

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
（H30-化学-指定-001）

平成 30 年度 分担研究報告書
短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による
反復曝露毒性予測技術の開発

菅野 純

独立行政法人 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

特に先行研究（平成 24～29 年度）で実施した Percellome 法*を基盤とした「新型」反復曝露実験**により、化学物質の反復投与による生体影響のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復曝露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究は、短期間「新型」反復曝露実験**のデータと単回曝露実験のデータを対比解析することで、反復曝露毒性の予測技術を開発することを目的とする。平成 30 年度は計画通りイミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンの 2 実験を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と上記の化学物質に特徴的な要素を抽出しつつある。特に先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の 2 物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性（神経毒性及び発癌性）に関わるシグナルネットワークが発動することが示された。

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。実験の反復曝露と単回曝露の回数をもとに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。

A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数（安全係数）を組み合わせた評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8.5 億遺伝子発現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曝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、反復曝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融合し、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築を進める。

B. 研究方法

●試薬及び動物：

イミダクロプリド (Imidacloprid; 分子量: 255.66, Cas No.: 138261-41-3, 105827-78-9, 純度 99.9%, 富士フイルム和光純薬(株)) 及び、ジエチルニトロサミン (Diethylnitrosamine; 分子量: 102.14, Cas No.: 55-18-5, 純度 100%, 東京化成工業 (株) (単回曝露時はナカライテスク: 製造中止のため同等品を選択)) について、単回曝露の既存データの解析を進めた。単回曝露 (0 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記) 時のイミダクロプリド及びジエチルニトロサミンの曝露量はそれぞれ 0、10、30、100 mg/kg 及び 0、1、3、10 mg/kg である。

「新型」反復曝露実験を、4 日間反復曝露 (4 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。イミダクロプリドの 4 回の全動物に対する反復曝露の用量は用量設定実験の結果 70mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様

の 0、10、30、100mg/kg とした。以下、同様に、ジエチルニトロサミンの 4 回反復投与の用量は 5mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、1、3、10mg/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) を用い溶媒はイミダクロプリドではコーンオイル (C8267, Sigma-Aldrich)、ジエチルニトロサミンでは 0.5%メチルセルロース (MC) (133-14255、富士フイルム和光純薬 (株)) 水溶液とし、金属製胃ゾンデ (KN-348、夏目製作所) を用いて、イミダクロプリドではガラス製シリンジ、ジエチルニトロサミンではプラスチック製シリンジを用いて強制経口投与を行い、最終曝露の 2、4、8 及び 24 時間後に肝を採取した。

●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碎液を調製した。得られた破碎液の 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。

●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、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°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。このソフトウェアは、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

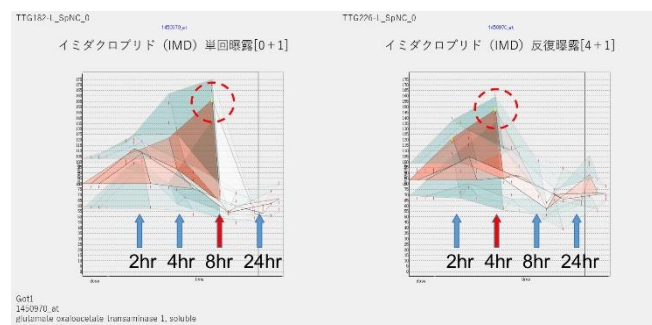
動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版))

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。

平成 30 年度は、イミダクロプリド及びジエチルニ

トロサミンを検討した。尚、最終投与後 2、4、8、24 時間の早い変動を過渡反応 (Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの上昇乃至低下の変動を基線反応 (Baseline Response) と定義し解析を実施した。

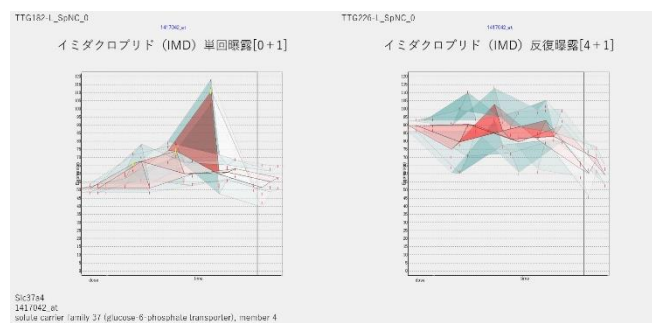


【単回に比して反復により発現ピークが早まる例を示す。GOT1 遺伝子において、[0+1]で8時間目にあるピークが[4+1]において4時間目に早まっている (赤丸)。】

イミダクロプリド (IMD) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数 (過渡反応を示す遺伝子) は単回曝露実験 (以下、[0+1]と表記) において 296、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 80 であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

[0+1]と[4+1]に共通する過渡反応遺伝子は 42 であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時に 8 時間ピークであった遺伝子が反復曝露時に 4 時間ピークに早まる傾向が明らかに認められた。この過渡遺伝子群からは、ニコチン拮抗剤ブチオン代謝系、ニコチン代謝系、アニリン代謝系等のネットワークが IPA により抽出された。

[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]にお



【 [0+1]でのピークが[4+1]において消失し基線反応が上昇している例】

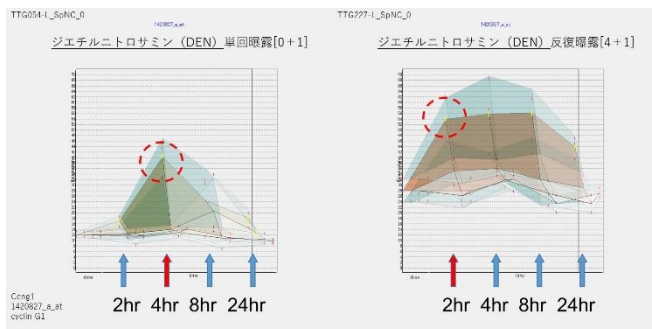
ジエチルニトロサミン (DEN) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数（過渡反応を示す遺伝子）は単回曝露実験（以下、[0+1]と表記）において 223、反復曝露実験（以下、[4+1]と表記）において 77 であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 22 は、多くが[4+1]に共通する変動遺伝子であった。

[0+1]と[4+1]に共通する変動遺伝子は 18 であり、内 11 が発現上昇、7 が発現低下を示した。上昇した遺伝子群は、Ccn1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM シグナルに関わる遺伝子群であった。これらは、[4+1]において、より早期に誘導がかかり発現値がより高値である傾向を示した。

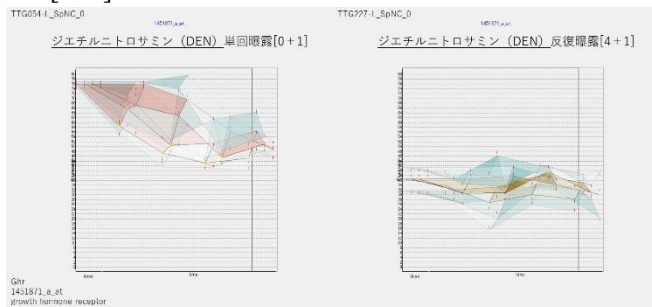
上昇に転じるものはなく、また、基線反応が上昇するものもほとんどなかった。

[4+1]において変動した 77 遺伝子、うち 58 が発現上昇を示し、Ccn1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM シグナルに関わる遺伝子群であった。発がん性を示唆する p53 シグナリング、Rb 遺伝子シグナリング等の誘導が示された。

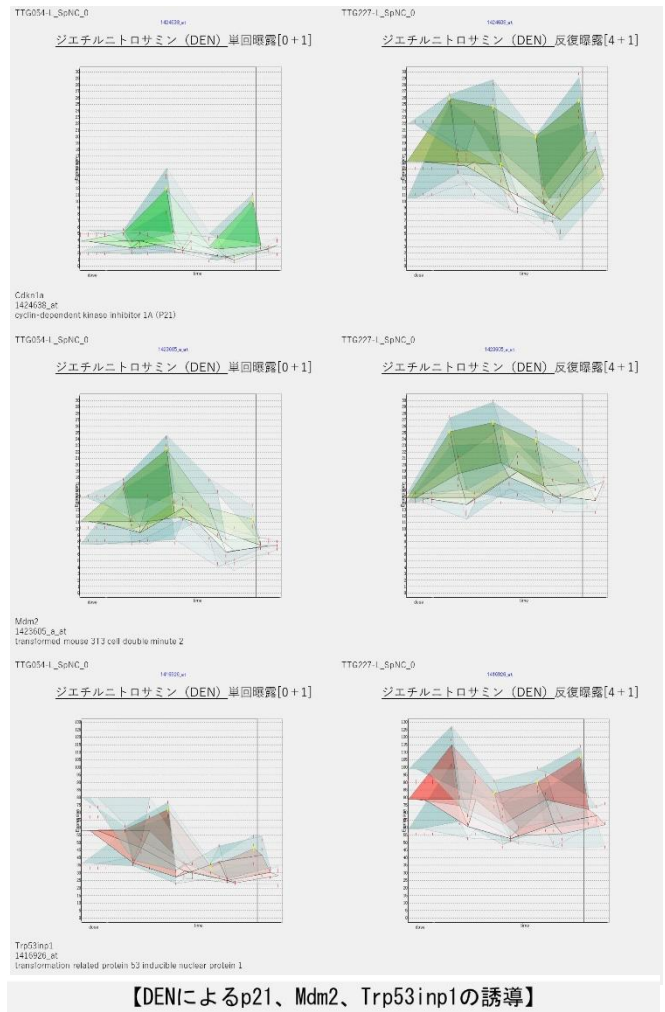


【DENによるCcn1(Cyclin G1)の誘導。[0+1]でのピークは、[4+1]により早まり、発現が持続するとともに基線反応が上昇している。】

[0+1]で下降する過渡反応を示した遺伝子は 201 あり、その意義については現在解析中である。これらは、[4+1]において過渡反応は減弱乃至無反応であり、



【[0+1]で下降ピークを示し、[4+1]でピーク消失し、基線反応が下降する例】



【DENによるp21、Mdm2、Trp53inp1の誘導】

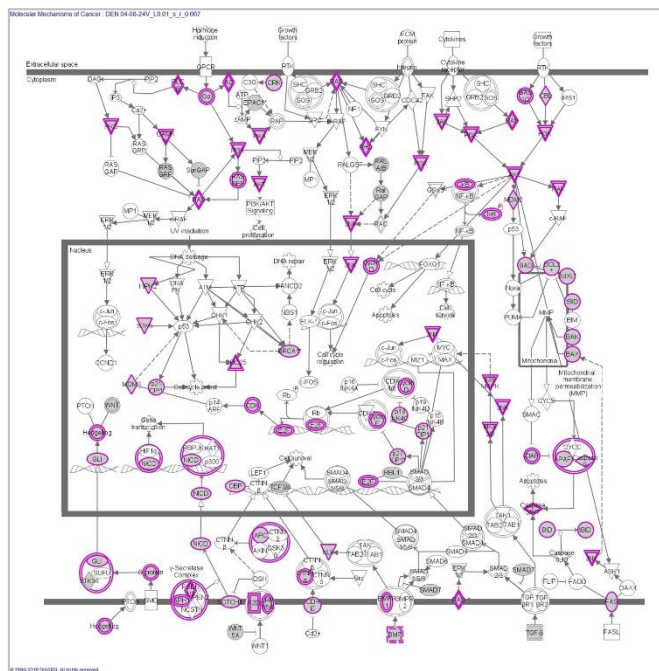
[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は 205 あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これの分子機構は現段階で不明である。

[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては

過渡反応が発現した遺伝子は 59 あり、その殆どに基線反応の上昇を伴っていた。PXR などの核内受容体系に微弱なシグナルが流れる可能性が示唆されたが詳細は現段階で不明である。

反復曝露が基線反応に及ぼす影響を見るため、[0+1]と[4+1]の溶媒対照群同士の発現値を比較した。反復曝露により統計学的に有意に発現値が上昇した発現コピー数 2 以上の遺伝子は約 7,100、低下した遺伝子は約 660 であった。上昇した遺伝子群は、p53 を上流とする発がん関連のネットワーク系、Wnt/ β -catenin シグナル系など、発がん系に加え、軸索誘導シグナル系など、神経毒性を示唆する系も発動していた。

NRF2 系は、[4+1]の基線反応が軽度上昇を示しており、第 II 相代謝酵素の弱い誘導がみられたが、第 I 相は誘導されていなかった。



【DENによる発がん機構シグナル系の誘導 (IPAより)】

基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、LXR、FXR 等、HNF4A、HNF1A、GR を上流に持つ核内受容体系シグナルを含んでいた。

以上、DEN はマウス肝において、反復曝露により発がん作用を示唆する p53 シグナル、Wnt/ β -catenin

シグナル系等を強力に起動させることが確認された。

先行研究で、実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

D. 考察

先行研究で実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

イミダクロプリド (IMD) は、ネオニコチノイド系の殺虫剤であり、昆虫のニコチン受容体に高親和性を有するが、哺乳類のニコチン受容体にもシグナルを流すデータが蓄積されている。本実験において、ニコチン系のシグナルネットワークを誘導し神経毒性を惹起することを示唆する解析結果が、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験のマウス肝からの遺伝子発現データの比較検討から得られたことは、本試験系の網羅性と高感性、高精細性を示すものと考えられる。

ジエチルニトロサミン (DEN) についても、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験の遺伝子発現データの比較検討から、発がん性を示す所見が確認され、その分子メカニズムを示唆する詳細な情報が得られたことも、本試験系の有意性を示すものと考えられる。

本年度研究成果により、新たな解析手法が利用可能となることから、先行研究のデータに対してもそれらを適用し、毒性標的とその上流ネットワークを過渡反応と基線反応の両面から更に深く解析する。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについて

も、反復曝露の実験プロトコルに差異があるものの、同様の検討を試みる予定である。

E. 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。先行研究で実施した化学物質とは用途や性質の異なる化学物質の解析を実施しているが、予想の通り、先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の2物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第I相第II相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有しており、構築中の反復毒性トランスクリプトームデータベースがカバーする範囲を広げることが出来た。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性、すなわち神経毒性及び発癌性、に関わるシグナルネットワークが発動することを捉え、僅か4日間の反復曝露で長期の反復毒性を推測する基礎データを取得できることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. (2019) Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol.* 2019 Feb 8;2:57. doi:10.1038/s42003-019-0300-2.

(2) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N.

Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.

PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Jun Kanno, Introduction to the Concept of “Signal Toxicity”. 10th Congress of Toxicology in Developing

Countries (CTDC10), (2018.4.19), Belgrade, Serbia, Plenary

(2) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

(3) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano. DTOX: Deep neural network-based computational framework to analyze omics data in Toxicology. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 25, 2018.

(4) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Ken-ichi Aisaki, Introduction to a Concept of “Signal Toxicity” for Broader Understanding of Mechanistic Toxicology. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand, KEYNOTE

(5) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi. Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, DSB Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the genome editing. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand,,Oral

(6) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid” AsiaTox 2018, (2018.6.18, Thailand), (Poster)

(7) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

(8) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for the prediction of acute and chronic toxicity. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP 2018 KYOTO), (2018,7,6), Kyoto, Japan, Joint Symposium between IUTOX and IUPHAR, Speaker

(9) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬Percellomeトキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

(10) 菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(11) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、水口賢司、菅野純、TargetMineによる標的予測、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(12) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(13) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose,

Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(14) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach” ISMB 2018, (2018.7.7, USA), (Poster)

(15) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima. Epigenetic Mechanism of Modification of Gene Expression Network by a Repeated Exposure to a Chemical. Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. The SOT 58th Annual Meeting, (2019.3.12), Baltimore, USA, Invited Symposium.

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