

内分泌攪乱化学物質に対する胎仔の転写プロファイル

ジョージ P. ダストン

米国 プロクターアンドギャンブル社

(スライド1)

この講演では、私の研究室において行っている、内分泌攪乱化学物質に対する胎仔の組織の転写プロファイルを明らかにする研究について、簡単にお話しします。発生期は一生の中で内分泌攪乱化学物質にもっとも感受性の強い時期であることは広く認識されていますが、内分泌系が関与した発生への影響は遅れて発現する傾向があるために、これまで開発されたスクリーニング法で哺乳類の胚や胎仔を用いたものは、ひとつもありませんでした。しかし、ホルモン様活性物質に対する反応における遺伝子発現の即時的恒久的な変化の中には、胎仔において測定が可能なものもあると思われまます。ゲノム科学の手法を用いることで、そうした特徴的な反応を明らかにすることができるようになるでしょう。

(スライド2)

私たちの目的は、ゲノムデータを用いて、エストロゲン類、抗アンドロゲン類、甲状腺毒性物質に特異的な転写プロファイルを解明し、そのうえで、そうした転写プロファイルを含んだアレイによる廉価なアッセイ法を開発することです。私たちは、このアッセイの重要な部分を従来の発生毒性アッセイの一部として組み込むことが可能であり、それによって経費と動物とがさらに節約できるものと、期待しています。講演時間に制限がありますので、本日はエストロゲン類に関する研究についてのみ説明いたします。

(スライド3)

私たちは、調べたいホルモン様活性物質が遺伝子発現に即時的かつ恒久的な変化を引き起こし、その変化は胎仔の反応しやすい組織において測定可能であると仮定しました。この仮定の根拠となっているのは、遺伝子発現はステロイドホルモンによって直接的に制御されているという事実です。しかしそれに比較して、哺乳類の発生期にエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモンで制御される遺伝子は、現在までのところわずかしが知られていません。

(スライド4)

こうした情報の不足に対処するために、私たちはゲノム科学の手法を応用して、ラットゲノムのおよそ 8000 個の遺伝子をスクリーニングしました。そのうち 7000 個は機能が判明している遺伝子です。私たちは、Affymetrix Gene Chip システムを用いました。

(スライド5)

私たちの実験の組立ては以下の通りです。胎齢 11 日から 20 日までのラットに試験化合物を毎日投与します。投与開始の時期は、ちょうど生殖器系の原基が出現する直前にあたります。第 20 日を最終投与日とするのは、発生毒性試験の最終日として一般的です。第 20 日に胎仔の子宮と卵巣を摘出し、同腹仔のサンプルと一緒にして mRNA 抽出を行います。

(スライド6)

用いた化学物質は強力なエストロゲンであるエチニルエストラジオール、中程度のエストロゲンであるゲニステイン、弱いエストロゲンであるビスフェノール A であり、それぞれ用量段階で 3 段階にしました。いずれの化学物質においても、その最高段階は、未成熟ラットにおいて同程度の子宮肥大反応を引き起こすことが文献で報告されている用量です。

(スライド7)

これは、ラットの胎仔の子宮です。米国のコインに子宮を載せて写真を撮りましたが、このコインの大きさは、1円硬貨とほぼ同じです。子宮は4個あれば、遺伝子チップにかけるのに十分な量の mRNA が抽出できます。私たちがエストロゲン受容体に特化して設計するつもりであるカスタムアレイは、少量の mRNA で十分であり、胎仔の子宮は1個で間に合うと思います。

(スライド8)

いずれの化合物も、チップ上のおよそ 600 から 8000 個の遺伝子に変化を引き起こします。その中で 60 個以上に強い変化が見られました。その強い変化は用量依存性の反応であり、3 種類の化合物に一貫して見られました。私たちは、この 60 個の遺伝子のグループを、胎仔の子宮と卵巣でのエストロゲン類に対する転写プロファイルであると見なしました。

(スライド9)

これは、エストロゲン類でアップレギュレーションが生じた転写プロファイルのリストの一部です。

(スライド10)

これは、プロファイルの中でダウンレギュレーションされた遺伝子のリストの一部です。

(スライド11)

このプロファイルには、エストロゲンに反応することがすでに知られているプロゲステロン受容体などの遺伝子がいくつか含まれていることに注目してください。また、ステロイド合成、細胞間相互作用タンパク質、増殖因子とその受容体、その他のタンパク質の遺伝子も含まれています。これまではエストロゲン作用とは結びつけられてこなかった遺伝子が多数含まれています。

(スライド12)

化合物の用量をエストロゲン様活性の強さで補正すると、化合物間で遺伝子発現の変化の大きさがきれいに一致しています。

(スライド13)

これは、定量的 RT-PCR という別の手法を用いて遺伝子チップの確認を行ったデータです。これは、エストロゲン類で遺伝子が制御されることがすでに明らかになっている、腸管カルシウム結合タンパク質の結果です。

(スライド14)

私たちはこれらの結果に基づき、ホルモンによる作用を特徴とする転写プロファイルを同定する手段として、ゲノム科学的手法が有用であると確信するようになりました。この手法は同時に、メカニズムの理解に対するヒントも与えてくれると考えられます。

(スライド15)

しかし、これらプロファイルの利用はスクリーニングに限定すべきだと、私たちは強く信じています。遺伝子の発現それ自身は必ずしも有害なものではないうえに、遺伝子発現の変化と毒性との間の定量的関係はまだ不明ですので、この手法は化学物質の危害性評価や規制には勧められません。

(スライド16)

結論として、私たちは、従来の発生毒性試験と互換性がある試験デザインを用いて、胎仔組織においてエストロゲン類に特徴的な転写プロファイルを同定しました。ただし、転写プロファイルは、内分泌攪乱化学物質のスクリーニングとしては有望な手法ですが、リスク評価としては適さないと考えられます。

質疑応答

ブルンバーグ：2、3、質問かコメントを受ける時間があります。

質問：ではジョージ、同じ質問をあなたに投げ返します。それらの遺伝子すべてが調節領域にエストロゲン反応性配列を持っているかどうかを調べる際に、なんらかのプロモーター分析を行いましたか？

ダストン：ええ、今現在、全部ではありませんがそれら遺伝子の多くで行っているところです。かなり骨の折れる探索作業です。その数を言うとなると、我々がエストロゲン受容体配列が確実にあると同定した数の半分よりは少ないです。

ブルンバーグ：他に質問は？

では、もう質問がないようですので、演者の皆さん、お疲れさまでした。