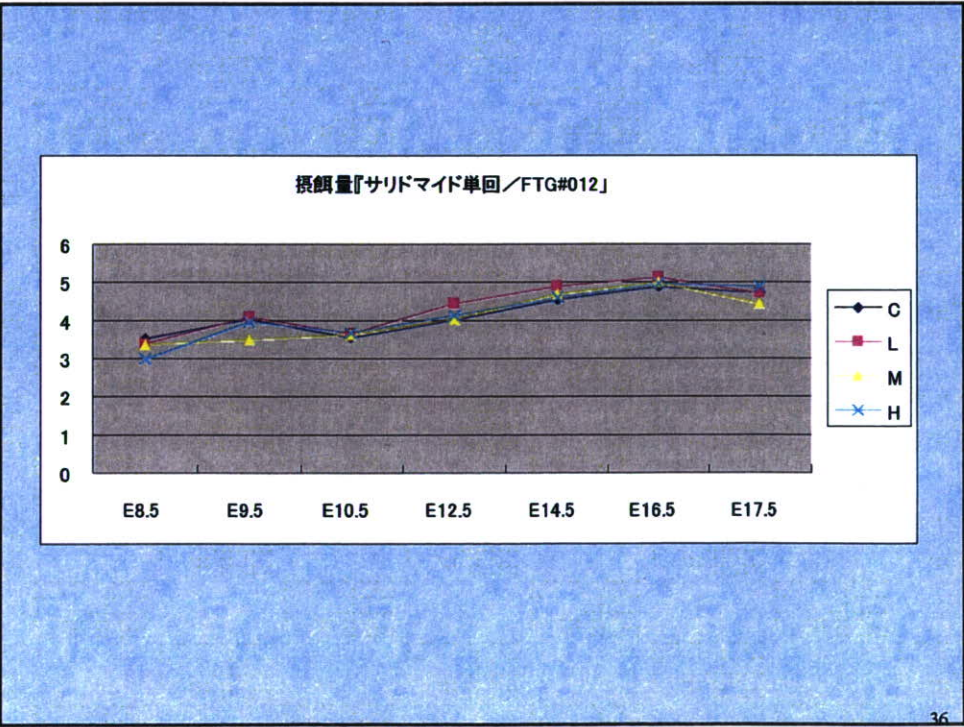
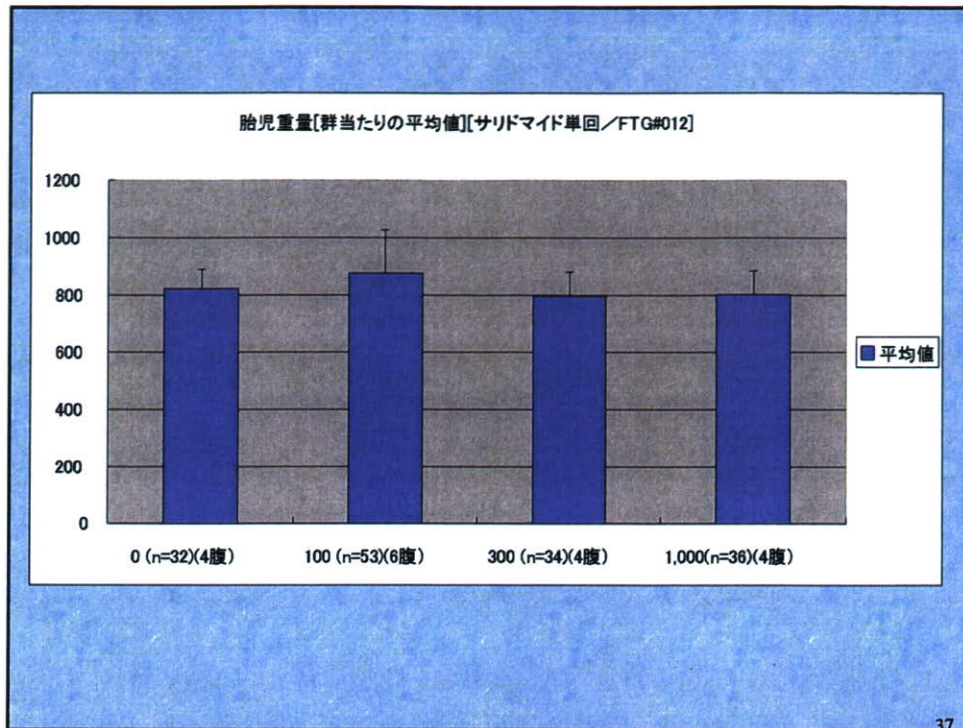


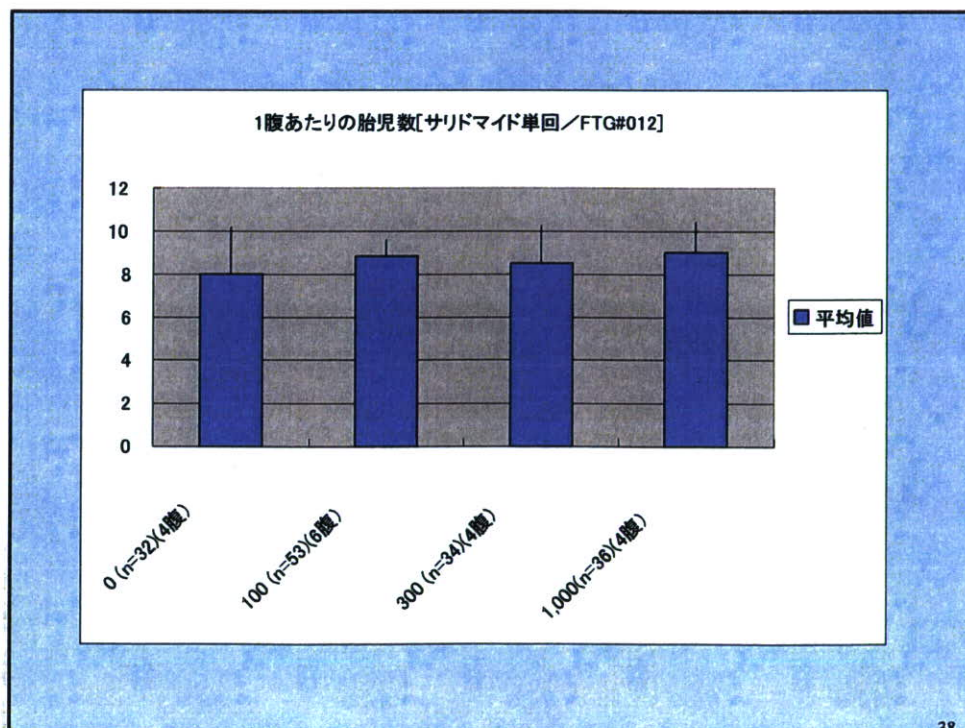
35



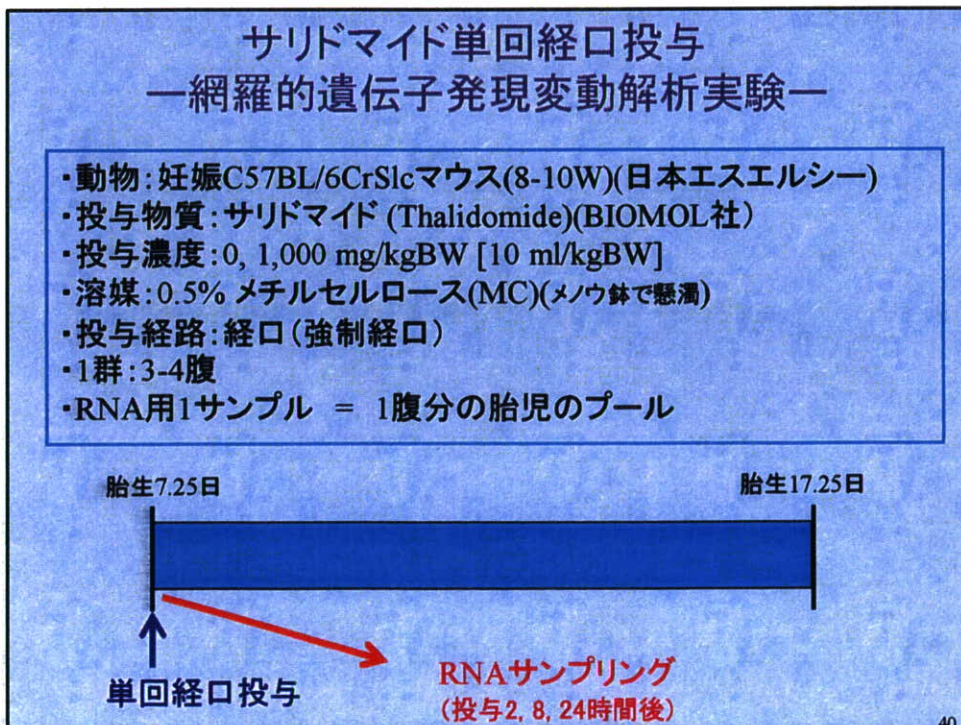
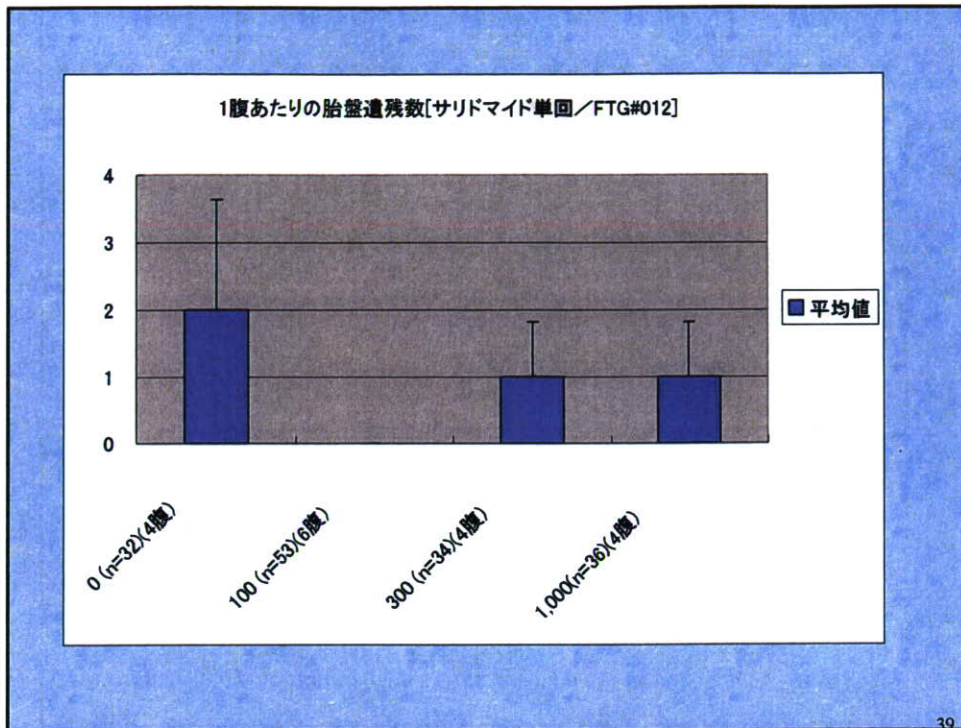
36



37



38



## 解析

この場合の実験目的達成のため、  
類似パターンを示す遺伝子のパターンを視つつ、  
機能既知のカスケードを認識しつつ、機能既知だ  
が場違いなカスケードもリストアップし、機能の情報を再確認[OMIM等で]

41

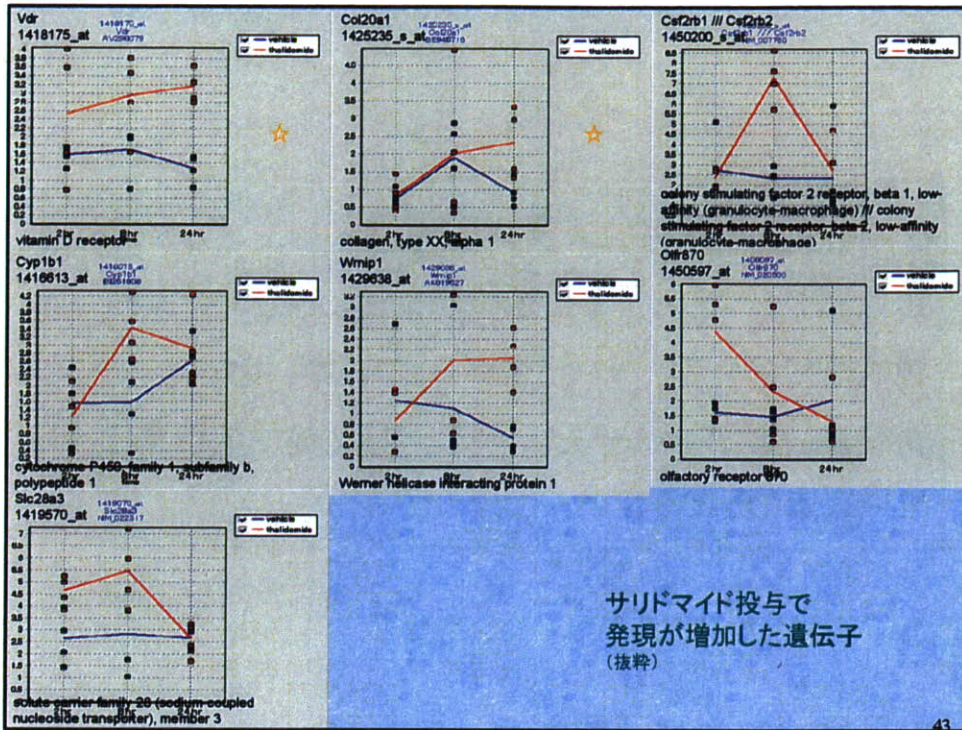
妊娠マウスへのサリドマイド(1,000 mg/kg)単回経口投与時の  
胎児での遺伝子変動解析

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

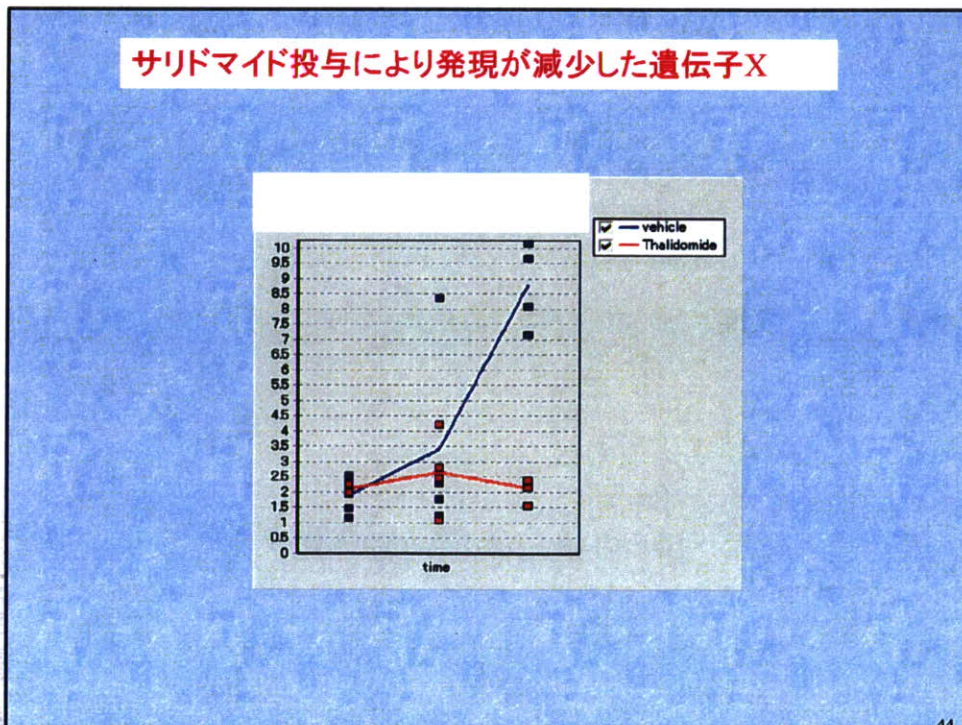


・投与 2時間後: 122 P.S.  
・投与 8時間後: 116 P.S.  
・投与24時間後: 329 P.S.

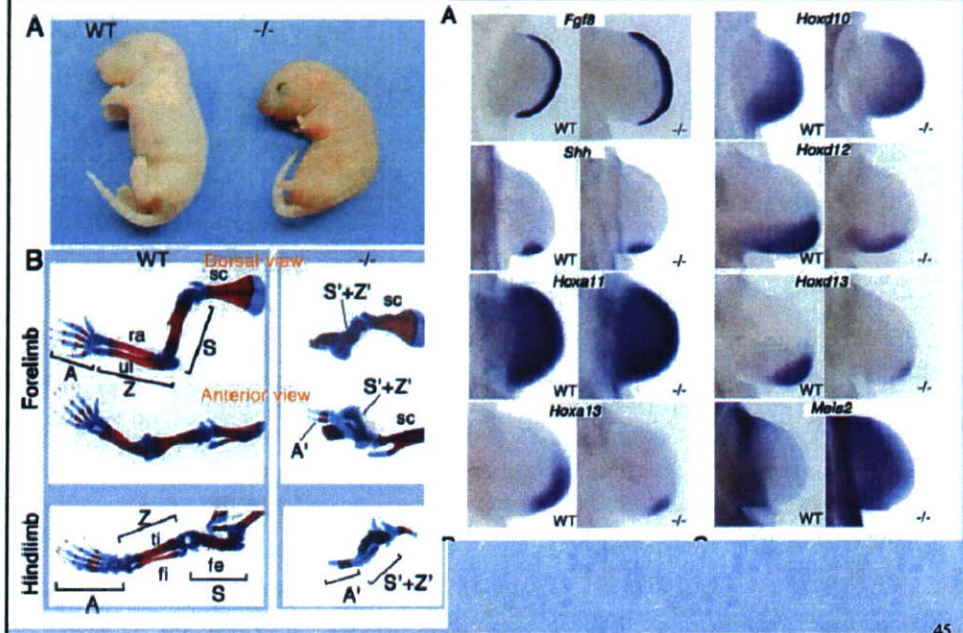
42



サリドマイド投与で  
発現が増加した遺伝子  
(抜粋)

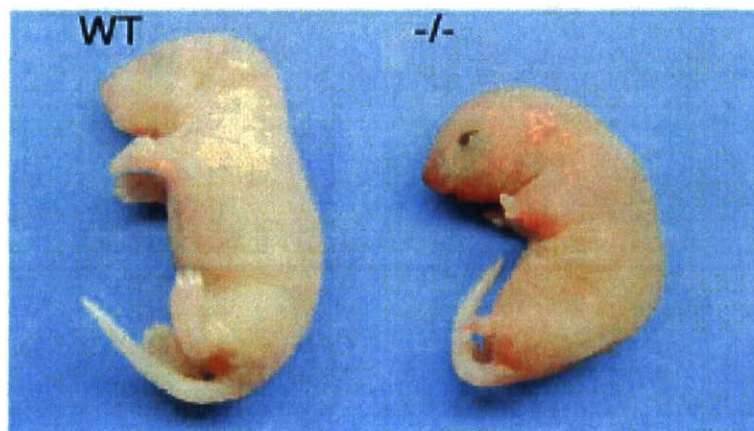


遺伝子X 欠失胚



45

遺伝子X 欠失胚



## まとめ

### 発生毒性モデル物質を妊娠マウスに投与した際の胎児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  
Shhシグナルではなくコレステロール生成に関わる遺伝子群に発現変動が見いだされた。  
→分子標的物質が影響する想定外のシグナルカスケードを見いだせたことを示唆しており、化学物質の安全性評価上、意義深いものと考えられた。
- 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  
当該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。  
→本分子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。  
★マウスで肢芽形成異常が認められないこととの関連は今後の課題  
\* 肢芽における遺伝子発現変動解析  
\* ヒト特異的代謝産物の妊娠マウスへの投与実験

47

## —今後の検討課題—

- I. 「実験例として、より一般化させる必要性」  
多様な化学物質の投与実験
- II. 「より精度の高いシグナルカスケード解析の必要性」  
バイオインフォマティクスの進捗を取り入れる

→ヒトにおける発生毒性評価を、正確に詳細に、また迅速・安価に予測する

48

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

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・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(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。

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。

ジーンチップ法や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予測情報の範囲での基礎情報を与えるなど、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、第二年度では(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の与える変動要因に注目し、具体的には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。

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での反応などを与条件とし、(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に焦点をあてつつ、またベンゼンや 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、造血幹細胞モデルにおける遺伝子発現変化の特徴を明らかにすることとした。併せて、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その方法を検討した。(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

無処置外界の酸化的ストレスに応じて異なった遺伝子発現の予想されるチオレドキシシン過剰発現 (Trx-Tg) マウス、同ノックアウト (Trx-KO) マウス並びにそれぞれに対する同腹野生型マウスの各群を用い、遺伝子発現解析の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 (図版は省略)。これによれば、Trx-Tg 群、Trx-KO 群はそれぞれ野生型マウスにおける骨髄細胞の発現パターンが相互に分離したものの、それらの明瞭な差異は目視しえなかった。即ち、測定遺伝子全体の発現で見ると、両者を明瞭に区別する遺伝子群は一部の遺伝子に局限した差異に基づいているものと考えられる。

#### 線図 (Line configuration) によるそれぞれの遺伝子型各群における発現の相違について

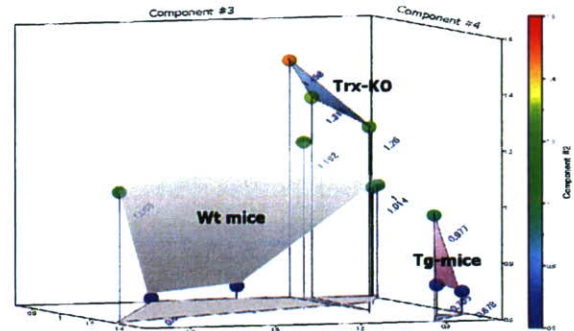
他方、Trx-Tg 及び Trx-KO マウスと野生型では、遺伝子発現強度による線図で比較すると、Trx-KO マウスで高発現している遺伝子の多くが Trx-Tg でむしろ発現低下状態を示し、野生型では双方の中間に位置していた (図版は省略)。この線図では各群各々のマウスにおける遺伝子発現強度の順に沿って同一遺伝子を連結させて描かせたものであり、Trx-KO マウスの Trx ヘテロ欠失による酸化的ストレス状態とこれに対応する消去遺伝子群の高発現と、Trx-Tg マウスにおける酸化的ストレスの高度に消去された状態に対応する酸化的ストレス消去遺伝子の発現ニーズの低下を反映しているものと考えられる。従って、これら両系統マウスで発現の逆転している遺伝子のプロファイリングの分別は酸化的ストレスに対する作用機転とバイオマーカーを明らかにする上で重要な役割を果たしているものと想定され、次の課題を推進した。

#### 種々の酸化的ストレス消去マウスにおける遺伝子発現プロファイリングの分別

Trx-Tg 及び Trx-KO マウスと野生型のアレイデータを元に主成分分析法 (PCA) を行うと、25.7% の contribution を示す主要な第1要因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、それぞれの群間における個体差も乏しかった (図版は省略)。しかし、第2・3・4要因によって各群の個体を検討するとそれらの contribution はそれぞれ 9.6%、7.6%、7.2% であるが、Trx-KO 及び Trx-Tg マウスがそれぞれ野生型マウスから明らかに分別された (図1)。これらの eigenvector 値の分布をみると、野生型での分散傾向が高く、野生型における各種の遺伝子の stochastic (確率論的) に拡散傾向をもつ eigenvector 値を反映していた。Trx-KO や Trx-Tg マウスにおける収束性の発現遺伝子パターンは、これらのマウスにおける遺伝子発現が、定常状態にあっても日常的に接している酸素を始めとする外

界異物との相互作用により、共通性の高い反応が惹起されている結果の反映であると考えられる。

図1 主成分分析法 (PCA) による各遺伝型マウス個体の eigenvector 値の分布



#### 分別責任遺伝子群の抽出

以上に基づき両者の分別に貢献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關与する 2074 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分析したところ、thioredoxin-like 5 を含む electron transporter activity、NADH dehydrogenase を含む oxido- reductase activity、peroxiredoxin を含む oxidative phosphorylation などの Gene Ontology (GO) が有意に抽出された他、細胞動態にも關与する cyclin dependent kinase 4 やその抑制に機能する p19、MAPK 経路の遺伝子群を含む transferase activity なども抽出された。また、遺伝型による発現の差異を ANOVA によって解析し、有意差水準  $P < 0.005$  を満たした 1991 遺伝子を選別した。これらの遺伝子の GO 解析結果は表1の如くである。即ち、ここでは Thioredoxin 遺伝子そのものの抽出もさることながら、多数の酸化的ストレス状態に対応する遺伝子群の発現が分別された。更に、これらの遺伝子について、ANOVA 解析に引き続き PostHoc Test をした結果を、図2に示す。

表1 ANOVA解析の有意差水準 $P < 0.005$ を満たした1991遺伝子のうちGO:5739: mitochondrionに含まれていた42遺伝子のリスト

Affymetrix ID	Description
1416119_at	thioredoxin 1
1416417_a_at	calmegin
1416616_s_at	caseinolytic protease, ATP-dependent, proteolytic subunit homolog (E. coli)
1416647_at	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
1416665_at	demethyl-Q 7
1416764_at	tetratricopeptide repeat domain 11
1417308_at	pyruvate kinase, muscle
1417551_at	ceroid lipofuscinosis, neuronal 3, juvenile (Batten, Spielmeier-Vogt disease)
1417750_a_at	mitochondrial solute carrier protein
1417834_at	synaptojanin 2 binding protein
1417970_at	RIKEN cDNA 1110015E18 gene
1418073_at	acyl-Coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial
1418530_at	nucleoporin 160
1418700_at	lipoic acid synthetase
1419499_at	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
1420888_at	Bcl2-like
1422484_at	cytochrome c, somatic
1422577_at	citrate synthase
1423908_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8
1424228_at	RIKEN cDNA 5031409G22 gene
1424776_a_at	solute carrier family 25, member 28
1424828_a_at	fumarate hydratase 1
1426100_a_at	thymidine kinase 2, mitochondrial
1428140_at	3-oxoacid CoA transferase
1428153_at	mitochondrial ribosomal protein S10
1428290_at	mitochondrial intermediate peptidase
1431800_at	RIKEN cDNA 1300010F03 gene
1448143_at	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
1448241_at	GM2 ganglioside activator protein
1448382_at	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase
1448887_x_at	fractured callus expressed transcript 1
1448937_at	solute carrier family 35, member B3
1449443_at	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial
1451088_a_at	oxidase assembly 1-like

1451164_a_at	mitochondrial ribosomal protein S18B
1451274_at	oxoglutarate dehydrogenase (lipoamide)
1451312_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7
1452048_at	mitochondrial ribosomal protein L12
1452500_at	trimethyllysine hydroxylase, epsilon
1453111_a_at	RIKEN cDNA 3010027G13 gene
1453149_at	mitochondrial folate transporter/carrier
1460718_s_at	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)

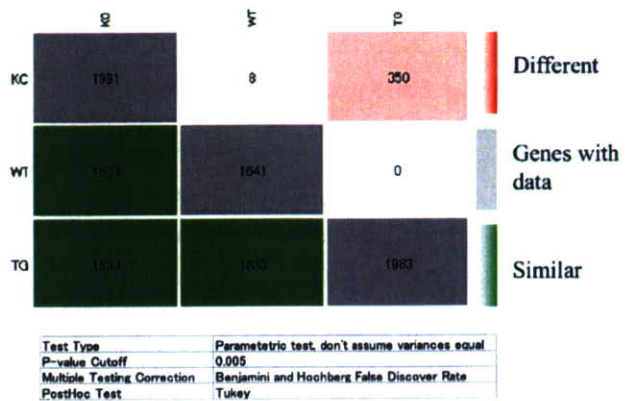


図2 ANOVA解析(有意水準 $p < 0.005$ )によって抽出された1991遺伝子によるPostHoc Testの結果

#### D. 考察

マイクロアレイ情報やジーンチップ情報の解析は、昨年度の報告で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させるものであった。特に、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予測する作業が示唆されている。

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、診断的価値を持つものに対して、後者の toxicology endpoint は共通性が乏しいか、むしろ共通性のない、様々な経路を経た cluster 群の diversity として表現される運命にある。従って、ここでの統計的 normalization はしばしば現実的でなく虚像に近い統計値を与える結果となるので注意が求められる。これを実体に則して分析するためには、非誘導的に、遺伝子相互の機能を相殺させることなく autoclassify させたり、比較的少数の分別要因遺伝子を主成分分析法 (PCA) によって選別し、さらにそうした亜群を分散エネルギー値 (エントロピー変換値) の極小化などにより、大容量要因解析

(SPSS)などを用いた多元次元的 autoclusterization をさせる手法をとることが必要である。

## E. 結論

本年度は、昨年度における実験動物の加齢影響に引き続き、常在的酸化的ストレスに注目し、Trx-KO マウス及び Trx-Tg マウスを用いて双方を比較しつつ、背景 DNA チップデータの解析を行った。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 原著

Suzuki H, Inoue T, Matsushita T, Kobayashi K, Horii I, Hirabayashi Y, Inoue T. In vitro gene expression analysis of hepatotoxic drugs in rat primary hepatocytes. *J Appl Toxicol*, 2008 (Feb 1 [Epub ahead of print]).

Suzuki H, Inoue T, Matsushita T, Kobayashi K, Horii I, Hirabayashi Y, Inoue T. In vitro gene expression analysis of nephrotoxic drugs in rat primary renal cortical tubular cells. *J Appl Toxicol*, 2008 (Jan 2 [Epub ahead of print]).

Inoue T, Hirabayashi Y. Mortality rate expressed by Gompertzian Law as consequent toxicological endpoints for elucidation of mechanistic background. *Toxicol Lett* 172:S48-S49, 2007.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. Membrane Channel Connexin 32 Maintains Lin(-)/c-kit (+) Hematopoietic Progenitor Cell Compartment: Analysis of the Cell Cycle. *J Membr Biol* 217:105-113, 2007.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Tsuboi I, Huo Y, Kodama Y, Kanno J, Ott T, Trosko JE, Inoue T. Protective role of connexin 32 in steady-state hematopoiesis, regeneration state, and leukemogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:700-712, 2007.

Hirabayashi Y, Inoue T. Implications of hemopoietic progenitor cell kinetics and experimental leukemogenesis: Relevance to Gompertzian mortality as possible hematotoxicological endpoint. *Exp Hematol* 35:125-133, 2007.

Yoshida K, Hirabayashi Y, Wada S, Watanabe F, Watanabe K, Aizawa S, Inoue T. p53 (TRP53) deficiency-mediated antiapoptosis escape after 5 Gy X irradiation still induces stem cell leukemia in C3H/He mice: comparison between whole-body assay and bone marrow transplantation (BMT) assay. *Radiat Res* 167:703-710, 2007.

#### 2) 総説・著書など

井上達. 新しい視点からみたトキシコロジー発生・成長・老化. In: 堀井郁夫, ed. トキシコロジー

ーの到達点と新しい展望ー多様性科学としてのトキシコロジー. 名古屋: 第33回日本トキシコロジー学会学術年会: 15-48, 2007.

## 2. 学会発表

井上 達、平林容子. ゴンパーツ函数を指標とした生体異物相互作用の加齢に及ぼす影響. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会(2007.12.14) [横浜, (Meeting abstract p503; 2007)]

Inoue T. Attenuation of oxidative stress in the Trx-overexpression mice: Study on benzene induced hemopoietic malignancies. The 4<sup>th</sup> Meeting of International REDOX Network (2007.11.2) [Jeju Island, Korea, Meeting Abstract 53; 2007]

井上 達、尹 秉一、児玉幸夫、菅野 純、藤井義明、平林容子: ベンゼンの造血障害発現機構: 多環芳香族炭化水素受容体の関与と骨髄特異的異物代謝の関与の役割について. 第 69 回日本血液学会総会 (2007.10.11) [横浜, プログラム・抄録集 pp159; 2007]

井上 達、尹 秉一、李 光勲、金子豊蔵、黒川雄二、菅野 純、藤井義明、平林容子: AhR, a suppressor gene: mice with low AhR or KO exhibit a shortened lifespan with early onset of spontaneous neoplasms. 第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.3) [横浜, (日本癌学会総会記事 pp122; 2007)]

井上 達、平林容子. ゴンペルツ函数を指標としたトキシコロジーにおける加齢変化の意義について 第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2007.6.28) [東京, (The Journal of Toxicological Sciences, 32 suppl., S90; 2007)]

Inoue T, Hirabayashi Y. Gompertzian expression of the lifespan elucidates a theoretical and toxicological ultimate risk. International Congress of Toxicology XI (2007. 7.18) [Montréal, Canada, Meeting abstract PW12.259]

井上 達、平林容子: 話題提供「老化と環境化学物質生体応答」日本基礎老化学会第 30 回大会 (2007.6.22) [札幌, (基礎老化研究 31(2); 44, 2007)]

## 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。

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、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。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半明し、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をつかむことができた。

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か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、それ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が見出されている。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、毒性パスウェイとして最も重要なものの一つとされている。この鍵となる分子のあるなしの状態で、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。

本研究では、対象を、これまであまり毒性学的検討がなされてこなかった消化器毒性、特に炎症性腸疾患にしている。炎症性腸疾患は予後不良・原因不明の慢性炎症性病変であり、その原因解明・治療法の確立が望まれている。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析法の開発初期にこれが応用され、各種サイトカインの関与が大きいことが示されたが、実際、臨床の場合において最大の治療効果をあげているのが、サイトカインの一つであるTNF $\alpha$ の中和抗体や結合蛋白である。しかしながら、これは既に成立してしまった病変に対する対症療法であり、根本的治療につながるものとはいえず、かつこの療法による発がんリスクの増大が問題視されている。

炎症性腸疾患の病因に、ストレスシグナルの関与が重要であることを示す証拠は多い。例えば、小胞体ストレスを感知してこれをASK1を含むストレスシグナルカスケードに伝達する分子IRE1 $\beta$ を欠損したマウスにおいては、

DSS 誘起炎症性腸疾患が悪化するという報告がなされている。

以上のことから、ASK1 欠損マウスにおける炎症性腸疾患モデルの網羅的遺伝子発現解析による解析は、十分に検討の価値があると考えられる。

前年度の研究において以下のような成果が得られている。

1. げっ歯類の病態モデルとして確立しているデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)による腸炎は、飲水中へDSSを添加して4~5日後に発生し、その重篤度評価も、体重減少や腸の短縮という、感度の低いものである。本研究では、腸炎発生初期の遺伝子発現変化を捉えることを目的としており、より高感度な評価法が望まれた。そこで、ウエスタンブロットによる便潜血反応により、投与開始2日後から病変発生を捉える方法を開発した。
2. マウスDSS誘発腸炎の発生時において、結腸粘膜におけるリン酸化ASK1、リン酸化JNK、リン酸化p38の量をウエスタンブロットで検討したところ、これらストレスキナーゼのリン酸化は明瞭に認められたものの、その応答する時期には個体によって大きなばらつきが認められたため、*in vivo*におけるそれ以上の解析が困難であった。
3. B57BL/6 とASK1 欠損マウスを用い、DSS 誘発腸炎の発生程度を比較したが、重篤度に明瞭な差を見出すことができなかった。

前年度の結果を検討し、本年度は、DSS 以外の腸炎モデル、特に Trinitrobenzenesulfonate (TNBS)により誘起される腸炎の検討を行った。

## B. 研究方法

### 動物と遺伝子解析

ASK1 ノックアウトマウスは、東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室一條秀憲教授より供与されたものを実験動物中央研究所においてSPF化し、同志社女子大学薬学部動物施設において維持繁殖した。

マウス腸炎モデルは、DSS あるいはTNBSによって誘起した(Nature Protoc. 2:541- 2007)。DSSの場合、3%水溶液を飲水中に混和して作成する標準プロトコールに加え、3%あるいは15%水溶液を1回強制経口投与し、DSS接触直後の粘膜変化を捉えることを試みたTNBSは、エーテル麻酔下、2.5%TNBS in 50% エタノール溶液を0.1ml/head で注入し、1分間頭を下にした状態を保つことにより作成した。Myeloperoxidase (MPO)はCytostoreのキットを用いて測定した。なお酵素活性は、標準酵素

(Sigma)を用いることにより換算した。組織より標準プロトコールに従ってmRNAを調製し、Affymetrix社GeneChip(Mouse Genome 430 2.0)により遺伝子発現を網羅的に解析した。このとき、SpikeによるmRNA絶対量化システムを用いて定量化を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究に用いた動物は同志社女子大学動物実験委員会の承認を得ている。使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用で苦痛の少ない方法を用いるといった本学の実験動物取り扱い倫理規定に従った対応を行っている。

## C. 研究結果

### 1. DSS、TNBS 腸炎の比較

腸炎は以下の項目で評価した。すなわち、体重(腸炎により低下)、大腸の長さ(盲腸直下から肛門まで:腸炎発症によって短縮)、便の潜血反応(便中のヘモグロビン量の免疫学的検出)、および粘膜中のMPO活性(好中球浸潤)である。

まず、野生型B57BL/6マウスを用いて、DSS誘起腸炎とTNBS誘起腸炎の発生を検討した。3%DSSを含む飲水中で飼育したマウスは、5日以内に腸炎を発症した。3%あるいは15%DSSを1回経口投与した群では、各項目にいかなる変化も検出できなかった。

次に、TNBS直腸内投与4日後剖検という標準プロトコールを用いても全く腸炎が認められなかった。そこで、TNBS腸炎の経日変化を検討することとした(各時点、N=3)。

図1・2に、体重、および大腸の長さを示した。TNBS投与によっても、全く変化が見られていない。また、糞便中の潜血反応もすべて陰性であった。勿論、死亡例も皆無であった。

図1. C57BL/6の体重変化

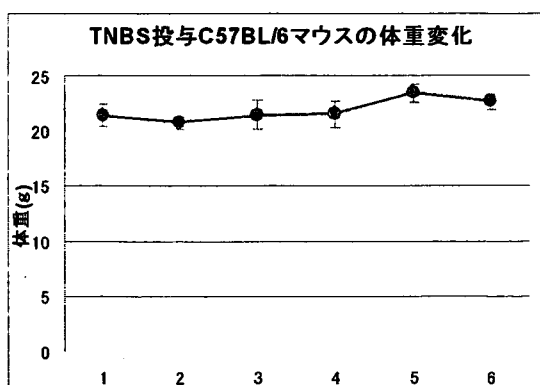
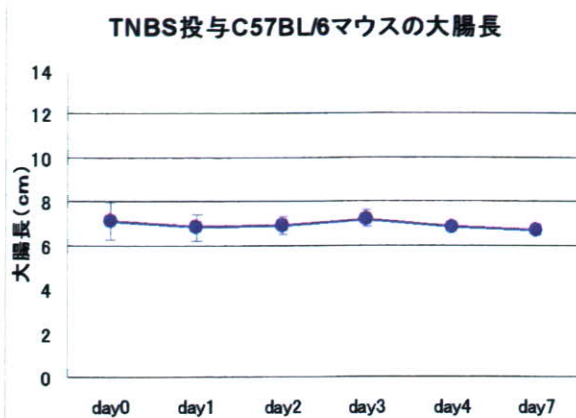


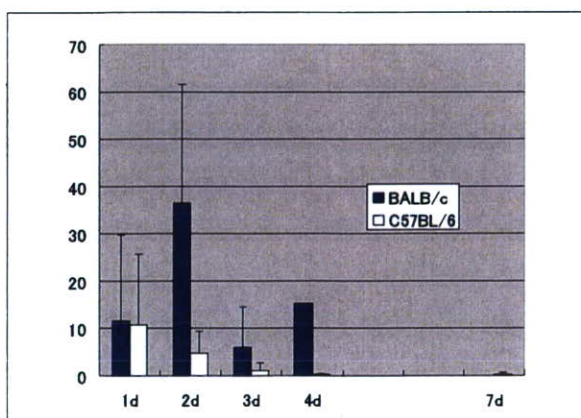
図2. C57BL/6 マウスの大腸長



TNBS 腸炎は、確立された病態モデルであり、この結果は全く予想外であった。TNBS 腸炎の誘起メカニズムとして、炎症細胞の誘引が提唱されている。そこで、粘膜内 MPO 活性を測定し、炎症細胞の浸潤が起きているかどうかを検討した。

図3の白カラムは、C57BL/6 マウスの粘膜内 MPO 活性である。投与の翌日には活性が大きく上昇し、炎症細胞の浸潤が起きていることが示唆されるが、2日以降、これが急速に低下し、そのままほぼ消失してしまった。このことは、B57BL/6 マウスにおいて、TNBS による初期反応は惹起されるものの、それ以降の病態が異なることを示唆する。そこで、別の系統のマウスとして、BALB/cを用いてみた。

図3. 大腸粘膜内 MPO 活性の経日変化



予試験において、BALB/cマウスの腸炎が重篤であることがわかっていたので、最初から群わけをせず、16匹のマウスに TNBS を投与し、1日ごとに3例のマウスをランダムに剖検していった。これは、死亡率が高いので、特定の日付のデータを失う危険を避けるためである。実際、

投与1日後に16例中1例、投与2日目に12例中4例、投与3日目に5例中1例が死亡し、4日後の剖検日には1例しか生存していなかった。

図4・5に体重と大腸長のデータを示す。2日目まで著明な体重減少と大腸長の短縮が見られている。3・4日目では、見かけ上、この両者の回復が起こっているが、これは、この時点まで死亡を免れた4例のデータであり、かなりのバイアスがかかっていると考えられる。

図4. BALB/cマウスの体重変化

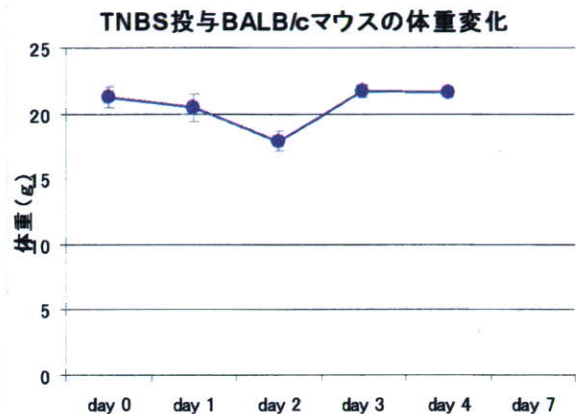


図5. BALB/cマウスの大腸長

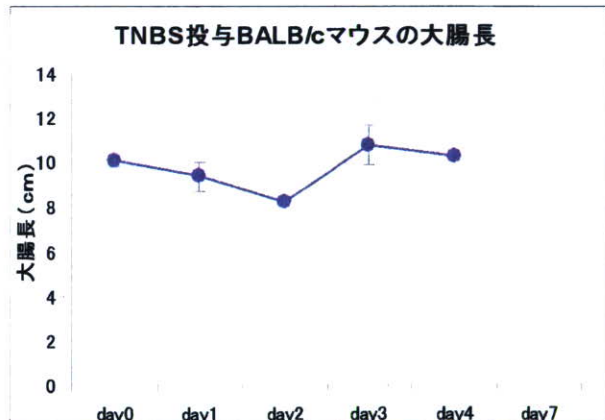


図3の黒カラムは BALB/cマウスの粘膜内 MPO 活性を示す。C57BL/6 と異なり、MPO 活性は高値が持続していた。4、5日目に低下しているかのように見えるが、これも、この時点まで生存していた4例(うち2例が正常値範囲)のデータであるための、バイアスであろうと考えられた。

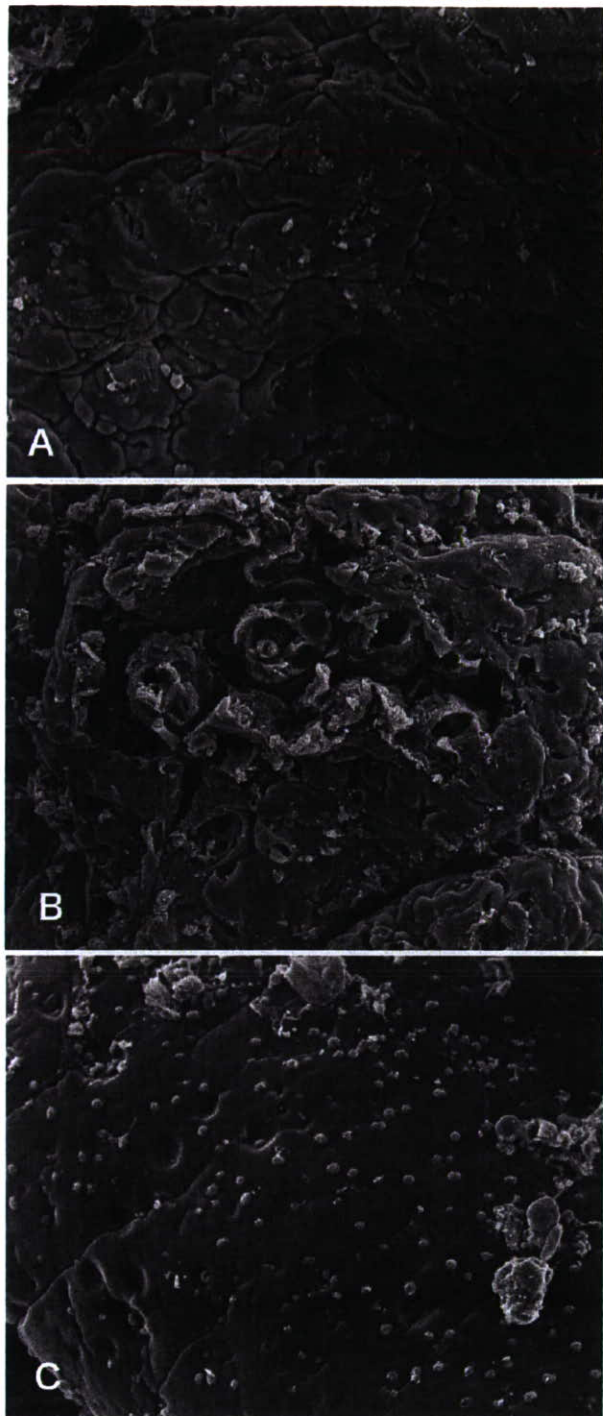
図6は、結腸粘膜面の走査電顕写真である。A は正常粘膜、B は DSS 誘起腸炎であり、上皮細胞の脱落が著明である。C は TNBS 誘起腸炎であり、粘膜の脱落よりも、恐らく粘液の放出像と思われる表面顆粒の出現が特徴的であった。

今年度の予定では、C57BL/6 の野生型と ASK1 欠損マウスの比較も行う予定であったが、繁殖により期待通りの数のホモマウスが得られなかったため、現在再度繁殖中

である。

また、TNBS 腸炎の毒性メカニズム解明のため、発生初期における結腸粘膜のトランスクリプトーム解析を GeneChip を用いて行った。

図6. マウス大腸粘膜の走査電子顕微鏡写真

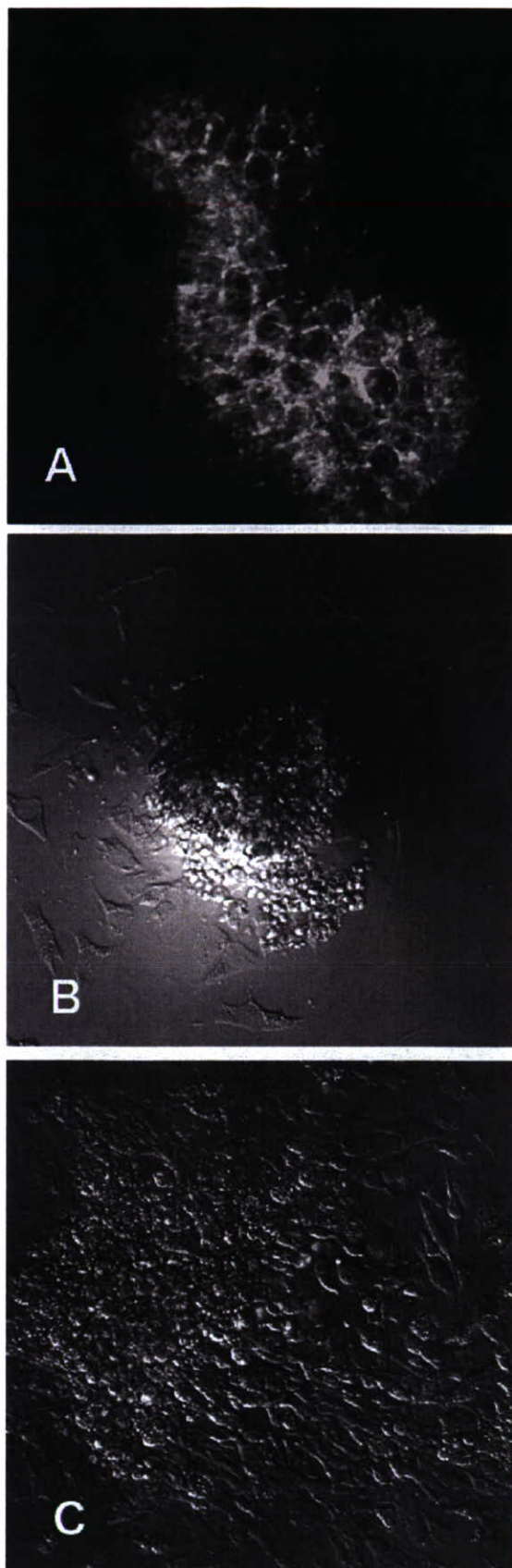


## 2. 毒性メカニズム解明のための大腸粘膜細胞培養系の確立

*In vivo* の腸炎モデルは、作成に時間がかかり、また、DSS などの場合、経口投与後、障害部位に到達する時間とその濃度が不明確であり、傷害発生初期の検討を行う

場合に困難が生じる。更に、分子メカニズムを追究する場合、適用できる手段に乏しい。そこで、細胞培養系が是非とも必要となる。

図7. 単離マウス crypt cell とその培養



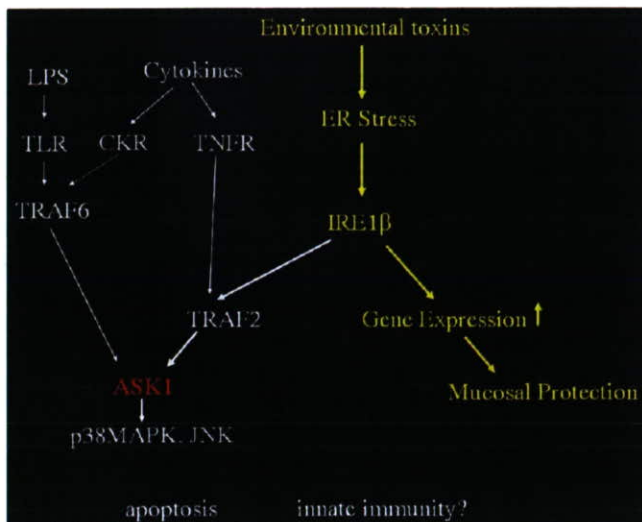
消化管細胞は、機能を保ったセルラインに乏しく、今回のような研究には、一次培養細胞が必須である。ところが、消化管粘膜、とくに下部消化管は微生物が多量に繁殖しており、無菌培養が極めて困難であり、確立された方法がない。そこで今回、腸炎モデルに耐えうる結腸粘膜細胞の一次培養系の確立を試みた。

種々の条件を検討した結果、crypt cellを単離し、これをコラーゲンコートディッシュにまき、接着率は低いものの、接着したものを遊走させる方法が有用と考えられた。

図7Aは、単離したマウスCrypt cellのF-アクチンをファロイジン染色したものであり、立体構造を保っている。図7Bは、これを播種した2日後のものであり、細胞の遊走が始まっている。4日後には、図7Cのように、増殖も起こり、密な上皮様構造をとるものも出てくる。現在、基質(マトリゲルなど)の検討、播種密度の検討を行い、また結腸としての機能をどの程度保持しつつ培養が可能かなどの条件検討を行っている。

#### D. 考察

炎症性腸疾患は各種サイトカインが関与した複雑な病態である。その発生初期のメカニズムの解明は以前より望まれていたところであるが、なかなか有効な手段に乏しかった。本研究で注目しているASK1を含むストレス応答系は、酸化ストレスシグナルやERストレスシグナルだけでなく、自然免疫の系にも重要な役割を果たしていることが見出されてきており、これに網羅的遺伝子発現解析を適用することは、最も有効な



戦略であると考えられる(下の図)

しかし、前年度の研究ではDSS誘起腸炎のフェノタイプにおいて野生型とASK1欠損動物の間に明瞭な差を見出すことができなかった。これは炎症性腸疾患にASK1の系が関与して

いないというよりも、病態の複雑さを示しており、DSS腸炎の現在のアッセイ系ではこれを再現することができていないと考えられた。

本年の研究において、C57BL/6マウスとBALB/cマウスの間で、TNBS誘起腸炎の発生が極端に異なることが見出された。ばらつきが大きくて確定的なことはまだいえないが、投与直後の炎症細胞浸潤(粘膜内MPO活性の上昇)は両系統とも同程度生じている。C57BL/6マウスの場合、それ以降、急激に活性が低下し、炎症が進展しない、或いは治癒していくことが示唆される。従って、この差異は、病変発症の鍵となる因子に関連している可能性が高く、その因子を見出すことは、非常に重要であると考えられる。炎症性腸疾患のような複雑な病態を解析する場合、正常と病態の比較を行うのみではなかなか本質的な因子を抽出することが困難であるが、遺伝的に均質である二つの系統の比較と、これに遺伝子操作を組み合わせた解析が可能となり、これからの解析の糸口がつかめたといえる。

以後、現在開発中の大腸粘膜一次培養細胞系を併用し、網羅的遺伝子発現解析により腸傷害の毒性学的シグナルを解析していきたい。

#### E. 結論

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C57BL/6マウスとBALB/cマウスの間で大きな感受性の違いが見出された。これを手がかりに、腸炎発症・進展にかかわる毒性学的パスウェイを、網羅的遺伝子発現解析により解明していきたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

Tetsuro Urushidani: "Prediction of hepatotoxicity based on the Toxicogenomics Project Database" in "Hepatotoxicity: From genomics to in vitro and in vivo models" ed. by Saura C. Sahu, John Wiley & Sons, 2008, pp507-530

###### 2) 雑誌

M. Hirode, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, Y. Ohno, and T. Urushidani. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis. J. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2008, in press.

T. Uehara, N. Kiyosawa, M. Hirode, K. Omura, T.



- Shimizu, A. Ono, Y. Mizukawa, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani. Gene Expression Profiling of Methapyriline-Induced Hepatotoxicity in Rat. *J. Toxicol. Sci.* 2008, in Press
- T. Uehara, N. Kiyosawa, T. Shimizu, K. Omura, M. Hirode, T. Imazawa, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani. Species Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity as an Example of How Toxicogenomics Help Assessing Risks for Human. *Hum. Exp. Toxicol.* 2008, in press.
- K. Omura, N. Kiyosawa, T. Uehara, M. Hirode, T. Shimizu, T. Miyagishima, A. Ono, T. Nagao, T. Urushidani. Gene Expression Profiling of Rat Liver Treated with Serum Triglyceride-Decreasing Compounds. *J. Toxicol. Sci.* 32: 387-399, 2007.
- N. Kiyosawa, T. Uehara, W. Gao, K. Omura, M. Hirode, T. Shimizu, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani. Identification of Glutathione Depletion-Responsive Genes Using Phorone-Treated Rat Liver. *J. Toxicol. Sci.* 32:469-486, 2007
- K. Takashima, Y. Mizukawa, K. Morishita, M. Okuyama, T. Kasahara, N. Toritsuka, T. Miyagishima, T. Nagao, and T. Urushidani. Effect of the difference in vehicles on gene expression in the rat liver — analysis of the control data in the Toxicogenomics Project Database. *Life Sci.* 78: 2787-2796, 2006.
- N. Kiyosawa, K. Shiwaku, M. Hirode, K. Omura, T. Uehara, T. Shimizu, Y. Mizukawa, T. Miyagishima, A. Ono, T. Nagao, and T. Urushidani. Utilization of a one-dimensional score for surveying the chemical-induced changes in expression levels of multiple biomarker gene sets using a large-scale toxicogenomics database. *J. Toxicol. Sci.* 31: 433-448, 2006.
- K. Tamura, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, and T. Urushidani. Comparison of gene expression profiles among papilla, medulla and cortex in rat kidney. *J. Toxicol. Sci.* 31: 449-470, 2006.
- K. Tamura, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, and T. Urushidani. Profiling of gene expression in rat liver and rat primary cultured hepatocytes treated with peroxisome proliferators. *J. Toxicol. Sci.* 31: 471-490, 2006.
- K. Morishita, Y. Mizukawa, T. Kasahara, M. Okuyama, K. Takashima, N. Toritsuka, T. Miyagishima, T. Nagao, and T. Urushidani. Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen. *J. Toxicol. Sci.* 31: 491-508, 2006.
- T. Kasahara, T. Miyazaki, H. Nitta, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, and T. Urushidani. Evaluation of the methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. *J. Toxicol. Sci.* 31: 509-520, 2006
2. 学会発表
- 漆谷徹郎:トキシコゲノミクスから見えてくること 日本薬学会関東支部第21回シンポジウム、東京、2007年11月
- 漆谷徹郎:トキシコゲノミクスデータベース(TG-GATEs)を用いた肝毒性の予測 第14回日本免疫毒性学会学術大会、神戸、2007年9月
- 水川裕美子、小野敦、宮城島利一、大野泰雄、長尾拓、漆谷徹郎:各種薬物によるラット肝毒性におけるLPS/TNFシグナルの解析—トキシコゲノミクスプロジェクトのデータを用いて— 第80回日本薬理学会年会、名古屋、2007年3月 *J. Pharmacol. Sci.* 103: suppl. I 221P, 2007.
- 清澤直樹、宮城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:トキシコゲノミクスの現状と展望 第7回創薬ビジョンシンポジウム 2006年4月
- 大村功、清澤直樹、上原健城、清水俊敦、廣出充洋、宮城島利一、小野敦、漆谷徹郎、長尾拓:血漿中トリグリセリドを減少させる化合物を投与したラット肝臓における遺伝子発現解析 第33回日本トキシコロジー学会学術年会、名古屋、2006年7月 *J. Toxicol. Sci.* 31: suppl. P108, 2006

上原健城、清澤直樹、清水俊敦、大村功、廣出充洋、今澤孝喜、小野敦、宮城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:クマリン誘発肝毒性:トキシコゲノミクス解析によるヒトへのリスク評価 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P109, 2006

廣出充洋、上原健城、大村功、清澤直樹、清水俊敦、小野敦、宮城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:ラットにおける薬物誘発性肝障害と血液凝固異常の関連(共同) 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P110, 2006

清水俊敦、大村功、清澤直樹、上原健城、廣出充洋、小野敦、漆谷徹郎、宮城島利一、長尾拓:バルプロ酸暴露後のラット初代肝細胞およびヒト初代肝細胞における遺伝子発現変化(共同) 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P111, 2006

清澤直樹、塩飽恒史、廣出充洋、上原健城、大村功、清水俊敦、宮城島利一、小野敦、漆谷徹郎、長尾拓:遺伝子発現変動レベルのスコア化によるトキシコゲノミクスデータベースの効率的解析(共同) 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P119, 2006

Takeki Uehara, Naoki Kiyosawa, Mitsuhiro Hirode, Koki Imazawa, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Tetsuro Urushidani, and Taku Nagao. A toxicogenomics approach for risk assessment of glutathione depletion and oxidative stress-induced nongenotoxic hepatocarcinogenesis in the rat liver. 43rd Congress of The European Societies of Toxicology, 6th Congress of Toxicology in Developing Countries, Croatia. 2006年9月

Mitsuhiro Hirode, Takeki Uehara, Naoki Kiyosawa, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Tetsuro Urushidani, and Taku Nagao. Comparison with aspirin and hepatotoxic compounds inducing coagulopathy- gene expression profiling in rat liver -43rd Congress of The European Societies of Toxicology, 6th Congress of Toxicology in Developing Countries, Croatia. 2006年9月

瓶子昌幸、廣出充洋、上原健城、小野敦、宮城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:トキシコゲノミクスプロジェクト化合物の遺伝子発現変動解析 第29回日本分子生物学会京都, 2006年9月

漆谷徹郎:バイオマーカー遺伝子リストによる肝毒性の予測-トキシコゲノミクス・データベースを用いた検討 第27回日本臨床薬理学会年会シンポジウム 東京, 2006年12月 臨床薬理37巻 Suppl.S114, 2006

#### G. 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

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

分担研究者 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

研究要旨

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ビ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。

A. 研究目的

感染に対する感受性を左右する薬剤について、宿主細胞(とくに胸腺や脾臓などの免疫系臓器)に及ぼす影響を網羅的に解析する。今回は胸腺の萎縮とT細胞の著明な減少を誘導することが知られているコルチコステロイドおよび種々の細胞に毒性を示すドキシソルビシンの投与による変化を観察した。

B. 研究方法

【マウス、ウイルス、薬剤】

- ・ C57BL/6 マウス: 6 週齢 ♂を搬入し、8 週齢で実験を行った。
- ・ コルチコステロイド(ヒドロコルチゾン)処理: 2.5 あるいは 10 mg/kg・body weight を腹腔内投与(胸腺は 2 日後くらいでかなり縮小するが、その後正常に復する)した。
- ・ ドキシソルビシン処理: 1.5 あるいは 15 mg/kg・BW を腹腔内投与
- ・ ウイルス感染に対する影響をみるためにフレンド白血病ウイルスを同時に接種する群も設けた。

【実験プロトコール】

- ・ 経過観察群: 薬剤投与 → 1 hr, 6 hr, あるいは 24 hr 後にマウスを sacrifice し、胸腺および脾臓を採取。また、マウスにフレンド白血病ウイルスを接種して 1 週後に薬剤投与して同様の経過で臓器採取する実験群を設けた。
- ・ percellome 解析手順にのっとり、DNA あるいは RNA を調整し、dose dependency および時間経過の上から本班で開発された解析ソフトを用いて遺伝子発現プロファイルを作製する。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて東京医科歯科大学実験動物委員会の定める倫理基準に準拠して行うものとし、同委員会に申請して承認された方法(承認番号 0050015)にのっとり行う。

C. 研究結果

1. これまで明らかにしたように、ステロイド投与によって胸腺は著明な萎縮を示し、10 mg/mouse 投与では 24 時間後までに重量にして約 3 分の 1 にまで低下し、

アポトーシス細胞が著明に増加した。変化は可逆的で、約3日で元に復した。

2. 脾の重量もステロイド投与後24時間まで軽度の減少を示したが、アポトーシス細胞の比率には大きな変化は認められなかった。
3. 胸腺の遺伝子発現プロファイルは平均して24時間後にピークを示すものが多い傾向があった。アポトーシス関連遺伝子についてもこのような傾向を示すものが多く認められた。その他には response to biotic stimulus という類型に属する遺伝子群の発現が典型的な24時間後ピークを呈するパターンを示していた。
4. 脾臓については有意なあるいは特異的な動きを示さないパターンで発現変化する遺伝子が多かったが、胸腺との比較において両者の特異性を検討する予定である。
5. ドキソルビシン投与では、脾臓の重量変化が認められた。ウイルス接種との関連を含めてさらに詳細な遺伝子発現検索を行う予定である。

#### D. 考察

胸腺に明らかな毒性を有するステロイドをマウスの腹腔内に投与して、*in vivo*における胸腺細胞の遺伝子発現変化を検討した。アポトーシスの著明な増加とともに、アポトーシス関連、サイトカイン関連(とくにIFN関係)、細胞増殖関連(コルチコステロイドレセプターの動きに連動)などに有意な発現の動き(増強)が認められた。

薬剤の胸腺毒性を試験する際に、一つのパターン(アポトーシス誘導)を示す薬剤の代表としてステロイド投与の影響を検討したところ、胸腺毒性が免疫抑制に作用して細菌感染を助長する作用と、ステロイド投与そのものが細菌に対する感受性を増強する作用とがあることがわかった。

さらにまったく異なる細胞毒性を示すドキソルビシンの胸腺毒性についても検討した。さらに、*in silico*での解析を工夫して、ウイルス感染に対する感受性の増強に寄与

する因子を検討する系を構築したい。

#### E. 結論

胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導する薬剤であるコルチコステロイドの作用機構を、細菌感染に対する感受性という観点から解析するため、遺伝子発現プロファイルの上から機能分類した。また、ウイルス感染とドキソルビシンによる胸腺毒性の関連についての解析を開始した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 【原著論文】

Sugino Y, Misawa A, Inoue J, Kitagawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J. Epigenetic silencing of prostaglandin E2 receptor (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas. *Oncogene*, in press.

Horibe S, Takagi M, Unno J, Nagasawa M, Morio T, Arai A, Miura O, Ohta M, Kitagawa M, Mizutani S. DNA damage checkpoints prevent leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, (10): 2195-2198, 2007.

Keith T, Araki Y, Ohyagi M, Hasegawa M, Yamamoto K, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, Kitagawa M. Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia. *Br J Haematol* 137:206-215, 2007.

Wachi M, Koyama M, Utsuyama M, Bittman BB, Kitagawa M, Hirokawa K. Recreational music-making modulates natural killer cell activity, cytokines, and mood states in corporate employees. *Med Sci Monit* 13:CR57-70, 2007.

Abe S, Hasegawa M, Yamamoto K, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, Takizawa T, Kitagawa M. Rapid induction of