

あり、HMBA

(N,N'-Hexamethylene-bis-acetamide)処理により、分化時に特徴的な形態変化・増殖活性の減少を起こすことが知られている細胞。

培地:RPMI1640 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HEC-1-A(子宮内膜)

世界初の子宮体癌株であり、71歳女性の子宮体癌より樹立された。エストロゲン受容体を発現していることが確認されている。

培地:EMEM with 15% heat inactivated fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

SKG-II(子宮内膜)

子宮頸部類上皮腫、大細胞非角化型の細胞株であり、黄体ホルモン療法に関する研究に使用されている。

培地:Ham's F-12 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

HepG2(肝臓)

毒性の分野で広く用いられているヒト肝癌由来細胞株であり、ダイオキシンに対する受容体発現が確認されている。

培地:Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

KMRC-3(腎臓)

腎明細胞がん由来細胞株。

培地:Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞)

骨髄由来間葉系幹細胞にヒトパピローマウイルス遺伝子E6,E7ならびにヒテロメラゼ遺伝子を導入して不死化した細胞株。脂肪、神経、骨への分化能を有しており、再生医療研究に広く利用されている。分化には化学物質の影響も少なくなく、DMSOの添加により分化することが確認されている。

培地:Ham's F-12 medium with 10% fetal calf serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.1% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

OVKATE(卵巣)

卵巣の漿液性乳頭状腺がん由来細胞株。

培地:RPMI1640 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.05% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

8505C(甲状腺)

ヒト甲状腺未分化癌由来細胞株。p53に変異が認められている。

培地:Eagle's minimal essential medium with 10% fetal calf serum.

継代方法:Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

SW-13(副腎皮質)

ヒト副腎皮質癌由来細胞株。アドレノメデュリンが発現しており、ACTH、アンギオテンシンII、デキサメサゾンやサイトカインとの関連性に関して研究が行われている。

培地: Leibovitz's L-15 medium with 10% fetal bovine serum.

継代方法: Cells are harvested after 0.25% trypsin and 0.02% EDTA treatment.

以上10株に関して、フェノールレッド不含培地を用いて培養を行い、倍加時間を算出するとともに、最終継代から24時間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種してRNA抽出を行った。

#### <RNA抽出に関して>

RNA抽出に関しては、キアゲン社製のRNeasyMiniキットを使用してRNA抽出した。

#### <リアルタイムRT-PCRによる遺伝子発現解析に関して>

リアルタイムRT-PCRにはApplied Biosystems 7300 リアルタイムPCRシステムならびにApplied Biosystems 7900HT Fast リアルタイムPCRシステムを使用し、TaqManプローブにて解析を行った。TaqManプローブはTaqMan® Gene Expression Assays Inventoriedプロダクトより選択して検討を行った。

### C. 結果

本研究では、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を中心に選択し、その細胞での核内受容体ならびに関連分子に関する網羅的遺伝子発現解析を目的とした。本検討で使用した細胞はフェノールレッド不含培地で行い、最終継代から24時

間後にサブコンフルエントになるように細胞を播種してRNA抽出を行った。今回用いた細胞の倍加時間はそれぞれ、MCF-7(乳癌)58時間、NEC14(精巣)62時間、HEC-1-A(子宮内膜)72時間、SKG-II(子宮内膜)47時間、HepG2(肝臓)32時間、KMRC-3(腎臓)14日、UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞)58時間、OVKATE(卵巣)18日、8505C(甲状腺)43時間、SW-13(副腎皮質)74時間、であった。細胞培養に際しては形態学的特徴を細胞の情報として記録するために動画撮影を行い、細胞増殖の過程を撮影した。

遺伝子発現解析を行う遺伝子に関しては核内受容体ならびにその関連分子を選択することとした。アプライドバイオシステムズ社で既に設計されているTaqMan® プローブであるTaqMan® Gene Expression Assays Inventoriedプロダクトより、核内受容体ならびにその関連分子に関して検索抽出したところ、598種類(598遺伝子ではない)のプローブが選択できた。選択されたプローブの中には47種の核内受容体が含まれており(表1)、ほぼ核内受容体を網羅できる(この他ホルモンレセプター、サイトカインレセプターなども含む)。まずはHeLa細胞のRNAを利用してこれらプローブの測定感度を検討したところ、約7割のプローブ(34種の受容体)で発現を検出できることがわかった。現在、受容体47種を含むTaqMan® Low Density Arrayを作成中であり、細胞ごとに順次遺伝子発現を定量していく予定である。

アレイのデザインはFormat 384とし、ターゲット遺伝子 380種類 + 内在性コントロール遺伝子 1種類。cDNAサンプル数:1種類の場合、1遺伝子あたりの反復(レプリケート)数: n=1(P/N 4342265)を採用した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	SAMPLE
A	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	CT1	CT1	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	1
B	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	1
C	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	1
D	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	1
E	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	1
F	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	1
G	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	1
H	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	1
I	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	1
J	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	1
K	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	1
L	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	1
M	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	1
N	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	1
O	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	1

#### D. 考察

今回用いた細胞株の倍加時間を見ると 3 日以上以上の倍加時間を示すもの、HEC-1-A (子宮内膜), KMRC-3 (腎臓), OVKATE (卵巣), SW-13 (副腎皮質) がある。このような細胞はもとの増殖能が低く、培養に長い時間を要するため、スクリーニング試験として大量の細胞を用意するのに多くの時間を要し、化学物質のスクリーニングという観点からは非常に使いにくい細胞株であるといえる。しかし、細胞の機能維持という面では、増殖能の低い細胞の方が優位であることが、これまでの研究結果よりわかっている。その現象は染色体の安定性 (逆にいえばゲノムの不安定性) に繋がっており、悪性度が高く増殖能が高い細胞は染色体プロファイルの変化が速い。したがって、倍加時間や染色体の安定性の情報もスクリーニングに使用する細胞を選択するには重要であるといえる。HeLa 細胞の倍加時間が約 24 時間程度であることを考えると、今回使用した増殖速度が遅いことがわかる。よく毒性試験に用いることの多い HepG2 (ヒト肝癌由来細胞) においても倍加時間が 32 時間と長くなっており、今後スクリーニングという観点から倍加時間の妥当性も考慮に入れて細胞を選択するべきであると考えられた。また、細胞の最終継代、つまり化学物質添加に用いる細胞の播種に関しても、これら増殖の遅い細胞を横並びにして 24 時間

後に薬剤処理を行ったが、この点に関しても考慮する必要があるかもしれない。

細胞の形態観察のため行った動画撮影においては前述の増殖速度の低さが問題となったが、実際に細胞分裂はしないものの、細胞が培養容器表面を非常によく運動している状態が記録され、分裂には至らないが、細胞活動は活発であるということが確認できた。細胞は生命の最小単位として最も基本的な生物とみなされており、生命科学においては『構造』と『機能』が重要な研究対象である。分子生物学が大きく発展した現代においても、重要な分野であることは間違い無く、細胞の分化の指標になっている。この点から考えても、化学物質作用時の経時的形態観察は網羅的な遺伝子発現解析と同時にを行うことによってより多くの情報をもたらすと考えられる。今後遺伝子発現解析とどのように結び付けられるかが重要となるだろう。

遺伝子発現解析には TaqMan® Low Density Array を用いる計画であり、47 種の核内受容体を網羅している。細胞によってはこれら核内受容体の発現が低く、今回使用予定の TaqMan® プローブでは検出限界以下になるものもあると考えられるが、TaqMan® による解析では非常に定量性にすぐれた解析が可能である。今回 HeLa 細胞を用いてプローブの検出感度のテストを行ったが、約 7 割のプローブにおいて定量性を持って検出が可能であることが示された。その他の 3 割のプローブに関しても、定量性は認められなかったが、非常に低い発現量の遺伝子まで検出しており、十分な感度であることが確かめられた。今後、本プローブを用いることによって、細胞ごとの遺伝子発現プロファイル作製が可能となり、非常に多くの情報が集積される。特に核内受容体の発

現プロファイルに関しては、化学物質のスクリーニングや毒性試験、細胞の分化など様々な研究者の興味の対象となり、これらのデータベース化が非常に有益な情報提供になるであろう。

#### E. 結論

核内受容体や関連する転写制御因子の発現に関しての網羅的に詳細な比較検討を行うため、内分泌かく乱化学物質のターゲットと成り得る臓器に由来する細胞株を10種(MCF-7(乳癌), NEC14(精巣), HEC-1-A(子宮内膜), SKG-II(子宮内膜) HepG2(肝臓), KMRC-3(腎臓), UE6E7T-3(骨髄由来間葉系幹細胞), OVKATE(卵巣), 8505C(甲状腺), SW-13(副腎皮質))選択した。形態観察記録として動画記録を行い、細胞の増殖速度は遅いが、細胞が活発に活動している状況が確認できた。倍加時間に関しては今回選択した細胞の中に非常に長い倍加時間を示す細胞種もありスクリーニングに不向きであることがわかった。今回培養した細胞のRNAを用いて47種の核内受容体遺伝子のTaqMan®プロブの感度確認を行い約7割の受容体に関して定量的な結果が得られることを確認した。また、47種の核内受容体を含む380種のTaqMan®プロブを用いてTaqMan® Low Density Arrayを作製した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

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. 2005 586(1):1-17

学会発表

小原有弘, 水澤博・国内培養細胞研究資源の現状と JCRB 細胞バンクにおける品質管理・日本組織培養学会(2005.5.26)

Arihiro Kohara, Tohru Masui, Hiroshi Mizusawa • Training Procedures in Cell Culture • Society for In Vitro Biology (2005.6.6)

Arihiro Kohara, Yutaka Ozawa, Setusko Shioda, Tohru Masui, Masao Takeuchi, Hiroshi Mizusawa • Developing an In Vitro Gene Expression Assay for Predicting Hepatotoxicity. •9<sup>th</sup> ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics(2005.9.1)

小原有弘・ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)の研究発表展示・日本分子生物学会(2005.12.7-9)

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1 遺伝子発現解析に用いる核内受容体プローブ一覧

レセプター	プロダクトID	レセプター	プロダクトID	レセプター	プロダクトID	レセプター	プロダクトID	
1	AR	Hs00171172,m1	14	GR	Hs00354508,m1	23	NGF-B $\gamma$	Hs00545007,m1
2	CAR	Hs00231959,m1			Hs00353740,m1			Hs00175077,m1
3	COUP-TF I	Hs00818842,m1			Hs00230818,m1			Hs00235001,m1
4	COUP-TF II	Hs00819630,m1			Hs00230813,m1	24	PNR	Hs00183917,m1
5	DAX1	Hs00230864,m1	15	HNF4 $\alpha$	Hs00230853,m1			Hs00183915,m1
6	EAF2	Hs00172870,m1	16	HNF4 $\gamma$	なし	25	PPAR $\alpha$	Hs00231882,m1
7	EFR $\alpha$	Hs00607062,m1	17	LRH-1	Hs00187067,m1	26	PPAR $\gamma$	Hs00234592,m1
8	EFR $\beta$	Hs00395184,m1	18	LXR $\alpha$	Hs00172885,m1	27	PPAR $\delta$	Hs00602622,m1
		Hs00374442,m1	19	LXR $\beta$	Hs00173195,m1			Hs00606407,m1
9	EFR $\gamma$	Hs00155006,m1	20	MR	Hs00230906,m1	28	PR	Hs00172183,m1
10	ER $\alpha$	Hs00174860,m1	21	NGF-B $\alpha$	Hs00172437,m1	29	PXR	Hs00254365,m1
11	ER $\beta$	Hs00230957,m1			Hs00544986,m1			Hs00243666,m1
12	FXR	Hs00231968,m1			Hs00374225,m1	30	RAR $\alpha$	Hs00230907,m1
13	GCNF	Hs00364256,m1	22	NGF-B $\beta$	Hs00428691,m1	31	RAR $\beta$	Hs00233405,m1
		Hs00265966,m1						Hs00233407,m1
						32	RAR $\gamma$	Hs00171273,m1
						33	REVERB $c$	Hs00253876,m1
								Hs00233309,m1
								Hs00536545,m1
								Hs00199445,m1
								Hs00172858,m1
								Hs00172860,m1
								Hs00172565,m1
								Hs00232774,m1
								Hs00199455,m1
								Hs00610436,m1
								Hs00222677,m1
								Hs00172664,m1
								Hs00172676,m1
								Hs00231489,m1
								Hs00268470,m1
								Hs00230861,m1
								Hs00172113,m1

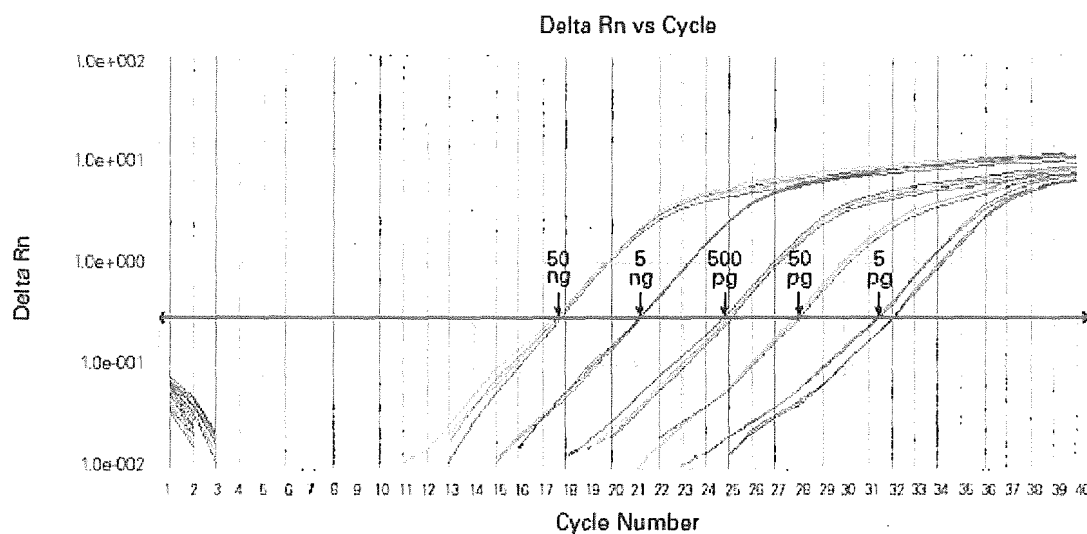


図 1 HeLa RNA の希釈系列を用いて PPAR $\gamma$  遺伝子の遺伝子発現を見たときの増幅曲線

厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

KeyMolnet を用いたネットワークパタニングによる作用未知内分泌かく乱物質  
の毒性予測

分担研究者 板井 昭子 株) 医薬分子設計研究所  
研究協力者 佐藤 陽美 株) 医薬分子設計研究所

研究要旨

生体において化合物の毒性は分子ネットワークを介して発現するが、特に内分泌かく乱化学物質の生体への影響は顕著なフェノタイプの変化を伴わない場合が多い。そこで、近年技術的進歩が著しく、かつ感度の高い DNA マイクロアレイによる遺伝子発現データとデータの標準化法 (Percellome method) を用いて、*in vivo* (マウス肝) での内分泌かく乱化学物質の毒性予測を試みることにした。ここでは毒性作用に結びつく分子ネットワークを DNA マイクロアレイデータに基づき、生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet を用いて生成する。作用既知の内分泌かく乱化学物質の遺伝子発現データに基づき生成したネットワークと、同様に生成する作用未知の化合物のネットワークを比較し、毒性予測を試みる方針である。今回はまず、pilot study として 3 種の合成ホルモン ethynyl estradiol, testosterone propionate, levothyroxine を経口投与したマウスの肝臓から RNA を抽出し、Affymetrix mouse 430A-2 により得た遺伝子発現データに基づき、上記 3 種の合成ホルモンが結合する核内レセプター estrogen receptor (ER), dihydrotestosterone receptor (DHTR), thyroid hormone receptor (TR) により制御されることが報告されている遺伝子の発現を異なる時系列、用量に対して観察した。KeyMolnet のコンテンツより、上記核内レセプターと制御される遺伝子との関係を表示させ、遺伝子発現データをマッピングし観察すると、上記合成ホルモン作用に対する遺伝子発現の顕著な変化は認められなかった。そこで、時系列、用量に関する適当な条件を選定した後、KeyMolnet により各ホルモン作用に対して有意に発現亢進または低下した分子を端点としてネットワークを生成し、各々ホルモンに特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークを論理演算法により抽出することにした。分子ネットワークは生体内の作用を惹起するメカニズムの示唆を与えることができ、さらに本方法は化合物特異的な分子ネットワークを簡便かつ効果的に生成、抽出できることから、フェノタイプの変化が顕著でない比較的低用量の化合物の毒性予測に有用であることが示唆される。

A. 研究目的

内分泌かく乱作用をもつ可能性のある化合物の毒性予測を行うため、DNA アレイ技術と Percellome method による標準化法及

び KeyMolnet によるネットワーク解析を組み合わせることで、毒性予測のための方法論を開発する。

## B. 研究方法

### 1. ネットワーク解析におけるデータ処理

3種の合成ホルモン ethynyl estradiol(E2), testosterone propionate(TESTO), levothyroxine(T4) を経口投与したマウスの肝臓からRNAを抽出し、Affymetrix mouse 430A.2により得た遺伝子発現データに各実験条件と以後用いる略号を表1に示す。遺伝子発現データは Percellome method により標準化した値を用い、さらに対数変換した後、 $p < 0.05$  を有意なデータとして採用した。各時系列において、D0 をコントロール群として、各データセットのプロープに対する遺伝子発現量比(fold change)を算出し、以降の解析に用いた(数値データ)。ネットワークにマッピングするデータ(fold change)は Legend に示したように色変換し、表示した。

### 2. E2, TESTO, T4 と結合する核内リセプターによるカノニカルな転写制御の関係における遺伝子発現の観察

3種の合成ホルモンが結合する核内リセプター estrogen receptor(ER), dihydrotestosterone receptor (DHTR), thyroid hormone receptor(TR) により制御されることが報告されている遺伝子の発現を異なる時系列、用量に対して観察した。上記核内リセプターとその分子種をすべて端点(ER, ERa, ERb, ERR, ERRa, ERRb, ERRg, TR, TRa, TRa1, TRa2, TRb1, TRb2, DHTR)として、これらに制御されることが報告されている分子のネットワークを検索し(図 1A)、各データセットにおける数値データをマッピングした(図 1B)。検索条件:下流方向のみ、1パス、全分子リレーション

### 3. 実験条件の絞り込み

表1に示した、時系列及び用量のデータから、以降のネットワーク解析に適した条件を選定するため、各条件において、コントロールに比べて2倍以上有意に発現亢進及び低下した

分子の数と時系列、用量の関係を調べた(図2)。以下で生成するネットワークの端点として用いる条件は図2において、○で囲んで示した。

採用した条件(表1参照):

・E2: Mol.  
Up\_T2D2, T2D3  
Down\_T1D2, T1D3

・TESTO: Mol.  
Up\_T2D1  
Down\_T2D2, T2D3

・T4: Mol.  
Up\_not determined  
Down\_T2D2, T2D3

(Up; up-regulation (2 fold up or higher), Down; down-regulation (2 fold up or lower))

### 4. 各ホルモン作用に対する up-regulate または down-regulate するネットワークの生成

3で選定した条件において、各データセットでコントロールに比べて2倍以上有意に発現亢進または低下した分子を KeyMolnet 上で抽出し、周辺検索法によりネットワークを生成した。検索条件:上下流方向、1パス、全分子リレーション

同一化合物に対する別条件で生成したネットワークは AND 論理演算法を用い、複数ネットワークの共通部分を抽出し、各化合物作用により“up-regulate または down-regulate するネットワーク”とした。

### 5. 各化合物特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークの抽出

4で抽出した3種類の化合物に対する up-regulate または down-regulate するネット

ワークに、DIFF 論理演算法を用いて、差分ネットワークを抽出し、各化合物特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークを構築した。

### C. 研究結果

#### 1. E2, TESTO, T4 と結合する核内リセプターによるカノニカルな転写制御の関係における遺

##### 伝子発現の観察

ER, ERa, ERb, ERR, ERRa, ERRb, ERRg, TR, TRa, TRa1, TRa2, TRb1, TRb2, DHTR のすべてを端点として、これらに制御されることが報告されている分子をネットワーク検索、表示し(図 1A)、各データセットにおける数値データをマッピングすると、どの条件においても各核内リセプターに直接制御されることが報告されている分子の発現量は顕著には変化していなかった(図 1B、例:条件 T4, T1D1)。このため、各化合物作用に対して、遺伝子発現量の有意な変化を示す分子(上記核内リセプターと直接的な関係が報告されている分子に限らない)によるネットワーク生成が必要と考えた。

#### 2. 実験条件の絞り込み

以降に行うネットワーク解析において、適当かつ有効な時系列、用量の実験条件を絞り込むため、各データセットにおいてコントロールに比べて 2 倍以上有意に発現亢進または低下している分子数と時系列、用量の関係を調べたところ、3 種類の化合物の作用においては、一般的に時系列では T2(8 時間後のデータ)、用量は比較的高用量(D2, D3)で発現量の変化が認められたため、図 2 で示した 9 点のデータセットを以下の解析に用いることにした。

#### 3. E2, TESTO, T4 特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークの抽出

生成、抽出したネットワークの例は図 4C,D

にそれぞれ E2, TESTO 特異的に up-regulate したネットワーク、図 5A, B, C にそれぞれ E2, TESTO, T4 特異的に down-regulate したネットワークとして示した。up-regulate したネットワークについては T4 によるネットワークは作成できなかったが、上記、全 5 種類のネットワークの canonical な“Pathway”および Gene Ontology の関与度をサマリーシート機能を用いて算出、表示した(表 2-6)。図と表はそれぞれ図 4C—表 2、図 4D—表 3、図 5A—表 4、図 5B—表 5、図 5C—表 6 に対応しているが、図に表示したネットワークは抽出したネットワークの典型的な部分である。

### D. 考察

今回実験に用いた合成ホルモンに結合することが知られている 3 種類の核内リセプターと、それらに制御される分子の遺伝子発現をそれぞれの条件において観察すると、コントロールに比べて著しい変化はほとんど認められなかった。このことはこれらの化合物の作用に対して、化合物が結合する転写因子が活性化し、これらの転写因子に制御されることが報告されている遺伝子の発現にある程度変化が認められるであろうという予想を覆す結果であった。しかし、今回の実験データから化合物の刺激に対して、遺伝子発現に変化が認められる分子は転写因子と直接関係が知られている分子以外にも相当数あったため、毒性予測のみならず、化合物の作用メカニズム解析においても単にこれまで報告されている知見における観察(転写因子—制御遺伝子)だけでは不十分であると考えられた。そこで、今回発現量に有意な変化が認められた分子に基づいて、ネットワークを生成し、さらに化合物作用特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークの抽出を試みたところ、幾つかの特徴的なネットワークが構築できた。現在のところ、3 種類の既知化合物 DNA マイクロアレイデータより化合物特異的なネットワークを生成、抽出したが、さらに多くの learning study を行う必要があると考えられる。



## E. 結論

化合物特異的に up-regulate または down-regulate するネットワークが簡便かつ効率的に抽出できたことから、今後さらに他の化合物作用に対する特徴的なネットワークを蓄積することによってパターンニングし、内分泌かく乱の可能性のある化合物に対しても、マイクロアレイデータからネットワークが生成でき、そのネットワークの類似性によって、毒性作用メカニズムの推定、毒性予測が行える可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 誌上発表

Sato H, Ishida S, Toda K, Matsuda R, Hayashi Y, Shigetaka M, Fukuda M, Wakamatsu Y, Itai A, New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet. Curr. Drug Dis. Technol., 2(2), 89-98, 2005

板井昭子, 佐藤陽美, KeyMolnet-ポストゲノム時代の新しい情報統合プラットフォームとネットワーク解析, 遺伝子医学 MOOK2 疾患プロテオミクスの最前線, 140-145 (メディカルドゥ) 2005

### 2. 学会発表

Society of Toxicology 45th Annual meeting, San Diego, CA, USA (2006. 3.8)

Network analysis for toxicity prediction of endocrine disruptors using KeyMolnet

(#2128) H. Sato, J. Kanno, A. Takagi, A. Ono, R. Taniguchi, M. Ogura, A. Itai

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他




なし

表 1 実験条件と略号

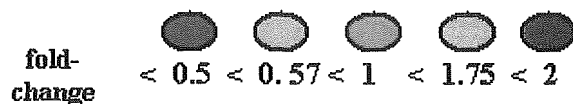
Time&Dose	Ethynyl estradiol(E2)	Teststerine propionate(TESTO)	Levothyroxine(T4)
T1	2h	2h	2h
T2	8h	8h	8h
T3	24h	24h	24h
D0(cont.)	0 ug/kg	0 mg/kg	0 ug/kg
D1	1	1	3
D2	3	3	10
D3	10	10	30



## Legends

### Molecule Symbols






-  protein
-  complex
-  small molecule

### Symbol Colors (Fold change)



-  no significance
-  no array data

### Relations

-  activate or increase
-  inhibit or repress
-  others(regulate)
-  via direct interaction
-  via expression

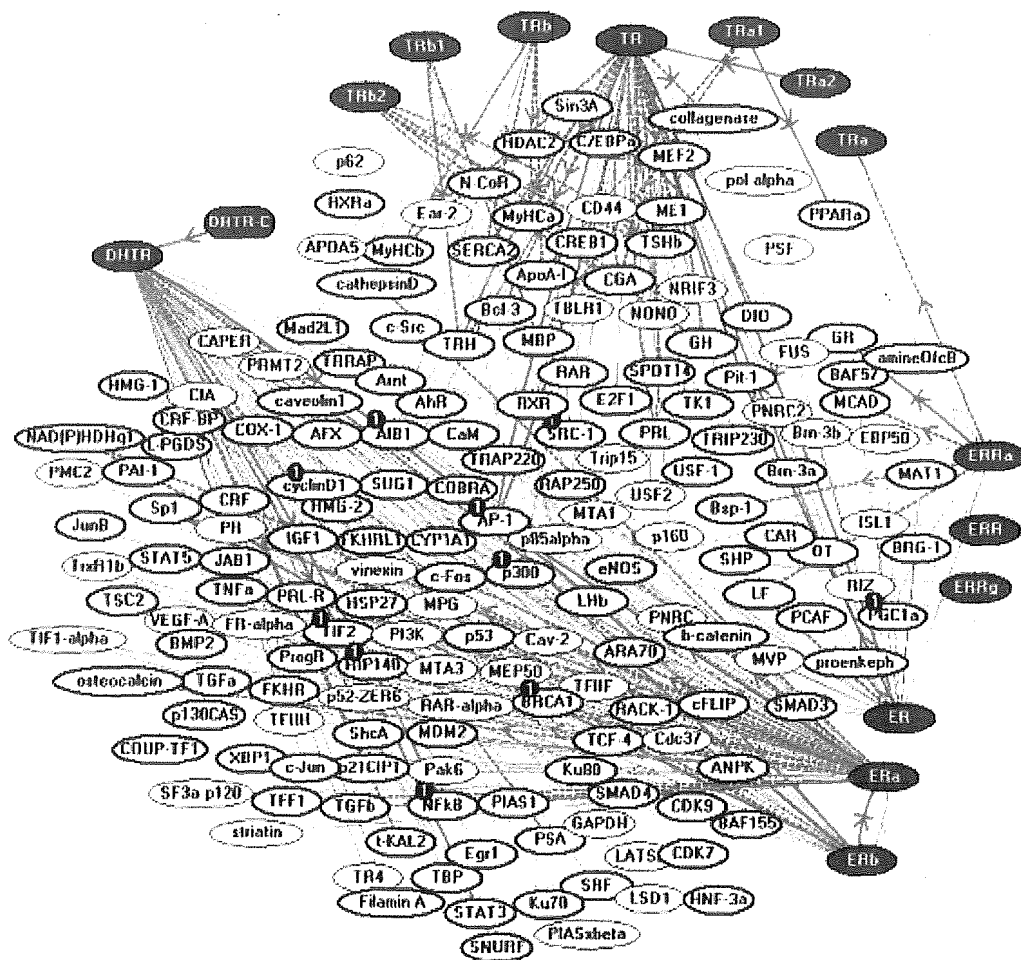


図 1A ER, DHTR, TR による発現制御の関係

KeyMolnet により、ER, ERa, ERb, ERR, ERRa, ERRb, ERRg, TR, TRa, TRa1, TRa2, TRb1, TRb2, DHTR をすべて端点として、これらに制御されることが知られている分子をネットワーク検索し、表示した。分子の肩に①とある分子は複数の転写因子に制御される分子。

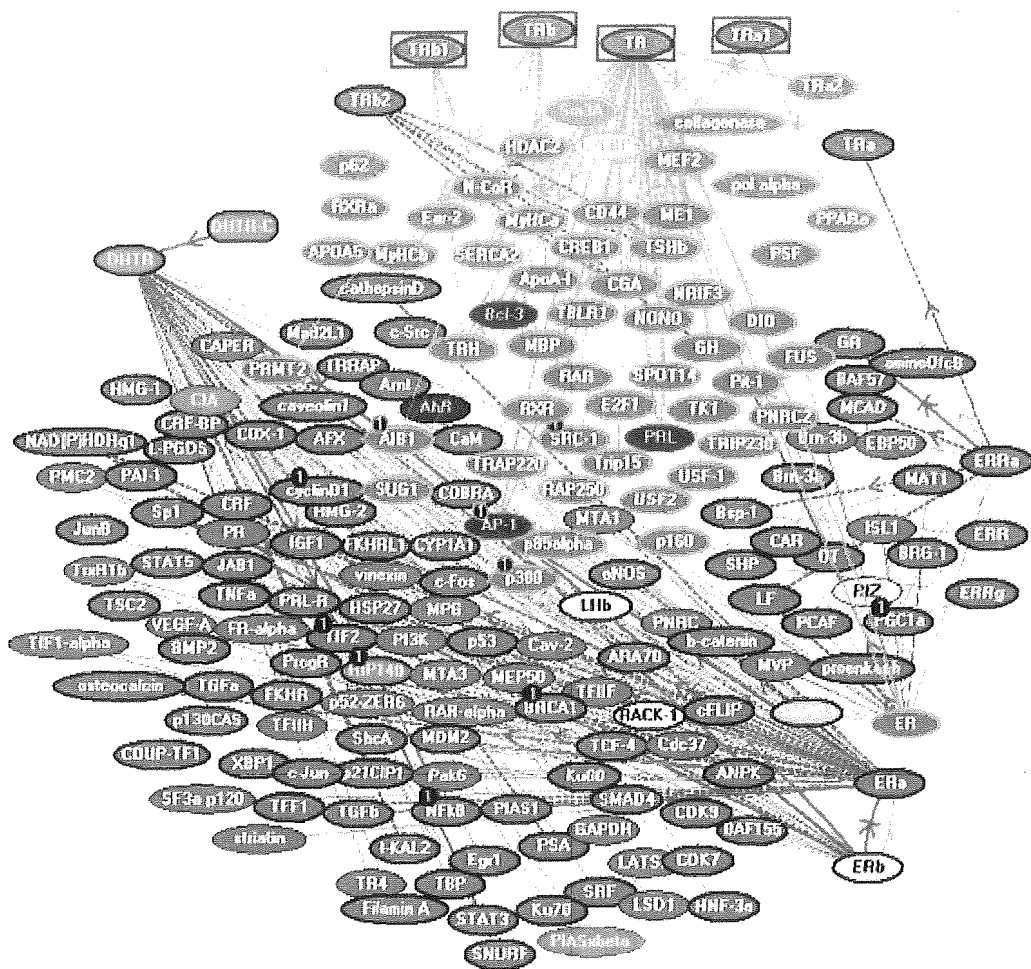


図 1B ER, DHTR, TR による発現制御分子の遺伝子発現量  
 全実験セット中、遺伝子の発現がコントロールに比べて亢進による変化が大きいデータセ  
 ットを図 1A のネットワークにマッピングした (例: 条件 T4, T1D1)。色表示は Legend 参  
 照。

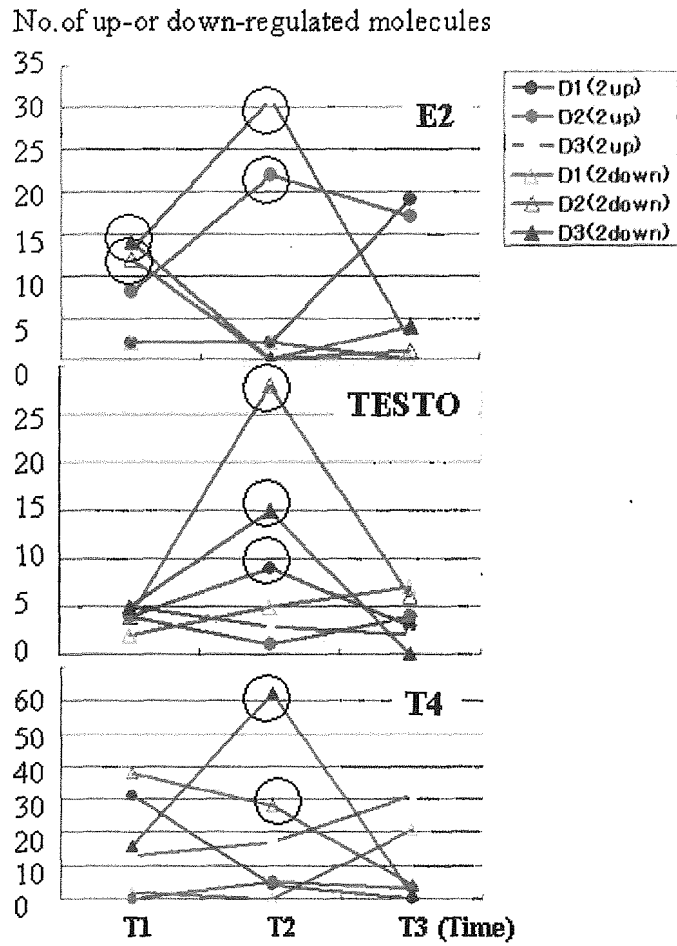


図2 各化合物の作用に対して有意に発現亢進または低下した分子の数と時系列、用量の関係

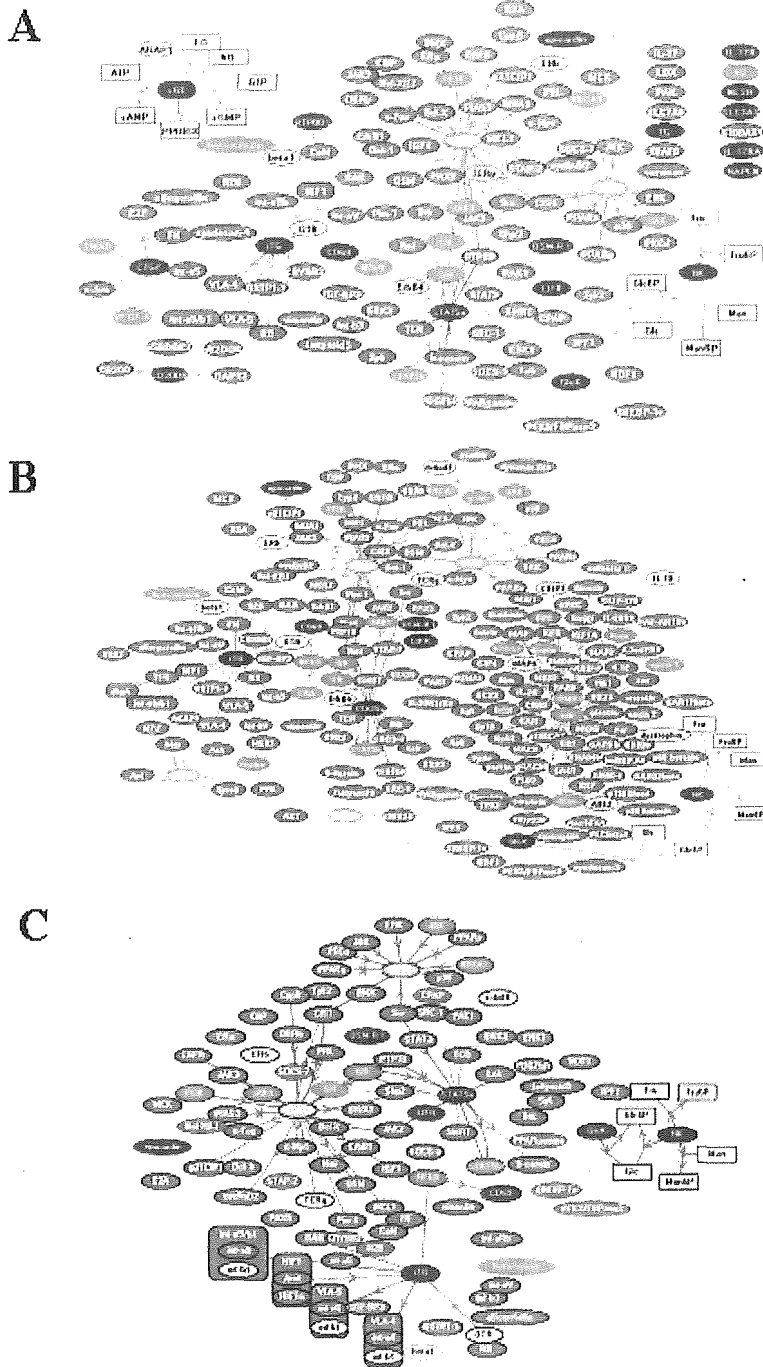


図3 E2作用に対して up-regulate するネットワーク

E2作用に対して有意に2倍以上発現亢進した分子を端点として、KeyMolnetの周辺検索法にてネットワークを生成した。Aは条件T2D2、BはT2D3による。CはさらにAND論理演算法を用いて、AとBのネットワークの共通部分を抽出した。



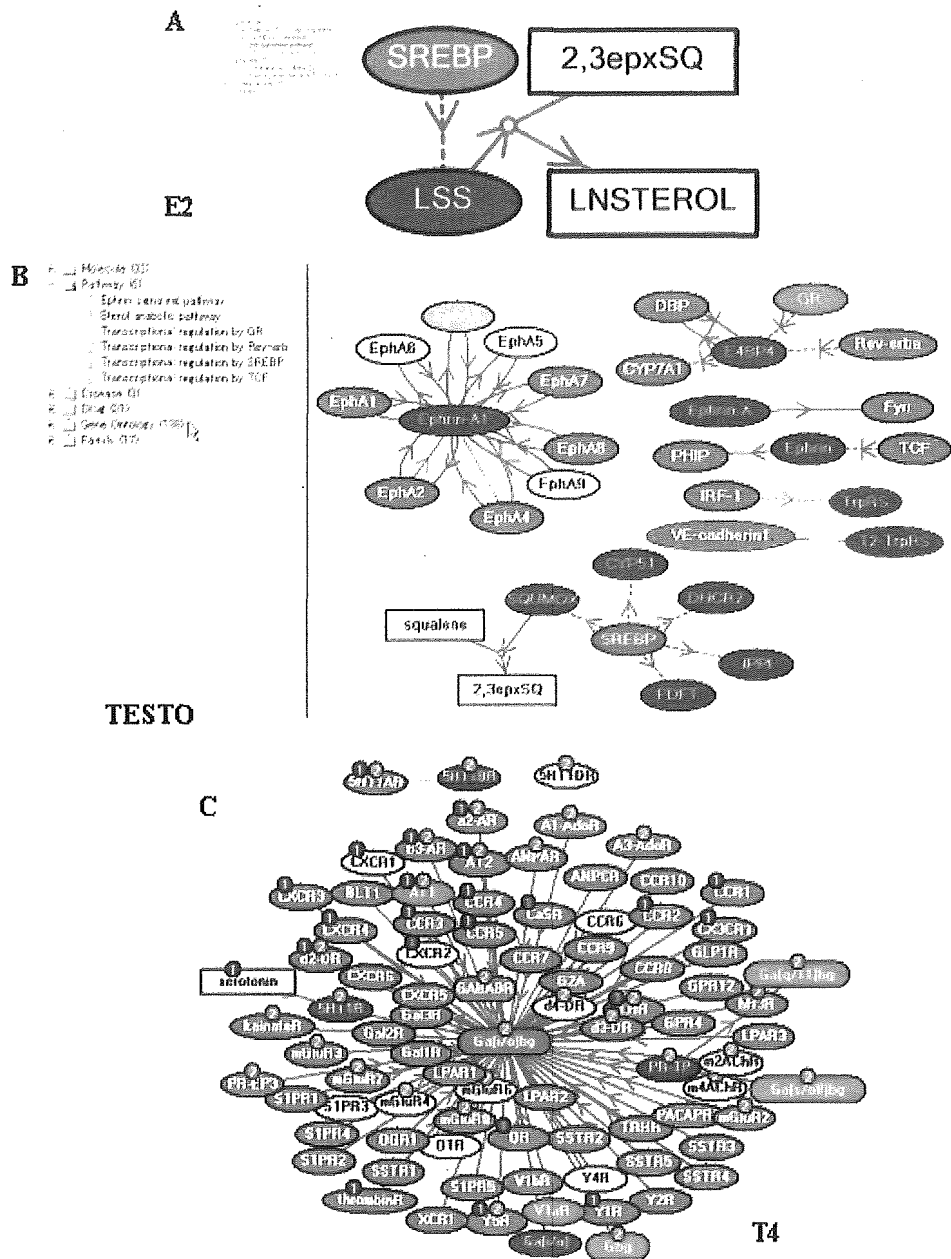


図5 E2, TEST, T4 作用特異的に down-regulate するネットワーク (DIFF 演算法による)  
 図3と4に示した方法と同様な操作により E2, TEST, T4 作用特異的に down-regulate する  
 ネットワークを抽出した。



表 2 E2 特異的に up-regulate したネットワークのサマリー

### Pathway

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	Transcriptional regulation by STAT	54.247	0.16	0.167
2	Prolactin signaling pathway	21.342	0.064	0.151
3	IL-5 signaling pathway	14.43	0.032	0.25
3	EPO signaling pathway	14.43	0.032	0.25
5	IL-3 signaling pathway	14.057	0.032	0.235
6	IL-9 signaling pathway	8.188	0.016	0.286
7	Glycogen anabolic pathway	7.786	0.016	0.25
8	IL-7 signaling pathway	6.849	0.016	0.182
8	GM-CSF signaling pathway	6.849	0.016	0.182
10	TPO signaling pathway	6.369	0.016	0.154

### Gene Ontology

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	signal transduction (GO:0007165)	48.779	0.615	0.032
2	cell communication (GO:0007154)	39.526	0.639	0.028
3	integrin-mediated signaling pathway (GO:0007229)	31.348	0.098	0.164
4	regulation of cellular process (GO:0050794)	28.898	0.516	0.028
5	JAK-STAT cascade (GO:0007259)	28.461	0.074	0.231
6	regulation of cellular physiological process (GO:0051244)	28.342	0.492	0.029
7	intracellular signaling cascade (GO:0007242)	26.187	0.295	0.039
8	regulation of physiological process (GO:0050791)	25.57	0.492	0.027
9	regulation of biological process (GO:0050789)	23.509	0.516	0.026
10	cell-matrix adhesion (GO:0007160)	22.928	0.09	0.112

表 3 TESTO 特異的に up-regulate したネットワークのサマリー

### Pathway

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	Rho family signaling pathway	4.662	0.069	0.019
2	Transcriptional regulation by PXR	4.011	0.034	0.048
3	Transcriptional regulation by HIF	2	0.034	0.011
4	Transcriptional regulation by NFkB	1.752	0.034	0.009
5	Ephrin signaling pathway	0.808	0.034	0.004

### Gene Ontology

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	Intracellular protein transport (GO:0006886)	20.623	0.238	0.036
2	protein transport (GO:0015031)	19.448	0.262	0.029
3	establishment of protein localization (GO:0045184)	18.721	0.262	0.028
4	protein localization (GO:0008104)	18.545	0.262	0.027
5	intracellular transport (GO:0046907)	15.79	0.238	0.025
6	clathrin cage assembly (GO:0048268)	15.372	0.048	1
7	Golgi to endosome transport (GO:0006895)	13.791	0.048	0.667
8	endocytosis (GO:0006897)	13.674	0.143	0.041
9	regulation of endocytosis (GO:0030100)	12.615	0.071	0.136
10	vesicle-mediated transport (GO:0016192)	10.737	0.167	0.023

表 4 E2 特異的に down-regulate したネットワークのサマリー

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	Transcriptional regulation by SREBP	7.013	0.5	0.027
2	Sterol anabolic pathway	6.937	0.5	0.026

### Gene Ontology

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	steroid metabolism (GO:0008202)	9.884	0.5	0.017
2	cellular lipid metabolism (GO:0044255)	7.247	0.5	0.007
3	lipid metabolism (GO:0006629)	6.646	0.5	0.006
4	steroid biosynthesis (GO:0006694)	5.346	0.25	0.019
5	cholesterol metabolism (GO:0008203)	5.012	0.25	0.015
6	sterol metabolism (GO:0016125)	4.949	0.25	0.014
7	lipid biosynthesis (GO:0008610)	4.127	0.25	0.008
8	alcohol metabolism (GO:0006066)	3.638	0.25	0.006
9	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006357)	3.068	0.25	0.004
10	transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006366)	2.287	0.25	0.002

表 5 TESTO 特異的に down-regulate したネットワークのサマリー

### Pathway

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	Ephrin signaling pathway	71.25	0.556	0.073
2	Transcriptional regulation by SREBP	22.056	0.139	0.135
3	Transcriptional regulation by Rev-erb	20.92	0.111	0.222
4	Transcriptional regulation by TCF	3.131	0.028	0.031
5	Sterol anabolic pathway	2.864	0.028	0.026
6	Transcriptional regulation by GR	1.788	0.028	0.011

### Gene Ontology

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	sterol metabolism (GO:0016125)	27.515	0.219	0.1
2	sterol biosynthesis (GO:0016126)	25.473	0.156	0.208
3	steroid biosynthesis (GO:0006694)	24.806	0.188	0.113
4	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)	23.389	0.25	0.05
5	cholesterol metabolism (GO:0008203)	22.739	0.188	0.09
6	steroid metabolism (GO:0008202)	22.491	0.219	0.061
7	enzyme linked receptor protein signaling pathway (GO:0007167)	20.164	0.25	0.037
8	cholesterol biosynthesis (GO:0006695)	20.041	0.125	0.19
9	alcohol metabolism (GO:0006066)	18.273	0.219	0.04
10	lipid biosynthesis (GO:0008610)	17.404	0.188	0.048