

ラットにおける非遺伝子傷害性肝発がん物質投与による 発現遺伝子群のカタログ化

渋谷 淳

国立医薬品食品衛生研究所

ありがとうございます。最初のスライドをお願いします。

本日のプレゼンテーションのデータは、内分泌攪乱化学物質問題に関するものではありません。ここでは、ラットを使用して実施した非遺伝子傷害性発がん物質によって誘発される遺伝子発現のトキシコジェノミクスプロファイルを発表します。次のスライドをお願いします。

ラットにおいてエームズ (-) 非遺伝子傷害性発がん物質に応答した共通の遺伝子群を明らかにし、新しい化学物質の発がん性の初期バイオマーカーの役割を果たす遺伝子を同定するため、我々は、高密度マイクロアレイを使用して、代表的な非遺伝子傷害性肝発がん物質を 28 日間投与したラットの肝臓の網羅的な遺伝子発現分析を実施しました。次のスライドをお願いします。

動物は 6 週齢の SD:IGS ラットを使用しました。混餌投与を 28 日間行いました。非遺伝子傷害性発がん腫瘍プロモーターとして、フェノバルビタール 600 ppm、チオアセトアミド 600 ppm、またはフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 2% を飼料に混入して投与しました。非発がん物質として、アセトアミノフェンの肝毒性用量を投与しました。次のスライドをお願いします。

完全な RNA を肝組織から分離しました。動物数は各群 3 匹とし、プローブハイブリダイゼーションを実施しました。プローブアレイには、Affymetrix Gene Chip, Rat Genome U34A Array を使用しました。このチップには、既知の 4,500 個の遺伝子と未知の 1,700 個の遺伝子および 800 個の EST 配列が搭載されていました。次のスライドをお願いします。

正常ラット肝では、7,000 個の遺伝子のうち 2,700 個が発現しています。この数はヒト肝に発現すると報告されている数と同じです。次のスライドをお願いします。

このスライドは、各化学物質を投与したラットの肝臓における発現上昇を示した遺伝子の数を示しています。アセトアミノフェンとフェノバルビタールは、わずかに約 40 個の遺伝子の発現上昇を誘発しました。一方、チオアセトアミドは 10 倍以上の遺伝子の発現上昇を誘発させました。DEHP は 179 個の遺伝子の発現上昇を誘発し、フェノバルビタールとチオアセトアミドの間にあります。次のスライドをお願いします。

これは発現減少を示した遺伝子です。発現上昇を示した遺伝子が少なかったのと同様、アセトアミノフェンとフェノバルビタールが、発現を減少させた遺伝子も少数ですが、その数は発現を上昇させた遺伝子の数よりも多数でした。チオアセトアミドは、これらの化学物質のうち、遺伝子の発現を最も減少させました。DEHP も多数の遺伝子の発現を減少させ、その数は発現を上昇させた遺伝子の数よりも多数でした。次のスライドをお願いします。

これらはアセトアミノフェンの投与により発現が上昇または減少した遺伝子の機能クラスターです。発現上昇が生じた遺伝子の主な機能クラスターは代謝に関するもので、発現減少が生じた遺伝子には、代謝、細胞の信号伝達、コミュニケーションに関わる遺伝子が見られました。次のスライドをお願いします。

フェノバルビタールは小葉中心性肝細胞肥大を誘発させることで有名な酵素誘導物質です。アセトアミノフェンの場合のように、発現上昇が生じた遺伝子の主な機能クラスターは代謝に関するクラスターで、発現減少が生じた遺伝子は細胞の信号伝達、代謝、および細胞の微生物免疫に関するもので、より広い範囲にわたっていました。次のスライドをお願いします。

チオアセトアミドは肝細胞再生を誘発しますが、それは酸化性ストレスに起因する細胞損傷によって肝硬変へと変化します。発現上昇または減少した遺伝子の機能クラスターは非常に多様です。次のスライドをお願いします。

DEHP は肝細胞の β -酸化を誘発させることで有名なペルオキシソーム増殖性物質です。発現が上昇した遺伝子の主なクラスターは代謝に関するもので、 β -酸化酵素が含まれます。この化学物質で発現が減少した遺伝子の機能クラスターは多様です。次のスライドをお願いします。

このスライドは、発現が上昇した遺伝子と発現が減少した遺伝子が非遺伝子傷害性発がん物質と一致することを示しています。アセトアミノフェンの投与を選択すると、遺伝子は発現レベルを変化させません。その結果、発現が上昇した遺伝子5個と発現が減少した遺伝子7個を選択しました。

混餌投与研究の28日および1年の時点でリアルタイム RT-PCR 分析を実施しました。青色の背景のものは発現が上昇した遺伝子で、黄色の背景パネルのものは発現が減少した遺伝子です。発現が上昇した遺伝子のうち、2個の遺伝子は、DEHP の投与により発現が抑制されましたが、チオアセトアミドは発現レベルを変化させませんでした。発現が減少した遺伝子のうち、対照群は1年で発現レベルが低下しました。したがって、これは加齢に関連した作用である可能性があります。次のスライドをお願いします。

一方、1個の EST 遺伝子は28日目から1年目にかけて逆の発現パターンを示しました。28日目では、対照群のレベルは高く、発がん物質投与群は発現が減少しました。しかし1年目では、非遺伝子傷害性発がん物質投与群は発現が上昇しました。次のスライドをお願いします。

結論として、28日目では、非遺伝子傷害性発がん物質に応答して発現上昇が生じた遺伝子の主な機能クラスターは、代謝であると分類されました。一方、発現減少が生じた遺伝子の主な機能クラスターは、多様であることが分かりました。従って、この多様性は、各化学物質により誘発される生物学的応答の表現型を示している可能性があります。アセトアミノフェンにより発現レベルが変化しなかった遺伝子のうち、合計12個の遺伝子は、各種の非遺伝子傷害性発がん物質で類似した発現パターンを示しました。1年の時点では、選択した遺伝子の多くはすべての投与群および対照群で発現レベルが低下し、非遺伝子傷害性発がん物質に共通の発現パターンを示しませんでした。EST-1 は28日目から1年にかけて逆の発現パターンを示し、この変化は非遺伝子傷害性発がん物質への長期間曝露により誘発された細胞機能の変調を反映している可能性があります。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

井上：渋谷博士、ありがとうございます。質問とコメントの時間が少しあります。はい、どうぞ。

曾根：国立環境研究所の曾根ですが、今現在いろいろなマイクロアレイ、ガラスアレイとかアフィメトリックスとかいろいろチップがあると思うのですが、先生がこのチップを選ばれた理由はどのようなものでしょうか。

渋谷：アフィメトリックスを選んだ理由でしょうか。

曾根：はい。

渋谷：一応、たくさんの遺伝子が乗っていることが、たぶんファーストチョイスになってくると思います。

曾根：そうしますと、その物質の毒性をプロファイリングするときには、今現在はアフィメトリックスが一番再現性もいいし・・・。

渋谷：再現性はいいと思います。あと、ラットの場合にもチップが3種類あり、大体2万1000遺伝子を網羅しています。

野原：国立環境研の野原と申します。非常に影響をきれいにまとめていらっしゃるのですが、ちょっとお聞きしたいのです。先生の場合、長期間にわたって曝露されたあとに肝臓全体でプロファイリングをされますと、例えば血液から入ってくる血液細胞とか、そこに免疫細胞などもずいぶん変わってきたりすることによって、そういう影響もかなり引っかけることになるかと思うのです。それで、何が発がんに関係があるかというとき、例えばヘパトサイトだけを分けてプロファイリングされるとか、そのようなことは有効かどうか、どのようにお考えでしょうか。

渋谷：たぶんすごく近い将来に、マイクロダイセクション等の技術を利用して、ヘパトサイトだけというのは難しいと思いますが、そういったものを特異的に切り取って解析する方法はできると思います。

野原：かなりほかの影響も見ていらっしゃるということは、ありますでしょうか。

渋谷：あると思います。

野原：ありがとうございました。

青木：同じ組織ばかりの質問で申し訳ないのですが、国立環境研究所の青木です。

今、いろいろな遺伝子の発現のパターンを見られていましたよね。だけどそのとき、例えば毒性の発現という観点から見たときは、むしろどういうオルガネラで現実存在する酵素タンパクあるいはファンクショナルなタンパクかという観点から整理されたら、毒性という観点から整理しやすいような気がするのですが、そのことに関してご意見はいかがですか。

渋谷：今回、そのようなかたちでまとめてなかったのは確かなのですが、確かにトキシコロジカルなプロファイリングはしなければいけないと思います。

青木：次に、今のは反復投与実験のあとのものを見られていますよね。

渋谷：そうです。

青木：そうすると、むしろ非常に特異的なターゲットに対する作用よりも、いろいろな二次的な作用の結果として発現されている遺伝子を見ていると思うのです。ですから何というか、そうしたらヒストロジカルな変化との対応という観点から見たとき、そういう観点から見られたらおもしろいのではないかと。そういう観点というのは、そういうオルガネラごとの整理という観点の方が一つの見方かなと思ったのですが、いかがでしょうか。

渋谷：確かにそう思います。

青木：どうもありがとうございます。

井上：他に質問はございませんか？私はあなたとテイモシー・ザカロフスキーさんに質問があります。あなたは、いわゆる発癌性が固定するのを観察するには28日で十分であるとおっしゃったように思いますが、確認させてください。

渋谷：我々は分からないですね。我々のデータからは何も言えないです。

井上：非遺伝子傷害性発がん物質の特異的なプロファイルを定義する場合、28 日までに固定時期を明らかにすることができるということでしょうか？あなたはどのように予測されますか？

渋谷：情報科学を構築するためにデータを蓄積する場合、遺伝子クラスターに関連する発癌性に関する遺伝的可能性をある程度予測することができると思います。

井上：どうもありがとうございます。そしてティモシー・ザカロフスキー博士、あなたは処理により発現の変動が増大するとおっしゃいました。化学物質の影響を観察するために要する最短時間はどのくらいであるとお考えですか？

ザカロフスキー：我々は *in vivo* 子宮肥大アッセイを用いて別の研究を行っており、2 時間以内で反応を観察していますが、恐らくそれよりもさらに早期に観察できると思います。細胞を観察して、できる限り早く RNA を取り出すことができれば、何らかの反応が観察できると思います。

井上：どうもありがとうございます。他に質問はありませんか？ありがとうございます。