

200839001A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 21(2009)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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 21(2009)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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 21(2009)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
ー 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ー
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 87

2. 毒性試験指標と対比したデータ解析手法の確立ー造血系における
生体異物応答モデルを用いた検討
井上 達 111

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 123

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 143

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 149

6. 化学物質の遺伝子傷害性予測に関する研究
本間 正充 167

7. 非形質依存的インフォマティクス開発研究
相崎 健一 201

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 241

IV. 研究成果の刊行物・別刷 243

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—

研究代表者 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、各分野の専門家を研究分担者として配し、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、研究代表者らが構築した遺伝子発現値の絶対値手法である 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(トリブチルスズ、バルプロ酸及びディート)、単回チャレンジ化合物2種類又は3種類(トリブチルスズにはトリブチルスズ、フェノバルビタール、バルプロ酸にはアスピリン、サリドマイド、及びバルプロ酸、ディートにはディート、ペルメトリン)を組み合わせた7実験のデータを蓄積した(総計1,944万データ)。これにより、3年間で合計20実験のデータを蓄積した。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、2化合物(バルプロ酸、5-FU)について取得した。バルプロ酸、5-FUともに肝、肺、心、腎、脳(大脳領域、海馬、脳幹、小脳)のデータを取得済み(総計1,536万データ)である。HS-ISHは染色工程の自動化(賦活化過程のみ手動)、signal増幅法の採用による検出感度向上に続き、蛍光オリゴプローブによる定量解析が可能となった。これを受け、本研究に於いて独自に見出したペンタクロロフェノールによるSTAT1、IRF7等のインターフェロン応答遺伝子群発現上昇について、24切片の染色データ取得を行った。

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手法を適用した検討を行った。発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析に於いて、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胚性幹(ES)細胞を分化させた胚様体(EB)を用いる *in vitro* の系を導入し、この遺伝子発現経時データベースを構築後、催奇形性の種差が著しいサリドマイドを、EBに持続適用した際の遺伝子発現変動を網羅的に解析し、肢部での背腹軸形成異常の報告がある遺伝子の発現増加などを見いだした。

インフォマティクス開発研究では、非形質依存的に Percellome データベースを有効活用するための基本技術開発を行い、マイクロアレイの飽和現象及びクロスハイブリダイゼーション現象に対するデータ補正アルゴリズムの開発や、遺伝子の発現パターンによる並べ替え・抽出アルゴリズムの開発・改良を進めると共に、網羅的解析の実用化に即した Percellome データベースの最適化とナレッジデータ強化を実施した。

〔(*)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る。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。〕

研究分担者

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、マウス肝に対して研究代表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

プールは行わない)。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人の研究分担者を配し、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)、遺伝子クラスター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】

今年度は、慢性暴露化合物3種類(トリブチルスズ、バルプロ酸及びディート)、単回チャレンジ化合物2種類又は3種類(トリブチルスズにはトリブチルスズ、フェノバルビタール、バルプロ酸にはアスピリン、サリドマイド、及びバルプロ酸、ディートにはディート、ペルメリン)を組み合わせた7実験のデータを蓄積した。投与経路は経口とし、慢性暴露期間は2週間、単回チャレンジ後、2, 4, 8, 24時間時に臓器を採取し、網羅的遺伝子発現データを取得した(総計 1944 万データ)。

データ解析を進めた結果、慢性曝露による他の化学物質への反応性の変化を示す遺伝子群が見出されるなど、新しい概念の有用性を確認する慢性影響情報が得られた。例えば、フェノバルビタールにより発現誘導される薬物代謝酵素 Cyp 群のうち、Cyp2b10, Cyp2c50, Cyp2c55, Cyp3a44 について、トリブチルスズ慢性曝露によりその誘導程度が減弱した(Fig.1)。

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、2化合物(バルプロ酸(VPA)、5-FU)について取得した。バルプロ酸、5-FU とともに肝、肺、心、腎、脳(大脳領域、海馬、脳幹、小脳)のデータを取得済み(総計 1536 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た。

VPAの多臓器影響解析結果を例として示す。まず、次のようにVPAの投与用量設定を行った。各群3匹の雄性成熟期マウスに各種濃度(0, 30, 50, 100, 200, 300, 500 mg/kg)のVPAを単回経口投与し、一般状態の観察及び投与24時間後の剖検による肉眼的所見を指標に設定した。死亡例は認められず、100 mg/kg以上の投与群で投与約30分後までよろめき歩行、その後投与約2時間後まで傾眠が認められたが、投与3時間後にはどの群でも回復した。300 mg/kg以上の投与群で腎の白色化が認められた。投与3時間後には一般状態の変化が回復したことから、VPAの最高用量として500 mg/kgを選択した。

そこで、VPA(0,50,100,500 mg/kg)を単回経口投与し、経時的(投与2,4,8,24時間後)得られた肝及び海馬のRNAサンプルを用い、Percellomeデータを取得した。遺伝子発現変動を、我々が開発した「Rsort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意な順に並べ替えるソフトである。また、シグナルパスウェイの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて検討した。

その結果、肝では、ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR)αの関連遺伝子(Acaa1a, Acad11, Acot3, Acot4, Acot8, Acox1, Acs11, Crat, Ehhadh, Peci, Pex11a, Tgoln1, Galnt7, Hstst1等)の発現増加が認められこのシグナルカスケードが活性化されていることが示唆された。またアポトーシスに関連する遺伝

子(Trp53, Casp2, Casp3, Casp8ap2, Aifn2, Bcl2l11, Bid, Bik, Gadd45b, Lgalas7, Pdcd10, Peg3, Tnfrsf12a 等)、細胞増殖に関連する遺伝子(Kras, Ccnd3, Ccne1, Ccne3, Cdc25a, Cdc4, Cdk2, Cdk4, Cdk7, Cdk8, Cdkn2c, Map2k1, Mapk1, Mapk14 等)の発現増加が認められたことから、アポトーシスシグナルが活性化されていることが示唆された。薬物代謝酵素遺伝子は、Cyp2b10, Cyp3a13, Cyp4a14, Cyp4a31 遺伝子の発現増加が認められ、これらの酵素誘導が引き起されているものと考えられた。膜輸送体蛋白では、Slc12a2, Slc10a7, Slc15a4, Slc16a1, Slc16a5, Slc22a5, Slc25a12, Slc25a19, Slc25a20, Slc25a30, Slc30a4, Slc35c1, Slc38a2, Slc39a14, Slc39a6, Slc9a6 等、多くの関連遺伝子の発現増加が認められ、多くのイオン、薬物などの膜輸送が活性化されていることが示唆された。金属結合性の蛋白質・メタロチオネイン遺伝子(Mt1, Mt2)の発現増加も認められた。加えて、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子(Hdac1, Hdac2, Hdac3)の発現増加が認められた。この他、特徴的なシグナルとして、イノシトールリン酸代謝関連遺伝子(Gla, Sgpp1, EDG5 遺伝子等)及びスフィンゴ脂質代謝関連遺伝子(Inpp1, Pip5k3, Pip5k1a)の発現増加が見いだされたが、これらの変動と細胞応答との関係は現時点で不明である。

以上のことから、VPA の投与により肝では、アポトーシスシグナルが活性化され細胞障害が懸念され、また多種のイオン、薬物の膜輸送が活性化されていることが示唆された。加えて、PPAR α シグナルカスケードの活性化を介し、細胞内ペルオキシゾームの増生と脂肪酸代謝が活性化されていることが示唆された。

海馬では、PPAR α 関連遺伝子の発現については顕著な変動を示すものが認められなかったが、アポトーシス関連遺伝子(Casp3, Casp9, Casp8ap2, Bid, Bcl2l11, Ddit4l 等)、細胞増殖に関連する遺伝子(Cadn2c, Cdc25a, Cdc7, Ccnd2, Ccnd3, Mapkapk2,

Mak10, Mknk2, Map3k3, Map3k9, Map2k6 等)の発現増加が認められたことから、アポトーシスシグナルが活性化されていることが示唆された。薬物代謝酵素遺伝子の発現については、顕著な変動を示すものが認められなかった。膜輸送体蛋白では、Slc10a7, Slc19a2, Slc25a29, Slc25a30, Slc44a2, Slc45a4, Slc9a5 等)の遺伝子の発現増加が認められた。金属結合性の蛋白質・メタロチオネイン遺伝子(Mt1, Mt2)の発現増加も認められた。加えて、ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子(Hdac1)の発現増加が認められた。この他、特徴的なシグナルとして、イノシトールリン酸代謝関連遺伝子(Gla, Sgpp1, EDG5 遺伝子等)の発現増加が見いだされたが、これらの変動と細胞応答との関係は現時点で不明である。

VPA は神経系の酵素 GABA(γ -アミノ酪酸)トランスアミナーゼを阻害すると報告されているが、この遺伝子(Abat: 4-Aminobutyrate aminotransferase)の発現変動は認められなかった。GABA 受容体を含む神経伝達物質受容体遺伝子の顕著な発現変動は認められなかったが、GABA 受容体シグナル経路に関与すると考えられる塩素イオンチャネル(Clcn2: chloride channel 2)の発現増加は認められた。

その他特徴的な遺伝子として、アンドロステジオンからテストステロンを作るものと考えられる酵素の遺伝子 Hsd17b7 の発現増加、テストステロンをジドロテストステロン(DHT)に変換すると考えられる酵素 5 α リダクターゼの遺伝子(Srd5a1)の発現増加が認められ、海馬中の DHT 合成が促進されている可能性が示唆された。Hsd17b7 は肝でも発現が増加していた。

したがって、VPA の投与により海馬では、肝の場合とプロファイルが似ており、アポトーシスシグナルが活性化され細胞障害が懸念され、また多種のイオン、薬物の膜輸送が活性化されていることが示唆された。しかし肝とは異なり、PPAR α シグナルカスケードの活性化している可能性が低いものと考えられた。また、テス

トステロン、DHT が増加している可能性が示唆されたが、細胞機能との関係は現時点で不明である。

ハイスルーブット *in situ hybridization* について、染色工程の自動化を完了(賦活化過程のみ手動)し、signal 増幅法の採用により、検出感度を30コピー前後まで改善させた。蛍光プローブを用いた定量的解析が可能となり、実際、10 コピー前後で日内変動を示す遺伝子の ARNTL の発現が定量的に捉えられた。これを受け、多数サンプルの定量解析として、本研究において独自に見出したペンタクロロフェノールによる STAT1, IRF7 等のインターフェロン応答遺伝子群発現上昇について、24 切片の染色データ取得を開始した。

【②基盤研究】

昨年度に続き、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行った。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、胚に於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於ける遺伝子発現プロファイルの投与後早期に於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) および 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、骨髓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、一部の薬物投与動物に於ける骨折部位の化骨反応の亢進及び、ほとんどの薬物投与動物に於ける皮質骨の肥厚反応が確認された。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): 遺伝子傷害性及び非遺伝子傷害性肝発癌物質を用いたマウス肝に於ける遺伝子発現解析の結果、遺伝子傷害性物質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、個々の配列に依り、飽和しやすさに差があること、及び、b) 飽和補正式は Langmuir の方程式が適していること、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、統計手法との組み合わせ機能を追加した結果、絞り込み効率が向上した。

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が多かった「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、に着手した。

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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍等

菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、種村健太郎、小川幸男、児玉幸夫、関田清司、Percellome Project、遺伝子医学 MOOK10、DNA チップ/マイクロアレイ臨床応用の実際、油谷浩幸編集、株式会社メディカルドゥ、p363-371、2008年6月30日

菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小川幸男、関田清司、トキシコゲノミクスの大規模高精度データベースの構築と解析、非臨床試験-ガイドラインへの対応と新しい試み- 野村護、堀井郁夫、吉田武美編集、株式会社エル・アイ・シー、p561-568、2008年9月30日

Hirabayashi Y, Inoue T (2008) Principles of data-mining in toxicogenomics. In Toxicogenomics: A Powerful Tool for Toxicity Assessment (S. C. Sahu, ed., pp. 57-84. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ)

2) 原著論文

Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. *Environmetrics* 2009; 20:1-13.

Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K. Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. *Neuroscience*, 155:780-788, 2008

Yasuhiko Y, Kitajima S, Takahashi Y, Oginuma M, Kagiwada H, Kanno J and Saga Y, Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of *Mesp2*. *Development* 135:3511-3519, 2008.

Hirabayashi Y, Tsuboi I, Kitada K, Igarashi K, Kodama Y, Kanno J, Yoshida K, Dainiak N, Inoue T. Comparison of murine gene expression profiles between spontaneous and radiation-induced myelogenous leukemias: Stochastic and probabilistic expression variances in the former vs. radiation-specific expression commonalities in the latter. *Exp Hematol*, 37:195-205, 2009

Hasegawa M, Kurata M, Yamamoto K, Yoshida K, Aizawa S, Kitagawa M., A novel role for acinus and MCM2 as host-specific signaling enhancers of DNA-damage-induced apoptosis in association with viral protein gp70. *Leukemia Res*, in press.

Konstantinou K, Yamamoto K, Ishibashi F, Mizoguchi Y, Kurata M, Sawabe M, Nakagawa Y, Suzuki K, Crawley JT, Kitagawa M., Angiogenic mediators of angiopoietin system are highly expressed by CD10-positive lymphoma cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma., *Br J Haematol*, 144:696-704, 2008

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

Uehara T, Hirode M, Ono A, Kiyosawa N, Omura K, Shimizu T, Mizukawa Y, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T., A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats., *Toxicology*, 250:15-26, 2008

Hirode M, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Ohno Y, Urushidani T., Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis., *Toxicol Appl Pharmacol*, 229:290-299, 2008

Uehara T, Kiyosawa N, Shimizu T, Omura K, Hirode M, Imazawa T, Mizukawa Y, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T, Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans., *Hum Exp Toxicol*, 27:23-35, 2008

Okuda, T, Ioku, K, Yonezawa, I, Minagi, H, Gonda, Y, Kawachi, G, Kamitakahara, M, Shibata, Y, Murayama, H, Kurosawa, H, Ikeda, T, The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite., *Biomaterials*, 29:2719-2718, 2008

Gonda, Y, Ioku, K, Okuda, T, Shibata, Y, Kamitakaraha, M, Kawachi, G, Yonezawa, I, Kurosawa, H, Ikeda, T., Osteoconductivity of hydrothermally synthesized beta-tricalcium phosphate composed of rod-shaped particles under mechanical unloading., *Key Eng. Mater.*, 396-398:253-256, 2009

Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F., Mutagenic

radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line.,
Mutat. Res, 638:48-55, 2008

Watanabe T, Tanaka G, Hamada S, Namiki C,
Suzuki T, Nakajima M, Furihata C,
Dose-dependent alterations in gene expression in
mouse liver induced by diethylnitrosamine and
ethylnitrosourea and determined by quantitative
real-time PCR, Mutat. Res, 673:9-20, 2009

2. 学会発表

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 35 回日
本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26 日、
東京

北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる毒性評
価法の高精細化、第 35 回日本トキシコロジー学会
学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、
菅野 純、エストロゲン受容体(α 型)ノックダウンマ
ウスの神経行動解析、第 35 回日本トキシコロジー
学会学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京

今井 清、坪井 優、向井大輔、山下 龍、関田清
司、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純、フタル酸エステ
ル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性
学的研究、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年
会、2008 年 6 月 27 日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、高
木篤也、関田清司、今井 清、菅野 純、
Percellome 手法を用いたフタル酸エステル DEHP
とその活性代謝産物 MEHP の腎に及ぼす遺伝子
発現変動の比較、第 35 回日本トキシコロジー学会
学術年会、2008 年 6 月 28 日、東京

五十嵐勝秀、小川幸男、笠井辰也、長野嘉介、北
嶋 聡、相崎健一、菅野 純、シックハウス指針値レ
ベルの経気道暴露による遺伝子発現変化の

Percellome 解析、第 35 回日本トキシコロジー学会
学術年会、2008 年 6 月 28 日、東京

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝秀、種村
健太郎、小川幸男、関田清司、肝障害性薬剤によ
る初期遺伝子発現応答の Percellome 解析、薬学
会第 129 年会、2009 年 3 月 28 日、京都

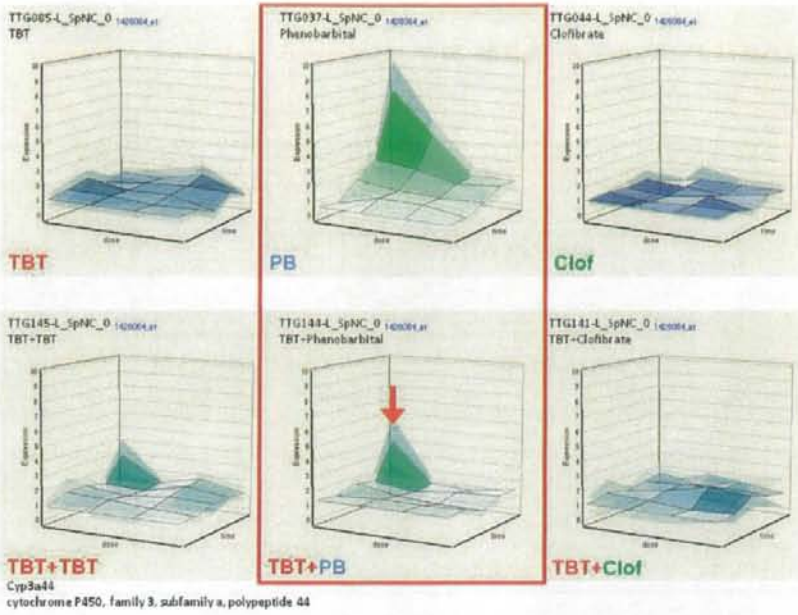
Takahashi Y, Kitajima S, Yasuhiko Y, Kanno J and
Saga Y, Delta-like 3(Dll3) does not substitute for
Delta-like 1 (Dll1) in somitogenesis in vivo but
modulates Dll1/Notch signaling in the posterior
PSM., 第 41 回日本発生生物学会、2008 年 5 月

種村 健太郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、北嶋
聡、菅野 純、発生期ドーモイ酸暴露によるマウス
脳微細構造異常と情動-認知行動障害、第 35 回
日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月

H. 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

A



B

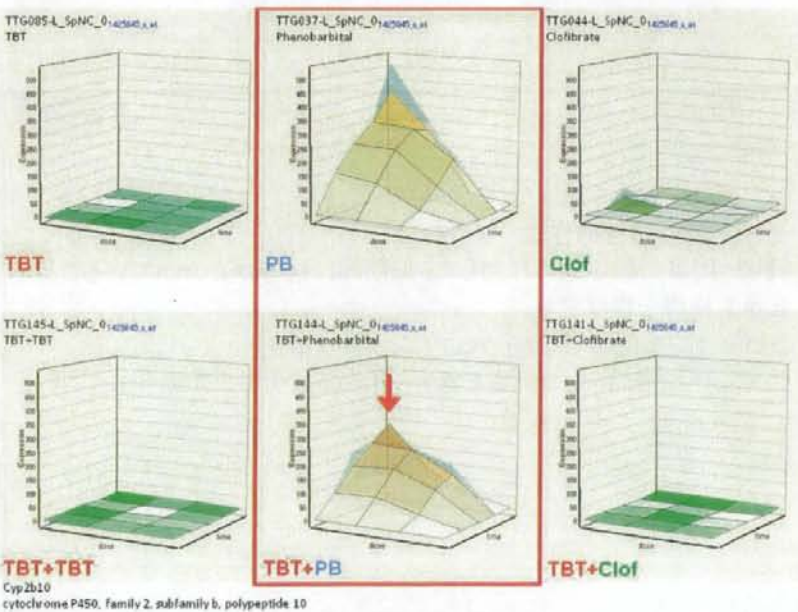


FIG1. 新型慢性暴露(慢性暴露:TBT)と単回投与実験に於ける遺伝子発現変化の比較
TBT慢性暴露動物で、PBによるCyp2b10(A), Cyp3a44(B)遺伝子の発現誘導の減弱が認められた。
TBT: Tributyltin, PB: Phenobarbital, Clof: Clofibrate

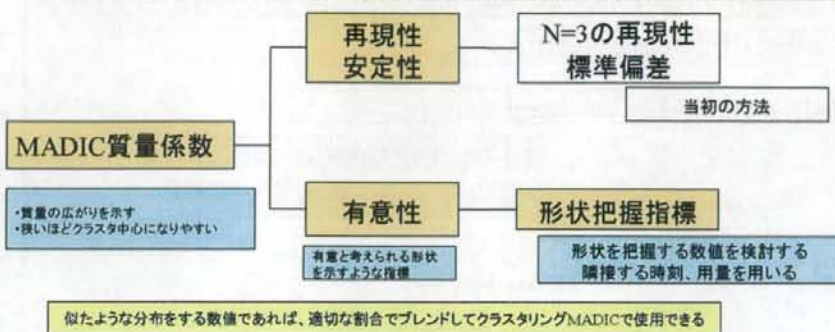
委託研究報告書 (STEP7)

テーマ

1. 局所変動性指標の作成
時間、用量の実験条件に対して、局所的に誘導がかかっていることを示す指標を作成する
2. プローブ配列に基づくマイクロアレイデータ補正
Cross-Hybridizationの影響と考えられるの数式モデルの作成

1.1.局所変動性指標の検討

以前に作成したクラスタリング手法(MADIC)では、再現性の指標を用いて、クラスタの発見を行っているが、一昨年の研究成果により、高濃度のRNAでは、再現性が高いにもかかわらず、実験時期などの影響を大きく受けることが示された。誘導がかかっていることを示す指標を用いて、クラスタリングを実施すれば、適切なクラスタの発見につながるはずである。



Copyright(C)2008-2009 MTT DASA Corporation

1.2.再現性指標と局所変動性指標

再現性指標	発現局所変動性指標
MADIC当初の質量分布を規定する指標	今回検討した指標
平均サーフェスから全観測の標準偏差	平均値の時刻差分と用量差分の絶対値の中央値
再現性の高い場合に、小さな値を示す	単純な誘導がかかっている場合に、小さな値を示す

Copyright(C)2008-2009 MTT DASA Corporation

1.3.形状把握指標 アイデア

変化が特定の時刻、用量に集中している形状は価値がある

サーカディアンは、時間方向変化はあるが、用量方向変化は小さい

単峰は、特定の時間用量だけで変化

MAD: the median for absolute deviation

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

標準偏差 = 偏差の平方の平均の平方根

$$MAD = \mathit{median}_{i=1}^n (abs(x_i - \bar{x}))$$

MAD = 偏差の絶対値の中央値

$$MAD1 = \mathit{median}_{i=1}^n (abs(\Delta Q_i))$$

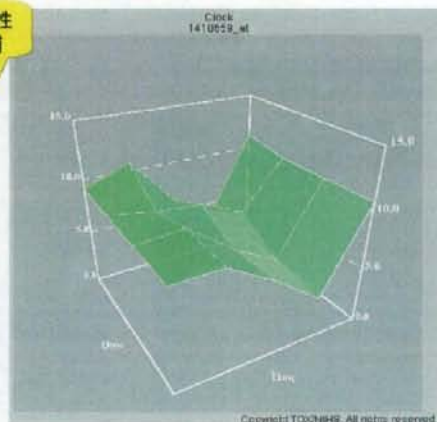
$$MAD2 = \mathit{median}_{i=1}^n (abs(\Delta Q_i - \overline{\Delta Q}))$$

1.4.試行結果(Ethanol)

局所変動性
指標候補

	正規化MAD
実	0.8678
1階差分	0.8358
1階差分(平均差)	0.8508
時間1階差分	1.3930
用量1階差分	0.3448
平均	0.8689
幾何平均	0.8636
最小	0.3448

Clock濃度は、サーカディアン濃度として、用量の影響を受けます。時間1階差分は大きく、用量1階差分は小さくなっています。



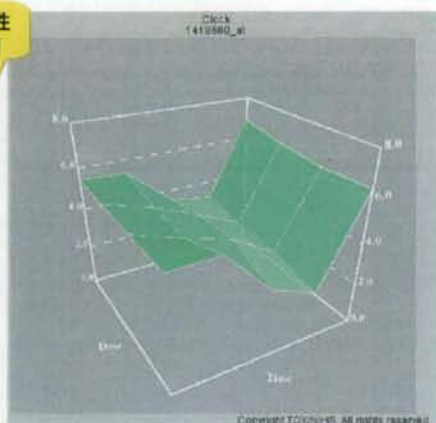
1.4.試行結果(Ethanol)



局所変動性
指標候補

	正規化MAD
実	0.9187
1階差分	0.4968
1階差分(平均差)	0.5831
時間1階差分	1.3941
用量1階差分	0.1699
平均	0.7820
幾何平均	0.7497
最小	0.1699

Clock遺伝子は、サーカディアン遺伝子として、用量の劇変を受けず、時間1階差分は大きく、用量1階差分は小さくなっている。



Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation

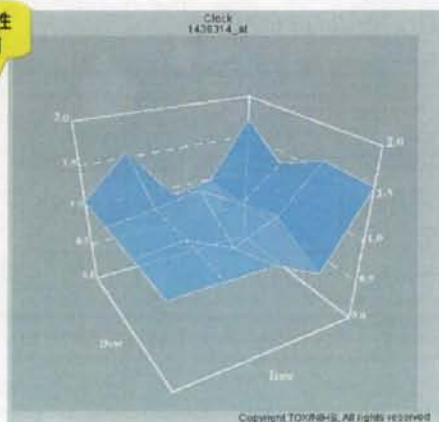
1.4.試行結果(Ethanol)



局所変動性
指標候補

	正規化MAD
実	0.7848
1階差分	0.9622
1階差分(平均差)	0.9941
時間1階差分	1.3420
用量1階差分	0.9002
平均	1.1211
幾何平均	1.0385
最小	0.9002

Clock遺伝子のこのプローブセットでは発現量が低く、偶然影響と考えられるように、面が見れていると思われる。他のClockプローブセットより1階差分の値が大きい。



Copyright©2008-2009 NTT DATA Corporation