

Kii I, Amizuka N, Minqi L, Kitajima S, Saga Y, Kudo A.	Periostin is an extracellular matrix protein required for eruption of incisors in mice.	Biochem Biophys Res Commun.	342	766-772	2006
Li GX, Hirabayashi Y, Yoon BI, Kawasaki Y, Tsuboi I, Kodama Y, Kurokawa Y, Yodoi J, Kanno J, Inoue T.	Thioredoxin overexpression in mice, model of attenuation of oxidative stress, prevents benzene-induced hemato-lymphoid toxicity and thymic lymphoma.	Exp Hematol.	34	1687-1697	2006
Corvi R, Ahr HJ, Albertini S, Blakey DH, Clerici L, Coecke S, Douglas GR, Gribaldo L, Groten JP, Haase B, Hamernik K, Hartung T, Inoue T, Indans I, Maurici D, Orphanides G, Rembges D, Sansone SA, Snape JR, Toda E, Tong W, van Delft JH, Weis B, Schechtman LM.	Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use.	Environ Health Perspect.	114	420-429	2006
井上 達	環境生体応答 -Toxicogenomics	医学のあゆみ	213	221	2005
Nakagawa Y, Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Abe S, Inoue M, Takemura T, Hirokawa K, Suzuki K, Kitagawa M.	Expression of IAP-family proteins in adult acute mixed lineage leukemia (AMLL).	Am J Hematol.	78	173-180	2005
Yamaguchi S, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka K, Yoshida K, Noda Y, Tatsumi K, Hirokawa K, Kitagawa M.	DNA-dependent protein kinase enhances DNA damage-induced apoptosis in association with Friend gp70.	Leuk Res.	29	307-316	2005
Hasegawa M, Yamaguchi S, Aizawa S, Ikeda H, Tatsumi K, Noda Y, Hirokawa K, Kitagawa M.	Resistance against Friend leukemia virus-induced leukemogenesis in DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient scid mice associated with defective viral integration at the Spi-1 and Fli-1 site.	Leuk Res.	29	933-942	2005

Fujita S, Hideshima K, Ikeda T.	Nestin expression in odontoblasts and odontogenic ectomesenchymal tissue of odontogenic tumours.	J Clin Pathol.	59	240-245	2006
K. Ioku, G. Kawachi, K. Nakahara, E.H. Ishida, H. Minagi, T. Okuda, I. Yonezawa, H. Kurosawa, T. Ikeda	Porous Granules of β -Tricalcium Phosphate Composed of Rod-Shaped Particles	Key Engineering Materials	309-311	1059-1062	2006
T.Okuda, I.Yonezawa, K. Ioku, H.Minagi, H.Kurosawa, T.Ikeda	Porous Ceramics of β -tricalcium Phosphate Compound of Rod-shaped Particle is Highly Biodegradable and Expresses Prominent Osteoconductivity	Key Engineering Materials	309-311	1063-1066	2006
Kiyosawa N, Shiwaku K, Hirode M, Omura K, Uehara T, Shimizu T, Mizukawa Y, Miyagishima T, Ono A, Nagao T, Urushidani T.	Utilization of a one-dimensional score for surveying chemical-induced changes in expression levels of multiple biomarker gene sets using a large-scale toxicogenomics database.	J Toxicol Sci.	31	433-448	2006
Tamura K, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T.	Comparison of gene expression profiles among papilla, medulla and cortex in rat kidney.	J Toxicol Sci.	31	449-469	2006
Morishita K, Mizukawa Y, Kasahara T, Okuyama M, Takashima K, Toritsuka N, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T.	Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen.	J Toxicol Sci.	31	491-507	2006
Koyama N, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinase N, Honma M.	Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells.	Mutat Res.	603	151-158	2006
Oka H, Ikeda K, Yoshimura H, Ohuchida A, Honma M.	Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines.	Mutat Res.	606	52-60	2006

Special Review

Percellome Projectによる毒性トランスクリプトミクスの新しい試み

Percellome Project as a New Approach to Toxicology Transcriptomics

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

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Yukio Kodama

身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、その被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である。この精度向上を目指したトキシコゲノミクス研究を実施する際に、マイクロアレイなどから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発した。90化合物のマウス肝初期応答データを採取し終え、新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えたPercellome Projectを展開している。

key words

トキシコゲノミクス, 分子毒性学, 遺伝子発現カスケード, 標準化, Percellome 法, 3次元多層(Millefeuille) データ

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌かく乱関連などの分子毒性学研究、トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所掌業務との有機的連携のもとに推進。

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 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

はじめに

医薬品、食品、化粧品、生活関連用品など、身の回りの物質が我々の身体に取り込まれた際に生じる可能性のある毒性(有害性)を予測し、それらの使用に際しての被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である^{注1}(図1)。具体的には、人々の安全を確保するために使用法(用途)や使用量(残留量)を制限したり、場合によっては禁止したりするための科学的根拠を提供するが、その際、人の身代わりとして実験動物を用いることが多い。このような毒性学の精度向上の一環として、従来からの毒性研究(毒性症候学、毒性病理学、など)に加えてのトキシコゲノミクス(Toxicogenomics)研究が進められている。

トキシコゲノミクスでは、物質が生体に及ぼす影響をトランスクリプトームとして観測・解析する。その際、①分子毒性学を構築し種差や個体差の問題、複合暴露の問題などを解決するためには、遺伝子発現カスケードの全容解明を目指す必要がある、②形態学的に変化が現れた段階のトランスクリプトームは、遺伝子発現カスケードの最終段階に過ぎない、③形態変化の現れないごく初期段階を含む遺伝子発現カスケードを描出するためにはまとまった量のデータの蓄積が必須である、との観点から、筆者らは、マイクロアレイや定量PCRから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome手法と、そのデータ解析のための3次元多

層(Millefeuille)システムを開発・実用化した。遺伝子発現量が共通の尺度、すなわち“コピー数/細胞”で表現されることから、検体間、実験間、マイクロアレイのバージョン間、異なったプラットホーム間、などのデータ比較が直接的に行えるようになり、数年かけて蓄積したデータの有機的活用が可能となった。現在、90種類の化学物質によるマウス肝の初期応答データを採取し終えたところである。新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えたPercellome Projectの概要を紹介する。

I. Percellome 法：細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る方法

原理は単純である。サンプルの細胞数を計測し、外部標準mRNA(スパイクRNA)を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そしてRNA抽出、測定に移る。サンプルのRNAの測定値を、スパイクRNAの値を基準に、細胞1個当たりのコピー数に換算する。実際には細胞数を直接計測するのが困難なことが多いため、その代替指標として細胞核内のゲノムDNA量を用いる^{1), 2)}。定量性・直線性の検証にはLBM標準サンプル(肝[L]と脳[B]を100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100に混合した5サンプルから成るセット)を用いる。なお、スパイクRNAは、5種類の枯草菌遺伝子のmRNAを濃度公比3で混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。高精度を要求されるDNA定量法は手作業プロトコルおよび自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコルを準備

注1 環境への配慮も含まれる。

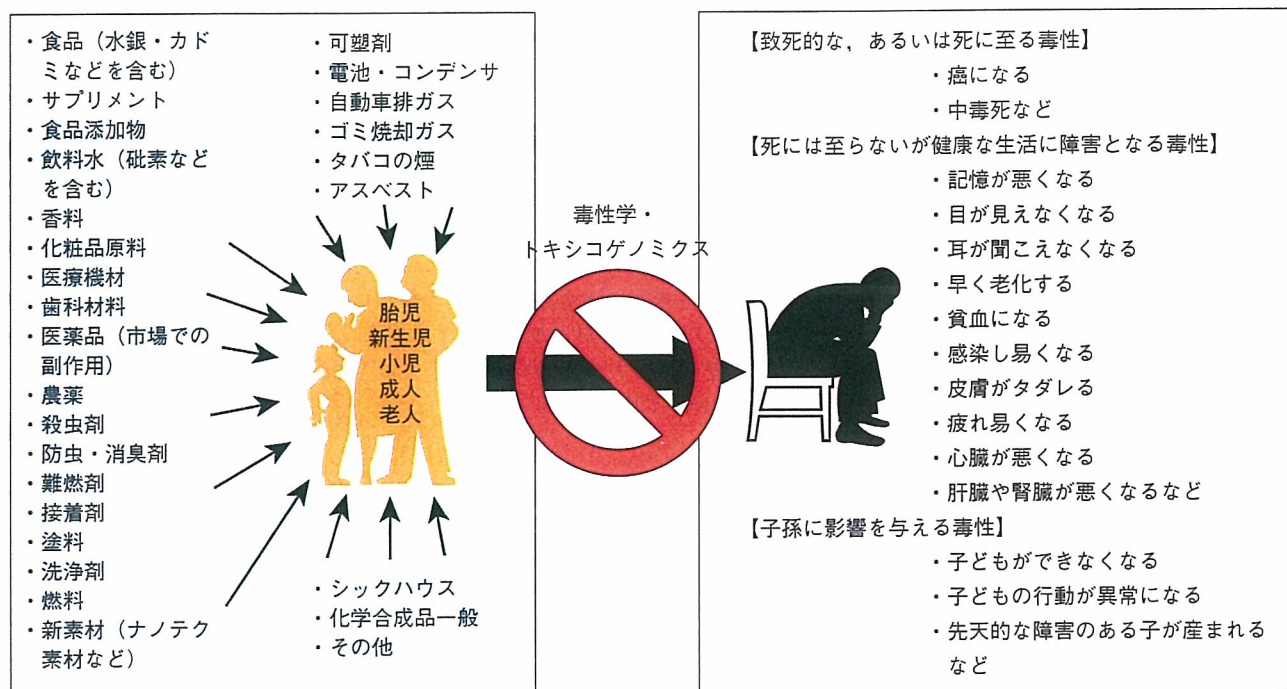


図1. 毒性学の対象

毒性学は、身の回りの物質が引き起こす障害を予測し、その発生を未然に防ぐことを目的としている。トキシゲノミクス（毒性ゲノミクス）は、最先端の網羅的遺伝子発現解析技術を用いて、従来の毒性学の予測の精度を著しく向上、迅速化させることで、国民の健康安全の確保にさらに貢献することを目指している。

中である。カクテルとも共同研究ベースで供給可能である（連絡先：kanno@nihs.go.jp）。また、ERCC（The External RNA Control Consortium）と連絡をとるとともに、国際的標準化への関与を深めるため平成18年度厚労科研費「医薬品などの有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の国際的標準化に関わる研究（H18-特別-指定-023）」を立ち上げた。現在、この他にシックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシゲノミクス、1匹のマウスから多臓器を採取しそれらの連携状況をトランスクリプトームから解析する多臓器トキシゲノミクスを開始し、特徴的な遺伝子について組織内の発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーションで確認する作業を並行している。また、下記の3次元データをweb公開するサーバを整備し、一部の化合物から3次元多層（Millefeuille）データを順次閲覧可能とした（<http://toxicomics.nihs.go.jp/db/>）。

II. 3次元多層（Millefeuille）データシステム：生物系研究者に優しいデータ可視化と解析

医薬品を含む毒性既知の90化合物について単回経口投与後のトランスクリプトームデータを取得して、初期応答遺伝子カスケードを解析するための基盤データベースを構築した。現在、第二段階として反復暴露データ集積を開始し

た。データは、用量軸、時間軸、および遺伝子発現軸から成る3次元表示により、遺伝子発現の用量および時間に依存した変化を1枚の曲面として表すことで可視的に変化を判別しやすいように配慮した（図2）。これにより、コンピュータが選び出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、特に、mRNAの合成分解のスピードなどの知見から生物学的にありえないパターン（用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など）を排除する際に威力を発揮している。

1つの実験から排出されるGeneChip約50枚のデータを一括処理する能力を持ったPerccellome自動換算・データ品質管理（QC）に関わるソフトウェアに加えて、3次元多層（Millefeuille）データに最適化した、発現パターン類似性による候補遺伝子検索、およびそれを発展させた教師無しクラスタリング³⁾を中心とした解析システム（MF System, MFシリーズ, 開発：相崎健一）を独自に実用化し、開発継続中である（図3）。これらにより、データQCはその日のうちに、基本的な発現情報検索から全遺伝子の教師無しクラスタリングまでを3日間で完遂できるものとなっている。

この基本解析を用いて、発現パターンによって分類された候補遺伝子リストが多数生成される。一部の幸運な例ではただちに新規と思われる毒性関連反応を見いだすことができた。またそうでない場合のための1つの補強手段とし

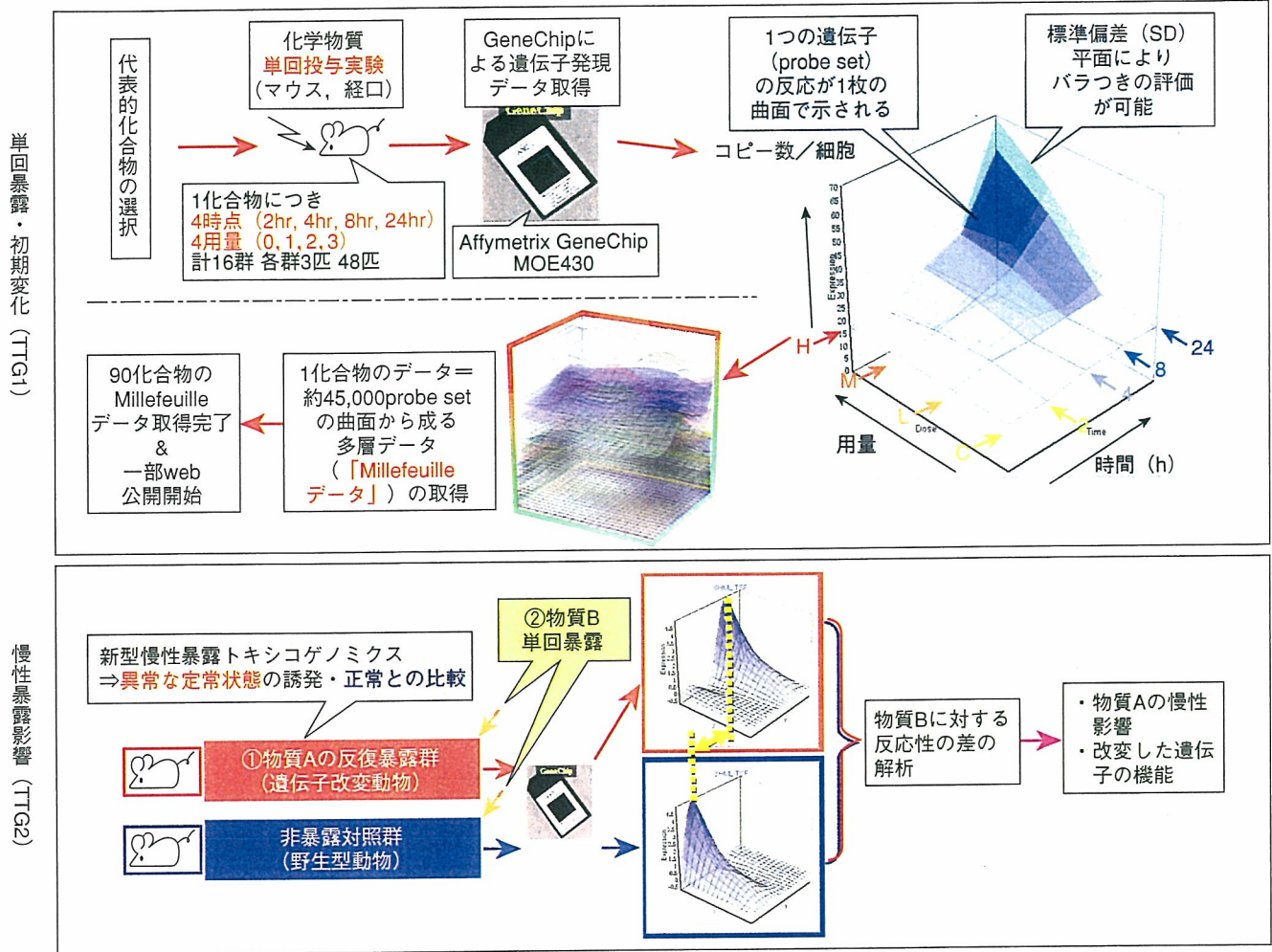


図2. Percellome 法と3次元表示による多層 (Millefeuille) データシステムを用いたプロジェクトの根幹部分の概要
 単回投与による遺伝子発現初期変化データを90化合物について取得 (上段)。現在、反復投与の影響を検討中 (下段)。H; 高用量 (high), M; 中用量 (medium), L; 低用量 (low), C; コントロール (control)。

て、Gene Ontology などの既存知識を利用して候補遺伝子リストの理解を支援するソフトウェア (MF GoPlot) を用意した。このツールは一種の化合物クラスタリングとしても利用することができる。

さらに候補遺伝子リストを基に複数化合物間比較を行い、複数条件下においても同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。本システムで得られた同期遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性があり、データベース化しつつ、その解析を進めている (5TB規模のデータベース部分および、大量計算アルゴリズム実装は (株) NTT コミュニティおよび (株) 日本NCR/Teradata との共同開発による)。

Ⅲ. Percellome 手法のリアルタイムPCRを含む他のプラットフォームへの適用

Percellome 手法は、GSC の受け入れ条件を整えることに

より、様々なプラットフォームに適用可能である。その1つとして最も定量性が高いとされるリアルタイムPCR (ABI PRISM 7900 HT・96 ウェルプレート) への適用例を示す。現行のRT-PCR絶対定量法では、遺伝子ごとに検量線が必要であり、多数のサンプルについて多数の遺伝子を検討するには不向きである。Percellome RT-PCRでは、マイクロアレイと同様の原理を用いる。すなわち、サンプル破碎液に、その細胞数に比例する量のスパイクカクテル (GSC) を添加し、それらのCt値をPCRプレートごとの検量線とすることにより、測定したい遺伝子のCt値を細胞1個当たりのmRNAコピー数に換算する。これにより、GAPDHやActinなどのハウスキーピング遺伝子が変動してしまう際の問題、例えば、少数の遺伝子を検討する際にGlobal normalization法を適用し難い問題などが解決される。共通サンプルを測定しデータを比較することにより、Affymetrix GeneChipのPercellome結果と9割程度の整合性が確認され、

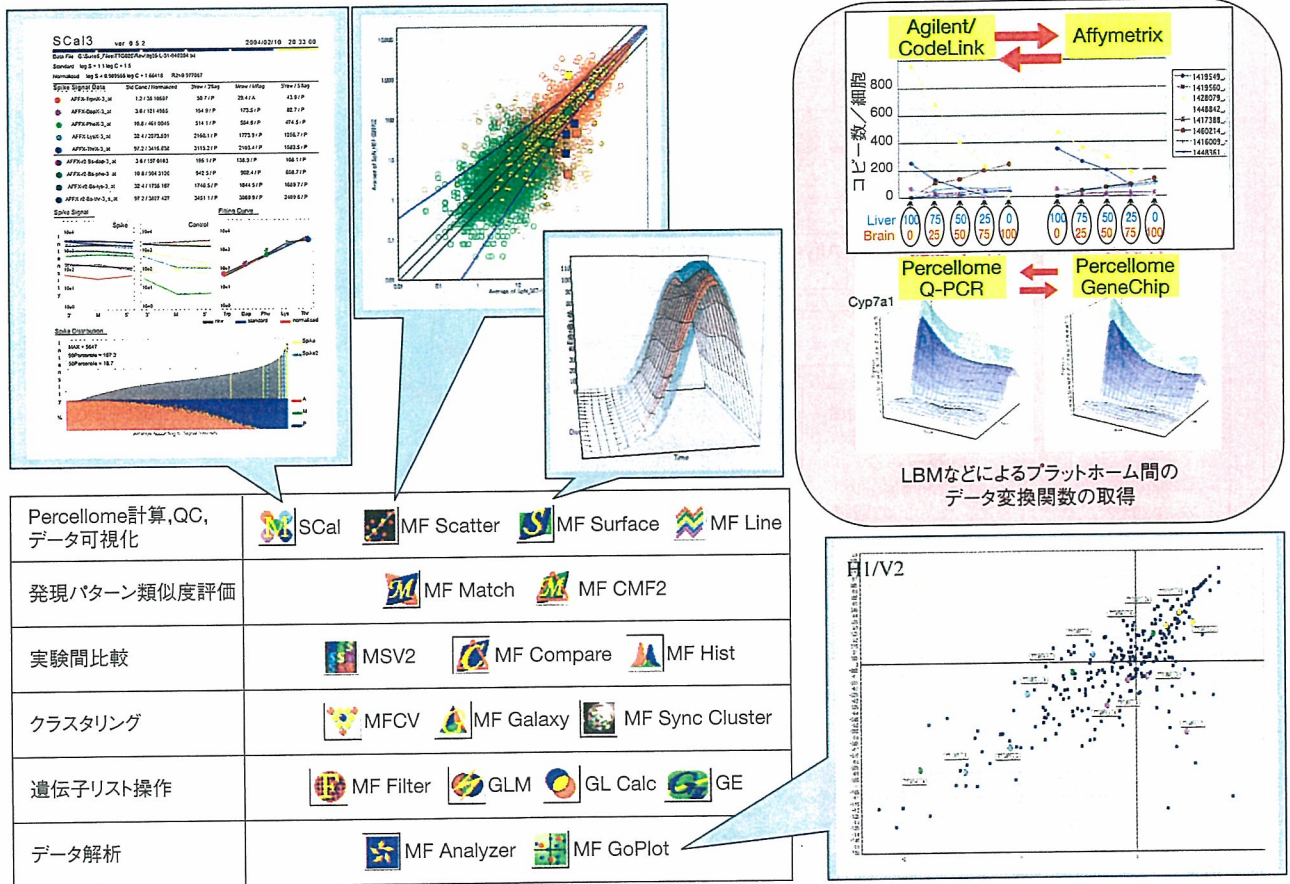


図3. 3次元多層 (Millefeuille) データの解析などに用いる独自開発プログラム群

品質管理とともにPercellome計算を自動的に実施するSCal, Plotソフトウェア, 3次元曲面の描画ソフト (MF Surface), など. 右上はプラットフォーム間のデータ変換情報の得方を示す. LBMを用いる方法 (上段) と, 実際の実験サンプルを用いる方法 (下段) がある. いずれも, 一度, 両方のプラットフォームでそれらのサンプルを測定する必要がある.

GeneChipとPercellome RT-PCRとの間でのコピー数の換算式がいくつかの遺伝子について得られている. この他に, Agilent社製の単色マイクロアレイとCodeLinkアレイにGSCを測定可能なカスタムアレイを用意し終え, LBMサンプルのデータなどをもとに, これらとの間の換算式も得つつある (図3右上).

Percellome法は, Affymetrixの新しいエクソンアレイの定量性・直線性の検討にも適応可能である. Affymetrix社のHuman Exon 1.0 ST Arrayと従来型の発現アレイHuman Genome U133 plus 2について, 性質の異なるヒト癌細胞株2株から調製したLBM様標準サンプル (100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100混合5サンプル) による比較を行い, 両アレイ間の相関性の高いprobe setを多数検出することができた. また, 既知のエクソンに対して設計されたprobe setでは発現が見られ, イントロンに対して設計されたprobe setでは発現が見られない, あるいは, 既知のsplicing variantに対応したprobe setの発現が検出された,

などの基本性能が確認された. しかし, Percellome法を適用して未知のsplicing variantの検出力を向上させるためには, 現状では各エクソン間の定量性に問題があることが示唆された. 定量値を算出する補正アルゴリズムの開発など, 何らかの対策が必要であることが考えられ, 現在, Affymetrix社に確認を行っている.

IV. 核内受容体原性毒性のPercellomeトキシコゲノミクス解析

受容体原性毒性とは, 化学物質が受容体 (リガンド依存的転写因子を含む) に選択的に結合してシグナルをかく乱し, その結果生じる有害性を指す. 代表例としてはダイオキシンが挙げられる. AhR (Arylhydrocarbon receptor) ノックアウトマウスでは, ダイオキシンを大量に投与しても毒性がほとんど観察されない. すなわち, 野生型マウスがダイオキシンで死ぬメカニズムには, AhRが必須であり, AhRからの異常なシグナルがマウスを死に至らせていることに

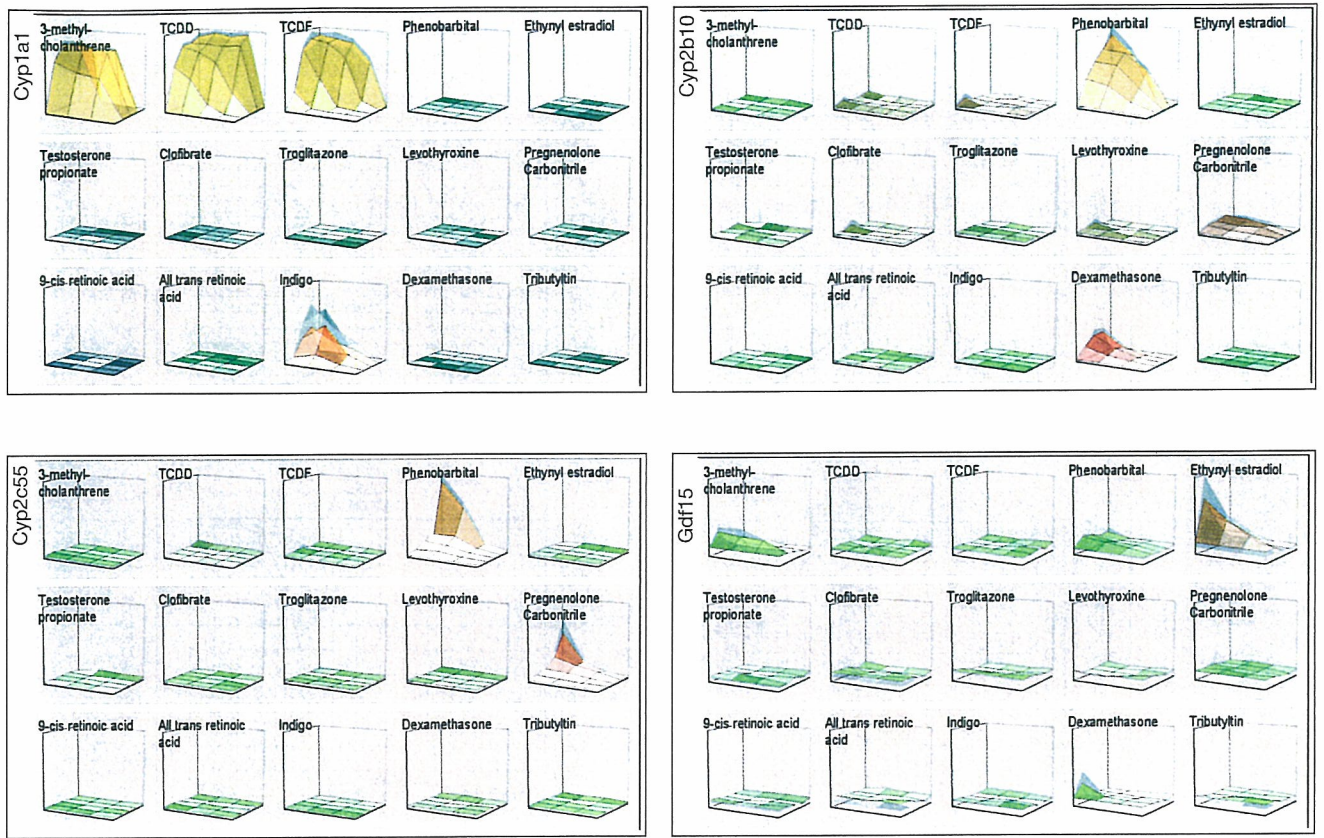


図4. 化合物間の発現比較

15種類の核内受容体リガンド化合物(各3次元グラフ内に表示)によるCyp1a1(左上), Cyp2c55(左下), Cyp2b10(右上)および, Gdf15(右下)の遺伝子発現を3次元表示したもの. 各軸は, 図2のとおり. 縦軸のスケールは遺伝子ごとに共通. リガンドに選択的な遺伝子の発現が確認される.

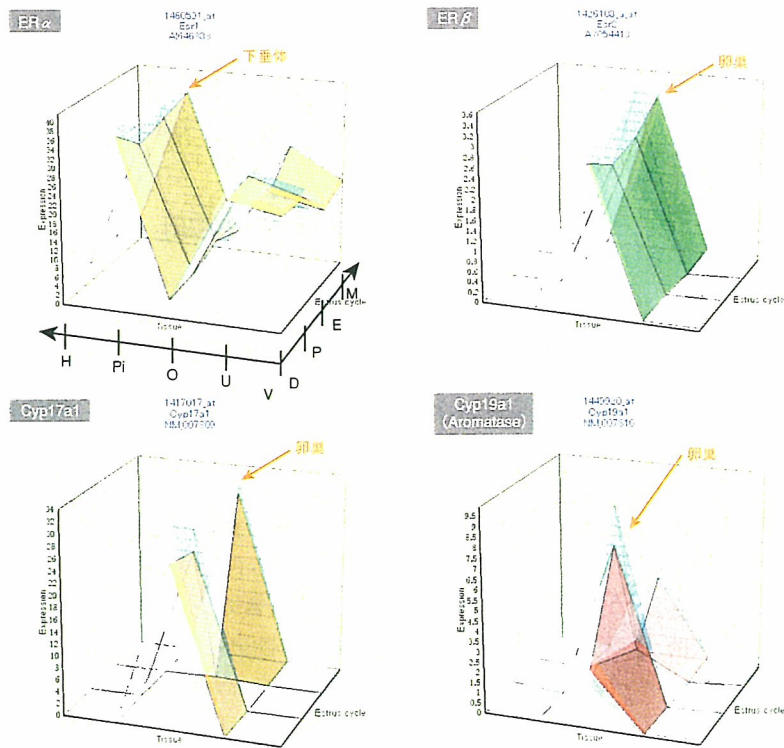


図5. 臓器間の発現比較

マウスの性周期(Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrusの4日間で1周期)ごとの視床下部(H), 下垂体(Pi), 卵巣(O), 子宮(U)および膈(V)における, ER α , ER β , Cyp17a1(steroid-17 α -hydroxylase), およびCyp19a1(Aromatase)の遺伝子発現変動を3次元表示したもの. 後二者の酵素は卵巣において周期性を持って発現している.

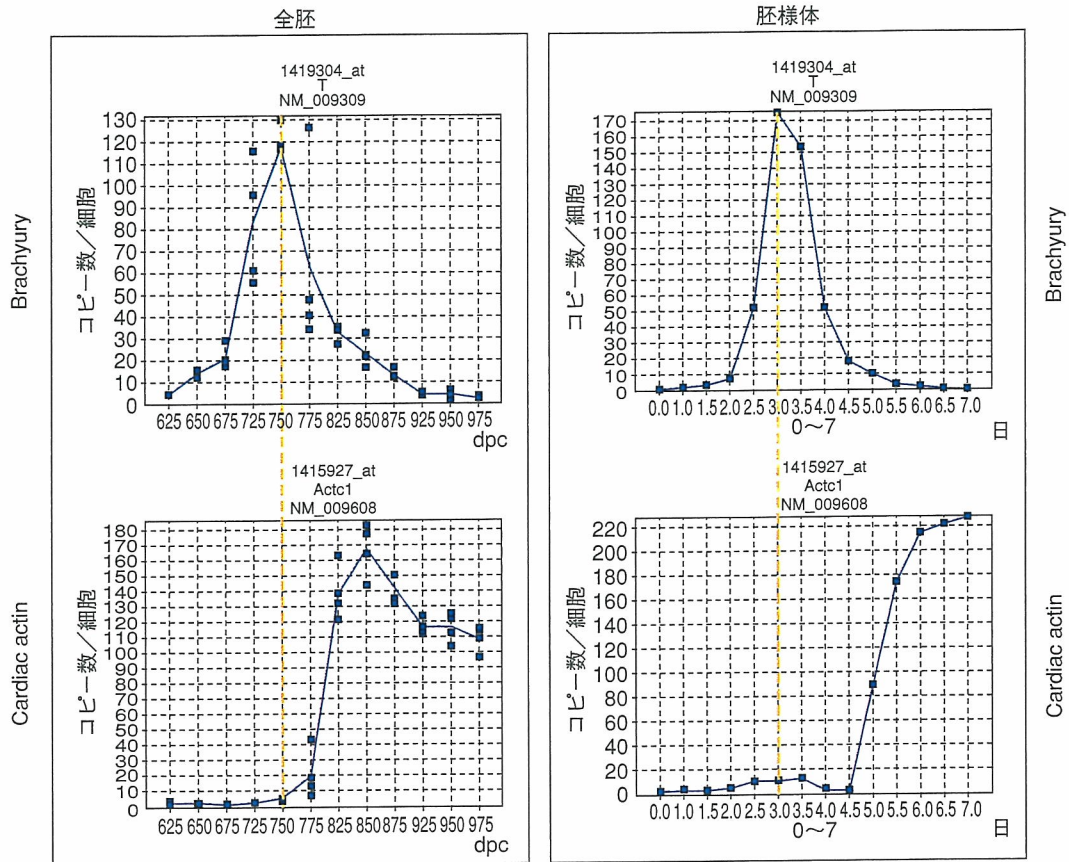


図6. マウス胎児（全胚）と胚様体の発現比較

マウス全胚の胎生6.25日～9.75日までの遺伝子発現と、胚様体の1日～7日目までの遺伝子変動の網羅的データベースから、初期中胚葉分化マーカーであるBrachyury遺伝子と、Cardiac actin遺伝子の経時変化を示す。

なる。エストロゲン活性化学物質による有害影響（内分泌かく乱化学物質問題）も同様にER（estrogen receptor）を介する受容体原性毒性と考えられ、胎生期にERを発現する組織が、低用量シグナルかく乱影響の重要標的であると考えられている。

ここでは、受容体原性毒性研究の基盤として、Percellome手法を適用して、①核内受容体作動性物質によるマウス雄肝臓の遺伝子発現変動、②性周期に伴うマウス雌生殖器遺伝子発現変動、③生後の発達過程におけるマウス雌生殖器遺伝子発現変動、の3種類のデータベースを構築した。例えば、①では10種類の核内受容体に作用する典型物質について、単回経口投与後、2, 4, 8, 24時間目の変動を解析し、Ethinyl-estradiolがGDF15, TCDDがCyp1a1, 9-cis Retinoic AcidがCyp26a1, DexamethasoneがCyp2b10, ClofibrateがCyp4a14, PCNがCyp2c55など、各々の受容体に特徴的な遺伝子発現を誘導するところをとらえられている（図4）。②の性周期データベースは視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣を対象としており、性周期との関連が網羅的にとらえら

れている（図5）。これらのデータベースは、今後、各種の候補物質が引き起こす変化を詳細に解析する際の基準として利用される。

V. 発生トキシコゲノミクスへの応用

発生毒性学は、個体発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現調節の分子機構を把握することにより、さらに正確なものに補強されると考える。現在、C57BL/6マウス胚の器官形成初期にあたる胎生6.5～9.5日（プラグ確認日：0.5日）の、①全胚の遺伝子発現変動解析、②遺伝子欠失マウス全胚との比較、および③標的が明らかな既知発生毒物質投与による本データベースの具体的な適用、を実施している。①についてはすでに0.25日間隔（Time point 計12点）の遺伝子発現データベースを得て、②遺伝子欠失胚のデータといくつかの注目すべき遺伝子についてはwhole mount ISHを用いた発現の検証を加えた。これと並行して、ES細胞からhanging drop法で得た胚様体の0.5日間隔の遺伝子発現データとの比較を実施している。個体発生に関与

する遺伝子群の多くは経時的に激しく変化しており、既知発生毒性物質投与実験については標的遺伝子シグナルカスケードを解析中である(図6)。

おわりに

ノーザンブロットでは実験サンプルにだけバンドが見られ、対照サンプルには遺伝子発現がないという結果を得ても、細胞1個当たりで定量してみると、対照が10コピーに対して実験サンプルが20コピーである場合がある。“無”が“有”になったのではなく、“10”が“20”になったのである。

さて、筆者らの属する毒性学でも、医学の分野でも、疾患概念や毒性概念が整理され、患者や実験動物を診断する際には、まず、そのどれに当てはまるかを検討する。すなわち、どの“典型”に近い症例であるかを検討することから始まることが多い。

しかし、最近の医学・生物学には多因子疾患・多因子形質発現制御の概念が導入され、今から何年かの後には、“21世紀初頭までは、患者の遺伝子多型を調べずして治療を行っていた時代”として、“血液型を調べずに輸血していた時代”と並び称されるようになる可能性がある。このような多因子概念が定着すると、その多くは、“有(100%)”“無(0%)”の組み合わせではなく、“70%”“50%”“90%”といった半端な数の組み合わせであることが考えられる。すなわち、今までの離散値的な“典型”例を基準とするアプローチから、

連続値的な病態“スペクトラム”を直接扱うアプローチに変革していく可能性が考えられる。その際の網羅的データの解析とその蓄積の必要性を考えると、遺伝子発現データの定量化・標準化という問題は、今まで以上に重みを増すと考えられる。生命現象の網羅的解析にはトランスクリプトームだけでは不十分であることは自明であるが、この定量性を確保することは、これから実現されるであろう網羅的プロテオミクスなどの基盤としても重要ではないかと考える。

マイクロアレイなどから得られるトランスクリプトーム情報が、今後の医薬品審査や化学物質の安全性評価の際に必須なものとなる時代がすぐそこまで来ていることを念頭に、筆者らはPercellome法をさらに展開し、Percellome Projectデータベースを可能な限り高精度に保ちつつ毒性学的内容を充実させるべく最大限の活動を継続して行く所存であるが、この技術、あるいは研究内容が毒性学以外の研究分野にもお役に立つことができれば幸甚である。

謝辞 本システムの開発とプロジェクトの遂行に当たっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H13-生活-013、H14-トキシコ-001、H15-化学-002、H18-化学-一般-001などによる。

文献

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194

毒性学

毒性の高精細解析に向けてのトキシコゲノミクス

Toxicogenomics for high-resolution toxicology

毒性学は生体と化学物質との相互作用を研究する分野であり、目的は“ヒトの安全”である。日常遭遇する化学物質(医薬品や食品を含む)が摂取された際の安全性を担保するため(毒性評価)に、実験動物の毒性所見をヒトに外挿することが行われてきた。これは実験動物もヒトも基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいている。そして呼吸鎖阻害、DNA損傷、活性酸素種生成など、非特異的な標的がおもな対象となってきた。これに加え、現在の分子毒性学は、生体反応メカニズムに踏み込み、受容体、転写因子などとの選択的結合によるシグナル伝達障害など標的の特異性の高いものや、エピジェネティックな遅発影響などを対象とするようになり、基礎分子生物学と直結する時代に入っている。

医薬品の開発ストラテジーも標的の特異性が高いものを追うものとなっており、医薬品審査行政の面からも同じことが毒性学に要求されている。そしてヒトボランティアに対するバイオ医薬品の微量投与が全員をICU送りにした最近の事件は、種差を含む分子毒性評価の重要性とその現状を示していると考えられる。また、インターネット上にはバイオ医薬品紛いの効能を謳いあげるサプリメントやダイエット/健康食品が氾濫している。これらについても場合によっては医薬品と同等の慎重さをもって評価にあたる必要がある。

胎児や子どもといった、ボランティアによる毒性評価がほとんど不可能と思われる対象のみならず、ヒトの安全のための毒性学には今後とも動物実験が必要であると考えられ、その高精度化のひとつの手段としてトキシコゲノミクス

は必須であるとの認識に変わりはない。著者らは定量PCRやマイクロアレイから細胞1個当りのmRNAコピー数を得るPercellome法¹⁾と、そのデータ解析のためのMillefeuilleシステムを開発し、この3年間でマウス肝を中心とした約90化合物(毒性学的情報の豊富なもの)の単回曝露による初期応答遺伝子データベースを構築するとともに、シックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入トキシコゲノミクス、発生毒性についての胎児トキシコゲノミクス、また*in situ* hybridizationによる局在確認系を立ち上げた。今後の3年間で、反復曝露による慢性毒性、および、多臓器間の関連性を検討する研究を行う。

今後の課題

トキシコゲノミクスの有効性がいまだに発揮されていないのかんばしくない評価を耳にすることがある。しかし、著者らの経験から、それには、すくなくとも2つの解決可能な理由があると考えられる。

第1に、mRNAの変動は、思いのほか速いので、いままで以上に実験の管理を厳重にしなければ有意なデータが得られない点である。マウス肝で有意に発現する12,000(いずれかの時点で3コピー/細胞以上)の遺伝子のうち、概日変動を示す遺伝子が3,600以上あり、激しい遺伝子では数十倍以上の発現差がみられる。まず、動物飼育施設の明暗サイクルを2週間以上一定に保ちマウスの概日リズムを安定化する。そのうえで、マウスに検体を投与する時刻、および、サンプルを採取する時刻を±30分以内に限定することで始めて正確なデータが得られ

る。肺や腎も同様の注意が必要である。第2に、蛋白、とくにリン酸化をはじめとする蛋白合成を伴わない早い反応とのリンケージが取れないとの指摘である。この問題点についてもPercellome法を用いた高精度解析によって間接的ながら解決策を提供できることが示されつつある。すなわち、リン酸化により制御される転写因子の働きが、時間差はあるものの、その遺伝子発現の変動として捕捉されている。

おわりに

従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、たとえ話としては光学顕微鏡に対しての電子顕微鏡のような立場にある。すなわち、より高精度な情報を得る手段であるため、いままでの実験設計と精度では不十分な場合がある。そして真の実用化には“新しい教科書”を書く時間が必要であることも事実である。一方で、電子顕微鏡と異なるのは網羅的かつ膨大なデジタル情報が得られる点であり、インフォマティクスの助けが必須な理由である²⁾。分子毒性学の実用化のために、トランスクリプトームデータを相互に直接比較できるPercellome法の特徴を生かしたコンソーシアムの構築をめざし、共同研究を含めたさまざまな生体反応研究を進めているところである。臨床の最先端から分子生物学の最先端まで連携をさらに広げる際のひとつのきっかけとなれば幸甚である。

(厚労科研費 H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ 001 および H15-化学-002)

1) Kanno, J. et al.: “Per cell” normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics*, 7: 64, 2006.

2) Matsumoto, S. et al.: Mass Distributed Clustering: A New Algorithm For Repeated Meas-

urements in Gene Expression Data. *Genome Informatics*, 16 (2) : 183-194, 2005.

菅野 純 / Jun KANNO
 国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物
 試験研究センター毒性部

膠原病学

顕微鏡的多発血管炎とKIR多型

Genetic interaction between killer cell immunoglobulin-like receptor(KIR) and HLA genes with microscopic polyangiitis(MPA)

Killer cell immunoglobulin-like receptor(KIR)はNK細胞や一部のT細胞に発現する活性化型・抑制型分子群である。活性化型KIRのリガンドは不明であるが、抑制型KIRのいくつかはHLA-class I分子をリガンドとして認識することが知られている。KIR遺伝子ファミリーはヒト染色体19q13.4上のleukocyte receptor complex(LRC)内に位置し、各遺伝子座における塩基多型のみならず、ハプロタイプ上の遺伝子座の数の多型(copy number polymorphism)が存在する¹⁾。さらに、リガンドであるHLAも高度に多型的であるが、それぞれが別の染色体上に存在し、独立に遺伝することから、個体におけるKIRとHLAの組合せは多様であり、これが免疫応答の個体差に関連する可能性が推測されている。

KIR多型の関連研究

これまでいくつかの自己免疫疾患やウイルス感染症の関連研究において、KIR遺伝子多型との関連を示す報告がある²⁾。アメリカ人集団において血管炎を合併した関節リウマチや、乾癬性関節炎などの自己免疫疾患ではKIR2DS1, KIR2DS2など活性化型KIR遺伝子が患者群において高い頻度で観察されている。また、AIDSの進行が遅いタイプのKIR遺伝子型や、C型肝炎ウイルスのクリアランスにかかわるKIR-HLA遺伝子型の組合せなど、ウイルス感染症の臨床経過との関連も報告されている。

KIR多型と顕微鏡的多発血管炎

顕微鏡的多発血管炎(MPA)は急速進行性腎炎や肺出血などの臓器障害を伴う稀少疾患であり、抗好中球細胞質抗体(ANCA)産生によって特徴づけられる。患者は高齢者に多く、病因はよく知られていないが、ウイルスや細菌感染との関連を示唆する報告もある。当研究室ではこれまでに日本人MPAにおいて、HLA-DRB1*0901-DQB1*0303ハプロタイプ

が有意に増加していることを報告している³⁾。

今回、著者らは、日本人集団におけるHLA, KIR遺伝子群とMPAの疾患感受性の検討を目的とした多施設共同研究を行った⁴⁾。日本人MPA 43例、健常対照者239例の末梢血中のゲノムDNAを用いてHLA-BとHLA-Cを決定し、KIRの14遺伝子座をPCR-SSP法によりタイピングして、それぞれ単独で疾患との関連を検討するとともに、KIRとHLAの遺伝子型の組合せとMPAの疾患感受性との関連を検討した。

HLA単独ではMPAと健常群に統計学的に有意な差はみられなかった一方、KIRに関しては活性化型受容体遺伝子であるKIR2DS3の陽性率が健常群の16.7%に比べMPAでは4.7%と有

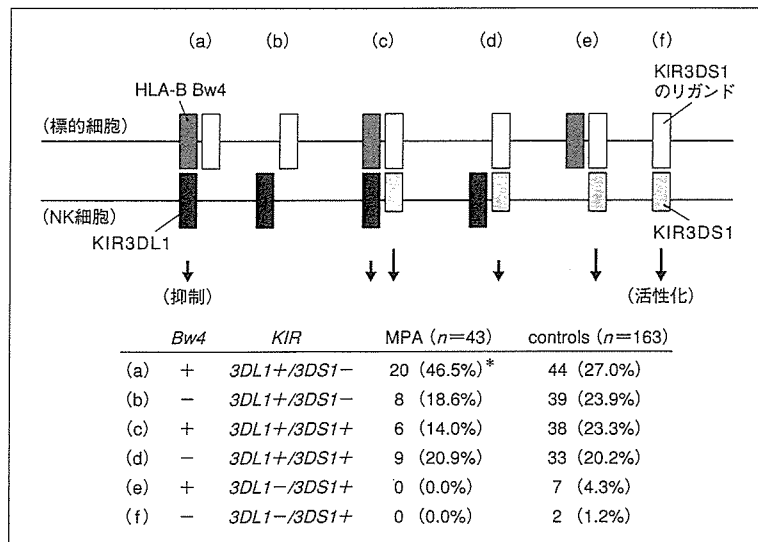


図1 MPAおよび健常群におけるHLA-B Bw4とKIR3DL1/3DS1の組合せ

KIR3DL1はHLA-Bアレルのうち約半数に存在するBw4エпитープを有するアレル産物に反応する。KIR3DS1とHLA-Bとの反応は証明されていないため、ここでは未知のリガンドが存在すると仮定して示してあるが、KIR3DS1はKIR3DL1遺伝子座における活性化型アレルであり、細胞外ドメインの相同性から何らかの条件下でBw4と反応する可能性が指摘されている。HLA-B Bw4とKIR3DL1/3DS1それぞれの遺伝子型の組合せは6通りに分類されるが、これらのうちで機能的にもっとも抑制的であると予想されるHLA-B Bw4陽性・KIR3DL1陽性・KIR3DS1陰性という群(a)がMPAにおいて46.5%と対照群の27.0%と比較してオッズ比2.35で有意に増加していた。

*p=0.014(χ²test), OR=2.35, 95%CI: 1.18-4.70

Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice

Hiroyuki Yoshioka[†], Takahiro Matsumoto^{**§}, Takashi Sato^{*}, Katsuhide Igarashi[¶], Junko Miyamoto^{*}, Sayuri Takemasa^{*}, Matomo Sakari^{*§}, Ichiro Takada^{*}, Takashi Nakamura^{*§}, Daniel Metzger^{||}, Pierre Chambon^{||}, Jun Kanno[¶], Hiroyuki Yoshioka[†], and Shigeaki Kato^{*§**}

*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan; [§]Exploratory Research for Advanced Technology, Japan Science and Technology, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan; [†]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan; [¶]Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; and ^{||}Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Louis Pasteur, Collège de France, 67404 Illkirch, Strasbourg, France

Edited by Bert W. O'Malley, Baylor College of Medicine, Houston, TX, and approved November 10, 2005 (received for review August 5, 2005)

Premature ovarian failure (POF) syndrome, an early decline of ovarian function in women, is frequently associated with X chromosome abnormalities ranging from various Xq deletions to complete loss of one of the X chromosomes. However, the genetic locus responsible for the POF remains unknown, and no candidate gene has been identified. Using the Cre/LoxP system, we have disrupted the mouse X chromosome androgen receptor (*Ar*) gene. Female *AR*^{-/-} mice appeared normal but developed the POF phenotype with aberrant ovarian gene expression. Eight-week-old female *AR*^{-/-} mice are fertile, but they have lower follicle numbers and impaired mammary development, and they produce only half of the normal number of pups per litter. Forty-week-old *AR*^{-/-} mice are infertile because of complete loss of follicles. Genome-wide microarray analysis of mRNA from *AR*^{-/-} ovaries revealed that a number of major regulators of folliculogenesis were under transcriptional control by AR. Our findings suggest that AR function is required for normal female reproduction, particularly folliculogenesis, and that AR is a potential therapeutic target in POF syndrome.

male hormone | nuclear receptor | female physiology | folliculogenesis | kit ligand

Premature ovarian failure (POF) is defined as an early decline of ovarian function after seemingly normal folliculogenesis (1). Genetic causes of POF have been frequently associated with X chromosome abnormalities (1, 2). Complete loss of one of the X chromosomes, as in Turner syndrome, and various Xq deletions are commonly identified as a cause of POF. However, responsible X-linked genes and their downstream targets have not been identified so far.

The androgen receptor (*Ar*) gene, which is the only sex hormone receptor on the X chromosome, is well known to be essential not only for the male reproductive system, but also for male physiology. In contrast, androgens are considered as male hormones; therefore, little is known about androgens' actions in female physiology, although AR expression in growing follicles has been described (3). However, because excessive androgen production in polycystic ovary syndrome causes infertility with abnormal menstrual cycles (4, 5), it is possible that AR-mediated androgen signaling also plays an important physiological role in the female reproductive system. Recently, using Cre/LoxP system, we generated an AR-null mutant mouse line (6) and demonstrated that inactivation of AR resulted in arrest of testicular development and spermatogenesis, impaired brain masculinization, high-turnover osteopenia, and late onset of obesity in males (7–9). At the same time, no overt physical or growth abnormalities were observed in female *AR*^{-/-} mice. Therefore, to further examine potential role of AR in female physiology, we characterized female reproductive system in *AR*^{-/-} females. Herein we show that female *AR*^{-/-} mice develop the POF phenotype. At 3 weeks of age, *AR*^{-/-} females had

apparently normal ovaries with numbers of follicles similar to those in the wild-type females. However, thereafter the number of healthy follicles in the *AR*^{-/-} ovary gradually declined, with a marked increase of atretic follicles, and by 40 weeks *AR*^{-/-} mice became infertile, with no follicle detectable in the ovary. Reflecting this age-dependent progression in ovarian abnormality, several genes known to be involved in the oocyte–granulosa cell regulatory loop were identified by microarray analysis as AR downstream target genes. These findings clearly demonstrate that AR-mediated androgen signaling is indispensable for the maintenance of folliculogenesis and implicate impaired androgen signaling as a potential cause of the POF syndrome.

Materials and Methods

Generation of AR Knockout Mice. *AR* genomic clones were isolated from a TT2 embryonic stem cell genomic library by using human *AR* A/B domain cDNA as a probe (6). The targeting vector consisted of a 7.6-kb 5' region containing exon 1, a 1.3-kb 3' homologous region, a single loxP site, and a neo cassette with two loxP sites (10). Targeted clones (FB-18 and FC-61) were aggregated with single eight-cell embryos from CD-1 mice (11, 12). Floxed *AR* mice (C57BL/6) were then crossed with CMV-Cre transgenic mice (6). The two lines exhibited the same phenotypic abnormalities. The chromosomal sex of each pup was determined by genomic PCR amplification of the Y chromosome *Sry* gene (13).

Western Blot Analysis. To detect AR protein expression, ovarian cell lysates were separated by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (14). Membranes were probed with polyclonal AR antibodies (N-20; Santa Cruz Biotechnology), and blots were visualized by using peroxidase-conjugated second antibody and an ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biosciences).

Morphologic Classification of Growing Follicles. Sections were taken at intervals of 30 μ m, and 6- μ m paraffin-embedded sections were mounted on slides. Routine hematoxylin and eosin staining was performed for histologic examination by light microscopy. Follicle numbers in 12 sections per ovary were evaluated as primary follicles (oocyte surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells), preantral follicles (oocyte surrounded by two or

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: AR, androgen receptor; DHT, 5 α -dihydrotestosterone; POF, premature ovarian failure.

*H.S. and T.M. contributed equally to this work.

**To whom correspondence should be addressed. E-mail: uskato@mail.eccu.tokyo.ac.jp.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

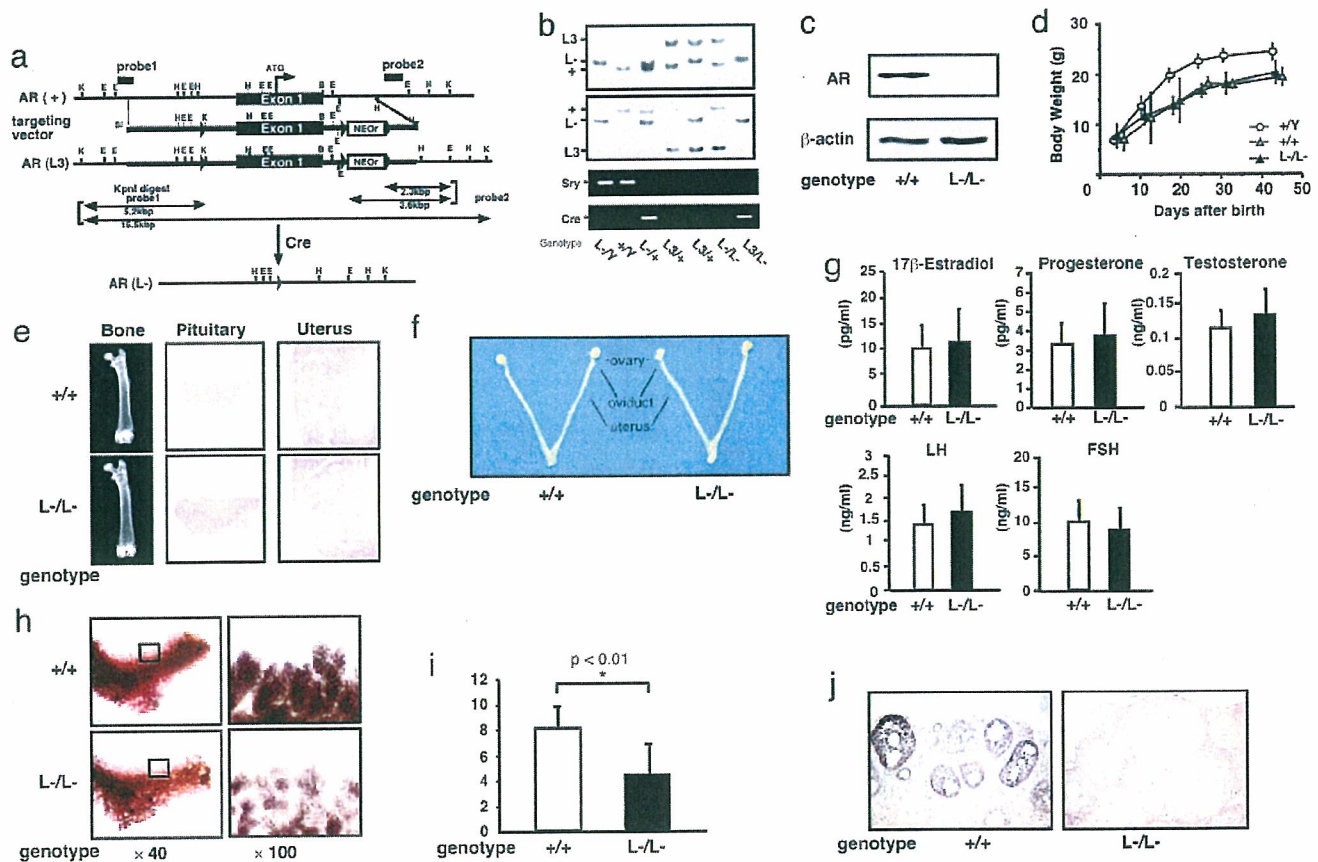


Fig. 1. Phenotypic characterization of AR knockout female mice. (a) Diagram of the wild-type *Ar* genomic locus (+), floxed AR L3 allele (L3), and AR allele (L-) obtained after Cre-mediated excision of exon 1. K, KpnI; E, EcoRI; H, HindIII; B, BamHI. LoxP sites are indicated by arrowheads. The targeting vector consisted of a 7.6-kb 5' homologous region containing exon 1, a 1.3-kb 3' homologous region, a single loxP site, and the neo cassette with two loxP sites. (b) Detection of the Y chromosome-specific *Sry* gene in *AR*^{-/-} mice by PCR. (c) Absence of AR protein in *AR*^{-/-} mice ovaries by Western blot analysis using a specific C-terminal antibody. (d) Normal weight gain in *AR*^{-/-} females. (e) Histology of pituitary, uterus, and bone tissues in *AR*^{-/-} and *AR*^{+/-} females at 8 weeks of age. (f) Female reproductive organs were macroscopically normal in *AR*^{-/-} mice. (g) Serum hormone levels at the proestrus stage in *AR*^{-/-} mice were not significantly altered. Serum 17 β -estradiol, progesterone, testosterone, luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) levels in *AR*^{+/-} (*n* = 13) and *AR*^{-/-} (*n* = 10) females at 8–10 weeks of age are shown. (h) Lobuloalveolar development is impaired in *AR*^{-/-} mammary glands. Whole mount of inguinal mammary glands (Left) and its higher magnification (Right) were prepared on day 3 of lactation. (i) Average number of pups per litter is markedly reduced in *AR*^{-/-} mice at 8 weeks of age. Data are shown as mean \pm SEM and analyzed by using Student's *t* test. (j) AR immunocytochemistry in *AR*^{+/-} and *AR*^{-/-} ovaries. Sections were counterstained with eosin.

more layers of granulosa cells with no antrum), or antral follicles (antrum within the granulosa cell layers enclosing the oocyte). Follicles were determined to be atretic if they displayed two or more of the following criteria within a single cross section: more than two pyknotic nuclei, granulosa cells within the antral cavity, granulosa cells pulling away from the basement membrane, or uneven granulosa cell layers (15).

Immunohistochemistry. Sections were subjected to a microwave antigen retrieval technique by boiling in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven for 30 min (16). The cooled sections were incubated in 1% H₂O₂ for 30 min to quench endogenous peroxidase and then incubated with 1% Triton X-100 in PBS for 10 min. To block nonspecific antibody binding, sections were incubated in normal goat serum for 1 h at 4°C. Sections were then incubated with anti-AR (1:100) or anti-cleaved caspase-3 (1:100) in 3% BSA overnight at 4°C. Negative controls were incubated in 3% BSA without primary antibody. The ABC method was used to visualize signals according to the manufacturer's instructions. Sections were incubated in biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200 dilution) for 2 h at room

temperature, washed with PBS, and incubated in avidin–biotin–horseradish peroxidase for 1 h. After thorough washing in PBS, sections were developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate, slightly counterstained with eosin, dehydrated through an ethanol series and xylene, and mounted.

Estrus Cycles and Fertility Test. To determine the stage of the estrus cycle (proestrus, estrus, and diestrus), vaginal smears were taken every morning and stained with Giemsa solution. For evaluation of female fertility for 15 weeks, an 8- or 24-week-old wild-type or *AR*^{-/-} female was mated with a wild-type fertile male, replaced every 2 weeks with the other fertile male. Cages were monitored daily and for an additional 23 days, and the presence of seminal plugs and number of litters were recorded.

RNA Extraction and Quantitative Competitive RT-PCR. Total ovarian RNA was extracted by using TRIzol (Invitrogen) (16). Oligo-dT-primed cDNA was synthesized from 1 μ g of ovarian RNA by using SuperScript reverse transcriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) in a 20- μ l reaction volume, 1 μ l of which was then diluted serially (2- to 128-fold) and used to PCR-amplify an internal control gene, *cycA*, to allow concentration estimation.

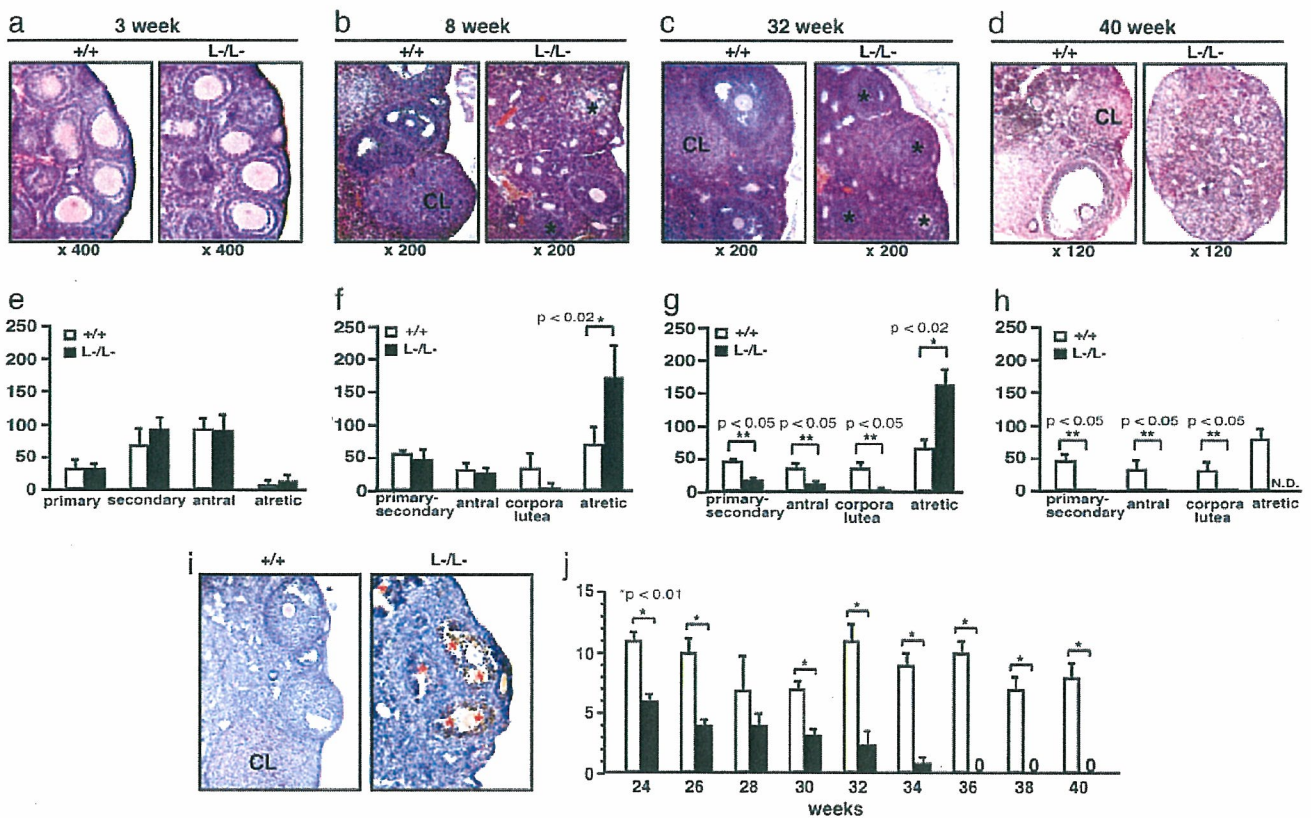


Fig. 2. POF in $AR^{-/-}$ female mice. (a–d) Histology of $AR^{+/+}$ and $AR^{-/-}$ ovaries at 3 weeks, 8 weeks, 32 weeks, and 40 weeks of age. All sections were stained with hematoxylin and eosin. An asterisk marks the atretic follicle. CL, corpus luteum. (e–h) Relative follicle counts at 3 weeks (e), 8 weeks (f), 32 weeks (g), and 40 weeks (h) of age. Numbers represent total counts of every fifth section from serially sectioned ovaries ($n = 4$ animals per genotype). (i) Immunohistochemical study for activated, cleaved caspase-3 revealed increased positive cells (apoptotic cells) in $AR^{-/-}$ ovaries. Sections were counterstained with hematoxylin. An asterisk marks the caspase-3-positive cell. CL, corpus luteum. (j) Age-dependent reduction in the number of pups per litter in $AR^{-/-}$ female mice. A continuous breeding assay was started at 24 weeks of age ($n = 6$ –10 animals per genotype). For all panels, data are shown as mean \pm SEM and were analyzed by using Student's t test.

Primers were designed from cDNA sequences of *Kitl* (M57647; nucleotides 1099–1751), *Gdf9* (NM008110; nucleotides 720–1532), *Bmp15* (NM009757; nucleotides 146–973), *Ers2* (NM010157; nucleotides 1139–1921), *Pgr* (NM008829; nucleotides 1587–2425), *Cyp11a1* (NM019779; nucleotides 761–1697), *Cyp17a1* (M64863; nucleotides 522–932), *Cyp19* (D00659; nucleotides 699–1049), *Fshr* (AF095642; nucleotides 625–1427), *Lhr* (M81310; nucleotides 592–1331), *Ptgs2* (AF338730; nucleotides 3–605), and *Ccnd2* (NM009829; nucleotides 150–1065) and chosen from different exons to avoid amplification from genomic DNA.

GeneChip Analysis. Ovaries were isolated and stabilized in RNA-later RNA Stabilization Reagent (Ambion, Austin, TX) before RNA purification (17). Total RNA was purified by using an RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 5 μ g of RNA by using 200 units of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 pmol T7-(dT)₂₄ primer [5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCAC-TATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3'], 1 \times first-strand buffer, and 0.5 mM dNTPs at 42°C for 1 h. Second-strand synthesis was performed by incubating first-strand cDNA with 10 units of *Escherichia coli* ligase (Invitrogen), 40 units of DNA polymerase I (Invitrogen), 2 units of RNase H (Invitrogen), 1 \times reaction buffer, and 0.2 mM dNTPs at 16°C for 2 h, followed by 10 units of T4 DNA polymerase (Invitrogen) and incubation for another

5 min at 16°C. Double-stranded cDNA was purified by using GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions and labeled by *in vitro* transcription by using a BioArray HighYield RNA transcript labeling kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). Briefly, dsDNA was mixed with 1 \times HY reaction buffer, 1 \times biotin-labeled ribonucleotides (NTPs with Bio-UTP and Bio-CTP), 1 \times DTT, 1 \times RNase inhibitor mix, and 1 \times T7 RNA polymerase and incubated at 37°C for 4 h. Labeled cRNA was then purified by using GeneChip Sample Cleanup Module and fragmented in 1 \times fragmentation buffer at 94°C for 35 min. For hybridization to the GeneChip Mouse Expression Array 430A or 430B or Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix), 15 μ g of fragmented cRNA probe was incubated with 50 pM control oligonucleotide B2, 1 \times eukaryotic hybridization control, 0.1 mg/ml herring sperm DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA, and 1 \times hybridization buffer in a 45°C rotisserie oven for 16 h. Washing and staining were performed by using a GeneChip Fluidic Station (Affymetrix) according to the manufacturer's protocol. Phycoerythrin-stained arrays were scanned as digital image files and analyzed with GENECHIP OPERATING SOFTWARE (Affymetrix) (17).

Luciferase Assay. The *Kitl* promoter region (–2866 to –1 bp) was inserted into the pGL3-basic vector (Promega) for assay using the Luciferase Assay System (Promega) (14, 16). Cells at 40–50% confluence were transfected with a reference pRL-CMV

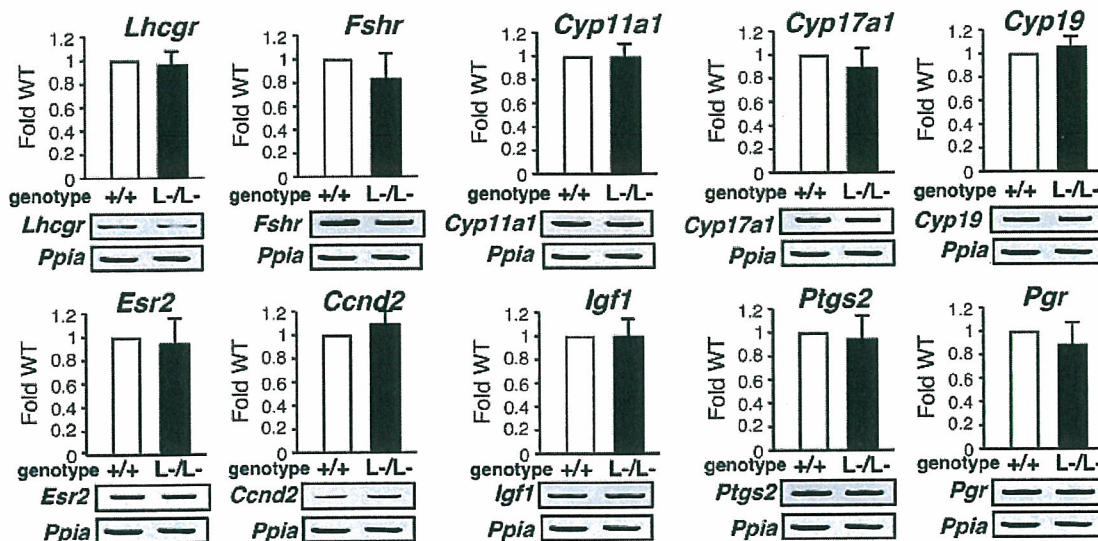


Fig. 3. No significant alterations in mRNA levels of several major regulators in folliculogenesis. Shown is semi-quantitative RT-PCR of LH receptor (*Lhr*), FSH receptor (*Fshr*), p450 side chain cleavage enzyme (*Cyp11a1*), 17- α -hydroxylase (*Cyp17a1*), aromatase (*Cyp19*), estrogen receptor- β (*Esr2*), cyclin D2 (*Ccnd2*), insulin-like growth factor 1 (*Igf1*), cyclooxygenase 2 (*Ptgs2*), or progesterone receptor (*Pgr*) gene expression in $AR^{+/+}$ and $AR^{-/-}$ ovaries. Results shown were representative (using one ovary per genotype in each experiment) of five independent experiments.

plasmid (Promega) using Lipofectamine reagent (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) to normalize transfection. Results shown are representative of five independent experiments.

Results and Discussion

Subfertility of $AR^{-/-}$ Female Mice at 8 Weeks of Age. The *Ar* gene located on the X chromosome was disrupted in mice by using the Cre/Lox P system (6) (Fig. 1 *a-c*). Female $AR^{-/-}$ mice showed normal growth compared with the wild-type littermates (Fig. 1*d*), with no detectable bone loss (Fig. 1*e*) or obesity common for male $AR^{-/-}$ mice (8, 9). Young (8-week-old) $AR^{-/-}$ females appeared indistinguishable from the wild-type littermates, displayed normal sexual behavior (7), and produced the first offspring of normal body size at the expected age. Macroscopic appearance of their reproductive organs, including uteri, oviducts, and ovaries, also appeared normal (Fig. 1*f*). Histological analysis showed no significant abnormality in the uterus or pituitary (Fig. 1*e*), whereas mammary ductal branching and elongation were substantially reduced, as revealed by whole-mount analysis (Fig. 1*h*). Serum levels of 17 β -estradiol, progesterone, testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone were also within normal range in 8-week-old mutant females at the proestrus stage (Fig. 1*g*), suggesting that the two-cell two-gonadotrophin system in female reproductive and endocrine organs (18) was intact in $AR^{-/-}$ mice at 8 weeks of age. The most obvious early sign of abnormal reproductive function in the $AR^{-/-}$ females was that their average numbers of pups per litter were only about half of those of the wild-type littermates, ($AR^{+/+}$, 8.3 ± 0.4 pups per litter; $AR^{-/-}$, 4.5 ± 0.5 pups per litter) (Fig. 1*i*).

$AR^{-/-}$ Female Mice Developed POF Phenotypes. Histological analysis of 8-week-old $AR^{-/-}$ ovaries clearly showed that numbers of atretic follicles were significantly increased, with decreased numbers of corpora lutea (Fig. 2 *b* and *f*). This finding suggests that the reduced pup numbers were due to impaired folliculogenesis in AR-deficient ovaries. Indeed, AR protein expression was readily detectable in the wild-type 8-week-old ovaries (Fig. 1*j*), with AR expressed at the highest levels in growing follicle granulosa cells at all developmental stages and at relatively low

levels in corpora lutea. Thus, AR appears to play a regulatory role in granulosa cells during their maturation to the luteal phase.

To investigate this possibility, we examined the ovarian phenotype of female $AR^{-/-}$ mice at different ages. At 3 weeks, ovaries contain various stages of follicles, including primary, secondary, and antral follicles in wild-type animals (Fig. 2*a*) (19). In $AR^{-/-}$ ovaries at 3 weeks of age, the folliculogenesis appeared to be unaltered, with normal numbers and localization of primary and secondary follicles (Fig. 2 *a* and *e*). However, degenerated folliculogenesis became evident with further aging. Although follicles and corpora lutea at all developmental stages were still present, corpora lutea numbers were clearly reduced in 8-week-old $AR^{-/-}$ mutants (Fig. 2 *b* and *f*), similar to that observed in another mouse line (20). Expected apoptosis was seen in atretic follicles by activated caspase-3 immunohistochemistry assays (Fig. 2*i*). But, by 32 weeks of age, defects in folliculogenesis in $AR^{-/-}$ ovaries became profound, with fewer follicles observed and increased atretic follicles (Fig. 2 *c* and *g*), and >40% (5 of 12 mice) of the $AR^{-/-}$ females were already infertile. By 40 weeks, all $AR^{-/-}$ females became infertile, with no follicles remaining (Fig. 2 *d* and *h*); at the same age, $AR^{+/+}$ females were fertile and had normal follicle numbers. Consistent with progressive deficiency in folliculogenesis, the pup number per litter steadily decreased in aging $AR^{-/-}$ females (Fig. 2*i*). These data indicate that AR plays an important physiological role at the preluteal phase of folliculogenesis.

Alteration in Gene Expressions of Several Major Regulators Involved in the Oocyte-Granulosa Cell Regulatory Loop. To explore the molecular basis underlying the impaired folliculogenesis in $AR^{-/-}$ ovaries, we analyzed expression of several major known regulators and markers of folliculogenesis (21–23). Surprisingly, no significant alterations in mRNA levels of LH receptor (*Lhr*), FSH receptor (*Fshr*), p450 side chain cleavage enzyme (*Cyp11a1*), 17- α -hydroxylase (*Cyp17a1*), aromatase (*Cyp19*), estrogen receptor- β (*Esr2*), cyclin D2 (*Ccnd2*), or insulin-like growth factor 1 (*Igf1*) of 8-week-old $AR^{-/-}$ ovaries at the proestrus stage, and further cyclooxygenase 2 (*Ptgs2*) or progesterone receptor (*Pgr*) at the estrus stage, were detected by

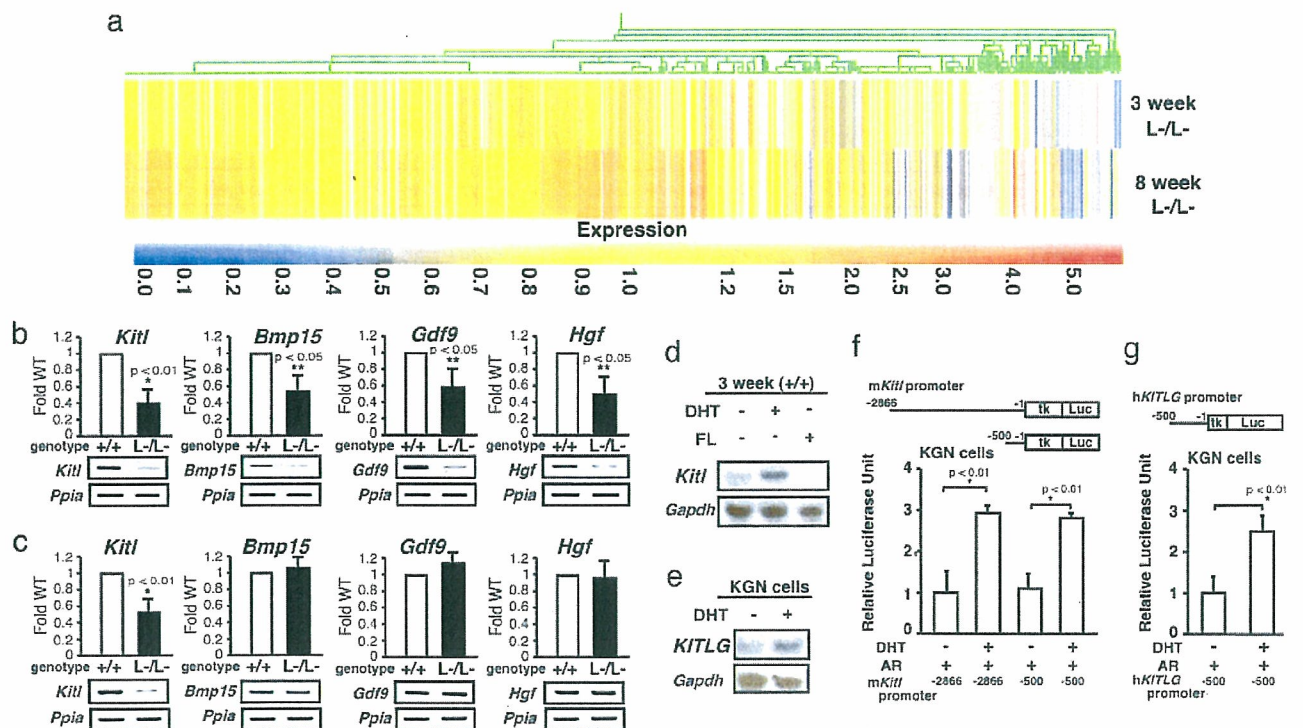


Fig. 4. Genome-wide microarray analysis and semiquantitative RT-PCR revealed that expression of the oocyte-granulosa cell regulator loop was down-regulated in $AR^{-/-}$ ovaries. (a) Microarray analysis of $AR^{-/-}$ compared with $AR^{+/+}$ ovaries at 3 and 8 weeks of age. Data obtained from microarray analysis as described in *Materials and Methods* were used to generate a cluster analysis. Each vertical line represents a single gene. The ratios of gene expression levels in $AR^{-/-}$ ovaries compared with wild type are presented. (b and c) Semiquantitative RT-PCR analysis of AR-regulated genes identified from the microarray study. Results shown are representative (using one ovary per genotype in each experiment) of five independent experiments. Data are shown as mean \pm SEM and were analyzed by using Student's *t* test. (d) Comparison of *Kitl* gene expression by Northern blot analysis among placebo-, DHT-, and flutamide (FL)-treated $AR^{+/+}$ mouse ovaries. (e) Induction of *KITLG* gene expression by DHT treatment in KGN cells. (f and g) Androgen responsiveness in the mouse and human *kit ligand* promoters by a luciferase assay performed by using KGN cells. Data are shown as mean \pm SEM and were analyzed by using Student's *t* test.

semiquantitative RT-PCR analysis (Fig. 3). Genome-wide microarray analysis (17) of RNA from 8-week-old $AR^{-/-}$ ovaries at the proestrus stage has been undertaken to identify AR-regulated genes. In comparison with $AR^{+/+}$ ovaries, expressions of 772 genes were down-regulated, whereas 351 genes were up-regulated in $AR^{-/-}$ ovaries (Fig. 4a; see also Tables 1 and 2, which are published as supporting information on the PNAS web site). Several genes known to be involved in the oocyte-granulosa cell regulatory loop (24) were identified as candidate AR target genes, including KIT ligand (*Kitl*) (25), morphogenetic protein 15 (*Bmp15*) (26), growth differentiation factor-9 (*Gdf9*) (27), and hepatocyte growth factor (*Hgf*) (28). Impaired folliculogenesis had been reported in mice deficient in each of these three regulators (26, 27, 29). To validate the microarray data, we performed semiquantitative RT-PCR analysis of 8-week-old $AR^{-/-}$ ovary RNA and confirmed that expression of these factors was down-regulated (Fig. 4b). To identify a regulator downstream of the AR signaling at an earlier stage of folliculogenesis, 3-week-old $AR^{-/-}$ ovaries that, as pointed out earlier, display no apparent phenotypic abnormality were examined. Fewer genes had altered expression levels (519 genes up-regulated; 326 genes down-regulated) (Fig. 4a; see also Tables 3 and 4, which are published as supporting information on the PNAS web site), and, of the four regulators tested by RT-PCR, only *Kitl* was found to be down-regulated at this age (Fig. 4c). Because *Kitl* is a granulosa cell-derived factor and stimulates oocyte growth and maturation (29–31), down-regulation of the *Kitl* expression in 3-week-old or even younger $AR^{-/-}$ ovaries may trigger impairment in folliculogenesis at a

later age. To test for possible *Kitl* gene regulation by AR, 3-week-old wild-type females were treated with 5 α -dihydrotestosterone (DHT). At 4 h after hormone injection, a clear induction of *Kitl* expression was observed in the ovaries, whereas a known antiandrogen flutamide attenuated the induction by DHT (Fig. 4d). The induction of endogenous human *kit ligand* (*KITLG*) gene by DHT was also observed in human granulosa-like tumor cells (KGN) in culture (Fig. 4e). Furthermore, androgen-induced transactivation of mouse and human *kit ligand* promoters (32) was observed by a luciferase reporter assay (33) in KGN (Fig. 4f and g), 293T, and HeLa (data not shown) cells. However, no response to DHT was detected in the similar assay using promoters of the *Bmp15*, *Gdf9*, and *Hgf* genes (data not shown). Thus, we have shown that, in a regulatory cascade controlling folliculogenesis, *Kitl* represents a direct downstream target of androgen signaling.

As an upstream regulator, AR may also be indirectly involved in control of expression of other genes critical for folliculogenesis, because an age-dependent down-regulation of *Bmp15*, *Gdf9*, and *Hgf* gene expression was also observed in $AR^{-/-}$ ovaries. *Bmp15* and *Gdf9* are oocyte-derived factors that promote the development of surrounding granulosa cells in growing follicles (34, 35), whereas *Hgf* is secreted by theca cells and acts as a granulosa cell growth factor (36). Down-regulation of these factors, presumably due to decreased *Kitl* expression, may lead to impaired bidirectional communication between oocyte and granulosa cells (24) and, eventually, to early termination of folliculogenesis, as in POF syndrome.

Thus, we have identified AR as a novel regulator of follicu-

logogenesis that apparently acts in the regulatory cascade upstream of the major factors controlling ovarian function, confirming the previous findings of the AR expression in granulosa cells of growing follicles (3). Although not immediately relevant to the ovarian physiology, abnormal development of the mammary glands observed in our AR-deficient mice adds further strong evidence of an essential role of the AR not only in male, but also in female, reproductive function.

With increasing age of the first childbirth by women in the modern society, POF syndrome has become an important social and medical problem. Our findings suggest that POF syndrome may be caused by an impairment in androgen signaling and that X chromosomal mutations affecting the AR gene function may

play a key role in hereditary POF. From clinical perspective, the present study provides evidence that AR can be a beneficial therapeutic target in treatment of POF syndrome patients.

We thank T. Iwamori and H. Tojo for expert advice on mammary gland anatomy, Y. Kanai for ovarian phenotypic analysis, members of the KO project team at the laboratory of Nuclear Signaling (Institute of Molecular and Cellular Biosciences) for their support, A. P. Kouzmenko for helpful suggestions, and H. Higuchi for manuscript preparation. This work was supported in part by the Program for Promotion of Basic Research Activities for Innovative Biosciences and priority areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (to S.K.).

- Laml, T., Preyer, O., Umek, W., Hengstschlager, M. & Hanzal, H. (2002) *Hum. Reprod. Update* **8**, 483–491.
- Davison, R. M., Davis, C. J. & Conway, G. S. (1999) *Clin. Endocrinol. (Oxford)* **51**, 673–679.
- Tetsuka, M., Whitelaw, P. F., Bremner, W. J., Millar, M. R., Smyth, C. D. & Hillier, S. G. (1995) *J. Endocrinol.* **145**, 535–543.
- Ehrmann, D. A., Barnes, R. B. & Rosenfield, R. L. (1995) *Endocr. Rev.* **16**, 322–353.
- Norman, R. J. (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* **191**, 113–119.
- Kato, S. (2002) *Clin. Pediatr. Endocrinol.* **11**, 1–7.
- Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1673–1678.
- Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H. & Kato, S. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 167–171.
- Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9416–9421.
- Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D. & Chambon, P. (2000) *Nature* **407**, 633–636.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. & Kato, S. (1999) *Nat. Genet.* **21**, 138–141.
- Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., et al. (1997) *Nat. Genet.* **16**, 391–396.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. (1990) *Nature* **346**, 245–250.
- Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhito, Y., Suzawa, M., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Toriyabe, T., Kawabata, M., Miyazono, K. & Kato, S. (1999) *Science* **283**, 1317–1321.
- Britt, K. L., Drummond, A. E., Cox, V. A., Dyson, M., Wreford, N. G., Jones, M. E., Simpson, E. R. & Findlay, J. K. (2000) *Endocrinology* **141**, 2614–2623.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., et al. (2003) *Nature* **423**, 545–550.
- Fujimoto, N., Igarashi, K., Kanno, J., Honda, H. & Inoue, T. (2004) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **91**, 121–129.
- Couse, J. F. & Korach, K. S. (1999) *Endocr. Rev.* **20**, 358–417.
- Elvin, J. A. & Matzuk, M. M. (1998) *Rev. Reprod.* **3**, 183–195.
- Hu, Y. C., Wang, P. H., Yeh, S., Wang, R. S., Xie, C., Xu, Q., Zhou, X., Chao, H. T., Tsai, M. Y. & Chang, C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11209–11214.
- Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K. & Matzuk, M. M. (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 1018–1034.
- Zhou, J., Kumar, T. R., Matzuk, M. M. & Bondy, C. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 1924–1933.
- Burns, K. H., Yan, C., Kumar, T. R. & Matzuk, M. M. (2001) *Endocrinology* **142**, 2742–2751.
- Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M. & Eppig, J. J. (2002) *Science* **296**, 2178–2180.
- Joyce, I. M., Pendola, F. L., Wigglesworth, K. & Eppig, J. J. (1999) *Dev. Biol.* **214**, 342–353.
- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., et al. (2001) *Mol. Endocrinol.* **15**, 854–866.
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N. & Matzuk, M. M. (1996) *Nature* **383**, 531–535.
- Parrott, J. A., Vigne, J. L., Chu, B. Z. & Skinner, M. K. (1994) *Endocrinology* **135**, 569–575.
- Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R. & Smits, J. (2000) *Rev. Reprod.* **5**, 143–152.
- Huang, E. J., Manova, K., Packer, A. I., Sanchez, S., Bachvarova, R. F. & Besmer, P. (1993) *Dev. Biol.* **157**, 100–109.
- Packer, A. I., Hsu, Y. C., Besmer, P. & Bachvarova, R. F. (1994) *Dev. Biol.* **161**, 194–205.
- Grimaldi, P., Capolunghi, F., Geremia, R. & Rossi, P. (2003) *Biol. Reprod.* **69**, 1979–1988.
- Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., et al. (2003) *Cell* **113**, 905–917.
- Otsuka, F. & Shimasaki, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8060–8065.
- Joyce, I. M., Clark, A. T., Pendola, F. L. & Eppig, J. J. (2000) *Biol. Reprod.* **63**, 1669–1675.
- Parrott, J. A. & Skinner, M. K. (1998) *Endocrinology* **139**, 2240–2245.

Methodology article

Open Access

"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays

Jun Kanno^{*†1}, Ken-ichi Aisaki^{†1}, Katsuhide Igarashi¹, Noriyuki Nakatsu¹, Atsushi Ono¹, Yukio Kodama¹ and Taku Nagao²

Address: ¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and ²President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno* - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - Atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 29 March 2006

Received: 06 November 2005

BMC Genomics 2006, 7:64 doi:10.1186/1471-2164-7-64

Accepted: 29 March 2006

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/64>

© 2006 Kanno et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Transcriptome data from quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarrays are typically obtained from a fixed amount of RNA collected per sample. Therefore, variations in tissue cellularity and RNA yield across samples in an experimental series compromise accurate determination of the absolute level of each mRNA species per cell in any sample. Since mRNAs are copied from genomic DNA, the simplest way to express mRNA level would be as copy number per template DNA, or more practically, as copy number per cell.

Results: Here we report a method (designated the "Percellome" method) for normalizing the expression of mRNA values in biological samples. It provides a "per cell" readout in mRNA copy number and is applicable to both quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarray studies. The genomic DNA content of each sample homogenate was measured from a small aliquot to derive the number of cells in the sample. A cocktail of five external spike RNAs admixed in a dose-graded manner (dose-graded spike cocktail; GSC) was prepared and added to each homogenate in proportion to its DNA content. In this way, the spike mRNAs represented absolute copy numbers per cell in the sample. The signals from the five spike mRNAs were used as a dose-response standard curve for each sample, enabling us to convert all the signals measured to copy numbers per cell in an expression profile-independent manner. A series of samples was measured by Q-PCR and Affymetrix GeneChip microarrays using this Percellome method, and the results showed up to 90 % concordance.

Conclusion: Percellome data can be compared directly among samples and among different studies, and between different platforms, without further normalization. Therefore, "percellome" normalization can serve as a standard method for exchanging and comparing data across different platforms and among different laboratories.

Background

Normalization of gene expression data between different

samples generated in the same laboratory using a single platform, and/or generated in different geographical

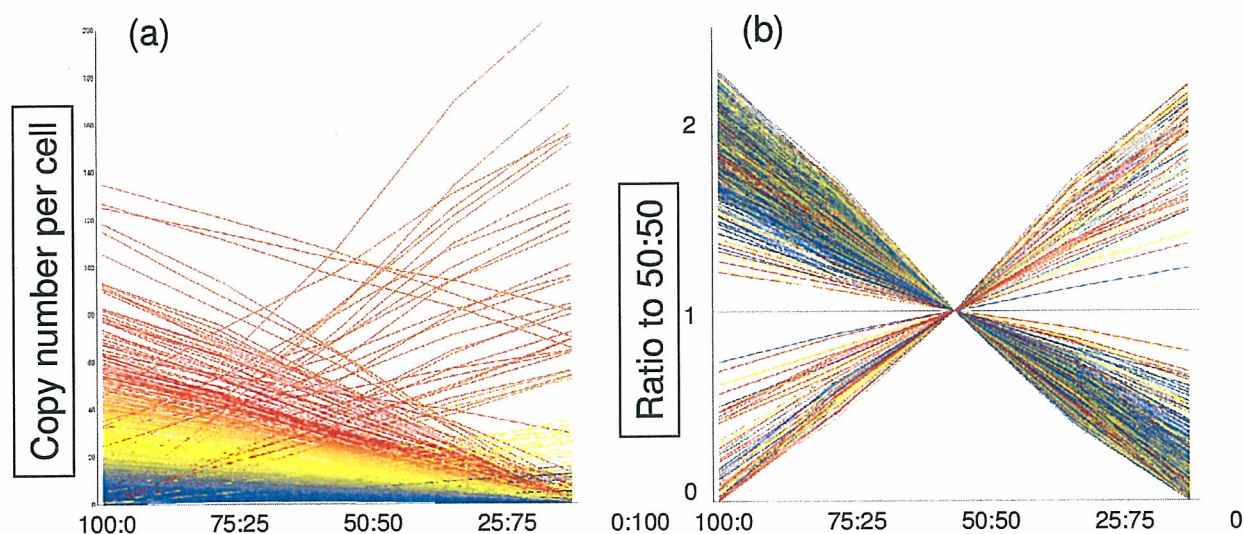
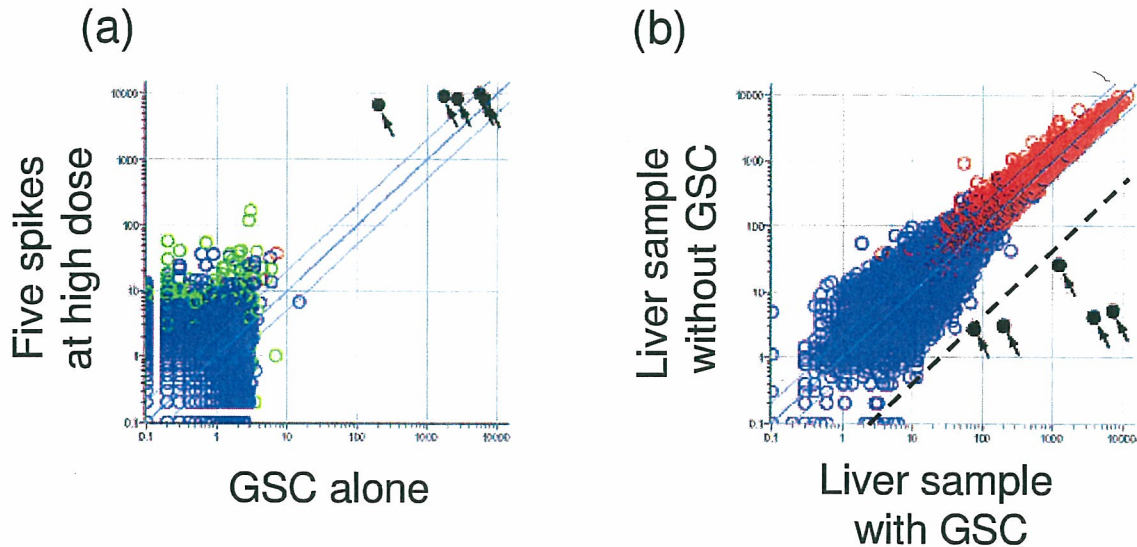


Figure 1

Dose-response linearity check by LBM. Dose-response linearity of the Affymetrix GeneChip by the LBM (liver-brain mix) sample set. Five samples, i.e. mixtures of mouse liver and brain at ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, were spiked with GSC and measured by Affymetrix GeneChips Mouse430-2. Signals were normalized by the PerCellome method as described in the text. Line graphs are in (a) copy numbers and (b) ratio to 50:50 sample for the top 1,000 probe sets with coefficient of correlation (R^2) closest to 1 among those having 1 copy or more per cell in the 50:50 sample (19,979 probe sets out of 45,101). The number of probe sets with $R^2 > 0.950$ was 8,655, and $R^2 > 0.900$ was 11,719.

regions using multiple platforms, is central to the establishment of a reliable reference database for toxicogenomics and pharmacogenomics. Transforming expression data into a "per cell" database is an effective way of normalizing expression data across samples and platforms. However, transcriptome data from the quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarray analyses currently deposited in the database are related to a fixed amount of RNA collected per sample. Variations in RNA yield across samples in an experimental series compromise accurate determination of the absolute level of each mRNA species per cell in any sample. Normalization against housekeeping genes for PCRs, and global normalization of ratiometric data for microarrays, is typically performed to account for this informational loss. Additional methods, such as the use of external mRNA spikes, reportedly improve the quality of data from microarray systems. For example, Holstege et al. [1] described a spike method against total RNA, based on their finding that the yields of total RNA from wild type and mutant cells were very similar. Hill et al. [2] reported a spike method against total RNA for normalizing hybridization data such that the sensitivities of individual arrays could be compared. Lee et al. [3] demonstrated that "housekeeping genes" cannot be used as a ref-

erence control, and van de Peppel et al. [4] described a normalization method of mRNA against total RNA using an external spike mixture. To achieve satisfactory performance they used multiple graded doses of external spikes, covering a wide range of expression, in order to align the ratiometric data by Lowess normalization [5]. Hekstra et al. [6] presented a method for calculating the final cRNA concentration in a hybridization solution. Sterrenburg et al. [7] and Dudley et al. [8] reported the use of common reference control samples for two-color microarray analyses of the human and yeast genomes, respectively. These are pools of antisense oligo sequences against all sense oligos present on the microarray. Instead of antisense oligos, Talaat et al. [9] used genomic DNA as a common reference control in studies of *E. coli*. Statistical approaches have been proposed for ratiometric data to improve inter-microarray variations, especially of non-linear relations [10]. However, because control samples may differ among studies, ratiometric data cannot easily be compared across multiple studies unless a common reference, such as a mixture of all antisense counterparts of spotted sense sequences is used [7-9]. Nevertheless, as long as the normalization is calibrated to total RNA, variations in total RNA profile cannot be effectively cancelled out. Although

**Figure 2**

Cross-hybridization of GSC. Cross-hybridization of the GSC spike mRNAs to Affymetrix GeneChip. (a) A scatter plot of a blank sample with the GSC (horizontal axis) and a blank with the five spike RNAs at a high dosage (vertical axis) measured by MG-U74v2A GeneChips (raw values generated by Affymetrix MAS 5.0 software). The five spikes are indicated by black dots with arrows. Signals of the murine probe sets were below 20 on the horizontal axis, indicating negligible cross-hybridization of GSC spike mRNAs to the murine probe sets. (b) A scatter plot of a liver sample with GSC (horizontal axis) and without GSC (vertical axis) measured by MG-U74v2A GeneChips. The five spikes are again indicated by black dots with arrows. The dotted line is the 1/25 fold (4%) line. Cross-hybridization of mouse liver mRNAs to the GSC signals was considered negligible (less than 4%).

some of these reports share the idea that "absolute expression" and "transcripts per cell" should entail robust normalization, further practical development to enable universal application has been awaited.

Here, we report a method for normalizing expression data across samples and methods to the cell number of each sample, using the DNA content as indicator. This normalization method is independent of the gene expression profile of the sample, and may contribute to transcriptome studies as a common standard for data comparison and interchange.

Results

Dose-response linearity of the measurement system as a basis for the Percellome method

The fidelity of transcript detection is the key to this "per cell" based normalization method, which generates transcriptome data in "mRNA copy numbers per cell". The Q-PCR system was tested by serially diluting samples to confirm the linear relationship between Ct values and the log

of sample mRNA concentration (data not shown). High density oligonucleotide microarrays from Affymetrix [11] were used in our experiments. We tested the linearity of the Affymetrix GeneChips using a set of five samples made of mixtures of liver and brain in ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, and 0:100 (designated "LBM" for liver-brain mix). The results showed a linear relationship ($R^2 > 0.90$) between fluorescence intensity and input for a sufficient proportion of probe sets, i.e. about 37% of the probe sets in the older MG-U74v2 and 70% in the newest Mouse Genome 430 2.0 GeneChip were above the detection level (approximately one copy per cell) in the 50:50 sample (Figure 1) [see Additional files 1 and 2].

Dose-response linearity alone is not sufficient to generate true mRNA copy numbers. An important additional requirement is that the ratio of signal intensity to mRNA copy number should be equal among all GeneChip probe sets of mRNAs and PCR primers. The Q-PCR primer sets were designed to perform at similar amplification rates to minimize differences between amplicons. The melting