

DNAマイクロアレイ技術を用いた内分泌攪乱化学物質の 影響評価の試験法開発

近藤 昭宏

宝酒造株式会社 バイオ研究所

宝酒造の近藤です。本日、このような場所で、私どもの研究を発表させていただく機会を得ましたことを大変光栄に思っております。

我々は先程、イントロでもありましたように、DNAマイクロアレイ、DNAチップを用いてEDCの活性を図ろう、そしてそのリスクアセスメントを見ようというテスト法を開発しております。ここに挙げましたように、本日は何度も出てきていますが、環境ホルモンとおぼしきもの、もしくはノニルフェノールについて、魚はその活性が確認されたという報告でありましたように、このような化合物がリストされています。それらの作用はここに示しましたように、正常なホルモンのレセプターを介するような正常なホルモンの作用の部分に、外界から直接入って作用します。もしくは代謝されたその化合物が作用して、攪乱状況を引き起こします。このような部分の反応を攪乱作用、そしてこの化合物を攪乱物質と呼んでいるわけです。

このアッセイには先程来、いくつか紹介されていますように、例えば *in vitro* のアッセイではレセプターの結合アッセイ、それからレポーター遺伝子・アッセイ、また、これはEスクリーン法で有名な、セル・プロリファレーション・アッセイ（細胞増殖アッセイ）です。この *in vivo* については子宮肥大試験だとか、ハーシュバーガー試験、それからいわゆる毒性学の試験法を応用したこれらの試験法が用いられています。

しかし、これらの試験法は先程来の報告にもありますように、必ずしも内分泌攪乱作用の検査には十分ではありません。その理由は、例えば一番問題となっているのが、ここに示したようなローレベル・エクスポージャー、もしくはロー・ドーズ・エフェクトで言われているような作用です。それがロングタームにて行われます。もしくは子宮内、もしくは母乳を通じて、幼児あるいは胎児に影響を及ぼします。

このような問題を解決するためには、先程来説明した方法が必ずしも十分ではないのはおわかりいただけると思います。

そこで我々は反応が起こったあとの部分も、この結合を見ているのですから、その結合のあとのシグナルを遺伝子の流れで見たいと思ったわけです。そして、例えば先程のこの部分をもう少し詳しく書いたのがこれですが、別にこれはエストロゲンのレセプターと限ったわけではありませんが、ある外からのリガンドがレセプターを通じてシグナルとして入ったときに、正常なホルモン作用ではない攪乱作用に分かれていくであろう分岐点があるだろうと。この辺の遺伝子を調べれば、攪乱作用を臓器の異常や異常な行動などが起こる前にチェックできるのではないかと思います。

これはDNAチップの図ですが、DNAチップ（DNAマイクロアレイ）自身にはどういう利点があるのかといいますと、この一番上にありますようなハイスループットのスクリーニングができます。普通のハイスループットは、化合物をいきなりたくさん検査できるということですが、この場合はある化合物について、種々多様な遺伝子の影響の発現や抑制を見ることができるという意味のハイスループットです。そのドーズ、それからタイムコースの辺を変えていった事件を重ね合わせますと、パスウェイの解析も可能となります。そして見つかったキー・遺伝子のタンパクへの転写物質を同定できれば、バイオマーカーとしての可能性もあります。

ここにリストしたのは、我々がチェックしたDNAチップに乗せた遺伝子群です。核レセプターやオンコジーン、シグナルトランスダクション・遺伝子であるとか、コ・ファクター、それから生殖腺の分化因子です。試験に用いたシステムは、*in vitro* と *in vivo* があります。*in vitro* は、バイオ細胞を用いました。ERARがエクспレスされているような細胞を用いて、そのデータをデータベース化したわけです。*in vivo* の場合は、子宮内曝露をまず行いました。そしてその胎児の脳の遺伝子の動きを調べましたが、これについては先ごろの環境ホルモン学会でも発表しましたので、今日はこの部分の細胞についての話をします。

繰り返しになりますが、私どものゴールとしてはGエクспレッション・プロファイルのデータベース化、これは化合物ごとにも行いますし、遺伝子ごとにも行います。これはそのデータ自身が積み重なれば、いろいろ

ろな局面で多方面の方々にご利用いただけると思います。そしてそれで見つかった攪乱にかかわるようなキーン、この遺伝子のアイデンティフィケーションと、バイオマーカーのアイデンティフィケーションをします。

これが私どもが今回お示しする、実験に用いた細胞ですが、非常によく使われている MCF 成分と、ごく同類に使われている T-47D です。これは両方とも乳癌細胞ですが、ビヘイビアがわりと異なるというのを、あとのデータでお示します。

次がアンドロゲン・レスポンスな遺伝子です。それぞれの細胞をはやして、プレインキュベーション、これはいわゆるエストロジェニックなレスポンスを抑える意味で、EDC をかける前に、細胞によって 96~120 時間と差があるわけです。そのプレインキュベーション後に EDC をかけたもの、かけていないもので、6 時間インキュベーションを行っています。そしてそれぞれのメッセンジャーを回収し、ラベルします。そしてラベルド cDNA を得るわけです。そして 2 色法でスキャンします。そうするとテストの方は赤く染めていますから、化合物を入れたときに赤く出てきたスポットについては、たくさん発現しているわけです。緑色の場合はコントロールでしか出ていません。テストの場合は出ていない。要するに抑えられたということですし、その間は例えばオープンであったり、それぞれ数字として現れてくるわけです。

これが実際のスポットで、ここが赤く非常に発現していますし、これは緑色で非常に抑えられているわけです。そうするとこの間のスポットはどのようになるかといいますと、例えばこれがコントロールで、これがテストであり、この比率を求めると何倍ということがわかります。

そのように出たデータを比率計算して、ノーマライゼーションを行って、データとして一つ一つ積み重ねていって、例えば化合物ごとにそれぞれのデータをクラスタリングを行ってみます。そして次に示しますように、ビスフェノール A、DES (ジエチルスチルベストロール)、E2 (エストラジオール)、ゲニステインで、クラスタリングを行った結果がこれです。このときの細胞は MFC-7 ですが、こちらの方はどの遺伝子がクラスターを持っているか。こちらは化合物ごとのクラスターを見たものです。今日は特にこの化合物ごとのクラスターについてご説明します。

このデータでは 2 番と 3 番、DES と E2 がよく似た動きをしており、その次にはゲニステイン、ビスフェノール A は DES、E2 よりも相当離れた動きをしています。これはこの 1~7 番に示しましたような EDC 活性が疑われている化合物のデータで、先程と同じようなアッセイをしました。そのときに 2 番、3 番、4 番、5 番のあたりの化合物は、エストロジェニックなアクティビティを持っていることがわかっています。例えば PS-2 プロテインは非常によく発現していますが、この 1 番については抑えられています。

このようなことがわかりますし、それをピックアップして示しますと、先程来説明していた MCF-7 の図がこれですし、T-47D がこのようですが、E2 を中心に書いてみますと、結構違うパターンが出ているのではないかと思います。

しかし、実はエストロジェニックなコンパウンドを赤く染めてみますと、このかたまりはここに移動しているだけで、EE (=E2) と DES との関係が違うだけです。ですから、このグルーピングは全然崩れていないということです。それは、例えばどうして崩れているかという、ER の発現に関しては、どの化合物についても MCF 成分と T-47D とでそんなに大差はないわけです。ところが PS2 の反応については、MCF 成分が非常にエストロジェニックな化合物について発現しているのに対して、T47-D はあまり大した発現を示していません。これがエストロゲン・レセプターについてはその逆で、NP と DBP についてはこのような結果が出ています。これが先程のようなクラスタリングの差を生むわけです。

これはファクター群について見た場合に結構同じ事がいえて、P300 についてはよく似た発現パターンです。ところが、SMAD-3 とか、ACTR については、MCF 成分ではエストロジェニックな化合物を投与すると抑えられています。T47D ではもともとこれらは発現していません。このような差があることから、先程のようなクラスタリングの差が出てくるわけです。

これは精巣系の細胞であるセルトリセル・ライディヒセルのパターンです。ライディヒセルについては、先程のエストロジェニックな反応をする乳癌細胞と似たように、エストロジェニック・コンパウンドはわりと固まっていますが、セルトリセルについてはこのように分かれています。それぞれの遺伝子について、それは説明できますが、今回は時間の都合で割愛します。

今のようなかたちで今回お示ししましたのは、化合物のクラスタリングです。そして横側の遺伝子のクラスタリングと組み合わせることによって、ここにあるキー・ジーンが絞られていきます。今後、そういうデータをどのように使っていくかといいますと、今、用いておりますヒューマンの場合は癌細胞だったわけです。ですから、それをもう少しレスポンスがいい正常細胞、これは乳腺由来の細胞ですし、これは子宮平滑筋由来の細胞です。それからセルトリ、ライディッヒも初代培養細胞を用いています。それらを同じようなアッセイをした後に、今までのデータと比べてみましょうということです。

in vivo の実験についても、実際のエストロゲン活性を図るのに非常によく用いられている子宮肥大試験の、実際のその中での遺伝子の動きがどうなっているか、そういう遺伝子の動きをデータベース化したものと比べてみようという仕事を行う予定です。

ここでもう1つ、この場で話題を提供したいと思います。これは新しく我々がトライしようと思って、現在、計画しているレーザーキャプチャー・マイクロ・ディセクションという、レーザー光線で細胞をピックアップして、その細胞ごとの反応をDNAチップで見ようという実験です。切片から分化前のその細胞をピックアップしたあと、10の6乗ぐらい細胞がいるわけですから、ここで取れてくるのは何枚か用いた場合でも、せいぜい数百です。それをアンチセンス・アンプリファイド RNA の方法でもって増幅し、DNA チップにもっていかうという実験も計画しています。

最後に、これらの実験は東京理科大学の武田先生のグループ、それから岡崎基生研の井口先生のグループと共同で行いました。ご清聴ありがとうございました。