

MHLW-Toxicogenomics Project for Chemical Safety

[KANNO Project]

February 23, 2009

Biological basis of data in toxicogenomics

「トキシコジノミクス・データの生物学的概念」

Tohru Inoue, MD, PhD
Center for Biological Safety & Research
National Institute of Health Sciences

Aim of Research

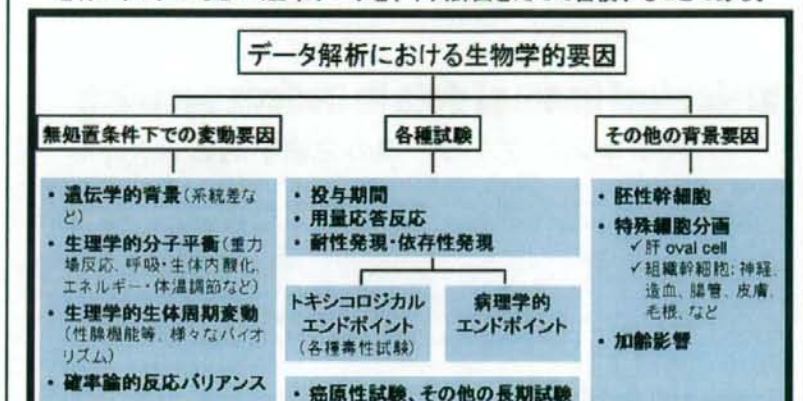
研究の目的

**トキシコジノミクスにおける
発現データ解析手法を確立
するための検討を行い、
これに基づく基本データを
年次計画をたてて、蓄積する。**

Aim of Research

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—

研究目的:トキシコジノミクスにおけるデータ解析手法を確立するための検討を行い、これにもとづく基本データを、年次計画をたてて蓄積することである。



進捗状況

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、deterministicな性格とstochastic且つepigeneticな性格について、小規模の実験を遂行・参照しつつ、トキシコロジーエンドポイントとして導き出されるべき情報取得の電腦生物学的検討を行った。実験動物の加齢影響に焦点を当て、加齢に伴って認められるepigenetic diversityの概念を明らかにした。

デンドログラムによる遺伝子発現の解析

- 2M齢と21M齢の骨髓由来のデータはデンドログラムで双方にわかれたものの明瞭なパタンの差異は見いだし得なかった。

Line configurationによる個々の遺伝子発現の加齢による違い

- 加齢個体(21M齢)群では、遺伝子発現が若年個体(2M齢)群と逆転する遺伝子群の存在と、発現強度の個体差の拡大とが示唆された。

加齢のひきおこす遺伝子発現プロファイリングの分別

- 加齢個体と若齢個体のデータをPCA解析して、3次元の分布に表現すると、両者は第2要因軸で分離され、2M齢のそれは比較的隣接し、21M齢のそれは拡散傾向をもって広く分布していた。

分別責任遺伝子群の抽出

- 多数の外來異物応答遺伝子の発現が含まれていた。

例: 投与期間と用量応答関係:

用量応答関係の意味づけは、従来、経験的に処理されてきた。ジーンチップやマイクロレイによる遺伝子発現データは、従来の経験的な用量応答関係にマッチするように取り扱い方を誘導する方法と、非誘導的に扱う方法とが採られる。

後者では、個々の遺伝子の発現が上昇しているか下降しているかといったパターン認識や、個々の変動の直接的な意味付けから解放される(表徴型[phenotypic anchoring]から独立した毒性プロファイリングの確率 ← 米国学士院の勧告)。

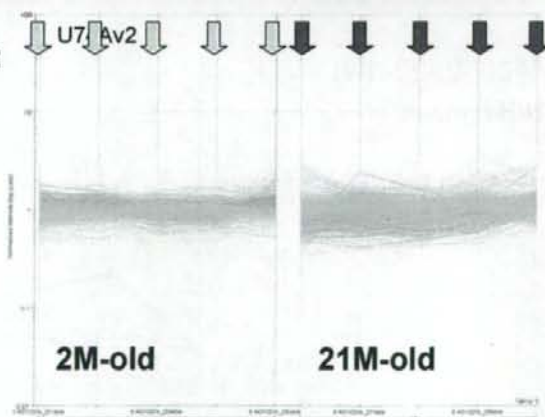
これは電算生物学(computational biology)的に、広域種間外挿などへの展望を導き出す可能性をもった毒性学全体の価値観を大きく変換させる結果となる。

実験動物の加齢変化

加齢に伴って分散する個体発現 確率論的な発現プロファイルの差異

C3H/He, male:

Age-related
stochastic and
diverse profiling



実験動物の加齢変化

加齢に伴って分散する確率的な発現プロフィール



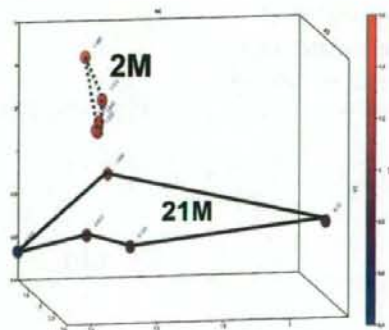
Young vs. Old: tree analysis using M430_2 chip

表徴型[phenotypic anchoring]から独立

実験動物の加齢変化

加齢に伴って分散する確率的な発現プロフィール

M430_2; 234(N)
C3H/He, male:



Responsible genes の非誘導的抽出

Gene Ontology Category	Biological process
GO: 9618:	response to pathogenic bacteria
GO: 42828:	response to pathogen
GO: 19733:	antibacterial humoral response (sensu Vertebrata)
GO: 19731:	antibacterial humoral response
GO: 1788:	antibody-dependent cellular cytotoxicity
GO: 42830:	defense response to pathogenic bacteria
GO: 42829:	defense response to pathogen
GO: 1906:	cell killing
GO: 1909:	immune cell mediated cytotoxicity
GO: 19735:	antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata)
GO: 19730:	antimicrobial humoral response
GO: 51241:	negative regulation of organismal physiological process
GO: 1794:	type IIa hypersensitivity
GO: 16068:	type I hypersensitivity
GO: 50728:	negative regulation of inflammatory response
GO: 50729:	positive regulation of inflammatory response
GO: 9617:	response to bacteria
GO: 6910:	phagocytosis, recognition

加齢に伴う遺伝子発現の 共通的プロフィールと確率的プロフィール

老年性変化の再考

Common aging profiling [CAP] と
Stochastic aging profiling [SAP] とに分けて
考えられる。

— 加齢に伴う遺伝子発現の変化には、
Common profiling と stochastic
profiling があり、それぞれを代表する発現遺
伝子は異なっていた。

加齢に伴う遺伝子発現の 共通的プロファイルと確率的プロファイル

材料の分取:

➤ **Common aging profiling [CAP] の採取:**

T-testでふたつの群間に有意差のあった遺伝子
(122)

➤ **Stochastic aging profiling [SAP] の採取:**

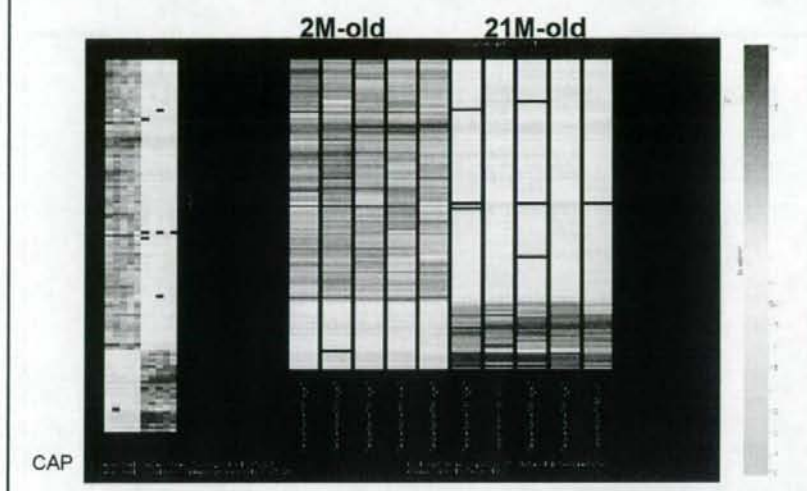
- 老化個体毎にユニークな孤発性の発現の認められた遺伝子 (SAP-1) (1288)
- 若齢Common遺伝子に対する老化個体での変動遺伝子の和集合 (SAP-2) (1005)

遺伝子発現の共通的プロファイルと確率的プロファイル

Common aging profiling [CAP] の特徴:

1. 免疫グロブリン関連の J-chain の発現の上昇、Cyclin D1、FoxP、Pax5、 β -cateninなどの低下が、加齢個体での発現として符合する程度で、
2. *Runx*とか*Notch*などの造血系関連遺伝子の動きは認められず、造血前駆細胞の刺激に関与するBMPの発現上昇が認められる以外は、老化を説明する変動は認められない。
3. にもかかわらず、これらのシグナルを繋ぐpathwayには、Notchシグナルを含む抗酸化やnicheの維持、種々のサイトカインを含む造血系・免疫系の遺伝子が介在している。
4. これは、加齢に伴うホメオステシスのエピジェネティックな変動を反映しているものと考えられる。

Common aging profiling [CAP] の特徴



遺伝子発現の共通的プロファイルと確率的プロファイル

Stochastic aging profiling [SAP] の特徴:

1. これに対してSAPでは、加齢に関与するより多くの遺伝子発現が認められ、その周辺遺伝子には、老化関連の遺伝子の発現を繋ぐpathwayがより明瞭に浮上した。
2. この内、老化個体毎にユニークなSAP1カテゴリーでは、AhR、Ets、VEGF、などの孤発性の発現が認められ、これらを繋ぐpathwayには、造血系、免疫系の関連遺伝子の発現が認められる他、造血器腫瘍関連遺伝子の発現も散見された。
3. 他方、若齢Common遺伝子に対する老化個体での変動遺伝子の和集合SAP2カテゴリーでは、免疫機能(含 自己認識系)、造血機能、細胞周期関連に特有な遺伝子群の直接的な発現が目立つ。

まとめ

加齢に伴う遺伝子発現の共通的プロファイルと確率的プロファイル

Common aging profiling [CAP] と
Stochastic aging profiling [SAP]とに分けて
考えられる。

- 加齢に伴う遺伝子発現の変化は、
stochastic changeであり、
CAPと、SAPという発現遺伝子群の異なる、
異なった概念から成立していた。

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

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

研究分担者 漆谷 徹郎

同志社女子大学・薬学部・病態生理学教室・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明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判明し、網羅的遺伝子解析によりこの系等差を説明する因子としてインターロイキンの関与が示唆された。また、DSS腸炎モデルを用い、ASK1経路が腸炎発現時の免疫応答を強める方向に関与していることが示唆された。

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、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おいて、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 α 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じてこれを 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 β 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。

これまで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、ウェ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. B57BL/6 (WT)と ASK1 欠損マウス(KO)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。またマウス 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 の量をウェ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。

3. B57BL/6 と BALBC マウスを用いて、Trinitrobenzenesulfonate (TNBS) により誘起される腸炎の検討を行ったところ、後者に比べて前者の感受性が非常に低いことが見出された。その機序を追求する過程で、病変初期の炎症細胞浸潤にはあまり差がないものの、その後の炎症の進展に大きな系統差があることが見出された。

4. 腸炎発現機序の分子毒性的な解明には *in vitro* の系が必須である。大腸粘膜の一次培養系はまだ確立されたものはないので、まず大腸粘膜細胞単離法を検討した。

以上の成果のもとに、今年度は網羅的遺伝子発現解析により、上記1~3の点をより詳細に検討した。

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 は 3%あるいは15%水溶液を1回直腸内投与し、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 で直腸内に注入し、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 腸障害における ASK-1 の関与

前年度までの検討において、DSS 腸炎の重篤度というフェノタイプに関しては、WT と KO の間に明瞭な差を認めていない。しかしながら、DSS 腸炎の標準プロトコールは、数%の DSS を飲水中に混和して数日後に剖検するというものであり、病変の発生、進展など複雑な因子が多数関与していることが容易に想像される。ASK-1 の病態生理学的役割からいって、病態の進展というより、細胞障害発生初期相に関与していることが考えられた。そこで、DSS と腸粘膜が接触した直後の変化を捉えようと試みた。

DSS 腸炎の急性モデルは知られていないため、まず、高濃度 DSS の一回経口投与方法を検討した。しかしながら、経口投与後、DSS が直腸粘膜に接触する時間が不定であり、かつ濃度も一定しないことから、この方法はとらないこととした。

次に、次項で行った TNBS 法に準じ、DSS を直接直腸内に投与方法を検討した。

3 または 15% の濃度の DSS 溶液をマウスの直腸内に 1 回投与し、6 及び 24 時間後に便中の潜血量、炎症細胞浸潤、および粘膜表面の走査電顕観察を行った。その結果、この投与方法では、いずれの評価項目においても、溶媒投与との差が認められなかった。すなわち、この方法では、腸粘膜に器質的な変化をもたらさないことが判明した。これは、細胞障害の結果としての遺伝子発現を見る危険性を排除できるため、病変初期の観察から病因を追及するのに好都合と考え、この条件下で GeneChip による網羅的遺伝子発現解析を行った。

その結果、DSS 刺激のない basal な状態で WT と KO の間に発現に差のある遺伝子群、および DSS に対する応答性において WT と KO の間に差のある遺伝子群が見出された。GO 解析では、DSS 投与後 6 時間の時点で免疫応答に関連する遺伝子が変動しており(表 1, 2)、24 時間後では、これに増殖や血管新生にかかわる遺伝子が加わっていた。

表 1. DSS 投与 6 時間後に 1.5 倍以上変動したブローセットの Gene ontology (WT)

Category	Term	Count	%	Pvalue
GOTERM_BP_8	GO:0002026-acute inflammatory response	13	1.60%	2.67E-06
GOTERM_BP_8	GO:0008897-organ morphogenesis	33	4.41%	6.28E-06
GOTERM_CC_8	GO:0008897-lateral side of plasma membrane	18	2.01%	1.41E-04
GOTERM_BP_8	GO:0002447-lymphocyte mediated immunity	12	1.60%	1.62E-04
GOTERM_BP_8	GO:0007173-regulation of immune response	13	1.74%	2.89E-04
GOTERM_BP_8	GO:0007173-positive regulation of immune response	12	1.60%	3.21E-04
GOTERM_BP_8	GO:0002684-positive regulation of immune system process	12	1.60%	3.76E-04
GOTERM_BP_8	GO:0018724-cell mediated immunity	10	1.34%	4.03E-04
GOTERM_MF_8	GO:0003811-unspecific monocytogenesis activity	7	0.94%	6.26E-04
GOTERM_CC_8	GO:0007193-microsome	14	1.87%	6.62E-04
GOTERM_CC_8	GO:0023988-vascular fraction	14	1.87%	1.27E-03
GOTERM_BP_8	GO:0008211-cell death	37	4.88%	1.36E-03
GOTERM_BP_8	GO:0008938-complement activation, classical pathway	6	0.80%	1.40E-03
GOTERM_MF_8	GO:0005606-ion ion binding	21	2.81%	2.39E-03
GOTERM_BP_8	GO:0042231-interleukin-13 biosynthetic process	3	0.40%	2.02E-03
GOTERM_BP_8	GO:0008044-cellular morphogenesis during differentiation	16	2.01%	2.89E-03
GOTERM_BP_8	GO:0002283-activation of immune response	6	1.20%	3.17E-03
GOTERM_BP_8	GO:0008902-cell morphogenesis	28	3.74%	3.82E-03
GOTERM_BP_8	GO:0007677-regulation of neurogenesis	7	0.94%	4.38E-03
GOTERM_BP_8	GO:0042891-regulation of apoptosis	26	3.34%	4.73E-03

表 2. DSS 投与 6 時間後に 1.5 倍以上変動したブローセットの Gene ontology (ASK1 KO)

Category	Term	Count	%	Pvalue
GOTERM_CC_8	GO:0032017-astrocyte	17	1.68%	1.19E-08
GOTERM_CC_8	GO:0044488-contraction fiber part	17	1.68%	2.28E-08
GOTERM_CC_8	GO:0032016-myofibril	17	1.68%	6.26E-08
GOTERM_CC_8	GO:0031674-I band	13	1.20%	7.90E-08
GOTERM_CC_8	GO:0043182-contraction fiber	17	1.68%	1.19E-07
GOTERM_CC_8	GO:0032018-Z disc	11	1.10%	1.68E-07
GOTERM_BP_8	GO:0007817-muscle development	38	2.48%	6.91E-07
GOTERM_CC_8	GO:0015828-actin cytoskeleton	27	2.68%	1.04E-06
GOTERM_BP_8	GO:0002026-acute inflammatory response	19	1.49%	6.36E-06
GOTERM_BP_8	GO:0008887-organ morphogenesis	48	4.48%	6.02E-06
GOTERM_MF_8	GO:0023269-adenyl ribonucleotide binding	87	8.67%	6.78E-06
GOTERM_CC_8	GO:0005737-cytoplasm	274	27.49%	7.39E-06
GOTERM_BP_8	GO:0008863-acute phase response	6	0.60%	8.11E-06
GOTERM_CC_8	GO:0043228-intracellular organelle	381	34.89%	8.77E-06
GOTERM_BP_8	GO:0008939-smooth muscle contraction	6	0.60%	2.08E-04
GOTERM_CC_8	GO:0048188-anchored to plasma membrane	6	0.60%	2.33E-04
GOTERM_CC_8	GO:0031128-anchored to membrane	6	0.60%	2.33E-04
GOTERM_CC_8	GO:0044444-cytoskeletal part	173	17.23%	4.32E-04
GOTERM_CC_8	GO:0005054-cytoskeleton	61	6.08%	6.14E-04
GOTERM_BP_8	GO:0014704-skeletal muscle development	18	1.69%	6.30E-04

2. TNBS 誘起腸炎の系統差の解析

前年度の研究において、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。同じ種でありながらこれだけ大きな系統差があるということは、ごく一部の遺伝子の差に起因していることが考えら

れ、ノックアウトマウスを用いたものと類似の戦略をとることができる。

今年度はまず、TNBS 接触後の病変の進展を観察した。24時間の時点では炎症細胞浸潤(粘膜内 MPO 活性の上昇)は両系統とも同程度生じているが、C57BL/6 マウスの場合はそれ以降、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が、BALB/cマウスの場合は、粘膜障害が進展していく。TNBS 接触直後から24時間以内の変化を観察したところ、炎症細胞浸潤は4時間から明瞭になり、8時間でピークとなった。そこで、TNBS 接触直後の変化を捉えるため、投与前、及び投与2時間後の直腸粘膜の遺伝子発現を測定した。

まず、対照群における遺伝子発現を両系統で比較すると、TNBSに対する感受性の高いBALB/cマウスにおいて、各種免疫関連遺伝子の発現が高く、これが腸炎の重篤度と関連していると考えられた(表3)。また、両系統とも、TNBS 投与により炎症性サイトカインやケモカインなどの免疫関連遺伝子や血管新生に関与する遺伝子の発現変動が見られた(表4)。中でも、IL6が本病変の発生、及び系統差に最も重要な因子であることが示唆された。

表3. BALB/c > C57BL/6 のプローブセットの Gene Ontology

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_CC_3	GO:0942311-55S protein complex	8	1.86%	0.98E-04
GOTERM_CC_3	GO:0009997-external side of plasma membrane	10	2.45%	0.33E-04
GOTERM_BP_3	GO:0030191-natural killer cell activation	4	0.88%	1.58E-03
GOTERM_BP_2	GO:0008116-apoptosis	23	5.64%	1.69E-03
GOTERM_BP_4	GO:0002221-haemopoiesis differentiation	9	2.21%	0.31E-03
GOTERM_BP_3	GO:0005220-amino acid metabolic process	12	2.84%	0.37E-03
GOTERM_BP_3	GO:0002121-cell death	23	5.64%	0.69E-03
GOTERM_BP_3	GO:0008009-chemokine activity	9	1.23%	0.69E-03
GOTERM_BP_3	GO:0048534-hemopoietic or lymphoid organ development	12	2.84%	0.61E-03
GOTERM_BP_3	GO:0042379-chemokine receptor binding	8	1.23%	0.69E-03
GOTERM_BP_2	GO:0030097-hemopoiesis	11	2.70%	0.16E-02
GOTERM_BP_2	GO:0032088-lymphocyte differentiation	7	1.72%	0.44E-02
GOTERM_BP_2	GO:0009644-phospholipid metabolic process	8	1.86%	0.27E-02
GOTERM_BP_2	GO:0009643-membrane lipid metabolic process	9	2.21%	0.54E-02
GOTERM_BP_2	GO:0043096-negative regulation of apoptosis	9	2.21%	1.23E-02
GOTERM_BP_1	GO:0043098-negative regulation of programmed cell death	9	2.21%	1.34E-02
GOTERM_BP_1	GO:0032126-lipid modification	4	0.88%	1.49E-02
GOTERM_CC_1	GO:0042132-55S class I protein complex	2	1.23%	1.69E-02
GOTERM_BP_3	GO:0046631-alpha-beta_T cell activation	4	0.88%	1.76E-02
GOTERM_CC_3	GO:0007737-cytoplasm	108	26.74%	1.88E-02

表4. 両系統とも TNBS で 2 倍以上発現変動したプローブセットの Gene Ontology

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_BP_3	GO:0009997-organ morphogenesis	49	6.28%	2.26E-09
GOTERM_BP_3	GO:0001829-angiogenesis	20	2.52%	4.03E-09
GOTERM_BP_3	GO:0011609-blood vessel development	24	3.79%	1.89E-09
GOTERM_BP_3	GO:0011844-vascular development	24	3.79%	4.87E-09
GOTERM_BP_3	GO:0048144-blood vessel morphogenesis	22	3.44%	9.91E-09
GOTERM_BP_3	GO:0008201-heparin binding	19	1.98%	4.23E-07
GOTERM_BP_3	GO:0009028-chemokine activity	19	1.98%	4.66E-07
GOTERM_BP_3	GO:0042379-chemokine receptor binding	19	1.98%	5.87E-07
GOTERM_BP_3	GO:0009928-chemotaxis	19	2.34%	2.89E-06
GOTERM_BP_3	GO:0033334-regulation of cell migration	19	1.98%	3.82E-06
GOTERM_CC_3	GO:0007737-cytoplasm	184	28.79%	1.31E-04
GOTERM_BP_3	GO:0019819-organic anion transport	18	2.34%	1.68E-04
GOTERM_CC_3	GO:0019829-anion transport	17	2.69%	2.71E-04
GOTERM_BP_3	GO:0071767-enzyme linked receptor protein signaling pathway	21	3.28%	2.46E-04
GOTERM_BP_3	GO:0009820-anion transport	18	2.69%	2.82E-04
GOTERM_BP_3	GO:0009820-tissue development	21	3.28%	2.83E-04
GOTERM_BP_3	GO:0007807-heart development	18	2.34%	4.38E-04
GOTERM_BP_3	GO:0048128-tissue morphogenesis	19	1.98%	4.72E-04
GOTERM_BP_3	GO:0009913-epidermal cell differentiation	7	1.09%	4.66E-04
GOTERM_BP_3	GO:0009824-epidermis development	11	1.72%	7.16E-04

3. *In vitro* 腸炎モデルの作成の試み

In vivo の腸炎モデルは、作成に時間がかり、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、傷害発生前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。

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。前年度、マウス結腸粘膜より crypt cell を単離する方法を確立したので、今年度はその一次培養系の構築を試みた。

単離した crypt cell を、希釈したマトリゲルでコートしたウェルにまくことにより、結腸粘膜細胞を1週間程度培養することができた。この細胞に対してDSSを投与することにより細胞死の検討が可能であった。ただし、無菌培養の確率が低いため、更なる改良が必要であった。

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。その発生前のメカニズムの解明は以前

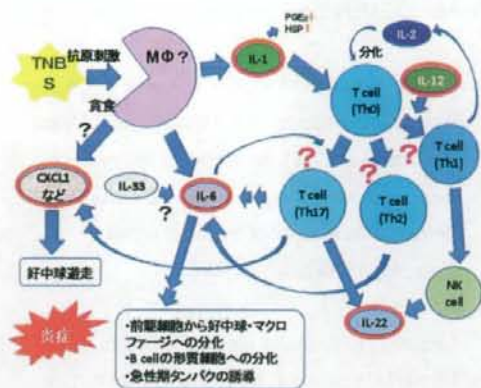
より望まれていたところであるが、なかなか有効な手段に乏しかった。本研究で注目している ASK1 を含むストレス応答系は、酸化ストレスシグナルや ER ストレスシグナルだけでなく、自然免疫の系にも重要な役割を果たしていることが見だされてきており、これに網羅的遺伝子発現解析を適用することは、最も有効な戦略であると考えられる。

しかしこれまでの研究では DSS 誘起腸炎のフェノタイプにおいて野生型と ASK1 欠損動物の間に明確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 の系が関与しては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。

今回、野生型と ASK1 欠損動物の間で、正常状態、DSS 障害初期期において、発現に差のある遺伝子群が見出され、その多くが免疫応答に関連していた。これは、DSS 腸炎発症初期に免疫応答が重要な役割を果たしていること、更にそこには、少なくとも遺伝子発現調節に関して、ASK1 が何らかの関与をしていることを示している。このことは、DSS 腸炎の病態生理・病因論に有用な手がかりを与えるものである。

しかしながら現在、解決すべき課題として、この初期相の違いが、なぜ明確なフェノタイプの差として現れないのかという点がある。そのためには、病変発現初期のより詳細な分子毒生学的解析が必要であり、これに今回開発した *in vitro* の系が有用であると思われる。

前年度見出した TNBS 腸炎の系統差に関しては、トキシコゲノミクス手法の威力が十分に立証される結果となった。文献を精査すると、BALB/c マウスに比べ C57BL/6 マウスの TNBS 感受性が低いことは見だされていたが、単にその現象が福次的に報告されているだけで、原因については全く予測すらできていなかった。従来のテクノロジーであれば、手探りの実験を繰り返すしかなく、ゴールは遠いものであったろうが、今回、網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、一気に病因論までの考察が可能となった。今回の遺伝子解析結果から予想される毒生学的メカニズムを次に示した。



E. 結論

本分担課題では ASK1 欠損マウスやフェノタイプに系統差のあるマウスを用いて大腸粘膜の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、消化管粘膜毒性の発現機序を明らかにすることを目的とした。

そのために TNBS 腸炎モデル、DSS 腸炎モデルについて、特に病変発現初期変化に注目して検討し、TNBS モデルでは系統差が免疫系の遺伝子発現、特にインターロイキン関連の差で説明できた。また ASK1 欠損と野生型の間でも免疫系に関連する一部遺伝子の発現が異なることがわかった。これらのことは、炎症性腸疾患の複雑な病態生理の解明に大きな貢献をするものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

T. 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

Hirode, M., Horinouchi, A., Uehara, T., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T., Ohno, Y., and Urushidani, T., Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing elevation of

bilirubin. *Hum Exp Toxicol*. In press.

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(1):15-26. 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(1):23-35. 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(3):290-9. 2008

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 8
0 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、2
006 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

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—

第3回班会議

分担課題

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

(代理 水川 裕美子)

背景

目的: 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

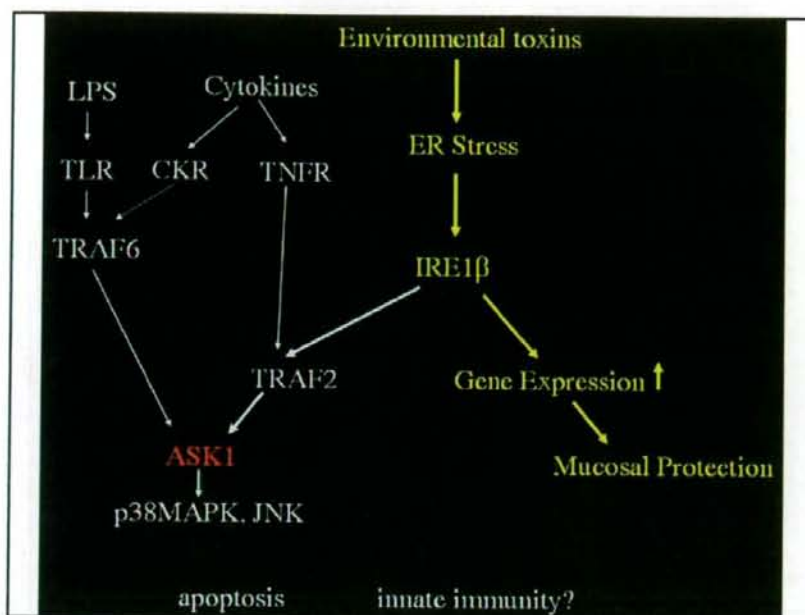
Apoptosis signal-related kinase 1 (ASK1): ストレスシグナルを受けて生存側, アポトーシス側に振り分ける鍵となるキナーゼ

消化管粘膜に着目: これまであまり毒性学的解析が行われていなかった

* 炎症性腸疾患と遺伝子発現

マイクロアレイ開発初期に解析が行われる

TNF α に代表される炎症性サイトカインの関与連鎖解析によりCDの原因としてCard15/Nod2が同定
IRE1 β KOマウスでDSS誘起炎症性腸疾患が悪化



これまでの経過

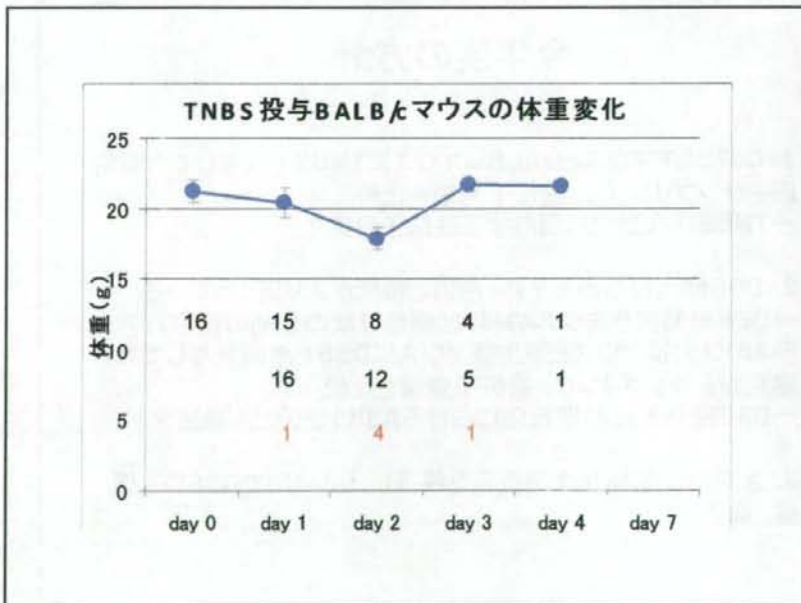
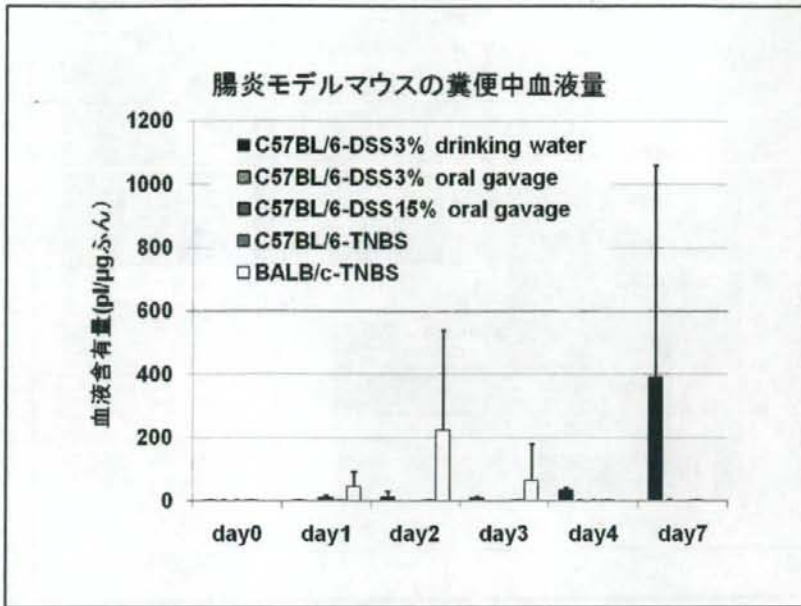
Dextran sodium sulfate (DSS)腸炎モデル

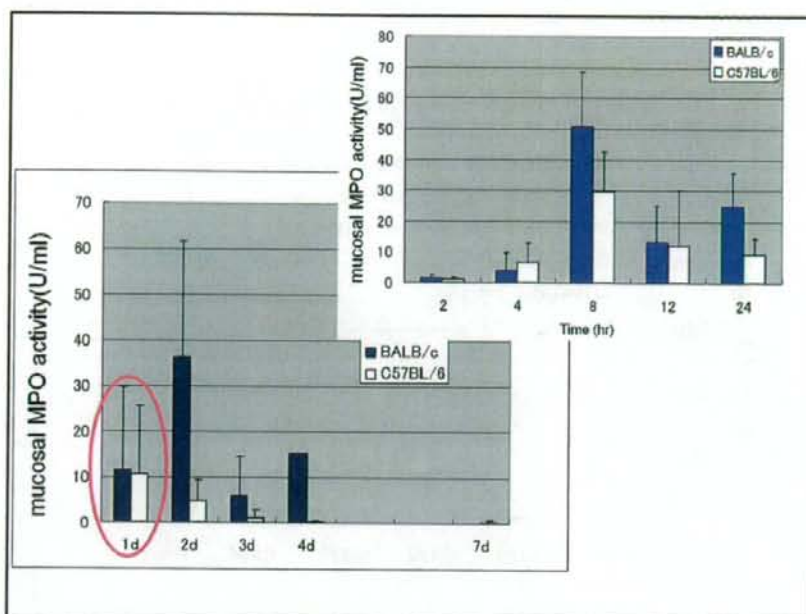
ASK1欠損マウスのバックグラウンド近縁系統: C57BL/6 ♂
 3% DSS飲水投与で投与2日後から便潜血反応検出
 ASK1欠損でも障害には差みられず。
 障害の程度 C57BL/6 ≥ BALB/c

Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)腸炎モデル

2.5% TNBS in 50% ethanolを直腸内単回投与
 C57BL/6では障害があまり起こらないが、BALB/cでは重篤。
 Myeloperoxidase (MPO)活性上昇。

MPO活性	~1 day	C57BL/6 ≤ BALB/c
	2day~	C57BL/6 << BALB/c





今年度の方針

1. C57BL/6マウスとBALB/cマウスにTNBSを投与して大腸粘膜をサンプリングし、遺伝子発現を比較
→TNBS腸炎形成に関与する遺伝子同定？
2. DSS飲水投与のモデル：原因と結果が入り混じっている
→DSS単回投与モデルの模索（病態形成の最初の段階）
→ASK1欠損マウスと野生型マウスにDSSを単回投与して大腸粘膜をサンプリング、遺伝子発現を比較
→DSS腸炎形成初期反応におけるASK1シグナル経路？
3. 大腸粘膜細胞初代培養系を構築し、in vitroでDSS等を曝露、解析