

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 -」
（H24-化学-指定-006）

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」

研究代表者 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。これに際し本分担研究では、新型反復暴露実験(**)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技術開発を行う。

先行研究による単回暴露実験と新型反復暴露実験の比較解析結果から、新型反復暴露が2種類の反応を遺伝子発現に及ぼすことが判明した。それは、過渡反応：暴露の都度に概ね24時間以内に収まる速い変化、及び、基線反応：暴露を重ねるに連れ、日を追って発現値の基線が徐々に移動する緩徐な反応である。さらに平成24年度、25年度に実施した四塩化炭素及びバルプロ酸ナトリウムにおける新型反復暴露実験の解析結果から、新型反復暴露で過渡反応の振幅が増減した遺伝子では、それらの基線反応も同様の増減傾向を示すことを見出した。ただし、四塩化炭素では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、バルプロ酸ではそのような傾向は弱いという差異が認められた。

今年度（平成26年度）はクロフィプレートにて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過渡反応 - 基線反応関係を確認した。またそれらのシグナルネットワーク解析の結果、それらの上流に共通の分子機構が働いている強い可能性が示された。

(*) 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、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した毒性評価手法の迅速化、高度化、及びその実用の為のインフォマティクス開発を目的とする。

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) と単回暴露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、反復暴露のネットワーク解析、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。

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【菅野】

B1-1: 試薬及び動物 :

本年度 (平成 26 年度) はクロフィブレート (Clofibrate; 分子量 : 242.7、Cas No. : 637-07-0、純度 98.0%、Enzo) について既存データの解析を進めた。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 : 0.1% DMSO 含有 0.5% メチルセルロース水溶液) のクロフ

ィブレードを、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) に肝を採取した。

単回暴露 ([0+1]) 時のクロフィブレードの投与量は 0、10、30、100 mg/kg とした。新型反復暴露である 14 日間反復暴露 ([14+1]) 時のクロフィブレードの投与量は全例に対し 70 mg/kg、単回暴露は 0、10、30、100 mg/kg とした。

B1-2: 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 (ライフテクノロジーズ・ジャパン社) 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。

B1-3: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 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、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。また、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

平成 26 年度はクロフィプレートについて同様の新型反復暴露実験を行い、[0+1]、[1+1]、[2+1]、[4+1]、及び[14+1]の 5 通りの反復投与期間の長短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。

過渡反応の有無(最終日の投与の影響の有無) に関わらず、約 4,000 の遺伝子に、有意な基線反応が認められ、うち 1,700 遺伝子に 1 回から 14 回反復に亘り基線の低下が認められた。この遺伝子群は既知遺伝子情報 (IPA) により、四塩化炭素と共通する特定の経路を構成する遺伝子を高率に含んでいることが判明した。また、過渡反応が基線反応の影響を受けるものは比較的少数であり、受けないものが多いことが判明した。

H24 年度に実施した四塩化炭素、及び平成 25 年度に実施したバルブプロ酸ナトリウムの解析結果を加え、これら 3 化学物質の解析結果を総合し、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た。その結果、

基線反応の強い抑制を示す遺伝子群の発現を支配する上流遺伝子群が 3 物質に共通していることが明らかになった事、その更なる上流の候補遺伝子が単回投与から数個示唆された事、新型反復暴露実験による過渡反応遺伝子群と基線反応遺伝子群の重なり具合が、化学物質固有であることから、この重なりの内容が反復毒性の予測に重要である可能性が示唆された事、が成果としてあげられた。

D . 考察

本年度は高脂血症治療薬として使用されているクロフィブレートについても新型反復暴露実験を行った結果、反復暴露により基線の低下が認められた遺伝子群が属する遺伝子発現経路群は四塩化炭素のそれ（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成分）は、過渡反応成分（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の成分）が増加する場合は増加、減弱する場合は減少すること）と酷似していることが確認された。他方、過渡反応については、四塩化炭素が基線反応の影響を強く受けたのに対し、クロフィブレートの過渡反応は基線反応の影響を受けないものの比率が多かった。

他方、クロフィブレートは治療薬として利用されているものの、四塩化炭素とバルプロ酸ナトリウムの関係と同様、クロフィブレートとバルプロ酸ナトリウムの比較解析に於いて共通要素や共通特性はあまり見ら

れなかった。

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、特徴的な基線反応と過渡反応の両極端のパターンを示す四塩化炭素とバルプロ酸ナトリウム、その中間的な反応を示すクロフィブレートの三者の所見の差異を利用し、基線反応を引き起こす上流機構、転写制御領域の解析、基線反応と過渡反応の連鎖・非連鎖の分子基盤、等を分担研究者の協力のもとに推進する。また、単回暴露実験の結果の中から、反復暴露時の基線反応と過渡反応と関連する、即ち、予測に使用可能な、所見の存否を明らかにする。

E . 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。新型反復暴露実験を実施した四塩化炭素（平成 24 年度）、バルプロ酸ナトリウム（平成 25 年度）及びクロフィブレート（平成 26 年度）の 3 化学物質の解析結果から、大筋に於いて、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が共通していることを見いだしつつ、各化学物質特有の所見を得た。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。これらの研究成果は、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とともに、その予測精度の把握と、1 乃至 4 日間の先行反

復暴露を行うプロトコール（上記において [1+1] 或いは [4+1] と表記したもの）による高精度の慢性毒性予測補填の技術開発の可能性をも明らかにするものである。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR γ signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development*. (2014);141(11):2260-70.

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. *Genomics Data* 2: 296–298, 2014.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*. (2014);124(7):3061-74.

2 . 学会発表

Jun Kanno, “ Taquann” Dispersion Method with Direct Injection Whole-Body Inhalation System for Engineered Nano Materials Toxicity Studies, the 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3.25) San Diego, USA, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014)(2014.9.9) Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学 Percellome トキシコゲノミクスの進捗 、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25) 東京、シンポジウム

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス - 化学構造が異なる 3 物質の比較 - 、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.3) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析 、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2) 神戸、シンポジウム

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、毒性の網

羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク
描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日
本毒性学会学術年会(2014.7.2)神戸、シンポ
ジウム

G . 知的所有権の取得状況

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