

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
「化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
—網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と毒性予測評価システム  
の実用化の為にインフォマティクス技術開発—」  
(H21-化学一般-001)  
分担研究報告書

既構築Percellomeデータベース解析  
—特定の分子標的を共有する化学物質群のデータと既知情報からの局所カスケードの描出—

研究分担者 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、分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、関連遺伝子発現ネットワーク描出の為にインフォマティクス開発を目的とする。本分担研究では、特定の分子標的を共有する化学物質群のデータと既知情報からの局所シグナルネットワークの描出することを目的とする。平成22年度は、ダイオキシン受容体（AhR）シグナルのネットワークの検証の為に、野生型マウスあるいはAhR欠失マウスに、AhRのリガンドである3-メチルコラントレンを単回経口投与し、経時的に得た肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを比較・解析することにより、AhR局所シグナルネットワークの描出をおこなった。

今年度（平成23年度）は、エストロゲン受容体 $\alpha$ （ER $\alpha$ ）シグナルのネットワークの検証のために、野生型マウスあるいはER $\alpha$ 欠失マウスに、ERのリガンドであるビスフェノールA（BPA）（0、30、100、300 mg/kg）あるいはエチニルエストラジオール（EE）（0、1、3、10  $\mu$ g/kg）を単回経口投与し、投与2、4、8及び24時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを比較・解析することにより、ER $\alpha$ 局所シグナルネットワークの描出をおこなった。野生型マウスとER $\alpha$ 欠失マウスに投与した場合との比較、及び*in silico*でのプロモーター解析から、ER $\alpha$ 局所シグナルネットワークに関係する遺伝子を抽出する事が出来、この中の多くのものは、新規のER $\alpha$ の標的遺伝子である事が示唆された。この中には、ヒストンアセチル化・ヒストンメチル化関連遺伝子（Anp32a遺伝子等）やRNAプロセッシング関連遺伝子が含まれていた。このBPA投与時に認められたER $\alpha$ 関連遺伝子の発現変動は、EE投与時では認められない場合もある事から、当該核内受容体に関する詳細な局所シグナルネットワークの描出には、*in silico*でのプロモーター解析、当該遺伝子欠失マウスを用いる手法に加えて、複数の当該受容体リガンド投与の比較・検討が有用である事が示唆された。

## A. 研究目的

本研究は、分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、関連遺伝子発現ネットワーク抽出の為のインフォマティクス開発を目的とする。今年度（平成23年度）は、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) シグナルのネットワークの検証をおこなった。そのために、野生型マウスあるいはER $\alpha$ 欠失マウスに、ERのリガンドであるビスフェノールA (BPA) (0、30、100、300 mg/kg) あるいはエチニルエストラジオール (EE) (0、1、3、10  $\mu$ g/kg) を単回経口投与 (4用量、16群構成、各群3匹) し、投与2、4、8、24時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを比較・解析した。

## B. 研究方法

試薬及び動物：

ビスフェノール A (Bisphenol A; 分子量: 228.29、CAS No.: 80-05-7、純度 99.7%、WAKO) あるいはエチニルエストラジオール (Ethinylestradiol; 分子量: 296.41、CAS No.: 57-63-6、純度 98%以上、Sigma-Aldrich) 血についてデータ解析を進めた。野生型マウスとして 12 週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウス (日本エスエルシー) を使用し、4 用量 (溶媒: 0.1%DMSO を含むコーンオイル) の BPA (0、30、100、300 mg/kg) あるいは EE (0、1、3、10  $\mu$ g/kg) を、金属ゾンデを用いて単回強制経口投与をおこない、経時的 (投与 2、4、8 及び 24 時間後) に肝を採取した。ER $\alpha$  欠失マウスは、Dr Chambon (INSERM, France) らのグループが作製した ER $\alpha$  欠失マウス (Development 127, 4277-4291 (2000)) を使用し、当研究所に

て自家繁殖させた後に、12 あるいは 13 週齢の雄性ホモ型マウスを実験に供した。自家繁殖の際、雄性ヘテロ型マウス 135 匹と雌性ヘテロ型マウス 180 匹との交配から、雄性ホモ型マウス 133 匹を得た。

BPA 投与 2 時間後の血清中 BPA 濃度：

各投与用量の BPA (0、30、100、300 mg/kg) (溶媒: 0.1%DMSO を含むコーンオイル) 投与 2 時間後の血清中 BPA 濃度を測定した (日本食品分析センターに依頼)。その結果、野生型マウスの場合では溶媒対照群では検出限界 (0.005  $\mu$ g/ml) 以下であったが、各投与用量 (30、100、300 mg/kg) ではそれぞれ、 $0.01\pm 0.01$ 、 $0.05\pm 0.02$ 、 $0.32\pm 0.03$  [ $\mu$ g/ml] (平均値 $\pm$ 標準偏差、n=3) と、用量依存的な増加が認められた。ER $\alpha$  欠失マウスの場合でも同様に溶媒対照群では検出限界 (0.005  $\mu$ g/ml) 以下であったが、各投与用量 (30、100、300 mg/kg) ではそれぞれ、 $0.01\pm 0.00$ 、 $0.05\pm 0.02$ 、 $0.49\pm 0.23$  [ $\mu$ g/ml] (平均値 $\pm$ 標準偏差、n=3) と、用量依存的な増加が認められた。

Total RNA の分離精製：

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晚浸漬し、RNase を不活化する。肝は 5mm 径の生検トレパンにより 3 ヶ所を各々別チューブに採取した。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10  $\mu$ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定

した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

#### GeneChip 解析：

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP、CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られた肝サンプルについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現データを、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。

#### (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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「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)」。

#### C. 研究結果及び考察

##### C-1：野生型マウスに BPA を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析：

野生型マウスに BPA を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動を解析したところ、解析発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 2,407 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 430 ps が見いだされた。

シグナルネットワークとして、ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化関連遺伝子及び、RNA プロセッシング関連遺伝子が見出された。また顕著に発現変動が認められた遺伝子として、Lipa 遺伝子 (リパーゼ)、プリン代謝に関係する Ampd2 遺伝子等が見いだされた。文献検索の結果、これらの遺伝子の殆どに ER との関連は認められなかった。

これらの BPA 誘発遺伝子のうち、ヒストンアセチル化酵素の抑制機能を有する Anp32a 遺伝子 (acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A) (Khan MZ et al., J Neuroimmune Pharmacol 1: 163-170, 2011) 及び、ヒストンメチル基転移酵素 Whsc1 (Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (human)) について、その発現

変化を図 1 に示す。尚、これらの図は下記のように、各遺伝子につき投与濃度、時間、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示した。具体的には、縦軸 (Z 軸) に絶対値化した (細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量と投与後経過時間を取り、各条件の n=3 の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差 (SD) 平面 (薄い色) を示す。溶媒群と投与群の間の有意差の検定を Student の t 検定によりおこない P 値が 0.05 未満の場合を有意と判定し、図中に黄色のアスタリスク ( ) を付した。

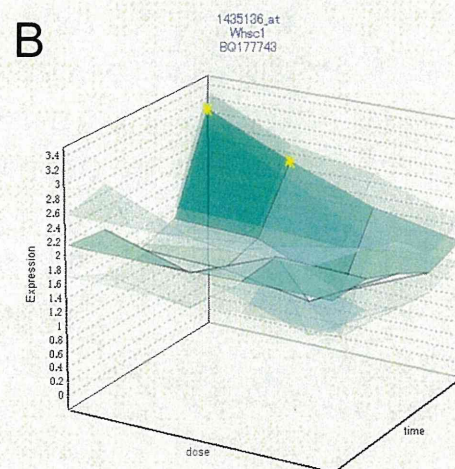
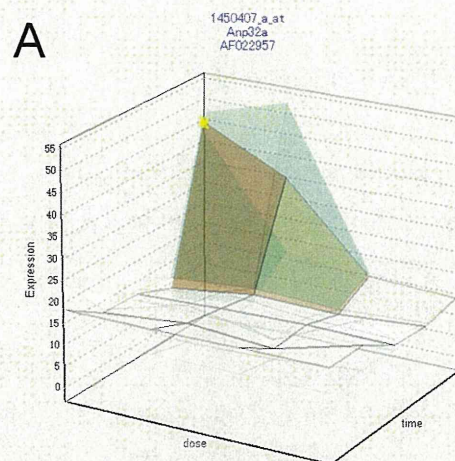


図 1 Anp32a (A) と Whsc1 (B) 遺伝子の遺伝子発現変動

他方、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に減少するものとして 1,142 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 70 ps が見いだされた。また ER $\alpha$  に関する遺伝子は見いだせなかった。



C-2: ER $\alpha$  欠失マウスに BPA を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析 :

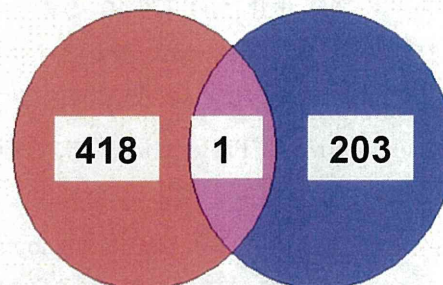
他方、ER $\alpha$  欠失マウスに BPA を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動を解析したところ、発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に増加するものとして 3,196 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 215 ps が見いだされた。特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

発現が有意 (t 検定での P 値 < 0.05) に減少するものとして 462 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして 6 ps が見いだされた。特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

C-3: BPA を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析の、野生型マウスの場合と ER $\alpha$  欠失マウスの場合との比較 :

BPA を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析について、上述した C-1、C-2 において得られた遺伝子リストを用いて、野生型マウスの場合と ER $\alpha$  欠失マウスの場合とを比較・検討した。結果を図 2 にベン図として示す。遺伝子リストは両者でかなり異なり、両者に共通して含まれていた遺伝子は、Dnajb9、Nfxl1、Dnaj1、Mat2a、Slc20a1 遺伝子など 12ps (増加: 10ps; 減少: 0ps) のみであった。

A: 発現増加分



B: 発現減少分

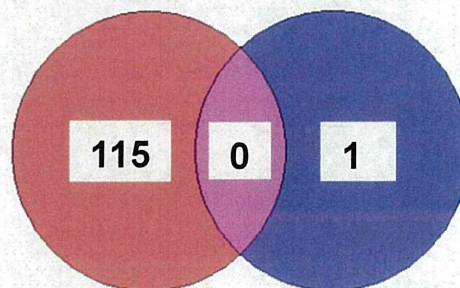


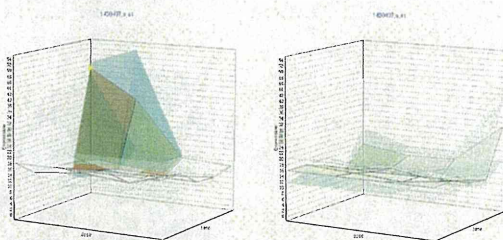
図 2 BPA を単回経口投与した際の肝において発現変動を示した遺伝子数について、野生型マウス (赤) と ER $\alpha$  欠失マウス用いた場合 (青) における比較 (A: 発現増加分、B: 発現減少分)



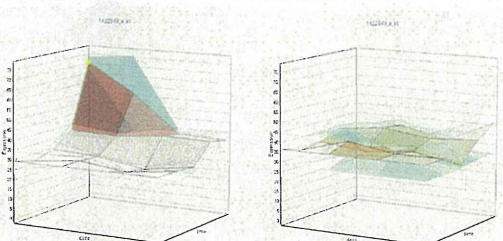
さらに精査したところ、89 ps が野生型マウスの場合のみで発現変動を示し、この中でも発現変動幅が顕著な遺伝子として、ヒストンアセチル化・メチル化関連遺伝子であり図 1 に示した Anp32a 及び Whsc1 遺伝子、RNA プロセッシング関連遺伝子である Nfic、Pabpn1 及び Prpf6 遺伝子、また Lipa、Ampd2 遺伝子等 14ps が見いだされた。

この中で、例として Anp32a、Pabpn1、Lipa 及び Ampd2 遺伝子について、野生型マウスと ER $\alpha$  欠失マウスで比較したものを図 3 に示す。

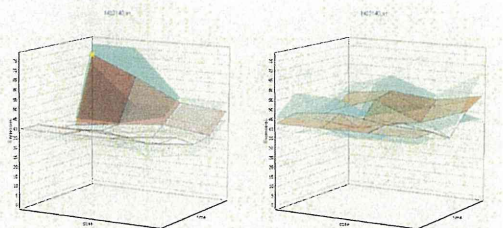
### A: Anp32a



### B: Pabpn1



### C: Lipa



### D: Ampd2

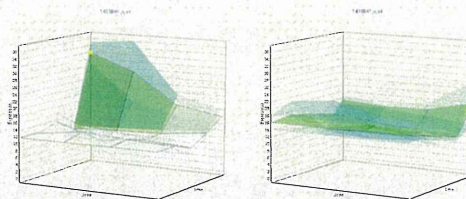


図 3 野生型マウス (左) と ER $\alpha$  欠失マウス (右) での Anp32a (A)、Pabpn1 (B)、Lipa (C)、Ampd2 (D) 遺伝子の発現変動の比較

両者共に発現量の軸を同一縮尺とした。

この野生型マウスの場合のみで発現変動を示した 89 ps のうち、特に発現変動が顕著であった 14ps について、ER との反応性が既知か否かについて文献検索したところ、Nfic 遺伝子以外はエストロゲンとの関連は未報告であり、少なくともこれらの遺伝子は、新規の ER $\alpha$  の標的遺伝子である事が示唆された。

これらの遺伝子が ER $\alpha$  の標的遺伝子であるならば、各遺伝子の転写開始点上流域に ER 結合配列が見いだせるはずである。そこで 89ps のうち発現変動の差が著しい 35 遺伝子について *in silico* のプロモーター解析を検討した (市販ソフト Genomatix を使用)。その結果、35 遺伝子中 20 遺伝子に ER 結合部位が見いだされた。したがって、少なくともこれらの遺伝子については ER $\alpha$  の標的遺伝子であるものとする。ER 結合配列が見いだされなかった 15 遺伝子については、ER $\alpha$  欠失マウスの場合との比較解析結果から、これらの発現制御は ER $\alpha$  に依存することが示唆されたため、ER $\alpha$  が他の転写因子

と相互作用し、その転写因子結合部位を介して発現制御を受ける機序が存在する可能性が示唆された。他方、35 遺伝子全てに共通する転写因子結合配列として E2F 結合配列が、34 遺伝子に共通して見出されたものとして 5 種類 (E2F、CTC、ETS、KLF、SP1) の結合配列が見いだされた。転写開始点上流域に ER 結合配列が見いだされなかった遺伝子の発現制御は、これらの結合部位を有する転写因子と ER $\alpha$  との相互作用を介している可能性が示唆された。

したがって、野生型マウスの場合でのみに発現変動が認められた遺伝子は ER $\alpha$  シグナルネットワークに関連する遺伝子であり、この中には転写上流域に ER 結合部位を有する遺伝子が含まれ、また新規の ER $\alpha$  の標的遺伝子が含まれている事、野生型及び ER $\alpha$  欠失マウス、双方において発現変動が認められた遺伝子は ER $\alpha$  シグナルとは関連しない遺伝子であると考えられた。

#### C-4: EE を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析

EE を野生型マウスに投与した場合、発現が有意 (t 検定での P 値 $<0.05$ ) に変動するものとして増加が 1,409 ps、減少が 949 ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして増加分が 268 ps、減少分が 15 ps 見いだされた。現時点ではいずれの場合でも特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。他方、ER $\alpha$  欠失マウスに投与した場合、発現が有意 (t 検定での P 値 $<0.05$ ) に変動するものとして増加が 957ps、減少が 830ps、このうち目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして増加分が 135 ps、減少分

が 21 ps、見いだされた。現時点では特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

得られた遺伝子リストを用いて、EE を単回経口投与した際の肝における遺伝子発現変動解析について、野生型マウスの場合と ER $\alpha$  欠失マウスの場合とを比較・検討した。その結果、野生型マウスの場合でのみ発現変動が認められた遺伝子数は、増加分が 265ps、減少分は 15ps であった。したがってこれらの遺伝子は ER $\alpha$  シグナルネットワークに関連する遺伝子であることが示唆された。また野生型マウスの場合と ER $\alpha$  欠失マウス、双方にて発現変動が認められた遺伝子数は、増加分が 3 ps (Cox8c、Ddx5 遺伝子等)、減少分は認められなかった。他方、ER $\alpha$  欠失マウスの場合でのみ、発現変動が認められた遺伝子数は、増加分が 132 ps、減少分は 21 ps であった。

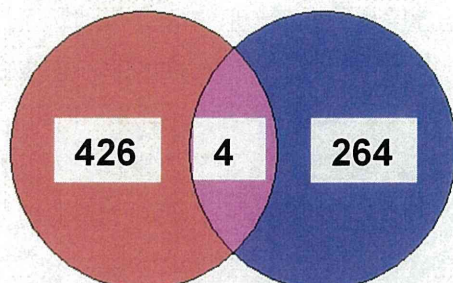
#### C-5: BPA 投与の場合と EE 投与の場合との比較 :

野生型マウス肝における発現変動が認められた遺伝子数を、BPA 投与の場合と EE 投与の場合とで比較した。その結果、図 4 としてベン図として示す。

両化合物共に ER に対するリガンドであるが、遺伝子リストは両者でかなり異なり、両者に共通して含まれていた遺伝子は、発現増加する Egl3、Fubp1 遺伝子など 4ps のみであった。



### A:発現増加分



### B:発現減少分

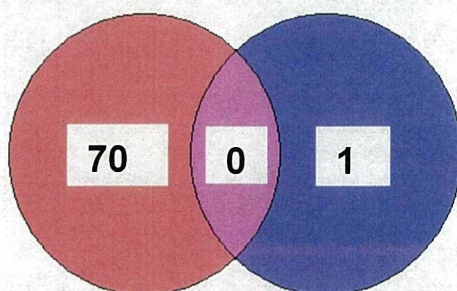


図4 BPAあるいはEEを野生型マウスに、単回経口投与した際の肝において発現変動を示した遺伝子数について、BPA投与の場合(赤)とEE投与の場合(青)における比較(A:発現増加分、B:発現減少分)

この結果から、当該核内受容体に関する詳細な局所シグナルネットワークの描出には、当該遺伝子欠失マウスを用いる手法に加えて、複数の当該受容体リガンド投与の場合を比較する事が有用であることが示唆

された。

続いて、上記 C-3 にて記載した、野生型マウス肝のみで発現変動が顕著に認められた遺伝子について、これらの発現変動はEE投与時でも認められるか否か、すなわち、BPA投与時に特異的か否かを検討する為に、これらの遺伝子の発現変動をEE投与の場合との比較・検討した。その結果、Anp32a、Whsc1、Pabpn1、Lipa、Ampd2、Wdr53 遺伝子等多くのもので、EE投与の場合には発現変動が顕著に認められなかった。この事からも、詳細な当該核内受容体局所シグナルネットワークの描出には、当該遺伝子欠失マウスを用いる手法に加えて、複数の当該受容体リガンド投与の場合を比較する事が有用であることが示唆された。これらの遺伝子のうち、Anp32a 遺伝子の場合の発現変動を図5に示す。

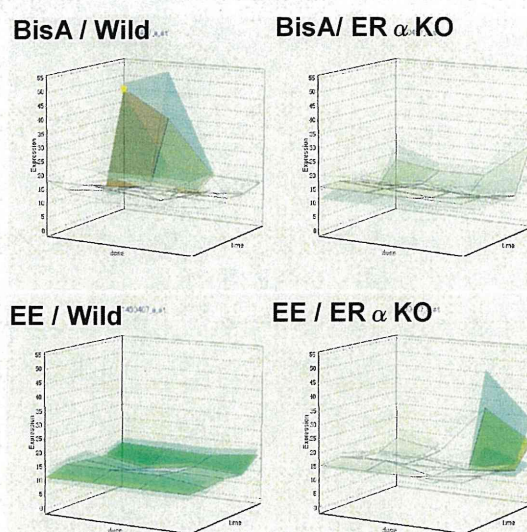


図5 野生型マウス(左)とER $\alpha$ 欠失マウス(右)での、BPA投与の場合(上段)及びEE投与の場合(下段)のAnp32a遺伝子の発現変動の比較

全ての発現量の軸を同一縮尺とした。



## D. 結論

本研究は、分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、関連遺伝子発現ネットワーク描出の為にインフォマティクス開発を目的とした。本分担研究では、特定の分子標的を共有する化学物質群のデータと既知情報からの局所カスケードの描出することを目的とした。

エストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) シグナルのネットワークの検証の為に、野生型マウスあるいは ER $\alpha$  欠失マウスに、ER のリガンドであるビスフェノール A (BPA) あるいはエチニルエストラジオール (EE) を単回経口投与し、投与 2、4、8、24 時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを比較・解析した。BPA を野生型マウスに単回投与した際、発現が増加するシグナルネットワークとして、ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化関連遺伝子及び、RNA プロセッシング関連遺伝子を見いだした。また、Lipa 遺伝子 (リパーゼ)、プリン代謝に関係する Ampd2 遺伝子等が見いだされた。ER $\alpha$  欠失マウスに単回投与した場合の遺伝子発現変動の解析結果と比較した結果、これらの遺伝子が ER $\alpha$  シグナルネットワーク関連遺伝子であることが明らかとなった。これらは、Nfic 遺伝子以外はエストロゲンとの関連は未報告であった。依って、ヒストンアセチル化関連遺伝子 Anp32a 及びヒストンメチル化関連遺伝子 Whsc1 を含むこれらは新規の ER $\alpha$  の標的遺伝子である事が示唆された。これらのうち発現変動の差が著しい 35 遺伝子について *in silico* のプロモーター解析を検討し 20 遺伝子に ER 結合部位が見いだされた。ER 結合配列が見いだされなかった 15 遺伝子については、ER $\alpha$  欠失

マウスの場合との比較解析結果から、これらの発現制御は ER $\alpha$  に依存することが示唆されたため、ER $\alpha$  が他の転写因子と相互作用し、その転写因子結合部位を介して発現制御を受ける機序が存在する可能性が示唆された。BPA についても同様の検討の結果を、EE 投与の場合との比較・検討し、Anp32a、Whsc1、Pabpn1、Lipa、Ampd2、Wdr53 遺伝子等多くのものが、BPA に特異的の局所シグナルネットワークの構成員である可能性が示唆された。

以上の検討結果から、野生型マウスと ER $\alpha$  欠失マウスの比較、及び *in silico* でのプロモーター解析の組み合わせから、ER $\alpha$  局所、及びリガンド特異的なシグナルネットワーク遺伝子を抽出する事が可能であることがある事が示された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Yuhji Taquahashi, Noriko Moriyama, Eriko Ikeno, Nae Matsuda, Yumiko Saga, Bruce Blumberg, and Jun Kanno, Development of Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain sequence. J Toxicol Sci. 2012, Vol.37, No.2, 373-380.

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S., GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. Nature. 2011 Nov 27.

- 480 (7378) 557-560, doi: 10.1038/nature10656.
- Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N., Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells., *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 26;412 (2) :366-72.
- Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S., PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B., *Nat Cell Biol.* 2011 Jun;13 (6) :668-75.
- Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno,15 STANDARDIZATION OF GENE-EXPRESSION INFORMATION FOR THE SAFETY EVALUATION: ACTIVITIES IN JAPAN Applications of Toxicogenomics in Safety Evaluation and Risk Assessment, 2011 323-329, Darrell R. Boverhof (Editor) , B. Bhaskar Gollapudi (Editor) , John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-44982-0
- J. Kanno, K. Aisaki, K. Igarashi, N. Nakatsu, Y. Kodama, K. Sekita, A. Takagi and S. Kitajima, Chapter11 Application of Percellome Toxicogenomics to Food Safety, Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food, 2011, 184-198, Editor (s) : Ingemar Pongratz, Linda Bergander, Royal Society of Chemistry, ISBN: 978-1-84973-297-0, DOI:10.1039/9781849732970-00184
- Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus., *Biol Reprod.* 2011 Apr;84 (4) :734-42.
- 菅野純 : Percellome トキシコゲノミクスの進捗 医学のあゆみ, 236 (12), 1125-1126 (2011)
2. 学会発表
- Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain." the 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2012.3.15) San Francisco, USA
- 菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、第34回日本高血圧学会総会 SHR 学会合同シンポジウム (2011.10.22) (宇都宮)、口演
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi. Kitajima, Percellome Toxicogenomics Project and its application to the studies on anticancer agents., 47th Congress of the European Societies of Toxicology, (2011.8.30) (Paris, France) , poster
- 相崎健一、五十嵐勝秀、種村健太郎、安彦行人、高橋祐次、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純、Percellome プロジェクト・オンライン解析システム、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7.13) (横浜)、

ポスター

菅野 純、イントロダクション：コリンエステラーゼ阻害物質による遅発性の中枢神経毒性—サリンの臨床から学ぶ動物モデルの機構解析—、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会（2011.7.13）（横浜）、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、中枢神経系の発生-発達期における神経活動かく乱による遅発性中枢影響解析—幼若期雄マウスへのアセフェートによる成熟後の脳高次機能障害について—、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会（2011.7.13）（横浜）、口演

北嶋 聡、小川幸男、長野嘉介、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、安彦行人、山本雅也、菅野 純、Percellome 法によるシックハウス症候群レベルの極低濃度暴露下での吸入トキシコゲノミクス、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会（2011.7.13）（横浜）、口演

五十嵐勝秀、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純、ヒト型 PXR 生理的発現マウス系の全身臓器トランスクリプトーム解析、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会（2011.7.13）（横浜）、口演

菅野 純、Percellome 解析：時間軸と用量軸の融合と絶対値による解析精度の向上、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会（2011.7.12）（横浜）、口演

菅野 純、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、種村健太郎、ヒト型リガンド結合ドメインノックイン PXR マウスの遺伝子発現応答特性、第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー（2011.7.8）（仙台）、ポスター

種村健太郎、五十嵐勝秀、佐藤英明、菅野 純、

発生・発達期のビスフェノール A 暴露による遅発中枢影響解析、第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー（2011.7.8）（仙台）、ポスター

菅野 純、Percellome Toxicogenomics Project の進捗と Chemical Biology としての毒性学、JSBi 応用システムバイオロジー研究会第 3 回応用システムバイオロジー研究会（2011.6.27）（福岡）、口演

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its application to studies on anticancer agents., the 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. ( 2011.3.8 ) (Washington D.C., USA) , poster

F. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

- (1) 特許出願(特願 2010-294175) 2010 年 12 月 28 日（審査請求 2011 年 1 月 7 日）「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



2012年2月9日(木)14:30~17:30  
東京国際フォーラム G503室

平成23年度厚生労働科学研究補助金 化学物質リスク研究事業  
化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
—網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発—

既構築Percellomeデータベース解析  
—特定の分子標的を共有する化学物質群のトキシコ  
ゲノミクスデータとそれらの標的の既知情報からの  
局所カスケードの描出—

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

## 目 的

分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階として、  
関連遺伝子発現ネットワーク描出の為にインフォマティクス開発を目的とする

今年度(平成23年度):

エストロゲン $\alpha$ 受容体(ER $\alpha$ )シグナルのネットワークの検証

・ER $\alpha$ 欠失マウスにERのリガンドであるビスフェノールA(BPA)(0, 30, 100, 300 mg/kg)を単回経口投与(4用量、16群構成、各群3匹)し、投与2、4、8、24時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを解析

・あわせて、ER $\alpha$ 欠失マウスにERのリガンドであるエチルエストラジオール(EE)(0, 1, 3, 10  $\mu$ g/kg)を単回経口投与(4用量、16群構成、各群3匹)した場合との比較解析

比較

ER $\alpha$ 欠失マウス ⇔ 野生型マウス [C57BL/6]

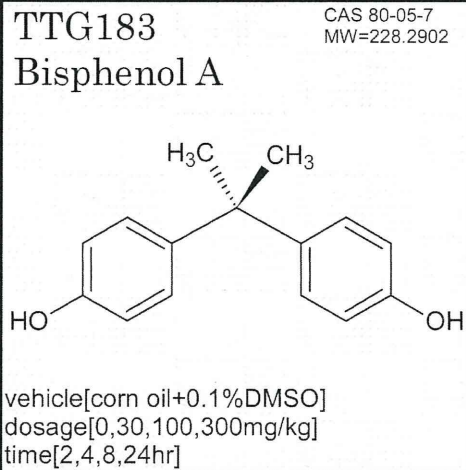
## ビスフェノールA [BisphenolA]

[300, 100, 30, 0 mg/kg]

・ポリカーボネート製のプラスチックを製造する際のモノマーや、エポキシ樹脂の原料として利用。  
・抗酸化剤、あるいは重合阻止剤としてポリ塩化ビニルの可塑剤に添加される。  
→これらの合成樹脂からの溶出が報告されている

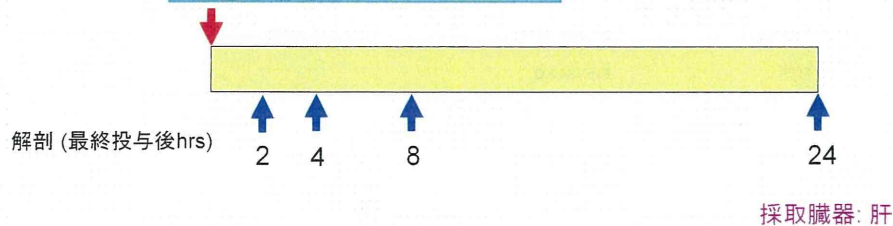
エストロゲン受容体と反応しエストロゲン様作用を有する。  
→内分泌攪乱化学物質としての懸念されている

2つのフェノール基を持つ芳香族化合物



## ビスフェノールA(BPA)単回経口投与時の肝における網羅的遺伝子発現変動解析

単回強制経口投与  
V:コーンオイル(+0.1%DMSO)  
L: 30 mg/kg  
M: 100 mg/kg  
H: 300 mg/kg



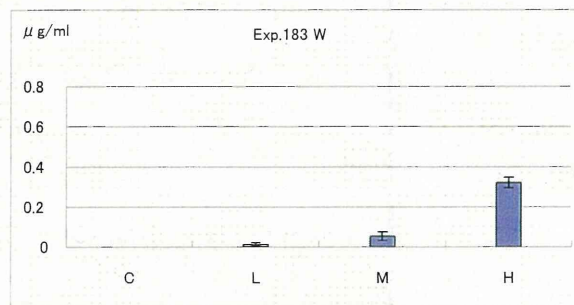
比較

ER $\alpha$  欠失マウス ⇔ 野生型マウス [C57BL/6]

TTG183 Bisphenol A / **野生型**  
 経口投与2時間後 血清中BPA濃度

群	dose(mg/kg)	血清中濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	SD
C	0	0 [検出限界以下]	
L	30	0.01	0.008326664
M	100	0.05	0.021702534
H	300	0.32	0.026457513

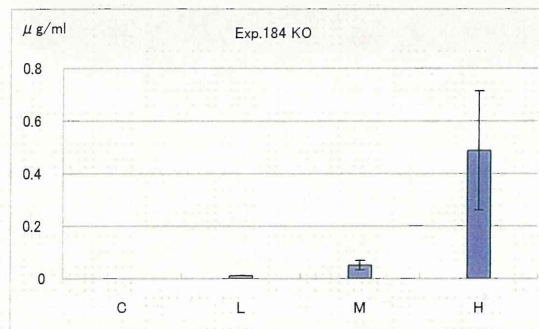
定量下限: 0.005  $\mu\text{g/ml}$



TTG184 Bisphenol A / **ER $\alpha$  KO (DrChambon) ホモ型**  
 経口投与2時間後血清中BPA濃度

群	dose(mg/kg)	血清中濃度( $\mu\text{g/ml}$ )	SD
C	0	0 [検出限界以下]	
L	30	0.01	0.001154701
M	100	0.05	0.017953644
H	300	0.49	0.226789183

定量下限: 0.005  $\mu\text{g/ml}$

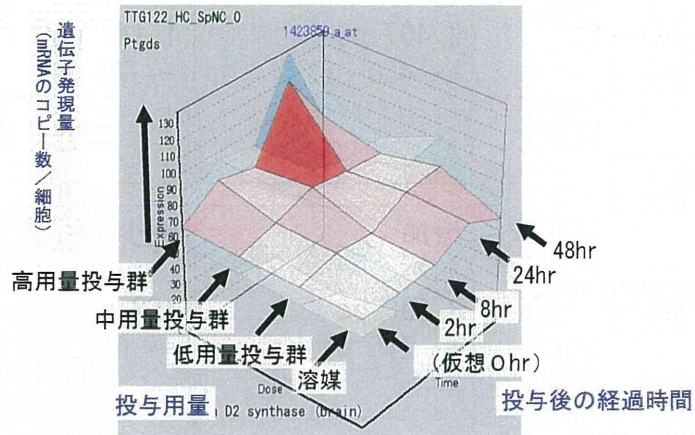




## 遺伝子発現変動解析実験 表示例

C57BL/6マウス (♂) (各点n=3、計48匹)

濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元グラフ  
あわせて、各平面の上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)を示す



Ptgds  
prostaglandin D2 synthase (brain)

## RSortによる解析:

各遺伝子(probe set: ps)につき、用量、経時変化及び発現コピー数を各軸とした3次元グラフにおいて、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全てのpsを生物学的に有意な順に並び替える、独自に開発したソフト

RSort条件:  
More than 3  
Max Gr No 3  
And evaluate 1  
P<0.05  
Subt Y= 0  
(Hor, Ver)

## RSort解析 BPA 肝

### 野生型マウスとER $\alpha$ 欠失マウスとの比較

有意 (P<0.05) に増加および減少したPS数と、目視により生物学的変化と示唆されたPS数 (→)

野生型マウス	増加	減少
	2,407 ps → 430 ps	1,142 ps → 70 ps
ER $\alpha$ 欠失マウス	増加	減少
	3,196 ps → 215 ps	462 ps → 6 ps

## ビスフェノールA投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析

### 野生型マウス

#### 増加

- ・生物学的に発現増加が示唆されたもの: 430 ps
- ・現時点で見いだされたシグナルネットワーク:
  - A) ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化関連遺伝子
    - ヒストンアセチル化酵素の抑制機能を有するAnp32aの顕著な発現増加 [24時間後]
  - B) RNA processing関連遺伝子  
キャップ形成やスプライシングなどmRNAの転写後加工過程
  - C) その他、リパーゼ(Lipa)、プリン代謝(AMP→IMP)(Ampd2)、Cyr61

#### 減少

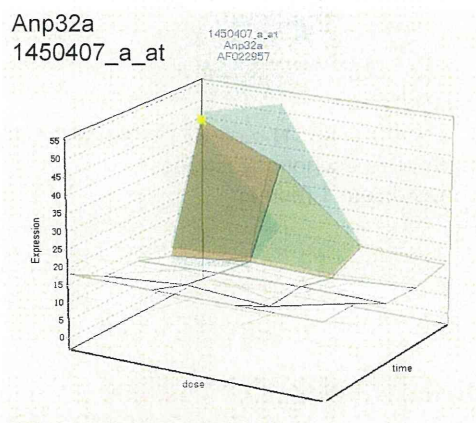
- ・生物学的に発現減少が示唆されたもの: 70 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

BPA投与時の  
肝における網羅的遺伝子発現変動解析

野生型マウス肝での発現増加した遺伝子

発現変化を3次元表示 例

BPA経口投与時の野生型マウス肝における、  
ヒストンアセチル化酵素の抑制機能を有するAnp32a遺伝子の顕著な発現増加



acidic (leucine-rich) nuclear  
phosphoprotein 32 family, member A

他のヒストンアセチル化関連遺伝子の発現変動は？

→MF Surfaceでannotationのところ Otherとし Histone入力し変動を観測



ヒストンアセチル化酵素の抑制機能を有するAnp32a遺伝子

OMIMには記載がない

J Neuroimmune Pharmacol. 2011 Mar;6(1):163-70. Epub 2010 Jul 9.

**CXCL12-mediated regulation of ANP32A/Lanp, a component of the inhibitor of histone acetyltransferase (INHAT) complex, in cortical neurons.**

Khan MZ, Vaidya A, Meucci O.

**Source**

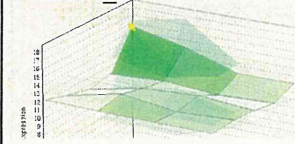
Department of Pharmacology and Physiology, Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA 19102, USA.

**Abstract**

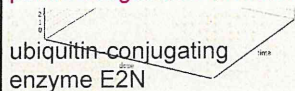
The chemokine receptor CXCR4 and its endogenous ligand, CXCL12, are involved in development and homeostasis of the central nervous system and in the neuropathology of various neuroinflammatory/infectious disorders, including neuroAIDS. Our previous studies have shown that CXCR4 regulates cell cycle proteins that affect neuronal survival, such as the retinoblastoma protein, Rb. These studies also suggested that Rb-mediated gene repression might be involved in the neuronal protection against NMDA excitotoxicity conferred by stimulation of the CXCL12/CXCR4 axis. In order to further test this hypothesis, we focused on the potential interaction of Rb with another protein implicated in regulation of gene expression, **leucine-rich acidic nuclear protein (Lanp), also known as ANP32A/pp32/PHAP1. Lanp is a critical member of the protein complex inhibitor of histone acetyltransferase (INHAT), which prevents histone tail's acetylation, thus leading to transcriptional repression.** Our data show that, in primary rat cortical neurons cultured for up to 30 days, Lanp is predominantly localized into the nucleus throughout the culture period, in line with in vivo evidence. Moreover, co-immunoprecipitation experiments show that endogenous Lanp interacts with Rb in neurons. Stimulation of CXCR4 by its endogenous ligand, CXCL12, increased Lanp protein levels in these neurons. Importantly, the effect of CXCL12 was preserved after exposure of neurons to NMDA. Finally, overexpression of exogenous Lanp in the neurons protects them from excitotoxicity. Overall, these findings suggest that Lanp can interact with Rb in both young and mature neurons and is implicated in the regulation of neuronal survival by CXCL12/CXCR4.

Ube2n

1422559\_at



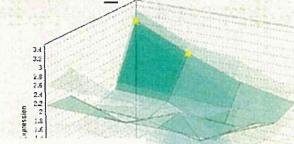
positive regulation of histone modification



ubiquitin-conjugating enzyme E2N

Whsc1

1435136\_at



histone-lysine N-methyltransferase activity

Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (human)

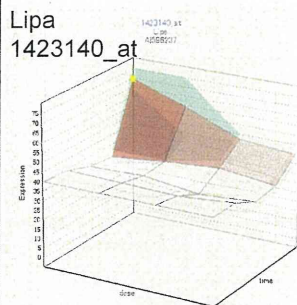
ヒストンアセチル化酵素関連だけでなく、  
ヒストンメチル化酵素関連遺伝子の発現増加が認められた

BPA経口投与時の野生型マウス肝における、  
RNA processingに関連する遺伝子の発現増加

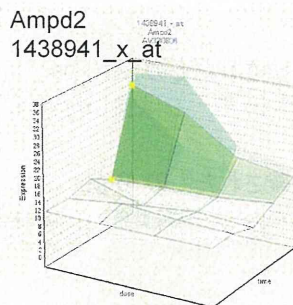
MF Surfaceでannotationのところ Otherとし RNA processingと入力し変動を観測

RNA processing関連の遺伝子発現増加

BPA経口投与時の野生型マウス肝において  
顕著な発現増加を示したその他の遺伝子

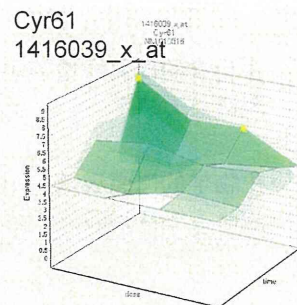


lysosomal acid lipase A



adenosine monophosphate  
deaminase 2 (isoform L)

プリン代謝 (AMP→IMP)



cysteine rich protein 61

## まとめ1

### ビスフェノールA投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析

#### 野生型マウス

##### 増加

- ・生物学的に発現増加が示唆されたもの: 430 ps
  - ・現時点で見いだされたシグナルネットワーク:
    - A) ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化関連遺伝子
      - ヒストンアセチル化酵素の抑制機能を有するAnp32aの顕著な発現増加 [24時間後]
    - B) RNA processing関連遺伝子
      - キャップ形成やスプライシングなどmRNAの転写後加工過程
    - C) その他、リパーゼ(Lipa)、プリン代謝(AMP→IMP)(Ampd2)、Cyr61
- ヒストンのアセチル化、メチル化を介する発現制御及びmRNAの転写後加工過程が活性化される事が示唆された  
→ 標的遺伝子の特定までには至っていない(投与24時間後以降の観測の必要性)

##### 減少

- ・生物学的に発現減少が示唆されたもの: 70 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。

この反応がER $\alpha$ を介するか否かの検討を含め、  
ER $\alpha$ 欠失マウスに投与した場合との比較解析へ

### ビスフェノールA投与時の 肝における網羅的遺伝子発現変動解析

#### ER $\alpha$ 欠失マウス

- ・生物学的に発現増加が示唆されたもの: 215 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。
  
- ・生物学的に発現減少が示唆されたもの: 6 ps
- ・現時点で特定のシグナルネットワークは見いだせなかった。