

#### 4. PPAR $\gamma$ 作用薬に関して

Troglitazone や Rosiglitazone などの TZD (thiazolidinedione) 系の薬剤は、インスリン抵抗性改善作用を有しており、2 型糖尿病治療薬として有用な経口糖尿病薬剤となっている。TZD 誘導体は PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) を活性化することによってインスリン抵抗性を改善することが明らかとなっている。PPAR は核内レセプターの一つであり、リガンド依存的な転写制御因子である。PPAR $\gamma$  は脂肪組織に多く発現して脂肪細胞分化に深く関与しており、分化促進による脂肪細胞の質的変化が PPAR $\gamma$  アゴニストによるインスリン抵抗性改善のメカニズムの 1 つと考えられている。これまでに 3 種類の TZD 薬が臨床に用いられてきた。Troglitazone は副作用である重篤な肝障害のために市販後中止になった薬剤として有名である。副作用の原因については不明な点も多いが、他の核内レセプターにも作用することが原因である可能性が指摘されている。今回 Troglitazone を用いて毒性が発現しない Rosiglitazone とともに網羅的遺伝子発現解析を行うことによってその毒性発現に関わる遺伝子発現変動の解析を試みた。また、本研究班の宮田直樹教授の下で新規に合成されたチアゾリジン骨格を持たない PPAR $\gamma$  アゴニストを用いて研究を行い、他の PPAR $\gamma$  アゴニストとの共通性等を調べた。研究には接着型凍結プライマリーヒト肝細胞である Lot100 を用いて処理時間 1, 4, 24, 72 時間で行った。被験物

質としては Troglitazone (30  $\mu$ M, 3  $\mu$ M), Rosiglitazone (30  $\mu$ M, 3  $\mu$ M), YH-1 (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) (新規合成化学物質), YH-16 (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) (新規合成化学物質) を用いた (図 5)。各処理時点で発現変動した遺伝子数を表 1 1 に示した。また、高濃度処理と低濃度処理で共通した変動を示した遺伝子数も併記した。さらに解析を進め YH-1 と YH-16 のそれぞれの両濃度で共通に変動する遺伝子数と Troglitazone と Rosiglitazone のそれぞれの両濃度で共通に変動する遺伝子数を表 1 2 に示した。さらに YH-1 および YH-16 によって発現変動する遺伝子が Troglitazone と Rosiglitazone で同じ方向に変動する遺伝子のどちらにより近いかの共通性を見ることで比較した (表 1 3)。

#### 5. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に関して

ヒストン脱アセチル化酵素は DNA が巻き付いているヒストンと呼ばれる構造体を脱アセチル化することによって遺伝子の発現を抑制している。この機能は転写抑制因子に支配されており高等生物の遺伝子発現制御に大きく関与している。

今回本研究で確立した試験系を用いてこのヒストン脱アセチル化酵素の網羅的遺伝子発現解析を行うことで新規合成された薬剤とすでに活性が報告されている薬剤の構造活性相関を試みた。

研究には接着型凍結プライマリーヒト肝細胞である Lot100 を用いて処理時間 1, 4 時間で行った。被験物質としてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、Trichostatin A (TSA) (0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M)、

*N*-Hydroxy-*N*-phenyloctanediamide (SAHA) (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M)および本研究班の宮田直樹教授の下で新規に合成された Methyl 6-anilino-6-oxohexylcarbamate (P-Me) (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M)と 6-[(aminocarbonyl)amino]-*N*-phenylhexanamide (P-Urea) (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M)を用いた(図6)。解析の結果を表14~16, 図7~10に示した。

処理1時間では発現変動する遺伝子数は少ないが、4時間処理ではTSA、SAHAおよびP-Meにおいて非常に多くの遺伝子が発現変動していることがわかった。特にTSA(0.1  $\mu$ M)、SAHA(10  $\mu$ M)では解析に至った遺伝子数が少なかった。また、2濃度共通して発現変動した遺伝子もTSA、SAHAおよびP-Meで多かった。また、TSAとSAHAで共通して発現変動した遺伝子も多いことがわかった。P-MeおよびP-Ureaによって発現変動する遺伝子のTSAとSAHA処理時に変動する遺伝子との共通性を比較したところ、P-Meに関しては多くの遺伝子で共通変動が認められたが、P-Ureaでは共通性が低かった。

## 考察

### 細胞の性質に関する考察

LI90 および HepG2 細胞はそれぞれ 55 歳の日本人女性、15 歳のコーカシア人男性由来の肝がん細胞株であり、その染色体数は近二倍体程度であるが、がん細胞として細胞の増殖は増大している。さらに肝細胞としての機能は低下しており、特に細胞内の酵素機能は著しく低下していることが考えられる。しかし HepG2 においては薬物代謝酵素誘導剤で処理することにより

CYP1A 分子種ならびに CYP3A 分子種に関しては誘導が確認されており、その活性は細胞に存在することがわかっている。実際に遺伝子発現解析結果からは酵素機能の変動つまり機能低下が観察された。このことから考えると、通常のヒトでの遺伝子発現と非常に異なるこれらの細胞を用いて毒性評価の実験系を確立することは危険因子を多く含むと考えられる。今後の検討結果によって毒性評価に有用な遺伝子群が抽出され、その遺伝子発現レベルがこれら株化細胞と比べて大きく通常のヒト細胞と異なることと、薬剤に対する遺伝子発現のレスポンスが同様であることが確認できれば、増殖する細胞であるこれら株化細胞は生命倫理上でも有用性が高いといえる。

薬物代謝酵素の発現遺伝子数が非凍結型、凍結型、株化細胞の順に少なくなったことは材料の有用性を評価する上で重要な知見といえる。薬剤は体内に吸収されると主に肝臓で代謝を受ける。もともと薬剤に毒性がある場合もあるが、肝臓で代謝されて初めて毒性を示す薬剤も数多く存在する。また、ヒト体内での薬剤の動態を考えた場合には代謝酵素によって代謝を受けた代謝産物が非常に重要であるといえる。遺伝子発現をヒト体内での毒性評価に用いる場合においては薬剤の未変化体およびその代謝産物の影響を考慮する必要があるが、そのためには薬物代謝酵素の活性を有する細胞を用いるのが適していると考えられ、またその薬物代謝活性が生体をよく反映している方が望ましい。そのような観点から考えると、非凍結型および凍結型のプライマリーヒト肝細胞を用いることが最適であると示唆された。

無処理の細胞同士の遺伝子発現を比較することによって、非凍結型、凍結型のロット間差すなわち個人差（由来個体差）が非常に大きいことが明らかとなり、薬剤処理を行ったときよりも遺伝子発現に差が生じていることがわかった。このような結果から様々な薬剤による影響をプライマリーヒト細胞で評価する場合には出来る限りロットを揃えなければ薬剤による遺伝子発現の違いは検出できず、ロット間差の変動の中に混ざってしまうことが考えられた。そのような観点から考えると凍結型のプライマリーヒト肝細胞が最適であると考えられた。薬物代謝酵素等の発現遺伝子数も非凍結型とそれほど差異は無く、凍結保存してある細胞を薬剤処理前に細胞を起こして準備し使用するのが望ましいと考えられた。もちろん考えられるのはロット間で共通性見出されるのかということであり、凍結型プライマリー細胞を数ロット用いて標準化する方法が良いと考えられた。

#### 処理時間に関する考察

非麻薬性鎮痛薬であるアセトアミノフェンの過剰使用による急性中毒は劇症肝炎の重要な原因となっている。成人で 10~15g 以上または 1日 4g 以上を数日間投与することにより肝のグルタチオンが減少する。このグルタチオンは危険性の高い毒素の中間代謝産物と結合することによって、通常は薬物の解毒を行う働きをもつ。この機能が飽和状態に至ると、遊離した代謝産物は肝の巨大分子と結合し、主に小葉における壊死を起こす。微小血管障害は重要な損傷の早期機序のようである。

肝障害はしばしばアセトアミノフェン摂

取の 2~5 日後まで明らかにならず、その後急性肝細胞壊死の臨床的または生化学的な証拠が明らかとなる。致死率はこの薬を 25g 以上摂取した場合増加する。

非凍結型プライマリー肝細胞 (Lot42) を用いてアセトアミノフェン処理時における遺伝子発現変動を経時的に解析した結果から、処理の初期では遺伝子発現変動が少ないが、24 時間処理後より発現変動してくる遺伝子の数が増大する。また 48 時間後で変動する遺伝子数が最高となる。48 時間処理、72 時間処理と共通した遺伝子が多く見られるようになった。このことはアセトアミノフェンの毒性は弱く、その代謝産物が毒性を有しており処理の初期においてはその毒性は比較的弱く観察され、その後経時的に細胞毒性が出てくると考えられる。それとともに遺伝子発現変動も大きくなり、48 時間処理の時点で最高となった。48 時間処理と 72 時間処理において共通して遺伝子の発現が抑制される遺伝子の内訳を見てみると細胞の増殖や維持に関連している遺伝子が多く含まれており、細胞毒性が出てその機能の維持が不能になってきていることが推察される。

処理時間を 4 時間として 6 種の細胞種 (凍結型 2 種、非凍結型 2 種、株化細胞 2 種) を用いてアセトアミノフェン処理を行ったときの遺伝子発現変動を解析したときには、同じ薬剤処理を行っているにもかかわらず、共通した発現変動を示す遺伝子は少なかった。これは 2 mM という高濃度の処理にもかかわらずアセトアミノフェンの毒性が低く、細胞に共通の変化が見られていないことが考えられる。アセトアミノフェンは代謝されて初めて毒性を示す薬剤であり、4

時間処理という時間では毒性効果が細胞にはっきりとした形であらわれていない結果であると考えられる。同様の処理を48時間行った場合には共通した発現変動を示す遺伝子が多くみられると考えられる。このようにどの時点で遺伝子発現変動を解析を行うのかということで、同じ処理を行っても細胞を変えるだけ、特に同じ凍結型あるいは非凍結型のプライマリーヒト肝細胞で細胞を変えるだけでも薬剤による特徴ある遺伝子発現変化を見逃す恐れがある。処理時間に関しては非常に短いものから72時間程度までの処理を行い、その中で数点の時点で評価するのが望ましいと考えられた。しかし、遺伝子発現解析には多くのコストを要するため、如何に少ない時点で遺伝子発現解析を行い、その毒性に基づく特徴ある遺伝子発現変動を捉えられるかが非常に重要であると考えられる。

#### 代表的肝毒性物質処理に関する考察

まず、今回研究に用いた薬剤の毒性機序について文献を参考に記載する。

カルバマゼピンは抗てんかん薬であり重篤な肝障害（胆汁うっ滞性、肝細胞性、または混合型、肉芽腫性）を起こす可能性がある薬剤である。またこの薬剤は間質性腎炎等の重篤な腎障害を起こすこともある薬剤である。

イソニアジドは抗結核薬であり、約20%の患者で通常一過性のわずかなトランスアミナーゼの上昇を認める。明らかな肝炎が1~2%にみられ、ときに死に至る。35歳以上の患者および同時にリファンピンを投与されている患者では、より肝障害を起こしやすい。肝毒性の発症率はアセチル化が遅

い人の方が大きい。服用後2~3週間に発症するほとんどの薬物関連肝炎と異なり、イソニアジドによる損傷は1年近くまで遅れて発症することもあり、その時点では関連性が見過ごされる。薬物を中止しない限り進行性慢性肝炎および肝硬変に移行しうる。この反応が過敏性メカニズムによるのか肝毒性の代謝産物に起因するものなのかはよくわかっていないが、多くの証拠では後者の可能性が高い。

四塩化炭素は肝障害のモデル物質として動物実験に繁用されてきた。四塩化炭素による肝障害は、四塩化炭素そのものによって引き起こされるのではなく、体内（肝臓）で生成した反応性に富む中間代謝物（ラジカル）によって引き起こされる。この活性代謝物は肝細胞内の滑面小胞体に局在するCYPによって生成する。一晩、ラットを絶食状態におくと、CYP2E1の活性が著しく亢進する。四塩化炭素はCYP2E1によって代謝されるので、一晩絶食したラットに四塩化炭素を与えると極めて強い肝障害が起こる。前の晩に普通に餌を食べたラットでは血清GPT（肝障害の指標）は数百で、肝臓も軽度の脂肪変性を示すのみで肝細胞の壊死はみられない。ところが、一晩絶食のラットでは、血清GPTは数千となり、肝中心葉に広範な細胞壊死が認められる。

これらの3薬剤を用いて文献値を参照に、十分に細胞毒性が現れるような濃度（カルバマゼピン：1 mM, イソニアジド：1 mM, 四塩化炭素：0.5 mM）で細胞処理を行った。網羅的遺伝子発現解析の結果から、それぞれの薬剤処理によって発現変動する遺伝子が導き出されたが、4時間程度の短時間の薬剤処理では比較的発現変動する遺伝子が

少なかった。このことは薬剤の毒性発現メカニズムと深く関わっており、そのメカニズムが用いた薬剤による直接毒性によるものであれば比較的処理の初期に大きく遺伝子発現が変化してくると考えられるが、今回用いた薬剤はその代謝産物が主に毒性を示すために48時間処理の時点で大きく遺伝子発現変動を示した。このことは初期の遺伝子発現変動が薬剤の特徴を示すような遺伝子発現となり、その後起こる細胞毒性に対する遺伝子発現変動が経時的に現れてくるものと考えられる。そのことは連続する時点間で共通する遺伝子発現変動が処理時間を長くすることで多くなることや、その共通して変動する遺伝子が細胞の増殖や維持、さらにはアポトーシスに関わっている遺伝子が多いことに示されている。今後のさらなる検討により、それぞれの毒性メカニズムに対応する遺伝子発現変動が見出されると考えられた。カルバマゼピンの処理で最も多くの遺伝子発現変動が観察されたが、すべての時点で共通して発現変動した遺伝子が見出されている。Up-Regulateされている31遺伝子とDown-Regulateされている9遺伝子である(表8)。これらの遺伝子が他の処理で同様に変動しているかを調べたところ、他の処理でも同様の変化を示していることが多いということがわかった。これらの遺伝子は肝毒性物質に共通で、評価に有用な遺伝子群であることが示唆された。

次にアセトアミノフェン処理に着目して他の薬剤処理との比較を行ったときには処理の初期段階ではアセトアミノフェン処理に固有の遺伝子発現変動が観察され、他の処理との共通性が見られなかった。このよ

うに薬剤処理の初期においては薬剤の特徴を表す遺伝子発現変動が観察されると考えられる。一方、24時間処理以降に着目してみると、他の処理で共通した遺伝子発現変動が良く見られるようになる。特に48時間処理では変動する遺伝子数も多いが、共通して変動する遺伝子数も多くなっていることがわかる。このことは薬剤で細胞が薬剤固有の特徴を示す遺伝子発現の変化を受け、その後細胞毒性として共通した遺伝子の変化が見られていることによると考えられる。

各時点ですべての処理に対して共通して変動する遺伝子のリストからは酵素関連やトランスポーター関連の遺伝子の変動が共通して見られたが、これは薬剤による誘導効果によるものと考えられ、毒性代謝物を分解あるいは排泄する方向に遺伝子の変化が起こっているためであると考えられる。

#### PPAR $\gamma$ 作用薬を用いた遺伝子発現解析における考察

インスリン非依存型糖尿病(NIDDM)の経口治療薬として、従来より、膵B細胞からのインスリン分泌を刺激するSU剤が用いられてきた。最近、これに加え新しい治療薬として、インスリン感受性を亢進させるチアゾリジン系薬剤(Thiazolidinediones)が発売、もしくは治験段階で使用されている。日本人の推定糖尿病患者は500~600万人であり、その95%はII型糖尿病がしめると考えられている。現在、日本国内販売されている唯一の薬剤は、ピオグリタゾン(商品名、アクトス:武田薬品)である。最初に販売されたTroglitazoneは肝障害の副作用が稀に出現することで、販売を停止された。現在、治験段階にある薬剤は、

JTT-501(日本たばこ)など数種類存在する。チアゾリジン系薬剤は、肥満のある糖尿病患者に高い有効率を示すことが証明されている。しかし、BMIが高くて無効例がある反面、やせていても著効例があるなど、どのような糖尿病患者に最も有効であるかは今後、検討されていかなければならない課題である。現段階では、インスリン抵抗性があると推測される患者(空腹時血中インスリン高値で、食事療法、運動療法のみで十分な効果が得られない患者)やSU剤で効果不十分な患者に使用するのが妥当だとされている。チアゾリジン系薬剤の直接の標的として脂肪細胞およびその分化過程に対する影響が注目されていた。そうした中、1988年にはチアゾリジン系薬剤を前駆脂肪細胞に加えると脂肪細胞に分化させることができることが初めて見出された。脂肪細胞の分化に重要な転写因子は核内受容体であるPPAR $\gamma$ であることが分かっていたが、1995年にチアゾリジン系薬剤はこのPPAR $\gamma$ に結合し、活性化することが報告された(*J Biol Chem* 270, 12953-12956, 1995)。さらにその後、PPAR $\gamma$ には内因性のリガンドがあるはずだという検討が進み、それが15-deoxy- $\Delta$ 12,14-プロスタグランジン J2 (15d-PGJ2)であることが分かった(*Cell* 83, 803-812 および 813-819, 1995)。これにより、チアゾリジン系薬剤はプロスタグランジン J2 代謝産物と共通の核内受容体情報伝達系を介して、脂肪細胞分化に重要な転写イベントを開始することが判明している。なぜ脂肪細胞を分化させる薬剤が、インスリン抵抗性を改善するのか。これについては、現在明らかではない。脂肪細胞から分泌される TNF $\alpha$  などのサイトカ

インが、筋肉や肝臓にインスリン抵抗性を引き起こし、チアゾリジン系薬剤はこれらの分泌量の変化をもたらすとの仮説が従来からあった。しかし、最近ではチアゾリジン系薬剤が直接筋肉や肝臓に作用してインスリン抵抗性を改善すると考えられるデータも示されている。例えば、脂肪細胞特異的な aP2 プロモーター下でジフテリア毒素 A を発現させ、脂肪細胞を壊死させたトランスジェニックマウス(aP2/DTA transgenic mice)を用いた検討が報告されている。aP2/DTA マウスは成長すると全く脂肪組織がなくなるが、高インスリン血症、高血糖、高中性脂肪血症、脂肪肝などを起こすことが知られている。ところがこのマウスに Troglitazone を投与すると、高血糖、高インスリン血症、高脂血症が劇的に改善される。そのためこの報告では、Troglitazone の効果は、脂肪細胞の存在とは独立に起こると結論している (*J Clin Invest* 100, 2900-2908, 1997)。

最近の報告では、1) チアゾリジン系薬剤は TNF- $\alpha$  によるインスリン抵抗性を改善する。2) チアゾリジン系薬剤は、単球マクロファージの遺伝子発現や炎症性サイトカイン産生を強力に抑制する。3) 高血圧、血中脂質の上昇、血液凝固系の亢進等を是正する作用を介して動脈硬化を改善する。などの報告もなされている。今回このチアゾリジン系薬剤である Troglitazone と Rosiglitazone を用いて、Troglitazone のみで惹起される肝毒性に関して、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことで比較検討した。

解析に至った遺伝子数を経時的に見てみ

ると1時間処理と4時間処理では24時間・72時間処理に比べて1000~2500遺伝子程度の差が見られることがわかる。このことは処理の比較的初期に強い遺伝子抑制が現れてしまい、発現解析に至らない検出限界以下の遺伝子が多いのではないかと考えられる。

発現変動する遺伝子数も経時的に解析したがそれほど大きな変化は見られなかった。また、濃度が異なっても共通変動した遺伝子数を比較してみたが、それほど大きな特徴は見られなかった。今回研究に用いた用量ではこれらの化学物質はそれほど強い細胞毒性を惹起しないために共通変動が見られていないと思われる。凍結型プライマリーヒト肝細胞を用いた細胞毒性試験を37ロット用いて行った結果をまとめた論文があるが (*Chemico-Biolog. Int.* 142, 57-71, 2002)、Rosiglitazoneの方が若干細胞毒性が弱いが大きな違いは認められない。今回用いた濃度は30  $\mu$ Mを用いたが、文献を参照するとTroglitazoneは平均82.8  $\mu$ MがIC<sub>50</sub>値となり今回の用量では毒性が低いことが示唆される。Rosiglitazoneに関しても同様であり、平均122.4  $\mu$ MがIC<sub>50</sub>値であった。この37ロットを用いた本研究においても毒性発現に差が見られるがこの差はロット間つまりは個人差を反映するものであり、この点からも1ロットを用いた遺伝子発現解析では薬剤に応答したレスポンスを一般化できない危険性がある。これは肝毒性発現メカニズムに関しても同様であると考えられる。細胞が何らかの共通方向への変動を起こせば、遺伝子変動は共通してくると考えられるが、今回はそのような変化は見られな

った。また、処理時点間で共通変動する遺伝子数についても調べてみたが、ほとんど共通性は見られなかった。化学物質処理による遺伝子発現の変動は一過性のものであると考えられ、毒性兆候などが現れ、細胞が死ぬ方向へ動き出した時には非常に共通した遺伝子の変化が現れると考えられるが、それ以外のレスポンスをmRNAレベルで捉えるには解析する時点の最適化あるいは多数の時点の解析を行い出来るだけ特徴的な遺伝子発現変化を見逃さないようにする必要があると考えられる。また、同じメカニズムで毒性発現の起こす化学物質だとしても、薬剤がそのような変化を細胞に起こさせるために必要な時間は異なり、そのレスポンスには時間差があると考えられる。今後この問題を如何に克服するかが重要な問題となるが、より多くの薬剤で多くのデータを蓄積し解析する必要があると考えられる。

今回新規合成されたYH-1およびYH-16はチアゾジン骨格を持たない薬剤であるが網羅的遺伝子発現解析を行うことで、PPAR $\gamma$ アゴニスト活性を有するかどうかと、さらにはTroglitazoneあるいはRosiglitazoneのどちらの薬剤に似た遺伝子発現変化を起こすかが興味をもたれるところであった。そこでYH-1およびYH-16で誘導される遺伝子発現変動がTroglitazoneあるいはRosiglitazoneで誘導される遺伝子発現変動のどちらと共通しているかを解析した。その結果は表13に示したが共通する遺伝子の総数ではYH-1、YH-16ともにTroglitazoneの遺伝子発現変動に近いことがわかる。ただしそれほど大きな違いは観察されておらず、今後の更な

る解析が必要と考えられる。

#### ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に関する考察

高等生物の核 DNA は 4 種類のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) からなる 8 量体構造の周囲を約 2 回弱巻き付きながら数珠上につながったヌクレオソームと呼ばれる構造体として存在する。これはさらに高次構造を作り高度な制御を受ける。こうした DNA と蛋白質の複合体は一般にクロマチン構造と呼ばれ、遺伝情報の正しい発現に寄与していると考えられる。ヒストンのアセチル化は、リン酸化とともに最も古くから知られたヒストンの翻訳後修飾であり、そのレベルはアセチルトランスフェラーゼ (HAT) とデアセチラーゼ (HDAC) のバランスによって決まっている。近年、その実体について研究が進み、HAT は転写促進因子に導かれて DNA に近づき、近隣のヒストンをアセチル化することによって遺伝子発現を誘導する一方、HDAC は転写抑制因子によって脱アセチル化することにより遺伝子発現のスイッチを OFF にすることがわかってきた。また、この HDAC が急性骨髄球性白血病などの癌に転写抑制などを引き起こし、癌の進展に深くかかわっていることがわかってきた。そこでこの HDAC を分子標的とした薬剤開発が進められており、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACI) は新規抗がん剤として注目されている。そのコンセプトは癌細胞での遺伝子の異常発現 (特に転写因子に関わるキメラ蛋白の異常発現) の結果引き起こされた、転写の異常抑制状態に HDAC が深く関与しており、その酵素活性を阻害すること

で腫瘍細胞内に正常の転写状態を取り戻そうというものである。その作用の結果として細胞の分化誘導、アポトーシス誘導、細胞周期停止、血管新生抑制、免疫修飾作用等が報告されている。

本研究に用いたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は Trichostatin A (TSA)(0.01  $\mu$  M, 0.1  $\mu$  M)、

*N*-Hydroxy-*N*-phenyloctanediamide (SAHA) (1  $\mu$  M, 10  $\mu$  M)および本研究班の宮田直樹教授の下で新規に合成された Methyl 6-anilino-6-oxohexylcarbamate (P-Me) (10  $\mu$  M, 100  $\mu$  M)と

6-[(aminocarbonyl)amino]-*N*-phenylhexanamide (P-Urea) (10  $\mu$  M, 100  $\mu$  M)であった。1 時間処理ではそれほど多くの発現変動は見受けられなかったが、4 時間処理では TSA、SAHA および P-Me において非常に多くの遺伝子の発現変動が観察された。このことは本薬剤の特徴的な遺伝子発現変化を解析するには 1 時間の処理では短すぎたということを表している。また、発現変動した遺伝子の中には、発現抑制される遺伝子が多かった。この事実は HDAC 阻害剤が遺伝子発現の抑制を OFF にする事実とは一見逆のように思える変動であったがその詳細を明らかにするには更なる解析が必要であると考えられる。ヒストン脱アセチル化酵素に対する TSA の阻害効果は IC<sub>50</sub> 値=6~38 nM であるという報告 (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 87-92 2001) があり、本研究に用いた用量では十分な効果が現れていると考えられる。しかし細胞の毒性は非常に弱いものであり、解析に十分な量の RNA が抽出できた。TSA 処理と SAHA 処理で共通した遺伝子が発現しているという



事実はこれらの薬剤がヒストン脱アセチル化酵素を阻害するメカニズムは化学構造に基づいて異なるが、阻害効果によって起こる遺伝子発現変化が似ていることを示すものである。また、P-Me が TSA および SAHA 処理で発現変動する遺伝子とよく共通していた事実から考えるとこの化合物が新たなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤となる可能性を示唆しており、今後の抗がん活性評価に興味を持たれる。

また、これまでにこのように顕著に遺伝子発現を変化させた薬剤はなく大変興味を持たれた。今後の更なる解析によって遺伝子発現制御に関わる遺伝子の同定ならびに抗がん活性に関わる遺伝子が同定がなされることを期待している。

## 結論

プライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現解析系の構築およびハイスループット試験系の開発を目的として研究を行った。

細胞の種類は、非凍結型プライマリーヒト肝細胞 2 種、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞 2 種、ヒト株化細胞（肝がん由来）2 種の合計 6 種を用いた。薬剤は、肝毒性を有するアセトアミノフェン、カルバマゼピン、イソニアジド、四塩化炭素および研究班の宮田直樹教授の下で新規合成された一連の構造類似化合物を用いて薬剤暴露時の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、それぞれの薬剤による遺伝子発現変化を比較する際には、定常状態で発現している遺伝子が大きく違うことや薬剤処理に対する遺伝子発現変化がプライマリーヒト肝細胞と大きく異なることから株化細胞では評価が困難であることがわかった。また、

プライマリーヒト肝細胞を用いた場合でも、薬剤処理に用いるプライマリーヒト肝細胞に由来するロット間差（個人差が）が非常に大きく、薬剤による遺伝子発現変化を見落とす可能性がある。このロット間差を含まないように同一ロットで実験が行える接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を使用する実験系の有用性が示された。また、薬物処理の条件や RNA 抽出のことを考慮すると接着型の細胞の利用が有用であると考えられた。接着型凍結プライマリーヒト肝細胞の培養は非常に困難とされてきたが、今回の検討から容易に培養できる方法を獲得した。また、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞から GeneChip による解析に十分な量の RNA を確保するための培養条件も本研究において確立できた。

薬剤の処理時間に関しては、その毒性発現メカニズムと密接に関わっており、今回の結果からは比較的初期の処理で化学物質固有の遺伝子発現変動が観察され 48 時間程度の処理によって、細胞毒性に基づく毒性物質に比較的共通した遺伝子発現変動が捉えられることがわかった。今後は薬剤固有の遺伝子発現変化と細胞毒性に基づく遺伝子発現変化をともに捉え薬剤が細胞に及ぼす毒性を予測するシステムを構築するため、比較的処理の初期の遺伝子発現変化と 48 時間程度以上の処理を行った時の遺伝子発現変化を捉えるようにした実験系で研究を行うことに決定した。本実験系によって様々な薬剤を用いた場合に薬剤固有ならびに毒性発現メカニズム固有に特徴ある遺伝子発現変化を捉えることが出来るようになり有用な遺伝子発現変化パターンの蓄積構築が出来るものと考えられる。

今回研究に使用した細胞は、コーカシアン由来のものが多く、遺伝子発現解析において人種差による評価が異なることが予測される。現在、日本人にも遺伝的に近いと考えられるモンゴリアン由来のプライマリーヒト肝細胞を用いた実験系の構築を行っており、人種差についての遺伝子発現解析情報を蓄積し、薬剤の毒性発現予測における人種差を明らかにしていきたいと考えている。

本研究に新規合成された一連の構造類似化合物を用いて構造活性相関の概念を導入したが、薬剤の開発において実験動物を用いた研究では予測できないヒトでの毒性予測試験系さらには活性評価にも、今後はプライマリーヒト細胞を用いた実験系の構築が有用であることが示唆された。現在、本実験系にロボットを導入したハイスループット試験系の確立を行っており、本研究成果がヒトでの毒性を予測できるハイスループット試験系として確立できることが期待される。

学会発表

プライマリーヒト肝細胞の GeneChip による遺伝子発現解析 (Toxicogenomics への応用を目指して) ○小原有弘<sup>1</sup>, 鈴木孝昌<sup>2</sup>, 林 真<sup>2</sup>, 菅野 純<sup>2</sup>, 二宮真一<sup>1</sup>, 須藤哲司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>第一化学薬品, <sup>2</sup>国立衛研)  
日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)

新規 Histone deacetylase inhibitor の創製 ○長野友紀<sup>1</sup>, 小原有弘<sup>2</sup>, 須藤哲司<sup>2</sup>, 幸田光復<sup>1</sup>, 宮田直樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名市大薬, <sup>2</sup>第一化学薬品)  
日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)

チアゾリジン骨格を持たない新規 PPAR $\gamma$  リガンドの創製 ○服部義史<sup>1</sup>, 小原有弘<sup>1,2</sup>, 須藤哲司<sup>2</sup>, 幸田光復<sup>1</sup>, 宮田直樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名市大薬, <sup>2</sup>第一化学薬品)  
日本薬学会第 123 年会 (2003 年 3 月長崎)

アクリジンマスタード ICR-170、ICR-191 のトランスジェニックマウスにおける変異原性 ○小原有弘<sup>1</sup>, 鈴木孝昌<sup>2</sup>, 小泉朋子<sup>2</sup>, 本間正充<sup>2</sup>, 林 真<sup>2</sup> (<sup>1</sup>第一化学薬品<sup>2</sup> 国立衛生研究所)  
日本環境変異原学会第 31 回大会 (2002 年 11 月東京)

表1 研究に用いた細胞のドナー情報

	Lot41	Lot42	Lot100	LotNOG	LI90	HepG2
性別	女性	女性	女性	男性	女性	男性
年齢	59歳	30歳	74歳	46歳	55歳	15歳
人種	コーカシアン	インディアン (アジア人)	コーカシアン	コーカシアン	日本人(アジア人)	コーカシアン
喫煙	なし	なし	あり	なし	-	-
飲酒	なし	若干	なし	あり	-	-
薬物使用	なし	プレドニゾン	なし	なし	-	-
死因	脳血管障害	肺繊維症	脳血管障害	脳障害	(肝がん)	(肝がん)

表2 研究に用いた細胞の薬物代謝酵素活性 (pmol/(min x 106 cells))

Enzyme	Substrate	Lot41	Lot42	Lot100	LotNOG
P450	7-methoxy-4-trifluoromethyl coumarin	32	81	-	-
UGTs and STs	7-hydroxycoumarin glucuronide, 7-	7.7	27	14	229
CYP3A4	Teststerone	260	80	86	127
CYP1A2	Phenacetin	1	N.M.	3	14
CYP3A4/5	Midazolam	21	N.M.	N.M.	N.M.
CYP2A6	Coumarin	N.M.	N.M.	20	68
CYP2D6	Dextromethorphan	N.M.	N.M.	28	15
CYP2B6	7-Ethoxycoumarin	N.M.	N.M.	19	41
CYP2C9/19	Mephenytoin	N.M.	N.M.	1	74
CYP2C8	Tolbutamide	N.M.	N.M.	38	46

表3 研究に用いた細胞の無処理時における解析遺伝子数と発現している薬物代謝酵素関連の遺伝子数

	非凍結型		接着型凍結		株化		
	lot41	lot42	lot100	lotNOG	LI90	HepG2	
解析した遺伝子数	8731	9872	9326	8626	8758	8222	
Phase I							
P450	76	31	34	37	31	17	19
ALDH	28	19	17	18	15	6	15
MAO	4	4	4	4	4	0	0
Epoxide Hydrolase	2	1	1	1	1	1	1
Esterase	6	4	4	4	4	2	4
FMO	7	4	4	4	3	1	3
Glucuronidase	1	1	1	1	1	1	1
NAD(P)H-dehydrogenase	40	38	38	38	37	36	36
Phase II							
GST	18	14	13	14	13	9	11
UDP-GT	3	1	2	2	0	0	1
NAT	2	2	2	2	1	1	1
N-acyltransferase	2	1	1	1	1	0	0
Methyltransferase	5	3	4	4	4	3	3
Sulfotransferase	15	13	12	13	7	4	10
Total	209	136	137	143	122	81	105

表4 研究に用いた6種の細胞の平均遺伝子発現量からそれぞれの細胞で発現変動した遺伝子数

	非凍結型		接着型凍結		株化	
	lot41	lot42	lot100	lotNOG	LI90	HepG2
Down-Regulate	186	79	75	142	490	675
Up-Regulate	748	499	75	274	1084	689

表5 非凍結型プライマリーヒト肝細胞 Lot42 において 2 mM アセトアミノフェン処理時に発現変動した遺伝子数の経時変化

	4 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Down-Regulate	72	155	304	208
Up-Regulate	59	67	342	119

表6 6種の細胞においてアセトアミノフェン4時間処理で発現変動した遺伝子数

	非凍結型		接着型凍結			株化			
	Lot41	Lot42 共通	Lot100	LotNOG 共通	LI90	HepG2 共通			
Down-Regulate	253	<u>3</u>	86	101	<u>4</u>	126	46	<u>0</u>	43
Up-Regulate	63	<u>12</u>	49	39	<u>18</u>	51	34	<u>1</u>	38

表7 非凍結型プライマリーヒト肝細胞 Lot42 においてカルバマゼピン(1 mM)、イソニアジド(1 mM)、四塩化炭素(0.5 mM)処理時に発現変動した遺伝子数の経時変化

		4 hr		24 hr		48 hr		72 hr
			共通		共通		共通	
カルバマゼピン	Down-Regulate	232	<u>19</u>	264	<u>164</u>	1033	<u>546</u>	883
	Up-Regulate	481	<u>67</u>	384	<u>192</u>	820	<u>356</u>	715
イソニアジド	Down-Regulate	255	<u>6</u>	79	<u>2</u>	1033	<u>10</u>	111
	Up-Regulate	334	<u>12</u>	124	<u>5</u>	820	<u>10</u>	79
四塩化炭素	Down-Regulate	231	<u>13</u>	69	<u>10</u>	197	<u>36</u>	310
	Up-Regulate	336	<u>1</u>	137	<u>2</u>	345	<u>47</u>	150

表8 カルバマゼピン(1 mM) 4, 24, 48, 72時間処理において共通した発現変動を示す遺伝子

Common Name	GeneBank ID	Description
<b>Down-Regulate Gene (9 genes)</b>		
PAPSS2	AW299958	xs44g05.x1 NCI_CGAP_Kid11
PLG	M74220	Plasminogen
COL4A1	NM_001845	Collagen, type IV, alpha 1
CPU, PCPB, TAFI	NM_016413	Carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)
TDO, TPH2, TRPO	NM_005651	Tryptophan 2,3-dioxygenase
FLJ22259	AK025912	Collagen, type IV, alpha 2
FLJ25113, B-ALPHA-1	AF141347	Tubulin, alpha 3
ILTMP, IL-TMP	BC001386	Transmembrane 4 superfamily member 4
NDRG3	BE300252	600944004T1 NIH_MGC_17
<b>Up-Regulate Gene (31 genes)</b>		
IL15	NM_000585	Interleukin 15
HMG2	BC000903	High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 2
MGC5306	BC001972	Hypothetical protein MGC5306
NRBF-2	AA883074	am18h01.s1 Soares_NFL_T_GBC_S1
FLJ11193	AJ421192	t24e12.x1 NCI_CGAP_Brn23
IFRD1	AA747426	nx88e08.s1 NCI_CGAP_GCB1 similar to TR:P70228 P70228 INTERFERON-BETA; 12S FRACTIO
OIP2	AL050353	Opa-interacting protein 2
KIAA0244	NM_015153	KIAA0244 protein
FLJ20152	NM_019000	Hypothetical protein
GEM	NM_005261	GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle
	AL021977	
RSS, IRBP, KIAA0207	U66065	Growth factor receptor-bound protein 10
GADD34	U83981	growth arrest and DNA damage-inducible gene 34; Gadd34;
DDIT1, GADD45	NM_001924	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
ARG2	U75667	Arginase, type II
KLF4	BF514079	U1-H-BW1-amw-b-08-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub7
CTH	NM_001902	Cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
FLJ11149	NM_018339	Hypothetical protein FLJ11149
USP21	NM_013396	Ubiquitin specific protease 25
	AL354872	
RSP5, KIAA0439	AB007899	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
HRH-J8	NM_004398	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 10 (RNA helicase)
DAF	BC001288	Decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)
4F2, CD98, MDU1, 4F2HC, NACAE	NM_002394	Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2
SLC20A1	NM_005415	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1
H10, H1FV	BC000145	H1 histone family, member 0
RTP801	NM_019058	Hypothetical protein
B4-2	AF279899	Proline-rich protein with nuclear targeting signal
HVH3	U16996	Dual specificity phosphatase 5
dJ1103G7.3	NM_021158	Protein kinase domains containing protein similar to phosphoprotein C8FW
ATF4	NM_001675	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)

表9 アセトアミノフェン処理と他の肝毒性物質処理において変動する遺伝子数の比較

		4 hr	24 hr	48 hr	72 hr
アセトアミノフェンで変化	Down-Regulate	72	155	304	208
	Up-Regulate	59	67	342	119
アセトアミノフェンのみで変化	Down-Regulate	45(63%)	75(48%)	113(37%)	89(43%)
	Up-Regulate	38(64%)	21(31%)	101(30%)	61(51%)
すべての処理で共通変化	Down-Regulate	0	6(3.9%)	9(3.0%)	2(1.0%)
	Up-Regulate	0	3(4.5%)	54(15.8%)	7(5.9%)

表 10 各処理時点ですべての処理に対して共通して変動した遺伝子のリスト

	Common Name	GeneBank ID	Description
<b>4 hr -</b>			
24 hr	<b>Down-Regulate Gene (6 genes)</b>		
	BT2, TFIH, BT2P44, T-BTF2P44	AF079847	General transcription factor IIIH, polypeptide 2 (44kD subunit)
	MRCKB, KIAA1124	NM_006035	CDC42-binding protein kinase beta (DMPK-like)
	KYNU	D55639	Kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
	BTNSA3	NM_006984	Butyrophilin, subfamily 3, member A3
	S100P	NM_005960	S100 calcium-binding protein P
	KJAA0878	N21138	yx52H03.st Soares melanocyte 2NblHM
	<b>Up-Regulate Gene (3 genes)</b>		
	NRP	BC002387	Nucleosome assembly protein 1-like 1
	C1, C-1, PFD4	NM_002623	Prefoldin 4
ACADSB	NM_001609	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	
48 hr	<b>Down-Regulate Gene (9 genes)</b>		
	HLA-F	BE138825	xw96a07.x1 NCI_CGAP_Pan1
	ANGPTL4	NM_016109	Angiopoietin-like 4
	FLJ20674	NM_019066	Hypothetical protein FLJ20674
	IGFALS	AW338791	ha66a11.x1 NCI_CGAP_Pan1 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN
	HOMG2, ATP1G1	NM_021603	PXYD domain-containing ion transport regulator 2
	CDH1, NCAD	M34064	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
	HRY	BE973687	601680688F1 NIH_MGC_83
	TRAMP	BC000687	Translocating chain-associating membrane protein
	PTPRF	AJ762627	w56g01.x1 NCI_CGAP_Col6
	<b>Up-Regulate Gene (54 genes)</b>		
	DKFZP566E104	AL110238	DKFZP566E104 protein
	MAN1A1	BC287153	602381898F1 NIH_MGC_93
	DONSON	AF232674	Downstream neighbor of SQN
	MGC1223	NM_030969	Hypothetical protein MGC1223
	DC37, RFXS15, MPR-S15, FLJ11564	NM_031280	Mitochondrial ribosomal protein S15
	MGC4276	NM_030940	Hypothetical protein MGC4276 similar to CG8198
	FLJ11068	NM_018814	Hypothetical protein FLJ11068
	FLJ11269	NM_018372	Hypothetical protein FLJ11269
	FLJ10896	NM_019044	Hypothetical protein
HSPC125	NM_014165	HSPC125 protein	
133K02	NM_018661	Chromosome 5 open reading frame 3	
HPT, MRS2	NM_020662	MRS2 (S. cerevisiae)-like, magnesium homeostasis factor	
PELI1	NM_020651	Pellino (Drosophila) homolog 1	
TMPT27	NM_018475	TPA regulated locus	
BM-002	NM_018617	Hypothetical protein	
API P, AF-1 P, MLLT5	NM_001981	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15	
ALEX3	NM_016607	ALEX3 protein	
EERI1A1	AL035687	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	
TXN delta 3	AF055241	SEE ALSO	
ATP2B1	L14561	PMCA1; alternatively spliced; plasma membrane calcium ATPase isoform 1 (ATP2B1) gene	
TNRG9	U80736	Trinucleotide repeat containing 9	
PAC 106H8	AL035295	SEE ALSO	
TPT1	A1888178	wm40b09.x1 NCI_CGAP_Lit4 TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (HUMAN)	
DKFZP586O1620	AA524525	ng4H03.st NCI_CGAP_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE937685 3'; mRNA sequence.	
RIKEN cDNA 1700029F09 gene	BE748563	601571521T1 NIH_MGC_55 Homo sapiens cDNA clone IMAGE3838541 3'; mRNA sequence.	
DKFZP564F1123	A1346504	q651 bl 2.x1 NCI_CGAP_Co8 Homo sapiens cDNA clone IMAGE1926527 3'; mRNA sequence.	
PRC2751	BF791738	602251923F1 NIH_MGC_84 Homo sapiens cDNA clone IMAGE4344389 3'; mRNA sequence.	
FLJ1827 fis, HEP04178	AK025580	SEE ALSO	
HHO, BCFM, PMR1, ATP2C1A, KIAA1347	AB097768	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, type 2C, member 1	
XPO7	A184005	w52c06.x1 NCI_CGAP_Pan1	
GNAI1	AL049933	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	
RABGGTB	U49245	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	
CD164	AF239343	CD164 antigen, sialomucin	
CLGN	NM_004362	Calinegin	
MAFG	NM_002359	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene family, protein G	
EEA3	AA812215	o24g01.st NCI_CGAP_GCB1	
NUCB2	NM_005013	Nucleobindin 2	
KJAA0305	NM_014733	Endosome-associated FYVE-domain protein	
GOLTC1	AU152134	AU152134 NT2RP3	
CIS2, SSI2, SSI-2, SOCS-2	NM_003877	STAT induced STAT inhibitor-2	
ATV, NES, AT-V1, AT-V2	NM_002485	Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)	
DOHT, SPAK	NM_013233	Ste-20 related kinase	
KJAA0259	NM_007027	Topoisomerase (DNA) II binding protein	
CNCT8	NM_004779	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	
HUMAUAANTIG	NM_013285	Nuclear GTPase	
NPSNAP2	NM_001483	Glioblastoma amplified sequence	
NJ, HC2, PROS30	NM_002786	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1	
D_9711f1.8.2	AL544094	AL544094 LT1_NFL006_P12	
RCN2	NM_002902	Reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	
E1F4	NM_001968	Eukaryotic translation initiation factor 4E	
NDUFA5	NM_005000	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5 (13kD, B13)	
RAMP4	AL136807	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1; ribosome associated membrane protein 4	
H172, PRL1, PRL-1, PTP4A2, PTPCAAX1, PTPCAAX1(x1)	U48296	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	
KJAA0244	NM_015153	KJAA0244 protein	
72 hr	<b>Down-Regulate Gene (2 genes)</b>		
	APOC3	NM_000040	Apolipoprotein C-III
	CYB5-M	NM_030579	Cytochrome b5 outer mitochondrial membrane precursor
	<b>Up-Regulate Gene (7 genes)</b>		
	MEKK2	AF239798	
	R32184_3	A1805266	te32c02.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1
	SOV7L	AJ006866	Nucleotide-sugar transporter similar to C. elegans scv-7
	TIP120A	AB020636	TBP-interacting protein
	CP34, NF-25, P450C3, P450PCNT	AF182273	Cytochrome P450, subfamily IIIA (nifedipine oxidase), polypeptide 4
	Rabl1-FIP2	BG248608	602319671F1 NIH_MGC_89
	DKFZP564A122	NM_015826	DKFZP564A122 protein

表 1 1 Troglitazone (30  $\mu$  M, 3  $\mu$  M), Rosiglitazone (30  $\mu$  M, 3  $\mu$  M), YH-1 (10  $\mu$  M, 1  $\mu$  M), YH-16 (10  $\mu$  M, 1  $\mu$  M) 処理によって発現変動した遺伝子数の経時変化

	Troglitazone 30 $\mu$ M		Troglitazone 3 $\mu$ M		Rosiglitazone 30 $\mu$ M		Rosiglitazone 3 $\mu$ M		YH-1 10 $\mu$ M		YH-1 1 $\mu$ M		YH-16 10 $\mu$ M		YH-16 1 $\mu$ M		
		共通		共通		共通		共通		共通		共通		共通		共通	
1 hr	解析遺伝子数	6628	8004	7473	8003	7205	7228	8168	8204								
	Down-Regulate	570	18	75	140	9	50	157	20	80	101	10	61				
	Up-Regulate	98	14	32	64	9	33	41	11	63	34	11	42				
4 hr	解析遺伝子数	7060	6638	6736	7318	7435	7586	7510	7690								
	Down-Regulate	52	5	38	62	4	30	37	7	62	62	0	69				
	Up-Regulate	106	17	61	70	18	77	97	23	84	104	33	134				
24 hr	解析遺伝子数	9305	8533	8801	8411	9961	8359	10025	9292								
	Down-Regulate	103	14	132	87	23	134	58	4	208	89	10	49				
	Up-Regulate	87	20	69	84	18	96	34	12	82	67	17	59				
72 hr	解析遺伝子数	7376	8731	8403	8555	8561	9020	9245	9221								
	Down-Regulate	519	8	52	139	11	83	67	6	79	115	23	102				
	Up-Regulate	105	12	46	65	11	51	56	15	86	141	51	114				



表 1 2 YH-1 と YH-16 の両濃度で共通に変動する遺伝子数と Troglitazone と Rosiglitazone の両濃度で共通に変動する遺伝子数

		Troglitazone	Rosiglitazone		YH-1	YH-16	
			共通			共通	
1 hr	Down-Regulate	18	<u>3</u>	9	20	<u>4</u>	10
	Up-Regulate	14	<u>3</u>	9	11	<u>3</u>	11
4 hr	Down-Regulate	5	<u>0</u>	4	7	<u>0</u>	0
	Up-Regulate	17	<u>7</u>	18	23	<u>7</u>	33
24 hr	Down-Regulate	14	<u>5</u>	23	4	<u>0</u>	10
	Up-Regulate	20	<u>6</u>	18	12	<u>1</u>	17
72 hr	Down-Regulate	8	<u>3</u>	11	6	<u>3</u>	23
	Up-Regulate	12	<u>2</u>	11	15	<u>5</u>	51

表 1 3 YH-1およびYH-16によって発現変動する遺伝子の Troglitazone と Rosiglitazone 処理時に変動する遺伝子との共通性

		YH-1			YH-16		
		Troglitazone	Rosiglitazone		Troglitazone	Rosiglitazone	
			共通			共通	
1 hr	Down-Regulate	4	<u>2</u>	2	4	<u>2</u>	2
	Up-Regulate	5	<u>1</u>	1	3	<u>1</u>	2
4 hr	Down-Regulate	1	<u>0</u>	0	0	<u>0</u>	0
	Up-Regulate	5	<u>3</u>	6	2	<u>2</u>	2
24 hr	Down-Regulate	0	<u>0</u>	0	3	<u>2</u>	3
	Up-Regulate	3	<u>0</u>	0	4	<u>2</u>	4
72 hr	Down-Regulate	1	<u>0</u>	0	1	<u>0</u>	1
	Up-Regulate	1	<u>1</u>	1	1	<u>1</u>	1
Total		20	<u>7</u>	10	18	<u>10</u>	15

表 1 4 TSA (0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M), SAHA (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), P-Me (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M), P-Urea (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) 処理によって発現変動した遺伝子数の経時変化

	TSA 0.01 $\mu$ M		TSA 0.1 $\mu$ M		SAHA 1 $\mu$ M		SAHA 10 $\mu$ M		P-Me 10 $\mu$ M		P-Me 100 $\mu$ M		P-Urea 10 $\mu$ M		P-Urea 100 $\mu$ M		
		共通		共通		共通		共通		共通		共通		共通		共通	
1 hr	解析遺伝子数	8585	8003	8994	7911	8407	8439	9184	8379								
	Down-Regulate	39	2	52	29	2	54	68	5	33	29	2	55				
	Up-Regulate	61	20	92	69	9	55	53	16	61	67	14	43				
4 hr	解析遺伝子数	6324	4361	6342	2776	5606	6498	7449	7843								
	Down-Regulate	631	277	898	1209	327	1849	537	298	60	254						
	Up-Regulate	128	51	335	150	79	185	144	103	16	64						

表 1 5 TSA と SAHA の両濃度で共通に変動する遺伝子数と P-Me と P-Urea の両濃度で共通に変動する遺伝子数

		TSA	共通	SAHA	P-Me	共通	P-Urea
1 hr	Down-Regulate	2	<u>0</u>	2	5	<u>0</u>	2
	Up-Regulate	20	<u>3</u>	9	16	<u>6</u>	14
4 hr	Down-Regulate	277	<u>100</u>	327	537	<u>26</u>	60
	Up-Regulate	51	<u>22</u>	79	46	<u>5</u>	16

表 1 6 P-Me および P-Urea によって発現変動する遺伝子の TSA と SAHA 処理時に変動する遺伝子との共通性

		P-Me			P-Urea		
		TSA	共通	SAHA	TSA	共通	SAHA
1 hr	Down-Regulate	0	<u>0</u>	0	0	<u>0</u>	0
	Up-Regulate	4	<u>2</u>	2	7	<u>3</u>	3
4 hr	Down-Regulate	95	<u>34</u>	81	8	<u>1</u>	3
	Up-Regulate	15	<u>9</u>	18	6	<u>3</u>	4
Total		114	<u>45</u>	101	21	<u>7</u>	10

### Lot41Control vs Lot42Control

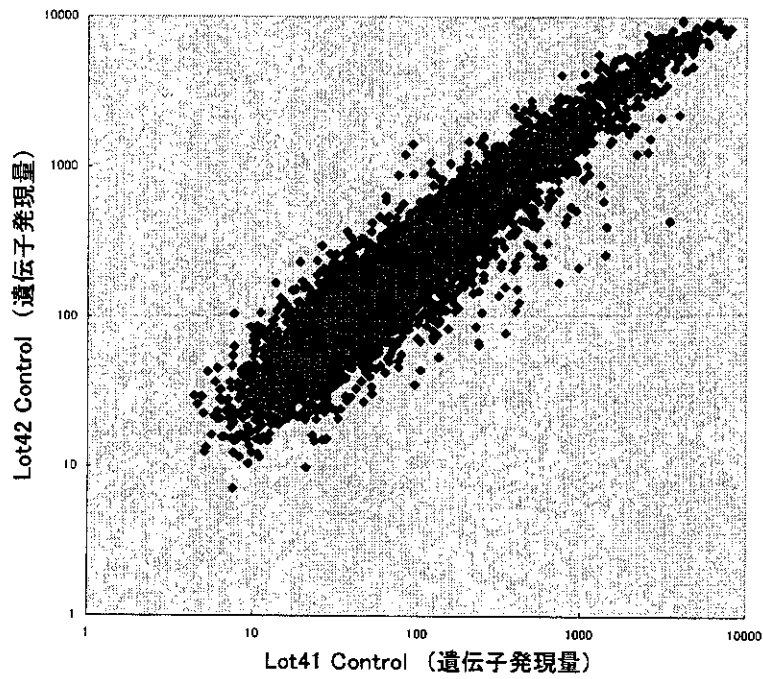


図1 非凍結型 Lot41 と非凍結型 Lot42 の無処理時における遺伝子発現強度の比較

### Lot41Control vs Lot100Control

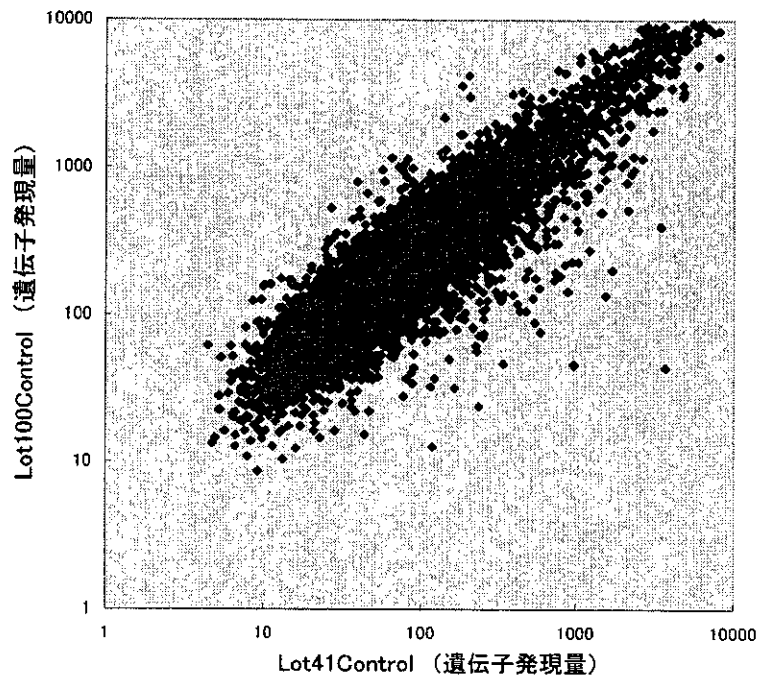


図2 非凍結型 Lot41 と接着型凍結 Lot100 の無処理時における遺伝子発現強度の比較