

制することが知られている Numb 及び Numb1 の発現も上昇したが、Numb1 の発現上昇は Hes1, Hes5 の発現上昇より早かった(図2D)。Notch のリガンドである Dll1, Dll3 の発現は変動しなかった。これら Notch 系に関する結果は、甲状腺ホルモンによって Notch シグナル系が、Numb ファミリーによる抑制を受けつつ活性化されていることを示唆するものと考えた。

核内受容体発現の経時的解析

胎児脳発達に於いて重要な機能を有する核内受容体を更に見出すために、胎児終脳の経時的遺伝子発現解析に加え、胎齢の異なる終脳由来ニューロスフェア(神経幹細胞塊)の遺伝子発現を網羅的に検討比較した。神経幹細胞は発生初期には増殖のみを行い、中期からニューロンに分化する能力を獲得し、後期にグリア細胞に分化出来るようになる。そこで、発生中期の妊娠10日目から、発生後期の妊娠16日目まで経時的に胎児終脳を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った(図3A)。更に、神経幹細胞に特化した解析も実施するため、ニューロンにしか分化しない妊娠11日目から、グリアにも分化可能になる妊娠14日目まで各日ニューロスフェアを培養し、Percollomeによる発現コピー数変換を施したDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った(図3B)。

核内受容体群について解析した結果、終脳に於いて、TRaの発現が経時的に上昇すること、COUP-TF1(Nr2f1)、LXRb(Nr1h2)、Nurr1(Nr4a2)、Rxrbの発現は持続的に高値を示すこと、COUP-TF2(Nr2f2)、EAR2(Nr2f6)、Tlx(Nr2e1)、

Rarg、Rxraの発現は経時的に減少することが分かった。また、ニューロスフェアに於いては、COUPTF-1、COUPTF2、ESRRa、GR(Nr3c1)、LXRb(Nr1h2)、NGFI-Ba(Nr4a1)、Rarg、REV-ERBa(Nr1d1)、REV-ERBb(Nr1d2)、Rora、Rxra、Rxrb、Tlx(Nr2e1)、TRa、TR2(Nr2c1)、TR4(Nr2c2)は持続的に高い発現を示すこと、EAR2は高い発現を保ちながら減少傾向を有すること、BPAが強く結合することが最近報告されたESRRgの発現は、胎児終脳で経時的に上昇し、神経幹細胞では数コピーの一定の発現を示すことが分かった。エストロゲン受容体については、ERaがニューロスフェアに於いて、低発現ながら一定値を保つ一方、ERbの発現はごく低いことが分かった。

よって、ESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa(Nr1d1)、REV-ERBb(Nr1d2)、TR2(Nr2c1)、TR4(Nr2c2)は、終脳全体でみると発現は低いながら神経幹細胞に於いて高発現を示す核内受容体であることが分かった。

D. 考察

本研究で見出した神経幹細胞で発現が高い核内受容体の多くは、神経幹細胞に於ける機能は不明である。今後それらの生理機能を明らかにすることは重要である。リガンド既知の受容体については、TRa に対するリガンドである甲状腺ホルモンによって、神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化が促進されることが分かった。TRa 以外でリガンドが同定されているのは GR のみであるが、GR の神経幹細胞における機能は不明である。

一方、BPA が ESRRg に強く結合するという例 (Toxicol Lett. 2006 Sep 3; [Epub ahead

of print]) を踏まえると、内分泌かく乱化学物質が、リガンド未知のいわゆるオーファン核内受容体に結合し作用する可能性も考慮する必要がある。ESRR ファミリーについては、beta 型に DES、gamma 型に BPA に加え 4-Hydroxytamoxifen も結合することが分かっているが、alpha 型に結合する物質はまだ報告されていない。Alpha 型は TRa の転写調節を行うという報告 (Oncogene 1998, 17:2429-2435) もあり、今後 ESRR family に着目した解析が重要となると考えられる。

神経幹細胞の増殖、分化は、塩基性-ヘリックス・ループ・ヘリックス型 (bHLH) 転写因子による制御を受けている。乳癌細胞株での知見ではあるが、bHLH 型転写因子に於いて、神経幹細胞の未分化性増殖を担う HES1 に関し、エストロゲンによる発現低下が報告されている (Oncogene 2000, 19, 5951-5953)。この知見は核内受容体と神経幹細胞機能制御の接点の 1 つを示唆している可能性があり、甲状腺ホルモンによる神経幹細胞における発現上昇の結果と合わせて興味深い。

E. 結論

これまでに、胎児期のエストロゲン様化学物質への暴露により、神経幹細胞の自己複製能、分化能に影響が生じることを示唆する結果を得ている。本研究により、胎児神経幹細胞では核内受容体 TRa が高発現しており、実際に甲状腺ホルモンがオリゴデンドロサイト分化を促進することが示された。神経幹細胞で特異的に高発現している核内受容体は他にも ESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa (Nr1d1)、REV-ERBb (Nr1d2)、TR2 (Nr2c1)、TR4 (Nr2c2)

などが見出されている。

以上得られた知見は、神経幹細胞に於ける核内受容体群の生理機能に関する基礎的情報として、内分泌かく乱化学物質の神経幹細胞に及ぼす影響を考察するために役立つものである。

F. 健康危険情報

特になし

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 cell² 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

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

Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev.* 2004 Dec;121(12):1443-53.

Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004 Jul;91(3):121-9.

Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol.* 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研

究実験ハンドブック、 p329-337 実験医学
別冊 2004

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、
中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキ
シコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol. 23
No. 6 2004685-693、株式会社秀潤社

菅野 純：医薬品開発におけるわが国のトキ
シコゲノミクスの取り組み、月刊薬事、2004
年5月、Vol. 46, No. 6 株式会社じほう

菅野 純：化学物質の毒性 化学と教育 52
巻5号『化学物質とリスク評価』 2004年
302-305 (社)日本化学会

2. 学会発表

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回日本癌学会総会、
2006年9月28-30日、横浜

菅野 純、中津則之、相崎健一、DEN 初期遺
伝子応答から見た好発癌系(C3H)と嫌発系
(B6)マウスの差異、第65回日本癌学会総会、
2006年9月28-30日、横浜

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
生研セミナー、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
本大学発生源・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

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

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono,
Yukio Kodama, "Per cell" mRNA
normalization system for microarrays and

quantitative PCR. Gordon Research Conference “Toxicogenomics”, Jun 5-10, 2005, NH, USA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

中津則之、相崎健一、菅野 純、

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

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

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

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

菅野 純、ナノマテリアルの安全性確認に関する課題、三菱安全化学研究所講演会、2005 年 12 月 1 日、東京

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

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

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

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

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

Jun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

菅野 純、「前向き」Toxicogenomics、第 88 次日本法医学会総会、2004 年 6 月 2~4 日、旭川

高橋雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕美子、「Notch リガンド D113 は Mesp2 の欠損によ

る体節形成と前後パターン形成の異常を回復する」、日本発生生物学会第37回大会、2004年6月4～6日、名古屋

J Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu, Y Kodama, K Igarashi,

PHENOTYPE-INDEPENDENT TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME” AND

“MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会（特別講演）、2004年7月6～8日、大阪

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、北嶋 聡、児玉幸夫、菅野 純、「日内変動遺伝子群プロファイルの解析」、第31回日本トキシコロジー学会学術年会（口演）、2004年7月6～8日、大阪

J Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi, TOXICOGENOMICS USING “PERCELLOME” AND

“MILLE-FEUILLE” DATA SYSTEM, 10th International Congress of Toxicology, 11-15 July, 2004; Tampere, Finland

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、

「GeneChipによる遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日～10月1日、福岡

菅野 純、藤井寿一、菅野 仁、相崎健一、

「解糖系障害で誘導される赤芽球アポトーシスと p53 の関連、p53 involvement in glycolysis disorder-induced apoptosis of erythroid cell」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日～10月1日、福岡

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama “Percellome” Analysis of Hormonally Active Compounds.

Toxicogenomics International Forum 2004, 12-13 October, 2004

五十嵐勝秀、高橋芳樹、菅野 純、内分泌かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対する作用、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

中津則之、相崎健一、小野 敦、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野 純、マウス肝臓におけるダイオキシン類による遺伝子発現変動解析、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛真友、菅野 純、吉川裕之、加藤茂明、アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

高橋芳樹、五十嵐勝秀、菅野 純、マウス胎

児神経幹細胞の維持における DNA メチル化
の役割、第 27 回日本分子生物学会年会、2004
年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

渡辺裕介, 小久保博樹, 宮川-富田幸子, 五
十嵐勝秀, 萱野 純, 相賀裕美子、マウス心
臓における Notch1 シグナリングの機能解析、
2004 年 12 月 8 日～12 月 11 日、神戸

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono,
Yukio Kodama, "Percellome" method
application to the analysis of hormonally
active compounds and its possible
contribution to the ecotoxicogenomics.
環境ホルモン学会第 7 回研究発表会、2004
年 12 月 15 日、名古屋

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定
も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

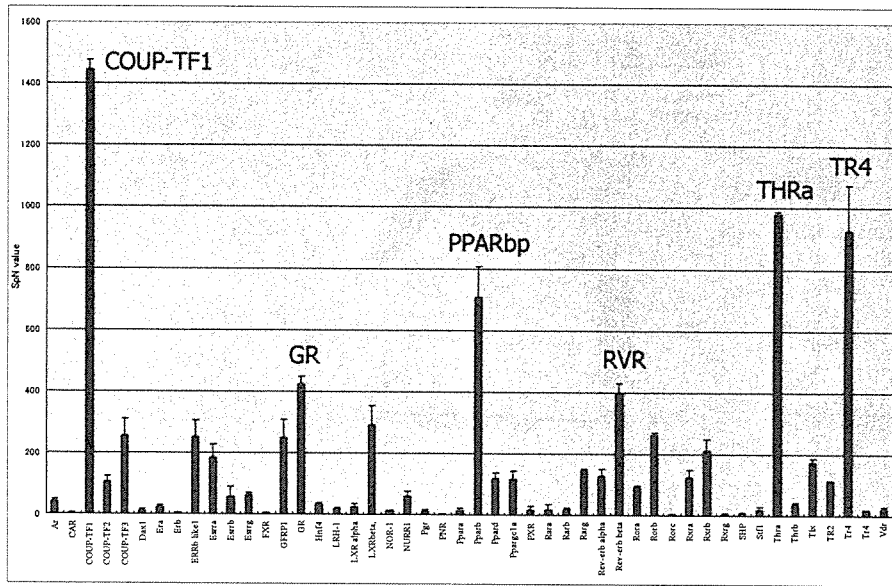
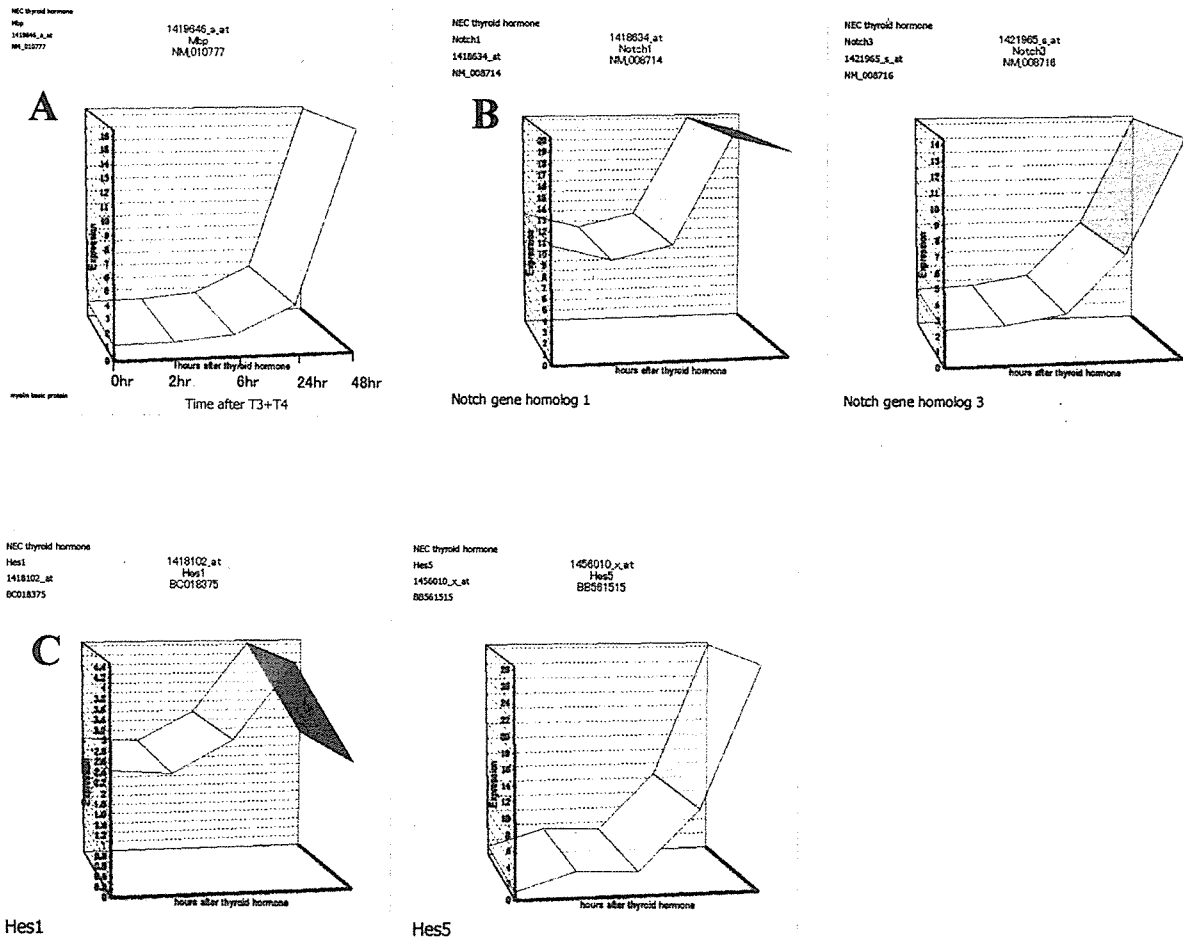


図1 マウス胎生14.5日胎児終脳由来神経幹細胞における核内受容体の発現

培養した胎児神経幹細胞遺伝子発現をPercellome手法を適用したDNAマイクロアレイにて測定した。その結果、特に発現の高いものとして、COUP-TF1, GR, PPARbp, RVR, Thra, TR4が検出された。



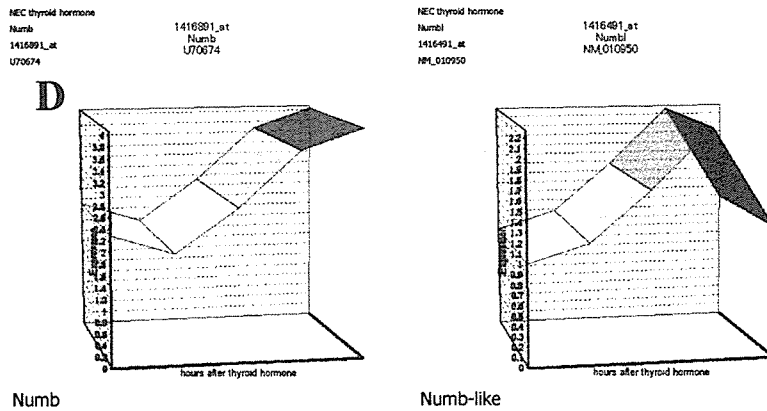
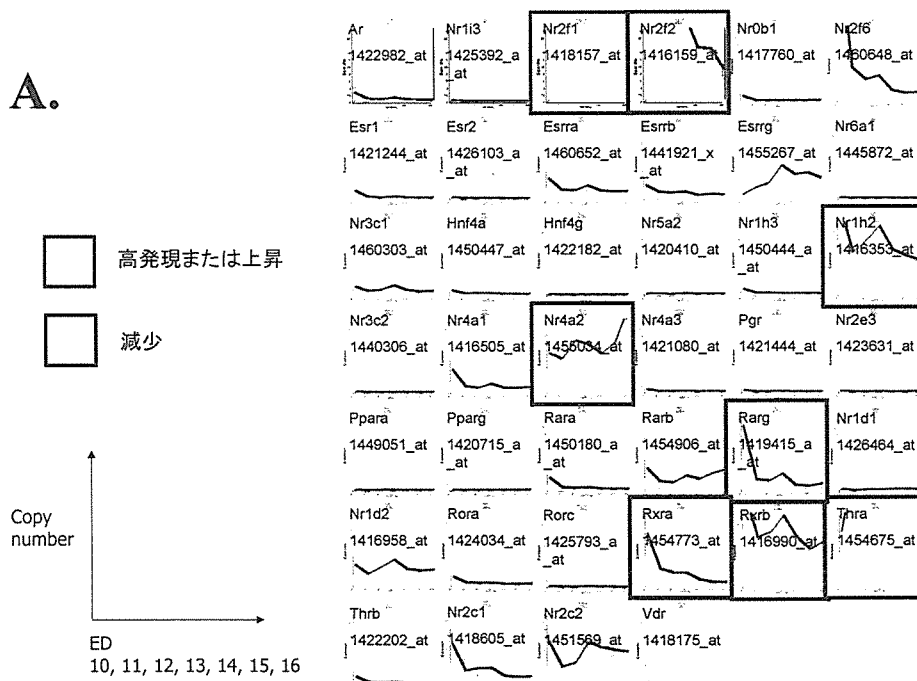


図2 甲状腺ホルモンによるオリゴデンドロサイト分化誘導に関わる遺伝子発現変動検討

マウス胎生 14.5 日胎児終脳培養神経上皮細胞に対し、甲状腺ホルモン (T3 30ng/mL, T4 40ng/mL) 添加後 2, 6, 24, 48 時間後の遺伝子発現を Percellome 手法を適用した DNA マイクロアレイにて測定した。A. Myelin basic protein, B. Notch1(left), Notch3(right), C. Hes1(left), Hes5(right), D. Numb(left), Numb-like(right)

甲状腺ホルモン添加に伴い、オリゴデンドロサイトマーカーの Myelin basic protein の発現が上昇した(A)。さらに、Notch1, Notch3 に加え、その下流遺伝子 Hes1, Hes5 の発現も上昇した(B, C)が、Notch の作用を抑制することが報告されている Numb, Numb-like の発現も上昇し(D)、甲状腺ホルモンにより Notch シグナルの活性化と抑制に関わる遺伝子発現が変化することが分かった。



B.

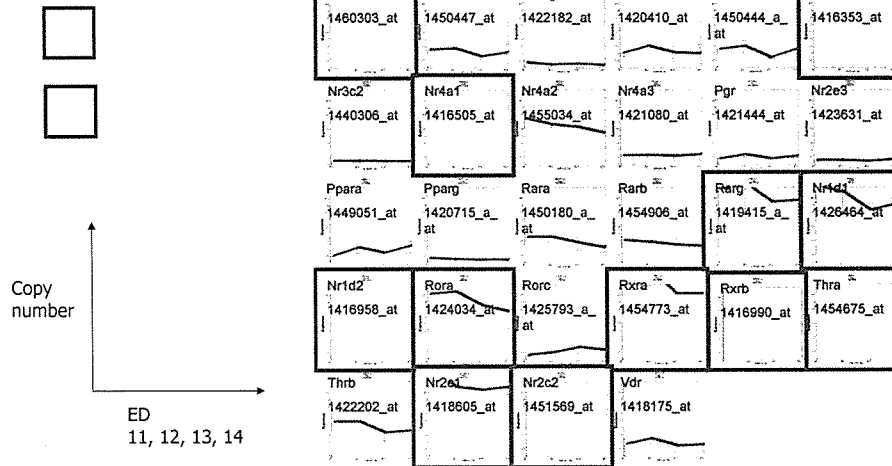


図3 核内受容体発現の経時的解析

A. 妊娠10日目から、発生後期の妊娠16日目まで経時的に胎児終脳を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行い、核内受容体について経時的変化を検討した。 B. 更に、神経幹細胞に特化した解析も実施するため、ニューロンにしか分化しない妊娠11日目から、グリアにも分化可能になる妊娠14日目まで各日ニューロスフェアを培養し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

その結果、ESRRa、GR、NGFI-Ba、REV-ERBa(Nr1d1)、REV-ERBb(Nr1d2)、TR2(Nr2c1)、TR4(Nr2c2)は、終脳全体で見ると発現は低いですが神経幹細胞に於いて高発現を示す核内受容体であることが分かった。

研究課題名=[マイクロアレイ基盤整備]

遺伝子発現の網羅的検索とインフォマティクスの確立

分担研究者 五十嵐 勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・主任研究官

研究要旨

本研究は、当研究班での幅広い研究対象に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することを目指したものである。そのために、我々が開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析による各班員の研究サポートを実施する体制を整え、1) ヒト骨芽細胞株に対するエストロゲン、テストステロン、アロマターゼ阻害剤による遺伝子発現変動の解析（笹野公伸班員）、2) マウス前立腺における BPA 作用の網羅的遺伝子発現解析（杉村芳樹班員）、3) 破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析（加藤茂明班員）、からなる共同研究を実施した。その結果、アロマターゼ阻害剤による骨芽細胞株増殖影響を考察するための網羅的遺伝子発現変化（笹野班員）、経胎盤暴露した BPA がマウス前立腺原基において、転写因子 SF-1 の発現を上昇させること（杉村班員）、破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウス骨髄細胞においてはエストロゲンによるアポトーシス関連遺伝子の発現が変化しないこと、が明らかとなった。これらの知見は、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得るために活用され、本研究班全体の研究を推進した。

A. 研究目的

本研究の目的は、当研究班での幅広い研究対象に DNA マイクロアレイ解析技術を適用することで、他の研究機関では得られないホルモン作用メカニズムを同定することである。すなわち、ホルモン受容体はリガンド依存的転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、胎生期には形態形成プログラムをも制御する。この遺伝子発現カスケードは、臓器ごとにその発生・発達段階により多種多様であると考えられる。例えば、ホルモン活性物質の *in vivo* 試験として従来から行われている子宮肥大試験や

Hershberger 試験における比較的単純な endpoint できえ、幾重かの反応カスケードの結果であると考えられる。このカスケードの解析は容易ではないが、進歩の著しい DNA マイクロアレイ技術を導入することにより包括的かつ迅速な検討を行う方が開けてきた。そこで本研究では、当班へ DNA マイクロアレイ技術を導入し、各班員が実施中の研究を網羅的遺伝子発現解析という側面からサポートする体制を整え、共同研究を実施した。

B. 研究方法

各班員との協議の下、共同研究を行い、組織もしくは細胞検体の供与を受け、DNA マイクロアレイ解析データ解析結果を班員にフィードバックすることで研究をサポートした。すなわち、

各班員からの検体の RNA の分離精製

生体組織もしくは培養細胞を材料とする。生体組織の場合は、採取後すみやかに RNAlater (Ambion 社) に浸漬し、RNase を不活化する。その際、組織の厚さが 5mm 以下となるように細切する。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存する。抽出に当たっては、RNAlater を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製し、破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。DNA 含量に応じ、Spike cocktail (Bacillus 由来の RNA 5 種類を濃度を変えてあらかじめ混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出する。一部を電気泳動し RNA の純度および分解の有無を検討した。培養細胞の場合は、細胞に直接 RLT buffer を添加し、細胞破碎液を調製する。21G の注射針を通し、ゲノム DNA を裁断した後、破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定する。以降は生体組織の場合と同様である。以上のステップのうち、生体組織分離と RNA later への浸漬まで、もしくは培養細胞 RLT 破碎液調製までを共同研究先の班員が実施し、その後のステップを当方で実施した。

Genechip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプ

ロトコールに従い、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を調製し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、Genechip ターゲット液とした。Genechip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス)、Human Genome 133 2.0 (ヒト) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

C. 研究結果

ヒト骨芽細胞株に対するエストロゲン、テストステロン、アロマトラーゼ阻害剤による遺伝子発現変動の解析 (笹野公伸班員)

内分泌かく乱化学物質の骨格系に対する影響の解析を目的とする共同研究を実施した。その背景は、内分泌かく乱化学物質の骨格系に対する影響が、げっ歯類、魚類などの実験動物で奇形という形で数多く報告されているものの、骨芽細胞における遺伝子レベルでの影響については今だ不明のままであったことである。共同研究では、ヒト骨芽細胞のモデルとしてヒト骨芽細胞由来株の hFOB (ATCC, CRL-11372) を使用し、核内受容体のうち、Estrogen receptor, Androgen receptor に注目し、E2、5 α -DHT との遺伝子発現の比較、

受容体拮抗剤、aromatase 阻害薬などを適用することによる遺伝子発現変化をそれぞれ網羅的に比較し、これら受容体を介した遺伝子発現変動を捉えることとした。

その結果、アロマターゼ阻害剤による骨芽細胞株増殖影響を考察するために役立つ網羅的遺伝子発現変化、特に Hox11, ADCYAP1R1 の発現が抑制される結果を得た。

マウス前立腺における BPA の作用の網羅的遺伝子発現変動解析 (杉村班員)

内分泌かく乱化学物質の前立腺に対する影響の解析を目的とする共同研究を実施した。杉村班員は BPA がマウス前立腺においてエストロゲン様作用を示すことを無血清器官培養法によって確認し、さらに BPA により TGF α が発現誘導されることを見いだしている。しかし、BPA が TGF α のみを誘導するとは考えられず、網羅的な解析を進めることにより他の因子を検索することが今後の研究方針を立てる上で重要であると考えられた。そこで、具体的な共同研究として、BPA 経胎盤投与による出生前後の前立腺における遺伝子発現変化の網羅的解析を実施した。胎生 13 日から 16 日まで BPA または DES を経胎盤投与 (母親に経口投与) し、胎生 17 日、18 日、生直後にマウス泌尿生殖洞 (UGS) を採取した。BPA、DES の投与量はそれぞれ 20ug/kg、0.2ug/kg とした。Percellome 法を適用し、コピー数に変換したデータを用いて網羅的に遺伝子発現変化を解析した。

その結果、ケラチン化に関わる遺伝子群 (Hmr, Ivl, Krt1-10, Krt2-1, Krt2-7, Krt2dp, Lor, Sprr1a, Sprr2d, Sprr2h) が BPA で発現上昇していた。これ

はすでに杉村班員が見出している BPA, DES 投与に伴う前立腺の扁平上皮化生に符合する発現変化であると考えられる。また、抗ミューラー管ホルモンの発現を制御する転写因子 Steroidogenic factor-1 (SF1) の発現が、BPA 投与により顕著に発現上昇することも見出された。

そこで、Amh の発現を制御するプロモーターに関する情報を参考に、Sox9, Gata4 が関連するとの予測を立て検討したところ、Gata4 も同様の発現上昇を示すことが分かった。

破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析 (加藤班員)

エストロゲンによる骨代謝制御機構に関する研究として実施した。閉経後骨粗鬆症の原因はエストロゲン欠乏に起因する事は明らかであるとされているが、その作用機序は不明である。骨代謝に直接関わる骨芽細胞 (骨形成細胞)、破骨細胞 (骨吸収細胞) に対する作用が有力視されているが、全身性エストロゲン受容体 (ER) ノックアウトマウスは内分泌系の異常により、骨量減少すら起きない事が分かっている。このような背景のもと、加藤班員が破骨細胞特異的な ER ノックアウトマウスを作製したところ、明確な骨量減少が観察され、骨に対するエストロゲン作用が強く抑制されている事から、破骨細胞が骨組織におけるエストロゲンの主要な標的細胞であると加藤班員は結論づけた。

そこで、破骨細胞でのエストロゲン標的遺伝子を特定するために、加藤班員と協同研究を実施した。12 週齢の野生型、破骨細胞特異的 ERKO マウスそれぞれに対し、卵巣摘出モデル群、卵巣摘

出後にエストロゲンを投与した群を作製し、遺伝子発現変動をエストロゲン投与後4時間で検討した。その結果、エストロゲン投与によりアポトーシス関連遺伝子群、破骨細胞分化遺伝子群が発現上昇するのに対し、破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウスでは抑制されていた。この結果は、エストロゲンの破骨細胞に対する作用はアポトーシスの誘導であるという加藤班員のモデルに合致するものであった。

D. 考察

笹野班員との共同研究は、骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質影響に焦点を絞って実施したが、アロマトーゼ阻害剤による骨芽細胞株増殖影響を考察するために役立つ網羅的遺伝子発現変化、特に Hox11, ADCYAP1R1 の発現が抑制される結果が得られ、ほぼ全ての遺伝子の発現値を俯瞰した解析が進められる網羅的遺伝子発現解析の威力が証明された。

杉村班員との共同研究では、BPA によるケラチン化と SF-1 発現上昇を介した抗ミューラー管ホルモンシグナル系の活性化の可能性が見出された。ケラチン化はこれまでの研究を裏付けるものであるが、SF-1 発現上昇は本研究によって初めて見出された現象である。この成果は BPA の前立腺発達に対する影響を解析する上で有用な情報となると考えられた。

加藤班員と行った共同研究においては、エストロゲンの骨代謝制御機構を解明する一助となる成果が得られた。すなわち、破骨細胞特異的 ER α ノックアウトマウスを用いることで初めて見出された、ER α を介した破骨細胞抑制現象を説明

する機構として、エストロゲンが破骨細胞にアポトーシスを誘導するという加藤班員のモデルを支持する遺伝子発現パターンが得られた。この成果は今後内分泌攪乱化学物質の骨代謝への影響を解析する際に貴重な情報となると考えられた。

E. 結論

本研究は、網羅的遺伝子発現解析を用いることで、各班員の研究方向決定に影響を与える情報を短期間のうちに得ることを狙いとし、実施した共同研究においてその目的を果たす成果が得られた。

網羅的遺伝子発現解析技術は、数万のマーカーを迅速に検討できる有効な技術である。本研究で示されてきたように、この技術は、既知の情報から推測することが困難であった新たな情報を提供してくれる可能性を秘めた解析手法であり、明確な表現型を伴って影響が現れることが少ない内分泌かく乱化学物質の作用を、その作用メカニズムに立ち入って解析するためには今後も有用なツールの一つである。

F. 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.

©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. J Pathol. 2006 209(4):522-31.

©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.

Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. Development. 2006 May;133(9):1625-34.

Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. J Steroid Biochem Mol Biol. (2004) 91 121-129.

©Nakamura Y, Igarashi K, Suzuki T, Kanno J, Inoue T, Tazawa C, Saruta M, Ando T, Moriyama N, Furukawa T, Ono M, Moriya T, Ito K, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. E4F1: a Novel Estrogen Responsive Gene in Possible Athero-protection Revealed by Microarray Analysis. Am. J. Pathol. (2004) 165 2019-2031.

2. 学会発表

核内受容体作動性物質による遺伝子発現変動の Percellome 解析, 五十嵐勝秀、中津則之、相崎健一、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、第33回日本トキシコロジー学会学術年会 P-094

Percellome 手法を用いた遺伝子発現変動解析の発生毒性実験への適用-, 北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、相賀裕美子、菅野純、第33回日本トキシコロジー学会学術年会 P-096

Percellome データ解析システム (Millefeuille システム) の開発, 相崎健一、中津則之、北嶋聡、五十嵐勝秀、菅野純、第33回日本トキシコロジー

一学会学術年会 P-097

Percellome 手法を用いたマウス胎児における TCDD 誘導口蓋裂の分子発生機序の解析, 高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、江馬眞、菅野純、第33回日本トキシコロジー学会学術年会 P-098

Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子の発現パターンの解析, 高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第33回日本トキシコロジー学会学術年会 P-099

Percellome 手法を用いた Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析, 中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野純、第33回日本トキシコロジー学会学術年会 P-100

受容体原性毒性の Percellome トキシコゲノミクス解析, 五十嵐勝秀、第1回毒性オミクスフォーラム T0-10

“A toxicogenomics study on the disruption of epigenetic regulation in neuronal stem cell model”, Katsuhide Igarashi, The 19th Annual and International Meeting of the JAACT symposium S8-2

Dynamic and comprehensive gene expression profile of hypothalamus-pituitary-ovary axis and reproductive tracts during estrous cycle revealed by “Percellome” method, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Yuko Matsushima, Jun Kanno, Keystone Symposia: Tissue selective nuclear receptors(2005. 9. 18-22)

飼料中植物性エストロゲ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, 五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、第32回日本トキシコロジー学会学術年会 P-54

Percellome 手法を用いた化学物質トキシコゲノミクス・データベースの構築-分子毒性機序解析

に向けた試み-, 菅野純、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、北嶋聡、小野敦、児玉幸夫、第32回日本トキシコロジー学会学術年会 P-52

Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた解析, 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、第32回日本トキシコロジー学会学術年会 P-53

分子発生毒性モデルとしての遺伝子欠失胚を用いた遺伝子発現変動の Percellome 手法を用いた解析, 北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、相賀裕美子、菅野純、第32回日本トキシコロジー学会学術年会 P-55

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, 菅野純、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、五十嵐勝秀、環境ホルモン学会第8回研究発表会 PB-22

飼料中の植物エストロゲンがトランスクリプトームに及ぼす影響, 五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋聡、菅野純、環境ホルモン学会第8回研究発表会PB-21

Keystone Symposia: Nuclear Receptors: Steroid Sisters (J8)
Poster Number 176 Poster Session 1 February 29, 2004
Inappropriate activation of estrogen receptor *in utero* affects neural stem cell differentiation
Igarashi K, Kanno J

Toxicogenomics International Forum 2004
Poster session
In utero DES (Diethylstilbestrol) exposure suppresses the expression of several estrogen responsive genes in embryonic neural stem cell revealed by DNA microarray analysis
Igarashi K, Takahashi Y and Kanno J

日本分子生物学会 2004 年会ポスターセッション (2PB-195) 内分泌かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対する作用
五十嵐 勝秀, 高橋 芳樹, 菅野 純

日本分子生物学会 2004 年会ポスターセッション

(1PA-121) アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である

椎名博子, 佐藤隆史, 五十嵐勝秀, 松本高広, 宮本純子, 高田伊知郎, 中村貴, 盛真友, 菅野純, 吉川裕之, 加藤茂明

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション (1PA-264) マウス胎児神経幹細胞の維持におけるDNA メチル化の役割
高橋芳樹, 五十嵐勝秀, 菅野純

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション (2PA-457) 転写因子MesP1 およびMesP2 はマウス心筋細胞の分化に必須である
北嶋聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 井上達, 菅野純, 相賀裕美子

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション (2PA-459) マウス心臓におけるNotch1 シグナリングの機能解析
渡辺裕介, 小久保博樹, 宮川一富田幸子, 五十嵐勝秀, 菅野純, 相賀裕美子

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション (2PB-381) マウス肝臓におけるダイオキシン類による遺伝子発現変動解析
中津則之, 相崎健一, 小野敦, 五十嵐勝秀, 児玉幸夫, 菅野純

日本分子生物学会2004年会ポスターセッション (2PB-386) Percellome - 細胞1個あたりのRNA発現量を測定する方法
相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 小野敦, 菅野純

3. 知的所有権の取得状況

A. 特許取得

なし

B. 実用新案登録

なし

C. その他

なし

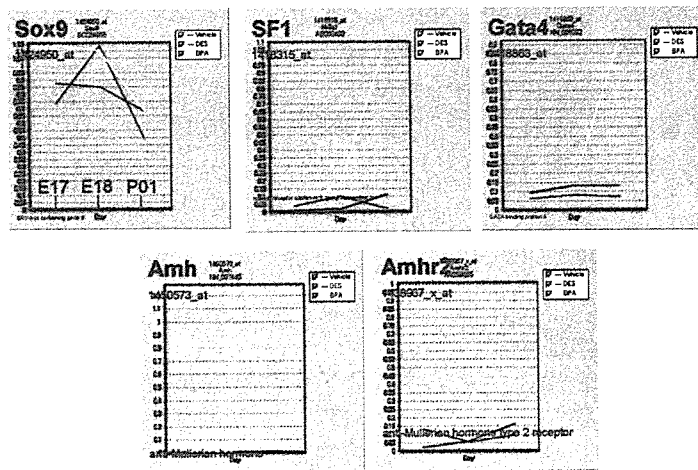


図1 BPA 経胎盤曝露によるマウス前立腺原基（泌尿生殖洞）における遺伝子発現変化
 胎生13日から16日までBPA(20ug/kg), DES(0.2ug/kg)を母体に経口投与し、胎生17日、18日、出生後1日に泌尿生殖洞を採取し網羅的遺伝子発現解析を実施した。SF1, Amh(抗ミューラー管ホルモン)の発現がBPA投与により上昇したことを認めた。Amhの発現を制御するプロモーターに関する情報から、Sox9, Gata4が関連するとの予測を立て検討したところ、Gata4も同様の発現上昇を示すことが分かった。
 青線：vehicle, 黄線：BPA, 赤線：DES。横軸は胎生17日(E17), 胎生18日(E18), 出生後1日(P01)。縦軸は細胞当たりのmRNAコピー数。

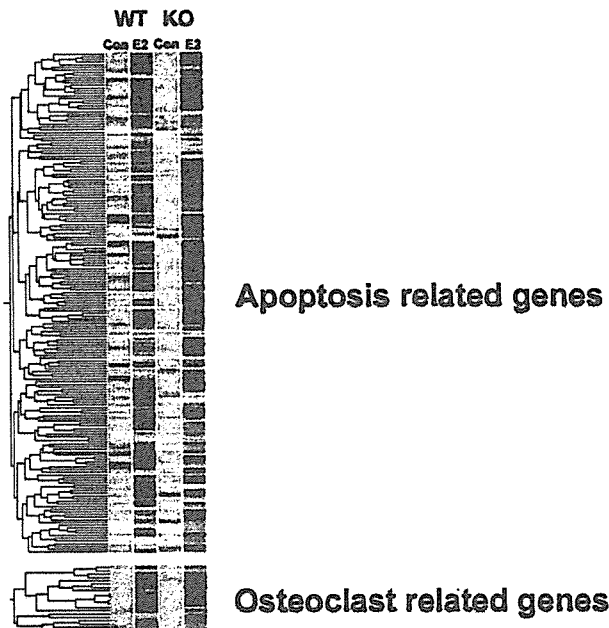


図2 破骨細胞特異的ER α ノックアウトマウス骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析
 12週齢のコントロール群・破骨細胞特異的ERKOマウス群、それぞれの群に対する卵巣摘出モデル群、更にそれぞれの卵巣摘出モデルにエストロゲンを投与した群の合計4群を作製し、骨髄細胞の網羅的遺伝子発現変動をエストロゲン投与後4時間で検討した。その結果、エストロゲン投与でアポトーシス関連遺伝子群、破骨細胞分化遺伝子群が発現上昇する(赤色)のに対し、破骨細胞特異的ER α ノックアウトマウスでは抑制(緑色)されていた。

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	号	ページ	年
Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, <u>Inoue T.</u>	Benzene-induced hemato-poietic toxicity transmitted by AhR in wild-type mouse and nullified by repopulation with AhR-deficient bonemarrow cells: time after benzene treatment and recovery.	Chemosphere			in press
Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama J, Ott T, Trosko JE, <u>Inoue T.</u>	Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state and leukemogenesis.	Exp Biol Med (Maywood)			in press
Yoshida K, Hirabayashi Y, Watanabe F, Sado T, <u>Inoue T.</u>	Caloric restriction prevents radiation-induced myeloid leukemia in C3H/HeMs mice and inversely increases incidence of tumor-free death: implications in changes in number of hemopoietic progenitor cells	Exp Hematol	34	274-283	2006
<u>関澤 純</u>	「環境ホルモン物質」の低用量影響を考える	四国医学雑誌	第62巻第3,4号	113-119	2006
<u>関澤 純</u>	「内分泌かく乱化学物質による低用量影響の蓋然性」	日本リスク研究学会			2006
Misaki K, <u>Matsui S</u> , Matsuda T.	Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Nonoxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	Chem Res Toxicol	20(2)	277-283	2007
Uchida K, Kanai M, Yonemura S, Ishii K, Hirokawa Y, <u>Sugimura Y.</u>	Proprotein convertases modulate budding and branching morphogenesis of rat ventral prostate	Int J Dev Biol	51		2007
Iguchi K, Otsuka T, Usui S, <u>Sugimura Y</u> , Hirano K.	Correlation Between ZIP2 Messenger RNA Expression and Zinc Level in Rat lateral Prostate	Bio Trace Elem Res	112	159-167	2006
Wei M, Hori T, Wanibuchi H, Morimura K, Kang JS, Puatanachokchai R and <u>Fukushima S</u>	Existence of no-observed effect levels for 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline on hepatic preneoplastic lesion development in BN rats	Cancer Lett.	231	304-308	2006
Wei M, Hori TA, Ichihara T, Wanibuchi H, Morimura K, Kang JS, Puatanachokchai R, <u>Fukushima S.</u>	Alpha-benzene hexachloride exerts hormesis in preneoplastic lesion formation of rat hepatocarcinogenesis with the possible role for hepatic detoxifying enzymes	Cancer Lett.	240	102-113	2006
Kinoshita A, Wanibuchi H., Wei M, <u>Fukushima S.</u>	Hormesis in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens	J Toxicol Pathol	19	111-122	2006
Jua G, Takahashi R, Zhang W, Tshuji Y, <u>Sone H</u>	Aldo-keto reductase 1 family B7 is the gene induced in response to oxidative stress in the livers of Long-Evans Cinnamon rats	Int J Oncol	29	829-836	2006
Sarkar P, Shiizaki K, Yonemoto J, <u>Sone H</u>	Activation of telomerase in BeWo cells by estrogen and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin in co-operation with c-Myc	Int J Oncol	28	43-51	2006
Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, <u>Kanno J</u> , <u>Iguchi T</u> , Blumberg B.	Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates	Mol Endocrinol.	20(9)	2141-2155	2006