

D): 1, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$

• 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF):

1, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$

• 3-methylcholanthrene (3-MC): 10, 30,

100  $\text{mg}/\text{kg}$

• Indigo: 30, 100, 300  $\text{mg}/\text{kg}$

#### <RNA の分離精製>

国立衛研毒性部で分担研究者らが開発した”Percollome”手法に基づき検体を処理した。すなわち、組織を分離後すみやかに RNAlater (Ambion 社)により RNase を不活化した。RNAlater 除去後、RLT buffer (Qiagen 社)を用いて組織破碎液を調製した。DNA 定量用蛍光試薬 Picogreen を用いて破碎液中の DNA 量を測定し、DNA 量に応じて Spike RNA cocktail (Bacillus RNA 5 種類の Mix)を添加した。TRIzol を用いて粗抽出し、RNeasy Kit により精製し、Total RNA を得た。精製した total RNA は電気泳動により品質を確認した。

#### <GeneChip 解析>

アフィメトリクス社のプロトコールに従い、total RNA 5  $\mu\text{g}$  を T7 プロモーターが付加されたオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し、cDNA を調製した。この cDNA を基に第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA polymerase (Enzo 社)によりビオチン化 CTP, UTP の存在下 cRNA を合成した。二本鎖 DNA 及び cRNA 精製には GeneChip sample cleanup module (アフィメトリクス社)を使用した。得られた cRNA を 300-500bp になるように断片化し、ハイブリダイゼーションコントロールを添加し、GeneChip ターゲット溶液とした。GeneChip は Mouse Genome 430 2.0 Array を使用した。45°C、18 時間のハイブリダイゼーション後、phycoerythrin (PE)ラベル

streptavidin にて染色し、専用スキャナーで測定した。測定したデータの標準化は Spike RNA の測定値を基に各遺伝子のシグナル値を細胞 1 個当たりのコピー数に変換する”Percollome”手法を用いて行った。解析は主に同様に国立衛研毒性部で開発した MF software を用いて行った。

#### 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 産生亢進に伴って動く血管新生関連遺伝子の探索を行うために、*in vitro* VEGF 産生亢進モデルの確立を目指した。*In vitro* モデルは、株化されたヒトの培養腫瘍細胞を低酸素下で培養し、同時に VEGF 産生促進因子を添加することにより確立した。

#### <細胞培養>

培養細胞は、ヒトの乳癌から樹立された細胞株 MCF-7 を用いた。MCF-7 は、6 穴培養プレートでフェノールレッド・フリー・ダルベッコ改変イーグル培地 (10% ウシ胎児血清 (FBS) と 2mM Glutamine を含む) を用いて培養した。サブコンフルエント (90%~) の状態になった時に、Dextran-charcol 処理をした FBS を 0.2% 含む培地と交換した。

#### <血清の Dextran-charcol 処理>

血清は、56°C、30 分で非働化後、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過滅菌したものを用いた。はじめに、Charcol (1g, Norit A) と Dextran T-70 (0.1g, MW : 70400, Pharmacia) を 100ml の蒸留水に溶解した。これを 1000g で 10 分間遠沈した後、上清を捨て、沈殿した Charcol に 100ml の血清を加えた後、これを 40°C で 30 分間攪拌し、10000rpm で 15 分間遠沈した。この Charcol 処理をもう一度繰り返した後、10000rpm で 15 分間遠沈し、これを濾過滅菌して培地に加えた。処理済み培地は、使用するまで -20°C で保管した。

#### <VEGF 産生亢進環境の準備>

Dextran-charcol 処理をした FBS を含んだ培地を用いて 48 時間培養後、低酸素環境下 (2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) と定常酸素環境

下(20%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、37°C)に移し、VEGF 産生促進因子と 24 時間作用させた。VEGF 産生を低酸素下で相乗的に増加させる外因性因子としては、Estradiol 17 β (E2) (SIGMA、10nM)と Transforming growth factor Beta 1 (TGF-β 1) (R&D SYSTEMS、0.3ng/μl)を用いた。E2 は、1mg をエタノール 10ml に溶解し(367μM)、ストック溶液として 4°C で、TGF-β1 は、4 mM HCl に 0.1%HSA を加えたもので 2μg/ml に希釈したものをストック溶液として-20°Cで使用時まで保存した。低酸素環境は、BINDER 社の CO<sub>2</sub> インキュベーターCB150 を用いて窒素を充填することにより準備した。

<VEGF mRNA の測定>

低酸素下、VEGF 産生促進因子を添加してから 24 時間後に QIAGEN 社の RNeasy Mini Kit と QIAshreader カラムを用いて total RNA の抽出を行った。VEGF 産生のモニターは、ヒト VEGF mRNA の部分配列(48-156、109 bp)を特異的に増幅するプライマーを設計し、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いてリアルタイム RT-PCR ( Applied Biosystems 、 7000Sequence Detection System)によって行った。スタンダードは、標的配列を含んだヒト VEGF mRNA の部分配列(38-391、354 bp)を RT-PCR により増幅し得られた PCR 産物をテンプレートとして希釈して用いた。抽出した total RNA 濃度は、RiboGreen RNA quantitation reagent (Molecular Probes)を用いて測定し、各サンプルから 100ng の total RNA を用いて VEGF mRNA の発現量を測定した。

#### C) HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索

実験のスキームを C 図 1 に示す。ヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL-60 細胞にレチノイン酸及び DMSO を処理し、48 時間後に分化

した細胞をトランスフェリン受容体(Trf-R)の有無を指標に、細胞分離装置 AutoMacs と抗体を用いて分離した。各サンプリング時点での細胞 1 時間後と 6 時間後のデータに関しては、独立した実験を繰り返し、再現性を確認した。また、HL-60 細胞とその亜株である HL-60RG 細胞の遺伝子発現比較を行うため、対数増殖期及び定常期の各細胞より total RNA を抽出し、定法に従って GeneChip 解析を行った。チップデータの解析には、GeneSpring ソフトウェアを用い、遺伝子の発現強度に応じて漸次的に発現比の有意水準を設定することにより、ステップワイズに遺伝子の選択を行った。

#### D) 老化促進(SAM)マウスの原因遺伝子の検索

8 ヶ月齢 SAMP8、SAMR1 各々 5 匹から脳の海馬を摘出し 5 匹分をプールした。totalRNA を抽出し RT-PCR により cDNA とし、T7 プロモーターを用いた *in vitro* transcription 法によりビオンチンラベルされた cRNA を合成し、断片化した後 GeneChip MOE 430A アレイにハイブリダイズさせた。Fluidic Station にて洗浄、フィコエリスリンによる染色を行った後、専用の GeneChip スキャナーでターゲットのシグナルを検出した。得られたデータは解析ソフト GeneSpring を用いて解析した。その後、変化の見られた遺伝子について real time PCR によって遺伝子発現変化を確認した。

#### 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

<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>

本データベースは、マウス(C57BL/6CrSlc)

胎生 10.5 日から 16.5 日まで連日胎児終脳を、雌雄を分けて採取し、国立衛研・毒性部に於いて分担研究者らが開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析法によってデータを取得し構築した。サンプルは各群 3 サンプルとし、DNA マイクロアレイはアフィメトリクス社 GeneChip Mouse Genome430 2.0 (約 45000 プローブセット)を用いた。

#### <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>

本データベースは、胎児発達に伴い神経幹細胞の分化能が成熟していくことを踏まえ、基盤データベースとして発生時期の異なる胎児脳の神経幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し構築したものである。具体的には、神経幹細胞を高選択的に培養系に移し、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ニューロスフェアを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 誘導が起こらない量を設定し、その量をはさんだ前後の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 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, 遺伝子発現データを時間、投与量、発現コピー数の3次元グラフに描き、同様の変化パターンを有する MF Surface 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。

#### 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

##### <KA による甲状腺発がん早期過程での検討>

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、その他の群については一群 8 匹ずつ計 6 群に群分けした(F 図 2)。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一回実施した。KA 投与 4 週後に全動物をジェチルエーテル吸入麻醉下で放血殺し、RNase 除去した器具で上皮小体や結合組織など甲状腺周囲組織を除去し、両側の甲状腺を採取した。甲状腺の重量を測定後、無処置群、DHPN 単独投与群については 4 個体分の両側甲状腺をまとめ、計 4 サンプルを遺伝子解析用として RNA later (Ambion)に浸漬させ、残り 4 個体の両側甲状腺を形態観察用にホルマリン固定した。その他の群に

については、各個体の両側の甲状腺を頭側、尾側に二分し、頭側をホルマリン固定、尾側をRNA later に浸漬し個体ごとに採材した。ホルマリン固定材料は、定法に従い切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色して病理組織学的検索を実施した。遺伝子解析用サンプルは、4°C一晩RNA later に浸漬した後、-80°Cで保存した。Total RNA 抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて行い、回収量はRiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。さらに、RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies)を用いて、回収した total RNA のクオリティーを確認した。各群から4サンプルを用意し、回収した1  $\mu$ g の total RNA について MessageAmp<sup>TM</sup> II aRNA kit (Ambion)を用いて1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 ver.5.1 (Silicon Genetics)を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、無処置対照群と DHPN 単独群、2.0% KA 群あるいは DHPN+2.0% KA 群と比較して2倍以上、あるいは1/2倍以下に変動した遺伝子について検索した。それらについてさらに DHPN+2.0% KA 群と DHPN 単独群または 2.0% KA 群間で比較し、DHPN+2.0% KA 群に於いて特異的に2倍以上、あるいは1/2倍以下に変動した遺伝子数を検索した。さらに、KA の用量に依存して DHPN 単独群に比して2倍以上、あるいは1/2倍以下に変動した遺伝子について検索し、それらを同定した。

KA の用量に依存して発現変動した代表

的な遺伝子(5 遺伝子;後述)については、マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、リアルタイム RT-PCR を実施した。方法としては、まず、前述の方法により得た total RNA を1  $\mu$ g ずつ、無処置群、DHPN 単独群については各4サンプル、DHPN+2.0% KA 群については6サンプル用意し、High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems; ABI)を用いて逆転写反応を実施した。得られた cDNA 溶液を25倍希釈したものを5  $\mu$ l 用いて、ABI 社の PRISM7000 により、TaqMan Probe Detection system に従い、リアルタイム PCR を実施した。PCR 反応液として、前述の cDNA 溶液、TaqMan Universal PCR Master Mix (ABI) と各遺伝子特異的なプライマー、プローブ(いずれも ABI)を用意した。プライマー、プローブは、ハウスキーピング遺伝子の検索のために、hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)については、以前実施した別の実験 (H. Takagi et al. Toxicol Appl Pharmacol. 208(2):127-136, 2005)で用いた特異的プライマーと TaqMan プローブ(ABI)を、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)については TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (ABI)を用いた。その他5 遺伝子(ABCA1, Ddah1, Fbp2, Ptprn, Rrad;結果参照)の検索については、Gene Expression Assay (ABI)を用いて、マニュアルに従ってリアルタイム PCR を実施した。PCR 条件は、いずれの遺伝子とも、50° C, 2 min; 95° C, 10 min の後、95° C, 15 sec→60° C, 1 min を50 サイクルとした。各遺伝子の発現量を、ABI 社の User Bulletin #2 の Standard Curve Method に従って解析し、各遺伝子と2種の

ハウスキーピング遺伝子との相対値を求め、それぞれについて無処置群、DHPN 単独群と DHPN+2.0% KA 群間で比較した。

#### 〈PB による肝発がん早期過程での検討〉

動物は、5 週齢の雄性 F344 ラット(日本チャールズ・リバー)を用い、一群 12 匹ずつ計 6 群に群分けした(F 図 3)。一週間馴化した後、DEN を投与する全群には DEN を 200 mg/kg、無処置群と PB 単独投与群には生理食塩水を相当量単回腹腔内注射した。DEN 投与 2 週後、PB 単独投与群と二段階発がんモデル群には PB を各々 500 ppm (PB 単独投与群)、56, 167, 500 ppm (DEN+PB 群)の用量で混餌投与した。DEN あるいは PB 単独投与群、DEN+PB 投与各群は、実験開始 3 週目に 2/3 部分肝切除を実施し、無処置群には sham operation を実施した。無処置群と DEN 単独投与群には基礎飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母)を自由摂取させた。PB 投与 6 週後に全動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、RNase 除去した器具で肝臓を採取した。肝臓の重量を測定後、無処置群については内側葉の肝組織を、肝部分切除を施した他の群では切除残余肝組織の一部を遺伝子解析用として RNA later (Ambion)に浸漬させた。DEN を投与した二段階発がんモデル各群で、肝発がんの発指標である glutathione-S-transferase, placental form (GST-P)陽性細胞巢の免疫組織染色用に肝臓の 2 スライスを、定法に従いホルマリン固定・パラフィン包埋した。GST-P の免疫染色は MBL 社のウサギ抗血清を用いて、ストレプト ABC 法で行い、DAB 発色し、陽性肝細胞の数及び面積の定量解析を IPAP (住化テクノサービス)にて行った。遺伝子解析用サンプルは、4°C 一晚 RNA

later に浸漬した後、-80°C で保存した。

Total RNA 抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて行い、回収量は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。さらに、RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies)を用いて、回収した total RNA のクオリティーを確認した。各群から 4 サンプルを用意し、回収した 5 µg の total RNA について BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling kit (Enzo)を用いて 1 回増幅とラベリングを行った。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。遺伝子発現データについて、PB による発がんに関与しない遺伝子発現を除外するために、DEN によるイニシエーション特異的な遺伝子発現プロファイル及び PB 投与のみに起因するプロファイルと比較し、発がん過程に特異的な遺伝子群を同定した。方法としては、GeneSpring ver.7.2 (Silicon Genetics)を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、明らかな PB の発がん用量を投与した DEN+500 ppm PB 群特異的に変化する遺伝子群を、イニシエーション単独あるいは 500 ppm PB 単独投与特異的に変化する遺伝子群と区別し、DEN 群に比し有意に 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現がみられる遺伝子群を選別した。具体的には、DEN+500 ppm PB 群で変化する遺伝子群のうち、DEN あるいは PB 群でも同様の発現変化を示す遺伝子群を除外した。次いで、DEN+500 ppm PB 群で有意に発現変化した遺伝子群を検索するために、発現の信頼性を示す flag が DEN 群、DEN+500 ppm PB 群、500

ppm PB 群の 12 サンプル全てに於いて absent であった遺伝子を除外し、さらに、DEN+500 ppm PB 群で DEN 単独投与に比べ 2 倍以上、あるいは 0.5 倍以下の発現がみられる遺伝子については、DEN+500 ppm PB 群の 4 サンプル中 3 サンプルの flag が present であったものを選択した。次いで、flag で選抜された DEN+500 ppm PB 群の遺伝子について One-way ANOVA による多群比較を行い、DEN 群との間に有意差が認められた遺伝子群を選抜した。さらに DEN+56 ppm PB 群、DEN+167 ppm PB 群について、DEN+500 ppm PB 群と同様の方法で遺伝子を選択し、DEN+500 ppm PB 群と共通に変化する遺伝子群、または無関係に変動する遺伝子群を選択した。発現が DEN+500 ppm PB 群と共通に変化するもののうち、DEN+56 ppm PB 以上の群または DEN+167 ppm PB 以上の群で有意に変化する遺伝子群を同定した。

マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、代表的な発現増減遺伝子について ABI 社の PRISM7900 を用いて、total reaction volume を  $50 \mu\text{l}$  としてリアルタイム RT-PCR を実施した。発現増加したものとして、Serine protease inhibitor, kazal type 1 (Spink1), Pregnancy-induced growth inhibitor (Okl38) の 2 遺伝子、発現減少したものとして Solute carrier family 34, member 2 (Slc34a2), Dual specificity phosphatase (Dusp1), Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1) の 3 遺伝子を選択し、TaqMan Probe detection system を利用して解析を行い、PCR 条件は KA による甲状腺発がんの実験のものと同じとした。発現値のノーマライゼーションはハウスキーピング遺

伝子である HPRT ないし GAPDH の発現値で行った(方法前述)。

#### <KA 誘発甲状腺腫瘍での検討>

前述の KA による甲状腺発がんの実験で、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 (F 図 2)。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  $4^{\circ}\text{C}$ 、1 時間ずつ、計 2 回浸漬し、3 回目の液交換後、 $4^{\circ}\text{C}$  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、 $60^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $15 \mu\text{m}$  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ガラス (Leica) に用意し、 $37^{\circ}\text{C}$  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個体分をまとめて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  $\mu$ 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aRNA0.5  $\mu$ 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  $\alpha$  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もしくは胃内強制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、研究所の利用規程に従った。

## C. 研究結果

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

### A-1 ヒトがん由来培養細胞株における遺伝子発現変動の網羅的解析

TCDD 非感受性 TCDF 感受性株(A株)および TCDD 非感受性 TCDF 非感受性株(B株)における TCDD, TCDF 処理による遺伝子変化の検討を行った。DMSO (vehicle)、TCDD、TCDF 処理した細胞株 A、B を遺伝子発現データにより階層的クラスタリングを行ったところ、A 図 1(I)に示すように細胞株 A 及び B は完全に二つのクラスターに分かれた。また、TCDD 及び TCDF により処理した実験サンプル同士もサブクラスターを形成した。ただし、 $10^{-5}$  M TCDF 処理されたサンプルが細胞株 A のクラスターで一つ大きく離れていた。これは  $10^{-5}$  M TCDF により処理した細胞株 A においては、培養時の形態観察等により細胞死が始まっていたことが示されており、この乖離の原因であると考えられた。これらのことから、遺伝子発現により2種類の細胞株の特性を分類できること、また、TCDD、TCDF による遺伝子発現の変化は、TCDF 感受性・非感受性の細胞株に関わらず多くの部分が共通していることが示唆された。

次に TCDD, TCDF によって発現が変化する遺伝子について検討を行った。解析対象遺伝子は 22284 遺伝子中、全ての実験サンプルにおいて発現がない、もしくは Absent である遺伝子を除いた 13393 遺伝子であった。これらの遺伝子のうち、細胞株 A に於いて TCDD 処理により 2 倍以上誘導された遺伝子数は 1835 遺伝子であり、TCDF により 2 倍以上誘導された遺伝子数は 1407 遺伝子であった。また、共通して誘導された遺伝子

は 46 遺伝子であった。A 図 1(II)に示すように、細胞株 A において共通して誘導される遺伝子の中にはダイオキシン類によって誘導されることが知られている遺伝子である CYP1B1 や CYP1A1 など含まれており、ヒトがん由来培養細胞株において GeneChip を用いてダイオキシン類に対する遺伝子発現変動を観察できることがわかった。また、同様に細胞株 B に於いて TCDD、TCDF によって誘導される遺伝子数はそれぞれ 136 遺伝子、756 遺伝子であり、共通して誘導される遺伝子数は 113 遺伝子であった。これらの遺伝子の中には細胞株 A と同様に CYP1A1 及び CYP1B1 が含まれていた。CYP1A1 及び CYP1B1 のように両細胞株に於いて TCDD、TCDF 双方により誘導が確認された遺伝子数は NAD(P)H dehydrogenase、quinone 1 をコードしている NQO1 遺伝子や aldehyde dehydrogenase 1A3 をコードしている ALDH1A3 遺伝子など 30 遺伝子であった。また、TCDF 感受性細胞株 A に於いてのみ、TCDD では誘導されないが TCDF によって誘導される遺伝子数は 553 遺伝子であり、この中には TCDF 感受性を示す要因となる遺伝子が含まれていると考えられる。さらに、細胞株 A でのみ TCDD、TCDF 双方により 2 倍以上誘導される superoxide dismutase 1 をコードしている SOD1 遺伝子などが確認された。

次に TCDD、TCDF によって発現が抑制される遺伝子について検討を行った。細胞株 A において、TCDD 処理によって 2 分の 1 以下に発現が抑制される遺伝子数は 121 遺伝子であり、TCDF 処理によって抑制される遺伝子数は 143 遺伝子であった。共通して抑制される遺伝子数は 17 遺伝子だった。同



様に、細胞株 B において、TCDD 処理によって 2 分の 1 以下に発現が抑制される遺伝子数は 3776 遺伝子であり、TCDF 処理によって抑制される遺伝子数は 500 遺伝子であった。共通して抑制される遺伝子数は 411 遺伝子だった。細胞株 A、B 両方で TCDD、TCDF 双方によって誘導される遺伝子は complement Factor H-related protein 1 をコードしている FHR1 遺伝子及び lectin、galactoside-binding、soluble、2 (galectin 2) をコードしている LGALS2 遺伝子の 2 遺伝子であった。さらに、TCDF 感受性細胞株 A においてのみ、TCDD では抑制されないが TCDF によって抑制される遺伝子数は pleckstrin homology domain containing、family A (phosphoinositide binding specific) member 1 をコードしている PLEKHA1 や GABA(A) receptor-associated protein like 1 をコードしている GABARAPL1 をはじめとした 121 遺伝子であり、この中にも TCDF 感受性を示す要因となる遺伝子が含まれている可能性があると考えられる。

#### A-2 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おける恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究 i Ahr作動性化学物質投与マウス肝臓の遺伝子発現データの取得

Ahr 作動性化学物質を強制経口投与(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。この時、肝臓重量は 2 時間から 4、8 時間にかけて減少し、24 時間に元のレベルに戻った。サンプリングした肝臓から、total RNA を取得し、GeneChip Mouse Genome 430 2.0

Array (アフィメトリックス社)により、45,101 プローブセットについて網羅的遺伝子発現解析を行った。当部で開発した“Percellome”手法に基づき、標準化を行った。

これに伴い、バックグラウンドの蛍光値、コントロール遺伝子の発現値、total RNA を増幅する際の増幅効率、遺伝子発現値の頻度分布等、各種にわたるクオリティーコントロールを実施した。また、遺伝子発現データの再現性をスキッタープロットにより検討した。その結果の一例を A 図 2 に示す。同一群に属する 2 匹のマウスの発現量をそれぞれ X、Y 軸にプロットすると“Percellome”手法により標準化したデータは  $y=x$  の直線上に分布し、非常によい再現性が得られた。尚、本テーマで施行した 4 種類の Ahr 作動性化学物質の実験は、それぞれ異なる時期に行っている。そこで、同じ暴露時間の溶媒群に属する 3 匹のマウスの遺伝子の発現量の平均値をとり、各々の化学物質の遺伝子の発現量を X、Y 軸にプロットすると  $y=x$  の直線上に分布する(A 図 3)。これは、異なる時期に実験を行っても同一条件での遺伝子発現は同様の値をとっていることを示しており、4 種類の化学物質間の直接的な比較が可能であることを示していると考えられた。

このように、“Percellome”手法による標準化を行うと、発現量を通常用いられている「基準量に対する比」ではなく、「絶対量」で表すことができ、絶対量でのデータ比較解析が可能になる。以降では、この“Percellome”手法で標準化したデータを解析に使用した。

#### ii Circadian rhythm

恒常性を維持する機構の一例として、化学物質投与などとは非依存的な circadian rhythm について解析を行った。哺乳類には視床下部の視交叉上核(SCN)に概日性リズムを発振する中枢が存在するが、肝臓等の末梢組織にも SCN での遺伝子発現調節と同様の現象がみられ、ローカルな時計として機能しているが知られている。この恒常性維持機構には、A 図 4(I)に示すように Bmal1, Clock, Per, Cry ファミリーなど多くの遺伝子が複雑に関連していることが報告されている。これら、Circadian rhythm に関する代表的な遺伝子の発現パターンを検討した結果、TCDD 投与について、投与量に関係なく、8 時間時に Dbp, Per, 及び Cry の発現上昇、Clock 及び E4bp4 の発現低下が観察された(A 図 4(II))。

次に、日内変動を示す遺伝子をリストアップし(A 表 1)、4 種類の AhR 作動性化学物質(TCDD, TCDF, 30MC, Indigo)の暴露に伴う発現変化を検討した。その結果、これらの遺伝子は、4 種類の化学物質いずれを暴露しても日内変動を示した(A 図 5)。この中に、日内変動を示しながら、化学物質による発現誘導を示す遺伝子も存在した。

### iii AhR を介して発現が誘導される遺伝子群

TCDD 等の AhR 作動性化学物質は、肝臓に於いて AhR を介して、A 図 6(I)に示すような遺伝子発現応答を引き起こすことが報告されている。そこで、これら AhR を介して発現が誘導されることが既知の遺伝子について発現パターンを解析した。Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1)は TCDD により、2 時間から濃度依存的な誘導がみられ、8

時間後に発現量は低用量でも飽和に達したが、24 時間まで誘導が持続した(A 図 6(II))。

ダイオキシン類の毒性は TCDD を1とした毒性等価係数(TEF)で評価されており、例えば、TCDF の TEF は 0.1 である。Cyp1a1 の誘導を 4 種の AhR 作動性化学物質について検討したところ、A 図 7 に示すように、TCDD, TCDF の発現誘導パターンは TEF にほぼ従ったものであった。3-MC は TCDD と同様に 2 時間から濃度依存的な誘導がみられたが、8 時間後に発現はピークを示し、24 時間後には発現の低下が見られた。Indigo は 4~8 時間後に発現のピークを示し、24 時間後には元のレベルに戻った。さらに、Cyp1a1 同様、Ahr を介して発現が誘導される Cyp1a2 (A 図 8)、Cyp1b1 (A 図 9)についても 4 種類すべてに於いて誘導が確認された。TCDD により早期に誘導・抑制が起こる遺伝子群について検討した結果、2, 4 時間と早期に発現のピークを迎える遺伝子として Serpine1, EST (AW558171), Hnf4, Oncogene-related (OR), Rassf1, Sap30, Txnip, Zfp361l, Gadd45b, Nfe2l2 の 10 遺伝子を見出した(A 図 10)。これらの遺伝子の多くが、他の 3 種類の AhR 作動性化学物質に於いても同様に誘導されることが観察された。

### 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

B 図 1 に示したように、恒常性維持機構が腫瘍により破綻したために起こる血管新生に関する研究として、腫瘍細胞から血管新

生因子 VEGF の産生が亢進するメカニズムを網羅的遺伝子発現解析により検討した。

低酸素とE2またはTGFによる同時刺激の影響による VEGF の発現量の変化を観察するために行ったリアルタイム RT-PCR の結果は、定常酸素下で何も作用させなかった群の平均値(各群 4well)で各群の平均値を割ったもので表した。VEGF mRNA の発現量は、低酸素刺激(2%)によって、定常酸素濃度下(約 20%)と比べて 1.96 倍増加していた(B 図 2-(I))。これに、Estradiol の作用が加わると、定常酸素濃度下と比べて VEGF mRNA の発現において 4.3 倍の増加が見られた。この効果は、過去に報告されているように、Estrogen Receptor の特異的なアンタゴニストである ICI182780 (TOCRIS、1 $\mu$ M)によって抑制されなかった。一方、低酸素下の MCF-7 に TGF- $\beta$ 1 を作用させた群では、低酸素下では 3.86 倍の発現量の増加が観察された(B 図 2-(II))。他に、reference gene としてヒト glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) やヒト acidic ribosomal phosphoprotein P0 (RPLP0) の発現量を測定する系を準備した。GAPDH のプライマーは、GAPDH mRNA の部分配列(24-95、72 bp)に対して、RPLP0 のプライマーは、RPLP0 mRNA の部分配列(119-189、71 bp)に対してそれぞれ設計した。各スタンダードは、その標的配列を含む部分配列を、RT-PCR を用いて増幅したものをテンプレートとして希釈して用いた。GAPDH は、本実験では低酸素刺激や外因性因子の影響を受けてその発現量が変化し、B 図 2 で見られるような VEGF mRNA の発現量の変化と似たパターンでその発現量の変化が観察された。一方、RPLP0 は、GAPDH

と異なり、各群でほぼ一定の値を示した。

### C) HL60 細胞を使った分化に関する遺伝子の検索

レチノイン酸及び DMSO 処理による遺伝子発現強度を、1,6,24,48 時間後における未処理細胞での遺伝子発現強度と比較することにより、それぞれの遺伝子に関する発現強度比を算出した。薬剤処理により、発現の変化する遺伝子数が多く見つかったが、分化した細胞にて発現の上昇している遺伝子には、イムノグロブリンやインターロイキン関連遺伝子が多く含まれており、分化に伴う機能変化として注目される。また、CD44 をはじめとして、6 種の血球膜抗原の発現も亢進した。さらに S-100 カルシウム結合蛋白群は、A12、A9 が発現上昇したのに対し、A8 は減少するという興味深い挙動を示した。

次に HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の比較に関して検討を行った結果、発現差のある遺伝子群を検出できた(C 図 3)。対数増殖期及び定常期の両方で発現の差があった遺伝子は 176 あり、これを Affymetrix 社から得られる gene ontology の情報に基づいて分類したものを、全体の遺伝子の分布と比較すると、興味深いことに外部刺激に対して応答する遺伝子群が多く含まれていることがわかった。これらの遺伝子の位置情報をもとに染色体上にマップすると C 図 4 のように分布する。

### D) 老化促進(SAM)マウスの原因遺伝子の検索

8 週齢のマウスに関して検討を行った結果、老化促進マウスにて発現の上昇する遺伝子 41、減少している遺伝子 34 を特定した

(D 表 1, 2)。このうち発現の上昇した遺伝子としては、melanoma antigen が注目される。また、減少した遺伝子としては、特に変化の大きかった遺伝子である transthyretin に注目した。transthyretin はアルツハイマー病などの原因とされる beta-amyloid タンパクの沈着を防ぐ働きが知られている。Transthyretin は、GeneChip に搭載されている塩基配列の位置が異なる 3 種類のプローブ全てで、SAMR1 と比較して 1/8、1/10、1/14 と発現減少で一致し、再現性が確認できた。また real time PCR による検討の結果も、約 1/50 の発現減少で一致した。

#### 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

E-1 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、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)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(E 図 1)。この発生時期に於ける主要な生命現象である神経発生と細胞移動、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(E 図 2, 3)。E 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 は神経幹細胞に於いて、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(E 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、E 図 2C に示したように、Stat, Smad と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。この時期にアストロサイト分化はまだ始まっていないため、終脳での Stat3 発現が非常に低かったものと考えられる。

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力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(E 図 3)。まず E 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 の発現は殆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ことと神経幹細胞での発現が全般に高かった。次にヒストン制御に関わる遺伝子群として、E 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(E 図 3C, D)と、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。

#### E-2\_ *In utero* AzaC 暴露の胎児終脳に対する影響の Percellome 解析

DNA メチル化を化学物質で変化させ、それに伴う遺伝子発現変動を解析することで、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に、脱メチル化作用を有する AzaC(Azacitidine)を胎生 10.5 日に経胎盤的に母体投与し、メチル化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以外への分化能を獲得した胎生 14.5 日に胎児終脳を採取し、Percellome 解析した。AzaC の投与量は、投与に伴う apoptosis 誘導が起らない量を設定し、その量をはさんだ前後の3段階(0.1, 0.3, 1mg/kg/day)とした。AzaC *in utero* 投与により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 日に於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殆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(E 図 4-1, 2)。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、E 図 5 に示すように、これらには共通して interferon responsive element が存在するのに加え、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、E 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(E 図 6)。

#### 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

##### F-1 KA による甲状腺発がん早期過程での検討

実験期間中の体重の変動を F 図 4 に示した。体重は、実験開始後 1 週目に於いて無処置対照と比べて DHPN を投与した各群で有意な低値を示した。第 4 週目に於いては、2.0% KA 群で無処置対照ないし DHPN 群と比較して、第 5 週目に於いては、

DHPN+2.0% KA 群で対照群と比較して有意な低値を示した。解剖時の甲状腺重量は、2.0% KA 群と DHPN+0.5% KA 以上の群に於いて、無処置対照群あるいは DHPN 単独群に比べて、絶対、相対重量ともに有意な増加が認められた (F 表 1)。

甲状腺の病理組織学的検索の結果を F 表 2 に示した。無処置群、DHPN 単独投与群とも明らかな病変を認めなかったが、2.0% KA 群においては、全例に軽度から高度のびまん性濾胞上皮肥大を認めた。DHPN+KA 群のうち、0.125%投与群では、明らかな濾胞上皮の病変は認められなかったが、0.5%以上で全例にびまん性肥大を認め、その強度は用量依存的に増加した。さらに、前がん病変と考えられる濾胞上皮の限局性過形成が 0.5%以上で多発し、切面(左右各 1 切面)あたりの発生病変数は用量とともに増加した。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析については、DHPN+2.0% KA 群に於いて DHPN 単独群、2.0% KA 群に比し有意に発現変動した遺伝子数を求めた結果、それぞれ 342 遺伝子 (2 倍以上)、または 244 遺伝子 (1/2 倍以下)であった (F 図 5)。そのうち、KA の用量に依存して発現変動した遺伝子数について Fig. 6 に示した。0.125%以上の KA 投与により KA 用量に関連して DHPN 単独群に比し有意に発現変動したものは 8 遺伝子 (1/2 倍以下)、0.5%以上の KA 投与により同様に発現変動したものは各々 12 遺伝子 (2 倍以上)、7 遺伝子 (1/2 倍以下)であった。以上の KA の用量に関連して発現変動した遺伝子の内訳を Table 3, 4 に示した。遺伝子名を同定できたものは、2 倍以上の発現増加を示したものは 9 個 (Ras-related

associated with diabetes (Rrad), tetraspan 2, fructose-1,6-bisphosphatase 2, potassium inwardly-rectifying channel, protein tyrosine phosphatase, receptor type, N (Ptprn), dimethylarginine dimethylaminohydase 1 (Ddah 1), sulfotransferase 1B1, solute carrier (SLC4a1), TBC1D12)であった。また、1/2 倍以上の発現減少したもののうち、遺伝子名を同定できたものは、0.125% 以上の KA で 5 個 (ischemia related factor (vof-16), complement receptor 2 (CR2/CD21), eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1), lymphocyte cytosolic protein 2 (Lcp2), kinesin-associated protein 3 (KAP3)), 0.5% 以上の KA で 4 個 (late gestation lung protein 1 (LGL1), fibulin-1, TGF  $\beta$ -inducible early growth response 3, ABCA-1)であった。

KA の用量に関連して発現変動し、遺伝子名を同定できたもののうち、ABCA1, Ddah1, Fbp2, Ptprn, Rrad についてリアルタイム RT-PCR 法で遺伝子発現量を定量した結果、GAPDH, HPRT 遺伝子発現量に対する各遺伝子の相対発現量は、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 (F 図 7)。

次に、別の研究班の研究として、KA と同じ動物実験計画の中で、SDM の用量反応性を検索する実験を行った。その中で、明らかに甲状腺機能低下と共にその発がんプロモーション作用を示す用量である 1000 ppm SDM 飲水投与群で、プロモーション 4 週目に発現の増減する遺伝子を検索し、2% KA プロモーション例と同様の変動を示した遺伝子をリストアップした (F 表 5, 6)。その中で、

共通に発現増加した遺伝子のうち、Kinesin family member 3C は SDM に対して用量依存的な反応を示し、Sulfotransferase family 1B, member 1, Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 13 は KA に対して用量依存的な反応を示した (F 表 5)。発現減少した遺伝子のうち、Cadherin 2 は SDM に対して、Fibulin 1, Ischemia related factor-16 は KA に対して用量依存的な反応を示した (F 表 6)。更に、共通に発現の増減した遺伝子のうち、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 等が見出された (F 図 8)。SDM に対して用量依存的な反応を示した遺伝子として、細胞骨格関連の Kinesin family member 22, pseudo, Kinesin family member C1、細胞接着因子の Protocadherin alpha subunit があり、KA の用量依存性の反応として細胞骨格関連の Kinesin-associated protein 3 と前述した共通遺伝子である細胞外マトリックス fibulin 1 が見出された。

#### F-2 PB による肝発がん早期過程での検討

実験期間中の体重増加は、無処置対照に比べ DEN+PH 群は 1 週目より実験終了時まで低値を示した (F 図 9)。PB 併用投与群では 56, 167 ppm 併用群で、1-5 週目に、500 ppm 併用群では 1,2,4 週目に低値を示した。摂餌量は DEN を投与した各群で 1 週目に低値を示した。また、PH を施した各群で 4 週目にも低値を示したが、5 週目には反

対に高値を示した (F 図 9)。

実験終了時の最終体重は、無処置対照に比べ DEN+PH 群、DEN+PH+56 ppm PB 群、DEN+PH+500 ppm PB 群で低値を示し、DEN+PH 群との比較では、PH+500 ppm PB 群で有意な増加を示したものの、PB 併用投与各群との間では差は認めなかった (F 表 7)。肝臓重量は、無処置対照に比べ、絶対重量の減少が DN+PH 群、DEN+PH+56 ppm PB 群で認められたが、相対重量にこれらの群間で差は認めなかった。また、絶対・相対重量の増加が PH+500 ppm PB 群と DEN+PH+500 ppm PB 群で認められた。DEN+PH 群との比較では、絶対・相対重量の増加が PH+500 ppm PB 群、DEN+PH+167 ppm PB 群、DEN+PH+500 ppm PB 群に認められた。

二段階発がん実験群間での GST-P 陽性細胞巢の形態計測の結果、数、面積とも 560 ppm PB では DEN 単独群と有意な差は認められなかったが、いずれも若干高値を示した (Table 8)。167 ppm 以上で有意な増加を示したが、いずれも用量依存性はなく、167 ppm でむしろ高い傾向があった (F 表 8)。

肝臓で発現の増減する遺伝子を検討した結果、Venn 図から、DEN 単独、500 ppm PB 単独、DEN+500 ppm PB 群のいずれに於いても変動する遺伝子が多数認められ、その中で DEN+500 ppm PB 群と共通に変動する遺伝子は DEN 群よりも PB 群で優勢であった (F 図 10)。DEN+500 ppm PB 群のみで発現変動した遺伝子のうち、DEN 単独、500 ppm PB 単独、DEN+500 ppm PB 群の 16 サンプル全てに於いて absent であった遺伝子を除外した結果、増加遺伝子は 148、減少遺伝子は 144 となり、その中で

DEN+500 ppm PB 群の 3/4 例が presence を示した遺伝子数がそれぞれ 92, 72 となった。更にその中で統計的な有意差を示した遺伝子数はそれぞれ 68, 36 であった。PB の用量に依存した発現増加遺伝子は 56 ppm 以上で 6 個、167 ppm 以上で 6 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は Syntaxin 6 (Stx6), Wee 1 tyrosine kinase (Wee1), Serine protease inhibitor, kazal type 1 (Spink1), Hemiferrin, Brain Ntab mRNA sequence, Pregnancy-induced growth inhibitor (Ok138) の 6 個であった (F 表 9)。また、PB の用量に依存して発現減少したものは 56 ppm 以上で 5 個、167 ppm 以上で 17 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は Solute carrier family 34, member 2 (Slc34a2), Dual specificity phosphatase (Dusp1), Insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1), Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K), CD3 antigen, zeta polypeptide (Cd3dz), Adipose differentiation-related protein の 6 個であった (F 表 10)。

発現の増減した 5 つの代表的遺伝子 (発現増加: Ok138, Spink1; 発現減少: Dusp1, Igfbp1, Slc34a2) についてリアルタイム RT-PCR により発現レベルの検証を行った結果、一部統計学的有意差はつかなかったものの、いずれの転写産物に於いても概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示した (F 図 11)。

### F-3 KA 誘発甲状腺腫瘍での検討

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 F 表 11 に示した。また、その病理像を F 図 12 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 Fig. 13 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 F 表 12, 13, 14 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 I, complement component 4a, complement component 2) が見出された。また、「FFCH+腺腫」に於いて特異的に 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 (F 図 14)。

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  $\alpha$  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 F 図 15 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」に於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於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

### 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

#### A-1 ヒトがん由来培養細胞株における遺伝子発現変動の網羅的解析

ヒトがん由来培養細胞株を用い、増殖阻害という指標でダイオキシン類の毒性を評価すると、2,3,7,8-TCDD 非感受性 2,3,7,8-TCDF 感受性細胞株 A が観察された。ダイオキシン類の毒性評価として広く用いられている毒性等価係数 (TEF) は 2,3,7,8-TCDD が 1、2,3,7,8-TCDF が 0.1 とされており、細胞株 A のように 2,3,7,8-TCDF の方が強い毒性を示したことは、化合物の毒性を評価する上で、評価法により毒性の現れ方は異なる事例を示している。また、ヒトがん由来培養細胞株において GeneChip を用いてダイオキシン類に対する応答を遺伝子発現変動という点から観察できることが確認された。さらに、ダイオキシン類の各内受容体である aryl hydrocarbon receptor が誘導されていた。

これらの結果は、化合物の投与によって起こる生体内での遺伝子発現カスケードを、ここに示す方法を用いることで解明出来る可能性を示唆している。以上の解析はごく限られたサンプル時点と濃度で行ったものであるが、それでもダイオキシン類によって誘導される既知遺伝子を検出することができた。

#### A-2 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おける恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究

恒常性を維持する機構の一例として、化学物質投与などとは非依存的な circadian rhythm について解析を行った。ヒトやマウスには、1 日を一周期とするリズムが認められる。この現象は光等、外界からの時間的な刺激がない定常状況下でも認められることから、生体内には自立的にリズムを発振する機能が存在していると考えられている。哺乳類には視床下部の視交叉上核(SCN)に概日性リズムを発振する中枢が存在し、遺伝子発現調節を通し、ホルモン分泌や代謝等多くの生体機能の日周リズムを制御している。また、肝臓等の末梢組織にも同様の遺伝子発現調節がみられ、ローカルな時計として機能している。このような中枢・末梢系における体内時計により生体の恒常性を維持している。実際、Bmal, Clock, Per, Cry, E4bp4 などの遺伝子が発現調節され、circadian rhythm を維持していることが知られている。SCN において Bmal, Clock はヘテロダイマーを形成し、E-box 配列(CACGTG)に結合、各種の遺伝子の転写を促進する。これにより、Dbp 等の時計調節遺伝子(clock-controlled gene, CCG)の転写が進み、circadian rhythm に関する表現系を示す。それと同時に Per ファミリーや Cry ファミリーの転写を促進する。発現した Per, Cry はヘテロダイマーを形成し、Bmal, Clock の転写活性化能を抑制し、Per 遺伝子の転写を抑制する。このような恒常性維持機構が Circadian rhythm で働いている。こうした恒常性維持機構は肝臓でも働いていることが報告されている。Per, Cry, Clock, E4BP4 の発現を検討した結果、既知の報告通り、8 時間に Dbp 等の CCG, Per, Cry の発現上昇が、Clock, E4bp4 の発現低下が観察された。この結果は、我々が得たデータが

末梢臓器である肝臓に於いても Circadian rhythm に則った発現変化を正確に捉えることが出来る高いレベルのデータであることを裏付けるものである。

次に、ダイオキシン類のレセプターである Ahr 系について検討した。Ahr はリガンドである TCDD 等と結合すると aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP)や HSP90 と複合体を形成し、核内に移行する。核内に移行した Ahr は aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)とヘテロダイマーを形成し、dioxin response element (DRE)に結合し、Ahrr, Cyp1a1, Cyp1b1, Nqo1 等の遺伝子の転写を促進する。発現が誘導された Ahrr は Arnt とヘテロダイマーを形成し、DRE に結合し、Ahr/ Ahnt ヘテロダイマーによる転写の活性化を阻害するネガティブフィードバックを構成する。また、TCDD は flavin containing monooxygenase 1 (Fmo1), Fmo2, Fmo3 等の遺伝子の発現を誘導することも知られている。このような、TCDD による遺伝子発現変動について解析を行った。TCDD により発現が誘導される既知の遺伝子群について検討した。その結果、TCDD により誘導される既知の遺伝子に関して、濃度・時間依存的な誘導を正確にみることができた。このことは、我々の系が非常に正確に発現誘導を検討できる系であることを示している。さらに、早期に誘導・抑制が起こる遺伝子群について検討した結果、2, 4 時間と早期に発現のピークを迎える遺伝子として Serpinel, EST (AW558171), Hnf4, Oncogene-related (OR), Rassf1, Sap30, Txnip, Zfp3611, Gadd45b, Nfe2l2 の 10 遺伝子が観察された。特に OR, Rassf1 は 2 時間目に強く誘導された後、4 時間後には定常レベルに回復した。マウスにおける TCDD の半減期は 11~24 日と報告されており、本実験中肝臓は常に TCDD の刺激を受け続けていると考えられる。しかし、一度誘導を受けた後、その発現が減少する遺伝子が複数観察された。このような現象は、なんらかのネガティブ・フィードバック機構が働いているために起こると考えられる。これら 10 遺伝

子について、Genomatix Suite Software (Genomatix Software GmbH)を用いてプロモーター解析を行った結果、10 遺伝子中、7 遺伝子が DRE と予測される配列を持っていることが分かった。これらの遺伝子のうち、OR, Nfe2l2 は転写因子として機能することが知られている。4, 8 時間で発現のピークを迎える遺伝子のうち Gadd45b や Nr1i3 は OR 結合配列を持つと予測され、TCDD→Ahr→OR, Nfe2l2→Gadd45b, Nr1i3 というような発現調節機構が推測される。さらに、既知のネガティブフィードバックを構成している Ahrr の発現誘導が 24 時間で濃度依存的にみられた。

AhR 作動性化学物質 4 種について、Cyp1a1 等の遺伝子発現を検討したところ、Cyp1a1 は TCDD により、2 時間から濃度依存的な誘導が見られ、8 時間後に発現量は低用量でも飽和に達し、24 時間までその誘導状態が持続した。ダイオキシン類である TCDD 及び TCDF はその毒性等価係数 (TEF)に従い、誘導にはほぼ 10 倍の開きがみられた。しかし、3-MC は TCDD と同様に 2 時間から濃度依存的な誘導がみられたが、8 時間後に発現はピークを示し、24 時間後には発現の低下が見られた。Indigo は 4~8 時間後に発現のピークを示し、24 時間後には元のレベルに戻った。これは吸収・代謝・排泄などによる化学物質の濃度を反映していると考えられる。さらに、同様に Ahr を介して誘導される Cyp1a2 は 3-MC、Indigo とともに 24 時間後まで発現誘導が認められた。Ahr を介して発現が誘導される代謝酵素である Cyp1a1 と Cyp1a2 の誘導パターンが異なることは、遺伝子発現カスケードを考える上で非常に重要であると考えられる。

#### 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

腫瘍の治療に於いて血管新生を抑制することは、副作用の強い従来の抗癌剤にかわる新しい治療法として注目され、とくに主要な血管新生促進因子である VEGF pathway を中心にその阻害剤の開発が進んでいる。しかし、一時的に腫瘍の成長を遅らせるなどの効果を示すものの、結果的に癌が進行してしまうという問題が起こる。この原因の一つとして挙げられているのが、VEGF pathway とは独立した別の血管新生 pathway の存在である。例えば、2001 年の Nature (vol.412, 877-844) に Endocrine gland-derived VEGF (EG-VEGF) の報告がある。これは、adrenal carcinoma に於いて VEGF と共発現するので、adrenal carcinoma による血管新生を完全に抑制するためには、VEGF と EG-VEGF の両 pathway を抑制しなければならないというものであった。この報告からは、腫瘍特性に依存した VEGF 以外の血管新生 pathway が、それぞれの腫瘍に備わっている可能性があることが推察される。また、VEGF 産生が増強されている即ち血管新生活動が亢進した状況では、腫瘍のもつ VEGF 以外の血管新生 pathway も同じように活性化されている可能性が高いことが予想された。従って、まず *in vivo* にお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た。一般に固形腫瘍の内部は、0.数%~1%前後といった低酸素部位がしばしば存在しており、この低酸素刺激により VEGF などの血管新生促進に関わる様々な因子の発現亢進が観察されている。さらに、エストロゲンなどの性ホルモンや種々の成長因子が VEGF 産生調節に関わっていることを示唆する報告がある。これらの報告の中で特に興味深いも

のは、低酸素下でこれらの VEGF 産生促進因子が腫瘍細胞に作用すると、VEGF 産生増加に相乗的に働くという報告である。そこで、本研究では、窒素を充填することで酸素濃度を 0.2% から 95% の範囲で制御することが可能な BINDER 社のインキュベーターを用いて腫瘍内の低酸素環境を模倣し、更に、この低酸素下で培養した MCF-7 に対して、幾つかの外因性因子をそれぞれ作用させることで VEGF 産生を更に増加させ、血管新生活動が亢進した状態とした。その結果、低酸素刺激とエストロゲンなどの VEGF 産生促進因子による同時刺激には、MCF-7 の VEGF 発現量を顕著に増加させる効果がある。このことから、これは腫瘍細胞に於いて血管新生活動が亢進したある一つの状態を *in vitro* で再現した系であると判断した。従って、この *in vitro* VEGF 産生亢進モデルに於いてマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行うことで、VEGF 産生亢進に伴って動く血管新生関連遺伝子の探索を行うことが可能であると考えた。

#### C) HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索

発現の下がった遺伝子としては、myeloperoxidase、eosinophil peroxidase、proteinase 3 などが含まれていた。分化のシグナルになる遺伝子変化としては比較的初期の変化が重要であると考えられるため、1 時間後と 6 時間後のデータに関して再実験を行い、再現性を検討した。その結果、1 回目の実験と全く同じ動きをする遺伝子は、11 遺伝子しか見つからず、*in vitro* の実験での再現性の低さが示された。共通性を持った遺伝子に関しては、分化誘導の引き金にな

っている可能性があり、今後これらの遺伝子の関与について検証するため、RNAi を用いた検討を行う必要があると考えられる。また、HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の比較に関して検討において、興味深いことは、比較的発現の変化している部分が染色体上に局在化しており、同じ方向へ変化していることがわかった。それぞれの細胞の核型を検討した結果、HL-60 では 6 番と 18 番のトリソミー、RG では 13 番の転座と 11 番短腕の欠失という変化が認められている。遺伝子発現変化は RG での 6 番染色体全般における発現低下など、染色体レベルでの核型の変化により説明できる部分と説明できない部分があり興味を持たれる。また、HL-60 細胞では、double minute (DM) 染色体の出現による myc 遺伝子の増幅が観察され、RG 株ではこの DM が消失していることが知られているが、今回発現解析の結果から、定常状態における両者の myc 遺伝子の発現量に差はなく、DM 上の遺伝子が発現していない可能性が示唆された。

#### D) 老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索

Transthyretin は脳の老化防止に効果があるとされる魚油や銀杏の葉エキスを投与したマウスにおいて顕著に発現が上昇することが知られており、脳の機能維持との関係が示唆されている。Transthyretin は脳において beta-amyloid タンパクを排出する作用を持つことが知られており、この遺伝子の発現が低下することにより細胞内に beta-amyloid タンパクが増加して沈着し、老化促進作用を示した可能性が考えられる。定量的 RT-PCR による検討では、1, 3 週齢のマウス