマイクロダイセクションにより回収したサンプルは、total RNA 抽出まで -80°C で保存した。全ての個体から各部位を回収後、2 個体分をま

めて 1 サンプルとし、各組織部位について 5 サンプルとし、RNAqueous-Micro (Ambion) を用いて total RNA を抽出した。回収量の測定は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe) を用いて実施し、各サンプル 200 μ g の total RNA を用意し、MessageAmp™ II aRNA kit (Ambion) を用いて 2 回増幅した。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) にて発現データを取り込んで定量した。方法としては、GeneSpring (Silicon Genetics) を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、「非腫瘍部」と「FFCH+腺腫」または「腺がん」を比較して 5 倍以上、あるいは 1/5 倍以下に変動した遺伝子について検索、同定した。さらに、マイクロアレイでの遺伝子発現量を検証するために、MessageAmp™ II aRNA kit で 1 回増幅した aRNA 0.5 μ g を用いて逆転写反応をし、リアルタイム PCR 法を実施した。検索した遺伝子は、HPRT、GAPDH の他、10 遺伝子 (Foxq1, Cp, C3, Dio1, Gfra3 Cck, Ppib, Cxcl12, Cryab, Prlr; 結果参照) について、Gene Expression Assay (ABI) を用いて行い、それぞれについて「非腫瘍部」と「FFCH+腺腫」または「腺がん」間で比較した。また、選出された遺伝子のうち、抗体による遺伝子産物の局在・分布の免疫組織学的検討が可能な抗体 (Rabbit anti-FOXQ1 polyclonal antibody; Affinity BioReagents; Rabbit anti-GFR α 3 polyclonal antibody, Chemicon; Anti-mouse IL-6R antibody;

R&D Systems)を用いて免疫染色を実施した。その結果の評価は、各部位毎の最高 18 カ所の病変について陽性細胞の分布程度を点数化し(0: 陰性、1: <20%陽性、2: 20~50%, 3: 50~80%, 4: >80%)、1カ所あたりの平均点を算出し各部位での陽性細胞の分布程度を比較した。

統計学的解析は、遺伝子発現レベルを含む numerical data については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不当分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合、その多重比較は Dunnett の方法で各群の間で有意差検定を行った。病変の発生頻度は、Fisher の直接確率法により検定を行い、病変の強度については、同様の比較を Mann-Whitney's U-test により行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、国立医薬品食品衛生研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

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

胎児神経幹細胞の2種類の基盤データ

ベース(胎児終脳発生に伴う遺伝子発現変化網羅的データベース、発生時期の異なる神経幹細胞遺伝子発現網羅的データベース)の解析

MF Surface ソフトウェアを用い、2種類のデータベース内容を解析した(図1)。この発生時期における主要な生命現象である神経発生に伴う細胞移動及び、細胞分化エピジェネティック制御の2種類の機能カテゴリーに属する遺伝子群の発現パターンを吟味した(図2、3)。図2Aは神経発生制御の重要なシグナル系の一つ、Notch シグナル系に属する遺伝子の発現パターン変化である。終脳では発生と共に多くが発現低下傾向を示したが、Notch 活性化に伴い誘導される Hes は神経幹細胞において、遺伝子毎に異なるパターンを示した。

次に、神経細胞分化に関わる遺伝子の発現パターンを調べたところ、転写因子 NeuroD、Neurogenin の発現が終脳発生と共に大きく変化することが分かった。NeuroD1、NeuroD6 の発現は経時的に上昇し、Neurogenin2 の発現は胎生 13 日をピークに減少した。神経細胞移動を制御する Reelin の発現は、終脳発生の進展、すなわちニューロン移動時期に符合して発現が上昇していた。Reelin の受容体 Lrp8 の発現パターンも同様であった(図2B)。

アストロサイト分化に関わる遺伝子群の発現パターンは、図 2C に示したように、Stat、Smad ともに終脳では発生に伴い発現が低下し、神経幹細胞での発現が高い傾向にあった。この時期はアストロサイト分化は開始

していないため、終脳での Stat3 発現が非常に低いことと符合している。

神経幹細胞が胎生期にエピジェネティックな制御を受け、ニューロンに特化した分化能からグリア細胞にも分化しうる能力を獲得していくことが知られている。そこで、エピジェネティック制御に関わる遺伝子群の発現変化を調べた(図3)。まず図3Aに示したように、DNA メチレーション維持型の DNA methyltransferase

1 (Dnmt1)の発現は終脳発生に伴い減少傾向であった。DNA メチレーション新規型の Dnmt3 は a の発現はほとんど変化しないのに対し、b の発現は急速に減少した。神経幹細胞では Dnmt1、Dnmt3a の発現が高く保たれていた。機能未知の Dnmt2 の発現が神経幹細胞で高かった。メチル化 DNA 結合タンパク質については、終脳での発現レベルは高くなく、Mbd3 が減少傾向を示していた。神経幹細胞での発現は全般に高かった。次にヒストン制御に関わる遺伝子群として、図3B に示すようにヒストンファミリーの発現変化を調べたところ、終脳発生に伴い発現が変化するヒストン遺伝子として Hist3h2ba、H2afx が見出された。ヒストンを介した遺伝子発現制御に関し、ヒストンのアセチル化(ヒストンは、アセチル化されると発現可能な状態、脱アセチル化されると発現不可能な状態のヌクレオソーム構造を形成する)に関わる遺伝子群を調べた(図3C, D)ところ、ヒストンにアセチル基を付加する Histone acetyl-transferase のうち、HAT1 は終脳発生に伴い発現低下した。またこれらは終脳

よりも神経幹細胞での発現が高い傾向を示した。ヒストンからアセチル基を除去する Histone de-acetylase については、終脳では Hdac1, 3, 6 が発現低下傾向にあり、神経幹細胞ではどれも発現が高い傾向にあった。

In utero AzaC 暴露の胎児終脳に対する影響の Percellome 解析

AzaC *in utero* 投与が神経幹細胞の分化能に影響を及ぼすことは、投与後に培養に移した神経幹細胞が、本来であればアストロサイトへの分化能を持たない胎生 12.5 日においても分化能を獲得したことを GFAP 陽性細胞の割合上昇を指標として明示すること、で確認した。網羅的遺伝子発現解析の結果、胎生 14.5 日由来では発現変化はほとんど見られなかったインターフェロン応答遺伝子群が、胎生 11.5 日由来では、ISGF3g、Stat1を含み、発現上昇していることが明らかとなった(図4)。次に、それらの遺伝子群に共通に存在する転写制御機構について調べるため、*in silico* プロモーター解析を実施した。その結果、図5に示すように、これらには共通して interferon responsive element に加え、Stat 結合部位が存在していた。この結果から、AzaC が Stat 結合部位に結合する転写制御因子の発現を上昇させ、それが引き金となって他の遺伝子群の発現を上昇させる可能性が示唆された。実際、図4で示した遺伝子群の中に Stat1 が存在したので、Stat1 のプロモーター配列をさらに詳細に解析したところ、メチル化されるシトシンを多数含む CpG island を

有することが明らかになった(図6)。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

KAによるプロモーション10週、15週の屠殺時での、甲状腺重量(絶対、相対)と甲状腺に発生した増殖性病変の発生個数をTable 1に示した。また、その病理像を図7に示した。10週目に比較して15週では、甲状腺重量が増加し、1個体あたりの甲状腺組織内の増殖性病変の増加を伴っていた。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、「非腫瘍部」での発現量に比し、「FFCH+腺腫」または「腺がん」で5倍以上または0.2倍以下の発現変動を認めた遺伝子数のVenn図を図8に示した。「非腫瘍部」に比し特異的に発現が5倍以上の発現の増減を示した遺伝子数は、「FFCH+腺腫」では各々1、5個、「腺がん」では各々22、12個であった。腫瘍共通に同様の発現変動が認められたものは各々16、2個であった。「FFCH+腺腫」と「腺がん」で共通に、またはそれぞれの部位で特異的に発現変動が認められた遺伝子のリストをTable 2, 3, 4に示した。今回検索した遺伝子のうち、遺伝子名を同定できたものは、「非腫瘍部」に比し特異的に発現が5倍以上の発現の増減を示した遺伝子数は、「FFCH+腺腫」では各々1、5個、「腺がん」では各々15、8個、「FFCH+腺腫」と「腺がん」に共通のものは各々13、2個であった。

「非腫瘍部」に比し「FFCH+腺腫」と「腺がん」で共通に mRNA 発現量が増加したもの

には、dipeptidase 1, ceruloplasmin, antigen p97, monooxygenase DBH-like 1 など、鉄や銅の金属イオンの輸送、結合に関連する遺伝子が見出された。

更に、「FFCH+腺腫」と「腺がん」で共通、あるいは「腺がん」特異的に発現増加していた遺伝子には、補体関連分子 (complement component 3, complement factor 1, complement component 4a, complement component 2)が見出された。また、「FFCH+腺腫」において特異的に Interleukin 6 (IL-6)が発現増加 (5.3倍)を示し、「腺がん」でも2.0倍発現増加していた。

これらの遺伝子名を同定できたもののうち、Foxq1, Ceruloplasmin (Cp), Complement component 3 (C3), Deiodinase iodothyronine, type 1 (Dio1), Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3 (Gfra3), Cholecystokinin (Cck), Peptidylprolyl isomerase B (Ppib), Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (Cxcl12), Crystallin, alpha B (Cryab), Prolactin receptor (Prlr)の10遺伝子についてリアルタイム RT-PCR法で遺伝子発現量を検索した結果、GAPDH、HPRT 遺伝子発現量に対する各遺伝子の相対発現量は、Ppibを除いて、マイクロアレイ法により得られた解析結果とほぼ一致していた(図9-1、図9-2)。

入手可能な抗体を用いて明確な陽性所見を得ることができた免疫染色 (GFR α 3, IL-6R, Foxq1)で、各部位での陽性細胞分布程度を比較した結果を図10に示す。GFR

$\alpha 3$ は、「FFCH」ではごく一部の細胞のみ陽性であったが、「非腫瘍部」や「腫瘍部」において陽性細胞の分布が広く、増殖性病変の進展に伴い分布が拡大していた。マイクロアレイ解析で同定された IL-6 に関して、その受容体である IL-6R は、「非腫瘍部」と「FFCH」で陽性細胞の分布が大きく、腫瘍の進展に伴い分布の程度が減少していた。また、Foxq1 は、甲状腺濾胞上皮細胞においては核と細胞質に陽性所見が認められ、「非腫瘍部」では細胞質よりむしろ核の陽性像が多く認められ、腫瘍の進展に伴い細胞質陽性像を示す細胞が増加し、「腺がん」ではほぼ細胞質のみの陽性像が認められた。

D. 考察

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

エピジェネティック制御系の機構解明を目的に、脳神経系の発生に関する Percellome 基盤データベース2種類の内容を詳細に解析し、次いで、DNA メチル化阻害作用を持つ AzaC をモデル化合物として胎児終脳での DNA メチル化阻害影響を解析した。その結果、インターフェロン応答遺伝子群の発現が上昇することについて、STAT 結合配列が重要である可能性および、STAT1 の promoter にメチル化されるシトシンを含む CpG 配列を多数有する CpG island が存在することから、AzaC が STAT1 promoter を脱メチル化し、発現上昇した Stat1 が他のインターフェロ

ン応答遺伝子群の発現を上昇させている可能性が示唆された。以上、本研究により、恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構の化学物質による障害メカニズムに関する基礎情報が得られた。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析

今回の研究で、マイクロダイセクション法とマイクロアレイ法を併用し、KA 誘発甲状腺二段階発がんモデルでの「腫瘍部」または「非腫瘍部」に特異的に発現する遺伝子群を検索し、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を実施した。

「非腫瘍部」に比し「FFCH+腺腫」と「腺がん」で共通に mRNA 発現量が増加したのものには、dipeptidase 1, ceruloplasmin, antigen p97, monooxygenase DBH-like 1 など、鉄や銅の金属イオンの輸送、結合に関連する遺伝子が見出された。金属類は、抗腫瘍作用があるという報告がある一方、酸化ストレスなどを介して発がんに関与するとの報告がある。よって、今回見出された鉄や銅の輸送や結合に関わる遺伝子発現の変動から、鉄や銅が KA 誘発甲状腺腫瘍の進展に関与することが示唆された。

また、「FFCH+腺腫」と「腺がん」で共通、あるいは「腺がん」特異的に発現増加していた遺伝子には、補体関連分子 (complement component 3, complement factor 1, complement component 4a, complement component 2)が見出された。また、「FFCH+腺腫」で特異的に Interleukin 6 (IL-6)が発

現増加 (5.3倍)し、この分子は「腺がん」でも2.0倍発現増加していた。補体関連分子はIL-6により発現制御されることが知られており、このことから、腫瘍の進展にIL-6を中心とした補体活性化メカニズムが関与することが示唆された。また、前述のceruloplasminには3つのIL-6 response elementが存在することが報告されていることから、IL-6はceruloplasminの発現に関与し、間接的に銅イオンの結合、輸送に関わっているかもしれない。IL-6については蛋白質の局在を免疫染色で確認することができなかったが、その受容体 (IL-6R; gp80) について免疫染色した結果、「非腫瘍部」に比較し腫瘍性病変で発現の減弱を認めた。腫瘍でのIL-6あるいはその受容体発現に関する報告は様々であるが、IL-6発現増強、gp80の発現減少は腫瘍細胞に対する免疫反応からの逃避メカニズムを示唆するかもしれない (J. Immunol., 165: 1939-1948, 2000)。

今回免疫染色で蛋白質の局在が確認できたもののうち、Foxq1は「FFCH+腺腫」、「腺がん」に共通して遺伝子の発現が増加しており、蛋白質は「非腫瘍部」では核内に、「腺がん」では細胞質に局在性が認められた。Foxq1は、fork-head (FOX)ファミリーの一種で、発達、代謝、がん、老化に重要な役割を果たす”winged-helix”転写因子である。ヒト結腸・直腸がん、肺がん由来の培養細胞で過剰発現しているとの報告があるが、甲状腺腫瘍でのこの発現に関する報告はない。他のsubfamilyであるFoxoやFoxm1bは細胞の増殖・生存シグナルに関与すること

が知られている。今回得られたFoxq1の免疫染色による解析では、正常の細胞では核に移行して転写機能を果たしているのに、腫瘍の進展過程で核への移行が妨げられ、正常な機能が果たせないものと考えられた。

GFR α 3は、今回の検索で遺伝子の発現とともに蛋白質の局在も確認できた。GFR α 3遺伝子は、mRNAレベルが「腺がん」で特異的に発現減少を示したが、蛋白質の発現は相関しておらず、免疫染色の結果、複雑な陽性所見を示した。即ち「非腫瘍部」で強く陽性所見を示しているものの、「FFCH」では陽性細胞の分布が最も少なく、腫瘍の進展の伴いその分布が拡大し、「腺がん」では「非腫瘍部」とほぼ同程度の陽性所見を示した。

GFR α 3は、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)ファミリーの一つであるartemin (ART)が選択的に結合するGDNF family receptor alpha (GFR)であり、proto-oncogene RETを活性化させる。GFR α 3は、末梢神経の発達に関与し、ヒト甲状腺髄様がんmedullary carcinomaにおいてはGFR α 3以外(GFR α 1、GFR α 4)が関与することが報告されている。甲状腺濾胞上皮腫瘍との関連を示す報告はないが、リガンドであるRETの変異はヒトの甲状腺乳頭状がんに関与することが示唆されている。RETに関する検索を今回は行っていないが、KA誘発甲状腺発がんの過程にGDNFファミリーやRETが関与する可能性が示唆された。

以上をまとめると、KA誘発甲状腺二段階発がんの腫瘍進展過程に、鉄や銅の輸送・

結合や、IL-6 が関与した補体の活性化や腫瘍細胞に対する免疫反応からの逃避メカニズムや、がん抑制作用の破綻や癌遺伝子の活性化の関与する可能性のあることが示唆された。今回の検索で遺伝子名を同定できたもののうち、免疫染色可能であった3種以外のいくつかの遺伝子産物について、免疫染色による局在を検索したが、いずれも良好な結果が得られず、細胞局在を示すことは困難であった。

E. 結論

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

DNA メチル化機構に影響を与えることが示唆されている化合物は、砒素化合物や高用量のDESなど、現時点ではその報告は限られている。この一つの理由として何らかの細胞機能を指標としたDNAメチル化修飾機構の有無をスクリーニングする良い系が存在しないことが挙げられる。神経幹細胞の発達には、DNAメチル化状態を適切に制御する能動的なシステムの働きが欠かせないと考えられているが、今回の結果はDNAメチル化を変化させそのシステムに障害を与えるAzaCの様な化学物質の作用が、システムに関連する遺伝子の発現変化となって現れることを示唆するものである。今後、これらの遺伝子発現変化の意義を、基本データベースを活用して解明し、エピジェネティック毒性メカニズムを洗い出すとともに、このことを良いスクリーニング系、及び適切な毒性評

価系の開発につなげることを目指す。

(2) 発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析

発がん性を招来する恒常性破綻の機序を明らかにする目的で、ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、KAにより形成された腫瘍特異的な発現変動遺伝子のプロファイリングを行った結果、KAによる腫瘍進展過程には、鉄や銅の輸送亢進、IL-6が関与する補体の活性化、がん抑制作用の破綻や癌遺伝子の活性化の関与する可能性のあることが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol.* 2006 20(9):2141-55 (2006)

Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development.*

2006 133(9):1625-34.

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 103(10):3651-6.

Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H. PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. Pathol. 2006 209(4):522-31 (2006)

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. Per cell normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics. 2006 Mar 29;7:64.

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. Dev Dyn. 2006 235(2):395-402.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen

receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 103(1):224-9.

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、細胞工学、2007 年 1 月号、株式会社秀潤社

菅野 純、毒性の高精細解析に向けてのトキシコゲノミクス、医学のあゆみ Vol.218 No.12 2006.9.16 p1035-6

2. 学会発表

菅野 純、Percellom トキシコゲノミクス・プロジェクトの概要と基礎生物学への応用、明治薬科大学オープンカレッジ、2006 年 8 月 7 日、東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年 7 月 3-5 日、名古屋

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 15 日、東京

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法の概略と生物研究への応用、九州大学医研セミナー、2006 年 4 月 17 日、福岡

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法の概略と生物研究への応用、第 104 回熊本大学発生研・拠点形成 A セミナー、2006 年 6 月 5 日、熊本

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールとしての Percellome System、第 95 回日本病理学会総会、2006 年 4 月 30 日-5 月 2 日、東京

井上 薫, 渋谷 淳, 禹 桂炯, 禹 麻美, 黒岩敬子, 菅野 純, 五十嵐勝秀, 広瀬雅雄: Kojic acid によるラット甲状腺発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング, 第 64 回 日本癌学会学術総会, 札幌, 第 64 回 日本癌学会学術総会記事: p. 474 (PA3-1116): 9 月 16 日, 2005

渋谷 淳, 井上 薫, 禹 桂炯, 富士本仁, 禹 麻美, 五十嵐勝秀, 菅野 純, 広瀬雅雄: 甲状腺機能低下に起因する甲状腺発がんプロモーション過程早期に特異的な発現遺伝子のプロファイリング。第 141 回日本獣医学会総会, つくば, 第 141 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, p. 201 (BP-095), 3 月 19-21 日, 2006

井上 薫, 渋谷 淳, 禹 桂炯, 禹 麻美, 富士本仁, 高橋美和, 菅野 純, 五十嵐勝秀, 広瀬雅雄: Kojic acid (KA) によるラット甲状腺発がん過程に特異的な発現遺伝子のプロファイリング。第 65 回 日本癌学会学術総会, 横浜, 第 65 回 日本癌学

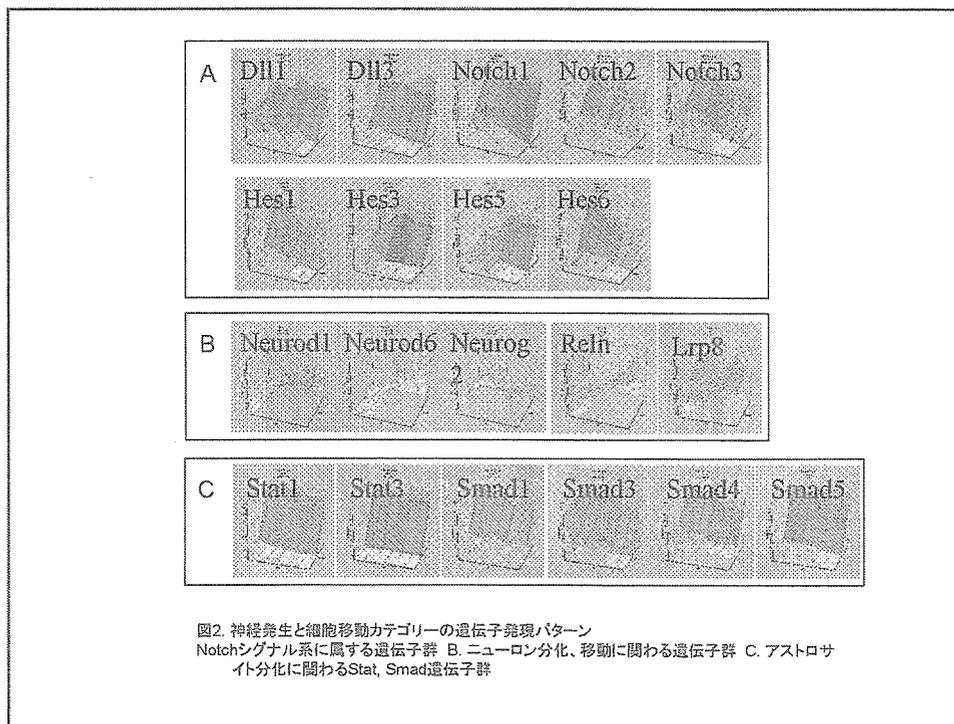
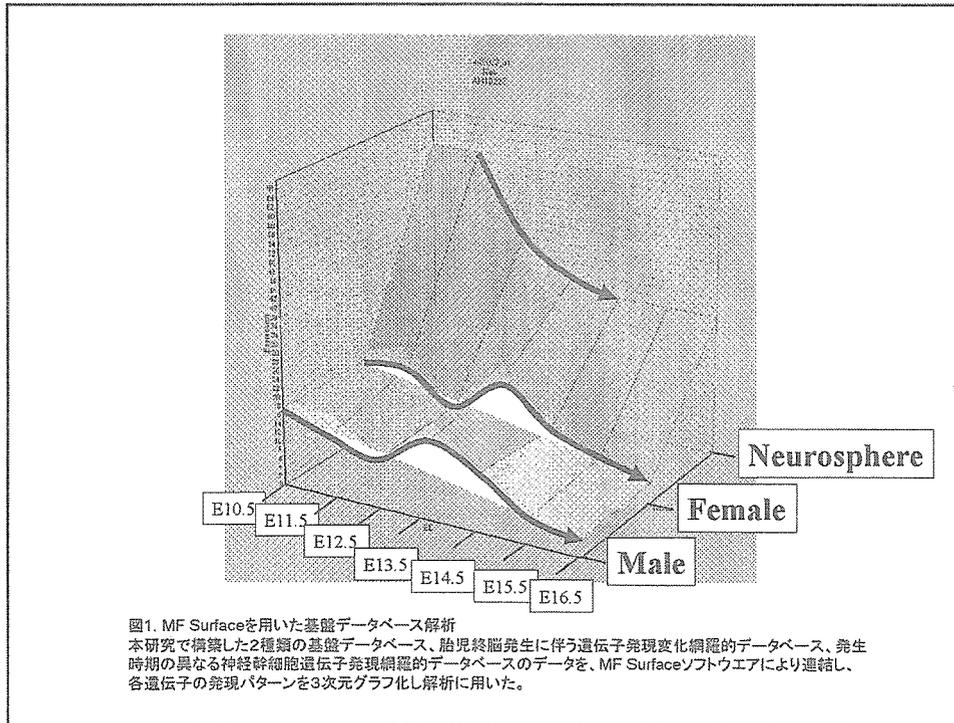
会学術総会記事: p. 116 (P-040): 9 月 28 日, 2006

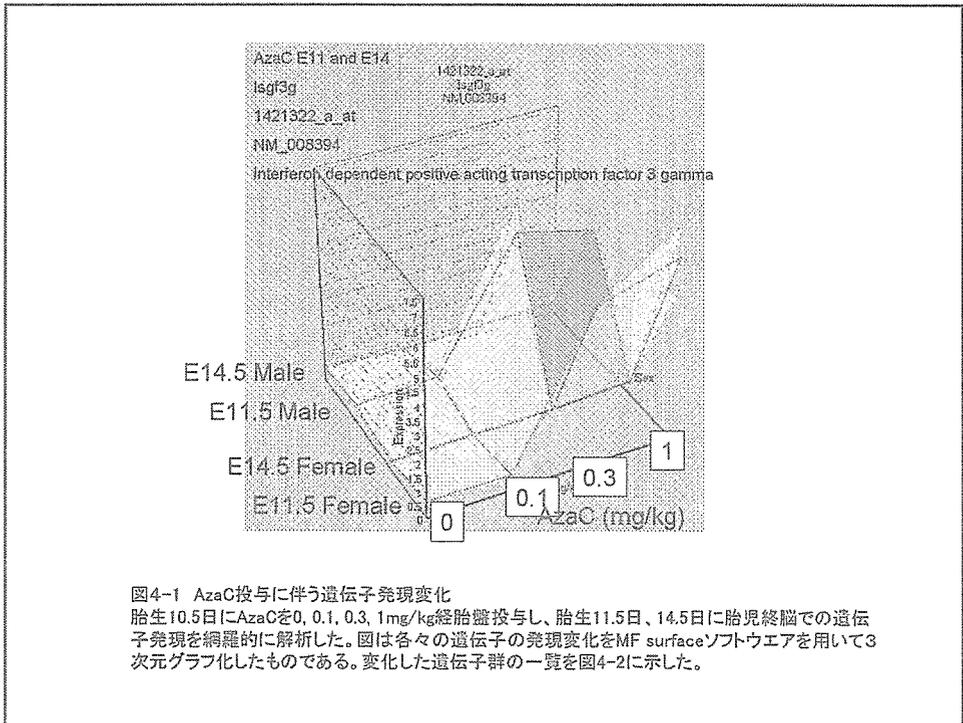
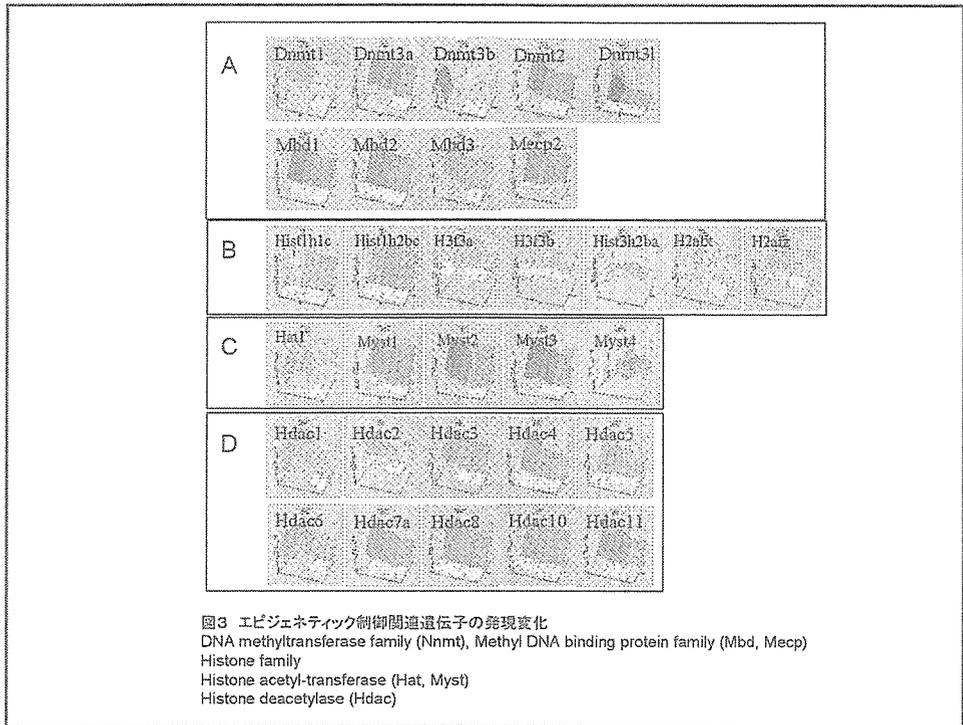
Makoto Shibutani, Kaoru Inoue, Gye-Hyeong Woo, Katsuhide Igarashi, Jun Kanno, Masao Hirose. Gene expression profiling specific to the tumor promotion process of rat thyroid carcinogenesis induced by sulfadimethoxine or kojic acid. 45th Annual Meeting of Society of Toxicology (2006. 3. 5-9), San Diego, California, U.S.A., Toxicol. Sci. 90 (No. 1): p.12 (No. 57)

渋谷 淳, 井上 薫, 禹 桂炯, 富士本仁, 禹 麻美, 五十嵐勝秀, 菅野 純, 広瀬雅雄: 甲状腺機能低下に起因する甲状腺発がんプロモーション過程早期に特異的な発現遺伝子のプロファイリング。第 141 回日本獣医学会総会, つくば, 第 141 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, p. 201 (BP-095), 3 月, 2006

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

国内特許申請中(特願 2003-317031、特願 2004-219285)





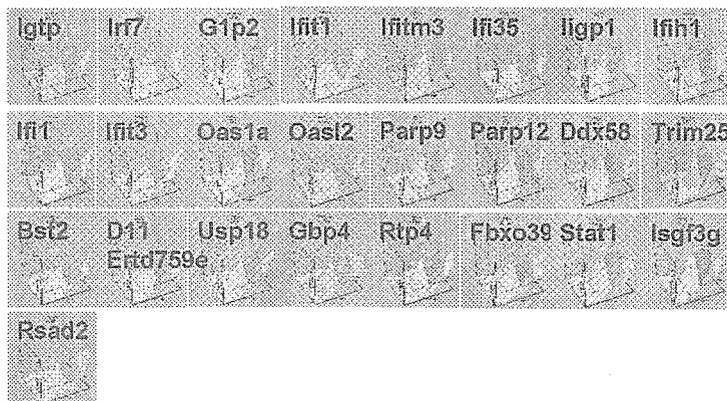


図4-2 AzaC投与に伴う遺伝子発現変化

胎生10.5日にAzaCを0, 0.1, 0.3, 1mg/kg経胎盤投与し、胎生11.5日、14.5日に胎児終脳での遺伝子発現を網羅的に解析した。変化した遺伝子群を一覧に示した。その中で遺伝子名を赤字で示したものはインターフェロンに応答して発現が変化することが報告されている遺伝子であった。

Igtp: interferon gamma induced GTPase, Irf7: interferon regulatory factor 7, G1p2: INTERFERON-INDUCED PROTEIN IFI-15K, Ifi1: interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1, Ifitm3: interferon induced transmembrane protein 3, Ifi35: interferon-induced protein 35, Iigp1: interferon inducible GTPase 1, Ifih1: interferon induced with helicase C domain 1, Ifi1: INTERFERON-INDUCIBLE PROTEIN 1, Ifi3: interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3, Oas1a: 2'-5' oligoadenylate synthetase 1A, Oas2: 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2, Parp9: poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9, Parp12: poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12, Ddx58, DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58, Trim25: tripartite motif protein 25, Bst2: bone marrow stromal cell antigen 2, D11Ertid759e: DNA segment, Chr 11, ERA70 Dcl 759, expressed, L5p16: ubiquitin specific peptidase 18, Gbp4: guanylate nucleotide binding protein 4, Rtp4: receptor transporter protein 4, Fbxo39: F-box protein 39, Stat1: signal transducer and activator of transcription 1, Isgf3g: interferon dependant positive acting transcription factor 3 gamma, Rsad2: radical S-adenosyl methionine domain containing 2

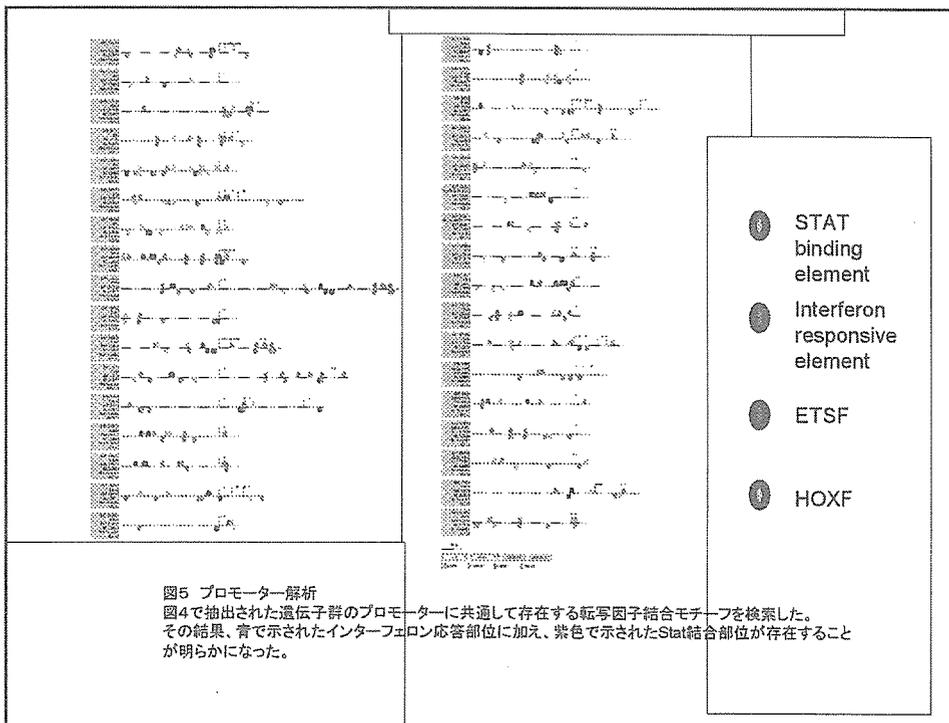
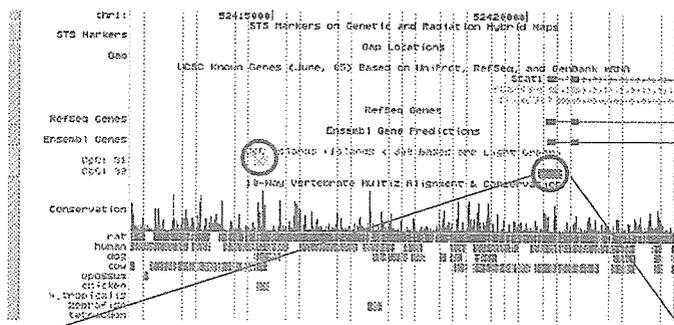


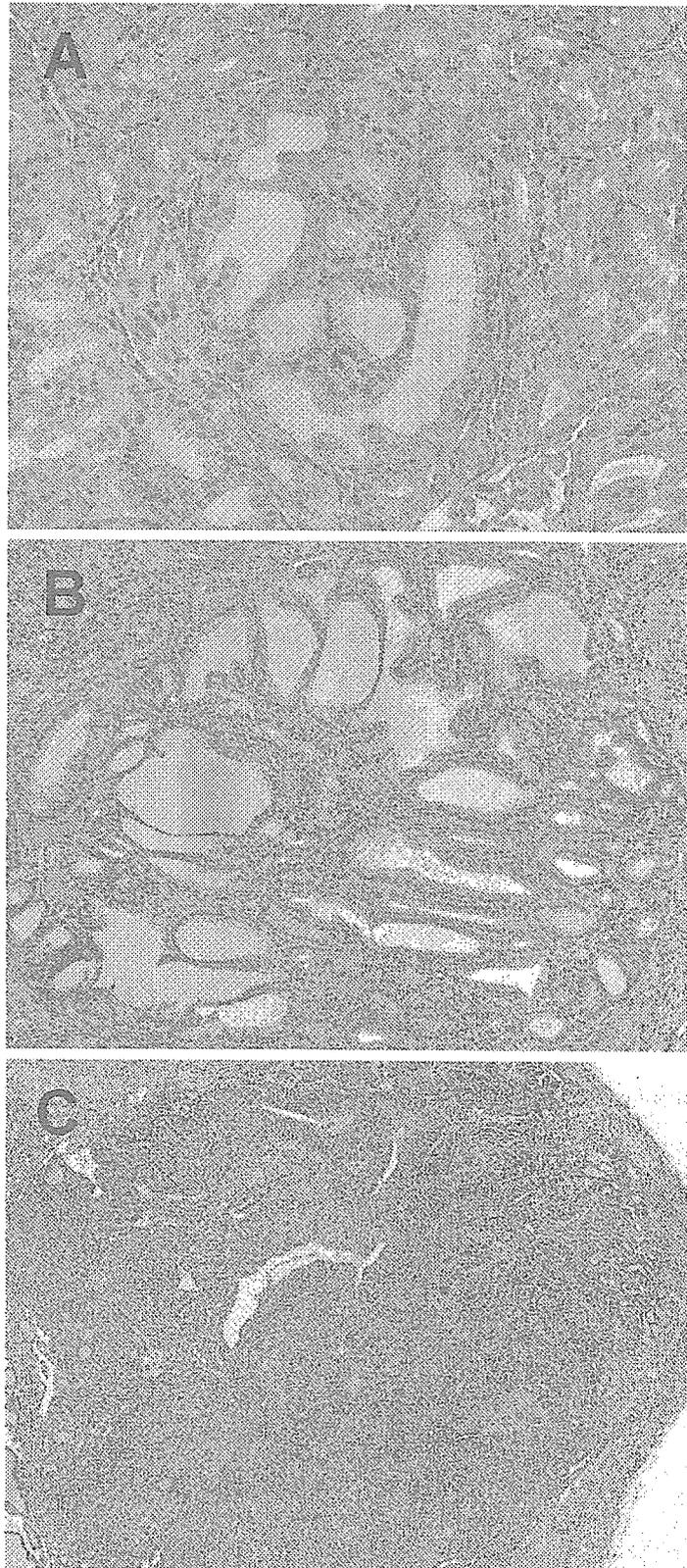
図5 プロモーター解析

図4で抽出された遺伝子群のプロモーターに共通して存在する転写因子結合モチーフを検索した。その結果、青で示されたインターフェロン応答部位に加え、紫色で示されたStat結合部位が存在することが明らかになった。



CGGTTTGCACCCACAGCCGCCCCCAAGTTTCCACCCCGGTAGGGAG
CCGCCCGACCAGGAAGGCCAAGCAGCCAGGGGGGGGGGACCGTGCCCTG
 ATGGAACAGCCGGCCAATCTCTGCCCGCTGATTGGCTGAGGCCGAAGGAGG
CGGGACCCCTCTAGCCTTTTTCTGCCCCTGACTTTCCGTTTTTCAGCC
CCGAGTCTGTCAAAGCTCCCTGGAGACCTCCGGACCCGCCCTCAGAC
 CCAC TTGGGACACTGCTGAGCCGCCAGAGAGATTGCCAGACTCCAGC
 TCCTGCCGTGCAGTGAGTGAGTGAGAGCCAGGTGCCGATCCCGGTGCCCGT
GCCGGTGAAGTGGGGCCCTCTCCTCCGACCTGGGGTCTGCTGCCAC
AGGTGACCTGTATCCCGCAGAGAGAACCCAGGAGCCCGATCC

図6 STAT1 promoter内にCpG islandが存在する
 STAT1 promoterについて検討した結果を示す。メチル化されうるシトシンを含むCpG配列を多数有するCpG
 islandが存在することが明らかになった

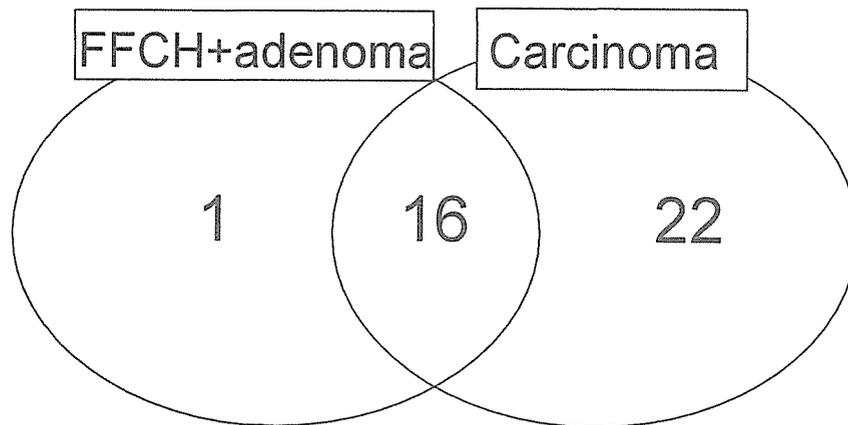


☒7.

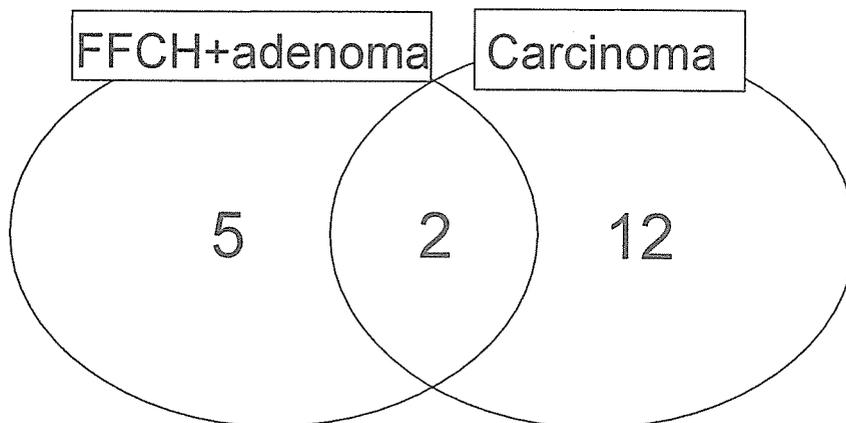
Representative histopathological lesions in the thyroid of the F344 rats treated with kojic acid for 10 or 15 weeks after DHPN-initiation.

A: focal follicular cell hyperplasia (FFCH), B: adenoma, C: carcinoma.

≥ 5 fold, $p < 0.05$



≤ 0.2 fold, $p < 0.05$



☒8

Number distribution of genes up- or down-regulated in FFCHs+adenomas and/or carcinomas.

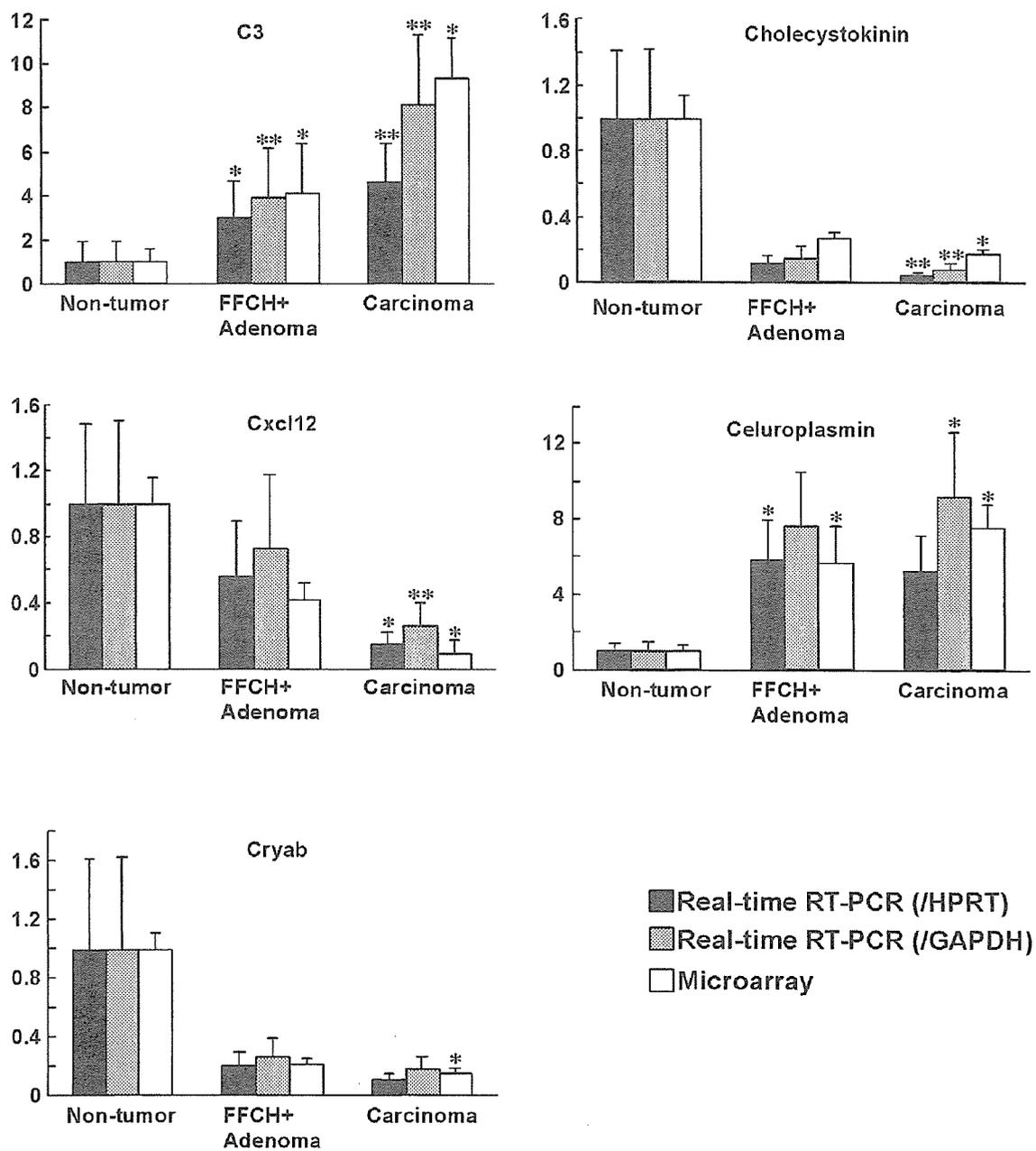


图9-1

Validation of expression data obtained from microarray by real-time RT-PCR.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. non-tumor portions.

Abbreviations: FFCH, focal follicular cell hyperplasia; C3, complement component 3; Cxcl12, chemokine (C-X-C motif) ligand 12; Cryab, crystallin, alpha B.

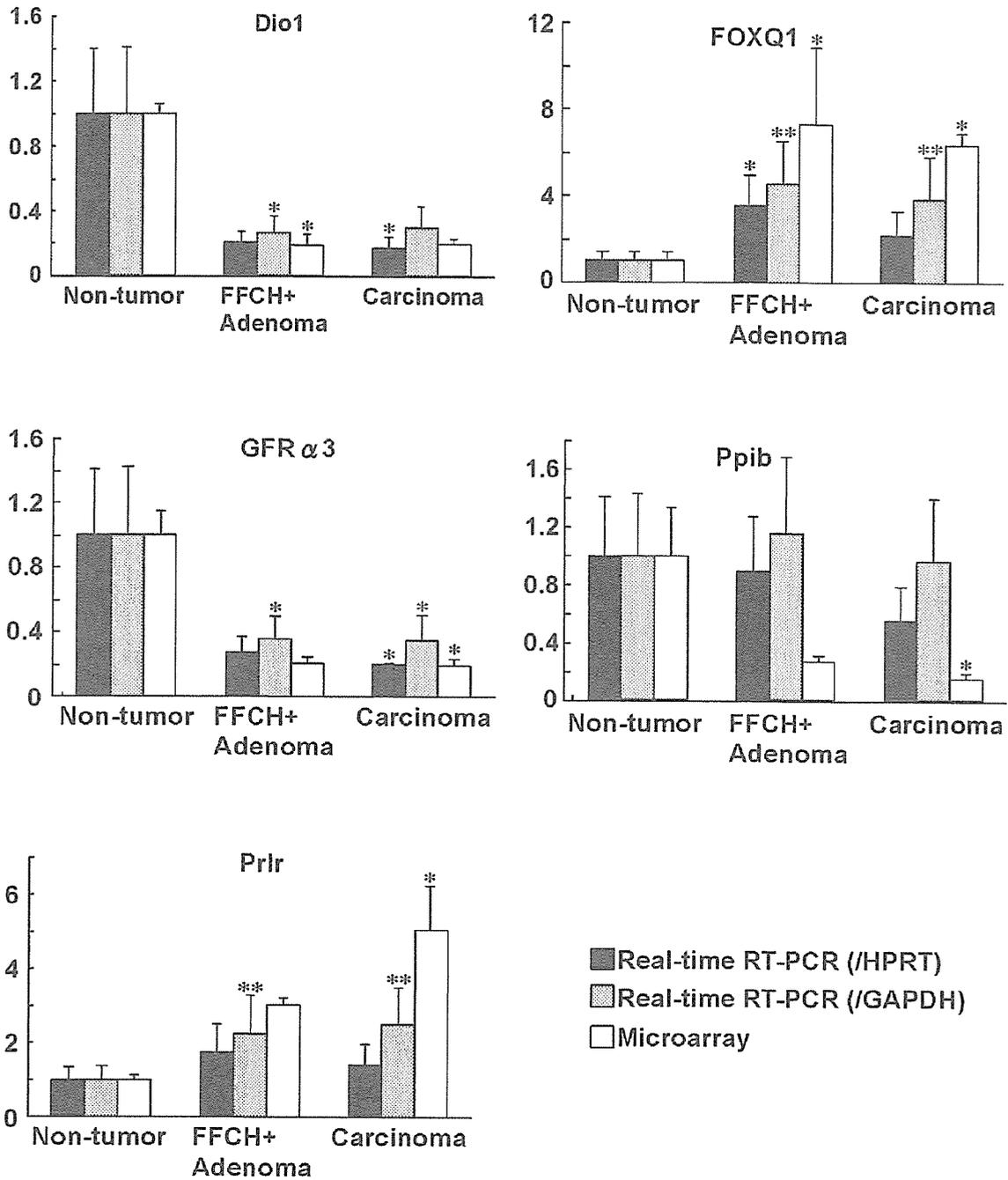


图9-2 (continued).

Validation of expression data obtained from microarray by real-time RT-PCR.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. non-tumor portions.

Abbreviations: FFCH, focal follicular cell hyperplasia; Dio1, deiodinase iodothyronine, type 1; FOXQ1, forkhead box q1; GFR α 3, glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3; Ppib, peptidylprolyl isomerase B; Prlr, prolactin receptor.

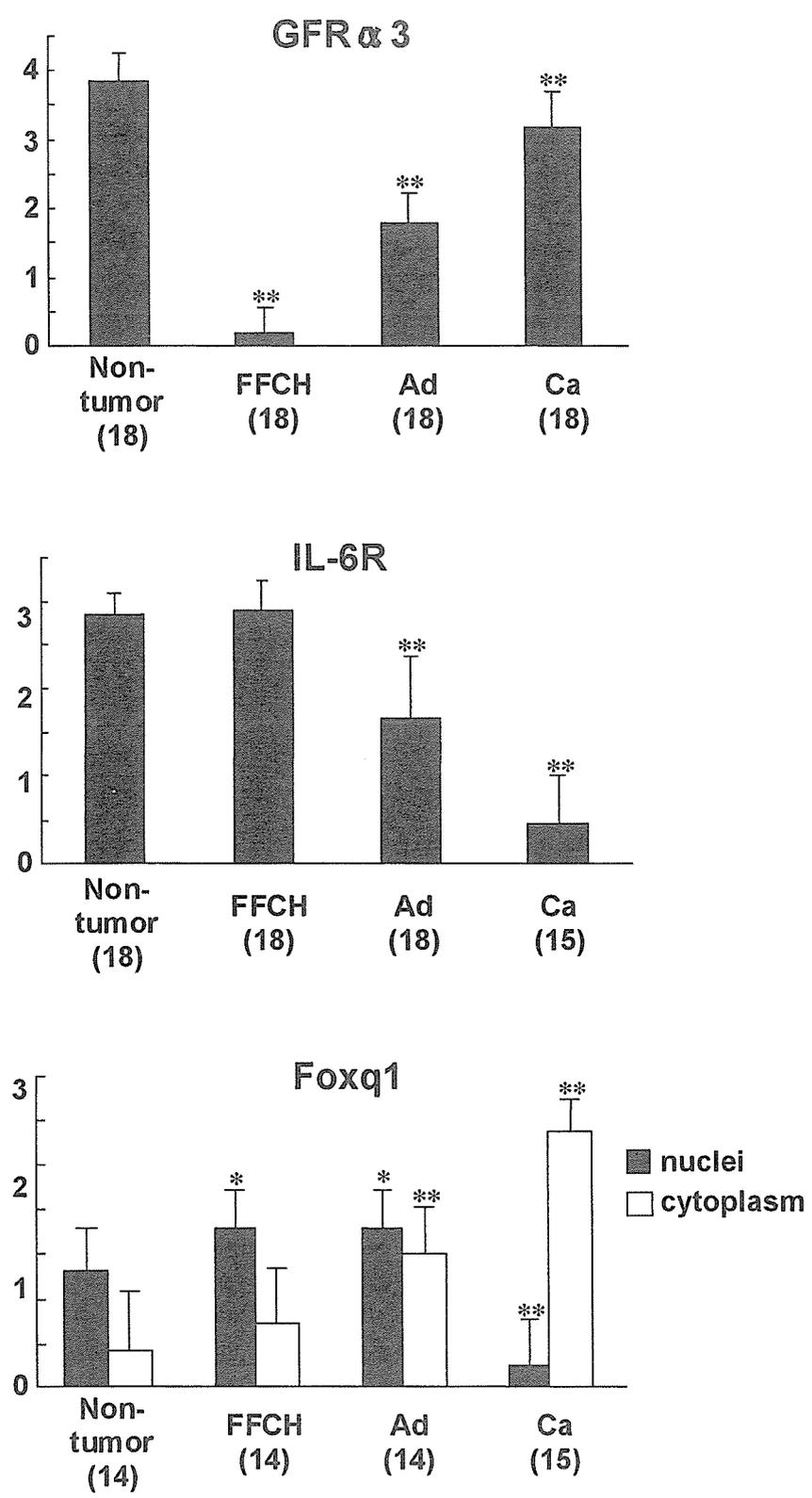


图 10.

Distribution of the immunoreactive-cells in each histopathological lesions. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. non-tumor portions. Values in parenthesis were numbers of animals examined each lesion.

Abbreviation: GFR α 3, glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 3; IL-6R, interleukin 6 receptor; Foxq1, forkhead box q1. Scores; 0: negative, 1, <20%; 2, 20~50%; 3, 50~80%; 4, >80% of the immunoreactive cells in total per lesion.

Table 1. Thyroid weights and multiplicity of proliferative lesions of F344 rats treated with (KA) for 10 or 15 weeks

Week	No. of animal examined	Thyroid weight		No. of the proliferative	
		Absolute (g)	Relative (mg/100g bw)	FFCH+Adenoma	C ₃
10	10	0.17 ± 0.28	55.6 ± 8.7	15.9 ± 6.3	
15	15	0.41 ± 0.05	124.1 ± 13.8	16.3 ± 5.2	1.3

Abbreviation: FFCH, focal follicular cell hyperplasia.