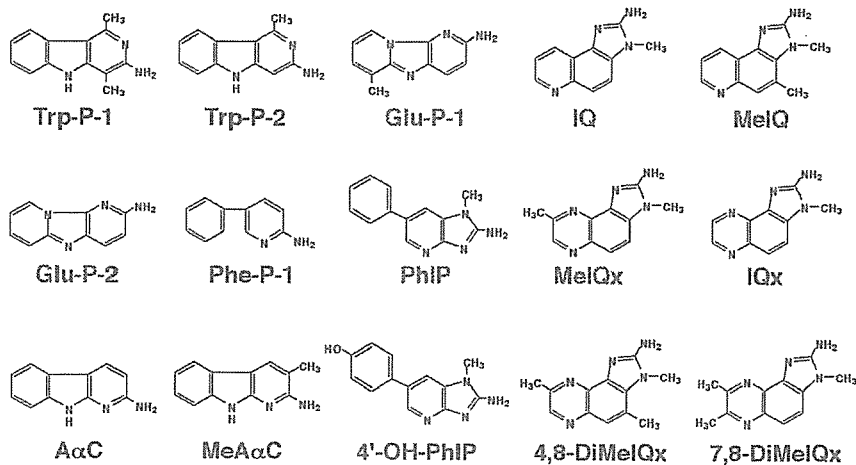


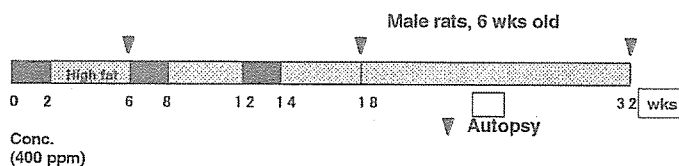
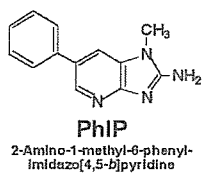
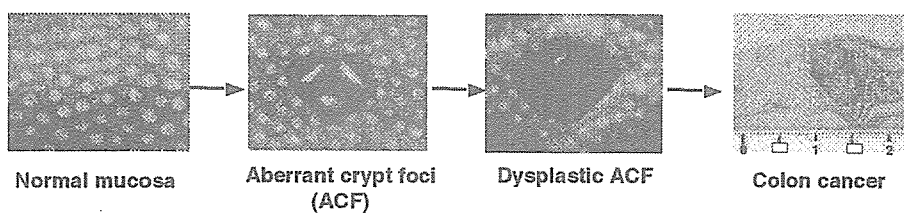
- 香保)、口頭。 2006年11月30日-12月1日。
- 48) 近藤靖之、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルを用いた大腸がん感受性遺伝子の探索。第23回日本疾患モデル学会総会(伊香保)、ポスター。 2006年11月30日-12月1日。
- 49) 泉谷昌志、落合雅子、土肥多恵子、杉村 隆、中釜 斉、化学発がんモデルを用いたマウス大腸腫瘍の genome-wide array CGH 解析。第23回日本疾患モデル学会総会(伊香保)、ポスター。 2006年11月30日-12月1日。
- 50) 阿部浩一郎、落合雅子、久山 泰、杉村 隆、中釜 斉、オリゴヌクレオチド CGH マイクロアレイを用いた PhIP 誘発ラット消化管腫瘍における遺伝子コピー数変化のゲノム網羅的解析。第23回日本疾患モデル学会総会(伊香保)、ポスター。 2006年11月30日-12月1日。
- 51) 近藤靖之、落合雅子、杉村 隆、中釜 斉、PhIP 誘発ラット大腸発がんモデルを用いた大腸がん感受性遺伝子の探索。分子生物学会 2006 フォーラム(名古屋)、ポスター。2006年12月6-8日。
- 52) 土屋直人、中島克彦、宮本 恵、細川元靖、杉村 隆、中釜 斉、RISC 複合体構成因子 SND1/Tudor-SN による翻訳制御の分子機構。分子生物学会 2006 フォーラム(名古屋)、ポスター。2006年12月6-8日。
- H. 知的財産権の出願/登録状況
1. 特許取得  
無
  2. 実用新案登録  
無
  3. その他  
特に無し
- 51) 近藤靖之、落合雅子、杉村 隆、中釜

## Various Heterocyclic Amines (HCAs) Produced in Cooked Foods

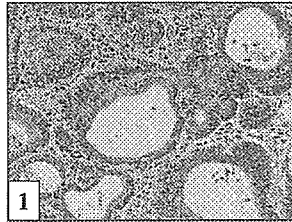
Colon carcinogen



## Sequential Progression Model from ACF to Cancer



## Histopathological Findings and Genetic Alterations Observed in PhIP-Induced Colon Tumors

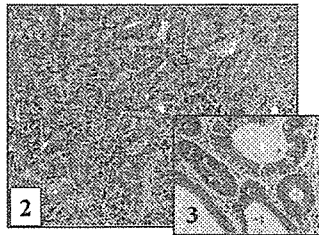


1

*Apc* (approx. 10 ~ 15 %)

Exon 14 or 15  
 5'-GTGGGAT-3' to 5'-GTGGAT-3'  
 (G deletion)

Intron 10 & exon 11 junction  
 5'-tagGGGGG-3' to 5'-~~ta~~GGGGG-3'  
 (G to T)  
 5'-tagGGGGG-3' to 5'-tagGGGGG-3'  
 (G deletion)



2

3

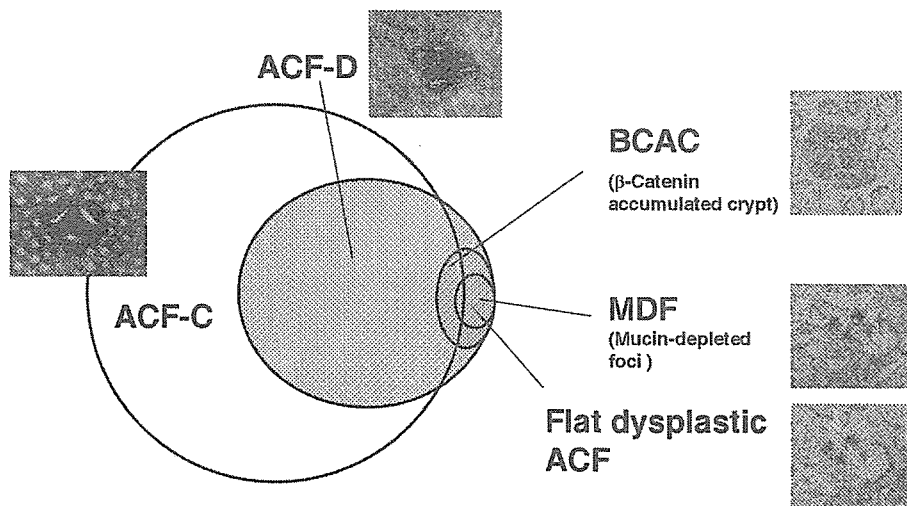
*β-catenin* (25 ~ 50 %)  
 Codons 32, 34, 36, 37, 38 (mainly G to T/A)

➡ Accumulation of *β-catenin*  
 Paneth cell dis differentiation

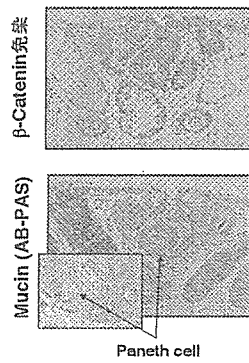
*K-ras* and *p53* mutations are rarely observed.  
 Genomic instability (MSI) is not evident.

Tubular growth pattern (No. 1, 2), and differentiation into Paneth cells (No. 3)

## Histopathological Relationship among Various Precancerous Lesions in the Colon



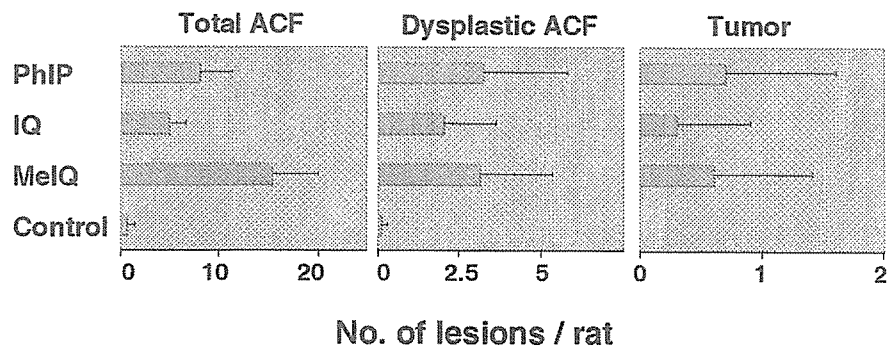
## Mutation Spectra in the $\beta$ -catenin Gene Observed in Dysplastic ACF and Colon Tumors induced by PhIP



Histopathological features of dysplastic ACF

病変	変異スペクトラム			変異が検出された病変の数	解析した病変の数
	コドン	変異タイプ	アミノ酸置換		
Dysplastic ACF	32	GAT → GGT	Asp → Gly	1	29
	34	GGA → GTA	Gly → Val	5	
	36	CAC → TAC	His → Tyr	1	
Tumor	32	GAT → AAT	Asp → Asn	1	6
	34	GGA → GTA	Gly → Val	2	
		GGA → GAA	Gly → Glu	1	
	36	CAC → CCC	His → Pro	1	
38	GGT → CGT	Gly → Arg	1		

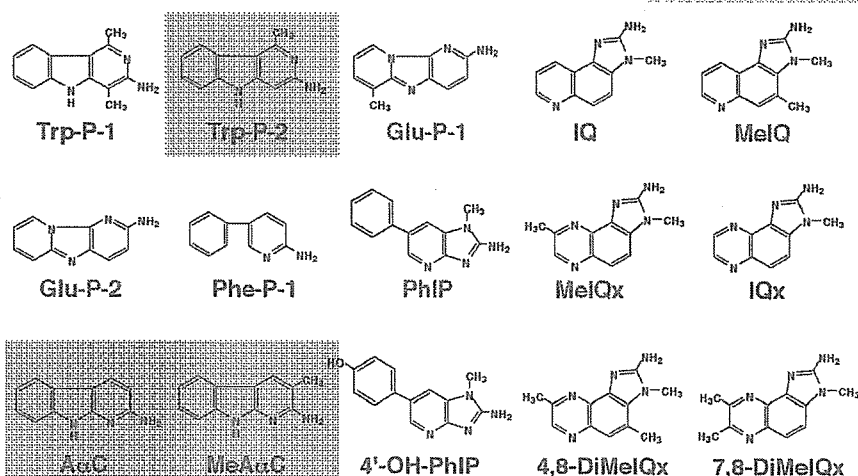
## Numbers of Dysplastic ACF, but Total ACF, induced by PhIP, IQ and MeIQ Well Represent Their Carcinogenic Potentials in the Colon



## Various Heterocyclic Amines (HCAs) Produced in Cooked Foods

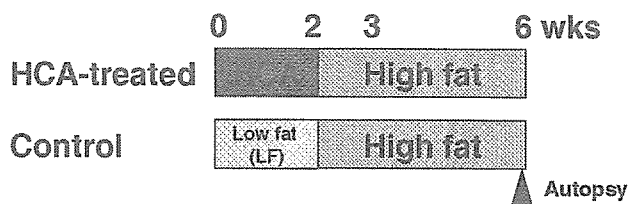
Colon carcinogen

Colon non-carcinogen



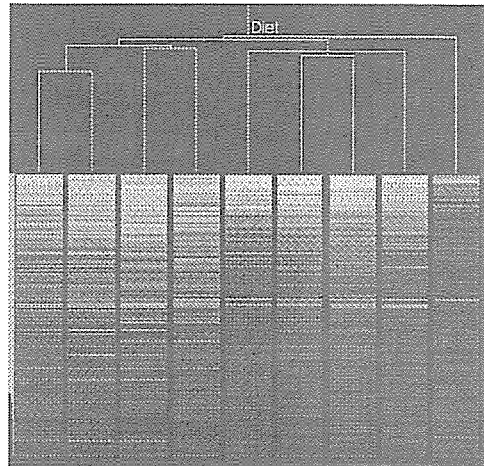
## Experimental Design

F344 male rats (6 wks old)



Gene expression (Colon mucosa, GeneChip RG-U34A)	4
ACF induction	5

## Hierarchical Gene Expression Clustering (I)

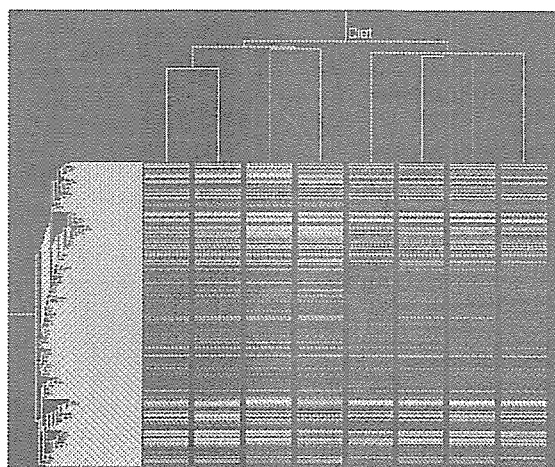


4687 genes were used for the analysis. The flags of selected genes were presence or marginal in more than one sample out of 41 samples

In IQ-treated group, the expression levels were low on the whole compared to those in other HCA- treated and untreated groups.

AoC  
MeAoC  
LF  
PhIP  
Glu-P-1  
MelQx  
Trp-P-2  
MelQ  
IQ

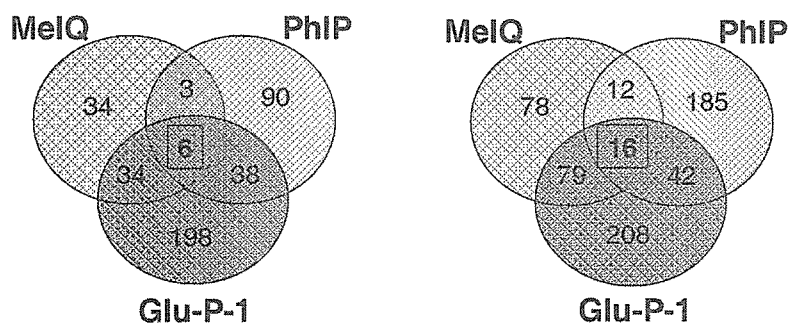
## Hierarchical Gene Expression Clustering (II)



4663 genes were used for the analysis. The flags of selected genes were presence or marginal in more than one sample out of 37 samples

AoC  
MeAoC  
LF  
PhIP  
Glu-P-1  
MelQx  
Trp-P-2  
MelQ

**Number of Genes Commonly Up- or Down-regulated by PhIP, MeIQ and Glu-P-1**



HCA↑ > LF-control

HCA↓ > LF-control

(1-Way ANOVA;  $p < 0.05$ )

**Six Genes Commonly Up-regulated in PhIP, MeIQ and Glu-P-1-treated Colon Epithelium of F344 Rats**

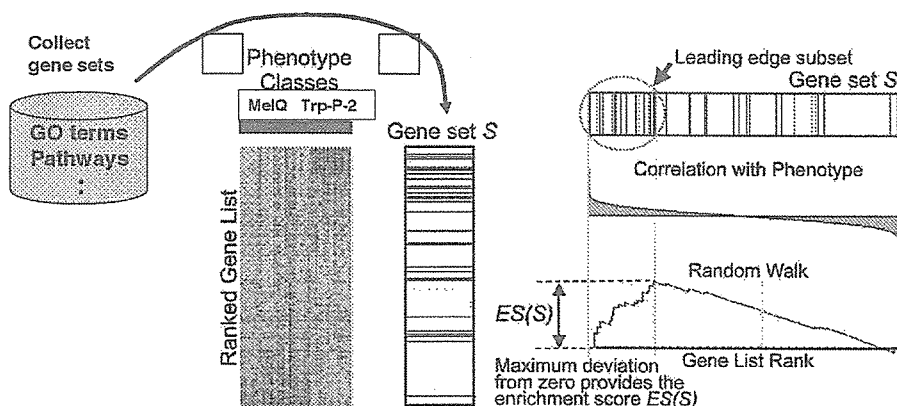
		MeIQx		AαC	MeAαC
L13025UTR	Rattus norvegicus mRNA, 3' end GAA-triplet repeat	+			
J01435cgs	Rattus norvegicus mitochondrial cytochrome oxidase subunits (Cox1)	++			
M81920	Rat mucin-like protein mRNA	++		+	+
rc_AA893485	Unkown Glu-Pro depeptide repeat protein	++		±~+	
U02506UTR	Rattus norvegicus polymeric immunoglobulin receptor mRNA	+		±	±
X06801cgs	Rat mRNA for vascular alpha-actin	+++		++	+++

+++ > 10-fold; ++ > 3-fold; + > 2-fold; ± > 1.5-fold

### 16 Genes Commonly Down-regulated in PhIP, MeIQ and Glu-P-1

		MelQx	Trp-P-2	AαC	MeAαC
rc_AI639342	ESTs, highly similar to YS64	+	+	+	+
rc_AI103911	ESTs, highly similar to Ubiquitinol-	+	+	+	+
rc_AA859806	ESTs	+	+		
D83796	UDP glycosyltransferase 1 family	+	+	±	±
rc_AA891422	Hypoxia induced gene 1 (HIG1)	+	+	±	±
rc_AA804330	Calmodulin-depend. protein kinase II	+	+	±	+
M94918mRNA	Rat beta-globin gene 1	±	±		±
rc_AA684641	ESTs	±	±	+	±
L07073	Adaptor-related protein complex AP3	+	+	±	+
M15562	Rat MHC class II alpha chain RT1.D	+	+		
rc_AI176491	ESTs	+	+	±	±
rc_AA944324	ADP-ribosylation factor 6	+	+		
rc_AA893147	ESTs	++	+	+	++
rc_AI172017	Aldehyde dehydrogenase 2 (mt)	+	+	+	+
AB010467	mRNA for MDR-associated protein		+	+	+
D90265	Proteasome subunit alpha type 1	+	+	±	±

### Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)



Subramanian et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 15545-15550

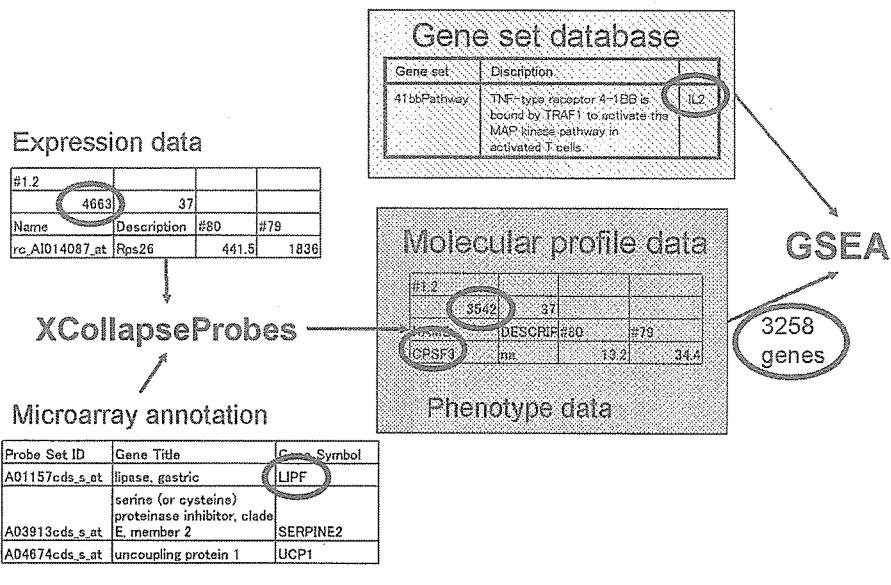


## The sources for Functional Set (C2)

- BioCarta: [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com).
- Signaling pathway database: [www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/menu.html](http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/menu.html).
- Signaling gateway: [www.signaling-gateway.org](http://www.signaling-gateway.org).
- Signal transduction knowledge environment: <http://stke.sciencemag.org>.
- Human protein reference database: [www.hprd.org](http://www.hprd.org).
- GenMAPP: [www.genmapp.org](http://www.genmapp.org).
- Gene ontology: [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org).
- Sigma-Aldrich pathways: [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Biochemicals/Enzyme\\_Explorer/Key\\_Resources.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources.html).
- Gene arrays, BioScience Corp.: [www.superarray.com](http://www.superarray.com).
- Human cancer genome anatomy consortium: <http://cgap.nci.nih.gov>.

Subramanian et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 15545-15550

## GSEA for Comprehensive Gene Expression Data of Rats; Generation of Functional Set (C2) of Rat version



**Number of Gene Sets Used for GSEA**  
 -Comparison of Carcinogenic and Non-carcinogenic HCAs in the Colon-

	No. of probes	No. of genes applied to GSEA	No. of gene set used GSEA	
			≥ 10	≥ 15
<b>Original</b> <sup>*1</sup>			429	328
<b>RG-U34A</b>	8800	6256	300	191
<b>Analyzed</b> <sup>*2</sup>	4663	3258	218	126

\*1; Fuctional set (C2) of human contained 522 gene sets.

\*2; The flags were presence or marginal in more than one sample out of 37 samples.

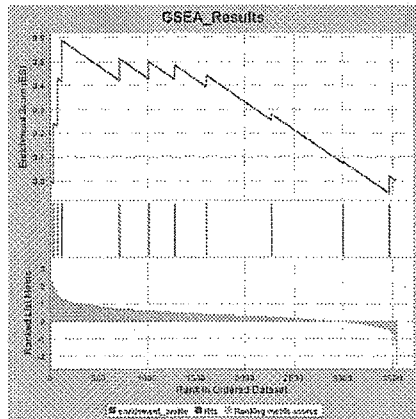
**Comparison of Carcinogenic and Non-carcinogenic HCAs in the Colon by GSEA**

Trp-P-2 ↔ MelQx, Glu-P-1, MelQ, PhIP

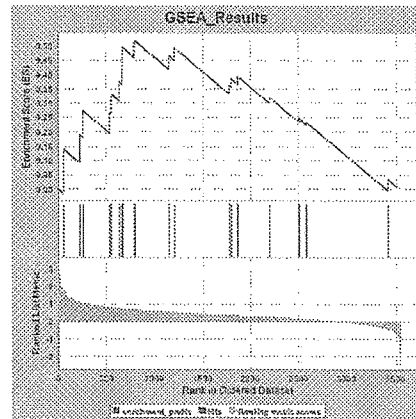
MeAαC ↔ AαC

LF ↔ Trp-P-2, MelQx, Glu-P-1, MelQ, PhIP, MeAαC, AαC

## Enrichment Score and the Leading-edge Subsets in MeIQ vs Trp-P-2



Inflammatory response pathway



Erk pathway

## Leading-edge Subset of Genes involved in Inflammatory Response and Erk Pathways

(a) Inflammatory Response

- FN1
- COL3A1
- COL1A1

(b) Erk pathway

- PDGFRA
- HRAS
- NGFB
- RAF1
- GNAS
- PPP2CA
- GRB2
- MAP2K1
- RPS6KA1

## Gene Sets and their FDR q-value of Those Enriched in Trp-P-2 Phenotypes

Gene set	No. of genes	Size of gene set	Trp-P-2 > PhIP		Trp-P-2 > Glu-P-1
			≥ 10	≥ 15	≥ 15
cell_growth_and_or_maintenance	14		0.00199		
MAP00910_Nitrogen_metabolism	10		0.03428		
ST_JNK_MAPK_Pathway	11		0.04583		
HEMO_TF_LIST_JP	24		0.07873	0.16873	
MAP00230_Purine_metabolism	26		0.1239	0.143138	
par1Pathway	10		0.14213		
vegfPathway	19		0.21316	0.235336	
cell_adhesion	34		0.21975	0.176604	
ptdinsPathway	16		0.2293	0.204085	
Electron_Transport_Chain	42				0.195

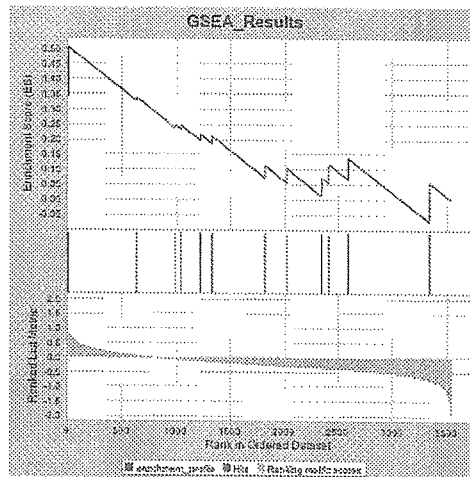
FDR q-value < 0.25 and Normal *P* value < 0.05

## Preneoplastic Lesions Induced in the Colon by PhIP, Trp-P-2, MeAαC and AαC

Compounds	No of rats	Dose (ppm)	ACF	ACs/ACF	Dysplastic ACF
PhIP	10	400	2.7 ± 1.5	2.3 ± 1.2	~1.0
Trp-P-2	4	400	2.8 ± 1.5	3.6 ± 1.0	1.3 ± 1.5
MeAαC	4	400	2.0 ± 1.2	2.3 ± 0.9	1.5 ± 1.3
AαC	4	500	0	0	0

\* N.A.; Data not available

## Enrichment Score and the Leading-edge Subsets in MeA $\alpha$ C vs A $\alpha$ C



ST Interleukin 4 pathway

FDR q-value = 0.25 and Normal P value < 0.001

## Summary

- In order to elucidate the differences of biological properties between Trp-P-2 and other colon carcinogens, we conducted detailed gene expression analysis using GSEA with functional gene set (C2).
- Four gene sets (erkPathway, RAP DOWN, and Inflammatory\_Response\_Pathway, sppaPathway, ) were identified in common as enrichment phenotypes in colon epithelium treated with MeIQ or MeIQx compared to those treated with Trp-P-2.
- Enrichment phenotype in MeA $\alpha$ C-treated colon epithelium compared to A $\alpha$ C is ST Interleukin 4 Pathway (FDR q-value; 0.100).
- Genes involved in cellular stresses and inflammatory responses could have a substantial impact on chemically-induced colon carcinogenesis.

## 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

協力研究者

渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所・病理部第二室長

鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部第三室長

### 研究要旨

トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究課題として、恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析、及びその検証に必要な生物学的基礎研究を行った。研究開始当初、培養細胞、マウス個体(モデルマウスを含む)を用い、多角的に各研究者の専門分野に関連したテーマを設定し、A) アリルハイドロカーボン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作動性化学物暴露時に於ける恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究、B) 恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討、C) HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索、D) 老化促進(SAM) マウスの原因遺伝子の検索、を行った。それにより、広範な実験系に対しての遺伝子発現解析の実効性を確認するとともに、体系的アプローチとして「発生」と「発現」について、そのノウハウを受けて、研究期間の後半に於いて、E) 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、及び、F) 発がんプロモーション過程に於ける甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析、を実施した。

A) AhR 作動性化学物質研究については、TCDD, TCDF, 3-MC, Indigo の4種類の化学物質がマウス肝に於いて共通の遺伝子群の発現変化を引き起こすことを明らかにした。B) 血管新生に関する検討では、*in vivo* に於いて血管新生が亢進した状態を *in vitro* の系で再現することを試み、MCF-7 細胞に対し低酸素条件を付与することで血管新生促進因子の一つ VEGF の発現が上昇することを確認した。一方で、C) HL60 細胞を用いた分化関連遺伝子検索では、複数回の実験で再現性のある結果を得ることは困難であるが明らかとなり、培養細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析に於ける実験条件の厳密な制御の重要性が認識された。D) 老化促進(SAM) マウスの原因遺伝子の検索に於いては、老化促進マウスに於いて発現の高い遺伝子として melanoma antigen が、低い遺伝子として transthyretin が見出された。E) エピ

ジェネティック制御機構障害研究については、胎児神経幹細胞に関する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、及び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)を構築し、それを活用し、経胎盤的に AzaC を暴露した胎児終脳の Percellome 解析を行った。その結果、AzaC によりインターフェロン応答遺伝子群の発現が上昇すること、それが Stat1 遺伝子プロモーターに存在する CpG island の脱メチル化がきっかけになっている可能性があることを明らかにした。F) 発がんプロモーション研究では、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、マイクロダイセクション法とマイクロアレイ法の併用による腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を行った。まず、DHPN 誘発ラット甲状腺発がんモデルを用いて、kojic acid (KA)による発がんプロモーション早期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、腫瘍性細胞増殖や血管新生の活性化、TGF- $\beta$  シグナリングの抑制、カドヘリンや APC の制御破綻を示唆する発現変動が見出された。更に、濾胞上皮限局性過形成 (FFCH)、腺腫、腺がん部位特異的な遺伝子発現解析を行った。その結果、「非腫瘍部」に比し、「FFCH+腺腫」または「腺がん」で5倍以上の発現の増減を認めた遺伝子数は、「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。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。Sufadimethoxine(SDM)を用いて同じ時期での遺伝子発現プロファイルを検討した結果、細胞骨格関連遺伝子のうち、モーター蛋白質あるいはその機能調節に関与する kinesin family member 3C、phosphatase and actin regulator、細胞接着因子である cadherin 2、細胞外マトリックスを構成する microfibrillar-associated protein 2、matrix Gla protein、fibulin 1 等が得られ、甲状腺発がん過程の早期から機能異常を示すものと考えられた。次にラットの代表的な肝発がんプロモーターである phenobarbital (PB)について、発がんプロモーション早期(投与6週目)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、細胞増殖抑制に関与する Wee-1 kinase や Pregnancy-induced growth inhibitor の発現増加が見出され、PBによるプロモーション6週目の肝臓では initiate されている細胞が少なく、主に細胞増殖活性の低い肝細胞から構成されていることを反映していると考えられた。一方で、鉄を介した細胞機能の亢進を示唆する鉄輸送蛋白質 transferrin の truncated form である hemiferrin の発現増加、

Trans-Golgi network で機能する syntaxin-6 や PI4K の発現変動、PI4K と共に phosphoinositide シグナリングの異常を示唆する dual specificity phosphatase の発現減少、IGF-1 の細胞増殖作用に対して促進あるいは抑制に機能する IGFBP-1 の発現減少等が見出された。

#### A. 研究の目的

恒常性維持機構が働く系に外界から化学物質等の影響が加わっても、そのフィードバック機構により Phenotype が容易に得られないことが多い。このような場合に網羅的遺伝子発現解析を用いることで少なくともフィードバック機構に関わる遺伝子群の発現変動という形で化学物質影響のモニターが可能であり、毒性予測の指標とすることができる。本研究では、ホルモンをはじめとする恒常性維持機構の標的であると同時に解毒代謝に関わる恒常性維持の中核であり再生能力に富む肝臓、内分泌制御機構モデルとしての甲状腺及び恒常性維持機構の上位中枢であり非分裂細胞臓器である脳を主要な対象とし、培養細胞、マウス個体（モデルマウスを含む）を用い、恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析、及びその検証に必要な生物学的基礎研究を行った。そのために、具体的な6つのテーマが設定された。

#### A) モデルとしてのアリルハイドロカーボン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作動性化学物質暴露時に於ける恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

現在、医薬品・食品等の安全性評価方法として、動物実験モデルを用いた方法が広く行われている。この方法では、高濃度に於ける生体反応から低濃度に於ける反応を予測することが通常行われている。しかし、恒常性維持機構が働く系に外界から化学物質

の刺激が加わっても、そのフィードバックにより低濃度での生体への影響が捉えにくいことが多い。そして、影響が捕らえられないから障害性が全く無いと言い切れるわけではない。内分泌かく乱化学物質等、このような特徴を持つ化学物質の安全性を評価するためには、評価に値する情報を表現型が現れない状況で取得する必要がある。このためには網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、フィードバック機構に関与する遺伝子群の発現変動の評価方法を開発する必要があり、それに必要な標準化手法・統計解析等の情報処理に関する新手法の開発・応用を行ってきた。そこで、このテーマでは特に恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析手法の確立とその検証に必要な生物学的基礎研究を行うことを目的とし、日内変動遺伝子群の解析、及び Ahr 作動性化学物質 TCDD, TCDF, 3-MC, Indirubin 暴露時に於ける遺伝子発現変動の比較検討を行うこととした。

#### B) 恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討

VEGF は、腫瘍による血管新生に於いて主要な促進因子の一つであることはよく知られている。近年、VEGF に対する中和抗体やその受容体のチロシンキナーゼ阻害剤によりこの VEGF の signaling pathway を阻害することが、腫瘍の分子標的治療方法として注目されている。しかし、結果的に腫瘍が進行



してしまうことから、一つの可能性として、メジャーな VEGF pathway 以外に有効な血管新生 pathway (ex. Endocrine gland-derived VEGF) の存在が考えられる。腫瘍細胞が低酸素下に置かれると、その低酸素刺激によって発現が誘導された低酸素誘導因子 (HIF-1 $\alpha$ ) の作用により VEGF 遺伝子の発現が促進され、VEGF の産生が亢進する。また、外因性因子 (ホルモンや種々の成長因子) によっても、その発現が調整されているという報告がある。さらに、この低酸素刺激と外因性因子による刺激が同時に腫瘍細胞に加えられると、VEGF 産生を相乗的に亢進させる。このような VEGF 産生が亢進した腫瘍細胞では、1) VEGF 産生を相乗的に促進させる機構、もしくは 2) VEGF 産生亢進時に挙動を同じくする他の血管新生 pathway なども影響を受けて働いていることが考えられることから、それらの機構に関連した機能蛋白をコードする遺伝子群も影響を受けて著しく変動する可能性が高いことが予想できる。

本テーマでは、低酸素刺激と VEGF 産生促進効果を有するホルモンや成長因子を培養腫瘍細胞に同時に作用させることで VEGF の産生が亢進した状態、即ち血管新生が活発に起こっている状態を *in vitro* で再現し、その際に発現が変化する遺伝子群をマイクロアレイによって網羅的に探索することを試みる予定である。これによって、VEGF 産生を相乗的に促進させる機構や VEGF 以外に有効な血管新生 pathway に関連した遺伝子クラスターを同定できると考える。以上の結果より、より効果的な分子標的治療薬の開発に展開できる分子情報を得ることを期待した。

### C) HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝

### 子の検索

血液幹細胞は様々な機能を持った血球細胞へと分化し、免疫系をはじめとして個体レベルでの恒常性を維持するために重要な働きをしている。この血球細胞の分化のコントロールは、生体の恒常性を保つ仕組みの中でも非常に重要なものである。そこで、ヒト培養細胞 HL60 細胞の分化モデルを用い、GeneChip を用いた遺伝子発現解析により、血球分化に働く重要な遺伝子を明らかにし、分化のコントロールのメカニズムに迫ることを目的とした。

分化誘導剤として、レチノイン酸及び DMSO を処理した時に、HL60 細胞はいずれも好中球へと分化する。薬剤処理により様々な遺伝子の発現が変化すると予想されるが、それらのうちどの遺伝子の変化が分化と直接的に関わっているのかを知ることは重要であり、分化という同様の事象を引き起こす二つの薬剤を使うことにより両者に共通した変化としての分化に関わる遺伝子を調べるというアプローチをとった。即ち、レチノイン酸及び DMSO により共通して変化する遺伝子を検索することにより、血球分化に深く関与すると考えられる遺伝子群が同定できる。また、これらの遺伝子の動きを経時的に調べるため、薬剤処理時間を変えたサンプリングを行い、遺伝子発現データを解析するとともに、細胞膜のトランスフェリン受容体 (Trf-R) の有無により分化した細胞と未分化な細胞を分離し、それぞれの遺伝子発現を比較することにより、更に詳細な検討を行った。また、HL-60 細胞には、培養の過程でその増殖能が亢進した亜株である HL-60RG 細胞が存在するが、この細胞は DMSO やレチノイン酸による分化誘導能を失っている。

そこで、両細胞に於ける遺伝子発現を比較することにより、分化誘導に重要な役割を果たす遺伝子を探ることができると考え、両細胞での定常レベルでの遺伝子発現の比較を行った。

#### D) 老化促進(SAM)マウスの原因遺伝子の検索

個体の老化は、生体の恒常性維持機構の破綻として起こると考えられる。老化のメカニズムについては、活性酸素による傷害や、遺伝子変異の蓄積など様々な説があり、各組織に於いて異なるメカニズムが働いている可能性もある。組織レベルでの老化、すなわち細胞機能の退化に伴い様々な遺伝子の発現が変化すると考えられる。また、これら老化の引き金となる遺伝子変化を調べることは、生体の機能維持、抗老化作用を考える上で重要である。これらの検討を行う上で、マウスに於ける早期老化変異体である老化促進マウス(SAMマウス: Senescence Accelerated Mouse)の利用が有用であると考えた。SAMマウスは京都大学胸部疾患研究所の竹田教授らがAKR/Jと不明の系統との交雑から偶発的に発生した老化が加速的に進行する個体同士をかけあわせて確立した系統である(D図1)。SAMP1-11などのsublineがあり、いずれも早期に老化兆候を示すが、その主な症状は、骨粗鬆症や、学習記憶障害などの差がある。本研究では、学習記憶障害と行動生理学障害を示すSAMP-8について、その対照となる正常系統であるSAMR-1との間で、同じ8週齢のマウス大脳の海馬における遺伝子発現をGeneChipを用いて比較することにより、海馬での機能低下に関わる責任遺伝子を同定することを目的とした。

#### E) 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

個体を構成する細胞はその種類に応じて異なる特性を示すが、ゲノムDNAは同じである。特性の違いは遺伝子発現パターンの差異によって生じ、エピジェネティック制御機構がその基盤となる。エピジェネティック制御機構には、ゲノムDNAの修飾を介するものや、クロマチンを構成するヒストン蛋白質の修飾を介するものがあり、どちらも化学物質による影響を受けることが知られている。よって、個体が外来性化学物質に対抗して恒常性を維持するためには、このエピジェネティック制御機構が適切に機能し、細胞の特性が維持されることが必須である。

エピジェネティック制御機構の中でも、ゲノムDNAの修飾を介する制御は、遺伝子発現のオンオフを恒久的に制御する特に重要性の高い制御機構であり、シトシン塩基のメチル化修飾を介することが知られている。このシトシン塩基のメチル化修飾は、臓器の形成・機能に必要な異なる特性の細胞を生み出す「幹細胞」の機能制御にとって必須である。殊に、神経幹細胞にこの異常が誘発されると、適切な神経系細胞の供給が行えなくなり、中枢神経系に恒久的な影響が残る可能性がある。しかし、メチル化修飾を攪乱する化学物質は、その毒性学的な重要性にもかかわらず、分子メカニズムの詳細は不明な点が多く、分子毒性基盤の整備は未だなされていない。

そこで、マウス胎児由来の神経幹細胞をモデルとして用い、シトシン塩基脱メチル化剤として知られる5-アザシチジン(AzaC)を神経幹細胞に暴露することで、神経幹細胞

の機能制御におけるDNAメチル化の役割を、我々の開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析の結果を通して検討し、メチル化修飾を攪乱する化学物質の神経幹細胞への影響の分子メカニズムを解明することを目的とした。

#### F) 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

医薬品として開発された化学物質の中にしばしば見受けられる発がん物質は、各種遺伝毒性試験で明らかな遺伝子傷害性を示さず、その機序が殆ど不明な非遺伝子傷害性のものが多い。

発がんの初期過程は、イニシエートされた細胞が組織臓器の構成成分としての恒常性を破綻させて、自律性の増殖形質を獲得することを起点としているが、その細胞環境に多大な影響を受ける。変異原性の知られていない医薬品等の動物に対する長期投与でしばしばみられる発がん性は、このような恒常性の破綻によって生じるものが殆どであると考えられているが、化学物質固有の生体反応性から、がん化に至る反応性を弁別するのは、初期病変と発がんの母地を区別して解析する必要があるため、現在まで殆ど研究が進んでいない。

そこでこのテーマでは、がん病変とその発生母地での網羅的遺伝子発現解析を行い、投与された化学物質による発がん過程特異的に誘起される遺伝子群の同定を行う。また、発がんに寄与しない化学物質特異的な遺伝子発現と弁別するために、イニシエーションの有無での遺伝子発現プロファイルと比較し、がんの発生に必要なプロファイルを同定する。このプロファイルを基に発がんに寄与する主要なメカニズムを同定する。標的臓

器は肝臓と甲状腺とし、それぞれについて強力な発がんプロモーション作用を示す phenobarbital (PB), kojic acid (KA)を用いる。部位特異的な発現解析手法として、独自に開発したパラフィン包埋切片中の微量組織からの定量的 RNA 発現解析を可能とするメタカーン固定法を用い、マイクロダイセクション法によりがん病変(あるいは前がん病変)と非がん部を分けてマイクロアレイ解析を行う。KA は Aspergillus, Acetobactor, Penicillium 等のカビにより生成される代謝物質で、日本では古くからみそや酒の発酵食品の生産に用いられてきた。本物質は静菌作用の他、シイタケチロシナーゼやポリフェノールオキシダーゼの阻害作用を有し、生エビやカニ等の変色防止の他、美白剤として用いられてきた。この物質は、抗甲状腺作用を示すが、その作用は、甲状腺でのヨード取り込みと有機化の抑制に起因した甲状腺ホルモンの合成抑制によることが報告されている。また、本剤はラット甲状腺に対し発がん性を示し、ラット甲状腺二段階発がんモデルに於いて、イニシエーターとして

N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を投与した後、本剤の連続投与により、4週目から甲状腺濾胞上皮細胞の過形成や腺腫が誘発され始め、その進展には血清中の高い甲状腺刺激ホルモン(TSH)レベルが重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、その進展過程での分子機序は殆ど解明されていない。そこでまず KA 誘発甲状腺発がん機序を解明するために、マイクロアレイ法による発がんプロモーション過程早期(投与4週目)に特異的に発現変動する遺伝子群の同定を行い、次いで、マイクロダイセクション法とマイクロアレイ法の併用による腫

瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定に着手した。また、別の研究班で遂行中の研究である、ラットに抗甲状腺作用を有することが知られている sulfadimethoxine (SDM)によるラット甲状腺発がんプロモーション作用特異的に発現の増減する遺伝子と共通するものを検索し、抗甲状腺作用に起因するその発がん標的遺伝子を選別した。また、PBについては、近年、その受容体である CAR が同定され、PB による発がん作用は CAR 依存性であることがわかってきたものの、実際の肝臓での発がんメカニズムに関与する遺伝子に関する検討は殆どなされていない。そこで、本研究では、ラット肝中期発がん性試験法を用いて、そのプロモーション作用検出のエンドポイントであるプロモーション 6 週の時点で、PB により最終的には肝細胞をがんに至らしめる、恒常性破綻メカニズムの探索を行った。最後に、KA によるプロモーションの結果生じた甲状腺の増殖性病変を対象として、マイクロダイセクション法を利用して、特異的に発現変動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行った。

## B. 研究の方法

### A) アリルハイドロカーボン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, Ahr)作動性化学物暴露時に於ける恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

〈ヒトがん由来培養細胞株を用いた TCDD、TCDF の増殖阻害に与える影響の検討〉

ダイオキシン類暴露によりどのような応答を示すかを検討するために「文部科学省がん特定 総合がん スクリーニング委員会」に於いて実施されているヒトがん細胞パネル

を用いた抗がん剤スクリーニングを応用し、これらの化合物のプロファイリングを行った。このスクリーニング系は肺がん 7 系、胃がん 6 系、大腸がん 5 系、卵巣がん 5 系、脳腫瘍 6 系、乳がん 5 系、腎がん 2 系、前立腺がん 2 系及びメラノーマ 1 系からなるヒトがん由来培養細胞株 39 系を用いて、各細胞株において 48 時間の化合物処理の前後におけるスルホローダミン B (SRB)による比色定量により測定した総タンパク量の変化を指標として 50%増殖阻害濃度を算出し、細胞の増殖阻害を評価する系である。ダイオキシン類より、TEF (Toxic equivalence factor, WHO) 値が 0.1 以上であり、現実的に 2,3,7,8-TCDD との比較投与実験が可能と考えられる数種類の PCDD、PCDF を検討したところ、TCDF が特異的反應を惹起することが判明したため、ヒトがん由来培養細胞株 (TCDD 非感受性、TCDF 感受性)及びヒトがん由来培養細胞株 (TCDD 非感受性、TCDF 非感受性)における感受性の差の要因となっている遺伝子を検索する目的で Affymetrix GeneChip (Hu133A)を用いた包括的発現遺伝子解析を実施した。標準化したデータにより実験サンプルに対して、ピアソン相関係数を距離とし、平均連結法による階層的クラスタリングを行った。また、各細胞株における TCDD、TCDF 処理による遺伝子発現変動に関して解析を行った。

### 〈動物実験〉

12 週齢雄の C57BL/6 マウスに 4 種類の Ahr 作動性化学物質を下記に示す濃度で強制経口投与(各群 3 匹、溶媒:コーンオイル)し、2, 4, 8, 24 時間暴露後に肝臓をサンプリングした。

・ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)