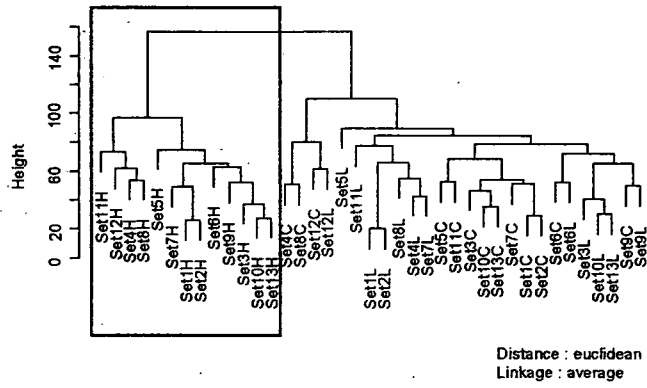


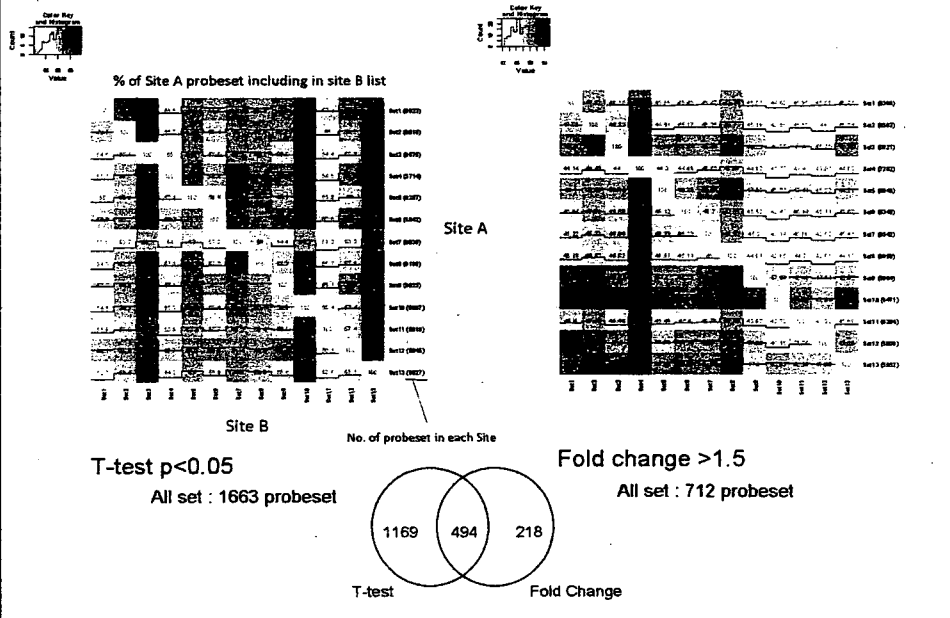
Hierarchical clustering of group mean signal

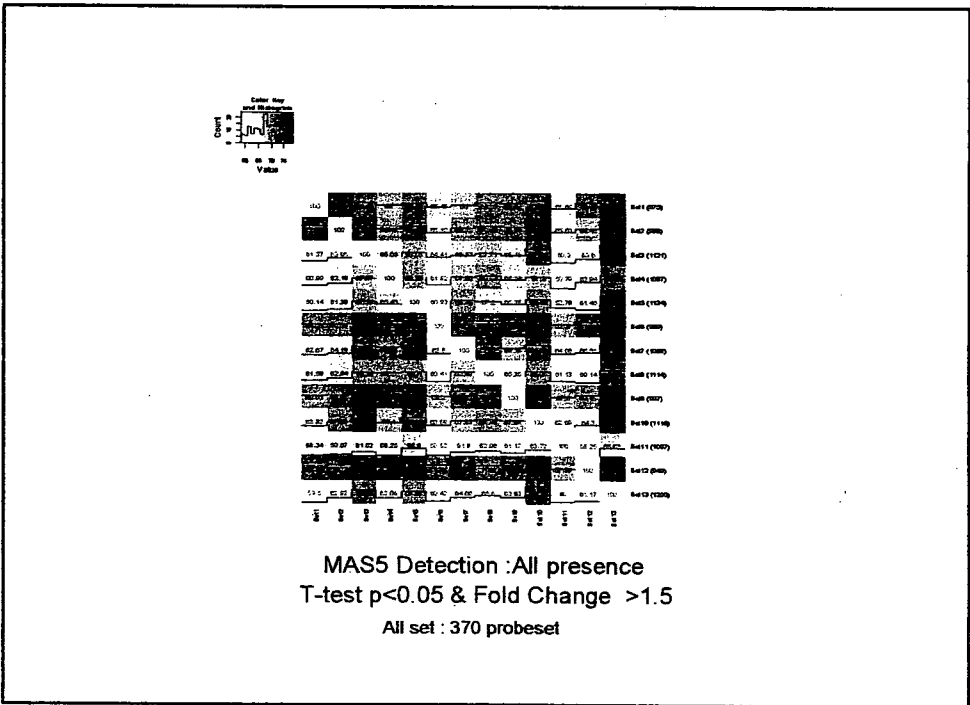
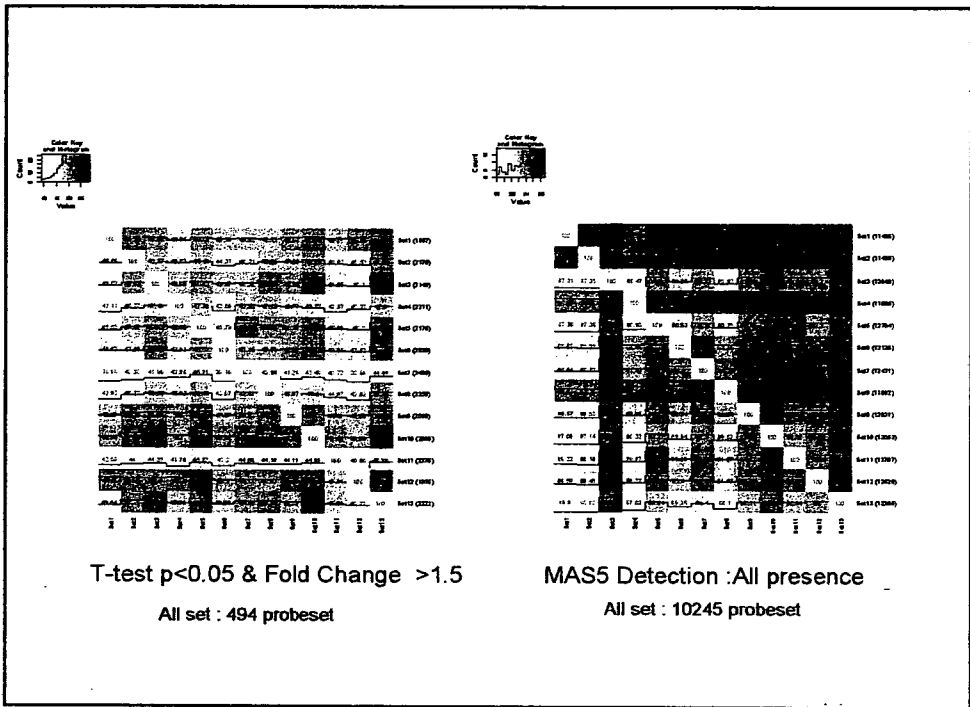


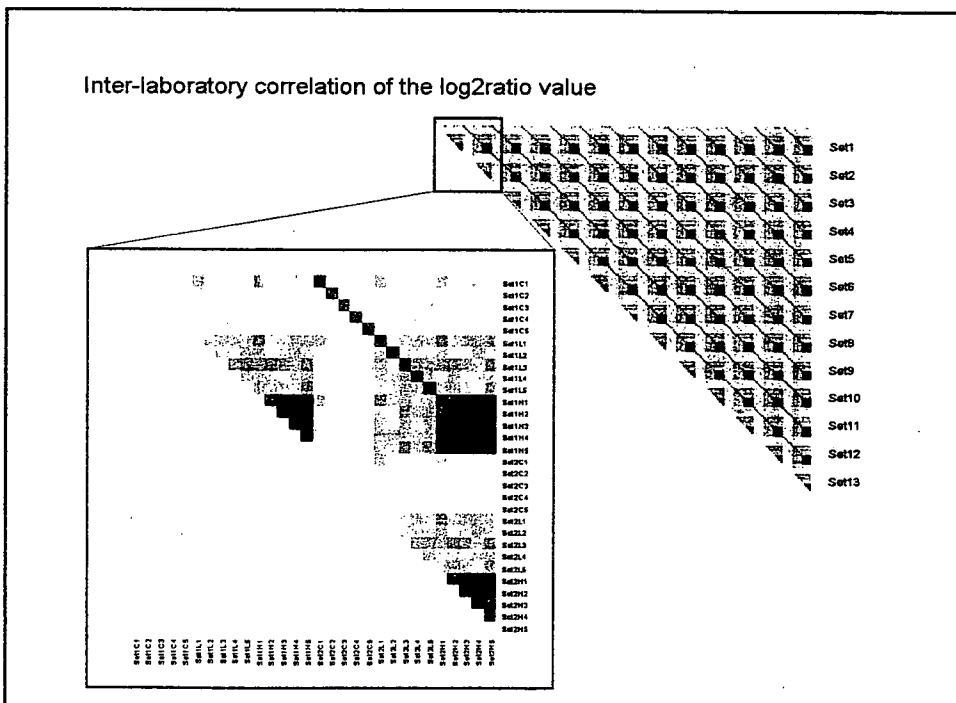
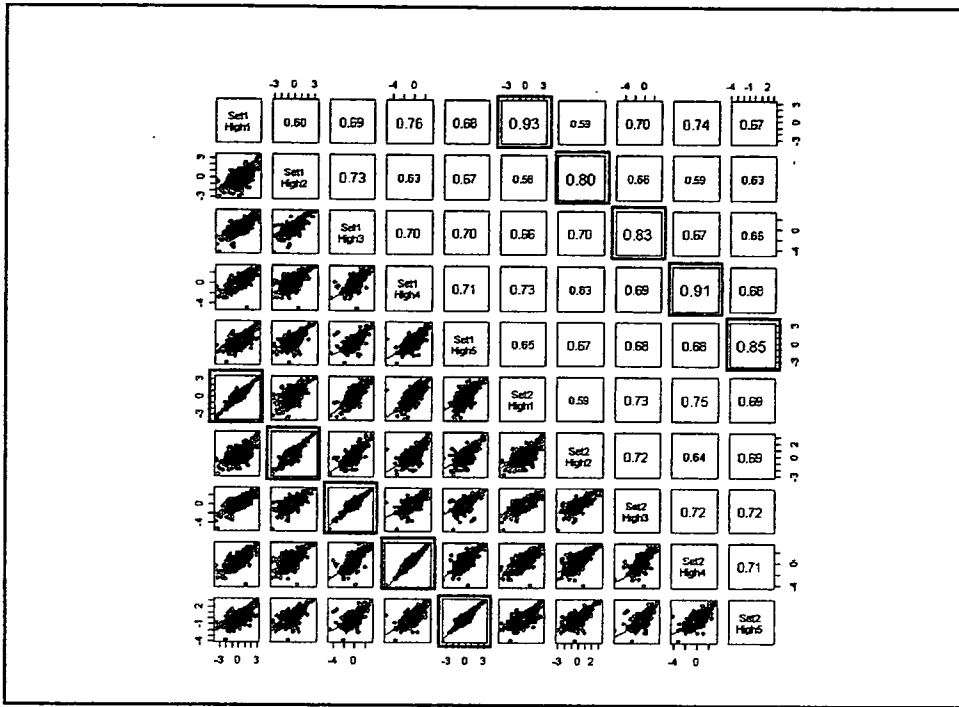
Distance : euclidean
Linkage : average

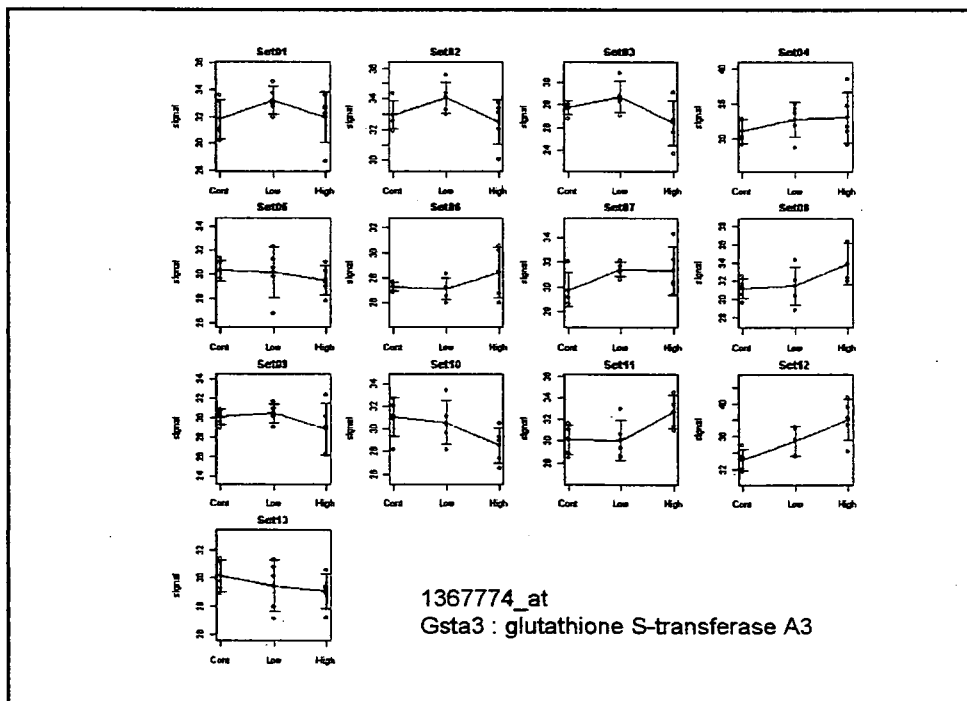
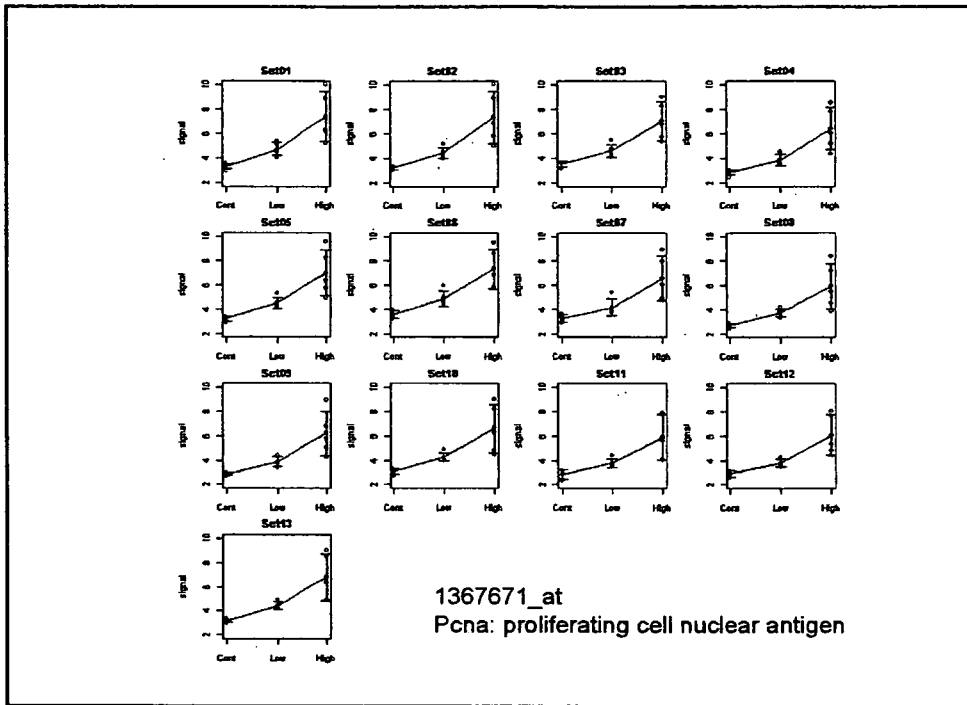
Group mean signal value of all probeset (exclude "AFFX-" probeset) was used.

Concordance of gene selection method









**Phase II:
Multi-platform analysis
2008 -**

Platform planning in TGP validation Phase

**Affymetrix
Agilent
Illumina
... Others**

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究)

分担研究報告書

創薬基盤としての分子毒性学研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長

研究要旨

毒性予測に際して、実験動物(マウス)からヒトへの外挿を考察する要因に、外来化学物質の代謝機能に関する種差が挙げられる。PXR(ヒトでは SXR)は薬剤代謝酵素の誘導に関わる重要な受容体であり、そのリガンド選択性に種差が大きいことが知られている。本分担研究では、ヒト受容体 SXR のリガンド選択性を考慮した毒性検討が可能なマウスモデルを作出するために、遺伝子相同組み換え技術を用い、ヒト SXR のリガンド結合ドメイン(LBD)のみをマウスの LBD と入れ替えたノックインマウス(hSXR-KI mouse)を作製した。これはhSXRの発現及び上・下流の制御は野生型マウスと同等で、リガンド特異性のみがヒト型化したモデルを狙ったものである。このマウスと野生型マウスの毒性発現を比較し、ヒトへ外挿するモデル系としての基盤情報を得ることとした。

本年度は、hSXR-KI mouse 作製に必要な targeting vector の設計から ES 相同組み換え体の取得、キメラマウス作製および生殖細胞系列への移行とホモ型の取得を行い、遺伝子構成上、目的の hSXR-KI mouse が作製されたことを確認した。更に、ノックインしたヒト型遺伝子が野生型マウスでの PXR に近いレベルと分布を保って全身に発現していること、及び、リガンド反応性がヒト型化することを肝、小腸で確認した。

A. 研究の目的

経口摂取された化学物質は消化管から吸収され、門脈経路で肝で代謝を受けた後、或いは乳び管を経由して大循環に入る。小腸や肝には齧歯類では PXR、ヒトでは SXR と呼ばれる核内受容体が外来異物センサーとして存在し、化学物質を極性物質に代謝し

体外への排出を促進する酵素 CYP3A 等の発現誘導を制御することが知られている。CYP3A は医薬品の相互作用問題において特に重要視されており、治療効果減少や、毒性増強に関わる可能性が考えられている。ところが、この PXR と SXR はリガンド結合領域(LBD)の種差が大きく、この受容体系の

反応が毒性を左右する物質については、齧歯類を用いた試験でヒトへの作用の予測は行えない可能性が指摘されている。実例として知られるのはリファンピシン (RIF: Rifampicin) で、ヒト SXR 系は活性化するがマウス PXR は活性化しない。この様なタイプの物質の毒性評価はマウスを用いた試験からは困難であることになる。逆の事例に PCN (pregnenolone-16 α -carbonitrile) 等の物質が知られており、この場合はマウスからはヒトに対して偽陽性の結果を得ることになる。

PXR と SXR を比較すると、DNA 結合ドメイン (DBD) のアミノ酸配列は 95% 保存されているのに対し、LBD は 77% 保存にとどまっている。また、ヒトとラットのキメラタンパク質を用いた解析により、LBD 内に種差を規定する領域が存在することが明らかにされており、ヒトの Leu308 とラットの Phe305 (マウスも同じ) が重要であることが示されている。ヒト PXR の結晶構造を元にした homology modeling により、これらのアミノ酸は located within or neighboring the flexible loop that forms part of the pore to the ligand-binding cavity であることが示唆されている。実際に、相互のアミノ酸を置換すると、Rifampicin に対する種特異性が逆転する。この事は、PXR と SXR の物質選択性の違いは LBD のアミノ酸配列の違いにあることを示している。マウス PXR の LBD をヒト SXR のものに変えればヒト型の活性化パターンを示すマウスが作製されることは容易に期待することができ、すでに、ヒト SXR 遺伝子をアルブミンプロモータ化に、肝に強制発現させるトランスジェニックマウスなどが開発されて、所定の成果を挙げている。しかし、今までのモデルマウスは何れも、発現臓器が限定されている等の人工的な第二の要素が加わっており、網羅性を重視する毒性評価に利用する為には十分

な性能を有していないと考えられた。そこで、我々は LBD の部分のみをヒト型化し、DBD を含むそれ以外の部分はマウス型のままにとするノックインマウスを作製することとした。これにより、マウスゲノム内に多数存在する cis-element への結合パターンに変化が生じないこと、及び、転写開始点上流の配列が維持されることから、マウス PXR 本来の組織発現パターンが保たれることが見込まれる。以上を踏まえ、LBD のみをヒト型化したキメラタンパク質 (mhSXR) をコードする cDNA をマウス PXR 遺伝子座の Exon3 に knock-in したマウスの作製を試み、作製されたマウスが実際にヒト SXR 特異的リガンドに対する反応を示したことを報告する。このマウスはヒト SXR を介した毒性研究を行うための有用なツールとなると期待される。

B. 研究の方法

(1) hSXR-KI mouse の作出

マウス LBD の代わりにヒト LBD を持つ mhSXR chimeric protein を発現するノックインマウス作製用ターゲティングベクターを作製するために、マウス PXR の intron2 から exon 3 領域の DNA をマウス BAC clone (BAC clone No. RP23-351P21) を鋳型に PCR (primer: BAC39486FW:CCATGGGTACCACGAATAACAA, mSXR462RV:CATGCCACTCTCCAGGCA) にて増幅し、別途 PCR 増幅したヒト SXR の cDNA (primer: hSXR904FW: AAGAAGGAGATGATCATGTCCG, hSXR1887RVEcoRI: CCGAATTCTCATCATCAGCTACCTGTGATACCGAACA) と連結し、終始コドンより 3' 側に BGH (bovine growth hormone) 3' UTR を付加した。配列を確認した後、この cDNA を Cre enzyme による除去が可能な

LoxP 配列で挟まれた Neomycin 耐性遺伝子を含むベクター(相賀らの文献を引用)に挿入し、相同組み換え用 long arm として exon 3 に対し 5' 側の intron 2 の KpnI 断片 7kbp を、short arm として 3' 側の exon 8 から intron 8 の PstI-EcoRI 断片 1.3kb を用い、ターゲティングベクターを構築した。制限酵素 SacII により直鎖化し、C57BL/6 と CBA の F1 由来の ES 細胞クローンである TT2 ES cells {Yagi, 1993 #1364} にエレクトロポレーションにて導入し、ネオマイシン耐性クローンを選択した。144 クローンを選択し、PCR によって相同組み換え体の選別を行って得た 10 クローン中の 6 クローンをサザンブロッティングによって検討し、相同組み換えが確認された 2 クローン(#4, #25)をキメラマウス作製に用いた。これら 2 クローンは ICR マウス卵を用い、キメラマウスを作製し、生殖系列への移行を確認した。次に、#4 クローンについて、ネオマイシン耐性遺伝子を CAG-Cre マウスとの交配により除去し、得られたマウスを C57BL/6 CrSlc に少なくとも 4 回バッククロスし、ホモ体を得て以降の解析に供した。

(2) リガンド反応性検討

得られた hSXR-KI mouse 及び野生型マウスの雄に対し、vehicle(corn oil), RIF (10mg/kg/day) または PCN (40mg/kg/day) を 3 日間連日強制経口投与し、最終投与 24 時間後に肝、小腸を採取した。肝は小片を RNA later に浸漬した後、残りはホルマリン固定し組織学的解析に供した。小腸は一部から粘膜領域のみを採取し RNA later に浸漬した後、残りはホルマリン固定した。PXR、hSXR の組織分布解析用として、化学物質を投与していないマウスから、脳、胸腺、心、肺、肝、胃、脾、腎、小腸及び精巣の 10 臓器を採取し、RNA later に浸漬した。

(3) 定量的 RT-PCR (Percellome PCR)

全体の解析手法は Kanno, J., Aisaki, K., Igarashi, K., Nakatsu, N., Ono, A., Kodama, Y., and Nagao, T. (2006). "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC genomics 7, 64 の方法に従った。簡略に記すと、組織片を RLT buffer (Qiagen GmbH., Germany) にて破碎した後、DNA 量を測定し、それに応じて spike RNA cocktail を添加した。その破碎液から total RNA を精製し、逆転写反応にて cDNA とし、CYP3A11(FW: cagcttggtgctcctctacc, RV:tcaaacaacccccatg tttt), PXR(FW:aatcatgaaagacagggttc, RV:aagacacagatctttccg), hSXR(FW:atcaccggaagacac gac, RV:aagagcacagatctttccg), PXR と hSXR を定量する primer として、FW:cccatcaacgtagagga gga, RV:tctgaaaaacccttgcac を用いて定量 RT-PCR を行い、spike RNA 量を基準にコピー数に変換した。

(4) *In situ* hybridization 解析

CYP3A11 検出用の DIG ラベル cRNA プロブを作製するために、FW:GATTGGTTTTGATGCCTGGT, RV:CAAGAGCTCACATTTTTCATCA を用い、肝 cDNA を鋳型に PCR 増幅し、配列を確認後、T7 RNA polymerase の promoter を含むリンカーを Block-iT T7-TOPO(Invitrogen, Carlsbad, CA) キットにより付加し、2nd PCR を行い、sense, antisense 用の鋳型を調製し、DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Germany) を用いて、DIG ラベルされた cRNA probe を作製した。パラフィン包埋切片に対する *in situ*

hybridization は、HistoVT One(nacalai tesque, Japan)中で 98°C、15 分間賦活化する処理を加え、定法に従って実施した。

(倫理面への配慮)

動物飼育、管理、動物実験に当たっては、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成 19 年 4 月版)に則って行った。動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。

C. 研究結果

(1)hSXR-KI mouse の作出

マウス LBD の代わりにヒト LBD を持つ hSXR mRNA を発現するノックインマウス作製用ターゲティングベクターを構築するために、マウス PXR の exon 3 にヒト SXR の cDNA を連結した。ターゲティングベクターには、ES 相同組み換え体選択用の Neomycin 耐性遺伝子を Cre enzyme による除去を可能とするために LoxP 配列で挟んだ形で共存させ、相同組み換え用 long arm として exon 3 に対し 5' 側の intron 2 の 7kbp を、short arm として 3' 側の exon8 から intron8 に対応する 1.3kb を用いた (Fig. 1)

このベクターを C57BL/6 と CBA の F1 由来の ES 細胞クローンである TT2 に導入し、サザンブロッティングによって相同組み換えが確認された 2 クローン(#4, #25) をキメラマウス作製に用いた。得られたキメラマウスを ICR 系マウスと交配し、2 クローンとも生殖系列に移行することが確認された。

そこで、#4 クローンを Cre を CAG

promoter 制御下に恒常的に発現するマウスと交配し、Neor を失ったマウスを選別した。このマウスを C57BL/6 CrSlc に少なくとも 4 回バッククロスし、ホモ体を得て以降の解析に供した。

(2)hSXR の組織発現パターン of 検討

mhSXR の組織発現パターンを定量 RT-PCR によって検討した。定量 RT-PCR は細胞当たりのコピー数に変換可能な手法である Percellome method (Kanno BMC genomics (2006) 7, 64)を用いて実施した

脳、胸腺、心、肺、肝、胃、脾、腎、小腸及び精巣の 10 臓器について検討したところ、発現パターンは野生型と一致し、肺、肝、胃、腎、小腸で 2 コピー以上の発現が認められた (Fig. 2)。また、1 コピー以上の発現が精巣において認められた。各臓器における発現量は総じて mhSXR の方が高く、野生型に対し肺で 1.8 倍、肝で 2.4 倍、胃で 1.8 倍、腎で 1.7 倍、小腸で 1.2 倍、精巣で 3.0 倍であった。

(3)ヒト型化リガンド反応性の検討

このマウスがヒト型化反応を示すか否かを、ヒト特異的 agonist として RIF を、マウス特異的 agonist として PCN を用いて検討した。それぞれ 10mg/kg, 40mg/kg を経口で 3 日間連日投与し、肝、小腸粘膜を採取し、CYP3A11 mRNA の発現量を Percellome 定量 RT-PCR によって検討した。その結果、肝、小腸粘膜ともに RIF で発現誘導されるが PCN では誘導されないという、典型的なヒト型反応を示すことが確認された (Fig. 3A)。一方で野生型では PCN による誘導が確認された。次に、肝での発現誘導を組織学的に検討するため、CYP3A11 mRNA に対する *in situ* hybridization を行った。その結果、野生

型での PCN による発現誘導と同様の、肝小葉中心静脈周囲を起点とする発現上昇が、ヒト型マウスで RIF 投与によって認められた (Fig. 3B)。尚、コントロール群の CYP3A11 発現量は mhSXR マウスの方が特に肝で高く、野生型の 2 倍程度に上昇していた。これは、肝での mhSXR の発現量が野生型での PXR に比べて 2 倍程度高い (Fig.2) ことに対応するものと考えられた。

D. 考察

(1) 既に報告のあるヒト型 SXR マウスとの比較

ヒト型化 SXR マウスに関してはすでに、PXR knock-out mouse に SXR を albumin promoter 下流につなぎ transgenic したヒト型マウス (Alb-VP-hPXR) (Xie et al. Nature (2000) 406, 435-439) と、ヒト SXR の Exon 領域全域を含む BAC clone を用い、ヒト SXR ゲノム領域を transgenic (マウス PXR は knock out) したマウスモデル (BAC-hPXR) (Ma, et al. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals (2007) 35, 194-200.) の 2 種類が存在し、各々ヒト型反応を示すことが報告されている。しかし、Ma らが指摘しているように、Alb-VP-hPXR マウスは、ヒト型 PXR の発現が肝に限定されており、腸を始めとする他の臓器でのヒト型 PXR の役割を検討できない点に限界がある。BAC-hPXR マウスは小腸、胃、腎臓での発現が確認されており、有用なヒト型マウスモデルであるが、肺での発現は確認されておらず、こちらも全身臓器を対象とした毒性研究に於いては限界があると考えられる。

これらに対し、我々が樹立したこのノックインマウスは肺に於いても導入遺伝子の発現が検出され、野生型マウスでの PXR 臓器発現パターンと一致する hSXR 臓器発現パ

ターンを示した。また、RIF と PCN の投与により、hSXR マウスにおいて、明確なヒト型化反応が示されたこのことから、本ノックインマウスは毒性研究における応用範囲が今までになくより広く、種差を勘案した毒性評価に適したツールであると考えられる。

(2) 組織発現パターンについて

PXR の発現を制御するプロモーター構造に関する研究は少ない。ラットへのクロフィブレート投与による PXR 誘導メカニズムに関し、ヒト SXR の転写開始点上流 2.2kb を対象に調べ、PPARalpha の結合部位を見出し、ヒト肝腫瘍細胞株 (Huh7) を用いてその部位の重要性を確認した報告 (Aouabdi et al. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals (2006) 34, 138-144) と、マウスにおいて、FXR による PXR 発現制御に関わる DNA 領域として、PXR の Intron2 領域に FXR 結合部位を 4 箇所見出し、それらが実際に機能していることを HEK293 細胞を用いた検討により明らかにした報告 (Jung et al. The Journal of biological chemistry (2006) 281, 19081-19091) がある。

hSX-KI mouse では、Intron2 配列は完全に保存されているため、FXR による制御も問題なく行われるものと期待される。また、ノックインであるため転写開始点上流のプロモーター構造はマウス本来のものと変わりなく、mhSXR はマウス本来の臓器発現パターンを示すものと期待され、実際、肺を含む 10 臓器における mhSXR の発現を調べたところ、野生型での臓器発現パターンと一致するパターンが得られた。野生型肺に於ける PXR 発現については、通常は検出できないレベルであるが、DEX 投与や DEX と PCN の投与により誘導検出されるとの報告がある (Haag et al. Archives of toxicology (2003) 77,

145-149)。我々の検討では、通常状態の肺でも野生型で約3コピー、mhSXR マウスで約5コピーの発現が検出された。この違いは primer 配列を含む PCR 条件の違いによるものと考えられ、実際、我々も今回用いたのは別の領域に設定した primer を用いた PCR では肺に於ける PXR を検出できなかった (data not shown)。以上、hSXR-KI mouse は LBD ノックイン設計であるため、マウス本来の PXR 発現と同じ発現パターンを期待することができ、種差を考慮した網羅的な毒性研究における応用範囲が今までのもののうちで最も広いツールであると考えられる。

尚、hSXR の各臓器に於ける発現量は、概してマウス野生型 PXR よりも高かった。この理由として、hSXR をノックインする際に mRNA の安定化を期待して Bovine growth hormone (BGH) の 3' UTR を導入したためであることが考えられる。それにより、hSXR mRNA の安定性が PXR mRNA よりも高くなり、結果的に高い発現量として検出された可能性がある。hSXR の発現量と CYP3A11 mRNA の発現量には相関傾向が認められ、化学物質を投与していないマウスの肝で hSXR が野生型の 2.4 倍に上昇しているのに対し、CYP3A11 は 2 倍、小腸では 1.2 倍に上昇しているのに対し、1.1 倍であった。よって、hSXR-KI mouse は mhSXR mRNA 量が高い傾向にあるマウスと位置づけられる。厳密な毒性学的検討を行う際には、同様の方針で PXR をノックインしたマウスをコントロールとして用意する必要があると考え、その準備を進めている。

E. 結論

本年度の研究により、ヒト型のリガンド反応性を示す hSXR/LBD-KI mouse の作出に成功し、ノックインしたヒト型遺伝子が野生型マ

ウスでの PXR に近いレベルと分布を保って全身に発現されること、及び、リガンド反応性がヒト型化することを肝、小腸で確認した。今後、このマウスを用い、様々な物質によるヒト型、マウス型の反応について検討する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130:811-823, 2007.

Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, Kanno J, Yamori T. Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. *Mol Pharmacol*. 2007 Aug 16

Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, Kanno J, Kanno H. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. *Exp Hematol*, 35:1190-1200, 2007.

Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R,

Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, Kanno J, Degawa M. A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats. Drug Metab Dispos,35:1949-1955, 2007

菅野 純, 北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 高木篤也, 小川幸男, 児玉幸夫 Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み 細胞工学(2007) 26: 71-77

菅野 純, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 北嶋聡, 中津則之, 児玉幸夫, 高木篤也 トキシコゲノミクスの新展開:Percellome プロジェクトによる 2,3,7,8-TCDD - 2,3,7,8-TCDF 比較 細胞工学(2007) 26: 1391-1396

2. 学会発表

菅野 純, Chemosphere-Biosphere Interaction 解析ツールとしてのPercellome Toxicogenomics, 第34回日本トキシコロジー学会学術年会 特別講演 2007年6月27日、東京

北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 菅野 純, モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノミクス(Percellome 手法)解析, 第34回日本トキシコロジー学会学術年会, 2007年6月27-29日、東京

五十嵐 勝秀, 種村健太郎, 中津 則之, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純, 化学物質によるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした Percellome 解析, 第34回日本トキシコロジー学会学

術年会, 2007年6月27-29日、東京

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its possible contribution to 3R's, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences(WC6: 第6回国際動物実験代替法会議) (Aug.21-25, 2007), Aug.23, Tokyo Oral

種村 健太郎, 五十嵐 勝秀, 北嶋 聡, 菅野 純, エストロゲン受容体 α 型の非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳機能解析, 第24回日本疾患モデル学会総会, 2007年8月31日-9月1日、つくば、口演

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Kodama Y, Takagi A, Kitajima S, TCDD-TCDF COMPARISON OF THE MOUSE LIVER TRANSCRIPTOME BY PERCELLOME ANALYSIS - A SEARCH FOR TEF GENE BY TIME AND DOSE-DEPENDENT RESPONSES -, Dioxin 2007(Sep2-7, 2007) Sep.4, 2007, Tokyo Oral

菅野 純, 相崎健一, 中津則之, 北嶋 聡, 児玉幸夫, 小川幸男, Percellome Toxicogenomics for the Development of Mechanism-based Predictive Toxicology 第66回日本癌学会総会, シンポジウム「がん創薬におけるイノベーション」 2007年10月3日、横浜、口演

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for Predictive Toxicology, 8th International ISSX meeting (Oct.9-12, 2007) Oct 9 short course speaker, Sendai

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、
菅野 純、エストロゲン受容体(α 型)非翻
訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および
脳高次機能解析 第100回日本繁殖生物
学会大会、2007年10月19-22日、東京

APPROACH TO MINIMISING TOXICITY
IN DRUG DEVELOPMENT. The 1st Asia
Pacific Regional Meeting (APISSX) of
International Society for the Study of
Xenobiotics (ISSX), December 3-6, 2007,
invited speaker

五十嵐勝秀, 北嶋聡, 種村健太郎, 菅野
純、エストロゲン受容体 α 型の妊娠維持
への関与 第100回日本繁殖生物学会大
会、2007年10月19-22日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi
Kitajima, Yukio Kodama, Yukio Ogawa,,
PERCELLOME TOXICOGENOMICS
PROJECT FOR MECHANISM BASED
PREDICTIVE TOXICOLOGY: AN

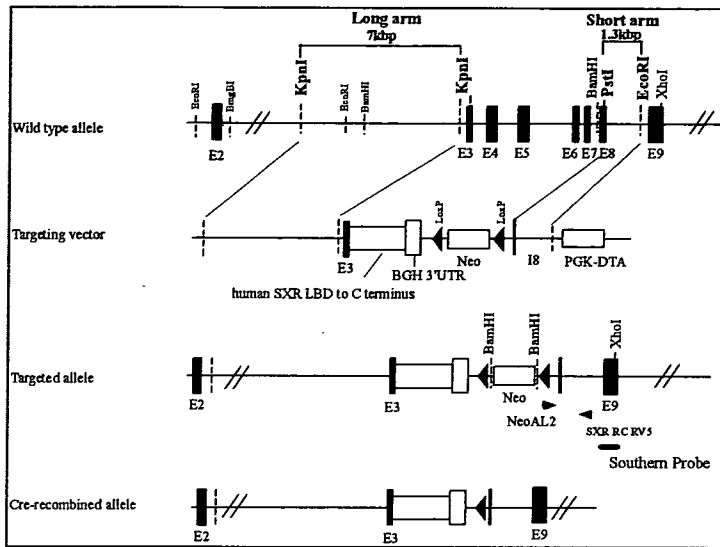


FIGURE 1. hSXR-KI mouse の作出

相同組み換え設計図を示す。マウスとヒト(LBD に対応する cDNA)のキメラである hSXR の DNA 断片を、BGH(bovine growth hormone)の 3' UTR を連結し、マウス PXR エクソン 3 領域にノックインした。その際、エクソン3から8に至る領域は除去した。相同組み換え体の選別には抗生物質ネオマイシン耐性遺伝子を用い、これは後に CAG-Cre マウスとの交配により除去できるよう、loxP 配列で挟んだ。

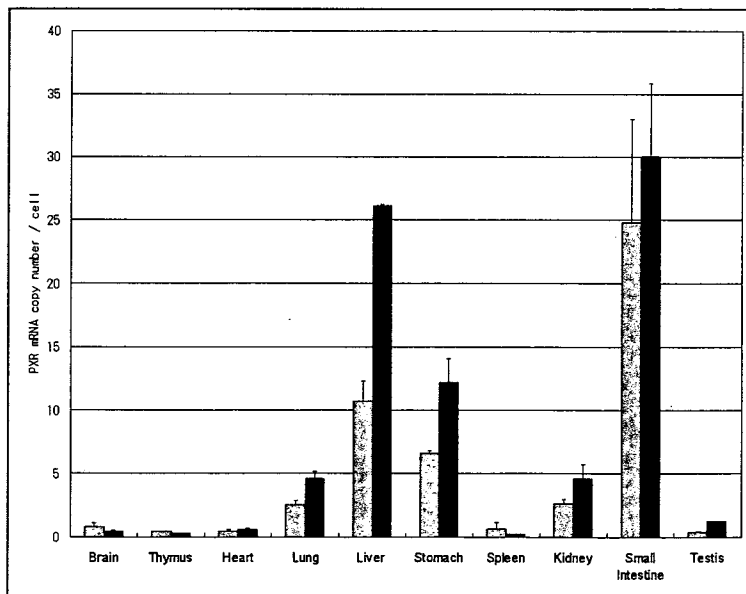


FIGURE 2 hSXR-KI mouse における臓器発現パターンの確認

10 種類の臓器に対し、野生型マウスと hSXR-KI mouse における PXR または hSXR mRNA の発現コピー数を、Perccellome 定量 RT-PCR 解析により検討した。Lung, liver, stomach, kidney, small intestine において数コピー以上の発現が検出された。灰色の棒が野生型(PXR)、黒色の棒が hSXR-KI mouse(hSXR)である。

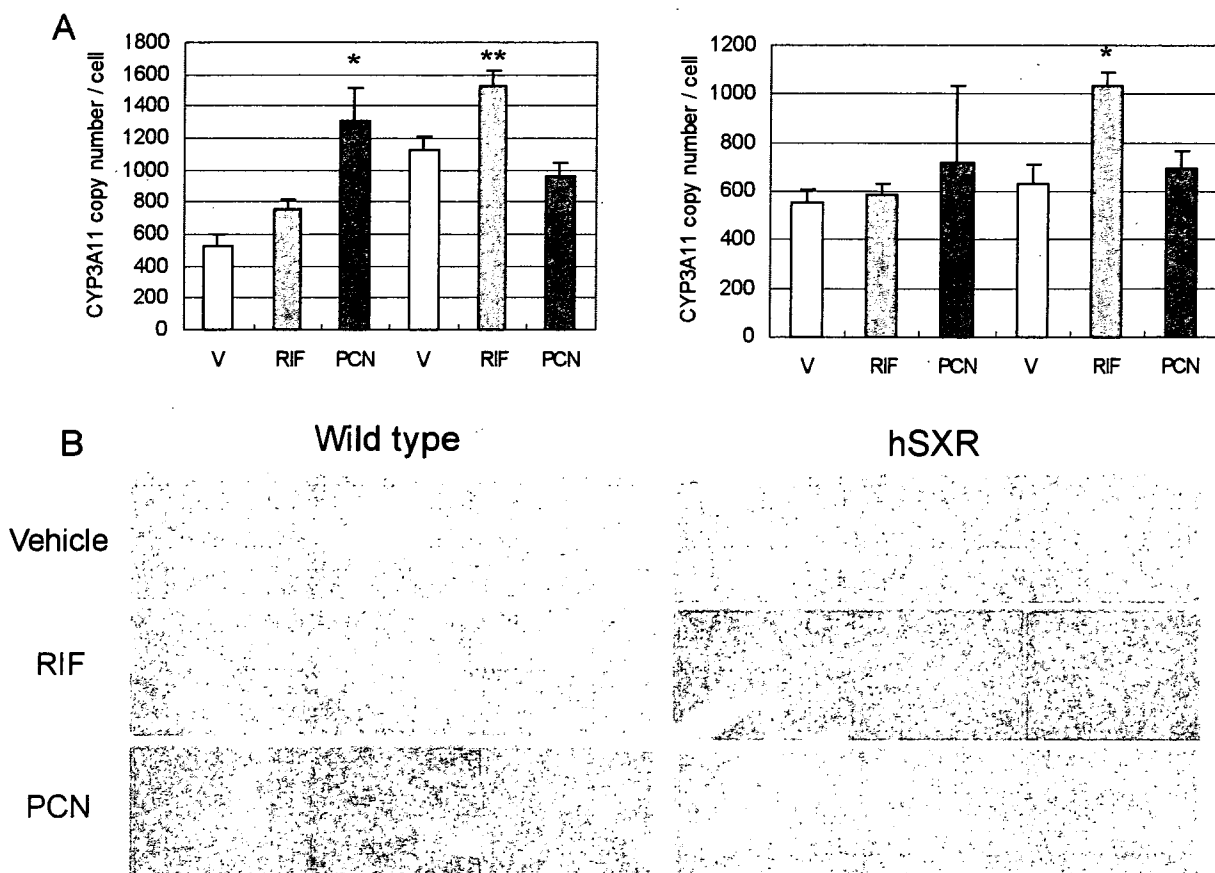


FIGURE 3 hSXR-KI mouse におけるヒト型化反応の RIF 及び PCN を用いた確認

野生型及び hSXR-KI mouse に対し、corn oil(V: vehicle), RIF 10mg/kg または PCN 40mg/kg を連日 3 日間、経口投与した。最終投与後、24 時間で肝、小腸を採取した。

A, Percecellome 定量 RT-PCR 解析

CYP3A11 mRNA の肝、小腸における発現コピー数を測定した。野生型において、CYP3A11 mRNA は肝および小腸で PCN によって発現誘導されている。一方、hSXR-KI mouse では RIF によって誘導されている。データは平均値± S.D., n=3.

*, P < 0.05, ** P < 0.01 とともに野生型との比較。

B, *In situ* hybridization 解析

肝における CYP3A11 mRNA 発現分布を ISH 法により検討した。典型的な組織学的写真を各群 3 マウスずつ示した。A で示したヒト型化反応が組織学的にも確認されている。CYP3A11 mRNA の誘導は中心静脈周囲に認められている。

別添 5

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
T. Urushidani	Prediction of hepatotoxicity based on the Toxicogenomics Project Database	Saura C. Sahu	Hepatotoxicity: From genomics to in vitro and in vivo models	Wiley & Sons	USA	2008	507-529
S. Ichida, H. Tanabe, Y. Shinozaki, S. Koyano, H. Kagechika, K. Shudo, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue.	How DNA microarray technology contributes to the retinoid evaluation.	I. T. Loesing	Vitamin A: New Reseach.			2007	71-92

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
T. Uehara, N. Kiyosawa, T. Shimizu, K. Omura, M. Hirode, T. Imazawa, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani.	Species Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity as an Example of How Toxicogenomics Help Assessing Risks for Human.	Hum. Exp. Toxicol.			In press
M. Hirode, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, Y. Ohno, and T. Urushidani.	Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing	Toxicol. Appl. Pharmac			2008 Feb

	phospholipidosis.	ol.			14; Epub
T. Uehara, N. Kiyosawa, M. Hirode, K. Omura, T. Shimizu, A. Ono, Y. Mizukawa, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani.	Gene Expression Profiling of Methapyrilene-Induced Hepatotoxicity in Rat.	J. Toxicol. Sci.	33	37-50	2008
S. Sakai, R. Matsuda, R. Adachi, H. Akiyama, T. Maitani, Y. Ohno, M. Oka, A. Abe, K. Seiki, H. Oda, K. Shiomi, A. Urisu.	Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed food.	J. AOAC International	91	123-129	2008
T. Oguchi, M. Onishi, Y. Chikagawa, Y. Minegichi, T. Kodama, H. Akiyama, Y. Ohno, S. Futo, A. Hino, S. Furui, K. Kitta.	Development of event-specific quantitation method for GA21 maize, which is a GM event without CaMV35S promoter.	J. Food Hyg. Soc. Japan	49	16-22	2008
T. Ashikaga, H. Sakaguchi, K. Okamoto, M. Mizuno, J. Sato, T. Yamada, M. Yoshida, N. Ota, S. Hasegawa, T. Kodama, Y. Okamoto, H. Kuwahara, N. Kosaka, S. Sono, and Y. Ohno.	Assessment of the human cell line activation test (h-CLAT) for skin sensitization; Results of the first Japanese inter-laboratory study.	AATEX	13	27-35	2008
H. Kojima, T. Ando, K. Inagaki, M. Ohhira, T. Kosaka, Y. Nakamura, H. Torishima, N. Morikawa, J. Kanno, M. Kuboki, M. Genno, M. Nokata, T. Harada, T. Morimoto, I. Yoshimura, Y. Ohno	Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan.	AATEX	13	36-44	2008
漆谷徹郎	医薬品安全性研究の動	新薬展	44	229-234	2008

	向～マイクロドーズ試験を含めて～	望 2008			
K. Omura, N. Kiyosawa, T. Uehara, M. Hirode, T. Shimizu, T. Miyagishima, A. Ono, T. Nagao, T. Urushidani.	Gene Expression Profiling of Rat Liver Treated with Serum Triglyceride-Decreasing Compounds.	J. Toxicol. Sci.	32	387-399	2007.
N. Kiyosawa, T. Uehara, W. Gao, K. Omura, M. Hirode, T. Shimizu, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani.	Identification of Glutathione Depletion-Responsive Genes Using Phorone-Treated Rat Liver.	J. Toxicol. Sci.	32	469-486	2007
漆谷徹郎	レクチャーノート トキシコゲノミクスプロジェクト (2)	Drug Metab. Pharmacokinet.	22(2)	13-15	2007
大野泰雄	日本薬理学会の奨める動物実験-苦痛の評価と軽減-「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針	日本薬理学雑誌	129	5-9	2007
Y. Shinozaki, Y. Sato, S. Koizumi, Y. Ohno, T. Nagao and K. Inoue.	Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase.	Neuroscience	147(1)	153-163	2007
Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K.	beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor	Brain Res.	1150	108-120	2007

	release from dentate gyrus granule cells.				
大野泰雄	動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について	Biophilia	3	4-5	2007
大野泰雄、小野俊介	マイクロドーズ試験ガイドランスの検討について	医薬品研究	38	623-638	2007
大野泰雄	動物実験代替法の国際動向	Fragrance Journal	10	20-28	2007
内藤真策、古田 盛、吉田武美、北田光一、笛木修、海野 修、大野泰雄、小野寺博志、河村信之、黒川美佐男、佐上文郎、篠田和俊、中澤隆弘、山崎恒義	医薬品開発における代謝物の安全性評価についての考え方	医薬品研究	38	495-498	2007
Naito S., Furuta S., Yoshida T., Kitada K., Fueki O., Unno T., Ohno Y., Onodera H., Kawamura N., Kurokawa M., Sagami F., Shinoda K., Nakazawa T, Yamazaki T.	Current opinion: Safety evaluation of drug metabolites in development of pharmaceuticals.	J. Toxicol. Sci.	32	329-341	2007
Seiki K., Oda H., Yoshioka H., Sakai S., Urisu A., Akiyama H., Ohno Y.	A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods.	J. Agric. Food Chem.	55(23)	9345-50	2007
大野泰雄	WC6(第6回国際動物実験代替法会議)を終えて.	日本動物実験代替法学会 News Letter.,	34	2-4.	2007

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, <u>Kanno J</u> , Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S.	Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts.	Cell	130	811-823	2007
Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, <u>Kanno J</u> , Yamori T.	Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines.	Mol. Pharmacol.			2007
Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, <u>Kanno J</u> , Kanno H.	Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line.	Exp Hematol	35	1190-1200,	2007
Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, <u>Kanno J</u> , Degawa M.	A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats.	Drug Metab Dispos	35	1949-1955	2007
菅野 純, 北嶋 聡, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 中津則之, 高木篤也, 小川幸男, 児玉幸夫	Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み	細胞工 学	26	71-77	2007
菅野 純, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 北嶋 聡, 中津則之, 児玉幸夫, 高木篤也	トキシコゲノミクスの新展開: Percellome プロジェクトによる2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF 比較	細胞工 学	26	1391-1396	2007