

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。その一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、

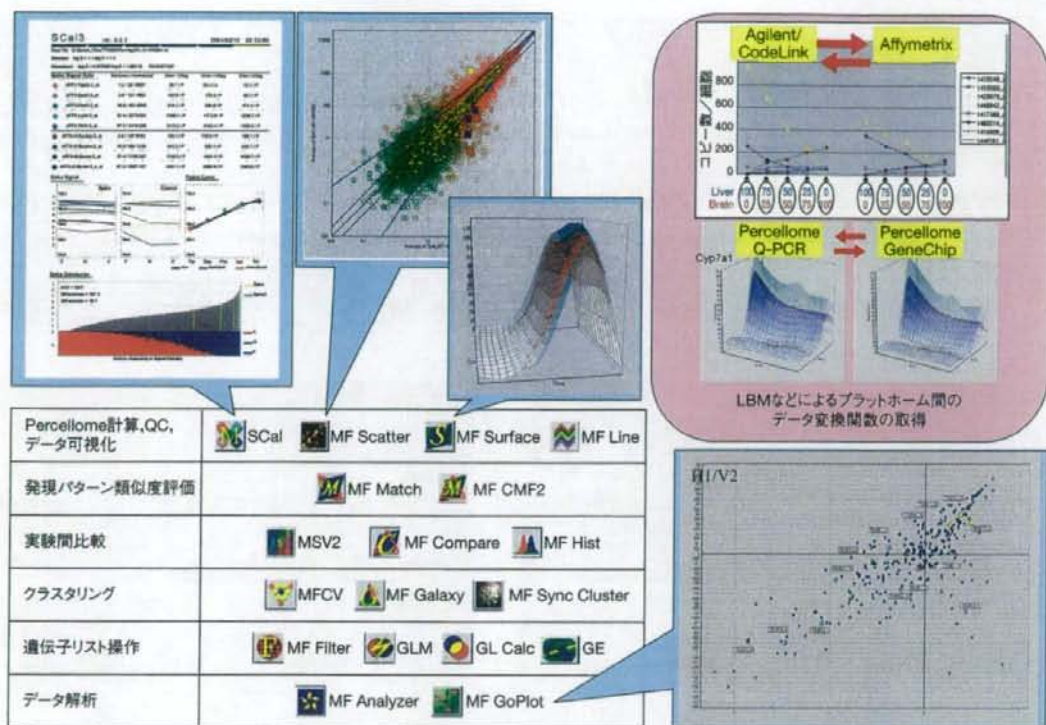


図3. 3次元多層 (Millefeuille) データの解析などに用いる独自開発プログラム群

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と従来型の発見アレイ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では発見が見られ、イントロンに対して設計されたprobe setでは発見が見られない、あるいは、既知のsplicing variantに対応したprobe setの発見が検出された、

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



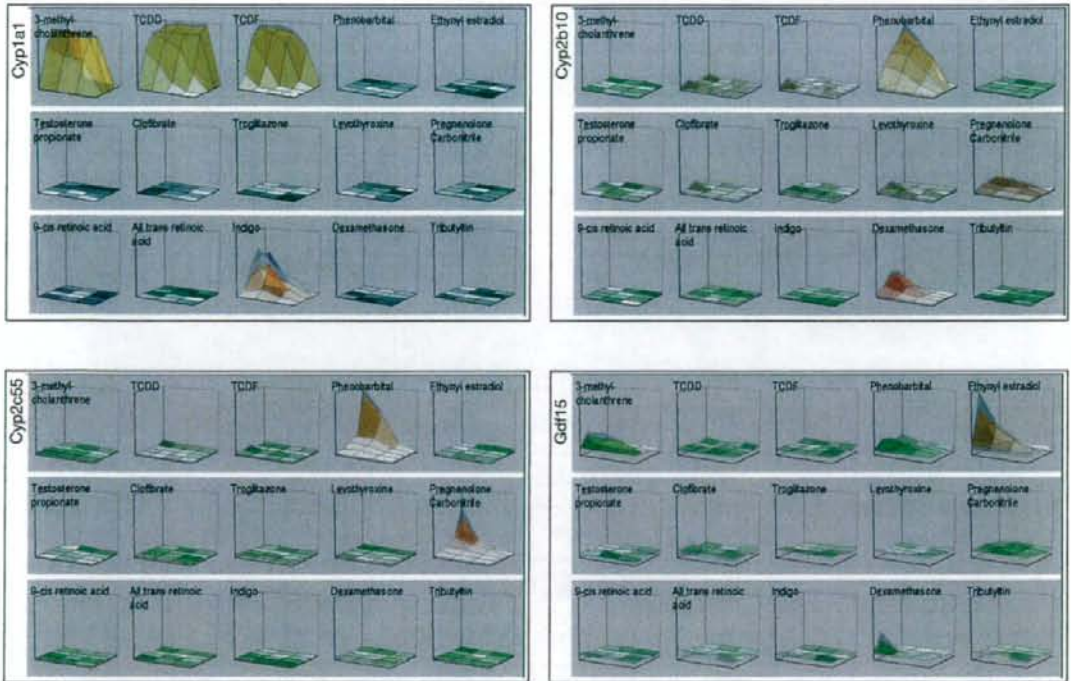


図4. 化合物間の発現比較

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。

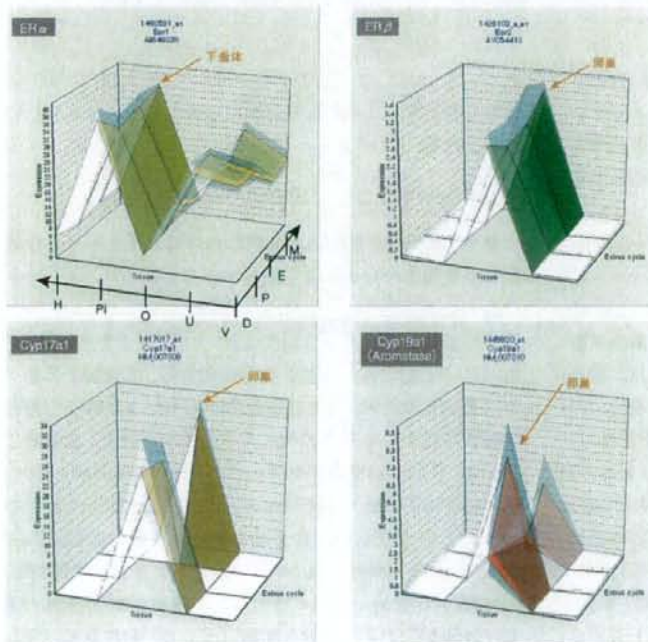


図5. 臓器間の発現比較

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 $\alpha$ 、ER $\beta$ 、Cyp17a1（steroid-17 $\alpha$ -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。

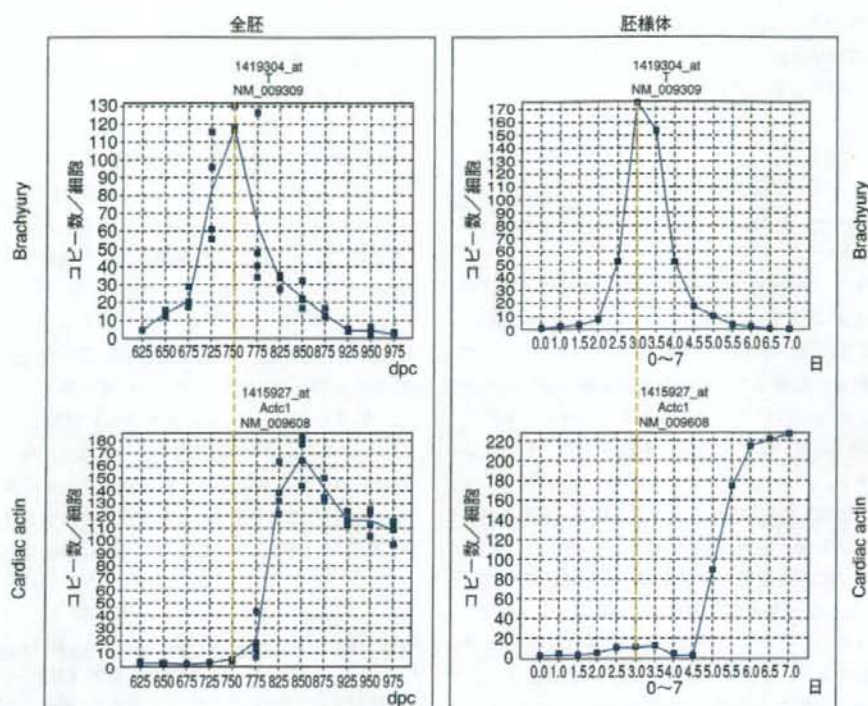


図6. マウス胎児（全胚）と胚様体の発現比較

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、初期中胚芽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がとらえられている(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、膈を対象としており、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、既知発生源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、“血液型を調べずして輸血していた時代”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Percollome法をさらに展開し、Percollome 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、森田絃一、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、相原紀佐子、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

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

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

別刷

秀潤社

細胞工学

CELL TECHNOLOGY

Vol.26 No.12 2007

## 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

① 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管業務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(後)医薬基礎研究所 基礎的研究部

## 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 (治療薬) 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<sup>1)~3)</sup>。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



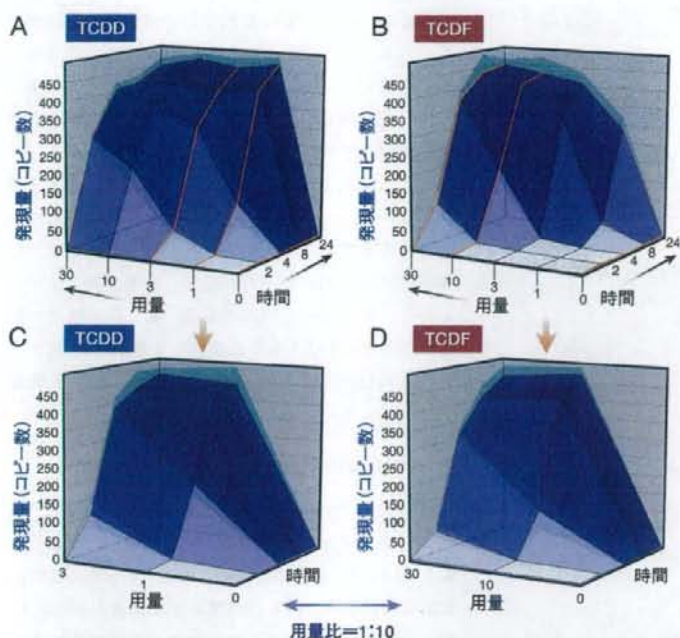


図1. TCDDとTCDFのPerclonomeデータ：  
TEF 依存遺伝子の抽出法 (1)

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。

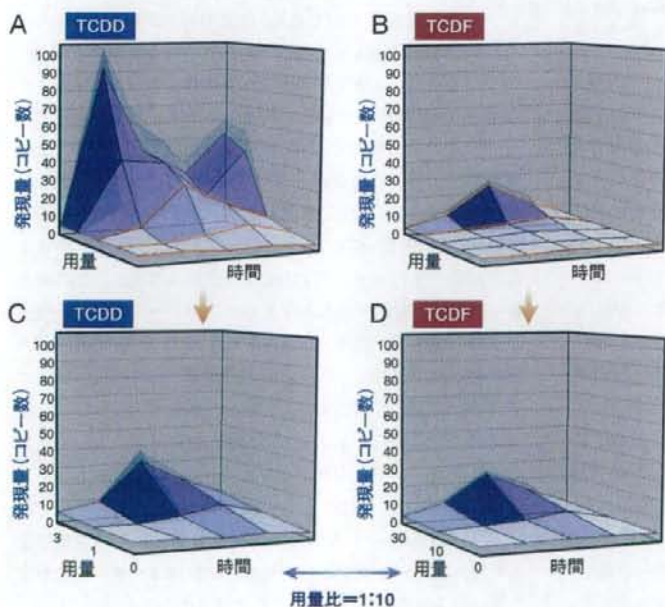


図2. TCDDとTCDFのPerclonomeデータ：  
TEF 依存遺伝子の抽出法 (2)

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, Perclonome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。



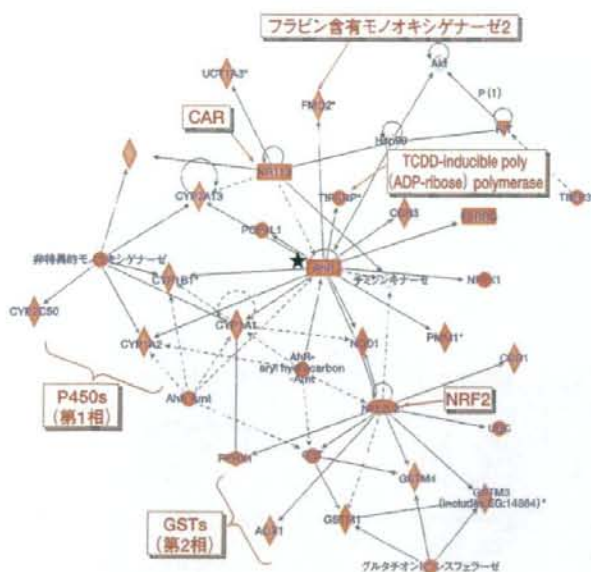


図3. TEF 依存遺伝子の描く Pathway

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<sup>注1</sup>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), 多穴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・発現値を三次元直行座標に置いた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のプロブ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(MADIC<sup>9</sup>)など)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<sup>9</sup>。

### 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。

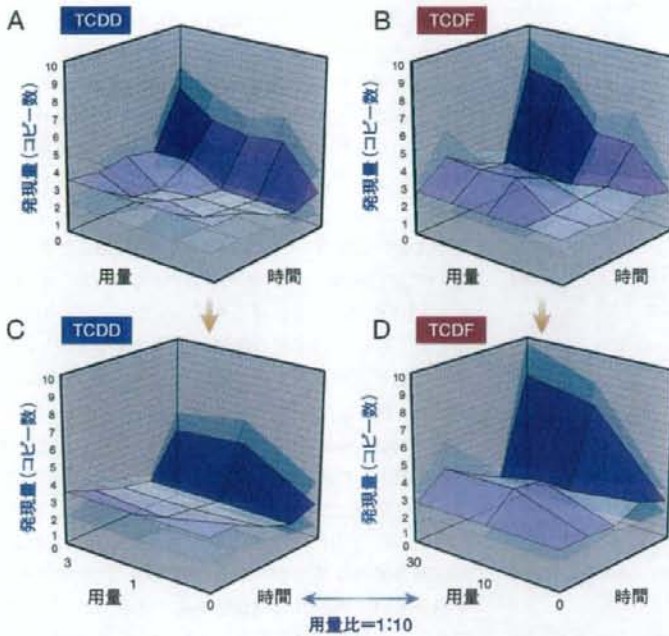


図4. TEF非依存遺伝子

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。

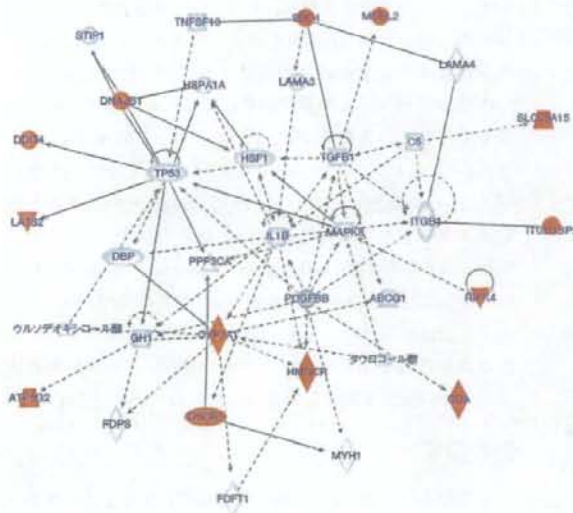


図5: TEF非依存遺伝子の描くPathway

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- $\beta$ , 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格納したもの。

factor)<sup>9</sup>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



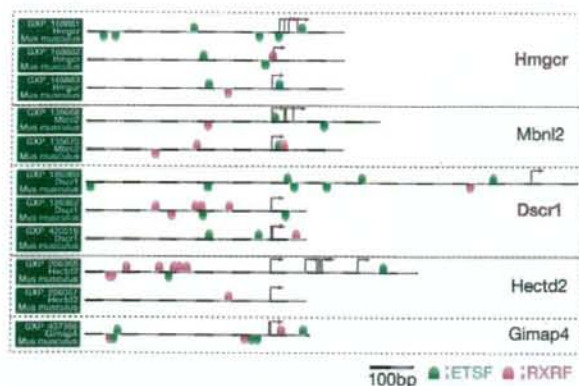


図6: TEF非依存遺伝子の *in silico* プロモーター解析

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RXRFファミリーの転写因子の結合配列を認めた。Hmgor: 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、リガンド分子個々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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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Perccellome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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群から成る3×5のSurfaceとTCDFの0, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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Nr2下流の第2相代謝酵素を中心に、AhRを中心としたPathwayの構成要素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(Genomatrix 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RXRF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), Hspa1a (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まだまだ途上にあり、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、Perccellome Projectの投与実験の組み合わせと、それらに対するPerccellome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、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、森田絃一、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、相原紀佐子、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



## 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が変わりはない。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<sup>1)</sup>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初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<sup>2)</sup>。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-

Measurements 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病部

が有意に増加していることを報告している<sup>3)</sup>。

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<sup>4)</sup>。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

## 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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、乾癆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

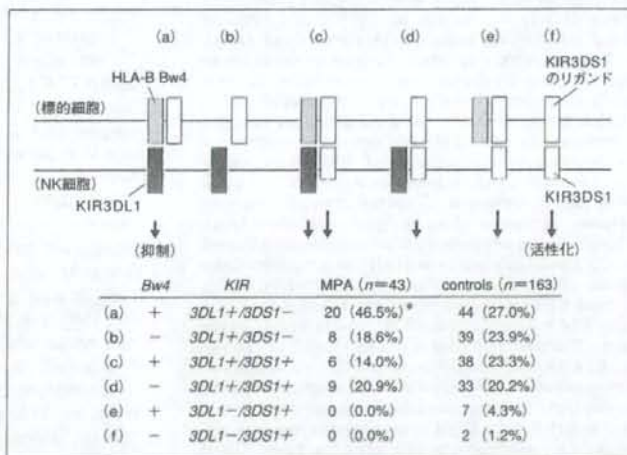


図 1 *MPA* および健常群における *HLA-B Bw4* と *KIR3DL1/3DS1* の組合せ

*KIR3DL1* は *HLA-B* アリルのうち約半数に存在する *Bw4* エピトープを有するアリル産物に反応する。*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リルであり、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。<sup>\*p=0.014 ( $\chi^2$  test), OR=2.35, 95% CI: 1.18-4.70</sup>



## IDENTIFICATION OF GENES THAT RESTRICT ASTROCYTE DIFFERENTIATION OF MIDGESTATIONAL NEURAL PRECURSOR CELLS

T. SANOSAKA,<sup>a</sup> M. NAMIHARA,<sup>a</sup> H. ASANO,<sup>a</sup> J. KOHYAMA,<sup>a</sup> K. AISAKI,<sup>b</sup> K. IGARASHI,<sup>b</sup> J. KANNO<sup>b</sup> AND K. NAKASHIMA<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Molecular Neuroscience, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5, Takayama, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

<sup>b</sup>Division of Cellular and Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institutes of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

**Abstract**—During development of the mammalian CNS, neurons and glial cells (astrocytes and oligodendrocytes) are generated from common neural precursor cells (NPCs). However, neurogenesis precedes gliogenesis, which normally commences at later stages of fetal telencephalic development. Astrocyte differentiation of mouse NPCs at embryonic day (E) 14.5 (relatively late gestation) is induced by activation of the transcription factor signal transducer and activator of transcription (STAT) 3, whereas at E11.5 (mid-gestation) NPCs do not differentiate into astrocytes even when stimulated by STAT3-activating cytokines such as leukemia inhibitory factor (LIF). This can be explained in part by the fact that astrocyte-specific gene promoters are highly methylated in NPCs at E11.5, but other mechanisms are also likely to play a role. We therefore sought to identify genes involved in the inhibition of astrocyte differentiation of NPCs at mid-gestation. We first examined gene expression profiles in E11.5 and E14.5 NPCs, using Affymetrix GeneChip analysis, applying the Perccellome method to normalize gene expression level. We then conducted *in situ* hybridization analysis for selected genes found to be highly expressed in NPCs at mid-gestation. Among these genes, we found that *N-myc* and high mobility group AT-hook 2 (*Hmga2*) were highly expressed in the E11.5 but not the E14.5 ventricular zone of mouse brain, where NPCs reside. Transduction of *N-myc* and *Hmga2* by retroviruses into E14.5 NPCs, which normally differentiate into astrocytes in response to LIF, resulted in suppression of astrocyte differentiation. However, sustained expression of *N-myc* and *Hmga2* in E11.5 NPCs failed to maintain the hypermethylated status of an astrocyte-specific gene promoter. Taken together, our data suggest that astrocyte differentiation of NPCs is regulated not only by DNA methylation but also by genes whose expression is controlled spatio-temporally during brain development. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding author. Tel: +81-743-72-5471; fax: +81-743-72-5479. E-mail address: kin@bs.naist.jp (K. Nakashima).

**Abbreviations:** bHLH, basic helix–loop–helix; BMP, bone morphogenetic protein; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CT-1, cardiotrophin-1; DIG, digoxigenin; E, embryonic day; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GEO, Gene Expression Omnibus; *gfap*, glial fibrillary acidic protein; *Hmga2*, high mobility group AT-hook 2; JAK, janus kinase; LIF, leukemia inhibitory factor; NPC, neural precursor cell; SSC, sodium chloride sodium citrate; STAT, signal transducer and activator of transcription.

**Key words:** *N-myc*, *Hmga2*, epigenetics, Perccellome method, differentiation.

The mammalian CNS is composed of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Although these three cell types are derived from common multipotent neural precursor cells (NPCs), their differentiation is spatially and temporally regulated during development (Temple, 2001). Fetal telencephalic NPCs divide symmetrically in early gestation to increase their own numbers, and then undergo neurogenesis through mostly asymmetric divisions. Toward the end of the neurogenic phase, NPCs acquire multipotentiality to generate astrocytes and oligodendrocytes as well as neurons. It has recently become apparent that NPC fate determination is controlled by both extracellular cues, including cytokine signaling, and intracellular programs such as epigenetic gene regulation (Edlund and Jessell, 1999; Takizawa et al., 2001; Hsieh and Gage, 2004).

Interleukin (IL) -6 family cytokines such as cardiotrophin-1 (CT-1), leukemia inhibitory factor (LIF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) activate the janus kinase (JAK)–signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway and are known to induce astrocyte differentiation of NPCs (Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998). Gene knockouts of LIF (Bugga et al., 1998), LIF receptor  $\beta$  (Koblar et al., 1998), the common receptor component gp130 (Nakashima et al., 1999a) and STAT3 (He et al., 2005) all result in impaired astrocyte differentiation *in vivo*, emphasizing the contribution of JAK-STAT signaling to astrogliogenesis in the developing CNS. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are another group of astrocyte-inducing cytokines. They synergistically induce astrocyte differentiation of NPCs via formation of a complex between STATs and BMP-activated transcription factor Smads, bridged by the transcriptional coactivators p300/CBP (Nakashima et al., 1999b).

In addition to these extracellular factors, intracellular programs and factors also play critical roles to regulate astrocyte differentiation of NPCs. We have previously shown that a CpG dinucleotide within a STAT3-binding element (TTCCGAGAA) in the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (*gfap*) gene promoter is highly methylated in NPCs at mid-gestation (embryonic day (E)11.5), when the cells differentiate only into neurons but not into astrocytes. Since STAT3 does not bind to the methylated cognate sequence, NPCs at mid-gestation do not express *gfap* even when stimulated by STAT3-activating cytokines such as LIF. As gestation proceeds, the STAT3-binding



site becomes gradually demethylated in NPCs, enabling them to express *gfap* in response to LIF stimulation (Takizawa et al., 2001). Thus, we have proposed that DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation during brain development. However, the important question of how this astrocyte-specific gene promoter becomes demethylated in NPCs remains unanswered.

Neurogenic basic helix–loop–helix (bHLH) transcription factors have been also shown to regulate astrocyte differentiation during early neural development. Mice carrying mutations in *mash1* and *math3* (Tomita et al., 2000), or, to a lesser extent, *mash1* and *ngn2* (Nioto et al., 2001) exhibit decreased neurogenesis and premature astrogliogenesis. Conversely, overexpression of neurogenic bHLH factors, either *in vivo* during the gliogenic period (Cai et al., 2000) or in cultured NPCs exposed to CNTF (Sun et al., 2001), promotes neurogenesis at the expense of astrogliogenesis. A possible mechanism underlying the repressive effect on astrogliogenesis is that Ngn1 binds to p300/CBP and sequesters them away from STAT3, thereby preventing STAT3 from activating astrocytic gene expression (Sun et al., 2001). Such a mechanism may ensure the restriction of astrocyte differentiation in NPCs that would otherwise differentiate into neurons under the influence of high-level neurogenic bHLH factor expression during the neurogenic period.

Although these studies have provided us with an integrated insight into the mechanism of neurogenic-to-gliogenic switching in NPCs, they do not preclude the involvement of other, as yet unknown, factors. To identify such factors, we first in this study examined gene expression profiles of mid- and late-gestational NPCs by Affymetrix GeneChip analysis, which is widely used to obtain a complete picture of developmental stage-specific gene expression (Abramova et al., 2005; Ajioka et al., 2006). We then performed *in situ* hybridization experiments to investigate the spatio-temporal expression pattern of genes that were found to be highly expressed in midgestational NPCs. Two genes, *N-myc* and high mobility group AT-hook 2 (*Hmga2*), were highly expressed in the ventricular zone of E11.5 but not of E14.5 mouse brain. Transduction of *N-myc* and *Hmga2* into E14.5 NPCs resulted in suppression of astrocyte differentiation, even in the presence of LIF. However, the prolonged expression of these genes in E11.5 NPCs failed to preserve the hypermethylated status of the astrocyte-specific *gfap* promoter. These results suggest that the inhibition of astrocyte differentiation in midgestational NPCs is regulated not only by DNA methylation of astrocyte-specific gene promoters but also by transcription-regulating factors whose expression is controlled spatio-temporally during brain development.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### NPC culture

Timed-pregnant ICR mice were used to prepare NPCs. The protocols described below were carried out according to the animal experimentation guidelines of Nara Institute of Science and

Technology that comply with National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. NPCs were prepared from telencephalons of E11.5 and E14.5 mice and cultured as described previously (Nakashima et al., 1999b). Briefly, the telencephalons were triturated in Hanks' balanced salt solution by mild pipetting with a 1-ml pipet tip (Gilson, Middleton, WI, USA). Dissociated cells were cultured in N2-supplemented Dulbecco's Modified Eagle's Medium with F12 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) containing 10 ng/ml basic FGF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (N2/DMEM/F12/bFGF) on culture dishes (Nunc, Naperville, IL, USA) or chamber slides (Nunc) which had been precoated with poly-L-ornithine (Sigma, St. Louis, MO, USA) and fibronectin (Sigma).

### Immunocytochemistry

E11.5 and E14.5 NPCs cultured on coated chamber slides were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, and stained with the following primary antibodies: rabbit anti-SOX2 (1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA), mouse anti- $\beta$ -III-tubulin (1:500, Sigma), rabbit anti-GFAP (1:2000, Dako, High Wycombe, UK). The following secondary antibodies were used: Alexa488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500, Chemicon). Nuclei were stained using bisbenzimidazole H33258 fluorochrome trihydrochloride (Nacal Tesque, Kyoto, Japan). All experiments were independently replicated at least three times.

### Sample preparation and GeneChip analysis

These procedures were conducted according to the Percellome method (Kanno et al., 2006) to normalize mRNA expression values to sample cell numbers by adding external spike mRNAs to the sample in proportion to the genomic DNA concentration and utilizing the spike RNA quantity data as a dose-response standard curve for each sample. Cells cultured on coated dishes were washed with PBS, lysed in 500  $\mu$ l of RLT buffer (Qiagen K.K., Tokyo, Japan) and transferred to a 1.5-ml tube. Two separate 10- $\mu$ l aliquots were treated with DNase-free RNase A (Nippon Gene, Tokyo, Japan) for 30 min at 37 °C, followed by proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 3 h at 55 °C, and then transferred to a 96-well black plate. PicoGreen fluorescent dye (Molecular Probes) was added to each well, and then incubated for 2 min at 30 °C. The DNA concentration was measured using a 96-well fluorescence plate reader with excitation at 485 nm and emission at 538 nm. Lambda phage DNA (PicoGreen kit, Molecular Probes) was used as standard. The appropriate amount of spike RNA cocktail was added to the sample homogenates in proportion to their DNA concentration. Five independent *Bacillus subtilis* poly-A RNAs were included in the grade-dosed spike cocktail. Total RNAs were purified using an RNeasy Mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were synthesized by incubating 5  $\mu$ g of total RNA with 200 U SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 100 pmol T7-(dT)<sub>24</sub> primer [5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)<sub>24</sub>-3']. After second-strand synthesis, the double-stranded cDNAs were purified using a GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix, Washington, DC, USA), according to the manufacturer's instructions, and labeled by *in vitro* transcription using a BioArray HighYield RNA transcript labeling kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). The labeled cRNA was then purified using a GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) and treated with fragmentation buffer at 94 °C for 35 min. For hybridization to a GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix), 15  $\mu$ g of fragmented cRNA probe was incubated with 50 pM control oligonucleotide B2, 1 $\times$  eukaryotic hybridization control (1.5 pM BioB, 5 pM BioC, 25 pM BioD and 100 pM Cre), 0.1 mg/ml herring sperm



DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA and 1× manufacturer-recommended hybridization buffer in a 45 °C rotisserie oven for 16 h. Washing and staining were performed in a GeneChip Fluidics Station (Affymetrix) using the appropriate antibody amplification, washing and staining protocols. The phycoerythrin-stained arrays were scanned as digital image files, which were analyzed with GeneChip Operating Software (Affymetrix). The expression data were converted to copy numbers of mRNA per cell by the PerCellome method, quality controlled, and analyzed using PerCellome software (Kanno et al., 2006). The GeneChip data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and is accessible through GEO series accession number GSE 10796.

### Quantitative real-time RT-PCR

Quantitative real-time PCR was performed to confirm the results of GeneChip analysis. RNAs from E11.5 and E14.5 NPCs were reverse transcribed using Superscript II (Invitrogen) and amplified by PCR, with a specific pair of primers for each gene, using the Mx3000P system (Stratagene, La Jolla, CA, USA). The expression of target genes was normalized to that of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). The gene-specific primers were as follows: mouse *N-myc*: *N-myc*-S, 5'-aacatgctgacccct-cacc-3'; *N-myc*-AS, 5'-tagcaagtcgagcgtgttc-3'; mouse *Hmga2*: *Hmga2*-S, 5'-ggcagcctccacatcag-3'; *Hmga2*-AS, 5'-taatcctctct-gcggactc-3'; mouse *Sox11*: *Sox11*-S, 5'-gagcctgacgacgaagtc-3'; *Sox11*-AS, 5'-tgaacaccaggtggagaag-3'; mouse *Bhlhb5*: *Bhlhb5*-S, 5'-gttgccctcaacatcaac-3'; *Bhlhb5*-AS, 5'-actttgca-gaggtggac-3'; mouse *Bcl11a*: *Bcl11a*-S, 5'-gcatcaagctggagaag-gag-3'; *Bcl11a*-AS, 5'-gagcttccatccgaaactg-3'; mouse *Gapdh*: *Gapdh*-S, 5'-accacagtcctgcatcacc-3'; *Gapdh*-AS, 5'-tccaccac-ctgttgcctga-3'.

### In situ hybridization

Digoxigenin- (DIG; Roche) labeled cRNA probes were synthesized for each gene, following the manufacturer's instructions. Cryosections were washed with PBS and fixed with 4% PFA. After fixation, sections were incubated in prehybridization solution (5× sodium chloride sodium citrate (SSC), 1% SDS, 50 µg/ml yeast transfer RNA, 50 µg/ml heparin in 50% formamide) at 70 °C for 1 h and hybridized with 500 ng/ml of DIG-labeled cRNA probes at 65 °C for 16 h. After three washes with wash solution 1 (5× SSC, 1% SDS in 50% formamide) and wash solution 2 (2× SSC in 50% formamide), sections were blocked with 10% normal sheep serum in TBST at room temperature for 1 h and then incubated with 1:1000 alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche) at 4 °C for 16 h. After four washes with TBST, hybridized probes were visualized with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate and nitro blue tetrazolium chloride.

### Recombinant retrovirus construction and infection

Human *N-myc* and mouse *Hmga2* cDNAs were cloned into the expression vector pMYs, which contains an internal ribosome entry site followed by the region upstream of the *EGFP* gene (Morita et al., 2000). The Plat-E packaging cell line was transiently transfected with the retrovirus DNA by Trans-IT 293 (Mirus, Madison, WI, USA) (Morita et al., 2000). On the following day, the medium was replaced with N2/DMEM/F12/bFGF, and the cells were cultured in this medium for 1 day before virus was collected.

### Fluorescence activated cell sorting

Virus-infected E11.5 NPCs were cultured for 4 days, after which GFP-labeled cells were sorted using a FACS Vantage (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at a flow rate of less than 1500 events/s; gating parameters were set by side and forward

scatter to eliminate debris, dead and aggregated cells. After sorting, genomic DNA was extracted and used for bisulfite sequencing.

### Bisulfite sequencing

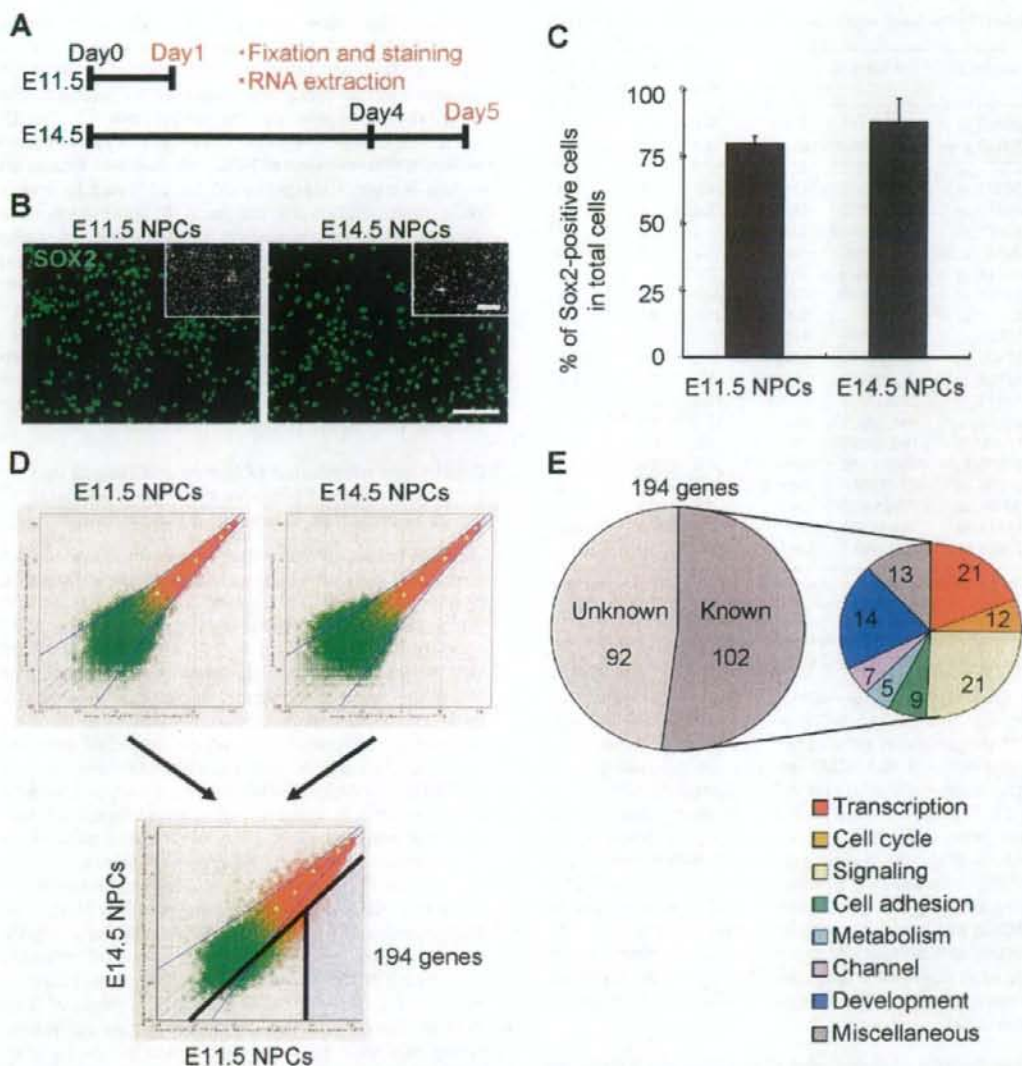
Sodium bisulfite treatment of genomic DNA was performed using a Methylamp DNA Modification kit (Epigentek, Brooklyn, NY, USA), according to the manufacturer's instructions. The region in the *gfap* promoter containing the STAT-binding site of the bisulfite-treated genomic DNA was amplified by PCR using the following primers: GFmS (5'-GGGATTTATTAGGAGAATTTAGAAGTAG-3'), GFmAS (5'-TCTACCATACTTAAACTTCTAATATCTAC-3'). The PCR products were cloned into pT7Blue vector (Novagen, Madison, WI, USA) and at least 12 randomly selected clones were sequenced.

## RESULTS

### Preparation of NPCs from different developmental stages and comparison of their gene expression profiles by GeneChip analysis

E11.5 NPCs do not differentiate into astrocytes, even in the presence of the astrocyte-inducing cytokine LIF, in contrast to 4-day cultured E14.5 NPCs (Takizawa et al., 2001). As a first step toward identifying factors involved in the inhibition of astrocyte differentiation of NPCs at mid-gestation, we examined the gene expression profiles of E11.5 and E14.5 NPCs.

E11.5 and E14.5 NPCs were isolated from embryonic telencephalon and cultured as indicated in Fig. 1A. To evaluate the purity of NPCs in each cell population, the cells were stained with antibody against SOX2, an NPC marker (Graham et al., 2003). As shown in Fig. 1B and C, the majority of cells in both populations were positive for SOX2, indicating that NPCs were highly enriched. An Affymetrix mouse genome GeneChip array was chosen to compare expression profiles in the two populations, and we adopted the PerCellome method to normalize gene expression from different samples (Kanno et al., 2006). The method enabled us to quantify mRNA molecules per cell based on the measurement of cell by adding a grade-dosed spike cocktail to the samples. We excluded genes whose transcript copy number was below six per cell. Scatter plots illustrating the differences between E11.5 and E14.5 NPCs are shown in Fig. 1D; 194 genes were expressed at >fivefold higher level in E11.5 NPCs than in E14.5 NPCs (Fig. 1D, light blue zone). Of these, 102 were known genes, and were classified by functional category (Fig. 1E). Since we wished to identify negative regulators of astrocyte differentiation, or factors involved in the epigenetic modification in midgestational NPCs, we focused on transcription-related genes (Fig. 1E, red). These 21 genes are listed in Table 1, and five (*N-myc*, *Hmga2*, *Bhlhb5*, *Sox11*, *Bcl11a*) were selected for further analysis because they have been reported to play roles in cell growth, differentiation, and chromatin remodeling in other types of stem cells (Sawai et al., 1990; Zhou et al., 1995; Saiki et al., 2000; Knoepfner et al., 2002; Brunelli et al., 2003; Sock et al., 2004).



**Fig. 1.** Comparison of gene expression profiles in E11.5 and E14.5 NPCs. (A) Schematic of experimental protocol. NPCs isolated from E11.5 mouse telencephalon were plated (day 0) and used on the following day for immunostaining and RNA extraction (day 1). NPCs isolated at E14.5 were expanded for 4 days and replated on day 4. On day 5, these cells were fixed for immunostaining. RNA was also extracted. (B) E11.5 and E14.5 NPCs were stained with antibody against Sox2 (green). Scale bar=25  $\mu$ m. Insets: Hoechst nuclear staining of each field. Scale bar=25  $\mu$ m. (C) The percentage of Sox2-positive cells in E11.5 and E14.5 NPCs was quantified. Mean $\pm$ S.D. (D) Scatter plots of E11.5 (upper left) and E14.5 (upper right) samples obtained from GeneChip analysis indicated no significant change between independent experiments with the same sample. Overview (lower plot) of gene expression change was compared between each sample. One hundred ninety-four genes were expressed at >fivefold higher level in E11.5 NPCs than E14.5 NPCs (light blue zone). (E) Of the 194 genes that were highly expressed in E11.5 NPCs, known genes were classified according to Affymetrix gene ontology. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.



**Table 1.** Transcription-related genes highly expressed in E11.5 NPCs

Probe set ID	GenBank ID	Gene symbol	E11.5 NPCs	E14.5 NPCs	E11.5/E14.5
1433919_at	AV302111	<i>Asb4</i>	9.8	0.5	19.6
1419406_a_at	NM_016707	<i>Bcl11a</i>	13.8	1.8	7.7
1418271_at	NM_021560	<i>Bhlhb5</i>	10.6	1.2	8.8
1452207_at	Y15163	<i>Cited2</i>	16.7	2.6	6.4
1449470_at	NM_010053	<i>Dlx1</i>	13.8	2.4	5.8
1448877_at	NM_010054	<i>Dlx2</i>	9.8	1.8	5.4
1449863_a_at	NM_010056	<i>Dlx5</i>	11.2	0.7	16.0
1459211_at	AW546128	<i>Gli2</i>	8.0	1.5	5.3
1456067_at	AW546010	<i>Gli3</i>	20.6	2.1	9.8
1422851_at	X58380	<b>Hmga2</b>	25.5	0.5	51.0
1450723_at	BQ178915	<i>Ils1</i>	8.6	0.1	86.0
1427300_at	D49658	<i>Lhx8</i>	10.5	0.1	105.0
1417155_at	BC005453	<b>N-myc</b>	8.2	1.2	6.8
1415811_at	BB702754	<i>NP95</i>	12.6	2.1	6.0
1421193_a_at	NM_016768	<i>Pbx3</i>	12.3	1.6	7.7
1417400_at	NM_030690	<i>Rai14</i>	11.0	1.6	6.9
1435856_x_at	AV310148	<i>Smarcb1</i>	8.0	1.6	5.0
1431255_at	BB656631	<b>Sox11</b>	38.7	6.2	6.2
1450034_at	AW214029	<i>Stat1</i>	9.6	1.8	5.3
1416711_at	NM_009322	<i>Tbr1</i>	9.8	0.2	49.0
1423424_at	BB732077	<i>Zic3</i>	11.2	0.5	22.4

Genes reported to participate in cell growth, differentiation and chromatin remodeling are shown in boldface.

#### Spatio-temporal expression patterns of genes highly expressed in E11.5 NPCs

To substantiate the GeneChip results, we extracted RNA from E11.5 and E14.5 NPCs and performed real-time RT-PCR using specific primers for each selected gene. Consistent with the GeneChip analysis, all five genes were highly expressed in E11.5 NPCs compared with E14.5 NPCs (Fig. 2A). We next performed *in situ* hybridization for each gene using E11.5, E14.5 and E17.5 mouse brain sections (Fig. 2B). *N-myc* and *Hmga2* mRNAs were specifically detected in the ventricular zone (VZ) of E11.5 brain, implying that *N-myc* and *Hmga2* play some role in NPCs at this stage. By contrast, *Bhlhb5*, *Sox11* and *Bcl11a* expression was stronger in cortical plate, where postmitotic neurons reside, than in the VZ (Fig. 2B). We therefore decided to analyze the function of *N-myc* and *Hmga2* in more detail.

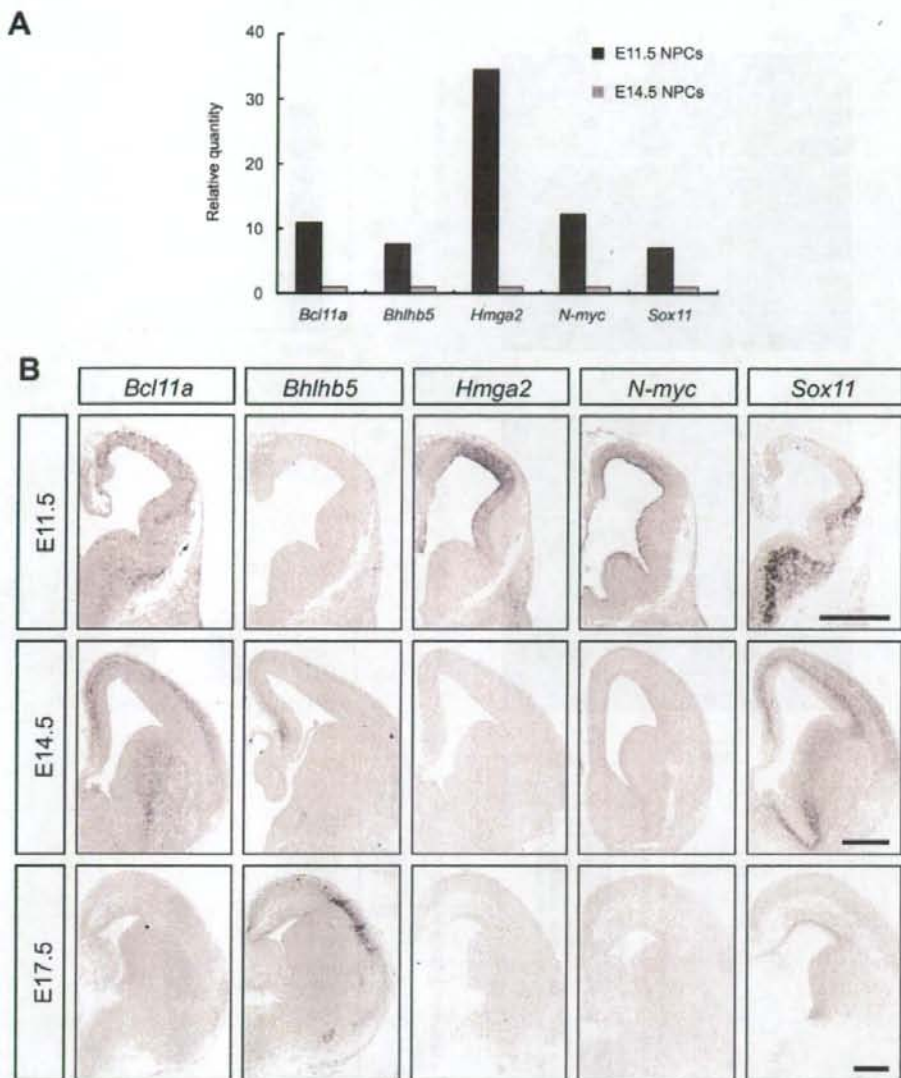
#### Transduction of *N-myc* and *Hmga2* inhibits astrocyte differentiation of E14.5 NPCs

We next examined whether *N-myc* and *Hmga2* affect astrocyte differentiation of NPCs. We expressed EGFP alone (control), and EGFP together with either *N-myc* or *Hmga2*, using retroviral infection in E14.5 NPCs, in which expression of the endogenous genes is very low. Virus-infected E14.5 NPCs were cultured for 4 days in the presence of LIF to induce astrocyte differentiation, and then stained with antibodies against GFP and GFAP. As shown in Fig. 3A and B, NPCs infected with control virus effectively differentiated into GFAP-positive astrocytes in response to LIF stimulation ( $42 \pm 2.6\%$ ). In contrast, GFAP-positive astrocyte differentiation was virtually abolished in cells ec-

topically expressing *N-myc* ( $0.5 \pm 0.4\%$ ) and *Hmga2* ( $3 \pm 2.0\%$ ) (Fig. 3A, B). Expression of these genes did not significantly affect neuronal differentiation of NPCs, as assessed by monitoring expression of the neuronal marker  $\beta$ III-tubulin, compared with the control cells (Fig. 3C, D). We further examined whether the observed suppression of astrocyte differentiation of NPCs infected with viruses encoding *N-myc* or *Hmga2* could be attributed to specific cell-growth inhibition or to cell death. To address this issue, we performed immune staining for the cycling cell marker Ki67 and the apoptotic marker cleaved caspase 3. Although proliferation of NPCs ectopically expressing *N-myc* or *Hmga2* appeared to be slightly enhanced, expression of either gene caused negligible cell death. These results suggest that *N-myc* and *Hmga2* inhibit astrocyte differentiation of NPCs by a mechanism distinct from that of the neurogenic bHLH factors, which enhance neuronal differentiation (Sun et al., 2001).

#### Continuous expression of *N-myc* and *Hmga2* in E11.5 NPCs fails to preserve the hypermethylated status of an astrocyte-specific gene promoter

We have previously shown that the *gfap* promoter is highly methylated in E11.5 NPCs, and becomes demethylated as gestation proceeds (Takizawa et al., 2001). This demethylation enables NPCs at later developmental stages, E14.5 or thereafter, to respond to LIF and differentiate into GFAP-positive astrocytes. As shown in the foregoing data, expression levels of *N-myc* and *Hmga2* thus seemed to be reduced concurrently with the developmental stage-dependent demethylation of an astrocyte-specific gene promoter; furthermore, ectopic expression of these genes in E14.5 NPCs inhibited GFAP-positive astrocyte differentiation. We therefore hypothesized that sustained expression of *N-myc* and *Hmga2* in E11.5 NPCs might maintain the hypermethylated status of the *gfap* promoter. To test this, we infected E11.5 NPCs with viruses expressing EGFP alone and EGFP together with either *N-myc* or *Hmga2* and cultured them for 4 days. GFP-positive cells were sorted by FACS and their genomic DNAs were extracted for bisulfite sequencing. As observed in the previous study (Takizawa et al., 2001), the *gfap* promoter including the STAT3 site became demethylated to about 65% in control virus-infected cells after the 4-day culture, and this was also the case for both *N-myc*- and *Hmga2*-expressing virus-infected cells (Fig. 3E, F). These results indicate that sustained expression of *N-myc* and *Hmga2* in E11.5 NPCs does not affect the process of demethylation in this astrocyte-specific gene promoter. On the other hand, when 4-day-cultured control virus-infected E11.5 NPCs were then stimulated with LIF for an additional 4 days, GFAP-positive astrocytes appeared, probably due to demethylation in the promoter, whereas neither *N-myc* nor *Hmga2* virus-infected cells gave rise to astrocytes even in the presence of LIF (data not shown). These results suggest that *N-myc* and *Hmga2* inhibit precocious astrocyte differentiation of midgestational NPCs independent of the DNA methylation status of an astrocyte-specific gene promoter.



**Fig. 2.** *N-myc* and *Hmga2* are highly expressed in the VZ of E11.5 mouse brain. (A) Gene-specific real-time RT-PCR was performed to validate GeneChip analysis data. (B) *In situ* hybridization was performed for E11.5, E14.5 and E17.5 mouse brain sections. No signal was detected when sense-probes for each gene were used (data not shown). Scale bar=500  $\mu$ m.

## DISCUSSION

In this study, we compared NPC gene expression profiles at different developmental stages using Affymetrix GeneChips and the Percellome method, and then analyzed by *in situ* hybridization the spatio-temporal expression patterns of genes which were highly expressed in E11.5 NPCs. We found that *N-myc* and *Hmga2* were specifically expressed in E11.5 NPC both *in vivo* and *in vitro* and,

furthermore, that the transduction of these genes into NPCs suppressed LIF-induced astrocytic differentiation without affecting DNA demethylation of the astrocyte-specific *gfap* gene promoter.

The basic HLH leucine zipper transcription factor *N-myc*, a member of the *myc* family of oncogenes, is a nuclear phosphoprotein exhibiting site-specific DNA-binding activity (Ramsay et al., 1986; Alex et al., 1992), and has