

3.2 用量・反応相関性と低用量特異的反応

いわゆる内分泌かく乱化学物質問題は、一般化学物質が動物の体内の核内や細胞質、細胞表面の受容体と相互作用を起こしてシグナルを惹起したり抑制したりする可能性を指摘した。これは基礎科学的に見て、当然あり得て且つ重要な指摘であった。以前から推測されていた⁷⁾、¹⁰⁾ ことであつたが、この研究経過の中で、用量反応相関性の問題と低用量特異性反応の問題がはじめて大きくクローズアップされることとなつた⁸⁾。水俣病のとき、ネコの振戦や麻痺に驚かなかつた当時の世論と科学が、内分泌かく乱問題でヒトに余程遠いワニや魚類の生殖器の変形と低用量反応に敏感に反応した背景には、各種生物の全ゲノムでの塩基配列の解読計画が終了間近に迫り、生物一般、殊にその核内受容体・性ホルモン受容体系を類似の機構上で相互に理解する基盤が、社会に広く浸透してきたことを反映している。米国環境防護庁NIEERL研究所の所長Larry Reiterは、そのヒトにも類似して“起こりそうなこと”を“Biological Plausibility”と呼び、これが米国におけるその後の環境研究の原動力となつた（筆者はこれを“生物学的蓋然性”と直訳して紹介し、その評判はたいへんに悪かつた）。低用量問題は内分泌かく乱化学物質問題に特定されることなく、本来、普遍的な課題であつたはずである⁹⁾。それが内分泌かく乱化学物質問題という実際の課題を通じてはじめて実際に取り上げられることになつたことは特筆しておく必要がある。

欧州連合（EU）が世界保健機構（WHO/IPCS）と経済開発協力機構（OECD）に呼びかけて、3者の共催で内分泌かく乱問題に関する最初の国際会議にあたるWeybridge会議をロンドン郊外で開催したのが1996年なので、歴史は巡り、近く約10年を迎えようとしている。EUや各国の科学アカデミーでは、この10年間の成果をまとめるワークショップを各地で企画している。これに先立って、世界保健機構は3年ほどの年月をかけて、2002年、各国の専門家によるピアレビューを経て内分泌かく乱問題のグローバル・アセスメントをまとめた¹⁰⁾。そこでは、「アダルトは影響を受けにくいようである。しかし、胎生期と新生児期の性成熟過程では不可逆的影響を及ぼす可能性がある」としている。

このグローバル・アセスメントを契機として、低用量問題に対する実験的認識がさらに進んだ¹¹⁾。図5は、米国EPAのWebsiteからとつたもので、すでに論文でも各方面で確認されているところであるが、「今日ではここに見られるように低用量域における用量・反応曲線は、U字型あるいは逆U字型をとるようなことが決して稀ではないこと、事象としてはむしろしばしば観察されること」なのだと言ふ認識で公式に報じられている。また、Earl Grayたちのデータを引用して、「用量反応相関が閾値を示唆する場合とそうでない場合とがある」と明記するに至っている¹²⁾。これは本邦においても同様であり、世界をリードするようなあたらしい発見が我が国からもたくさん輩出するようになり、本邦の科学水準の面目躍如たるところが発揮されつつある¹³⁾。

¹⁰⁾ レイチェル・カーソンは、1907年5月27日、ペンシルヴァニア州のスプリングデールで生まれ、1964年4月14日、ワシントンの郊外シルヴァースプリングで死去。農業、主に、DDT、BHCをはじめとする有機塩素系殺虫剤と、パラチオンに始まる有機りん系殺虫剤を取り上げた。2007年5月は生誕100年となる。

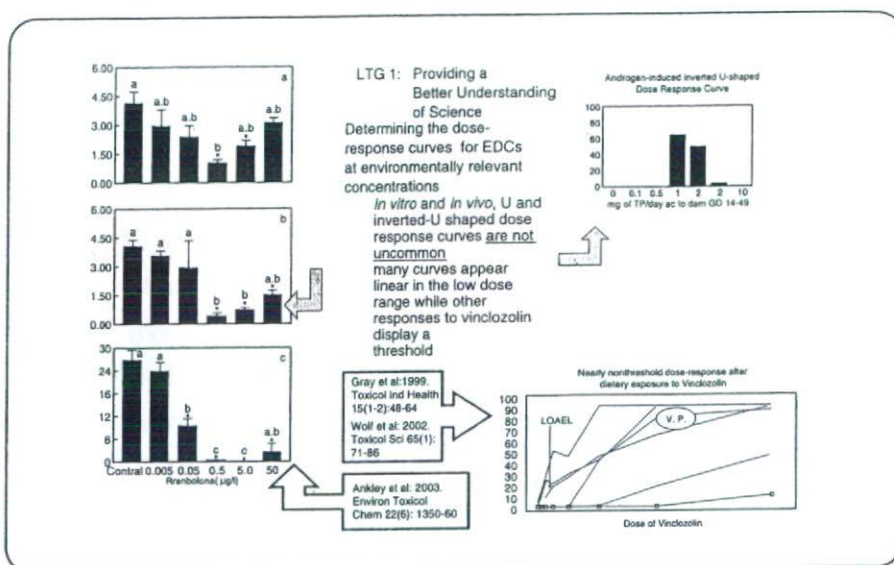


図5 U字型反応を紹介する米国EPAのホームページ
(<http://www.epa.gov/oscpmont/oscpendo/pubs/edspoverview/chronology.htm>)

かくして、従来用いてきた高用量での影響から低用量での影響を外挿して推測することが対象物質にもよるが、必ずしも適切な方法とは限らないことが明らかになってきた。ヒトが事故的（accidental）に摂取する高用量に対する対応は別に考慮することにして、実際に用いる用量近傍の濃度域で、丁寧に傷害性の如何を観察することが肝要という流れになってきた。

3.3 発がん性に関する問題

発がん性試験についても、様々な指摘がなされている。その理由は、通常、無閾値性と信じられてきた直接型遺伝子傷害性発がん、あたかも閾値が存在するようなデータが得られたり、逆に、閾値があるものと考えられてきた非直接型遺伝子傷害性発がん（いわゆるエピジェネティック発がん）で無閾値性を示唆するデータが得られたりといった実験的事象が増えていることにもとづいていると思われる。

1) 直接型遺伝子傷害性発がんの閾値について

行政試験で、日常使用しているものに発がん性が認められるという事例は、幸いにも決して多くはないが、時に見いだされることがある。最近、話題になった「あかね色素」の腎をはじめとする器官の比較的“弱い”発がんへの危惧は、使用中の既存食品添加物に対する使用禁止の例だけに注目を集めた。しかし、この物質のDNAアダクト形成性などの性質が分かってみると、それなりに当然の結果でもあり、疑義となる点はむしろなかったと云ってよい。高熱処理炭水化物からのアクリルアミド生成については生成物が直接型遺伝子傷害性発がん物質であることから、

注意を喚起する以上の方策を取り得なかったが、これとてもやむを得ないことと考えられた。

反対に、発がん性化学物質、それも直接型のDNAアダクト形成性の物質、メチルニトロソウレア (MNU) における閾値 (らしい反応曲線) の検出は、問題を考える上で示唆的であり興味深い。このものは文献的にも、筆者らの実測でも、閾値形成と思われる用量

Incidence of Thymic lymphoma after MNU treatment with 25/50mg/Kg, i.p. at 70 days-old.

MNU dose	25mg/Kg	50mg/Kg
Male	0/20 0%	9/30 30%
Female	1/20 5%	27/41 66%

□ 今回のデータ
* Terracini et al¹⁷⁾

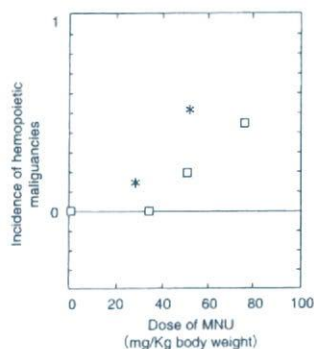


図6 直接遺伝子傷害性発がん物質の実質的な閾値の存在? ¹⁶⁾

相関カーブ, すなわちいわゆるホッケースティック型の結果を示すことが分かっている。ここで, 33.3mg/kgで発症が見られないことは, たくさんの文献的背景データで一致している。報文からとった表¹⁷⁾でも, 筆者らのデータが雌の骨髄細胞を使っているから, その雄のデータと比較すると, 25mg/kgで0/20, 50mg/kgで9/30となり, 30mg/kg前後が腫瘍発症のプラクティカルなLOAELであることが伺われる (図6)。このケースでは, 30mg/kg以下では, もはや白血病は出なくなっているのので, 統計的な適合シミュレーションに意味があるとは思われないが, ここでの計算でも直線回帰 (linear regression fitness) が一番よく適合するので, 閾値が或るものと理解した方がわかりやすい。これが, LogisticやLinear, そしてQuadratic並びにLinear-Quadraticにどのくらいfitするかについて検討しても, 尤度 (likelihood ratio) が最も高くなるのは直線回帰であった¹⁶⁾。

しかしこの話には続きがあって, この実験をp53遺伝子のヘテロ欠失動物を用いて行くと, 用量作用関係は, 図7のグラフに示す通りとなり, 疑いようのない無閾値性の結果を示す。これは, 尤度という物差しで示しており, 1.0に近い値が, より「そうらしい」ということを意味している。

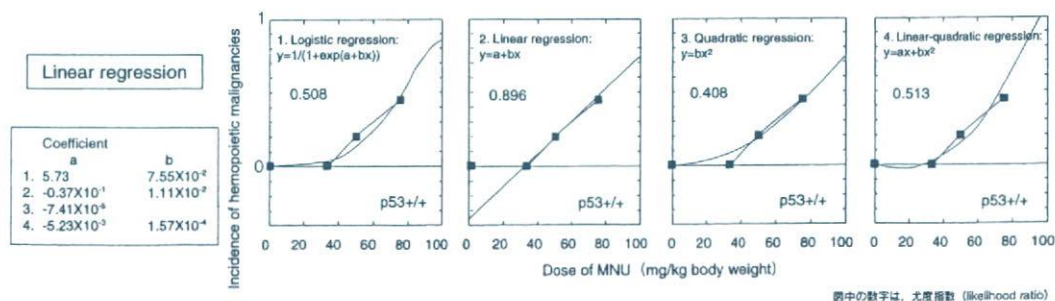


図7 直接遺伝子傷害性発がん物質の実質的な閾値の存在? ¹⁶⁾

それが0.88であり、ほぼ原点を通過しているため、より無閾値性 (non-threshold) であるらしい、ということになる。従って考え方としては、野生型での結果は、低用量部分でのp53依存性の遺伝子傷害の修復が関与していたことが示唆され、他方、p53遺伝子は、老年者と老化動物の体細胞では、しばしばアレルの一方 (half aryl) の不活性化を起こしていることが知られているので、p53遺伝子の関与したこのケースでのリスクマネジメントとしては、安全性の側から見て閾値がないものと判断した方が合理的と云ってよいかも知れない。つまり、実際に直接性遺伝子傷害のある物質に対して、こうした用量・作用の実験値で閾値のあるなしを一般化することは、実際にはたいへん難しそうだということになる^{*11}。

2) 閾値の有無に影響を与える要因

目を転じて、身の回りの、実験条件に即して、閾値の有無に影響を与える可能性のある要因に注目してみよう。経験則として直線・二次曲線モデルが無閾値性の印象を与えることは知られている。しっかりとした検定抜きに直接型遺伝子傷害性という「論理」が先行したものと受け取れる例も垣間見られる。要因は様々である。最も大きな要因は、動物の屠殺時期や食餌条件が引き起こす、観察期間との関連である。多くの発がん試験では、実験動物は、背景腫瘍が比較的少ないうちに、図8のAのような、1年なり2年のある時点で屠殺される。実験動物では自然発生性の腫瘍が或る程度の頻度を示すので、Bの生涯観察 (life time observation) の結果と比較すると、それぞれの腫瘍頻度は、図8左下のA、Bのような違いを生み、結果的にAでは閾値が認識されやすく、Bでは統計的に有意な閾値は見られないという結果になる。

Cross-sectional study(一斉屠殺)による“見かけ”の閾値形成と
Life-time study(生涯観察)による統計的閾値の不明確化

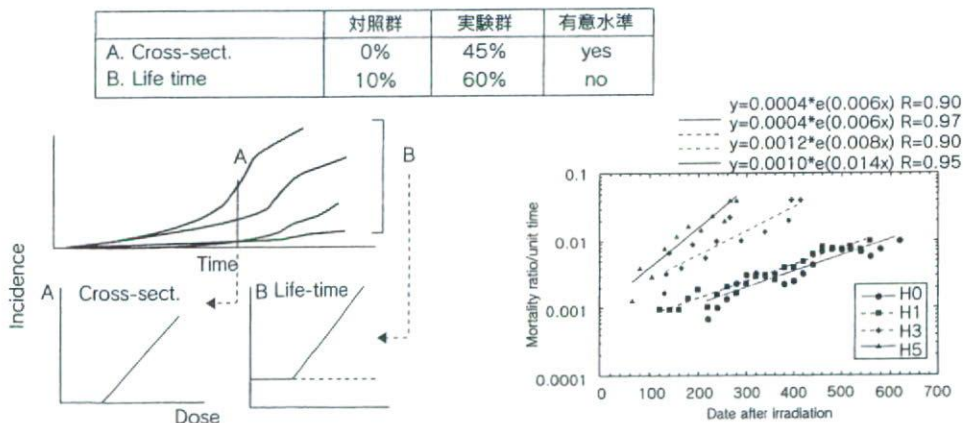


図8 観察期間との関連で見る閾値性と無閾値性

*11 直接性遺伝子傷害物質の閾値を論じる論文は、そうした背景にもかかわらず取り上げられる機会が増している。その一因は次項2) 閾値の有無に影響を与える要因、でのべる。

他方、図8右の、1, 3, 5Gyの放射線曝露のようなケースでは（これは後述するゴンベルツ函数という方法で、年齢毎の単位時間当たりの死亡率を対数尺で示している^{※10)}、^{※12)}）、1Gyと非曝露の対照群との間隔は限りなく近接しているため、これを早い時期に屠殺すると1Gyにおける造腫瘍性も対照群との峻別もでき無くなることになる。つまり、論理上非閾値性に近い結果が出てくる運命になっていることがわかる。前項の末尾でふれた、直接性遺伝子傷害性発がん物質に閾値があるとする論文の増加も、現在の発がん性試験法（図8のA）での低用量域での実験値は、非投与群（用量0）での結果と容易に有意差がなくなる傾向にあることに起因している。そしてそうした経験が積み重なっていることを反映している。しかしそうした事実も、図8のBにそって解析すると異なった結果となることはすでに述べた。慎重な検討が求められる所以である。

最近、アスパルテーム（Aspartame）の発がん性について、前者の例と似た取り上げ方で、Environmental Health Perspective誌に結果が紹介された^{※10)}。ここに認められた無閾値性には多分に対照群の自然発生腫瘍が効いている。こうした結果は数字の論理に過ぎないが、そこには、人々が、“生物は、所詮、こうした或る程度リスクの中で生活をしているのだ”、という事実を納得するための科学を求め始めているという認識の変化が垣間見られる。一見、本末転倒ではあるが実質安全量（Virtually Safe Dose; VSD）の積極的な導入を求める声なども、そうした認識を背景にしているものと理解される。

全体を通して見て理解されるとおり、発がん性試験の今抱えている問題点は、このものが発がんの本態が不明のまま試験法として発展してきたこと、そしてその経験則の一人歩きによって定着してきた認識と実験的事実とがぶつかり合っているという点にある。これに対して現代の科学が答えることができるか、それは依然として疑問であるが、時間が掛かっても将来に向けて、本態に則した試験法への対応とリスク評価の考え方を整理し直すことが求められている。

3.4 リスクアセスメントをめぐる課題

かくしてリスクとリスクアセスメントの今日的課題が登場する。これまで、食品添加物や残留農薬評価のための急性・亜急性の試験を重ねて行くと、様々のエンドポイントで無毒性量が得られ、それらの結果を相互比較して丁寧に許容1日摂取量（TDI）などを抽出してきた。ところで2006年5月には残留農薬のポジティブリスト制への移行が実現した。多数の農薬のリスク評価などは、十分なデータもなく、さりとて試験的にそうした評価をする費用も時間も限りがあると思われる。何らかの指標を通じて、VSDのような値を暫定的に求めるものとする、おそらくこれまでのやり方を根本から転換する必要に迫られよう。こうしたあらたなインパクトも、その遠因はと云えば、ヒトとヒトを取り巻く生体の異物に対する応答作用を、より客観的に直視することを人々が求めつつあり、“零リスク”とか“無毒性状態”といった建前論を多くの人々が納得しないという、時代の流れを反映している。

^{※12)} Gompertz-Makeham law of mortalityとして知られる。 $N'(t) = -N(t) \log(N(t)/K)$ （ここで、 $CN(t)$:時刻 t における個体数、 r :自然増加、 K :平衡状態下での個体数）と表現される。Benjamin Gompertz (1779-1865)は英国の数学者。

4. 将来に向けて開発すべき試験法

以上のような問題点を直接すぐさま解決することにはならないが、比較的近い将来に向けて開発されることが期待されるあらたな試験法が、おそらくここに掲げる、1. 発生過程、2. 成長過程（あるいは思春期？）、そして、3. 老化過程に対応したあたらしい試験法である。因みに、これらの対象が、WHOが注意を喚起している高感受性のポピュレーションに属することは、多くの人々の関心の集中しているところでもあり、また、それにもかかわらず、そこにガイドラインが整備されていないことは先に述べたとおりである。

4.1 発生過程、胎生期における試験法

発生過程の試験法開発は、器官形成期に当たるため、とりわけその重要性が強調されるワケであるが、先にJames Wilsonのプリンシプル（表5参照）で見たとおり、その臓器特異性、時間特異性、用量特異性などを考えると、技術的に簡略かつ網羅性をカバーすることには難しい問題があることが理解される。現在の三節生殖発生毒性試験でさえも十分に煩雑且つたくさんの動物を使う試験なのである。他方、発生期の遺伝子をひとつひとつ、つぶしてみると、見たこともないような奇形や発生異常が観察されるから、将来に向けてという話になるとしても、より合理的で網羅性の高い試験法の開発を考える余地があることは明らかである。

事実、筆者の主宰する内分泌かく乱化学物質関連の研究班では、そうした化学物質の胎生期の曝露が生体成長後に影響を及ぼす危惧を検討することが求められており、岡崎基生研の井口教授や三重大大学の杉村教授をはじめとする班員によって、様々の事象が見いだされている。井口教授はこれまでに、エストロジェンの膈上皮に対する不可逆性変化の分子背景を明らかにしてきた功績で知られるが、このほどはアンドロジェンにも、エストロジェン受容体を介して同様に膈上皮に不可逆性の角化上皮性変化が引き起こす作用があることを見いだしている。すなわち、出生直後の雌マウスにアンドロゲン（DHT）を投与すると卵巣非依存的な不可逆性膈上皮細胞増殖が起こるが、これにはエストロゲン受容体a（ERa）が不可欠であり、不可逆的細胞増殖を示す膈では、ERaのリン酸化が起こっていた。これは出生直後のDES投与で起こる不可逆的な膈上皮の増殖機構と同じである。

詳述するスペースはないが、三重大大学の杉村教授によれば、そうしたことはエストロジェン受容体を介して、前立腺でも不可逆性の分化を引き起こす可能性があることが分かっている。これらの作用は体内ホルモンバランスに因るものではなく、エストロゲン様物質がエストロゲン受容体を介して直接的に作用した結果であるという。

他方、ショウジョウバエにおける8組のHox遺伝子の研究²⁰や線虫²¹における全ゲノムプロジェクトを通じた発生奇形の先駆的研究にはめざましいものがあり、そうした遺伝子の側からリパー

スの形で明らかにされる奇形発生のメカニズム研究にも期待するところが大きい。

かくして、より合理的なスクリーニング系を作る必要が出てくる。種間相同性をもった遺伝子はたくさん同定されているので、図9のようなモデルは、いくらでも作れるワケであるが、

このやり方では、おそらく、毒性学に必要な網羅性を満たすことが出来ないであろう。種々の受容体の異常²⁴⁾、²⁵⁾が口蓋裂 (cleft palate) などを引き起こすことが知られているので、受容体原性発生毒性 (receptor-mediated teratogenicity) として奇形をスクリーニングすることは考えられなくはないが、やはり検索の網羅性の面から考えると、まだ全体をカバーする戦略を確立するには時間と叡智が必要のように思われる。批判に耐え得るよい系は紹介されていない。まず、薬物代謝酵素などによる変化物だけは、なんとしてもつかんでおく必要がある²⁶⁾。Wilsonの臓器特異性や時間特異性などを超越する方法として、ある意味では、酵母やE. coliのようなものでも網羅的な導入系を用意してデータを取り、その結果をin silicoのデータベースにまで発展させるといった視点が効果的なのではないかと思われる。その上で、あとは大胆に考えるしかない。発生にかなり相同性の高い遺伝子発現が観察されることで知られている魚類の切断ヒレの再生過程 (図10) などに着目すると、同時に三胚葉性の修復過程を脚注のような遺伝子²⁴⁾を対象に観察することができる。こうしたやり方で、スクリーニングに必要な網羅性がかなり達せられるのではないかと考えられ、事実、そうした試みを進める研究者が見られる²⁶⁾。



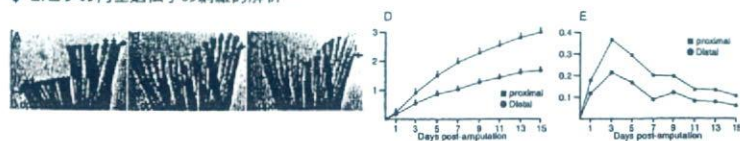
図9 ヒトと動物間の種間相関性

◆ 1.薬物代謝酵素系の網羅的プレスクリーニング(In Silico, yeast, nematode, etc.)

EPA研究課題²⁵⁾

Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome
Pedro Romero*, Jonathan Wagg*, Michelle L Green*, Dale Kaiser*, Markus Krummenacker* and Peter D Karp*

◆ 2.ヒレの再生遺伝子の網羅的解析²⁶⁾



◆ 標的シグナルの網羅的解析:

Signaling pathways

- Apoptosis
- Checkpoint pathways
- Delta pathways
- Epidermal growth factor
- Hedgehog pathways
- Molecular-stress pathways
- Notch pathways
- Receptor tyrosine kinase (RTK)
- Transforming growth factor
- WNT (Wnt) pathways

図10 発生過程の2段階スクリーニング戦略

²³⁾ Basic Helix-Loop-Helix Transcription Superfamilyによる奇形の発症。

²⁴⁾ 代表的標的シグナル:アポトーシス関連遺伝子, 細胞周期傷害チェックポイント関連遺伝子, Delta-Pathway, 上皮細胞増殖因子関連遺伝子, Hedgehog Pathway, Molecular Stress Pathway, Notch Pathway, 受容体チロシンキナーゼ関連遺伝子, TGFファミリー遺伝子, WNT シグナル関連遺伝子, など。

4.2 成長過程における試験法

成長過程の試験でもっとも注目しなければならないと思われるのが思春期への対応である。ここでは、2点のみデータを揚げよう。最初の話は、国環研の曾根秀子博士らの仕事で、エストロジェンやTCDDの曝露で、テロメラーズの活性が上昇したので、これらには発がん性の蓋然性があり得るのではないかという趣旨の報告である²⁷⁾。エストラジオールの変異原性²⁸⁾は以前から指摘があった。NTPのデータにも、そうした背景を示唆する結果が見られる。この実験自体は培養細胞上のことでもあり、個体レベルでの実験結果が期待される場所である。

つぎの結果は、ビスフェノールAがB6C3F1でエピジェネティック発がんの頻度を引き上げたというものである²⁹⁾。報文をみると白血病の頻度が増している。エストラジオールには内在性の遺伝子傷害性があり、他方、そのこととの関連は明らかではないが、内分泌かく乱化学物質に時としてこうしたエピジェネティックな発がん性を示唆する結果がEPAなど国外の諸機関から出はじめている¹¹⁾。これに対応する本邦で行われている既存の発がん性試験の結果はしばしば陰性でありコントロールである。こうした乖離に対しては、発がん性試験の成り立ちに立脚した虚心坦懐な試験法そのものの基礎的研究が必要である。この問題は、あとで述べる老化と寿命の項で、もう一度取り上げたい。

さて、ここでの動物たちのGompertz表現による蓄積死亡曲線を原著のデータから作図して見よう。すると、図11に見られる通り、対照に対して、低用量、高用量とも、それぞれ、傾きが急峻になり、死亡が前倒しになっている。つまり、これは被験物質による促進加齢状態を意味している。思春期に与える性ホル

モン系への影響がこうした促進加齢をもたらすことは、動物学的には以前から知られている。こうした結果を念頭に置いて、本邦では、内分泌かく乱化学物質問題におけるあらたな動物試験として、マウスの一生涯試験と称するフル・ライフサイクル試験を提案し、米国EPAをはじめとする各国との共同研究の検討がはじまったところである（詳細は厚生労働省のWebsiteを参照されたい）。成長過程を対象にした試験法の開発の難しさは、齧歯類と霊長目のそれぞれの寿命中に発育期の占める割合のギャップにあると思われる。先の寿命曲線などを基礎とした新しい視点にたった試験法の開発が求められる所以である。

B6C3F1, male mice treated with/without BPA (Adapt for Huff 2001)

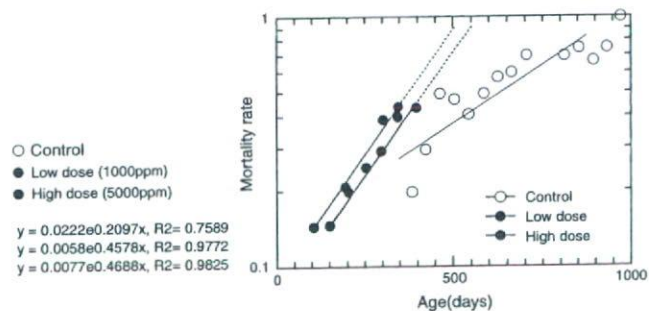


図11 ビスフェノールAのB6C3F1 マウスにおける死亡曲線（文献29より著者作図）

4.3 老化過程における試験法

老化過程についてとりあげる意義は、種々の生体異物相互作用が究極的に寿命に影響を与える可能性を示唆するデータが増えてきたことにある。ヒトの分裂細胞系に普遍的に存在する幹細胞系列では、分裂回数の増加に伴って染色体末端のテロメアの長さが短縮し、これを修復するテロメラーゼの活性上昇が認められる。骨髄移植などで造血細胞に分裂回数を増やすような負荷をかけるとテロメアの短縮が起こる。化学物質の曝露でもそうした変化の兆しが見えるので、これを積極的にとらえてゆこうということである。まだあくまでも理論にとどまるとも考えられるが、老化は化学発がんの蓋然性を高め、化学物質一般に対する生体の異物応答は老化を促進するという概念である。

すでに見てきたとおり、哺乳類動物の寿命と単位時間当たりの死亡率の変化を対数目盛でプロットすると、図12に示すグラフに見られるようなGompertzの直線が得られる。外来異物に曝露すると、これらの直線の傾きは太線で示す直線のように急峻になり、平均寿命や最長寿命が短くなることが知られている^{*15}。最後の6章でも改めて言及するが、寿命を視野にいれた毒性試験法についての考え方を検討する参考となれば幸いと考える。

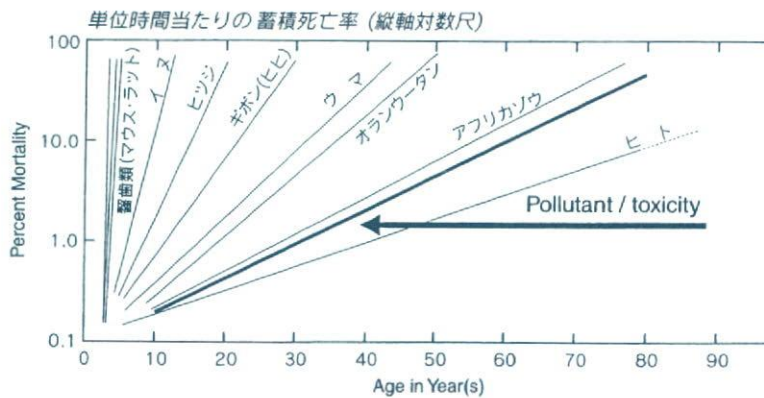


図12 寿命に対するリスク学としてのトキシコロジー

5. トキシコロジーに取り入れたい新しい方法

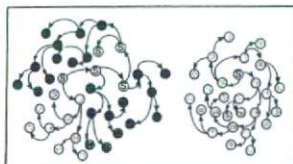
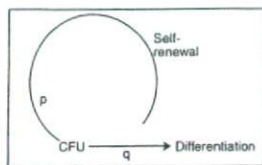
ここで筆者らがこれまでに手がけてきて重要な意味をもつと考える新しい方法を、トキシコロジーにあらたに取り入れるべき手法として3つ取り上げて紹介したい。

その最初は、1) 幹細胞、特に造血幹細胞に関するもの、次にそのアッセイ法を用いた 2) 幹細胞特異的細胞動態解析、3つ目は、3) マイクロアレイデータの取り扱いについてそのデータマイニング、結果の理解の仕方を中心に解説してみよう。

^{*15} なお、直接型遺伝子傷害性の発癌剤を曝露した時の死亡カーブは、Gompertz型の直線ではなく、ガウス分布を取ることが分かっている。

5.1 幹細胞を対象とした試験法 (図13)

ここで幹細胞トキシコロジーを取り上げる理由は、幹細胞が個体もしくは組織の形態形成の出発点にたっていて、必要なすべての遺伝子発現がスタンバイの状態になっている、システムズ・バイオロジーのスタートラインの細胞だと考えられるからである。そして実際に、臨床的に前骨髄性白血病で腫瘍性



Mixed colony Unipotent colony



Stem cell hierarchy

LTFC	CFU-S	CFU-C
Long term repopulating cells	Colony forming unit in spleen	Colony forming unit in culture
Survival of irradiated mice	Spleen colony formation	Colony formation in semi-solid culture

図13a トキシコロジーの方法 - 幹細胞 -

の前骨髄球がall-trans retinoic acidの標的細胞として劇的な効果を示し³⁰⁾、チロシンキナーゼ阻害剤 (imatinib; STI-571) がc-kit陽性の白血病を標的とすることが分かってきたように³¹⁾、しばしばトキシコロジーでも幹細胞が毒性発現の標的となることが分かって来ている³²⁾。

造血幹細胞群は、種々の程度に自己複製 (self-renew) と分化の双方を繰り返し、その頻度と比率によって分化程度に応じたヒエラルキーを構成することが分かっている。種々のコロニーの中には、ひとつのコロニーの中に幾種類かの異なった血球成分を含む混合性のコロニー (mixed colony) が

コロニーの大きさ: Stem cell kinetics (growth rate: rapid or slow)



コロニー数: Self-renewal capacity (stem cell change in: primitive vs. matured fract.)



コロニーの形: Grade of immaturity or maturation (compact immature vs. dispersed differentiated)



傷害の特徴: Grade of damage (healthy burst vs. scanty & apoptotic colony)

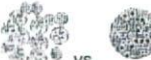


図13b トキシコロジーのパラメータとしての幹細胞系列

観察されるので、これらは自己複製が活発で多方向分化能をもつ造血幹細胞に由来するものであろうとの認識が生まれた。さらにそれらは、細胞培養系においても種々の血球成分を含むコロニー形成をも引き起こす。それらの中には、リンパ球性の分画が分化系列として含まれていることも証明されている。

コロニーは、その大きさ、数、形などによって、生理的な位置のみならず、傷害を受けたときの標的分子機構も推測が可能であり、したがってトキシコロジーのパラメーターとして用いることが可能である。分化段階に応じて、生理的にもテロメラーゼの活性が認められ、幹細胞系に掛かる異物ストレスが分化段階に応じた傷害履歴として細胞反応を引き起こし、影響を残すことになる。

造血幹細胞には、時には他の分化型の血球系に発現のまったく見られない分子の発現が確認され、それらが生体防護に役割を果たしているものと判断されることがある。例えばコネクシン32は、造血器系では造血幹細胞のみに発現していて、骨髄全体をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）にかけて発現RNAを増幅しても検出されない。しかしこの分子を欠失させると、その欠失マウスでは、野生型での頻度を遙かに上回る白血病の発症を惹起させる。従ってコネクシン32は、造血幹細胞の造血の場における安定性を維持し、化学白血病からの防護に働いているものと理解される³⁰。

同様に、ダイオキシン受容体AhRの場合も、比較的未分化な前駆細胞群で特異的に高い発現が認められること、さらに、ベンゼンを代謝することの知られるCYP2E1は、肝臓のみならず、骨髄、特に骨髄の造血幹細胞分画に高い発現があることが分かっている。ベンゼンの造血毒性の主要な原因となる薬物代謝は、肝のそれではなく、骨髄そのものの造血幹細胞に発現するCYP2E1に基づいているということが分かってきた³⁰。

以上のように、幹細胞分画は、おそらく、例を挙げた造血系の幹細胞に限らず、胚幹細胞をはじめ、神経幹細胞、肝幹細胞あるいは間葉系幹細胞など種々の前駆細胞で同様の独自機能を持っていることが予想される。そしてそれらの機能はしばしば分化した分画では明確な機能変異としては検出できないことが少なくない。是非とも簡便な幹細胞特異的なアッセイ系を樹立して、毒性学のプレディクタビリティの向上の為に貢献することが期待される所以である³⁰。

5.2 造血幹細胞分画特異的な幹細胞動態解析法：BUUV法

そこで、つぎに筆者らの考案した、造血幹細胞特異的に幹細胞動態を測定するBUUV法を紹介する^{36,38}。骨髄細胞の中に占める造血幹細胞の比率は、アッセイ法にもよるが0.02%程度に過ぎない。ここに紹介するBUUV法は、このものの特異的な細胞動態を観察する為の、*in vivo*でのプロモデオキシユリジン（BrdUrd）持続標識と近紫外線（UVA）照射とを組み合わせた、従来にない新しい細胞動態解析法である。すなわち生体内でBrdUrdの持続標識をした後、このBrdUrdを取り込んだ細胞のみを特異的に近紫外線照射によって死滅させ、生残した幹細胞分画の比率をコロニーアッセイ法などによって求めるものである。

持続標識は細胞分裂速度を反映するので、図14のように縦軸を対数尺にとると直線的に増加し、幹細胞分画の倍加時間（doubling time）や細胞周期速度（傾き）を与え、標識が恒常状態に達すると、幹細胞分画のうち、細胞周期に入っている分画（*cycling fraction*）と細胞周期に入っていない

分画 (Dormant fraction) との比率を与える。

これまでの方法では、紫外線にUVAを使わずUVCやUVBを使ったために細胞傷害を生み、持続標識の結果が恒常的平衡状態に達することなく、時間と共に休止期分画 (dormant fraction) が減少し細胞が新陳代謝性に入れ

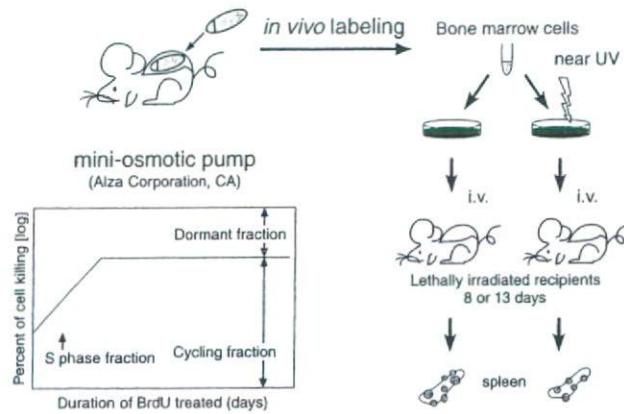


図14 BUUV method to measure cycling stem cells : Model & Parameters ³⁸⁾

替わるものとの誤認を生んできた。この長期休止期分画は発育初期に成立するものと考えられるが、実際の筆者らの検討結果でも、途中で感染性ないし腫瘍性の細胞周期内分画の必要性が高まることのない限り、このdormant fractionは1年以上にわたって変化しないことが分かっている。

この方法が開発されたことによって明らかになったことからは、未分化な幹細胞分画と分化型の幹細胞分画とでは、前者で後者に較べて細胞周期速度が速く、周期内分画の大きさが後者に較べて小さいことをはじめとする幹細胞分画のヒエラルキー構造を構成していること、さらに、老年個体でも、分化型の幹細胞の細胞周期内分画の細胞動態には、若年者のそれと較べて差がみられないにもかかわらず、未分化型の幹細胞周期は遅く、休止期細胞分画もより大きいこと、従って持続感染のような負荷に対して老年個体の応力は若年者のそれに較べて劣っているものと考えられること、などの背景メカニズムが明らかになったことなどをあげることができる。これはトキシコロジーの面での老若分画の対異物応答についても同様の対応となることを予測させるものである。

筆者らはこのBUUV法を用いて、ベンゼンの曝露下では造血幹細胞分画の細胞周期が停止し、曝露を中止すると直ちに細胞回転が開始する機構を明らかにし、それまでの骨髓細胞全体の検索で明らかにすることの出来なかった、持続間歇曝露による造血幹細胞動態の波状変化がベンゼンの白血病発症要因となっている機構をはじめ明らかにしている³⁹⁾。

5.3 マイクロアレイ法

1) 遺伝子発現とトキシコロジー

最後に近年活発に応用のはじまりつつあるマイクロアレイ法のトキシコロジーへの利用法について略述しよう。

生物の遺伝情報は染色体が担い、4種類の塩基の配列からなる核酸（DNA鎖）を構成要素としている。これらの塩基配列情報は、メッセンジャーRNAに転写され、3個ずつの塩基の組毎にアミノ酸に翻訳され、これをもとにタンパクが合成され、それが生命活動の源となる。一組の染色体をゲノムと呼び、その構成要素としてのDNA塩基配列は、半保存的に複製されて遺伝情報として子孫に受け継がれたり、あるいは各々の生物の細胞増殖、細胞死をはじめとする様々な情報発現の設計図としての役割を果たしたりする。マイクロアレイ法をトキシコロジーに利用するねらいは、以上のような背景に立って発現した情報が、生体周囲の異物に対する応答反応としてのすべてを反映し、異物応答を読みとる媒体として機能することが期待される点にある⁴⁰⁾。

線虫（ネマトーダ）、ショウジョウバエ、ヒト、そしてマウスと、各々の生物に固有のゲノムの全塩基配列の解読計画が西暦2000年を前後して相次いで完結した。これによって、マクロサイドから大量の遺伝子発現を見る方法が確立し、種々の生体障害性の背景となる発現プロファイリングを明らかにする試みが進展した。この情報は様々に利用され得るが、それらの毒性学への応用、特に毒性発現の予測に関する機能をトキシコゲノミクスと呼んでいる。

2) トキシコゲノミクス

この方法は、いわば「発現遺伝子顕微鏡」とでもいうべき検出装置に相当する。なぜならば、ひとつ一つの発現スポットそのものに個々の遺伝子の機能的な意味があるとは云うものの、まずそれら全体としての発現パターンに注目しようとしているからである。

例えば図15に示した発現パターンは、国際生命科学研究所ILSIの共同研究コンソーシアムにProcter and Gamble社のMarilyn J. Aardemaのグループが発表したデータ⁴¹⁾から紹介するものであるが、ここでは、直接型遺伝子傷害性の制がん剤としてcisplatin, methyl-methane sulfonate, mitomycin Cなどをあげ、それらの生体応答を、非直接型遺伝子傷害性の制がん剤すなわちtaxol, hydroxyurea, そしてetoposideなどのそれと比較している。これによると、投与後わずか4時間にして両者を分別する発現遺伝子の発現

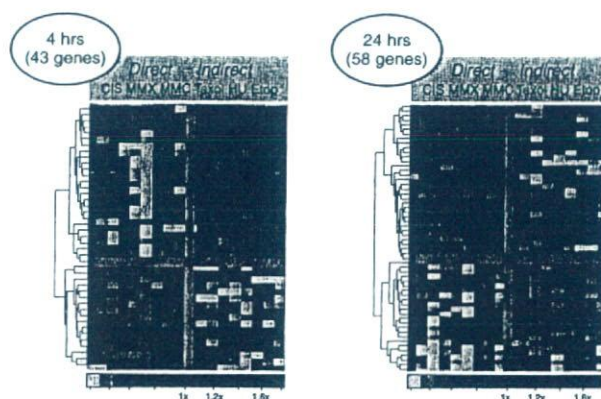


図15 背景：DNA-反応性 & -非反応性薬物の分別
(文献41より)

の相反性が認められる。さらに24時間後の発現パターンを見ると、異なった発現遺伝子プロファイルが異なった分別パターンを表している。このデータは明瞭な両者の分別と共に、多くの時間軸を対照的に取らなければ物事の比較ができないという認識の誤謬を与えた点で、なかなか興味深い。ここでは、遺伝子個々の役割もさることながら、これらの生体応答の違いをパターン認識することが可能である点についてのみ注目して欲しい。そうした背景で個々の遺伝子群が果たす役割の分析に重要な意味がないわけではないが、その解析はつぎのステップである。そのような認識を念頭に以下を読み進められたい。

3) マイクロアレイデータの与える情報

観察される遺伝子発現の意味する内容は、大別して相対するつぎの二つの概念にもとづいている。一方が、遺伝子の文字通り遺伝学的で決定論的 (deterministic) な性質に基づくものとするれば、他方は、メチル化、リン酸化、といった塩基の修飾に基づく、組織特異的な生理的プログラムの発現や、生体異物応答を反映した結果の産物と考えられる遺伝子のエピジェネティクス (epigenetics) の発現であり、遺伝子発現の確率論的 (probabilistic) で、可塑的な (plastic) 変化を反映するものである。前者で観察される内容には、生理的なヌクレオチド多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) のようなその試料固有の遺伝子情報が対照となるほか、そうした変化に伴う機能が考えられ、これはいわばあたらしい変異原性試験に他ならない^{*16}。他方、後者は、ちょうど病理学における顕微鏡所見とアナロジーの情報を意味し、適切な対照を置きつつ分析することにより、外界に対する生体異物応答性を反映することが期待される。双方とも遺伝子発現が与えるトキシコロジーの分野の貴重な情報に他ならないが、ここでも技術的な意味は同じなので、より一般性の広い後者を題材として話を進めよう。もちろん適切な例を取り上げることにより、前者についても同様の方法が成り立つのである。

さて、いま放射線を照射した際の発現遺伝子のプロファイルを、生体応答のモデルとして考えてみよう。一般に無処置、1Gy、2Gy、・・・という具合に照射線量を増してゆき、その結果骨髄に引き起こされる遺伝子発現を調べると、①照射線量に応じて、発現が変化するプロファイリング (dose-dependent profiling) が見いだされる一方、②個々の照射線量に特異的なプロファイリング (dose-independent profiling) が見いだされる。前者は、従来の様々な試験法における判断と同様、用量相関性にそって検討するときに便利な指標と考えられ易いので、それはそれなりの意味を持つと考えてよいであろう。一方、後者は用量特異的で、しかも場合によっては種を超えた外挿にも用い得る生物学的指標となるので、このものの将来的な利用の展望には大きな期待がある。

^{*16} 従来の変異原性試験の多くが遺伝子変異の固定と、固定された塩基配列の増幅の双方を基礎にしている点で比較にならない鋭敏さを示すのに対して、本法の利点は、その変異の成立前、固定前のpredictabilityへの期待にある。

4) マイクロアレイにおけるデータ処理の考え方

マイクロアレイデータは、例えば3万個の遺伝子の発現を観察するものとする、それらは3万次元空間に配位する情報単位を意味している。これをそのままデータ処理することは意外に難しい。因みに解析ソフトウェアを用いて図16に見られるようなデンドログラムによるツリー解析を行うと、種々の遺伝子発現データは、まず発現強度という1次元データにそって、つぎに物質毎の発現データの位置を考慮したベクトルによって、樹枝状のリンケージ（デンドログラム）による2～数次元にわたる多相構築が、非誘導的（unsupervised）に作図（autogenerate）される。この解析方法では各々の遺伝子は、一元的にのみ関与することになる。つまり、deterministicな変化に対する解析にもっぱら有利な解析構造になっている。

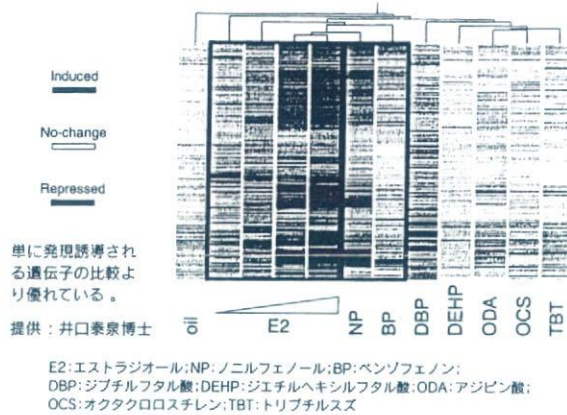


図16 背景：遺伝子発現プロフィールの2次元デンドログラム解析の特徴と問題点

導き出される結果は極めて教育的なので井口教授（岡崎国立基生研）からお借りしたこの図16を対象にいま少し考えてみたい。このデータは用量相関リファレンスとして濃度を振ったエストロジェン(E2)に対する結果が左側2～5レーンに置いてある。この解析ではエストロジェンの或る一面での作用類似性を尺度に遺伝子の配置がgenerateされたことが分かる。そのある一面からみたエストロジェンの作用と近似した物質として、ノニルフェノールとベンゾフェノンの結果が同定された。しかし、内分泌かく乱物質と考えられている他の物質にそれらの尺度からの共通要因は見いだすことは困難であった。つまり、ツリー解析には遺伝子発現の強さや、そこで対象となった試料にある共通の性質によって自動発生（autogenerate）するベクトル方向があるのだが、そこで生まれる多層性のデータプロファイリングと多元次元認識とは似て非なるものなのである。遺伝子個々のデータが一次的に配置してしまえば、遺伝子の機能の多相性を反映した立体的な相互関係は浮かび上がってこない。もとより遺伝子の機能は強い発現のもの程、重要な意味を持っているというわけではない。そこでは、遺伝子相互の転写活性化などの連鎖機能を考慮すると、この方法による解析はさらに困難であり、例えば、極めて弱い発現の遺伝子の持つ重要な意味を解析することは難しくなる。

従って、図17①のように“3万人”の人々が、それぞれ個性的な表現で情報を発信していたとしても、その情報の受け手が取っているデータは、結果としては、何らかの尺度、例えば発現強度といった要因に強く支配された図17②のような変形した情報プロフィールを受信しているかもしれない。マイクロアレイデータから期待した情報が取れないのは、キチンとした標準化 (normalization) が行われていないことによるデータの質の低さや有意なデータの不足によるとは限らない。データ処理の仕方に多元次元認識を取り込むコンピューショナルな工夫が足りないことに起因している可能性を十分に念頭に置かなければならない。そして図17③に示したような表現が、必要なデータ処理への警告を十分に満足する表現となっているかどうかは分からないが、あるがままの発現をそのまま多元次元的に要因解析することが求められている点を強調しておきたい。

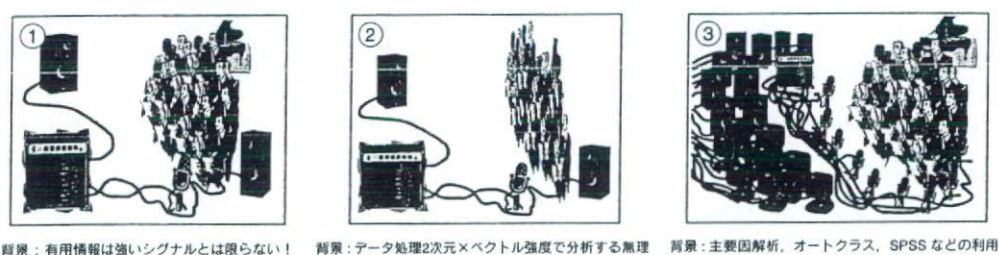


図17 3万次元のすべてのデータをデータ処理に生かす

5) マイクロアレイデータの均質性の向上と異なったプラットフォーム間での比較

自分でRNAを採ったことがあれば容易に気づくことだが、網羅的な遺伝子発現データ相互の比較のためには、データの採取過程の再現性、均質性、安定性は必要不可欠である。個体投与のレベルにはじまって、ロボティックに個体から得られる試料の質的標準化のために重ねられてきたこれまでの努力と改良が、今日のマイクロアレイ技術の基盤の発展に果たした役割は極めて大きい⁴²⁻⁴⁶⁾。ついでスポッティング技術やスパイク遺伝子の導入などによるハード面での進展も、データの質的選別や半定量的発現データへの補正を側面から支える⁴⁷⁾。かくして、今や異なったプラットフォームから得られたデータの電算的・コンピューショナルな比較の試みが、最近のインフォマティクス関連の雑誌を埋め尽くしている観がある。そして異なったプラットフォームから得られたデータの比較の試みが積極的に報告されている。検証の実例は省略するが、例えば主要要因解析のような手法でいくつかのプラットフォームから得られたデータを比較すると、容易にそれら相互の近似性を検証することができる。これは意外に生物学的な遺伝子変動のリンケージが基礎になっている点に負うところが少なくないようだが、近年の技術水準の均質性にも驚かされる。コンポーネントを選んで分別状況を比較すると、これもかなり近似した結果が得られる。

今日のマイクロアレイやジーンチップのプラットフォーム水準では、特別な細工が組み込まれていない限り、かなりの相互比較が可能になっている。

6) “病理学的エンドポイント”と“毒性学的エンドポイント”

実際にマイクロアレイで観察をするときに、そこで得られるデータの持つ意味について考えてみよう。図18は碁盤の目の右下をスタートとして、左上のゴールに至る経過中の発現の多様性を、分別するマイクロアレイのエンドポイント・パターンに注目して戯画化している。すると左上のゴールを中心に図示した“病理学的エンドポイント”と、右下に図示した“毒性学的エンドポイント”との間には、発現遺伝子の分布と質の点で、相互に際だった違いがある。すなわち、前者はゴールに近く、遺伝子発現をも特定してバイオマーカーとしてそのまま診断に使える内容を持つ可能性が明らかに見て取れるのに対して、後者での発現パターンは、多くの確率論的な不確定性を含んでいて、いまだ確定的な要素に乏しい。前者の“病理学的エンドポイント”に対しては、マイクロアレイが比較的明瞭な生物学的指標を与える可能性が示唆されるのに対して、“毒性学的エンドポイント”の方は、そのような確定的な情報はむしろ与えられないかに見える。両者にはデータ処理の仕方に違いが求められている。“毒性学的エンドポイント”では、確率論的で併存しない複数の経路を見ているので、それら個々の値を解析する必要がある。高い確率よりも、高い個別の頻度分布ということである。器械的な統計処理で闇雲に関与遺伝子を強引に引き出そうとすると、「何らの共通して動く遺伝子も抽出できなかった」といった結果になる。ここでは、“病理学的エンドポイント”としてマイクロアレイが比較的明瞭な生物学的指標を与える事例のみならず、後者の“毒性学的エンドポイント”に対しても、適切な解析方法を用いることによって、確かな“予知力 (predictability)” が得られるものであるという、生物学の引き起こす意外なマジックを、いくつかの例をもって供覧しよう。

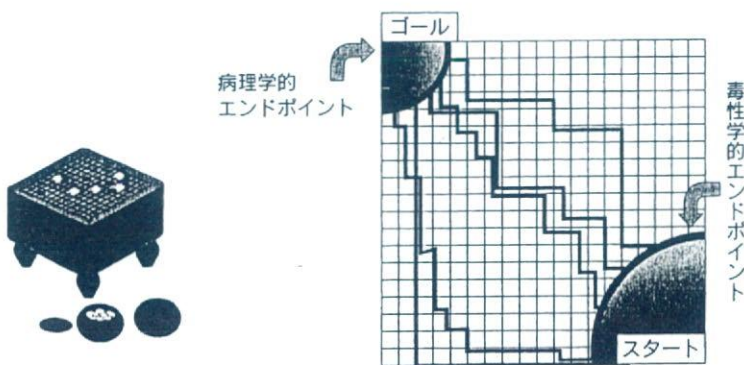


図18 マイクロアレイ(DNAチップ)における病理学的エンドポイントと毒性学的エンドポイント

【病理学的エンドポイント】

図19の病理学的エンドポイントの事例は、血液病理学的に同じ骨髄性白血病と診断された実験白血病例で、自然発症白血病（4例：①）と放射線誘発白血病（6例：②）を比較した場合を示している。左の自然発症腫瘍が線図で個々の症例別のパラッキと大きな振幅を示しているのに対して、右の放射線誘発のそれらは、どちらかと云えば比較的収束傾向のある線図パターンを示していることが注目されよう。

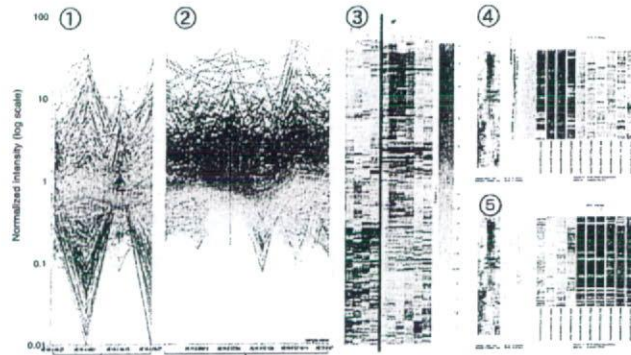


図19 自然発症白血病profile（左）と放射線誘発白血病profile（右）

これは、後者の発症過程に、複数かつ確率的に限局した放射線脆弱サイトといった特定遺伝子群を介した発がん過程が関与したものと仮説を支持している。実際両者には、デンドログラムによるツリー解析でも明確な分離が見取れる。

このなかから、特徴的な“枝”を構成する遺伝子を取り出して、前者で高発現のパターン、あるいは反対に、後者で高発現のパターンをとる部分を抽出して解析すると、それぞれに代表的な遺伝子が浮上してくる（図19④、⑤）。これらは、いわゆるバイオマーカーとして診断的な意味をもって利用することが可能であり、臨床医学的にすでに活発に利用されている。これこそが病理学的エンドポイントの特徴ということが出来よう。

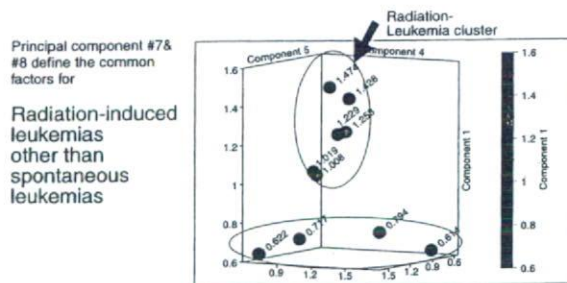


図20 病理学的エンドポイント

これらの主要要因分析を見ると、放射線白血病クラスターが得られる。今ひとつ要因を加えて90度方向上からこれを観察した3次元表現で分布図を描くと、両者は図20のように明瞭に分別されることが分かる。強調しておきたい点は、病理学的エンドポイントの場合、その分別因子の全遺伝子の発現に対する貢献度が比較的小さい場合でも重要性が賦与され得るという点である。これはつぎに述べる毒性学的エンドポイントでリスク評価をしようとする場合と異なる。

【毒性学的エンドポイント】

毒性学的エンドポイントの方は、今見てきた病理学的エンドポイントのようなその時点かもしくは極めて近い時点での確定的な“分析”とは異なって、多くの不確定で確率論的な予測を含む“分散性”の判定を意味している。発がんに向かう過程の“point of no return（最終可逆点）”以前のがんの確定診断が論理上は困難なことでも明らかとなり^{*17}、このものでの予測の可能性については、携わっている人々それぞれに考え方が異なっている。その主な背景的理由は、例えば先のILSI/HESIの変異原性試験に関する図15に見たような、4時間と24時間の診断的プロファイルの変化、時間軸、ひいては動物種差にプロファイルが大きく左右されることへの危惧にあるのであろう。しかしすでに述べたとおり、特定の判断軸に縛られてマイクロアレイ解析を行うと先の図17②に見たような変形を来すだけで、ここで真に必要なとされる分別軸は見いだされない。図15に戻って云うならば、この4時間と24時間を横断する“グループ変動”の結果こそが、むしろそうした投与時間軸とは別の分別コンポーネントの存在を示唆しているのである。つまり毒性学的エンドポイントの多くでは、分別軸を既存のパラメーターや変化軸に拘泥して見る限り、しばしば有効な分別因子を見いだすことができず、投与時間や投与用量などの既存試験の概念からくる呪縛から逃れられないのである。

実験動物の加齢影響は、毒性学的エンドポイントのひとつの要素として興味深い差異を描き出す。図21①の21ヶ月齢（右）の5レーンの発現プロファイルは、2ヶ月齢（左）の5レーンのそれに較べて、個体毎の線図の拡散度が明らかに大きいことが観察されよう。これは個体差と云えば個体差だが、むしろ、純系動物でも確率論的（stochastic）で蓋然的（probabilistic）な発生・成長過程の違いが

あって、これが引き起こす差であり、確率論的な拡がりの程度の差を意味している。こうした個々のデータの拡がりの意味は、細胞個々各々の機能の違いを観察することによってはじめて明確になることも少なくない⁴⁰。この違いをデンドログラム解析で比較すると、図21②や図21④の左10レーンのようにautogenerativeに入れ子になり、両群はまったく分別されなくなる。それはこの両者を区別している要因がもともと弱い遺伝子発現のプロファイリングによって分別されていたからである。そこでつぎにこの両者に対する分別ファクターを主要要素解析（PCA）すると、中間過程は省略するが第2および第6コンポーネントに分別パターンが見いだされ両者を切り分ける要素が確かに存在することが分かる（図21③の2Mと21M参照）。

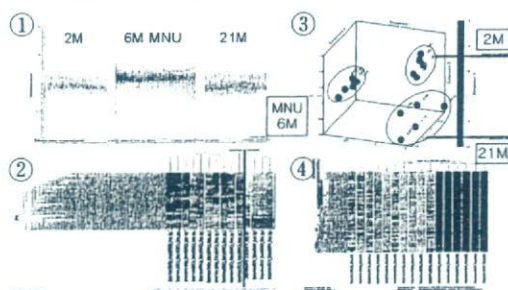


図21 毒性学的エンドポイント
直接性遺伝子傷害性化学物質（MNU）の引き起こす
集束型遺伝子発現プロファイリング

^{*17} 病理学で前がん状態と呼んでいる状態は、生物学的には“前がん”状態ではない。なお、臨床科学領域でも、近年、真の前がん状態のプロファイルを抽出する試みが進んでいる。

ここに化学発がん剤投与後の生体応答例を並べて解析してみよう。メチルニトロソウレア (MNU) は直接型遺伝子傷害性を有する強い発癌剤である。これを投与して6ヶ月後の骨髄の遺伝子発現プロファイリングを見た結果を先の図21①の中央に置いた。MNU投与個体の6例を見ると、左右の、無処置の2ヶ月齢と21ヶ月齢のそれぞれと発現遺伝子の逆相関性が認められるだけでなく、個々の個体における発現プロファイル相互の間の、全体的パターンの均一化傾向が窺われる。これに対してまずデンドログラムによるツリー解析をすると、図21②や図21④の老若無処置の骨髄 (左10レーン) と比較して、いまや際だった違いが認められる。ここから人為的に分別パターンを選び出すと、さらに明瞭な分別域が見いだされ (図21④)、それらの中には脚注にあげたような合目的な遺伝子群が抽出される^{*18}。これをさらに主要要因解析で分析すると、MNU投与群はコンポーネント1で高い比率の貢献度で顕著に分別され (図21③)、背景となる遺伝子はSPSSなどの方法によって抽出され、比較的初期反応からなる毒性学的エンドポイントにあっても、十分な判別プロファイルを得ることができるのである。

7) 毒性学的エンドポイントの分別度によるリスク評価

ところで、いまだ筆者らの独自の試みながら、このようにして分別されるアレイデータに対して、分別度に対する定量的判断を適用することによって得られる主要要因解析の結果を、リスク評価に用いることが可能である。図22に示す2つのグループは、先に紹介したデータと別に得られた放射線照射群 (3Gy) と非照射の対照群を示している。

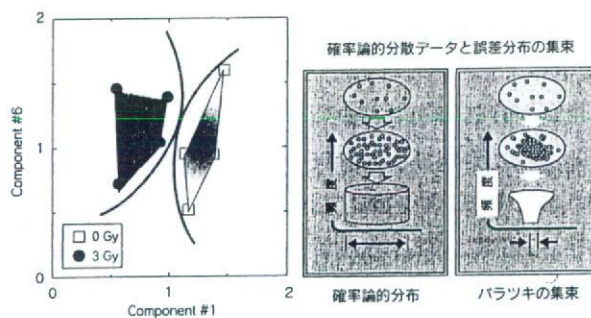


図22 統計的分別度によってあたらしいNOAELを設定する!

これを第1及び第6コンポーネントで展開すると、図22左のグラフのように両者が分離する。これらの重なる確率を統計的に計算すると、このデータは無作用量 (NOEL) や無毒性量 (NOAEL) の設定に用いることができる。

これはマイクロアレイデータに適用可能な新しいリスク手法ということになるが、この作業では多少の基礎的認識が前提となる。いまマイクロアレイデータから見て、或るグループが対照群との間にもつ何らかの差異を探索する場合には、如何に分別貢献度の低いコンポーネントをも用いることができるのであるが、反対に、対照群との差がないことを証明する場合には、貢献度の高いメジャーなコンポーネント群での一致率が高いことはもちろんのこと、貢献度の低いコンポーネントについても (分別コンポーネントがある場合は) その差を無視することが出来るかどうかを十分に吟

*18 hTPI1, telomerase-associated protein 1; BCL-XL, anti-apoptotic; topoisomerase (DNA) II alpha; Annexin A9; Braf; mutS homolog 3[E. coli]; MLL5, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5; PBX2, preB-cell leukemia transcription factor 2; Mapk8ip3, mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3.