

## (2)造血毒性

恒常状態における遺伝子発現データの変動要因を中心とした考察、並びにこの認識を基礎とした常人的酸化的ストレスに注目した Trx 遺伝子改変マウスを用いた解析、及び実験動物の週齢差に注目した加齢影響の遺伝子発現を検討した。

## (3)消化管毒性

TNBS 腸炎モデルにおいて、ASK1 欠損マウスのバックグラウンドである C57BL/6 マウスと BALB/c マウスの間で大きな感受性の違いが見出された。これを手がかりに、腸炎発症・進展にかかわる毒性学的パスウェイを、網羅的遺伝子発現解析により解明していきたい。

## (4)T細胞機能に関わる胸腺毒性

薬剤の胸腺毒性のパターンとメカニズムを知る上で percellome による遺伝子発現解析は非常に有用である。

## (5)骨毒性

中枢神経系に作用する薬物のうち、alprazolam は骨折部位の化骨を促進するが、正常骨組織には影響を及ぼさない。また、alprazolam は骨髄間葉系細胞の骨芽細胞への分化には直接関与しない。ジーンチップ解析から alprazolam 投与により DMP1 の発現が上昇することが示され、化骨促進作用が DMP1 を介したものであることが示唆される。

## (6)遺伝子傷害毒性

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。

選択された遺伝子セットを用いて、二つの化合物セットを解析した結果、2 回目の検討において、遺伝子傷害性肝発癌物質とそれ以外の化合物間に明確な判別を行うためのアルゴリズムを設定できた。また、最終的には、反応性の良い 25 遺伝子を用いることで、パフォーマンスを向上できることがわかった。今後、本試験法は新たな遺伝子傷害性スクリーニング法として有用であると期待できる。

これらに加え、独自開発したインフォマティクス解析手法を活用し、蓄積したデータベースを詳細に解析し、化学物質によって生じる遺伝子発現カスケードを解明していく実地体制が整った。これにより、安全性評価に於けるトキシコゲノミクスの利用が従来以上に促進されると期待できる。

## 【③トキシコゲノミクスのためのインフォマティクス開発研究】

トキシコゲノミクスのためのデータ変換技術や高次解析アルゴリズムなどの開発を行った結果、世界有数の規模と精度を誇る Percellome データベースから毒性に関わる遺伝子群を効率良く網羅的に抽出できる様になり、また毒性反応シグナルネットワークの基本構成単位を自動生成する技術の開発見込みが立った。

今後もアルゴリズムやソフトウェアの改良を

進めつつ、Percellome データベースの解析、特に遺伝子クラスターの意味抽出に重点を移し、毒性反応シグナルネットワーク研究を推進する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍等

菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、種村健太郎、小川幸男、児玉幸夫、関田清司、Percellome Project、遺伝子医学 MOOK10、DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実際、油谷浩幸編集、株式会社メディカルドゥ、p363-371、2008年6月30日

菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司、トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析、非臨床試験-ガイドラインへの対応と新しい試み- 野村護、堀井郁夫、吉田武美編集、株式会社エル・アイ・シー、p561-568、2008年9月30日

Hirabayashi Y, Inoue T (2008) Principles of data-mining in toxicogenomics. In Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment (S. C. Sahu, ed., pp. 57-84. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ

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年1月号、株式会社秀潤社

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 Project による 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF 比較、細胞工学、26、1391-1396、2007

菅野純、毒性の高精細解析に向けてのトキシコゲノミクス、医学のあゆみ Vol.218 No.12 2006.9.16 p1035-6

#### 2) 原著論文

Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K. Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. Neuroscience 155: 780-788, 2008

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2. Development 135: 3511-3519, 2008

Hirabayashi Y, Tsuboi I, Kitada K, Igarashi K, Kodama Y, Kanno J, Yoshida K, Dainiak N, Inoue T.

Comparison of murine gene expression profiles between spontaneous and radiation-induced myelogenous leukemias: Stochastic and probabilistic expression variances in the former vs. radiation-specific expression commonalities in the latter. Exp Hematol 37: 195-205, 2009

Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K,

- Yoshida K, Aizawa S, Kitagawa M. A novel role for acinus and MCM2 as host-specific signaling enhancers of DNA-damage-induced apoptosis in association with viral protein gp70. *Leukemia Res* in press 2009
- Konstantinou K, Yamamoto K, Ishibashi F, Mizoguchi Y, Kurata M, Sawabe M, Nakagawa Y, Suzuki K, Crawley JT, Kitagawa M. Angiogenic mediators of angiopoietin system are highly expressed by CD10-positive lymphoma cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 144: 696-704, 2008
- Uehara T, Hirode M, Ono A, Kiyosawa N, Omura K, Shimizu T, Mizukawa Y, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology* 250: 15-26, 2008
- Hirode M, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Ohno Y, Urushidani T. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 229: 290-299, 2008
- Uehara T, Kiyosawa N, Shimizu T, Omura K, Hirode M, Imazawa T, Mizukawa Y, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans. *Hum Exp Toxicol* 27: 23-35, 2008
- Okuda, T, Ioku, K, Yonezawa, I, Minagi, H, Gonda, Y, Kawachi, G, Kamitakahara, M, Shibata, Y, Murayama, H, Kurosawa, H, Ikeda, T. The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 29: 2719-2728, 2008
- Gonda, Y, Ioku, K, Okuda, T, Shibata, Y, Kamitakaraha, M, Kawachi, G, Yonezawa, I, Kurosawa, H, Ikeda, T. Osteoconductivity of hydrothermally synthesized beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles under mechanical unloading. *Key Eng. Mater.* 396-398: 253-256, 2009
- Yatagai, F, Umebayashi, Y, Honma, M, Sugawara, K, Takayama, Y, Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res* 638: 48-55, 2008
- Watanabe T, Tanaka G, Hamada S, Namiki C, Suzuki T, Nakajima M, Furihata C. Dose-dependent alterations in gene expression in mouse liver induced by diethylnitrosamine and ethylnitrosourea and determined by quantitative real-time PCR *Mutat. Res* 673: 9-20, 2009
- 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
- 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
- Baniyadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J. Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1. *Arch Pharm Res* 30: 444-452, 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*. 72: 1171-1180, 2007
- Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H. Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: a possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. *Bone* 40: 876-887, 2007
- Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M, Kudo, A. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction *J Exp Med* 205: 295-303, 2008
- David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hoecker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM. MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation via Dkk-1 mediated blockage of wnt-signalling *Nat Cell Biol* 10: 338-345, 2008
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. Membrane Channel Connexin 32 Maintains Lin(-)/c-kit (+) Hematopoietic Progenitor Cell Compartment: Analysis of the Cell Cycle *J Membr Biol* 217: 105-113, 2007
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state, and leukemo- genesis *Exp Biol Med* 232: 700-712, 2007
- Hirabayashi Y, Inoue T. Implications of hemopoietic progenitor cell kinetics and experimental leukemogenesis: Relevance to Gompertzian mortality as possible hemato- toxicological endpoint *Exp Hematol* 35: 125-133, 2007
- Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of prostaglandin E2

- receptor (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas *Oncogene* 26: 7401-7413, 2007
- Keith T, Araki Y, Ohyagi M, Hasegawa M, Yamamoto K, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, Kitagawa M. Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia. *Br J Haematol* 137: 206-215, 2007
- Abe S, Hasegawa M, Yamamoto K, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, Takizawa T, Kitagawa M. Rapid induction of IAP family proteins and Smac/DIABLO expression after proapoptotic stimulation with doxorubicin in RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Exp Mol Pathol* 83: 405-412, 2007
- Iizuka A, Ikarashi Y, Yoshida M, Heike Y, Takeda K, Wakasugi H, Kitagawa M, Takaue Y. Interleukin (IL)-4 promotes T helper 2 biased-Natural Killer T (NKT) cell expansion, which is regulated by NKT cell-derived interferon-gamma and IL-4. *Immunology* 123: 100-107, 2007
- Kurata M, Hasegawa M, Nakagawa Y, Abe S, Yamamoto K, Suzuki K, Kitagawa M. Expression dynamics of drug resistance genes, multidrug resistance 1 (MDR1) and lung resistance protein (LRP) during the evolution of overt leukemia in myelodysplastic syndromes. *Exp Mol Pathol* 81: 249-254, 2006
- 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
- Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawachi G, Gonda Y, Murayama H, Shibata Y, Minami S, Kamihira S, Kurosawa H, Ikeda T. The effect of the microstructure of b-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue *Biomaterials* 28: 2612-2261, 2007
- Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, Hirata K, Hishikawa Y, Tanaka Y, Bessho K, Ikeda T, Atsuta M. Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells. *Biomaterials* 28: 3469-3477, 2007
- 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
- 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
- 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
- Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific *Mesp2* expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 3651-3656, 2006
- Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. *Mesp1*-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn.* 235: 395-402, 2006
- Kii I, Amizuka N, Minqi L, Kitajima S, Saga Y, Kudo A. Periostin is an extracellular matrix protein required for eruption of incisors in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 342: 766-772, 2006
- Li GX, Hirabayashi Y, Yoon BI, Kawasaki Y, Tsuboi I, Kodama Y, Kurokawa Y, Yodoi J, Kanno J, Inoue T. Thioredoxin overexpression in mice, model of attenuation of oxidative stress, prevents benzene-induced hemato-lymphoid toxicity and thymic lymphoma. *Exp Hematol.* 34: 1687-1697, 2006
- Corvi R, Ahr HJ, Albertini S, Blakey DH, Clerici L, Coecke S, Douglas GR, Gribaldo L, Groten JP, Haase B, Hamernik K, Hartung T, Inoue T, Indans I, Maurici D, Orphanides G, Rembges D, Sansone SA, Snape JR, Toda E, Tong W, van Delft JH, Weis B, Schechtman LM. Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use. *Environ Health Perspect.* 114: 420-429, 2006
- Fujita S, Hideshima K, Ikeda T. Nestin



- expression in odontoblasts and odontogenic ectomesenchymal tissue of odontogenic tumours. *J Clin Pathol.* 59: 240-245, 2006
- K. Ioku, G. Kawachi, K. Nakahara, E.H. Ishida, H. Minagi, T. Okuda, I. Yonezawa, H. Kurosawa, T. Ikeda Porous Granules of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Composed of Rod-Shaped Particles Key Engineering Materials 309-311: 1059-1062, 2006
- Kiyosawa N, Shiwaku K, Hirode M, Omura K, Uehara T, Shimizu T, Mizukawa Y, Miyagishima T, Ono A, Nagao T, Urushidani T. Utilization of a one-dimensional score for surveying chemical-induced changes in expression levels of multiple biomarker gene sets using a large-scale toxicogenomics database. *J Toxicol Sci.* 31: 433-448, 2006
- Tamura K, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. "Comparison of gene expression profiles among papilla, medulla and cortex in rat kidney." *J Toxicol Sci.* 31: 449-469, 2006
- Morishita K, Mizukawa Y, Kasahara T, Okuyama M, Takashima K, Toritsuka N, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. "Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen." *J Toxicol Sci.* 31: 491-507, 2006
- Koyama N, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinae N, 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
2. 学会発表
- Weihua Gao, Yumiko Mizukawa, Hiroshi Yamada, Noriyuki Nakatsu, Yosuke Minowa, Yasuo Ohno, and Tetsuro Urushidani. Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione-depletion related hepatotoxicity in rat liver. Society of Toxicology, 48th Annual Meeting, Mar. 2009.
- 北川昌伸、長谷川真紀、田中薫、吉田和子、相澤志郎、山本浩平、倉田盛人、レトロウイルス感染に伴う DNA 傷害誘発アポトーシス増強作用に関する研究、日本病理学会(会誌第 97 巻、204 頁、2008 年)
- 北川昌伸、倉田盛人、長谷川真紀、山本浩平、梅田茂明、田中薫、吉田和子、相澤志郎、レトロウイルスによる DNA 損傷誘発アポトーシス増強作用に関わる宿主特異的因子、第 67 回日本毒学会学術総会、2008 年
- 菅野 純、トキシコゲノミクス(Percellome Project)を基盤とした分子毒性学の展開の試み、第 35 回日本トキシコロジー学会学

術年会、2008年6月26日、東京  
北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる  
毒性評価法の高精細化、第35回日本ト  
キシコロジー学会学術年会、2008年6月、  
東京  
北嶋 聡、Percellome 手法を用いたフタル酸  
エステル DEHP とその活性代謝産物  
MEHP の腎に及ぼす遺伝子発現変動の  
比較、第35回日本トキシコロジー学会学  
術年会、2008年6月、東京  
菅野 純、トキシコゲノミクス(Percellome  
Project)を基盤とした分子毒性学の展開の  
試み、第145回日本獣医学会学術集会  
日本比較薬理学・毒性学会、教育講演、  
2008年3月28日、相模原  
Suzuki T, Koizumi T, Honma M, Hamada S,  
Nakajima M, Watanabe T, Furihata C  
Collaborative study on the toxicogenomics  
in JEMS/MMS/2008 II: Validation of the  
TaqMan Low Density Array for a rapid  
screening of genotoxic carcinogens 日本  
環境変異原学会第37回大会、2008  
Tetsuro Urushidani, Atsushi Ono, Noriyuki  
Nakatsu, Toshikazu Miyagishima, and  
Yasuo Ohno. The second stage of the  
Toxicogenomics Project in Japan: a  
multicenter validation study of gene  
expression in rat liver. Society of  
Toxicology, 47th Annual Meeting, Mar. 2008  
Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide  
Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi  
Kitajima, Yukio Kodama, Yukio Ogawa,,  
PERCELLOME TOXICOGENOMICS

PROJECT FOR MECHANISM BASED  
PREDICTIVE TOXICOLOGY: AN  
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  
Inoue T. Attenuation of oxidative stress in  
the Trx-overexpression mice: Study on  
benzene induced hemopoietic malignancies.  
The 4th Meeting of International REDOX  
Network (2007.11.2) [Jeju Island, Korea,  
Meeting Abstract 53; 2007]  
Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics  
Project for Predictive Toxicology, 8<sup>th</sup>  
International ISSX meeting (Oct.9-12,  
2007) Oct 9 short course speaker, Sendai  
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  
Ioku, K., Kamitakahara, M., Kawachi, G.,  
Gonda, Y., Okuda, T., Yonezawa, I.,  
Kurosawa, H., and Ikeda,  
T.:Microstructure designing of porous  
-tricalcium phosphate for control of  
reactions in the bone. Bioceramics 20,  
Oct. 24-26, 2007. Nantes, France.  
Gonda, Y., Ioku, K., Okuda, T., Kawachi,  
G., Yonezawa, I., Kurosawa, H., and Ikeda,



- T.: Application of newly developed globular-shaped granules of beta-tricalcium phosphate for bone substitute. *Bioceramics* 20, Oct. 24-26, 2007. Nantes, France.
- 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
- Kitajima S, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N and Kanno J, Fetus (developmental) toxicogenomics for addressing the embryotoxicity induced by chemicals. Demonstration by a model teratogen cyclopamine. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the life Sciences, 2007.8., Tokyo
- Inoue T, Hirabayashi Y. Gompertzian expression of the lifespan elucidates a theoretical and toxicological ultimate risk. International Congress of Toxicology XI (2007. 7.18) [Montréal, Canada, Meeting abstract PW12. 259]
- 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
- Kanno Jun, Aisaki Ken-ichi, Igarashi Katsuhide, Nakatsu Noriyuki I, Kitajima Satoshi, Kodama Yukio, "PERCELLOME" TOXICOGENOMICS PROJECT FOR THE MECHANISM-BASED TOXICOLOGY, the SOT 46th Annual Meeting March 25-29, 2007
- 菅野 純、Percellome 法による遺伝子発現解析研究(トキシコゲノミクス)とその基礎研究への適用性、東京大学分子細胞生物学研究所・機能形成研究分野セミナー、2007年3月5日
- T. Suzuki, T. Koizumi, D. Prabha, M. Honma, S. Hamada, M. Nakajima, T. Watanabe, C. Furihata Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput Quantitative Real-time PCR analysis by the TaqMan Low Density Array. The 1st Asian Conference on Environmental Mutagens, 2007
- Gonda, Y., Ioku, K., Okuda, T., Shibata, Y., Kamitakaraha, M., Kawachi, G., Yonezawa, I., Kurosawa, H., and Ikeda, T.: Osteoconductivity of hydrothermally synthesized beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles under mechanical unloading. *Bioceramics* 21, Oct. 24-26, Buzios, Brazil
- 菅野 純、中津則之、相崎健一、DEN 初期遺伝子応答から見た好発癌系(C3H)と嫌発系(B6)マウスの差異、第65回日本癌学会総会、2006年9月28-30日、横浜
- 菅野 純、Percellom トキシコゲノミクス・プロジェクトの概要と基礎生物学への応用、明治薬科大学オープンカレッジ、2006年8

月 7 日、東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、  
第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年  
7 月 3-5 日、名古屋

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics  
Project, ASIA TOX IV, 18-23 June, 2006

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、  
中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第 10  
回がん分子標的治療研究会総会、2006  
年 6 月 15 日、東京

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細  
胞当たりの mRNA コピー数を得る  
Percellome 法\*の概略と生物研究への応  
用、第 104 回熊本大学発生研・拠点形成  
A セミナー、2006 年 6 月 5 日、熊本

Inoue T: Summary and Future Directions  
“ Regulation of hematopoiesis ” .  
Pathophysiology & Molecular Biology of  
Hematopoiesis, Malignancy & Radiation  
Response “ International Symposium in  
Memory of Eugene P. Cronkite, M.D.”  
(2006.5.12) [Brookhaven National  
Laboratory, NY, No abstract]

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールと  
しての Percellome System、第 95 回日本病  
理学会総会、2006 年 4 月 30 日-5 月 2 日、  
東京

菅野 純、マイクロアレイや定量 PCR から細  
胞当たりの mRNA コピー数を得る  
Percellome 法の概略と生物研究への応用、  
九州大学医師研セミナー、2006 年 4 月 17  
日、福岡

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特許(3995099 号)「高次元データを  
塊に分割する装置」

### 2. 実用新案登録

該当しない

### 3. その他(データベース等)

<http://toxicomics.nih.gov/db/>

## (資料1) 総括資料

TTG II 菅野班会議報告 (2009-02-23)

平成20年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

研究課題名:

化学物質リスク評価の基盤整備におけるトキシコゲノミクスの利用に関する研究  
- 反復暴露影響及び多臓器連関性(発達過程を含む)に重点を置いた解析研究 -  
(H18 - 化学 - 一般 - 001)

網羅的遺伝子発現解析による毒性評価システム開発  
(反復暴露影響及び多臓器連関性に重点を置いた研究開発)  
及び  
研究の総括

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 菅野 純

2009-02-23 TTGII 班会議 ④ 総括資料

## 背景

H15～H17:

化学物質リスク評価の基盤整備としての  
トキシコゲノミクスに関する研究

トキシコゲノミクス・データベースを構築(約90化学物質、  
2億2,500万データ)

- 単回(急性)暴露プロトコール
- マウス肝の初期応答
- 解析のための視覚化ツールとクラスタリング解析法を開発

2009-02-23 TTGII 班会議 ④ 総括資料





## MHLW\* Toxicogenomics Projects

\*Ministry of Health Labour and Welfare

- Toxicogenomics Project (2002~2006, 5Y)  
NIHS + 17 Pharmaceuticals
  - *in vivo* (oral, liver, kidney) 150 chem, single/repeat exposure
  - *in vitro* (rat primary hepatocyte, human primary hepatocyte)
  - New @ Nat'l Institute of Biomedical Innovation (Osaka) 2005~2006
  - 2nd round project at Osaka (2007~2011), mainly for further data analysis

### ■ Percellome Project (Mouse)

Chemical Safety Database

- Div. Cellular and Molecular Toxicology/ BSRC/ NIHS
  - TTG1: 2003~2005 (single exposure), oral, liver 90 chem (肝+α)
  - ITG: 2005~2007 Inhalation Toxicogenomics (吸入)
  - TTG2: 2006~2008 (repeated exposure, multi-organ etc.), oral  
(反復暴露・多臓器連関)
  - FTG: 2004~ Fetus (developmental) 胎児・発生
  - NTG: 2006~ Behavior -> Brain TG (HC, BS, Cx, Cl)  
(行動神経・脳(大脳・脳幹部・海馬・小脳))
  - Food TG: 2007~ Functional Health Food (CoQ10, α-lipo), food ingredient (食品関連)
  - Nano-PM\*TG 2007~ Asbestos, Multiwall Carbon Nanotube, Fullerene (腹膜中皮) \*PM: 粒子状物質 particulate matter

2008-02-28 T108 経産省 産 経産省



## Percellome Projects

### Aim目的:

Develop **Gene Cascade Database** by **Phenotype-Independent Approach** (非形質依存的) for predictive mechanism-based toxicology

### Ultimate Goal究極の目的:

Virtual mouse, virtual human *in silico*

### Tentative Goal現実的ゴール:

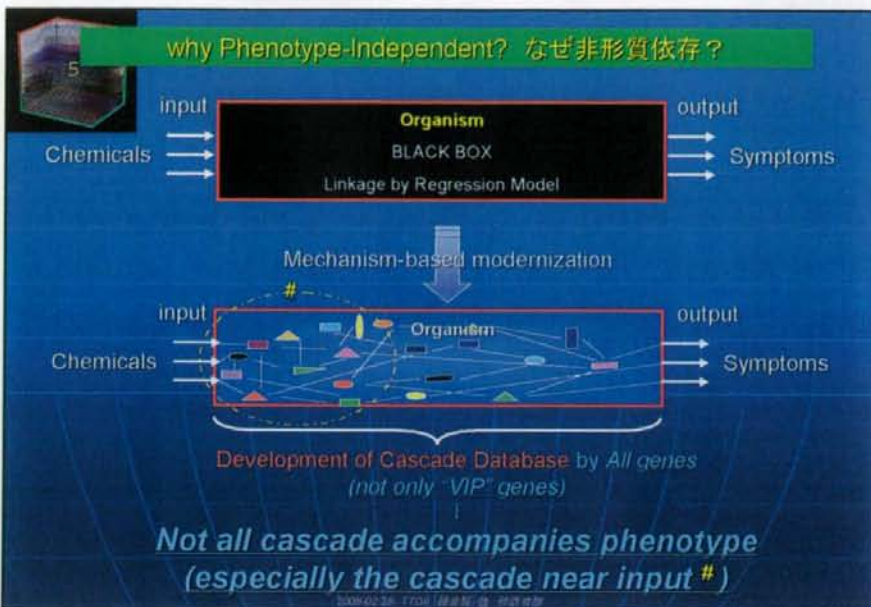
High-Resolution, Mechanism-based Toxicology to reinforce Traditional Toxicology (高精度な機序に基づいた毒性学の導入による毒性学の補強)

### Practical Contribution期待される効果:

Cheaper(安), Faster(速), and More Accurate(精) Assessment

And yet Comprehensive to meet the regulatory needs (safety assessment: 網羅性が必要)

2008-02-28 T108 経産省 産 経産省



6

トキシコゲノミクスは現行毒性学にとって、光学顕微鏡しかない時代に現れた電子顕微鏡のようなもの。その実用化には、皆が納得する「教科書」が必要。

電子顕微鏡の教科書や図譜が出来るまでに、10~20年。研究者が多数の電子顕微鏡写真をアーカイブ化した。

トキシコゲノミクスは、電子顕微鏡のような立場。多数のデータを基に、「教科書」を書く必要がある。

データを蓄積するには、標準化が必須。  
→Percellome法を開発した。

↓

数万種類のmRNAの各々を、細胞一個当たりのコピー数として測定。

2008-02-28 T108 | 経産省 | 産 研 産 学 創 造 課



## Why mouse? なぜマウスか

- 遺伝子改変動物(マウス)を用いることで、客観的な遺伝子発現カスケードの情報(欠落や過剰発現による)が得られる。
- Gene Knockout Organism  
will bring us Objective data, and therefore important for writing a "toxicogenomics text book"
  - p53 KO
  - ER  $\alpha/\beta$  KO, KI
  - hSXR KI
  - etc.

2006-02-28 TT08 経産省 自 印刷会誌



## BMC Genomics



Methodology article

Open Access

### "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays

Jun Kanno<sup>\*1</sup>, Ken-ichi Aisaki<sup>1</sup>, Katsuhide Igarashi<sup>1</sup>, Noriyuki Nakatsu<sup>1</sup>, Atsushi Ono<sup>1</sup>, Yukio Kodama<sup>1</sup> and Taku Nagao<sup>2</sup>

Address: <sup>1</sup>Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and <sup>2</sup>President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno\* - kanno@nih.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nih.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nih.go.jp; Noriyuki Nakatsu - n-nakatsu@nih.go.jp; Atsushi Ono - Atsushi@nih.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nih.go.jp; Taku Nagao - nagao@nih.go.jp

\* Corresponding author † Equal contributors

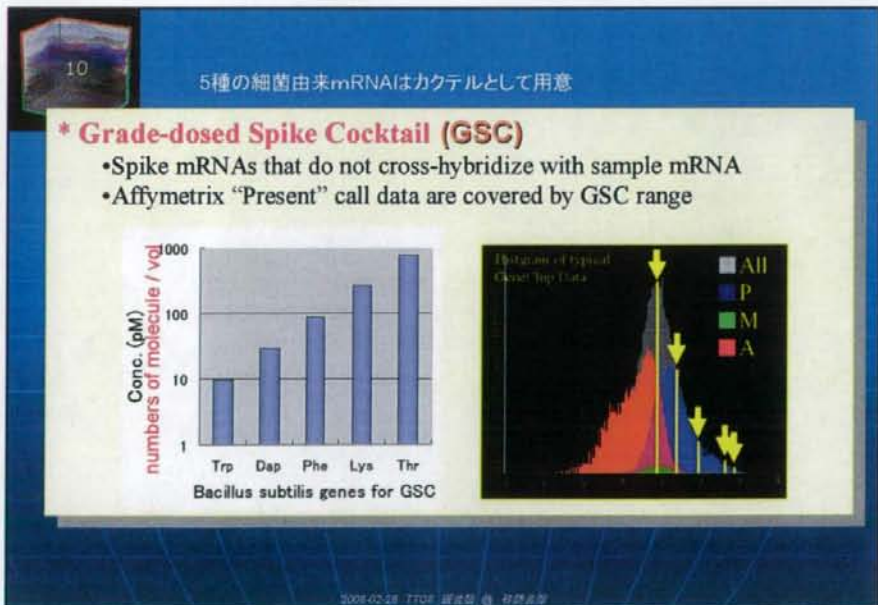
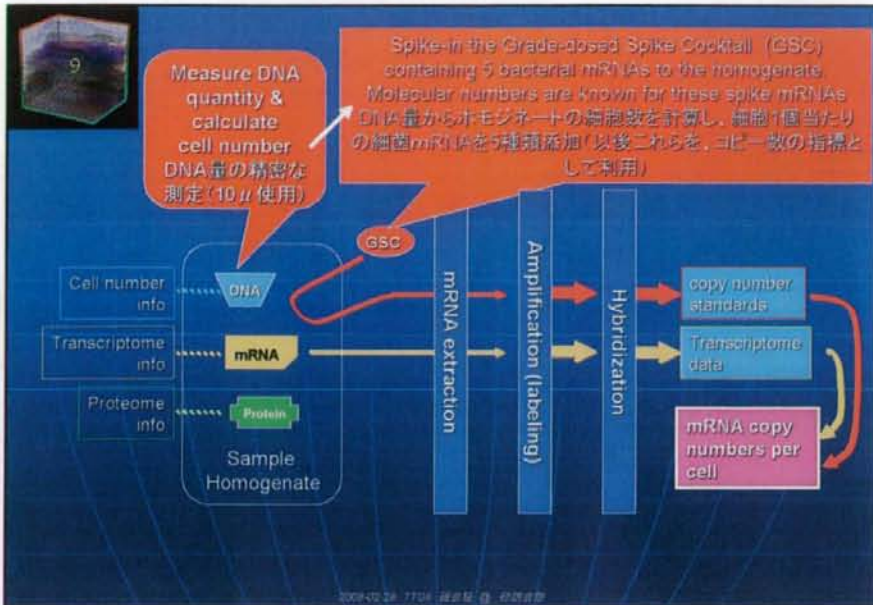
Open Access

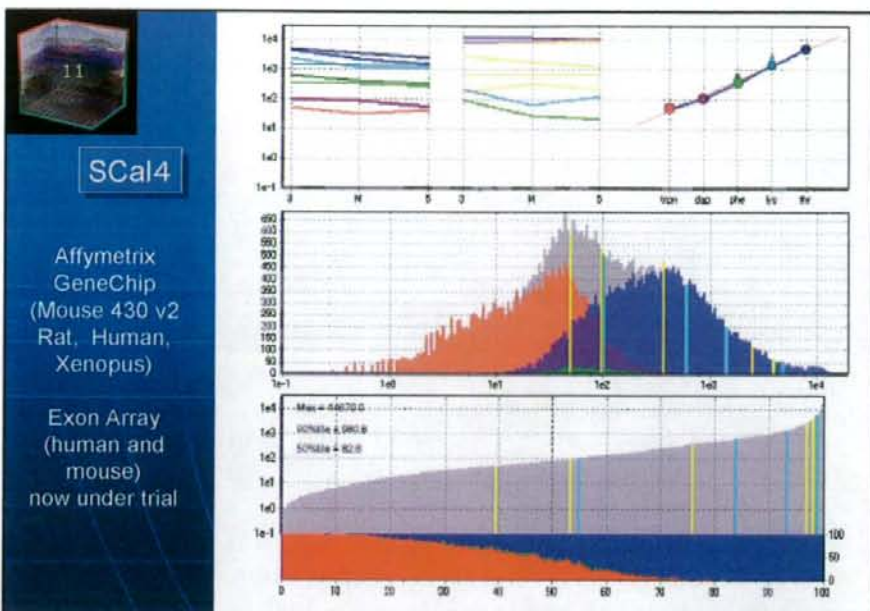
on line journal: **BMC Genomics, 2006 Mar 29;7(1):64**

**PMID: 16571132**

2006-02-28 TT08 経産省 自 印刷会誌







12

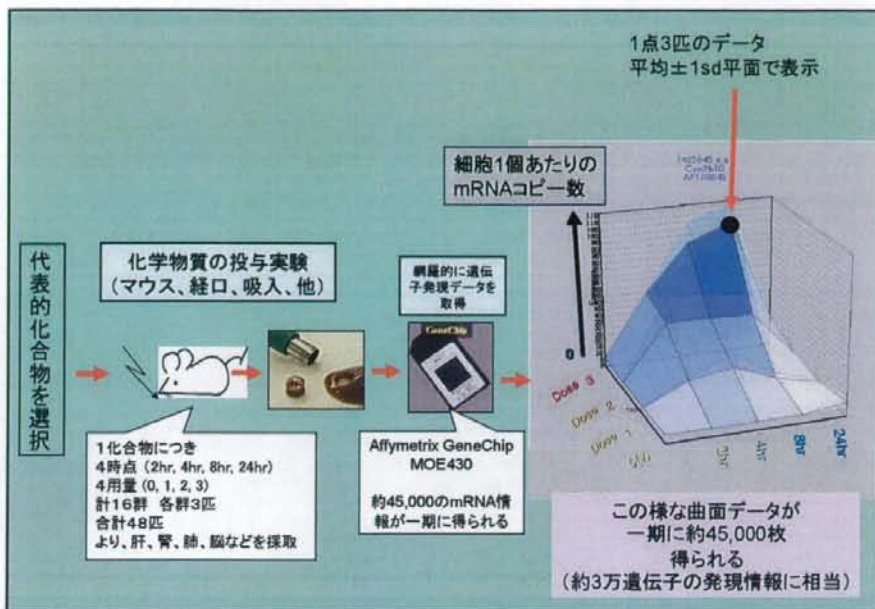
## Percellome essentials

Percellome に必要な物

- RLT Buffer (Qiagen) for homogenates
- dose-graded spike cocktail; GSC\*
  - synthesized from ATCC clones
- DNA quantification protocols (manual or for PerkinElmer JANUS robot) \*\*

\* and \*\* are available at collaboration basis, contact [kanno@nihs.go.jp](mailto:kanno@nihs.go.jp).

2008-03-28 17:08 経路解析 遺伝子発現



化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシゲノミクスに関する研究 (3)  
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 毒物部 毒野 純

### H17年度までの進捗

- 経口単回投与毒性  
約90物質のデータ取得予定  
(延べ約110実験)
- データベース構築完成
- クラスタリング手法実装
- Percellome研究用コンピュータシステム(MF System)構築
- 公開用サーバの構築
- Percellome Project展開
  - 吸入毒性トキシゲノミクス開始  
(シックハウス症候群を視野に)
  - 胎児(発生)毒性トキシゲノミクス開始  
(胎児毒性解析、遺伝子変動動物解析を含む)



## 研究班構成

### 【①データベース生成研究】

- ・ **新型慢性暴露実験**: 慢性毒性化合物の単体暴露化合物を組み合わせデータを取捨する(年間1x10<sup>4</sup>データポイントを予定)(暫野)
- ・ **多臓器間**: 3種類の化合物について多臓器間のデータを取捨する(年間30x48データポイントを予定)(暫野)
- ・ **ハイスループット in situ hybridizationシステム**: システムの自動化を行う(暫野)

### 【②基礎研究】

- ・ **発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析**(北嶋): 分子種別が異なる遺伝毒性物質及び分子種別は不明だがマウスに於ける典型的な遺伝毒性物質のマウス胎児への影響解析 (in vitro実験系導入(胚細胞系利用)を行う)
- ・ **毒性試験指標と対比したデータ解析手法の確立としての遺伝子系に於ける生体異物応答モデルを用いた検討**(井上): 統計的適合解析と集合分析を中心課題として研究する
- ・ **消化管粘膜毒性発現機序の網羅的遺伝子発現解析による解明**(池田): 腸管上皮細胞 (Intestibermisulphonic acid, dihomomethylornithineなど) を取り出し、腸粘膜の遺伝子発現変化をGeneChipを用いて網羅的に解析する
- ・ **7細胞機能に関わる肺腫瘍性発現の分子メカニズムに関する研究**(尾川): マウスの肺腫瘍(リステリア菌, *Listeria monocytogenes*) に対する感受性を左右する様々な薬剤についてD-キニンとシリン、サイクロフォスファミド、エストロゲン、メチルコランソレン、腸腫瘍に及ぼす影響をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。免疫抑制剤(phenotypic)としてリステリア感染による死亡率を算出する
- ・ **中枢神経系に作用する薬物の骨代謝への影響**(池田): Alprazolam (12.5mg, 30mg, 120mg/kg), Etizimide (15mg, 90mg, 240mg/kg), Suberide (2.5mg, 10mg, 40mg/kg), Sodium Valproate (5mg, 20mg, 90mg/kg)の本薬物を異なるそれぞれ濃度投与し、毎日C57BL/6マウスに経口投与する。また、高濃度のみを経口投与したものを対照として用いる。薬物投与1週間後に左大腿骨を骨幹部で切断し、シリンジの針を骨髄腔に通すことで固定し、手術野開示、手術後、薬物投与を続け、手術1週間後に左大腿骨の骨質抽出及び右大腿骨の骨質を、X線写真、骨密度測定、病理組織学的方法により比較検討する
- ・ **化学物質の遺伝子傷害性予測に関するトキシコゲノミクス研究**(本間): 既に候補に挙がっている遺伝子群から、RT-PCR法による反応性及び選択性の高い約50遺伝子を取り込み、スクリーニング用遺伝子セットとする。新たに遺伝毒性、非遺伝毒性化合物のセット(10化合物をマウスに投与し、これらの遺伝子を用いたRT-PCR法によるスクリーニング系のバリデーションを行う)

### 【③トキシコゲノミクスのためのインフォマティクス開発研究】

- ・ **発現同期遺伝子の抽出・解析技術の開発・改良**(HBE)
- ・ **Exonレベルでの遺伝子発現データの解析技術開発**(Takabe)(HBE)
- ・ **アルゴリズム開発用の基礎データ採取**
- ・ **プラットフォーム間データ変換の検証**(HBE)  
Affymetrix GeneChipとAgilent Microarrayをモデルとする

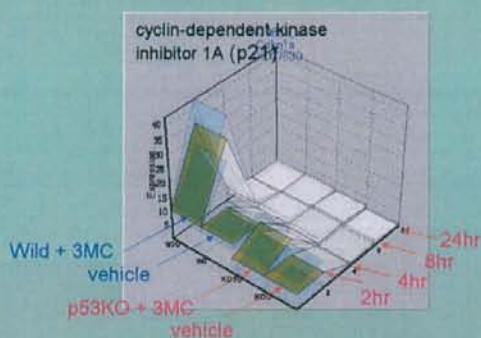
## 本研究班の概要

- ・ **目的**:
  - 化学物質リスク評価の基盤整備としての安全性評価システム構築の第二段階
- ・ **概要**:
  - **反復(慢性)暴露実験**からの情報
  - **多臓器間**の連関情報
  - **in situ hybridization**による臓器内の遺伝子発現部位(細胞別、或は組織内領域別)の可視化情報
  - 毒性的意味付けを膨大なゲノミクス情報から取り出すための **インフォマティクス技術開発**
  - **基盤研究**からの遺伝子発現情報による解析強化
- ・ **必要性**:
  - 従来の毒性評価方法が持つ限界の克服:「安全係数」の科学的代替
  - 毒性の発現メカニズムに基づいた評価システムの開発
  - 実際の毒性発現との連関性の分子メカニズムを明確化
- ・ **期待される成果**:
  - 毒性発現の分子メカニズムに基づいた、迅速、正確且つ詳細な毒性予測の向上
  - 様々なエンドポイントの組み合わせで評価されてきた毒性の包括的評価への展望

# 新型慢性毒性

遺伝子改変動物の実験からの発想

p53KO マウス = p53が機能しない個体



- 慢性的影響が反応性を修飾
    - 遺伝子改変による生来の異常反応系
    - 化学物質の十分に長期間の反復投与による異常反応系
- =Chemically-Induced Transgenic State

