

厚生科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

核内受容体作用による遺伝子相互作用の電算探索手法の研究

板井昭子 (株)医薬分子設計研究所・代表取締役

研究協力者 佐藤陽美 (株)医薬分子設計研究所・研究員

研究要旨

生体において化合物の毒性は分子ネットワークを介して発現するが、内分泌かく乱化学物質の生体内作用は顕著なフェノタイプの変化を伴わない場合が多いため、毒性予測及び評価が困難である。そこで、近年技術的進歩が著しく、かつ感度の高い DNA マイクロアレイによる遺伝子発現データとデータの標準化法(Percellome method)を用いて、*in vivo*(マウス肝)での内分泌かく乱物質候補化合物の毒性予測法を構築することにした。ここでは毒性作用に結びつく分子ネットワークを DNA マイクロアレイデータに基づき、生命情報統合プラットフォーム KeyMolnet を用いて生成する。作用、ターゲット既知の化合物の遺伝子発現データに基づき生成したネットワークと、同様に生成する作用未知の化合物のネットワークを比較し、毒性予測を試みるという方針である。今回は、pilot study としてデータ蓄積のため、clofibrate を経口投与したマウスの肝臓から RNA を抽出し、Affymetrix mouse 430A-2 により得た遺伝子発現データに基づき、核内受容体 PPARα (Peroxisome proliferator activated receptor alpha) に制御されることが報告されている遺伝子の発現を異なる時系列、用量に対して観察した。さらに、発現変動の大きい幾つかのポイントにおけるデータから分子ネットワークを生成し、これらの分子ネットワークに対するカノニカルなパスウェイ、疾患、病態における現象(病態イベント)、生体现象(生体イベント)及び Gene Ontology に関するプロファイリングを行った。分子ネットワークは生体内の作用を惹起するメカニズムの示唆を与えることができ、さらに本方法は化合物特異的な分子ネットワークを簡便かつ効率的に生成、抽出できることから、フェノタイプの変化が顕著でない比較的低用量の化合物の毒性予測に有用であることが示唆される。

A. 研究目的

内分泌かく乱作用をもつ可能性のある化合物の毒性予測を行うため、DNA アレイ技術と、Percellome method によるデータ標準化法及び KeyMolnet によるネットワーク解析を組み合わせ

せ、毒性予測のための方法を構築する。

B. 研究方法

1. ネットワーク解析におけるデータ処理

Clofibrate を経口投与したマウスの肝臓(1

群 3 匹)から RNA を抽出し、Affymetrix mouse 430A-2により得た網羅的遺伝子発現データを Percellome method により標準化した値を用いた。実験における時系列は、投与 2、4、8、24 時間後、用量 0、10、30、100(mg/kg)の各 4 点ずつである。用量 0 をコントロールとして、10、30、100(mg/kg)における各時系列の発現量比 (fold change)を後のネットワーク解析に用いた。また、ここでは $p < 0.05$ を有意なデータとして採用した(統計処理には Spotfire®を利用した)。

2. カノニカルパスウェイ“PPAR α による発現調節”における遺伝子の発現変動の観察

すでに KeyMolnet に収録されている“PPAR α による発現調節”(レビュー誌に報告されている PPAR α と関連分子の関係)に各条件のデータを各々KeyMolnet(KeyMolnet Viewer Version 3.6, Contents 8.62006920164953)にインポートし、PPAR α による発現変動を観察した。

3. 実験条件の絞り込み

KeyMolnet 上で、各実験条件において、 $P < 0.05$ かつ2倍以上発現亢進した分子の数を抽出した。

4. 化合物作用に対して up-regulate するネットワークの生成

3 の結果から、発現変動の大きかった投与 4 時間後のデータ(10、30、100mg/kg)についてコントロール(投与量 0)に比べて 2 倍以上有意に発現亢進した分子を KeyMolnet 上で抽出し、共通上流検索法によりネットワークを生成した。また、生成した各ネットワークに対し KeyMolnet のサマリーシートを用いて、カノニカルパスウェイ(Pathway)、疾患(Disease)、病

態における現象(病態イベント、Pathological Event)、生体现象(生体イベント、Bio-Event)、Gene Ontology について、これらの関与度とともにサマライズした。

ネットワーク検索条件:上流方向、1 パス、最短経路、コア、セカンダリコンテンツ、検索の種類、発現調節のみ

C. 研究結果

カノニカルパスウェイ“PPAR α による発現調節”における遺伝子の発現変動の観察

図 1A-L に各実験条件(時系列 2, 4, 8, 24 hr, 10, 30, 100 mg/kg)における foldchange(コントロール:用量 0)を色変換して示した。いずれの時系列に対しても、最高用量時(100 mg/kg)での発現変動が大きかった。

実験条件の絞り込み

上記 KeyMolnet 上で、各実験条件において、 $P < 0.05$ かつ 2 倍以上発現亢進した分子の数を表 1, 図 2 に示す。この結果より、投与 4 時間後で発現変動が大きいことが示された。

化合物作用に対して up-regulate するネットワークの生成

図 3 に、発現変動の大きかった投与 4 時間後のデータ(10、30、100mg/kg)についてコントロール(投与量 0)に比べて 2 倍以上有意に発現亢進した分子を端点として共通上流検索法によりネットワークを生成した(図 3A-C)。図 3 に示した 3 つの分子ネットワークのプロファイルを表 2 に示す。

D. 考察

Clofibrate 作用 4 時間後の網羅的遺伝子発現データに対し、100mg/kg では、2 倍以上有

意に発現亢進した分子が最も多かった。これら有意に 2 倍以上発現亢進した分子を端点として、共通上流検索法を用い、分子リレーション(分子と分子の関係)の条件を発現調節のみに絞ると、発現変動した分子を制御している転写因子の候補を調べることができる。100mg/kg 投与では発現変動(有意に亢進)した分子を制御している可能性が最も高い転写因子として、PPAR α がリストアップされた。他の用量に対しては必ずしも PPAR α が上位にランクされていなかったため、今後の作用未知の化合物の毒性予測あるいはネットワークを用いたプロファイリングには、ある程度高用量を作用させる必要があるかもしれない。化合物作用各用量 4 時間後の発現亢進分子によるネットワークで共通している作用に癌、骨制御、血管新生が挙がっている。

E. 結論

化合物特異的に up-regulate するネットワークが簡便かつ効率的に抽出でき、そのネットワークに関する作用、パスウェイなどのプロファイリングも行えた。今後はさらに他の化合物作用に対する特徴的なネットワークとそのプロファイリングデータを蓄積することによって既知化合物-ネットワーク-作用のパターニングを行う予定である。内分泌かく乱の可能性のある候補化合物に対しても、マイクロアレイデータからネットワークが生成し、毒性予測が行える可能性が示唆された。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.誌上発表

Mizutani, M. Y.; Takamatsu, Y.; Ichinose, T.; Nakamura, K.; Itai, A. Effective handling of induced-fit motion in flexible docking. PROTEINS, 2006, 63, 878-891.

Mizutani, M. Y.; Nakamura, K.; Ichinose, T.; Itai, A. Starting point to molecular design: Efficient automated 3D model builder Key3D. Chem. Pharm. Bull., 2006, 54, 1680-1685.

2.学会発表

水谷実穂、高松善弘、市瀬多鶴子、野中はるみ、志谷和紀、武藤進、板井昭子:論理的分子設計から創薬への道. 第 25 回メディスナルケミストリーシンポジウム(2006.11.29)

H.知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

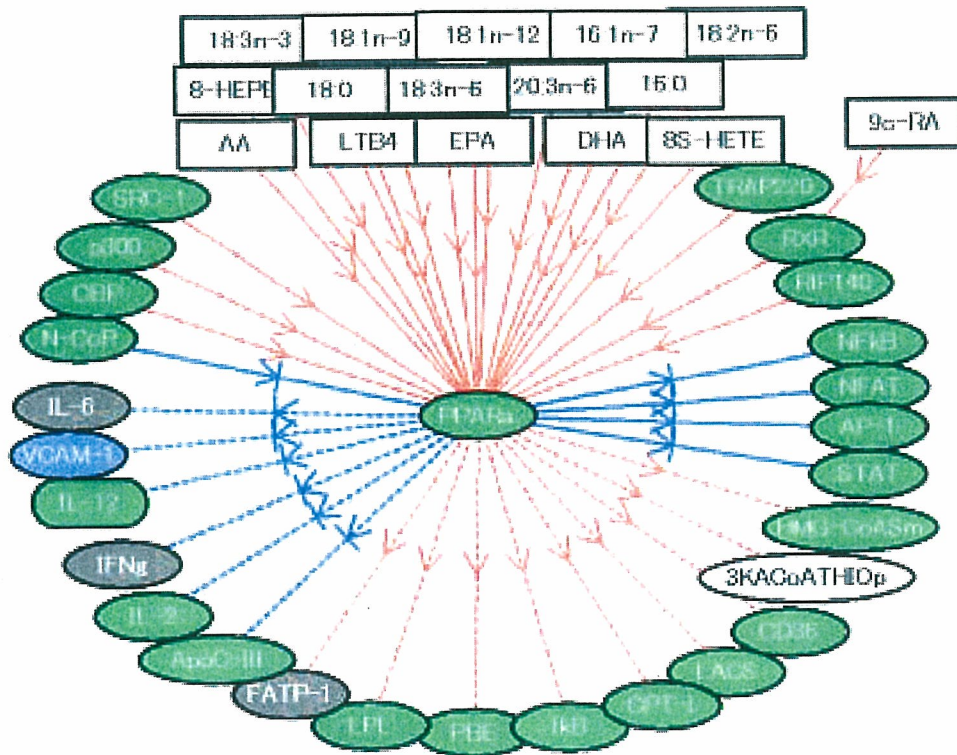


図 1A “PPARαによる発現調節”(2hr, 10mg/kg)

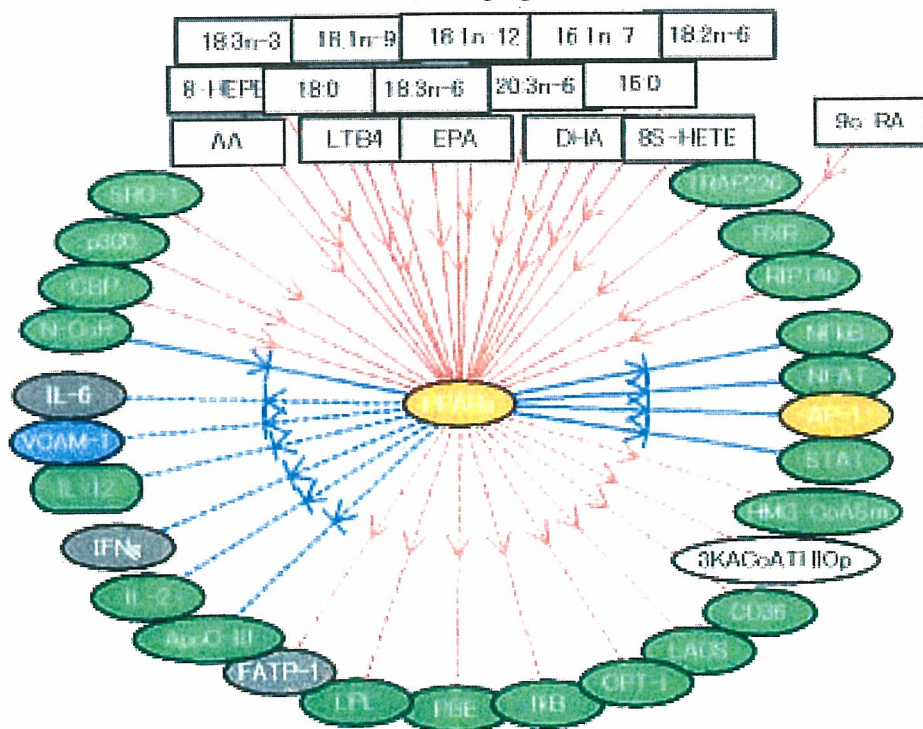


図 1B “PPARαによる発現調節”(2hr, 30mg/kg)

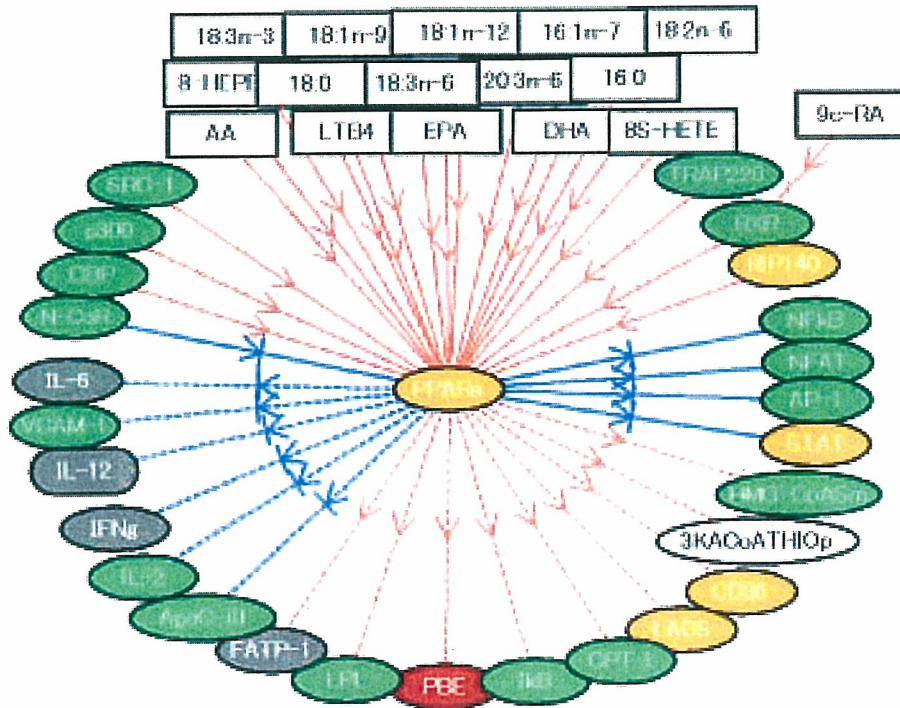


図 1C “PPARαによる発現調節”(2hr, 100mg/kg)

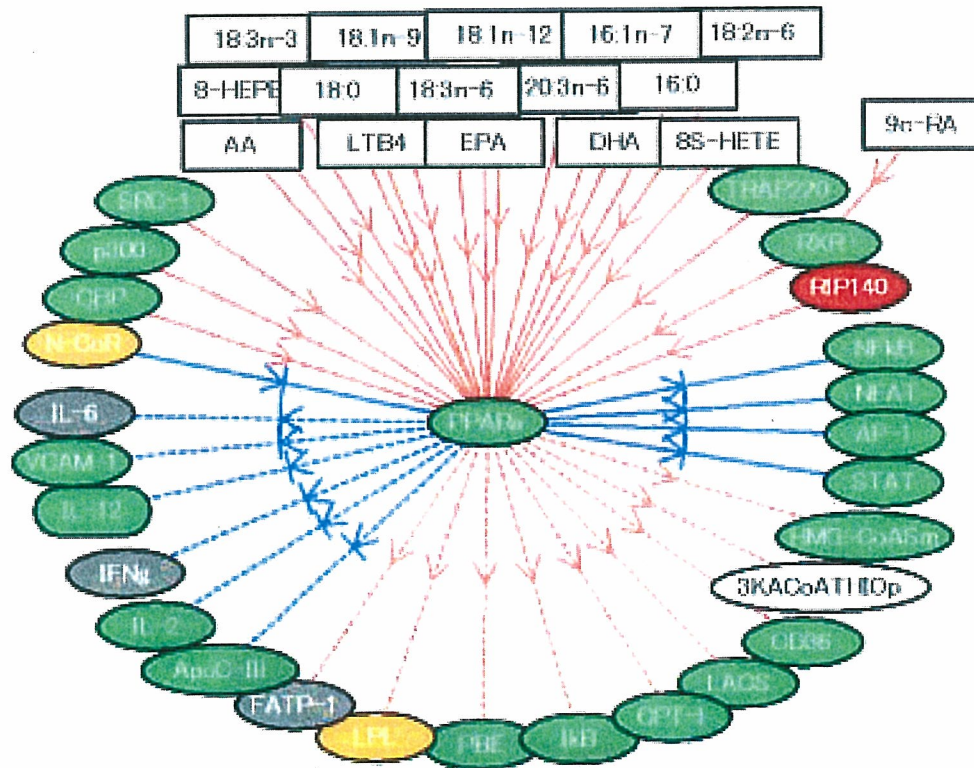


図 1D “PPARαによる発現調節”(4hr, 10mg/kg)

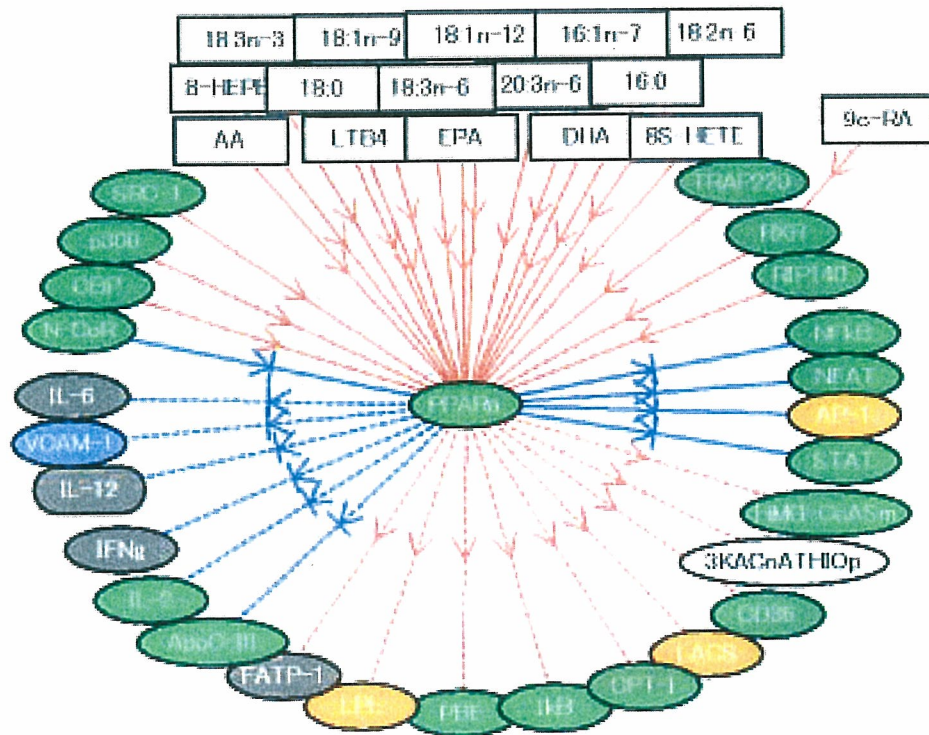


図 1E “PPARαによる発現調節” (4hr, 30mg/kg)

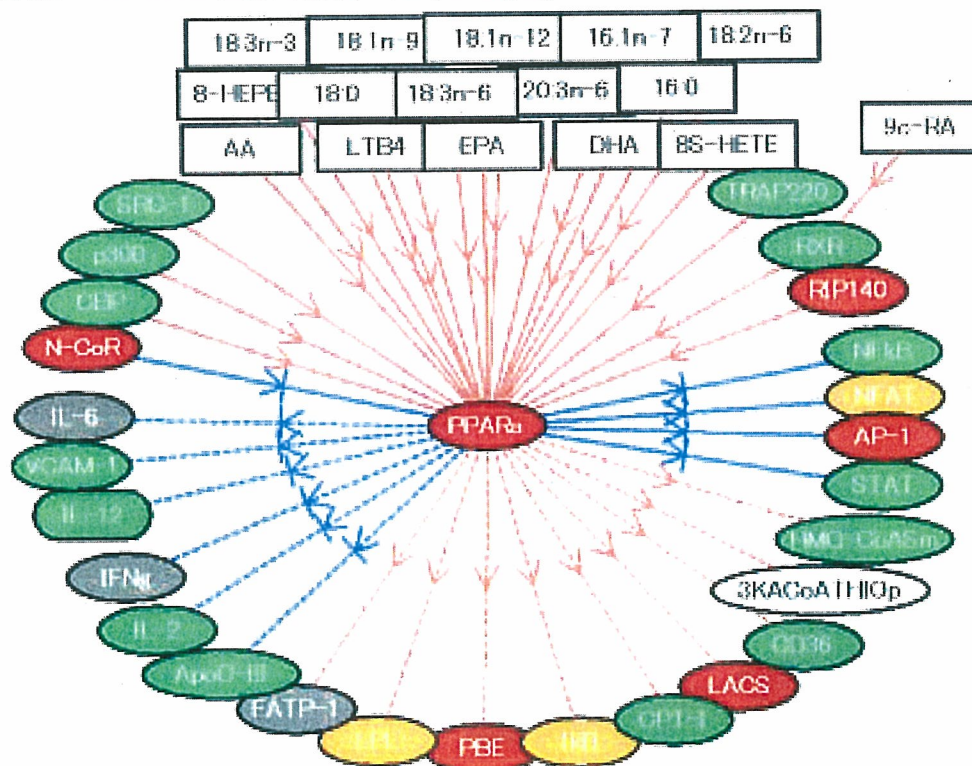


図 1F “PPARαによる発現調節” (4hr, 100mg/kg)

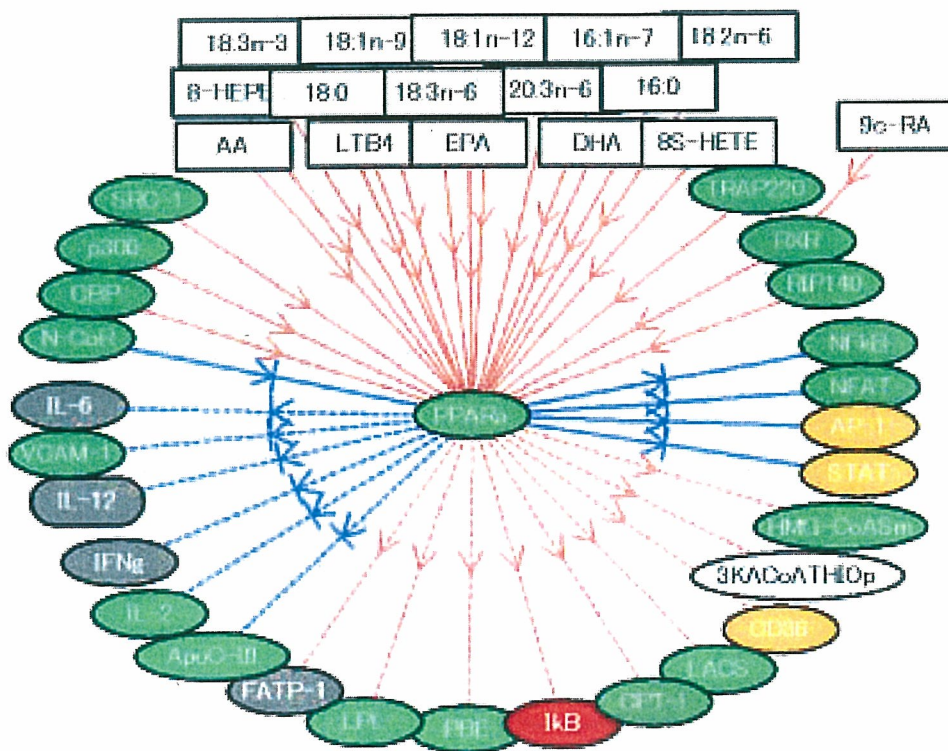


図 1G “PPARαによる発現調節” (8hr, 10mg/kg)

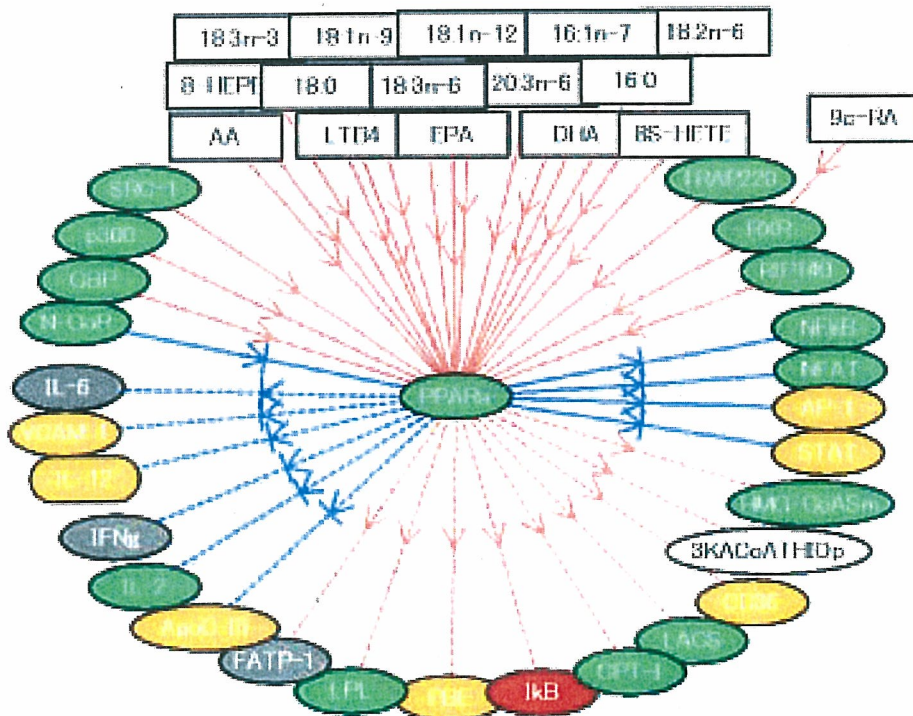


図 1H “PPARαによる発現調節” (8hr, 30mg/kg)

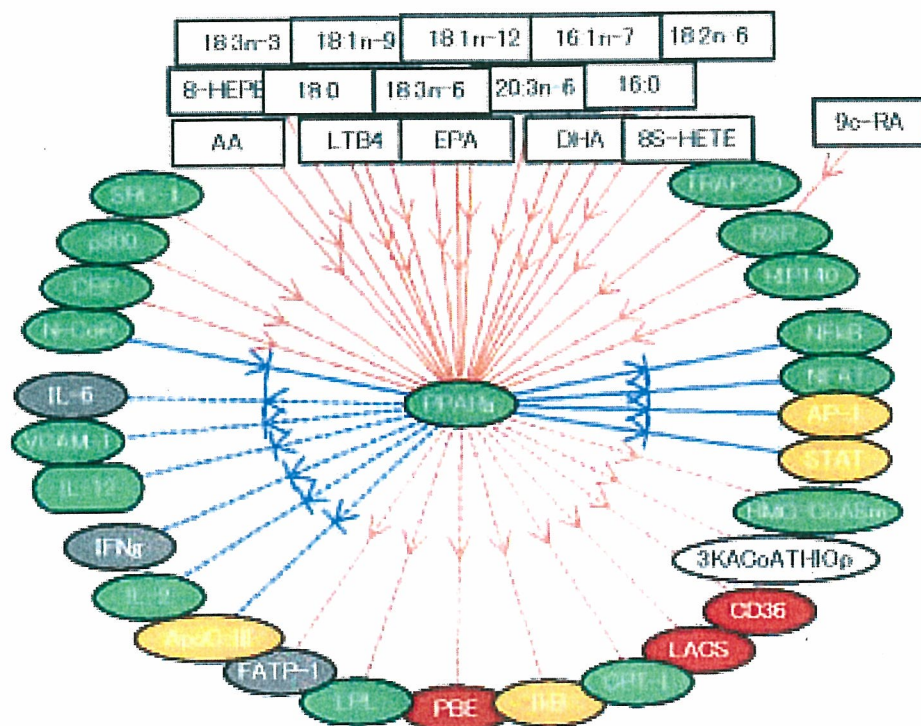


図 1I “PPARαによる発現調節” (8hr, 100mg/kg)

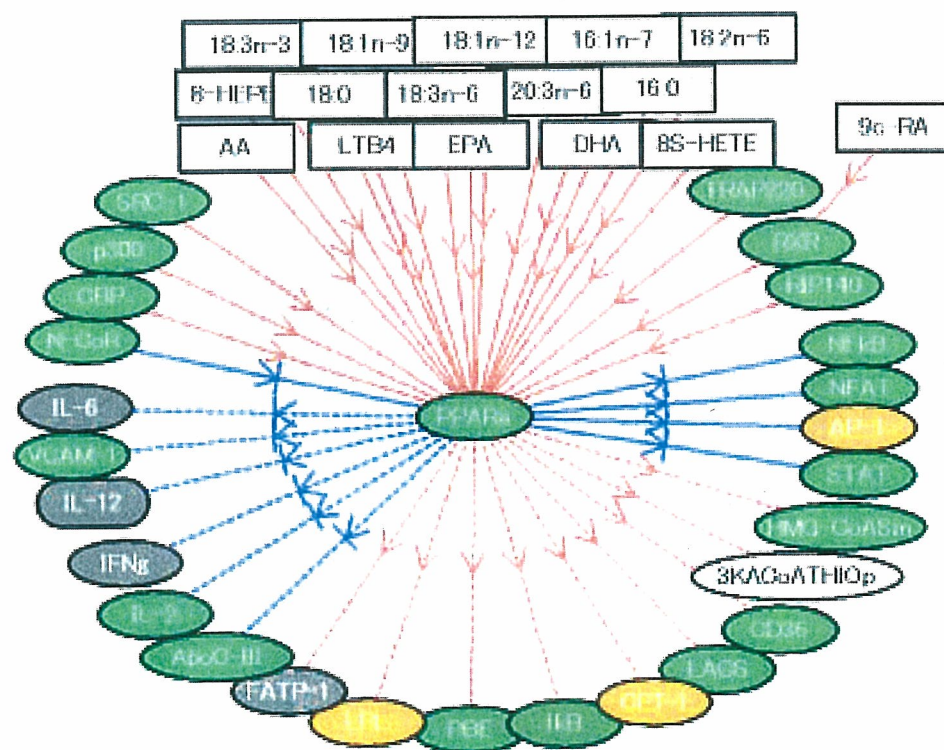


図 1J “PPARαによる発現調節” (24hr, 10mg/kg)

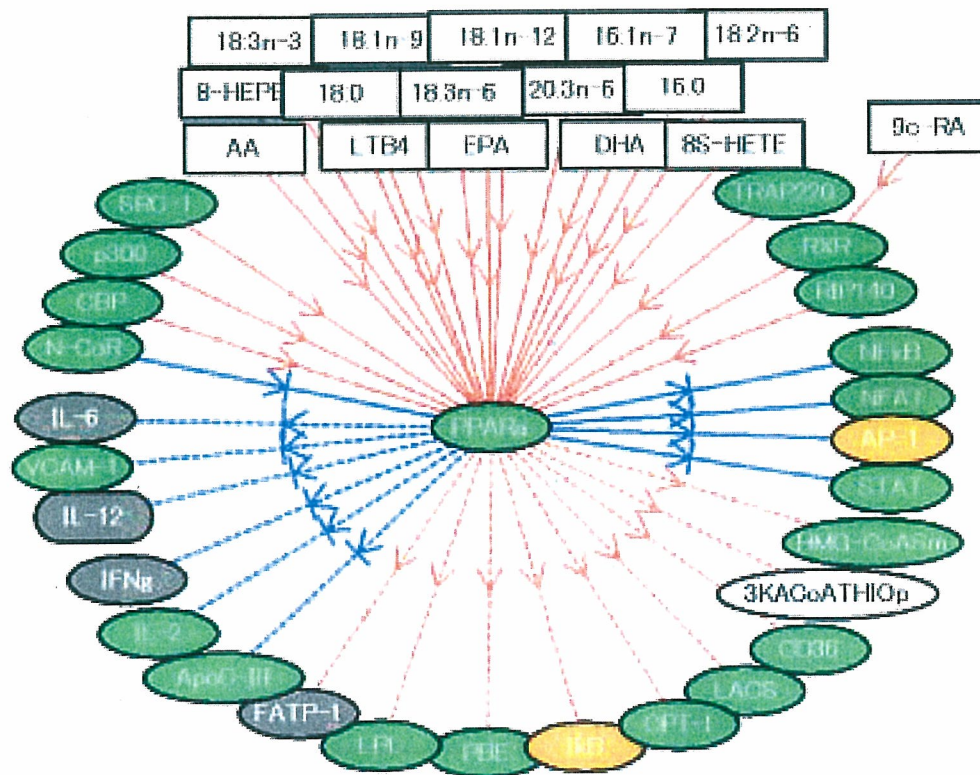


図 1K “PPARαによる発現調節” (24hr, 30mg/kg)

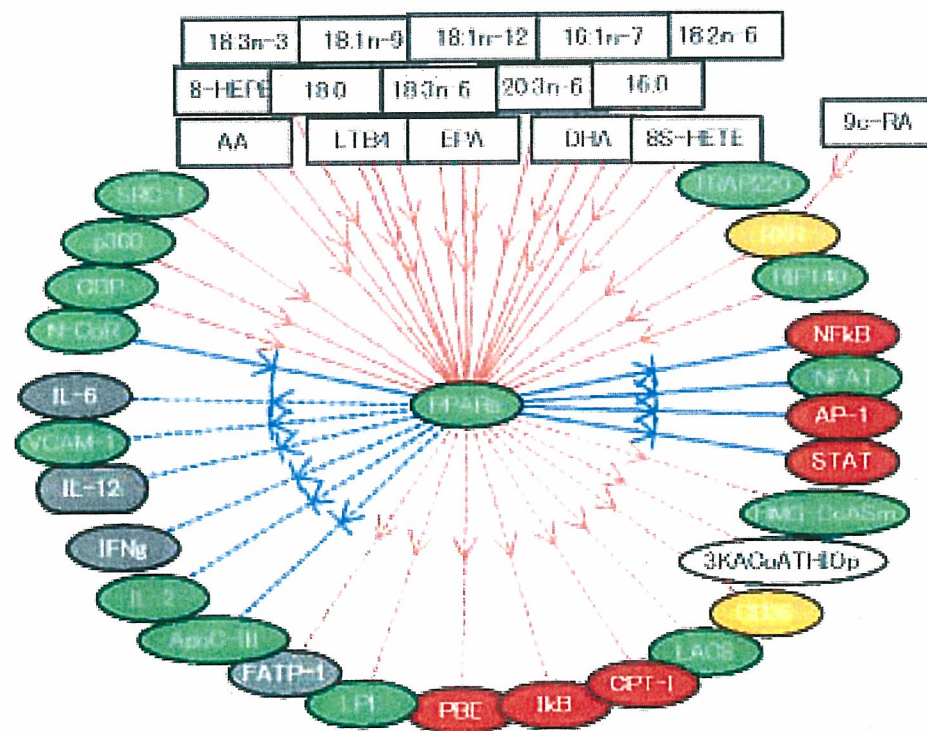
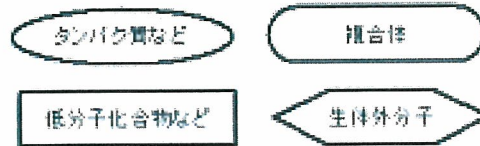
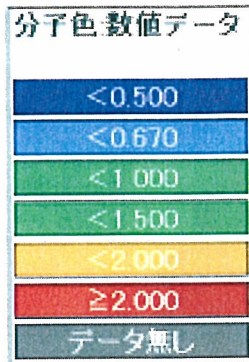


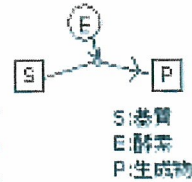
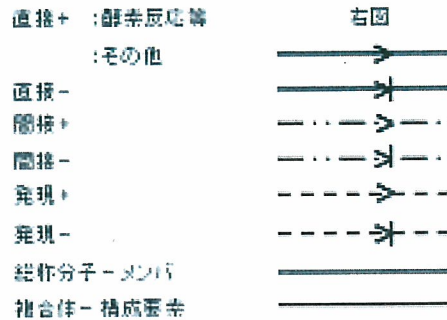
図 1L “PPARαによる発現調節” (24hr, 100mg/kg)

Legends



Core Contents. ユーザ独自追加レレーション

線の種類



線の太さ



Secondary Contents

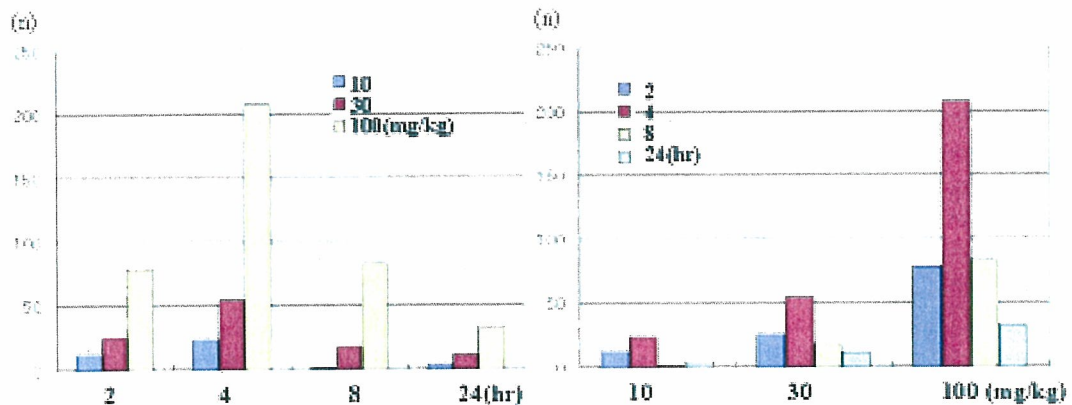


図2 化合物作用により2倍以上発現亢進(p<0.05)した分子数

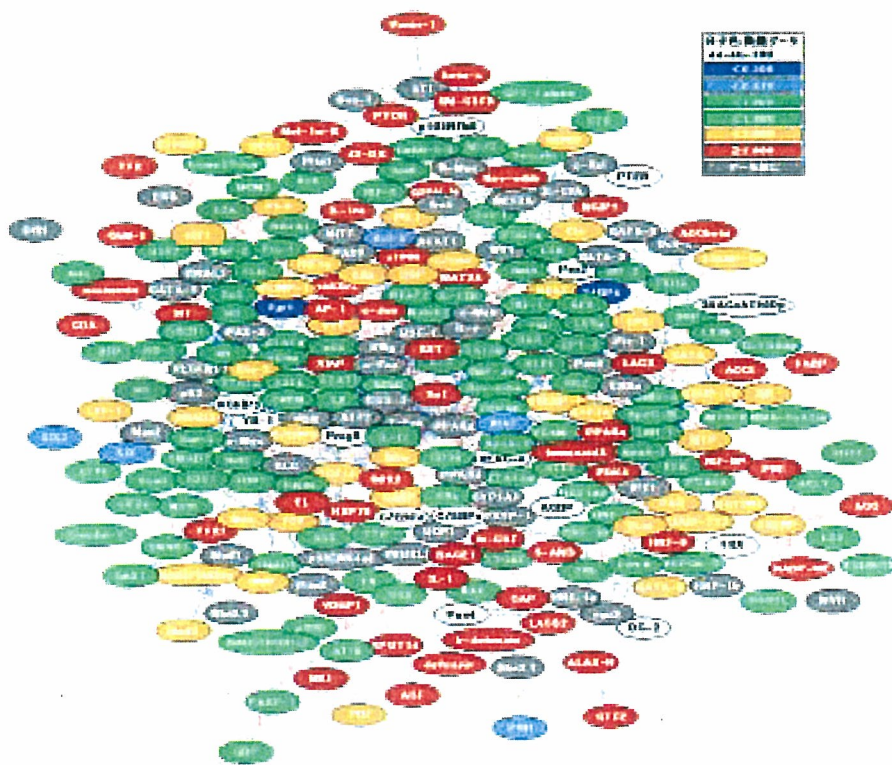


図 3A 発現亢進した分子によるネットワーク(4hr, 100mg/kg)

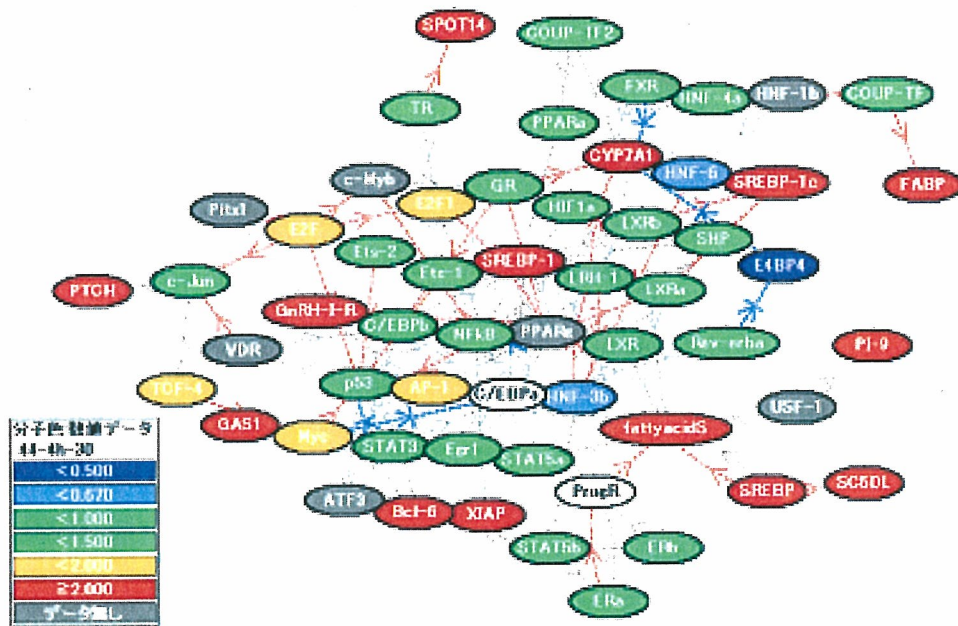


図 3B 発現亢進した分子によるネットワーク(4hr, 30mg/kg)

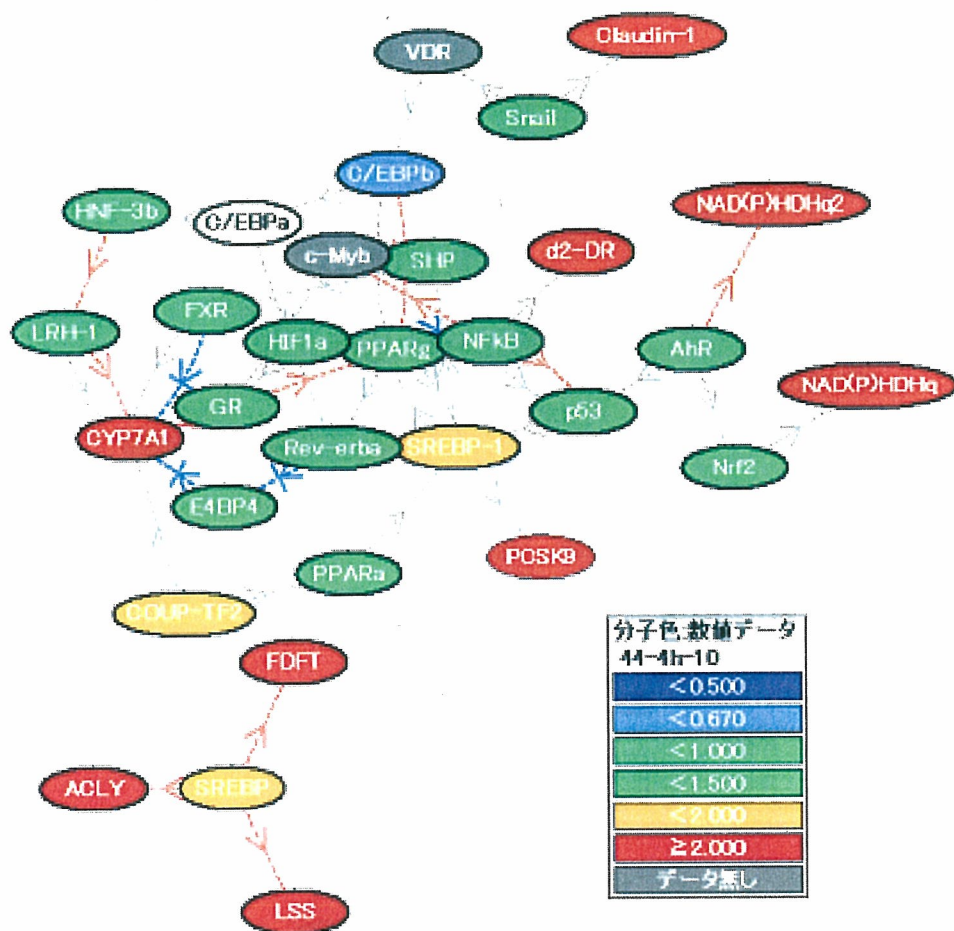


図3C 発現亢進した分子によるネットワーク(4hr, 10mg/kg)

表1 化合物作用により2倍以上発現亢進(p<0.05)した分子数

44 clofibrate (hr)	Over 2 fold up (mg/kg)		
	10	30	100
2	12	25	78
4	23	54	207
8	1	17	82
24	4	11	32

表 2A ネットワークのプロファイリング (4h, 100mg/kg)

Pathway

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	PPARa による発現調節	26.961	0.023	0.357
2	PPARg による発現調節	25.292	0.027	0.277
3	Ets(ERG サブファミリー)による発現調節	14.242	0.009	0.462
4	GR による発現調節	14.208	0.024	0.182
5	BLIMP-1 による発現調節	13.016	0.012	0.296
6	SREBP による発現調節	12.011	0.014	0.243
7	Rev-erb による発現調節	11.177	0.009	0.333
8	NFkB による発現調節	9.67	0.024	0.139
9	COUP-TF による発現調節	6.637	0.008	0.217
10	LRH-1 による発現調節	5.881	0.008	0.192

Disease

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	膵癌 (Pancreatic Cancer)	41.747	0.046	0.371
2	骨粗鬆症 (Osteoporosis)	26.278	0.046	0.171
3	免疫芽球性リンパ腫 (Immunoblastic lymphoma)	23.085	0.018	0.714
4	肝炎 (Hepatitis)	22.026	0.036	0.189
5	関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis)	20.286	0.046	0.121
6	肺癌 (Lung Cancer)	18.94	0.028	0.205

6	サルコイドーシス (Sarcoidosis)	18.94	0.028	0.205
8	多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma)	18.185	0.039	0.128
9	マイコバクテリア易感染疾患 (Mycobacteria Susceptibility)	17.308	0.018	0.385
10	動脈硬化症 (Arteriosclerosis)	17.245	0.036	0.133

Pathological Event

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	癌 (Cancer)	31.321	0.075	0.12
2	骨制御 (Bone Regulation)	22.593	0.039	0.172
3	細胞周期 (Cell Cycle)	13.538	0.018	0.238
4	ウイルス感染 (Viral Infection)	10.969	0.018	0.167
5	血管新生 (Angiogenesis)	9.752	0.021	0.113
6	生物学的療法 (Biologic Therapy)	8.865	0.018	0.122
7	化学療法 (Chemotherapy)	8.694	0.021	0.098
8	食細胞システム (Phagocyte System)	8.625	0.014	0.154
9	血管炎 (Vasculitis)	8.197	0.011	0.214
10	リポタンパク制御 (Lipoprotein Regulation)	8.125	0.018	0.109

Bio-Event

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	転写 (transcription)	229.597	0.459	0.134
2	転写 (RNA ポリメラーゼ II プロモータ) (transcription from RNA polymerase II promoter)	193.473	0.335	0.174
3	転写調節 (regulation of transcription)	154.332	0.338	0.128
4	DNA 依存性転写調節 (regulation of transcription, DNA-dependent)	147.663	0.306	0.138
5	転写調節 (RNA ポリメラーゼ II プロモータ) (regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)	97.849	0.185	0.162
6	翻訳制御 (-) (negative regulation of transcription)	37.669	0.085	0.128

7	発生 (development)	34.31	0.27	0.048
8	DNA 依存性転写制御(-) (negative regulation of transcription, DNA-dependent)	32.215	0.064	0.149
9	転写調節(RNA ポリメラーゼ II プロモータ)(-) (negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)	31.46	0.053	0.183
10	発生(臓器) (organ development)	29.189	0.142	0.064

Gene Ontology

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	transcription, DNA-dependent (GO:0006351)	229.901	0.434	0.147
2	transcription (GO:0006350)	229.597	0.459	0.134
3	transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006366)	193.473	0.335	0.174
4	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)	179.054	0.498	0.091
5	regulation of transcription (GO:0045449)	154.332	0.338	0.128
6	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0019219)	150.871	0.342	0.122
7	regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	147.663	0.306	0.138
8	regulation of cellular metabolism (GO:0031323)	146.917	0.367	0.109
9	cellular metabolism (GO:0044237)	142.607	0.644	0.057
10	regulation of metabolism (GO:0019222)	137.558	0.367	0.101

表 2B ネットワークのプロファイリング (4h, 30mg/kg)

Pathway

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	LRH-1 による発現調節	8.772	0.026	0.115
2	Rev-erb による発現調節	6.13	0.018	0.111
3	LXR による発現調節	5.452	0.018	0.087

3	COUP-TF による発現調節	5.452	0.018	0.087
5	RB/E2F による発現調節	4.923	0.053	0.026
6	SREBP による発現調節	4.189	0.018	0.054
7	Myc/Mad による発現調節	4.067	0.026	0.034
8	GR による発現調節	4.027	0.026	0.034
9	FXR による発現調節	2.897	0.009	0.071
10	PPAR γ による発現調節	2.807	0.018	0.031

Disease

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	膵癌 (Pancreatic Cancer)	26.564	0.105	0.171
2	MALT リンパ腫 (MALT Lymphoma)	15.666	0.053	0.25
3	骨粗鬆症 (Osteoporosis)	15.356	0.088	0.066
4	びまん性大細胞リンパ腫 (Diffuse Large-Cell Lymphoma)	13.997	0.035	0.667
5	肝炎 (Hepatitis)	13.339	0.07	0.075
6	メサングウム増殖性糸球体腎炎 (Mesangioproliferative Glomerulonephritis)	13.33	0.053	0.15
7	濾胞性リンパ腫 (Follicular Lymphoma)	13.001	0.035	0.5
7	髄膜腫 (Meningiomas)	13.001	0.035	0.5
9	Burkitt リンパ腫 (Burkitt's Lymphoma)	12.269	0.035	0.4
10	多発性骨髄腫 (Multiple Myeloma)	10.642	0.07	0.047

Pathological Event

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	細胞周期 (Cell Cycle)	13.112	0.053	0.143
2	癌 (Cancer)	12.812	0.105	0.034
3	化学療法 (Chemotherapy)	8.54	0.053	0.049
4	日光暴露 (Sun Exposure)	8.388	0.035	0.111
5	骨制御 (Bone Regulation)	8.343	0.053	0.047
6	ステロイド制御 (Steroid Regulation)	7.488	0.053	0.038
7	転移 (Metastasis)	6.75	0.035	0.063
8	卵巣機能 (Ovary Function)	6.131	0.035	0.05

9	血管新生 (Angiogenesis)	5.364	0.035	0.038
10	薬物代謝 (Drug Metabolism)	3.914	0.018	0.067

Bio-Event

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	転写 (transcription)	81.159	0.614	0.036
2	転写 (RNA ポリメラーゼ II プロモータ) (transcription from RNA polymerase II promoter)	75.768	0.491	0.052
3	DNA 依存性転写調節 (regulation of transcription, DNA-dependent)	57.913	0.439	0.04
4	転写調節 (regulation of transcription)	55.481	0.456	0.035
5	転写調節 (RNA ポリメラーゼ II プロモータ) (regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)	48.939	0.316	0.056
6	転写調節 (RNA ポリメラーゼ II プロモータ)(-) (negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)	19.049	0.105	0.073
7	DNA 依存性転写制御(-) (negative regulation of transcription, DNA-dependent)	15.79	0.105	0.05
8	翻訳制御 (-) (negative regulation of transcription)	15.531	0.123	0.037
9	細胞増殖 (cell proliferation)	10.707	0.175	0.016
10	細胞周期調節(-) (negative regulation of progression through cell cycle)	9.825	0.07	0.04

Gene Ontology

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	transcription, DNA-dependent (GO:0006351)	83.709	0.596	0.041
2	transcription (GO:0006350)	81.159	0.614	0.036
3	transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006366)	75.768	0.491	0.052

4	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0006139)	58.567	0.614	0.023
5	regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)	57.913	0.439	0.04
6	regulation of transcription (GO:0045449)	55.481	0.456	0.035
7	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism (GO:0019219)	53.677	0.456	0.033
8	regulation of cellular metabolism (GO:0031323)	50.505	0.474	0.028
9	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006357)	48.939	0.316	0.056
10	regulation of metabolism (GO:0019222)	48.015	0.474	0.027

表 2C ネットワークのプロファイリング (4h, 10mg/kg)

Pathway

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	BLIMP-1 による発現調節	21.707	0.051	0.222
2	LRH-1 による発現調節	8.665	0.026	0.115
3	WT1 による発現調節	7.213	0.017	0.167
4	PPARa による発現調節	6.698	0.026	0.071
5	HIF による発現調節	5.87	0.034	0.043
6	PPARg による発現調節	5.02	0.026	0.046
7	SREBP による発現調節	4.122	0.017	0.054
7	AP-1 による発現調節	4.122	0.017	0.054
9	XBP1 による発現調節	3.07	0.009	0.083
9	IL-15 シグナル伝達	3.07	0.009	0.083

Disease

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	びまん性大細胞リンパ腫 (Diffuse Large-Cell Lymphoma)	22.565	0.043	1
2	MALT リンパ腫 (MALT Lymphoma)	21.226	0.058	0.333

3	膵癌 (Pancreatic Cancer)	19.592	0.072	0.143
4	Burkitt リンパ腫 (Burkitt's Lymphoma)	19.254	0.043	0.6
5	濾胞性リンパ腫 (Follicular Lymphoma)	12.447	0.029	0.5
6	肝炎 (Hepatitis)	12.264	0.058	0.075
7	慢性骨髄性白血病 (Chronic Myelogenous Leukemia)	12.085	0.043	0.136
8	免疫芽球性リンパ腫 (Immunoblastic lymphoma)	10.656	0.029	0.286
9	大腸癌 (Colorectal Cancer)	10.342	0.058	0.053
10	前立腺癌 (Prostate Cancer)	10.322	0.043	0.091

Pathological Event

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	癌 (Cancer)	11.288	0.087	0.034
2	性分化 (Sexual Differentiation)	8.375	0.029	0.133
3	血管新生 (Angiogenesis)	8.334	0.043	0.057
4	鉄代謝 (Iron Regulation)	8.187	0.029	0.125
5	日光暴露 (Sun Exposure)	7.847	0.029	0.111
6	骨制御 (Bone Regulation)	7.565	0.043	0.047
7	ステロイド制御 (Steroid Regulation)	6.726	0.043	0.038
8	薬物代謝 (Drug Metabolism)	3.648	0.014	0.067
8	T 細胞分化 (T cell Differentiation)	3.648	0.014	0.067
10	ビタミン D 制御 (Vitamin D Regulation)	3.253	0.014	0.05

Bio-Event

rank	name	score	score(v)	score(c)
1	転写 (transcription)	83.89	0.565	0.041
2	転写(RNA ポリメラーゼ II プロモータ) (transcription from RNA polymerase II promoter)	66.346	0.406	0.052
3	転写調節 (regulation of transcription)	57.655	0.42	0.039
4	DNA 依存性転写調節 (regulation of	57.226	0.391	0.043