

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590743

研究課題名(和文) 化学物質の生体での毒性を予測するためのバイオインフォマティクスツールの開発

研究課題名(英文) Development of bioinformatics tool to predict the hepatotoxicity of chemicals

研究代表者

稲寺 秀邦 (Inadera, Hidekuni)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：10301144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、動物愛護の観点から、動物を使用しない化学物質の毒性評価法が求められている。本研究は培養細胞を用いて行ったトランスクリプトーム解析の結果(in vitro系)を、生体(in vivo系)での影響評価に結びつけるインフォマティクスツールを開発することを目的とした。代表的な化学物質をマウスに投与、および初代培養肝細胞に添加した時に、発現が変動する遺伝子をマイクロアレイを用いて解析し結果を比較検討した。得られたデータをもとに、培養細胞(vitro)の結果を生体(vivo)の結果予測につなげるためのアルゴリズムを構築し、in vivo生体影響予測バイオインフォマティクスツールの開発をこころみた。

研究成果の概要(英文)：The development of systems for analyzing global expression patterns by molecular profiling techniques provides opportunities to establish the basis of toxicological responses. The general profile of gene expression provides insights into the molecular mechanisms by which chemicals might exert toxic effects. We developed a customized DNA microarray system and analyzed gene expression changes in response to representative chemicals. In vitro hepatotoxicity prediction systems using primary cultured hepatocytes have been used in this study. We found in vitro toxicity systems cannot fully reflect the in vivo expression profile and cellular function. We tried to establish the bioinformatics tool which can predict the in vivo response by using the transcriptome data of in vitro systems.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：化学物質 毒性学

1. 研究開始当初の背景

工業化時代とともに、環境中には様々な化学物質が放出されてきた。化学物質は生活に不可欠な存在であり、人類の生活レベルの向上に貢献している。その一方、取扱いを誤ったため、野生生物や人体に被害を与えた事例は多い。今日なお化学物質の生体影響評価は、環境保健・公衆衛生の観点から重要な課題である。

現在、化学物質の構造から毒性を予測する手法のひとつとして、定量的構造活性相関 (QSAR) が進歩している。しかし未だ完全であるとは言いがたく、化学物質の生体影響評価には、いまなお生きた動物を用いた *in vivo* 試験が行われている。一方、近年、動物愛護の観点から提唱されている 3R (reduction, refinement, replacement) コンセプトにより、動物をできるだけ使用しない毒性評価法が求められている。

実験動物を用いない化学物質の毒性評価法として、不死化した細胞株や初代培養細胞を用いた *in vitro* 評価系がある。しかし *vitro* の培養細胞で得られた化学物質に対する反応は *vivo* での応答状況を必ずしも反映しない場合がある。

近年の生物情報科学とりわけゲノム情報科学の進歩は著しい。情報科学を駆使した生物学では、コンピューター技術により生体情報を解析する。これまでの情報科学の膨大な情報量の蓄積を活かし、動物を使用しない化学物質の毒性評価手法を確立することが求められている。

2. 研究の目的

化学物質の生体影響評価手法のひとつとしてトランスクリプトーム解析がある。これは化学物質の投与により、発現が変動する遺伝子を網羅的に解析することにより、化学物質の生体影響を予測する手法である。現在ゲノム情報・アレイ技術の進歩により、多くの種において遺伝子配列が明らかにされてい

る。またある臓器や細胞で発現している遺伝子の情報を比較的簡便に、短期間で解析することが可能となっている。

トランスクリプトーム解析を行うにあたっては、使用するアレイを選定する必要がある。市販のアレイは、多くの遺伝子が搭載されており、多数の遺伝子の発現変動を解析できるメリットがある。しかしその反面、変動する遺伝子が多数検出されるため、primary な変化と二次的・三次的な変化を判別することが難しい。これを解決する方策として、ゲノム情報・インフォマティクス情報をもとに、搭載遺伝子を絞り込み、後の解析が容易なアレイ (*in house* マイクロアレイ) を構築する方法がある。

化学物質に対する生体応答の要となる臓器は肝臓である。生体に侵入した化学物質は肝臓において代謝を受け、一般に生体に対して有毒性の低い物質に変換される。さらにこれまで肝臓を標的としたトキシコゲノミクス解析のデータが数多く蓄積されている。そこで本研究では、生体の薬物代謝の要の臓器である肝臓をターゲットとした。

本申請研究では、代表的な環境化学物質による肝臓 (肝細胞) における遺伝子応答を解析するために、*in house* マイクロアレイを用い、*vivo* と *vitro* の遺伝子応答の結果を比較検討した。そして培養細胞 (*vitro*) を用いて行ったトランスクリプトーム解析の結果を、バイオインフォマティクスの技法を用いて、生体 (*vivo*) での影響評価に結びつけるツールを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究を開始するにあたり、搭載遺伝子を生体応答のキーとなる遺伝子に絞り込み、後の解析も容易な *in house* マイクロアレイシステムを構築した。

環境化学物質として、重金属 (カドミウム・メチル水銀・鉛)、内分泌かく乱物質 (ト

リブチルスズ・ビスフェノールA・残留性有機塩素系化合物)、肝臓障害性物質(アセトアミノフェン・四塩化炭素・トリクロロエチレン)を使用した。

不死化した細胞は、培養自体は容易であるが、癌細胞由来であることや、SV40などのウイルスで不死化することにより薬物に対する応答性が生体と大きく異なる可能性がある。そこで本申請研究では培養細胞として、初代マウス肝細胞を用いた。

環境化学物質をマウス生体に投与、および初代培養肝細胞に添加した時に、発現が変動する遺伝子を、in house マイクロアレイを用いて解析した。また Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を使用し、変動遺伝子間の相互関係や生体応答ネットワークについての解析を行った。

4. 研究成果

トランスクリプトーム解析のために、搭載遺伝子を絞り込み、肝臓への毒性影響評価の目的に特化したマイクロアレイシステムを構築した。本アレイに搭載した遺伝子は、薬物代謝酵素、ストレス応答遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、細胞内情報伝達系の要となる遺伝子、生体異物の代謝に関与する核内受容体の応答遺伝子等である。

搭載遺伝子を絞り込むことにより後の解析が容易になること、生体応答のキーとなる遺伝子に絞り込んで解析を行っても、バイオインフォマティクスの技法を組み合わせることにより、生体で変動を受けるパスウェイやネットワークを解析できることを確認した。

環境化学物質として、重金属、内分泌かく乱物質、肝臓障害性物質を使用し、生体(vivo)と培養細胞(vitro)における発現変動遺伝子を in house マイクロアレイを用いて解析した。その結果、vivo と vitro では、共通に変動する遺伝子が認められる一方、応答遺伝子が

異なることや影響を受ける生体パスウェイが異なることが明らかとなった。

その理由として、以下が考察された。

1. vivo においては、細胞は異種の複数の種類の細胞と接触し情報交換を行っているが、単独の細胞を用いた vitro の評価系では異なる種類の細胞とは接触していない。
2. 培養細胞では、vivo でみられる3次元立体構造は消失しており、通常は細胞外マトリクスも失われている。
3. vivo では、化学物質は吸収・代謝され、生体内に分布しその後排出される。その過程において、細胞が接する化学物質やその代謝物質の濃度は一様ではないと推測されるが、培養細胞ではメディウムに添加した化学物質は、通常そのままの状態に留まっている。
4. vivo では、化学物質は神経系やホルモン系を介することによっても、生体応答を引き起こすが、vitro の系ではそのような応答は感知できない。
5. 初代培養細胞は、生体から切り離されることにより、徐々に生理的な作用を消失する。これらの理由により、vitro の培養細胞で得られた化学物質に対する応答は、vivo での応答とは異なるものと推察された。

なお本研究で使用したマウス初代肝細胞は、培養手技が難しく、培養に著しい困難をともなった。すなわち生きた細胞数を確保すること、培養細胞のバイアビリティを継続維持することが当初より困難であった。生体(vivo)での遺伝子応答は一定の結果が再現性よく得られたのに対し、培養細胞では、発現変動遺伝子の再現性が乏しい結果であった。これは初代培養肝細胞では、プレパレーション毎に細胞のバイアビリティが異なること等が原因であるためと推測された。

今後はこれまで得られたデータをもとに、vitro の系の結果を vivo の系の結果予測につなげるためのアルゴリズムを構築し、in vivo 生体影響予測バイオインフォマティクス

ールを開発する。さらに公表されているトキシコゲノミクスデータベースを用いて、作成した in vivo 生体影響予測ツールのバリデーションを行う。必要に応じてツールの改良を行う。

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5件)

- 1) Cui ZG, Piao JL, Rehman MUR, Ogawa R, Li P, Zhao QL, Kondo T, Inadera H. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A. Eur. J. Pharmacol. 723:99-107, 2014.
- 2) Cui ZG, Piao JL, Kondo T, Ogawa R, Tsuneyama K, Zhao QL, Feril LB Jr, Inadera H. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: implication for cancer therapy. Chem Biol Interact. 215:46-53, 2014.
- 3) Zenda T, Hamazaki K, Oka R, Hagishita T, Miyamoto S, Shimizu J, Inadera H. Endoscopic assessment of reflux esophagitis concurrent with hiatal hernia in male Japanese patients with obstructive sleep apnea. Scand J Gastroenterol. 49:1035-1043, 2014.
- 4) Hamazaki K, Hamazaki T, Inadera H. Abnormalities in the fatty acid composition of the postmortem entorhinal cortex of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. Psychiatry Res. 210:346-350, 2013.
- 5) Hamazaki K, Hamazaki T, Inadera H. Fatty acid composition in the postmortem amygdala of patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. J. Psychiatr. Res., 46:1024-1028,

2012.

〔学会発表〕(計4件)

- 6) 崔正国, 近藤隆, 稲寺秀邦. ドコサヘキサエン酸によるヘムオキシゲナーゼ1誘導とその分子メカニズムの検討. 第84回日本衛生学会学術総会; 2014 May 25-27; 岡山.
- 7) 崔正国, 近藤隆, 稲寺秀邦. 温熱誘発アポトーシスにおけるアシュワガンダの併用効果に関する基礎的研究. 第83回日本衛生学会学術総会; 2013 Mar 25; 金沢.
- 8) 稲寺秀邦, 崔正国, 橘信二郎: トランスクリプトーム解析を用いた高血糖の胎盤絨毛細胞分化に及ぼす影響の検討. 第82回日本衛生学会総会, 2012, 3, 25, 京都.
- 9) 崔正国, 近藤隆, 稲寺秀邦: ドコサヘキサエン酸による温熱誘発アポトーシスの増強とその分子メカニズムの検討. 第82回日本衛生学会総会, 2012, 3, 25, 京都.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲寺秀邦 (INADERA HIDEKUNI)
富山大学大学院医学薬学研究部(医学)教授
研究者番号: 10301144

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし