

研究課題名=[内分泌かく乱研究整備]

神経に対する内分泌かく乱化学物質研究

-cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析-

分担研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部長

研究要旨

cDNA マイクロアレイは、大量の発現遺伝子の解析を迅速に進める手だてを現実のものとし、総合的な遺伝子発現カスケードを解析するツールとなることが期待される。そこで、緊急の課題として、本年度よりこれを研究班に導入し、内分泌かく乱化学物質（EDCs）に応答する遺伝子を機能別に整理し、いわば EDC-トキシコゲノミクスデータベースを構築する課題を設定することとした。

A. 研究目的

ホルモン受容体は転写因子として特定の遺伝子（群）を発現させ、最終的に形態形成プログラムにも結びついている。この過程において、受容体下流に位置する遺伝子群は、連鎖的に発現が調整される。この経時的变化は、臓器ごと、あるいは個体の発達段階により、多種多様であると考えられている。例えば、従来より行われている内分泌かく乱化学物質の *in vivo* 実験法である子宮肥大試験や Hershberger 試験で用いられる比較的単純な endpoint でさえ、幾重かの反応カスケードの結果の現象であると考えら

れる。これらの解析を個別に行うのは容易ではないが、近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイを導入することにより、このような遺伝子群の発現カスケードの包括的な検討を迅速に進める方が開けてきた。そこで、当研究班では、これを時宜に即した早急に取り組むべき課題として、内分泌かく乱化学物質研究への cDNA マイクロアレイ技術の導入を試みた。

B. 研究方法

cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子の解析を当班の高次系解析の中心とな

る神経系に焦点を当て、外来性ホルモン様作用物質の代表として DES の影響について、内因性ホルモン様作用物質である Estradiol と比較検討することとした。対象としては、I. *in vivo* における神経系の発生・分化モデル系として、胎内暴露胎児脳、II. *in vitro* 神経分化モデル系として、胎児脳初代培養細胞について、さしあたり検討することとした。mRNA の取得法は下記の通りである。

I. 胎内暴露胎児脳

C57BL/6 妊娠マウスに DES を胎生 10 日目から 9 日間連続で高濃度 (66 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 投与し、胎生 19 日目の胎児から、脳全体を摘出し、total RNA を取得した。

II. 胎児脳初代培養細胞

Wistar 系妊娠 15 日目のラット胎児による大脳新皮質の初代培養を行い、培養 24 時間後から 24 時間 Estradiol (10^{-9} M) 処理した培養後細胞から total RNA を取得した。

得られた total RNA から mRNA を精製し、mRNA の cDNA の逆転写反応を行い DNA チップ上でハイブリダイゼーションを行った。

C. 研究結果

DNA チップについては、ヘリックス研究所村松部長の協力下、マウス脳に関連す

る遺伝子をピンコンタクト法でプロットしたチップをアッセイに使えるよう準備を進めた。現在、胎児に関連した遺伝子の DNA チップについても作製中である。そして、mRNA として、ハイブリダイゼーションに必要な量を見積もり、再現性も含めたアッセイのための mRNA の最低量を 10 マイクログラムという概算をえた。現在、これに必要な量の mRNA の分離、蓄積を行い、mRNA の cDNA の逆転写反応を終了し、チップの選択とハイブリダイゼーションの条件検討を行った段階である。

D. 考察

近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイは、大量の発現遺伝子の解析を迅速に進める手だてを現実のものとし、総合的な遺伝子発現カスケードを解析するツールとなることが期待される。高次生命系の中心である神経系について、内分泌かく乱化学物質の初期発生における発現遺伝子変化を解析することで、window 問題の分子メカニズム解明のための研究に一定の結論的な方向性を与えたい。また、この cDNA マイクロアレイ技術の内分泌かく乱化学物質研究への支援のため、必要に応じて、当班の実績として各班員より得られた遺伝子についても解析を支援するためのシステムを整備する計画である。

E. 結論

マウス脳に関連する遺伝子をピンコンタクト法でプロットしたチップをアッセイに使えるよう準備を進めた。また、mRNA として、ハイブリダイゼーションに必要な量を見積もり、最低 10 マイクログラム (mRNA) という概算をえて、システムの運用のメドを得た。妊娠時に DES 投与された各成長段階マウスの脳について、mRNA の分離、蓄積を行い、mRNA の cDNA の逆転写反応を終了し、チップの選択とハイブリダイゼーションの条件検討を行っている。

F. 研究発表

3) 論文発表

Yoshida K, Inoue T, Hirabayashi Y, et al.: Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/He mice, *J Nutrition, Health and Aging*, 1999, 3:121-126

Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki Ji, Inoue T: MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126(15):3437-47, 1999.

3) Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T, Arai Ki.: Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice. *Allergy Clin Immunol*, 103: 471-84, 1999.

2. 学会発表

1) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Conformational changes on ER α induced by endocrine disrupting chemicals (EDCs). *Keystone symposia*, 2000

2) K.Sai, B.L. Upham, K. -S. Kang, R. Hasagawa, J.E.Trosko, T.Inoue, Pentachlorophenol inhibits gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. 1999 International Gap junction Conference Gwatt, Switzerland (August 28 ~ September 2, 1999)H/He

3) 佐井君江、菅野 純、黒川 雄二、井上 達 : Pentachlorophenol の肝培養細胞におけるアポトーシス阻害作用ならびにギャップ結合細胞間連絡阻害との関連 : 第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日~10 月 1 日)

4) 平林容子、高木篤也、児玉幸夫、菅野純、黒川雄二、井上達：Mn-SOD 遺伝子導入マウス骨髄細胞での紫外線抵抗性：第 58 回日本癌学会総会、広島(平成 11 年 9 月 29 日～10 月 1 日)

5) K.Sai, J.E.Trosko, T.Inoue: Pentachlorophenol-induced down-regulation of gap junctional intercellular communication was ameliorated by (-)-epigallocatechin gallate in rat liver epithelial cells. Epigenetic Toxicant-Induced Signal Transduction and Altered Cell-Cell Communication, Ann Arbor, Michigan (Oct.17-20,1999)

6) A. Ono, J. Kanno and T. Inoue, Mechanism based high throughput screening method for

endocrine disrupting chemicals (EDCs) using bio-sensor. 2nd European Workshop 99 International Molecular Toxicology 1999

7) 松島裕子、菅野純、宮城恵理、井上達、卵巣摘出ラットにおけるエストロゲン枯渇期間と子宮肥大反応の関係について、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし