

れているが、ヒト肝における promazine 類の代謝に最も関与するのは CYP1A1 であると Wojcikowski らによって報告されている。そして、我々の解析において Chlor-promazine の曝露によって最も強く誘導された CYP は CYP1A1 であった。PPAR γ アンタゴニストである diclofenac と PPAR α のアゴニストである gemfibrozil は CYP の発現パターンが非常に類似していた。Diclofenac は主に CYP2C9 により代謝され 4' 位の水酸化を受けるが、一部 CYP3A4 により代謝され、5' 位が水酸化されることも明らかとなっている。我々の結果においても CYP2C9 の発現量は 11.8 倍まで亢進しており、また、CYP3A4 も 3.4 倍まで発現が亢進していることが示された。Diclofenac は他の非ステロイド性消炎鎮痛剤と同様に酸化ストレスの原因となるが、ストレス応答タンパクである heme oxygenase 1(HMOX1)の発現誘導は 1.9 倍とわずかであった。Diclofenac と APAP のみに共通して誘導が確認された応答性遺伝子としては転写活性化因子である ATF3 があった。なお、ATF3 は DNA 損傷によって活性化されることが知られている。

一方で遺伝子それぞれの発現変動の予測が困難であることは、過去の文献によって報告された遺伝子発現の傾向が一致しないことが少なからず確認されることから明らかである。文献によって発現の誘導あるいは抑制についての報告が異なった遺伝子、または我々の本研究におけるデータとは反対の傾向を示した遺伝子について検討した。

Wortelboer らはラットを用いて isoniazid

投与時の遺伝子発現を解析し、CYP の発現に変化は見られないと報告しているが、Lake らによれば CYP1A2, 2B1/2, 2E and 4A がラットの肝臓で誘導されことを報告しており、また、Longueville も CYP3A1 の誘導を報告している。さらに同じく isoniazid を用いた実験であるが、Nishimura らはヒトにおいて CYP1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2E1 and 3A の発現が抑制されると報告しているが、Madan らによれば、CYP2E1 に関しては発現が誘導されると報告している。なお、我々の解析では CYP2A6, 2B6, 2C8, 3A4, 3A7, 4F2, 4F3 の誘導が見られたが、発現が抑制される遺伝子の中に CYP3A5 が含まれていることは、過去の報告で CYP3A が誘導されていることと相反するものでもあり、興味深い結果であった。また、GADD153 が 5.8 倍に発現誘導されており、用いた種は異なるものの de Longueville らの報告にある 3.2 倍の誘導と傾向が一致する。Dimethylnitrosamine の曝露による遺伝子についてはあまり変動は見られなかったが、発現変動が確認できた遺伝子に BUB1 と cyclin E2 という細胞周期の制御に深く関与している 2 つの遺伝子が含まれていた。特に cyclin E2 の高発現はヒトにおける癌の発生または進行に深く関連していることが知られているが、我々のデータでは dimethylnitrosamine だけが cyclin E2 の誘導を示し、他の化合物では誘導が見られなかったという点で興味深い。

我々が phenobarbital をヒトヘパトサイトに曝露した結果では CYP3A4, 3A5, 3A7

の誘導が確認されたが、この結果は Usui らが HepG2 cell を用いて解析した結果と一致した。

以上から、遺伝子発現データの解析にあたっては、単に一つの遺伝子の発現量に注目し、薬物に対する細胞の応答を予想することは極めて危険であり、慎重なデータの取扱いと深い考察が必要とされると言える。また、データベースの信頼性をより高めるために、サンプル数（実験の繰り返し回数）やサンプルの調製、さらにデータの正規化やフィルターによる解析対象遺伝子の絞り込みなどについても、今後更なる検討が必要と考えられた。

1-3. 肝毒性予測モデルの検討について

データベース化された遺伝子発現データを利用し未知化合物の毒性や薬効を予測するには、メカニズムレベルでの検証が非常に重要であると考えられるが、医薬品開発時に化合物ライブラリーの毒性をスクリーニングする場合にはより効率の良い方法が求められる。本研究では、毒性や薬効などが類似する化合物群と類似しない化合物を遺伝子発現レベルで効率良く予測するための手法として、遺伝子発現データを用いたモデル作成を検討した。

モデル作成には ADMEWORKS / ModelBuilder を使用した。本ソフトウェアは化学性に基いた化合物群の解析と予測モデルを構築するための化学データ解析支援／予測モデル作成システムであり、本来は化合物の構造情報からデ

ィスクリプターを発生させ予測モデルを作成するソフトウェアである。今回は GeneChip 解析で得られた 23 化合物の遺伝子発現データ(24 時間後)をサンプルとして用い、パラメーターにはクラスタ解析および主成分分析に用いた遺伝子を使用した。

4種類のモデルを作成した。1 つ目のモデル(model_a)は肝毒性を誘発するとされている化合物を「1」と設定し、そうではない化合物を「2」としている。ただし gemfibrozil はヒトにおける肝臓の誘導は報告されていないため、肝毒性化合物とはしなかった。また、重篤な肝障害を誘発することが報告され、医薬品としての販売が中止となった troglitazone は肝毒性薬剤とした。また、pioglitazone、rosiglitazone や SAHA、tamoxifen の誘導体については肝毒性が無いと仮定してモデルを作成した。その結果、Cross validation error が 4 つ検出され、prediction ratio も約 83%と低く、この原因については、使用したパラメーターの中にこの 2 つの「クラス」、即ち肝毒性の発現とそうではないことを十分に説明することのできる遺伝子発現データのセットが無いことが原因であると思われた。化合物による毒性の発現機序やあるいは毒性の発現を回避する機序に関与する肝細胞の遺伝子レベルでの応答は、処理される薬剤や発現する毒性の種類によってそれぞれ異なることは言うまでもなく、本研究における階層型クラスタ解析や主成分分析の結果からもそれは明らかである。つまり「model_a」の結果は、肝毒性の発現という現象と発現しないという

現象を、少なくとも遺伝子発現レベルでは明確に分けることが困難であることを示す結果であると。肝毒性をタイプ別に予測するためには、各毒性につき複数の化合物を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施し、予めタイプ別のクラスターが作られることを確認した上で実際にモデル作成とその検証を行わなければならない。しかし、今回の実験では各毒性につき1化合物の設定であり、その検証は実施不可能であった。そこでその代わりに、それぞれの誘導体と明確なクラスターを形成した SAHA、troglitazone 類および tamoxifen について、それぞれのクラスターを他と区別するモデルの作成を行い、その精度を確認した(model_b~d)。その結果、何れも model_a に比べて cross validation error が少ない結果が得られた。特に主成分分析において明確なクラスターを形成した SAHA とその誘導体はエラーがわずか1つであり prediction ratio も 95.7%と良好な結果が得られた。これはあくまでも、今回の研究で使用した 23 種類の化合物の中で、SAHA とその誘導体 4 種の計 5 化合物とその他の 18 化合物とを遺伝子発現データを基に分類するためのモデルであり、肝毒性を予測するものではない。しかしこれらの結果は、今後の実験及び解析方法の検討によっては遺伝子発現解析データを基に精度の高い肝毒性予測モデルを構築することができる可能性を示唆するものと言える。先述のとおり、このような予測モデル作成には今後より多くの肝毒性薬剤、あるいは肝毒性陰性の薬剤を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝

子発現レベルでの毒性を分類する必要がある。そのためには非常に多くの遺伝子発現データが必要となるが、それを実現できれば、その分類に必要な最小限の遺伝子を Modelbuilder によって抽出し、そのパラメーター遺伝子の発現定量のみで肝毒性を予測することが可能となる。さらにパラメーターのみの定量であれば、TaqMan RT-PCR などの定量 PCR 技術を用いることで、多検体の同時測定が可能となり、毒性スクリーニングの HTS 化の実現を期待できる。

課題としては、マイクロアレイのデータベースを構築する際のデータ信頼性の向上が挙げられる。マイクロアレイによる遺伝子発現定量解析は、ハードおよびソフト共に著しい進歩により精度の向上が続いているものの、決して十分なものとは言えない。よってサンプル数、データの解析方法も含めた実験条件の最適化について今後さらに検討を重ねなければならない。

さらにもう一つの課題として、モデルに用いるパラメーターの抽出方法がある。今回の得られた 4 つのモデルでは予測因子として残るパラメーターが 2 個あるいは 3 個と非常に少ない。これは遺伝子解析のデータをもとに 2 つの現象を説明するにはこれだけのパラメーターで必要十分であるということで、理論上は正しい結果である。しかし、特に in vitro 試験においては培養の条件の微妙な違い、細胞のコンディションの違いが遺伝子発現に影響を与えるため、今回の方法で Modelbuilder より得られたモデルを用いて毒性を予測することは精度および信頼

性の点でまだ不十分であると考えられる。よって、今後は実験間誤差の影響をある程度緩衝できるようなモデル作成法を検討する必要があると考える。例えばモデル作成の過程では correlation test と呼ばれる検定を行い、各実験間における遺伝子発現の相関の高い複数の遺伝子群の中から自動的に一つの遺伝子のみを残して他の全てを除外している。このようなパラメーターを利用して複数のモデルを評価に用いることや、パラメーターの数がもう少し多くなるように ModelBuilder の条件を検討するなどが考えられる。これらについては今後検討が必要である。

1-4. 細胞培養・薬剤曝露のハイスループット試験系の開発についての考察

本研究では、医薬品開発時における毒性試験の HTS (high-throughput screening) 化の検討も実施した。In vitro での毒性スクリーニングを行う際には、播種した細胞の培地交換、薬剤の曝露および細胞溶解液やアッセイ用試薬の添加といった作業を伴うが、これらの作業に必要な労力は非常に大きく、スクリーニングの効率を大幅に低下させる。この問題をクリアし、in vitro での毒性スクリーニングの HTS 化を実現するため、アッセイ用ロボット Workstation Genesis を用いて作業の自動化を行い、本研究における遺伝子発現解析のための細胞培養において大きな成果をあげた。また、細胞からの核酸サンプルの抽出および精製も迅速に対応可能な状況にある。MTT アッセイのような一般的な細胞毒性試験の HTS 化が可能であるだけでなく、肝毒

性の発現メカニズムが化合物で解明され、マーカーとなる遺伝子を得ることができれば、HTS 系により遺伝子発現解析を高効率で行い、遺伝子レベルでの毒性予測スクリーニングを効率よく行うことができると思う。本プロジェクトでは、このような HTS のためのハードの整備という面においても成果を得ることができた。

1-5. プライマリーヒト腎細胞を用いた薬剤曝露および遺伝子発現解析系の検討についての考察

肝毒性と同様に薬剤の投与による副作用が問題となっている腎毒性のメカニズム解析および毒性予測も非常に重要な課題である。腎は化学物質の主要な排泄器官の 1 つであることから、薬剤の影響を受ける機会が多く、また、その発達した代謝機能により活性代謝物の障害を受ける機会も多い。また、浸透圧や酸塩基平衡といった生理機能の維持に重要な働きをしていることから、これらの機能の障害は生体の機能に大きな影響を与える。このように腎臓は肝臓と並んで薬剤による毒性が発現しやすい臓器と言え、薬剤による毒性発現の早期予測が求められている。

本プロジェクトにおいてはヒトプライマリー腎細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析のための培養系の検討を行い、薬剤 (benzyl penicillin) に対する時間依存的なトランスポーター取り込み活性を観察することができた。この結果は、プライマリーヒト腎細胞とその培養系がヒトの腎臓における薬剤に対する応答反応の解析に非常に有用であることを示すと共に、

プライマリーヒト肝細胞と同様に、トキシコゲノミクス的手法を用いることによって、薬剤による腎毒性発現メカニズムを遺伝子発現レベルで解析することができる可能性を示唆する。しかし膨大な遺伝子発現データを用いて腎毒性の早期予測を実現するには、今回のプライマリーヒト肝細胞を用いた解析と同様に、培養条件や薬剤の用量および薬剤処理時間等の設定について、より詳細な検討が必要である。

2. 実験動物データのヒトへの外挿を目指した基本手法の確立・プロテオーム解析への応用

2-1. 遺伝子発現変化の解析手法

GeneChip を用いた解析では、一般に個別別データや再現性を見るために複数のチップを用いてデータを取得することにより、発現変化を示した遺伝子を統計的な手法を用いて選択可能になり、データの信頼性も増す。しかし、チップ自体が高価なこともあり、データポイントに対して複数枚のチップを使うことにより、用量やサンプリングタイムの選択が限られることになる。これまでの我々の検討、および他の GeneChip を用いた解析により、RT-PCR データとの相関性の高さからチップデータの信頼性が高いこと、また、マウス個体間でのばらつきが比較的小さいことがわかっている。一方で、用量、サンプリングタイムを変化させた場合に結果が大きく変化する傾向にあり、各データポイントでの信頼性を増すよりも、より広く用量、サンプリングタイムを設定する方が有益な情報が得られると考えられ

ている。本研究では、各データポイントに対して一枚のチップのみを用いたことにより、発現変化した遺伝子の選択にあたっては、統計的な手法を用いる事ができず、発現比の値からの判断が必要となった。一般に用いられている方法では、単純に一定の比の値にて判定されるが、この場合、発現の弱い領域でのノイズの問題と、発現の高い領域での選択漏れの危険性が生じる。そこで、単純に発現比のみではなく、シグナル強度を考慮して段階的に有意水準を変化させる手法を開発した。最終的に回帰曲線を用いることにより、発現強度に応じて連続的に有意水準を変化させ、遺伝子を選択する方法を確立した。これにより、発現変化ありと選択された遺伝子に関する信頼性を増すことができた。また、こうして選択した遺伝子に関し、共通する作用を持つ化合物間での共通性を調べることにより、再現性を持たせることができる。

2-2. TK6 細胞での遺伝子傷害性物質に関する検討

これまでに多くの遺伝子傷害性物質に関して検討を行ってきたが、共通性をもって変化する遺伝子は少なく、全てに共通して変化する遺伝子は存在しなかった。しかし、遺伝子傷害性物質のみに比較的共通性を持って変化する遺伝子群を指標遺伝子として選択できた。本年度は、これら遺伝子の有用性を検討するため、まず RT-PCR 法によりチップデータの再現性を確認したところ、良い相関が得られ、GeneChip データの信頼性が確認できた。一方で、発現変化の見られなかつ

た化合物に関してはやはり変化がないことが確認された。この理由として、解析に単一の用量とサンプリングタイムのみしか用いていない点が考えられたため、RT-PCR法を用いてより広い濃度範囲およびサンプリングタイムに関して検討を行ったところ、高用量および遅いサンプリングタイムにて陽性を示す例が観察できた。この結果より、遺伝子発現解析においては、より広い用量およびサンプリングタイムに関して検討を行う重要性が示唆された。しかし、一般にチップが高価であるため、詳細な検討を行うことが難しいため、今回のように、ある程度の解析から対象とある遺伝子を絞り込み、RT-PCR の手法を使ってより広範な解析を加えていくことは、有用であると考えられる。

2-3. グリタゾン系糖尿病治療薬による遺伝子発現解析による肝毒性の検討

PPAR γ レセプター作用薬であるグリタゾン系化合物は、その作用を介してインシュリン低感受性のII型糖尿病の治療薬となる。3種の構造の類似した化合物のうち、トログリタゾンは市販後重篤な肝毒性のため使用が中止された。本研究ではこの毒性発現のメカニズムを、遺伝子発現解析を用いて検討する事を目的とした。トログリタゾンは従来動物実験では肝毒性が予見できず、フェノタイプとして毒性は見られなくても、遺伝子発現レベルでは何らかの変化が起きている可能性があり、発現解析により毒性のメカニズム解析に迫れる可能性があるとして期待される。一方、トログリタゾン以外のグリタゾン系化合物についても、ヒトでの肝毒

性を持つ可能性も示唆されており、共通のメカニズムおよびトログリタゾン特異的なメカニズムでの肝毒性の解析を行った。その結果、共通した変化として脂肪酸合成に関わる遺伝子の変化がクローズアップされた。もともとPPAR γ 作用薬は脂肪細胞での脂肪合成を活性化するが、肝臓においても脂肪酸の合成を促進すると考えられる。一般に糖尿病患者では、脂肪肝を伴う場合が多く、さらに脂肪酸合成が促進される事により、脂肪肝の症状が悪化すると考えられる。事実、ピオグリタゾンは肥満モデルマウスを使った検討で肝毒性を示すことが報告されており、グリタゾン系薬剤共通のメカニズムとして、脂肪肝の悪化による毒性発現のメカニズムが考えられる。正常のマウスおよび健常人では、肝臓における脂肪の蓄積が少ないため、これら薬剤による脂肪合成の亢進が重篤な毒性としては現れず、調節可能であるためフェノタイプとしての毒性が予測できなかったとも考えられる。

一方、トログリタゾンに特異的に変化する遺伝子を解析した結果、ミトコンドリアの機能関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、酸化的傷害応答遺伝子、炎症関連遺伝子などが特徴として見つかった。これらから類推されるメカニズムとして、活性酸素を介したミトコンドリアの酸化的傷害によりアポトーシスが引き起こされ、肝細胞の傷害が起きるとともに、局所での炎症反応が引き起こされることが考えられる。実際に、トログリタゾンだけが、他の薬物と異なりキノタイプ活性代謝物が生成するため、そこから活性酸素が

発生して肝細胞に傷害を与えたと説明することができる。生体側の防御機構によりこの作用単独ではそれほど重篤な肝毒性は起こらないにしても、脂肪肝の悪化との相乗作用により、若しくは関連した防御機構に障害のある個人において重篤な肝毒性へと結びつくことが考えられる。今後、この仮説を元にヒトにおける重篤な肝毒性メカニズムの解明にアプローチできることが期待される。

以上の結果より、正常な個体ではフェノタイプとしては現れない毒性も、遺伝子発現レベルでは何らかの変化が起きており、発現解析から従来は困難であった毒性の予測が可能になることが示唆され、遺伝子発現解析を用いたトキシコゲノミクス研究の有用性が示された。

2-4. 乳癌治療薬タモキシフェン誘導体による遺伝子発現解析

タモキシフェンはエストロゲンリセプター(ER)に対するアンタゴニストとして作用することによりホルモン依存的な乳癌細胞の増殖を抑える。しかし、子宮においては逆にアゴニストとして作用し副作用を引き起こす事が知られており、同じ薬物でも作用する組織により効果が異なる。これは、化合物自身の構造によるERとの相互作用、主に働くERのサブタイプおよびコアクチベーター、コリプレッサーなどとの相互作用によりもたらされ、薬物の微妙な構造変化により各種組織に対する作用が異なることが予測される。一方、タモキシフェンはラットに対して肝発現性を示すという事実からDNAとの反応性も調べられており、 α 位の水酸化が代

謝活性化のメカニズムと考えられている。そこで、この水酸化が起こりにくい構造修飾を行った化合物を用いて、遺伝子傷害性の変化を遺伝子発現の変化から検討したが、肝臓においては明確な差異は認められなかった。マウスでは肝癌ができず、遺伝子傷害性も弱いという事実もあり、今回の処理条件ではそれを検出できるだけの変化が見られなかった可能性もある。

一方、合成化合物である ΔC_2H_5 体のみ特徴的な変化として、代謝酵素であるCYP2b類の誘導が見られた。一般に、タモキシフェン誘導体はヒトではCYP3A4で代謝されるが、そのマウスホモログは発現に変化が見られなかった。これは、おそらくこれらの代謝酵素の定常レベルでの発現量が多いためであると考えられる。これに対しマウスで誘導がかかったCYP2b10, 20のヒトホモログはCYP2b6であり、フェノバルビタールで誘導がかかる事が知られているが、定常レベルでの発現が低いため誘導がかかりやすいと考えられる。一般に酵素誘導がかかる場合には、他の薬物の代謝が影響を受けるため望ましくない作用と考えられるが、酵素誘導に関する構造活性相関にも興味を持たれる。

子宮においては、Tam, 4OHに関して顕著な子宮肥大作用がみられ、アゴニストとして働いてエストロゲン様作用を示したと考えられる。事実、ER関連遺伝子に関しても動きが見られていたが、作用の弱かったTre, ΔC_2H_5 との間に明確な区別はみられなかった。Tre, ΔC_2H_5 に関しては子宮に対する副作用が低いこと

が期待されるが、ER を介した作用調節のメカニズムは複雑であるため、フェノタイプを遺伝子発現から予測するため有効なマーカーの選択には、さらに検討が必要である。現時点においては、子宮肥大という肉眼的所見の方が、遺伝子発現よりも明確な解答を与えている。

2-5. ヒトとマウスの遺伝子発現情報の直接比較

マウスとヒト遺伝子のホモログの情報から、両者のデータを結びつけ、比較することが可能となった。今回は、グリタゾン系薬物とタモキシフェン誘導体に関して、マウスを用いた *in vivo* での検討とヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* での検討を平行して行い、得られたデータから両者の直接比較を行った。その結果、両者の相関性は非常に低いことがわかった。種の違いおよび *vivo* と *vitro* の違いという二つのファクターがあるため一概には言えないが、両者を結びつけることの難しさが浮き彫りとなった。トキシコゲノミクス研究では、遺伝子発現を手がかりに最終的にヒトの *vivo* での毒性を予測することを目的としているが、そのためにはまだ今後乗り越えなければならない課題も多い。ヒトでの予測を行うためには、可能であれば直接ヒトでの試料を使った解析が有効であると考えられ、そのためには今後非侵襲的な試料を使った解析の重要性が高まったと言える。肝臓での毒性を予測するために肝臓組織を採取することは難しいため、血液や尿中にて有効となる変化を追う必要がある。その意味では、遺伝子発現という指標ではなく、タン

パク、代謝産物を対象としなければならず、プロテオミクス、メタボノミクス解析という方向性が重要であると考えられる。

D. 結論

プライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現解析では、構築したプライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現解析系を用い、肝毒性発現予測のための遺伝子発現データベースを作成した。この際、細胞培養・薬剤暴露用ロボットにより細胞培養の HTS 化について検討を行い、実験作業の高効率化を実現することができた。今回使用したロボットは周辺機器の拡張によって RNA 抽出および標識 cRNA 調製への対応が可能であり、今後より多くの化合物を用いた遺伝子発現データベースの構築に大きく貢献することができる。

構築したデータベースについては、PPAR γ 作用薬、HDAC 阻害剤、抗エストロゲン作用薬とそれらの誘導体を用いて検証を行った結果、構造の類似した化合物間でそれぞれ遺伝子発現プロファイルが近似しており、本データベースを構築した際のデータ解析方法が有効であったことが示された。

また、モデル作成ソフト (ModelBuilder) を利用し、肝毒性予測モデル構築とその実用化の可能性について検討を行った。この結果は、データベースに用いる精度の向上や解析手法の最適化の検討を続けることで、遺伝子発現レベルでの毒性予測システムの高精度化とマーカー遺伝子を利用した毒性試験の HTS 化が可能であることを示唆する。

さらに、プライマリーヒト腎細胞を用いた薬剤暴露と遺伝子発現解析系についても検討を行った。網羅的遺伝子発現解析によって腎毒性発現メカニズムを解析するための基礎検討として培養系の検討を行った。その後、benzyl penicillinを用いてトランスポーターの取り込み活性を測定した結果、時間依存的な取り込み活性を確認することができ、今後の網羅的遺伝子発現解析を用いた毒性発現メカニズム解析に有用であることを示唆するデータを得ることができた。

実験動物データのヒトへの外挿を目指した基本手法の確立・プロテオーム解析への応用については、GeneChipを用いた解析により、各種薬剤処理により変動する遺伝子群を、遺伝子発現強度に応じた有意水準にて選択することにより、ある程度信頼性をもった解析手法を確立することができた。1万を超える遺伝子群から、有意な変化を示す遺伝子を網羅的に検出できる手法は非常に有益であり、直接メカニズムの解明にはつながらなくても、データベースとして蓄積された各種薬剤による発現変化の情報は、トキシコゲノミクスプロジェクト等で構築される大規模な外部データベースとともに、今後の毒性研究にとって有益な情報となることが期待される。

我々の検討においては、まず遺伝子傷害性物質については、in vitroのヒト培養細胞を用いた系においてスクリーニングを行う際に有効となる指標遺伝子を選ぶことができた。今後はさらに多くの薬剤についてその有効性を検討することで、マーカーとしての有効性が検証されること

を期待する。なお、この際には網羅的なチップを使用する必要はなく、より簡便迅速で安価な定量的RT-PCRを用いた方法が有効である。

次に、グリタゾン系化合物の肝毒性の解析に関しては、マウスにおいてはフェノタイプの変化としては現れないものの、遺伝子発現は変化していることがわかり、毒性予測における有効性が示された。グリタゾン系化合物共通にして、脂肪酸合成関連遺伝子の変化が認められ、糖尿病患者での脂肪肝を悪化させることが共通した肝毒性のメカニズムとして考えられた。一方、トログリタゾン特異的な肝毒性に関しては、この薬物のみから生成するキノンタイプの代謝物の関与が考えられ、特徴的に変化した遺伝子の機能より、活性酸素を介したミトコンドリアの酸化的傷害により、アポトーシスを引き起こし、肝細胞の傷害が起きると予想した。脂肪肝との相乗作用によりトログリタゾンに特異的な重篤な肝障害へとつながったと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis, enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based non-hydroxamates, Takayoshi Suzuki, Yuki Nagano, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matsuura, Sakiko Maruyama, Mineko Kurotaki, Hidehiko Nakagawa, and Naoki Miyata, *J. Med. Chem.*, 48, 1019-1032 (2005).

- 2) Design, synthesis and biological activity of novel PPAR γ ligands based on rosiglitazone and 15d-PGJ₂, Shinya Usui, Takayoshi Suzuki, Yoshifumi Hattori, Kazuma Etoh, Hiroki Fujieda, Makoto Nishizuka, Masayoshi Imagawa, Hidehiko Nakagawa, Kohfuku Kohda, and Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 1545-1551 (2005).
- 3) Identification of a potent non-hydroxamate histone deacetylase inhibitor by mechanism-based drug design, Takayoshi Suzuki, Azusa Matsuura, Akiyoshi Kouketsu, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 331-335 (2005).
- 4) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤開発の最前線, 鈴木孝禎、宮田直樹, *ファルマシア*, **41**, in press (2005).
- 5) 癌の分子標的治療薬の開発: 非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の設計、合成と生物活性評価, 鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹, *有機合成化学協会誌*, **63**, in press (2005).
- 6) Thiol-based SAHA analogues as potent histone deacetylase inhibitors, Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matsuura, Arihiro Kohara, Shin-ichi Ninomiya, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**(12), 3313-3317(2004).
- 7) Design and synthesis of cyclic urea compounds: a pharmacological study for retinoidal activity, Masaaki Kurihara, Abu Shara Shamsur Rouf, Hisao Kansui, Hiroyuki Kagechika, Haruhiro Okuda, Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**(16), 4131-4134 (2004).
- 8) Associations between chemical properties and oxidative damage due to nitrophenanthrenes and their related compounds in primary rat hepatocytes, Nobuyuki Sera, Hiroshi Tokiwa, Hideo Utsumi, Shigeki Sasaki, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, *Polycyclic Aromatic Compounds*, **24**(4-5), 487-500 (2004).
- 9) A planar catechin analogue having a more negative oxidation potential than (+)-catechin as an electron-transfer antioxidant against a peroxy radical, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Miyazaki, W. Hakamata, S. Urano, T. Ozawa, H. Okuda, S. Fukuzumi, N. Ikota, and K. Fukuhara, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 26-31(2004).
- 10) In vivo mutagenicity of benzo[f]quinoline, benzo[h]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the lac Z transgenic mice, Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K, *Mut. Res.*, **559**, 83-95, (2004).
- 11) DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitro-benzanthrone in Muta Mouse, Arlt VM, Zhan L, Schmeiser HH, Honma M, Hayashi M, Phillips DH, Suzuki T,

- Environ. Mol. Mutagen.*, 43, 186–195, (2004).
- 12) Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells, Zhan L, Sakamoto H, Sakuraba M, Wu de S, Zhang LS, Suzuki T, Hayashi M, Honma M., *Mutat Res.*, 557, 1–6. (2004).
- 13) Novel histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, enzyme inhibition, and binding mode study of SAHA-Based non-hydroxamates, Takayoshi Suzuki, Yuki Nagano, Azusa Matsuura, Arihiro Kohara, Shin-Ichi Ninomiya, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(24), 4321–4326 (2003).
- 14) Activation of the Human Ah Receptor by Aza-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Halogenated Derivatives, Ken-ichi Saeki, Tomoaki Matsuda, Taka-aki Kato, Katsuya Yamada, Takaharu Mizutani, Saburo Matsui, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, *Biol. Pharm. Bull.*, 26(4), 448–452 (2003).
- 15) Structural activity relationship between Salmonella-mutagenicity and nitro-orientation of nitroazaphenanthrenes, Hiroshi Tokiwa, Nobuyuki Sera, Kiyoshi Fukuhara, Hideo Utsumi, Shigeki Sasaki, Naoki Miyata, *Chemico-Biological Interactions*, 146(1), 19–25(2003).
- 16) Metabolic activation of 10-aza-substituted benzo[a]pyrene by cytochrome P450 1A2 in human liver microsomes, Yamada K, Suzuki T, Hakura A, Mizutani T, Saeki K., *Mutat Res.* 557, 159–165. (2004).
- 17) In vivo transgenic mutation assays., Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Heddle JA, Heflich RH, Lambert I, Martus HJ, Mirsalis JC, Suzuki T, Yajima N., *Mutat. Res.*, 540, 141–151 (2003).
- 18) Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in lambda/lacZ transgenic mice, Itoh T, Kuwahara T, Suzuki T, Hayashi M, Ohnishi Y., *Mutat. Res.*, 539, 99–108. (2003).
- 19) DNA Cleavage via Superoxide Anion Formed in Photoinduced Electron Transfer from NADH to gamma-Cyclodextrin-Bicapped C60 in an Oxygen-Saturated Aqueous Solution, Ikuo Nakanishi, Shunichi Fukuzumi, Toshifumi Konishi, kei Ohkubo, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito and Naoki Miyata, *J. Phys. Chem. B*, 106(9), 2372–2380 (2002).
- 20) Enhanced Radical-Scavenging Activity of a Planar Catechin Analogue, Kiyoshi Fukuhara, Ikuo Nakanishi, Hisao Kansui, Etsuko Sugiyama, Mitsuhiro Kimura, Tomokazu Shimada, Shiro Urano, Kentaro Yamaguchi, and Naoki Miyata, *J. Am. Chem. Soc.*, 124(21), 5952–5953 (2002).
- 21) Matsuoka, Atsuko; Takeshita, Kenji; Furuta, Ayumi; Ozaki, Masayasu;

Fukuhara, Kiyoshi; Miyata, Naoki. The 4'-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol, *Mutation Research*, 521(1-2), 29-35 (2002).

22) Effect of 10-aza-substitution on benzo[a]pyrene mutagenicity in vivo and in vitro, Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Hayashi M, Hakura A, Mizutani T, Saeki K., *Mutat. Res.* 521, 187-200 (2002).

23) Dinitropyrenes induce gene mutations in multiple organs of the lambda/lacZ transgenic mouse (Muta Mouse), Kohara A, Suzuki T, Honma M, Ohwada T, Hayashi M., *Mutat Res.* 515: 73-83 (2002).

24) Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaMouse), Kohara A, Suzuki T, Honma M, Ohwada T, Hayashi M., *Mutat. Res.* 515: 63-72 (2002).

2. 学会発表(主要なもの)

1) 新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の設計・合成と酵素活性評価、松浦梓、長野友紀、鈴木孝禎、幸田光復、宮田直樹、第50回日本薬学会東海支部大会、名古屋、2004年、7月3日。

2) Synthesis and Biological Activity of Thio-Based Small Molecule Inhibitors of Human Histone Deacetylases, Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matuura, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, 15th Conference on Organic Chemistry (IUPAC ICOS-15), Nagoya, August, 3, 2004.

3) Gene expression profiles in liver of

thiazolidinedione-treated mice and consideration on mechanisms for troglitazone hepatotoxicity, Y. Luan, R. Palanisamy, A. Kohara, S. Ninomiya, N. Miyata, M. Honma, T. Yamaguchi and T. Suzuki, Toxicogenomics International Forum 2004, Kyoto, October, 12-13, 2004.

4) 新規非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の設計と合成、鈴木孝禎、松浦梓、額額章泰、中川秀彦、宮田直樹、第30回反応と合成の進歩シンポジウム、札幌、2004年、10月20日。

5) 新規非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の設計、合成と生物活性評価、鈴木孝禎、長野友紀、額額章泰、松浦梓、中川秀彦、宮田直樹、第23回メディシナルケミストリーシンポジウム、つくば、2004年、11月24日。

6) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の合成と活性評価、額額章泰、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、名古屋大学COEプログラム第2回有機化学若手研究会、名古屋、2004年11月26日。

7) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の癌細胞増殖抑制作用、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第125回日本薬学会、東京、2005.3.29-31。

8) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の構造活性相関研究、額額章泰、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第125回日本薬学会、東京、2005.3.29-31。

9) チオール系ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のプロドラッグ化研究、久川伸

- 也、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 10) ヒストン脱アセチル化酵素を阻害する非ヒドロキサム酸系化合物の創製、松浦梓、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 11) PPAR γ アゴニスト作用をもつ 3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propanoic acid の構造修飾と活性評価、臼井伸也、藤枝広樹、江藤一摩、鈴木孝禎、中川秀彦、宮田直樹、第 125 回日本薬学会、東京、2005.3.29-31.
- 12) チアゾリジオン誘導体曝露ヒトプライマリー肝細胞の GeneChip 遺伝子発現解析 (KeyMolnet を用いた分子ネットワーク解析への展開)、小原有弘、鈴木孝昌、小貫慶昭、佐藤陽美、板井昭子、鈴木孝禎、宮田直樹、二宮真一、須藤哲司、第 124 年会、日本薬学会 (大阪 2004.3)
- 13) GeneChip を用いた薬剤曝露時の遺伝子発現解析 (Toxicogenomics への応用を目指して)、二宮真一、鈴木孝昌、鈴木孝禎、宮田直樹、小原有弘、須藤哲司、第 124 年会、日本薬学会 (大阪 2004.3)
- 14) Tissue mRNA Expression of Monkey MDR1 and Functional Analysis of Monkey MDR1/P-Glycoprotein, Yasuhisa Adachi, Declan Mulhern, Shin-ichi Ninomiya and Tetsuji Sudo, 7th Interanational ISSX meeting, 2004, Canada.
- 15) Ultimate Predictability for Human Drug Disposition Using Chimera Mice, Tae Inoue, Yasuhisa Adachi, Shin-ichi Ninomiya, Yoshinori Soeno, Chise Tateno, Horie Toru, Tetsuji Sudo and Katsutoshi Yoshizato, 7th Interanational ISSX meeting, 2004, Canada.
- 16) The Use of Chimeric Mice (Humanized Mice) in Drug Discovery and Development, Toru Horie, Chise Tateno, Tae Inoue, Yasuhisa Adachi, Hiroki Ebine, Yoshihiro Ohzone, Shin-ichi Ninomiya, and Katsutoshi Yoshizato, 19th Annual Meeting of ISSX, 2004 Kanazawa.
- 17) Utilization of Human Chimeric Mice for Predicting Human Metabolism of Drugs(I), Yoshihiro Ohzone, Yasuhisa Adachi, Hiroki Ebine, Atsuhiko Inaba, Yoshinori Soeno, Tae Inoue, Shin-ichi Ninomiya, Tetsuji Sudo, Katsutoshi Yoshizato and Tohiro Horie, 19th Annual Meeting of ISSX, 2004 Kanazawa.
- 18) Utilization of Human Chimeric Mice for Predicting Human Metabolism of Drugs(II), Yoshinori Soeno, Yoshihiro Ohzone, Yasuhisa Adachi, Hiroki Ebine, Yoshihiro Ohzone, Tae Inoue, Yoji Hakamata, Shin-ichi Ninomiya, Eiji Kobayashi, Katsutoshi Yoshizato and Tohiro Horie, 19th Annual Meeting of ISSX, 2004 Kanazawa.
- 19) 網羅的遺伝子発現解析データを用いた肝毒性予測モデルの構築、横川伸也, Declan Mulhern, 清水和, 小原有弘, 北島正人, Jose Martin Ciloy, 鈴木孝昌, 奥田晴宏, 宮田直樹, 二宮真一,

須藤哲司, 第 32 回 日本トキシコロジー学会学術年会(東京 2005.6).

20) Gene expression profiles of hepatotoxin-treated human hepatocytes can be used to cluster unknown compounds according to their mode of action, Declan Mulhern, Shinya Yokokawa, Hitoshi Shimizu, Arihiro Kohara, Takayoshi Suzuki, Haruhiko Okuda, Naoki Miyata, Shin-ichi Ninomiya and Tetsuji Sudo, 32th Annual Meeting of JSOT, 2005 Tokyo.

21) Gene-expression analysis by the Atlas™ glass microarray after gamma irradiation to the human lymphoblastoid TK6 cells; Effect of cell-cycle synchronization, T Suzuki, A Kohara, M Honma, H Sakamoto, M Hayashi, UKEMS annual meeting 2002.

22) Gene chip を用いた DEN 投与後のラット肝臓における遺伝子発現解析, 大内田昭信, 田中剛太郎, 鈴木孝昌, 中嶋圓, 兵庫淳志, 浜田修一, 降旗千恵, 日本環境変異原学会第 31 回大会.

23) プライマリーヒト肝細胞の GeneChip による遺伝子発現解析 (Toxicogenomics への応用を目指して), 小原有弘, 鈴木孝昌, 林 真, 菅野 純, 二宮真一, 須藤哲司, 日本薬学会第 123 年会.

24) GeneChip®を用いた薬剤曝露時の遺伝子発現解析 (Toxicogenomics への応用を目指して), 小原有弘, 鈴木孝昌, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 二宮真一, 須藤哲司, 日本薬学会第 124 年会 (2004.3).

25) チアゾリジンジオン誘導体曝露ヒトブ

ライマリー肝細胞の GeneChip®遺伝子発現解析 (KeyMolnet を用いた分子ネットワーク解析への展開, 小原有弘, 鈴木孝昌, 小貫慶昭, 佐藤陽美, 板井昭子, 鈴木孝禎, 宮田直樹, 二宮真一, 須藤哲司, 日本薬学会第 124 年会 (2004.3)

26) トキシコゲノミクス研究から見た大集積アレイの有用性と臨床診断用の次世代カスタムアレイに求められるもの, 鈴木孝昌, 文部科学省科学技術振興調整費ゲノムフロンティア開拓研究シンポジウム—次世代のマイクロアレイ—カスタムアレイの展開— (2004.3)

27) マウス肝発癌初期過程における遺伝子発現解析に用いる Oligonucleotide Microarray の開発, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中嶋圓, 浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代英夫, 榊佳之, 降旗千恵, 日本分子生物学会 (2003.12).

28) ヒトリンパ腫由来 TK6 細胞における遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の解析, パラニサミー・ラジャグル, 鈴木孝昌, 坂本浩子, 菅野 純, 林 真, 本間正充, 日本環境変異原学会第 32 回大会 (2003.11).

29) Toxicogenomics in the genetic toxicology, Suzuki, T., Annual Meeting of the Chinese Environmental Mutagen Society (2003.11).

30) GeneChip analysis on transcriptional changes induced in human lymphoblastoid (TK6) cells by six genotoxic chemicals, T. Suzuki, P. Rajaguru, J. Kanno, H. Sakamoto, M. Hayashi, T. Yamaguchi, and M. Honma, 33rd Annual Meeting of the European

Environmental Mutagen Society
(2003.8).

31) Oligonucleotide Microarray for Examining Gene Expression Clustering in Early Mouse Liver Chemical Carcinogenesis, K. Tobe, K. Kawai, Y. Nakachi, Y. Kondoh, M. Nakajima, S. Hamada, T. Suzuki, A. Hyogo, T. Tashiro, H. Ito, Y. Sakaki, H. Tashiro, C. Furihata, The 5th International Workshop on Advanced Genomics (2003.6).

32) GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か, 鈴木孝昌, Palanisamy Rajaguru, 小原有弘, 本間正充, 林 真, 高木篤也、菅野 純、山口照英, 第 63 回日本癌学会総会 (2004.9).

33) DNA マイクロアレイの変異原性試験への応用に関する共同研究: GeneChip による指標遺伝子の選択, 鈴木孝昌, 欒 洋, Palanisamy Rajaguru, 中嶋圓, 浜田修一, 兵庫淳志, 降旗千恵, 日本環境変異原学会第 33 回大会(2004.11)

34) “-omics”解析がもたらす環境変異原研究の新展開, 鈴木孝昌, 日本環境変異原学会第 33 回大会4研究会合同定例会(2004.11).

35) ヒト細胞における遺伝毒性物質による遺伝子発現変化の解析, 欒 洋、ラジャグル パラニサミー、本間正充、林真、鈴木孝昌, 日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11).

36)

37)

F. 知的財産権の出願登録状況

なし

資料 1

プライマリーヒト細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究の図表

表1 研究に用いた細胞のドナー情報

	Lot41	Lot42	Lot100	LotNOG	LI90	HepG2
性別	女性	女性	女性	男性	女性	男性
年齢	59歳	30歳	74歳	46歳	55歳	15歳
人種	コーカシアン	インディアン (アジア人)	コーカシアン	コーカシアン	日本人(アジア人)	コーカシアン
喫煙	なし	なし	あり	なし	-	-
飲酒	なし	若干	なし	あり	-	-
薬物使用	なし	プレドニゾン	なし	なし	-	-
死因	脳血管障害	肺繊維症	脳血管障害	脳障害	(肝がん)	(肝がん)

表2 研究に用いた細胞の薬物代謝酵素活性 (pmol/(min x 106 cells))

Enzyme	Substrate	Lot41	Lot42	Lot100	LotNOG
P450	7-methoxy-4-trifluoromethyl coumarin	32	81	-	-
UGTs and STs	7-hydroxycoumarin glucuronide, 7-	7.7	27	14	229
CYP3A4	Teststerone	260	80	86	127
CYP1A2	Phenacetin	1	N.M.	3	14
CYP3A4/5	Midazolam	21	N.M.	N.M.	N.M.
CYP2A6	Coumarin	N.M.	N.M.	20	68
CYP2D6	Dextromethorphan	N.M.	N.M.	28	15
CYP2B6	7-Ethoxycoumarin	N.M.	N.M.	19	41
CYP2C9/19	Mephenytoin	N.M.	N.M.	1	74
CYP2C8	Tolbutamide	N.M.	N.M.	38	46

表3 研究に用いた細胞の無処理時における解析遺伝子数と発現している薬物代謝酵素関連の遺伝子数

	非凍結型		接着型凍結		株化		
	lot41	lot42	lot100	lotNOG	LI90	HepG2	
解析した遺伝子数	8731	9872	9326	8626	8758	8222	
Phase I							
P450	76	31	34	37	31	17	19
ALDH	28	19	17	18	15	6	15
MAO	4	4	4	4	4	0	0
Epoxide Hydrolase	2	1	1	1	1	1	1
Esterase	6	4	4	4	4	2	4
FMO	7	4	4	4	3	1	3
Glucuronidase	1	1	1	1	1	1	1
NAD(P)H-dehydrogenase	40	38	38	38	37	36	36
Phase II							
GST	18	14	13	14	13	9	11
UDP-GT	3	1	2	2	0	0	1
NAT	2	2	2	2	1	1	1
N-acyltransferase	2	1	1	1	1	0	0
Methyltransferase	5	3	4	4	4	3	3
Sulfotransferase	15	13	12	13	7	4	10
Total	209	136	137	143	122	81	105

表4 研究に用いた6種の細胞の平均遺伝子発現量からそれぞれの細胞で発現変動した遺伝子数

	非凍結型		接着型凍結		株化	
	lot41	lot42	lot100	lotNOG	LI90	HepG2
Down-Regulate	186	79	75	142	490	675
Up-Regulate	748	499	75	274	1084	689

表5 非凍結型プライマリーヒト肝細胞 Lot42 において 2 mM アセトアミノフェン処理時に発現変動した遺伝子数の経時変化

	4 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Down-Regulate	72	155	304	208
Up-Regulate	59	67	342	119

表6 6種の細胞においてアセトアミノフェン4時間処理で発現変動した遺伝子数

	非凍結型		接着型凍結			株化			
	Lot41	Lot42 共通	Lot100	LotNOG 共通	LI90	HepG2 共通			
Down-Regulate	253	<u>3</u>	86	101	<u>4</u>	126	46	<u>0</u>	43
Up-Regulate	63	<u>12</u>	49	39	<u>18</u>	51	34	<u>1</u>	38

表7 非凍結型プライマリーヒト肝細胞 Lot42 においてカルバマゼピン(1 mM)、イソニアジド(1 mM)、四塩化炭素(0.5 mM)処理時に発現変動した遺伝子数の経時変化

		4 hr	24 hr	48 hr	72 hr			
		共通	共通	共通	共通			
カルバマゼピン	Down-Regulate	232	<u>19</u>	264	<u>164</u>	1033	<u>546</u>	883
	Up-Regulate	481	<u>67</u>	384	<u>192</u>	820	<u>356</u>	715
イソニアジド	Down-Regulate	255	<u>6</u>	79	<u>2</u>	1033	<u>10</u>	111
	Up-Regulate	334	<u>12</u>	124	<u>5</u>	820	<u>10</u>	79
四塩化炭素	Down-Regulate	231	<u>13</u>	69	<u>10</u>	197	<u>36</u>	310
	Up-Regulate	336	<u>1</u>	137	<u>2</u>	345	<u>47</u>	150

表8 カルバマゼピン(1 mM) 4, 24, 48, 72時間処理において共通した発現変動を示す遺伝子

Common Name	GeneBank ID	Description
Down-Regulate Gene (9 genes)		
PAPSS2	AW299958	xs44g05.x1 NCI_CGAP_Kid11
PLG	M74220	Plasminogen
COL4A1	NM_001845	Collagen, type IV, alpha 1
CPU, PCPB, TAF1	NM_016413	Carboxypeptidase B2 (plasma, carboxypeptidase U)
TDO, TPH2, TRPO	NM_005651	Tryptophan 2,3-dioxygenase
FLJ22259	AK025912	Collagen, type IV, alpha 2
FLJ25113, B-ALPHA-1	AF141347	Tubulin, alpha 3
ILTMP, IL-TMP	BC001386	Transmembrane 4 superfamily member 4
NDRG3	BE300252	600944004T1 NIH_MGC_17
Up-Regulate Gene (31 genes)		
IL15	NM_000585	Interleukin 15
HMG2	BC000903	High-mobility group (nonhistone chromosomal) protein 2
MGC5306	BC001972	Hypothetical protein MGC5306
NRBF-2	AA883074	am18h01.s1 Soares_NFL_T_GBC_S1
FLJ11193	AJ421192	t24e12.x1 NCI_CGAP_Brn23
IFRD1	AA747426	nx88e08.s1 NCI_CGAP_GCB1 similar to TR:P70228 P70228 INTERFERON-BETA; 12S FRACTION
OIP2	AL050353	Opa-interacting protein 2
KIAA0244	NM_015153	KIAA0244 protein
FLJ20152	NM_019000	Hypothetical protein
GEM	NM_005261	GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle
RSS, IRBP, KIAA0207	AL021977	U66065
GADD34	U83981	Growth factor receptor-bound protein 10
DDIT1, GADD45	NM_001924	growth arrest and DNA damage-inducible gene 34; Gadd34;
ARG2	U75667	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
KLF4	BF514079	Arginase, type II
CTH	NM_001902	UI-H-BW1-amw-b-08-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub7
FLJ11149	NM_018339	Cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
USP21	NM_013396	Hypothetical protein FLJ11149
RSP5, KIAA0439	AL354872	Ubiquitin specific protease 25
HRRH-J8	AB007899	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
DAF	NM_004398	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 10 (RNA helicase)
4F2, CD98, MDU1, 4F2HC, NACAE	BC001288	Decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)
SLC20A1	NM_002394	Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2
H10, H1FV	NM_005415	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1
RTP801	BC000145	H1 histone family, member 0
B4-2	NM_019058	Hypothetical protein
HVH3	AF279899	Proline-rich protein with nuclear targeting signal
dJ1103G73	U16996	Dual specificity phosphatase 5
ATF4	NM_021158	Protein kinase domains containing protein similar to phosphoprotein C8FW
	NM_001675	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)

表9 アセトアミノフェン処理と他の肝毒性物質処理において変動する遺伝子数の比較

		4 hr	24 hr	48 hr	72 hr
アセトアミノフェンで変化	Down-Regulate	72	155	304	208
	Up-Regulate	59	67	342	119
アセトアミノフェンのみで変化	Down-Regulate	45(63%)	75(48%)	113(37%)	89(43%)
	Up-Regulate	38(64%)	21(31%)	101(30%)	61(51%)
すべての処理で共通変化	Down-Regulate	0	6(3.9%)	9(3.0%)	2(1.0%)
	Up-Regulate	0	3(4.5%)	54(15.8%)	7(5.9%)