

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 31/令和元年度 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

研究代表者 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 31/令和元年度は、クロルピリフォス、及び、5-アザシチジンの 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と比較すると、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子の農薬であるアセフェートと類似した傾向が明らかとなった。5-アザシチジンが反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系（小胞体ストレス等）、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導するという点では、5-フルオロウラシル、及び、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を更に進める。なお、当初、パクリタキセルで実施する予定であったが、納期に時間がかかることと、購入費用が非常に高価であることから保留とし、翌年度予定であったクロルピリフォスを優先して実施した。

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。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。

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、代表的物質についてのDNAメチル化及びヒストン修飾情報を加え、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：

クロルピリフォス(Chlorpyrifos; 分子量: 350.59、Cas No.: 2921-88-2、純度98%、富士フイルム和光純薬株式会社(製造元: Toronto Research Chemicals))、及び、5-アザシチジン(5-azacytidine; 分子量: 244.21、Cas No.: 320-67-2、純度>99%、Sigma-Aldrich)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)時のクロルピリフォス及び5-アザシチジンの曝露量は

それぞれ0、3、10、30mg/kg及び0、0.3、1、3mg/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。クロルピリフォスの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20mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の0、3、10、30mg/kgとした。以下、同様に、5-アザシチジンの4回反復投与の用量は2mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に0、0.3、1、3mg/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)を用い溶媒はクロルピリフォスで、5-アザシチジン共に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、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。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10µL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RNA5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))

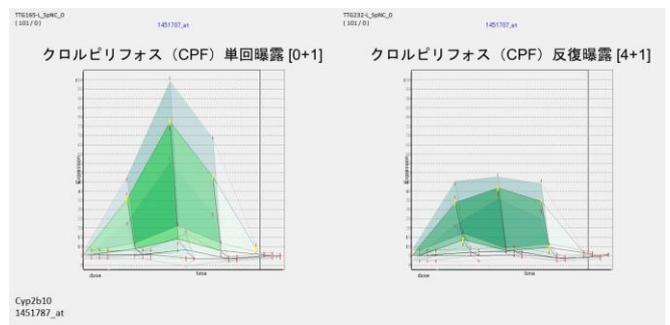
C. 研究結果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

平成 31/令和 01 年度は、クロルピリフォス (CPF)、及び、5-アザシチジン (AZC) 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。

クロルピリフォス (CPF) 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 298、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 60 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。

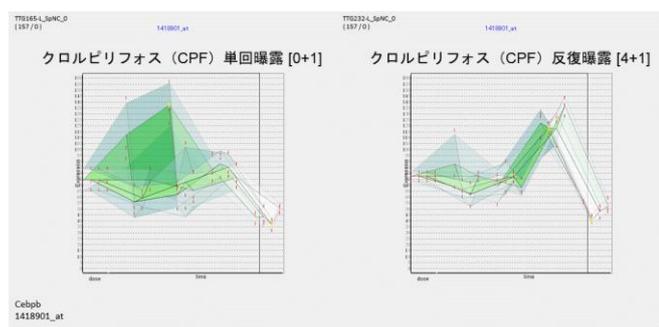
[0+1]と[4+1]に共通する過渡反応遺伝子は 10 であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時によりも反復曝露時に過渡反応が減弱する傾向が見られた。



【共通する遺伝子 Cyp2b10。基線の変化は見られず過渡反応が減弱している】

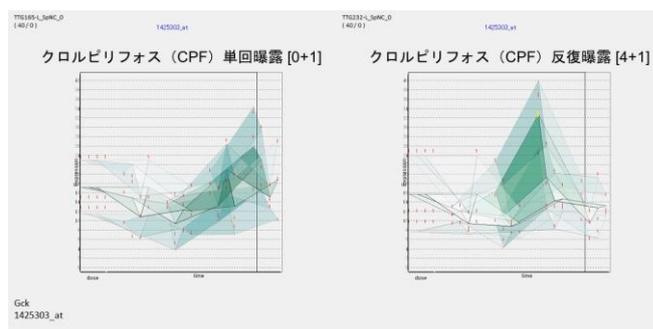
基線反応の変化はこの共通 10 遺伝子および、発現コピー数が 3 以上の全ての遺伝子において変動は少なかった。共通 10 遺伝子に特徴的なネットワークは抽出されなかった。

[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 288 あり、それらは[4+1]における基線反応に弱いながら低下の傾向がみられた。これらの遺伝子はビタミン D 受容体系、PXR 受容体系、グルココルチコイド受容体系、甲状腺ホルモン受容体系等の核内受容体を介したシグナルネットワークに属する遺伝子が含まれ、その上流にグルココルチコイド受容体の作用、グルカゴン等の介在が示唆された。これらは投与後 2~4 時間において顕著に誘導された遺伝子群が示すものであった。24 時間目に発現する遺伝子数は僅かであった。



【ビタミン D 受容体系に属する Cebpb。2~4 時間目の過渡反応が反復曝露により消失している。】

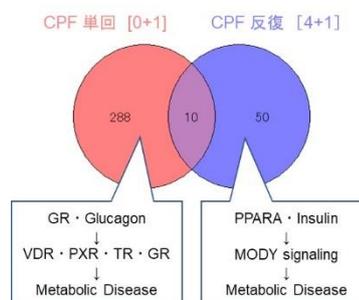
[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は 50 あり、弱い基線反応の上昇傾向を伴って Glut2 (Slc2a2)、GCK、などが発現変動を示した。この発現変動遺伝子リストからは、MODY シグナル (Maturity Onset Diabetes of Young ; 若年発症型成人型糖尿病) 及び糖代謝系が IPA により抽出され、その上流に PPARA (発現抑制)、insulin などが挙げられた。



【糖代謝に関わる Gck が反復曝露により誘導された。】

反復曝露が基線反応に及ぼす影響は CPF の場合は、軽微ながら上昇作用 (210 遺伝子) を有し、コレステロール代謝に関わる遺伝子群が含まれる。

以上、CPF はマウス肝において、グルココルチコイド受容体系へのシグナル入力に反応して、ビタミン D、PXR、甲状腺ホルモン受容体系に作動性を示すとともに、PPARα の系に抑制的に働くことが示唆され、反復投与により糖代謝異常が遷延する可能性が示唆された。

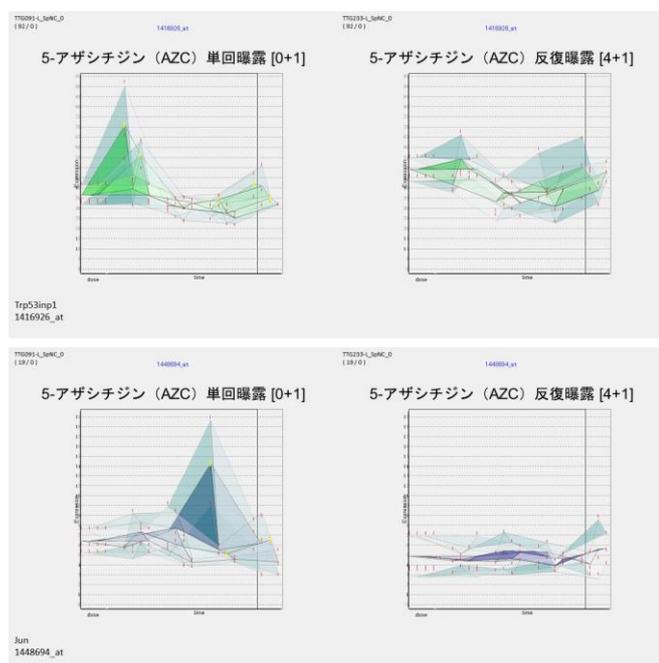


【CPF の単回と反復曝露との遺伝子発現の関係の概略を示す。】

CPF がグルココルチコイド受容体シグナル、グルカゴン系、糖代謝系に影響を与えるという本解析結果と、ヒトや実験動物に対して CPF の比較的長期の曝露が血糖値を上昇させる、或いは、II型糖尿病、妊娠性糖尿病、及び肥満と関係するという報告との関係の解析を更に進める。一方、小胞体ストレスなどの“一般的”な毒性を示唆する変化の誘導は弱かった。

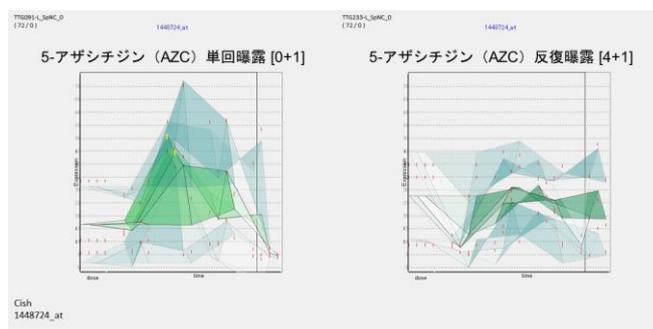
糖代謝等について、先行研究で実施したアセフェート、昨年度実施したイミダクロプリドとの対比解析をも進める。

5-アザシチジン (AZC) 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 24、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 28 であり、共通する遺伝子が認められなかった。



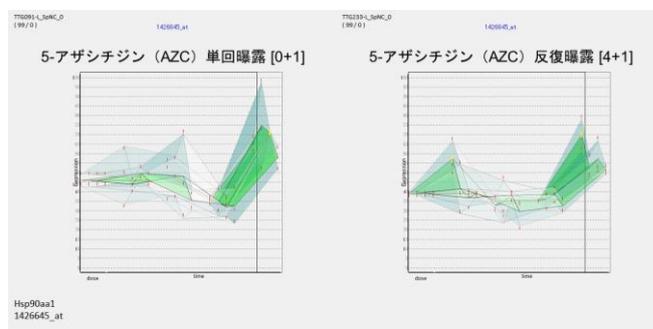
【p53 シグナル系に属する Trp53inp1、Jun を示す。反復により過渡反応は消失している。】

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 24 は、[4+1]と共通性が無く、p53 を上流とするシグナル系と、TLR 9や TLR 3を上流とする JAK/STAT シグナル系などが IPA により抽出された。



【JAK/STAT 系に属する Cish。“ノイズ”が多い遺伝子であるが、反復により過渡反応のピークが消失している。】

[4+1]において変動した 28 遺伝子は、[0+1]と共通性が無く、ユビキチン化系のものを少数含んでいた。



【蛋白ユビキチン化の系に含まれる Hsp90aa1。微弱ながら 2 時間目の誘導が認められる】

[0+1]も[4+1]も共に、過渡反応の 2 時間目からシグナル系が作動することから、弱いながら標的の比較的明瞭な系に対する活性を、代謝を受けない状態で発揮することが確認された。

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細胞当たりの発現コピー数が 3 以上の遺伝子は約 600、低下した遺伝子は約 1,500 であった。上昇した遺伝子群には、特定のシグナル系および上流因子は見いだせなかった。

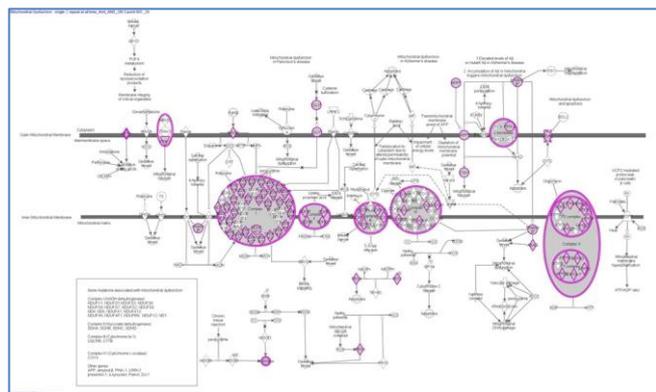
基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、IPA 分析におけるミトコンドリア機能不全、酸化的リン酸化、EIF-2 シグナル系への強い影響が示された。また、LXR 系、上流に RICTOR、あるいは HNF4A、を上流に持つ系シグナルを含んでいた。

Top Canonical Pathways	
Name	p-value
Mitochondrial Dysfunction	1.26E-52
Oxidative Phosphorylation	1.17E-51
EIF2 Signaling	1.01E-48
Sirtuin Signaling Pathway	7.97E-32
LXR/RXR Activation	1.92E-21

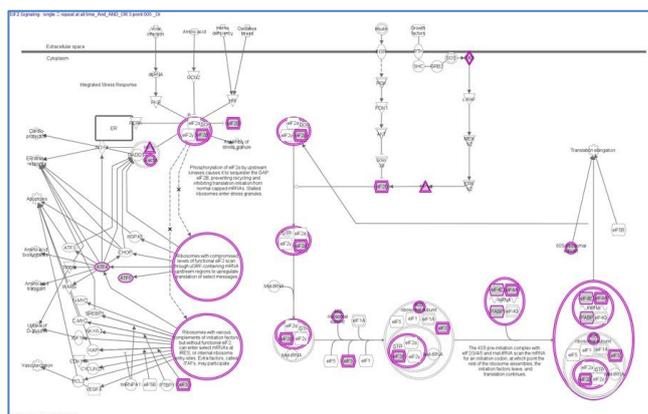
Top Upstream Regulators	
Name	p-value
RICTOR	2.05E-107
HNF4A	9.32E-59
1,2-dithiol-3-thione	3.26E-55
TLE3	1.41E-48
5-fluorouracil	2.80E-45

【基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群の IPA 分析結果】

以上、AZC はマウス肝において、4 日間の 2mg/kg の反復経口投与により強力に、ミトコンドリア機能障害に関わる諸因子（トランスポーター、NADH ユビキチン酸化還元酵素などのミトコンドリア呼吸鎖酵素）、EIF2 シグナル系、等を抑制することが確認された。



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）のミトコンドリア機能マップ中の位置を示す（IPA 解析）】



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）の EIF-2 シグナル系のマップ中の位置を示す（IPA 解析）】

D. 考察

先行研究で実施した 8 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 (5FU)、アセフェート (APT)、ペンタクロロフェノール (PCP)、イミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンと、本年度の 2 物質を比較すると、クロルピリフォス (CPF) は APT に類似していた。糖代謝に対する急性及び慢性的な影響が示唆された。5-アザシチジン (AZC) は、基線反応の変化した遺伝子群が属する遺伝子発現経路が、5FU や PCP と類似していたが、それらの実際に発現の方向が逆であった。すなわち、AZC は反復曝露により遺伝子発現が低下するが、5FU と PCP は増加する。しかし、過渡反応は 5FU では増強するのに対して、PCP では減弱する傾向を示すことから、いずれもが独自の遺伝子発現機構を持つことが示唆された。

本年度研究成果により、新たな解析手法やツールが利用可能となったことから、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。特に、これらの化学物質における変動遺伝子のリストの差分を手掛かりに、既に得ている対照群動物のエピゲノム情報や、エンハンサー・プロモータ領域の特性から (SHOE 等を活用)、時系列

に沿った遺伝子発現制御機構の詳細の分析 (AGCT 活用を含む) を進める。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについての同様の検討も新たなツールを用いて試みる予定である。

E. 結論

本研究は、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、先行研究で実施した化学物質と比較すると、本年度の2物質のうち、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子農薬であるアセフェートと糖代謝系への影響を含めて類似する傾向が明らかとなった。5-アザシチジンは、反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系 (小胞体ストレス等)、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導するという点では、5-フルオロウラシル、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を更に進める。

以上より、明瞭な毒性発現が誘発されない用量における僅か4日間の反復曝露により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が示唆されたと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y. (2019) CYP3A4 induction in the liver and intestine of PXR/CYP3A-humanized mice:

approaches by mass spectrometry imaging and portal blood analysis. *Mol Pharmacol*. 2019 Aug 27. pii: mol.119.117333. doi: 10.1124/mol.119.117333.

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

2. 学会発表 (抜粋)

(1) J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), (2020.3.15-19) Anaheim, USA, ePoster.

(2) R. Ono, Y. Yasuhiko, K. Aisaki, S. Kitajima, J. Kanno, Y. Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster.

(3) Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, and Jun Kanno Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts, Oral presentation.

(4) Jun Kanno, Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, and Ken-ichi Aisaki., Analysis of the effect of epigenetic modification on gene expression by the newly designed

repeated dose study – progress report of the Percellome Project. Gordon Research Conference: Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2019.8.11-16), Proctor Academy, NH, USA, Poster.

(5) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第15回国際毒性学会 (ICT XV) (2019.7.17), Hawaii, USA, Poster

(6) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno., Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid. 第15回国際毒性学会 (ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster.

(7) 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状 「シグナル毒性」の概念と子どもの毒性学. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(8) 種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中枢神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(9) 菅野純, 北嶋聡, 相崎健一, 小野竜一, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Percellome トキシコゲノミクスのエピ

ジェネティクス基盤 — 「新型」 反復曝露試験の解析—. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(10) 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Samik Gosh, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Ga rudaプラットフォームによる多角的毒性予測. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(11) 小野竜一, 相崎健一, 北嶋聡, 菅野純, 毒性エピゲノミクスの新潮流 Percellomeプロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.27), 徳島, シンポジウム, 口演

(12) 種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 日本中毒学会合同シンポジウム: 海産毒 リビジテッド 発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演

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