

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

核内受容体作用物質による生体標的分子相互作用への影響の解析と評価手法の開発

小野 敦 医薬基盤研究所・トキシコゲノミクスプロジェクト主任研究員

研究要旨

本研究では、核内受容体作用物質の化合物特異的もしくは組織特異的な生体作用を検出・評価する系の構築のため、受容体に作用を有する物質が、その標的分子であるホルモン受容体との結合により他の生体分子との相互作用を変化させることに着目し、リガンド結合により受容体と相互作用する種々の分子との相互作用変化を SPR バイオセンサーやマスペクトル等を用いて解析する手法を確立し、得られた結果と生体作用との関連について検討を行うことを目的としている。本年度は、主に核内転写因子及び転写共役因子のアミノ酸配列をもとにデータベース探索により抽出した核内受容体との相互作用が予測される 21 配列について ER との相互作用を検討したところ、8 種の配列でアゴニスト型 ER との相互作用が認められ、そのうち 2 種をプローブとして、28 化合物の SPR スクリーニングアッセイを実施してその有用性について確認した。また、ERE 結合担体を用いた網羅的相互作用因子探索において、ER とリガンド特異的に相互作用する因子の検出に成功した。

A. 研究目的

化学物質が生物の内分泌系をかく乱し、野生生物及びヒトの健康に影響を及ぼすことが懸念されている。その一方、我々の現代生活においては膨大な種類の化学物質が利用されているため、これらの化学物質の生体影響について早急に調査する必要がある。一方、これまでの研究より同程度のホルモン様作用を示す化合物であってもその生体作用が化合物ごとに異なることが示されており、科学的に裏付けられた対応が求められている。しかし、核内受容体作用物質の標的分子である核内受容体及びその下流のレギュレーションについては未だ不明の部分も多く、個々のホルモン様作用の内分泌かく乱性による生体影響や危険性についての評価は依然困難であり、化合物の内分泌かく乱メカニズムに即した信頼性の高いスクリーニング系の構築が求められている。内分泌ホルモンは、その「特異的」受容体と結合することでその作用を発現する。

核内受容体はリガンドとの結合により立体構造が変化して、制御下にある遺伝子のプロモーター領域に存在する受容体レスポンスエレメントにコファクターをリクルートしてその転写を制御し、引き続く生体反応を惹起する。本研究では、受容体作用物質が標的分子であるホルモン受容体との結合により他の生体分子との相互作用を変化させることに着目し、種々の分子と受容体相互作用の変化を SPR バイオセンサーやマスペクトル等を用いて解析する手法を構築し、その変化と生体作用との関連について検討を行う。核内受容体作用リガンドが受容体構造に及ぼす影響が化合物特異的に異なることは、これまでも報告されているが、それらを生体作用との関連から解析する試みはなされていない。また近年の遺伝子発現解析技術の発達によりそれぞれの化合物の暴露による反応結果としての遺伝子発現変化が化合物ごとに異なる情報も蓄積されつつあるが、全てのホルモン受容体作用物質について

多数の臓器で解析を行うことは困難である。

一方、内分泌かく乱性が危惧される物質の作用分子である核内受容体は、そのものが転写調節因子であり化学物質が結合した状態における受容体の挙動すなわち他の細胞内因子との相互作用を解析することが出来れば、引き続き生体反応である遺伝子発現調節との関連において化学物質の生体作用を解析することが可能である。またさらに、受容体作用物質の組織特異性や種差について解析する手法の構築のため、受容体作用物質が影響を及ぼす可能性のある組織や細胞における構成要素からなる擬似生体系を *in vitro* に構築し、標的分子(ホルモン受容体)と生体分子との特異的な相互作用の変化について解析するための手法の開発を行う。これまでもエストロゲン受容体と相互作用する細胞内因子に関する報告は多数あるが、化学物質によるそれぞれの因子との相互作用変動についての解析やそれを用いたスクリーニング手法はこれまでは報告されておらず、本研究における成果は化学物質の内分泌かく乱を始めとした、生体作用の解析に貢献する。

本年度は、主に核内転写因子及び転写共役因子のアミノ酸配列をもとにデータベース探索により抽出した核内受容体との相互作用が予測される 21 配列について ER との相互作用を検討したところ、8 種の配列でアゴニスト型 ER との相互作用が認められ、そのうち 2 種をプローブとして、28 化合物の SPR スクリーニングアッセイを実施してその有用性について確認した。また、ERE 結合担体を用いた網羅的相互作用因子探索において、ER とリガンド特異的に相互作用する因子の検出に成功した。

## B. 研究方法

### 1. ER と相互作用する新規分子の SPR 探索

核内転写因子や転写共役因子として報告されている分子であって、これまで ER との相互作用についての報告のないタンパク質について、核内受容体と相互作用モチーフとの相同性を有する部位を

データベース探索して、候補となるアミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列を含む周辺部位について N 末端ビオチン化ペプチドを合成し、測定用バッファー(50mM Tricine-NaOH pH7.8、150mM KCl、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.05% Tween 20%、BSA 5 μg/ml、TCEP 5nM)に希釈してストレプトアビジンセンサーチップにインジェクトして固定化して SPR 探索に用いた。SPR 探索では候補ペプチドを固定化したセンサーチップに、数種の代表的リガンドと混合した核内受容体をフローして結合活性を解析した。

### 2. 新規 ER 相互作用ペプチドを用いた化合物スクリーニング

新規に ER との相互作用活性が検出されたペプチドのうち、特に強い相互作用が認められた DAX1、AIB3 由来のペプチドを用いて約 30 種の化合物について ER アゴニストスクリーニングを実施した。ER は、リコンビナント Human ER α および β (invitrogen) を使用した。ER を測定用バッファーで希釈して、化合物を 10<sup>-6</sup>M の濃度で 10nM ER と混合し、4℃、5 分以上インキュベートした後、サンプルをセンサーチップにインジェクトして SPR 装置(Biacore 3000, BiacoreAB)を用い、結合と解離の過程をそれぞれ測定した。相互作用の結合解離過程をそれぞれ 2 分間測定してプローブ未固定のコントロール表面とのレスポンスの差より相互作用によるレスポンスを求めた。解析には BIAevaluation 3.0(BIACORE AB)を用いた。

### 3. 核抽出液を用いた網羅的相互作用プロファイルの解析

核抽出液からの相互作用分子の分離には、ERE を固定化セファロース担体(GE Healthcare)を用いた。すなわち予めストレプトアビジンコートされたセファロース担体にビオチン化 ERE を混合して約 1 時間放置し、ERE を固定化した。ER-核内たんぱく質複合体を形成のため、予めリガンド化合物と混合した ER 液を、MCF-7 細胞核抽出物(Active Motif

社)と混合して、さらに 15 分間、4°C 下でインキュベートした。ER-核内たんぱく質複合体を ERE 固定化セファロース担体でキャプチャーするため、まず ERE 固定化セファロース担体をフィルターカラム (UltraFree-MC(0.45  $\mu$ m)、ミロポア) に分注し、数回洗った後、ER-核抽出液混合液を加え 5 分程度放置し卓上小型遠心機にて遠心して未結合成分を除去した。さらに、結合バッファーで 1 回洗い、0.5%SDS 溶液を加えて混合し ERE 固定化セファロース担体に結合した成分を溶出した。溶出液は、マイクロコン YM3 (ミロポア) で濃縮し、SuperSep7.5%ゲル (和光純薬) を用いて SDS-PAGE (Laemmli 法) を行った。泳動終了後、ネガティブ染色によりバンドを検出した。

## C. 研究結果

### 1. ER と相互作用する新規分子の SPR 探索

図1に代表的リガンド存在下における ER $\alpha$  と ER $\beta$  と候補ペプチドとの結合解離過程の SPR センサーグラムの代表例を示した。また、図2に本年度検討を行った全ペプチドにおける ER $\alpha$  と ER $\beta$  との相互作用活性を 2 分間結合後の結合量によるヒートマップにより示した。今回検討を行った 21 種のペプチドのうち 8 種で、いずれかのリガンド存在下において ER $\alpha$  もしくは ER $\beta$  との明確な相互作用が検出された。相互作用が検出されたペプチドはいずれも ER $\alpha$  に比べ ER $\beta$  で強くもしくは同程度の相互作用活性が認められた。今回の相互作用の認められたペプチドはいずれも、E2、GEN もしくは BPA 結合によるアゴニスト型 ER との相互作用であり、アゴ型もしくはアンタゴニスト型 ER との相互作用は認められなかった。

### 2. 新規 ER 相互作用ペプチドを用いた化合物スクリーニング

上記の新規相互作用ペプチドの探索において検討に用いたペプチドは、メンブレン上にペプチドをハイスループット合成する方法により合成したもの

であり、純度や配列精度などは、通常のペプチド合成法と比べあまり良くない。そこで上記ペプチド探索において ER との相互作用活性が認められたペプチドのうち転写因子 DAX1 及び転写共役因子 PRIP に由来する2種のペプチドをプローブ用に高純度合成し、新規スクリーニング用プローブとしての有用性について、実際に 28 種の化合物について、これまでに開発した SPR-HTTPS 系において用いてきた TIF2 プローブと並列に簡易スクリーニングを実施し比較検討した。図3に2種のペプチドの DAX1、PRIP のアミノ酸配列中における位置を示した。今回、スクリーニングを行った化合物を表1に示した。スクリーニング対象化合物として、これまでに大規模スクリーニングにおいて ER アゴニスト活性が検出されている化合物を中心に選択し、スクリーニングを実施した。図4に3種のペプチドを用いた ER $\alpha$ 、ER $\beta$  系アゴニストスクリーニング結果を示した。いずれの化合物においても TIF2 では ER $\alpha$ 、ER $\beta$  ともにほぼ同程度の結合を示した。TIF2 で活性の認められた化合物はいずれも PRIP、DAX1 において ER $\beta$  系で非常に強い結合が認められたが、ER $\alpha$  ではいずれも弱い結合を示すのみであった。特に PRIP は ER $\beta$  に対して TIF2 より強い結合活性を示し、これらの共役因子が共存する環境下では ER $\beta$  はむしろ PRIP をリクルートする可能性が示唆された。これらの結果より、これら 2 種のペプチドは ER $\beta$  系のスクリーニングにおいて TIF2 よりもダイナミックレンジの広い測定が可能であることが示された。

### 3. 核抽出液を用いた網羅的相互作用プロファイルの解析

核内受容体と相互作用する因子の ERE 結合カラムによる網羅的解析の手順を図5に示した。ERE をセファロース担体に固定化して、核抽出液中の ER 相互作用成分をフィルターカラムにより用いてトラップし、引き続き SDS-PAGE により解析した。まず始めに、ER $\alpha$  もしくは ER $\beta$  のみを ERE 固定化セファロースに添加して、本法により解析可能であるかど

うかについて検討した(図6)。いずれの受容体についても ERE 結合画分より単一バンドの検出が可能であり、測定条件下で ER を ERE 上にトラップ可能であることが示された。添加する ER の量などについて検討を行った後、ER の代表的なリガンドの存在下における ER $\alpha$  と MCF7 核抽出液中での相互作用因子の探索を行った結果を図7に示した。カラム法では、リガンド非存在下においても ER $\alpha$  の ERE への結合が認められた。これはこれまでの報告と一致する。E2 及び BPA の存在下では図7において ER の他に b, c, d のバンドの検出が認められた。一方、OHT 存在下において E2 では認められないバンド a が検出され、アンタゴニスト特異的に相互作用する因子の可能性が示唆された。

#### D. 考察

ER と特異的な相互作用活性を有する新たな分子プローブの探索のため、本年度は昨年度に引き続き核内受容体との相互作用に関与するといわれるアミノ酸配列相同部位を有するたんぱく質の受容体との相互作用部位およびその相同配列について、ペプチドを合成して、代表的な数種のリガンド存在下における ER $\alpha$ ・ $\beta$  との相互作用について検討を進めた。昨年度は同様の手法により、これまで ER との相互作用について報告のない PGC-1 由来ペプチドが ER $\beta$  特異的な相互作用活性を示した。PGC-1(PPAR $\gamma$ -coactivator-1)は、PPAR $\gamma$  のコファクターであることから、本年度は同様に核内転写因子や転写共役因子を中心に解析を行った。その結果、新たに数種のペプチドとアゴニスト型 ER との相互作用活性が示された。相互作用活性を示したペプチドのうち 2 種を用いてこれまでに大規模スクリーニングを実施した 28 化合物について SPR スクリーニングを実施したところ、今回プローブとして選択した DAX1 および PRIR 由来のペプチドは、いずれもこれまでスクリーニングに用いてきた TIF2 に比べ ER $\beta$  では強い相互作用活性を示し、これらが共存する環境下では ER $\beta$  は TIF2 よりむしろ PRIP

をリクルートする可能性が示唆された。一方、ER $\alpha$  では DAX1 および PRIR 由来ペプチドとの相互作用活性を示すものの TIF2 に比べ非常に弱かった。今回、新たなスクリーニング用プローブとして選択した、DAX1 はステロイド産生組織の発達に寄与する核内オーファン受容体で、レチノイン酸による転写の抑制因子として機能することが知られている。また、DAX1 欠損や異常は先天性の副腎形成異常や生殖機能不全を引き起こすことが報告されており、これまで DAX1 と ER との直接の相互作用の報告はないが、今回の結果は、内分泌かく乱化学物質による障害として示唆されている生殖機能発達への影響において、ER と DAX1 との相互作用への影響が関連する可能性を示唆するものと考察された。一方、PRIP(PPAR interacting protein)は、昨年度の解析において新たに ER との相互作用が確認された PCG-1 と同様 PPAR の転写共役因子として選択したが、その後の検索の結果 ASC-2、RAP250 として報告されている転写共役因子と同一のもので、PPARs を始め GR, ERs, RARs, RXRs, TRs, VDR といった幅広い受容体と相互作用することがすでに報告されていた。PRIP は、クロマチンリモデリングを引起し、NF-kappa-B パスウェイのコアクチベーションに関与する。PRIP 由来ペプチドは、昨年度報告した PCG-1 と同様、ER $\alpha$  に比べ ER $\beta$  に対して非常に選択的な相互作用を示すことから、内分泌かく乱物質による ER $\beta$  を介した PPAR シグナルへの影響を示唆する結果と考察された。スクリーニングを実施した 2 ペプチド以外にも数種のペプチドにおいて相互作用活性が示されており、それらについても今後、解析を進める。

アミノ酸配列をもとにした相互作用因子の探索する手法とは別に、本年度は新規相互作用因子の探索のため核内に存在する全タンパク質からの相互作用因子の網羅的解析法の検討を行った。本研究では、始めにプロテインチップによる相互作用分子の解析を試みたが、プロテインチップは、TOF-MS を検出に用いるため比較的 low molecular weight には高感度であ

るが、核内受容体共役因子の多くはネイティブな状態では高分子であることから不向きであることが示唆されたため、ERE 結合担体による相互作用因子の抽出を試みた。本年度は、結合、洗浄等の条件検討の結果、ER $\alpha$ を用いた解析によりリガンド特異的に結合すると思われるバンドの検出に成功した。しかしながら、バンドの同定を行うには、再現性やバンドの分離精度などに問題が残されており、今後さらなる条件検討が必要であると考察された。

今後は、上記の相互作用因子の探索により得られた結果をもとに、化合物の生体作用についてより詳細に検討できる新たなスクリーング評価手法の開発を進める。

#### E. 結論

核内受容体作用物質による化合物特異的もしくは組織特異的な生体作用を検出・評価する系の構築のため、リガンド結合により受容体と特異的に相互作用する種々の分子との相互作用変化を解析する手法の構築を目的として、本年度は、アミノ酸配列をもとにした相互作用分子の探索により、生殖機能発達に関与する核内受容体 DAX1 由来ペプチドがアゴニスト型 ER $\beta$  選択的に相互作用することが新規に明らかとなった。また、PPAR の転写共役因子である PRIP が、やはりアゴニスト型 ER $\beta$  と非常に強く相互作用することが明らかになった。実施に化合物スクリーニングアッセイを行い、スクリーング用プローブとしての有用性を検討したところ、いずれも ER $\beta$  系では、これまで用いてきた TIF2 由来のペプチドに比べダイナミックレンジの広い解析が可能であることが示された。一方、ERE 結合担体を用いた核内タンパク質からの相互作用因子の網羅的解析では、リガンド特異的な相互作用因子の検出に成功した。本系については、引き続き解析条件などの検討が必要であるが、今後、さらに多くの特異的相互作用因子の探索を進め、それらを統合的に解析する系を構築することで、より詳細なメカニズムに即した化合物スクリーニングが可能になり、個々の化

合物についてより多面的に内分泌かく乱作用を検討可能になると結論づけられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 誌上発表

なし

##### 2. 学会発表

Takeki Uehara, Naoki Kiyosawa, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Tetsuo Urushidani, Taku Nagao, A toxicogenomics approach for risk assessment of glutathione depletion and oxidative stress-induced nongenotoxic hepatocarcinogenesis in the rat liver. 43rd Congress of The European Societies of Toxicology (Croatia, 2006.9.20-24)

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

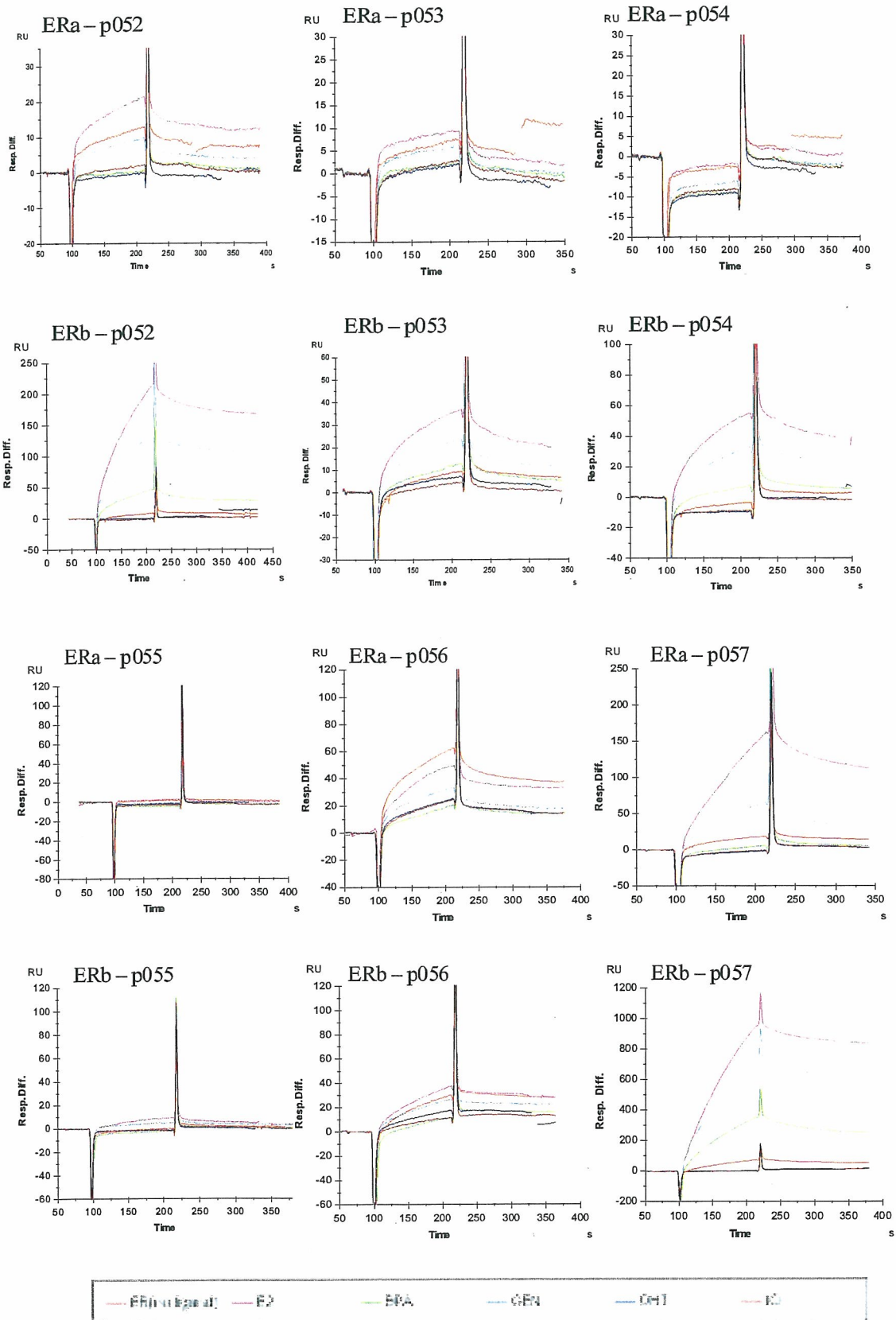


図1. 各種ペプチドとERとの相互作用SPRセンサーグラム  
各グラフタイトルのpナンバーは、候補ペプチドのIDを示す。

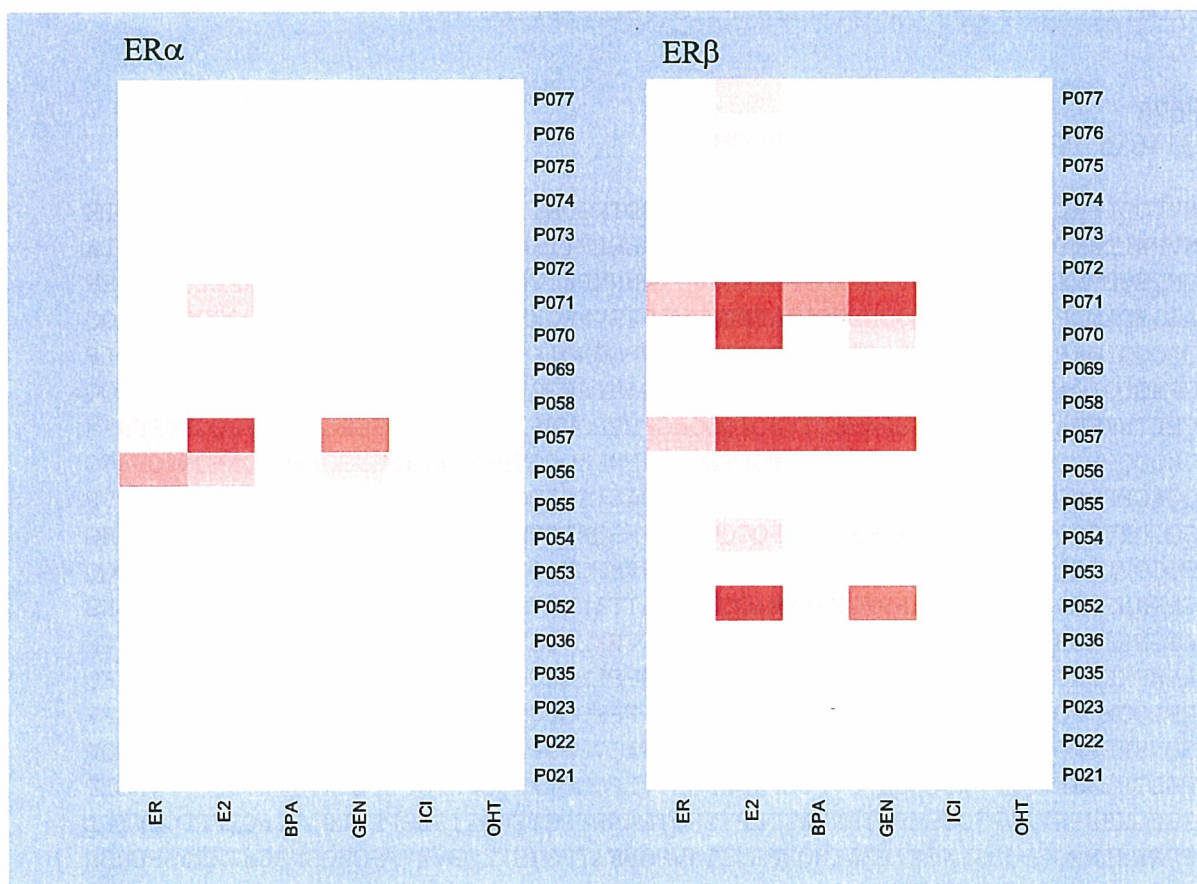


図2. 検討を行った全ペプチドとのERα、ERβの相互作用活性のまとめ

P052

P51843, DAX1\_HUMAN Nuclear receptor 0B1 (Nuclear receptor DAX-1)

MAGENHQWQGSILYNMLMSAKQTRAAPPEAPETRLVDQCWGCSCGDEPGVGRELLGGRNVALLYRCCFCG  
KDHPROGSILYSMLTSAKQTYAAPKAPEATLGPCWGCSCGSDPGVGRAGLPGGRPVALLYRCCFCGEDHP  
RQGSILYSLLTSSKQTHVAPAAPEARPGGAWWDRSYFAQRPGGKEALPGGRATALLYRCCFCGEDHPQOG  
STLYCVPTSTNQAQAAPPEERPRAPWWDTSAGALRPVALKSPQVVCEAASAGLLKTLRFVKYLPFCQVLPFL  
DQQLVLRNCWASLLMLELAQDRLQFETVEVSEPSMLQKILTRRRRETGGNEPLPVPTLQHHLLAPPAEAR  
KVPSASQVQA IKCFLSKCWSLNI STKEYAYLKGTVLFNPDVPGLOQCVKVIQGLQWGTQQILSEHTRMTHQ  
GPHDRFIELNSTLFLLRFINANVIAELFFRPIIGTVSMDDMMLEMLCTKI

P076

Q14686, PPAR-interacting protein (PRIP)

MVLDDLPNLEDIYTSLCSSTMEDSEMDFDSGLEDDDDTKSDSILEDSTIFVAFKGNIDDKDFKWKLDAILK  
NVPNLLHMESSKLVQKVEPWNSVRVTFNIPREAAERLRILAQSNNQQLRDLGILSVQIEGEGAINLALA  
QNRSDQVRMNGPMGAGNSVRMEAGFPMASGPGIIRMNPNATVMIIPGGNVSSSMAPGPNPELQPRTPRP  
ASQSDAMDPLLSGLHIQQQSHPSGSLAPPHHPMQPVSVNRQMNPNANFPQLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ  
QQQQQLQARPPQOHHQQOQPOGIRPQFTAPTQVPVPPGWNQLPSGALQPPPAQGS LGTMTANQGWKKAPLP  
GPMQQQLQARPSLATVQTPSHPPPPYPFGSQASQAHTNFPQMSNPGQFTAPQMKSLQGGPSRVPTPLQQ  
PHLTNKSPASSPSSFQOGSPASSPTVNQTQQQMGRPPQNNPLPQGFQQPVSSPGRNPMVQQGNVPPNFM  
VMQQQPPNQGPQSLHPLGGMKRLPPGFSAGQANPNFMQGVSTTATTTPGNSGAPQLQANQNVQHAGG  
QGAGPPQNMQVSHGPPNMMQPSLMGIHGNNMNQOAGTSGVPQVNLNMQGQPOQGPSSQLMGMHQIIVP  
SQGQMVQQGTLPNPNMILSRAQLMPQGMVNPSSQNLGSPQRMTPPKQMLSQOQPOMMAMPHNQMMG  
PQGVLLQQNPMIEQIMTNMQGNKQOQFNTQNSNVMPGPAQIMRGFTPNMQGNMVQFTGQMSGQMLPQQ  
GPVNNSPSQVMGIQGVLRPPGSPHMAQQHGDPAATTANNVSVLSQMPDVSIIQOTNMVPPHVQAMQONS  
ASGNHFSHGMSFNAPFSGAPNGNQMSGQNPGFVWKDVTLTSPILLVNLQSDISAGHFVNNKQNNTN  
ANKPKKKKPPRKKKNSQDNLNTPDTRPAGLEEADQPPLPGEQGINLDNSGPKLPEFSNRPPGYSPQVEQ  
RPLQQMPQLMQHVAPPPQPPQOQPQLPQQOQPPPPSQPSQQOQOQOQMMMLMMQDPKSVRLPV  
SQNVHPPRGPLNPDQRMPMQSGSVPMVSVLQGPASVPPSPDKQRMMPVNTPLGNSNRKMVYQESPQN  
PSSSPLAEMASLPEASGSEAPSVPGPNMPSHVVLQNLMMTGPKPGSPLSATQGATPQOPPVSLSL  
SSHGHFFPNVAAPTQTSRPKTPNRASPRPYYPQTPNNRPPSTEPSEISLSPERLNASIAGLFPPQINIP  
PPRPNLNRGFDQGLNPTTLKAIQAPSNTMNSNFATPQTHKLDVSVVNSGKQSNNGATKRASPSNSR  
RSSPGSSRKTTPSPGRQNSKAPKLTLASQTNAAALLQNVLPVSVPTPLANPPVPGSFPNNSGLNPQN  
STVSVAAVGGVVEDNKESLNVQSDCQNSQSRKEQVNI ELKAVPAQEVKVVVPEQSKKDKGQPSDPNKL  
PSVEENKNLVSPAMREAPTSLSQLLDNSGAPNVTIKPPGLTDLEVTPPVVSGEDLKKASV IPTLQDLSS  
KEPSNSLNLPHSNELCSSLVHPELSEVSSNVAPSIPPVMSRPVSSSSISTPLPPNQITVFVTSNPIITSA  
NTSAAALPTHLQSA LMSTVVTMPNAGSKVMVSEGCQSAAQSNARPOFITPVFINSSSI IQVMKGSQPSTIPA  
APLTTNSGLMPPSVA VVGLHIPQNIKFSSAPVPPNALSSSPAPNIQTGRPLVLSRRATPVQLPSPPCTS  
SPVWPSHPPVQVKELNPDEASPQVNTSADQNTLPSSQSTTMVSPLLTNSPGSSGNRRSPVSSSKGKGV  
DKIGQILLTKACKKVTGSLEKGEQYGADGETEQGLDITAPGLMGTEQLSTELDSKTPTPPAPTLLKMT  
SSPVGPGTASAGPSLPGGALPTSVRISVTTLVPSLISAVPTTNSNHGGIASESLAGGLVEEKVGVSHPEL  
LPSIAPSQNLVSKETSTTALQASVARPELEVNAAI VSGQSSEPKIVEKSKIPGRRNSRTEEPTVASESV  
ENHRKRSSRPASASSSTKDITSAVQSKRRKSK

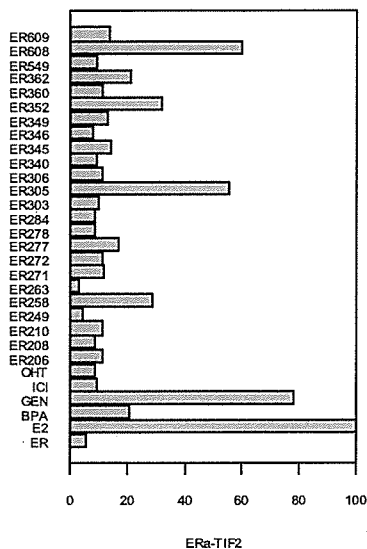
図3. 新規スクリーニングプローブとして選択したペプチドの配列(赤字)と由来タンパク質アミノ酸配列における部位



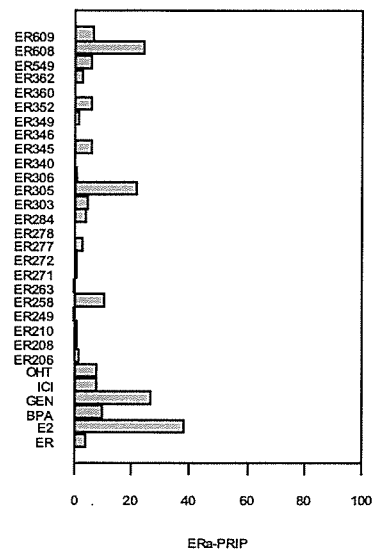
表1. スクリーニングを実施した化合物

Chem. ID	CAS No.	Name
ER206	6807-17-6	4,4'-(1,3-Dimethylbutylidene)diphenyl
ER208	843-55-0	4,4'-Cyclohexylidenebisphenol
ER210	5153-25-3	4'-Hydroxybenzoic acid 2-Ethylhexyl ester
ER249	-	(4-Aminophenyl)(2,3,4,5,6-Pentamethylphenyl)methanone
ER258	-	3-(2-Chloro-6-Fluorobenzyl)-7-Hydroxy-4-Propyl-2H-Chromen-2-one
ER263	-	Methyl 5-[2-Amino-4-(trifluoromethyl)-5-Pyrimidinyl]-3-(2,6-Dichlorophenyl)-4-Isoxazolecarboxy
ER271	41796-12-7	4-Heptylsulfanyl-phenol
ER272	-	2,4-Dihydroxyphenyl 1-Naphthyl Ketone
ER277	81-92-5	Bis-(4-hydroxyphenyl)-(2-hydroxymethylphenyl)methane
ER278	341-58-2	2,2'-Bis(Trifluoromethyl)benzidine
ER284	81936-33-6	p-(trans-4-Propylcyclohexyl)phenol
ER303	1038-66-0	4,4'-Diaminooctafluorobiphenyl
ER305	131-55-5	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone
ER306	17696-62-7	4-Hydroxybenzoic acid phenyl ester
ER340	52222-87-4	6-benzoyl-2-naphthol
ER345	6468-96-8	3-Phenylumbelliferone
ER346	2589-73-3	1-(4-Hydroxy-phenyl)-octan-1-one
ER349	-	1-(4-Hydroxyphenyl)-2-Phenyl-3-Heptanone
ER352	7507/1/9	3,4-Bis(4-Hydroxyphenyl)-3,4-Hexanediol
ER360	472-41-3	3,4-Dihydro-4-(4-Hydroxyphenyl)2,2,4-Trimethyl-2H-1-Benzopyran
ER362	59517-19-0	3,3'-Dimethyl-4,4'-Biphenol
ER549	6948-88-5	alpha-Naphtholbenzein
ER608	131-55-5	2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone
ER609	131-56-6	2,4-dihydroxybenzophenone

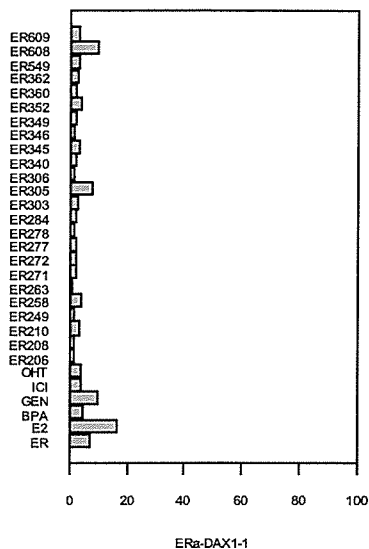
ER $\alpha$ -TIF2



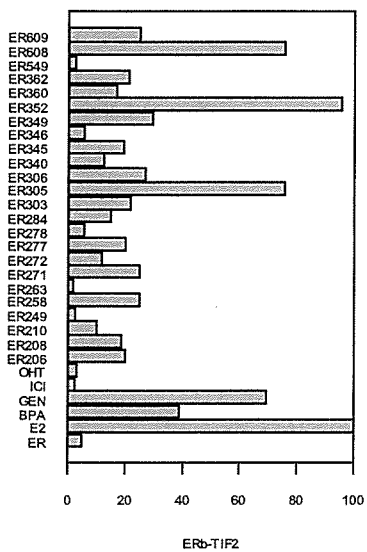
ER $\alpha$ -PRIP



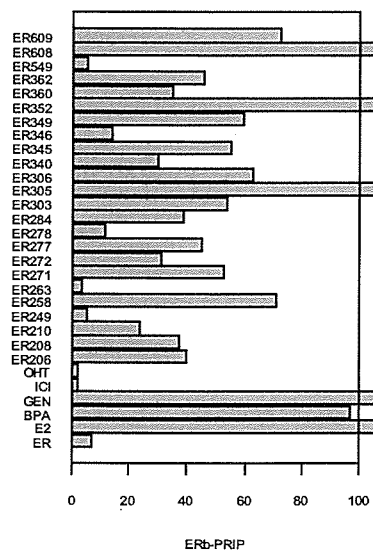
ER $\alpha$ -DAX1



ER $\beta$ -TIF2



ER $\beta$ -PRIP



ER $\beta$ -DAX1

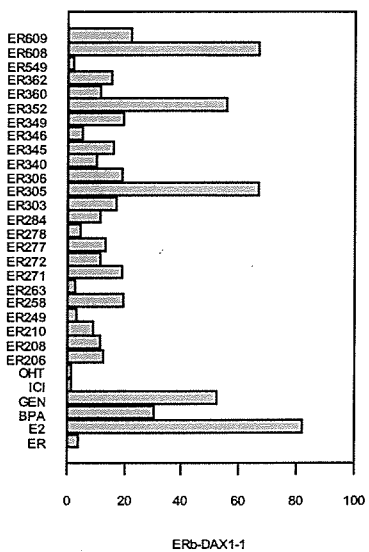


図4. 3種のプローブ(TIF2, PRIP, DAX1)によるER $\alpha$ 、ER $\beta$ アゴニストスクリーニング結果 (結果はE2存在下におけるER-TIF結合量を100%として表示)

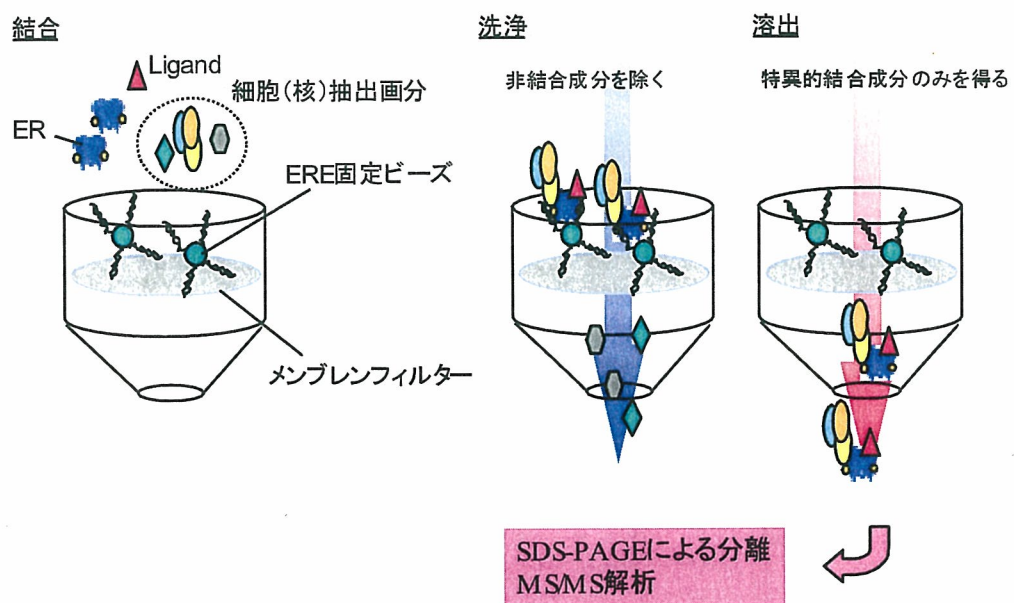
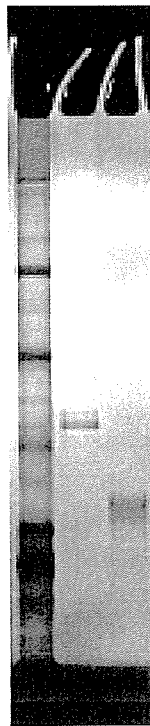


図5. DNA固定化担体を用いた核内受容体リガンド特異的相互作用因子の解析



1; マーカー  
2; ER $\alpha$   
3; ER $\beta$

図6. ERE固定化セファロースへのER $\alpha$ 、ER $\beta$ 結合活性の検討

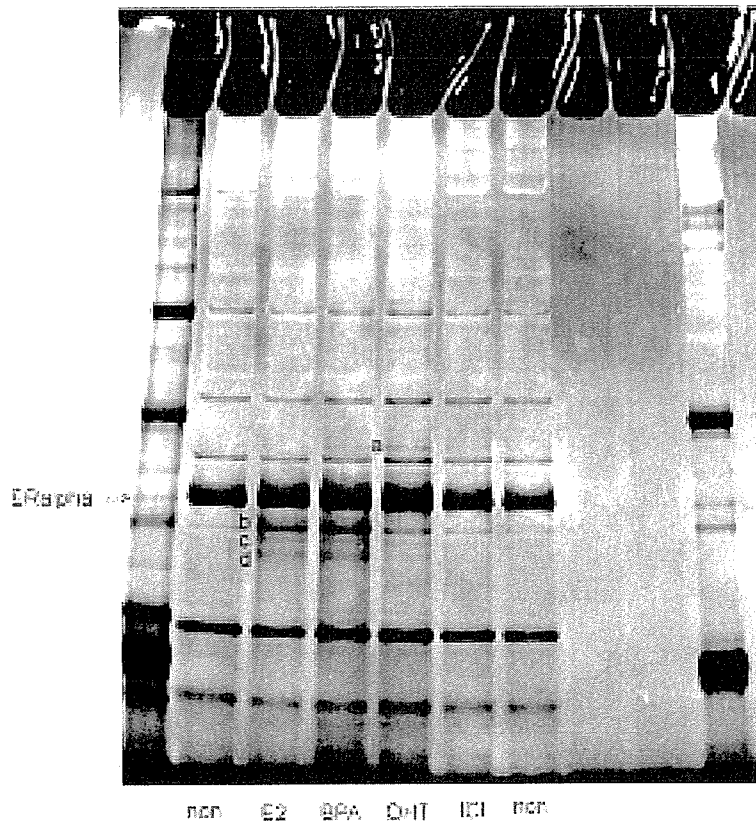


図7. MCF7核抽出液中の各種リガンド結合型ER $\alpha$ との結合成分の検討

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

受容体作用物質ターゲット細胞の転写制御関連分子プロファイルの研究

小原 有弘 (独)医薬基盤研究所 細胞資源研究室研究員

研究要旨

核内受容体や関連する転写制御因子の発現に関しての網羅的、詳細な比較検討を行うため内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を選択し、形態観察記録、倍加時間算出をしながら細胞培養を行うとともに遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析には47種の核内受容体と外部標準(シロイヌナズナ)を含む380種のTaqMan®プローブを用いてTaqMan® Low Density Arrayを作製し解析に用いた。その際、細胞毎に異なる遺伝子発現量を標準化するため、細胞1個あたりの遺伝子発現量とするため、細胞のDNA量に比例した外部標準(シロイヌナズナ cDNA)を添加した。核内レセプターに関連する遺伝子発現を解析した結果、細胞のキャラクタライズを示す非常に有用な知見が得られた。

A. 研究目的

培養細胞を用いた高速分析系は各国で開発が進められており、様々な細胞が用いられている。エストロゲン受容体を始めとする核内受容体のリガンドは非常にリダンダントに他の受容体に作用することが明らかになっており、このため用いた細胞によってその応答性が大きく異なることもあり、結果の比較評価を困難にしている。この多様性は国際的バリデーションの際には統一性の問題となるものの、科学的には個体差や臓器特異性の関連情報源と成り得る。本研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を中心に、個々の細胞株におけるターゲット分子を含む各種の核内受容体や関連する転写制御因子の発現に関しての網羅的、詳細な比較検討を行い、感受性差と関連分子の発現との解析より化学物質の作用特異性、個体差

や臓器特異性の情報源としての有効性を検討する。またこれらのデータベース化・公開を図り、細胞のキャラクタライズ情報として情報提供することを目指す。

B. 研究方法

<細胞に関して>

L190(肝臓)

肝臓のイトウ細胞由来の正常細胞であり、脂肪蓄積能がある細胞。

培地:Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HUV-EC-C(血管内皮)

ヒト正常血管内皮細胞であり、in vitroにおける血管内皮の研究に多用されている。

培地: MCDB 107 with 10% FBS, 100  $\mu$  g/ml heparin and 50  $\mu$  g/ml endothelial cell growth supplement

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### NCR-G1 (精巣)

AFP産生能のほか、Type IV collagen, fibronectin, lamininなど細胞外基質の産生能を保持した細胞株

培地: G031101

継代方法: The cell is peeled off by pipetting. (handle it like embryonic stem cell.)

#### HeLaS3 (子宮頸部)

浮遊培養可能としたHeLa細胞亜株。子宮頸部由来のがん細胞として非常に有名。

培地: Eagle's minimal essential medium with 10% calf serum.

継代方法: Cells are treated with 0.05 % trypsin.

#### HL60 (急性前骨髄球性白血病由来細胞)

がん遺伝子による分化誘導やDMSOによる分化誘導による研究に良く用いられる細胞株。

培地: RPMI1640 medium with 20% fetal calf serum.

継代方法: Simple dilution.

#### MCF-7 (乳癌)

エストロゲン受容体陽性細胞として広く内分泌かく乱化学物質のスクリーニングに使用されている細胞。

培地: Eagle's minimal essential medium with NEAA, 1.5g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1mM pyruvate and

0.01mg/ml insulin with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### NEC14 (精巣)

ヒト精巣テラトカルチノーマ由来の細胞種であり、HMBA

(N,N'-Hexamethylene-*bis*-acetamide)処理により、分化時に特徴的な形態変化・増殖活性の減少を起こすことが知られている細胞。

培地: RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### HEC-1-A (子宮内膜)

世界初の子宮体癌株であり、71歳女性の子宮体癌より樹立された。エストロゲン受容体を発現していることが確認されている。

培地: EMEM with 15% heat inactivated fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### SKG-II (子宮内膜)

子宮頸部類上皮腫、大細胞非角化型の細胞株であり、黄体ホルモン療法に関する研究に使用されている。

培地: Ham's F-12 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### HepG2 (肝臓)

毒性の分野で広く用いられているヒト肝癌由

来細胞株であり、ダイオキシンに対する受容体発現が確認されている。

培地: Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### KMRC-3 (腎臓)

腎明細胞がん由来細胞株。

培地: Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### UE6E7T-3 (骨髄由来間葉系幹細胞)

骨髄由来間葉系幹細胞にヒトパピローマウイルス遺伝子E6,E7ならびにヒテロメラーゼ遺伝子を導入して不死化した細胞株。脂肪、神経、骨への分化能を有しており、再生医療研究に広く利用されている。分化には化学物質の影響も少なくなく、DMSOの添加により分化することが確認されている。

培地: Ham's F-12 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### OVKATE (卵巣)

卵巣の漿液性乳頭状腺がん由来細胞株。

培地: RPMI1640 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.05% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### 8505C (甲状腺)

ヒト甲状腺未分化癌由来細胞株。p53に変異

が認められている。

培地: Eagle's minimal essential medium with 10% fetal calf serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

#### SW-13 (副腎皮質)

ヒト副腎皮質癌由来細胞株。アドレノメデュリンが発現しており、ACTH、アンギオテンシンII、デキサメサゾンやサイトカインとの関連性に関して研究が行われている。

培地: Leibovitz's L-15 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

以上の細胞株に関して、フェノールレッド不含培地を用いて培養を行い、倍加時間を算出するとともに、最終継代から24時間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種してRNA抽出を行った。

#### <DNA・RNA抽出に関して>

DNA・RNA抽出に関しては、キアゲン社製のAllPrep DNA/RNA Miniキットを使用してDNA・RNAを別々に抽出した。

#### <リアルタイムRT-PCRによる遺伝子発現解析に関して>

リアルタイムRT-PCRにはApplied Biosystems 7300 リアルタイムPCRシステムならびにApplied Biosystems 7900HT Fast リアルタイムPCRシステムを使用し、TaqManプローブにて解析を行った。TaqManプローブはTaqMan® Gene Expression Assays Inventoriedプロダクトより選択して検討を行った。

### C. 研究結果

本研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を中心に選択し、その細胞での核内受容体ならびに関連分子に関する網羅的遺伝子発現解析を目的とした。本検討で使用した細胞はフェノールレッド不含培地で行い、最終継代から24時間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種してDNA・RNA抽出を行った。今回用いた細胞の倍加時間はそれぞれ、LI90(肝臓)35時間、HUV-EC-C(血管内皮)38時間、NCR-G1(精巣)3.5日、HeLaS3(子宮頸部)24時間、HL60(急性前骨髄球性白血病由来細胞)18時間、MCF-7(乳癌)58時間、NEC14(精巣)62時間、HEC-1-A(子宮内膜)72時間、SKG-II(子宮内膜)47時間、HepG2(肝臓)32時間、KMRC-3(腎臓)14日、UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞)58時間、OVKATE(卵巣)18日、8505C(甲状腺)43時間、SW-13(副腎皮質)74時間、であった。細胞培養に際しては形態学的特徴を細胞の情報として記録するために動画撮影を行い、細胞増殖の過程を撮影した。

遺伝子発現解析を行う遺伝子に関しては核内受容体ならびにその関連分子を選択することとした。アプライドバイオシステムズ社で既に設計されているTaqMan® プローブである TaqMan® Gene Expression Assays Inventoried プロダクトより、核内受容体ならびにその関連分子に関して検索抽出したところ、598種類(598遺伝子ではない)のプローブが選択できた。選択されたプローブの中には47種の核内受容体が含まれており(表1)、ほぼ核内受容体を網羅できる(この他ホルモンレセプター、サイトカインレセプターなども含む)。

アレイのデザインはFormat 384とし、ターゲット遺伝子 380種類 + 内在性コントロール遺伝子 1種類。cDNAサンプル数:1種類の場合、1遺伝子あたりの反復(レプリケート)数: n=1(P/N 4342265)を採用した。

Format 384 P/N 4342265

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	SAMPLE
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL1	CTL1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	1
B	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	CTL1	CTL1	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	1
C	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	1
D	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	1
E	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	1
F	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	1
G	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	1
H	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	1
I	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	1
J	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	1
K	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	1
L	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	1
M	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	1
N	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	1
O	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	1
P	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	1

まず 10 種の細胞で行った遺伝子発現解析の結果、全細胞で発現が認められなかったプローブが APRIN, EMR3, EMR4, GHRHR, GPX5, HSD3B2, PLA2G, SRD5A2, TPO の 14プローブであった。また、細胞特有の遺伝子発現が認められた遺伝子もあった。核内レセプター47種に関して検討すると、全ての細胞で共通して発現したレセプター23種と細胞毎に異なる遺伝子発現を示した24種が認められた(図1)。

HeLa細胞を用いてジエチルスチルベステロール(DES)処理した際の遺伝子発現変動にも解析を行い、発現変動した遺伝子群を抽出した(図2)。

### D. 考察

今回用いた細胞株の倍加時間を見ると3日以上以上の倍加時間を示すもの、HEC-1-A(子宮内膜)、KMRC-3(腎臓)、OVKATE(卵巣)、SW-13(副腎皮質)がある。このような細胞はもともとの増殖能が低く、培養に長い時間を要するため、スクリーニング試験として大量の細胞を用意するのに多くの時間を要し、化学物質



のスクリーニングという観点からは非常に使いにくい細胞株であるといえる。しかし、細胞の機能維持という面では、増殖能の低い細胞の方が優位であることが、これまでの研究結果よりわかっている。その現象は染色体の安定性(逆にいえばゲノムの不安定性)に繋がっており、悪性度が高く増殖能が高い細胞は染色体プロファイルの変化が速い。したがって、倍加時間や染色体の安定性の情報もスクリーニングに使用する細胞を選択するには重要であるといえる。HeLa 細胞の倍加時間が約 24 時間程度であることを考えると、今回使用した増殖速度が遅いことがわかる。よく毒性試験に用いることの多い HepG2(ヒト肝癌由来細胞)においても倍加時間が 32 時間と長くなっており、今後スクリーニングという観点から倍加時間の妥当性も考慮に入れて細胞を選択するべきであると考えられた。また、細胞の最終継代、つまり化学物質添加に用いる細胞の播種に関しても、これら増殖の遅い細胞を横並びにして 24 時間後に薬剤処理を行ったが、この点についても考慮する必要があるかもしれない。

本解析においては種類の違う細胞での遺伝子発現量の比較をできるだけ正確に行うため、ハウスキーピング遺伝子(内部標準)による標準化ではなく、細胞 1 個あたりに相当するであろうゲノム DNA の量に比例した外部標準の添加による標準化を行った。

外部標準としては TaqMan® Low Density Array に搭載できるヒト以外の生物種で、できるだけ相同性が少ないものを考慮してシロイヌナズナの遺伝子を添加することとした。この方法を用いることで細胞 1 個あたりに近い定量性の高い遺伝子発現プロファイルを得ることができ

る。遺伝子発現解析には TaqMan® Low

Density Array を用いたが、47 種の核内受容体を網羅している。今回の解析によってこれら 47 種のプローブの内、全ての細胞で検出されなかったものは無く、設計された核内レセプターのプローブに問題が無いことがわかる。TaqMan® による解析では非常に定量性にすぐれた解析が可能であるので、細胞のキャラクタライズに非常に有用であると考えられる。今回の解析において核内レセプター 23 種は 10 種の細胞全てにおいて発現が確認されているが、24 種のレセプターに関しては細胞毎に発現パターンが異なっていた、これに関しても細胞を特徴付けるのに有用であると考えられた。また、肝臓由来の細胞である HepG2 においては肝臓で特異的に発現されるとされている核内レセプター CAR と PXR の発現が認められ、この細胞が肝臓由来であるということを示す重要な結果となっていた。今後これらの解析を継続し、細胞の種類を遺伝子発現のパターンから分類できるようなクラスター解析を実施、細胞のキャラクタライズを行う予定である。

これらの遺伝子発現解析結果を細胞の特性解析情報としてデータベース化していく予定であるが、その構造として細胞の核内レセプター発現情報とレセプターごとの核内レセプター関連遺伝子発現情報の付加を考えており、現在データベース化に向けプログラムを開発している。その構造は図3のような構造を考えており、細胞に関して 47 種の核内レセプター発現情報、また、その一つ一つのレセプターに関する関連遺伝子の発現情報をデータベースとして提供していく計画である。(参考(表2):各核内レセプターに直接関連する遺伝子グループ)

## E. 結論

核内受容体や関連する転写制御因子の発

現に関しての網羅的に詳細な比較検討を行うため、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を10種(MCF-7(乳癌), NEC14(精巣), HEC-1-A(子宮内膜), SKG-II(子宮内膜) HepG2(肝臓), KMRC-3(腎臓), UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞), OVKATE(卵巣), 8505C(甲状腺), SW-13(副腎皮質))選択した。シロイヌナズナのcDNAを外部標準として用いることで細胞1個あたり(ゲノム量あたり)の遺伝子発現量を定量的に比較することが可能となった。今回遺伝子発現解析によって核内レセプターによる細胞のキャラクタライズが可能であることが示唆された。今後細胞のキャラクタライズ情報としてデータベース化を行い、研究者が研究に用いる細胞を選択する際の有用情報として提供できるよう整備を進める。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 誌上発表

小原有弘, 水澤博

JCRB 細胞バンクの事業の概要

分子細胞治療 vol. 5 no. 2 (2006)

Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, Satoh M, Shioda S, Ozawa Y, Ohtani A, Morita K, Hirano T, Terai M, Umezawa A, Mizusawa M. Chromosomal Instability in Human Mesenchymal Stem Cells Immortalized with Human Papilloma Virus E6, E7 and hTERT Genes. •In Vitro. 2007 in press

#### 2. 学会発表

Arihiro Kohara, Yutaka Ozawa, Setusko Shioda, Tohru Masui, Kikuko Takeuchi, Masao Takeuchi, Hiroshi Mizusawa • High Resolution Genomic Analysis of Immortalized human Cells and Tumor Cells Using Array-Based Comparative Genomic Hybridization. EMS Annual Meeting (Vancouver, 2006.9.16-21)

小原有弘・ヒト由来培養細胞系で多発するクロスコンタミネーションの検出. 第7回アデノウイルス研究会(2006.11.19)

小原有弘・hTERTにより不死化したヒト間葉系幹細胞の染色体安定性と形質. 日本再生医療学会(2007.3.13-14)

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1 遺伝子発現解析に用いる核内受容体プローブ一覧

レセプター	プロダクトID	レセプター	プロダクトID	レセプター	プロダクトID	レセプター	プロダクトID
1	AR Hs00171172_m1	14	GR Hs00354508_m1	23	NGFI-B $\gamma$ Hs00545007_m1	34	REVERB $\beta$ Hs00233309_m1
2	CAR Hs00231959_m1		Hs00353740_m1		Hs00175077_m1	35	ROR $\alpha$ Hs00536545_m1
3	COUP-TF I Hs00818842_m1		Hs00230818_m1		Hs00235001_m1	36	ROR $\beta$ Hs00199445_m1
4	COUP-TF II Hs00819630_m1		Hs00230813_m1	24	PNR Hs00183917_m1	37	ROR $\gamma$ Hs00172858_m1
5	DAX1 Hs00230864_m1	15	HNF4 $\alpha$ Hs00230853_m1		Hs00183915_m1		Hs00172860_m1
6	EAR2 Hs00172870_m1	16	HNF4 $\gamma$ なし	25	PPAR $\alpha$ Hs00231882_m1	38	RXR $\alpha$ Hs00172565_m1
7	ERR $\alpha$ Hs00607062_gH	17	LRH1 Hs00187067_m1	26	PPAR $\gamma$ Hs00234592_m1	39	RXR $\beta$ Hs00232774_m1
8	ERR $\beta$ Hs00395184_m1	18	LXR $\alpha$ Hs00172885_m1	27	PPAR $\delta$ Hs00602622_m1	40	RXR $\gamma$ Hs00199455_m1
	Hs00374442_m1	19	LXR $\beta$ Hs00173195_m1		Hs00606407_m1	41	SF-1 Hs00610436_m1
9	ERR $\gamma$ Hs00155006_m1	20	MR Hs00230906_m1	28	PR Hs00172183_m1	42	SHP Hs00222677_m1
10	ER $\alpha$ Hs00174860_m1	21	NGFI-B $\alpha$ Hs00172437_m1	29	PXR Hs00254365_m1	43	TLX Hs00172664_m1
11	ER $\beta$ Hs00230957_m1		Hs00544986_m1		Hs00243666_m1	44	TR2 Hs00172676_m1
12	FXR Hs00231968_m1		Hs00374225_m1	30	RAR $\alpha$ Hs00230907_m1	45	TR4 Hs00231489_m1
13	GCNF Hs00364256_m1	22	NGFI-B $\beta$ Hs00428691_m1	31	RAR $\beta$ Hs00233405_m1	46	TR $\alpha$ Hs00268470_m1
	Hs00265966_m1				Hs00233407_m1	47	TR $\beta$ Hs00230861_m1
					Hs00171273_m1	48	VDR Hs00172113_m1
					32 RAR $\gamma$ Hs00171273_m1		
					33 REVERB $\gamma$ Hs00253876_m1		

図1 核内レセプターの遺伝子発現プロファイル

全ての細胞で発現確認された  
核内受容体  
23種

COUP-TF II, EAR2, ERR $\alpha$ ,  
GCNF, GR, LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ ,  
MR, NGFI-B $\alpha$ , NGFI-B $\beta$ ,  
PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ ,  
RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$ , REVERB $\alpha$ ,  
REVERB $\beta$ , ROR $\alpha$ , RXR $\alpha$ ,  
RXR $\beta$ , TR2, TR4, TR $\alpha$

Cell	AR	CAR	COUP-TF I	DAX1	ERR $\beta$	ERR $\gamma$	ER $\alpha$	ER $\beta$	FXR	HNF4 $\alpha$	LRH-1
8505C(甲状腺)											
HEC-1-A(子宮内膜)											
Hep G2(肝癌)											
KMRC-3(腎臓)											
MCF-7(乳癌)											
NEC14(精巣)											
OVKATE(卵巣)											
SKG-II(子宮内膜)											
SW-13(副腎皮質)											
UE6E7T-3(骨髄)											

Cell	NGFI-B $\gamma$	PNR	PR	PXR	RAR $\beta$	ROR $\beta$	ROR $\gamma$	RXR $\gamma$	SF-1	SHP	TLX	TR $\beta$	VDR
8505C													
HEC-1-A													
Hep G2													
KMRC-3													
MCF-7													
NEC14													
OVKATE													
SKG-II													
SW-13													
UE6E7T-3													

図2 HeLa 細胞 DES 処理による遺伝子発現変化の解析

発現が検出限界以下になった遺伝子  
(On⇒Off)

ADMP, ALDH1A1, CRABP1,  
CREB3L3, HSD3B1, NR2E3,  
NR5A1, NR5A2, PPAPDC3,  
PYY2, TG

検出限界以下から発現した遺伝子  
(Off-On)

NR1I2, PLA2G10, NR3C1,  
PTHR2, ESRRG, GHR,  
PLA2G2A, PLCL3(2),  
RARB

発現増加した遺伝子(1.5倍以上)

CDK5R2, CSH2, EPO,  
GHSR, GREB1, HSD3B2,  
NR2E1, NR2E3, PIP5K2B,  
PTHR1, SOCS2,  
SULT1B1(2), THRSP

発現減少した遺伝子(0.75倍以下)

CDKN2B, HNF4A,  
PPAPDC1A, SNFT,  
UGT1A10

図3 データベースの構造予定

