

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

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ためのインフォマティクス技術開発 -

分担研究課題：「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」

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、先行実施されたPercellome(*)トキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。本分担研究では、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を目的とする。

今年度(平成25年度)は、1) 初年度実施した四塩化炭素による新型反復暴露実験(**)のデータ解析を網羅的に進め、遺伝子発現調節に係る情報を抽出する手法を検討した。2) バルプロ酸にて肝を対象に同設計の新型反復暴露実験セットを行い、四塩化炭素と類似した反応を確認しつつ、バルプロ酸固有の所見を得た。すなわち、バルプロ酸(0、50、150、500 mg/kg)の単回暴露(4用量、16群構成、各群3匹)時と比較し、14回の新型反復暴露(全動物に100 mg/kgを1日1回14日間反復投与後、15日目に0、0.7、2、7 mg/kgを単回投与の実験において、過渡反応(暴露の都度の速い発現変化、ここでは15日目の変化)が増加あるいは減少した遺伝子は、単回暴露時に発現変動を示した遺伝子の多くと一致していた。ただし、基線反応(Baseline Response; B-Res: 回を重ねるに連れて発現値の基線が徐々に変化する)を同時に示す遺伝子は多く、基線反応の増減が過渡反応に影響を及ぼすことが確認された。基線反応と過渡反応の関係が反復回数によりどの様に推移するかを検討したところ、多くの遺伝子については、2回暴露の時点で基線変動が完成することが明らかとなった(例外あり)。そこで投与期間をさらに短くし、1回の反復暴露実験を実施、現在、データ取得中である。また、TGPラットデータをPercellome変換し、類似の解析を加えマウスデータと比較した。次いで、反復投与によりどの様な転写制御を受けるこ

とで基線反応が生じるかを検討する為に、基線反応を示した当該遺伝子の転写開始点上流に共通する転写因子や結合配列を*in silico*プロモーター解析により検討し、一定の傾向が存在することを明らかにした。基線反応低下には、小胞体ストレス系のXbp1の関与が示唆される経路と、eIF2の関与が示唆される経路とが区別される可能性があり、前者は単回暴露時に遺伝子発現が誘発され、反復暴露によりそれが減弱する遺伝子群、後者は、単回暴露による遺伝子発現誘導が見られず、反復暴露により基線のみが低下する遺伝子群がより高頻度に該当する傾向があった。今後、詳細なPromoter解析等を加える予定である。基線反応が過度反応に影響するメカニズムの解明は、反復暴露による毒性の発現メカニズム解明に密接に関係することが考えられる。

(*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。特許取得済み。

(**) 全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う。

A. 研究目的

本研究は、先行実施されたPercellomeトキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。即ち、先行研究にて構築済みの延べ5.8億遺伝子情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベース(TGDB)及び、単回暴露(急性)時の毒性ネットワーク解析技術を基盤に、これらを維持・拡充しつつ、反復暴露による生体影響の解析及び、その予測評価技術を開発する。ここにインフォマティクス専門家によるシステムトキシコロジーの概念を導入し、網羅的毒性予測評価システムの機能強化と精度向上を図る。本分担研究では、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を目的とする。

化学物質の反復暴露に対する生体反応は、毎回の投与の度に、その都度の変化を示す過渡反応(Transient Response;T-Res)と、回を重ねるに連れて発現値の基線(ベースライン)が徐々に移動する基線反応(Baseline Response;B-Res)の二つの成分から構成されることが判明した。これにより反復暴露影響は単回暴露影響を単純に積算して得られる変化とは異なることが明らかとなった。遺伝子発現データを比較解析するための標準化に際して、従来のGlobal normalization法では基線反応検知が不正確となる点、さらにそのための遺伝子発現プロファイルのゆがみが過渡反応の誤測定のもととなるという問題は、我々が開発、実用化したPercellome絶対量化法を用いることで解決済みである。このため、反復暴露影響の分子機序の解析、特に基線反応に係わるフィードバック機序を高精度に解明し、慢性影響予測精度の向上を目指す

すことが可能となっている。

B. 研究方法

(1) 反復暴露影響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

試薬及び動物：

バルプロ酸ナトリウム (Valproic acid sodium salt; 分子量：166.19、Cas No.: 1069-66-5、純度 98%以上、Sigma-Aldrich) について既存データ(単回投与および 14 回反復投与)の解析を進めた。また新たに 12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に 4 用量 (溶媒：0.5%メチルセルロース水溶液) のバルプロ酸ナトリウムを、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、経時的 (投与 2、4、8 及び 24 時間後) に肝及び肺を採取した。

単回暴露 (0 回反復暴露後に単回暴露、以降、[0+1]と表記) 時のバルプロ酸ナトリウムの投与量は 0、50、150、500 mg/kg とした。新型反復暴露である 14 回反復暴露 (14 日間、1 日 1 回反復暴露の 15 日目に単回暴露、以降、[14+1]と表記) 時のバルプロ酸ナトリウムの 14 回反復投与の用量は全例に対し 100 mg/kg、最終の単回暴露の用量は 0、50、150、500 mg/kg とした。本年度は[1+1]、[2+1]、[4+1]を実施する。

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 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。その後、RNA 抽出操作までは

-80 にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RN easy 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 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、RN easy 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 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、発現を表す平面の凹凸を評価し、ノイズデータを排除し、全ての ps を生物学的に有意な反応を示していると考えられる順に並び替えるソフトである。また、既知のシグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

(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的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成 19 年 4 月版)及び国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行う。)

C. 研究結果

バルプロ酸ナトリウム (VPA) について新型反復暴露実験を行い ([1+1]、[4+1] は完了。[2+1] は 1 月末に実施済み、データ採取中)、[0+1]、[1+1]、[4+1]、及び[14+1] の 4 通りの反復投与回数による過渡反応と基線反応のそれぞれの推移と両反応の関連性の解析を肝について進めた。VPA は、反復暴露後も過渡反応が完全消失しない遺伝子の数が多いという特徴を有してい

た。その上で、基線反応との関連傾向は基本的に四塩化炭素と同様であり、反復投与により基線が低下した際には、過渡反応のピークが低下する傾向が認められた。一旦発現が抑制されるものの、[14+1]において再び基線が上昇し、それに伴い過渡反応が回復する遺伝子が検出されたほか、基線反応、過渡反応ともに反復暴露に影響されない遺伝子も多数検出された。[2+1]の新型暴露実験結果を待って、[0+1]、[1+1]、[2+1]、[4+1]、[14+1]から得られる諸傾向を確認し、分子機序の解析を進める予定である。平行して、反復暴露後に異なった化学物質を単回暴露した新型反復毒性実験の結果の解析も進め、ネットワーク交叉に関する情報を得る。また、ラット TGP データを Percellome 変換し、類似の解析を加えマウスデータと比較した。

反復投与による基線反応を示す遺伝子が、どのような転写制御を受けるかを検討した。当該遺伝子の転写開始点上流において共通する転写因子や結合配列を *in silico* プロモーター解析により検討した結果、一定の傾向の存在が示唆された。基線反応低下には小胞体ストレスシグナルが関与しており、その中の Xbp1 の関与が示唆される経路と、eIF2 の関与が示唆される経路とが区別される可能性があることが判明した。前者は単回暴露時に遺伝子発現が誘発され、反復暴露によりそれが減弱する遺伝子群、後者は、単回暴露による遺伝子発現誘導が見られず、反復暴露により基線のみが低下する遺伝子群に該当する傾向があった。今後、研究分担者の協力のもと、詳細な Promoter 解析等を加える予定である。これに関連して、四塩化炭素反復暴露がクロフ

イプレート単回暴露に与える影響を解析中である。

これらを総合し、基線反応と過渡反応の組み合わせによる遺伝子リストを完成させ、その経時的な変動を調節する上下流の遺伝子発現ネットワークを明らかにし、慢性毒性の分子背景の解明を進める計画である。

D. 考察

先に、肝及び肺における四塩化炭素の新型反復暴露実験により、単回暴露時に発現変動した遺伝子のほぼ全てについて、基線反応成分（暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン（基線）が徐々に変動する反応（Baseline Response；B-Res））は、過渡反応（単回暴露時の2, 4, 8, 24時間のうちに発現が変動する速い変化（Transient Response；T-Res））が増加する場合は増加、減弱する場合は減少することを見いだした。増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられた。むしろ、この過渡反応と基線反応の連関性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクスに関わる分子機序の関与が示唆されることから、これを明らかにすることは、反復毒性の分子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測法を開発するにあたり重要と考えられる。

今年度は抗けいれん薬として使用されているバルプロ酸ナトリウムについて同様の解析を実施したところ、四塩化炭素で見られた所見と基本的に同傾向であるものの、発現抑制を受けない遺伝子の数が多いとい

う特徴が見られた。この特徴は、治療薬として反復投与とされている化学物質の特性として、長期使用でも薬効が維持されるために必要なものであるとの見方が可能性であるものとして注目される。また、TGPのラットのデータから、種間に共通な分子機構が存在することを示唆した点は、外挿性の点から注目される。

今後、慢性毒性の理解のための過渡反応と基線反応の分子機序解明に、四塩化炭素とバルプロ酸ナトリウムの差異を利用した転写制御領域の解析等を分担研究者の協力のもとに推進する。

E. 結論

本研究は、先行実施された Percellome トキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。本分担研究では、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を目的とする。

初年度に実施した、四塩化炭素による新型反復暴露解析では、単回暴露時の過渡反応成分と反復暴露時の基線反応成分の基本的な関連性を見だし、今年度、同様の解析をバルプロ酸ナトリウムで実施し、大筋での同様の所見、及び、化学物質固有の所見を得た。この過渡反応と基線反応に関する知見は生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクス等の機序の関与が示唆されることから、これを明らかにすることは、反復毒性の分子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露実験データベースからの反

復毒性予測法を開発するにあたり重要と考える。

来年度は、クロフィプレートについて同様の実験・解析を実施し、単回暴露（急性）の毒性ネットワーク解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価技術の開発を推進する。

F. 研究発表

(1) 論文発表

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y. (2013) Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci.* 38(4):643-54.

Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y (2013) Autoimmune regulator, Aire, is a novel regulator of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* ;437(4):579-84.

Fujimoto, N, Takagi, A, Kanno, J. (2013) Neonatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the mRNA expression of prostatic proteins in C57BL mice. *J Toxicol Sci.* 38(2):279-83.

(2) 学会発表

Jun Kanno, Progress in Japanese Percellome Project and incorporation of TGP data, 11th International

Conference of Environment Mutagens (11th ICEM), (2013.11.4), Fos do Iguassu, Brazil, invited

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics, A Quantitative and Comprehensive Approach for Basic and Applied Toxicology. ICT2013 The XIII International Congress of Toxicology, (2013.7.2), Seoul, Korea, distinguished lecture

菅野 純、"Percellome Project ケミカルバイオロジ - の視点からのトキシコゲノミクス Percellome Project の進捗とその応用性 "、第 40 回日本毒性学会学術年会、2013 年 6 月 18 日、千葉、シンポジウム

菅野 純、網羅的絶対量化遺伝子発現解析による外来物質生体影響の動的ネットワークマーカー描出：Percellome Project、第 102 回日本病理学会総会、2013 年 6 月 7 日、札幌、シンポジウム

Jun Kanno, Percellome toxicogenomics for more comprehensive and quantitative toxicology-extending the analysis among different organs and different species, the workshop on Moving Forward in Human Cancer Risk Assessment in the Genomics Era 2.0, (2013.5.16), Paris, France, invited

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics application to Sick House Syndrome-level inhalation toxicity, the

Meeting of the Extended Advisory
Group on Molecular Screening,
(2013.5.15), Paris, France, invited

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 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