

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成 29 年度 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 Percellome*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 Percellome 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 29 年度はアセフェート及び五塩化フェノールに対し「新型」反復暴露実験セット、網羅的遺伝子発現解析を行い、詳細解析を進めた。先行研究において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、昨年度までのアセトアミノフェン、フェノバルビタール、サリドマイド及び5-フルオロウラシルに引き続き、むしろ過渡反応としての発現が増加する遺伝子が多く、基線反応も上昇する場合が多いという結果がえられた。

アセフェートは、反復曝露と単回曝露の差が極めて少ない特徴を有していた。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が変動することから、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響が示唆された点が注目される。また、発がん性を示唆する遺伝子群の発現誘導を伴っており、反復曝露により増強する傾向が見られた。

五塩化フェノールにおいては、反復曝露により殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線反応が上昇する特徴を有していた。その上流に RICTOR、HNF4A、NRF2 が位置し、EIF2 シグナル等が活性化する小胞体ストレスに関わる点で四塩化炭素と類似していた。尚、単回曝露時に特徴的であったインターフェロンシグナル遺伝子群は、反復曝露により過渡反応は消失するとともに有意な基線上昇を示していた。反復投与により常時誘導状態が誘導

される機序の解析が新たな課題として浮上した。

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づいて迅速化、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。

本分担研究では、「新型」反復暴露実験を実施し、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のためのデータ取得と解析を行う事を目的とする。

B. 研究方法

B1-1: 試薬及び動物 :

アセフェート (acephate ; 分子量 : 183.2、Cas No. : 30560-19-1、純度 99.5%、和光純薬) 及び、五塩化フェノール (pentachlorophenol (PCP) ; 分子量 266.34、

Cas No. : 87-86-5、純度 99.7%、和光純薬) 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、7、20、70 mg/kg 及び 0、10、30、100 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) のプロトコールにて実施した。アセフェートの 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 10 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様の 0、7、20、70 mg/kg とした。五塩化フェノールの 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]実験と同様に 0、10、30、100 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°C 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°C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、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°C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）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。

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 度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタール、平成 28 年度に実施したサリドマイド及び 5-フルオロウラシルは、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。

アセフェートは、反復曝露 [4+1] 実験も単回曝露 [0+1] 実験とほぼ同等の基線を維持している遺伝子が殆どであり、過渡反応を示す遺伝子のリスト及び、それらの過渡反応の大きさには殆ど変化がなかった。これは、過渡反応が増加を示す遺伝子にも発現が低下を示す遺伝子にも該当する所見である。その中であって、代謝酵素の一部については [4+1] において過渡反応が減弱するものが認められた。[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は殆ど認められなかった。

2時間目の誘導の上流に PXR/SXR 及び GR が位置し、時間の経過とともに PPAR も作動する様子が示された。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が変動することから、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響を示唆する遺伝子リストが含まれるとの出力がデータベース照合 (IPA) により得られた。急ぎ他の向神経作用のある化学物質の肝プロファイルを精査する計画である。また、発がん性を示唆する遺伝子群の発現誘導を伴っており、その発現ネットワークの解析も進める。

五塩化フェノールについては、殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線が上昇すること、基線上昇を示した遺伝子は、四塩化炭素の反復暴露において過渡反応が消失し、基線が低下した遺伝子群を含み、四塩化炭素の解析の際と同様に、上流に RICTOR、HNF4A、NRF2 が位置し、EIF2 シグナル、ミトコンドリア機能異常、ユビキチン化経路の遺伝子発現に関わり、小胞体ストレスが誘発されていることが明らかとなった。

尚、[0+1] の五塩化フェノールに特徴的であったインターフェロンシグナル遺伝子群はそのすべての過渡反応は反復曝露により消失し、その多くは有意な基線上昇を示していた。すなわち、この系の遺伝子群は、反復投与により常時誘導状態に置かれた可能性が示唆された (但し、実験の実施時期が離れていることから最終的な定量的確認は、少数の動物を用いての再現実験を必要とする可能性がある)。更に注目されるのは、4日間反復曝露により5日目の曝露に対する反応性が、単回時と大幅に変化した状態における、[4+1] 実験の24時間目に誘導される遺伝子群はインターフェロンシグナル系の属さないものの、その上流に、IRF7、IRF3、PTGER4 など、[0+1] 実験の際の上流と共通の因子が抽出される点であり、その共通性の解析を進める必要がある。

今回、五塩化フェノールが、過渡反応の消失という点で四塩化炭素類似の反応を示すことが判明したが、その基線反応の方向が逆である可能性があることから、常時誘導状態の存在とその成立機序の解析が新たな課題として浮上した。

以上より、複数の制御系が関与する事が明らかとなり、基線反応と過渡反応の組み合わせによる、それらの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。その中で、反応が増加する遺伝子群が存在することから、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。これに加え、今回、アセフェートが、肝のプロファイルにおいて、中枢神経影響と発がん性を示唆されたことは、多臓器関連に関わる所見として今後の解析の導入に利用可能であると考えられた。また、五塩化フェノールにおいて、基線反応の変動方

向が四塩化炭素と逆となった点について、詳細に解析する必要がある。四塩化炭素と類似の反応を示した化学物質を先行研究において複数解析（トリブチル錫、ディート、クロフィブレート）しており、それらとの対比も行う。

過渡反応と基線反応の連関を規定する分子機序として小胞体ストレス系、ミトコンドリア／代謝系、細胞回転制御系、など、複数の系の相互作用による複雑な制御の存在が本研究により示唆された。これらの複数の制御系の上流に注目した解析をさらに進めることで反復曝露の分子機構の解明が進むことが期待される。

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る。

平成 28 年度のサリドマイド及びフルオロウラシル(5-FU)においては、さらに、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果が得られたのに対し、平成 29 年度のアセフェートは単回曝露で発現変動した遺伝子が、反復においてもほぼ同様に発現変動しており、基線反応が殆ど見られないこと、肝のプロファイルにも拘わらず中枢神経毒性を示唆する遺伝子群が変動すること、五塩化フェノールにおいては、殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線が上昇すること、基線上昇を示した遺伝子は、四塩化炭素と同様の遺伝子群を含み、小

胞体ストレスが誘発されていること、単回曝露時に特徴的に誘導されたインターフェロニングナル系遺伝子群は、反復曝露により過渡反応を消失しつつ常時誘発状態に移行した可能性が示唆されるという従来に加えて新たな反応事例を得た。今後とも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したい。

更に、従来知識に照らしても、今までに本研究及び先行研究において解析してきた化学物質とは特徴異なる低分子化学物質について同様の実験・解析を実施できれば、反復曝露 [4+1] 実験の結果からの予測評価精度の更なる向上が見込めると考える。特に、多臓器に異なった標的を有する化学物質、発がん性物質（遺伝子障害性物質）の曝露情報の補充が望まれることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

(1) Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A., (2017) Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop. Regul Toxicol Pharmacol. 2017 Dec;91 Suppl 1:S3-S13.

2. 学会発表（抜粋）

- (1) Jun Kanno, Introduction to a concept of “Signal Toxicity” for broader research planning to promote precision medicine and healthy aging. The 33rd Joint Annual Conference of Biomedical Science, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan R.O.C. (2018.03.24-25).
- (2) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project., SOT2018, San Antonio, USA (2018.03.11-15)
- (3) 菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第 20 回研究発表会、(2017.12.12) 神戸、特別講演
- (4) Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop, (2017.12.4) NC USA, Plenary
- (5) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote
- (6) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017.9.13) poster EUROTOX（第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016）(2016.9.6)、Seville, Spain, poster
- (7) 相崎健一、小野竜一、北嶋聡、菅野純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析（第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月 11 日）、口演
- (8) 菅野 純、シグナル毒性としての中樞神経系に対する低用量化学物質ばく露影響（第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月 12 日）、口演

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