

には Transthyretin の発現に変化がなかったことより、さらに、他の遺伝子の初期に於ける関与も重要であると考えられた。

#### 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

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及び、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。

#### 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>

イニシエーション特異的な遺伝子及び KA 投与による甲状腺機能減少に関連する遺伝子を除外することにより、KA による甲状腺発がん過程の早期に特異的な遺伝子発現プロファイルを検索したが、その結果、KA の用

量に関連して発現増加する遺伝子の機能は、イオン輸送、血管新生、糖新生など多岐に及んだ。その内、Ras-related associated with diabetes (Rrad) は、2 型糖尿病患者の骨格筋に過剰発現していることが明らかになり、正常ではヒト心臓、骨格筋、肺に発現している Ras-related GTPase である。腫瘍との関連では、ヒト乳腺腫瘍細胞で、腫瘍転移抑制因子である nm23 とともに移植腫瘍の進展抑制に関する報告があるが、甲状腺腫瘍との関連を示唆する報告はない。Tetraspan は、細胞表面でインテグリンなどの接着分子に関わる膜貫通分子である。ある種の tetraspan (Epithelial membrane protein-2, EMP-2) は腫瘍抑制遺伝子としての機能が示唆されている。Tetraspan 2 は、ミエリン鞘を構成し、グリア細胞の分化に関わることが示唆されているが、甲状腺腫瘍に関連する報告はない。Fructose-1,6-bisphosphatase 2 は糖新生に関わる酵素である。腫瘍組織では高度にエネルギーが消費されるため腫瘍組織内では解糖が、腫瘍周囲組織では糖新生が生じるとされ、ラットに誘発された乳腺腫瘍では fructose-1,6-bisphosphatase 2 など糖新生に関わる酵素の活性が有意に低下したとの報告がある。甲状腺腫瘍に関する報告はない。Potassium inwardly-rectifying channel は 2 型ある K イオンチャンネルのうちの 1 型で、7 つのサブタイプが存在する。Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6 (Kcnj6) は、ATP 感受性であり、Kcnj6 遺伝子はてんかん発作や膵島 B 細胞からのインスリン放出に中心的役割を果たすことが示唆されている。腫瘍との関連では、ある種の培養ヒト乳腺がん細胞での発現に

関する報告はあるが、甲状腺腫瘍との関連での報告はない。別の isoform で、同じく ATP 感受性である *kcnj3* が、培養ヒト乳がん細胞やリンパ節転移した乳がん組織で高発現することや、ラット甲状腺濾胞上皮細胞に局在することが報告されている。Protein tyrosine phosphatase (PTP) は、サイトカインレセプターによって活性化されたチロシンリン酸化カスケードを停止させるなど重要な役割をもつ。また PTP は腫瘍抑制遺伝子とされ、更にある種の receptor type PTP (RTP) は、ヒト肺がんや膵臓がんを抑制するという報告がある一方、ヒトメラノーマ細胞に於いて腫瘍の進展に伴って PTP 活性が増加するという報告もある。今回の検索で KA の用量に関連して発現増加した protein tyrosine phosphatase, receptor type, N (*Ptprn*) が腫瘍の進展に関連するという報告はない。*Dimethylarginine dimethylaminohydase 1* (*Ddah 1*) は、窒素酸化物 (NO) 合成の内因性抑制因子である不斉型 dimethylarginine を代謝する。腫瘍との関連については、*Ddah 1* はラット C6 グリオーマ細胞に於いて NO 濃度増加や vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生を亢進させることにより腫瘍の発達や血管新生に関与することが示唆されている。*Sulfotransferase* は多くの発がん性、変異原性物質を硫酸化することによりその生物活性を変化させる。*Sulfotransferase1A1* については、その遺伝子多型がヒトの肺がん、膀胱がんリスクに影響することが示唆されているが、*Sulfotransferase1B1* については、発がんとの関連での報告はない。*Solute carrier (SLC) family* は、有機陰イオンの輸送に重要な役割を果たす。*SLC4a1* についてはヒト *SLC4a1*

遺伝子の変異が遺伝性球状赤血球性貧血や腎遠位尿細管アシドーシスに関与することが示唆されているが、発がんとの関連での報告はない。*TBC1 domain family* についての詳細な報告はないが、このファミリーに属する *NB4S* が、stage 4S のヒト神経芽細胞腫で染色体の転座により truncate しているとの報告がある。

KA による用量に依存した発現減少は、細胞増殖抑制シグナルである TGF  $\beta$  の 3 個のエフェクター分子や、APC と  $\beta$  カテニンの細胞内輸送に関与する kinesin-associated protein 3 等にみられた。即ち、0.125% 以上の KA 投与により発現減少した遺伝子として、まず Ischemia related factor (*vof-16*) は、両側頸動脈を閉塞させ慢性低血流状態にしたときラット大脳領域に高発現し、認知障害に関連が示唆されている近年発見された遺伝子である。腫瘍や甲状腺との関連を示す報告はない。*Complement receptor 2* (*CR2/CD21*) は、補体成分 C3d, C3dg や Epstein-Barr virus のレセプターであり、外来性病原体や蛋白質に対する先天免疫や養子免疫に関与し、自己抗原に対する耐性を維持するといった免疫反応に主要な役割を果たす。近年の報告により、ヒト血小板表面に存在する CR2 に Epstein-Barr virus が結合すると TGF- $\beta$  が放出されることや、HOS-CR2 細胞に於いて CR2 が mitogen-activated protein kinases (MAPK) 活性を単独で亢進させること、培養ヒト悪性 B 細胞に於いてセリン/スレオニンキナーゼの活性化が CR2 の産生を抑制することが示唆されている。また、ヒト甲状腺腫瘍組織における CR2 を含む complement-regulatory factors の局在検索により、CR2 は濾胞上皮

細胞に検出されなかったという報告があるが、ラット甲状腺での発現についての報告はない。Eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1)は、mRNA の 5' 末端に於いて翻訳開始に中心的役割を果たす。また、eIF4G1 は、アポトーシスの過程で caspase-3 によって急速に分解され、eIF2 など他のタイプの eIF は、それに遅れて分解され、細胞に於ける蛋白合成が抑制されることが示唆されている。eIF4G1 の甲状腺腫瘍との関連での報告はない。Lymphocyte cytosolic protein 2 (Lcp2) は、近年見出された遺伝子で、造血細胞特異的蛋白質であり、多種の免疫系細胞のシグナル伝達に関与することが示唆されているが、甲状腺あるいは腫瘍との関連は報告がない。Kinesin-associated protein 3 (KAP3)は、細胞内で膜性小器官 membranous organelles をトランスロケート(生体膜輸送)させる微小管関連モーターである KIF3A と KIF3B のヘテロダイマー (KIF3A/3B)に関連した蛋白で、KIF3A/3B とヘテロダイマーを形成し、生体内で KIF3A/3B の細胞膜への結合を促進させることが示唆されている。腫瘍との関連については、ヒトの散发性、家族性大腸癌に対するがん抑制遺伝子である adenomatous polyposis coli (APC)が  $\beta$ -catenin と共に KAP3-KIF3A-KIF3B により微小管を通過して輸送され、膜突出部先端に蓄積され、細胞の遊走を抑制することが示唆されている。KAP3 について甲状腺やその腫瘍の進展に関する報告はないが、ヒト甲状腺腫瘍での  $\beta$ -catenin 発現の異常やヒト家族性腺腫様ポリプ症患者の一部に見られる甲状腺腫瘍組織で APC の変異が認められることが報告されている。また、0.5%以上の KA 投与に

より発現減少した遺伝子として、まず Late gestation lung protein 1 (LGL1)は、cysteine-rich secretory proteins (CRISPs)のファミリー蛋白質で、これらの蛋白質はN末端が疎水性アミノ酸のクラスター、C末端が cysteine-rich な領域から構成されるが、ほ乳類の CRISPs は多くは機能が分かっていない。最近の研究で、CRISP family は生殖器の発達の細胞接着に機能し、C. elegans の発達過程で、TGF  $\beta$  のシグナリングのエフェクター分子として機能することが分かってきた。その中で、LGL1 は胎児の肺で glucocorticoid-inducible gene として見出されてきた遺伝子であり、胎児の間葉系細胞から分泌され、上皮細胞に取り込まれて、気道上皮のブランチングに機能する。また、ニワトリ胚に於いて膵臓や甲状腺の間葉系細胞に発現し、その発達に関わることが報告されている。発がんとの関連での報告がない。ABCA-1 は ATP-binding cassette transporters のひとつで、ABC は特定の蛋白質(Lipophilicity は蛋白質により異なる)の transmembrane translocation に関与するが、その内 ABC-1 はマクロファージからコレステロールやリン脂質の排出に関与し、その過程に TGF  $\beta$  の関与が報告されている。発がんとの関連の報告はない。Fibulin-1 は細胞外マトリックス蛋白質で、上皮性の卵巣癌や肺癌に過剰発現している。この蛋白質は、腫瘍細胞の移動や、その anchorage-independent growth に関与すると考えられている。また、子宮内膜で性周期の過程で内膜上皮や間質細胞に発現が変化し、プロゲステロンやエストロゲンにより発現が制御されることが知られている。また 4 つの major な spliced variants(A, B, C, D)が

存在し、それぞれ機能が異なることが想定されている。すなわち、fibulin-1C は正常に発現するが、fibulin-1D は発達の過程で apoptosis を減少させる。TGF  $\beta$ -inducible immediate early gene (Tieg) は C 末端に 3 個の C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-zinc finger DNA binding motif を有する Sp1-like transcription factors に属する。Tieg は 3 種類同定されており、TGF  $\beta$  に反応して発現の増加することが分かっている。

以上のことから、DHPN によりイニシエートされた細胞が、甲状腺ホルモン環境の恒常性破綻によるプロモーション作用を受けた状態で、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、マイクロアレイ解析の結果選別された 5 つの代表的な発現増減遺伝子は、概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示し、データは検証されたものと考えられた。遺伝子名を同定できたもののうち、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。

また、甲状腺機能低下に起因して生じる発がんプロモーション過程で発現変動する遺伝子として、細胞骨格のモーター蛋白質あるいはその機能調節蛋白質、細胞接着因子、細胞外マトリックス等、相互に作用し合うことが知られている遺伝子産物が早期からの標的遺伝子候補として見出されてきた。今後、この方面での経時的な解析により、甲状腺機能低下に起因する甲状腺発がん初期のメカニズムの解明が期待される。

#### <PB による肝発がん早期過程での検討>

PB 実験をまとめてみると、167 ppm 以上か

ら明らかな肝発がんプロモーション作用が認められ、プロモーション過程特異的な遺伝子発現プロファイリングにより、肝発がんプロモーション作用の明らかに認められない PB の 56 ppm から用量に伴い発現変動する遺伝子が複数見出された。また、これらのマイクロアレイデータはリアルタイム RT-PCR により検証された。

PB による肝発がんプロモーション過程の早期特異的に発現変動した遺伝子の機能を簡単にまとめてみると、増加遺伝子のうち、Syntaxin 6 は、Trans-Golgi network と endosome との間の蛋白質の vesicular transport に機能することが知られ、Wee 1 tyrosine kinase は核内蛋白質で、Cdc25 とともに phosphatase-kinase switch を構成し、Cdc2 の活性化に関与することが知られている。この分子は S 期と G<sub>2</sub> 期で合成が増加し、G<sub>2</sub>/M arrest で発現増加することが知られている。Serine protease inhibitor, kazal type 1 は、膵 trypsin inhibitor の一つで先天性膵炎や膵癌の標的遺伝子と考えられている。Hemiferrin は鉄輸送蛋白質 transferrin の truncated protein であるが、詳しい機能については研究が進んでいない。

Pregnancy-induced growth inhibitor は腫瘍等の細胞増殖抑制に機能することが知られている。減少遺伝子のうち、Solute carrier family 34, member 2 は Sodium phosphate の co-transporter で無機リンの恒常性維持に機能することが知られており、腎尿管や小腸上皮に apical site に発現している。Dual specificity phosphatase は PI3 kinase のシグナリングの下流にある癌抑制遺伝子で PTEN と呼ばれ、lipid phosphatase と protein tyrosine phosphatase からなる。

IGFBP-1 は、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ことが知られているが、その促進・抑制の方向性は細胞や条件によって異なる。PI4-kinase は Trans-Golgi network に存在し、イノシトール 3 ないし 4リン酸の合成、貯蔵に関与することが知られている。CD3 antigen, zeta polypeptide は T 細胞の腫瘍免疫に機能し、Adipose differentiation-related protein は PPAR $\gamma$  2 を介した肝細胞の脂肪蓄積に関与し、いずれも発がんとの関連での報告はない。

以上をまとめると、PB によるラット肝発がん過程の早期に生じる破綻現象としては、細胞増殖抑制や Cell cycle arrest に関連する機能の増強 (Wee-1 kinase, Pregnancy-induced growth inhibitor の発現増加)、一方で、がん抑制遺伝子 (PTEN) の発現低下や鉄輸送機能の亢進 (Hemiferrin の発現増加)、Trans-Golgi network を介したシグナリングの変化 (Syntaxin-6 の発現増加と PI4K の発現低下)、phosphoinositide シグナリングの変化 (Dual specificity phosphatase 1 と PI4K の発現低下) 等が示された。この中で、PB による肝発がんの早期過程では、細胞増殖に関して、抑制方向に進行する細胞機能が推定される遺伝子発現プロファイルが得られた。このことは、ラット肝中期発がん性試験法のエンドポイントとして設定されている 8 週目では、増殖活性の高いイニシエートされた細胞は肝臓の一部分を構成するのみで、比較的増殖活性の低い肝細胞が大部分を占めていることに起因するのかもしれない。

#### <KA 誘発甲状腺腫瘍での検討>

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、酸化的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 I, 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  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  3は、末梢神経の発達に関与し、ヒト甲状腺髄様がんmedullary carcinomaに於いてはGFR  $\alpha$  3以外(GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 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

本分担研究の各研究テーマにおける結果から、網羅的解析から個別の標的に対する詳細研究に至る広い範囲に対してトキシコゲノミクス手法が有効であることが示された。これらの結果は、恒常性維持機構や各種の制御系に対する影響に際してのトランスクリ

プームデータの精密化と、それによるデータベースの高精度化に寄与する情報を提供するものである。個々のテーマに関する結論を以下に記した。

#### 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

ダイオキシン類の投与により発現が誘導されることが知られている遺伝子である CYP1A1、CYP1B1 の発現が、我々のマウス、ヒトがん由来培養細胞株においても TCDD、TCDF 投与により確認された。さらに解析を行った結果、CYP1A1、CYP1B1 と同様の発現パターンを示す遺伝子として ALDH1A3、NQO1 などが共通あるいは投与化学物質依存的に抽出された。これらの結果は、遺伝子発現変動のパターンにより様々な投与化合物を分類し、評価できる可能性を示唆するものである。

Circadian rhythm のように、「絶対量化手法」を用いなければ DNA マイクロアレイデータからは直接、検討することが困難な遺伝子群の解析に成功した。更に、TCDD 投与による濃度・時間的な遺伝子発現誘導を検討した結果、AhR による発現誘導が既知の遺伝子が確かにこの系でも誘導されていることを確認した。この方法により、多様な解析に適用しうる信頼性の高いデータが保たれることが確認された。更に、TCDD の影響解析の結果、TCDD 刺激が持続しているにもかかわらず、投与後早期に遺伝子の発現誘導がみられた後、まもなく定常状態に戻る遺伝子群が存在しており、何らかのネガティブフィードバックが働いていることが示唆された。これらの新知見を元にプロモーター解析等を行うことで、多段階の遺伝子発現調節機構を予測することが可能となると考える。

このように「絶対量化手法」を用いた網羅的遺伝子発現解析とプロモーター解析等各種解析を組み合わせることで、恒常性維持機構に関連する遺伝子群の制御回路の更なる解明が進むことが期待される。

#### 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

本研究により、低酸素条件下で培養腫瘍細胞株からの VEGF 発現が上昇することが確認された。この結果を踏まえ、今後、血管新生の際に生じる腫瘍細胞と血管内皮細胞間の相互作用を *in vitro* で再構築するためには、表現型の異なる腫瘍細胞と HUVECs (正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) の共培養系の確立と細胞間相互作用の評価系の確立に関する実験条件の整備を図る必要がある。それにより、腫瘍の遺伝子発現特性に応じた血管新生抑制物質の治療選択の可能性の検討、癌浸潤モデルや遠隔転移モデルを用いた腫瘍進展抑制について基礎的知見が得られるものと期待される。

#### C) HL60 細胞を使った分化に係る遺伝子の検索

分化誘導処理により、ある程度分化が誘導された時期に於いては、既に知られている分化マーカーなど、分化と関連した多くの遺伝子の変化が見つかった。しかし、分化に導くシグナルとしては、薬剤処理初期に変化する遺伝子が重要であると考えられるため、再現性を持って変化する遺伝子を調べたところ、初期の遺伝子変化に関する再現性は低かったものの、いくつかの遺伝子が候補として見つかった。また、分化能を失った

HL-60 株においては、親株との間にいくつかの遺伝子発現変化があり、特に外部刺激に対して反応する遺伝子群の変化が大きく、これらの遺伝子の変化が増殖能及び外部刺激に対する分化誘導の違いに寄与している可能性がある。

#### D) 老化促進(SAM)マウスの原因遺伝子の検索

老化促進マウスに於いて、海馬に於ける transthyretin の発現が減少しており、この遺伝子は、beta-amyloid タンパクの排泄に関与していることより、その蓄積が起こることにより、機能低下及び老化が促進されている可能性が示唆された。即ち、transthyretin は海馬機能の恒常性の維持に関して重要な働きをしていると考えられる。なお、本研究は、青山学院大学の降旗教授との共同研究として行われた。

#### 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

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期待する。

#### F) 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、まず、ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、KA による発がん過程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、発現挙動はリアルタイム RT-PCR により検証された。甲状腺機能低下作用に起因する甲状腺発がんに通ずる遺伝子発現変動から、モーター蛋白質あるいはその機能調節に関与する分子、細胞接着因子、細胞外マトリックス構成蛋白質が標的遺伝子と考えられた。PB による発がんプロモーション早期特異的な標的遺伝子として、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、Trans-Golgi network で機能するシグナリングの変化、phosphoinositide シグナリングの異常を示唆する発現変動等が見出された。更に、KA により形成された甲状腺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

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.

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)

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.

萱野 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、九州大学医師研セミナー、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, 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

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

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)

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

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

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、環境ホルモロン学会第 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, KFPA/NITR International Symposium, Oct 11-12, 2005, Korea

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, 2005 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

Jun Kanno “Focusing on Toxicogenomics Research” The 3<sup>rd</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology : ASIATOX III February 1-6, 2004, Bangkok / Chiang Mai, Thailand

Jun Kanno, Aisaki Ken-ichi, Atsushi Ono, Katsuhide Igarashi “Toxicogenomics using “percellome” and “mille-feuille” data system” The Joint International Meeting

of The Japanese Society of Toxicologic Pathology (JSTP) and The International Federation of Societies of Toxicologic Pathology (IFSTP) including The International Academy of Toxicologic Pathology (IATP) February 15-18, 2004, Kobe, Japan

菅野 純 「Toxicogenomics の進捗」 第 240 回 CBI 学会研究講演会、2004 年 3 月 19 日、東京

Kanno J Toxicogenomics in Pharmacology/ Physiology studies by functional genomics technology, The 76th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March 24-26, 2003, Fukuoka, Japan

菅野 純、内分泌攪乱化学物質とトキシコジェノミクス、第 5 回日本水環境学会シンポジウム、平成 14 年 9 月 26 日、東京

菅野 純、トキシコジェノミクスの展望、薬物動態談話会特別例会、平成 14 年 10 月 4 日、浜松

Kanno J Toxicogenomics の現状 ゲノム創薬フォーラム ゲノム創薬へのパラダイムシフト、平成 14 年 11 月 13 日、東京

菅野 純、創薬とトキシコジェノミクス研究戦略、第 94 回基礎研究部総会、平成 15 年 2 月 27 日、浜松

菅野 純 「分子標的」と「全遺伝子トキシコ

ゲノミクス」、がん分子標的治療研究会  
2003年6月2日 東京

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

菅野 純、「トキシコゲノミクスの現状」、第  
30回トキシコロジー学会学術年会ワークシ  
ョップ「プロテオミクスとトキシコゲノミクスの  
現状と問題点」2003年7月20日 相模原

Jun Kanno, Toxicogenomics -A phenotype  
independent approach-, Annual Meeting  
of Korean Society of Toxicology, Oct 30,  
2003, Seoul, Korea

菅野 純、「トキシコゲノミクスの新展開」、  
第26回日本学術会議トキシコロジー研究  
連絡委員会シンポジウム 2003年12月3  
日 東京

菅野純、「IGS ラットを用いたトキシコゲノミ  
クス」、CD(SD)IGS 研究会/研究集会 2003  
年12月19日 東京

Kanno J Reverse toxicology and data  
normalization/standardization  
Toxicogenomics International Forum 2002、  
Okazaki, 2002

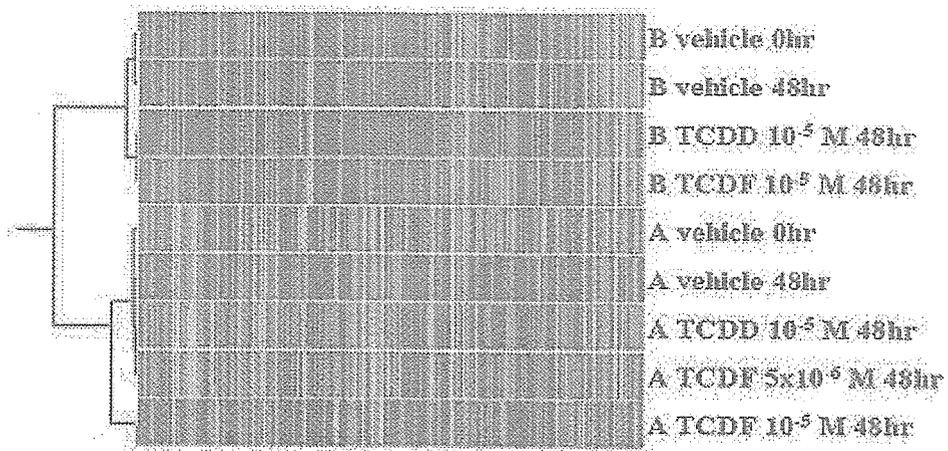
H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予  
定も含む)

1. 特許取得  
なし

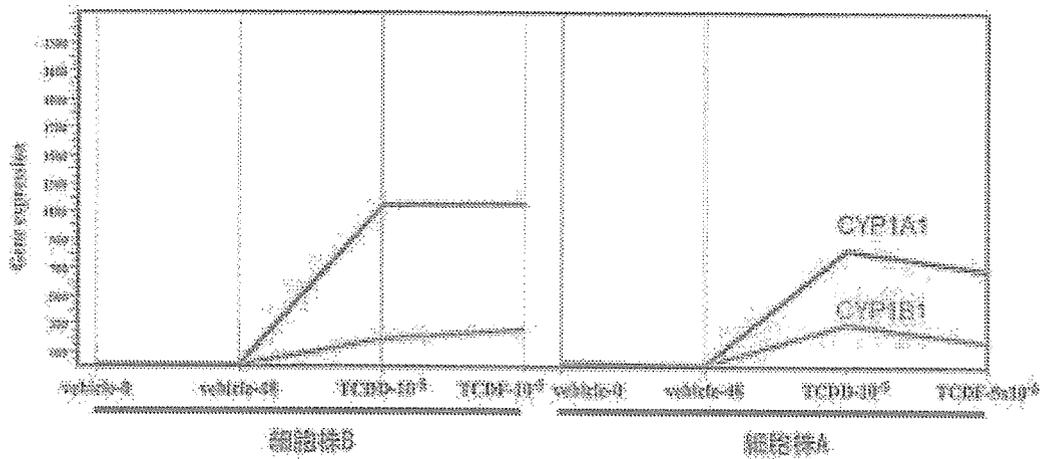
2. 実用新案登録  
なし

4. その他

(I)



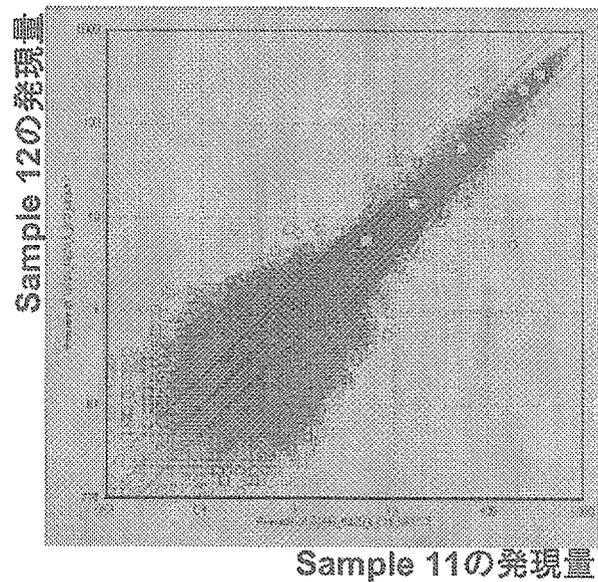
(II)



### A 図1

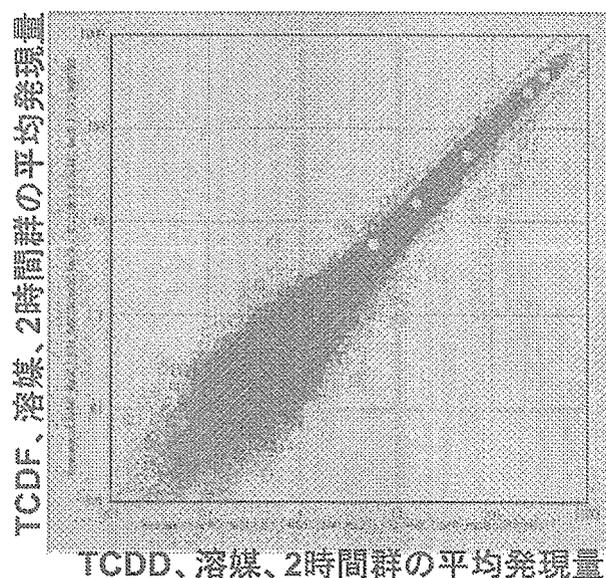
#### ヒトがん由来培養細胞株におけるTCDD, TCDFによる遺伝子発現変化

- (I) 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
- (II) 両細胞株におけるCYP1A1, CYP1B1の発現変化



**A図2. 同一群内での再現性の検討**

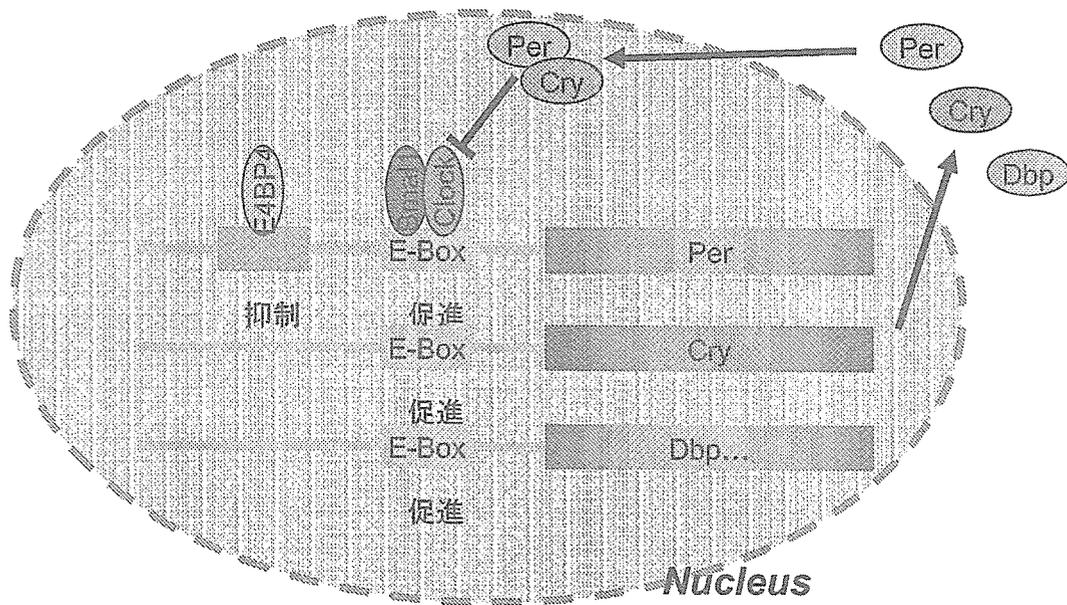
遺伝子発現解析の再現性をスキッタープロットにより検討した。TCDD、溶媒対照、2時間群の例を示した。n=3で取得したうち2つのサンプルの遺伝子の発現量をそれぞれX, Y軸にプロットすると"Percellome"手法により標準化したデータは $y=x$ の直線上に分布し、非常によい再現性を示した。



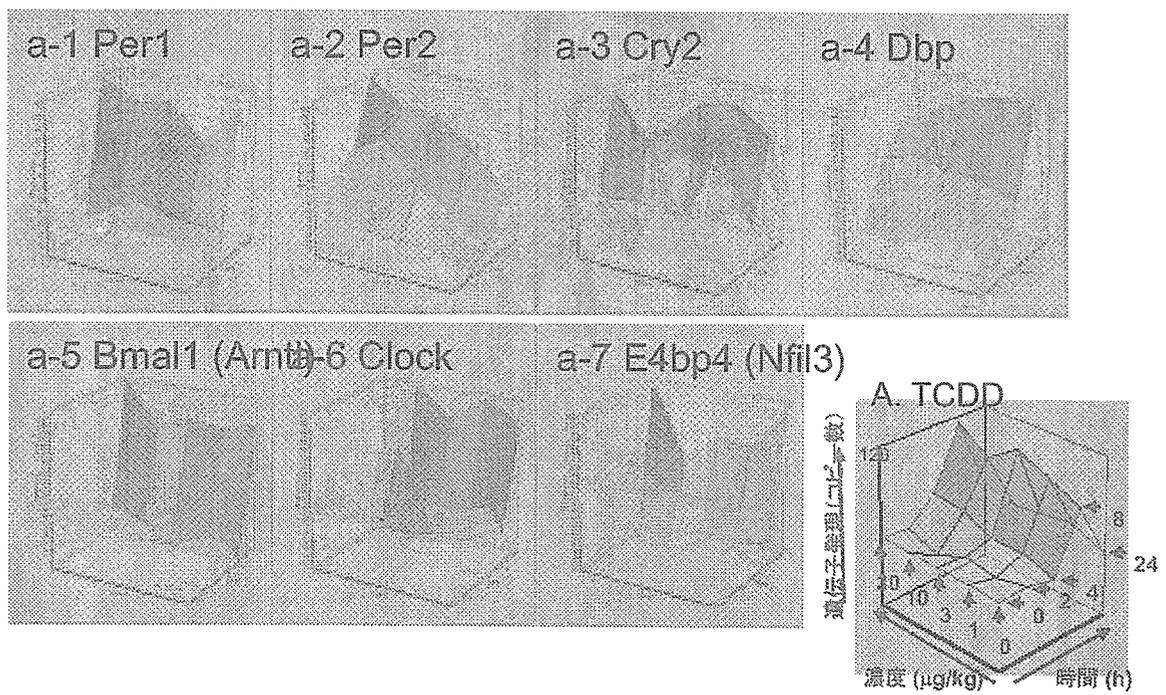
**A図3. 異なる化学物質を投与した際の溶媒対照群の再現性の検討**

遺伝子発現解析の再現性をスキッタープロットにより検討した。TCDDおよびTCDFを投与した際の溶媒対照、2時間群の例を示した。n=3で取得したサンプルの遺伝子の発現量の平均をそれぞれX, Y軸にプロットすると $y=x$ の直線上に分布し、異なる化学物質を投与したときにも、溶媒対照群の発現量は非常によい再現性を示した。

(I)



(II)



## A 図4

### Circadian rhythmに関する解析

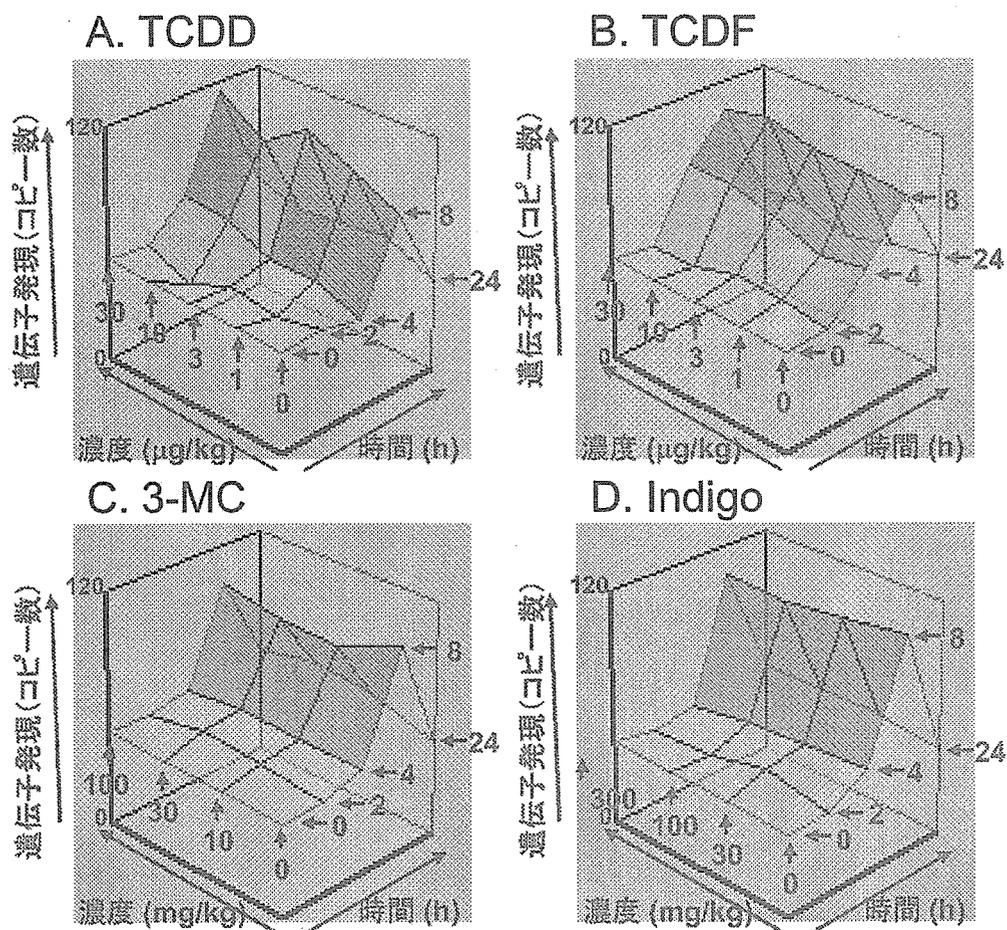
(I) Circadian rhythmにおける恒常性維持機構

(II) Circadian rhythmに関連する遺伝子群のTCDD投与に伴う発現パターン

表1 日内変動パターンを示した遺伝子群

GeneChip ID	Symbol	GenBank ID	Description
1415772_at	Ncl	BC005460	nucleolin
1416256_a_at	Tubb5	NM_011655	tubulin, beta 5
1416344_at	Lamp2	NM_010685	lysosomal membrane glycoprotein 2
1416816_at	Nek7	BQ175300	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 7
1416913_at	Es1	NM_007954	esterase 1
1416924_at	Bri3	NM_018772	brain protein I3
1416933_at	Por	NM_008898	P450 (cytochrome) oxidoreductase
1416958_at	Nr1d2	BC008556	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1416959_at	Nr1d2	NM_011584	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1417168_a_at	Usp2	NM_016808	ubiquitin specific protease 2
1417169_at	Usp2	A1553394	ubiquitin specific protease 2
1417190_at	Pbef-pending	BC018358	pre-B-cell colony-enhancing factor
1417339_a_at	Dncl1	NM_019682	dynein, cytoplasmic, light chain 1
1417602_at	Per2	NM_011066	period homolog 2 (Drosophila)
1417603_at	Per2	AF035830	period homolog 2 (Drosophila)
1417828_at	Aqp8	NM_007474	aquaporin 8
1418352_at	Hsd17b2	BC012682	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
1420342_at	Gdap10	NM_010268	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 10
1421829_at	Ak4	AB020239	adenylate kinase 4
1421830_at	Ak4	NM_009647	adenylate kinase 4
1421991_a_at	Igfbp4	NM_010517	insulin-like growth factor binding protein 4
1421992_a_at	Igfbp4	AA119124	insulin-like growth factor binding protein 4
1422568_at	Ndel1	AF323918	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)
1423086_at	Npc1	BB769209	Niemann Pick type C1
1423757_x_at	Igfbp4	BC019836	insulin-like growth factor binding protein 4
1423804_a_at	Idi1	BC004801	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
1424275_s_at	Trim41	BC020156	tripartite motif-containing 41
1425099_a_at	Amtl	BC011080	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
1425456_a_at	Map2k3	D87115	mitogen activated protein kinase kinase 3
1425678_a_at	Snrk	BC020189	SNF related kinase
1425742_a_at	Tgfb1i4	AF201285	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1425792_a_at	Rorc	AF163668	RAR-related orphan receptor gamma
1425824_a_at	Pcsk4	D01093	proprotein convertase subtilisin/kexin type 4
1426441_at	Slc11a2	BB772362	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2
1427229_at	Hmgcr	BB123978	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
1427347_s_at	Tubb2	BC003475	tubulin, beta 2
1427838_at	Tubb2	M28739	tubulin, beta 2
1428381_a_at	2700038C09Rik	BG868450	RIKEN cDNA 2700038C09 gene
1434866_x_at	Cpt1a	BB021753	camitine palmitoyltransferase 1, liver
1435732_x_at	Atp6v0c	AV172216	ATPase, H+ transporting, V0 subunit C
1437932_a_at	Cldn1	AV227581	claudin 1
1438156_x_at	Cpt1a	BB119196	camitine palmitoyltransferase 1, liver
1439270_x_at	Ran	AV116470	RAN, member RAS oncogene family
1448202_x_at	2610524G07Rik	NM_025596	RIKEN cDNA 2610524G07 gene
1448276_at	Tm4sf7	NM_053082	transmembrane 4 superfamily member 7
1448346_at	Cfl1	NM_007687	cofilin 1, non-muscle
1448390_a_at	Rsdr1-pending	NM_011303	retinal short-chain dehydrogenase/reductase 1
1448450_at	Ak2	BC008610	adenylate kinase 2
1448451_at	Ak2	NM_016895	adenylate kinase 2
1448607_at	Pbef-pending	AW989410	pre-B-cell colony-enhancing factor
1448619_at	Dhcr7	NM_007856	7-dehydrocholesterol reductase
1448682_at	Dncl1	NM_019682	dynein, cytoplasmic, light chain 1
1448864_at	Snrk	NM_133741	SNF related kinase
1449029_at	Mknk2	NM_021462	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2
1450014_at	Cldn1	NM_016674	claudin 1
1450264_a_at	Chk	NM_013490	choline kinase
1450387_s_at	Ak4	NM_009647	adenylate kinase 4
1450982_at	Slc9a3r1	BG066200	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1
1451002_at	Aco2	AA034553	aconitase 2, mitochondrial
1451122_at	Idi1	BC004801	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
1451255_at	Lisch7-pending	BC004672	liver-specific bHLH-Zip transcription factor
1451371_at	1110025G12Rik	AY079153	RIKEN cDNA 1110025G12 gene
1451714_a_at	Map2k3	A1481780	mitogen activated protein kinase kinase 3
1452179_at	D530048A03Rik	BG066552	RIKEN cDNA D530048A03 gene
1452180_at	D530048A03Rik	BG065238	RIKEN cDNA D530048A03 gene
1452482_at	ErbB3	B1251855	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
1452555_at	---	AF037046	---
1452769_at	3732413111Rik	AK014408	RIKEN cDNA 3732413111 gene
1454758_a_at	Tgfb1i4	AU016382	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1454967_at	---	BM246522	Mus musculus transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_001888.1
1454971_x_at	Tgfb1i4	BB357514	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4
1460409_at	Cpt1a	A1987925	camitine palmitoyltransferase 1, liver

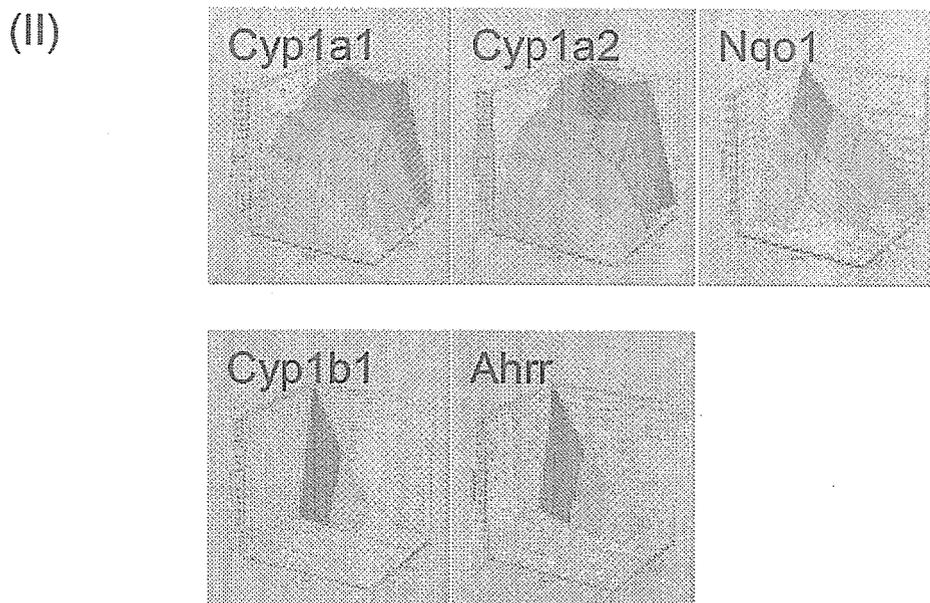
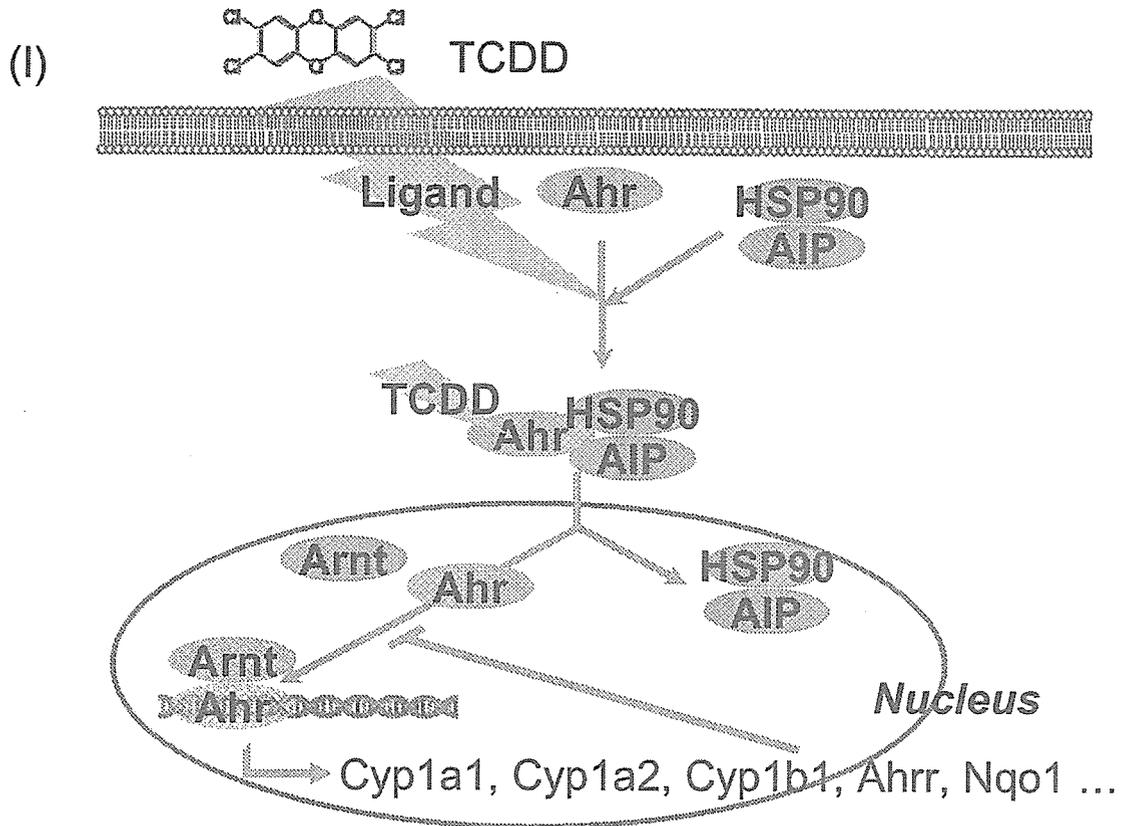
A 表1



A図5.

日内変動遺伝子のAhR作動性化学物質暴露に伴う発現変化  
TCDD (A), TCDF (B), 3-MC (C), Indigo (D)投与時のadenylate  
kinase 2 (Ak2)遺伝子の発現パターンを示す。

右方向は時間軸を、左方向が濃度軸を、上方向が遺伝子の発現  
量(コピー数)を表している。投与後、0-2時間の約50コピーから、8  
時間後の約120コピーまで、化学物質非依存的に発現が上昇し、  
24時間後には0-2時間後のレベルに戻っており、日内変動を示し  
ている。



A 図6

**Ahr pathway**

(I) TCDD, TCDF, 3-MC, IndigoはAhrを介してシグナルを伝達することが知られている。TCDDを例に示すが、Ahrリガンドが結合することにより、Ahrは核内に移行し、dioxin response element (DRE)を介してCyp1a1等の下流遺伝子の発現を誘導する。

(II) AhRを介した発現応答を示す遺伝子群のTCDDによる発現変化