

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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関連性
(発達過程を含む) に重点を置いた解析研究－
(H18－化学－一般－001)

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 19 (2007) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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関連性(発達過程を含む)に重点を置いた解析研究—
(H18-化学-一般-001)

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 19(2007)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書	
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	
菅野 純 1
II. 分担研究報告書	
1. 発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析	
北嶋 聡 81
2. 毒性試験指標と対比したデータ解析手法の確立ー造血系における生体異物応答モデルを用いた検討ー	
井上 達 103
3. 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	
漆谷 徹郎 119
4. T細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究	
北川 昌伸 135
5. 中枢神経系に作用する薬物の骨代謝への影響	
池田 通 151
6. 変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究 159
本間 正充	
7. 非形質依存的インフォマティクス開発研究	
相崎 健一 179
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 221
IV. 研究成果の刊行物・別刷 225

別添 3

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

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—

主任研究者 菅野 純

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・部長

研究要旨

本研究は化学物質リスク評価の基盤整備に於けるトキシコゲノミクスの利用に関する研究として、反復(慢性)暴露データベース、及び多種臓器間の連関性を検討するトキシコゲノミクスデータベースを取得し、有機的活用を促進するためのデータベースの検証と個別テーマに則った基盤研究、及び、大量データから生物学的に有意な情報を効率的に抽出するインフォマティクス開発研究を配し、すでに構築済みの約90種類の化学物質を対象にした単回(急性)暴露マウス肝トキシコゲノミクスデータベースとの対比により、安全性評価に於けるトキシコゲノミクスの有機的利用を相乗的に促進させるものである。

研究班はデータベース(DB)生成研究、基盤研究、及び、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の3部構成とした。具体的には、【①データベース生成研究】として、1) 新型慢性暴露トキシコゲノミクスデータベース*: 14日間の暴露を経て定常状態化した化学物質慢性暴露状態の実験動物に対し、単回暴露トキシコゲノミクス実験を適用し、遺伝子発現カスケードに慢性暴露が如何なる影響を与えるかを検討するためのデータを取得し、先行研究により構築済みの急性暴露データベースと比較統合するもの、及び、2) 多種臓器トキシコゲノミクスデータベース: 脳、肺、肝、腎臓等の多臓器トキシコゲノミクスデータを毒性学的重要度の高い化学物質を対象に取得し、個々の臓器の反応性の時間的、質的な差異情報から、多臓器間の連関性を明らかにし、前記データベースと統合するもの、の構築に加え、3) ハイスループット *in situ* hybridization データベース: 臓器内の遺伝子発現部位(細胞別、或は組織内領域別)の可視化をハイスループット性を以て実施し、遺伝子発現の生物学的意義の解釈を形態学的に支援するシステムの立ち上げ、を始めた。それに加え、【②基盤研究】として、発生毒性、免疫毒性、造血毒性、消化管毒性、骨毒性、遺伝子傷害毒性を取り上げ、各分野の専門家を分担研究者として配し、得られた情報による前述のデータベースの関連部分の検証と、有機的データベース活用手法の開発の促進を図った。【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】として、主任研究者らが構築した遺伝

子発現値の絶対値化手法であるPercellome手法に基礎を置くMillefeuille data (ミルフィーユデータ) システムの改良、大量データから生物学的有意な情報を効率的に抽出する新規アルゴリズムの開発・検証を開始した。

本年度、DB生成研究に於いては、新型慢性暴露実験、多種臓器についてデータ生成のための化合物暴露実験系の整備を完了したのち、DB生成を開始した。HT-ISHはシステムの自動化に目処がついた。基盤研究では、各班員の実験系を網羅的遺伝子発現解析に対応させるための条件設定を行い、次年度以降に網羅的遺伝子発現解析を用いた解析が可能な研究体制整備を完了した。インフォマティクス開発研究では、独自のアプローチによる発現同期遺伝子の抽出・解析技術の開発・改良、Exonレベルでの遺伝子発現データの解析技術開発、異なったメーカーのマイクロアレイプラットフォーム間でのデータ変換の検証、経時変化に対応したシミュレーションに関わる時系列ソーティング技術の基礎開発を行った。

[*慢性暴露状態を、遺伝子改変動物と類似の状態に見立てた慢性毒性概念である。即ち、反復投与は、個体の遺伝子発現プロファイルを異常な定常状態に陥れる原因であると考える。その様な個体が、外来物質に曝された際の反応を、正常(無処置)個体のそれと比較することで、慢性暴露状態の本質を明らかにしようとするものである。]

分担研究者

研究科・包括病理学分野・教授

北嶋聡

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・室長

池田通

長崎大学大学院・医歯薬学総合研
究科・教授

井上達

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・セ
ンター長

本間正充

国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
変異遺伝部・室長

漆谷徹郎

同志社女子大学・薬学部・病態生
理学教室・教授

相崎健一

国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・
毒性部・主任研究官

北川昌伸

東京医科歯科大学・医歯学総合

A. 研究目的

本研究は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に、網羅的な遺伝子発現変化解析法を適用するものである。先の3年間の厚生労働科学研究にて構築済みの単回(急性)暴露プロトコールによるマウス肝の初期応答トキシコゲノミクス・データベースに、本研究では反復(慢

性)暴露実験からの情報、多臓器間の関連情報、及び、*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)の可視化情報を加え、更なる充実を図るとともに、毒性学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を平行して進める。これにより、従来以上に迅速、定量的且つ高精度な

評価システムの構築を目指す。

B. 研究方法

【①データベース生成研究】の新型慢性暴露トキシコゲノミクスデータベース構築のために、3年間の研究期間に於いて数種類の毒性学的に重要な慢性暴露化合物と適切な単回暴露化合物を選択し、14日間の慢性暴露を経て定常状態化したマウスへの単回暴露によるトキシコゲノミクスデータを、マウス肝に対して申請者らの開発した絶対標準化手法 (Percellome 手法) を用いて取得し蓄積する。化学物質は原則的に経口投与 (混餌、飲水、或は胃内) とし、慢性暴露後の単回投与 (2、4、8、24 時間後検体採取) 実験を行う。投与用量は慢性暴露1段階、単回投与 4 段階を設定する (16 群構成、各群 3 匹、1 実験 48 匹規模)。mRNA は個体ごとに採取し、原則的に個体別に遺伝子発現プロファイルを得る (群ごとのプールは行わない)。多種臓器トキシコゲノミクスデータベース構築のために、基本データベースから重要度の高い化学物質を9種類 (/3 年) 選び、経口単回強制経口投与 (2、4、8、24 時間後検体採取) 時の脳、肺、肝、腎臓等の多臓器トキシコゲノミクスデータを取得する。遺伝子発現変化を組織学的に解析しデータベース活用を促進するシステムとして立ち上げるハイスループット *in situ* hybridization (臓器・組織内の遺伝子発現部位の可視化をハイスループット性を以て実施) システムについては、*in situ* hybridization の自動化を初年度に行った。今年度は各データベース活用に役立つデータ取得及び蓄積を行う。

【基盤研究】: 各専門分野からの6人の分担研究者を配し、評価精度の向上を目指す。

(1) 発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析として、毒性発現メカニズムに支えられた新たな発生毒性評価系を構築するため、分子標的が明らかな催奇形

性物質と明らかでない典型的な催奇形性物質をモデルとし、胎児の他、胚性幹細胞 (ES 細胞) を標的とした実験を行い、催奇形性予測の精密化を目指す (北嶋)、(2) 毒性試験指標と対比したデータ解析手法の確立として、造血系に於ける生体異物応答モデルを用い検討する (井上)、(3) 消化管粘膜毒性発現機序の解明として、網羅的遺伝子発現解析の進んでいない消化管について遺伝子改変マウスを活用して解析する (漆谷)、(4) T細胞機能に関わる胸腺毒性発現の分子メカニズムに関する研究として、胸腺細胞の分化と個体の感染防御に及ぼす毒性のプロファイルの詳細解析を *in vitro* と *in vivo* で比較検討する (北川)、(5) 臨床現場で特定の薬物投与下にある患者の骨折病変に異常な化骨誘導が認められた観察例を踏まえ、マウスに特定作用薬を慢性暴露し骨代謝への作用機序を明らかにする (池田)、(6) 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として、遺伝子傷害性物質と非遺伝子傷害性物質のマウス肝への作用を比較し、遺伝子傷害性の有無を予測する遺伝子セットを絞り込む (本間)。

【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】: 非形質依存的インフォマティクス開発研究として、主任研究者らが既に構築した遺伝子発現値の絶対値化手法である Percellome 法に最適化した解析システム (MilleFeuille system) の改良を推進するとともに、遺伝子の個々の Exon レベルでの更に詳細な発現の解析方法の開発や、マイクロアレイ製品間のデータ相互変換技術の検証を併せて行う。また、全遺伝子情報を含む大量データから生物学的に有意な情報を効率的に抽出する方法の開発・検証を推進する (相崎)。

C. 研究結果

【①データベース生成研究】

データベース生成のための化合物慢性暴露実験系及び多種臓器実験系の整備を完了し、データベース生成を開始した。新型慢性暴露実験については、慢性暴露化合物としてクロフィブレートを選択し、これに単回チャレンジ化合物を組み合わせたデータの蓄積を進めた。単回投与化合物として選択したのは、クロフィブレート、PCN (5-Pregnen-3beta-ol-20-one-16alpha-carbonitrile)、及び ATRA (All trans retinoic acid) の3種類である。用量は、クロフィブレート慢性暴露は 70mg/kg を 14 日間連日とし、単回チャレンジは、4用量段階(クロフィブレート: 0, 10, 30, 100mg/kg、PCN: 0, 7, 20, 70mg/kg、ATRA: 0, 0.3, 1, 3mg/kg)にて行い、2, 4, 8, 24 時間後(n=3)にサンプリングした。多種臓器については、四塩化炭素、サリドマイドの実験を実施した。用量は4段階(四塩化炭素: 0, 0.7, 2, 7mg/kg、サリドマイド: 0, 100, 300, 1,000mg/kg)とし、単回投与後、2, 4, 8,、及び 24 時間後(n=3)に四塩化炭素は肝、肺、心、精巣、腎の 5 臓器を、サリドマイドは肝、肺、心、腎、脳(大脳領域、海馬、脳幹、小脳の4部位に分けた)のデータを各動物から取得した。

これらのうち、新型慢性暴露実験については、単回投与化合物として慢性暴露と同じクロフィブレートを用いた実験、多種臓器については四塩化炭素の実験、についてデータ解析を始めた。先行する厚生労働科学研究において、クロフィブレートは単回投与時に肝で脂肪酸代謝に関わる遺伝子群の発現が変化することを既に捉えているので、新型慢性暴露時のそれらの遺伝子発現変化を検討したところ、経時的発現変化の程度が概して減弱する傾向にあることが分かった。その一方で、GJB2(CX26, コネクシン 26)や CCND1 が反復暴露により誘導されることが明らかとなった(FIG.1)。多種臓器については、概日変化を示す遺伝子群の各臓器における発現変化を指標に、実験の品質検討を行った。その結果、概日変化を示さない臓器である精巣以外の臓器に於いて典型的な

日内変動パターンが捉えられ、詳細な解析に値するデータが得られていることが確認された(FIG.2)。

ハイスループット *in situ* hybridization (ISH) システムについては、ISH の自動化を行った。まず、パラフィン切片を用いた標準的な ISH 法を検討した(DIGラベル cRNA probe を用い、Alkaliphosphatase ラベルされた抗 DIG 抗体を作用させ、BCIP/NBT の色素沈着により陽性染色反応を得る方法)。その結果、cRNA probe の細胞内への浸透化に関し、クエン酸と界面活性剤を主成分とする賦活化溶液 HistoVT One (ナカライテスク) を用い 98 °C 15 分間加熱することで、3-methylcholanthrene (3MC) 投与時の CYP1A1 のように、細胞あたりの発現量が 300 コピーを超える遺伝子については良好に検出可能となった。しかし、この方法では、細胞あたり 200 コピー程度の発現を捉えることは困難であったため、検出感度の向上を図ることが最優先課題となった。まず、対象遺伝子 mRNA に対する結合力の高い PNA probe を用いた検討を行ったが、検出感度を上げることは出来なかったため、反応性ラジカルの一種 tyramide を用いた増感法である Tyramide Signal Amplification (TSA) 法を検討した。その際、TSA 法用の実験キットとして販売されている、Perkin Elmer 社または DAKO 社のキットを用い比較した。Perkin Elmer 社のキットは ISH 法の増感キットとして一般に用いられている報告例の多いキットであるが、予想に反し検出感度は向上せず、バックグラウンドの高い染色像しか得られなかった。一方で DAKO 社のキットでは良好な結果が得られ、細胞当たり 30 コピーまでの発現量があれば検出が可能であることが分かった。ただし、このキットはコストが高く、マニュアルで実施するよりも多量の試薬を必要とする自動染色に用いるのは現実的ではなかった。そこで、最もコストがかかる tyramide の自家合成を試み、自家合成した tyramide でも良好な陽性シグナルが得られキットと同等の感度が得られることが分かった。以上、本年度の

研究により、ISH の自動染色の自動化に目処がついたと結論した。

【②基盤研究】

本年度は各班員の実験系を網羅的遺伝子発現解析に対応させるための条件設定を主に行った。以下に、各班員の進捗を記す。

発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析(北嶋)：遺伝子発現解析手法のマウス初期胚への適用条件の設定ならびに、発生に関わる特定の遺伝子を欠損させたマウス胚をモデルとして用いた解析技術の実用性の検証を終了した。また、分子標的が明らかな催奇形性物質を用いた検討を開始し、発生に必須な Shh シグナルを阻害する化合物であり、本化合物を含む植物を食べた妊娠羊由来の子羊に単眼症が生じることが報告されているサイクロパミンを妊娠 7.25 日の母マウスに投与し、胚(投与後 2, 4, 24 時間)に於ける網羅的遺伝子発現解析を検討した。投与時期、投与量の選定にあたっては本研究で得た野生型マウス胚全胚の経時的遺伝子発現データベースにおける Shh シグナル関連遺伝子の経時変化並びに予備試験結果(70mg/kg 投与で妊娠マウスが 10 匹中 2 匹死亡)を考慮し、投与時期を妊娠 7.25 日目、投与量を 3, 10, 30mg/kg とした。Percellome 手法により得られた網羅的遺伝子発現データを解析した結果、この投与条件ではサイクロパミンは Shh シグナルを阻害するというより、むしろコレステロール合成・代謝系カスケードに影響を与えている可能性が示唆された。この結果は化学物質の安全性評価上、意義深いものと考えられる。

毒性試験指標と対比したデータ解析手法の確立一造血系における生体異物応答モデルを用いた検討(井上)：異なったプラットフォームからの生成データの生物学的集約のための評価手法の検討を行い、さらに、週齢による遺伝子発現の確率論的エピジェネティック・ヴァリアンスの拡大について加齢マウ

スを用いた予備検討を進めた。本年度は、実験動物の加齢影響に焦点を当て、加齢に伴って認められる epigenetic diversity の概念を明らかにした。即ち、2M 齢の遺伝子発現と 21M 齢の遺伝子発現は、2M 齢のそれは比較的隣接し、21M 齢のそれは拡散傾向をもって広く分布していた。

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(漆谷)：酸化ストレス応答の鍵となる分子である ASK1 欠損マウスを用いて、主に消化管粘膜に於ける酸化ストレスシグナルを解析することを目的に研究を進めた。本年度は、デキストラン硫酸 DSS 腸炎モデルに於いて、ASK1 関連シグナルの変動が観察されたものの、病変自体には野生型と ASK1 欠損マウスの間に明瞭な差を認めないという結果を得た。これは、このシグナルが防御系と病態の進展の両方に関与するためと思われた。今後、他の病態モデルや培養系など、腸粘膜障害の各ステップを詳細に解析する系の確立が必要である。

T細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究(北川)：T細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析し、実際の感染症の発症に与える影響を遺伝子発現の変化という観点から網羅的に検討した。胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているコルチコステロイドをマウスに *in vivo* 腹腔内投与し、投与マウスの胸腺細胞及び脾細胞に於ける遺伝子発現プロファイルの投与後早期に於ける変化を経時的に解析した。発現変化を示した遺伝子群をいくつかの類型に分類して、細菌感染に関わることが知られている遺伝子リストと比較検討した。その結果、コルチコステロイド投与によりアポトーシスが著明に増加するとともに、アポトーシス関連、サイトカイン関連(特に IFN 関係)、細胞増殖関連(コルチコステロイドレセプターの動きに連動)などに有意な発現の動き(増強)が認められた。これらのうち、典型的な 24 時間後ピークを呈するパターンを示して

いたものについてさらに解析を進める予定である。本年度の研究は、薬剤の胸腺毒性を試験する際に、一つのパターン(アポトーシス誘導)を示す薬剤の代表としてステロイド投与の影響を検討するものと位置づけられる。その結果、胸腺毒性が免疫抑制に作用して細菌感染を助長する作用と、ステロイド投与そのものが細菌に対する感受性を増強する作用とがあることがわかった。さらに、*in silico*での解析を工夫して、細菌感染に対する感受性の増強に寄与する因子を検討する系を構築する。

中枢神経系に作用する薬物の骨代謝への影響(池田): Alprazolam (12.5 ug, 30 ug, 120 ug/kg)、Etizolam (15 ug, 60 ug, 240 ug/kg)、Sulpiride (2.5mg, 10mg, 40mg/kg)、Sodium Valproate (5mg, 20mg, 80mg/kg)の各薬物を連日 Wistar 系ラットに経口投与した。投与量は一般的な人体への投与量を各動物の体重に換算したものを基準とした。薬物投与1週間後に左側大腿骨を骨幹部で切断、固定し、手術後も毎日薬物投与を続け、手術4週間後までの状態を、X線写真、マイクロCTにより比較検討し、Alprazolam, Sodium Valproate 投与動物に於いて化骨の促進が強く示唆される所見を得た。これらについてのサンプリング法の検討など、遺伝子発現解析の準備を進めた。

変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究(本間): 遺伝子傷害性及び非遺伝子傷害性肝発癌物質を用いたマウス肝に於ける網羅的遺伝子発現解析の結果に基づき、遺伝子傷害性物質にのみ共通して発現変化する遺伝子群を絞り込み、これらの遺伝子を用いた迅速スクリーニングを可能にするためのTaqMan® Low Density Array (TLDA) (複数種類の遺伝子に対する定量 RT-PCR 実施用の multiwell plate) を作製した。TLDA を用いたデータと、GeneChip により得られた遺伝子発現データとを比較したところ、非常に良く一致した結果が得られ、両手

法の信頼性が確認された。今後はさらに多くの化合物群に対して本手法を用いた検討を行い、有効性を検証する。

【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】(相崎):

1. 発現同期遺伝子の抽出・解析技術の開発・改良:

同期して発現変動する遺伝子を化学物質間で比較することにより、遺伝子カスケードの抽出を促進する。それにより、化合物毎の解析では得られない、より関連性の強い重要な候補遺伝子群を抽出することができると考えられる。このために、既に開発した実装アルゴリズムについて、同時に解析可能なプロジェクト数を増加させることにより、より広汎に同期している遺伝子群の抽出を可能とする。本年度はMFサーバーに導入済みの発現同期率計算アルゴリズムをさらに改良し、より多くの化合物投与データを用いてより高速に計算が行えるようにすると共に、巨大な出力結果を効率的に閲覧することのできるソフトウェアの開発を行った。

2. Exon レベルでの遺伝子発現データの解析技術開発(1)

Exon 発現解析アルゴリズム開発用の基礎データを採取し初期評価を行ったところ、Exon アレイ (Affymetrix Human Exon 1.0 ST 及び Mouse Exon1.0 ST) について、プローブセットの特性に関する問題があることが判明した。スプライシング・バリエーションを含む、発現データの精度を向上させるために実施している数値化アルゴリズムの開発・改良の成果を待って本研究を再開する予定とした。

3. プラットフォーム間データ変換の検証

Affymetrix GeneChip と Agilent 単色系 Microarray を対象として、異なったメーカーの製造するマイクロアレイのプラットフォーム間データ変換の検証を実施した。Percellome 法によりプラットフォーム間でのデータ相互変換が多数のプローブ間で可能であり、プローブ

毎に補正係数を計算することが可能となった。また、Agilent 単色系 Microarray でも細胞 1 個当たりの発現量の数値変換が可能であることを確認し、結果公表の準備に入った。一方、信用に足る補正係数が求められなかったプローブ(セット)が存在し、その原因について考察したところ、1つの大きな要因としてプローブの飽和現象が影響しているものと推測された。この問題は標準データを増やすことである程度解消されると予測された。

4. 時系列ソーティング技術の基礎開発

系列ソーティングのための基本技術として、測定点間のデータ補間及び日内変動リズムを考慮した測定区間外へのデータ外挿を検討した。実際の測定値を正確に反映し、なおかつ測定点間を滑らかに接続すること、及び補間関数自体を微分・積分できることから補間関数としてスプライン関数を採用した。測定区間外へのデータ外挿に際しては測定区間に於ける溶媒コントロールの補間関数をベースとして化合物投与による変動曲線に滑らかに接続するようパラメータを調整した。生成した変動曲線方程式は微積分可能であるため、発現誘導やタンパク質合成のパターンも推測可能であり、今後はアルゴリズムの改良を進めつつ、得られた推測式を利用して時系列シフトした発現パターンや推測された発現誘導因子パターン・タンパク質合成パターンを鋳型としてシグナルへの関与の可能性のある遺伝子の抽出を検討する。

D. 考察

本研究の最終的な目標は、人に於ける毒性作用を、毒性発現の分子メカニズムに基づいて、より迅速、正確且つ詳細にマウス等の実験動物のデータから予測可能とすることにある。これにより、化審法や毒物劇物法の取り扱う物質のみならず、食品添加物、医薬部外品など、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が開けるものと期

待される。更に、「死ぬ毒性」あるいは「全身状態が悪くなる毒性」とは別途に評価されることの多かった「死なないう毒性」、例えば記憶、視覚、聴覚、生殖能力などを失う毒性の評価の統合化も展望される。

これらの状況を踏まえ、先行する厚生労働科学研究に於いて、トキシコゲノミクス基盤整備のために約90種類の化学物質を対象にした急性暴露マウス肝トキシコゲノミクスデータベースを構築した。このデータベースは基本データベースとして極めて有用であるが、十分ではない。次に求められるのは、日常生活に於いて想定される化学物質暴露形態である慢性暴露を考慮すること、及び、肝臓以外の臓器での化学物質作用について情報を得ることである。

そのために本研究では、1)データベース生成研究として、2種類の新しいデータベース構築と解析技術システムの立ち上げ、2)探索型の基盤研究(分担研究)による未知の遺伝子発現プロファイルの検証及びインフォマティクスへの還元、及び、3)大量データから生物学的有意な情報を効率的に抽出するインフォマティクス開発、に着手した。

本年度これらのデータベース生成に必要な条件設定を完了し、データ取得を順調に開始した。その結果、次年度以降、本格的に研究を進める見通しが立った。これらのデータベースにより、特定の化学物質への慢性暴露により、生体の各種制御系が変化し、次に暴露される化学物質に対して正常とは異なる過敏あるいは鈍感な反応を示すという、人の実生活に於いて現実的に起こりうる暴露状況、すなわち、人の実生活に即した安全性評価システム構築が可能となる。また、本研究で得られる脳、肺、肝、腎臓等の多臓器トキシコゲノミクスデータベースにより、多種臓器での変化を総合的に解析し、化学物質の全身への作用を分子メカニズムのレベルで評価する他に類のない評価システムの開発が実現可能となる。

E. 結論

今年度の研究により、データベース生成に必要な条件設定を完了し、データ取得を順調に開始し得た。次年度は、さらに新型慢性暴露実験、多種臓器のデータ蓄積を進め、ハイスループット *in situ* hybridization システムを活用した解析を行う。さらに、基盤研究、インフォマティクス開発研究からの成果を取り込み、網羅的遺伝子発現解析による毒性評価システム開発を押し進める。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S.(2006) Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(1):224-9

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T.(2006) Per cell normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics 29;7:64.

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. (2006) Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. Mol Endocrinol. 20(9):2141-55

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y.(2006) Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(10):3651-6

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、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. 学会発表

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、九州大学医学生研セミナー、2006年4月17日、福岡

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、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

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、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

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、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、相崎健一、小川幸男、関田清司、北嶋
聡、ヒドロキシクエン酸による精巢毒性のトキシコゲ
ノミクス解析、第96回病理学会総会、2007年3月
13-15日、大阪

Kanno Jun, Aisaki Ken-ichi,
Igarashi Katsuhide, Nakatsu Noriyuki1, Kitajima
Satoshi, Kodama Yukio,
"PERCELLOME" TOXICOGENOMICS
PROJECT FOR THE MECHANISM-BASED
TOXICOLOGY, the SOT 46th Annual Meeting
March 25-29, 2007

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得:

特になし

2. 実用新案登録

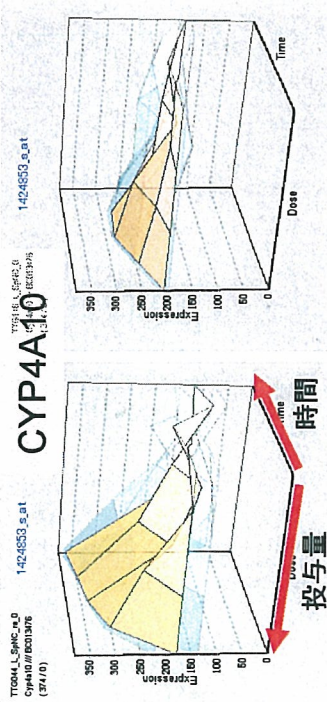
該当しない

3. その他(データベース等)

該当しない

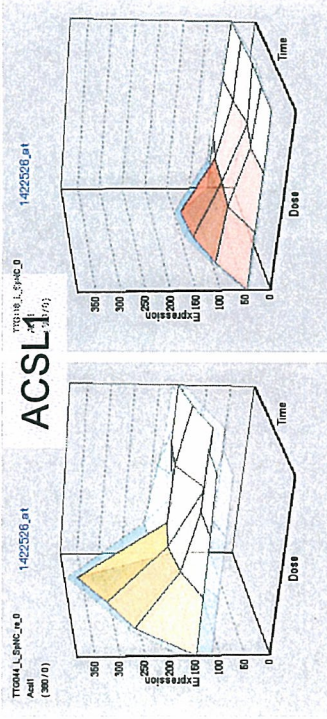
単回投与

新型慢性暴露

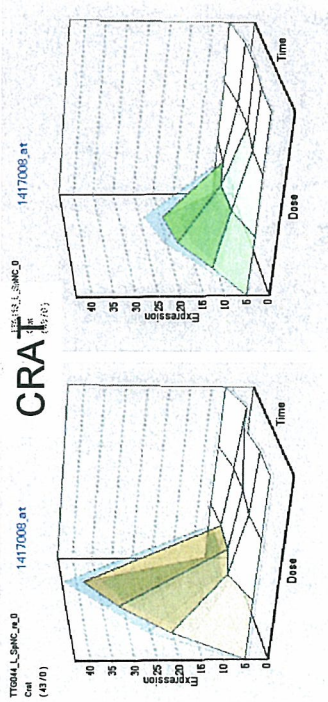


単回投与

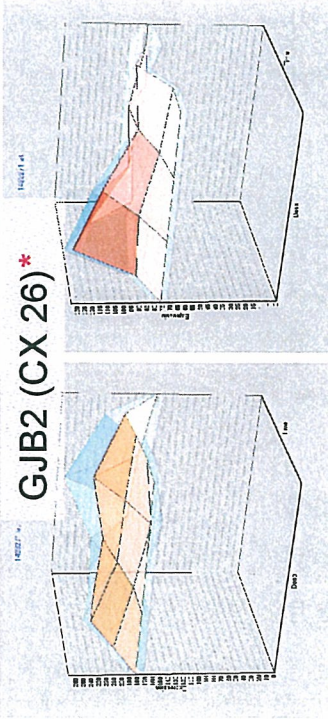
新型慢性暴露



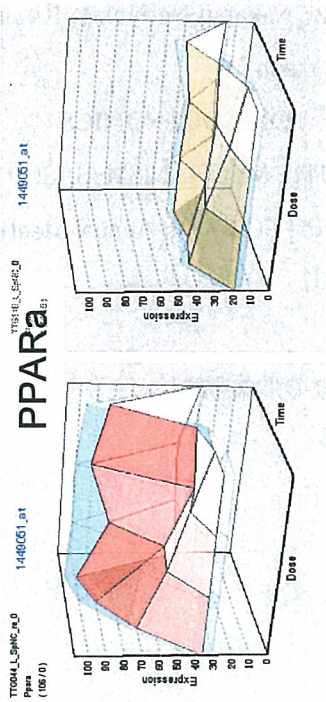
CRAI



GJB2 (CX 26)*



PPARA



CCND1*

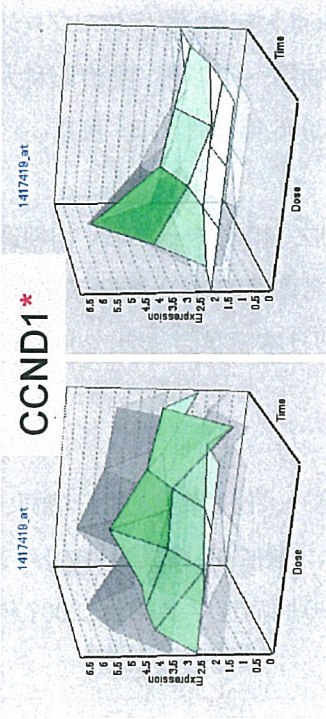


FIG.1 新型慢性暴露と単回投与実験における遺伝子発現変化の比較

単回投与のみの暴露で発現が変化することが明らかとなっている遺伝子の発現変化を比較した。概して慢性暴露実験の方が発現変化の程度が減弱する傾向にある中、幾つかは慢性暴露により誘導されるものが同定された(*)。

Testis

Kidney

Heart

Lung

Liver

ARNTL

DBP

PER1

PER2

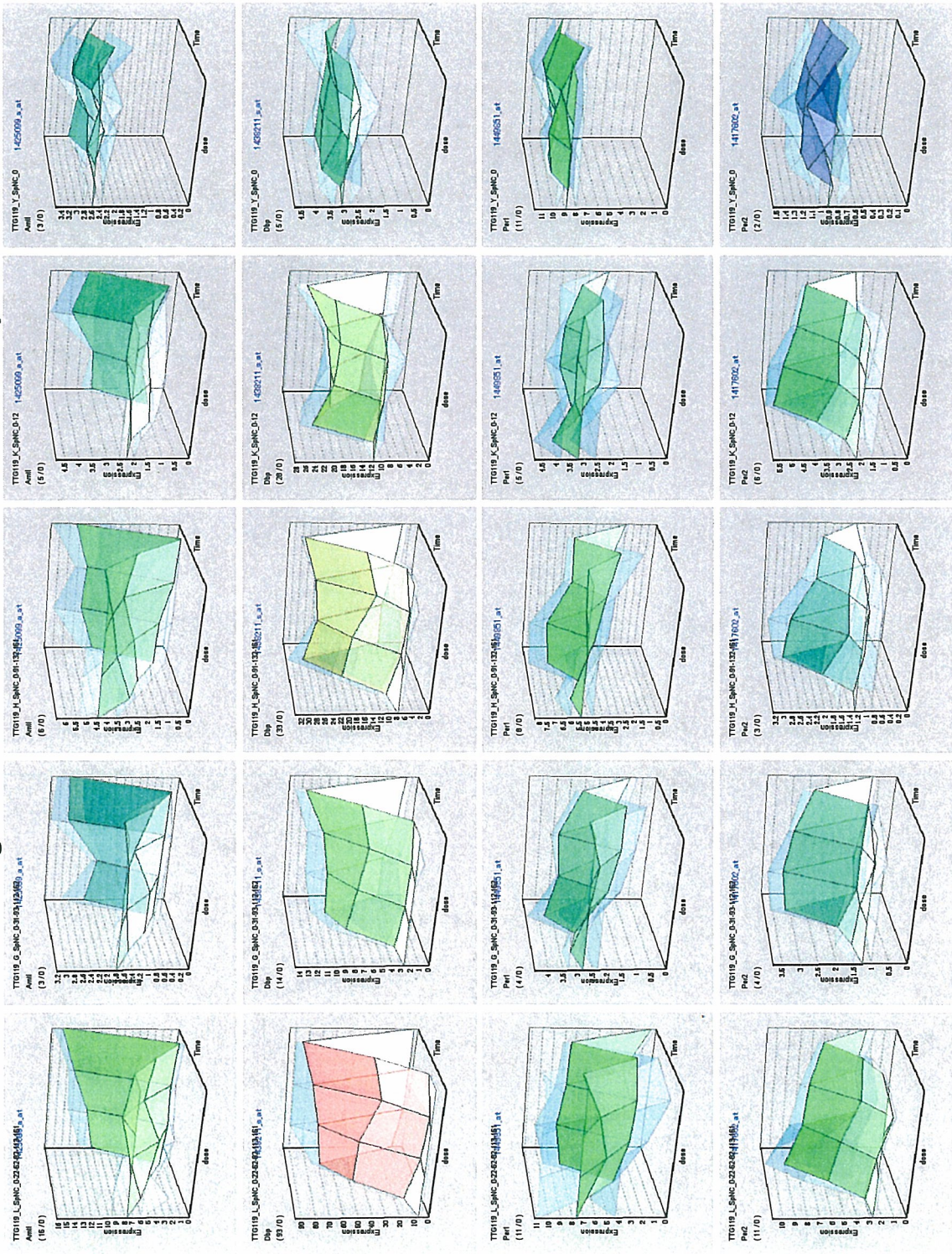


FIG.2 四塩化炭素単回暴露多種臓器における概日変動遺伝子発現変化

肝、肺、心、精巣、腎の5種類の臓器に於ける概日変動遺伝子ARNTL, DBP, PER1, PER2の発現変化を示した。概日変化を示さない精巣以外の臓器で典型的な日内変動パターンが捉えられた。

委託研究報告書 (STEP 5)

2007年3月23日(金)

NTTコムウェア株式会社

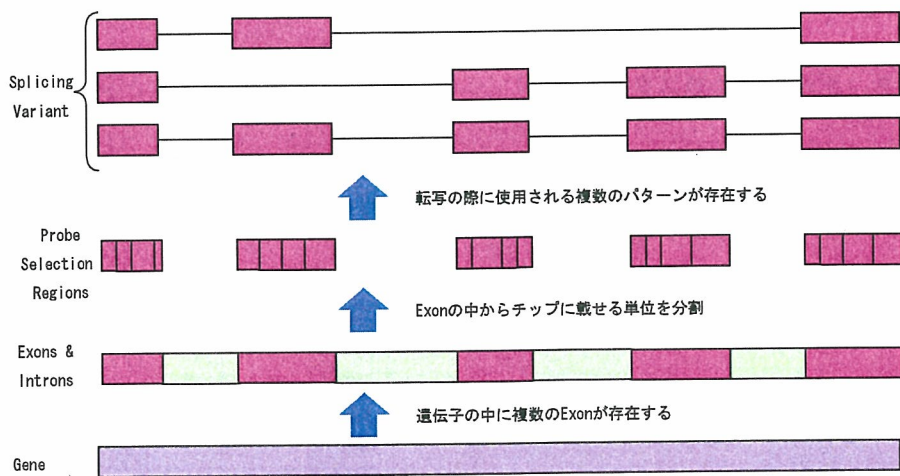
目次

1. Exon Chip実験結果のAICを用いた推定
2. 化合物間クラスタリング
3. 化合物間クラスタリング②
クラスタリング結果を用いたクラスタリング

1. EXON CHIP実験結果のAICを用いた推定

1. Exon Chip実験結果のAICを用いた推定

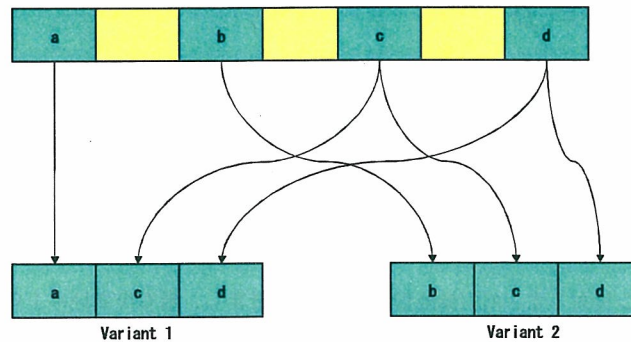
ExonとSplicing Variantの基本的な考え方



1.1. 計算手順概要



Splicing Variantが存在する場合、個々のExon単位で発現量調整が行われている。

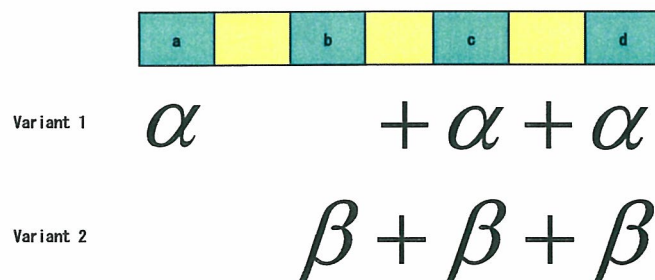


Copyright © NTT COMWARE 2007

1.1. 計算手順概要



Splicing Variantの種類によって、連立方程式を立てることが可能であると考えられる



Splicing Variantごとに各Exonを使う/使わないの情報とSplicing Variantの存在量が既知ならば、各Exonの存在量も分かる。逆に、各Exonの量が与えられた時に、使う/使わないの情報と、Splicing Variantの存在量も計算可能である。

Copyright © NTT COMWARE 2007

1.1. 計算手順概要



観測結果は、モデルと誤差項の組み合わせであると考える

Exon量の観測値

観測誤差項

$$e_a = \alpha + \sigma_a$$

$$e_b = \beta + \sigma_b$$

$$e_c = \alpha + \beta + \sigma_c$$

$$e_d = \alpha + \beta + \sigma_d$$

$$AIC = -2(\text{最大対数尤度}) + 2(\text{パラメータ数})$$

組合せの全パターンに対して、AIC(赤池情報量規準)を計算し、最も小さいAICとなるパターンを採用する。全パターンを計算しつくすのは、膨大な計算時間が必要となるので、バリエーション数を制限する。

Copyright © NTT COMWARE 2007

1.1. 計算手順概要



n 種類のバリエーションが存在する遺伝子であると仮定する。LiverとBrainにおいて各々違う比率で発生していると仮定する。エクソン数が m 個であるとして数式をたてる。

$$\begin{pmatrix} \beta_{11} & \beta_{12} & \cdots & \beta_{1n} \\ \beta_{21} & \beta_{22} & & \beta_{2n} \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ \beta_{m1} & \beta_{m2} & \cdots & \beta_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_m \end{pmatrix}$$

β_{ij} : 発現パターン係数:0か1の値

x_j : 発現量

y_i : 発現観測量

ε_i : 発現観測誤差量

Copyright © NTT COMWARE 2007

1.1. 計算手順概要



LiverとBrainを同時に式に与え、複雑な式になるものを行列として表現する。

$$\begin{pmatrix} \beta_{11} & \beta_{12} & \cdots & \beta_{1n} \\ \beta_{21} & \beta_{22} & & \beta_{2n} \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ \beta_{m1} & \beta_{m2} & \cdots & \beta_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_{L1} \\ x_{L2} \\ \vdots \\ x_{Ln} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_{L1} \\ \varepsilon_{L2} \\ \vdots \\ \varepsilon_{Lm} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} y_{L1} \\ y_{L2} \\ \vdots \\ y_{Lm} \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} \beta_{11} & \beta_{12} & \cdots & \beta_{1n} \\ \beta_{21} & \beta_{22} & & \beta_{2n} \\ \vdots & & \ddots & \vdots \\ \beta_{m1} & \beta_{m2} & \cdots & \beta_{mn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_{B1} \\ x_{B2} \\ \vdots \\ x_{Bn} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \varepsilon_{B1} \\ \varepsilon_{B2} \\ \vdots \\ \varepsilon_{Bm} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} y_{B1} \\ y_{B2} \\ \vdots \\ y_{Bm} \end{pmatrix}$$

$\mathbf{B} \cdot \mathbf{x}_L + \boldsymbol{\varepsilon}_L = \mathbf{y}_L$
 $\mathbf{B} \cdot \mathbf{x}_B + \boldsymbol{\varepsilon}_B = \mathbf{y}_B$

$$\begin{pmatrix} \mathbf{B} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{B} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{x}_L \\ \mathbf{x}_B \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \boldsymbol{\varepsilon}_L \\ \boldsymbol{\varepsilon}_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{y}_L \\ \mathbf{y}_B \end{pmatrix}$$

Copyright © NTT COMWARE 2007

1.1. 計算手順概要



LiverとBrain、更にMixtureも考慮した式を作成する。

$$\begin{pmatrix} \mathbf{I} & \mathbf{0} \\ 0.8 \cdot \mathbf{I} & 0.2 \cdot \mathbf{I} \\ 0.6 \cdot \mathbf{I} & 0.4 \cdot \mathbf{I} \\ 0.4 \cdot \mathbf{I} & 0.6 \cdot \mathbf{I} \\ 0.2 \cdot \mathbf{I} & 0.8 \cdot \mathbf{I} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{x}_L \\ \mathbf{x}_B \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \boldsymbol{\varepsilon}_L \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L2B2} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L6B4} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L4B6} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L2B8} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{y}_L \\ \mathbf{y}_{L2B2} \\ \mathbf{y}_{L6B4} \\ \mathbf{y}_{L4B6} \\ \mathbf{y}_{L2B8} \\ \mathbf{y}_B \end{pmatrix}$$

誤差項の二乗和を最小化する発言推定量が、その発現パターンに対する推定量であるとみなすことができる。

$$g(\mathbf{x}) = \begin{pmatrix} \boldsymbol{\varepsilon}_L \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L2B2} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L6B4} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L4B6} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L2B8} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_B \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \boldsymbol{\varepsilon}_L \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L2B2} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L6B4} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L4B6} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_{L2B8} \\ \boldsymbol{\varepsilon}_B \end{pmatrix}$$

Copyright © NTT COMWARE 2007