

を測定した。DNA 含量に応じ、あらかじめ臓器毎に設定した割合で GSC (Graded dosed spike cocktail; Bacillus subtilis 由来 RNA 5 種類を濃度を振って混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

(4) GeneChip 解析

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターにより付されたオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成した。得られた cDNA の第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ピオチン化 UTP、CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーにて発現データを得た。得られた発現データは、当方が開発した各種ソフトウェアを用いてコピー数に変換 (Percellome 法) し解析に供した。

(5) 定量的 RT-PCR (Percellome PCR)

BMC genomics 2006, 7, 64 の方法に従い、以下の手順で実施した。組織破砕液中の DNA 含量を DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて測定し、それに依りて spike RNA cocktail を添加した後に精製した total RNA を、逆転写反応にて cDNA とし、Ces6 に対する primer (FW:GGAGC

CTGAGTTCAGGACAGAC、RV:ACCCTCACTGTTGGGGTTC)、Cyp3a11 に対する primer (FW:CAGCTTGGTGCTCCTCTACC、RV:TCAAACAACCCCATGTTTT)、及び、Bacillus subtilis 由来 RNA 5 種類の spike RNA に対する primer を用いて定量 RT-PCR を行い、spike RNA 量を基準に CES6 のコピー数を算出した。

(6) *In situ* hybridization 解析

CYP3A11 検出用の DIG ラベル cRNA プローブを作製するために、FW:GATTGGTTTTGATGCCTGGT、RV:CAAGAGCTCACATTTTTTCATCA を用い、肝 cDNA を鋳型に PCR 増幅し、配列を確認後、T7 RNA polymerase の promoter を含むリンカーを Block-iT T7-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) キットにより付加し、2nd PCR を行い、sense、antisense 用の鋳型を調製し、DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Germany) を用いて、DIG ラベルされた cRNA probe を作製した。パラフィン包埋切片に対する *in situ* hybridization は、HistoVT One (nacal tesque, Japan) 中で 98°C、15 分間賦活化する処理を加え、定法に従って実施した。

(7) 肝初代培養

コラゲナーゼ灌流法によって肝細胞を回収し、マイクロスフェアアレイ (ステムバイオメソッド社) 中で培養し、肝スフェロイドを形成させた。また、付着培養の場合は、コラーゲンをコートした 24well 容器に肝細胞を播種した。

コラゲナーゼ灌流法の手順は以下の通りである。麻酔下マウスを開腹し、EGTA を添

加した PBS を下大静脈から灌流する。血液が除かれたら、コラゲナーゼ溶液に切り替え、10 分間灌流する。肝をシャーレに採取し洗浄液中、実体顕微鏡下、胆嚢を除去し、被膜をはがし、肝実質を緩やかに培養液に拡散させ、70 μ m のセルストレーナーにて濾過後、50g、2 分、4 $^{\circ}$ Cにて遠心し、沈澱細胞を回収する。3回洗浄した後、培地を添加し生細胞数を計測、マイクロスフェアアレイに (400 μ m 径アレイの場合、 1.25×10^5 / 0.25mL) 添加する。細胞が容器底に沈降した時点で培地を交換する。連日培地交換を続けながら5日間培養を継続し、肝スフェロイド形成を確認し、化学物質添加実験に供した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) hSXRki マウスの作製

マウスLBDの代わりにヒトLBDを持つノックインマウス作製用ターゲティングベクターを構築するために、マウスSXRの exon 3 にヒト SXR の cDNA を連結した。ターゲティングベクターには、ES 相同組み替え体選択用の Neomycin 耐性遺伝子を Cre enzyme による除去を可能とするために LoxP 配列で挟んだ形で共存させ、相同組

み替え用 long arm として exon 3 に対し 5' 側の intron 2 の 7kbp を、short arm として 3' 側の exon8 から intron8 に対応する 1.3kb を用いた (Figure. 1)。

このベクターを C57BL/6 と CBA の F1 由来の ES 細胞クローンである TT2 に導入し、サザンブロットイングによって相同組み替えが確認された 2 クローン (#4, #25) をキメラマウス作製に用いた。得られたキメラマウスを ICR 系マウスと交配し、2 クローンとも生殖系列に移行することが確認された。そこで、#4 クローンについて Cre を CAG promoter 制御下に恒常的に発現するマウスと交配し、Neo^r を失ったマウスを選別した。このマウスを C57BL/6 CrSlc に少なくとも 6 回バッククロスし、ホモ体を得て以降の解析に供した。

(2) 各臓器における SXR 発現

hSXR chimeric protein の組織発現パターンを定量 RT-PCR によって検討した。定量 RT-PCR 手法は細胞当たりのコピー数に変換可能な Percellome method (Kanno et al. BMC genomics (2006) 7, 64) を用いた。

検討臓器は、脳、胸腺、心、肺、肝、胃、脾、腎、小腸及び精巣の 10 臓器とした。その結果、発現パターンは野生型本来の SXR のパターンと一致し、肺、肝、胃、腎、小腸で細胞 1 個当たり平均 2 コピー以上の発現が認められた (Figure. 2)。また、1 コピー以上の発現が精巣において認められた。

(2) 肝、小腸における SXR 応答のヒト型化確認

SXR 応答臓器であることが知られている肝、小腸について、SXR 応答遺伝子である Cyp3a11、Ces6 の定量 RT-PCR 解析 (Percellome 法)を行った。PCN は 20、70、200mg/kg、RIF は 10、30、100mg/kg を単回強制経口投与し、投与後 8 時間目に臓器を採取した。その結果、mSXR リガンドである PCN は野生型のみ、hSXR リガンドである RIF は hSXRki のみで発現上昇を示した (Figure 3)。また投与量依存的に発現上昇が見られることも確認された。

よって、少なくとも肝、小腸において SXR が予想通りヒト型反応パターンを示すことが示され、その LBD の種差に応じた活性化が確認された。

(3) *In situ* hybridization による CYP3A11 発現応答解析

Cyp3a11 の発現応答を *in situ* hybridization 法によって確認した。定量 RT-PCR 解析の結果通り、*in situ* hybridization 法でも hSXRki マウスがヒト型化反応パターンを示すことが確認された (Figure 4)。

(4) マウス SXR に作用する可能性のある化学物質の抽出

我々は、独自にマウス肝のトキシコゲノミクスデータベースを構築している。化学物質の種類は 100 を超え、現在も増え続けている。このデータベースは濃度 4 点、時間 4 点 (投与後 2、4、8、24 時間) の 16 群の網羅的発現データが各々の化学物質について蓄積されているものである。

マウスの SXR (mSXR) を活性化し、ヒトの SXR (hSXR) を活性化しない PCN についても

上記データベース中にデータがあり、その解析から、PCN によって発現が上昇する遺伝子として、よく知られた Cyp3a11 (プローブ設計不良であることが知られており GeneChip では変化を検出できない ; Percellome RT-PCR にて誘導を確認済み) の他に、Cyp2b10、Ces6、Gstm3 を用いることが可能であることが判明した (Figure 5)。

そこで、これらを mSXR 活性化のマーカー遺伝子として、全化学物質のデータを一覧できる MSV ソフトウェアを用いて PCN 同様の発現上昇を示す化学物質を検索した (Figure 6)。その結果、合計 4 種類の化学物質 (90 : PCN 自身に加え、100:Phenytoin 、 126:Thalidomide 、 37:Phenobarbital) が抽出された。

(5) 肝スフェロイドの検討

(4) においてデータベースから抽出された化学物質の hSXR への作用を、肝スフェロイドを用いて検討した。肝スフェロイドは Figure 7 に示すように、細胞境界が不明瞭な凝集体として培養形成されるもので、平板付着培養よりも肝細胞の特性保持に優れていることを特徴とする。実際、PCN による Cyp3a11 の誘導を肝スフェロイドと平板付着培養で比較したところ、肝スフェロイドで顕著な誘導が確認されている。

まず、肝スフェロイドが検討系として妥当であるかを、ヒト型化反応を指標に検討した。ヒト特異的 agonist として RIF を、マウス特異的 agonist として PCN を用いて検討した。それぞれ 20 μ M、2 μ M を培養液に添加し 24 時間後に CYP3A11 mRNA の発現量を定量 RT-PCR で測定したところ、典型的なヒト型反応を示すことが確認された (Figure 8)。

(6) 肝スフェロイドを用いた候補化学物質作用の検討

Phenytoin、Thalidomide、Phenobarbital の作用を肝スフェロイドを用いて検討した。Phenytoin は 6.32 μ M、20 μ M を、Thalidomide は 100、316.2、1000 μ M を、Phenobarbital は 1000 μ M を培養系に添加して 24 時間後に肝スフェロイドを回収し、Cyp3a11、Ces6、Cyp2b10、Gstm3 を定量 RT-PCR (Percellome PCR) にて測定した。

その結果、Phenytoin、Thalidomide は野生型および hSXRki で CYP3A11、CES6、CYP2B10、GSTM3 の誘導作用が認められない結果となったが (data not shown)、Phenobarbital については hSXRki の方でより強い誘導が認められた (Figure 9)。なお、平成 21 年度報告書における肝スフェロイドのデータに誤りがあることが判明したため、本総合報告書では修正したデータを載せた。

(7) 全身臓器のトランスクリプトーム解析

定量 RT-PCR、*in situ* hybridization 解析により、少なくとも肝、小腸で hSXRki マウスがヒト型化パターンを示すことが確認されたので、各種臓器のトランスクリプトーム解析を実施した。PCN は 70mg/kg、RIF は 30mg/kg について、Affymetrix 社の GeneChip (Mouse Genome 430 2.0) を用いた Percellome 法を行った。野生型マウスで PCN、hSXRki マウスで RIF によって同方向への変化を示す遺伝子を「SXR 依存型発現変動」遺伝子と捉える事が出来る (Figure10)

その結果、Figure 11A に示すように、CES6、CYP2B10、が肝、小腸の両方でヒト

型化反応パターンを示す遺伝子であることが分かった。Cyp3a11 については肝、小腸ともに応答が見られなかったが、これについてはプローブ設計不良であることが知られており GeneChip では変化を検出できないことが再確認された。GSTM3 は小腸でヒト型化反応パターンを示すが、肝では応答が見られなかった。他の GSTM family について調べたところ、GSTM3 以外にも GSTM1、4 が小腸でのみヒト型化反応パターンを示すことが分かった (Figure 12)。そこで、GSTM1、3、4 の転写調節領域 (プロモーター) の塩基配列中に存在する転写因子結合配列を検索したところ、Figure 13 に示すように、KLF、RXR、SP1 エlement からの配列が共通して存在することが分かった。RXR は SXR とヘテロダイマーを形成してゲノム上の標的配列に結合することが知られているので、その近傍に SXR が結合し、小腸での発現制御を行っている可能性が示唆されるが、近傍に明確な SXR 結合配列は見出されなかった。なぜ肝では応答が見られないかについては、エピジェネティックな制御が考えられるが、現時点では不明である。

次に、肝、小腸以外の臓器において SXR 活性化に伴うヒト型化反応パターンを示す遺伝子を抽出する為、野生型で PCN、hSXRki マウスで RIF によって同方向への変化を示す遺伝子を「SXR 依存型発現変動」遺伝子と捉え (Figure10)、統計解析 (p-value < 0.05) による絞り込みを行った。その結果、Figure14 に示したように、肝、小腸において発現変動を示すプローブセット数が多く、次いで腎、肺で多い結果となった。また、肝、小腸では変動幅が大き

いプローブセットが多かったが、それ以外の臓器での変動幅は小さいレベルに留まった。臓器間における候補プローブセットの重なりを、肝を基準に検討したところ、肝、小腸でも候補プローブセットの重なりは小さいこと、他の臓器においても同様であることが判明した (Figure15)。ごく少数の肝、小腸以外の臓器で SXR 依存的な発現減少パターンを示す 3 遺伝子の例を Figure11B に示した。HMBOX1 は海馬で、HIC2、CYP26B1 は腎で SXR 活性化に伴う減少を示した。

(8) 白血球細胞における機能の解析

SXR は炎症性サイトカインによる細胞内シグナル伝達転写因子の NF κ B に結合し、相互抑制を行うことが明らかになっている。また、Figure1 に示したように、SXR の発現は肝、小腸に留まるものではなく、様々な臓器で確認されている。これらを踏まえると SXR に肝、小腸以外の臓器での機能があると考えることが妥当であるので、米国カリフォルニア大アーバイン校の Bruce Blumberg と共同研究を行い、hSXR 選択的な作用を有する化学物質による影響を検討した。Blumberg は PCB の一種がヒト SXR を特異的に抑制すること (マウス SXR は活性化)、SXR ノックアウトマウスが B-1 Cell Lymphoma を発症することを見出している。よって、当該 PCB を hSXRki マウスに投与することで B-1 Cell Lymphoma が生じることが想定されたが、実際に B-1 lymphocyte の数が増加することが確認された (論文投稿準備中のため data not shown)。

D. 考察

(1) 既に報告のあるヒト型 SXR マウスとの

比較

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

これらに対し、我々が樹立したノックインマウスは肺に於いても導入遺伝子の発現が検出され、野生型マウスでの SXR 臓器発現パターンと一致する hSXR 臓器発現パターンを示し、毒性研究における応用範囲がより広いツールであると考えられる。

(2) 組織発現パターンについて

SXR の発現を制御するプロモーター構造に関する研究は少ない。ラットへのクロフィブレート投与による SXR 誘導メカニズムに関し、ヒト SXR の転写開始点上流 2.2kb を対象に調べ、PPARalpha の結合部位を見出し、ヒト肝腫瘍細胞株 (Huh7) を用いてその部位の

重要性を確認した報告(Aouabdi et al. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals (2006) 34, 138-144)と、マウスにおいて、FXR による SXR 発現制御に関わる DNA 領域として、SXR の Intron2 領域に FXR 結合部位を 4 箇所見出し、それらが実際に機能していることを HEK293 細胞を用いた検討により明らかにした報告(Jung et al. The Journal of biological chemistry (2006) 281, 19081-19091)がある。

本研究による hSXRki mouse では、Intron2 配列は完全に保存されているため、FXR による制御も問題なく行われるものと期待される。また、ノックインであるため転写開始点上流のプロモーター構造はマウス本来のものと変わりなく、hSXRki はマウス本来の臓器発現パターンを示すものと期待され、実際、肺を含む 10 臓器における hSXRki の発現を調べたところ、野生型での臓器発現パターンと一致するパターンが得られた。野生型肺に於ける SXR 発現については、通常は検出できないレベルであるが、DEX 投与や DEX と PCN の投与により誘導検出されるとの報告がある(Haag et al. Archives of toxicology (2003) 77, 145-149)。我々の検討では、通常状態の肺でも野生型で約 3 コピー、hSXRki マウスで約 5 コピーの発現が検出された。この違いは primer 配列を含む PCR 条件の違いによるものと考えられ、実際、我々も今回用いたのは別の領域に設定した primer を用いた PCR では肺に於ける SXR 発現を検出できなかった (data not shown)。

(3) ヒト型化反応について

我々が作製した hSXRki マウスは、野生型マウスの SXR 発現と同様の臓器発現分布を

示し、少なくとも肝、小腸においては SXR のヒト型反応パターンを示すことが確認された。

その結果は論文として発表しており (J Toxicol Sci. 2012, vol37, No2, p373-380)、今後ヒトへの外挿を念頭に置いた毒性研究で本マウスが有用なツールとなると考えられる。

肝スフェロイド培養を用いた検討において、マウス特異的な化学物質である PCN は、野生型のみで顕著な Cyp3a11 の誘導がかかることが確認されたが、ヒト特異性の高い RIF は hSXRki の方で誘導が高いものの、野生型でも弱く誘導がかかるなど、マウス個体で確認された特異性の高いヒト型化パターンは得られなかった。また、Phenytoin や Thalidomide は野生型でも誘導が弱い結果となっており、ヒト型反応の程度について判定しうるデータは得られていない。これらの理由として、肝スフェロイド培養が十分に最適化できていない可能性が考えられ、今後の課題である。

全身臓器を対象にしたトランスクリプトーム解析から、SXR 依存型発現変動を示す遺伝子が多い臓器は当初の予想通り肝及び小腸であることが明らかになった。肺や腎においても SXR mRNA 発現が確認されているにも関わらず、肝、小腸に比べ、SXR 依存型発現変動を示す遺伝子は少なかった。一方で、今回のトランスクリプトーム解析が、臓器全体を対象にしていることを踏まえると、今後は応答細胞が臓器内の特定の細胞に限られる可能性も考慮しつつ、*In situ* hybridization などによる局在解析を含めた慎重な解析を進める必要があると考えられる。また、SXR 依存型発現変動を示す遺伝子のプロモーター配列の解析結果から、必ずしも SXR が結合する配列が見出されるわけでは無いことも判明し

た。検索した数 kb のプロモーター領域外に SXR 結合配列が存在する可能性もあるが、SXR が他の DNA 結合性タンパク質と協調して転写を制御している可能性もあり、SXR の機能メカニズムの観点から有用な情報である。

SXR の機能は当初予想されていた外来化学物質代謝系における機能に留まらないことを考慮する必要がある。NFκB など他の転写因子との相互作用等を介した未知の機能があることを想定すべきであり、実際我々の解析でも SXR を化学物質によって抑制することにより、B-1 lymphocyte が増加することが確認されている。

E. 結論

本研究により、我々が独自に作製したマウス SXR の LBD のみをヒト SXR の配列で置き換えた hSXRki マウスの化学物質反応性がヒト型化していること、全身を対象とした化学物質影響解析に有用であることを確認した。

本マウスは今後ヒト SXR リガンド特異性を反映した毒性研究を行うための有用なツールとして活用されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Hara da 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 estroge

n receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. Cell, 130:811-823, 2007.

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

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

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

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

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

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y., NANOS2 interacts wit

h the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 23;107(8):3594-9.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus., Biol Reprod. 2011 Apr;84(4):734-42. Epub 2010 Dec 1

Yoshida T, Sekine T, Aisaki KI, Mikami T, Kanno J, Okayasu I., CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid., J Gastroenterol. 2010 Dec 17.

Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Yuhji Taquahashi, Noriko Moriyama, Eriko Ikeno, Nae Matsuda, Yumiko Suga, Bruce Blumberg, and Jun Kanno Development of Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain sequence. J Toxicol Sci. 2012, vol37, No2 (in press).

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. Nature. 2011 Nov 27;480(7378):557-60

Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K,

Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N. Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Aug 26;412(2):366-72.

2. 学会発表

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

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

五十嵐 勝秀、種村健太郎、中津 則之、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質によるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした Percellome 解析、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月 27-29 日、東京

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

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体 α 型の非翻訳

領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳機能解析、第24回日本疾患モデル学会総会、2007年8月31日-9月1日、つくば、口演

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

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

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

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

五十嵐勝秀、北嶋聡、種村健太郎、菅野純、エストロゲン受容体 α 型の妊娠維持への関

与 第100回日本繁殖生物学会大会、2007年10月19-22日、東京

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, invited speaker

荒瀬 栄樹、石井 健一郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、杉村 芳樹、ビスフェノールA経胎盤投与によるマウス泌尿生殖洞でのSF1発現誘導、第96回日本泌尿器科学会総会、2008年4月25-27日、横浜

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、口演

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27日、東京、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋聡、菅野 純、エストロゲン受容体(α 型)ノ

ックダウンマウスの神経行動解析、第 35 回
日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年
6 月 27 日、東京、ポスター

Kanno J, RISK MANAGEMENT FOR
FOOD SAFETY AND INTRODUCTION
TO THE SCIENCE AND TECHNOLOGY,
Risk Management Seminar 2009, 2009 年 3
月 27 日、東京、講演

菅野 純、インフォマティクス局面にある
Percellome トキシコゲノミクスの食品・食品
添加物への適用、第 37 回日本トキシコロジ
ー学会 学術年会(2010.6.16) (沖縄)、口
演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome
トキシコゲノミクスの抗がん剤研究への応用、
第 69 回日本癌学会学術総会(2010.9.24)
(大阪)口演

Natalia Polouliakh, Jun Kanno, Yukiko
Matsuoka, Ken-Ichi Aisaki, Richard Nock,
Frank Nielsen, Keigo Oka, Satoshi Kitajima
and Hiroaki Kitano, Discovery of Gene
Network Regulated by the Toxicity
Equivalent Factor of
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
(TCDD) and
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF)
chemicals. the 11th International
Conference on System Biology
(2010.10.11) (Edinburgh, UK), Poster
Presentation

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics

Project and its application to studies on
anticancer agents., the 50th Annual
Meeting of the Society of Toxicology,
2011.3.8, Washington D.C., USA, Poster
Presentation

五十嵐 勝秀, 北嶋 聡, 相崎 健一, 菅野
純 ヒト型 PXR 生理的発現マウス系の全身
臓器トランスクリプトーム解析、第 38 回日本
トキシコロジー学会 学術年会(2011.7.13)
(横浜)、口演

菅野 純 Percellome 解析:時間軸と用量軸
の融合と絶対値による解析精度の向上
第 38 回日本トキシコロジー学会 学術年会
(2011.7.12) (横浜)、シンポジウム 口演

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予
定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

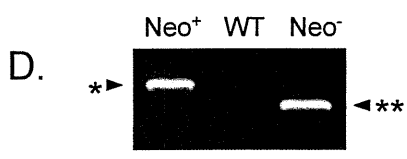
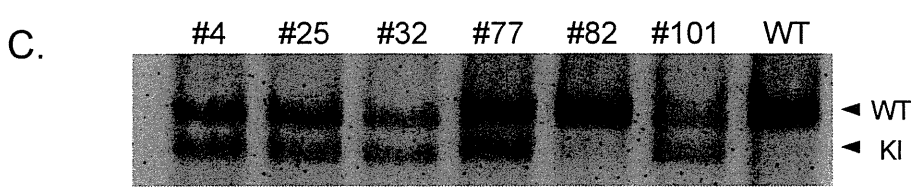
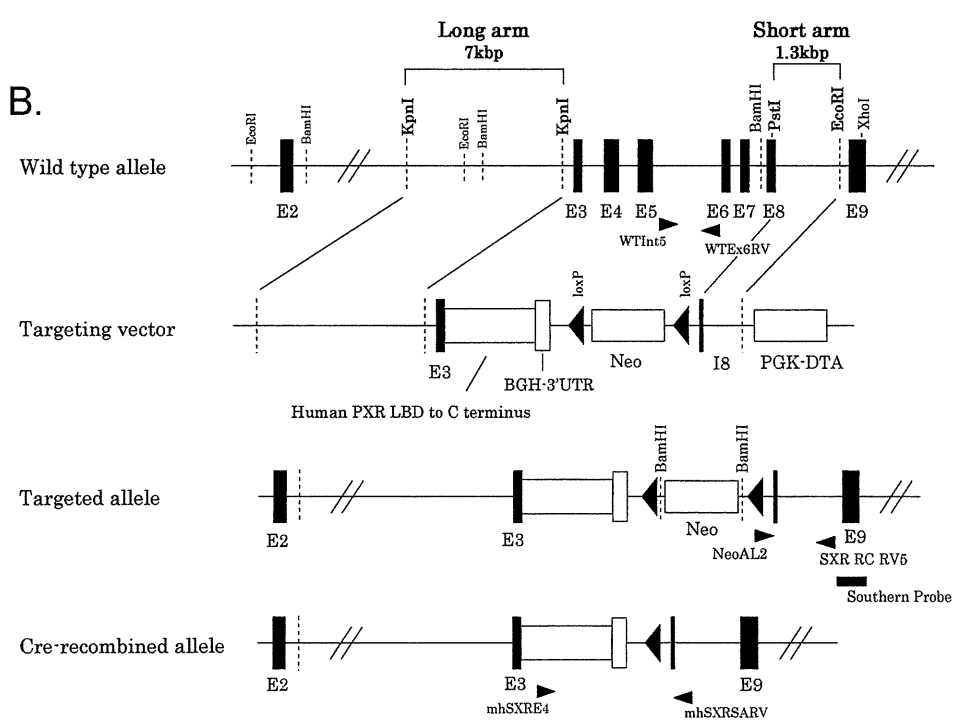
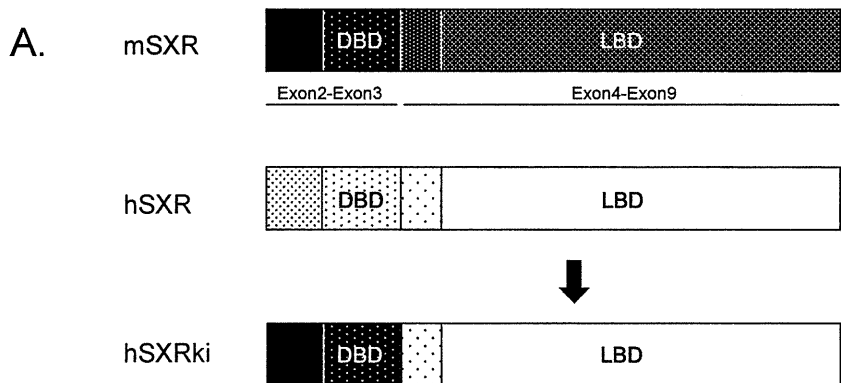
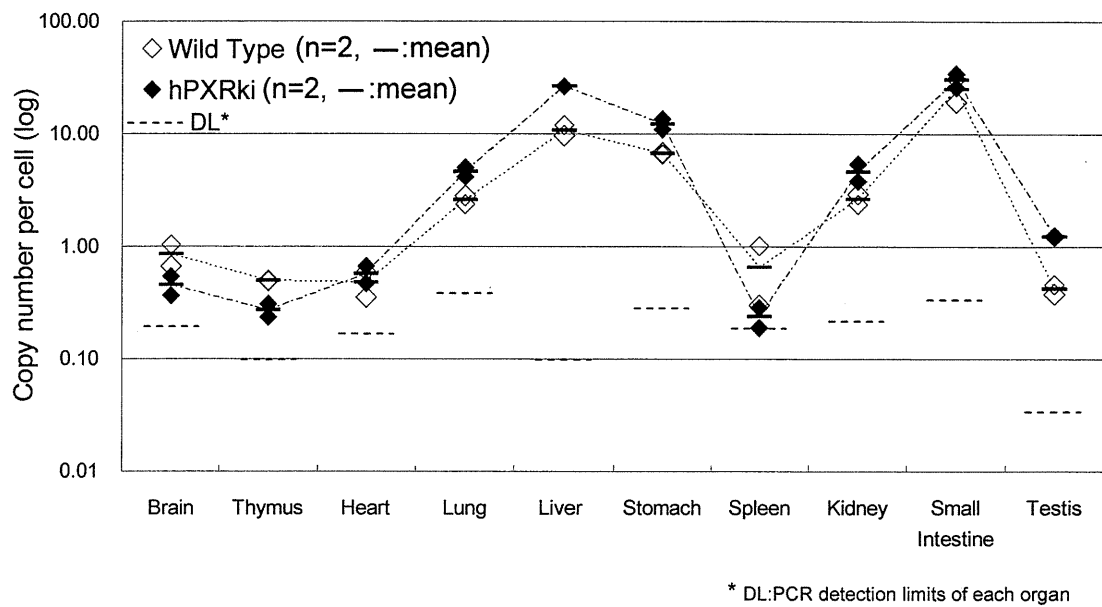


Figure1 相同組み換えによる hSXRki マウス作製方針とその確認



Figur2 hSXRki マウスにおける SXR の臓器毎の発現

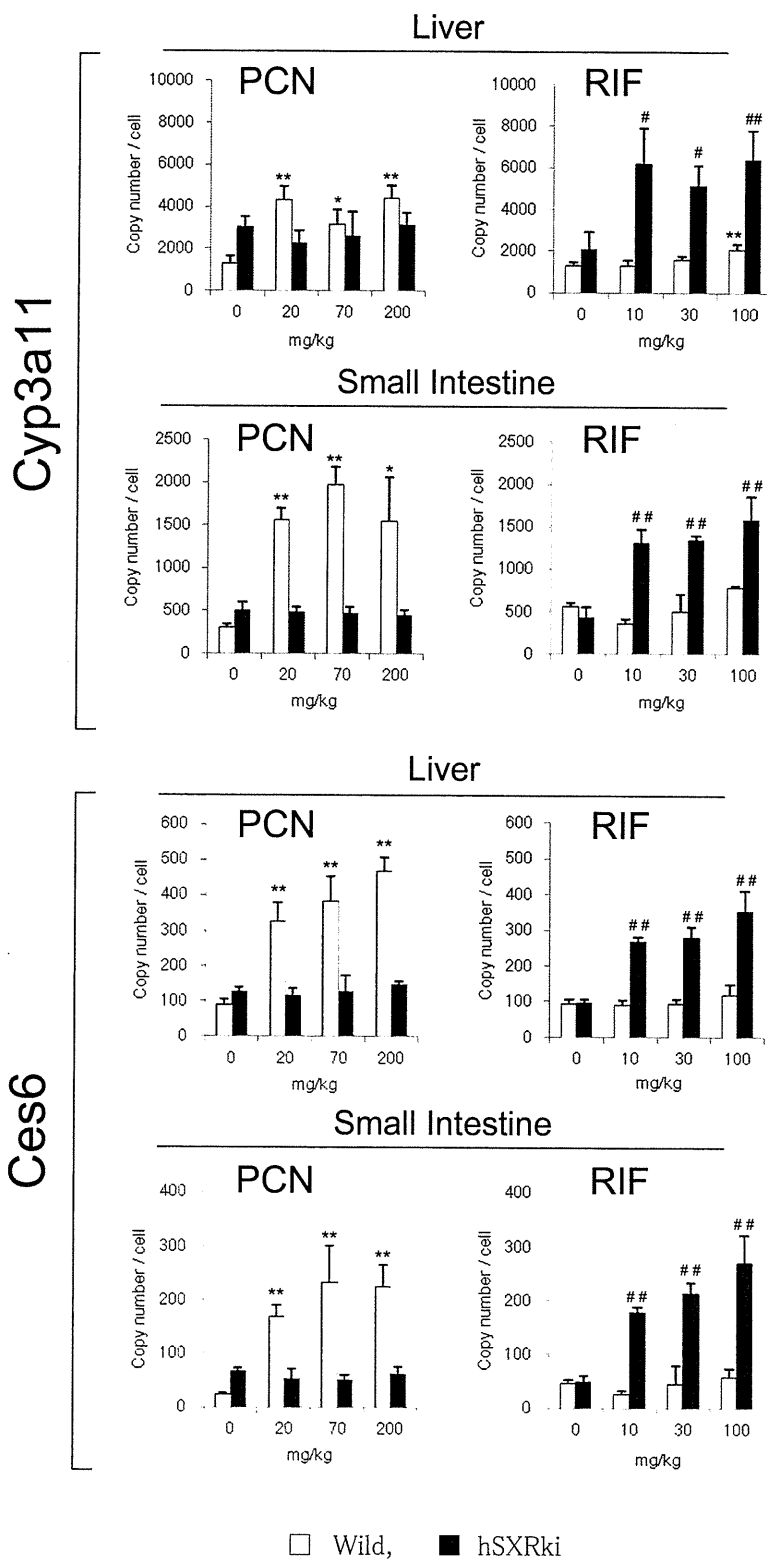


Figure3 肝、小腸における SXR 応答のヒト型化確認

ISH of Cyp3a11

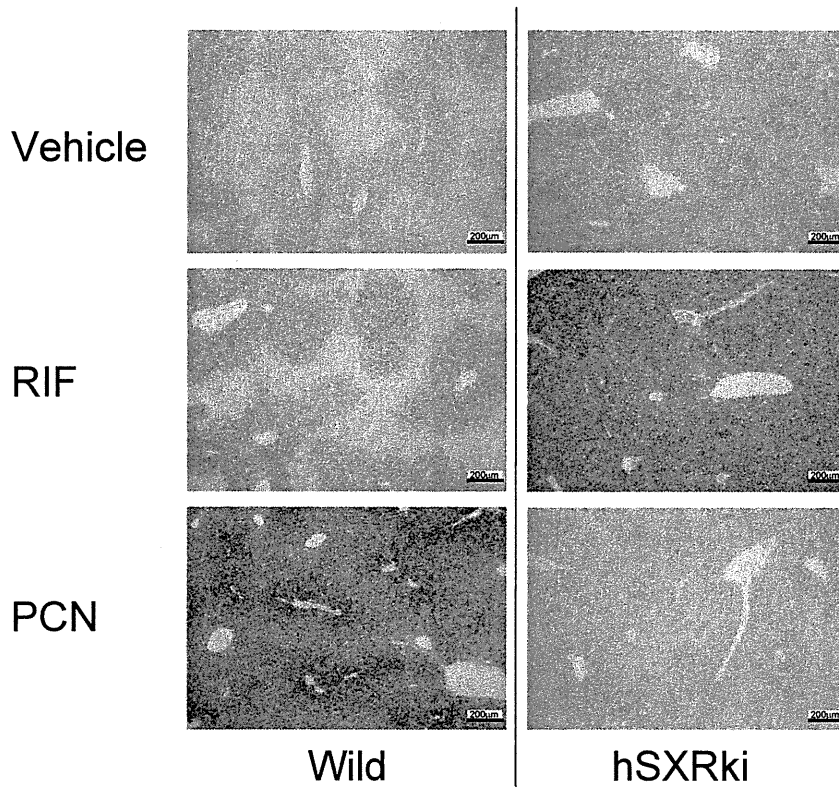


Figure4 肝における SXR 応答のヒト型化の *in situ* hybridization による確認 (Cyp3a11)

マウス型物質PCNによる発現変動

Wild type: TTG90 Liver Percellome data

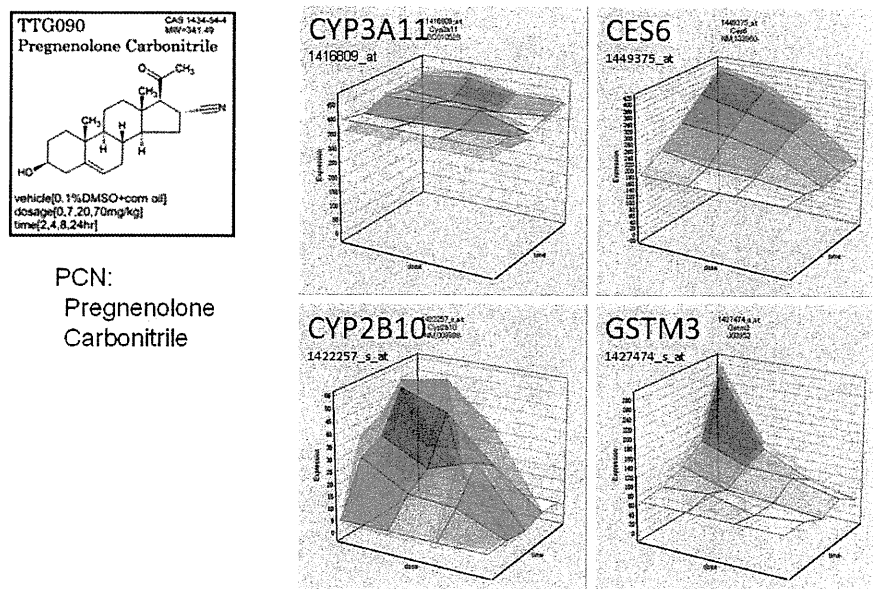


Figure 5 PCN による野生型マウス肝での発現誘導

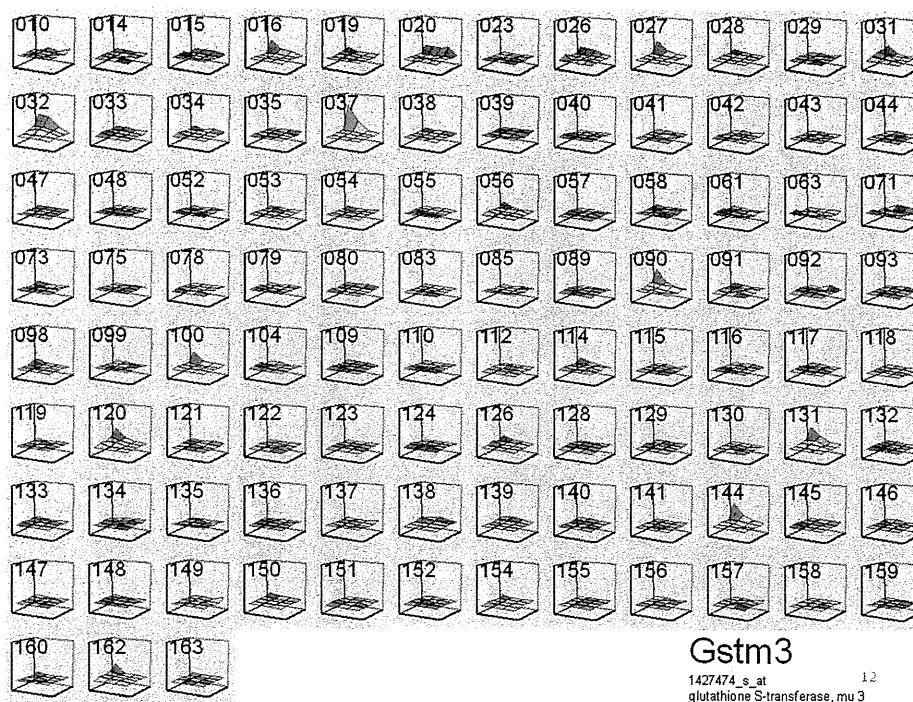


Figure 6 MSV (Multi Surface Viewer)による遺伝子発現データの一覧比較の一

例(Gstm3)。マーカー遺伝子は、Cyp2b10、Ces6をも参照し決定した。

Hepatospheroid - 培養経時変化 -

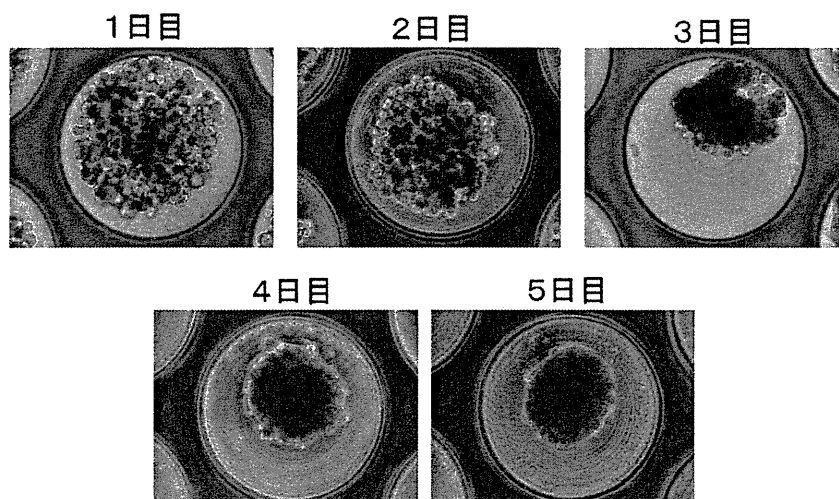


Figure 7 肝スフェロイド:培養経時変化

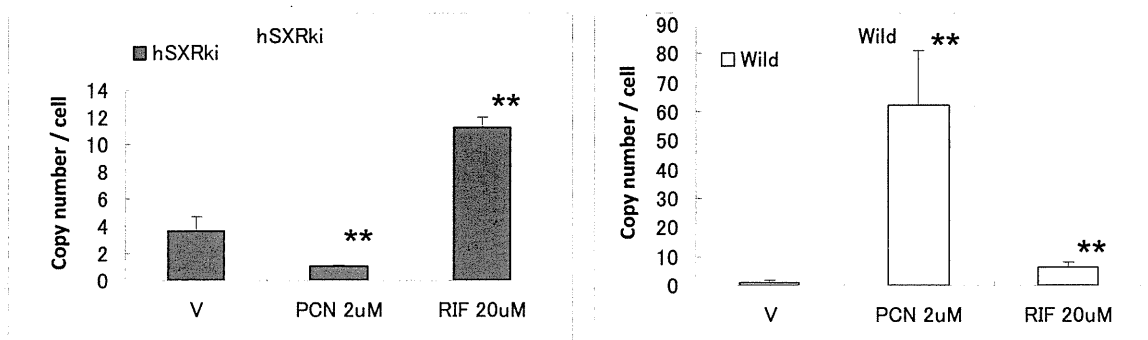


Figure 8 肝スフェロイドにおけるヒト型化反応の確認 (Cyp3a11 mRNA 発現量)

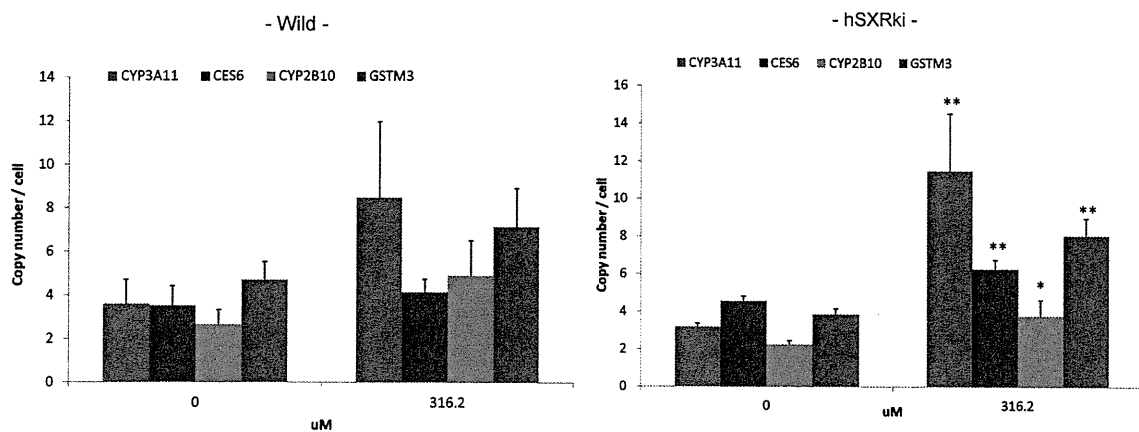
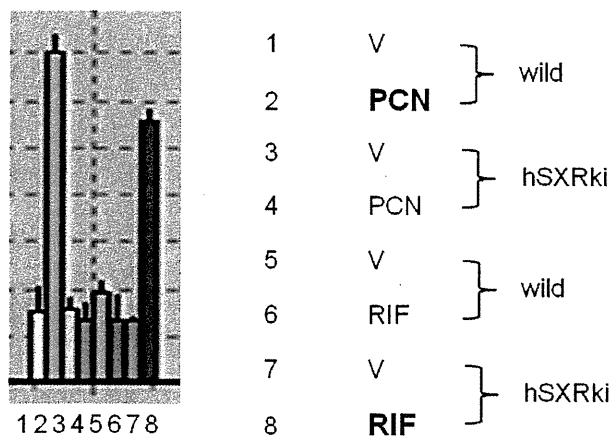


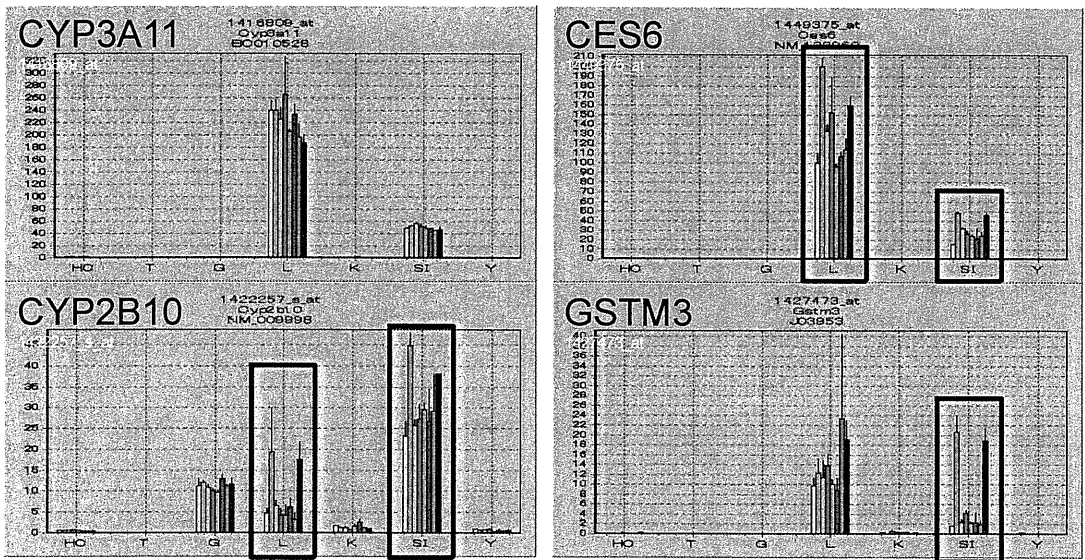
Figure 9 Phenobarbital による遺伝子発現変化



Wild-PCN及びhSXRki-RIFのみにおいて同じ方向への変化
=PXR活性化パターン

Figure10 SXR 活性化パターンを示すプローブセットの典型的データ

A



B

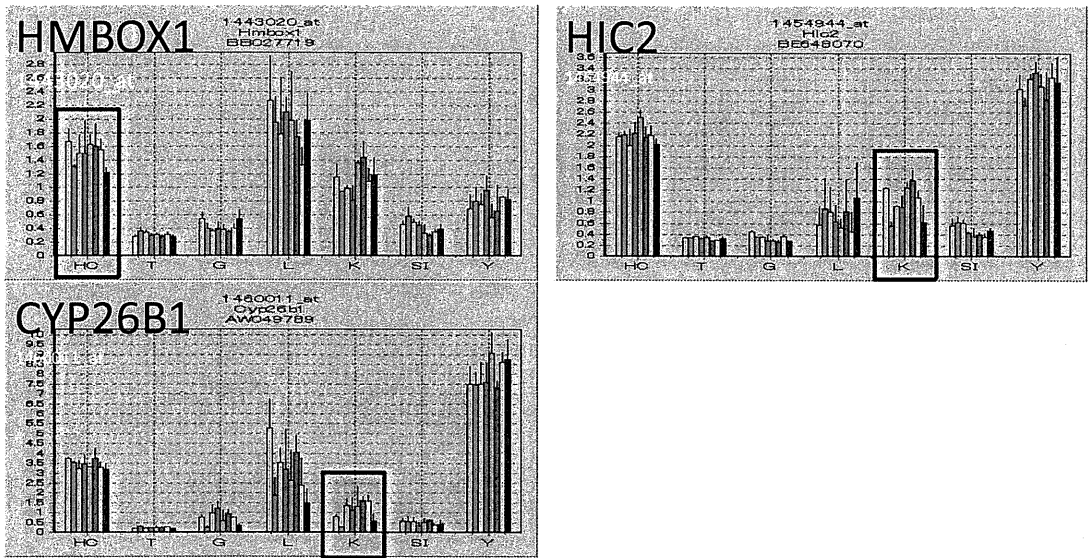


Figure11 7臓器における遺伝子発現応答検討(赤棒は種特異的抑制を表している)。

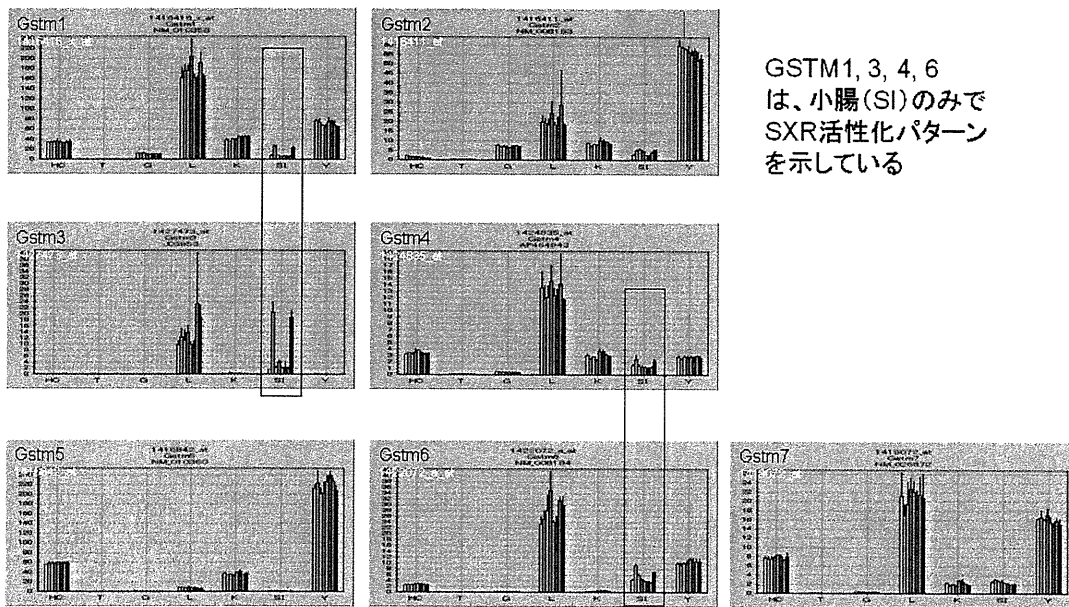
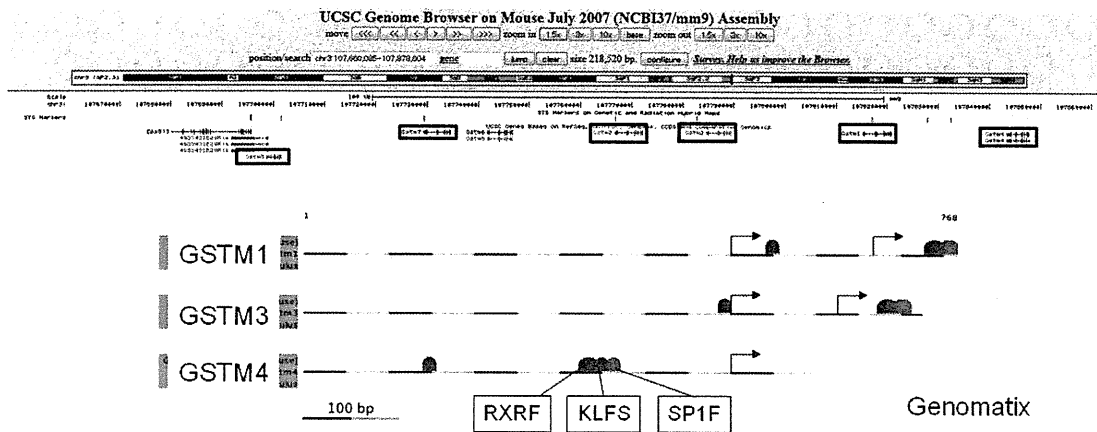


Figure12 GSTM family の発現変化



KLF, RXR, SP1エレメントからなる配列がプロモーター上に共通して存在。

Figure13 GSTM family の3番染色体におけるクラスター様の存在