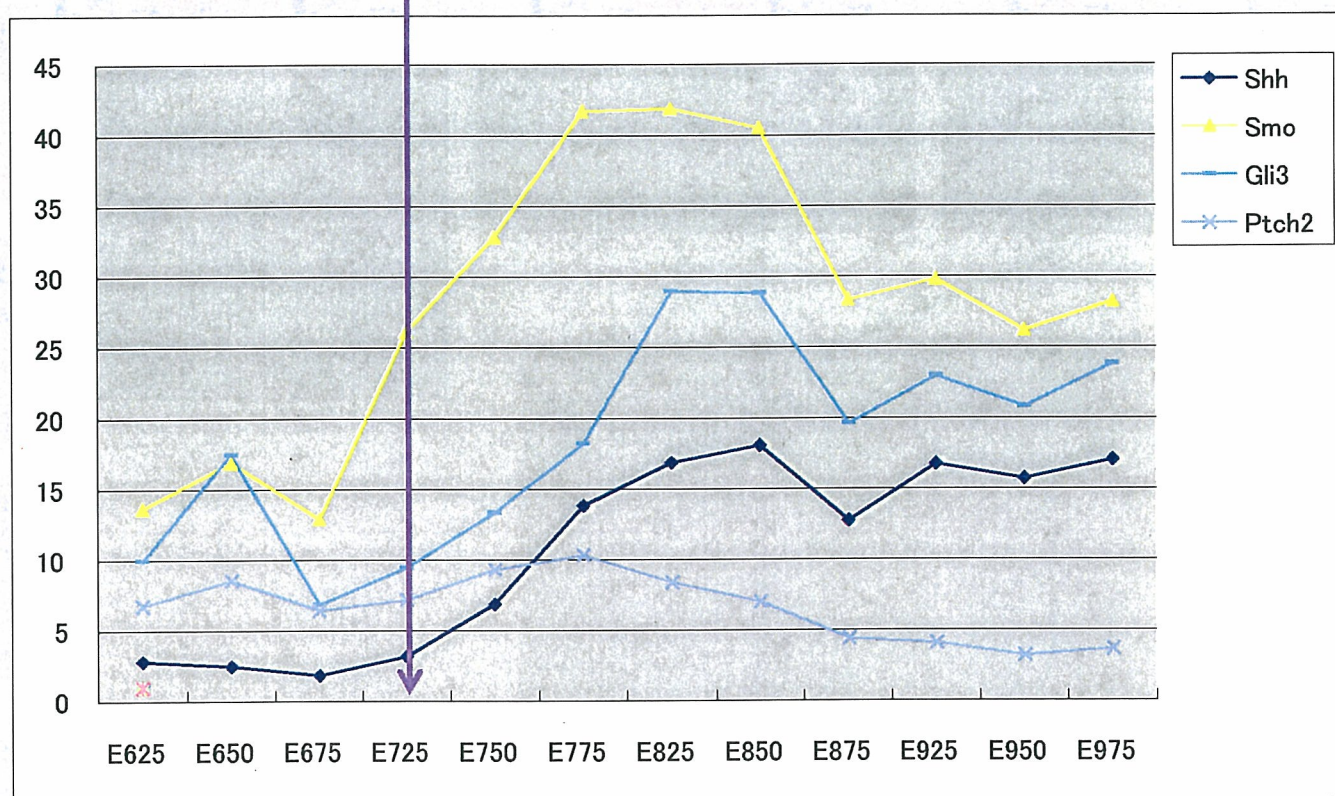


Shhシグナリング抑制, 発生毒性モデル物質: サイクロパミン

サイクロパミン単回経口投与

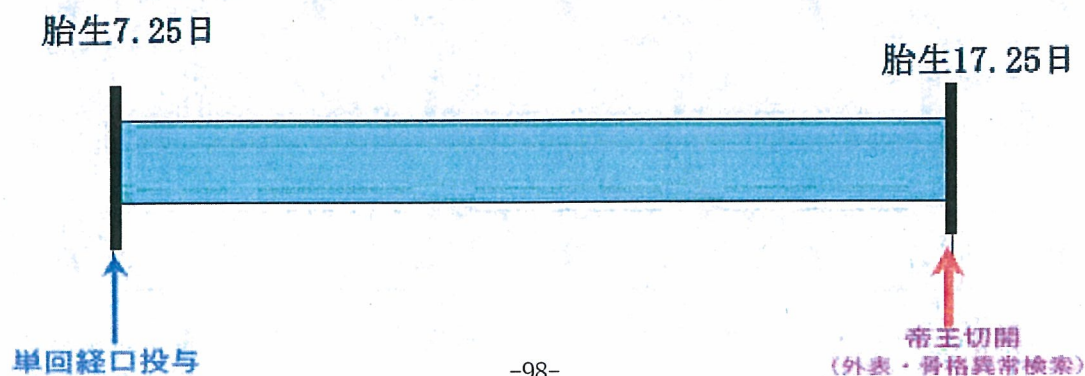


25

Shhシグナリング抑制, 発生毒性モデル物質: サイクロパミン

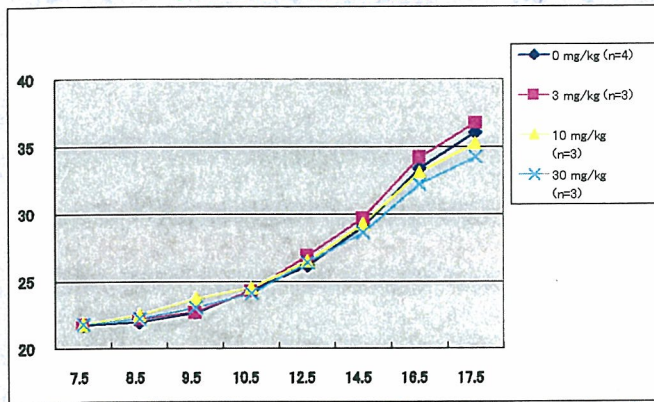
用量設定実験

- 動物 妊娠C57BL/6CrSlcマウス(日本エスエルシー)
- 投与物質 サイクロパミン (Cyclopamine) (LC laboratories社)
- 投与濃度 0, 3, 10, 30 mg/KgBW投与群[10 ml/kgBW]
- 溶媒: コーンオイル ☆ 70 mg/kgBW投与で妊娠マウス10匹中2匹死亡
- 投与経路 経口投与
- 1群: 3-5匹
- RNA用1サンプル = 1腹分の胎児のプール

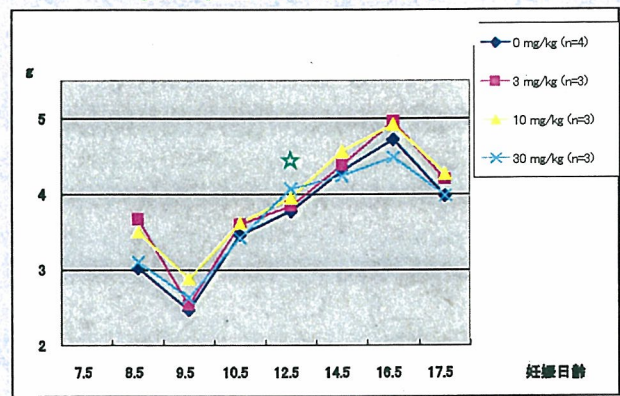


サイクロパミン 用量設定実験 一胎生7.25日単回経口投与→胎生17.25日で帝王切開一

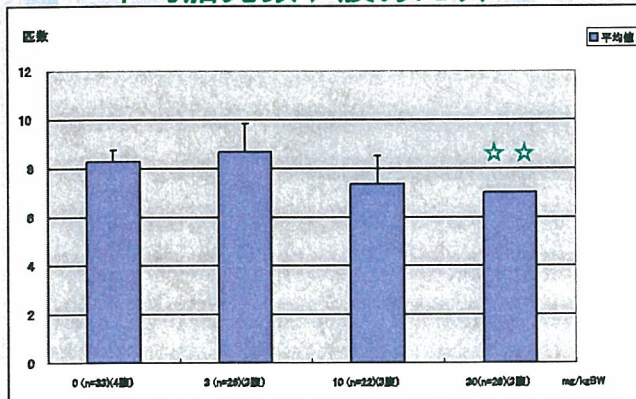
体重(妊娠動物)



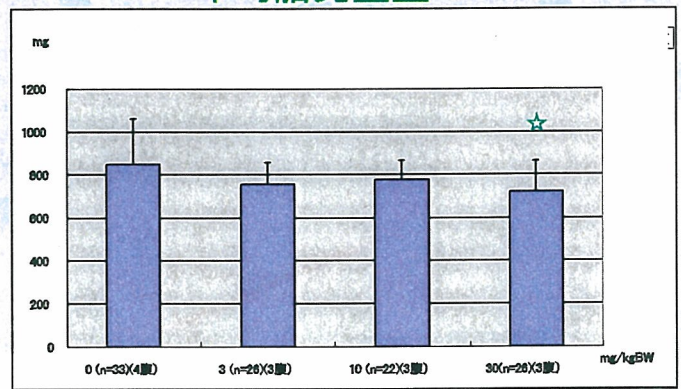
摂餌量(妊娠動物)



平均胎児数(1腹あたり)



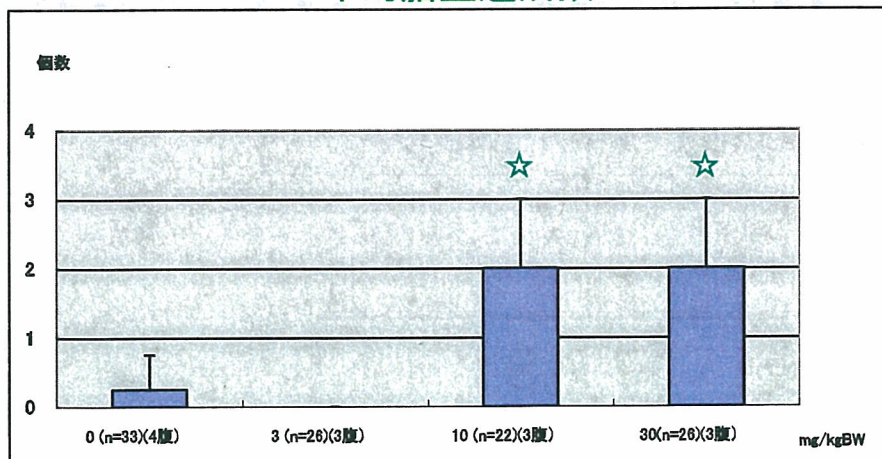
平均胎児重量



27

サイクロパミン 用量設定実験 一胎生7.25日単回経口投与→胎生17.25日で帝王切開一

平均胎盤遺残数



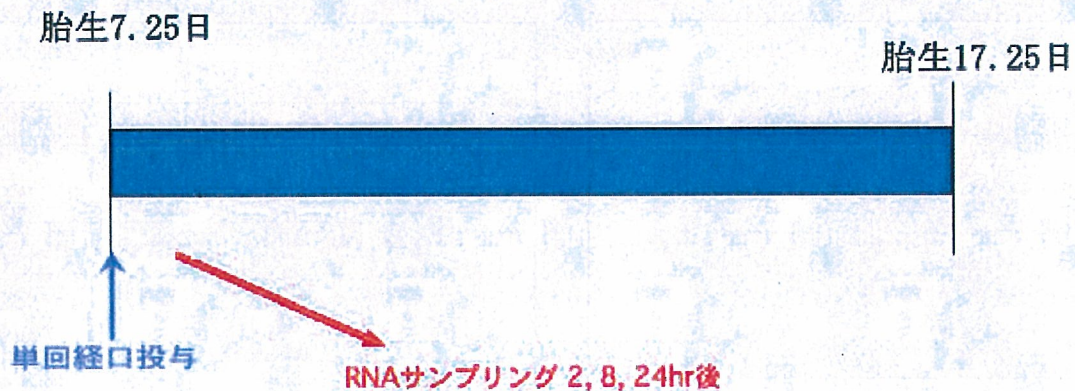
浸軟胎児

[30mg/kgサイクロパミン
投与群 胎児 計28匹中1匹]

QuickTime[®] C²
TIFFILZWÄj òLi&EvEçEOÉâÉÄ
Ç™Ç±ÇÄEsÉNE'ÉEÇ%â@ÇEÇzÇ¼Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇIÄB

遺伝子発現変動解析実験

- ・動物 妊娠C57BL/6CrSlcマウス(日本エスエルシー)
- ・投与物質 サイクロパミン (Cyclopamine) (LC laboratories社)
- ・投与濃度 0, 30 mg/KgBW投与群[10 ml/kgBW]
- ・溶媒: コーンオイル ☆ 70 mg/kgBW投与で妊娠マウス10匹中2匹死亡
- ・投与経路 経口投与
- ・1群: 3-5匹
- ・RNA用1サンプル = 1腹分の胎児のプール



31

妊娠マウスへのサイクロパミン(30 mg/kg)単回経口投与時の 胎児での遺伝子変動解析

- 対照群と投与群とで比較し，
- 1) どちらかの発現コピー数が2より大.
 - 2) t-testでのP値が0.05未満.
 - 3) 双方の平均値の比(投与/溶媒)が1.6より大



- ・投与 2時間後: 17 P.S.
- ・投与 8時間後: 23 P.S.
- ・投与24時間後: 213 P.S.

これからのストラテジー

「平成18年度」

- 1) [分子標的が明らかな催奇形性物質の使用]
 - ・サイクロパミン単回投与
- 2) [分子標的が不明だが種差が著しい催奇形性物質の使用]
 - ・サリドマイドおよびその代謝物単回投与
- 3) [in vitroの実験系の導入]
 - ・ES分化系[胚様体: EB形成]の利用(data base構築済み)

「平成19年度」

- 4) [分子標的が不明だがマウスにおける典型的な催奇形性物質の使用]
 - ・フェニトイン、バルプロ酸単回投与 [胎児ヒダントイン症候群]
- 5) [反復投与の検討]
- 6) [in vitroの実験系での催奇形性物質の適用]

「平成20年度」

- 7) [解析データから演繹される発生毒性分子カスケード探索]

31

謝辞

国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・毒性部

菅野 純

五十嵐 勝秀

相崎 健一

中津 則之

安東 朋子

安部 麻紀

松田 菜恵

生見 まり子

池野 絵里子

国立遺伝学研究所・
系統生物研究センター・発生工学研究室

相賀 裕美子

毒性試験指標と対比したデータ解析手法の確立
－ 造血系における生体異物応答モデルを用いた検討 －

分担研究者 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長

研究要旨

遺伝子発現に対して、DNA チップやマイクロアレイによる解析の与えるデータの、deterministic な性格と stochastic 且つ epigenetic な性格について、小規模の実験を遂行・参照しつつ、トキシコロジーエンドポイントとして導き出されるべき情報取得の電腦生物学的検討を行った。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。

A. 研究目的

本研究の目的は、トキシコジノミクスにおけるデータマイニングの為に必要な基本的問題を、年次計画をたてて、整理蓄積することである。

マイクロアレイ法は、1) 遺伝子の構造によって規定される deterministic な情報と、2) その発現の probabilistic な情報、即ち生体の外界との相互作用としての発生・成長・老化あるいは生体異物相互作用としての生体異物の反応性、の双方の情報を与えるものであり、全ゲノム解読の成果によって提供されることとなった究極的な生体異物応答解析手法のひとつである。

そこでは、生体異物応答の初期過程と終局過程とでは解析方法も異なり、後者が診断・予後などの認識に概念づけられる総じて deterministic な endpoint を提供するのに対して、前者は不確定な確率を基礎とする predictability を基礎情報として与えるなど、応用手段も異なってくる。本研究ではこれらに対して、小規模の実験を繰り返し、解析法の展望を明らかにすることを目的としてきた。

B. 研究方法

プラットフォームの異なる遺伝子発現解析手法を用い、マウスを中心に、無処置の個体の遺伝子発現の特徴を明らかにすると共に、加齢影響、チオレドキシン遺伝子改変動物など

を与条件とし、生理的酸素影響などに焦点をあてつつ、ベンゼンやMNUなどへの異物反応を参照し、特に造血系、造血前駆細胞並びに、造血幹細胞における遺伝子発現変化の特徴を明らかにし、目的に応じたバイオマーカーとしての robustness のある候補遺伝子の組み合わせの試行的な抽出と抽出法を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、野生型並びに人為的に遺伝子改変を施した種々の実験動物を駆使することで、関連の遺伝子発現を指標として、最小限の動物数をもって生体影響を的確に把握し、効果的に研究の目的を達成するよう実験を計画した。ここで用いられる実験動物の取扱いについては、世界保健機関が、動物を用いる生物医学研究のための国際指針を設けこれらに特段の配慮をするに至った動物愛護の問題に端を発した動物の福祉の観点にたつて、必要な動物の不安や苦痛の排除もしくは低減などへの配慮に努めることにも留意し、これを全面的に取り入れて研究を進めることとしている。

こうした視点は、かねてより厚生労働省が努力を傾けてきた課題でもあり、その所轄の国立研究機関としての国立医薬品食品衛生研究所における責任の上からも、各研究者にその精神の理解と遵守を求めていくことの重要性に鑑みて、研究班内でも必要な小委員会を設置するなど、定められた動物実験指針に基づ

いて研究を遂行すべく、その趣旨説明などを実施し、もって動物実験に関する倫理面への配慮に努める方針としている。尚本研究には、①ヒトの遺伝子解析研究、②相手方の同意・協力や社会的コンセンサスを必要とする研究課題又はアンケート調査等を行う研究課題、③生命倫理・安全対策に関して留意すべき研究は、これを含まない。

C. 研究結果

デンドログラムによる遺伝子発現の解析

異なった遺伝子発現の予想される2群、ここでは2M 齢と21M 齢の性質の違い、を明らかにしようとする際に、しばしば用いられるデンドログラムによる解析を行ったものが図1である。左の4レーンと、その隣の4レーンはそれぞれ2M 齢と21M 齢の骨髓由来であり、両者はデンドログラムで双方にわかれたものの明瞭なパターンの差異は目視し得ない。このことは、右端の2レーンのうち右が21M 齢由来、左が2M 齢由来であるにも関わらず、それぞれのカウンターパートのグループのデンドログラムとリンクしていることにも反映されている。老化は、大部分の遺伝子の発現で見る限り、2M 齢と21M 齢を明確に区別するものではない。この点が、本研究の原点である。

Line configuration による個々の遺伝子発現の加齢による違い

図1のような結果が認められるにもかかわらず、個々の遺伝子の発現を、各々のマウスにおける遺伝子発現強度の順に、同一遺伝子を連結させて、線図を描かせると、遺伝子の発現順位は、2M 群と21M 群間で主旨逆転して認められる(省略)。さらに、2M 齢の骨髓由来の遺伝子発現は、21M 齢のそれに比べて遺伝子群の発現強度のレンジが、前者で振幅が狭小であり、后者で広幅であるのみならず、后者では各々の個体間でも相互に個体間の差異が見て取れる。即ち、加齢により、gene expression は若年個体と発現の逆転する遺伝

子群の存在と、発現強度の個体差の拡大とが示唆される。

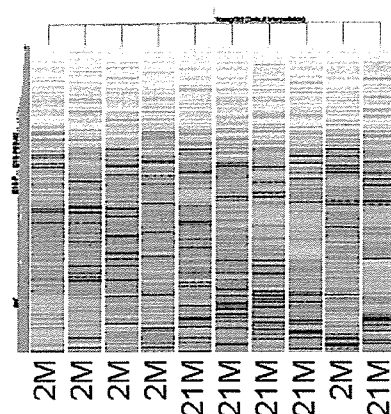


図1 2M 齢と21M 齢のマウス各5匹から採取した骨髓細胞におけるマイクロアレイ解析のデンドログラム表示

加齢のひきおこす遺伝子発現プロファイリングの分別

要因解析によれば、83.5%の contribution を示す主要な第1component では先のデンドログラムが示唆したとおり、両者に顕著な差異が見られないだけでなく、それぞれの群間での個体差も乏しい。しかし、その他の component のなかには、第2 component のように contribution そのものは2.4%に過ぎないが、2M 齢個体群と21M 齢個体群の eigenvector 値の明らかな違いを表現するものも見出される。その他、両者で幅広い eigenvector 値の分布の広がり示す component (1.8%)も含まれていた。これを3次元の分布に表現すると、2M 齢の遺伝子発現と21M 齢の遺伝子発現は、第2component 軸(縦軸)で分離され、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。この結果は、同一材料による別のプラットフォームで検索した結果でも分別 component はことなるものの、分別パターンはほぼ同様の結果であった(詳細は省略)。

分別責任遺伝子群の抽出

両者の分別に contribute した遺伝子を検討した。発現遺伝子全体における各々の遺伝子の機能分布と、先の分別コンポーネントに関

与する遺伝子での機能分布の差から求められた遺伝子の性質を、今分析中である。なかには、response to pathologic bacteria や defense response to pathogenic bacteria、あるいは、positive and/or negative regulation of inflammation response 等を含む多数の外来異物応答遺伝子の発現が含まれている。

D. 考察

マイクロアレイ情報の解析は、今、図2のような碁盤の目の右下から始まって、左上にいたる、種々の経路をとって、発がんなり、死なりの終局的 endpoint (病理学的エンドポイント) に至る生体異物応答を想定すると、toxicology endpoint では、様々に予想される確率論的な経路の中間点における先々の時点でのリスクを predict する作業を意味している。

前者の deterministic endpoint が終局的にいくつかの限られた遺伝子変化に収束し、診断的価値を持つのに対して、後者の toxicology endpoint では共通性が乏しいか、むしろ共通性のない、様々な経路を得た cluster 群の diversity として表現される運命にある。この diverse した cluster 群の解析が重要なのであるが、ここで生じる cluster 化は、stochastic diversity であり、個体差とは似て非なるものである。つまり同じ実験を繰り返したならば、そこでは同じ case でありながら別の値を取っていたかも知れず(probabilistic)、また実験回数を増やしても CV 値は一般に小さくならず一定の範囲に収束する(他方、個体差の方は、同じ実験が繰り返されたならば近似値が得られ、また繰り返すならば一般に CV 値は小さくなると考えられている)。そこで明らかになる点は、ここでは統計的 normalization がしばしばあまり現実的でなく、むしろ虚像に近い統計値を与える結果となるので注意を要するということである。これを実体に則して分析するためには、unsupervised に、遺伝子相互の機能を相殺させることなく autoclassify させたり、大容量要因

解析(SPSS)などの手法により多元次元の autoclusterization をさせる、といった手法をとることが肝要である。このために用いる方法は、どのような方法でもよいと思われるが、デンドログラム解析だけは deterministic な endpoint の解析にとどめるべきである。

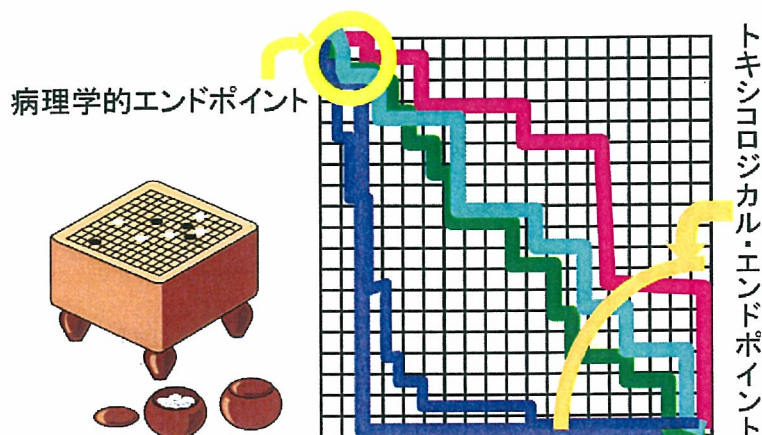


図 2 トキシコロジカル・エンドポイントと病理学的エンドポイント

E. 結論

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 歳の遺伝子発現と 21M 歳の遺伝子発現は、2M 歳のそれは比較的隣接し、21M 歳のそれは拡散傾向をもって広く分布していた。

F. 健康危惧情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著

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.

Yoshida K, Hirabayashi Y, Watanabe F, Sado T, Inoue T. Caloric restriction prevents radiation-induced myeloid leukemia in C3H/HeMs mice and inversely increases incidence of tumor-free death: implications in changes in number of hemopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 34:274-283, 2006.

2) 総説・著書など

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.* 2006;114:420-429.

井上 達 (2006)新しい視点から見たトキシコロジー ―発生・成長・老化―. *J Toxicol Sci.* 31, app 69-73.

2. 学会発表

Inoue T: Effect of endocrine disruptors on health: possible underlying mechanistic background of low-dose and synergistic actions. Weybridge+10 Workshop “Impacts of Endocrine Disruptors (2006. 11.10) [Helsinki, Finland, Meeting abstract, 7: 2006]

Inoue T, Yoon BI, Igarashi K, Kanno J, Yodoi J, Hirabayashi Y Global Gene-Expression Profiling of Steady-State Mice Carrying A Graded Dosage of Trx-Gene Elucidate Major Principal Gene-Component for the ROS-removal and for Trx-Dependent Anti-Oxidative Stress. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006.6.23) [Kyoto, Meeting abstract pp 797]

Inoue T: Summary and Future Directions “Regulation of hematopoiesis”.

Pathophysiology & Molecular Biology of Hematopoiesis, Malignancy & Radiation Response “International Symposium in Memory of Eugene P. Cronkite, M.D.” (2006.5.12) [Brookhaven National Laboratory, NY, No abstract]

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

該当しない。

2. 実用新案登録

該当しない。

3. その他

該当しない。

MHLW-Toxicogenomics Project for Chemical Safety

[KANNO Project]

November 17, 2006

Toxicogenomics in the Hemopoietic System

「毒性試験指標と対比したデータ解析手法の確立
—造血系における生体異物応答モデルを用いた検討」

Tohru Inoue, MD, PhD
Center for Biological Safety & Research
National Institute of Health Sciences

Aim of Research

研究の目的

トキシコジノミクスにおける
発現データ解析手法を確立
するための検討を行い、
これに基づく基本データを
年次計画をたてて、蓄積する。

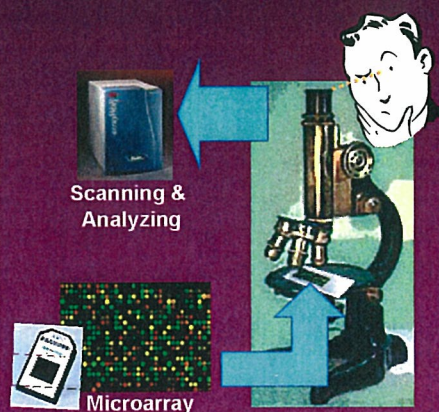
Introduction

Image of "Toxicogenomics"

a **Molecular microscope** [分子顕微鏡]
[gene-expression microscopy]

Toxicogenomics

Deductive, Diagnostic
& Predictive
or
Inductive, Analytical
& Mechanistic



Methodologies

To what the transcriptomics exhibits

Genetic
determinism

Genetic information

Probabilistic
uncertainty

Epigenetic information

遺伝学的な決定論的情報

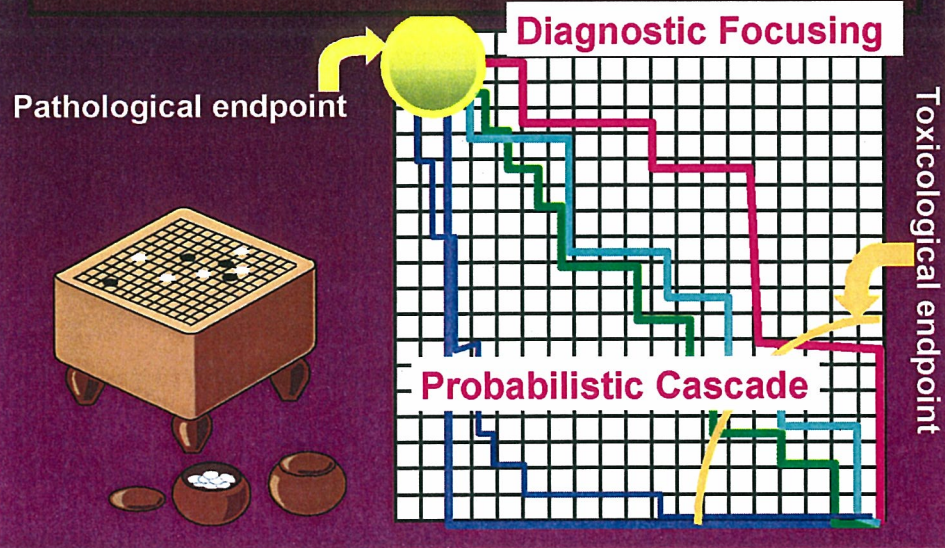
- 薬物代謝酵素の個体差 (SNPs など)
- 初期胚分化の個体情報

確率論的非遺伝学的発現情報

- 非決定論的エピジェネティック拡散情報
- 確率論的ケース・バリエーション

Methodologies

Pathological endpoint vs. Toxicological endpoint in genomics

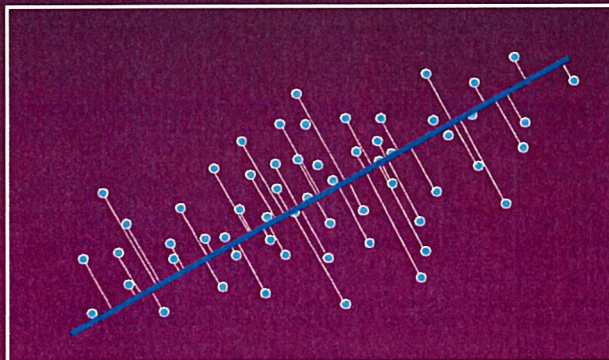


Methodologies

Data analysis for gene expression from multi-dimension :

Reducing a dimension?

Ex. Least square linear regression



Methodologics

有用情報は強いシグナルとは限らない！
3万次元のすべてのデータをデータ処理に生かす



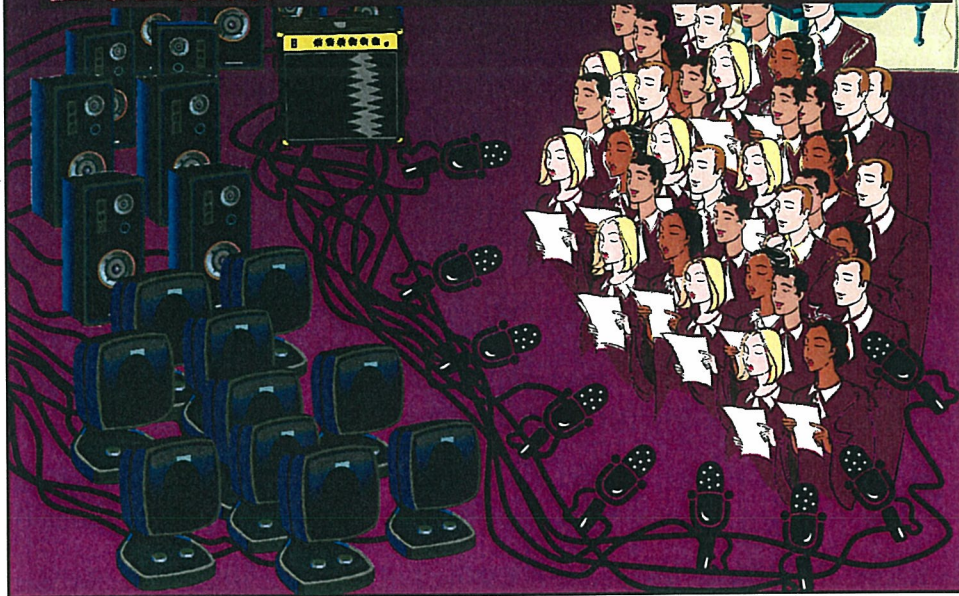
Methodologics

背景：データ処理
2次元×ベクトル強度で分析する無理



Methodologies

主要因解析、オートクラス、SPSS などの利用

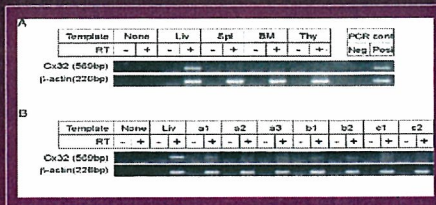


Problematic issue

**Blood cells and
Stem cell profiling**

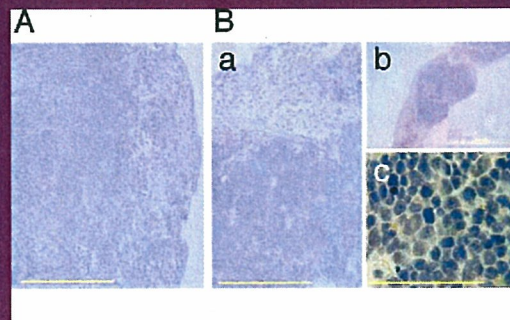
Problematic issue

造血幹細胞にのみ発現するコネクシン32



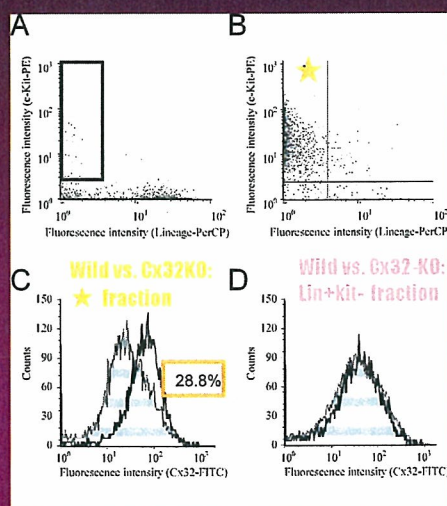
←脾コロニーにのみ見られるコネクシン32の発現。分画なしの骨髓細胞全体では、発現は、検出できない。

→脾コロニーに見られる、コネクシン32の発現。



Problematic issue

Expression of Cx32



- Question: Does any Cxs function in the hematopoietic system?
- Cx32: Only member of connexin family expressed in the hematopoietic stem cells

★ a $\text{lin}^- \text{c-kit}^+$ hematopoietic stem cell fraction ★, was 106 times enriched as compared with the rectangular area in Fig. A.

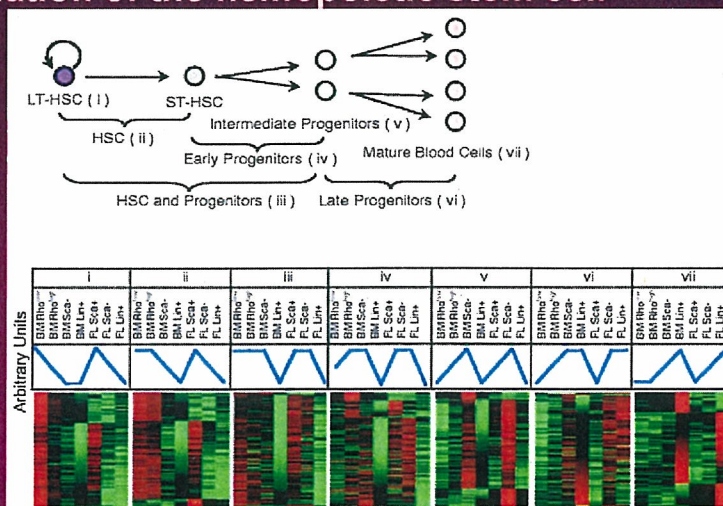
A 28.8% of $\text{lin}^- \text{c-kit}^+$ HSC fraction is Cx32-positive.

Problematic issue

Stem cell profiling

Problematic issue

Database for the hemopoietic stem cell -Fractionation of the hemopoietic stem cell-



Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, Ivanova N, Mahan MA, Deanehan JK, Moore KA, Overton GC, Lemischka IR: Science 288: 1635 1640, 2000

Strategic computational biology

A. Diversity of gene expression in references:
from each individual animals based on the
stochastic & probabilistic biological process.

B. Biological component analysis:
focusing **a weak expression** based on
the “computational biology”

C. Pitfall in statistical clustering analysis:
multi-dimensional data-based autoclasis

Today's talk

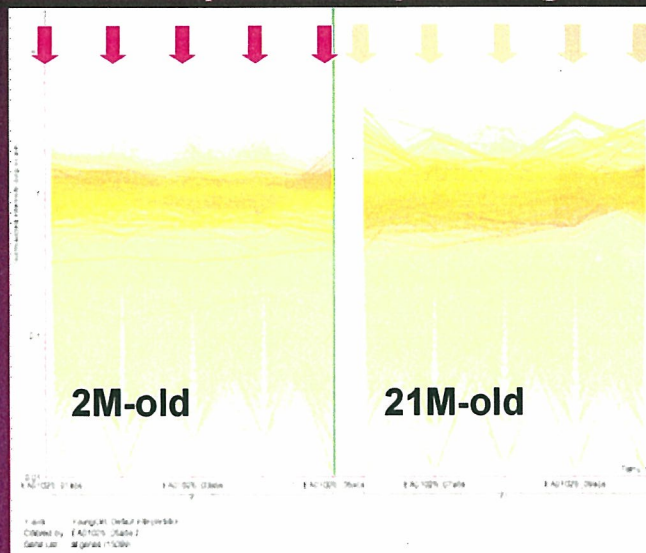
Epigenetics in ageing

Epigenetics in ageing

Individual differences diverse with aging - Probabilistic expression profiling

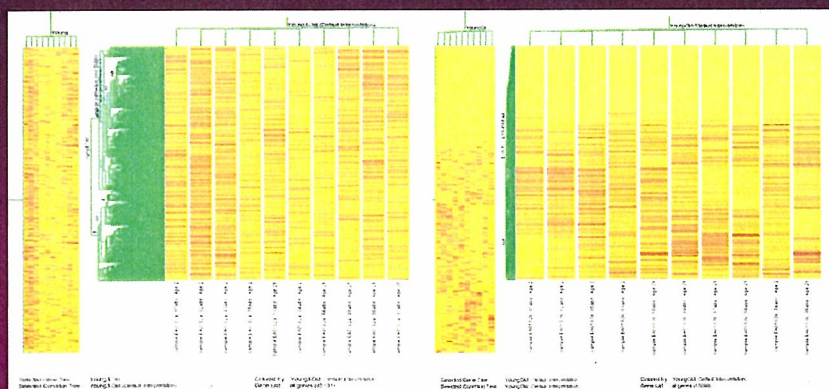
C3H/He, male:

Age-related
stochastic and
diverse profiling



Epigenetics in ageing

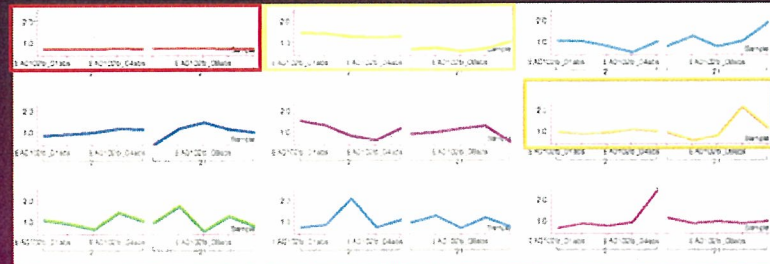
Individual differences diverse with aging - Probabilistic expression profiling



Young vs. Old: tree analysis using M430_2 chip

Epigenetics in ageing

Individual differences diverse with aging - Probabilistic expression profiling

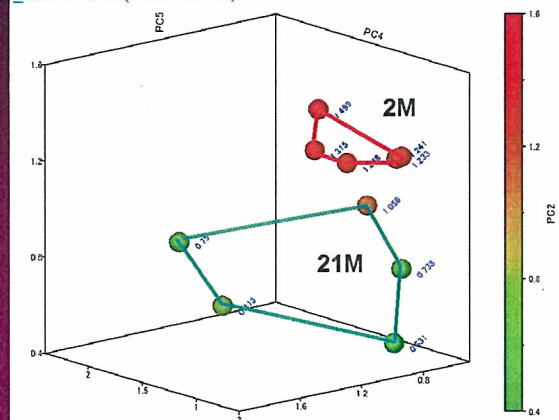


U74Av2	Principal component #1	Principal component #2	Principal component #3	Principal component #4	Principal component #5	Principal component #6	Principal component #7	Principal component #8	Principal component #9
	83.54%	2.38%	1.94%	1.91%	1.82%	1.83%	1.75%	1.69%	1.60%
	83.54%	85.92%	87.86%	89.77%	91.60%	93.42%	95.17%	96.86%	98.49%
Sample EA0102b_01.0bs, Age 2	0.73%	1.44%	1.09%	0.85%	1.53%	0.97%	1.03%	0.74%	0.70%
Sample EA0102b_02.0bs, Age 2	0.72%	1.44%	1.07%	0.91%	1.33%	0.90%	0.91%	0.56%	0.89%
Sample EA0102b_03.0bs, Age 2	0.72%	1.27%	0.82%	1.02%	0.84%	0.95%	0.66%	2.06%	0.78%
Sample EA0102b_04.0bs, Age 2	0.73%	1.22%	0.54%	1.19%	0.62%	1.09%	1.44%	0.75%	0.95%
Sample EA0102b_05.0bs, Age 2	0.71%	1.26%	1.04%	1.18%	1.19%	0.93%	1.03%	1.10%	2.32%
Sample EA0102b_06.0bs, Age 2	0.74%	0.64%	0.83%	0.42%	0.93%	0.54%	0.50%	0.92%	1.15%
Sample EA0102b_07.0bs, Age 2	0.73%	0.73%	1.23%	1.19%	0.99%	0.56%	1.75%	1.49%	0.82%
Sample EA0102b_08.0bs, Age 2	0.73%	0.61%	0.75%	1.48%	1.17%	0.80%	0.83%	0.72%	0.97%
Sample EA0102b_09.0bs, Age 2	0.72%	0.70%	1.07%	1.14%	1.26%	2.14%	1.25%	1.30%	0.90%
Sample EA0102b_10.0bs, Age 2	0.73%	1.01%	1.91%	1.01%	0.59%	1.15%	0.81%	0.78%	0.97%

Epigenetics in ageing

Individual differences diverse with ageing - Probabilistic expression profiling

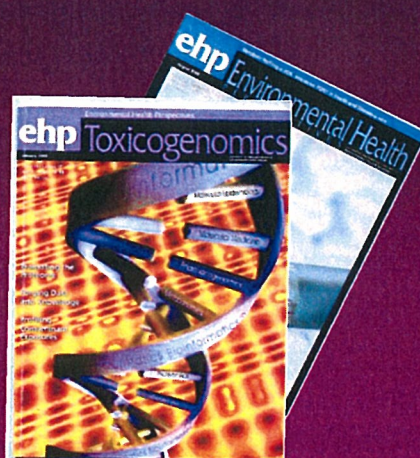
M430_2/2M vs. 21M (PC2/PC4/PC5)



Conclusion

1. トキシコジノミクス手法による遺伝子発現情報は、生体異物応答の基本情報を含む究極的な表現形であり、旧来の試験法で用いた種々の情報は、エピジェネティック情報を含めて、捕捉される性質を持っている
2. そのための結果の運用法の開発が重要である。
3. 安全性の標的指標の開発が期待される。

FIN



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

分担研究者 漆谷 徹郎 同志社女子大学 薬学部 教授

研究要旨

本研究は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、主に消化管粘膜における酸化ストレスシグナルを解析しようとするものである。DSS 腸炎モデルにおいて 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かった。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る。そこで、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望まれた。

A. 研究目的

本研究の目的は、消化管粘膜に注目し、細胞のストレス応答に関係する細胞内情報伝達系を解析することにある。このため、ストレス応答の鍵となる遺伝子を欠損したマウスの遺伝子発現応答を正常マウスのそれと比較することによって、当該遺伝子の下流のシグナルを一気に解明しようとするものである。

本研究で注目している分子 ASK1 は、各種のストレスやサイトカインのシグナルを受けてこれを生存側かアポトーシス側に振り分ける鍵となるキナーゼである。細胞がストレスを受けたとき、ある程度まではこれを解消して生き延びようとする機構を働かせるが、ある程度以上の障害を受けると、アポトーシスの形で積極的に死を選ぶ、という防御機構が生体には備わっている。毒性物質や病態によって生じる細胞死の機構解明には、最も重要な分子の一つといえよう。現在、ASK1 のノックアウトマウスが作成されており、この分野の研究が進んでいる。このマウスは、通常に誕生・成熟し、生殖能力にも殆ど問題がなく、正常な状態では ASK1 は殆ど重要な働きをしていないことが分かる。言い換えれば、正常な発生・分化に伴うアポトーシスには、この酵素活性は寄与していないか、他の分子で代替されるといえる。しかしポリグ

ルタミン病モデルマウスや SOD 変異による ALS モデルマウスの神経変性が、ASK1 欠損によって軽減されることである。従って、少なくとも ER ストレスによる神経変性疾患の発症には ASK1 が重要な役割を果たしていることが想像できる。

更に、種々の実験から、ASK1 がチオレドキシンをセンサーとして酸化ストレス応答を受容し、以後のストレス応答を制御していることが明らかとなっている。近年の研究から、種々の物質の毒性発現機序が、酸化ストレスに関係していることが分かってきており、毒性パスイエとして最も重要なものの一つと考えられるに至っている。この鍵分子のあるなしの状態、それ以降の応答を比較できれば、毒性シグナルの解明に大きく寄与することが期待される。

これまでの研究において以下のような成果が得られている。

1. 肝臓および脳における遺伝子発現には野生型と ASK1 ノックアウトマウス間で大きな差は見られず、生体にストレス負荷がかかっていない状態では、ASK1 の関与は小さいと考えられた。
2. 酸化ストレスを誘発する毒性物質である MPTP を投与したマウスの肝臓、脳の両組織において、GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析により、発現の変化する遺伝子が多数抽出できた。また、