

別添 4

# . 分担研究報告書

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客員研究員

研究要旨

本研究は、先行実施された Perce llome<sup>\*</sup>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<sup>\*\*</sup>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<sup>\*\*\*</sup>。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 28 年度はサリドマイド及び5-フルオロウラシルに対し同設計の「新型」反復暴露実験セットを実施した。四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、昨年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。

サリドマイドは、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応がないか微弱な遺伝子が基線の上昇とともに過渡反応を明瞭に示すようになる遺伝子が多数認められた。このような遺伝子は、過渡反応のピークが4~8時間目のものであった。これに対し、反復曝露により、単回曝露時の過渡反応が消失または低下する遺伝子を少数ながら認めた。この遺伝子群は、単回曝露時に2時間目にピークを示す早期反応性の遺伝子であった。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。

5-フルオロウラシルについては、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応のある遺伝子が基線の変化なく過渡反応を消失ないし減ずる遺伝子が多数認められた。それらには、遺伝子発現を抑制的に調節する遺伝子が多く含まれていた。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構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 :

サリドマイド (Thalidomide; 分子量 : 258.233、Cas No. : 50-35-1、純度 98.4%、Carbosynth) 及び、5 - フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU; 分子量 : 130.077、Cas No. : 51-21-8、純度 99.8%、東京化成) について、既に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) 時の投与量はそれぞれ 0、100、300、1000 mg/kg 及び 0、30、100、300 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。サリドマイドの 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 70 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様の 0、100、300、1000 mg/kg とした。5-FU 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、7 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に 0、30、100、300 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 µL 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 µg 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、ピオチン化 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に行い、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)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

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

なお、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)と定義したところであるが、本研究においても、これを使用した。

サリドマイド及び5-フルオロウラシルは、四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、昨年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。

サリドマイドは、反復曝露[4+1]実験により単回曝露[0+1]実験よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応がないか微弱な遺伝子が基線の上昇とともに過渡反応を明瞭に示すようになる遺伝子が多数認められた。このような遺伝子は、過渡反応のピークが4~8時間目のものであった。これに対し、[4+1]実験により、[0+1]実験の過渡反応が消失または低下する遺伝子を少数ながら認めた。この遺伝子群は、[0+1]実験で2時間目にピークを示す早期反応性の遺伝子であった。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。(図1~4参照)

5-フルオロウラシルについては、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応のある遺伝子が基線の変化なく過渡反応を消失ないし減ずる遺伝子が多数認められた。それらには、遺伝子発現を抑制的に調節する遺伝子が多く含まれていた。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさ

らに解析中である。(図5~8参照)

これらの[4+1]実験は、同一化学物質を投与しているA+A型の新型反復曝露実験であるが、4日間曝露する化学物質と5日目に曝露する化学物質が異なるA+B型の新型反復曝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

反復曝露影響の分子機序解析による、既存の単回曝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曝露実験により、単回曝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(曝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(単回曝露時の2、4、8、24時間のうちに発現が増加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ビ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、単回曝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。

平成29年度は、新型反復曝露実験を実施し、前2年間に得られた情報をもとに、単回曝露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復曝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28年度に実施した、サリドマイド及び5-フルオロウラシルによる新型反復曝露解析では、大筋で先行研究と同様の所見、すなわち単回曝露時の過渡反応成分と反復曝露時の基線反応成分の基本的な関連性を見いだした。化学物質特有の傾向としては、四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失

する遺伝子が多いのに対し、平成 27 年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。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 29 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. 研究発表

### 1. 論文発表 (抜粋)

(1) Kanno J. (2016) Introduction to the concept of signal toxicity. *J Toxicol Sci.* 2016;41(Special):SP105-SP109

(2) Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K., The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- B Signaling., *Mol Cell.* 2016 Oct 20;64(2):251-266.

(3) Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J., Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period., *Front Neurosci.* 2016 Jul 20;10:339.

(4) Fujimoto N, Kanno J., Increase in prostate stem cell antigen expression in prostatic hyperplasia induced by testosterone and 17 $\beta$ -estradiol in C57BL mice., *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Apr;158:56-62.

### 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, Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems biology, 第 105 回日本病理学会総会 (2016.5.13) 仙台、診療領域別講習特別プログラム、口演

(3) Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Jun KANNO, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity, 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6.29) 名古屋、日米毒性学会の交流促進プログラム、口演

(4) 菅野 純、社会に浸透した毒性学をめざして、第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6.30) 名古屋、日本毒性学会 35 周年記念特別企画、口演

(5) 種村健太郎、古川佑介、北嶋 聡、菅野 純、キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行動影響解析、第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6.30) 名古屋、一般演題、口演

(6) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復暴露の比較による予測性向上 -、第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.7.1) 名古屋、シンポジウム、口演

(7) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016) (2016.9.6)、Seville, Spain, poster

(8) Kanno J., Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of

"signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology., 第14回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

⑨ Kitajima S, Aisaki KI, Kanno J, Percellome project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement., 第14回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

(10) Tanemura K, Kanno J., Neurobehavioral toxicity at adult period induced by pesticide exposure at juvenile period. 第14回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.5), Merida, Mexico, Symposium

⑪ Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health., the 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016.11.29), Seoul, Korea, Invited

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

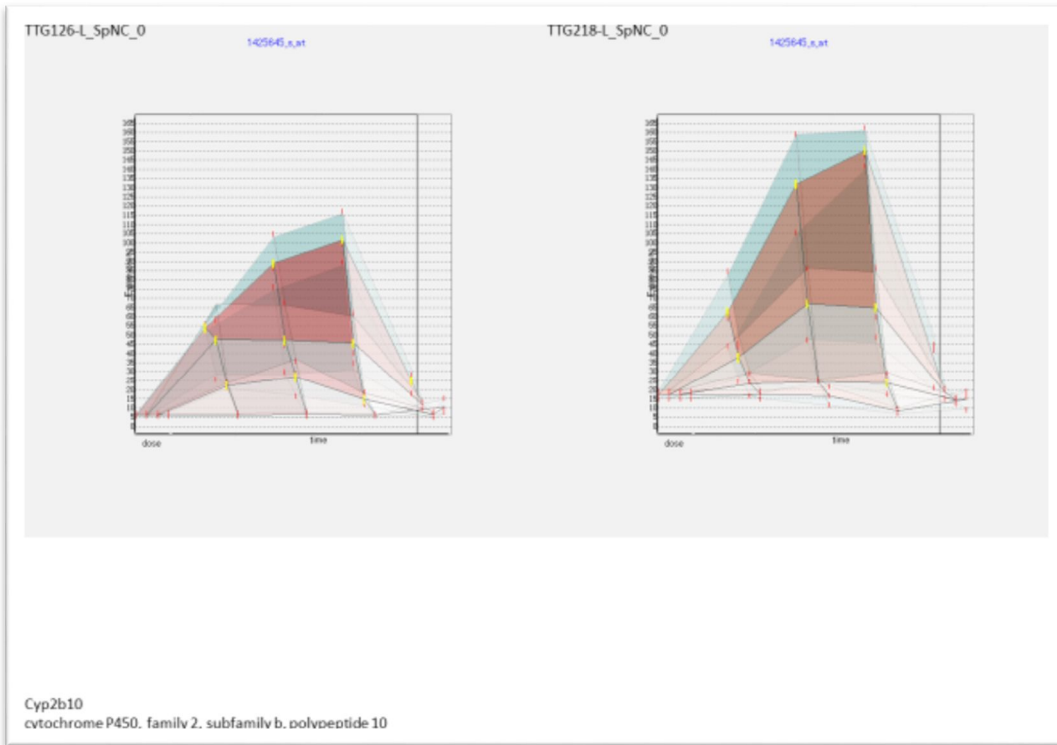
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

サリドマイド (左 [0+1]、右 [4+1])



]

図 1

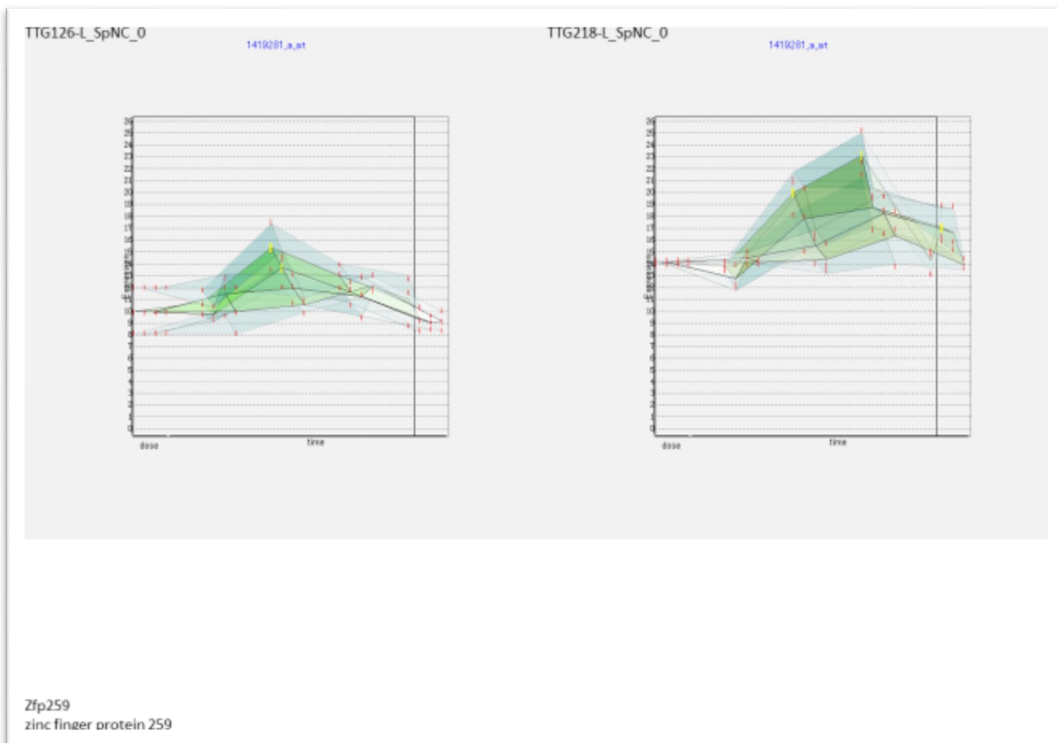
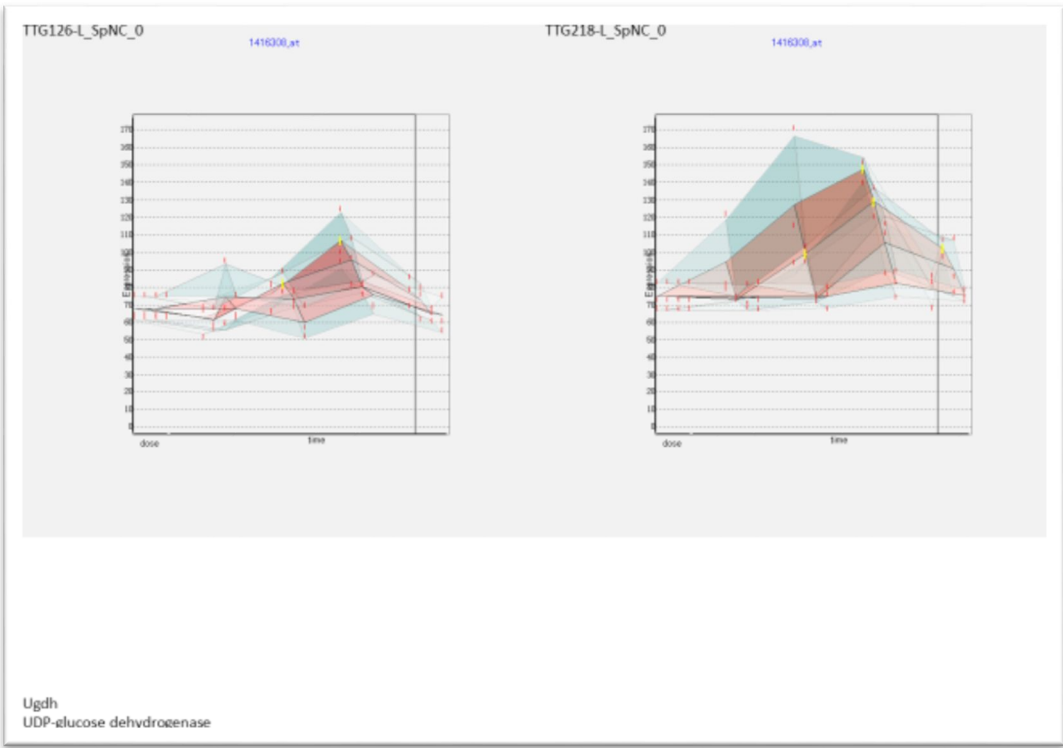
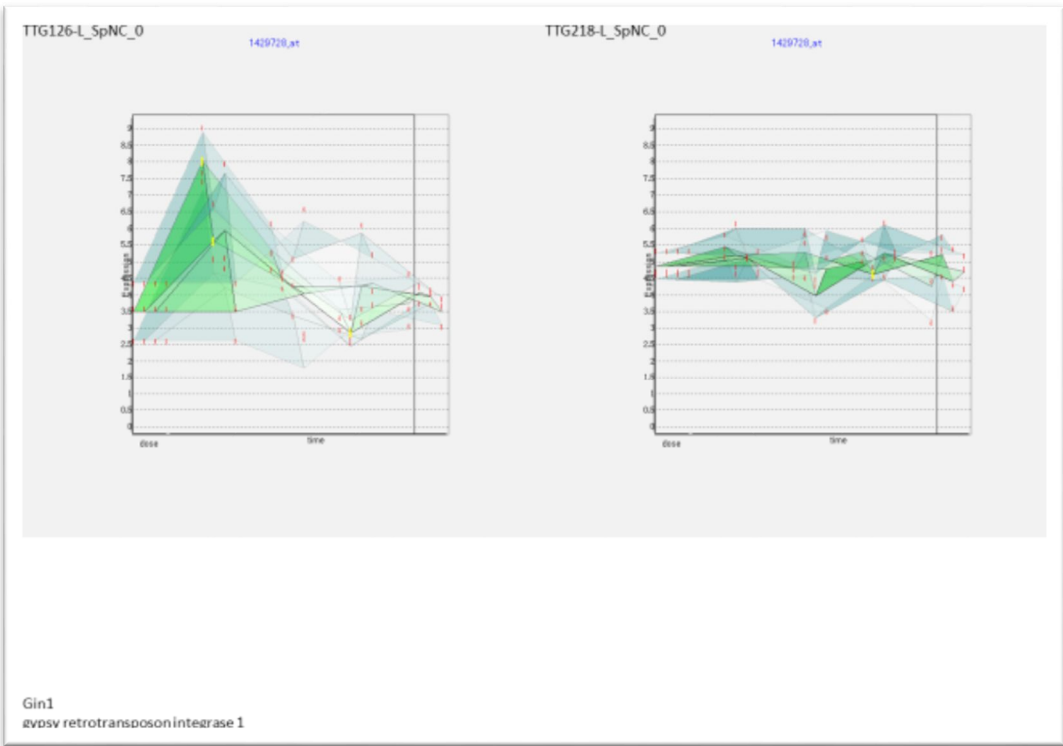


図 2



☒ 3



☒ 4



5 - フルオロウラシル (左 [0+1]、右 [4+1])

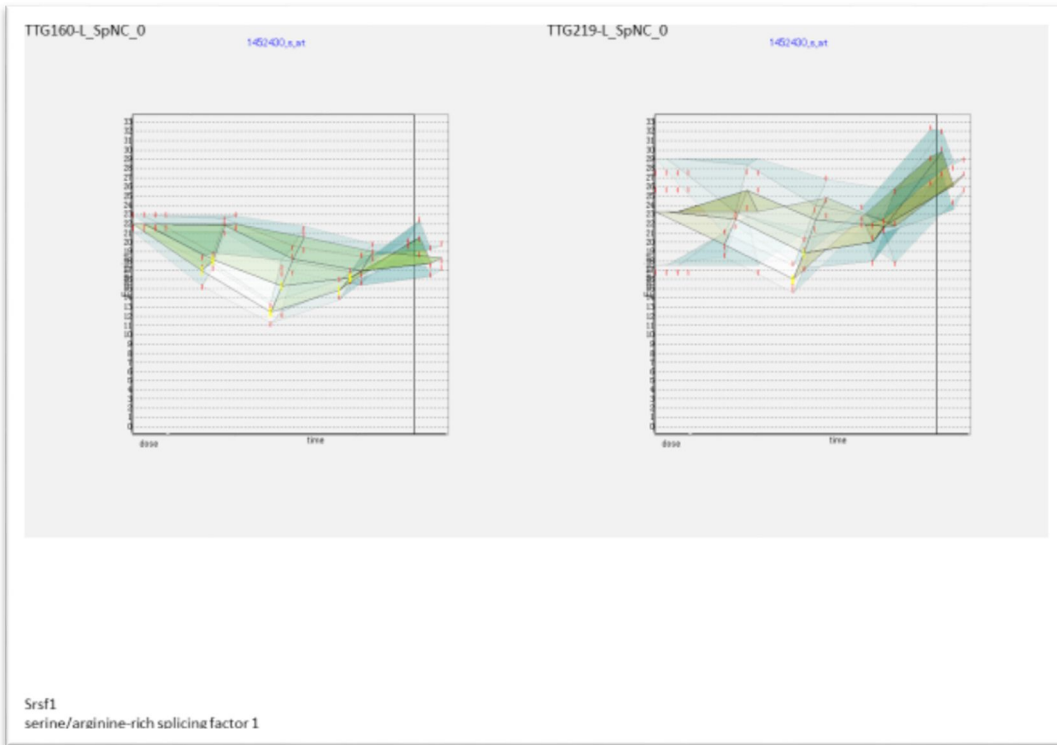


図 5

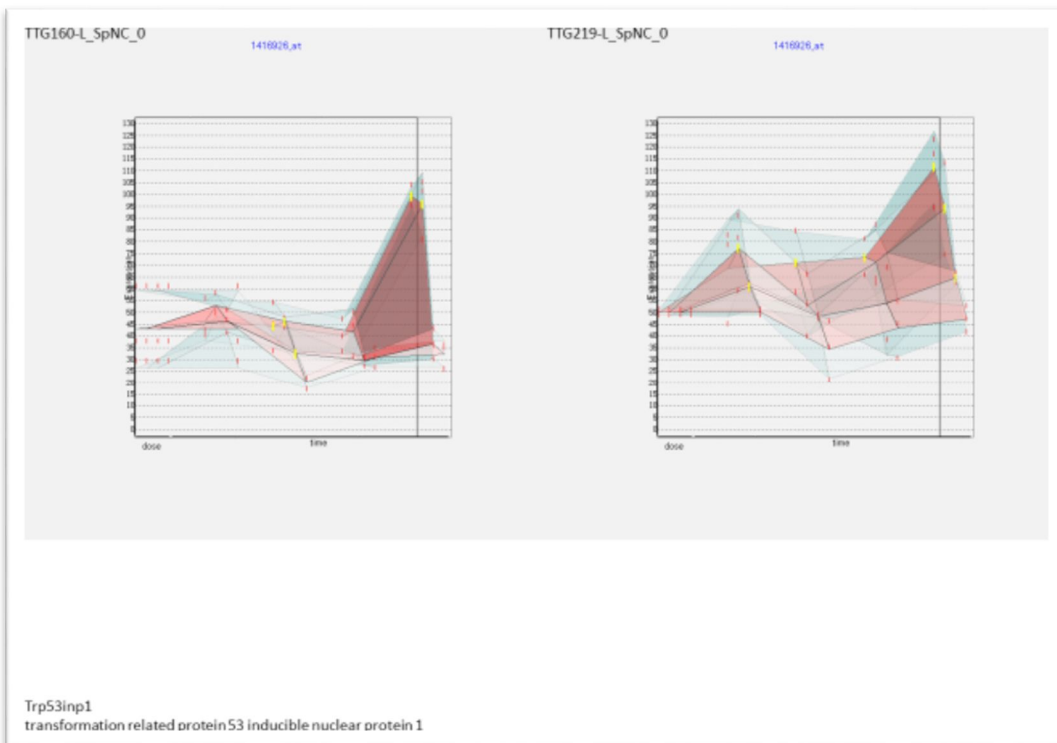


図 6

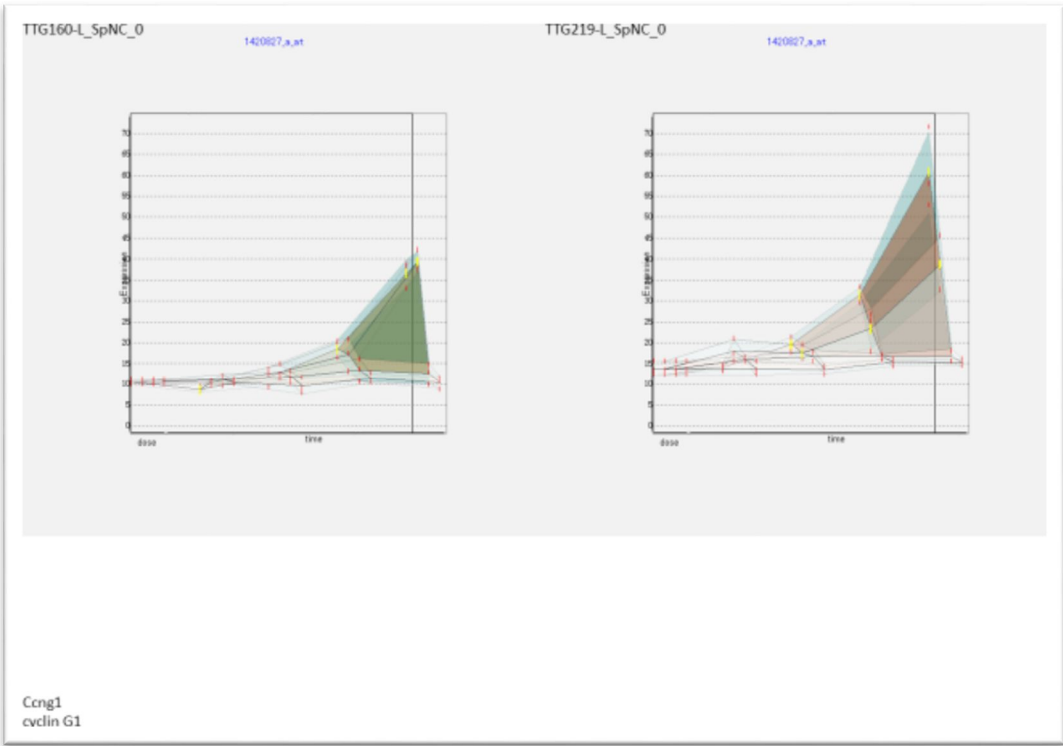


図 7

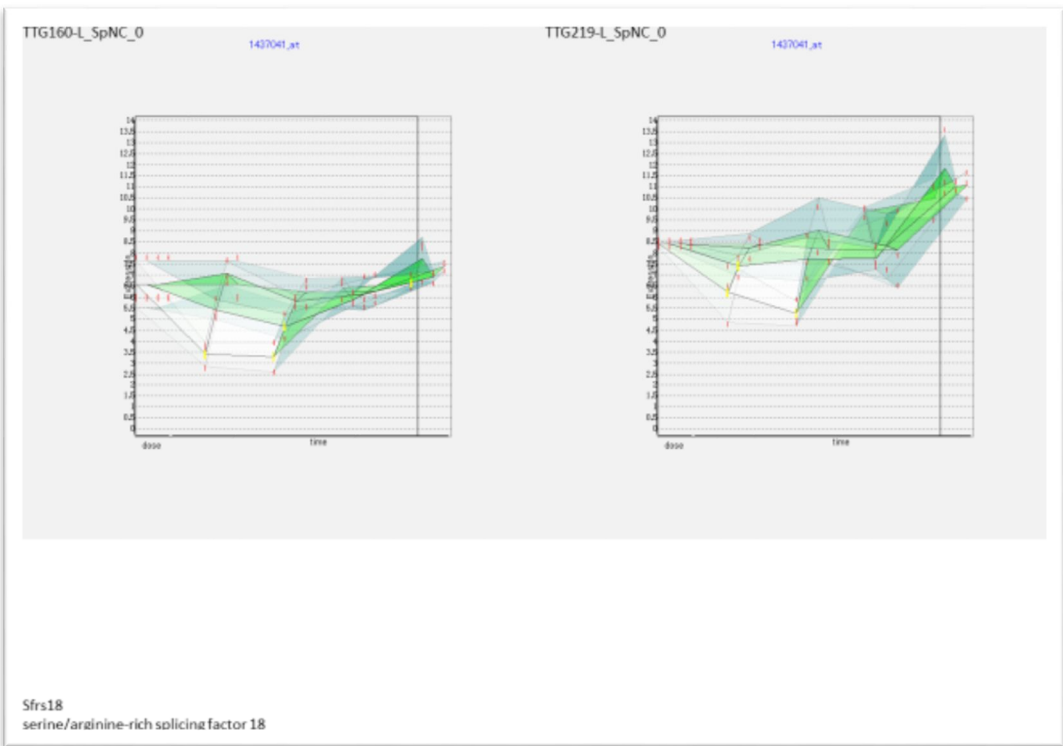


図 8