

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み

菅野 純、北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木敦也、小川幸男、児玉幸夫
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

要旨

身の回りの物質の毒性(有害性)を予測し、その被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である。この精度向上を目指したトキシコゲノミクス研究を実施する際に、マイクロアレイ等から細胞 1 個当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法を開発した。90 化合物のマウス肝初期応答データを採取し終え、新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えた Percellome Project を展開している。

Keywords

トキシコゲノミクス
分子毒性学
遺伝子発現カスケード
標準化
Percellome 法
3 次元多層 (Millefeuille) データ

0. はじめに

医薬品、食品、化粧品、生活関連用品など、身の回りの物質が我々の身体に取り込まれた際に生じる可能性のある毒性(有害性)を予測し、それらの使用に際しての被害を未然に防ぐのが毒性学の役割である*(図 1)。具体的には、人々の安全を確保するために使用法(用途)や使用量(残留量)を制限したり、場合によっては禁止したりする為の科学的根拠を提供するが、その際、人の身代わりとして実験動物を用いる場合が多い。この様な毒性学の精度向上の一環として、従来からの毒性研究(毒性症候学、毒性病理学、等)に加えてのトキシコゲノミクス(Toxicogenomics)研究が進められている。

トキシコゲノミクスでは、物質が生体に及ぼす影響をトランスクリプトームとして観測・解析する。その際、①分子毒性学を構築し種差や個体差の問題、複合暴露の問題等を解決する為には、遺伝子発現カスケードの全容解明を目指す必要がある、②形態学的に変化が現れた段階の transcriptome は、遺伝子発現カスケードの最終段階に過ぎない、③形態変化の現れないごく初期段階を含む遺伝子発現カスケードを描出するためには纏まった量のデータの蓄積が必須である、との観点から、我々は、マイクロアレイや定量 PCR から細胞1個当たりの mRNA コピー数を得る

Percellome 手法と、そのデータ解析の為の Millefeuille システムを開発・実用化した。遺伝子発現量が共通の尺度、即ち『コピー数／細胞』で表現されることから、検体間、実験間、マイクロアレイのバージョン間、異なったプラットフォーム間、等のデータ比較が直接的に行えるようになり、数年かけて蓄積したデータの有機的活用が可能となった。現在、90 種類の化学物質によるマウス肝の初期応答データを採取し終えたところである。新たな対象(反復投与、胎児毒性、吸入毒性、多臓器連携)を加えた Percellome Project の概要を紹介する。

脚注 *:環境への配慮も含まれる。

1. Percellome 法:細胞1個当たりのmRNA 絶対量を得る方法

原理は単純である。サンプルの細胞数を計測し、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。サンプルの RNA の測定値を、スパイク RNA の値を基準に、細胞1個当たりのコピー数に換算する。実際には細胞数を直接計測するのが困難なことが多いため、その代替指標として細胞核内のゲノム DNA 量を用いる(詳細は細胞工学 2004 年 Vol. 23, No.6, pp. 685-693 及び BMC Genomics. 2006 Mar 29;7:64 参照)。定量性・直線性の検証には LBM 標準サンプル(肝[L]と脳[B]を 100:0、75:25、50:50、25:75 及び 0:100 に混合した 5 サンプルからなるセット)を用いる。なお、スパイク RNA は、5 種類の枯草菌遺伝子の mRNA を濃度公比 3 で混合したカクテル(dose-graded spike cocktail; GSC)として用意した。高精度を要求される DNA 定量法は手作業プロトコル及び自動ロボット(PerkinElmer JANUS)のプロトコルを準備中である。いずれも共同研究ベースで供(Consortium)と連絡を取るとともに、国際的標準化への関与を深めるため H18 年度厚労科研

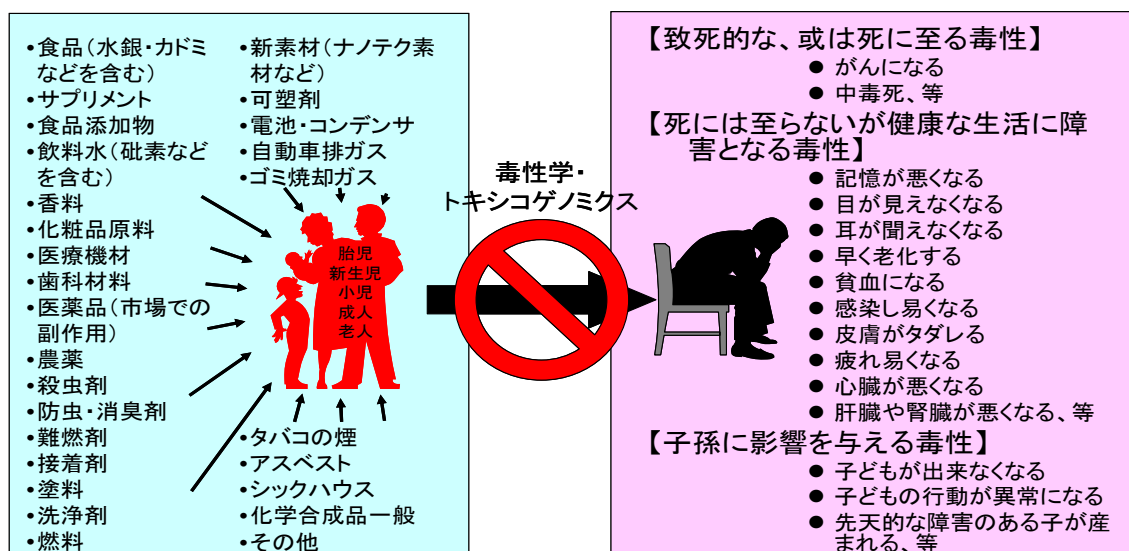


図 1:毒性学の対象

毒性学は、身の回りの物質が引き起こす障害を予測し、その発生を未然に防ぐことを目的としている。トキシコゲノミクス(毒性ゲノミクス)は、最先端の網羅的遺伝子発現解析技術を用いて、従来の毒性学の予測の精度を著しく向上、迅速化させることで、国民の健康安全の確保に更に貢献することを目指している。

費「医薬品等の有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の国際的標準化に関わる研究 (H18・特別・指定・023)」を立ち上げた。現在、この他にシックハウス症候群を考慮した低用量域での吸入毒性トキシコゲノミクス、一匹のマウスから多臓器を採取しそれらの連携状況をトランスクリプトームから解析する多臓器トキシコゲノミクスを開始し、特徴的な遺伝子について組織内の発現分布を *in situ hybridization* で確認する系を確立した。また、下記の3次元データをweb公開するサーバを整備し、一部の化合物から順次閲覧可能とした (<http://toxicomics.nihs.go.jp/db/>)。

2. 3次元多層 (Millefeuille) データ・システム: 生物系研究者に優しいデータ可視化と解析

医薬品を含む毒性既知の90化合物について単回経口投与後のトランスクリプトームデータを取得して、初期応答遺伝子カスケードを解析するための基盤データベースを構築した。現在、第二段階として反復暴露データ集積を開始した。データは、用量軸、時間軸、及び遺伝子発現軸からなる3次元表示により、遺伝子発現の用量及び時間に依存した変化を一枚の曲面として表すことで可視的に変化を判別しやすい様に配慮した(図2)。これにより、コンピュータが選り出した遺伝子クラスターの中身を確認する際、特に、mRNAの合成分解のスピード等の知見から生物学的にあり得ないパターン(用量軸の方向にも時間軸の方向にもジグザグな変化など)を排除する際に威力を発揮している。

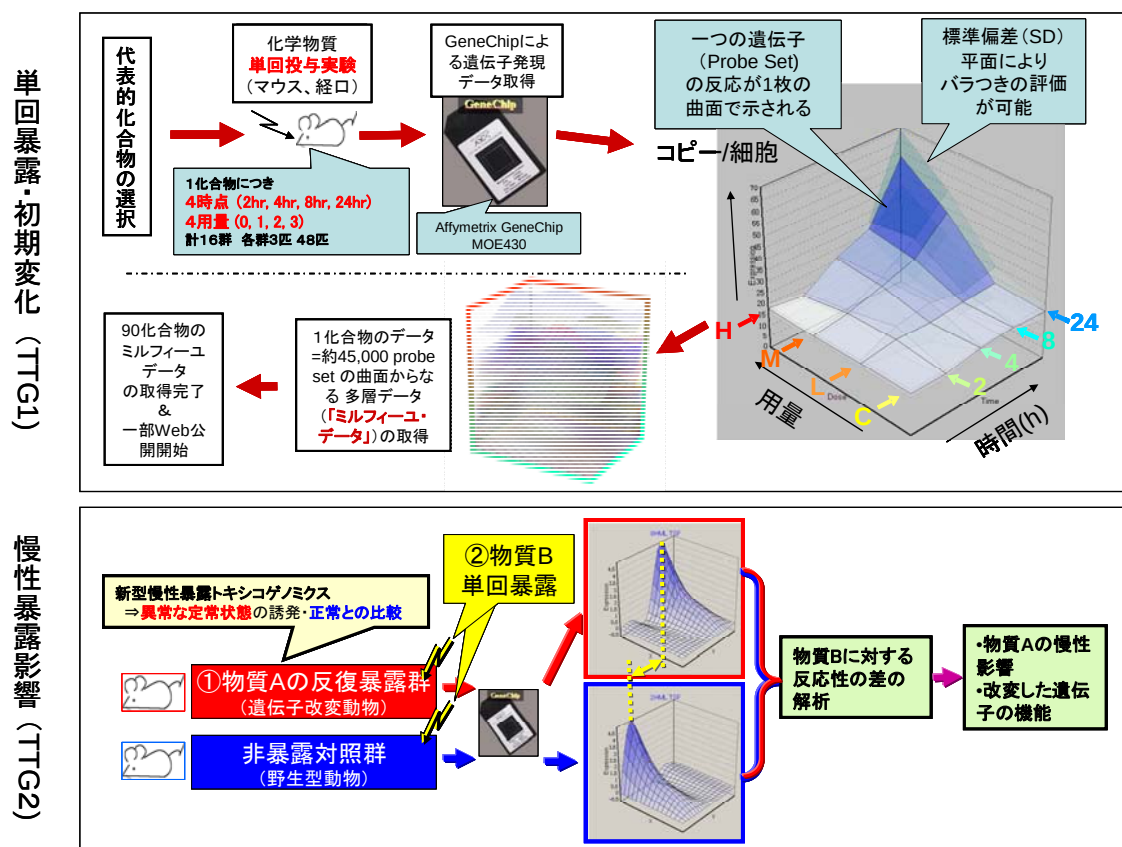


図 2: Percellome 法と 3 次元表示による多層 (Millefeuille) データシステムを用いたプロジェクトの根幹部分の概要
単回投与による遺伝子発現初期変化データを 90 化合物について取得 (上段)。現在、反復投与の影響を検討中
(下段)。H; 高用量(high)、M; 中用量(medium)、L; 低用量(low)、C; コントロール(control)。

ひとつの実験から排出される GeneChip 約 50 枚のデータを一括処理する能力を持った Percellome 自動換算・データ品質管理 (QC) に関わるソフトウェアに加えて、3 次元多層 (Millefeuille) データに最適化した、発現パターン類似性による候補遺伝子検索、及びそれを発展させた教師無しクラスターリングを中心とした解析システム (MF System、MF シリーズ、開発: 相崎健一) を独自に実用化し、開発継続中である (図 3)。これらにより、データ QC はその日のうちに、基本的な発現情報検索から全遺伝子の教師無しクラスターリングまでを 3 日間で完遂できるものとなっている。

この基本解析を用いて、発現パターンによって分類された候補遺伝子リストが多数生成される。一部の幸運な例では直ちに新規と思われる毒性関連反応を見出すことが出来た。またそうでない場合のための一つの補強手段として、Gene Ontology などの既存知識を利用して候補遺伝子リストの理解を支援するソフトウェア (MF GoPlot) を用意した。このツールは一種の化合物クラスターリングとしても利用することができる。

さらに候補遺伝子リストを基に複数化合物間比較を行い、複数条件下においても同期して発現する遺伝子群を自動抽出するシステムも開発済みである。本システムで得られた同期遺伝子群はシグナルカスケードの構成単位である可能性があり、データベース化しつつ、その解析を進めている (5TB 規模のデータベース部分及び、大量計算アルゴリズム実装は (株) NTT コミュニケーションズ及び (株) 日本 NCR/Teradata との共同開発による)。

3. Percellome 手法のリアルタイム PCR を含む他のプラットフォームへの適用

Percellome 手法は、GSC の受け入れ条件を整えることにより、様々なプラットフォームに適用可能である。その一つとして最も定量性が高いとされるリアルタイム PCR (ABI PRISM 7900 HT・96 ウェルプレート) への適用例を示す。現行の RT-PCR 絶対定量法では、遺伝子毎に検量線が必要であり、多数のサンプルについて多数の遺伝子を検討するには不向きである。Percellome RT-PCR では、マイクロアレイと同様の原理を用いる。即ち、サンプル破碎液に、その細胞数に比例する量のスパイクカクテル (GSC) を添加し、それらの Ct 値を PCR プレート毎の検量線とすることにより、測定したい遺伝子の Ct 値を細胞 1 個当たりの mRNA コピー数に換算する。これにより、GAPDH や Actin などのハウスキーピング遺伝子の変動してしまう際の問題、少数の遺伝子を検討する際に Global normalization 法が適応し難い問題等が解決される。共通サンプルを測定しデータを比較することにより、Affymetrix GeneChip の Percellome 結果と 9 割程度の整合性が確認され、GeneChip と Percellome RT-PCR との間でのコピー数の換算式が得られている。この他に、Agilent 社製の単色マイクロアレイと CodeLink アレイに GSC を測定可能なカスタムアレイを用意し終え、LBM サンプルのデータ等をもとに、これらとの間の換算式も得つつある (図 3 右上)。

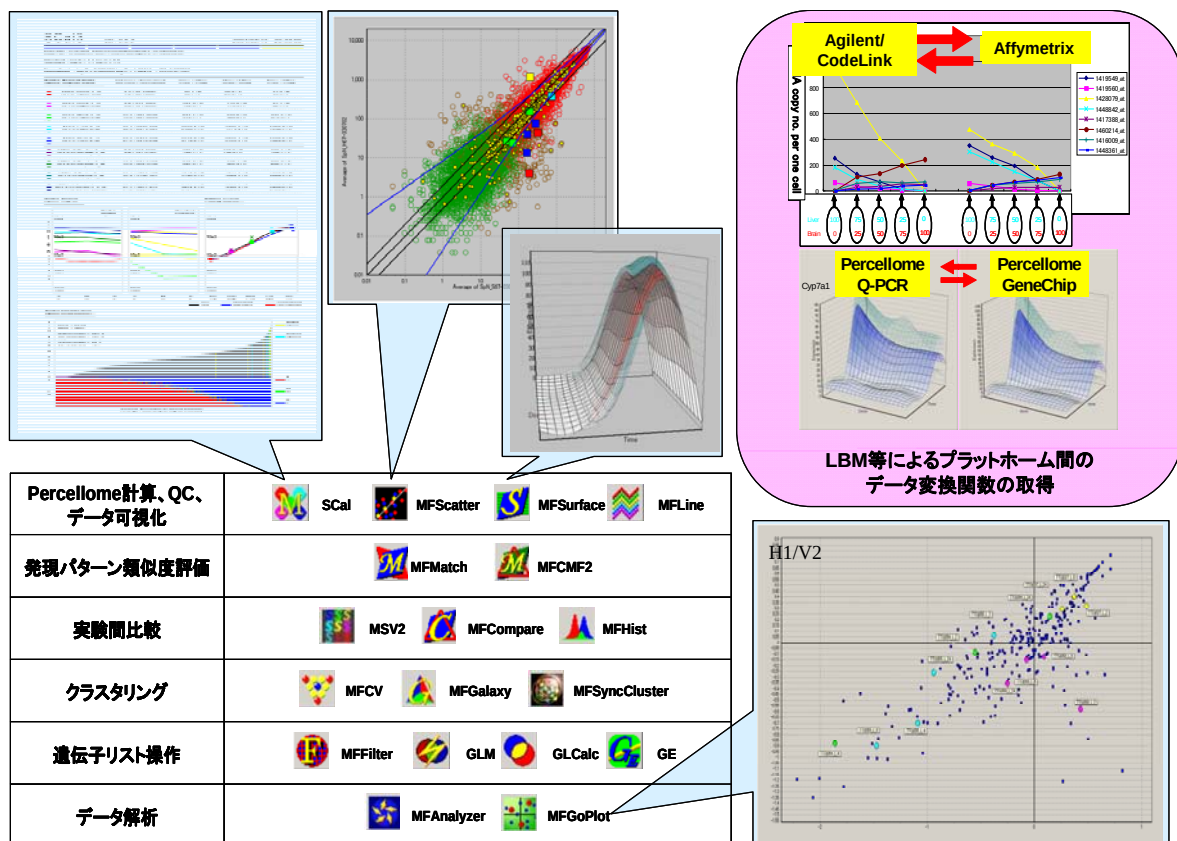


図 3-3 次元多層(ミルフィーユ)データの解析などに用いる独自開発プログラム群

品質管理とともに Percellome 計算を自動的に実施する SCal、Plot ソフトウェア、3 次元曲面の描画ソフト(MF surface)、など。右上はプラットフォーム間のデータ変換情報の得方を示す。LBM を用いる方法(上段)と、実際の実験サンプルを用いる方法(下段)がある。いずれも、一度、両方のプラットフォームでそれらのサンプルを測定する必要がある。

Percellome法は、Affymetrixの新しいexon アレイの定量性・直線性の検討にも適応可能である。Affymetrix社のHuman Exon 1.0 ST Array と従来型の発現アレイHuman Genome U133 plus 2について、性質の異なるヒト癌細胞株2株から調整したLBM様標準サンプル(100:0、75:25、50:50、25:75及び0:100混合5サンプル)による比較を行い、両アレイ間の相関性の高いプローブセットを多数検出することができた。また、既知のexonに対して設計されたprobe setでは発現が見られ、intronに対して設計されたprobe setでは発現が見られない、あるいは、既知のsplicing variantに対応したprobe setの発現が検出された、等の基本性能が確認された。しかし、Percellome法を適用して未知のsplicing variantの検出力を向上させるためには、現状では各exon間の定量性に問題があることが示唆された。定量値を算出する補正アルゴリズムの開発等、何らかの対策が必要であることが考えられ、現在、Affymetrix社に確認を行っている。

4. 核内受容体原性毒性の Percellome トキシコゲノミクス解析

受容体原性毒性とは、化学物質が受容体(リガンド依存的転写因子を含む)に選択的に結合し

でシグナルをかく乱し、その結果生じる有害性を指す。代表例としてはダイオキシンが挙げられる。Arylhydrocarbon receptor (AhR)ノックアウトマウスでは、ダイオキシンを大量に投与しても毒性がほとんど観察されない。即ち、野生型マウスがダイオキシンで死ぬメカニズムには、AhR が必須であり、AhR からの異常なシグナルがマウスを死に至らせていることになる。エストロゲン活性化化学物質による有害影響(内分泌かく乱化学物質問題)も同様に estrogen receptor (ER)を介する受容体原性毒性と考えられ、胎生期に ER を発現する組織が、低用量シグナルかく乱影響の重要標的であると考えられている。

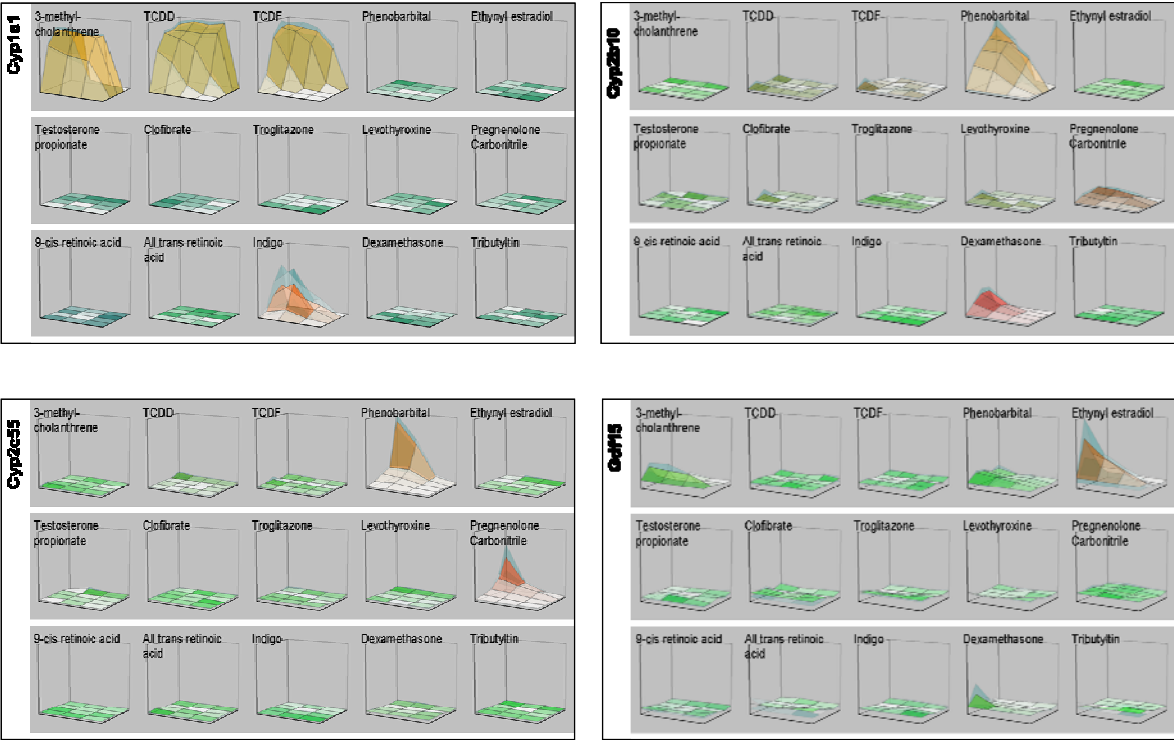


図 4: 化合物間の発現比較
 15 種類の核内受容体リガンド化合物(各 3 次元グラフ内に表示)による Cyp1a1(左上)、Cyp2c55(左下)、Cyp2b10(右上)及び、Gdf15(右下)の遺伝子発現を 3 次元表示したもの。各軸は、図 2 のとおり。縦軸のスケールは遺伝子ごとに共通。リガンドに選択的な遺伝子の発現が確認される。

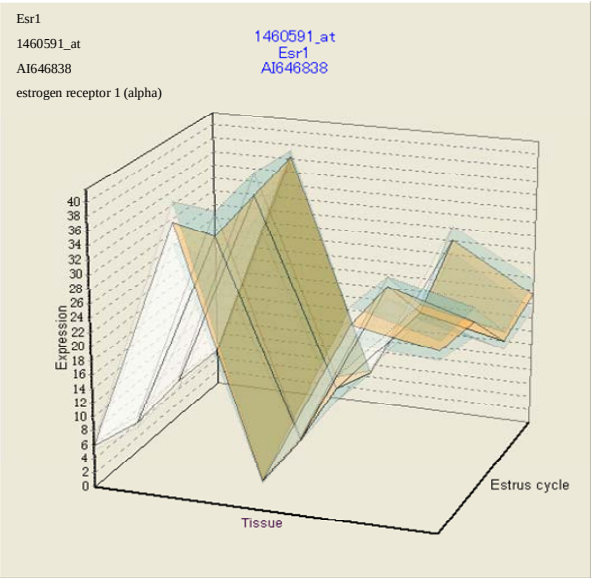


図 5:臓器間の発現比較

マウスの性周期(Diestrus, Proestrus, Estrus, Metestrus の4日間で一周期)ごとの視床下部(H)、下垂体(Pi)、卵巢(O)、子宮(U)及び膣(V)における、ER α 、ER β 、Cyp17a1(steroid-17 α -hydroxylase)、及び Cyp19a1(Aromatase)の遺伝子発現変動を3次元表示したもの。後2者の酵素は卵巢において周期性を持って発現している。

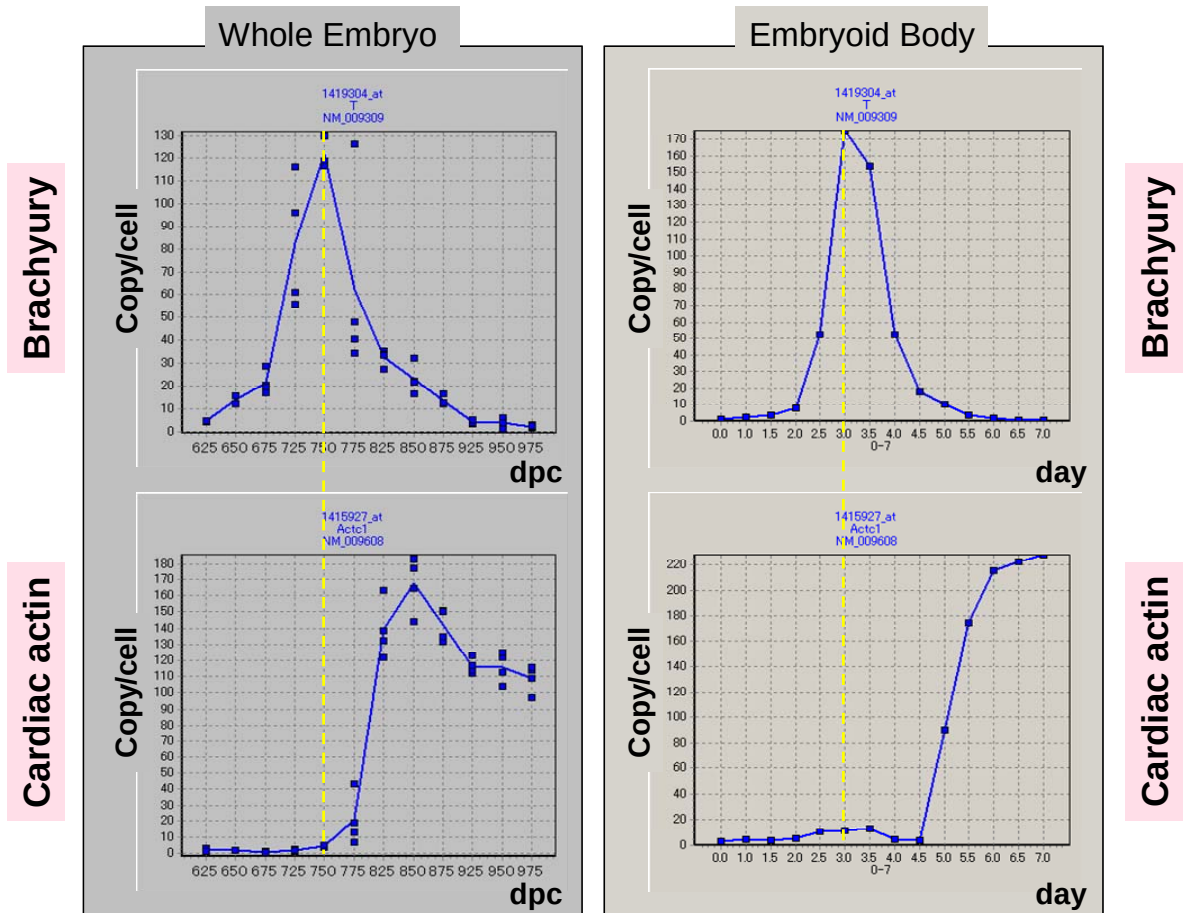


図 6:マウス胎児(全胚)と胚様体の発現比較

マウス全胚の胎生 6.25 日～9.75 日までの遺伝子発現と、胚様体の 1 日～7 日目までの遺伝子変動の網羅的データベースから、初期中胚葉分化マーカーである Brachyury 遺伝子と、Cardiac actin 遺伝子の経時変化を示す。

ここでは、受容体原性毒性研究の基盤として、Percellome 手法を適用して、①核内受容体作動性物質によるマウス雄肝臓の遺伝子発現変動、②性周期に伴うマウス雌生殖器官遺伝子発現変動、③生後の発達過程におけるマウス雌生殖器官遺伝子発現変動、の3種類のデータベースを構築した。例えば、①では 10 種類の核内受容体に作用する典型物質について、単回経口投与後、2, 4, 8, 24 時間目の変動を解析し、Ethinyl-estradiol が GDF15、TCDD が Cyp1a1、9-cis Retinoic Acid が Cyp26a1、Dexamethasone が Cyp2b10、Clofibrate が Cyp4a14、PCN が Cyp2c55 など、各々の受容体に特徴的な遺伝子発現を誘導するところが捉えられている(図 4)。②の性周期データベースは視床下部、下垂体、卵巢、子宮、膣を対象としており、性周期との関連が網羅的に捉えられている(図 5)。これらのデータベースは、今後、各種の候補物質が引き起こす変化を詳細

に解析する際の基準として利用する。

5. 発生トキシコゲノミクスへの応用

発生毒性学は、個体発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現調節の分子機構を把握することにより、更に正確なものに補強され则认为。現在、C57BL/6 マウス胚の器官形成期初期にあたる胎生 6.5~9.5 日(プラグ確認日: 0.5 日)の、①全胚の遺伝子発現変動解析、②遺伝子欠失マウス全胚との比較、及び③標的が明らかな既知発生毒性物質投与による本データベースの具体的な適用、を実施している。①については既に 0.25 日間隔(Time point 計 12 点)の遺伝子発現データベースを得て、②遺伝子欠失胚のデータと幾つかの注目すべき遺伝子については whole mount ISH を用いた発現の検証を加えた。これと平行して、ES 細胞から hanging drop 法で得た embryoid body の 0.5 日間隔の遺伝子発現データとの比較を実施している。個体発生に関与する遺伝子群の多くは経時的に激しく変化しており、既知発生毒性物質投与実験については標的遺伝子シグナルカスケードを解析中である(図 6)。

6. まとめ

ノーザンブロットでは実験サンプルにだけバンドが見られ、対照サンプルには遺伝子発現が無いという結果を得ても、細胞1個当たりで定量してみると、対照が 10 コピーに対して実験サンプルが 20 コピーである場合がある。「無」が「有」になったのではなく、「10」が「20」になったのである。

さて、我々の属する毒性学でも、医学の分野でも、疾患概念や毒性概念が整理され、患者や実験動物を診断する際には、まず、そのどれに当てはまるかを検討する。即ち、どの『典型』に近い症例であるかを検討することから始まることが多い。

しかし、最近の医学・生物学には多因子疾患・多因子形質発現制御の概念が導入され、今から何年かの後には、『21 世紀初頭までは、患者の遺伝子多型を調べずして治療を行っていた時代』として、『血液型を調べずに輸血していた時代』と並び称されるようになる可能性がある。この様な多因子概念が定着すると、その多くは、「有(100%)」「無(0%)」の組み合わせではなく、「70%」「50%」「90%」といった半端な数の組み合わせであることが考えられる。即ち、今までの離散値的な『典型』例を基準とするアプローチから、連続値的な病態『スペクトラム』を直接扱うアプローチに変革してゆく可能性が考えられる。その際の網羅的データの解析とその蓄積の必要性を考えると、遺伝子発現データの定量化・標準化という問題は、今まで以上に重みを増すと考えられる。生命現象の網羅的解析にはトランスクリプトーム だけでは不十分であることは自明であるが、この定量性を確保することは、これから実現されるであろう網羅的 proteomics 等の基盤としても重要ではないかと考える。

マイクロアレイ等から得られるトランスクリプトーム情報が、今後の医薬品審査や化学物質の安全性評価の際に必須なものとなる時代がすぐそこまで来ている事を念頭に、我々は Percellome 法を更に展開し、Percellome Project データベースを可能な限り高精度に保ちつつ毒性学的内容

を充実させるべく最大限の活動を継続して行く所存であるが、この技術、或いは研究内容が毒性学以外の研究分野にもお役に立つことができれば幸甚である。

謝辞：

本システムの開発とプロジェクト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。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。

【文献】

- (1) Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. BMC Genomics. 2006 Mar 29;7:64.
- (2) 菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 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 Vol.23 No.6 2004 685-693、株式会社秀潤社
- (3) Shinya Matsumoto, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Mass Distributed Clustering: A New Algorithm for Repeated Measurements in Gene Expression Data. Genome Informatics 16(2): 183-194(2005)