

以上の細胞からでも胚様体を形成することが出来る。

今回、この3種類のデバイスに対し、胚様体形成のES細胞をいくつか変えながら、神経分化に有効なデバイスについて検討を行った。

3) ヒト ES 細胞から胚様体形成の諸条件に関する検討-各種分化培養液及び誘導因子の検討

これまで我々が行ってきたヒトESから神経分化への実験では48日間と言う長期間の培養が必要であった。近年、ヒトESから神経系への分化についての報告が多くなされるようになったことを受けてこれまでより更に効率の良い神経分化誘導系を確立できないか報告のあった神経分化方法の比較を行った(図1)。

4) 被験物質サリドマイドの曝露

サリドマイドの曝露試験は、0.1% DMSOのコントロール、0.1, 1, 10 μ Mの(±)-サリドマイド(Wako)を、胚様体形成後3日目に96時間(図6A、プロトコル1、3日目)、またはオルチニン・ラミニン上に再播種しMAP2ニューロンへ分化をした培養30日目から96時間(図6B、プロトコル2、30日目)の曝露をそれぞれ行った。

5) 神経分化の培養方法

図2に示す通り、単一分散後はY-27632の添加期間を胚様体形成開始から2日目までとし、3日目からはNIM培地(Neural Induction Medium; DMAM/F-12, N-2(1:100, Wako), B-27(1:50, Invitrogen), 5ng/ml bFGF, 10ng/ml BMP4(R&D systems))を添加し、ニューロスフィアを形成した。ニューロスフィアはMatrigelコートしたプレートに播種し、NPM培地(Neural Proliferation Medium; DMEM/F-12, N-2(1:100), B-27(1:50), 5ng/ml bFGF, 200ng/ml Noggin (R&D systems))にてニューラルロゼッタ構造が確認できるまで培養を行った(28~30日間)。ロゼッタ構造を確認後、プレートに再播種しNDM培地(Neural Differentiation Medium;

DMEM/F-12, N-2(1:100), B-27(1:50), 5ng/ml bFGF, 10ng/ml recombinant human EGF(Wako))にて1週間培養を行った。

6) 免疫染色

免疫染色は両プロトコルの培養42日目の細胞を、4% PFA 固定液で15分間固定して行った。固定後、0.1M PBSで3回洗浄後、0.1% TritonX-100 - 0.1M PBSで30分間の処理の後、0.1M PBSで3回洗浄し、1% BSA-0.1M PBSで10分間のブロッキング操作を行った。一次抗体は、Mouse anti-MAP2 monoclonal antibody (CHEMICON, 1/300)、及びRabbit anti-Tyrosine Hydroxylase antibody (MILLIPORE, 1/300)を使用し、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜反応させた。翌日、0.1M PBSで3回洗浄を行い、二次抗体としてGoat anti-mouse IgG Alexa Fluor 568抗体(1/1000)、Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488抗体で1時間室温の反応を行い、0.1M PBSにて10分間で3回ずつ洗浄を行った。核染色として2 μ g/mlのHoechst 33342 solutionにて15分間反応後、0.1M PBS、5分間で3回の洗浄を行った。IN Cell Analyzer 1000で解析を行うために各ウェルにPBSを80%くらいに満たし、乾燥を防ぐためにパラフィルムでカバーをしてディッシュの蓋で密閉し冷蔵庫内で保存を行った。免疫蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡(OLYMPUS TH4-100)下にて観察した。

7) 細胞形態測定の方法

マルチチャンネル細胞画像解析装置(IN Cell Analyzer 1000, GEヘルスケア株式会社)によって画像として取得後、マルチ解析ソフトウェアの一つであるDeveloper Tool Boxによって42日目のMAP2、及びTH陽性ニューロンの形態情報を取得した。使用したパラメーターは、全細胞数、MAP2陽性細胞数、TH陽性細胞数、各神経マーカー(MAP, TH)に対する神経突起の長さとした。パラメーターの設定方法は、既報に従った。細胞培養プレート24穴を用い、対物レンズ4倍で、1穴あたり、60視野の画像をイメージングし、視野あたりの平均及び標準偏差を求めた。

8) ベイジアンネットワーク解析方法

0.01%DMSO をコントロールとして、初期曝露、及び後期曝露での遺伝子変動をマイクロアレイ（Agilent Technologies, SurePrint G3 Human GE 8x60 1color）にて測定を行った。ベイジアンネットワーク解析にはコントロールに比べ2倍以上変動した遺伝子について自己組織化マップ（Self-Organizing Map、SOM）にて30のクラスターに分類し、各クラスターに分類された遺伝子に関して統計的に有意な（ $p < 0.01$ ）アノテーション（生物学的な意味づけ）遺伝子を選別した。これら遺伝子発現データは、遺伝子発現解析ソフトウェア GeneSpring GX10（Agilent Technologies）にて正規化、及びクラスタリング解析を行った。

（倫理面への配慮）

共同研究機関である国立環境研究所は、2008年10月11日付で文部科学省ヒトES細胞使用実験倫理審査委員会から研究実施が認可されている。

C. 研究結果

1) ヒト ES 細胞神経分化の培養条件の検討

図1に標準プロトコルを示した。従来の標準プロトコルでは少なくとも神経分化には46日以上の日数がかかる。そこで、今回①胚様体形成デバイス、②各分化誘導期間の検討、③神経分化誘導試薬の検討の3点について検討した。検討に関する種々のプロトコル条件を図3にリストした。合計3条件を実施した。条件1から2においては、胚様体形成期間を13日とし、条件3においては18日とした。ニューロスフィアは Matrigel コートしたプレートに播種し、ニューラルロゼッタ構造が確認できるまで培養を行った。ロゼッタ構造を確認後、オルニチン/ラミニンコートプレートに再播種し DMAM/F-12 培地に N-2, B-27, bFGF, EGF にて4日から1週間培養を行った。さらに、条件1-3までの各条件下での神経細胞及び TH 陽性細胞（ドーパミンニューロン細胞）の結果を図4にまとめた。

その結果、ニューロスフィアの播種後ニューラルロゼッタ構造の形成までには時間が掛かり、全体としては46日よりも長くなった。しかしながら、MAP2 陽性細胞、TH 陽性細胞が多数存在し、成熟した神経細胞に分化していることを確認した。再播種後の MAP2 陽性細胞、TH 陽性細胞を解析したところ、MAP2 陽性細胞については Nunc を用いた場合が陽性細胞数、神経突起の長さについて良い結果が得られたが（図4A, C）、TH 陽性細胞に関しては Aggrewell を使用した場合が TH 陽性細胞の増加が認められた（図4B, D, E、および図5）。

2) サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成

胚様体形成時、または神経分化後期にサリドマイドを曝露したサンプルをマイクロアレイにより遺伝子変動を測定した結果を図9に示す。コントロールに比べ2倍以上変動した遺伝子を SOM により30のクラスターに分類し、各クラスターに分類された遺伝子に関して統計的に有意な GO ($p < 0.01$) による特徴づけを行った。この GO 解析の結果今回の神経分化と関連する GO を多く含む9個のクラスターについて p-value の小さい GO term を図10に示した。各クラスターにおいて、解析に用いた遺伝子のコントロールに対する変動値（対数変化倍率）を図11AからIに示した。この変動値を用いてベイジアンネットワーク解析を行った。すなわち、サリドマイド曝露により変動した遺伝子を GO により分類し、代表的な GO をノードとしてベイジアンネットワーク解析を行った（図12）。解析に用いた値はコントロールに対する比であることから、初期曝露、後期曝露のネットワークの違いは遺伝子発現の変動の違いと言える。初期曝露のネットワークでは、胚様体分化に関連した遺伝子群がネットワークの上位に位置し、Forebrain 関連の遺伝子や、Proliferation に関する遺伝子群と正の相関を示している。さらに、Proliferation も Embryonic と正の相関関係にあり、サリドマイドの曝露により細胞数が増加す

ることが予測される。また、ProliferationはTranscriptionやNeuro-System関連遺伝子とも正の相関を示している。Chemical, Proliferation, Transcription, Neuro-Systemの関連性を見ると、サリドマイドの添加により、Chemical応答関連遺伝子が変動し、細胞増殖を促し、最終的に転写活性、及び神経系の誘導が促進されることが示唆される。全体で見ると、Embryonic（胎生）やForebrain（前頭脳）のGOがNeuro-system（神経システム）を抑制する関係にあることが予測された。一方、後期曝露のネットワークでは、Embryonicに代わりNecrosisが上位にきており、Neuro-SystemやNeurogenesisを抑制することが示された。

D. 考察

1) ヒトES細胞神経分化の培養条件の検討

様々な基盤で作成されたプレートを用いた胚様体形成の条件検討、分化誘導条件の検討などを行った。その中で、手技、再現性、ヒトの手によるスループットな方法として、丸底96穴プレートが、最も胚様体形成に適していることがわかった。本試験の丸底96穴プレートは、Nuncプレートをを用いた。この場合の培養細胞が神経突起の伸展が最もよく、TH陽性細胞数の含有量も他の条件と比べ多いことがわかった。また、Nuncプレートの場合、胚様体形成のための1wellあたりのES細胞播種数を多くすることができ、胚様体形成の期間を短縮することが可能となった。さらに、胚様体の大きさと培養期間がその後の神経分化の発達に関わることが示唆された。また、神経上皮細胞の分化を介さなければ成熟神経分化に移行しないことがわかった。今後、安定して神経細胞の分化が可能なプロトコルで化学物質曝露の影響を評価する予定である。これには、凡そ40日間がかかる。我々の用いた系では、神経分化に凡そ5、6日間しか観察していないが、必要に応じて培養延長も可能である。

2) サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成

今年度の研究では、GO解析による同一クラスター内の遺伝子を同調して変動する遺伝子群と位置づけ、GO間のネットワークを解析することにより、サリドマイドの初期曝露と後期曝露の影響の特徴づけを行った。その結果、初期曝露と後期曝露で影響を受ける遺伝子群がことなり、さらに曝露によって反応した遺伝子群の相互関係がわかった。GOを用いたベイジアンネットワークは、本研究が初めての試みであるが、個々の遺伝子ネットワークと異なり、影響の様子が俯瞰できて、病態をより説明しやすいように考えられた。

E. 結論

上記考察より、本研究課題で検討したサリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク解析では、評価法として導入するベイズ推定モデルにおいては、個々の遺伝子発現変動だけではなく、遺伝子オントロジー（GO）解析も有用である可能性があきらかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表（2009～）

1. Qin XY, Fukuda T, Yang L, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, and Sone H. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 13(5), 296-306, (2012).
2. Nagano R, Akanuma H, Qin XY, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, and Sone H. Multi-Parametric Profiling Network Based on Gene Expression and Phenotype Data: A Novel Approach to Developmental Neurotoxicity Testing. *Int J Mol Sci* 13(1), 187-207, (2012).
3. Qin XY, Wei F, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, and Sone H. siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer

- cells. *FEBS Lett* 585(20), 3310-3315, (2011).
- Qin XY, Zaha H, Nagano R, Yoshinaga J, Yonemoto J, and Sone H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol Lett* 206(2), 152-157, (2011).
 - Imanishi S, Okura M, Zaha H, Yamamoto T, Akanuma H, Nagano R, Shiraishi H, Fujimaki H, and Sone H. Prenatal Exposure to Permethrin influences Vascular Development of Fetal Brain and Adult Behavior in Mice Offspring. *Environ Tox* (2012) (in press).
 - Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, and Takahashi T. In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16331-16335, (2010).
 - Sone H and Akanuma H. Oxidative Stress-Mediated Signaling Pathways by Environmental Stressors. In: Tahira Farooqui and Akhlaq A. Farooqui editors. *Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell Signaling in Vertebrates and Invertebrates*. Hoboken, NJ., Wiley-Blackwell, March, in press (書籍) (2011).
 - Ohsako S, Fukuzawa N, Ishimura R, Kawakami T, Wu Q, Nagano R, Zaha H, Sone H, Yonemoto J, and Tohyama C. Comparative contribution of the aryl hydrocarbon receptor gene to perinatal stage development and dioxin-induced toxicity between the urogenital complex and testis in the mouse. *Biol Reprod* 82(3), 636-643, (2010).
 - Sone H, Akanuma H, and Fukuda T. Oxygenomics in environmental stress. *Redox Rep* 15(3), 98-114, (Review) (2010).
 - Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, and Yonemoto J. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxicol Sci* 35, 115-123, (2010).
 - Sone H, Fukuda T, Toyoshiba H, Yamanaka T, Perham F, Portier CJ. Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method. *The Open Cell Signaling Journal* 2, 1-12, (2010).
 - Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C, and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction* 139, 427-437, (2010).
 - Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, and Sone H. High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577, 55-65, (2009).
 - Sone H, Imanishi S, Nagano R, Akanuma H, Fukuda T, and Ohsako S. Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In: *Biophys.Soc.China (BSC)ed. The Roles of Free radicals in Biology and Medicine*. Medimond S.r.l., 45-52, (2009).
2. 学会発表 (2009～)
- Miyazaki W., Nagano R., **Sone H.**, Tohyama C., and **Ohsako S.** Effects of dioxin and OH-PCB on neural differentiation from mouse ES cells. Horiba/CDBIM Symposium, Tokyo, JAPAN, (2009).
- Nagano R., Akanuma H., Koikegami S., Imanishi S., Miyazaki W., Okura M., Zaha H., **Ohsako S.**,

and **Sone H.** Development of an image profiling system to evaluate for the effects of Thalidomide and permethrin in neural differentiation from mouse embryonic stem (ES) cells. Horiba/CDBIM Symposium, Tokyo, JAPAN, (2009).

Miyazaki W., Nagano R., **Sone H.**, Tohyama C., and **Ohsako S.** Effects of dioxin and OH-PCB on neural differentiation from mouse ES cells. DIOXIN2009, Beijing, China (2009).

Nagano R., Akanuma H., Koikegami S., Imanishi S., Miyazaki W., Okura M., Zaha H., **Ohsako S.**, and **Sone H.** Development of an image profiling system to evaluate for the effects of chemicals in neural differentiation from mES cells. The 32nd Ann Meeting of Japanese Society of Neuroscience, Nagoya, JAPAN, (2009).

赤沼宏美、永野麗子、座波ひろ子、**大迫誠一郎**、**曾根秀子**。胎生プログラミング異常を検出するためのマルチプロファイリング技術の確立、第13回環境ホルモン学会 12月、東京 (2010)

大迫誠一郎、永野麗子、何小明、今西哲、**藤渕航**、赤沼宏美、**曾根秀子**。マウスおよびヒトES細胞を用いた神経分化培養系におけるメチル水銀の毒性影響評価、第13回環境ホルモン学会 12月、東京 (2010)

Hideko Sone, Hiromi Akanuma, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, **Wataru Fujibuchi**, Takeaki Taniguchi, Reiko Nagano, **Seichiroh Ohsako**. Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks. CBI2010, 9月、東京(2010)

Hiromi Akanuma, **Hideko Sone**, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, **Wataru Fujibuchi**, Takeaki Taniguchi. Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and toxicity information by using O-PLS CBRC2010, 9月、東京(2010)

何小明、永野麗子、赤沼宏美、座波ひろ子、遠山千春、

曾根秀子、**大迫誠一郎**。マウスES細胞を用いた神経分化系におけるメチル水銀の毒性影響評価、第37回日本トキシコロジー学会、6月、沖縄(2010)

永野麗子、何小明、横山雅美、赤沼宏美、座波ひろ子、末盛博文、**大迫誠一郎**、**曾根秀子**。マウスおよびヒトES細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究、第37回日本トキシコロジー学会、6月、沖縄(2010)

秦咸陽、座波ひろ子、永野麗子、吉永淳、米元純三、**曾根秀子**。男児生殖疾患感受性遺伝子ARNT2とエストロゲン様内分泌かく乱物質との関連、第80回日本衛生学会学術総会 5月、仙台(2010)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

曾根秀子、**大迫誠一郎**、永野麗子、今西哲、赤沼宏美、宮崎航。「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」特願 2009-81497, (2009).

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

図1. ヒトES細胞から胚様体形成の諸条件に関する

検討-各種分化培養液及び誘導因子の検討

図2. ヒトES細胞の維持培養概略図

図3. ヒトES細胞から胚様体形成の諸条件に関する

検討-各種マイクロスフィアプレートの検討

図4. 細胞形態測定結果-各種マイクロスフィアプレ

ートの検討

図5. 細胞形態測定結果-各種マイクロスフィアプレ

ートの検討結果

図6. 被験物質サリドマイドの曝露プロトコル

A：初期曝露に関する培養実験プロトコル - 1、

B：後期曝露に関する培養実験プロトコル - 2

図7. 細胞形態測定結果-サリドマイド胚様体初期曝

露の影響

図8. 細胞形態測定結果-サリドマイド神経分化後期

曝露の影響

図9. サリドマイド曝露による遺伝子発現の変動

図10. 自己組織化マップ解析によるサリドマイドで

変動した遺伝子オントロジー（GO）の一覧

下線は、ネットワーク解析に用いたGOを示す。

図11. 各クラスターに含まれる遺伝子名および解析

データ

図12. ベイジアンネットワーク解析結果

| | Sone | ES株 | EB形成時期 | | | | 神経前駆細胞誘導期 | | | 神経分化誘導期 | | |
|---|----------------------------------|----------------------|---------|---|--------------------------|------------|-----------------------|---|---|---------------------------------------|--|--------------------|
| | | | EB形成 | EB培地 | デバイス | 期間 | バイオコート・プレ | 培地・添加物 | エンドポイント | コート | 培地 | 期間 |
| | | KhES-3 | + | DMEM/F12 Y-27632 bFGF | nunc | 12days | Olnithine/ Laminin | DMEM/F12 Neurobasal N-2 B-27 | Rosette | Olnithine/ Laminin/ fibronectin | DMEM/F12 Neurobasal N-2 B-27 bFGF | 32days |
| 1 | PNAS, 2011 | Kim JE | + | DMEM/F12 Y-27632 N-2 B-27 200ng/ml Noggin | nunc Aggre well | 2days | Matrigel | DMEM/F12 N-2 B-27 200ng/ml Noggin 20ng/ml FGF2 | Rosette | Olnithine/ Laminin | DMEM/F12 N-2 B-27 EGF FGF2 Z-VAD(caspase inhibitor) | 1 or 2 passages |
| 2 | Plos ONE, 2011 | Yuan SH | + | WiCell hESC medium | low adherence dish | 4days | Matrigel | DMEM/F12 ITS | Rosette | Olnithine/ Laminin | DMEM/F12 N-2 B-27 EGF | 3- 4weeks |
| 3 | Methods Mol Biol, 2010 | Zhang XQ | + | DMEM/F12 | | 7days | | Neural induction mediul | Rosette →epithelial aggregates 4 weeks | Olnithine/ Laminin | Neuronal differentiation medium | several weeks |
| 4 | Stem Cells, 2009 | Cai J | + | | | | collagen | DMEM/F12 Noggin ITS Premix | Rosette →epithelial aggregates 2-3 weeks | Olnithine/ Laminin | Neuronal differentiation medium | 1week |
| 5 | Frontiers in Neuroengineering | Laura YO | + | DMEM/F12 N-2 B-27 bFGF | | 8weeks | | | | MEA plate | Neuronal differentiation medium bFGF BDNF | 3weeks |
| 6 | Stem cells, 2011 | Bissonnette CJ | - | | | | nonadherent flask | hESC medium Neurosphere medium FGF8 SHH | Neurosphere | Laminin | Neuromedia SHH FGF8 BMP9 BFCN AraC | 19days |
| 7 | PNAS, 2011 | Li W | | DMEM/F12 Neurobasal 3uMCHIR99021(GSK-3 阻害剤) 2uMSB431542(TGF-β 拮抗剤) Compound E (γ-secretase 阻害剤) | | 6 passages | | | | | | |
| | | H1 HUES9 HUES1 | EB like | N-2 B-27 BSA hLIF | | | Matrigel | | 7days | | | |

図1. ヒトES細胞から胚様体形成の諸条件に関する検討(各種分化培養液及び誘導因子の検討)。

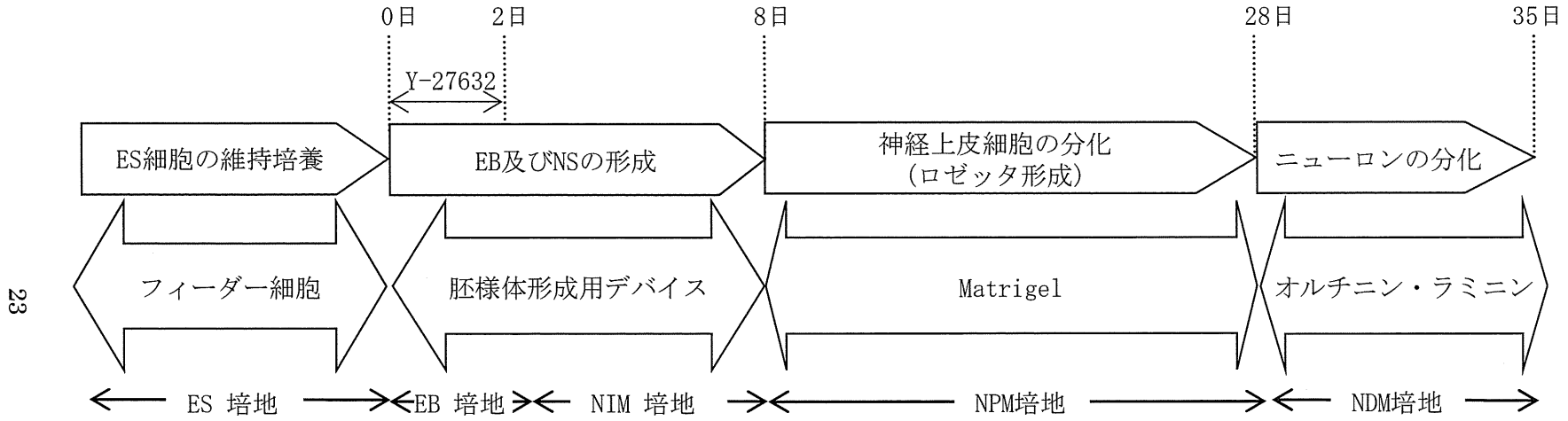
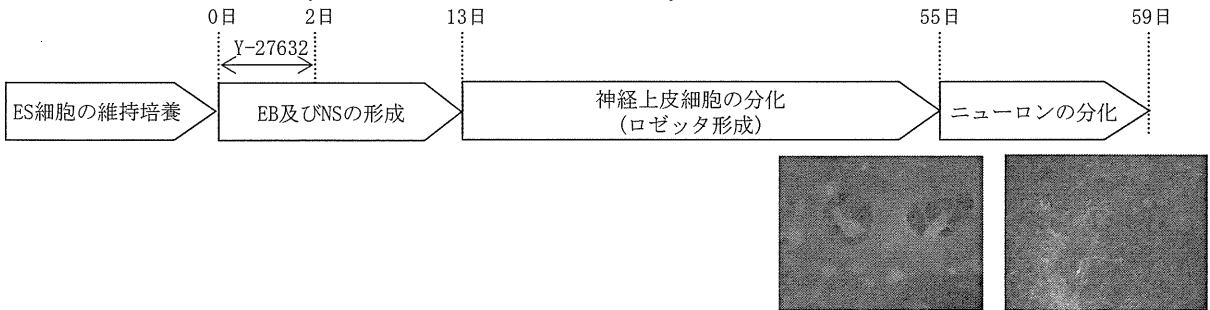
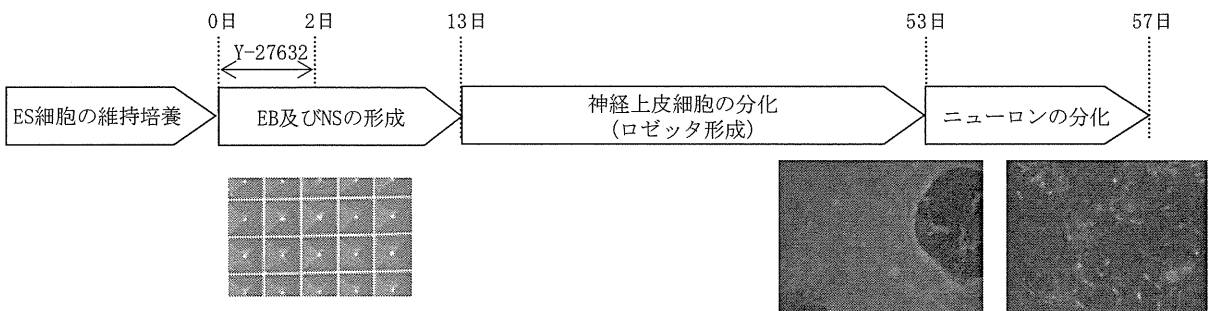


図2. ヒトES細胞の維持培養概略図

A; Nunc 96 well (3000cells/micro well)



B; Aggre-well (100cells/micro well)



C; Hydro-cell

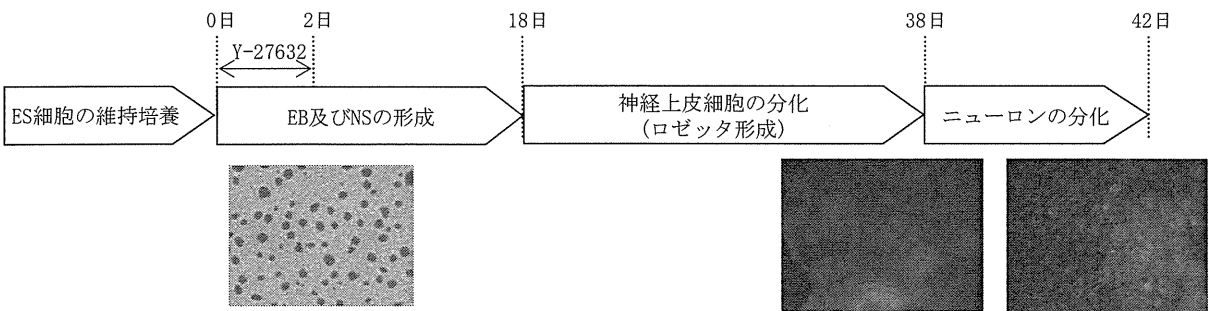


図3. ヒトES細胞から胚様体形成の諸条件に関する検討-各種マイクロスフィアプレートの検討

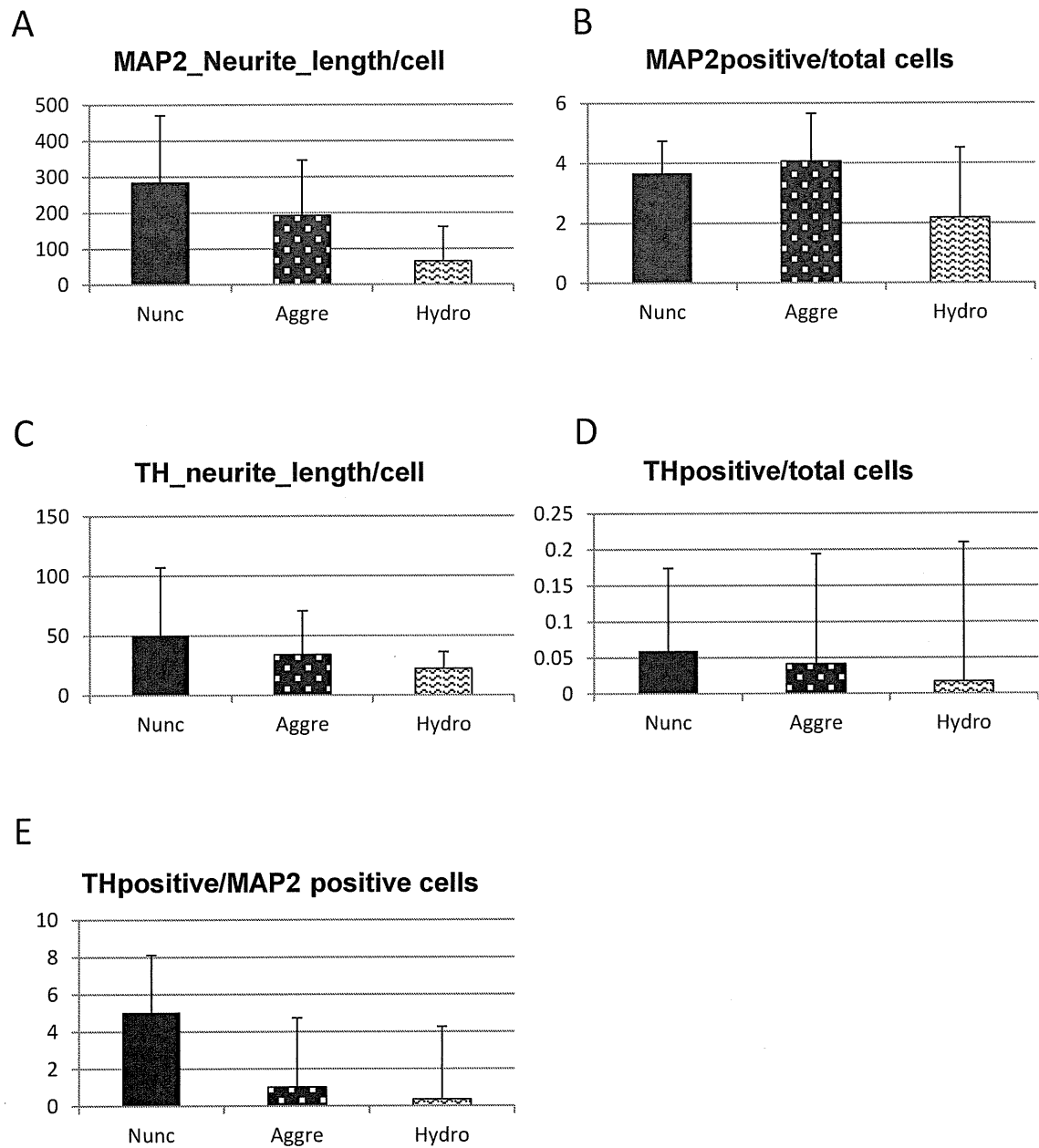


図4. 細胞形態測定結果-各種マイクロスフィアプレートを検討

| | Nunc | Aggre | Hydro |
|---------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| MAP2_Neurite_length/ cells | +++ | ++ | + |
| TH_Neurite_length/ cells | ++ | + | + |
| MAP2positive/ total cells | ++ | ++ | + |
| THpositive/ total cells | + | + | - |
| THpositive/ MAP2 positive cells | ++ | + | - |

図5. 細胞形態測定結果-各種マイクロスフィアプレートの検討結果

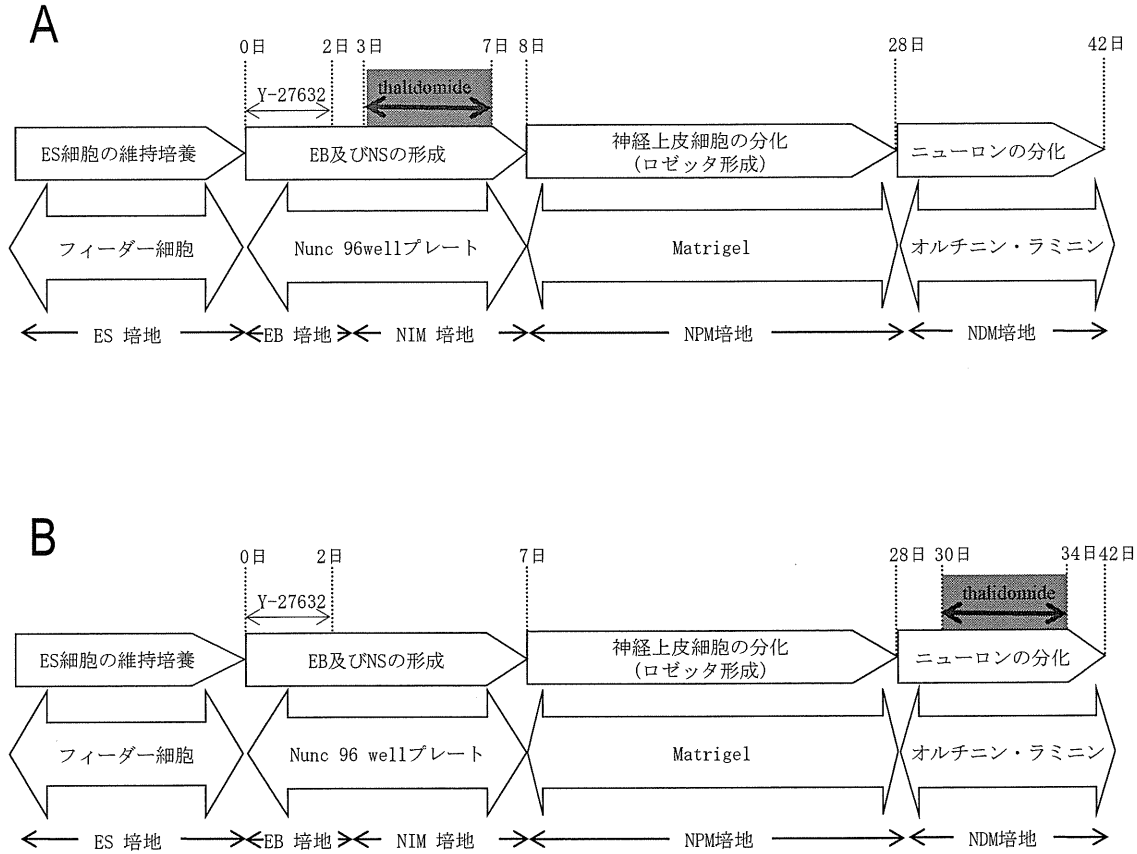


図6. 被験物質サリドマイドの曝露プロトコル

A: 初期曝露に関する培養実験プロトコル - 1、B : 後期曝露に関する培養実験プロトコル - 2

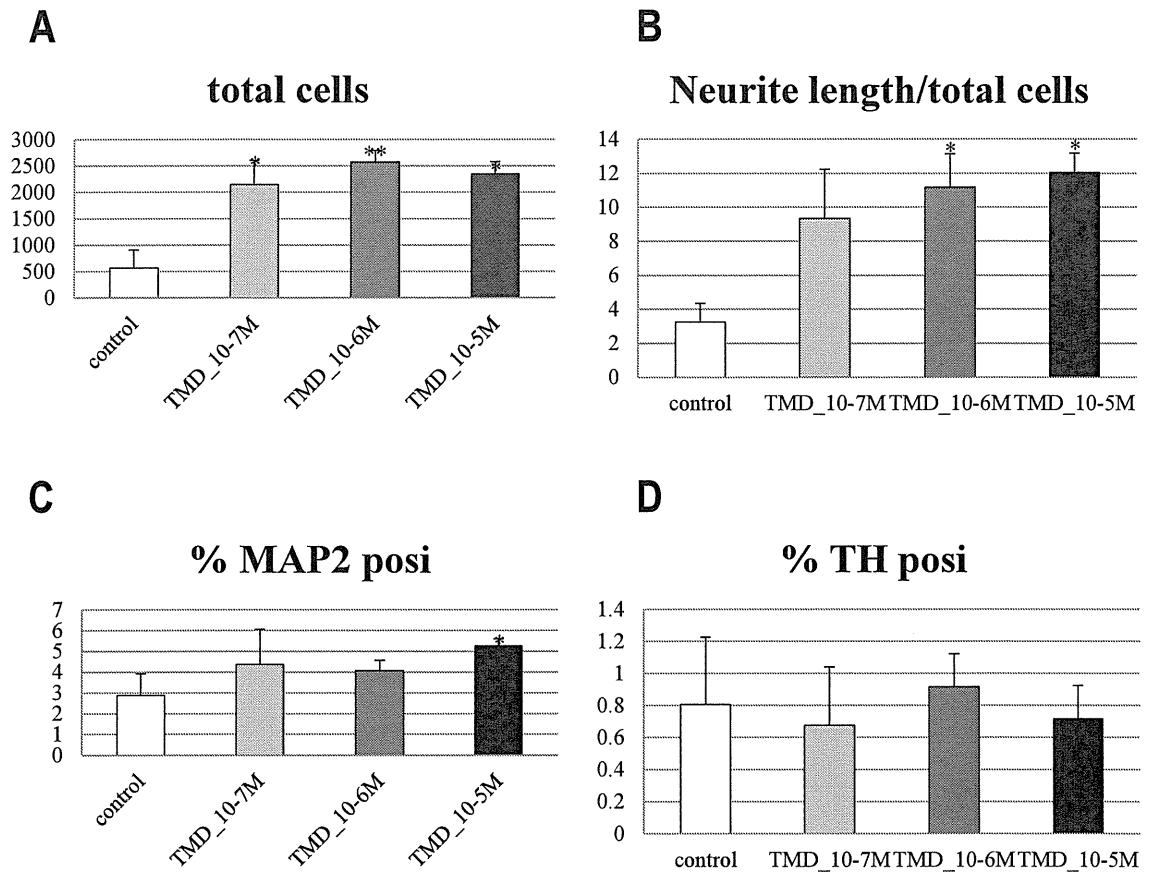


図7. 細胞形態測定結果-サリドマイド胚様体初期曝露の影響

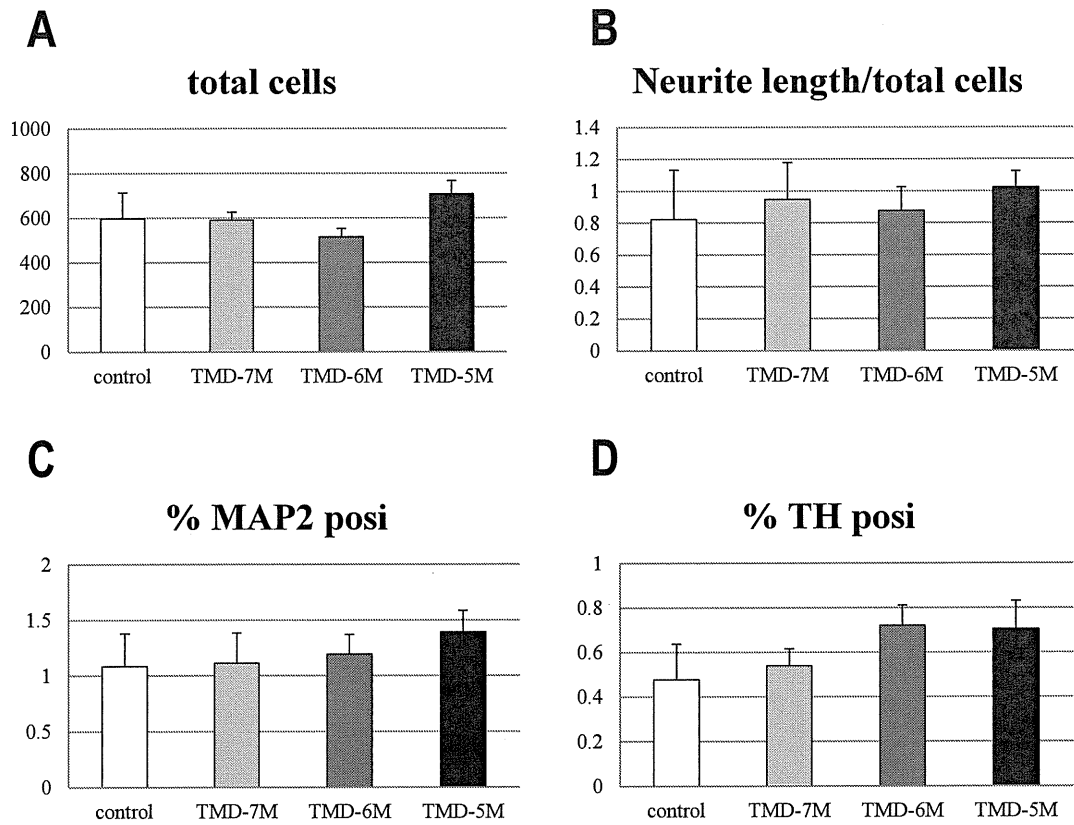


図8. 細胞形態測定結果-サリドマイド神経分化後期曝露の影響

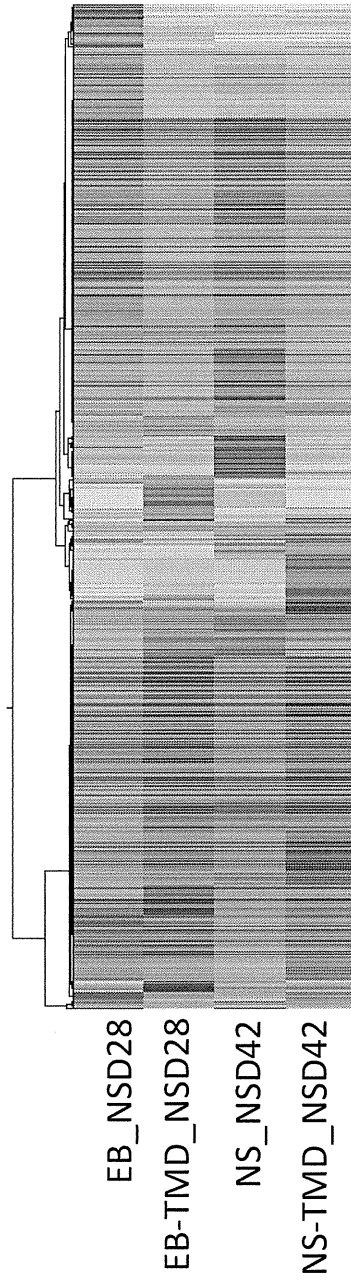


図9. サリドマイド曝露による遺伝子発現の変動

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

| Cluster | GO ACCESSION | GO Term | p-value | Count |
|------------|----------------------------------|--|----------|-------|
| C-6 | GO:0009653 | anatomical structure morphogenesis | 4.69E-10 | 18 |
| | GO:0001568 | blood vessel development | 3.36E-08 | 14 |
| | GO:0001944 | vasculature development | 5.34E-08 | 14 |
| | GO:0001525 | angiogenesis | 1.25E-06 | 10 |
| | GO:0048706 | embryonic skeletal system development | 1.78E-06 | 4 |
| C-11 | GO:0006259 GO:0055132 | DNA metabolic process | 3.87E-10 | 25 |
| | GO:0003677 | DNA binding | 7.09E-09 | 61 |
| | GO:0006260 GO:0055133 | DNA replication | 2.30E-08 | 15 |
| | GO:0003676 | nucleic acid binding | 2.59E-05 | 64 |
| | GO:0045449 GO:0061019 | regulation of transcription | 2.66E-04 | 24 |
| C-12 | GO:0001501 | skeletal system development | 5.20E-16 | 33 |
| | GO:0003779 | actin binding | 8.51E-11 | 31 |
| | GO:0048706 | embryonic skeletal system development | 4.06E-07 | 11 |
| | GO:0048598 GO:0048828 | embryonic morphogenesis | 5.76E-07 | 10 |
| | GO:0009790 GO:0009795 | embryo development | 2.84E-06 | 15 |
| GO:0048562 | embryonic organ morphogenesis | 1.55E-04 | 10 | |
| C-13 | GO:0005515 GO:0045308 | protein binding | 2.52E-15 | 338 |
| | GO:0023052 | signaling | 1.79E-09 | 109 |
| | GO:0032570 | response to progesterone stimulus | 8.67E-05 | 6 |
| | GO:0042221 | response to chemical stimulus | 1.08E-04 | 27 |
| | GO:0001666 | response to hypoxia | 3.71E-04 | 14 |
| C-19 | GO:0008285 | negative regulation of cell proliferation | 3.37E-05 | 18 |
| | GO:0005737 | cytoplasm | 4.76E-05 | 141 |
| | GO:0005516 | calmodulin binding | 5.53E-05 | 13 |
| | GO:0016192 GO:0006899 | vesicle-mediated transport | 1.17E-04 | 7 |
| | GO:0042127 | regulation of cell proliferation | 1.60E-04 | 20 |
| C-22 | GO:0007417 | central nervous system development | 3.45E-07 | 13 |
| | GO:0007399 | nervous system development | 3.96E-07 | 24 |
| | GO:0007420 | brain development | 1.61E-06 | 8 |
| | GO:0030900 | forebrain development | 7.24E-06 | 3 |
| | GO:0030030 | cell projection organization | 1.78E-05 | 2 |
| C-25 | GO:0005031 GO:0005032 GO:0005033 | tumor necrosis factor receptor activity | 6.66E-06 | 3 |
| | GO:0043120 | tumor necrosis factor binding | 9.13E-06 | 3 |
| | GO:0005035 | death receptor activity | 1.21E-05 | 3 |
| | GO:0033209 | tumor necrosis factor-mediated signaling pathway | 4.43E-05 | 3 |
| C-26 | GO:0060850 | regulation of transcription involved in cell fate commitment | 5.63E-06 | 2 |
| | GO:0021882 | regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in forebrain neuron fate commitment | 3.02E-05 | 2 |
| | GO:0021893 | cerebral cortex GABAergic interneuron fate commitment | 3.02E-05 | 2 |
| | GO:0021898 | commitment of multipotent stem cells to neuronal lineage in forebrain | 3.02E-05 | 2 |
| | GO:0021879 | forebrain neuron differentiation | 3.47E-05 | 3 |
| C-28 | GO:0030182 | neuron differentiation | 4.46E-08 | 2 |
| | GO:0048699 | generation of neurons | 6.45E-08 | 2 |
| | GO:0022008 | neurogenesis | 2.01E-07 | 2 |
| | GO:0007399 | nervous system development | 4.57E-07 | 8 |
| | GO:0045202 | synapse | 6.47E-06 | 12 |

図10. 自己組織化マップ解析によるサリドマイドで変動した遺伝子オントロジー（GO）の一覧

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

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|--|--------------|-------------------------------|------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| ACVRL1 | activin A receptor type II-like 1, transcript variant 1 | NM_000020 | 2.41 | 3.91 |
| ANGPT1 | angiopoietin 1 | NM_001146 | 3.68 | 5.28 |
| COL15A1 | collagen, type XV, alpha 1 | NM_001855 | 2.26 | 3.31 |
| COL18A1 | collagen, type XVIII, alpha 1, transcript variant 1 | NM_030582 | 2.09 | 2.71 |
| COL3A1 | collagen, type III, alpha 1 | NM_000090 | 1.86 | 2.03 |
| ECSCR | endothelial cell-specific chemotaxis regulator | NM_001077693 | 3.57 | 6.51 |
| FLT1 | fms-related tyrosine kinase 1, transcript variant 1 | NM_002019 | 2.08 | 2.77 |
| HAND2 | heart and neural crest derivatives expressed 2 | NM_021973 | 2.67 | 3.97 |
| IL8 | interleukin 8 | NM_000584 | 2.84 | 3.87 |
| JMJD6 | jumonji domain containing 6, transcript variant 2 | NM_015167 | 1.74 | 2.15 |
| LOX | lysyl oxidase | NM_002317 | 3.87 | 6.46 |
| NRP1 | neuropilin 1, transcript variant 3 | NM_001024629 | 3.74 | 5.88 |
| PLAT | plasminogen activator, tissue, transcript variant 1 | NM_000930 | 4.08 | 6.47 |
| POFUT1 | protein O-fucosyltransferase 1, transcript variant 1 | NM_015352 | 1.92 | 2.32 |
| POFUT1 | protein O-fucosyltransferase 1, transcript variant 2 | NM_172236 | 3.13 | 4.16 |
| PTPRB | protein tyrosine phosphatase, receptor type, B, transcript variant 2 | NM_002837 | 3.51 | 4.55 |
| VEGFA | vascular endothelial growth factor A, transcript variant 1 | NM_001025366 | 1.72 | 2.21 |
| WT1 | Wilms tumor 1, transcript variant D | NM_024426 | 1.83 | 2.84 |

図11 A. クラスタ-6 Vascular に含まれる遺伝子名および解析データ

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|---|--------------|-------------------------------|--------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| ARID3B | AT rich interactive domain 3B | NM_006465 | -6.29 | -5.41 |
| CALCA | calcitonin-related polypeptide alpha, transcript variant 3 | NM_001033953 | -30.06 | -18.73 |
| CARD11 | caspase recruitment domain family, member 11 | NM_032415 | -8.22 | -7.39 |
| DLX3 | distal-less homeobox 3 | NM_005220 | -20.23 | -11.58 |
| FOXA1 | forkhead box A1 | NM_004496 | -32.26 | -14.87 |
| FOXD3 | forkhead box D3 | NM_012183 | -6.63 | -5.01 |
| FOXO4 | forkhead box O4, transcript variant 1 | NM_005938 | -5.91 | -4.12 |
| GATA5 | GATA binding protein 5 | NM_080473 | -25.84 | -12.12 |
| HESX1 | HESX homeobox 1 | NM_003865 | -28.89 | -15.68 |
| HNF1A | HNF1 homeobox A | NM_000545 | -16.86 | -8.83 |
| IGSF1 | immunoglobulin superfamily, member 1, transcript variant 1 | NM_001555 | -6.53 | -5.14 |
| LIN28 | lin-28 homolog | NM_024674 | -33.85 | -17.87 |
| LIN28B | lin-28 homolog B | NM_001004317 | -5.76 | -4.59 |
| MXN1 | motor neuron and pancreas homeobox 1, transcript variant 1 | NM_005515 | -62.57 | -38.98 |
| NODAL | nodal homolog | NM_018055 | -24.95 | -16.36 |
| NR3C2 | nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2, transcript variant 1 | NM_000901 | -6.43 | -4.98 |
| T | T, brachyury homolog | NM_003181 | -6.86 | -5.13 |
| ZFP42 | zinc finger protein 42 homolog | NM_174900 | -21.53 | -12.03 |
| ZNF90 | zinc finger protein 90 | NM_007138 | -8.56 | -5.31 |
| ZNF99 | zinc finger protein 99 | NM_001080409 | -15.56 | -8.99 |

図11 B. クラスタ-11 Transcription に含まれる遺伝子名および解析データ

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

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|---|--------------|-------------------------------|-------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| HOXD3 | homeobox D3 | NM_006898 | 61.72 | 60.96 |
| HOXD8 | homeobox D8 | NM_019558 | 53.52 | 60.49 |
| HOXD13 | homeobox D13 | NM_000523 | 41.45 | 67.23 |
| HOXA13 | homeobox A13 | NM_000522 | 36.94 | 53.12 |
| HOXA11 | homeobox A11 | NM_005523 | 36.08 | 69.66 |
| HOXA6 | homeobox A6 | NM_024014 | 31.09 | 32.64 |
| MEOX2 | mesenchyme homeobox 2 | NM_005924 | 25.21 | 43.21 |
| GREM1 | gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog | NM_013372 | 25.03 | 38.00 |
| FOXC2 | forkhead box C2 | NM_005251 | 18.12 | 26.59 |
| HOXD1 | homeobox D1 | NM_024501 | 17.36 | 19.12 |
| GREM1 | gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog | NM_013372 | 16.04 | 24.56 |
| HOXC4 | homeobox C4, transcript variant 1 | NM_014620 | 13.20 | 20.15 |
| HOXD9 | homeobox D9 | NM_014213 | 13.06 | 16.94 |
| HOXD9 | homeobox D9 | NM_014213 | 12.67 | 13.47 |
| ENG | endoglin, transcript variant 2 | NM_000118 | 10.26 | 14.94 |
| WNT5A | wingless-type MMTV integration site family, member 5A | NM_003392 | 9.71 | 13.59 |
| TBX18 | T-box 18 | NM_001080508 | 9.61 | 15.27 |
| HLX | H2.0-like homeobox | NM_021958 | 8.80 | 10.98 |
| EDNRA | endothelin receptor type A, transcript variant 1 | NM_001957 | 8.36 | 10.21 |
| EDNRA | endothelin receptor type A, transcript variant 1 | NM_001957 | 8.16 | 11.88 |

図11 C. クラスタ -12 Embryonic に含まれる遺伝子名および解析データ

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|--|--------------|-------------------------------|-------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| FABP4 | fatty acid binding protein 4, adipocyte | NM_001442 | 21.10 | 24.18 |
| SP100 | SP100 nuclear antigen, transcript variant 2 | NM_003113 | 14.48 | 14.40 |
| CUBN | cubilin | NM_001081 | 13.40 | 9.59 |
| CAV1 | caveolin 1, caveolae protein, 22kDa, transcript variant 1 | NM_001753 | 12.07 | 11.42 |
| CAV1 | caveolin 1, caveolae protein, 22kDa, transcript variant 1 | NM_001753 | 11.99 | 11.38 |
| MVP | major vault protein, transcript variant 1 | NM_017458 | 11.13 | 11.21 |
| KCNMA1 | potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1, transcript variant 2 | NM_002247 | 10.96 | 9.15 |
| PLAUR | plasminogen activator, urokinase receptor, transcript variant 3 | NM_001005377 | 10.53 | 9.87 |
| KCNMA1 | potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1, transcript variant 1 | NM_001014797 | 10.04 | 9.77 |
| KCNMA1 | potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1, transcript variant 2 | NM_002247 | 9.92 | 9.43 |
| KCNMA1 | potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1, transcript variant 2 | NM_002247 | 9.22 | 8.34 |
| PRKCA | protein kinase C, alpha | NM_002737 | 9.02 | 9.85 |
| TGFB2 | transforming growth factor, beta 2, transcript variant 2 | NM_003238 | 9.00 | 7.91 |
| MMP14 | matrix metalloproteinase 14 | NM_004995 | 8.28 | 9.85 |
| CTSC | cathepsin C, transcript variant 3 | NM_001114173 | 8.01 | 8.40 |
| ANGPTL7 | angiopoietin-like 7 | NM_021146 | 7.85 | 9.39 |
| XDH | xanthine dehydrogenase | NM_000379 | 6.88 | 7.36 |
| THBS1 | thrombospondin 1 | NM_003246 | 6.41 | 5.58 |
| MSX1 | msh homeobox 1 | NM_002448 | 6.35 | 6.35 |
| PPARG | peroxisome proliferator-activated receptor gamma, transcript variant 3 | NM_138711 | 6.24 | 6.37 |

図11 D. クラスタ -13 Chemical に含まれる遺伝子名および解析データ

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

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|--|--------------|-------------------------------|-------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| HOXA3 | homeobox A3, transcript variant 2 | NM_153631 | 45.73 | 22.66 |
| RUNX2 | runt-related transcription factor 2, transcript variant 3 | NM_004348 | 19.54 | 15.23 |
| CD274 | CD274 molecule | NM_014143 | 10.93 | 6.89 |
| PMP22 | peripheral myelin protein 22, transcript variant 1 | NM_000304 | 7.03 | 5.19 |
| CAV2 | caveolin 2, transcript variant 1 | NM_001233 | 6.51 | 4.75 |
| CAV2 | caveolin 2, transcript variant 1 | NM_001233 | 5.95 | 4.09 |
| BMPR2 | bone morphogenetic protein receptor, type II | NM_001204 | 5.56 | 4.41 |
| CCL3L3 | chemokine ligand 3-like 3 | NM_001001437 | 5.28 | 4.11 |
| CDKN1A | cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, transcript variant 2 | NM_078467 | 4.96 | 4.29 |
| TICAM1 | toll-like receptor adaptor molecule 1 | NM_182919 | 4.63 | 3.50 |
| CRIP2 | cysteine-rich protein 2 | NM_001312 | 4.23 | 3.22 |
| BDNF | brain-derived neurotrophic factor, transcript variant 1 | NM_170735 | 4.03 | 3.39 |
| ADM | adrenomedullin | NM_001124 | 3.74 | 3.07 |
| VCAM1 | vascular cell adhesion molecule 1, transcript variant 1 | NM_001078 | 3.74 | 2.88 |
| ADAMTS1 | ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 | NM_006988 | 3.73 | 3.05 |
| TGFB3 | transforming growth factor, beta 3 | NM_003239 | 3.63 | 2.99 |
| BNC1 | basonuclin 1 | NM_001717 | 3.44 | 3.06 |
| EDN1 | endothelin 1, transcript variant 1 | NM_001955 | 3.19 | 2.89 |
| JUN | jun oncogene | NM_002228 | 3.01 | 2.64 |
| PML | promyelocytic leukemia, transcript variant 1 | NM_033238 | 2.99 | 2.84 |

図11 E. クラスタ -19 Proliferation に含まれる遺伝子名および解析データ

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|---|-----------|-------------------------------|--------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| ARX | aristaless related homeobox | NM_139058 | -6.94 | -9.19 |
| CLIC5 | chloride intracellular channel 5, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2 | NM_016929 | -24.21 | -67.75 |
| NR2E1 | nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1 | NM_003269 | -19.88 | -39.65 |
| TLX3 | T-cell leukemia homeobox 3 | NM_021025 | -18.75 | -29.63 |
| DLL1 | delta-like 1 | NM_005618 | -16.04 | -28.38 |
| NEUROG2 | neurogenin 2 | NM_024019 | -13.26 | -25.78 |
| GHRH | growth hormone releasing hormone | NM_021081 | -8.58 | -11.68 |
| C17orf28 | chromosome 17 open reading frame 28 | NM_030630 | -7.94 | -12.97 |
| GHRH | growth hormone releasing hormone | NM_021081 | -7.80 | -13.70 |
| NHLH1 | nescient helix loop helix 1 | NM_005598 | -6.95 | -13.54 |
| SOX1 | SRY-box 1 | NM_005986 | -5.99 | -11.59 |
| MYT1 | myelin transcription factor 1 | NM_004535 | -5.27 | -12.67 |
| ID4 | inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein | NM_001546 | -4.96 | -8.79 |
| RGMA | RGM domain family, member A, transcript variant 4 | NM_020211 | -4.34 | -5.44 |
| CKB | creatine kinase, brain | NM_001823 | -4.31 | -5.54 |
| TFAP2B | transcription factor AP-2 beta | NM_003221 | -4.22 | -6.25 |
| NNAT | neuronatin, transcript variant 1 | NM_005386 | -4.10 | -6.55 |
| SH3GL2 | SH3-domain GRB2-like 2 | NM_003026 | -4.03 | -6.83 |
| EFNA1 | ephrin-A1, transcript variant 1 | NM_004428 | -3.83 | -4.71 |
| CHRN2 | cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 | NM_000748 | -3.72 | -5.73 |

図11 F. クラスタ -22 Neuro-system に含まれる遺伝子名および解析データ

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

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|--|--------------|-------------------------------|------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| TNFRSF19 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19, transcript variant 1 | NM_018647 | 2.97 | 1.89 |
| TNFRSF1B | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B | NM_001066 | 4.38 | 1.75 |
| TNFRSF25 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25, transcript variant 12 | NM_001039664 | 2.13 | 1.26 |

図11 G. クラスタ -25 Necrosis に含まれる遺伝子名および解析データ

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|--|-----------|-------------------------------|-------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| DLX1 | distal-less homeobox 1, transcript variant 1 | NM_178120 | 3.65 | 1.02 |
| DLX2 | distal-less homeobox 2 | NM_004405 | 2.61 | -1.28 |
| POU3F4 | POU class 3 homeobox 4 | NM_000307 | 2.32 | 1.18 |

図11 H. クラスタ -26 Forebrain に含まれる遺伝子名および解析データ

| GeneSymbol | Description | GenBank | Talidomide 10 ⁻⁷ M | |
|------------|---|-----------|-------------------------------|--------|
| | | | 初期曝露 | 後期曝露 |
| NEUROG1 | neurogenin 1 | NM_006161 | -7.74 | -17.25 |
| SLC17A6 | solute carrier family 17, member 6 | NM_020346 | -6.96 | -25.98 |
| LHX5 | LIM homeobox 5 | NM_022363 | -5.88 | -13.26 |
| TLX2 | T-cell leukemia homeobox 2 | NM_016170 | -5.40 | -15.92 |
| CNTN2 | contactin 2 | NM_005076 | -5.31 | -12.32 |
| USH1G | Usher syndrome 1G | NM_173477 | -5.23 | -9.10 |
| GRIK3 | glutamate receptor, ionotropic, kainate 3 | NM_000831 | -4.89 | -10.89 |
| EMX2 | empty spiracles homeobox 2, transcript variant 1 | NM_004098 | -4.86 | -10.88 |
| LGI1 | leucine-rich, glioma inactivated 1 | NM_005097 | -3.97 | -7.75 |
| SYP | synaptophysin | NM_003179 | -3.80 | -10.37 |
| TULP1 | tubby like protein 1 | NM_003322 | -3.67 | -7.58 |
| FOXP1 | forkhead box G1 | NM_005249 | -3.31 | -6.20 |
| SEPT3 | septin 3, transcript variant A | NM_145733 | -3.21 | -6.20 |
| EFHD1 | EF-hand domain family, member D1, transcript variant 1 | NM_025202 | -2.81 | -3.88 |
| SHANK2 | SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2, transcript variant 1 | NM_012309 | -2.74 | -4.96 |
| GAD2 | glutamate decarboxylase 2, transcript variant 1 | NM_000818 | -2.64 | -6.16 |
| NEUROD4 | neurogenic differentiation 4 | NM_021191 | -2.48 | -7.32 |
| WNT7A | wingless-type MMTV integration site family, member 7A | NM_004625 | -2.47 | -8.37 |
| DCX | doublecortin, transcript variant 1 | NM_000555 | -2.43 | -6.71 |
| CELSR2 | cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 | NM_001408 | -2.37 | -3.76 |

図11 I. クラスタ -28 Neurogenesis に含まれる遺伝子名および解析データ