

- [160] Reistad T, Mariussen E, Fonnum F. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: the involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C. *Toxicol Sci* 2005;83(1):89–100.
- [161] Belcher SM, Le HH, Spurling L, Wong JK. Rapid estrogenic regulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling in cerebellar granule cells involves a G protein- and protein kinase A-dependent mechanism and intracellular activation of protein phosphatase 2A. *Endocrinology* 2005;146(12):5397–406.
- [162] Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res* 2003;45(3):345–56.
- [163] Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 2006.
- [164] Holdstock G, Chastenay BF, Krawitt EL. Effects of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. *Clin Exp Immunol* 1982;47(2):449–56.
- [165] Paavonen T, Andersson LC, Adlercreutz H. Sex hormone regulation of in vitro immune response. Estradiol enhances human B cell maturation via inhibition of suppressor T cells in pokeweed mitogen-stimulated cultures. *J Exp Med* 1981;154(6):1935–45.
- [166] Segura JJ, Jimenez-Rubio A, Pulgar R, Olea N, Guerrero JM, Calvo JR. In vitro effect of the resin component bisphenol A on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod* 1999;25(5):341–4.
- [167] Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K. Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci* 2005;84(2):319–27.
- [168] Masuno H, Kidani T, Sekiya K, Sakayama K, Shiosaka T, Yamamoto H, et al. Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J Lipid Res* 2002;43(5):676–84.
- [169] Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology* 2004;196(1/2):137–45.
- [170] Cappelletti V, Saturno G, Miodini P, Korner W, Daidone MG. Selective modulation of ER-beta by estradiol and xenoestrogens in human breast cancer cell lines. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(3):567–76.
- [171] Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biol Pharm Bull* 2006;29(2):206–10.
- [172] Tsutsui T, Tamura Y, Yagi E, Hasegawa K, Takahashi M, Maizumi N, et al. Bisphenol-A induces cellular transformation, aneuploidy and DNA adduct formation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer* 1998;75(2):290–4.
- [173] Tsutsui T, Tamura Y, Suzuki A, Hirose Y, Kobayashi M, Nishimura H, et al. Mammalian cell transformation and aneuploidy induced by five bisphenols. *Int J Cancer* 2000;86(2):151–4.
- [174] Jin H, Audus KL. Effect of bisphenol A on drug efflux in BeWo, a human trophoblast-like cell line. *Placenta* 2005;26(Suppl A):S96–103.
- [175] Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori T, Yamada F. Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 2003;17(4):457–64.
- [176] Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T. Identification of genetic networks involved in the cell injury accompanying endoplasmic reticulum stress induced by bisphenol A in testicular Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(3):1044–50.
- [177] Seiwa C, Nakahara J, Komiyama T, Katsu Y, Iguchi T, Asou H. Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cells. *Neuroendocrinology* 2004;80(1):21–30.
- [178] Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Effects of 17beta-estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in an organotypic hippocampal culture. *Neuroendocrinology* 2002;76(4):223–34.

特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

トキシコゲノミクスの新展開

Percellome プロジェクトによる 2,3,7,8-TCDD - 2,3,7,8-TCDF 比較

An Attempt for Adding a New Dimension to Toxicogenomics Research : 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF Comparison Trial in The Percellome Project

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 北嶋 聡 中津則之 児玉幸夫 高木篤也

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

Percellome トキシコゲノミクスはマイクロアレイという数万遺伝子の発現レベルを一気に測定するハイスループット技術を利用し、全遺伝子のカスケード解明を最終目標としつつ、従来に比べてより早く安くかつ正確な毒性評価系の確立を目指すものである。筆者らはこのような次世代の毒性評価・予測技術を開発するために、細胞1個当たりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法を開発した。今までに 90 以上の化学物質についての網羅的遺伝子発現情報を得て、なお追加中である。本稿では環境化学物質の一例としてダイオキシンの分子毒性に関わる知見を紹介する。

key words

Percellome Project, 遺伝子発現カスケード, 分子毒性学

i 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。内分泌攪乱関連などの分子毒性学研究、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所事業の一環として有機的に推進。

相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋 聡、中津則之*、児玉幸夫、高木篤也 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
*現(独)医薬基盤研究所 基盤的研究部

はじめに

毒性学は生体 (Biosphere) と外来性物質 (Chemosphere) 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 (生活化学物質、環境化学物質、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、人体実験が困難な場合、身代わりとしての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。これは両者が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、酵素、膜、DNA など比較の普遍的かつ基本的な標的が主な検討対象となってきた。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の標的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も直接的な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。古い話ではあるもののいまだに分子機構の解明が完結していないサリドマイドの催奇形性問題、あるいは、最近の健康人ボランティアに対するバイオ医薬品 (治験薬) の微量投与がその全員を集中治療室送りにした事件は、種差問題の解決を含む分子毒性評価法の確立の重要性と、その現状を示していると考えられる。

I. トキシコゲノミクス

分子毒性メカニズム解析のためのツールの1つに mRNA を対象とするトキシコゲノミクスがあり、見落としのない網羅性が要求される毒性学では全遺伝子のカスケード解明がそ

の最終目標となる。これにより従来に比べて早く安く正確な毒性評価を目指すことができる。そして、種差・個体差、一生涯の反応性を修飾する胎生期・周産期影響、あるいは複合作用などを包括的に扱う際には、生命科学の各分野との緊密な連携が必須となる。また、従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、例え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と考えられる。電子顕微鏡が広く用いられるようになるには、教科書や図譜が必要であったように、トキシコゲノミクスの実用化にはある程度の量のデータの蓄積と解析のための基礎研究 (関連分野との連携を含む) が必要である。そこで、筆者らは、情報の互換性を確保するために細胞1個当たりの mRNA 発現コピー数を得る Percellome 手法を開発した。これを基盤としたプロジェクトを展開中であり、今までに 90 以上の化合物についてのデータを蓄積し、その解析ツールを開発している。

II. Percellome 法

原理は単純で、サンプルの細胞数を測る代わりに DNA 濃度を精密に計測し、それをもとに外部標準 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。スパイク RNA の測定値を基準に、サンプルの各 RNA の測定値を細胞1個当たりのコピー数に換算する^{1)~3)}。これにより、実験操作、試薬やマイクロアレイのロット差などによる系統誤差を相殺するという本来の目的が果されるほか、測定過程における各種の異常が高感度に検出されることから、品質管理精

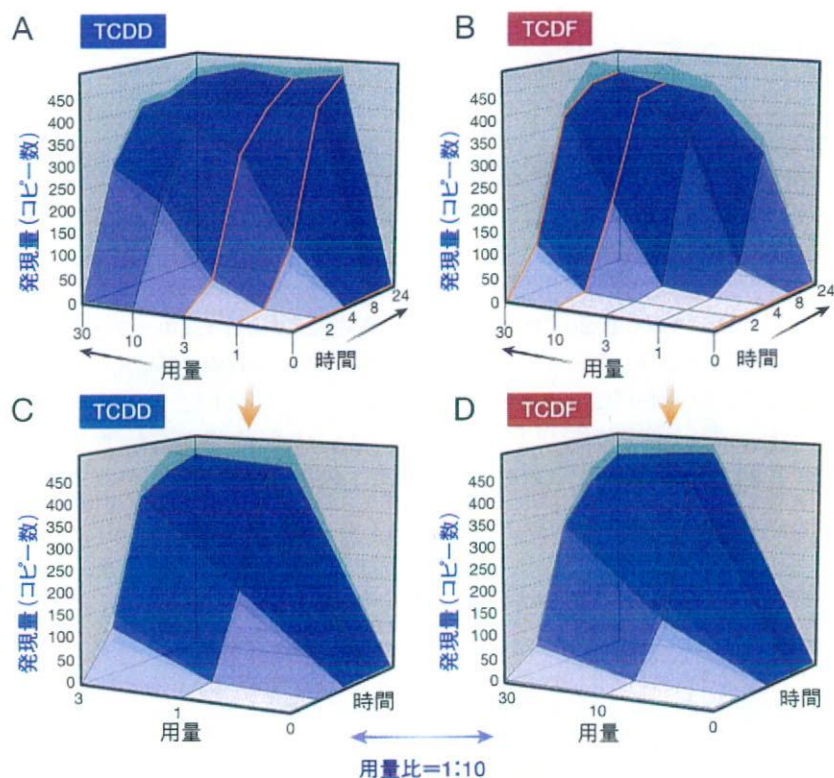


図1. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：
TEF 依存遺伝子の抽出法 (1)

TCDDおよびTCDFの単回経口投与をC57BL/6雄マウスに行った。用量は両実験とも0(溶媒対照), 1, 3, 10, および30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、投与後2, 4, 8, および24時間後に肝を採取しマイクロアレイ解析を行った(両動物実験は1カ月を隔てて、国立医薬品食品衛生研究所、環境保全型動物実験施設内にて厳重管理の下に実施された)。代表例としてcytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1; Affymetrix probe ID 1422217_a_at)を示す。

A: TCDDによるCyp1a1の発現変動のSurface(反応曲面)表示。

B: TCDFによるCyp1a1の発現変動のSurface表示。

丁度、用量について10倍ずれた反応を示している。

C: TCDDの3, 1, 0から作製したSurfaceとD: TCDFの30, 10, 0から作製したSurfaceが形状および発現値ともほぼ完全に一致している。このような遺伝子をTEF依存性とした。

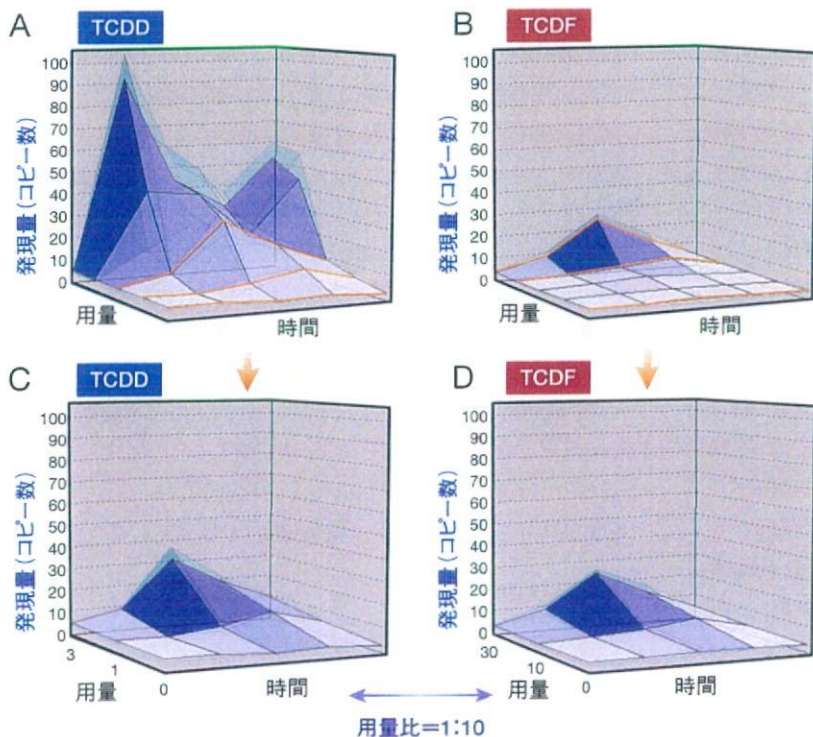


図2. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：
TEF 依存遺伝子の抽出法 (2)

TEFに従うもう1つの例としてTCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase (Tiparp; 1452160_at)を示す。A, B, C, Dは図1と同様の表示。AとBを比較すると一見違った反応をしているようだが、CとDを比較するとTEF依存性であることがわかる。

度の向上が図られている。例えば、高密度マイクロアレイで問題となるプローブの飽和によるダイナミックレンジの狭小化の検証・回避に役立っている。新世代Affymetrix GeneChipにおいて高発現遺伝子プローブが容易に飽和し高用量域で定量性を失う現象は、一般的なデータ標準化手法

では検出困難であり、Percellome法を用いて初めて直接的に感知することができる。現在、筆者らはサンプルRNA量をメーカー推奨プロトコールの半量にすることなどにより効率的にこれを回避している。

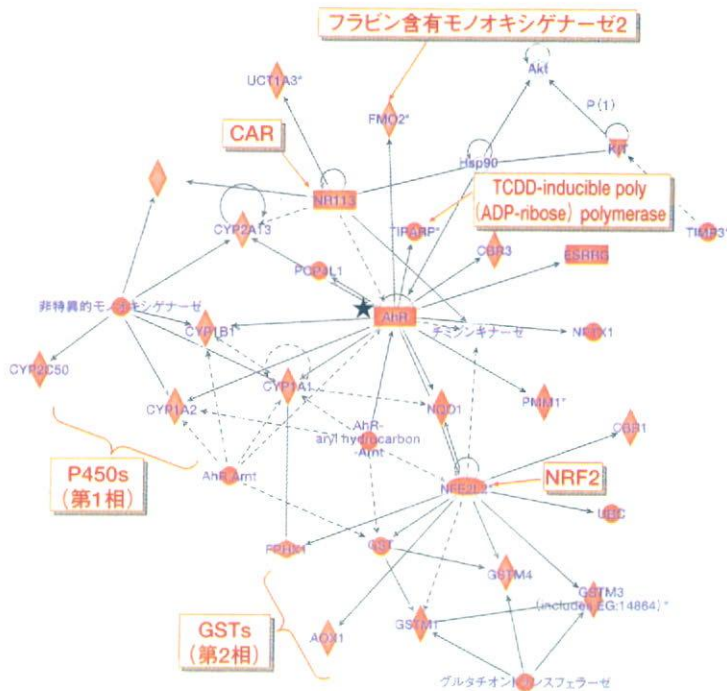


図3. TEF 依存遺伝子の描く Pathway

図1, 2の方法で抽出されたTEF依存遺伝子約140をIngenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.)に投入し, 得られるPathwayの代表的なものを示す。AhR (★)を中心にNRF2を含む転写因子群を介して, 第1相および第2相の代謝酵素を含むAhR依存性の遺伝子を認める。赤色;計算に投入したTEF依存遺伝子のうち, このPathwayに含まれるもの。灰色;Pathwayのメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの。

III. Percellome Project

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)の単回暴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^{注1}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*ハイブリダイゼーションによる局在確認系を立ち上げた。現在, これらに加えて反復暴露による慢性毒性, および多臓器間の関連性を検討する研究を展開中である。データの一部はホームページ(<http://toxicomics.nih.gov/db/>)にて公開中であり, 今後, 内容を拡充する予定である。

ここで, 本プロジェクトにより明らかとなった一般的な注意点について簡単に触れる。それは, 再現性の高いデータを得るためには実験管理を厳重にする必要があるという点である。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, 最大で数十倍以上の発現差が見られる。この変動が実験の邪魔をしないようにするためには, 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し, 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分以内に限定する必要がある。概日リズムは肺, 腎, 脳, 心, 胸腺などにも明瞭に存在するので, 同様の注意が必要である。培養細胞実験においても細胞密度, 培地交換, シャーレのインキュベーター内の位置, 倒立顕微鏡での観察の影響(操作による培地攪拌による刺激), 多孔プレートでは辺縁と中央の違いなどが, 遺伝子発現データに大きく影響することを観察している。

IV. Percellome を活かしたデータ解析

Percellome法の絶対量データの特徴は, 原点(zero)から表示可能なコピー数という“名数”である点にある。基底発現量がわかる, データの四則演算が可能であり, 例えば処置群から溶媒対照群の値を引くことで概日リズムや溶媒による影響を容易に取り除くことができる, などの利点が多い。これらは発現比を用いた解析では問題となる操作であるが, Percellome法であれば自然な処理が可能である。さらに, この性質を利用し, 用量と時間が発現変動を規定するとの前提に基づき, 用量・時間・発現値を三次元直交座標に置いた1つの三次元グラフに反応曲面(Surfaceと呼称)として可視化して, 直感的なデータの把握を実現している。1つの化合物についてGeneChipのプロープセット数に対応する約45,000枚のSurfaceが描出される。この中から生物学的に有意であると考えられるパターンを含む特徴的な発現パターンを効率的に自動抽出するRSort(Surfaceの凹凸の特徴を解析し, その明瞭さの順にソートする)アルゴリズムを考案, 活用している。また, 別途に独自開発した教師無しクラスタリングアルゴリズム(MADIC⁴)を活用して, 発現パターンが類似しているものを網羅的にクラスター化している。2枚のSurfaceの形の類似性を数値化するアルゴリズム(tmf)も開発済みであり, 注目すべき遺伝子の発現パターンを鋳型として同様の発現誘導パターンを呈する遺伝子を自動抽出できるようになっている⁵。

V. TCDDとTCDFのPercellome比較によるTEF依存遺伝子および非依存遺伝子の解析アプローチ

ここでは解析例として, TCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)とTCDF(2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran)の遺伝子発現応答データを比較しTEF(toxicity equivalence

注1 住宅の高気密化や化学物質を放散する建材・内装材の使用などにより, 新築・改築後の住宅やビルにおいて, 化学物質による室内空気汚染などにより, 居住者に生じる様々な健康障害の総称。

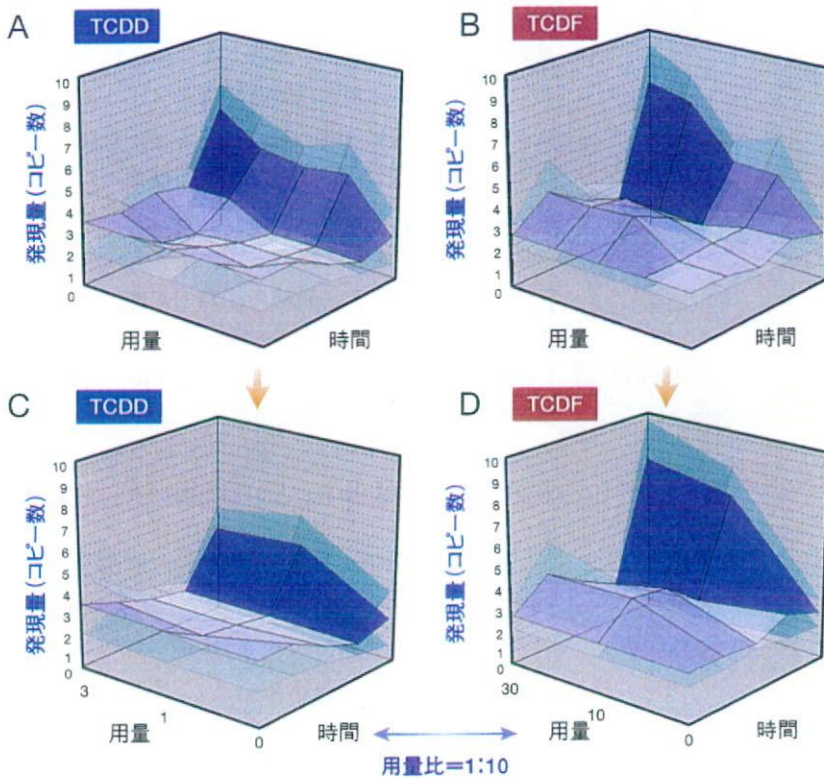


図4. TEF 非依存遺伝子

TEF に従わない遺伝子の一例として、Hectd2 (HECT domain containing 2, 1433944_at) の Surface を示す。A, B, C, D は図1と同様の表示。2時間目の応答の違いのほか、24時間目の応答が TCDF > TCDD である。

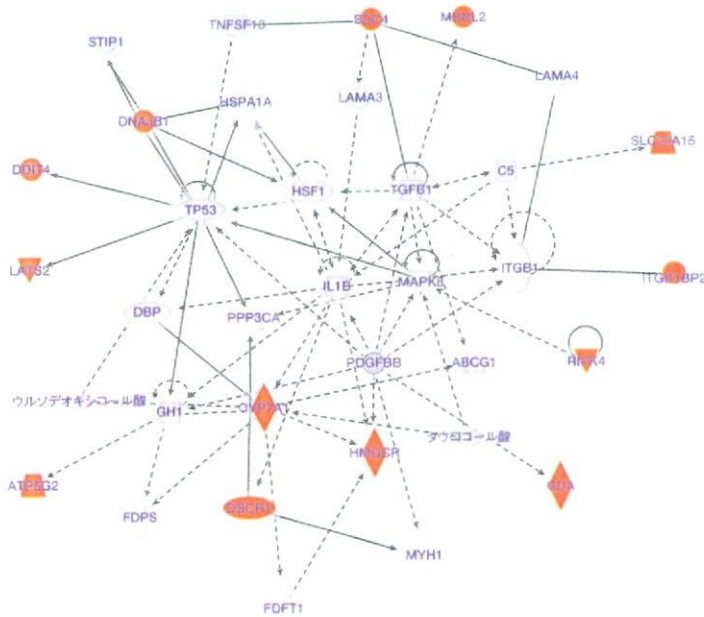


図5：TEF 非依存遺伝子の描く Pathway

図1の方法を利用し抽出されたTEF非依存遺伝子約20をIngenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.)に投入し、得られるPathwayの代表的なものを示す。AhRは含まれず、p53, TGF-β, MAPK8などが見られる。赤色；計算に投入したTEF非依存遺伝子のうち、このPathwayに含まれるもの。灰色；Pathwayのメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの。

factor)⁶⁾に従う遺伝子と従わない遺伝子を検討した事例を紹介する。

ダイオキシン類、すなわちダイオキシン、ジベンゾフラン、およびコプラナー-PCBは、そのいずれにもベンゼン環に結合する塩素の数の違う異性体や同族体が多数あり、個々はそれぞれダイオキシンとしての生物活性の強さ、例えば*in vitro*実験系でCyp1a1の発現を誘導する能力に違いがある。他方、環境中では、これらダイオキシン類の同族体などを様々な比率で含む混合物として検出されることから、その生物影響の総体強度を推定するために、個々の同族体の活性を合計して評価することが行われている。その際の強度の単位にTEFが用いられる。TEFは最も活性が強い2,3,7,8-TCDDを1とし、2,3,7,8-TCDFは0.1, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuranは0.05, などとして表す。なお、TEFの値は、ほぼ、AhR結合能に比例していることが経験的に知られている。

ダイオキシン毒性は、受容体原性毒性の典型であり、その説明には“AhRノックアウトマウスがダイオキシン投与に対し事実上無反応”であることが用いられる。すなわち、このノックアウトマウスでは、体中に広がったTCDDはそこにある酵素や膜などの生体分子に対して何の影響も与えないということを示している。野生型のマウスがTCDDで死ぬのはAhRが存在するからであり、言い換えれば、AhRからの異常なシグナルによるという

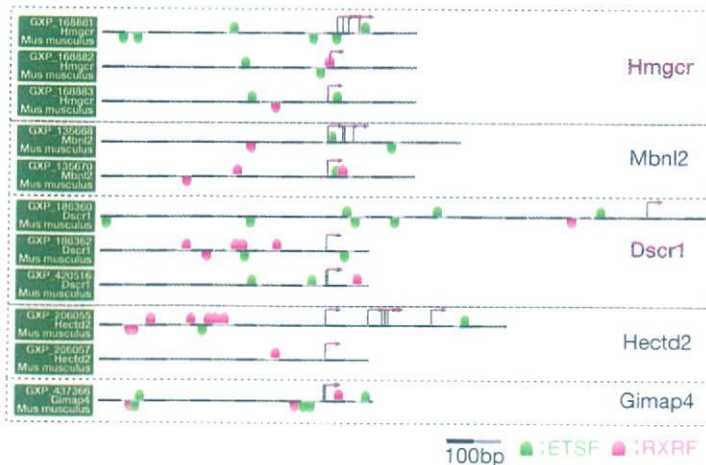


図6：TEF非依存遺伝子の *in silico* プロモーター解析

TEF非依存遺伝子約20のうち、TCDF優位の5遺伝子を絞り込み、Genomatix Software GmbHの提供する *in silico* プロモーター解析の結果を示す。5つの遺伝子に共通して、ETSファミリーとRXRファミリーの転写因子の結合配列を認めた。Hmgcr；3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, Mbnl2；muscleblind-like 2, Dscr1；Down syndrome critical region homolog 1 (human), Hectd2；HECT domain containing 2, Gimap4；GTPase, IMAP family member 4.

ことになる。この際の毒性も概してTEFに従うことが知られており、TCDDの1に対してTCDFの10が同等の影響を及ぼす。しかし、リガンド分子個有の作用には受容体毒性学上、興味があるところであり、培養細胞に対する影響を検討した際にこの値が逆転する場合があることを見いだしたことから、TCDF特有の作用がある可能性をマウス肝において遺伝子発現レベルで検討することとした。

TCDDとTCDFについて、以下のような同一プロトコールを用いての実験を行った。12週齢雄C57BL/6マウスの1群3匹、20群を用意し、0, 1, 3, 10, および30 μ g/kgの用量で単回強制経口投与後、2, 4, 8, および24時間後に肝を採取し、Affymetrix GeneChip, MOE430 2.0によりPercllome遺伝子発現データを得た。2時間目の反応を見やすくするために、仮想0時間に2時間溶媒対照群の値を流用し、用量軸5点、時間軸5点から成る5×5の三次元Surfaceを作製した。さらに、TCDD = 1, TCDF = 0.1というTEF値に従った反応を示す遺伝子を抽出するために、TCDDの0, 1, 3 μ g/kg群から成る3×5のSurfaceとTCDFの0, 10, 30 μ g/kg群から成る3×5のSurfaceを用意した。そして、この3×5のSurface同士について、上述のtmfアルゴリズムにより類似度を計算し、類似性の十分に高い遺伝子のリストを得た。次にコピー数が同等であるか、反応が投与と依存的変動として生物学的蓋然性があるかを3×5および5×5のSurfaceにより確認し、TEFに忠実に従うTEF依存遺伝子(図1, 2)を約140, 従わないTEF非依存遺伝子を約20得た。TEFに従うと判定

された遺伝子群を、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Inc.)により既知情報と照合するとAhRの下流の第1相代謝酵素やNrf2下流の第2相代謝酵素を中心に、AhRを中心としたPathwayの構成要員であることが示され(図3)、上述したTEFについて現在想定されている分子背景に合致するものであった。従わない遺伝子についても、5×5のSurface同士を比較し、TCDDとTCDFで反応のパターンが異なるもの、および類似していてもTEF値の10倍差を説明できないもの、すなわち、TCDFが同等あるいはより強い反応を示すものを抽出した(図4)。TEF非依存遺伝子群は既知情報との照合で予想どおりAhRを含まないPathwayを描き出した(図5)。 *In silico* プロモーター解析ソフトウェア (Genomatix Software GmbH)に甘い条件で遺伝子リストを投入した結果、すべてに共通するものとして多数のエレメント、例えば、E2F, EKL, ETS, HES, NR2, RXR, SP1, TBPなどのファミリーが見いだされたが、AhR結合配列は抽出されなかった。さらに、非依存遺伝子のうちTCDF優位の5遺伝子を絞り込みパスウェイ解析を行った結果、TNFを中心とし、ESR1やABCA1を含むネットワークが描かれ、 *in silico* プロモーター解析では5遺伝子に共通するものとしてETSファミリーとRXRファミリーの結合部位が選択された(図6)。ETSはERK/MAPKシグナル系の下流に位置し、その1つであるETS2の強制発現系の実験などからp53系を介する胸腺系のアポトーシス、あるいはダウン症候群との関連性などが指摘される。これらの既知情報ベースの解析結果は限られた共通の公開情報源を基にしているため、概して同じリストに収束する。しかし、得られたリストのうち、この検索に投入しなかった遺伝子(図5中の灰色)について、再度Surfaceを吟味すると選定基準ぎりぎりまで排除されていた遺伝子が見つかる。ここでは、図5中のTgfb1 (transforming growth factor beta 1), Hspala (heat shock protein 1A), およびFdft1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1)が該当する。このような既知情報と実際のデータとの往復が、データ解釈の向上と今後の検証実験の計画立案に役立つものと見込まれる。

おわりに

このTCDDとTCDFの実験結果の比較によるダイオキシン類化合物の生体影響に関わる分子メカニズム解析はいまだ途上にあり、追加としてAhRノックアウトマウスを用いた投与実験やChIP(クロマチン免疫沈降)解析などによる確認作業が考えられる。ここでは、Percllome Projectの投与実験の組み合わせと、それらに対するPercllome法の利点を生かした網羅的な解析が、環境化学物質をはじめとする外来性化学

物質 (Xenobiotics) の生体影響に関する分子生物学的メカニズム解明研究のユニークな糸口を提供する手段としても利用可能であることを示すことができたと考えられる。誌面の都合上、他に譲るが、ヒトに対する催奇形性があり使用禁止となっていたが、癌や難治性炎症性疾患の治療薬として再登場したサリドマイドについて、成獣雄マウスの肺に及ぼす影響と経胎盤的にマウス胎仔に及ぼす影響とを Percellome 解析により対比すると、間葉系成分に対する共通の抑制シグナルの存在が示唆される事例を見いだした。異なったプロトコルで異なった組織に対して行われた実験の間でも、このように共通のメカニズムを抽出しうる可能性を見ており、今後の複合的展開に大きな期待を抱いているところである。今後、本法の利点を生かした解析をさらに進めるとともに、データ・

解析ツールの公開Webサイトの充実、および、実験のみならずデータ解析・データマイニングについての共同研究を含めた展開を加速させていきたい。

謝辞 本Percellome Projectの遂行にあたっては、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。三次元Surface可視化およびそれを用いた解析ツール群のアルゴリズム開発は共筆者の相崎健一主任研究官による。データベース関連、MADIC実装などのIT開発はNTTコムウェア、日本NCR (日本テラデータ)との共同研究に負うところ大である。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) 菅野 純ら: 細胞工学 (2007) 26: 71-77
- 4) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194
- 5) 相崎健一ら: 細胞 (ニュー・サイエンス社), 印刷中
- 6) Van den Berg M, et al: Toxicol Sci (2006) 93: 223-241

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場合が多い。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、異なったプラットフォーム間、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。トキシコゲノミクス（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、これ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コゲノミクス、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コ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

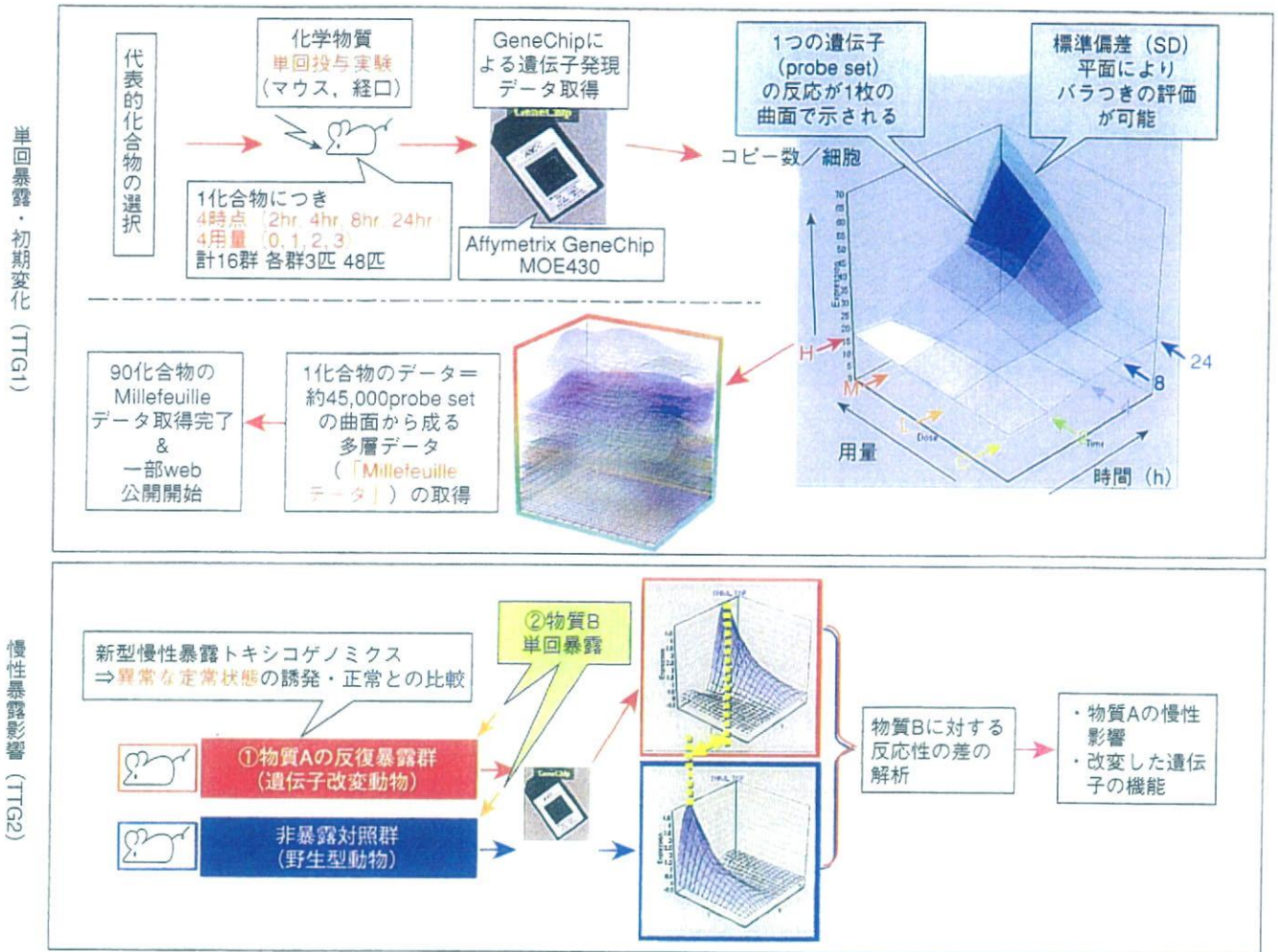


図2. Percellome 法と3次元表示による多層 (Millefeuille) データシステムを用いたプロジェクトの根幹部分の概要
単回投与による遺伝子発現初期変化データを90化合物について取得 (上段). 現在, 反復投与の影響を検討中 (下段). H; 高用量 (high), M; 中用量 (medium), L; 低用量 (low), C; コントロール (control).

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 コムウェアおよび (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, サンプル破砕液に, 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の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,

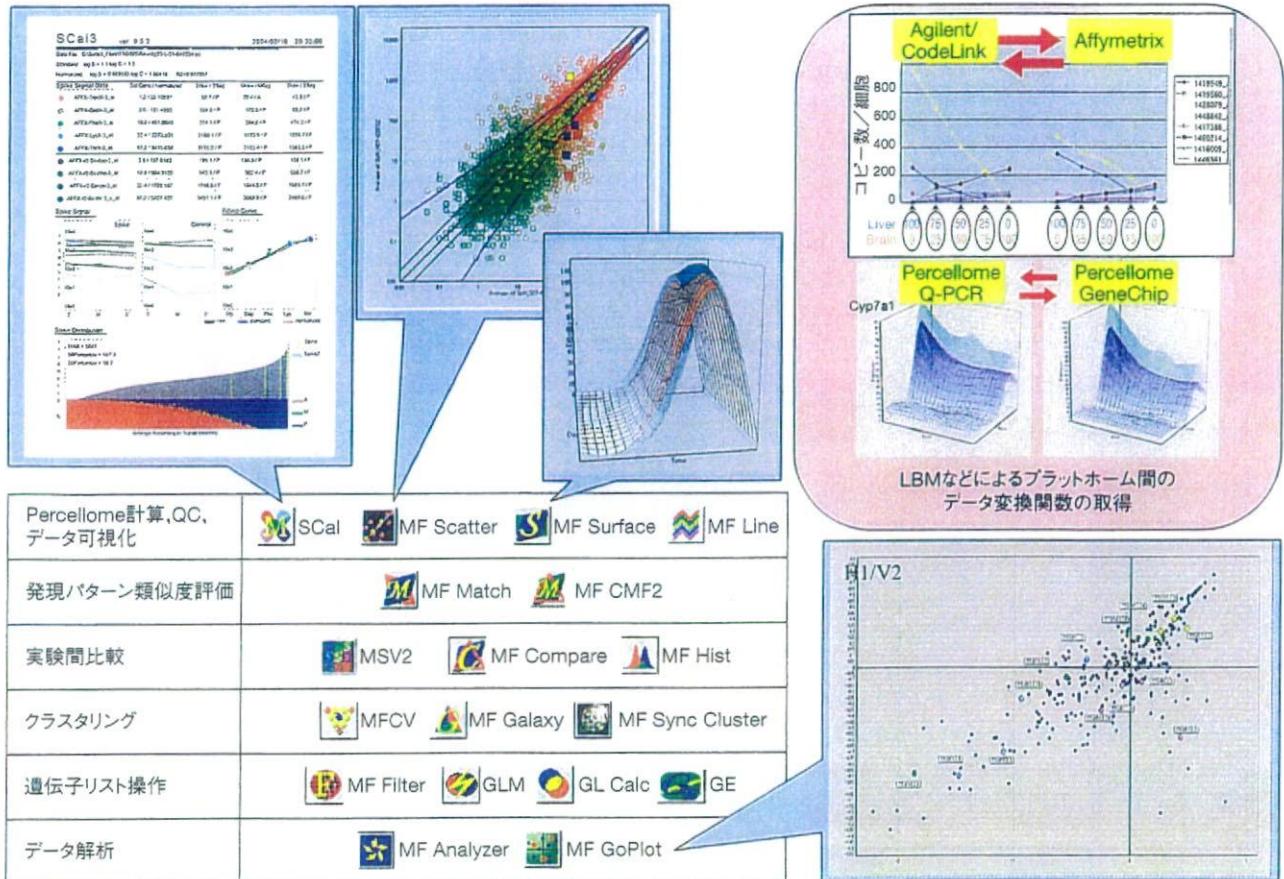


図3. 3次元多層 (Millefeuille) データの解析などに用いる独自開発プログラム群

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

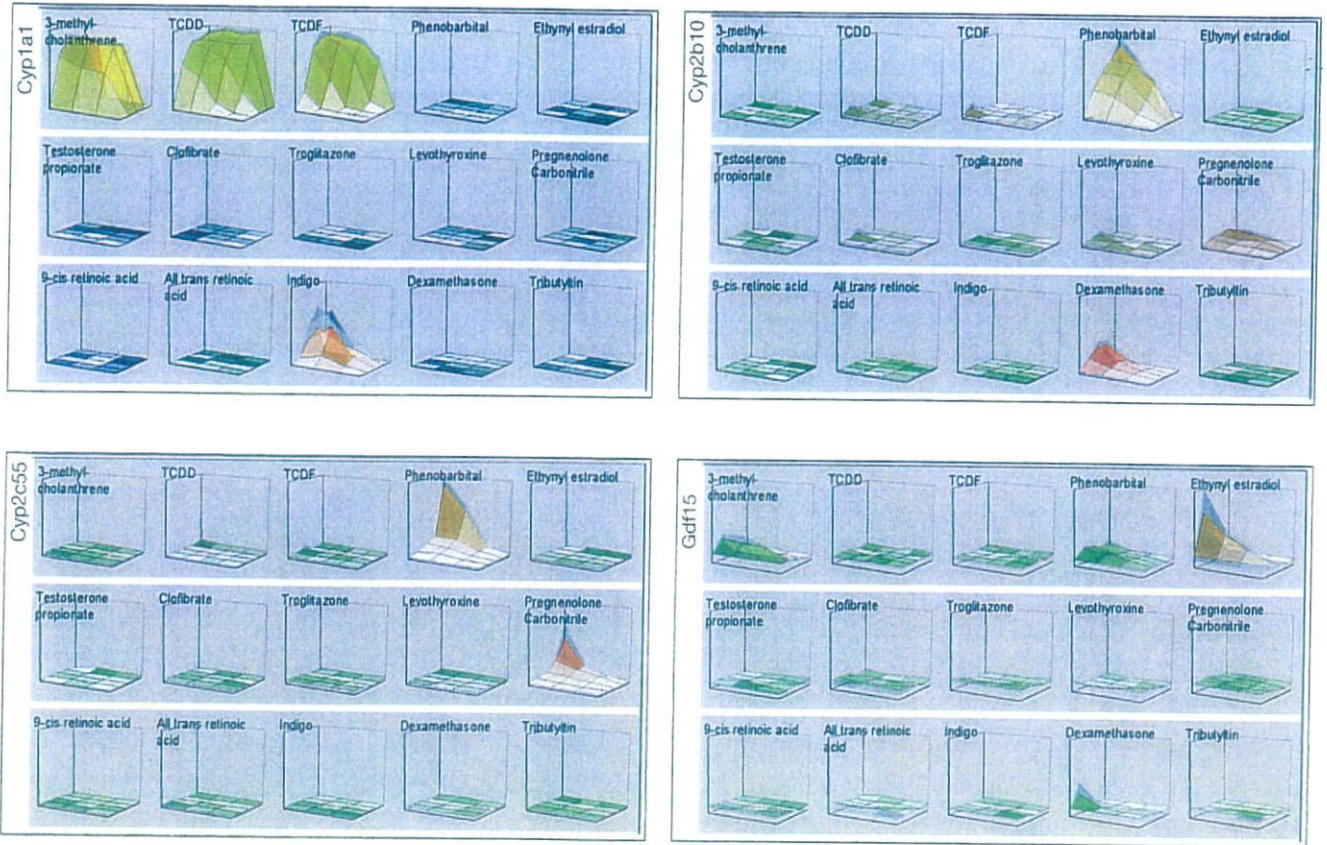


図4. 化合物間の発現比較

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。

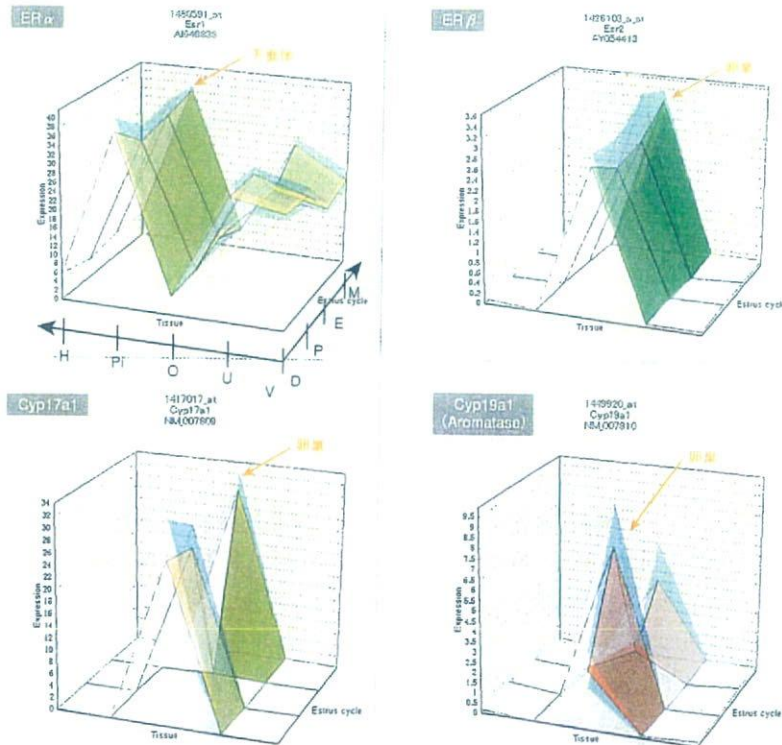


図5. 臓器間の発現比較

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) および膣 (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。

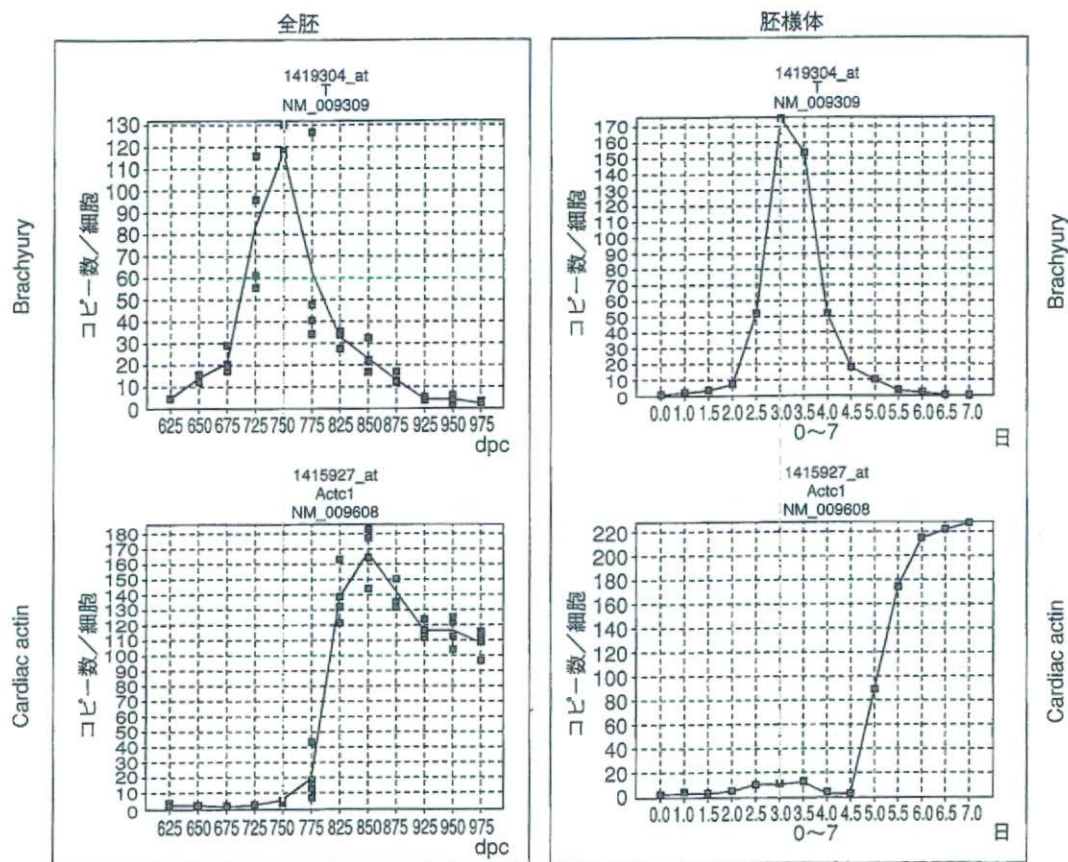


図6. マウス胎児 (全胚) と胚様体の発現比較

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日目までの遺伝子発現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、Perclomelle手法を適用して、①核内受容体作用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期初期にあたる胎生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性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

A POSSIBLE MECHANISM FOR THE DECREASE IN SERUM THYROXINE LEVEL BY POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN WISTAR AND GUNN RATS

Yoshihisa Kato¹, Shin-ichi Ikushiro², Rie Takiguchi¹, Sekihiro Tamaki¹, Koichi Haraguchi³, Toshiyuki Sakaki², Shizuo Yamada¹, Jun Kanno⁴ and Masakuni Degawa¹

¹ School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

² Biotechnology Research Center, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University, 5180 Kurokawa, Imizu, Toyama, 939-0398, Japan

³ Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, 22-1, Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815-8511, Japan

⁴ Division of Cellular & Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Introduction

Most polychlorinated biphenyl (PCB) congeners are known to decrease the levels of serum thyroid hormone and to increase the activities of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats^{1,2}. As possible mechanisms for the PCB-mediated decrease in level of serum thyroid hormone, enhancement of thyroid hormone metabolism by PCBs and displacement of the hormone from serum transport proteins (transthyretin (TTR)) are considered³⁻⁵. Especially, the decrease in the level of serum thyroxine (T₄) by 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, Aroclor 1254, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats is thought to occur mainly through the induction of the UDP-glucuronosyltransferase (T₄-UDP-GT) responsible for glucuronidation of T₄^{2,4}. However, the magnitude of decrease in level of serum total T₄ is not necessarily correlated with that of increase in T₄-UDP-GT activity^{1,6}. Recently, we suggested that the decrease in serum total T₄ level by a single administration of either Kanechlor-500 (KC500) or 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl in UGT1A-deficient Wistar rats (Gunn rats) was not dependent on the increase in hepatic T₄-UDP-GT activity, and further suggested that even in Wistar rats, the PCB-mediated decrease in serum T₄ level might occur not only through the increase in hepatic T₄-UDP-GT⁷. In the environment, humans and animals are exposed to PCB of very low level extent over a long period of time.

In the present study, therefore, to clarify possible mechanisms for the PCB-mediated decrease in level of serum thyroid hormone, we examined a relationship between the decrease in serum total T₄ level and the increase in the hepatic T₄-UDP-GT (UGT1A1 and UGT1A6) by the consecutive treatment of Wistar and Gunn rats with PCB and demonstrated that the PCB-mediated decrease in serum total T₄ level in rats was not necessarily dependent on the increase in hepatic T₄-glucuronidation, but the decrease occurs through the increased transport of T₄ to the liver.

Materials and Methods

Animal treatments. Male Wistar rats (160-200 g) and Gunn rats, (180-210 g) were obtained from Japan SLC., Inc. (Shizuoka, Japan). Male Wistar and Gunn rats were housed in three or four per cage with free access to commercial chow and tap water, and were maintained on a 12-h dark/light cycle (8:00 a.m.-8:00 p.m. light) in an air-controlled room (temperature: 24.5 ± 1°C, humidity: 55 ± 5%), and were handled with humane care under the guidelines of the University of Shizuoka (Shizuoka, Japan). The rats were treated with ip injection of KC500 (10 mg/kg) dissolved in Panacete 810 (5 ml/kg) at 24 h-intervals for 10 days. Control animals were treated with vehicle alone (5 ml/kg).

A) *In vivo* study. Rats were killed by decapitation on day 4 after the final dosing, and the liver was removed, and hepatic microsomes were prepared according to the method of Kato *et al.*⁸ and stored at -85°C until used. Blood was collected from each animal between 10:30 and 11:30 a.m. After clotting at room

temperature, serum was separated by centrifugation and stored at -50°C until used.

Analysis of serum hormones. The levels of total T_4 , free T_4 , and thyroid-stimulating hormone (TSH) were measured by radioimmunoassay using the T4-RIABEAD (DAINABOT Co., Ltd, Tokyo, Japan), free T_4 (Diagnostic Products Corporation; Los Angeles, CA), and Biotrak rTSH [^{125}I] assay systems (Amersham Life Science Ltd.; Little Chalfont, UK), respectively.

Hepatic microsomal UDP-GT assay. The amount of protein was determined by the method of Lowry *et al.*⁹ with bovine serum albumin as a standard. The activity of microsomal UDP-GT toward T_4 was determined by the method of Barter and Klaassen³. The UDP-GT activity was measured after activation of the UDP-GTs by 0.05% Brij 58.

Western blot analysis. Polyclonal anti-peptide antibodies against the common region of UGT1A isoforms and specific antibodies against UGT1A1, UGT1A6, and UGT2B1 were used¹⁰. Western analyses for microsomal UGT isoforms were performed by the method of Luquita *et al.*¹¹

B) Ex vivo study. At 4 day after last treatment with KC500, animals were anesthetized with 50 mg/ml sodium pentobarbital combined 1:1 with 1 mg/ml potassium iodide at 2 mg/ml. The femoral artery was cannulated and primed with heparinized saline. Fifteen minutes later, animals were given [^{125}I] T_4 i.v. at 15 $\mu\text{Ci/ml}$ in 10 mM NaOH saline including 1 % normal each animal serum.

Clearance of [^{125}I] T_4 from serum. Five minutes following i.v. administration of [^{125}I] T_4 and five more times at the indicated time, a portion of blood was sampled from the artery, and serum was collected and stored at -50°C for assay. Two aliquots were taken from serum samples for γ -counting.

Analysis of [^{125}I] T_4 binding to serum proteins. The levels of serum [^{125}I] T_4 -albumin, [^{125}I] T_4 -thyroxine binding protein, and [^{125}I] T_4 -TTR complexes were determined by the method of Kato *et al.*¹²

Tissue distribution of [^{125}I] T_4 . At 60 min after the administration of [^{125}I] T_4 , blood was sampled from abdominal aorta, and tissues were removed and weighted. Radioactivities in serum and tissues were determined by γ -counting, and concentration ratios of the tissue to serum were determined.

Results and Discussion

The serum total T_4 and free T_4 levels were markedly decreased not only in the Wistar rats but also in the Gunn rats 4 days after final treatment with KC500 (10 mg/kg, i.p., once daily for 10 days), and there was no significant difference in magnitude of the decrease between Wistar and Gunn rats (Fig. 1). At the same time, the level and activity of T_4 -UDP-GT (UGT1A1 and UGT1A6) were significantly increased by treatment with KC500 in Wistar rats but not in Gunn rats (Fig. 2). In contrast, the level of UGT2B1 was increased by KC500 in both Wistar and Gunn rats. Hepatic microsomal enzyme activities (benzyloxyresorufin *O*-dealkylase activity, 48- and 35-fold; pentoxyresorufin *O*-dealkylase activity (CYP2B1/2), 17- and 10-fold; ethoxyresorufin *O*-dealkylase activity (CYP1A1/2), 64- and 10-fold in Wistar and Gunn rats, respectively) were significantly increased by KC500 treatment. In addition, no significant change in the level of serum TSH by the KC500 treatment was observed in either Wistar or Gunn rats.

Furthermore, significant increases in the disappearance of [^{125}I] T_4 from the serum and in the distribution volume of [^{125}I] T_4 by KC500 treatment were observed in both Wistar and Gunn rats. A concentration ratio of the liver to serum was approximately one in either Wistar or Gunn rats, and KC500-treatment increased the ratio by 4 times. The concentration of [^{125}I] T_4 appeared to be the highest in the liver in both Wistar and Gunn rats. The hepatic levels of [^{125}I] T_4 in both rats were further increased by KC500 treatment. More than 40% of [^{125}I] T_4 dosed was transported to the liver of both rats (Fig. 3). In contrast, a significant increase in liver weight was observed in KC500-treated Wistar rats but not in the Gunn rats. In addition, significant decrease in the binding of [^{125}I] T_4 to serum TTR and significant increase in the binding to serum albumin by KC500 treatment were observed in either Wistar or Gunn rats.

In conclusion, the present findings demonstrate that the PCB-mediated decrease in serum total T_4 level in Gunn rats occurs without an increase in hepatic T_4 -UDP-GT activity; they further suggest that in both strain rats, the PCB-mediated decrease occurs through the increased transportation of T_4 to the liver. Furthermore, the decrease in the binding of T_4 to serum TTR and hepatic hyperplasia might be attributed to the increase in the level of T_4 in the liver. In Wistar rats, however, the PCB-mediated induction of T_4 -UDP-GT might, at least in part, contribute to the decrease. Further studies are necessary for understanding the susceptibility toward a PCB-mediated decrease in serum T_4 level in animals including humans.

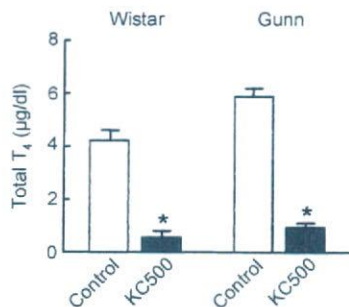


Fig. 1. Effect of KC500 on the level of serum total thyroxine in Wistar and Gunn rats

Animals were killed 4 days after the final administration of KC500 (10 mg/kg, i.p., once daily for 10 days). Each column represents the mean ± S.E. (vertical bars) for five to six animals. **P*<0.01, significantly different from each control.

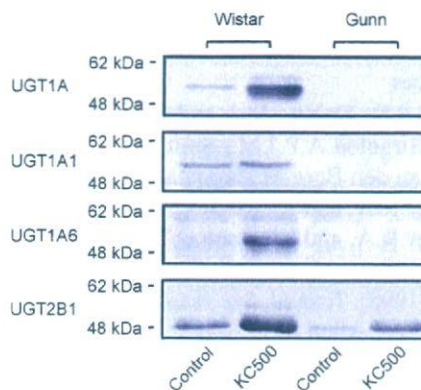


Fig. 2. Representative Western blot patterns for hepatic microsomal UGT isoforms in KC500-treated Wistar and Gunn rats

Animals were killed 4 days after the final administration of KC500 (10 mg/kg, i.p., once daily for 10 days).

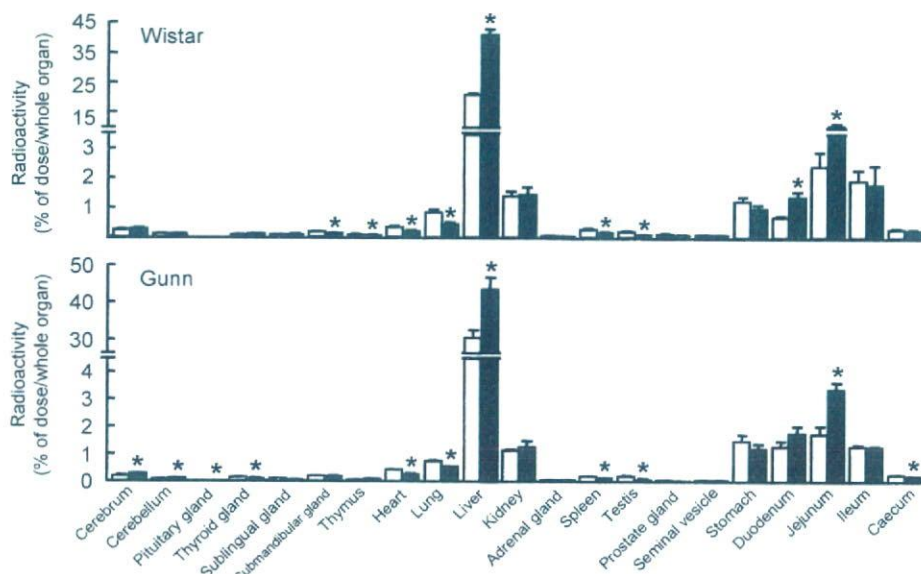


Fig. 3. Tissue distribution of total radioactivity after the administration of [¹²⁵I]T₄ to the KC500-treated Wistar and Gunn rats

KC500 (10 mg/kg) was given i.p. to animals at 24 hr-intervals for 10 days. The radioactivity of each tissue was measured at 60 min after the i.v. administration of [¹²⁵I]T₄. Each column represents the mean ± S.E. (vertical bars) for three to six animals. **P*<0.05, significantly different from each control. □, control; ■, KC500.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (no. 18510061, Y.K.) from Japan Society for the Promotion of Science, and by a Health and Labour Sciences Research Grant for Research on Risk of Chemical Substances (H16-Kagaku-003, Y.K.) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

1. Craft E.S., DeVito M.J. and Crofton K.M. (2002). *Toxicol. Sci.* **68**, 372-380.
2. van Birgelen A.P.J.M., Smit E.A., Kampen I.M., Groeneveld C.N., Fase K.M., van der Kolk J., Poiger H., van den Berg M., Koeman J.H. and Brouwer, A. (1995). *Eur. J. Pharmacol.* **293**, 77-85.
3. Barter R.A. and Klaassen C.D. (1992). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 261-267.
4. Barter R.A. and Klaassen C.D. (1994). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128**, 9-17.
5. Brouwer A., Morse D.C., Lans M.C., Schuur A.G., Murk A.J., Klasson-Wehler E., Bergman Å. and Visser T.J. (1998). *Toxicol. Ind. Health* **14**, 59-84.
6. Hood A., Allen M.L., Liu Y., Liu J. and Klaassen, C.D. (2003). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **188**, 6-13.
7. Kato Y., Ikushiro S., Haraguchi K., Yamazaki T., Ito Y., Suzuki H., Kimura R., Yamada S., Inoue T. and Degawa M. (2004) *Toxicol. Sci.* **81**, 309-315.
8. Kato Y., Haraguchi K., Kawashima M., Yamada S., Masuda Y. and Kimura R. (1995). *Chem.-Biol. Interact.* **95**, 257-268.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
10. Ikushiro S., Emi Y. and Iyanagi T. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 267-272.
11. Luquita M.G., Catania V.A., Pozzi E.J.S., Veggi L.M., Hoffman T., Pellegrino J.M., Ikushiro S., Emi Y., Iyanagi T., Vore M. and Mottino A.D. (2001). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 49-56.
12. Kato Y., Suzuki H., Ikushiro S., Yamada S. and Degawa M. (2005). *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1608-1612.

Original Paper

PTOVI: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta

Y Nakamura,¹ T Suzuki,¹ K Igarashi,⁴ J Kanno,⁴ T Furukawa,² C Tazawa,¹ F Fujishima,¹ I Miura,¹ T Ando,⁴ N Moriyama,¹ T Moriya,¹ H Saito,⁵ S Yamada³ and H Sasano^{1*}

¹Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

²Department of Molecular Pathology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

³Department of Radiology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

⁴Division of Toxicology, the Biological Safety Research Centre, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

⁵Department of Radiology, Sendai Medical Centre, Sendai, Japan

*Correspondence to:

Dr H Sasano, Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine, 2-1 Seiyō-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8575 Japan.
E-mail: hsasano@patho2.med.tohoku.ac.jp

Abstract

There are gender differences in the development of atherosclerosis, possibly owing to differences in sex steroid hormone action and/or metabolism. One of the atherogenic effects of testosterone is thought to be androgen receptor (AR)-mediated vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation. However, the detailed mechanism of this effect, particularly the identity of the genes associated with VSMC proliferation, remains largely unknown. Therefore, we first employed microarray analysis and, subsequently, quantitative RT-PCR to analyse RNA expression in AR-positive human VSMCs treated with testosterone in order to detect testosterone-induced genes associated with cell proliferation. We further examined whether the genes identified were involved in cell proliferation using small interfering RNA (siRNA) transfection. Expression of the gene products was then evaluated in human aorta with various degrees of atherosclerosis in order to evaluate the clinical relevance of the findings. Both microarray and quantitative RT-PCR analyses demonstrated marked induction of the human prostate overexpressed protein 1 (*PTOVI*) gene by testosterone in the cell lines: this gene was recently identified as a novel androgen-induced gene involved in prostate tumour cell proliferation. Inhibition of *PTOVI* by transfection of its corresponding siRNA suppressed testosterone-induced cell proliferation. In human aorta, *PTOVI* immunoreactivity in the nuclei of neointimal VSMCs was abundantly detected in male aorta with mild atherosclerotic changes compared with female aorta or male aorta with severe atherosclerotic changes. These findings indicate that the *PTOVI* gene is androgen-responsive in VSMCs and that it may play an important role in androgen-related atherogenesis in the human aorta, particularly early atherosclerosis in the male aorta, through regulating proliferation of neointimal VSMCs.

Copyright © 2006 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: vascular smooth muscle cells; androgen receptor; testosterone; cell proliferation; *PTOVI*

Received: 25 October 2005

Revised: 8 February 2006

Accepted: 4 March 2006

Introduction

There is an important, well-documented, gender difference in coronary heart disease risks, with earlier onset of disease and excess mortality in male subjects [1–3]. Athero-protective effects of oestrogens on vascular structure and function have been proposed as one of the most important mechanisms accounting for this gender difference [4]. On the other hand, an association between androgens and atherosclerosis continues to be disputed. Androgens have been considered to reduce the incidence of ischaemic myocardial disease in men, but they have also been reported to exert atherogenic effects on the human cardiovascular system through promoting plaque formation and enhancing monocyte adhesion to endothelial cells [5–8]. It

has been demonstrated that testosterone exerts direct atherogenic effects by promoting cell proliferation through an initial interaction with the androgen receptor (AR) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) *in vitro* [9]. However, unlike oestrogens, the possible effects of testosterone on atherogenesis and/or anti-atherogenesis have not been extensively studied. It is therefore important to study the detailed mechanisms of these direct effects of testosterone on the human cardiovascular system.

In this study, we first screened for testosterone-induced genes involved in the proliferation of VSMCs using microarray analysis in cell lines derived from AR-positive human VSMCs. We then confirmed the results by employing other *in vitro* studies. As testosterone induced marked overexpression of *PTOVI* in

these assays, we subsequently examined the levels of expression of PTOVI protein in VSMCs in samples of the human abdominal aorta obtained at autopsy.

Materials and methods

Vascular smooth muscle cells

Two types of human dedifferentiated VSMCs, ie HUVS-112D (derived from human umbilical cord), and T/G HA-VSMC (derived from human aorta) were commercially obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) [10,11]. We examined whether these cells expressed AR using an RT/real-time PCR with a light Cyclor System using DNA binding dye SYBR Green I, and immunoblotting with AR polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), as reported previously [10,12].

GeneChip microarray assay

The VSMCs above were cultured until a sub-confluent state was achieved. The medium was then replaced with fetal bovine serum (FBS)-free and phenol red-free medium to arrest cell proliferation. After 24 h, the medium was replaced again with phenol red-free and FBS-free medium in the presence of testosterone (10 nM) or vehicle (0.1% ethanol). After incubation for 2 h, the cells were subsequently subjected to total RNA extraction for microarray analysis. Isolated total RNA was labelled as described in the Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) GeneChip Expression Analysis Technical Manual (revision 3), as previously described [10]. The ratios represent the values up- or down-regulated by 10 nM testosterone treatment compared with control. We independently repeated the same experiment twice. Genes for which the average ratios increased more than 1.5-fold in both experiments using 10 nM testosterone treatment were considered up-regulated via AR when compared with control values [13]. When studying the potential functions of these genes, we used the homepage of the HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>, accessed 28 March 2006) for further examination of whether any had been previously reported to be involved in cell proliferation and to be associated with androgen effects. In this study, among the genes that were found to be significantly induced by testosterone treatment by microarray analysis, we regarded a gene that was up-regulated, and was known to be associated with both cell proliferation and androgenic effects, as a target gene.

Quantitative real-time PCR

After achieving sub-confluence and following growth arrest states of the VSMCs as described above,

the medium was replaced again with phenol red-free and FBS-free F12-K medium with testosterone (10 nM), testosterone (10 nM) with flutamide, an AR-blocker (100 nM), or vehicle. After incubation for 2 h, the cells were subsequently subjected to total RNA extraction for RT/real-time PCR analysis, described previously [10]. mRNA levels for the target gene *PTOVI* were determined in each VSMC as a ratio relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), and evaluated as a ratio (%) compared with that of each control cDNA. The analyses with real-time PCR were repeated three times. Table 1 summarizes the primers used [14].

siRNA preparation, transfection, and cell count assay

Small interfering RNAs (siRNAs) corresponding to *PTOVI* (Table 2) were synthesized based on results of a previous report, and were transfected into the VSMCs [15]. These VSMCs were seeded in a 24-well plate at an initial concentration of 50 000 cells/well with F-12K medium containing 2% FBS and were cultured until a sub-confluent status was achieved. The medium was then replaced with phenol red-free and FBS-free medium to arrest cell proliferation. After 24 h, transfection experiments of siRNA for endogenous gene targeting (10 nM or 100 nM) were carried out using RNAiFect™ transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA). After transfection, the cells were incubated in phenol red-free medium containing 2% dextran-coated, charcoal-stripped FBS with testosterone (10 nM) or vehicle (0.1% ethanol) for 24 h. We measured the number of cells in each sample as described above with Cell Counting Kit-8 system (Wako, Tokyo, Japan) after incubation for 48 h. We also examined the number of cells treated with

Table 1. Primer sequences used in RT-PCR analysis

cDNA	Sequence	Size (bp)
AR	Forward 5'-CTCACCAAGCTCCTGGACTC-3'	246
	Reverse 5'-CAGGCAGAAGACATCTGAAG-3'	
GAPDH	Forward 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	307
	Reverse 5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'	
PTOVI	Forward 5'-CACCATCCCTCCATGTTGCTG-3'	250
	Reverse 5'-TCTTCATTGGCCTCATCCCC-3'	

Table 2. Sequences used in siRNA transfection analysis

cDNA	Sequence
PTOVI	Sense r(CAACAAGUUUCUGGCAUGG)dTdT
	Antisense r(CCAUGCCAGAAACUUGUUG)dTdT
Negative control	Sense r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)dTdT
	Antisense r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)dTdT

The target gene in this study (*PTOVI*) was determined by microarray analysis. The sequences of *PTOVI* siRNAs are based on a previous report [15].