

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5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、毒性の分子生物学的機序に基づいて、現行の不確実係数（安全係数）を利用する数量的な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する。方法として、マイクロアレイ（GeneChip）と次世代シーケンサを用いて分子生物学的な情報の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の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。

特に先行研究において、Percellome 法*を基盤とする「新型」反復曝露実験**の蓄積により構築した化学物質の反復曝露による生体影響のデータベースについては、溶媒の反復曝露影響や、反復曝露影響の可逆性・非可逆性を遺伝子単位で取得した網羅的情報をデータベースに反映することにより、評価系の解析精度を向上させる。既に構築済みの単回曝露実験のデータベースと共にこれを利用することで、現段階で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の期間短縮と効率化を検証する。

令和5年度は、DEHP、BrBenz および 2-VP の4日間の新型反復曝露（以下、[4+1]と表記）の遺伝子発現解析を単回曝露[0+1]と共通の要素と異なる要素の抽出及び、基線反応の増減に関わる要素を抽出した。

DEHP [0+1]、及び DEHP [4+1]の遺伝子発現誘導は、ともに PPAR 下流の脂質代謝に関わる遺伝子が主体で、誘導された遺伝子数と時間経過には大きな差はみられなかった。しかし、4日間の反復曝露により PPAR を上流に含まない遺伝子群の基線反応が上昇し、酸化ストレスからオートファジーやライソゾームへの活性化、臓器肥大に関わる系が活性化していることが示唆され、細胞増殖シグナルの増強が示唆され、少なくともマウス肝に対する発癌性が Gene Ontology から強く示唆された。また、基線反応が低下した遺伝子群の

上流にむしろ PPAR が位置していることが示唆された。基線反応と過渡反応の関係を含め、先行研究にて解析した PPAR リガンド化学物質との比較を進めた。また DEHP[4+1]は、同じく PPAR のリガンドとして知られる前年度の estragole とは基線反応に対する影響が異なっていた。DEHP[4+1]は PPAR 下流の遺伝子の基線反応を下げることを示唆され、これは estragole[4+1]とは逆の方向であった。肝発がん性を示唆する点では共有であった。

BrBenz[4+1]は、タンパク質翻訳に関わる遺伝子群(真核生物翻訳開始因子(Eif: eukaryotic translation initiation factor))の強力な抑制効果を発揮することが示された。この作用により肝、および、翻訳に関する機作に共通性を有する諸臓器に対する広範な毒性を発揮することが考察された。

2-VP[4+1]は、GCR (Glucocorticoid receptor)、NRF2 系、グルタチオン、チオレドキシニン系、PPAR α による脂質代謝、PXR、AhR、CAR を介しての広範な標的に対する酸化的ストレスに対抗する因子の増強を誘導することが示唆された。2-VP で報告されている中枢毒性に対する予測に関しては、Percellome database に収録されている神経毒性物質との比較検討を進めるが、肝において神経関連の遺伝子の発現抑制を確認することが可能であった。

いずれも、明らかな毒性所見を発揮しない用量において、4日間という短期の反復曝露によって、単回曝露とは異なった広範囲な変化が誘発されることを明らかにすることが出来た。反復投与により活性化、あるいは抑制された遺伝子群の網羅的な分析とメタデータを組み合わせることにより短期試験の結果から慢性毒性への外挿の可能性が示唆された。その際、Gene ontology (GO)が共通な化学物質が抽出されても、詳細にその内容を確認すると、変動の増減の方向が逆である場合、GO の組み合わせ、特に重なり合う遺伝子群が異なる場合があり、GO の段階での記述では化学物質ごとの毒性機序が説明できない幾つかの様式があることが示唆された。今後、AI の導入による Percellome database 内での多角的な詳細解析およびメタデータとの照合の高次元での促進と実用化を目指す予定である。

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コ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

(1) 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】

● 試薬及び動物：

フタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)、分子量：390.56、Cas No.: 117-81-7、純度 98%以上、東京化成工業(株))について、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。DEHPの4回反復曝露の用量は200mg/kg、最終の単回曝露の用量は先行実験で実施した[0+1]実験と同様に0、200、700、2,000 mg/kgとした。各曝露実験には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。

ブロモベンゼン (Bromobenzene(BrBenz)、分子量：157.01、Cas No.: 108-86-1、純度 98%以上、富士フイルム和光純薬(株))について、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。BrBenzの4回反復曝露の用量は50mg/kg、最終の単回曝露の用量は先行実験で実施した[0+1]実験と同様に0、7、20、70 mg/kgとした。各曝露実験には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。

2-ビニルピリジン(2-Vinylpyridine (2-VP)、分子量：105.14、Cas No.: 100-69-6、純度 97%以上、富士フイルム和光純薬(株))について、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。2-VPの4回反復曝露の用量は200mg/kg、最終の単回曝露の用量は先行実験で実施した[0+1]実験と同様に0、20、70、200 mg/kgとした。各曝露実験には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)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

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

フタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (DEHP) の新型反復曝露実験 (TTG251-L) (DEHP[4+1]と表記) に対する GeneChip による肝の網羅的遺伝子発現解析を実施し、単回曝露実験 (TTG098-L) の肝の網羅的遺伝子発現解析結果を再評価・更新し、それとの比較を行った。

① DEHP[0+1] (実験コード TTG098-L)

先行研究で実施した単回曝露実験 (以後 DEHP[0+1]と表記) の、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 131、302、786、140 であった。

DEHP 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 131 遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR α 、PPAR δ 、NR3C1 (グルココルチコイド受容体)、PPAR γ 等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (図 1 : Abcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14 等)。

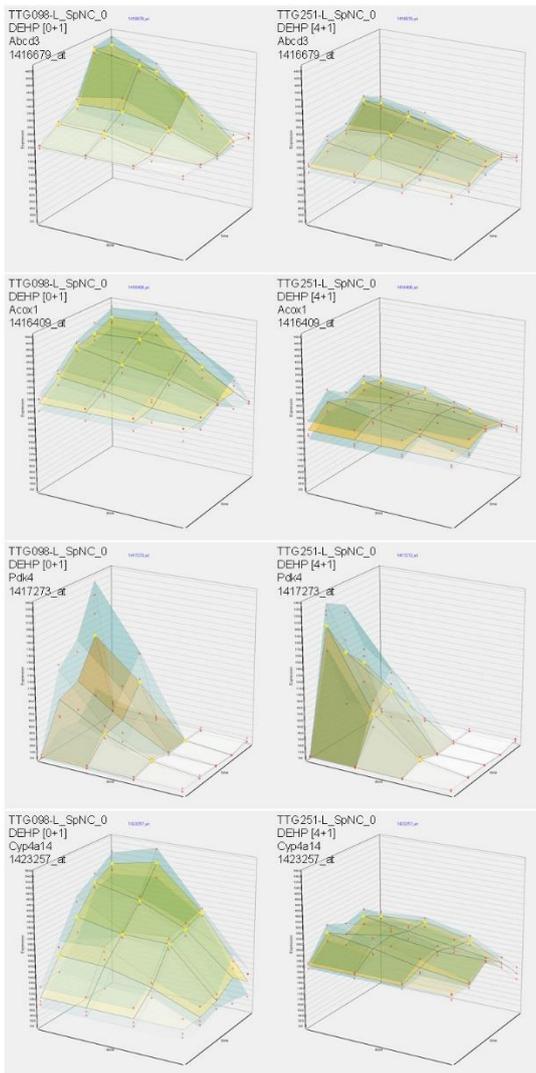


図1 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にてAbcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14を示す。

4 時間目に誘導開始される遺伝子数は 302 で、PPAR α 、PPAR γ に加えて、Hnf4a (NR2A1)、Myc、Nfe2l2 (Nrf2)等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (図 2 : Abcc2、Casp8、Eif4A1、Srxn1 等)。

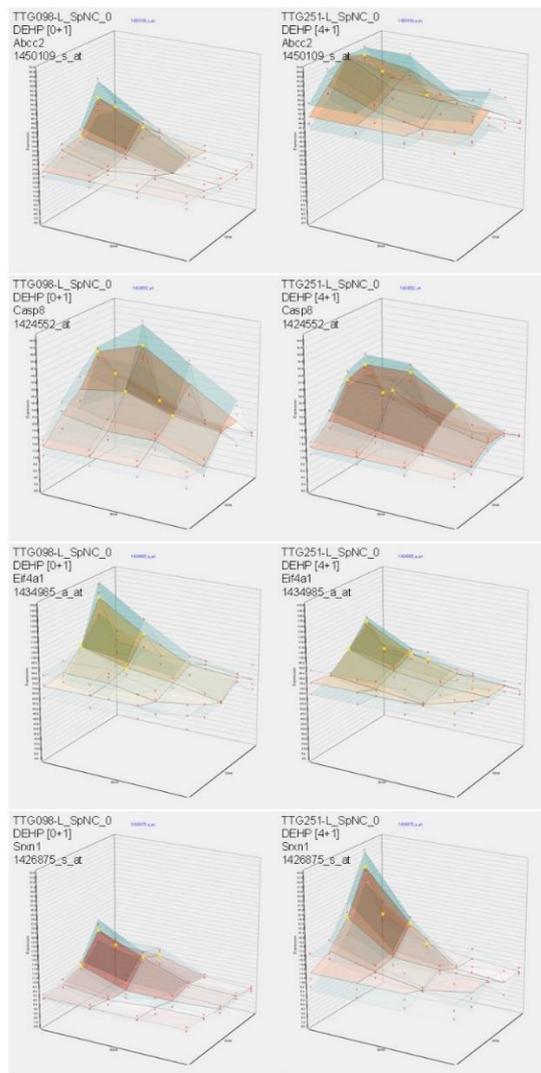


図2 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にてAbcc2、Casp8、Eif4A1、Srxn1を示す。

8 時間目に誘導開始された遺伝子は 786 で、PPAR α に加えて Nfe2l2 (Nrf2)、Myc、p53 等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (図 3 : Gsr、Gstm4、Cdc34、Psm6 等)。

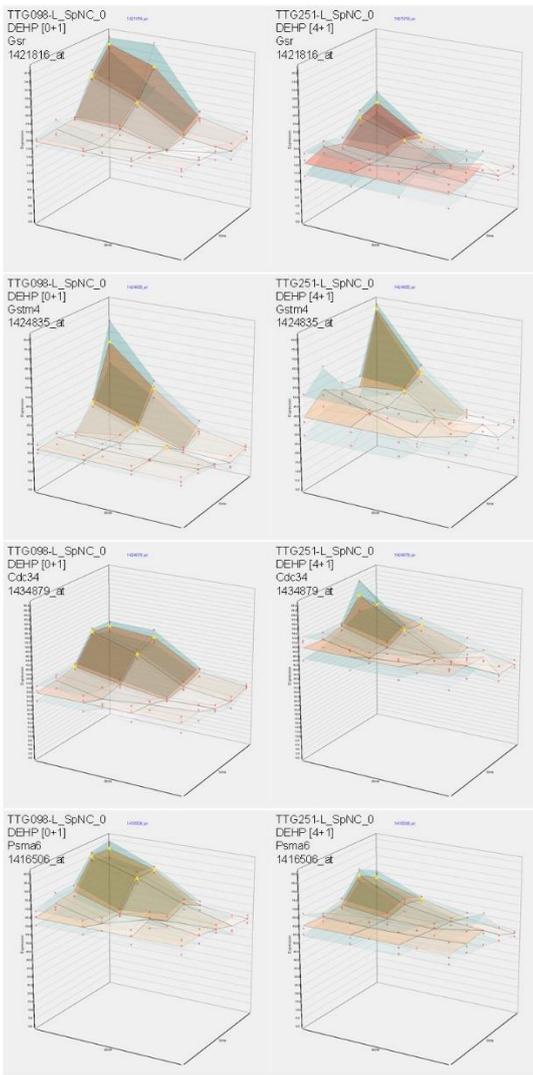


図3 DEHP左[0+1] 右[4+1]にてGsr、Gstm4、Cdc34、Psma6を示す。

24時間目に誘導開始された140遺伝子は、PPAR α に加え、Mlxipl、p53、Ctnmb1を上流に持つものが多かった(図4)。

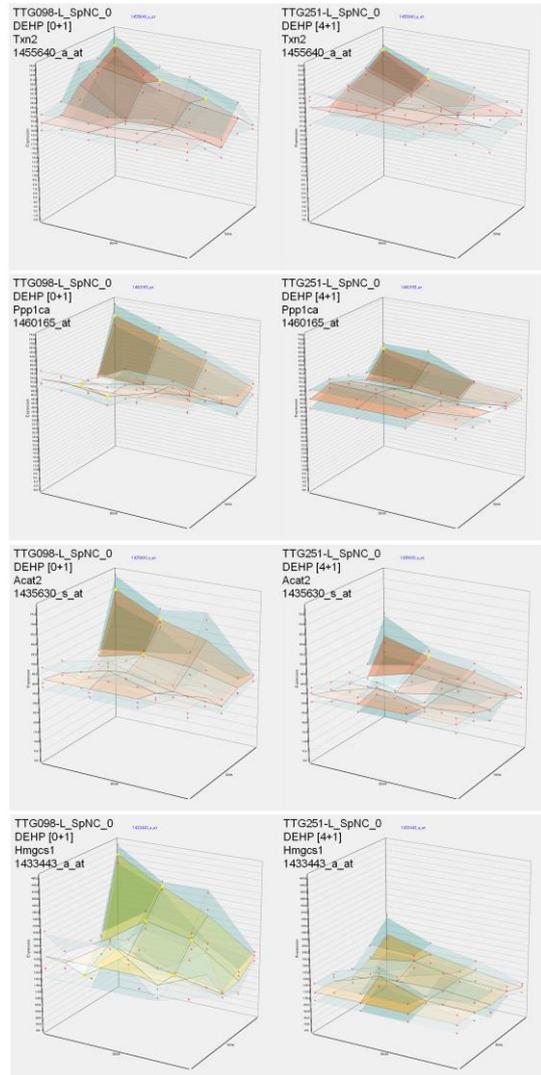


図4 DEHP左[0+1] 右[4+1]にてTnx2、Ppp1ca、Acat2、Hmgcs1を示す。

② DEHP[4+1] (実験コード TTG251-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、127、349、362、29であった。

2時間目に誘導開始された遺伝子は、DEHP[0+1]とほぼ同様であり、PPAR α 、PPAR δ 、NR3C1(グルココルチコイド受容体)、PPAR γ 等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた(図1参照 Abcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14)。加えて、[4+1]において、Hnf4a(NR2A1)、STAT5B、PTENを上流とするいくつかの遺伝子において、発現のタイミングが若干早まることが示唆された(図5: Acsl1、Hif1a、Vnn1、Lpcat3等)。

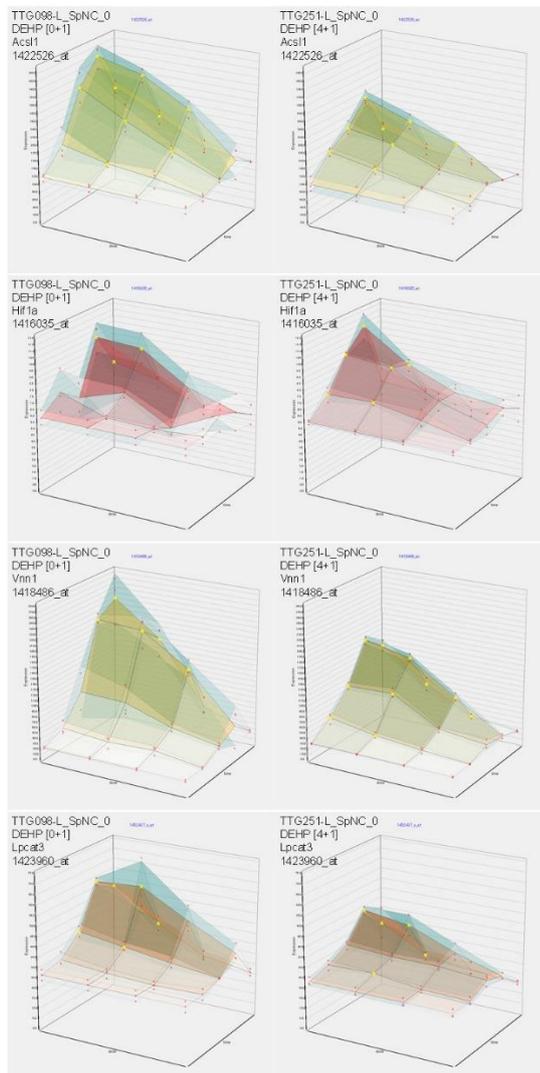


図5 DEHP左[0+1] 右[4+1]にてAcs1l、Hif1a、Vnn1、Lpcat3を示す。P>0.05の有意差を示す黄色*の位置が右[4+1]の方が2時間早くなっている。

4時間目に誘導開始された遺伝子の数は、DEHP[0+1]とほぼ同等で、PPAR α 、Hnf4a (NR2A1)、PPAR γ などの下流の遺伝子であった (図2参照)。加えて、[4+1]において、PPAR α 、PPAR γ 、Nr1i2(PXR)などの下流で、発現時期が若干早まる遺伝子を認めた (図6)。

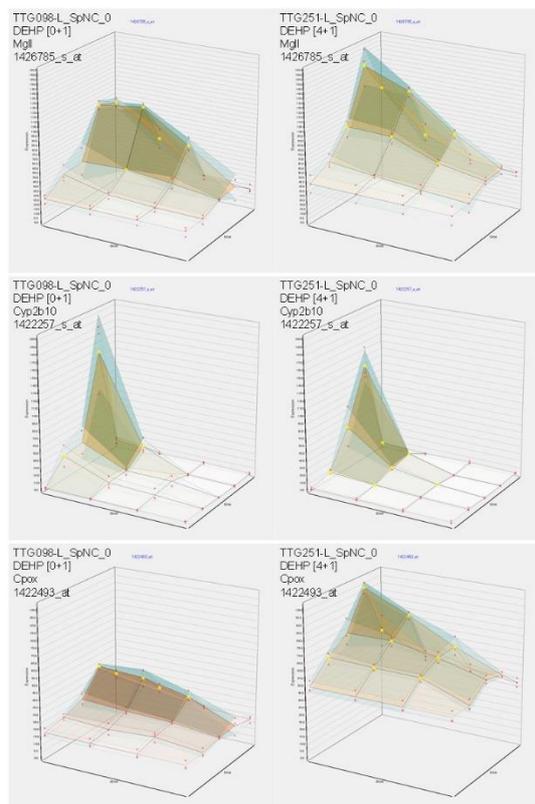


図6 DEHP左[0+1] 右[4+1]にてMgl1、Cyp2b10、Cpxを示す。P>0.05の有意差を示す黄色*の位置が右[4+1]の方が2時間早くなっている。

8時間目に誘導開始された遺伝子の数は、DEHP[0+1]のやく半数で、脂質代謝に関わるPPAR α の他、p53、Nfe2l2 (Nrf2)、Hnf4a (NR2A1)、RICTOR、Nfe2l1等に属する下流遺伝子も誘導されていた (図7及び図3参照)。 $[4+1]$ に特有の遺伝子発現は少数であった。

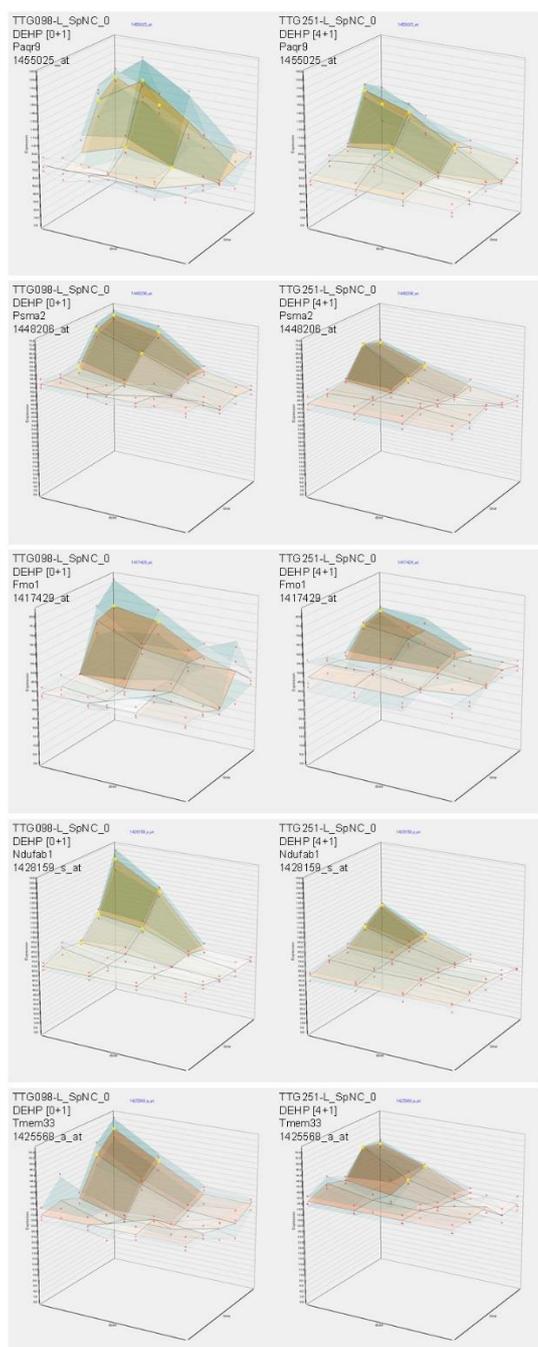


図7 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にてPaqr9、Psma2、Fmo1、Ndufab1、Tmem33を示す。

24時間目に誘導開始された遺伝子は[0+1]よりやや少なかった。[4+1]に特有に遺伝子発現は明らかでなかった(図7)。

図8に示す様に、DEHPにおいては、4日間の反復

投与の遺伝子発現開始時ごとの誘導遺伝子数には大きな差はなかった。

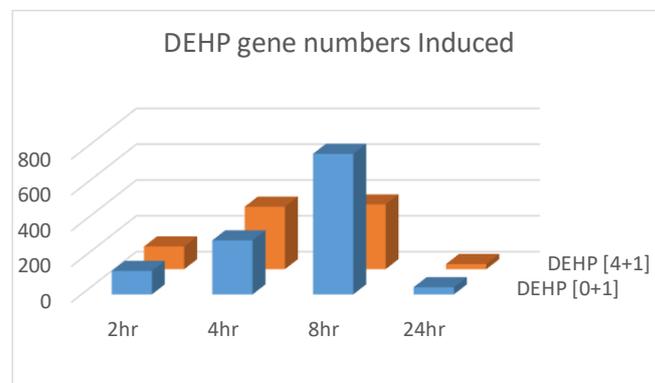


図8 DEHP[0+1]と[4+1]の誘発開始時間による遺伝子数の比較

③ DEHP[0+1]とDEHP[4+1]の比較

次に最終曝露後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 $p < 0.05$ 、3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281、上昇した基線反応遺伝子は1450であった。

[4+1]の基線反応(Baseline Response)が[0+1]より低下した遺伝子群は、上流にPPAR α 、Myc、Hnf4a(NR2A1)等を持ち、コレステロール合成系(DHCR24 signaling)や脂質代謝系(LXR/RXR activation)に属する遺伝子が含まれていた(図9)。

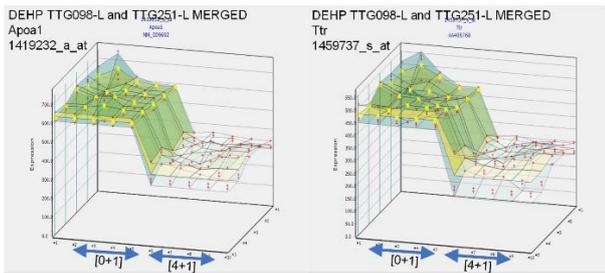


図9 DEHP [4+1]と[0+1]の3次元グラフを左右隣り合わせにして、基線反応を強調した表示にて Apo1、Ttr を示す（奥行きは2, 4, 8, 24時間）。

基線反応（Baseline Response）が[4+1]にて上昇した遺伝子群は、上流に PPAR を含まず、Esr、Kras、p53 等を持ち、酸化ストレスからオートファジーやライソゾームへの活性化に関わるシグナル（CLEAR Signaling）、RHO、および YAP1 にかかわる Hippo 系が活性化していることが示唆された（図）10。

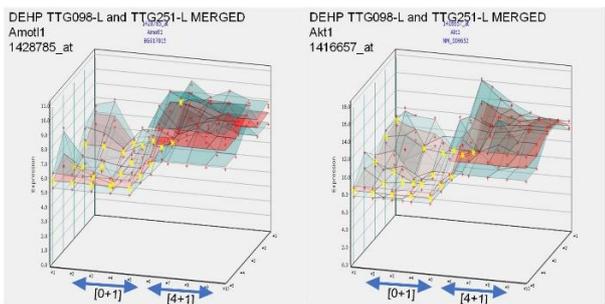


図10 DEHP [4+1]と[0+1]の3次元グラフを左右隣り合わせにして、基線反応を強調した表示にて Amot1、Akt1 を示す（奥行きは2, 4, 8, 24時間）。

以上より、DEHP の4日間反復曝露は、PPAR の直下でない遺伝子群の基線反応を上昇させ、酸化ストレス、増殖、臓器肥大などに関わる反応の増強が示唆された。IPA の Gene Ontology 解析においても Cancer や Gene expression などが上位を占めた。

他方、基線反応が低下した遺伝子群は、Hnf4a (NR2A1)、Myc、PPAR α を上流に持ち、脂質代謝系に関わる遺伝子群を含んでいた。何等かの Negative feedback 機構が示唆された。この点については、基線反応が低下した遺伝子の過渡反応が減弱する傾向が認められ、上流に PPAR 系と peroxisome 形成に関わ

る因子の存在が示唆され、エピジェネティックな制御機構、特にヒストン修飾が関与する可能性が示唆されたことから、合わせて考察を進める。

少なくともげっ歯類に於いて発癌性が強く示唆された。先行研究において解析した PPAR リガンド化学物質との比較解析を追加し、ヒトへの外挿についても検討を進める。

④ BrBenz [0+1]（実験コード TTG074-L）

先行研究で実施した単回曝露実験（以後 BrBenz [0+1]と表記）の、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9、30、27、1であった。

BrBenz は2時間目に、Hmox1、Mbd1 の発現誘導がみられ（図11）、上流には MC3R、DRD5 などの G タンパク質共役型受容体や膜受容体の関与が弱いながら示唆されたがそれらのシグナル伝達系の4時間目以降の発現誘導への関与について、今後検討する。

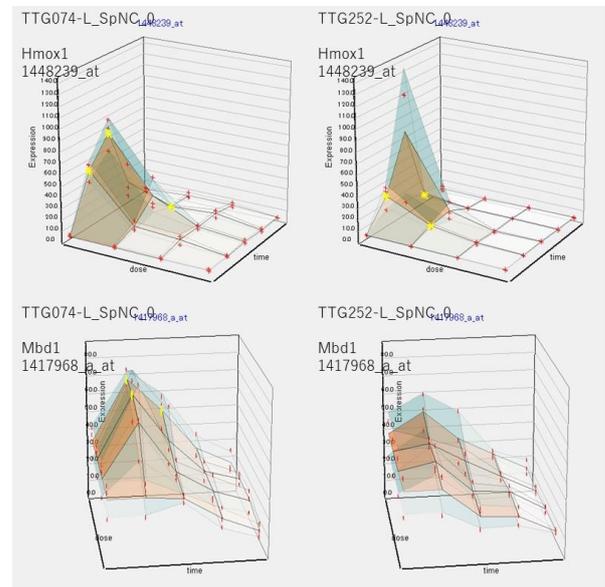


図11 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Hmox1、MDB1 を示す。

4時間目より、Cyp2a4、Ikbkg、Txnrd1、Entpd5、Ubt2b35 など NRF2 系及び一部 NR1i3 (CAR) 系の誘導が開始され（図12）、8時間に向けて、グルタチオ

ン、第 II 相の代謝酵素の誘導が開始された (図 13)。

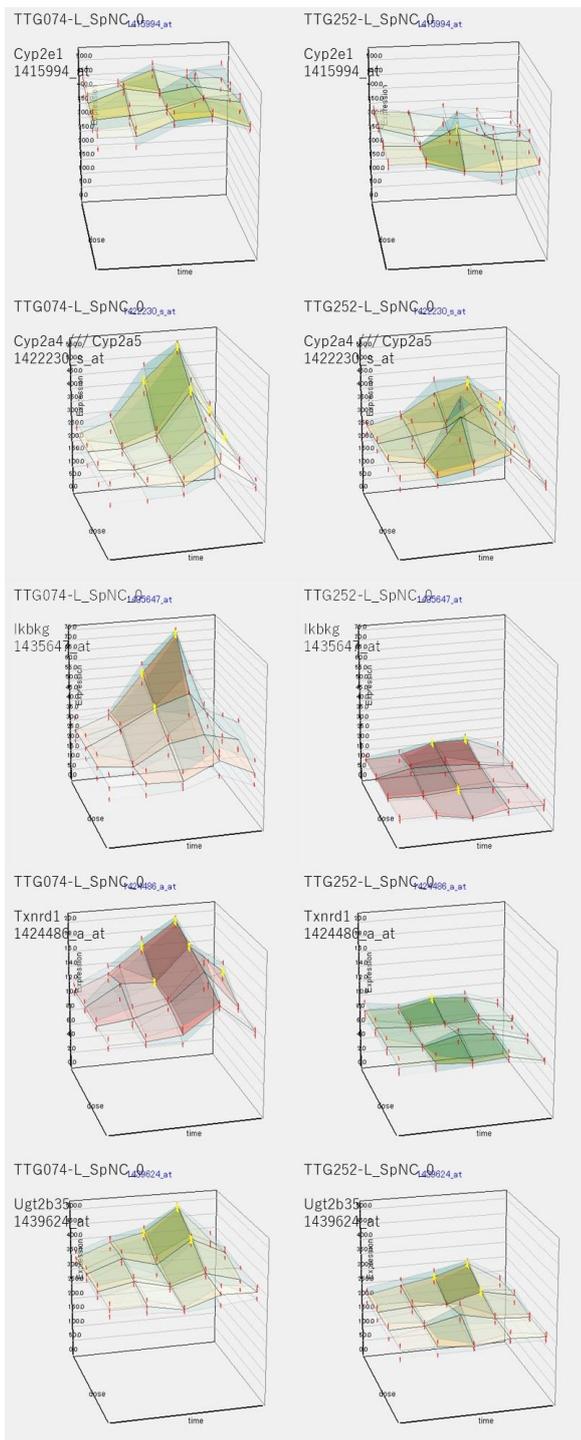


図 12 BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Cyp2e1、Cyp2a4、Ikbkg、Txnrd1、Ugt2b35 を示す。

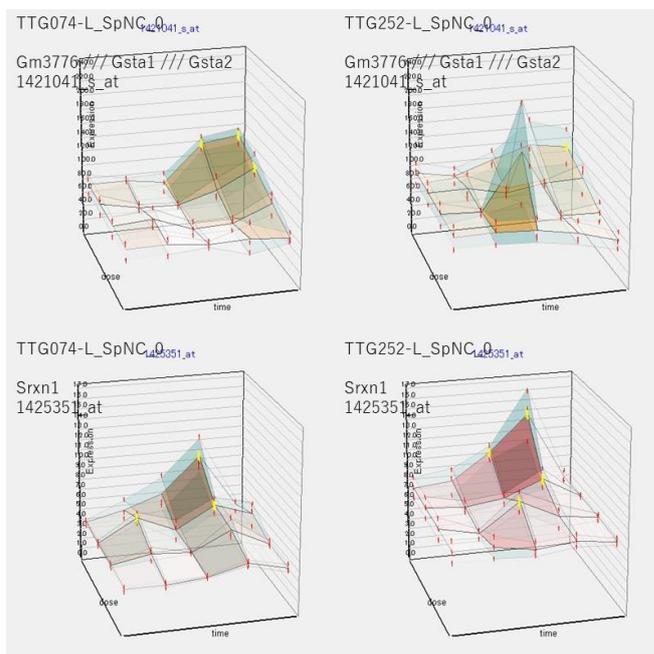


図 13 BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Gsta1/2、Srxn1 を示す。

これは、Cyp2e1 などの常時発現 P450 により BrBenz が代謝を受け、順次、第 II 相代謝酵素を誘導した可能性を示唆すると考えられた。IPA による解析においては、下表の様に、

| Name | p-value |
|---|----------|
| NFE2L2 regulating antioxidant/ detoxification enzymes | 1.49E-12 |
| NRF2-mediated Oxidative Stress Response | 1.63E-12 |
| Xenobiotic Metabolism General Signaling Pathway | 1.13E-05 |
| Glutathione Biosynthesis | 1.25E-05 |
| NLR signaling pathways | 2.11E-04 |

が示され、その上流因子として、

| Upstream Regulator | p-value of overlap |
|--------------------|--------------------|
| TXNRD1 | 1.26E-18 |
| GSR | 2.40E-17 |
| SQSTM1 | 9.09E-15 |
| NFE2L2 | 9.65E-15 |
| ALDH3A2 | 6.52E-11 |

が挙げられた。

以上、BrBenz は核内受容体にはほぼ結合することなく、Cyp2 系統により代謝が開始され、NRF2 系を活性化し、Cyp2a4 などの第 I 相、グルタチオン抱合系などの第 II 相の代謝経路を活性化することが示唆された。その過程で、NR1I3 (CAR) 下流の活性化も示

唆された。示唆される肝毒性としてはグルタチオン枯渇によるものが挙げられる。

⑤ BrBenz [4+1] (実験コード TTG252-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、3、36、69、1 であった。

2 時間目に誘導開始された遺伝子は少なく、解析は難しいが、4 時間目、8 時間目の発現遺伝子は、基本的に BrBenz[0+1] と類似していた (図 12,13 参照)。

⑥ BrBenz [0+1] と BrBenz [4+1] の比較

図 14 に示す様に、BrBenz においては、4 日間の反復投与の遺伝子発現開始時ごとの誘導の傾向には大きな差はなかったが、8 時間目の遺伝子数が増加していた。

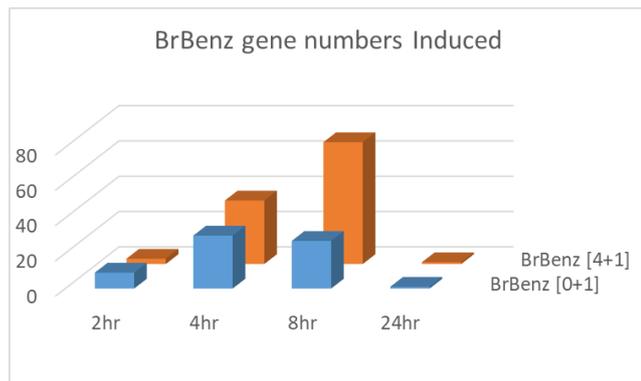


図 14 BrBenz [0+1] と [4+1] の誘発開始時間による遺伝子数の比較

時間経過による遺伝子数の変化は、ほぼ同一であり、内容的にも図 15 に示すように、誘発される遺伝子の Canonical Pathway、上流遺伝子は、ほぼ共通であった (TTG074-L が [0+1]、TTG252-L が [4+1])。

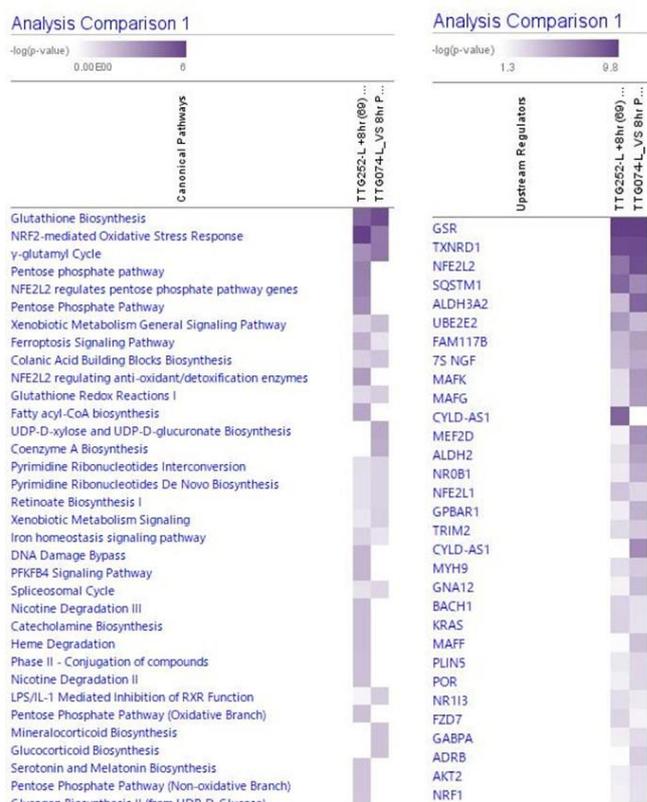


図 15 BrBenz [0+1] と [4+1] の Canonical Pathway と Upstream Genes の比較 (IPA) (TTG074-L が [0+1]、TTG252-L が [4+1])。

次に最終曝露後 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 $p < 0.05$ 、3 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 2774、上昇した基線反応遺伝子は 291 であった。

[4+1] の基線反応が [0+1] より低下した遺伝子群は、HNF4a、Rictor などの上流遺伝子の発現低下とともに (図 16)、リボゾーム蛋白系 (Rpl: ribosomal protein L)、真核生物翻訳開始因子 (Eif: eukaryotic translation initiation factor) などの、翻訳に関わる遺伝子群の発現強力な抑制効果が観測された (図 17)。

Upstream Genes

| Name | p-value |
|--------|----------|
| HNF4A | 4.98E-85 |
| RICTOR | 1.16E-81 |
| MYC | 6.07E-49 |
| UQCC3 | 6.08E-47 |
| LARP1 | 9.47E-47 |

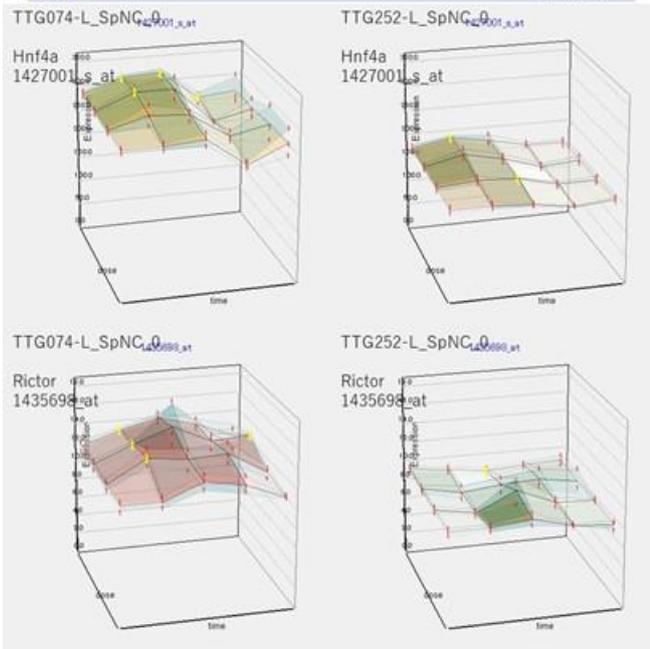


図 16 BrBenz 上流遺伝子の IPA による解析結果の抜粋、および、BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Hnf4a、Rictor を示す。

Canonical Pathways

| Name | p-value |
|--|----------|
| Eukaryotic Translation Initiation | 6.37E-57 |
| SRP-dependent cotranslational proteintargeting to membrane | 1.15E-54 |
| Selenoamino acid metabolism | 1.63E-51 |
| Eukaryotic Translation Termination | 5.74E-48 |
| Eukaryotic Translation Elongation | 1.72E-47 |

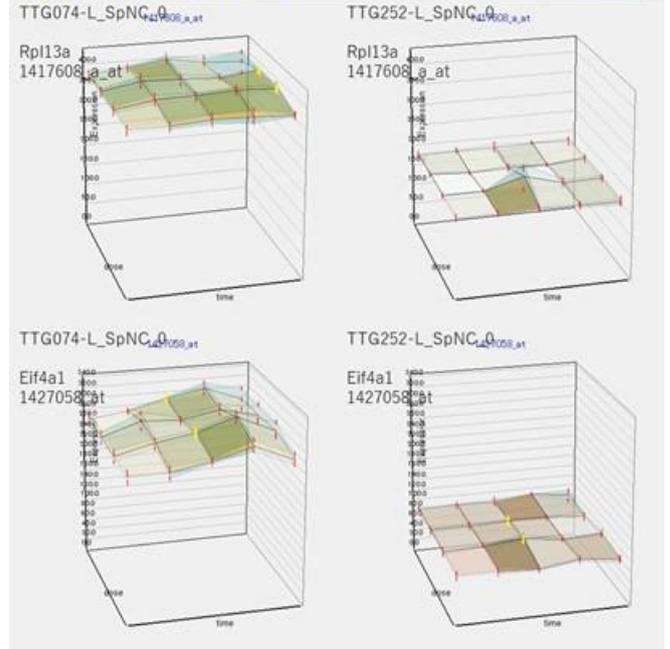


図 17 BrBenz 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Rpl3a、Eif4a1 を示す。

Eukaryotic Translation Elongation に関しても、抑制がみられた。その中で、Eef1a1 は肝において高発現することが知られ、それが抑制されており、これと相補的 (reciprocal) に発現することが知られる Eef1a2 は発現が増強していた (図 18)。

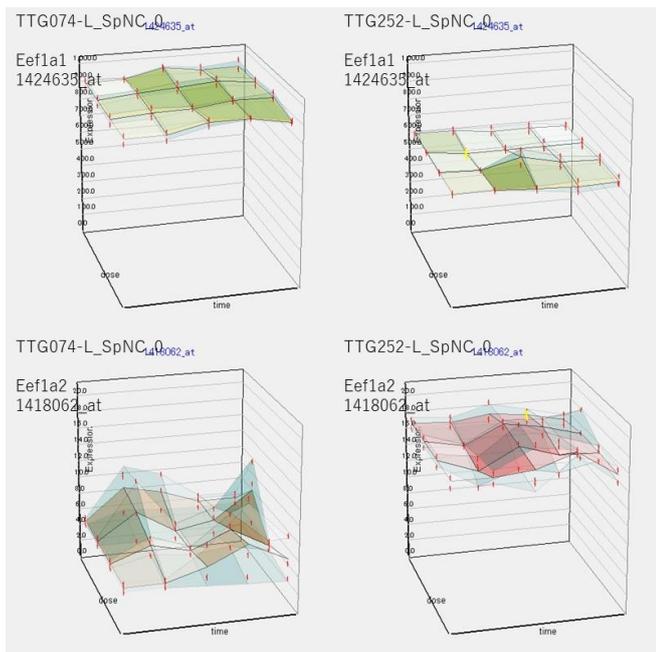


図 18 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Eef1a1、Eef1a2 を示す。

以上より、BrBenz の 4 日間反復曝露は、直後に受容体系にシグナルを入れる作用は限定的で Hmxo1 を含むごく少数の遺伝子の発現を、G 蛋白共役受容体や膜受容体を介して誘導するとともに、常時発現している P450 (Cyp2e1) などにより代謝され NRF2 系を介しての第 II 相代謝酵素の誘導を惹起し、反復投与により、タンパク質翻訳に関わる遺伝子群の強力な抑制効果を発揮することが示された。この作用により肝、および、翻訳に関する機作に共通性を有する諸臓器に対する広範な毒性を発揮することが考察された。

⑦ 2-VP [0+1] (実験コード TTG019-L)

先行研究で実施した単回曝露実験 (以後 2-VP[0+1] と表記) の、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 86、98、104、42 であった。

2-VP は、2 時間目に GCR (Glucocorticoid receptor) を介したシグナルを惹起した (図 19)。

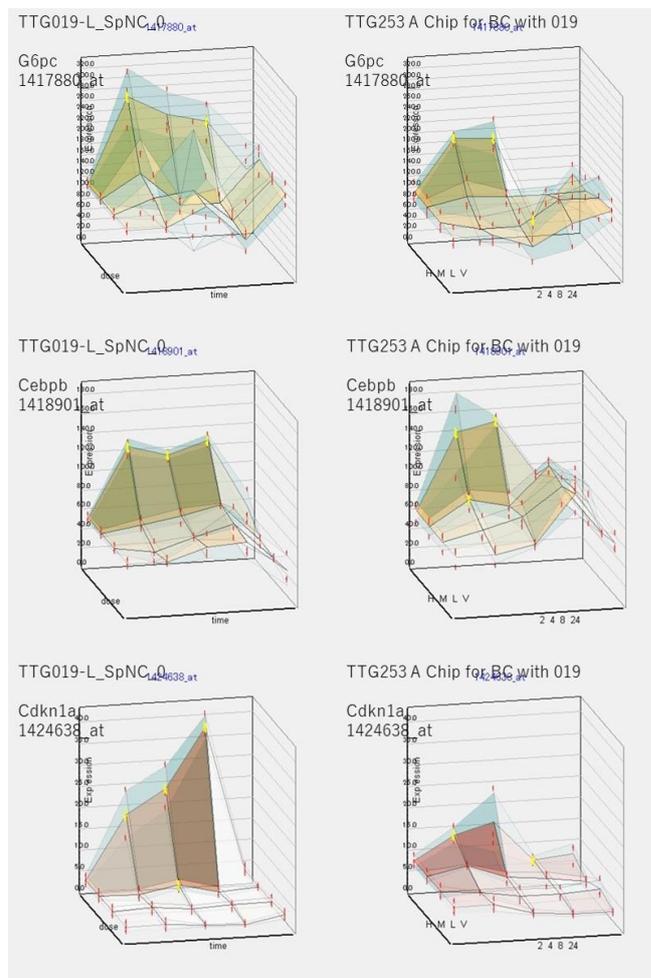


図 19 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて G6pc、Cebpb、Cdkn1a(p21)を示す。

4 時間目に NRF2 系を惹起し、グルタチオン、チオレドキシシン系を誘導し (図 20)、8 時間目に PPAR α による脂質代謝に影響した (図 21)。24 時間目に PXR、AhR、CAR にもシグナルを入れる経過を辿り、広範な標的に対する酸化的ストレスを含む障害が示唆された (図 22)。

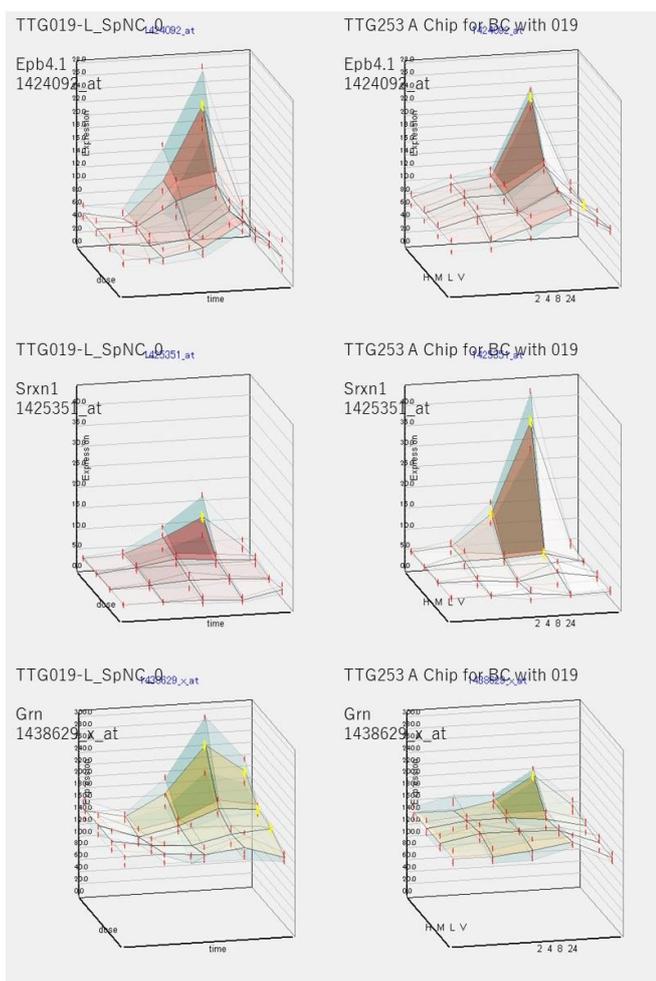


図 20 2-VP 左[0+1] 右[4+1] にて Epb4.1、Srxn1(sulfiredoxin 1)、Grn(granulin)を示す。

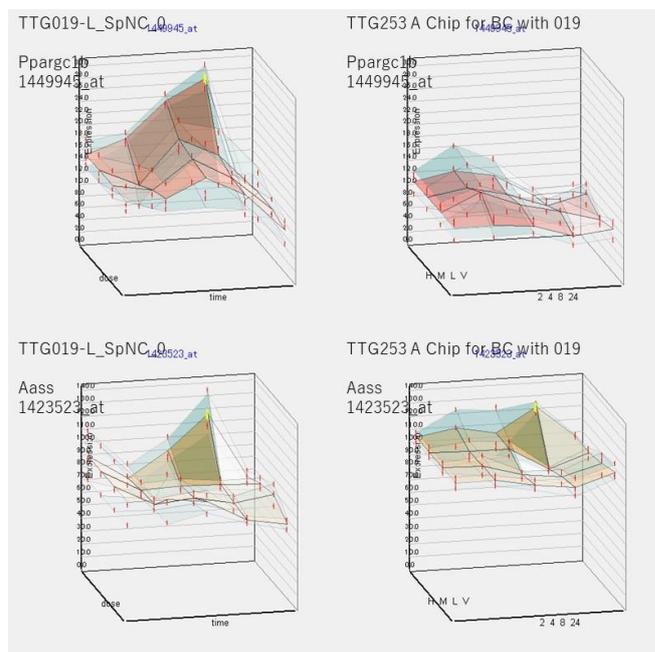


図 21 2-VP 左[0+1] 右[4+1] にて Pparg1b、Aass を示す。

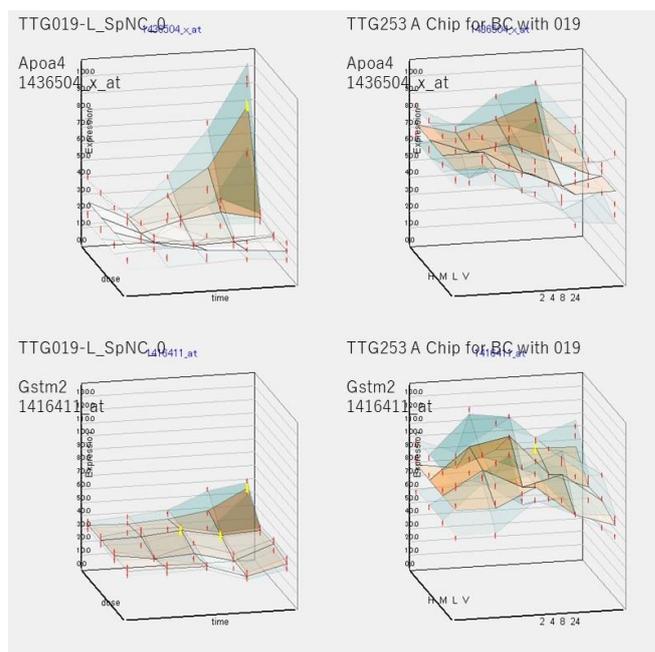


図 22 2-VP 左[0+1] 右[4+1] にて Apoa4、Gstm2 を示す。

⑧ 2-VP [4+1] (実験コード TTG253-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、67、37、19、0 であった。

2 時間目に誘導開始された遺伝子は[0+1]と類似し

ていたが、過渡反応の低下傾向がみられた。4 時間目の誘導遺伝子数は半減したが、酸化ストレスに対抗する因子の過渡反応が増強する傾向がみられた。8 時間目の発現遺伝子はさらに減少したが、NRF2 系の基線反応と過渡反応が増強する傾向がみられた (図 19,20,21 参照)。

⑨ 2-VP [0+1]と 2-VP [4+1]の比較

図 23 に示す様に、2-VP においては、4 日間の反復投与の遺伝子発現開始時ごとの誘導遺伝子数は減少の傾向を示し、特に 24 時間に向かって減少傾向が増強した。

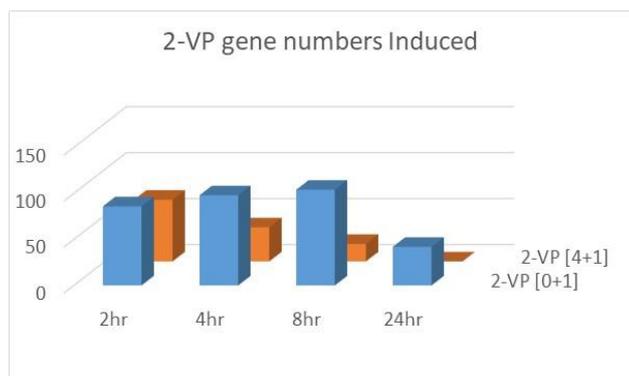


図 23 2-VP [0+1]と[4+1]の誘発開始時間による遺伝子数の比較

Canonical Pathway と上流遺伝子について IPA による解析した結果においても、誘導される系および、上流遺伝子に大きな差はみられなかった (図 24 (◇ TTG019-L が[0+1]、TTG253-L が[4+1]))。

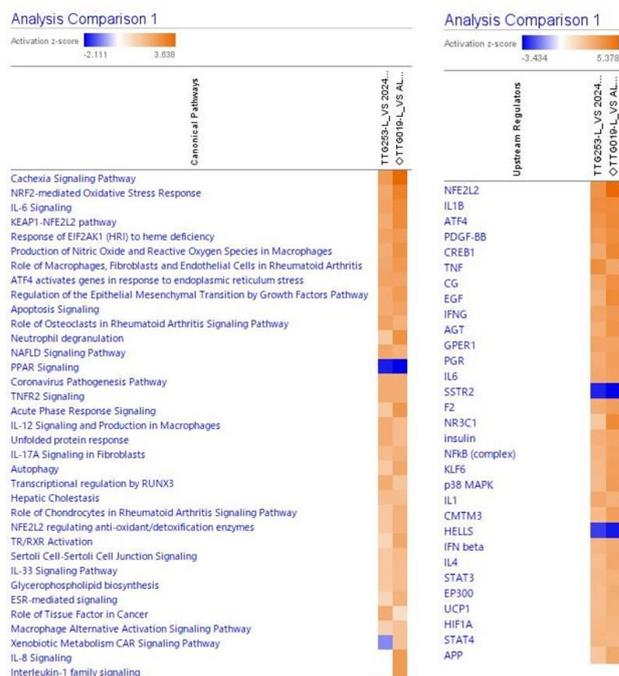


図 24 2-VP [0+1]と[4+1]の Canonical Pathway と Upstream Genes の比較 (IPA) (◇TTG019-L が[0+1]、TTG253-L が[4+1])。

次に最終曝露後 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 $p < 0.05$ 、3 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 2373、上昇した基線反応遺伝子は 1269 であった。ここから、TTG019-L が MOE430 A Chip を使用している点と、Spike Factor が TTG019-L と TTG253-L とで異なる点を補正すると、反復曝露による基線反応の低下が 1130 遺伝子、上昇が 657 遺伝子と判定された。

[4+1]の基線反応が[0+1]より低下した遺伝子群は、上流に Hnf4a、ESR1、Nrf2、Rictor、Catenin b1、My などを持ち (図 25)、Eif2 シグナル (真核生物翻訳開始因子 (Eif: eukaryotic translation initiation factor)) 系

の低下を引き起こした。これらにはインスリン調整を含む系の低下が含まれている(図 26、Pax6、Fosl2、Ern1、Apob、Plg)。

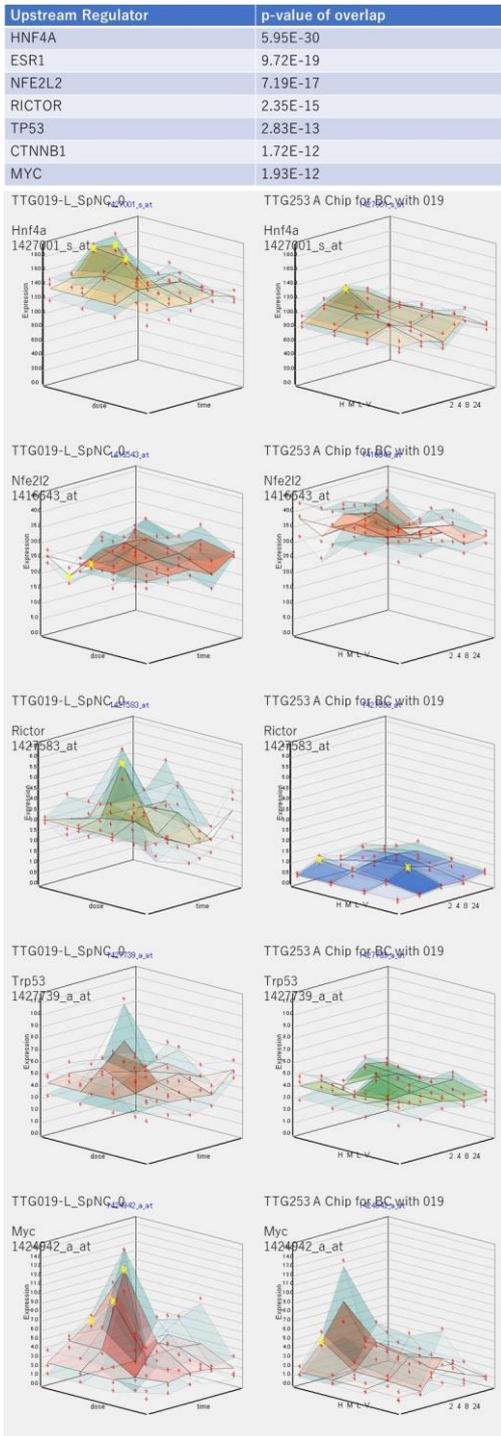


図 25 2-VP 上流遺伝子の IPA による解析結果の抜粋、および、2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Hnf4a、Nrf2、Rictor、p53、Myc を示す。

| Canonical Pathways | p-value |
|---|----------|
| EIF2 Signaling | 4.63E-14 |
| Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling | 2.19E-11 |
| Huntington's Disease Signaling | 4.08E-11 |
| Eukaryotic Translation Initiation | 1.47E-10 |
| SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane | 2.51E-10 |

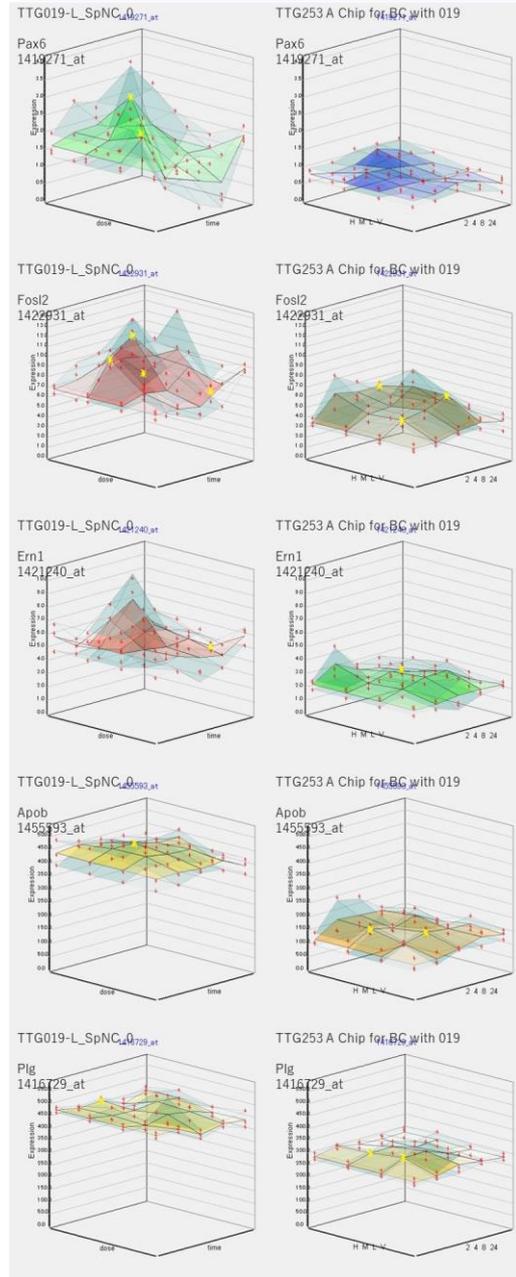


図 26 2-VP 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および 2-VP 左 [0+1] 右[4+1]にて Pax6、Fosl2、Ern1、Apob、Plg を示す。

[4+1]の基線反応が[0+1]より上昇した遺伝子群は、上流に p53、Hnf4a、Tgfb1、E2f1、Nrf2 などをもち(図 25 参照)、Nrf2 系(第 II 相代謝酵素系)を含む代謝系と、ストレス応答系の増強をみとめた。細胞増殖系

に関わるシグナルは軽度の増進が示唆された(図 27)。

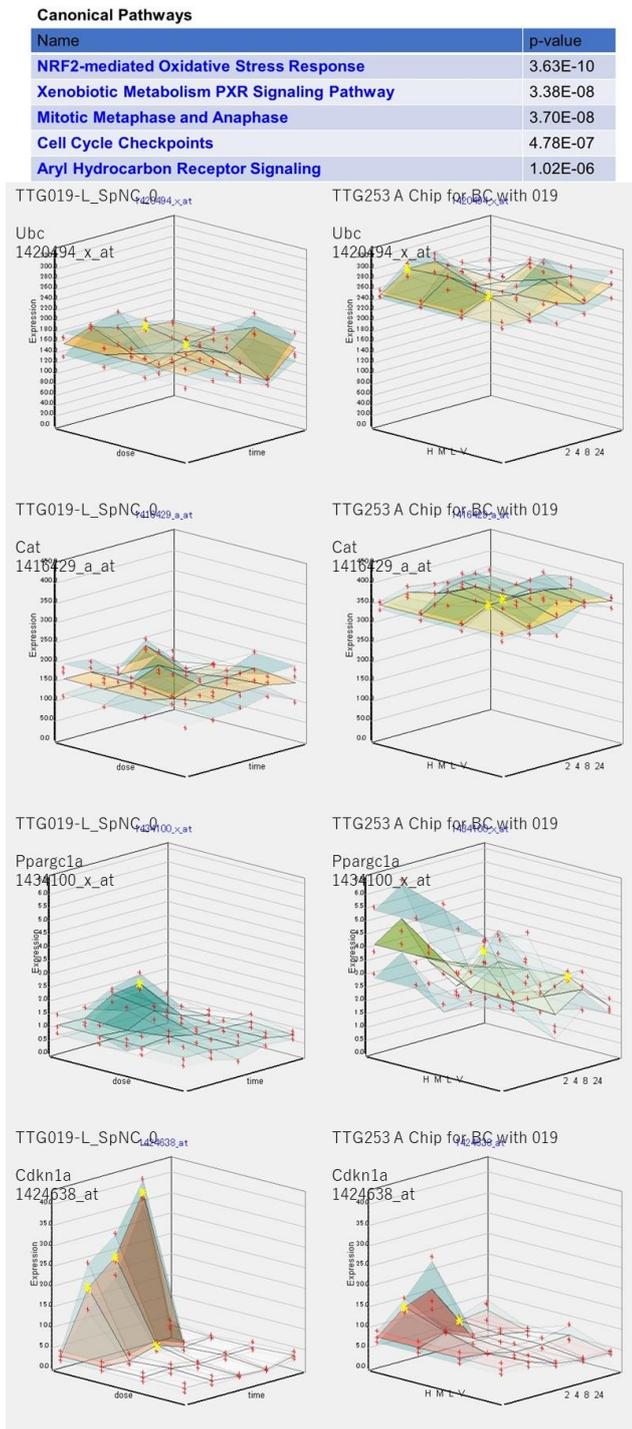


図 27 2-VP 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および 2-VP 左 [0+1] 右[4+1]にて Ubc、Catalase、Pparg1a、Cdkn1a (p21) を示す。

以上より、2-VP の 4 日間反復曝露は、GCR (Glucocorticoid receptor)、NRF2 系、グルタチオン、

チオレドキシシン系、PPAR α による脂質代謝、PXR、AhR、CAR を介しての広範な標的に対する酸化的ストレスに対抗する因子の増強を誘導することが示唆された。

D. 考察

令和 5 年度は、DEHP、BrBenz および 2-VP の 4 日間の新型反復曝露(以下、[4+1]と表記)の遺伝子発現解析を単回曝露[0+1]と共通の要素と異なる要素の抽出及び、基線反応の増減に関わる要素を抽出した。

DEHP[4+1]の結果は、PPAR のリガンドとして知られる前年度の estragole とは基線反応に対する影響が異なっていた。DEHP[4+1]は PPAR 下流の遺伝子の基線反応を下げることを示唆され、これは estragole[4+1]とは逆の方向であった。詳細な比較検討をさらに進めるが、肝発がん性を示唆する点では共有であった。

BrBenz[4+1]は、タンパク質翻訳に関わる遺伝子群の強力な抑制効果を発揮することが示された。この作用により肝、および、翻訳に関する機作に共通性を有する諸臓器に対する広範な毒性を発揮することが考察された。

2-VP[4+1]は、Gcr (Glucocorticoid receptor)、Nrf2 系、グルタチオン、チオレドキシシン系、PPAR α による脂質代謝、Pxr、AhR、Car を介しての広範な標的に対する酸化的ストレスに対抗する因子の増強を誘導することが示唆された。2-VP で報告されている中枢毒性に対する予測に関しては、Percellome database に収録されている神経毒性物質との比較検討を進めるが、肝における関連遺伝子の発現変動は下図 28 の様に確認することが可能である。

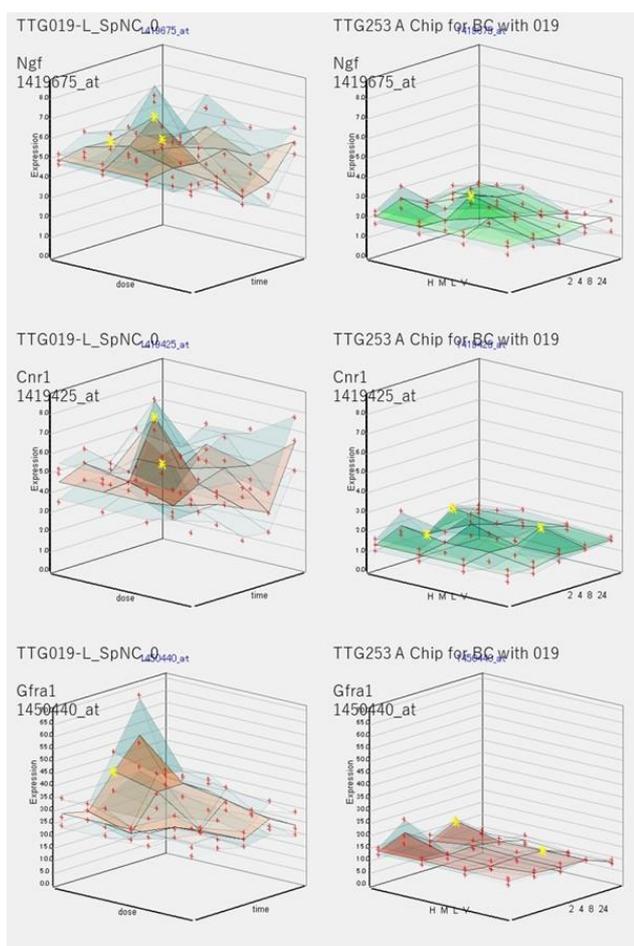


図 28 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて、Nerve growth factor、cannabinoid receptor 1 (brain)、glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 を示す。

いずれの3物質とも、明らかな毒性所見を發揮しない用量において、4日間という短期の反復曝露によって、単回曝露とは異なる変化を明らかにすることが出来た。個々の物質の特性に依存して、反復投与により活性化し抑制された遺伝子群について、その付帯情報を導入することで慢性毒性への外挿の可能性が示唆された。その際、Gene ontology (GO)が共通な化学物質が抽出されても、詳細にその内容を確認すると、変動の増減の方向が逆である場合、GOの組み合わせ、特に重なり合う遺伝子群が異なる場合があり、GOの段階での記述では化学物質ごとの毒性機序が説明できない幾つかの様式があることが示唆された。今後、AIの導入による Percellome database 内で

の多角的な詳細解析およびメタデータとの照合の高次元での促進と実用化を目指す予定である。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

今回のデータからも僅か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、化学物質ごとの特性が明らかになる点を含めて、高いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.* *J Toxicol Sci.* 2024; 49(3): 105-115.[doi.org/10.2131/jts.49.105].
- (2) Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamidrid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front. Neurosci.* 2023; 17:1239808. [doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]
- (3) Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamidrid 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]
- (4) 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]
- (5) Zahm S, Bonde JP, Chiu WA, Hoppin J, Kanno J, Abdallah M, Blystone CR, Calkins MM, Dong

GH, Dorman DC, Fry R, Guo H, Haug LS, Hofmann JN, Iwasaki M, Machala M, Mancini FR, Maria-Engler SS, Møller P, Ng JC, Pallardy M, Post GB, Salihovic S, Schlezinger J, Soshilov A, Steenland K, Steffensen IL, Tryndyak V, White A, Woskie S, Fletcher T, Ahmadi A, Ahmadi N, Benbrahim-Tallaa L, Bijoux W, Chittiboyina S, de Conti A, Facchin C, Madia F, Mattock H, Merdas M, Pasqual E, Suonio E, Viegas S, Zupunski L, Wedekind R, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid. *Lancet Oncol*, 2024 Jan;25(1):16-17. doi: 10.1016/S1470-2045(23)00622-8. Epub 2023 Nov 30.

- (6) Kishi M, Hayashi T, Mitani K, Tsuboshima K, Kurihara M, Hosoya M, Sekimoto Y, Okura MK, Mitsuishi Y, Okada Y, Kanno J, Yao T, Takahashi K, Seyama K. Clinicopathological Impacts of Expression of Neuronal Markers in Lymphangioliomyomatosis. *Am J Surg Pathol*. 2023 Nov 1;47(11):1252-1260. doi: 10.1097/PAS.0000000000002113. Epub 2023 Aug 21. PMID: 37599567
- (7) Motomu Shimizu, Motoki Hojo, Kiyomi Ikushima, Yukio Yamamoto, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Naozumi Ishimaru, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Jin Suzuki, Akiko Inomata, Dai Nakae. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci*. 2023;48(12):617-639. doi: 10.2131/jts.48.617
- (8) Sasaki T, Saito H, Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. 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: 10.2131/jts.48.211.
- (9) 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，67p，医歯薬出版（東京）[ISBN: 978-4-263-73220-5]

2. 学会発表

- (1) Jun Kanno, Keynote Lecture: Molecular toxicology in health and diseases, The 13 th National Conference in Toxicology (NCT13), Thai Society of Toxicology, (2023.08.06), Bangkok, Oral.

- (2) Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Miho Kobayashi, Tetsuro Watabe, and Satoshi Kitajima. Basic lung responses to multiwall carbon nanotubes monitored in mouse whole body inhalation studies. Symposium: Nanosafety and Nanotoxicology. ASIATOX-X, (2023.7.18), Taipei, Taiwan, Oral.
- (3) 菅野純：日本毒性学会における国際的な知名度の向上と国際連携の推進、及び、国際水準による学術振興－国際連携活動の勧め－. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.20)、パシフィコ横浜 会議センター、佐藤哲男賞受賞講演、口演
- (4) 菅野純、相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡：新型反復曝露実験による 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、(2023.6.19)、パシフィコ横浜 会議センター、シンポジウム、口演
- (5) 菅野純：毒性オミクスフォーラム. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、パシフィコ横浜 会議センター、イーブニングフォーラム、パネリスト
- (6) 夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純：PPAR alphaリガンドが惹起する遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、パシフィコ横浜 会議センター、イーブニングフォーラム、口演
- (7) Yayoi Natsume-Kitatani、Ken-Ichi Aisaki、Satoshi Kitajima、Jun Kanno：Comparative analysis of gene expression profiles induced by chemicals with the same target molecule、ISMB/ECCB 2023

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