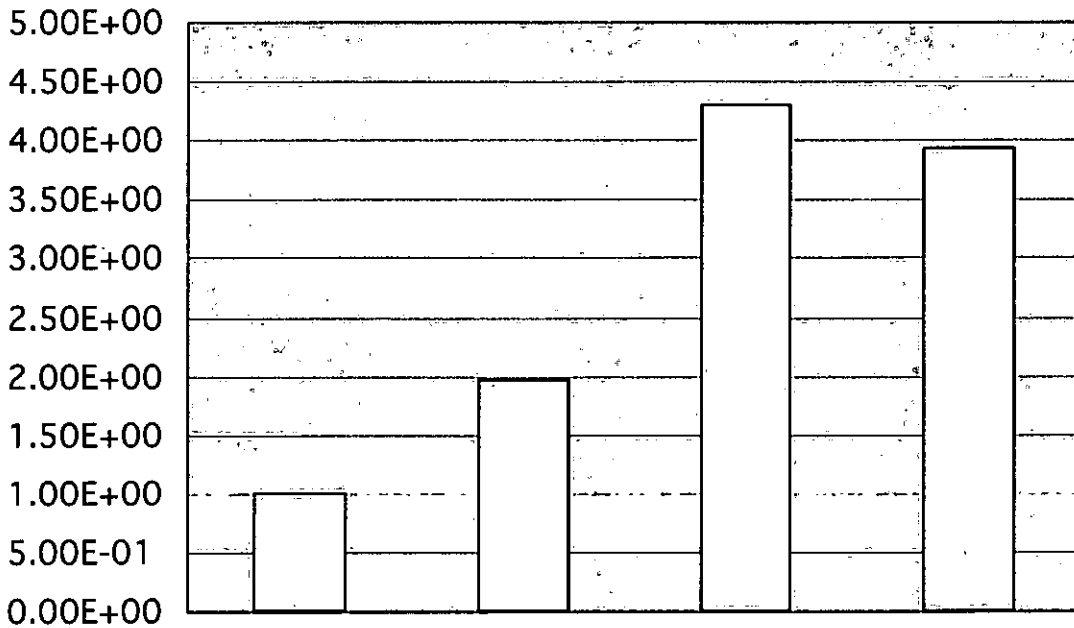


現のピークを迎える遺伝子として Serpine1, EST (AW558171), Hnf4, Oncogene-related (OR), Rassf1, Sap30, Txnip, Zfp3611, Gadd45b, Nfe2l2 の 10 遺伝子が観察された。特に OR, Rassf1 は 2 時間に激しく誘導された後、4 時間後には定常レベルに回復した。

(2)恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討

低酸素と E2 または TGF による同時刺激の影響による VEGF の発現量の変化を観察するために行ったリアルタイム RT-PCR の結果は、定常酸素下で何も作用させなかった群の平均値 (各群 4well) で各群の平均値を割ったもので表した。VEGFmRNA の発現量は、低酸素刺激 (2%) によって、定常酸素濃度下 (約 20%) と比べて 1.96 倍増加していた (図 10)。

図10 MCF-7における低酸素刺激とE2によるVEGF mRNA発現量の変化

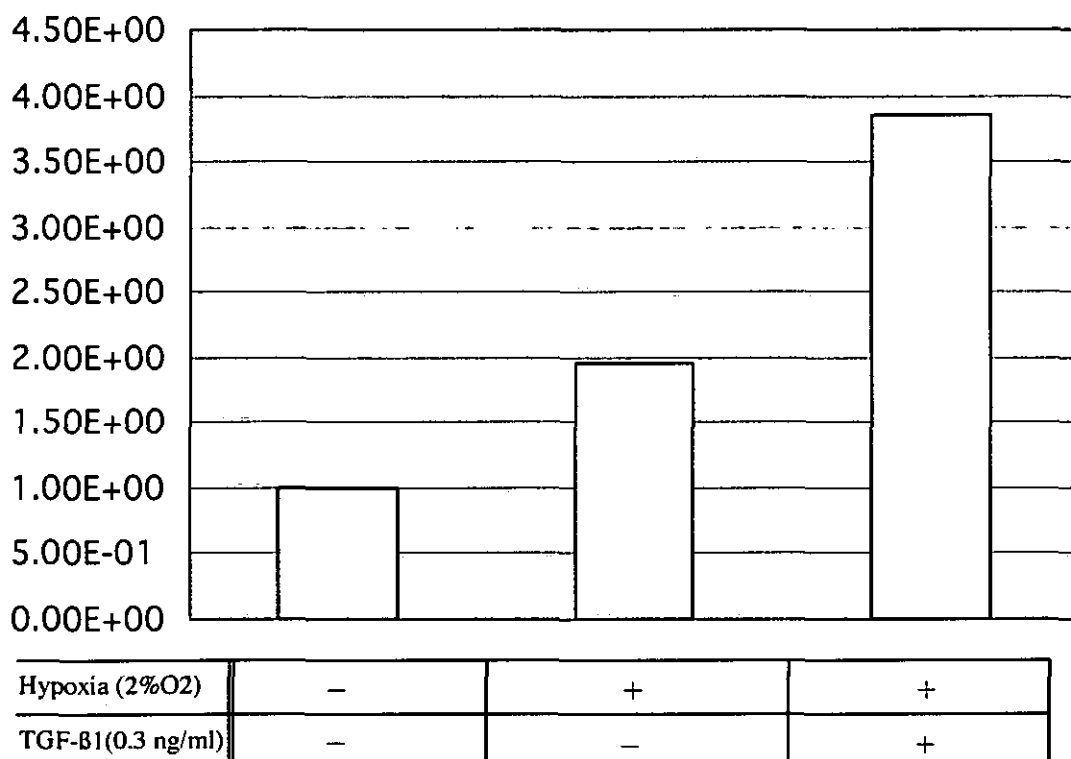


Hypoxia (2%O2)	-	+	+	+
E2 (10 nM)	-	-	+	+
ICI182780 (1μM)	-	-	-	+

これに、Estradiol の作用が加わると、定常酸素濃度下と比べて VEGFmRNA の発現において 4.3 倍の増加が見られた (図 1)。この効果は、過去に報告されているように、Estrogen Receptor の特異的なアンタゴニス

トである ICI182780 (TOCRIS, 1μM) によって抑制されなかった。一方、低酸素下の MCF-7 に TGF-β1 を作用させた群では、低酸素下では 3.86 倍の発現量の増加が観察された (図 11)。

図11 MCF-7における低酸素刺激とTGF-β1によるVEGF mRNA発現量の変化



他に、reference gene としてヒト glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) やヒト acidic ribosomal phosphoprotein P0 (RPLP0) の発現量を測定する系を準備した。GAPDH のプライマーは、GAPDH mRNA の部分配列 (24-95、72 bp) に対して、RPLP0 のプライマーは、RPLP0 mRNA の部分配列 (119-189、71 bp) に対してそれぞれ設計した。各スタンダー

ドは、その標的配列を含む部分配列を、RT-PCR を用いて増幅したものをテンプレートとして希釈して用いた。GAPDH は、本実験では低酸素刺激や外因性因子の影響を受けてその発現量が変化し、図 10 や 11 で見られるような VEGF mRNA の発現量の変化と似たパターンでその発現量の変化が観察された。一方、RPLP0 は、GAPDH と異なり、各群でほぼ一定の値を示した。

表3 使用したオリゴヌクレオチド・プライマー配列

Genes	Oligonucleotide	Sequence	PCR product size (bp)
VEGF	Upper primer	5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3'	109
	Lower primer	5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGA-3'	
GAPDH	Upper primer	5'-CAACGGATTTGGTTCGTATTGG-3'	72
	Lower primer	5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3'	
RPLP0	Upper primer	5'-TGCAGCAGATCCGCATGT-3'	71
	Lower primer	5'-CTTGCGCATCATGGTGTTCCT-3'	

使用したプライマー配列は、表3に示した。

さらに、低酸素下で VEGF の発現量を増加させる報告のある他の外因性因子の選択も行った。候補としては、Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB (R&D SYSTEMS、10ng/ml)、Insulin-like growth factor-I (IGF-I) (R&D SYSTEMS、100ng/ml)、Basic fibroblast growth factor (bFGF) (R&D SYSTEMS、3ng/ml)を選択した。PDGF-BB は、4 mM HClに0.1%HSAを加えたもので100μg/mlに、IGF-Iは、10 mM acetic acidに0.1%HSAを加えたもので100μg/mlに、そして、bFGFは、PBSに0.1%HSAと1mM DTTを加えたもので25μg/mlにそれぞれ希釈し、ストック溶液として使用時まで-20°Cで保存した。これらの因子の低酸素下における VEGF 発現量への作用条件などは、現在検討中である。

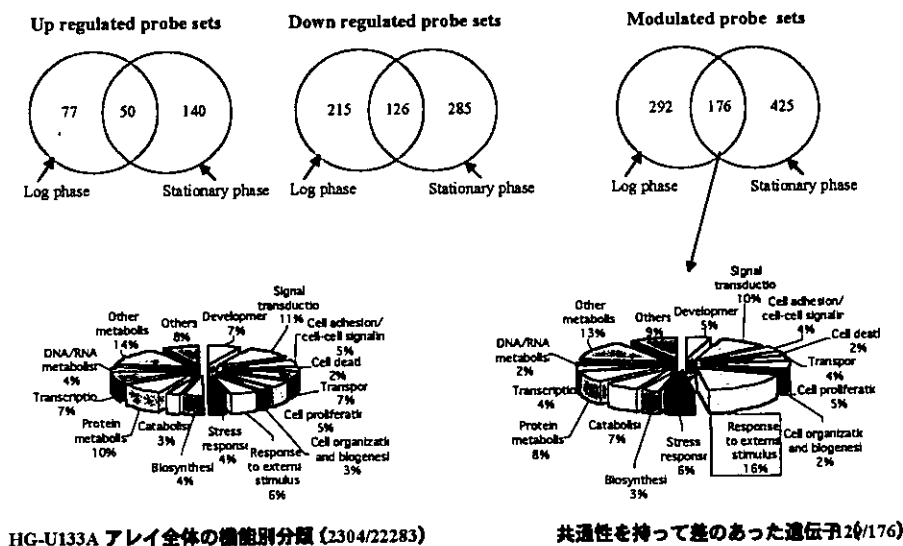
(3)HL60 細胞を使った分化に係る遺伝

子の検索

レチノイン酸及び DMSO 処理による遺伝子発現強度を、1,6,24,48 時間後における未処理細胞での遺伝子発現強度と比較することにより、それぞれの遺伝子に関する発現強度比を算出した。薬剤処理により、発現の変化する遺伝子数が多く見つかったが、分化した細胞にて発現の上昇している遺伝子には、イムノグロブリンやインターロイキン関連遺伝子が多く含まれており、分化に伴う機能変化として注目される。また、CD44 をはじめとして、6 種の血球膜抗原の発現も亢進した。さらに S-100 カルシウム結合蛋白群は、A12、A9 が発現上昇したのに対し、A8 は減少するという興味深い挙動を示した。

次に HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の比較に関して検討を行った結果、発現差のある遺伝子群を検出できた (図 12)。

図 12 HL60/HL-60RG細胞間での比較により発現差のあった遺伝子と、対数増殖期と定常期において共通性のあった遺伝子の機能による分類



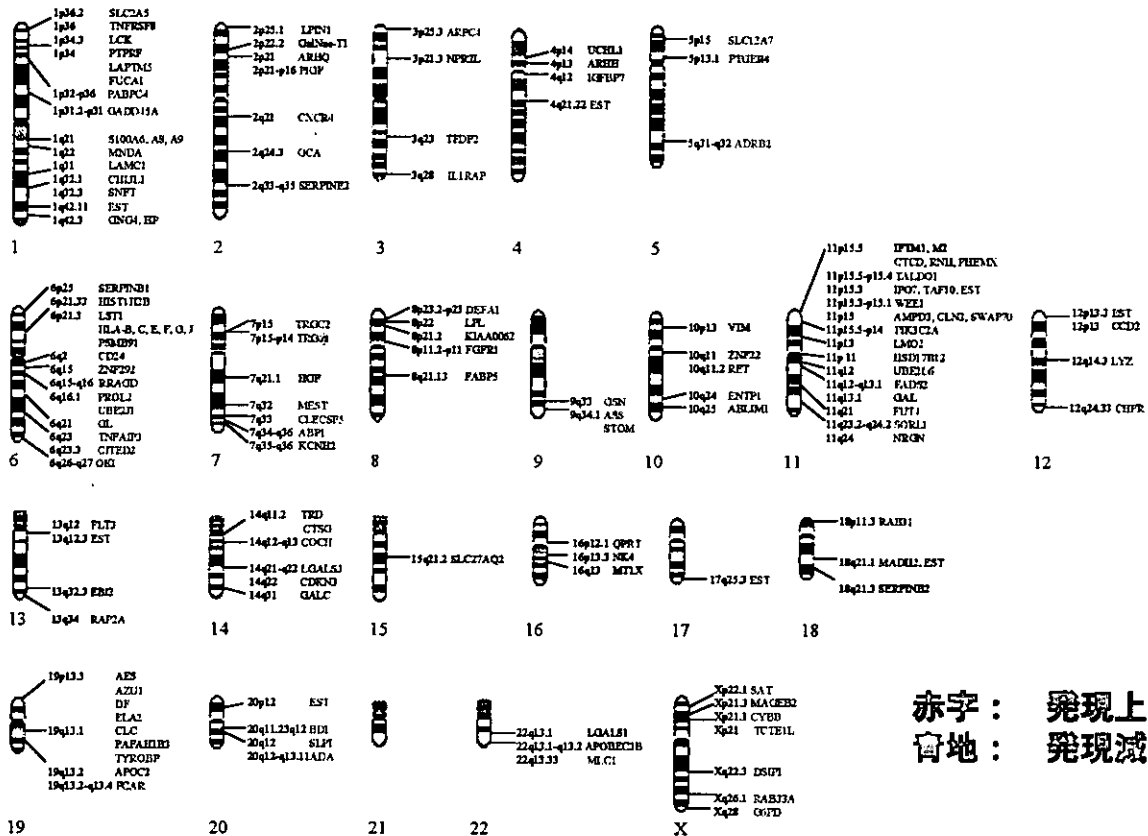
対数増殖期及び定常期の両方で発現の差が

あった遺伝子は 176 あり、これを Affymetrix

社から得られる gene ontology の情報に基づいて分類したものを、全体の遺伝子の分布と比較すると、興味深いことに外部刺激に対して応答する遺伝子群が多く含まれてい

ることがわかった。これらの遺伝子の位置情報をもとに染色体上にマップすると図 13 のように分布する。

図 13 HL-60RG株にて発現変化の見られた遺伝子の染色体上の分布



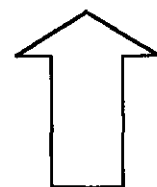
(4) 老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索

8週齢のマウスに関して検討を行った結果、老化促進マウスにて発現の上昇する遺伝子 41、減少している遺伝子 34 を特定した (表 4,5)。このうち発現の上昇した遺伝子としては、melanoma antigen が注目される。また、減少した遺伝子としては、特に変化の大きかった遺伝子である transthyretin に注

目した。transthyretin はアルツハイマー病などの原因とされる beta-amyloid タンパクの沈着を防ぐ働きが知られている。Transthyretin は、GeneChip に搭載されている塩基配列の位置が異なる 3 種類のプローブ全てで、SAMR1 と比較して 1/8、1/10、1/14 と発現減少で一致し、再現性が確認できた。また real time PCR による検討の結果も、約 1/50 の発現減少で一致した。

表4 老化促進マウスの海馬で発現の上昇した遺伝子

Flags	SAMR1	Ratio	Flags	SAMP8	Gene Name
A	2	202.73	P	304	melanoma antigen
A	8	61.15	P	495	melanoma antigen, 13D
A	29	37.10	P	1080	chemokine (C-C motif) ligand 9
A	4	31.51	P	117	lysozyme
A	7	15.51	P	115	histocompatibility D region locus*
A	1	13.29	P	9	RIKEN cDNA0610009D07 gene
A	12	11.25	P	137	xanthine dehydrogenase
P	116	8.15	P	947	unknown EST, full insert sequence.
A	18	7.09	P	126	VonWillebrand factor homolog
A	20	6.36	P	128	RIKEN cDNA2310076021 gene
A	93	5.19	P	484	RIKEN cDNA2810477H02 gene
A	134	4.16	P	556	phosphatidylinositol 3-kinase class O
A	125	3.93	P	489	galactosylceramidase
A	14	3.92	P	53	RIKEN cDNA1110018N24 gene
A	155	3.88	P	603	phosphatidylinositol 3-kinase class O
A	31	3.66	P	112	cadherin 1
P	296	3.62	P	1070	RIKEN cDNAD130027G05 gene
A	131	3.60	P	471	angiotensinogen
P	29	3.47	P	100	ATP-binding cassette, family B (MDR/TAP), member 1A
P	19	3.36	P	62	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase short chain
P	27	3.32	P	91	beclin1 (coiled coil, myosin-like BCL2 interacting protein)
A	18	3.11	P	56	fibromodulin
A	28	3.05	P	85	RIKEN cDNA2810431B21 gene
A	20	3.00	P	61	X-linked lymphocyte regulated 3a
A	11	2.99	P	34	similar to zinc finger protein 113
A	25	2.98	P	74	proline serine threonine phosphatase interacting protein 2
A	25	2.96	P	74	Mus musculus clone IMAGE:5364905, mRNA, partial
P	790	2.94	P	2320	cadherin 1
P	79	2.93	P	233	transmembrane superfamily member 1
A	31	2.92	P	89	mitogen activated protein kinase kinase kinase 5
A	154	2.92	P	448	cadherin 1
P	77	2.81	P	215	Mus musculus proteasome beta subunit C5 (Psmb1)
A	61	2.73	P	166	methyl CpG binding domain protein 4
A	71	2.68	P	191	N-deacetylase-1 sulfotransferase (heparan glucosaminyl)
P	114	2.62	P	298	microfibril associated protein 1
A	15	2.61	P	39	RAD54 like (S. cerevisiae)
A	77	2.58	P	198	Mus musculus clone MGC:6827 IMAGE:2649084
A	49	2.57	P	127	adenylate cyclase 7
P	44	2.53	P	112	myelin basic protein expression factor 2, repressor
P	463	2.53	P	1172	RIKEN cDNA2810477H02 gene
P	381	2.51	P	956	HYPOTHETICAL 19.1 KDA PROTEIN (MAL2 PROTEOLIPID)



>2.5
41 gene

表5 老化促進マウスの海馬で発現の減少した遺伝子

Flags	SAMR1	Ratio	Flags	SAMP8	Gene Name
P	153	0.02	A	3	ESTs, Moderately similar to S12207 hypothetical protein (B2 element)
P	313	0.02	A	7	histocompatibility L region
P	686	0.05	A	32	histocompatibility D region locus
P	8679	0.07	P	646	transthyretin
P	64	0.08	A	5	RB1-inducible colledoll 1
P	12072	0.10	P	1203	transthyretin
P	4829	0.12	P	583	transthyretin
P	350	0.13	P	44	SRY-box containing gene 11, full insert sequence.
P	71	0.19	A	13	Zinc finger protein 68
P	1427	0.21	P	296	RIKEN cDNA2700089E24 gene
P	87	0.23	A	20	ActAbinding protein 3
P	74	0.23	A	17	ribosomal protein S6
P	219	0.24	A	52	mitogen-activated protein kinase5
P	206	0.25	P	51	similar to chromosome 1 open reading frame 27
P	25	0.25	A	6	kinesin family member 10
P	697	0.25	P	176	DNA segment Chr 6, Wayne State University 157, expressed
P	810	0.25	A	206	endometrial bleeding associated factor
P	243	0.26	A	63	RIKEN cDNA1500015010 gene
P	951	0.29	P	278	protein phosphatase, regulatory (inhibitor) subunit 1A
P	1709	0.30	P	511	paternally expressed 3
P	75	0.30	A	23	Fc receptor IgG low affinity b
P	167	0.31	A	52	Mouse endogenous urinemic cell focus forming (MCF) envelope protein
P	170	0.31	P	54	ESTs
P	202	0.32	A	65	gamma glutamyl carboxylase
P	3364	0.34	P	1144	erythroid differentiation regulator
P	1025	0.35	P	358	RIKEN cDNA2810443J12 gene
P	688	0.36	P	250	similar to chromosome 1 open reading frame 27
P	154	0.36	A	56	Mouse endogenous urinemic cell focus forming (MCF) envelope protein
P	137	0.37	P	51	RIKEN cDNA2810439M05 gene
P	493	0.38	A	186	blocked early in transport 1 homolog (visia) like
P	45	0.38	P	17	filaggrin
P	52	0.39	A	20	RIKEN cDNA2900009I07 gene
P	228	0.40	P	90	ribosomal protein S25
P	189	0.40	M	75	Rab38, member of RAS cogen family



<2.5
34 gene

D. 考察及び今後の展望

(1) モデルとしての Circadian rhythm 及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群の解析に関する研究

まず、恒常性を維持する機構の一例として、化学物質投与などとは非依存的な circadian rhythm について解析を行った。ヒトやマウスには、1 日を一周期とするリズムが認められる。この現象は光等、外界からの時間的な刺激がない定常状況下でも認められることから、生体内には自立的にリズムを発振する機能が存在していると考え

られている。哺乳類には視床下部の視交叉上核(SCN)に概日性リズムを発振する中枢が存在し、遺伝子発現調節を通し、ホルモン分泌や代謝等多くの生体機能の日周リズムを制御している。また、肝臓等の末梢組織にも同様の遺伝子発現調節がみられ、ローカルな時計として機能している。このような中枢・末梢系における体内時計により生体の恒常性を維持している。実際、Bmal, Clock, Per, Cry, E4bp4 などの遺伝子が発現調節され、circadian rhythm を維持していることが知られている。SCN において Bmal,

Clock はヘテロダイマーを形成し、E-box 配列(CACGTG)に結合、各種の遺伝子の転写を促進する。これにより、Dbp 等の時計調節遺伝子(clock-controlled gene, CCG)の転写が進み、circadian rhythm に関する表現系を示す。それと同時に Per ファミリーや Cry ファミリーの転写を促進する。発現した Per, Cry はヘテロダイマーを形成し、Bmal1, Clock の転写活性化能を抑制し、Per 遺伝子の転写を抑制する。このような恒常性維持機構が Circadian rhythm で働いている(図5)。このような恒常性維持機構は肝臓でも働いていることが報告されておる。例えば、上田らは網羅的遺伝子発現解析により肝臓で周期的な遺伝子発現パターンを示す遺伝子群について報告した(Nature. 2002 Aug 1;418(6897):534-9)。代表的な遺伝子群の動きについて図6に示す。我々の系では8時間で Per, 8-24時間で Cry の発現が上昇し、Clock, E4BP4 の発現量が減少することに相当する。これらの遺伝子の発現を検討した結果、既知の報告通り、8時間に Dbp 等の CCG, Per, Cry の発現上昇が、Clock, E4bp4 の発現低下が観察された。しかし、「各時間における vehicle control に対する比」を用いて解析すると、circadian rhythm はみられなくなった(図7)。このことは、「絶対量手法」による解析に非常に大きな意義があることを示している。

今後、類した挙動を示す遺伝子がこの様にいくつか同定されており、これらを含めた発現制御回路の描出を目指し、もってこの様なアプローチのモデルケースとしたい。

次に、ダイオキシン類のレセプターである Ahr 系について検討した。Ahr はリガ

ンドである TCDD 等と結合すると aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) や HSP90 と複合体を形成し、核内に移行する。核内に移行した Ahr は aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)とヘテロダイマーを形成し、dioxin response element (DRE)に結合し、Ahrr, Cyp1a1, Cyp1b1, Nqo1 等の遺伝子の転写を促進する。発現が誘導された Ahrr は Arnt とヘテロダイマーを形成し、DRE に結合し、Ahr/ Ahnt ヘテロダイマーによる転写の活性化を阻害するネガティブフィードバックを構成する(図8)。また、TCDD は flavin containing monooxygenase 1 (Fmo1), Fmo2, Fmo3 等の遺伝子の発現を誘導することも知られている。このような、TCDD による遺伝子発現変動について解析を行った。TCDD により発現が誘導される既知の遺伝子群について検討した。図9に示したように我々の系において TCDD により誘導される既知の遺伝子に関して、濃度・時間依存的な誘導を正確にみることができた。このことは、我々の系が非常に正確に発現誘導を検討できる系であることを示している。さらに、早期に誘導・抑制が起こる遺伝子群について検討した結果、2, 4時間と早期に発現のピークを迎える遺伝子として Serpine1, EST (AW558171), Hnf4, Oncogene-related (OR), Rassf1, Sap30, Txnip, Zfp3611, Gadd45b, Nfe2l2 の10遺伝子が観察された。特に OR, Rassf1 は2時間に激しく誘導された後、4時間後には定常レベルに回復した。マウスにおける TCDD の半減期は11~24日と報告されており、本実験中肝臓は常に TCDD の刺激を受け続けていると考えられる。しかし、一度誘導を受けた後、その発

現が増加する遺伝子が複数観察された。このような現象は、なんらかのネガティブ・フィードバック機構が働いているために起こると考えられる。これら 10 遺伝子について、GenomatixSuite Software (Genomatix Software GmbH)を用いてプロモーター解析を行った結果、10 遺伝子中、7 遺伝子が DRE と予測される配列を持っていることが分かった。これらの遺伝子のうち、OR, Nfe2l2 は転写因子として機能することが知られている。4, 8 時間で発現のピークを迎える遺伝子のうち Gadd45b や Nr1i3 は OR 結合配列を持つと予測され、TCDD→Ahr→OR, Nfe2l2→Gadd45b, Nr1i3 というような発現調節機構が推測される。さらに、既知のネガティブフィードバックを構成している Ahrr の発現誘導が 24 時間で濃度依存的にみられた。このように、経時的な遺伝子発現変化を検討し、プロモーター解析等の解析手法を組み合わせることで、恒常性維持機構に関連する遺伝子群の制御回路の更なる解明が期待できる。

(2)恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破壊したために起こる血管新生に関する検討

腫瘍の治療において血管新生を抑制することは、副作用の強い従来の抗癌剤にかわる新しい治療法として注目され、とくに主要な血管新生促進因子である VEGF pathway を中心にその阻害剤の開発が進んでいる。しかし、一時的に腫瘍の成長を遅らせるなどの効果を示すものの、結果的に癌が進行してしまうという問題が起こる。この原因の一つとして挙げられているのが、VEGF pathway とは独立した別の血管新生 pathway の存在である。例えば、2001 年の Nature

(vol.412, 877-844) に Endocrine gland-derived VEGF (EG-VEGF)の報告がある。これは、adrenal carcinoma において VEGF と共発現するので、adrenal carcinoma による血管新生を完全に抑制するためには、VEGF と EG-VEGF の両 pathway を抑制しなければならないというものであった。この報告からは、腫瘍特性に依存した VEGF 以外の血管新生 pathway が、それぞれの腫瘍に備わっている可能性があることが推察される。また、VEGF 産生が増強されている即ち血管新生活動が亢進した状況では、腫瘍のもつ VEGF 以外の血管新生 pathway も同じように活性化されている可能性が高いことが予想された。従って、まず *in vivo* において血管新生が亢進した状態を *in vitro* の系で再現することを試みた。一般に固形腫瘍の内部は、0.数%~1%前後といった低酸素部位がしばしば存在しており、この低酸素刺激により VEGF などの血管新生促進に関わる様々な因子の発現亢進が観察されている。さらに、エストロゲンなどの性ホルモンや種々の成長因子が VEGF 産生調節に関わっていることを示唆する報告がある。これらの報告の中で特に興味深いものは、低酸素下でこれらの VEGF 産生促進因子が腫瘍細胞に作用すると、VEGF 産生増加に相乗的に働くという報告である。そこで、本研究では、窒素を充填することで酸素濃度を 0.2%から 95%の範囲で制御することが可能な BINDER 社のインキュベーターを用いて腫瘍内の低酸素環境を模倣し、さらに、この低酸素下で培養した MCF-7 に対して、幾つかの外因性因子をそれぞれ作用させることで VEGF 産生をさらに増加させ、血管新生活動が亢進した状態とした。図 10 や

11で見られるように、低酸素刺激とエストロゲンなどの VEGF 産生促進因子による同時刺激には、MCF-7 の VEGF 発現量を顕著に増加させる効果がある。このことから、これは腫瘍細胞において血管新生活動が亢進したある一つの状態を *in vitro* で再現した系であると判断した。従って、この *in vitro* VEGF 産生亢進モデルにおいてマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行うことで、VEGF 産生亢進に伴って動く血管新生関連遺伝子の探索を行うことが可能であると考えた。

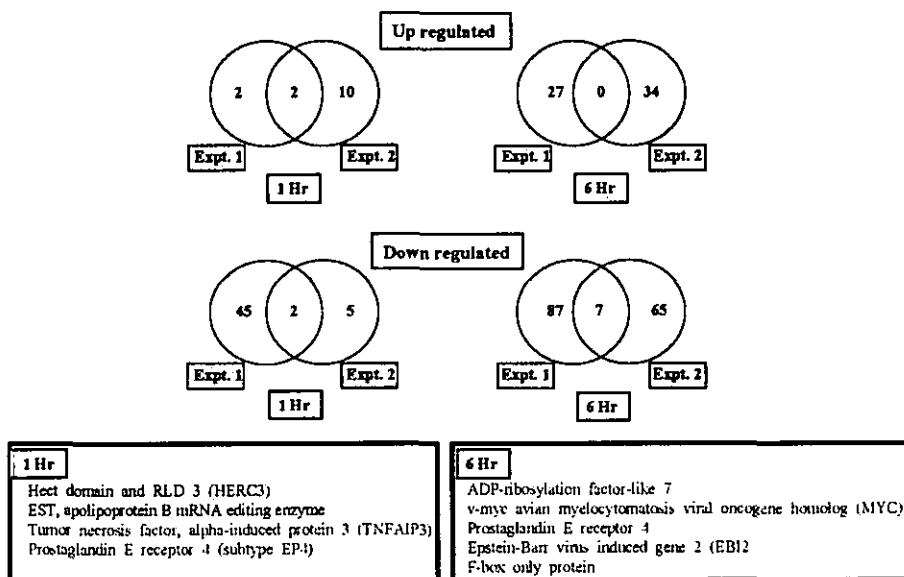
本研究では、E2 や TGF- β 1 の他に、VEGF 産生促進効果のある PDGF-BB や IGF-I、bFGF などを用いた *in vitro* VEGF 産生亢進モデルの確立も行う予定である。それぞれの状況下で VEGF 産生が促進された腫瘍細胞に網羅的遺伝子発現解析手法を適用し、その結果を比較検討することで、血管新生を亢進させる (VEGF 産生を相乗的に促進させる) 機構において共通に働く機能蛋白群や VEGF 以外に有効な血管新生 pathway に関連した遺伝子クラスターを同定できる

ことが期待される。また、組織起源の異なる腫瘍細胞を用いることで、その腫瘍に特異的な血管新生 pathway を見出すことが可能となることが考えられた。これら一連の研究結果によって、血管新生抑制の新たな分子標的や腫瘍特性に応じた治療薬の開発に展開できる分子情報、また治療に用いる血管新生抑制物質の選択などに有用な基礎的知見が得られることが期待できる。

(3)HL60 細胞を使った分化に関する遺伝子の検索

発現の下がった遺伝子としては、myeloperoxidase, eosinophil peroxidase, proteinase 3 などが含まれていた。分化のシグナルになる遺伝子変化としては比較的初期の変化が重要であると考えられるため、1 時間後と 6 時間後のデータに関して再実験を行い、再現性を確認した。その結果、図 14 に示すように、同様に変化した遺伝子を同定できたが、1 回目の実験と全く同じ動きをする遺伝子は、11 遺伝子しか見つからず、*in*

図 14 分化初期の変化としMSOとレチノイン酸で共通性を持って変化した遺伝子の実験での比較と選択された遺伝子リスト



in vitro の実験での再現性の低さが示された。

共通性を持った遺伝子に関しては、分化誘導の引き金になっている可能性があり、今後これらの遺伝子の関与について検証するため、RNAi を用いた検討を行いたい。また、HL-60 細胞と HL-60RG 細胞の比較に関して検討において、興味深いことは、比較的発現の変化している部分が染色体上に局在化しており、同じ方向へ変化していることがわかった。それぞれの細胞の核型を検討した結果、HL-60 では 6 番と 18 番のトリソミー、RG では 13 番の転座と 11 番短腕の欠失という変化が認められている。遺伝子発現変化は RG での 6 番染色体全般における発現低下など、染色体レベルでの核型の変化により説明できる部分と説明できない部分があり興味を持たれる。また、HL-60 細胞では、*double minute* (DM) 染色体の出現による *myc* 遺伝子の増幅が観察され、RG 株ではこの DM が消失していることが知られているが、今回発現解析の結果から、定常状態における両者の *myc* 遺伝子の発現量に差はなく、DM 上の遺伝子が発現していない可能性が示唆された。

(4) 老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索

Transthyretin は脳の老化防止に効果があるとされる魚油や銀杏の葉エキスを投与したマウスにおいても顕著に発現が上昇することが知られており、脳の機能維持との関係が示唆されている。*Transthyretin* は脳において *beta-amyloid* タンパクを排出する作用を持つことが知られており、この遺伝子の発現が低下することにより細胞内に *beta-amyloid* タンパクが増加して沈着し、老化

促進作用を示したと考えられる。定量的 RT-PCR による検討では、1, 3 週齢のマウスには *Transthyretin* の発現に変化がなかったことより、さらに、他の遺伝子の初期における関与も重要であると考えられた。そこで、1 週齢及び 3 週齢のマウスに関しても GeneChip を用いた同様の比較を行っている。

E. 結論

(1) モデルとしての Circadian rhythm 及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群の解析に関する研究

我々は *circadian rhythm* のように、「絶対量化手法」を用いなければマイクロアレイからは直接、検討できない遺伝子群の解析に成功した。さらに、TCDD 投与による濃度・時間的な遺伝子発現誘導を検討した結果、既知の遺伝子が確かにこの系でも誘導されていることを確認した。この方法により、多様な解析に適用しうる信頼性の高いデータが保たれることが確認された。更に、TCDD の影響解析の結果、TCDD 刺激が持続しているにもかかわらず、投与後早期に遺伝子の発現誘導がみられた後まもなく定常状態に戻る遺伝子群が存在しており、何らかのネガティブフィードバックが働いていることが示唆された。これらの新知見に対して、プロモーター解析等を行うことで、多段階の遺伝子発現調節機構を予測することが可能となった。今後、培養細胞を用いるなど、この予測のメカニズム検証を行っていく必要がある。このように「絶対量化手法」を用いた網羅的遺伝子発現解析とプロモーター解析等各種解析を組み合わ

せることにより、恒常性維持機構に関連する遺伝子群の制御回路の更なる解明が進むことが期待される。

(2)恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討

血管新生の際に生じる腫瘍細胞と血管内皮細胞間の相互作用を *in vitro* で再構築するため、表現型の異なる腫瘍細胞と HUVECs (正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) の共培養系の確立と細胞間相互作用の評価系の確立に関する実験条件の整備を図った。今後は、microarray による腫瘍細胞・血管内皮細胞間の相互作用に関連した遺伝子クラスターの同定を進め、これに関わる評価系の形成を進めると共に、腫瘍の遺伝子発現特性に応じた血管新生抑制物質の治療選択の可能性の検討、癌浸潤モデルや遠隔転移モデルを用いた腫瘍進展抑制についても考察を進める。

(3)HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索

分化誘導処理により、ある程度分化が誘導された時期においては、既に知られている分化マーカーなど、分化と関連した多くの遺伝子の変化が見つかった。しかし、分化に導くシグナルとしては、薬剤処理初期に変化する遺伝子が重要であると考えられるため、再現性を持って変化する遺伝子を調べたところ、初期の遺伝子変化に関する再現性は低かったものの、いくつかの遺伝子が候補として見つかった。また、分化能を失った HL-60 株においては、親株との間にいくつかの遺伝子発現変化があり、特に外部刺激に対して反応する遺伝子群の変化が

大きく、これらの遺伝子の変化が増殖能及び外部刺激に対する分化誘導の違いに寄与している可能性がある。

(4)老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索

老化促進マウスにおいて、海馬における transthyretin の発現が減少しており、この遺伝子は、beta-amyloid タンパクの排泄に関与していることより、その蓄積が起こることにより、機能低下及び老化が促進されている可能性が示唆された。即ち、transthyretin は海馬機能の恒常性の維持に関して重要な働きをしていると考えられる。なお、本研究は、青山学院大学の降旗教授との共同研究として行われた。

以上、(1) モデルとしての Circadian rhythm 及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群の解析に関する研究、(2)恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討、(3)HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索、(4)老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索、の各研究の結果から、網羅的解析から個別の標的に対する詳細研究に至る広い範囲に対してトキシコゲノミクス手法が有効であることが示された。これら研究が恒常性維持機構や各種の制御系の作動に際してのトランスクリプトームデータの精密化と、それらによるデータベースの高精度化に寄与する情報を提供するものと考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willileeche K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 2004 Jan 15;195(1):19-29.

Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect*. 2003 Aug;111(11):1411-20.

Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata, Madoka Nakagomi, Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Jun Kanno Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reproductive Toxicology* 18 2004 109-120

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. *Environ Health Perspect*. 2003 Sep;111(12):1550-8.

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ Health Perspect*. 2003 Sep;111(12):1530-49.

Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y. Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect*. 2003 Aug;111(11):1411-20.

Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine disruptor animal experiment- Synergism in endocrine disruptor studies, *Environmetrics* 2003, Volume 14, Issue 2,; 213-222

Kanno J, Reverse toxicology as a future predictive toxicology, T. Inoue, W.D. Pennie Eds, *Toxicogenomics*, pp.213-218, Springer-Verlag Tokyo, 2002

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kanno J, Kim DY, Fujii-Kuriyama Y, Inoue T. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. *Toxicol Sci*. 2002 Nov;70(1):150-6.

Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K. Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice. *Toxicol Lett.* 2002 Sep 5;135(1-2):145-53.

2. 学会発表

菅野 純「分子標的」と「全遺伝子トキシコゲノミクス」、がん分子標的治療研究会 2003年6月2日 東京

菅野 純、「トキシコゲノミクスの現状」、第30回トキシコロジー学会学術年会ワークショップ「プロテオミクスとトキシコゲノミクスの現状と問題点」2003年7月20日 相模原

Jun Kanno, Toxicogenomics -A phenotype independent approach-, Annual Meeting of Korean Society of Toxicology, Oct 30, 2003, Seoul, Korea

菅野 純、「トキシコゲノミクスの新展開」、第26回日本学術会議トキシコロジー研究連絡委員会シンポジウム 2003年12月3日 東京

菅野純、「IGS ラットを用いたトキシコゲノミクス」、CD(SD)IGS 研究会/研究集会 2003年12月19日 東京

Jun Kanno "Focusing on Toxicogenomics Research" The 3rd International Congress of Asian Society of

Toxicology : ASIATOX III February 1-6, 2004, Bangkok / Chiang Mai, Thailand

Jun Kanno, Aisaki Ken-ichi, Atsushi Ono, Katsuhide Igarashi "Toxicogenomics using "percellome" and "mille-feuille" data system" The Joint International Meeting of The Japanese Society of Toxicologic Pathology (JSTP) and The International Federation of Societies of Toxicologic Pathology (IFSTP) including The International Academy of Toxicologic Pathology (IATP) February 15-18, 2004, Kobe, Japan

菅野 純「Toxicogenomicsの進捗」第240回CBI学会研究講演会、2004年3月19日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

国内特許申請中 (特願 2003-317031)

別添6

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻 名	ペー ジ	出版年
Takamatsu, H., <u>Nagao, T.</u> , Ichijo, H., and Adachi-Akahane, S.	L-type Ca ²⁺ channels serve as a sensor of the SR Ca ²⁺ for tuning the efficacy of Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release in rat ventricular myocytes.	<i>J. Physiol</i>	552	415- 424	2003
Yamaguchi, S., Zhorov, B.S., Yoshioka K., <u>Nagao, T.</u> , Ichijo, H., and Adachi-Akahane, S.	Key roles of Phe ¹¹² and Ser ¹¹⁵ in the pore-forming IIIIS5-S6 linker of L-type Ca ²⁺ channel α_{1C} subunit (Ca _v 1.2) in binding of dihydropyridines and action of Ca ²⁺ channel agonists	<i>Mol. Pharmacol.</i>	64	235- 248	2003
Kobayashi, H., Miwa, T., <u>Nagao, T.</u> , Adachi-Akahane, S.	Negative modulation of L-type Ca ²⁺ channels via β -adrenergic receptor stimulation in guinea-pig detrusor smooth muscle cells.	<i>Eur. J. Pharmacol.</i>	470	9-15	2003
Hagiwara, M., Adachi-Akahane, S., and <u>Nagao, T.</u>	High affinity binding of [³ H]DTZ323 to the diltiazem-binding site of L-type Ca ²⁺ channels.	<i>Eur. J. Pharmacol</i>	466	63-71	2003
K. Tashiro, <u>T. Nagao</u> , H. Kurose, H. Ichijo, and <u>T. Urushidani</u> .	Role of Rho in rabbit parietal cell.	<i>J. Cell. Physiol.</i>	197	409- 417	2003
J. Matsukawa, K. Nakayama, <u>T. Nagao</u> , H. Ichijo, and <u>T. Urushidani</u> .	Role of ADP-ribosylation factor 6 in gastric acid secretion.	<i>J. Biol. Chem.</i>	278	36470 - 36475	2003
Sehata S., Teranishi M., Yamoto T., Matsunuma N. and <u>Doi K.</u>	T-2 toxin-induced toxicity in pregnant rats - Histopathology and gene expression profiles -	<i>Mycotoxins</i>	54	in press	2004
Yamauchi H., Katayama K., Ueno M., Uetsuka K., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	Involvement of p53 in 1- β -D-arabinofuranosylcytosine-induced trophoblastic cell apoptosis and impaired proliferation in rat placenta.	<i>Biol. Reprod.</i>	70	in press	2004

Sehata S., Kiyosawa N., Sakuma K., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Uetsuka K., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	Gene expression profiles in pregnant rats treated with T-2 toxin.	Exp. Toxicol. Pathol	55	in press	2004
Woo G.H., Katayama K., Bak E.J., Ueno M., Yamauchi H., Uetsuka K., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	Effects of prenatal hydroxyurea-treatment on mouse offsprings.	Exp. Toxicol. Pathol.	55	in press	2004
Woo G.H., Katayama K., Jung J.Y., Uetsuka K., Bak E.J., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	Hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in the mouse fetal tissues.	Histol. Histopatho l.	18	387- 392	2003
Ejiri N., Katayama K. and <u>Doi K.</u>	Induction of CYP3A1 by dexamethasone and pregnenolone-16 α -carbonitrile in pregnant rat and fetal livers and placenta.	Exp. Toxicol. Pathol	54	273- 280	2003
Takai H., Katayama K., Uetsuka K., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain.	Exp. Mol. Pathol.	75	89-94	2003
Takai H., Katayama K., Yasoshima A., Uetsuka K., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	NMDA-induced apoptosis in the developing rat brain.	Exp. Toxicol. Pathol.	55	33-37	2003
Michishita M., Ikeda T., Nakashiba T., Ogawa M., Tashiro K., Honjo T., <u>Doi K.</u> , Itohara S. and Endo S..	A novel gene, Btcl1 containing CUBand LDLa domains is expressed in restricted areas of mouse brain.	Biochem Biophys. Res. Comm	306	680- 686	2003
Yamauchi H., Katayama K., Yasoshima A., Uetsuka K., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	1- β -D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C)-induced apoptosis in the rat fetal tissues and placenta.	J. Toxicol. Pathol.	16	223- 230	2003
Ito K., Kajikawa S., Nii A., Hanada T. and <u>Doi K.</u>	Antioxidants suppress nitrofurazone-induced proliferation of hepatocytes.	Exp. Toxicol. Pathol	55	247- 250	2003
Okada T., Uetsuka K., Yamauchi H., Tani Y., Endo K., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	Effects of exogenous growth hormone (GH)-treatment on carbon tetrachloride (CCl ₄)-induced acute liver injury in GH-deficient Mini rats.	J. Toxicol. Pathol	16	49-57	2003
Suzuki K., Kanabayashi T., Nakayama H. and <u>Doi K.</u>	Kinetics of chemokines and their receptors in mercuric chloride-induced tubulo-interstitial lesions in Brown Norway rats.	Exp. Mol. Pathol.	75	58-67	2003
Ichida, K., Hosoyamada, M., Kimura, H., Takeda, M.,	Urate transport via the human PAH transporter hOAT1 and its gene	Kidney Int.	63	143- 155	2003

Utsunomiya, Y., Hosoya, T., <u>Endou, H.</u> :	transporter hOAT1 and its gene structure.			155	
Khandang, S., Takeda, M., Babu, E., Noshiro, R., Onozato, M.L., Tojo, A., Enomoto, A., Huang, X.L., Narikawa, S., Anzai, N., Piyachaturawat, P. and <u>Endou, H.</u>	Interaction of human and rat organic anion transporter 2 with various cephalosporin antibiotics.	Eur. J. Pharmacol	465	1-7	2003
Okubo, M., Yamada, K., Hosoyamada, M., Shibasaki, T. and <u>Endou, H.</u>	Cadmium transport by human Nramp 2 expressed in <i>Xenopus laevis</i> oocytes.	Toxicol. Applied Pharmacol	187	162-167	2003
Enomoto, A., Takeda, M., Taki, K., Takayama, F., Noshiro, R., Niwa, T. and <u>Endou, H.</u> : I	Interactions of human organic anion as well as cation transporters with indoxyl sulfate.	Euro. J. Pharmacol.	466	13-20	2003
Satoh, H., Moriyama, N., Hara, C., Yamada, H., Horita, S., Kunimi, M., Tsukamoto, K., Iso-o, N., Inatomi, J., Kawakami, H., Kudo, A., <u>Endou, H.</u> , Igarashi, T., Goto, A., Fujita T and Seki G:	Localization of Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ cotransporter (NBC-1) variants in rat and human pancreas.	Am J. Physiol. Cell Physiol.	284	C729-C737	2003
Kanai, Y. and <u>Endou, H.</u>	Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity.	J. Toxicol. Sci.	28	1-17	2003
Hasegawa, M., Kusuhara, H., <u>Endou, H.</u> and Sugiyama, Y.	Contribution of organic anion transporters to the renal uptake of anionic compounds and nucleoside derivatives in rat.	J. Pharmacol. Exp. Ther.	305	1087-1097	2003
Jutabha, P., Kanai, Y., Hosoyamada, M., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Iribe, Y., Babu, E., Kim, J.Y., Anzai, N., Chatsudhipong, V. and <u>Endou, H.</u>	Identification of a novel voltage-driven organic anion transporter present at apical membrane of renal proximal tubule.	J. Biol. Chem.	278	28930-27938	2003
Hosoya K, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, Saeki S, Kanai Y, <u>Endou, H.</u> , Naito M, Tsuruo T, Terasaki T.	Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment.	J Pharmacol Exp Ther.	302	225-231	2003
Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Wakita N, Adachi M, Nonoguchi H, Kitamura K, Hosoyamada M, <u>Endou, H.</u> , Tomita K.	Two male siblings with hereditary renal hypouricemia and exercise-induced ARF.	Am J Kidney Dis.	42	1287-92	2003
Babu E, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim do K, Iribe Y, Tangtrongsup S, Jutabha P, Li Y, Ahmed N, Sakamoto	Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid	J Biol Chem.	278	43838-45	2003

S, Anzai N, Nagamori S, <u>Endou H.</u>	transporters.				
Kim GH, Na KY, Kim SY, Joo KW, Oh YK, Chae SW, <u>Endou H.</u> , Han JS.	Up-regulation of organic anion transporter 1 protein is induced by chronic furosemide or hydrochlorothiazide infusion in rat kidney.	Nephrol Dial Transplant	18	1505-11	2003
Alebouyeh M, Takeda M, Onozato ML, Tojo A, Noshiro R, Hasannejad H, Inotaomi J, Narikaw S, Huang XL, Khandang, Anzai N, and <u>Endou H</u>	Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites.	J Pharmacol sci.	93	430-436	2003
Yoon JH, Kim YB, Kanai Y, <u>Endou H.</u> and Kim DK	Sequential Increases in 4F2hc expression during DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis.	Anticancer Res.	23	3877-3882	2003
Takeda M, Norshio R, Onozato ML, Tojo A, Hasannejad H, Hang XL, Narikawa S and <u>Endou H.</u>	Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors.	Eur. J. Pharmacol.	483	133-138	2004
Sakata T, Anzai N, Shin HJ, Norhiro R, Hirata T, Yokoyama H, Kanai Y and <u>Endou H.</u> :	Novel single nucleotide polymorphisms of organic cation transporter 1 (SLC22A1) affecting transport functions.	Biochem Biophys Res Comm.	313	789-793	2004
Koepsell H, <u>Endou H.</u>	The SLC22 drug transporter family.	Pflugers Arch.	447	666-76.	2004
Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, <u>Endou H.</u> , Kanai Y.	CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters.	Pflugers Arch.	447	532-42	2004
Hasannejad H, Takeda M, Taki K, Jung SH, Babu E, Jutabha P, Khandang S, Aleboyeh M, Onodera ML, Tojo A, Enomoto A, Anzai N, Narikawa S, Huang XL, Niwa T, <u>Endou H.</u>	Interactions of human organic anion transporters with diuretics.	J Pharmacol Exp Ther.	308	1021-29	2003
<u>遠藤 仁</u> , <u>宮崎博喜</u> , <u>安西尚彦</u> :	新規尿酸トランスポーターURT1の同定と尿酸研究の現状	蛋白質核酸酵素	48	18-25	2003
Shibata, H., Iimuro, M., Uchiya, N., Kawamori, T., Nagaoka, M., Ueyama, S., Hashimoto, S., Yokokura, T., Sugimura, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	Preventive effects of cladosiphon fucoidan against Helicobacter pylori infection in mongolian gerbils.	Helicobacter	8	59-65	2003
Kawamori, T., Uchiya, N.,	Enhancement of colon carcinogenesis by	Carcinogen	24	985-	2003

Sugimura, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	prostaglandin E ₂ administration.	esis		990	
Kitamura, T., Itoh, M., Noda, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimura, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	Combined effects of prostaglandin E receptor subtype EP ₁ and subtype EP ₄ antagonists on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice.	Cancer Sci.	94	618-621	2003
Mutoh, M., Matsui, H., Takahashi, M., Takamura-Enya, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	Suppression of transcriptional activity of gene promoter for cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in colon cancer cells.	American Chemical Society	851	100-121	2003
Niho, N., Takahashi, M., Kitamura, T., Shoji, Y., Itoh, M., Noda, T., Sugimura, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands.	Cancer Res.	63	6090-6095	2003
Matsubara, S., Shibata, H., Ishikawa, F., Yokokura, T., Takahashi, M., Sugimura, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	Suppression of Helicobacter pylori-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils	Biochem. Biophys. Res. Commun.	310	715-719	2003
Takahashi, M., Mutoh, M., Shoji, Y., Kamanaka, Y., Naka, M., Maruyama, T., Sugimura, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	Transfection of K-ras ^{4wt2} cDNA markedly elevates IL-1 β - and lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase expression in rat intestinal epithelial cells.	Oncogene	22	7667-7676.	2003
Niho, N., Takahashi, M., Shoji, Y., Takeuchi, Y., Matsubara, S., Sugimura, T., <u>Wakabayashi, K.</u>	Dose-dependent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Min mice by pioglitazone, a PPAR γ ligand.	Cancer Sci.	94	960-964	2003
Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, <u>Kanno J</u> , Kim DY, Willilleeche K, Inoue T.	Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells.	Toxicology	195	19-29	2004
Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, <u>Kanno J</u> , Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y.	Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue.	Environ Health Perspect.	111	1411-20	2003
Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata, Madoka Nakagomi,	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR	Reproductive	18	109-120	2004

Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, <u>Jun Kanno</u>	mice.	Toxicology			
<u>Kanno J.</u> , Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W.	The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: coded single-dose studies.	Environ Health Perspect.	111	1550- 8	2003
<u>Kanno J.</u> , Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W.	The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies.	Environ Health Perspect.	111	1530- 49	2003
Matsunaga N, <u>Kanno J.</u> , Yoshimura I	A statistical method for judging synergism: Application to an endocrine disruptor animal experiment- Synergism in endocrine disruptor studies	Environmet rics	14	213- 222	2003