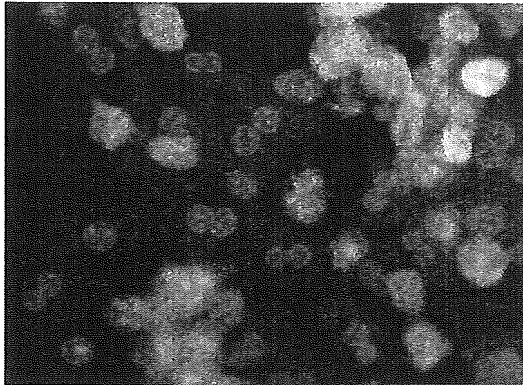


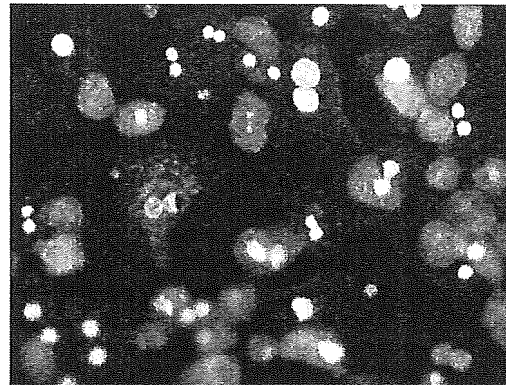
Fig. 2

Mouse primary cultured hepatocytes (24 hr)

control



MPTP 1 mM



ており、タンパク量自体、あるいは mRNA の発現量で制御されている部分が多いという意見は今のところないので、この現象の解釈には更なる検討が必要であろう。また、図には示さないが、別経路で ASK1 の活性を制御することが示唆されているカルモジュリンキナーゼ 2 の幾つかに、ノックアウト動物で大きく発現変動している例がみられた。いずれにしても、ASK1 が欠如すると MPTP によるアポトーシスが抑制されるという前項の結果と合わせて、MPTP による毒性シグナルに、ASK1 カスケードが重要な役割を果たしていることが推定される。

次に注目されたのはインターフェロン関連遺伝子である。Fig.7 にその一部を示すが、一般に ASK1 が欠如すると発現上昇するプローブセットが多く認められ、また、MPTP によって顕著に誘導されるものも認められた。

また、非常に特徴的だったのは、増殖因子およびその関連蛋白質が、一様にノックアウト細胞で過剰発現していることであった (Fig. 8)。これまで、増殖因子関連蛋白質の発現に ASK1 経路が関与しているという報告はなく、以後の興味深い検討課題で

ある。

同様に、細胞骨格蛋白質が ASK1 の有無によって発現変動していることも特徴的であった (Fig. 9)。このうち、細胞骨格の制御に関連する小分子 GTP 結合蛋白質 Rho の関連蛋白質の発現が ASK1 の有無によって発現変動し、かつ MPTP 投与によってノックアウト細胞において比較的大きな誘導が生じている (Fig.9, 下)

以上の二つと逆に、細胞相互作用・細胞外マトリックス関連蛋白質の多くにおいて、ノックアウト細胞での発現が大きく低下している例が認められた (Fig. 10)。これらについても、その生理的意味を含めて、今後の検討課題である。

最後に、前年度、*in vivo* の状態で投与したマウス脳・肝臓に於いて抽出した

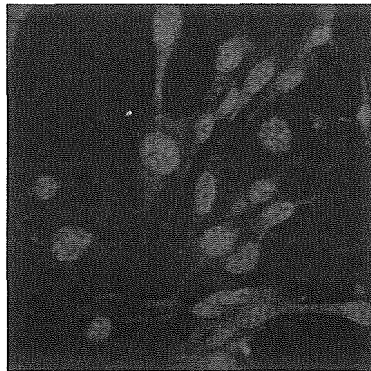
D. 考察

前年度 ASK1 ノックアウトマウスが野生型に比べて MPTP に対する抵抗性を示したことから、MPTP による毒性発現、すなわちドパミンニューロンの細胞死に ASK1 が関与している可能性を示唆した。今回、ノックアウトマウス由来の MEF が野生型に比べ

Fig. 3

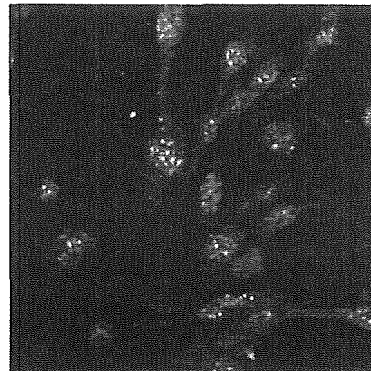
24hr
MPTP
0.3mM

WT

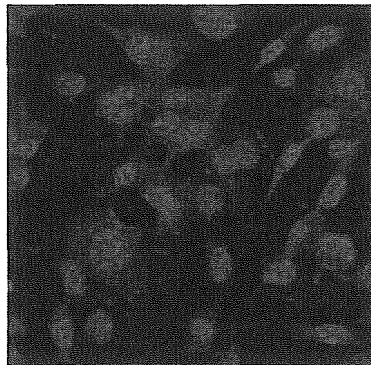


Nucleus

Free 3'OH DNA Terminal



KO



MPTPによるアポトーシス誘導に耐性を示したことから、MPTPによる細胞死誘導に、細胞普遍的な機構が存在することが示唆される。このことは、培養細胞を用いた系が毒性学的なパスウェイ解析のための有用なツールになりうることを示している。培養細胞の系が使用可能であれば、*in vitro*で、特定の遺伝子の機能を除去したり、外部から遺伝子を導入したりすることが比較的容易に出来るようになることから、以降の研究の発展が期待できる。

今回の結果から、ASK1シグナルの下流にある重要遺伝子を多数抽出できた。これらを毒性パスウェイとして提案するためには、それら遺伝子発現変動の因果関係を明らかにする必要がある。そのためには特定遺伝子を人為的に除去したり加えたりする検証実験が必須である。今回、それを可能とする系が確立できたと考えられ、予定されている*in vivo*の実験とともに、今後検討していきたい。

E. 結論

神経細胞の酸化ストレスによる障害機構の解明のための網羅的遺伝子発現解析に端を発して、各種組織・細胞の解析を進めたところ、一般的な細胞におけるストレスシグナルの解析に繋がる手がかりが得られた。今回の戦略の上に検証的研究を積み重ねれば、複雑で解析困難であった細胞死に至るストレス応答の全容が明らかになる。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takashima K, Mizukawa Y, Morishita K, Okuyama M, Kasahara T, Toritsuka N, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. Effect of the difference in vehicles on gene expression in the rat liver-analysis of the control data in the Toxicogenomics Project Database. *Life Sci.*, 2006, in press.

2. 学会発表

水川裕美子, 小野敦, 宮城島利一, 長尾拓, 漆谷徹郎: ラットおよびヒト初代培養肝細胞における各種薬物によるCYP1A1の誘導—トキシコゲノミクスプロジェクトのデータによる解析— 第107回日本薬理学会近畿部会 2005年6月

漆谷徹郎: トキシコゲノミクスプロジェクトデータベースを用いた肝毒性発現機序の解析. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会 2005年6月

宮崎登志子, 笠原利彦, 小野敦, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓: ラット肝組織の保存条件についての検討1 RNA later 組織保存法についての検討. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会 2005年6月

新田浩之, 笠原利彦, 小野敦, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓: ラット肝組織の保存

条件についての検討2 RLT Bufferに溶解したラット肝組織の保存条件について. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会 2005年6月

笠原利彦, 宮崎登志子, 小野敦, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓: ラット肝組織の保存条件についての検討3 肝組織を保存するまでの時間がRNAの品質に及ぼす影響. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会 2005年6月

松下智哉, 小野敦, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓: エチオニン暴露後のヒト初代培養肝細胞およびラット初代培養肝細胞での遺伝子発現変化. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会 2005年6月

上田浩之, 笠原利彦, 小野敦, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓: ラット肝組織および初代培養肝細胞への化合物暴露がトランスポーター遺伝子群に及ぼす影響. 第32回

Fig. 4

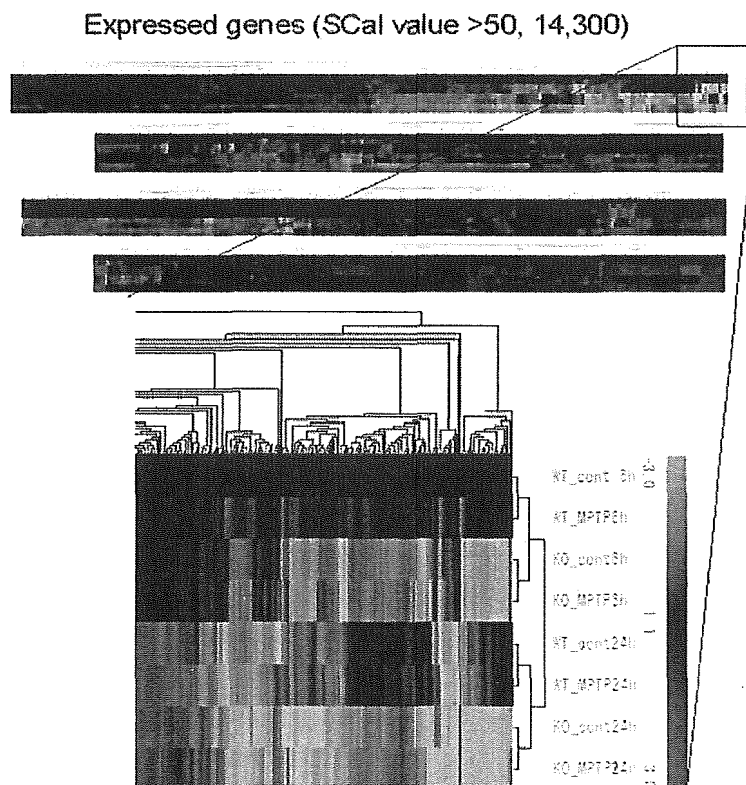
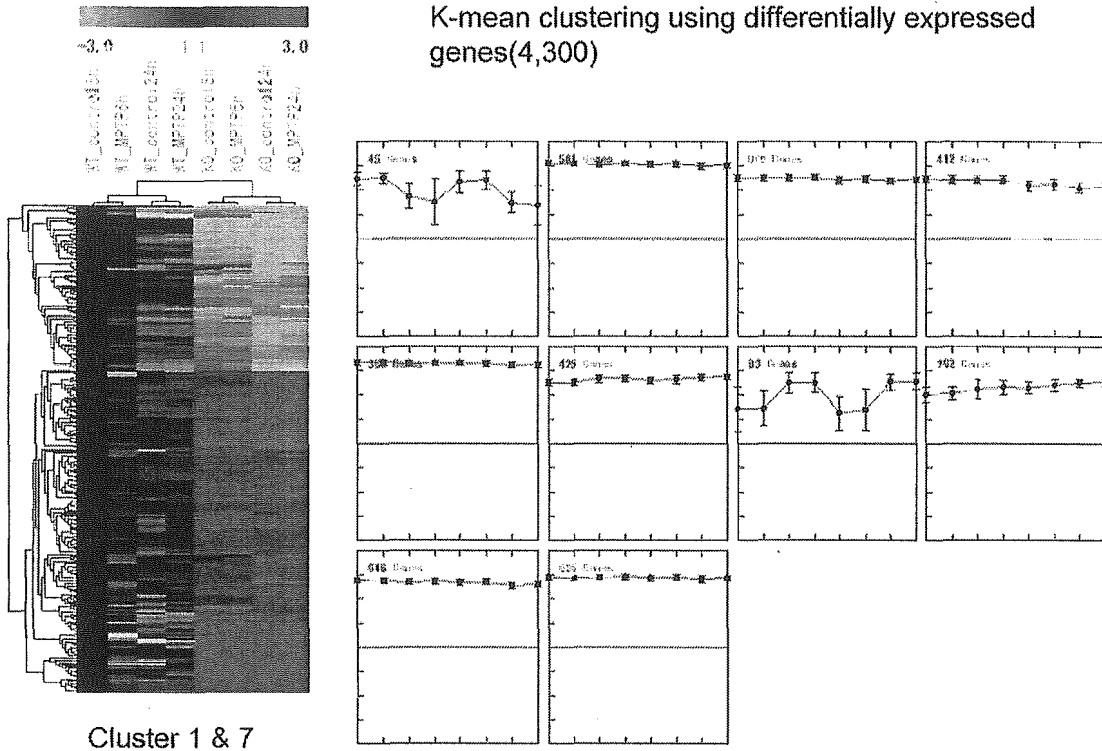


Fig. 5



日本トキシコロジー学会学術年会 2005年6月

その問題点. 動物細胞工学会シンポジウム, 2005年11月

田村幸太朗, 小野敦, 漆谷徹郎, 宮城島利一, 長尾拓: ラット腎臓(乳頭, 髓質, 皮質)における遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第32回日本トキシコロジー学会学術年会 2005年6月

上原健城, 小野敦, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 長尾拓. Toxicogenomic approach for early assessment of potential hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. 第22回日本毒性病理学会総会, 2006年1月

T. Urushidani. Toxicological analysis of hepatotoxicants in the Toxicogenomics Project Database 20th International Society for the Study of Xenobiotics, Maui, Hawaii, 2005.10.

廣出充洋, 小野敦, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 長尾拓. エチオニン投与ラット肝臓における遺伝子発現解析—肝障害と血液凝固系異常との関連. 第22回日本毒性病理学会総会, 2006年1月

T. Urushidani. Prediction of hepatotoxicity of drugs based on the Toxicogenomics Project Database in Jeju Island, Korea, 2005.11.

A. Ono, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Toxicogenomics comparison of the species difference of PPARalpha ligand. 45th Society of Toxicology, 2006.3.

漆谷徹郎. トキシコゲノミクスプロジェクトにおける一次培養幹細胞データの解析と

Table 1.

x1.5 Up in WT & KO

GO ID	GO Term	Total Probe Sets	Probe Sets in List	hit, fold vs total	Chi2
30644	chloride ion homeostasis	3	2	31.114	58.295
30320	trivalent inorganic anion homeostasis	5	3	28.002	76.129
48246	terpene biosynthesis	5	2	18.668	33.447
9241	polyisoprenoid biosynthesis	5	2	18.668	33.447
30002	anion homeostasis	9	3	15.557	40.871
8299	isoprenoid biosynthesis	26	7	12.565	74.556
18009	polyisoprenoid metabolism	10	2	9.334	14.886
6721	terpenoid metabolism	10	2	9.334	14.886
6720	isoprenoid metabolism	37	7	8.830	48.64
51130	positive regulation of cell organization and biogenesis	11	2	8.466	13.21
7520	myoblast fusion	11	2	8.496	13.21
50850	positive regulation of calcium-mediated signaling	17	3	8.236	19.079
50848	regulation of calcium-mediated signaling	19	3	7.369	16.521
6688	glycosphingolipid biosynthesis	13	2	7.190	10.642
45453	bone resorption	15	2	6.223	8.7688
50852	T cell receptor signaling pathway	16	2	5.834	8.0133
48562	embryonic organ morphogenesis	16	2	5.834	8.0133
6687	glycosphingolipid metabolism	18	2	5.186	6.7596
9247	glycolipid biosynthesis	21	2	4.445	5.3421
7271	synaptic transmission, cholinergic	22	2	4.242	4.9594
43064	flagellum organization and biogenesis	22	2	4.243	4.9594
1759	induction of an organ	24	2	3.880	4.2949
10082	specification of organ identity	24	2	3.889	4.2949
42102	positive regulation of T cell proliferation	39	3	3.590	5.6106
7563	aging	46	3	3.044	4.121
6096	glycolysis	106	6	2.642	6.136
7605	sensory perception of sound	89	5	2.622	5.0266
6084	acetyl-CoA metabolism	91	5	2.564	4.7811

x 1.5 Down in WT & KO

GO ID	GO Term	Total Probe Sets	Probe Sets in List	hit, fold vs total	Chi2
6707	cholesterol catabolism	2	2	49.326	94.702
16127	sterol catabolism	2	2	49.326	94.702
16384	nucleosome spacing	6	3	24.064	68.124
16054	organic acid catabolism	6	2	16.443	29.011
46395	carboxylic acid catabolism	6	2	16.443	29.011
6706	steroid catabolism	6	2	16.443	29.011
43123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	8	2	12.332	20.830
50892	intestinal absorption	16	4	12.332	41.668
31295	T cell costimulation	9	2	10.962	18.110
31294	lymphocyte costimulation	9	2	10.962	18.110
44241	lipid digestion	11	2	8.969	14.164
43122	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	11	2	8.969	14.164
31032	actomyosin structure organization and biogenesis	12	2	8.221	12.690
18298	protein-chromophore linkage	12	2	8.221	12.690
15074	DNA integration	12	2	8.221	12.690
6824	cobalt ion transport	12	2	8.221	12.690
8046	dosage compensation, by inactivation of X chromosomes	13	2	7.589	11.445
7549	dosage compensation	17	2	5.803	1.954
7586	digestion	44	5	5.606	18.398
45086	positive regulation of interleukin-2 biosynthesis	18	2	5.581	7.330
7257	activation of JNK activity	19	2	5.192	6.773
42116	macrophage activation	19	2	5.192	6.773
7009	plasma membrane organization and biogenesis	19	2	5.192	6.773
43507	positive regulation of JNK activity	19	2	5.192	6.773
45577	regulation of B cell differentiation	19	2	5.192	6.773
6635	fatty acid beta-oxidation	20	2	4.933	6.274
15893	drug transport	20	2	4.933	6.274
19866	antigen presentation, exogenous antigen via MHC class II	21	2	4.698	5.824
43506	regulation of JNK activity	21	2	4.698	5.824

Table 2.

x1.5 Up in WT only

GO ID	GO Term	Total Probe Sets	Probe Sets in List	hit, fold vs total	Chi2
48314	phosphocreatine biosynthesis	3	2	12.118	20.399
45581	negative regulation of T cell differentiation	5	2	7.270	10.816
35110	leg morphogenesis	6	2	6.058	8.448
8356	asymmetric cell division	6	2	6.058	8.448
48170	positive regulation of long-term neuronal synaptic plasticity	5	2	6.056	8.440
48133	male germ-line stem cell division	6	2	6.058	8.448
7288	epem axonema assembly	13	4	5.592	15.089
30301	cholesterol transport	12	3	4.544	8.294
15918	sterol transport	12	3	4.544	8.294
8548	histidine catabolism	17	4	4.276	10.045
6547	histidine metabolism	17	4	4.276	10.045
43064	flagellum organization and biogenesis	22	5	4.131	11.889
46339	diacylglycerol metabolism	16	3	3.835	5.732
35136	forelimb morphogenesis	17	3	3.207	4.559
6826	iron ion transport	42	7	3.029	9.524
6857	oligopeptide transport	18	3	3.029	4.079
7586	digestion	44	7	2.891	8.669
7595	lactation	26	4	2.798	4.818
7823	circadian rhythm	45	6	2.423	5.021
16358	dendrite morphogenesis	55	7	2.313	5.225
6889	lipid transport	122	13	1.937	5.905
45596	negative regulation of cell differentiation	95	10	1.913	4.368
16043	cell organization and biogenesis	3837	182	0.862	4.390
7242	intracellular signaling cascade	2192	96	0.798	5.277
46907	intracellular transport	1564	60	0.697	8.172
16070	RNA metabolism	939	36	0.697	4.851
16071	mRNA metabolism	584	19	0.591	5.438
42254	ribosome biogenesis and assembly	249	6	0.438	4.352

x 1.5 Up in KO only

GO ID	GO Term	Total Probe Sets	Probe Sets in List	hit, fold vs total	Chi2
48165	fused antrum stage oogenesis	3	2	18.824	33.757
6703	estrogen biosynthesis	4	2	14.118	24.380
48157	oogenesis (sensu Mammalia)	5	2	11.295	18.788
15840	urea transport	5	2	11.295	18.788
18208	peptidyl-proline modification	6	2	9.412	15.039
48536	spleen development	8	2	7.059	10.403
7527	adult somatic muscle development	9	2	6.275	8.870
30879	mammary gland development	9	2	6.275	8.870
51227	mitotic spindle assembly	10	2	5.847	7.650
51225	spindle assembly	10	2	5.847	7.650
7525	somatic muscle development	10	2	5.847	7.650
7888	excretion	16	3	5.294	10.453
8432	phenylalanyl-tRNA aminoacylation	11	2	5.134	6.859
46330	positive regulation of JNK cascade	12	2	4.706	5.839
18298	protein-chromophore linkage	12	2	4.706	5.839
10033	response to organic substance	12	2	4.706	5.839
45885	positive regulation of survival zone product activity	13	2	4.344	5.150
17156	calcium ion-dependent exocytosis	20	3	4.235	7.418
7223	fizzled-2 signaling pathway	34	5	4.152	11.975
46328	regulation of JNK cascade	35	5	4.034	11.417
7216	metabotropic glutamate receptor signaling pathway	14	2	4.034	4.565
42591	antigen presentation, exogenous antigen via MHC class II	29	4	3.895	8.611
46339	diacylglycerol metabolism	16	2	3.785	4.062
7613	memory	23	3	3.683	5.887
7215	glutamate signaling pathway	31	4	3.643	7.677
1657	ureteric bud development	33	4	3.423	6.804
48477	oogenesis	25	3	3.398	5.053
6171	cAMP biosynthesis	26	3	3.258	4.698

Table 3.

x1/1.5 Down in WT only					x 1/1.5 Down in KO only						
GO ID	GO Term	Total Probe Sets	Probe Sets in	hit, fold vs total	Chi2	GO ID	GO Term	Total Probe Sets	Probe Sets in	hit, fold vs total	Chi2
6535	cysteine biosynthesis from serine	2	2	17.322	30.76	43000	regulation of macrophage activation	3	2	10.561	29.244
19343	cysteine biosynthesis via cystathione	2	2	17.322	30.76	7217	tachykinin signaling pathway	4	2	12.421	21.004
9448	gamma-aminobutyric acid metabolism	2	2	17.322	30.76	30259	lipid glycosylation	8	3	9.315	22.272
45585	positive regulation of gamma-delta T cell differentiation	3	2	11.548	19.27	48536	spleen development	8	2	6.210	8.7442
45586	regulation of gamma-delta T cell differentiation	3	2	11.548	19.27	19229	regulation of vasoconstriction	8	2	6.210	8.7442
46045	positive regulation of gamma-delta T cell activation	3	2	11.548	19.27	45830	positive regulation of isotype switching	12	3	6.210	13.117
46043	regulation of gamma-delta T cell activation	3	2	11.548	19.27	45191	regulation of isotype switching	13	3	5.733	11.724
19344	cysteine biosynthesis	3	2	11.548	19.27	45190	isotype switching	19	4	5.230	13.698
19605	butyrate metabolism	3	2	11.548	19.27	35115	embryonic forelimb morphogenesis	11	2	4.517	5.4779
40828	gamma-delta T cell activation	5	3	10.393	25.47	7588	digestion	44	7	3.922	15.45
42233	interleukin-3 biosynthesis	4	2	8.661	13.55	1058	ureteric bud branching	19	3	3.922	6.5345
43306	positive regulation of mast cell degranulation	4	2	8.661	13.55	9546	glycine catabolism	13	2	3.822	4.168
43304	regulation of mast cell degranulation	4	2	8.661	13.55	6182	cGMP biosynthesis	13	2	3.822	4.168
43303	mast cell degranulation	4	2	8.661	13.55	6171	cAMP biosynthesis	26	4	3.822	8.3383
43302	positive regulation of immune cell degranulation	4	2	8.661	13.55	9190	cyclic nucleotide biosynthesis	40	8	3.726	11.978
43300	regulation of immune cell degranulation	4	2	8.661	13.55	7223	frizzled-2 signaling pathway	34	5	3.653	8.6415
6534	cysteine metabolism	5	2	6.929	10.15	19915	sequestering of lipid	21	3	3.549	5.4941
42253	granulocyte macrophage colony-stimulating factor biosynthesis	5	2	6.929	10.15	9187	cyclic nucleotide metabolism	55	7	3.162	10.358
6890	retrograde transport, Golgi to ER	8	3	6.495	13.93	5749	glutathione metabolism	32	4	3.105	5.7128
46041	positive regulation of alpha-beta T cell proliferation	6	2	5.774	7.90	1667	ureteric bud development	33	4	3.011	5.3760
46040	regulation of alpha-beta T cell proliferation	6	2	5.774	7.90	8825	copper ion transport	25	3	2.981	3.9514
45573	positive regulation of B cell differentiation	13	4	5.330	14.07	7580	blood coagulation	81	9	2.780	10.12
46324	regulation of glucose import	17	5	5.095	16.48	7599	homeostasis	84	9	2.662	8.3529
46323	glucose import	17	5	5.095	16.48	8015	circulation	64	8	2.398	8.3189
46833	alpha-beta T cell proliferation	7	2	4.949	8.30	30258	lipid modification	53	5	2.344	3.8556
40036	regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway	7	2	4.949	8.30	51251	positive regulation of lymphocyte activation two-component signal transduction system	98	9	2.329	8.8388
8340	determination of adult life span	7	2	4.949	8.30	160	humoral defense mechanism (sensu Vertebrata)	107	10	2.322	7.5413
46825	negative regulation of glucose import	11	3	4.724	8.01	18064	humoral defense mechanism (sensu Vertebrata)	124	11	2.204	7.2510

T. Uehara, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Toxicogenomic approach for early assessment of potential hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. 45th Society of Toxicology, 2006.3.

M.Hirode, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Gene expression profiling in rat liver treated with various hepatotoxic-compounds inducing coagulopathy. 45th Society of Toxicology, 2006.3.

K. Ohmura, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds which change plasma triglyceride. 45th Society of Toxicology, 2006.3.

N.Kiyosawa, T. Miyagishima, T.

Urushidani, T. Nagao. Identification of glutathione deletion-responsive genes in rat livers using large-scale toxicogenomic database. 45th Society of Toxicology, 2006.3.

T. Shimizu, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Gene expression profiling of rat and human primary cultured hepatocytes in response to the drugs affecting mitochondrial functions. 45th Society of Toxicology, 2006.3.

Y.Mizukawwa, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao. Analysis of LPS/TNF signal in the hepatotoxicity of various chemicals in the database of toxicogenomics project in Japan. 45th Society of Toxicology, 2006.3.

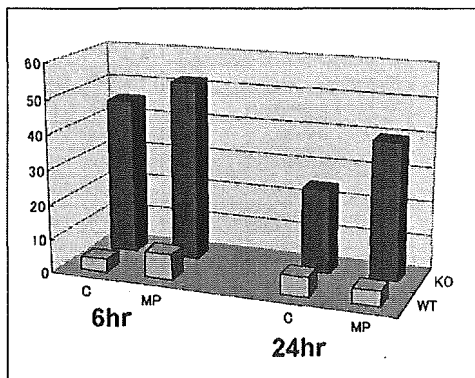
H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予

定も含む)

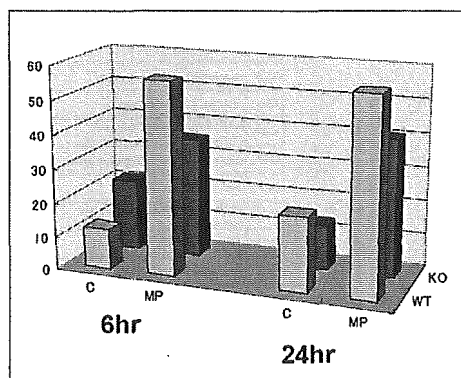
なし

Fig. 6

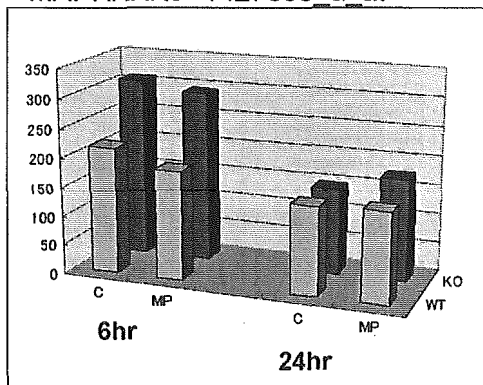
MAPKKK5(ASK-1) 1439830_at



MAPKK7 1425513_at



MAPKKK5 1427083_a_at



MAPKKK7 1449693_at

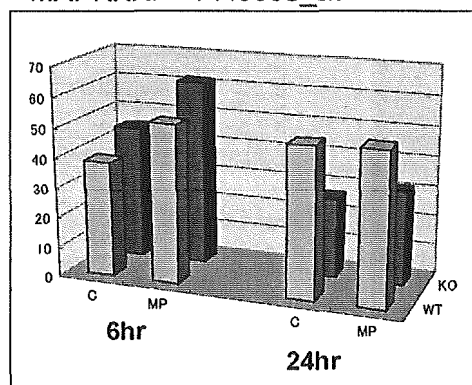
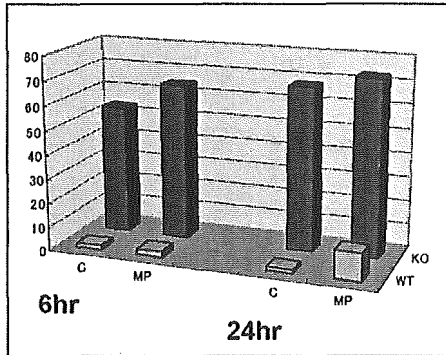
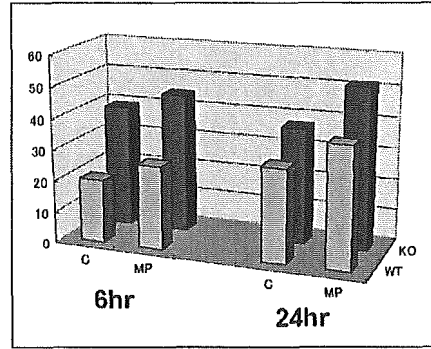


Fig. 7

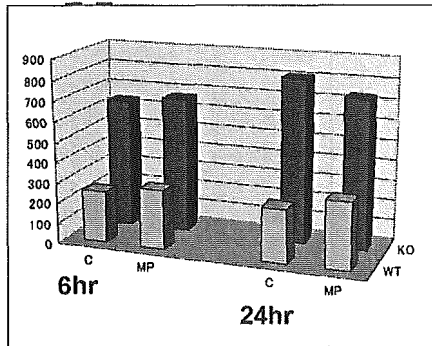
interferon, alpha-inducible protein 27
1426278_at



interferon (alpha and beta) receptor 1
1442222_at



interferon activated gene 205
1452349_x_at



interferon-induced protein with
tetratricopeptide repeats 31449025_at

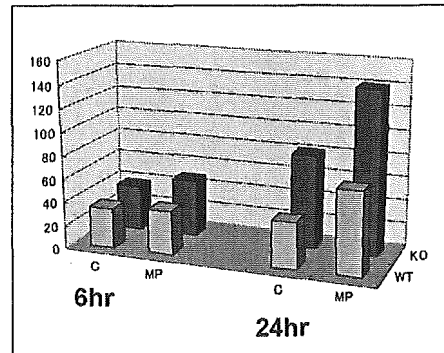
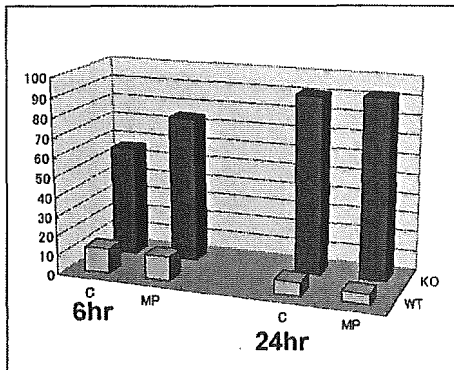
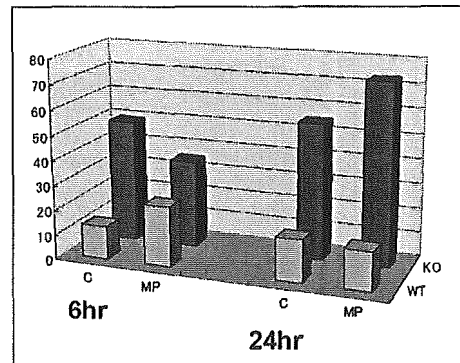


Fig. 8

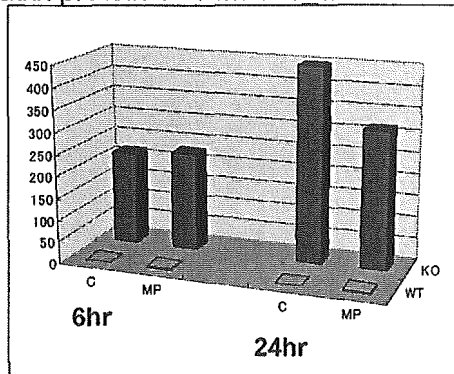
PDGF receptor-like 1428896_at



HGF 1425379_at



EGF-containing fibulin-like extracellular
matrix protein 1 1427183_at



growth factor receptor bound
protein 10 1430164_a_at

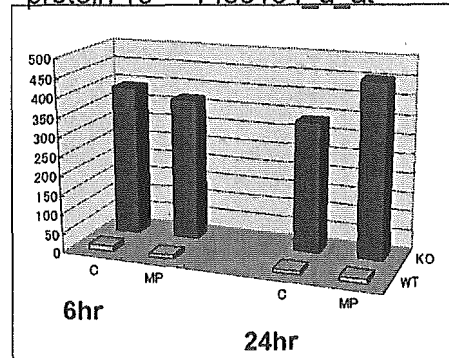
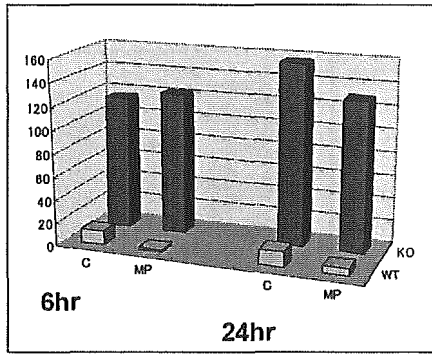
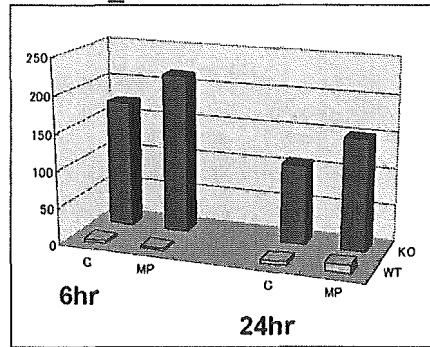


Fig. 9

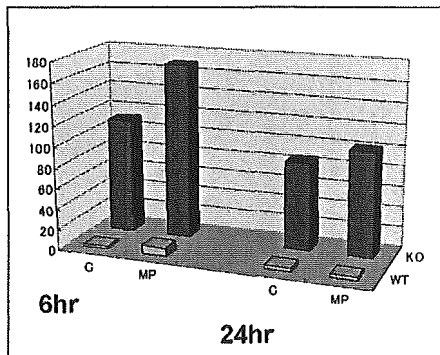
kelch-like 13 1448269_a_at



keratin complex 1, acidic, gene 19 1417156_at



Rho GTPase activating protein 22 1435108_at



RhoGEF and PH domain containing 6 1435467_at

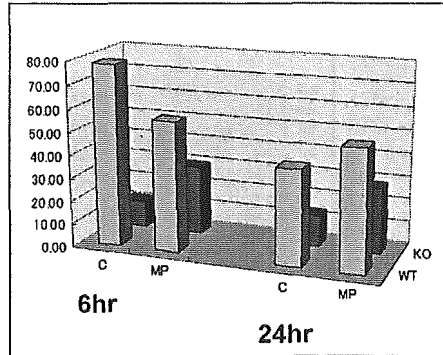
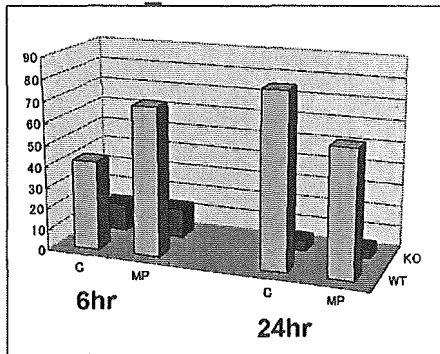
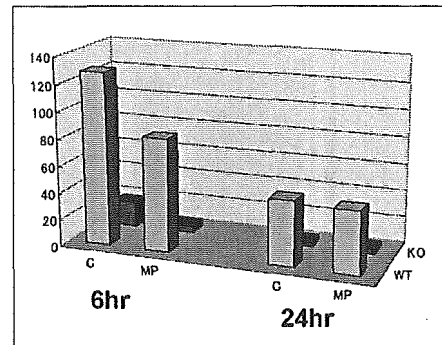


Fig. 10

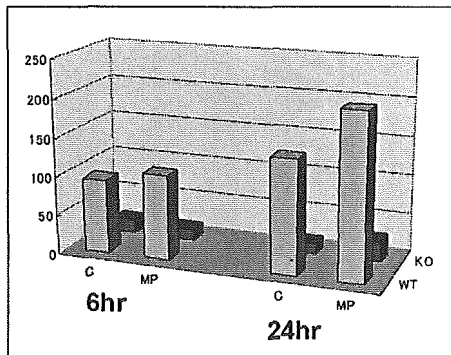
Lectin, mannose-binding, 1 1444037_at



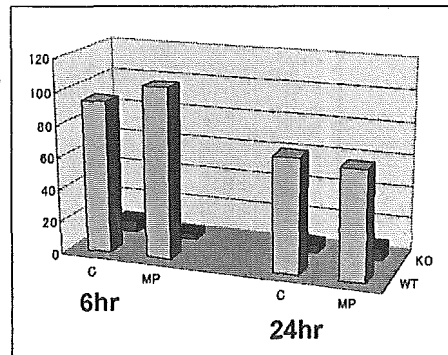
netrin 4 1450512_at



olfactomedin 1 1425784_a_at



Zic 1 1439627_at



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究

分担研究者 北川 昌伸 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析するための手掛かりとして、胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているコルチコステロイドの影響を検討した。薬剤はマウスに *in vivo* 腹腔内投与し、投与マウスの胸腺細胞および脾細胞における遺伝子発現プロファイルの投与後早期における変化を経時的に解析した。投与によって有意な発現変化を示す T 細胞機能に関わる遺伝子、細菌感染に関わる遺伝子リストを作製し、胸腺におけるコルチコステロイドの作用について網羅的に検討した。

A. 研究目的

細菌感染に対する感受性を左右する薬剤について、宿主細胞(とくに胸腺や脾臓などの免疫系臓器)に及ぼす影響を網羅的に解析する。今回は胸腺の萎縮とT細胞の著明な減少を誘導することが知られているコルチコステロイドの投与による変化を観察した。

B. 研究方法

【マウス、細菌、薬剤】

- ・ C57BL/6 マウス: 6 週齢 ♂を搬入し、8 週齢で実験を行った。
- ・ コルチコステロイド(ヒドロコルチゾン)処理:2.5 あるいは 10 mg/mouse を腹腔内投与(胸腺は 2 日後くらいでかなり縮小するが、その後正常に復する)した。

【実験プロトコール】

- ・ 経過観察群:ステロイド投与 → 1 hr, 6 hr, あるいは 24 hr 後にマウスを sacrifice し、胸腺および脾臓を採取
- ・ percellome 解析手順ののち、DNAあるいはRNAを調整し、dose dependency および時間経過の上

から本班で開発された解析ソフトを用いて遺伝子発現プロファイルを作製した。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて東京医科歯科大学実験動物委員会の定める倫理基準に準拠して行うものとし、同委員会に申請して承認された方法(承認番号 0050015)にのっとり行う。

C. 研究結果

1. ステロイド投与によって胸腺は著明な萎縮を示し、10 mg/mouse 投与では 24 時間後までに重量にして約 3 分の 1 にまで低下し、アポトーシス細胞が著明に増加した。変化は可逆的で、約 3 日で元に復した。
2. 脾の重量もステロイド投与後 24 時間まで軽度の減少を示したが、アポトーシス細胞の比率には大きな変化は認められなかった。
3. フローサイトメトリーによる解析では、ステロイド投与後、胸腺中の CD4/8 double positive T 細胞の比率が減少し、CD4あるいはCD8 single positive T 細胞の比率が相対的に増加していた。脾の T 細胞については、

分画の構成に変化は認められなかった。

4. 胸腺の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、dose dependent にまた時間経過とともに発現増強する遺伝子群が数多く認められ、遺伝子機能の上から整理して解析する作業を行った。
5. 脾臓については有意なあるいは特異的な動きを示さないパターンで発現変化する遺伝子が多かったが、胸腺との比較において両者の特異性を検討する。

D. 考察

胸腺に明らかな毒性を有するステロイドをマウスの腹腔内に投与して、in vivo における胸腺細胞の遺伝子発現変化を検討した。アポトーシスの著明な増加とともに、アポトーシス関連、サイトカイン関連(とくに IFN 関係)、細胞増殖関連(コルチコステロイドレセプターの動きに連動)などに有意な発現の動き(増強)が認められた。

脾においてもいくつかの遺伝子群での発現増強は起こっているが、その意味付けは難しい。胸腺と異なり、成熟リンパ球の多い脾では、リンパ球そのものに対するステロイドの影響はより微妙かつ複雑なものである可能性が考えられる。

薬剤の胸腺毒性を試験する際に、一つのパターン(アポトーシス誘導)を示す薬剤の代表としてステロイド投与の影響を検討した。ステロイドの影響をどのような機能群でとらえることができるか遺伝子発現プロファイルのパターンの上から分類し、in silico での解析も加えて、細菌感染に対する感受性の増強に寄与する因子を検討する系を構築したい。

E. 結論

胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導する薬剤であるコルチコステロイドの作用機構を、遺伝子発現プロファイルの上から機能分類することにより、ステロイドの胸腺毒性を評価するための基礎データを得ることができた。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表(2004-2006)

【原著論文】

Kurata M, Hasegawa M, Nakagawa Y, Abe S, Yamamoto K, Suzuki K, Kitagawa M. Expression dynamics of drug resistance genes, multidrug resistance 1 (MDR1) and lung resistance protein (LRP) during the evolution of overt leukemia in myelodysplastic syndromes. *Exp Mol Pathol*, 2006, in press.

Abe S, Yamamoto K, Hasegawa M, Inoue M, Kurata M, Hirokawa K, Kitagawa M. Bone marrow cells of myelodysplastic syndromes exhibit significant expression of apollon, livin and ILP-2 with reduction after transformation to overt leukemia. *Leukemia Res* 29:1095-1096, 2005.

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. *Leukemia Res*, 29:933-942, 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). *Am J Hematol*, 78:173-180, 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. *Leukemia Res* 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. *Leukemia Res* 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. *Leukemia Res* 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.

【総説・著書】

Kitagawa M, Utsuyama M, Kurata M, Yamamoto K, Yuasa Y, Ishikawa Y, Arai T, Hirokawa K. Cancer and aging: symposium of the 27th annual meeting of the Japan society for biomedical gerontology, Tokyo. *Cancer Immunol Immunother*, 54:623-634, 2005.

2. 学会発表

北川昌伸、長谷川真紀、田中 薫、相沢志郎、廣川勝昱. レトロウイルス感染こともなう放射線誘発アポトーシス増強作用と宿主遺伝的背景. *日本病理学会会誌* 94 巻:220, 2005.

北川昌伸、長谷川真紀、田中 薫、吉田和子、野田攸子、巽 紘一、廣川勝昱、相沢志郎. レトロウイルス感染に伴う放射線誘発アポトーシス増強作用について. *Cancer Science* 95 巻 Suppl.:222, 2004.

北川昌伸、宇津山正典、廣川勝昱. Host aging effects on carcinogenesis. *基礎老化研究* 28 巻 2 号:19, 2004.

北川昌伸、長谷川真紀、山口修一、野田攸子、巽 紘一、廣川勝昱、相沢志郎. レトロウイルス感染による放射線誘発アポトーシス増強効果. *日本病理学会会誌* 93 巻:240, 2004.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究

分担研究者 矢守 隆夫 財団法人癌研究会 癌化学療法センター分子薬理部 部長

研究要旨

Cancer Cell Informatics は、被験化学物質の作用メカニズムや分子標的を、39 種のヒトがん細胞株への増殖阻害効果に基づき予測する化学物質評価系であり、抗がん物質の評価系としては優れている。本研究では、Cancer Cell Informatics を毒性化学物質の評価に応用できるかどうかを検討した。今年度、新たに 15 種を加え、計 155 種の毒性化学物質を評価したところ、約 6 割強はがん細胞に対する増殖阻害効果を示し、フィンガープリントを得ることができ、評価可能であった。多くの毒性化学物質は既存の抗がん剤とは異なるフィンガープリントを示し、薬物である抗がん剤とは作用機作や分子標的を異にすることが示唆された。フィンガープリントに基づくクラスター解析の結果、同一クラスターに属するものは共通の作用メカニズムをもつ傾向が見られた。作用メカニズム未知の毒性化学物質 ziram は、Cancer Cell Informatics によりその作用メカニズムは活性酸素誘導であると予測され、この予測は、ziram が MDA-MB-231 細胞において実際に活性酸素を誘導したことで確かめられた。今年度、さらに詳細な解析を行った結果、ziram はスーパーオキシド発生誘導に関わっており、同一クラスター内のパラコートと同じ作用機作であることが明らかとなった。よって、Cancer Cell Informatics は毒性化学物質の作用メカニズム予測にも有用と考えられる。ただし、その予測能を高めるには、より多くの作用メカニズム既知の毒性化学物質のフィンガープリントをデータベース化する必要がある。

A. 研究目的

Cancer Cell Informatics(下記研究方法参照)は、被験化学物質の作用メカニズムや分子標的を予測する化学物質評価系であり、抗がん物質の評価系としてはたいへん優れている。本研究では、Cancer Cell Informatics を毒性化学物質の評価に応用できるかどうか検討することを目的とした。本年度 15 種類の化合物を加えた合計 155 種の毒性化学物質について、フィンガープリント(下記研究方法参照)に基づくクラスター解析を行い、毒性化学物質群と抗がん剤群が作用メカニズムの見地から区別できるかどうかを検討した。さらに、作用メカニズム不明の毒性化学物質

ziram の作用メカニズムの予測とその検証を行った。

B. 研究方法

Cancer Cell Informatics

化学物質を肺がん、胃がん、大腸がんなどからなる 39 系のヒトがん培養細胞株(JFCR39)に 48 時間作用させたのち、細胞株ごとに 50%細胞増殖阻害濃度(GI50 値)を求める。この GI50 値は細胞株の個性を反映して様々な値をとり、パネル全体で見るとその化学物質固有の GI50 値パターン(フィンガープリント)を示す。われわれは、作用メカニズムが既知の標準化学物質(抗がん剤、阻害剤など)約 300 種類のフィンガープリントをデータベース化することによって、作

用メカニズムが同じ化学物質同士は互いに似たフィンガープリントを示すことを示した。また、フィンガープリントに基づくクラスター解析を行うと、フィンガープリントの類似した化学物質はクラスターし、同一クラスターに属する化学物質は作用メカニズムが共通であることも示した。このデータベースは、被験化学物質の作用メカニズムの予測に使える。すなわち、被験化学物質のフィンガープリントを標準化学物質のフィンガープリントと比較とすることによってその作用メカニズムの予測ができる。このようにフィンガープリントに基づき化学物質の作用メカニズムを予測するシステムを Cancer Cell Informatics と呼んでいる。本研究では、毒性化学物質 155 種類のフィンガープリントを調べ、フィンガープリントの得られたものは Cancer Cell Informatics により評価した。クラスター解析には、Gene Spring (Agilent Technologies) を用いた。

Ziram による活性酸素発生の検出

Ziram をヒト乳癌 MDA-MB-231 細胞株に作用させたのち、活性酸素検出試薬 Aminophenyl fluoresce (APF)、Hydroethidium (HE) を添加し、trypsin 処理、PBS wash 後 Flow Cytometer による解析を行った。様々な種類の活性酸素関連酵素阻害剤を用い、ziram が関係する活性酸素種の探索を行った。さらに、ziram を作用させる以前に抗酸化剤 RADICUT (虚血再灌流時の脳保護剤) やスーパーオキシド特異的な抗酸化剤 tiron など添加し、ziram による活性酸素発生に対する阻害効果を FACS により観察した。また tiron による ziram の増殖阻害効果の回復を SRB assay を用いて解析した。

C. 研究結果

155 種の毒性化学物質のうち約 6 割強は、がん細胞増殖阻害効果を示し、フィンガープリントを得ることができた。すなわち、約 6 割の毒性化学物質が Cancer Cell Informatics による評価の対象となった。多くの毒性化学物質が既存の抗がん剤とは異なるパターンフィンガープリントを示した。これは、毒性化

学物質の多くが薬物である抗がん剤とは作用機作や分子標的を異にすることを示唆している。次に、フィンガープリントに基づくクラスター解析によって毒性化学物質のグループ分けを行った。ジギタリス系強心配糖体である Digoxin や Ouabain は強固なクラスターを形成し、またヘビ毒に関しては、作用機序の異なることが分っているヘビ毒がそれぞれ別々のクラスターを形成した。そのほかに酸化的ストレスに関与する paraquat、thiram が同一クラスターを形成した。このクラスター内に作用メカニズム未知の ziram が含まれていることに注目した。すなわち、ziram は paraquat や thiram と同様に活性酸素誘導能をもっているのではないかと考えた。そこで、ziram をヒト乳癌 MDA-MB-231 細胞株に作用させたのち、活性酸素検出試薬 APF、HE を添加し観察したところ実際に活性酸素の発生が認められた。ziram による活性酸素発生に対する種々の抗酸化剤の抑制効果を検証したところ、スーパーオキシド特異的な抗酸化剤 tiron が顕著な活性酸素発生抑制効果を示した。さらに、ziram による増殖阻害効果も tiron を添加することにより約 10 倍弱められた。

D. 考察

毒性化学物質をフィンガープリントにより特徴付けし、分類できることが明らかとなった。ことに本研究では、作用メカニズム未知の毒性化学物質 ziram について、Cancer Cell Informatics によってその作用メカニズムが活性酸素誘導にあると予測され、実際に ziram が MDA-MB-231 細胞において活性酸素を誘導することが実験的に確かめられた。さらに、今年度の詳しい解析から、ziram はスーパーオキシドの発生誘導に関わっていることが明らかとなった。ziram の生体への毒性として受精における着床不全や精子形態異常の誘発が報告されているが、それらにスーパーオキシド発生誘導が関与する可能性を本研究結果は示した。よって、Cancer Cell Informatics は毒性化学物質の作用メカニズム予測に有用と考えられる。ただし、その予測能を高めるには、より多くの作用

メカニズム既知の毒性化学物質のフィンガープリントをデータベース化する必要がある。

E. 結論

毒性化合物の6割程度はCancer Cell Informaticsによって評価可能と期待される。Cancer Cell Informaticsに基づき、ziramの作用メカニズムの一端は活性酸素誘導能にあることが示されたので、Cancer Cell Informaticsは、毒性化学物質の作用メカニズム予測に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(過去3年間)

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

1. Yanagihara, M., Sasaki-Takahashi, N., Sugahara, T., Yamamoto, S., Shinomi, M., Yamashita, I., Hayashida, M., Yamanoha, B., Numata, A., Yamori, T., and Andoh, T. Leptosins isolated from marine fungus *Leptoshaeria* species inhibit DNA topoisomerases I and/or II and induce apoptosis by inactivation of Akt/protein kinase B. *Cancer Sci*, *96*: 816-824, 2005.
2. Maezaki, N., Tominaga, H., Kojima, N., Yanai, M., Urabe, D., Ueki, R., Tanaka, T., and Yamori, T. Total synthesis of murisolins and evaluation of tumor-growth inhibitory activity. *Chemistry*, *11*: 6237-6245, 2005.
3. Honma, Y., Kasukabe, T., Yamori, T., Kato,

N., and Sassa, T. Antitumor effect of cotylenin A plus interferon-alpha: Possible therapeutic agents against ovary carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2005.

4. Guleng, B., Tateishi, K., Ohta, M., Kanai, F., Jazag, A., Ijichi, H., Tanaka, Y., Washida, M., Morikane, K., Fukushima, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Kawabe, T., Miyagishi, M., Taira, K., Sata, M., and Omata, M. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res*, *65*: 5864-5871, 2005.
5. Sohda, K. Y., Nagai, K., Yamori, T., Suzuki, K., and Tanaka, A. YM-216391, a novel cytotoxic cyclic peptide from *Streptomyces nobilis*. I. fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, *58*: 27-31, 2005.
6. Nomura, T., Shinoda, S., Yamori, T., Sawaki, S., Nagata, I., Ryoyama, K., and Fuke, Y. Selective sensitivity to wasabi-derived 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate of human breast cancer and melanoma cell lines studied in vitro. *Cancer Detect Prev*, *29*: 155-160, 2005.
7. Kamata, K., Kiyota, M., Naoe, A., Nakatani, S., Yamamoto, Y., Hayashi, M., Komiyama, K., Yamori, T., and Ishibashi, M. New bisindole alkaloids isolated from *Myxomycetes* *Arcyria cinerea* and *Lycogala epidendrum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *53*: 594-597, 2005.
8. Mashima, T., Oh-hara, T., Sato, S., Mochizuki, M., Sugimoto, Y., Yamazaki, K., Hamada, J., Tada, M., Moriuchi, T., Ishikawa, Y., Kato, Y., Tomoda, H., Yamori, T., and Tsuruo, T. p53-defective tumors with a

- functional apoptosome-mediated pathway: a new therapeutic target. *J Natl Cancer Inst*, *97*: 765-777, 2005.
9. 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 chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol Cancer Ther*, *4*: 399-412, 2005.
 10. Yoneyama, H., Hara, T., Kato, Y., Yamori, T., Matsuura, E. T., and Koike, K. Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells. *Mol Cancer Res*, *3*: 14-20, 2005.
 11. Lai, Y. Y., Huang, L. J., Lee, K. H., Xiao, Z., Bastow, K. F., Yamori, T., and Kuo, S. C. Synthesis and biological relationships of 3',6-substituted 2-phenyl-4-quinolone-3-carboxylic acid derivatives as antimetabolic agents. *Bioorg Med Chem*, *13*: 265-275, 2005.
 12. Tanaka, R., Wada, S., Aoki, H., Matsunaga, S., and Yamori, T. Spiromarienols A and B: two new 7(8 → 9)abeo-lanostane-type triterpene lactones from the stem bark of *Abies mariesii*. *Helvetica Chimica Acta*, *87*: 240-249, 2004.
 13. Mimaki, Y., Yokosuka, A., Hamanaka, M., Sakuma, C., Yamori, T., and Sashida, Y. Triterpene Saponins from the Roots of *Clematis chinensis*. *J Nat Prod*, *67*: 1511-1516, 2004.
 14. Park, H. R., Tomida, A., Sato, S., Tsukumo, Y., Yun, J., Yamori, T., Hayakawa, Y., Tsuruo, T., and Shin-ya, K. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. *J Natl Cancer Inst*, *96*: 1300-1310, 2004.
 15. Saito, H., Honma, T., Minamisawa, T., Yamazaki, K., Noda, T., Yamori, T., and Shiba, K. Synthesis of functional proteins by mixing peptide motifs. *Chem Biol*, *11*: 765-773, 2004.
 16. Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene*, 2004.
 17. Sakai, K., Fukuda, Y., Matsunaga, S., Tanaka, R., and Yamori, T. New Cytotoxic Oleanane-Type Triterpenoids from the Cones of *Liquidambar styraciflua*. *J Nat Prod*, *67*: 1088-1093, 2004.
 18. Hama, K., Aoki, J., Fukaya, M., Kishi, Y., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Yamori, T., Watanabe, M., Chun, J., and Arai, H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem*, *279*: 17634-17639, 2004.
 19. Mizui, Y., Sakai, T., Iwata, M., Uenaka, T., Okamoto, K., Shimizu, H., Yamori, T., Yoshimatsu, K., and Asada, M. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. III. In vitro and in vivo antitumor activities. *J Antibiot (Tokyo)*, *57*: 188-196, 2004.
 20. Bai, J., Kitabatake, M., Toyozumi, K., Fu, L., Zhang, S., Dai, J., Sakai, J., Hirose, K., Yamori, T., Tomida, A., Tsuruo, T., and Ando, M. Production of Biologically Active Taxoids by a Callus Culture of *Taxus cuspidata*. *J Nat Prod*, *67*: 58-63, 2004.
 21. 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.
22. Andoh, T., Umemura, K., Yanase, K., and Yamori, T. Development of new topoisomerase II-targeting compounds as candidate anticancer drugs, p. 167–188. *New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers*, 2003.
23. Mashino, T., Nishikawa, D., Takahashi, K., Usui, N., Yamori, T., Seki, M., Endo, T., and Mochizuki, M. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, *13*: 4395–4397, 2003.
24. Sugiyama, Y., Dan, S., Yoshida, Y., Akiyama, F., Sugiyama, K., Hirai, Y., Matsuura, M., Miyata, S., Ushijima, M., Hasumi, K., and Yamori, T. A large-scale gene expression comparison of microdissected, small-sized endometrial cancers with or without hyperplasia matched to same-patient normal tissue. *Clin Cancer Res*, *9*: 5589–5600, 2003.
25. Dan, S., Shirakawa, M., Mukai, Y., Yoshida, Y., Yamazaki, K., Kawaguchi, T., Matsuura, M., Nakamura, Y., and Yamori, T. Identification of candidate predictive markers of anticancer drug sensitivity using a panel of human cancer cell lines. *Cancer Sci*, *94*: 1074–1082, 2003.
26. Tanabe, M., Izumi, H., Ise, T., Higuchi, S., Yamori, T., Yasumoto, K., and Kohno, K. Activating transcription factor 4 increases the cisplatin resistance of human cancer cell lines. *Cancer Res*, *63*: 8592–8595, 2003.
27. Bando, T., Iida, H., Tao, Z. F., Narita, A., Fukuda, N., Yamori, T., and Sugiyama, H. Sequence specificity, reactivity, and antitumor activity of DNA-alkylating pyrrole-imidazole diamides. *Chem Biol*, *10*: 751–758, 2003.
28. Shiwa, M., Nishimura, Y., Wakatabe, R., Fukawa, A., Arikuni, H., Ota, H., Kato, Y., and Yamori, T. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform. *Biochem Biophys Res Commun*, *309*: 18–25, 2003.
29. Matsuda, M., Yamori, T., Naitoh, M., and Okutani, K. Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Mar Biotechnol (NY)*, *5*: 13–19, 2003.
30. Umemura, K., Yanase, K., Suzuki, M., Okutani, K., Yamori, T., and Andoh, T. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide. *Biochem Pharmacol*, *66*: 481–487, 2003.
31. Suzuki, M., Watanabe, K., Fujiwara, S., Kurasawa, T., Wakabayashi, T., Tsuzuki, M., Iguchi, K., and Yamori, T. Isolation of Peridinin-Related Norcarotenoids with Cell Growth-Inhibitory Activity from the Cultured Dinoflagellate of *Symbiodinium* sp., a Symbiont of the Okinawan Soft Coral *Clavularia viridis*, and Analysis of Fatty Acids of the Dinoflagellate. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *51*: 724–727, 2003.
32. Yamori, T. Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother*

Pharmacol, 52 Suppl 1: 74-79, 2003.

(邦文発表)

1. 矢守隆夫、志和美重子 プロテオミクスによる大腸癌マーカーの探索. G.I. Research, 13: 115-121, 2005.
 2. 矢守隆夫 Cancer Cell Informatics と抗がん薬検索. 臨床医薬, 20: 913-918, 2004.
 3. 中津則之、矢守隆夫 ヒトがん細胞パネルによる化合物の分子薬理の評価と抗がん剤感受性関連遺伝子. がん分子標的治療, 2: 54-60, 2004.
 4. 矢守隆夫 Cancer Cell Informatics —抗がん剤探索とポストゲノム研究への応用. バイオサイエンスとインダストリー 62: 445-449, 2004.
 5. 矢守隆夫 癌分子標的と創薬スクリーニング. 現代医療, 36: 1339-1346, 2004.
 6. 矢守隆夫 Cancer Cell Informatics と抗がん剤探索. Jpn J Clin Pharmacol Ther, 35: 329S-330S, 2004.
 7. 矢守隆夫 がん細胞パネルによる化合物評価とその分子標的スクリーニングにおける役割. 癌と化学療法, 31: 485-490, 2004.
 8. 矢守隆夫, 安藤俊夫, 上原至雅, 小野眞弓, 河野通明, 済木育夫, 内藤幹彦, 早川洋一, 鶴尾隆, 杉本芳一, 馬島哲夫 制がん剤の分子標的スクリーニング成績—わが国における制がん剤候補物質のスクリーニング成績・第10報—癌と化学療法, 31 Suppl. 1: 1-150, 2004.
 9. 鶴尾隆, 矢守隆夫, Shoemaker, R. 分子標的治療薬の開発戦略. がん分子標的治療, 1: 7-15, 2003.
 10. 矢守隆夫 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤. Surgery Frontier, 10: 56-57, 2003.
 11. 矢守隆夫 Cancer Cell Informatics による制癌剤のスクリーニング. Surgery Frontier, 10: 304-312, 2003.
 12. 矢守隆夫 ケモカインとがん転移. 日本臨床, 61: 116-122, 2003.
 13. 且慎吾、矢守隆夫 遺伝子発現情報を用いた抗がん剤感受性予測. 血液・腫瘍科, 47: 575-581, 2003.
 14. 且慎吾、矢守隆夫 がん化学療法感受性と遺伝子発現. 分子細胞治療, 2: 378-384, 2003.
 15. 矢守隆夫 がん細胞パネルインフォーマティクス - 分子標的治療薬探索と感受性診断への応用. Drug Delivery System, 18: 385-393, 2003.
 16. 矢守隆夫 がん細胞パネル —抗がん剤探索およびポストゲノム研究における活用, 3 edition, p. 196-202. 東京: 癌と化学療法社, 2003.
 17. 矢守隆夫 抗がん剤スクリーニングの変遷. 化学療法の領域, 19, 5-1: 16-21, 2003.
2. 学会発表(発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)
- 若松猪策無、中津則之、山崎佳波、菅野純、矢守隆夫、ヒトがん細胞パネルによる毒性化合物の機能予測、日本薬学会第126回年会(仙台、2006)発表予定
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

マウス培養細胞による毒性メカニズム研究

分担研究者 小野 宏 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 乗務理事

研究協力者 佐々木澄志、田中憲穂 (財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

たとえ同じ細胞株でもその性質は、管理・維持されている研究室間で異なることが知られている。食品薬品安全センター(食薬センター)と European Centre for the Validation of Alternative Methods(ECVAM)において維持されている BALB/3T3 細胞(マウス全胎児由来)を用い、形質転換試験を行うことで両細胞を比較した。細胞を 3-methylcholanthrene (MCA) 3 µg/ml で処理し、6 週間培養した結果、食薬センターの細胞では形質転換巣が誘発されたが、ECVAM の細胞では全く誘発されなかった。

以上の結果より、培養細胞を用いて化学物質をマイクロアレイ法で分析する時は、標準となるべき細胞株、およびデータが必要であることが示唆された。

A. 研究目的

マウス培養細胞である BALB/3T3 細胞は化学物質に高い感受性を示し、また形質転換しやすいことから細胞毒性作用や癌化の研究によく用いられている。今回、BALB/3T3 細胞を用いた形質転換試験の国際的なバリデーションスタディを行うにあたり、協同研究機関の ECVAM で用いられている細胞の形態を観察したところ、食薬センターで用いている細胞と形態が異なることが見出された。もし、ある同一細胞株を用いてマイクロアレイ法による遺伝子発現を評価する際、各研究室で管理・

維持されている細胞の性質が異なっていた場合、どのデータが正しいのか判断できない。

そこで食薬センターと ECVAM の BALB/3T3 細胞を MCA または TPA で処理後、マイクロアレイ法で分析し、研究室間による細胞の反応性の違いを調べる。

B. 研究方法

BALB/3T3 A31-1-1 細胞(食薬センターで使用:JCRB 細胞バンクから入手、ECVAM で使用:ECVAM から入手)は、ウシ胎児血清を 10%含む MEM または DMEM 培地を用いて培

養した。

形質転換試験:104 個の細胞を 60 mm ディッシュに播種した。24 時間後、MCA を添加し (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 72 時間処理した。培地交換は、細胞播種後の最初の 4 週間は 1 週間に 2 回、後の 2 週間は 1 週間に 1 回行った。細胞を播種してから 6 週目にメタノールで固定後、ギムザ液で染色し、ディッシュあたりの形質転換巣を数えた。

軟寒天コロニー形成試験:100~1000 個の細胞を 0.33%軟寒天培地に播種し、3 週間培養しコロニー数を数えた。

C. 研究結果

BALB/3T3 細胞は接触阻止能を持つため、数週間に渡って単層状態が維持される。ところが、ECVAM で実施された形質転換試験の陰性対照群のディッシュを観察したところ、細胞密度が高く、さらに多くの弱い形質転換巣 (細胞密度が高いのみ) が誘発されていた。そこで ECVAM から細胞を入手し、食葉センターが所有している細胞と比較した。

最初に形質転換試験を行ったところ、食葉センターの細胞においては、MCA 処理により細胞毒性作用が観察され、さらに典型的な形質転換巣 (高密度、紡錘状、配列の乱れを示す) が誘発された。一方、ECVAM の細胞においては、MCA による細胞毒性作用が観察されなかった。また弱い形質転換巣が、陰性

対照群および MCA 処理群のどちらにも同程度に誘発されたものの、典型的な形質転換巣は全く誘発されなかった。

ECVAM の細胞では、陰性対照群においても弱いながらも多くの形質転換巣が誘発されていた。そこで、初めから形質転換細胞が含まれているのではないかと考え、次に軟寒天コロニー形成試験を行った。その結果、両細胞において軟寒天培地中にコロニーは形成されなかった。

両細胞とも、増殖期では線維芽細胞状の形態を示しているが、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 100 ng/ml で処理したところ、食葉センターの細胞では 30 分後に球形となった。この形態変化は数時間維持したが、翌日には元の形態に戻った。一方、ECVAM の細胞では全く形態変化は認められなかった。

なお、今回はまだマイクロアレイ法で分析するまでには至っていない。

D. 考察

ECVAM の BALB/3T3 細胞は、食葉センターの細胞と異なり、MCA および TPA に反応しなかった。同一細胞であるはずなのに、これほど細胞の性質が異なっている原因として二つの理由が考えられた。

一つは、培地の影響で細胞の性質が変わってしまった可能性である。ECVAM で使用し