

検討した。対照群と投与群とで比較し、以下の3条件を満たす遺伝子群(プローブセット: p.s.)を選別した。すなわち、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。その結果、投与2時間後で122、投与8時間後で116、投与24時間後で329のp.s.が見いだされた。骨軟骨形成に関与するシグナルカスケード面から検討したところ、VdrやCol20a1遺伝子の発現上昇が認められた。他方、リストアップされたp.s.の遺伝子機能を検索したところ、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、投与24時間後に認められた(図1)。

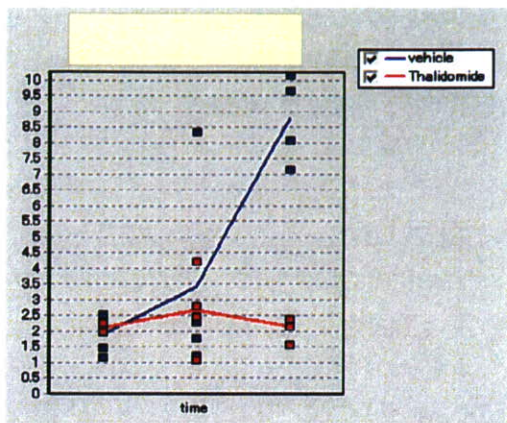


図1. 遺伝子欠失マウス胚の肢部で形成異常の報告があり、サリドマイド投与により、発現が減少した遺伝子の発現変動

次いで、この遺伝子カスケードを明らかにする目的で、この遺伝子のプロモーター解析および、ピアソンの相関係数を用いたこの遺伝子の発現変動と似た経時変化を示す遺伝子の抽出など、現在さらに解析中である。

D. 考察

以上の結果から、サリドマイド(1,000 mg/kgBW)の経胎盤暴露により、マウス胚では、ビタミンD受容体やコラーゲン遺伝子といった骨軟骨形成に関与する遺伝子の発現に影響を与えるとともに、遺伝子欠失マウス胚の肢部で形成異常が報告されている遺伝子の発現を抑制するということが明らかとなった。サリドマイドの催奇形性とこの遺伝子の関係についての報告は見いだされず、したがって、本実験により、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たことは非常に興味深い。

他方、サリドマイドが作用する可能性が示唆されたこの

遺伝子の欠失により、肢部の形成異常が認められるにも関わらず、マウスでサリドマイドを投与しても肢部の形成異常が認められないこと理由は、現時点で不明である。この理由の可能性として、1) サリドマイドの体内での代謝速度がヒトと比較してマウスで非常に速やかである可能性、2) マウスではサリドマイドが、胚特に肢部に分布しない可能性、以上、2点が考えられた。1)に関しては報告があり、この可能性を支持するものと考えられた。

今後は、マウスでのサリドマイド代謝の阻害により、マウスにおいてもサリドマイド投与による催奇形性が顕著となる可能性が示唆された。また、本実験において作用することが示唆された遺伝子産物の阻害実験による催奇形性の検証実験により、サリドマイド誘発奇形の分子機序の一端が明らかとなる可能性が示唆された。

他方、本解析法の今後の検討課題として、催奇形性物質を含む多様な化学物質の投与実験などを考慮し、より一般化させる必要性、およびバイオインフォマティクスの進捗を適宜取り入れることによる、より精度の高い解析法の開発の必要性が考えられた。本研究を通して、ヒトにおける発生毒性評価を、正確に詳細に、また迅速・安価に予測できることが期待される。

E. 結論

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、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、安全性評価上も、意義深いものとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、中津 則之、高木篤也、小川幸夫、児玉幸夫

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」監修:澤 明、細胞工学 特集 精神疾患研究の新たな戦略 vol. 26 No.1, 2007、秀潤社、東京、2007年、71-77 ページ

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—」監修:加藤茂明、細胞工学 特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす vol. 26 No.12, 2007、秀潤社、東京、2007年、1391-1396 ページ

2) 雑誌

Takahashi Y, Yasuhiko Y, Kitajima S, Kanno J and Saga Y, Appropriate suppression of Notch signaling by Mesp factors is essential for stripe pattern formation leading to segment boundary formation. *Dev Biol* 304: 593-603, 2007.

Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M and Kudo, A, Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction *J Exp Med*, 205: :295-303, 2008.

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S and Kanno J, Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci*. 33: 105-116, 2008.

David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Müller-Hoercker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R and Franz WM, MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation via Dkk-1 mediated blockage of wnt-signalling. *Nat Cell Biol*, in press, [Published online: 24 February 2008], 2008.

2. 学会発表

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巣毒性のトキシコゲノクス解析
[第96回日本病理学会総会] 2007年3月

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J and Saga Y
Tbx6 controls Mesp2 expression in forming somites

[第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会 合同大会] 2007年5月

北嶋 聡

トキシコゲノクスを用いた毒性予測の迅速・精細化研究

[日本実験動物医学会・教育シンポジウム-動物実験代替法における分子毒性学的アプローチ-] 2007年5月

北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、中津 則之、相賀 裕美子、菅野 純

モデル催奇形性物質を用いた発生トキシコゲノクス(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

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

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、中津 則之、相崎 健一、北嶋 聡、児玉 幸夫、菅野 純

アセフェート暴露によるマウス神経行動毒性の発現機構の 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

高木 篤也、北嶋 聡、五十嵐 勝秀、中津 則之、相崎 健一、菅野 純

マウスES細胞分化系における分化マーカー遺伝子発現パターン解析(その2)[第34回日本トキシコロジー学会学術年会]2007年6月

中津 則之、相崎 健一、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、児玉 幸夫、菅野 純

2-Vinyl pyridine のマウス肝トキシコゲノクス(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

Kitajima S, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N and Kanno J Fetus (developmental) toxicogenomics for addressing the embryotoxicity induced by chemicals.

Demonstration by a model teratogen cycloamine.[6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the life Sciences]2007年8月

菅野 純、種村 健太郎、五十嵐 勝秀、北嶋 聡エストロジェン受容体 α 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

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Takagi A, Kodama Y, Ogawa Y, Sekita K and Kitaïma S Percellome toxicogenomics project and its possible contribution to 3R's.[6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the life Sciences] 2007年8月

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

目的

遺伝子発現変動に立脚した
高精度の発生毒性評価系の確立

背景1

高精度の発生毒性評価系の必要性

1) 種差の問題

例) サリドマイド

2) 検出感度の問題

例1) 対照群での奇形発生

例2) 同一母体内での胎児間の差

例3) 見過ごされやすい異常

[機能障害, 免疫障害, 腫瘍, 発生頻度の変化, 短命等]

→ 実験動物で催奇形性という所見が認められなくても
ヒトでの催奇形性を正確に予見しなければならない

背景2

遺伝子発現からみた胎児の特徴

adultとは異なり胎児では
発生に関与する遺伝子群が
激しく経時的に変化する

→ 特定のシグナルカスケードを描出できる可能性

3

高精度な発生毒性評価系を構築するには

化学物質投与 → 遺伝子発現変化 → 毒性発現

網羅的遺伝子
発現解析

毒性

毒性発現の有無に関わらず
遺伝子発現変化に着目した
解析技術へ

これまでの取り組み

1. 本計画の実用性の検討
ーモデル遺伝子改変マウス胚を用いてー
2. 基礎データとしての無処置野生型マウス・全胚
における遺伝子発現の, 経時変化の網羅的解析
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT:12点)

5

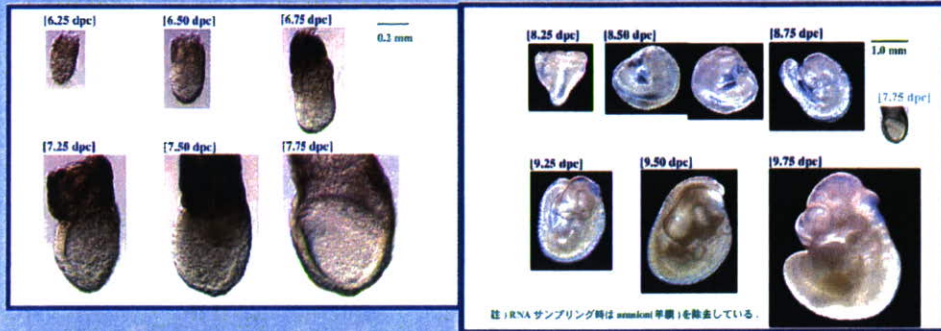
これまでの取り組み

1. 本計画の実用性の検討
ーモデル遺伝子改変マウス胚を用いてー
2. 基礎データとしての無処置野生型マウス・全胚
における遺伝子発現の, 経時変化の網羅的解析
[マウス胎生6.25-9.75日](TIME POINT:12点)

6

マウス胎生6.25-9.75日胚 [C57BL/6CrSlc]

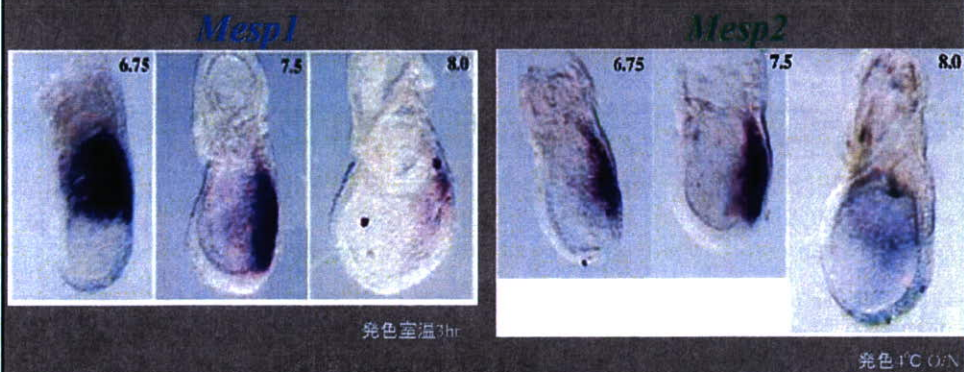
Time point 12点



7

データ活用例

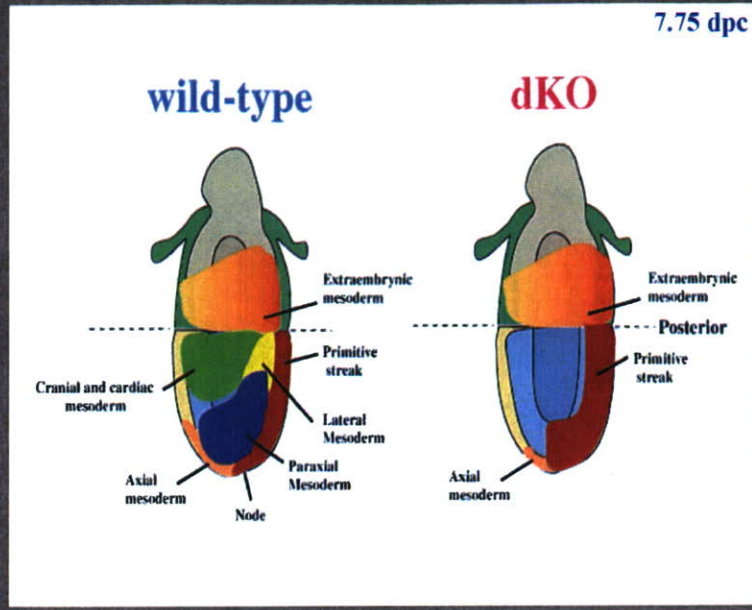
bHLH型転写因子 *Mesp1*と*Mesp2*の発現の比較



8

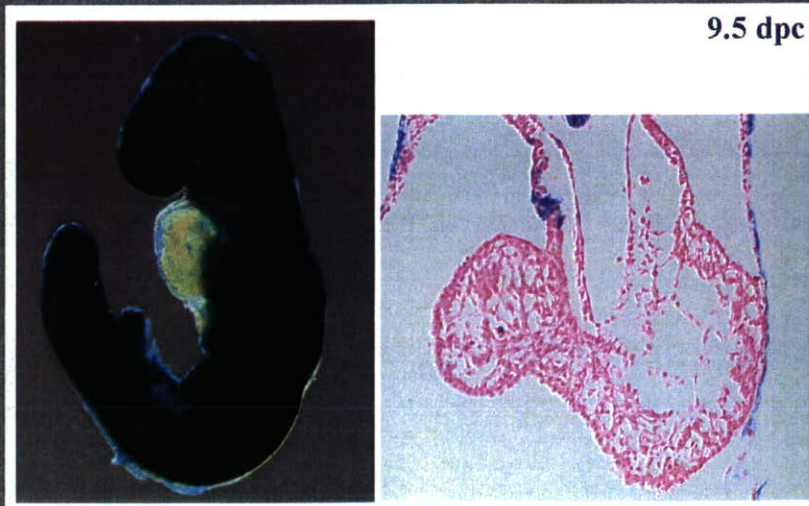
データ活用例

Mesp1, *Mesp2* 欠失胚は胚性中胚葉形成不全を示す



データ活用例

Mesp1, *Mesp2* 欠失細胞は心臓形成に寄与できない
—*Mesp1*, *Mesp2*は心臓中胚葉形成に必要な転写因子—

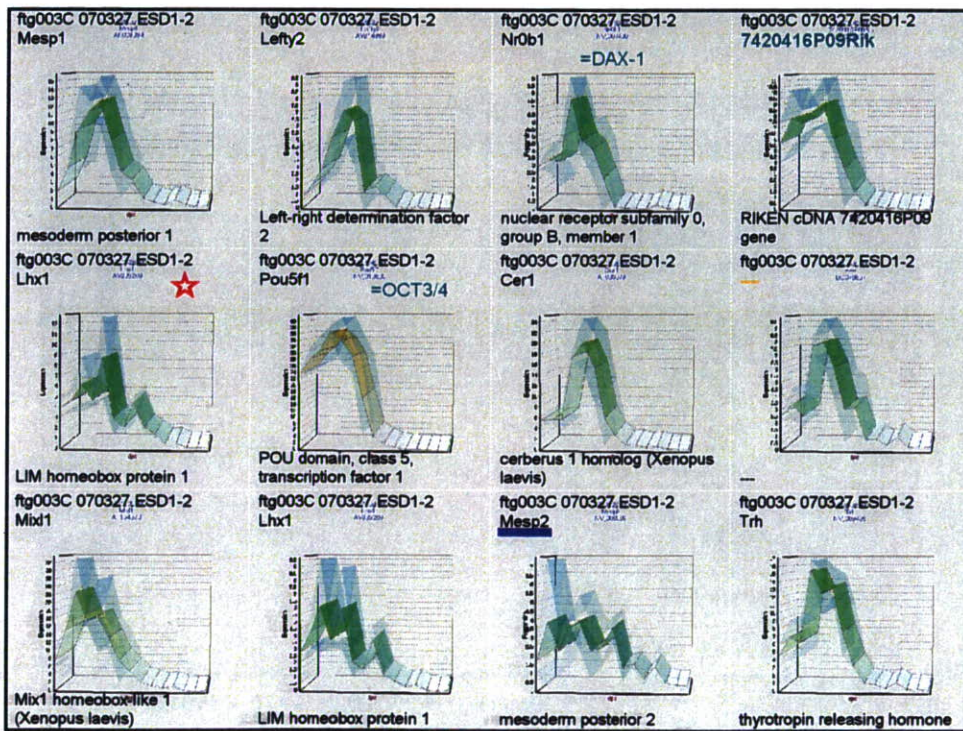
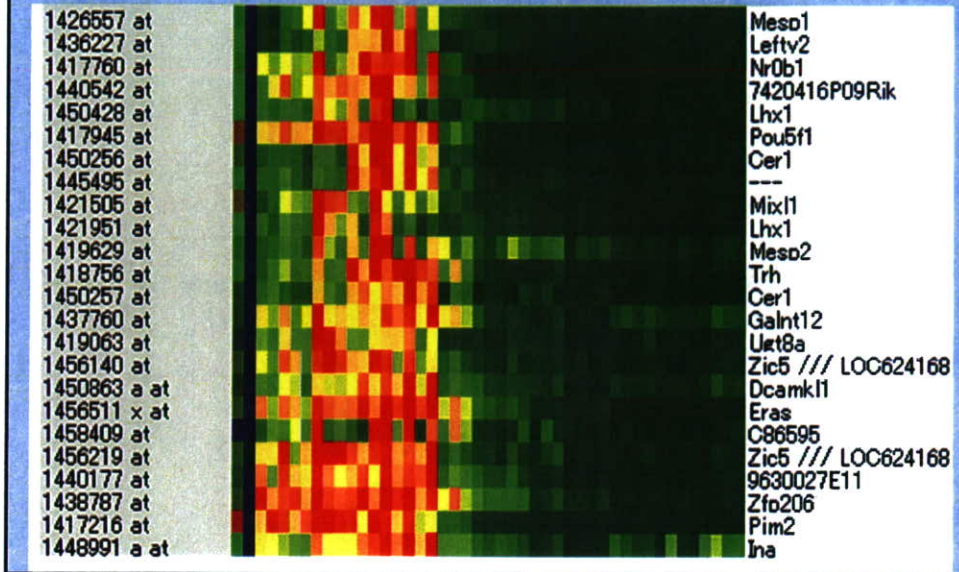


Kitajima et al., *Development* 127: 3215-3226, 2000

データ活用例

*Mesp1*の発現と似た経時変化を示す遺伝子群

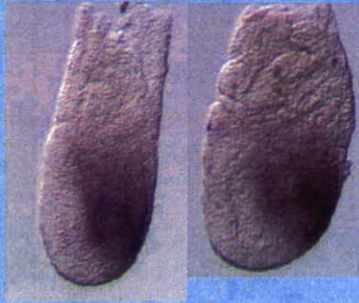
ピアソン相関係数 $\alpha > 0.8$



*Lhx1*は*Mesp1*と似た発現を示す

dKO胚では発現が維持される

6.5 dpc



7.5 dpc



dKO胚 7.5 dpc



Head organizer

13

これまでの取り組みのまとめ

—高精度の発生毒性評価系の確立—

1. 本計画の実用性の検討
—モデル遺伝子改変マウス胚を用いて—
→ モデル胚を特徴づける遺伝子群がリストアップされ、またISHの結果と基本的にはよく対応しており、実用性の検証はできた
2. 基礎データとしての無処置野生型マウス・全胚における遺伝子発現の経時変化の網羅的解析
→ *Mesp1*などの遺伝子を雛形とし、経時変化として同様な発現パターンを示す遺伝子群をリストアップすることができた。

14

本論

発生毒性モデル物質を 妊娠マウスに投与した際の胚に対する 本手法の適用と解析

- 1) 分子標的が一応明らかな催奇形性物質：
サイクロパミン
- 2) 分子標的不明、種差が著しい催奇形性物質：
サリドマイド

15

本論

発生毒性モデル物質を 妊娠マウスに投与した際の胚に対する 本手法の適用と解析

- 1) 分子標的が一応明らかな催奇形性物質：
サイクロパミン
- 2) 分子標的不明、種差が著しい催奇形性物質：
サリドマイド

16

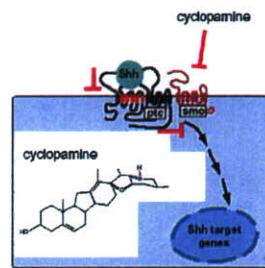
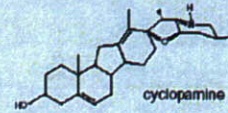
サイクロパミンの特徴

☆ユリ科バイケイソウ属植物由来 催奇形性 ベラトルムアルカロイド

神経管発生における細胞間相互作用などに関与する *Shh* シグナリングに対する阻害作用を有する

歴史

- ・ユリ科植物を食べた妊娠羊から産まれた仔羊が単眼症を示した(Binnsら, 1963).
- ・サイクロパミンを経口投与した妊娠羊から産まれた仔羊が単眼症を示した(KeelerとBinns, 1968).
- ・サイクロパミン経口投与による奇形発生は、ウシ、ヤギ、ウサギ、ハムスター、ラット、マウスで認められた。ただし、ラット、マウスでは低感受性(Keeler, 1975)
- ・サイクロパミンは、*Shh* シグナリング関連分子の *Smo* の阻害作用を有する (Cooperら, 1998; Incardonaら, 1998).
- ・*Smo* のKOマウスが単眼症を示す(Zhangら, 2001).



標的分子が一応明らかなモデル催奇形性物質

注) 母動物への経口投与時、サイクロパミンが胎児の *Smo* 分子を標的とする、と直接証明した報告はない。

17

マウスにおけるサイクロパミンを用いた催奇形性実験の報告は妊娠動物が、かなり死亡する投与用量[180 mg/kgBW]を用いたもののみ

TABLE II. EFFECT OF JERVINE AND CYCLOPAMINE ON MICE.

Group and gestation period	Individual daily dose (mg)	Dose (mg/kg)	No. of dams	Ratio of affected to normal litters	No. of normal off-spring	No. of affected off-spring w/offspring litters	No. of resorptions in litters	No. of totally re-sorbed litters	No. of over-dose deaths in dams	Malformations ^a
Cyclopamine:										
7	5 ^b	180	3	0/1	10	0	0	0	2	—
6-7	10 ^b	360	3	0	0	0	0	0	3	—
6-8	10 ^b	360	4	0/2	26	0	0	0	2	—
7-9	10	360	7	0/1	12	0	0	0	6	—
7	5	180	6	0/2	23	0	0	0	4	—
7	10 ^b	360	4	1/2	25	1	0	0	2	1-E
8	5	180	6	1/1	11	1	0	1	4	1-E
9	5	180	11	2/7	73	2	0	0	4	2-E
Controls:										
nongavaged			14	0/14	148	1	2	0	0	1-E
H ₂ O-gavaged			13	0/13	127	0	2	0	0	—

^a E = exencephalic.
^b Sample and buffer.

Keeler, RF., Teratogenic effects of cyclopamine and jervine in rats, mice and hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med*. 14: 302-306, 1975.

18

疑問

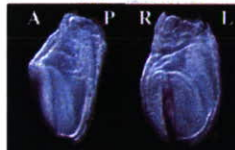
・サイクロパミンの”マウス”胚の標的分子は
本当にSmoなのか？ 他の分子では？

→ 網羅的遺伝子発現変動解析へ

19

胎生7.5-9.5日マウス胚における*Shh*の発現

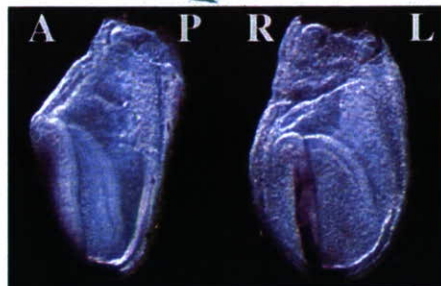
胎生 7.5 日



胎生 8.5 日

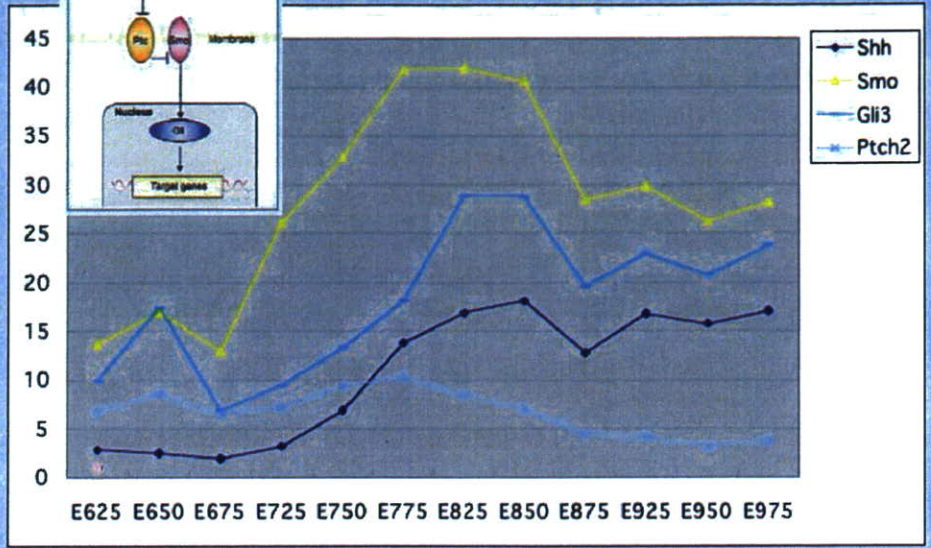
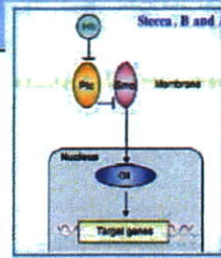


胎生 9.5 日



20

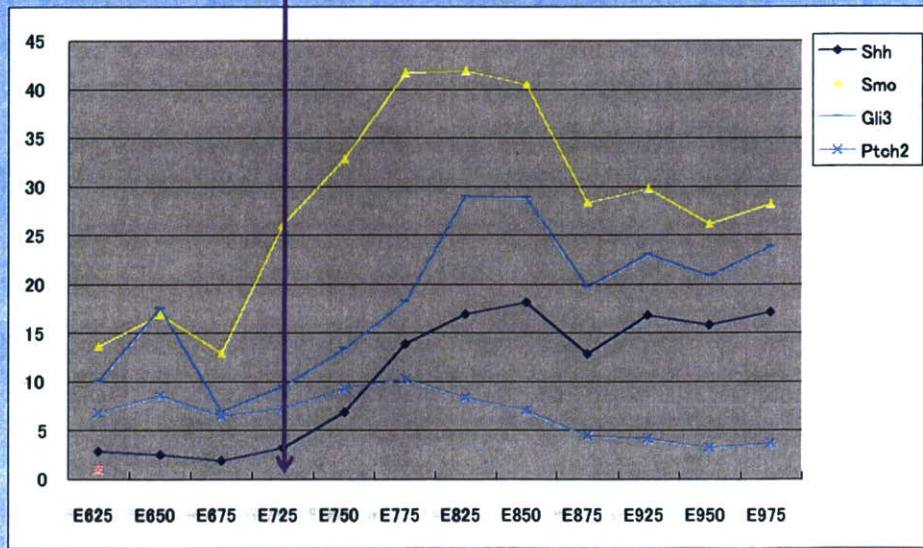
マウス胎生6.25-9.75日胚全胚poolサンプルを用いた
Shhカスケード関連遺伝子群の経時変化[2段階増幅法]



26

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

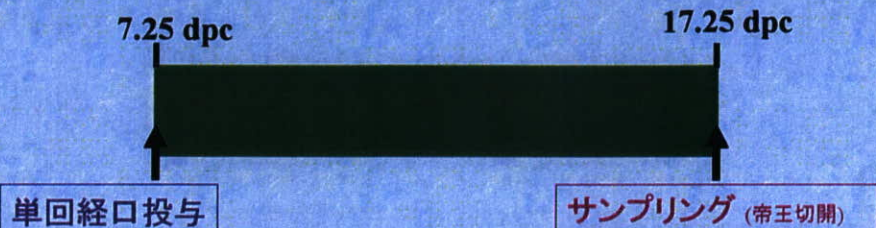


27

用量設定実験

- ・系統: C57BL/6CrSlc (Japan SLC, Inc.)
- ・投与物質: Cyclopamine (LC laboratories)
- ・投与濃度: 0, 3, 10, 30 mg/kgBW* [volume: 10 ml/kgBW]
- ・溶媒: corn oil (Sigma)
- ・投与経路: 経口(強制経口投与)

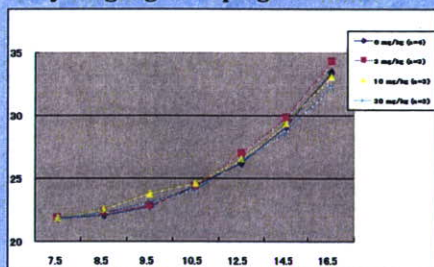
*: 70 mg/kgBW投与で妊娠マウス10匹中2匹死亡



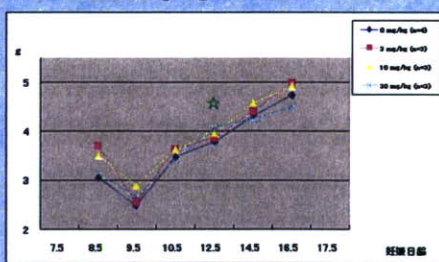
73

サイクロパミン 用量設定実験

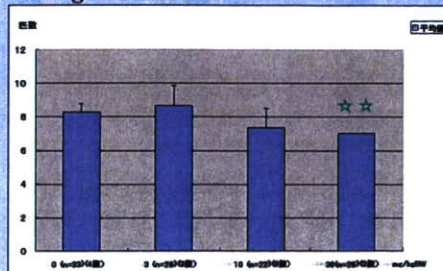
Body weight gain of pregnant mice



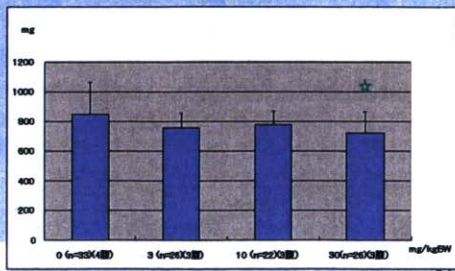
Food intake of pregnant mice



Average litter size



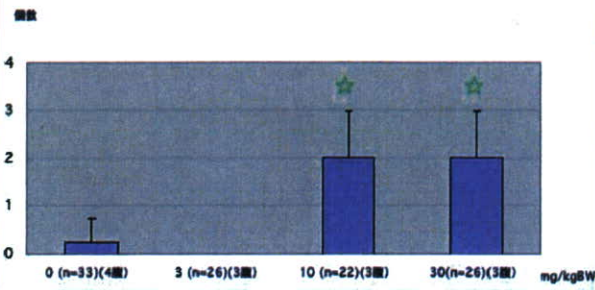
Average weight of embryos



74

サイクロパミン 用量設定実験

Placental remnant



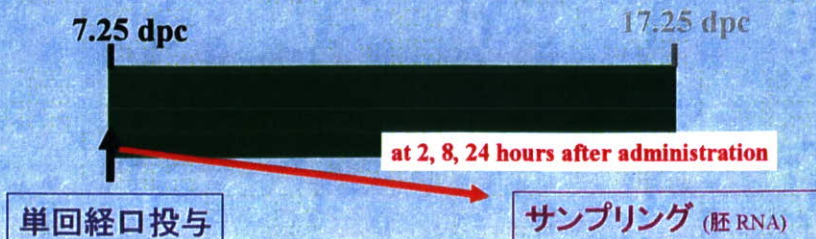
Macerated Fetus

(one of 28 embryos was induced in the group of 30 mg/kg cyclopamine)



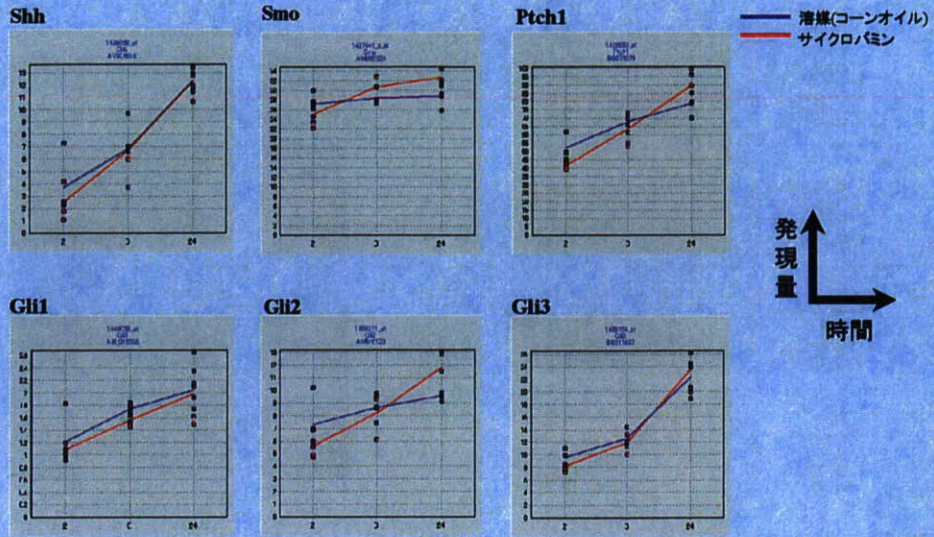
遺伝子発現変動解析実験

- ・系統: C57BL/6CrSlc (Japan SLC, Inc.)
 - ・投与物質: Cyclopamine (LC laboratories)
 - ・濃度: 0, 30 mg/kgBW [volume: 10 ml/kgBW]
 - ・溶媒: corn oil (Sigma)
 - ・投与経路: 経口(強制経口投与)
- # RNAサンプルは、同腹の胚・全胚のプールサンプル



26

妊娠マウスへのサイクロパミン(30 mg/kg)単回経口投与は
胎児での*Shh*シグナル関連遺伝子の発現を顕著に変化させない



27

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

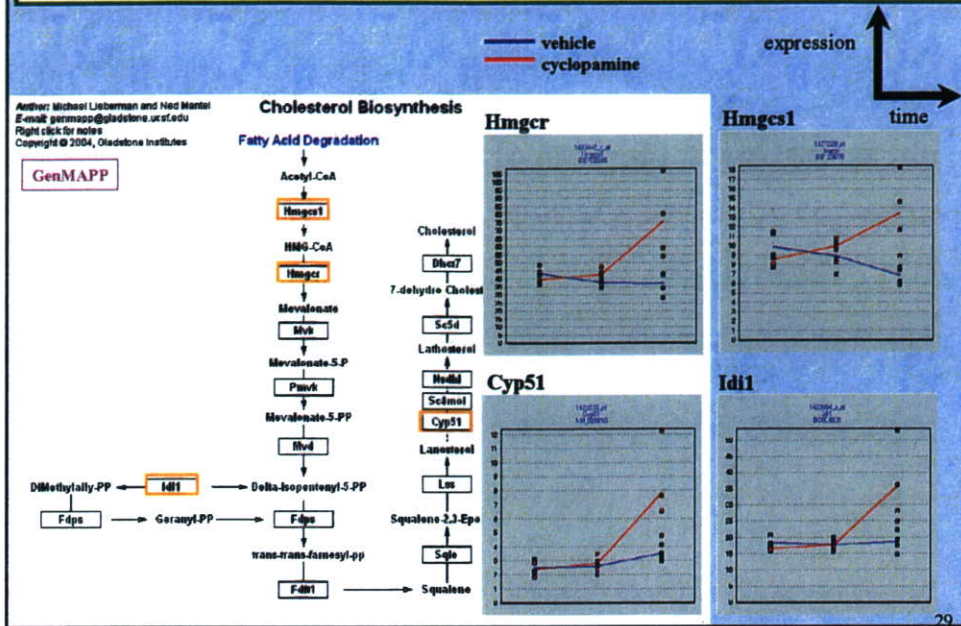
- 対照群と投与群とで比較し、
- 1) どちらかの発現コピー数が2より大.
 - 2) t-testでのP値が0.05未満.
 - 3) 双方の平均値の比(投与/溶媒)が1.6より大



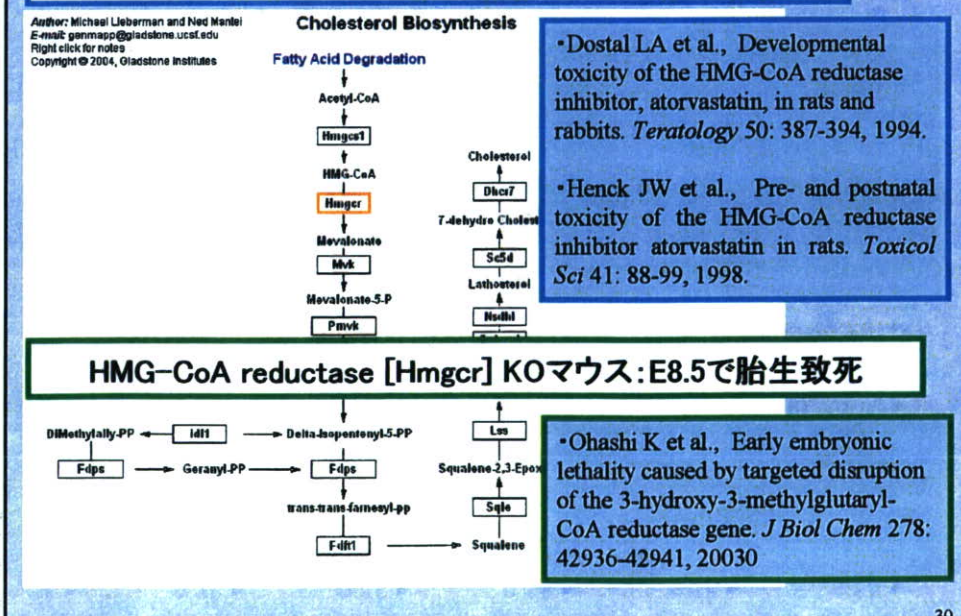
- ・投与 2時間後: 17 P.S.
- ・投与 8時間後: 23 P.S.
- ・投与24時間後: 213 P.S.

28

妊娠マウスへのサイクロパミン (30 mg/kg) 単回投与は、
胎でのコレステロール生合成関連遺伝子の発現変動を引き起こす



HMG-CoA reductase [Hmgcr]阻害剤 atorvastatin の
妊娠ラットへの経口投与: 胎吸収 (母ラットの死亡)(300 mg/kgBW)



したがって、

マウス胚(経胎盤投与)では サイクロパミンは Shh シグナル
よりはむしろコレステロール生合成シグナルが標的である
可能性が示唆された。

31

本論

発生毒性モデル物質を
妊娠マウスに投与した際の胚に対する
本手法の適用と解析

- 1) 分子標的が一応明らかな催奇形性物質:
サイクロパミン
- 2) 分子標的不明、種差が著しい催奇形性物質:
サリドマイド

32

サリドマイドは、薬物動態上、種差が著しい

Thalidomide Pharmacokinetics and Metabolite Formation in Mice, Rabbits, and Multiple Myeloma Patients

Francisco Chung,¹ Jun Lu,¹ Brian D. Palmer,¹
Philip Kastell,¹ Peter Browett,²
Bruce C. Baguley,¹ Malcolm Tingle,³ and
Lai-Ming Ching¹

¹Auckland Cancer Society Research Centre, ²Department of Molecular Medicine and Pathology, ³Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medical and Health Sciences, The University of Auckland, Auckland, New Zealand.

Clinical Cancer Research 9:9

Vol. 10, 5949-5956, September 1, 2004

血液中の半減期
ヒト：7.3時間
ウサギ：2.2時間
マウス：0.5時間

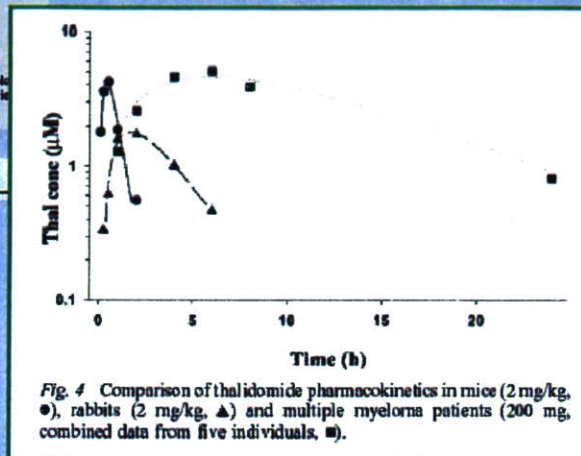


Fig. 4 Comparison of thalidomide pharmacokinetics in mice (2 mg/kg, ●), rabbits (2 mg/kg, ▲) and multiple myeloma patients (200 mg, combined data from five individuals, ■).

33

サリドマイド単回経口投与 —用量設定実験—

- ・動物: 妊娠C57BL/6CrSlcマウス(8-10W)(日本エスエルシー)
- ・投与物質: サリドマイド (Thalidomide)(BIOMOL社)
- ・投与濃度: 0, 100, 300, 1,000 mg/kgBW [10 ml/kgBW]
- ・溶媒: 0.5% メチルセルロース(MC)(メノウ鉢で懸濁)
- ・投与経路: 経口(強制経口)
- ・1群: 4-6腹

胎生7.25日

胎生17.25日

↑
単回経口投与

↑
帝王切開
(胎児重量、胎児数、外表異常)