

201133001B

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にインフォマティクス技術開発—

(H21-化学-一般-001)

平成 21 年度～23 年度

総合研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 24(2012)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

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にインフォマティクス技術開発—
(H21-化学-一般-001)

平成 21 年度～23 年度

総合研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 24(2012)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

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にインフォマティクス技術開発—

(H21-化学-一般-001)

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 24(2012)年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書

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にインフォマティクス技術開発—

菅野 純

..... 1

(資料 1) 総合報告資料

(資料 2) 委託研究報告書(STEP8~10)

(資料 3) マイクロアレイ補正アルゴリズム

(資料 4) Percellome Database -Percellome Explorer 解析結果-

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 255

III. 研究成果の刊行物・別刷

..... 259

別添 3

I. 総合研究報告書

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)

総合研究報告書

研究代表者 菅野 純

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 部長

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実用化の最終段階として、インフォマティクス技術を開発することを目的とする。

先行研究において独自開発したパーセローム(Percellome)法*により、定量的、高精度、且つ網羅的な遺伝子発現プロファイルを約100化学物質について構築し、研究分担者による解析プログラム開発や、(株)NTT データ及び日本テラデータ(株)との共同委託研究により5テラバイト級研究計算サーバーを含むインフォマティクス基盤の構築、特に生物学的に有意な遺伝子発現変動を効率的に網羅抽出する方法の開発をほぼ完了した。

本研究では、網羅的発現変動遺伝子情報から、毒性に関わる遺伝子発現ネットワークを描出するインフォマティクスの開発を実施する。特に今までのトキシコゲノミクスが関連した遺伝子の単なる列挙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により、遺伝子発現情報からの毒性予測の精度を格段に向上させる。

具体的には、(1)核内受容体シグナルをモデルとして、特定の標的を共有する化学物質のトキシコゲノミクスデータとそれらの標的の既知情報から局所遺伝子発現ネットワークを描出、(2)既知情報からのネットワーク・テンプレート生成、(3)複数の化学物質の発現遺伝子クラスターの交叉点からのネットワーク描出、(4)胎児、ES・胚様体(EB)分化系、及び概日変動など自律的な遺伝子発現データからのネットワーク描出、(5)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ネットワークの描出、の5つのアプローチから段階的に技術開発を行う。

加えて、遺伝子欠失マウス等による実験を実施して遺伝子発現データを採取し検証研究に供するとともに、インフォマティクスによるデータベース活用の最大化を目指す。

*mRNA 発現値を細胞1個当たりの平均コピー数として絶対定量する方法。論文発表及び特許取得済み

研究分担者

北野 宏明	特定非営利活動法人 システム・バイオロジー研究機構 会長
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 第5室長
相崎 健一	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 第1室長

A. 研究目的

本研究は、分子メカニズムに依拠した毒性予測評価システム実用化の最終段階として、毒性関連遺伝子の発現ネットワーク抽出の為にインフォマティクス開発を目的とする。

具体的には、先行研究にて構築済みの延べ3.5億遺伝子情報からなるトキシコゲノミクスデータベースと毒性学的意味付けを網羅的に抽出するために独自に開発したプログラム群を基盤に、バイオインフォマティクスの専門家の参加を得て、「毒性と直結したネットワークの反応」を導き出すことを可能にするネットワーク抽出技術の開発と、これを用いた毒性予測評価システムの実用化を目指す。

また本研究は「毒性学の近代化」に資するものである。即ち、数万種に及ぶと言われる身の回りの化学物質の毒性評価は、実験動物の所見を人に外挿する事によって実施され、種差や個体差は「安全係数」或は「不確実係数」により、量的な安全マージンをとる事で勘案されてきた。しかしサリドマイドに代表されるが如く、この方法論には科学的な限界がある。そこで従来法に加え、網羅的遺伝子発現プロファイリングからなるトキシコゲノミクスと、それを活用するインフォマティクスの構築・活用が有効であることは内外の研究の方向性が示すところであり、本研究は、より高度、且つ正確な毒性評価の実現によって国民生活の安全確保をより確実にすることを期している。

B. 研究方法

1. Percellome 法による高精度の網羅的遺伝子発現量測定

Percellome 法 (Kanno et al. BMC Genomics. 7, 64, 2006 / 特許第 4415079 号) は細胞 1 個当たりの mRNA コピー数として遺伝子発現量を得る方法である。具体的には、サンプル破砕液中の DNA 含量から細胞数を求め、濃度の異なる 5 種類の外部標準 RNA (スパイク RNA) を細胞 1 個当たり決まった分子数だけその破砕液に添加してから、RNA 抽出、マイクロアレイ測定を行う。スパイク RNA の測定値が細胞 1 個当たり何コピーに相当するかが既知であることを利用し、サンプル中の全ての RNA 測定値を、細胞 1 個当たりのコピー数に換算する。

これを基礎に、体内に侵入してきた化学物質等に対する初期応答を網羅的に観測すべく、主として成獣マウスの肝を対象とした単回経口投与実験プロジェクトを実施した。mRNA 合成のスピードと動物実験の手法上の現実的限界を考慮し、単回強制経口投与の 2、4、8、及び 24 時間後にサンプリングを行うプロトコルを設定した。また用量依存性を考慮し、投与量を溶媒対象 (0)、x1、x $\sqrt{10}$ 、及び x10 とした 4 群を設定した。これにより、一化合物につき 4 時点 x 4 用量の 16 群、各群 3 匹、合計 48 匹の実験を行う。マイクロアレイは Affymetrix 社 GeneChip Mouse430 2.0 を用いた。サンプルはプールせず、個体毎に測定した。

また本研究において実施する動物実験は、野生型マウスを用いた実験だけでは見いだせない毒性シグナルの詳細を検討する目的で、ダイオキシン受容体 (AhR)、エストロジェン受容体 (ER α) といった重要な遺伝子を改変したマウスを用いた網羅的遺伝子発現量測定に重点的をおく。

2. 網羅的な遺伝子発現量データの基本情報処理

Percellome 法を適用し、過去 6 年以上にわたって実施したトキシコゲノミクス研究により、延べ 3.5 億遺伝子情報からなる高精度、且つ網羅的なトキシコゲノミクスデータベース (Percellome データベース) を構築した。このデータベースは情報量に富む 3 次元データ (時間、投与用量、遺伝子発現量) よりなる

ことから、解析に際しては、生物学者によるデータ把握が容易な 3 次元波動面に測定データを変換した上で特徴抽出を行うという独創的な方法を使った。解析に用いるアルゴリズム及びソフトウェア群は全て独自に開発し (Aisaki et al. Exp Hematol. 35, 1190, 2007, Matsumoto et al, Genome Inform. 16, 183, 2005 など。一部は特許取得済)、汎用 (市販製品を含む) のソフトウェアだけでは得られない有効性を発揮している。

またマイクロアレイデータ補正や発現類似度計算等の高度解析アルゴリズムの実装と検証実験は、今までのノウハウを活かすべく、引き続き (株) NTT データ及び日本テラデータ (株) との共同委託研究により、演算空間 5 テラバイト級の研究計算サーバーを用いて実施する。

3. 遺伝子発現ネットワークの描出処理の検討

Percellome データや既知情報を元に、代表的な遺伝子発現ネットワークの描出を行いつつ、解析やネットワーク化の手法開発を行う。

3. 1 特定の分子標的を共有する化学物質群が誘導する遺伝子発現ネットワークの描出

ダイオキシン類や核内受容体リガンドを対象として、Percellome データと該当化学物質の既知情報から、特定の分子標的に関連するネットワークの描出を試みる。特に、細部の描出においては、遺伝子改変マウスにおけるトキシコゲノミクス実験データを活用する。

3. 2 胎児・ES 細胞での発生過程や概日変動といった自律的な遺伝子発現ネットワークの描出

先行研究において取得済みの、野生型マウス胚及びマウス ES (胚性幹)・EB (胚葉体) 分化系の遺伝子発現データベース、あるいは概日変動リズム 1 周期=24 時間の遺伝子発現データベースを利用し、フィードバックループが大きな役割を担う遺伝子発現ネットワークの描出、及びその処理に必要な手法の開発・検討を行う。

4. 遺伝子発現ネットワーク描出の為にインフォマティクス開発

4. 1 既知情報からのシグナルネットワーク・テンプレート生成

既知情報から毒性反応に係わる遺伝子発現ネットワークの骨格を生成するために、公開オンラインデータベースから遺伝子改変マウスに関する情報を抽出する汎用的なアルゴリズム開発を行う。

4. 2 複数の化学物質に共通する遺伝子群情報からの遺伝子発現ネットワーク描出

Percellome データベースの約 100 化学物質の情報から、化学物質ごとに実施した tmf 教師無しクラスタリング (関連特許取得済み。特許第 3995099 号) 及び RSort 波動面抽出等の結果から共通情報を抽出し、時間要素を維持したまま毒性反応シグナルネットワークの構成要員を得て、波動パターンの類似性による構成要員の結合や、経時的変動様態による信号方向の決定を試みる。

4. 3 初期反応ネットワークのインフォマティクス描出

大規模データから初期反応に関わる遺伝子発現ネットワークを同定する手法の開発に向け、実際の Percellome データを用いて基本推定手法の構築と最適化を行う。特に、前処理 (フィルタリング) としては遺伝子発現レベルだけでなく、実データの化学物質用量要素や時間要素に対する Slope もしくは Wavelet によるフィルタを掛け、独自のクラスタリングプログラム AGCT の最適化によって、効率的なネットワーク抽出を実現する。

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、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる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) 及び国立医薬品食

品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行う。)

C. 研究成果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

(1) 特定の分子標的を共有する化学物質群のトキシコゲノミクスデータとそれらの標的の既知情報からの局所遺伝子発現ネットワークの描出 (菅野・北嶋)

実際のデータからネットワーク描出を行う方法を検討するにあたり、まず標的分子がごく少数で、遺伝子発現制御に関する研究報告も進んでいるネットワーク系をモデルとして選択した。

平成 21 年度はアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) を介して毒性ネットワークを活性化させる化学物質、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin

(TCDD) と 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF) の測定データと論文報告などの既知情報からの局所ネットワークの描出に向けた遺伝子発現制御の詳細を解析した。特に毒性等価係数 (TEF) の違いに着目し、TCDD と TCDF が等価となる用量域において比較を行い、共通遺伝子や特徴遺伝子を抽出して確度の高い情報を得た。同様に AhR に結合すると考えられている 3-methylcholanthrene (3-MC) や Indigo の暴露実験データも用いて、共通あるいは関連ネットワークの要素の追加抽出を行った。これらの解析結果を基に、既存情報によるネットワーク図との比較を行いつつ、AhR シグナルの局所ネットワーク描出を進めた (成果の一部について論文作成中)。

また AhR シグナルにおける直接因子と間接因子、および未解明のダイオキシン応答関連分子の同定を行うために、AhR 欠失遺伝子改変マウス (国衛研にて 60 代以上 C57BL/6 に Backcross 済) における網羅的遺伝子発現データを採取することとし、AhR ホモ欠失マウスの自家繁殖を進めた。

平成 22 年度は、自家繁殖した AhR ホモ欠失マウス

の 12 週齢の雄 48 匹を揃え、Percollome 遺伝子発現データを取得して、野生型マウスにおけるデータとの比較・差分解析を参考に、AhR シグナルの局所の遺伝子発現ネットワーク描出を進めた。具体的には、ダイオキシン受容体 (AhR) シグナルのネットワークの検証の為に、AhR 欠失マウスに、AhR のリガンドである 3-メチルコラントレン (3MC) (0、10、30、100 mg/kg) を単回経口投与 (4 用量、16 群構成、各群 3 匹) し、投与 2、4、8 及び 24 時間後の肝サンプルにつき網羅的遺伝子発現データを解析した。またこの結果を、既に取得済みの、野生型マウスに 3MC を同様の条件にて投与した際の遺伝子発現変動の経時データベースと比較検討した。野生型マウスでは 3MC の投与により、AhR シグナル関連遺伝子、酸化的ストレス関連遺伝子をはじめとして多くの遺伝子発現変動が認められた。生物学的な発現変動が示唆された遺伝子として 685ps (増加: 659ps、減少 26ps) が見いだされた。これと比較し、AhR 欠失マウスでは、3MC の投与により変動した遺伝子では特定のシグナルネットワークは見いだせず、変動する遺伝子数も少なく 216ps (増加: 172ps、減少 44ps)、また発現の変動幅も狭いものであった。

また AhR 欠失マウスと野生型マウスに共通して発現変動が認められた遺伝子数は 11ps であった。AhR の活性化に伴い、3MC を代謝する薬物代謝酵素の誘導が生じる。したがって、AhR 欠失マウスでは 3MC の代謝が引き起されないことを考慮する必要があるが、AhR シグナルに関連すると考えられる遺伝子の多くは AhR 欠失マウスにて発現変動が著しく抑制されたため、その関連遺伝子である事が再確認されたと共に、野生型及び AhR 欠失マウスの両方で発現変動を示した少なくとも 11ps の遺伝子については、3MC 投与の際、AhR を介さない経路で発現変動するものであることが明らかとなった。

さらに 3MC と同様に、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD) についても AhR ホモ欠失マウスに投与し、網羅的な遺伝子発現データを得て、3MC データと比較解析して候補遺伝子リストの

検証を行った。

平成23年度は引き続き AhR シグナルの局所ネットワーク描出を行い、AhR シグナルに関与する多数の遺伝子を同定したほか、TCDD あるいは 3-MC 投与によって誘導される AhR 非依存性の遺伝子を同定した。

また毒性等価係数 (TEF) の違いに着目し、TCDD と TCDF が等価となる用量域において比較して、共通遺伝子や特徴遺伝子を抽出して確度の高い情報を得た。

また Dr Chambon (INSERM, France) らのグループが作製した ER α 欠失マウス (Development 127, 4277-4291 (2000)) を当研究所にて自家繁殖し、12 及び 13 週齢の雄性ホモ欠失マウス 133 匹を実験に供した。エストロゲン様活性化合物としては Ethynyl Estradiol (EE) (0, 1, 3, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 及び Bishphenol A (BPA) (0, 30, 100, 300 mg/kg) を選択し、これらをホモ欠失マウス及び野生型マウスに経口投与して Percellome 解析を実施した。

この結果、生物学的な発現変動が示唆された遺伝子として EE 投与時は野生型マウスにて 283ps (増加: 268ps, 減少 15ps) が、ER α 欠失マウスにて 156ps (増加: 135ps, 減少 21ps) が見いだされたが、特定のシグナルネットワークは見出されなかった。

一方、BPA 投与時には野生型マウスにて 500ps (増加 430ps, 減少 70ps) が見出され、増加する遺伝子にはヒストンアセチル化、ヒストンメチル化関連遺伝子及び、RNA プロセッシング関連遺伝子が含まれていた。顕著に発現変動が認められた遺伝子として、Lipa 遺伝子 (リパーゼ)、プリン代謝に関係する Ampd2 遺伝子等が見出された。文献検索の結果、これらの関連遺伝子の多くのものに ER との関連は認められなかった。

ER α 欠失マウスにおいては 221ps (増加: 215ps, 減少 6ps) が見いだされたが、特定のシグナルネットワークは見出されなかった。

ER α 欠失マウスと野生型マウスでの反応を比較したところ、両者の遺伝子リストはかなり異なってお

り、両者に共通して含まれていた遺伝子は、Dnajb9、Nfxl1、Dnaja1、Mat2a、Slc20a1 遺伝子など 12ps のみであった。

野生型マウスでのみ発現変動を示した遺伝子は 89 ps で、中でも発現変動幅が顕著な遺伝子として、ヒストンアセチル化・メチル化関連遺伝子 Anp32a 及び Whsc1 遺伝子、RNA プロセッシング関連遺伝子である Nfic、Pabpn1 及び Prpf6 遺伝子、また Lipa、Ampd2 遺伝子等 14ps が見いだされた。文献情報では Nfic 遺伝子がエストロゲンとの関連が報告されていたが他は未報告であった。

野生型マウス特異的な遺伝子のうち、発現変動が确实視された 35 遺伝子について Genomatix を用いて *in silico* プロモータ解析を実施したところ、20 遺伝子の転写開始点上流域に ER 結合部位が見出された。また ER 結合配列が見出されなかった 15 遺伝子についても、ER α 欠失マウスの場合との比較解析結果から、これらの発現制御は ER α に依存することが示唆された。このことは、ER α が他の転写因子と相互作用し、その転写因子結合部位を介して発現制御を受ける機序が存在する可能性を示唆していた。

野生型マウスに於いて EE 及び BPA に共通して発現する遺伝子は Egl3、Fubp1 遺伝子など 4ps のみで、両化学物質では同じ受容体を標的とすると考えながら、それらの遺伝子発現誘導は大きく異なることが確認された。特に BPA 投与時に発現変動が認められた遺伝子、例えばヒストンアセチル化に関連する Anp32a 遺伝子及び、ヒストンメチル化に関連する Whsc1 遺伝子は、内因性のエストロゲンでは認められない BPA 特異的な生体影響を研究する上で重要な発見と考える。

(2) 既知情報からのネットワーク・テンプレート生成 (菅野・相崎)

文献データベース等の公開データベースから毒性反応遺伝子発現ネットワークの骨格を生成するために、モデルデータベースとして、米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Online

Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 及び米国 Jackson Laboratory の Mouse Genome Informatics (MGI) を利用して、非定型の文章データを主としたデータベースから有用な情報を選別取得する技術の開発を行った。平成 21 年度は公開データベース Mouse Genome Informatics (MGI) から 9977 種類の表現型の記述表記をインポートした。Affymetrix マイクロアレイデータとの統合は、メーカーからリリースされている Annotation データから生成したプローブセット ID-遺伝子名の多対多テーブルを介して行い、約 12,000 のプローブセットに表現型情報を追加した。

平成 22 年度は、米国 NCBI PubMed 等でも利用している米国 NLM 管理下の専門語彙集 MeSH の遺伝子改変技術や疾病等を含む表現型に関する語彙の抽出を開始し、周辺情報に関しても取りこぼさないよう対策を検討した。

平成 23 年度は、独 BIOBASE 社の非公開データベース TRANSFAC Professional から転写因子とその認識配列情報に関する情報を抽出し、これを解析に利用するソフトウェアを作成した。

これらの研究開発により、抽出した有用な既知情報を独自に開発した解析用アプリケーションソフトウェア内から直接参照することが可能となり、プレートあるいは要員結合情報として実際のデータからシグナルネットワークを生成する際の作業効率を大幅に向上させた。

(3) 複数の化学物質の発現遺伝子クラスターの交叉点からのネットワーク描出 (相崎)

tmf 教師無しクラスタリングの解析結果を利用した同基点要員抽出については、先行研究で作成したクラスタービューソフトウェア MFCV.exe の改良を重ね、より効率良くネットワーク描出作業に利用できるようにした。

一方、tmf 教師無しクラスタリングの 1/100 以下の計算量で遺伝子発現波動面 (3 次元表示) の特徴 (凹

凸の多寡と位置) を認識・整列し、疑似的なクラスターを生成するソフトウェア RSort.exe を利用した同期点要員抽出を実用化すべく、平成 21 年度は、Percellome データベースに登録されているほぼ全ての遺伝子発現変動データを対象として RSort.exe を実行し、凹凸の少ない単純なパターンを示す遺伝子、つまり、より強力、もしくは、よりユニークな発現制御を受ける遺伝子を化学物質および臓器 (肝、肺、腎) ごとに網羅的に自動抽出した。

この結果、200 を超える数の Surface データセット (4 万 5 千遺伝子の発現変動を示す三次元曲面波からなるデータセット) から延べにして約 58 万の特徴的な発現パターンを示す候補遺伝子情報を得た。これらの候補遺伝子群は各化学物質が誘導する生体反応の詳細を直接示すものであり、通常は各々について、さらに精密な解析を行う対象であるが、それと平行して、ここではクラスター同期点要員を抽出するためのプロファイル情報として利用した。なお Percellome データベースの全情報を利用した横断的な解析はこれが初めての試みであった。

具体的には、総当たり比較で共通する遺伝子を抽出し、その数を母数 (化学物質ごとの候補遺伝子総数) で除した値を「反応類似度 (以下、類似度)」として評価して、化学物質ごとに共通した遺伝子発現の多い (=類似の遺伝子発現変動を呈する) 化学物質のリストを得ることに成功した。このプロセスは、類似度と共に、類似根拠となる詳細情報 (遺伝子リスト、及びその発現のピーク時間、発現が増加か抑制か) を同時に生成する点で優れている。

さらに化学物質同士の関連性を概覧するために、化学物質ごとの類似度リストを元にして類似度の正方向行列を生成し、可視化手段の 1 つとして主成分解析を実施した。

平成 22 年度は RSort アルゴリズムの改良を進め抽出効率・精度を向上させたほか、前年度は手動で試行した総当たり比較を自動化し、短時間で効率良く解析計算を行う共通変動遺伝子の高速抽出・評価用

の解析プログラム PercellomeExplorer.exe (PE) を開発した。本プログラムにより、Percellome データベースの全データを対象とした化学物質暴露影響の比較解析が数クリックでほぼ瞬時に容易に実施できるようになり、遺伝子発現ネットワーク研究の効率が飛躍的に向上した。

試験運用を兼ねて化学物質による暴露影響の類似性解析を行い、例えばアセフェートによる遺伝子発現誘導とデヒドロ酢酸ナトリウムによる遺伝子発現誘導とに共通点が多いことを見いだしたほか、GO 情報を元に生成した候補遺伝子リスト、例えばトランスポゾン関連遺伝子リストをクエリとして Percellome データベース内を検索し、ホルムアルデヒドやアセフェート、デキサメサゾン、MEHP、ディー、クロルピリフォス等に反応して発現していることを見いだすなど、有効に機能することを確認した。

平成 23 年度は、引き続き RSort.exe および PE の改良を進めた。特に後者では類似度評価式を複数追加し、母集団のサイズに影響を受けにくい詳細評価を実行可能とした。また PE 専用データセットに依存せず、より柔軟な比較解析を実行するために、PE の作図解析機能を独立・強化した RSGLComparison.exe を新たに開発した。これらのソフトウェア活用により各化学物質の投与によって特徴的な発現パターンを示す要素遺伝子の化学物質間での同期状況を、発現誘導のピーク時間の要素を維持したまま網羅的に抽出することが可能になり、クラスター同基点からのネットワーク抽出を強力に推進した。

さらに遺伝子発現の周期性を評価して候補遺伝子を抽出するために高速フーリエ変換アルゴリズムを組み込んだ解析プログラム MF WaveAnalyzer.exe を新規開発した。これによりネットワーク上で、着目した遺伝子の直上あるいは直下の遺伝子を一括して抽出できるようになり、関連遺伝子の抽出作業効率が大幅に向上した。

(4) 胎児、ES 細胞、概日変動における自律的な遺

伝子発現データからのネットワーク描出 (北嶋)

平成 21 年度は、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) *in vitro* 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検討した。

野生型マウスの全胚の経時データベース (胎生 6.25 ~9.75 日の間 12 時点) 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行えることが示唆された。

他方、ES・EB 分化系における経時データベース (0 ~7 日まで 14 時点) 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を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、関連性は部分的にあるものの、野生型胚において再度検証する必要があるものと判明した。

平成 22 年度は、成熟期マウスの肝および視交叉上核 (SCN) サンプル由来の概日変動リズム 1 周期 (= 24 時間、Time point: 7 点 = 4 時間毎) に渡る網羅的ト

ランスクリプトームデータを用い、概日変動リズム遺伝子のひとつ Dbp 遺伝子について局所ネットワークの描出を検討した。ピアソン相関係数を利用し (α 値 0.9 以上) Dbp 遺伝子の発現と同様な遺伝子を抽出、さらに目視による検討により生物学的な変化が示唆されたものとして、肝では 81 プローブセット (ps) (64 遺伝子)、SCN では 44ps (39 遺伝子) の遺伝子リストが得られた。このうち、概日リズムとの関連が既知の遺伝子は肝では 6 遺伝子、SCN では 4 遺伝子であり、ほとんどが概日リズムとの関連が未報告の遺伝子であった。また、Nr1d2 遺伝子 (Rev-ErbA beta) のみ両遺伝子リストに共通していた。両リストにつき *in silico* でのプロモーター解析を検討したところ、肝では KLF の、SCN では EGR family、ETS1 及び KLF の結合配列が見いだされ、Dbp 遺伝子の関与する局所ネットワークの発現制御は肝と SCN では異なるが、KLF が関与する制御は共通である事が示唆された。

加えて、当毒性部が所有する 100 化合物を超える Percellome データベースを利用し、肝において Dbp 遺伝子の発現を抑制する化学物質の探索を経て、その際の経時データベースを活用する事で、抽出した遺伝子リストの妥当性を示す事ができた。肝において Dbp 遺伝子の発現を特に強く抑制する化学物質は、化審法での所謂白物質である 2-クロロ-4,6-ジメチルアニリン[0、3、10、30mg/kg]、有機リン系殺虫剤であるアセフェート[0、7、20、70mg/kg] 及び、食品添加物の保存料であるデヒドロ酢酸ナトリウム[0、30、100、300mg/kg]の 3 化合物であった。

平成 23 年度は、局所シグナルネットワークの描出の効率化を計るため遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、成熟期マウス肝の網羅的トランスクリプトームデータを解析した。具体的には新規に開発された MF WaveAnalyzer.exe を導入し、遺伝子発現変動波をフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関解析をおこなった。その結果、Dbp 遺伝子と同じ波長分布 (点灯 8 時間後に発現ピーク)

を示す遺伝子だけではなく、位相あるいは波長が異なるものを同時に抽出する事ができた。一連の操作で抽出できた遺伝子は計 460ps で、内訳は 0/24h に発現ピークのあるもの 43 ps、同 4h : 37 ps、同 8h : 90 ps (Dbp 遺伝子 2 ps を含む)、同 12h : 176 ps、同 16h : 73 ps、同 20h : 41 ps である。尚、これらの遺伝子リストの中に、多くの時計遺伝子が含まれており (0/24h: Arntl (=Bmal1)、Npas2、Nfil3、4h : 該当なし、8h : Dbp、Nr1d1 (=Rev-erba-alpha)、Nr1d2、Ppara、12h : Per1,Per3、16h : Per2、20h : Cry1,Rorc)、同手法の有効性が示された。

さらに位相別に遺伝子リスト要員の *in silico* プロモーター解析を検討した。Dbp と同じく、照明点灯後 8hr に発現ピークのある遺伝子群は、Dbp 結合部位及び Klf 結合部位を有する遺伝子と、Dbp 結合部位を持たず Klf 結合部位を有する遺伝子の 2 種に分類できることが判明した。点灯後 4 時間に発現ピークを有する遺伝子の中に Klf11 が存在しており、一連の解析により、経時的な遺伝子発現カスケードを捉えることに成功した。転写因子 Klf ファミリーと概日リズムとの関連については Guillaumond ら (Mol Cell Biol 30 (12) :30, 3059-3070, 2010) の報告が 1 報あるのみである。上田ら (Nature 418: 534-539, 2002) は、マウス肝を 4 時間ごとに採取し、遺伝子発現変動を網羅的に解析し、発現が概日リズムを示す 393 遺伝子を見出しているが、KLF ファミリーに属する遺伝子は Klf9 遺伝子が含まれるのみであり、これは Rev-ErbA 遺伝子のクラスターに分類されていた (Supplementary Table2)。したがって、本研究において見出され、Dbp 遺伝子の局所シグナルネットワークへの関与が示唆された Klf11 遺伝子についての新規性は高いものとする。以上のごとく、実データの解析と *in silico* プロモーター解析を組み合わせた本手法の有効性が確認された。

(5) 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ネットワークの描出 (北野) 大規模トランスクリプトームデータから初期反応

に関わる発現ネットワークを同定する手法の開発に向け、Percellome データベースの実際のデータを用いて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を実施した。

平成 21 年度は、初期反応ネットワークの描出に向け、Percellome データベースの実際のデータを用いて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を実施した。また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) の開発を開始した。評価・検討のための実データとしては、Percellome データベースより二つの化合物 (TCDD、TCDF) の単回暴露実験データを選択し、これらの実データから自動的に検出したネットワークを、毒性学専門家が別途選別した遺伝子情報に照らし合わせた結果、本手法では約 70% を網羅する高性能を有することが判明した。

AGCT を用いれば、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、処理速度も早いいため、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。

なお、*in silico* 実験により明らかになったネットワーク情報を可視化する際には、Systems Biology Markup Language (SBML) ベースの独自の解析アプリケーションソフトウェア Cell Designer を採用し、作図したネットワーク図の校正・改良を複数の専門家の意見を取り入れて効率的に進めるために、新しく開発した Web アプリケーションソフトウェア PAYAOLOGUE を用いた。

平成 22 年度は、独自のクラスタリング技術 (AGCT) など基本推定手法及びこれを実装した解析ソフトウェアの拡張と最適化を行った。また AGCT によるクラスタリングデータを元にしたインタラクティブ抽出とネットワークの自動描画も試み、良好な結果を得た。

H23 年度はユーザーインターフェイスを含めた AGCT の最終的な最適化を行った。この結果、AGCT の処理は、4 段階構成となった。すなわち①時系列データの前処理、②構造計算、③クラスタリング、及び出力結果フィルタリング、である。①の前処理としては、多次元データの時間要素の特徴をより細かく捉えるために幾何学手法の Wavelet transform を適用する。その後、②として主成分分析 (PCA) 法やスペクトラルクラスタリング法によってデータ構造の構築計算を行う。③としては、得られた構造に対して幾つかのクラスタリング手法 (Affinity Propagation、K-means、ect) を利用して、遺伝子の発現類似度によってグルーピングを行う。これらの処理により、大規模データから、遺伝子群間の相互作用関係の抽出が可能となった。クラスタリングを行った後ユーザにとって重要となるのは、全体構造の形成しているクラスター群から刺激反応を示すクラスターを選択することである。そのため、出力結果のフィルタリングの手続きを幾つか追加した。これにより無関係と思われる遺伝子情報を最初から取り除くのではなく、全ての情報の中から必要な情報がユーザによって決められていくコンセプトになっている。それによってデータの漏れ防止が期待される。

また、共発現する遺伝子は同じ転写因子による制御を受けている可能性が高いので、得られたクラスター情報をもとに、SHOE (Sequence Homology in Higher Eukaryotes) ソフトウェアの開発を開始し、これによってオルソログ制御領域の分析を行った。本処理によって、推定された相互作用関係の信頼度が向上するものと期待されている。

(6) その他

研究成果の速やかな社会還元と、国際的な共同研究の活性化を目的として、新たに Web サーバーを構築し、Web アプリケーション PercellomeWeb の in house 開発を行って、研究進捗に対応した新たなアルゴリズムに対応可能な研究情報公開サイトを開設した (<http://percellome.nihs.go.jp>)。

また菅野、相崎の指導の下、(株)NTT データによる委託研究を実施した。

平成 21 年度は発現データそのものを用いた独自の tmf 教師無しクラスタリングを実施した際、異なる化学物質暴露によっても同じクラスターに所属する率 = 同期発現率を算出する) によって、毒性ネットワークの基本要素を抽出する技術の改良を行った。

平成 22 年度は毒性反応シグナルネットワークの主要要素抽出精度を向上すべく、データ補正技術 MLANG (論文投稿準備中) の改良及びその独立拡張技術 (特許出願済み) を開発した。これらにより、マイクロアレイ測定におけるプローブ飽和現象やクロスハイブリダイゼーションに起因する計測誤差を大幅に小さくする事に成功した。

平成 23 年度はマイクロアレイよりも高精度かつ詳細なトランスクリプトーム解析を実現すると考えられている、次世代シーケンサを用いた RNA シーケンス (RNA-Seq) 技術の性能評価を行った。その結果、現状の RNA-Seq 技術でも、基本的には利用可能な性能水準に近づきつつあり、Percellome 手法の適用も不可能ではないと評価されたが、より厳密なデータ精度が必要なトキシコゲノミクス用途へ本格的に採用するためには数値化アルゴリズムなどいくつかの解決すべき問題があることを確認した。

D. 考察

本研究は、毒性発現の分子メカニズムに基づいて、最終的には実験動物を用いながら人に於ける毒性作用を、より迅速、正確、詳細、且つ見落とし無く予測可能とするための基盤技術を開発するために実施した。

この技術が実用化すれば更に、化審法や毒物劇物法の取り扱う物質のみならず、食品添加物、医薬部外品など、様々なエンドポイントの組み合わせで評価されてきた毒性の包括的評価への展望が開けるも

のと期待される。そして、「死ぬ毒性」あるいは「全身状態が悪くなる毒性」とは別途に評価されることの多かった「死なない毒性」、例えば記憶、視覚、聴覚、生殖能力などを失う毒性の評価の統合化も展望される。具体的にはドーモイ酸による記憶喪失や、エストロゲン様化学物質による内分泌かく乱現象など、特定の細胞の受容体を介する毒性、そのほかにも、遺伝毒性、発癌性、等がこれに含まれる。

遺伝子発現データの解析の一般的なアプローチとして、しばしば Phenotypic anchoring (観測される病理形態学的変化への関連付け) に基づくバイオマーカー検索が行われるが、バイオマーカーという局所的変化のみを観察する結果生じる網羅性の欠如と見落としのリスクの増大や、生体変化の最終的結果である病理形態との関連性に基づくための限界、すなわち初期応答情報への対応の困難さと毒性予測性能の低さが常に指摘されている。

これに対して、我々が提唱する毒性ネットワークに基づく毒性評価・予測技術は、初期～最終応答情報を包含する幅広い適応性能および、明確な関連性が不明の「点」(バイオマーカー)ではなく複数の線から成る「網」(ネットワーク)で生体反応を捉えることによって、格段の高感度性、頑強性及び網羅性が期待できることが示されつつある。

本研究では、独自開発になる教師無しクラスタリングや、複数の特徴抽出アルゴリズムによる解析から、網羅性を確保しつつ、生物学的意味を持つ遺伝子変動現象の抽出が可能とした。これらの技術により、ネットワークの要員遺伝子が抽出され、新規のネットワーク抽出の糸口が次々に得られている。既にこれらの要員遺伝子の連結作業を自動的に行う基礎技術を構築しつつあり、網羅性を確保した状態での毒性ネットワークの同定が効率的に実行可能になると見込まれる。

新規技術開発研究の成果は一般的に直ちに実用に耐え得るものでないことも多いが、本研究の成果は既に実用に供しつつあり、毒性の見落とし防止など

に効果を発揮している。構築済みデータベース (Percellome データベース) が化学物質の単回投与データを中心に置いている現状では反復暴露時の安全性評価に用いる際は注意が必要であるが、今後の研究計画で高精度の反復暴露データの取得を予定しており、近い将来において、より広い安全性試験研究への利用拡大が期待できる。

なお本研究では多数の独自技術を生成しているが、それに固執せず共同研究を展開する柔軟性を維持したことも研究推進に効果的であった。今後も国際的なバイオインフォマティクスプロジェクト Garuda との連携を引き続き進める予定であり、同サービスの運用開始の暁には、国際的な共同研究が展開され、研究進捗の飛躍的な加速が期待される。

E. 結論

本研究はほぼ計画に沿い進行し、申請者らが実用化した遺伝子発現データの絶対標準化手法 (Percellome 法) の活用により高品質かつ大量に蓄積されたデータと、毒性メカニズム解析のインフォマティクス開発とを融合し、そこに遺伝子欠失マウスなどの所見や人に於ける遺伝子病の所見等からの客観的な遺伝子情報を参照させる方法により、毒性判定・予測の精度をより向上させた。

特に最終年度までに生成したアルゴリズム・解析プログラムによって、化学物質による遺伝子発現反応の総当たり評価が、100 余の化学物質の情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベース (Percellome データベース) の全てを対象とし、尚且つ用量及び時間的要素を考慮して実施できるようになった。類似の発現ネットワークを作動させる化学物質をその類似の程度の順にリストアップする機能を有しており、この機能の応用で毒性作用の見落とし防止 (危険性の高感度推測) など、既に実用的な性能を有している。試験的に毒性評価への適用を行い、報告書を作成、或いは作成準備中である。

また従来困難であった遺伝子発現ネットワークの

自動描出についても、時間要素を反映したクラスタリング手法の開発により、要員の抽出が可能となり、オルソログ制御領域の分析を行うソフトウェア SHOE (Sequence Homology in Higher Eukaryotes) の開発と合わせ、ネットワーク構造の自動生成にも成功しつつある。

これらの研究成果によって、アーティファクト回避と網羅性維持を確保しつつ、生物学的意味を持つ遺伝子発現変動のハイスループット抽出を中心とした解析技術の開発に目処がついた。最終的には網羅的な毒性ネットワークの生成技術が開発可能と見込まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, 15 STANDARDIZATION OF GENE-EXPRESSION INFORMATION FOR THE SAFETY EVALUATION: ACTIVITIES IN JAPAN Applications of Toxicogenomics in Safety Evaluation and Risk Assessment, 2011 323-329, Darrell R. Boverhof (Editor), B. Bhaskar Gollapudi (Editor), John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-44982-0

J. Kanno, K. Aisaki, K. Igarashi, N. Nakatsu, Y. Kodama, K. Sekita, A. Takagi and S. Kitajima, Chapter 11 Application of Percellome Toxicogenomics to Food Safety, Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food, 2011, 184-198, Editor (s) : Ingemar Pongratz, Linda Bergander, Royal Society of Chemistry, ISBN: 978-1-84973-297-0, DOI: 10.1039/9781849732970-001 84

菅野純 : Percellome トキシコゲノミクスの進捗 医学のあゆみ, 236 (12)、1125-1126 (2011)

Kitano, H. The Theory of Biological Robustness and its Implication to Cancer. SYSTEMS BIOLOGY AND SYNTHETIC BIOLOGY Pengcheng Fu and Sven Panke John Wiley & Sons, Inc USA 529-547, 2009

北嶋 聡、「5.3 食品, 食品添加物, 食品汚染物質, 飼料添加物」、新刊トキシコロジー、朝倉書店、東京、2009年、pp. 118-126.

2) 雑誌

Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Yuhji Taquahashi, Noriko Moriyama, Eriko Ikeno, Nae Matsuda, Yumiko Saga, Bruce Blumberg, and Jun Kanno, Development of Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain sequence. *J Toxicol Sci.* 2012, Vol.37, No.2, 373-380.

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S., GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature.* 2011 Nov 27. 480 (7378) 557-560, doi: 10.1038/nature10656.

Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N., Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells., *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 26;412 (2) :366-72.

Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S., PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B., *Nat Cell Biol.* 2011 Jun;13 (6) :668-75.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine disrupter bisphenol A increases in situ estrogen production in the mouse urogenital sinus., *Biol Reprod.* 2011 Apr;84 (4) :734-42.

Kitano, H.; Ghosh, S.; Matsuoka, Y. Social engineering for virtual "big science" in systems biology. *Nature Chemical Biology.* 7 (6) , 323-326, published online

May 17, June 2011.

Tiago J.S. Lopes; Martin Schaefer; Jason Shoemaker; Yukiko Matsuoka; Jean-Fred Fontaine; Gabriele Neumann; Miguel A. Andrade-Navarro; Yoshihiro Kawaoka and Hiroaki Kitano. Tissue Specific subnetworks and characteristics of publicly available human protein interaction databases. *Bioinformatics* (2011) doi: 10.1093/bioinformatics/btr414, published online July 28, 2011. 27 (17) : 2414-21

Ghosh, S.; Matsuoka, Y.; Asai, Y.; Hsin, K-Y.; Kitano, H. Software for systems biology: from tools to integrated platforms. *Nature Reviews Genetics.* Published online Nov. 3, 2011.

Oginuma M, Takahashi Y, Kitajima S, Kiso M, Kanno J, Kimura A, Saga Y., The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite., *Development.* 2010 May;137 (9) :1515-22.

Saegusa Y, Woo GH, Fujimoto H, Inoue K, Takahashi M, Hirose M, Igarashi K, Kanno J, Mitsumori K, Nishikawa A, Shibutani M., Gene Expression Profiling and Cellular Distribution of Molecules with Altered Expression in the Hippocampal CA1 Region after Developmental Exposure to Anti-Thyroid Agents in Rats. *J Vet Med Sci.* 2010 Feb;72 (2) :187-95

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y., NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 23;107 (8) :3594-9.

Nils Gehlenborg; Seán I. O'Donoghue; Nitin S Baliga; Alexander Goesmann; Matthew A Hibbs; Hiroaki Kitano; Oliver Kohlbacher; Heiko Neuweger; Reinhard Schneider; Dan Tenenbaum and Anne-Claude Gavin, Visualization of omic's data for systems biology. *Nature Methods.* 7, 3s, 56-68, 2010

Hiroaki Kitano, Grand Challenges in Systems Physiology, *Front Physiol.* 1(3), 1-3, 2010

Hiroaki Kitano, Violations of robustness trade-offs,

- Molecular Systems Biology, 6(384), 1-8, 2010
- Tetsuya Shiraishi, Shinako Matsuyama, Hiroaki Kitano, Large-Scale Analysis of Network Bistability for Human Cancers, PLoS Computational Biology, 6(7), 1-12, 2010
- Matsuoka Y, Ghosh S, Kikuchi N, Kitano H., Payao: a community platform for SBML pathway model curation., Bioinformatics, 26(10), 1381-1383, 2010
- Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y., Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. Mol Cell Biol. 2009 Dec;29 (24) :6391-400
- Tanemura K, Igarashi K, Matsugami TR, Aisaki K, Kitajima S, 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. 2009;34 Suppl 2:SP279-86. Review.
- Hase, T.; Tanaka, H.; Suzuki, Y.; Nakagawa, S.; Kitano, H. Structure of Protein Interaction Networks and Their Implications on Drug Design. PLoS Computational Biology. 5, 10, e1000550, Oct. 2009.
- Le Novere, N.; Hucka, M.; Mi, H.; Moodie, S.; Schreiber, F.; Sorokin, A.; Demir, E.; Wegner, K.; Aladjem, M.; Wimalaratne, S.; Bergman, F.; Gauges, R.; Ghazal, P.; Kawaji, H.; Li, L.; Matsuoka, Y.; Villeger, A.; Boyd, S.; Calzone, L.; Courtot, M.; Dogrusoz, U.; Freeman, T.; Funahashi, A.; Ghosh, S.; Jouraku, A.; Kim, S.; Kolpakov, F.; Luna, A.; Sahle, S.; Schmidt, E.; Watterson, S.; Wu, G.; Goryanin, I.; Kell, D.; Sander, C.; Sauro, H.; Snoep, J.; Kohn, K.; & Kitano, H. The Systems Biology Graphical Notation. Nature biotechnology. 27, 8, 735-741, Aug. 2009.
- Ktantz, M.; Ahmadpour, D.; Ottosson, L-G.; Warringer, J.; Waltermann, C.; Nordlander, B.; Klipp, E.; Blomberg, A.; Hohmann, S.; Kitano, H, Robustness and fragility in the yeast high osmolarity glycerol (HOG) signal-transduction pathway., Molecular Systems Biology., 5(281), 1-7, 2009
- Matsuoka, Y.; Ghosh, S.; Kitano, H. Consistent design schematics for biological systems: Standardization of representation in biological engineering. Journal of the Royal Society Interface. 6, Suppl 4, S393-404, June 2009.
2. 学会発表
- Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Humanized Steroid and Xenobiotic Receptor Mouse by homologous knock-in of the human Steroid and Xenobiotic Receptor Ligand Binding Domain." the 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2012.3.15) San Francisco, USA
- 菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、第34回日本高血圧学会総会 SHR学会合同シンポジウム (2011.10.22) (宇都宮)、口演
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi. Kitajima, Percellome Toxicogenomics Project and its application to the studies on anticancer agents., 47th Congress of the European Societies of Toxicology, (2011.8.30) (Paris, France) , poster
- 相崎健一、五十嵐勝秀、種村健太郎、安彦行人、高橋祐次、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純、Percellome プロジェクト・オンライン解析システム、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7.13) (横浜)、ポスター
- 菅野 純、イントロダクション：コリンエステラーゼ阻害物質による遅発性の中枢神経毒性—サリンの臨床から学ぶ動物モデルの機構解析—、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7.13) (横

- 浜)、口演
- 種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、中枢神経系の発生-発達期における神経活動かく乱による遅発性中枢影響解析—幼若期雄マウスへのアセフェートによる成熟後の脳高次機能障害について—、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7.13) (横浜)、口演
- 北嶋 聡、小川幸男、長野嘉介、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、安彦行人、山本雅也、菅野 純、Percellome 法によるシックハウス症候群レベルの極低濃度暴露下での吸入トキシコゲノミクス、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7.13) (横浜)、口演
- 五十嵐勝秀、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純、ヒト型 PXR 生理的発現マウス系の全身臓器トランスクリプトーム解析、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7.13) (横浜)、口演
- 菅野 純、Percellome 解析：時間軸と用量軸の融合と絶対値による解析精度の向上、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7.12) (横浜)、口演
- 菅野 純、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、種村健太郎、ヒト型リガンド結合ドメインノックイン PXR マウスの遺伝子発現応答特性、第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー (2011.7.8) (仙台)、ポスター
- 種村健太郎、五十嵐勝秀、佐藤英明、菅野 純、発生・発達期のビスフェノール A 暴露による遅発中枢影響解析、第 29 回内分泌代謝学サマーセミナー (2011.7.8) (仙台)、ポスター
- 菅野 純、Percellome Toxicogenomics Project の進捗と Chemical Biology としての毒性学、JSBi 応用システムバイオロジー研究会第 3 回応用システムバイオロジー研究会 (2011.6.27) (福岡)、口演
- Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its application to studies on anticancer agents., the 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. (2011.3.8) (Washington D.C., USA), poster
- Natalia Polouliakh, Jun Kanno, Yukiko Matsuoka, Ken-Ichi Aisaki, Richard Nock, Frank Nielsen, Keigo Oka, Satoshi Kitajima and Hiroaki Kitano, Discovery of Gene Network Regulated by the Toxicity Equivalent Factor of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF) chemicals., the 11th International Conference on System Biology (2010.10.11) (Edinburgh, UK), poster
- 菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome トキシコゲノミクスの抗がん剤研究への応用、第 69 回日本癌学会学術総会 (2010.9.24) (大阪)、口演
- 菅野 純、ケミカルバイオロジーとしての Percellome Toxicogenomics Project、第 24 回「ケミカルバイオロジー研究領域」勉強会、理化学研究所 (2010.9.15)
- 菅野 純、北嶋 聡、高橋祐次、五十嵐勝秀、相崎健一 インフォマティクス局面にある Percellome トキシコゲノミクスの食品・食品添加物への適用、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会 (2010.6.16) (沖縄) 口演
- 高木篤也、北嶋 聡、五十嵐勝秀、相崎 健一、江馬 眞 菅野 純 Percellome 手法を用いた TCDD 投与マウスの胎児口蓋の遺伝子発現解析 (3)、第 37 回日本トキシコロジー学会 学術年会 (2010.6.17) (沖縄) 口演
- Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Hirotugu Asano, Kinichi Nakashima, Glucocorticoid induces expression of astrocyte marker GFAP mRNA in mouse neural stem cells. 14th International Congress of Endocrinology, (2010.3.29) (Kyoto), poster
- 菅野 純、分子メカニズムとヒト影響を結ぶツールとしてのパーセローム系の開発、第 3 回 In vivo 実験医学シンポジウム、学士会館 (2009.12.9) (東京)
- 菅野 純、相崎健一、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトの進捗—インフォマティクス構築へ—、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、

- (2009.7.7) (岩手)、口演
- 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、(2009.3.28) (京都)、口演
- 菅野 純、Percellome 遺伝子発現解析標準化及び解析手法、第11回癌治療増感研究シンポジウム、(2009.2.14) (奈良)、口演
- 北野宏明. シグナルネットワーク創薬の最先端. バイオファイナンスギルド第9期第8回/9回セミナー「次世代のシグナル伝達医薬・抗がん剤」、バイオフロンティアパートナーズ特別講堂、Apr. 8、2011. (invited)
- 北野宏明. Systems medicine. LO 皮膚科学研究会夏季シンポジウム、チサンホテル浜松町、June 11、2011. (invited)
- 北野宏明. システムバイオロジーの起源と展開. 電子情報通信学会ニューロコンピューティング研究会/情報処理学会バイオ情報学研究会 合同研究会、琉球大学、June 23、2011. (invited)
- 北野宏明. システムトキシコロジープラットフォーム. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜、July 12、2011. (invited)
- 北野宏明. システム創薬と新たなグローバルプロジェクトの可能性. 東京大学医科学研究所 G-COE 特別セミナー、東京大学医科学研究所 (医科学教育セミナー)、July 13、2011. (invited)
- Polouliakh, N. 時系列データから遺伝子ネットワーク推定. Japanese Society of Bioinformatics (JSBi) 第3回 応用システムズバイオロジー研究会、九州大学、福岡、July 27、2011. (invited)
- Kitano, H. Robustness and Fragility of Biology Systems. Karles' Invitational Conference on Microbial Systems and Synthetic Biology, Naval Research Laboratory, USA, Aug. 15, 2011. (invited)
- Kang, H.; Ghosh, S.; Suzuki, K.; Matsuoka, Y.; Kitano, H. Integrated experimental and computational analysis for the dynamics of Tamoxifen resistance in MCF-7 cell lines. ICSB 2011, Rosengarten Conference Center, Mannheim, Germany, Aug. 29, 2011. (poster presentation)
- Ghosh, S.; Matsuoka, Y.; Kitano, H. iPathways-biological pathways on your palm! ICSB 2011, Rosengarten Conference Center, Mannheim, Germany, Aug. 30-31, 2011. (poster presentation)
- S. Ghosh, Y. Matsuoka, A. Funahashi, H. Takizawa, N. Hiroi, Y. Asai, T. Abe, T. Okamoto, Y. Kido, H. Oka, T. Nomura, R. Adams, N. Hanlon, N. Tsorman, A. Clark, S. Gilmore, A. Yamaguchi, H. Mi, A. Muruganujan, P. D. Thomas, V. Satagopam, R. Schneider, T. Ohta, M. Miwa, S. Ananiadou, J. Tsujii, M. Wybrow, K. Marriott, I. Goryanin, H. Kitano. GarudaTM □ Towards an integrated platform for systems biomedicine. ICSB 2011, Rosengarten Conference Center, Mannheim, Germany, Aug. 31, 2011. (poster presentation)
- Kitano, H. How networks can be used to find diagnostic and therapeutic candidates. ICSB 2011 Workshop 4: Systems biology to personalize medication and to find novel drug candidates, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany, Sep. 1, 2011. (invited)
- S. Ghosh, Y. Matsuoka, A. Funahashi, H. Takizawa, N. Hiroi, Y. Asai, T. Abe, T. Okamoto, Y. Kido, H. Oka, T. Nomura, R. Adams, N. Hanlon, N. Tsorman, A. Clark, S. Gilmore, A. Yamaguchi, H. Mi, A. Muruganujan, P. D. Thomas, V. Satagopam, R. Schneider, T. Ohta, M. Miwa, S. Ananiadou, J. Tsujii, M. Wybrow, K. Marriott, I. Goryanin, H. Kitano. GarudaTM □ Towards an integrated platform for systems biomedicine. Garuda 5 Workshop, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany, Sep. 1, 2011. (poster presentation)
- Kitano, H. Garuda Vision and Goals. Garuda Five Workshop, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany, Sep. 1, 2011.
- Kitano H. Robustness and Fragility of Disease Networks. 1st International Systems Medicine Symposium. Luxembourg Centre for Systems Biomedicine,