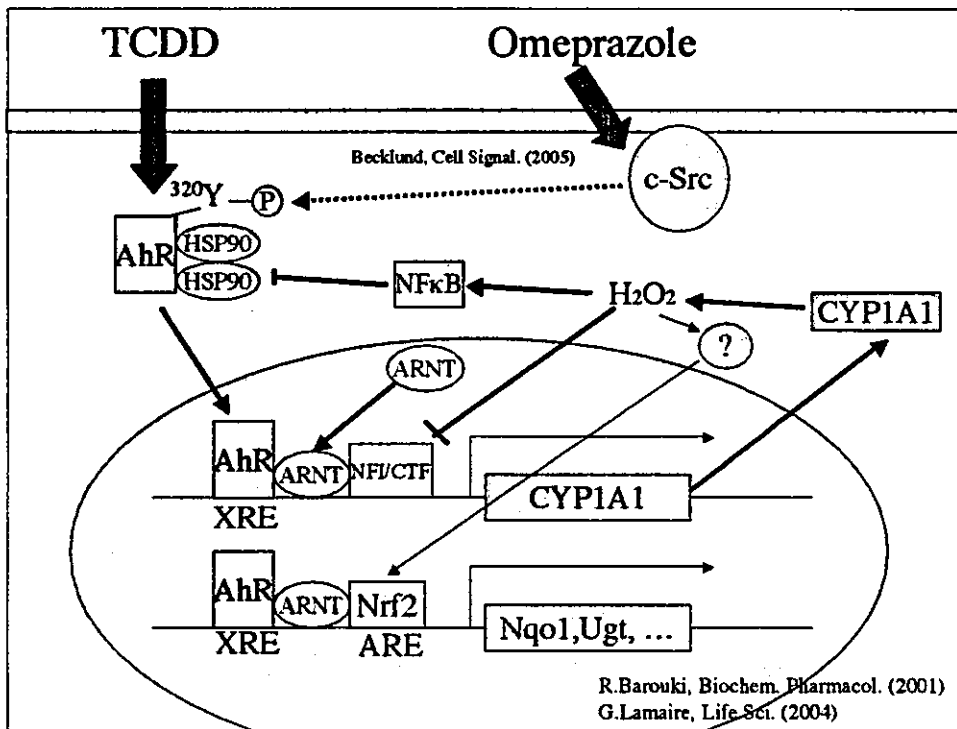


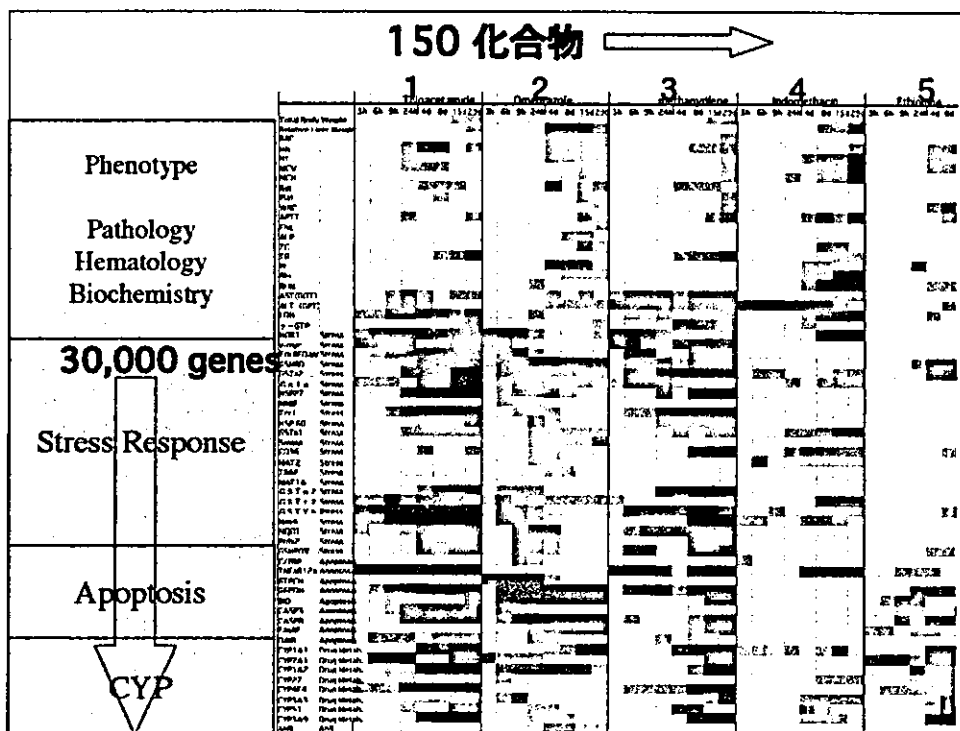
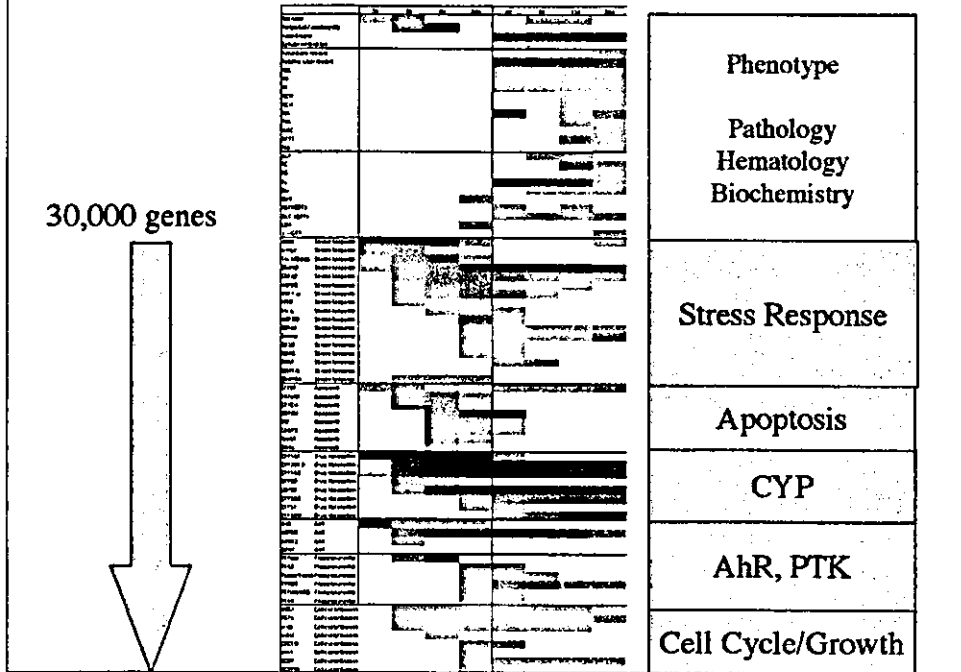
### CYP1A1を誘導する薬物 (7/25)

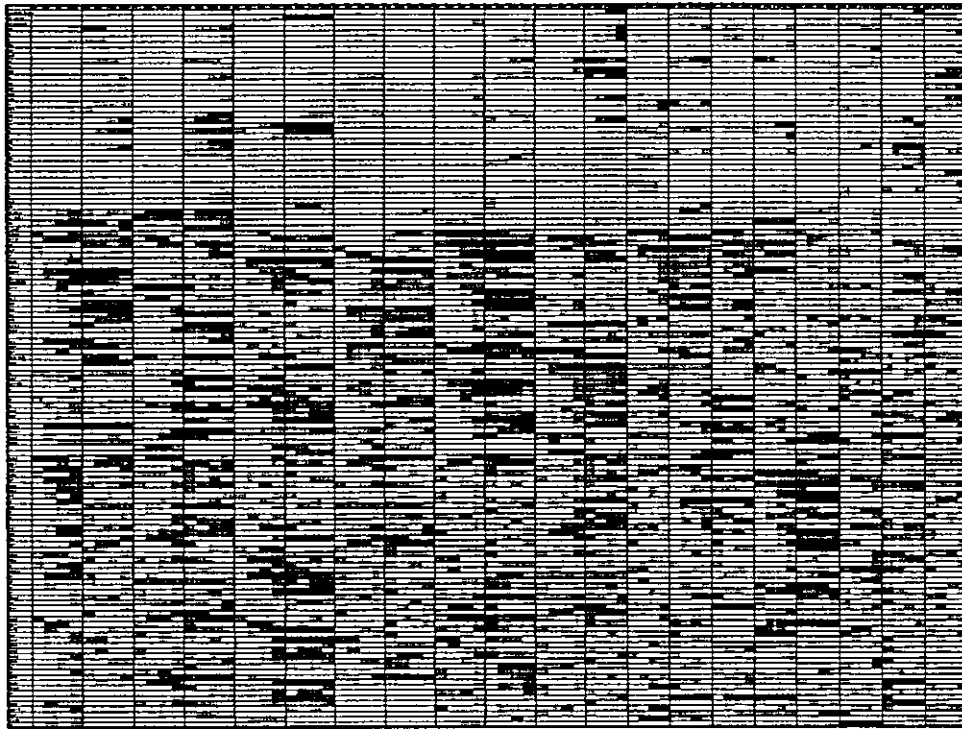
Drugs	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d
Omeprazole		■	■	■	■	■	■	■
Hexachlorobenzene			■	■	■	■	■	■
ANIT			■	■	■	■	■	■
Isoniazid								
Chlorpromazine								
Thioacetamide								
Metapyrene								

Dose-dependent increase:



### Omeprazole : Heat map of phenotype and gene expression





## トキシコゲノミクスプロジェクト

リーダー 長尾 拓 国衛研所長

NIHS

サブリーダー  
漆谷徹郎

菅野純  
小野敦  
五十嵐勝秀  
相崎健一  
鈴木孝昌  
渋谷淳  
広瀬明彦  
水川裕美子

TGP

サブリーダー  
宮城島利一

花田貴宣、小宮雅信、井出照一郎、  
笠原利彦、奥山学、高島佳代子、  
森下克美、鳥塚尚樹、宮崎登志子、  
田村幸太郎、上田浩之、新田浩之、  
松下智哉

日立製作所

大野美恵、富田裕之、山下智也、  
戸塚裕彦

#### 別添 4

厚生労働省科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

#### 分担研究報告書

薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究

分担研究者 土井邦雄 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

#### 研究要旨

本年度はまず、streptozotocin (SZ)による肝毒性の性状を *in vivo* と *in vitro* で比較・検討し、遺伝子発現プロファイルは両者で良く相関しているが、肝細胞の形態変化には相違がみられることを明らかにした。ついで、nitrofurazone (NF)による肝細胞 mitogen 作用の発現機構を明らかにした。さらに、本プロジェクトを補完する目的で、DNA 傷害物質 ethylnitrosourea (ENU) による胎児中枢神経の傷害期および修復期における遺伝子発現プロファイルを明らかにした。

#### A. 研究目的

化学物質による肝毒性の性状（遺伝子発現プロファイルと病変）に関し、*in vivo* と *in vitro* との相関を検討することは、本プロジェクトの重要課題の一つである。そこで、糖尿病モデルの誘発に汎用されている streptozotocin (SZ)を用いて、この点について検討する。併せて、SZ の肝への直接作用を明らかにする。ついで、本プロジェクトでも取り上げられている nitrofurazone (NF) の肝細胞 mitogen 作用の発現機構を、フリーラジカルの関与との関連で、遺伝子発現プロファイルの面から明らかにする。さらに、本プロジェクトを補完する目的で、DNA 傷害物質である ethylnitrosourea (ENU) による胎児中枢神経毒性に関する遺伝子発現プロ

ファイルを明らかにする。

#### B. 研究方法

(1) SZ による肝毒性の性状に関する *in vivo* と *in vitro* の比較

*In vivo* の実験については、Crj-CD-1 雄マウスに SZ (200mg/kg) を腹腔内投与し、6 から 48 時間後にかけて経時的に諸種の検索を行った (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 55,467-480,2004; 56,235-244,2005)。

一方、*in vitro* の実験については、上記系統の雄マウスから調整した肝細胞初代培養系を用い、1-100mM の濃度の SZ に 6 ないし 24 時間暴露後に諸種の検索を行った (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 56,245-253,2005)。

(2) NF による肝細胞 mitogen 作用の発現機構

雄の F344 ラットに 80mg/kg の NF を腹腔内投与し、24 時間後まで経時的に諸種の検索を行った。併せて、NF 投与の 0.5 時間前と 5 時間後に 50mg/kg の抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC) を腹腔内投与したラットについても同様に検索した。いずれの場合も、利処分の 2 時間前に 50mg/kg の BrdU を腹腔内に投与した (Ito et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, in press)。

(3) ENU による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析

妊娠 13 日齢の雌ラットに 60mg/kg の ENU を腹腔内投与し、投与 3 から 48 時間後にかけて胎児終脳を採材して諸種の検索を行った。遺伝子発現プロファイルに関しては、傷害期 (6 時間後) および修復期 (24 時間後) について解析した (Katayama et al.: *Develop.Deprod.Toxicol.*, in press)。

## C. 研究結果

(1) SZ による肝毒性の性状に関する in vivo と in vitro の比較

In vivo: SZ 投与 6 および 12 時間後には膵島ベータ細胞が急激に傷害を受け、血清インスリン値が一過性に上昇し、血糖値が減少すること、および、24 時間を境に血清インスリン値は正常値よりも低下し、血糖値が上昇することが確認された。また、投与 6 時間後には形態学的変化としてミトコンドリアの膨化が観察

され、同時に TBARS やリン脂質過酸化物の増加がみられた。投与 24 および 48 時間後には PCNA 陽性肝細胞数および網状赤血球数の明瞭な減少が観察された。さらに、マイクロアレイ解析では、細胞周期停止関連遺伝子 (*GADD45*, *p21*)、アポトーシス促進関連遺伝子 (*BAX*, *Bcl2-like11*, *Apaf1*, *p53*, *perp*, *mdm2*)、免疫/炎症関連遺伝子およびストレス反応/異物代謝関連遺伝子の up-regulation、ならびに、糖、脂質およびタンパク質代謝関連遺伝子の down-regulation が観察された。アポトーシスに関しては、抑制関連遺伝子 (*bcl-xl*, *bag3*) の up-regulation も同時に観察された (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 55,467-480,2004; 56,235-244,2005)。

In vitro: 肝細胞の 50% 生存率 (IC50) は SZ 6 時間暴露では 62mM および 24 時間暴露では 7mM であった。また、3 および 10mM の 24 時間暴露では形態学的に肝細胞の核クロマチンのマージネーションが観察された。さらに、マイクロアレイ解析では、in vivo と同様、細胞周期停止関連遺伝子、アポトーシス促進関連遺伝子およびストレス反応/異物代謝関連遺伝子の up-regulation ならびに、糖、脂質およびタンパク質代謝関連遺伝子の down-regulation が観察された (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 56,245-253)。

(2) NF による肝細胞 mitogen 作用の発現機構

NF の血中濃度は投与後速やかに上昇

し、1時間後に最大となり、その後徐々に減少した。また、NF 投与により BrdU labelling index で示される肝細胞増殖活性は顕著に増加したが、肝細胞増殖に先立って生化学的にも組織学的にも肝細胞傷害は認められなかった。こうした NF 投与による肝細胞増殖は、細胞内グルタチオン濃度を上げ、抗酸化剤としても作用する NAC の投与で、対照レベルにまで抑制された。さらに、NF 投与後の遺伝子発現プロファイルを調べたところ、投与後1、2時間目に *c-jun*, *c-myc* が増加し、続いて *TNF- $\alpha$*  および *TGF- $\alpha$*  が投与後8時間目にかけて増加、*c-Ha-ras* が投与後8-12時間目、および *cyclin E* が16から20時間目にかけて増加した。こうした遺伝子の発現増加は NAC の投与で抑制された。なお、NF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 の肝細胞核内への移行は認められなかった (Ito et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, in press)。

(3) ENU による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析

Laser scanning cytometer による胎児終脳神経上皮細胞の細胞周期解析の結果、ENU 投与後早期に S 期細胞の集積 (6時間後にピーク) とアポトーシス細胞の増加 (12時間後にピーク) がみられたが、いずれも48時間後には対照群のレベルに戻った。また、マイクロアレイ解析では、発現増加が見られた遺伝子数は傷害期で21および修復期で15、一方、発現減少が見られた遺伝子数は傷害期で

5および修復期で3であった。傷害期に増加を示した遺伝子のなかにはアポトーシスや細胞周期停止に関与する p53 標的遺伝子が含まれており、また、修復期に増加を示した遺伝子には増殖促進関連遺伝子 (Id) および osteopontin 遺伝子が含まれていた。一方、傷害期に発現減少を示した遺伝子のなかにはコレステロール合成関連遺伝子 (*liver steroyl-coenzyme Adesaturase*, *cytosolic 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A synthase*, *sequalene synthase*) およびコレステロール恒常性維持関連遺伝子 (*growth-response protein (CL-6)*) が含まれていた (Katayama et al.: *Develop.Reprod.Toxicol.*, in press)。

#### D. 考察

(1) SZ による肝毒性の性状に関する in vivo と in vitro の比較

今回の検査の結果、in vivo では、SZ 投与後血糖値が上昇する以前に、肝における TBARS および脂質過酸化物の増加といった酸化的ストレスの増加を示唆する所見と肝細胞のミトコンドリアの膨化が認められ、酸化的ストレスを介した SZ の肝細胞への直接傷害作用が示された。同時に、肝細胞増殖抑制が観察され、これはマイクロアレイ解析で認められた細胞周期停止関連遺伝子やアポトーシス促進関連遺伝子の up-regulation と関連しているものと考えられた。

一方、in vitro のマイクロアレイ解析では、免疫/アレルギー関連遺伝子を除き、

in vivo のそれときわめて類似した結果が得られた。免疫/炎症関連遺伝子の発現に関する in vivo と in vitro の相違は、前者ではクッパー細胞や免疫応答細胞が含まれているのに後者ではそれが欠けていることによるものである。また、in vitro では肝細胞で形態学的にアポトーシスの初期像と考えられている核クロマチンのマージネーションが観察された。

このように、in vivo と in vitro で、遺伝子発現プロファイルには良い相関が認められたが、肝細胞の形態学的変化には相違が見られた。その原因については今後の検討課題である (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 55,467-480,2004; 56, 235-244, 245-253,2005)。

#### (2) NF による肝細胞 mitogen 作用の発現機構

今回の検索の結果、NF は肝細胞の傷害を伴わずに肝細胞増殖作用を示す mitogen としての作用を有し、その作用にフリーラジカルが関与していることが示された。また、NF の mitogen 作用は(a)フリーラジカル発生→(b)early response genes の発現増加による肝細胞の priming (G0→G1) →(c)TNF- $\alpha$  および TGF- $\alpha$  による増殖刺激 →(d)c-Ha-ras および cyclin E の増加→(e)restriction point 通過と S 期移行→(f)肝細胞 DNA 合成、という経路を辿る可能性が示唆された。

NF により発現が増加した遺伝子セットは他の mitogen として知られている物質のそれと良く類似していた。また、肝

毒性物質投与後や肝切除後にみられる compensatory proliferation と比べると、c-jun, c-myc, TNF- $\alpha$ 等の発現増加は共通していたが、compensatory proliferation でみられる EGF や HGF の発現増加は認められなかった。なお、フリーラジカル発生とその後の変化を結ぶ因子として最近注目されている NF- $\kappa$ 活性化を調べたところ、そのサブユニットである p65 の核内への移行は認められなかった。

フリーラジカルおよびそれに伴う GSH を含む細胞の防御システムの変化は、細胞の酸化還元電位や環境に変化をもたらすが、この変化はタンパクキナーゼやフォスファターゼおよびその他の転写因子等のシグナル伝達系に影響することが知られている。NF 投与に際し、これらの影響がどの程度であったかは不明であるが、フリーラジカル発生による細胞内の環境変化が、集散的に遺伝子発現の変化、さらには最終的に肝細胞増殖へと導いた可能性が考えられた (Ito et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, in press)。

#### (3) ENU による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析

コレステロール代謝は神経細胞の発達に必須の役割を果たすことが知られている。ところで、今回の ENU による胎児中枢神経の傷害期においては、コレステロール生合成に必要な酵素関連遺伝子の発現減少に加え、コレステロールの恒常性維持に必要な CL-6 遺伝子の発現減少も観察されているところから、これらの

遺伝子の発現減少が ENU 暴露後の胎児中枢神経系の発達異常に何らかの役割を果たしているものと推察された。傷害期にはまた、既に RT-PCR の結果を基に報告したアポトーシスや細胞周期停止に関与する遺伝子群の発現増加も認められた (Katayama et al.: *Neurobiol.Dis.*, 18,218-225,2005)。

ENU による胎児中枢神経の修復期には、2種類の Id 遺伝子の発現が増加していた。Id タンパクは、多くの細胞系列で細胞分化を正の方向に制御している basic helix-loop-helix (bHLH)の主要な負のアンタゴニストとして作用しており、皮質形成期の細胞の運命を決定づける重要な役割を果たしている。こうしたことから、Id タンパクは、ENU による傷害によって失われた神経上皮細胞を回復するため、神経上皮細胞の増殖活性を維持する働きをしているものと考えられた。修復期にはまた、発生期の脳のマクロファージに発現し、マクロファージの侵入と貪食作用に関与している osteopontin 遺伝子の発現増加が認められ、アポトーシスに陥った神経上皮細胞の除去に寄与しているものと思われた (Katayama et al.: *Develop.Reprod.Toxicol.*, in press)。

#### E. 結論

本年度は、まず、本プロジェクトの重要課題の一つである化学物質による肝毒性の性状に関する in vivo と in vitro での検索結果の相関について、糖尿病モデル

作出に汎用されている SZ を用いて検討した。その結果、遺伝子発現プロファイルについては両者の結果は良く相関していたが、形態学的変化については相違がみられた。その原因については今後の検討に待ちたい。ついで、本プロジェクトでも取り上げられている NF の示す肝細胞 mitogen 作用の発現機構について詳細に検索した。その結果、NF による mitogen 作用の発現に関与する遺伝子群は他の mitogen 物質のそれと類似していること、および、フリーラジカルが全ての変化の引き金となることを明らかにした。さらに、本プロジェクトを補完する目的で、DNA 傷害物質である ENU による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析を行い、傷害期におけるアポトーシスおよび細胞周期停止関連遺伝子の発現増加に加え、コレステロール生合成に関与する酵素関連遺伝子や CL-6 遺伝子の発現減少の重要性を明らかにした。また、修復期にける Id 遺伝子および osteopontin 遺伝子の発現増加の意義を明らかにした。

現在、上記以外の化学物質 (5-azacytidine, hydroxyurea, Ara-C, etoposide, CYP inducers, T-2 toxin, NMDA, foreign serum) についても、その肝毒性および胎児毒性の発現機構に関する検討を継続中である。

#### F. 健康危機情報

なし



G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Ito K., Kajikawa S., Nii A., Hanada T., and Doi K. Nitrofurazone-induced gene expressions in rat hepatocytes and their modification by N-acetylcysteine. *Exp. Toxicol. Pathol.*, in press.
2. Katayama K., Ueno M., Yamauchi H., Nakayama H., and Doi K. Microarray analysis of genes in the fetal central nervous system after ethylnitrosourea administration. *Develop. Reprod. Toxicol.*, in press.
3. Ejiri N., Katayama K., Kiyosawa N., Baba Y., and Doi K. Microarray analysis on CYPs expression in pregnant rats after treatment with pregnerolone-16alpha-carbonitrile and Phenobarbital. *Exp. Mol. Pathol.*, 78, 71-77, 2005.
4. Ejiri N., Katayama K., and Doi K. Induction of cytochrome P450 isozymes by phenobarbital in pregnant rat fetal livers and placenta. *Exp. Mol. Pathol.*, 78, 150-155, 2005.
5. Kume E., Aruga C., Takahashi K., Miwa S., Ito M., Fujimura H., Toriumi W., Kitamura K., and Doi K. Gene expression profiling in streptozotocin treated mouse liver using DNA microarray. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 56, 235-244, 2005.
6. Kume E., Aruga C., Takahashi K., Miwa S., Dekura E., Ito M., Fujimura H., Toriumi W., and Doi K. Morphological and gene expression analysis in mouse primary culture hepatocytes exposed to streptozotocin. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 56, 245-253, 2005.
7. Katayama K., Ueno M., Yamauchi H., Nagata T., Nakayama H., and Doi K. Ethylnitrosourea induces neural progenitor cell apoptosis after S-phase accumulation in a p53-dependent manner. *Neurobiol. Dis.*, 18, 218-225, 2005.
8. He X.J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.*, 78, 64-70, 2005.
9. Yamauchi H., Katayama K., Ueno M., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Involvement of p53 in 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced trophoblastic cell apoptosis and impaired proliferation in rat placenta. *Biol. Reprod.*, 70, 1762-1767, 2004.
10. Yamauchi H., Katayama K., Ueno M., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Involvement of p53 in 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced rat fetal brain lesions. *Neurotox. Teratol.*, 26, 579-586, 2004.
11. Shata S., Kiyosawa N., Makino T., Atsumi F., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Morphological and microarray analysis of T-2 toxin-induced fetal brain brain lesion. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 1727-1736, 2004.

12. Sehata S., Kiyosawa N., Sakuma S., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Gene expression profiles in pregnant rats treated with T-2 toxin. *Exp.Toxicol.Pathol.*, 55, 357-366, 2004.
13. Baba Y. and Doi K. MHC class II-related genes expression in porcine-serum-induced rat hepatic fibrosis. *Exp.Mol.Pathol.*, 77,214-221,2004.
14. Sehata S., Teranishi M., Yamoto T., Matsunuma N., and Doi K. T-2 toxin-induced toxicity in pregnant rats-histopathology and gene expression profiles-Proceedings of International Symposium of Mycotoxicology, Kagawa. Japanese Association of Mycotoxicology, pp33-39, 2004.
15. Kume E., Fujimura H., Matsuki N., Ito M., Aruga C., Toriumi W., Kitamura K., and Doi K. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. *Exp.Toxicol.Pathol.*, 55,467-480,2004.

(2) 学会発表

1. 篠塚淳子、瀬畑信哉、鈴木雅実、石上紀明、アルバレンケ・ステラ・マリス、鳥海 亘、土井邦雄「T-2 トキシンによる多細胞種でのアポトーシス」第21回日本毒性病理学会、2005年1月20—21日、浜松
2. He X.J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Effects of pregnancy on CYPs protein

expression in rat liver. 第21回日本毒性病理学会、2005年1月20—21日、浜松

3. 瀬畑信哉、清沢直樹、渥美房子、伊藤和美、矢本 敬、寺西宗広、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「T-2 toxin 投与妊娠ラットの肝臓、胎盤および胎児肝臓病変のマイクロアレイ解析」第21回日本毒性病理学会、2005年1月20—21日、浜松

4. 馬場也須子、土井邦雄「ラットブタ血清誘発肝線維化モデルにおける線維化関連因子の変化」第21回日本毒性病理学会、2005年1月20—21日、浜松

5. 三上貴史、上野将紀、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「Ochratoxin A による胎仔中枢神経毒性に関する検索」第138回日本獣医学会、2004年9月10—12日、札幌

6. Ueno M., Katayama K., Nakayama H., and Doi K. Delay in translocation of neuronal stem cells due to chemical-induced cell cycle arrest. The 15th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Aug. 4-7, 2004, Edinburgh, Scotland.

7. Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Porcine-serum-induced hepatic fibrosis in Brown Norway and Wistar rats. The 23rd Annual Society of Toxicologic Pathology, June 13-17, Salt Lake City, USA.

8. Uetsuka K., Yamauchi H., Nakayama H.,

and Doi K. Impaired liver regeneration in db/db mice after 2/3 partial hepatectomy. The 23rd Annual Society of Toxicologic Pathology, June 13-17, Salt Lake City, USA.

9. Woo G.H., Katayama K., Bak, E.J., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in fetal mouse. The 23rd Annual Society of Toxicologic Pathology, June 13-17, Salt Lake City, USA.

10. 山内啓史、片山圭一、上野将紀、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「ラットにおける 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine の胎児中枢神経毒性と p53 の関与」第93回日本病理学会、2004年6月9-11日、札幌

11. 馬場也須子、中山裕之、土井邦雄「ラットブタ血清誘発肝線維化モデルにおける免疫グロブリンの変化」第93回日本病理学会、2004年6月9-11日、札幌

12. 白井真人、中山裕之、上塚浩司、土井邦雄「イヌの脳に加齢による遺伝子発現プロファイルの変化」第137回日本獣医学会、2004年4月2-4日、藤沢

13. Ueno M., katayama K., Nakayama H., and Doi K. Analysis of cell cycle, migration and apoptosis of neuronal stem cell in the 5-azacytidine (5AzC)-treated rat fetal brain. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

14. Woo G.H., Bak E.J., Uetsuka K.,

Nakayama H., and Doi K. Hydroxyurea (HU)-induced apoptosis and changes in apoptosis-related genes expression in the mouse fetal lung. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

15. Takai H., Ito T., Tatsuyama K., Suzuki M., Katayama K., and Doi K. Neuronal cell death in the fetal rat spinal cord following NMDA-treatment to dams. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

16. Sehata S., Kiyosawa N., Makino T., Atsumi F., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Manabe S., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. T-2 toxin-induced changes in the rat fetal brain. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

17. Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Porcine-serum-induced hepatic fibrosis in Brown Norway rats. JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

H. 知的財産権の出願・登録状況

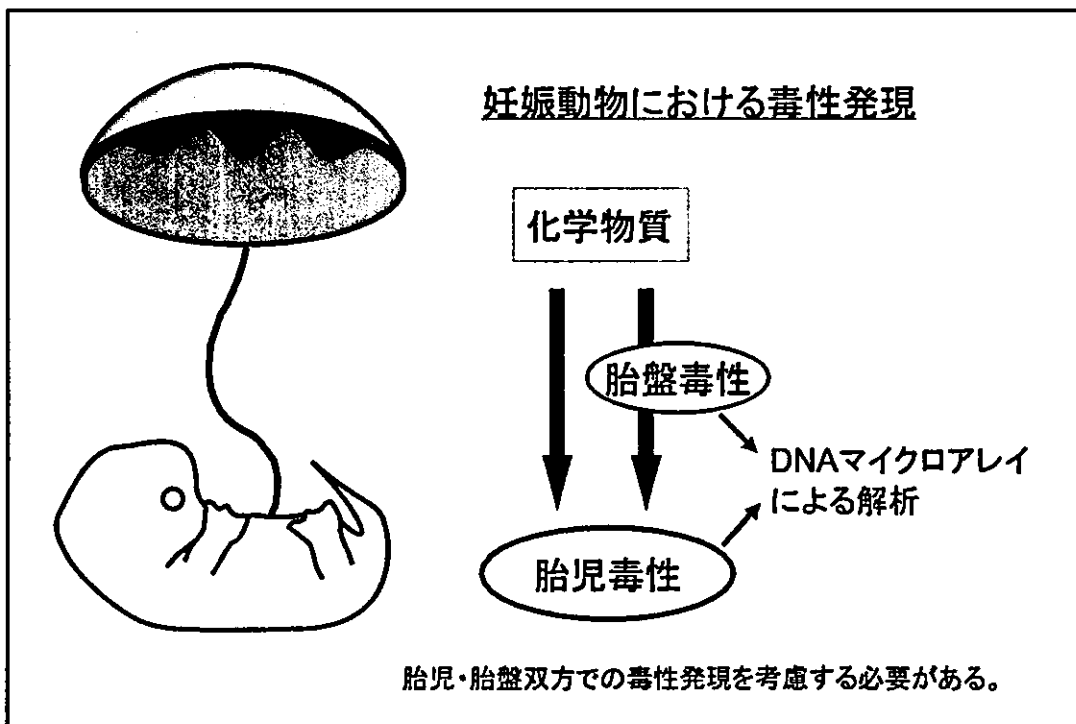
なし

I. 特許出願

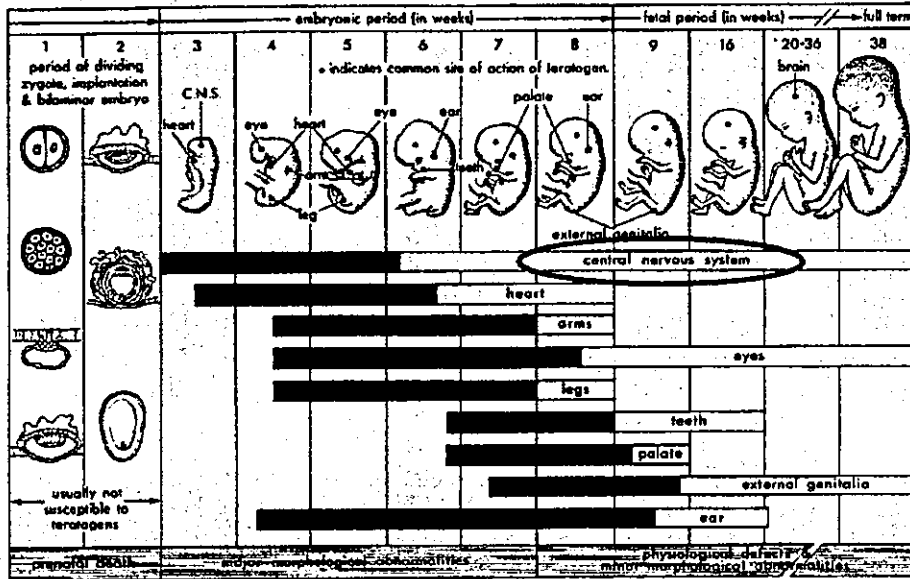
なし

## 妊娠動物における毒性発現機構の解析への応用

東京大学農学生命科学研究科  
獣医病理学教室



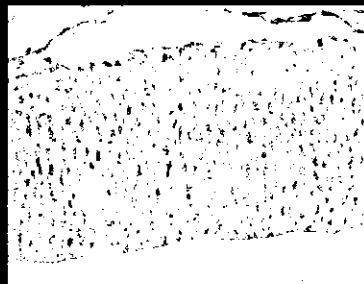
# ヒトの胎児期における各器官の感受性



胎児中枢神経組織は化学物質に高い感受性を示す。

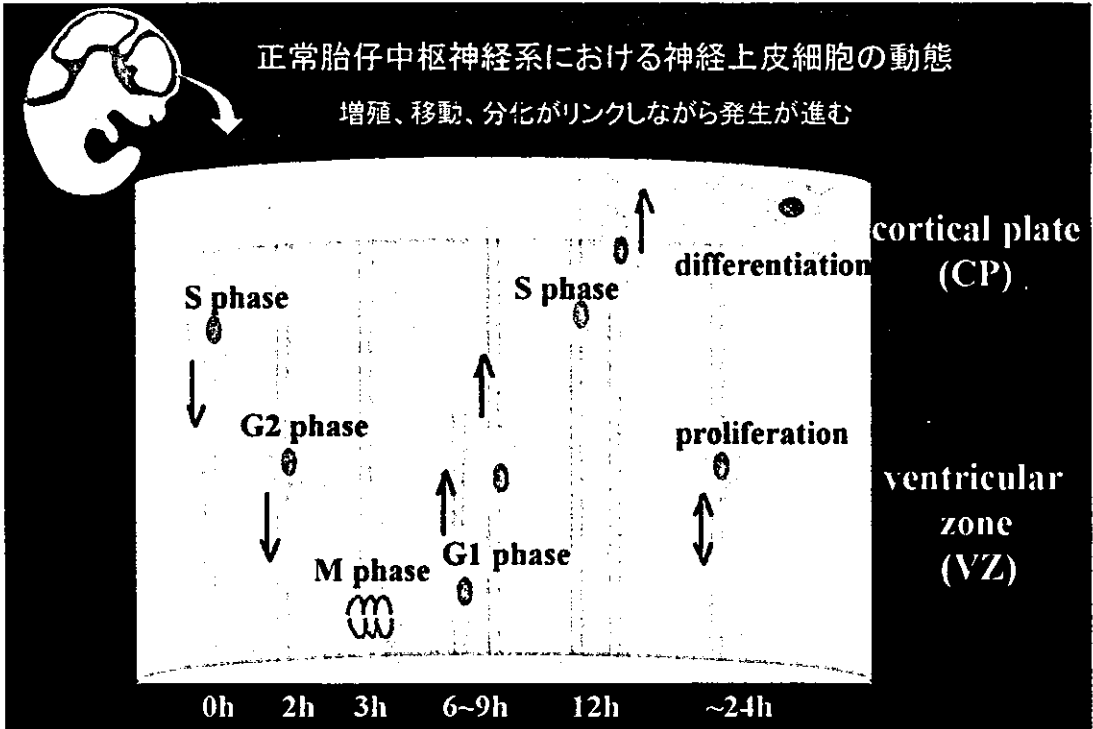
Moore, 1998

## 正常ラット胎仔中枢神経系(胎齢13~14日)



ventricular zone (VZ)

神経上皮(幹)細胞が偽重層多列上皮を形成し増殖



### 化学物質暴露による新生仔脳障害の発生機序

↓: 化学物質暴露

#### 胎仔脳組織の傷害

増殖・移動・分化・  
神経回路構築の阻害

細胞死(アポトーシス)

#### 出生後の神経障害

奇形  
行動異常

## 胎児中枢神経系にアポトーシスを誘導する物質

### DNA傷害物質

X-ray

$\gamma$ -ray

EthylNitrosourea

Cytosine arabinoside

Hydroxyurea

5-Azacytidine

### マイコトキシン

T-2 toxin

Ochratoxin

### 神経興奮性物質

N-methyl-D-aspartate

Kainate

いずれも出生仔には小脳症等の脳奇形・障害を引き起こす

胎児の中枢神経組織の発生に影響を及ぼす可能性を持った化学物質が数多く存在しており、また、その数は年々増加の一途をたどっている。

胎児中枢神経毒性の発現機序に関しては未だほとんど明らかにされていない。



本研究の目的

胎児中枢神経毒性の発現機序の解明

## DNA傷害物質を暴露したラット胎仔脳での 毒性発現における遺伝子発現の解析

目的 : 胎児中枢神経毒性の全容の解明

投与物質 : 1. 5-Azacytidine (5AzC; 10 mg/kg i.p.)  
2. Ethylnitrosourea (ENU; 60 mg/kg i.p.)  
3. Cytosine arabinoside (Ara-C; 250 mg/kg i.p.)

動物 : 妊娠13日齢ラット (n=2)

チップ解析 : GeneChip (AFFYMETRIX)

↓: 投与

胎仔脳組織の傷害  
(胎齢13~14日)

胎仔脳組織の再生・修復  
(胎齢14~16日)

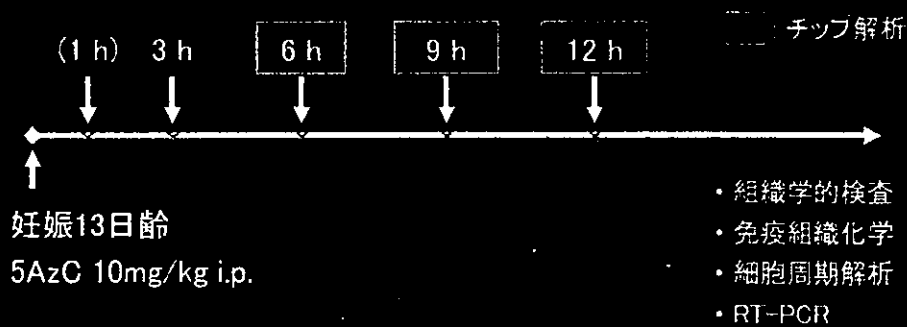
出生後の神経障害  
(生後0日~)

## 5-Azacytidine (5AzC) 暴露ラット胎仔脳での 毒性発現過程における遺伝子発現の解析

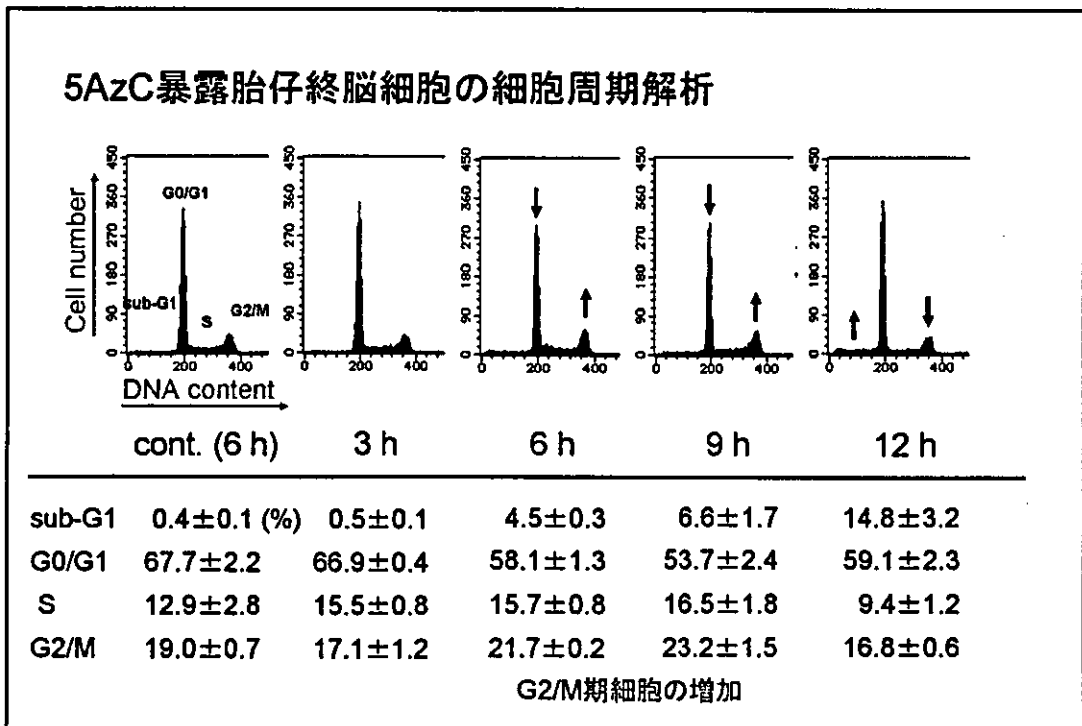
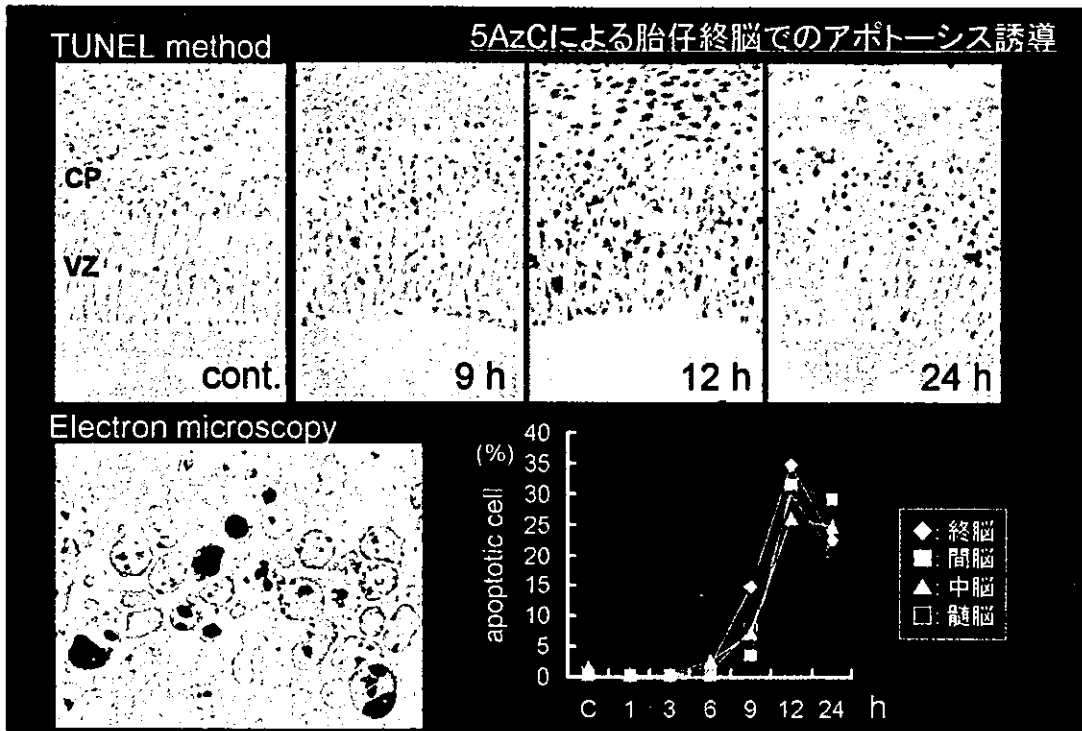
5-Azacytidine (5AzC) : cytidine のアナログ、脱メチル化・DNA傷害作用

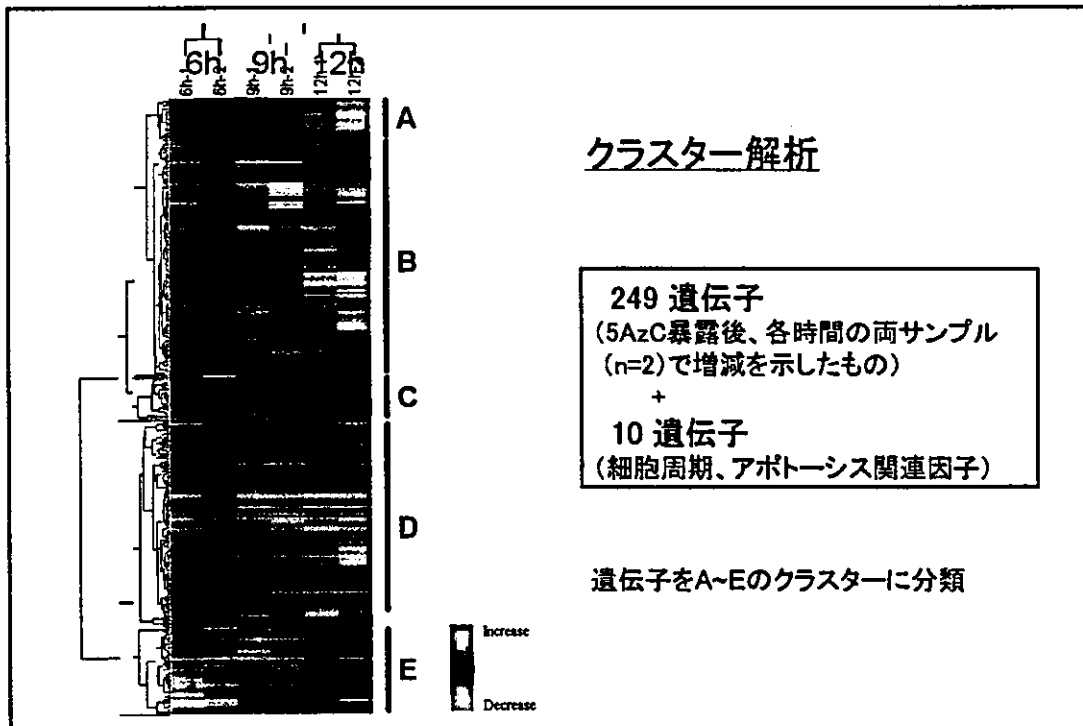
投与条件 : 妊娠13日齢 Jcl:Wistar rat (n=2), 10 mg/kg i.p.

チップ解析 : GeneChip (Rat Expression Array 230A, AFFYMETRIX)



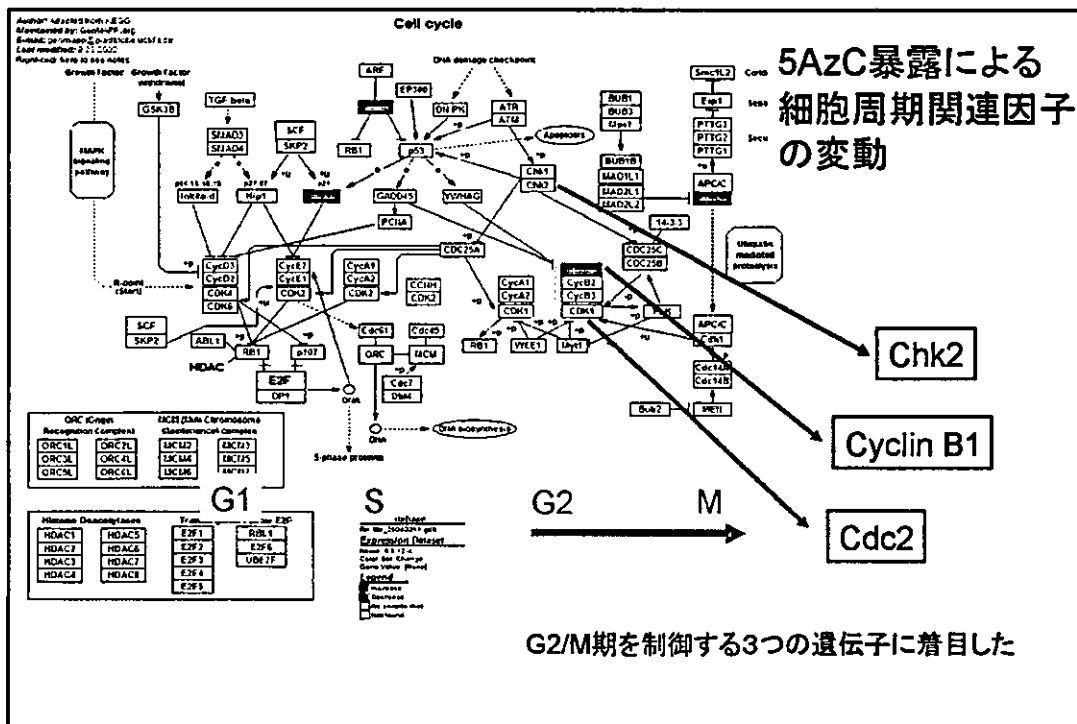
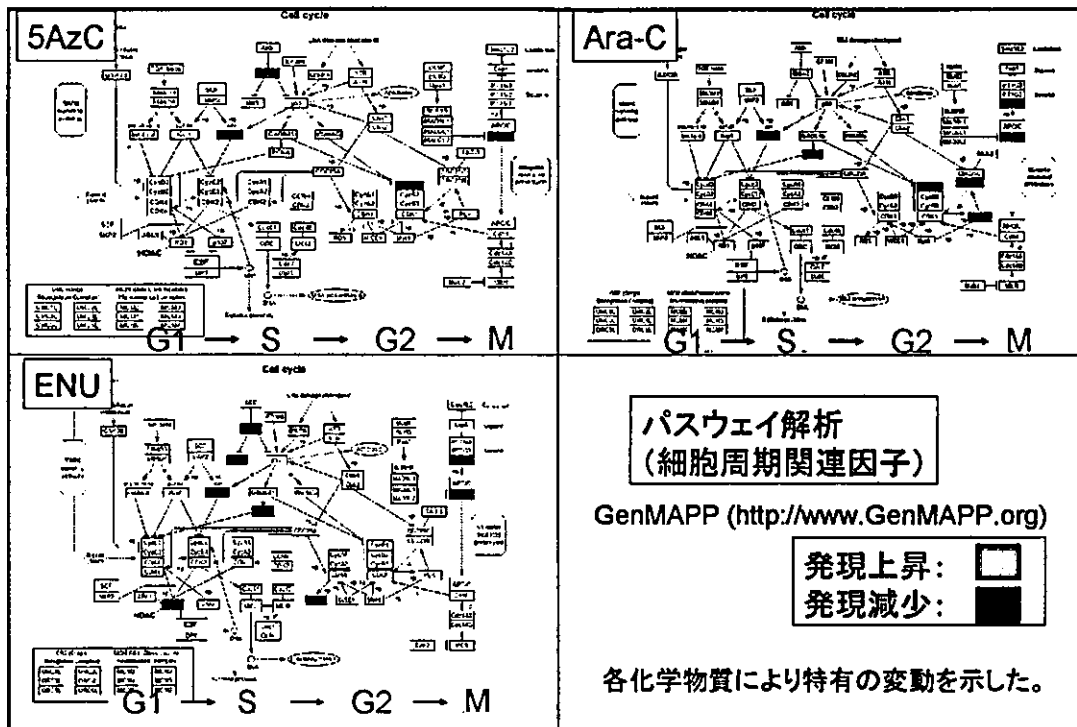




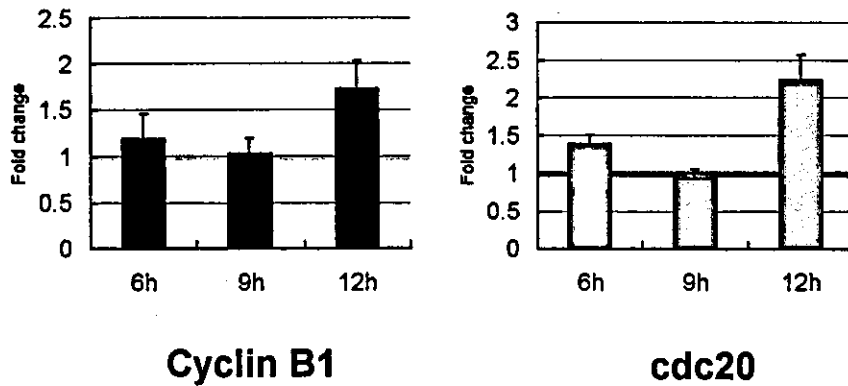


**5AzC暴露による細胞周期関連因子の変動**

Accession No.	Genes	Fold change			Cluster
		6h	9h	12h	
<b>Cell cycle</b>					
NM_022183.1	topoisomerase (DNA) II alpha (Top2a)		1.3		E
U05341.1	Cdc20 / p55CDC			1.5	D
X64589.1	cyclin B (Ccnb1)			1.4	D
NM_012760.1	lost on transformation 1 (Lot1) / pleiomorphic adenoma gene-like 1 (Plagl1) / Zac1	-1.2			D
NM_054008.1	rgc32 protein (Rgc32)			-1.9	A
NM_022683.1	vasopressin-activated calcium-mobilizing receptor protein (VACM-1) / cullin-5 (Cul5)			-1.6	A
NM_021662.1	DNA polymerase delta, catalytic subunit (Pold1)			-1.5	A
NM_017258.1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative (Btg1)			-1.3	A
<b>p53-target genes</b>					
NM_012923.1	cyclin G1 (Ccng1)	1.9	3.0	3.2	D
U24174.1	p21 (Waf1 / Cip1)		4.1		E
BF548539	ESTs, Moderately similar to S15349 mdm2 protein - mouse (M.musculus)		1.6		D
NM_031821.1	serum-inducible kinase (Snk) / PIK2		1.4		D
NM_012588.1	insulin-like growth factor-binding protein (Igfbp3)		2.3	1.9	D
<b>Growth factor</b>					
NM_022266.1	connective tissue growth factor (Ctgf)		1.6		D
NM_019198.1	fibroblast growth factor 17 (Fgf17)		1.5		D
NM_030859.1	midkine (Mdk)		1.3		D



mRNAの発現比(Realtime PCR)



GeneChipと同様、12時間目に発現増加

