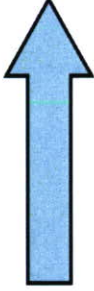


Trichostatin A (TSA)  
(100ng/mL)



OME (50uM)  
or RIF (25uM)



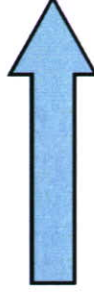
0 24 48 72 96 h



5-Aza-2'-deoxycytidine  
(AzaC) (5uM)

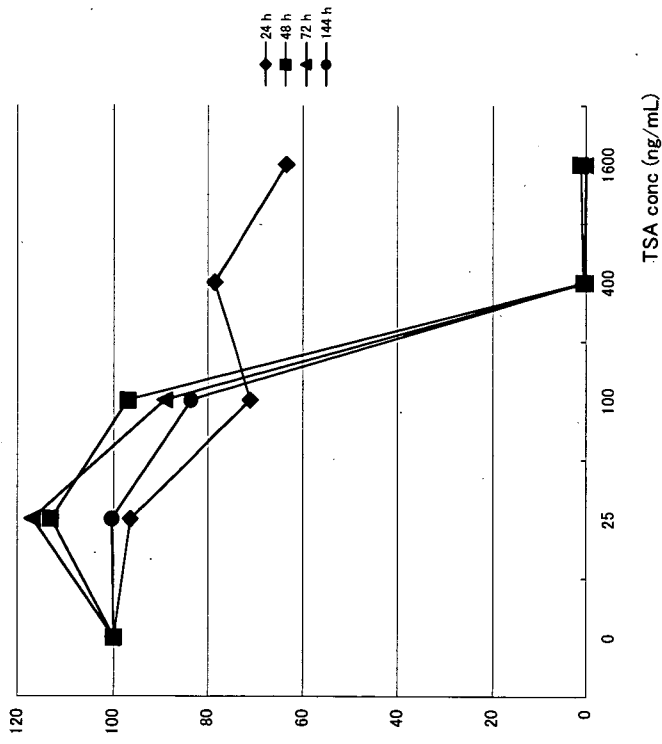


OME (50uM)  
or RIF (25uM)

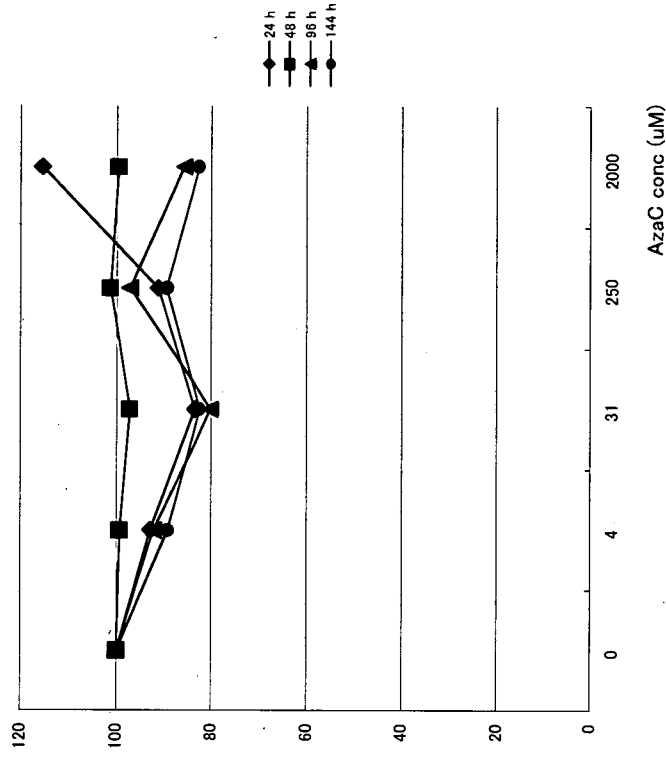


**Fig. 18 Treatments of TSA and AzaC on HepG2 cells**

TSA



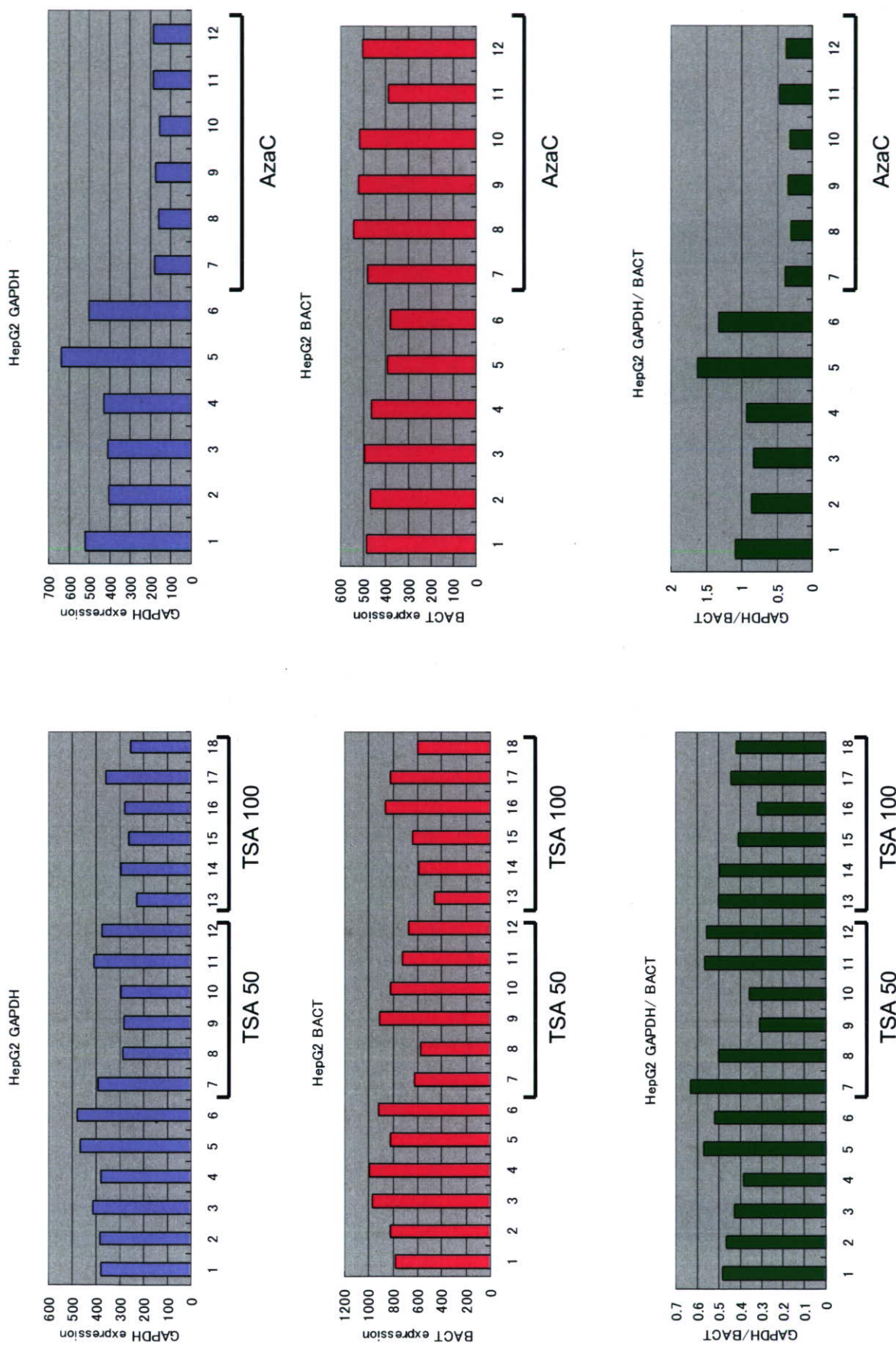
AzaC



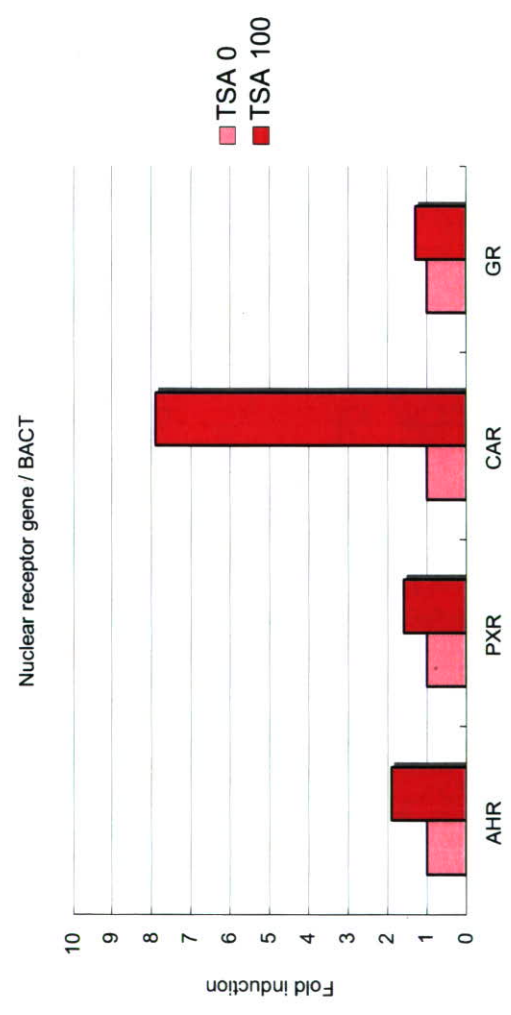
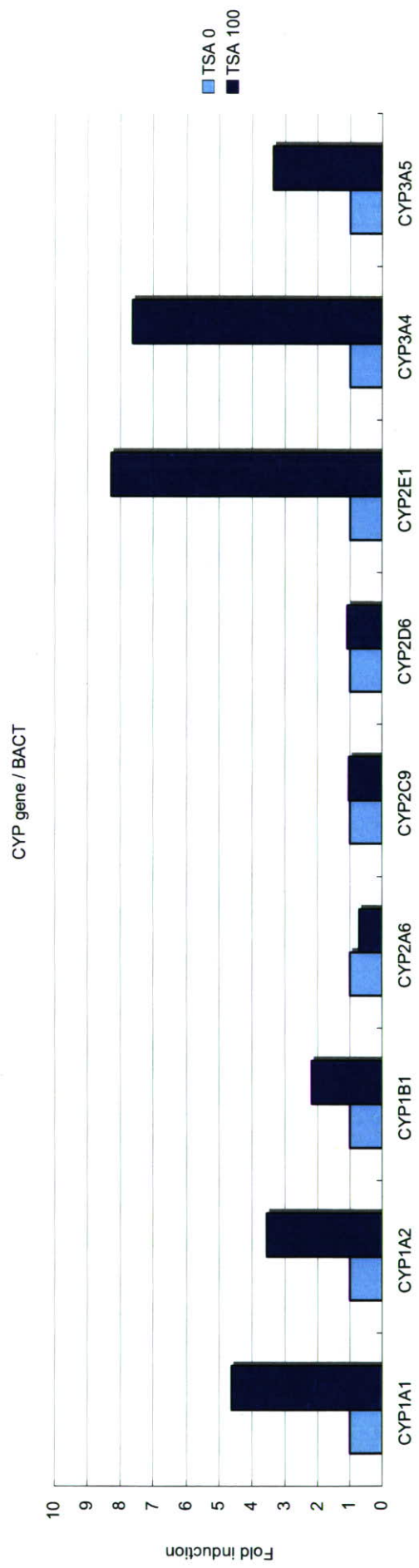
TSA IC50=160 ng/mL (48h)

AzaC IC50= >2 mM (96h)

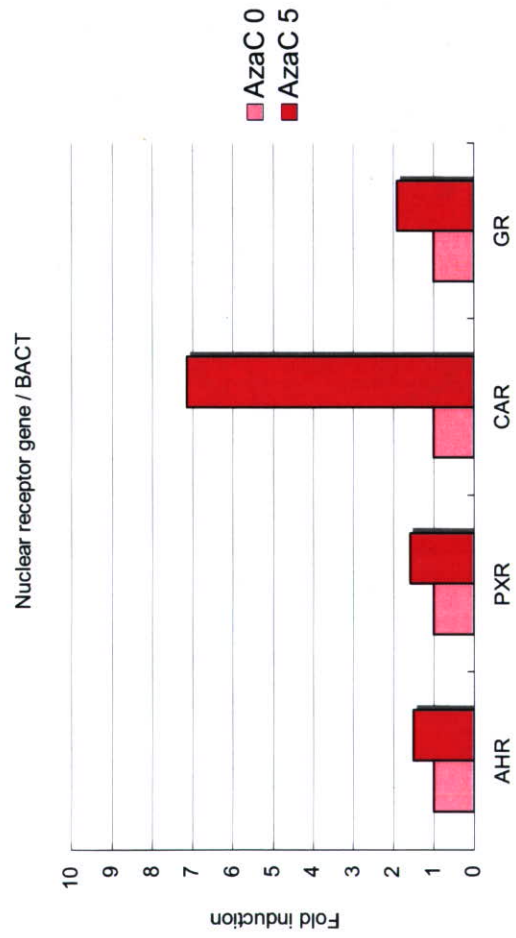
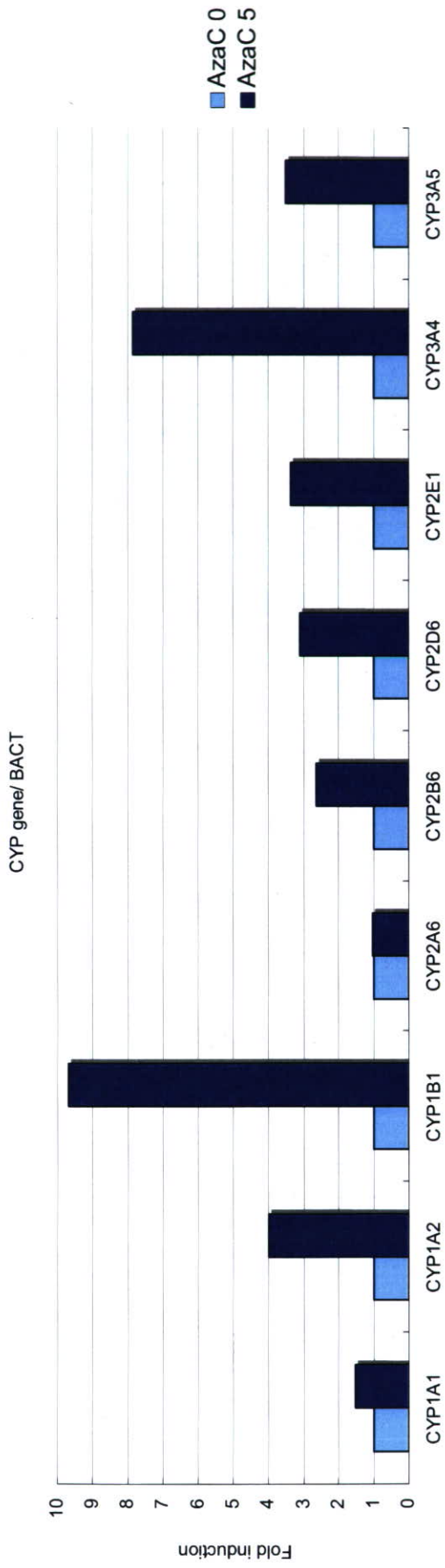
**Fig. 19 Cytotoxicities of TSA and AzaC on HepG2 cells**



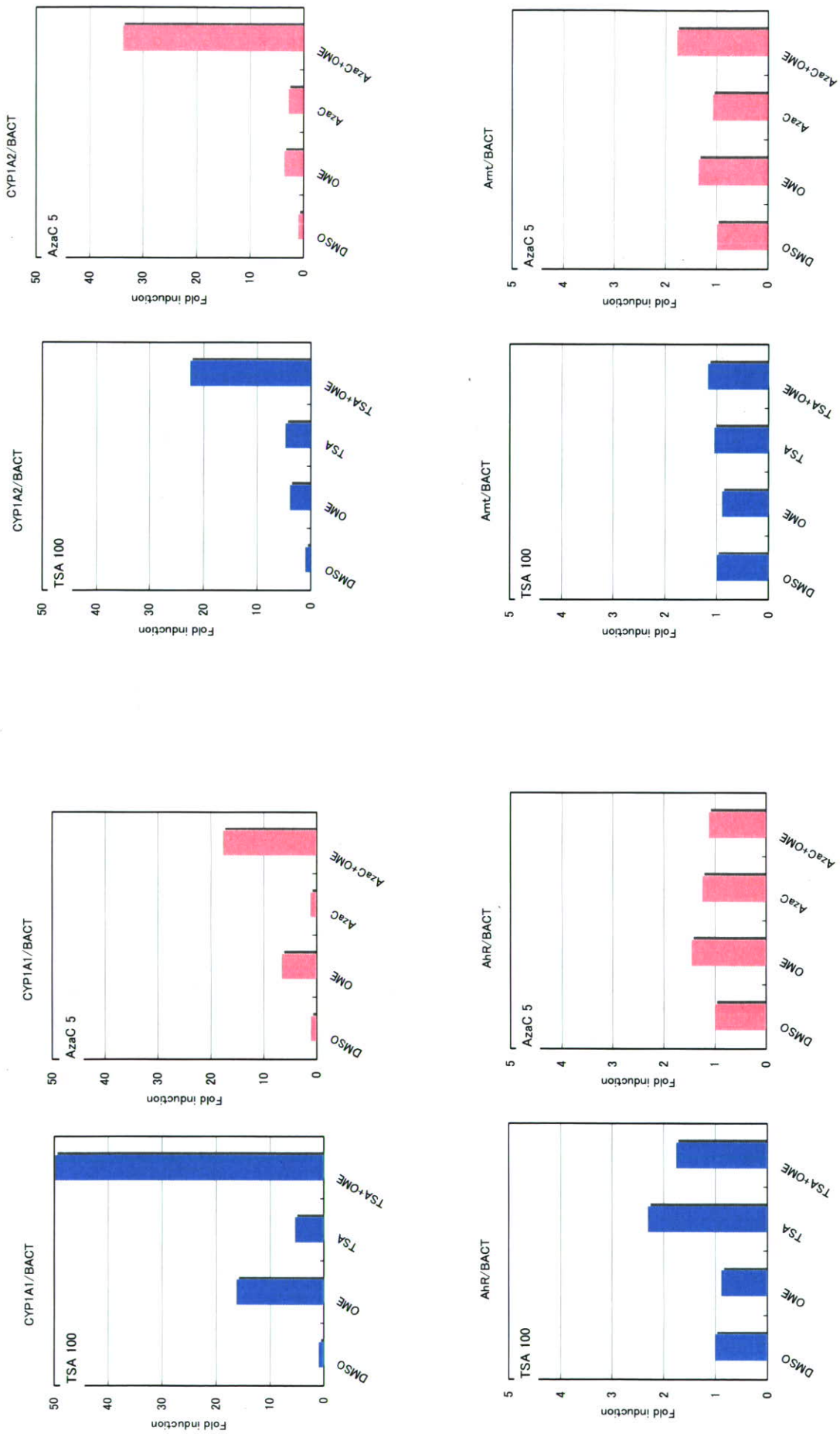
**Fig. 20 Effects of AzaC on the expressions of GAPDH and BACT mRNAs in HepG2 cells**



**Fig. 21 Effects of TSA on the mRNA expressions in HepG2 cells**

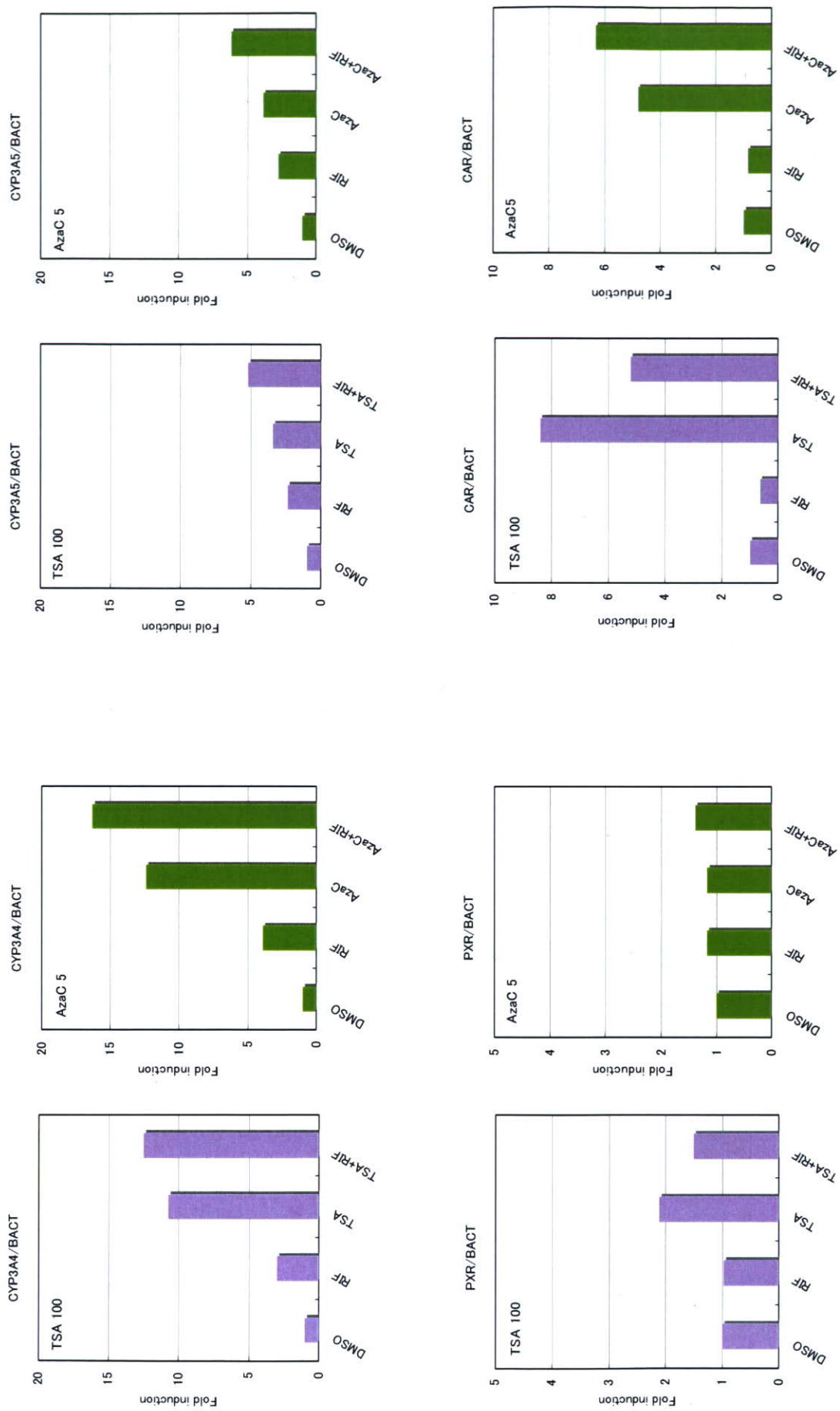


**Fig. 22 Effects of AzaC on the mRNA expressions in HepG2 cells**

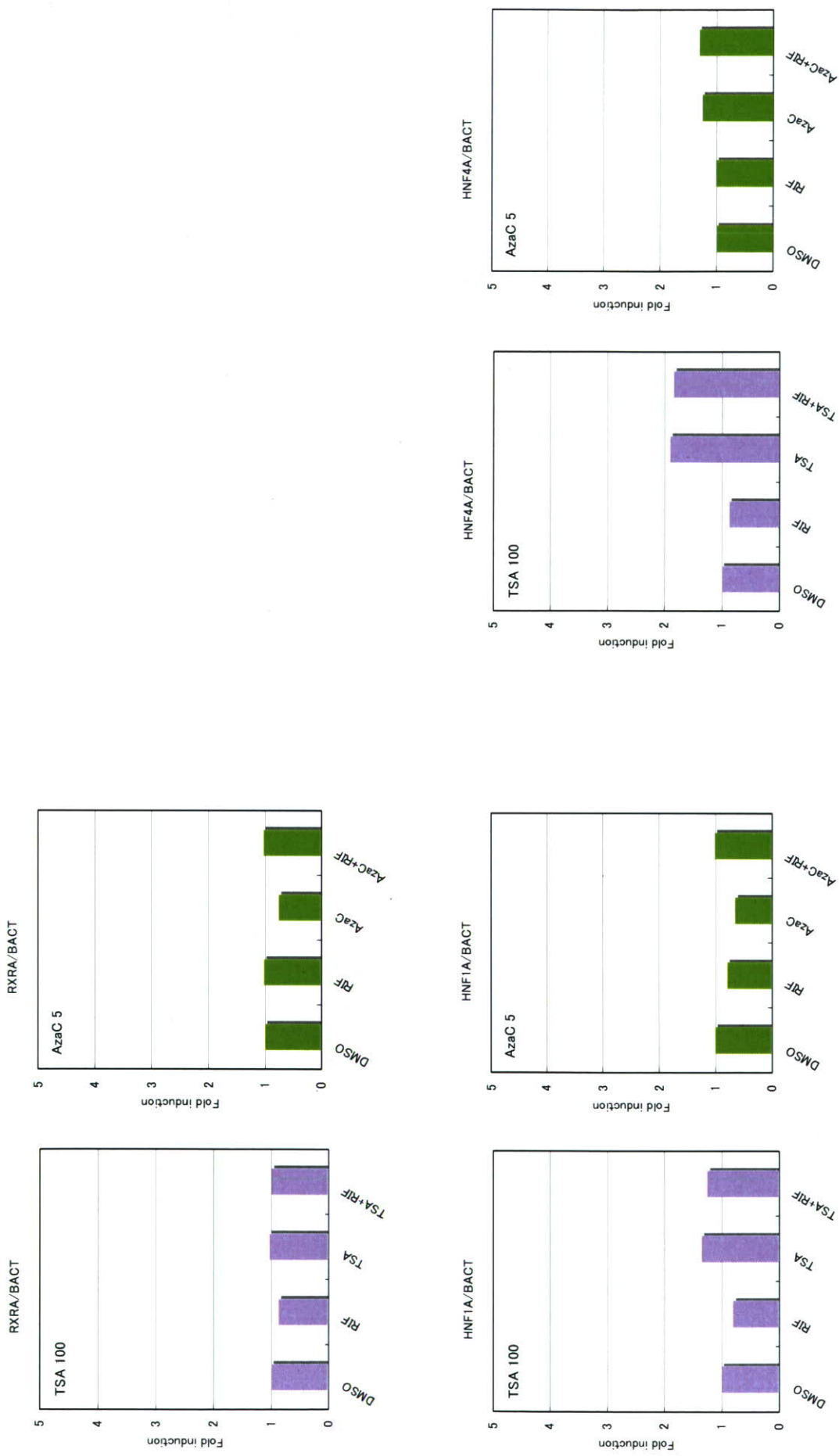


**Fig. 23 Effects of TSA and AzaC on the expressions of CYP1A1, 1A2, AhR and Arnt mRNAs in HepG2 cells**





**Fig. 24 Effects of TSA and AzaC on the expressions of CYP3A4, 3A5, PXR and CAR mRNAs in HepG2 cells**



**Fig. 25 Effects of TSA and AzaC on the expressions of RXRA, HNF1A and HNF4A mRNAs in HepG2 cells**



Table.4 三次元培養と平面培養における薬物代謝関連遺伝子の発現の比較

	gene symbol	3D / 2D (fold)	p-value(n=3)		
drug transporters	metallothioneins	MT2A	0.78	0.06	
		MT3	1.29	0.04	
	p-glycoprotein	ABCB1	1.14	0.73	
		ABCC1	2.15	0.00	
		GPI	1.16	0.31	
phase I metabolizing Enzymes	P450 gene family	CYP1B2	1.29	0.04	
		CYP17A1	1.53	0.30	
		CYP19A1	0.80	0.23	
		CYP1A1	1.97	0.02	
		CYP2B6	8.95	0.03	
		CYP2C19	1.48	0.42	
		CYP2C8	1.87	0.30	
		CYP2C9	1.29	0.04	
		CYP2D6	1.31	0.29	
		CYP2E1	4.05	0.05	
		CYP2F1	1.33	0.07	
		CYP2J2	0.66	0.00	
		CYP3A5	1.46	0.27	
		phase II metabolizing enzymes	carboxyltransferase	CES2	1.54
CES4	1.27			0.67	
decarboxylase	GAD1		9.87	0.00	
	ADH1B		1.29	0.04	
dehydrogenase	ADH1C		1.09	0.87	
	ADH4		2.66	0.01	
	ADH5		1.32	0.02	
	ADH6		1.22	0.10	
	ALAD		0.73	0.03	
	ALDH1A1		2.77	0.00	
	HSD17B1		0.92	0.83	
	HSD17B2		0.55	0.04	
	HSD17B3		2.36	0.03	
	glutathione peroxidases		GPX1	1.89	0.01
GPX2			1.54	0.16	
GPX3			0.50	0.04	
GPX4			1.33	0.01	
GPX5			1.29	0.04	
GSTA3			4.73	0.01	
GSTA4			1.42	0.00	
GSTM2			1.37	0.04	
GSTM3			1.00	0.98	
GSTM5			1.29	0.04	
lipooxygenase	GSTP1		7.31	0.00	
	GSTT1		0.98	0.89	
	GSTZ1		1.19	0.04	
	LPO		1.44	0.00	
	MPO		1.29	0.04	
	ALOX12		1.46	0.33	
	ALOX15		0.66	0.12	
	ALOX5		1.81	0.09	
	APOE		1.30	0.09	
	EPHX1		2.05	0.04	
hydrolases	FAAH		2.02	0.02	
	FBP1		0.68	0.07	
	HK2		1.32	0.33	
	kinases		PKLR	0.76	0.15
			PKM2	1.27	0.03
	glutathione peroxidases		BLVFA	1.11	0.37
			BLVFB	0.95	0.89
			CYB5R3	0.89	0.54
			GPX1	1.89	0.01
			GPX2	1.54	0.16
GSR			1.66	0.03	
MTHFR			1.26	0.43	
NOS3			2.24	0.03	
NOC1			1.51	0.05	
SRD5A1			1.29	0.12	
peroxidases	SRD5A2		3.37	0.04	
	PON1		1.03	0.92	
	PON2		1.93	0.02	
	PON3		1.27	0.08	
	other related genes	CHST1	3.11	0.00	
		GSTM2	1.37	0.04	
		GSTM3	1.00	0.98	
		GSTM5	1.29	0.04	
		GSTP1	7.31	0.00	
		GSTT1	0.98	0.89	
MGST1		1.50	0.02		
MGST2		0.53	0.00		
MGST3		1.52	0.01		
NAT1		2.15	0.04		
other related Genes	NAT2	5.91	0.01		
	COMT	1.20	0.12		
	GST1	1.17	0.14		
	AHR	1.00	0.92		
	ARNT	1.34	0.67		
other related Genes	ASNA1	2.22	0.00		
	GCKR	0.65	0.11		
	MARCKS	1.11	0.16		
	EMR1CAL1	1.31	0.16		
	SNN	4.67	0.00		
ABP1	1.54	0.06			

Table.5 三次元培養と平面培養における薬剤による誘導倍率の比較2

	gene symbol	3D-rif./2D-rif.	3D-dex./2D-dex.	3D-PB/2D-PB	
drug transporters	metallothioneins	MT2A	1.42	1.47	1.30
		MT3	0.81	1.11	1.10
	p-glycoprotein	ABCB1	1.01	0.76	0.77
		ABCC1	0.77	1.23	1.00
		GPI	0.77	0.89	0.74
phase I metabolizing Enzymes	P450 gene family	CYP11B2	0.81	1.10	1.10
		CYP11A1	0.44	0.47	1.82
		CYP19A1	0.62	0.89	0.68
		CYP1A1	1.55	1.39	0.60
		CYP2B6	0.36	1.00	0.81
		CYP2C19	0.04	1.21	1.13
		CYP2C8	0.98	1.23	1.15
		CYP2C9	0.81	1.11	1.10
		CYP2D6	1.34	0.92	0.89
		CYP2E1	1.86	0.25	0.74
		CYP2F1	0.36	1.02	1.10
		CYP2J2	1.32	0.96	1.13
		CYP3A5	2.19	1.33	1.13
		phase II metabolizing enzymes	carboxylesterase	CEB2	0.89
CEB4	0.68			1.70	0.70
decarboxylase	GAD1		0.93	1.57	0.60
	ADH8		0.81	1.11	1.10
dehydrogenase	ADH7C		0.75	4.22	0.39
	ADH4		0.50	0.91	0.62
	ADH5		0.73	0.95	0.74
	ADH6		0.70	0.92	0.68
	ALAD		1.02	0.82	0.86
	ALDH1A1		0.64	1.00	0.60
	HSD17B1		1.18	0.61	1.00
	HSD17B2		1.01	0.81	0.93
	HSD17B3		1.08	1.33	0.71
	glutathione peroxidase		GPX1	0.72	1.03
GPX2			1.02	1.08	1.05
GPX3			0.98	1.03	0.86
GPX4			0.70	0.86	0.83
GPX5			0.74	1.11	0.96
GSTA3			0.45	0.91	0.47
GSTA4			0.97	1.02	0.88
GSTM2			0.84	0.90	0.88
GSTM3*			1.07	1.71	0.59
GSTM5			0.81	1.11	1.10
lipoygenase	GSTP1		1.67	0.82	0.61
	GSTT1		0.95	1.18	0.95
	GSTZ1		0.89	1.11	1.01
	LPO		0.70	0.85	1.07
	MPO		0.62	1.10	1.10
hydroxylase	ALOX12*		1.49	0.81	0.69
	ALOX15		0.83	0.91	1.93
	ALOX5		1.86	0.60	1.40
	ARDE		0.93	0.83	1.08
kinases	EPHX1		0.76	0.80	1.61
	FAAH		0.73	0.98	0.80
	FBP1		1.18	0.78	1.88
glutathione peroxidase	HK2		0.69	0.47	0.84
	PKR		1.01	0.88	0.91
	PKM2		0.81	0.88	0.92
	BLVRA		0.82	1.12	0.85
	BLVRE		0.73	0.90	0.88
	CYB5R3		0.75	1.12	1.33
	GPX1		0.72	1.03	0.83
	GPX2		1.02	1.08	1.05
	GSR		0.62	0.58	1.21
	MTHFR		0.93	0.90	1.20
paracoxases	NCS3		1.25	0.88	0.85
	NGO1		0.75	0.83	1.06
	SRDSA1		1.50	0.65	1.05
	SRDSA2*		0.22	0.95	0.15
	PON1		2.41	2.00	1.31
other related genes	PON2	0.90	1.18	0.95	
	PON3	1.09	1.16	0.83	
	CHST1	2.07	2.12	0.61	
	GSTM2	0.84	0.90	0.88	
	GSTM3	1.07	1.71	0.59	
	GSTM5	0.81	1.11	1.10	
	GSTP1	1.67	0.82	0.61	
	GSTT1	0.95	1.18	0.95	
	MGST1	0.88	1.02	1.04	
	MGST2	1.27	1.02	1.42	
other related Genes	MGST3	0.95	1.15	0.90	
	NAT1	1.07	0.89	0.81	
	NAT2	0.39	0.92	0.65	
	COMT	0.74	0.92	0.94	
	GGT1	1.01	0.88	0.90	
	AHR	0.94	0.40	0.99	
	ARNT	1.33	1.05	0.17	
	ASNA1	0.59	1.01	0.70	
	GOKR	1.03	1.11	0.80	
	MARCKB	0.98	0.98	0.99	
SMARCA1	0.84	0.97	0.75		
SNN	0.96	0.89	0.47		
ABP1	0.81	0.66	1.09		

Table.6 三次元培養と平面培養における薬剤によるCYP3A4の誘導 (RT-PCR)

system	treatment	concentration	induction fold	p-value(n=3)
plate	rifampicin	100 $\mu$ M	1.148	0.213
RFB	rifampicin	100 $\mu$ M	3.566	0.001
plate	dexamethasone	10 $\mu$ M	1.658	0.000
RFB	dexamethasone	10 $\mu$ M	2.037	0.031
plate	phenobarbital	250 $\mu$ M	0.987	0.826
RFB	phenobarbital	250 $\mu$ M	1.211	0.452

(誘導期間 3日間)

三次元培養と平面培養における薬剤処理(100  $\mu$  M rifampicin, 10  $\mu$  M dexamethasone, 250  $\mu$  M phenobarbital) によるCYP3A4の誘導倍率 (薬剤処理/薬剤未処理) を示した。

Table.7 微小管に関する遺伝子の発現比 (三次元培養/平面培養)

A)

gene symbol	fold(3D/plate)	gene name
ARHGEF2	0.466	RHO/RAC GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 2
AURKA	3.058	AURORA KINASE A
BIRC5	3.822	BACULOVIRAL IAP REPEAT-CONTAINING 5 (SURVIVIN)
BUB1	2.935	BUB1 BUDDING UNINHIBITED BY BENZIMIDAZOLES 1 HOMOLOG (YEAST)
BUB1B	3.573	BUB1 BUDDING UNINHIBITED BY BENZIMIDAZOLES 1 HOMOLOG BETA (YEAST)
CDC20	3.008	CDC20 CELL DIVISION CYCLE 20 HOMOLOG (S. CEREVISIAE)
CENPF	2.736	CENTROMERE PROTEIN F, 350/400KA (MITOSIN)
CETN2	3.289	CENTRIN, EF-HAND PROTEIN, 2
ESPL1	4.212	EXTRA SPINDLE POLES LIKE 1 (S. CEREVISIAE)
GTSE1	3.757	G-2 AND S-PHASE EXPRESSED 1
K-ALPHA-1	3.234	TUBULIN, ALPHA, UBIQUITOUS
KIF15	2.848	KINESIN FAMILY MEMBER 15
KIF20A	3.794	KINESIN FAMILY MEMBER 20A
KIF2C	3.264	KINESIN FAMILY MEMBER 2C
LOC146909	3.166	HYPOTHETICAL PROTEIN LOC146909
MAP1LC3B	0.439	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1 LIGHT CHAIN 3 BETA
MC1R	3.885	MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (ALPHA MELANOCYTE STIMULATING HORMONE RECEPTOR)
PRC1	4.744	PROTEIN REGULATOR OF CYTOKINESIS 1
SPAG5	3.580	SPERM ASSOCIATED ANTIGEN 5
TPX2	4.608	TPX2, MICROTUBULE-ASSOCIATED, HOMOLOG (XENOPUS LAEVIS)
TTK	3.603	TTK PROTEIN KINASE
TUBB	3.324	TUBULIN, BETA
TUBB2A	2.453	TUBULIN, BETA 2A
TUBB2B	6.120	TUBULIN, BETA 2B
TUBB2C	2.681	TUBULIN, BETA 2C
TUBB6	2.284	TUBULIN, BETA 6

B)

gene Symbol	fold(3D/plate)	DAVID gene name
ARHGEF2	0.466	RHO/RAC GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 2
AURKA	3.058	AURORA KINASE A
BUB1B	3.573	BUB1 BUDDING UNINHIBITED BY BENZIMIDAZOLES 1 HOMOLOG BETA (YEAST)
CKS2	3.714	CDC28 PROTEIN KINASE REGULATORY SUBUNIT 2
ESPL1	4.212	EXTRA SPINDLE POLES LIKE 1 (S. CEREVISIAE)
GTSE1	3.757	G-2 AND S-PHASE EXPRESSED 1
K-ALPHA-1	3.234	TUBULIN, ALPHA, UBIQUITOUS
KIF15	2.848	KINESIN FAMILY MEMBER 15
KIF20A	3.794	KINESIN FAMILY MEMBER 20A
KIF2C	3.264	KINESIN FAMILY MEMBER 2C
KPNA2	2.232	KARYOPHERIN ALPHA 2 (RAG COHORT 1, IMPORTIN ALPHA 1)
LOC146909	3.166	HYPOTHETICAL PROTEIN LOC146909
NUSAP1	3.757	NUCLEOLAR AND SPINDLE ASSOCIATED PROTEIN 1
PRC1	4.744	PROTEIN REGULATOR OF CYTOKINESIS 1
SPAG5	3.580	SPERM ASSOCIATED ANTIGEN 5
TTK	3.603	TTK PROTEIN KINASE
TUBB	3.324	TUBULIN, BETA
TUBB2A	2.453	TUBULIN, BETA 2A
TUBB2B	6.120	TUBULIN, BETA 2B
TUBB2C	2.681	TUBULIN, BETA 2C
TUBB3	3.885	MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (ALPHA MELANOCYTE STIMULATING HORMONE RECEPTOR)
TUBB6	2.284	TUBULIN, BETA 6
UBE2C	3.521	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2C
ZWINT	4.815	ZW10 INTERACTOR

GeneChip の結果、三次元培養と平面培養において有意な発現の差異が観察された遺伝子を DAVID により解析し、microtubule に関連する遺伝子として分類された遺伝子とその発現比 (三次元培養/平面培養) を示した。

A) microtubule cytoskeleton      B) microtubule-based process

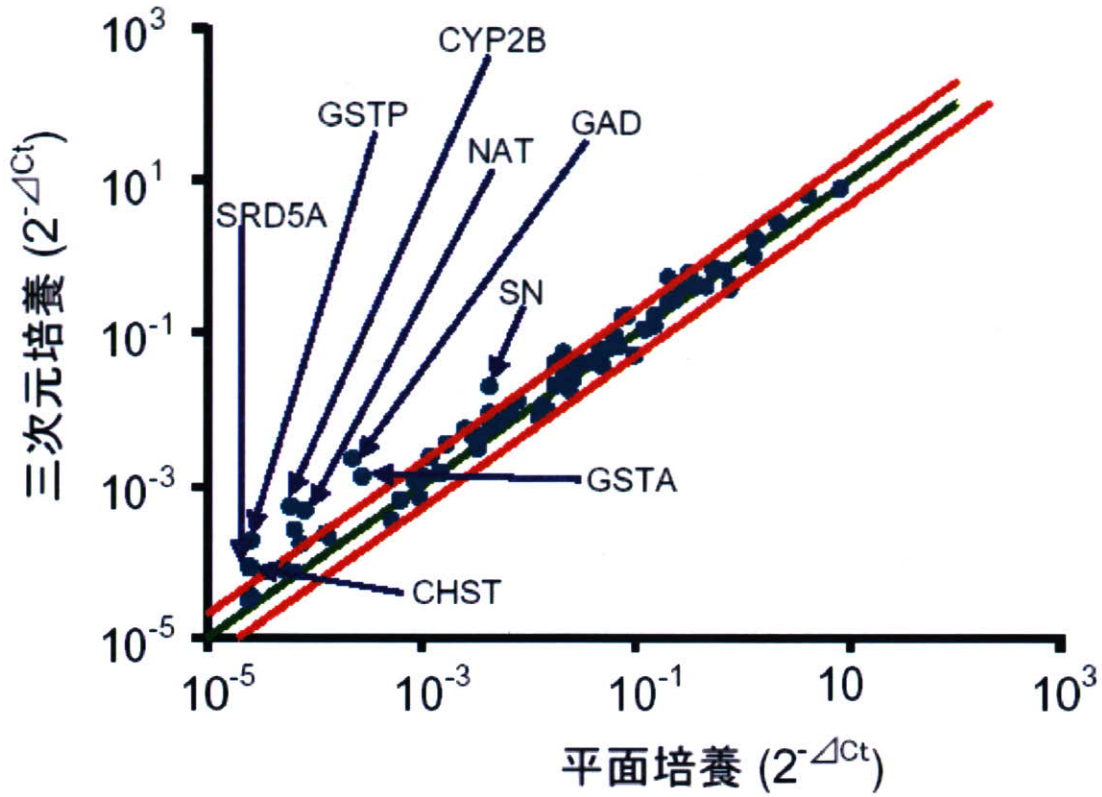
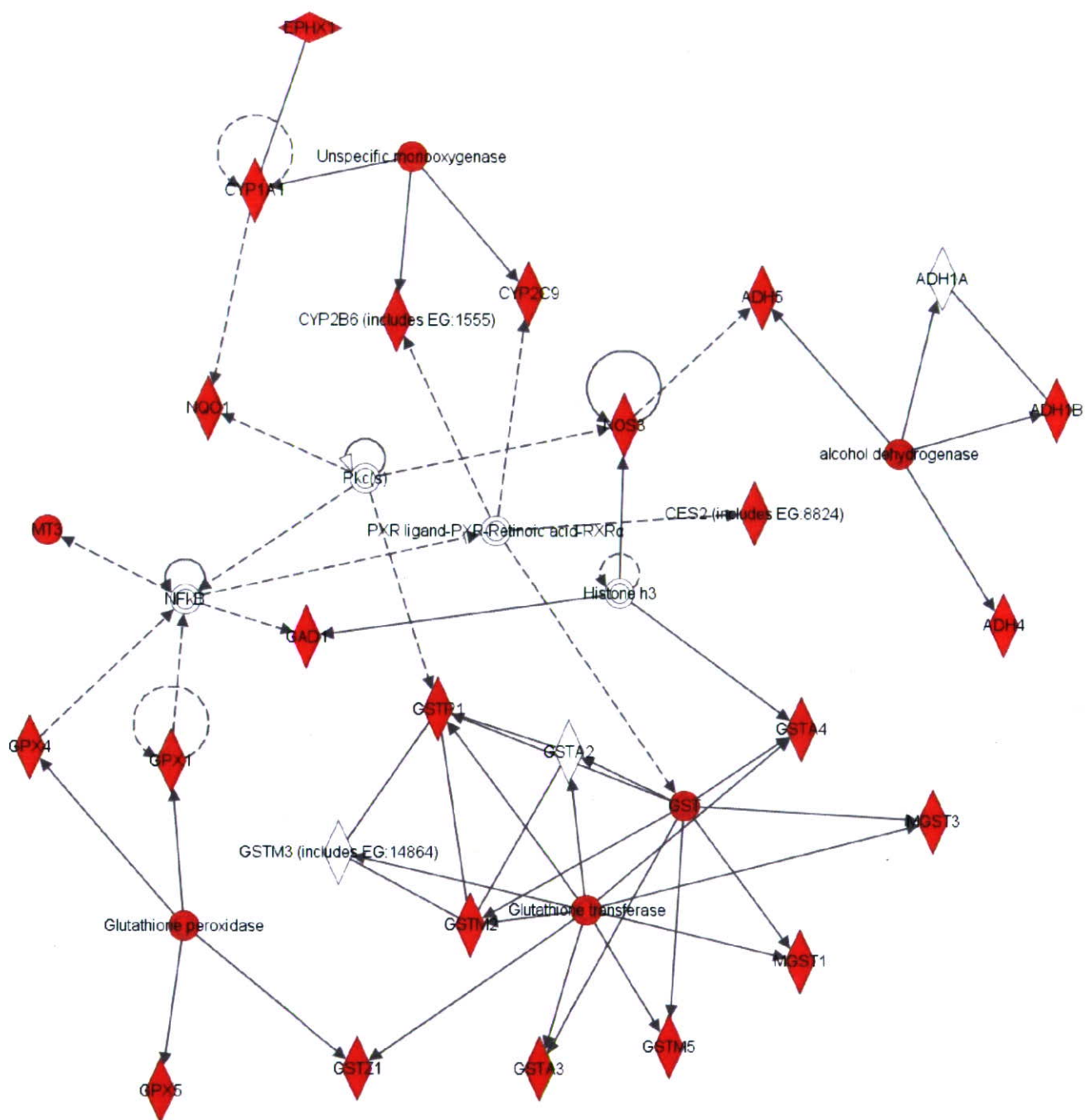


Fig.26 PCRArray による三次元培養と平面培養の薬物代謝関連遺伝子の発現比較

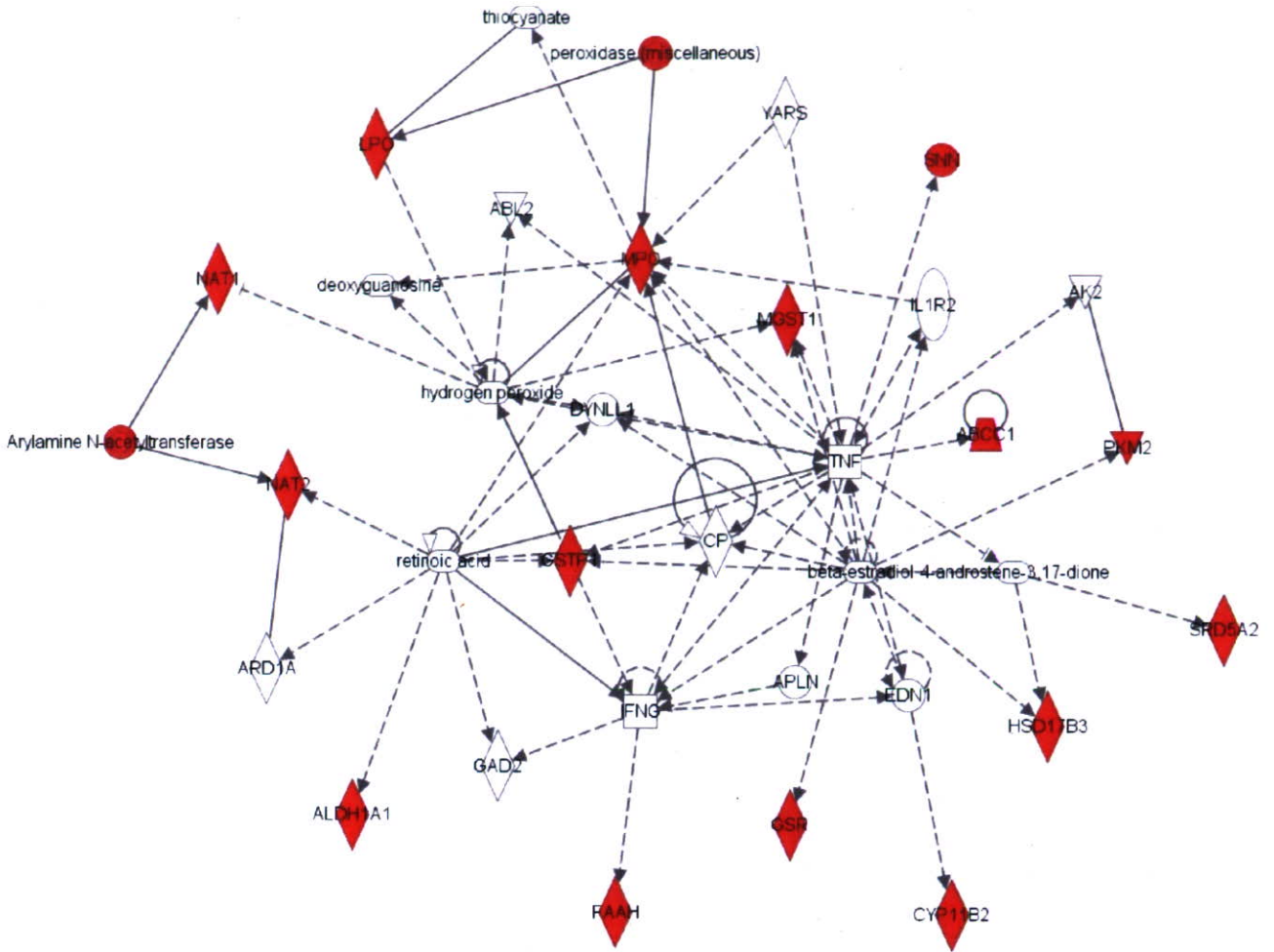
PCR-Array で得られた  $2^{-\Delta Ct}$  より作成した scatter plot (縦軸: 三次元培養時の  $2^{-\Delta Ct}$ 、横軸: 平面培養時の  $2^{-\Delta Ct}$ ) を示した。三次元培養と平面培養における発現比が1となるラインを緑、三次元培養における発現が平面培養に対して2倍、1/2倍となるラインを赤で示した。また、三次元培養において三倍以上の発現上昇が観察された遺伝子名を示した。

A)





B)



**Fig.27 Ingenuity Pathways Analysis (IPA) により構築されたネットワーク**

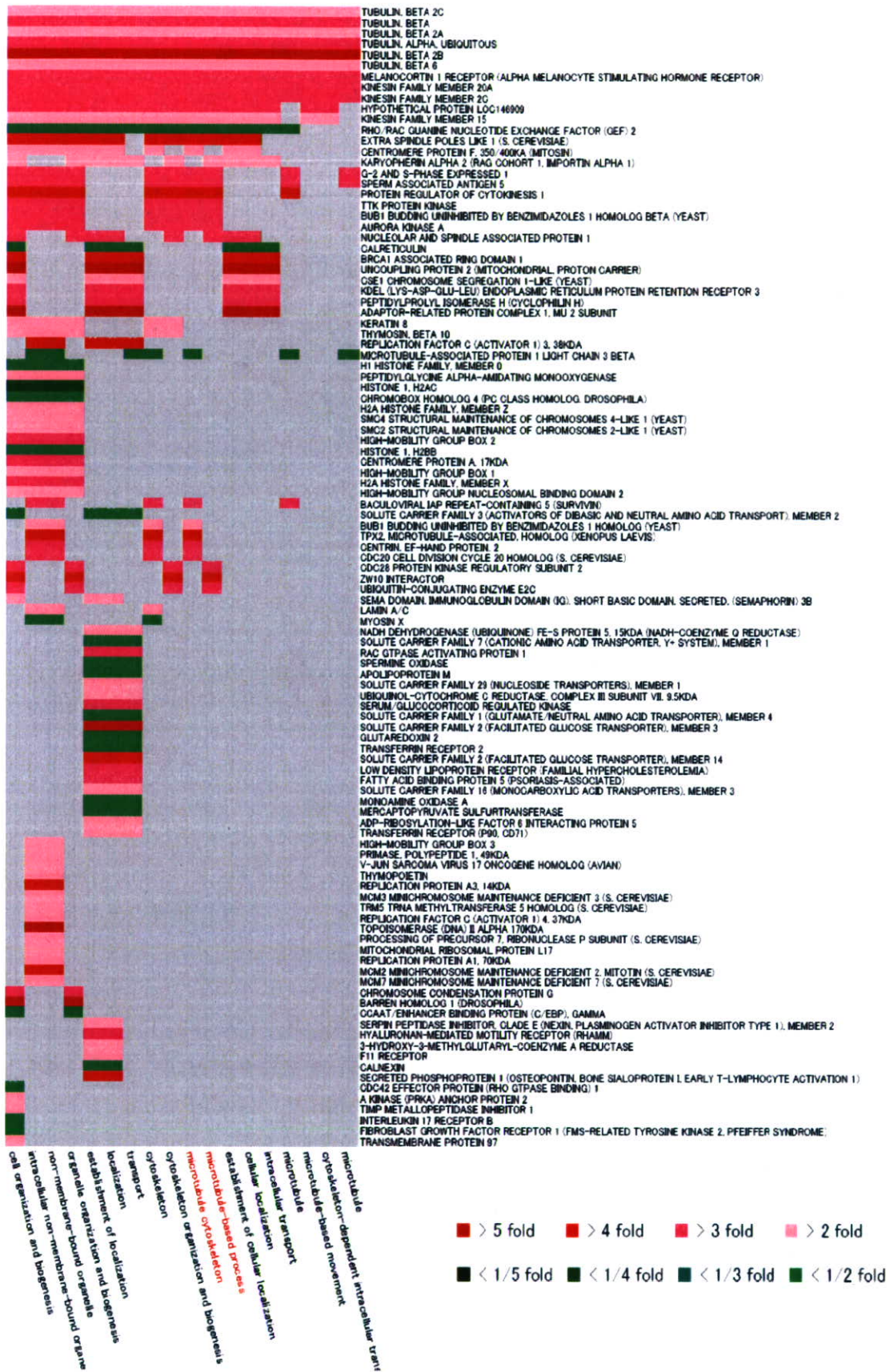
PCR-Arrayの結果、三次元培養において有意な発現上昇が確認された遺伝子をIPAにより解析し、構築されたネットワークを示した。三次元培養により有意な発現上昇が確認された遺伝子を赤で示した。

A) PXRに関するネットワーク

B) エストロゲン、レチノイン酸に関するネットワーク

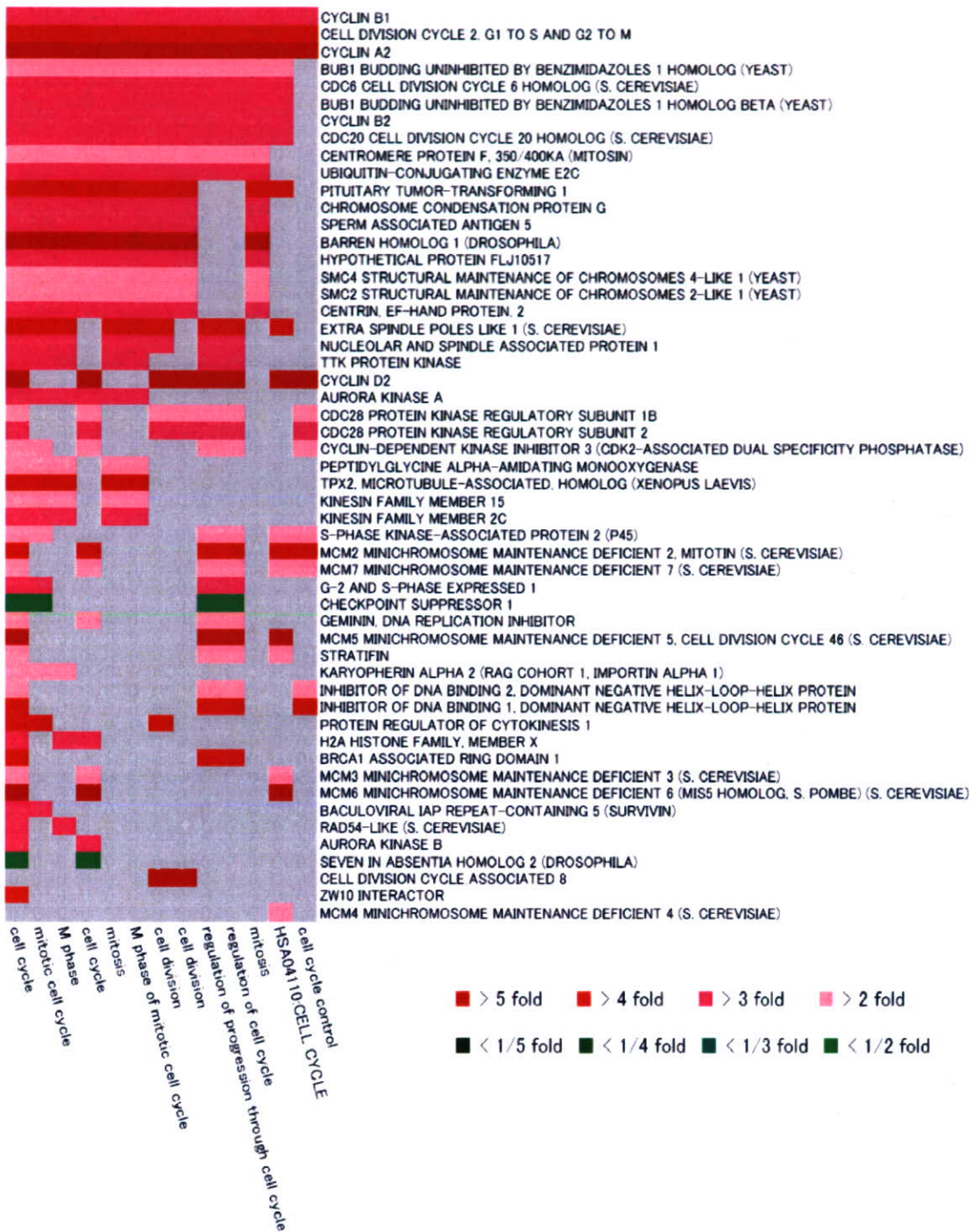
- ◇ : 酵素
- ◎ : 複合体、またはグループ
- : キナーゼ
- ▽ : 化学物質、または薬剤
- : その他

A)





B)







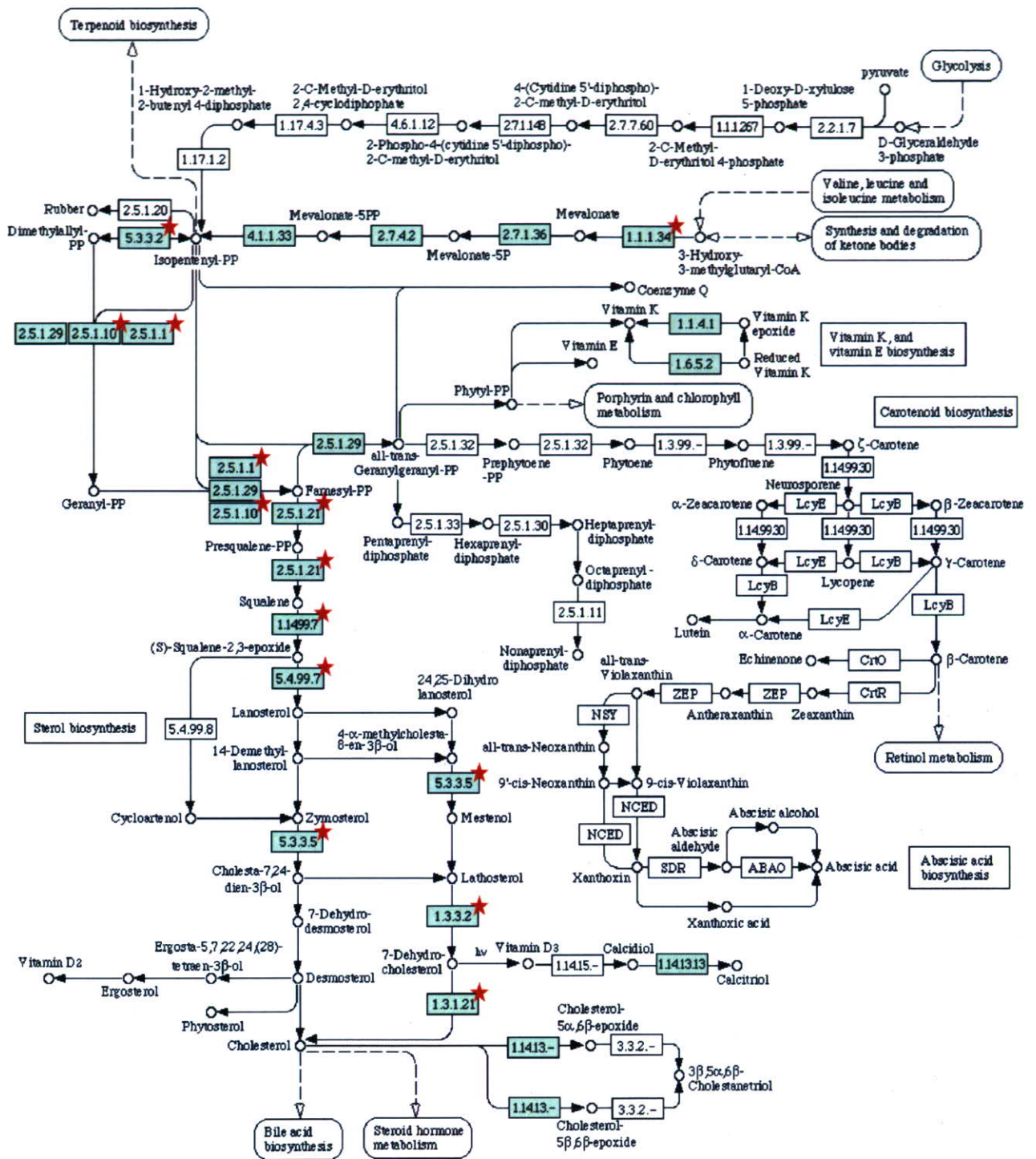
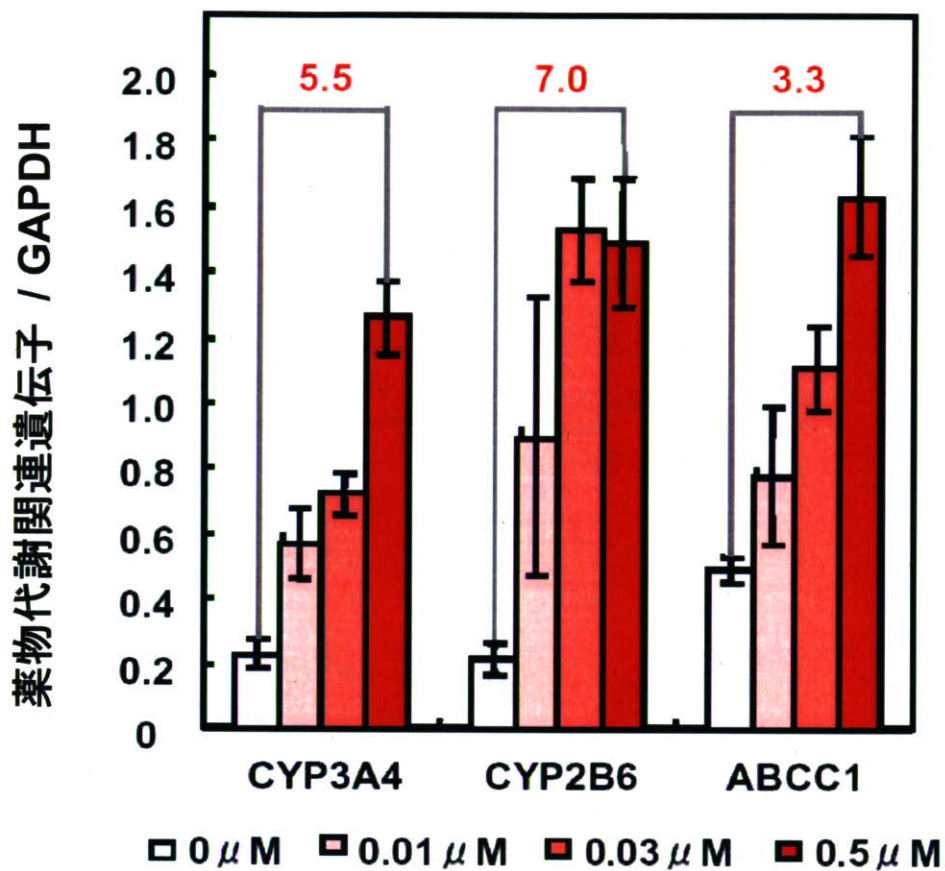


Fig. 29 ステロイド合成経路 (KEGG PATHWAY Database) において  
三次元培養で発現が上昇した遺伝子

KEGG PATHWAY Database におけるステロイド合成経路を示し、三次元培養において有意に発現上昇した遺伝子に★の印を付けた。また、緑のボックスはヒトにおいて報告のある酵素を示している。



**Fig. 30 paclitaxel 処理による薬物代謝関連遺伝子の発現変化**

Paclitaxel 処理 (0  $\mu\text{M}$ 、0.01  $\mu\text{M}$ 、0.03  $\mu\text{M}$ 、0.5  $\mu\text{M}$ ) を行った際の *CYP3A4*、*CYP2B6*、*ABCC1* の発現量を示した。各遺伝子の発現量は RT-PCR で得られた相対発現量を GAPDH の相対発現量で正規化した値である。