

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 - 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による 毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 - (H27-化学-指定-001)

「新型」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発

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 Perce llome^{*}トキシコゲノミクス研究を基盤に、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。

特に先行3年間に実施した「新型」反復暴露実験^{**}により、化学物質の反復投与による生体影響が分子レベルにおいて数日で定常化する所見を複数見出した^{***}。これを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復暴露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究では、「新型」反復暴露実験を実施して基盤となる Perce llome データベースを拡充すると共に、短期間の「新型」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発を行う。

平成 27 年度はアセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩に対し同設計の「新型」反復暴露実験セットを実施し、先行研究での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。注目すべきは、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、アセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩ではむしろ発現が増加する遺伝子が多いという差異が認められた。それにも関わらず、反復暴露による遺伝子発現変化の基盤的分子機構には、EIF2 シグナル等を主体とする小胞体ストレスの存在が明らかとなった。この変化は NRF2 の下流で mTOR シグナルの関与のもとに誘導されることが示唆された。詳細をさらに解析中である。

尚、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、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」(動物実験承認番号 365)に従い実施した。

(*) 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。

(**) 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。

(***) 先行3年間の研究により、反復暴露による生体影響は分子レベルでは、暴露の都度の変化を示す成分である「過渡反応」と、回を重ねるに連れ発現値の基線を徐々に移動させる成分である「基線反応」に分けて解釈できることが判明している。

A . 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評

価手法を、生体反応の分子メカニズムに基いて迅速化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技

術と統合して実用化する事を目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 6.5 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、反復暴露にも対応する網羅的毒性予測評価システムの構築を進める。

B . 研究方法

B1-1:試薬及び動物：

アセトアミノフェン (Acetaminophen; 分子量：151.17、Cas No.: 103-90-2、純度 99% 以上、Sigma-Aldrich) 及び、フェノバルビタール ナトリウム塩 (Phenobarbital sodium salt; 分子量：254.22、Cas No.: 57-30-7、純度 99% 以上、Sigma-Aldrich) について、既の実施済みの単回投与のデータの解析を進めた。単回暴露 (0 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[0+1]と表記) 時のアセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩の投与量はそれぞれ 0、18、60、180 mg/kg 及び 0、15、50、150 mg/kg である。

「新型」反復暴露実験を、4 日間反復暴露 (4 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。アセトアミノフェンの 4 回の全動物に対する反復投与の用量は用量設定実験の結果 120 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様の 0、18、60、180 mg/kg とした。フェノバルビタール ナトリウム塩の 4 回の全動物に対する反復投与の用量は用量設定実験の結果、30 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に 0、15、50、150 mg/kg とした。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) を用い溶媒は 0.5%メチルセルロース水溶液とし、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、最終投与の 2、4、8 及び 24 時間後に肝を採取した。

B1-2:Total RNA の分離精製：

マウス肝組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4 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 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 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 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、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、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。これにより抽出された、有意に変動する ps について目視による選択を行い、生物学的に有意と判定される変化を示した ps を解析に使用した。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・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版))

C . 研究結果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

アセトアミノフェンについて解析した結果、4 日間の反復投与後の単回暴露の [4+1] 実験では、単回暴露のみの [0+1] 実験の場合に比べて、反応が減弱ないし消失する遺伝子が少数、反応が増強する遺

伝子が比較的多数認められた。また、その際に溶媒対照群の発現値から読み取れるところのベースラインが、反応が減弱した遺伝子では低下し、反応が増強した遺伝子では上昇する傾向が認められ、この結果は先行研究と同様であったが、例外も認められた。先行研究において、最終投与後 2、4、8、24 時間の変動を過渡反応 (Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの変動を基線反応 (Baseline Response) と定義したが、その各々の特性及び両者の関連性について更に解析を進めている。現段階では、反復暴露により基線反応が低下した遺伝子群は、先行研究での四塩化炭素等の場合とほぼ同様遺伝子群を含むことが確認された。ただし、その多くは過渡反応を示さない遺伝子であった。過渡反応を示す遺伝子の基線反応は、先行研究の四塩化炭素等に比較すると、アセトアミノフェンではその運動性は弱い傾向にあり、発現が増加、減少、及び同等である遺伝子が基線反応の増・減・不変と一致しない場合があるという特徴が明らかとなった。それらの遺伝子群の特徴について更なる解析を実施中である。

フェノバルビタール ナトリウム塩の新型暴露実験のデータの解析も途上にあるが、結果はアセトアミノフェンと同様の傾向を示した。詳細な解析を継続するが、反復暴露による遺伝子発現変化の基盤的分子機構には、EIF2 シグナル等を主体とする小胞体ストレスの存在が明らかとなり、これは四塩化炭素と共通する所見であった。尚、初期の PXR/SXR、CAR のシグナルネットワークの発動に前後し、GADD45 などの細胞増殖、修復、アポトーシス関連のシグナルが単回暴露と同様、あるいは、増幅傾向をもって反復暴露においても維持されていることが示された。これはアセトアミノフェンには見られない反応である。

これらの [4+1] 実験は、同一化学物質を投与している A+A 型の新型反復暴露実験であるが、4 日間暴露する化学物質と 5 日目に暴露する化学物質が異なる A+B 型の新型反復暴露実験の結果を既に得ている組み合わせがあり、その結果との対比を進め、ネットワーク交叉に関する、より詳細な遺伝子ネットワーク情報を得る。

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

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においては、先行研究において、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。

H27 年度は解熱鎮痛薬として使用され、毒性学的に過剰投与により肝の小葉中心性壊死を誘発することが知られているアセトアミノフェンにおいて同様の実験を行ったところ、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、発現増加する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されている化学物質の特性として、長期のアセトアミノフェン服用による肝障害と関連する可能性があり注目され、引き続き関係するシグナルネットワークを含め解析中である。また抗てんかん薬フェノバルビタール ナトリウム塩についても解析を進め、単回暴露と反復暴露との差異を含め、共通点と相違点が整理されつつある。注目される点として、細胞増殖、修復、アポトーシス関連のシグナルが単回暴露と同様、あるいは、増幅傾向をもって認められたことが挙げられる。

平成 28 年度は、5-FU の一定用量を 4 日間反復暴露後 5 日目にサリドマイドを単回暴露 (4 用量) した際、及び五塩化フェノールの一定用量を 4 日間反復暴露後 5 日目にバルプロ酸ナトリウムを単回暴露 (4 用量) した際の解析を実施し、単回暴露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価精度の向上を目指す。

E . 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

平成 27 年度に実施した、アセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩による新型反復暴露解析では、大筋で先行研究と同様の所見、すなわち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、また、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。

平成 28 年度も、別の化学物質について同様の実験・解析を実施し、単回暴露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価精度の向上を目指す。

F．健康危険情報 なし

G．研究発表

1．論文発表（抜粋）

(1) Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. Stem Cell Reports. 2015 Dec 8;5(6):996-1009.

2．学会発表（抜粋）

(1) Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study (2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster

(2) 菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性 - 毒性学的観点からの考察- (2015.12.12)、日本動物実験代替法学会第 28 回大会、横浜、特別講演

(3) 菅野 純
OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み
環境ホルモン学会第 18 回研究発表会(2015.12.11)

(4) Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium

(5) Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop “The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity”, Brussels, Oral

(6) Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations.-with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop “The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity”, Brussels, Oral

(7) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium

(8) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, “Signal Toxicity” to study Endocrine Disruptors Issues and Children’s Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

(9) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

(10) 菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期暴露-遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について (2015.8.20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)、東京、セミナー

(11) 菅野 純、種村健太郎、ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるか - 有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の発現実験より - (2015.7.17)、第 37 回日本中毒学会総会・学術集会、和歌山、シンポジウム

(12) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.7.1)

(13) 北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純
シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6.30)

(14) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純
医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6.29)

(15) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

(16) Jun Kanno, Construction of “ Dynamic Biomarkers ” by Percellome Toxicology based on a new Concept of “ Signal Toxicity ” , The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6.25), Jeju, Korea

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし