

遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究

(平成12年度～平成14年度)

世話人 大野 泰雄

化学物質の安全性評価においては、分子レベルでの毒性発現機構解析が重要である。特に、従来の実験法では困難な内分泌攪乱化学物質等のような低濃度暴露による影響の評価においては、分子レベルでの毒性発現機構を迅速正確に解析できる方法の研究開発は急務である。しかし、分子生物学的手法の中心であるゲノム解析は、毒性発現の場である細胞の動的な生命活動の解析には不十分である。一方近年の実験技術の進歩は、特定の細胞において特定の時期に発現しているタンパク式であるプロテオームと細胞の状態との関係の解析からタンパクの機能及び相互作用を明らかにするプロテオミクスにより、生命活動を動的に捉えることを可能にした。また、多数のmRNAを検出するジーンチップテクノロジーはmRNAレベルでの遺伝子発現を動的に解析することを可能にした。さらに、コンピューターサイエンスの進歩は、これらの実験から得られる膨大なデータのデータベース化及びデータ処理により情報を抽出するバイオインフォーマティクスを可能にした。これらの方法により、迅速正確な分子レベルでの毒性発現機構の解析が可能になることが期待されるが、実験技術としても発展段階の状態であり、化学物質の安全性評価法としては確立されていない。本研究では、遺伝子発現を指標とする分子レベルでの毒性発現機構に基づく化学物質の安全性評価法及びスクリーニング法の確立を目標として、タンパク発現及びmRNA発現の変化と毒性との関連、並びにデータベースとしての利用法としての可能性を調べることを目的とした。本研究により、信頼性の高い迅速な化学物質の安全性評価を可能にし、医薬品の開発、化学物質の安全性対策に大きく寄与することが期待される。

第一次研究期間(平成12年度～平成14年度)においては、化学物質の安全性評価に必須である実験方法の信頼性、迅速性及び有効性を高めるために、タンパク発現及びmRNA発現の解析法の検討及び解析する分子の選定を行う。さらに、毒性既知の化学物質を用いた実験によりタンパク発現及びmRNA発現の変化と毒性との関連づけを行いデータベース化し、基礎的な評価法を確立するために以下の研究を行った。

1. タンパク発現を指標とする安全性評価に関する研究
 - (1) ラット初期着床胚のプロテオーム解析による化学物質の安全性評価法に関する研究

(2) 肝臓における細胞外基質分解に関与する因子のmRNAレベルの変動に着目した化学物質の安全性評価法に関する研究

(3) 金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価

(4) 遺伝子発現を指標とした心血管系における薬効および毒性の病理生化学的解析に関する研究

(5) 細胞動態関連分子の発現変化を指標とする安全性評価法

2. mRNA発現を指標とする安全性評価に関する研究

(1) 培養マウスメラノサイトをを用いた細胞毒性関連遺伝子に関する研究

(2) 化学物質によるアレルギー発症の指標としてのサイトカイン及びケモカイン遺伝子発現の解析

3. 遺伝子発現データベースを利用した安全性評価に関する研究

(1) 化学物質の安全性評価のための遺伝子発現プロファイル解析システムの開発

(2) 化学物質による遺伝子発現プロファイル解析のための文献情報検索

第二次研究期間においては、種々の化学物質を用いた実験により評価法をさらに検討するとともにデータを蓄積し、タンパク発現及びmRNA発現の変化から毒性発現機構を推定できる安全性評価法及びスクリーニング法を確立する予定である。

1. タンパク発現を指標とする安全性評価に関する研究

(1) ラット初期着床胚のプロテオーム解析による化学物質の安全性評価法に関する研究

薬理部 宇佐見誠, 大野泰雄

[目的]

近年、特定の細胞において特定の時期に発現しているタンパク式であるプロテオームと細胞の状態との関係を調べるプロテオーム解析によりタンパクの機能及び相互作用を明らかにすることが可能になった。一方、発生毒性を有する化学物質には特有の胚発生異常をおこすものがあり、これらの化学物質はランダムな遺伝子突然変異ではなくmRNA発現、翻訳後修飾および活性阻害等

により、特定の胚タンパクの発現および機能に影響していると考えられる。しかし、主要な器官形成が始まる初期着床胚へのプロテオーム解析の応用は、胚が小さくかつ多様な組織を含むため解析が難しくほとんど行われていない。

本研究では、ラット初期着床胚におけるプロテオーム解析法を確立するとともに、化学物質への暴露による胚の異常とプロテオームの変化との関連を明らかにすることにより、プロテオーム解析を用いた化学物質の発生毒性評価法を確立することを目的とする。プロテオーム解析法として、ラット初期着床胚タンパクの二次元電気泳動法による解析法を検討した。また、胚発育に関与するタンパクと相互作用するタンパクを同定する方法として、アフィニティークロマトグラフィーで前処理したサンプルの二次元電気泳動法による解析法を検討した。

[方法]

胎齢 11.5 日または対応する培養時期のラット胚および卵黄嚢膜のタンパクを、二次元電気泳動により分離・解析した。胚または卵黄嚢膜を等電点電気泳動用サンプルバッファー中でホモジナイズしサンプルとした。一次元目は固定化 pH 勾配ゲルを用いた等電点電気泳動によりタンパクの等電点により分離を行い、二次元目は SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパクの分子量により分離を行った。泳動終了後にゲルを銀染色し、二次元電気泳動解析装置で解析した。また、胚発育に関与するタンパクを固定したアフィニティークロマトグラフィーで卵黄嚢膜サンプルを前処理して同様に解析した。いくつかのタンパクについては、クマシー染色したゲルからタンパクスロットを切り出してトリプシン消化した後、質量分析により同定した。

[結果と考察]

1. ラット胚の二次元電気泳動法の検討

ラット胚および卵黄嚢膜は、比較的塩を多く含むサンプルであるため、通常の等電点電気泳動ではタンパク沈殿などによる脱塩が必要であったが、胚および卵黄嚢膜が小さいことおよび操作を簡略にするために、脱塩を必要としないサンプルバッファーと泳動条件を検討した。その結果、還元剤として tributyl phosphine を含むサンプルバッファーおよび電極パッドの利用により一頭での胚および卵黄嚢膜タンパクの二次元電気泳動解析が可能になった (Fig.1)。この方法ではラット初期着床胚は十分な大きさであるので、胚を形態異常の認められた部位ごとに解析することが可能である。

2. サリチル酸のラット胚プロテオームに及ぼす影響

ラットにおいて発生毒性を示すことが知られているサリチル酸存在下で、24 時間培養したラット胚タンパク

の二次元電気泳動像を対照のラット胚のものと比較した。その結果、Fig.2 に示したように、サリチル酸存在下で 2 倍以上増加または減少したタンパクが認められた。現在のところ例数が少ないためこれらの差が単なる個体差である可能性があるが、胚は多様な組織が混在したサンプルであるので、胚組織ごとの発育の差によるのかもしれない。もしそうであれば、プロテオーム解析では一般にサンプルは均質な細胞集団であることが望ましいが、胚サンプルでは組織ごとの発育に及ぼす化学物質の影響を検出できる可能性がある。一方、これらの差が

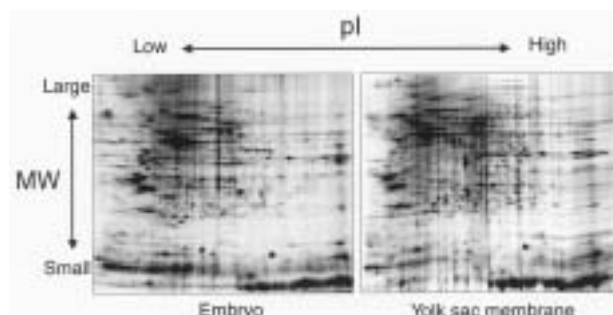


Fig.1 . Two-dimensional gel electrophoresis of rat embryonic and yolk sac membrane proteins

Rat embryonic and yolk sac membrane proteins were isolated by isoelectric focusing for the first dimension and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for the second dimension. After the electrophoresis, the gels were silver-stained for the visualization of protein.

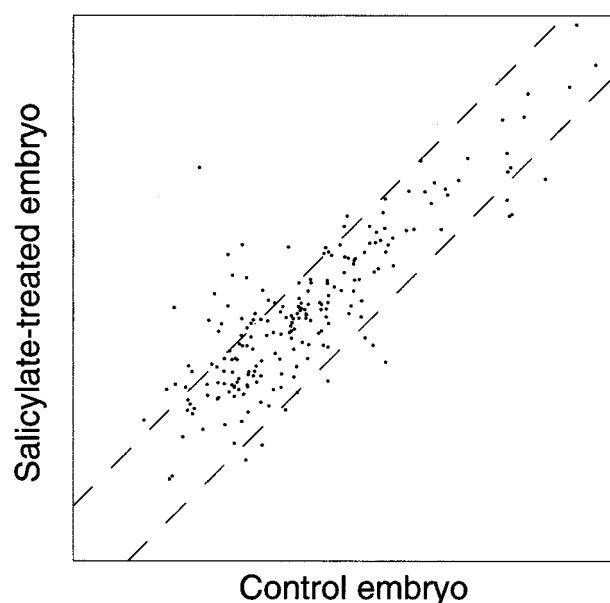


Fig.2 . Scatter gram of spot quantity of rat embryonic protein isolated by two-dimensional gel electrophoresis

The quantity of each spot in the control embryo is plotted on a log scale against that in the salicylate-treated embryo. The spots outside the area between dashed lines have quantities different over the factor of two in the two embryos.

各細胞におけるタンパク発現または修飾の変化を表すものであれば、サリチル酸の発生毒性に関与するタンパクの同定につながると期待される。

3. 胚発育に関与するタンパクと相互作用するタンパクの同定

胚発育に関与するタンパクを固定したアフィニティゲルに結合したラット卵黄嚢膜タンパクを二次元電気泳動で解析した。その結果、胚発育に関与するタンパクに特異的に結合するタンパクのスポットが見いだされた（Fig.3）。質量分析の結果、このタンパクは胚発育に関与することが知られていない既知のタンパクとして同定された。

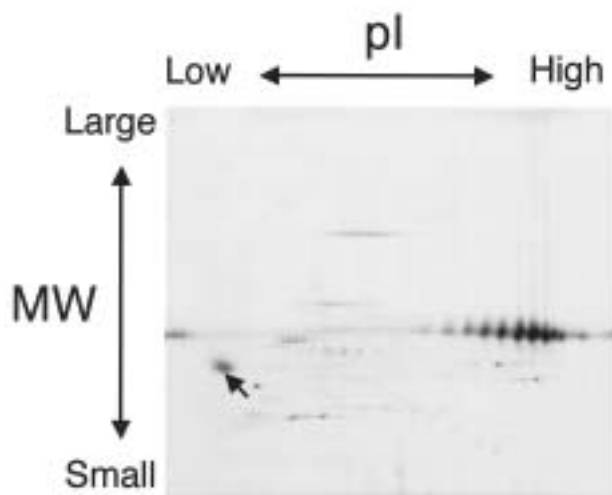


Fig.3 . Identification of a yolk sac membrane protein that specifically binds to the embryotrophic factor

Yolk sac membrane protein treated with the embryotrophic factor-conjugated affinity gel was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. The specifically bound protein is indicated by the arrow.

【発表論文】

- 1) Usami, M., Nakaura, S., Kawashima, K., Tanaka, S. and Takanaka, A.: Culture of postimplantation rat embryos in rabbit serum for the identification of the growth factor in fractionated rat serum. *J. Exp. Zool.*, **264**, 214-218 (1992)
- 2) Usami, M. and Ohno, Y.: Partial purification and characterization of serum embryotrophic factor required for early postimplantation growth of rat embryos in culture. *J. Exp. Zool.*, **276**, 403-414 (1996)

(2) 肝臓における細胞外基質分解に関与する因子の mRNA レベルの変動に着目した化学物質の安全性評価法に関する研究

生物薬品部 小林 哲, 新見伸吾, 川西 徹, 早川堯夫

[目的]

本研究においては化学物質としてフタル酸エステルを用い、肝臓に対する安全性を評価する有用な指標として、細胞外基質成分の分解促進に関与する因子の変動に着目して検討を行った。フタル酸エステルは輸血用プラスチック容器などの医療用具をはじめとして、食品容器、家庭用品等、プラスチック製品で可塑剤として広く用いられている化学物質である。これらプラスチック製品から溶出あるいは蒸散されたフタル酸エステルの人体への摂取に対し、現在、安全性が懸念されている。肝臓はフタル酸エステルの代表的な受容体であるペロオキシゾーム活性化受容体 α (PPAR $\cdot\alpha$) が最も多く存在する、主要な標的臓器である。フタル酸エステルは肝臓においてペロオキシゾーム β 酸化系に関与する酵素の遺伝子発現を促進することにより過酸化水素の産生を亢進し、げっ歯類では結果的に酸化ストレスによるDNAの損傷、さらには癌化を誘発することが知られている。癌の発生過程においては細胞外マトリックスの産生及び分解のバランスの破綻が生ずるが、細胞外マトリックスの分解はMMP $\cdot 2$, MMP $\cdot 9$ をはじめとする各種MMPにより起こる。また、プラスミノゲンからプラスミノゲンアクチベーター (PA) による限定分解により生じるプラスミンは、細胞外マトリックスを分解するだけでなく、各種MMPを活性化させることも知られている。そこで本研究においては、フタル酸エステルとしてフタル酸ジ $\cdot n$ -ブチルエステル (DBP) を用い、ラット肝臓のMMP $\cdot 2$, MMP $\cdot 9$, ウロキナーゼタイプ $\cdot PA$ (u $\cdot PA$)、およびu $\cdot PA$ 受容体 (u $\cdot PAR$) mRNAレベルに及ぼす作用について検討を行った。

[方法]

1. RNAの調製

雄性ウイスターラット (約200 g) を一群4匹としDBPを8.6 mmol/kg経口投与して、1～48時間後に肝臓を摘出し、市販のキットを用いてトータルRNAを調製した。

2. cDNAの合成

一本鎖cDNAは市販のキットを用い、ランダムヘキサマーをプライマーとしてトータルRNAから合成した。

3. PCR反応

cDNAを90℃, 5分処理後、プライマー及びTaq DNA polymeraseを含むPCR反応液を添加し、PCR反応 (変性: 95℃, 30秒, アニール: 55℃, 30秒, 伸長反

応: 72 (60秒)を各プライマーに応じ適切な回数行った。なお、用いるプライマーは各遺伝子に特異的な配列を参考に作成した。

4. PCR産物の定量

PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動後、サイバーグリーンで染色し、蛍光イメージアナライザーで定量した。各バンドの蛍光強度は同様にして求めた常在性遺伝子であるグリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素のPCR産物の蛍光強度で補正し、無処置のラット肝臓における値に対する相対値として示した。

[結果と考察]

Fig.4に示すように、MMP-2 mRNAレベルはDBP投与後6時間でコントロールの約2倍に増加し、以降12時間でコントロールレベル以下に低下した。MMP-9 mRNAレベルも投与後6時間で上昇傾向を示した(Fig.5)。さらに、u-PA mRNAレベルも投与後6時間で約2倍に増加し、以降12時間でコントロールレベル以下に低下した(Fig.6)。一方、u-PAR mRNAレベルはDBP投与後1時間に約2倍増加後、6時間でさらにコントロールの4倍にまで増加し、12時間後にはコントロールのレベルにまで低下した(Fig.7)。

今回の実験においては、DBP投与後、毒性発現に先立ち変動する因子を探索するため、単回投与後短時間における各種mRNAの変動を調べた。その結果、細胞外マトリックスの分解の促進に関与する因子であるMMP-2, MMP-9, u-PA及びu-PARにおいてmRNAレベル

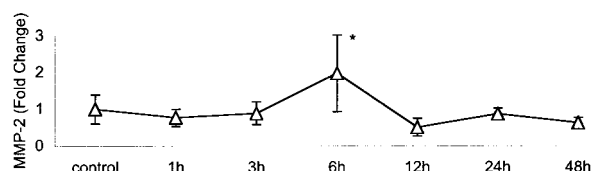


Fig.4. Time course of MMP-2 mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

Each point represents the mean $\pm$ S.E. of four rats.

* $P < 0.05$ compared with the respective controls; Dunnett-type mean rank test.

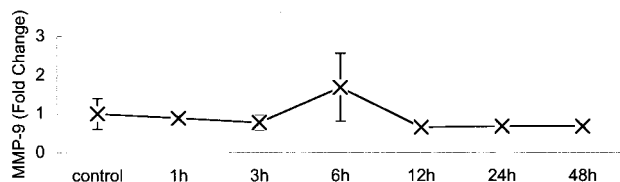


Fig.5. Time course of MMP-9 mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

の上昇がみられ、そのタイムコースはほぼ同様であった。同様な実験系においてPPAR α を介して作用する化合物は、肝臓におけるDNA合成を24時間後に促進することが明らかになっている。従って本結果はDBPによる増殖促進に先立ち、細胞外マトリックスの分解が亢進されることを示唆している。その後、恐らく肝臓において細胞外マトリックスの合成を伴う組織の再構築が起こると考えられる。慢性投与における癌化はこのような初期の作用に加えて、DNAの損傷による異常な表現型の発現及び細胞増殖亢進が複雑に相互作用することにより起こると考えられる。以上、本結果からMMP-2, MMP-9, u-PA及びu-PAR mRNAレベルが、フタル酸エステルの肝臓に対する安全性を評価する上で有用な指標となることが明らかになった。

[発表論文]

- 1) Kobayashi, T., Niimi, S., Fukuoka, M. and Hayakawa, T.: Regulation of inhibin beta chains and follistatin mRNA levels during rat hepatocyte growth induced by the peroxisome proliferator di-n-butyl phthalate. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1214-1216 (2002)
- 2) Kobayashi, T., Niimi, S., Kawanishi, T., Fukuoka, M. and Hayakawa, T.: Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate. *Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225 (2003)

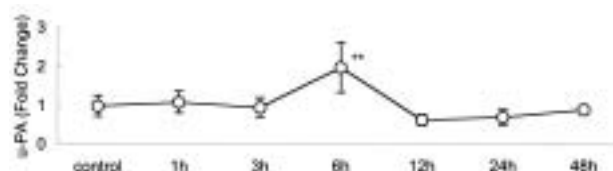


Fig.6. Time course of u-PA mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

** $P < 0.01$ compared with the respective controls; Dunnett-type mean rank test.

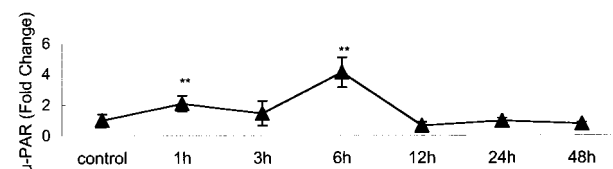


Fig.7. Time course of u-PAR mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

** $P < 0.01$ compared with the respective controls; Dunnett-type mean rank test.

（3）金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価

療品部 伊佐間和郎，土屋利江

〔目的〕

金属は現在用いられている医用材料の中でも最高の強度を有し、人工関節や人工歯根のように高い強度が望まれる部位に用いる埋植医療用具の材料として不可欠である。金属製医用材料には、ステンレス鋼（ニッケル・クロム・モリブデン鋼）、コバルト・クロム合金、チタン合金などが用いられているが、生体親和性や耐腐食性を高めるための研究が現在も進展している。埋植された医療用具が組織・構造的のみならず機能的にも生体組織の一部となり得るためには、材料に接触する細胞がその機能を維持することが重要である。しかし、金属材料については、金属塩を用いた細胞毒性試験や感作性試験が行われているに留まり、骨芽細胞の機能、特に骨分化機能に及ぼす影響について十分な評価が行われていない。そこで本研究では、骨芽細胞の骨分化機能を定量的に評価する方法を確立し、金属材料の正常ヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響を解析した。

生体内に埋入された金属製医用材料は、溶出する金属イオン及び金属の材料表面が、それぞれ細胞の機能に影響を及ぼす。そこで本研究では、初めに、各種金属塩を培地に添加して、正常ヒト骨芽細胞の増殖及び分化に及ぼす影響を系統的に評価した。次に、細胞毒性の異なる金銀パラジウム合金の上で培養した正常ヒト骨芽細胞の骨分化機能を試験した。

〔方法〕

1. 金属塩のヒト骨芽細胞の増殖及び分化に及ぼす影響

金属塩には、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 MnCl_2 、 MoCl_5 、 NbCl_5 、 NiCl_2 、 TaCl_5 、 TiCl_4 、 VCl_3 、 ZnCl_2 、 ZrCl_4 （和光純薬工業、以下結晶水は省略）を用いた。また、細胞には正常ヒト骨芽細胞 NHOst（BioWhittaker, Inc.）を用い、培地には5 mM β -グリセロリン酸ナトリウム及び10%牛胎児血清を含有する α -MEM培地を用いた。細胞の培養は、コラーゲン Type I コート24ウエルプレートに10,000個のNHOst細胞を播種し、24時間後に規定濃度の金属塩を含む培地1 mlと交換した。以後、同濃度の金属塩を含む培地を週3回の頻度で交換し、2週間培養した。

細胞の増殖度は、TetraColor ONE（生化学工業）を用いて測定した。分化指標として、アルカリホスファターゼ（ALP）活性は、パラニトロフェニルリン酸を基質に用いてパラニトロフェノールの生成量として求め、カ

ルシウム量は、カルシウムC-テストワコー（和光純薬工業）を用いて定量した。

2. 金銀パラジウム合金の細胞毒性と骨芽細胞機能影響

歯科鑄造用金銀パラジウム合金（ $13\text{Au} \cdot 58\text{Ag} \cdot 21\text{Pd}$ 及び $10\text{Au} \cdot 62\text{Ag} \cdot 13\text{Pd}$ ）について、「医療用具及び医用材料の基礎的な生物試験のガイドライン」に基づく細胞毒性試験を行った。細胞にはV79細胞を、培地にはM05培地を用いた。また、試料の培地による抽出は、 $6\text{ cm}^2/\text{ml}$ 、37℃、24時間の条件で行った。細胞の培養は、24ウエルプレートに50個のV79細胞を播種し、24時間後に100%抽出液及び種々の濃度の抽出液と交換した。6日間培養した後、ギムザ染色して各ウエルのコロニー数を数えた。コントロール群のコロニー数を50%阻害する抽出液の濃度（ IC_{50} ）をプロビット法で求めた。

金銀パラジウム合金の骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響は、微小集積培養法で試験した。用いた細胞及び培地は、1の実験と同様である。滅菌した試料を、コラーゲン Type I コート24ウエルプレートに置き、その上に40,000個/20 μl のNHOst細胞をスポット状に播種した。細胞が試料に接着した後、培地1 mlを加え、以後、週3回の頻度で培地を交換した。2週間培養した後、細胞の増殖度及びALP活性、カルシウム量を測定した。

〔結果と考察〕

1. 金属塩のヒト骨芽細胞の増殖及び分化に及ぼす影響

正常ヒト骨芽細胞の増殖における50%阻害モル濃度（ pIC_{50} ）は、 $\text{CdCl}_2 < \text{VCl}_3 < \text{CuCl}_2 < \text{CoCl}_2 < \text{NiCl}_2 < \text{TiCl}_4 < \text{TaCl}_5 < \text{MnCl}_2 < \text{ZnCl}_2 < \text{ZrCl}_4 < \text{FeCl}_2 < \text{FeCl}_3 < \text{NbCl}_5$ の順になった。なお、 AlCl_3 、 CrCl_3 、 MoCl_5 、 NbCl_5 は検討した最高濃度（1 mmol/l）においても増殖を阻害しなかった。また、カルシウム量を指標とした分化における50%阻害モル濃度（ dIC_{50} ）は、 $\text{AlCl}_3 < \text{FeCl}_2 < \text{TiCl}_4 < \text{CdCl}_2 < \text{CrCl}_3 < \text{MnCl}_2 < \text{CuCl}_2 < \text{VCl}_3 < \text{ZnCl}_2 < \text{FeCl}_3 < \text{ZrCl}_4 < \text{NiCl}_2 < \text{CoCl}_2 < \text{MoCl}_5$ の順になった。なお、 NbCl_5 及び TaCl_5 は、分化を促進させた。 pIC_{50} と dIC_{50} の間には相関関係は認められず、 pIC_{50} と dIC_{50} の比から、各金属塩は以下のように分類された。

a) 増殖を阻害する金属塩（ $\text{pIC}_{50}/\text{dIC}_{50} < 3$ ）： CdCl_2 、 CoCl_2 、 CuCl_2 、 NiCl_2 、 VCl_3

b) 増殖阻害濃度より低濃度で分化を阻害する金属塩（ $20 < \text{pIC}_{50}/\text{dIC}_{50} < 400$ ）： FeCl_2 、 MnCl_2 、 TiCl_4 、 ZrCl_4 、 ZnCl_2

c) 分化を阻害する金属塩（ $1,300 < \text{pIC}_{50}/\text{dIC}_{50}$ ）： AlCl_3 、 CrCl_3 、 FeCl_3 、 MoCl_5

d) 分化を促進させる金属塩： NbCl_5 、 TaCl_5

これらの結果から、骨芽細胞の増殖には影響しないで分化を阻害する金属塩（ AlCl_3 、 CrCl_3 、 MoCl_5 ）や、骨

芽細胞の分化を促進させる金属塩 (NbCl_5 , TaCl_5) のように、骨分化に特異的に影響を及ぼす金属塩が明らかになった。

2. 金銀パラジウム合金の細胞毒性と骨芽細胞機能影響

金銀パラジウム合金のV79細胞を用いた細胞毒性試験の結果をFig.8に示した。13Au・58Ag・21Pdは、100%抽出液でもコロニーの形成を阻害しなかった。しかし、10Au・62Ag・13Pdは、抽出液の濃度依存的にコロニーの形成を阻害した。なお、10Au・62Ag・13Pdの IC_{50} は67.5%であった。さらに、抽出液中の金属イオンをキャピラリーゾーン電気泳動で分析したところ、 Cu^{2+} の濃度が13Au・58Ag・21Pdでは23 $\mu\text{mol/l}$ であったのに対して、10Au・62Ag・13Pdでは160 $\mu\text{mol/l}$ であった。 CuCl_2 の IC_{50} が200 $\mu\text{mol/l}$ であることと合わせて、13Au・58Ag・21Pdと10Au・62Ag・13Pdの細胞毒性強度の差は、抽出液中の Cu^{2+} 濃度の差に因るものである。

金銀パラジウム合金の上で培養した正常ヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響をTable 1に示した。増殖度及びALP活性、カルシウム量のすべてにおいて、13Au・

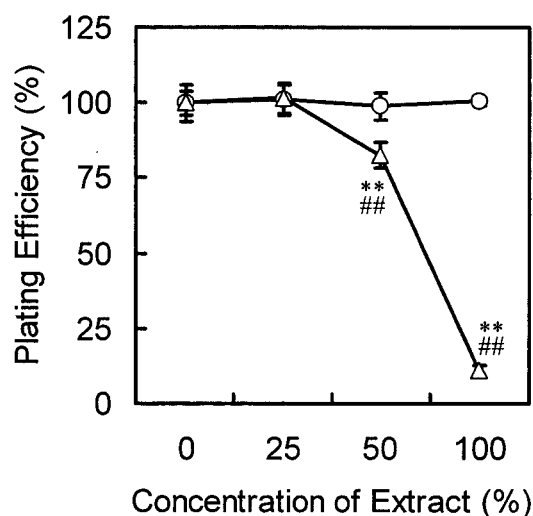


Fig.8. The plating efficiencies of V79 cells cultured with the medium extract of dental Au-Ag-Pd casting alloy. Medium extraction of 13Au-58Ag-21Pd (circles) and 10Au-62Ag-13Pd (triangles) with M05 medium at 6 cm^2/ml for 24 h. Values are expressed as means $\pm$ S.D. for 3 dishes. Significant difference compared with control at $^{**}P < 0.01$ and compared with 13Au-58Ag-21Pd at $^{***}P < 0.01$ by Tukey-Kramer test in two-way ANOVA.

Table 1. The proliferation and differentiation of NHOst cells cultured on the dental Au-Ag-Pd casting alloy

Sample	Proliferation (%)	ALP activity (%)	Ca amount (%)
13Au-58Ag-21Pd	36.8 $\pm$ 3.0	28.6 $\pm$ 4.9	27.6 $\pm$ 2.5
10Au-62Ag-13Pd	22.4 $\pm$ 6.3 ^{**}	13.1 $\pm$ 4.8 ^{**}	22.1 $\pm$ 2.1 [*]

Values are % of the controls and expressed as means $\pm$ S.D. for 4 dishes. Significant difference compared with 13Au-58Ag-21Pd at ^{*} $P < 0.05$ and ^{**} $P < 0.01$ by Tukey-Kramer test in one-way ANOVA.

58Ag・21Pdと10Au・62Ag・13Pdとの間には有意な差が認められた。1の実験で得られた CuCl_2 の pIC_{50} は7.4 $\mu\text{mol/l}$ であり、 Cu^{2+} は骨芽細胞の増殖を強く阻害する。V79細胞を用いた細胞毒性試験の結果と合わせて、10Au・62Ag・13Pdの骨分化機能阻害は、 Cu^{2+} の増殖阻害に起因することが示唆された。

我々が確立した骨芽細胞の増殖及び分化を指標とする試験法は、細胞毒性の異なる金銀パラジウム合金の骨分化機能に及ぼす影響を明確に区別できた。また、増殖には影響しない分化を阻害するような試料を評価することも可能であり、金属材料の骨分化機能評価法として有用である。

【発表論文】

- 1) Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y. and Tsuchiya, T.: Proliferation and Differentiation of Normal Human Osteoblasts on Dental Au-Ag-Pd Casting Alloy: Comparison with Cytotoxicity to Fibroblast L929 and V79 Cells. *Materials Transactions*, **43**, 3155-3159 (2002)
- 2) Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y. and Tsuchiya, T.: *In vitro* toxicity test of dental casting alloy using normal human osteoblast: Comparison with L929 and V79 cytotoxicity tests. *Journal of Toxicological Sciences*, **27**, 382 (2002)

(4) 遺伝子発現を指標とした心血管系における薬効および毒性の病理生化学的解析に関する研究

遺伝子細胞医薬部 佐藤陽治

【目的】

免疫抑制剤FK506や血管拡張薬Minoxidilのような薬物・化学物質の投与の副作用および毒性として心室筋に肥大がもたらされることが知られている。心室筋の肥大は心臓に対する液性環境変化および物理的負荷の増大に対する代償反応であると考えられるが、心肥大が持続することにより心不全発症のリスクが増大することが知られている。また最近、心筋収縮調節を行なうことを目的とした遺伝子治療的アプローチの可能性が着目されているが、人為的遺伝子発現が心筋細胞の分化・肥大におよぼす影響も未知数である。化学物質および人為的遺伝子発現による心肥大・心筋症といった病態発症の機序は多岐にわたると考えられている。また環境要因および遺伝的要因も病態を決定する重要な要素であることも最近明らかとなりつつあり、病態の理解を一層複雑化させている。心筋細胞の病態を制御する様々な経路のnodal pointとなりうるステップを特定することは病態およびその発症を理解するためだけでなく、薬物・化学物質の心筋に

おける副作用評価・毒性評価の効率化を図る上でも重要である。近年、肥大大心筋においては心筋カルシウム制御遺伝子の発現異常、特に心筋小胞体カルシウムポンプの遺伝子およびタンパク質発現の低下が高頻度で観察されることが明らかとなった。しかし、心筋小胞体カルシウム制御異常が心肥大の主原因であるかどうか、心筋小胞体カルシウム制御異常が心肥大の心不全への移行に関与しているかどうか、あるいは異常な心筋小胞体カルシウム制御を正常化することにより肥大大心筋の機能が改善するかどうかはこれまで明らかではなかった。そこで本研究では心血管系における副作用評価・毒性評価の指標としてのカルシウム制御系遺伝子の重要性を検討することを目的として、心肥大発症における心筋小胞体カルシウム制御の役割を評価した。

[方法]

1. 動物

筋小胞体は心筋における細胞内カルシウムの恒常性と収縮性制御の上で鍵となる役割を担っている。心筋の弛緩においてカルシウムは細胞質から筋小胞体内腔に筋小胞体 Ca^{2+} ・ATPase の働きにより取り込まれ、筋小胞体内のカルシウム結合タンパク質カルセクエストリンにより保持される。活動電位の発生に伴ってカルシウムが細胞外から細胞膜上のカルシウムチャンネルを通過して流入すると、これが刺激となって筋小胞体カルシウム放出チャンネルが開閉し、小胞体内腔に保持されたカルシウムの細胞質への放出（CICR: Calcium-induced-calcium-release）が惹起され収縮が引き起こされる。筋小胞体 Ca^{2+} ・ATPase の活性はホスホランパンと呼ばれる心室筋細胞に比較的特異的な低分子量タンパク質により制御されている。ホスホランパンの量的低下もしくはホスホランパンのリン酸化は筋小胞体 Ca^{2+} ・ATPase のカルシウムに対する親和性の増大を引き起こし、結果として心筋収縮性の上昇をもたらす。 α ミオシン重鎖プロモーターにより心筋特異的にカルセクエストリンを20倍過剰発現したトランスジェニックマウス（CSQOE）では心筋小胞体のカルシウム容量が増加するものの、興奮収縮連関におけるカルシウム放出が著しく阻害され、収縮能が低下している。また同時に、CSQOE マウスは心肥大を呈することが知られている。一方、ホスホランパンを欠損したノックアウトマウス（PLBKO）においてはホスホランパンの機能消失により、心拍数の上昇なしに心筋小胞体カルシウムポンプ機能および心収縮性が大幅に上昇することが知られている。本研究ではCSQOE マウスを心筋小胞体機能不全モデル、PLBKO マウスを心筋小胞体機能促進モデルとして採用し、心筋小胞体カルシウムイオン制御異常を正常化することにより肥大大心筋の機能が改善するかどうかを検討する目的で、CSQOE マウ

スとPLBKO マウスを交配しF2世代として野生型、CSQOE型、およびホスホランパン欠損バックグラウンドにカルセクエストリンを過剰発現したマウス（CSQOE/PLBKO）を作成した。F2世代の遺伝型は尾部先端より抽出したゲノムDNAのPCRにより同定した。

2. 心機能解析

*In vivo*における心機能はAvertinによる麻酔下、頸動脈から挿入した1.4Fミラーカテーテルにより左心室圧を測定してその時間微分を解析することにより評価し、*ex vivo*における心機能は急性単離した心臓によりランゲンドルフ標本を作製し、心筋を定圧条件下で逆行性に灌流にした際の左心室圧を測定してその時間微分を解析することにより評価した。

3. 電気生理学的評価

成獣マウスより左心室筋細胞をコラゲナーゼ処理により急性単離し、ホールセルパッチクランプ法により活動電位、L-タイプカルシウム電流およびナトリウム/カルシウムエキスチェンジャー電流を測定した。

4. タンパク質発現および遺伝子発現解析

心筋小胞体タンパク質発現および遺伝子発現はそれぞれ心室筋ホモジェネートの定量性ウェスタンブロッティングおよび心室筋総RNAを用いたドットプロット法により解析した。総RNAはTRIzol試薬を用いて抽出した。

[結果と考察]

1. CSQOE マウスの表現型の加齢による変化

心肥大の予後は多くの場合良好であるが、長期に症状が持続する場合は時として非代償性心筋拡張およびこれに伴う心不全を起こすことが知られている。本研究担当者の作製したCSQOE マウスモデルとは別にJones *et al.* (1998) によっても心筋カルセクエストリン過剰発現マウス（10倍）が作製されており、このモデルは本研究者のモデルよりもカルセクエストリン発現量が少ないにも関わらず、生後16週間までに心不全により死亡してしまう。対照的に、本研究者のモデルは3ヶ月令では死亡率増加は認められない。この相違点が単に病態の進行速度の差であるかどうかを検討するために、本研究者のモデルにおける心筋表現型の加齢（2～3ヶ月 vs. 17ヶ月齢）による変化を形態学的、分子生物学的および生理学的側面から評価した。その結果、Jones *et al.* (1998) のモデルとは異なり本研究担当者のCSQOE マウスは最低17ヶ月齢まで外見上の異常は認められず、17ヶ月までの生存率も100%であった。また、心筋のカルセクエストリンタンパク質レベルは17ヶ月齢でも若齢期と同様、野生型と比べて20倍の過剰発現が維持されていた。重篤な病態心筋においては筋小胞体カルシウム・ATPase、ホスホランパンのタンパク質レベルが変化することがあるが、17ヶ月齢のCSQOE マウスと野生型マウスにおけ

る心筋小胞体 Ca^{2+} ・ATPase およびホスホランパン量には差が認められなかった。若齢(2~3ヶ月齢)CSQOEマウスにおいては心肥大が報告されている。17ヶ月齢のCSQOEマウスにおいては左心房がほぼ全域にわたり石灰化・線維化していたものの、左右心室筋湿重量/体重比は若齢群と較べて有意な変化が見られなかった。また肺湿重量/体重比(肺鬱血・心不全の指標)も加齢による変化および遺伝型の差による違いは認められなかった。若齢CSQOEマウスにおいては興奮収縮連関の心筋小胞体カルシウム制御系異常と、それに伴う低心筋収縮能が知られているが、2~3ヶ月齢および17ヶ月齢のCSQOEマウス心筋の収縮能・弛緩能を単離心筋灌流標本により検討したところ、若齢CSQOEマウスで観察された低収縮能および低弛緩能は加齢によってさらに悪化することのないことが明らかとなった。これらの知見より、心筋小胞体のカルシウム制御障害は心肥大の発症と持続に関わっていること、およびカルシウム制御障害は必ずしも心肥大の心不全への移行には必ずしも結びつかないことが示唆された。

2. 心筋小胞体機能改善によるCSQOE表現型の変化

心筋小胞体のカルシウム制御障害と深くかかわる心肥大病態が、心筋小胞体のカルシウム制御亢進によって回復するかを検討する目的でCSQOEマウスとPLBKOマウスの交配を行い、CSQOE/PLBKOマウスの表現型を検討したところ、*in vivo*および*ex vivo*においてもCSQOE心筋の低収縮能はホスホランパン欠損によって野生型の心筋と同等以上にまで回復することが明らかとなった。単離心筋細胞にカフェイン(心筋小胞体カルシウムチャネル開口薬)を投与した際のナトリウム/カルシウムエキスチェンジャー電流を測定した結果から、CSQOE/PLBKO心筋細胞では心筋小胞体のカルシウム容量がCSQOE心筋細胞よりも上昇していることが明らかとなった。CSQOE/PLBKO心筋細胞のL型カルシウムチャネル電流を測定したところ、電流の脱活性化がCSQOE細胞よりも速くなっていることが明らかとなった。L型カルシウムチャネル電流の脱活性化速度はCICRによるカルシウム放出量と相関することから、この結果はCSQOE/PLBKO細胞はCSQOE細胞よりもCICRの効率が高いことを示している。野生型細胞と比べてCSQOE細胞は長い活動電位持続時間をもつが、ホスホランパン欠損により活動電位持続時間も野生型細胞と同等まで回復した。さらに、PLB欠損によりCSQOE細胞のサイズが正常化したと同時に、CSQOE心筋において上昇する心房性ナトリウム利尿ペプチド遺伝子および骨格筋型 α アクチン遺伝子といった心肥大マーカー遺伝子の発現が低下して正常値に回復することが明らかとなった。これらの結果より、PLB機能の低下もしくは心筋小胞体カルシウム取り込み機能の亢進により心肥大の

低収縮能およびリモデリング過程が克服されることが示され、同時に心筋細胞肥大の発症において筋小胞体カルシウム制御機能および筋小胞体関連タンパク質遺伝子の発現が鍵となっていることが明らかとなった。また、筋小胞体機能改善をもたらす薬剤は心筋病態に対する新しい治療ターゲットとなることが示唆された。

〔発表論文〕

- 1) Sato, Y., Schmidt, A.G., Kiriazis, H., Hoit, B.D. and Kranias, E.G.: Compensated hypertrophy of cardiac ventricles in aged transgenic FVB/N mice overexpressing calsequestrin. *Mol. Cell. Biochem.*, **242**, 19-25 (2003)
- 2) Carr, A.N., Schmidt, A.G., Suzuki, Y., Del Monte, F., Sato, Y., Lanner, C., Breeden, K., Jing, S.L., Allen, P.B., Greengard, P., Yatani, A., Hoit, B.D., Grupp, I.L., Hajjar, R.J., DePaoli-Roach, A.A. and Kranias E.G.: Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4124-4135 (2002)
- 3) Kiriazis, H., Sato, Y., Kadambi, V.J., Schmidt, A.G., Gerst, M.J., Hoit, B.D. and Kranias, E.G.: Hypertrophy and functional alterations in hyperdynamic phospholamban-knockout mouse hearts under chronic aortic. *Cardiovasc. Res.*, **53**, 372-381 (2002)
- 4) Frank, K.F., Mesnard-Rouiller, L., Chu, G., Young, K.B., Zhao, W., Haghighi, K., Sato, Y. and Kranias, E.G.: Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene. *Basic Res. Cardiol.*, **96**, 636-644 (2001)
- 5) Sato, Y., Schmidt, A.G., Kiriazis, H., Hoit, B.D. and Kranias, E.G.: Re-evaluation of heart failure in transgenic mice with impaired SR Ca^{2+} release. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **33**, 1757-1759 (2001)
- 6) Sato, Y., Kiriazis, H., Yatani, A., Schmidt, A.G., Hahn, H., Ferguson, D.G., Sako, H., Mitarai, S., Honda, R., Mesnard-Rouiller, L., Frank, K.F., Beyermann, B., Wu, G., Fujimori, K., Dorn, G.W. II and Kranias, E.G.: Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in calsequestrin overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9392-9399 (2001)

(5) 細胞動態関連分子の発現変化を指標とする安全性評価法

毒性部 平林容子

〔目的〕

造血機構では恒常性の維持機構がよく作用するため、通常の毒性試験で観測する末梢血細胞数の変化をみても、それらの恒常性の範囲に隠れてしまうことが少なく

ない。ここで、特殊アッセイ系として、遅発性造血障害の標的と考えられる造血幹・前駆細胞数をコロニーアッセイなどの手法を使って細胞動態を計測すると、末梢血の回復とは裏腹に、しばしば回復の遅延ないしは障害の持続が観察される。このような障害発現パターンを示すものの中には、明らかに白血病リスクを伴った物質が含まれる。本研究では、こうした従来の末梢血のモニターだけではとらえきれない潜在的な前駆細胞に局限した障害性を予知し、ひいては安全性評価につながる指標として、コロニーアッセイ以上の効果の期待できる指標分子を検索するため、関連の遺伝子発現変化について、細胞動態関連遺伝子を中心に検索することを計画した。

対象化学物質として選択したベンゼンはヒトでの白血病誘発性が知られている化学物質である。ところが実験動物モデルでの白血病誘発性を証明することは容易ではなかった。即ち、ベンゼンの持続暴露ではむしろ貧血になって動物が死んでしまい、一般に白血病を誘発するに至らない。これを、職業暴露を念頭に、一日6時間、週5日の間歇的暴露として26週間繰り返すと、その後約300日を起点として、次第に白血病が誘発されることが明らかになった。この白血病誘発性の背景を探る目的で、これまで造血幹細胞動態に焦点をあてて研究をすすめている。その結果、これまで報告が錯綜していた細胞動態に関して、筆者らが開発した個体内造血幹細胞動態解析法（BUUV法）を用いることで、ベンゼン暴露中、造血幹細胞の細胞回転が停止することを明らかとした。更に、この停止はp53欠失マウスでは観察されないことから、野生型ではp53もしくはp53依存性シグナル分子のいずれかが誘導されて細胞動態を停止させていることが想定され、事実野生型ではp21の蛋白量の増大が観察された。また、末梢血球数は、ベンゼン暴露を停止後速やかに回復するが、造血幹細胞数の回復には長時間を必要とし、その間、間歇的な増殖刺激がかかり続け、白血病発症の所謂プロモータ活性として作用することが発がん機構として想定されるに至った。こうした状態にあつては、増殖刺激への反応としての増殖促進因子の発現と同時に、恒常性維持のための抑制因子の発現とが拮抗していることが予想される。ここでは、これらの結果を踏まえ、細胞周期関連遺伝子群の発現変化について、網羅的な検索を行うことを企図した。これにより、発現量の変動は必ずしも大きくはなくても、比較的多数の遺伝子群の動態を観察することを通じて分子毒性メカニズムが解明され、そうした基盤の上に立った検討の延長線上で安全性評価に足りうる指標が獲得されるものと考えた。

[方法]

1. ベンゼン吸入暴露

ベンゼンの暴露は、職業暴露を念頭に置いた1日6時

間、週5日の、スケジュールで行った（Fig.9）。ベンゼン溶液（和光純薬）は16℃に加熱して、蒸気として、縦層流式吸入暴露チェンバー内の還流空气に混入させた。チェンバー内のベンゼンの濃度は、30分ごとに、ガスクロマトグラフィー（GC・14A、島津）にてモニターし、チェンバー内は、温度 24 ± 1 ℃、湿度 $55 \pm 10\%$ 、1日12時間毎の明暗周期を維持した。

被検マウスは、C57BL/6、8週齢のオスを用い、チェンバー内の金網ケージにて個別飼育し、飲料水は紫外線滅菌したものを自由摂取させた。飼料はCRF・1を用い、ベンゼン暴露中は絶食とした。尚、対照群（sham暴露群）は、ベンゼンを含まない還流空气による金網ケージ、縦層流暴露チェンバー内飼育を行い、飲水、給餌などの条件は暴露群と同様とした。

2. Gene Chip 解析

ベンゼン暴露中（暴露開始5日目、D5；暴露開始12日目、D12）ないし、暴露後（暴露休止後3日、D+3）に、それぞれ暴露群とsham暴露群のマウスを屠殺して骨髓細胞を採取し、凍結保存した（Fig.9）。このものから、適宜セパゾール溶液並びにキアゲンのカラムを用いて、総RNAを抽出・精製した。各群から抽出した総RNA10 µgを鋳型として、Affymetrixのmouse U74 Chip（D12）及びIncyteのGEM（gene expression microarray）system（D5、D12、D+3）による網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータはGene springTMにて解析した。

[結果と考察]

ベンゼン暴露12日後において、骨髓細胞におけるsham暴露群に対する発現遺伝子変化をAffymetrixのmouse U74 Chipを用いて比較検討した。結果の一部として、細胞回転関連遺伝子の発現変化をTable 2にまとめた。このうち暴露5日、12日及び、暴露中止後3日の、経時的な遺伝子発現変化の観察を行ったGEMでの結果

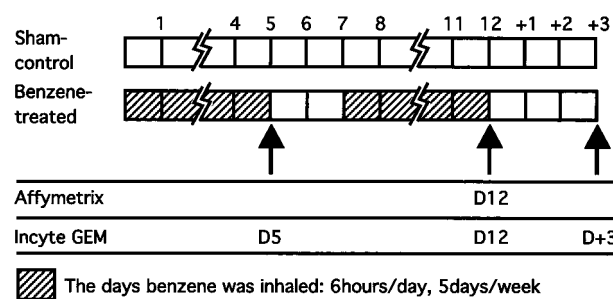


Fig. 9. Schedule of benzene inhalation for tissue sampling. Benzene was exposed on days shaded in the figure. Exposure started 10:00am and lasted 16:00. Tissue sampling was made at the day indicated by arrows, i.e., fifth (D5), twelfth (D12), and three days after termination of the last exposure (D+3). The sampling time was strictly made immediate after the exposure termination of the day.

Table 2 . Expression changes in genes related to cell kinetics after 12-day intermittent exposure to 300ppm benzene (D12 ; ref. Fig.9) (Affymetrix, mouse U74 Chip)

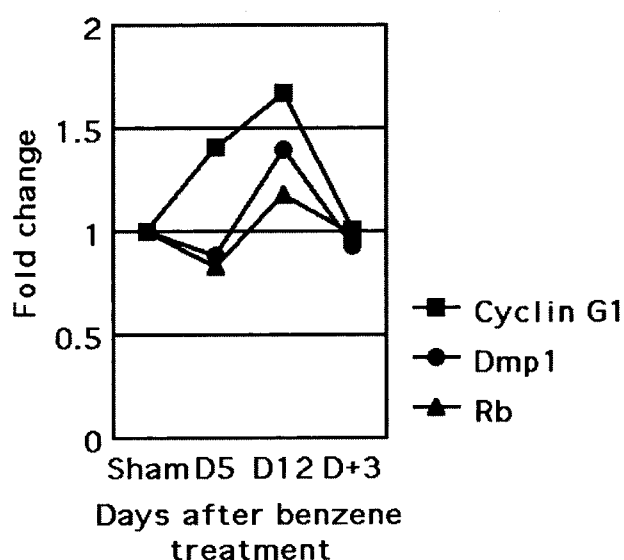
Gene name	Accession No.	Fold change
cdc2 (cell division cycle protein 2)	U69555	1.04
cdk2 (Cyclin dependent kinase2)	NM_016756	1.17
cdk2L (39 kDa variant of cdk2)	AJ223732	0.83
Cyclin A2	X75483	0.88
Cyclin B2	X66032	1.11
Cyclin D1	M64403	0.64
Cyclin E	X75888	0.71
Cyclin E2	AF091432	0.93
Cyclin F	Z47766	0.94
Cyclin G1	L49507	1.67
Dmp1 (cyclin D-interacting myb-like protein)	U70017	2.26
E2F1	NM_007891	0.78
Mdm2	NM_010786	0.68
c-myc	AH005318	0.80
p16 INK4a (cyclin dependent kinase inhibitor/Cdkn2a)	AF044336	1.49
p18 (Cdk4 and Cdk6 inhibitor)	U19596	0.90
p19 (Cdk4 and Cdk6 inhibitor)	L01640	0.75
p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)	U09507	1.51
p53 (mutant, 181L->R)	AB021961	1.43
Retinoblastoma 1	M26391	0.91
Retinoblastoma-like 1 (p107)	U27177	1.02
Wig-1 (p53-inducible zinc finger protein)	AF012923	2.19

の代表例を Fig.10 に示す .

1. ベンゼン暴露による p53 及び関連遺伝子の発現変異
p53 及びその転写活性によって制御されることが知ら

れる Cyclin G1, p21, Wig-1 の発現量の増加と p53 の抑制因子である Mdm2 の減少が観察された . Cyclin G1 は DNA 障害時の G2/M arrest に関与することが知られている . また p21 は Cyclin A, E, G の抑制因子として知られる . ここで得られた結果は , 先に示したベンゼンによる造血抑制には p53 関連の抑制シグナルが関与することを示す p53 欠失マウスでの解析結果や , p21 の蛋白量の増加等ともよく符号する結果であり , p53 そのものの発現量の増大は必ずしも多くはないものの , その転写活性化の結果が , 下流に位置するとされる遺伝子群の発現変化としてとらえられたものと考えられる . 但し , in vitro でのベンゼン曝露試験や , これまで観察された細胞回転の抑制に対して , p21 の増加の peak は暴露後 12 日目であり , むしろ遅い . これは , 幹細胞動態停止に対して , p21 は全骨髓細胞で見ているため , 個々の細胞 , 特に幹細胞でのそれを必ずしも反映していないことが考えられ , 事実 , 本年の米国トキシコロジー学会では , ベンゼンを 100 ppm 曝露した場合 , 骨髓細胞では , p21 が増加するものの , 白血病発症の母地と想定されている造血前駆・幹細胞分画では , それが見られないとの報告がなされた . ところがこのことは一方で , 野生型マウスに 100 ppm の間歇吸入曝露を行っても白血病発症頻度は増加しないことから , 100 ppm では , 前駆・幹細胞分画の細胞回転は停止しない可能性があり , 結果として , 有意な白血病の発症が観察されないことを反映していることが想定され , 逆に , 300 ppm で観察した全骨髓細胞での p21 の発現増加は , 幹細胞分画でも認められるとも考えられる .

A



B

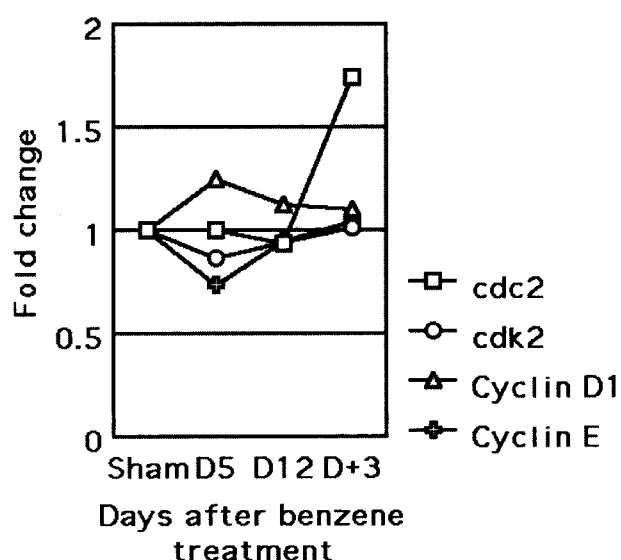


Fig.10 . Sequential gene expression change from non-treated sham control, day 5 (D5), day 12 (D12) and 3 days after the last exposure (D+3) (GEM system) Ordinate indicates fold change to the sham control. Panel A shows genes suppressing cell kinetics, whereas panel B shows those accelerating cell kinetics.

2. ベンゼン暴露による細胞動態関連遺伝子の発現変異

p53 関連遺伝子群の発現変化に加えて、p16^{Ink4a}や、Dmp1 といった p53 とは別経路の細胞回転抑制因子の発現量の増加も観察された（Table 2）。p16^{Ink4a}は、Cyclin D1/cdk4 もしくは Cyclin D1/cdk6 の抑制因子として知られる。この Cyclin D1 は、Cyclin E/cdk2 を活性化し、ともに Rb をリン酸化することで不活化する。リン酸化された Rb は E2F を遊離し、この E2F は Cyclin E を活性化する、いわば positive feedback によって、G1 から S 期への移行が促される。今回の結果では、これら細胞回転促進関連分子の発現量はベンゼン暴露によっても sham 曝露群と差異を認めず、ベンゼン暴露による細胞動態の停止状態に一致するものと考えられる。尚、Cyclin D1 は、ベンゼン暴露後 5 日目には発現の増加傾向が認められる（Fig.10B）。他方、Cyclin E はむしろ減少傾向が見られる。これはベンゼン暴露による細胞回転の抑制という障害に対抗する増殖反応と、これを上回る抑制性障害との拮抗状態を垣間見る結果として興味深い。

Dmp1 は p19 を活性化することによって細胞回転を止めることが知られているが、暴露 12 日目の p19 の発現量は必ずしも多くはなかった。しかし、これまでの検討で、蛋白量については、曝露開始直後（1 日、3 日）に sham 曝露群に比べて 2 倍程度に上昇し、その後も 1.8 倍程度を維持するが、暴露 12 日目には sham 曝露群との差異が認められないことを報告している。一方、Dmp1 の発現は暴露 5 日目には必ずしも高くない（Fig.10A）ことから、詳細な機構は未だ明らかではないが、ベンゼンの造血抑制機構には、p53 及びその関連分子に加えて Dmp1・p19 も関与することが示唆された。

3. ベンゼン暴露中止による細胞動態関連遺伝子発現の変化

ベンゼンの暴露を休止すると、細胞回転の抑制に作用していた因子は、その発現量が減少した（Fig.10A）。このことは、暴露休止後速やかに造血細胞の回復性増殖が起ることや、p21 タンパク量が、暴露休止後速やかに sham 曝露群と差異のないレベルまで低下することなどともよく一致しているものと考えられる。同時に増殖促進因子として cdc2 の発現の増加が観察された（Fig.10B）。尚、すべての増殖促進因子が暴露直後から速やかに増加するとは限らない。末梢血数回復は速やかであるものの、白血病の母地とも考えられる造血前駆・幹細胞の増殖には時間がかかることなどからも、両者の差異を反映する事象たり得るのかの如何については、今後、幹細胞分画での解析を試行し、全骨髄細胞での結果との差異について検討を重ねることで明らかにしていきたい。同時に、併行して 100 ppm での幹細胞動態について BUUV 法を用いた解析を進めることで、得られている知見を一元的に統括することができるものと期待する。

【発表論文】

- 1) Hirabayashi, Y., Matsuda, M., Aizawa, S., Kodama, Y., Kanno, J. and Inoue, T.: Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **227**, 474-4799 (2002)
- 2) Yoshida, K., Aizawa, S., Watanabe, K., Hirabayashi, Y. and Inoue, T.: Stem-cell leukemia: p53 deficiency mediated suppression of leukemic differentiation in C3H/He myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, **26**, 1085-1092 (2002)
- 3) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kim, D.Y., Fujii-Kuriyama, Y. and Inoue, T.: Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. *Toxicol. Sci.*, **70**, 150-156 (2002)
- 4) Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., Hirakawa, T., Inoue, T. and Yodoi, J.: Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid. Redox. Signal.*, **4**, 693-696 (2002)
- 5) Tanaka, K., Watanabe, K., Mori, M., Kamisaku, H., Tsuji, H., Hirabayashi, Y., Inoue, T., Yoshida, K. and Aizawa, S.: Cytogenetic and cellular events during radiation-induced thymic lymphomagenesis in the p53 heterozygous (+/-) B10 mouse. *Int. J. Radiat. Biol.*, **78**, 165-172 (2002)
- 6) Yoshida, K., Hirabayashi, Y. and Inoue, T.: Calorie restriction reduces the incidence of radiation-induced myeloid leukaemia. *IARC Sci. Publ.*, **156**, 553-555 (2002)
- 7) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kim, D.Y. and Inoue, T.: Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp. Hematol.*, **29**, 278-285 (2001)
- 8) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kaneko, T., Kodama, Y., Kanno, J., Yodoi, J., Kim, D.Y. and Inoue, T.: Transgene expression of thioredoxin (trx/adf) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd)-induced hematotoxicity. *Arch Environ Contam. Toxicol.*, **41**, 232-236 (2001)
- 9) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Ogawa, Y., Kanno, J., Inoue, T. and Kaneko, T.: Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. *Chemosphere*, **43**, 819-822 (2001)

2. mRNA発現を指標とする安全性評価に関する研究

(1) 培養マウスケラチノサイトを用いた細胞毒性関連遺伝子に関する研究

大阪支所生物試験部 天野博夫

[目的]

ほ乳類の皮膚は個体と環境を隔てる組織である。バリアとしての皮膚機能は表皮角質層が担っているが、角質構造は、これを構成する角質細胞の前駆細胞である表皮ケラチノサイトの増殖と分化の動的平衡状態によりその恒常性が維持されている。配置の特性上、ケラチノサイトは環境中の多種多様な化学物質に暴露される可能性が高く、これら物質の直接作用、免疫系等内在性要因の介在、またはその両者により生じる増殖と分化のアンバランスが皮膚炎等病理の状態をもたらすと考えられている。

本研究第一期においては、培養化したマウスケラチノサイトを用いて、インターフェロン γ (IFN $\cdot\gamma$) を中心とする炎症性サイトカイン類の細胞毒性発現に関連する遺伝子を解析する目的で研究を行った。

[方法]

NC/Jic, BALB/c および C57BL/6 各系統マウスの培養ケラチノサイトは鐘紡株式会社薬品探索研究所 (現日本オルガノン株式会社研究開発本部) より提供を受けた。ケラチノサイトの培養には keratinocyte $\cdot$ SFM および Dispase を用いた。免疫細胞化学 (ICC) 法およびウェスタンブロッティング (WB) 法による誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 検出にはモノクローナル抗マウス iNOS 抗体を用いた。4種のサイトカイン (いずれもマウスリコンビナントの、インターフェロン $\cdot\gamma$ (IFN $\cdot\gamma$), 腫瘍壊死因子 α (TNF $\cdot\alpha$), インターロイキン $\cdot 1\beta$ (IL $\cdot 1\beta$), インターロイキン $\cdot 6$ (IL $\cdot 6$)), エンドトキシン (LPS) および過酸化水素のケラチノサイトに対する作用を検討した。RNA フィンガープリント法にはニッポンジーン社製, mRNA Fingerprinting Kit を, mRNA の5' 側配列解析には Invitrogen 社製, GeneRacer Kit を用いた。

1. 細胞培養

各系統の培養マウスケラチノサイトは Dispase を用いて分散し, K $\cdot$ SFM 中 37 $^{\circ}$, 5% CO $_2$ にて継代培養した。サブクローンの分離は, 継代培養中の NC/Jic マウス皮膚由来培養ケラチノサイトを Dispase を用いて分散し, コラーゲンコート 96 ウェルプレートに各ウェル細胞1個の密度にて播種し, K $\cdot$ SFM 中 37 $^{\circ}$, 5% CO $_2$ にて培養し, 増殖が認められたウェルの細胞を順次大きな容器に継代してクローンを得た。

2. RT $\cdot$ PCR 解析

継代培養中の各系統ケラチノサイトから総 RNA を抽出し, オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応により 1st cDNA 鎖を調製した。目的遺伝子の配列に従って設計したプライマーセットを用いて PCR にかけて, 予定サイズフラグメントの増幅を確認した。逆転写反応のコントロールとして, Glyceraldehyde 3phosphate dehydrogenase 遺伝子の発現を確認した。

3. マウスケラチノサイトにおける iNOS 誘導の検討

IFN $\cdot\gamma$, LPS による iNOS 誘導効果を検討した。35 mm ϕ ディッシュ内サブコンフレントの状態に IFN $\cdot\gamma$ (5 ng/ml) and/or LPS (1 μ g/ml) 添加培地に交換し, 24 時間インキュベート後に WB 法により iNOS を検出した。

4. 細胞増殖に対する諸種サイトカインの作用

マウスケラチノサイトの増殖に対する諸種サイトカインの作用は, 細胞播種時にサイトカインを培地中に添加し 72 時間培養後の細胞数を, 対照群と処置群とで比較して検討した。細胞数を直接計数する方法と, クリスタルバイオレット染色の比色定量を細胞数の指標とする方法 (CV 染色法) の両者を用いた。

5. RNA フィンガープリント法

NC/Jic マウスケラチノサイトサブクローン NCK2 $\cdot$ IGR および SGE(-) X12 より抽出した総 RNA から調製した cDNA に対して, キットのプライマーセットを用いた low stringency PCR を行い, 電気泳動後 SYBR Gold 染色, 蛍光イメージアナライザーを用いて両系統の増幅パターンを比較した。両系統間で濃度に差のあるバンドを切り出し, DNA を熱水抽出後 PCR により再増幅し, 得られた PCR 産物をダイレクトシーケンスにより配列解析した。5' 側配列は, キットを用いて SGE(-) X12 の 5' キャップサイト cDNA を調製し, キットの上流プライマー, 3' 側既知配列から設計した下流プライマーを組み合わせた PCR 増幅をかけ, 得られた 5' フラグメントをダイレクトシーケンスにより配列解析した。

[結果と考察]

一般的に, 近交系マウスは実験的皮膚炎症状を起こしにくい事が知られているが, 本研究に用いたケラチノサイトの起源マウス3系統のうち, 「アトピー素因」を持つと言われる NC/Jic 系統マウスに起こる皮膚炎において, ラジカル性の細胞障害メディエーターである一酸化窒素 (NO) とその合成酵素 iNOS の関与が示唆されていることから, 通常の継代培養条件下で増殖中の各系統ケラチノサイトにおける iNOS および神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 遺伝子の発現を, RT $\cdot$ PCR 法を用いて検討した。NC/Jic, BALB/c, C57BL/6 いずれの系統に於いても iNOS 遺伝子の発現が認められたが, 発現の強さは, NC/Jic と C57BL/6 のケラチノサイトにおいて

は同程度の発現が認められたのに対して、BALB/c系統では極めて弱い発現しか検出されなかった。nNOS遺伝子の発現はいずれの系統のケラチノサイトにおいても検出されなかった (Fig.11)。

ICC法WB法いずれを用いても、通常の増殖培養条件下ではどの系統のケラチノサイトに於いてもiNOS蛋白の発現量は検出限界以下であった。免疫系細胞に対するiNOS誘導効果が報告されているIFN- γ (5 ng/ml)を加えた培地中で24時間培養すると、3系統中NC/Jicマウス由来のケラチノサイトにおいてのみ、iNOSの誘導が認められた。一方、LPS (1 μ g/ml) はいずれの系統に於いてもiNOSを誘導しなかったが、IFN- γ が共存する実験条件下ではNC/Jic、C57BL/6の両者に於いてiNOS誘導が認められた。BALB/c系統のケラチノサイトでは、検討したいずれの条件においても蛋白レベルでのiNOS発現は認められなかった。iNOSタンパク発現に関しては、ICC法、WB法いずれの検出法を用いてもほぼ同様の成績が得られた。

NC/Jicマウスケラチノサイトの増殖に対する諸種サイトカインの作用を検討した。4種類のサイトカインのうちIFN- γ のみが増殖抑制効果を示し、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、は有意な効果を示さなかった。

NC/JicマウスケラチノサイトでiNOS免疫染色を研究中、IFN- γ によるiNOS発現誘導効果が細胞の継代数の増加に伴って減弱していく傾向を認めた。この現象の原因が、培養条件によるクローンのセレクションであろうとの仮定のもとに、IFN- γ の増殖抑制作用に対する感受性を指標に、限界希釈法を用いてIFN- γ 感受性の異なる2系統のサブクローン、NCK2-IGRおよびSGE(-)G12を分離した (Fig.12)。この2系統間には、IFN- γ 感受性の他に、細胞増殖の上皮成長因子依存性 (NCK2-IGRが依存性大)、過酸化水素によるアポトーシス誘導に対する抵抗性 (SGE(-)G12が抵抗性大) などの性質の違いが認められている。

系統的に近くIFN- γ 感受性の異なる2クローンが得られたことから、両者のIFN- γ 感受性の差に関連する遺伝子が見つけられるのではと考え、RNAフィンガープリント法を用いて、両系統間の発現強度に差の認められ

る遺伝子を検索し、SGE(-)G12系統においてより強い発現を示す、仮称IGSR-1遺伝子mRNAを新たに同定した (Fig.13B)。RT-PCR法を用いて各系統マウスケラチノサイトにけるIGSR-1遺伝子の発現を検討したところ、NC/JicとC57BL/6のケラチノサイトに強い発現、BALB/c系統では弱い発現と、iNOS遺伝子の発現パターンとの類似性が認められた (Fig.11, Fig.13A)。IFN- γ 単独ではiNOSが誘導されないC57BL/6系統においてIGSR-1の強い発現が認められたことから、IGSR-1はIFN- γ 刺激の受容過程よりも、iNOSの誘導過程により深く関連している可能性が示唆される。

マウスの諸組織におけるIGSR-1遺伝子の発現を同じくRT-PCR法により検討したところ、胸腺、脳において強い発現が認められた一方、肝、精巣における発現は極めて弱かった。胸腺、脳は、アポトーシスの現象がよく観察される組織であり、NCK2-IGRとSGE(-)G12のアポトーシス抵抗性の違いをふまえると、IGSR-1とこの現象間に何らかの関連があるかも知れない。

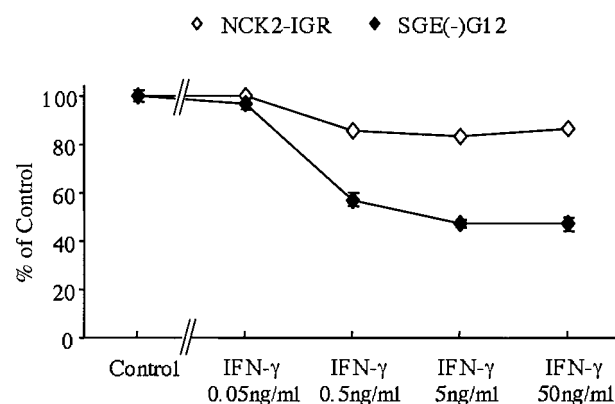


Fig.12 . Effects of IFN- γ on the cell growth of NC mouse keratinocyte subclone SGE(-)G12 (solid diamond) and NCK2-IGR (open diamond) in the presence of EGF (2.5ng/ml)

Cells were plated on the 96 well collagen coated plate at the density of 2500 cells/well. On day 4 of culture, cells were stained by crystal violet and the optical densities at 570/405 nm of extracted dye were measured as the indicator of cell number in wells. Data are expressed as means and standard errors of percentages relative to mean control (without IFN- γ) value of each subclone.

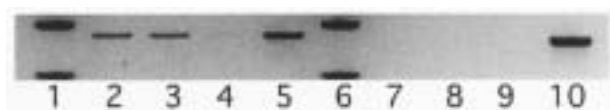


Fig.11 . RT-PCR analysis of iNOS and nNOS gene expression in cultured keratinocytes from newborn mice of three strains (Nc/Jic, BALB/c and C57BL/6)

Lanes 1-5: iNOS (1: Size marker 2: NC/Jic 3: C57BL/6 4: BALB/c 5: Positive control (Rat ovary)), 6-10: nNOS (6: Size marker 7: NC/Jic 8: C57BL/6 9: BALB/c 10: Positive control (Rat cerebellum)).

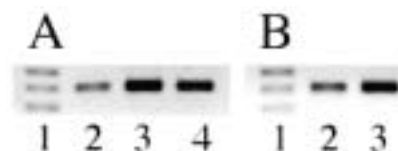


Fig.13 . RT-PCR analysis of IGSR-1 gene expression in cultured keratinocytes from mice of three strains (A) and two subclones separated from Nc/Jic mouse keratinocyte culture (B)

A Lane 1: Size marker (100 base pair ladder) 2: BALB/c 3: C57BL/6 4: Nc/Jic. B Lane 1: Size marker 2: NCK2-IGR 3: SGE(-)G12.

マウスゲノムDNA配列をもとに設計した種々のプライマーを用いたRT・PCR実験の結果より、培養マウスケラチノサイトにおいては、オルターナティブスプライシングによる少なくとも3種のIGSR・1遺伝子ホモログ(IGSR・2, IGSR・2', IGSR・4)の存在が予測された。4種のホモログ中IGSR・1 mRNAのみが, SGE(-) G12, NCK2・IGR両細胞での発現強度に差が認められた。この知見は, IGSR・1遺伝子の発現調節が転写終了後, スプライシングの段階で行われている可能性を示唆しており極めて興味深い。

4種のIGSR mRNAの配列から、理論上、C末部分に共通配列を持つ3種のタンパク(仮称MASP・1, MASP・2, MASP・3)が翻訳されることが予測される。IGSR・1遺伝子産物として予測されるMASP・1の配列中15アミノ酸の部分配列をペプチド抗原とする抗体を作成し、WB法を用いてNCK2・IGRおよびSGE(-)G12クローンにおけるMASP・1タンパクの発現を解析すると、約25キロダルトンの鮮明なバンドが確認された。バンド濃度はSGE(-)G12においてより濃く、mRNAレベルでの発現を反映しているものと考えられる。

今後はケラチノサイトを用いた遺伝子のノックダウン実験などを行って、IGSR・1遺伝子とIFN・ γ 感受性、iNOS誘導との関連を解析し、MASP・1タンパクの生理的役割を明らかにしたいと考えている。

【発表論文】

投稿準備中

(2) 化学物質によるアレルギー発症の指標としてのサイトカイン及びケモカイン遺伝子発現の解析

機能生化学部 手島玲子, 中村亮介, 澤田純一

【目的】

化学物質、薬物あるいは食物によるアレルギーはますます増加の傾向を呈しているが、その発症を高感度に測定する方法、また、アレルギー発症を予知する方法については開発が遅れているのが現状である。本研究課題においては、特に即時型アレルギーを高感度に測定するために、アレルギー担当細胞であるマスト細胞からのサイトカイン、ケモカイン等の遺伝子発現を指標にして、化学物質によるアレルギー発症のメカニズムの解析並びに検出法に関する検討を行うことを目的とした。

【方法】

アレルギー担当細胞であるマスト細胞として、ラット由来の培養マスト細胞株、RBL・2H3細胞を用いた。細胞は10%のFCSを添加したDMEM培地を用い、5%の

CO₂存在下、37℃で培養した。細胞の抗原刺激には抗DNP(di-nitrophenyl)IgE抗体と抗原(DNP・BSA)とを用いた。また、マスト細胞への影響が懸念される化学物質として、細胞内カルシウムイオン濃度上昇作用を持つ抗酸化剤DTBHQ(di-t-butyl hydro-quinone)を用いた。1×10⁵個のRBL・2H3細胞に1/800希釈のIgE抗体を添加した上でプラスチックプレートに一晩培養し、PIPESバッファーで洗浄後、10 μg/mlの抗原あるいは10 μMのDTBHQで37℃, 30分間刺激した。上清を採取し、定法に則って細胞外に放出されたβ-hexosaminidaseの活性を指標としてマスト細胞の脱顆粒を測定した。また、細胞内Ca²⁺の蛍光指示薬fura-2 AMで細胞を標識し、細胞内Ca²⁺濃度変化を蛍光分光光度計により測定した。

DNAチップによる遺伝子発現の網羅的解析は以下のように行った。1×10⁷個のRBL・2H3細胞を抗原またはDTBHQにより3時間刺激した。細胞を回収し、PBSで2回洗浄した後、TRIzol処理によりtotal RNAを抽出した。これを基に1st strand cDNAを調製し、二本鎖cDNAを得た。これをBioArray HighYieldにより*in vitro*で転写し、得たcRNAを加水分解処理により短い断片に調製した。これをAffymetrixのGeneChip(Rat Genome U34A array)にハイブリダイズさせ、Affymetrix Fluidics Stationにより洗浄及び染色を施した。蛍光をスキャンした画像からAffymetrix Microarray Suiteにより8799種の遺伝子発現量を数値化し、Silicon Genetics GeneSpring及びMicrosoft Excelを用いて遺伝子発現を解析した。発現の変化は、3回の実験に基づいたWelchのt検定(p<0.05)により有意な発現上昇及び発現減少を決定した。

発現変化が顕著であった遺伝子に関しては、TaqMan PCR法によりABI PRISM 7700 Sequence Detector Systemを用いてmRNAの定量を行った。この時、内標準としては、TaqMan^R Rodent GAPDH control reagentsを用い、GAPDHに対する目的遺伝子発現の比率を計算した。

次に、遺伝子発現と、タンパク質産生の関係を調べるために、ケモカインであるMCP・1(monocyte chemo-attractant protein 1)に関して、ELISAによるタンパク質の定量を行った。

【結果と考察】

RBL・2H3細胞を抗原で刺激したところ、細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、約20%の細胞内の分泌顆粒が放出(脱顆粒)された。一方、DTBHQにより刺激したときも、細胞内Ca²⁺濃度の上昇及び抗原刺激時と同程度の脱顆粒が観察された。これは、DTBHQが小胞体上のCa²⁺・ATPaseを阻害して小胞体からのCa²⁺の漏出を誘導するという我々の過去の知見¹⁾とよく一致する。

以上の条件においてRBL・2H3細胞を3時間刺激し、GeneChipによりそのmRNA発現プロファイル調べたところ、未刺激の状態に比べ、抗原刺激では162種の遺伝子の発現が有意に増加、130種が有意に減少していた。またDTBHQ刺激では、248種が有意に増加、355種が有意に減少していた²⁾。中でも、両刺激において共通する67種の遺伝子発現が増加し、共通する60種の遺伝子発現が減少していた。様々なサイトカインや受容体、シグナル伝達分子などが発現変化していたが、中でもケモカインであるMCP・1の発現上昇が顕著であった。

Fig.14に、GeneChipにより同定されたマスト細胞の刺激に応じて発現変化する遺伝子のうち、代表的な4種についてTaqMan PCR法により定量した結果を示す。GeneChipの結果から予見されたとおり、ケモカインMCP・1の発現増加が著しかった。MCP・1の発現はタンパク質レベルでも確認し、抗原及びDTBHQにより、約100 pg/6hr/2 × 10⁵ cellsのMCP・1が放出されることが分かった。MCP・1は単球・マクロファージの遊走を促すため、炎症反応に積極的に関与すると考えられている。抗原刺激だけでなく、抗酸化剤として使われている化学物質DTBHQ刺激がMCP・1の産生を強く誘導したことは、化学物質によるアレルギー促進のメカニズムを考える上で非常に重要であると思われる。

他のサイトカイン分子としては、IL(Interleukin)・3及びIL・4の発現増加が顕著であり、特にDTBHQ刺激の際により顕著であった。サイトカインの中でもIL・4は

体液性免疫を亢進させる働きが強いことから、DTBHQがIL・4の発現誘導を通じてアレルギー反応などの体液性免疫を増悪させる可能性が示唆された。また、両刺激において、ストレス応答遺伝子GADD45の発現が増加していた。GADD45は細胞がDNAに傷害を及ぼすストレスを受けた際に発現し、PCNA(proliferating cell nuclear antigen) と共同してDNAの修復や細胞周期の停止などに関与する分子として知られている。特にDTBHQ刺激においてGADD45遺伝子の発現が顕著であることから、DTBHQ刺激はRBL・2H3細胞にとって非常に大きなストレスとなっていることが分かる。マスト細胞においてGADD45遺伝子の発現が誘導されることが示されたのは本研究が初めてである。

マスト細胞の抗原及びDTBHQ刺激において網羅的な遺伝子解析を行った結果、MCP・1を始めとする多くの特徴的に変動する遺伝子、すなわちアレルギー反応のマーカーとして利用できる可能性を持つ遺伝子が同定された。また、これらの遺伝子の中には多くのEST(Expressed Sequence Tag) も存在し、これらの中にはアレルギー反応の抑制制御に関与する新規遺伝子候補が含まれている可能性があると思われる。本研究のようなDNAチップ技術に基づく遺伝子発現の網羅的解析は、化学物質によるアレルギー発症のメカニズムを考える上で非常に有用であることが明らかになった。現在、含窒素系農薬やフタル酸エステルなどによる遺伝子発現変化についても、同様な網羅的解析をすすめている。

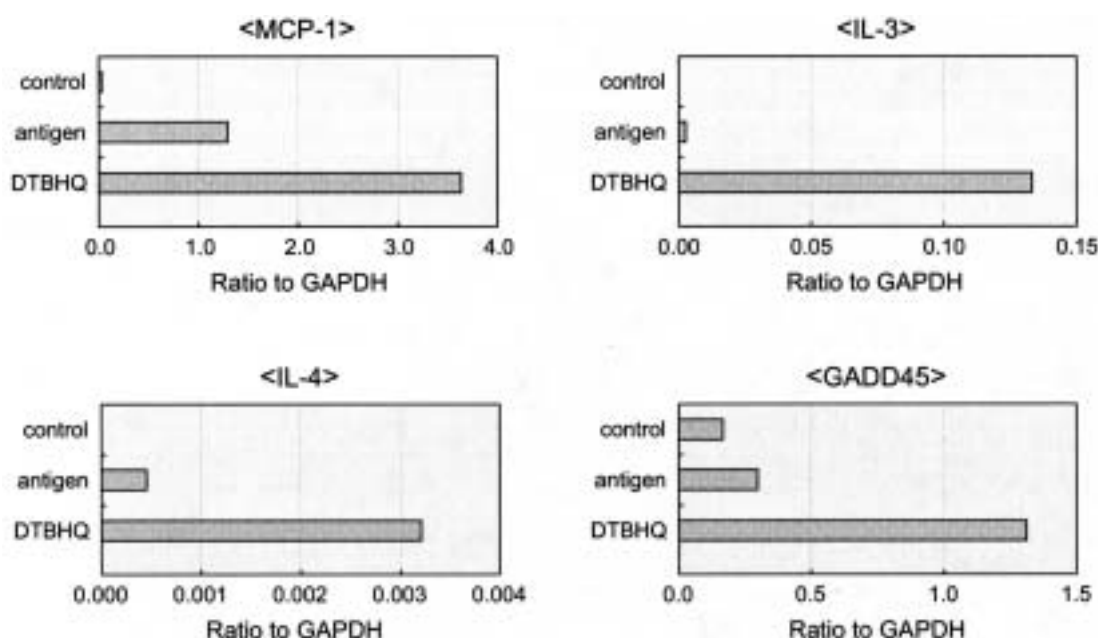


Fig.14 . Quantitative PCR analysis for MCP-1, IL-3, IL-4, and GADD45 mRNA

The mRNA expression levels in resting RBL-2H3 cells and cells stimulated for 3 hours with 10 μ g/ml antigen and 10 μ M DTBHQ are shown as ratio to GAPDH mRNA.

【発表論文】

- 1) Onose, J., Teshima, R. and Sawada, J.: Ca^{2+} -ATPase inhibitor induce IL-4 and MCP-1 production in RBL-2H3 cells. *Immunol. Lett.*, **64**, 17-22 (1998)
- 2) Nakamura, R., Ishida, S., Ozawa, S., Okunuki, H., Teshima, R. and Sawada, J.: Gene expression profiling of Ca^{2+} -ATPase inhibitor DTBHQ and antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Inflamm. Res.*, **51**, 611-618 (2002)

3. 遺伝子発現データベースを利用した安全性評価に関する研究

(1) 化学物質の安全性評価のための遺伝子発現プロファイル解析システムの開発

安全情報部 戸田恭子, 高井貴子^{*1}, 林譲, 中田琴子
^{*1}(現所属) 東京大学情報理工学系研究科

【目的】

統計解析と生物学的知識を統合した、遺伝子発現プロファイル解析システムの開発を行い、化学物質の安全性評価という目的に適したシステムの開発を目的とする。DNAチップを使う上での現状の問題点、測定結果のバラツキや反復測定による弊害をなくすため、統計的判定方法に関するプログラムを開発する。DNAチップによる遺伝子発現変化の適切な判定と解析を試みる。

【方法】

1. 市販の遺伝子解析ソフト Gene Spring を介したデータについて、情報部で既開発の細胞内シグナル伝達ネットワークデータベース (CSNDB) で解析する。
2. 胃粘膜上皮培養細胞系を用いて、(a) 無刺激分、(b) TNF- α 添加群、(c) ヘリコバクター・ピロリ抽出液添加群、(d) ヘリコバクター・ピロリ抽出液添加 + 薬剤投与群について Gene Spring を用いて解析する。
3. チップ測定の精度・検出限界をもとめ、あらかじめ推定した測定値のSDを規準にして統計的判定を行うプログラム (MS EXCEL マクロによるプログラム) を開発する。基本的考え方は機器分析の精度を求める理論 (FUMI理論) と同じであり、有意差検定は3つのステップから成る：(1) 同じ条件での測定値のバラツキが異常に大きいときは、この遺伝子データは解析から削除する；(2) 異なった条件での測定値の差が有意であれば、このデータは残す；(3) 異なった条件での測定値が、両方とも検出限界近辺の時は、このデータを削除する。最後に、データを増加と減少に分ける。(Fig.15)

【結果と考察】

1. 平成12年度は、Affymetrix社のヒトDNAチップを用いて測定し Gene Spring で処理した、発癌剤 (TPA) 処理後 EB ウイルス初期抗原を発現した Human B・Cell Raji 細胞に対する抗プロモータ剤レチノイン酸の効果に

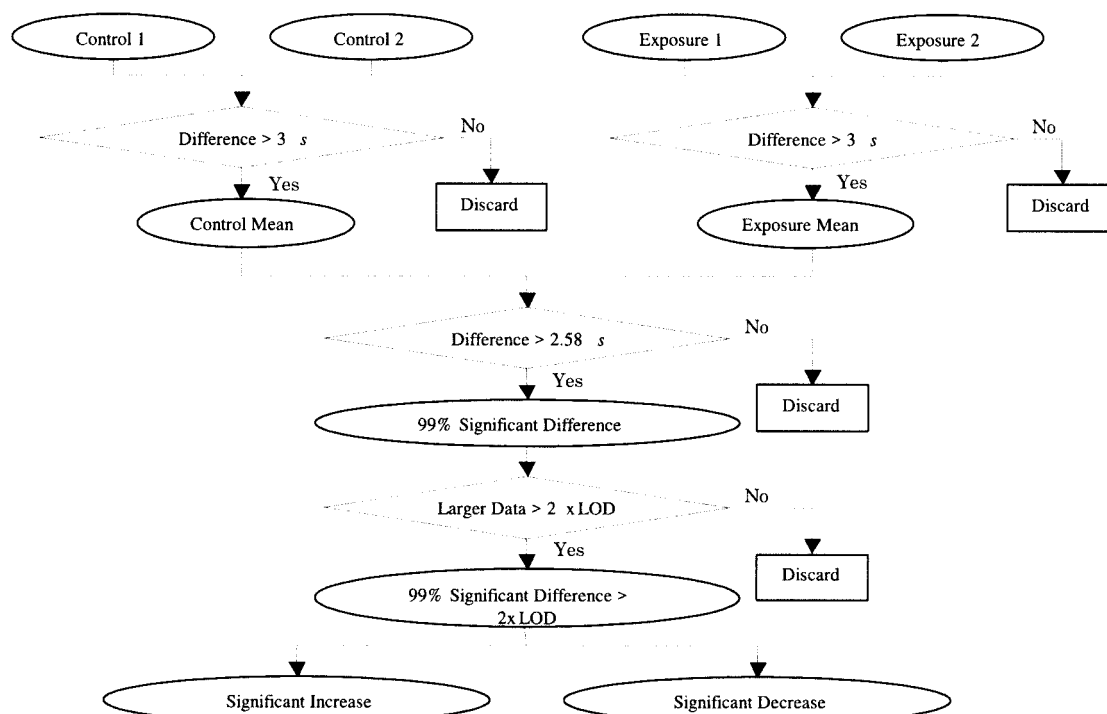


Fig.15 . Flow chart for the significant difference test

Analysis of a single pair of experiments should be skipped and the test begins at Step 2.

ついて、細胞内シグナル伝達ネットワークデータベース（CSNDB）を用いて、シグナル伝達系と遺伝子発現プロファイルの関連の解析を試みた。CSNDB内の遺伝子の登録制度と、Gene Springにおける登録制度が異なっていたので、両者の対応をとるためにGene Springにおける登録制度をCSNDBに追加した。またGene Springの処理結果を一度にCSNDBで解析するために、これまで逐一処理であったインタフェースに、バッチ処理を可能とする機能を追加した。解析の結果、同時に発現抑制されている遺伝子の間に、3種類のシグナル伝達経路が見つかった。いずれも細胞増殖に関わるパスウェイであった（Fig.16）。また同時に発現促進されている遺伝子の中に、分化誘導のパスウェイに関与する遺伝子（TGF- β ・3）があることを見出した。（遺伝子発現プロファイルデータは京都府立医科大学―石英一郎博士より提供された。）

2．平成13年度はGene Spring を用いて胃粘膜上皮培養細胞系を用いて、TNF- α （Tumor Necrosis Factor）添加における遺伝子発現変化とヘリコバクター・ピロリ菌による胃炎にて効果が期待される薬剤の影響についてGene Springを用いて解析し、遺伝子発現の型と信号伝達の関係づけを試みた。（b）～（d）の処理における発現の変化から関連があると期待される遺伝子を分類することはできたが、詳細な遺伝子発現パスウェイを特定するには至らなかった。もっと多くのDNAチップ実験デー

タを用いた解析が必要である。（DNAチップデータは京都府立医科大学―石英一郎博士より提供された。）

3．平成14年度はDNAチップ測定の精度・検出限界について研究し、前もって実施した実験から得られた測定値のSDを規準にして、くり返し測定（n）が1回または2回で統計的判定を行うためのプログラムを開発した。（DNAチップデータは当所薬理部の石田誠一主任研究官より提供された。）

この方法を用いたGeneChipデータの有意差検定の有用性については別途検討中である。

【 発表論文 】

- 1) Toda, K., Ishida, S., Hayashi, Y., Nakata, K., Matsuda, R., Shigemoto-Mogami, Y., Fujishita, K., Ozawa, S., Sawada, J., Inoue, K. and Shudo, K.: A novel algorithm to test significant differences in microarray experiments. *Genome Informatics*, **13**, 274-275 (2002)
- 2) Nakata, K., Toda, K., Ichiishi, E. and Kaminuma, T.: A Network-Based Array Data Interpreter. *Genome Informatics*, **12**, 261-262 (2001)
- 3) Ichiishi, E., Yoshikawa, T., Takai, T., Tokuda, H., Yoshida, Y., Hanashiro, K., Kaminuma, T., Yoshida, N., Nishino, H.: Effect of retinoic acid on cell proliferation-related gene expression in Raji cells induced by 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **30**, 21-31 (2001)

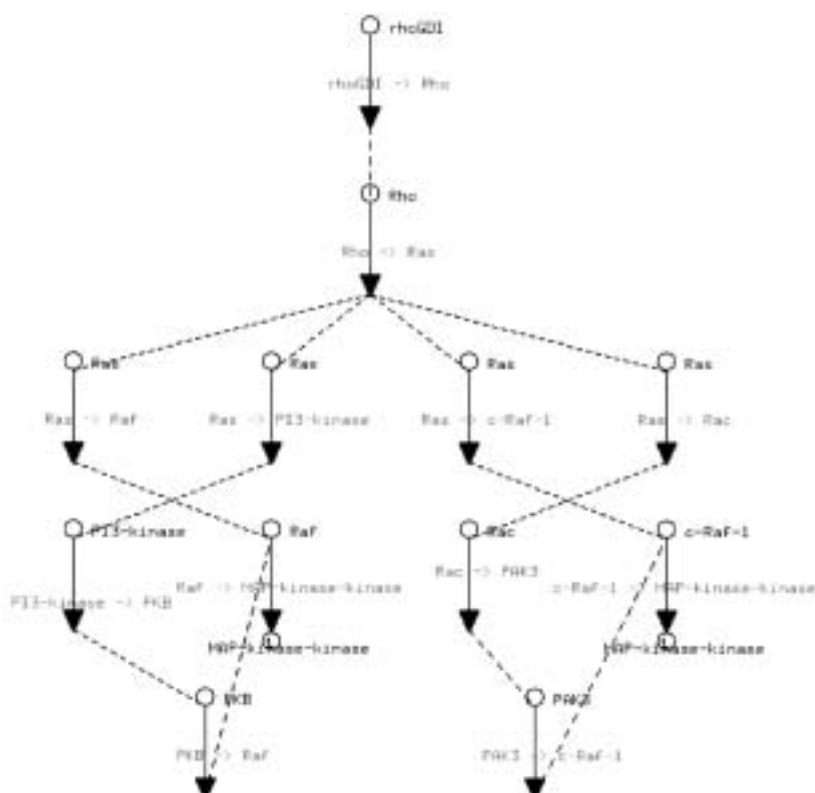


Fig.16 . An example of signal pathway among simultaneously suppressed genes

(2) 化学物質による遺伝子発現プロファイル解析のための文献情報検索

総合評価研究室 広瀬明彦, 江馬 眞
医薬安全科学部 長谷川隆一

[目的]

近年, ジーンチップ等を用いた遺伝子発現プロファイルリング技術のめざましい発展に伴い, 一度に何千もの遺伝子発現変化をとらえることができるようになったが, その膨大なデータ量のため, 未だに決定的な解析手法を見いだせない状況にあると思われる. 一般には, 遺伝子発現量と症状または毒性との相関関係を基にした統計学的手法が用いられるが, 生物学的パラメータを必ずしも反映していないのが現状である. そこで, 本研究では, 生体側の標的因子が同定されている内分泌かく乱物質について, そのレセプターを介した遺伝子発現指標と毒性発現量および暴露量との間の定量的な解析を行うことにより, 遺伝子発現を指標とした毒性評価への適用性について検証を行うことを目的としている.

[方法]

内分泌かく乱物質としては, 近年その低用量影響が最も注目されているビスフェノールA (BPA) を取り上げ, *in vivo* と *in vitro* の内分泌かく乱作用を検証した報告, BPA の暴露量および体内動態に関する約 80 の情報を MEDLINE などの文献情報検索や公表された各種報告書等を収集し, それらの情報整理と評価を行った. これらの情報のうち, *in vitro* 系の反応性と血中濃度に関しては BPA 濃度 (ng/ml) を, *in vivo* 系の毒性情報と暴露量情報は 1 日摂取量 ($\mu\text{g/kg/day}$) を基準として定量的解析を行った. その結果を基に BPA による低用量影響のヒトへの健康影響評価を行うと共に, 主に *in vitro* 系の実験から得られる遺伝子発現指標の化学物質の安全性評価への適用性について考察した.

[結果と考察]

In vitro 系におけるエストロゲン様活性を調べた文献からは, BPA のエスラジオール (E2) に対する相対的なエストロゲン活性は 1,000 分の 1 ~ 100,000 分の 1 の範囲で, ほとんどの報告は, 数千分の 1 から 1 万分の 1 の間に集中していた. また, レポーター遺伝子発現や MCF7 細胞増殖活性は, 概ね $10 \mu\text{M}$ ~ 10 mM ($1 \mu\text{M} = 0.229 \text{ ng/ml}$), エストロゲンレセプター (ER) へ結合阻害活性は $100 \mu\text{M}$ 以上の BPA 濃度で活性が現れることが示された.

また, *in vivo* 系の実験では, BPA によるエストロゲン作用や生殖期発生障害等の内分泌かく乱作用の有無に関し

て異なる結果が報告されている. 陽性結果を示す報告に限れば, 未成熟または卵巣摘出雌動物に対する子宮重量増加反応は, 最低用量は $100 \mu\text{g/kg}$ 以上から報告されているが, 多くは 10 mg/kg 以上で認められている. 精子数減少, 前立腺重量増加や膣開口の遅延などの胎児期及び授乳期暴露による主に生殖器官の発生異常は, $2 \mu\text{g/kg}$ 以上で認められている.

体内動態研究からは, ラットにおいて BPA は体内でほとんどがグルクロン酸抱合体化され 10 ~ 30 % が尿中に, 残りは胆汁排泄により糞中に排泄され, 体内消失半減期は 20 ~ 40 時間であると考えられる. また, 経口投与における未抱合体血中 BPA 濃度は投与後 1 時間前後と 3 ~ 6 時間後にほぼ同じ高さのピークを示す 2 相性の変化で, ピーク時の濃度は 10 mg/kg 投与で $31 \sim 40 \text{ ng/ml}$, 100 mg/kg 投与で $134 \sim 150 \text{ ng/ml}$ を示すことが報告されている. ヒトにおける代謝研究はほとんど報告されていないが, ヒト肝臓組織を用いた *in vitro* 研究では, げっ歯類と同様にヒトでも主代謝物はグルクロン酸抱合体であることが示されているほか, 要旨だけの限られた情報として経口摂取後の血中消失半減期は 3.5 時間であることが報告されている. その他, サルにおける経口投与時の尿中排泄の割合は約 80 % であることが報告されている.

一方, ヒトにおける暴露状況に関しては食事由来の平均摂取量調査で, 約 $0.03 \sim 1 \mu\text{g/kg/day}$ と見積もられ, 未抱合体の血中濃度としては, 約 $0.1 \sim 2 \text{ ng/ml}$ という値が報告されている. さらに尿中排泄量に関する報告では, 様々な単位が使用されているため, 報告値のままでは同一基準で定量化できなかった. そこで, ヒトの 1 日クレアチニン排泄量 ($14 \sim 26 \text{ mg/kg/day}$) や総尿量 ($1 \sim 1.5 \text{ L/day}$) の正常値を基に, 抱合体を含めた BPA 排泄量を推定したところ, 約 $0.01 \sim 0.2 \mu\text{g/kg/day}$ であると考えられた.

上記の結果を基に, まず *in vitro* 系研究での BPA 濃度を基準としたエストロゲン活性の発現状況とヒト血中濃度を Fig.17 にまとめてみた. 上段にはレポーター遺伝子発現や MCF7 細胞増殖活性, 最下段にはエストロゲンレセプター結合阻害活性の認められたレンジを示した. なお, 同じ報告の中で陽性対照として用いたエスラジオールに対する活性レンジを左側に点線で示してある. また, 中段の上側には, ヒト及びラットにおける通常のエスラジオール血中濃度レンジを, 下側にはヒトで報告されている BPA の血中濃度レンジを示した. その結果, この Fig.17 からは, ヒトの BPA 血中濃度の高い領域では, レポーター遺伝子発現や MCF7 細胞増殖活性が現れる濃度領域に極めて近いものであることが示され, 血中濃度がそのまま標的組織中の BPA 濃度を示すわけではないが, 現状のヒトの BPA 暴露レベルでも, エストロゲン作用が発現する可能性を示唆しているように見える. しかし,

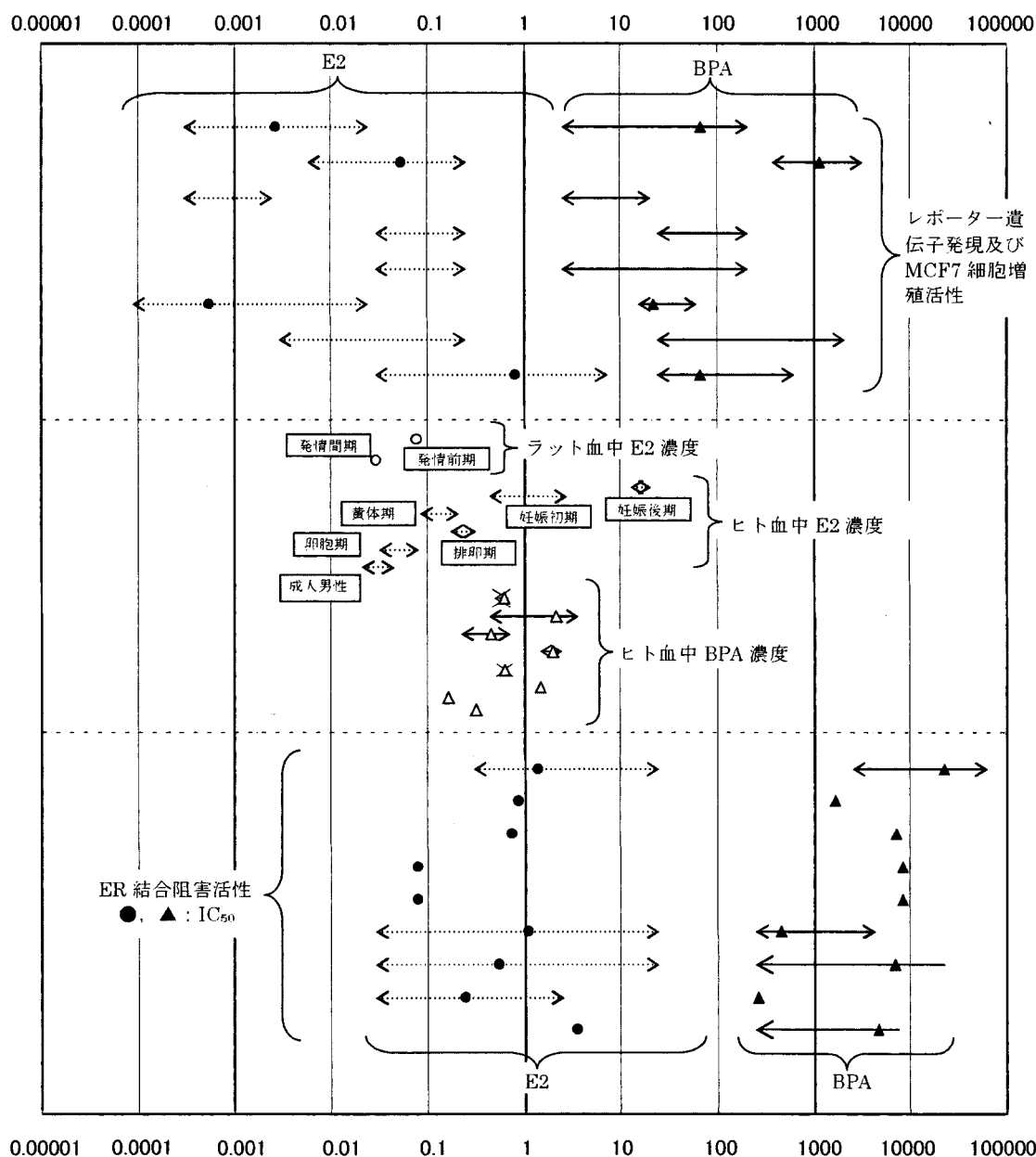


Fig.17. *In vitro*試験系およびヒト血中のビスフェノール濃度の比較 (ng/ml)
 上段と下段の矢印の範囲は用量反応シグモイド曲線の上端及び下端濃度を示し、
 上段の"●"および"▲"はEC₅₀を、下段の"●"および"▲"はIC₅₀を示している。

通常の生体内エストラジオール濃度はビスフェノール濃度よりやや低い値でしかないことは、両者の相対的活性強度の比が1000倍以上であることからすると、現状のBPA暴露レベルにおける生体内でのエストロゲン作用発現には疑問が残る。このことは、標識エストラジオールを用いたBPAの結合阻害活性が、レポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性よりも高い濃度から示されていることから指示されと思われる。

次に、*in vivo*系の実験結果とヒトのBPA摂取量を体重あたりの1日摂取量を基準としてFig.18にまとめた。上段には、胎児期及び授乳期暴露による影響、下段には

未成熟または卵巣摘出雌動物に対する子宮重量増加作用の現れる用量レンジを示した。なお、各実験の設定用量のうち影響の認められなかった用量は白抜きのシンボルで示した。また、中段にはヒトにおける摂取量調査の結果と尿中排泄量から逆算した1日摂取量を示した。経口摂取によるヒトの尿中排泄の割合は知られていないが、ラットで約10～30％、サルで約80％であることが報告されているので、安全性を見込んだ観点から尿中排泄の割合を10％として算出した。その結果は0.01～2 µg/kg/dayとなり、1日摂取量調査結果の値とオーバーラップするものとなった。このFigからは、齧歯類における

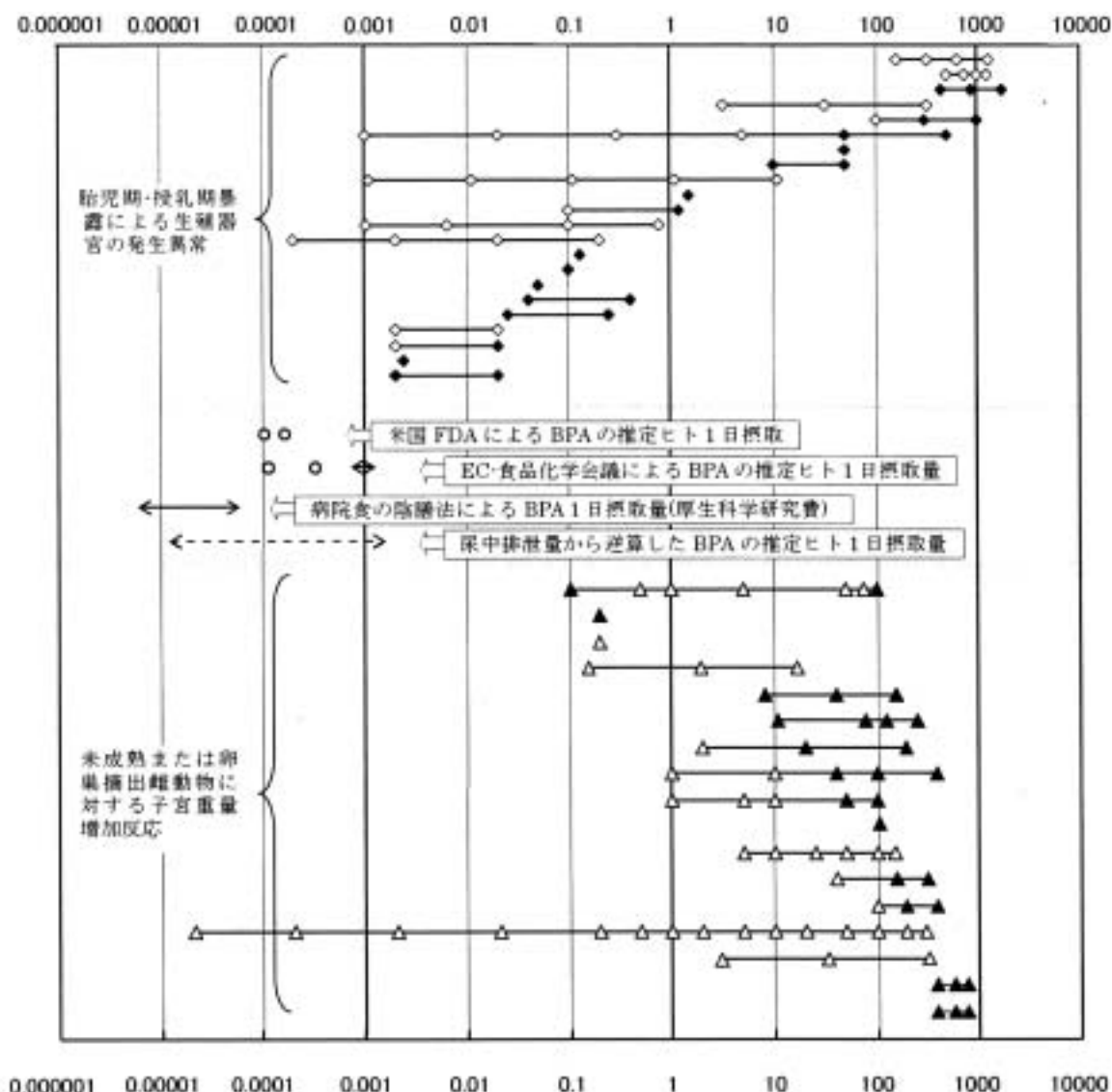


Fig.18. *In vivo*試験系における投与量およびヒト摂取量の比較 (mg/kg/day)
 上段及び下段の白抜きシンボル (○, △) は有意差のある影響が認められなかった用量を示す。

胎児期及び授乳期暴露による最低影響用量とヒトで推定される摂取量がほぼ同じレベルであることが示され、現状のヒト暴露量においても内分泌かく乱作用が発現する可能性を示唆するものとなった。一方、*in vivo*系で直接エストロゲン活性を測定できると考えられている未成熟または卵巣摘出ラットの子宮重量増加に対する影響は、0.1～0.2 mg/kg/dayでも認められるとする報告もあるが、その他の結果を総合すると、概ね10 mg/kg/day以上の投与量で子宮重量増加が引き起こされると見ることができる。このエンドポイントに限れば、現状のヒト摂取量との間に十分なマージンのあることが示された。

これら2つのFigを比較すると、Fig.17における*in vitro*系でのレポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性発現濃度レンジとヒトBPA血中濃度レンジとの位置関係が、Fig.18における*in vivo*試験系での胎児期・授乳期

暴露による影響が表れる用量レンジとヒト摂取量との位置関係と相似しているように見える。このことは、BPAについては、エストロゲンレセプターを介する遺伝子発現を指標とした研究結果が、血中濃度との比較を行えば、直接*in vivo*における影響を予測し得ることを示唆しているとも考えられる。しかし、これにBPAに関する代謝研究から得られる情報を考慮するといくつかの矛盾が浮き彫りにされる。上述したように、10 mg/kgのBPAをラットに投与したときの最高血中濃度は30～40 ng/mlであることが示されているが、この濃度レンジは、ちょうどFig.17での*in vitro*系でのレポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性発現濃度レンジと重なる。また、この代謝研究の投与用量：10 mg/kgはFig.18における子宮重量増加反応が認められる最低投与量とほぼ同じである。つまり、エストロゲンレセプターの反応を見る*in*

vitro 及び *in vivo* の試験系が血中濃度を基準にすると同様の濃度レンジで発現していることを示唆することになる。この過程に基づくと、 $2 \mu\text{g/kg/day}$ の低用量から認められる胎児期・授乳期暴露による低用量影響は、 pg/ml レベルの血中濃度で誘発されることになるが、*in vitro* 系において、この濃度レベルで検出できる指標は報告されていない。また、ヒトでは $0.01 \sim 2 \mu\text{g/kg/day}$ のビスフェノールを摂取した結果、血中濃度が $0.1 \sim 2 \text{ ng/ml}$ となっていると考えられるが、このヒトにおける血中濃度は前述したラットの代謝研究から予想される濃度より著しく高いものになっていることも同時に示唆される。

今回の研究では、明確な定量的安全性評価を行うことはできなかったが、BPAの安全性評価を行うに当たり少なくとも2つの今後の検討項目を示すことができたと考えられる。まず一つには、BPAによる低用量影響を引き起こす原因は、今まで指標としてきた遺伝子発現よりも低濃度で惹起されている可能性が示唆されたことである。これには、ジーンチップ等を用いた遺伝子発現解析をより低濃度で行うことにより補足することが可能であ

るかもしれないし、その遺伝子の同定は、低用量発現メカニズムの解明や毒性学的意味合いの確定等に役立つと考えられる。二つ目には低用量摂取による体内動態研究を血中濃度のみならず標的臓器で行う必要があることも示された。今回は血中濃度レベルのみでの比較を行っているので、必ずしも影響発現との相関を示しているとは限らない。標的組織でのBPA濃度や低用量摂取における体内動態の情報があれば、上記の矛盾は解消されるかもしれない。

結論的に今回の研究では、化学物質の安全性評価において遺伝子発現指標を用いると、その定量的評価に対して十分な情報を提供できることが示されたが、今後さらなる指標探索や代謝研究などの基礎的研究の発展が望まれるところである。

【発表論文】

- 1) 広瀬明彦, 江馬 眞, 鎌田栄一, 小泉睦子, 長谷川 隆一: ビスフェノールAの内分泌かく乱作用のヒトへの健康影響評価. 日本食品化学学会誌, 10, 1-12 (2003)