

表 1. 有意となったプローブ数

	up	down	total
0hr	17	4	21
3hr	73	1	74
6hr	73	4	77
24hr	122	3	125
48hr	22	4	26

直後から 48 時間後のいずれかにおいて有意となったプローブの総数は 177

表 2. 有意な変化のあったプローブ (減少、直後)

Probe Name	Fold Change	Description
X91234_at	8.813145467	R.norvegicus mRNA for 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2.
AF003835_at	6.482652041	IPP isomerase; localized in peroxisomes; Rattus norvegicus isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase mRNA, complete cds.
rc_AA866299_g_at	5.353938487	UI-R-A0-ac-f-12-0-UI.s3 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-ac-f-12-0-UI 3', mRNA sequence.
J03863_at	5.06615485	Rat serine dehydratase (SDH2) mRNA, complete cds.
rc_AA892522_at	5.05107131	EST196325 Normalized rat kidney, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RKIAS45 3' end, mRNA sequence.
M33329_f_at	4.70579786	hydroxysteroid sulfotransferase a (STa); Rat hydroxysteroid sulfotransferase a (STa) mRNA, complete cds.
rc_AI176456_at	4.536086939	EST220041 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVBR96 3' end, mRNA sequence.
J05181_at	4.246902063	gamma-glutamylcysteine synthetase; Rat gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA, complete cds.

表 3. 有意な変化のあったプローブ (減少、3 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
M11794cds#2 _f_at	134.9339904	metallothionein 2; metallothionein 1; Rat metallothionein-2 and metallothionein-1 genes, complete cds.
D11445exon# 1-4_s_at	6.210810009	Rattus norvegicus gene for gro, complete cds.
M29249cds_at	5.055035921	Rat 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene, partial cds.
D37920_at	4.794929842	Rat mRNA for squalene epoxidase, complete cds.
D86745cds_s_ at	4.572940926	Rat DNA for small heterodimer partner homologue, exon 1.
rc_AA859980_ at	4.511804357	UI-R-E0-ca-h-07-0-UI.s1 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-ca-h-07-0-UI 3' similar to gb M35797 MUSTCP1X Mouse t-complex protein (Tcp-1x) mRNA, 3' end, mRNA sequence.
X55286_g_at	4.503728437	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH); R.norvegicus mRNA for HMG-CoA reductase.
AF003835_at	4.377567955	IPP isomerase; localized in peroxisomes; Rattus norvegicus isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase mRNA, complete cds.
rc_H33426_g_ at	4.332270932	EST109414 Rat PC-12 cells, NGF-treated (9 days) Rattus sp. cDNA clone RPNAR42 3' end similar to M.musculus hypothetical protein (PIR:S12207), mRNA sequence.

表 4. 有意な変化のあったプローブ (減少、6 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
rc_AA946108_at	16.34292	EST201607 Normalized rat lung, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLUBB32 3' end, mRNA sequence.
M12672_at	13.71191	Guanine nucleotide-binding protein alpha subunit; Rat guanine nucleotide-binding protein G-i, alpha subunit mRNA, complete cds.
L28135_at	7.093204	putative; Rattus norvegicus glucose transporter type 2 gene, 3'end.
L32132_at	6.723433	Rat lipopolysaccharide binding protein mRNA, complete cds.
rc_AA893338_at	6.368506	EST197141 Normalized rat kidney, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RKIBF24 3' end, mRNA sequence.
M13100cds#2_s_a t	6.215382	ORFa'; putative; ORFa; putative; ORFb; putative; ORFc; putative; ORFd1; putative; ORFd2; putative; Rat long interspersed repetitive DNA sequence LINE3 (L1Rn).
rc_AI011998_at	5.628796	EST206449 Normalized rat placenta, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RPLAR43 3' end, mRNA sequence.
rc_AI638960_at	5.604595	rx00909s Rat mixed-tissue library Rattus norvegicus cDNA clone rx00909 3', mRNA sequence.
X65083cds_at	5.27687	R.norvegicus mRNA for cytosolic epoxide hydrolase.
rc_AA891220_at	4.940445	EST195023 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEAQ68 3' end, mRNA sequence.
D13907_g_at	4.920271	Rat mRNA for mitochondrial processing protease P52, partial sequence.
AF003835_at	4.883768	IPP isomerase; localized in peroxisomes; Rattus norvegicus isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase mRNA, complete cds.
rc_AA874926_at	4.514424	UI-R-E0-ck-h-06-0-UI.s1 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-ck-h-06-0-UI 3' similar to gi 2887277 emb Z98750 HS454G6 Human DNA sequence from PAC 454G6 on chromosome 1q24. Contains trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein, TIGR , myocilin, ESTs and STS, mRNA sequence.
U20796_at	4.512159	Rattus norvegicus nuclear receptor Rev-ErbA-beta mRNA, partial cds.
M58040_at	4.510391	Rat transferrin receptor mRNA, 3' end.
rc_AA799812_g_at	4.436416	EST189309 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEAF64 3' end, mRNA sequence.
X67859_at	4.338556	R.norvegicus mRNA for autoantigen.
X91234_at	4.080328	R.norvegicus mRNA for 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

表 5. 有意な変化のあったプローブ (減少、24 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
X91234_at	7.570961	R.norvegicus mRNA for 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2.
U20796_at	7.539212	Rattus norvegicus nuclear receptor Rev-ErbA-beta mRNA, partial cds.
rc_AA893870_g_at	6.268969	EST197673 Normalized rat placenta, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RPLAM86 3' end, mRNA sequence.
L32132_at	6.163417	Rat lipopolysaccharide binding protein mRNA, complete cds.
D11445exon#1-4_s_at	6.009331	Rattus norvegicus gene for gro, complete cds.
D37920_at	4.389386	Rat mRNA for squalene epoxidase, complete cds.
L07736_at	4.329642	Rat carnitine palmitoyltransferase I mRNA, complete cds.

表 6. 有意な変化のあったプローブ (減少、48 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
AB016532_at	5.80815	Rattus norvegicus mRNA for rPER2, complete cds.
X65083cds_at	5.01713	R.norvegicus mRNA for cytosolic epoxide hydrolase.
Y14933mRNA_s_a t	4.99479	R.norvegicus mRNA for hepatocyte nuclear factor 6 beta.
rc_AA800272_at	4.512522	EST189769 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEAN26 3' end, mRNA sequence.

表 7. 有意な変化のあったプローブ (増加、直後)

Probe Name	Fold Change	Description
rc_AI179150_s_at	75270.27	EST222834 Normalized rat spleen, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RSPCC55 3' end, mRNA sequence.
rc_AA866237_s_at	34.93122	UI-R-A0-bg-f-12-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bg-f-12-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
D10261_g_at	25.46433	Rattus norvegicus mRNA for 59-kDa bone sialic acid-containing protein, complete cds.
M20131cds_s_at	18.72246	cytochrome P450IIE1; Rat cytochrome P450IIE1 gene, complete cds.
M58634_at	14.94043	Rat IGF binding protein-1 (rIGFBP-1) mRNA, complete cds.
M96548_at	8.534863	renal transcription factor; Rat zinc finger protein (kid-1) mRNA, complete cds.
D00753_at	7.565812	Rat mRNA for contrapsin-like protease inhibitor related protein (CPI-26).
S76779_s_at	6.748534	apolipoprotein E, ApoE; This sequence comes from Fig. 1; ApoE; rApoE=apolipoprotein E [rats, liver, mRNA Partial, 951 nt].
X15512_at	6.671134	Rat mRNA for apolipoprotein C1.
rc_AI112173_at	6.65684	UI-R-Y0-ml-e-08-0-UI.s1 UI-R-Y0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-Y0-ml-e-08-0-UI 3', mRNA sequence.
J02810mRNA_s_at	5.562573	glutathione S-transferase Yb-1 subunit; Rat prostate glutathione S-transferase mRNA, complete cds.
X16481_r_at	5.552522	Rat mRNA for zinc(2+) binding protein.
rc_AA891842_g_at	4.993273	EST195645 Normalized rat kidney, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RKIAH53 3' end, mRNA sequence.
M96601_at	4.880311	putative; Rattus norvegicus taurine transporter mRNA, complete cds.
rc_AI639384_s_at	4.497137	rx04495s Rat mixed-tissue library Rattus norvegicus cDNA clone rx04495 3', mRNA sequence.
rc_AI230614_s_at	4.276992	EST227309 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMCZ06 3' end, mRNA sequence.
rc_AA892128_at	4.251753	EST195931 Normalized rat kidney, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RKIAM69 3' end, mRNA sequence.
rc_AA945321_at	4.242516	EST200820 Normalized rat liver, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLIAK73 3' end, mRNA sequence.
X67948_at	4.154407	CHIP28; R.norvegicus mRNA for channel integral membrane protein 28.
L37333_s_at	4.120517	putative; Rattus norvegicus glucose-6-phosphatase (G6Pase) mRNA, complete cds.

表 8. 有意な変化のあったプローブ (増加、3 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
rc_AI179150_s_at	1899.469	EST222834 Normalized rat spleen, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RSPCC55 3' end, mRNA sequence.
rc_AA860062_g_at	154.8087	UI-R-E0-bz-h-06-0-UI.s2 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-bz-h-06-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
rc_AA866237_s_at	112.9002	UI-R-A0-bg-f-12-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bg-f-12-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
D00753_at	18.5171	Rat mRNA for contrapsin-like protease inhibitor related protein (CPI-26).
D10261_g_at	18.05822	Rattus norvegicus mRNA for 59-kDa bone sialic acid-containing protein, complete cds.
X15512_at	12.96675	Rat mRNA for apolipoprotein CI.
S76779_s_at	11.86553	apolipoprotein E, ApoE; This sequence comes from Fig. 1; ApoE; rApoE=apolipoprotein E [rats, liver, mRNA Partial, 951 nt].
J02810mRNA_s_at	11.74381	glutathione S-transferase Yb-1 subunit; Rat prostate glutathione S-transferase mRNA, complete cds.
X16481_r_at	8.982164	Rat mRNA for zinc(2+) binding protein.
K01933_at	8.890218	preprohaptoglobin; Rat haptoglobin mRNA, partial alpha-, complete beta-subunit and 3' flank.
rc_AI176456_at	7.957656	EST220041 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVBR96 3' end, mRNA sequence.
U02506UTR#1_s_at	6.991308	Rattus norvegicus clone 7 polymeric immunoglobulin receptor mRNA, 3' untranslated region microsatellite repeats.
M62642_at	6.25402	Rat (clone pRHx1) hemopexin mRNA, complete cds.
S87544_at	6.182713	This sequence comes from Fig 1; polyprotein 1-microglobulin/bikunin [rats, liver, mRNA, 1162 nt].
M20131cds_s_at	5.062102	cytochrome P450IIE1; Rat cytochrome P450IIE1 gene, complete cds.
X16273cds_at	4.580231	Rat mRNA for serine proteinase inhibitor-like protein, partial.
D00512_g_at	4.082665	Rattus sp. mRNA for mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase precursor, complete cds.

表 9. 有意な変化のあったプローブ (増加、6 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
rc_AI179150_s_at	57689.41	EST222834 Normalized rat spleen, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RSPCC55 3' end, mRNA sequence.
rc_AA860062_g_at	1667.541	UI-R-E0-bz-h-06-0-UI.s2 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-bz-h-06-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
rc_AA866237_s_at	313.6355	UI-R-A0-bg-f-12-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bg-f-12-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
M11794cds#2_f_a t	288.3804	metallothionein 2; metallothionein 1; Rat metallothionein-2 and metallothionein-1 genes, complete cds.
rc_AI176456_at	137.4604	EST220041 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVBR96 3' end, mRNA sequence.
M20131cds_s_at	28.34975	cytochrome P450IIE1; Rat cytochrome P450IIE1 gene, complete cds.
D00753_at	25.13978	Rat mRNA for contrapsin-like protease inhibitor related protein (CPI-26).
X15512_at	19.4226	Rat mRNA for apolipoprotein CI.
U02506UTR#1_s_ at	17.77753	Rattus norvegicus clone 7 polymeric immunoglobulin receptor mRNA, 3' untranslated region microsatellite repeats.
K01933_at	15.1866	preprohaptoglobin; Rat haptoglobin mRNA, partial alpha-, complete beta-subunit and 3' flank.
S76779_s_at	11.23561	apolipoprotein E, ApoE; This sequence comes from Fig. 1; ApoE; rApoE=apolipoprotein E [rats, liver, mRNA Partial, 951 nt].
J02810mRNA_s_a t	9.438373	glutathione S-transferase Yb-1 subunit; Rat prostate glutathione S-transferase mRNA, complete cds.
M62642_at	7.909897	Rat (clone pRHx1) hemopexin mRNA, complete cds.
S87544_at	7.821137	This sequence comes from Fig 1; polypeptide 1-microglobulin/bikunin [rats, liver, mRNA, 1162 nt].
M27434_s_at	7.742383	Rat alpha-2-u globulin mRNA.
rc_AI010453_at	6.691975	EST204904 Normalized rat lung, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLUBZ64 3' end, mRNA sequence.
X16481_r_at	6.132993	Rat mRNA for zinc(2+) binding protein.
D10261_g_at	5.35011	Rattus norvegicus mRNA for 59-kDa bone sialic acid-containing protein, complete cds.
M96601_at	5.167167	putative; Rattus norvegicus taurine transporter mRNA, complete cds.
X16273cds_at	4.109053	Rat mRNA for serine proteinase inhibitor-like protein, partial.

表 10. 有意な変化のあったプローブ (増加、24 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
rc_AA860062_g_at	42454.88	UI-R-E0-bz-h-06-0-UI.s2 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-bz-h-06-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
rc_AI179150_s_at	504.3588	EST222834 Normalized rat spleen, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RSPCC55 3' end, mRNA sequence.
rc_AA866237_s_at	358.3839	UI-R-A0-bg-f-12-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bg-f-12-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
M11794cds#2_f_a t	112.6566	metallothionein 2; metallothionein 1; Rat metallothionein-2 and metallothionein-1 genes, complete cds.
K01933_at	29.83485	preprohaptoglobin; Rat haptoglobin mRNA, partial alpha-, complete beta-subunit and 3' flank.
D00753_at	26.7832	Rat mRNA for contrapsin-like protease inhibitor related protein (CPI-26).
X15512_at	20.48195	Rat mRNA for apolipoprotein CI.
rc_AI176456_at	16.14616	EST220041 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVBR96 3' end, mRNA sequence.
D10261_g_at	11.24312	Rattus norvegicus mRNA for 59-kDa bone sialic acid-containing protein, complete cds.
S87544_at	10.18476	This sequence comes from Fig 1; polyprotein 1-microglobulin/bikunin [rats, liver, mRNA, 1162 nt].
rc_AA945321_at	9.61571	EST200820 Normalized rat liver, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLIK73 3' end, mRNA sequence.
rc_AI010453_at	8.869136	EST204904 Normalized rat lung, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLUBZ64 3' end, mRNA sequence.
S76779_s_at	8.333658	apolipoprotein E, ApoE; This sequence comes from Fig. 1; ApoE; rApoE=apolipoprotein E [rats, liver, mRNA Partial, 951 nt].
X16481_r_at	8.254272	Rat mRNA for zinc(2+) binding protein.
U02506UTR#1_s_ at	7.955546	Rattus norvegicus clone 7 polymeric immunoglobulin receptor mRNA, 3' untranslated region microsatellite repeats.
M62642_at	7.71284	Rat (clone pRHx1) hemopexin mRNA, complete cds.
rc_AA945169_at	6.211567	EST200668 Normalized rat liver, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RLIAH44 3' end, mRNA sequence.
M27434_s_at	5.87013	Rat alpha-2-u globulin mRNA.
J02810mRNA_s_a t	5.545174	glutathione S-transferase Yb-1 subunit; Rat prostate glutathione S-transferase mRNA, complete cds.
X16273cds_at	5.479021	Rat mRNA for serine proteinase inhibitor-like protein, partial.
M96601_at	4.979739	putative; Rattus norvegicus taurine transporter mRNA, complete cds.
L37333_s_at	4.890219	putative; Rattus norvegicus glucose-6-phosphatase (G6Pase) mRNA, complete cds.

表 1 1. 有意な変化のあったプローブ (増加、48 時間後)

Probe Name	Fold Change	Description
rc_AA860062_g_at	341.0252	UI-R-E0-bz-h-06-0-UI.s2 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-bz-h-06-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
M11794cds#2_f_a t	201.5166	metallothionein 2; metallothionein 1; Rat metallothionein-2 and metallothionein-1 genes, complete cds.
rc_AI179150_s_at	182.5472	EST222834 Normalized rat spleen, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RSPCC55 3' end, mRNA sequence.
rc_AA866237_s_at	70.04697	UI-R-A0-bg-f-12-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bg-f-12-0-UI 3' similar to emb V01222 RNALBU Messenger RNA for rat preproalbumin gi 202823 gb J00698 RATALBM Rat serum albumin mRNA, mRNA sequence.
rc_AI176456_at	63.86542	EST220041 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVBR96 3' end, mRNA sequence.
D00753_at	17.13627	Rat mRNA for contrapsin-like protease inhibitor related protein (CPi-26).
M20131cds_s_at	15.89488	cytochrome P450IIE1; Rat cytochrome P450IIE1 gene, complete cds.
X15512_at	6.922464	Rat mRNA for apolipoprotein CI.
X16481_r_at	5.92596	Rat mRNA for zinc(2+) binding protein.
M58634_at	4.498067	Rat IGF binding protein-1 (rIGFBP-1) mRNA, complete cds.
M19257_at	4.362967	cytosolic retinol-binding protein; Rat cytosolic retinol-binding protein (CRBP) mRNA.
L37333_s_at	4.355612	putative; Rattus norvegicus glucose-6-phosphatase (G6Pase) mRNA, complete cds.
D10262_at	4.278625	Rattus norvegicus mRNA for choline kinase R1, complete cds.

I - 3. 「変異原」

I - 3 - 1. 「マイトマイシン C による遺伝子発現の研究」

要旨 DNA相補鎖間の架橋はDNA障害の一種であり、修復には、ヌクレオチド除去修復（以下、NER）や相同組換え（以下、HRR）が関与する。マイトマイシンC（以下、MMC）は架橋剤として有名であり、アポトーシスを起こすことが知られている。曝露濃度を定めるための予備実験として、ヒトリンパ球に0.025、0.1、0.3 μ Mの濃度でMMCに曝露させ、3日後まで細胞数の推移をみた。曝露後24時間後から細胞数の低下する濃度があったが、0.1 μ Mを境に細胞数の低下がみられた。本実験では0.025と0.1 μ Mの2濃度を、それぞれ、低濃度（L）および高濃度（H）としてリンパ球に曝露し、total RNAを抽出、cDNA、cRNAを合成し、DNAチップ(HumanGenome U133A, Affymetrix)とハイブリダイズさせ、遺伝子の発現プロファイルを得た。4倍以上の変化を基準としてコントロールとLを比較したところ3個（亢進3個、低下0個）のプロンプが基準を満たし、コントロールとHとの比較では7個（亢進6個、低下1個）が基準をクリアした。個々の遺伝子で、注目すべきものとしてアポトーシスに陥った細胞の効率的な食事に必要なCED-6の発現亢進がみられ、MMCによる毒性への生体反応の一部と考えられた。既知のNERまたはHRR関連の因子で4倍上の発現の変化を示したものはなかった。

Mitomycin C（以下、MMC）は、抗がん抗生物質であり、細胞障害性がある。多くのがんの化学療法に使用されている。分子レベルでは有名であるが、細胞内で酵素により活性化され活性酸素供与体、DNAの相補鎖間 cross-link (ICL)、グアニンへの付加体ができる。このうち ICL は、単一の分子によって DNA 2 重螺旋の相補鎖間に共有結合ができるもので、複製や転写、組換えの際に必要となる 2 重螺旋の開裂が阻害される。MMC の細胞障害性は、主として DNA 付加体によるとされ、とりわけ、二機能性アルキル化によって生ずる ICL は細胞死の原因とされている。

MMC に近縁の Decarbamoyl mitomycin C (DMC) は単一機能性で ICL はできないと考えられていたが、CHO 細胞やマウス乳腺腫由来 EMT6 細胞を低酸素状態で培養した場合、DMC は MMC に比べてやや毒性が強いことが示されている。そこで、Palom¹⁾らは EMT6 細胞を低酸素状態で MMC または DMC に曝露させて出来る付加体を解析した。MMC 処理群では同一鎖間クロスリンク、ICL、4 種の単一付加体できたのに対して、DMC では 2 種の立体異性単一付加体と 2 種の立体異性 ICL が産生

された。DMC と MMC とでは、DMC の方が 20~30 倍付加体ができやすいが、DMC によって産生される単一付加体と ICL を比較すると前者が 10 倍多く、ICL の数では MMC と同等か、やや上であった。DMC が MMC と同様の細胞障害性を示すのは ICL の数が同等であることと関連すると考えられ、ICL の細胞死にとって重要性を示している。

大腸菌や下等な真核生物においては ICL の修復はヌクレオチド除去修復（以下、NER）と相同組換え（以下、HRR）の組み合わせで行われる。NER によって ICL が除かれ、生じたギャップは、健全なクロモソームをドナーとして HRR により修復される。酵母では NER ができない RAD3 変異体と、HRR ができない RAD52 変異体の両者が、ICL を生ずる二機能性アルキル化剤に対して感受性が高い。出芽酵母にソラレン曝露させて誘導した ICL における HRR の関与も示されている。

HRR 能を欠く哺乳類の変異体では、二機能性アルキル化剤に感受性が強く、高等な真核生物における DNA 修復における組換えの役割が基本的なものであることを示唆している。対照的に、大部分の NER 能を欠

く哺乳類の変異体のセルラインでは、架橋結合剤に対して中等度の感受性しか示されないが、ERCC1 や XPF に関する変異体では ICL を起こす薬剤に対して深刻な影響があり、ERCC1-XPF の endonuclease 活性が役割を果たしている可能性が指摘されている。

興味深いことに、MMC と同様に DNA 相補鎖に架橋を架けることができるソラレンを用いた実験によると、S 期の終りから G2 期に ICL を導入しても、G2-M チェックポイントが働かないという。哺乳類の細胞は DNA 複製装置が ICL と遭遇しない限り、未修復の ICL を寛容することができることが示唆されるという。組換えにより、ICL から 2 本鎖断裂が誘導され、相同組換えにより修復されることが示唆されている。

哺乳類の細胞では、紫外線によるピリミジンダイマーの修復に病変部のスキップとある種の DNA ポリメラーゼを利用した「誤りがち修復」が存在する。ICL の修復にも、フィジリティの低い、相同組換えを利用しない機構の存在を予想される。Zheng らは²⁾、哺乳類の細胞を使って、MMC による部位特異的な ICL の除去を調べることができるアッセイ系を開発し、損傷を受けていない相同鎖がなくても、試料中の ICL が除去されることを見出した。HRR によらない ICL の修復機構の存在が示唆される。さらに、NER 変異体について調べたところ、「転写に伴う」NER と病変部をスキップする DNA ポリメラーゼ η の関与が明らかとなったという。

ICL 修復のモデル実験系としては光反応性のソラレン誘導体が多く使われてきた。ソラレンを使うと二重螺旋の歪が劇的になる。歪は、螺旋構造の完全性を検知するさまざまな損傷検出複合体により認識される可能性がある。対照的に、MMC による ICL は二重螺旋の歪が最小であり、塩基配列特異性がある。今回は、ICL を起こす代表的薬剤として MMC を選び、リンパ球に曝露させ、曝露後の遺伝子の発現プロファイルについて検討した。

I - 3 - 1 - 1.

cell viability

本実験に入る前に曝露濃度決定のため、予備実験を行った。アポトーシスに対応するため、細胞数の低下が明確な濃度を高濃度とした。量-影響関係をみる観点から、細胞数の低下が明確でない濃度でも曝露実験を行うこととした（低濃度）。過去の文献を参考に 0.025、0.1、0.3 μ M の 3 濃度について検討することとした。

材料と方法 (図 1)

リンパ球の分離

ヘパリン入り採血管を用いて手背静脈より採血を行い、Phicoll-Paque Plus (Amasham-Pharmacia) のマニュアルに従ってリンパ球の分離を行った。最終的にリンパ球は 10 % FBS(Gibco BRL) 添加 RPMI1640 培地 (4.0 μ g/ml PHA-M、100 μ unit/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン添加) に浮遊させ、2 mm 格子付きのペトリディッシュ (直径 6 cm、図 2) に播き、37°C、5 % CO₂ 下で 24 時間培養した。なお、PHA-M はリンパ球を芽球化させるため添加している。

なお、本研究で使用している血液はすべて研究者自身のものである。

マイトマイシン C 処理

培地を blanced solution に変え、ペトリディッシュに MMC(Sigma) を 0.025、0.1 および 0.3 μ M の濃度で添加、混和し、37°C、5%CO₂ 下で 3 時間インキュベートした。インキュベーション終了後、細胞を 2 回洗ったのち、10 % FBS(Gibco BRL) 添加 RPMI1640 培地 (ペニシリン、ストレプトマイシン添加) を 2 ml 加え、37°C、5%CO₂ の条件で培養した。コントロール群では、MMC の投与以外の処置をまったく同様に行った。

細胞数の計測

曝露終了 24、48、72 時間後にトリパンブルー染色液(Gibco BRL)を 19 対 1 の割合で加え、1 グリッドあたりの染色液に染まらない細胞の個数を計測した (図 3)。一ディッシュあたり 5 グリッド数え、一濃度・時

点につきディッシュを2枚用意した。コントロールディッシュとMMC処理ディッシュのデータの差は、マンローホイットニイのU検定で検定した。

結果と考察

細胞数の推移を図4～6に示す。統計学的な有意差は72時間後の0.1 μ Mのみであったが、0.1 μ Mから細胞数の低下が見られたので0.025 μ Mを低濃度(L)、0.1 μ Mを高濃度(H)とした。

I - 3 - 1 - 2.

DNAチップによる expression profile の解析

「変異原」では昨年度までにブレオマイシン、UVC、UVAについてヒトリンパ球を使って発現プロファイルを得てきた。3つの化学物質・物理要因とも曝露終了後3および24時間後にtotal RNAを回収し、遺伝子の発現パターンを解析した。曝露終了3時間後にも変化がみられ、一部に24時間後の変化との関連を示唆するものもみられたが、曝露24時間後の遺伝子発現の変化が多彩であった。そこで、MMCにおいては曝露24時間にtotal RNAを回収、遺伝子の発現プロファイルをみることにした。

材料と方法 (図7)

リンパ球の分離

ヘパリン入り採血管を用いて手背静脈より採血を行い、Phicoll-Paque Plus (Amasham-Pharmacia)のマニュアルに従ってリンパ球の分離を行った。リンパ球は、最終的に10% FBS(Gibco BRL)添加RPMI1640培地(4.0 μ g/ml PHA-M、ペニシリン100 μ g/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml)に浮遊させ、直径10cmのペトリディッシュに5mlずつリンパ球を播き37°C、5%CO₂の条件で24時間インキュベートした。

なお、本研究で使用している血液はすべて研究者自身のものである。

マイトマイシンC処理

培地をblanced solutionにかえ、MMCを0.25 μ Mおよび0.1 μ Mの濃度で添加、混和

し、37°C、5%CO₂の条件で1時間インキュベートした。インキュベーション終了後、細胞を2回洗ったのち、10% FBS(Gibco BRL)添加RPMI1640培地(4.0 μ g/ml PHA-M、ペニシリン100 μ g/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml)に浮遊させ、再び37°C、5%CO₂の条件で24時間培養した。コントロール群では、MMCの投与以外の処置をまったく同様に行った。

total RNA の抽出

total RNAの抽出は、RNA easy mini kit (Qiagen)によった。24時間後に静かに培養液を取り除き、細胞を洗ったのち、1ディッシュあたり600 μ lのBuffer RLTを加え、万遍無くディッシュ全体に行き渡らせ、静置し、細胞を回収、-80°Cで保存した。total RNAの抽出はキットに添付のマニュアルに従った。

2本鎖 cDNA の調製

2本鎖DNAの合成には、SuperScript Choice System (Gibco BRL)を用いた。詳細は添付のマニュアルに従った。また、Affimetrix社のExpression Analysis Technical Manualも参照した。

cRNA の調製

in vitro transcriptionには市販のキット(ENZO BioArray Terminal Labeling Kit)を用いた。詳細は使用説明書に従い、Affimetrix社のExpression Analysis Technical Manualも参照した。

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションには、DNAチップとしてHumanGenomeU133Aを用いて45°Cで毎分60回転させながら、16時間インキュベートした。詳細はAffimetrix社のExpression Analysis Technical Manualに従った。

Wash と Staining

washとstainingにはfluidics stationを用いた。詳細はAffimetrix社のExpression Analysis Technical Manualに従った。

Scanning と解析

WashとStaining終了後、専用のscannerで各プローブのシグナルを読み取った。解析はMicroarray suite 5.0 (Affimetrix)によ

った。normalizationはMicroarray suiteのall probe setモードを選択した。コントロール群と0.025 μ M処理群、コントロール群と0.1 μ M処理群の比較を行い、「増加」または「減少」の判定のでたプローブのうちで、両者の間で発現に4倍以上差のあるプローブ(遺伝子)であり、1)「増加」の場合は少なくとも曝露群で発現のあるもの、2)「減少」の場合は少なくともコントロール群で発現のあるものを抽出した。

結果と考察

解析ソフトで有意と判定されたプローブのうちで2倍以上の変化まで含めてリストを作製した(表1、2、3)。4倍以上の変化を示したプローブについては、コントロール、0.025 μ M、0.1 μ Mのすべてについてデータを掲載した(表4、5)。また、4倍以上の変化を示したプローブについては機能別のプローブ数の図を作成した(図7、8)。

コントロールと0.025 μ Mの比較では3個(亢進3個、低下0個)のプローブが基準を満たし、コントロールと0.1 μ Mとの比較では7個(亢進6個、低下1個)が基準をクリアした。

dose dependentに発現の変化したプローブはKDRのみであった。KDRは、kinase insert domain receptorの略であり、ヒト内皮細胞のライブラリーから得られた遺伝子である。ATP binding site、membrane spanning region、split tyrosine kinase regionsのドメインをもつtype III receptor tyrosine kinasesである。Vascular endothelial growth factor (VEGF)は血管内皮に働く唯一のミトジェンであり、酸欠により発現が亢進するが、KDRはその細胞表面のレセプターである。通常、血管新生に役割があるが、固形がんができる際にも役割をはたすことが考えられる。MMCの毒性と生体反応との関連の観点からの発現亢進の意義は残念ながら、現在のところ不明である。

ゲノムへの損傷があった場合には、細胞周期が止まり、この間に損傷の修復が行わ

れる。もし、損傷が大きく修復不能である場合にはアポトーシスが誘導され、間違った遺伝情報が伝わらないようになっていると言われている。MMCの毒性との関連で注目されるのがCED-6の発現亢進である。MMCはアポトーシスを起こすことが知られている。胃がん由来のセルラインSNU-16を10 μ g/mlのMMC存在下で培養したところ、電気泳動でラダーパターンがみられ8時間の培養でもっとも鮮明であったという³⁾。アポトーシスの最終局面はアポトーシスに陥った細胞の貪食による除去である。これにより二次的な壊死が防止され、死にかかっている細胞からの有害な物質の放出が起こらないようになっている。また、この除去の破綻によりある種の慢性炎症おこるとも言われている。線虫のアポトーシス関連遺伝子ced-6はアポトーシスに陥った細胞の効率的な貪食に寄与している。ced-6は、アポトーシスに陥った細胞を認知し貪食する系におけるシグナル伝達系のなかのアダプター蛋白であることが示唆されている。0.1 μ Mで発現亢進のみられたCED-6は、ced-6のヒトのホモログであり、主としてマクロファージで発現しているが、大部分の組織で発現している。トランスジェニックマクロファージでhCED-6を強制発現させると、アポトーシスに陥った細胞の貪食のみが促進されるという⁴⁾。また、貪食能を欠くced-6変異体線虫であってもhCED-6の強制発現により表現型が救済されるという⁵⁾。CED-6の発現亢進はMMCによるアポトーシスに対する生体反応の一断面を捉えていると考えられた。

次に注目した変化としてFLJ10339の発現低下とFLJ12178の発現亢進がある。両プローブを比較した(表6)。2つのプローブは、Helicase, C-terminal、SNF2 related domain、DEAD/DEAH box helicaseの3つの共通なドメインを持っている。FLJ10339は、helicase, lymphoid-specific (HELLS)と呼ばれ、生理的には末梢Tリンパ球の正常な分化誘導に役割を果たしているとされている。一方、FLJ12178はhypothetical proteinであり、役割の詳細に

については分かっていない。DNA helicase には多様なものがあるが、複製、transcription のほか DNA repair の際に活躍し、DNA 鎖が必要以上に wind するのを防いでいるものもある。DEAD/DEAH box helicase をドメインとして持つ蛋白には、transcription-repair coupling factor もある。また、DNA repair に関与する ERCC6、RAD16、RAD5 でも SNF2 related domain がみられる。発現の亢進した FLJ12178 の生体における役割として DNA repair の可能性も考えられた。

DNA チップはゲノムワイドな遺伝子発現の変化を捉えるという点で優れていると考えられた。

健康危害情報

なし

研究発表

中島 宏、佐野有理、武林 亨、大前和幸
マイトマイシンC曝露によるヒトリンパ球の遺伝子発現プロファイル

(第73回日本衛生学会総会、平成15年3月、大分)

知的財産権の出願・登録状況

未

参考文献

1) Palom Y, Suresh Kumar G, Tang LQ, Paz MM, Musser SM, Rockwell S, Tomasz

M. Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C. *Chem Res Toxicol* 2002; 11:1398-406

2) Zheng H, Wang X, Warren AJ, Legerski RJ, Nairn RS, Hamilton JW, Li L. Nucleotide excision repair- and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23: 754-761.

3) Park IC, Park MJ, Hwang CS, Rhee CH, Whang DY, Jang JJ, Choe TB, Hong SI, Lee SH. Mitomycin C induces apoptosis in a caspases-dependent and Fas/CD95-independent manner in human gastric adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2000;158:125-132.

4) Smits E, Van Crielinge W, Plaetinck G, Bogaert T. The human homologue of *Caenorhabditis elegans* CED-6 specifically promotes phagocytosis of apoptotic cells. *Curr Biol* 1999; 9: 1351-1354.

5) Liu QA, Hengartner MO. Human CED-6 encodes a functional homologue of the *Caenorhabditis elegans* engulfment protein CED-6. *Curr Biol* 1999; 9: 1347-1350.

Schedule	
Day-1	Lymphocyte Isolation and Stimulation by 4 μ g/ml PHA-M for 24 hours
Day 0	3 hours MMC exposure at 0.025, 0.1, 0.3 μ M
Day 1	Count 24 hours after
Day 2	Count 48 hours after
Day 3	Count 72 hours after

図 1 . cell viabilityの検討.

Cells were cultured with RPMI 1640 medium with 100 unit /ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 4 μ g/ml PHA-M at 37°C, 5% CO₂

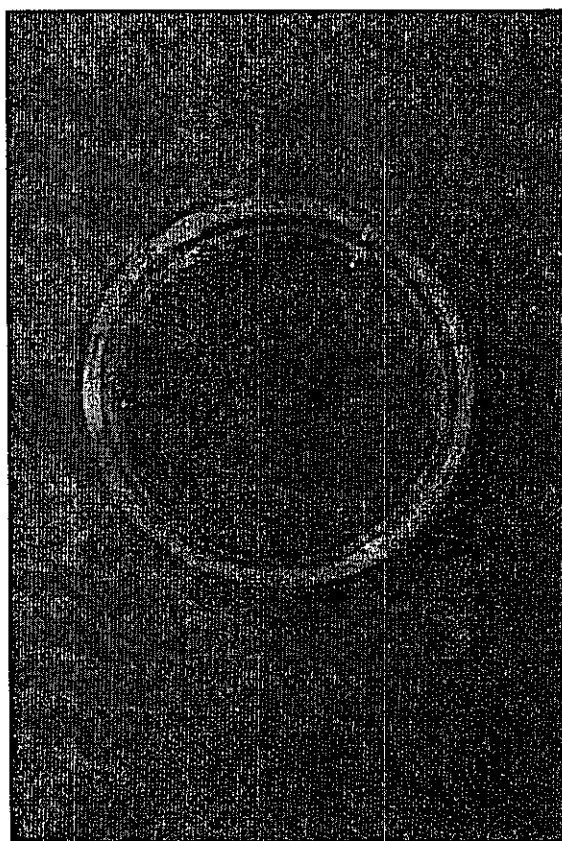


図 2 .

Cells were seeded on 6 cm diameter petli dish with 2 mm grid.

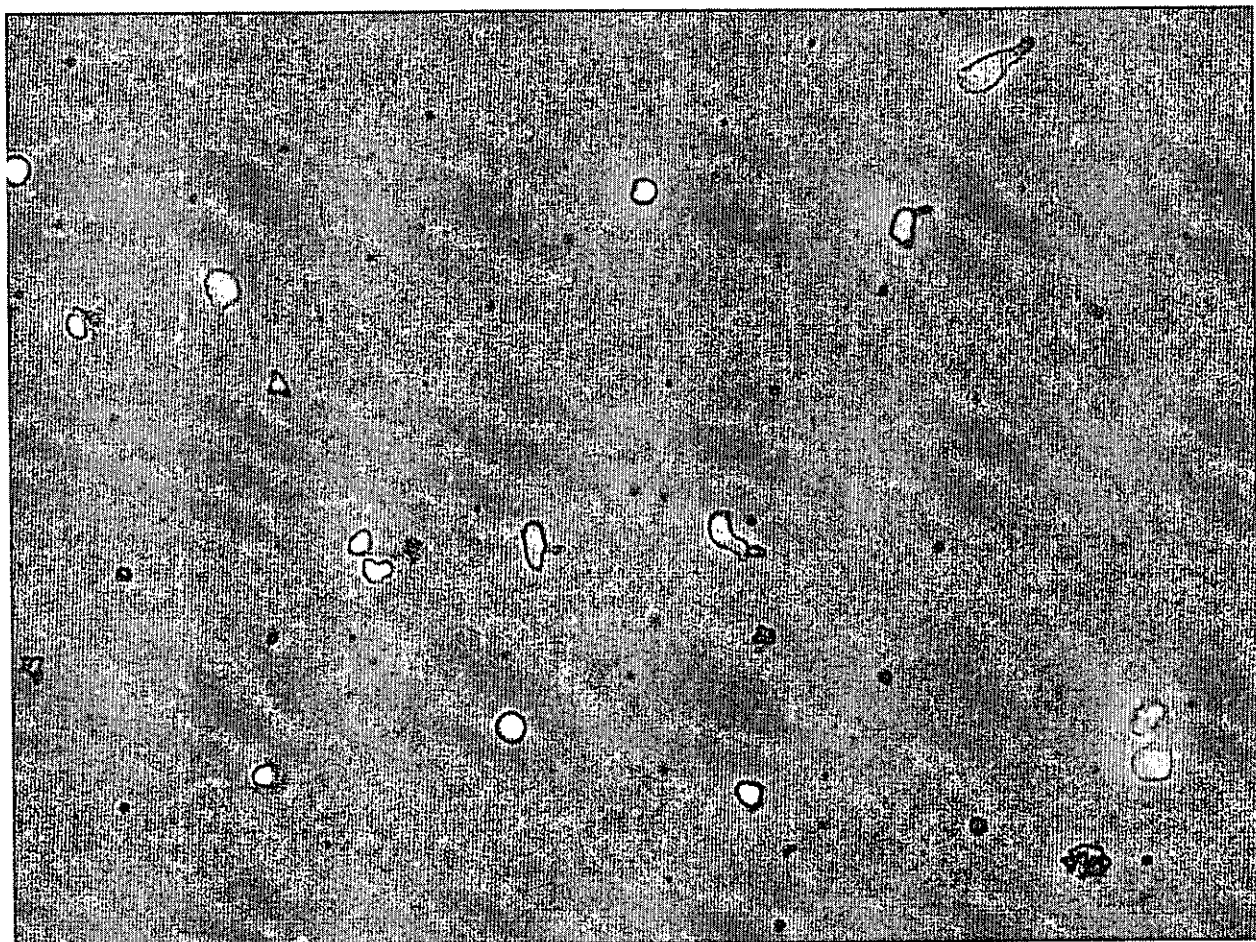


图 3.

Five squares were counted per each dish.
Examination was done in double for each
concentration.

Day 1

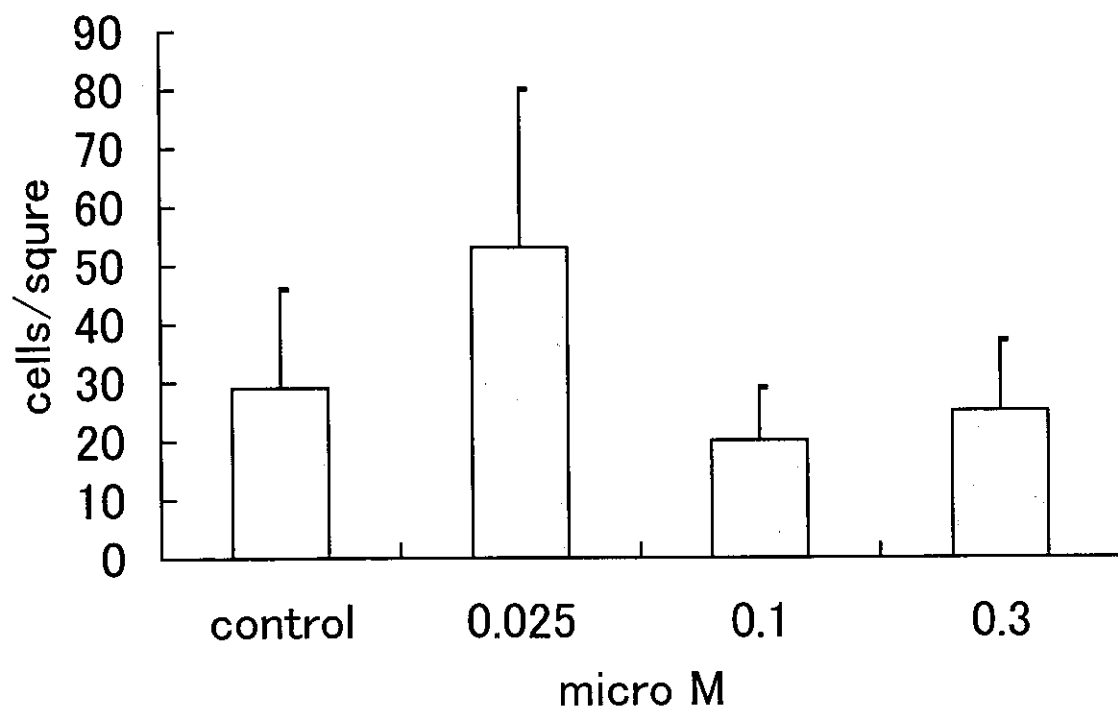


図4. Cell viability (Day 1).

Results were tested with Mann-Whitney's U-test.

*: $p < 0.05$

