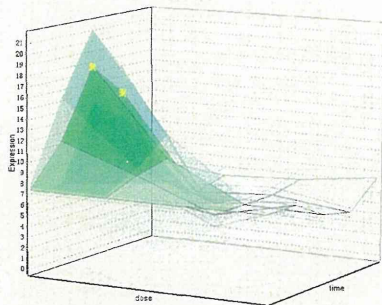
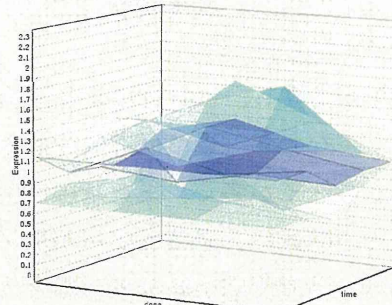


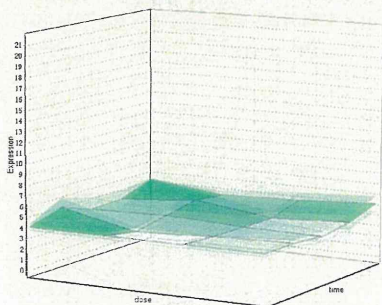
A Gclc [0+1] 肺



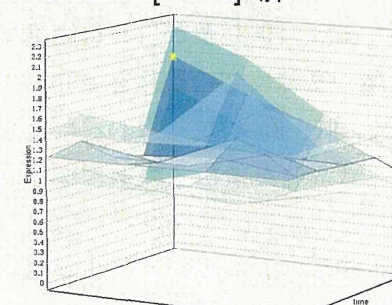
E Cnnm3[0+1] 肺



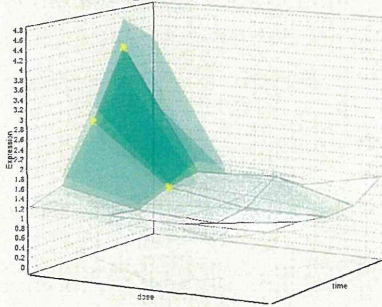
B Gclc [14+1] 肺



F Cnnm3 [14+1] 肺



C Gsta2 [0+1] 肺



D Gsta2 [14+1] 肺

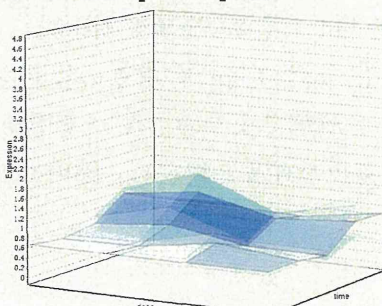


図2 Gclc (A, B)、Gsta2 (C, D) 及び Cnnm3 (E, F) 遺伝子の [0+1] 及び [14+1] 時の発現変動比較

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。

この際、肝の場合と同様に肺においても、これらの遺伝子のほぼ全てについて、「基線反応成分は、過渡反応が増加する場合は増加、減少する場合は減少する」ことを見いだした。

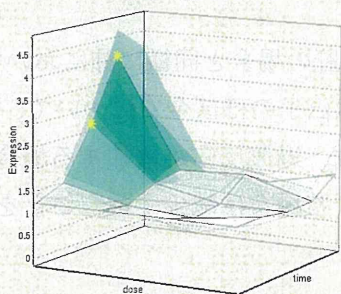
C-4: 四塩化炭素の2及び4日間反復暴露時と単回暴露時の、肝及び肺での遺伝子発現変動の比較解析 :

[0+1]時と比較し、[14+1]により認められた所見、すなわち「過渡反応成分が顕著に減弱する遺伝子が多く、また基線反応成分は、肝及び肺共に、過渡反応が増加する場合は増加、過渡反応が減少する場合は減少する傾向がある事」が成立する過程を明らかにする目的で、四塩化炭素の2日間([2+1])及び4日間([4+1])の反復暴露を実施し、それらと、[0+1]及び[14+1]実験と合わせ、4実験の基線反応の推移を観測した。

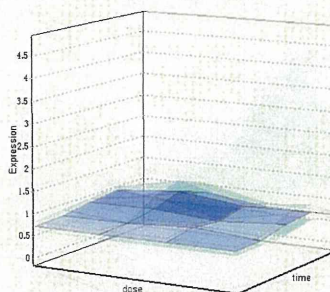
その結果、肝、肺共に、[14+1]により発現が著しく減弱した遺伝子の発現変動は、ほぼ全ての場合について、[2+1]、及び[4+1]のいずれの場合にも、既に著しく減弱しており、ベースラインも下がる傾向にあった。他方、[14+1]により発現が著しく増強した遺伝子については、基線反応は増加す傾向にあるが、[4+1]の段階では基線反応が起っていない例が認められた。

観察された遺伝子発現変動の一例として、[2+1]及び[4+1]の肺において顕著に減少を示す Gsta2 遺伝子の発現変動を図3に示す。

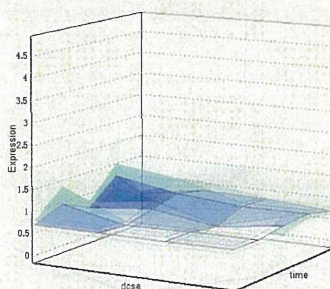
A Gsta2 [0+1] 肺



B Gsta2 [2+1] 肺



C Gsta2 [4+1] 肺



D Gsta2 14日間反復 肺

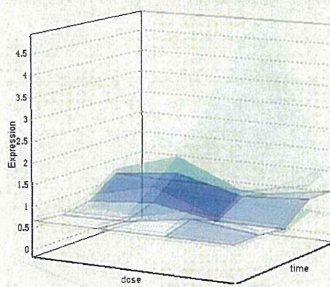


図3 Gsta2 遺伝子の[0+1] (A)、[2+1] (B)、[4+1] (C) 及び[14+1] (D) の発現変動比較

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。

このことから、四塩化炭素の[14+1]の新型反復暴露実験時に過渡反応成分が減少した遺伝子の多くについて、[2+1]において既に同様の過渡反応と基線反応を示す事が明らかとなった。そこで投与期間をさらに短くし1日間とした反復暴露実験([1+1])を実施中である。

#### C-5: 四塩化炭素の反復暴露により、単回投与時の発現が影響を受ける遺伝子についての、*in silico*でのプロモーター解析:

四塩化炭素の反復暴露により、単回投与時の発現が影響を受ける遺伝子が、同じ転写制御を受けるか否かは不明であるが、制御を受けていると仮定し、各遺伝子の転写開始点上流において共通する転写因子の有無を *in silico* でのプロモーター解析により検討した (データベース TRANSFAC と解析ソフト geneXplain を使用)。

その結果、転写開始点上流に共通する転写因子結合部位として、肝において顕著に発現が減少した遺伝子 (219 ps) 全てについては、

V\$NKX25\_02、 V\$PAX8\_01、 V\$HOXA4\_Q2、 V\$PPARG\_02、

発現が増加した遺伝子 (20 ps) 全てについては、

V\$NKX25\_02、 V\$PPARG\_02、 V\$DBP\_Q6 が、

他方、肺において顕著に発現が減少した遺伝子 (73 ps) 全てについては、

V\$NKX25\_02、 V\$TCF11\_01、 V\$HOXA4\_Q2、 V\$PAX4\_02、 V\$GRE\_C、 V\$PAX8\_01、 V\$DBP\_Q6、

V\$CDPCR3\_01、 V\$PPARG\_02、 V\$CHOP\_01 が、

発現が増加した遺伝子 (6 ps) 全てにつ

いては、

V\$NF1\_Q6\_01、 V\$MYOGNF1\_01、 が見いだされた。

これらの結合部位に結合する因子を規程する遺伝子は[0+1]において発現変動を示していなかった。このため、四塩化炭素の反復暴露により、単回投与時の発現が影響を受ける遺伝子が、同じ転写制御を受ける機序が存在する場合、この制御因子のタンパクレベルでの機能が重要である可能性が示唆された。

尚、四塩化炭素 14 日間反復投与後にクロフィブレートあるいはフェノバルビタールを単回投与したデータを解析したところ、四塩化炭素により基線反応が低下した遺伝子においては CF や PB による過渡反応も抑制される傾向が確認された。

#### D. 結論

四塩化炭素による新型反復暴露実験の結果から、単回暴露時に発現が増加した遺伝子の内、肝では約 8 割の遺伝子が、肺では約 6 割の遺伝子が、反復暴露時にその発現が顕著に減弱することが明らかとなった。またこれらの遺伝子の基線反応成分は、肝及び肺共に、過渡反応が増加する場合は増加、減少する場合は減少する傾向があることが明らかとなった。

また、四塩化炭素の単回暴露時に認められた、肝においてはタンパクのユビキチン化に関連する遺伝子の発現増加、肺においてはタンパクのユビキチン化、Nrf2 を介する酸化ストレス、グルタチオン代謝、及び炎症メディエーターの産生に関連する遺伝子の発現増加は、反復暴露時では顕著に減弱した事から、反復投与はこれらのシ



グナルネットワークを抑制し、これらに起因する細胞障害を減弱する可能性が示唆された。

[2+1]及び[4+1]の実験の結果、反復暴露により発現が著しく減弱した遺伝子については2日間の反復暴露で過渡反応と基線反応が完成すること、反復暴露により発現が著しく増強する遺伝子については、過渡及び基線反応の完成が遅れるものがあることが示された。尚、[1+1]実験を実施中である。

これらの知見は、これまでの報告では認められず、生物学的・毒性学的に新規性が高い発見と考える。加えて、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測を行うにあたり、この分子機序を明らかにすることが重要と考える。

この機序の解明に向け、過渡反応及び基線反応を示した遺伝子に共通する転写因子を *in silico* プロモーター解析により検討したところ、転写開始点上流に共通する転写因子結合部位が、肝、肺の減少、増加遺伝子毎に見いだされた。したがって、同じ転写制御を受ける可能性が高まったが、これ以外の分子機序が存在する可能性を含め今後さらに検討を進める。

来年度は、バルプロ酸ナトリウムについての新型反復暴露実験を実施する。反復暴露と単回暴露を同一の化学物質で行うA+A'プロトコールに加え、異なった化学物質を合わせるA+Bプロトコールの結果を解析する。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y.

(2012) Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase. *Diabetes*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]

Abe S, Kurata M, Suzuki S, Yamamoto K, Aisaki K, Kanno J, Kitagawa M. (2012) Minichromosome maintenance 2 bound with retroviral Gp70 is localized to cytoplasm and enhances DNA-damage-induced apoptosis. *PLoS One*. 7(6):e40129.

Swedenborg E, Kotka M, Seifert M, Kanno J, Pongratz I, Rüegg J. (2012) The aryl hydrocarbon receptor ligands 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3-methylcholanthrene regulate distinct genetic networks. *Mol Cell Endocrinol*. 362(1-2):39-47. doi: 10.1016/j.mce.2012.05.006

Fujimoto H, Woo GH, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M. (2012) Increased cellular distribution of vimentin and Ret in the cingulum induced by developmental hypothyroidism in rat offspring maternally exposed to anti-thyroid agents. *Reprod Toxicol*. 34(1):93-100.

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. (2012) 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(2):373-80.

## 2. 学会発表

田中美和、山崎ゆかり、菅野陽平、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野 純、中村卓郎、ユウイング肉腫モデルマウスを用いた発生起原の同定と遺伝子発現解析、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、東京、一般口演

Jun Kanno, Modernization and Harmonization of Toxicology; an Approach by Percellome Toxicogenomics, 2012 Global Summit on Regulatory Science - Modernizing Toxicology(2012.5.11) Hangzhou, People's Republic of China, Invited

菅野 純、Percellome Project: 組織、臓器、種を跨いで、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日、仙台、シンポジウム

種村健太郎、古川佑介、大塚まき、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、佐藤英明、菅野純、発生-発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢影響解析-幼弱期マウスへのイボテン酸投与による成熟期の脳高次機能障害について-、2012 年 7 月 17 日、仙台、シンポジウム

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、菅野 純、食品の安全性確認に向けた Percellome トキシコゲノミクスの適用-香料エストラゴ

ールの場合-、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日、仙台、一般口演

富永貴志、富永洋子、五十嵐勝秀、種村健太郎、菅野 純、中島欽一、妊娠期投与による胎生期バルプロ酸暴露マウスは学習記憶異常と海馬抑制系の減弱を示す、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 19 日、仙台、一般口演

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Katsuhide IGARASHI and Jun KANNO, Application of Percellome Toxicogenomics approach to food safety in case of a flavor, estragole, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology(2012.7.20) Sendai, Symposium

菅野 純、創薬とトキシコゲノミクス- Percellome Project の進捗とその応用性-、医薬基盤研究所公開セミナー、大阪、2012 年 10 月 30 日

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Endocrine disruptor as receptor mediated signal toxicity. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer (2012.11.16) Kanazawa, invited

Katsuhide Igarashi, Noriko Moriyama, Kentaro Tanemura, Maki Otsuka, Yusuke Furukawa, Hirotsugu Asano, Kinichi Nakashima and Jun Kanno, Glucocorticoid

Receptor (GR) enhances the astrocytic differentiation of neural stem cells via LIF-STAT3-GFAP pathway by a ligand dependent binding of GR to STAT3 at the STAT3 responsive element of GFAP promoter, 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer (2012. 11. 16) Kanazawa, poster

Jun Kanno, Cancer risk and the nuclear desaster in Japan, The 7th Princess Chulabhorn International Science Congress Cancer: from Basic Research to Cure (2012. 11. 30) Bangkok, Thailand, invited

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

特許第 5177712 号、2013 年 1 月 18 日登録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究所、NTT データ、発明者：菅野純、相崎健一ら、「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

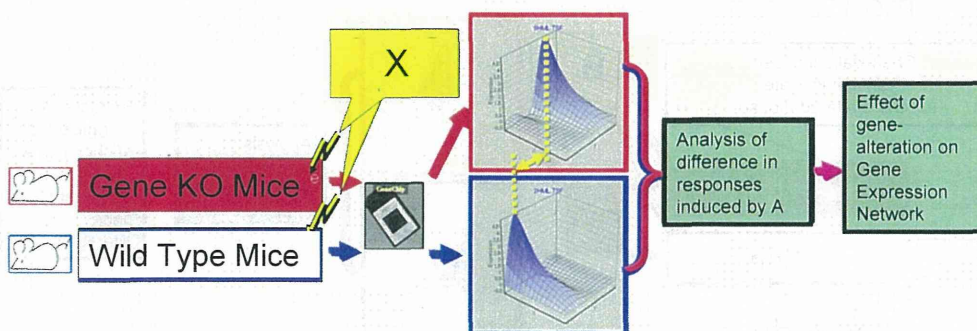
2013年2月8日(金) 14:00~17:30  
東京国際フォーラム G401室

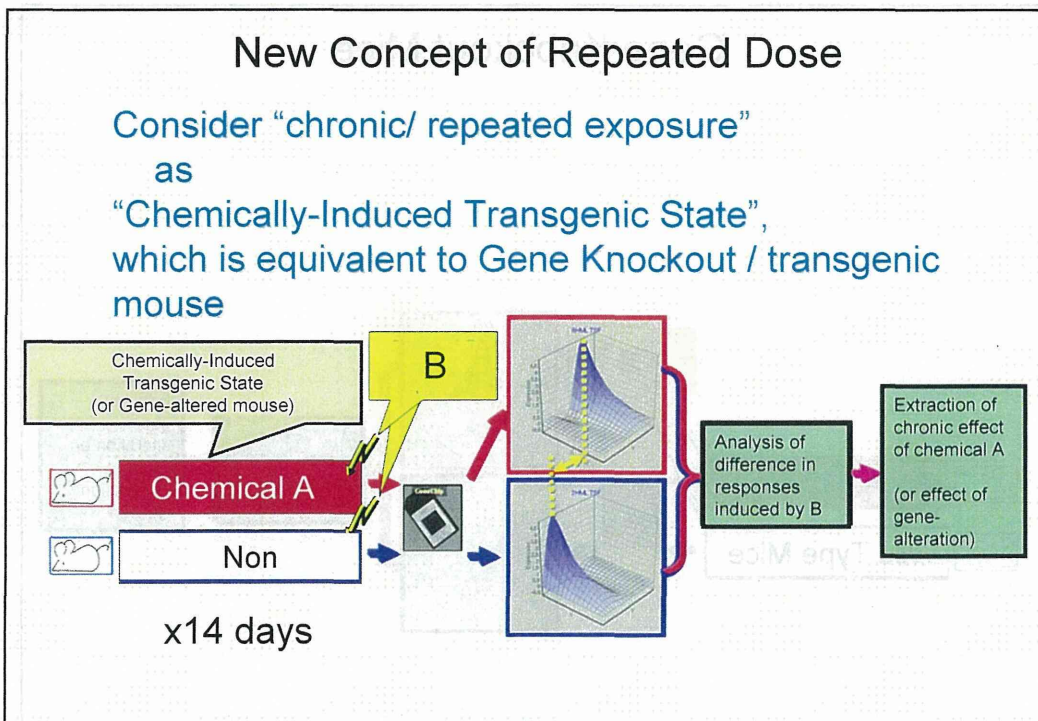
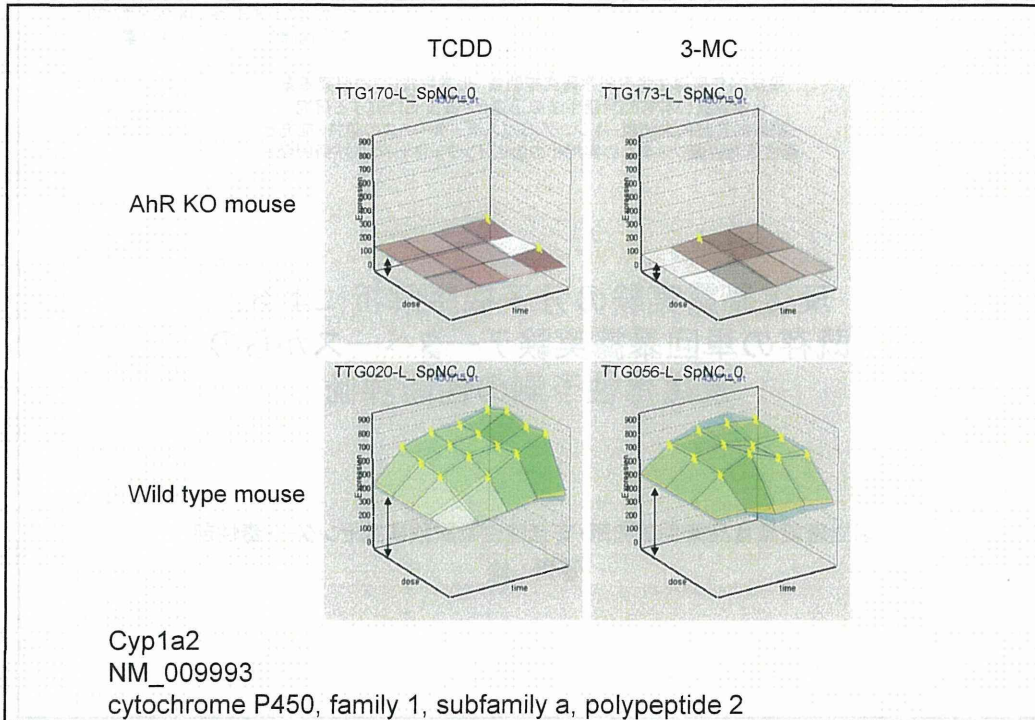
平成24年度厚生労働科学研究補助金 化学物質リスク研究事業  
化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
一網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発

## 反復暴露実験の分子機序解析による、 既存の単回暴露実験データベースからの 反復毒性予測の性能評価

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

## Gene Knockout Mice





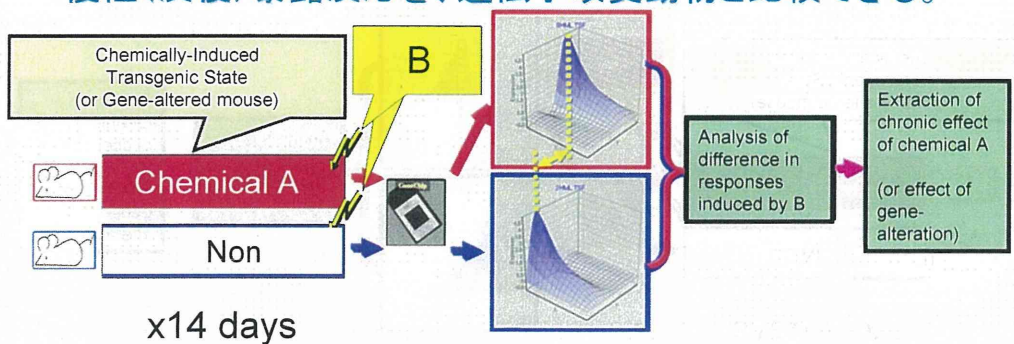


## New Concept of Repeated Dose

慢性(反復)暴露を、  
【化学物質投与により誘導された遺伝子発現改変状態】と  
考える。



慢性(反復)暴露反応を、遺伝子改変動物と比較できる。

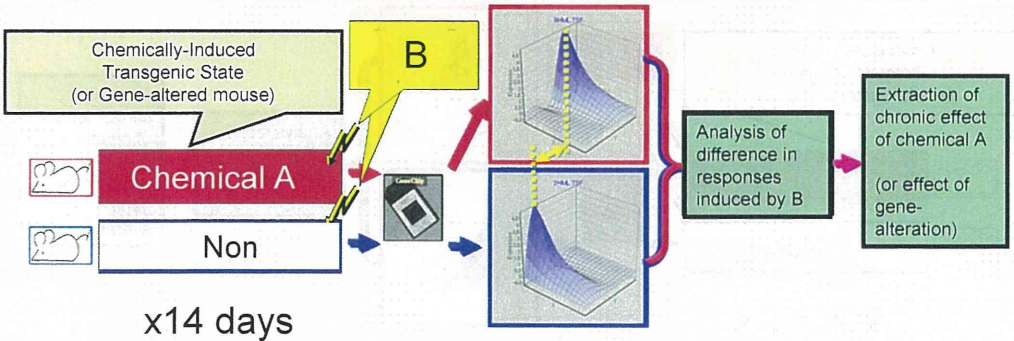


## New Concept of Repeated Dose

慢性(反復)暴露を、  
【化学物質投与により誘導された遺伝子発現改変状態】と  
考える。

↓ **A+B protocol**

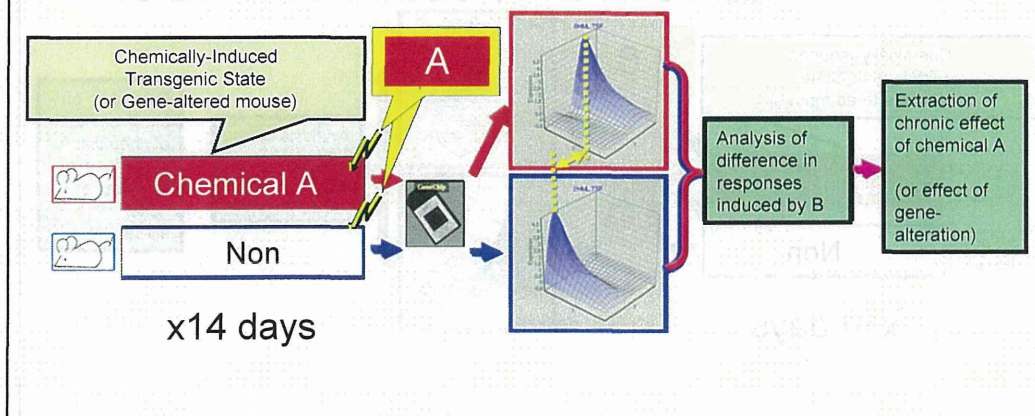
慢性(反復)暴露反応を、遺伝子改変動物と比較できる。



## New Concept of Repeated Dose 拡張

慢性(反復)暴露を、化学物質投与により誘導された遺伝子発現改変状態と考える。

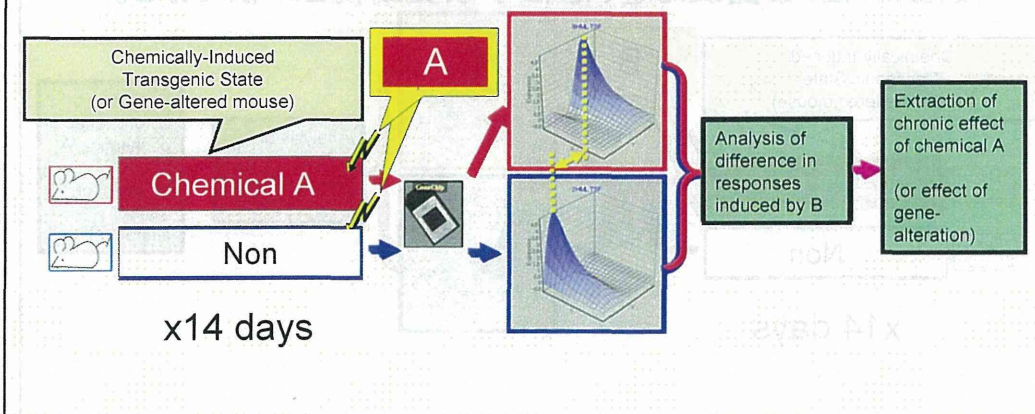
↓  
化学物質 A の反復影響を A で観察する。



## New Concept of Repeated Dose 拡張

慢性(反復)暴露を、化学物質投与により誘導された遺伝子発現改変状態と考える

化学物質 **A+A' protocol**



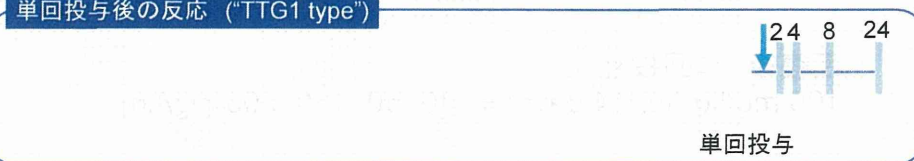
## 単回投与 vs 反復投与後の反応

A+A' protocol バルプロ酸 と 四塩化炭素

反復投与後の反応 ("TTG2 type")



単回投与後の反応 ("TTG1 type")

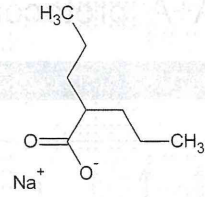


## 進 捗

A+A' protocol 実験で示唆されたこと

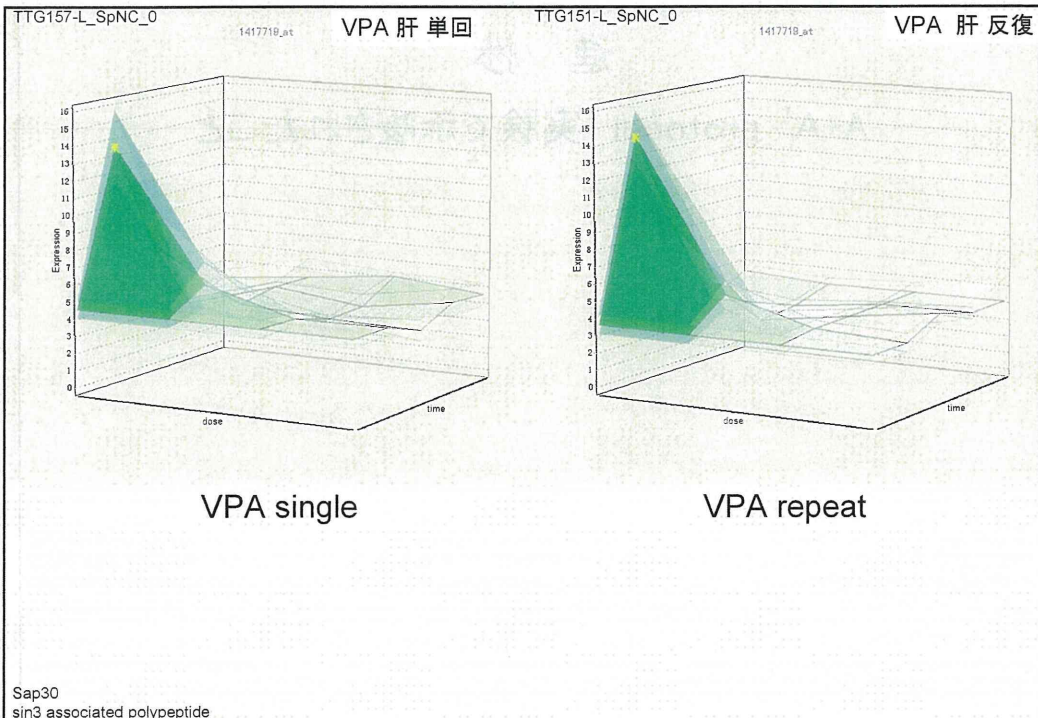


バルプロ酸ナトリウム  
[Valproic acid sodium salt]

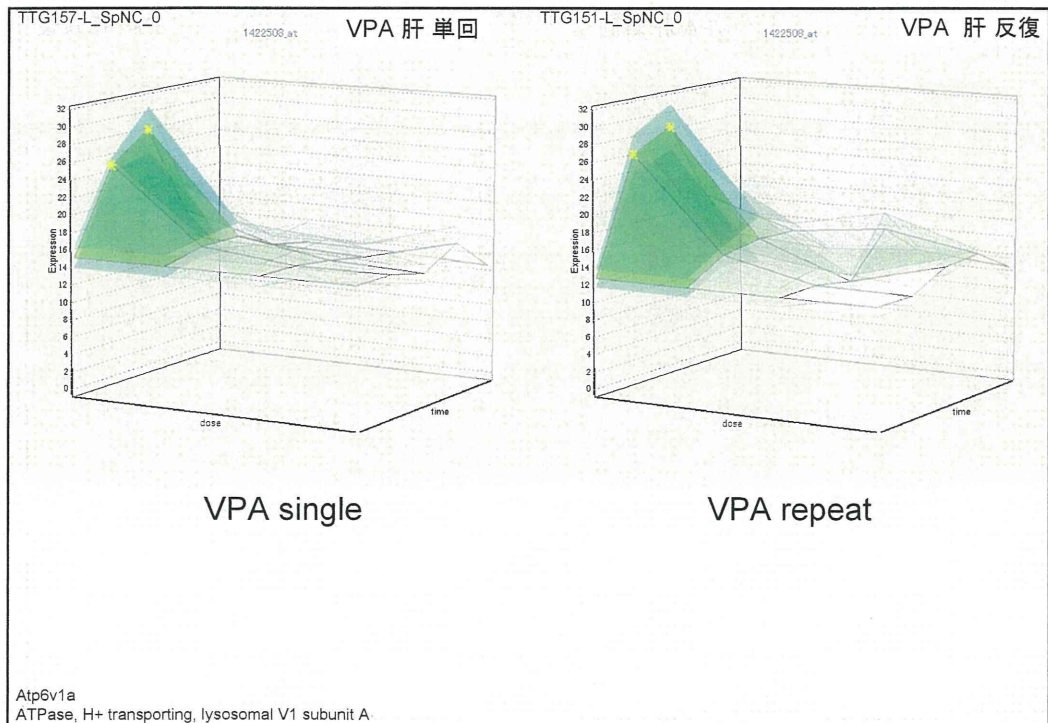
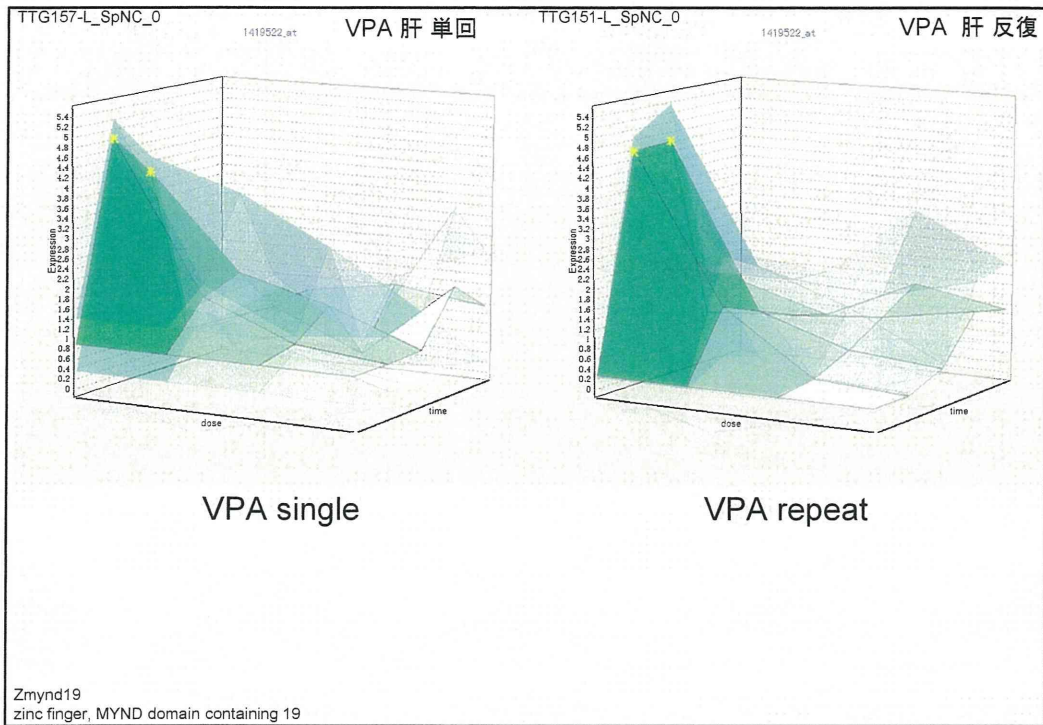


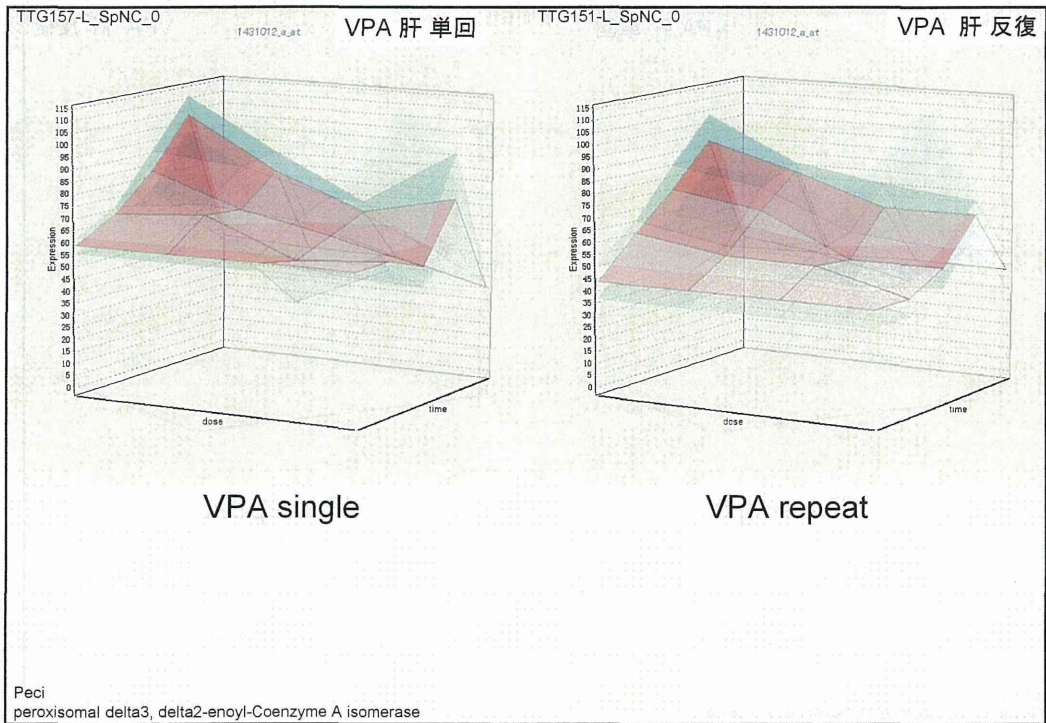
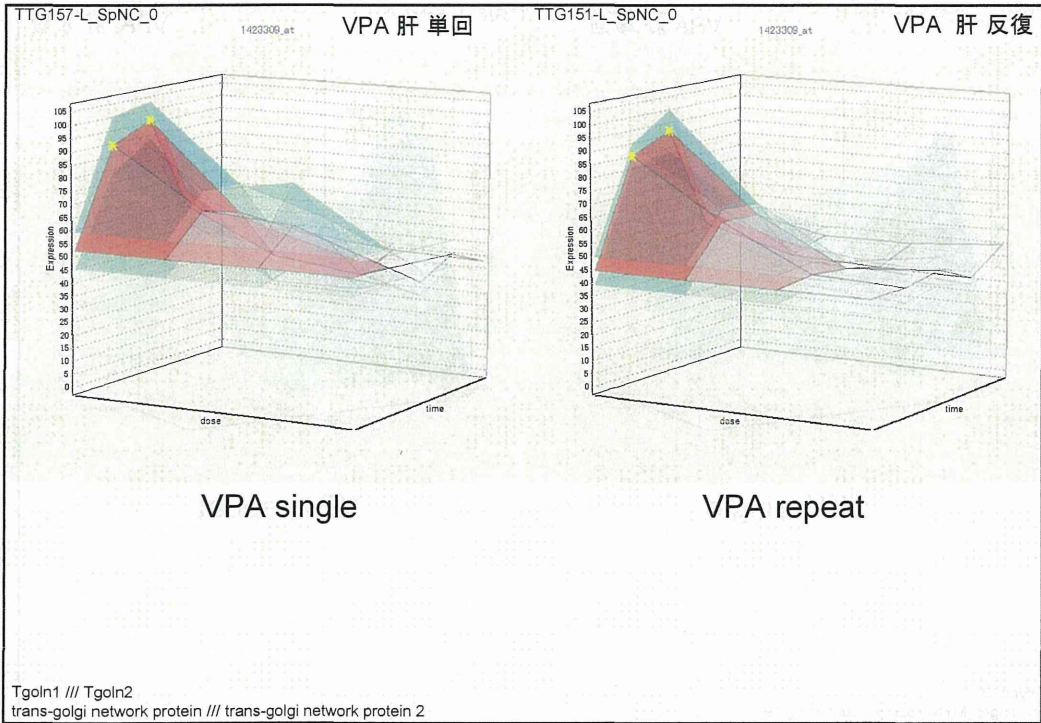
単回投与  
[0, 50, 150, 500 mg/kg]

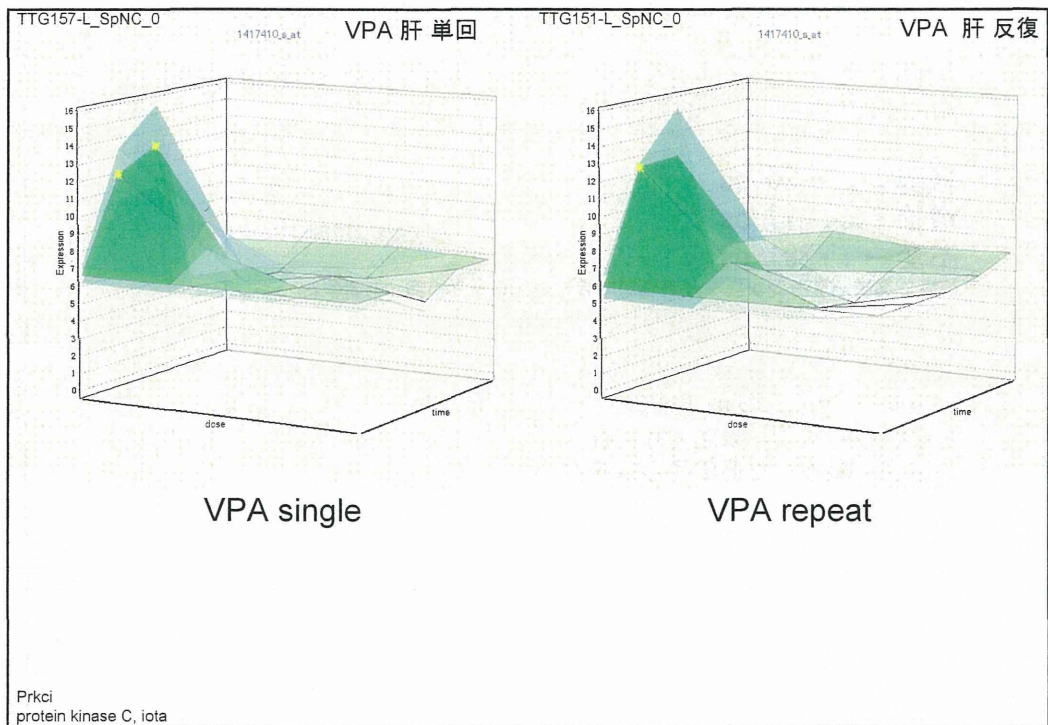
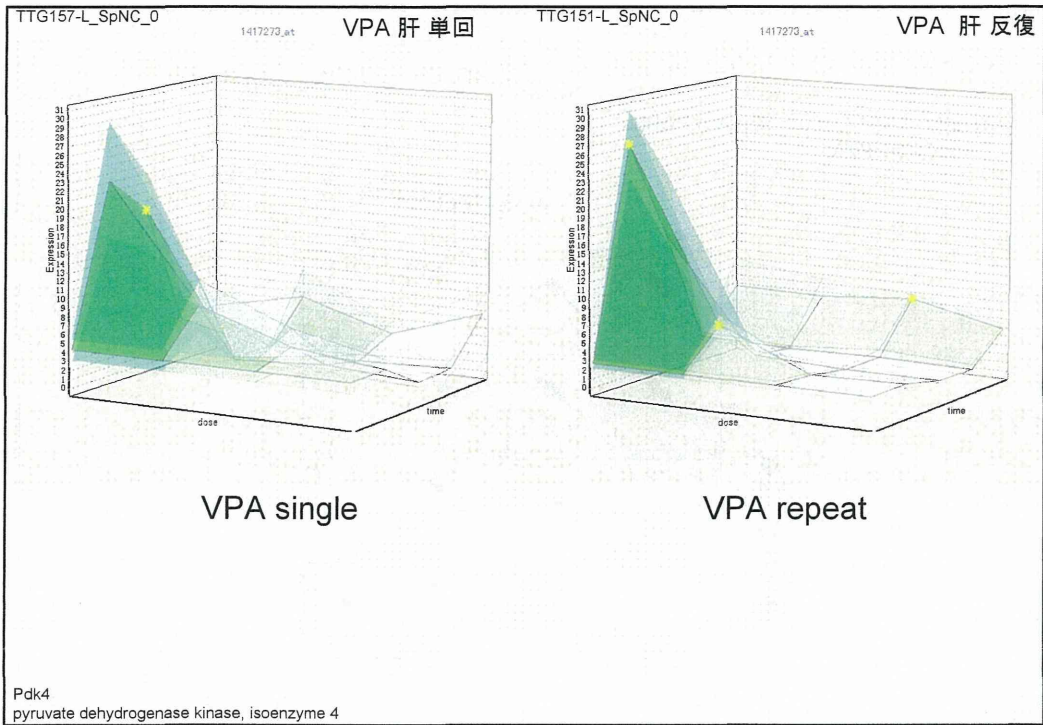
反復後 単回投与  
100 mg/kg (for 14 days) + [0, 50, 150, 500 mg/kg]











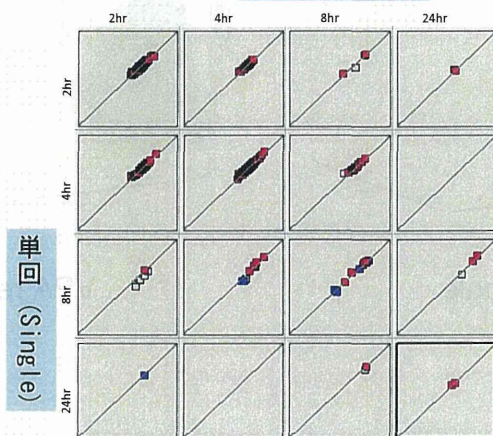


## Percellome Explorer解析

## バルプロ酸ナトリウム [Valproic acid sodium salt]

- PDBEx\_RSORT101008\_Std-Med.PDBEx
- Target\*Candidate

反復 (repeat)



## バルプロ酸ナトリウム [Valproic acid sodium salt]

減弱 ↓ : 26 ps

増強 ↑ : 17 ps

不変 → : 391 ps

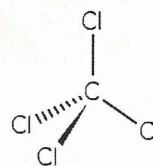
両方で発現パターンが異なり判別ができない遺伝子 (ps) 数 : 1,885 ps

- 単回の2%が、反復で減弱
  - 反復の99%が、単回と同程度
- 減弱・増強した遺伝子数は少ない



## 四塩化炭素 [Carbon tetrachloride]

単回投与  
[0, 0.7, 2, 7 mg/kg]



反復後 単回投与  
5 mg/kg (for 14 days) + [0, 0.7, 2, 7 mg/kg]

