

学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

C. 研究結果

8-10 週齢の妊娠 NFS/sld マウス(3 日目、15 日目)及び非妊娠マウスに TCDD(100、1000ng/Kg 体重)を腹腔内投与した後、妊娠マウスに関しては出産、授乳、離乳後6ヶ月齢にて解析した。非妊娠マウスにおいても6ヶ月齢にて解析した。

1) 病理組織学的変化

全身諸臓器について固定後、有機溶媒に浸染したのち組織切片を作成して病理組織学的検討を実施した。その結果、唾液腺(顎下腺)を中心に妊娠群の TCDD 投与により炎症性病変が認められ、特に妊娠 15 日目(後期)の投与にてその病変は顕著に認められた。妊娠後期に TCDD を投与されたマウスの唾液腺組織では導管周囲性に単核リンパ球の浸潤像が認められたのに対し、対照群である非妊娠マウスへの TCDD 投与群、妊娠マウスへの基剤であるオリーブオイル投与群において有意な炎症性病変は認められなかった(図 1、2)。他の臓器に関してはそれぞれの群で肺、腎、肝にごく軽度のリンパ球の浸潤像が認められたが TCDD 投与による有意な所見ではなかった。

2) T 細胞への TCDD 投与による影響

TCDD の投与による T 細胞への影響について明らかにするため、脾細胞、胸腺細胞を分散し、フローサイトメトリーによる解析を実施した。脾臓において、非妊娠群、妊娠群ともに TCDD の投与により CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の分画に変化は無かった(図 3)。胸腺において、非妊娠群で高濃度の TCDD 投与により CD4 シングル陽性 T 細胞への分化がやや減少していた、一方で、妊娠群では初期での TCDD 投与により CD4 シングル陽性 T 細胞の分化が促進していることが明らかとなった(図 3)。また、妊娠後期での TCDD 投与により大きな変化は各分画において

認められなかった(図 3)。

3) TCDD 投与によるサイトカインの産生への影響

TCDD の投与による T 細胞のサイトカイン産生能への影響を知るために、抗 CD3 抗体による *in vitro* での刺激で脾臓の T 細胞から分泌されたサイトカインに関して培養上清を用いて ELISA 法にて定量化した。妊娠初期及び後期に TCDD を投与した群において、IL-2 の産生が TCDD の投与により増加していることが判り、非妊娠マウスへの TCDD 投与では IL-2 の産生上昇は確認されず、逆に 1000ng/kg 投与により IL-2 の産生は低下していた(図 4)。IFN- γ に関しては妊娠後期への TCDD 投与により産生上昇が認められたが、妊娠初期投与群、非妊娠群では TCDD の影響は認められなかった(図 4)。また、TCDD 非投与群を比較すると、妊娠群で非妊娠群よりも IFN- γ の産生が増加していることが判った(図 4)。一方で、Th2 サイトカインである IL-4 及び IL-10 の産生に関しては TCDD による影響は観察されなかったものの、IL-4 に関しては妊娠によって産生が増加していることが確認された。

4) TCDD 投与による末梢 T 細胞のサイトカイン制御分子への影響

妊娠後期への TCDD 投与により Th1 型のサイトカインの産生が増加していたことから、Th1、Th2 サイトカイン産生を制御することが知られている転写因子である T-bet、GATA-3 及び NF- κ B に関して各群の脾臓における T 細胞での各分子の mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量化した。各分子の mRNA 発現は b-actin の mRNA 発現に対する相対的な数値で評価された。Th1 型サイトカインを調節することが知られている T-bet に関しては妊娠後期に TCDD 投与された群で、明らかに発現増強が確認された(図 5)。さらに、それらのサイトカインの転写活性に重要である NF- κ B に関しても、妊娠後期での TCDD 投与群にて、T-bet と同様に投与濃度依存的に有意な上昇が認められた(図 5)。Th2 型サイトカインを調節することが知られている GATA-3 に関しては妊娠

後期 TCDD 投与群で発現の低下傾向が認められた。妊娠初期投与群、非妊娠投与群においては GATA-3、T-bet、NF- κ B の mRNA 発現は影響が認められなかった(図5)。

5) 胸腺での自己抗原制御への TCDD の影響

TCDD による胸腺への影響として、胸腺における自己抗原の発現を制御している AIRE の発現に関し、各群の胸腺組織を用いて解析した結果、妊娠後期に TCDD の投与により AIRE の mRNA 発現が有意に低下していることが判明した(図6)。妊娠初期及び非妊娠投与群においては AIRE の発現に大きな変化は認められなかった。さらに、代表的な自己抗原の mRNA 発現に関して検討したところ、唾液腺抗原として知られている SP-1 に関して、妊娠後期群で TCDD の投与により、AIRE の発現パターンと一致して、低下していることが明らかになった(図7)。他の自己抗原である GAD67、Insulin に関しては各群で TCDD による影響は確認されなかった。Insulin に関しては妊娠両群で非妊娠群に比較して有意に発現が低下していることが確認された(図7)。

D. 考察

平成 18 年度までに NFS/*sld* マウスの新生仔期でのダイオキシン投与により、唾液腺を中心とした炎症性病変が誘導されることを確認した。昨年度の実験では、TCDD 暴露による母体側の免疫系への影響を検討した。その結果、妊娠後期の母体に TCDD が暴露されることにより、唾液腺に炎症性病変が誘導された。しかし、妊娠前期での TCDD 投与では炎症性病変は誘導されなかった。また、非妊娠マウスに TCDD を投与しても炎症性病変は確認されなかった。今年度はこの実験の再現性を確認するとともに、炎症性病変の発症機序に関して詳細な検討を行った。

妊娠後期では出産を控え母体側で様々なホルモンの変化が起こっているものと想定される。その時期に TCDD が投与されることにより内分泌系に大きな影響が生じる可能性がある。平成 18 年度までの研究により妊娠 15 日目に TCDD を母体側に投与しても、出産された仔マウスに関し

ては免疫系に大きな影響は観察されず、自己免疫性病変も確認されなかった。TCDD 投与後、出産、育児を終え6ヶ月齢になると唾液腺に限局した自己免疫性病変が確認された。妊娠後期の母体の免疫系に関しては報告が少なく、具体的な免疫機能異常に関しては知られていない。出産後の母体の胸腺に関しては著しく萎縮していることは知られているものの免疫疾患との関連は不明な点が多い。本研究では前期での TCDD 投与よりも後期での投与にて強い病変が誘導されたことから、妊娠後期の母体側の免疫系への TCDD の影響が大きかったものと考えられる。末梢 T 細胞の細胞数や分画に対する TCDD 投与による影響はほとんど無かったが、サイトカインの産生能に関しては病変が目立った妊娠後期 TCDD 投与による影響が顕著に見られ、IL-2、IFN- γ といった Th1 型のサイトカイン産生の亢進が認められた。このことは平成18年度まで行っていた新生仔マウスへの TCDD 投与による自己免疫性病変の誘導に関する研究においても、Th1 型へのサイトカイン産生のシフトが見られ、末梢 T レランズ破綻に共通の分子機序が存在する可能性が示された。本年度の研究で、末梢 T 細胞の T-bet の mRNA が TCDD 投与により増加していたことは Th1 型サイトカイン産生のスイッチングに重要である T-bet の発現に TCDD が周産期の内分泌変化を介して大きく影響していることが示された。また、IL-2、IFN- γ の転写を直接調節する NF- κ B の TCDD による発現亢進に関して何らかの重大な影響があることを示唆している。

新生仔期の TCDD 投与では NFS/*sld* マウスの生後 3 日目までの胸腺細胞における TCDD のレセプターである AhR の発現が上昇していることが TCDD の反応性を増強させていた可能性があるが、今年度の実験では 6 ヶ月齢時点での胸腺細胞、末梢免疫細胞における AhR の発現に関しては各群で有意な変化は認められなかった。ただ、母体側の胸腺組織における AIRE の発現が妊娠後期の TCDD 投与により有意に低下していたことは、胸腺における自己抗原の発現を制御出来なくなってしまっているものと考えられる。

さらに、唾液腺抗原として知られている SP-1 の発現に関しても AIRE と同様に妊娠後期の TCDD 投与により低下していた。このことは胸腺組織で自己の抗原タンパクが正常に発現されなくなると胸腺における T 細胞の負の選択が正常に行われなくなり、末梢に自己反応性 T 細胞を発生させてしまう可能性が高くなることを示している。AIRE 遺伝子の欠損マウスでは唾液腺をはじめ様々な臓器に自己免疫性病変が生じることがすでに報告されていることから、TCDD の反応が AIRE に何らかの影響を与えていることが示唆された。

TCDD は細胞内のレセプター(AhR)と結合し、核内に移行した後、AhR nuclear translocator (ARNT)と複合体を形成し、プロモーター領域に Xenobiotic response elements(XRE) を有する標的遺伝子の転写調節をすることが知られている。また、その標的遺伝子には NF- κ B などのサイトカインの調節に重要な遺伝子も含まれており、TCDD のサイトカイン産生制御機構が存在することが考えられる。妊娠後期になぜ TCDD が免疫系に大きく影響を及ぼすのかはまだ不明な点が多いが、妊娠期の終了する時期に免疫システムに何らかの大きな変化が生じているものと考えられる。TCDD が胸腺における AIRE による自己抗原発現の調節機構に重大な影響を及ぼしていると想定されるが、現在のところ TCDD のシグナル機構に AIRE が関与しているという報告はない。妊娠期にはエストロゲン、プロゲステロンなど性ホルモンの変動が激しく観察される。内分泌かく乱物質である TCDD がそれらのホルモン類の機能に障害を及ぼす作用が免疫系に波及したものと考えられるが、直接的な根拠はまだ明らかにされていない。

今後、さらに詳細な分子機序を明らかにすることにより、周産期における内分泌かく乱物質の影響に関して有益な情報を提供できるものと考えられる。

E. 結論

シェーグレン症候群疾患モデル NFS/*sld* 雌マウスを用いて内分泌かく乱化学物質としてダイオ

キシ TCDD を妊娠後期に投与した結果、妊娠後期を経て6ヶ月齢に胸腺での AIRE の発現異常、T 細胞のサイトカイン分泌異常が認められ、唾液腺に激しい炎症性病変が観察された。

F. 健康危険情報

現在の時点で該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arakaki R, Nagaoka A, Ishimaru N, Yamada A, Yoshida S, and Hayashi Y : Role of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) for aberrant class II expression in the exocrine glands from estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol* in press, 2009
- 2) Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S, and Hayashi Y : Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Exp Med* 205, 2915-2927, 2008
- 3) Hikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, Yano K, Ishimaru N, Hayashi Y, Matsumoto M, Matsuo K, Penninger JM, Takayanagi H, Yokota Y, Yamada H, Yoshikai Y, Inoue J, Akiyama T, Takahama Y. RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity* 29, 438-450, 2008
- 4) Ishimaru N, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Takahashi T, Izumi K, and Hayashi Y : Development of inflammatory bowel disease (IBD) in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats based on CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell dysfunction. *J Immunol* 180, 6997-7008 2008
- 5) Kinouchi N, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanimoto Y, Moriyama K, and Noji S : Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting saran increase skeletal muscle mass. *Gene Ther* 15, 1126-1130 2008
- 6) Kohashi M, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y : Effective treatment with oral administration of rebamipide in a mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 58, 389-400, 2008

7) 石丸直澄、林良夫: ダイオキシンによる免疫異常 **臨床免疫・アレルギー科 リウマチ科** 51, 60-65, 2009

2. 学会発表

- 1) 自己免疫病と性差 日本病理学会会誌、97 巻第1号 p.170 2008
- 2) I型糖尿病モデルマウスにおけるカテプシン L 阻害剤を用いた治療学的解析 日本病理学会会誌、97 巻第1号 p.266, 200
- 3) エストロジェン欠乏による外分泌腺上皮クラス II 発現の誘導メカニズム 日本病理学会会誌、97 巻第1号 p.322, 2008
- 4) I型糖尿病モデルマウスにおけるカテプシン L 阻害剤を用いた治療学的解析 日本免疫学会総会学術集会記録、38 巻 p.93, 2008
- 5) 低用量 TCDD の新生児期投与による自己免疫病変の誘導 日本免疫学会総会学術集会記録、38 巻 p.97, 2008
- 6) エストロジェン欠乏によって唾液腺組織に発現増強される CD11c+B220+樹状細胞の同定とその機能解析 日本免疫学会総会学術集会記録、38 巻

p.97, 2008

7) Analysis of RANKL and Fas signaling through NF- κ B in dendritic cell activation in murine autoimmune arthritis models. 日本免疫学会総会学術集会記録、38 巻 p.176, 2008

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

本年度該当なし

図説明

図-1 妊娠後期における TCDD 投与による唾液腺での炎症性病変の誘導

妊娠後期での TCDD 投与群 (1000 ng/kg) の唾液腺組織における炎症性病変を示す。導管周囲性にリンパ球の浸潤像が認められる。対照群として妊娠後期での基剤投与群の唾液腺組織を示す (ヘマトキシリンエオジン染色)。

図-2 唾液腺組織における炎症性病変の病理組織学的評価

各群の唾液腺組織に関して病理組織学的評価を示す。各群 6 - 8 匹のマウスの平均値 ± SD を示す。

図-3 TCDD 投与による脾臓及び胸腺での T 細胞分画

各群の脾臓及び胸腺における CD4/CD8 の T 細胞分画に関してフローサイトメーターにて解析した。脾臓に関しては各群ともに TCDD の大きな影響は観察されない。妊娠初期に TCDD 投与により、胸腺の CD4 シングルポジティブへの分化が増加傾向にある。

図-4 サイトカイン産生への影響

脾細胞を固相化した抗 CD3 抗体にて 24 時間刺激した後、培養上清中の各種サイトカイン濃度を ELISA にて定量化した。IL-2、IFN- γ の産生に関して妊娠後期での TCDD 投与により有意に増加していた。妊娠初期投与及び非妊娠群への TCDD 投与により IFN- γ の産生は軽度上昇していた。

図-5 脾臓 T 細胞におけるサイトカイン制御因子の発現

脾臓 T 細胞における T-bet、GATA-3、NF- κ B の mRNA 発現を real-time PCR にて定量化した。数値は各群 (4 - 6 匹) の平均 ± SD を示す。 β -actin mRNA に対する相対的値で表す。妊娠後期での TCDD 投与により T-bet 及び NF- κ B の発現の増加が認められる。

図-6 胸腺組織における AIRE の発現に対する TCDD 投与の影響

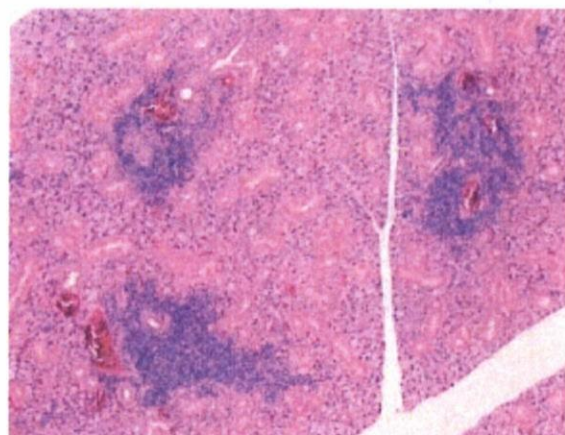
脾臓 T 細胞における AIRE の mRNA 発現を real-time PCR にて定量化した。数値は各群 (3 - 6 匹) の平均 ± SD を示す。 β -actin mRNA に対する相対的値にて表す。妊娠後期での TCDD 投与により AIRE の発現の低下が確認された。

図-7 胸腺組織における自己抗原の発現に対する TCDD 投与の影響

胸腺組織における自己抗原 SP-1、GAD67、Insulin の mRNA 発現を real-time PCR にて定量化した。数値は各群 (4 - 6 匹) の平均±SD を示す。β-actin mRNA に対する相対的値にて表す。妊娠後期での TCDD 投与により SP-1 の発現の低下が確認された。

図1

妊娠後期TCDD投与(6ヶ月齢)



対照群(6ヶ月齢)

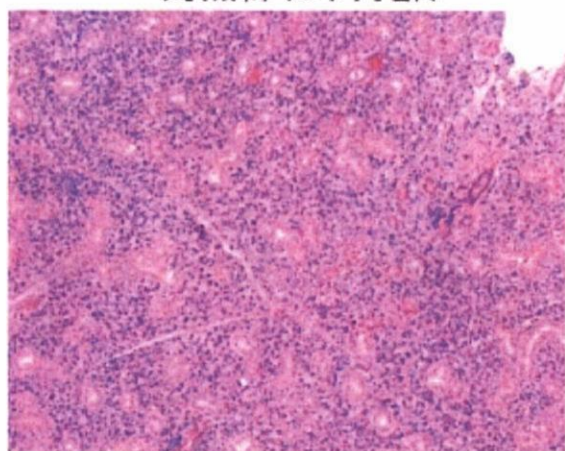


図2

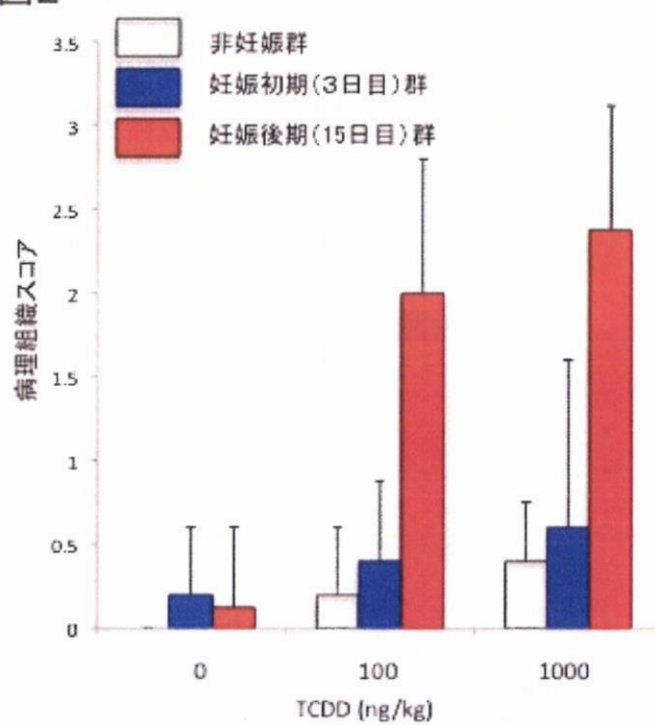


图3

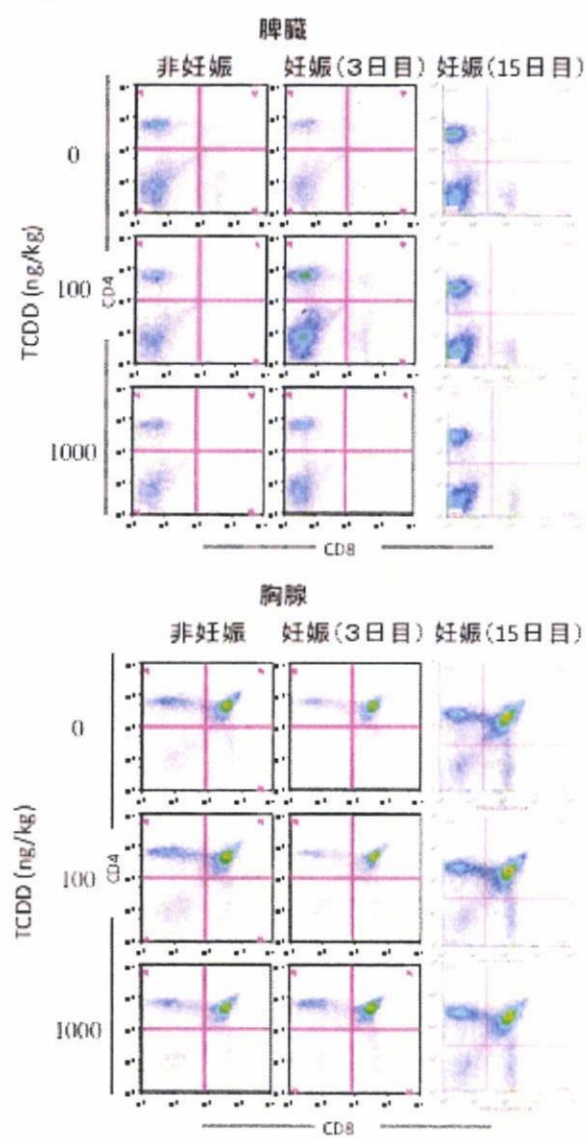


図4

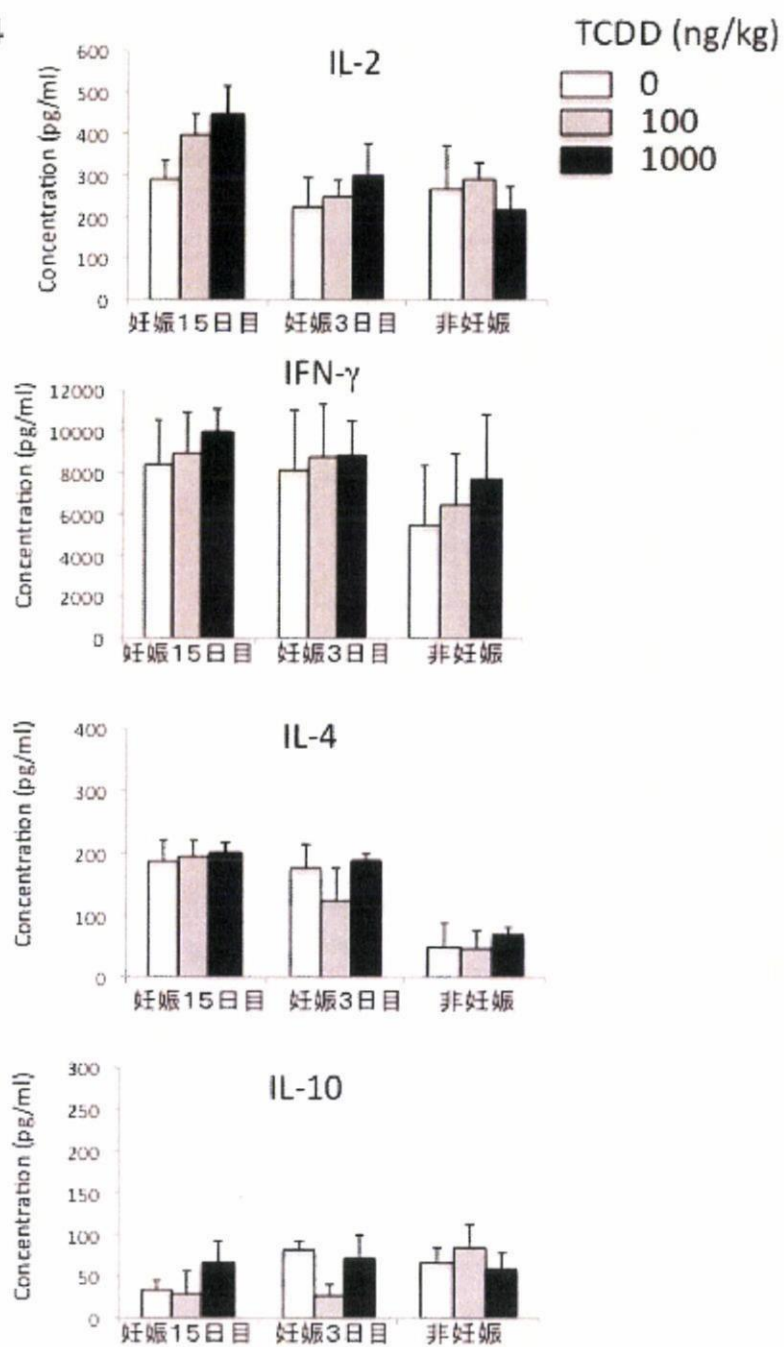


図5

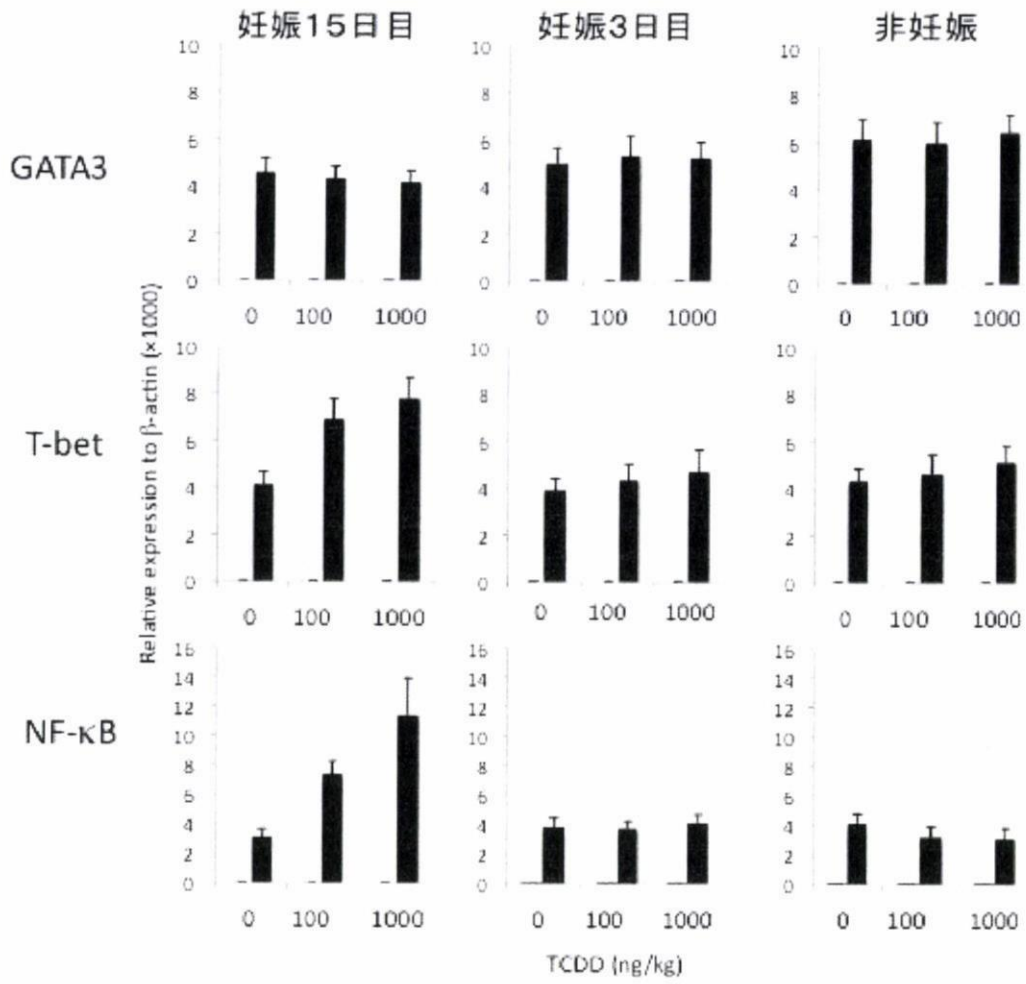


図6

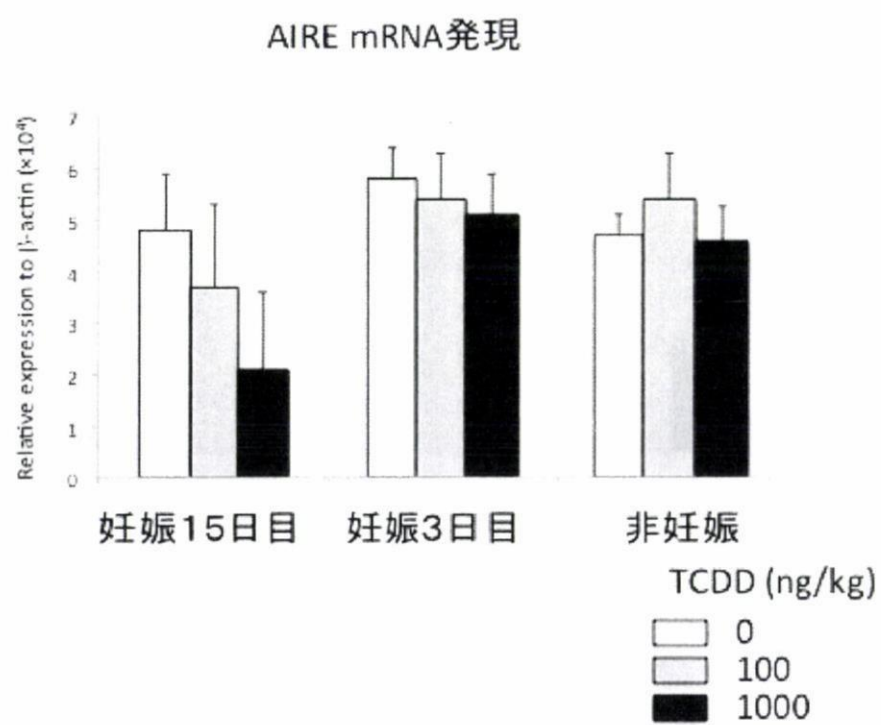
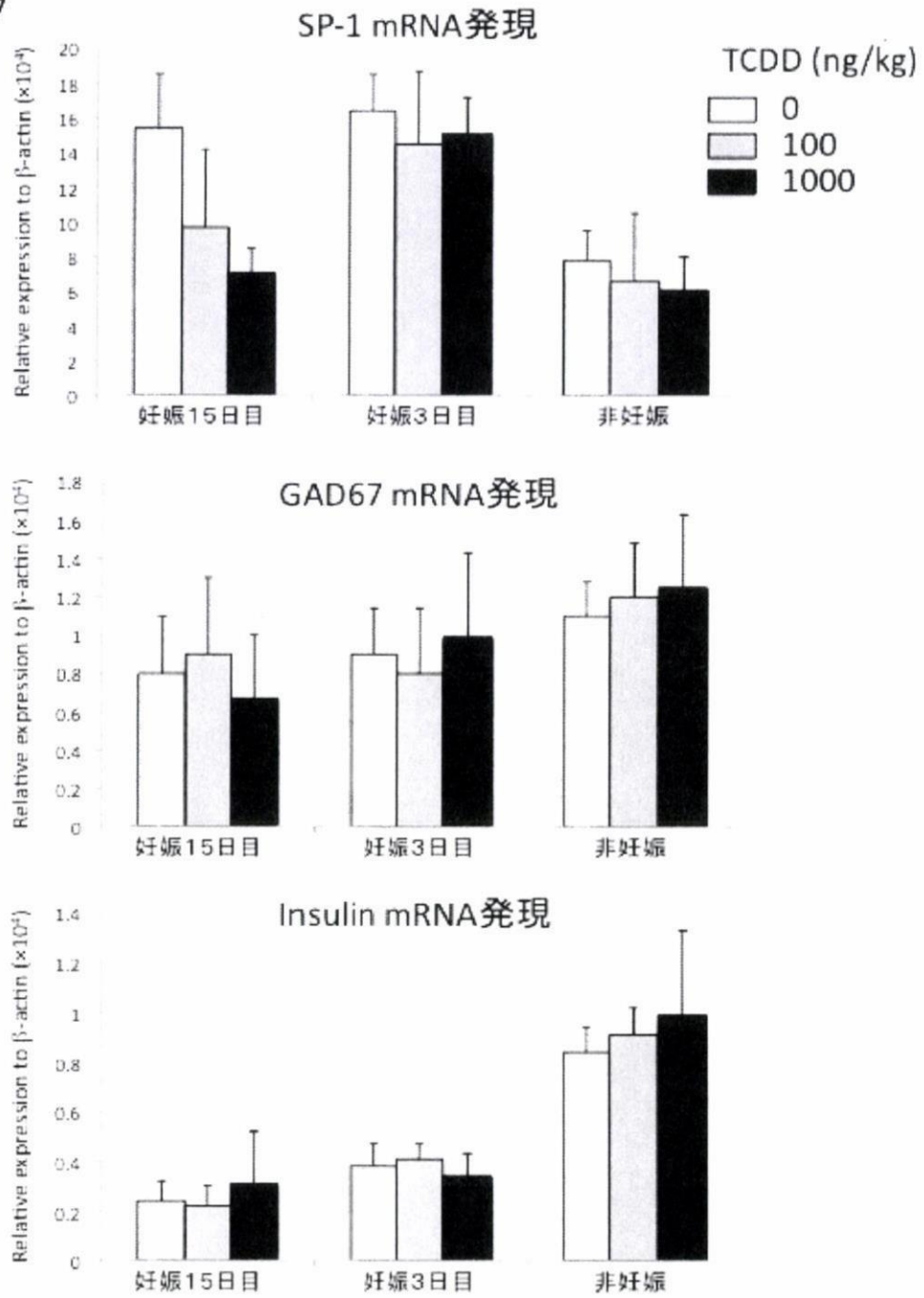


図7



6. 化学物質の周産期暴露及び *in vitro* 暴露の初期免疫応答に対する影響評価

研究分担者 武吉 正博 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 課長
研究協力者 宮浦 英樹 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
研究協力者 林 多恵 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
研究協力者 山中 秀徳 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

研究要旨

前研究班の研究で内分泌かく乱物質の周産期暴露による初期免疫応答能への影響が示唆されている。本研究では初期免疫応答能を評価するための有効な分子候補を培養細胞を用いた実験系にて、昨年度プロテオミクス技術を用いて探索したマーカー候補について、今年度は遺伝子発現解析による比較検証を行った。その結果、共通の発現変動を示す遺伝子は3種あり、また新たに免疫機能に関わる23遺伝子をマーカー候補として取得した。

A. 研究目的

平成18年度までの前研究班の研究で内分泌かく乱物質の周産期暴露により初期免疫応答能に変調を引き起こす可能性が示唆されている。

本研究では周産期暴露による初期免疫応答能への影響を評価するため、培養細胞を用いた実験系により初期免疫応答、特に抗原提示過程に関わるタンパク質を昨年度プロテオミクス技術を用いて網羅的に解析し、アレルギー反応のキーとなる初期免疫応答能を評価するための有効な分子候補を探索した。今年度は昨年度プロテオミクス技術を用いて探索したマーカー候補タンパク質について、遺伝子発現解析による比較検証を行った。次年度、これらのマーカー候補を数種の既知感作性物質にて検証すると共に化学物質の周産期暴露動物実験を予定している。

B. 研究方法

1. 被験物質暴露及びサンプリング

10%FBSを含むRPMI1640完全培地で継代培養したヒト単球系細胞株THP-1を24well plateに 1×10^6 cells/mL/wellで播種し、媒体DMSO、既知マーカー膜タンパク質CD86の発現がみられる濃度とその1/10濃度の各2用量で強度感作性物質Dinitrochlorobenzene (DNCB) 0.3及び3 μ g/mL、軽度感作性物質Eugenol (EUG)10及び100 μ g/mL並びに非感作性物質Propylene glycol (PG) 100及び1000 μ g/mLをn=3で暴露し、3、6及

び24時間後に経時的にサンプルを採取した。

2. フローサイトメトリーによるCD86の発現確認

サンプルの一部をPE標識した抗CD86抗体で染色し、フローサイトメーターEpics XL (ベックマン・コールター社製)にてCD86発現を媒体対照群(VC)に対する相対蛍光強度(Relative Fluorescence Intensity ; RFI)を指標として、RFI=120を境に感作性/非感作性を判定した。

3. マイクロアレイによる遺伝子発現解析

各被験物質暴露後のTHP-1細胞からそれぞれTotal RNAを抽出し、同じ暴露条件のTotal RNA(n=3)を等量混合した。等量混合したTotal RNAをTemplateとしてLow RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent社製)を使用して蛍光標識(Cy3) cRNAを作製し、Whole Human Genome Oligo Microarray 4x44K (Agilent社製)を用いて1色法により網羅的に遺伝子発現解析を行った。媒体対照群に対する被験物質暴露群の発現比を算出し、2倍以上または1/2倍以下に発現変動した遺伝子を抽出した後、ベン図解析を行い、感作性物質DNCB及びEUGで共通に発現変動し、かつ非感作生物質PGで共通に発現変動しなかった感作性物質特異的遺伝子群を抽出した。なお、マイクロアレイによる遺伝子発現解析については、原則高用量群のみとした。

4. 遺伝子機能及びネットワーク解析

遺伝子機能及びネットワーク解析を Ingenuity Pathways Analysis (IPA ; Ingenuity 社製) により行った。

C. 研究結果

1. フローサイトメトリーによる CD86 の発現確認

フローサイトメトリーにおいて、3及び6時間暴露では、いずれの群でも RFI は 120 未満であった。24 時間暴露の強度感作性物質 DNCB 0.3 及び 3 $\mu\text{g/mL}$ 、弱感作性物質 EUG 10 及び 100 $\mu\text{g/mL}$ で RFI が 120 以上となった。非感作性物質 PG では、いずれの時点でも 100 及び 1000 $\mu\text{g/mL}$ 共に RFI が 120 未満であった (図 1)。

2. マイクロアレイによる遺伝子発現解析

24 時間暴露の強度感作性物質 DNCB の高用量群 3 $\mu\text{g/mL}$ では、被験物質暴露の影響によると考えられる RNA の分解が n=3 全例に見られ、RNA の品質が遺伝子発現解析には適さなかったことから、24 時間暴露の DNCB については低用量群 0.3 $\mu\text{g/mL}$ について解析を実施した。

初めにマイクロアレイによる遺伝発現解析データから CD86 を検索し、遺伝子 (mRNA) レベルでの発現量を確認したところ、24 時間暴露では媒体対照群に対して感作性物質 DNCB (低用量群) 及び EUG は、フローサイトメトリーで確認したタンパク質レベルでの発現と同様の比率で増加していたが、遺伝子レベルでは 6 時間暴露の時点で既に感作性物質 DNCB (高用量群) 及び EUG でより大きな発現増加がみられた (図 2)。加えて遺伝子レベルでは 6 時間暴露の方が 24 時間暴露に比べ、発現変動遺伝子数も多かったこと (data not shown) から、以後の解析は 6 時間暴露のデータを中心に行うこととした。

次に媒体対照群に対して 2 倍以上または 1/2 倍以下に発現変動した遺伝子を抽出した後、ベン図解析を行い、感作性物質 DNCB 及び EUG で共通に発現変動し、かつ非感作生物質 PG で共通に発現変動しなかった感作性物質特異的遺伝子群を抽出したところ、感作性物質特異的に発現増加及び発現減少した遺伝子が、それぞれ 249 遺伝子及び 871 遺伝子得られた (図 3)。

3. 遺伝子機能及びネットワーク解析

感作性物質特異的に発現増加した遺伝子機能を IPA ソフトウェアを用いて調べたところ、遺伝子機能情報が得られたものは 249 遺伝子中 119 遺伝子あり、そのランキングは 1 位:「細胞の成長と分化」(62 遺伝子)、2 位:「細胞死」(55 遺伝子)、3 位:「免疫系疾患」(31 遺伝子) であった (図 4)。遺伝子機能情報が得られたものの中で免疫系に関連性が高い遺伝子群について、さらに詳しく調べたところ、22 遺伝子はネットワークを形成し、その中には今回指標とした CD86 も含まれていた (図 5)。

一方、感作性物質特異的に発現減少した遺伝子機能を調べたところ、遺伝子機能情報が得られたものは 871 遺伝子中 425 遺伝子あったが、発現増加した遺伝子群に比べ、免疫系に関連性が高い遺伝子群は上位に来なかった (図 6)。そこで、発現減少した遺伝子群について免疫系に関連性が高い遺伝子群を個々に調査したところ、抗原提示に関わる樹状細胞の成熟に伴って減少する 2 遺伝子が抽出された (表 1)。

以上の解析から抽出された CD86 を除く免疫系に関連したこれら 23 遺伝子は新規のバイオマーカー候補として考えられた。

4. 昨年度同定したマーカー候補タンパク質との比較

昨年度同定したマーカー候補タンパク質について遺伝子発現解析データとの比較を行ったところ、タンパク質レベルで発現変動した 13 種 (増加:6 種、減少:7 種) 中、共通の発現変動を示す遺伝子は 3 種あり、これらは、有力なバイオマーカー候補であると考えられた (表 2)。

D. 考察

ヒト単球系細胞株を用いた感作性物質暴露に対する遺伝子発現解析では、感作性の強度に応じて発現変動を示す遺伝子数が多くなり、24 時間暴露よりも 6 時間暴露の方で変動する遺伝子数が多かった。既知マーカー膜タンパク質 CD86 について、フローサイトメトリーで確認したタンパク質レベルでは、24 時間暴露でしか発現増加を検出できなかったが、遺

伝子レベルでは6時間暴露の時点で発現増加が検出された。また、昨年度同定したマーカー候補タンパク質についての遺伝子発現解析データとの比較において、タンパク質レベルで発現変動した13種中、共通の発現変動を示す遺伝子が3種しかなかった。これらについては、遺伝子発現とタンパク質発現の間での発現のタイムラグが1つの原因として考えられた。

新たにマーカー候補として抽出された23遺伝子には、形成したネットワークから、CD86の上流又は平行して存在するものがあり、より単時間に感作性物質を検出可能なマーカーであることが示唆された。

昨年度プロテオミクス技術を用いて探索したマーカー候補の内、今回の遺伝子発現解析でも共通の発現変動を示した3種については、タンパク質レベル、遺伝子レベルの結果が一致しており、より有力なマーカー候補であると考えられる。

E. 結論

ヒト単球系細胞株に強弱2種の感作性物質DNCB及びEUG並びに非感作性物質PGを暴露した実験系における遺伝子発現解析から、新たに感作性物質を検出可能なマーカー候補23遺伝子を取得した。また、昨年度プロテオミクス技術を用いて探索したマーカー候補の内、今回の遺伝子発現解析でも共通の発現変動を示した3遺伝子を有力なマーカー候補として抽出した。

今後、今回得られたマーカー候補について、他の物質を用いた検証及び動物実験による検証を予定している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tarama R, Kato H, Ishikawa Y, Miyaura H, Takeyoshi M, Iwata H. Gene expression changes induced by type IV allergy-inducible chemicals in dendritic cells. *J Vet Med Sci.*, 70(7):673-80, 2008.

Omori T, Idehara K, Kojima H, Sozu T, Arima K, Goto H, Hanada T, Ikarashi Y, Inoda T, Kanazawa Y, Kosaka T, Maki E, Morimoto T, Shinoda S, Shinoda N, Takeyoshi M, Tanaka M, Uratani M, Usami M, Yamanaka A, Yoneda T, Yoshimura I, Yuasa A. Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 58(1):11-26, 2008.

Basketter D, Cockshott A, Corsini E, Gerberick GF, Idehara K, Kimber I, Van Loveren H, Matheson J, Mehling A, Omori T, Rovida C, Sozu T, Takeyoshi M, Casati S. An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay. The report and recommendations of ECVAM Workshop 65. *Altern Lab Anim.*, 36(2):243-57, 2008.

Takeyoshi M, Iida K, Suzuki K, Yamazaki S. Skin sensitization potency of isoeugenol and its dimers evaluated by a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay and guinea pig maximization test. *J Appl Toxicol.*, 28(4):530-4, 2008.

Adachi S, Hashimoto T, Takeyoshi M, Kato H, Iwata H., Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of guinea pig interleukin-2. *J Vet Med Sci.*, 68:1281-7. 2006.

Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K, Advantage of using CBA/N strain mice in a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *Appl Toxicol.*, 26(1):5-9, 2006.

2. 学会発表

Takeyoshi M. Overview - Non-radioisotopic Local Lymph Node Assay Based on BrdU Incorporation. Independent Scientific Peer Review Panel Meeting on the Murine Local Lymph Node Assay, March 3, 2008.

Takeyoshi M., Miyaura H., Minobe Y., Takatsuki M. EFFECTS OF IN UTERO THROUGH

LACTATIONAL EXPOSURE OF
ETHYNYL-ESTRADIOL ON IMMUNE SYSTEM
IN F1 MICE. 11th International Congress of
Toxicology 2007 (ICT XI), July 15 - 19, 2007.

宮浦英樹、武吉正博: エチニルエストラジオール
を用いたマウスにおける経胎盤・経乳汁暴露による
出生仔の免疫系への影響、第14回日本免疫毒
性学会各術大会(JSIT2007)、2007年9月20日～9
月21日

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
Non-RI LLNA 法の感度上昇法
出願番号：特許出願 2004-230151
公開番号：特許公開 2006-42702

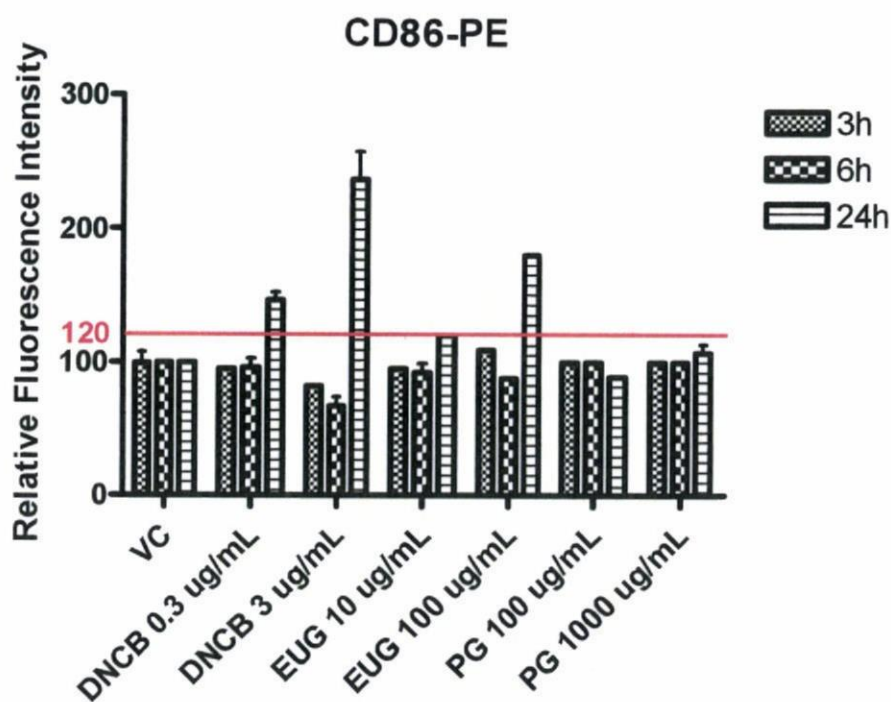


図1 フローサイトメリーによるCD86の発現確認 (タンパク質レベル)

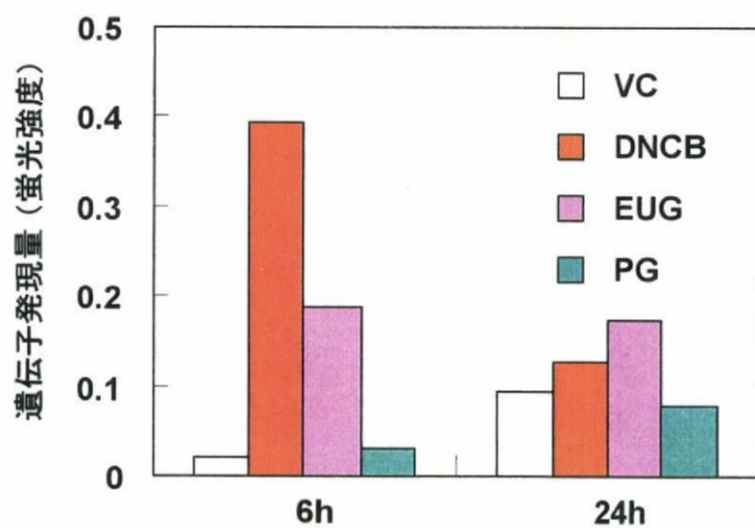


図2 CD86 遺伝子の発現量 (mRNA レベル)

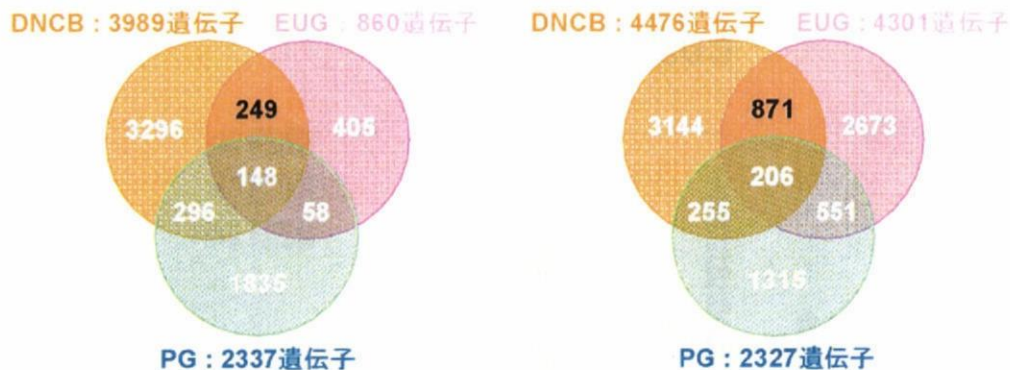


図3 媒体対照群に対して発現変動した遺伝子数
(6時間暴露、左:2倍以上発現増加、右:1/2倍以下発現減少)

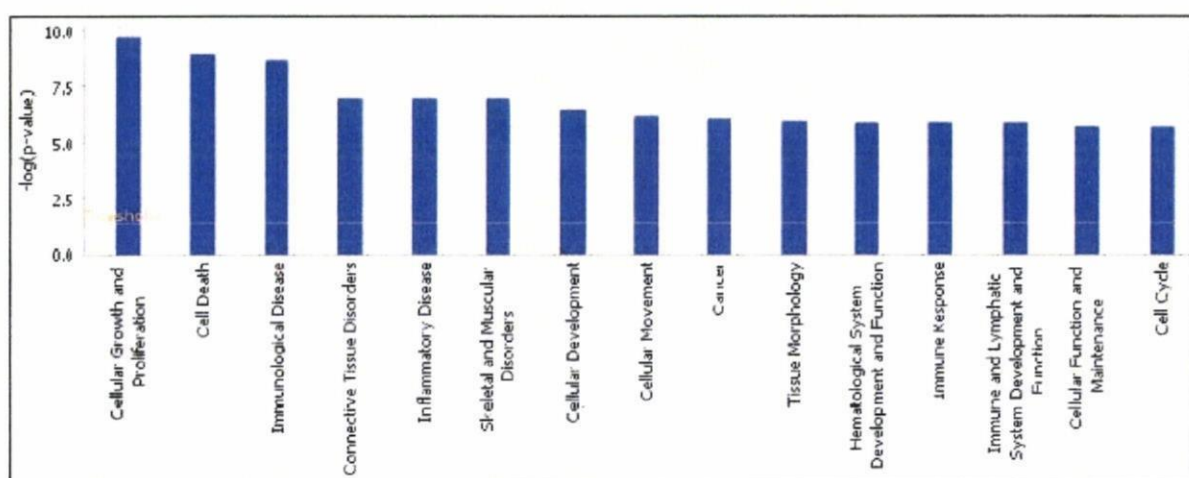


図4 遺伝子の機能ランキング (発現増加、上位15位)

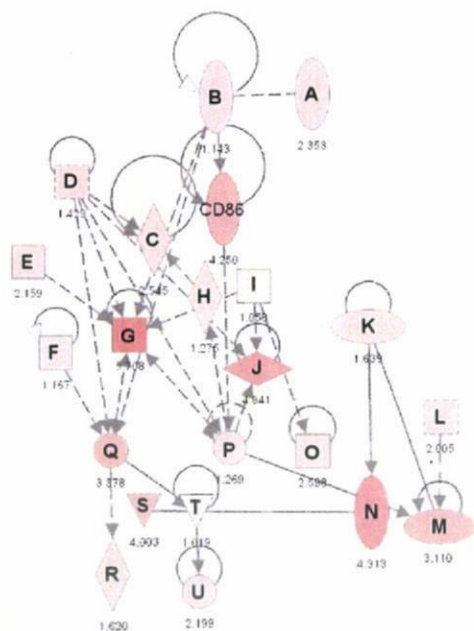


図5 発現増加した免疫系関連遺伝子群のネットワーク図

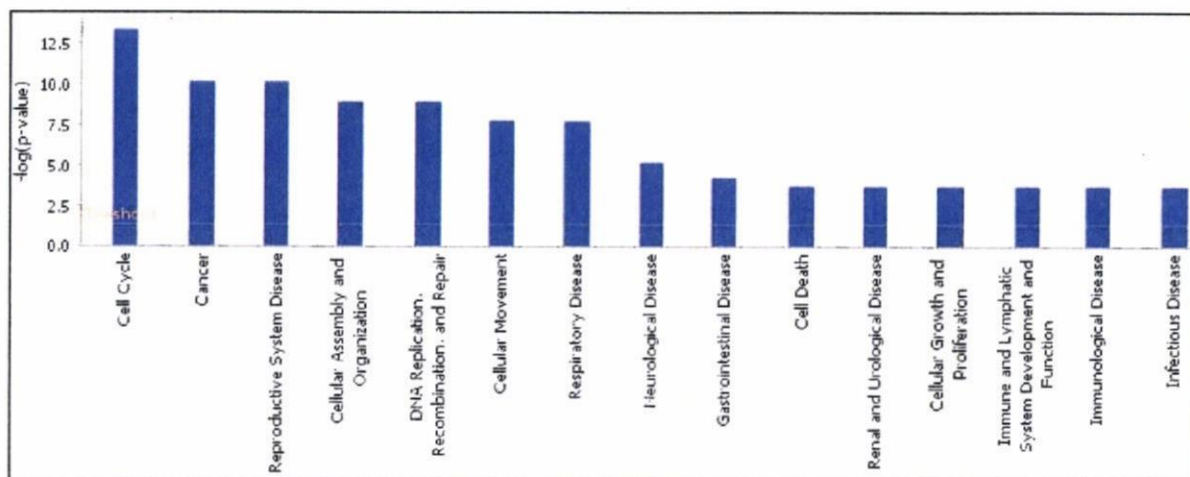


図6 遺伝子の機能ランキング (発現減少、上位15位)

表1 発現減少した抗原提示に関わる樹状細胞の成熟に伴って減少する遺伝子

遺伝子	機能	発現比(Log2ratio)	
		DNCB	EUG
V	マクロファージで発現、遊走を促進。ヒト樹状細胞の成熟に伴って発現減少	-4.62	-1.30
W	未成熟樹状細胞で発現、成熟樹状細胞で発現せず	-2.06	-2.29

表2 昨年度同定したマーカー候補タンパク質と遺伝子発現が一致した遺伝子

遺伝子	機能	発現	
		遺伝子	タンパク質
X	ヌクレオチド合成関連遺伝子	↓	↓
Y	スプライシング関連遺伝子	↓	↓
Z	ヒートショックプロテイン関連遺伝子	↑	↑