

200839001B

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 18 年度～20 年度
総合研究報告書

研究代表者 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 18 年度～20 年度
総合研究報告書

研究代表者 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 18 年度～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 21(2009)年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

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—
菅野 純 1

(資料 1) 総括資料

(資料 2) 委託研究報告書(STEP5~7)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表339

III. 研究成果の刊行物・別刷345

別添 3

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総合研究報告書

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、反復暴露データベース(新型慢性暴露^(*))、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、個別テーマに則った基盤研究、及び、有意な情報を抽出するインフォマティクス開発研究を配し、すでに構築済みの単回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。

本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。DB生成研究に於いては、新型慢性暴露実験^(*)について、14日間反復投与する化合物5種類、それに15日目に組み合わせる単回チャレンジ化合物3種類、等による20実験のデータを蓄積した(総計5,554万データ)。解析結果、この新しい試験法の有用性を確認する慢性影響情報が得られた。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、4化合物について取得した。その結果、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ている。HS-ISHは染色工程の自動化を終了(賦活化過程のみ手動)した。また、平行して10コピー/細胞程度の感度で定量的に捉える蛍光オリゴプローブによる定量的解析システムを導入した。

基盤研究では、発生毒性に於いて、催奇形性物質の経胎盤暴露マウス胚に於ける網羅的遺伝子発現変動解析により、各物質の新規標的分子候補を同定するなどの成果が得られた。造血毒性では、免疫学的耐性や自己認識に関わる遺伝子群が、消化管毒性では、障害発生時の毒性シグナルが、

胸腺毒性では、アポトーシス関連遺伝子を始めとする多くの遺伝子が、骨毒性では、中枢神経系に作用する薬物の骨代謝への影響が、遺伝子傷害毒性では、50 遺伝子を用いるスクリーニング系を検討した。

インフォマティクス開発研究では、教師無しクラスタリング法の最適化を行い、全発現パターンを網羅するクラスタリング性能を向上させた。また生物学的に有意であると判断される発現パターンを抽出するアルゴリズム Rsort を独自開発した。これらの併用により、一度に測定される約 45,000 遺伝子の中から見落とし無く、既知情報に頼ること無く、生物学的な意味のあると思われる遺伝子の挙動を迅速に把握することが可能となった。

[*]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概念。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。]

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し、迅速、定量的且つ高精度な評価システムを構築することを目的とする。3 年間の先行研究の成果として構築済みの 90 化合物に対する単回(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】

(1) 新型慢性暴露トキシコゲノミクスデータベース構築

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、マウス肝に対して申請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した。化学物質は原則的に経口投与(餌、飲水、或いは胃内)とし、14日間反復暴露後、15日目に単回投与(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た(群ごとのプールの行わない)。

(2) 多種臓器トキシコゲノミクスデータベース構築

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した。

(3) ハイスループット *in situ* hybridization システム

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

スループット性を持って実施)システムについては、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。

【②基盤研究】

各専門分野から6人の研究分担者を配した。

(1) 発生毒性(北嶋)

C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた(プラグが確認された日の15時を胎生0.5日とした)。基本的には本プロジェクトの研究方法に則したかたちで、経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した)を1腹分ブールしたRNAサンプルを用い、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて、網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。マウス胚は、直接、1%の2-メルカプトエタノール含有RLTバッファー(QIAGEN社)に変性・溶解させた。

ES細胞はTT2を使用し、GeneChip MOE430v2(Affymetrix社)(約45,000プローブセット)を用いて遺伝子発現変動解析を検討した。ES細胞の分化は、LIF非存在下で2日間天井培養し(day2)、その後得られたEBを浮遊培養することにより行った。EB形成に向けた、1滴20μlあたりのES細胞数は800個とし1プレートあたり40滴とした。EBに対する遺伝子発現変動解析は、サリドマイド(0、10μM)存在下で培養・分化させたEB(day1~day7)を一日毎にサンプリングし

た RNA を用いて検討した。天井培養開始が 14 時であるため、EB のサンプリングを 14 時とした。EB は、180 個～60 個(分化日数によって異なる)をプールして 1 サンプルとし、直接、1% の 2-メルカプトエタノール含有 RLT バッファー(QIAGEN 社)に変性・溶解させた。

サイクロパミン(LC laboratories 社)は、ユリ科バイケイソウ属植物由来のアルカロイドで、妊娠羊から産まれた仔羊が単眼症を示すことが報告され(Keeler と Binns, 1968)、最近では、Shh シグナリング関連分子の Smo 分子を阻害することが報告された化学物質である(Cooper ら, 1998; Incardona ら, 1998)。留意点として、母動物への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、ハムスターで明らかに認められるが、ラット、マウスでは低感受性と報告されている(Keeler, 1975)ことが挙げられる。

サイクロパミン投与実験に関しては、投与経路は経口投与、投与容量は 10 (ml/kgBW)、溶媒はコーンオイル(シグマ社製)とし、懸濁にメノウ鉢を使用し、用事調整にて作製した。投与時期、用量設定の根拠に関しては、本研究で得た野生型マウス胚全胚の遺伝子発現データベースにおける Shh シグナル関連遺伝子の経時変化ならびに、予備投与実験の結果(70mg/kgBW 投与で妊娠マウス 10 匹中 2 匹死亡)を考慮し、本実験での用量を 30 mg/kgBW とした。したがって、本実験の群構成を 0 および 30 mg/kg 投与群とし、胚 RNA のサンプリングは投与後 2, 8, 24 時間後に行った。

サリドマイド(BIOMOL)の投与経路は経口投与、投与容量は 10 (ml/kgBW)、溶媒は 0.5%メチルセルロース(信越化学)とし、懸濁にはメノウ鉢を使用し用事調整にて作製した。投与時期に関しては、昨年度のサイクロパミン投与実験での検討を考慮し、同じく妊娠 7.25 日とした。用量設定に際しては、用量設定実験として強制経口投与の最大耐量と考えられる 1,000 mg/kgBW を含む用量で検討した結果、いずれの用量でも毒性学的変化が認められなかったことから、本実験での用量を 1,000mg/kgBW とした。したがって、本実験の群構成を 0 および 1000 mg/kg 投与群とし、胚 RNA のサンプリングは投与後 2, 8, 24 時間後に行った。

EB 実験用には、サリドマイド(BIOMOL)は、10 mM のストック DMSO 溶液を作製し、EB に対し 10 μ M となるように 1,000 倍希釈により適用した。対照群には 0.1%となるように DMSO を添加した。濃度設定に関しては、文献を参考に胚線維芽細胞に対し細胞毒性を示さない最大濃度として 10 μ M を選定した(Miyata et al, Drug Metab Dispos 31: 469-475, 2003)。なお、ヒトに 3 mg/kg のサリドマイドを経口投与した際の血液中の最大濃度は約 5 μ M と報告されている(Chung et al, Clin Cancer Res, 10: 5949-5956, 2004)。

whole mount ISH は、ジゴキシゲニンでラベルした dNTP を用いて作製した RNA プローブを用いて、固定後プロテナーゼ K 処理したマウス胚とハイブリダイゼーションを行い、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色は BM purple で行った。

(2)造血毒性(井上)

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、チオレドキシシン遺伝子改変動物での反応などを与条件とし、種々の階層レベルの生理的分子平衡に焦点を当てつつ、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した。尚、最終年度は、加齢影響について、2ヶ月齢(2M)並びに21ヶ月齢(21M)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。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も検討した。

(3)消化管毒性(漆谷)

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.2:541-546 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。尚、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。

(4)胸腺毒性(北川)

細菌やウイルスなどの感染に対する感受性を左右する薬剤の宿主免疫系細胞に及ぼす影響を明らかにするため、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ピシンによる変化を解析する。実験にはC57BL/6マウスおよびC3Hマウスを用い、薬剤投与後の胸腺毒性を中心にT細胞のシグナル伝達系の機能に関わる遺伝子発現をPercellome解析した。

<マウス、細菌、薬剤>

- C57BL/6マウス、C3Hマウス: 6週齢を搬入し、8週齢で実験を行った。
- リステリア菌: 感染後7日程度で約半数死亡するdoseのListeria monocytogenesをorganismとして 7×10^6 腹腔内に接種した。
- 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/mouseを腹腔内投与(胸腺は2日後くらいでかなり縮小するが、その後正常に復した)した。
- フレンド白血病ウイルス: 腹腔内接種し

た。

- ・ ドキソルピシン処理:1.5 or 15 mg/mouse を腹腔内投与した。

<実験プロトコール>

- ・ 経過観察群:薬剤投与 → 1日あるいは3日後 →リステリア菌感染 →経過観察
- ・ sacrifice 群:薬剤投与 → 1hr, 6hr, あるいは24hr後にマウスをsacrificeし、胸腺および脾臓を採取
- ・ Percellome 解析手順のつとって、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した。

(5)骨毒性(池田)

1. 薬物の予スクリーニング実験

生後8週齢メスWistar系ラットに、alprazolam[ベンゾジアゼピン系](120ug/kg)、etizolam[チエノジアゼピン系](240ug/kg)、sulpiride[ベンズアミド系](40mg/kg)、sodium valproate[バルプロ酸ナトリウム系](80mg/kg)の各薬物を蒸留水に溶解または懸濁した物を、連日経口投与し、また、蒸留水のみを経口投与したものを対照として用いた。投与量は一般的な人体への投与量を各動物の体重に換算したものを基準とし、人体における1日投与量の極量における実験を行った。

上記薬物の連日経口投与開始1週間後にケタラール5・セラクタール1混合液を60mg/kg腹腔内注射してラット及びマウスを

麻酔した上、歯科用電気エンジンを使用してラット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り骨固定を施した後、術創を縫合した。手術後も各薬物を連日経口投与した。術後1週ごと5週後まで動物の骨折部位のX線写真を撮影した後、動物を安楽死処置し、手術部位の骨組織を採取した。尚、安楽死処置の4日前および前日にcalcein(8mg/ml)を1ml/kg量腹腔内に投与し、骨の標識を行った。採取した骨組織は固定後に樹脂包埋し、マイクロCTによる断層撮影を行った後、非脱灰骨組織標本を作製した。

2. 対象薬物2種の投与実験

上記のスクリーニング結果を参考にし、仮骨形成に促進的な作用があると疑われた2種類の薬物を用いて実験を行った。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0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁したものを所定濃度になるように蒸留水に希釈し(メチルセルロースの最終濃度はいずれも0.005%になるよう統一)、生後8週齢メスWistar系ラット(1群8匹)に、ゾンデにより連日経口投与した。投与量は一般的な人体への投与量を各動物の体重に換算したものを基準とし、その他に4倍量(人体における1日投与量の極量)を投与量として設定した。また対照として、薬物を除いて同様に調製したものを連続経口投与した。

連日経口投与開始1週間後にケタラール

5・セラクタル 1 混合液を 60mg/kg 腹腔内注射してラット及びマウスを麻酔した上、歯科用電気エンジンを使用してラット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。術後 1 週ごと 4 週後まで動物の骨折部位の X 線写真を撮影した後、動物を安楽死処置し、手術部位の骨組織を採取した。尚、安楽死処置の 4 日前および前日に calcein (8mg/ml) を 1ml/kg 量腹腔内に投与し、骨の標識を行った。採取した骨組織は固定後に樹脂包埋し、非脱灰骨組織標本を作製した。

3. 定量的 PCR による遺伝子発現の検討
生後 5 週齢メス C57BL/6 系マウスを用いて上記のラットと同様の実験を行い、大腿骨を切除して凍結、ハンドミルにて破碎後 Trizol®液を用いて RNA を抽出した。

さらに、alprazolam の骨組織細胞への直接作用を確認するために、骨芽細胞前駆細胞を含んでいる骨髓間葉系細胞を 5 週齢マウス大腿骨及び脛骨から採取し、10% FCS を含む alpha-MEM 培養液で培養、増殖させ、少量のエタノールで溶解した alprazolam を alpha-MEM 培養液で希釈した後、 1×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M の各濃度になるように細胞に添加し、24 時間後に細胞を採取、RNA を抽出後、骨芽細胞の分化マーカーである osteocalcin, Runx2, alkaline phosphatase (ALP) の各遺伝子発現の変化を定量的 PCR 法で解析した。対照として

alprazolam を含まない上記の希釈溶液を同量同様に添加した。

定量的 PCR は、Mx3005P QPCR System (Stratagene) と蛍光標識プライマー Runx2: Mm00501580_m1, Alkaline phosphatase (ALP): Mm00475834_m1, Osteocalcin: Mm03413826_mH, Gapdh: Mm99999915_g1 (Applied Biosystems, CA) を用いて行った。

4. GeneChip 解析

仮骨形成促進的な作用があった alprazolam [ベンゾジアゼピン系] (30 ug, 120 ug/kg) 及び sodium valproate [バルプロ酸ナトリウム系] (20mg, 80mg/kg) の各薬物を 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁したものを所定濃度になるように蒸留水に希釈し (メチルセルロースの最終濃度はいずれも 0.005% になるよう統一)、生後 8 週齢メス Wistar 系ラット (1 群 8 匹) に、ゾンデにより連日経口投与する実験を行った。投与量は一般的な人体への投与量を各動物の体重に換算したものを基準とし、その他に 4 倍量 (人体における 1 日投与量の極量) を投与量として設定した。また対照として、薬物を除いて同様に調製したものを連続経口投与した。その結果、alprazolam 投与ラットの骨折治癒部において対照と比較して軟骨組織の形成を伴う過剰な仮骨形成を約 25% の出現頻度で認めた。また、組織解析により外骨膜側の隆起の他、内骨膜側 (骨髓側) での軟骨の形成促進を認めた。

これらの結果を受け、生後 5 週齢の C57BL/6 マウスに alprazolam 120 μ g/kg と

なるように連日ゾンデにて経胃管投与を行った。

投与7日目に左大腿骨骨幹部に歯科用ラウンドバーにて直径1.2mmの骨孔を開けた後、創部を縫合、閉鎖した。術翌日より7日間引き続きalprazolamを連日投与し、大腿骨の骨孔治癒部位の検体を採取した。検体採取に際し、周囲の軟組織と骨髄組織は可及的に除去した。採取した検体は大部分骨組織からなるため、液体窒素で凍結した状態でハンドミルにより粉碎し、粉碎材料をRNA later液に浸漬し、GeneChip解析に供した。

(6) 遺伝子傷害毒性(本問)

1. TaqMan® Low Density Array (TLDA)の作製

これまで、日本環境変異原学会MMS研究会の共同研究として、GeneChip等の解析により、遺伝子傷害性に特異的に反応する遺伝子群を選択した。これらの遺伝子45種類の発現を、定量的RT-PCR法にて解析するための48x8フォーマットのTLDAを設計し、アプライドバイオシステムズ社に作製を依頼した。

遺伝子セットの妥当性を検討した結果、反応性の悪い遺伝子が7種あったので、共同研究者である青山学院大学におけるオリジナルマイクロアレイの検討において有効性の高かった遺伝子に変更した。

内在性コントロールとしては、TLDAにあらかじめ組み込まれて提供される18sリボソームタンパクに加えて、GeneChip解析の結果、

発現変化がもっとも少なかった遺伝子として、Psm3 (proteasome (prosome macropain) subunit, type3)、青学グループにおけるRT-PCR解析のコントロール遺伝子として使用されているglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)、GeneChipデータより選択したmitochondrial ribosomal protein S24 (Mrps24)を用いた。

2. TLDAカードのバリデーション試験のための化合物群の投与

スクリーニング系としてのTLDAカードに選んだ遺伝子の有効性を評価するための新たな化合物として以下の2種のセットを選んだ。遺伝子傷害性物質としては、いずれもトランスジェニックマウスを用いた変異原性試験データがあり、投与量の設定が可能なものを選んだ。

(化合物セット-1)

遺伝子傷害性物質として、肝発癌性をもつ4,6-diaminotoluene (DT), 4-(dimethylamino)azobenzene (DMAA), N-nitrosomorpholine (NNM), quinoline (Qn)の4化合物を、非遺伝子傷害性物質として、肝発癌性を有するclofibrate (Cl), 1,4-dichlorobenzene (DCB)と肝毒性物質である1-naphthyl isothiocyanate (NIC)および非肝毒性物質であるglycine (Gl)の4化合物を用いた。

(化合物セット-2)

遺伝子傷害性肝発癌物質として、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-but anone (NNK), urethane,

2-acetylaminofluorene (2AAF), diisopropylnitrosamine (IPNA)の4化合物を選択し、対照となる非遺伝子傷害性物質として、非遺伝子傷害性肝発癌物質として知られる di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), dichloro-diphenyl- trichloroethane (DDT), furan の3化合物と、非発癌性の肝毒性物質として Phenacetin を選んだ。

投与量の設定に関しては、遺伝子傷害性物質については、トランスジェニックマウス変異原性試験のデータより、単回投与にて肝臓の変異頻度を上昇させる用量を、非遺伝子傷害性物質については、それぞれ LD50 の 1/4-1/2 量で単回投与した。

薬物投与 4 時間後および 48 時間後に肝臓を回収した。そして、抽出した total RNA より cDNA を調整し、作製した TLDA を用いて、TaqMan RT-PCR 法による遺伝子発現の解析を行った。同時に、青山学院大学を始めとする共同研究参加機関においては、独自に設計したリアルタイム PCR 用のプライマーセットを配布し、SYBR Green によるリアルタイム RT-PCR(2step)法により、指標遺伝子の発現変化を解析した。

【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)

我々は遺伝子発現データの絶対量化技術である Percellome 手法を考案し、これに最適化した”Millefeuille”(ミルフィーユ)データ処理システムを開発している。

開発・改良したアルゴリズムは、研究者本人がソフトウェアを作成し、実際に本研究計

画で得られた生データをサンプルに用いて、ワークステーション上で性能検証を行う。これは本研究におけるプログラム開発はアルゴリズムの改良・微調整を兼ねた try and error 方式で行う必要があり、職業プログラマーに開発委託する際に必要となる仕様の事前決定が出来ないためである。開発言語には、研究的なプログラミングに適した、つまり生成したプログラムの実行速度が早いだけでなく、実行プログラムの生成(コンパイル速度)も速い Delphi 言語(=object pascal 言語、開発環境としては Borland Delphi7 もしくは Delphi2006, Delphi2007)を使用した。また一般的なグラフ描画には TeeChart コンポーネント(Steema 社)を利用し、100 万件以下の小規模なデータベース操作には組み込み型リレーショナルデータベースコンポーネントである DBISAM(ElevateSoftware 社)を利用して、プログラム開発の効率化を図った。

大規模計算が必要な場合は、専用計算サーバーシステム(MFサーバーシステム)にアプリケーションソフトウェアを移植して、大規模計算用グリッド PC や高速データベースエンジンである Teradata(Teradata 社)を活用して計算処理を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、それを遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬

品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成19年4月版)に則って行った;東京医科歯科大学は東京医科歯科大学動物実験委員会に申請して承認された実験計画に則って行った;長崎大学は長崎大学動物実験施設の規定に従って行った;同志社女子大学は同大学実験動物委員会の承認を得て行った。)

C. 研究結果

【①データベース生成研究】

新型慢性暴露実験について、14日間反復投与する化合物に5種類(クロフィブレート、四塩化炭素、トリブチルスズ、バルプロ酸、ディート)、15日目に単回投与するチャレンジ化合物をその各々につき3種類(クロフィブレートにはクロフィブレート、PCN及びATRA、四塩化炭素には四塩化炭素、クロフィブレート、及びフェノバルビタール、トリブチルスズには、トリブチルスズ、クロフィブレート、及び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)等を組み合わせた20実験のデータを蓄積した(総計5,554万データ)。クロフィブレートとトリブチルスズはいずれも核内受容体を標的とする。クロフィブレート14日間暴露は概してクロフィブレート15日目の効果を減弱する傾向にあった。これは、慢性暴露によりRXR活性が低下し、RXRを介する反応が減弱した可能性に対応すると考えられる。また、PCN単独では2時間目と8時間目に2度発現誘導がかかるパターンの応答を示す遺伝子Alas1が、クロフィブレート反復暴露の

後では2時間目の反応だけが消失するといった影響が捉えられた。四塩化炭素慢性暴露も同様に、チャレンジ化合物の影響を減弱する傾向にある結果が得られた。例えば、クロフィブレートで発現上昇するvanin1、Cyp4a10、Pparaやフェノバルビタールで発現上昇するCyp2b10、Gstm1、Gstm3等でその傾向が認められた。四塩化炭素では肝全体の機能抑制のために応答性低下が誘発されている可能性がある。

多種臓器については、単回投与後、2、4、8及び24時間後(n=3)について、四塩化炭素とカフェインは肝、肺、心、精巣、腎の5臓器を、サリドマイドとバルプロ酸は肝、肺、心、腎、脳(大脳領域、海馬、脳幹、小脳)のデータを各動物から取得した。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ており、例えば、サリドマイドによるTsc22d3遺伝子の発現は、肝、肺、腎、心において、2時間目に用量依存的な発現誘導が見られるが、脳では、4時間目をピークとする形に遅れることが分かった。四塩化炭素については、肝よりも肺で酸化ストレス反応に関わる遺伝子群の発現変化が明瞭に認められることが分かった。

ハイスループット *in situ* hybridization (ISH) システムは、明視野観察用発色検出について、自動化に加え、DAKO社のTyramide Signal Amplification(TSA)法を用いたキットを利用した検出感度の改善を行い、肝で30コピー前後の検出まで安定実施できる体制を整えた。本キットの販売中止に対してはtyramideの自家合成、抗体等試薬の個別購

入により対応した。尚、本法を用いない場合の検出感度は肝で150コピー程度であった。更に、より定量性の高い蛍光プローブを用いた ISH システムについて、発現値の異なる Albumin、Cyp2e1、Cyp1a2 及び Arntl を例に検討し、マイクロアレイにおいて10コピー/細胞程度発現している Arntl 遺伝子が門脈域を中心に分布することが明瞭に示された。尚、Albumin は Arntl と同様の分布を、Cyp2e1、Cyp1a2 は中心静脈を中心とした発現分布を示すことが確認された。

【②基盤研究】

(1)発生毒性

1.サイクロバミンを妊娠マウスに投与した際の胚における網羅的遺伝子発現変動解析

妊娠 7.25 日の妊娠動物に、各種濃度のサイクロバミンを単回強制経口投与し、妊娠 17.25 日に帝王切開して得られた胎児の外表検査、胎児重量、胎児数を検討したところ、30 mg/kgBW 投与群で、a) 平均胎児数の有意な減少、b) 平均胎児重量の有意な減少、c) 平均胎盤遺残数の有意な増加、d) 浸軟胎児が胎児計 28 匹中 1 匹に認められ、10 mg/kgBW 投与群で a) 平均胎盤遺残数の有意な増加が認められた。尚、顕著な外表異常は認められなかった。

この用量設定実験結果を参考とし、妊娠 7.25 日の妊娠動物にサイクロバミン(0, 30 mg/kg)を単回経口投与し、投与 2、8、24 時間後の胎児 RNA サンプルにつき、遺伝子発現変動解析を検討した。まず、サイクロバミンの標的分子である Smo ならびに Shh シグナル関連遺伝子

(Shh, Ptch1, Gli1, Gli2, Gli3)につき検討したところ、対照群と投与群とで有意な変化が認められなかった。

次いで、網羅的に遺伝子発現変動解析を検討した。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 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(投与/溶媒)が 1.6 より大、である。その結果、投与 2 時間後で 17、投与 8 時間後で 23、投与 24 時間後で 213 の p.s. が見いだされた。シグナルカスケード面からさらに検討したところ、コレステロール生合成に関わる遺伝子群の発現変動が見いだされた

2.サリドマイドを妊娠マウスに投与した際の胚における網羅的遺伝子発現変動解析

まず用量設定実験として、妊娠 7.25 日の妊娠マウスに、各種濃度(0, 100, 300, 1,000 mg/kgBW)のサリドマイドを単回経口投与し、妊娠 17.25 日に帝王切開して得られた胎児の外表検査、胎児重量、胎児数を検討したところ、いずれの群でも有意差は認められなかった。

この結果を考慮し、妊娠 7.25 日の妊娠動物にサリドマイド(0, 1,000 mg/kg)を単回経口投与し、投与 2、8、24 時間後の胚 RNA サンプルにつき網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。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 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(投与/溶媒)が 1.6 より大、である。その結果、各サンプリング時間で発現が増

加あるいは減少が認められた p.s.数は、投与 2 時間後で 122(増加)、514(減少)、投与 8 時間後で 116(増加)、285(減少)、投与 24 時間後で 329(増加)、164(減少)となった。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レチノイン酸分布を攪乱することにより、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。この遺伝子のサリドマイド投与時期での発現部位は、菱脳分節(rhombomere) 3, 5, 6 であり、このことは実際 ISH で確認した。

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につき検討中である。

3.サリドマイドを EB に持続適用した際の EB における経時的な網羅的遺伝子発現変動解析

まず、無処置野生型 ES 細胞を用いた、EB における遺伝子発現変動の経時データベース [EB 形成 0-7 日] (TIME POINT: 14 点)を作成した。すでに取得済みのマウス無処置野生型胚のデータベースとの対比もでき、Brachyury や Cardiac actin など、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。

次いで、サリドマイド(0, 10 μ M)存在下で培養・分化させ、経時的にサンプリングした EB の RNA サンプルにつき網羅的遺伝子発現変動

解析を検討した。対照群と投与群とで比較し、以下の 2 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)最大発現コピー数が 0.3 より大、2) t-test での P 値が 0.1 未満。その結果、発現が減少又は増加するものとして計 1,077p.s.が見いだされ、このうち生物学的変動と考えられたものとして計 72 ps(増加: 63、減少9)が見いだされた。この発現増加しているものの中には、シグナルカスケードとしては Wnt シグナル(Wnt9B, Fzd3)機能不明であるが肢芽と菱脳分節(rhombomere)に発現する Lix1 (limb expression 1 homolog)や肢部の背腹軸形成異常が報告されている Lmx1b が見いだされた。現在、昨年度検討した、妊娠マウスへのサリドマイド投与実験での解析結果と照合しつつ再解析中である。

(2)造血毒性

1. 試行的デンドログラムによる加齢遺伝子発現の解析

異なった遺伝子発現の予想される 2 群、2M 齢と 21M 齢の性質の違いを解析した(井上図1)。左の4レーンと、その隣の4レーンはそれぞれ 2M 齢と 21M 齢の骨髄由来であり、両者はデンドログラムで双方にわかれたものの明瞭なパターンの差異は目視し得なかった。このことは、右端の 2 レーンが孤立し、そのうち右が 21M 齢由来、左が 2M 齢由来であるにも関わらず、それぞれのカウンターパートのグループのデンドログラムとリンクしていることにも反映されている。蓋し、老化は、一般的に大部分の遺伝子の発現で見ると、2M 齢と 21M 齢を明確に区別するものではない。

この点を前提にして分別方法を明らかにすることが本研究の原点である。尚、加齢遺伝子発現のその後の検討は後述する。

2. 酸化ストレス応答に注目したチオレドキシソニ遺伝子改変動物を用いたデンドログラムによる無処置状態での遺伝子発現の解析

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ソニ過剰発現 (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。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髓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。これは、生体酸化にかかる遺伝子の発現平衡が、遺伝型の各型間で見出し得ない微小な変化に基づいていることを示している。即ち、測定遺伝子全体の発現で見る限り、両者を明瞭に区別する遺伝子群は一部の遺伝子に限局した差異に基づいているものと考えられる。

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

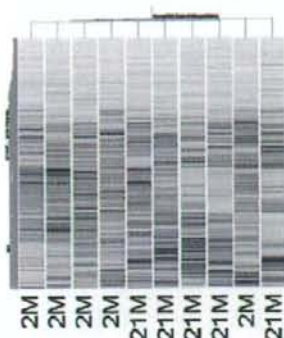
他方、Trx-Tg 及び Trx-KO マウスと野生型では、遺伝子発現強度による線図で比較すると、Trx-KO マウスで高発現している遺伝子の多くが Trx-Tg でむしろ発現低下状態を示し、野生型では双方の中間に位置していた。

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。

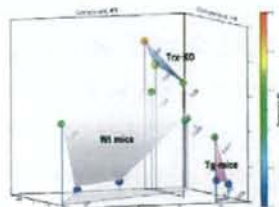
4. 種々の TRX 遺伝子型改変動物における遺伝子発現プロファイリングの分別

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。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 (井上図2)。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。



井上図1. 2M 齢と21M 齢のマウス各5匹から採取した骨髄細胞におけるマイクロアレイ解析のデンドログラム表示



井上図2. 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

5. 種々の TRX 遺伝型動物における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)

群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 解析結果は井上表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、井上図3に示す。

6. 線図 (Line configuration) による 2M 齢・21M 齢各群における遺伝子発現の比較

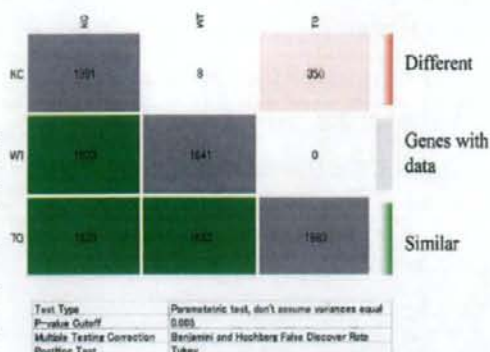
2M 齢および 21M 齢の C3H/He 雄マウス、各群 5 匹ずつの個体ごとの発現遺伝子の発現強度を、同一遺伝子毎に接続して比較した結果、井上図4に認められるとおり、2M 齢と 21M 齢とでは、1) 発現強度に、一部やや逆転傾向があり、2) 個々の遺伝子毎の発現強度分布が 21M 齢で 2M 齢に比べて拡大する傾向が認められた。

7. 2M 齢・21M 齢各群におけるデンドログラムによる遺伝子発現の解析

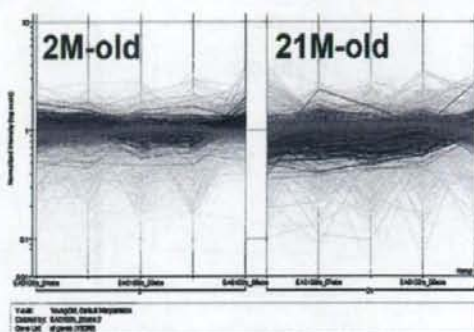
以上の差異を、デンドログラムによる発現プロフィールで比較すると、2M 齢、21M 齢の各個体は明瞭には分離しなかった。

井上表1 ANOVA解析の有意水準 $P < 0.005$ 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, Spielmeyer-Vogt disease)
1417750_a_at	mitochondrial solute carrier protein
1417834_at	synaptotagmin 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)



井上図3. 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



井上図4. 線図による2M齢・21M齢各群の遺伝子発現の比較

8. 主要要因解析(PCA)に基づく2M齢および21M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2M齢および21M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。前者の結果は井上図5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井上図6の通りとなる。第3、4要因面でも21M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