

そのモデル施設となっている。

C. 研究結果

日本環境変異原学会の MMS 研究会において、マイクロアレイの変異原研究への応用をテーマとした共同研究の一環として、これまでに DEN 処理したサンプルを用い様々なアレイプラットフォームにて肝臓における遺伝子発現変化について解析を行った。その結果、Affymetrix 社製 GeneChip がデータの信頼性および網羅製からも優れていたため、これを用いてすべての化合物に関してデータを取得することにした。

今年度新たに検討した化合物に関しては、既に研究方法の項に示したとおり、アルキル化剤を中心とした 6 種の遺伝子傷害性物質と対象として 2 種の非遺伝子傷害性物質を用いた。前者に関しては、すでにトランスジェニックマウスを用いた変異原性試験における検討を参考に用量を設定し、1 群 5 匹のマウスに対して単回投与を行い、4 時間、20 時間、14 日、28 日後 (DEN は 4 時間、28 日後のみ) にマウスより臓器を回収し、TRIzol 中にてホモジネートとし、凍結保存した。このサンプルを各機関に配布し、マイクロアレイを使った解析に供した。

Affymetrix 社の GeneChip を用いた解析においては、プローブを固層合成するためアレイ間でのスポットの定量性が高いため、単色におけるシグナル強度の比較が可能である。このアレイでは約 17000 の遺伝子が搭載されているが、得られたシグナル強度の標準化のためシグナル強度の中間値を 100 に設定してスケージングを行い、Microarray Suite (Affymetrix 社) という専用の解析ソフトにより判定された遺伝子発現の度合いに基

づいて、コントロール、処理群ともに Absence と call された遺伝子を除いた後、発現強度に応じて Cut-off 値を定める独自の解析手法を用いて発現変化の有意な遺伝子を選択した。なお、この解析においては、前年度の結果よりマウス個体間のばらつきは比較的少ないことがわかったため、固体ごとの臓器より抽出した RNA をプールしてチップ解析に用いた。

まず、各化合物において 4 時間、20 時間、28 日後に発現の変化した遺伝子の数をまとめたのが表 2 である。変化の見られた遺伝子の数は 20 時間後が最も多く、次いで 4 時間後が多かった。化合物ごとに見てみると、エタノール処理が最も多くの遺伝子に変化が見られ、DBP が最も少なかった。遺伝子傷害性を持つ化合物で多いという傾向は見られず、単純に肝毒性を反映した結果であると考えられる。

次に、遺伝子発現解析の結果から、遺伝子傷害性の有無で区別が可能であるかを検討するため、GeneSpring というデータ解析ソフトを用いて、各処理と遺伝子発現変化に関して 2 次元の系統図を作成しクラスタリング解析を行った。図 1 に示すように、まずデータの得られた全遺伝子を使ってクラスタリングしたのが左の図である。時間および化合物の種類 (アルキル化剤、芳香族化合物、非遺伝子傷害性物質) ごとに比較的まとまった傾向が見られたが、一部はうまくクラスタリングされなかった。そこで、変化の見られた遺伝子のみを用いて同様の解析を行ったところ、右の図のように非常にきれいにクラスタリングされ、類似した処理どうしが近くに分類され、非遺伝子傷害性物質処理のみが一箇所にまとめられた。以上の結果より、遺伝子発現解析結果から、遺伝子傷害性物質と

非遺伝子傷害性物質を区別することが可能であることが示唆された。

次に、個別の遺伝子に関して、遺伝子傷害性の有無にかかわらず共通性を持って変化した遺伝子を選び出したのが表3である。発現が上昇した遺伝子のうち最も共通性が高かったのが、がん抑制遺伝子であるp21であり、遺伝子傷害性物質のみに共通した変化であった。次に共通性が高かった遺伝子として lipin1、sialyltransferase 9、cyclinG1 が得られた。Lipin1 に関しては、2種類のプロブセットが存在したが、いずれもかなり類似した結果が得られており、GeneChip での再現性の高さが示された。ただし、これら3種の遺伝子に関しては、非遺伝子傷害性物質でも変化しており、その他共通性の高かった遺伝子に関しても、同様の傾向が見られた。

一方、発現の減少した遺伝子としては、上昇した遺伝子に比べると共通性は低く、serum amyloid A2 が最も共通性が高かった。ただし、発現が上昇する場合も多く見られ、非遺伝子傷害性物質での変化も多かった。その他、GADD45 γ 遺伝子などが共通性が高かったが、同様の傾向が見られた。

この結果より、当初期待していた遺伝子傷害性物質すべてに共通して変化するオールマイティな遺伝子は存在しないことが判明した。

そこで、遺伝子傷害性の有無を判別するために有効な遺伝子を抽出するため、遺伝子傷害性物質のみで京津して変化した遺伝子を選択した結果を表4に示す。4箇所以上で有意となり、非遺伝子傷害性の2化合物では有意とならない遺伝子として約30遺伝子が抽出された。これらの遺伝子には、すでに遺伝子傷害により発現が誘導され

ることが知られている p21、cyclinG1、Jun、mdm2 などの遺伝子が含まれていた。また、機能未知の cDNA や、遺伝子傷害と直接は関連性のない遺伝子も含まれており、その関連性に興味を持たれた。

今後、今回得られた指標遺伝子群に対して RT-PCR 解析用のプライマープローブを設計し、定量的 RT-PCR 法を用いてさらに多くの化合物およびサンプリングタイム、用量相関性の検討をおこなっていく予定である。

D. 考察

GeneChip データの解析にあたり、発現変化を示した遺伝子の選択法としてはマウス個別別のデータを利用した統計的手法の有効性が高いが、より多くのチップが必要となる。本研究においては、比較的マウスの個体差が小さかったことより、個別データを取る代わりに、より多くの化合物およびサンプリングタイムに関して解析を行うという方針を立てた。よって、各処理における発現解析には単一チップのデータを使わざるを得ず、統計的手法を遺伝子の選択に用いることができなかった。よって遺伝子の選択には fold-increase の値に頼らざるを得なくなるが、単純に一定のカットオフ値を用いた場合には発現強度の低い遺伝子に関して多くの遺伝子を拾ってしまう問題がある。そこで、我々は発現強度に応じて有意水準を変化させて遺伝子を選択する方法を取った。これにより、広い発現強度に対し同程度の数の遺伝子を選択することが可能となった。そして選択された遺伝子に関して、遺伝子傷害性を持つ化合物間での共通性をもとに有効な遺伝子を選択するというアプローチにより、ある程度再現性に関する保証を求めた。

結果として選ばれた遺伝子の中に既に遺伝子傷害にて誘発されることが知られている遺伝子群が含まれていたことは、本手法の有効性を保証するものであると考えられる。一方で、遺伝子傷害により誘発されることが知られているものの選択されなかった遺伝子も多いが、その原因は非遺伝子傷害性物質においても変化を示したことによる。今後、より多くの化合物群に関して、検討を加えることが重要である。理想的には、すべてのケースに対して GeneChip を用いた解析を行うことが望まれるが、経済性および効率性の理由から限られた数の遺伝子に対して RT-PCR 法を用いた解析を行うことがより有効であると考えた。

今回、変化の見られた遺伝子群を用いてクラスタリング解析をすることにより、処理の種類によりきれいに分類がされた。これに対して、全遺伝子を用いた解析では、重要でない遺伝子群がノイズとなるために、分離は良くなかった。別の実験からも同様の結果が得られており、クラスタリング解析を行う際には、変化の見られた遺伝子群を使って解析を行うことが有効であると考えられる。

今回の結果より、遺伝子発現解析により遺伝子傷害性物質のスクリーニングが可能そうであることがわかったが、その際に有効となる指標遺伝子の数はそれほど多くなく、すべての遺伝子傷害性物質に共通して変化する遺伝子は存在しないことがわかった。この原因としては、用量が1点しかない事、サンプリングタイムによる見落としが考えられ、今後 RT-PCR を用いてより詳細な検討を行うことによりカバー率が上がることが期待される。

E. 結論

GeneChip を用いた遺伝子発現解析により、遺伝子

傷害性物質に特徴的な変化を示す遺伝子を選択することができた。変化の見られた遺伝子を用いてクラスタリング解析を行うことにより、作用機序、経時変化に応じた分類ができた。今後は、選択した遺伝子を用いて、より簡便で効率的な手法として RT-PCR を用いた解析を行うことにより、さらに多くの化合物群に対してより詳細な検討を行い、有効性を検証する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M. Genotoxicity of microcystine-LR in human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, 557, 1-6 (2004)

Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M. and Enomoto, T. The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochem. Biophys. Acta* 168, 137-144 (2004)

Yatagai F, Morimoto S, Kato T, Honma M. Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK6 cells: disappearance of endpoint hotspots. *Mutat. Res.*, 560, 133-145 (2004)

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K, In vivo mutagenicity of benzo[f]quinoline, benzo[h]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the lac Z transgenic mice. *Mut. Res.*, 559, 83-95, (2004)

Arlt VM, Zhan L, Schmeiser HH, Honma M, Hayashi M, Phillips DH, Suzuki T, DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta Mouse. Environ. Mol. Mutagen., 43, 186-195, (2004)

2. 学会発表

鈴木孝昌, Palanisamy Rajaguru1, 小原有弘, 本間正充, 林 真, 高木篤也, 菅野 純, 山口照英
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 第 63 回日本癌学会総会 (2004.9.)

鈴木孝昌, 欒 洋, Palanisamy Rajaguru, 中嶋圓, 浜田修一, 兵庫淳志, 降旗千恵
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
日本環境変異原学会第 33 回大会(2004.11)

鈴木孝昌

“-omics”解析がもたらす環境変異原研究の新展開
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)

欒 洋、ラジャグル パラニサミー、本間正充、林真、鈴木孝昌
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
日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11)

板倉宏治, 本橋理恵, 坂本健作, 押澤正, 鈴木

孝昌, 山口芳樹, 加藤晃一, 横山茂之
アンバー・サブプレッション法によるタンパク質の部位特異的標識
第 27 回日本分子生物学会年会 (2004.12)

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
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
第 27 回日本分子生物学会年会 (2004.12)

鴻野貴司、欒洋、鈴木孝昌、野村靖幸、降旗千恵
学習記憶障害を示す老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse : SAM) SAMP8 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイクロアレイを用いた解析
第 27 回日本分子生物学会年会 (2004.12)

宮島正樹、欒洋、鈴木孝昌、野村靖幸、降旗千恵
大脳萎縮を示す老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse : SAM)SAMP10 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイクロアレイを用いた解析
第 27 回日本分子生物学会年会 (2004.12)

Takayoshi Suzuki

Current status in in vitro diagnostics in Japan
International Symposium on International Harmonization on Biopharmaceuticals—
KFDA, Seoul, Korea (2004.10)

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 今回検討した化合物と投与量

アルキル化剤		
Dimethylnitrosamine	(DMN)	5 mg/kg
Ethyl nitrosoarea	(ENU)	150 mg/kg
Dipropylnitrosamine	(DPN)	250 mg/kg
多環芳香族化合物		
o-Aminoazotoluene	(AAT)	300 mg/kg
Dibenzo[a, f]pyrene	(DBP)	6 mg/kg
7,12-Dimethylbenz[a]anthracene	(DMBA)	20 mg/kg
非遺伝子傷害性物質		
Ethanol	(EtOH)	1000 mg/kg
Phenobalbial sodium	(PB)	30 mg/kg

表2 共通して変化の見られた遺伝子

Genes Commonly Up-regulated among All Chemicals												UP	Down											
芳香族			遺伝毒性がない				アルキル化剤					Gene name												
AAT	DMBA	DBP	EtOH		PB	DMN		ENU	DPN															
4h	20h	28d	4h	20h	28d	4h	20h	28d	4h	20h	28d	4h	20h	28d										
repeat 10 times																								
2.77	16.8	3.00	0.79	1.52	2.76	2.17	2.05	1.53	2.28	2.53	1.44	0.83	1.05	1.09	3.91	24.2	3.29	12.2	21.2	4.43	20.7	106	6.98	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)
repeat 9 times																								
0.94	1.76	2.78	0.98	2.65	3.44	0.95	2.77	2.37	1.17	1.05	0.60	0.92	0.71	2.78	1.24	1.66	1.19	0.35	0.85	1.26	2.66	1.04	0.67	spin 1
0.84	1.79	3.14	0.95	2.48	4.09	0.91	2.99	2.64	1.09	0.71	1.01	0.93	0.73	2.80	1.23	1.43	1.17	0.13	0.87	1.44	3.36	1.11	0.80	spin 1
0.92	3.33	2.49	1.05	3.62	4.29	0.99	3.33	3.81	1.37	0.21	6.40	1.11	1.03	2.00	1.28	1.05	1.10	2.39	1.09	0.83	2.34	1.24	0.87	sialyltransferase 9
1.06	0.14	1.65	0.93	1.85	1.34	0.57	1.32	1.39	0.97	2.54	1.10	1.02	1.37	1.13	2.98	7.75	1.07	5.18	6.17	0.87	10.7	8.08	2.47	cydin G1
repeat 8 times																								
1.41	0.15	2.90	0.8	4.73	3.95	1.33	3.94	4.04	1.56	1.09	5.40	1.00	0.43	1.31	1.43	0.92	1.47	4.25	1.20	0.42	2.13	0.96	0.44	Hermansky-Pudlak syndrome 4 homolog (human)
0.93	4.28	2.62	1.40	1.04	1.43	0.83	0.35	1.23	0.82	1.06	1.45	2.29	1.10	0.82	1.09	3.46	2.84	5.00	18.4	6.40	14.8	7.53	5.53	clone IMAGE3493956, mRNA, partial cds
2.29	2.24	1.26	1.25	1.13	1.02	1.08	0.78	0.85	1.07	1.10	1.14	0.87	0.88	0.77	2.87	3.10	0.96	4.21	2.83	0.80	3.50	5.10	1.90	stress induced protein
0.91	2.85	3.53	1.12	1.14	2.10	1.04	1.09	1.38	1.04	1.41	0.95	1.14	1.36	1.58	0.90	2.64	4.73	0.84	2.35	2.66	0.77	1.53	5.56	lymphocyte antigen 8 complex, locus A
repeat 7 times																								
1.32	0.40	1.15	2.62	1.04	0.10	2.90	1.27	0.88	0.93	0.31	2.91	0.79	2.29	1.00	0.20	6.48	0.29	1.10	14.6	0.82	0.03	0.09	2.53	neuronal PAS domain protein 2
0.51	1.16	0.37	0.37	4.95	5.15	0.76	2.44	2.47	1.06	2.02	0.96	0.44	0.67	1.11	1.22	0.69	2.42	3.31	0.50	2.07	2.07	3.38	1.21	gamma-aminobutyric acid (GABA-B) receptor, 1
11.2	4.01	4.47	0.30	13.5	3.46	6.54	0.78	3.31	1.64	0.73	0.46	0.48	1.34	0.76	1.14	1.47	2.05	5.67	11.8	7.16	4.19	8.90	9.88	clone IMAGE3493956, mRNA, partial cds
1.86	0.28	1.86	0.87	0.85	1.95	0.99	0.74	1.15	0.83	1.16	0.76	0.90	0.94	0.89	1.75	0.97	1.44	2.86	2.95	1.06	3.84	9.49	3.07	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3
1.28	4.86	1.17	0.84	1.44	1.38	0.85	1.19	0.92	0.99	0.59	1.47	1.21	0.98	0.99	2.35	6.64	1.86	4.17	3.75	1.30	5.31	7.53	1.92	cydin G1

Genes Commonly Down-regulated among All Chemicals																								
芳香族			遺伝毒性がない				アルキル化剤					Gene name												
AAT	DMBA	DBP	EtOH		PB	DMN		ENU	DPN															
4h	20h	28d	4h	20h	28d	4h	20h	28d	4h	20h	28d													
repeat 7 times																								
1.06	0.77	1.15				0.30	0.22	3.74	0.16	5.64	1.21	0.55	1.04	0.09	1.57	12.4	0.87	0.07	0.06	0.71				serum amyloid A 2
repeat 6 times																								
1.41	0.15	0.63	1.40	0.26	0.60	1.11	0.18	0.05	0.64	1.44	0.32	0.58	1.10	0.51	0.12	0.11	0.47	1.62	3.75	1.64	0.49	1.21	0.13	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
0.30	0.47	0.86	0.63	0.65	0.57	0.55	0.76	0.43	0.40	4.26	0.46	0.55	1.65	0.64	0.99	0.38	0.76	0.76	0.97	0.69	0.79	0.35	0.43	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
1.32	0.40	1.15	2.62	1.04	0.10	2.90	1.27	0.88	0.93	0.31	2.91	0.79	2.29	1.00	0.20	6.48	0.29	1.10	14.6	0.82	0.03	0.09	2.53	lipocalin 2
repeat 5 times																								
0.34	0.13	1.00	1.15	0.83	1.10	0.83	0.28	0.91	0.54	0.94	1.31	0.44	1.05	0.51	0.28	0.66	1.31	0.56	1.46	0.74	0.05	1.29	1.08	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
0.12	0.12	0.77	0.06	0.58	1.36	2.19	0.38	0.50	1.10	0.86	1.83	2.16	0.99	0.95	0.28	0.22	0.25	2.95	0.73	1.37	0.87	0.90	1.60	insulin-like growth factor binding protein 5
0.93	0.77	0.97	1.19	1.00	0.91	1.40	1.14	1.32	0.59	0.63	2.52	0.37	3.47	0.98	0.45	1.04	0.16	2.74	4.70	0.78	0.16	0.12	0.77	serum amyloid A 2
1.68	0.60	0.86	1.43	1.04	0.84	1.39	1.09	0.73	0.54	0.38	1.26	1.00	1.65	1.24	0.82	0.47	0.86	0.92	0.23	1.01	0.74	0.25	0.89	stearyl-Coenzyme A desaturase 1

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
菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、中津則之	トキシコゲノミクス	辻本豪三、田中利男	ゲノム研究実験ハンドブック	羊土社	東京	2004	329-337
Hirabayashi Y and Inoue T	Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology.	Borlak J	Handbook of Toxicogenomics	Wiley-VCH	Weinheim	2005	583-608

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
Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T.	Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis.	J Steroid Biochem Mol Biol.	91	121-129	2004
Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T.	Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice.	Exp Biol Med (Maywood)	229	494-502	2004
Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J.	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice.	Reprod Toxicol.	18	109-120	2004
Asano, K., Ono, A, Hashimoto, S, Inoue, T, and Kanno, J	Screening of endocrine disrupting chemicals using a surface plasmon resonance sensor.	Anal Sci.	20	611-616	2004
Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke 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
Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy.	Food Chem Toxicol	43	325-331	2005
Ema, M., Hrazono, A., Fujii, S. and Kawashima, K.	Evaluation of developmental toxicity of β -thuyaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats.	Food Chem. Toxicol	42	42, 465-470	2004
Fukuda, N., Ito, Y., Yamaguchi, M., Mitsumori, K., Koizumi, M., Hasegawa, R., Kamata, E. and Ema, M.	Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats.	Toxicol. Lett	150	145-150	2004
Fukui Y, Ema M, Fujiwara	Comments from the Behavioral	Cong. Anom.	44	172-177	2004

M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, and Tanimura T	Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003).	(Kyoto)			
Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M and Ema M	Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride - differences from the latest WHO guideline drafts	<i>J Toxicol Sci</i>	29	535-539	2004
Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y.	Differential contributions of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites.	<i>Development</i>	132	787-796	2005
Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y.	Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling.	<i>Mech Dev</i>	121	1443-1453	2004
Nakazawa T, Kai S, Kawai M, Maki E, Sagami F, Onodera H, Kitajima S, Inoue T.	"Points to consider" regarding safety assessment of biotechnology-derived pharmaceuticals in non-clinical studies (English translation).	<i>J Toxicol Sci</i>	29	497-504	2004
Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J and Inoue T:	Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses.	<i>Toxicol Pathol</i>	32	12-16	2004
Hasegawa M, Yamaguchi S, Aizawa S, Ikeda H, Tatsumi K, Noda Y, Hirokawa K, Kitagawa M.	Resistance against Friend leukemia virus-induced leukemogenesis in DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) deficient Scid mice associated with defective viral integration to the Spi-1 and Fli-1 site.	<i>Leukemia Res</i>		in press.	2005
Nakagawa Y, Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Abe S, Takemura T, Hirokawa K, Suzuki K, Kitagawa M.	Expression of IAP family proteins in adult acute mixed lineage leukemia (AMLL).	<i>Am J Hematol</i> ,		in press.	2005
Yamaguchi S, Hasegawa M, Aizawa S, Tanaka K, Yoshida K, Noda Y, Tatsumi K, Hirokawa K, Kitagawa M.	DNA-dependent protein kinase enhances DNA damage-induced apoptosis in association with Friend gp70.	<i>Leukemia Res</i>	29	307-316	2005
Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, Hirokawa K, Kitagawa M.	Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia.	<i>Leukemia Res</i>	28	487-494	2004
Yamamoto K, Abe S, Nakagawa Y, Suzuki K, Hasegawa M, Inoue M, Kurata M, Hirokawa K, Kitagawa M.	Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia.	<i>Leukemia Res</i>	28	1203-1211	2004

Seidler HBK, Utsuyama M, Nagaoka S, Takemura T, Kitagawa M, Hirokawa K.	Expression level of Wnt signaling components possibly influence the behavior of colorectal cancer in different age groups.	Exp Mol Pathol	76	224-233	2004
Nemoto T, Kitagawa M, Hasegawa M, Akashi T, Takizawa T, Hirokawa K, Koike M.	Expression of IAP family proteins in esophageal cancer.	Exp Mol Pathol	76	253-259	2004
Endo T, Abe S, Seidler HBK, Nagaoka S, Takemura T, Utsuyama M, Kitagawa M, Hirokawa K.	Expression of IAP family proteins in colorectal cancer in different age groups.	Cancer Immunol Immunotherapy	53	770-776	2004
Tanaka K, Watanabe K, Yamaguchi S, Hasegawa M, Kitagawa M, Aizawa S.	Cytological basis for enhancement of radiation-induced mortality by Friend leukaemia virus infection.	Int J Radiat Biol	80	673-681	2004
Nakatsu, N., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Nakamura, T., Dan, S., Fukui, Y., and Yamori, T.	Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining the chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays.	Mol Cancer Ther		in press	2005
Rengifo-Cam, W., Konishi, A., Morishita, N., Matsuoka, H., Yamori, T., Nada, S., and Okada, M.	Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis.	Oncogene	23	289-297	2004
矢守 隆夫	がん分子標的と創薬スクリーニング	現代医療	36.7	1339-1346	2004
Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M.	Genotoxicity of microcystine-LR in human lymphoblastoid cells.	Mutat. Res.	557	1-6	2004
Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M. and Enomoto, T.	The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells.	Biochem. Biophys. Acta	168	137-144	2004
Yatagai F, Morimoto S, Kato T, Honma M.	Further characterization of loss of heterozygosity enhanced by p53 abrogation in human lymphoblastoid TK6 cells: disappearance of endpoint hotspots.	Mutat. Res.	560	133-145	2004
Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K,	In vivo mutagenicity of benzo[f]quinoline, benzo[h]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the lac Z transgenic mice.	Mut. Res.	559	83-95	2004
Arlt VM, Zhan L, Schmeiser HH, Honma M, Hayashi M, Phillips DH, Suzuki T,	DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta Mouse.	Environ. Mol. Mutagen.	43	186-195	2004

4. トキシコゲノミクス

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 小野敦 中津則之

遺伝子発現カスケード解析を目指した形質非依存型トキシコゲノミクスに適用するため、マイクロアレイから細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る方法(“Percellome”)を開発した。これにより遺伝子発現量を、ゼロを起点とする均等目盛りで表示し直接比較することができるようになった。対照群も処置群も無理なく同列に表示することができ、さらなる標準化操作が原則的に不必要となったため、測定し得たすべての遺伝子についてマイクロアレイ間はもとより、実験間での直接比較が行えるようになった。この特長は、生物学者が内容を直感的に把握しやすいようなデータの可視化にも役立ち、その後のデータ解析とインフォマティクス形成を促進することが示されつつある。本システムは大型プロジェクトを対象として開発したものであるが、実際には小規模の実験サンプルに対しても有用性が高いことが実証されている。特に変動遺伝子リストの遺伝子数が飛躍的に増大することが多い。それは、変動比率による足切りやハズレ値計算のような統計手法を用いる必要がなく、個々の遺伝子について逐一比較検討ができるためである。異なったプラットフォーム間でのデータ互換にも拡張可能であり、研究規模やプラットフォームの種類にかかわらずデータをもちより、相互にデータを直接比較することが可能なコンソーシアムを構築することに本手法が貢献することが期待される。

はじめに

毒性学は、生物界(biosphere)と化学物質界(chemosphere)との相互作用を解析し、現実にかき起こした有害作用(薬の副作用、健康被害など)の把握、評価、対策のみならず、そのような事態の未然防止を目指す学問体系である。例えば、PCB(ポリ塩化ビフェニール)はその電気抵抗性、熱安定性、低反応性などから、工業的に優秀な材料として熱交換や絶縁に汎用された。この物質の毒性知識が早期に浸透していれば食品を直接加熱する熱媒体にPCBを用いる

という発想は回避されたのかもしれない。当時の生物学・臨床医学・病理学・毒性学では、PCBのような化学物質の生体影響は、肝臓などでの代謝酵素(P450など)の誘導現象として把握されていたが、その基礎となるリガンド依存的転写因子群(AhR, CAR, PXRをはじめとするorphan受容体群)とその関連シグナル伝達に関する事象が明らかとなってきたのは比較的最近のことである¹⁾。その結果を受けて胎児影響を含む毒性の分子機構が明らかになるに連れて、実際にどの程度の暴露が、どの発達時期の人体に、どのように有害であるかの判断がより正確にくだせるようになり

Jun Kanno / Ken-ichi Aisaki / Katsuhide Igarashi / Atsushi Ono / Noriyuki Nakatsu : Division of Cellular & Molecular Toxicology, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences (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毒性部)

つつある。さらには、個人を対象とした毒性評価から、集団（日本国民全体）を対象としたそれまでを、広く見渡すことが要求される。例として有名なのは、PCB暴露によるIQ低下論議である。ある集団のIQが5ポイント下がると、何らかの介護を必要とする人々の数が著増するというものである。すなわち、平均的なIQをもつ個人のIQが5ポイント下がっても実質上問題はないが、社会集団としての影響は無視できないという問題である^{2) 3)}。科学的には、高感受性亜集団、個体差、動物実験データからヒトへの外挿に際しての種差問題などが関連する。

近年の健康ブームは、いわゆる「サプリメント」など、健康に有益な効能を示唆あるいは謳う一連の食品関連製品を生み出している。他方の医薬品については「薬効」と引き換えに「副作用」が常に考慮されることから、使用者のcost-benefit（費用便益・費用対効果）の概念を基礎に、取り扱いの体系ができあがっており「処方箋」が必要であったり、注意書きが添付されていたりする。これに対してサプリメントなどは食品、および食品に由来する成分からなるとされることから、「食経験」にもとづいた安全性の概念が基本となっている。しかし、食品も医薬品も、生活の利便性のために毎日利用する化学物質も、体内で生体分子と相互作用を起こす。それらの毒性評価を生体側からみると、身体に入るまでの「物質の分類」や「能書き」はもはや重要ではなく、身体に入ったあとにどのような反応が如何に惹起されるかが問題となる。

人体に化学物質が何を引き起こすかを検討するためには、ヒトからの情報を得ることが一番正確なことはいうまでもない。薬の開発の過程では、ヒトによる「臨床試験」が可能である。この場合の毒性には、用量作用関係の概念が乏しい。すなわち、実際に薬として投与するときの薬用量において、どのような毒性（副作用）があらわれるかが、最大の焦点であり、わざわざ「自殺目的」の大量投与を行うことはなく、薬効が期待できない微量投与も行わないわけである。これに対して、いわゆる化学物質、例えば、家庭用品、工業製品、食品添加物などの現代生活の利便性に欠かせない物質に由来する化学成分の体内への侵入に対しては、一般的にcost-benefitの概念が弱く働き、可能ならばゼロにしたいという傾向がある。しかし、「完全ゼロ」は使用する限り基本的には不可能であるの

で、どの位の量までなら安全と見なせるかを検討することが行われてきている。これらについては、人体実験が倫理的にも現実的にもできないと考えるのが通常である。なお、薬でも「人体実験」が事実上できない対象がある。それは、胎児と子供である。いずれの場合も、現在のところ、人の身代わりとしてモデル動物を用いることになる。他方、食品そのもの、あるいは食品の主成分については「食経験有り」=「安全」という考えの下に、毒性評価を行ってきていないのが現状である。しかし、成分などの濃縮や抽出により錠剤やエキスの形を取るサプリメントでは少なくとも「調理法」と「摂取量」のコントロールが「今までの経験の適用外」となる場合が多い。このようなものが「処方箋なし」に利用される場合の安全性を検討する際に、人体実験を行うか、動物実験を行うか、動物で得た情報はどのようにヒトに適用するのか、などが問題となる。

化学物質の毒性の量と質の問題

多量に摂取すれば毒性は強く、少量になれば毒性は弱まるという大原則（毒性は用量に関して単調増加する）の下では、「毒性に閾値がある」と考えられる場合と、「閾値が存在しない」と考えられる場合とで扱いを分けている。前者の場合は無毒性量あるいは無作用量を実験動物で求め、種差や個体差を勘案した係数（不確実係数あるいは安全係数と呼び、通常100を用いる）で除して、安全の目安となる基準値とする。後者の場合は、無毒性量の代わりに、俗に「運悪く雷に打たれて死ぬ確率」を目安とする実質安全量（virtually safe dose、通常 10^{-5} ないし 10^{-6} の危険率を適用）を採用し、同様の手続きを経てヒトへの外挿を行っている。これらの判断が正しいか否かを検討する材料としては人での中毒事例、自殺事例、事故事例やそれらに関する疫学調査が活用され、それにもとづく基準設定法の修正が折にふれて加えられてきた歴史がある。ところで、食品あるいは食品関連製品（サプリメントなど）の場合、安全性評価に不確実係数100を使用するとどうということになるであろうか。例えば、ニンニクや玉ねぎを毎日1個食べても安全であるという結果を引き出そうとすると、実験動物に毎日100個相当を食べても何も起こらないことを示す必要がある。

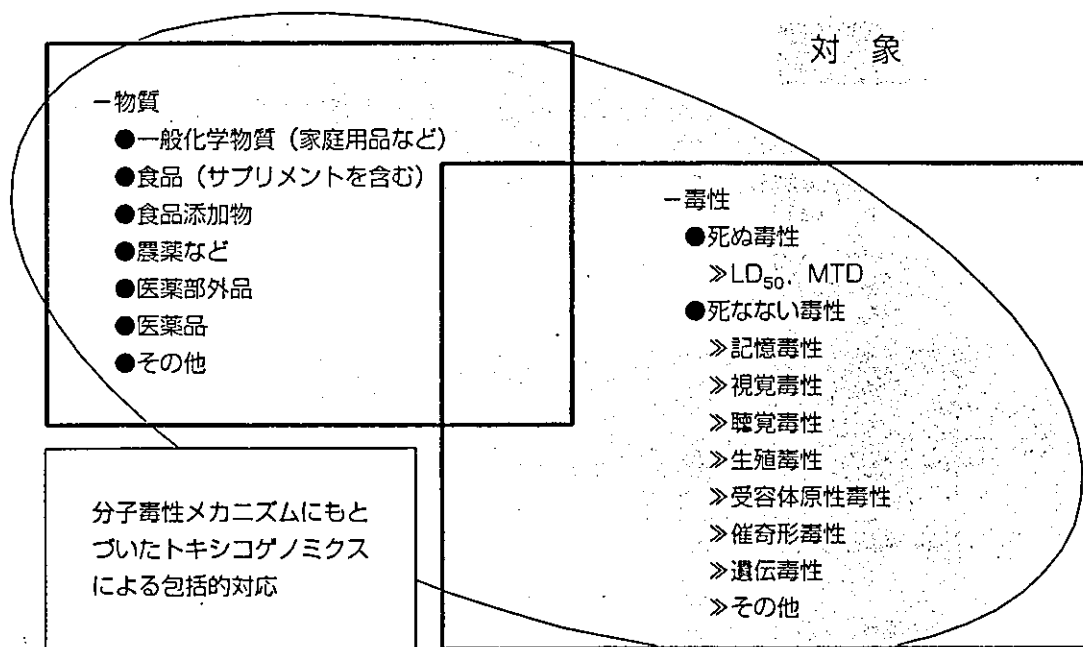


図1 分子毒性メカニズムにもとづいたトキシコゲノミクスが目指す包括的毒性

毒性を分類する際に、物質のカテゴリーを用いたり、毒性の症状を用いたりする。しかし、生体側からみれば、体内に入った物質がどのような生体反応を誘導するかが問題である。分子毒性メカニズムにもとづいたトキシコゲノミクスでは、生体反応を遺伝子発現カスケードとして把握することにより、このような従来の分類を包括した対応を目指す

ニンニクや玉ねぎ中のアリシンが動物に溶血を引き起こすが、100倍量を摂取すれば影響がみられる可能性が高い。すなわち、食品に関して動物実験を行った場合、一般論として不確実係数は利用できず、問題とする成分に対する生体反応のヒト・動物間の種差そのものを検討することが必要となる。

毒性の質的な問題はどのように取り扱われてきたか。生物学が現象の記述学に基礎を置いていた段階での毒性学は、対象が医薬品であれ、一般的な化学物質であれ、その要求される役割を果たすために、投与された化学物質と症状との関連性にもとづいた化学物質の体系化を基盤として発達してきた(図1)。その過程でのさまざまな経験を取り入れる形で、前述の「不確実係数」や「LD₅₀」の概念が利用され、現在まで、非常に有効に機能してきている。ここまでの毒性学は、化学物質の投与とそれによる症状(毒性)発現の関連性を分類し体系化するものであり、実験動物と人をつなぐために、回帰モデル(regression model)の概念に根差した後向きの検討が行われることが多かった。しかし、サリドマイド禍(奇形発生)に象徴されるように、げっ歯類の実験動物では毒性が確認されず、人に使用して初めて催奇形性が明らかになった事例の存

在は、この方法の限界を示している。

火事場の現場検証?

近年、科学の進歩により、毒性学は生体内で引き起こされる反応の分子レベルから形態レベルまでのメカニズム記述を基礎とするものへと変貌しつつある。ここで、活躍するのがハイスループット性の高いマイクロアレイ技術である。しかし、マイクロアレイから得られた遺伝子発現プロファイルによる検討も、そのときに観測される毒性形質と関連付け、いわゆる化学物質のフィンガープリント(指紋)として毒性反応の類型化を行うことが多い。このような関連付けを「phenotypic anchoring」と呼ぶことがある⁴⁾。

分子毒性学の立場からは、化学物質が生体内で引き起こしている一連の事象を理解することが直近の目標である(図2)。毒性所見が明瞭に現れた段階では、化学物質による遺伝子発現はすでに十分にタンパク発現を引き起こしており、その結果としての組織改変までも完了してしまっている。この段階での遺伝子発現プロファイルは、所見と直結したものであることに間違いはないが、そこに至る過程を端的に示すものでは

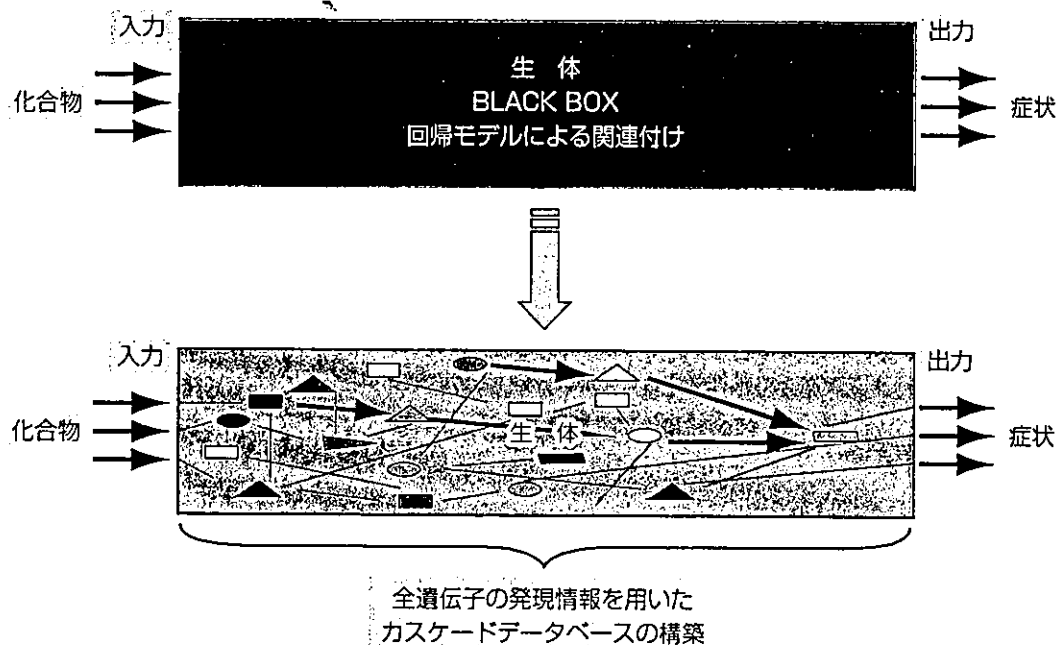


図2 経験則からメカニズムによる予測へ

生物学が現象の記述学に基づいていた段階での毒性学は、投与された化学物質と症状との間を回帰モデルにより関連付けることで体系化が行われてきた。しかし、分子毒性学の立場から一番知りたいことは、生体内で実際に起こっている一連の事象であり、遺伝子発現解析の場合にはすべての遺伝子の情報をもとにした遺伝子カスケードの全容解明である。毒性学的に重要なマーカー遺伝子（数十～数百のことが多い）についてのこのようなデータベースは存在するが、ここではすべての遺伝子を対象としたものを指向する

必ずしもない。丁度、火事場の現場検証で出火元を特定する作業に似ている。これに対する別のアプローチとして、出火直後の変化から逐次検索することが考えられる。すなわち、化学物質に暴露され始めた初期からの遺伝子カスケードの全容解明である（図2）。全ゲノムが明らかになった現在、形質発現の有無にかかわらずすべての遺伝子の発現をモニターするこのようなアプローチ、すなわち「形質非依存型トキシコゲノミクス (phenotype-independent toxicogenomics)」を考慮せざるを得ない。

動物実験を主な手段として駆使しうる立場からは、この目的のための実験プロジェクトを企画することが可能である。タンパクのリン酸化や発現の変化も同時に観測できれば理想的であるが、それらに関する網羅的観測手法が整っていない現段階では、マイクロアレイ技術による遺伝子発現が頼りである。十分に精密かつ実態的に生体反応が記載されれば、従来の膨大な時間と費用のかかる長期毒性試験（ラットなどを用いる）の代替として、より早く、安く、正確な評価、さらに、種差や個人差を勘案した正確なヒト毒性予測が

可能となることが強く期待される。特に胎児、新生児、小児、成人、老人の各発達段階における生体側の反応様式・感受性の変化や、複数の物質の進入による複合作用なども包括的に扱えるようになると考えられる。マウスにおいては遺伝子ノックアウト手法により遺伝子ごとの機能解析が可能であり、ヒトではSNPs解析が同様に利用できるであろう。これらについても、形質発現が伴わないために解析が行き詰まった場合には、形質発現に依存しない手段を選ばざるを得ない。恒常性維持機構に深くかかわる内分泌かく乱化学物質の問題など、外界からの影響が効率よく中和されてしまい、形質変化がモニターしにくい対象を扱う場合にも、形質発現の有無にかかわらずmRNAやタンパクの発現修飾を観測することが有効な影響解析手段となることが考えられる。

今後の毒性学における遺伝子発現解析 (transcriptome)、すなわちトキシコゲノミクス (toxicogenomics) は、従来の「形質依存型」のものに「形質非依存型 (phenotype-independent)」のものを加える時期にきているといえよう。

形質非依存型トキシコゲノミクス (phenotype-independent toxicogenomics) の条件

形質依存型では、ある特定の毒性所見に関連した遺伝子をマーカーとして選択し、それが毒性発現に重要であると認定することから始まる。これに対して、形質非依存型トキシコゲノミクスは、まずは形質発現情報などの情報を用いずに、自らの遺伝子発現プロファイル情報のみを頼りに遺伝子発現変化の解析を開始しようとする点に特徴がある。このためには、測定するすべての遺伝子はどれも平等に重要であると仮定する必要がある。そして、そのすべてがどれだけ変動したかを正確に観測する必要がある。さらに、幾多の実験の結果を統合してはじめて全体像が明らかになるため、複数の実験の結果を長期にわたり集積し、それらのデータを縦横に解析する必要がある。

この条件を満たすためには、今までのマイクロアレイ手法には問題があった。まず、マイクロアレイの性能として、mRNAの測定可能な範囲が比較的狭いためチップ1枚当たりに用いる総mRNA量を一定量に揃える必要があった点である。この場合、サンプル中の細胞1個当たりのmRNAの絶対的な多寡に関する情報は消失してしまう。これを補う種々の標準化手法が編み出されている^{5)~12)}が、それらは原則的には統計学的な有意差検定をもとにした変動遺伝子の抽出を行う。このような計算では、一般に大半の遺伝子はサンプル間で不変であるとの前提から、多数の遺伝子が「変動したとはいえない」と位置付けられることが多い。また、変動を表現するために対照サンプルに対する比率表示をすることが多い。この場合、異なる時期に実施した複数の実験から得られたデータを比較する際に、対照群の実験間変動を吟味することが難しいという問題が加わる。

細胞1個当たりの mRNA絶対量を得る方法

このような問題を解決し、形質非依存型トキシコゲノミクスに適用するため、われわれは、細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る方法(“PerCellome”)を、当時それに必要な条件を満たしていたアフィメトリク

ス社のGeneChip®を対象に開発した(特許出願中、投稿中)。このシステムは大きく4つの要素からなっている。

①RNA用に準備したサンプル破砕液の一部からそのDNA濃度を簡便に測定する方法：細胞1個当たりのmRNA情報を得るために、サンプルを構成する総細胞数を測定する。実際に細胞数を計測することは特に実質臓器の場合には困難であるため、その代替指標として細胞核内のゲノムDNA量を用いる。サンプルをDNA測定専用消費することを避けるため、RNA調整用の組織破砕液の極一部(通常、10 μ l)からDNAを測定するプロトコルを確立した。

②用量関係を考慮し工夫された多段階濃度スパイクカクテル(GSC:dose-graded spike cocktail)の調整と、その破砕液への添加法：細胞1個当たりのmRNAの標準として、組織破砕液に添加するスパイクRNAには、GeneChip®が使用者のために用意していた5種類の枯草菌由来遺伝子のRNAを用いた。5種類の枯草菌RNAをおのおの約2,000塩基の長さに合成し、5段階の用量に配合したカクテルを作製した。これにより、広い濃度範囲をカバーする標準用量作用曲線をすべてのサンプルに導入することが可能となった。

③Hill式にもとづいた絶対化アルゴリズム：GeneChip®では、蛍光シグナルとmRNA量との間にHill式に従う関係が成立することを後述のLBM標準サンプルなどにより確認した。その結果からHill式の直線化式によりGSCを直線化して絶対量化を行う変換アルゴリズムを開発し、それを自動実行するプログラムを独自に開発した。

④マイクロアレイの用量相関性確認およびバージョン間・プラットフォーム間データ変換対応のためのLBM(liver-brain mix)標準サンプルおよびデータ変換アルゴリズム：遺伝子発現プロファイルが大きく異なる一対の組織を一定の比率で相互に希釈しあったサンプルセットを表記の目的のために用意した。具体的には、肝と脳を用い、100:0, 75:25, 50:50, 25:75, および0:100の混合比の5サンプルからな

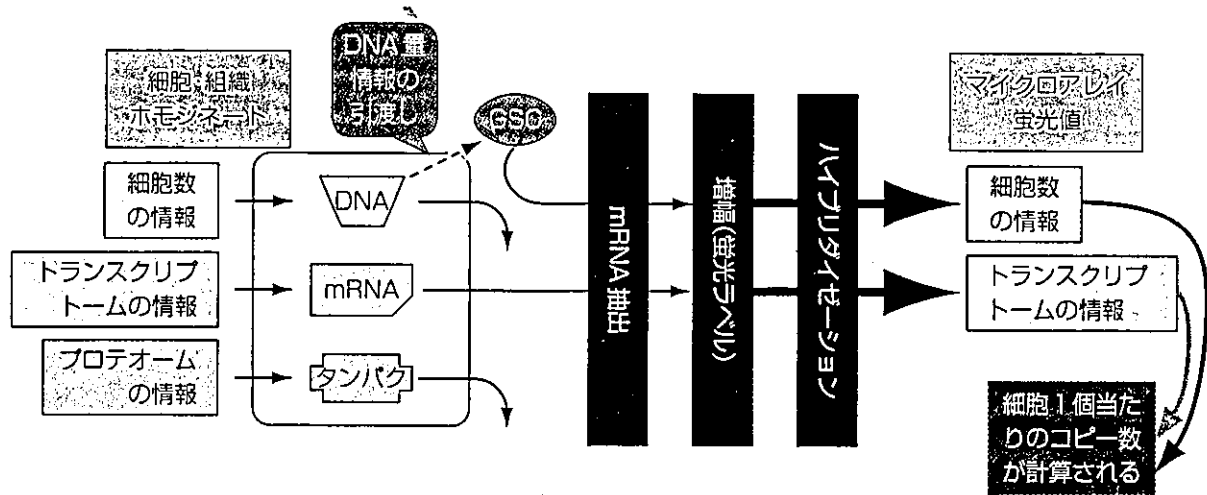


図3 絶対量化の原理

マイクロアレイなどから絶対量を得る方策は、まず、サンプル・ホモジネートのもととなった検体の細胞数の情報をDNA量として捉える。mRNA抽出段階でこのDNA情報が失われてしまうことを回避するために、DNA量の代わりに相当量の多段階濃度スパイクRNAカクテル(GSC)を添加する。mRNA抽出以降、GSCとサンプルのmRNAがともに増幅・蛍光ラベリング、マイクロアレイ表面へのハイブリダイゼーションなどの段階をほぼ平等に経験する。その結果、マイクロアレイの蛍光値を適切に比較・補正することにより、mRNAの細胞1個当たりのコピー数が計算される

るセットを用意した。

絶対量化の基本的原理は、サンプルの細胞数(ゲノムDNA濃度で代替)に比例した分子数のスパイクRNAを添加することで、サンプルの細胞1個当たりのmRNA絶対量(コピー数)の指標をサンプル中に導入するものである(図3)。ただし、スパイクRNAは1点を規定するものではなく、5種類の枯草菌遺伝子に対するRNA(哺乳類の配列と交叉しない)を適切な公比をもたせて5段階の濃度に割り振ったカクテルとして用いることが特長である。これにより、絶対コピー数の指標になると同時に、広い用量範囲について検量線を各サンプルに導入したことになり、mRNA抽出からGeneChip®の蛍光測光までの過程で生じるデータ全体の歪みを補正する際に威力を発揮する

他方、チップ内での異なる遺伝子の発現量の正確さに関しては、GeneChip®のプローブセットの設計に依存する。アフィメトリクス社はプローブの設計に際してそれらのT_m値を一定に保つアルゴリズムを用いている。これについては、利用者として個々に定量的PCRなどにより検証する必要がある。本手法の特徴の1つとして、真の値が明らかになった時点で、すべての既測定値を一括修正することが可能であることがあげられる。

LBM (liver-brain mix) 標準サンプルとの組合せ

LBMは実験動物サンプルに対しては肝と脳の組合せを用いたが、遺伝子発現プロファイルの異なるペアであればどのような組合せでも利用可能である(ヒトサンプルに対しては2種類のヒト培養細胞株も可)。複数のペアを併用すればさらに精度のよい検定が可能となる。GSCをDNA濃度に応じて添加したLBMセットを測定し、絶対量化した結果は、グラフ化すると直線を描くはずであり、さらに50:50のサンプルで除した場合、理想的にはすべての遺伝子が50:50のところから1の値を取り、100:0あるいは0:100では0から2の間の値を取るところの直線を描くはずである。この結果から、マイクロアレイの定量性が確認される。

さらに、LBMをバージョンアップ前後の新旧GeneChip®で測定しておくことにより(図4)、LBMに含まれるすべての遺伝子(プローブセット)について、5点からなる新旧のチップ間の換算関数を求めることができる。LBMに他の臓器の組合せを用いることで取り扱える遺伝子数を増やすことが可能である。

本システムのGSCを添加したサンプルはスパイクRNAを検出するプライマーセットを用意することでPCRにおいても容易に絶対量化データを得ることができる。詳細は他に譲るが、プライマーペアの増幅効率

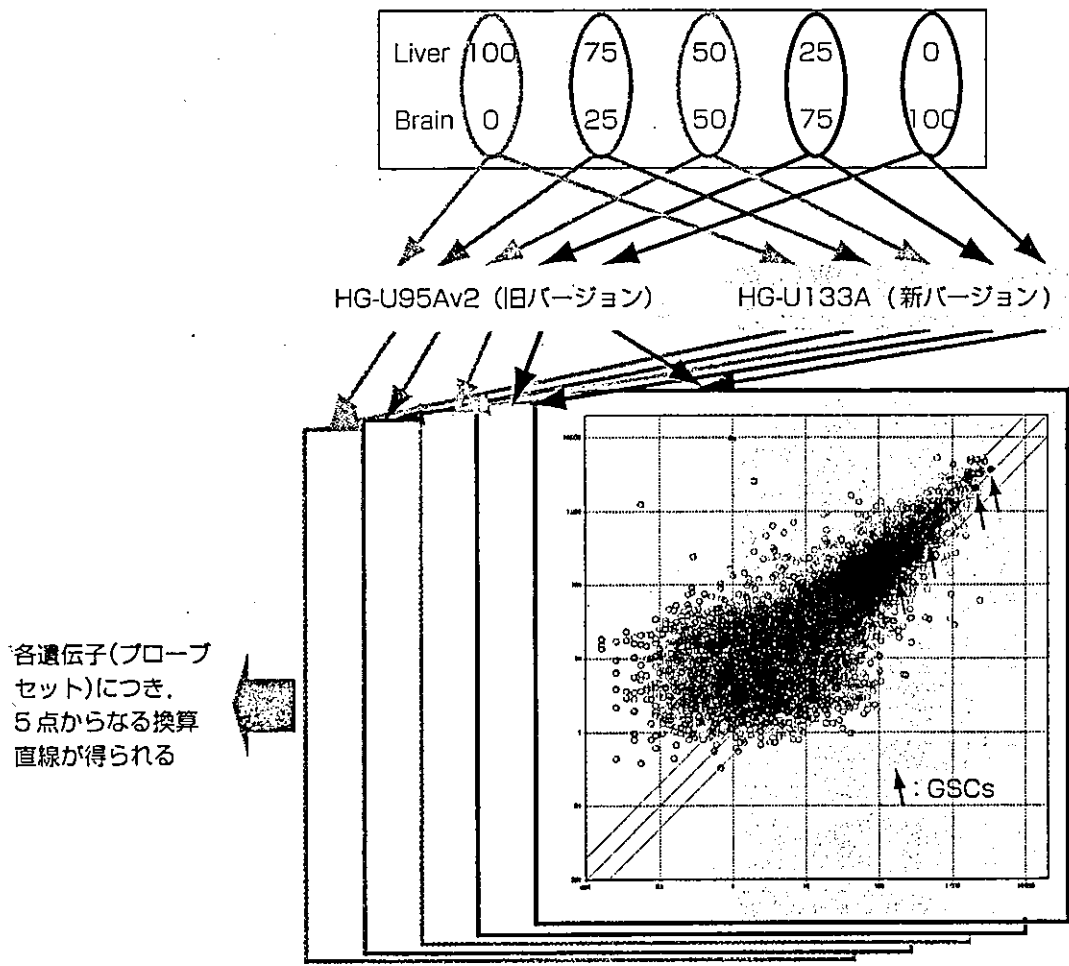


図4 GeneChipの新旧バージョン間のデータ互換

LBMサンプルセットを新旧のバージョンのGeneChip®において測定する。スカッターグラフで示すような関係が5組得られる。矢印で示す黒丸がGSCである。ここにプロットされた遺伝子(両バージョンに同一または対応するアノテーションが得られ、かつ、LBMサンプルに発現されているもの)については個々について直接変換式が得られる。これは、定量的PCRやアフィメトリクス社以外のマイクロアレイプラットフォームにも拡張可能である

のばらつきを勘案した絶対化アルゴリズムとともに Percellome 定量PCR システムを構築中である。GeneChip®以外のプラットフォームとのデータ互換も可能である。本システムが適応可能なプラットフォームの条件としては、GSCを受け付けるプローブセットが用意されていること、および用量相関性が確保されていることの2点を満たしている必要がある(図5)(現在、2社の製品について検討開発中)。

遺伝子カスケード解析を目指した形質非依存型トキシコゲノミクスへの適用

厚生労働科学研究費のプロジェクトにこのPercellome システムが採用され進行中である〔厚生労働科学研究費補助金H14-トキシコ-001(創薬支援トキシ

コゲノミクス)およびH15-化学-002(化学物質トキシコゲノミクス)]。4~5段階の用量(公比 $\sqrt{10}$ 等)について、4時点(2, 4, 8, 24時間等)での遺伝子発現を観測する16~20群(一群3匹)の構成からなるプロトコルにより、1つの化合物について48~60匹の動物のサンプルからPercellomeデータを生成している。化学物質トキシコゲノミクスプロジェクトでは、遺伝子の発現値を3次元表示することでその用量・時間依存性を視覚化し、データ解析を進めている。X軸に用量、Y軸に時間、Z軸に発現量(ゼロからの均等目盛り表示)をプロットすることにより、1つの遺伝子につき16~20格子点(48~60枚のGeneChipからのデータ)からなる1枚の局面を描くことができる(図6)。1つのGeneChipが45,000のプローブセットからなる場合、1つの化合物の用量・

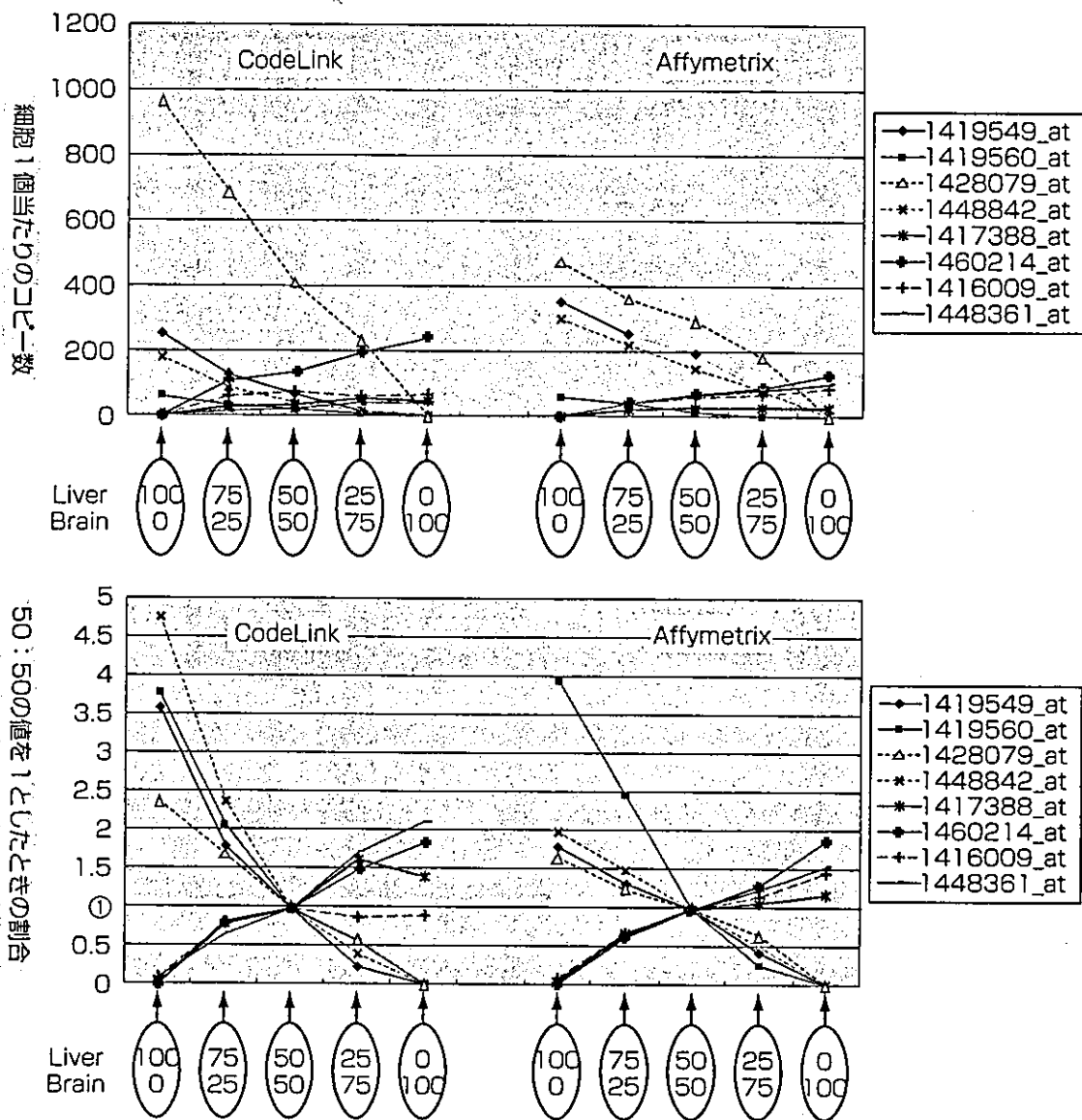


図5 LBM標準サンプルセット (Liver-Brain Mix) によるシステムの定量性の検定とデータ直接変換式の生成

LBMの5サンプルをAffymetrix社 GeneChip® (MOE430v2) および、Amersham社 CodeLink アレイ (GSCが測定可能な試作品) にて測定した。ここでは、共通に測定された8遺伝子 (AffymetrixのIDにて表示) を示す。上段は、細胞1個当たりのコピー数で表示したもの。下段はLBM (50:50) の値に対する比を表示したもの (理想的には、すべての遺伝子が50:50のところでは1を通り100:0におけるy切片が0~2の範囲に収まる直線を描く)。個々のprobe setには若干の性質の相違があるが、押しなべて直線性がよく、2社間のデータの相互直接変換関数が求められる。別途に真のコピー数が判明した際 (定量PCRなどにより) には、その値をもとに過去のマイクロアレイ・データを一括変換することが可能となる

時間依存的データ3次元表示では45,000枚の局面の層状集合体からなる「多層構造からなる菓子などになぞらえミルフィーユ・データ [millefeuille (MF) data] と名付けた」。このMF dataは1局面の各格子点が3匹の動物に由来する3つのデータにもとづいており、格子点のデータの信頼性の評価、artifactの除去や、生物学的な蓋然性を有する変化であるか否かの判別に適しているうえに、類似の用量・時間反応を示す遺伝子の選別に威力を発揮する。

生体反応の分子メカニズム解析 (カスケード解析) を目標に、遺伝子欠失動物の活用を見込んで、マウスを用いた実験を重ね、2004年6月現在で約25の既知化合物についてのデータ収集を終え、向こう2年の内に90化合物のデータを蓄積する予定である。まずはすべての遺伝子が平等に重要と考える方策を取るため、生物学者が視覚的に確認できるMF dataを利用した完全な教師なし (unsupervised) クラスタリングを開発・実施している。[NTTコムウェア株式会社

1つの化合物のデータは約45,000 probesetの曲面からなる
(MOE430 v 2 GeneChipの場合)

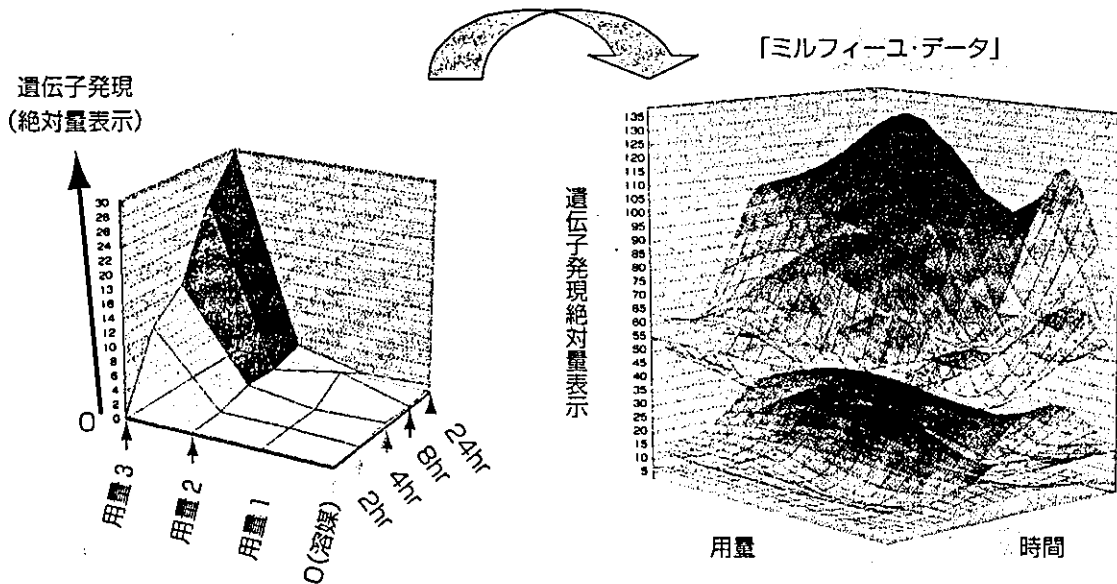


図6 トキシコゲノミクス・プロジェクトにおける単回投与実験の基本構成とミルフィーユ・データ

時間と用量の組合せからなる4×4のマトリックス構造のプロトコルを示す。各群3匹、サンプルはプールせず個別にGeneChip®解析を実施している。X軸に用量、Y軸に時間、Z軸に発現量（ゼロからの均等目盛り表示）をプロットすることにより、1つのプローブセットごとに1枚の発現局面を描くことができる。現在使用中のMOE430v2は約45,000のプローブセット情報を生成するため、1つの化合物のトランスクリプトーム情報は45,000枚の局面の集合体（ミルフィーユ・データ）であらわされる。→巻頭カラー参照

と共同開発し、Teradata（日本NCR株式会社）による解析・データベース上に搭載した。このクラスタリング手法は、クラスター数を指定せず、45,000プローブセット（MOE430v2）を小さいクラスターから数百のクラスターに分類する。複数の化学物質からのクラスターデータの解析と、適切な遺伝子欠失マウスによるMF dataにより、客観的な遺伝子カスケードの描出を試みている。これと既知の情報との比較を行い、必要に応じて不足部分の確認実験を別途追加して実施し、最終的に信頼性の高い遺伝子カスケードデータベースの構築と、これにもとづいた効率的で正確な毒性評価・予測技術の開発を目指している。

〈謝辞〉

本システムの開発とプロジェクトの遂行に当たり、当毒性部の諸先生方および安東朋子、森山紀子、近藤優子、中村祐子、安部麻紀、吉木健太、松田菜恵、森田統一、今井あや子、青柳千百合、相原妃佐子の各氏に深く感謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H13-生活-013、H14-トキシコ-001およびH15-化学-002による。

参考文献

- 1) Ema, M. et al. : J. Biol. Chem., 269 : 27337-27343, 1994
- 2) Jacobson, J. L. & Jacobson, S. W. : Neurotoxicology, 18 : 415-424, 1997
- 3) Jacobson, J. L. & Jacobson, S. W. : Obstet Gynecol Surv., 59 : 412-413, 2004
- 4) Waters, M. D. et al. : Mutat. Res., 544 : 415-424, 2003
- 5) Hill, A. A. et al. : Genome Biol., 2 : RESEARCH0055, 2001
- 6) van de Peppel, J. et al. : EMBO Rep., 4 : 387-393, 2003
- 7) Hekstra, D. et al. : Nucleic Acids Res., 31 : 1962-1968, 2003
- 8) Sterrenburg, E. et al. : Nucleic Acids Res., 30 : e116, 2002
- 9) Talaat, A. M. et al. : Nucleic Acids Res., 30 : e104, 2002
- 10) Bolstad, B. M. et al. : Bioinformatics, 19 : 185-193, 2003
- 11) Lee, P. D. et al. : Genome Res., 12 : 292-297, 2002
- 12) Wilson, M., et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96 : 12833-12838, 1999

Handbook of Toxicogenomics

Strategies and Applications

Edited by
Jürgen Borlak



WILEY-
VCH

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

24

Toxicogenomics Applied to Hematotoxicology

Yoko Hirabayashi and Tohru Inoue

24.1

Introduction: Forward and Reverse Genomics

Microarray [1, 2] and/or gene chip [3] technologies have enabled the survey of a large number of gene expressions. Specifically, along with the progress in the human and the mouse whole-genome sequencing projects [4, 5], nearly complete gene expression profiling for not only cellular physiological phenotypes, but also for pathological and clinical phenotypes, can also be done with the newly developed genomics methodology. In contrast, prediction and identification of a variety of physiological and pathologic phenotypes solely by gene expression profiling, that is, predictive genomics, is also presumed to be possible by this strategy, once a comprehensive database has been established. The former is called forward genomics, and the latter reverse genomics (Figure 24.1) [6]. The application of microarray and gene chip technologies in toxicology is called toxicogenomics [7]. Toxicogenomics can contribute to elucidating the toxicological mechanism (inductive toxicogenomics) and to predicting various possible toxic phenotypes solely on the basis of similarity in gene expression profiling without annotation of chemical characteristics (deductive toxicogenomics). The former is intended to define an unknown gene profiling marker, and consequently, proteomics markers, whereas the latter is intended to predict various possible toxicological phenotypes even without annotative information. The predictability of the latter strategy should be enhanced by using a database resulting from collaboration between the above-mentioned inductive and deductive approaches. These are analogous to the clinical use of genomics for human tissue samples and using informatics on clinical data to predict the diagnosis of diseases, responses to treatment, and consequent individual prognoses. Such medical and medicinal genomics information (including knowledge of single nucleotide polymorphisms; SNPs) may eventually make custom-made personal treatment protocols possible, and the newly established methodology should also make SNP-oriented human ecotoxicological risk evaluation possible.

In the toxicological application of toxicogenomics using experimental animals, toxicogenomics appears to have two definitive advantages: first, a reduction in the number of test animals and a shortening of the test period, and second, the use of