

### 3. バリデーション試験に向けた予試験としての Chrysene 投与実験

実験では、検証用化合物群を用いたバリデーション試験に先立って、遺伝子傷害性肝発癌物質である chrysene を用いて予備的検討を行った。B6C3F1 マウスに化合物を単回腹腔内投与した後、4、16、20、24 および 48 時間後に肝臓を回収した。その後 total RNA を抽出し、同様に TLDA による解析を行った。

### 4. 遺伝子傷害性スクリーニング系としての TLDA カードのバリデーション試験のための新たな化合物群の投与

スクリーニング系としての TLDA カードに選んだ遺伝子の有効性を評価するための新たな化合物として以下のセットを選んだ。

遺伝子傷害性物質として、肝発癌性をもつ 4,6-diaminotoluene, 4-(dimethylamino)azobenzene, N-nitrosomorpholine, quinoline の 4 化合物を、非遺伝子傷害性物質として、肝発癌性を有する clofibrate, 1,4-dichlorobenzene と肝毒性物質である 1-naphthylisothiocyanate および非肝毒性物質である glycine の 4 化合物を用い、これら 2 群の化合物を、肝臓における選択した遺伝子の発現解析により予測可能かどうかを検証することにした。B6C3F1 マウスに各化合物を単回腹腔内投与した後、4 時間後および 48 時間後に肝臓を回収した。なお、投与量の設定に関しては、遺伝子傷害性物質はトランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異試験において、単回処理にて肝臓での変異頻度の上昇が期待できる用量を用いた。また、それ以外の物質については、LD50 の半分量もしくは、毒性のない化合物については上限として 1g/kg を用いた。本研究室においては、抽出し

た total RNA より cDNA を調整し、48 遺伝子を搭載した TLDA を用いて、遺伝子発現の解析を行った。同時に、青山学院大学を始めとする共同研究参加機関においては、独自に設計したリアルタイム PCR 用のプライマーセットを配布し、SYBR Green によるリアルタイム RT-PCR (2step) 法により、指標遺伝子の発現変化を解析した。

### 5. oligo-CGH アレイを用いた形質転換試験用 Balb3T3 細胞の遺伝的同一性評価

CGH 解析用アレイとして、Nimblegen 社から提供されているマウス用 Whole Genome NADEMO アレイを用いた。このアレイにはアレイ一枚あたり 39 万個のオリゴヌクレオチド (50mer) プローブがマウス全染色体上からデザインされている。アレイ上にはオリゴマーがデジタルミラーを用いたマスクレス法により固層合成されている。

用いた細胞は、日本国内および欧州 (ECVAM) において形質転換試験用に使用されている同じ起源の Balb3T3 細胞を、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所の田中憲穂博士および佐々木澄志博士のご厚意により提供いただいた。委託 CGH 解析においては、細胞より抽出したゲノム DNA 1 $\mu$ g を、超音波処理によりランダムに 500-200bp のサイズに断片化した。その後、Cy3 (HL60) または Cy5 (コントロール) ラベルしたランダム nonamer の存在下 98 $^{\circ}$ C にて変性し、氷冷後、100unit の Klenow fragment および dNTP (6mM) と 37 $^{\circ}$ C 2 時間インキュベーションしてラベル化した。0.5M EDTA (pH8.0) を用いて反応を止め、イソプロパノールにて沈殿後水に再懸濁したのち、二つの溶液 15 $\mu$ g 相当を混合した。遠心濃縮機にて乾固後、40 $\mu$ g/l の NimbleGen

Hybridization Buffer に溶解し、95°Cにて5分変性後 42°Cにし、18 時間マイクロアレイスライドにハイブリダイズさせた。アレイは NimbleGen Wash Buffer System にて洗浄後、遠心によりただちに乾燥させた。

GenePix4000B マイクロアレイスキャナーを用いて 5 $\mu$ m の解像度にてスキャニングを行いイメージデータを取得し、NimbleScan 2.0 extraction software にて、数値データとした。データ解析には、専用の SignalMap ソフトウェアを用いて、染色体上の2サンプル間のシグナル比を可視化し、増減の判定を行った。

(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. TLDA による既存の GeneChip データの評価

遺伝子傷害特異的応答遺伝子 46 種類を搭載した TLDA カードを用いて、これまでに GeneChip 解析を行ったサンプルの解析を行い、それぞれのデータの再現性に関して検討を行った結果を図 2 に示す。発現の上昇する遺伝子、減少する遺伝子ともに全体として TLDA と GeneChip の結果は良く一致しており、両者の信頼性が確認された。

また、本解析の過程において、TLDA 法の再現性を確認する目的で、同一サンプルを用いた duplicate 実験間での Ct 値の相関性を検討した結果を図 3 に示す。異なるウェル間の Ct

値は非常によい相関性を示し、TLDA カードによるデータの高い再現性が示された。3 ウェル以上の replicate を用いた解析が標準的プロトコールとして推奨されているが、2 ウェル以下でも十分信頼性のあるデータが得られることがわかった。

### 2. バリデーション試験に向けた予試験としての chrysene 投与実験

Chrysen 処理を行ったマウスより得られた肝臓における遺伝子発現変化を、遺伝子傷害性との関連性が示唆される 46 遺伝子に関して TLDA カードを用いて解析した結果を図 4 にまとめた。

20 時間のコントロールの一匹のデータを基準に  $\Delta$ Ct 値を算出し、各時間におけるコントロール群および chrysene 処理群の平均値の比より発現比を求めた。発現の減少する例がいくつか見られたが、全体としてあまりきれいなレスポンスは得られなかった。また、マウス個体間でのデータのばらつきが大きかった。

バリデーションのための化合物群については既に投与を終了し、total RNA の抽出、cDNA 合成のステップまで進んでおり、来年度の報告書においては、バリデーションの結果についてまとめて報告できる予定である。

### 3. oligo-CGH アレイを用いた形質転換試験用 Balb3T3 細胞の遺伝的同一性評価

欧州(ECVAM)および日本において形質転換試験用に使われている Balb3T3 細胞について、そのゲノムを比較するため、各細胞より抽出したゲノム DNA を用いて、Mouse Whole Genome CGH アレイを用いた解析を行った。それぞれの細胞から抽出した DNA から調製したプローブを競合的に CGH アレイ上にハイブ

りさせた際のシグナル強度比から、コピー数変化がある可能性のある部分が、表3のように抽出された。CGH アレイ上のオリゴマーは 50bp であり、それぞれ、5,000, 50,000, 100,000, 250,000bp あたりのシグナル強度の平均値を元に、ソフトウェア的にシグナル変化ありと判断されたセグメントの数が表中に示されている。この中で、各部位について raw data のシグナル値を吟味したところ、4 番、5 番、10 番染色体に関しては、明らかにシグナル値の変化する領域が存在する事を確認した。この領域のシグナル値の変化を図5に示す。4 番染色体では、ECVAM 使用の細胞において長腕側にコピー数の増加領域が観察された。また5番染色体においては、短腕末端部における欠失が認められた。さらに、10 番染色体では、長腕側に短い欠失領域が二つ存在し、全体は5つのセグメントに分かれていることが確認できた。表3におけるこれ以外の部分については、検出された領域におけるプローブ数が少ないため、有意な変化であるとは認められず、擬陽性であると判断した。

増減が確認された3染色体上の4つの領域について、そこに存在する遺伝子群を UCSC のゲノムブラウザーを使って検索した結果を、図6に示す。5 番染色体などは数多くの遺伝子が存在しているが、リストアップされた遺伝子のなかで注目すべきものとして、10 番染色体の 10qD2 領域に存在する mdm2 遺伝子があげられる。Mdm2 遺伝子は、transformed mouse 3T3 cell double minute 2 遺伝子であり、その名前からも形質転換感受性との関連性が注目される。今後、定量的 PCR や FISH 法によりこの遺伝子のコピー数変化を確認するとともに、形質転換感受性との関連について検討を進めたい。

#### D. 考 察

GeneChip 解析データをもとに、46 遺伝子を遺伝子傷害性スクリーニングのための候補遺伝子として選択し、これらを搭載した 48x8 フォーマットのカスタムメイド TLDA カードを作製したが、TLDA カードを使った RT-PCR 解析は、大変簡便かつ迅速な手法であり、そのデータの再現性も高いことがわかった。かねてより、GeneChip データの信頼性は高いと言われていたが、今回の TLDA を使った確認試験からも両者のデータは非常に良く一致しており、双方のデータの信頼性が担保された。一部遺伝子において、反応性の異なるサンプルも散見されたが、RT-PCR 用には一ヶ所のプローブのみが設計されている影響もあるものと考えられる。また、全体として変化量は TLDA の方が大きい傾向にあり、より高感度な手法としての期待がかかる。

Chrysenne を用いた予備的検討の結果、GeneChip 解析で得られていたようなきれいなレスポンスは見られなかったが、これは、各マウス個体でのデータがばらついていたことに起因すると考えられる。コントロール群のみの発現値においてばらつきが見られたため、比の値の信頼性は低いと考えられる。また、遺伝子によっては、Ct の大きいもの即ち増幅の悪い遺伝子も含まれており、これらのデータの信頼性も低いと考えられる。今後は何らかデータの質を評価するパラメータを設定する必要があると考えられる。

バリデーションのための化合物セットによる解析においてはこれらの点を考慮しデータ解析を行うことにより、選択した遺伝子およびスクリーニング系の有用性に関して検討したい。

CGH アレイを使った解析からは、同一起源

の細胞であるが、違う場所にて維持された事によるゲノムコピー数の変化が簡便に検出できた。該当部位の遺伝子のコピー数変化が、形質転換感受性の差の直接の原因になっているかは今のところ不明ではあるが、欠損領域に存在する遺伝子として、p53とも関連のあるmdm2遺伝子がひっかかって来たことは注目しに値する。もともとこの遺伝子は、形質転換したマウス3T3細胞にて、DM染色体として増幅していた遺伝子であり、形質転換との関連性は高いと予想される。Mdm2はp53遺伝子のネガティブレギュレーターとして、細胞の増殖を促進するがん遺伝子として知られている。もともとの細胞においてコンスティテューティブにmdm2が活性化されているという報告もあり、この遺伝子のコピー数が増えていたとすると、その不安定性からコピー数変化が容易に起きたと考えることもできる。今後は、FISH等を用いた解析により、mdm2遺伝子自身のコピー数の変化を各細胞株にて確認したい。もし、mdm2遺伝子のコピー数の変化により、形質転換感受性に差があることがわかれば、今後そのコピー数をモニタリングし、クオリティーコントロールすることにより、より統一された形質転換試験データがえられることが期待できる。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危惧情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase Ci in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.

Zhan, L., Honma, M., Wang, L., Hayashi, M., Wu, D., Zhang, L., Rajaguru, P., Suzuki, T. Microcystin-LR is not Mutagenic in vivo in the  $\lambda$  /lacZ Transgenic Mouse (Muta™Mouse). *Genes and Environment*, 28: 68-73, 2006.

Dertinger, S.D., Bishop, M.E., McNamee, J.P., Hayashi, M., Suzuki, T., Asano, N., Nakajima, M., Saito, J., Moore, M., Torous, D.K., Macgregor, J.T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. *Toxicol Sci.* 94: 83-91, 2006.

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.*, 603, 151-158 (2006)

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell

- lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)
- Umebayashi, Y. Honma, M., Abe, T., Ryuto, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2006)
- Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)
- Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)
- Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)
- Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, in press (2007)
2. 学会発表
- 田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、長尾拓、山口照英 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の品質管理に関するゲノムプロファイリング 日本薬学会第 127 年会 (2007.3)
- 豊田淑江、押澤正、石井明子、鈴木孝昌、山口照英 Thrombopoietin(TPO)による AC133 陽性細胞より分化する血管内皮前駆細胞 (EPC)の分化促進作用 日本薬学会第 127 年会 (2007.3)
- 鈴木孝昌、欒 洋、田邊思帆里、佐藤陽治、小木美恵子、山口照英 ヒト間葉系幹細胞培養時の染色体安定性の解析 第 5 回日本再生医療学会総会 (2007.3)
- Takayoshi Suzuki Toxicogenomic approach in mutation research International conference on Biomarkers in Health and Environmental Management and XXXII EMSI Annual Meeting (2007.1)
- 鈴木孝昌、スレッシュ テイルパツティ、小木美恵子、山口照英、本間正充、欒 洋 染色体を覗ずに染色体を診る技術としての CGH および SNP アレイの有用性 日本環境変異原学会第 35 回大会 (2006.11)
- スレッシュ テイルパツティ、押澤 正、山田勉也、

- 佐伯憲一、山口照英、鈴木孝昌 プロテオミクスを用いた変異原研究に有用なバイオマーカーの探索 日本環境変異原学会第 35 回大会 (2006.11)
- T. Suzuki, Y. Luan, M. Honma, S. Thiruppathi, M. Kogi, T. Yamaguchi CGH AND SNP ARRAYS ARE POWERFUL TOOLS FOR CHROMOSOME ANALYSIS EMS Annual Meeting 2006 (2006.9)
- C. Furihata, K. Tobe, T. Watanabe, S. Maeda, M. Hirayama, M. Harada, M. Nakajima, S. Hamada, C. Namiki, T. Suzuki, Y. Nakachi, Y. Kondoh, T. Tashiro and C. Furihata Differentially expressed genes in mouse liver induced by N-nitroso carcinogenic compounds, phenobarbital and ethanol. 第20回国際生化学・分子生物学会 (2006.6)
- S. Yokokawa, D. Mulhern, Y. Ohshima, Y. Adachi, A. Kohara, T. Suzuki, H. Okuda, N. Miyata, S. Ninomiya T. Sudo Environmental factors outweigh drug-response factors at early time points in toxicogenomic experiments. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2006 年 7 月)
- 本間正充 In vitro コメット試験は遺伝毒性のエビデンスになりうるか? 日本環境変異原学会 MMS 研究会第 49 回定例会 (2006.5)
- Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and error-free nonhomologous end-joining for repairing DNA double strand breaks in human cells. 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)
- Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay—A possible candidate as a member of the standard test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar —Pros & Cons of Comet Assay— (2006.8)
- 本間正充、高島良生、安井学、谷田貝文夫、鈴木雅雄、林 真 低放射繊維による相同組換え修飾効果 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 谷田貝文夫、梅林志浩、本間正充、阿部知子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭、岩本正哉 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- 高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、安井学、林 真、本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)
- Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T., Masui T., Mizusawa H. High resolution genomic analysis of immortal human cells and tumor cells using array-based comparative genomic hybridization. Environmental Mutagen Society 37<sup>th</sup> Annual Meeting (2006.9)
- Luan Y., Honma M., Suresh T., Kogi M., Yamaguchi T., Suzuki T. CGH and SNP array are powerful tools for chromosome analysis. Environmental Mutagen Society 37<sup>th</sup> Annual Meeting (2006.9)

Matsufuji H., Chino M., Hayashi M., Honma M., Yamagata K. Genotoxicity of quercetine in the presence of reactive oxygen species using human lymphoblastoid TK6 cells. Environmental Mutagen Society 37<sup>th</sup> Annual Meeting (2006.9)

本間正充、鈴木雅雄、谷田貝文夫 染色体切断に対する放射線影響の検討 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)

梅林志浩、菅澤薫、本間正充、島津徹、鈴木ひろみ、石岡憲昭、岩本正哉、谷田貝文夫 放射線適応応答による突然変異の抑制 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本宇宙生物科学会第 20 回大会(2006.9)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Requirement of p53 for maintenance of chromosome integrity against DNA double strand breaks. DNA Repair 2006 (2006.9)

本間正充 DNA2 本鎖切断修復によるゲノム安定化機構 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

斉藤美香、高島良生、坂本浩子、林 真、松藤寛、山形一雄、本間正充 簡便な in vitro コメット試験法の確立とその評価 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

小山直己、加藤竜也、本間正充、林 真、増田修一、木苗直秀 ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

谷田貝文夫、梅林志浩、鈴木雅雄、岩本正哉 染色体特定部位 DSB の修復:低線量/低線量率ガンマ線照射による影響 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、林 真、本間正充 ライブセルイメージングによる小核の運命の追跡 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

松藤寛、千野誠、本間正充、林 真、山形一雄 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた亜硝酸ナトリウムと抗酸化剤の複合遺伝毒性 日本環境変異原学会第 35 回大会(2006.11)

Honma M. DNA double strand break inducing chromosome instability and its genetic consequences. International Conference on Biomarkers in Health and Environmental Management & XXXII Annual Meeting Environmental Mutagen Society of India (2007.1)

Honma M. DNA double strand breaks inducing chromosome instability in p53-deficient human cells. Key Stone Symposia -Genome Instability and Repair (2007.1)

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 2 TLDA カード用に選択した指標遺伝子

	Gene Symbol	Gene Name	RefSeq
1	Hamp2	hepcidin antimicrobial peptide 2	NM_183257.1
2	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1	NM_008341.2
3	Elovl6	ELOVL family member 6	NM_130450.2
4	Pasma3	proteasome (prosome macropain) subunit	NM_011184.2
5	Gsta2	glutathione S-transferase alpha 2 (Yc2)	NM_008182.2
6	Gstm3	glutathione S-transferase mu 3	NM_010359.1
7	Nono	non-POU-domain-containing octamer binding protein	NM_023144.1
8	Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	NM_010634.1
9	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	NM_010738.2
10	Glul	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	NM_008131.2
11	Lpp	LIM domain containing preferred translocation partner in lipom	NM_178665.3
12	Dscr1	Down syndrome critical region homolog 1 (human)	NM_019466.2
13	Camk1d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1D	NM_177343.3
14	Gatad2a	GATA zinc finger domain containing 2A	NM_145596.2
15	Dscr1	Down syndrome critical region homolog 1 (human)	
16	Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	NM_030210.1
17	Ddit4l	DNA-damage-inducible transcript 4-like	NM_030143.2
18	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1	
19	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	NM_029083.1
20	Sult1d1	sulfotransferase family 1D, member 1	NM_016771.2
21	Jun	Jun oncogene	NM_010591.1
22	St3gal5	ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 5	NM_011375.2
23	Slc4a4	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	NM_018760.1
24	Cyr61	cysteine rich protein 61	NM_010516.1
25	Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	NM_010786.2
26	Mbl2	mannose binding lectin (C)	NM_010776.1
27	Car3	carbonic anhydrase 3	NM_007606.2
28	Cyp4a14	cytochrome P450 family 4 subfamily a polypeptide 14	NM_007822.1
29	Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing class B2	NM_011498.2
30	Btg2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	NM_007570.2
31	Isg2011	interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	NM_026531.2
32	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	NM_010145.2
33	Eva1	epithelial V-like antigen 1	NM_007962.2
34	Lrp1	low density lipoprotein receptor-related protein 1	NM_008512.1
35	Mtss1	metastasis suppressor 1	NM_144800.1
36	Trp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	NM_021897.1
37	Sds	serine dehydratase	NM_145565.1
38	Phlda1	pleckstrin homology-like domain family A, member 1	NM_009344.1
39	Cyp2b10	cytochrome P450 family 2 subfamily b polypeptide 10	NM_009998.4
40	Phlda3	pleckstrin homology-like domain family A, member 3	NM_013750.1
41	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	NM_011817.1
42	Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	Gene mCG4326 (NM_010482.1)
43	Ccng1	cyclin G1	NM_009831.2
44	Hhex	hematopoietically expressed homeobox	NM_008245.2
45	Egfr	epidermal growth factor receptor	NM_207655.2
46	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	NM_007669.2
47	Bax	Bcl2-associated X protein	Gene mCG23178 Celera Annotation NM_007527.2
48	Hs99999901_s1	Eukaryotic 18S rRNA	

\*4 は GeneChip データより選択したコントロール遺伝子、48 は TLDA にあらかじめ組み込まれていたコントロール遺伝子

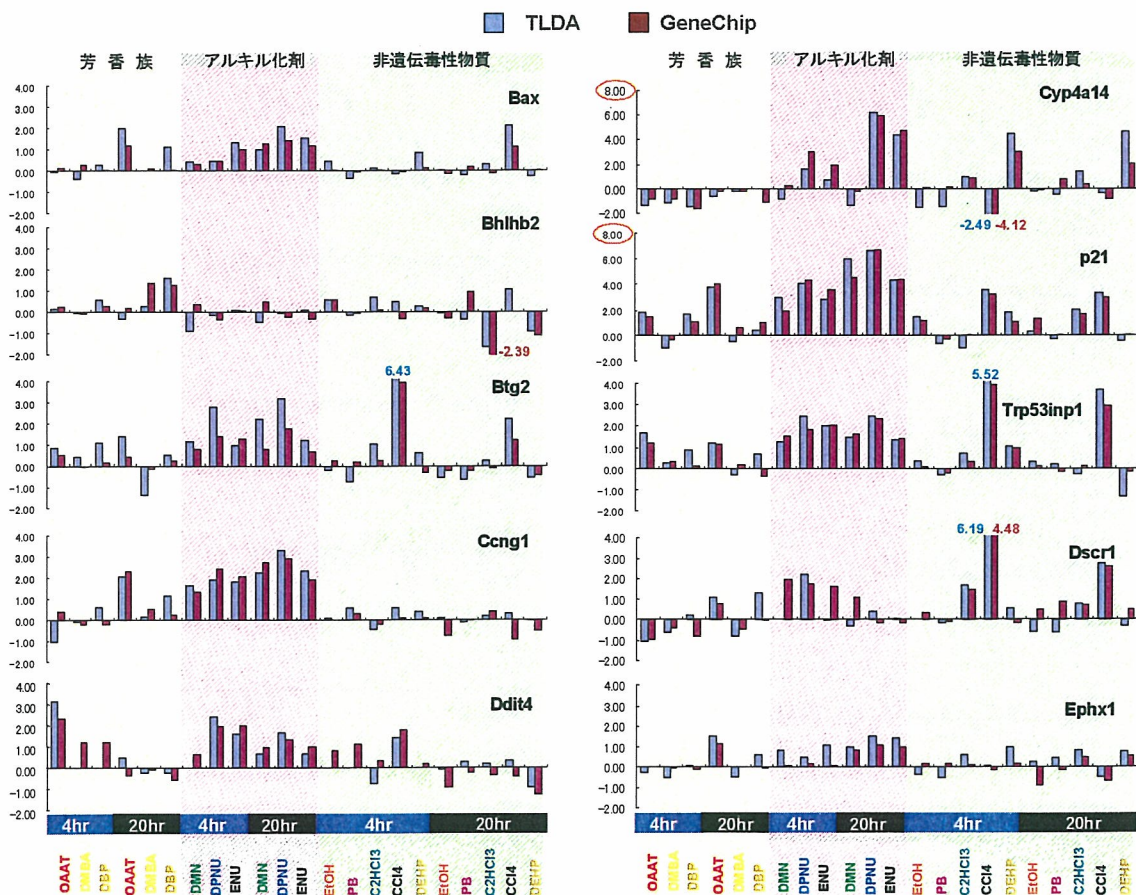
表 3 Oigo-CGH アレイ解析により得られた Balb3T3 細胞ロット間での遺伝子量変化

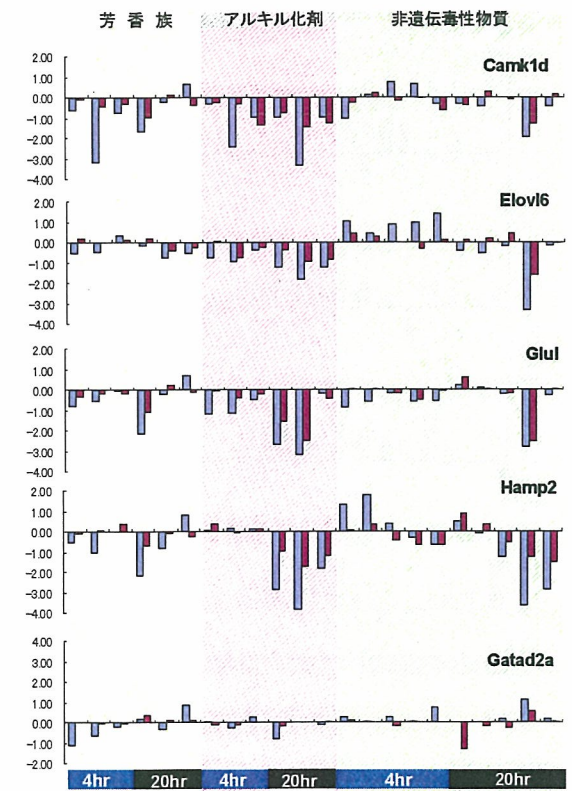
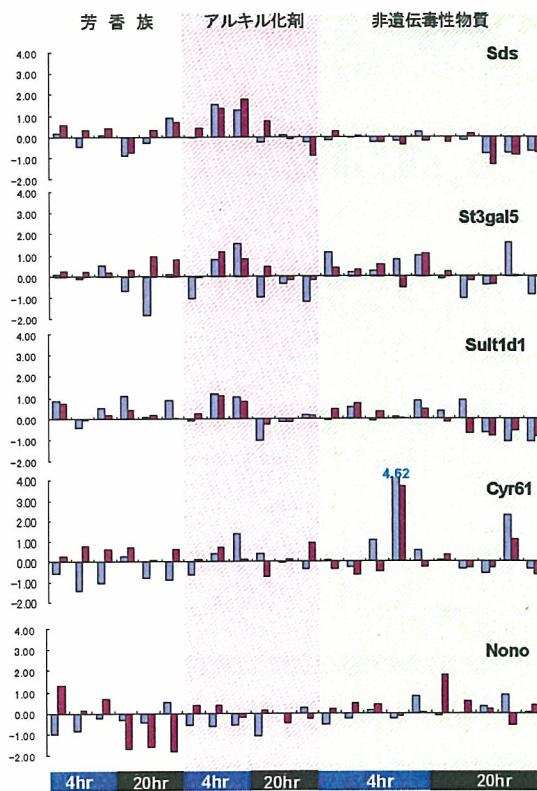
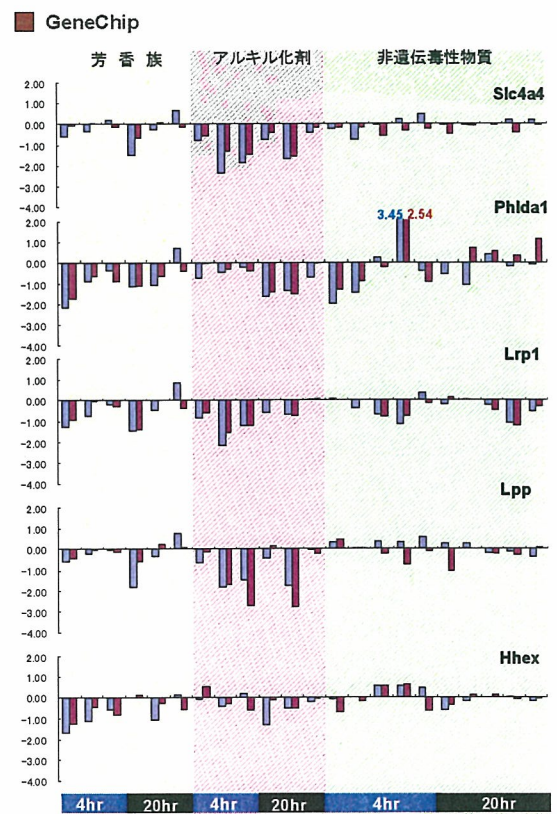
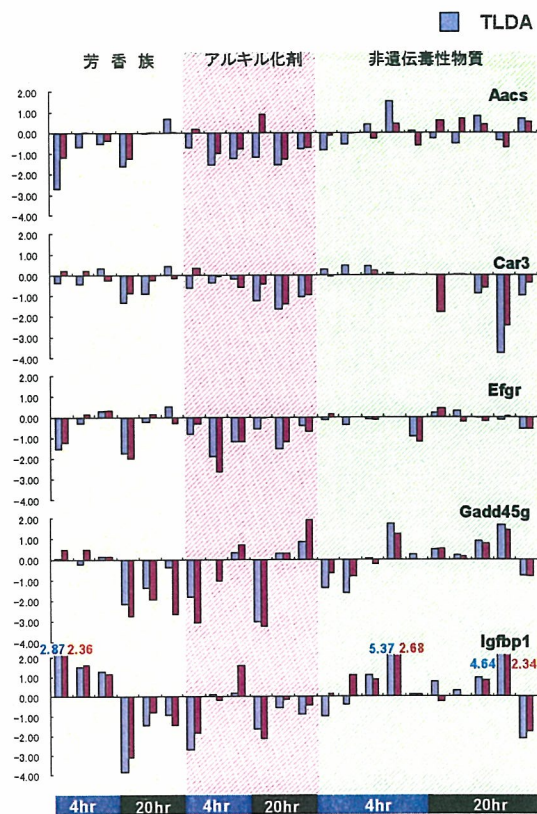
Chromosome	Segments				← 平均をとる単位	
	5000	50000	100000	250000		
1	1	1	1	1		
2	1	1	1	1		
3	1	1	1	1		
4	1	3	1	1	OK	↑
5	1	1	2	2	短腕末端	↑
6	1	1	1	1		
7	1	1	1	1		
8	1	1	1	1		
9	1	1	1	1		
10	1	3	4	1	del 2箇所	↓
11	1	1	1	1		
12	1	1	1	3	? プローブ少ない	
13	1	1	1	3	? プローブ少ない	
14	1	1	1	1		
15	1	1	1	1		
16	1	1	1	1		
17	1	1	1	1		
18	1	1	1	1		
19	1	1	3	1	? プローブ少ない	
X	1	1	1	1		
Y	1	1	1	1		

図1 TLDA カードの構成遺伝子

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
2	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a
3	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
4	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a
5	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
6	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a
7	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
8	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a
9	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
10	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a
11	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
12	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a
13	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
14	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a
15	Lpl1	Cng1	PHd1	Dscr1	Lpp	Sk44	Elov8	Eva1	Hamp2	Ly6a	H99999 S01_s1	Btg2	Mtsr1	Ca3	Btgal5	Igf1	Osm3	Bac	Mdm2	Igf201	Cy91	Eph1	Trp53np 1	Hhex
16	Cyp4a14	PHd3	Igf1	Dscr1	Mbz1	Sult1d1	Oas2a	Acs	Dd4	Egr	Camk1d	Nano	Oad45 g	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Oas2	Bhh2	Hrb1	Ola	Cd1e1a

図2 TLDA カードデータと GeneChip データの比較





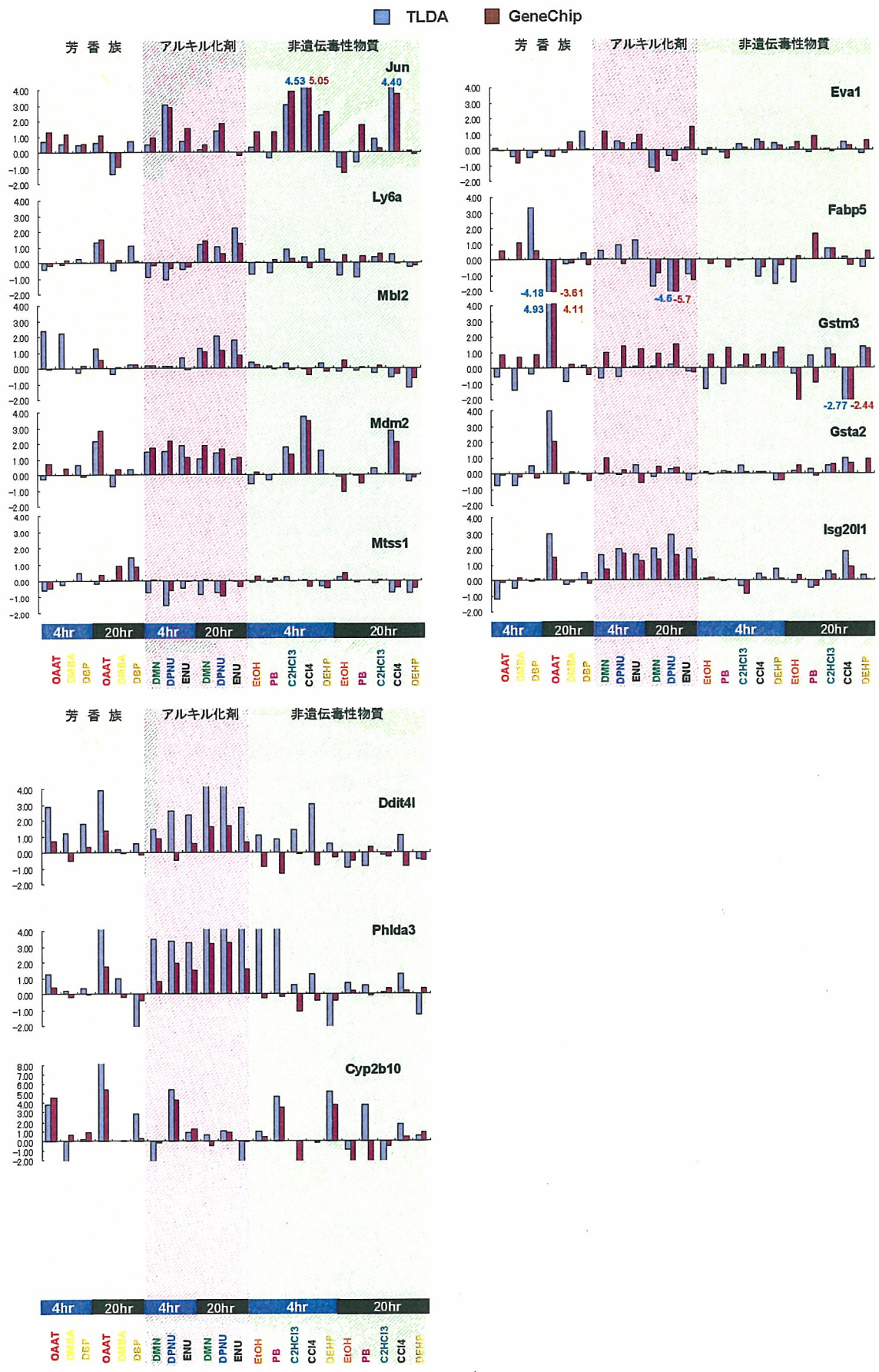


図3 TLDA カード duplicate ウェル間でのデータの再現性

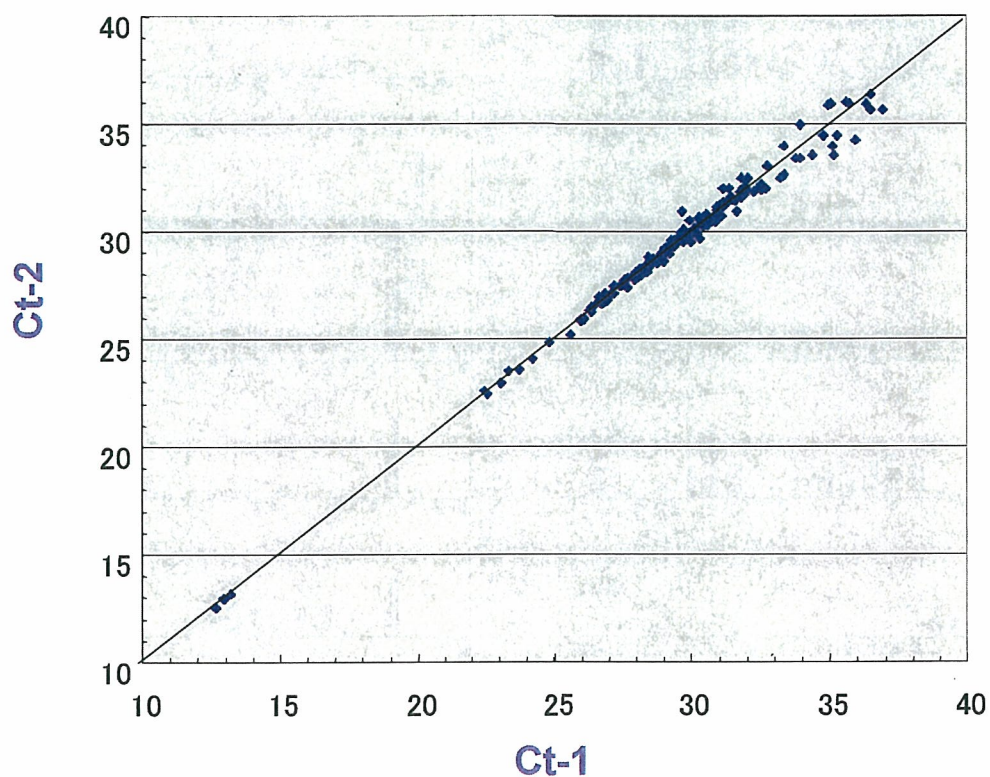
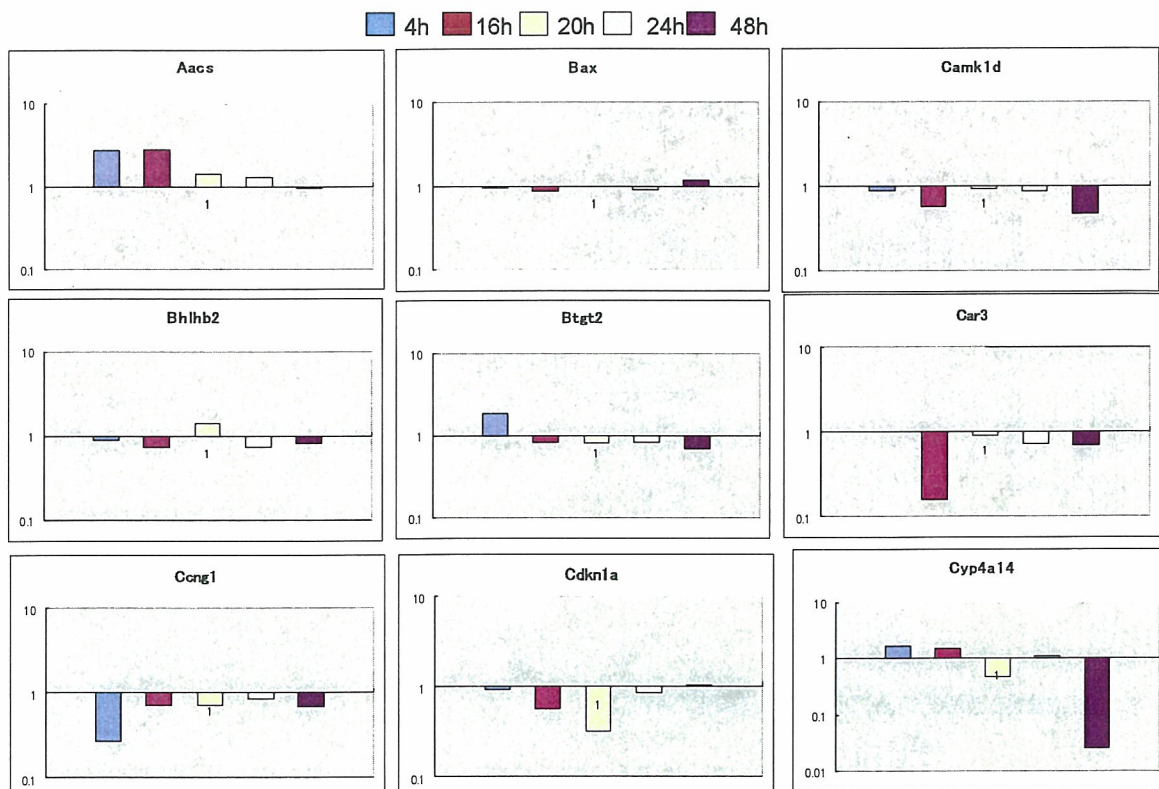
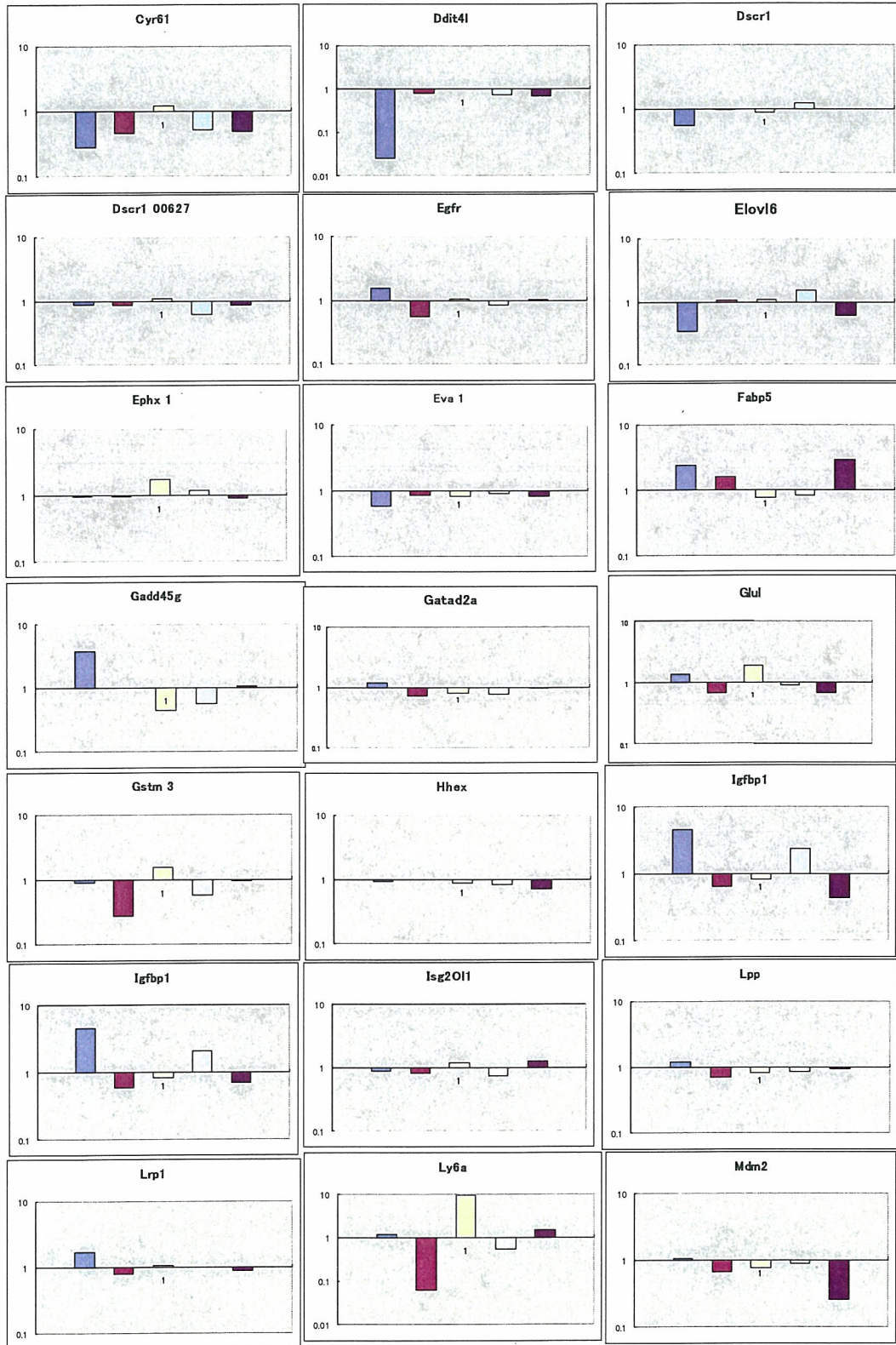


図4 TLDA を用いた Chrysene 投与マウス肝臓における遺伝子発現変化の解析



4h 16h 20h 24h 48h



4h 16h 20h 24h 48h

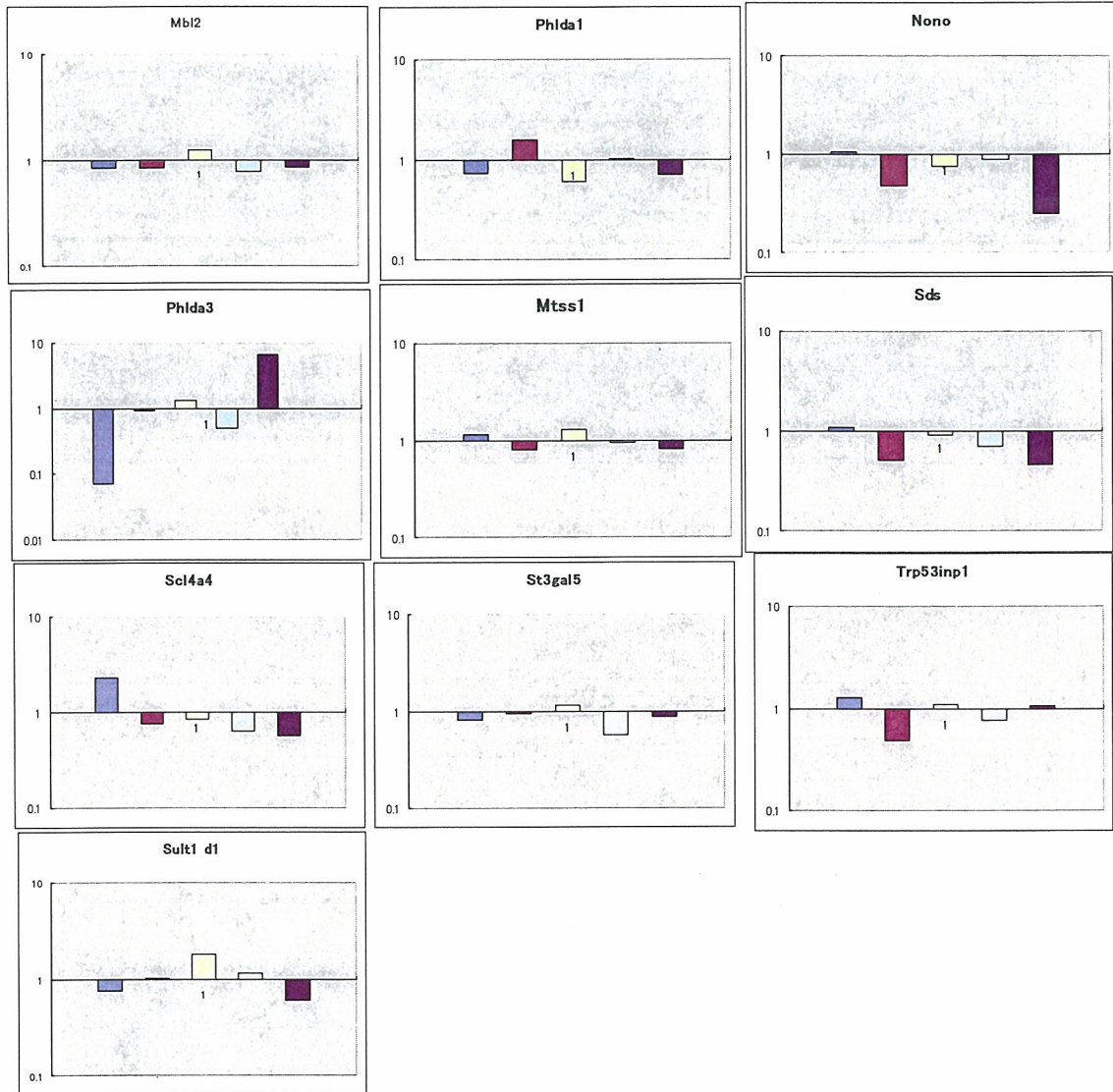




図5 CGH 解析により変化が見られた染色体領域

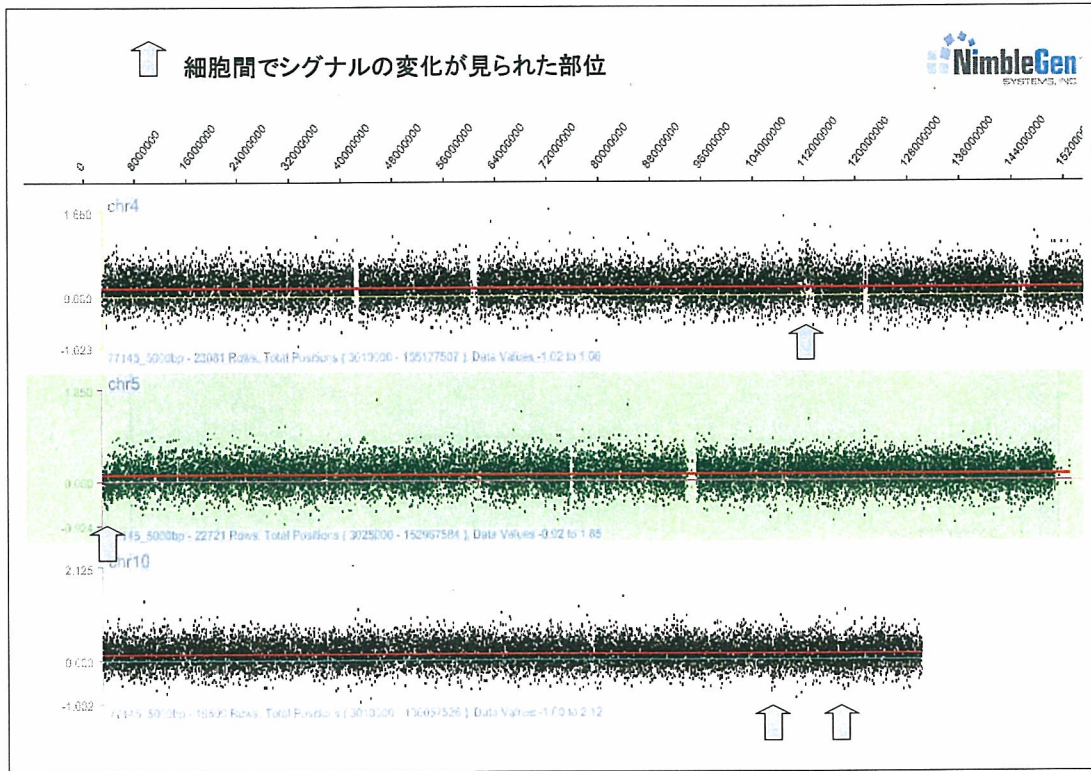
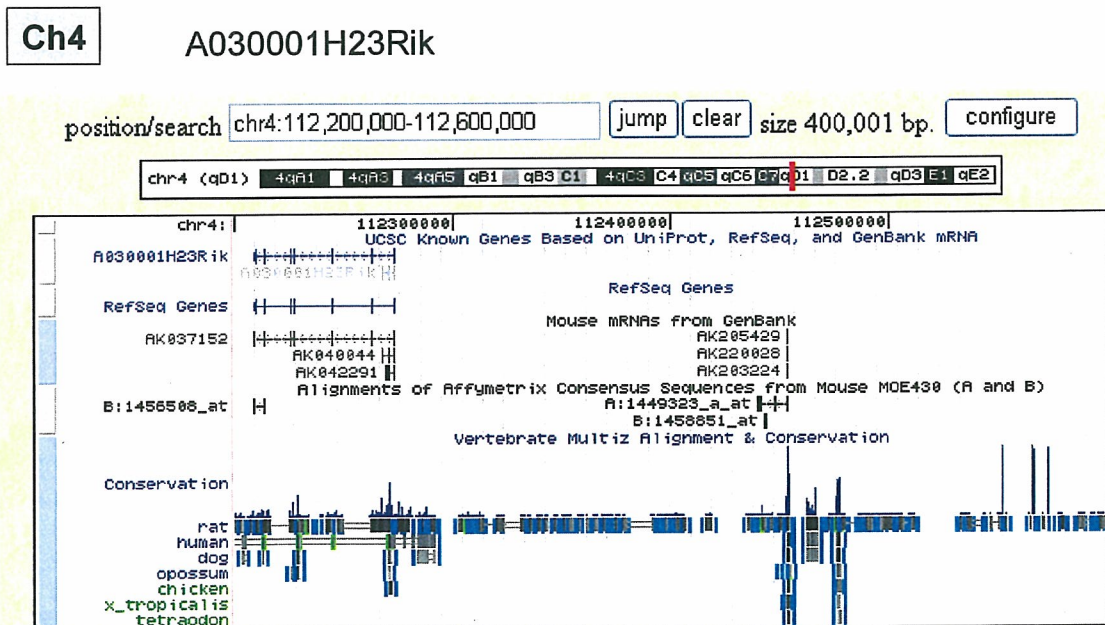


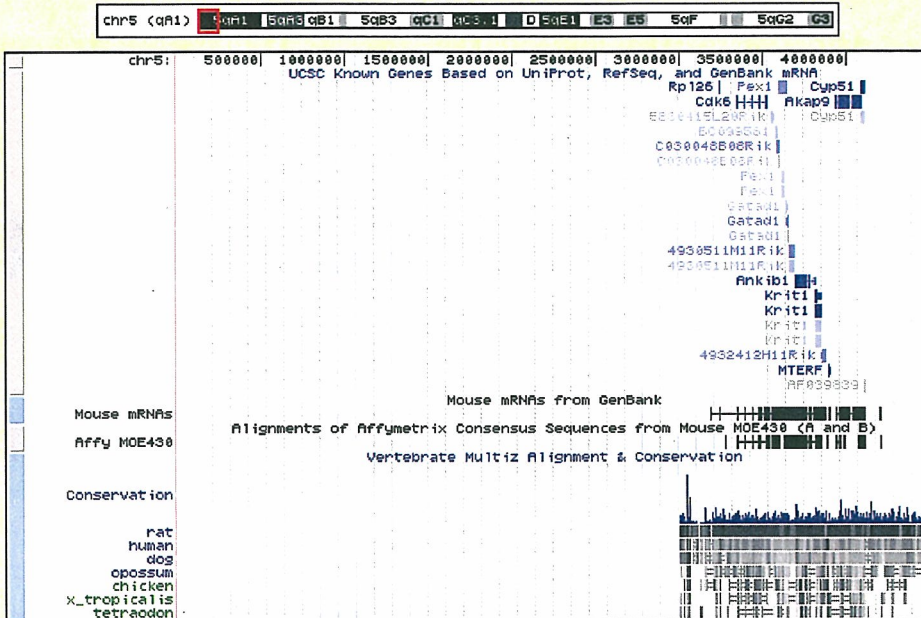
図6 コピー数変化の見られた各領域に存在する遺伝子



Ch5

Rpl26, Pex1, Cdk6, Cyp51, Akap9, 5830415L20Rik, BC099581, C030048B08Rik, Gatad1, 4930511M11Rik, Ankib1, Krit1, 4932412H11Rik, MTERF, AF039839

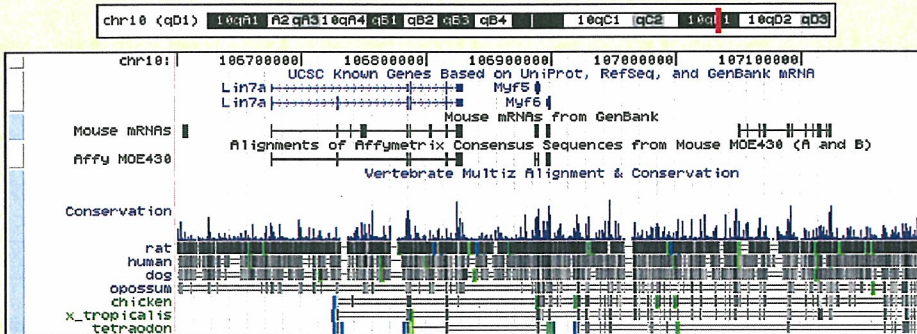
position/search chr5:1-4,500,000 jump clear size 4,500,000 bp. configure



Ch10

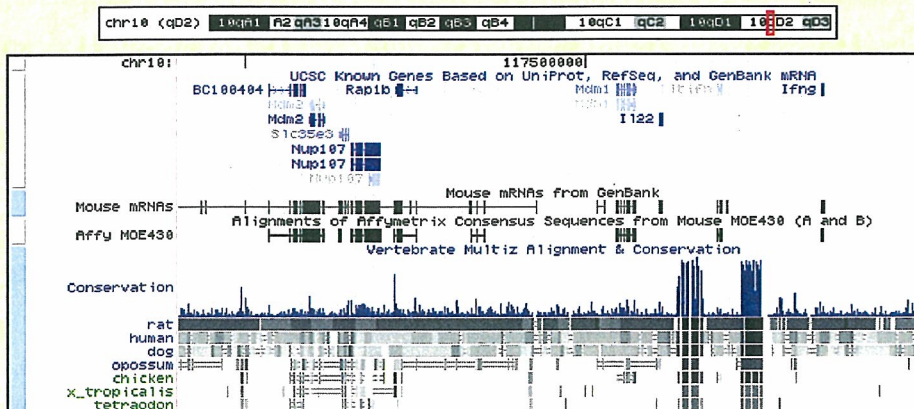
Lyn7a Myf5, Myf6

position/search chr10:106,600,000-107,200,000 jump clear size 600,001 bp. configure



BC100404, mdm2, Slc35e3, Nup107, mdm1, l122, Itifb, Ifng

position/search chr10:116,900,000-118,000,000 jump clear size 1,100,001 bp. configure



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

【トキシコゲノミクスのためのインフォマティクス開発】非形質依存的インフォマティクス開発研究

分担研究者：相崎 健一 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部 主任研究官

研究要旨

非形質依存的に Percellome データベースを有効活用するための基本技術開発を行っている。今年度は複数の実験にわたり同期して発現する遺伝子リストの抽出・利用の実用化や、エクソンアレイの性能評価、異なるプラットフォーム間のデータ相互変換技術の開発、さらには発現パターンの時系列ソーティングに必要な基本技術として測定データの補間・外挿アルゴリズムの開発を行い、これらを組み込んだアプリケーションソフトを作成して基本的な動作を確認した。今後はさらに、構築したアルゴリズムを利用する高次解析技術の開発を推し進める。

A. 研究目的

全遺伝子情報を含む大量データから生物学的に有意な情報を効率的に抽出するアルゴリズムを生成し、安全性評価におけるトキシコゲノミクスの有機的活用を促進させる。特に症状として現れる毒性反応自体の分子機序だけではなく、その毒性反応を引き起こす発端となった分子標的や、最終的な毒性反応を誘導するまでの過程の解明を最終目標とした非形質依存的解析手法の開発を目指す。

B. 研究方法

我々は遺伝子発現データの絶対量化手法である Percellome 手法を構築し、これに基礎を置く Millefeuille Data (ミルフィーユデータ) システムを開発したが、これをさらに改良しつつ新規開発もを行い、より充実した解析システムを構築する。

開発・改良したアルゴリズムは、研究者本人が検証用のソフトウェアを作成し、実際に本研究計画で得られた生データをサンプルに用

いて、ワークステーション上で検証を行う。この際のプログラム開発は研究的な性質が強く、フローチャートを作成してソースコードを作成するのではなく try and error で開発・改良を行うため、生成したプログラムの実行速度が早いことに加え実行プログラムの生成 (コンパイル速度) も速い Delphi 言語 (=object pascal, 開発環境としては Borland Delphi7 もしくは Delphi2006) を使用した。また一般的なグラフ描画には TeeChart コンポーネント (Steema 社) を利用し、小規模なデータベース操作には組み込み型リレーショナルデータベースコンポーネントである DBISAM (ElevateSoftware 社) を利用することにより、プログラム開発の効率化を図った。

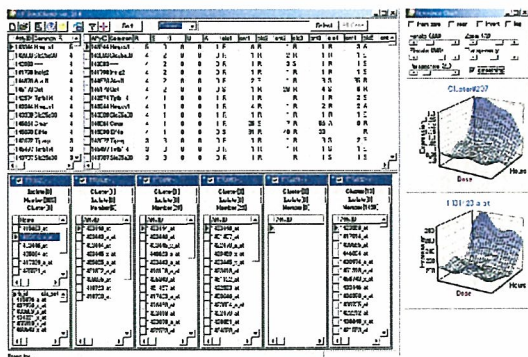
大規模計算が必要な場合は、適宜 MF サーバーシステムにアプリケーションソフトウェアを移植して検証計算を行った。

C. 研究結果

1. 発現同期遺伝子の抽出・解析技術の開

## 発・改良

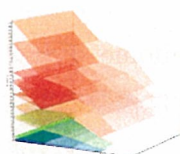
異なる化合物投与実験においても高率に類似発現パターンを呈する候補遺伝子グループ、すなわち発現同期遺伝子群の効率的な抽出を試みた。複数の化合物投与実験のデータを個々の遺伝子の発現パターンを基準として化合物毎独立にクラスタリングし、その結果から発現同期遺伝子を抽出することで、化合物毎の解析では得られない、より関連性の強い重要な候補遺伝子群を抽出することができると考えている。本年度はMFサーバーに導入済みの発現同期率計算アルゴリズムをさらに改良し、より多くの化合物投与データを用いてより高速に計算が行えるようにすると共に、巨大な出力結果を効率的に閲覧することのできるソフトウェアの開発を行った。



## 2. エクソンレベルでの遺伝子発現データの解析技術開発

アルゴリズム開発用の基礎データを採取するために、LBM Mixture サンプル(肝臓と脳由来の total RNA を、細胞数に従って5段階の比率で混合希釈したもの。このサンプル群では全ての遺伝子において混合比と発現量が直線的な用量相関を呈する)を Affymetrix エクソナレイにハイブリダイゼーションし、測定・解析を行った。個々の遺伝子に所属するエクソン毎の発現量・発現パターンを調査したところ、定量性に無視できない問題があることが判明

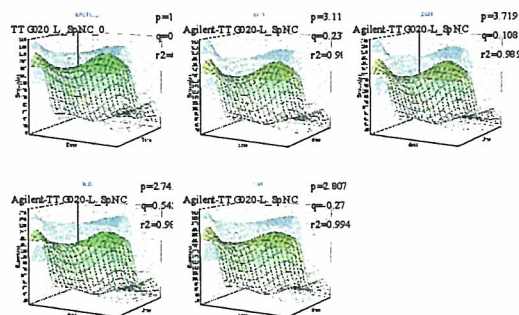
した。これはプローブ設計の問題および数値化アルゴリズムの問題が影響していると考えられ、少なくともメーカーが提供している数値化アルゴリズムをそのまま用いるのではエクソンレベルでの定量解析を行うことは困難と判断した。



同じ遺伝子に所属するエクソンであるにも関わらず発現レベルが一致しない。

## 3. プラットホーム間データ相互変換技術の開発

Affymetrix GeneChip (MOE430v2) と Agilent Microarray (NIHS44K) をモデルとして、同一サンプルをハイブリダイズさせたときの1対1対応データを用いてプローブ(セット)毎に補正係数を求めた。両プラットフォーム間のプローブ(セット)の対応表は RefSeq もしくは UniGene の情報を元に作成した。またこの補正係数を用いて双方のデータを自動相互変換するためのソフトウェアも開発した。一方、信用に足る補正係数が求められなかったプローブ(セット)についても原因調査を進めているが、1つの大きな要因としてプローブの飽和現象が影響し



ているものと推測された。

## 4. 時系列ソーティング技術の基礎開発