

令和5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	相崎健一	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(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。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開発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。R4年度は、モデル物質として 4,4'-Dihydroxybiphenyl (4,4'-D) を選択し、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。R5年度は、さらにインフォマティクス解析を進め、具体的には Percellome データベース全体と網羅的に比較解析を行う、独自に開発した Percellome Explorer プログラムにより、382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、4,4'-D と類似した反応を惹起する化学物質のリストを生成した。その結果、類似反応を惹起する化学物質として、高順位のものとしてはインディゴや硫酸アンモニウムアルミニウムなどが抽出されてきたが、概して類似度は低く、また各化学物質と共通して発現していた遺伝子群からは、特に

タンパク質の変性が亢進が示唆されるという、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。

## 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開発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 を選択した。

動物は、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。マウス各組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) の入った RNA 用サンプルチューブ (キアゲン社) に採取し、4°C で一晚浸漬し、RNase を不活化した。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。

インフォマティクス解析 (ビッグデータによる毒性分子機序解析) には独自に開発した専用ソフトウェア Percellome Explorer を使用した。Percellome データベースは *in vivo* 系のトキシコゲノミクスデータベースとしては世界有数の規模となっており、現在では延べ遺伝子数にして 8 億 5 千万件が登録されている。この比較作業で扱うデータ量は膨大であり、人手では到底無理と考えられる。そこで、大規模比較解析を容易に実行できるように、Percellome Explorer を使用し、各化学物質の曝露で変動する遺伝子リスト間で多対多の類似計算を行い、Percellome データベースの全レコードを検索して類似反応を示す化学物質を抽出した。

なお実験結果における各遺伝子の発現変動を、下記図 1 (別添) のように、各遺伝子につき濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての 3 次元グラフとして示す。具体的には、縦軸 (Z 軸) に絶対値化した (細胞 1 個あたりのコピー数) mRNA の発現量を取り、X、Y 軸にはそれぞれ、投与用量とサンプリング時間を取り、各条件の  $n=3$  の平均値曲面で表示する。加えてこの平均曲面の上下に標準偏差 (SD) 平面 (薄い色) を示す。

## 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)」。

## C. 研究結果及び考察

R4 年度は、モデル物質として 4,4'-Dihydroxybiphenyl (4,4'-D) を選択し、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。

R5 年度は、さらにインフォマティクス解析を進め、具体的には Percellome データベース全体と網羅的に比較解析を行う、独自に開発した Percellome Explorer プログラムにより、382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、類似した反応を惹起する化学物質のリストを生成した(表1)。その結果、4,4'-D の類似反応を惹起する化学物質として、高順位のものとしてはインディゴや硫酸アンモニウムアルミニウムなどが抽出されてきたが、類似度は低いものばかりであった。続いて、各化学物質に共通して発現していた遺伝子群につ

いて、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、4,4'-D とインディゴ、あるいは 4,4'-D と硫酸アンモニウムアルミニウム、双方の場合ともに、共通して変動した遺伝子群は、特に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、この解析結果は、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。この内、4,4'-D とインディゴの場合に、共通して変動した遺伝子について、Upstream Analysis を用いて解析した結果を図2に示す。

したがって、各化学物質と共通して発現していた遺伝子群からは、新たな毒性学的な意味付けを見いだすことは出来ず、特にタンパク質の変性が亢進が示唆されるという、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。

4,4'-D は、ラットにおける単回経口投与では 2,000 mg/kg の用量で黄疸が、そして投与二日後に、3 匹中 1 例に死亡が認められている(内部データ)。本遺伝子発現解析においては、4,4'-D の単回経口投与により、肝において、折りたたみ不全タンパク質(unfolded protein)反応の障害が誘発され、タンパク質の変性が亢進していることが示唆されたことから、この機序が、4,4'-D による遅発性の毒性が認められた分子機序である事が示唆された。

## 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、昨年度検討した 4,4'-D を単回投与した場合について、今年度はさらにインフォマティクス解析を進めた。その結果、類似反応を惹起する化学物質は抽出されてきたが、概して類似度は低く、ここから新たな毒性プロファイルを見出すことはできなかった。また各化学物質と共通して発現していた遺伝子群からは、特に、タンパク質の変性の亢進が示唆されるという、昨年度の解析結果の内容を裏付ける解析結果となった。このタンパク質の変性の亢進という解析結果からは、遅発性に肝毒性が誘発される事が強く示唆され、このことは、急性毒性を考慮する際、必ずしも速やかではなく遅発性に症状が認められる分子機序があり得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する。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156 doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]

Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie: DTox: A deep neural network-based in visio lens for large scale toxicogenomics data. *J Toxicol Sci.* 2024; 49(3): 105-115. doi.org/10.2131/jts.49.105]

Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front. Neurosci.* 2023; 17:1239808. doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]

Hirokatsu Saito\*, Kentaro Tanemura\*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (\*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 203-210. doi.org/10.2131/jts.48.203]

Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82. doi.org/10.2131/fts.10.69]

Takahiro Sasaki\*, Hirokatsu Saito\*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (\*co-first author): 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; 48(4): 211-219. doi.org/10.2131/jts.48.211]

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡: 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向, 月刊「食品衛生研究」, 2023; 通巻 885 号(73 巻 12 号), 公益社団法人日本食品衛生協会(東京)

齊藤洋克、北嶋 聡: 化学物質を発生・発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, 化学物質と環境: 化学物質と環境との調和をめざす情報誌, 184, 3-6, 2024

Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. doi.org/10.2131/fts.11.37]

菅野純、相崎健一、北嶋 聡: 遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測, 単行本「化学物質の複合影響と健康リスク評価」, 2024; 第 2 章 複合曝露による毒性の評価手法 第 1 節, 医歯薬出版(東京)[ISBN: 978-4-263-73220-5]

### 2. 学会発表

北嶋 聡: 生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 19 日

菅野 純 ,相崎 健一 ,小野 竜一 ,北嶋 聡、新型反復ばく露実験による PFOA の毒性発現分析 Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して、

第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 19 日

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡:ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明. 第 63 回日本先天異常学会学術集会(2023.7.28-30)

Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10-13)

北嶋 聡:トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第 1 回付加体科学部会研究会 2023、岡山、2023 年 9 月 26 日

北嶋 聡:分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発～食品トキシコゲノミクスを例に～、第 9 回 浜松毒性試験フォーラム 基調講演、浜松、2023 年 10 月 27 日

北嶋 聡:職域における環境因子による健康影響～化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究～、第 38 回日本健康科学学会学術大会、東京、2023 年 12 月 2 日

## 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

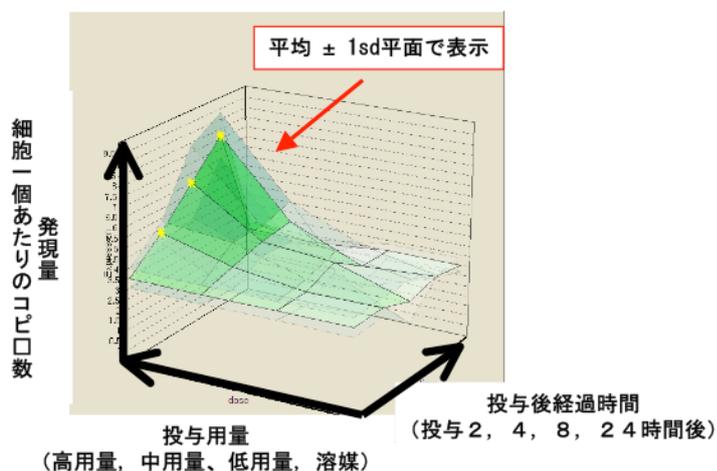


図1 遺伝子発現変動を示す図

各遺伝子につき、濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元の曲面グラフとして示し、各条件の3サンプルの平均値を示す曲面と、その上下に標準偏差(SD)平面(薄い色)をあわせて示した。一つの化学物質につき、約45,000枚の平面が描かれる。

化学物質名	類似度
Indigo	0.805
Aluminum ammonium sulfate	0.785
Bisphenol A (corn oil)	0.635
Tetrodotoxin	0.607
DMSO	0.586
4-EthylNitrobenzene	0.585
Sodium Dehydroacetate	0.581
Dexamethasone	0.579
2-Aminomethylpyridine	0.573
Verbenone	0.571

表1 4,4'-D と類似した反応を惹起する化学物質のリスト

独自に開発した PercellomeExplorer プログラムにより、Percellome データベース全体と網羅的に比較解析を行った。382 通りの試験データベース中、227 の肝プロファイルデータについて、類似した反応を惹起する化学物質のリストを生成した(単回経口投与の場合を対象とした)。いずれも類似度は低かった。

	Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Target Molecules in Dataset
1	TP53	transcription regulator	4.25E-16	Abca8a,ACER2,AKAP13,BHLH
2	CTNNB1	transcription regulator	1.21E-12	AKAP13,AKT2,ALCAM,BHLHE
3	ERN1	kinase	2.39E-12	CAD,CEBPB,CPT1A,DLAT,DN
4	tunicamycin	chemical - endogenous non-mammalian	3.16E-12	CAD,CEBPB,CPT1A,DNAJB11
5	XBP1	transcription regulator	7.76E-11	COPE,COPG1,DNAJB11,EDEM
6	lipopolysaccharide	chemical drug	1.38E-10	AKAP13,AKT2,ALCAM,CCAR1
7	beta-estradiol	chemical - endogenous mammalian	1.58E-10	ACER2,ALCAM,B4GALT1,BHL
8	EIF2AK3	kinase	3.85E-09	CEBPB,CPOX,DNM1L,EDEM1,
9	SRSF1	other	2.35E-08	EIF4G1,EIF4G2,NARS1,Qars1
10	USF1	transcription regulator	5.77E-08	CAD,CEACAM1,CEBPA,CPT1/
11	trovafloxacin	chemical drug	6.86E-08	BHLHE40,CEBPA,EGFR,GNP
12	tretinoin	chemical drug	8.39E-08	B3GALT1,BHLHE40,CA8,CAD,
12	clofibrate	chemical drug	9.97E-08	CEACAM1,CPT1A,ECH1,EGFF
12	ATF4	transcription regulator	0.000000187	CEBPB,CPOX,CPT1A,IGFBP1
15	metribolone	chemical reagent	0.000000188	B4GALT1,CPOX,DBI,DLAT,EC

図 2 4'-D とインディゴの場合に、共通して変動した遺伝子についてのプロモーター解析 (in silico) IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、小胞体ストレス関連遺伝子である XBP1 などが調節因子として抽出されてきた。小胞体ストレス関連と考えられる因子については、カラムの水色を変えた。