

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

目 次

第3分野

課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究	頭金正博 …… 67
926A KH31037	多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

第4分野

929A KH41039	ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
研 究 者 井上 達

研究要旨 創薬過程での前臨床試験で予知が困難な毒性を cDNA マイクロアレイを用いて簡便に予知することを目的とし、造血器系や、肝・腎などに対する希少毒性を対象に、標識分子を探索した。検討により、それらの臓器における希少毒性に対応した遺伝子群が浮上してきた。

分担研究者

日本ロシュ 前臨床科学研究部 (現：中外製薬 (株) 鎌倉研究所 前臨床研究第二部) 井上智彰

A. 研究目的

本研究の目的は、創薬過程での前臨床試験で予知が困難で、特殊なアッセイ系のみではじめて予知可能であったような、造血器、特に造血幹細胞に対する障害、或いは肝・腎などに対する希少毒性を、cDNAマイクロアレイを用いて簡便に予知する標識分子の探索や探索法などの方策を探ることにある。まず、造血細胞は、未分化な造血前駆細胞からさまざまな分化系列の細胞を含む。このため、従来の末梢血のモニターだけでは、前駆細胞に局限した潜在性の障害や、前駆細胞への障害性の波及度を予知することは困難で、しばしば臨床試験に至って初めてそれらが認識されることが少なくなかった。また、肝細胞や腎臓の尿細管細胞の培養系を用いて毒性を予測する場合、従来の方法では特異酵素の逸脱やミトコンドリア活性を指標とした生存細胞数などをパラメータとしてきたが、この従来の方法では、1つまたは数種類のパラメータしか同時に評価できないので、そのメカニズムや標的に至る正確な細胞障害性の本質が見落とされがちであった。そこで、ここではcDNAマイクロアレイを用いて、考えられる障害性の可能な限り広範な対象を念頭に置いた網羅的な遺伝子発現を把握することによって、一見すると毒性指標とは思われないような通常の遺伝子発現を若干上回る（下回る）レベルの包括的な遺伝子発現影響を毒性発現スペクトラムとして把握し、これらを通じてメカニズムや標的の評価も視野に入れた、これまで見落とされがちであった多面的な毒性の評価を可能とする予知技術を確立する方策を探った。

造血毒性に関しては、国立衛研が中心となり、明らかな遺伝子毒性物質であるところのベンゼンの、野生型マウスにおけるエピジェネティックな発がん機構と、p53欠失マウスでの遺伝子毒性発が

ん機構という、特異な白血病発症機構に着目し、ベンゼンの吸入暴露時の、造血前駆細胞の遺伝子発現変化を野生型マウスとp53欠失マウスとで経時的に測定し、細胞動態関連分子を中心に関連遺伝子の検索を行う。

肝・腎などでの希少毒性に関しては、肝毒性及び腎毒性の予測を行うことを究極的な目的として、日本ロシュ（現：中外製薬（株）、平成14年10月1日より、合併による社名変更）が中心となって進めている。即ち、①ラット実質肝細胞及び腎細胞の培養系を樹立し、②培養条件による発現遺伝子のプロファイルを把握し、③それぞれの毒性が既にしられているreference chemicalに対する応答遺伝子発現プロファイルを得、④毒性発現メカニズムに沿った共通遺伝子の抽出をもって、毒性予測性に関する検証を進めた。

B. 研究方法

① 造血毒性

ベンゼン吸入暴露：ベンゼン溶液（和光純薬）は16℃に加熱して、蒸気として、縦層流式吸入暴露チェンバー内の還流空気に混入させた。チェンバー内のベンゼンの濃度は、30分ごとに、ガスクロマトグラフィー（GC-14A、島津）にてモニターした。

ベンゼンの曝露は、1日6時間、週5日の、職業曝露を念頭に置いたスケジュールで曝露を行った。

チェンバー内は、温度24±1℃、湿度55±10%、1日12時間毎の明暗周期を維持した。

被検マウスは、チェンバー内の金網ケージにて個別飼育し、水は紫外線滅菌したものを自由摂取させた。餌は、ベンゼン曝露中のみ絶食とした。即ち、ベンゼン曝露前に餌鉢を除き、曝露後に戻すことにより、餌へのベンゼン残留の可能性を排除した。

尚、対照群（擬似 sham 曝露群）は、ベンゼンを含まない還流空気による金網ケージ、縦層流曝露チェンバー内飼育をし、飲水、給餌などの条件は曝露群と全く同様とした。

個体内造血幹細胞動態解析法(BUUV 法)：BUUV 法は、

ブロードオキシキュリジン (Sigma, MO, USA) の浸透圧ミニポンプ (Alza, CA, USA) によるマウス個体への持続投与後、そのマウスの骨髄細胞を *ex vivo* で近紫外線を照射する事による細胞周期内細胞の淘汰と、その後のコロニーアッセイによる生残コロニーの比率によって周期内造血幹細胞比率を求める方法であり、造血幹細胞レベルでの細胞動態を正しく把握する従来にない解析手段である。

即ち、BrdUrd 溶液を充填した浸透圧ミニポンプを、マウスの背部皮下に移植して、細胞回転分画にある細胞を標識し、1~5 日後に大腿骨を採取する。この大腿骨を、27G 針を使って DMEM 溶液で洗浄し、中の骨髄細胞を単細胞浮遊液として回収する。4×10⁶ cells/mL の濃度に調整した細胞浮遊液を、平底の容器に 2 個に分注し、一方に近紫外線を照射し、他方はそのまま、培養性コロニーアッセイに供する。

培養性コロニーアッセイは、2×10⁴ cell/mL の細胞を、メチルセルロースを用いた半固形培地に、30% FCS、1% BSA、10⁻⁴ M-2ME、1ng/mL-GM-CSF を添加して、炭酸ガス培養装置 (37°C、5%CO₂) で 6 日間孵置した後に、形成されたコロニーの数を、倒立顕微鏡下で計測する。紫外線照射の有無による生残コロニー数の比率を計測し、周期内造血幹細胞比率とする。

ウエスタン解析: 被検マウスの骨髄細胞から、細胞溶解バッファー (20%SDS, 2mM-phenylmethylsulfonyl fluoride, 5mM-p-aminobenzamide, 2μM-leupeptin, 1.3μM-pepstatin) 中で、超音波粉碎して粗蛋白溶液を抽出する。これを SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し、Hybond polyvinylidene fluoride 膜 (Amersham Life Science, UK) に転写し、細胞回転関連分子の特異抗体によって、泳動された蛋白中に含まれる当該蛋白量を測定した。

網羅的発現遺伝子解析: 被検マウス骨髄細胞から、セパゾール溶液並びにキアゲンのカラムを用いて、総 RNA を抽出・精製した。**cDNA マイクロアレイ (Incyte™) による競合ハイブリダイゼーション法:** 検体は、ベンゼン暴露開始 5・12 日後、及び 5 日×2 週間の曝露後休曝 3 日目に、それぞれ各群 3 匹野生型マウスの大腿骨から採取した骨髄細胞を用いた。曝露群から抽出した総 RNA を鋳型として cDNA を合成するときに Cy5、sham 群から抽出した RNA を鋳型とした場合に Cy3 でそれぞれ標識し、両者を混合して、Incite のマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせ、蛍光強度を計測し、曝露群の sham 群に対する遺伝子発現の相対変化としての結果を得た。**Gene chip (Affymetrix) による発現遺伝子解析:** 検体は、野生型と p53 欠失マウスを用い、sham 群とベンゼン暴露 (5 日×2 週間) 群、各群 3 匹の大腿骨から採取した骨髄細胞を用いた。それぞれのマウスから抽出した総 RNA を鋳型として 2 本鎖 cDNA を合成し、さらにこれを鋳型にビオチンラベル cRNA を合成、断片化を行い、Gene chip にハイブリダイゼーションさせて解析した。Chip は、Affymetrix の mouse U74 ver.2 を用い、Affymetrix GCS/FS にて測定した。

② 肝腎毒性

腎尿細管の分離: 雄 Sprague-Dawley ラット (5~8 週齢) の腎臓を 0.19 g/l の EGTA を含む Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)、Ca, Mg free で約 1-2 分還流後、0.5 g/l コラゲナーゼ、0.17 g/l ヒアルノニダーゼを含む HBSS (分散酵素液)

で約 1-2 分還流した。腎臓を摘出後皮質の部分を分離・細切し、更にコラゲナーゼ、ヒアルノニダーゼ溶液中に於いて 37°C で約 10 分攪拌する事によって分散させた。細胞を HBSS に浮遊させ、尿細管細胞を分離するために 45% percoll で作製した密度勾配上に重層して比重遠心 (30,000g、10 分) を行い、上層の白濁部分を棄て沈降した尿細管細胞を多く含む分画を用いた。細胞は Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 (1:1) 培養液 (10% FCS, 100 ng/ml hydrocortisone 含) に浮遊させ、培養に用いた。細胞浮遊液を I 型コラーゲンコートディッシュ中で 37°C、5% CO₂ で 1 hr インキュベート後付着性の線維芽細胞を除き、腎尿細管細胞としての培養を行った。

尿細管細胞の培養: 培養は、I 型コラーゲンコートディッシュ中で 37°C、5% CO₂ で 2 日間前培養後、トリプシン-EDTA 処理で剥離し、(1) I 型コラーゲンコートプレートでの単層培養 (monolayer)、または、(2) I 型コラーゲンゲル上での単層培養 (collagen gel)、の 2 種類を行った。(1) では、市販の I 型コラーゲンコートプレート (IWAKI) に尿細管細胞浮遊液を分注し、培養した。培養開始翌日には、上皮様の形態を呈する細胞が接着し、伸展した単層の細胞層を形成した。(2) では、プレートの底に 2.3 mg/ml の I 型コラーゲンゲルを作製し、その上に尿細管細胞浮遊液を分注し、培養した。コラーゲンゲルの作製には塩酸を含む低 pH のコラーゲン溶液に 10 倍濃度の minimum essential medium (MEM) を 1/10 容量加え、中性にした後で、37°C でインキュベートすることによりゲル化させた。尿細管細胞はコラーゲンゲル上に単層に並んだが、コラーゲンコートプレートでの培養より細胞は伸展せず、細胞の高さを保った状態で並んだ。培養条件は、各培養法共に 37°C、5% CO₂、湿潤条件下で行った。

腎尿細管細胞培養系における既知の腎毒性物質への暴露: 培養条件の検討の結果、比較的遺伝子発現の変化が少ない collagen gel の条件で既知の腎毒性物質を腎尿細管細胞培養系に添加した。添加した薬物は、carboplatin (IC50: 936 μg/ml), cephaloridine (IC50: 960 μg/ml), cisplatin (IC50: 6.0 μM), cyclosporine (IC50: 61.2 μM), diclofenac sodium (IC50: 273 μg/ml), gentamicin (IC50: 14100 μg/ml), zinc sulfate (IC50: 50.7 μM) であった。濃度は上記 () 内に示したラット腎尿細管細胞 monolayer 培養系での 24 時間曝露における tetrazolium salts WST-1 アッセイによる細胞毒性評価結果から IC50 の 1/3 または 1/10 の濃度で行った。培養終了 6 時間前または 24 時間前に薬物を添加し、培養終了時に細胞を回収し RNA の分離を行った。今回の解析は、IC50 の 1/3 の濃度で 24 時間曝露の条件の結果を中心に解析を行った。**網羅的発現遺伝子解析: RNA の分離:** 培養 24 時間後に細胞を回収し、RNA の分離を行った。Monolayer 及び collagen gel 共に、培養液を除いた後に直接、分離直後 (培養前) および spheroid では上清を除いた後に、セパゾール RNAI (ナカライテスク) を加えて抽出した総 RNA を、RNeasy column (QIAGEN) にてさらに精製した。**Gene chip への Hybridization および解析:** 抽出した総 RNA を鋳型として 2 本鎖 cDNA を合成し、さらにこれを鋳型にビオチンラベル cRNA を合成、断片化を行い、Gene chip にハイブリダイゼーションさせて解析した。Gene chip は、Affymetrix の Rat Toxicology U34 Array を用い、Affymetrix GCS/FS に

で測定した。

(倫理面への配慮)

使用する実験動物の屠殺にあたっては、炭酸ガスや麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法等、苦痛の少ない方法を用いるなど、実験動物の取り扱いには、それぞれの所属研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。尚、国立医薬品食品衛生研究所の研究施設は当該のガイドラインを持ち、そのモデル施設となっている。また、本研究計画には、ヒトの検体を対象としたものを含まない。即ち、ヒトの遺伝子解析研究や、相手方の同意協力や社会的コンセンサスを必要とする研究課題又はアンケート調査等を行う研究課題などを含まない。

C. 研究結果

① 造血毒性

前年度までに、エビジェネティック発がんとしての白血病発症機序の背景にあると考えられる、ベンゼンの吸入暴露時の造血前駆細胞の細胞回転の停止と、暴露の中断による急速な細胞動態の亢進について造血動態解析法 (BUUV 法) で解析した。また、野生型マウスにおけるベンゼン曝露中及び回復期の遺伝子発現の経時変化を Incyte® のシステムによる cDNA マイクロアレイを用いて解析し、更に、より遺伝子数が多く、偽陽性に対する精度も高いとされる Affymetrix の Gene chip を用いた、ベンゼン曝露直後についての発現遺伝子変化についての解析を進めてきた。これらの経過中に、ベンゼン毒性発現メカニズムに、アリールヒドロカーボン受容体 (AhR) の関与があることが示唆されたため、本年度は、①AhR 遺伝子欠失マウスでのベンゼン毒性について検討し、ベンゼンからフェノールやヒドロキノンに代謝される経路に AhR が関与することを明らかにした。②Gene chip による野生型と p53 欠失マウスでの発現遺伝子の変化について、一部遺伝子については、定量 PCR 法などによりその発現を確認しつつ、さらに詳細に比較検討し、恒常性維持機

構の陰に隠れるような発現遺伝子についての知見を得た。

芳香族炭化水素受容体を介したベンゼン代謝

リガンド依存性に賦活化される bHLH 型の転写因子としての芳香族炭化水素受容体 (AhR) の機能について、AhR 野生型、AhR ヘミアリル欠失、AhR ホモ欠失の各マウスを用いて、研究した。その結果、ベンゼンの血液毒性は、AhR ホモ欠失マウスでは、抵抗性であることが分かった。そしてこれを裏付ける所見として、AhR ホモ欠失マウスでは、p21 の発現の上昇も観察されなかった。このマウスでベンゼンの代謝物としてのフェノールとヒドロキノンの混合物を投与すると造血障害が発生したので、このマウスでは、ベンゼン暴露によって、フェノールやヒドロキノンなどを生成する代謝機構が欠失しているものと示唆された。

マイクロアレイによる遺伝子発現変化—野生型マウスについて

細胞生物学的な種々の検討の結果、ベンゼン暴露では、代謝、遺伝毒性、細胞周期制御、ならびにアポトーシス関連の諸分子が関与していることが示唆された。これに符合して、マイクロアレイでは、これらに関連する種々の遺伝子変化が観察され、ベンゼンの血液毒性のメカニズムの全貌が明らかになった。すなわち、細胞周期関連遺伝子では、p53 や p21 に加えて、Rb 関連遺伝子として Rb-related protein p130 および Rb binding protein p48 が、それぞれ 2.68 倍、および 3.21 倍の発現の上昇、G2/M 細胞周期チェックポイントである EF 1-delta の 3.12 倍の発現上昇、またこれと逆に、G1 specific cyclin D1 や BimB のそれぞれ 0.44 倍ならびに 0.38 倍の発現低下を観察した (この他、こうした局面での変化の知られる cyclin G や Gadd45 の変化は、確認されたが、2 倍に達しない程度であった)。DNA 傷害/修復関連遺伝子では、ADP-ribosylation factor-like protein 1 (ARL-1)、Rad51 が、それぞれ 4.39 倍と 2.05 倍で観察された (p 値 : 0.014 および 0.007)。つぎに酸化的ストレス関連では、MPK2 (mitogen activated protein kinase 2) や、GST-1 や UDP glucuronosyl-transferase などの典型的な ROS (reactive oxygen species)-absorber-genes がそれぞれ 1.76 倍、1.96 倍と軽微ながら高い有意水準で観察された。

Table 1: Gene expression changes during/after benzene inhalation with/without p53 normal functions.

Change in gene expression after benzene inhalation		Category
WT	p53 KO	
No change	No change	No relationship
	Up-regulated	Leveled by WT p53 during/after the benzene inhalation
	Down-regulated	
Up-regulated	No change	Genes up-regulated during/after benzene inhalation.
	Up-regulated	Genes up-regulated during/after benzene inhalation without any correlation of the p53 gene.
	Down-regulated	Genes leveled and also up-regulated by WT p53 with some other genes during/after benzene inhalation.
Down-regulated	No change	Genes down-regulated during/after benzene inhalation.
	Up-regulated	Genes leveled and also down-regulated by WT p53 with some other genes during/after benzene inhalation.
	Down-regulated	Genes down-regulated during/after benzene inhalation without any correlation of the p53 gene.

Table 2. Major gene expression profiles observed difference between wild-type (WT) and p53 knockout (KO) mice.

Gene Name	Fold change		Accession number
	WT	KO	
aldehyde dehydrogease 4	1.07	2.44	U14390
apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)	1.16	1.75	AF064071
Bcl-2 alpha	0.91	1.66	L31532
Calcyclin	1.08	1.89	X66449
caspase-9	0.83	1.59	AB019600
caspase-9S	0.84	2.26	AB019601
caspase-11	2.49	1.22	Y13089
caspase-12	0.86	0.18	Y13090
c-fos	1.57	0.94	V00727
cyclin B1	0.85	1.48	X64713
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.06	3.34	M32599
G protein-coupled receptor (GPCR/EB11)	0.01	0.97	L31580
JNK2	1.07	1.82	AB005664
KSR1, protein kinase related to Raf protein kinase	1.11	2.57	U43585
Lactate dehydrogenase1 (LDH1)	1.13	2.34	AW123952
Lactate dehydrogenase2 (LDH2)	0.97	1.72	X51905
Metallothionein 1	4.89	0.93	V00835
Metaxin2	0.95	1.55	AF053550
mLimk1, Mus musculus protein kinase	2.67	1.18	X86569
Mph1/Rae 28, polycomb binding protein	4.97	0.06	U63386
p53, variant mRNA	1.03	0.13	U59758
p58, protein kinase inhibitor (PKI)	1.55	0.81	U28423
PERK, ER resident kinase	0.81	1.63	AF076681
PI3K catalytic subunit p110 delta	2.36	0.18	U86587
RAB17, member of RAS oncogene family	2.42	1.53	X70804
Rad50	1.23	0.40	U66887
Siva, pro-apoptotic protein	0.88	1.62	AF033115
Smad6	1.36	1.92	AF010133
serum inducible kinase (SNK)	1.68	1.02	M96163
super oxide dysmutase, Cu/Zn	1.19	1.63	M35725
tuberous sclerosis 2 (Tsc-2)	2.00	1.25	U37775
Wig-1, p53-inducible zinc finger protein	1.83	0.07	AF012923
WISP2	0.83	8.32	AF100778
Wnt-1/INT-1	1.72	1.23	M11943

この他このカテゴリーでは、発現水準の詳細は省くが、Adh4(C3h dioxin inducible cytosolic aldehyde dehydro- genase-3)、cytochrome c oxidase Vb、LDH などの発現が認められた。増殖関連遺伝子としては、hepatocyte growth factor-like protein (2.1)、fibroblast growth factor 15 (FGF-15)、FGFb、G-protein-coupled receptor (eb1)、growth factor-induced delayed early response protein、insulin-like growth factor 1 receptor precursor、insulin-induced growth response protein cl-6、TGF-beta 1、TGF-beta 1 masking protein、TNF alpha などが観察されている。最後に、がん遺伝子として、遺伝子障害性のベンゼン代謝と関連するものと考えられる RhoB が2.70 倍の発現を見た点が注目される。

マイクロアレイによる遺伝子発現変化—p53 欠失マウスとの比較

これまで、ベンゼン曝露によって p53 依存性の細胞周期停止を BUUV 法や、p53 の下流で発現制御を受ける p21^{waf1} の蛋白量増加などによって明らかにしてきた。こ

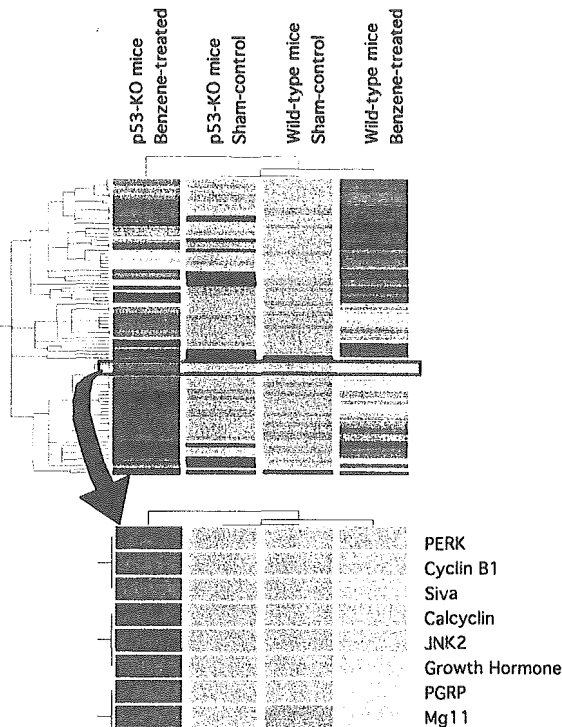
こでは、野生型マウスでのベンゼンの暴露による遺伝子発現変化を、p53 欠失マウスのそれと比較することで、p53 非依存性/依存性のシグナル経路の分別をはかり、それぞれの遺伝子の役割を解釈する術とすべく解析を行った。その結果、例えば、非依存性のシグナル経路としては、ベンゼンの代謝酵素として知られる Cyp2E1 や、Myeloperoxidase などがあげられるが、これらは、予想通り野生型でも p53 欠失マウスでも同様に増加した (Fold change : 2.13 vs.1.72, 1.68 vs.1.49)。また、細胞周期停止因子として知られ、p53 の発現にも関わる cyclin D-interacting myb-like protein (Dmp1)は、野生型でも発現が 2.01 倍に増加するが、p53 欠失マウスでは p53 の欠失状態を補うかのようにその程度がさらに増加し、2.81 倍であった。他方、依存性のシグナル経路としては、p21、Wig-1、caspase 12 など、野生型ではベンゼン曝露によってそれぞれ 1.37、1.83、2.49 倍と発現上昇がみられる遺伝子の発現は、p53 欠失マウスでは変化がないか、むしろ定常状態の発現そ

のものが見られない。さらには、乳がん細胞株の研究から p53 による発現制御が示唆されている metallothionein についても、野生型で 4.89 倍の増加を示す一方、欠失マウスでは 0.93 倍と、全く増減しないことが伺われ、先の報告と矛盾しない結果が得られた。

恒常性維持に関わる遺伝子群

さらに、野生型と p53 欠失マウスとの遺伝子発現の変動を比較することで、初めてその動きが恒常性維持機構の陰から引きずり出されるような遺伝子群が見いだされた。つまり、野生型では、ベンゼンの暴露によっても、発現が変動しない遺伝子のうち、p53 欠失マウスで、ベンゼンを暴露することで、その発現が変化する一連の遺伝子群の存在が観察された。それぞれの遺伝子機能とベンゼンによる障害性との関連には、必ずしも充分な知見が現段階であるものとは限らないが、図はその一例で、クラスター解析の結果得られた、p53 欠失マウスのベンゼン曝露でのみ発現が上昇した遺伝子を示す (PERK (AF076681), CyclinB1 (X64713), Siva (AF033115), Calcyclin (X66449), JNK2 (AB005664), Growth hormone (X02891), PGRP (AF076482), Mg11 (U15635))。また、apoptosis に関わる Caspase-9 とその抑制因子として知られる Caspase-9S は、ともに p53 欠失マウスでのみ 1.59、2.26 倍 (野生型では 0.83、0.84 倍) に増加し、p53 欠失マウス内での新たなバランスづくりの一端を垣間見ているものと解釈した。

こうした遺伝子群は、野生型マウスの体内にあつては、いわゆる恒常性維持のバランスのうえで、その発現量を全く変えないが、例えば、加齢や何らかの状態で p53 が機能不全に陥ると、思わぬ障害性が表に出てくる可能性を示唆する結果として興味深い。



図：アレイデータのクラスター解析。ベンゼン暴露によって、p53 欠失状態でのみ発現上昇が観察された遺伝子群の例。(下の拡大部分)

② 肝腎毒性

昨年度までに、ラット培養肝細胞の既知毒性物質による遺伝子発現変化を観察することを目的に、ラット肝から分離した実質肝細胞の培養条件及び培養期間による遺伝子発現の変化を調べた。更に、これらの肝細胞の培養系に既知の肝毒性物質添加による遺伝子発現変化を検討し、それぞれの肝毒性物質の、作用の特徴を反映すると考えられる遺伝子発現変動及び、肝毒性に共通した遺伝子発現変動の抽出を試みた。これらの成果をふまえ、本年度は、ラット尿細管細胞の培養系を樹立し、培養による発現遺伝子プロファイルの変動、並びに、腎毒性物質に対する応答性について検討した。

尿細管細胞培養による遺伝子発現変化

腎臓からの尿細管細胞分離の過程に培養容器への附着性の違いによる線維芽細胞の除去、既知の腎毒性物質に暴露する前の 2 日間の培養の操作が入るために、培養による遺伝子発現変化に加えて細胞種の選別による population shift による全体としての遺伝子発現変化が重なって生じていると考えられる。この理由により、単純に分離直後の腎臓皮質の遺伝子発現と培養後の細胞の遺伝子発現を比較する事によって培養による遺伝子発現変化を明らかにすることは難しい。しかしながら、培養終了時に存在する細胞での発現が増加している場合には、遺伝子発現が増加しているということがいえる。また、尿細管細胞の機能に関連した遺伝子については、発現の変化が尿細管細胞で起こっていることが推測できる。このような背景から、腎尿細管細胞の培養による遺伝子発現変化であると考えられる変化は、以下の通りであった。

- ・ 細胞増殖関連遺伝子の発現増加
- ・ ストレス関連遺伝子の発現増加
- ・ mdr 遺伝子の発現増加
- ・ 脂質代謝関連遺伝子の発現減少
- ・ グルクロン酸抱合関連遺伝子の発現減少
- ・ P450 関連遺伝子の発現減少
- ・ cMOAT 遺伝子の発現減少

また、monolayer と collagen gel の違いによる遺伝子発現変化の差は著明ではなかったが、いくつかの遺伝子において遺伝子発現変化の程度が小さい場合が認められた。

Collagen gel 培養での腎毒性物質暴露による遺伝子発現変化

Collagen gel の培養条件でラット腎尿細管細胞を既知の腎毒性物質に暴露 24 時間暴露した後の遺伝子発現の変化を Table 3 に示した。

Cisplatin (Table3a) : Cisplatin により発現が増加した遺伝子は、HSP、シャペロン関連の heat shock protein 27 (HSP 27), mitochondrial GrpE-like 1, ストレス関連の DNA-damage-inducible transcript 3, cell cycle, 細胞分裂に関与する p21 protein (cip 1), cyclin G1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 等であった。Cisplatin により発現が減少した遺伝子は、P450 関連の CYP7B1、CYP4A3、細胞分裂・癌遺伝子関連の p21 (c-Ki-ras), cdc42 homolog, BCL-X, v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog, c-jun mRNA for transcription factor AP-1, HGFR/met proto-oncogene, FGFR4, RL/IF-1, IL-1 beta converting enzyme, DNA 修復関連の DNA polymerase alpha, mismatch repair protein, 細胞内情報伝達

に関わるリン酸化酵素、グルタチオン代謝に関与する gamma-glutamyltransferase (GGT)、イオンチャンネル、トランスポーター関連の transient receptor potential melastatin-2 (TRPM-2), Na+K+ transporting ATPase alpha 1, mdr、中間フィ

ラメントのサブユニットである vimentin、金属結合タンパク質である metallothionein-2 and metallothionein-1 等であった。

Table 3a: Alterations of Gene Expression in Rat Renal Tubular Cells by Cisplatin

Up-regulated	Down-regulated
<ul style="list-style-type: none"> ● Hsp27 ● mitochondrial GrpE-like 1 ● DNA-damage inducible transcript 3 ● p21 protein (cip 1) ● Cyclin G1 ● PCNA ● c-ras-H-1 ● ras-related associated with diabetes ● extracellular signal-related kinase (ERK3) ● NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 ● ornithine decarboxylase (ODC) ● proteasome RN3 subunit ● PHAS-I, eIF4E-binding protein ● EST, moderately similar to mdm2 protein - mouse 	<ul style="list-style-type: none"> ● CYP7B1 ● CYP4A3 ● p21 (c-Ki-ras) ● cdc42 homolog (yeast) ● BCL-X ● v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) ● c-jun mRNA for transcription factor AP-1 ● HGFR/met proto-oncogene ● mismatch repair protein ● DNAPol alpha mRNA 3' end ● FGFR4 ● RL/IF-1 ● IL-1 beta converting enzyme (IL1BCE) ● PI 4-kinase ● AMP-activated protein kinase ● mitogen activated protein kinase kinase 5 (MEK5) ● protein kinase PASK ● dual specificity phosphatase, MKP-3 ● MUK (Zipper (leucine) protein kinase) ● MAP kinase kinase kinase 1 (MEKK1) ● UDP-gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase polypeptide 6 ● gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) ● carboxylesterase ● epoxide hydrolase 1 ● transient receptor potential melastatin-2 (TRPM-2) ● Na+K+ transporting ATPase alpha 1 ● N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase) ● vimentin ● peroxisome proliferator-inducible gene ● B1 repeat (1-42) from gamma crystallin ● phospholipase A2 group IV A (cytosolic, calcium-dependent) ● catecholamine-o-methyltransferase ● STase family 1A, phenol-preferring member 1 ● mdr ● metallothionein-2 and metallothionein-1 ● mitochondrial cytochrome B gene

Table 3b: Alterations of Gene Expression in Rat Renal Tubular Cells by Cyclosporine

Up-regulated	Down-regulated
<ul style="list-style-type: none"> ● CYP4A3 ● cytochrome P450, subfamily 51 ● lanosterol 14-alpha-demethylase, P450 subfamily 51 ● calnexin ● glutathione reductase ● UGT1 mRNA for UDP-glucuronosyltransferase ● PHAS-I, eIF4E-binding protein ● AMP-activated protein kinase ● mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1 ● HMG-CoA reductase ● hexokinase ● VEGF 	<ul style="list-style-type: none"> ● Ras-related associated with diabetes

Table 3c: Alterations of Gene Expression in Rat Renal Tubular Cells by Carboplatin

Up-regulated	Down-regulated
<ul style="list-style-type: none"> ● Hsp70 protein 1A ● Hsp70.2 ● Hsp27 ● DNA-damage inducible transcript 3 ● p21 protein (cip 1) ● PCNA ● Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 ● glutathione reductase ● NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 ● heme oxygenase ● aldose reductase gene ● proteasome subunit RC7-1 ● 5S rRNA ● EST, moderately similar to mdm2 protein - mouse 	<ul style="list-style-type: none"> ● CYP4A3 ● ras-related protein rab10 ● v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) ● N-ras gene for p21 protein ● pRb ● HGFR/met proto-oncogene ● mismatch repair protein ● topoisomerase IIβ ● DNAPol alpha mRNA 3' end ● zinc finger protein 36, C3H type-like 1 ● O6-methylguanine-DNA methyltransferase ● TGF beta type I receptor ● TGF beta 2 ● PRKC, apoptosis, WT1, regulator ● STAT3 ● NFκB p105 subunit ● immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) (Hsp70 like) ● caspase 2 ● ink 4 ● insulin-like growth factor I receptor ● mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor (M6P/IGF2r) ● calnexin ● FGFR 1 ● phospholipase A2 group IV A (cytosolic, calcium-dependent) ● protein disulfide isomerase related protein (calcium-binding protein, intestinal-related) ● p38 mitogen activated kinase ● MUK (zipper (leucine) protein kinase) ● extracellular signal-related kinase (ERK3) ● mitogen activated protein kinase kinase 5 (MEK5) ● MAK kinase kinase kinase 1 (MEKK1) ● PI 4-kinase ● protein kinase PASK ● cdc2-related protein kinase ● peroxisomal multifunctional enzyme type II ● peroxisome proliferator-inducible gene ● protein disulfide isomerase-related protein ● monoamine oxidase A ● NCK-associated protein 1 ● bleomycin hydrolase ● UDP-Gal:beta 1,4-galactosyltransferase polypeptide 6 ● UGT1 mRNA for UDP-glucuronosyltransferase ● UDP-glucuronosyltransferase ● 3MC inducible truncated UDP-glucuronosyltransferase ● transient receptor potential melastatin-2 (TRPM-2) ● epoxide hydrolase 1 ● carboxylesterase 1 ● HMG-CoA reductase ● apamycin and FKBP12.target-1 protein (rRAFT1) ● Na+K+ transporting ATPase alpha 1 ● metallothionein-2 and metallothionein-1 ● CD44 antigen ● myosin Ib ● vimentin ● pgp ● EST, modelately similar to mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 - mouse ● EST, highly similar to yeast BET3 ● EST, similar to glucose regulated protein, 94 kDa (GRP94) ● EST, similar to mgm2 protein - mouse

Cyclosporine (Table3b) : Cyclosporine により発現が増加した遺伝子は、P450 関連の CYP4A3, cytochrome P450 subfamily 51、分子シャペロン関連の carnexin、グルタチオン合成関連の glutathione reductase、グルタチオン抱合関連の UGT1、脂肪酸代謝関連の HMG-CoA reductase、mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1、糖代謝調節関連の hexokinase、成長因子の VEGF 等であった。Cyclosporine により発現が減少した遺伝子は、癌遺伝子関連の Ras-related associated with diabetes であった。

Carboplatin (Table3c) : Carboplatin により発現が増加した遺伝子は、HSP、シャペロン関連の HSP 70 protein 1A, HSP 70.2, HSP 27, ストレス関連の DNA-damage-inducible transcript 3、細胞動態・細胞分裂に関与する p21 protein (cip 1/waf1), proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、低酸素状態で誘導される Cbp/p300-interacting trans-activator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2、グルタチオン関連の glutathione reductase 等であった。Carboplatin により発現が減少した遺伝子は、P450 関連の CYP4A3、細胞分裂・癌遺伝子関連の ras-related protein rab10, v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog, N-ras gene for p21 protein, pRb, HGFR/met proto-oncogene, TGF beta type I receptor, TGF beta 2, FGFR 1, insulin-like growth factor I receptor, mannose 6-

phosphate/insulin-like growth factor II receptor (M6P/IGF2r), ink 4、DNA 修復関連の DNA polymerase alpha, mismatch repair protein, topoisomerase IIB、転写因子関連の STAT2, NFkB p105 subunit、細胞内情報伝達に関わるリン酸化酵素類、ペルオキシソーム関連の peroxisomal multifunctional enzyme type II, peroxisome proliferator-inducible gene、グルタチオン抱合に関与する UDP-glucuronosyltransferase、イオンチャンネル、トランスポーター関連の、Na+K+ transporting ATPase alpha 1, pgp、細胞骨格関連の myosin Ib, vimentin、金属結合タンパク質である metallothionein-2 and metallithionein-1、細胞間物質との相互作用に関与する CD44 等であった。

Cephaloridine (Table3d) : Cephaloridine により発現が増加した遺伝子は、DNA 損傷により誘導される GADD45、細胞死関連の BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)、グルタチオン合成関連の gamma-glutamylcysteine synthetase, glutathione reductase、グルタチオン抱合関連の GST 等であった。Cephaloridine により発現が減少した遺伝子は、細胞分裂・癌遺伝子関連の RL/IF-1、活性酸素解毒関連の TST similar to Mn SOD、金属結合タンパク質である metallothionein-2 and metallithionein-1 等であった。

Table 3d: Alterations of Gene Expression in Rat Renal Tubular Cells by Cephaloridine

Up-regulated	Down-regulated
<ul style="list-style-type: none"> ● GADD45 ● BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) ● gamma-glutamylcysteine synthetase ● glutathione reductase ● GST, mu type 2 (Yb2) ● GST alpha type 2 (Ya) ● GST Yc2 ● GST Yc1 ● GST Yc ● cytochrome b5 ● NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 ● malic enzyme 1 ● aflatoxin B1 aldehyde reductase ● guanosine monophosphate reductase ● heme oxygenase ● aldose reductase gene ● proteasome RN3 subunit ● EST, weakly similar to JC7185 chromosome 1 C1orf9 protein - human ● EST, highly similar to ubiquitin conjugating enzyme - rat ● EST, highly similar to transmembrane protein induced by TNK alpha - human 	<ul style="list-style-type: none"> ● RL/IF-1 ● TST, similar to Mn SOD ● metallothionein-2 and metallithionein-1 ● EST, similar to Hsp86 mRNA, 28S rRNA

Rat isolated renal tubular cells were exposed to reference compound at the concentration of IC50x 1/3 for 24 hr.

Up-regulated: values $\geq 2E+1.0$ -fold of the control culture

Down-regulated: values $\leq 2E-1.0$ -fold of the control culture

Gentamicin : Gentamicin により発現が増加した遺伝子は、P450 関連の CYP1B1, cytochrome P450 MC gene, cytochrome P450 from rat liver (E00717UTR#1)、HSP 関連の HSP 70, HSP 70 protein 1A, HSP 70.2, immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) (HSP 70 like), carnexin、ストレス関連の DNA-damage-inducible transcript 3、細胞分裂・

癌遺伝子関連の BCL-X, c-jun mRNA for transcription factor AP-1、グルタチオン関連の glutathione reductase, GST Yc2、カルシウム結合タンパク質である calreticulin 低酸素状態で誘導される oxigen regulated protein (ORP150) 等であった。Gentamicin により発現が減少した遺伝子は、DNA 損傷により誘導される GADD45、タンパク質リン酸化酵素であ

る MUK (zipper (leucine) protein kinase)、細胞周期関連の cyclin C、中間フィラメントのサブユニットである vimentin、IL-2 と共通の活性が多いサイトカインである IL-15 等であった。

尚、今回行った化合物のうち diclofenac および zinc sulfate については、発現が変化した遺伝子は少なく、それらの変化の特徴を抽出できなかった。

D. 考察

① 造血毒性

血液毒性は、さまざまな構成細胞の変化が折り重なってそこでの本質的な変化を見分けるのが困難なことが少なくない。このために、近年開発の著しく進んだ種々の色素標識タンパクを用いたセルソータによる細胞機能分別と、それぞれの分画での影響評価がすすんでいる。当研究では、そうした間接法をとらず、当研究者ら自らが他に先駆けて開発した造血幹細胞特異的な細胞周期測定法 (BUUV 法) を用いて、ベンゼン暴露期間中、およびその直後からの変化を細胞生物学的に押さえて、これと併行して関連遺伝子の発現プロファイリングデータを取り、相互に比較検討した。

ベンゼン暴露によって引き起こされる骨髓細胞数の顕著な振幅性 (oscillatory) の変化は、ベンゼン暴露中に前駆細胞レベルの細胞周期が、極めて低く抑制されていることによって裏付けられ、この時点で、当報告者らが得ていた、骨髓における p53 依存性の p21 の発現上昇を軸にした遺伝子・分子変化とよく符合していた。

これと併行してすすめた p53 欠失マウスにおける研究によって、当研究は、大きく進展した。結果の項で明らかにしたとおり、p53 を保持する野生型のマウスと、p53 の欠失マウスでは、後者では、比較的弱い DNA 傷害と比較的強い染色体異常が p53 の欠失により修復されることなく、またアポトーシスに陥ることなく、引き続く腫瘍形成へのステップに進行してゆくものに対して、野生型でのそれでは、先の振幅性造血が、エピジェネティックな形で、間接的な遺伝子変異を引き起こし、白血病発症につながってゆくという、白血病発症のメカニズムの上での違いが明らかになった。

本研究では、そうした知見の上に立って、これに符合した、マイクロアレイ上でのこれらに関連する種々の遺伝子変化が観察され、ベンゼンの血液毒性のメカニズムの全貌が明らかになった。その結果の詳細は、ここでは繰り返さないが、細胞周期関連遺伝子、DNA 傷害/修復関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、増殖関連遺伝子、および、がん遺伝子などの各々のカテゴリーで、その役割があきらかになり、これまでの断片的な研究がつながり会った点で、所期の目的以上の成果が上がったものと考えられる。

② 肝腎毒性

本実験ではラット腎臓から分離した尿細管細胞に *in vitro* で既知の腎毒性物質に暴露することによって生ずる遺伝子発現の変化を網羅的に検索し、それぞれの腎毒性物質の毒性メカニズムを反映していると考えられる遺伝

子発現の変化を捉えることができた。既知の腎毒性物質として cisplatin、carboplatin、cephaloridine、cyclosporine、gentamicin を選択し、予め WST-1 アッセイによりラット腎尿細管細胞に対する細胞毒性濃度を求めた上で IC50 の 1/3 濃度または 1/10 濃度で 6 時間または 24 時間暴露後に RNA を抽出し、Affymetrix Rat Toxicology U34 Array により遺伝子発現の変化を調べた。今回の解析ではより多くの遺伝子発現の変化が認められた腎毒性物質の濃度は IC50 の 1/3 で 24 時間暴露のデータを中心に解析を行った。

cisplatin と carboplatin は類似の構造を持つ化合物であるが、認められた遺伝子発現の変化も類似していた。両化合物共に発現が増加した遺伝子より発現が減少した遺伝子の方が多かった。両化合物に共通して認められた変化は、ストレス反応によるシャペロン関連遺伝子の発現増加と、細胞分裂を示唆する変化であった。また、抑制を受けた遺伝子発現は、CYP4A3、グルクロン酸抱合、細胞内情報伝達関連で解毒機能が低下していることが示唆された。cisplatin および carboplatin で発現が減少した遺伝子が増加した遺伝子より多かったのに対して、cephaloridine、cyclosporine、gentamicin では、発現が増加した遺伝子が減少した遺伝子より多かった。Cephaloridine では、ストレス反応が認められるのに加えて、グルクロン酸抱合関連遺伝子の発現上昇が認められ、細胞の解毒作用が亢進していることが示唆された。しかしながら、シャペロン関連遺伝子の発現増加は認めず cisplatin および carboplatin とは毒性のメカニズムが異なることが示唆された。Cyclosporine では、cisplatin および carboplatin と同様に CYP4A3 の誘導が認められたが、ストレス反応を示唆する変化は少なく、脂肪代謝、グルタチオン合成の亢進が認められた。Gentamicin では、CYP1B1 の誘導に加えて、ストレス反応、シャペロン関連遺伝子の発現増加、グルタチオン合成、グルクロン酸抱合の亢進等が認められた。他の腎毒性物質に認められない特徴的な変化としては、IL-15 の発現低下が認められた。IL-15 は炎症に関与するサイトカインとして知られ、IL-2 と共通する特徴が多いが、IL-15 の方が多くの組織 (胎盤、骨格筋、腎臓、肺、心臓) で発現しており、自己免疫疾患や慢性炎症に関与している。IL-15 が抑制されると T 細胞の活性化等が抑えられることが考えられるが、gentamicin の腎毒性発現との関係は現在までの解析では判明していない。

今回結果を示した 5 つの既知の腎毒性物質に共通する遺伝子発現の変化としては、特定する事ができず、腎毒性のメカニズムが異なる化合物に共通して認められる指標は見つからなかった。しかしながら、分子シャペロン関連の HSP 等の発現増加、DNA 損傷関連の NDA-damage inducible transcript の発現増加は cisplatin、carboplatin、gentamicin において認められ、一部の化合物を除き指標となる変化であると考えられた。

E. 結論

ベンゼン白血病をめぐる基礎的背景研究として、その造血毒性について、細胞生物学的なこれまでの検討結果と、遺伝子発現研究を結合して研究を進めた。造血器毒性に対するトキシコジノミクスとも称すべき概念の端緒

的なモデル研究を形成することができた。野生型マウスに見られたベンゼンによる骨髄造血幹細胞の細胞動態の抑制は、p53KO マウスで抑制が認められなかったこととあわせて、p53 機能によって平衡関係の背後に隠されていたベンゼンの影響を明らかにすることができた点も、今後の研究の重要な視点として、明記しておきたい。

腎を対象とした研究の方では、ラット腎臓から分離した尿細管細胞に *in vitro* で既知の腎毒性物質に暴露することによって生ずる遺伝子発現の変化を網羅的に検索した。その結果、それぞれの腎毒性物質の毒性メカニズムを反映していると考えられる遺伝子発現の変化を捉えることができた。一方、毒性発現の結果現れる共通した変化を捕らえるための解析を進めたが、全ての腎毒性物質に共通する遺伝子発現の指標は見いだせなかった。今後の研究方向としては、メカニズム毎に異なる遺伝子プロファイルリングを明らかにし、それらのバッテリーとして、遺伝子群を取り上げる方向性が重要になってきた。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著

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

Hirabayashi, Y., K. Yoshida, S. Aizawa, Y. Kodama, J. Kanno, Y. Kurokawa, I. Yoshimura and T. Inoue (2003). Evaluation of nonthreshold leukemogenic response to methyl nitrosourea in p53-deficient C3H/He mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **190**: 251-61.

Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki and A. Miyajima (2003). Targeted disruption of ncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* **102**: 3154-62.

Takahashi, Y., T. Inoue, A. Gossler and Y. Saga (2003). Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* **130**: 4259-68.

総説・著書

Hirabayashi Y, Yoon BI, Kawasaki Y, Li GX, Kanno J, and Inoue T. On the Mechanistic Differences of Benzene-induced Leukemogenesis between Wild type and p53 Knockout Mice. In: K. Tanaka, T. Takabatake, K. Fujikawa, T. Matsumoto, and F. Sato (eds.), *Molecular Mechanisms for Radiation-induced Cellular Response and Cancer Development*, pp. 110-116. Aomori: Institute for Environmental Sciences, 2003.

2. 学会発表

Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Kawasaki Y, Kodama Y,

Yodoi J, Kanno J, Inoue T. Leukemia-Prevention *in vivo*-Model: Attenuation of Spontaneous and Benzene-Induced Thymic Lymphoma by Absorption of Reactive Oxygen Species (ROS) using Thioredoxin Over-Expression Mouse. *6th Joint conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association Advances in Cancer Research: Molecular and Cellular Biology, Genomics and Proteomics, Targeted Therapeutics, Novel Clinical Trials, Molecular and Genetic Epidemiology / Prevention* (2004.1.28) [Waikoloa, HI, (Conference proceedings, pp158, 2004)]

Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Yodoi J, Kanno J, Inoue T: Prevention of benzene-induced leukemogenesis by Trx/ADF requires of p53-expression. The 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology (2003.12.8) [San Diego, CA, (Blood 102 (11): pp829a, 2003)]

Inoue T: The Next Step of the TOXICIGENOMICS- From forward to reverse, a predicting genomics-Toxicogenomics International Forum (2003.10.13) [Seoul Korea, (Meeting abstract p6-7, 2003)]

Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y: Exploration of the hematotoxic mechanism of benzene based on the cDNA microarray analyses in the mouse bone marrow tissue. *Toxicogenomics International Forum 2003* (2003.10.9) [Tokyo, (Meeting abstract, p89-90, 2003)]

Inoue T: Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. A symposium in Honor of Wagner BM, MD at New York Medical College, "Chemical Safety Assessment: Contributions of Toxicological Pathology and Mechanistic Investigations", (2003.9.23) [Valhalla, NY]

Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T: AhR suppresses hemopoiesis during steady state but accelerates cell cycle as an early response: a study of AhR-knockout mice. *DIOXIN 2003* (2003.8.26) [Boston, MA, (Organo-halogen Compounds 64:270-273, 2003)]

Hirabayashi Y, Yoon BI, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Li GX, Kanno J, Kim DY, Inoue T: cDNA microarray analysis addressing the mechanisms of benzene-induced epigenetic and genotoxic changes. *Gordon Research Conference on Toxicogenomics* (2003.6.25) [Lewiston, ME]

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他
該当しない

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社