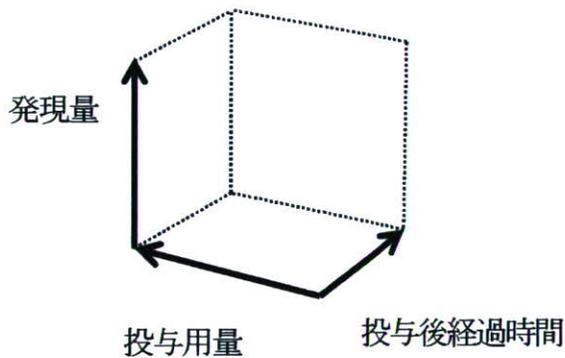


Asah3l、Sgms1 遺伝子)が見いだされた。この代表的な遺伝子の変動を図1に示す。

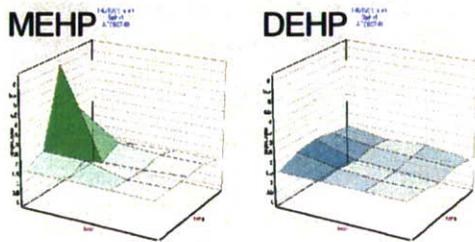
なお以降、図はすべて下記のように濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元グラフとして示す。

SIPは脂質シグナル分子であり、細胞膜のスフィンゴシンが、スフィンゴシンキナーゼ(Sphk1 遺伝子)によりリン酸化され生成され細胞外に放出される。このSIPの受容体がEDG受容体(Edg1分子等)である。なお、このスフィンゴシンは、セラミドからセラミダーゼ(Asah3l分子等)により生成される。

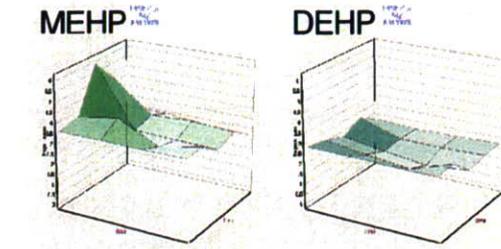
その他、酸化ストレス時に誘導されるSesn1、Sesn2、Srxn1 遺伝子及びサイトカインシグナルに関与するSocs2、Socs3 遺伝子の発現増加が認められた。



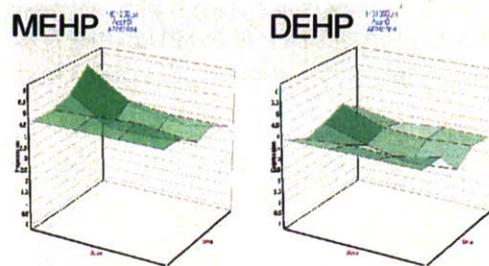
A) Sphk1 遺伝子  
[sphingosine kinase 1]



B) Edg1 遺伝子  
[endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1]



C) Asah3l 遺伝子  
[N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like]



D) Sgms1 遺伝子  
[sphingomyelin synthase 1]

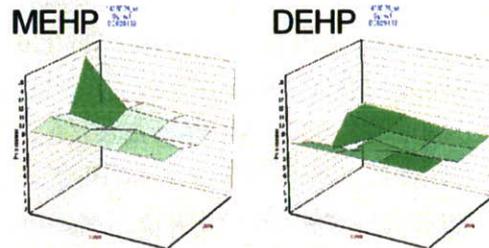


図1 スフィンゴシン-1-リン酸シグナルカスケード  
に關する遺伝子の発現変動

- DEHP 投与時と MEHP 投与時との比較-

(A: Sphk1、B: Edg1、C: Asah3l、D: Sgms1)

C-2) 腎において発現が、DEHP 投与で変動し  
MEHP 投与では顕著に変動しない遺伝子:

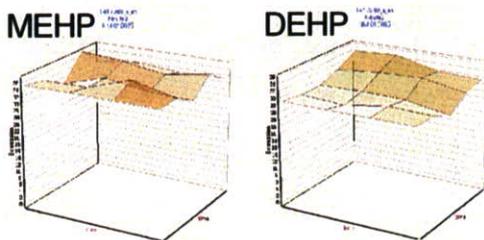
解析の結果、腎において発現が、DEHP 投与  
で変動し MEHP 投与では顕著に変動しない遺伝

子として、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I (NADH dehydrogenase) を構成する遺伝子群 (Ndufa2, Ndufa12, Ndufa5, Ndufb2, Ndufb10, Ndufs2 遺伝子) の発現増加が見いだされた。この増加量は、先に示した SIP シグナル関連遺伝子および、後で示す PPAR 関連遺伝子のもものと比較し低いものであった。以下に、この代表的な遺伝子を示す(図2)。

この複合体 I 分子は、脱共役剤でありマメ科植物のデリス根部に含まれる毒の主成分ロテノンの標的分子であることから、DEHP は、弱いながらも、電子伝達系の阻害作用とそれに続く活性酸素の産生増加、細胞内 ATP の低下作用を有する可能性が示唆された。

#### A) Ndufa2 遺伝子

[NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2]



#### B) Ndufs2 遺伝子

[NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2]

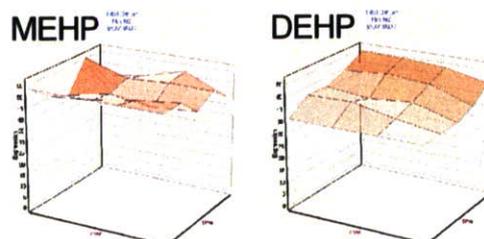


図2 ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I を構成する遺伝子の発現変動

#### - DEHP 投与時と MEHP 投与時との比較 (A: Ndufa2, B: Ndufs2)

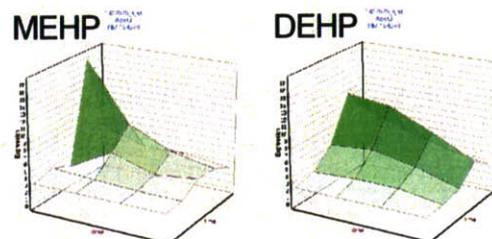
C-3) 腎において発現が、投与により DEHP、MEHP 両者で共通して変動する遺伝子:

解析の結果、腎において発現が、投与により DEHP、MEHP 両者で増加する遺伝子として、PPAR  $\alpha$  のシグナルカスケードに関する遺伝子群が見いだされた (Cebp $\beta$ , Acot3, Acs11, Crat, Hacl1, Pex11a 遺伝子など)。この時の遺伝子発現は、MEHP 投与時の方が DEHP 投与時よりも、経時的に早く、また用量依存的に大きな増加を示した。このシグナルカスケードに加えて、PPAR  $\gamma$  のシグナルカスケードに関する遺伝子群も見いだされた (Fabp1, Adfp, Sgk, Scn11, UCP2 遺伝子など)。この場合は、MEHP 投与時と DEHP 投与時で同様な用量反応性を示した。なお、PPAR  $\alpha$ 、PPAR  $\gamma$ 、RXR については顕著な発現変動は認められなかった。

以下に、これらの遺伝子のうち代表的なものを示す(図3)。

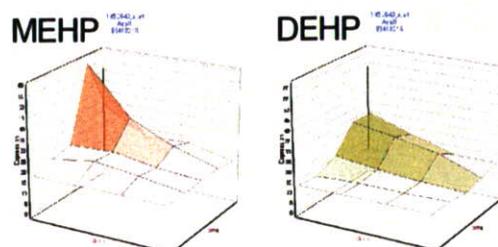
#### A) Acot3 遺伝子

[acyl-CoA thioesterase 3]

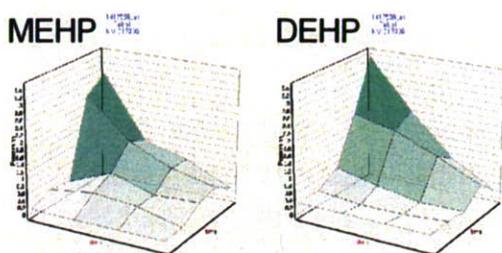


#### B) Acs11 遺伝子

[acyl-CoA synthetase long-chain family member 1]



C) Fabp1 遺伝子  
[fatty acid binding protein 1]



D) Ucp2 遺伝子  
[uncoupling protein 2]

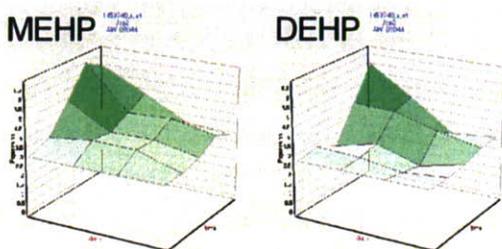


図 3 PPAR $\alpha$  および PPAR $\gamma$  のシグナルカスケードに関係する遺伝子の発現変動  
- DEHP 投与時と MEHP 投与時との比較-  
(PPAR $\alpha$  : Acot3(A), Acsl1(B) ; PPAR $\gamma$  : Fabp1(C), UCP2(D))

D. 考察

以上の DEHP、MEHP 単回投与時の腎における遺伝子発現変動解析結果から、1) MEHP は DEHP と異なり、スフィンゴシン-1-リン酸(SIP)シグナルカスケードを活性化すること、2) DEHP は MEHP と異なり、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I (NADH dehydrogenase) を標的分子とすること、3) DEHP、MEHP 共に、核内受容体 PPAR $\alpha$  受容体および PPAR $\gamma$  受容体を介したシグナルカスケードを活性化することが示唆された。

1) の SIP シグナルカスケードと腎障害との関連性については不明な点が多い。この点、Kim ら (Kim et al, J Toxicol Environ Health A 69:

2071-2082, 2006) は、セラミド合成酵素阻害作用を有するかび毒「フモニシン」投与により誘発されるマウスでの腎障害時(尿細管の拡張と壊死)に腎での SIP 量が有意に増加することを報告している。また、*in vitro* 実験において、5  $\mu$ M の SIP が、ヒト近位尿細管由来細胞株(HK-2)の細胞死を引き起こすことが報告されている(Iwata M et al, Proc Natl Acad Sci U S A 92: 8970-8974, 1995)。これらの報告は、SIP シグナルカスケードが、腎尿細管の障害に関与することを示唆しており、本解析結果を支持するものと考えられた。また SIP シグナル以外にも、Sesn1、Srxn1 遺伝子など酸化ストレス時に誘導される遺伝子の発現変動も認められているが、これらの分子と SIP シグナルとの関連は不明である。今後、この腎障害における SIP シグナルカスケードの分子機序について、さらに検討が必要であるものと考えられた。

一方、DEHP は生体内で MEHP に代謝されることが報告されているため、DEHP 投与時も MEHP 投与時と同様にこの SIP カスケードに影響を与えてもよいものと考えられる。影響が認められない理由として、1) MEHP の作用が、細胞外から働く場合と、DEHP の細胞内代謝を介して細胞内から働く場合とで異なる可能性、2) DEHP が腎においては MEHP に代謝されにくく、MEHP 生成量が少ない可能性、が考えられた。今後、より詳細な検討が必要なものと考えられた。

2) のミトコンドリア電子伝達系への影響については、単離肝ミトコンドリアを用いた *in vitro* 実験において、DEHP では影響がほとんど認められないが、その代謝物 MEHP がミトコンドリア呼吸鎖の複合体 II (succinate dehydrogenase) を阻害するという報告がある(Melnick and Schiller, Environ Health Perspect 45: 51-56, 1982)。他方、本解析結果では、腎において DEHP が複合体 I (NADH dehydrogenase) に影響を与える可能性が示唆さ

れ、MEHP にはこの発現への影響は認められず、また DEHP、MEHP 投与時共に、複合体IIの遺伝子発現変動は認められないことから、従来の報告とは異なるものとなった。今後、DEHP には MEHP と異なり、複合体Iに作用する可能性という観点からの検討が必要なものと考えられた。ただし、この発現変動は、比較的軽微であることに留意する必要がある。

3)の DEHP、MEHP 共に PPAR  $\alpha$  受容体を介したシグナルカスケードを活性化することに関して、DEHP が肝において PPAR  $\alpha$  受容体を活性化し、ペルオキシゾーム増生を通じ、脂肪酸の  $\beta$  酸化をはじめ脂質代謝関連遺伝子の発現上昇を引き起こすことはよく知られている。本解析結果は、DEHP、MEHP 投与時、腎においてもペルオキシゾーム関連遺伝子の発現が増加することを明らかにした。最近になって、DEHP 誘発糸球体腎炎が、PPAR  $\alpha$  受容体欠失マウスでも認められたことから、DEHP による腎障害には PPAR  $\alpha$  受容体は関与せず、酸化的ストレスが関与する可能性を示唆する報告がなされた(マウスでの22ヶ月混餌投与実験)(Kamijo et al, J Am Soc Nephrol 18: 176-188, 2007)。したがって、MEHP 投与で認められたマウス腎障害に PPAR  $\alpha$  受容体は関与しない可能性が示唆された。

他方、3)の DEHP、MEHP 共に PPAR  $\gamma$  受容体を介したシグナルカスケードを活性化することに関し、最近になって、MEHP が PPAR  $\gamma$  受容体を介したシグナルカスケードを活性化することが報告され、本解析結果を支持するものと考えられた(Feige et al, J Biol Chem 282: 19152-19166, 2007)。PPAR  $\gamma$  受容体作動薬(抗 2 型糖尿病薬)投与時の副作用として腎障害の報告は少なく、PPAR  $\gamma$  受容体と腎障害については不明な点が多いため、今後、検討が必要である。なお、最近になって、PPAR  $\gamma$  受容体欠失マウスを用いた実験により、

PPAR  $\gamma$  受容体作動薬(チアゾリジンジオン)投与時の副作用である浮腫は、PPAR  $\gamma$  受容体の標的分子である尿細管の Na チャネル(Scnn1)の発現誘導により Na<sup>+</sup>の再吸収が亢進するため引き起こされる、という報告がなされた(Guan Y et al, Nat Med 11: 861-866, 2005)。この Na<sup>+</sup>チャネル(Scnn1)の遺伝子発現増加は、本実験でも認められている。

## E. 結論

今年度我々は、マウスを用いた 28 日間強制経口投与実験において、MEHP 投与群では DEHP 投与群と比べ、肝障害、精巣障害に比較し腎障害が、より強く発現することを見いだした。そこで本分担研究では、この MEHP 誘発毒性をより詳細に把握する目的で、雄性マウスに MEHP 及び DEHP を単回強制経口投与し、腎の遺伝子発現変動解析をおこなった。その結果、1) MEHP は DEHP と異なり、SIP シグナルカスケードを活性化すること、2) DEHP は MEHP と異なり、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I (NADH dehydrogenase)を標的分子とすること、3) DEHP、MEHP 共に、核内受容体 PPAR  $\alpha$  受容体および PPAR  $\gamma$  受容体を介したシグナルカスケードを活性化することが示唆された。したがって、MEHP の腎標的性には、MEHP 投与時に発現が誘導され、DEHP 投与時には発現変動が認められなかった、SIP シグナルカスケードが関与する可能性が示唆された。

## 資料 2-4)

### 文献や国際動向に関する調査研究による MEHP と DEHP の比較研究

分担研究者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

**研究要旨** 毒性評価が遅れている MEHP による毒性プロファイルを明らかにするとともに、その内容を当班で行う実験プロトコール作成に役立てることを目的に、MEHP の毒性に関する内外の情報を特に、精巣、腎、神経、心臓毒性を中心に調べた結果、MEHP が PPAR  $\alpha$  のみならず PPAR  $\gamma$  のアゴニストであることが判明したが、PPAR が精巣、腎、神経、心臓毒性に関与している明らかな証拠は無かった。一方で、ミトコンドリア、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、cAMP、アセチルコリン受容体等への影響が報告されていることから、これらの PPAR 非依存的な作用にも注意する必要があると思われた。

#### A. 研究目的

これまで医療用具等から溶出することが報告されていなかった MEHP が、最近になって、ガンマ線滅菌することによりプラスチック製医療器具等から溶出してくることが報告されたため、この MEHP の毒性プロファイルの把握する必要がある。そこで、MEHP による毒性プロファイルを明らかにするとともに、その内容を当班で行う実験プロトコール作成に役立てることを目的に、MEHP の毒性に関する内外の情報を収集し整理する。

#### B. 研究方法

本年度は、MEHP の一般毒性、生殖毒性、薬理学的研究、毒性発現メカニズム研究等に関する直近までの文献の調査を継続して実施するとともに、標的臓器であることが示されてい

る精巣、心臓、神経毒性、腎毒性に焦点をあてて情報収集を行った。

#### C, D. 結果と考察

##### 1) 精巣毒性

*In vitro* の系でラットのセルトリ細胞初代培養に対する MEHP の影響が調べられている。18 日齢の F-344 ラット雄から得たセルトリ細胞 (78-84%) に MEHP を添加すると細胞 ATP のレベルが減少し、培地の乳酸、細胞内脂質が増加した。蛋白合成については影響は認められなかった。ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素は減少した(添加 4 時間後、3  $\mu$  M の MEHP で有意に減少)。この結果、ミトコンドリアがセルトリ細胞で MEHP 標的の一つであることを示された(Chapin RE et al., 1988)。

これに関連して、CD ラット肝から得られたミト

コンドリアに対する影響が MEHP で調べられている。MEHP はコハク酸脱水素酵素活性を非競合的に阻害した( $k_i=2.1 \times 10^{-4} M$ )。さらに、脱共役作用を示した。一方、同時に調べられた DEHP では 1mM の濃度でもこれらの作用は見られなかった(Melnick RL et al., 1985)。

ラットセルトリ細胞の機能に対する MEHP の影響がさらに調べられている。F-344 ラットから調整されたセルトリ細胞の FSH-刺激による cAMP の蓄積を MEHP が阻害した(ID50; 2-9  $\mu M$ )。また MEHP は乳酸の分泌を促進した(ED50; 4-12  $\mu M$ )。これらの二つの作用の濃度レベルは同様であった。なお、ATP レベルの減少が MEHP によりセルトリ細胞で見られたが、28 日齢以上のラットから得られたセルトリ細胞では見られなかったことから、ATP 減少は、*in vivo* での DEHP の作用機序で重要な部分ではないと推測している(Heindel J. and Powell CJ, 1992)。

28 日齢ウイスターラットに MEHP を単回強制経口投与し、3、6、12 時間後に精巣について検索した。Germ cell の分離と脱皮が観察され、セルトリ細胞内では中間フィラメントのビメンチンが崩壊した。アンドロゲン受容体の分布には変化は無かった。

Testosterone-repressed-prostatic message-2 遺伝子の発現が、3 時間後に増加したが、6 時間後に元のレベルに戻った。カスパーゼ-3 活性が 3 と 12 時間で増加した。これらの増加はアポ

トーシスと関係しておらず、感度の高い初期マーカーとして有用であるとしている(Dalgaard M et al., 2001)。

精巣で MEHP により影響を受ける遺伝子がマイクロアレイを用いて検索されている。米国 CIIT のグループは雄 F344 ラット 28 日齢に MEHP を 1000mg/kg の用量で単回経口投与後、1、2、3、6、12 時間後に精巣のマイクロアレイ解析を Affymetrix 社の chip を用いて実施した。最も、顕著に増加したのは Thbs1 (thrombospondin1)であった。その他、転写因子 Nr0b1、ステロイド合成遺伝子(Cyp17a1、StAR)、コレステロール代謝遺伝子(Dhcr7)が用量依存的に変化した(Lahousse SA et al., 2006)。

## 2)腎障害

MEHP の腎障害に関連する論文として *in vitro* の実験が行われている。ドイツの Rothenbacherらは DEHP の代謝物が尿中に多く排泄されるのに、腎臓への影響が着目されていないことから近位尿細管由来の OK 細胞 (Opposum (袋鼠) kidney epithelial cell)に MEHP あるいは 2-EHP を 0.1-500  $\mu M$  の濃度で 3 日間添加した。MEHP は用量に依存した細胞生存率減少をおこしたが(ED50=25  $\mu M$ )、2-EHP では変化はなかった。また MEHP は細胞骨格線維の F-actin を減少させた (Rothenbacher K et al., 1998)。

上記以外に、MEHP と腎障害に関する論文は見られなかった。一方、DEHP と腎障害に関する論文は認められた。

B6C3F1 マウスに DEHP を 6000ppm の濃度で飼料に添加し、104 週間投与すると雌雄に、1500ppm で雌に慢性進行性ネフロパチーが見られている(David RM et al., 2000)。

DEHP の腎障害について PPAR  $\alpha$  ノックアウトマウスを用いて影響が調べられている。DEHP を 0.05 または 0.01% の濃度で資料に添加し、22 ヶ月投与すると PPAR  $\alpha$  ノックアウトマウスで糸球体腎炎が見られたことから、PPAR  $\alpha$  は腎障害に対してむしろ防御的に働いていることが示唆されている(Kamijo Y. et al., 2007)。

MEHP は PPAR  $\alpha$  のアゴニストであることは知られているが、最近 MEHP が PPAR  $\gamma$  を直接活性化することが報告されている(Feige JN et al., 2007)。

PPAR と腎障害に関する研究が *in vitro* で行われている PPAR  $\alpha$  のアゴニストとして、WY14623 とクロフィブレートが、PPAR  $\gamma$  のアゴニストとして、pioglitazone と ciglitazone が用いられ、3 つの異なる近位尿細管細胞に対する毒性が調べられている。その結果、clofibrate と pioglitazone には 100  $\mu$  M の濃度まで細胞毒性は見られなかった。一方、WY14643 と ciglitazone は細胞死を増加させことから、細胞死は PPAR の活性化とは関係しないだろうと推

測している(Giral H et al., 2007)。

MEHP による腎障害の機序については、現時点では明らかでない。ミトコンドリアの酵素阻害があることから尿細管の ATP 合成阻害が生じて尿細管の機能が障害されているかもしれない。DEHP に関しては Na(+)-K+-ATPase を阻害することが報告されている。詳細は明らかでないが、7.5mg/kg の DEHP をラット腹腔内投与すると脳、肝、RBC の Na(+)-K+-ATPase が阻害された(Dhanya CR et al., 2003)。

Na(+)-K+-ATPase の阻害による腎障害についてアミノ配糖体抗生剤(ゲンタマイシン、ストレプトマイシン等)が良く知られている。従って、MEHP が尿細管の Na(+)-K+-ATPase を阻害して腎障害を起こす可能性も候補の一つにあげられるであろう。いずれにしても MEHP の腎障害の機序についてはさらなる研究が必要である。

### 3)神経毒性

MEHP の急性毒性試験での痙攣誘発作用、*in vitro* の系でのコリン作動性作用から MEHP の脳、神経系に対する影響が示唆され、文献検索を行ったが、MEHP の脳に対する影響を調べた文献は見つからなかった。一方、MEHP がトリプトファン経路の酵素である  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate-e-semialdehyde decarboxylase を阻害することにより神経毒性を有するキノリン酸の産生を促進するとの報告がある。ただし、ラットにおいて MEHP や DEHP

投与で尿中のキノリン酸の排出量は増えているが、神経毒性は特に認められていないので (Fukuwatari T et al., 2004)、これにより MEHP の神経毒性が引き起こされた可能性は低いと思われる。

#### 4)心毒性について

心毒性についての新たな情報は無かった。心筋では無いが、*in vitro* で摘出ラット胃の筋肉を用いて PGE2 やアセチルコリンによる収縮作用が MEHP により減少したとの報告がある (Tavares et al., 1985)。

#### E. まとめ

MEHP の毒性試験の文献調査を精巣、腎、神経、心臓毒性を中心に調べた結果、MEHP が PPAR  $\alpha$  のみならず PPAR  $\gamma$  のアゴニストであることが判明した。しかし、PPAR が精巣、腎、神経、心臓毒性に関与している明らかな証拠は無かった。一方で、ミトコンドリア、cAMP、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、アセチルコリン受容体等への影響が報告されていることから、これらの PPAR 非依存的な作用にも注意する必要があると思われる。

#### 参考文献

Chapin RE, Gray TJB, Phelps JL and Dutton SL, The effects of mono-(2-ethylhexyl)-phthalate on rat sertoli cell-enriched primary cultures, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 92, 467-479, 1988.

Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK and Ladefoged O., The acute effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats, *Toxicol Lett.*, 122, 69-79, 2001.

Dhany CR, Indu AR, Deepadevi KV, Kurup PA, Inhibition of membrane Na<sup>(+)</sup>-K<sup>+</sup>Atpase of the brain, liver and RBC in rats administered di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) a plasticizer used in polyvinyl chloride (PVC) blood storage bags, *Indian J Exp Biol.*, 41, 814-820, 2003.

David RM, Moore MR, Finney DC and Guest D., Chronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in mice, *Toxicol Sci.*, 58, 377-385, 2000.

Feige JN, Gelman L, Rossi D et al., The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  modulator that promotes adipogenesis, *J Biol Chem.*, 282, 19152-19166, 2007.

Fukuwatari T, Ohsaki S, Fukuoka S, Sasaki R and Shibata K., Phthalate esters enhance quinolinate production by inhibiting  $\alpha$ -amino- $\beta$ -carboxymuconate- $\epsilon$ -semialdehyde decarboxylase (ACMSD), a key enzyme of the tryptophan pathway, *Toxicol Sci.*, 81, 302-308,

2004.

Giral H, Villa-Bellosta R, catalan J and Sorribas V, Cytotoxicity of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  agonists in renal proximal tubular cell lines, *Toxicol in vitro*, 21, 1066-1076, 2007.

Heindel JJ and Powell CJ, Phthalate ester effects on rat sertoli cell function in vitro: Effects of phthalate side chain and age of animal, *Toxicol Appl Pharmacol.*, 115, 116-123, 1992.

Lahousse SA, Wallace DG, Liu D, Gaido KW, Johnson KJ, Testicular gene expression profiling following prepubertal rat mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure suggests a common initial genetic response at fetal and prepubertal ages, *Toxicol Sci.*, 92, 369-381, 2006.

Melnick RL and Schiller CM, Effect of phthalate esters on energy coupling and succinate oxidation in rat liver mitochondria, *Toxicol.*, 34, 13-27, 1985.

Rothenbacher K, Kimmel R, Hildenbrand S, Schmahl FW and Dartsch PC, Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney

epithelial cells, *Human & Exp Toxicol.*, 17, 336-342, 1998.

Kamijo Y, Hora K, Nakajima T et al., Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  protects against glomerulonephritis induced by long-term exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate, *J Am Soc Nephrol.*, 18, 176-188, 2007.

Tavares IA, Bennett A, Gaffen JD, Morris HR and Taylor GW., The biological activities of phthalate esters on rat gastric muscle, *Eu J Pharmacol.*, 106, 449-452, 1985.

## 別添 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
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	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	26	71-77	2007
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 Project による 2, 3, 7, 8-TCDD-2, 3, 7, 8-TCDF 比較	細胞工学	26	1391-1396	2007

IPR

## Percellome Projectによる毒性トランスクリプトミクスの新しい試み

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

別刷

秀潤社  
細胞工学  
CELL TECHNOLOGY  
Vol.26 No.1 2007

## Special Review

## Percellome Projectによる毒性トランスクリプトミクスの新しい試み

Percellome Project as a New Approach to Toxicology Transcriptomics

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

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Yukio Kodama

身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、その被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である。この精度向上を目指したトキシコゲノミクス研究を実施する際に、マイクロアレイなどから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome法を開発した。90化合物のマウス肝初期応答データを採取し終え、新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えたPercellome Projectを展開している。

## key words

トキシコゲノミクス, 分子毒性学, 遺伝子発現カスケード, 標準化, Percellome 法, 3次元多層(Millefeuille) データ

① 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 E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分秘かく乱関連などの分子毒性学研究、トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所事業務との有機的連携のもとに推進。

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 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

## はじめに

医薬品、食品、化粧品、生活関連用品など、身の回りの物質が我々の身体に取り込まれた際に生じる可能性のある毒性(有害性)を予測し、それらの使用に際しての被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である<sup>注1</sup>(図1)。具体的には、人々の安全を確保するために使用法(用途)や使用量(残留量)を制限したり、場合によっては禁止したりするための科学的根拠を提供するが、その際、人の身代わりとして実験動物を用いる場合が多い。このような毒性学の精度向上の一環として、従来からの毒性研究(毒性症候学、毒性病理学、など)に加えてのトキシコゲノミクス(Toxicogenomics)研究が進められている。

トキシコゲノミクスでは、物質が生体に及ぼす影響をトランスクリプトームとして観測・解析する。その際、①分子毒性学を構築し種差や個体差の問題、複合暴露の問題などを解決するためには、遺伝子発現カスケードの全容解明を目指す必要がある、②形態学的に変化が現れた段階のトランスクリプトームは、遺伝子発現カスケードの最終段階に過ぎない、③形態変化の現れないごく初期段階を含む遺伝子発現カスケードを描出するためにはまとまった量のデータの蓄積が必須である、との観点から、筆者らは、マイクロアレイや定量PCRから細胞1個当たりのmRNAコピー数を得るPercellome手法と、そのデータ解析のための3次元多

層(Millefeuille)システムを開発・実用化した。遺伝子発現量が共通の尺度、すなわち“コピー数/細胞”で表現されることから、検体間、実験間、マイクロアレイのバージョン間、異なったプラットフォーム間、などのデータ比較が直接的に行えるようになり、数年かけて蓄積したデータの有機的活用が可能となった。現在、90種類の化学物質によるマウス肝の初期応答データを採取し終えたところである。新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えたPercellome Projectの概要を紹介する。

## I. Percellome 法: 細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る方法

原理は単純である。サンプルの細胞数を計測し、外部標準mRNA(スパイクRNA)を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そしてRNA抽出、測定に移る。サンプルのRNAの測定値を、スパイクRNAの値を基準に、細胞1個当たりのコピー数に換算する。実際には細胞数を直接計測するのが困難なことが多いため、その代替指標として細胞核内のゲノムDNA量を用いる<sup>1), 2)</sup>。定量性・直線性の検証にはLBM標準サンプル(肝[L]と脳[B])を100:0, 75:25, 50:50, 25:75および0:100に混合した5サンプルから成るセット)を用いる。なお、スパイクRNAは、5種類の枯草菌遺伝子のmRNAを濃度公比3で混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。高精度を要求されるDNA定量法は手作業プロトコルおよび自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコルを準備

注1 環境への配慮も含まれる。

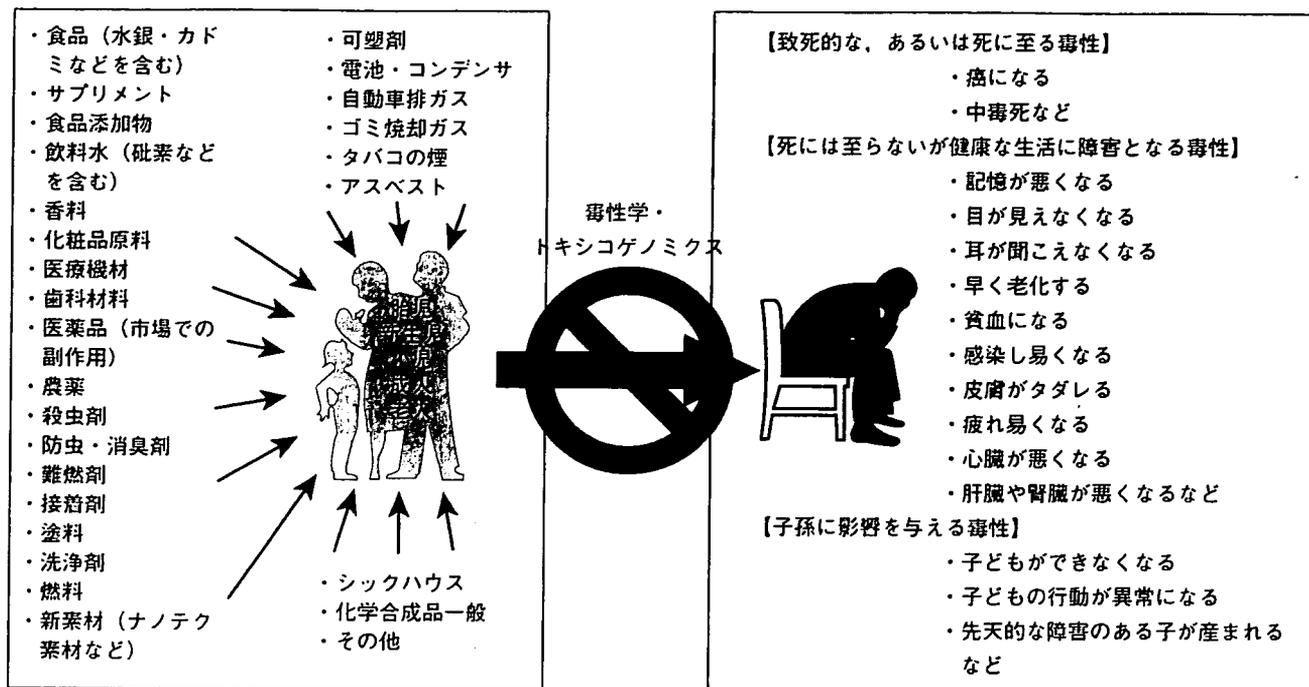


図1. 毒性学の対象

毒性学は、身の回りの物質が引き起こす障害を予測し、その発生を未然に防ぐことを目的としている。トキシコゲノミクス（毒性ゲノミクス）は、最先端の網羅的遺伝子発現解析技術を用いて、従来の毒性学の予測の精度を著しく向上、迅速化させることで、国民の健康安全の確保にさらに貢献することを目指している。

中である。カクテルとも共同研究ベースで供給可能である（連絡先：kanno@nihs.go.jp）。また、ERCC（The External RNA Control Consortium）と連絡をとるとともに、国際的標準化への関与を深めるため平成18年度厚労科研費「医薬品などの有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の国際的標準化に関わる研究（H18-特別-指定-023）」を立ち上げた。現在、この他にシックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス、1匹のマウスから多臓器を採取しそれらの連携状況をトランスクリプトームから解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始し、特徴的な遺伝子について組織内の発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーションで確認する作業を並行している。また、下記の3次元データをweb公開するサーバを整備し、一部の化合物から3次元多層（Millefeuille）データを順次閲覧可能とした（<http://toxicomics.nihs.go.jp/db/>）。

## II. 3次元多層（Millefeuille）データシステム：生物系研究者に優しいデータ可視化と解析

医薬品を含む毒性既知の90化合物について単回経口投与後のトランスクリプトームデータを取得して、初期応答遺伝子カスケードを解析するための基盤データベースを構築した。現在、第二段階として反復暴露データ集積を開始し

た。データは、用量軸、時間軸、および遺伝子発現軸から成る3次元表示により、遺伝子発現の用量および時間に依存した変化を1枚の曲面として表すことで可視的に変化を判別しやすいように配慮した（図2）。これにより、コンピュータが選び出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、特に、mRNAの合成分解のスピードなどの知見から生物学的にありえないパターン（用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など）を排除する際に威力を発揮している。

1つの実験から排出されるGeneChip約50枚のデータを一括処理する能力を持ったPercellome自動換算・データ品質管理（QC）に関わるソフトウェアに加えて、3次元多層（Millefeuille）データに最適化した、発現パターン類似性による候補遺伝子検索、およびそれを発展させた教師無しクラスタリング<sup>3)</sup>を中心とした解析システム（MF System, MFシリーズ、開発：相崎 健一）を独自に実用化し、開発継続中である（図3）。これらにより、データQCはその日のうちに、基本的な発現情報検索から全遺伝子の教師無しクラスタリングまでを3日間で完遂できるものとなっている。

この基本解析を用いて、発現パターンによって分類された候補遺伝子リストが多数生成される。一部の幸運な例ではただちに新規と思われる毒性関連反応を見いだすことができた。またそうでない場合のための1つの補強手段とし

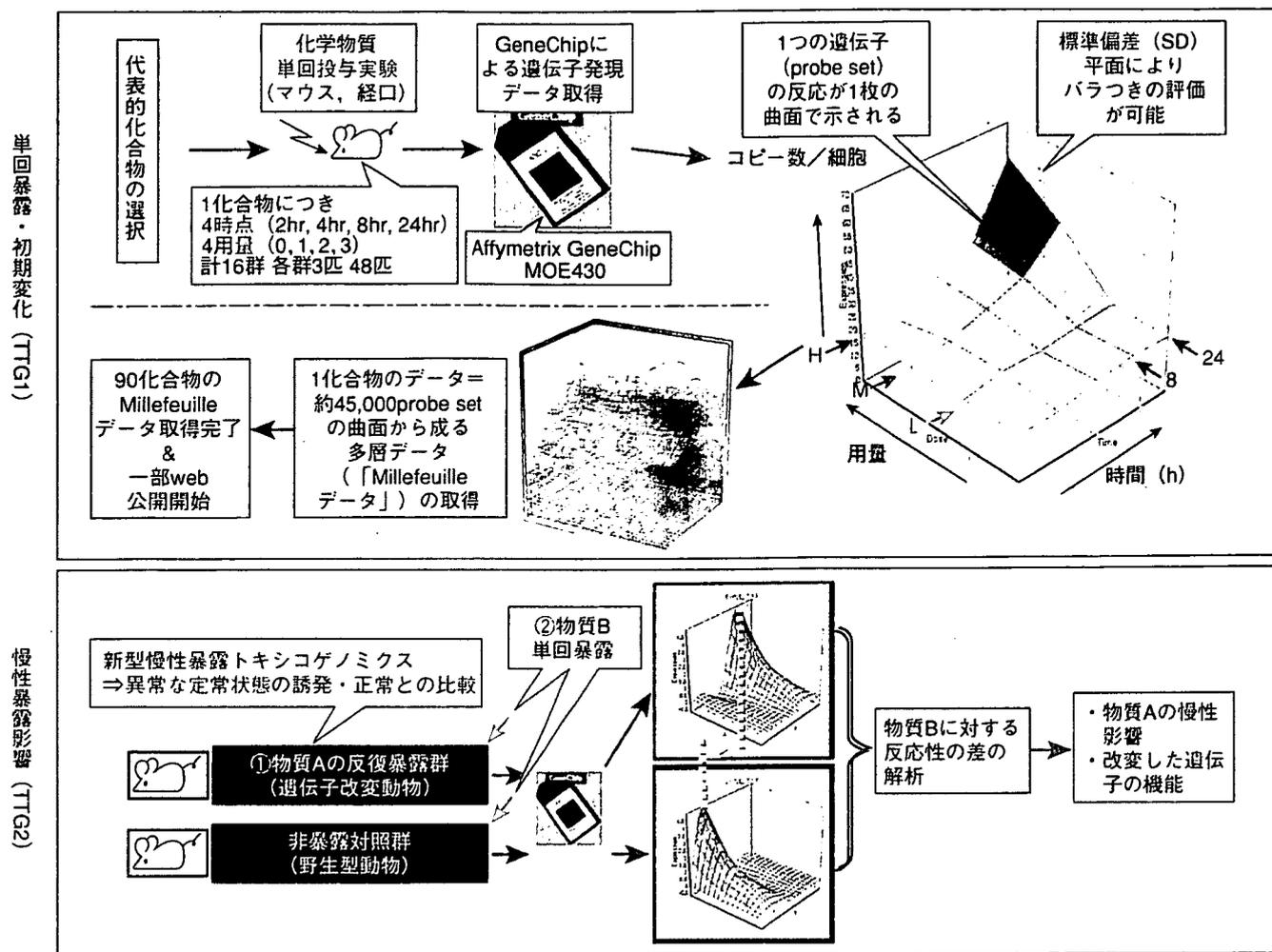


図2. Percellome法と3次元表示による多層 (Millefeuille) データシステムを用いたプロジェクトの根幹部分の概要  
 単回投与による遺伝子発現初期変化データを90化合物について取得 (上段)。現在、反復投与の影響を検討中 (下段)。H; 高用量 (high), M; 中用量 (medium), L; 低用量 (low), C; コントロール (control)。

て、Gene Ontologyなどの既存知識を利用して候補遺伝子リストの理解を支援するソフトウェア (MF GoPlot) を用意した。このツールは一種の化合物クラスタリングとしても利用することができる。

さらに候補遺伝子リストを基に複数化合物間比較を行い、複数条件下においても同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。本システムで得られた同期遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性があり、データベース化しつつ、その解析を進めている (5TB規模のデータベース部分および、大量計算アルゴリズム実装は (株) NTTコムウェアおよび (株) 日本NCR/Teradataとの共同開発による)。

### Ⅲ. Percellome手法のリアルタイムPCRを含む他のプラットフォームへの適用

Percellome手法は、GSCの受け入れ条件を整えることに

より、様々なプラットフォームに適用可能である。その1つとして最も定量性が高いとされるリアルタイムPCR (ABI PRISM 7900 HT・96ウェルプレート) への適用例を示す。現行のRT-PCR絶対定量法では、遺伝子ごとに検量線が必要であり、多数のサンプルについて多数の遺伝子を検討するには不向きである。Percellome RT-PCRでは、マイクロアレイと同様の原理を用いる。すなわち、サンプル破碎液に、その細胞数に比例する量のスパイクカクテル (GSC) を添加し、それらのCt値をPCRプレートごとの検量線とすることにより、測定したい遺伝子のCt値を細胞1個当たりのmRNAコピー数に換算する。これにより、GAPDHやActinなどのハウスキーピング遺伝子が変動してしまう際の問題、例えば、少数の遺伝子を検討する際にGlobal normalization法を適用し難い問題などが解決される。共通サンプルを測定しデータを比較することにより、Affymetrix GeneChipのPercellome結果と9割程度の整合性が確認され、

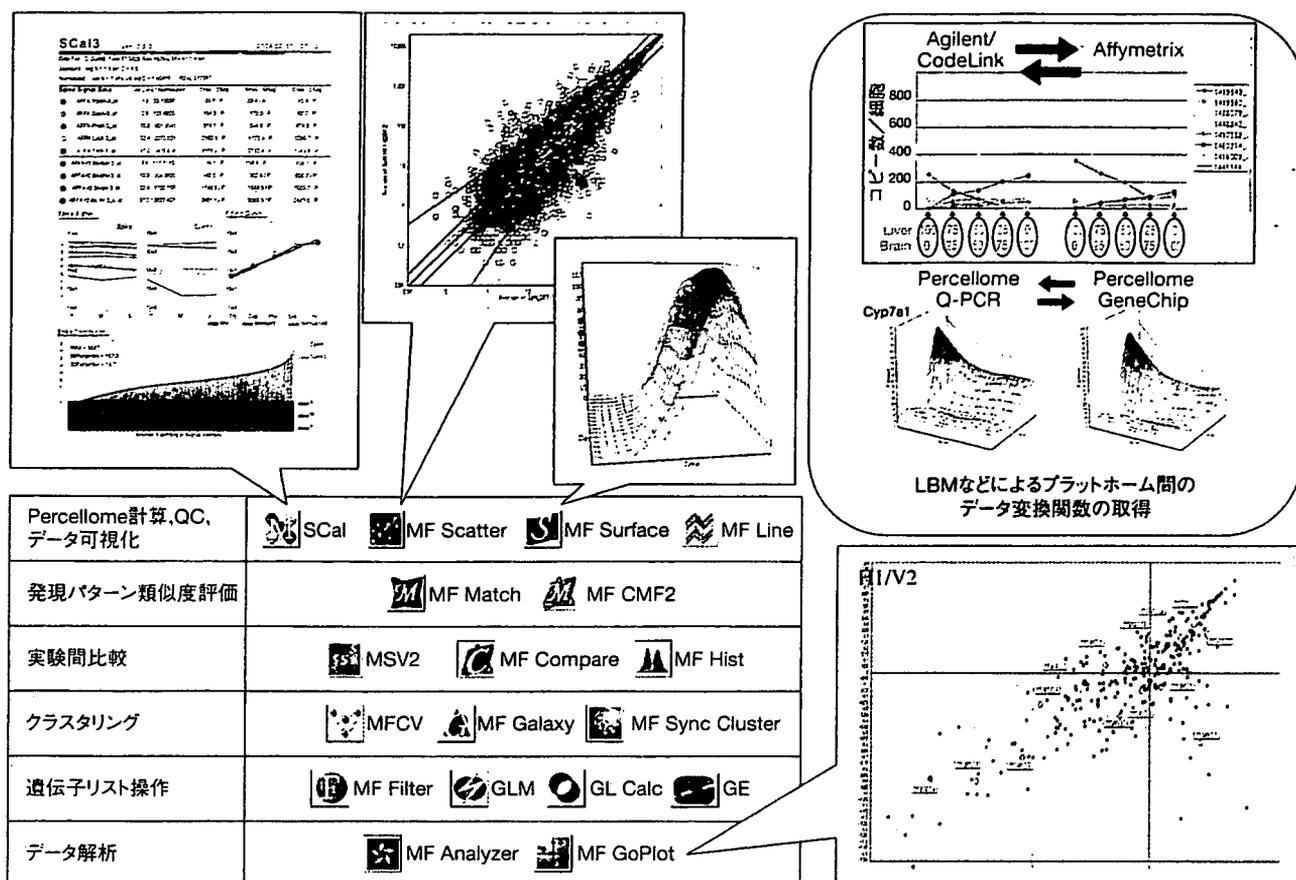


図3. 3次元多層 (Millefeuille) データの解析などに用いる独自開発プログラム群

品質管理とともに Percellome 計算を自動的に実施する SCal, Plot ソフトウェア, 3次元曲面の描画ソフト (MF Surface), など。右上はプラットフォーム間のデータ変換情報の得方を示す。LBM を用いる方法 (上段) と、実際の実験サンプルを用いる方法 (下段) がある。いずれも、一度、両方のプラットフォームでそれらのサンプルを測定する必要がある。

GeneChip と Percellome RT-PCR との間でのコピー数の換算式がいくつかの遺伝子について得られている。この他に、Agilent 社製の単色マイクロアレイと CodeLink アレイに GSC を測定可能なカスタムアレイを用意し終え、LBM サンプルのデータなどをもとに、これらとの間の換算式も得つつある (図3右上)。

Percellome 法は、Affymetrix の新しいエクソンアレイの定量性・直線性の検討にも適応可能である。Affymetrix 社の Human Exon 1.0 ST Array と従来型の発現アレイ Human Genome U133 plus 2 について、性質の異なるヒト癌細胞株 2 株から調製した LBM 様標準サンプル (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 および 0:100 混合 5 サンプル) による比較を行い、両アレイ間の相関性の高い probe set を多数検出することができた。また、既知のエクソンに対して設計された probe set では発現が見られ、イントロンに対して設計された probe set では発現が見られない、あるいは、既知の splicing variant に対応した probe set の発現が検出された、

などの基本性能が確認された。しかし、Percellome 法を適用して未知の splicing variant の検出力を向上させるためには、現状では各エクソン間の定量性に問題があることが示唆された。定量値を算出する補正アルゴリズムの開発など、何らかの対策が必要であることが考えられ、現在、Affymetrix 社に確認を行っている。

#### IV. 核内受容体原性毒性の Percellome トキシコゲノミクス解析

受容体原性毒性とは、化学物質が受容体 (リガンド依存的転写因子を含む) に選択的に結合してシグナルをかく乱し、その結果生じる有害性を指す。代表例としてはダイオキシンが挙げられる。AhR (Arylhydrocarbon receptor) ノックアウトマウスでは、ダイオキシンを大量に投与しても毒性がほとんど観察されない。すなわち、野生型マウスがダイオキシンで死ぬメカニズムには、AhR が必須であり、AhR からの異常なシグナルがマウスを死に至らせていることに

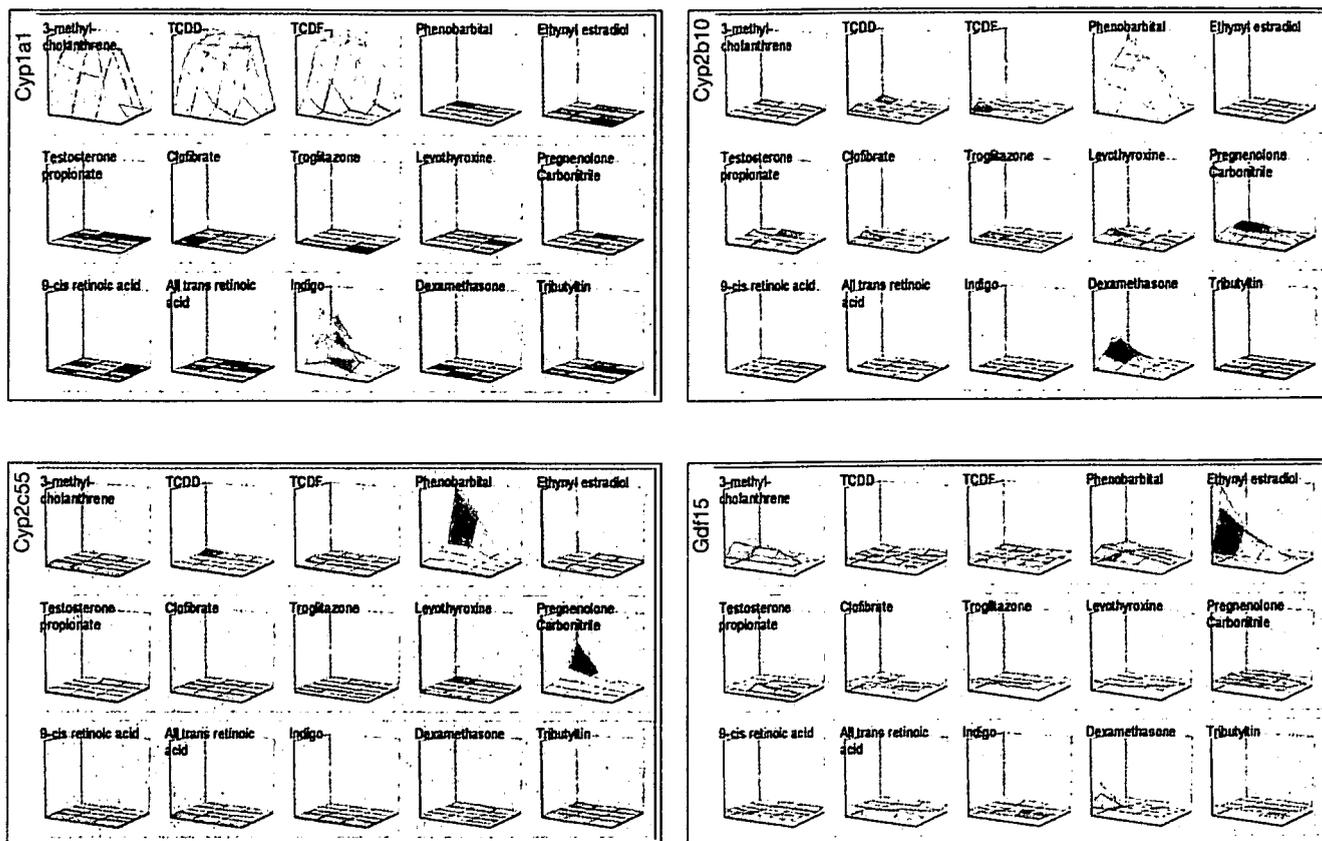


図4. 化合物間の発現比較

15種類の核内受容体リガンド化合物(各3次元グラフ内に表示)によるCyp1a1(左上), Cyp2c55(左下), Cyp2b10(右上)およびGdf15(右下)の遺伝子発現を3次元表示したもの。各軸は、図2のとおり。縦軸のスケールは遺伝子ごとに共通。リガンドに選択的な遺伝子の発現が確認される。

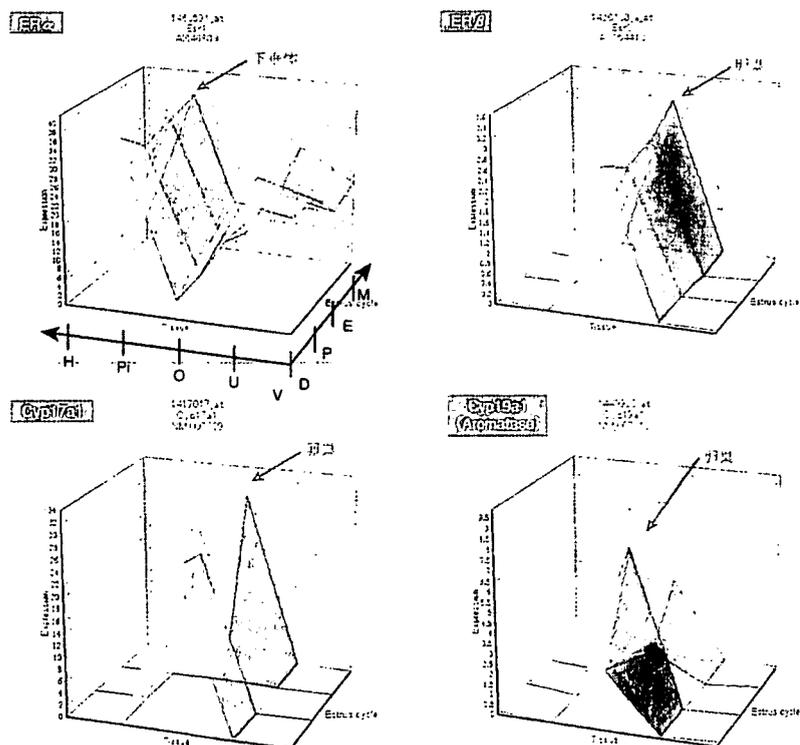


図5. 臓器間の発現比較

マウスの性周期(Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrus)の4日間(1周期)ごとの視床下部(H)、下垂体(Pi)、卵巣(O)、子宮(U)および膣(V)における、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、Cyp17a1(steroid-17 $\alpha$ -hydroxylase)、およびCyp19a1(Aromatase)の遺伝子発現変動を3次元表示したもの。後二者の酵素は卵巣において周期性を持って発現している。

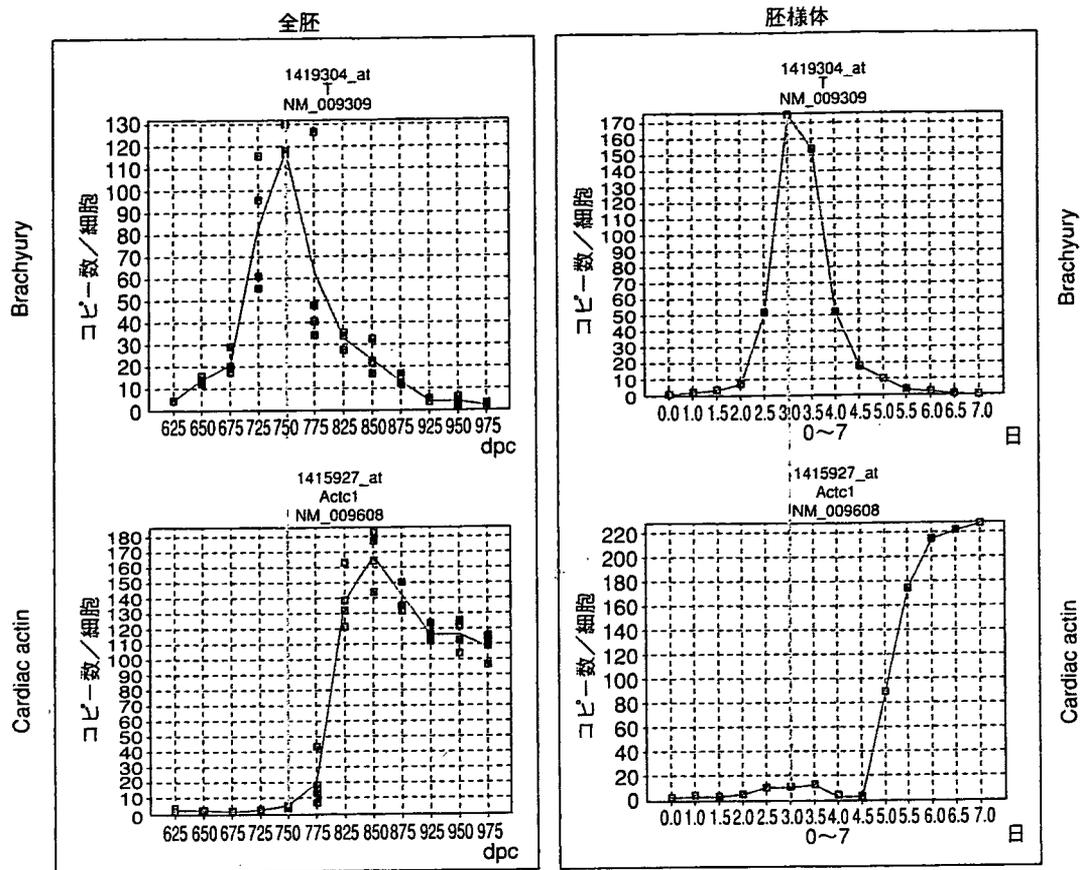


図6. マウス胎児 (全胚) と胚様体の発現比較

マウス全胚の胎生6.25日～9.75日までの遺伝子発現と、胚様体の1日～7日目までの遺伝子発現の網羅的データベースから、初期中胚葉分化マーカーであるBrachyury遺伝子と、Cardiac actin遺伝子の経時変化を示す。

なる。エストロゲン活性化学物質による有害影響(内分泌かく乱化学物質問題)も同様にER (estrogen receptor) を介する受容体原性毒性と考えられ、胎生期にERを発現する組織が、低用量シグナルかく乱影響の重要標的であると考えられている。

ここでは、受容体原性毒性研究の基盤として、Percellome手法を適用して、①核内受容体作用性物質によるマウス雄肝臓の遺伝子発現変動、②性周期に伴うマウス雌生殖器遺伝子発現変動、③生後の発達過程におけるマウス雌生殖器遺伝子発現変動、の3種類のデータベースを構築した。例えば、①では10種類の核内受容体に作用する典型物質について、単回経口投与後、2, 4, 8, 24時間目の変動を解析し、Ethinyl-estradiolがGDF15, TCDDがCyp1a1, 9-cis Retinoic AcidがCyp26a1, DexamethasoneがCyp2b10, ClofibrateがCyp4a14, PCNがCyp2c55など、各々の受容体に特徴的な遺伝子発現を誘導するところをとらえられている(図4)。②の性周期データベースは視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣を対象としており、性周期との関連が網羅的にとらえら

れている(図5)。これらのデータベースは、今後、各種の候補物質が引き起こす変化を詳細に解析する際の基準として利用される。

## V. 発生トキシコゲノミクスへの応用

発生毒性学は、個体発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現調節の分子機構を把握することにより、さらに正確なものに補強されると考える。現在、C57BL/6マウス胚の器官形成初期にあたる胎生6.5～9.5日(プラグ確認日: 0.5日)の、①全胚の遺伝子発現変動解析、②遺伝子欠失マウス全胚との比較、および③標的が明らかな既知発生毒性物質投与による本データベースの具体的な適用、を実施している。①についてはすでに0.25日間隔(Time point 計12点)の遺伝子発現データベースを得て、②遺伝子欠失胚のデータといくつかの注目すべき遺伝子についてはwhole mount ISHを用いた発現の検証を加えた。これと並行して、ES細胞からhanging drop法で得た胚様体の0.5日間隔の遺伝子発現データとの比較を実施している。個体発生に関与

する遺伝子群の多くは経時的に激しく変化しており、既知発生毒物質投与実験については標的遺伝子シグナルカスケードを解析中である(図6)。

## おわりに

ノーザンブロットでは実験サンプルにだけバンドが見られ、対照サンプルには遺伝子発現がないという結果を得ても、細胞1個当たりで定量してみると、対照が10コピーに対して実験サンプルが20コピーである場合がある。“無”が“有”になったのではなく、“10”が“20”になったのである。

さて、筆者らの属する毒性学でも、医学の分野でも、疾患概念や毒性概念が整理され、患者や実験動物を診断する際には、まず、そのどれに当てはまるかを検討する。すなわち、どの“典型”に近い症例であるかを検討することから始まることが多い。

しかし、最近の医学・生物学には多因子疾患・多因子形質発現制御の概念が導入され、今から何年かの後には、“21世紀初頭までは、患者の遺伝子多型を調べずして治療を行っていた時代”として、“血液型を調べずに輸血していた時代”と並び称されるようになる可能性がある。このような多因子概念が定着すると、その多くは、“有(100%)”“無(0%)”の組み合わせではなく、“70%”“50%”“90%”といった半端な数の組み合わせであることが考えられる。すなわち、今までの離散値的な“典型”例を基準とするアプローチから、

連続値的な病態“スペクトラム”を直接扱うアプローチに变革していく可能性が考えられる。その際の網羅的データの解析とその蓄積の必要性を考えると、遺伝子発現データの定量化・標準化という問題は、今まで以上に重みを増すと考えられる。生命現象の網羅的解析にはトランスクリプトームだけでは不十分であることは自明であるが、この定量性を確保することは、これから実現されるであろう網羅的プロテオミクスなどの基盤としても重要ではないかと考える。

マイクロアレイなどから得られるトランスクリプトーム情報が、今後の医薬品審査や化学物質の安全性評価の際に必須なものとなる時代がすぐそこまで来ていることを念頭に、筆者らはPercellome法をさらに展開し、Percellome Projectデータベースを可能な限り高精度に保ちつつ毒性学的な内容を充実させるべく最大限の活動を継続して行く所存であるが、この技術、あるいは研究内容が毒性学以外の研究分野にもお役に立つことができれば幸甚である。

謝辞 本システムの開発とプロジェクトの遂行に当たっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。本研究は厚生労働科学研究費補助金H13-生活-012, H13-生活-013, H14-トキシコ-001, H15-化学-002, H18-化学-一般-001などによる。

## 文献

- 1) Kanno J, et al: BMC Genomics (2006) 7: 64
- 2) 菅野 純ら: 細胞工学 (2004) 23: 685-693
- 3) Matsumoto S, et al: Genome Informatics (2005) 16: 183-194

特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

---

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

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

別刷

秀潤社  
細胞工学  
CELL TECHNOLOGY  
Vol.26 No.12 2007

## 特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

## 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

An Attempt for Adding a New Dimension to Toxicogenomics Research : 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF Comparison Trial in The Percellome Project

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

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Atsuya Takagi

Percellome トキシコゲノミクスはマイクロアレイという数万遺伝子の発現レベルを一気に測定するハイスループット技術を利用し、全遺伝子のカスケード解明を最終目標としつつ、従来に比べてより早く安くかつ正確な毒性評価系の確立を目指すものである。筆者らはこのような次世代の毒性評価・予測技術を開発するために、細胞1個当たりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法を開発した。今までに 90 以上の化学物質についての網羅的遺伝子発現情報を得て、なお追加中である。本稿では環境化学物質の一例としてダイオキシンの分子毒性に関わる知見を紹介する。

**key words**

Percellome Project, 遺伝子発現カスケード, 分子毒性学

**i** 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 E-mail : kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌攪乱関連などの分子毒性学研究、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所掌業務の一環として有機的に推進。

相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋 聡、中津則之\*、児玉幸夫、高木篤也 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 \*現(独)医薬基盤研究所 基盤的研究部

## はじめに

毒性学は生体 (Biosphere) と外来性物質 (Chemosphere) との相互作用を研究する分野であり、目的は“ヒトの安全”である。日常遭遇する化学物質 (生活化学物質、環境化学物質、医薬品や食品を含む) が摂取された際の安全性を担保するため (毒性評価) に、人体実験が困難な場合、身代わりとしての実験動物の毒性所見をヒトに外挿することが行われてきた。これは両者が基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいている。そして、酵素、膜、DNA など比較的普遍的かつ基本的な標的が主な検討対象となってきた。現在の分子毒性学は、生体反応メカニズムに踏み込み、受容体、転写因子などとの選択的結合によるシグナル伝達障害などの標的的特異性の高いものや、エピジェネティックな発現影響なども直接的な対象とするようになり、基礎分子生物学と直結する時代に入っている。古い話ではあるもののいまだに分子機構の解明が完結していないサリドマイドの催奇形性問題、あるいは、最近の健常人ボランティアに対するバイオ医薬品 (治療薬) の微量投与がその全員を集中治療室送りにした事件は、種差問題の解決を含む分子毒性評価法の確立の重要性と、その現状を示していると考えられる。

## I. トキシコゲノミクス

分子毒性メカニズム解析のためのツールの1つに mRNA を対象とするトキシコゲノミクスがあり、見落としのない網羅性が要求される毒性学では全遺伝子のカスケード解明がそ

の最終目標となる。これにより従来に比べて早く安く正確な毒性評価を目指すことができる。そして、種差・個体差、一生涯の反応性を修飾する胎生期・周産期影響、あるいは複合作用などを包括的に扱う際には、生命科学の各分野との緊密な連携が必須となる。また、従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、例えとしては光学顕微鏡に対しての電子顕微鏡のような立場にあると考えられる。電子顕微鏡が広く用いられるようになるには、教科書や図譜が必要であったように、トキシコゲノミクスの実用化にはある程度の量のデータの蓄積と解析のための基礎研究 (関連分野との連携を含む) が必要である。そこで、筆者らは、情報の交換性を確保するために細胞1個当たりの mRNA 発現コピー数を得る Percellome 手法を開発した。これを基盤としたプロジェクトを展開中であり、今までに 90 以上の化合物についてのデータを蓄積し、その解析ツールを開発している。

## II. Percellome 法

原理は単純で、サンプルの細胞数を測る代わりに DNA 濃度を精密に計測し、それをもとに外部標準 mRNA (スパイク RNA) を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そして RNA 抽出・測定に移る。スパイク RNA の測定値を基準に、サンプルの各 RNA の測定値を細胞1個当たりのコピー数に換算する<sup>1)~3)</sup>。これにより、実験操作、試薬やマイクロアレイのロット差などによる系統誤差を相殺するという本来の目的が果されるほか、測定過程における各種の異常が高感度に検出されることから、品質管理精