

ている培地は、グルタミン 6 mM を含み(通常の濃度の 3 倍)、さらに防カビのためファンギゾン(アムホテリシン B) 2.2 µg/ml が添加されている。この培地を使用してコロニー形成試験を実施したところ、ECVAM の細胞のコロニー形成率は 13.3%であったが、食薬センターの細胞では全くコロニーが形成されなかった。この結果は、ECVAM の細胞はこの培地に対し耐性を獲得し、他の化学物質に対する反応性も変わってしまったことを示唆している。

もう一つは、細胞間汚染の可能性である。3T3 細胞にはマウスの系統が異なる多くの細胞株が存在している。さらに、BALB/3T3 細胞の中にも多くのクローンがあり非常に紛らわしい。すなわち、間違っても BALB/3T3 A31-1-1 細胞とは別の細胞を培養している可能性も考えられた。

E. 結論

形質転換試験の結果から、ECVAM の細胞と食薬センターの細胞では性質が異なることが分かった。以上の結果から、マイクロアレイ法において、MCA と TPA で処理し、遺伝子発現の違いを詳細に分析することとした。

また、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。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
無し

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

分担研究者 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
協力研究者 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

研究要旨

遺伝子傷害性肝発癌物質および非遺伝子傷害性物質を使ったマウス肝臓における遺伝子発現変化を GeneChip にて解析した結果得られた、遺伝子傷害特異的な反応を示す遺伝子群に対しプライマーを設計し、定量的 RT-PCR 法による検討を行った。その結果、GeneChip データとの再現性は高く、より感度良く遺伝子発現変化が検出された。さらに、用量相関性を詳細に検討した結果、多くの遺伝子に関して良い用量反応性が得られ、選択した遺伝子が遺伝子傷害性をスクリーニングのために有用であることがわかった。

A. 研究目的

動物個体における遺伝子傷害性物質に対する遺伝子発現変化を解析することにより、遺伝子傷害に対する生体防御機構のメカニズムを解析する。また、化合物の遺伝子傷害性のメカニズムに特異的な遺伝子発現変化を調べることにより、作用機序のよくわからない化合物に対する、メカニズムの予測につながることを期待される。遺伝子傷害は外見上の形質として観察されにくいいため、その検出は容易ではないが、遺伝子発現を指標として化合物の遺伝子傷害性をスクリーニングできれば、簡便な試験系として有効性が期待できる。GeneChip を用いた網羅的解析は、詳細な遺伝子発現の検討に有効であるが、費用および簡便性の問題から、遺伝子傷害の予測に有用な遺伝子群を抽出し、より安価、簡便かつ信頼性の高い手法としての定量的 RT-PCR 法へ応用することにより、新たなスクリーニング系を確

立することを目的とした。

B. 研究方法

1. RT-PCR 法による検討

昨年度までの検討における 7 種の遺伝子傷害性肝発癌物質、diethylnitrosamine (DEN), dimethylnitrosamine, ethylnitrosourea, dipropylnitrosamine, 芳香族化合物として dimethylbenzoanthracene, *o*-aminoazotoluene, dibenzo[*a, l*]pyrene, および非遺伝子傷害性物質として、ethanol, phenobarbital、の計 9 化合物を用いた。遺伝子発現解析の結果、遺伝子傷害性物質に特徴的に変化する遺伝子群約 40 遺伝子 (表 1) に対して、RT-PCR を行うための primer の設計を行った。Primer は特異性や自己会合性などを考慮に入れ設計し、遺伝子あたり 2 セットを準備した。

定量的 RT-PCR 法には、リアルタイム PCR

装置 ABI prism7000 を用い、蛍光色素として Syber Green-I を使った 2-step 法にて行った。すなわち、マウス肝臓より抽出したトータル RNA サンプル 10 μ g を DNase (Wako RT grade) で処理した後、1 μ g 分を用いて High-Capacity cDNA Archive kit (ABI) により、逆転写反応を行い cDNA を合成した。その 40ng 分を SYBR Green PCR Master Mix にて各遺伝子特異的プライマーを用いて増幅し、ABI7000 により増幅 DNA 量を 2 本鎖 DNA 特異的にインターカレートする蛍光色素 SYBR Green 1 にてリアルタイムにモニタする。別途求めた希釈サンプルの増幅速度から得られたキャリブレーション値を元に、各サンプルの増幅速度から cDNA 量を定量する。そして、ハウスキーピング遺伝子として用いた GAPDH の量を基準に補正を行い、各サンプル間での目的遺伝子の発現量を相対定量した。

2. 用量反応性の検討

GeneChip 解析においては、単一の投与量のみを用いたが、遺伝子発現変化の用量反応性を調べる目的で、DEN および ENU に関して、以下の複数の用量を設定し、新たに 1 群 5 匹のマウスに対して単回腹腔内投与を行った。

DEN: 3, 9, 27, 80 mg/kg

ENU: 6, 17, 50, 150 mg/kg

投与後、4 時間および 28 日後にマウス肝臓を回収し、5 匹分をまとめて TRIzol 溶液にてホモジネートとした。そして、抽出したトータル RNA を用いて、RT-PCR による解析を行った。

3. 非遺伝子傷害性肝毒性物質を追加した

GeneChip 解析

これまでの GeneChip 解析では、2 種の非遺伝子傷害性物質のみを用いていたため特異性の面で心配があることから、さらに非遺伝子傷害性物質として以下の化合物を追加して、GeneChip 解析を行い、これまでのデータと統合して、特異性の高い遺伝子を選び直した。

四塩化炭素 (CCl_4): 1g/kg

Diethylhexyl phthalate (DEHP): 2g/kg

trichloro ethylene (C_2HCl_3): 1g/kg

上記投与量にて 1 群 5 匹のマウスに単回腹腔内投与を行い、4 時間後と 20 時間後にマウスより肝臓を摘出し、RNA 抽出を行った。

以下、定法に従って GeneChip による遺伝子発現解析を行った。その結果得られたデータを、これまでに蓄積された 9 化合物のデータとあわせて再解析を行い、遺伝子傷害性物質に特異的な発現変化を示す遺伝子群を、今後の RT-PCR 法によるスクリーニングのための候補遺伝子とした。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、本研究の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、当研究施設はそのモデル施設となっている。

C. 研究結果

1. RT-PCR による GeneChip データの再現性の確認

前年度までの解析の結果、遺伝子傷害性物質特異的な変化を示す遺伝子群を抽出し、

表 1 に示した遺伝子に対して、遺伝子配列情報をもとに RT-PCR 用のプライマーを Primer 3 というフリーのオンラインソフトウェアを用いて行った。この際、各プライマーの T_m 値は 60°C に揃えるようにした。

設計したプライマーを用いて、新たに追加した非遺伝子傷害性 3 物質のサンプルも加えて定量的 RT-PCR 反応による解析を行い、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH の発現量でノーマライズした後 (GAPDH 遺伝子の GeneChip でのデータを図 1 に示す)、GeneChip で得られたデータとの比較を行った。いくつかの遺伝子について得られたデータの例を図 2 に示す。

2. RT-PCR による用量反応性の検討

これまでの GeneChip を使った解析では、単一の用量のみしか用いていなかったため、用量反応性に関するデータは取れていなかった。そこで、DEN と ENU に関して、それぞれ 4 用量を設定してマウスに投与を行い、遺伝子発現変化の用量反応性を検討するため、GeneChip の結果より選択した遺伝子群について、詳細な用量反応性を調べた。サンプリングタイムは、4 時間と 28 日の 2 点を設定し、肝臓より抽出したトータル RNA を使って RT-PCR による発現量の変化を解析した。

対応する溶媒処理コントロールに対する発現量の比を、GAPDH 遺伝子の発現量よりノーマライズして算出した結果を図 3 に示す。一遺伝子に対して 2 種類のプライマーセットを設計しているため、基本的に 2 種類ずつのデータが得られているが、両者の相関は非常に良かった。

このなかで、特に変化量が大きくきれい

な用量相関が見られた遺伝子として、Btg2, Ccng1, p21, Dscr1, Gadd45b, Gdf15, Jun, Cyp210hA, Isg201 などが得られた。これらは、いずれも発現上昇を示す遺伝子であり、発現が減少する遺伝子に比べて反応性が良かった。さらに、4 時間後のデータと比較して、28 日目では全体として変化が小さく、発現がもとに戻っていることがわかった。ただし、一部 p21 遺伝子のように、依然として発現上昇を示す遺伝子もみられた。

3. 非遺伝子傷害性物質を追加した再解析

これまでの解析においては、非遺伝子傷害性物質としては、エタノールとフェノールのみを用いていたが、特異性という観点から、より有効性のある遺伝子を選択するためには、さらに非遺伝子傷害性物質の数を増やす必要があると考え、新たな化合物として、 CCl_4 、 C_2HCl_3 、DEHP を追加して、投与後 4 時間と 20 時間目の肝臓における遺伝子発現を、従来と同様に GeneChip を用いて解析を行った。

従来用いていた、発現強度に依存した段階的有意水準を用いて、発現の変化した遺伝子を選択し、共通性の高いものをリストとしたのが図 4 である。非遺伝子傷害性物質の増加とともに、遺伝子傷害性物質のみで発現変化を示す遺伝子は、ごく一部のみとなった。そこで、図 5 に示すように、遺伝子傷害性物質特異性の他に、陽性データ数、陽性化合物数 (遺伝子傷害性物質)、変動率、Intensity の T-test、コントロールのばらつき、コントロールの発現強度、逆の動きをするデータ数という項目に関して、それぞれ 5 段階評価を行い、図に示したような各項目のウエートをかけることにより、遺

伝子の有効性に関して採点を行った。その結果、発現上昇および発現減少を示す遺伝子として高得点を得た遺伝子を表3に示す。青色で示した遺伝子は、前回も選ばれた遺伝子であり、高得点のものには重複して選ばれた遺伝子が多く含まれているが、今回新たに選ばれた遺伝子も多く含まれた（同じ遺伝子名は、違うプローブセットに由来するもの）。

この結果を元に、さらに遺伝子の機能等も加味して、最終的にスクリーニング候補遺伝子として、表**に示した遺伝子を追加した。さらに、GeneChipデータより、発現変化の最も少ない遺伝子を調べ、これらのうち比較的発現量の高かったものを、RT-PCR実験における追加の補正用ハウスキーパー遺伝子候補とした。現在これらの遺伝子に関するプライマーを設計、合成中であり、これまでに得られているサンプルを元に、それらの評価をRT-PCRを使っておこなう予定である。

D. 考察

GeneChipデータの解析は、網羅的に遺伝子発現変化を検出できる非常に有効な手法である。目的とする表現系変化や薬物作用の分類に際して、どのような遺伝子がキーとして働いているかがわからない場合には、すべての遺伝子の動きの中から重要な遺伝子群を選択することが重要である。すなわち、大量の発現データの中から、目的とする解析を行う上で重要なデータを拾い上げるデータマイニングの作業が大切である。一方で、目的をある程度絞って、簡便かつ経済的なスクリーニングを行うためには、すべてこうした網羅的解析に頼ることは効

率が悪く、ターゲットを絞って、より簡便な手法での試験が重要となる。このような考え方のもと、我々は初期のGeneChipデータから遺伝子傷害性のスクリーニングに有効である、すなわち遺伝子傷害性物質に特異的に発現の変化する遺伝子群を選択した。これらの遺伝子に対し、マイクロアレイと比較して、迅速かつ信頼性の高い手法である定量的RT-PCR法を用い、遺伝子発現変化を調べた。

まず、従来のGeneChipデータとの比較においては、比較的良い再現性を示すとともに、発現比の値としては、RT-PCRの方が高い値が得られた。これは従来指摘されているように、チップ実験に比べて、RT-PCR実験ではプローブの飽和などの問題が起きにくく、ダイナミックレンジが広いことに起因すると考えられ、より感受性が高い検出が可能であると言える。さらに、マイクロアレイを用いた実験では、一般にプローブの作成ハイブリに要する時間から数日の期間を要するのに対し、RT-PCRでは、数時間で結果が得られるという利点もある。また、一般的にマイクロアレイのデータが、RT-PCRの結果で検証されるように、よりデータの信頼性が高いと言え、網羅性が必要なく、目的遺伝子数が限られる場合には、RT-PCRを用いた方法がより優れた方法である。

次に、用量を細かく設定し、DENとENUについて遺伝子発現の用量反応性を、RT-PCRを使って詳細に検討した。その結果、多くの遺伝子に関して、きれいな用量相関性が得られた。特に、反応性の大きかったp21などの遺伝子に関しては、低用量まで変化が認められ、これらの遺伝子を指標と

することにより、より低用量の暴露によっても遺伝子傷害性が検出できる可能性が示された。また、こうした強い変化を示す遺伝子に関しては、28日後に関しても変化が認められ、比較的、広いサンプリングタイムをカバーできる可能性がある。経時変化を考慮しなければ成らない場合においても、有効である可能性が示唆された。

4時間後と28日後のデータを比較した場合、後者において全体に変化量が小さいことがわかるが、これは、投与が単回投与によるためと考えられ、今回遺伝子傷害性物質に共通に変化するとして選ばれた遺伝子には、初期に変化を示す遺伝子群が多いことを示唆している。28日後というサンプリングタイムは、前癌病変など何らかの癌原性の変化を捉えようとする目的で選ばれたが、前癌病変としては共通した変化が起こっているのであれば、すでに遺伝子傷害性の有無にかかわらず、発癌物質として共通の変化が観察されることになる。そのため、28日後の変化が最初の投与の遺伝子傷害性を反映することが難しいと考えられるが、いくつかの遺伝子の変化については、依然として差が見られるものがあり、これらが過去の遺伝子傷害を反映できるかどうかに興味を持たれる。

次に、これまでの検討で遺伝子傷害性を示す物質に共通して変化をする遺伝子を選択したわけであるが、非遺伝子傷害性の物質が2化合物しか用いておらず、特異性の面でやや不十分であった。そこで、新たに非遺伝子傷害性の3化合物を加え、GeneChip解析を行うことにより、これまでの結果と総合して再び候補遺伝子の選択を行った。この際、発現が有意に変化する遺

伝子の選択法として、発現強度に依存した異なる有意水準を設ける従来の方法を継続して用いた。

こうして選ばれた遺伝子の数をみると、図4に示すように必ずしも遺伝子傷害性物質が高いわけではなく、むしろエタノールや四塩化炭素といった非遺伝子傷害性物質の方が高いことがわかる。これは、これらの投与量が比較的高いことと、一般的な肝毒性としては強く作用が現れている事を反映していると考えられる。

共通性という観点からリストアップした場合、表2に示すように共通性の高い遺伝子を選ばれたものの、遺伝子傷害性物質のみに変化する遺伝子は少なく、多くの遺伝子は非遺伝子傷害性物質によっても発現が変化することがわかる。そこで、より特異性が高く遺伝子傷害性の予測に役立つ遺伝子を選択するため、図5に示したような各種要因を考慮して、各遺伝子の採点を行った。特異性は、変化したデータ数に対する遺伝子傷害性物質の割合をしめす。また、変動率は、得られたRatioの平均値から算出しT-testの項は、intensityのデータを元に、遺伝子傷害性の有無による2群間での有意差を統計的に評価した値である。さらに重要な項目として、各遺伝子のコントロールにおける発現の安定性と強度を考慮した。例えば、ハウスキーピング遺伝子は、それ自体がコントロールレベルで変動するため、指標としては適さない。また、変化が大きい遺伝子でも、コントロールの発現強度が小さいものは、信頼性が低いとともにRT-PCR法による検出も難しい。これらの要因に関して、それぞれ5段階の評価を行い、さらに各要素に図に示すような重み付け

をした後、最終的に各遺伝子の採点を行った。その結果、上位にランクされた遺伝子に関する GeneChip データを抜き出したのが表 4 である。ここでは、先ほどに比べ共通性という点では劣るものの、遺伝子傷害性物質への特異性は高く、その有効性が期待できる。得点の高かった遺伝子を表 3 に示すが、高得点のものは、前回の 9 化合物による解析でも選択されたものが多いが、新たな候補遺伝子も多く選択された。これらのうち、注目される遺伝子として 1700037B15Rik と 5830413E08Rik が挙げられる。これらは、以前はアノテーションがなく、RIKEN の ID が付いていた遺伝子であるが、最近の情報より相同性のある遺伝子としてそれぞれ、Ddit4

(DNA-damage-inducible transcript 4) および Ddit4l (DNA-damage-inducible transcript 4 like) として命名された。Ddit4 遺伝子は既に REDD1 および RTP801 として知られる遺伝子で、p63 および p53 による転写のターゲットとして、p63 の活性酸素種の制御に関わっているとともに (Ellisen et al., 2002) アルキル化剤であるメチルメタンスルホン酸、ヒ素により、CCAAT/Enhancer Binding Protein を介したストレス応答としてこの遺伝子が誘導されることが報告されている (Lin et al., 2005)。さらに、活性型ベンツピレン (BPDE) でトランスフォームした細胞で、サブトラクションハイブリダイゼーション法により検出された過剰発現遺伝子としても報告されている (An et al., 2005)。このように、今回選択した遺伝子は、遺伝子傷害に対して応答性の遺伝子である可能性が高く、特にまだアノテーションの付いていない遺伝

子の機能の解明にも興味を持たれるところである。

今後新たに追加した遺伝子を含め、GeneChip データの再現性と用量反応性の検討から、有用性の高い遺伝子を絞り込み、最終的な遺伝子傷害性スクリーニング用指標遺伝子として確定する予定である。そして、次のステップとしてこれら選択した遺伝子の有用性を評価する目的で、新たに遺伝子傷害性/非遺伝子傷害性物質のセットを選び、RT-PCR 法による解析が両者の判定にどれくらい有効であるかを実証する予定である。

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。これらの遺伝子に対するプライマーを設計し定量的 RT-PCR 法を用いて遺伝子発現変化を解析した結果、GeneChip データと相関性のあるデータが得られるとともに、より感度高く検出が可能であった。また、用量反応を調べた結果、多くの遺伝子に関してよい用量反応性がみられ、選択した遺伝子の有用性が示された。また、初期の変化がより大きかったことより、今後は投与後早いタイミングでの解析が有効であることが示唆された。さらに、非遺伝子傷害性 3 物質を加えた GeneChip データの再解析により、新たな候補遺伝子を選択した。今後 RT-PCR を用いた検証により、これらの中から最終的に使用する遺伝子を確定させる予定である。

*本研究は日本環境変異原学会 MMS 研究会のトキシコゲノミクス共同研究として行われ、主に以下に示す機関の方々に協力をいただいた。

- 青山学院大学理工学部 (降旗千恵)
- 大鵬薬品工業 (株) (田中剛太郎)
- (財) 食品農医薬品安全性評価センター
(中嶋 圓)
- エスエス製薬 (株) (浜田修一)

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res.*, 586, 1-17. (2005)

Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 94, 303-309. (2005)

Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176 (2005)

Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of

acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, (in press)

Matsura-Eisaki, K., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M. and Honma, M. In vitro genotoxicity of inorganic arsenics and their genotoxic risk through food intake. *Environ. Mutat. Res.*, 27, 153-160 (2005)

2. 学会発表

鈴木孝昌, 欒 洋, Palanisamy 田中剛太郎, 中嶋圓, 浜田修一, 三浦知弘, 降旗千恵

Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS: Quantitative RT-PCR analysis on the selected genes by the GeneChip
日本環境変異原学会第34回大会
(2005. 11)

欒 洋, 本間正充, Suresh Thiruppathi, 小木美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌

Application of CGH and SNP arrays for chromosome analysis
日本環境変異原学会第34回大会
(2005. 11)

鈴木孝昌, 降旗千恵

Transcriptomics — Can gene expression profiles distinguish the genotoxic hepatocarcinogens?
日本環境変異原学会第34回大会
(2005. 11)

三浦知弘, 欒 洋, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 鈴木孝昌, 田代英夫, 降旗千恵

DNA マイクロアレイを用いた非遺伝子傷害

性肝発癌物質投与マウス肝臓における遺
伝子発現解析

第 28 回日本分子生物学会年会 (2005. 12)

原田基裕, 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

Original oligonucleotide microarray に
よる 5 種類の遺伝子傷害性肝発がん物質
と phenobarbital と ethanol の遺伝子発現
解析

第 28 回日本分子生物学会年会 (2005. 12)

宮島正樹, 欒 洋, 渡辺貴志, 鈴木
孝昌, 村上勝彦, 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 28 回日本分子生物学会年会 (2005. 12)

鴻野貴司, 欒 洋, 鈴木孝昌, 野村
靖幸, 太田浩良, 降旗千恵

8 ヶ月齢の老化促進モデルマウス

(Senescence-Accelerated Mouse: SAM)

SAMP8 海馬における Transthyretin の発現
低下

第 28 回日本分子生物学会年会 (2005. 12)

Toshie Kanayasu-Toyoda, Tomofumi
Fujino, Tadashi Oshizawa, Takayoshi
Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yoji
Sato, Jun-ichi Sawada, Kazuhide Inoue,
Koichi Shudo, Yasuo Ohno, Teruhide
Yamaguchi

HX531, a retinoid X receptor antagonist,

inhibited the 9-cis retinoic
acid-induced binding with steroid
receptor coactivator-1 as detected by
surface plasmon resonance

第 78 回日本生化学会大会 (2005. 10)

Declan Mulhern, Shinya Yokokawa,
Hitoshi Shimizu, Arihiro
Kohara, Takayoshi, Suzuki, Haruhiko
Okuda, Naoki Miyata, Shin-ichi
Ninomiya and Tetsuji Sudo

Gene expression profiles of
hepatotoxin-treated human hepatocytes
can be used to cluster unknown compounds
according to their mode of actions
第32回日本トキシコロジー学会学術年会
(2005. 6)

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

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
第32回日本トキシコロジー学会学術年会
(2005. 6)

Takayoshi Suzuki

Organ-specific toxicity of
aristolochic acid; studied by the
transgenic mouse mutation assay and the
DNA microarray

2nd International Conference and
Exposition on the Modernization of
Traditional Chinese Medicine (成都、中
国)

Suzuki, T. , Luan, Y. , Honma, M. , Kogi,
M. , and Yamaguchi, T.

**Application of microarrays for
chromosome analysis**

第9回国際環境変異原学会サテライトシ
ンポジウム"トキシコゲノミクス" (ハワ
イ、米国)

C Furihata, K Tobe, Y Nakachi, Y Kondoh,
M Nakajima, S Hamada, C Namiki, T Suzuki,
A Hyogo, M Hoshino, M Harada, T Tashiro,
H Ito, H Inazumi, Y Sakaki and H Tashiro
Original oligonucleotide microarray-
baesd gene expression profile indused by
genotoxic carcinogens and Phenobarbital
in mouse liver

第9回国際環境変異原学会サテライトシ
ンポジウム"トキシコゲノミクス" (ハワ
イ、米国)

鈴木孝昌

変異原処理による in vivo/in vitro 遺伝
子発現

日本動物実験代替法学会第 19 回大会
(2005.12)

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

表 1 GeneChip 解析より選択した遺伝子

1 acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	23 heat shock protein 1
2 B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	24 insulin-like growth factor binding protein 1
3 Bcl2-associated X protein	25 Jun oncogene
4 CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	26 low density lipoprotein receptor-related protein 1
5 cerebellum postnatal development associated protein 2	27 lymphocyte antigen 6 complex, locus A
6 cyclin G1	28 Mus musculus, clone IMAGE:3493956, mRNA, partial c
7 cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	29 phosphomannomutase 1
8 cytochrome P450, 1a1, aromatic compound inducible	30 pleckstrin homology-like domain, family A, member 3
9 cytochrome P450, 1a2, aromatic compound inducible	31 protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3
10 cytochrome P450, 2b10, phenobarbital inducible, type b	32 protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
11 cytochrome P450, 2b20	33 RIKEN cDNA 1300007C21 gene
12 cytochrome P450, 4a10	34 RIKEN cDNA 1700037B15 gene
13 cytosolic acyl-CoA thioesterase 1	35 RIKEN cDNA 1810073K19 gene
14 Down syndrome critical region homolog 1 (human)	36 RIKEN cDNA 2700083B06 gene
15 epidermal growth factor receptor	37 RIKEN cDNA 4930542G03 gene
16 epoxide hydrolase 1, microsomal	38 RIKEN cDNA 4933425F03 gene
17 fatty acid binding protein 5, epidermal	39 RIKEN cDNA B130055L10 gene
18 glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	40 serum/glucocorticoid regulated kinase
19 glutathione S-transferase, mu 3	41 stress induced protein
20 growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	42 transformed mouse 3T3 cell double minute 2
21 growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	43 tubulin, beta 2
22 growth differentiation factor 15	

表 2 共通して変化の見られた遺伝子

	Genotoxic	Non-genotoxic
1	0.21	0.00
2	0.15	0.00
3	0.10	0.00
4	0.05	0.00
5	0.05	0.00
6	0.05	0.00
7	0.05	0.00
8	0.05	0.00
9	0.05	0.00
10	0.05	0.00
11	0.05	0.00
12	0.05	0.00
13	0.05	0.00
14	0.05	0.00
15	0.05	0.00
16	0.05	0.00
17	0.05	0.00
18	0.05	0.00
19	0.05	0.00
20	0.05	0.00
21	0.05	0.00
22	0.05	0.00
23	0.05	0.00
24	0.05	0.00
25	0.05	0.00
26	0.05	0.00
27	0.05	0.00
28	0.05	0.00
29	0.05	0.00
30	0.05	0.00
31	0.05	0.00
32	0.05	0.00
33	0.05	0.00
34	0.05	0.00
35	0.05	0.00
36	0.05	0.00
37	0.05	0.00
38	0.05	0.00
39	0.05	0.00
40	0.05	0.00
41	0.05	0.00
42	0.05	0.00
43	0.05	0.00

表3 高スコアを示した遺伝子

	Score	Gene	Description	
UP	32	BC005512	similar to BC005512 protein /// hypothetical LOC432650	
	32	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	
	29	Ppp1r3c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	
	28	Phlda3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	
	27	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	
	27	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	
	27	Ccng	cyclin G1	
	27	Ccng	cyclin G1	
	26	Ccng	cyclin G1	
	26	Rbx1	ring-box 1	
	25	Sds	serine dehydratase	
	25	Ppp1r3c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	
	25	Fkbp5	FK506 binding protein 5	
	25	AI467657	zinc finger and BTB domain containing 16	
	25	BM122014	Mus musculus, clone IMAGE:5050186, mRNA, partial cds	
	25	AI467657	zinc finger and BTB domain containing 16	
	24	Stinp	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	
	24	Eva	epithelial V-like antigen 1	
	24	BB794742	---	
	24	Mbl2	mannose binding lectin (C)	
	24	AW763751	similar to BC005512 protein /// hypothetical LOC432650	
	24	Siat9	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5	
	23	2700083B06Rik	interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	
	23	1700037B15Rik	DNA-damage-inducible transcript 4-like	
	23	Suftn	sulfotransferase family 1D, member 1	
	23	2700083B06Rik	interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	
	22	Lpin1	lipin 1	
	22	Sphk2	D site albumin promoter binding protein	
	22	Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing, class B2	
	22	MGC28623	RIKEN cDNA 4930542G03 gene	
	22	Hbb-bh1	metastasis suppressor 1	
	22	Herpud1	homocysteine-inducible, ubiquitin-like domain member 1	
	21	Bax	Bcl2-associated X protein	
	21	Serpina3n	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3N	
	21	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	
	21	3300001H21 Rik	RIKEN cDNA 3300001H21 gene /// UbiE-YGHL1 fusion protein	
	21	Nfe2l2	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	
	21	Mknk2	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	
	21	1300007C21Rik	similar to Retrovirus-related POL polyprotein (Endonuclease)	
	21	Rps8	ribosomal protein S8	
	21	CD151	CD151 antigen	
	20	Lpin1	lipin 1	
	20	Lcn2	lipocalin 2	
	20	AI467657	---	
	20	5830413E08Rik	DNA-damage-inducible transcript 4	
	20	Ppp2r1a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65)	
	Down	31	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1
		30	Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B
		30	Nono	non-POU-domain-containing, octamer binding protein
		27	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
		25	Nrp	neuropilin 1
		25	Lpl	lipoprotein lipase
		24	Nrp	neuropilin 1
		24	Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
		24	Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal
		24	F5	coagulation factor V
		23	Dio1	deiodinase, iodothyronine, type I
		23	Egfr	epidermal growth factor receptor
		23	2810439F02Rik	RIKEN cDNA 2810439F02 gene
		22	Cyp4a14	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14
21		Acacb	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	
21		Tgfb1i4	transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	
21		Hamp	hepcidin antimicrobial peptide 2	
21		Rps24	ribosomal protein S24	
21		2210408B16Rik	acetoacetyl-CoA synthetase	
20		Hhex	hematopoietically expressed homeobox	
20	Srebf1	sterol regulatory element binding factor 1		
20	MGC36662	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1		
20	Cp	ceruloplasmin		
20	Glns	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)		

表4 遺伝子傷害性物質に特異的に変化の見られた遺伝子

Genotoxic																							Non-genotoxic																																																																												
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV	AW	AX	AY	AZ																																																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

表5 新たに追加した RT-PCR 用遺伝子リスト

	Gene	Description
Up	BC005512	similar to BC005512 protein /// hypothetical LOC432650
	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A
	Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)
	Rbx1	ring-box 1
	Sds	serine dehydratase
	Eva	epithelial V-like antigen 1
	BB794742	---
	Mbl2	mannose binding lectin (C)
	Siat9	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5
	Sultn	sulfotransferase family 1D, member 1
	Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing, class B2
	Hbb-bh1	metastasis suppressor 1
	1300007C21Rik A1467657	similar to Retrovirus-related POL polyprotein (Endonuclease) ---
Gstm3	glutathione S-transferase, mu 3	
Down	Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B
	Nono	non-POU-domain-containing, octamer binding protein
	Hamp	hepcidin antimicrobial peptide 2
	2210408B16Rik	acetoacetyl-CoA synthetase
	Hhex	hematopoietically expressed homeobox
	A630059D12 Rik 3000002J10Rik	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID protein tyrosine phosphatase, receptor type, D

図1 GAPDH 遺伝子の GeneChip 解析結果

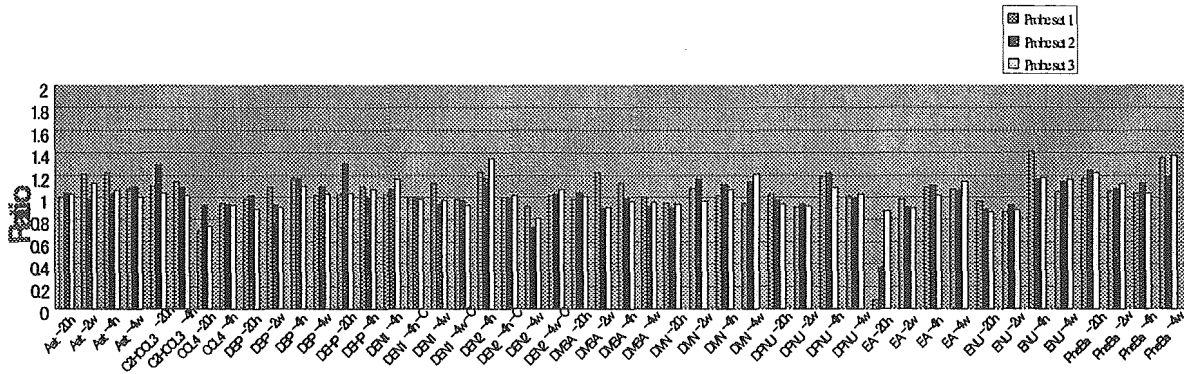


図2 RT-PCR と GeneChip データの比較

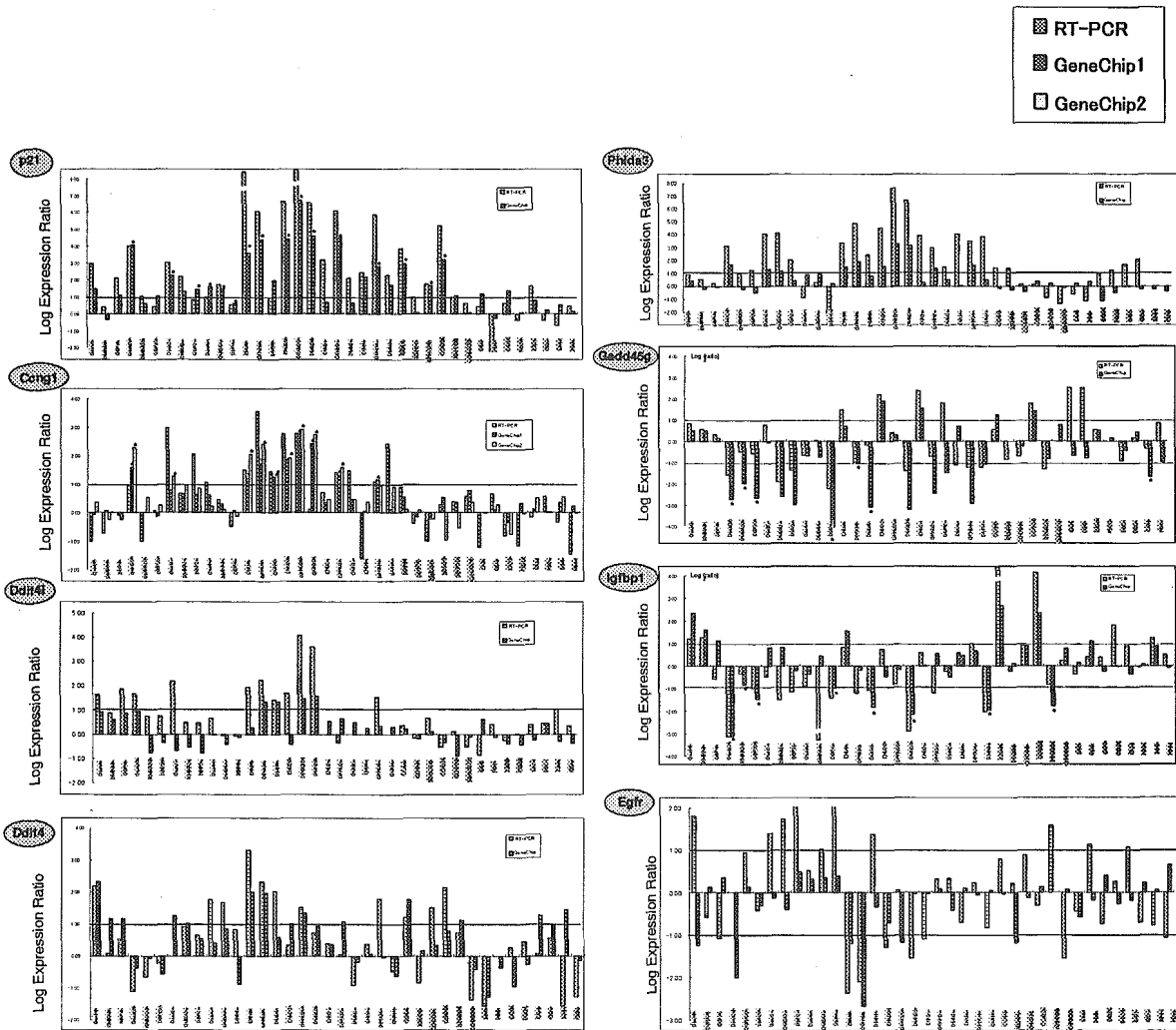


図3 RT-PCR 法による DEN および ENU の用量反応性の解析

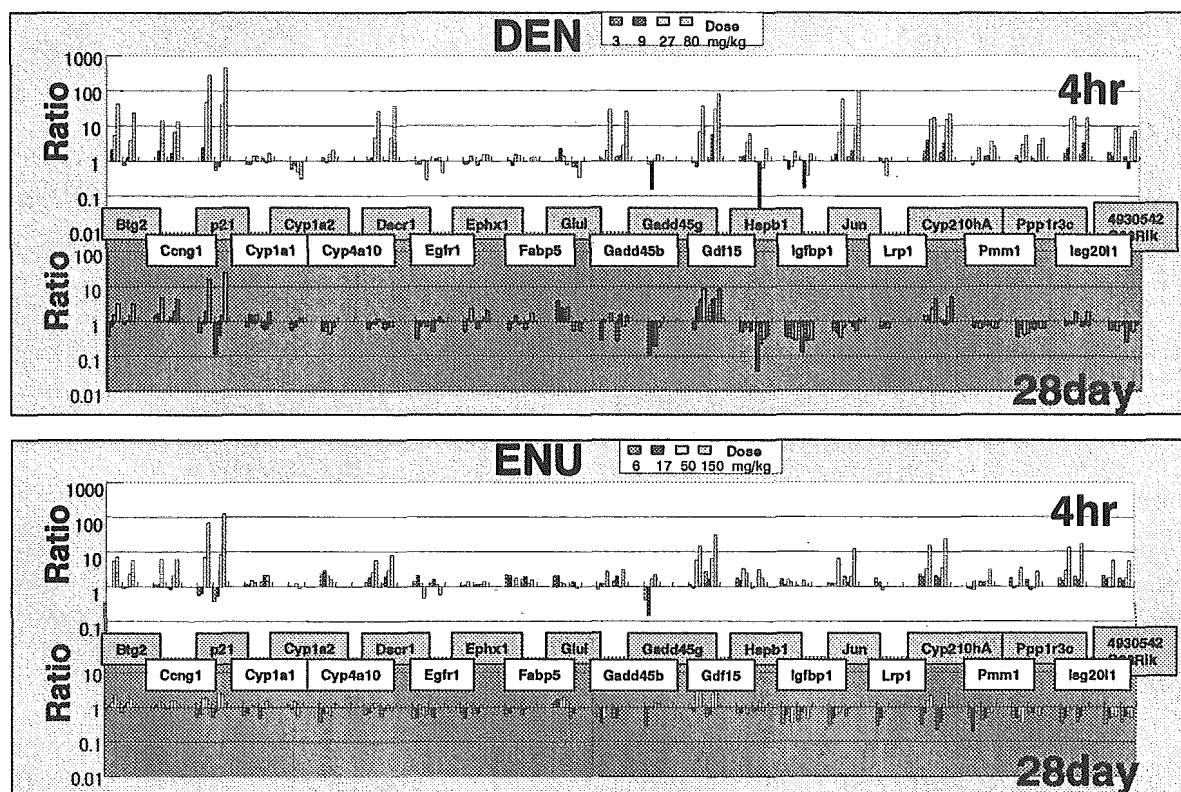


図4 再解析後に変化の見られた遺伝子数

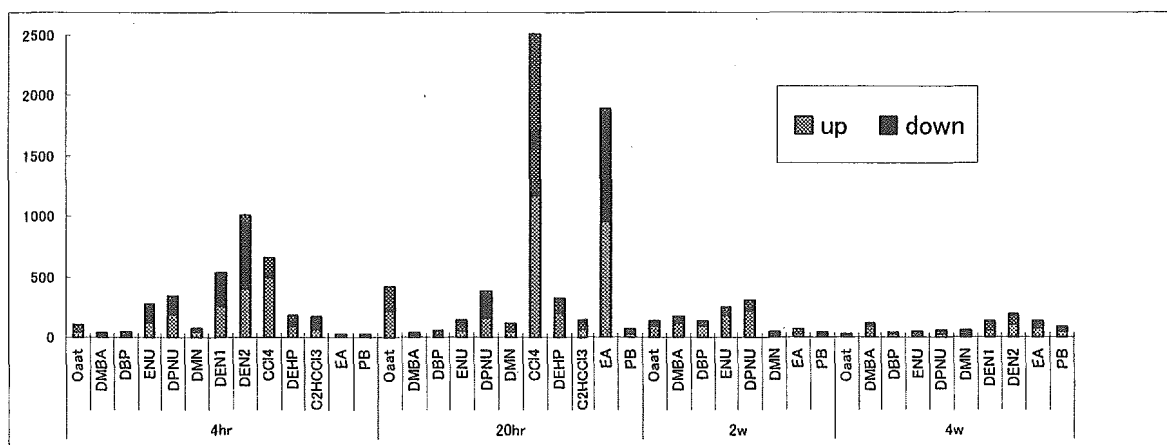
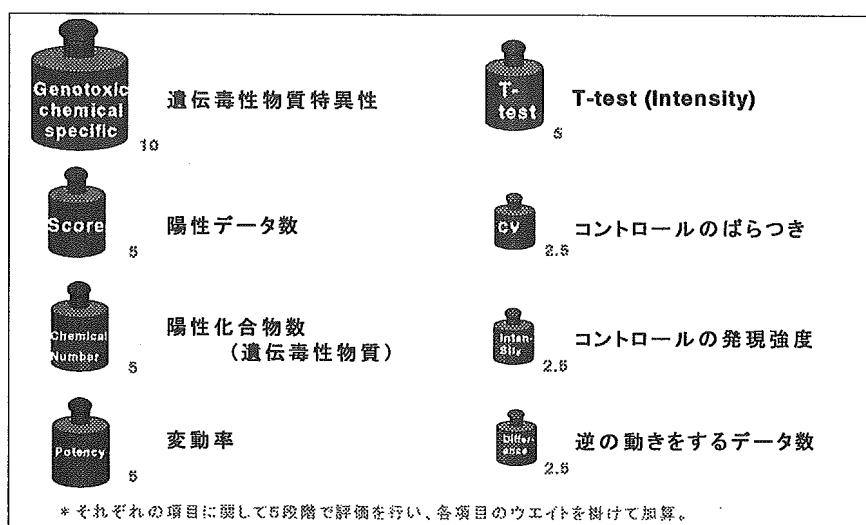


図5 候補遺伝子選択における評価項目と重み付け



研究成果の刊行に関する一覧表

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanno J, Aisaki KI, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T.	"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays.	BMC Genomics.	7	64-(Epub ahead of print)	2006
Shinya Matsumoto, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno	Mass Distributed Clustering: A New Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data.	Genome Informatics	16	183-194	2005
Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y.	Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse.	Development	133	1625-1634	2006
Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E.	Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-o-tolylguanidine, in rats.	Reprod Toxicol.	Epub ahead of print	-	2005
Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Ema M.	In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals.	Mutat Res.	588	129-135	2005
Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ema M.	Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals.	Congenit Anom (Kyoto).	45	137-145	2005
Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y.	Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression.	Proc Natl Acad Sci U S A.	103	3651-3656	2006
Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y.	Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system.	Dev Dyn.	235	395-402	2006
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.	Development.	132	787-796	2005
Byung-Il Yoon, Toyozo Kaneko, Yoko Hirabayashi, Takayoshi Imazawa, Akiyoshi Nishikawa, Yukio Kodama, Jun Kanno, Junji Yodoi, Jeong-Hee Han, Masao Hirose and Tohru Inoue	Electron Microscopical Evidence of the Protective Function of Thioredoxin (TRX/ADF) Transgene against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced Cellular Toxicity in the Liver and Brain	Journal of Toxicologic Pathology	18	41-46	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T.	Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses.	<i>Toxicol Pathol.</i>	32	12-16	2004
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.	<i>Life Sci.</i>	Epub ahead of print	-	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 at the Spi-1 and Fli-1 site.	<i>Leuk Res.</i>	29	933-942	2005
Nakagawa Y, Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Abe S, Inoue M, 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>	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.	<i>Leuk Res.</i>	29	307-316	2005
Yanagihara M, Sasaki-Takahashi N, Sugahara T, Yamamoto S, Shinomi M, Yamashita I, Hayashida M, Yamanoha B, Numata A, Yamori T, Andoh T.	Leptosins isolated from marine fungus <i>Leptoshaeria</i> species inhibit DNA topoisomerases I and/or II and induce apoptosis by inactivation of Akt/protein kinase B.	<i>Cancer Sci.</i>	96	816-824	2005
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, 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.	<i>Cancer Res.</i>	65	5864-5671	2005
Nakatsu N, Yoshida Y, Yamazaki K, Nakamura T, Dan S, Fukui Y, Yamori T.	Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays.	<i>Mol Cancer Ther.</i>	4	399-412	2005
Koyama N, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinae N, Honma M.	Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells.	<i>Mutat Res.</i>	603	151-158	2006

Methodology article

Open Access

"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays

Jun Kanno*^{†1}, Ken-ichi Aisaki^{†1}, Katsuhide Igarashi¹, Noriyuki Nakatsu¹,
Atsushi Ono¹, Yukio Kodama¹ and Taku Nagao²

Address: ¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and ²President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno* - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - n-nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 29 March 2006

Received: 06 November 2005

BMC Genomics 2006, 7:64 doi:10.1186/1471-2164-7-64

Accepted: 29 March 2006

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/64>

© 2006 Kanno et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Transcriptome data from quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarrays are typically obtained from a fixed amount of RNA collected per sample. Therefore, variations in tissue cellularity and RNA yield across samples in an experimental series compromise accurate determination of the absolute level of each mRNA species per cell in any sample. Since mRNAs are copied from genomic DNA, the simplest way to express mRNA level would be as copy number per template DNA, or more practically, as copy number per cell.

Results: Here we report a method (designated the "Percellome" method) for normalizing the expression of mRNA values in biological samples. It provides a "per cell" readout in mRNA copy number and is applicable to both quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarray studies. The genomic DNA content of each sample homogenate was measured from a small aliquot to derive the number of cells in the sample. A cocktail of five external spike RNAs admixed in a dose-graded manner (dose-graded spike cocktail; GSC) was prepared and added to each homogenate in proportion to its DNA content. In this way, the spike mRNAs represented absolute copy numbers per cell in the sample. The signals from the five spike mRNAs were used as a dose-response standard curve for each sample, enabling us to convert all the signals measured to copy numbers per cell in an expression profile-independent manner. A series of samples was measured by Q-PCR and Affymetrix GeneChip microarrays using this Percellome method, and the results showed up to 90 % concordance.

Conclusion: Percellome data can be compared directly among samples and among different studies, and between different platforms, without further normalization. Therefore, "percellome" normalization can serve as a standard method for exchanging and comparing data across different platforms and among different laboratories.

Background

Normalization of gene expression data between different

samples generated in the same laboratory using a single platform, and/or generated in different geographical

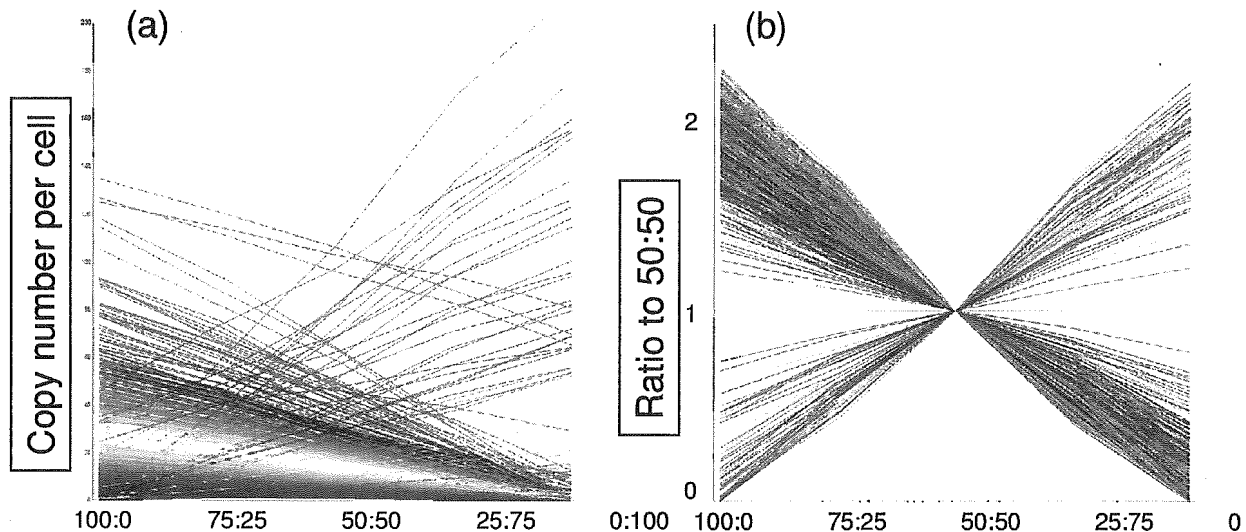


Figure 1

Dose-response linearity check by LBM. Dose-response linearity of the Affymetrix GeneChip by the LBM (liver-brain mix) sample set. Five samples, i.e. mixtures of mouse liver and brain at ratios of 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, were spiked with GSC and measured by Affymetrix GeneChips Mouse430-2. Signals were normalized by the Percellome method as described in the text. Line graphs are in (a) copy numbers and (b) ratio to 50:50 sample for the top 1,000 probe sets with coefficient of correlation (R^2) closest to 1 among those having 1 copy or more per cell in the 50:50 sample (19,979 probe sets out of 45,101). The number of probe sets with $R^2 > 0.950$ was 8,655, and $R^2 > 0.900$ was 11,719.

regions using multiple platforms, is central to the establishment of a reliable reference database for toxicogenomics and pharmacogenomics. Transforming expression data into a "per cell" database is an effective way of normalizing expression data across samples and platforms. However, transcriptome data from the quantitative PCR (Q-PCR) and DNA microarray analyses currently deposited in the database are related to a fixed amount of RNA collected per sample. Variations in RNA yield across samples in an experimental series compromise accurate determination of the absolute level of each mRNA species per cell in any sample. Normalization against housekeeping genes for PCRs, and global normalization of ratiometric data for microarrays, is typically performed to account for this informational loss. Additional methods, such as the use of external mRNA spikes, reportedly improve the quality of data from microarray systems. For example, Holstege et al. [1] described a spike method against total RNA, based on their finding that the yields of total RNA from wild type and mutant cells were very similar. Hill et al. [2] reported a spike method against total RNA for normalizing hybridization data such that the sensitivities of individual arrays could be compared. Lee et al. [3] demonstrated that "housekeeping genes" cannot be used as a ref-

erence control, and van de Peppel et al. [4] described a normalization method of mRNA against total RNA using an external spike mixture. To achieve satisfactory performance they used multiple graded doses of external spikes, covering a wide range of expression, in order to align the ratiometric data by Lowess normalization [5]. Hekstra et al. [6] presented a method for calculating the final cRNA concentration in a hybridization solution. Sterrenburg et al. [7] and Dudley et al. [8] reported the use of common reference control samples for two-color microarray analyses of the human and yeast genomes, respectively. These are pools of antisense oligo sequences against all sense oligos present on the microarray. Instead of antisense oligos, Talaat et al. [9] used genomic DNA as a common reference control in studies of *E. coli*. Statistical approaches have been proposed for ratiometric data to improve inter-microarray variations, especially of non-linear relations [10]. However, because control samples may differ among studies, ratiometric data cannot easily be compared across multiple studies unless a common reference, such as a mixture of all antisense counterparts of spotted sense sequences is used [7-9]. Nevertheless, as long as the normalization is calibrated to total RNA, variations in total RNA profile cannot be effectively cancelled out. Although