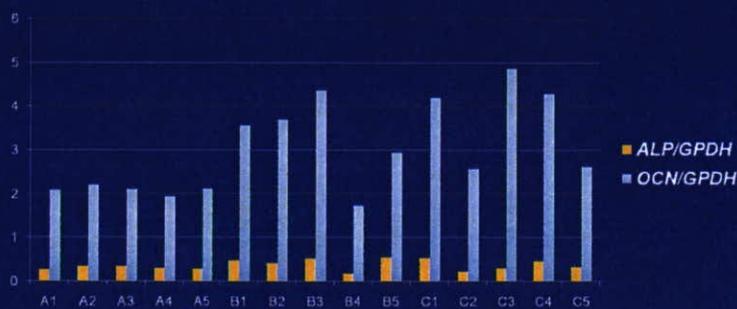
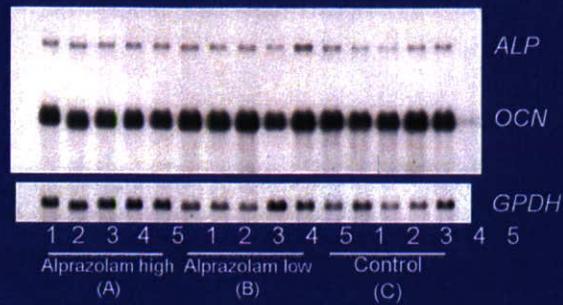


Relative expression of ALP and OCN in femurs of Alprazolam-administrated n



研究の進捗状況

【18年度】

予備実験を行い、薬物投与モデルを確立。また、予備実験結果から、本実験で用いる薬物をAlprazolamとSodium valproateに絞る。マイクロCT解析は、CTを切るレベルによりいかようになると判明。あくまでも補助的に利用する方針を確認。

【19年度】

ラット40匹、マウス24匹を用いて薬物投与実験を実施。ラット骨組織切片作製と所見の解析。マウスの骨組織標本採取。マウスの骨組織からRNAを採取し、Northern hybridization解析を実施。

【20年度】

ラット及びマウス骨組織の骨形態計測解析。マウス組織のRNAを用いて、遺伝子発現を解析。薬物の骨芽細胞への直接作用をin vitro実験系を用いて検討。総括的検討。

化学物質の遺伝子傷害性予測に関する研究

分担研究者 本間正充

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター変異遺伝部 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

遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝発癌物質を用いたマウス肝臓における遺伝子発現解析の結果、遺伝子傷害性物質にのみ共通して発現変化する遺伝子群を絞り込み、これらの遺伝子をつかった迅速スクリーニングのための TaqMan® Low Density Array (TLDA) を作製した。新たな 8 種の化合物セットをマウスに処理し、作製した TLDA のパフォーマンスをチェックした結果、ある程度の判別が可能であったが、非遺伝子傷害性物質によっても多くの遺伝子が増加したことから、さらに有効な遺伝子を絞り込む必要があることがわかった。

A. 研究目的

近年のゲノム解析の進展に伴う DNA マイクロアレイ技術の普及をうけ、遺伝子発現解析により、メカニズムを含めた毒性解析を行ういわゆる“トキシコゲノミクス”の手法が注目を浴びることになり、遺伝毒性の研究分野においても新しい試験法の開発に期待がかかっている。こうした流れを受け、我々は GeneChip 等のマイクロアレイを用いた網羅的発現解析により、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とともに、新たなスクリーニング系としての開発を目的としてきた。広く一般毒性を対象とした場合、多くのタイプの作用が考えられるため、すべての遺伝子に対して網羅的に調べることは有効であると考えられるが、「遺伝毒性」とその領域を絞った場合には、予測に必要な遺伝子数はある程度絞られ、他の遺伝子の

データはむしろノイズになると考えられる。そこで、ある程度限られた数の遺伝子について、それらの動きをより正確にかつ簡便に測定することが、新規スクリーニング系を開発する上で重要であると考えられる。こうした考えに基づいて、我々はリアルタイム RT-PCR を使った解析、また、操作が簡便である TLDA の系を用いて、より安価、簡便かつ信頼性の高い手法としての新規スクリーニング法を確立することを目的とした。そして、網羅的解析により抽出された指標遺伝子候補のバリデーションを行うための、新たな化合物セットを設定し、これらを処理したマウス肝臓サンプルの解析から、最終的に有効なスクリーニング系としてのリアルタイム PCR による解析法を確立することを目的に検討を行った。

B. 研究方法

1. TaqMan® Low Density Array (TLDA) の

作製

これまで、日本環境変異原学会 MMS 研究会の共同研究として、GeneChip 等の解析により、遺伝子傷害性に特異的に反応する遺伝子群を選択した。これらの遺伝子 46 種類の発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析するための 48x8 フォーマットの TLDA を設計し、アプライドバイオシステムズ社に作製を依頼した。

この設計に際して、常に発現の変化しない遺伝子を内在性コントロールとして用いる事が望まれており、TLDA にあらかじめ組み込まれて提供される 18s リボゾームタンパクに加えて、これまでの GeneChip データから変動のなるべく少ない遺伝子を選択することにした。

GeneChip 解析用ソフトウェアである、GeneSpring を用いて、コントロールとの発現比が全ての実験において1付近であり、ある程度高い発現量を示す遺伝子をセレクションしたところ表 1 に示す数種の遺伝子がリストアップされた。アプライドバイオシステムズ社にて、設計済みの TaqMan プローブが使用可能であり、発現強度が安定しているという理由から、Psm3 (proteasome (prosome macropain) subunit, type3)を選んだ。

2. 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。そして、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する。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、本研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠し、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た。

C. 研究結果

1. TLDA による新たな化合物セットのスクリーニング

遺伝子傷害特異的反応遺伝子 46 種類を搭載した TLDA カードを用いて、4 種の遺伝子傷害性肝発癌物質および 4 種の非遺伝子傷害

性物質処理によるマウス肝臓での遺伝子発現変化を検討した。

一群 5 匹のマウスに対し RNA 抽出および cDNA の合成は青山学院大学(青学)および国立医薬品食品衛生研究所(衛研)にて分担して行った。青学では、cDNA 合成時の primer として oligo-dT を、衛研 random hexamer を用いた。合成した cDNA を用い TLDA を用いた TaqMan 定量 PCR 法にてマーカー候補遺伝子の発現を比較した。データの解析にあたっては、通例内在性コントロール遺伝子の発現量を基準とした $\Delta \Delta Ct$ 法を用いるが、今回のデータでは、内在性コントロールの発現量が比較的ばらつく、および oligo-dT プライマーを用いた際に Ribosomal RNA がコントロールとして使えないなどの理由により、より適切なコントロールとして全遺伝子(発現量の少ない数種の遺伝子を除外)の発現量(Ct 値)の平均値を ΔCt を算出する際の基準として用いた。そして、各遺伝子に対して対照となるコントロール群の ΔCt 値の平均値をもとに $\Delta \Delta Ct$ 値を計算し、次式よりコントロールに対する発現量の比(RQ)を算出した。

$$RQ(\text{ratio}) = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

($\Delta \Delta Ct$ 法では、1 サイクルの差による増幅量の差を 2 倍として比を算出する)

こうして算出した各サンプルの RQ 値を表 2 と 3 にまとめた。表 2 においては、4 時間後のデータを表 3 においては 48 時間後のデータを遺伝子傷害物質と非遺伝子傷害性物質に分けてマウス個体ごとにリストした。そして、発現量が 2 倍以上になったものを赤印で、1/2 以下になったものを青印でそれぞれ変化量に応じて

3 段階に色分けし示した。表には比の値のみを示したが、発現量の低い遺伝子に関してはデータの信頼性が低いため、Ct 値が 25 サイクルを超えるような遺伝子(Cyr61, Glu1, Isg2011, Psma3, Trp53inp1)に関しては、遺伝子名に緑色でマークした。これらの遺伝子については、各サンプルにおける平均 Ct 値の計算より除外した。昨年度の検討結果と比較して、今回の化合物セットにおいては、全体として明らかな差が見られず、非遺伝子傷害性物質においてもかなり多くの変化が認められたことが、判別を難しくした。しかし、遺伝子ごとに変化を精査してみると、4 時間後における Hhex 遺伝子のように、逆の動きをする遺伝子もあり、判別性のあった遺伝子に黄色でマークした。図 2 にクラスター解析の結果を示したが(縦方向が遺伝子の階層、横方向が処理の階層を示す)、全遺伝子の結果を用いて解析を行った場合には、赤色の遺伝子傷害性物質と緑色の非遺伝子傷害性物質の群が分離できなかったが、いずれかのタイミングで判別性が見られた 15 種の遺伝子を選択して、これらを用いて解析を行ったところ、2 者をほぼきれいに分けることができた。それぞれの群の化合物に関してさらに詳しく見てみると、同じ色をつけた同じ化合物処理マウスは必ずしもかたまたま、個体差が認められた。

2. 新たなマーカー遺伝子の選択と最終バリデーションのための試験化合物の設定

今回得られた結果を元に、新たなカスタム TLDA 作製のための遺伝子セットの選択を行った。反応性の悪かった Elovl6, Psma3, Glu1, Dscr1, Gatad2a, Slc4a4, Eval の 7 種の遺伝子を除き、代わりに青学におけるオリジナルマイクロアレイの検討において有効性の高かった

遺伝子を新たに加え、表 4 に示した遺伝子セットを確定した。ここで、青色で示した遺伝子は内在性コントロール用である。このうち Gapdh は青学グループにおける RT-PCR 解析のコントロール遺伝子として使用されているものであり、Mrps24 は、昨年度に検討した GeneChip で最も変化の少なかったコントロール候補遺伝子群より選択した遺伝子である。Hs99999901_s1 (18S rRNA) は、TLDA 作製においてメーカー側より指定されたコントロール遺伝子である。以上、48 遺伝子セットを用いて、同じ 48x8 フォーマットにて新規カスタム TLDA を作製した。

この TLDA を用いた遺伝子傷害性のスクリーニング系を再評価するために、表 5 に示した 4 化合物ごとの新規の化合物セットを設定した。遺伝子傷害性肝発癌物質として、トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験データがあり、投与量の設定が可能な 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), urethane, 2-acethylaminofluorene, diisopropylnitrosamine の 4 化合物を選択し、表に示した投与量と溶媒にてマウスに単回腹腔内投与した。

また対照となる非遺伝子傷害性物質として、非遺伝子傷害性肝発癌物質として知られる di(2-ethylhexyl)phthalate, dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), furan の 3 化合物と、非発癌性の肝毒性物質として Phenacetin を選び、それぞれ LD₅₀ の 1/4-1/2 量で単回投与した。

投与についてはすでに終了し、現在来年度に向け RNA 抽出および cDNA 合成を行っている。

D. 考察

GeneChip を用いた網羅的解析より選択した 46 遺伝子を用い TLDA を作製して、RT-PCR 法による新規化合物セットのスクリーニングを行ったわけであるが、TLDA に関しては非常に簡便迅速な手法としてパフォーマンスは高かったが、発現解析結果としては、期待していたほどのパフォーマンスが得られなかった。一番の原因としては、非遺伝子傷害性物質においても、選択した遺伝子の発現変化が大きかったことが上げられる。遺伝子傷害性はないものの、LD₅₀ 半分量という用量を用いているため、毒性の結果としてある程度遺伝子を動かしてしまうのかもしれない。特に NIC に関しては遺伝子の動きが多かった。もうひとつの要因として、今回は動きのある遺伝子のみを選択して解析したため、バイアスとして絶対量として変化のなかった遺伝子も相対的に逆の方向へ変化したように見えた可能性もある。いくつかの遺伝子において、遺伝子傷害性の有無により動く方向が逆になっており、方向性を加味して検討した場合には、これらの遺伝子は分類器として有効であった。

今後来年度において、新規の化合物セットを用いて最終的なバリデーションを行うわけであるが、スクリーニング法としての有効性を客観的に評価するために、あらかじめ遺伝子傷害性の判定のためのアルゴリズムおよび基準値を既存のデータを用いて設定しておく必要があると考えられる。この際、マウス間のばらつき、発現変化量、方向性などのファクターを得点化し、一定の得点を得た場合に遺伝子傷害性ありと判断するような方法を想定している。

E. 結論

遺伝子発現解析においては、標的遺伝子が絞りこまれた場合には、簡便、迅速かつ信頼性の高

い手法として TLDA を用いた解析法が有効であることが再確認できた。

遺伝子を選択した化合物セットに比べ、新規の化合物セットでは遺伝子傷害性の判別はやや難しくなったが、遺伝子をさらに選択することで予測性は高まった。

遺伝子リストを更新し、最終的なバリデーションを行うための試験を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.*, 48, 248-257 (2007)
- Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. *DNA Repair*, 6, 781-188 (2007)
- Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat. Res.*, 619, 113-123 (2007)
- Newwirth, E., Honma, M., and Grosovsky, A., Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts. *Mol. Cell. Biol.*, 27, 5261-5274 (2007)
- Yatagai, F, Umebayashi, Y., Suzuki, M., Abe, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M, and Honma, M. Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing radiation on mutation induction in human cells. *Advan. Space Res.*, 40, 470-473 (2007)
- Watanabe T, Tobe K, Nakachi Y, Kondoh Y, Nakajima M, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Maeda S, Tadakuma A, Sakurai M, Arai Y, Hyogo A, Hoshino M, Tashiro T, Ito H, Inazumi H, Sakaki Y, Tashiro H, Furihata C. Differential Gene Expression Induced by Two Genotoxic N-nitroso Carcinogens, Phenobarbital and Ethanol in Mouse Liver Examined with Oligonucleotide Microarray and Quantitative Real-time PCR. *Genes and Environment*, 29:115-127 (2007)

- Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133-positive cells. *J Biol Chem.*, 282:33507-33514 (2007)
- Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R. Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia*. 21:2344-2353 (2007)
- Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C α in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196 (2007)
- Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)
2. 学会発表
- 田邊思帆里、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博、佐藤陽治: 細胞治療薬応用を目的とした骨髄由来間葉系幹細胞のゲノムプロファイリング 日本ケミカルバイオロジー研究会 第2回年会(2007.5)
- 本間正充: 代謝物の遺伝毒性評価 第34回日本トキシコロジー学会学術年会(2007.6)
- 鈴木孝昌: 生殖細胞特異的変異原物質は存在するか? ~トランスジェニックマウスを用いた突然変異試験結果より~ 第34回日本トキシコロジー学会(2007.6)
- Honma M.: DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)
- Yatagai F., Suzuki M., Ishioka N., Ohmori H., and Honma M.: Repair of dsb at a specific site of chromosome: influence of low-dose/low-dose-rate gamma-rays. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)
- Honma M.: Genotoxic assessment of drug metabolite and ICH guideline. Chinese National Conference on Drug Toxicology 2007 (2007.8)
- Honma M.: A multi-endpoints in vitro genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007.8)
- Honma M., Takashima Y., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Sugimoto K., and Hayashi M.: Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37th European Environmental Mutagen Society (2007.9)
- Honma M.: Genomic instability caused through breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)
- Suzuki T., Luan Y., Praba D., Kogi M., Honma M., Koizumi T., Tanabe S., Sato Y., Suzuki K., and Yamaguchi T.: CGH and SNP arrays; as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)
- Honma M.: The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007.10)
- Honma M.: Validation of a humanized in vitro genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007.10)
- 安井学、小山直己、高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、坂本浩子、杉本憲治、林 真、本

- 間正充: ライブセルイメージングを用いた γ 線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)
- 本間正充、櫻庭真弓、林 真: DNA マイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)
- 谷田貝文夫、鈴木雅雄、本間正充: 低線量・低線量率 γ 線照射によるヒトリンパ芽球細胞での変異誘発 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)
- Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinase N., Matsuda T, Hayasi M., and Honma M: Genotoxicity of acryamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., and Honma M.: Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase η and κ . 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Yatagai F., Matsumoto H., Honma M.: A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Saito M., Matsufuji H., Chino M., Hyashi M., Honma M., and Yamagata K. : Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid TK6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Arai S., Saito M., Takashima Y., Honma M., and Kojima H.: A new trial for in vitro Comet assay using 3-dimensional human epidermal model. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Kimura A., Sakamoto H., Hayashi M., Saigo K., Tokado H., and Honma M.: Establishment of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Honma M.: Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Suzuki T., Koizumi T., Prabha D., Luan Y., Honma M., Hamada S., Nakajima M., Watanabe T., and Furihata C.: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)
- Honma M.: Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual

Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society) (2007.11)

C. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Sakurai, T. Suzuki, S. Hamada, K. Narumi, M. Nakajima, A. Koeda, T. Sakuma, K. Oshida, H. Sanada, M. Hirayama Collaborative study of JEMS/MMS/ Toxicogenomics: Quantitative real-time PCR analysis on mouse liver carcinogens. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society) (2007.11)

村田香織、森山英樹、高島良生、本間正充、岡茂範、杉本憲治: マルチカラーライブセルイメージングにより明らかとなった Aurora-B キナーゼ阻害剤 VX-680 の染色体分配ダイナミズムに及ぼす影響 BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会)

田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英 遺伝子発現プロファイリングによる新規ヒト骨髄由来間葉系幹細胞継代培養時系列マーカー遺伝子の探索 BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会) (2007.12)

押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英 カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球分化において増殖・分化に重要な働きをする BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会) (2007.12)

T Suzuki, T Suresh, K Ramesh, T Oshizawa, K Suzuki Searching for the hepatotoxicity-related makers in urinary proteome by the nano-LC MS/MS and original software “mzMore” International Conference on Toxic Exposure Related Biomarker, Genome and Health Effects

(2008.1)

Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Honma M.: Genotoxic Responses by Live Cell Imaging Analysis International Conference on Toxic Exposure Related Biomarker, Genome and Health Effects (2008.1)

Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H., and Hayashi M. Inter-allelic homologous recombination and target integration induced by DNA double strand break Key Stone Symposium”DNA Repair and Recombination”(2008.2)

G. 知的財産所有権の出願・登録情報

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 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	Psmc3	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 ID	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	Isg20l1	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2 TLDAによる発現解析結果 (4時間-1)

Chemical	Mouse No.	Aacs	Bax	Bhlhb 2	Btg2	Camk 1d	Car3	Ceng f	Cdkn1 a	Cyp2b 10	Cyp4a 14	Cyr61	Ddit41	Ddit4	Dscr1	Dscr1	Egfr	Elovl6	Ephx1	Eval	Fabp5	Gaadd 5g	Gatad 2a	Gli3	Gsta2	
																										1
Genotoxic	DMAA	0.77	1.08	1.78	3.75	1.72	0.17	0.89	1.93	2.14	0.12	1.27	0.64	0.86	2.17	1.36	0.50	1.67	2.19	4.40	2.06	1.53	0.57	1.97	5.84	1.86
		0.54	1.06	0.91	1.40	2.26	0.23	0.23	0.92	1.06	0.12	0.81	0.86	0.63	0.63	1.09	0.94	1.31	0.87	0.81	1.42	0.93	0.42	1.15	1.78	0.89
		1.26	1.34	0.67	1.81	1.27	0.14	0.22	1.21	1.11	0.22	1.36	1.03	0.60	0.60	1.88	1.12	1.36	0.88	0.84	1.43	1.23	0.51	1.29	1.31	1.09
		1.00	0.75	1.15	0.79	1.22	0.23	0.23	1.01	0.65	0.50	1.96	2.03	1.76	0.70	0.92	0.70	0.58	0.58	0.73	1.03	1.48	0.34	2.17	1.96	1.21
		0.74	1.11	0.76	1.43	0.94	0.66	0.66	1.09	0.44	2.07	0.33	1.57	1.61	0.44	0.99	2.35	1.07	1.07	1.11	1.01	1.96	0.57	1.68	1.57	1.09
DT	1	0.75	2.07	0.83	2.87	2.42	0.55	0.80	1.95	0.82	1.09	0.66	0.66	1.65	0.95	0.63	0.78	1.59	2.57	1.74	1.25	0.35	1.77	1.71	1.44	
	2	0.34	1.28	0.43	0.88	0.99	0.58	0.63	0.98	0.15	2.54	0.49	0.33	5.59	0.83	0.82	0.57	0.30	0.30	3.26	0.48	4.20	2.00	1.08	0.48	
	3	0.72	2.35	0.96	0.86	0.72	3.38	0.85	0.52	1.07	0.25	0.40	0.31	1.16	0.64	0.58	0.71	0.48	0.48	1.66	0.49	3.39	1.19	0.40	0.79	
	4	0.63	1.66	0.76	0.73	0.98	2.03	0.98	0.82	0.52	0.61	0.42	0.56	0.42	2.58	0.71	0.32	0.32	0.42	2.16	0.61	3.52	1.66	0.46	0.58	
	5	0.48	1.96	1.04	0.92	0.85	1.44	0.87	0.19	0.83	0.20	0.51	0.49	0.42	2.64	0.68	0.46	0.78	0.37	1.66	0.80	1.94	1.87	0.51	0.90	
NNM	1	1.72	0.72	0.87	1.57	2.69	0.65	0.78	0.54	1.23	0.61	0.95	0.86	0.82	0.78	1.12	1.17	0.98	1.49	2.74	1.02	0.94	1.36	1.42	1.34	
	2	0.87	1.00	0.37	0.82	1.10	0.14	0.78	4.70	0.72	0.34	0.38	0.44	0.29	3.76	0.81	1.94	0.88	0.43	2.63	1.46	1.29	1.10	1.31	0.71	
	3	0.86	1.57	0.52	0.60	0.54	0.65	1.34	9.18	0.66	0.51	0.84	0.42	1.12	1.71	0.88	0.66	0.83	0.50	1.16	1.99	1.39	1.47	0.84	1.17	
	4	0.67	1.32	0.98	4.46	0.61	0.22	1.15	12.18	1.15	0.44	0.84	0.42	1.01	2.55	0.89	0.70	0.76	0.31	0.77	2.68	1.42	1.26	0.84	0.80	
	5	1.39	1.32	0.55	3.66	0.81	0.59	1.06	13.74	0.78	0.30	0.85	1.18	1.20	1.28	0.88	1.45	0.74	0.41	0.91	1.86	1.11	1.23	0.85	0.86	
Qn	1	0.53	0.52	0.56	1.20	1.08	3.29	0.54	4.87	0.77	0.69	1.16	0.67	0.79	1.88	0.53	0.87	0.56	1.28	3.83	0.75	1.19	1.36	1.75	0.77	
	2	0.73	1.18	0.41	1.41	0.91	2.32	0.55	12.99	0.60	0.51	0.78	0.28	0.29	4.84	0.66	0.76	0.51	0.41	1.52	0.77	1.68	1.34	0.70	0.71	
	3	0.51	1.12	0.53	1.04	1.06	1.97	0.52	9.46	0.64	0.23	1.02	0.56	0.26	4.20	0.48	0.48	0.47	0.35	2.32	0.70	1.54	1.14	0.82	0.55	
	4	1.03	0.79	0.15	1.31	1.19	0.65	0.90	8.20	0.96	0.37	1.71	0.61	0.10	0.77	0.69	1.15	0.62	0.41	2.36	1.69	1.33	2.43	1.71	0.81	
	5	3.23	1.53	0.31	1.01	0.40	0.71	0.71	3.93	0.84	0.29	0.56	0.39	0.41	1.36	0.42	0.68	0.51	0.29	1.22	0.82	1.94	1.58	0.56	0.58	
Non-genotoxic	CI	1	1.26	0.81	0.21	2.75	0.91	1.93	1.10	44.38	0.81	5.46	0.41	0.31	4.20	30.90	1.02	0.74	0.20	0.85	0.84	2.24	0.65	0.65	0.24	0.85
		2	0.71	0.57	0.44	0.95	0.63	13.77	0.69	32.14	0.63	5.39	0.52	0.61	0.94	0.88	0.80	0.80	0.58	0.81	0.99	0.63	1.17	0.55	0.52	0.85
		3	0.33	0.51	0.63	0.30	0.78	2.16	0.71	59.59	0.49	0.92	1.81	1.10	0.82	2.20	0.70	1.12	0.82	0.57	0.84	0.91	0.30	1.97	5.32	0.79
		4	0.44	0.72	0.38	0.42	1.20	0.96	0.84	35.76	0.63	1.45	0.75	1.01	0.58	1.35	0.88	1.78	0.85	0.55	0.76	0.76	0.70	1.56	1.84	1.44
		5	0.31	1.24	0.89	1.45	0.43	0.74	1.67	13.66	2.87	0.96	1.02	1.02	0.28	0.20	0.84	0.58	1.87	0.90	1.86	0.75	0.92	1.20	6.74	2.49
DBC	1	0.72	0.76	0.64	0.45	1.06	13.55	0.91	1.73	0.41	5.30	0.94	0.98	0.64	1.89	0.90	0.36	0.59	0.44	2.11	0.57	2.49	0.86	0.43	0.56	
	2	1.18	0.75	0.71	0.63	1.14	11.61	0.94	3.18	0.53	1.53	1.09	0.67	0.54	1.75	1.54	0.67	0.74	0.43	2.09	0.46	1.44	0.89	0.46	0.66	
	3	1.01	1.41	1.67	0.85	0.94	19.13	1.03	2.23	0.72	5.33	1.89	1.63	1.12	3.95	0.65	0.64	1.09	1.11	3.78	1.04	1.84	1.78	1.20	1.13	
	4	0.25	0.88	1.23	0.73	0.92	4.07	1.24	5.26	2.51	0.42	3.93	0.39	0.36	3.17	0.79	0.50	1.46	0.74	5.01	0.67	0.78	1.62	3.70	1.12	
	5	0.29	0.94	1.33	0.60	0.30	0.42	0.90	0.83	1.64	0.55	1.43	0.57	1.33	4.48	0.19	0.49	0.97	1.04	3.13	0.76	0.82	2.05	7.30	1.18	
GI	1	0.57	0.46	1.04	0.68	3.29	3.48	1.37	1.28	0.99	0.40	0.98	1.11	1.07	1.34	3.26	1.40	1.01	0.73	0.82	0.63	0.35	0.78	0.76	0.99	
	2	2.72	0.43	0.94	0.83	2.72	0.75	1.20	0.91	1.31	3.57	0.61	1.70	0.52	1.19	0.42	0.87	1.11	0.42	1.29	0.80	0.44	1.19	1.04	0.92	
	3	0.57	0.38	1.21	0.77	0.95	2.74	1.02	1.70	1.02	0.44	1.25	0.91	0.65	1.33	3.07	1.58	1.03	0.64	1.32	0.87	0.37	0.99	1.02	0.84	
	4	1.98	0.37	0.64	0.45	2.27	2.97	0.75	1.54	1.43	4.66	0.71	0.96	1.70	2.02	1.95	3.44	0.66	0.78	0.50	0.96	1.11	2.03	0.40	0.70	
	5	0.78	0.36	1.03	0.50	2.66	3.70	0.85	0.72	1.07	0.82	1.07	1.07	1.07	1.57	3.93	1.80	1.21	1.15	0.76	0.37	0.87	1.11	1.52	0.67	
NIC	1	1.14	0.83	0.53	0.99	1.43	1.48	1.01	2.20	0.94	1.64	1.01	1.68	0.66	0.47	2.08	0.96	0.87	0.34	1.17	0.52	0.47	0.65	0.81	0.96	
	2	1.37	0.80	0.47	1.08	1.31	8.88	0.99	2.31	0.73	6.61	0.50	0.48	0.86	0.90	1.46	0.59	0.92	0.97	1.23	0.76	1.97	0.92	0.65	0.85	
	3	0.39	1.81	2.91	1.43	0.52	1.21	1.82	0.58	4.46	2.68	0.89	0.50	0.67	1.41	0.38	0.43	2.02	1.42	2.50	0.75	0.49	0.84	5.28	2.37	
	4	0.89	0.99	1.01	1.77	0.61	0.51	1.34	1.57	2.91	0.51	1.64	0.48	0.57	1.38	0.36	0.47	1.86	1.68	1.95	1.01	0.45	1.83	3.14	2.25	
	5	0.40	1.89	2.65	1.58	0.58	0.74	1.71	1.48	3.39	0.22	1.09	0.51	0.49	1.27	0.56	0.64	1.81	1.49	2.78	0.87	0.84	0.86	6.28	1.90	

* Mouse No. in Orange; RNA was extracted at NIH5 (cDNA was synthesized by random hexamer).
 Green; RNA was extracted at Aoyama (cDNA was synthesized by oligo dT)

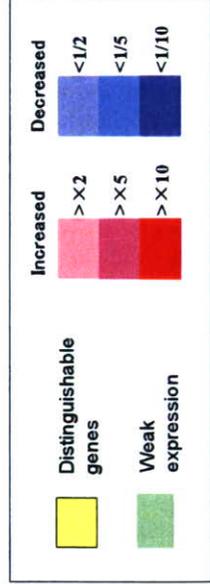


表2 TLDAによる発現解析結果 (4時間-2)

Chemical	Mouse No.	Gstm 3	Hamp 2	Hhex	Hs999 99901_s1	Htr1b	Igf1b1	Igf1b1	Igf201	Jun	Lpp	Lrp1	Ly6a	Mbi2	Mdm2	Mts1	Nono	Phlda 1	Phlda 3	Pema 3	Sds	Slc4a 4	St3gal 5	Sult1 d1	Trp53i np1	
																										1
Genotoxic	DMAA	1	1.57	2.25	1.68	0.77	0.21	1.04	0.13	1.99	5.41	1.07	5.63	3.66	1.80	1.82	0.48	1.82	1.41	1.41	1.84	2.84	1.44	13.37	1.82	15.68
		2	1.25	0.78	2.09	0.61	1.64	1.21	1.21	2.06	0.73	2.13	3.32	3.32	3.32	1.90	1.42	0.91	0.91	0.80	0.75	1.23	0.84	13.37	0.79	0.60
		3	0.85	0.94	N.D.	1.46	1.20	1.10	0.11	1.04	0.76	1.38	1.98	2.49	0.94	1.26	1.32	0.85	1.32	0.85	1.45	1.18	1.08	0.83	0.46	0.33
		4	1.15	0.93	1.16	7.16	0.99	1.26	0.19	1.96	0.56	6.53	0.69	0.96	3.77	3.11	1.79	1.46	1.46	0.69	1.96	0.67	0.66	0.51	0.51	1.96
		5	1.27	1.23	1.45	4.29	0.74	0.94	0.11	1.41	0.73	5.22	0.27	1.98	1.66	1.68	1.03	1.03	1.52	1.08	1.41	1.05	0.81	0.58	0.58	1.41
	DT	1	1.82	1.23	2.99	0.63	0.35	1.69	0.64	0.22	1.32	2.50	2.40	12.43	0.42	3.21	1.78	1.52	1.52	1.04	0.86	2.10	0.92	2.39	1.56	0.32
		2	0.73	0.26	2.14	0.40	3.85	1.06	5.69	7.14	0.35	0.49	3.11	2.08	1.03	3.48	3.48	0.86	0.86	0.45	0.55	0.77	0.55	0.11	0.48	5.43
		3	0.58	0.30	2.40	4.47	3.68	1.08	4.18	0.50	0.54	2.36	1.27	0.25	0.41	0.79	4.30	0.38	4.29	0.69	1.50	1.56	0.77	0.32	0.45	0.50
		4	0.60	0.37	1.48	2.82	3.67	1.28	1.60	0.46	0.31	1.76	1.59	0.48	3.64	3.78	2.92	0.88	1.83	0.59	0.48	0.82	0.59	0.15	0.30	0.48
		5	0.58	0.28	9.41	3.01	2.46	1.21	1.52	0.51	0.36	1.12	1.45	0.94	1.00	2.33	4.57	0.34	2.03	0.81	0.51	1.27	0.68	0.14	0.40	0.51
	NNM	1	1.67	0.95	1.99	1.04	0.71	0.79	0.53	0.52	0.83	3.01	0.23	3.16	0.12	0.83	0.42	1.01	0.56	0.45	1.14	0.77	1.40	0.99	0.99	
		2	1.15	0.98	1.98	1.18	1.23	0.98	0.11	1.57	0.22	1.28	4.63	2.30	0.55	0.89	0.83	0.93	1.83	1.27	10.53	5.07	1.11	1.45	0.34	
		3	0.94	0.74	1.13	4.25	0.98	1.20	0.95	0.84	0.17	3.23	1.03	0.69	0.87	1.45	4.21	1.09	3.70	1.50	0.84	5.82	0.83	0.41	0.19	0.84
		4	0.94	0.74	2.20	4.55	1.04	1.00	0.21	0.84	0.15	1.83	1.27	1.02	5.32	2.11	2.78	0.71	3.08	1.36	0.84	6.43	0.66	0.15	0.19	0.84
		5	0.94	0.76	1.74	3.88	0.74	1.16	0.74	0.85	0.20	5.78	0.80	0.27	2.70	1.30	2.09	1.17	4.13	1.04	0.84	4.40	0.76	0.54	0.23	0.85
Qn	1	2.06	0.76	2.30	1.40	1.16	1.07	3.17	12.03	0.68	0.47	8.08	20.50	0.03	0.42	0.49	0.35	0.68	0.50	0.55	0.64	0.79	1.24	0.97	0.66	
	2	0.48	0.57	17.05	0.29	3.78	0.78	2.14	6.69	0.37	2.29	4.78	6.72	0.87	0.47	4.82	0.44	3.05	0.42	1.84	0.53	0.48	0.19	0.31	0.49	
	3	0.57	0.63	12.43	0.88	3.28	0.98	1.55	14.32	0.30	1.43	6.02	6.13	0.89	2.00	3.99	0.61	2.77	0.46	2.06	0.58	0.66	0.23	0.35	0.52	
	4	0.76	0.85	4.97	1.09	2.77	1.16	0.74	1.71	0.31	6.88	0.84	3.06	0.48	2.42	6.57	0.27	3.94	1.10	1.71	0.38	0.92	0.75	0.46	1.71	
	5	0.44	0.45	5.19	1.03	8.53	0.94	0.80	0.56	0.39	7.55	2.20	0.76	1.72	1.63	65.96	0.62	3.27	0.78	0.56	1.05	0.69	0.13	0.43	0.50	
Non-genotoxic	Cl	1	0.51	0.30	1.53	0.40	5.56	0.89	1.38	21.95	0.18	0.46	2.34	31.89	6.00	3.94	1.22	0.91	1.93	0.74	8.51	3.23	0.44	0.12	0.28	0.50
		2	0.67	0.63	1.36	0.36	7.99	1.03	1.94	7.96	0.57	0.29	1.75	45.87	0.38	0.29	0.50	0.77	0.76	0.44	0.48	0.56	0.55	0.23	1.36	0.53
		3	1.33	1.42	0.72	3.46	2.73	1.25	1.95	0.69	0.99	0.20	1.30	1.11	0.66	1.79	1.01	0.43	1.04	1.06	0.71	0.63	0.84	0.72	2.08	2.88
		4	1.38	1.00	0.70	1.86	3.78	1.41	0.93	4.51	1.14	3.24	0.66	1.06	1.28	1.49	1.28	0.57	0.68	0.64	0.48	1.20	0.94	0.48	1.80	1.607
		5	0.63	0.62	1.25	0.28	4.51	2.94	0.81	0.38	0.86	0.44	1.54	0.89	0.37	0.81	1.19	0.33	2.29	1.34	0.34	2.15	1.85	0.56	2.26	3.103
	DBC	1	0.63	0.58	1.45	0.60	1.89	1.32	0.73	51.4	0.61	0.23	5.26	9.07	0.33	2.73	0.31	0.38	0.83	0.58	0.32	0.48	0.76	0.44	0.92	0.27
		2	1.16	0.57	0.44	0.60	3.20	2.34	7.16	176.6	0.51	0.25	3.26	15.30	1.11	3.99	0.80	0.48	0.67	0.44	0.35	0.59	0.59	0.68	0.87	0.81
		3	2.14	1.73	0.14	1.27	3.84	2.78	2.53	227.1	1.13	0.74	12.89	2.83	0.40	2.39	1.09	0.74	0.97	1.00	0.89	1.12	1.46	2.09	1.58	2.07
		4	0.53	0.70	0.18	1.14	1.69	6.17	3.18	72.91	1.05	0.47	6.31	0.96	0.19	1.55	0.38	0.17	1.09	1.09	1.31	1.27	2.01	1.35	0.39	1.78
		5	0.76	1.27	0.27	3.42	1.54	2.54	3.94	71.84	0.85	0.32	15.69	0.38	0.21	0.76	1.14	0.18	1.14	1.28	0.69	1.30	1.16	1.34	1.70	1.33
	GI	1	1.84	0.76	0.62	1.24	0.62	0.77	2.79	5.32	0.93	1.60	0.43	2.90	1.22	6.37	0.45	1.33	0.85	0.62	1.02	0.85	0.70	0.42	1.02	0.97
		2	1.44	0.65	0.35	1.53	0.49	1.02	0.60	1.05	0.72	1.70	0.49	3.43	3.76	10.11	0.25	0.53	0.77	0.71	0.76	0.80	0.82	0.25	1.14	0.85
		3	1.80	0.69	0.35	2.16	0.57	0.56	2.14	1.71	0.80	1.14	0.59	4.65	1.28	3.19	0.76	1.06	0.84	0.66	1.00	0.80	1.01	1.20	1.33	0.34
		4	1.20	1.02	0.17	4.31	0.65	0.52	3.61	1.08	1.01	1.29	0.33	0.21	5.60	2.72	0.50	0.31	0.73	0.54	0.32	0.47	0.54	0.39	0.89	0.84
		5	1.30	1.08	0.25	3.44	3.55	0.53	6.73	1.49	1.18	0.84	0.48	0.69	1.54	2.68	0.70	0.49	0.90	0.51	1.86	0.65	0.50	0.44	0.78	0.28
NIC	1	1.38	0.55	0.96	0.98	3.34	0.66	1.05	0.63	0.64	0.72	0.45	255.3	1.32	1.84	0.76	1.88	0.50	0.51	0.57	0.66	0.62	0.22	0.95		
	2	0.58	0.63	1.99	0.20	3.66	1.77	8.09	1.79	0.77	1.22	2.46	0.32	0.16	0.36	0.60	0.56	1.29	0.82	0.83	0.97	0.68	0.41	0.97		
	3	0.56	0.66	0.70	0.28	0.82	2.10	1.10	2.09	1.19	0.69	2.55	0.35	0.21	0.65	3.99	0.66	1.82	1.43	0.22	3.61	1.86	0.38	1.69		
	4	0.73	0.83	0.53	0.16	0.77	2.05	0.82	0.37	1.16	1.68	3.36	0.82	0.32	1.01	1.32	0.54	2.07	2.09	0.53	3.12	1.81	0.91	2.46		
	5	0.50	0.52	0.82	0.20	0.70	3.12	0.77	0.31	1.30	0.62	3.52	0.19	0.40	0.83	2.02	0.39	1.52	1.90	1.42	3.72	1.87	0.73	2.65	1.24	

* Mouse No. in Orange; RNA was extracted at NIH8 (cDNA was synthesized by random hexamer).
 Green; RNA was extracted at Aoyama (cDNA was synthesized by oligo dT)

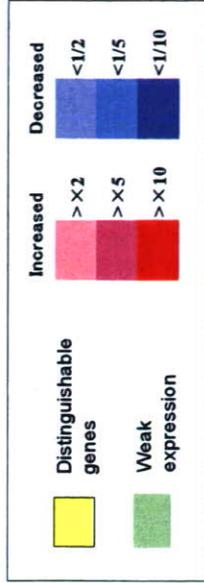


表 3 TLDA による発現解析結果 (48 時間-1)

Chemical	Mouse No.	Aacs	48 hr																							
			Bax	Bhlhb 2	Btg2	Camk 1d	Car3	Cong 1	Cdkn1 a	Cyp2b 10	Cyp4a 14	Cyr61	Ddit41	Ddit4	Dscr1	Egfr	Elov6	Ephx1	Eva1	Fabp5	Gadd4 5g	Gatad 2a	Gli3	Gsta2		
Genotoxic	DMAA	1	4.26	0.43	2.14	2.32	0.47	1.30	5.34	0.85	0.82	2.86	0.83	1.07	1.13	1.02	1.87	0.76	1.05	1.01	1.01	0.84	1.02	1.05	1.15	
		2	0.50	0.69	1.68	2.70	0.64	1.49	2.45	1.13	0.91	5.58	1.49	0.92	1.41	0.95	1.66	0.85	0.70	1.34	1.20	0.78	0.86	1.00	1.11	
		3	0.60	0.24	0.66	2.29	1.44	2.01	0.17	0.43	2.68	1.58	1.29	0.87	0.63	1.08	2.82	0.56	0.63	0.86	1.66	0.39	0.76	1.58	0.66	
		4	0.66	0.33	1.21	1.67	1.13	1.39	0.83	0.60	2.08	1.87	0.87	0.86	1.19	0.75	1.20	0.65	0.54	1.21	1.79	1.17	1.35	1.87	0.56	
		5	0.62	0.13	1.17	1.61	0.60	0.99	0.66	0.35	0.87	2.73	1.57	1.19	1.03	0.84	1.66	0.54	1.12	1.15	2.76	0.87	1.12	2.73	0.51	
Genotoxic	DT	1	0.35	0.40	1.44	0.47	2.61	0.63	4.58	1.41	2.25	1.60	0.60	1.28	2.45	0.65	1.29	0.59	1.03	1.49	0.75	1.73	1.01	1.62	0.78	
		2	0.55	0.32	1.45	0.42	3.36	0.20	2.04	0.91	3.38	1.19	0.83	1.05	2.28	0.21	1.64	0.97	1.81	0.48	0.95	2.41	0.84	1.57	0.64	
		3	0.36	0.37	1.08	0.43	3.32	0.33	3.92	1.06	1.08	2.10	0.54	1.21	2.04	0.46	1.63	0.68	1.10	1.16	1.07	2.51	1.01	2.87	0.64	
		4	0.29	0.72	0.32	0.87	0.90	0.42	0.88	0.33	3.86	3.84	0.69	1.38	1.39	0.34	2.08	0.52	0.64	2.11	1.40	1.75	3.84	0.32		
		5	0.56	0.78	0.35	0.67	1.20	0.47	1.35	0.66	1.60	2.93	0.48	1.79	1.27	0.20	1.72	0.80	0.95	1.12	2.25	2.74	1.33	2.93	0.70	
Genotoxic	NNM	1	0.18	0.88	0.89	1.48	0.94	0.48	1.64	1.13	0.52	1.09	0.67	0.70	0.98	0.70	0.55	0.55	0.59	1.70	0.66	0.97	1.10	1.89	0.61	
		2	0.55	0.43	0.39	2.73	0.80	1.70	1.43	0.82	0.83	1.75	3.82	0.64	2.01	0.73	2.77	0.53	0.46	0.79	1.29	1.16	0.70	0.68	0.86	
		3	0.19	0.35	0.25	3.87	2.18	0.38	1.69	1.43	1.00	0.62	3.17	1.88	0.48	3.44	0.53	2.71	0.62	0.47	0.48	1.92	1.31	0.61	0.96	0.47
		4	0.20	0.47	0.17	3.49	1.38	0.83	2.04	10.83	0.44	1.31	1.66	0.80	1.11	2.22	0.34	4.73	0.48	0.27	0.25	3.02	1.35	0.90	1.66	0.44
		5	0.18	0.43	0.17	2.94	1.92	0.64	2.15	12.49	0.28	0.88	2.36	0.91	0.44	1.87	0.40	4.65	0.46	0.22	0.54	4.06	1.40	0.93	2.36	0.39
Non-genotoxic	Qn	1	0.34	0.72	1.10	3.34	0.70	0.58	1.75	1.04	0.66	1.28	2.82	0.83	0.76	0.76	0.98	0.54	0.80	1.96	0.75	1.40	0.95	1.51	0.85	
		2	0.36	1.05	0.61	1.35	2.07	0.32	0.50	9.05	0.85	0.33	1.81	0.81	0.63	0.96	1.46	1.08	1.19	0.83	0.86	0.79	1.24	1.29	0.63	
		3	0.52	1.54	0.85	1.17	0.68	1.14	0.84	1.70	0.70	1.75	0.73	0.81	1.35	1.24	1.11	0.86	0.74	0.59	0.84	1.09	0.92	0.85	0.73	
		4	0.68	0.56	0.31	0.82	0.80	1.72	0.79	0.57	0.37	1.16	3.47	0.81	1.17	1.02	1.38	0.65	0.64	0.81	2.23	1.00	2.04	3.47	0.53	
		5	0.23	0.69	0.44	0.82	0.60	2.01	1.01	0.35	0.48	0.57	1.48	0.91	0.57	1.13	1.80	0.76	0.84	0.90	1.17	1.13	1.01	1.48	0.61	
Non-genotoxic	CI	1	1.55	1.12	0.71	1.16	0.83	0.70	0.86	1.13	0.36	0.46	1.22	0.95	0.72	1.51	0.44	0.78	0.97	1.08	0.76	0.63	1.10	1.44	1.07	
		2	0.76	1.07	1.73	0.82	1.75	0.90	0.51	0.66	0.26	0.21	0.61	1.40	0.67	1.74	1.28	0.84	1.04	0.96	0.93	0.67	1.37	0.86	1.26	
		3	1.98	0.77	1.48	0.60	0.77	1.74	0.59	0.33	1.88	0.45	0.91	0.99	0.75	0.89	0.75	0.89	1.12	1.16	0.87	0.65	1.05	1.75	0.90	
		4	1.06	11.06	0.83	1.57	1.39	1.62	1.06	6.49	1.30	0.94	2.10	0.76	0.80	0.88	2.38	1.72	0.79	1.23	1.26	1.20	0.73	0.41	1.07	
		5	0.75	12.73	1.39	1.55	0.38	3.60	1.27	0.75	0.79	2.47	0.93	0.60	1.48	1.50	1.39	0.57	1.04	1.10	0.70	1.18	0.75	4.84	1.44	
Non-genotoxic	DBC	1	2.91	1.04	0.98	0.82	1.43	0.46	0.89	0.54	1.62	0.66	1.04	1.10	0.89	1.49	0.92	0.97	0.69	1.04	0.88	0.64	1.35	0.82	1.24	
		2	1.80	0.68	1.37	0.49	2.33	1.45	0.53	1.84	0.74	3.49	0.17	0.41	0.85	0.55	1.57	0.65	0.68	0.84	0.50	0.65	1.11	2.53	0.85	
		3	0.69	0.65	1.96	0.47	0.33	0.89	0.66	1.00	0.88	1.21	0.85	0.73	0.85	0.75	0.57	0.59	0.59	0.95	0.65	0.81	1.09	1.03	0.66	
		4	0.41	7.83	1.83	1.54	4.04	4.04	1.92	4.31	0.33	0.81	1.83	0.83	1.31	0.75	0.90	1.30	1.21	0.89	0.48	0.83	0.81	2.18	1.53	
		5	0.14	17.74	0.56	3.79	0.53	4.37	1.61	0.29	0.33	0.26	3.54	0.76	1.51	1.31	1.44	0.98	1.20	1.97	1.63	0.57	1.09	0.93	1.86	2.03
Non-genotoxic	GI	1	0.14	13.46	0.58	2.64	0.40	2.94	1.60	11.19	0.70	0.18	0.53	0.99	2.19	1.41	0.93	0.48	1.52	2.48	0.40	1.09	1.15	1.71	1.37	
		2	2.09	1.10	1.07	0.56	0.63	0.63	0.31	0.74	2.83	0.86	0.61	1.44	0.59	0.75	0.85	0.62	0.85	1.76	0.88	0.91	1.03	1.06	1.13	
		3	1.72	0.24	1.14	0.95	0.24	0.42	0.85	0.26	0.80	4.68	0.81	1.13	0.97	0.73	0.79	0.88	1.15	1.08	1.02	1.05	1.33	1.02	1.23	
		4	3.13	2.04	3.10	1.68	1.83	0.41	1.07	0.10	2.93	2.88	2.67	0.42	0.99	1.30	2.51	0.21	2.24	0.97	2.13	0.39	2.29	0.32	0.78	0.96
		5	1.05	2.51	2.63	2.88	3.52	1.46	1.04	0.18	1.25	0.37	1.33	0.47	0.72	1.22	1.94	1.15	1.85	1.13	2.56	0.53	1.83	0.42	0.69	1.76
Non-genotoxic	NIC	1	1.80	1.08	1.47	0.74	0.48	0.84	0.48	4.82	0.47	0.14	0.75	0.78	0.61	1.31	1.04	1.44	0.87	0.84	0.98	3.35	1.25	0.04	0.82	
		2	0.73	5.30	0.33	1.13	1.74	1.84	0.84	24.77	0.69	3.56	2.04	1.86	0.39	0.95	0.03	0.24	0.14	0.60	1.53	2.05	0.80	2.20	0.73	
		3	0.68	0.84	0.58	1.20	10.1	5.4	1.10	26.76	0.80	2.94	1.27	1.37	-0.52	1.14	0.05	0.23	0.29	0.20	1.31	2.53	0.80	1.58	0.94	
		4	0.87	0.79	0.44	0.82	2.00	2.51	1.14	13.09	0.89	4.35	0.74	1.54	0.47	1.19	0.51	0.45	0.53	0.14	0.26	1.08	2.04	0.75	1.25	
		5	0.89	1.66	1.38	2.90	2.34	0.43	2.63	10.44	2.21	0.43	1.67	0.97	0.32	1.93	0.55	0.30	1.90	0.26	0.94	0.48	6.87	0.18	3.85	

* Mouse No. in Orange; RNA was extracted at NIHS (cDNA was synthesized by random hexamer).
Green; RNA was extracted at Aoyama (cDNA was synthesized by oligo dt)

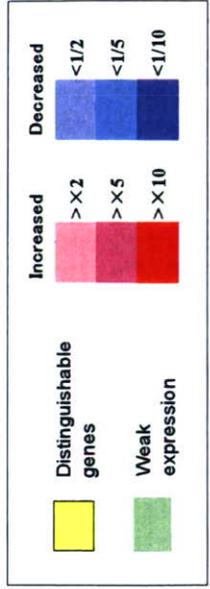
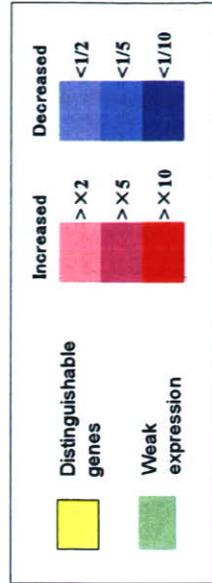


表3 TLDAによる発現解析結果 (48時間-2)

Chemical	Mouse No.	Gstm	Hamp	Hhex	Hs989	Htr1b	Igfbp1	Igfbp1	Isg201	Jun	Lpp	Lrp1	Ly6a	Mbl2	Mdm2	Mtss1	Nono	Phlda	Phlda	Pama	Sds	Sic4a	St3gal	Sult1	Trp53
		3	2	1	si	1	1	1	1	1	1	1	3	3	4	3	3	1	3	3	4	5	dt	1	1
DMAA	1	0.50	0.96	1.64	0.81	0.43	0.88	0.47	0.51	1.00	0.84	2.17	2.39	0.29	0.53	0.89	2.22	1.12	1.23	2.01	1.25	0.66	0.78	0.88	0.13
	2	0.75	1.02	2.64	1.85	0.32	0.86	0.84	0.50	1.14	0.54	3.94	0.63	0.19	1.03	0.91	1.94	0.94	1.15	2.10	1.25	1.08	0.54	1.02	0.19
	3	1.02	0.66	1.13	1.06	1.17	0.56	0.83	1.67	1.58	0.65	3.21	4.72	0.56	3.20	0.60	0.85	0.78	1.33	1.58	1.77	0.87	1.62	0.66	1.58
	4	0.66	0.87	0.89	1.68	1.28	0.79	1.87	0.59	1.87	0.59	4.87	0.66	0.50	1.20	0.73	0.50	1.25	1.30	1.87	1.31	0.76	1.08	0.84	1.87
	5	0.96	1.26	1.23	2.36	1.10	0.87	0.51	2.73	0.54	0.54	2.09	1.80	0.29	1.34	0.69	0.87	1.30	1.71	2.73	0.99	0.79	2.16	0.54	2.73
DT	1	0.96	1.02	1.58	1.37	0.79	1.66	2.49	0.24	0.61	0.52	34.85	2.29	0.29	0.48	0.64	0.92	0.88	0.83	0.98	1.07	0.65	0.69	0.59	6.15
	2	1.06	0.93	8.85	0.18	2.33	1.04	7.01	0.24	1.04	0.38	5.79	5.20	0.20	0.08	0.31	0.45	0.91	0.73	2.14	1.39	0.78	0.95	1.03	0.68
	3	2.05	0.96	1.93	2.03	1.20	1.00	2.46	0.25	0.72	0.31	7.33	6.24	0.25	0.28	0.30	0.77	0.77	0.98	1.01	1.27	0.98	1.29	1.03	1.04
	4	1.12	1.47	1.12	4.31	1.38	1.19	1.72	3.84	0.60	0.80	3.15	4.06	0.23	0.80	0.40	0.27	1.56	1.20	3.84	0.61	0.79	2.40	0.84	3.84
	5	1.34	1.23	1.15	2.81	1.42	1.15	1.63	2.90	0.78	0.54	7.50	2.73	0.23	0.31	0.47	0.28	1.56	1.40	2.90	0.96	1.14	2.52	0.94	2.90
NNM	1	2.52	0.81	3.08	1.76	1.81	1.02	0.71	1.62	1.05	0.71	0.28	8.47	5.12	3.36	1.51	1.10	1.30	0.56	8.47	0.65	0.78	0.79	0.89	0.97
	2	0.76	0.70	3.01	1.41	0.41	0.79	0.81	1.71	0.70	0.58	0.60	3.99	5.99	0.78	2.57	0.87	1.68	1.27	1.66	8.28	2.16	0.96	0.27	0.64
	3	0.75	0.53	2.81	1.04	0.33	0.98	0.31	3.98	0.62	0.42	0.39	9.05	27.88	0.09	1.59	0.38	1.53	1.61	2.36	14.53	3.98	0.60	0.35	0.54
	4	0.57	0.43	0.67	2.62	1.20	0.96	0.95	1.66	0.51	0.42	6.59	1.64	0.20	2.24	0.51	0.16	2.56	3.03	1.66	3.78	0.62	1.33	0.48	1.66
	5	0.50	0.46	0.79	2.02	0.98	1.19	0.85	2.24	0.48	0.32	5.68	5.26	0.23	3.12	0.55	0.39	2.53	3.85	2.24	2.79	0.67	2.18	0.50	2.24
Qn	1	1.28	0.82	2.10	1.54	0.45	0.81	0.68	0.73	0.79	0.78	3.99	1.38	0.79	1.39	1.30	1.32	0.67	0.53	1.45	1.77	0.68	1.36	0.75	0.22
	2	0.97	1.07	5.48	0.95	2.82	1.26	0.24	0.72	0.85	0.72	1.39	62.99	6.47	1.02	2.03	1.32	1.10	0.69	1.45	1.49	0.83	0.80	0.98	0.19
	3	0.14	0.75	4.34	1.61	1.29	0.39	1.62	0.73	0.96	0.64	2.33	0.78	0.28	1.12	1.55	0.72	1.09	0.80	2.61	1.82	0.65	0.57	0.73	0.73
	4	1.46	1.06	0.38	4.63	0.94	1.00	1.69	2.61	0.81	0.43	1.41	5.42	1.19	1.46	0.64	0.58	0.82	1.41	2.61	0.93	0.84	1.63	0.71	2.61
	5	0.82	0.76	0.42	2.36	1.02	1.97	2.59	1.48	1.10	0.49	4.94	1.92	2.14	1.68	1.10	0.82	0.89	1.40	1.48	1.48	0.83	0.88	0.85	1.48
Cl	1	1.32	0.91	1.61	1.77	0.76	1.08	0.62	N.D.	1.00	0.88	0.96	0.71	3.97	1.53	2.12	0.54	0.77	0.48	0.46	0.80	0.71	0.56	1.08	9.43
	2	0.72	0.76	4.22	0.31	0.77	1.03	0.77	1.86	N.D.	0.98	0.59	3.34	5.65	0.66	1.66	1.04	0.87	0.67	0.70	0.79	0.68	0.41	1.45	30.83
	3	1.46	0.92	5.57	1.57	0.86	0.91	1.46	0.05	0.88	1.11	0.84	6.40	0.56	0.92	1.39	0.44	0.67	0.57	0.47	0.65	1.13	1.70	1.02	27.10
	4	0.71	1.04	0.78	0.56	0.32	1.19	1.25	0.47	0.79	0.83	0.54	0.22	6.24	2.35	1.31	0.38	1.62	0.73	1.00	1.51	0.74	0.26	0.81	42.56
	5	0.37	0.95	0.16	3.00	0.61	1.06	1.03	1.29	0.42	1.02	2.26	0.88	3.30	1.39	1.84	1.00	1.76	0.47	0.05	1.53	0.73	0.27	0.75	182.3
DBC	1	2.04	0.95	6.51	1.50	0.80	0.95	0.45	0.04	1.08	1.47	0.79	0.02	2.59	1.29	1.27	1.25	0.70	0.64	0.50	0.72	0.79	1.50	1.41	0.99
	2	1.01	0.60	5.54	0.14	1.71	1.00	1.36	4.25	0.98	1.24	0.53	N.D.	1.52	0.96	0.45	0.40	0.51	0.43	0.46	0.58	0.50	0.57	1.01	1.64
	3	0.85	0.44	6.58	1.41	0.45	0.69	0.78	3.00	0.61	0.49	1.85	1.51	0.52	4.40	0.63	0.71	0.43	0.61	1.21	0.50	0.60	2.34	0.72	5.23
	4	0.49	0.56	3.27	3.51	1.21	0.37	1.34	1.31	0.52	0.42	2.08	1.50	0.43	3.35	1.18	0.31	1.35	0.44	0.37	1.28	0.48	0.63	0.54	6.93
	5	0.40	0.92	0.59	4.27	0.63	0.53	0.53	1.73	0.89	0.37	1.52	1.01	1.13	0.82	0.83	1.24	1.21	0.53	0.11	2.70	0.71	0.39	0.54	6.68
GI	1	1.31	1.15	0.90	3.27	0.62	1.23	0.71	0.88	1.09	1.19	1.27	0.84	1.29	0.93	0.85	1.44	0.76	0.69	0.44	0.75	0.91	0.96	0.89	0.82
	2	1.80	1.26	0.84	0.36	1.08	1.55	1.87	N.D.	1.16	0.72	0.52	0.52	2.26	1.32	0.89	0.72	1.02	1.02	0.61	1.25	1.42	0.53	1.76	2.96
	3	2.17	0.90	1.03	3.26	1.31	1.08	0.39	N.D.	0.85	0.89	1.28	1.04	2.39	1.17	0.94	2.54	0.81	0.97	0.63	0.80	1.45	2.30	1.52	3.00
	4	0.58	0.61	1.82	0.04	0.16	2.71	0.72	0.05	1.62	2.73	0.70	0.04	2.19	1.29	1.11	7.10	1.04	0.72	1.31	1.86	1.71	0.32	10.40	13.23
	5	1.32	1.16	1.93	0.55	1.25	1.53	0.97	0.69	0.95	0.88	0.97	0.60	8.16	1.25	1.87	0.74	1.70	0.46	0.21	1.58	0.70	0.38	1.10	0.69
NIC	1	0.04	0.47	8.68	0.89	2.92	2.34	2.52	72.10	1.13	0.58	5.24	N.D.	0.97	1.50	1.26	2.60	0.83	0.24	2.84	0.72	0.62	0.85	0.86	6.41
	2	0.95	0.57	25.61	0.28	7.43	0.94	3.90	54.71	1.31	0.70	2.21	3.13	0.95	1.81	1.73	2.28	0.93	0.34	1.53	1.04	0.93	0.10	2.13	30.81
	3	0.06	0.44	24.41	0.87	6.82	1.23	2.01	14.33	0.94	0.63	2.44	5.66	0.13	4.56	1.58	2.38	0.64	0.44	1.63	0.68	0.82	0.10	1.88	14.81
	4	0.03	0.28	8.11	0.65	1.98	0.57	15.62	0.98	0.81	0.93	2.05	0.92	0.52	4.79	3.28	3.11	1.10	0.35	1.02	3.83	1.19	0.95	5.98	15.12
	5	0.05	0.45	4.22	0.15	1.34	4.27	5.08	49.49	1.04	0.81	3.45	0.99	0.98	18.13	1.10	2.79	0.98	0.43	0.60	3.28	1.50	0.93	4.10	81.18

* Mouse No. in Orange; RNA was extracted at NIH8 (cDNA was synthesized by random hexamer), Green; RNA was extracted at Aoyama (cDNA was synthesized by oligo dT)



48 hr Genotoxic Non-genotoxic

表 4 新しく設計した TLDA 遺伝子

Gene Symbol	Gene Name	Ref Seq	Gene Symbol	Gene Name	Ref Seq
Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	Mm00513427_m1	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1	Mm00515154_m1
Bax	Bcl2-associated X protein Gene	Mm00432050_m1	Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1	Mm00833447_m1
Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing class B2	Mm00478593_m1	Isg2011	interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	Mm00471554_m1
Btg2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Mm00476162_m1	Jun	Jun oncogene	Mm00495062_s1
Camk1d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	Mm00616508_m1	Lpp	LIM domain containing preferred translocation partner in lipom	Mm00724478_m1
Car3	carbonic anhydrase 3	Mm00483016_m1	Lrp1	low density lipoprotein receptor-related protein 1	Mm00464608_m1
Ccnf	<i>cyclin F</i>	Mm00432385_m1	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	Mm00726565_s1
Ccng1	cyclin G1	Mm00438084_m1	Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1	Mm00522100_m1
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Mm00432448_m1	Mbl2	mannose binding lectin (C)	Mm00487623_m1
Cyp2b10	cytochrome P450 family 2 subfamily b polypeptide 10	Mm00456591_m1	Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	Mm00487656_m1
Cyp4a14	cytochrome P450 family 4 subfamily a polypeptide 14	Mm00484132_m1	Mpz2	<i>myelin protein zero-like 2</i>	Mm00488397_m1
Cyr61	cysteine rich protein 61	Mm00487498_m1	Mrps24	mitochondrial ribosomal protein S24	Mm00466026_m1
Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	Mm00512503_g1	Mtss1	metastasis suppressor 1	Mm00460614_m1
Ddit4l	DNA-damage-inducible transcript 4-like	Mm00513313_m1	Nono	non-POU-domain-containing octamer binding protein	Mm00834875_g1
Egfr	epidermal growth factor receptor	Mm00433023_m1	Phlda1	pleckstrin homology-like domain family A, member 1	Mm00456345_g1
Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	Mm00468752_m1	Phlda3	pleckstrin homology-like domain family A, member 3	Mm00449846_m1
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	Mm00783731_s1	Rcan1	<i>regulator of calcineurin 1</i>	Mm00627762_m1
Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	Mm00442225_m1	Rcan1	<i>regulator of calcineurin 1</i>	Mm00517094_m1
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm9999915_g1	Sds	serine dehydratase	Mm00455126_m1
Gsta2	glutathione S-transferase alpha 2 (Yc2)	Mm00833353_mH	St3gal5	ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 5	Mm00488232_m1
Gstm3	glutathione S-transferase mu 3	Mm00833923_m1	Suk1d1	sulfotransferase family 1D, member 1	Mm00502030_m1
Hamp2	hepcidin antimicrobial peptide 2	Mm00842044_g1	Trp53inp1	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	Mm00458141_m1
Hhex	hematopoietically expressed homeobox	Mm00433954_m1	Tubb2c	<i>tubulin, beta 2c</i>	Mm00847804_gH
Htr1b	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B Gene	Mm00439377_s1			
			Hs9999901_s1	Eukaryotic 18S rRNA	

赤字 ; 新しく選択したマーカー候補遺伝子 青字 ; 内在性コントロール遺伝子

表 バリデーションのための新規化合物セットと投与量

Genotoxic carcinogens (4)

1. 4-(mehylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 、 250mg/kg bw, olive oil
2. urethane, 1000 mg/kg bw, saline
3. 2-acetylamnofluorene, 300 mg/kg bw, olive oil
4. diisopropanolnitrosamine, 500mg/kg bw , saline

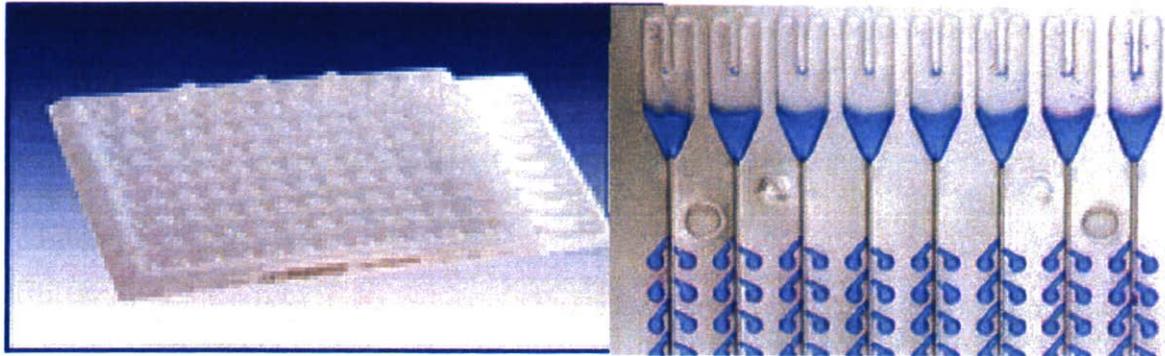
Non-genotoxic carcinogens (3)

5. di(2-ethylhexyl)phtalate (peroxisome proliferator), 2000 mg/kg bw, olive oil
6. dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) (not peroxisome proliferator) 、 50 mg/kg bw, olive oil
7. furan (not peroxisome proliferator), 30 mg/kg bw, olive oil

Hepatotoxin

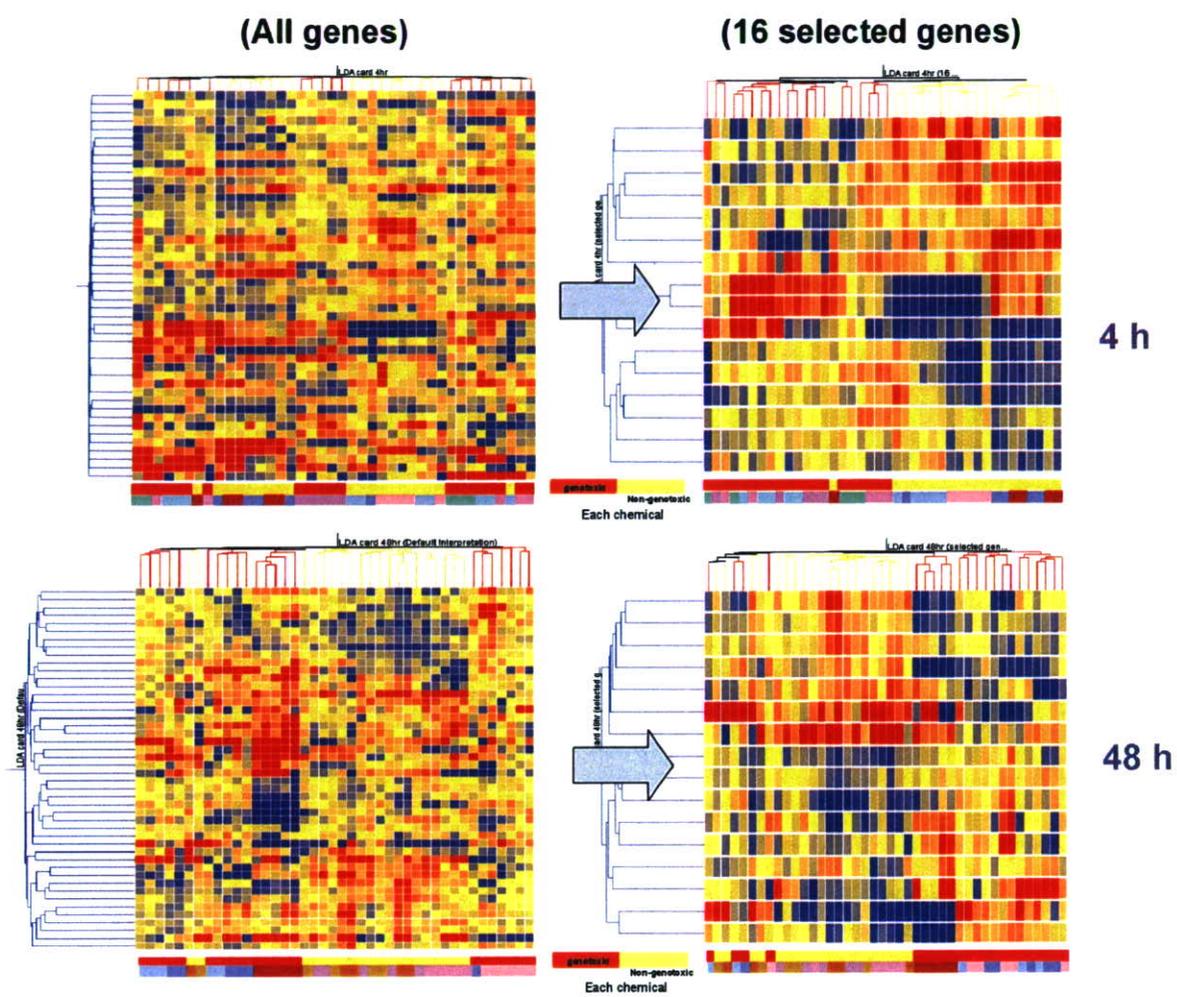
8. phenacetin, 400 mg/kg bw, olive oil

図1 TLDA カードと構成遺伝子



	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	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
2	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a
3	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
4	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a
5	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
6	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a
7	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
8	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a
9	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
10	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a
11	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
12	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a
13	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
14	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a
15	Lp1	Cong1	Phes1	Deer1	Lp	Sk4a	Elov8	Evs1	Hamp2	Lp8a	Hs9999 99_01	Btg2	Mtor1	Car3	Btgpa5	Igf1r1	Odm3	Bar	Mdm2	Hg201	Cyt1	Ephr1	Top3ho 1	Hba
16	Cyp4a14	Phes3	Igf1r1	Deer1	M92	But1e1	Osd32a	Aks	Dd4	Egr	Camk1d	Nono	Osd45 8	Sd	Jun	Fabp5	Cyp2b10	Dd4l	Pama3	Osd2	Bhh2	Hrb	Otd	Cdler1a

図2 GeneSpring を用いた遺伝子発現データのクラスター解析



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・安全性生物試験研究センター・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。今年度はマイクロアレイデータの補正アルゴリズムの検討や発現パターンのソーティング・抽出アルゴリズムの開発・改良、および遺伝子クラスターの意味空間への投影解析手法の改良を行い、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・解析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。この際のプロダクト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, Delphi2007)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. プローブ毎の飽和補正

マイクロアレイデータの誤差発生の主要な原因の1つとして、プローブの飽和による測定値の頭打ち現象を確認した。Percellome プロジェクトで採用している Affymetrix のマイクロアレイ GeneChip は、1つの遺伝子発現データを22種類のプローブの測定値から算出しているため、飽和補正式の検討は個々のプローブデータを表す内部データレベルで行った。この結果、a) 同一の遺伝子をターゲットとしたプローブであっても、個々の配列に依り、飽和しやすさに差があること、およびb) 飽和補正式は Langmuir の方程式が適していること、が判明した。そこで飽和補正式 (Langmuir の方程式) の定数項を求めるため、LBMサンプル (サンプルに含まれる mRNA 量が厳密に検量直線に乗ることが保証されている特殊なサンプル) を用いて、最適化計算を行った。

2. 発現パターンのソーティング・抽出アルゴリズム (RSort) の開発・改良
遺伝子発現を3次元平面波で表現する手法 (Surface グラフ) を元に、その凹凸の多寡を評価して単純なものから複雑なものへ分類・ソートを行う RSort アルゴリズムを改良・応用し、凹凸の少ない単純なパターンを示す遺伝子 (= より強力もしくは単純な発現制御を受けるもの) をより精度良く抽出できるように改良を加えた。また偶然、特徴的な発現パターンを呈するケースを除外するため、変動 CV 値や t 検定など、統計手法と組み合わせたとこ、絞り込み効率が向上した。
3. 遺伝子クラスタの意味空間への投影解析

昨年度開発した GoPlot を中心とした遺伝子クラスタの意味空間への投影解析の開発を進め、分解能向上の糸口を見いだした。すなわち、GoPlot 作図に利用する候補遺伝子群間で共通する GO Keyword を排除し、さらに候補遺伝子群間で差異が大きくても出現頻度が低いか分布が異常に偏っている GO Keyword も除外することで、分解能が向上するケースが多く観察された。この選定作業の大半を自動化するために MF GoViewer を作成し、GoPlot との連携強化を図った。



D. 考察

1. プローブ毎の飽和補正

現状では飽和補正の最適化は十分でなく、直接、数値比較を行えるレベルに達していないが、現状においても、化合物クラスタリングなど、飽和現象による誤差の影響を受けやすい解析精度の向上には有効であると考えている。

飽和補正式の定数項を求めるにあたって、基礎データが不足していることが判明しているため、補正精度をさらに向上させるため、LBM サンプルと同様の試料を用意し、基礎データの取得を目指す。

2. 発現パターンのソーティング・抽出アルゴリズム (RSort) の開発・改良

RSort は実行スピードも速く、実用性の高いアルゴリズム・プログラムだが、現状では45000個のデータから平均1000個程度までの絞り込みが限界であり、それ以上条件を厳しくすると有意と思われるデータまで

候補から除外してしまう場合がある。RSortにより抽出された候補の中には、有意と判断できないものも依然含まれるため、さらなる精度向上を目指す。

また特徴点の位置を単純なスカラー値で決定するため、本来特徴点として認識すべき点の近傍を選択してしまうことがある。この性質についても検討し、より研究者の判断に近づけるべく研究を進める。

3. 遺伝子クラスタの意味空間への投影解析

MFGoViewer.exe の制作により、GoPlot 作図の前処理が飛躍的に効率化された。MFGoViewer は、候補遺伝子群間での各 GO Keyword の存在比率の差異を評価する新規アルゴリズムを搭載しており、通常は適切に機能しているが、存在比率が極端に偏っている場合などでは不適切な値を出すことが観察されている。今後はアルゴリズムを見直してこの欠点を解消し、より効率的な解析処理の実現を目指す。

E. 結論

今年度は、マイクロアレイデータの精度向上のための基本技術開発や、効率的な解析処理のためのアルゴリズム開発・改良およびその実装プログラム開発を行った。RSort による遺伝子発現パターンの特徴抽出や GoPlot の分解能向上については一定の成果を得た。今後はこれら技術を基礎とした応用研究を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

・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.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産所有権の出願・登録情報

1. 特許取得

・高次元データを塊に分割する装置(特許第 3995099 号)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし