

Requirements to the Methodology

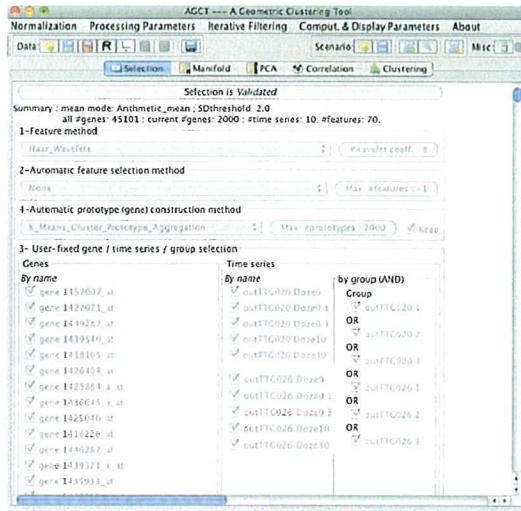
- Extract biologically significant interconnections without *a priori* knowledge
- Process multidimensional data and visualize
- Analyze large-scale data (whole cell) in a limited time on a single PC



Processing on **AGCT** – A Gene Clustering Tool

- Obtain a global processing chain:
 - 1 **Coding**: from signal to slopes and wavelets
 - 2 **Filtering**: select variables and subsets of genes
 - 3 **Geometric learning**: approximate representations into a low-dimensional manifold
 - 4 **Clustering**: post-process to find clusters of genes with close expressions
- Obtain a user-friendly chain:
 - 1 **Visualization**: all steps must be graphical (3D)
 - 2 **Record-replay**: incorporate a scenario-macro mechanism

Data loading and pre-processing



$$S_{ij} = \frac{\text{cov}(t, x_{ij})}{\text{var}(t)} = \frac{\sum_k (t_k - \text{avg}(t))(x_{ijk} - \text{avg}(x_{ij}))}{\sum_k (t_k - \text{avg}(t))^2}$$

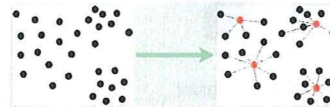
A *time series* for gene *i* and compound *j* was mapped to a slope s_{ij} using a conventional linear regression fit:

Similarity matrix and Nearest Neighbors

2. A *similarity matrix* M is computed, whose entry in row *i*, column *l* (m_{il}) is the similarity between gene *i* and *l*, chosen to be proportional to the heat kernel.

$$m_{il} = \exp\left(-\frac{1}{q} \sum_j (s_{ij} - s_{lj})^2\right).$$

Matrix M is then post-processed following a procedure close to Local Linear Embedding (Roweis, 2000). For each row \mathbf{i} of M , we search for the r largest entries whose columns define the r nearest neighbors of gene \mathbf{i} . $q=2$ here.



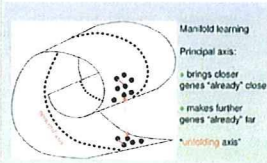
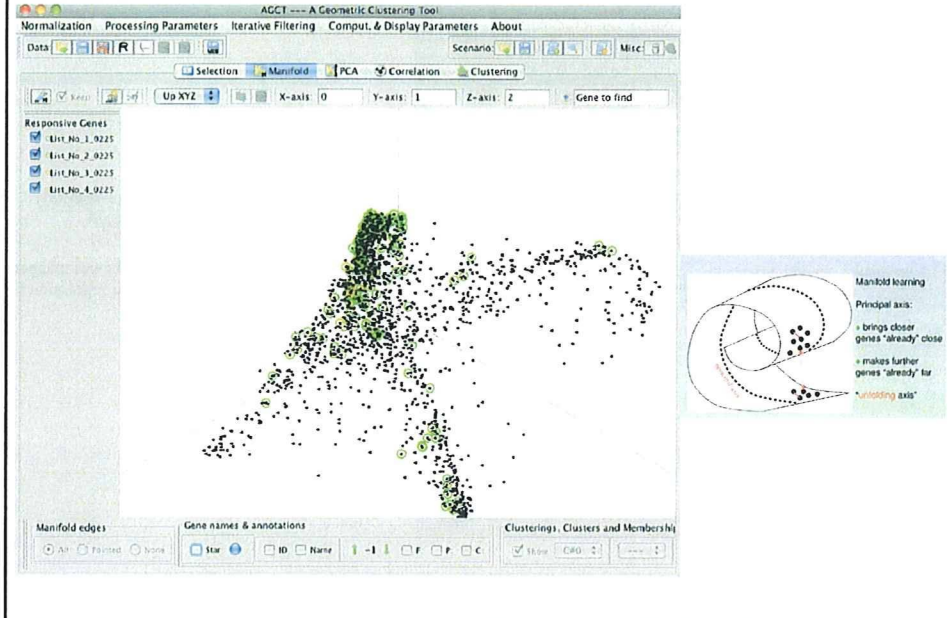
The symmetric nearest neighbors of each gene \mathbf{i} , is computed by aggregating both the nearest neighbors of the gene, and the genes for which gene \mathbf{i} is a nearest neighbor.

M is finally replaced by using the Boolean indicator matrix for symmetric nearest neighbors ($m_{ij} = 1$ if genes \mathbf{i} and \mathbf{l} are symmetric nearest neighbors, or 0 otherwise).

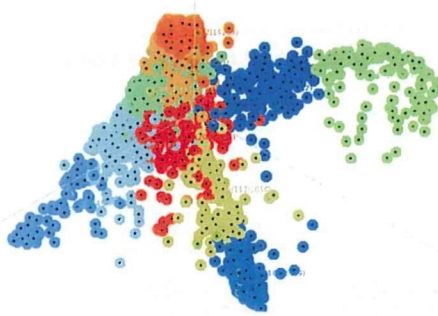
$$\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Compute **MANIFOLD** for TCDD - TCDF data matrix.

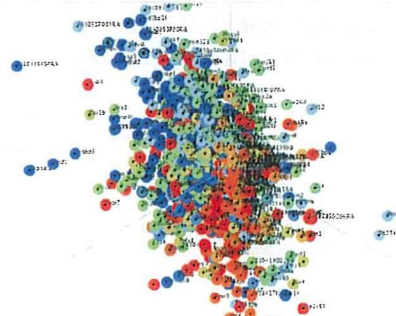
Genes known to be involved in TCDD or/and TCDF response are green.



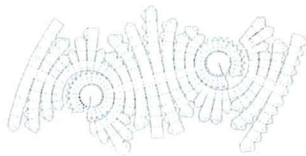
Manifold clustering (m*m) PCA clustering (m*n)



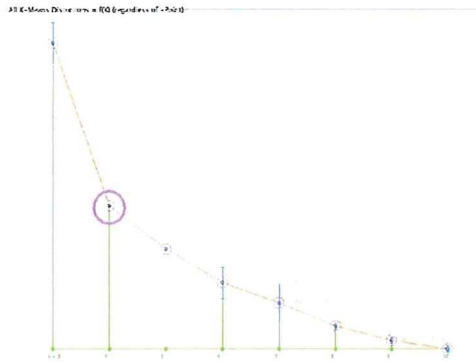
'unfolded origami'



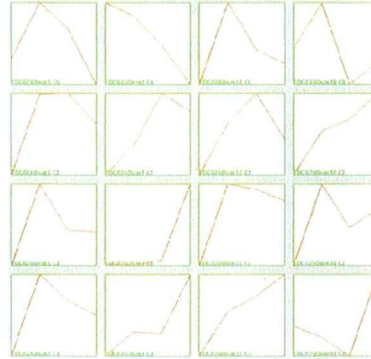
Number of clusters (k) is defined automatically



Evaluation for cluster convergence

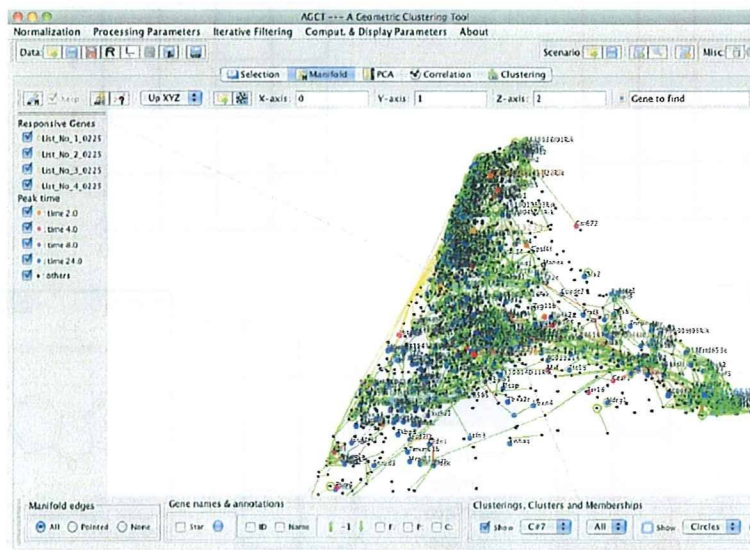


Doze-dependent cluster centroids

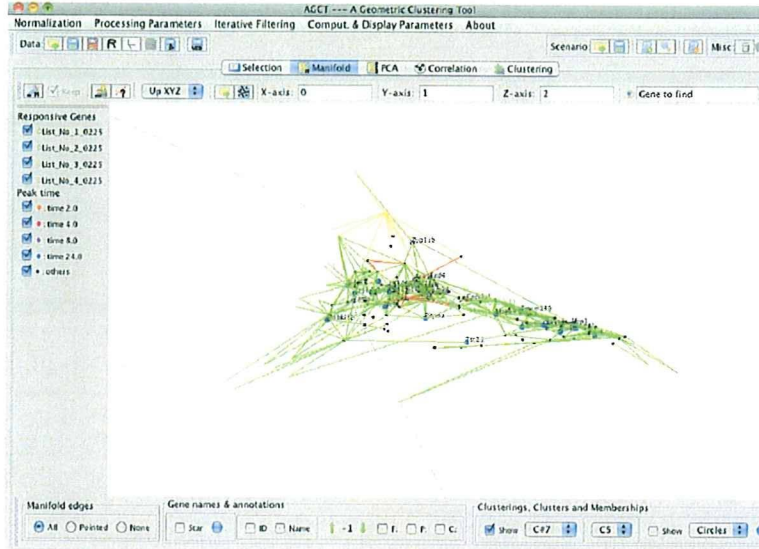


Calculate most **anti**/**co**-related edges among nodes

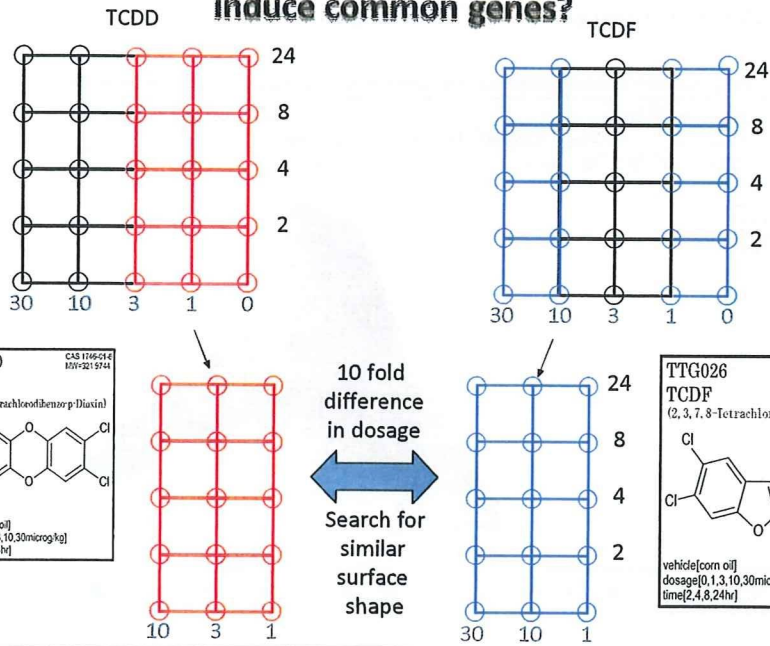
Filter TCDD-TCDF shared genes by Q1 (25%) using total distance: $V_b^a(f) = \sup_P \sum_{i=0}^{n,p-1} |f(x_{i+1}) - f(x_i)|$.



Example:
 Cluster 5 is shown separately.
 Select blue dots as biologically significant within the defined cluster.



DOES 10 FOLD CHANGE DOSAGE OF TCDD AND TCDF induce common genes?



YES!

Conclusions

We identified **4288 (10%)** probes activated by the exposure of cells to TCDD and TCDF to mouse liver cell.

158 probes found are known candidates related to the Ahr pathway (45% of 351 probes) and others are newly discovered candidates.

Biological interpretation of the role and relations of those genes within the network is the next step to take.

Acknowledgments

Sony CSL

Martinique University, France

Tokyo University

Hiroaki Kitano
Frank Nielsen

Richard Nock

Keigo Oka

NIHS

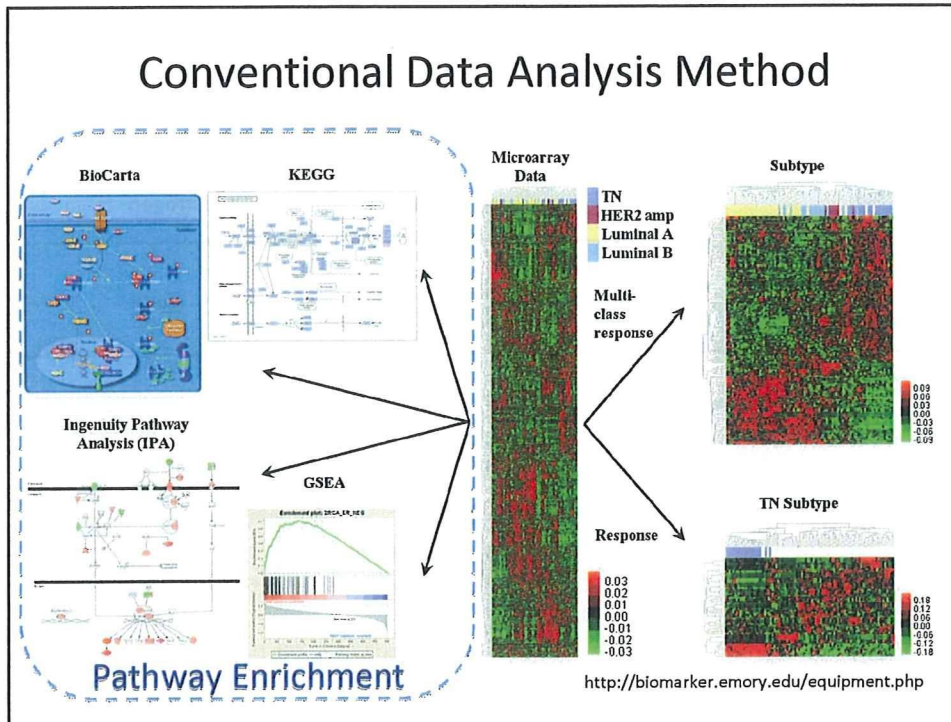
Jun Kanno
Ken-ichi Aisaki
Satoshi Kitajima

- **研究要旨:**
 - 本研究は、先行実施された化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクス研究の成果を受け継ぎ拡充しつつ、毒性分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階としてのインフォマティクス技術を開発することを目的とする。
- **A. 研究目的**
 - ベイジアンネットワーク等のアルゴリズムの複合適応による初期反応カスケードの描出を行う。大規模データから擾乱初期に関わる分子標的を同定する手法の開発を行い、実際のデータを基にそのカスケードを抽出する。
- **B. 研究方法**
 - 平成21年度は、基本的な推定手法の調査と従来方法を克服する手法の基礎開発。小規模データで試験を行う。また、本課題でのニーズを分析し、そのニーズに適合する手法を特定する。
- **C. 研究結果**
 - 大規模データから擾乱初期に関わる分子標的を同定する手法の開発に向け、実際のデータを用いて、独自クラスタリングなど最適な基本推定手法の調査を行った。併せてニーズへの最適化と従来方法を克服する手法の検討を行った。
- **D. 考察**
 - 多次元のデータ構造から発見的手法を使って、全細胞の遺伝子ネットワークやクラスタリングを行うソフトウェア (AGCT - A Gene Clustering Tool)を開発した。実データとして、二つの化合物 (TCDD, TCDF) に対して検出したネットワークを既知情報に照らし合わせた結果、本手法では70%感度を期待できることが分った。コアネットワークに新規ノードを選択することで、新しい相互作用の同定を行うことができる。
- **E. 結論**
 - 現在の解析方法より優れた解析手法を考案した。低次元でヴィズアラゼーションを行うために結果とユーザのインタラクションから生物機能へのより深い解釈を期待できる。更に配列解析モジュールの追加や解析をサポートするデータベースの開発が始まりつつである。処理速度が早いため、このシステムを使った網羅的なデータ解析が可能となる見込みである。

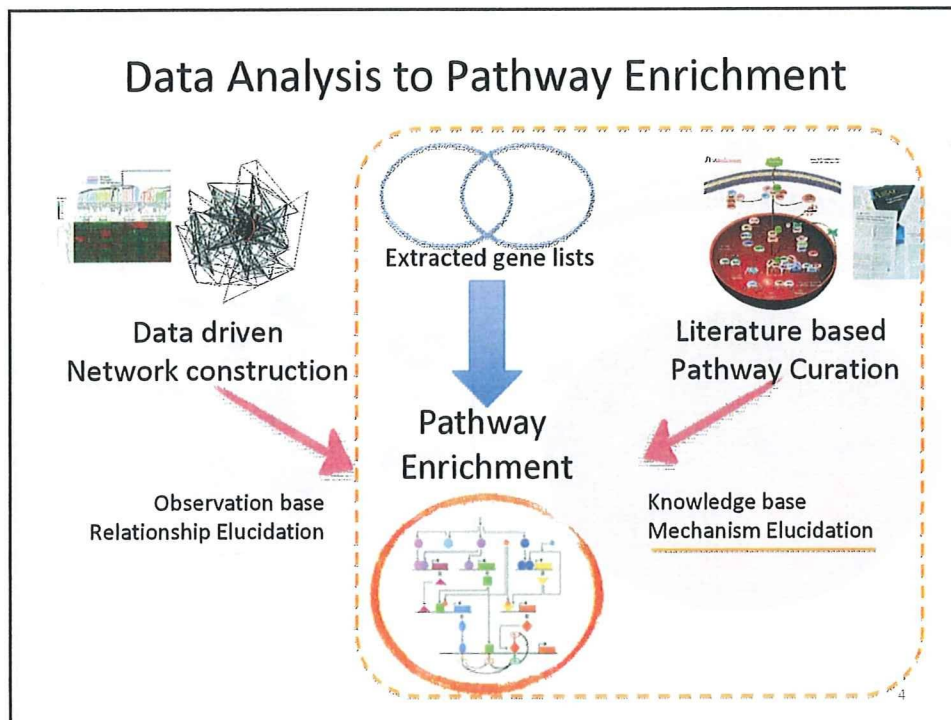
Gene Regulatory Network and Pathway Enrichment

2010 Mar 19
Yukiko Matsuoka
The Systems Biology Institute

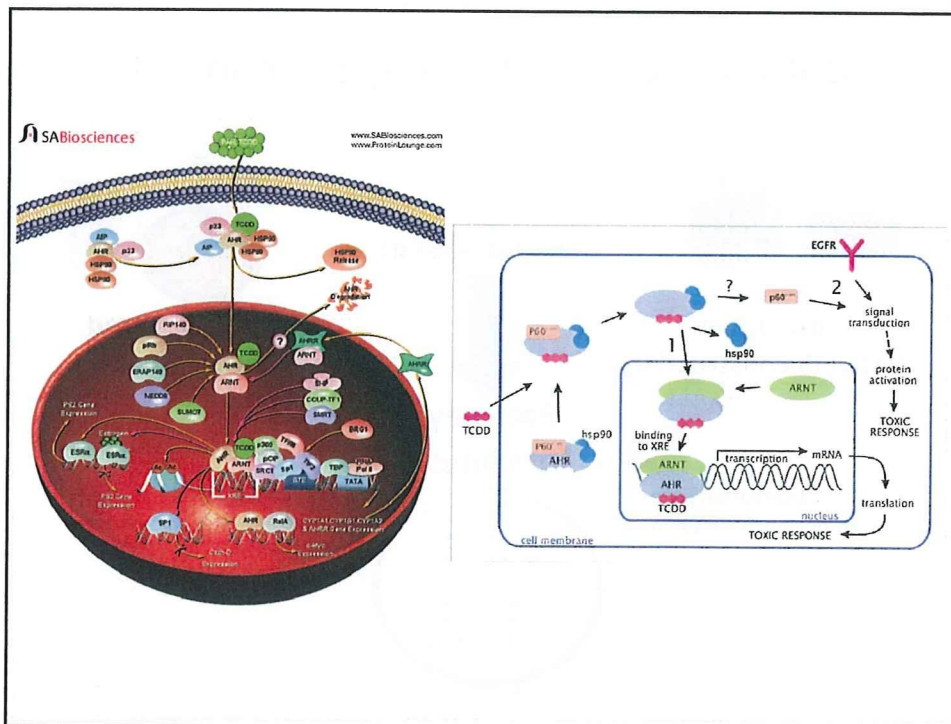
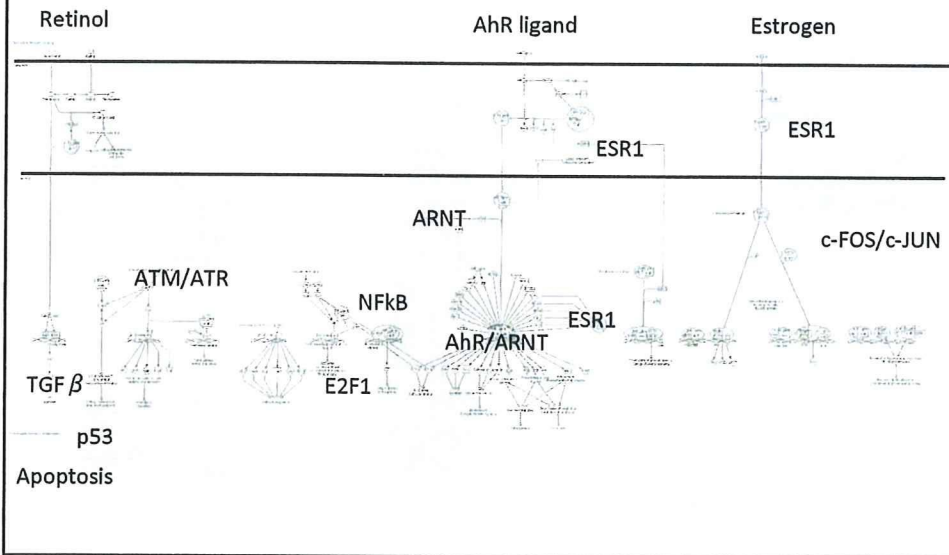
Conventional Data Analysis Method



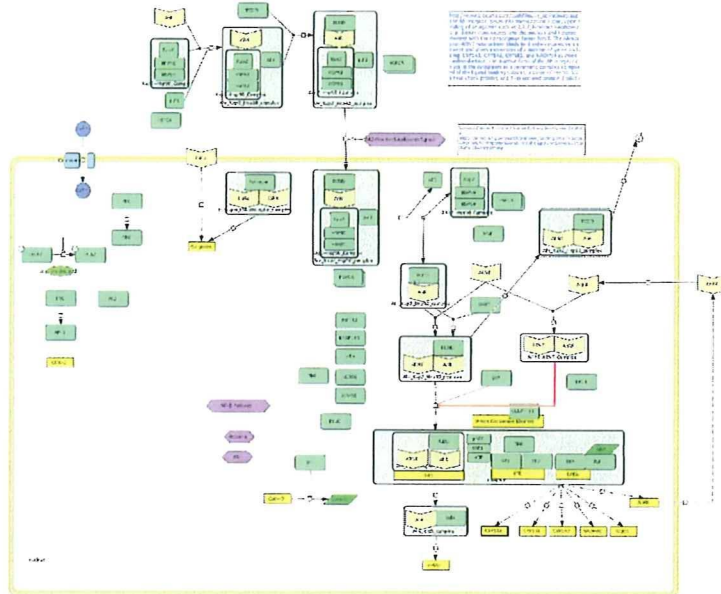
Data Analysis to Pathway Enrichment



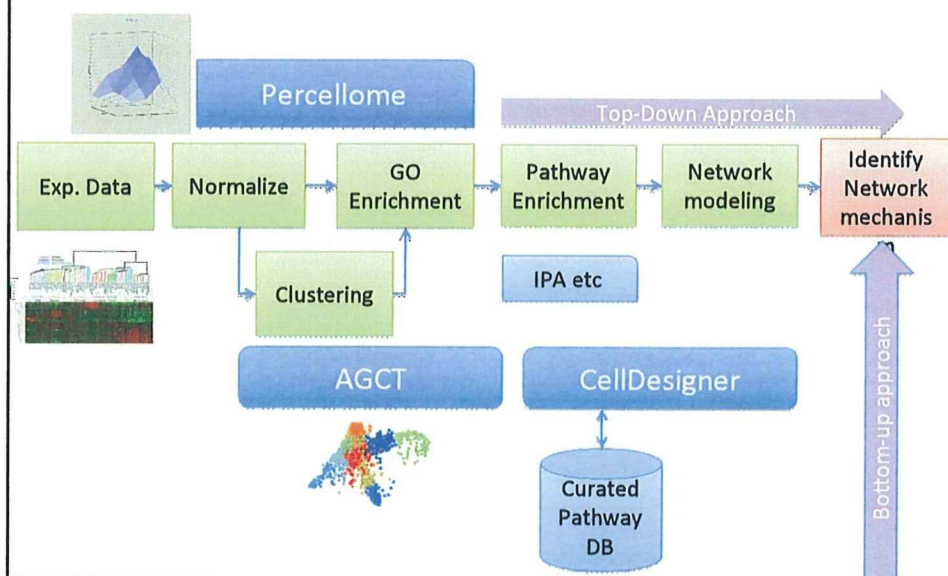
AhR pathways (IPA)



AhR pathway built by CellDesigner



Toxicology Data Analysis Pipeline



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
「化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究
—網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と毒性
予測評価システムの実用化の為のインフォマティクス技術開発—」
(H21-化学-一般-001)

分担研究報告書

胎児・ES細胞データをモデルとした遺伝子カスケード描出研究

研究分担者 北嶋 聡

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・室長

研究要旨

先行研究において取得・構築済みの野生型マウス胚およびマウスES(胚性幹)・EB(胚葉体)分化系の遺伝子発現の経時データベースを活用し、脊索を含む中胚葉の形成と原腸陥入に関わるT遺伝子に着目し、この局所シグナルネットワークの描出を目的とし検討した。マウス野生型胚の経時データベースを用い、T遺伝子発現の経時変化を基としたピアソン相関係数の利用およびISHによる発現部位の可視化を通し検討した結果、計37プローブセット(ps)(遺伝子数としては31個)の遺伝子リストが得られた。このうち9遺伝子についてwhole mount in situ hybridization (ISH)を検討した結果、T遺伝子との関連が既知のSp5とZic3遺伝子だけでなく、T遺伝子との関連が未知のDll3、FrzbおよびLefty2遺伝子がT遺伝子と似た発現局在を示した。したがって、構築した経時データベースとISHを組み合わせる本解析を通して、当該遺伝子ネットワークに関連する既知の遺伝子の抽出だけでなく、機能未知の遺伝子の探索を効率よくおこなえるものと考えられた。他方、ES・EB分化系における経時データベースを用い、T遺伝子発現の経時変化を基としたピアソン相関係数の利用し検討した結果、計137psの遺伝子リストが得られた。このリストを、既述の野生型胚の経時データベースにより得た遺伝子リストと比較・検討した結果、両者でかなり異なり、この理由として、ES・EB分化系における分化過程は、野生型胚における発生過程と、必ずしも一致しない可能性が考えられた。したがって、ES・EB分化系から得られた結果については、野生型胚において再度検証する必要があるものとする。本分担研究を通して、実験動物を用いながら、人に於ける毒性作用を毒性発現の分子メカニズムに基づいて、より迅速、正確、詳細、且つ見落とし無く予測可能となることが期待される。

A. 研究目的

本研究は、先行実施された化学物質リスク評

価の基盤整備としてのトキシコゲノミクス研究の

成果を受け継ぎ拡充しつつ、毒性分子メカニ

ズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階としてのインフォマティクス技術を開発することを目的とする。これには、更なる高度な知識と技術を要するが、今までのトキシコゲノミクスが「関連した遺伝子のリスト」や「バイオマーカー」等の静止画的な情報しか提供しない状況を打破し「どのネットワークが反応すると、どのような毒性と直結するか」という時間的要素を含む動的な因果関係を導き出すことが可能となり、遺伝子発現情報からの毒性予測の精度の格段の向上が見込まれる。

本分担研究では、1)特に自律的な遺伝子発現が認められる発生過程や概日リズムのシグナルネットワークを描出し、また2)マウス胚およびES(胚性幹)・EB(胚葉体)分化系に化学物質を暴露し、遺伝子発現データを得て、発生過程のシグナルネットワークに対する影響を検証する。

平成21年度は、先行研究において取得・構築済みのマウス野生型胚およびマウスES・EB分化系の遺伝子発現の経時データベースを利用し、脊索を含む中胚葉の形成と原腸陥入に関わるT(Brachyury)遺伝子に着目し、この局所シグナルネットワークの描出を目的とし検討した。T遺伝子に関しては、その発現時期から、野生型胚およびES・EB分化系、双方の経時データベースを活用できるため、両者共に活用し比較・検討することとした。なお、ES・EB分化系における経時データベースは、ES・EB分化系が、マウス胚の採取が困難な着床前後の胎生4-6日の代替となりうることから作成した経緯がある。

加えて、ES・EB分化系にレチノイン酸受容体(RAR)関連物質を暴露し、データを得て、ES分化系におけるRARに関する局所ネットワークの描出を検討することとした。

B. 研究方法

B-1: マウス野生型胚の遺伝子発現経時データベースの構築:

C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた(プラグが確認された日の15時を胎生0.5日とした)。経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した)を1腹分プールしたRNAサンプルを用い、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて、網羅的遺伝子発現変動解析を検討することにより、遺伝子発現経時データベース[胎生6.25-9.75日](TIME POINT:12点)を作製した。マウス胚は、直接、1%の2-メルカプトエタノール含有RLTバッファー(QIAGEN社)に変性・溶解させた。RLTバッファーは、RNeasyキット(QIAGEN社)に含まれる。

B-2: マウスES・EB分化系の遺伝子発現変動の経時データベースの構築:

ES細胞はTT2を使用し、GeneChip MOE430v2(Affymetrix社)(約45,000プローブセット)を用いて遺伝子発現変動解析を検討することにより、EBにおける遺伝子発現変動の経時データベース[EB形成0-7日](12時間毎、TIME POINT:14点)を作製した。ES細胞の分化は、LIF非存在下で2日間天井培養し(day2)、その後得られたEBを浮遊培養することによりおこなった。EB形成に向けた、1滴20 μ lあたりのES細胞数は800個とし1プレートあたり40滴とした。天井培養開始時刻を20時とし、またEBのサンプリング時刻を1日あたり8時と20時とした。EBは、180個-60個(分化日数によって異なる)をプールして1サンプルとし、直接、1%の2-メルカプトエタノール含有RLTバッファー(QIAGEN社)に変性・溶

解させた。

B-3: Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、サンプルの入った RLT buffer の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

全胚サンプルについては、2 段階増幅により cDNA を得た。すなわち、全 RNA の 100ng にとり、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を得、2 本鎖とした後、T7 RNA ポリメラーゼ (Ambion 社) を用いて cRNA を合成 (この段階ではビオチン化塩基は用いない) した (増幅 1 回目)。その cRNA を鋳型に random primer を用いて逆転写して cDNA を得、2 本鎖にし、T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社) を用い、ビオチン化 CTP, UTP 共存下 cRNA を合成、断片化した後、GeneChip へのハイブリダイゼーションに供した。

B-4: GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マ

ウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアならびに、シグナルネットワークの探索のための市販の Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を併用して解析した。

B-5: whole mount ISH

whole mount ISH は、当該 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、ジゴキシゲニンでラベルした 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、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色は BM purple でおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 野生型マウス胚の遺伝子発現経時データベースを用いた T 遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出:

胎生 6.25 から 9.75 日の無処置野生型マウス・全胚 RNA サンプルから得た遺伝子発現経時データベース (TIME POINT: 12 点) を用いて、T 遺伝子の発現変動を検討した。その結果 T 遺伝子は、胎生 6.75 日から急速に発現が

増加しはじめ、胎生 7.50 日でピークを示す一過性の発現パターンを示した。この結果を図 1 に示す。

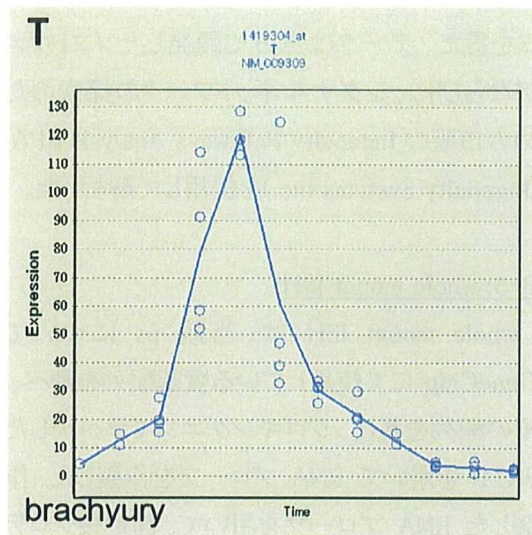
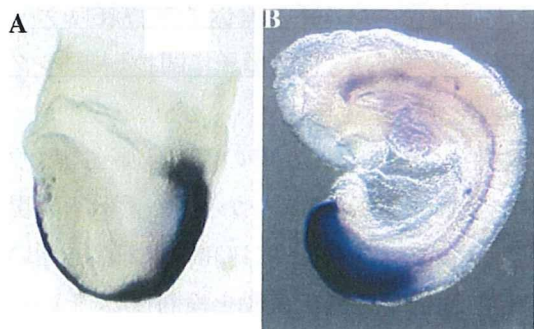


図 1 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける T 遺伝子の発現変動: グラフの線は各平均値を結び、点は各データの素点を表す(n=2~4)。縦軸は、発現コピー数、横軸は胎齢(各胎生 6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 日)を表す。

この T 遺伝子の胚における発現を whole mount ISH により可視化した。既に報告されている通り、原始線条、脊索および尾部に発現が認められた。胎生 7.75 日および 8.75 日胚を



用いた結果を図 2 に示す。

図 2 無処置野生型マウス・全胚における T 遺伝子の発現:

A: 胎生 7.75 日、B: 8.75 日

次いで、T 遺伝子に関わる局所シグナルネットワークを描出する目的で、当該遺伝子の発現が、図 1 で示したような T 遺伝子と似た経時変化を示す遺伝子の抽出をおこなった。標準化(normalize)した T 遺伝子の各時点の平均値の経時変化を基に、各遺伝子の経時変化についてピアソンの相関係数を求め α 値が高い順に並び替えた。この際、発現コピー数に制限を設けなかった。その結果 α 値が 1)0.85 以上の場合は、113 プローブセット(ps)、2)0.90 以上の場合は、32 ps、3)0.95 以上の場合は、6 ps、と求められた。T 遺伝子を最上段に据え、ピアソンの相関係数順に並べた図(ヒートカラーマップ)を図 3 に示す。

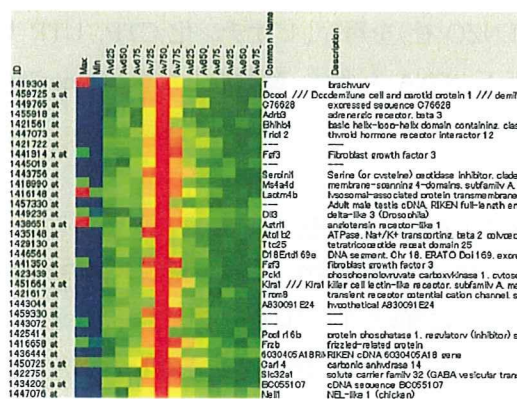


図 3 無処置野生型マウス・全胚における T 遺伝子発現の経時変化を基に、ピアソンの相関係数順に並べたもの。発現の高低を色で示した(ヒートカラーマップ)。発現が高いほど赤く、低いほど青い。

この α 値が0.85以上を示す遺伝子リスト(113 ps)について、主として標準偏差の大きさをもとに目視による経時変化の再検討をおこない、より生物学的な経時変化を示す遺伝子リストを作成した。その結果、37 psの遺伝子リストが得られた(T遺伝子を含まない)。この遺伝子リストについて、市販のIPAにより検索したところ、特定のシグナルネットワークは抽出されてこなかった。

そこで、この37 psについてPubMedによる遺伝子機能の検索をおこない、下記の3グループ、すなわちグループ a:T遺伝子との関連が既知の遺伝子、グループ b:(T遺伝子との関連は未知だが)原腸陥入(gastrulation)との関連が既知の遺伝子、およびグループ c:T遺伝子および原腸陥入との関連が未知な遺伝子、に分類した。重複するpsが存在したため遺伝子数としては31個であった。

グループ a: T遺伝子との関連が既知の遺伝子; Sp5 および Zic3、以上2遺伝子。

グループ b: 原腸陥入に関連が既知の遺伝子; Dll3、Agtr1 [ゼブラフィッシュ]、Frzb [カエル]、Msx2 [ウニ]、Trh、Cer1 および Lefty2、以上6遺伝子。

グループ c: T遺伝子および原腸陥入との関連が未知の遺伝子; Fgf3、Ms4a4d、Laptn4b、BG064897、Car14、Slc32a1、Dapk1、5033414K04Rik、Btla、Cps1、Cdc14b、Myom2、Slc13a4、EG436523、Sprr2a、Slco3a1、Dock11、F10、Josd3、0610040J01Rik、AW550831、Mns1 および Phlda2、以上23遺伝子。

したがって本抽出法により、グループ aである、T遺伝子と関連が既知のSp5 および Zic3 遺伝子は、実際、T遺伝子と関連する遺伝子として抽出できたこととなり、またグループ bのDll3、Agtr1、Frzb、Msx2、Trh、Cer1、Lefty2各遺伝子については、T遺伝子と関連する可能性が高い遺伝子と考えられた。

この遺伝子発現経時データベースは全胚を用いているため、胚における当該遺伝子発現の空間的局在が不明である。したがって当該遺伝子とT遺伝子の関連を検討するには、両者の発現部位の重なりを、whole mount ISHにより確認する必要があるものと考えられた。そこで、本31遺伝子の中から複数選択しISHを検討した。検討した遺伝子は、グループ aの全て(Sp5 および Zic3 遺伝子)、グループ bのAgtr1 以外の全て(Dll3, Frzb, Msx2, Trh, Cer1 および Lefty2 遺伝子)およびグループ cのひとつ(Fgf3 遺伝子)である。その結果、T遺伝子と似た発現局在を示した遺伝子は、Sp5, Zic3, Dll3, Frzb および Lefty2 遺伝子であることが明らかとなった。他方、Trh および Cer1 遺伝子は、原始線条部位とは反対の胚の前方に発現し、またMsx2 および Fgf3 遺伝子は、胚体外の部位に発現していた。Agtr1 を含むその他のISHについては今後検討する予定である。

したがって、マウス野生型胚の遺伝子発現経時データベースを用い、T遺伝子発現の経時変化を基としたピアソン相関係数の利用、およびISHによる発現部位の可視化を通し検討した結果、T遺伝子との関連が既知のSp5とZic3遺伝子だけでなく、T遺伝子との関連が未知のDll3、Frzb および Lefty2 遺伝子がT遺伝子と似た発現局在を示すことが明らかとなった。Zic3、Dll3、Trh および Fgf3 各遺伝子について

の胎生 7.5 日胚における ISH 解析結果を図 4 に示す。

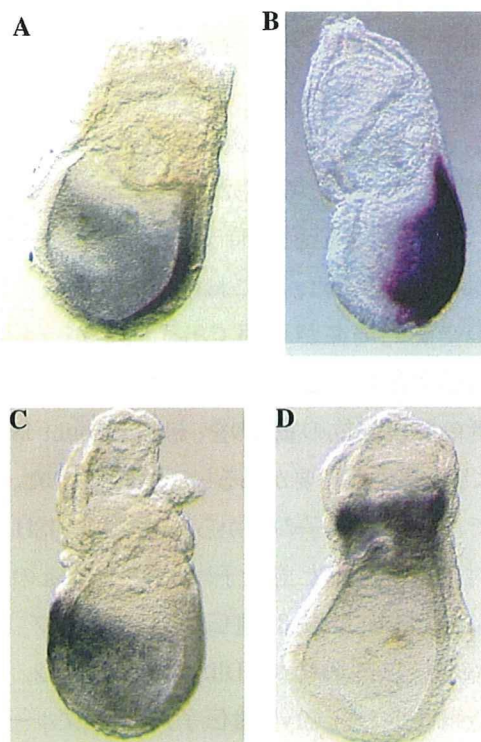


図 4 胎生 7.5 日胚を用いた ISH による、Zic3(A)、Dll3 (B)、Trh (C)および Fgf3 (D)各遺伝子の発現部位

Zic3 および Dll3 遺伝子は T 遺伝子と似た発現パターンを示すが、Trh 遺伝子は胚の前方、Fgf3 遺伝子は胚体外の部位に発現が認められた。

したがって、構築した経時データベースと ISH を組み合わせる本解析を通して、当該遺伝子ネットワークに関連する既知の遺伝子の抽出だけでなく、機能未知の遺伝子の探索を効率よくおこなえるものと考えられる。

C-2: マウス ES・EB 分化系の遺伝子発現変動の経時データベースを用いた T 遺伝子に関わる局所シグナルネットワークの描出:

無処置野生型 ES 細胞(TT2)を分化させ、EB

形成 0 から 7 日 (12 時間毎)の EB の RNA サンプルから得た遺伝子発現経時データベース [TIME POINT:14 点]を用いて、T 遺伝子の発現変動を検討した。その結果 T 遺伝子は、EB 形成 2.5 日から急速に発現が増加しはじめ、EB 形成 3.5 日でピークを示す一過性の発現パターンを示した。この結果を図 5 に示す。

なお ES 細胞の発生ステージについては、マウス ES 細胞は、胎生 3.5 日胚である胚盤胞内の内細胞塊(inner cell mass: ICM)由来と考えられるため、EB 形成 0 日が胎生 3.5 日相当と考えられる。

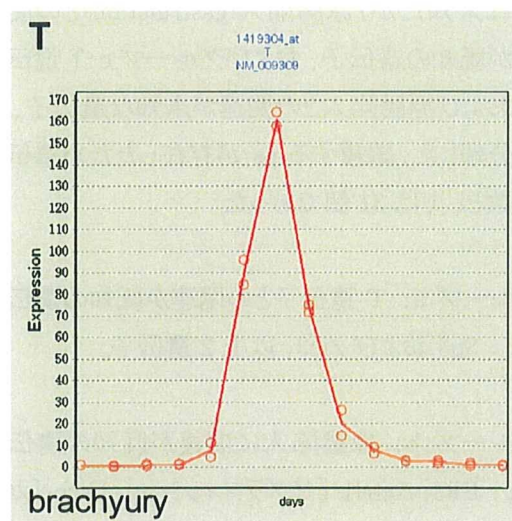


図 5 無処置野生型 ES 細胞を分化させ、得られた EB の遺伝子発現経時データベースにおける T 遺伝子の発現変動:

グラフの線は各平均値を結び、点は各データの素点を表す(n=2)。縦軸は、発現コピー数、横軸は EB 形成後の日数(0 から 7 日まで 12 時間毎)を表す。

次いで、T 遺伝子に関わる局所シグナルネットワークを描出する目的で、当該遺伝子の発現が、図 5 で示したような T 遺伝子と似た経時

るために、野生型胚の経時データベースを用いて発現変動を検討した。その結果、共通して存在した Sp5 は同様であったが、多くの遺伝子の野生型胚における発現変動は、T 遺伝子のもものと異なっていた。例えば Eomes (eomesodermin homolog) や Mixl1 (Mix1 homeobox-like 1) 遺伝子のように T 遺伝子よりも早期に発現増加が認められるものや Pcdh8 (protocadherin 8) 遺伝子のように、一過性ではなく持続的な発現増加が認められるものが存在した。例として、野生型胚における経時データベースでの、T、Sp5、Eomes および Pcdh8 遺伝子の発現変動を図 8 に示す。

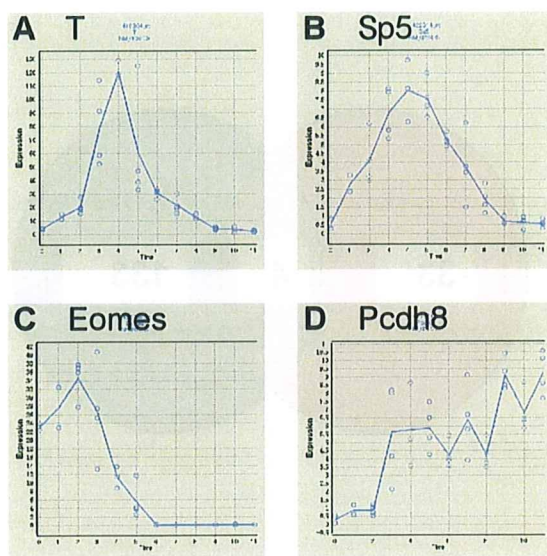


図 8 野生型胚における経時データベースでの、T (A)、Sp5 (B)、Eomes (C) および Pcdh8 (D) 遺伝子の発現変動

このことから、ES・EB 分化系における分化過程は、野生型胚における発生過程と、必ずしも一致しない可能性が考えられた。したがって ES・EB 分化系は、マウス胚の採取が困難な着床前後の胎生 4～6 日の代替となりうるため、

その遺伝子発現の経時データベースは有用であるが、そこから得られた結果については、野生型胚において再度検証する必要があるものとする。

C-3: ES・EB 分化系にレチノイン酸受容体 (RAR) 関連物質を適用することによる RAR に関する局所ネットワークの描出:

以上 C-1, C-2 での解析結果の通り、胚および ES・EB 分化系では、発生に関わる特定の遺伝子の発現が自律的に変動するため、化学物質を投与や適用をすることなく、当該遺伝子ネットワークを描出でき得る。ここでは、さらに当該遺伝子の発現を化学物質の適用により変動させ、この際に同様な発現変動が認められた遺伝子リストを抽出し、これと、非適用時の際の当該遺伝子に似た発現変動を示す遺伝子リストを比較することを目的とする。検討する分子として、核内受容体であり、そのアゴニスト・アンタゴニストが比較的豊富に知られているレチノイン酸受容体 (RAR) とした。化学物質として、汎 RAR アンタゴニストである合成レチノイド「AGN 193109」を選択した。現在、濃度設定等、実験実施を目指し検討中である。

D. 結論

本研究の目的は、毒性分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システムの実用化の最終段階としてのインフォマティクス技術を開発することである。今年度の本分担研究では、先行研究において取得・構築済みの、マウス野生型胚およびマウス ES・EB 分化系の遺伝子発現の経時データベースを利用し、脊索を含む中胚葉の形成と原腸陥入に関わる T 遺伝子に着目し、この局所シグナルネットワークの描出

を目的とし検討した。

野生型マウス胚の遺伝子発現経時データベースを用い、T 遺伝子発現の経時変化を基としたピアソン相関係数の利用および ISH による発現部位の可視化を通し検討した結果、計 37 プローブセット(ps)(遺伝子数としては 31 個)の遺伝子リストが得られた。このうち 9 遺伝子について whole mount ISH を検討した結果、T 遺伝子との関連が既知の Sp5 と Zic3 遺伝子だけでなく、T 遺伝子との関連が未知の Dll3、Frzb および Lefty2 遺伝子が T 遺伝子と似た発現局在を示した。したがって、構築した経時データベースと ISH を組み合わせる本解析を通して、当該遺伝子ネットワークに関連する既知の遺伝子の抽出だけでなく、機能未知の遺伝子の探索を効率よくおこなえるものと考えられた。

次いで、ES・EB 分化系における経時データベースを用い、T 遺伝子発現の経時変化を基としたピアソン相関係数の利用し検討した結果、計 137ps の遺伝子リストが得られた。このリストを、既述の野生型胚の経時データベースにより得た遺伝子リストと比較・検討した結果、両者でかなり異なり、この理由として、ES・EB 分化系における分化過程は、野生型胚における発生過程と、必ずしも一致しない可能性が考えられた。したがって、ES・EB 培養分化系は、マウス胚の採取が困難な着床前後の胎生 4~6 日の代替となりうるため、その遺伝子発現の経時データベースは有用であるが、そこから得られた結果については、野生型胚において再度検証する必要があるものとする。

このような結果を踏まえ、来年度は、ES・EB 分化系において、アンタゴニスト適用時の RAR 分子ネットワークを描出し、非適用時の自律的ネットワークと比較・検証する予定である。加えて、申請書での年次計画通りに、既に遺伝子

発現の経時データベースを豊富に有している成熟期マウス肝における、網羅的な概日ネットワークを描出する予定である。本分担研究により、実験動物を用いながら、人に於ける毒性作用を毒性発現の分子メカニズムに基づいて、より迅速、正確、詳細、且つ見落とし無く予測可能となることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1-1) 書籍

北嶋 聡

5.3 食品、食品添加物、食品汚染物質、飼料添加物

「新版トキシコロジー」編集委員：上野光一ら、朝倉書店、東京、2009 年 7 月

1-2) 雑誌

Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S and Kanno J,

Intrauterine environment-genome interaction and children's development (2): Brain structure impairment and behavioral disturbance induced in male mice offspring by a single intraperitoneal administration of domoic acid (DA) to their dams. J Toxicol Sci 34: SP279-SP286, 2009.

2. 学会発表

北嶋 聡、菅野 純

Percellome 手法を用いた発生毒性に関わる遺伝子発現変動解析 [第 49 回日本先天異常学会学術集会] 2009 年 6 月

北嶋 聡、菅野 純

Percellome Toxicogenomics Project toward

Informatics Stage for Predictive Toxicology
[the symposium of ICT-TIES 2009, the Joint Symposium of 5th International Conference on Toxicogenomics (ICT) and 2nd Toxicogenomics Integrated Environmental Science (TIES2009)] Plenary and Keynote Speaker (PLENARY LECTURE III) 2009年9月

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝秀、種村健太郎、小川幸男、関田清司
肝障害性薬剤による初期遺伝子発現応答の Percellome 解析 [薬学会第 129 年会] 2009年3月

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、小縣昭夫、北嶋 聡
多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発 [第 98 回日本病理学会総会] 2009年5月

種村健太郎、松上稔子、五十嵐 勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純
脳発生・発達期の神経シグナルかく乱による遅発性中枢影響解析: 幼若期雄マウスへのトリアゾラム投与による学習記憶障害について [第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会] 2009年7月

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio Ogata, Norio Ohashi, and Satoshi Kitajima
Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. [The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology

(ASIATOX V)] 2009年9月

高木篤也、北嶋 聡、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純
Percellome 手法によるマウス ES 細胞分化過程における遺伝子発現の経時データベースの構築と活用 [第 32 回日本分子生物学会年会]

2009年12月

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし