

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500398

研究課題名（和文） サリドマイドに感受性を示すマウス胚内の遺伝子を標的としたアザラシ肢症発症の種差

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of species differences of the thalidomide - induced phocomelia by targeting thalidomide - responsive transcriptome in mouse embryo

研究代表者

北嶋 聡 (KITAJIMA SATOSHI)

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・毒性部第五室 室長

研究者番号：30270622

研究成果の概要（和文）： ヒトで催奇形性を示すがげっ歯類では示さないサリドマイドの分子種差を明らかにする目的で、1,000 mg/kg サリドマイドを経胎盤投与した際の、マウス胚の胚肢芽及び初期胚・全胚のサンプルについて、網羅的に遺伝子発現変動を比較・解析した結果、候補となる転写因子結合配列を2つ見いだした。このシグナルネットワークの機能を修飾する化学物質を併用した奇形誘発実験に向け予備実験を検討中である。

研究成果の概要（英文）： Thalidomide, a sedative originally used and now used for the treatment of multiple myeloma, is one of the most famous teratogen that causes birth defects such as limb truncations in humans. The teratogenic effect of thalidomide is strictly species specific, i. e. mice and rats are resistant upon thalidomide exposure. In order to seek the molecular mechanism on this species difference of the thalidomide-induced phocomelia, we attempt to examine three point-time series of comprehensive gene-expression analysis for 1,000 mg/kg thalidomide-exposed mouse embryo in the case of both the whole embryo at 7.5 dpc and the hindlimb bud at 10.5 dpc. As a result, two candidate transcription factors were identified, and the teratogenicity experiment using the activator and/or inhibitor of the related signal network are now in progress, in order to verify these candidate genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,000,000	0	1,000,000
2012年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	3,300,000		3,300,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：安全性、催奇形性、トキシコゲノミクス、マウス胚

1. 研究開始当初の背景

(1)「サリドマイドは、ヒトで催奇形性を示すがげっ歯類では示さず、この分子機序は不明である」

公知の事実として、サリドマイドはヒトで催奇形性を示すがげっ歯類では示さず、催奇形性に「種差」があることで有名である。しかし、この種差のメカニズムが不明なままであることから、未だに、経験的に感受性のあることが分かったウサギを用いて、すべての化学物質について発生毒性試験がおこなわれてきているという、非科学的な現状がある。今までに種差や催奇形性メカニズムとして報告されている事項としては、血中半減期の種差（ヒトの 7.3 時間に比較してマウスでは 0.5 時間で速やかに代謝されるという報告）(文献 1)、あるいは、活性酸素種による Wnt/ β -catenin および Akt シグナルの抑制(文献 2)や NF- κ B の誤制御 (文献 3) によるとする報告がある。しかし前者は、大量の反復投与により補完されるし、後者では奇形が肢芽に集中することと種差が説明できない。他方、多発性骨髄腫など治療薬として再認可されているが、その作用メカニズムは不明であり、治療効果と催奇形性を分離した類似新薬の開発も達成されていない。

(2)「サリドマイド催奇形に関係する候補分子を独自に見いだした」

他方私は、高精度な発生毒性評価系を構築する目的で、cDNA マイクロアレイを用いたマウス胚全胚（胎生 6.25~9.75 日：12 点）の経時遺伝子発現データベースを構築し、これを参照しつつ、催奇形性物質の遺伝子発現変動解析を実施してきた。この過程で、サリドマイドが発現を顕著に抑制する遺伝子のうち、その遺伝子の欠失マウス胚がアザラシ肢症と酷似する肢帯形成異常を示すもの（以降、X 遺伝子と記載）を見出した。

この X 分子は、マウス肢芽に発現し、細胞の増殖や分化ではなく基部先端部軸のパターン形成に関わる分子である。ヒトのアザラシ肢症において骨や軟骨への細胞分化自体は認められることから、この X 遺伝子がサリドマイド催奇形に関係する可能性が強く示唆された。

初期胚での検討とはいえ、奇形という表現型の変化は誘発されなくとも、サリドマイド投与により遺伝子発現のレベルで変動が認められたことから、肢帯において、潜在的に奇形に関与する遺伝子の発現変動が認められる可能性は非常に高いものと考えられる。そこで本研究では、この X 遺伝子に焦点をあてつつ、サリドマイドを経胎盤投与したマウス

肢芽での遺伝子発現変動を網羅的に解析し、肢芽でのサリドマイド標的因子と奇形回避機構の探索をおこなう。その結果を基に、マウス胚に肢芽奇形を誘発する実験の構築を試みる。なお、X 遺伝子が発達中の肢芽に発現・局在することは、当方にて whole mount in situ (ISH)法により確認済みである。

文献 1: Chung F et al.: Clin Cancer Res 10(17): 5949-5956, 2004.

文献 2: Knobloch Jet al., Mol Cell Biol 28(2): 529-538, 2008.

文献 3: Hansen JM and Harris C: Antioxid Redox Signal 6(1): 1-14, 2004.

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトで催奇形性を示すがげっ歯類では示さないサリドマイドの分子種差を詳細に明らかにすることであり、以って、その有効薬剤としての多標的性と安全性を両立した新規誘導物質の設計に寄与するとともに、現行のウサギなどを用いた催奇形性評価の近代化に資するものである。既に、我々はマウス発生初期胚から催奇形に関係するサリドマイド感受性の候補分子を見出した。これをマーカーとしてマウス肢芽の遺伝子に対するサリドマイドの影響を網羅的に解析し、マウス胚でサリドマイド奇形が誘発されない原因分子機構を明らかにする。

サリドマイドは 1957 年にグリュネンター社から睡眠薬として発売され、妊婦の使用によりヒト胎児に四肢の発育不全、いわゆるアザラシ肢症を引き起こしたものである。

3. 研究の方法

(1) サリドマイドを経胎盤投与したマウス肢芽での遺伝子発現変動解析：

「サリドマイド催奇形に関係する分子」の探索に向けて、サリドマイド (BIOMOL 社) (溶媒：0.5% メチルセルロース(WAKO)) を、妊娠 C57BL/6CrSlc マウス (8-10 週齢) (日本エスエルシー) に経胎盤単回投与し、経時的に得られた胚後肢・肢芽 RNA サンプルを用いて網羅的に遺伝子発現変動解析をおこなった。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。先行研究において、1,000 mg/kg サリドマイド経胎盤単回投与時の肢芽形成以前の初期胚(胎生 8.5 日)における遺伝子発現変動解析から、サリドマイド催奇形に関係する候補分子 (X 遺伝子) を見いだしている。この分子は、前肢の肢芽に胎生 9.5 日から、後肢では胎生 10.5 日より発現しはじめ、この欠失胚ではアザラシ肢

症に似た表現型を示す。

このことを踏まえ、サリドマイドの投与用量を1,000 mg/kgとし、サンプリング部位を、前肢ではなく、心などの隣接組織の少ない後肢の肢芽とし、投与時期を、後肢での発現開始時期に相当する妊娠10.5日とした。サンプリング時期は、影響を受ける分子ネットワークを見いだすため、投与早期に経時的に投与2、8、24時間後とした。後肢・肢芽サンプルは、超精密ピンセットを用いて、体幹を含むかたちで左右の後肢・肢芽部分を体軸に直角に切断した組織片とした。この理由は、四肢形成に重要な役割を担う領域である、肢芽先端部の外胚葉性頂堤(Apical Ectodermal Ridge: AER)や後縁部の極性化活性帯(zone of polarizing activity: ZPA)をはじめ肢芽部分の切断による障害をなるべく避けるためである。またこの際、同腹内での胚の遺伝子変動の差異をできるだけ少なくするため、1腹分の胚をプールしたサンプルを1サンプルとした。

解析は、当研究所当毒性部にて開発された、発現コピー数を絶対値化するPercellome手法(Kanno Jら、BMC Genomics 7:64, 2006)を使用し高精度な発現変動解析をおこなった。得られた候補遺伝子については、候補遺伝子の遺伝子欠失マウスの文献情報、及びin silicoでのプロモーター解析を利用することにより、標的候補シグナルネットワークの絞り込みを検討した。また肢芽での発現局在を全胚を用いるISHにより確認し、時間的・空間的な発現パターンを検討から候補遺伝子を絞り込んだ。

whole mount ISHは、当該プローブセット(ps)についてGeneChipにて使用している塩基配列を調べ、その配列を基に、ジゴキシンでラベルしたdNTPを用いてRNAプローブを作製した。作製したRNAプローブを用いて、固定後プロテナーゼK処理したマウス胚とハイブリダイゼーションをおこない、検出は抗ジゴキシン抗体、発色はBM purpleでおこなった。

(2) マウス胚に肢芽奇形を誘発する実験：

マウスにおいては、サリドマイド催奇形が生じないことが知られている。したがって、潜在的に奇形に関係する遺伝子の発現変動が生じているにもかかわらず、変動幅の小ささなどから、奇形が生じない可能性が考えられる。そこで、候補分子ネットワークを、活性化あるいは阻害など機能を修飾する化学物質を併用し、サリドマイド誘発奇形が生じないマウス胚にて奇形を誘発させる実験をおこない得られた候補遺伝子の妥当性の検証をおこなう。

4. 研究成果

(1) 平成22年度は計画通り、サリドマイド(0, 1,000 mg/kg)を妊娠10日のマウス(C57BL/6CrSlc)に経胎盤単回投与(経口)し(溶媒: 0.5%メチルセルロース)、経時的(投与2、8及び24時間後)に得られた胚後肢・肢芽RNAサンプル(1腹分をプールし1サンプルとした; 各3例)についてGeneChip(Mouse Genome 430 2.0, Affymetrix社)を用いて網羅的に遺伝子発現変動を解析した。t-testでのP値が0.05未満且つどちらかの発現コピー数が0.2以上という条件下にて対照群と投与群とを比較し、発現変動が認められた遺伝子を抽出した。その結果、投与2、8及び24時間後についてそれぞれ、増加分は49、130及び1,779、減少分は110、26及び9プローブセット(ps)が見出された。

(2) 平成23年度は、平成22年度に得られた、発現変動を示した遺伝子(計2,103プローブセット[ps])について、その遺伝子欠失マウスの文献情報との照合、及びin silicoでのプロモーター解析を利用することにより、標的候補シグナルネットワークの絞り込みを検討した。あわせてこの検討結果と、肢芽形成以前の初期胚(胎生7.5-8.5日)の遺伝子発現変動解析から得た、発現変動遺伝子(計194 ps)及び、独自に見いだしたサリドマイド催奇形に関係する候補分子(X遺伝子)のシグナルネットワークと比較・検討し、候補分子あるいは当該分子ネットワークの絞り込み作業をおこなった。

(3) 平成24年度は最終的に、投与2時間後における胚後肢・肢芽サンプルと肢芽形成以前の初期胚サンプルとの発現変動する遺伝子の解析から、候補となる転写因子結合配列を2種見いだすことができた。この候補シグナルネットワークの機能を修飾する化学物質を併用した、奇形誘発実験の用量設定実験を検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J、Development of Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain sequence, J Toxicol Sci、査読有、37巻、2012、373-380

[学会発表] (計4件)

- ① 北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一、菅野 純、Percellome 網羅的定量的トキシコゲノミクス、平成 24 年度公益社団法人日本実験動物学会 維持会員懇談会、2012 年 11 月 16 日、東京（中央大学 駿河台記念館）
- ② 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、第 34 回日本高血圧学会総会、2011 年 10 月 22 日、宇都宮市（栃木県総合文化センター）
- ③ 相崎 健一、五十嵐 勝秀、種村 健太郎、安彦行人、高橋祐次、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純、Percellome プロジェクト・オンライン解析システム、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会、2011 年 7 月 13 日、横浜（パシフィコ横浜 会議センター）
- ④ 北嶋 聡、Percellome 発生トキシコゲノミクスの進捗、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、2010 年 6 月 16 日、沖縄（沖縄コンベンションセンター）

〔図書〕（計 1 件）

- ① Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Kodama Y, Sekita K, Takagi A, Kitajima S, Royal Society of Chemistry, Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food -Chapter11 Application of Percellome Toxicogenomics to Food Safety, 2011, 14 (P184-P198)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北嶋 聡 (KITAJIMA SATOSHI)
 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・毒性部第五室 室長
 研究者番号：30270622

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：