

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-(22KD1004)
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 毒性部 部長

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。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により、死因の究明につながる情報を得ることを目的としている。R6 年度は、フグ毒として知られているテトロドトキシンを対象に、海馬の解析を行った。遺伝子発現変動解析の結果、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、in silico プロモーター解析を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾン、あるいはサイトカインである TNF が調節因子として抽出されてきた。興味深いことに、海馬での上流解析において、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病の病因遺伝子であるが、正確な機能は未解明であるハンチンチンタンパク質(HTT)が抽出された。

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

モデル物質として、フグ毒として知られているテトロドトキシン(Tetrodotoxin, TTX)を選択し、雄性マウスに単回経口投与した際の、「海馬」における網羅的な遺伝子発現変動解析について検討した。

24 時間無作用量を高用量とし、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを対象とし、モデル物質として、フグ毒として知られるテトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX、生化学用；ロット番号：LKG5746；純度：95.7 % [HPLC]、富士フイルム和光純薬(株))を、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)を用いて強制経口投与し、投与後の時間 4 点(投与 2, 4, 8 及び 24 時間後)、投与用量各 300, 100, 30, 0 $\mu\text{g/kg}$ (溶媒:0.1%酢酸を含む 0.5%メチルセルロース(MC)液(0.5w/v% メチルセルロース溶液 400cP、滅菌済)、富士フイルム和光純薬(株)), pH3.5)の 4 点からなる計 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹の海馬の mRNA を採取し、GeneChip MOE430v2 (affymetrix 社)を用い、約 45,000 プローブセット(ps)の遺伝子発現の絶対量を Percellome 法(Kanno J et al, BMC Genomics 7 64 2006)により得て網羅的解析をおこなった。なお、TTX はアルカリ性の溶液中では不安定であり、酸性条件下で溶解し、投与溶液を準備することは必須操作である(常法では、0.1%酢酸で希釈)。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で一晩浸漬し、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 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。

C. 研究結果

用量設定実験の結果、24 時間無作用量であった 300 $\mu\text{g/kg}$ を最高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ で除して 300、100、30 $\mu\text{g/kg}$ の投与用量を設定した。海馬において、比較的多くの遺伝子の発現変動が認められ(121ps の増加、減少はゼロ)、解析の結果、ストレス応答やサイトカインに係るシグナルネットワークが抽出された。具体的には、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、in silico プロモーター解析を、IPA における Upstream Analysis を用いて検討した結果、ストレス応答に絡むデキサメタゾン、あるいはサイトカインである TNF が調節因子として抽出されてきた。また、フォールスコリンとイソブチルメチルキサンチンが抽出され、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆された。興味深いことに、海馬での上流解析において、軸索輸送に関与していることが知られハンチントン病(HD)の病因遺伝子であるが、正確な機能は未解明であるハンチンチンタンパク質(HTT)が抽出されてきた。

D. 考察

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、以下のような背景をもとに実施した。すなわち、フグ毒として知られる TTX とその類似物質が、ヨーロッパ海域の腹足類や二枚貝から検出されたため、欧州食品安全機関(EFSA)は、海産二枚貝における TTX のリスク評価を実施した。雌性 Swiss マウスを用いた急性経口試験の結果に基づき、最も感度の高いエンドポイントとして「apathy(無気力状態)」が選択され、その無影響量(NOAE)である 25 $\mu\text{g/kg}$ 体重に基づいて、TTX およびその類縁物質の急性参照用量(ARfD)として 0.25 $\mu\text{g/kg}$ 体重が導き出された(2017 年)。従ってマウスにおいては、TTX の経

口投与により、人での中毒症状としてあまり知られていない「apathy」という中枢影響が、最も感度良く誘発されることが示唆された。TTX 誘発 apathy の誘発分子メカニズムの探索を目的として、分子メカニズムに基づく毒性予測に向けて開発された Percellome トキシコゲノミクスを適用した。

TTX の単回経口投与により、マウス海馬においてストレス応答や炎症、及び、細胞内 cAMP レベルの増加が示唆され、後者では海馬における記憶の長期増強や非選択的なニューロン活性化が起きている可能性が示唆された。しかし、チャネル分子など、神経伝達に絡むシグナル分子の発現変動は目立たなかったことから、示唆されたこれらの影響では、apathy との関連は不明であった。そこでさらに詳細な解析を行うために、Percellome データベース(150 化学物質)について、海馬において TTX の場合と類似した遺伝子発現変動を惹起する物質を探索したところ、デヒドロ酢酸ナトリウム、サリドマイド、クロルピリホスなどが挙がってきた。これらについてもそれぞれ上流解析をしたところ、興味深いことに、これらに共通して、ストレス応答やサイトカインに関わるものに加え、やはり HTT が抽出されてきた。すなわち、これらの物質においても急性影響として apathy が誘発される可能性が示唆されたが、いずれも未報告であり、今後の検討を要する。この点、apathy は一般状態の変化であり、人への外挿性を考慮すると、本研究班でも扱っている脳波などの測定により Apathy の把握の客観化をする必要があるものとする(急性毒性の近代化の必要性)。

そこで、この HTT と apathy との関連について文献検索をしたところ、「ハンチントン病(HD)は常染色体優性の神経変性疾患であり、運動障害、認知症、精神症状を引き起こすが、apathy は一般的な症状であり、HD における apathy は時間とともに増加し、臨床転帰の悪化と関連し、これらの関連はうつ病とは独立していた」という論文(Michael H Connors et al, J Neuropsychiatry Clin Neurosci 35(1): 69-76,2023)を見出した。すなわち、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が強く示唆された。しかし、apathy 誘発に向けた HTT の具体的なシグナルネットワークは不明であり、

HTT シグナルのさらなる機能解析が待たれる(シグナルネットワーク基礎研究の必要性)。

D. 結論

急性毒性試験における遺伝子発現変動解析については、apathy はハンチントン病(HD)で最もよくみられる神経行動学的症状の 1 つとする論文から、TTX による apathy 誘発に、HTT シグナルネットワークが関与する可能性が示唆されたが、apathy 誘発に向けた HTT の具体的なシグナルネットワークは不明であり、HTT シグナルのさらなる機能解析が待たれる。また人への外挿性を考慮すると、apathy のような一般状態の変化を、脳波などの測定により Apathy の把握の客観化をする必要があるものと考えられた。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(6): 289-296.[doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. Fundam. Toxicol. Sci. 2024; 11(4): 169-181. [doi.org/10.2131/fts.11.169]

Kiyoshi Hashimoto, Hiroshi Arakawa, Rikako Imamura, Takuya Nishimura, Satoshi Kitajima, Takuya Sato, Kazuhide Makiyama, Takehiko Ogawa, Satoshi Yokota: A novel alternative method for long-term evaluation of male reproductive toxicity and its recovery using a pre-pubertal mouse testis organ culture system.

J Appl. Toxicol. 2024; 44(5): 784-793. [doi.org/10.1002/jat.4584]

Hidehito Miyaso, Satoshi Yokota, Kousuke Suga, Yui Hashimoto, Céline Kouno, Kenta Nagahori, Masahiro Itoh, Satoshi Kitajima: Histological differences between the central and peripheral areas of the testes of busulfan-administered mice. J Toxicol Sci. 2024; 49(4): 139-149. [doi.org/10.2131/jts.49.139]

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]

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

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]

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

2. 学会発表

五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋 雄、桑形麻樹子、北嶋 聡: ゲノム編集によるノックインマウス作製時に生じた、オンターゲット部位の多様な変異とその次世代伝達、第71回日本実験動物学会総会、

京都、2024年5月29日、ポスター

北嶋 聡, 高橋祐次, 相崎健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、口頭

横田 理、宮宗秀伸、菅 康佑、兼子 智、若山友彦、北嶋 聡: Reactive blue 2 の雄性生殖毒性評価への適用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

小野竜一、桑形麻樹子、成瀬美衣、渡邊章仁、鷹野正生、長谷川拓郎、高島宏昌、吉岡祐亮、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡: バルプロ酸(VPA)の妊娠マウスへの反復投与により誘導される羊水由来の細胞外小胞 Small RNA、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月5日、口頭

齊藤洋克、横田 理、北嶋 聡: セルトリ細胞におけるビメンチンの免疫組織化学的变化と精子形成不全との関連、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月3日、ポスター

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡: 細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月4日、ポスター

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥月、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡: 細胞培養食品バイオハザード研究 2: 培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

高橋祐次、相崎健一、森田紘一、菅 康佑、辻昌貴、北嶋 聡: 心電図の異常検出法としてのマトリクスプロファイルアルゴリズムの応用、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、ポスター

横田 理、前野 愛、北條 幹、辻 昌貴、森田 紘一、菅 康佑、相田麻子、広瀬 明彦、菅野 純、高橋祐次、北嶋 聡: 多層カーボンナノチューブのマウス単回吸入曝露による肺負荷量の経時的変化、第51回日本毒性学会学術年会、福岡、2024年7月4日、

ポスター

北嶋 聡:毒性学 revisited-生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展-、基調講演 6L-1「拮抗剤、分析と中毒」、第 46 回日本中毒学会総会・学術集会、(2024.7.24.)、神戸

五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡:細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向—家畜・家禽以外の動物 種を含めて—、日本動物学会第 95 回長崎大会、長崎、2024 年 9 月 14 日、口頭

北嶋 聡:いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会第 40 回食品化学シンポジウム、(2024.11.15)、川崎

北嶋 聡:網羅的分子毒性学からみたヒトと化学物質との共生、シンポジウム 3S02m「ヒトとヒト、異種生物、そして環境との「共生」を考える」、APPW2025(第 130 回日本解剖学会・第 102 回日本生理学会・第 98 回日本薬理学会 合同大会)、2025.3.19、千葉

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