

200941019A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験
データ適用法の標準化に関する研究
(H21-化学-一般-003)

平成 21 年度 総括・分担報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験

データ適用法の標準化に関する研究

(H21-化学-一般-003)

平成 21 年度 総括・分担報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 22 (2010) 年 3 月

目次

I 総括研究報告書

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験データ適用法の標準化に関する研究

..... 1

研究代表者 東京大学 大迫 誠一郎

II 分担研究報告書

1. ヒト ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究

..... 7

国立環境研究所 曾根 秀子

2. ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究

..... 15

産業技術総合研究所 藤渕 航

3. ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究

..... 19

東京大学 大迫 誠一郎

III 研究成果の刊行一覧表

.....

IV 研究成果の刊行物・別刷り

.....

総括研究報告書

確率推論型アルゴリズムに対するヒト胚性幹細胞試験データ適用法の標準化に関する研究

研究代表者 大迫 誠一郎 東京大学 准教授

研究要旨

化学物質の安全性評価で重要な問題であるヒトへの生体影響を予測するシステムを開発するため、ヒト胚性幹細胞試験（EST）を利用、影響評価のためのデータ適応法の標準化に関する開発を行う。初年度はモデル化合物としてメチル水銀、TCDD、サリドマイドをヒトならびにマウス ES 細胞の神経系分化系に曝露し、その影響を比較検討した。メチル水銀の曝露実験結果より、開発した神経細胞分化系は発生という観点からヒトにおける特徴的影響を観察できるポテンシャルをもつことが実証された。また、評価法として導入するベイズ推定モデルも遺伝子発現変動とその結果である細胞表現型に予測性を持つことが提示できた。これら研究成果はヒトの感受性を評価するためにヒト ES を利用した本システムの有効性を示している。

共同研究者

サブテーマ 1: ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究

- 曾根秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター
- 永野麗子 国立環境研究所 環境リスク研究センター
- 赤沼宏美 国立環境研究所 環境リスク研究センター

サブテーマ 2: ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究

- 藤渕航 産業技術総合研究所 生命情報工学センター

サブテーマ 3: ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究

- 何小明 東京大学 疾患生命工学センター

A. 研究目的

ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）の再生医療技術への応用研究が進展し、随時大量に準備可能な ES 細胞から、各種細胞への分化培養系が確立されつつある。このような分化培養系は受精卵から胚、胎児を経て成熟個体

に至るまでの過程を再現しており、ヒトの発生影響試験の理想的モデルと言える。本研究では化学物質の安全性評価で重要な問題であるヒトへの生体影響を予測するシステムを開発するため、ヒト胚性幹細胞試験（EST）を利用する。マウス ES 細胞実験との比較検討とともに、取得する影響指標（遺伝子発現情報および形態情報）から数理工学理論に基づくバイオインフォマティクスを駆使し、ヒトへの影響レベルの予測を試みるが、そのために使用する確率推論アルゴリズムに適用するための実験系確立ならびにシステム標準化を実施する。最終的には、ヒト細胞への分化影響を類型化し、これを基に化学物質のヒトへの生体影響を予測するシステム構築を行う。

B. 研究方法

マウス ES 細胞で確立された神経細胞分化系を、ヒト ES 細胞にも適用し、化学物質 3 種（メチル水銀・サリドマイド・TCDD）を曝露、両 ES 細胞分化系から、細胞形態情報（IN Cell Analyzer 1000 解析（MAP2・GFAP ラベル）で神経突起長、分岐点数、交差点数を測定）、および遺伝子発現情報（神経細胞への分化誘

導前後の遺伝子変動プロファイルをマイクロアレイと qPCR 測定) を取得した。これら情報を基に「表現型構成要素間ネットワーク」形成を試みた。また、マイクロアレイによる遺伝子変動情報をもとに、化合物の影響をスコア化する手法の確立のため、独自開発のカーネルサポートベクターマシンの予測性の試験、ならびにカーネル正準相関解析による相関性予測の予備試験を実施した。

(倫理面への配慮)

共同研究機関である国立環境研究所は、2008 年 10 月 11 日付で文部科学省ヒト ES 細胞使用実験倫理審査委員会から研究実施が認可されている。また、研究代表者大迫も東京大学ライフサイエンス委員会倫理審査専門委員会で 2009 年 12 月機関承認、2010 年 1 月文部科学省より使用許可を得た。また、データ解析を行う産業技術総合研究所でもヒト由来試料実験倫理委員会で研究承認が得られた (2009 年 7 月 8 日付)。

C. 研究結果

サブテーマ 1： ES 細胞試験における形態情報のインフォマティクス利用に関する研究：ベイズ推定 (確率推論モデル：ソフトウェア TAOgen) で遺伝子発現レベルならびに最終表現型である神経細胞の形態変化の相互作用を数理的に予測し、その依存関係をネットワークモデル化した。「表現型構成要素間ネットワーク」における各ノード間ベータ値 (依存関係) のデータテーブル化した。このネットワークモデルにおいて、サリドマイドにも神経細胞分化影響があることが示唆された。また、TCDD およびサリドマイドによる神経軸索伸張に関する遺伝子ネットワークでは、TCDD で AhR 調節機構異常、サリドマイドでは軸索伸張の抑制作用が予測できるモデルを書くことができた。

サブテーマ 2： ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究：論文元に、化合物の構造式から共通に存在する構造パターンとアミノ酸配列を抽出した。カーネルサポートベクタ

ーマシンのよって、GPCR タンパク質と化合物の対応を予測した結果、GPCR と結合するテスト化合物は 93%、テスト GPCR が 97%と精度の高いデータを得ることに成功した。16 種類の抗がん剤を3種類のヒト細胞株に曝露した場合のマイクロアレイデータと KEGG パスウェイデータにおける相関関係を明らかにするために、カーネル正準相関解析を行った。その結果、carmustine を含む3つのニトロロ尿素系アルキル化剤である抗がん剤が Ascorbate and aldarate metabolism と Pentose and glucuronate interconversions の2つのパスウェイと高い正の相関関係を示した。

サブテーマ 3： ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究：メチル水銀は 10 nM からマウス胚様体 (EB) の生存率を低下させる作用を示したが、生存した神経細胞の dendrite 伸長には影響がなかった。一方、ヒト EB への生存率には影響がないものの、分化した神経細胞の dendrite 伸長には抑制的効果を示した。また、TCDD はヒトならびにマウス両分化系での 100 nM の高濃度においても分化レベルの影響は見られなかった。

D. 考察

サブテーマ 1： ES 細胞試験における形態情報のインフォマティクス利用に関する研究：ベイズ推定でネットワークモデル化した遺伝子発現と神経細胞の形態情報の依存関係「表現型構成要素間ネットワーク」において、サリドマイドにも神経細胞分化影響があることが示唆された。本研究で確立したヒトおよびマウス ES 細胞由来神経誘導系は、神経分化におけるサリドマイド感受性においてヒトとマウスにおいて種間差があることを明らかに出来る有用なモデル系であるといえる。

サブテーマ 2： ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究：化学物質の生体への影響予測のための基礎となる化学物質の構造やアミノ酸配列情報がどの程度有効であるか、またパスウェイ解析では非線形の要素が重要であることを明らかにした。

サブテーマ 3： ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究：メチル水銀によりマウスでは EB 生存率低下を、ヒトでは EB 生存率に影響はないものの分化神経細胞の dendrite 伸長抑制効果が観察できたことは、この物質のヒト神経細胞への特有の効果だと考えられる。マウスではこれまで、実験動物による胎生期メチル水銀曝露で神経系影響モデルを作ることが困難とされてきたが、これは神経細胞機能異常に先んじて細胞死が起きていた可能性がある。またヒトでは細胞死よりも神経系機能異常が生じるため胎生期影響が顕著に出るのではないかと考察できる。これらのデータはヒトの感受性を評価するためにヒト ES とマウス ES 細胞を利用した本システムの有効性を証明したものとと言える。また、TCDD は神経分化影響が重篤と予想されたが、ヒトならびにマウス両分化系での 100 nM の高濃度においても形態レベルでの影響は見られず、ダイオキシン類のヒトへの神経発達影響は少ないものと考察できる。

E. 結論

上記サブテーマ 1 およびサブテーマ 3 の結果より、本研究課題で開発した神経細胞分化系は、同一化合物であっても、発生という観点からヒトにおける特徴的影響を観察できるポテンシャルをもつことが実証された。また、評価法として導入するベイズ推定モデルも遺伝子発現変動とその結果である細胞表現型に予測性を持つことが提示できた。これら研究成果はヒトの感受性を評価するためにヒト ES とマウス ES 細胞を利用した本システムの有効性を如実に示している。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

大迫誠一郎：研究代表者

1. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, and Yonemoto J.

pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxicol Sci*, 35: 115-123, (2010).

2. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C, and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction*, 139, 427-437, (2010).
3. Ohsako S, Fukuzawa N, Ishimura R, Kawakami T, Wu Q, Nagano R, Zaha H, Sone H, Yonemoto J, and Tohyama C. Comparative contribution of the aryl hydrocarbon receptor gene to perinatal stage development and dioxin-induced toxicity between the urogenital complex and testis in the mouse. *Biol Reprod*, 82, 636-643, (2010).
4. Ishihara K, Ohsako S, Tasaka K, Harayama H, Miyake M, Warita K, Tanida T, Mitsuhashi T, Nanmori T, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, and Hoshi N. When does the sex ratio of offspring of the paternal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure decrease: In the spermatozoa stage or at fertilization? *Reprod Toxicol*, 29, 68-73, (2010).
5. 大迫誠一郎. プログラムされる“病”の新たな仮説—環境化学物質による代謝系遺伝子の次世代エピゲノム変化. *科学*, 79, 984-988, (2009).
6. Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, and Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacol*, 77, 660-669, (2009).
7. Kawakami T, Ito T, Ohsako S, Shiizakia K, Murakami Y, Hirowatarid K, Sato M, and Tohyama C. Possible Involvement of arylhydrocarbon receptor variants in TCDD-induced thymic atrophy and XRE-dependent transcriptional activity in Wistar Hannover GALAS rats. *J Toxicol Sci*, 34, 209-220, (2009).

8. Sone H, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Fukuda T, Ohsako S. Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In “The roles of free radicals in biology and medicine”, MEDIMOND SRL Publ., 45-52, (2009).

曾根秀子：研究分担者

1. Sone H, Akanuma H, Fukuda T. (2010) Oxygenomics and environmental stressor. *Redox Reports*, (in press).
2. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S., and Yonemoto J. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxcol Sci*, 35, 115-123, (2010).
3. Sone H, Fukuda T, Toyoshihara H, Yamanaka T, Perham F, Portier C. Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method. *The Open Cell Signaling Journal* 2, 1-12, (2010).
4. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate. *Reproduction*. 139: 427-437, (2010).
5. Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, Sone H. High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577:55-65, (2009).
6. Sone H., Imanishi S., Nagano R., Akanuma H., Fukuda T., Ohsako S. Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In: Biophys.Soc.China (BSC)ed. The Roles of Free radicals in Biology and

Medicine. Medimond S.r.l., 45-52, (2009).

藤淵航：研究分担者

1. Jean-François Pessiot, Hirokazu Chiba, Hiroto Hyakkoku, Takeaki Taniguchi, Wataru Fujibuchi PeakRegressor identifies composite sequence motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs, *PLoS ONE* (under revision).
2. Tochigi, H. et al. A sensitive and convenient yeast reporter assay for high-throughput analysis by using a secretory luciferase from *Cypridina noctiluca*. *Analytical Chemistry* (accepted).
3. Kinouchi, M., Miura, K., Mizoi, T., Ishida, K., Fujibuchi, W., Ando, T., Yazaki, N., Saito, K., Shiiba, K., and Sasaki, I. Infiltration of CD14 positive macrophages in the invasive front indicates a favorable prognosis of colorectal cancer with lymph node metastasis, *Hepato-gastroenterology* (accepted).
4. Kato, T. and Fujibuchi, W. Kernel Classification Methods for Cancer Microarray Data, *Medical Biostatistics for Complex Diseases*, pp. 279-303, Wiley-Blackwell, Germany, 2010.
5. 藤淵航. シミュレーテッドアニーリングによる多重プライマー配列デザイン法, シングルセル解析の最前線, pp. 265-73, シーエムシー出版, (2010).
6. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, and Yonemoto J. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxcol Sci*, 35, 115-23, (2010).
7. 幡野晶子、Harry Amri Moesa、千葉啓和、谷口丈晃、永家聖、山根木康嗣、藤淵航. 細胞分化解析を目指した網羅的ヒト細胞データベース「CELLPEDIA」、情報処理学会研究報告 2010-BIO-20, No.12, (2010).
8. 金蕙鈴、加藤毅、茂樺薫、田中博、藤淵航. 正則化正準相関解析を用いた抗がん剤の影響による共通

- パスウェイ解析, 情報処理学会研究報告 2010-BIO-20, No.9, (2010).
9. Jean-François Pessiot, Hirokazu Chiba, Hiroto Hyakkoku, Takeaki Taniguchi, Wataru Fujibuchi PeakRegressor identifies composite sequence motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs, *Proceedings of Critical Assessment of Massive Data Analysis 2009*, pp. 4-11, (2009).
10. Wataru Fujibuchi, Hirokazu Chiba, Hideo Akiyama, and Hitoshi Shiku Designing Pyro-Primer Sequences Using a Simulated Annealing Algorithm, to Critically Target mRNAs in Quantitative Cell Analysis, *Proceedings of the 6th International Forum on Post-genome Technologies*, pp. 253-7, (2009).
11. Hideaki Karasawa, Koh Miura, Wataru Fujibuchi, Kazuyuki Ishida, Naoyuki Kaneko, Makoto Kinouchi, Mitsunori Okabe, Toshinori Ando, Yukio Murata, Hiroyuki Sasaki, Kazuhiro Takami, Akihiro Yamamura, Chikashi Shibata and Iwao Sasaki Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells, *Cancer Sci.*, 100, 903-13, (2009).
12. 百石弘澄、杉原稔、諏訪牧子、加藤毅、山名早人、藤淵航. 2-way prediction 法による GPCR リカントの結合予測, 情報処理学会研究報告 2009-BIO-18, No.2, (2009).
13. Wataru Fujibuchi, Hyeryung Kim, Yoshifumi Okada, Takeaki Taniguchi, Hideko Sone, High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data, *Methods in Mol. Biol. 577: Reverse Chemical Genetics*, pp. 55-65, Humana Press, U.S.A., (2009).
1. 曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西聡、赤沼宏美、宮崎航. 「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」. 特願 2009-81497(識別番号 100078662) (2009)
2. 大迫誠一郎、栗田尚佳. 「CpG メチル化頻度の変動をゲノムワイドに比較解析するための DNA 試料作成方法」. 米国仮出願（出願番号: 61/309971）(2010)
3. 藤淵航、千葉啓和. 「プライマーセット探索装置、プライマーセット探索方法およびプログラム」. 特願 2009-212703、(2009)

2. 学会発表

各研究分担報告書に記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担研究報告書

ヒト ES 細胞実験における神経分化細胞のフェノタイプネットワーク解析の研究

研究分担者 曾根秀子 国立環境研究所 主任研究員

研究要旨

サリドマイドの胎児期暴露後の神経分化に対するヒトとマウスの形態(フェノタイプネットワーク)上の種間差を MulCEH を元に検証を行った。その結果、ヒトとマウスでは明らかにサリドマイドの影響が異なるフェノタイプネットワークを構築した。したがって、ヒトおよびマウス ES 細胞由来の神経誘導系と MulCEH による検証手法は、将来的に環境化学物質の神経毒性影響における種間差を検出する有効な系であると考えられた。

A. 研究目的

胎児性毒性の一つとしてサリドマイド(α -Phthal-imido-glutarimide)は、以前より催奇形性を示す化合物として報告され、ヒトと実験動物の感受性の差が安全性評価の上で大きな問題となった。しかし、近年になって、サリドマイドは国内では骨髄異形成症候群の治療薬として認可され、海外ではハンセン病の鎮痛剤、HIV ウイルスの増殖抑制剤として使用されている。これまでに、マウス、サル、およびヒトの ES 細胞を使用した化学物質の曝露試験は、ビスフェノール A、カドミウム、ヒ素、およびメチル水銀で行われており、ECVAM においても EST (embryonic stem cells test) の毒性評価モデルを確立している。しかし、その主たるアッセイ系は胚葉体形成時期 (EB, embryoid body) や心筋の評価モデル系が殆どであり、胎児期における化学物質が、その後の神経形成に影響を与える晩発影響や種間差を検証するモデル系は未だ確立されていない。

本研究では、胎児性毒性であるサリドマイドを使用し、既に、我々が開発した化学物質の胎児期暴露後における神経分化の毒性影響評価系が、マウスおよびヒト ES 細胞由来神経分化において種間差を明らかにする事が可能であるか検証を行った。

B. 研究方法

手法として、我々が開発した胎児期における化学物質

曝露評価系と MulCHE を使用し、種間差の検出系として応用可能であるか検証を以下のように行った。

本研究で使用したヒト胚性幹細胞株 (hES 細胞: human Embryonic stem cells) は、京大再生医科学研究所幹細胞センターから提供された KhES-3 株 (♂) を使用した。マウス ES 細胞株は、理研 BRC から購入した B6G-2 株 (♂) を導入した。サリドマイド (100nM, 10 μ M) は、マウス ES 細胞については EB 形成直後 (Day0) から 2 日間、ヒト ES 細胞曝露評価系については EB 形成後 (Day 8) から 4 日間行った (図 1)。マルチチャンネル画像解析装置 (IN Cell アナライザー1000, GE ヘルスケア・ジャパン) によるニューロスフィアや MAP2 ニューロンの形態解析については、マウスは神経誘導後 12 日目 (Day20)、ヒトは神経誘導後 32 日目 (Day46) に行った。解析に使用した 10 種類のパラメーターは、ニューロスフィアの面積 (Area)、真円率 (Form factor)、円周 (Perimeter)、数 (Count)、細胞の数 (Nuc count)、核の面積 (Nuc area)、MAP2 陽性面積 (MAP2 positive area)、MAP2 陽性に対する神経突起の総伸長 (Neurite length)、分岐点の総数 (Branch point)、および交差点 (Crossing point) の総数とした。更に、形態数値情報を元にベイジアンネットワークを基盤としたソフトウェア MulCEH によって、ヒトおよびマウスにおけるサリドマイド曝露後の神経分化におけるフェノタイプネットワーク構造の違いを比較した。

（倫理面への配慮）

ヒトES細胞の培養操作は、文部科学省の「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」および国立環境研究所の医学研究倫理審査委員会の「国立環境研究所ヒトES細胞使用研究倫理規定」に基づいて行われた。

C. 研究結果

1) 形態的解析

図2は、サリドマイドをEB形成直後に曝露後の46日目（ヒト）と20日目（マウス）のニューロンの形態を示したものである。ヒトについては、コントロールと比較して100nMサリドマイド曝露群は、ニューロスフィアから伸張するMAP2陽性ニューロンが抑制される形態の様子を示した（図2A、図2B、および図2C）。一方、マウスにおいては、100 μ Mおよび10 μ Mのサリドマイド曝露群についてはMAP2陽性ニューロンの伸張は抑制された（図2D、図2E、図2F）。

次に、IN Cell アナライザー1000によってウェルあたりの総MAP2陽性突起長の比較検討を行った。ヒトの場合は、100nMのサリドマイド曝露群は抑制された（ $p < 0.001$ 、図3A）。マウスの場合は、両曝露群において著しく抑制された（図3C）。ウェルあたりのニューロスフィアから遊走する全細胞数については、ヒトの場合は、両曝露群において細胞増殖は減少した（図3B）。マウスの場合は、100nMサリドマイド曝露群は、細胞増殖が誘導された（図3D）。

2) フェノタイプネットワーク解析

MulCEHによる形態ネットワーク解析により、グラフでは表すことが出来なかった各形態パラメーター間の相関関係を読み取る事が可能となったことを以下の様に示した。

(a) マウスの20日目の神経形態ネットワーク（図4A）

コントロール群については、神経突起伸長とMAP2陽性面積のパラメーターがそれぞれ独立して、各パラメーターを支配している。また、神経突起が分岐点や交差点を促進する（赤い矢印）ことから、神経突起を正常に伸長させることにより分岐点や交差点の数も増加することをネットワーク図で示している（図4A）。100nMサリドマイド曝露は、神経形成のパラメーター（総神経突起長、総分岐点

数、総交差点数）は、ニューロスフィア形成のパラメーター群によって抑制的な支配（青い矢印）を受けている事が示された（核の総数、核の総面積、円周、真円率、総面積、数）。したがって、交差点形成を抑制されるが、分岐点からの短い神経突起の形成が予想された。10 μ Mサリドマイド曝露は、コントロール群と類似したネットワークパターンではあるが、陽性総面積（Positive area）が核の面積や交差点のパラメーターによって抑制されているため、神経細胞の伸張が抑制されているか、ニューロスフィアや分岐点から伸長する神経突起の数が少ないことが予測された。

(b) ヒトの46日目の神経形態ネットワーク（図4B）

ヒト神経分化パターンは、コントロール群と10 μ Mサリドマイド曝露において類似の特徴を示した。すなわち、全細胞数（Nuc_count）から総神経突起長（Neurite length）へ促進的な矢印を伸ばし、分岐点総数（Branch_point）へ促進的な矢印を示した。更に、全細胞数（Nuc_count）からMAP2陽性総面積（Posi_Area）へ抑制的な矢印を伸ばした。全細胞の総面積（Nuc_Area）は、総神経突起長（Neurite length）へ抑制的な矢印を示した。したがって、総神経突起長、細胞数、分岐点の各ノード間に共通の依存関係があることから、類似の神経形成パターンを示す事が示唆された。一方で、100nMサリドマイド曝露の形態ネットワークパターンは、コントロール群と10 μ Mサリドマイド曝露とは異なる様式を示した。すなわち、全細胞数の面積（Nuc_area）が8種類のノードを支配しているネットワークを構築した。全細胞数の面積（Nuc_area）は、総神経突起長（Neurite length）を抑制するが、総神経突起長（Neurite length）は分岐点の総数（Branch_point）を促進的し、交差点の総数（Crossing_point）へ促進することを示した。このことから、100nMサリドマイドは、総神経突起長（＝神経突起の総本数）は減らすものの、分岐点や交差点は増やすことが予測できた。100nMサリドマイド群の形態ネットワークが、コントロール群と10 μ Mサリドマイド曝露と異なる点は、神経形成に関与するネットワークが、ニューロスフィアを示すノード群に支配を受けている点である。このことは、100nMのサリドマイドがニューロスフィアへの

分化に影響を及ぼし、その結果として神経分化に影響を及ぼすことが示唆された。

D. 考察

本研究は、胎児期のサリドマイド曝露後におけるマウスとヒトの毒性影響の差を、マルチチャンネル画像解析装置による網羅的解析を元に、MulCEH によってフェノタイプネットワークを構築し種間差を明らかにした。

E. 結論

サリドマイドに対するヒトとマウスの種間差を、神経分化フェノタイプネットワークによって明確にする事が出来た。ヒトおよびマウス ES 細胞由来の神経誘導系と MulCEH による検証は、将来的に環境化学物質の毒性影響における種間差を検出する有効な系であるといえる。

F. 健康危険情報

特に記載する項目はない

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sone H, Akanuma H, Fukuda T. (2010) Oxygenomics and environmental stressor. Redox Reports. *In press*.
2. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S., and Yonemoto J. (2010) pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxcol Sci.* 35: 115-123.
3. Sone H, Fukuda T, Toyoshiba H, Yamanaka T, Perham F, Portier C. (2010) Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method. *The Open Cell Signaling Journal* 2: 1-12.
4. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C and

Kurohmaru M. (2010) Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate. *Reproduction.* 139: 427-437.

5. Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, Sone H. (2009) High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577:55-65.
6. Sone H., Imanishi S., Nagano R., Akanuma H., Fukuda T., Ohsako S. (2009) Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In: *Biophys.Soc.China (BSC)ed. The Roles of Free radicals in Biology and Medicine.* Medimond S.r.l., 45-52 (書籍).

2. 学会発表

1. Miyazaki W, Nagano R, Sone H, Tohyama C, Ohsako S: Dioxin 2009 (北京) ”The effect of Dioxin and OH-PCB on neural differentiation from mouse ES cells”
2. Nagano R, Akanuma H, Koikegami S, Imanishi S, Miyazaki W, Okura M, Zaha H, Ohsako S, and Sone H: 第32回日本神経科学大会 (2009) ”Development of an image profiling system to evaluate for the effects of chemicals in neural differentiation from mES cells”
3. Nagano R, Akanuma H, Koikegami S, Imanishi S, Miyazaki W, Okura M, Zaha H, Ohsako S, and Sone H: CDBIM Symposium. 21st Century advances in the molecular toxicology of environmental chemicals and pathogenesis of disease. (2009) ”Development of an image profiling system to evaluate for the effects of thalidomide and permethrin in neural differentiation from mouse embryonic stem (ES) cells”
4. Miyazaki W, Nagano R, Sone H, Tohyama C, Ohsako S. CDBIM Symposium. 21st Century advances in the molecular toxicology of environmental chemicals and pathogenesis of disease. (2009) . “Effect of Dioxin

and OH-PCB on neural differentiation from mouse ES cells”

5. 永野麗子、小池上 繁、今西 哲、赤沼宏美、宮崎航、大迫誠一郎、座波ひろ子、黄倉雅広、曾根秀子：環境ホルモン学会第12回研究発表会（2009）「マウスES細胞を用いた神経形成におけるサリドマイドとペルメトリンの影響評価」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西 聡、赤沼宏美、宮崎 航。「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」特願 2009-81497, (2009).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

本研究は、永野麗子（独立行政法人国立環境研究所，NIES ポスドクフェロー）及び赤沼広美（独立行政法人国立環境研究所，NIES リサーチアシスタントフェロー）が共同研究者として参加した。

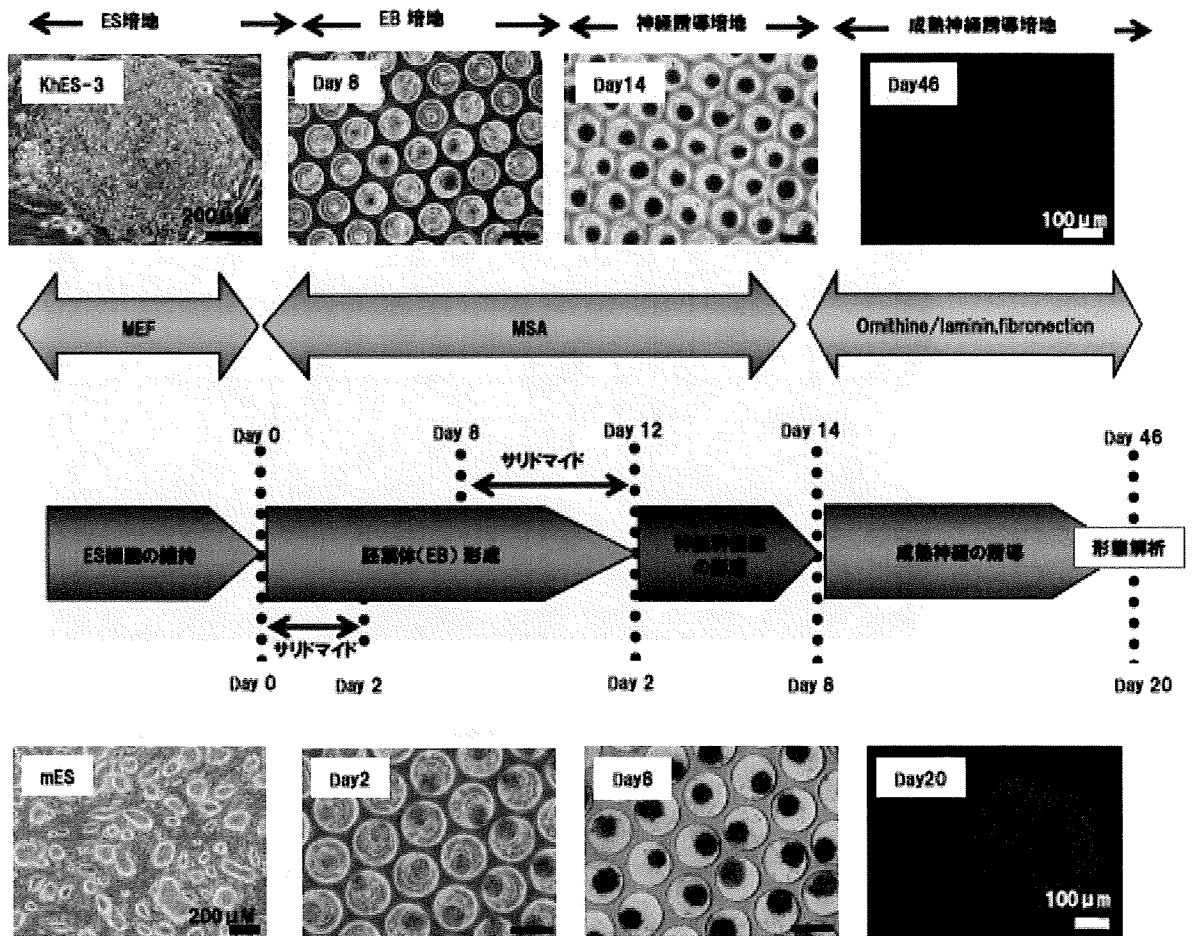


図1 胎児期プログラミングを模倣した3次元培養法によるヒトおよびマウスES細胞の神経誘導とサリドマイドの曝露スケジュール
mES:マウスES細胞の神経誘導系; KhES-3:ヒトES細胞の神経誘導系。

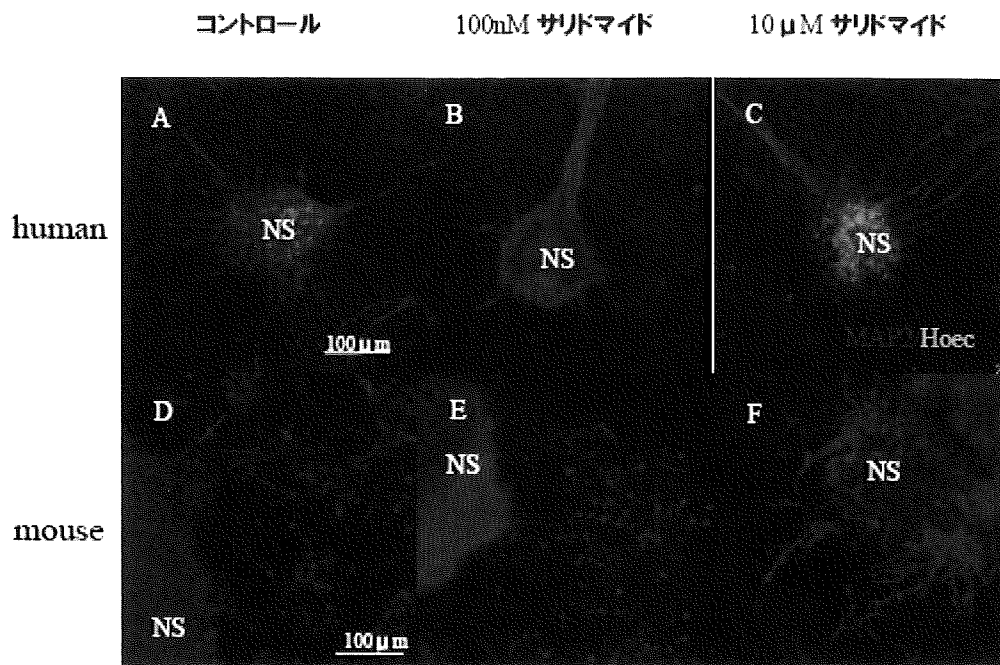


図2 分化した神経系細胞（ヒトDay46(A, B, C)、マウスDay20(D, E, F)）の免疫染色像
A, D, 対照群；B, E, 100nM サリドマイド曝露群；C, F, 10µMサリドマイド曝露群。
MAP2免疫染色像。NS=ニューロスフィア

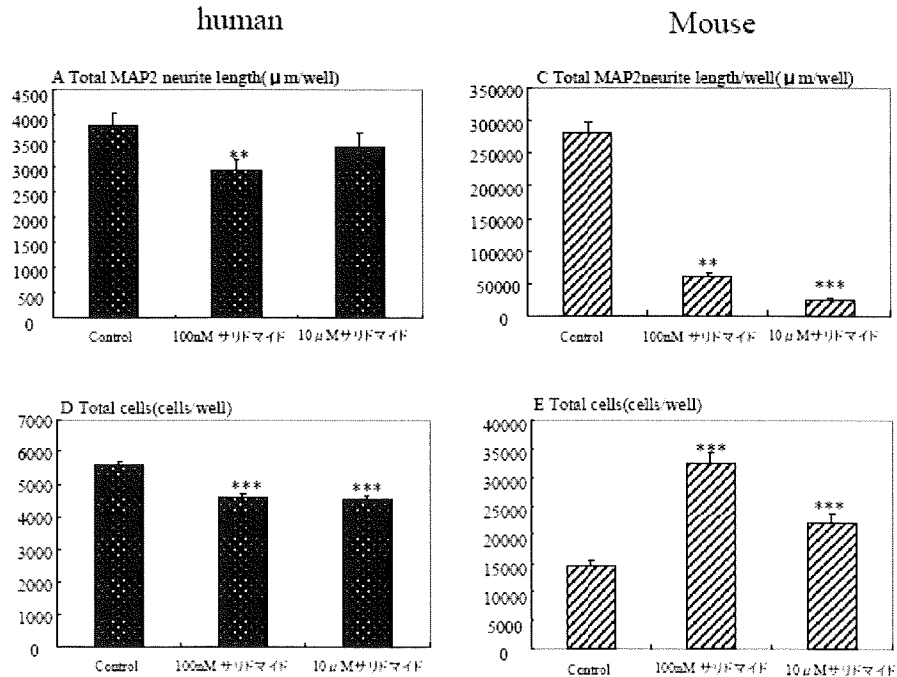
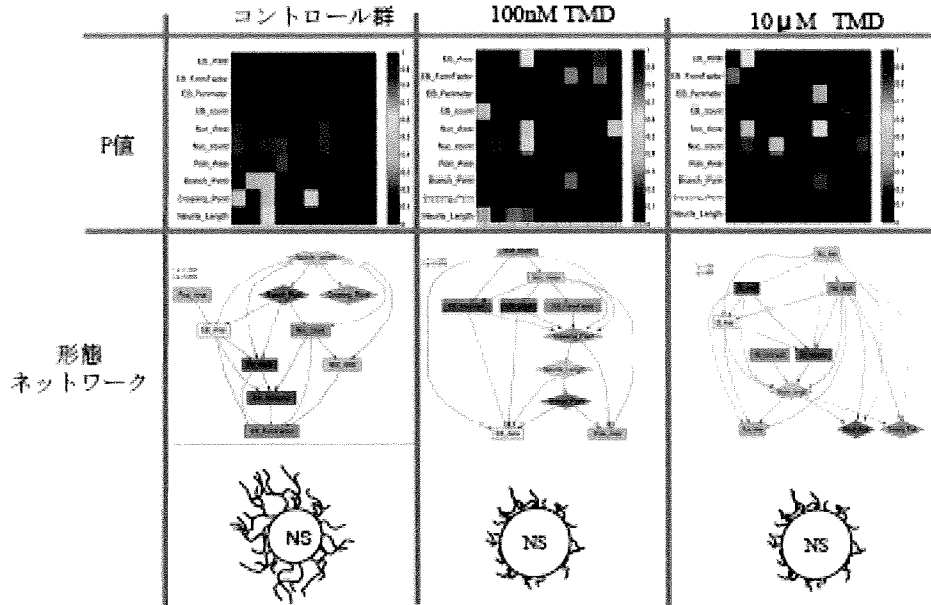


図3 分化した神経系細胞（ヒト Day46、マウスDay20）の形態計測結果
A, C, ウェルあたりの総MAP2陽性突起長；D, E, ウェルあたりの総細胞数
対照群との有意差：*** p<0.001, **p<0.005

A. mouse



B. human

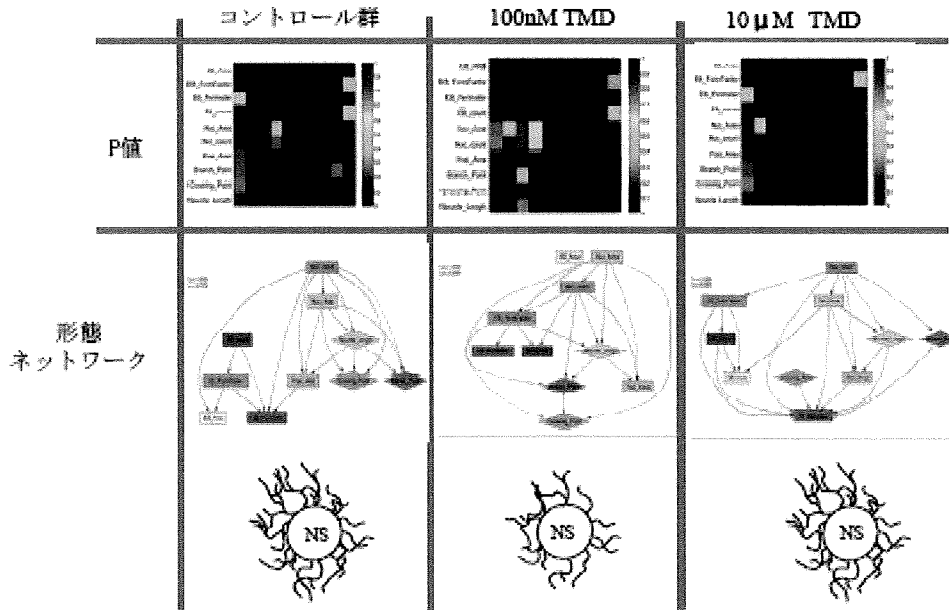


図4. 分化した神経系細胞（ヒトDay46、マウスDay20）の各形態情報間の相互関係の確率推論アルゴリズム（ベイジアンネットワークモデル）に基づくネットワーク解析結果

ES 細胞試験における遺伝子発現情報の整備ならびに影響スコアリングに関する研究

研究分担者 藤渕 航 独立行政法人産業技術総合研究所 研究チーム長

研究要旨

計算機を用いて化合物の生体への影響を予測する際に重要となる手法を開発した。1つは、化合物やタンパク質の構造を特徴とするサポートベクターマシンを用いて、反応が全く未知の組み合わせのリセプターと結合する化合物を 72%もの高い精度で予測する手法を開発した。2つ目は、異なる種類のデータ間の関係性を解析するのに非線形空間へのマップを行うカーネル正準相関解析法を利用して、従来の線形法では不可能であった抗癌剤に反応する遺伝子発現データと KEGG 代謝パスウェイ間の相関を求める手法を開発した。

A. 研究目的

本研究では生体のへ影響が類型化された毒性の高い化学物質をヒト ES 細胞に曝露する実験を他の研究分担者が行い、これにより攪乱される遺伝子の発現量と、形態測定値データを測定することになっている。並行して我々は、このデータを元に細胞内で重要な遺伝子ネットワークを推定する方法を開発する。さらに推定されたネットワークを元にサポートベクターマシン等の機械学習による判別分析を高精度で行う。最終的には新規化合物の毒性を評価するためのインフォマティクスの手法を開発する。

B. 研究方法

1) 化合物やタンパク質の構造を特徴とするサポートベクターマシンの開発

化合物の生体への影響は基本的にはその化合物の構造式に情報が含まれていると考えられる。これらの化合物の生体でのターゲットが予測できれば毒性予測には大きな手がかりとなることが予想される。例としてヒトの細胞膜に存在する代表的なリセプターである GPCR タンパク質とそれが認識する化合物間の組み合わせを予測する方法の開発を行った。

2) カーネル正準相関解析を利用した化合物の生体ネットワークへの影響パターンの解析法の開発

本研究では遺伝子発現データ(遺伝子名×化学物質

名)、遺伝子ネットワーク(遺伝子名×パスウェイ名)、形態データ(形態特徴名×化学物質名)など行列データを取り扱うことが多い。行列間での関係を解析する時に用いられるカーネル正準相関解析を本研究に応用できないかを検討するため、例として抗癌剤のパスウェイへの影響解析を行った。

(倫理面への配慮)

今回の報告に使用したデータは全て一般に公開されているデータのみであり、倫理面への問題はない。

C. 研究結果

1) 化合物やタンパク質の構造を特徴とするサポートベクターマシンの開発

論文から GPCR タンパク質と結合する化合物を抽出しまとめた対応表を作成した。化合物の構造式から共通に存在する構造パターンを全て抜き出した。また、GPCR タンパク質からリガンド結合部位のアミノ酸配列をアライメントし、重要な 10~20 残基長を抜き出した。この構造パターンおよびアミノ酸配列を特徴として、GPCR と化合物の対応をカーネルサポートベクターマシンで予測した。その結果、同じ GPCR に結合する化合物や同じ化合物に結合する GPCR がある程度わかっているデータで学習させた場合に GPCR と結合するテスト化合物は 93%、テスト GPCR は 97%もの高い精度が得られた。

さらに、結合する化合物もGPCRも全く例がないデータで学習させた場合でも72%の精度が得られた。

2) カーネル正準相関解析を利用した化合物の生体ネットワークへの影響パターンの解析法の開発

16種類の抗癌剤を3種のヒト細胞株に濃度を変えて暴露した場合のマイクロアレイデータ66枚とKEGGにあるヒトの遺伝子を含むパスウェイデータ197枚全てを用いてその相関をカーネル正準相関解析を行った。その結果、線形カーネルでは低い相関しか得られなかった。非線形カーネルとしてRBFカーネルを用いると $r=0.98$ と高い相関が得られたため、これを詳細に解析した。

その結果、carmustineを含む3つのニトロソ尿素系アルキル化剤である抗癌剤が Ascorbate and aldarate metabolism と Pentose and glucuronate interconversions の2つのパスウェイと高い正の相関を示した。

D. 考察

化学構造式やアミノ酸配列を入力としたカーネルサポートベクターマシン法は高性能に分子間相互作用を見つけることができる結果が得られた。また、これまでGPCRや結合化合物の例が両方とも知られていないデータに対しても72%の精度が得られたことは、本研究においても未知の環境化学物質の影響予測を考える上で大変興味深い。

カーネル正準相関解析で従来法である線形法では低い相関しか得られなかった。これは、遺伝子の発現とパスウェイは単純な解析では求められず、遺伝子の組が非線形の相乗効果や隠れ因子の効果を含んでいることが示唆された。

E. 結論

化学物質の生体への影響予測のための基礎となる化学物質の構造やアミノ酸配列情報がどの程度有効であるかの知見が得られた。また、パスウェイ解析では非線形の要素が重要であることも認識された。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jean-François Pessiot, Hirokazu Chiba, Hiroto Hyakkoku, Takeaki Taniguchi, Wataru Fujibuchi. PeakRegressor identifies composite sequence motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs, *PLoS ONE* (under revision).
2. Tochigi, H. et al. A sensitive and convenient yeast reporter assay for high-throughput analysis by using a secretory luciferase from *Cypridina noctiluca*. *Analytical Chemistry* (accepted).
3. Kinouchi, M., Miura, K., Mizoi, T., Ishida, K., Fujibuchi, W., Ando, T., Yazaki, N., Saito, K., Shiiba, K., and Sasaki, I. Infiltration of CD14 positive macrophages in the invasive front indicates a favorable prognosis of colorectal cancer with lymph node metastasis, *Hepato-gastroenterology* (accepted).
4. Kato, T. and Fujibuchi, W. Kernel Classification Methods for Cancer Microarray Data, *Medical Biostatistics for Complex Diseases*, pp. 279-303, Wiley-Blackwell, Germany, 2010.
5. 藤渕航. シミュレーテッドアニーリングによる多重プライマー配列デザイン法, シングルセル解析の最前線, pp. 265-73, シーエムシー出版, 2010.
6. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, and Yonemoto J. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxicol Sci*, 35, 115-23, 2010
7. 幡野晶子, Harry Amri Moesa, 千葉啓和, 谷口丈晃, 永家聖, 山根木康嗣, 藤渕航. 細胞分化解析を目指した網羅的ヒト細胞データベース「CELLPEDIA」, 情報処理学会研究報告 2010-BIO-20, No.12, 2010.
8. 金蕙鈴, 加藤毅, 茂榎薫, 田中博, 藤渕航. 正則化正準相関解析を用いた抗がん剤の影響による共通

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
研究分担報告書

- パスウェイ解析，情報処理学会研究報告 2010-BIO-20, No.9, 2010.
9. Jean-François Pessiot, Hirokazu Chiba, Hiroto Hyakkoku, Takeaki Taniguchi, Wataru Fujibuchi PeakRegressor identifies composite sequence motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs, *Proceedings of Critical Assessment of Massive Data Analysis 2009*, pp. 4-11, 2009.
 10. Wataru Fujibuchi, Hirokazu Chiba, Hideo Akiyama, and Hitoshi Shiku Designing Pyro-Primer Sequences Using a Simulated Annealing Algorithm, to Critically Target mRNAs in Quantitative Cell Analysis, *Proceedings of the 6th International Forum on Post-genome Technologies*, pp. 253-7, 2009.
 11. Hideaki Karasawa, Koh Miura, Wataru Fujibuchi, Kazuyuki Ishida, Naoyuki Kaneko, Makoto Kinouchi, Mitsunori Okabe, Toshinori Ando, Yukio Murata, Hiroyuki Sasaki, Kazuhiro Takami, Akihiro Yamamura, Chikashi Shibata and Iwao Sasaki Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells, *Cancer Sci.*, 100, 903-13, 2009.
 12. 百石弘澄、杉原稔、諏訪牧子、加藤毅、山名早人、藤渕航. 2-way prediction 法による GPCR リカントの結合予測，情報処理学会研究報告 2009-BIO-18, No.2, 2009.
 13. Wataru Fujibuchi, Hyeryung Kim, Yoshifumi Okada, Takeaki Taniguchi, Hideko Sone, High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data, *Methods in Mol. Biol. 577: Reverse Chemical Genetics*, pp. 55-65, Humana Press, U.S.A., 2009.
2. Taku Tanaka, Hirokazu Chiba, Wataru Fujibuchi, Masato Miyake, Adipogenesis Induced by Short Interference RNAs Predicted by Informatics, Cold Sprint Harbor Laboratory Meeting-Systems Biology, NY, U.S.A., Mar. 2010.
 3. 藤渕航. 生命情報工学の医学への応用. 第 9 回重粒子医科学センターシンポジウム「先端科学と社会の接点」、静岡(2009)12月
 4. Wataru Fujibuchi, Hirokazu Chiba, Hideo Akiyama, and Hitoshi Shiku Designing Pyro-Primer Sequences Using a Simulated Annealing Algorithm, to Critically Target mRNAs in Quantitative Cell Analysis, 6th International Forum on Post-genome Technologies, Beijing, China, Sep. 2009.
 5. 藤渕航. 産総研の細胞形態・遺伝子発現情報 統合データベースの紹介. 国際バイオ EXPO、東京(2009)7月
 6. 千葉啓和、幡野晶子、永家聖、山根木康嗣、Larisa Kiseleva、谷口丈晃、Paul Horton、藤渕航. CELLPEDIA/CellMontage 細胞統合解析データベース、「データベースが拓くこれからのライフサイエンス」、東京大学(2009)6月

2. 学会発表

1. Hirokazu Chiba, Taku Tanaka, Masato Miyake, Wataru Fujibuchi, A Method for Optimizing Gene Combination to Induce Adipocyte Differentiation from Mesenchymal Stem Cells, Cold Sprint Harbor Laboratory Meeting-Systems

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

藤渕 航、千葉 啓和、プライマーセット探索装置、プライマーセット探索方法およびプログラム、特願 2009-212703、2009/09/15.

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し