

令和4年度
厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の判定基準策定と代替法に資する研究
-診断学とAIによる致死性予測と人道的エンドポイントの設定-

分担研究報告書

分担研究課題 急性毒性試験における遺伝子発現変動解析

研究分担者	北嶋 聡	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 部長
研究協力者	栗形麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部 室長
研究協力者	齊藤洋克	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	辻昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	森山紀子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

研究要旨

本分担研究では、急性毒性発現時の海馬、肺、肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施した。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳4部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、当方が開発した Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4用量、4時点の遺伝子発現情報を既に関済済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行い、多臓器連関及びインフォマティクス解析の開発を進める計画である。4,4'-Dihydroxybiphenyl は、0.5% MC を溶媒として 0、7、20 及び 70 mg/kg の用量で実施した。肝についての解析の結果、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、折りたたみ不全タンパク質反応、酸化ストレス応答転写因子、糖質コルチコイド受容体シグナルが抽出されてきた。発現増加が認められる遺伝子のプロモーター解析した結果、小胞体ストレス応答の下流に位置する ATF4 あるいは XBP1 が抽出されてきたことから、肝においてはタンパク質の変性が亢進していることが示唆された。また、Nrf2 が抽出されてきたことから、酸化的ストレスが更新していることが示唆された。加えて、TNF, IL4, IL1B, IL6, IL3 及び TGFB1 が抽出してきたことから、サイトカインシグナルが活性化され炎症が誘発されることが示唆された。2,5-Di-tert-butylhydroquinone (DTBHQ) はコーンオイルを溶媒として 0、10、30、100 mg/kg の用量で実施した。海馬において有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、概日リズムが見出された。発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子のプロモーター解析した結果、やはり概日リズム関連遺伝子である PER2、PER1、CLOCK や CRY1、CRY2 などが抽出されてきた。したがって、被験物質の投与により、少なくとも海馬領域における概日リズムの変調が示唆された。海馬における概日リズムの乱れを示唆する所見であり、このことは神経毒性を示唆する一般状態の変化には、概日リズム

の乱れが寄与する可能性を示唆しており、今後、この観点からの観測も本研究に有用となるものと考え。

A. 研究目的

本研究の目的は、Reduction と Refinement によりヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発である。本分担研究では、脳、肝、腎において、急性毒性発現時にどのような現象が生じているかを遺伝子発現変動解析により、バイタルサインの妥当性を考察し人への外挿を図る。

B. 研究方法

急性毒性発現時の海馬、肺及び肝の遺伝子発現データを取得し、その臓器連関解析を実施する。具体的には、被験物質を単回経口投与後、得られたマウスの海馬を含む脳 4 部位、肺及び肝の mRNA サンプルにつき、独自の遺伝子発現値の絶対化手法である Percellome 法 (Kanno J et al, BMC Genomics 7 64 2006) による網羅的遺伝子発現解析を行なった。再現性、感度、用量相関性、全遺伝子発現の網羅性を考慮し Affymetrix 社 GeneChip、Mouse Genome 430 2.0 を使用した。4 用量、4 時点の遺伝子発現情報について既に関済みの波面解析等を用いた教師無しクラスタリング解析を行なった。

モデル物質として、4,4'-Dihydroxybiphenyl (CAS No: 92-88-6, 富士フィルム和光純薬) 及び 2,5-Di-tert-butylhydroquinone (CAS No: 88-58-4, DTBHQ, 富士フィルム和光純薬) を選択した。

動物は何れも、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用い、金属製胃ゾンデ (KN-348, 夏目製作所) を用いて各群 3 匹に単回経口投与した。遺伝子発現変動解析は、投与後の時間 4 点 (投与 2、4、8 及び 24 時間後)、各群 3 匹、合計 48 匹のマウスについて解析を行った。具体的には、解析ソフト RSort を利用し、遺伝子の発現変動が有意 (t 検定での各時点に溶媒対照との間で P 値 < 0.05) で、発現変動の最高値のコピー数が 1 以上という条件で遺伝子を粗抽出した。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、発現を表す平面につき凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意と

考えられる順に並び替えるものである。また、既知情報との照合によるシグナルネットワーク及び遺伝子発現の制御因子の探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて行った。

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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「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)」。承認番号: 365、716-1

C. 研究結果及び考察

4,4'-Dihydroxybiphenyl は、0.5% MC を溶媒として 0、62.5、125、250、500 mg/kg を投与した用量設定試験の結果、125 mg/kg 以上で腎が硬くなり、表面が粗造を呈し、250 mg/kg 以上で体重抑制、500 mg/kg で腎重量増加が認められたことから、主試験を 0、7、20 及び 70 mg/kg の用量で実施した。

肝についての解析の結果、発現が増加する遺伝子 1,425 プローブセット (ps) が粗抽出され、このうち目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 788 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 859 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 26 ps が抽出された。次いで、増加分 788 ps について検討した結果、IPA による検索で、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、折りたたみ不全タンパク質 (unfolded protein) 反応、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 (NFE2L2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) や糖質コルチコイド (Glucocorticoid) 受容体シグナルが抽出されてきた。発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、小胞体ストレス応答の下流に位置する ATF4 あるいは XBP1 が抽出されてきたことから、肝においてはタンパク質の変性が亢進していることが示唆された。また、Nrf2 が抽出されてきたことから、酸化的ストレスが更

新していることが示唆された。加えて、TNF, IL4, IL1B, IL6, IL3 及び TGFβ1 が抽出してきたことから、サイトカインシグナルが活性化され炎症が誘発されることが示唆された。

2,5-Di-tert-butylhydroquinone (DTBHQ) はコーンオイルを溶媒として、0、100、300、1000 mg/kg を投与した用量設定試験の結果、300 mg/kg 以上において体重増加抑制及び肝重量の増加、100 mg/kg 以上において腎重量の増加が認められたことから、主試験を0、10、30、100 mg/kg の用量で実施した。

海馬についての解析の結果、発現が増加する遺伝子 1,256 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 87 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 337 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 1 ps が抽出された。次いで、増加分 87 ps について検討した結果、IPA による検索で、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワークとして、概日リズムが見出された。発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、やはり概日リズム関連遺伝子である PER2、PER1、CLOCK や CRY1、CRY2 などが抽出されてきた。したがって、被験物質の投与により、少なくとも海馬領域における概日リズムの変調が示唆された。この概日リズムの乱れを誘発する因子は現時点では不明であり、また有害事象との直接的な関連は不明であるが潜在的に、生理現象(睡眠、摂食、細胞の分裂・再生、ホルモン分泌など)における体内リズムの変調によるなんらかの異常が誘発される可能性が示唆された。

肝についての解析の結果、発現が増加する遺伝子 802 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 63 ps が抽出された。また発現が減少する遺伝子としては 296 ps が粗抽出され、目視による確認により生物学的な変化が示唆されたものとして 5 ps が抽出された。次いで、増加分 63 ps について検討した結果、IPA による検索で、有害事象との関連を示唆するシグナルネットワ

ークとして、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 (NFE2L2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) シグナルが見出された。発現増加が認められる遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析 (*in silico*) を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、insulin, IGF1, LEPR (レプチン受容体) は抽出されてきた。インスリンは、グリコーゲン合成酵素 (glycogen synthase) を活性化させ、グリコーゲン合成を促進させるため、グリコーゲンが貯蔵させる作用を有する可能性が示唆された。また、TNF と IL1B が抽出してきたことから、サイトカインシグナルが活性化され炎症が誘発されることが示唆された。

D. 結論

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析においては、肝での解析では、それぞれの化学物質をマウスに単回経口投与した際の毒性プロファイルが明らかとなったが、特に注目すべきは、DTBHQ を投与した際の海馬における概日リズムの乱れを示唆する所見であり、このことは神経毒性を示唆する一般状態の変化には、概日リズムの乱れが寄与する可能性を示唆しており、今後、この観点からの観測も本研究に有用となるものと考えられる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. J. Toxicol. Sci. 2023; in press.

Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and Satoshi Kitajima,

Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. J Toxicol Sci. 2022; 48 in press.

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡:Percellome プロジェクト～トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求～、日本薬理学雑誌, 2022; 157: 200-206. doi.org/10.1254/fpj.21122

高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡: 加圧式定量噴霧式吸入器(pMDI)製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, 中毒研究(Jpn J Clin Toxicol), 2022; 35: 255-59.[ISSN: 0 914-3777]

2. 学会発表

北嶋聡:創薬研究における薬理-病理連携の必要性: 毒性学の立場から 一食品トキシコゲノミクスと薬理学一、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォ マティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑介、種村健太郎、相崎健一北嶋聡:バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした急性毒性試験の近代化、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

小野竜一、田埜慶子、安田智、佐藤陽治、内田恵理子、平林容子、北嶋聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第118回学術講演会 2022.11.11 長崎(口頭発表)

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical.

The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋聡、栗形麻樹子:ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)

菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡: Percellome project からみた毒性 AI の展望 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)

齊藤洋克、種村健太郎、菅野純、北嶋聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析 -化学物質曝露影響から考える神経発達障害-第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)

大久保佑亮、菅野聖世、北嶋聡、平林容子、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)

菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡:新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)

高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑亮、相崎健一、北嶋聡:バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の致死性予測 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.6.30)

小野竜一、山本雄介、成瀬美衣、田邊思帆里、吉岡祐亮、相崎健一、広瀬明彦、落谷孝広、平林容子、北嶋聡:cfDNA による毒性評価 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし