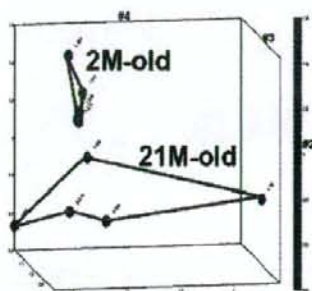


見られる限りでは、21M 齢における各種の遺伝子の stochastic(確率論的)な拡散傾向が反映されており、2M 齢における eigenvector 値の収束性と対照的である。



井上図5. PCA による第 1～第 9 要因の 2M・21M 齢のマウス個体ごとの eigenvector 値



井上図6. 第 2, 3, 4 要因(井上図5)の eigenvector 値

9. 2M 齢・21M 齢各群の分別責任遺伝子群の抽出

以上に基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 845 遺伝子のうち、Gene Ontology (GO) による annotation のある 338 の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、Biological process などの GO 毎の両者の差異が認められた。これら、GO に含まれる遺伝子数の比率について、元のデータベース(全 45101 probe sets 中、annotation のある 16467 probe sets) での比率との間の尤度を計測し、

P 値 0.05 未満の GO を選別してリスト化すると、井上表2のような GO 群が浮上してきた。これらの中には、加齢個体における免疫学的耐性や自己認識に關わる遺伝子群が含まれていることが表から明らかである。

井上表 2. 尤度 $P < 0.05$ を示した GO のリスト (抜粋)

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

(3) 消化管毒性

1. DSS 腸障害における ASK-1 の関与

1-1. DSS 腸障害モデルの改良

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。そこで初年度、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。

確立された系を用いて、B57BL/6 (WT)とASK1欠損マウス(KO)間の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。

1-2. DSS 腸障害発生初期相の検討

以上の検討において、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なかった。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、TNBS法に準じ、DSSを直接直腸内

に投与する方法を検討した。

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。1-3.DSS腸障害初期相の網羅的遺伝子発現解析

上記方法では、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(添谷表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増加していた。

添谷表1. DSS投与6時間後に1.5倍以上変動したブローアップセット

Category	Item	Count	PValue
GOTERM_BP_0	GO:0002626-acute inflammatory response	11	1.80E-02
GOTERM_BP_0	GO:0008887-organ morphogenesis	11	4.41E-02
GOTERM_CC_0	GO:0008897-lateral side of plasma membrane	10	2.01E-04
GOTERM_BP_0	GO:0002448-lymphocyte mediated immunity	10	1.69E-04
GOTERM_BP_0	GO:0009718-regulation of immune response	10	1.74E-04
GOTERM_BP_0	GO:0009778-positive regulation of immune response	10	1.60E-04
GOTERM_BP_0	GO:0002684-positive regulation of immune system process	10	1.60E-04
GOTERM_BP_0	GO:0018724-B cell mediated immunity	10	1.34E-04
GOTERM_LMF_0	GO:0003381-unspecific monoxygenase activity	7	0.94E-04
GOTERM_CC_0	GO:0009792-microsome	14	1.87E-04
GOTERM_CC_0	GO:0042698-vesicular fraction	14	1.87E-04
GOTERM_BP_0	GO:0008216-cell death	10	1.34E-03
GOTERM_BP_0	GO:0006808-complement activation, classical pathway	6	0.80E-03
GOTERM_LMF_0	GO:0005508-ion ion binding	11	2.81E-03
GOTERM_BP_0	GO:0042211-intensin-13 biosynthetic process	3	0.40E-03
GOTERM_BP_0	GO:0009804-cellular morphogenesis during differentiation	10	2.01E-03
GOTERM_BP_0	GO:0002253-activation of immune response	8	1.20E-03
GOTERM_BP_0	GO:0009802-cell morphogenesis	28	3.74E-03
GOTERM_BP_0	GO:0007787-regulation of neurogenesis	7	0.94E-03
GOTERM_BP_0	GO:0042887-regulation of apoptosis	28	3.24E-03

漆谷表2. DSS 投与 6 時間後に 1.5 倍以上変動した
プローブセット

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_CC	GO:0030017-actin filament	17	1.89%	1.19E-08
GOTERM_CC	GO:0044448-contraction	17	1.89%	2.29E-08
GOTERM_CC	GO:0030018-myofibril	17	1.89%	6.21E-08
GOTERM_CC	GO:0031741-tissue	12	1.33%	7.90E-08
GOTERM_CC	GO:0043292-contraction	17	1.89%	1.10E-07
GOTERM_CC	GO:0030019-Z disc	11	1.19%	1.69E-07
GOTERM_BP	GO:0067917-muscle development	25	2.89%	5.81E-07
GOTERM_CC	GO:0015423-actin cytoskeleton	27	2.89%	1.04E-06
GOTERM_BP	GO:0062826-acute inflammatory response	18	1.49%	8.36E-06
GOTERM_BP	GO:0009887-organ morphogenesis	49	4.48%	8.02E-06
GOTERM_MF	GO:0031989-adenyl ribonucleotide binding	87	8.87%	8.78E-05
GOTERM_CC	GO:0000727-cytoplasm	276	27.49%	7.39E-05
GOTERM_BP	GO:0000883-acute phase response	81	8.02%	8.11E-05
GOTERM_CC	GO:0043229-intracellular organelle	351	34.98%	8.77E-05
GOTERM_BP	GO:0006839-smooth muscle contraction	8	0.80%	2.09E-04
GOTERM_CC	GO:0046959-anchored to plasma membrane	6	0.60%	2.33E-04
GOTERM_CC	GO:0031228-anchored to membrane	6	0.60%	2.33E-04
GOTERM_CC	GO:0044444-cytoplasmic part	173	17.23%	4.32E-04
GOTERM_CC	GO:0005858-cytoskeleton	61	6.08%	5.14E-04
GOTERM_BP	GO:0014708-striated muscle development	16	1.59%	5.30E-04

2. TNBS 誘起腸炎の系統差の解析

2-1. TNBS 誘起腸炎の系統差の確認

DSS モデルでは少なくともフェノタイプにおいて KO と WT の間に明瞭な差が認められなかったため、他の繁用腸炎モデルとして TNBS を検討することとした。KO と WT の比較であるから、WT として C57BL/6 マウスを用いた予備検討を行ったところ、既報と異なり、ほとんど病変が発生しなかった。病変誘導のプロトコールに問題がある可能性を検討するため、通常使用される系統である BALB/c マウスを用いたところ、問題なく重篤な病変が発生した。同じ種でありながら病変発生に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。

まず、TNBS 接触後の病変の進展を定量的に評価するため、炎症細胞浸潤(粘膜内 MPO 活性の上昇)を測定した。BALB/c マウスの場合、投与の翌日には活性が大きく上昇し、2 日目をピークとして炎症細胞の浸潤が起きていることが示唆され、4 日までにその多くが死亡した。一方、B57BL/6 マウスの

場合は、24 時間後での炎症細胞浸潤は BALB/c とほぼ同程度に生じるが、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い、粘膜障害も生じなかった。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。

次に TNBS 接触直後から 2~24 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。すなわち、投与直後の変化は 4 時間以内に検討すべきであると考えられた。

2-2. TNBS 腸炎発生初期における網羅的遺伝子発現解析

TNBS 腸炎の系統差の原因を究明するために GeneChip 解析を行った。解析の時点は、なるべく早い時期とすべきであった。なぜなら、明瞭な病変の発生する 3 日以降の時点では、すでにフェノタイプの差が見られており、遺伝子発現に差が出るのは当然であって、単なる病変の結果を観察するに過ぎない。TNBS 接触直後の変化を捉えるため、前項の検討結果を踏まえ、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(漆谷表 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(漆谷表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。

漆谷表3. BALB/c > C57BL/6 のプローブセット

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_CC_5	GO:0942811-MHC protein complex	8	1.94%	5.09E-04
GOTERM_CC_5	GO:0001897-external side of plasma membrane	10	2.44%	6.33E-04
GOTERM_BP_5	GO:0033101-natural killer cell activation	4	0.98%	1.36E-03
GOTERM_BP_5	GO:0004915-apoptosis	23	5.64%	1.86E-03
GOTERM_BP_5	GO:0001212-leukocyte differentiation	8	2.11%	2.81E-03
GOTERM_BP_5	GO:0004520-amino acid metabolic process	12	2.94%	3.37E-03
GOTERM_BP_5	GO:0008218-cell death	23	5.64%	3.60E-03
GOTERM_MF_5	GO:0004009-chemokine activity	6	1.23%	3.89E-03
GOTERM_MF_5	GO:0048334-hemopoiesis or lymphoid organ development	12	2.94%	4.91E-03
GOTERM_MF_5	GO:0042379-chemokine receptor binding	8	1.92%	4.99E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030099-hemopoiesis	11	2.79%	6.16E-03
GOTERM_BP_5	GO:0030098-lymphocyte differentiation	7	1.72%	6.34E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006644-phospholipid metabolic process	8	1.98%	6.27E-03
GOTERM_BP_5	GO:0006634-membrane lipid metabolic process	8	2.11%	6.56E-03
GOTERM_BP_5	GO:0031036-negative regulation of apoptosis	9	2.11%	1.23E-02
GOTERM_BP_5	GO:0031035-negative regulation of programmed cell death	9	2.11%	1.34E-02
GOTERM_BP_5	GO:0030328-lipid modification	4	0.98%	1.69E-02
GOTERM_CC_5	GO:0043812-MHC class I protein complex	8	1.92%	1.68E-02
GOTERM_BP_5	GO:0048331-alpha-beta T cell activation	4	0.98%	1.76E-02
GOTERM_CC_5	GO:0001737-cytoplasm	104	25.74%	1.89E-02

漆谷表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

Category	Term	Count	%	PValue
GOTERM_BP_5	GO:0026887-organ morphogenesis	40	6.28%	2.88E-08
GOTERM_BP_5	GO:0001822-angiogenesis	20	3.12%	4.03E-08
GOTERM_BP_5	GO:0001694-blood vessel development	24	3.78%	6.99E-08
GOTERM_BP_5	GO:0007844-vasculature development	24	3.78%	6.87E-08
GOTERM_BP_5	GO:0048514-blood vessel morphogenesis	22	3.44%	8.81E-08
GOTERM_MF_5	GO:0008201-heparin binding	12	1.89%	4.23E-07
GOTERM_MF_5	GO:0008209-chemokine activity	10	1.56%	4.66E-07
GOTERM_MF_5	GO:0042379-chemokine receptor binding	10	1.56%	6.87E-07
GOTERM_BP_5	GO:0008810-chemotaxis	10	2.34%	2.80E-06
GOTERM_BP_5	GO:0036334-regulation of cell migration	10	1.56%	6.82E-06
GOTERM_CC_5	GO:0008737-cytoplasm	184	28.78%	1.31E-04
GOTERM_BP_5	GO:0011669-inorganic anion transport	18	3.34%	1.69E-04
GOTERM_CC_5	GO:0011663-actin cytoskeleton	17	2.66%	2.27E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007187-enzyme linked receptor protein signaling pathway	21	3.29%	2.45E-04
GOTERM_BP_5	GO:0008830-anion transport	16	2.50%	2.82E-04
GOTERM_BP_5	GO:0008859-tissue development	21	3.29%	2.63E-04
GOTERM_BP_5	GO:0007637-heart development	18	3.34%	4.39E-04
GOTERM_BP_5	GO:0048729-tissue morphogenesis	10	1.56%	4.73E-04
GOTERM_BP_5	GO:0008913-epidermal cell differentiation	7	1.09%	6.68E-04
GOTERM_BP_5	GO:0008644-epidermis development	11	1.72%	7.18E-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。

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。そこで結腸粘膜細胞一次培養系の作成を試みた。

平成 20 年度にマウス結腸粘膜より crypt cell を単離する方法を確立し、最終年度は、これを希釈したマトリゲル上に播種することにより、ある程度の長期間の培養が可能であった。更に、この培養細胞に対して 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、今後更なる改良が必要であると考えられた。

(4) 胸腺毒性

以下に記す結果が得られた。

- 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。
- 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。
- ドキシソルピシン投与でもいくつかの遺伝子群の発現変化が認められた。ウイルス感染との関連、宿主遺伝的背景の影響を含めてさらに詳細な解析を行っている。

(5)骨毒性

1. 薬物の予スクリーニング実験

<一般所見>

各薬物を投与したことによる急性毒性、顕著な行動変化等は認められなかった。また、骨折手術創の治癒経過の肉眼所見に薬物投与による差は認められなかった。

<骨折治癒所見>

X線写真所見では、術後1週目では各薬物を投与した動物および対照となる蒸留水を投与した動物において、顕著な化骨反応が認められなかった。

骨折部位の化骨反応は術後2週目から認められたが、すでにこの段階で、対照と比較して Alprazolam, Sodium Valproate 投与動物において化骨の促進が強く疑われる所見が得られた。術後3週目より新生化骨の再構築反応が見られはじめ、化骨断端が丸みを帯びて来るのが確認された。術後5週目には、各薬物を投与した動物および対照の動物において骨折部位は治癒したと判断された。

2. 対象薬物2種の投与実験

<X線写真所見>

X線写真所見では、術後1週目では各薬物を投与した動物および対照となる薬物非投与群の動物において、顕著な化骨反応はまだ認められなかった。

骨折部位の化骨反応は術後2週目から認められたが、すでにこの段階で、対照と比較して alprazolam, sodium valproate 投与動物において化骨の促進が強く疑われる所見が得られた。術後3週目より新生化骨の再構築

反応が明らかに見られはじめ、化骨断端が丸みを帯びて来るのが確認された。術後4週目には、各薬物を投与した動物および対照の動物において骨折部位はおおむね癒合したと判断された。4週目の時点においてX線写真上で顕著な骨の過剰形成が認められたのは alprazolam を高濃度で投与されたラット2匹であり、発生率は25%であった。

<組織所見>

骨折部位の治癒は主として軟骨内骨化によって起こり、軟骨内骨化は骨折部位にとどまらず、髄内釘に沿って進行していることが確認された。alprazolam 高濃度投与群でX線写真上顕著な化骨反応が認められたものは、組織学的には骨折部位の盛り上がり大きいものの、薬物非投与群でも盛り上がり目立つ個体もあり、個体間のばらつきを考慮するとさらに別の指標を用いて裏付ける必要があると考えられた。そこで、皮質骨に注目したところ、薬物投与群では、非投与群と比較して皮質骨の肥厚が顕著であり、多いものでは当初の2倍以上の厚みで、しかも骨折部位からかなり離れた部位まで新生皮質骨の過剰添加が認められた。この皮質骨の肥厚は、alprazolam を高濃度に投与した群でも顕著に認められた。尚、対照の薬物非投与群では、肥厚が平均1.3倍程度であった。また、骨折部位以外の骨組織には顕微鏡観察をした限りでは薬物投与群と非投与群との間に顕著な差は見いだされなかった。

3. 定量的PCRによる遺伝子発現の検討

マウスの実験では、骨組織の所見は現在

標本作成中であるため詳細は不明であるが、alprazolamを高濃度に投与したマウス1匹にX線写真上で顕著な骨の過剰形成が認められた。マウスの健側大腿骨からRNAを抽出し、骨外細胞の分化マーカーである osteocalcin 及び alkaline phosphatase の発現を Northern hybridization で確認したところ、薬物投与群と対照群との間に発現量の差は認められなかった。

骨髄間葉系細胞に alprazolam をいずれの濃度に添加しても、骨芽細胞の分化マーカーである osteocalcin, Runx2 及び ALP の発現に変化は見られなかった。

4. GeneChip 解析

骨組織の破砕後 RNA の分解が比較的少なかった4検体(薬物投与群2検体、対照群2検体)について GeneChip 解析を行った。検体採取時の混入によると強く疑われる筋肉組織由来の遺伝子群及び骨髄細胞由来遺伝子群を除いた遺伝子を解析した結果、発現上昇を認める遺伝子として Dentin Matrix Protein 1 (DMPI)が検出された。

(6) 遺伝子傷害毒性

1. TLDA による既存の GeneChip データの評価

遺伝子傷害特異的反応遺伝子46種類を搭載した TLDA カードを用いて、これまでに GeneChip 解析を行ったサンプルの解析を行い、それぞれのデータの再現性に関して検討を行った。発現の上昇する遺伝子、減少する遺伝子ともに全体として TLDA と

GeneChip の結果は良く一致しており、両者の信頼性が確認された。

また、本解析の過程において、TLDA 法の再現性を確認する目的で、同一サンプルを用いた duplicate 実験間での Ct 値の相関性を検討した。異なるウエル間の Ct 値は非常に高い相関性を示し、TLDA カードによるデータの高い再現性が示された。3ウエル以上の replicate を用いた解析が標準的のプロトコールとして推奨されているが、2ウエル以下でも十分信頼性のあるデータが得られることがわかった。

2. TLDA による新たな化合物セットのスクリーニング(セット-1)

一群5匹のマウスに対し RNA 抽出および cDNA の合成は青山学院大学(青学)および国立医薬品食品衛生研究所(衛研)にて分担して行った。青学では、cDNA 合成時の primer として oligo-dT を、衛研 random hexamer を用いた。合成した cDNA を用い TLDA を用いた TaqMan 定量 PCR 法にてマーカー候補遺伝子の発現を比較した。データの解析にあたっては、通例内在性コントロール遺伝子の発現量を基準とした $\Delta \Delta Ct$ 法を用いるが、今回のデータでは、内在性コントロールの発現量が比較的ばらつく、および oligo-dT プライマーを用いた際に Ribosomal RNA がコントロールとして使えないなどの理由により、より適切なコントロールとして全遺伝子(発現量の少ない数種の遺伝子を除外)の発現量(Ct 値)の平均値を ΔCt を算出する際の基準として用いた。そして、

各遺伝子に対して対照となるコントロール群の ΔCt 値の平均値をもとに $\Delta \Delta Ct$ 値を計算し、次式よりコントロールに対する発現量の比(RQ)を算出した。

$$RQ(\text{ratio})=2^{-\Delta \Delta Ct}$$

($\Delta \Delta Ct$ 法では、1 サイクルの差による増幅量の差を 2 倍として比を算出する)

こうして算出した各サンプルの RQ 値をまとめた。4 時間後のデータと 48 時間後のデータを遺伝子傷害物質と非遺伝子傷害性物質に分けてマウス個体ごとにリストした。そして、発現量が 2 倍以上になったもの、1/2 以下になったものを変化量に応じて 3 段階に分け示した。発現量の低い遺伝子に関してはデータの信頼性が低いため、 Ct 値が 25 サイクルを超えるような遺伝子に関しては、遺伝子名にマークした。これらの遺伝子については、各サンプルにおける平均 Ct 値の計算より除外した。今回の化合物セットにおいては、全体として明らかな差が見られず、非遺伝子傷害性物質においてもかなり多くの変化が認められたことが、判別を難しくした。しかし、遺伝子ごとに変化を精査してみると、逆の動きをする遺伝子もあり、判別性のあった遺伝子に黄色でマークした。クラスター解析の結果、全遺伝子の結果を用いて解析を行った場合には、赤色の遺伝子傷害性物質と緑色の非遺伝子傷害性物質の群が分離できなかったが、いずれかのタイミングで判別性が見られた 15 種の遺伝子を選

択して、これらを用いて解析を行ったところ、2 者をほぼきれいに分けることができた。それぞれの群の化合物に関してさらに詳しく見てみると、同じ色をつけた同じ化合物処理マウスは必ずしもかたまたま、個体差が認められた。

3. TLDA による新たな化合物セットのスクリーニング (セット-2)

一部入れ替えた遺伝子傷害特異的反応遺伝子 45 種類を搭載した新規 TLDA カードを用いて、新たなセットの 4 種の遺伝子傷害性肝発癌物質および 4 種の非遺伝子傷害性物質処理によるマウス肝臓での遺伝子発現変化を検討した。

同様に算出した各サンプルの RQ 値をまとめた。4 時間後のデータと 48 時間後のデータを遺伝子傷害物質と非遺伝子傷害性物質に分けてマウス個体ごとにリストした。そして、発現量が 2 倍以上になったもの、1/2 以下になったものをそれぞれ変化量に応じて 3 段階に分け示した。

これまでの傾向と同じく、非遺伝子傷害物質処理によっても多くの遺伝子に変化を示し、一見しての判別は難しそうであったが、48 時間後では、遺伝子傷害性物質処理により、より多くの遺伝子が動く傾向が見られた。特に、Bax, CyclinG1, Isg201I, Mbl2 などの遺伝子は、遺伝子傷害性物質特異的に変化した。それ以外の遺伝子に関しても、変化の方向性や変化率を考慮すると、判別に有効であると考えられた。そこで、それらを考慮した点数付けにより各遺伝子のスコア

リングを行った結果、上位 25 遺伝子を以下の解析において、選択遺伝子として使用した。

4. 統計解析と遺伝子傷害性の有無に関する判定法の検討

まず、遺伝子傷害性物質と非遺伝子傷害性物質が単純な判別分析によって分離できるかどうかを、主成分分析法を用いて検討した結果を示す。すべてのデータを使って解析した結果、上記 25 遺伝子のみを使った場合にもかなりオーバーラップが見られた。比較的差のあった 48 時間のみのデータを使った場合には、25 遺伝子を選択した際には、かなり分離は良くなった。さらに、遺伝子傷害性物質から AAF を、非遺伝子傷害性物質から Phenacetin を除いて解析した場合には、すべての遺伝子を用いた場合でも、よい分離が得られた。

次に、統計解析により 2 群間の有意差を検定した。コントロール群との ΔCt 値の比較により、t 検定においての有意水準を各種設定した際に、有意差のつく遺伝子の数を示した。まず、変化の方向性を考慮せず有意差のついた遺伝子から、2 群間の比較検定を t-test にて行ったところ、48 時間のデータでは遺伝子ごとの有意水準を 1%とした場合のみ $p < 0.05$ となったが、4 時間のデータに関してはいずれの場合においても有意差はみられず、両者を総合した場合にも有意差はつかなかった。そこで、非遺伝子傷害性物質では逆方向の変化をするケースが多い点に着目し、逆方向に動いた場合を除いた時

(片側検定)には、2 群間の差がより顕著になり、4 時間では依然差はつかなかったものの、48 時間のデータでは、部分的に $P < 0.05$ となった。4 時間と 48 時間をあわせたデータに関しては、有意差はつかなかった。そこでさらに、逆に動いた遺伝子数を減点したところ、2 群間の有意差はより顕著となり、遺伝子ごとの有意水準を 2.5%とした場合には、いずれの比較においても $p < 0.05$ となった。個々の化合物での有意遺伝子数を比較した場合にも、非遺伝子傷害性物質で最も数の多かった Phenacetin が、遺伝子傷害性物質で最も数の少ない 2AAF の数を下回り、なんとか 2 群を分離できた。

さらに、遺伝子傷害性物質の場合にはより変化の度合いが大きい点を考慮し、変化率による重み付けをすることにした。個別のマウスデータにおいて、2 倍、5 倍、10 倍以上の変化をそれぞれ 1 点、2 点、3 点とスコアリングし、個別マウスの得点を合計した。この場合にも、方向性を考慮しなかった場合には 2 群間の有意差はつかなかったが、方向性を考慮し、さらに逆に動いた場合を減点した場合には、良い分離が得られた。

以上の結果から、最適なスコアリング法として、遺伝子間比較有意水準 2.5%での方向性を考慮して減点した有意遺伝子数に 10 を乗じた値に、変化率での得点を加えた値を化合物ごとのスコア値として算出したところ、4 時間、48 時間個々では 2 群間を完全には分離できなかったが、両者を合わせたスコアは、非遺伝子傷害性物質 DEHP (102), DDT (-35), Phe(146), Furan (120)に対し、遺伝子

傷害性物質 IPNA(642), Urethane (286), 2AAF (188), NNK (630)となり、両者の間にカットオフラインを設定可能となることがわかった。

同様のスコアリングを、反応性の良かった25 遺伝子に限定して行ったところ、全体にパフォーマンスは向上し、25 遺伝子のみからも、全遺伝子を用いた場合と同等以上の判別結果が得られることがわかった。最終的なスコアリングとして、遺伝子間比較有意水準5%での方向性を考慮して減点した有意遺伝子数に10を乗じた値に、変化率での得点を加えた値を化合物ごとのスコア値として算出したところ、4 時間、48 時間を合わせたスコアは、非遺伝子傷害性物質 DEHP (66), DDT (-88), Phe(91), Furan (100)に対し、遺伝子傷害性物質 IPNA(613), Urethane (290), 2AAF (192), NNK (675)となった。この結果から最終的な判別法としては、選択した25 遺伝子を用いて算出したスコアより、非遺伝子傷害性物質の最高値100と遺伝子傷害性物質の最低値192の間にカットオフライン(便宜的に150)を設定することにより、遺伝子傷害性物質を判別可能となることがわかった。

最後に、同じ動物由来のサンプルを用いて並行して行われた共同研究のデータとして、SyBr Green Iを用いた一般的なRT-PCR法によるデータを、今回得られたTLDAデータと比較した。共通して用いられた20 遺伝子に関して4 時間後のデータでは、全体に非常に一致した傾向を示し、両者のデータの信頼性が確認できた。なお、一部の遺伝子に関し

ては異なる傾向が得られたが、これはプライマーの配列や位置による影響が考えられ、今後の検討課題となった。

【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】

1. 複数の実験にわたり同期して発現する遺伝子(発現同期遺伝子)群の抽出

様々な化合物投与実験においても高率に類似の発現パターンを呈する候補遺伝子群、すなわち発現同期遺伝子群の効率的な抽出を試みた。まず化合物毎独立に発現パターンを基準として遺伝子をクラスタリング(独自開発の教師無しクラスタリングアルゴリズムによる)してクラスタ情報を蓄積した上で、最後に複数の化合物投与実験のクラスタリング結果を総覧して同一クラスタに分けられていることの多い発現同期遺伝子を抽出した。これにより化合物毎の単独解析では得られない、より関連性の強い重要な候補遺伝子群を抽出できる。本研究ではMFサーバーの発現同期率計算アルゴリズムを改良し、より多くの化合物投与データを用いてより高速に計算が行えるようにすると共に、巨大な出力結果を効率的に閲覧するためのクライアントソフトウェアの開発を行った。



2. エクソンアレイの性能評価

性能評価用の基礎データを採取するために、LBM Mixture サンプル(肝臓と脳由来の total RNA を、細胞数に従って5段階の比率で混合希釈したもの。このサンプル群では全ての遺伝子において混合比と発現量が直線的な用量相関を呈する)を Affymetrix エクソンアレイにハイブリダイゼーションし、測定・解析を行った。個々の遺伝子に所属するエクソン毎の発現量・発現パターンを調査したところ、混合比とシグナル強度の相関性は良かったものの、定量性能に無視できない問題があることが判明した。



同じ遺伝子に所属するエクソンであるにも関わらず発現レベルが一致しない。

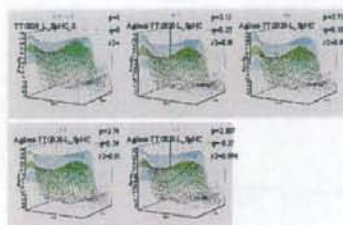
これはプローブ設計あるいは数値化アルゴリズムに起因する問題と考えられ、少なくともメーカーが提供している標準的な数値化アルゴリズムをそのまま用いるのではエクソンレベルでの定量解析は困難であることが判明した。

現在、メーカーの協力の下、ジャンクションアレイ(2つのエクソンにまたがるプローブを搭載した技術開発用アレイ。非売品)なども用いて定量的数値化アルゴリズムの開発を進めている。

3. 異なるプラットフォーム間のデータ相互変換

Percellome 手法に対応している Affymetrix GeneChip (MOE430v2) と Agilent Microarray

(NIHS44K) をモデルとして、同一の LBM Mixture サンプルをハイブリダイズさせたときの1対1対応データを得、最小自乗法によりプローブ(セット)毎のデータ相互変換係数を求めた。また得られた補正係数表を用いて双方のデータを自動的に相互変換するためのソフトウェアも開発した。



一方、信用に足る補正係数が求められなかったケースの原因調査を進めた結果、影響の大きな要因の1つとしてプローブの飽和現象が検出された。

4. マイクロアレイのデータ補正

マイクロアレイデータの誤差の主要な原因の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、および 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 Mixture サンプルを用いて、補正係数を求めた。

この過程で、複合要因として染色・洗浄前のハイブリダイゼーション過程におけるクロスハイブリダイゼーション影響の存在が示唆され、擬似的にプローブ飽和様の現象も引き起こすことを見いだした。現在、全プローブ間のクロスハイブリダイゼーション係数を求め、補正計算モデルを構築して、試験計算を行っている。

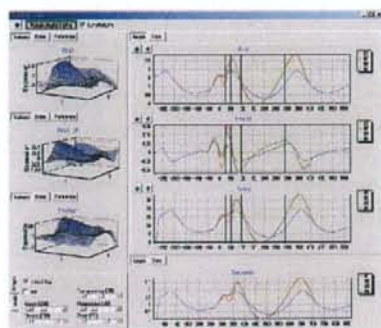
5. 発現パターンの特徴抽出

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並び替える RSort アルゴリズムを改良し、凹凸の少ない単純なパターンを示す遺伝子、つまり、より強力もしくは単純な発現制御を受ける遺伝子を網羅的に自動抽出できるように改良を加えた。また独自に開発した変動レベル別の有意差指標 Fx Curve や、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に変動 CV 値やt検定などの統計手法と組み合わせた結果、絞り込み効率が飛躍的に向上した。

6. 発現パターンの時系列ソーティング

時系列ソーティングのための基本技術として、測定点間のデータ補間および日内変動リズムを考慮した測定区間外へのデータ外挿を検討した。実際の測定値を正確に反映し、なおかつ測定点間を滑らかに接続すること、および補間関数自体を微分・積分でき

ることから補間関数としてスプライン関数を採用した。測定区間外へのデータ外挿に際しては測定区間に於ける溶媒コントロールの補間関数をベースとして化合物投与による変動曲線に滑らかに接続するようパラメータを調整した。

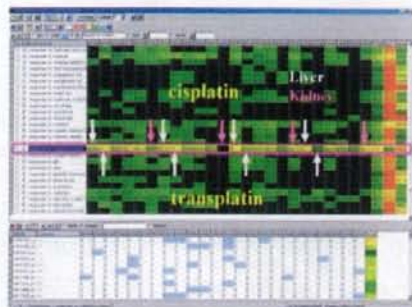


また5の発現パターンの特徴抽出技術を応用して遺伝子発現波の出現時間を特定し、自動的に候補遺伝子を時系列順に並び替えるアルゴリズムも生成した。

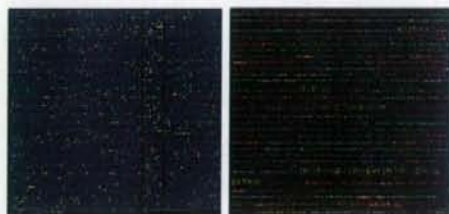
7. 遺伝子クラスタの意味抽出

独自に開発したGoPlotアルゴリズム、すなわち GO キーワード等の意味を持つノード(意味ノード)が配置された疑似空間に、複数の候補遺伝子群(遺伝子クラスタ)を意味ノードとの相関関係に応じた位置へプロットする技術を中心に、遺伝子クラスタの意味抽出技術の開発・改良を進めた。まず、GoPlot 作図の分解能を低下させる要因を検索したところ、プロットする遺伝子クラスタ間で共通する GO Keyword の存在(遺伝子クラスタノードを無用に接近させる)や、候補遺伝子群間で差異が大きくても出現頻度が低いか分布が大きく偏っている GO Keyword

の存在(意味空間を必要以上に歪ませる)を特定した。これらを意味空間から除外することで、GoPlot の分解能が向上することを確認したため、このような GO Keyword の選定作業の大半を自動化するためのソフトウェア MF GoViewer を作成した。



その他、定型的な意味スクリーニング処理を行うための可視化ツール、MFGoMap や関連性の高い意味キーワードを直接総覧するための可視化ツール、MFGoCloud を作成した。



MF GoMap

MF

D. 考察

【①データベース生成研究】

データベース生成では、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。インフォマティクスについて、世界有数の規模を誇るこの

Percellome データベースから、毒性に関わる遺伝子群を効率良く網羅的に抽出できる様になり、毒性反応シグナルネットワークの基本構成単位を自動生成する技術の開発見込みが立った。

これらのデータベースとインフォマティクス技術により、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或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った。また、脳、肺、肝、腎等の多臓器トキシ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った。

【②基盤研究】

(1) 発生毒性

1. サイクロパ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

実験結果から、Shh シグナリング阻害剤サイクロパミン(30 mg/kgBW)の経胎盤暴露により、マウス胚では、Shh シグナルカスケードというよりも、コレステロール生合成シグナルカスケードに影響を与えている可能性が示唆された。現時点では、このカスケードに対して促進的に作用するのか、抑制的に作用するのか、不明である。サイクロパミンによる催奇形性は、ラット、マウスでは低感受性であることを上述したが、この理由として、少な

くともマウスでは、このコレステロール生合成シグナルカスケードにおいてサイクロパミンが結合あるいは代謝されている可能性が考えられた。したがって今後、コレステロール生合成阻害剤との併用により、マウスにおいてもサイクロパミン投与による催奇形性が顕著となる可能性が推測された。

また、コレステロール生合成を阻害する HMG-CoA reductase 阻害剤 atorvastatin の妊娠ラットへの経口投与で胚吸収が報告されている(Dostal ら、1994)。したがって、サイクロパミンがコレステロール生合成阻害作用を有している場合、このことにより胚吸収が引き起こされる可能性が示唆され、サイクロパミン(30 mg/kgBW)で認められた、平均胎児数の有意な減少、平均胎児重量の有意な減少、平均胎盤遺残数の有意な増加、ならびに浸軟胎児の出現は、この阻害機序に起因している可能性も考えられた。本解析結果は、阻害剤・活性化剤などの分子標的物質が、生体においては、当該分子とは異なる分子に作用する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. 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

実験結果から、サリドマイド(1,000mg/kgBW)の経胎盤暴露により、マウス胚では、ビタミン D 受容体やコラーゲン遺伝子といった骨軟骨形成に関与する遺伝子の発現に影響を与えるとともに、遺伝子欠失マウス胚の肢部で形成異常が報告されている遺伝子

の発現を抑制するということが明らかとなった。サリドマイドの催奇形性とこの遺伝子の関係についての報告は見いだされず、したがって、本実験により、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たことは非常に興味深い。

他方、サリドマイドが作用する可能性が示唆されたこの遺伝子の欠失により、肢部の形成異常が認められるにも関わらず、マウスでサリドマイドを投与しても肢部の形成異常が認められないこと理由は、現時点で不明である。この理由の可能性として、1) サリドマイドの体内での代謝速度がヒトと比較してマウスで非常に速やかである可能性、2) サリドマイドによる当該遺伝子発現制御が肢部では働かない可能性、の以上 2 点が考えられた。ISH による検討の結果、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 であったが、現在、インフォマティクスを用いて当該遺伝子カスケードの探索をおこなっており、上記 2) の可能性について検討中である。また、サリドマイドを投与した際の胚の肢部での遺伝子発現変動解析により、サリドマイド誘発奇形の分子機序の一端が明らかとなる可能性が示唆された。

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

実験結果から、サリドマイド(10 μ M)存在下で培養・分化させ EB では、Wnt シグナルおよび肢芽に発現する遺伝子の発現に影響を

与えることが明らかとなった。今後、先行し検討した *in vivo* 実験との比較検討を行い、サリドマイド誘発催奇形の分子機序につきさらに詳細に検討する予定である。

他方、本実験結果から ES 分化系である EB を用いた *in vitro* 実験系の基本的な実験部分は整備できたものと考えられた。マウス野生型胚は胎生 4~6 日は技術的にサンプリングが困難であり、事実上解析できないステージであるが、この ES 分化系を用いれば、ES 細胞はマウス胎生 3 日の胚盤胞の内部細胞塊由来であるため、このステージの胚の代替モデルとなり得る。この意味でも、EB を用いる実験系は有用なものと考えられた。

(2) 造血毒性

マイクロアレイ情報の解析は、今、下図のような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すると、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 predict する作業を意味している。

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、これら確率論的分散データの統計学的平均化は stochasticity を消去させる(プロクラステス消去)。

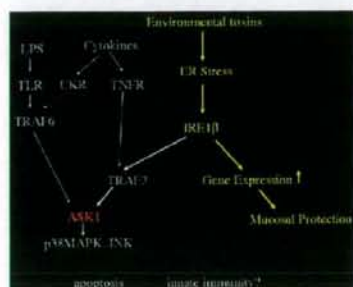
以上の認識に立って、ジーンチップデータで発生するデータの生物学的変動要因についてまとめ、これに基づいて酸化的ストレスと加齢影響の2つの要因から解析を行った。前者では、thioredoxin-like 5 を含む electron transporter activity、NADH dehydrogenase を含む oxidoreductase activity、peroxiredoxin を含む oxidative phosphorylation などの GO が有意に抽出され、解析は基本的に目的を達した。また、後者の加齢影響については、主要要因解析によって、2M 齢と 21M 齢の遺伝子発現プロフィールに有意な差異を生み出した遺伝子の分離に成功した。尚、実際には、そうした群毎に共通性をもつ遺伝子と別に、井上図 4 でみたような、21M 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、個体別の cluster 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。

ジーンチップやマイクロアレイによる化学物質の生体応答予測は、WHO/OECD の 8 つのサブグループからなるシグナル別のコ

ンソーシウムや、米国学士院による学識経験者からなる化学物質の生体応答予測の向こう 10~20 年をロードマップとした現実的な課題として、将来が託されている。これは一方で、化学物質が 8 万とも 10 万種とも言われる多数に及ぶ傍ら、生体応答シグナルの方は、遺伝子で 2 万数千、パスウェイで数千の既知のネットワークからなる事から、後者の方からバイオマーカーとなりうる生体障害性のネットワークをスクリーニングして、化学物質安全のマネージメントに取り込んでゆこうとするものである。そうした視点から見て、本課題の成果は有用なものであったと考えられる。

(3) 消化管毒性

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。本研究で注目した 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(下図)。



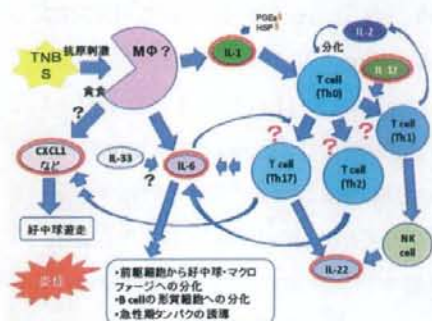
しかし今回の研究では DSS 誘起腸炎のフェノタイプにおいて野生型と ASK1 欠損動物の間に明瞭な差を見出すことができなかった。これは炎症性腸疾患に ASK1 の系が関与していないというよりも、病態の複雑さを示しており、DSS 腸炎の現在のアッセイ系ではこれを再現することができていないと考えられた。

今回網羅的遺伝子発現解析法を適用することにより、野生型と ASK1 欠損動物の間に、正常状態、DSS 障害初期両方において、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係していた。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、解決すべき問題として、この初期相の違いが、なぜ明瞭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性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。

今回の研究途上で見出された 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すでに報告されていたが、単にその現象が副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性的メカニズムを下図に示した。



(4) 胸腺毒性

免疫機能に影響を及ぼす薬剤を用いて、胸腺細胞の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、シグナル伝達系への影響をパターン化できた。感染時はさらに複雑化すると予想されるが、その制御に向けての端緒となる。

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。ステロイドの影響をどのような機能群でとらえることができるか遺伝子発現プロファイルのパターンの上から分類し、*in silico*での解析も加えて、細菌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。

(5) 骨毒性

今回の実験で使用した薬物 alprazolam が骨代謝に影響を及ぼすことを示唆する報告

は少数見られる。いずれも人における長期投与例で骨量の減少が認められたという単発的な報告にとどまり、これらの薬物が骨代謝にどのように影響を及ぼしているかについての詳細は全く不明である。

今回の動物実験では一部の薬物投与動物における骨折部位の仮骨形成亢進及び、ほとんどの薬物投与動物における皮質骨の肥厚反応が確認された(18年度、19年度)。さらに組織所見を詳細に検討した結果、外骨膜側の膜性骨化による肥厚に加え、内骨膜側には軟骨組織の添加による肥厚が認められた。このことは、alprazolam が軟骨内骨化及び膜性骨化にともに影響を及ぼすことが示唆され、また、骨折等の何らかの刺激に対して骨芽細胞のみならず軟骨細胞に強く影響を及ぼすことが示唆された。しかも、このような変化は骨折治療部位にのみ認められたので、成熟骨組織に存在する骨芽細胞、骨細胞、軟骨細胞及び破骨細胞には直接影響を及ぼすことはなく骨組織が形成され、成熟する過程でその増殖または分化・成熟に影響を及ぼしていることが考えられた。

現在注目されている leptin による骨芽細胞増殖調節機構は、骨芽細胞の分化には直接影響がないと考えられている(Cell 111, 305-317, 2002)。また、詳細は不明であるものの、軟骨内骨化をきたす海綿骨部位と膜性骨化をきたす皮質骨部位に leptin の影響による差はなく、leptin が骨組織全体に均等に影響を及ぼすことが疑われている(Nature Medicine 13, 1234-1240, 2007)。本研究で alprazolam の投与によっても大腿骨の骨芽

細胞の分化マーカーになんら変化が見られなかった(19年度)。また、マウス骨髄由来間葉系細胞に alprazolam を添加しても骨芽細胞の分化マーカーである osteocalcin, Runx2, ALPの発現に変化が見られなかったことから、alprazolam が骨芽細胞の分化には直接関与していないことが示唆された。

Alprazolam の投与によって仮骨形成が促進されるという今回の動物実験結果は、この薬物投与を受けた患者の骨量が減少するという人における過去の報告とは異なるが、人におけるこれまでの報告は骨折治癒や成長期の骨組織に関するものではなく、あくまでも成熟した骨組織への影響を見ているものであるため、本研究結果とは必ずしも矛盾しないと判断される。しかし、人においては通常1日3回経口投与されるこれらの薬物を、今回の動物実験では1日1回投与している点の違いが実験全体にどのような影響を及ぼしているか、投与期間の違いでどのような影響があるか等については今後検討する必要があると思われる。

GeneChip 解析の結果 alprazolam 投与によって骨組織で発現上昇する遺伝子の有力な候補として DMP1 が見いだされた。DMP1 はラット切歯の cDNA ライブラリーから見つかった酸性リン酸化細胞外マトリックス蛋白であり、この遺伝子のノックアウトマウスではくる病及び骨軟化症が発症し(Nature Genetics 38:1310, 2006)、かつ、DMP1 は遺伝性の低リン酸血症性くる病の原因遺伝子であることが判明している(Nature Genetics 38:1248)。ノックアウトマウスの骨組織では著明な類骨

の増加と石灰化障害、成長板軟骨の著明な増加、関節軟骨の肥大等くる病特有の所見が認められている。DMP1 は骨や歯の基質蛋白であり、類似した他のタンパク質、matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) や osteopontin 等とともに SIBLING (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein)と呼ばれている。このうち、DMP1 と MEPE は cathepsin B によって分解され、分解産物が体内のリン代謝の中心的な調節因子として働いている Phex や FGF23 の機能や発現を調節していることがわかっており、さらなる解析が期待されている。MEPE はリンの排泄を促進する作用があると考えられており、MEPE のノックアウトマウスは骨量が増加して、石灰化も亢進すると報告されている。一方、DMP1 の作用はノックアウトマウスの解析結果を考えると骨組織の石灰化機構に不可欠な因子であると思われる、MEPE との相互関係は明らかにされていないが、MEPE とは相反する作用を発揮していると考えられる。このことから、DMP1 の発現上昇は骨の石灰化や化骨に有利に働くことが疑われる。

本研究では alprazolam 投与により骨折部位の化骨の促進や軟骨組織の形成促進が認められたが、こうした組織反応にジーンチップ解析により検出された発現上昇遺伝子のひとつである DMP1 が関与している可能性は十分に考えられる。また、DMP1 は骨小腔内の骨細胞(osteocyte)で強く発現されることが知られているが、骨細胞で産生された DMP1 はそのまま骨基質として骨内に蓄えら

れ、これが破骨細胞による骨吸収で体液中に遊離してリン代謝に関与すると考えられる。我々は、このような基質蛋白が骨代謝調節に重要な影響を及ぼしていることから、人工のセラミックに蛋白を担持させ、組織反応を調べる実験系の確立も行った。新規に開発したカルシウム欠損型ハイドロキシアパタイト(HA)は骨内に移植すると骨形成を刺激するが(Biomaterials 29:2719-2728, 2008)、体液中の因子がHAに吸着することによって骨形成促進が起こる可能性が疑われる。このカルシウム欠損型 HA には酸性蛋白を選択的に吸着させる性質があり、体液中のどのような蛋白が吸着し、骨形成を促進するか現在検討中であるが、酸性基質蛋白で、かつHAに吸着性があるDMP1は有力候補の一つである。

Alprazolam 投与による化骨促進により創部は一過性に隆起するが、その後骨のリモデリングにより最終的には正常に治癒すると考えられる。従ってこの反応は、骨折部位の早期治癒には寄与しても何ら為害作用はないと思われ、本研究が DMP1 を介した骨代謝機構の解明に寄与する他、臨床的には骨折治癒促進薬の開発等にも役立つ重要な情報を提供していると考えられる。

(6) 遺伝子傷害性毒性

GeneChip を用いた網羅的解析より選択した45-6 遺伝子を用いて作製した TLDA を用いて、定量 RT-PCR 法による新規化合物セットのスクリーニングを行ったわけであるが、1 回目よりも 2 回目の検討の方がより良いデ

ータが得られた。本来は、1 回目のデータより判別のアルゴリズムを作成し、今年度の化合物セットにおいてその検証を試みる予定であったが、昨年度のデータに関してはサンプル調整上のばらつき等から、満足のいく評価アルゴリズムを設定することが難しかった。そこで、2 回目の検討においては、RNA 抽出および cDNA 合成を同じ研究室にて一貫して行った結果、データの質は向上し、評価アルゴリズムの作成に耐えうるデータが得られた。得られた発現データは、昨年検討と同様に、非遺伝子傷害性物質での動きも多く見られたことより、一見しては遺伝子傷害性の有無による判別は難しそうであったが、統計解析などの判別法を検討することにより、最終的に両者を判別可能なアルゴリズムを設定することができた。また、この判別には、用いた遺伝子のうち約半数の 25 遺伝子のデータで十分であることがわかった。また、スコアリングを行うことにより、遺伝子傷害性に関してある程度定量的な評価を行うことも可能であると期待できる。

今後は、選択した 25 遺伝子を使った定量的 RT-PCR 法により、遺伝子傷害性の判別が可能であることを実証してゆきたい。

【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】

1. 複数の実験にわたり同期して発現する遺伝子(発現同期遺伝子)群の抽出

現在の発現同期率計算式では、同時に評価する化合物暴露実験データが増えるほど、発現同期率を示す値が小さくなってしま

今後、複数の発現同期率計算結果を直接比較できるよう、計算式を改良する予定である。

また、開発した発現同期率計算結果の閲覧ソフトウェアは、同期率計算結果に応じて遺伝子情報や各化合物投与実験での発現パターン、更には同じクラスタに所属する他の遺伝子の情報などを簡単に検索・表示できるようになっているが、基本的にキャラクターベースの表示であり、同期率計算結果全体をより直感的に捉えられるようなグラフィカル表示の開発予定している。

2. エクソンアレイの性能評価

エクソンアレイを活用し、既知のみならず未知のスプライシングバリエーションの発現をも検出・定量するためには、Percellome 法の適用と数値化アルゴリズムの改良が必要である。

数値化アルゴリズムについては、基本的には4のデータ補正技術が応用できる見込みであるが、スプライシングバリエーションを考慮したプローブ選択アルゴリズムの新規開発が必須であり、予備検討を開始している。

3. 異なるプラットフォーム間のデータ相互変換

各プラットフォームでの性能評価において用量相関性の悪いプローブ(セット)についてはマイクロアレイのプローブ設計を変更しなければならないため、考察の対象外とする。各プラットフォームでの性能評価において用量相関性が良好なプローブ(セット)であるにも関わらず、プラットフォーム間でのデータ相互

変換の信頼性が低かったものは、変換パラメータを算出するための標準サンプルにおいて発現値が大きすぎて飽和しているか、小さすぎて測定値がきちんと得られていないかのいずれかが多かった。これらの問題は標準データを増やすことで解消可能と予測された。

4. マイクロアレイのデータ補正

現状では飽和補正やクロスハイブリダイゼーション補正は完全ではなく、直接、数値比較を行えるレベルに達していないが、現状においても、化合物クラスタリングなど、飽和現象等による誤差の影響を受けやすい解析の精度向上には有効であると考えている。

補正式の定数項を求めるにあたっては、基礎データが不足していることが判明しているので、補正精度をさらに向上させるためにLBM サンプルと同様の試料を複数種類用意し、定数項の取得数拡大を目指す。

5. 発現パターンの特徴抽出

RSort の開発・改良は極めて順調に進み、既に日常的な解析作業に活用され、網羅的な遺伝子発現解析の効率向上に役立っている。

今後は RSort 計算結果のデータベース化を推し進め、更なる解析効率の向上を目指す。

6. 発現パターンの時系列ソーティング

測定区間外へのデータ外挿によって生成した変動曲線方程式は微積分可能であるため、発現誘導やタンパク質合成のパターン

も推測可能であり、今後はアルゴリズムの改良を進めつつ、得られた推測式を利用して時系列シフトした発現パターンや推測された発現誘導因子パターン・タンパク質合成パターンを鋳型としてシグナルへの関与の可能性のある遺伝子の抽出を検討する。

5の RSort による遺伝子発現波の出現時間検出は簡便法であるものの、大量のデータを集積すれば遺伝子発現ネットワークの推定のための基礎データとなり得る。RSort 計算結果のデータベースの完成後、これを利用した遺伝子間の発現順序関係の抽出を計画している。

7. 遺伝子クラスタの意味抽出

MFGoViewer.exe の制作により、GoPlot 作図の前処理が大幅に効率化された。

MFGoMap や MFGoCloud はさらに改良を進め、遺伝子クラスタの意味把握の作業効率向上を目指す。

一連の研究・開発ではモデルとして GO を用いたが、遺伝子クラスタの意味抽出目的には情報量の不足が明白であった。今後は、Percellome データベースにおける化合物別の発現状況など、独自に遺伝子アノテーション情報を生成する他、既存の遺伝子アノテーション情報を収集・集積し、意味抽出に活用する計画である。

E. 結論

【①データベース生成研究】

データベースを拡充し、データ解析を進めた結果、慢性暴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。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。基盤研究では特に発生毒性において、催奇形性モデル物質を用いて、網羅的に遺伝子発現変動を解析した結果、新たな標的分子やシグナルカスケードを示唆する知見が得られたことから、発生毒性に向けた本手法の基本的な部分の整備が完了した。これらに加え、独自開発したインフォマティクス解析手法を活用し、蓄積したデータベースを詳細に解析し、化学物質によって生じる遺伝子発現カスケードを解明していく実地体制が整った。これにより、安全性評価に於けるトキシコゲノミクスの利用が従来以上に促進されると期待できる。

【②基盤研究】

(1)発生毒性

モデル催奇形性物質を妊娠マウスに投与した際の胚における、以上の遺伝子発現変動解析結果から、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。また、EBを用いた遺伝子発現変動解析も可能となった。EBは、より早期の胚の代替モデルとなり得ることからも、この系は有用な方法であるものと考えられた。今後は、システムバイオロジーの進捗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。この研究を通して、ヒトにおける発生毒性評価を、高精度で迅速に予測できることが期待される。