

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 生命情報工学センター研究 チーム長

研究要旨

計算機を用いて多数ある化合物の生体への影響を一度に予測する新しい手法を開発した。これまでの機械学習では、サポートベクターマシンの様なある特定の1種類の毒物に対して正誤判定が主流であったが、我々は様々な毒性を一度に線形空間で学習する基礎的な手法である PARCA (PAirwise Ranking Component Analysis) を開発した。この手法を用いることで、i) 新しい化学物質が毒性の観点から、これまで知られているどの毒物に近いかをランキングで表示できるとともに、ii) 毒物間の関係が空間中に視覚化できる効果が期待できる。

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的手法を開発する。

B. 研究方法

1) Pairwise Ranking Component Analysis 法の開発

機械学習により、正確に質問データと類似した細胞をデータベースと比較してランキングする手法である PARCA を考案した。本手法では、線形空間でランキングエラーを最小化する目的関数を持つ。さらに非負値の重みを持ち、過学習に対する抑制パラメーターを持つ logistic PARCA も開発した。

2) 大規模遺伝子ネットワーク探索法の開発

遺伝子の数や実験データの数が増大すると、ベイジアンネットワークの推定は事後確率分布に基づくため、推定が困難になることが知られている。そこで、遺伝子モジュールを初期値として探索空間を効率よく探す手法を開発した。本手法は今後、公開が見込まれている毒性試験のマイクロアレイなどの大量遺伝子発現データにも応用できる画期的な手法である。

(倫理面への配慮)

産総研ではヒト由来試料倫理委員会を通してその倫理面の審査を行っている。共同研究者から得られた遺伝子発現データは全てこの倫理委員会で承認されたものであり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1) Pairwise Ranking Component Analysis 法の開発

PARCA を用いて、ES 細胞、iPS 細胞、癌細胞のデータを類似検索させたところ、検索ランキング間違いのエラー率がわずか6%という、既存の手法に

比べて最も良い精度が得られた（論文5）。今後は、これを毒性予測に応用できる見込みが得られたとともに、線形手法のため、空間中に毒物間の関係が視覚化できることが期待できることが見込まれた（論文6）。

2) 大規模遺伝子ネットワーク探索法の開発

昨年度から国立環境研究所と共同開発してきたレプリカ交換法ベイジアンネットワーク推定プログラム RX-TAOgen を完成させ、インターネット上から利用できるようにした。また、産業技術総合研究所で開発された遺伝子モジュール探索プログラム SAMURAI を用いて 100-200 遺伝子のマイクロアレイデータに対して遺伝子モジュールを網羅探索し、このモジュールを出発点として、RX-TAOgen を用いると従来よりも高速に遺伝子ネットワークを推定することができた（発表5）。

D. 考察

当初はSVMによる特定の毒性を持つかどうかの二値予測のみを考えていたが、複数の毒性を持つことも考えられるため、類似毒性のランキングを用いるデータマイニングの手法を導入した。これは現実の問題をより良く反映しており、神経毒でありかつ発癌性がある化合物などに対して計算機が示唆を与えるものとして重要であると考えられる。また、今回の報告書には載せていない予備研究データとして、実際に遺伝子ネットワークを用いた SVM 予測を行ったところ十分な予測精度が得られそうな結果が得られた。

E. 結論

研究は概ね計画通りに遂行できている。高性能で大規模遺伝子ネットワーク推定法が開発でき、毒性予測をするアルゴリズムも揃ってきた。最終年度は全体を統合して予測するシステムを開発し、公開したいと考えている。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jean-Francois 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*, 5(8):1-8, 2010.
2. Edward Wijaya, Jean-Francois Pessiot, Martin Frith, Wataru Fujibuchi, Kiyoshi Asai and Paul Horton, In Search of True Reads: A Classification Approach to Next Generation Sequencing Data Selection, in *Proc. 2010 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM) Next Generation Sequencing Workshop*, 561-566, 2010.
3. Miura K., Kinouchi M., Ishida K., Fujibuchi W., Naitoh T., Ogawa H., Ando T., Yazaki N., Watanabe K., Haneda S., Shibata C., and Sasaki I. Cell Death and Cancer (Edited by Prof. Samali A) 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs, *Cancers Special Issue*, 2, 1717-1730, (2010).
4. 千葉啓和、藤渕航「細胞情報解析に役立つツール—幹細胞研究の進展とその創薬応用に向けて」、*実験医学* Vol.28(19)(12月号)2010.
5. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Learning similarity functions for multi-platform microarray data, *SIG-BIO*, 2011.
6. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Pairwise Ranking Component Analysis, submitted to *Knowledge and Information Systems* (submitted).

2. 学会発表

1. Jean-Francois Pessiot, Hirokazu Chiba, Hiroto Hyakkoku, Takeaki Taniguchi, Wataru Fujibuchi, PeakRegressor identifies composite sequence

- motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs, oral presentation at CBRC, (2010) July, Tokyo.
2. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Cross-platform analysis of microarray data, poster presentation at CBRC, (2010) July.
 3. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Learning similarity functions for gene expression data, poster presentation at LS-BT, (2011) February, Tsukuba.
 4. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Learning similarity functions for multi-platform microarray data, oral presentation at SIG-BIO, (2011) March, Kyoto.
 5. Wataru Fujibuchi, Takeaki Taniguchi, Hideko Sone, Seiichiro Ohsako, Analysis of toxic effects on ES cell differentiation by integrated gene networks, poster presentation at CBRC, (2010) July, Tokyo.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

RX-TAOgen による遺伝子ネットワーク推定ページ:

<http://med.cbrc.jp/rxtaogen/> (要パスワード)

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

研究分担者

大迫誠一郎

東京大学 疾患生命工学センター 准教授

研究要旨

ヒト胚性幹細胞試験（EST）を利用した毒性影響評価のための、被験モデル化合物としてメチル水銀を用いてその有効性を検討した。ヒト ES 細胞（hESC）ならびにマウス ES 細胞（mESC）から神経系分化培養系を確立し、未分化神経細胞のステージでメチル水銀を各種濃度で曝露した。MTT アッセイによる細胞死、全自動細胞画像解析装置によるハイスループットデータ処理、ならびに定量 PCR による分化マーカー遺伝子の発現レベル測定でその影響を比較検討した。その結果、細胞死と分化後の細胞形態表現型の影響において、両種間でメチル水銀の濃度に対する感受性が異なることがわかった。この違いを評価するため、ベイジアンネット解析を実施したところ、より低用量から分化マーカーへの影響の見られた hESC 由来細胞のネットワーク解析でメチル水銀ノード(Node)が最上層に来ることがわかった。

A. 研究目的

受精卵から胚、胎児を経て成熟個体に至るまで各細胞の分化過程をヒト胚性幹細胞（hESC）の分化培養系を利用して再現することは可能であり、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ことを目的に、ヒト胚性幹細胞試験（hEST）を利用する。このサブテーマでは古くから発達神経毒性の知られているメチル水銀を用いて、ヒト ES 細胞の神経系細胞分化培養において毒性影響を観察し、形態情報と遺伝子発現情報を取得して確率推論アルゴリズム（ベイジアンネット解析）で評価を行った。比較検討対象にマウス ESC を用い、同一濃度での曝露実験を実施した。

B. 研究方法

hESC は京大再生医科学研究所幹細胞センターの

末盛博文博士から提供された KhES-3 株（XY genotype）を使用した。ES 細胞の維持分化にはマウス胚性線維芽細胞（MEF）をフィーダー細胞として継代を行った。胚様体（EB）の形成にはマイクロスフィアアレイ（MSA; 1020 holes, ϕ 300 $\mu\text{m}/\text{hole}$ ）を用いた。MEF を酵素的に浮遊させ、ES 細胞集塊のみをディッシュ上に残した上で、Rock 阻害剤 Y-27632 を添加した EB 培地に懸濁し、 2.0×10^4 個/ml の hES 細胞を MSA に播種した（Day1）。Day3, Day5 で同じ培地で交換し培養を継続、EB の成長を待った。Day7 で Y-27632 非添加の EB 培地に交換し、Day9 に NIM 培地に交換した。Day11 で形成された EB を 20 個/well の密度でオルチニン・ラミニン（O/L）コート 24-well-plate に NPM 培地を用いて播種した。2 日おきに NPM 培地を交換し、Day18 で NDM 培地に交換してその後 Day50 に到達するまで NDM 培地で培養し続けた。一方、mES 細胞には Green mouse FM131 系から樹立した

B6G-2 (XY genotype) を使用した。ES 細胞の維持培養には LIF を用い、MEF を支持細胞として用いた。最終継代から 48 時間目に酵素的に mES 細胞のみを回収し、EB 培地に懸濁してピペティングによりシングルセルとし、同じく MSA に 1.0×10^5 個/ml の密度で播種し EB 形成を行った (Day 1)。Day 3 で 10 nM の RA を含む EB 培地 (EB+RA) に交換した。1 日おきに、EB+RA で培地交換し Day 7 には再び EB 培地に交換した Day 9 で形成された EB を 80 個/well の密度で O/L コートの 24-well-plate に EB 培地を用いて播種した。Day 10 に相当する翌日、NIM 培地に交換してその後 Day 23 に到達するまで 2 日おきに NIM 培地を交換しながら培養し続けた。

メチル水銀の曝露はヒト培養系では NDM 培地培養期間中の Day 27 (O/L day 16) から最終培養到達時点の Day 50 まで、2 日おきに培地を交換しつつ曝露し続けた。マウス培養系では NIM 培地培養期間中の Day 12 (O/L day 3) から最終培養到達時点の Day 23 まで、2 日おきに培地を交換しつつ曝露し続けた。曝露スタート時点から MTT アッセイにより経時的に細胞活性を測定した。また、培養最終段階で RNA を採取し、*Nanog*, *Pou5f1*, *Nodal*, *Nes*, *Pax6*, *Emx2*, *Mtap2*, *En1*, *Otx1*, *Hoxb1*, *Hoxb4*, *Olig1*, *Olig2*, *Gapdh* の mRNA を定量 RT-PCR で測定した。また MAP2 抗体による免疫染色と Hoechst 33342 による核染色を施し、IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) で MAP2 陽性細胞からの神経突起長と分岐点数を測定した。

(倫理面への配慮)

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 月機関承認を得、それにより、2010 年 1 月文部科学省より使用許可を得た。

C. 研究結果

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 (図 1)、生存した神経細胞の dendrite 伸長には影響がなかった (図 2 および図 3)。一方ヒト EB では、10 nM

メチル水銀は生存率には影響がないものの (図 1)、分化した神経細胞の dendrite 伸長には 1nM から統計学的に有意な抑制効果を示した (図 2 および図 3)。ヒトおよびマウス間で十分に比較可能なオースログ遺伝子 13 種を定量 PCR で測定したデータセットと形態情報 (IN Cell Analyzer 1000 解析) による確率推論モデルにおいても、マウスではメチル水銀に起因するネットワーク構造が見られないのに対して、ヒトではメチル水銀を最上位 (親 Node) にもつネットワークを描くことがわかった (図 4)。

D. 考察

メチル水銀曝露は低濃度 (10nM) でマウスの EB 生存率低下を引き起こしたが、ヒトではこの濃度では EB 生存率に影響はなかった。しかしながら、1nM から分化神経細胞の 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。

E. 結論

上記の結果より、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 細胞とマウス ES 細胞を利用した本システムの有効性を示している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ohsako S. Perinatal exposure to environmental chemicals induces epigenomic changes in offspring. *Genes Environ* (2011) (*in press*)
- 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).
- 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).
- 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).
- Ishihara K, Ohsako S, Tasaka K, Harayama H, Miyake M, Warita K, Tanida T, Mitsushashi 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).

2. 学会発表

- 永野麗子、何小明、横山雅美、赤沼宏美、座波ひろ子、末盛博文、大迫誠一郎、曾根秀子。マウスおよびヒト ES 細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究。第 36 回日本トキシコロジー学会、沖縄（2010）6 月 17 日沖縄コンベンションセンター
- 何小明、永野麗子、赤沼宏美、座波ひろ子、遠山千春、曾根秀子、大迫誠一郎。マウス ES 細胞を用いた神経系分化系におけるメチル水銀の毒性影響評価。第 36 回日本トキシコロジー学会、沖縄（2010）6 月 17 日沖縄コンベンションセンター
- Hideko Sone, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Seiichiroh Ohsako. Multi-profiling analysis in neuronal cells derived from embryonic stem cells to identify fetal programming. The 12th International Congress of Toxicology. 2010
- 赤沼宏美、永野麗子、座波ひろ子、大迫誠一郎、曾根秀子。胎生プログラミング異常を検出するためのマルチプロファイリング技術の確立。第 13 回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会、東京（2010）12 月 16 日東京大学山上会館
- 曾根秀子、永野麗子、赤沼宏美、座波ひろ子、大迫誠一郎。ヒト ES 細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究。第 13 回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会、東京（2010）12 月 16 日
- 大迫誠一郎、永野麗子、何小明、今西哲、藤渕航、赤沼宏美、曾根秀子。マウスおよびヒト ES 細胞を用いた神経分化培養系におけるメチル水銀の毒性影響評価。第 13 回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会、東京（2010）12 月 16 日東京大学山上会館

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（識別番号 100078662）（2009）
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：

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

61/309971) (2010)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

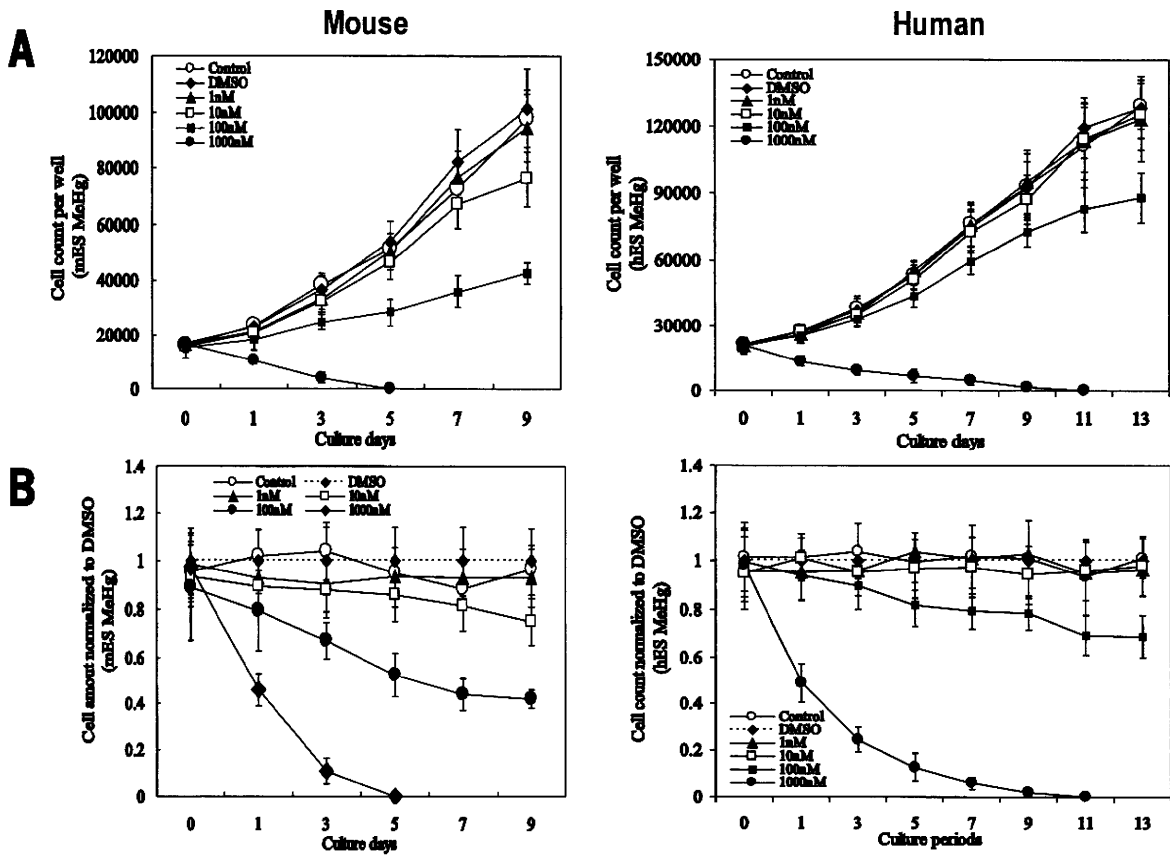


図1. マウスES細胞およびヒトES細胞の神経系細胞培養系に及ぼすMeHgの影響。MTTアッセイによって用量依存的な細胞活性の測定を行った。MeHg濃度：1, 10, 100, 1000 nM。A, 培養時間によるウェル内細胞数の推移。B, 培養時間による細胞活性の推移を細胞数あたりに換算して計算した。各時間後とのDMSO対照群の活性を1とした。

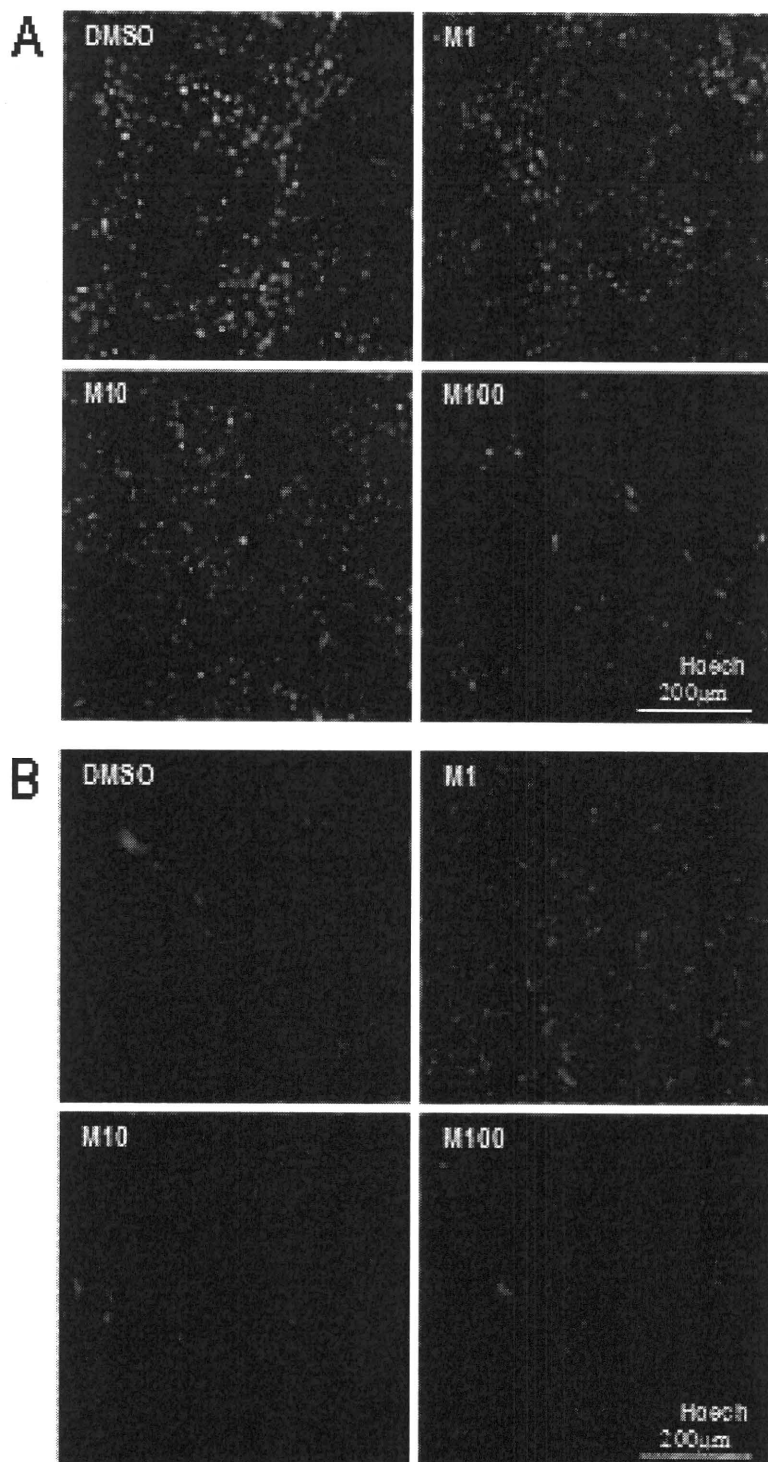
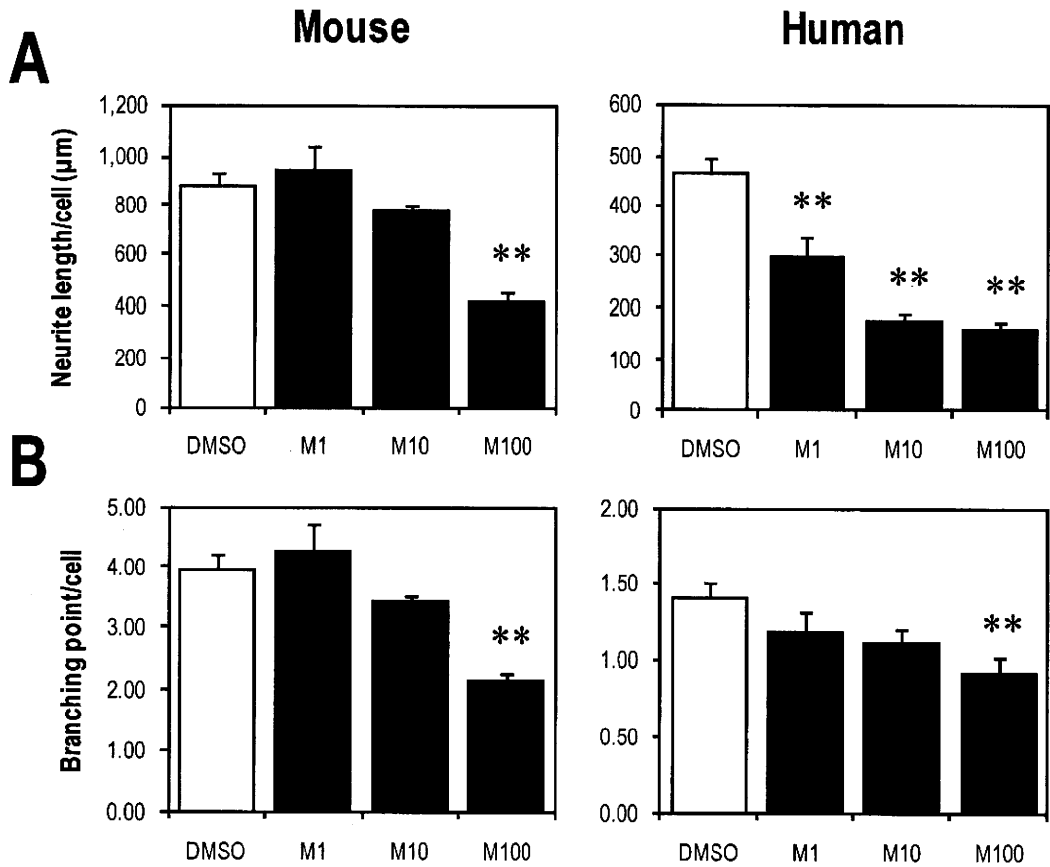


図2. マウスES細胞(A)およびヒトES細胞(B)の神経系細胞培養系に及ぼすMeHgの影響。DMSO, 対照; M1, 1 nM MeHg; M10, 10 nM MeHg; M100, 100 nM MeHg。



■3. マウスES細胞およびヒトES細胞の神経系細胞培養系に及ぼすMeHgの影響。全自動細胞画像解析装置でMAP2陽性細胞の神経突起長(Neurite length, A)と分岐点数(Branching points, B)の測定を行った。DMSO, 対照; M1, 1 nM MeHg; M10, 10 nM MeHg; M100, 100 nM MeHg。DMSO対照群との比較(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)。

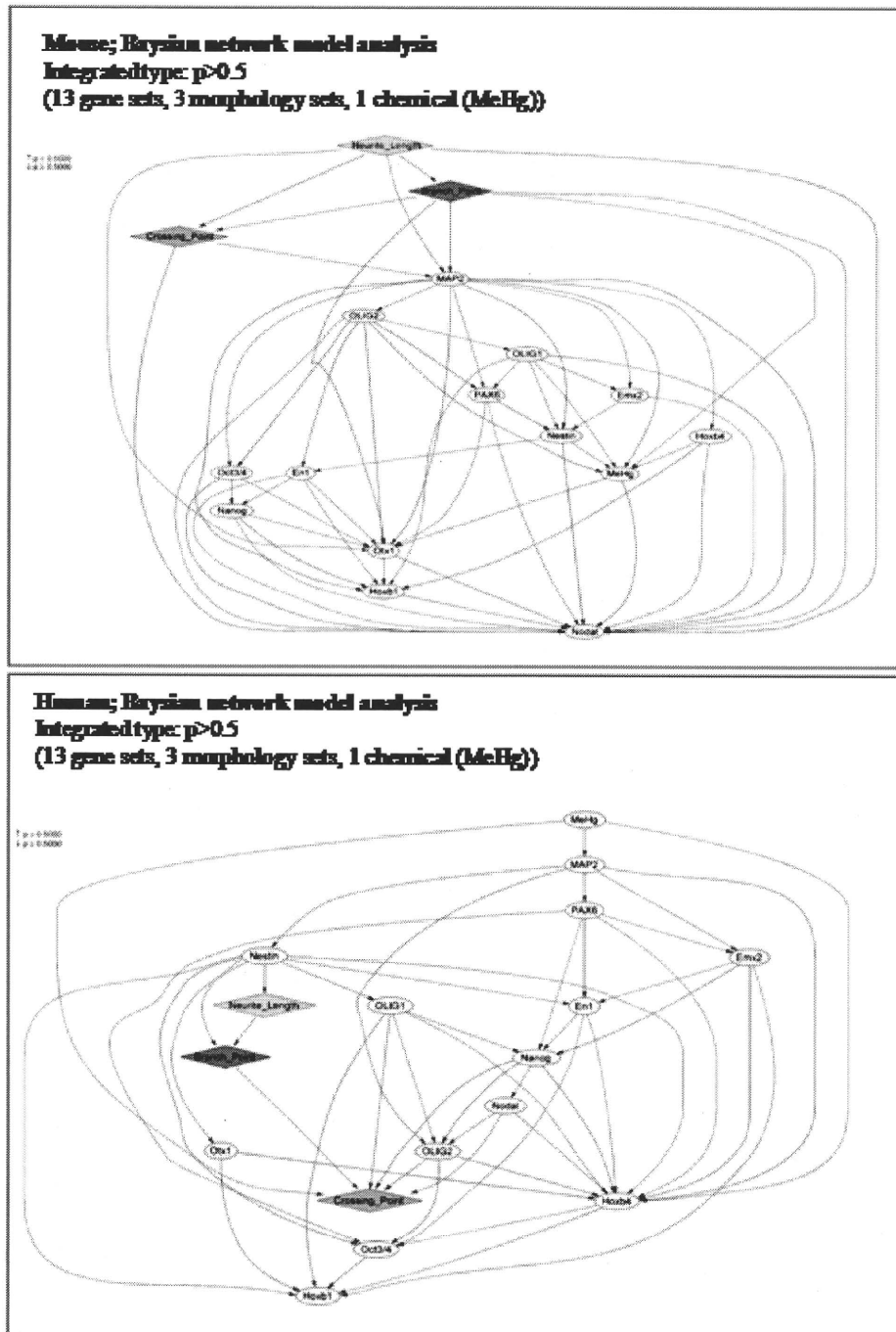


図4. マウスES細胞およびヒトES細胞の神経系細胞培養系に及ぼすMeHgの影響の確率推論アルゴリズム(ベイジアンネットワークモデル)に基づく統合化ネットワーク解析結果。マウス細胞培養系のDay 23ならびにヒトES細胞培養系のDay50における13種の遺伝子発現データと3種の形態情報(Neurite length, Branching points, Crossing points)ならびにMeHgとの関係をコンピュータ解析し自動的に図式化させた。ベイズモデルにおけるベータ値が正の関係のものを赤い矢印、負の関係を青い矢印で示した。相互作用確率が $p > 0.5$ のものを抽出した。

ES 細胞試験データを用いたサポートベクターマシンによる化合物影響の 判別試験に関する研究

研究分担者

大迫誠一郎

東京大学 疾患生命工学センター 准教授

研究要旨

確率推論型アルゴリズム（ベイジアンネットワーク解析）は遺伝子発現等の観察値データセットから各遺伝子間の相互作用を予測するために使用することが可能である。本試験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、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。本年度は予備的試験として、複数の化合物（神経毒性物質、発ガン性物質（遺伝毒性発ガン物質ならびに非遺伝毒性発ガン物質）、その他化学物質）を用い、曝露試験はヒト ES 細胞 KhES-3 から EB 形成させた後、神経誘導培養条件下で化学物質を添加、経時的に RNA を採取して 10 種の遺伝子について測定した。得られた遺伝子変動情報を基に最大エントロピーカーネルを利用したサポートベクターマシン（SVM）による判別予測を実施した。その結果、神経毒性物質に対しては 86.6%、発ガン性物質で 93.3%、さらには非遺伝毒性発ガン物質で 100%の確率で判別可能であった。これにより、使用したヒト ES 細胞 KhES-3 株は十分に化合物固有の毒性影響を表出することがわかり、また開発した SVM の精度を確認できた。さらに、ベイジアンネットワーク解析から計算された各遺伝子ノード間のベータ値を利用することにより、この予測率がアップすることもわかった。

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一部再現しており、ヒトの発生影響試験の理想的代替モデルと言える。しかしながら、胚性幹細胞試験（EST）はあくまでも *in vitro* の試験系であり、分化レベルなど単一の指標でその影響を評価しても実際の個体内で起きうる影響を評価できるかという問題が残る。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、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、確率推論アルゴリズムによるヒトへの影響レベルの予測を試みるが、そのための実験系確立ならびにシステム標準化を実施する。この目的達成のために、発生学的生体影響が既知の複数の化合物群の神経系細胞初期分化ステージへの影響を遺伝子発現レベルで解析し、化合物固有の毒性影響を検出できるか検討した。

B. 研究方法

ヒト ES 細胞 (KhES-3 株, XY genotype) は維持分化にマウス胚性線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として継代を行った (ヒト ES 細胞用培地組成: DMEM/F12, 20% KSR, 100 μ M NEAA, 2 mM L-glutamine, 100 μ M 2-ME, 5 ng/ml bFGF)。十分にコンフルエントに成長した KhES-3 を Rock 阻害剤である Y-27632 を 10 μ M 添加したヒト ES 細胞用培地で 1 時間前処理した後、ヒト ES 細胞用解離液にて MEF ごと剥離して回収した。回収した細胞から MEF を除去するためにヒト ES 細胞用培地に懸濁し、0.1%ゼラチンでコートした培養用ディッシュにて 2 時間培養した。MEF がディッシュ底面に接着したことを確認し、浮遊している KhES-3 を回収した。この KhES-3 を TrypLE Select に懸濁して 37°C で 5 分間処理し、シングルセルにまで分散した。分散した KhES-3 を Y-27632 を 10 μ M 添加したヒト EB 形成用培地に懸濁して数を数えた後、9000 cell/well となるように、非接着性 U 字底 96 穴プレートにまいた (Day1)。Day6 まで Y-27632 添加培養し、Day7 から Day11 まで非添加で培養した。Day12 に神経誘導培地 (DMEM/F12: Neurobasal[®] Medium (1:1), 1 倍濃度 N-2 Supplement, 1 倍濃度 B-27[®] Supplement, GlutaMAX[™]-I, Penicillin-Streptomycin) に交換し Day14 にオルニチン/ラミニンでコートした接着性平底 96 穴プレートに 1 EB/well となるように播いた。同時に培地を神経増殖培地に交換した。Day16 に EB が接着したことを確認した後、化学物質もしくは溶媒のみ (DMSO 終濃度 0.002%) を添加した神経増殖培地 (DMEM/F12: Neurobasal[®] Medium (1:1), 2 倍濃度 N-2 Supplement, 2 倍濃度 B-27[®] Supplement, GlutaMAX[™]-I, Penicillin-Streptomycin, 20 ng/ml bFGF) に交換し曝露を開始した。24、48、72、96 時間後に RNA 精製用のライシスバッファーにて、各実験群 EB2 個ずつ処理した。

神経毒性物質として (Methylmercury, 2-Nitorpropane, Acrylamide, 4(OH)-2',3',3',4',5'-pentachlorobiphenyl)、発ガン性物質として (遺伝毒性発ガン物質 (Benz[a]pyrene, Diethylnitrosamine)、非遺

伝毒性発ガン物質 (Phenobarbital, Tamoxifen, Diethylstilboestrol, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin)、その他化学物質 (Bisphenol-A, Permethrin) を用いた各種用量の曝露を行った。RNA を採取して複数の分化マーカー遺伝子 (OCT3/4, NANOG, NESTIN, NODAL, GATA2, LMX1A, PAX6, TUJ1, MAP2, β -ACTIN) の発現レベルを qRT-PCR で測定した。この大規模遺伝子発現情報を基にサポートベクターマシン (SVM) を構成し、毒性の判別試験を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞使用実験は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

全ての実験系において、2 試験、4 タイムポイント (化学物質曝露 24, 48, 72, 96 時間後)、6 濃度を使用した。この大規模遺伝子発現情報を基に、藤渕らが独自開発した最大エントロピーカーネルを利用した SVM を構成し、毒性の判別試験を行った。

その結果、添付の図に示すように判別試験対象の化学物質を含まず構成した場合においても、神経毒性物質に対して 86.6%、発ガン性物質で 93.3%、さらに、非遺伝毒性発ガン物質で 100%という高確率で判別可能であった。さらに、ベイジアンネットワーク解析から計算された各遺伝子ノード間のベータ値を利用することにより、この予測率がアップすることもわかった (今回その詳細なデータは示さない)。

D. 考察

今回作成した判別装置である最大エントロピーカーネルを利用した SVM は化学物質の毒性影響を十分に判別することができることが立証された。また、使用したヒト ES 細胞 KhES-3 は化合物固有の

毒性影響を十分に表出することがわかった。現在確率推論により取得したネットワークデータによる判別や正準相関解析等の検討を行っている。

E. 結論

本研究課題で評価法として導入する確率推論モデルのベイズ推定は遺伝子発現変動という細胞表現型に予測性を持つことが提示できた。また、目標とする化学物質影響予測システムのための判別装置開発に今回確立したヒトES細胞分化培養系は有効であることも立証された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohsako S. Perinatal exposure to environmental chemicals induces epigenomic changes in offspring. *Genes Environ (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. 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).
4. 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).

5. Ishihara K, Ohsako S, Tasaka K, Harayama H, Miyake M, Warita K, Tanida T, Mitsushashi 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).

2. 学会発表

1. 永野麗子、何小明、横山雅美、赤沼宏美、座波ひろ子、末盛博文、大迫誠一郎、曾根秀子. マウスおよびヒトES細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究. 第36回日本トキシコロジー学会、沖縄（2010）6月17日沖縄コンベンションセンター
2. 何小明、永野麗子、赤沼宏美、座波ひろ子、遠山千春、曾根秀子、大迫誠一郎. マウスES細胞を用いた神経系分化系におけるメチル水銀の毒性影響評価. 第36回日本トキシコロジー学会、沖縄（2010）6月17日沖縄コンベンションセンター
3. Hideko Sone, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Seiichiroh Ohsako. Multi-profiling analysis in neuronal cells derived from embryonic stem cells to identify fetal programming. The 12th International Congress of Toxicology. 2010
4. 赤沼宏美、永野麗子、座波ひろ子、大迫誠一郎、曾根秀子. 胎生プログラミング異常を検出するためのマルチプロファイリング技術の確立. 第13回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会、東京（2010）12月16日東京大学山上会館
5. 曾根秀子、永野麗子、赤沼宏美、座波ひろ子、大迫誠一郎. ヒトES細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究. 第13回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会、東京（2010）12月16日
6. 大迫誠一郎、永野麗子、何小明、今西哲、藤渕

航，赤沼宏美，曾根秀子．マウスおよびヒト ES 細胞を用いた神経分化培養系におけるメチル水銀の毒性影響評価．第 13 回日本外因性内分泌攪乱化学物質学会、東京（2010）12 月 16 日東京大学山上会館

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（識別番号 100078662）（2009）

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）

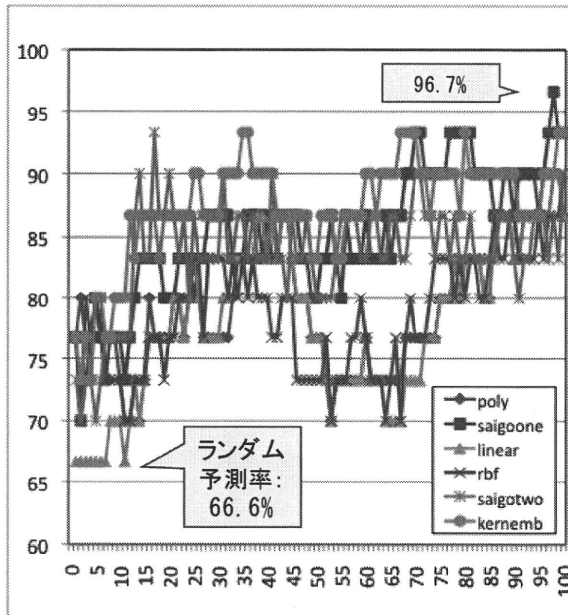
2. 実用新案登録

なし

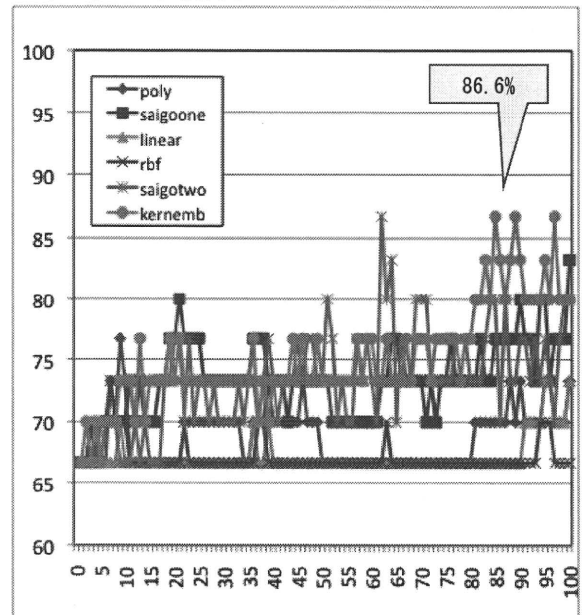
3. その他

なし

A) 既知予測(リポート混在)



B) 未知予測(リポート非混在)



特徴パラメータ数(Gene x Time x Dose)

使用した15化合物の曝露実験データを基にした神経毒性物質の判別予測結果。使用した神経毒性物質5種のうち、1種に対する判別を行うために、他の化合物のデータを基にサポートベクターマシンで判別装置を作成した。この判別装置に抜き取った1化合物の情報を判別させた。縦軸は判別の正解率、横軸は特徴パラメータ数(遺伝子x時間x用量)を示す。A)判別対象の化合物情報を含んだ場合(既知予測)。B)判別対象の化合物情報を含まない場合(未知予測)。

研究成果の刊行一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Seiichiroh Ohsako	Perinatal exposure to environmental chemicals induces epigenomic changes in offspring.	<i>Genes Environ</i>			in press
Seiichiroh Ohsako, Noriho Fukuzawa, Ryuta Ishimura, Takashige Kawakami, Qing Wu, Reiko Nagano, Hiroko Zaha, Hideko Sone, Junzo Yonemoto, and Chiharu Tohyama.	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.	<i>Biol Reprod</i>	82	636-643	2010
Mohammad Shan Alam, Seiichiroh Ohsako, Tay TW., Naoki Tsunekawa, Yoshiakira Kanai, and Masamichi Kurohmaru.	Di(n-butyl) phthalate induces vimentin filaments disruption in rat Sertoli cells: A possible relation with spermatogenic cell apoptosis.	<i>Anatomia Histologia Embryologia</i>	39	189-193	2010
Kana Ishihara, Seiichiroh Ohsako, Ken Tasaka, Hiroshi Harayama, Masashi Miyake, Katsuhiko Warita, Takashi Tanida, Tomoko Mitsuhashi, Takashi Nanmori, Yoshiaki Tabuchi, Toshifumi Yokoyama, Hiroshi Kitagawa and Nobuhiko Hoshi	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?	<i>Reprod Toxicol</i>	29	68-73	2010
Mohammad Shan Alam, Seiichiroh Ohsako, Takashi Matsuwaki, Xiao Bo Zhu, Naoki Tsunekawa, Yoshiakira Kanai, Hideko Sone, Chiharu Tohyama and Masamichi Kurohmaru.	Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate.	<i>Reproduction</i>	139	427-437	2010
Takayuki Mitsuhashi, Junzo Yonemoto, Hideko Sone, Yasuhiro Kosuge, Kenjiro Kosaki, and Takao Takahashi	In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	107	16331-16335	2010
Hideko Sone, Hiromi Akanuma, Tomokazu Fukuda.	Oxygenomics and environmental stressor.	<i>Redox Reports</i>	15	98-114	2010

Hideko Sone, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, Wataru Fujibuchi, Takeaki Taniguchi, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Seiichiro Ohsako, Junzo Yonemoto	Profiles of Chemical Effects on Cells (pCEC): a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals.	<i>J Toxicol Sci.</i>	35	115-23	2010
Hideko Sone, Tomokazu Fukuda, Hiroyoshi Toyoshiba, Takeharu Yamanaka, Perham Fred, Christopher J Portier	Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method.	<i>The Open Cell Signaling Journal</i>	2	1-12	2010
Jean-Fran ois Pessiot, Hirokazu Chiba, Hiroto Hyakkoku, Takeaki Taniguchi, Wataru Fujibuchi	PeakRegressor identifies composite sequence motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs	<i>PLoS ONE</i>	5	e11881	2010
Yuki Tochigi, Natsuko Sato, Takehiko Sahara, Chun Wu, Shinya Saito, Tsutomu Irie, Wataru Fujibuchi, Takako, Goda, Ryoichi Yamaji, Masahiro Ogawa, Yoshihiro Ohmiya, Satoru Ohgiya	Sensitive and convenient yeast reporter assay for high-throughput analysis by using a secretory luciferase from <i>Cypridina noctiluca</i> .	<i>Anal Chem</i>	82	5768-5776	2010
Miura K., Kinouchi M., Ishida K., Fujibuchi W., Naitoh T., Ogawa H., Ando T., Yazaki N., Watanabe K., Haneda S., Shibata C., and Sasaki I.	5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs	<i>Cancers</i>	2	1717-1730	2010
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
金蕙鈴、加藤毅、茂櫛薫、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ハロスウェイ解析	情報処理学会 研究報告	2010- BIO- 20	No.9	2010

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大迫誠一郎	エピジェネティクスと環境医学	松島・酒井・遠山ら編	分子予防環境医学	本の泉社	日本	2010	568-575
Sone H and Akanuma H.	Oxidative Stress-Mediated Signaling Pathways by Environmental Stressors. Signaling in Vertebrates and Invertebrates.	In: Tahira Farooqui and Akhlaq A. Farooqui editors.	Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell	Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell, March		2011	
千葉啓和、藤渕航	細胞情報解析に役立つツール—幹細胞研究の進展とその創薬応用に向けて		実験医学		日本	2010	3171-3174
Edward Wijaya, Jean-Francois Pessiot, Martin Frith, Wataru Fujibuchi, Kiyoshi Asai and Paul Horton	In Search of True Reads: A Classification Approach to Next Generation Sequencing Data Selection		(BIBM) Next Generation Sequencing Workshop			2010	561-566
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	神原秀記、松永是、上田充美	シングルセル解析の最前線	シーエムシー出版	日本	2010	265-273
加藤毅、藤渕航	Kernel Classification Methods for Cancer Microarray Data	Frank Emmert-Streib and Matthias Dehmer	Medical Biostatistics for Complex Diseases	Wiley-Blackwell	ドイツ	2010	279-303