

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連関性  
(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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 20(2008)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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 20(2008)年 3 月

目 次

I. 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－ 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	..... 135
2. 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 井上 達	..... 163
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	..... 167
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	..... 175
5. 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 池田 通	..... 189
6. 化学物質の遺伝子傷害性予測に関する研究 本間 正充	..... 199
7. 非形質依存的インフォマティクス開発研究 相崎 健一	..... 215
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 245
IV. 研究成果の刊行物・別刷	..... 249

# I . 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、それらの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(\*)：14～28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 (HS-ISH) 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整備を行った。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、遺伝子傷害毒性について、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、申請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・検証を行った。

本年度、DB 生成研究に於いては、新型慢性暴露実験について、化合物3種類(クロフィブレート、四塩化炭素、及びトリブチルスズ)、単回チャレンジ化合物3種類(クロフィブレートにはクロフィブレート、PCN 及び ATRA、四塩化炭素には四塩化炭素、クロフィブレート、及びフェノバルビタール、トリブチルスズには、トリブチルスズ)を組み合わせた7実験のデータを蓄積した(総計 1944 万データ)。データ解析を進めた結果、新しい概念の有用性を確認

する慢性影響情報が得られている。多種臓器については、肝、腎、心、肺、精巣、脳(皮質、海馬、小脳、視床下部)からの組み合わせのデータを、3化合物(四塩化炭素、カフェイン、サリドマイド)について取得した。四塩化炭素とカフェインについては肝、腎、心、肺、精巣、サリドマイドについては肝、腎、心、肺、大脳皮質、海馬からならデータを取得済み(総計3,456万データ)である。臓器共通、及び臓器特異的な遺伝子発現が明瞭に捉えられている。HS-ISHは染色工程の自動化はほぼ終了(賦活化過程のみ手動)し、signal増幅法の採用により、検出感度も30コピー前後まで改善した。48切片の染色データ取得を開始し、Albuminを陽性対照として、実地運用体勢を確立した。また、定量的解析システムの導入も開始した。基盤研究では、各班員の実験系について網羅的遺伝子発現解析を用いた検討を開始し、発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析において、分子標的が明らかな催奇形性物質(サイクロパミン)あるいは、分子標的が不明だが種差が著しい催奇形性物質(サリドマイド)の経胎盤投与マウス胚における網羅的遺伝子発現変動解析により、各物質の新たな標的分子候補を同定するなどの成果が得られた。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、プラットフォーム間データ変換の検証、プローブ毎の飽和補正、発現パターンのソーティング・抽出アルゴリズムの開発・改良(RSort)、遺伝子クラスタの意味空間への投影解析技術(GOPlot)の改良を行った。

〔(\*)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。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

- 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
- 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
- 漆谷徹郎 同志社女子大学・薬学部・病態生理学教  
室・教授
- 北川昌伸 東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・  
包括病理学分野・教授
- 池田通 長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・  
教授
- 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
- 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

#### 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、多臓器間の連関情報、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. 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 (群ごとのプールの行わない)。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のハイスループット *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 の自動化に加え、検出感度の改善、実地運用体制の確立、定量的解析システムの導入を行った。

【基盤研究】: 各専門分野から6人の分担研究者を配し、評価精度の向上を目指した。(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 (北嶋): 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、(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、申請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、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、プラットフォーム間データ変換の検証、プローブ毎の飽和補正、発現パターンソーティング・抽出アルゴリズムの開発・改良 (RSort)、遺伝子クラスタの意味空間への投影解析技術 (GOPlot) の改良を行う (相崎)。

## C. 結果

### 【①データベース生成研究】

昨年度に続き、データベース生成を継続した。化合物3種類 (クロフィブレート、四塩化炭素、及びトリブチルスズ)、単回チャレンジ化合物3種類 (クロフィブレートにはクロフィブレート、PCN 及び ATRA、四塩化炭素には四塩化炭素、クロフィブレート、及びフェノバルビタール、トリブチルスズには、クロフィブレート) を組み合わせた7 実験のデータを蓄積した (総計 1944 万データ)。各化合物の投与量は次の通り。クロフィブレート慢性曝露 70mg/kg に対し、単回チャレンジは、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。四塩化炭素慢性曝露 5mg/kg に対し、単回チャレンジは、クロフィブレート: 0, 10, 30, 100mg/kg、四塩化炭素: 0, 0.7, 2, 7mg/kg、フェノバルビタール: 0, 15, 50, 150mg/kg。トリブチルスズ慢性曝露 300ug/kg に対し、単回チャレンジはクロフィブレートを 0, 10, 30, 100mg/kg。

多種臓器については、四塩化炭素、サリドマイドの実験に加え、カフェインのデータを追加した。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, 1000mg/kg、カフェイン: 0, 3, 10, 30mg/kg) とし、単回投与後、2, 4, 8 及び 24 時間後 (n=3) に四塩化炭素とカフェインは肝、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。

新型慢性曝露実験では四塩化炭素以外は受容体が既知の化学物質を対象にした。それらはいずれも核内受容体を標的としている。特に、クロフィブレート慢性曝露の実験では、核内受容体 RXR を介した影響が生じることを想定した。データ解析を進めた結果、まず、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。これは、クロフィブレート慢性曝露により、RXR 活性が低下し、RXR を介するこれらの反応程度が減弱した可能性に対応するものと考えられる。また、PCN 単独では 2 時間目と 8 時間目に 2 度発現誘導がかかる珍しいパターンの応答を示す遺伝子 *Alas1* について、クロフィブレート慢性曝露動物では、2 時間目の反応が消失するといった影響も捉えられた (FIG.1)。四塩化炭素慢性曝露についても同様に、他の化合物による経時的発現変化の程度が概して減弱する傾向にある結果が得られた。例えば、クロフィブレートで発現上昇する *vanin1*, *Cyp4a10*, *Ppara* (FIG.2) やフェノバルビタールで発現上昇する *Cyp2b10*, *Gstm1*, *Gstm3* 等でその傾向が認められた。四塩化炭素では肝全体の機能抑制のために応答性低下が認められている可能性がある。

多種臓器については、臓器共通、及び臓器特異的な遺伝子発現が明瞭に捉えられており、例えば、サリドマイドを単回投与されたマウスの肝、肺、腎、心、脳(海馬及び大脳)における *Tsc22d3* 遺伝子の発現状況について、肝において、2 時間目に用量依存的な発現誘導が見られ、同様の早い反応が肺、腎、心に見られるが、脳では、反応が 4 時間目をピークとする形に遅れることが分かった (FIG.3)。また、四塩化炭素について、肝よりも肺で酸化ストレス反応に関わる遺伝子群の発現変化が明瞭に認められた (FIG.4)。

ハイスループット *in situ* hybridization (ISH) システムについては、自動化に加え、DAKO 社の Tyramide Signal Amplification (TSA) 法を用いたキットを利用した検出感度の改善を行い、肝で 30 コピー前後の検出まで安定実施できる体制を整えた。しかし、本キットは販売が中止されたため、tyramide の自家合成、個別購入した抗体等試薬により、同等の染色像が得られるよう検討したところ、抗体以外は個別試薬でまかなえることが判明した。必要に応じ、本法に適した抗体の入手もしくは作製を行う。なお、本法を用いない場合の検出感度は肝で 150 コピー程度であった。これにより、48 切片の染色データ取得を開始し、Albumin を陽性対

照として、実地運用体勢を確立した (FIG.5)。更に、定量的解析システムの導入について、蛍光プローブを用いた ISH の実施と定量性検討を行い、良好な結果を得、次年度以降の定量的解析に目処がついた。

## 【②基盤研究】

本年度は各班員の実験系について網羅的遺伝子発現解析を用いた検討を開始した。以下に、各班員の進捗を記す。

**発生毒性(北嶋聡)**: 遺伝子発現変動に立脚した高精度な発生毒性評価系の確立を目的として今年度は、催奇形性の種差が著しい化学物質サリドマイドを妊娠マウスに単回経口投与した際の、胚における網羅的遺伝子発現変動解析を検討した結果、遺伝子欠失マウス胚の肢部で形成異常の報告がある遺伝子の発現減少が認められた。この遺伝子産物がサリドマイドの未知の標的分子である可能性が示唆され、安全性評価上、意義深いものと考えられた。

**造血毒性(井上達)**: 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(重力場反応、呼吸・生体内酸化、エネルギー・体温調節などの)種々の階層レベルの生理的分子平衡が与える変動要因を考慮することを目的とし、酸化的ストレス消去機能を有するチオレドキシン遺伝子改変動物を用いた遺伝子発現解析を行った。これにより、酸化的ストレス関連生理的分子平衡の全体像が明らかになった。

**消化管毒性(漆谷徹郎)**: 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、消化管粘膜における酸化ストレスシグナルを解析するために、腸炎モデルを検討した結果、TNBS 腸炎モデルにおいて ASK1 欠損マウスのバックグラウンドである B57BL/6 は、BALB/c に比較して極端に感受性が低いことが判明し、これは炎症細胞浸潤以降の機序に関連する可能性が示唆された。今後この系統差と、ASK1 欠損を利用して、遺伝子発現レベルと腸粘膜障害機構を結びつけることにより、毒性シグナル解析する糸口がつかめた。

**免疫毒性(北川昌伸)**: 種々の薬剤の 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影響を与えうる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

ドの実験結果のまとめを行うとともに、新たに細胞毒性のあるドキシソルピシンの影響について、投与マウスの胸腺細胞および脾細胞における遺伝子発現プロファイルの投与後早期における変化を経時的に解析した。

**骨毒性(池田通):** 化骨に促進的作用があることが示唆された 2 種類の薬物について研究を進めた。alprazolam[ベンゾジアゼピン系] (30ug, 120ug/kg) 及び sodium valproate[バルプロ酸ナトリウム系] (20mg, 80mg/kg) の各薬物を、生後 8 週齢メス Wistar 系ラットに連日経口投与した。1 週間後に右側脛骨の骨幹部を1カ所水平に切断し、骨髄腔にワイヤーを貫通させることによる髄内釘骨固定を施した後、術創を縫合した。手術後も各薬物を連日経口投与した。その結果、一部の動物における骨折部位の化骨形成の亢進及び、ほとんどの動物における皮質骨の肥厚の亢進が確認された。このことは、これらの薬物投与によって軟骨内骨化よりも膜性骨化により強い骨形成促進作用があることを示唆するものである。

**遺伝子傷害毒性(本間正充):** 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。新たな 8 種の化合物セットをマウスに処理し、作製した TLDA のパフォーマンスをチェックした結果、ある程度の判別が可能であったが、非遺伝子傷害性物質によっても多くの遺伝子が増加したことから、さらに有効な遺伝子を絞り込む必要があることがわかった。

【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】

**相崎健一:**

#### 1. プローブ毎の飽和補正

マイクロアレイデータの誤差発生の主要な原因の1つとして、プローブの飽和による測定値の頭打ち現象を確認した。PerCellome プロジェクトで採用している Affymetrix のマイクロアレイ GeneChip は、1 つの遺伝子発現データを 22 種類のプローブの測定値から算出しているため、飽和補正式の検討は個々のプローブデータを表す内部データレベルで行った。この結果、a) 同一の遺伝子をターゲットとしたプローブであっても、個々の塩基配列に依り、飽和しやすさに差がある

こと、およびb) 飽和補正式は Langmuir の方程式が適用していること、が判明した。そこで飽和補正式 (Langmuir の方程式) の定数項を求めるため、LBM サンプル(サンプルに含まれる mRNA 量が厳密に検量直線に乗ることが保証されている特殊なサンプル) を用いて、最適化計算を行った。

#### 2. 発現パターンのソーティング・抽出アルゴリズム (RSort) の開発・改良

遺伝子発現を 3 次元平面波で表現する手法 (Surface グラフ) を元に、その凹凸の多寡を評価して単純なものから複雑なものへ分類・ソートを行う RSort アルゴリズムを改良・応用し、凹凸の少ない単純なパターンを示す遺伝子 (= より強力もしくは単純な発現制御を受けるもの) をより精度良く抽出できるように改良を加えた。また偶然、特徴的な発現パターンを呈するケースを除外するため、変動 CV 値や t 検定など、統計手法を組み合わせることで、絞り込み効率を向上させることが出来た。

#### 3. 遺伝子クラスターの意味空間への投影解析

昨年度開発した GoPlot を中心とした遺伝子クラスターの意味空間への投影解析の開発を進め、分解能向上の糸口を見いだした。すなわち、GoPlot 作図に利用する候補遺伝子群間で共通する GO Keyword を排除し、さらに候補遺伝子群間で差異が大きくても出現頻度が低いか分布が異常に偏っている GO Keyword も除外することで、分解能が向上する場合が多く観察された。この選定作業の大半を自動化するために MF GoViewer を作成し、GoPlot との連携強化を図った。

#### 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開発、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、に着手している。

本年度は、データベース生成研究について、新型慢性暴露実験、多種臓器のデータを蓄積し、新しい概念の有用性を確認する慢性影響情報、臓器共通、及び臓器特異的な明瞭な遺伝子発現変化データが具体的に得られた。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伴い、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、脳、肺、肝、腎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、データベースを拡充し、データ解析を進めた結果、慢性曝露による他化合物への反応性の修飾が遺伝子レベルで認められた。また、経口投与によっても、化合物によっては肺が鋭敏に反応するなど、多種臓器を同時解析しなければ捉えられない現象を捉えることが出来たことは、本研究の戦略の正しさを示すものである。次年度は、データ蓄積を進めるとともに、開発したデータ解析システム、およびハイスループット *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

#### 1) 書籍等

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

#### 2) 原著論文

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*, 130:811-823, 2007.

Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, Kanno J, Degawa M. A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats.

*Drug Metab Dispos*,35:1949-1955, 2007

Baniasadi S, Chairoungdua A, Iribe Y, Kanai Y, Endou H, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J. Gene expression profiles in T24 human bladder carcinoma cells by inhibiting an L-type amino acid transporter, LAT1. *Arch Pharm Res*, 30:444-452, 2007.

Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, Kanno J, Kanno H. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. *Exp Hematol*,35:1190-1200, 2007.

Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, Kanno J, Yamori T. Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. *Mol Pharmacol*.

2007 Aug 16

## 2. 学会発表

菅野 純、Chemosphere-Biosphere Interaction 解析ツールとしての Percellome Toxicogenomics、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会 特別講演 2007 年 6 月 27 日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、菅野 純、モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノミクス(Percellome 手法)解析、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月 27-29 日、東京

五十嵐勝秀、種村健太郎、中津 則之、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質によるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした Percellome 解析、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月 27-29 日、東京

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its possible contribution to 3R's, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences(WC6:第 6 回国際動物実験代替法会議)(Aug.21-25, 2007), Aug.23, Tokyo Oral

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体  $\alpha$  型の非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳機能解析、第 24 回日本疾患モデル学会総会、2007 年 8 月 31 日-9 月 1 日、つくば、口演

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Kodama Y, Takagi A, Kitajima S, TCDD-TCDF COMPARISON OF THE MOUSE LIVER TRANSCRIPTOME BY PERCELLOME ANALYSIS - A SEARCH FOR TEF GENE BY TIME AND DOSE-DEPENDENT RESPONSES -, Dioxin 2007(Sep2-7, 2007) Sep.4, 2007, Tokyo Oral

菅野 純、相崎健一、中津則之、北嶋 聡、児玉幸夫、小川幸男、Percellome Toxicogenomics for the Development of Mechanism-based Predictive Toxicology 第 66 回日本癌学会総会、シンポジウム「がん創薬におけるイノベーション」 2007 年 10 月 3 日、横浜、口演

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for Predictive Toxicology, 8th International ISSX meeting (Oct.9-12, 2007) Oct 9 short course speaker, Sendai

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体 ( $\alpha$  型) 非翻訳領域遺伝子改変マウスの脳構造および脳高次機能解析 第 100 回日本繁殖生物学会大会、2007 年 10 月 19-22 日、東京

五十嵐勝秀、北嶋聡、種村健太郎、菅野純、エストロゲン受容体  $\alpha$  型の妊娠維持への関与 第 100 回日本繁殖生物学会大会、2007 年 10 月 19-22 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Yukio Ogawa,, PERCELLOME TOXICOGENOMICS PROJECT FOR MECHANISM BASED PREDICTIVE TOXICOLOGY: AN APPROACH TO MINIMISING TOXICITY IN DRUG DEVELOPMENT. The 1st, Asia Pacific Regional Meeting (APISSX) of International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), December 3-6, 2007, invited speaker

菅野 純、トキシコゲノミクス(Percellome Project)を基盤とした分子毒性学の展開の試み、第 145 回日本獣医学会学術大会、比較薬理学・毒性学会 教育講演 2008 年 3 月 28 日、横浜、口演

## H. 知的財産所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

高次元データを塊に分割する装置(特許第 3995099 号)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

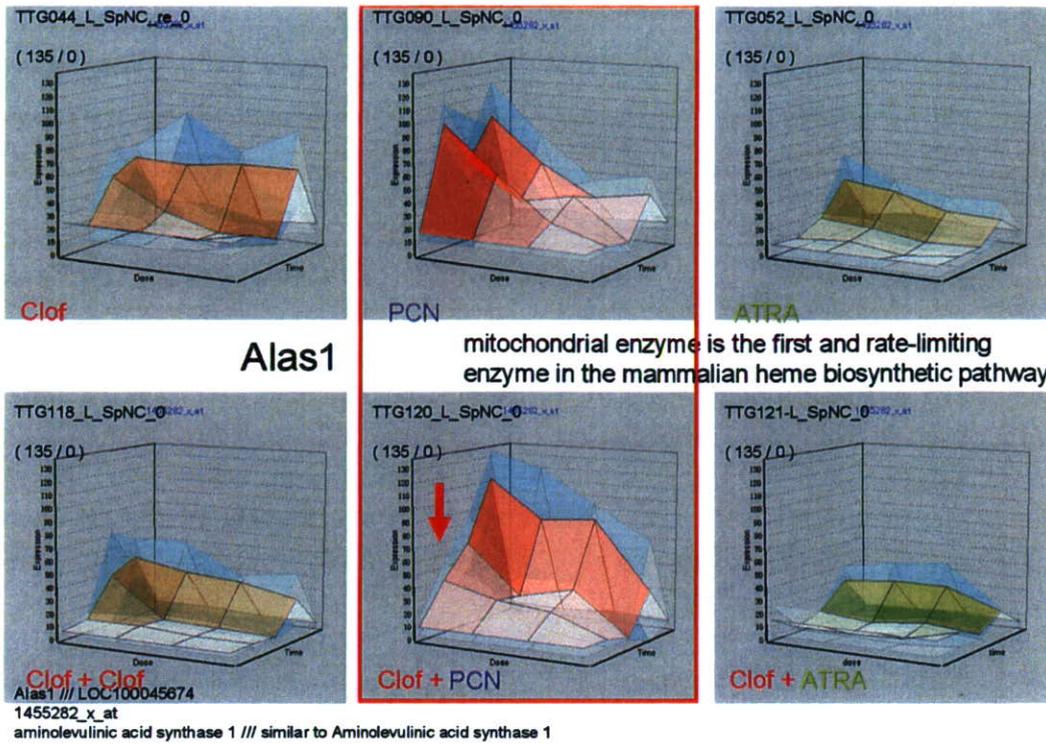


FIG1. 新型慢性暴露(慢性曝露:クロフィブレート)と単回投与実験に於ける遺伝子発現変化の比較  
 PCN 単独では 2 時間目と 8 時間目に 2 度発現誘導がかかる珍しいパターンの応答を示す遺伝子 Alas1  
 が、クロフィブレート慢性暴露動物では 2 時間目の反応が消失していた。

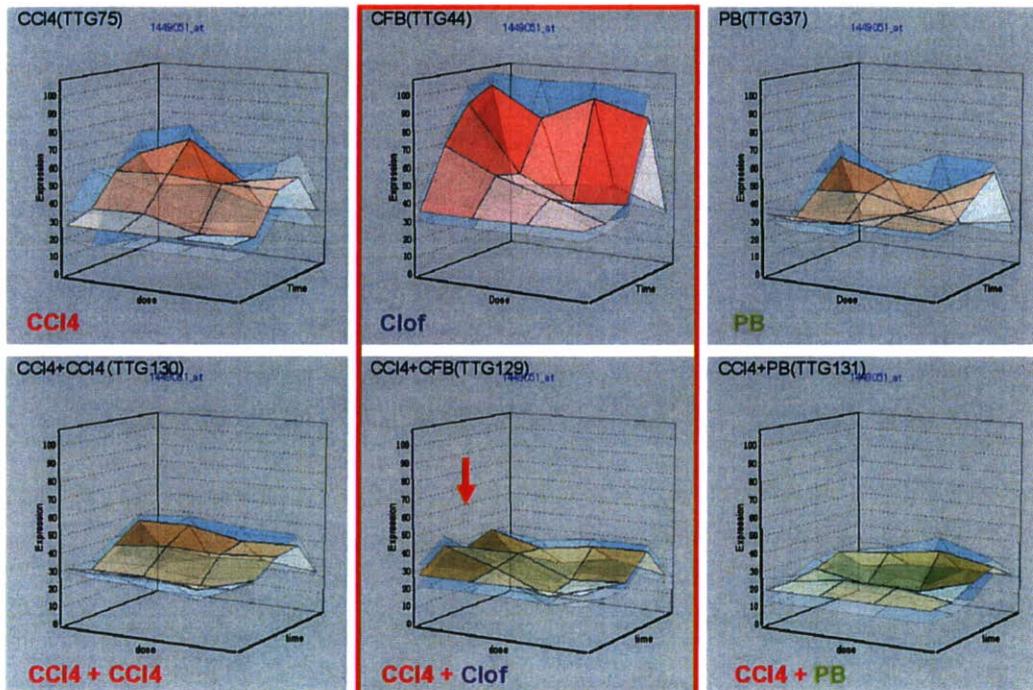


FIG2. 新型慢性暴露(慢性曝露:四塩化炭素)と単回投与実験に於ける遺伝子発現変化の比較  
 クロフィブレート(Clof)投与により発現上昇する PPAR $\alpha$  の応答程度が CCl4 慢性曝露により減弱して  
 いた。

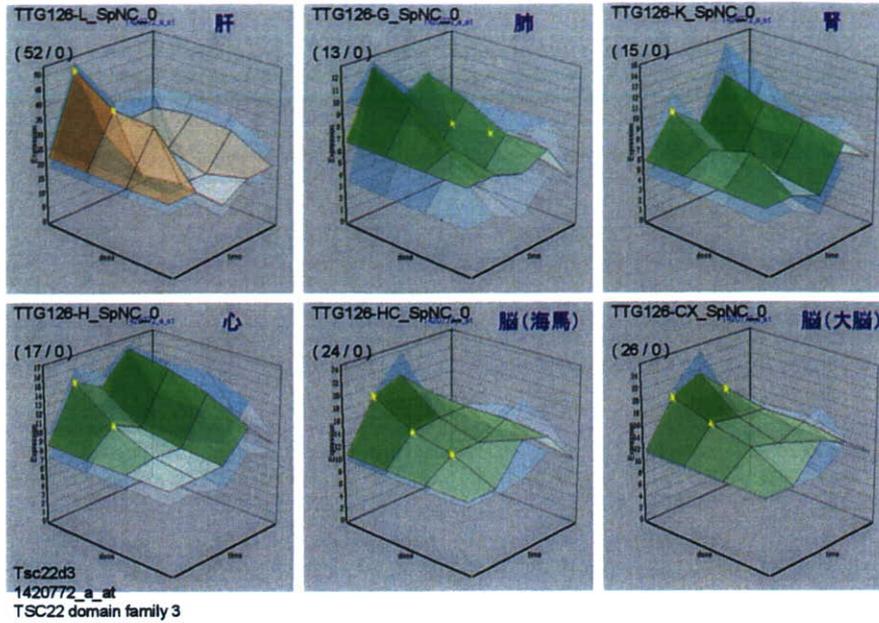


FIG3. サリドマイド単回暴露多種臓器に於ける遺伝子発現変化の比較

サリドマイドを単回投与されたマウスの肝、肺、腎、心、脳(海馬及び大脳)における Tsc22d3 遺伝子の発現状況。肝において、2 時間目に用量依存的な発現誘導が見られ、同様の早い反応が肺、腎、心に見られるが、脳では、反応が 4 時間目をピークとする形に遅れている。

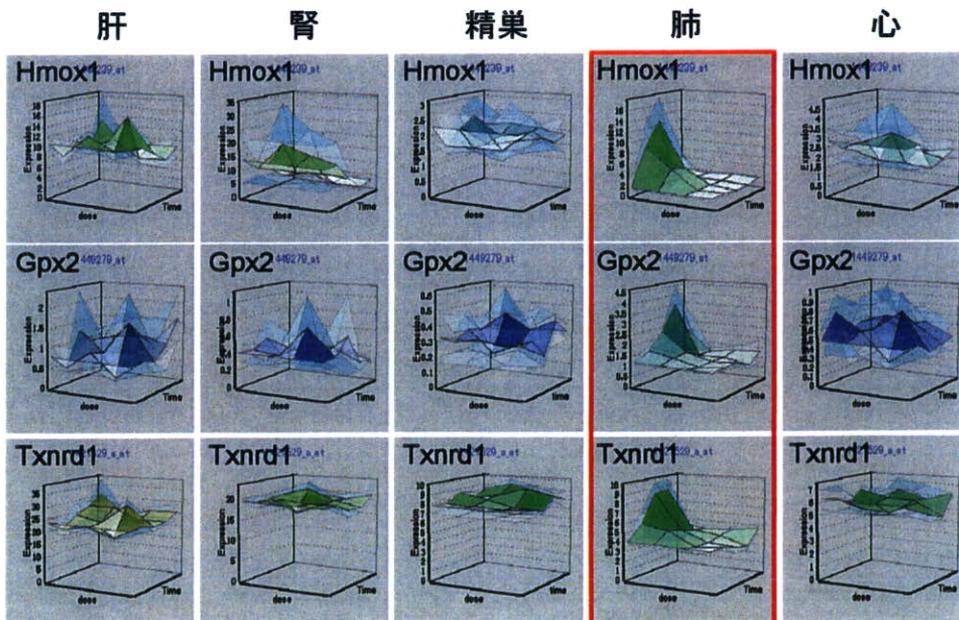


FIG4. 四塩化炭素単回暴露多種臓器に於ける遺伝子発現変化の比較

四塩化炭素を単回投与されたマウスの肝、腎、精巣、肺、心における酸化ストレス応答遺伝子(Hmox1, Gpx2, Txnrd1)の発現状況。ほぼ肺でのみ発現上昇が認められている。

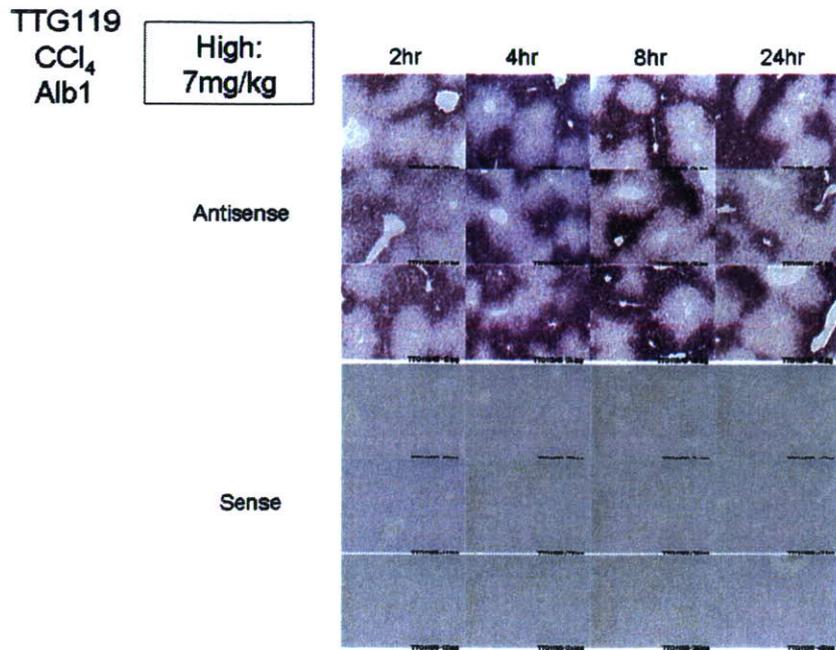


FIG5. ハイスループット *in situ* hybridization:

四塩化炭素投与実験(TTG119)の肝についてアルブミン mRNAの発現部位を *in situ* hybridization により描出した。非特異的な反応が生じていないことを確認する為の Sense 鎖による染色も実施した。その結果、陽性反応は門脈域周囲に認められることが明瞭に示されると共に、非特異的な反応が無い特異性の高い染色であることが示された。

## 委託研究報告書 (STEP 6)

---

2008年3月31日(月)

NTTコムウェア株式会社

## 目次

---

- ・ テーマ1. 飽和プローブセットの調査と対処方法の検討
- ・ テーマ2. MADICパラメータ検討

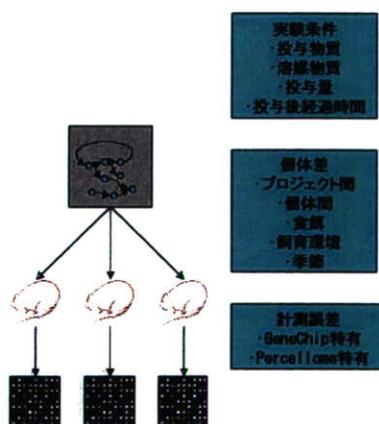
### 1.1.1. テーマ1



- テーマ
  - 飽和プローブセットの調査と対処方法の検討
- 背景
  - 平成18年度(STEP5)のテーマとして、化合物間クラスタリングの検討を行いました。この中で、高発現のプローブセットで飽和により、正常に計測されていないと考えられるプローブセットが見つっています。これらのプローブセットを特定し、適切な対処を行わないと計測結果を用いた研究にて誤った結論を導く可能性があります。
- 目的
  - 飽和していると考えられるプローブセットの特定とその対処方法を検討すること

Copyright © NTT COMWARE 2008

### 1.1.1. テーマ検討



- 仮説1: 計測誤差は個体差に比べて小さい
  - 発現量が小さい領域では成り立たない(一般に認知されている)
  - 発現量が大きい領域でも成り立たない(Step5における発見)
- 仮説2: 観測誤差は不偏誤差
  - 不偏であるかのチェックがなされていない。
    - 発現量が大きい領域では、不偏ではない

Copyright © NTT COMWARE 2008

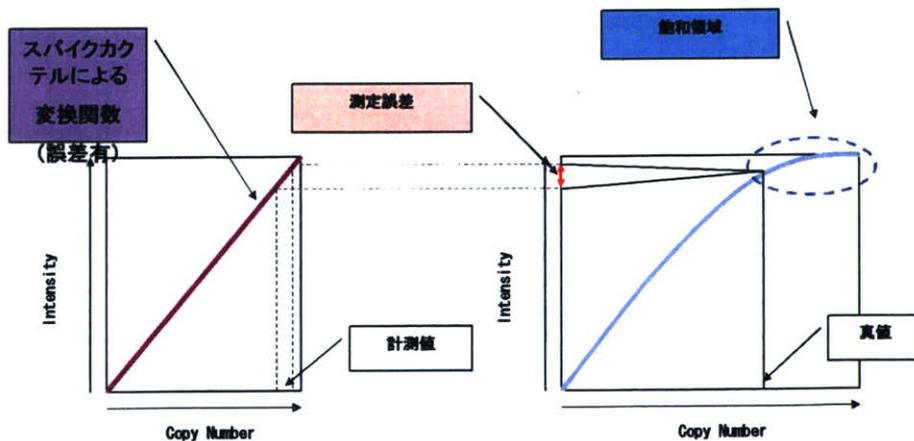
## 1.1.2. テーマ検討



- 高発現域において正常に計測されていないと考えられるプローブセットが見つかった
- 飽和の可能性
  - 完全に飽和しているのではなく、飽和への漸近状態
  - 不偏の条件を満たさない
  - 特に飽和近辺では不偏の条件が明らかに崩れている
- 個体差と計測誤差を別個に取り扱うことが可能か？
  - N=3ならば、正規分布とみなすことが可能
  - 計測誤差が個体差に比べて小さければ、計測誤差が0であるとみなしても影響は少ない
    - 既存の統計手法で分析可能なはず
- 計測誤差が個体差よりも大きく、不偏の条件を満たさないならば、特別の取扱いが必要である
  - 低発現域では、計測誤差(チップ偏差)は個体差よりも大きい。
    - 既知の課題として研究対象になっている
  - 中発現域では、計測誤差が不偏の条件を満たすと仮定できる？
    - 既存の分析手法で可能と考えられる
  - 高発現域は、飽和しつつある領域で、計測誤差が大きく、かつ、不偏の条件を満たしていない
    - Percolomeにより量を計測するためには補正が必要と考えられる。

Copyright © NTT COMWARE 2008

## 1.1.3. テーマ検討—Percolome変換の基礎



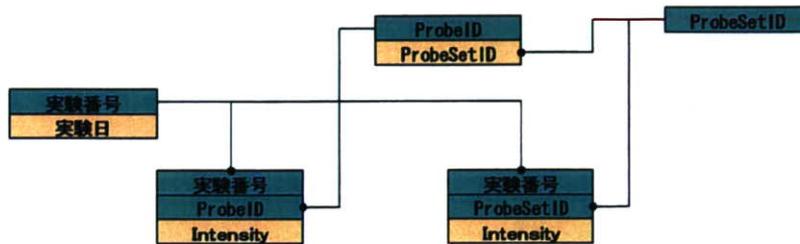
- 初期のデータでは、メーカーSOPをそのまま採用していたため、スパイク自身が飽和していた可能性がある
- 飽和領域はプローブごとorプローブセットごとの検討を行う

Copyright © NTT COMWARE 2008

### 1.1.4. テーマ検討 データ構造



- データ分析を行うにあたって、Probe単位のデータを取り扱うためのデータ構造を示す。



Copyright © NTT COMWARE 2008

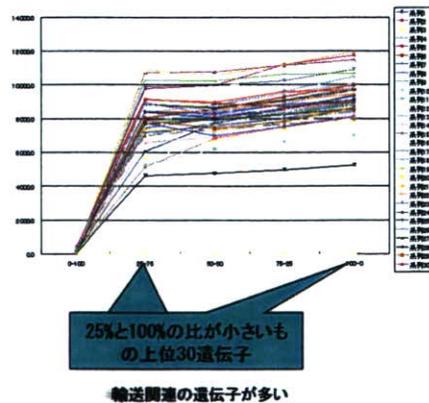
### 1.2.1. データ状況把握(飽和プローブセット)



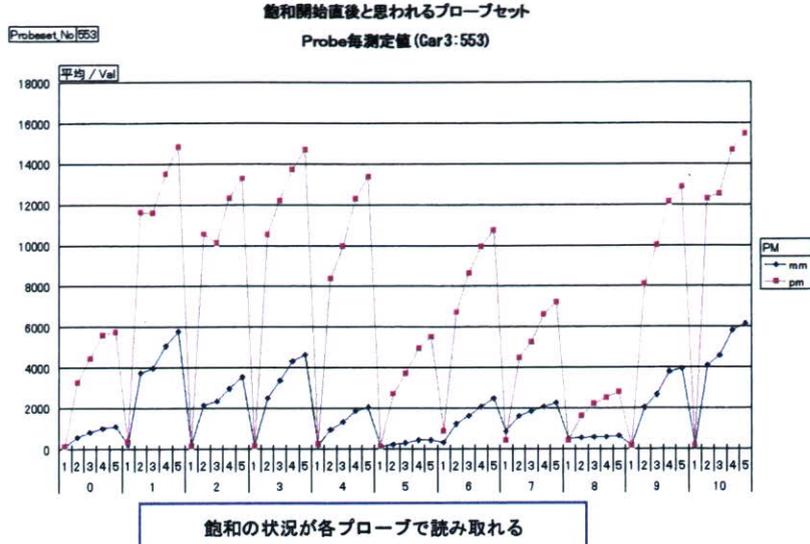
LBM (LiverとBrainの混合サンプル)のLiver100%において飽和していると考えられるProbeSetに着目し、状況を確認する

Gene_Sym	probeSet ID	ProbeSet 0-100	25-75	50-90	75-25	100-0	
Cad1	1480258.st	553	30.8	6034.7	7700.3	8808.2	8070.3
Anch	1455993.st	5214	22.5	5132.0	6807.3	7458.6	8048.9
Cys22	1449792.st	12010	30.7	5842.2	6895.4	7317.3	7789.2
Fab	1428078.st	32717	1.8	8556.2	6720.0	6814.8	10454.8
Asoc1	1419232.st	41539	7.0	9785.8	9640.1	11189.0	11702.8
Alth	1451184.st	8813	89.1	8008.8	8538.2	8254.4	8936.8
Hema1	1418188.st	41575	33.8	8852.6	7728.8	8380.0	8880.0
C1	1422854.st	38842	10.8	7407.5	8030.5	8478.1	8369.2
Alth	1455993.st	5714	5.2	7977.7	8211.1	8059.2	8778.2
List12	1428280.st	34538	135.2	8541.8	7122.5	7789.3	8511.4
Anoc4	1418708.st	42063	23.6	5246.1	6178.4	6592.6	6874.3
Mel	1424818.st	38178	36.5	8804.4	7597.8	8004.3	8617.1
Pra	1417248.st	43525	17.2	8352.9	8746.7	8420.8	10048.8
Sam1	1417452.st	43249	3.1	8520.7	8970.0	7489.1	8184.2
Ambo	1418848.st	44122	22.1	7138.5	7455.2	7895.1	8751.5
Faz	1418025.st	44748	10.9	7584.1	7857.8	8378.8	8879.8
Asa1	1418238.st	44832	35.8	7155.1	7567.4	7877.9	8361.3
Fra	1424278.st	36517	30.1	8637.8	8185.8	8810.4	8854.4
Rhad	1428225.st	36571	57.8	7892.8	7348.2	8187.4	8889.5
Asoc3	1418278.st	42463	54.8	7282.8	7280.4	7707.1	8473.4
Fab	1434110.st	28888	88.0	10897.3	10518.8	11158.5	11878.1
Qc	1428547.st	34249	17.8	8349.3	8418.9	8974.4	8389.7
Asa1	1438845.st	71858	26.1	8878.4	8845.8	10245.0	10889.7
Fat	1418913.st	43858	12.6	7011.2	7388.8	7889.2	7851.0
Sam1a1	1451513.st	8284	14.3	8387.7	8018.4	8548.8	8271.5
Asoc1	1417561.st	43210	79.8	7814.4	7872.7	8182.3	8782.8
Sam1a3	1422884.st	38300	28.1	8812.0	8828.1	8548.1	8880.4
Hema	1422854.st	38842	42.2	7877.2	7840.0	8254.8	8552.3
Cys2a11	1418808.st	43867	114.3	7872.8	7388.8	7807.7	8813.3
Asoc2	1417850.st	42821	74.3	10703.5	10735.1	11088.1	11417.8
Cys2a1	1418894.st	44777	71.8	8358.2	8289.8	8778.3	8040.2
Anch	1455993.st	5212	28.0	8838.2	8788.3	8888.2	8340.2
Asa1	1433021.st	43061	28.8	10783.1	10504.2	10889.3	11213.8
Sam1a1	1448880.st	12122	108.3	8107.8	8862.2	8550.2	8621.4
Asa1	1418233.st	41538	10.8	10848.1	10893.0	10803.8	10838.2
Alth1	1418223.st	44548	54.1	7740.3	8888.3	7503.0	8058.0
Psk1	1450208.st	4398	1.8	14.8	28.5	27.1	27.4
Sam1a1	1418825.st	42489	12.0	8850.2	8149.0	8577.9	8811.8
Alth1	1425280.st	35338	171.0	8848.4	8444.8	8238.3	8788.0
Mel1	1420463.st	40331	436.3	8125.8	8888.6	8558.7	8943.8

Copyright © NTT COMWARE 2008

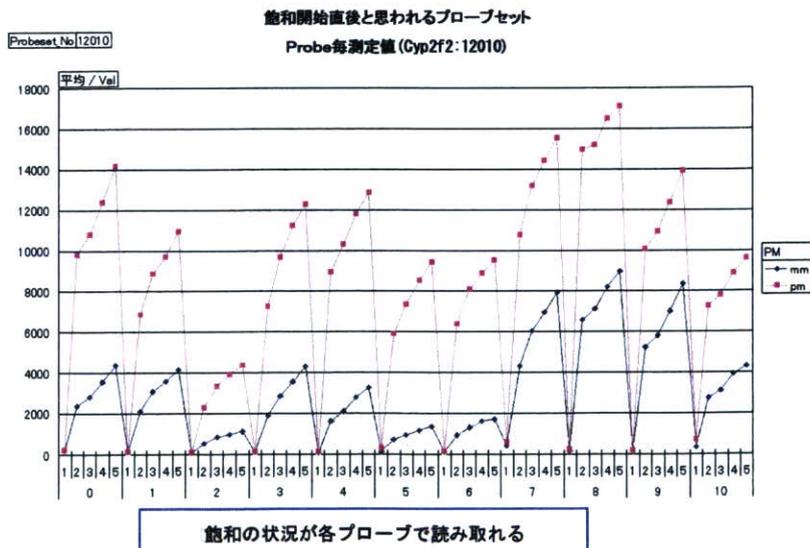


## 1.2.1. データ状況把握(飽和プローブセット)



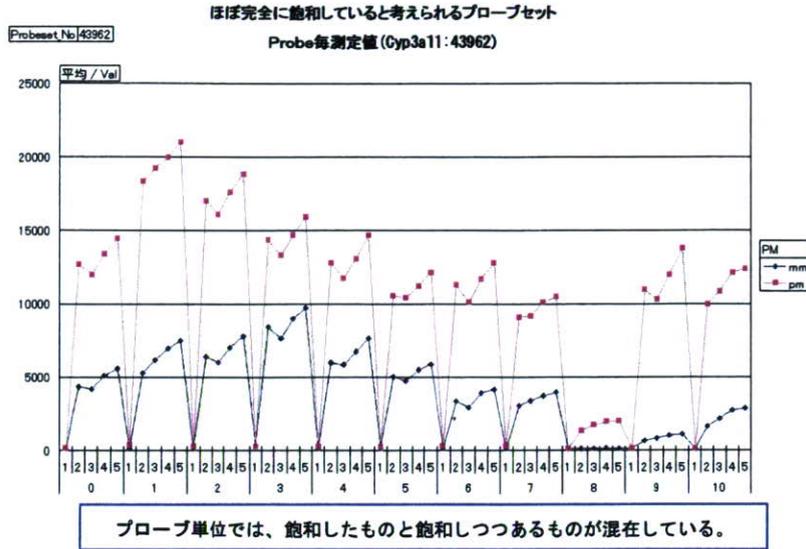
Copyright © NTT COMWARE 2008

## 1.2.1. データ状況把握(飽和プローブセット)



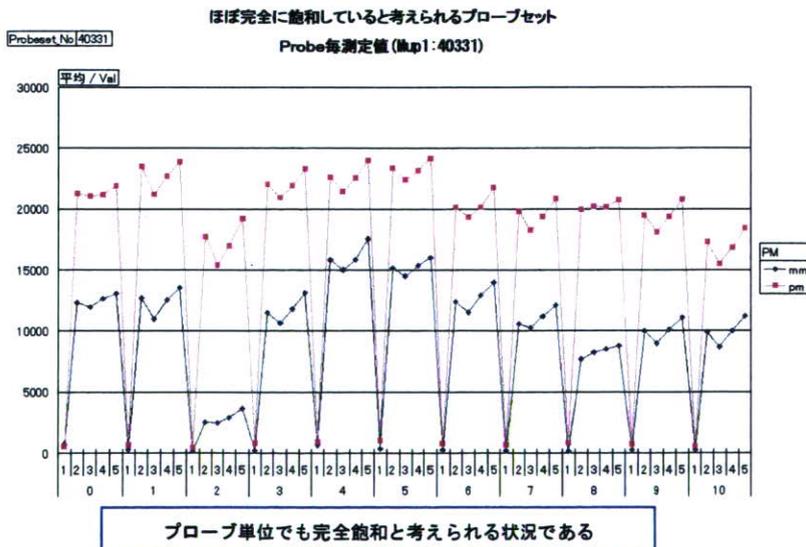
Copyright © NTT COMWARE 2008

## 1.2.1. データ状況把握(飽和プローブセット)



Copyright © NTT COMWARE 2008

## 1.2.1. データ状況の把握(飽和プローブセット)



Copyright © NTT COMWARE 2008