

Day 2

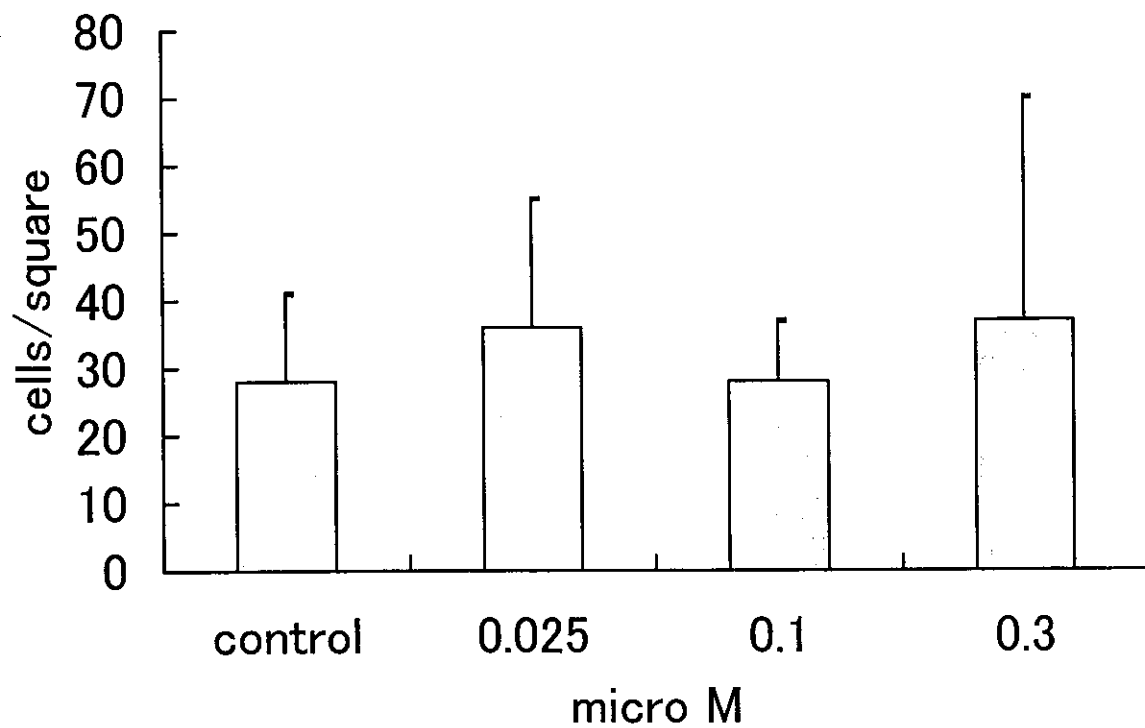
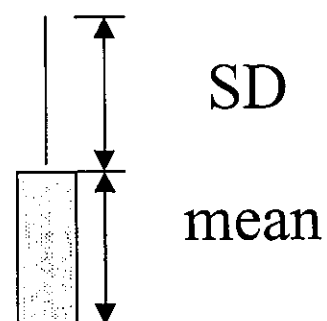


図5. Cell viability (Day 2).
Results were tested with
Mann-Whitney's U-test.
*: $p < 0.05$



Day 3

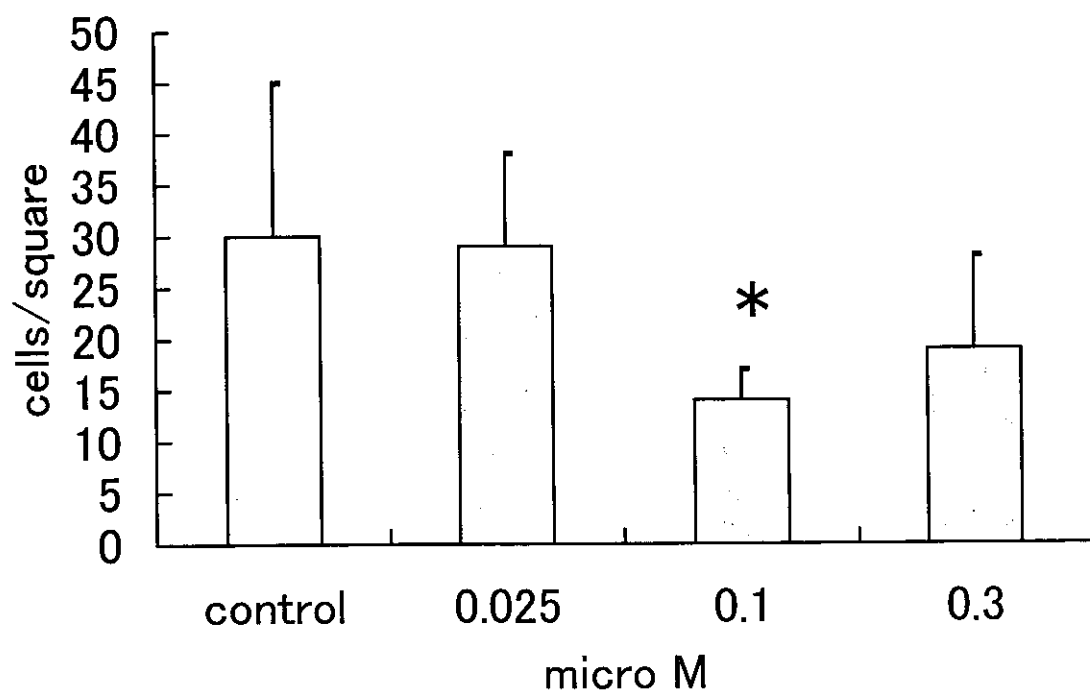
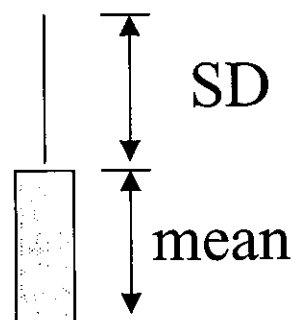


図6. Cell viability (Day 3).
Results were tested with
Mann-Whitney's U-test.
*: $p < 0.05$



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(C) 0.025(L) 0.1(H) μ M

Day 1

Total RNA Recovery at
24 hours after exposure

図7. 本実験スケジュール.

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

表 1. コントロールと MMC0.025 μ M 処理の比較.

	control		low		Change	Log Ratio	p-value	Descriptions
	Detection	p-value	Detection	p-value				
AFFX-r2-Hs18S rRNA-M_x_at	P	0.023926	A	0.466064	D	-1	0.996959	Human 18S rRNA sequence
201187_s_at	A	0.19458	P	0.023926	I	1	0.000692	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3
204262_s_at	A	0.129639	P	0.030273	I	1	0.001336	presenilin 2 (PSEN2), transcript variant 1
207464_at	A	0.095215	P	0.00415	I	1	0.000046	PRO0233 protein
216489_at	A	0.111572	P	0.046143	I	1	0.004073	KIAA1616 protein, partial cds.
218692_at	P	0.035645	P	0.005859	I	1	0.000241	hypothetical protein FLJ20366
209576_at	A	0.27417	P	0.008057	I	1	0.003355	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting activity polypeptide 1
220812_s_at	A	0.366211	P	0.023926	I	1	0.004073	HERV-H LTR-associating 2 (HHLA2)
208421_at	A	0.334473	P	0.01416	I	2	0.000389	RIG-like 14-1 (LOC51047)
214212_x_at	A	0.129639	P	0.008057	I	2	0.000389	mitogen inducible 2
216259_at	A	0.080566	P	0.01416	I	2	0.000389	clone IMAGE:35527 unknown protein
211606_at	A	0.334473	P	0.037598	I	2	0.00249	nucleoporin nup 36
214376_at	A	0.129639	P	0.030273	I	2	0.001336	clone 24626
215231_at	A	0.303711	P	0.030273	I	2	0.001651	FLJ10068 fis

	control		low		Change	Log Ratio	p-value	Descriptions
	Dete-ct ion	p-value	Dete-c tion	p-value				
216068 _at	A	0.398926	P	0.037598	I	2	0.000966	clone DKFZ p434N021
203934 _at	A	0.466064	P	0.030273	I	2	0.004481	KDR
206460 _at	A	0.696289	P	0.023926	I	3	0.003041	hypothetical protein MOT8
217209 _at	A	0.72583	P	0.037598	I	4	0.001832	carcino-embryo nic antigen subdomains A and B

(表 1 つづき)

表 2. コントロールと MMC0.1 μ M 処理の比較 (発現低下).

	control		high		Log Ratio	Change	p-value	Descriptions
	Dete-ct ion	p-value	Dete-c tion	p-value				
220085 _at	P	0.001953	A	0.366211	-2.5	D	0.996301	hypothetical protein FLJ10339
212384 _at	P	0.046143	A	0.72583	-1.9	D	0.99751	HLA-B associated transcript-1
203577 _at	P	0.000244	P	0.018555	-1.8	D	0.999977	general transcription factor IIH, polypeptide 4 (GTF2H4)
208657 _s_at	P	0.001221	P	0.023926	-1.7	D	0.99994	septin D1
202840 _at	P	0.000244	P	0.001953	-1.6	D	0.999308	TATA box binding protein associated factor, RNA polymerase II, N, (TAF2N)
200612 _s_at	P	0.00293	P	0.030273	-1.4	D	0.999954	adaptor-relate d protein complex 2, beta 1 subunit (AP2B1)
215210 _s_at	P	0.000244	P	0.001221	-1.4	D	0.999977	alpha-ketoglut arate dehydrogenase complex dihydrolipoyl succinyltransf erase, E2k
201222 _s_at	P	0.000244	P	0.000244	-1.3	D	0.999786	RAD23 (S. cerevisiae) homolog B
202827 _s_at	P	0.037598	A	0.27417	-1.2	D	0.999562	matrix metallo-protei nase 14 (membrane-in serted)

	Control		High		Log Ratio	Change	p-value	Descriptions
	Detection	p-value	Detection	p-value				
202856 _s_at	P	0.000244	P	0.001953	-1.2	D	0.999954	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (SLC16A3)
209734 _at	P	0.000244	P	0.001953	-1.2	D	0.999886	hematopoietic protein 1
211136 _s_at	P	0.000244	P	0.000244	-1.2	D	0.99998	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1
215338 _s_at	P	0.000244	P	0.000732	-1.2	D	0.998514	natural killer-tumor recognition sequence
217370 _x_at	P	0.001221	P	0.00415	-1.1	D	0.999448	myxoid liposarcoma specimens, mRNA Partial Mutant, 3 genes
200841 _s_at	P	0.000244	P	0.000732	-1	D	0.999853	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase
201055 _s_at	P	0.000244	P	0.000244	-1	D	0.995927	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 (HNRPA0)
201123 _s_at	P	0.000244	P	0.00415	-1	D	0.999973	eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF5A)

(表 2 つづき)

表 3. コントロールと MMC0.1 μ M 処理の比較 (発現亢進).

	Control		High		Log Ratio	Change	p-value	Descriptions
	Dete-ct ion	p-value	Dete-c tion	p-value				
41469_at	A	0.127645	P	0.043968	1	I	0.002517	elafin
201261	A	0.080566	P	0.023926	1	I	0.002753	biglycan
_x_at								
203395	P	0.030273	P	0.00293	1	I	0.000214	hairy (Drosophila)-h omolog (HRY)
_s_at								
206639	A	0.111572	P	0.023926	1	I	0.001651	histatin 1 (HTN1)
_x_at								
211388	A	0.129639	P	0.018555	1	I	0.00013	CTG26 alternate open reading frame
_s_at								
214050	A	0.080566	P	0.046143	1	I	0.003355	CGG triplet repeat binding protein 1
_at								
214419	A	0.171387	P	0.023926	1	I	0.000618	cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase) , polypeptide 9 clone HEMBA 1006421
_s_at								
215898	P	0.030273	P	0.005859	1	I	0.000774	hypothetical protein FLJ23384
_at								
219792	A	0.080566	P	0.030273	1	I	0.001832	hypothetical protein FLJ23384
_at								
220206	A	0.080566	P	0.037598	1	I	0.00249	hypothetical protein FLJ23151
_at								
209242	A	0.080566	P	0.010742	1.1	I	0.001651	paternally expressed 3
_at								
218692	P	0.035645	P	0.023926	1.1	I	0.001486	hypothetical protein FLJ20366
_at								
206161	A	0.19458	P	0.023926	1.2	I	0.000438	synaptotagmin V
_s_at								
205539	A	0.095215	P	0.037598	1.3	I	0.00225	advillin
_at								
206564	A	0.171387	P	0.046143	1.3	I	0.00225	opiate receptor-like 1 (OPRL1)
_at								
209909	A	0.219482	P	0.046143	1.4	I	0.00249	transforming growth factor, beta 2
_s_at								

	Control		High		Log Ratio	Change	p-value	Descriptions
	Dete- ction	p-value	Dete- ction	p-value				
214212_x_at	A	0.129639	P	0.018555	1.4	I	0.000147	mitogen inducible 2
215331_at	A	0.129639	P	0.018555	1.4	I	0.000147	KIAA1000 protein
215695_s_at	A	0.246094	P	0.030273	1.4	I	0.00249	glycogenin-2 delta
39966_at	A	0.089405	P	0.006532	1.5	I	0.000029	neuroglycan C
216293_at	A	0.171387	P	0.037598	1.5	I	0.003699	clathrin light chain a
220931_at	A	0.303711	P	0.037598	1.5	I	0.004481	hypothetical protein MGC5590
214591_at	A	0.246094	P	0.030273	1.6	I	0.003355	Drosophila Kelch like protein
201187_s_at	A	0.19458	P	0.008057	1.8	I	0.00004	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3
208086_s_at	A	0.5	P	0.037598	2.1	I	0.001201	dystrophin
220586_at	A	0.149658	P	0.023926	2.1	I	0.002032	hypothetical protein FLJ12178
203934_at	A	0.466064	P	0.037598	2.6	I	0.000389	KDR
205620_at	A	0.696289	P	0.046143	3.1	I	0.000307	coagulation factor X (F10)
204237_at	A	0.466064	P	0.010742	3.2	I	0.003355	CED-6
216752_at	A	0.533936	P	0.010742	3.7	I	0.000774	FLJ21373

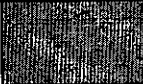
(表 3 つづき)

表 4. 変化のみられたジロージ (low dose).

	control			low			high				
	Date- ction	p-value	Date- ction	p-value	Change	Log Ratio	Date- ction	p-value	Change	Log Ratio	p-value
KDR	A	0.466064	P	0.030273	I	2	0.004481	P	0.037598	I	3 0.000389
hypothetical protein	A	0.696289	P	0.023926	I	3	0.003041	A	0.27417	NC	4 0.019624
MOT8											
carcinoembryonic	A	0.72583	P	0.037598	I	4	0.001832	A	0.303711	NC	3 0.016731
antigen subdomains A and B											

表 5. 変化のみられたゾローゾ (high dose).

	control			low			high					
	Dete- ction	p-value	Dete- ction	p-value	Log Ratio	Change	p-value	Dete- ction	Log Ratio	Change	p-value	
FLJ10339	P	0.001953	M	0.056152	-0.3	NC	0.681091	A	0.366211	-2.5	D	0.996301
dystrophin	A	0.5	A	0.171387	1.2	NC	0.010135	P	0.037598	2.1	I	0.001201
FLJ12178	A	0.149658	A	0.366211	0.9	NC	0.48058	P	0.023926	2.1	I	0.002032
KDR	A	0.466064	P	0.030273	2.3	I	0.004481	P	0.037598	2.6	I	0.000389
coagulation factor X (F10)	A	0.696289	A	0.149658	2.3	NC	0.054022	P	0.046143	3.1	I	0.000307
CED-6	A	0.466064	A	0.219482	2.7	NC	0.5	P	0.010742	3.2	I	0.003355
FLJ21373	A	0.533936	A	0.171387	2.7	NC	0.222749	P	0.010742	3.7	I	0.000774

negative			description		positive	
			transmembrane receptor protein			
			tyrosine kinase			
			DNA helicase			
			actin binding			
			blood coagulation			
			apoptosis			
			unknown			

☒8. Cellular function and the number of significant probe (low dose, 24 hours after).

 : up regulation of a gene that accelerates its function, or down regulation of a gene that decelerates its function.

 : up regulation of a gene that decelerates its function, or down regulation of a gene that accelerates its function.

Each cell corresponds to each significant probe.

negative			description	positive		
			transmembrane receptor protein tyrosine kinase			
			DNA helicase			
			actin binding			
			blood coagulation			
			apoptosis			
			unknown			

☒9. Cellular function and the number of significant probe (high dose, 24 hours after).

 : up regulation of a gene that accelerates its function, or down regulation of a gene that decelerates its function.

 : up regulation of a gene that decelerates its function, or down regulation of a gene that accelerates its function.

Each cell corresponds to each significant probe.

表 6. FLJ10339 と FLJ12178 の比較

	FLJ10339 helicase, lymphoid- specific HELLS	FLJ12178 hypothetical protein	
変化	2-2.5	22.1	
ドメイン	Helicase, C-terminal SNF2 related domain DEAD/DEA H box helicase	Helicase, C-terminal SNF2 related domain DEAD/DEA H box helicase	The domain, which defines this group of proteins is found in a wide variety of helicases and helicase related proteins. It may be that this is not an autonomously folding unit, but an integral part of the helicase. This domain is found in proteins involved in a variety of processes including transcription regulation (e.g., SNF2, STH1, brahma, MOT1) , DNA repair (e.g., ERCC6, RAD16, RAD5), DNA recombination (e.g., RAD54), and chromatin unwinding (e.g., ISWI) as well as a variety of other proteins with little functional information (e.g., lodestar, ETL1). Proteins that contain this domain appear to be distantly related to the DEAX box helicases, however no helicase activity has ever been demonstrated for these proteins. A number of eukaryotic and prokaryotic proteins involved in ATP-dependent, nucleic-acid unwinding have been characterized on the basis of their structural similarity. All these proteins share a number of conserved sequence motifs. Some of them are specific to this family while others are shared by other ATP-binding proteins or by proteins belonging to the helicases 'superfamily'. Found in: Transcription-repair coupling factor ATP-dependent DNA helicase RecQ
生理的意義	HELLS is not obligatory for normal lymphoid development but is essential for normal proliferation of peripheral T lymphocytes.	?	

I - 3 - 2. 「メチルニトロソウレアによる遺伝子発現の研究」

要旨 アルキル化はDNA障害の一種であり、代表例として発がん重要なグアニンのO⁶位のメチル化がある。修復は、O⁶メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ（以下、MGMT）。によって行われる。O⁶メチルグアニンを産生する化学物質メチルニトロソウレア（以下、MNU）について予備実験として、ヒトリンパ球を50、100、200 μ g/mlの濃度で曝露させ、3日後まで細胞数の推移をみた。曝露後24時間の時点から細胞数の低下がみられた。100 μ g/mlにおいても軽度の細胞数の低下がみられたが、200 μ g/mlのそれは顕著であり、統計学的にも有意であった。MNUを様々な濃度でリンパ球に暴露し、SCEや付加体の形成を見た研究では、200 μ g/mlの濃度から付加体が見られたと報告されている。200 μ g/mlの濃度は、O⁶メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼによる付加体の除去が追いつかなくなり、細胞への影響が深刻である可能性が考えられた。100と200 μ g/mlの2濃度を、それぞれ、低濃度（L）および高濃度（H）として本実験を開始した。

アルキル化剤は実験動物の発がん実験に用いられてきたが、オーバーオールでみたDNAの改変レベルと発がん性との間には単純な相関がある訳ではない。グアニンのO⁶位の改変が大変重要である可能性があるとの説が注目され、動物実験によって、アルキル化による発がんにおけるO⁶-alkylguanineの重要性が示されている。N-methyl-N-nitrosourea（以下、MNU）は、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineとともにO⁶位を改変する能力が高く、グアニンのO⁶位がメチル化されたO⁶meGを生成する。複製のあいだにO⁶meG:Tのペアができ、相補鎖に間違っただピリミジンを導入することになり、GからAへのトランジション変異がおこるので、O⁶meGは潜在的に変異原性のある塩基である。O⁶meGはO⁶メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ（以下、MGMT）によって修復される。O⁶meGは変異の導入と発がんにとって意義があるが、細胞死にも大きな貢献をしている。

MNUは実験動物を用いた発がん実験における発がんを誘導する薬剤としてよく用いられてきた。また、ケモプリベンション研究の際に、研究対象物質の予防効果をみるための発がん誘導をMNUで行う研究も多い。

アルキル化剤への曝露による遺伝子の発現プロファイルの変化を知る目的でMNUのリンパ球への曝露実験を開始した。

I - 3 - 2 - 1.

cell viability

細胞数の推移をみるためのMNUの濃度は文献を参考に50、100、200 μ g/mlの3濃度とした。

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。リンパ球は、最終的に10%FBS(Gibco BRL)添加RPMI1640培地（2.5 μ g/mlPHA-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、2mm格子付きのペトリディッシュ（直径6cm）に播き、37°C、5%CO₂の条件で24時間培養した。

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。

メチルニトロソウレア処理

MNU(Sigma)は目的の濃度となるようDMSOに溶いた。培地をblanced solutionに変え、ペトリディッシュに最終的に50、100、200 μ g/mlの濃度となるようMNU溶液を添加、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（2.5 μ g/mlPHA-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) 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、DMSO を 2 μ l 添加し DMSO0.1%溶液とした。

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。

細胞数の計測

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。一群 5 グリッド数え代表とした。結果はマンローホイットニの U 検定で検定した。

結果と考察

細胞数の推移を図 2～4 に示す。曝露後 24 時間の時点から細胞数の低下がみられた。100 μ g/ml においても軽度の細胞数の低下がみられたが、200 μ g/ml のそれは顕著であり、統計学的にも有意であった。MNU を様々な濃度でリンパ球に暴露し、小核試験や SCE、O⁶meG の形成を見た研究では、200 μ g/ml の濃度から O⁶meG がみられたと報告されている¹⁾。小核試験や SCE は、より低い濃度で陽性であった。O⁶meG が低い濃度でみられなかったことから、O⁶meG と細胞遺伝学的影響は相関しないと解釈されるが、O⁶meG 以外の変異のもとになる損傷の影響や 200 μ g/ml の濃度は、O⁶メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼによる付加体の除去能も考慮すべきであると述べている。

100 および 200 μ g/ml を曝露濃度として DNA チップによる遺伝子発現実験を行うこととした。

I - 3 - 5 - 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

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 (2.5 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 時間培養した。N-メチルニトロソウレア処理

培地を blanced solution に変え、N-メチルニトロソウレア(Sigma)を 100 μ g/ml および 200 μ g/ml の濃度で添加、混和し、37°C、5%CO₂ の条件で 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 (2.5 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、N-メチルニトロソウレア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、静置した。細胞を回収し、-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 HumanGenomeU95A 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 4.0 (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 7.5 μ g/ml 処理群、コントロール群と 30 μ g/ml 処理群の比較を行い、「増加」または「減少」の判定のためプローブのうちで、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

100 および 200 μ g/ml の濃度でリンパ球に MNU を曝露させる実験を開始した。DNA チップによるハイブリダイゼーションを行うには、最低でも 5 μ g の total RNA が必要であるが、total RNA が所定量に達せず、ハイブリダイゼーションが未実施である。

健康危害情報

なし

研究発表

未

知的財産権の出願・登録状況

未

参考文献

1) Stephanou G, Vlastos D, Vlachodimitropoulos D, Demopoulos NA. A comparative study on the effect of MNU on human lymphocyte cultures in vitro evaluated by O6-mdG formation, micronuclei and sister chromatid exchanges induction. *Cancer Lett* 1996; 109: 109-114.

Schedule

Day -1

Lymphocyte Isolation and
Stimulation by $2.5 \mu\text{g/ml}$
PHA-M for 24 hours

Day 0

3 hours MNU exposure
at 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$

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 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 4 $\mu\text{g/ml}$ PHA-M at 37°C , 5% CO_2

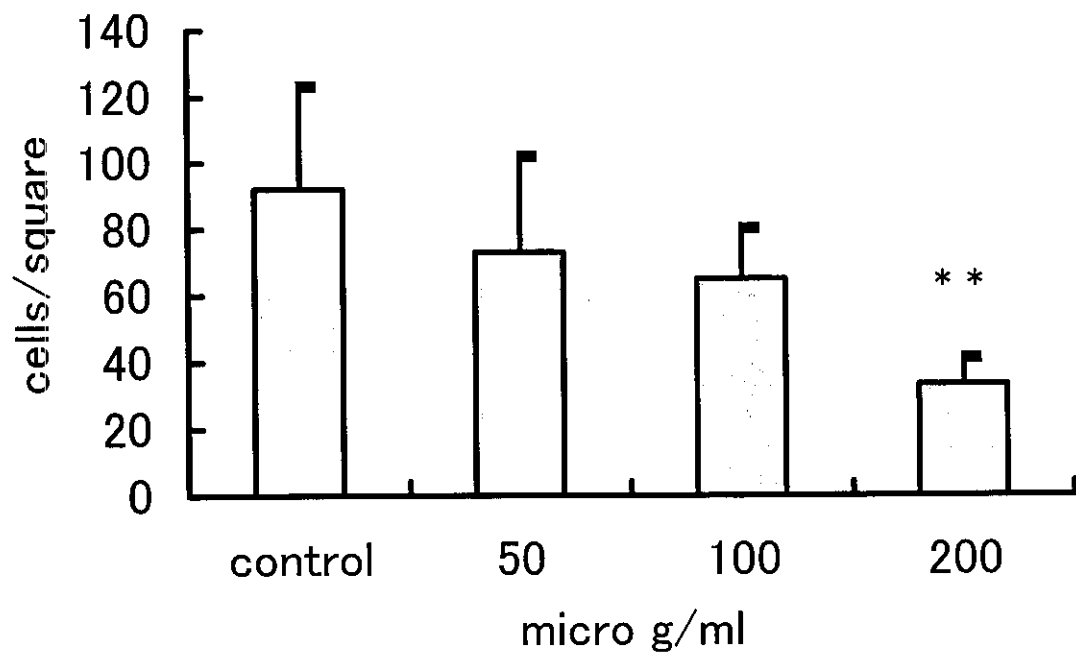
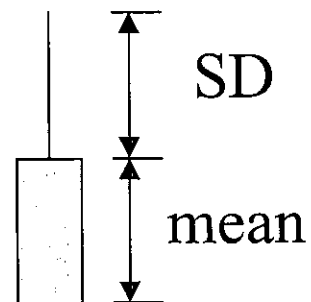


图2. Cell viability (Day 1).

Results were tested with Mann-Whitney's U-test. **: $p < 0.01$



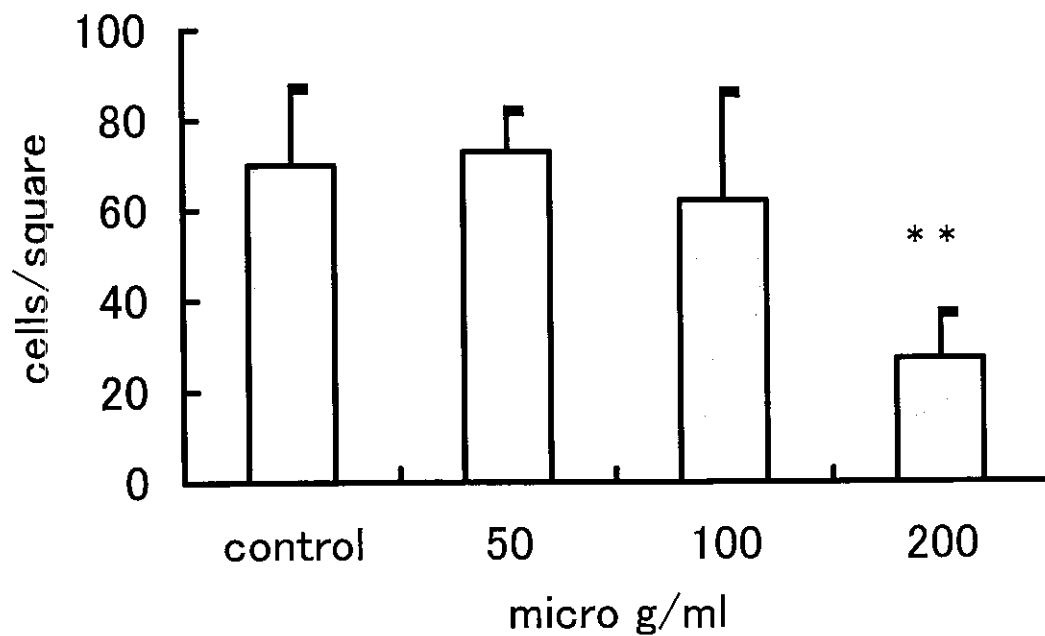


图3. Cell viability (Day 2).

Results were tested with Mann-Whitny's U-test. **: $p < 0.01$

