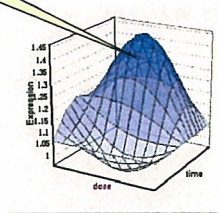


Average Drifting Pattern throughout 45000 probe sets

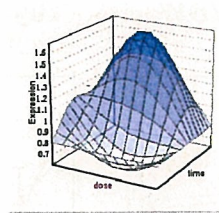
Spleenでは6hr peakが多い

spleen

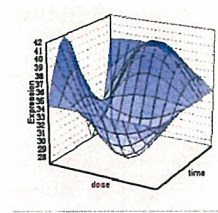
Mean



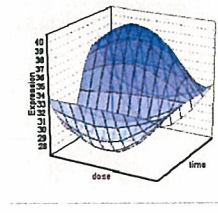
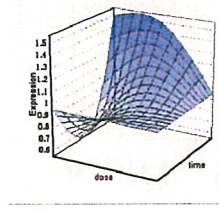
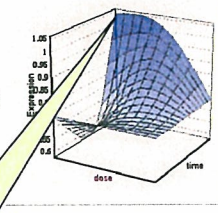
Norm



%CV mean



thymus

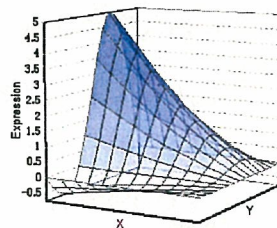


thymusでは24hr peakが多い

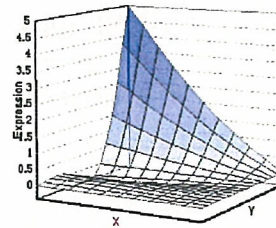
Templates for pattern matching by MF CMF2

これらのパターンに似た発現を呈する遺伝子を抽出した

6HML TSF

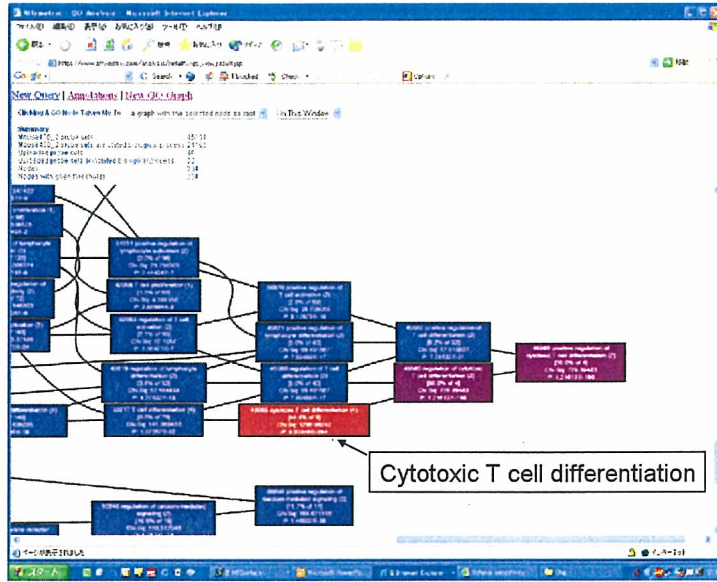


24HML TSF

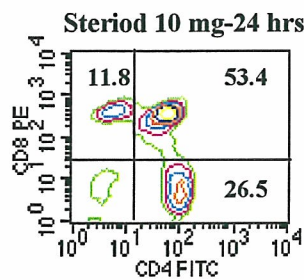
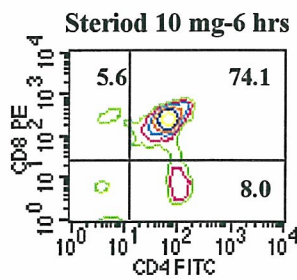
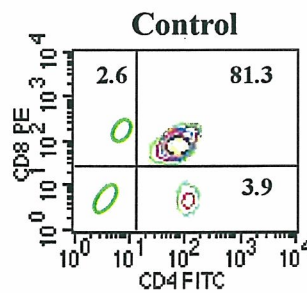


Gene ontology analysis

- Thymus 10mg/kg 6hr

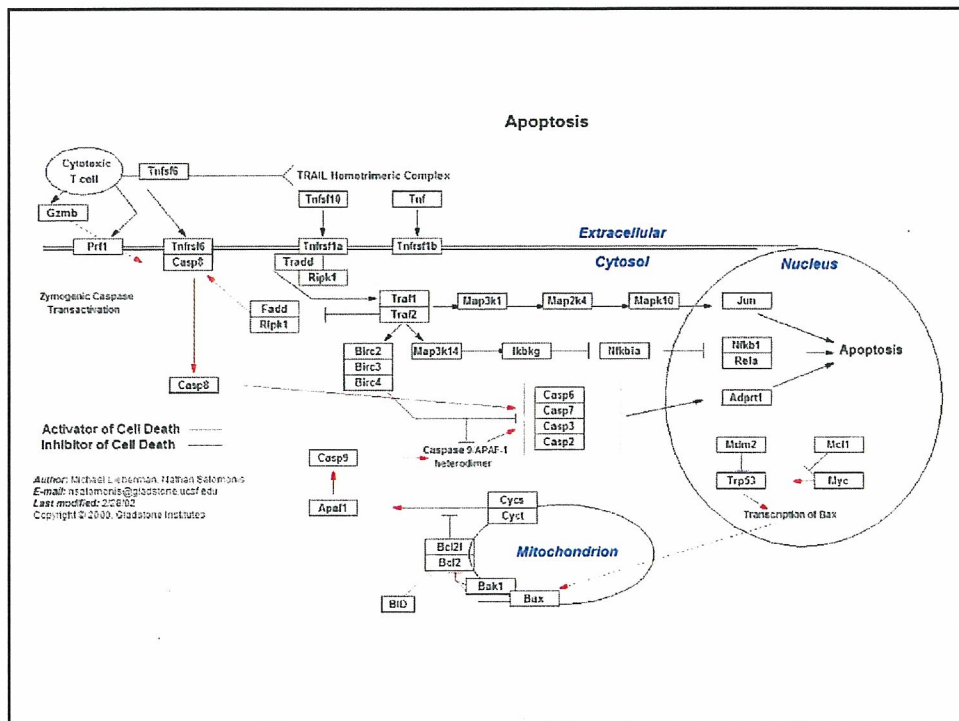
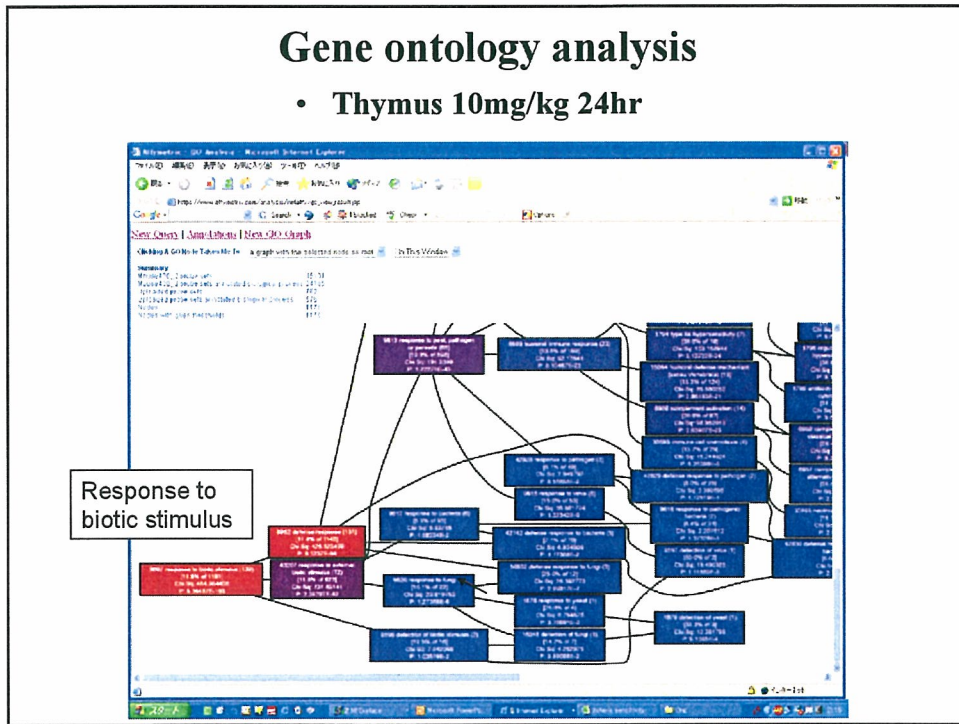


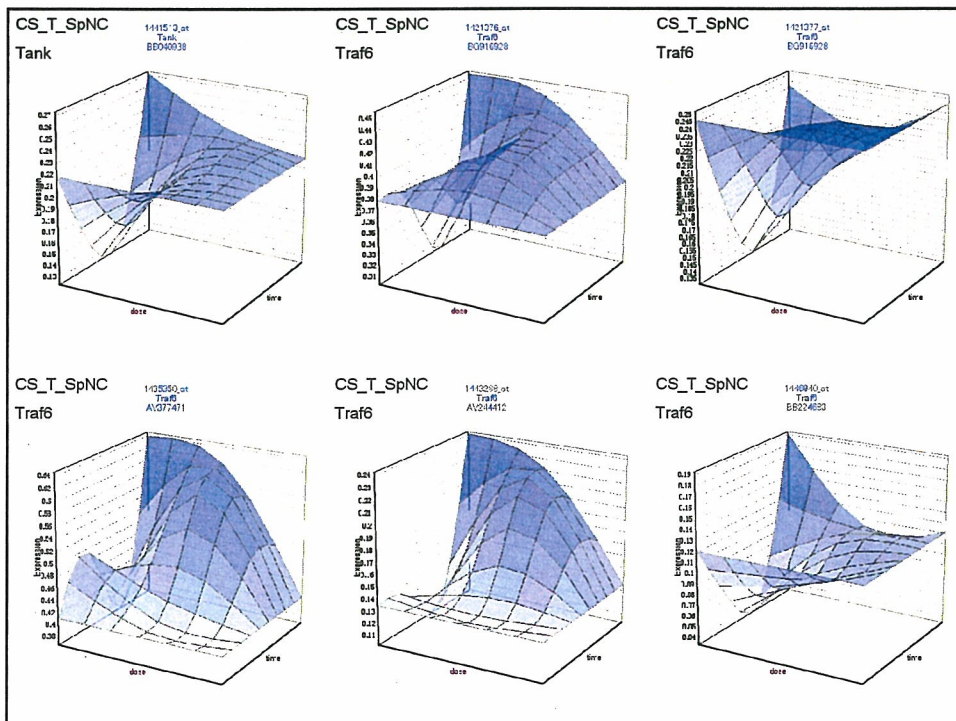
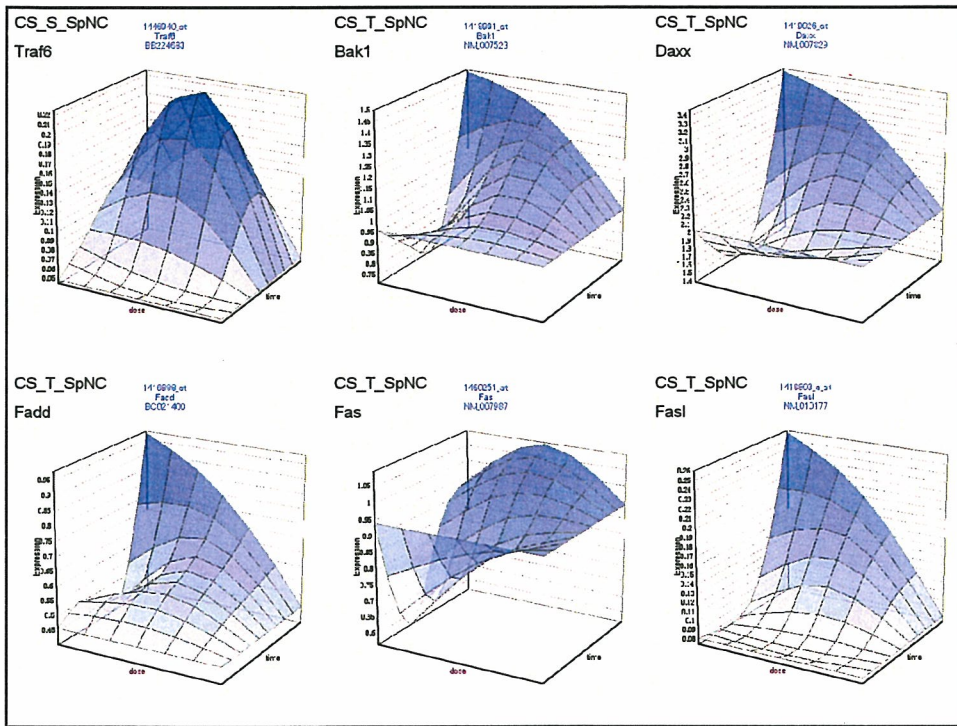
CD4/8 ratio of the thymus

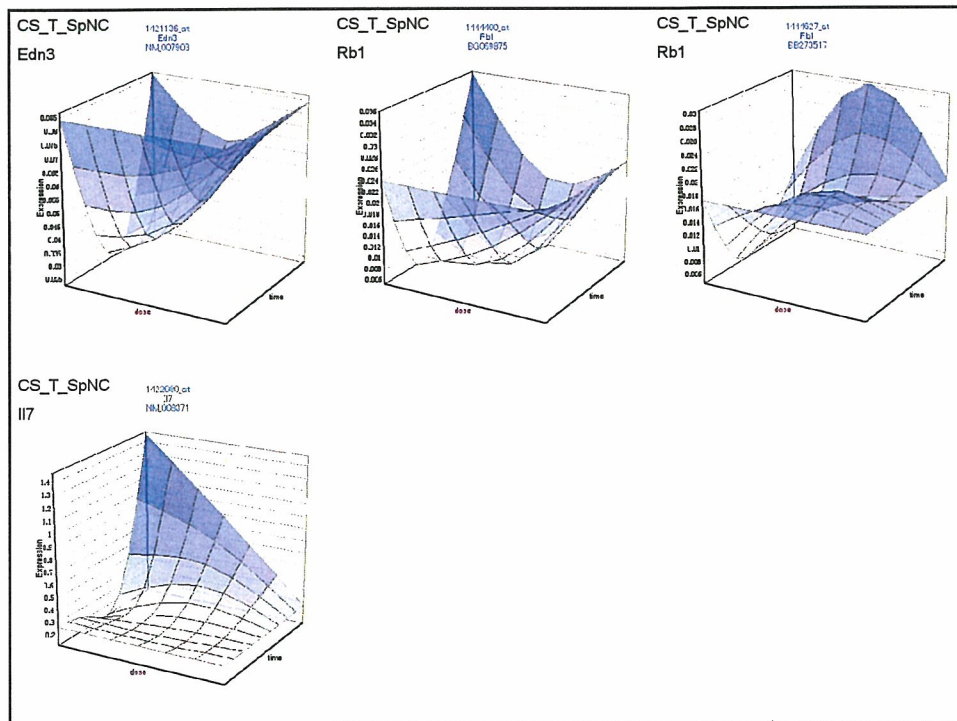
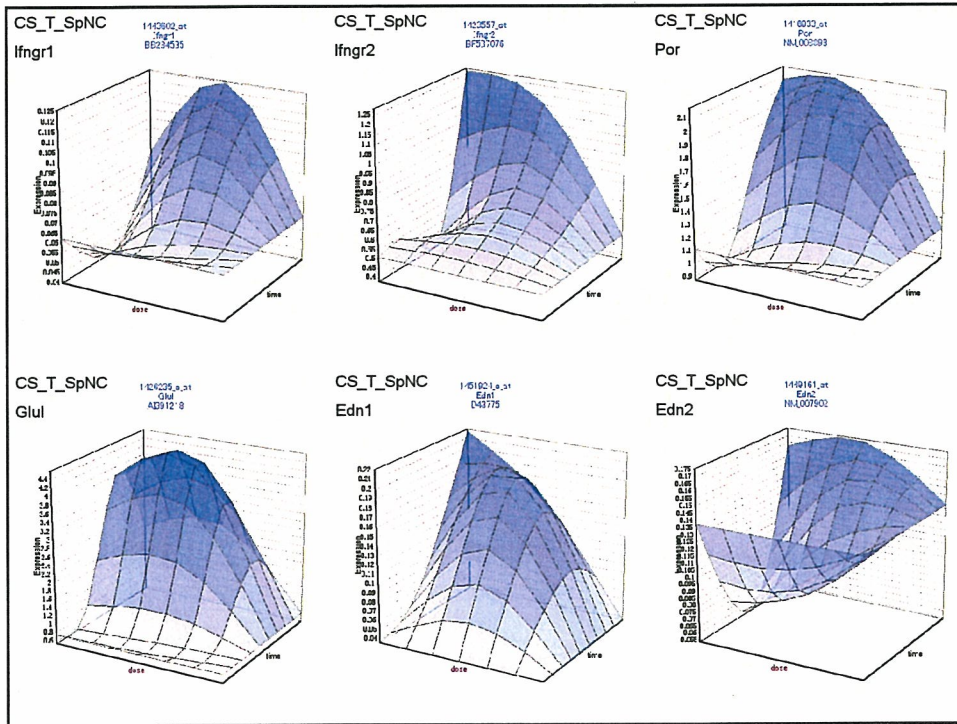


Gene ontology analysis

- Thymus 10mg/kg 24hr

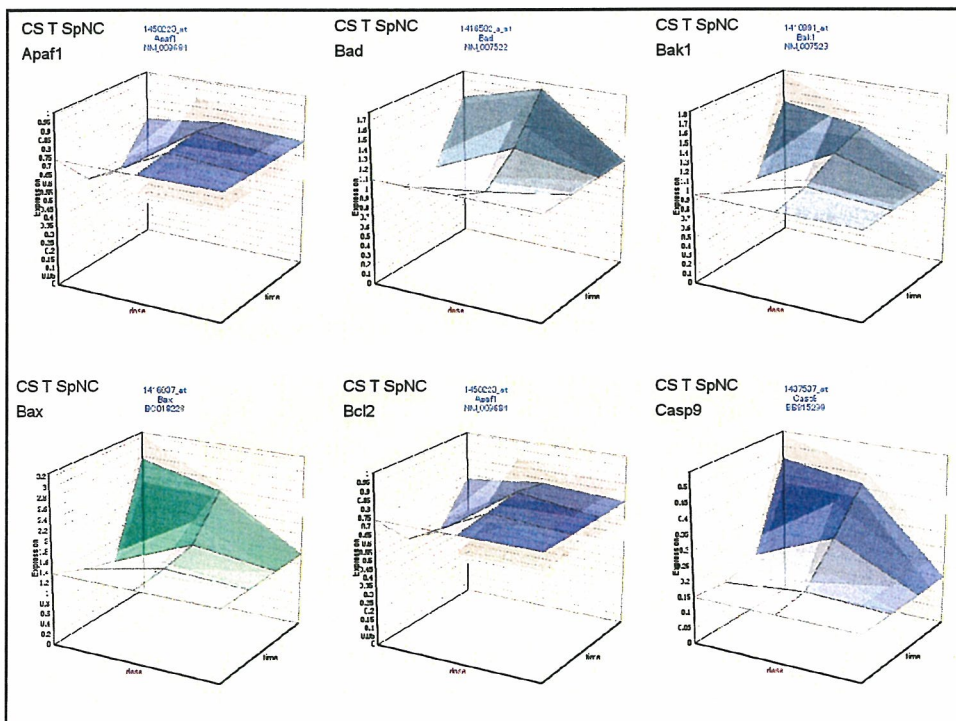


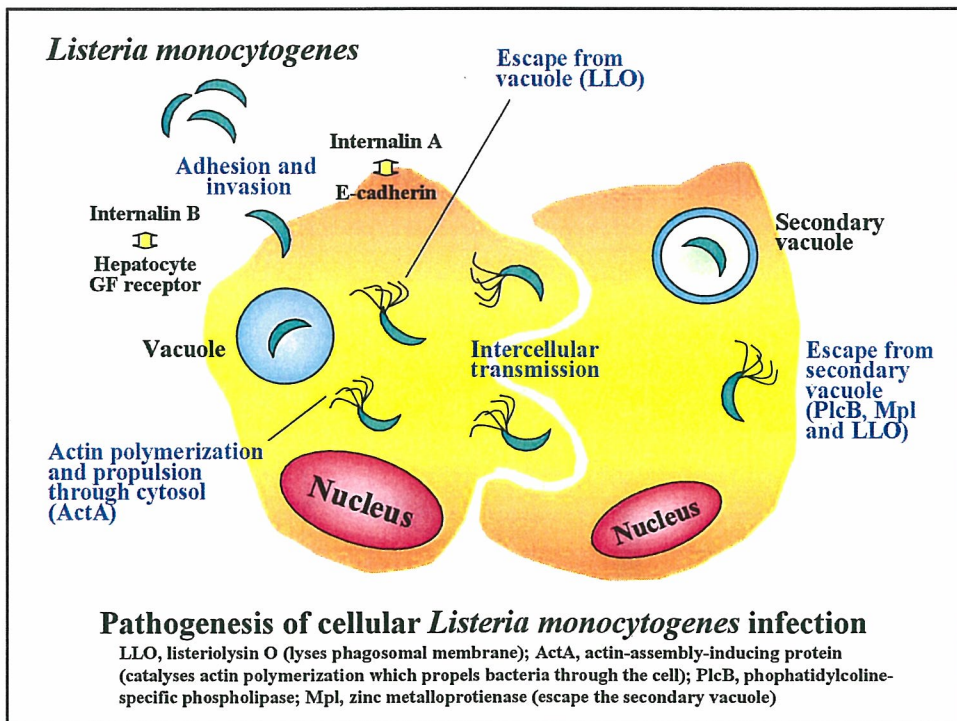
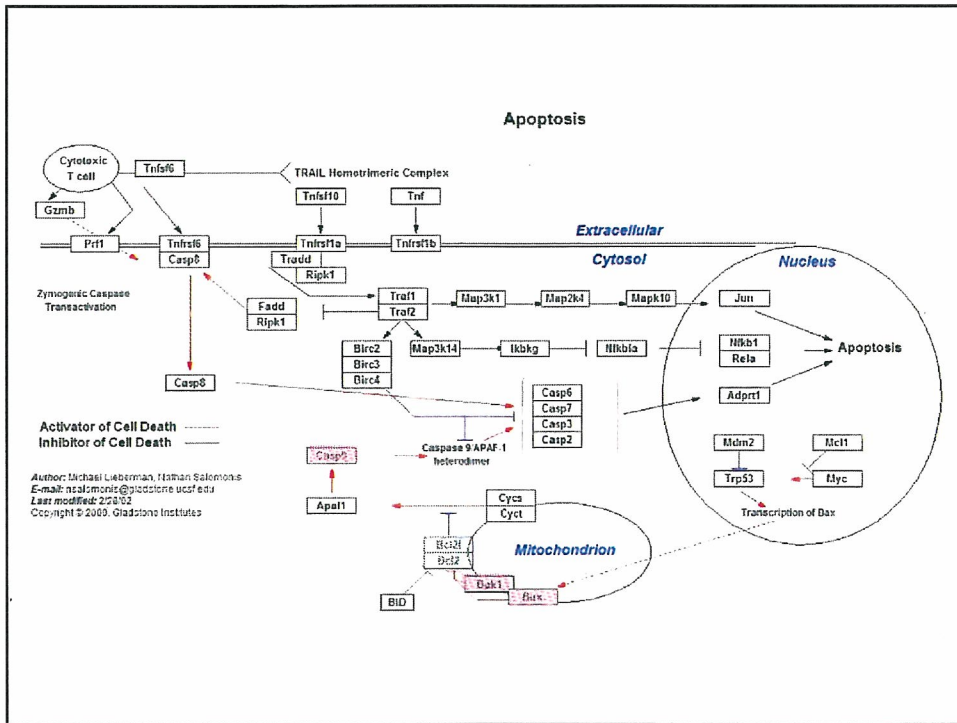


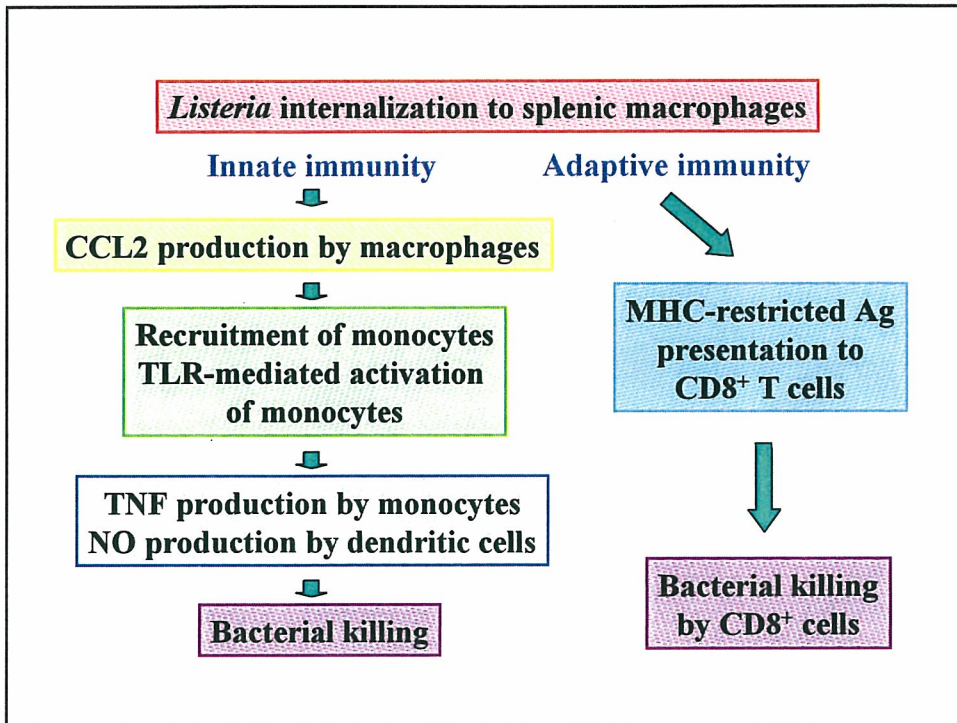


Mechanisms by which glucocorticoids cause apoptosis is still largely unknown.

- 1. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is mediated via the “mitochondrial” pathway: inhibitable by Bcl-2 and Bcl-x_L and requiring Apaf-1 and caspase-9.**
- 2. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis requires GR-mediated gene transactivation.**







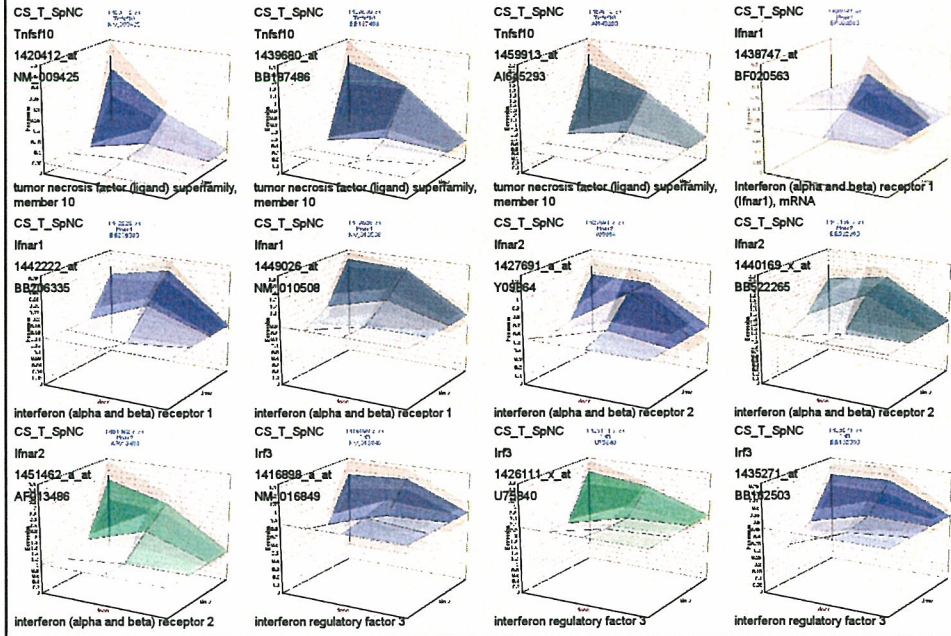
Gene list controlling susceptibility to *Listeria*

Table1 from Nature reviews immunology 2004, 4, p812-819

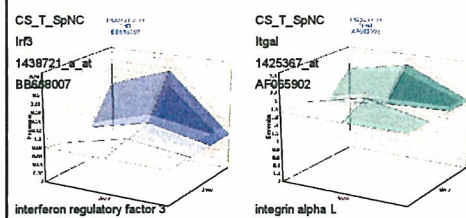
Mouse strain	Another gene name	Response to infection (KO phenotype)	Susceptibility score
Ifn-alpha receptor ^{-/-}	Infra1	Increased resistance	-1
Irf3 ^{-/-}	Irf3	Increased resistance	-1
Lfa1 ^{-/-}	Itgal	Increased resistance	-1
Trail ^{-/-}	Tnfsf10	Increased resistance	-1
Ccr5 ^{-/-}	Ccr5	Normal resistance	0
Tlr2 ^{-/-}	Tlr2	Normal resistance	0
Tlr4 ^{-/-}	Tlr4	Normal resistance	0
Lt ^{-/-}	Lta, Ltb, Ltbr	Reduced resistance	1
Casp1 ^{-/-}	Casp1	Mildly increased susceptibility	2
p47phox ^{-/-}	Ncf1	Mildly increased susceptibility	2
Ccl2 ^{-/-}	Ccl2	Moderately increased susceptibility	3
Nos2 ^{-/-}	Nos2	Moderately increased susceptibility	3
Rip2 ^{-/-}	Ripk2	Increased susceptibility, delayed lethality	4
NF-kb ^{-/-}	NF-kb	Highly susceptible	5
Ccr2 ^{-/-}	Ccr2	Very susceptible, early lethality	6
Ifn-gamma ^{-/-}	Infg	Highly susceptible, early lethality	6
Mvd88 ^{-/-}	Mvd88	Very susceptible, early lethality	6
Tnfrp55 ^{-/-}	Tnfrsf1a	Highly susceptible, early lethality	6

Response to infectionの記載に従い、Susceptibility scoreを設定した

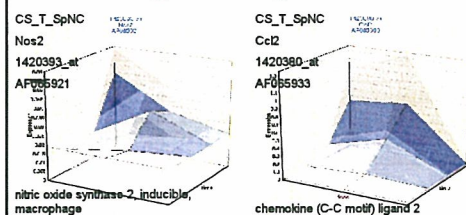
Susceptibility score=-1



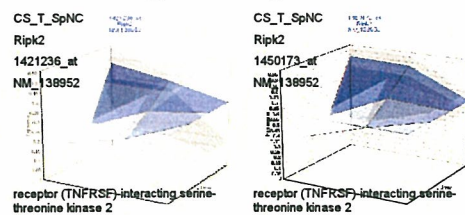
Susceptibility score=-1



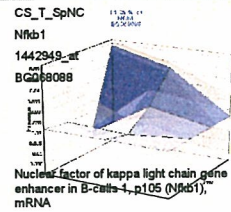
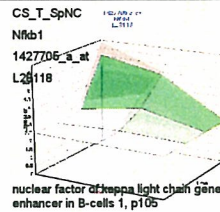
Susceptibility score=3



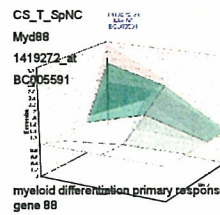
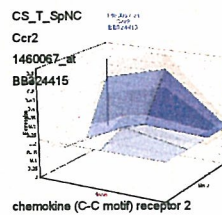
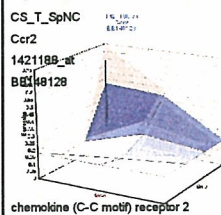
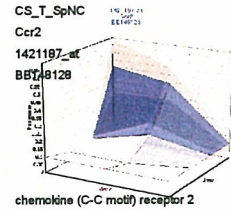
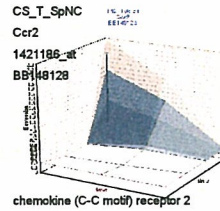
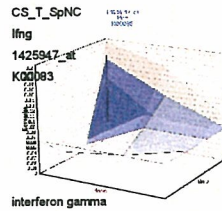
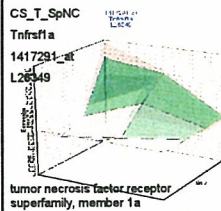
Susceptibility score=4



Susceptibility score=5



Susceptibility score=6



Effects of glucocorticosteroid on thymic gene expression

- T-cell differentiation
- Apoptotic induction via mitochondrial pathway

Effects of glucocorticosteroid on *Listeria*-associated gene expression

- Up-regulation of susceptibility-inducing gene expression
- Central and peripheral lymphoid organs

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

中枢神経系に作用する薬物の骨代謝への影響に関する研究

分担研究者 池田 通 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

中枢神経系に作用する薬物が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する論文が今までにいくつか出されており、かつ自検例もあることから、こうした薬物が中枢神経系を介して間接的に、もしくは直接骨組織に作用して骨代謝に介入していることが強く疑われる。本研究ではこうした薬物の動物への連続投与実験を通して、その骨代謝への作用機序を明らかにする。

A. 研究目的

骨代謝調節の分子機構は、破骨細胞形性因子である Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL)の発見によって急速に明らかになりつつある。骨芽細胞が産生する RANKL を、その受容体である RANK を有する破骨細胞前駆細胞が受けることにより、多核巨細胞である破骨細胞へと分化し、さらに活性化する。また、RANK と同様に RANKL と結合することができる分子 Osteoprotegerin (OPG)が知られており、OPG は可溶性蛋白として細胞から遊離しているため RANKL と結合してもその情報を細胞に伝えないことから、RANKL による破骨細胞形成を阻害する役割を担っていると考えられている。骨代謝がこうした分子の相互作用によって調節されていることが明らかになった上、ビスホスフォネートの臨床応用によってかなり薬

物による骨代謝のコントロールが可能となってきた。しかしながら、高齢社会において骨粗鬆症患者が今後激増することが予想される我が国においては、さらなる研究が望まれる。

そのような状況の中、大麻の薬効成分である cannabinoid に対する受容体を經由したシグナルが破骨細胞形成に重要な影響を与えているという報告がなされ (Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors, Nature Medicine 11, 774-779, 2005)、破骨細胞に cannabinoid 受容体が存在することが示されるとともに、中枢神経系に未知の骨代謝調節機構が存在する可能性も考えられた。

過去の報告を調べてみると、中枢神経系

に作用する薬物が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する論文がいくつか出されており、中枢神経系を介して間接的に、もしくは直接骨組織に作用して骨代謝に介入している薬物が存在することが強く疑われる。さらに、中枢神経系に作用する薬物の投与を受けていた患者で受傷後に異常な化骨誘導が認められた複数の自験例があったため、調査した結果、ベンゾジアゼピン系の alprazolam、チエノジアゼピン系の etizolam、ベンズアミド系の sulpiride が関与している可能性が疑われた。実際これらの薬物が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する臨床論文も少数ながらいくつかあることがわかった(Bone mineral density in an outpatient population receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs, *Epilepsy and Behavior* 5, S24-S29, 2004; The effect of valpronate on bone mineral density in adult epileptic patients, *Pharmacological Research* 50, 93-97, 2004; Benzodiazepine use and hip fractures in the elderly, *Archives of Internal Medicine* 164, 1567-1572, 2004)。これらの薬物の骨代謝への副作用はまだ問題視されていないが、ある期間連続投与される可能性が高い薬物でもあり、患者に無視できない影響を及ぼしている可能性がある。本研究ではこうした疑いのある薬物を動物に連続投与する実験を通して、その骨代謝への作用機序を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

実験計画としては、生後 8 週齢メス

Wistar 系ラットに、Alprazolam [ベンゾジアゼピン系] (12.5 μ g, 30 μ g, 120 μ g/kg)、Etizolam [チエノジアゼピン系] (15 μ g, 60 μ g, 240 μ g/kg)、Sulpiride [ベンズアミド系] (2.5mg, 10mg, 40mg/kg)、Sodium Valproate [バルプロ酸ナトリウム系] (5mg, 20mg, 80mg/kg)の各薬物を蒸留水に溶解または懸濁した物を、連日経口投与し、また、蒸留水のみを経口投与したものを対照として用いる。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、その 1/4 量および 4 倍量 (人体における 1 日投与量の極量) に設定することとした。このうち、今回は最大投与量における実験を行った。

上記薬物の連日経口投与開始 1 週間後にケタラル 5・セラクター 1 混合液を 60mg/kg 腹腔内注射してラット及びマウスを麻酔した上、歯科用電気エンジンを使用してラット右側脛骨の骨幹部を 1 カ所水平に切断し、骨髓腔にワイヤーを貫通させることにより骨固定を施した後、術創を縫合した。手術後も各薬物を連日経口投与した。術後 1 週ごと 5 週後まで動物の骨折部位の X 線写真を撮影した後、動物を安楽死処置し、手術部位の骨組織を採取した。なお、安楽死処置の 4 日前および前日に calcein(8mg/ml)を 1ml/kg 量腹腔内に投与し、骨の標識を行った。採取した骨組織は固定後に樹脂包埋し、マイクロ CT による断層撮影を行った後、非脱灰骨組織標本作製した。

次に、遺伝子発現の網羅的解析をするための試料作成の予備実験を行った。生後 5

週齢メス C57BL/6 系マウスを頸椎脱臼により安楽死処置した後、頭蓋冠を切除して Trizol 液を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を定量し、解析に必要な動物数を確認した。倫理面への配慮として、本実験は長崎大学学長の承認を受けた後、長崎大学の定める規定に従って実施した。

C. 研究結果

【一般所見】

第一段階の実験として各薬物の最大投与量による実験を行ったが、各薬物を投与したことによる急性毒性、顕著な行動変化等は認められなかった。また、骨折手術創の治癒経過の肉眼所見に薬物投与による差は認められなかった。

【骨折治癒所見】

X 線写真所見では、術後 1 週目では各薬物を投与した動物および対照となる蒸留水を投与した動物において、顕著な化骨反応が認められなかった。

骨折部位の化骨反応は術後 2 週目から認められたが、すでにこの段階で、対照と比較して Alprazolam, Sodium Valproate 投与動物において化骨の促進が強く疑われる所見が得られた。術後 3 週目より新生化骨の再構築反応が見られはじめ、化骨断端が丸みを帯びて来るのが確認された。術後 5 週目には、各薬物を投与した動物および対照の動物において骨折部位は治癒したと判断された。

一匹のマウス頭蓋冠の表面にある細胞は、骨芽細胞、前骨芽細胞を主体とした骨芽細

胞系細胞及び、少数の線維芽細胞系細胞が含まれると

判断されるが、頭蓋冠表面の細胞 1 匹分から、480 ng の total RNA が採取された。

D. 考察

Alprazolam, Sodium Valproate が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する報告が少数見られるが、いずれも人における長期投与例で骨量の減少が認められたという単発的は報告にとどまり、これらの薬物が骨代謝にどのように影響を及ぼしているかについて、詳細は全く不明である。

今回の動物実験では化骨反応の亢進が確認され、人における過去の報告とは異なる結果が得られた。この理由は不明だが、人においては通常 1 日 3 回経口投与されるこれらの薬物を、1 日 1 回投与している点の違いが、実験全体にどのような影響を及ぼしているかについて今後検討する必要があると思われる。しかし、対照を含めて同一条件で行った実験であることから、Alprazolam 及び Sodium Valproate が骨代謝に何らかの影響を及ぼした結果、化骨反応が亢進したことを強く示唆する結果であったといえる。

作成した今回の実験資料の非脱灰骨組織切片の検討及び、マイクロ CT 画像の解析はまだ行っていないため、これを実施してより多くの詳細な情報を得たい。また、今後一日平均投与量及びその 1/4 量での動物実験も実施し、骨折治癒時における化骨反応にこれらの薬物がどのように影響するかを詳細に確かめていく予定である。

E. 結論

中枢神経系に作用する薬物のうち、Alprazolam 及び Sodium Valproate が骨代謝に影響を及ぼすことが強く示唆された。本研究を推進することで、新たな骨代謝調節機構が明らかにできる可能性がある。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ioku, K., Kawachi, G., Nakahara, K., Ishida, H., Minagi, H., Okuda, T., Yonezawa, I., Kurosawa, H., Ikeda, T. Porous Granule of β -Tricalcium Phosphate Composed with Rod-shaped Particles. Key Eng. Mater. 309-311:1059-1062. 2006.

Okuda, T., Yonezawa, I., Ioku, K., Minagi, H., Kurosawa, H., Ikeda, T. Porous Ceramics of β -tricalcium Phosphate Composed of Rod-shaped Particles is Highly Biodegradable and Expresses Prominent Osteoconductivity. Key Eng. Mater. 309-311:1063-1066. 2006.

Fujita, S., Hideshima, K., Ikeda, T. Nestin expression in odontoblasts and odontogenic ectomesenchymal tissue of odontogenic tumors. J. Clin. Pathol. 59:240-245. 2006.

2. 学会発表

奥田貴俊, 権田芳範, 井奥洪二, 米澤郁穂, 黒澤尚, 柴田恭明, 池田通: 新規吸

収性骨代替材料微細柱状結晶 β -リン酸三カルシウムの評価. 第24回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 7月 {抄録集 演題番号P2-57, p. 274}

権田芳範, 井奥洪二, 奥田貴俊, 米澤郁穂, 黒澤尚, 池田通: 歯骨細胞培養系を用いた骨代替材料の吸収性の評価. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会, 長崎, 12月 {抄録集 演題番号1-P4-14, p. S935}

奥田貴俊, 井奥洪二, 権田芳範, 米澤郁穂, 黒澤尚, 池田通: 柱状結晶 β -TCPからなる新しい骨代替材料の開発と評価. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会, 長崎, 12月 {抄録集 演題番号1-P4-20, p. S938}

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。

中枢神経系に作用する薬物の 骨代謝への影響

池田 通、権田芳範、奥田貴俊
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病理学分野

【背景】

精神科に通院する患者の骨密度や骨折治癒に異常があることが多い傾向を感じている臨床医が少なからず存在し、投与薬物による副作用が疑われるが、世界的に見ても系統だった研究はほとんどなされていない。

一方、骨代謝研究分野では2005年にcannabinoidが骨代謝に影響を及ぼすという論文が報告されて以来、中枢神経系による骨代謝調節機構について関心が高まっているが、全体的な傾向としてはあまり注目されておらず、未開拓領域の一つであると言える。

骨代謝に影響を及ぼすと疑われる薬物はいくつかあげられるが、いずれも骨組織への副作用に関する記載はなく、シンプルな動物実験系での確認とメカニズムの解明が必要であると考えられる。

骨代謝に影響を及ぼす可能性がある中枢神経系に作用する主な薬物

【Phenitoin, phenobarbital, primidone】

Cytochrome P450 inhibitors

骨密度の減少や大腿骨頸部骨折のリスクの増加等の報告

機序: 肝臓における活性型ビタミンDの不活化亢進による低カルシウム血症による副甲状腺機能亢進

【Valproate】

Cytochrome P450 inhibitor, Histone deacetylase inhibitor

骨密度の減少等の報告、骨芽細胞の分化を促進するという報告

機序: 詳細は不明

【Benzodiazepine】

GABAの増強作用

大腿骨頸部骨折のリスクの増大

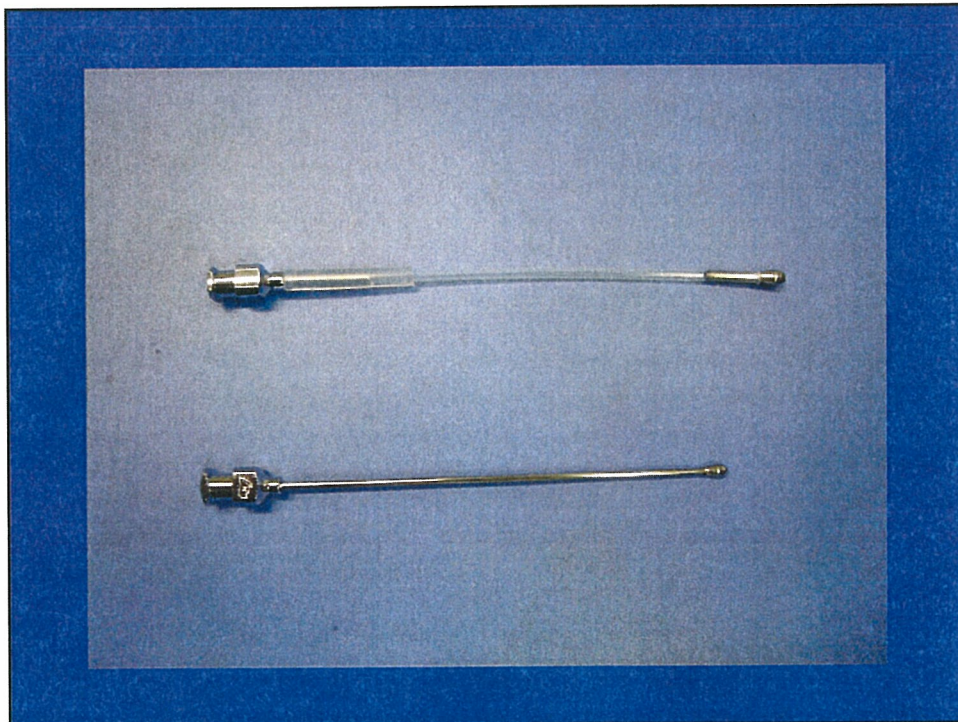
機序: 詳細は不明

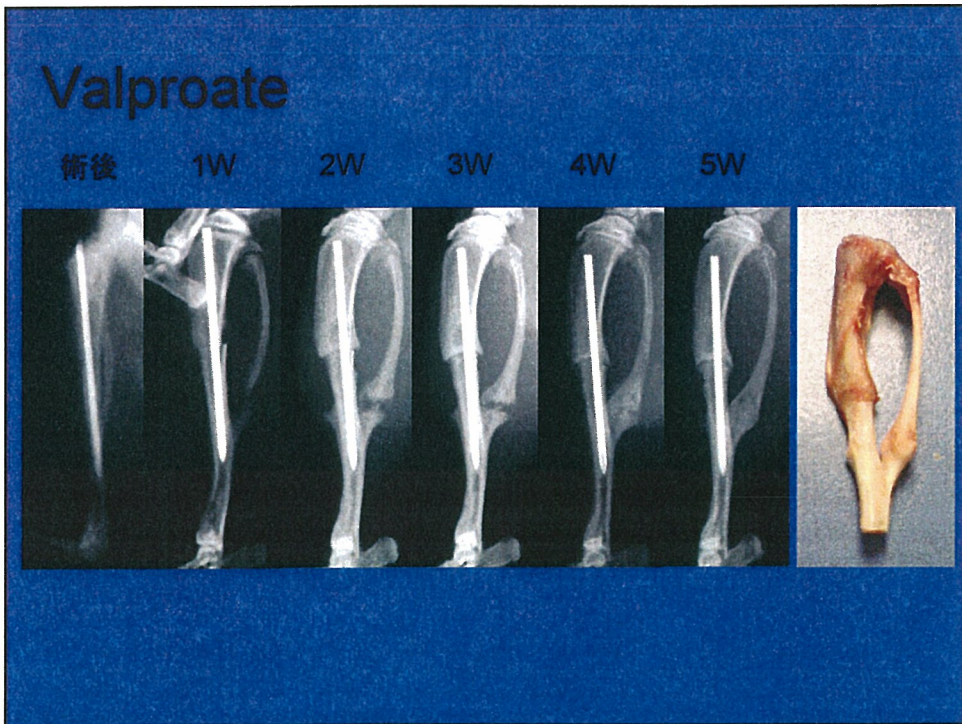
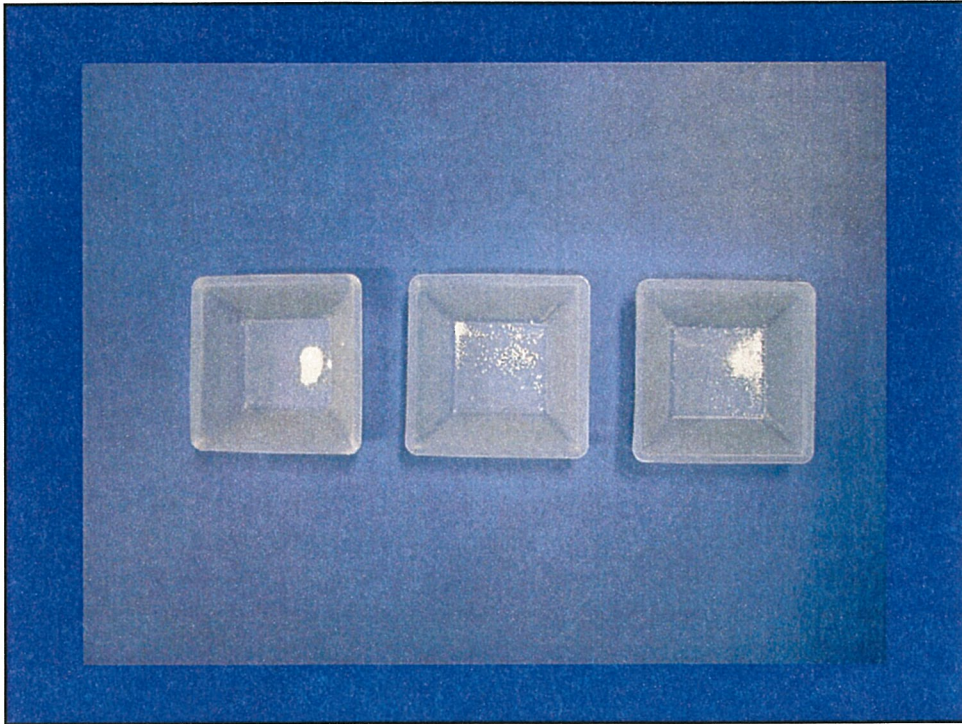
【Benzamide】

Dopamine receptor antagonist

骨吸収の抑制効果

機序: 詳細は不明 Cathepsin Kの抑制が関与?





研究方針

【18年度】

小動物への薬物投与演習をした後、ラット骨折モデルを用いた薬物投与実験を実施する。薬物投与実験終了後**マイクロCT**による検討および標本作製を行う。

【19年度】

標本作製及び、作成した標本の**骨形態計測**評価を行う。

【20年度】

19年度までの結果に基づき、さらに薬物を絞り込んだ上、1-2種類の薬物をマウスに投与し、**頭蓋冠骨芽細胞における遺伝子発現**の変化を検索する。

問題点・疑問点に対する対応

1. 過去の報告結果のばらつきについて

骨代謝回転を上げる効果がある薬物の場合は、被投与者の骨組織の状態が結果に大きく影響すると思われる。

比較的若年で骨芽細胞の活性が高い場合は、造骨反応として表現され、高齢者で骨芽細胞の活性が低い場合は、骨吸収系の活性が形成系に比べて相対的に高くなるため、骨量減少として表現される可能性がある。

2. 骨組織の細胞に対する直接作用について

特に、破骨細胞活性への直接作用を疑わせる報告に関しては、本研究においても追試またはそれに準じた実験を行う必要がある。

変異原性毒性の生体防御反応として検出の研究

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

協力研究者： 鈴木孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長

研究要旨

遺伝子傷害性および非遺伝子傷害性肝発癌物質を用いたマウス肝臓における遺伝子発現解析の結果、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、これらの遺伝子をつかった迅速スクリーニングのための TaqMan® Low Density Array (TLDA) 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を比較したところ、非常に一致した結果が得られ、両手法の信頼性が確認された。

A. 研究目的

従来の遺伝毒性試験においては、主に既に確立されたいくつかの古典的評価法により検討がなされてきた。しかし、近年のゲノム解析の進展に伴う DNA マイクロアレイ技術の普及をうけ、遺伝子発現解析により、メカニズムを含めた毒性解析を行ういわゆる“トキシコゲミクス”の手法が注目を浴びることになり、遺伝毒性の研究分野においてもそれを利用した新しい試験法の開発に期待がかかっている。こうした流れを受け、我々は GeneChip 等のマイクロアレイを用いた網羅的発現解析により、動物個体における遺伝子傷害性物質に対する遺伝子発現変化を解析することにより、遺伝子傷害に対する生体防御機構のメカニズムを解析するとともに、新たなスクリーニング系としての開発を目的としてきた。広く一般毒性を対象とした場合、多くのタイプの作用が考えられるため、すべての遺伝子に対して網羅的に調べることは有効であると考えられるが、「遺伝毒性」

とその領域を絞った場合には、予測に必要な遺伝子数はある程度絞られ、他の遺伝子のデータはむしろノイズになると考えられる。そこで、ある程度限られた数の遺伝子について、それらの動きをより正確にかつ簡便に測定することが、新規スクリーニング系を開発する上で重要であると考えられる。こうした考えに基づいて、我々はリアルタイム RT-PCR を使った解析、また、操作が簡便である TLDA の系を用いて、より安価、簡便かつ信頼性の高い手法としての新規スクリーニング法を確立することを目的とした。そして、網羅的解析により抽出された指標遺伝子候補のバリデーションを行うための、新たな化合物セットを設定し、これらを処理したマウス肝臓サンプルの解析から、最終的に有効なスクリーニング系としてのリアルタイム PCR による解析法を確立することも目的とした。

また、化学物質の試験管内での発がん予測法としての形質転換試験に関して、以前の本

研究班において欧州と日本において使用している同じ Balb3T3 細胞の感受性が多少異なっているという報告があったため、その遺伝的同一性を検証するため、oligo-CGH アレイを用いた解析を行った。

B. 研究方法

1. TaqMan® Low Density Array (TLDA)の作製

これまで、日本環境変異原学会 MMS 研究会の共同研究として、GeneChip 等の解析により、遺伝子傷害性に特異的に反応する遺伝子群を選択した。これらの遺伝子 46 種類の発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析するための 48x8 フォーマットの TLDA を設計し、アプライドバイオシステムズ社に作製を依頼した。

この設計に際して、常に発現の変化しない遺伝子を内在性コントロールとして用いることが望まれており、TLDA にあらかじめ組み込まれて提供される 18S リボゾームタンパクに加えて、これまでの GeneChip データから変動のなるべく少ない遺伝子を選択することにした。

GeneChip 解析用ソフトウェアである、GeneSpring を用いて、コントロールとの発現比が全ての実験において1付近であり、ある程度高い発現量を示す遺伝子をセレクションしたところ表 1 に示す数種の遺伝子がリストアップされた。アプライドバイオシステムズ社にて、設計済みの TaqMan プローブが使用可能であり、発現強度が安定しているという理由から、Psm3 (proteasome (prosome macropain) subunit, type3) を選んだ。

その他、GeneChip を使った解析より得られた遺伝子傷害性特異的遺伝子として、TLDA に組み込んだ遺伝子群を表2に示すとともに、TLDA カードのデザインを図1に示した。TLDA

カードのフォーマットは、48x8 即ち、8 レーンあるサンプル inlet に対して 48 ウェルがデザインされており、この 48 ウェルに対して全て異なる 48 種類の遺伝子の RT-PCR 用の TaqMan プローブを搭載した形になっている。よって、最大で 8 サンプルに対して 48 遺伝子を同時に RT-PCR 解析可能なシステムとなっている。

2. TLDA による既存の GeneChip データの評価

日本環境変異原学会 MMS 研究会における共同研究として、アルキル化剤および多環芳香族化合物などの遺伝子傷害性物質7化合物、非遺伝子傷害性物質としてフェノバルビタールとエタノールなど 5 化合物をマウスに投与し、肝臓における遺伝子発現を Affymetrix 社製 GeneChip (Mouse Genome 430A) を用いて解析した。この解析に用いた total RNA を用いて、カスタムデザインした TLDA カードによる RT-PCR 解析を行った。

解析は、total RNA より High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成し、30-1000 μ g を RT-PCR 反応に使用した。TLDA カードの各リザーバー inlet に cDNA サンプル 50 μ l と 2xTaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 50 μ l を混合して加え、遠心分離器により TLDA の各ウェルに分注した。専用の装置にてカードの各ウェルをシールした後、7900HT Real-Time PCR 装置にて、定量的 PCR 反応を行った。付属の SDS ソフトウェアにて、内在性コントロール遺伝子の増幅の Ct 値(所定量の増幅に要した PCR サイクル数)と各遺伝子の増幅の Ct 値との差 Δ Ct 値を元に、各サンプル間の発現量の比を Δ Δ Ct 法に基づき算出した。