

*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

II. 本論 (今年度報告)

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の
本手法の適用と解析(続き)
2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚様体(EB)形成における遺伝子発現変動の
経時データベースの作成
[EB形成0-7日](TIME POINT: 14点)
3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析
[より早期のマウス胚の代替としてのEB]

II. 本論

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の本手法の適用と解析(続き)

2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚種体(EB)形成における遺伝子発現変動の経時データベースの作成
[EB形成(0-7日)](TIME POINT 14点)

3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析
[より早期のマウス胚の代替としてのEB]

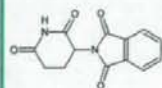
背景

サリドマイド

化合物名: 3-(N-フルタリミド)グルタルイミド [グルタミン誘導体]

- ・1957年、グリュンター社(西ドイツ)から発売された睡眠薬
→妊婦のつわりや不眠症の改善のために多用(多発性神経炎の副作用)
- ・1961年、W・レント博士が催奇形性を学会で報告
同年グリュンター社が製品の回収を開始(日本では翌年開始)
- ・**催奇形性:** 種差が著しい→分子機序不明
 - ・ヒトで四肢の発育不全(アザラシ肢症): 手足が極端に未発達で出産、発育
 - ・耳の障害(難聴、無耳症、小耳症)
→げっ歯類では催奇形性が認められない(ウサギでは認められる)
 - ・自閉症を誘発する可能性が示唆されている
- ・**新たな薬効:** →分子機序不明
多発性骨髄腫治療、ハンセン病治療、リウマチ治療、乾癬治療、
血管新生阻害作用、TNF- α の産生抑制作用

催奇形性が認められないマウス胚に
本手法を適用し、遺伝子発現変動の観点から
網羅的にこの誘発分子機序を明らかにする



背景2

サリドマイドは、薬物動態上も種差が著しい

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

Francisco Chung,¹ Jun Lu,¹ Brian D. Palmer,¹
Philip Kestell,¹ Peter Browett,²
Bruce C. Baguley,¹ Malcolm Tingle,¹ 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 2004

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

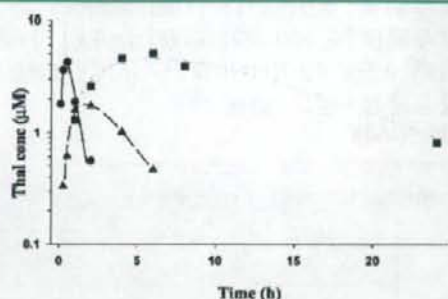
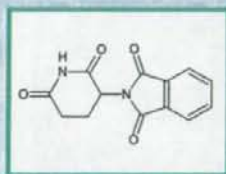


Fig. 4 Comparison of thalidomide pharmacokinetics in mice (2 mg/kg, ●), rabbits (2 mg/kg, ▲) and multiple myeloma patients (200 mg, combined data from five individuals, ■).

目的

遺伝子発現変動の観点から、
催奇形性が認められないマウス胚に、本手法を適用し、
サリドマイド誘発奇形の分子機序を明らかにする



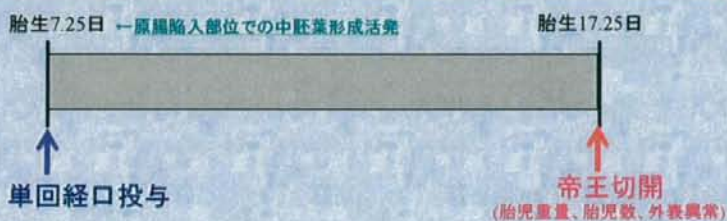
サリドマイド

化合物名: 3'-(N-フタルイミド)グルタルイミド [グルタミン誘導体]

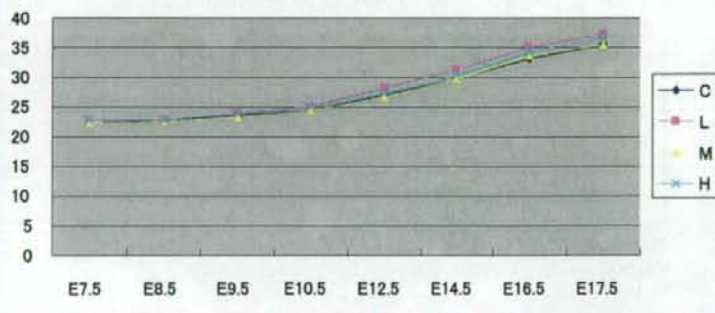
用量設定実験

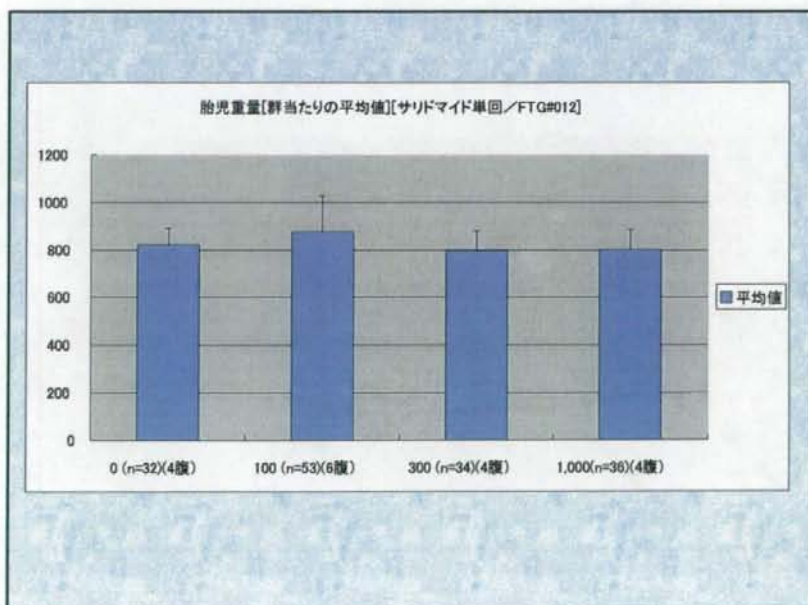
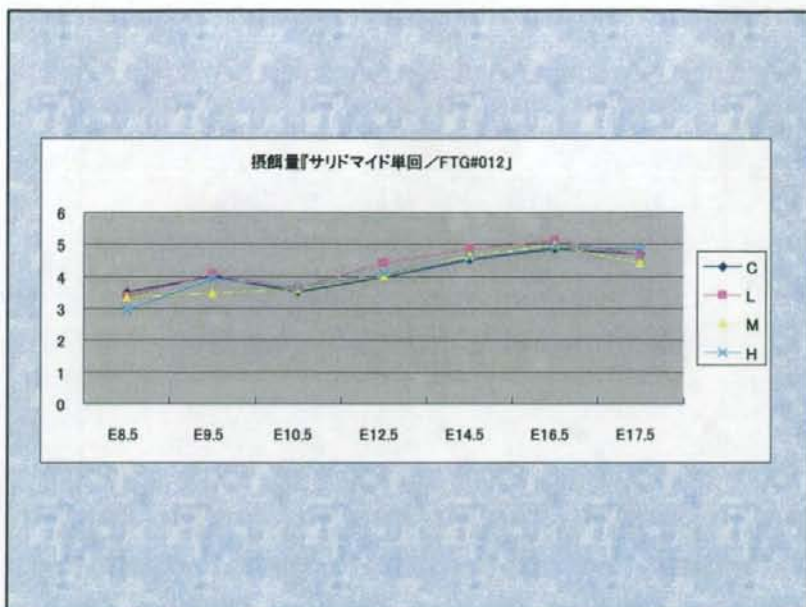
— サリドマイド単回経口投与(経胎盤) —

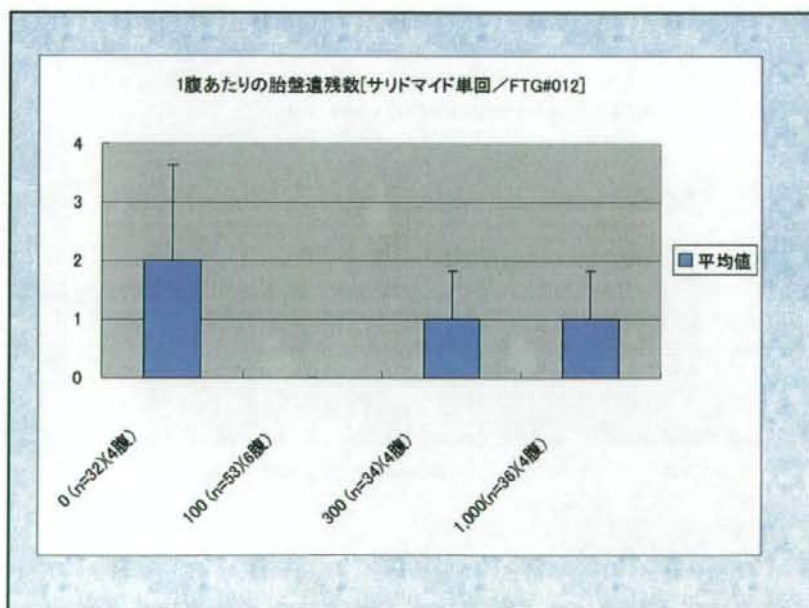
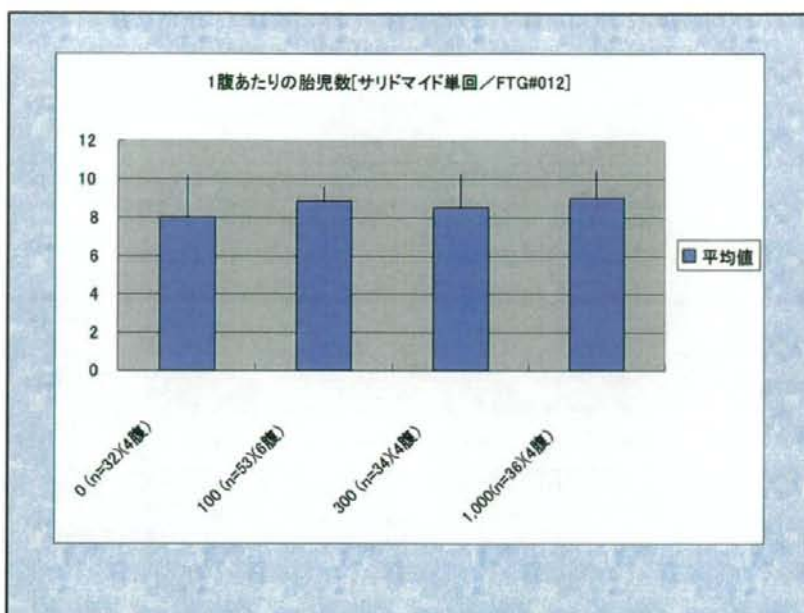
- ・動物: 妊娠C57BL/6CrSlcマウス(8-10W)(日本エスエルシー)
- ・投与物質: サリドマイド (Thalidomide)(BIOMOL社)
- ・投与濃度: 0, 100, 300, 1,000 mg/kg [10 ml/kg]
- ・溶媒: 0.5% メチルセルロース(MC) (信越化学工業) [メノウ鉢で懸濁]
- ・投与経路: 経口(強制経口)
- ・1群: 4-6腹



妊娠マウス体重変化[サリドマイド単回/FTG#012]



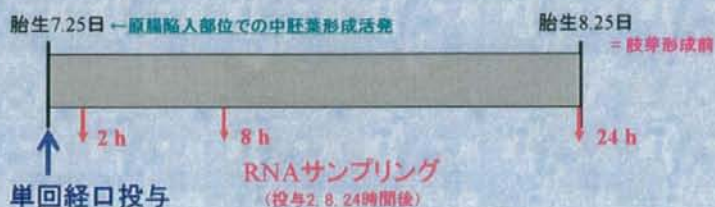




網羅的遺伝子発現変動解析実験

—サリドマイド単回経口投与(経胎盤)—

- ・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、1,000 mg/kg [10 ml/kg]
- ・溶媒: 0.5% メチルセルロース(MC) (信越化学工業) [メノウ鉢で懸濁]
- ・投与経路: 経口(強制経口)
- ・1群: 3-4腹
- ・RNA用1サンプル = 1腹分の胎児のプール



妊娠マウスへのサリドマイド(1,000 mg/kg)単回経口投与時の全胚における網羅的遺伝子発現変動解析 [Perclom法]

[Analyzer]

- 条件** 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0.2より大.
 - 2) t-testでのP値が0.05未満.
 - 3) 双方の平均値の比が[投与/溶媒](増加)または[投与/溶媒](減少)で1.6より大

- ・投与 2時間後: 増加: 122 ps
: 減少: 514 ps 計636 ps
- ・投与 8時間後: 増加: 116 ps
: 減少: 285 ps 計401 ps
- ・投与 24時間後: 増加: 329 ps
: 減少: 164 ps 計493 ps

ps = probe sets

総計 1,530 ps

影響を受けたシグナルパスウェイの探索

Ingenuity Pathways Analysis (IPA)
(Ingenuity Systems Inc.)

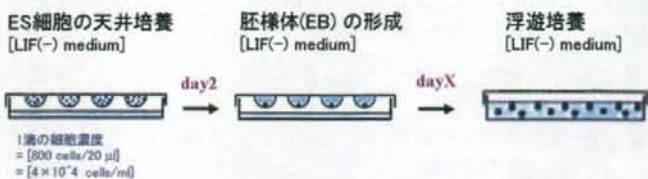
・サリドマイド投与2, 8, 24時間後に増加または減少したps数: 1,530

II. 本論 (今年度報告)

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の本手法の適用と解析(続き)
2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚様体(EB)形成における遺伝子発現変動の経時データベースの作成
[EB形成0-7日](TIME POINT: 14点)
3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析
[より早期のマウス胚の代替としてのEB]

胚様体(EB)の形成によるES細胞の三胚葉分化

・ESは生殖細胞伝達頻度の高い TT2を使用した



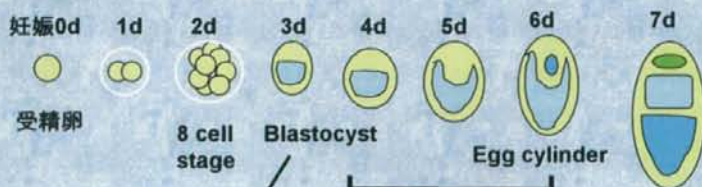
[EB形成の経時変化]



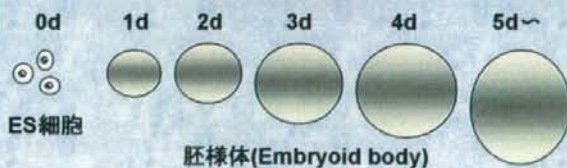
マウス胚とES細胞/胚様体(EB)の比較

—より早期の胚の代替となり得る—

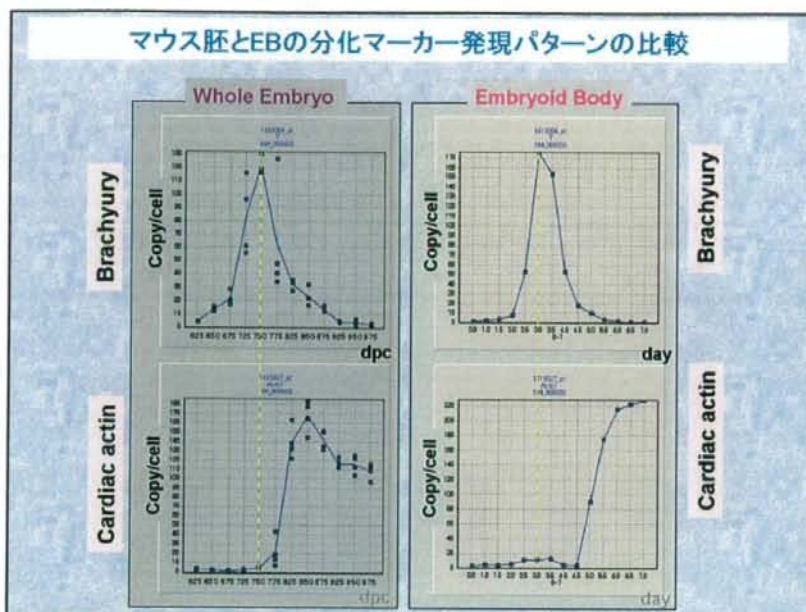
In vivo



In vitro



マウス胚とEBの分化マーカー発現パターンの比較



II. 本論 (今年度報告)

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の本手法の適用と解析(続き)
2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚様体(EB)形成における遺伝子発現変動の経時データベースの作成
[EB形成0-7日](TIME POINT: 14点)
→ 取得できた。すでに取得済みのマウス胚のデータベースとの対比もでき、いくつかの分化マーカーについて、両データベース間で似た発現パターンを示すことを確認できた。
3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析
[より早期のマウス胚の代替としてのEB]

II. 本論（今年度報告）

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の本手法の適用と解析(続き)
2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚様体(EB)形成における遺伝子発現変動の経時データベースの作成
[EB形成0-7日](TIME POINT: 14点)
3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析
[より早期のマウス胚の代替としてのEB]

サリドマイド適用時の EB分化過程における網羅的遺伝子発現変動解析



Rsortによる解析

条件

最大発現コピー数 > 0.3

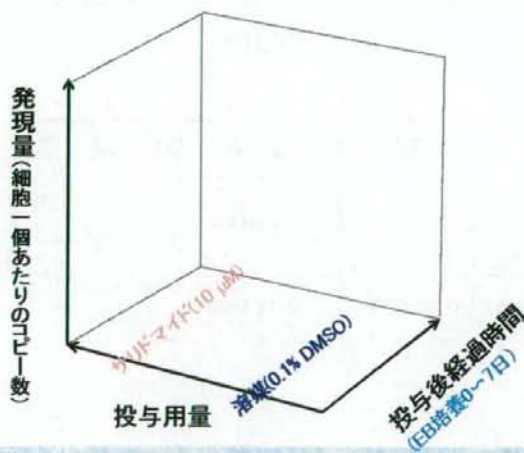
$P < 0.05$

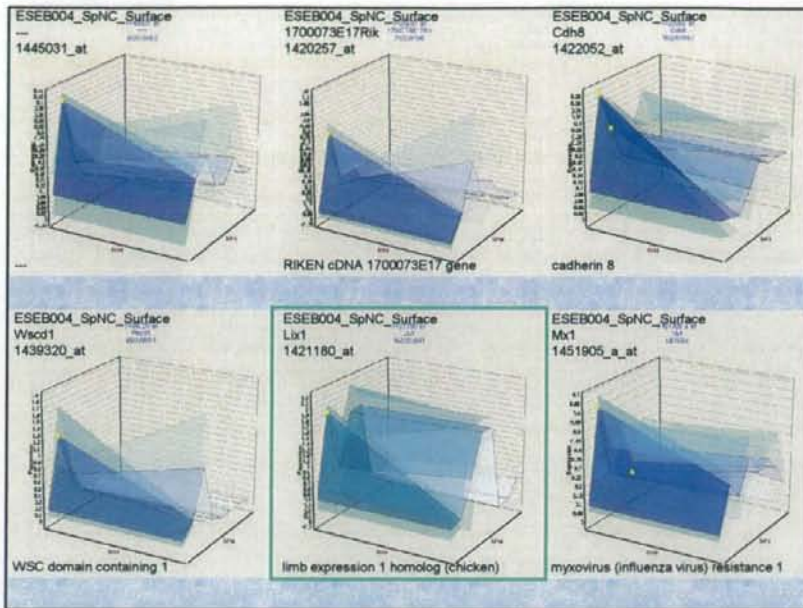
発現減少または増加

→556 p.s.

→このうち目視により生物学的変化と考えられたもの: 118 p.s.

Millefeuille data (MF surface data)





Lix1: limb expression 1 homolog (chicken)

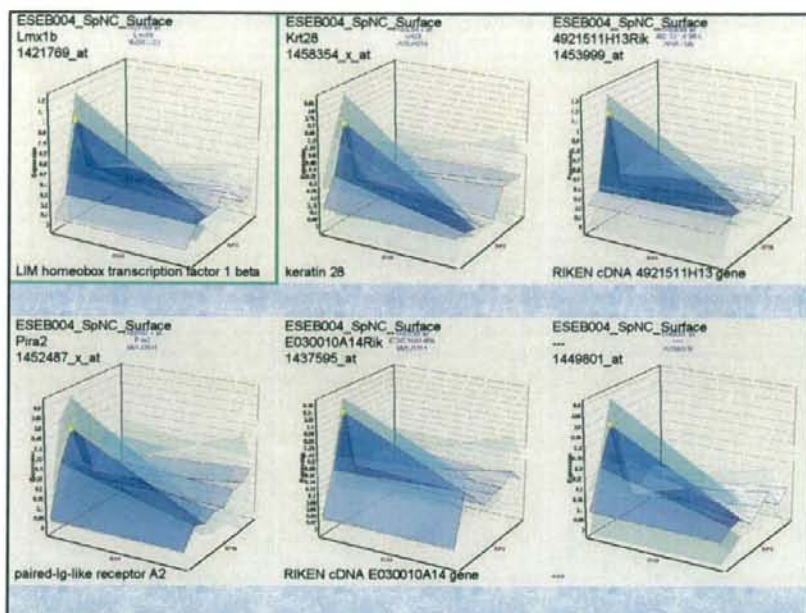
機能不明

Lix1 is transiently expressed in the **nascent hindlimb bud** between Hamburger-Hamilton stages 15 and 19.

Chicken Lix1 transcripts are also found in the basal plate of **rhombomeres 3 and 5**, in pharyngeal and



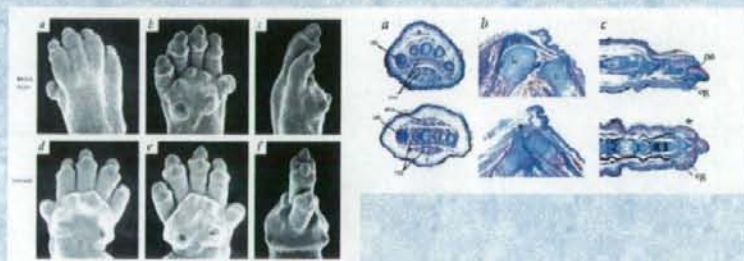
Swindell EC et al.,
Cloning and expression
analysis of chicken Lix1,
a founding member of a
novel gene family. *Mech
Dev* 109: 405-408, 2001.



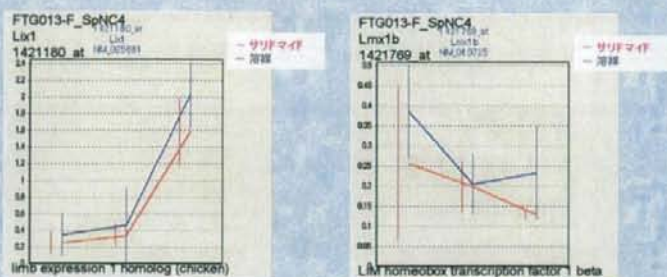
Lmx1b: LIM homeobox transcription factor 1 beta

Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome

Haixu Chen¹, Yi Lan¹, Dmitry Oychinnikov¹, Hiroki Kokubo¹, Kerby C. Oberg², Carmen V. Pepicelli¹, Lin Gan¹, Brendan Lee³ & Randy L. Johnson¹



野生型胚におけるLix1, Lmx1bの遺伝子発現変動に対するサリドマイド経胎盤投与の影響



II. 本論 (今年度報告)

1. 催奇形性モデル物質であるサリドマイドをマウス胚に経胎盤暴露した際の
本手法の適用と解析(続き)
2. 無処置野生型ES細胞を用いた、胚性体(EB)形成における遺伝子発現変動の
経時データベースの作成
[EB形成0-7日](TIME POINT: 14点)
3. サリドマイドをEBに暴露した際の本手法の適用と解析
【より早期のマウス胚の代替としてのEB】
→マウス胚(in vivo)との対応については、今後検討していく。
本解析手法の基本的な部分は確立されたものと考えられた。

今後は、システムバイオロジーの連携を適宜取り入れることにより、より精
度の高い解析法の確立を目指す。

謝辞



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

菅野 純
五十嵐 勝秀
相崎 健一
高木 篤也

松田 菜恵
安東 朋子
安部 麻紀
池野 絵里子
松坂 俊輔

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 —

研究分担者 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に、生理的分子平衡が与える変動要因(平成 19 年度報告)のうち、加齢影響に注目し、共通性の加齢要因と stochastic/probabilistic な変動要因の双方から解析を試みた。前者では、自己認識関連遺伝子の機能平衡の変動が注目された。

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、前者は不確定性の確率を基礎とする予測情報の範囲での cluster 情報を与えることなど、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、第二年度で検討した種々の階層レベルの生理的分子平衡の与える変動要因のうち実験動物の週齢差に注目し、遺伝子発現変動を比較検討した。

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、加齢影響について、2 ヶ月齢並びに 21 ヶ月齢の C3H/He 系統の雄マウスを用い遺伝子発現変化の特徴を明らかにすることとした。(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基づく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。

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。

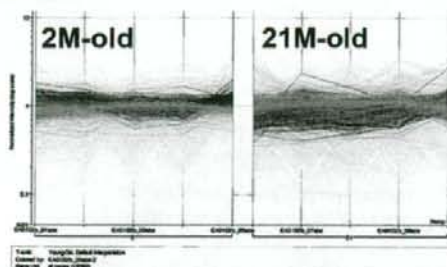
C. 研究結果

線図(Line configuration)による2ヶ月齢・21ヶ月齢各群における発現比較

2ヶ月齢および21ヶ月齢のC3H/He α マウ

ス、各群 5 匹ずつの個体ごとの発現遺伝子の発現強度を、同一遺伝子毎に接続して比較した結果、図1に認められるとおり、2ヶ月齢と21ヶ月齢とでは、1)発現強度に、一部やや逆転傾向があり、2)個々の遺伝子毎の発現強度分布が、21ヶ月齢で2ヶ月齢に比べて拡大する傾向が認められた。

図1:線図



デンドログラムによる遺伝子発現の解析

以上の差異をデンドログラムによる発現プロフィールで比較すると、2ヶ月齢、21ヶ月齢の各個体は明瞭には分離しなかった。この結果は平成18年度報告でも触れたので図版は省略する。

主要要因解析(PCA)に基づく2ヶ月齢および21ヶ月齢の個体ごとのeigenvector値による比較検討

主要要因解析に基づく2ヶ月齢および21ヶ月齢の個体ごとのeigenvector値による分離コンポーネントの同定とその3次元解析を行った。前者の結果は図2のとおり、第2、3、4要因によって両者が分離するものと推測されるので、それら3要素のeigenvector値に基づく3次元表現を作図すると図3の通りとなる。第3、4要因面でも21ヶ月齢のeigenvector値の拡散傾向が、発現遺伝子の特徴を意味するものではないが、この表現で見られる限りでは、21ヶ月齢における各種の遺伝子のstochastic(確率的)な拡散傾向が反映されており、2ヶ月齢におけるeigenvector値の収束性と対照的である。

尚、加齢影響の特性に鑑みて、これら2ヶ月齢及び21ヶ月齢の2群間でのStudent's two-sample t-testによる検討も行った(結果は省略)。

図2:PCAによるeigenvector値

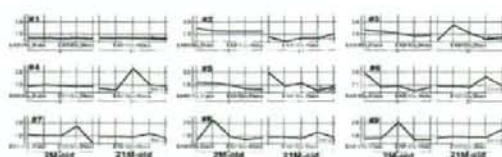
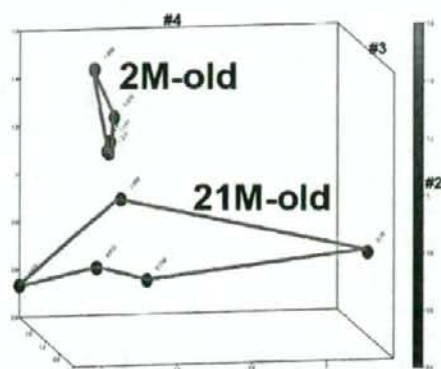


図3:図2の第2、3、4要因による3次元図



分別責任遺伝子群(CAP及びSAP)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すると、これは老化個体全般にわたるcommon aging profile(CAP)と、個別に観察される加齢遺伝子の和集合からなるstochastic aging profile(SAP)の2つに分けて考えることができる。このうち前者に相当するCAPは、老化個体全般にわたる加齢要素を支配しているものと考えられ、デンドログラムによる分別などをみても極めて明瞭な老若の分別をしている。興味深いのは、後に述べるSAP構成遺伝子と異なり、遺伝子発現レベルに群内の各個体の共通性が認められるものの、際だった高発現や低発現に至ることはなく、抽出した122の遺伝子を基礎としたシグナルパスウェイとしてのみ、p53、bcl2、myc、や、FoxO、Hif1、cyclin G2、あるいはTNF- α 、Interferon- γ 、PPAR- α などの連絡が認知されるに留まっていることであり、老年性ホメオステシスを反映しているものと推定される。これに対しSAPは、細胞骨格(actin binding LIM 1)や、調整因子(acetylcholin-esterase)などの細胞機能や、細胞周期(cyclin depending kinase 5 & Able

enzyme substrate 1)などに関係する遺伝子の変化が際立った変化として認められ、加えて最も注目される直接的加齢関連遺伝子変化としては、Lamin B1 や、thioredoxin 2、peroxiredoxin 4 及び MnSOD などの抗酸化遺伝子群の動きが認められるのをはじめ、Gene Ontology (GO)でも個別遺伝子でも、極めて多数の遺伝子群からなる自己認識、並びに免疫機能に関する遺伝子変化が個々に目立ち、更に MLL5(myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5)や BCL(B-cell CLL/ lymphoma) 7a、BCL11a などの血液腫瘍関連遺伝子の発現変化が散見されることであった。

D. 考察

今回の解析では、主要要因解析によって、2ヶ月齢と 21ヶ月齢の遺伝子発現プロフィールに差異が有意であった遺伝子を分離する戦略が取られた。実際には、そうした群毎に共通性をもつ遺伝子と別に、図1でみたような、21ヶ月齢の各個体間の stochastic な発現の拡散傾向を反映した cluster として認識される可能性を持つ遺伝子群が epigenetic に存在するものと想定されるが、解析には至らなかった。この目的のためには、個別別の cluster 亜群を分散エネルギー値(エンタルピー変換値)の極小化などにより、大用量要因解析、SPSS などを用いることにより、多元次元的な autoclusterization させる手法をとることが必要である。

E. 結論

本年度は、昨年度において検討した種々の階層レベルの生理的分子平衡の与える変動要因のうち、実験動物の週齢差に注目し、加齢影響の遺伝子発現の検討をおこなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著

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.

Tsuboi I, Hirabayashi Y, Harada T, Koshinaga M, Kawamata T, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Role of hematopoietic microenvironment in prolonged impairment of B cell regeneration in age-related stromal-cell-impaired SAMPI mouse: effects of a single dose of 5-fluorouracil. *J Appl Toxicol* 28:797-805, 2008.

Tsuboi I, Hirabayashi Y, Harada T, Hiramoto M, Kanno J, Inoue T, Aizawa S. Predominant regeneration of B-cell lineage, instead of myeloid lineage, of the bone marrow after 1 Gy whole-body irradiation in mice: role of differential cytokine expression between B-cell stimulation by IL10, Flt3 ligand and IL7 and myeloid suppression by GM-CSF and SCF. *Radiat Res* 170:15-22, 2008.

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* 28:227-236, 2008.

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* 28:237-248, 2008.

Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J, Inoue T. Benzene-induced hematopoietic toxicity transmitted by AhR in wild-type mouse and nullified by repopulation with AhR-deficient bone marrow cells: time after benzene treatment and recovery. *Chemosphere* 73:S290-294, 2008.

2) 総説・著書など

Hirabayashi Y, Inoue T. (2009) Aryl hydrocarbon receptor biology, xenobiotic responses in hematopoietic progenitor cells.

Biochem Pharmacol. 77:521-535.

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. 学会発表

井上 達、壺井 功、北田邦夫、五十嵐勝秀、児玉幸夫、菅野 純、吉田和子、平林容子、マウス放射線誘発骨髄性白血病の遺伝子発現プロファイルの確率論的特異性:自然発症白血病との比較. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) (2008.12.11) [神戸, (Meeting abstract p677; 2008)]

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 続報. 第70回日本血液学会総会(2008.10.12) [京都, 臨床血液 49 (9) p1141; 2008]

Inoue T, Hirabayashi Y. Gompertzian expression of the life span: Toxicological ultimate risk for xenobiotic responses. The 45th Congress of the European Societies of

Toxicology (2008.10.6) [Athens, Greece, Toxicology Letters 180S, S68, 2008]

井上 達、松下智哉、五十嵐勝秀、菅野 純、平林容子:一般口演「血液2」マウス自然発症及び放射線誘発骨髄性白血病の遺伝子発現プロファイルの主要因解析による分別遺伝子の抽出. 第97回日本病理学会総会(2008.5.16) [金沢, 日本病理学会会誌 97: 246; 2008]

井上 達:セッション4 まとめと将来展望. 栄養補助食品国際ワークショップ 国際的視点で考える栄養補助食品(ダイエタリーサプリメント)の精度とその科学:国際ハーモニゼーションをめざして(2007.4.17) [横浜, (報告書 p113-119, 2007)]

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
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。