

トキシコゲノミクスの新展開

-Percellome プロジェクトによる TCDD-TCDF 比較-

An attempt for adding a new dimension to toxicogenomics research: a TCDD-TCDF comparison trial in the Percellome Project

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋 聡、中津則之、児玉幸夫、高木篤也

要旨

Percellome トキシコゲノミクスはマイクロアレイという数万遺伝子の発現レベルを一気に測定するハイスループット技術を利用し、全遺伝子のカスケード解明を最終目標としつつ、従来に比してより早く安く且つ正確な毒性評価系の確立を目指すものである。我々はこの様な次世代の毒性評価・予測技術を開発するために、細胞 1 個当たりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法を開発した。今までに 90 以上の化学物質についての網羅的遺伝子発現情報を得、なお追加中である。本稿では環境化学物質の一例としてダイオキシンの分子毒性に関わる知見を紹介する。

Key words: Percellome Project, 遺伝子発現カスケード, 分子毒性学

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

E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985 年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学，実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て，2002 年より同部長。

内分泌攪乱関連などの分子毒性学研究，Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所掌業務の一環として有機的に推進。

はじめに

毒性学は生体 (Biosphere) と外来性物質 (Chemosphere) との相互作用を研究する分野であり、目的は「ヒトの安全」である。日常遭遇する化学物質（生活化学物質、環境化学物質、医薬品や食品を含む）が摂取された際の安全性を担保するため（毒性評価）に、人体実験が困難な場合、身代わりとしての実験動物の毒性所見をヒトに外挿することが行われてきた。これは両者が基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいているが。そして、酵素、膜、DNA、など比較的普遍的且つ基本的な標的が主な検討対象となってきた。現在の分子毒性学は、生体反応メカニズムに踏み込み、受容体、転写因子等との選択的結合によるシグナル伝達障害などの標的特異性の

高いものや、エピジェネティックな遅発影響なども直接的な対象とするようになり、基礎分子生物学と直結する時代に入っている。古い話ではあるものの未だに分子機構の解明が完結していないサリドマイドの催奇形性問題、或いはつい最近では健常人ボランティアに対するバイオ医薬品（治験薬）の微量投与がその全員を集中治療室送りにした事件は、種差問題の解決を含む分子毒性評価法の確立の重要性と、その現状を示していると考えられる。

トキシコゲノミクス

分子毒性メカニズム解析のためのツールの1つにmRNAを対象とするトキシコゲノミクスがあり、見落としの無い網羅性が要求される毒性学では全遺伝子のカスケード解明がその最終目標となる。これにより従来に比して早く安く正確な毒性評価を目指すことが出来る。そして、種差・個体差、一生涯の反応性を修飾する胎生期・周産期影響、或いは、複合作用等を包括的に扱う際には、生命科学の各分野との緊密な連携が必須となる。他方、従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、例えとしては光学顕微鏡に対しての電子顕微鏡の様な立場にあると考えられる。電子顕微鏡が広く用いられるようになるには、教科書や図譜が必要であった様に、トキシコゲノミクスの実用化にはある程度の量のデータの蓄積と解析のための基礎研究（関連分野との連携を含む）が必要である。そこで、我々は、情報の互換性を確保する為に細胞1個当たりのmRNA発現コピー数を得るPercellome手法を開発した（サンプルのDNA量に対する標準化を行うもの）。これを基盤としたプロジェクトを展開中であり、今までに90以上の化合物についてのデータを蓄積し、その解析ツールを開発している。

Percellome 法

原理は単純で、サンプルの細胞数を測る代わりにDNA濃度を精密に計測し、それを基に外部標準mRNA（スパイクRNA）を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そしてRNA抽出、測定に移る。スパイクRNAの測定値を基準に、サンプルの各RNAの測定値を細胞1個当たりのコピー数に換算する^(1,2,3)。これにより、実験操作、試薬やマイクロアレイのロット差等による系統誤差を相殺するという本来の目的が果されるほか、測定過程に於ける各種の異常が高感度に検出されることから、品質管理精度の向上が図られている。例えば、高密度マイクロアレイで問題となるプローブの飽和によるダイナミックレンジの狭小化の検証・回避に役立っている。新世代Affymetrix GeneChipに於いて高発現遺伝子プローブが容易に飽和し高用量域で定量性を失う現象は、一般的なデータ標準化手法では検出困難であり、Percellome法を用いて初めて直接的に感知することができる。現在、我々はサンプルRNA量をメーカー推奨プロトコルの半量にすることなどにより効率的にこれを回避している。

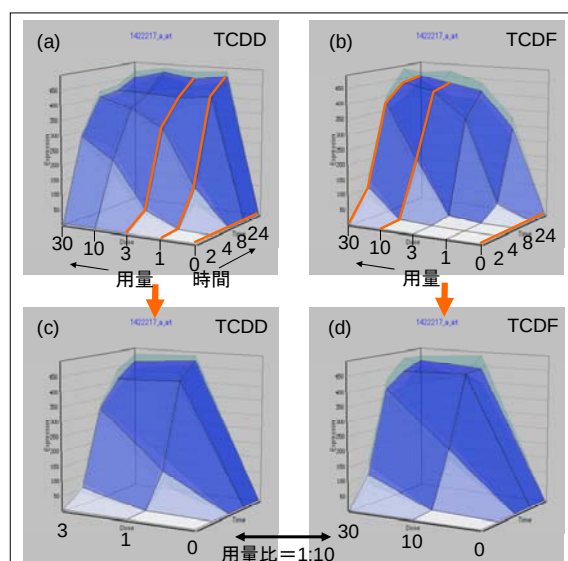


図1:TCDDとTCDFのPercellome データ:TEF 依存遺伝子の抽出(1)

TCDD 及び TCDF の単回経口投与を C57BL/6 雄マウスに行った。用量は両実験とも 0 (溶媒対照)、1、3、10、及び 30 μ g/kg とし、投与後 2、4、8、及び 24 時間後に肝を採取しマイクロアレイ解析を行った(両動物実験は 1 ヶ月を隔てて、国立医薬品食品衛生研究所、環境保全型動物実験施設内にて厳重管理の下に実施された)。代表例として cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (*Cyp1a1*; Affymetrix probe ID 142217_at) を示す。

A: TCDD による *Cyp1a1* の発現変動の Surface (反応曲面) 表示。

B: TCDF による *Cyp1a1* の発現変動の Surface 表示。丁度、用量について 10 倍ずれた反応を示している。C: TCDD の 3、1、0 から作製した Surface と D: TCDF の 30、10、0 から作製した Surface が形状及び発現値ともにほぼ完全に一致している。この様な遺伝子を TEF 依存性とした。

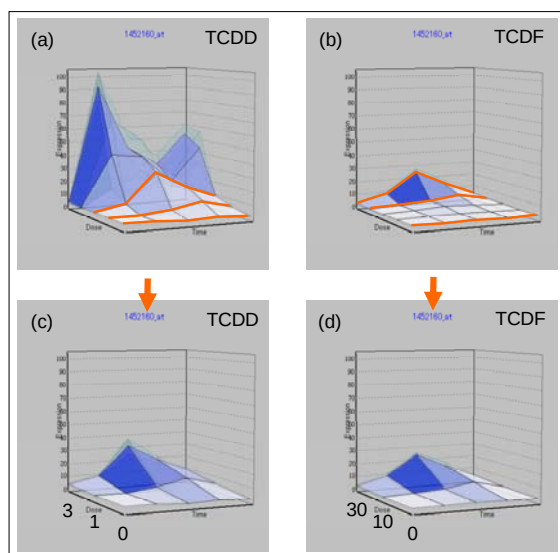


図2:TCDDとTCDFのPercellome データ:TEF 依存遺伝子の抽出(2)

TEF に従うもう一つの例として TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase (*Tiparp*; 1452160_at) を示す。A、B、C、D は図1と同様の表示。A と B を比較すると一見違った反応をしているようだが、C と D を比較すると TEF 依存性であることがわかる。

Percellome Project

マウス肝を中心とした約 90 化合物（毒性学的情報の豊富なもの）の単回暴露による初期応答遺伝子データベースを構築すると共に、シックハウス症候群^{注1}を考慮した低用量域での吸入トキシコゲノミクス、発生毒性についての胎児トキシコゲノミクス、また *in situ* ハイブリダイゼーションによる局在確認系を立ち上げた。現在、これらに加えて反復暴露による慢性毒性、及び、多臓器間の関連性を検討する研究を展開中である。データの一部は <http://toxicomics.nihs.go.jp/db/> にて公開中であり、今後、内容を拡充する予定である。

ここで、本プロジェクトにより明らかとなった一般的な注意点について簡単に触れる。それは、再現性の高いデータを得るためには実験管理を厳重にする必要があるという点である。マウス肝で有意に発現する 12,000（何れかの時点で 3 コピー/細胞以上）の遺伝子のうち、概日変動を示す遺伝子が 3,600 以上あり、最大で数十倍以上の発現差が見られる。この変動が実験の邪魔をしないようにするには、動物飼育施設の明暗サイクルを 2 週間以上一定に保ちマウスの概日リズムを安定化し、その上で、マウスに検体を投与する時刻、及び、サンプルを採取する時刻を±30 分以内に限定する必要がある。概日リズムは肺、腎、脳、心、胸腺などにも明瞭に存在するので、同様の注意が必要である。培養細胞実験においても細胞密度、培地交換、シャーレのインキュベーター内の位置、倒立顕微鏡での観察の影響（操作による培地攪拌による刺激）、多穴プレートでは辺縁と中央の違いなどが、遺伝子発現データに大きく影響することを観察している。

注1：住宅の高気密化や化学物質を放散する建材・内装材の使用等により、新築・改築後の住宅やビルにおいて、化学物質による室内空気汚染等により、居住者に生じる様々な健康障害の総称

Percellome を活かしたデータ解析

Percellome 法の絶対量化データの最大の特徴は、原点（zero）から表示可能なコピー数という「名数」である点にある。基底発現量がわかる、データの四則演算が可能であり、例えば処置群から溶媒対照群の値を引くことで概日リズムや溶媒による影響を容易に取り除くことができる、などの利点が多い。これらは発現比を用いた解析では問題となる操作であるが、Percellome 法であれば自然な処理が可能である。更に、この性質を利用し、用量と時間が発現変動を規定するとの前提に基づき、用量・時間・発現値を三次元直行座標に置いた一つの三次元グラフに反応曲面（Surface と呼称）として可視化して、直感的なデータの把握を実現している。1つの化合物について GeneChip のプローブセット数に対応する約 45,000 枚の Surface が描出される。この中から生物学的に有意であると考えられるパターンを含む特徴的な発現パターンを効率的に自動的抽出する RSort（Surface の凹凸の特徴を解析し、その明瞭さの順にソートする）アルゴリズムを考案、活用している。また、別

途に独自開発した教師無しクラスタリングアルゴリズム (MADIC⁽⁴⁾ 等) を活用して、発現パターンが類似しているものを網羅的にクラスター化している。2 枚の Surface の形の類似性を数値化するアルゴリズム (tmf) も開発済みであり、注目すべき遺伝子の発現パターンを鋳型として同様の発現誘導パターンを呈する遺伝子を自動抽出できるようになっている⁽⁵⁾。

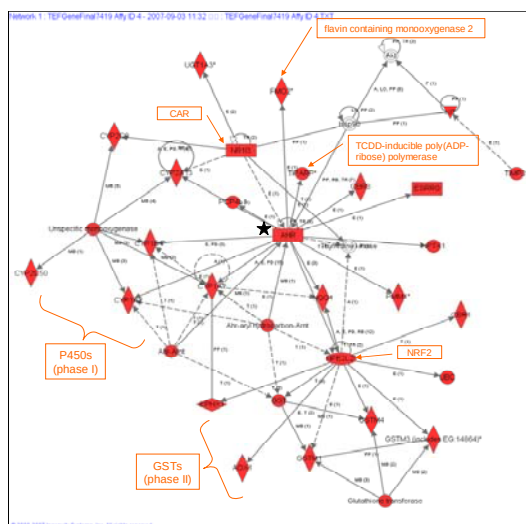


図3:TEF 依存遺伝子の描く Pathway

図1の方法で抽出された TEF 依存性遺伝子約 140 を Ingenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.)に投入し、得られる Pathway の代表的なものを示す。AhR(★)を中心に NRF2 を含む転写因子群を介して、第一相及び第二相の代謝酵素を含む AhR 依存的な遺伝子を認める(赤色:計算に投入した TEF 非依存的遺伝子のうち、この Pathway に含まれるもの、灰色:Pathway のメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの)。

TCDD と TCDF の Percellome 比較による TEF 依存遺伝子及び非依存遺伝子の解析アプローチ

ここでは、解析例として、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) と、2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) の遺伝子発現応答データを比較し Toxicity Equivalence Factor (TEF)⁽⁶⁾に従う遺伝子と従わない遺伝子を検討した事例を紹介する。ダイオキシン類、即ちダイオキシン、ジベンゾフラン、及びコプラナーPCB は、その何れにもベンゼン環に結合する塩素の数の違う異性体や同族体が多数あり、個々はそれぞれダイオキシンとしての生物活性の強さ、例えば *in vitro* 実験系で Cyp1a1 の発現を誘導する能力に違いが有る。他方、環境中では、これらダイオキシン類の同族体等を様々な比率で含む混合物として検出されることから、その生物影響の総体強度を推定する為に、個々の同族体の活性を合計して評価することが行われている。その際の強度の単位に TEF が用いられる。TEF は最も活性が強い 2,3,7,8-TCDD を 1 とし、2,3,7,8-TCDF は 0.1、1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran は 0.05、などとして表す。

尚、TEF の値は、ほぼ、AhR 結合能に比例していることが経験的に知られている。

ダイオキシン毒性は、受容体原性毒性の典型であり、その説明には「AhR ノックアウトマウスがダイオキシン投与に対し事実上無反応」であることが用いられる。即ち、このノック

アウトマウスでは、体中に広がった TCDD はそこにある酵素や膜などの生体分子に対して何の影響も与えないと言うことを示している。野生型のマウスが TCDD で死ぬのは AhR が存在するからであり、言い換えれば、AhR からの異常なシグナルによるということになる。この際の毒性も概して TEF に従うことが知られており、TCDD の 1 に対して TCDF の 10 が同等の影響を及ぼす。しかし、リガンド分子固有の作用には受容体毒性学上、興味があるところであり、培養細胞に対する影響を検討した際、この値が逆転する場合があることを見出したことから、TCDF 特有の作用がある可能性をマウス肝において遺伝子発現レベルで検討することとした。

TCDD と TCDF について、以下の様な同一プロトコールを用いての実験を行った。12 週齢雄 C57BL/6 マウスの 1 群 3 匹、20 群を用意し、0、1、3、10、及び 30 μ g/kg の用量で単回強制経口投与後、2、4、8、及び 24 時間後に肝を採取し、Affymetrix GeneChip、MOE430 2.0 により Perccellome 遺伝子発現データを得た。2 時間目の反応を見やすくするために、仮想 0 時間に 2 時間溶媒対照群の値を流用し、用量軸 5 点、時間軸 5 点からなる 5x5 の三次元 Surface を作製した。更に、TCDD=1、TCDF=0.1 という TEF 値に従った反応を示す遺伝子を抽出するために、TCDD の 0、1、3 μ g/kg 群からなる 3x5 の Surface と TCDF の 0、10、30 μ g/kg 群からなる 3x5 の Surface を用意した。そして、この 3x5 の Surface 同士について、上述の tmf アルゴリズムにより類似度を計算し、類似性の十分に高い遺伝子のリストを得た。次にコピー数が同等であるか、反応が投与依存的変動として生物学的蓋然性があるかを 3x5 及び 5x5 の Surface により確認し、TEF に忠実に従う TEF 依存遺伝子 (図 1, 2) を約 140、従わない TEF 非依存遺伝子を約 20 得た。TEF に従うと判定された遺伝子群は、Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Inc.) による既知情報と照合すると AhR の下流の第一相代謝酵素や Nrf2 下流の第二相代謝酵素を中心に、AhR を中心としたパスウェイの構成要員であることが示され (図 3)、上述した TEF について現在想定されている分子背景に合致するものであった。従わない遺伝子についても、5x5 の Surface 同士を比較し、TCDD と TCDF で反応のパターンが異なるもの、及び、類似していても TEF 値の 10 倍差を説明できないもの、即ち、TCDF が同等或いはより強い反応を示すものを抽出した (図 4)。TEF 非依存遺伝子群は既知情報との照合で予想通り AhR を含まない Pathway を描き出した (図 5)。In silico プロモータ解析ソフトウェア (Genomatix Software GmbH) に甘い条件で遺伝子リストを投入した結果、多数のエLEMENT、例えば、E2F ファミリー、EKL ファミリー、ETS ファミリー、HES ファミリー、NR2 ファミリー、RXR ファミリー、SP1 ファミリー、TBP ファミリー等が見出されたが、AhR 結合配列は存在しなかった。更に、非依存遺伝子のうち TCDF 有意の 5 遺伝子を絞り込み Pathway 解析を行った結果、TNF を中心とし、ESR1 や ABCA1 を含むネットワークが描かれ、in silico プロモータ解析では 5 遺伝子に共通するものとして ETS ファミリーと RXR ファミリーの結合部位が選択された (図 6)。ETS は ERK/MAPK シグナル系の下流に位置し、その一つである ETS2 の強制発現系の実験等から p53 系を介する胸腺系のアポトーシス、或いはダウン症候群との関連性などが指摘される。これらの既

知情報ベースの解析結果は限られた共通の公開情報源を基にしているため、概して同じリストに収束する。しかし、検索遺伝子リストのうち、この検索に投入しなかった遺伝子について、再度 Surface を吟味すると選定基準ぎりぎりで排除されていた遺伝子が見つかる。ここでは、図4中の *Tgfb1* (transforming growth factor, beta 1)、*Hsp70* (heat shock protein 70)、及び *Fdft1* (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1) が該当する。このような既知情報と実際のデータとの往復が、データ解釈の向上と今後の検証実験の計画立案に役立つものと見込まれる。

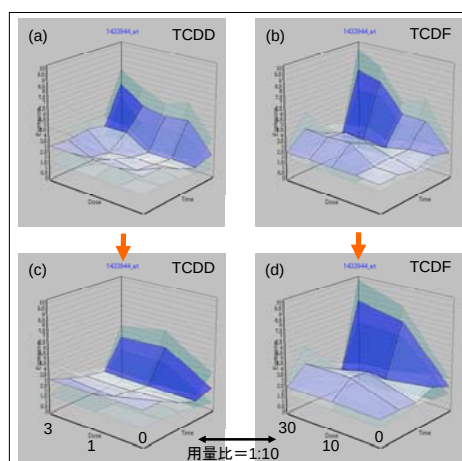


図4:TEF 非依存遺伝子

TEF に従わない遺伝子の一例として、HECT domain containing 2 (*Hectd2*, 1433944_at)の Surface を示す。A、B、C、D は図1と同様の表示。2 時間目の応答の違いのほか、24 時間目の応答が TCDF>TCDD である。

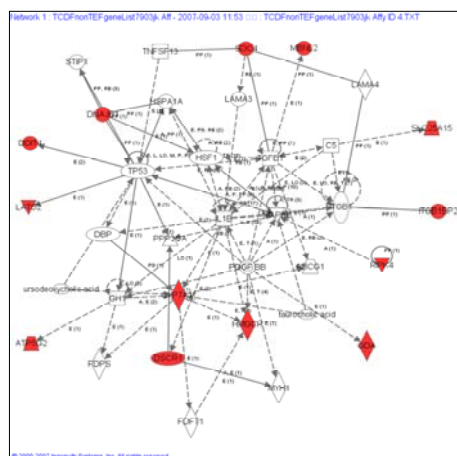


図5:TEF 非依存遺伝子の描く Pathway

TEF 非依存性な遺伝子約 20 を Ingenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.) に投入し、得られる Pathway の代表的なものを示す。AhR は含まれず、p53、TGF β 、MAPK8 などが見られる(赤色:計算に投入した TEF 非依存的遺伝子のうち、この Pathway に含まれるもの、灰色:Pathway のメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの)。

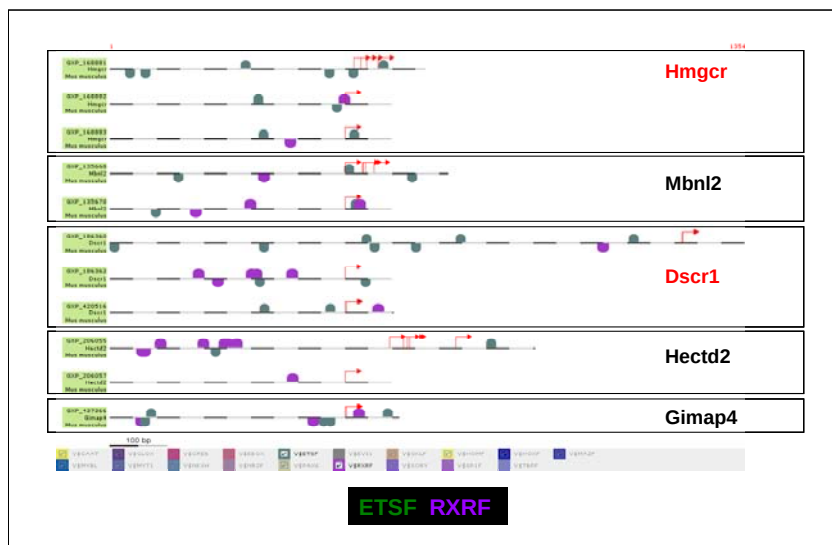


図6:TEF 非依存遺伝子の *in silico* プロモーター解析

TEF 非依存性な遺伝子約 20 の内、TCDF 有意の 5 遺伝子を絞り込み、Genomatix Software GmbH の提供する *in silico* プロモーター解析の結果を示す。5 つの遺伝子に共通して、ETS ファミリーと RXR ファミリーの転写因子の結合配列を認めた(*Hmgcr*: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase、*Mbnl2*: muscleblind-like 2、*Dscr1*: Down syndrome critical region homolog 1 (human)、*Hectd2*: HECT domain containing 2、*Gimap4*: GTPase, IMAP family member 4)。

おわりに

この TCDD と TCDF の実験結果の比較によるダイオキシン類化合物の生体影響に関わる分子メカニズム解析は未だ途上にあり、追加として AhR ノックアウトマウスを用いた投与実験や ChIP (クロマチン免疫沈降) 解析等による確認作業が考えられる。ここでは、Percellome Project の投与実験の組み合わせと、それらに対する Percellome 法の利点を生かした網羅的な解析が、環境化学物質をはじめとする外来性化学物質 (Xenobiotics) の生体影響に関する分子生物学的メカニズム解明研究のユニークな糸口を提供する手段としても利用可能である事を示すことが出来たと考える。紙面の都合上、他に譲るが、ヒトに対する催奇形性があり使用禁止となっていたが、癌や難治性炎症性疾患の治療薬として再登場したサリドマイドについて、成獣雄マウスの肺に及ぼす影響と、経胎盤的にマウス胎児に及ぼす影響とを Percellome 解析により対比すると、間葉系成分に対する共通の抑制シグナルの存在が示唆された事例を見出した。異なったプロトコルで異なった組織に対して行われた実験の間でも、この様に共通のメカニズムを抽出し得る可能性を見ており、今後の複合的展開に大きな期待を抱いているところである。今後、本法の利点を生かした解析を更に進めるとともに、データ・解析ツールの公開ウェブサイトの充実、及び、実験のみならずデータ解析・データマイニングについての共同研究を含めた展開を加速させて行きたい。

謝辞

本 Percellome Project の遂行に当たっては、当毒性部の全メンバー、特に松田菜恵、辻昌貴、森田紘一、今井あや子、安東朋子、安部麻紀、森山紀子、近藤優子、青柳千百合、相原妃佐子、渡辺忍の各氏の卓越した働きに深謝する。三次元 Surface 可視化及びそれを用いた解析ツール群のアルゴリズム開発は共著者の相崎健一主任研究官による。データベース関連、MADIC 実装等の IT 開発は NTT コムウェア、日本 NCR（日本テラデータ）との共同研究に負うところ大である。本研究は厚生労働科学研究費補助金 H13-生活-012、H13-生活-013、H14-トキシコ-001、H15-化学-002、H18-化学-一般-001、等による。

参考文献

- 1) Kanno J, et al: "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics. 2006 Mar 29;7:64
- 2) 菅野 純ら、ゲノム毒性学:形質非依存型トキシコゲノミクスの導入. 細胞工学 2004 年 Vol. 23, No.6, pp. 685-693.
- 3) 菅野 純ら、Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み. 細胞工学 2007 年 Vol. 26, No.1, pp.71-77.
- 4) Matsumoto S, et al. Mass Distributed Clustering : A New Clustering Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data, Genome Informatics 16: 2005, 183~194.
- 5) 相崎健一ら、Percellome システム. 月刊「細胞」、ニュー・サイエンス社
- 6) Van den Berg M, et al. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic