

## 廃棄物処理等科学研究補助金 総合研究報告書概要版

研究課題名 = ヒト DNA チップを用いた多指標型環境汚染化学物質の毒性評価システムの開発

研究番号 = K1819、K1933

国庫補助金精算所要額 (円) = 23,065,000.-

研究期間 (西暦) = 2006-2007

研究代表者名 = 渡辺 義公 (北海道大学)

共同研究者 = 岡部 聡 (北海道大学)、木村 克輝 (北海道大学)、佐藤 久 (北海道大学)

### 研究目的

現在、急速な科学技術の発展と工業化によって数万種を超える化学物質が環境中に蓄積していると推定されている。これらの化学物質の挙動に関しては厳格なリスク管理が求められており、環境水中の化学物質がヒトの健康や生態系に与える影響を迅速に評価する必要がある。従来、我々は毒性が認知される代表的な化学物質についてのみ濃度で基準を設け、機器分析による個々の化学物質の検出を行い、監視することで化学物質のリスクを管理している。しかし、年々の増大し続ける化学物質種に対して、機器分析で検出可能な化学物質種には限界があり、同定可能な化学物質は全体のわずか 10% 程度であると報告されている。このような背景から、ある特定の生物活性を利用し、環境中に存在する化学物質の毒性を評価するバイオアッセイ法が試みられている。現在利用されているバイオアッセイは、ある特定の害作用 (変異原性、内分泌攪乱作用等) を特異的に検出することが可能であるが、低濃度かつ多数の化学物質による複合汚染が予想される環境水の評価には、検出する有害作用ごとに試験系を設定する必要があり、環境水の有害性を多角的に評価するには限界がある。本研究は、ヒト遺伝子 DNA マイクロアレイを用いて、ヒト由来細胞における化学物質暴露後の複数の遺伝子発現状態を同時に検出することにより、体系化されたバイオアッセイシステムの開発をめざすものである。従来のバイオアッセイによって得られる情報は、環境水中における毒性物質の有無のみであるが、このバイオアッセイでは具体的な物質情報を付加することが出来、また無害な天然物質による誤判定の可能性を回避することができる。

本研究では、3 つの基礎的毒性作用を酸化ストレス、発癌性、タンパク変性作用と仮定し、これらの作用に対するモデル化学物質 (DMNQ、ニトロソアミン、フェノール) の遺伝子発現パターンと環境汚染物質のそれを比較することで、毒性作用を分類することを試みた。さらに、毒性作用の中でもとくに重要である発癌性に着目し、この作用 DNA マイクロアレイを用いて検出、評価する手法についても検討を行った。本研究では、代表的な環境汚染物質である各種の重金属をモデル物質として用い、その急性毒性、発癌性について、本手法による評価を試みた。また、本手法によって同定された重金属の主要な毒性は、環境試料中の重金属に対する有用な検出指標となると考えられる。

### 研究方法

**使用細胞と培養条件:** ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を MEM 培地を用いて、飽和水蒸気、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で培養した。培地は 48 時間毎に交換し、細胞密度が 80% 飽和に達した時点で継代を行った。

**暴露濃度の決定:** 本研究では各種の毒性作用のモデルとして、2,3-ジメトキシ-1,4-ナフトキノ (DMNQ)、N-ジメチルニトロソアミン (DMN)、フェノールを選択した。また、毒性評価の被験金属化合物として、塩化

カドミウム六水和物：CdCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O、塩化ニッケル六水和物：NiCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O、三酸化ひ素：As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、塩化水銀：HgCl<sub>2</sub>、二クロム酸カリウム：K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、酒石酸アンチモンカリウム：K<sub>2</sub>[Sb<sub>2</sub>(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)<sub>2</sub>]を用いた。細胞を96穴ウェルプレートに接種し24時間培養後、各物質の濃度を段階的に調整した培地で6時間（DMNのみ48時間）暴露を行った。暴露後、5 mg/L ニュートラルレッド溶液を5 μl 添加し試料を遮光してCO<sub>2</sub>インキュベーターで3時間保温し、染色した。染色後、培地除去、PBSによる洗浄、溶出液（エタノール50%、超純水49%、酢酸1%）添加し、20分間振とうし、540 nmの波長で分光光度計を用いて吸光度を測定した。それぞれの濃度における細胞の生存率を（曝露吸光度）／（未処理吸光度）により算出した。本実験は1物質種の濃度系列に対し、同条件で8つのウェルを利用し、平均値を採用した。以上の実験より細胞生存率が70～80%となる物質濃度を曝露濃度とした。発癌性の評価については、ジメチルニトロソアミン（DMN）、12-O-テトラデカノールホルボール-13-アセテート（TPA）、テトラクロロエチレン（TCE）の3種の発癌性物質を選択し、また、毒性評価の被験金属化合物として、上記の重金属のうち、As、Cd、Niを用いた。暴露時間は48時間とし、上記と同様の操作を行った。

**DNA チップ解析：**上記の細胞毒性試験の結果から6種の重金属（As、Cd、Cr、Hg、Ni、Sb）及び3種の化学物質（DMN、DMNQ、Phenol）の曝露濃度を設定し、それぞれの濃度でHepG2を曝露し、6時間または48時間培養した。処理済の細胞群からRNeasy Mini Kit(QIAGEN、Germany)を用いて、total RNAの抽出を行った。DNAチップ解析にはHuman Genome Focus Array (Affymetrix、搭載遺伝子数8793)を用いた。ターゲットの調整にはComplete Reagent Package for Eukaryotic Arrays（真核生物用 試薬パッケージ）を用い、添付の操作手順に従って、cRNA合成、標識化、プローブとのハイブリダイズを行った。得られたデータは解析ソフトウェアAvadis (Strand Life Science)を用いて、遺伝子発現量の数値化および統計学的処理を行った。

## 結果と考察

### モデル化学物質による遺伝子発現変動

本研究では、HepG2の遺伝子発現パターンに基づいて6種の重金属の毒性を酸化ストレス、発癌性、タンパク変性作用に評価、分類することが目的である。この目的を達成するために、モデル化学物質曝露によって有意に発現変動を呈した遺伝子（処理群 / 未処理群 $\geq 2.0$ 、Present calls、T-検定：P<0.05）を選択した（655遺伝子）。さらに、DMNQ、DMN、Phenol これらのうち3種のモデル物質間で共通した挙動を示す遺伝子を除いた467遺伝子（DMNQ：99、DMN：237、Phenol：131遺伝子）を評価遺伝子とした。また、これらの作用遺伝子を重金属同様にGO termによって機能分類を行った。DMNQ曝露においては3遺伝子以上が関わるbiological processのGO termには21種類挙げられ、その中で37遺伝子が発現上昇を呈していた。特に、「M phase」、「mitotic cell cycle」、「regulation of cell cycle」、「regulation of cell proliferation」の発現上昇が顕著であった。このプロセスの中には8つのUBE2C、CDC25B、CDKN3、KIF22、H2AFX、SMC4L1、RAE1、CCNB2遺伝子が含まれており、細胞の分化や増殖の促進に関する機能を持つ遺伝子であると報告されている。これらの遺伝子の中で、特にCCNB2、UBE2C、SMC4L1、CDKN3は顕著に高い発現上昇を呈していた（7.0、6.3、3.0、2.6倍）。

一方で、DMNQ曝露においては抑制された3遺伝子以上が関わるbiological processのGO termには30種類挙げられ、その中で49遺伝子が発現抑制を呈していた。特に、「immune response」、「lipid metabolism」、「amino acid and derivative metabolism」、「programmed cell death」の機能に分類される遺伝子群が顕著であった。このプロセスの中ではCLU、AZGP、BF、TNFSF10、PCYOX1、BCAT1、ALDH6A1、PSPH、ITIH3、ST6GACNAC4が顕著にその発現を低下させていた。

DMNQのようなキノン類は生体内のエネルギー代謝過程において、redoxサイクルを経ながら過酸化水素や水酸基ラジカル、一重項酸素のような活性酸素種（reactive oxygen species: ROS）を生じさせる。これらROSは脂質過酸化物の生成や、DNA傷害を引き起こし、結果として細胞を傷つける。しかし、同時には乳類細胞においてはc-fosやc-junのような細胞生育に関連遺伝子の発現を刺激する。本研究で観察された遺伝子の発現変動はROSの影響による細胞分裂の促進と、プログラム細胞死の抑制を誘導していると考えられる。一方

で、グルタチオン生合成やカタラーゼ生産に関連する抗酸化作用を担う遺伝子群は発現を呈しておらず、これらの遺伝子群の発現には物質の曝露時間と濃度によって変化している可能性が考えられる。

DMN 曝露においては有意な 237 遺伝子のうち、110 遺伝子が発現上昇、127 遺伝子が発現抑制を呈していた。GO に基づく機能分類においては発現上昇遺伝子として 85 遺伝子が機能付けられ、21 種のプロセスに分類された。特に、「programmed cell death」、「regulation of cell cycle」の分類が特徴的に示されていた。これらの分類には PHLDA2、DFFA、BCL10、CIDEc、TGFB1、CDKN1A、NCKAP1、FAF1、YARS、BUB3、CHES1、SHC1 遺伝子の発現が顕著に示され、これらの遺伝子はアポトーシス、細胞増殖の抑止に関連した機能が報告されている。このことから、DMN の発現遺伝子はその発癌性を反映した機能特性が支持されていると考えられる。これらの遺伝子の中で、特に CDKN1A (p21/Waf1)、CIDEc、PHLDA2 遺伝子は顕著に高い発現上昇を呈していた (3.5、3.6、3.8 倍)。特に、CDKN1A はラット肝細胞において DNA 傷害剤であるニトロソアミンの曝露下で発現し、DNA 傷害及び成長阻害に関与することが過去の研究において報告されている。一方で、発現抑制された 127 遺伝子のうち 91 遺伝子が 40 種の機能プロセスに分類された。この結果、本遺伝子群は「lipid metabolism」、「cellular lipid metabolism」、「lipid biosynthesis」に分類されるものが顕著であった。これらのプロセスに含まれた 20 遺伝子のうち、15 遺伝子がステロイドやコレステロールの生合成に関与する遺伝子であった。加えて、EBP、LSS、HSD17B2、FDPS、HMGCR、SQLE、FDFT1、DHCR7、HSD17B7、HMGCS1 遺伝子はその発現が強く抑制されていた (6.4、6.4、5.7、5.4、5.3、5.1、5.1、4.7、4.1、3.8 倍)。この結果は DMN 曝露によって強くコレステロール生合成が抑制されるが、コレステロール代謝において発癌性の影響をはっきりと示唆する研究は見受けられない。この現象は発癌性よりもむしろ、DMN の別の生物学的作用機序によって引き起こされていると考えられる。

フェノール曝露においては有意な 131 遺伝子のうち、61 遺伝子が発現上昇、70 遺伝子が発現抑制を呈していた。GO に基づく機能分類においては発現上昇遺伝子として 46 遺伝子が機能付けられ、発現抑制遺伝子としては 55 遺伝子が機能付けられた。また、これらの遺伝子が 3 遺伝子以上関わる機能プロセスはそれぞれ 14 種、21 種のプロセスに分類された。特に、「regulation of cellular metabolism」に分類された遺伝子が特徴的に示されていた (発現上昇 19 遺伝子、発現抑制 12 遺伝子)。このプロセスに分類された遺伝子中には ING3、KLF10、MYC、ELL2、PER2PPARG、TCFL5、HES1、NFYA、TERF2 遺伝子の発現上昇、TAF7、RPE、NR0B2 遺伝子の発現抑制が顕著に示されていた。これらの遺伝子はアポトーシス、細胞増殖、転写、抗生刺激、脂質代謝等の様々な機能に関連していた。この結果は フェノール 曝露が様々な細胞機能に影響を及ぼす非特異的なストレスに基づいた応答を示していることが示唆された。

### 階層的クラスタ解析

選択した 467 作用評価遺伝子を用いて、モデル物質と重金属の遺伝子発現プロファイルの関係を階層的クラスタ解析によって評価、分類した。各物質間の遺伝子発現量のユークリッド距離を算出し、9 種の発現系の類縁性、つまり各物質の毒性作用の類縁性をデンドログラム (樹形図) で明確に順序付けて推定することが可能となった。本解析によって As、Cd、Cr、及び Hg は主な作用が酸化作用である DMNQ とクラスタを形成し、他のモデル化学物質とは明確に区別された (図 1)。Ni と Sb はそのクラスタに近接するサブクラスタとして位置していた。従って、6 種の重金属は DMN、フェノールと明確に区別され、高濃度短時間の重金属曝露においては、酸化ストレスがその主要な毒性作用であることが示唆された。遷移金属は細胞内において、redox サイクルもしくは抗酸化酸素の枯渇によるフリーラジカルの増加を引き起こし、酸化ストレスを生ずると推測されており、これらの結果はこの見解を強く支持していると考えられる。

加えて、発癌性は重金属においてもよく知られた毒性であるが、本研究における DMN と重金属の遺伝子発現プロファイルからは確認できなかった。重金属による発癌性の機構は多段階的であり、DNA アルキル化剤や DNA 架橋剤の様な遺伝的発癌物質による特徴的な遺伝子発現にのみ基づいて特徴付けられないことが考えられる。

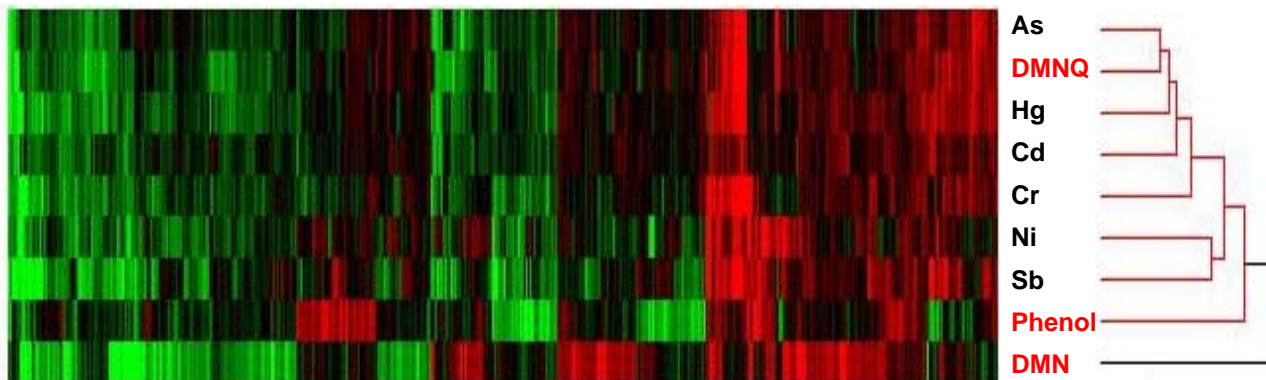


図 1 評価遺伝子を用いたモデル化学物質及び重金属の階層的クラスター解析

### 主成分解析

また、階層的クラスター解析と同様に上記の選択した 467 作用評価遺伝子を用いて、主成分解析を行った (図 2)。本解析は 467 次元のデータを直交する第 1 成分と第 2 成分で表現される 2 次元上に次元を下げ、その相関関係を集約している。つまり 467 遺伝子の発現変動から 9 種の物質の傾向を算出している。本解析においては、第 1 主成分、第 2 主成分におけるその寄与率はそれぞれ 32.1、25.4 % となった。つまり、467 遺伝子の発現変動の 6 割近くの変動傾向を この 2 種の成分で評価することが出来た。その分布においては、3 種のモデル物質の発現変動は互いに分離し、DMNQ が As、Cd、Cr、及び Hg と近縁な発現変動パターンを持つことが示された (図 2)。続いて Sb、Ni がその近接した領域に示され、6 種の重金属は DMNQ の発現パターンに類似することが示され、階層的クラスター解析の結果が支持された。

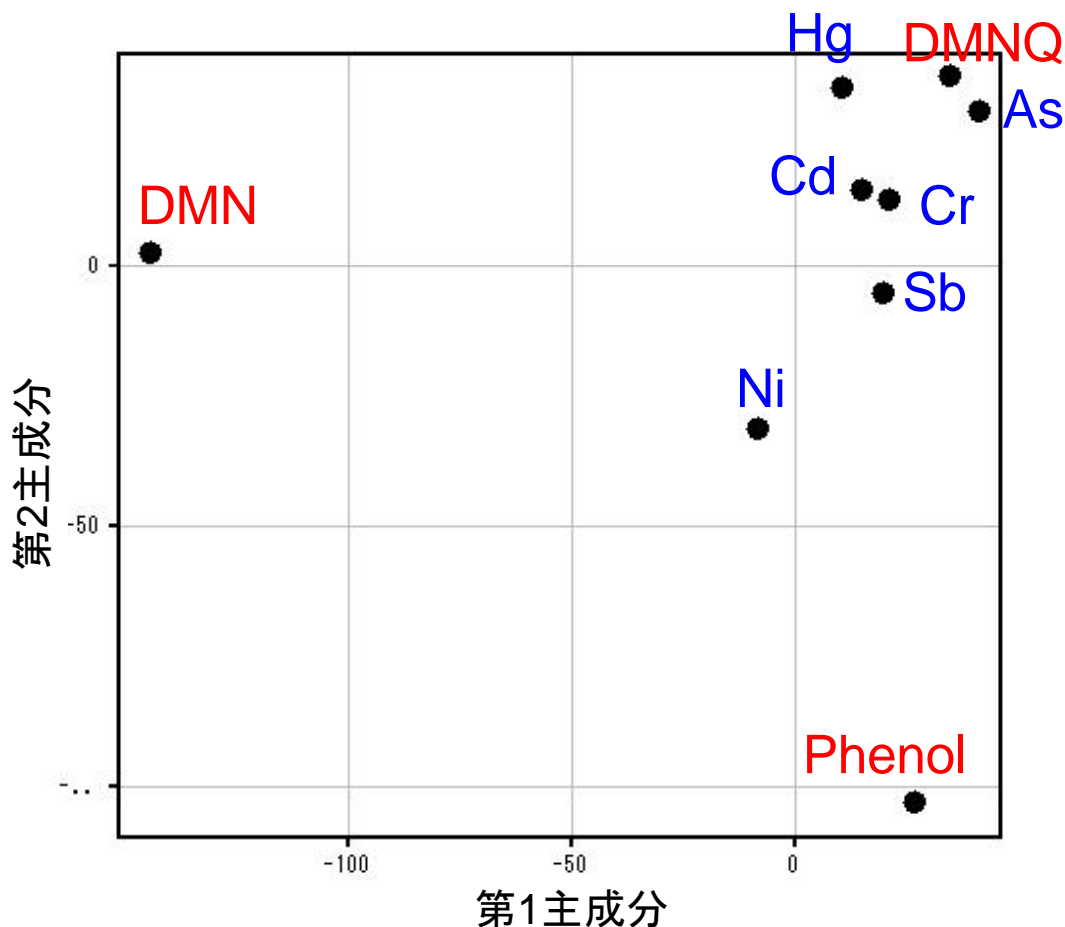


図 2 遺伝子発現パターンに基づく被検物質の主成分解析

### 発癌性物質曝露系における遺伝子発現変動

モデル発癌性物質として使用した DMN、TPA、TCE の 48 時間曝露による有意変動遺伝子数は、それぞれ 481 遺伝子 (増加変動: 236 遺伝子、抑制変動: 245 遺伝子)、655 遺伝子 (増加変動: 313 遺伝子、抑制変動: 342 遺伝子)、445 遺伝子 (増加変動: 197 遺伝子、抑制変動: 248 遺伝子) であった。これらの遺伝子を FatiGO+ により機能ごとに分類したところ、それぞれ 398、550、384 遺伝子がアノテーションされた。遺伝子機能分類の結果より見出された主要な機能群を図 3 に示す。分類した遺伝子のうち、TPA と TCE は変動遺伝子の 10 % 程度が M phase 関連遺伝子であり、DMN はこれら 2 物質に比して少ない 2.3 % の遺伝子が M phase 関連遺伝子であった。本機能に分類される遺伝子は、細胞周期 M 期への関与を通じて細胞増殖に関与するため、発癌作用との関連性が高いと考えられる。また DNA の損傷は発癌や変異原性の原因となることから、機能分類上 DNA repair に分類される遺伝子に着目したところ、DMN では 4 遺伝子、TPA では 14 遺伝子、TCE では 4 遺伝子が発現変動した。加えて、DNA を損傷した細胞の細胞周期停止を担い DNA 障害性に応答すると考えられる遺伝子 CDKN1A は、DMN と TPA で 3.5 倍および 2.5 倍に発現量が増加した。DMN はその DNA 傷害性により小核の形成や姉妹染色分体交換の頻度を増加させ、TPA および TCE は細胞分化の促進により細胞の異常増殖を誘発することがそれぞれ報告されている。得られた結果は各物質がこのような異なるメカニズムにより発癌を誘発することを反映しており、遺伝子発現解析により各物質の有する発癌性および発癌メカニズムの差異を確認することが可能であった。

### 重金属による遺伝子発現変動

As、Cd、Ni の各物質曝露により発現変動した遺伝子はそれぞれ 637 遺伝子 (増加変動: 288 遺伝子、抑制変動: 349 遺伝子)、208 遺伝子 (増加変動: 99 遺伝子、抑制変動: 109 遺伝子)、462 遺伝子 (増加変動: 189 遺伝子、抑制変動: 273 遺伝子) であった。これらの変動遺伝子のうち、それぞれ 34~49 %、45~56 %、31~41 % が DMN、TPA、TCE の各物質曝露による変動遺伝子と同一の遺伝子であった (表 1)。特に増加変動した 11 遺伝子 (*AKAP3*、*ANXA2*、*FHL2*、*IER3*、*JAG1*、*LGALS1*、*MAFF*、*MXRA7*、*PTTG1*、*RBPMS*、*WASF2*) および抑制変動した 10 遺伝子 (*AKR1B1*、*DGAT1*、*EIF2AK3*、*ETF1*、*GPR30*、*IL17RB*、*NKFBIA*、*PEBP1*、*PGC*、*SAA4*) は、全ての曝露条件下において発現変動しており、増加・抑制といった変動のパターンも一致した。

さらに、重金属曝露により発現変動する遺伝子を機能分類し、その結果を 3 種の発癌性物質曝露系と比較した (図 3)。前述した発癌性物質曝露系における機能分類上の特徴は、重金属曝露系においても観察された。3 種の重金属曝露系全てにおいて、“M phase” に分類される遺伝子の増加変動が観察され、As 曝露により発現が誘導された 26 遺伝子、Cd 曝露による 5 遺伝子、Ni 曝露による 17 遺伝子 (重金属曝露により発現変動した遺伝子のうち 6.5~11.8%) が本プロセスに分類された。一方でこれら増加変動遺伝子に対し抑制変動遺伝子は 1~5 遺伝子 (発現変動した遺伝子のうち 1.3~2.0 %) と少数であった。“lipid biosynthetic process” および “steroid metabolic process” においては、As、Cd 曝露条件においてそれぞれ 24~30、12 遺伝子が抑制変動しており、増加変動遺伝子はわずか 4 遺伝子のみであった。

DNA 傷害性に応答する遺伝子は主に “DNA repair” プロセスに分類されており、重金属曝露系では本プロセスに分類される遺伝子の増加変動も観察された。Cd および Ni 曝露条件下では 2 および 3 遺伝子が対照系に比して 2.0~6.8 倍に増加変動し、As 曝露においては 13 遺伝子が 2.1~12.9 倍に発現量が増加した。

本研究では、ROS 生成物質のモデルとして一般的に用いられる DMNQ についても他の化学物質と同様の遺伝子発現解析を実施した。DMNQ 曝露により 565 遺伝子が有意に発現変動し、うち 228、326、294 遺伝子 (40、58、52 %) が DMN、TPA、TCE における有意変動遺伝子と重複した。また 312 遺伝子 (49 %) は As 曝露系と、109 遺伝子 (52 %) は Cd 曝露系、195 遺伝子 (42 %) は Ni 曝露系とそれぞれ共通して発現量の変動が観察された。機能分類の結果では “M phase” に 25 遺伝子 (増加変動: 24 遺伝子、抑制変動: 1 遺伝子)、“lipid biosynthetic process” および “steroid metabolic process” にそれぞれ 29 遺伝子 (増加変動: 4 遺伝子、抑制変動: 25 遺伝子)、28 遺伝子 (増加変動: 3 遺伝子、抑制変動: 28 遺伝子) が分類されており、これらの変動遺伝子数は他の機能に比べ顕著に多かった。さらに DNA 傷害性に応答する遺伝子は 9 遺伝子が増加変動し、そ

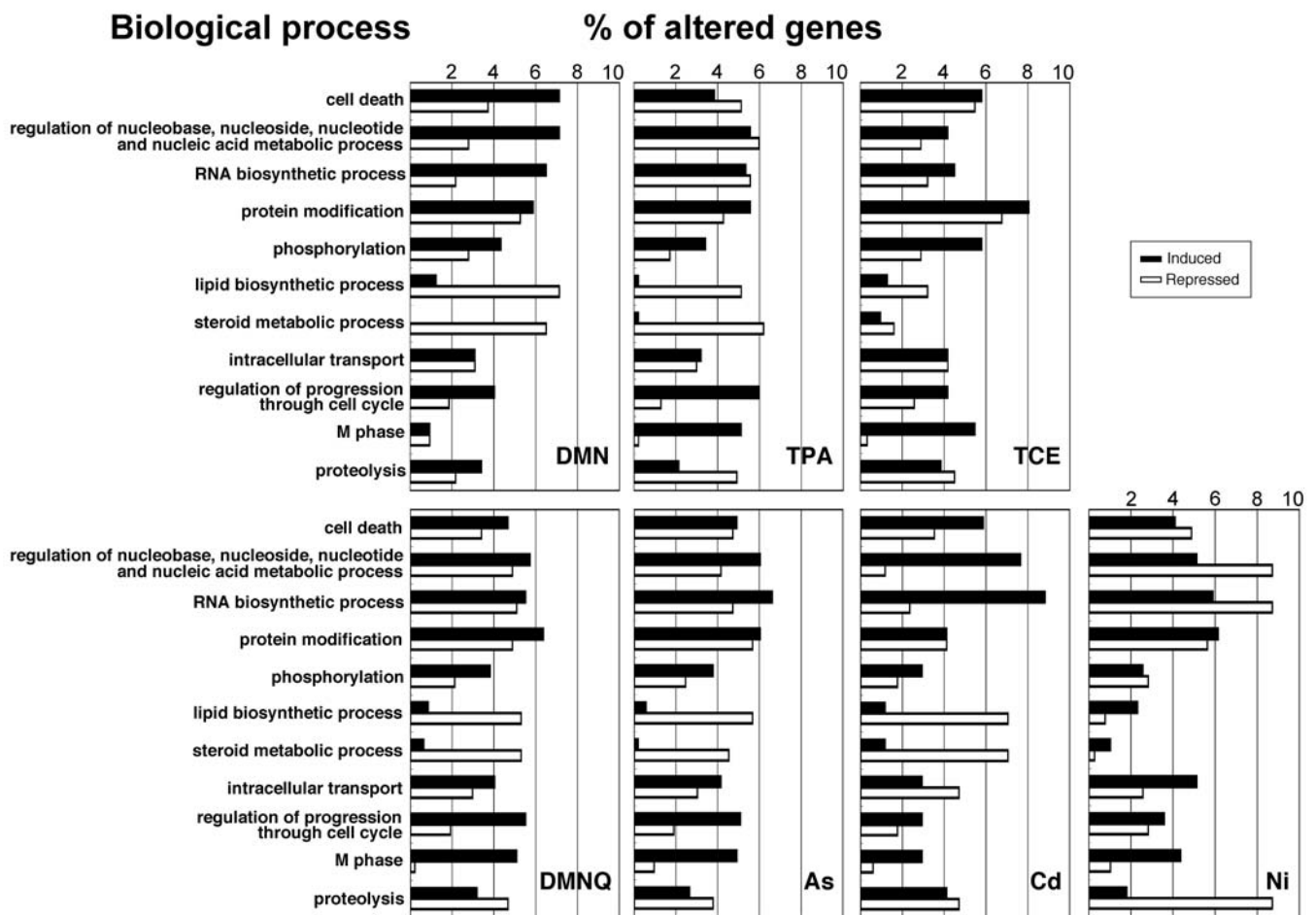


図 3 各毒性物質曝露により誘導される有意変動遺伝子の機能分類結果

表 1 各毒性物質に誘導される有意変動遺伝子の重複

	DMNQ	As	Cd	Ni
No. of altered genes	induction: 260 repression: 305 Total: 565	induction: 288 repression: 349 Total: 637	induction: 99 repression: 109 Total: 208	induction: 189 repression: 273 Total: 462
<b>DMN</b>				
induction: 236	93	98	43	59
repression: 245	135	122	51	84
Total: 481	228	220	94	143
<b>TPA</b>				
induction: 313	141	140	47	70
repression: 342	185	171	54	107
Total: 655	326	311	101	177
<b>TCE</b>				
induction: 197	136	101	65	79
repression: 248	158	115	51	110
Total: 445	294	216	116	189
<b>DMNQ</b>	-	140	55	81
	-	172	54	114
	-	312	109	195

の対照系に対する変動倍率は2-10倍程度であった。以上のようにDMNQ曝露により誘導された変動遺伝子の機能分類結果は、2種の発癌性物質（TPA、TCE）および3種の重金属と同様の特徴を示した。

#### DHA 処理時における遺伝子発現変動

細胞に対しアスコルビン酸による前処理を行い、重金属を曝露後、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。アスコルビン酸処理を行うことにより未処理の重金属曝露系に比して変動遺伝子数は減少した（As 曝露系：208 遺伝子、Cd 曝露系：96 遺伝子、Ni 曝露系：238 遺伝子）。そのうちアスコルビン酸処理・未処理双方で同様の発現変動をした遺伝子は130 遺伝子、42 遺伝子、134 遺伝子であった。機能分類した結果より、As 曝露に伴って発現量の増加していた“M phase” 関連遺伝子の数は大幅に減少した（14/26：アスコルビン酸処理/未処理）。対照的にCd 曝露およびNi 曝露では“M phase” に関係する遺伝子数は増加した（Cd 曝露系 14/5、Ni 曝露系 23/17：アスコルビン酸処理/未処理）。またAs 曝露系およびCd 曝露系において“lipid biosynthetic process” および“steroid metabolic process” に分類される抑制変動遺伝子の数はそれぞれ減少した（As 曝露系 13/30、11/30、Cd 曝露系 2/12、1/12：アスコルビン酸処理/未処理）。“DNA repair” に分類される増加変動遺伝子はAs 曝露系のみにおいてその数が減少し、Cd 曝露およびNi 曝露では増加した（As 曝露系 6/13、Cd 曝露系 3/2、Ni 曝露系 9/3：アスコルビン酸処理/未処理）。

アスコルビン酸による処理を行った細胞では未処理の細胞と比べ発現変動する遺伝子数は少数であり、また未処理の細胞で発現変動していた遺伝子の20-34%のみがアスコルビン酸処理済みの細胞においても変動していた。これらの結果は重金属により引き起こされるさまざまな生物現象においてROSが重要な役割を担うことを示唆している。特にAsおよびCd曝露系で観察された“lipid biosynthetic process” および“steroid metabolic process” 関連遺伝子の抑制変動は、アスコルビン酸処理を行った曝露系においては大きく減少した。またAs曝露系においてはアスコルビン酸処理を行うことで発癌作用への寄与が大きいと考えられる“M phase” および“DNA repair” に関与する遺伝子の増加変動が減少した。その一方でCdおよびNi曝露系ではこれらの遺伝子発現変動は中和されることなく、増加変動した。このことは重金属曝露により引き起こされる細胞増殖とDNA損傷において、As曝露条件下ではROSが中心的な役割を果たしており、その一方でCd曝露およびNi曝露ではROSとは異なる他の作用が関与する可能性を示唆している。

#### マーカー遺伝子の探索

遺伝子発現解析の結果より、重金属の発癌作用を評価する上で有効となるマーカー遺伝子の選定を行った。その結果本研究で使用した7種の毒性物質（DMN、TPA、TCE、DMNQ、As、Cd、Ni）の全条件下で、有意な発現量の増加が癌遺伝子 *pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1)* において観察された（2.5、6.5、6.5、10.1、12.9、2.7、6.8倍）。*PTTG1* は構造的相同性より有糸分裂期の姉妹染色体分裂調節に関与するセキュリンとして同定された。本遺伝子は様々な腫瘍中でその発現が観察されており、*in vitro* では過剰な異所性発現により細胞の変異を引き起こすこと、および癌細胞の浸襲性へ影響を与えることで転移に関与するとされていることが報告されている。*PTTG1* は発癌性物質および重金属、DMNQの各条件全てにおいて発現量が有意に増加したことから、発癌性評価において発癌メカニズムに依存しない指標として有効である可能性があり、マーカー遺伝子としての汎用性が期待される。そこでRT-PCR法による本遺伝子の発現定量を行った。

#### RT-PCR 法による *PTTG1* 発現の定量

各条件下における *PTTG1* 遺伝子の発現変動倍率と細胞生存率を図4に示す。発癌性物質曝露系ではDMN、TPA、TCEの3物質の全濃度条件下（5-150 mM、0.01-25  $\mu$ M、0.01-3  $\mu$ M）において、*PTTG1* 発現は対照系の2倍以上に増加した。さらに酸化ストレス作用物質であるDMNQ曝露系においても、同様に全濃度条件下（0.1-25  $\mu$ M）で有意に発現量が増加した。3種の重金属ではDNAマイクロアレイの実験条件に採用した濃度（As曝露系：6 $\mu$ M、Cd曝露系：5  $\mu$ M、Ni曝露系：150  $\mu$ M）において *PTTG1* の発現量は2.1-4.2倍へと増加し、マイクロアレイの解析結果と一致した。As、Cd、Niの各重金属存在下においては細胞生存率が80%前

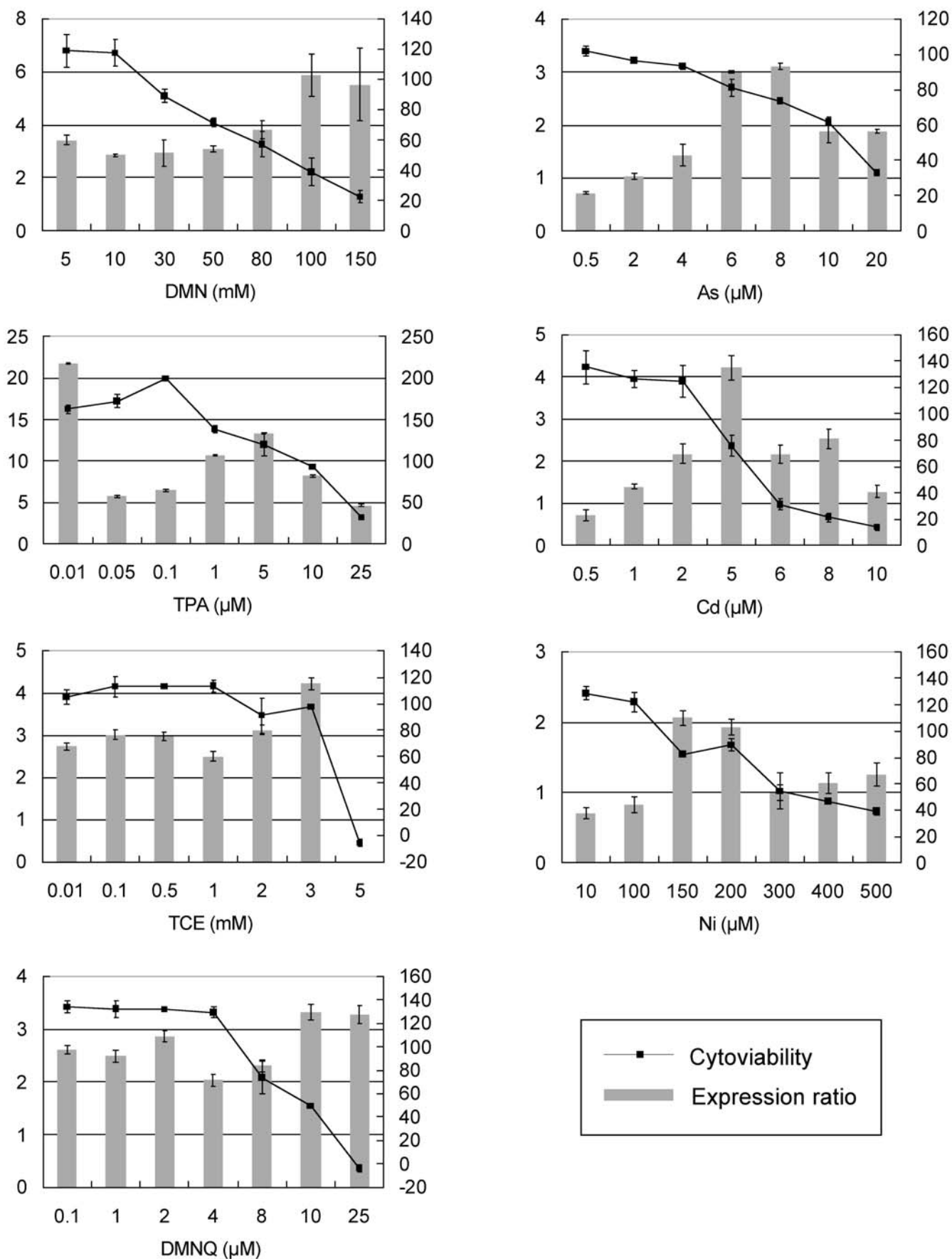


図4 各条件下における *PTTG1* 遺伝子の発現量および細胞生存率



後となる 8  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、150  $\mu\text{M}$  まで、濃度の上昇に伴う *PTTG1* 発現量の増加が観察された。さらに高濃度の領域では細胞生存率の低下に伴い発現量は低下した。

今回の研究では *PTTG1* は発癌作用のメカニズムが異なる 3 種の発癌性物質すべてにおいて発現量が増加した。発癌性物質の曝露により *PTTG1* が発現調節されるメカニズムは未だ明らかにされていないが、本遺伝子は様々な種類の発癌性物質に対し迅速な評価を行うマーカー遺伝子として有用であると考えられる。重金属曝露系に対して RT-PCR 法を実施した結果より、曝露した重金属の濃度上昇にしたがって *PTTG1* 発現量は上昇し、細胞生存率 80 % となる濃度においてその発現変動倍率は最大値に達した。これらの結果は、細胞が非致死的な条件下にある場合に *PTTG1* は高度に発現し、強い細胞毒性が働く場合には発現が抑制される可能性を示す。既往の研究においても、細胞に対する高濃度の As 曝露によりアポトーシス関連のシグナル伝達経路が活性化され、低濃度の As 曝露により細胞分裂関連の経路が活性化されて発癌につながるということが指摘されている[65]。本研究で観察された *PTTG1* の発現は、低濃度の重金属による発癌作用を示すものと考えられる。

以上のことから、*PTTG1* 遺伝子は重金属由来の発癌性評価においてメカニズムに依存せず、広範な重金属に対して利用可能であること、また重金属の毒性作用における濃度依存性を反映することが示された。

## 結論

本研究では DNA マイクロアレイを用いた毒性評価法確立の為の基礎的データとして、6 種の高濃度重金属曝露ヒト由来細胞の DNA マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現パターンを 3 種のモデル物質曝露時と比較することによって、その毒性作用の分類、評価を試みた。選択した評価遺伝子 (467 遺伝子) を用いた主成分解析及び階層的クラスタ解析により、供試した物質を DMNQ、DMN、フェノール がそれぞれ持つ作用に従って分類可能であることが示された。すなわち、上記の解析により 6 種の重金属 (As、Cd、Cr、Hg、Ni、Sb) は DMNQ に類似した生物学的作用を有することが示され、これらの金属が酸化ストレスを主要な毒性作用として有することが示唆された。また、発癌性物質を用いた 48 時間の曝露系では、各物質における発癌メカニズムの差異を確認することが可能であった。重金属曝露により誘導される遺伝子発現変動は TPA および TCA によるものと類似しており、細胞分裂の促進および DNA 傷害が重金属の発癌性に重要な役割を果たしていることが確認された。さらに、RT-PCR 法により *PTTG1* 発現を定量した結果、*PTTG1* の発現量は重金属の発癌作用における濃度依存性を反映することが示された。重金属由来発癌作用評価における本遺伝子のマーカー遺伝子としての有効性が示唆された。これらの結果は、重金属を含む環境汚染物質に対し有効な評価手法を確立する上で有用なデータであり、また新規化学物質の発癌性、安全性評価にも応用可能であると考えられる。

## 英語概要

The aim of this study was to evaluate the toxicities of heavy metals through the comparison with gene expression patterns induced by well-known chemicals. For this purpose we first identified the genes altered specifically in HepG2 under the exposure of 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ), phenol and N-nitrosodimethylamine (DMN), which were selected as the model chemicals, using DNA microarray. Based on the expression profiles of these genes, toxicities of six heavy metals; arsenic, cadmium, nickel, antimony, mercury and chromium were evaluated. The specific gene alteration and hierarchical clustering revealed that biological action of six heavy metals were clearly related to that of, DMNQ, which has been reported to be reactive oxygen species (ROS) generating chemical. From the comparisons of gene expression profiles of DMN, TPA and TCE, these carcinogens were clearly distinct from each other. In particular, three heavy metals shared certain characteristics with TPA and TCE in remarkable up-regulations of the genes associated with progression of cell cycle which might play a central role in carcinogenesis. Furthermore, from the results of RT-PCR, the oncogene *PTTG1* was up-regulated by heavy metals in a dose dependent manner and might be a useful biomarker for evaluation of various carcinogens, which have different biological actions. These result suggest that our DNA microarray technique would be able to characterize the toxic mechanisms of environmental pollutants

including heavy metals and give an insight into a development of novel evaluation methods for these substances.