

トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の免疫毒性評価法

環境健康研究領域・分子細胞毒性研究室 野原恵子 keikon@nies.go.jp

目次

はじめに

胸腺萎縮作用を示す化学物質のトキシコゲノミクス

実験方法

結果

1. 無機ヒ素
2. デキサメタゾン (DEX)
3. ダイオキシン (TCDD)
4. β -エストラジオール (E2)
5. メチルジチオカルバメート
6. トリフェニルスズ (TPT)
7. メチル水銀
8. Perfluorooctane sulfonate (PFOS)

まとめと今後の展望

付録

ダイオキシンの毒性

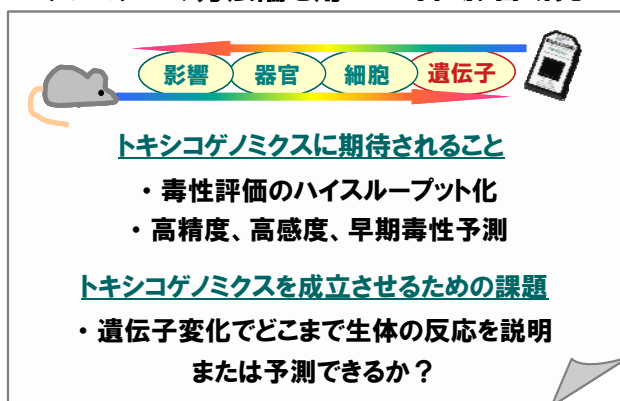
はじめに

ゲノミクスは、生命現象の基本となっている多種多様な遺伝子の構造や働きに関する網羅的な研究である。近年、遺伝子発現解析用マイクロアレイなどの関連技術や各種の遺伝子情報データベースの進歩・整備によって、ゲノミクス研究が大きく進展した。その方法論を用いた毒性影響研究、すなわちトキシコゲノミクスも毒性のメカニズム解析において成果を収めている。

さらにトキシコゲノミクスは、毒性の評価においても大いに期待される特徴を備えている。例えば、多くの動物実験を繰り返す代わりに遺伝子発現変化で網羅的、迅速に影響を検出できることや、影響が明らかに発現する前に遺伝子レベルで変化を鋭敏に検出、予測できる可能性が考えられる。WHO/IPCS によ

ると、環境中には生体影響の検討が必要な化学物質が約 5000 種類存在するが、実際に生体影響が検討されているのは約 300 種類である。トキシコゲノミクスはこのように膨大な数の被験物質の影響検索を可能とするツールとしても期待される。しかし、環境汚染物質による遺伝子発現変化と生体レベルでの悪影響を対応づけた研究例はまだ多くは報告されておらず、トキシコゲノミクスによってどこまで生体の反応を予測できるか、その有効性の検証は今後の課題である。

トキシコゲノミクス： ゲノミクスの方法論を用いた毒性影響研究



分子細胞毒性研究室では、環境汚染物質の免疫系への悪影響をトキシコゲノミクスを用いて検出し評価する方法の開発をめざして研究を行っている。研究の戦略としては、まず実験動物で悪影響が現れることが明らかになっている実験系（汚染物質、用量、標的臓器・細胞）について、影響の原因となる遺伝子や影響発現と密接に関連する遺伝子群を明らかにしたいと考えている。それらの遺伝子発現変化を指標として毒性を評価する計画である。そのために遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、発現が変動した遺伝子群から影響経路を予測し、タンパクレベルでの検討を行って影響経路を実証したいと考えている。

ここでは、胸腺萎縮作用をもつ化学物質の遺伝子発現解析の例を紹介させていただく。

胸腺萎縮作用を示す化学物質のトキシコゲノミクス

胸腺は、重要な免疫細胞であるTリンパ球（T細胞）の分化・成熟の場となる免疫臓器である。同時に胸腺は環境からの影響を受けやすい臓器でもあり、多くの環境化学物質が胸腺を萎縮させる作用をもつことが知られている。胸腺萎縮作用をもつ化学物質の多くは、同時にT細胞への影響を介して、または異なる経路で、免疫機能抑制作用を示すことが報告されている。

一方、最近の研究から、多くの環境化学物質が各種の転写因子や核内受容体に作用し、転写すなわち遺伝子発現を変化させることによって生体に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。そこで本研究では、各種環境化学物質による免疫系への悪影響を、胸腺での遺伝子発現変化から予測することを目標として、環境化学物質をマウスに投与し、胸腺での変動遺伝子群の検索をおこなっている。

これまでに、環境汚染物質のダイオキシン、無機ヒ素、PFOS、トリフェニルスズ、メチルジチオカルバメート、メチル水銀について検討を行った。また無機ヒ素やその他のストレスがグルココルチコイドホルモンを介して胸腺を萎縮させることが報告されていることから、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン (DEX)についても検討を行った。環境汚染物質のエストロゲン作用が問題となっているが、エストロゲンは胸腺萎縮作用をもつことから、エストロゲンの中の1つである β -エストラジオール(E2)についても検討した。

表1. 実験に用いた化学物質

化学物質名	投与量	活性化されることが報告されている転写因子
ダイオキシン (2,3,7,8-tetra-chloro-dibenzo-p-dioxin, TCDD)	10 μ g/kg	arylhydrocarbon receptor (AhR)
無機ヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム、NaAsO ₂)	10 mg/kg	nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) (肝細胞等)
Perfluorooctane sulfonate (PFOS)	30 mg/kg	peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)
トリフェニルスズ (TPT)	10 mg/kg(塩化トリフェニルスズ)	peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)
メチルジチオカルバメート	200 mg/kg(メチルジチオカルバメートナトリウム)	-
メチル水銀	5 mg/kg(塩化メチル水銀)	-
デキサメタゾン (DEX)	2.5 mg/kg	glucocorticoid receptor (GR)
β -エストラジオール (E2)	3 mg/kg	estrogen receptor (ER)

実験方法

各化学物質を1群3匹の C57BL/6 マウスに腹腔内投与し、1週間の間に胸腺重量が最大で 50 - 70% に減少する用量を選択した。

これらの用量の化学物質、または対照としてコーンオイルを、1群3匹のマウスに投与し、24 時間後に胸腺からトータル RNA を調製した。3匹分のトータル RNA をあわせて1サンプルとした。GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて遺伝子発現変化を測定し、対照群と化学物質投与群の結果を比較した。上記の実験を独立に2回行い、2回の比較で共通して対照群に対して2倍以上、または 1/2 以下に発現が変化した遺伝子を選択した^{1,2)}。

また化学物質投与後7日目まで、体重、胸腺重量、胸腺細胞数・細胞構成を調べた。

参考文献

- 1) Nagai, H. et al. (2005) Int. Immunopharmacol., 5, 331.
- 2) Ito, T. et al. (2006) J. Immunotoxicol., 3, 21.

結果

各化学物質投与によって、体重には対照群と比較して顕著な変化は見られなかった。

胸腺重量は、ダイオキシン投与群では1, 3, 7日と経時的に減少した。メチルジチオカルバメート投与群では1日後に胸腺重量が最小となり、その後3日、7日と回復した。その他の化学物質では、投与3日後に胸腺重量が最小になり、7日後には回復が見られた。胸腺細胞数も、胸腺重量と同様の増減を示した。

GeneChip アレイを用いて遺伝子発現解析を行い、独立の2回の実験で、対照群に対して暴露群で発現が繰り返し2倍以上に上昇した遺伝子と1/2以下に低下した遺伝子の数(プローブ数)を表2に示した。

表2. 化学物質の暴露によって発現が2倍以上に上昇した遺伝子と1/2以下に低下した遺伝子の数(プローブ数)

	上昇	低下
ダイオキシン (2,3,7,8-tetra-chloro-dibenzo-p-dioxin, TCDD)	6	1
無機ヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム、NaAsO ₂)	21	126
Perfluorooctane sulfonate (PFOS)	1	0
トリフェニルスズ (TPT)	21	247
メチルジチオカルバメート	2	191
メチル水銀	1	0
デキサメタゾン (DEX)	30	13
β -エストラジオール (E2)	1	1

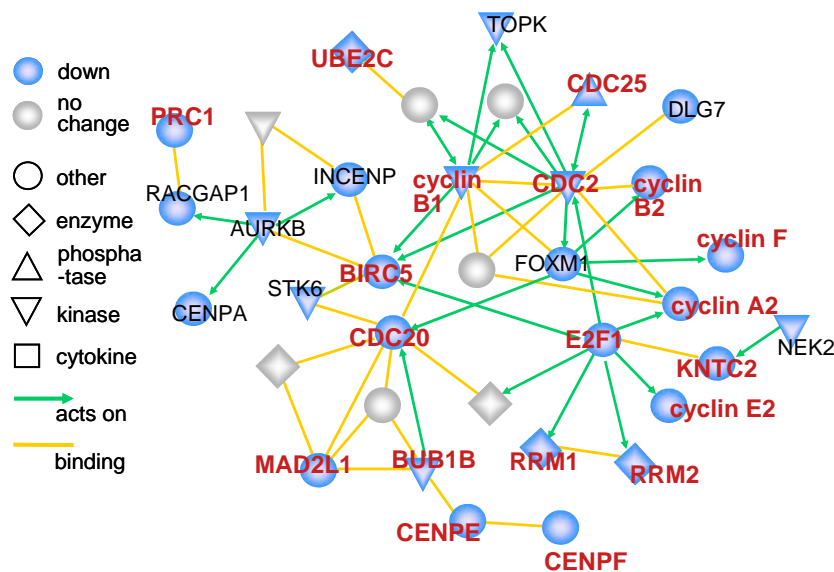
1. 無機ヒ素

地下水の無機ヒ素汚染がインド、バングラデッシュ、中国をはじめとした世界各国で発生している。潜在的患者を含めた慢性ヒ素中毒患者は世界中で 5000 万人を超えるという報告もあり、大きな問題となっている³⁾。無機ヒ素による健康被害として顕著なものは皮膚障害で、また疫学調査の結果では発がん性が示されている³⁾。そのほか動物実験では、免疫抑制作用を含む種々の悪影響が報告されている。

本研究では、無機ヒ素投与マウスの胸腺で対照群と比較して21種類の遺伝子の発現が増加し、126種類の遺伝子の発現が減少した。これらの発現変動した遺伝子について、影響パスウェイ解析ソフトである KeyMolnet および Ingenuity Pathway Analysis を用いてパスウェイ解析を行った。その結果、無機ヒ素暴露が転写因子 E2F1、および E2F1 によって発現制御される細胞周期進行に必要な遺伝子の発現を低下さ

せることが明らかとなった。また胸腺細胞の細胞周期を測定したところ、実際に細胞周期の抑制が検出された。胸腺で細胞分裂し増殖している細胞の約 90%は胸腺で成熟中の CD4⁺CD8⁺ 細胞 (DP 細胞) というポピュレーションで、残りの 10%以下が最も未成熟な CD4⁺CD8⁻細胞(DN 細胞)の中の DN3 というポピュレーションである。ヒ素暴露したマウス胸腺では、DN 細胞の中の DN1 から DN4 の4つのポピュレーションの細胞比は変化しないことから、ヒ素で細胞周期抑制をおこすのは DP 細胞であることが示唆された。さらにマウス B リンパ球株を用いた実験でも、無機ヒ素によって E2F1 や、その下流の細胞周期進行に必要な遺伝子の発現が低下し、実際に細胞周期抑制も観察された。最近、肝細胞株などで無機ヒ素が Nrf2 を活性化することが報告されているが⁴⁾、胸腺では Nrf2 の標的遺伝子である HO-1 などの発現誘導は観察されないことから、免疫細胞ではヒ素はむしろ E2F1 に作用すると考えられた。すなわちヒ素による E2F1 の抑制が胸腺萎縮や、またリンパ球増殖抑制の原因となるという新たな影響経路が示唆された。

亜ヒ酸で発現が低下した遺伝子群ネットワーク



参考文献

- 3) 山内博 (2004) 分子予防環境医学、本の泉社、p.611.
- 4) He, X. et al. (2006) J. Biol.Chem. 281, 23620.

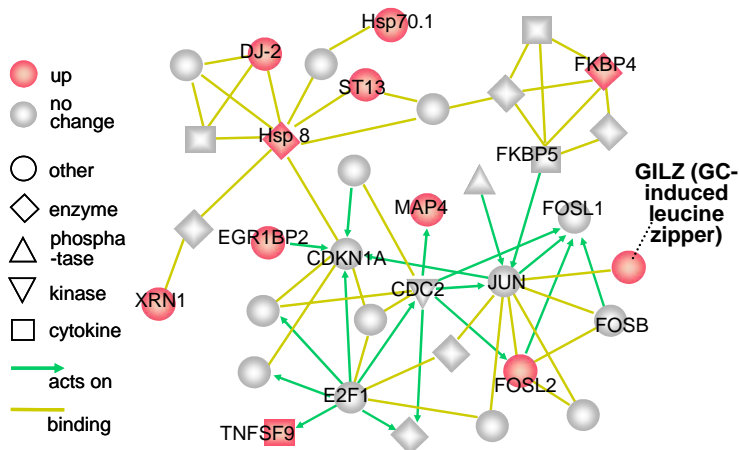
2. デキサメタゾン (DEX)

グルココルチコイド(GC)や合成グルココルチコイドである DEX は、核内受容体であるグルココルチコイドレセプター(GR)と結合することによって胸腺萎縮を誘導すると考えられている。DEX 投与マウスの胸腺では、対照群と比較して 30 種類の遺伝子の発現が増加し、13 種類の遺伝子の発現が減少した。Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析の結果、GC による胸腺萎縮の原因となることが報告されている GC-induced leucine zipper (GILZ)⁵⁾に関連する遺伝子群の発現が上昇していることが示された。GILZ がどのように胸腺萎縮を起こすかはまだ明らかにされていないが、DEX 投与によって GILZ の発現が上昇し胸

腺萎縮を誘導することが示唆された。

なお、無機ヒ素による胸腺萎縮が GC を介して胸腺萎縮をおこすことが報告されているが、今回の研究では無機ヒ素暴露で GILZ の発現上昇は観察されなかったことから、ヒ素による胸腺萎縮は GC による GR の活性化とは異なる経路でおこることも示唆された。

DEXで発現が上昇した遺伝子群ネットワーク



参考文献

5) Delfino, D. V. et al. (2004) Blood, 104, 4134-4141.

3. ダイオキシン(TCDD)

ダイオキシンは転写因子 arylhydrocarbon receptor (AhR)を活性化し、主にエンハンサー領域に XRE 配列を持つ遺伝子の転写を ON にしたり調節することによって、胸腺萎縮や免疫機能の抑制を含むさまざまな悪影響を發揮すると考えられている(付録参照)。ダイオキシン投与によって、種々の臓器や細胞で薬物代謝酵素である CYP1A1 遺伝子がダイオキシン標的遺伝子として強く誘導される。本研究でもダイオキシン暴露マウスの胸腺で CYP1A1 の発現が大きく増加した。しかし発現上昇した遺伝子数は少なく、他にはダイオキシン暴露で胸腺で誘導されることがすでに報告されている adseverin⁶⁾と、CTLA2 α および機能不明な遺伝子3種類の、合計6種類のみであった。また発現が減少した遺伝子は Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M という遺伝子1種類であった。今回発現変動が検出された遺伝子の中には、細胞増殖に関与することが明らかにされている遺伝子はなく、これらの遺伝子の発現変動が胸腺萎縮の原因となるとは考えにくかった。

ダイオキシン暴露による胸腺萎縮の原因として、ダイオキシンによる胸腺細胞のアポトーシス⁷⁾と細胞周期抑制⁸⁾の2つが示唆されている。ダイオキシンによる胸腺細胞のアポトーシスについては、Fas/FasL 経路の活性化によることが報告されている。しかしながら筆者らの研究で、Fas または FasL の機能欠損マウスである lpr マウスまたは gld マウスにおいても、AhR の活性化による胸腺萎縮がおこることが示されたこ

とから、ダイオキシンが Fas/FasL 経路の活性化を介して胸腺細胞のアポトーシスを誘導することは否定された⁹⁾。

一方ダイオキシンによる細胞周期抑制は、胸腺細胞全体の中のごく小さなポピュレーションである CD4⁺CD8⁻ 細胞(DN 細胞)の中の特に DN3 というポピュレーションへの影響であることが報告されている⁸⁾。したがって、ダイオキシンが DN 細胞特異的に影響を及ぼすとすると、対照群と TCDD 暴露群について胸腺細胞全体で比較したのでは変動が検出できない可能性が考えられた。

そこで対照群と TCDD 暴露群マウスの胸腺からそれぞれ DN 細胞を調製し、GeneChip を用いて遺伝子発現の比較を行った。その結果、予想通り胸腺細胞全体で比較を行なった場合より多くの遺伝子の発現変化が検出された。DN 細胞で TCDD 暴露によって発現が上昇した遺伝子(プローブ)は71種類で、低下した遺伝子(プローブ)は5種類であった。これらの遺伝子には、ダイオキシン標的遺伝子の CYP1B1, adseverin, TiPARP や、細胞周期、アポトーシス、細胞接着、受容体その他いろいろなカテゴリーの遺伝子が含まれていた。

ダイオキシンの毒性は AhR の活性化を介することが明らかにされ、毒性メカニズムの研究が盛んに行われてきたが、AhR の下流から毒性発現に至るメカニズムはまったく明らかにされていない。すなわち、AhR 活性化によって遺伝子発現が誘導あるいは抑制されて毒性影響につながると考えられるが、その原因遺伝子は明らかにされていない。今回ダイオキシンによる胸腺萎縮の原因遺伝子として、DN 細胞で特異的に多くの遺伝子の発現変動がおこっていることが明らかとなったことから、今後これらの候補遺伝子の胸腺萎縮への関与について検討することによって、AhR 下流で胸腺萎縮に結びつく影響経路を明らかにしたいと考えている。

参考文献

- 6) Svensson, C. et al. (2002) *Biochem Biophys Res Commun.* 291, 1194.
- 7) Fisher, M.T. et al. (2004) *Toxicol. Sci.* 78, 96.
- 8) Laiosa, M. D. et al. (2003) *J. Immunol.* 171, 4582-4591.
- 9) Nagai, H. et al. (2006) *Int. Immunopharmacol.* 6, 279-286.

4. β -エストラジオール(E2)

エストロゲンは、胸腺の発達や T リンパ球産生に影響を及ぼすことが知られている。特に妊娠によって血液中のエストロゲン濃度は大きく上昇し、実験動物ではこの時期に胸腺萎縮がおこることが観察されている¹⁰⁾。エストロゲンによる胸腺萎縮の生理学的な意義は明らかではないが、胎児を異物として攻撃しないための母親の免疫寛容に関与することも示唆されている。

本研究では、E2 暴露で変動した遺伝子数はごく少なく、palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated という遺伝子1種類が上昇し、機能不明の遺伝子1種類が低下したのみであった。

エストロゲンは核内受容体であるエストロゲンレセプター (ER)を活性化して作用を発揮すると考えられるが、エストロゲンによる胸腺萎縮の原因となる遺伝子は不明である。エストロゲンによる胸腺萎縮につい

ては、最近3つのメカニズムが示唆された¹¹⁾。すなわち骨髄細胞中の胸腺細胞前駆細胞の減少、胸腺細胞中最も未成熟な DN 細胞数の減少、および DN 細胞の増殖抑制である。胸腺細胞の中で DN 細胞が特異的に影響を受けるとすると、ダイオキシンの場合と同様に胸腺細胞全体の遺伝子発現解析では対照群と暴露群の差は検出されない可能性が考えられる。なお、胸腺で ER α が発現していることは RT-PCR で確認された。そこでエストロゲンによる遺伝子発現から胸腺萎縮にいたる経路については、ダイオキシンの場合と同様に、DN 細胞を分離して遺伝子発現変化を調べることによって胸腺萎縮の原因遺伝子を見つけられる可能性が考えられた。

参考文献

10) Clarke, A. G. and Kendall, M. D. (1994) *Immunol. Today*, 15, 545-551.

11) Zoller, A. L. and Kersh, G. J. (2006) *J. Immunol.* 176, 7371-7378.

5. メチルジチオカルバメート

メチルジチオカルバメートは、殺虫剤として多用されている。活性酸素のスキャベンジャー作用をもつと同時に、酸化促進作用も示し、また銅のキレーターとして銅依存性酵素に作用することも報告されている。胸腺萎縮や抗炎症性サイトカイン産生の抑制をおこし、また免疫抑制性サイトカイン(IL-10)産生を増強することが報告されている¹²⁾。

SMD で発現上昇した遺伝子は、CD163, serine proteinase inhibitor の2種類だった。発現低下した遺伝子(プローブ)は191種類で、ヒ素暴露と同様に cyclin A2, cyclin B1, cyclin B2, cyclin E2, cyclin F などの細胞周期関連の遺伝子が多数含まれることが明らかとなった。これらの変動遺伝子から、SMD はヒ素と同様に E2F 依存的に細胞周期進行に必要な遺伝子の発現を低下させ、胸腺を萎縮させることが示唆された。

参考文献

12) Pruetz, S. B. et al. (2006) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 172.

6. トリフェニルスズ(TPT)

トリフェニルスズ(TPT)は、農業において殺菌剤として使用されており、免疫抑制作用を示すことが報告されている。最近の *in vitro* 実験系を用いた研究では、TPT が核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)のアゴニストとなることが報告されている¹³⁾。

本研究では、TPT 暴露で21遺伝子(プローブ)の発現上昇が観察され、その中には PPAR γ の標的遺伝子である CD36, angiopoietin-like 4 (Angptl4), fatty acid binding protein 3 (Fabp3)が含まれていた。この

ことから、TPTはマウス胸腺においてもPPAR γ のアゴニストとして働くことが示唆された。またTPT暴露で247遺伝子(プローブ)の発現低下が観察された。その中にはヒ素暴露で低下した細胞周期関連の遺伝子が数多く含まれていることが明らかとなった。これらの結果から、TPTは無機ヒ素と同様にE2F1の系を介して細胞周期抑制をおこし、これが胸腺萎縮の原因となることが示唆された。また、PPAR γ のアゴニストがリンパ球でアポトーシスを誘導することが報告されていることから¹⁴⁾、PPAR γ の活性化によるアポトーシスもTPTによる胸腺萎縮に関与する可能性が示唆された。両者の関与についてはさらに検討が必要である。

なお、TPT やいくつかの有機スズがグルココルチコイド(GC)を不活化する酵素である11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type2の活性を阻害することが報告され、有機スズによるこの酵素の阻害によってGCが増加し胸腺萎縮につながることを示唆されている¹⁵⁾。しかし本研究では、TPTによって発現変化した遺伝子と、GILZをはじめとした上述の合成GCであるDEXで発現変動した遺伝子に共通する遺伝子は含まれなかった。このことから、TPTはGCとは独立の経路で胸腺萎縮を誘導することが示唆された。

参考文献

- 13) Kanayama, T. et al. (2005) Mol. Pharmacol. 67, 766-774.
- 14) Ray, D. M. et al. (2005) J. Immunol. 174, 4060.
- 15) Atanasov, A. G. et al. (2005) Environ. Health Persp. 113, 1600.

7. メチル水銀

メチル水銀は、わが国の公害病の原点といわれる水俣病の原因物質で、中枢神経系に特異性の高い毒性を示すことが知られているが¹⁶⁾、免疫系もメチル水銀に感受性が高いことが報告されている¹⁷⁾。

本研究では、メチル水銀で変動した遺伝子は1遺伝子のみで、CYP2E1が発現上昇することが明らかとなった。メチル水銀の毒性におけるCYP2E1の寄与についてはこれまでほとんど研究が行われていないが、CYP2E1は活性酸素種(ROS)を発生させ細胞に酸化傷害を与えることが報告されている¹⁸⁾。また肝細胞ではCYP2E1による酸化傷害を誘導型のヘムオキシゲナーゼ(HO-1)が防ぐことが報告されているが¹⁸⁾、肝臓では種々の化学物質でHO-1が誘導されるのに対して、胸腺ではHO-1誘導はほとんど認められない。これらのことから、メチル水銀暴露によってCYP2E1を介した酸化ストレスが胸腺萎縮をおこす可能性が考えられるが、その因果関係を明らかにするためにはCYP2E1活性測定やさらなる検討が必要である。また、メチル水銀がミトコンドリアの膜電位を変化させることが報告されており¹⁹⁾、メチル水銀は膜たんぱくなどへの作用を介して遺伝子発現非依存的に作用する可能性も考えられた。

参考文献

- 16) 国本学(2004) 分子予防環境医学、本の泉社、p596.
- 17) Haggqvist, B. et al. (2005) Toxicol. 208, 149.

- 18) Gong, P. et al. (2004) Free Radic. Biol. Med. 36, 307.
19) Shenker B. J. et al. (2002) Antioxid. Redox. Signal. 4, 379.

8. Perfluorooctane sulfonate (PFOS)

PFOSは強力な界面活性剤として、また紙や布に撥水性や耐油性を持たせるために、広く工業や生活の中で使用されている。

PFOSは核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α や PPAR β / δ を活性化することが報告されているが²⁰⁾、本研究では、PFOS 暴露ではわずかに parathyroid hormone (PTH) 1 遺伝子が発現上昇したのみであった。今回の研究で、PTH はヒ素暴露でも上昇が観察されており、PTH が PPAR α や PPAR β / δ の標的遺伝子であるという報告はないことから、PTH の発現上昇が PPAR α や PPAR β / δ の活性化を介した結果とは考えにくかった。また、PTH は免疫系に影響を及ぼすことが報告されているが²¹⁾、胸腺萎縮との関連や細胞増殖における役割は報告されていないことから、今回観察された PTH の発現上昇が胸腺萎縮に関与するかどうか不明である。今後 PTH の胸腺萎縮への関与を調べるためには、PTH をリンパ球系の細胞に強制発現し、細胞増殖やアポトーシスへの関与を調べることで有効であろう。また PFOS は細胞表面の電荷を変化させることが報告されており²²⁾、遺伝子発現を介するよりも、むしろ生化学的な変化を介して胸腺萎縮を起こす可能性も考えられた。

- 20) Takacs, M. L. and Abbott, B. D. (2007) Toxicol. Sci. 95, 108.
21) Shurtz-Swirski, R. et al. (1995) Nephron. 70, 21.
22) Harada, K. H. et al. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun. 351, 240.

まとめと今後の展望

胸腺はいろいろなストレスや化学物質の暴露によって影響を受けやすく、胸腺萎縮をおこすことが知られていた。しかし、それぞれの物質が同じ経路、たとえば GC の分泌を介して胸腺萎縮をおこすのか、またはそれぞれに異なる経路で胸腺萎縮をおこすのかについてや、具体的な影響経路は不明の部分が多かった。それは従来の生化学的手法では、簡便なスクリーニングが難しかったためと考えられる。本研究では、種々の化学物質による胸腺萎縮について遺伝子発現の網羅的解析を行うことによって、各物質の影響経路について多くの情報が得られることが明らかとなった。

本研究では、無機ヒ素が胸腺で転写因子 E2F1 の作用を抑制し、DP 細胞の細胞周期を抑制することによって胸腺萎縮をおこすことが示唆された。実際に胸腺細胞で細胞周期の抑制がおこっていることも測定された。またメチルジチオカルバメートやトリフェニルスズでも同じ経路によって胸腺萎縮がおこることが示唆された。

合成 GC である DEX では、胸腺萎縮の原因となることが報告されていた GILZ の発現上昇が検出され、これが GC 依存性の胸腺萎縮のマーカーとなると考えられた。無機ヒ素は GC 依存的に胸腺萎縮をおこすことが示唆されていたが、本研究の結果からヒ素と GC は別々の経路で胸腺萎縮をおこすと考えられた。

またダイオキシンと E2 は、それぞれ転写因子 AhR または核内受容体 ER を活性化するが、本研究でダイオキシンと E2 によって胸腺全体で発現変動が検出される遺伝子の数はごく少なかった。この原因は、ダイオキシンと E2 はいずれもごく小さなポピュレーションである DN 細胞の中の DN3 細胞の遺伝子発現に特異的に影響を及ぼすためであり、すなわち DN3 細胞が両化学物質の標的細胞であることが示唆された。なおダイオキシン暴露については、胸腺萎縮の原因ではないと思われるが、CYP1A1 や adseverin の発現上昇が特異的な暴露のマーカーとなることが示された。

メチル水銀暴露では1遺伝子、CYP2E1 の発現上昇が認められたのみであった。CYP2E1 を介した酸化傷害が胸腺萎縮につながる可能性が考えられるが、今後の検討が必要である。また PFOS でも1遺伝子の変動が検出されたのみで、胸腺萎縮との関連は明らかにならなかった。これらの化学物質についても、ダイオキシンや E2 と同様に胸腺細胞のなかのごくわずかなポピュレーションに影響を及ぼすことから胸腺細胞全体の解析では影響が検出できない可能性も考えられるが、むしろ遺伝子発現変化を介さず、直接たんぱく質に影響を及ぼして作用する可能性が考えられた。

マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析が一般的になり始めた 2000 年頃には、遺伝子発現を見ても細胞内でおこっていることはわからないだろう、たんぱく質まで見ないとわからないだろう、ゲノクスよりはプロテオミクスを行うべきである、と予測する意見も聞かれた。しかし上に述べたように本研究では、トキシコゲノミクスが各化学物質に特異的な影響経路や標的細胞に関する情報を得るために大いに有効な手法であることが示された。近年いろいろな化学物質が各種転写因子や核内受容体に作用することが明らかにされており、影響の原因経路を探るために遺伝子発現の網羅的解析を行うことの妥当性を支持している。また各種転写因子・核内受容体の標的遺伝子が次々と明らかにされていることも、結果を解析する上での助けとなっている。影響経路に関する一次スクリーニングの手段として、ゲノクスはプロテオミクスよりもずっと簡便に行えることも大きな利点であると考えられる。

本研究では、種々の化学物質がそれぞれ特異的な経路で胸腺萎縮を誘導する可能性が明らかとなった。この結果をもとに、さらにたんぱくレベルの検討や関連する経路に関する検討を行うことによって、各化学物質が胸腺萎縮を誘導する経路が明らかになることが期待される。このような影響との関連が明らかな遺伝子指標を用いることによって、より確実性をもって遺伝子発現から影響予測を行うことが可能となると考えている。

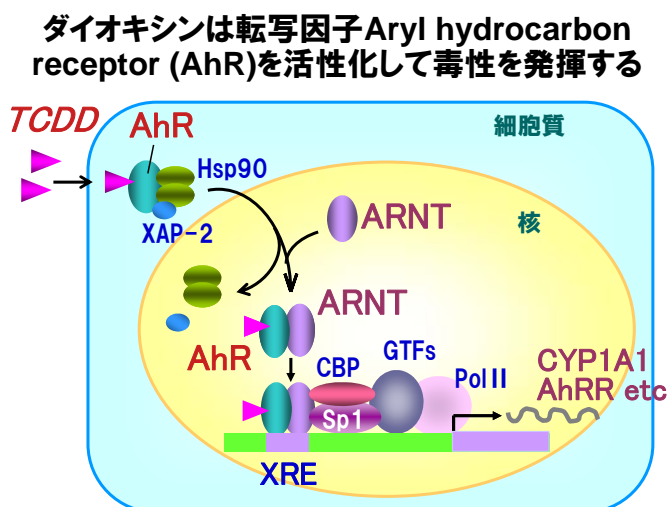
なお、本サイトに掲載したダイオキシン応答遺伝子データベースは、今後、環境汚染物質応答遺伝子データベースと改名し、本稿で述べた各種化学物質による変動遺伝子のデータを、論文発表をした後に順次加えてデータを拡張していく予定である。

付 録

ダイオキシンの毒性

TCDD は、1960 年代にベトナム戦争で大量に使用された枯葉剤に不純物として混入し、奇形や不妊の原因となる可能性が指摘された化学物質である。TCDD と近縁の構造をもち、TCDD と同じメカニズムで毒性を発揮する一群の化合物を総称してダイオキシン類とよぶが、日本でも 1970 年代までは農薬の成分として多量のダイオキシン類が環境中に放出されていたことが報告されている。環境中に放出されたダイオキシン類は食物連鎖を通してヒトが摂取する食物を汚染し、ヒトの体内に取り込まれる。ダイオキシン類は分解されにくく、特にヒトでは半減期が長いことから、一旦体内に入ると次第に蓄積する性質をもっている。ダイオキシン類を含む農薬が規制され、また少量ではあるがゴミ焼却場の排ガスから環境中に排出されてきたダイオキシン類も規制されたことによって、現在わが国では食物のダイオキシン汚染も軽減している。しかし動物実験で低用量の TCDD がさまざまな悪影響をもつことが報告され、ダイオキシンの毒性について動物種特異性や臓器・細胞特異性、影響を受けやすい時期の特異性など未解明な部分も多いことから、その悪影響については注意が必要であろう²³⁾。

TCDD は arylhydrocarbon receptor (AhR) を活性化することによって毒性を発揮することが AhR 欠損マウスを用いた実験で証明されている。TCDD は、細胞質に存在する転写因子 AhR と結合することによって AhR を活性化し核移行を誘導する。核に移行した AhR は転写因子 ARNT (arylhydrocarbon receptor nuclear translocator) とヘテロダイマーを形成し、CYP1A1 をはじめとする種々の遺伝子のエンハンサー領域に存在する xenobiotic responsive element (XRE) に結合して、遺伝子発現の誘導や調節を行う²⁴⁾。その結果、生体に種々の悪影響を及ぼすと考えられている。



参考文献

23) 野原恵子 (2006) ファルマシア 42, 700

24) Fujii-Kuriyama, Y., and Mimura, J. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 331.