

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

(分担研究者) 研究報告書

「経気道曝露モデルに対応した化学物質のヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響」

分担研究者 慶長直人 国立国際医療研究センター研究所 呼吸器疾患研究部 部長

研究協力者 松下育美、土方美奈子 同研究部

研究要旨 化学物質の吸入曝露は、人体に有害な影響を与える場合があることが知られているが、そのメカニズムは十分に明らかにされていない。病態モデル系を確立することはシックハウス症候群の対策上、重要と考えられる。ヒトの肺は外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が惹起される可能性がある。我々はこれまで各種ヒト気道上皮細胞株を用いて、細菌性リポ多糖ないし poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を検討してきた。最も正常の気道細胞に近いといわれる BEAS2B 細胞株を用い、poly I:C (10 µg/ml) 存在下で 24 時間刺激後、ホルムアルデヒド(10 µM) を 3 時間添加することにより、IL-8 mRNA 発現量が有意に増強すること、ホルムアルデヒド添加により JNK のリン酸化が亢進することを報告した。本年度はさらにその機序に迫るため、IL-8 遺伝子発現に関わるとされる p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要なシグナル伝達系に対する各種阻害剤の効果を検討し、改めて polyI:C による IL-8 遺伝子発現がそれら3つの主要なシグナル伝達系に依存していること、特に JNK 系がホルムアルデヒドによる IL-8 遺伝子増強効果に関わっている可能性を示した。

A. 研究目的

ヒトの肺は常に、外界の吸入粉塵や微生物に常に曝されており、吸入化学物質が加わった場合、相乗的に気道系の炎症が誘発される可能性がある。揮発性有毒物質であるホルムアルデヒドの曝露により、気道上皮細胞系の炎症応答が増強される可能性が知られているため、我々はこれまで、ヒト気道上皮細胞株 BEAS2B を用いて、ウイルス曝露を念頭に置いた poly I:C の低濃度刺激下での炎症応答に対する、ホルムアルデヒド添加による *in vitro* での影響を定量 RT-PCR で検出する系を確立し、培養上清中のサイトカイン、ケモカイン類を ELISA にて測定してきた。

さらにシグナル伝達に関するタンパクのリン酸化について検討を行ない、ホルムアルデヒドがシグナル伝達分子の活性化に影響を与える可能性を示してきた。

本年度は、特に、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系で、ホルムアルデヒドによる IL-8

mRNA 発現増強効果に関連して、さらにその機序に迫るため、IL-8 遺伝子発現に関わるとされる p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要なシグナル伝達系に対する各種阻害剤の効果を検討した。

B. 研究方法

B. 研究方法

「刺激物質」

外来性吸入粉塵や微生物を代表する物質として、作用機作がよく検討されており、構造の単純な Poly I:C を刺激物質として選択した。自然免疫系が病原体(特にウイルス)を認識する際のレセプターの agonist として知られている。

「細胞」

ヒト気道上皮細胞株の中で、最も、正常の細胞に近い応答性を維持している安定した株化細胞として、BEAS2B を用い、予備実験を行っている。

「培養および刺激」

BEAS2B 細胞株は、25cm² フラスコで培養し (5 × 10⁵ cells / flask)、90% confluent で、Poly I:C (10 μg/ml) 存在下、24 時間後にホルムアルデヒド (10 μM) を添加 3 時間後に細胞を回収した。

「遺伝子発現解析の RT-PCR」

細胞から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を実施した。発現遺伝子 IL-8、RANTES などの mRNA 発現レベルを測定した。

「シグナル伝達分子リン酸化検出のための western blotting」

培養・刺激後の細胞を、脱リン酸化阻害剤を添加した Lysis Buffer に溶解し、サンプルとした。サンプルを限外ろ過にて濃縮後、20 μg を SDS sample buffer に溶解、200V、50~60 分電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、引き続き polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に 20%メタノール含有の blotting buffer にて 160 mA、35 分で転写した。転写膜を 5% skim milk/TBS-T (1 × TBS、0.1% Tween-20) で室温、1 時間ブロッキング後、各々推奨希釈濃度に 5% BSA/TBS-T にて希釈したリン酸化タンパク質特異的的一次抗体 (p38MAPK, ERK1/2 及び JNK) とともに 4℃、一晩振盪した。次に、PVDF 膜を洗浄後、HRP 標識二次抗体を含む 5% BSA/TBS-T 中で室温、1 時間インキュベートした。検出は、化学発光 (ECL plus もしくは ECL Advance) により、CCD カメラにて画像取得後、Quantity One ソフトウェアを用いて解析を行った。

「IL-8 遺伝子シグナル伝達系に関する阻害剤の添加実験」

BEAS2B 細胞株を培養、Poly I:C (10 μg/ml) 存在下、24 時間刺激後に、シグナル伝達分子 p38MAPK, ERK1/2 及び JNK 各々の阻

害剤 SB203580, U0126 及び SP600125 (各 10 μM) を添加して 1 時間プレインキュベートした。その後、ホルムアルデヒド (10 μM) を加え、一定時間後 (リン酸化検出用には、0, 15, 30min 後、mRNA 発現は 3 時間後) に細胞を回収し、解析した。

(倫理面への配慮)

個人に由来するヒト検体を用いておらず、公に入手される細胞株のみを用いている。

C. 研究結果

「IL-8 遺伝子発現に関わるシグナル伝達系の同定」

IL-8 の遺伝子発現に関わると考えられる細胞内シグナル伝達系として、p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要な経路が報告されている。これまでの検討により、いずれの系も poly IC により、リン酸化が誘導されることを示してきたが、これらのシグナル伝達系が我々の《poly I:C ⇒ ホルムアルデヒド》の刺激応答系で、IL-8 遺伝子発現に直接の影響を及ぼしているかどうかは不明であった。そこで、本実験では、IL-8 遺伝子発現に対する p38MAPK, ERK1/2 及び JNK 阻害剤の効果を検討した。

予想通り、どの阻害剤においても、IL-8 mRNA の発現の抑制が観察されたが、特に p38MAPK, ERK1/2 の阻害剤の効果は大きく、JNK の阻害剤の効果は部分的であったが認められた (省略)。

一方、阻害剤によるシグナル伝達分子のリン酸化阻害効果は、特に ERK1/2 で著明に認められた (図1) が、JNK では部分的であった (図2)。

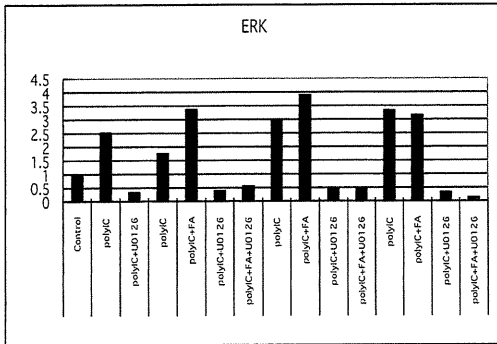


図1 各刺激下での細胞内シグナル伝達分子リン酸化に対する阻害剤の影響 (ERK1/2)

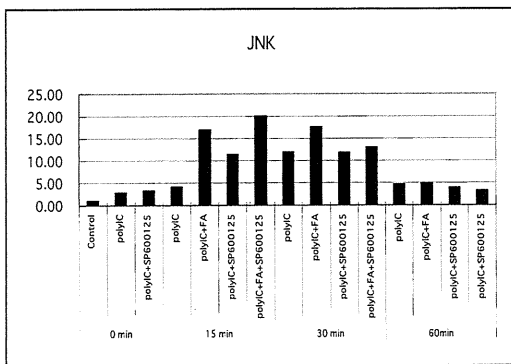


図2 各刺激下での細胞内シグナル伝達分子リン酸化に対する阻害剤の影響 (JNK)

ホルムアルデヒドによる増強効果が観察された JNK の系をさらに検討するため、poly I:C による刺激 24 時間後に、JNK 阻害剤をさらに高濃度(2, 10, 20 μ M)添加して、その後ホルムアルデヒドを加えて、3 時間後に細胞を回収、阻害剤による IL-8 mRNA の発現を検討したところ、IL-8 の遺伝子発現は、阻害剤の濃度依存的に減少したが、やはり高濃度でも抑制効果は部分的であった(図 3)。JNK のリン酸化も十分なリン酸化の抑制には至らなかった。(省略)。

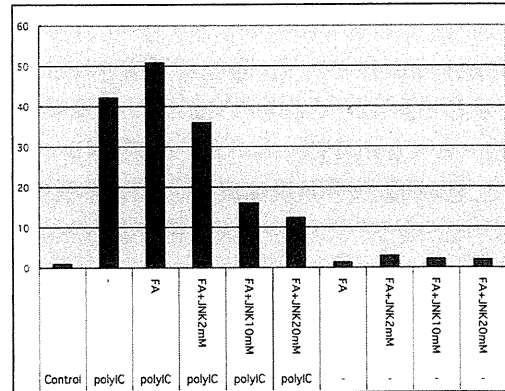


図3 JNK 阻害剤の濃度依存的 IL-8 mRNA の発現抑制

「ホルムアルデヒドによる CCL5(RANTES)の遺伝子発現の抑制」

好中球性炎症に関連の深い IL-8 に対応する形で、好酸球性炎症に関係の深い RANTES の遺伝子発現を同一の系で検討したところ、RANTES はホルムアルデヒドにより、むしろ遺伝子発現が抑制されていた。

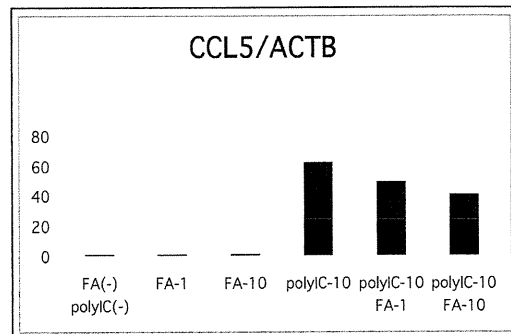


図4 ホルムアルデヒドによる CCL5 (RANTES) の遺伝子発現の抑制 (ACTB で補正)

D. 考察

IL-8 の遺伝子発現に関わると考えられる細胞内シグナル伝達系として、p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つの主要な経路が報告さ

れている。これまでの検討により、いずれの系も poly I:C により、リン酸化が誘導されることを示してきたが、これらのシグナル伝達系が我々の《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系で、IL-8 遺伝子発現に直接の影響を及ぼしているかどうかについては不明であった。本研究では、この p38MAPK, ERK1/2, JNK の3つのシグナル伝達系に対する阻害剤の効果を検討した結果、polyIC 刺激により気道上皮細胞のIL8発現増強に至るシグナル伝達系については、p38MAPK および ERK1/2 系がおそらく重要な役割を果たしているものと思われた。しかしながら、ホルムア

ルデヒド併用により、これらふたつの系がさらに増強されている明確な証拠は得られなかった。一方、ホルムアルデヒド併用によるIL8遺伝子発現増強時には JNK のリン酸化亢進がみられ、JNK 系は、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系において、polyIC 刺激単独より、むしろホルムアルデヒド併用時の増強効果に関与している可能性が示唆された。この点については、さらなる刺激実験、阻害剤による検討が必要である。(図5)。

ホルムアルデヒドによる遺伝子発現の様式は、遺伝子により IL-8 のように増強するもの、RANTES のように減弱するものとパターンが異なるため、それらが JNK のみで説明がつくかどうかは今後の検討を要するものと思われる。

経気道曝露モデルに対応した化学物質によるヒト気道上皮細胞の遺伝子発現への影響について長期的には、

1. 培養ヒト気道上皮細胞に対する毒性化学物質の曝露系を確立する。
2. 毒性化学物質によるヒト気道上皮細胞を用いた遺伝子発現応答様式を解析して、吸入曝露モデルにより得られた遺伝子発現様式と比較検討する。
3. 遺伝子発現応答様式の対比から、ヒト気道上皮を用いた化学物質の最適な毒性評価系を明らかにする。

といった研究により、臨床、動物モデル、細胞モデルの統合が必要と思われた。

E. 結論

《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》の系において、IL-8 遺伝子発現に関わると報告されている ERK, p38, JNK のリン酸化のうち、ホルムアルデヒドは、JNK のリン酸化を亢進して、IL-8 遺伝子発現増強に関連する可能性が示唆された。

今後、《poly I:C⇒ホルムアルデヒド》で見

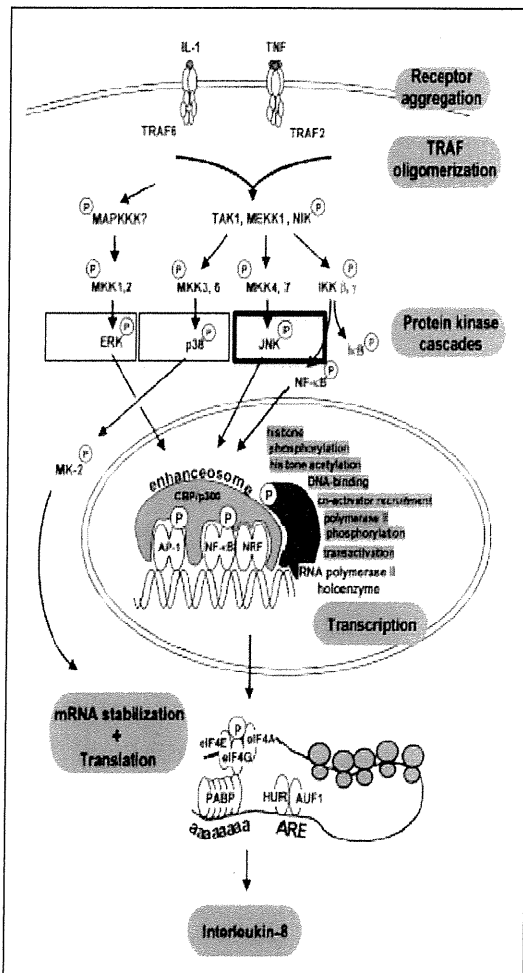


図5 IL-8 発現に関わる刺激伝達系

られた遺伝子発現増強効果について、さらに検討を進め、ホルムアルデヒド以外の化学物質の効果、IL-8 以外の遺伝子発現の変化についての網羅的解析、動物モデルとの対比、ホルムアルデヒド以外の化学物質による同様な検討などを行なう必要があるものと思われた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

2) 雑誌

1. Hang NT, Lien LT, Kobayashi N, Shimbo T, Sakurada S, Thuong PH, Hong LT, Tam DB, Hijikata M, Matsushita I, Hung NV, Higuchi K, Harada N, Keicho N. Analysis of factors lowering sensitivity of interferon-gamma release assay for tuberculosis. *PLoS One* 6 (8): e23806, 2011.
2. Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Tsuchiya T, Ito H, Tokunaga K, Ohashi J, Homma S, Kobashi Y, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Hum Genet* 29 (2): 117-28, 2011.
3. Keicho N, Hijikata M. Genetic predisposition to diffuse panbronchiolitis. *Respirology* 6 (4): 581-8, 2011.
4. Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of CD209 polymorphisms with tuberculosis in an Indonesian population. *Hum*

Immunol 72 (9): 741-5, 2011.

5. Pitabut N, Mahasirimongkol S, Yanai H, Ridruechai C, Sakurada S, Dhepakson P, Kantipong P, Piyaworawong S, Moolphate S, Hansudewechakul C, Yamada N, Keicho N, Okada M, Khusmith S. Decreased granulysin and increased interferon-gamma levels in plasma of patients with newly diagnosed and relapse tuberculosis. *Microbiol Immunol* 55 (8): 565-73, 2011.
6. Ridruechai C, Sakurada S, Yanai H, Yamada N, Kantipong P, Piyaworawong S, Dhepakson P, Khusmith S, Keicho N. Association between circulating full-length osteopontin and IFN-gamma with disease status of tuberculosis and response to successful treatment. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 42 (4): 876-889, 2011.
7. Tanaka T, Sakurada S, Kano K, Takahashi E, Yasuda K, Hirano H, Kaburagi Y, Kobayashi N, Hang N, Lien L, Matsushita I, Hijikata M, Uchida T, Keicho N. Identification of tuberculosis-associated proteins in whole blood supernatant. *BMC Infect Dis* 11: 71, 2011.

2. 学会発表

国際学会発表

1. Hijikata M, Matsushita I, Ito H, Ohashi J, Homma S, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Genetic analysis of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. In: European Respiratory Society Annual Congress 2011, September 24 -

- 28, Amsterdam, Netherlands, 2011.
2. Keicho N. Diffuse panbronchiolitis. In: 11th Killarney National Cystic Fibrosis Meeting, Feb 3-4, Killarney, Ireland, 2011.
 3. Matsushita I, Hijikata M, Ito H, Keicho N. Enhanced inflammatory response to formaldehyde in human bronchial epithelial cells. In: European Respiratory Society Annual Congress 2011, September 24 - 28, Amsterdam, Netherlands, 2011.

国内学会発表

1. 慶長直人, 松下育美, 土方美奈子. MAC症のヒト遺伝子研究. 第86回日本結核病学会総会, 6月2-3日, 2011.
2. 田中崇裕, 櫻田紳策, 加納圭子, 鍋木康志, 小林信之, 慶長直人. 結核患者における血漿ペプチドーム解析によるバイオマーカー探索. 第34回日本分子生物学会年会, 12月13-16日, 横浜, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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、H23-化学一般-001）

化学物質の経気道暴露による毒性評価の迅速化、定量化、高精度化に関する研究
—シックハウス症候群を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、及び
中枢神経影響を包含する新評価体系の開発—
分担研究報告書

分担研究課題：「吸入暴露影響の脳を含む網羅的遺伝子発現解析、多臓器連関、
インフォマティクス解析」

研究分担者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群の指針濃度をはるかに超える高濃度であることから、動物試験からの毒性情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。この点に対し先行研究では、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質について指針値レベルでの吸入毒性試験（1～7日間）を実施し、遺伝子発現変動を肺及び肝について網羅的に観測し、病態の惹起或いは生体防御の発動を示唆する影響が高感度に捕捉された。この成果を踏まえ本研究の目的は、第一に、極低濃度下での比較的長期暴露（7～28日間）後の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データの予見性を確認することにある。第二に、シックハウス症候群等において通常の検査からは病因が特定されない「不定愁訴」の分子実態を把握することにある。本分担研究では第二の目的に向け、先行研究での暴露条件である6時間/日 x 7日間反復暴露及び22時間/日 x 7日間反復暴露の2種類のプロトコールによる、雄性マウスを対象とした極低濃度経気道暴露実験により得られた脳・肺・肝サンプルについて、遺伝子発現データ生成、脳・肺・肝の多臓器連関の解析及びデータベース及び予測システムの基盤確立作業をおこなう。

平成23年度（今年度）は、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）について極低濃度下（0、0.1、0.3及び1.0 ppm）での6時間/日 x 7日間反復、及び22時間/日 x 7日間反復経気道暴露実験の実施と、その際経時的に得たマウス脳・肺・肝のmRNAにつき遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果、22時間 x 7日間反復暴露の際の海馬において、暴露期間中、神経活動の指標となる初期応答遺伝子（Immediate early gene: IEG）（Arc、Nr4a1、Fos、Junb及びEgr4遺伝子等）の発現が強く抑制されたことから、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。他方、6時間 x 7日間反復暴露の場合では、これらの遺伝子の発現抑制は一過性であり暴露期間中に回復していることが示唆された。この抑制により、記憶をはじめとする情動認知行動異常が誘発される可能性が高く、この事がシックハウス症候群で認められる不定愁訴と関係している可能性が考えられ、健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。解析の精度向上と効率化のために、（株）NTTデータにマイクロアレイデータ解析技術開発研究を業務委託した。以上のごとく、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、脳サンプルを用いる網羅的遺伝子発現解析手法により化学物質の経気道暴露によって生じる中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。

A. 研究目的

日常生活で暴露される様々な化学物質の毒性評価は、実験動物における毒性所見を人に外挿することで実施されている。しかし、気化性化学物質の経気道暴露による毒性については、シックハウス症候群の如く人における被害報告濃度と実験動物の器質変化濃度の乖離が甚だしく、現行の吸入毒性試験での毒性指標（器質的障害）を、人へ外挿することには大きな困難が伴う事例が指摘されてきた。この問題に対し、先行研究（厚生科研費・化学物質リスク研究事業）では、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げるホルマリンを含む13の気化性物質について指針値レベルの極低濃度での吸入毒性試験（1～7日間）を実施し、遺伝子発現変動を肺及び肝について網羅的に観測した結果、指針値レベルにおいて肺及び肝に有意な遺伝子発現変動が高感度に検出され、反応した遺伝子は、1) Cyr61をはじめとする肺防御系に関わる毒性標的候補、2) 酸化ストレス等のストレス応答系、3) 当該遺伝子の欠失マウスが肺炎等により死亡するといった肺機能に深く関わるもの、及び4) 概日リズムに関わるものであった。これらは、毒性の基礎と考えられる病態の惹起或いは生体防御の発動を高感度に確実に捉えているものと考えられた。動物実験から人へ外挿が困難という課題が、本トキシコゲノミクス手法により克服されうることが明らかとなった。

この成果を踏まえ本研究の目的は、第一に、極低濃度下での比較的長期暴露（7～28日間）後の肺を電子顕微鏡等により高精度に解析し、暴露による有害性を実証し、先行研究の遺伝子発現変動データの予見性を

確認することにある。第二に、シックハウス症候群等において通常の検査からは病因が特定されない「不定愁訴」の分子実態を把握することにある。この為に、肺・肝に加え中枢神経のトキシコゲノミクス解析を実施し、惹起される反応を抽出し、超微形態解析等の標的の絞り込みを行う。

本分担研究では、上記第二の目的に向け、先行研究での暴露条件である6時間/日 x 7日間反復暴露 [=労働暴露モデル] 及び22時間/日 x 7日間反復暴露 [=生活暴露モデル] の2種類のプロトコールによる、雄性マウスを対象とした極低濃度経気道暴露実験により得られた脳・肺・肝サンプルについて、遺伝子発現データ生成、脳・肺・肝の多臓器連関の解析及びデータベース及び予測システムの基盤確立作業をおこなう。今年度は、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）について検討した。

B. 研究方法

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 で一晩浸漬し、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。肺は気管から RNA later を注入し、RNase の不活化を促した後、採取した。脳は摘出後、カミソリ刃にて正中で左右に切断し左部について、小脳、脳幹、海馬及び大脳皮質の 4 部位に分離後、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砕液を

調製した。得られた破砕液の 10 μ 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 μ g 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。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

解析の精度向上と効率化のために、(株) NTT データにマイクロアレイデータ解析技術開発研究を業務委託した。

(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の配慮を十分行い、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

本年度は、ホルムアルデヒド (formaldehyde; 分子量: 30.03、Cas No. : 50-00-0) についてデータ解析を進めた。試薬としてホルムアルデヒド液 (カタログ番号: 064-00406、特級、ホルムアルデヒド濃度 37.3% [メタノール 7.4% 含有、ギ酸含量 0.04% 以下]、和光純薬工業) を使用した。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に経気道暴露 (4 用量にて、6 時間/日 \times 7 日間反復暴露 (6、22、70 及び 166 時間後に観測) と 22 時間/日 \times 7 日間反復暴露 (22、70、166 及び 190 時間後に観測) させた際の脳、肺及び肝を採取して網羅的に遺伝子発現変動を解析した。ホルムアルデヒドの指針値は 0.08 ppm、暴露目標値は 0.1、0.3、1.0 ppm である。得られた脳、肺、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。DNA マイクロアレイはアフィメトリクス社の GeneChip (Mouse Genome 430 2.0) を用いた。遺伝子発現変動を、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトウェアは、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 を生物学的に有意と考えられる順に並び替えるものである。また、既知情報との照合によ

るシグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)を用いて行った。

以下に、6時間/日×7日間反復暴露と22時間/日×7日間反復暴露、それぞれについて、海馬、肝及び肺における解析結果を示す。

C-1：ホルムアルデヒド極低濃度[6時間/日×7日間]反復暴露時の遺伝子発現変動解析：

C-1-1：ホルムアルデヒド[6時間/日×7日間]反復暴露時の「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして1,236 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190 psが見いだされた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また現時点において神経系の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に減少するものとして5,152 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115 psが見いだされた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また現時点で有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。概日リズム関連遺伝子 Per2 の発現減少(投与70及び116時間後、中・高用量)が認められたが、他の概日リズム関連遺伝子の顕著な発現変動が認められなかったことから概

日リズムシグナルが影響を受ける可能性は低いものとする。

C-1-2：ホルムアルデヒド[6時間/日×7日間]反復暴露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析：

暴露及びサンプリングをすでに終了しており、今後できるだけ速やかに、網羅的に遺伝子発現変動解析を検討する。

C-1-3：ホルムアルデヒド[6時間/日×7日間]反復暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析：

暴露及びサンプリングをすでに終了しており、今後できるだけ速やかに、網羅的に遺伝子発現変動解析を検討する。

C-2：ホルムアルデヒド極低濃度[22時間/日×7日間]反復暴露時の遺伝子発現変動解析：

C-2-1：ホルムアルデヒド[22時間/日×7日間]反復暴露時の「海馬」における網羅的遺伝子発現変動解析：

発現が有意(t検定でのP値<0.05)に増加するものとして6,099 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346 psが見いだされた。IPAによる検索では特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかったが、K⁺チャネル関連遺伝子の発現増加が認められた。具体的には、Kcnk3及びKcnk7(投与22時間後、高用量)、Kcnql(投与166時間後、高用量)、Kcnab1(投与70時間後、中・高用量)、Kcnv1(投与166時間後、中・高用量)及びKcnma1(投与70及び166時間後、

高用量) 遺伝子の発現増加が認められた。K⁺チャネルの活性化は、神経細胞の膜の過分極による膜電位の低下が生じることから、海馬における神経伝達の抑制が示唆された。しかし、上記の通り、各 K⁺チャネル関連遺伝子の発現増加が認められた暴露後の時間が、それぞれ異なるため、この作用は強いものではない可能性が示唆され、今後の検討を要するものとする。その他の神経系の有害影響に関係する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 1,127 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 28 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかったが、神経活動の指標となる初期応答遺伝子 (Immediate early gene : IEG) の顕著な発現減少が認められ、またそれぞれ同様な発現パターンを示した。具体的には、Arc、Fos、Dusp1、Nr4a1、Junb、Egr4、Klf2 及び Ier2 遺伝子 (いずれも投与 22、70 及び 166 時間後、低・中・高用量) の発現減少が認められた。興味深い事に、暴露休止 24 時間後である投与 190 時間後には逆に、これらの IEG の遺伝子の発現の増加が認められた (中・高用量)。このことから、ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間]の極低濃度経気道暴露により、海馬において暴露期間中は神経活動が抑制される事が示唆され、また暴露休止後少なくとも 24 時間後には、逆に神経活動が活性化することが示唆された。いずれの IEG の遺伝子も同様な発現パターンを示したことから、同一の分子機序により発現が制御される可能性が示唆された。

この点、Saha ら (Nat Neurosci 14(7): 848-856, 2011) は、ラット初代培養神経細胞を用いて、IEG の遺伝子の発現は、Pol II に結合する 4 つのサブユニット (NELF-A、NELF-B、NELF-C/D 及び NELF-E) の複合体である Negative elongation factor (NELF) によって制御されると報告している。しかし本解析結果では、この NELF のサブユニットの各遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。したがって、NELF の発現変動を伴わずに、その機能が抑制された結果、IEG の遺伝子の発現減少が誘発された可能性が考えられる。

この IEG の遺伝子の内、Arc、Fos、Dusp1 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動について図 1 に示す。図は下記のように、各遺伝子につき濃度依存性、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。



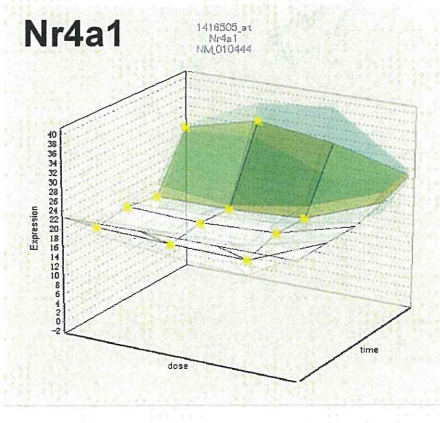
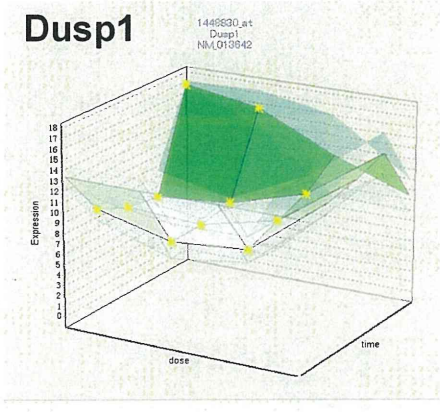
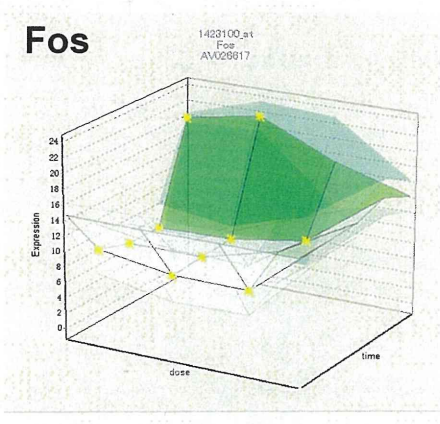
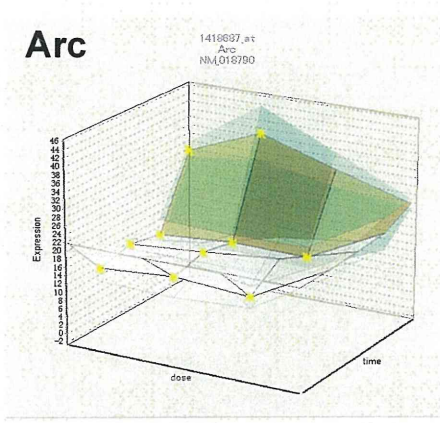


図 1 ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間]反復暴露時の「海馬」における初期応答遺伝子 (Immediate early gene : IEG) である Arc、Fos、Dusp1 及び Nr4a1 遺伝子の発現変動

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★を付した。

いずれも同様な発現パターンを示した。

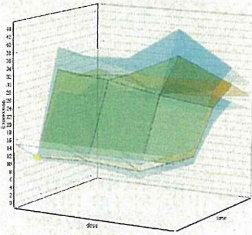
次いで、これらの IEG の遺伝子の発現変動について、[6 時間/日×7 日間]反復暴露時のものと [22 時間/日×7 日間]反復暴露時のものとを比較・検討した。IEG 遺伝子の中、Arc 及び Dusp1 遺伝子の発現変動を図 2 に示す。

なお遺伝子発現変動の観測時点は、[6 時間/日×7 日間]反復暴露の場合は、投与 6、22、70 及び 166 時間後、[22 時間/日×7 日間]反復暴露の場合は、投与 22、70、166 及び 190 時間後であり、海馬の採取時刻は、前者はそれぞれ 18 時、10 時、10 時及び 10 時、後者はそれぞれ 10 時、10 時、10 時及び 10 時となっている。

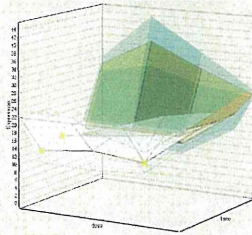
両遺伝子共に、[22 時間/日×7 日間]反復暴露の際には、暴露期間中は顕著に発現が抑制されているが、[6 時間/日×7 日間]反復暴露の際には、顕著な発現抑制が認められないことから、IEG の遺伝子の発現抑制は一日あたりの暴露時間に依存することが明らかとなった。

Arc

6時間×7日間暴露

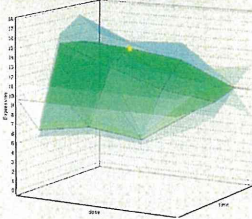


22時間×7日間暴露



Dusp1

6時間×7日間暴露



22時間×7日間暴露

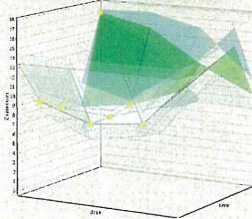


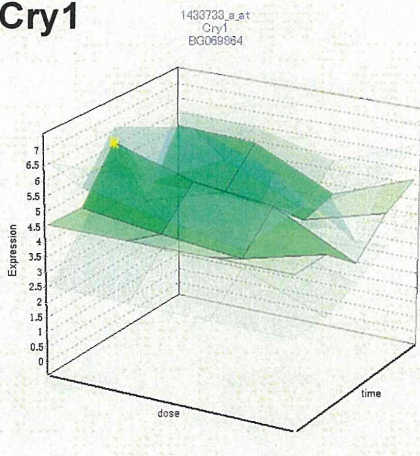
図 2 「海馬」における初期応答遺伝子 (Immediate early gene: IEG) である Arc (上段) 及び Dusp1 遺伝子 (下段) のホルムアルデヒド[6 時間/日×7 日間]反復暴露の場合 (左)、及び[22 時間/日×7 日間]反復暴露の場合 (右) との発現変動の比較

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★を付した。

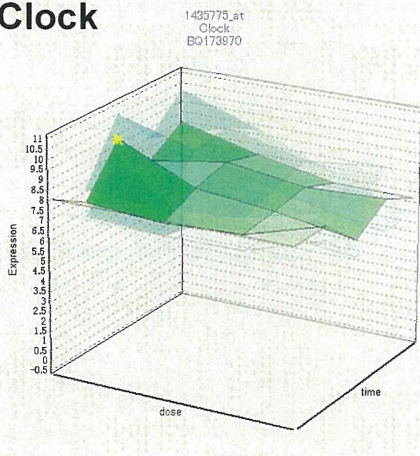
C-2-2: ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間] 反復暴露時の「肝」における網羅的遺伝子発現変動解析:

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に増加するものとして 572 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 92 ps が見いだされた。特定のシグナルネットワークとして概日リズム関連遺伝子が認められ、この結果は IPA による検索でも "Circadian Rhythm Signaling"として抽出されてきた。具体的には Cry1、Clock、Arntl 及び Npas2 遺伝子の発現増加 (投与 70 時間後、高用量) が認められた。また暴露休止 24 時間後である投与 190 時間後には、高用量で発現増加傾向が認められた。この内、Cry1、Clock 及び Npas2 遺伝子の発現変動の結果を図 3 に示す。

Cry1



Clock



Npas2

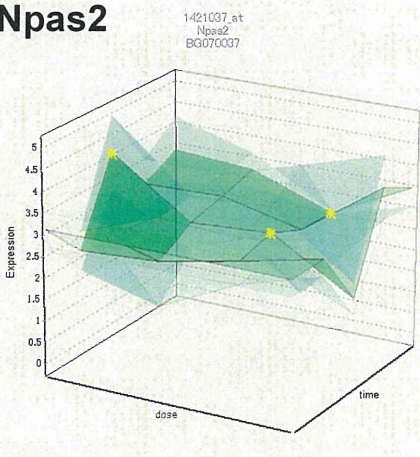


図 3 ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間]の「肝」における概日リズム関連遺伝子 Cry1、Clock 及び Npas2 遺伝子の発現変動

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★を付した。

したがって、ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間] 反復暴露により、肝における概日リズムが乱れ、その結果、肝機能に影響が現れる可能性が弱いながらも示唆された。今後、より詳細な検討を要するものとする。なお、薬物代謝酵素及び輸送体蛋白（トランスポーター）に関わる遺伝子の顕著な発現増加は認められなかった。

発現が有意(t 検定での P 値<0.05)に減少するものとして 3,179 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 44 ps が見いだされた。IPA による検索では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。また現時点で有害影響に関する遺伝子あるいはシグナルネットワークは認められなかった。

C-2-3: ホルムアルデヒド[22 時間/日×7 日間] 反復暴露時の「肺」における網羅的遺伝子発現変動解析：

暴露及びサンプリングをすでに終了しており、今後できるだけ速やかに、網羅的に遺伝子発現変動解析を検討する。

C-3 : マイクロアレイデータ解析技術開発に

関する共同開発委託研究：

解析の精度向上と効率化のために、(株)NTT データにマイクロアレイデータ解析技術開発研究を業務委託した。昨年度までに開発したマイクロアレイデータ補正技術 (MLANG、すなわちマイクロアレイの測定値をプローブ毎に補正し、より高精度の定量測定を行う技術) の開発を(株)NTT データと共に行い、従来除去不能であったクロスハイブリダイゼーションによる系統誤差を補正する基本技術を確立した。このデータ補正技術を、遺伝子発現誘導に基づく化学物質の分類技術、及び同期して発現する遺伝子の抽出技術に適用して、解析結果の精度を従来法と比較、評価した。その結果、従来抽出できなかった特殊な挙動を示す遺伝子群を発見した。さらに MLANG の補正パラメータ設定アルゴリズムを改良したところ、MLANG の計算結果の精度や安定性が向上することを確認した。

D. 結論

本年度はホルムアルデヒド (指針値 0.08 ppm、暴露目標値 0.1、0.3、1.0 ppm) (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) の 6 時間/日×7 日間反復暴露 (6、22、70 及び 166 時間後に観測) 及び 22 時間/日×7 日間反復暴露 (22、70、166 及び 190 時間後に観測) を実施した際の脳、肺及び肝サンプルについて網羅的に遺伝子発現変動を解析した。肺における解析及び 6 時間/日×7 日間反復暴露の際の肝における解析に関しては、サンプリングをすでに終了しており、今後できるだけ速やかに、網羅的に遺伝子発現変動解析を検討する。

解析の結果、海馬において有害性を示

唆するシグナルとして、初期応答遺伝子関連シグナルが見いだされた。具体的には、ホルムアルデヒドの[2 2 時間 x 7 日間]反復暴露の際の海馬において、暴露期間中、神経活動の指標となる初期応答遺伝子 (IEG) (Arc、Nr4a1、Fos、Junb 及び Egr4 遺伝子等) の発現が強く抑制され、このことから、海馬における神経活動が抑制される事が示唆された。他方、6 時間 x 7 日間反復暴露の場合では、これらの遺伝子の発現抑制は一過性であり暴露期間中に回復していることが示唆された。したがって、IEG の遺伝子の発現抑制は一日あたりの暴露時間に依存することが明らかとなった。海馬における神経活動の抑制は、記憶をはじめとする情動認知行動異常が誘発される可能性が高く、この事がシックハウス症候群で認められる不定愁訴と関係している可能性が考えられた。この事は、健康被害の未然防止、治療の観点から意義深いことと考える。今後、この観点から研究を推進していく必要があるものとする。

またいずれの IEG の遺伝子も同様な発現パターンを示した事から、同一の分子機序により発現が制御される可能性が示唆された。この点、Saha ら (Nat Neurosci 14(7): 848-856, 2011) は、ラット初代培養神経細胞を用いて、IEG の遺伝子の発現は、Pol II に結合する4つのサブユニット (NELF-A, NELF-B, NELF-C/D and NELF-E) の複合体である Negative elongation factor (NELF) によって制御されると報告している。しかし本解析結果では、この NELF のサブユニットの各遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。したがって、NELF の発現変動を伴わずに、その機能が抑制された結果、

IEG の遺伝子の発現減少が誘発された可能性が考えられた。

肝において有害性を示唆するシグナルとして、概日リズム関連シグナルが見いだされた。具体的には、ホルムアルデヒドの[22時間 x 7日間]反復暴露の際の肝において、概日リズムに関連する遺伝子の発現増加が認められた事から、末しょう組織における概日リズムの乱れが、肝機能に対する影響として現れる可能性が弱いながらも示唆された。今後、より詳細な検討を要するものとする。

解析の精度向上と効率化のために、(株) NTT データにマイクロアレイデータ解析技術開発研究を業務委託した結果、従来抽出できなかった特殊な挙動を示す遺伝子群を発見し、さらに MLANG の補正パラメータ設定アルゴリズムを改良したところ、MLANG の計算結果の精度や安定性が向上することを確認した。

以上のごとく、シックハウスレベルの極低用量暴露に於いても、脳サンプルを用いる網羅的遺伝子発現解析手法により化学物質の経気道暴露によって生じる中枢影響を予測することが可能である事が明らかとなった。

来年度も、本研究の目的の一つである、シックハウス症候群等における「不定愁訴」の分子実態の把握に向け、「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が室内指針値とともに掲げるホルマリン等 13 物質の中から被験物質を選択し、同様の解析・検討をおこなうことにより、「不定愁訴」の分子実態の把握を進展させる。これらにより先行研究での評価系を、中枢影響評価と多臓器連関を包含するかたちに発展

させる事を通して、近年の技術革新の加速に伴い急増する「新規物質」の吸入毒性評価に際し中枢影響を含むかたちで、極低濃度での有害性を見逃しなく検出できるようになることが期待される。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1-1) 書籍等

K. Aisaki and J. 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

菅野純：高濃度にジアシルグリセロールを含む食品（エコナ）の毒性学的な考え方について

臨床栄養, 118 (2), 177-183 (2011)

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)

1-2) 学術雑誌

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* 37: 373-380, 2012.

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. doi: 10.1038/nature10656.

Hokari T, Tsuboi I, Harada T, Oshima H, Hirabayashi Y, Kanno J, Inoue T, Aizawa S., Mast cell development and biostresses: different stromal responses in bone marrow and spleen after treatment of myeloablater, 5-fluorouracil, and

inflammatory stressor, lipopolysaccharide., *Biol Pharm Bull*. 2011;34(10):1533-41.

Fujimoto N, Kitamura S, Kanno J., Androgen dependent transcription of a mouse prostatic protein gene, PSP94: Involvement of estrogen receptors., *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):301-6.

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
Yoshida T, Sekine T, Aisaki K, Mikami T, Kanno J, Okayasu I., CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid., *J Gastroenterol*. 2011 Mar;46(3):339-49.

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.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Tsuda H, Sakamoto Y, Ogata A, Nakae D, Hino O, Kanno J., [Importance of researches on chronic effects by manufactured nanomaterials]., Yakugaku Zasshi. 2011 Feb;131(2):195-201. Review. Japanese.

Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T, Suzuki T, Narita M., Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment., Hippocampus. 2011 Feb;21(2):127-32. doi: 10.1002/hipo.20775.

2.学会発表

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

菅野 純, 高木篤也, 西村哲治, 広瀬明彦、Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Nanomaterials、第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.4, 名古屋、口演

菅野 純、化学物質の発がん性のリスク評価

について、第 70 回日本癌学会学術総会 特別企画 市民公開講座「放射線発がんと化学発がん—原発事故から学ぶこと」、愛知県がんセンター国際医学交流センター、2011.10.1、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

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial Toxicology - Importance of Chronic Toxicity Assessment, Attendance at 5th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health, (2011.8.10) (Boston, USA), Oral

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

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
特許第 4415079 号、2009 年 12 月 4 日登録、遺伝子の絶対発現量測定方法
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 御中

遺伝子発現誘導に基づく化学物質分類技術及び同期発現遺
伝子抽出技術の高精度化に関する業務コンサルティング
御報告書

平成24年2月24日
株式会社NTTデータ