

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による
新型化学物質有害性評価系の実装研究
（21KD2001）

令和3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

研究分担者 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 客員研究員

研究要旨

本研究は、毒性の分子機序に基づいて、現行の不確実係数（安全係数）を利用する有害性評価手法を補強し、より迅速で、高精度且つ省動物を具現化した新たな有害性評価系の開発を目標として、マイクロアレイ（GeneChip）と次世代シーケンサを用いて基盤となる遺伝子発現及びエピゲノムの網羅的データを得つつ、独自開発のソフトウェア群による化学物質の生体影響の網羅的分析法の体系化を行い、これに、毒性学・分子生物学に精通したデータサイエンス専門家を擁して、システムバイオロジー及び人工知能（AI）技術を融合した新たな有害性評価系の開発を進める。

令和3年度は、ペルフルオロオクタン酸（PFOA）の単回曝露、及び、4日間の新型反復曝露の2実験（以下、PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]と表記）を実施し、遺伝子発現解析を進めて単回曝露、反復曝露に共通の要素と各々の曝露条件に特徴的な要素を抽出した。PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]の遺伝子発現誘導は、2時間目の誘導遺伝子数が少なく、24時間目に向けてその数が増加することが示された。基本的にPPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ を上流にもつ遺伝子が誘導されたが、2時間目に誘導された遺伝子には、NR1I2（PXR）、あるいは、immediate early genes（IEG）の発現機構にかかわるシグナルの関与が示唆された。8時間以降は、PPARの下流の因子、SCL27A2などを介した系の動員が示唆された。また、Gadd45bをはじめ、DNA障害、RNA障害、タンパク合成障害、等、を示唆する反応が見られた。24時間目に向けて、癌関連、ユビキチン関連、及びNRF2系が含まれていた。この中にCAR下流のCyp2B10も含まれ、それらの誘導までの8時間以上の潜伏期の存在が注目された。これらに加え、PFOA[4+1]においては、Sirtuinシグナル、ミトコンドリア障害などの系の動員が示唆された。また、両実験の溶媒対照群の遺伝子発現値の差は、4日間の反復曝露の効果（基線反応）を示しており、定時点の内、3時点乃至4時点で、反復により発現が有意に低下（1.25倍、t検定で $p<0.05$ ）した119の基線反応遺伝子を解析した結果、HOTAIR（long non-coding RNA）制御回路、14-3-3回路などへの影響が示唆され、

遺伝子発現、及び、タンパク合成機構への広範な影響の可能性が示唆された。更に精緻な解析を進める。

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曝露し、遺伝子発現測定直前の曝露時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終曝露を一回行う。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、独自構築したトキシコゲノミクス・データベース (DB) にインフォマティクス、及び、人工知能 (AI) を拡大適用し、化学物質が実験動物に惹起する遺伝子発現変動等の分子毒性学情報から、科学的根拠に基づく有害性予測評価手法を確立する。これにより「安全係数」を用いる従来の有害性評価手法を補強するとともに、迅速、高精度、省動物を具現化する新たな評価システムを構築することを目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ8億5千万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及び反復曝露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、さらに臓器別のゲノムDNAメチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

B. 研究方法

●試薬及び動物：

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA: Pentadecafluorooctanoic Acid; 分子量：414.07、Cas No.: 335-67-1、純

度 99.7%、東京化成工業 (株)) について、単回曝露

(0日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記) 及び4日間「新型」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。PFOAの単回曝露時の用量は0、1、3、10 mg/kgとし、4回反復曝露の用量は0.1mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に0、1、3、10 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)を用い溶媒はコーンオイル(C8267、Sigma-Aldrich)とし、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)と、ガラス製シリンジを用いて強制経口曝露を行い、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、RNeasy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。肝サンプルからこの様にして得られたデータについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対量化手法) を適用して絶対量化した後に網羅的遺伝子発現解析を行った。先ず我々が開発した「RSort」ソフトウェアを用いて、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 を数理的に有意な変動を示す順に自動的に並び替えた。このリストの上位のものから専門家による Visual Selection を行い、生物学的に有意と判定される変化を示した ps を網羅性を維持しつつ厳選して解析に使用した。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

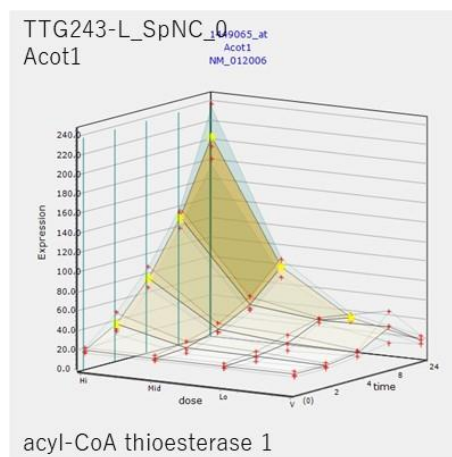
動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版))

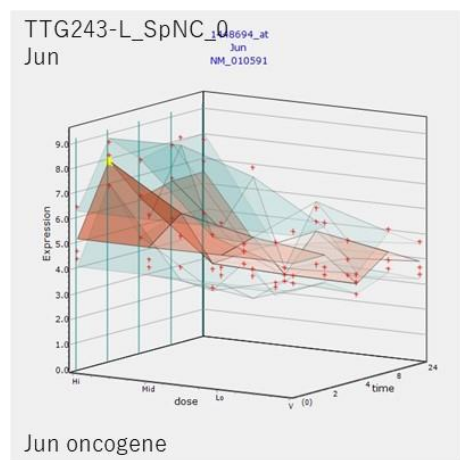
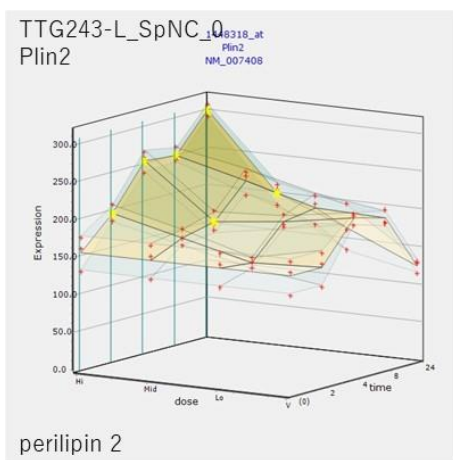
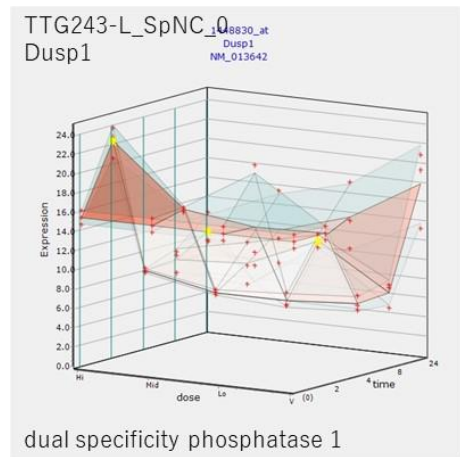
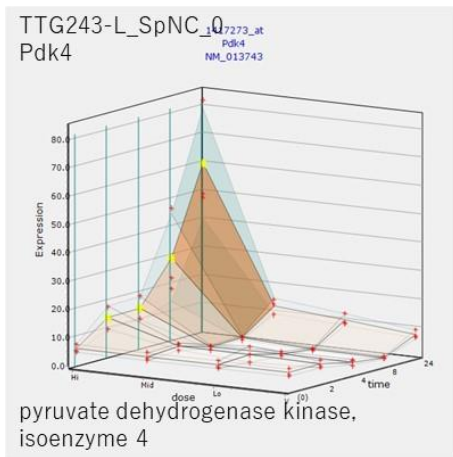
C. 研究結果

令和 3 年度は、ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の単回曝露実験 (TTG243 : 0, 1, 3, 10mg/kg) 及び A+A 実験 (TTG244 : 0.1mg/kg を 4 日間曝露後、5 日目に 0, 1, 3, 10mg/kg) を行い (PFOA[0+1]、及び、PFOA[4+1] と表記)、GeneChip による肝の網羅的遺伝子発現解析を実施した。尚、PFOA[4+1]における 4 日間反復曝露の用量が 0.1 mg/kg と低値である理由は、曝露中及び終了後 24 時間以内のマウス全身状態及び、肝重量変化を指標とした毒性が、単回曝露に比し反復曝露において著しく増強したためである。

① PFOA[0+1] (実験コード TTG243-L)

単回曝露後、2、4、8、24 時間目に増加を開始した遺伝子の数は、それぞれ 32、179、167、503 であった。PFOA は PPAR α のリガンドであることが知られており、2 時間目の 32 遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR δ 及び PPAR α を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Acot1、Pdk4、Plin2 等)。



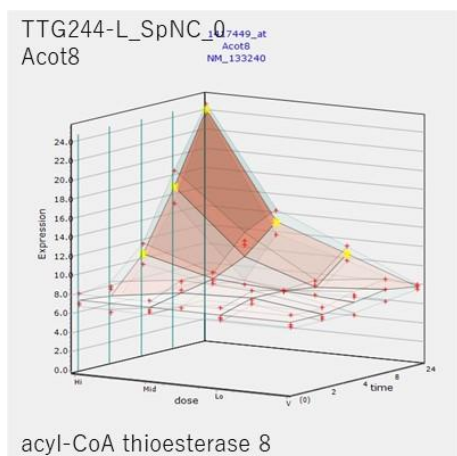
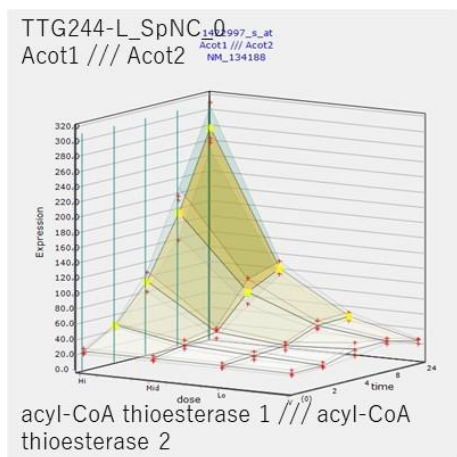


☒ Acot1、Pdk4、Plin2

☒ Dusp1、Jun

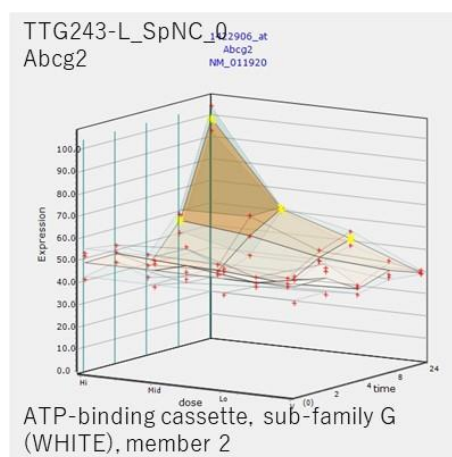
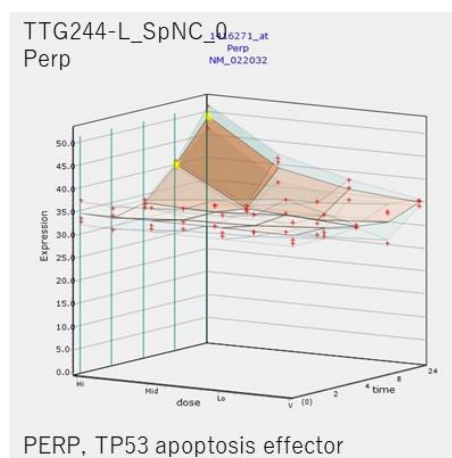
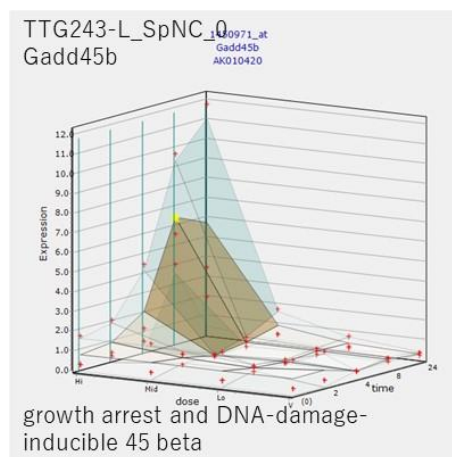
先行研究において解析した PPAR α のリガンドであるクロフィブラートの遺伝子リストとの差分を解析すると、2 時間目の遺伝子群には、PPAR α の下流以外に、Dusp1 などの immediate early gene (IEG) の系のシグナルが起動していることも示された (Dusp1、Jun 等)。

4 時間目に誘導開始された 179 遺伝子には、PPAR α 、PPARA δ 、及び PPARA γ の下流のものが多く含まれていた。(Acot2、Acot8 等)。



☒ Acot2、Acot8

8 時間目に誘導開始された 167 遺伝子は、PPAR α の下流の SCL27A2 などの因子の下流に位置する遺伝子のほか、TGF β 1 の下流の遺伝子、DNA、RNA、タンパクに対する傷害に反応する系の遺伝子が含まれていることが示唆された (Gadd45b、Perp、Abcg2 等)。



☒ Gadd45b、Perp、Abcg2

24 時間目に誘導開始された 503 遺伝子は、癌関連、ユビキチン関連、及び NRF2 系が含まれていた。この中に CAR 下流の Cyp2B10 も含まれ、それらの誘導までに 8 時間以上の潜伏期があることが注目された (Cyp2b10、GSR、GSTM4、NFE2L2 等)。

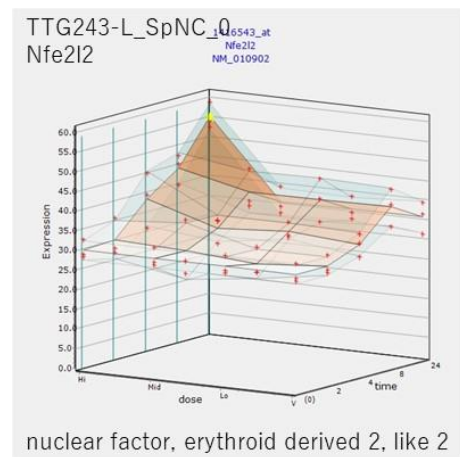
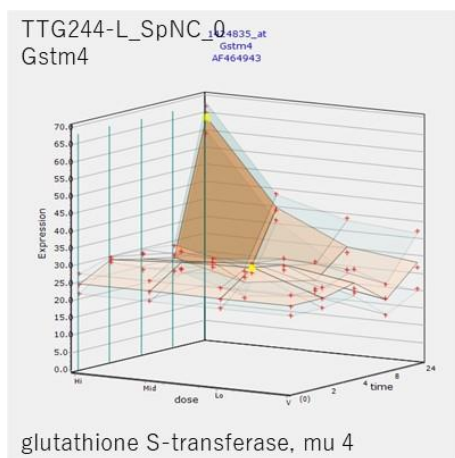
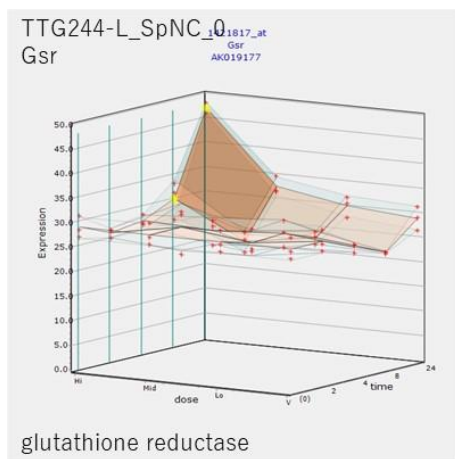
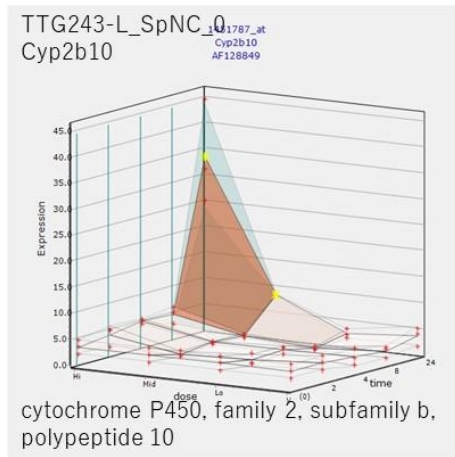


図 Cyp2b10、GSR、GSTM4、NFE2L2

今までに測定した化学物質においては Cyp2b10 は 2 時間~4 時間目に誘導が開始しており、24 時間目まで誘導が開始しない例は PFOA が初めてであった。曝露直後のシグナル受容体からの下流遺伝子への誘導に時間がかかっているか、或いは、何らかの代謝産物が後半の遺伝子の誘導に寄与している可能性が示唆されるが、PFOA は難分解性であり、少なくともラットでは代謝されることは無いと報告されている。尚、Gsr、Gstm4 は Nrf2 の下流と考えられ、24 時間目まで誘導が開始しない例は比較的多くの化学物質で測定されていることから、これらとは別途の制御ネットワークが存在する可能性が示唆された。

② PFOA[4+1] (実験コード TTG244-L)

最終曝露終了後、2、4、8、24 時間目に発現増加を開始した遺伝子の数は、22、127、751、581 であった。2 時間目には、PXR 下流、TNF 下流の遺伝子が含まれていた (ALAS1、TXNIP 等)。

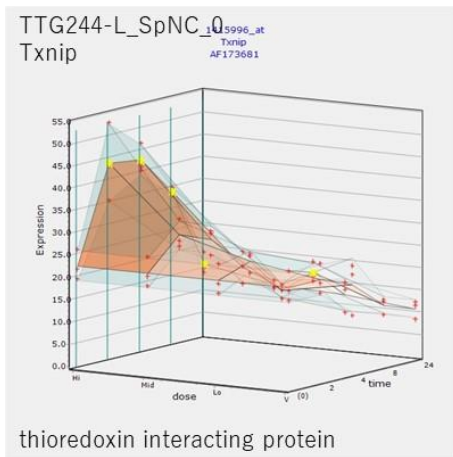
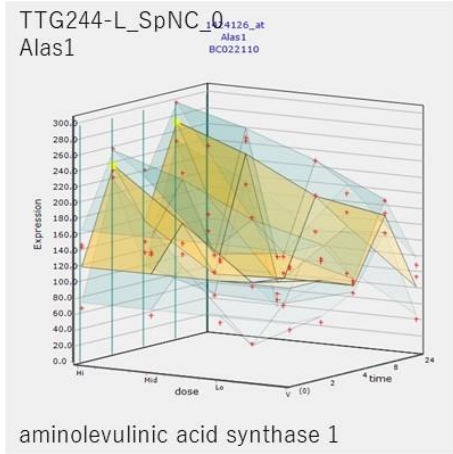


図 ALAS1、TXNIP

誘導された遺伝子の多くは、PFOA[0+1]と共通であった。

PFOA[0+1]では発現誘導されず、PFOA[4+1]に特徴的に発現したものとして、Sirtuin シグナル系、ミトコンドリア障害、酸化的リン酸化などが示された (Agt7、Atp5f1、Ndufa5 等)

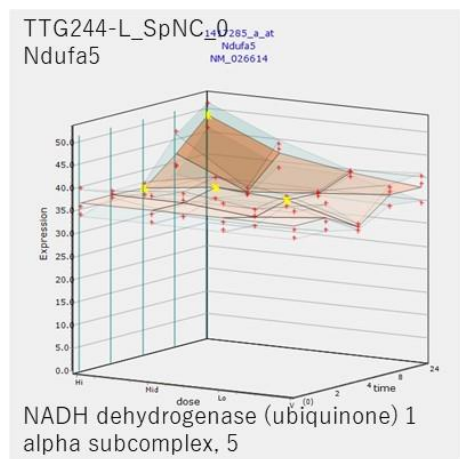
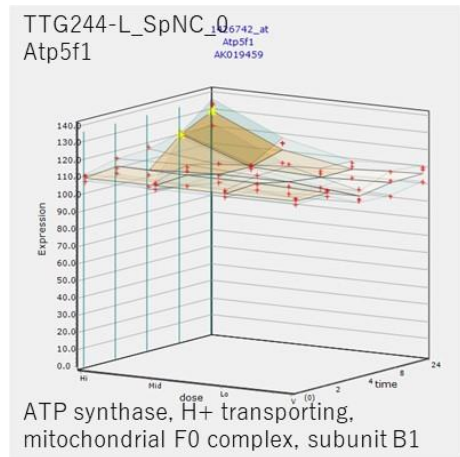
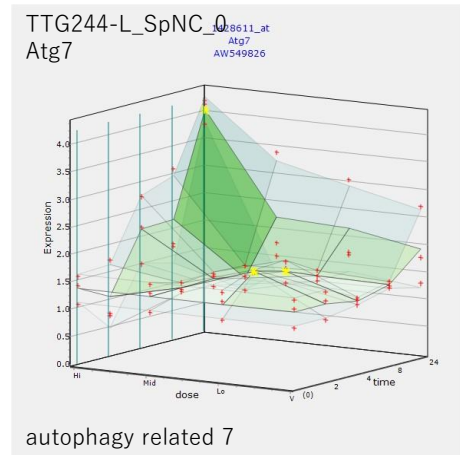


図 Agt7、Atp5f1、Ndufa5

その他の遺伝子は、PFOA[0+1]と類似のものが多く含まれていたが、PFOA[4+1]の方が、発現するタイミングが早まる傾向が見られ(667中、不変のもの341、

早くなったもの 256、遅くなったもの 70)、早くなった遺伝子群には Nrf2 が上流に位置するものが多い傾向が認められた。

③最終曝露後 2、4、8、24 時間に生じる早い変動を過渡反応 (Transient Response) とし、反復曝露で引き起こされるベースラインの上昇、或いは、低下の変動を基線反応 (Baseline Response) と定義して、その解析を実施した。

4 日間反復曝露により誘発された基線反応の解析を行った。測定 4 時点の内、3 時点乃至 4 時点で、反復により発現が有意に低下 (1.5 倍、t 検定で $p < 0.05$ 、1 コピー/細胞以上) した基線反応遺伝子 (ソフトウェア“Baseline Comparison”による計算結果) は 39、上昇した遺伝子は 5 と少なかった。低下した遺伝子群は、HOTAIR (long non-coding RNA) 制御回路などへの影響が示唆された。選択条件を 1.25 倍、t 検定で $p < 0.05$ に緩和した場合は、基線反応が低下した遺伝子は 119 あり、HOTAIR (long non-coding RNA) 制御回路、14-3-3 回路などへの影響が示唆され、遺伝子発現、及び、タンパク合成機構への広範な影響の可能性が示唆された。この所見からも、0.1mg/kg の用量において PFOA の 4 日間反復曝露が基本的な生命維持機構に強く影響する可能性が示唆された。更に精緻な解析を進める。上昇した遺伝子は 13 と少なく、有意な情報は得られなかった。

D. 考察

令和 3 年度は、ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の単回曝露実験 (PFOA[0+1]と表記) 及び 4 日間の新型反復曝露実験 (PFOA[4+1]と表記) を行った。4 日間の反復曝露の用量は、予備実験の結果から 0.1 mg/kg とし、単回曝露の用量 (0, 1, 3, 10mg/kg) に比し低値となった。これは反復曝露中、及び、終了後 24 時間以内のマウス全身状態及び、肝重量変化を指標

とした毒性が、単回曝露に比し反復曝露において著しく増強したためである。遺伝子発現の解析結果、PFOA[4+1]では PFOA[0+1]と類似のものが多く含まれていたが、PFOA[4+1]の方が、発現するタイミングが早まる、或いは、反応が増強する傾向が見られた。PFOA[4+1]の発現変動遺伝子から PFOA[0+1]のそれを差し引いた遺伝子リストの解析からは 0.1 mg/kg と低濃度ながら 4 日間の反復曝露により、Sirtuin シグナル系、ミトコンドリア障害、酸化的リン酸化等の系が、基線反応の低下を示した遺伝子のリストからは、タンパク合成、ミトコンドリア機能、細胞増殖、等の基本的な生命維持機構に強く影響する可能性が示され、これは反復曝露によるマウスの全身状態、肝重量変化といった毒性の増悪にも整合する。

また PFOA は PPAR α のリガンドであることが知られており、実際に単回曝露 2 時間目に誘導が開始される 32 遺伝子は PPAR δ 及び PPAR α を上流に持つものであった。しかしながら遺伝子発現誘導数は時間が経過するほどに増加しており、このことから曝露直後のシグナル受容体からの下流遺伝子への誘導に時間がかかっているか、シグナル受容体からの継続的な刺激の増強による現象であるか、或いは、何らかの代謝産物が後半の遺伝子の誘導に寄与している可能性が示唆された。但し、PFOA は難分解性であり、ラットでは代謝されることは無いと報告されているため、マウスでも同様と考えられる。尚、代謝されない難分解性の受容体リガンドの代表的な例であるダイオキシンの単回曝露時の遺伝子発現誘導の様態と比較したところ、PFOA の経過とは異なっていた。

これらの PFOA に誘導された反応は、反復曝露による明らかな増悪例として注目すべきものであり、更に精緻な分子機序解析を進める。

E. 結論

今年度、単回曝露、及び反復曝露実験を行った

PFOA は、先行研究で実施した化学物質比較して毒性の強いものであり、遺伝子発現解析からもそれを説明しうる毒性シグナルネットワークの挙動が示唆された。反復曝露による明らかな増悪例として注目すべきものであり、更に精緻な分子機序解析を進める。

また PFOA の解析結果は僅か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、即ち新型反復曝露実験プロトコルと Percellome 法に基づく網羅的解析技術による、短期間試験での反復曝露毒性の予測の実現可能性が高いことを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. *Development*. 2021 Oct 1;148(19): Epub 2021 Oct 4. [DOI: 10.1242/dev.193664].

(2) Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci*. 2021 Jun;112(6):2185-2198. Epub 2021 May 2.[DOI: 10.1111/cas.14873]

2. 学会発表

(1) Jun Kanno、Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. ASIATOX-IX, (2021.10.22)、Virtual、Oral

(2) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima、Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral

(3) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(4) 石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純、ナノマテリアルの吸入曝露による肺免疫応答と線維化の分子機構. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(5) 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(6) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(7) 菅野純、「子供の毒性学：脳の発達を中心に」ーイントロダクションー. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(8) 齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価ー発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析

を中心にー. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑨) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑩) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純：PPAR α リガンドの比較毒性オミクス. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑪) J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, S. KITAJIMA , Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

(12) 菅野純、外来性化学物質(xenobiotics)により誘発される生体反応の分子機構解析と創薬加速、第3回医薬品毒性機序研究会、(2021.1.15)、online meeting、口演

(13) 種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) Web 口演

(14) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun

Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (2020.11.12-13) e-poster.

⑮) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima、Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Special lecture, Web, Oral presentation.

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