

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
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	野村護、 堀井郁夫、 吉田武美	非臨床試験－ ガイドラインへ の対応と新しい 試み－	株式会 社エル・ア イ・シー	東京	2008	561 - 568
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	油谷浩幸	DNA チップ/マ イクロアレイ臨 床応用の実際	株式会 社メディカ ルドウ	大阪	2008	363 - 371
Hirabayashi Y, Inoue T	Principles of data-mining in toxicogenomics.	S.C. Sahu	Toxicogenomics :A Powerful Tool for Toxicity Assessment	John Wiley & Sons, Ltd.	USA	2008	57-84
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	株式会 社 秀潤社	東京	2007	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 Project による2,3,7,8- TCDD-2,3,7,8-TC DF比較		細胞工学	株式会 社 秀潤社	東京	2007	1391 - 1396
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	医歯薬出 版株式会 社	東京	2006	1035 - 1036

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	
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., Umabayashi, Y., Honma, M., Sugasawa, K., Takayama, Y., and 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
Baniasadi 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 and 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 and 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 leukemogenesis	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 hematotoxicological 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,	Identification of Glutathione Depletion-Responsive Genes Using Phorone-Treated Rat Liver	J. Toxicol. Sci	32	469 - 486	2007

T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani					
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 USA.	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 β -Tricalcium Phosphate Composed of Rod-Shaped Particles	Key Engineering Materials	309-3 11	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

非臨床試験

—ガイドラインへの対応と
新しい試み—

編集委員 野村 護 / 堀井郁夫 / 吉田武美

第3節 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

1. はじめに

毒性学(トキシコロジー)はヒトの健康・安全を確保することを目的とし、外来性の物質(化学物質など)が生体に進入した際の生体反応を記述し理解することにより、身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、それらの曝露による被害を未然に防ぐとともに、曝露された場合の治療法を開発する研究分野である。

この毒性予測の精度向上を目指した分子生物学レベルの毒性研究は、遺伝子、遺伝子発現、タンパク合成、タンパク修飾などから最終的な毒性症状までのあらゆる段階を対象とする。その際、探索的な科学研究と異なる点として、毒性学には、予期せぬ事態を見逃がさない「網羅性」の確保が要求されることが挙げられる。我々はその現実的対応として、遺伝子発現をほぼ全遺伝子についてカバーする高密度 cDNA マイクロアレイによる毒性学的トランスクリプトーム研究、すなわちトキシコゲノミクス研究を開始した。

創薬過程における非臨床段階での毒性学、特にラットを用いた一連の毒性試験は、薬の安全性確保に大きく貢献するとともに、審査資料の構成成分としての重要な役割を果たしてきている。これに対するトキシコゲノミクスの位置づけには、その発達段階にも応じて、何通りかあるように思われる。ここでは、薬学の中の副作用学としての毒性学に加えて、医学(病理学)、環境生物学、あるいは生物界に対する化学界の関わりとしての毒性学を念頭に、我々が進める Percellome Project を中心とした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、そのデータ解析についての現状と展望を概説する。

2. トキシコゲノミクス研究の目的と最終目標

従来の毒性学は、生物個体が「ブラックボックス」であっても、それに対する「入力」としての化学物質が引き起こす毒性症状をそれからの「出力」として記述し、入出力の関連を体系化することで安全性確保に貢献してきた。我々のトキシコゲノミクス研究は、ブラックボックスの中身を遺伝子発現カスケードの面から解明することにより生体反応メカニズムに基いた分子毒性学を構築することを目的としている。そして、究極の目標としてコンピュータ内のバーチャルマウスやバーチャル人間の完成を掲げ、そこへ向う過程で実験動物からヒトへの外挿の精度向上を実現しようとするものである。前述のごとく毒性学は網羅性を重んじるため、得たデータを既知情報により分類・解析するアプローチ(いわゆる、phenotypic anchoring や、既知の応答に関わるバイオマーカー探索など)は後に回し、トランスクリプトーム情報そのものの中から、生物学的に有意な反応カスケードを描出するアプローチを取ることとした。これは丁度、電子顕微鏡写真が世に現れた時の状況に準えることができる。すなわち、光学顕微鏡では見えない「もの」が新たに見えるようになったわけであるが、それが何であるかは、光学顕微鏡像を参照しても簡単には分からない。電子顕微鏡像を解釈しコンセンサスとしての教科書

(図譜など)ができ上がって初めて日常的に利用されるようになったわけであり、教科書を完成する作業自体が1つの研究分野を形成したという歴史がある。繰り返しになるが、我々の目指すトキシコゲノミクスと従来の毒性学との関係は電子顕微鏡と光学顕微鏡の関係にあり、実用化に向けての教科書作成にあたる基礎研究が必要である。

話は前後するが、毒性学研究は、人体実験が可能な一部の状況(成人を対象とした医薬品の臨床試験など)を除いて、ヒトの身代わりとしての実験動物を用いて行われる。上記の目標を達成するために、我々は動物種としてマウスを選択したが、その理由は、遺伝子情報がヒトに次いで豊富であること、および、遺伝子改変マウスが利用可能であり、それから得られる情報(下流カスケードの情報、ノックアウトマウスが示す欠落症状等)が遺伝子発現カスケードの客観的な描出と毒性学的意義付けに大きく貢献することが予見されたことによる。それでも、複数の実験から得られる大量の実験データを蓄積した上での横断的な解析が必須となる。そのためには、データの標準化と互換性確保が重要となってくる。そこで、我々は、発現データの標準化手法として、マイクロアレイや定量PCRから細胞1個あたりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発した。

3. Percellome Project

3.1 Percellome法：細胞1個あたりのmRNAコピー数として発現値を得る方法

原理は、サンプルの細胞数に対してmRNAの発現値を標準化するという単純なものである。具体的には、サンプル破砕液のDNA量から細胞数を求め、外部標準mRNA(スパイクRNA)を細胞1個あたり決まった分子数だけその破砕液に添加し、そしてRNA抽出、測定に移る。スパイクRNAの

発現値が細胞1個あたり何コピーに由来するかが既知であることを利用し、サンプル中の全てのRNA測定値を、細胞1個あたりのコピー数に換算する。スパイクRNAは、枯草菌の5種類の遺伝子のmRNAを濃度を公比3で振って混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。これにより、各サンプルに細胞1個あたりのコピー数が既知である標準点5点が導入され、これらを繋げば標準直線が得られる。この直線を用いて実際に測定したmRNAの発現値(マイクロアレイの場合数万種)をコピー数に換算する¹¹⁻¹³⁾。

このような測定に用いるマイクロアレイには十分な定量性・直線性が備わっている必要がある。その検証にはLBM標準サンプル(肝[L]と脳[B]を100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100に混合した5サンプルからなるセット)を用いた。現在までに、Affymetrix社GeneChip(マウス、ラット、ヒト、ゼノバス)、Agilent社の単色44kアレイ(マウス、ラット、ヒト)、およびCodelink(マウス、ラット、ヒト)マイクロアレイについて、定量性・直線性を確認し、Percellome測定が可能な状態となっている。ただし、真のコピー数は、原則的にマイクロアレイからは求まらず、プローブあるいはプローブセットごとの用量反応特性の影響を受ける(現行のExpression Arrayのプローブの塩基配列設計にはある程度の同一定量性が得られる配慮がなされている)。この問題に対するPercellome法の利点は、定量PCR等で真の値が測定されたサンプルを、一度、マイクロアレイで測定すれば、そこから換算式が導かれ、真の値への一括変換が原理的に可能であることにある。現段階では、AffymetrixのGeneChipのプローブセットごとの特性に依存したデファクト絶対値である。LBMのようなサンプルをPercellome法を実行可能なプラットフォーム間で共通に測定すれば、プローブあるいはプローブセットごとの換算式が用意される。これは、マイクロアレイ間のみならず、定量的PCRとの間、および、同一プラットフォーム

ホーム内での1回増幅プロトコールと2回増幅プロトコールとの間でも可能である。

GSCの添加を正確に行うために高精度を要求されるDNA定量については、手作業プロトコールおよび自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコールを準備した。GSCのストックも含め共同研究ベースで供給可能である(連絡先:kanno@nihs.go.jp)。

3.2 Percellome Projectの実験プロトコール

体内に侵入してきた化学物質等を第一に感知するのは、多くの場合タンパク質であり、それからの次の影響が遺伝子発現に波及した場合にmRNAの変動として現れ、それが次のタンパク質を誘導し、次のmRNA変動を招く、と模式的には考えられる。このような初期応答を観測する目的から、まず、成獣の肝を対象とした単回経口投与実験プロジェクトを開始した。mRNA合成のスピードと動物実験の手技上の現実的限界を考慮し、単回強制経口投与の2, 4, 8, および24時間後にサンプリングを行うプロトコールを設定した。また、用量依存性を考慮し、投与量を溶媒対象(0), $\times 1$, $\times \sqrt{10}$, および $\times 10$ とした4群を設定した。すなわち、1つの化合物について、4(時点) \times 4(用量)の16群、各群3匹、合計48匹とした。マウスはノックアウトマウスを併用する前提からC57BL/6(SLC)を、週齢は肝の酵素が安定する12週齢、性別は性周期のない雄、とした。また、後述するが、肝、腎、肺、心、脳など、ほとんどの臓器に明瞭な日内変動が認められるため、マウスを10週齢時点で搬入し、明暗12時間サイクルを厳守した環境で2週間馴化した後、明サイクル2時間目に投与、以後、各予定時刻の前後20分~30分以内にサンプリングを完了することとした。1匹につき、麻酔(エーテル)、脱血(腋窩動脈より)の後の2分~3分以内としている(実施要領を執筆中)。マイクロアレイはAffymetrix社GeneChip

Mouse430 2.0(初期は430 A)を用いた。サンプルはプールせず、個体ごとに測定した。

3.3 Percellome Project データの構造 (Millefeuille surface data) と解析

化学物質単回投与による遺伝子発現変動は、時間および用量に依存するという考えから、x軸=時間、y軸=用量、z軸=mRNAコピー数とする3次元グラフ上に曲面(surface)として投与が誘発する遺伝子発現変動を可視化した。1つの遺伝子(GeneChipでのprobe set)につき、3匹の平均surfaceと ± 1 標準偏差(SD)surfaceを表示することで、視覚的に反応を捉えると同時に、ノイズあるいはartifactであるか否かの感触を容易に得られるようにした。Percellome Projectではこの3次元surfaceのパターンを基礎に遺伝子発現カスケードの描出に関わる方法論の開発を進めている。現在、1つの実験から得られるGeneChip 48枚のデータを一括処理する能力を持ったPercellome自動換算・データ品質管理(QC)ソフトウェア、3次元多層データ(Millefeuille data; MFデータあるいはSurfaceデータと呼んでいる)のパターン類似性を元にした候補遺伝子検索ソフトウェア群を中心とした解析システム(MFソフトウェアシリーズ、開発:相崎健一)、およびその概念を発展させた教師なし(クラスター数の指定なし)クラスタリング⁴⁾を独自に実用化し、現在も改良・開発を継続中である。データの3次元可視化は、コンピュータが選び出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、殊にmRNAの合成分解のスピード等の常識から考えて生物学的にあり得ないパターン(用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など)をノイズとして排除する際に威力を発揮している(図1)。

いくつかの化合物の全遺伝子リストを比較し、化合物に共通して同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。ここで得

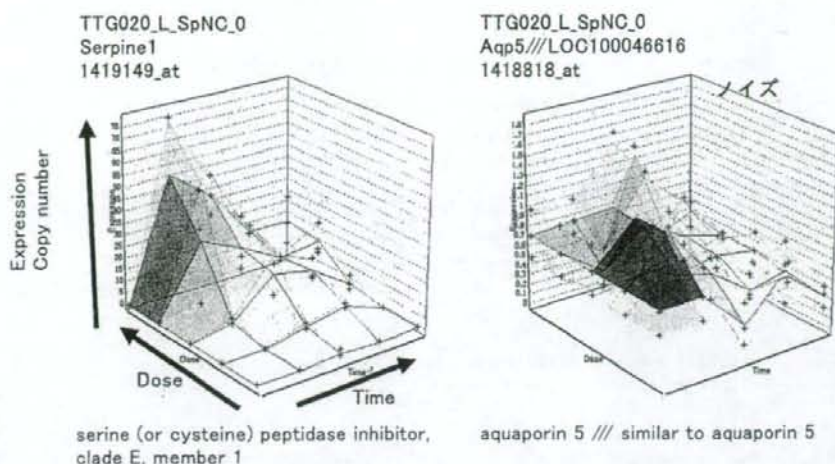


図1 Percellome Projectにおけるデータの3次元表示(Millefeuille surface データ)

用量, 時間, 発現値を3次元表示し, 1つの遺伝子(probe set)につき1枚の曲面を描く。1つの格子点が1群に対応し, 3匹のデータから計算される平均値からなる平均 surface(濃く色づけ)と±1SDの2つの surface(薄く半透明表示)の合計3層からなる。2,3,7,8-四塩化ジベンソダイオキシシン(0, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を単回投与した後, 2, 4, 8, および 24 時間後の肝における serpine 1(左)および aquaporin 5(右)である。serpine 1は, 2時間目をピークとする用量依存的な誘導がかかっており, SD surfaceも平均 surfaceに近接していることから, 生物学的に有意なデータであることが容易に判断される。これに対し, aquaporin 5は, 時間経過からも用量からも生物学的に考え難い上下を繰り返しており, また, SD surfaceも分離していることから, 生物学的蓋然性のない, おそらくノイズであると直感される。実際に, その発現絶対値はこの場合の公称下限感度である1コピー/細胞を下回っている。(図中の(+))は個別のデータを示す)

られた遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性がある。(5TB規模のデータベース部分および, 大量計算アルゴリズム実装, クラスタリングアルゴリズム等は㈱NTTコムウェア・NTTデータおよび㈱日本NCR/Teradata(松本伸哉氏)との共同開発による)。

3.4 Percellome Projectの概要とデータ例

現在までに, 単回強制経口投与による肝の初期反応データを, 既知情報のある約100以上の化学物質(医薬品, 一般化学物質, 食品関連物質を含む)について採取し終えた。これに引き続くプロジェクトとして, 食品・食品添加物関連, シックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス, 1匹のマウスから多臓器を採

取しそれらの連関を解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始したほか, 胎児発生, 行動神経に関わるプロジェクトへの展開を図っている。ここで, 多臓器連関解析の一部を紹介する。サリドマイドを0, 100, 300, および1,000 mg/kg の用量で強制経口投与し, その2, 4, 8, および24時間後に, 肝, 腎, 肺, 心, 脳の5臓器を採取, Percellome dataを得た。まず, 投与とは無関係に変動する概日遺伝子は全ての臓器において明瞭なパターンを示し, 最高値が最低値の数倍を超えるものが多数見られた(図2)。ここでは肺に注目した解析の一部を紹介する。2時間目に用量相関性を持って発現誘導のピークを示す遺伝子に, Cdkn1a(P21)が認められた(図3)。類似のパターンを示す初期応答遺伝子には, Fas, Foxo3a, Gata2, など50あまりがあり, 酸化ストレスが誘発されているこ

Circadian Gene
(Dbp : D site albumin promoter binding protein 1438211_s_at)

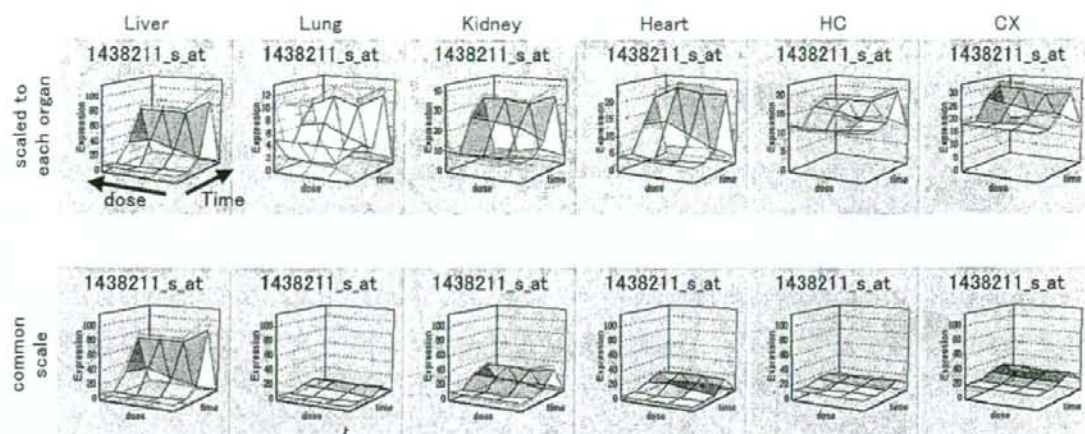


図2 サリドマイドによる多臓器影響(1)

肝, 肺, 腎, 心, 海馬(HC)および大脳(CX)のサリドマイドによる遺伝子発現影響を示す。Dbpは、概日遺伝子であり、全ての組織に投与に依存しない概日変動を認めた。最低値と最高値には数倍の差が多く臓器で認められた。

Cdkn1a (P21) ; cyclin-dependent kinase inhibitor 1A 1424638_at

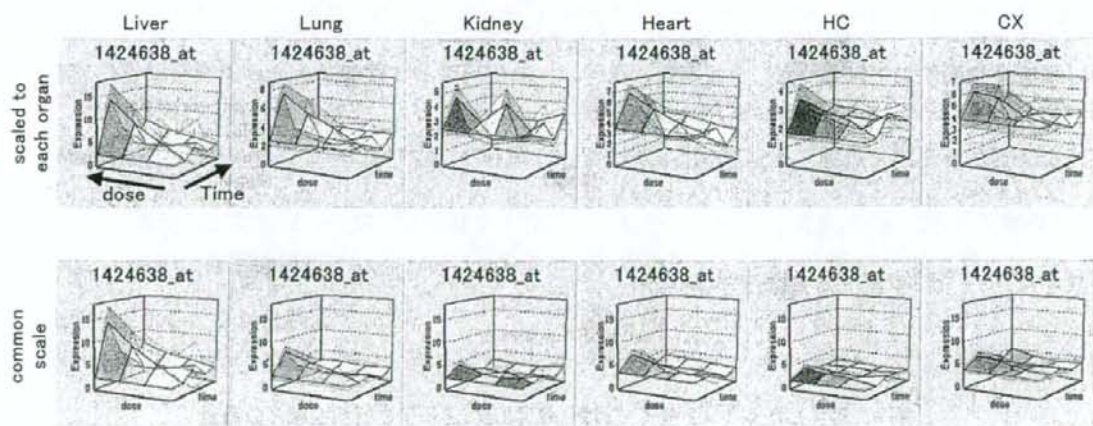


図3 サリドマイドによる多臓器影響(2)

肝, 肺, 腎, 心, 海馬(HC)および大脳(CX)のサリドマイドによる遺伝子発現影響を示す。いずれの臓器・組織においても、2時間目に用量相関性をもって、Cdkn1a(P21)の誘導が認められた。

とが示唆された。既知情報との照合によっても、Free Radical Scavengingなるキーワードが含まれる反応であった(図4)。これらのことから、サリドマイドは肺に対して酸化的ストレスを介した毒

性を示すことが示唆され、文献的に多発性骨髄腫患者にサリドマイドが間質性肺炎を誘発するなどの報告があり、それが確認された。肝ではサリドマイドにより発現が減少する遺伝子はほとんど認

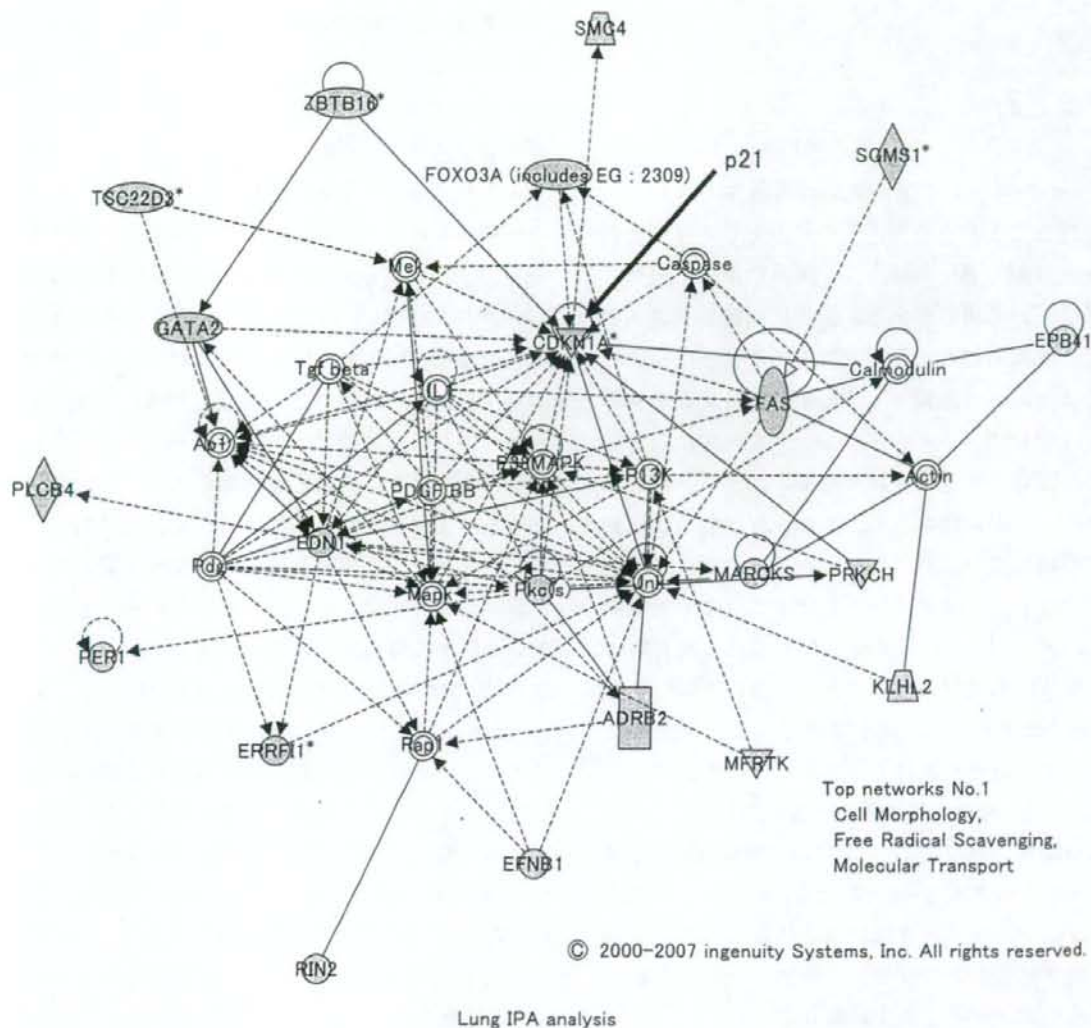


図4 肺におけるサリドマイド誘導(発現上昇)遺伝子の既知情報との照合

Ingenuity Pathway Analysis のデータベースとの照合から、フリーラジカルに関するカスケードの関与が示され、文献的に肺に対する障害を示す事例が確認された(灰色: 実際に変動している遺伝子)。

められなかったが、肺では数十の発現減少遺伝子が抽出された。既知情報と照合すると、Connective Tissue Development and Function, Skeletal and Muscular System Development and Tissue Development というキーワードにくくられる遺伝子群が含まれており、その中には、肢芽形成に関わる Lbh

(limb-bud and heart)なるものが含まれていた。肺は、肝に比べて間葉系成分が多く、より多彩な反応が観測される可能性が指摘される。どの細胞集団が該当遺伝子を発現しているかの同定には、必要に応じて、*in situ* hybridization を実施することとしており、現在の感度は50コピー/細胞程度

であるが、さらなる高感度化を図っている。

4. まとめ

「マイクロアレイデータには再現性がない」と言われることがあるが、その原因としては、その定量性の善し悪しのほかに、実験計画の不充分さが挙げられる場合がある。動物には概日リズムがあり、前述のごとく肝では数千の遺伝子に、また、他のほとんどの臓器でも明らかな概日変動が見られる。サンプリングのタイミングを一定にしないとこの影響を大きく受けてしまい、データが再現しないことが経験される。また、実験前の馴化期間中の動物舎の照明スケジュールが厳密に管理されていないと、タイミングを守っていても実験間誤差が大きくなる。その他、餌の組成、飼育時のストレスにも注意が必要である。これに似た影響は、*in vitro* サンプルにも経験される。例えば、培養細胞の培地交換はもとより、倒立顕微鏡での観察の有無(培地の攪拌等の影響)、インキュベータ内の配置、96穴プレートでの辺縁効果(最外周wellの培養条件が中心と異なる)などが、時に明瞭に遺伝子発現データに反映される。このような点に配慮することで、遺伝子発現データが安定し、再現性が向上することを経験している。

データ解析のアプローチとして、しばしばバイオマーカー検索が行われるが、最終的フェノタイプとの連関性による抽出の限界が気になる場所である。我々の目指すカスケード抽出については、教師なしクラスタリングと網羅的特徴抽出アルゴリズムの組み合わせによる解析が始まったところである。教師なしクラスタリングは、Percellomeデータの3次元曲面の形状の類似性を指標に、45,000枚の曲面について総あたり計算を行い、45,000プローブセットの類似性密度を求め、高密度の中心をそのクラスターの代表反応としてクラスターを抽出する。他方、密度の低いところに

は、他の45,000とは似ていないものが点在する。これらは、1つのプローブセットが1つのクラスターを形成していると考え、single gene clusterとして抽出する。同様に2遺伝子クラスター、3遺伝子クラスター、といった具合に、小さいクラスターから大きいクラスターまで、教師なしクラスター解析を行っている。網羅的特徴抽出アルゴリズムは、Percellome曲面の16格子点情報から凸ピークおよび凹ピークを検出し、その複雑さなどの特徴から、mRNAの反応特性に照らして生物学的意味を持つ可能性の高い曲面を網羅的に抽出するものである。この2つのアプローチを組み合わせることにより、網羅性を確保しつつ、生物学的意味を持つ曲面の抽出を行っている。これらにより、カスケードの要員遺伝子の抽出が可能となっており、このアプローチによるカスケード抽出の糸口が次々に得られている。今後、これらの要員遺伝子の連結作業を加速する手段としてのInformatics研究を外部との共同研究を含めて推進することにより、近い将来には網羅性を確保した状態でのカスケード同定が可能となることを見込まれるに至っている。特に、遺伝子改変マウス情報との対比が有効であることが示されており、国内外のノックアウトマウスプロジェクト(KOMP)や、国立遺伝学研究所の城石俊彦博士らによるMSM/MsマウスとC57BL/6Jマウスのコンソミックマウスライブラリ研究⁵⁾などとの連携も考慮したデータ解析をも展望するものである。

謝 辞

本システムの開発とプロジェクトの遂行にあたっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻 昌貴、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、森田絃一、近藤優子、古川佑介、青柳千百合、相原妃佐子の各氏に深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012、H14-トキシコ指定-001、H15-化学-002、H17-化学-一般-003、H18-化学-一般-001等による。

参考文献

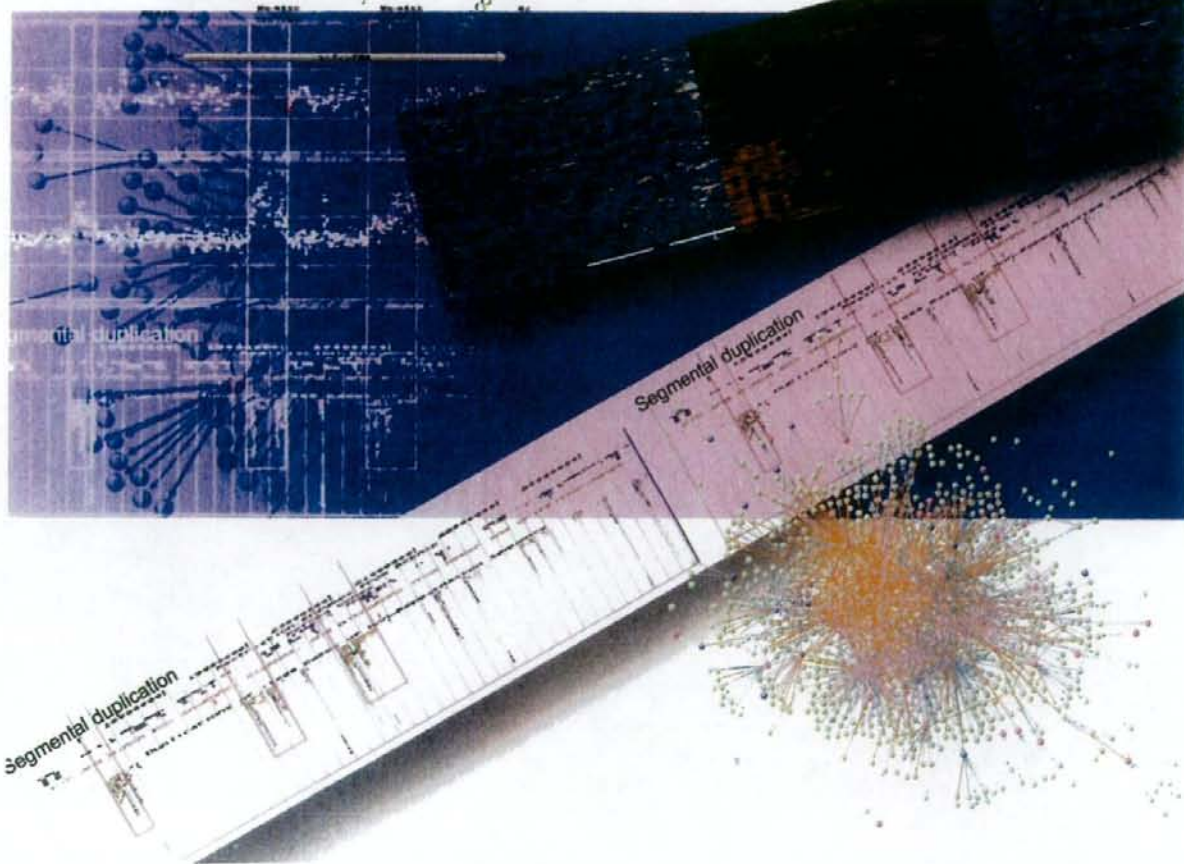
- 1) Kanno J., Aisaki K., Igarashi K., Nakatsu N., Ono A., Kodama Y. and Nagao T. : "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics*, 7: 64, 2006.
- 2) 菅野 純, 相崎健一, 五十嵐勝秀, 小野 敦, 中津則之 : ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入. *細胞工学*, 23(6): 685-693, 2004.
- 3) 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(1): 71-77, 2007.
- 4) Matsumoto S., Aisaki K. and Kanno J. : Mass Distributed Clustering : A New Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data. *Genome Informatics*, 16: 183-194, 2005.
- 5) Takada T., Mita A., Maeno A., Sakai T., Shitara H., Kikkawa Y., Moriwaki K., Yonekawa H. and Shiroishi T. : Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits. *Genome Res.*, 18: 500-508, 2008.
(菅野 純/北嶋 聡/相崎健一/五十嵐勝秀/
小川幸男/関田清司)

DNAチップ/マイクロアレイ 臨床応用の実際

基礎、最新技術、臨床・創薬研究応用への実際から
今後の展開・問題点まで

【編集】 油谷浩幸

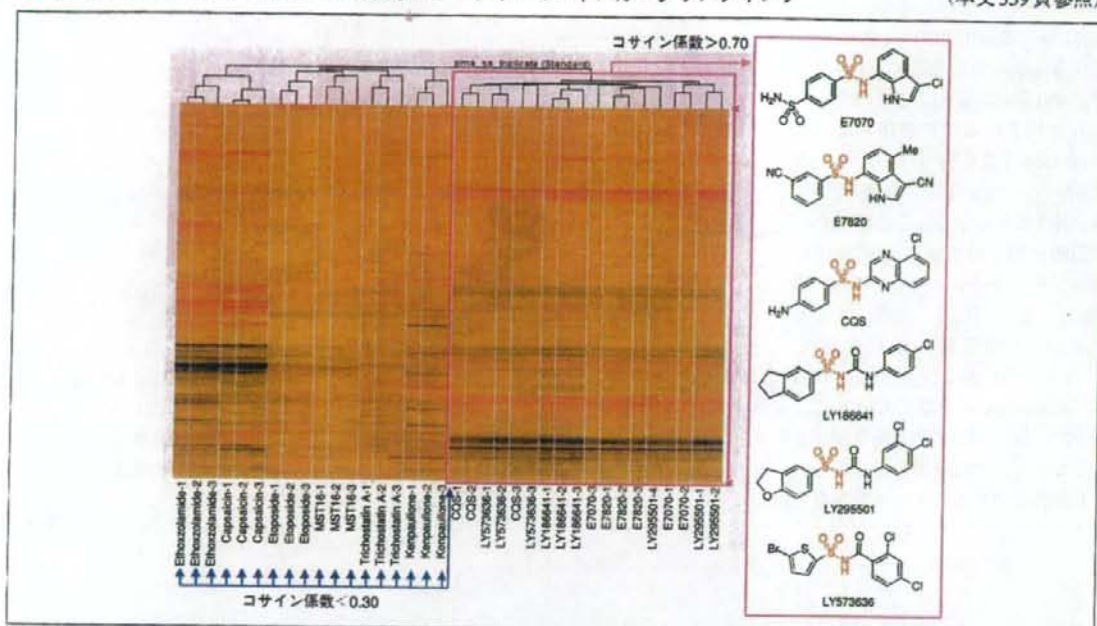
(東京大学先端科学技術研究センター教授)



株式会社 メディカルドゥ

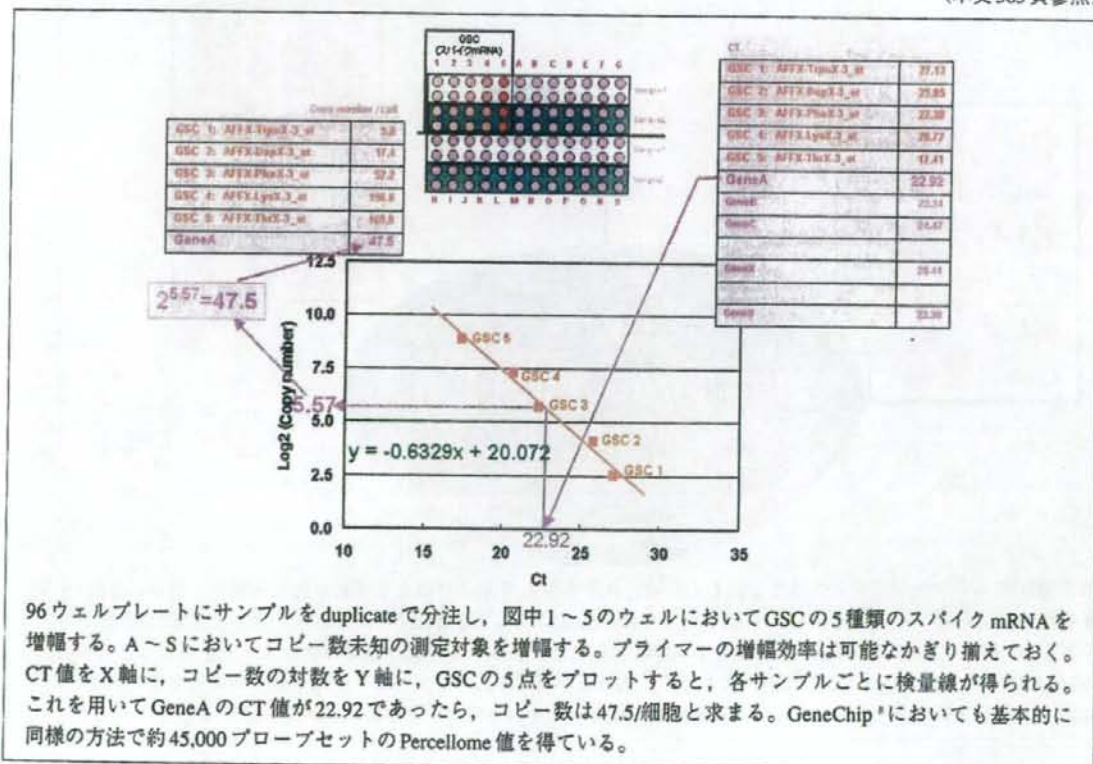
● 階層的クラスタリングによる化合物転写プロファイルのフィンガープリンティング

(本文 359 頁参照)



● 定量 PCR による Percellome 法の概要

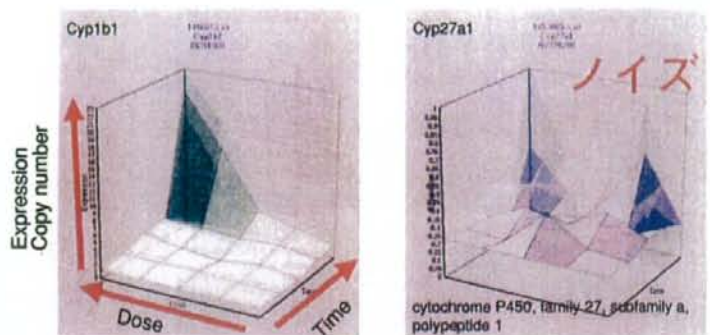
(本文 365 頁参照)



● Percellome Project におけるデータの三次元表示 (Millefeuille surface data)

(本文 366 頁参照)

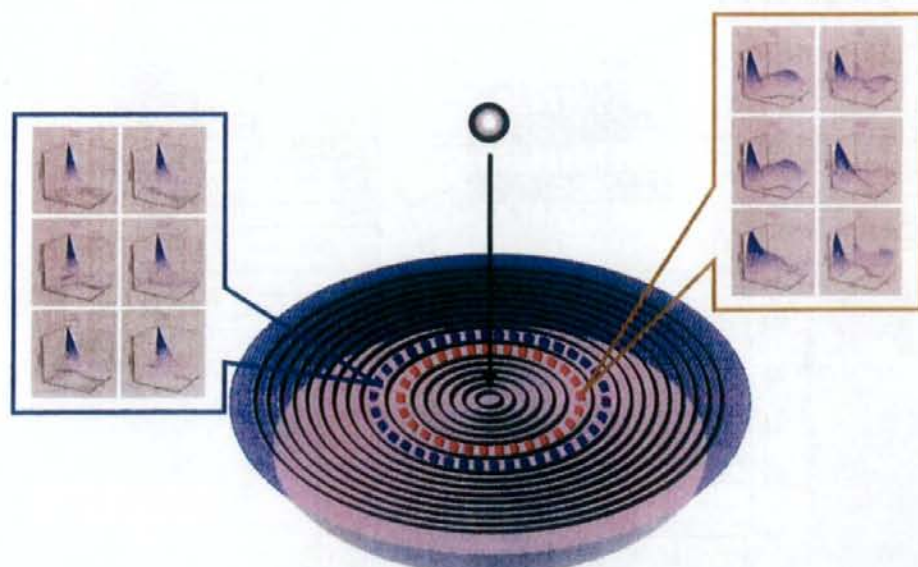
用量, 時間, 発現値を三次元表示し, 1つの遺伝子(プローブセット)につき1枚の曲面を描く。1つの格子点が1群に対応し, 3匹のデータから計算される平均値からなる平均 surface (濃く色づけ) と±1SDの2つの surface (薄く半透明表示) の合計3層からなる。ここに示すのは図①と同一の2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾダイオキシン (0, 1, 3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を単回投与した後, 2, 4, 8 および 24 時間後の肝における



CYP1b1 (左) および CYP27a1 (右) である。CYP1b1は, 24時間目に用量依存的に誘導がかかっており, SD surface も平均 surface に近接していることから, 生物学的に有意なデータであることが留意に判断される。これに対し, CYP27a1は, 時間経過からも用量からも生物学的に考えにくい上下を繰り返しており, またSD surface も分離していることから, 生物学的蓋然性のない, おそらくノイズであると直感される。実際に, その発現絶対値はこの場合の公称下限感度である1コピー/細胞を下回っている。

● Percellome Project データ解析の基本概念

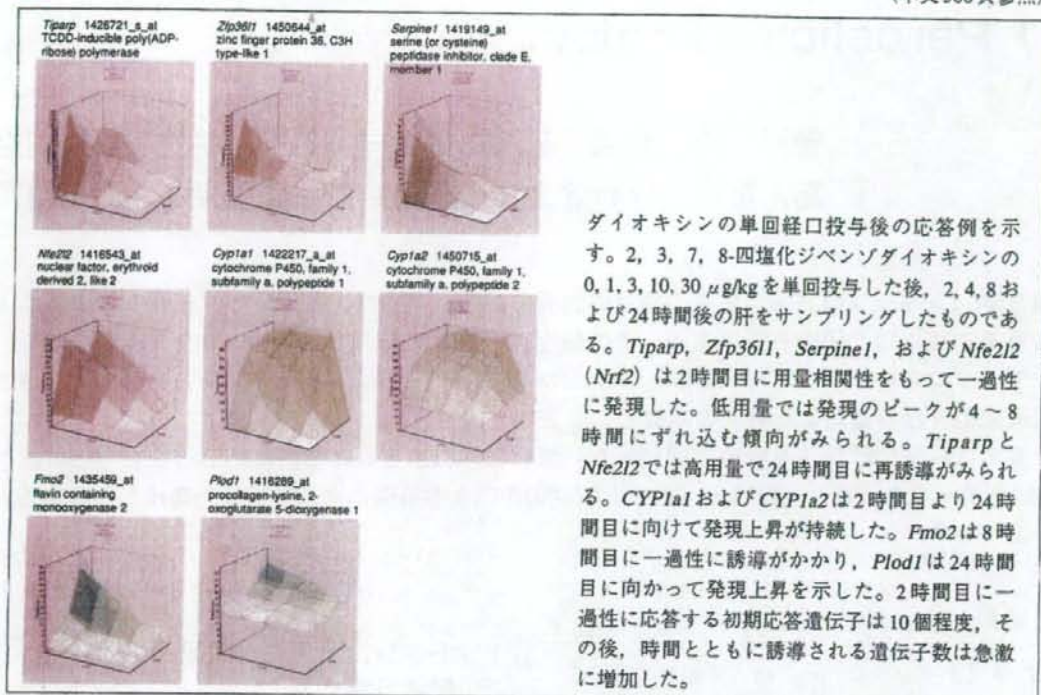
(本文 367 頁参照)



水面を遺伝子カスケード, そこへ落とし込む石を投与/化学物質と考え, 石による波紋が投与実験から得られる遺伝子発現の初期応答であると考え。そして, 三次元 surface の類似する遺伝子をクラスターとして網羅的に抽出すると, 1つのクラスターは同心円状の波の1つに当たることになる。このような波のクラスターを異なる「石」(別の化合物)のクラスターと比較検討することで, 生命体を利用するカスケードの共通部分を特定してゆく。これに遺伝子ノックアウトマウスなどからの客観情報を組み合わせ, カスケードの描出範囲を広げてゆく。

●ダイオキシンによる肝遺伝子発現応答

(本文368頁参照)



ダイオキシンの単回経口投与後の応答例を示す。2, 3, 7, 8-四塩化ジベンゾダイオキシンの0, 1, 3, 10, 30 μ g/kgを単回投与した後、2, 4, 8および24時間後の肝をサンプリングしたものである。Tiparp, Zfp361f, Serpine1, およびNfe2l2 (Nrf2)は2時間目に用量相関性をもって一過性に発現した。低用量では発現のピークが4~8時間にずれ込む傾向がみられる。TiparpとNfe2l2では高用量で24時間目に再誘導がみられる。CYP1a1およびCYP1a2は2時間目より24時間目に向けて発現上昇が持続した。Fmo2は8時間目に一過性に誘導がかり、Plod1は24時間目に向かって発現上昇を示した。2時間目に一過性に応答する初期応答遺伝子は10個程度、その後、時間とともに誘導される遺伝子数は急激に増加した。

●四塩化炭素による多臓器影響

(本文369頁参照)

肺, 肝, 腎, 心および精巣の四塩化炭素による遺伝子発現影響を示す。Dbpは概日遺伝子であり, 精巣を除くすべてに投与に依存しない概日変動を認めた。最低値と最高値には数倍の差が多くの臓器で認められた。比較的低用量の四塩化炭素では, 比較的限られた少数の遺伝子に変動が認められた。その中で2時間目に最も多くの遺伝子発現がみられたのは肺で, ここに示すPigs2 (COX2)のほか, heat shock proteinなどのいわゆるストレス応答を示唆する遺伝子が変動した。肝では, 2, 4, 8時間にはほとんど遺伝子発現はみられず, 24時間目にここに示すHIF1 α のほか, Thyoredoxin, Gultathione S-transferase, SAA1など比較的多数誘導された。腎においては2時間目(Slc25a33)と24時間目に少数の発現があり, 心では8時間目(Pcdh7)を中心にいくつかの遺伝子の発現を認めた。

