

# 内分泌攪乱化学物質のトキシコジェノミクス評価

ティモシー リチャード ザカロフスキー

米国 ミシガン州立大学

ありがとうございます。1枚目のスライドを映してください。どうも。本題は2枚目からですので、次のスライドをお願いします。

地球規模での評価技術が開発、利用可能になったおかげで、毒性学の分野にはまったく新しいパラダイムが登場しつつあります。そのパラダイムで主張されているのは、人工化学物質だけでなく天然化学物質やそれらの混合物への慢性・亜慢性曝露のリスクをもれなく評価するためには、生物個体、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームの各レベルにおける生理学的、細胞学的、分子的影響のより包括的な理解が必要です。

今日は、トランスクリプトームに関するこの領域における我々の取り組みについてお話しします。次のスライドをお願いします。

現在、我々の研究室では、トキシコジェノミクスに関するものやトランスクリプトーム研究など3つのプロジェクトが進んでいます。その1つ目が、内分泌攪乱化学物質への妊娠期・授乳期曝露による生殖能発達や精子の質への影響を調べる研究です。この研究は、カエン・ショウ氏とピーター・サーマ氏と共同して行っています。

2つ目が、合成・天然内分泌攪乱化学物質が *in vitro* においてヒトの神経細胞分化に与える影響を調べるものです。

最後に、内分泌攪乱化学物質とその混合物を *in vitro* および *in vivo* のモデルに用いて、その遺伝子発現プロファイルを明らかにしようとするものです。

時間に限りがありますので、今回は、これら進行中のプロジェクトの実例として1つ目の研究で用いているトキシコジェノミクスの分野で我々が行っていることを取り上げ、そのプロジェクトを進めるために我々の研究室で開発を進めているインフラストラクチャについてお話しすることにいたします。

この発想は2つの部分からできています。その第1段階は、内分泌攪乱化学物質として特異的なモデル物質が生殖能発達や精子の質に影響を与えるのかどうかを判定することです。

それをうけて第2段階は、精子産生に影響を与える可能性のあるその他の物質を同定するのに有用なバイオマーカーを明らかにし、さらに、そのバイオマーカーを野生の両生類、爬虫類、鳥類、水生動物などの他生物種に外挿し、同様の反応が見られるのかどうかを調べます。次のスライドをお願いします。

男性の内分泌攪乱において、一般の関心を集めている問題点は実際には3種類があります。その第1が、おそらくはもっとも強い関心を集めているものかもしれませんが、精子数と精液の減少についてです。第2の問題点は生殖器系の奇形についてであり、この問題も大きな関心の的であり、時の経過と共に関心が強まっています。第3の問題点は、精巣がんの発生率の増加についてです。

そのいずれの場合にも、発生の臨界期において内分泌攪乱化学物質に曝露した個体は、生涯の後の段階、主に性成熟に達する時期において健康への悪影響を受けやすくなると考えられています。次をお願いします。

ここに、シャープ-スカケベックの仮説を図示しました。同時に、この仮説の根拠となる具体的なメカニズムも示してあります。このスライドには、精子について、精子数の減少とその理由が描いてあります。

基本的に、精子と精子数はセルトリ細胞の数で決定されます。さらにセルトリ細胞の数はFSHによって制御されています。FSHはセルトリ細胞を増殖させます。セルトリ細胞は精子を養う保育細胞として働きます。したがって、セルトリ細胞の数は、実際にどのくらいの数の精子が産生されるのかを示しています。

このFSHによる制御は、エストロゲン類による負のフィードバックがかかっています。したがって仮説では、発生期に内分泌攪乱化学物質への曝露の結果として、エストロゲン様物質に曝露したりエストロゲン負荷量が増大したりすると、エストロゲンのレベルが高くなり、負のフィードバックがそれだけ強まることになり、FSH分泌が低下し、セルトリ細胞数が減少します。その結果、男性が成人した際に精子数が少なくなるわけです。

このプロジェクトで我々が目指したのは、この仮説を試行検証して、そうした有害作用の予測に役立つ、精巣遺伝子発現の有力なマーカーを見つけ出すことでした。次のスライドをお願いします。

我々はその研究において、この種の作用を生物の 4 つの異なったレベルで検証するという包括的な評価戦略を採用しました。

発生レベルでは、二次性徴、体重、臓器重量および、肛門性器間距離などの発生指標について調べました。

組織レベルでは、精巣を調べました。我々はこれを組織病理レベルで調べており、うまくすれば *in situ* ハイブリダイゼーションを用いることでこのレベルに帰着させることができるでしょう。

細胞レベルでは、精子産生もしくは精子の質について調べました。精子の数と運動能を調べ、*in vitro* での受精によって質も調べました。

ゲノムレベルでは、マウス精巣の遺伝子の発現について調べました。これには、我々が開発した cDNA マイクロチップによるマイクロアレイ技術を用いました。そして、該当遺伝子の発現をリアルタイム PCR で検証しました。次のスライドをお願いします。

研究デザインの概要がこれです。3 種類の化学物質を研究対象にしました。ジエチルスチルベストロール、この物質は、妊娠中にこの薬物を処方された母親から生まれた子供の男女ともに、有害作用を及ぼすことが知られています。ゲニステイン、これは大豆に含まれているフィトエストロゲンです。エチニルエストラジオール、これは経口避妊薬に使われるエストロゲン様物質です。

本日の講演では、ジエチルスチルベストロールを中心に、その結果を示しながらお話します。ゲニステインについてはつい先ごろに結果がすべて揃い、エチニルエストラジオールは現在、まだ処置段階にあります。

実験の期間とそのレイアウトを時間軸に沿って示したものがこれです。我々は C57BL/6 と DBA/2 の交配系を用いました。交配系を用いたのはなるべく良い結果を得る必要があったためであり、この交配系が *in vitro* 受精において最良の結果が出たモデルだったので、我々の先端的な試験においても適していると考えたからです。

処置は、妊娠期間から授乳期間にまたがって行いました。妊娠 12 日に処置を開始し、生後 21 日まで続けました。子個体については、分娩時にいろいろなパラメータを測定しました。生後 21 日には、それらに加えて肛門生殖器間距離、精巣の重量と組織、さらに遺伝子発現についても調べました。15 週と 45 週には、精子運動能、精子数、*in vitro* での受精能など、精子についても調べました。次のスライドをお願いします。

ジエチルスチルベストロールの結果を、ここにまとめました。精巣重量については、ご覧のように、10  $\mu$ g/kg という高用量のジエチルスチルベストロールに曝露した個体に、第 3 週、15 週、45 週で有意な低下が見られました。この用量は、ヒトにおいて実際に起こった曝露量の範囲内です。

本実験では、開始濃度を高くしないようにしました。開始濃度を高くすると生殖器系の奇形が引き起こされるために、本来なら精子の質を調べるためのこの研究にとって不都合である不必要な奇形発生事象がこれらの個体に起こる可能性があるからです。

ご覧のように精子数も、10  $\mu$ g/kg の段階で有意に減少しました。精子数の減少は用量依存性であるようにも見えますが、有意だったのは高用量の場合のみです。次のスライドをお願いします。

続いて精子の運動能について調べたところ、精子運動能には影響はありませんでした。15 週と 45 週において用量依存性とも見える傾向が観察されましたが、統計的に有意ではありませんでした。

高度な試験—これは精子受精能試験ですが—高用量段階で有意な低下があります。このアッセイでは、精子数を全個体を通じて標準化し、それを 1 個体の雌から採取した卵と一緒に培養し、卵割の観察を行いました。

このアッセイでは、興味深いことにジエチルスチルベストロールが最小の用量の場合に、精子の質に向上が見られたことです。また、弱いエストロゲンであるゲニステインでの実験で興味深いのは、高用量のゲニステインにおいて、精子の *in vitro* 受精能にやはり向上が見られたことです。このことから、エストロゲン類への低レベルの曝露の結果として、精子活動に増強が起こりうる考えられます。次のスライドをお願いします。

このことを、このプロジェクトにおけるトキシコジェノミクス部分で検証するために、我々はいくつかの市販アレイを用いて実験をしてみました。しかし、それらの製品は我々が調べたいエンドポイントの実験には使えないということがすぐに判明しました。市販のアレイは精巣に特異的ではなく、ある時点で精巣で発現する遺伝子の 5~10%しか含まれていないのが通常だったからです。

そこで我々は、精巣で発現する遺伝子を含んでいる cDNA マイクロアレイを自分たち自身で開発するという、野心的な計画にとりかかりました。このアレイは、数多くのいろいろな分野から集めた遺伝子を含んでおり、現在でも拡張が続いています。当初は、確認済みの遺伝子が 960 配列含まれていました。その遺伝子の大部分は、デヴィッド・ディックス氏を通じて EPA のマイクロアレイ・コンソーシアムから入手しました。これらの内約 300 は、精巣に発現することがわかっています。

その後、I.M.A.G.E コンソーシアムから約 1200 配列のクローンを入手しました。その中から、自分たちで配列検証し、特異的プラスミドを分離することで、分離・配列検証済みのユニークな cDNA と EST を 1304 個、得ることができました。さらに、自分たちが調べたいと思ったものや、調べている最中の遺伝子を選び抜きました。これがそれで、エストロゲン誘導性の遺伝子が 200 種、アンドロゲン誘導性遺伝子が約 75 種、ダイオキシン反応性配列を含む遺伝子が 400 種含まれます。こちらが一連の対照です。次のスライドをお願いします。

これが、我々のマイクロアレイのバージョン 2 です。スポットのひとつひとつが、1 種の cDNA か EST を意味しています。どのスポットも、ラベルと共にアレイ上に 2 個ずつプリントしてあります。我々は精巣を扱っていますので、RNA は十分にあります。また、サンプルへの Cy5 と Cy3 の直接結合も自分たちでやっています。Cy5 は処置群の動物であり、Cy3 は対照群の動物です。これらは時間をマッチさせた対照でもあります。

画像解析は、GenePix ソフトウェアを用いて行いました。この画像はこのソフトウェアで得られたものですが、このソフトは実際には、我々の研究室が開発した GP3 というスクリプトを用いて後処置を行っています。GP3 は、データの訂正、フラグ立て、正規化、変形を行い、率と品質管理のレポートを作成します。

続いて、データ分析に移ります。データ分析は GP3 で出力されます。データ分析には 2 つの方式があります。その第 1 がスクリーニング処理というもので、実験処置の結果として何らかの影響が実際に起きた遺伝子を同定するものです。続いてもう少し洗練された方法を使って、クラスターになったこれら遺伝子群の中の傾向や関係性を検証します。

最後に、これら情報をすべて、dbZACH に入力します。dbZACH は、サンプルおよび遺伝子の追跡、データの蓄積、検索のためのリレーショナルデータベースです。次のスライドをお願いします。

このスライドは、我々が取り組んだ作業の全体像を示したものです。この方法で、こうしたプロジェクトで生み出される莫大な量のデータの追跡が可能になりました。得られた画像は、TIFF 形式の画像ファイルとして蓄積します。TIFF 画像は、すべてのクローン、その位置と同定の追跡情報を収めた別のファイルとセットにしておきます。

これは GenePix で処理したものです。GenePix の結果は GPR ファイルになります。これがデータベースに戻され、分析用のシステムに戻されます。続いて GenePix 処理によって、正規化、標準化、フラグ立てを行います。

それが済んだら、続いてスクリーニング処理に移ります。我々が試みたスクリーニング処理では、先ほど説明したように、有意な変化をもたらした遺伝子を同定します。そうした遺伝子の同定にはいろいろな手法がありますが、同定が済んだら、カットオフ値を適用したり、t 検定を行ったり、シャノン・エントロピーを用いたり、ANOVA を行ったりすることが可能になります。

これら遺伝子群の間の関係性を明らかにするためには、クラスター分析、主成分分析などの測定を行います。我々はこれをバージニア大学医学部の統計学者クリス・ゲニングス氏と共同して行っています。

この情報をすべて dbZACH に蓄積します。dbZACH は 4 つのサブシステムで構成されています。これがその 1 つの、マイクロアレイ・サブシステムです。その他の 2 つは、遺伝子に関するすべての情報すなわち遺伝子の配列や機能を格納する遺伝子サブシステムと、もう 1 つは配列情報とユニークな同定因子を格納するクローンシステムです。次のスライドをお願いします。

15 週処置に関して我々が得た結果の一部を示します。3 つのグラフはそれぞれ、2 種類の対照群と処置群への効果を表わしています。実験上の変動がありますので、対照群と対照群とを比較するわけです。アレイ上の遺伝子のそれぞれに対応するスポットは直線にかなり近い形に集まっており、相関係数は 0.97 と十分に大きなものでした。このことは、我々が生み出したアッセイ法には十分な再現性があることを示しています。

生物学的変動について見る場合には、2 種類の動物群を調べます。その群のどちらも、対照群に属する動物です。この場合でも、ご覧の通り、この群の中で若干多く散在しています。このばらつきは生物学的変動によ

るものなので、予測されなかったわけではありません。この場合の相関係数もかなり良かったことから、アッセイ法および個体間変動が我々の作業にとって大きな問題になることはないでしょう。

処置による変動について見てみますと、Cy3 は対照群に用い、Cy5 は処置群に用いていますが、ほとんど目で見て分かるくらい大きな量的変動が、直線に並んでいる遺伝子あるいはそのプロットに見られます。このことは  $r$  値に反映され、 $r$  値は 0.89 でした。

これは、実際に行った処置が遺伝子発現に何らかの作用を及ぼすかどうかを明らかにする外挿的手法です。我々がやろうとしたのは、これら遺伝子をより徹底的に分析して、ジエチルスチルベストロールへの胎内曝露や経乳曝露の結果として実際に変化を起こした遺伝子を同定しようというものでした。次のスライドをお願いします。

ここで我々が行ったのは、すでに述べましたように、対  $t$  検定です。これが 3 週、15 週、45 週の動物です。我々は処置動物群と時間を同様にマッチさせた対照群を用いました。この実線は、遺伝子発現の変化が  $p$  値 0.05 未満、すなわち 95%信頼区間の中に収まっているものを表わしています。

第 3 週の動物では、遺伝子の数はおよそ 641 個で、抑制された遺伝子と誘導された遺伝子の数はほぼ半分ずつに分かれました。

15 週の動物では遺伝子数が増加して、およそ 1,200 個になります。この時もほぼ半数ずつに分かれます。そして 45 週ですが、処置は実際には 3 週齢の時点で終了していることを思い出してください。45 週まで遺伝子の数は依然としてかなり多く、178 個の遺伝子に変化が見られました。以上の数値はみな未補正值です。

単回の実験に基づいた多重比較を行った結果については、統計的には  $p$  値になんらかの修正ないしは補正を行う必要があります。この場合には、サイダックのステップダウン修正を用いました。するとこのように、これら遺伝子の多数が脱落して、変化が有意でなくなります。

これは極端な調整で、私としては極端な保存性であると呼びたいのですが、ご覧のように 0.05 の水準で有意に、これら 641 個の遺伝子がたった 1 個にまで減ります。処置の結果としての変化が統計的に有意であった遺伝子は、15 週では 46 個ありますが、45 週では事実上ゼロになります。次のスライドをお願いします。

遺伝子の同定の手法と、予測因子として価値のあるバイオマーカー値があるかどうかの判定の手法を我々は組み合わせて用いました。その中で、未補正值を用いてこのベン図を描き、同様に補正值を用いてそこからさらにサブセットを選び出し、さらに一步進めて、その遺伝子の精子産生における役割について情報が既にあるかどうかを判定することで、遺伝子の選択の有効性を検証しました。

3 週、15 週、45 週のデータについては、長期にわたる持続性の変化を示す遺伝子の約 32 個が共通していました。それら遺伝子の一部はダウンレギュレーション性やアップレギュレーション性であり、精子産生においてなんらかの役割ないしは既知の反応や機能を有しています。次のスライドをお願いします。

これはリアルタイム PCR による検証例のひとつです。現在進行中のものです。この場合には、これらのグループのエストロゲン受容体 -  $\alpha$  mRNA をリアルタイム PCR によって定量していました。3 週では、ジエチルスチルベストロールのすべての用量段階への曝露の結果として、エストロゲン受容体 -  $\alpha$  mRNA が有意に抑制されました。15 週と 45 週では、検出限界以上の mRNA はありませんでした。次のスライドをお願いします。

まとめますと、この時期に我々が同定・判定ができたのは、10  $\mu$ g/kg の DES への発生期での曝露で、精巣重量、精巣上体内の精子数、*in vitro* での精子受精能の低下でしたが、組織学的な異常はまったくありませんでした。本日は組織についてまったくお話ししませんでした。精巣はまったく正常に見えました。次に、DES は精子受精能を低下させ、その作用は 15 週から 45 週まで持続しました。すなわちこれは、遺伝子発現に対する持続性の作用もしくは祖父効果があって、その結果、精子の受精能が低下したと思われます。次のスライドをお願いします。相関分析を行ったところ、処置によって遺伝子発現レベルの変動が対照群に見られた生物学的変動を超えたということが確認されました。我々は次の段階の  $t$  検定と補正  $p$  値によって、遺伝子発現に有意な変化を確認しました。

今回の講演資料を用意する直前に、このデータをさらに詳しく調べることができましたので、ここである程度の要約を申し上げることができます。つまり、妊娠期・授乳期での DES への曝露によって、動物にエストロゲンへの不応答性が引き起され、それによってさらに、生体の内因性エストロゲン類への反応能が失われることになり、精子の質が低下した可能性があるのです。次のスライドをお願いします。

この写真は、研究室です。次のスライドをお願いします。

私の共同研究者たちです。それでは、質問があれば歓迎いたします。ありがとうございました。

## 質疑応答

井上：ティモシー・ザカロフスキー先生、たいへんありがとうございました。皆さん質問がありましたら、お答えする時間がありますので、どうぞ。

ダストン：ティム、たいへん興味深い研究内容でした。実際の傷害時期から長期間にわたって動物を観察することには、長所と短所があります。疑問の一つは、遺伝子発現の変化が DES 処置の主作用で起こったものなのか、それとも、何らかの種類の長期反応で起こったものなのか、という点です。どうお考えですか？ 例えば、その遺伝子配列を分析して、その持続的に変化をした遺伝子の中のエストロゲン反応性エレメントが存在しているかどうかを、調べてみましたか？

ザカロフスキー：我々も同じことを考えました。DES への主反応などのエストロゲン様反応をする遺伝子を同定しようとしたのは、決して意図的に行ったものではありません。攪乱をうけるものを探索し、その攪乱が実際に長期間持続し、後に動物成体におけるバイオマーカーとして利用可能かどうかを調べたのです。

ですから我々は、発生期での曝露を調べ、その曝露の終了時よりもずっと後の時点でその曝露を推測しようとしたわけです。2 つ目の質問への答えはノーです。プロモーターを分析して、そのプロモーターにエストロゲン反応性エレメントが含まれるかどうかを調べるようなことはいっさい行いませんでした。

井上：他に質問はありますか？ 進んでご質問ください。ありませんか？ では、ザカロフスキー先生、ありがとうございました。