

201133003A

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 23 年度 総括・分担報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 24 (2012) 年 4 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 23 年度 総括・分担報告書

研究代表者 大迫誠一郎

平成 24 (2012) 年 4 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 疾患生命工学センター 大迫 誠一郎	
II	分担研究報告書	
1.	サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成	・・・・・・・・・・9
	国立環境研究所 環境リスク研究センター 曾根 秀子	
2.	限定 ES 細胞毒性試験における遺伝子発現情報からの一般化に関する研究	・・・・・・・・・・16
	産業技術総合研究所 生命情報工学センター 藤渕 航	
3.	ヒト ES 細胞の培養ステージの違いに試験にダイオキシン(TCDD)曝露の晩発的影響	・・・・・・・・・・22
	東京大学 疾患生命工学センター 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。今年度実施した各研究項目の概要は以下であり、1) 2) に示すように確率推論による化合物の晩発性影響予測や化合物影響の類型化に実効性があることが示された。

1) サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成：化学物質の安全性評価において、重要な課題であるヒトへの生体影響予測を可能にするシステムの確立のため、神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワークを作成する目的で、ヒト胚性幹細胞試験（EST）の様々ステージの分化細胞に対してサリドマイド曝露し、その後分化した神経系細胞の形態を観察した。胚様体（EB）にサリドマイドを曝露した場合、または神経上皮細胞分化後に曝露した場合の遺伝子発現をマイクロアレイで解析、遺伝子オントロジー（GO）を自己組織化マップによって類型化し、アノテーション間のネットワーク解析を試みた。初期曝露では、Embryonic（胎生）やForebrain（前頭脳）のGOがNeuro-system（神経システム）を抑制する関係にあった。一方、後期曝露では、Necrosis（壊死）のGOがNeuro-SystemやNeurogenesis（神経新生）のGOを抑制する関係にあり、初期と後期曝露で作用メカニズムが異なることが示唆された。

2) 限定ES細胞毒性試験における遺伝子発現情報からの一般化に関する研究：限られた数の既知の毒性化合物を用いたES細胞試験から、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。10種の毒性既知の化合物のマイクロアレイの結果から多変量解析の手法を用いて10遺伝子を選択、20種の毒性化合物の予測を行った結果、神経毒、発癌毒、変異原性のどのカテゴリーにおいても90%以上の高性能な予測率が得られた。

3) ヒトES細胞の培養ステージの違いにダイオキシン（TCDD）曝露の晩発的影響：アリアル hidrocarbon 受容体（Ahr）は多環芳香族炭化水素やダイオキシンなどの体外異物に反応する核内受容体であり、個体発生過程において活性化が起きると催奇形性等の様々な生体影響を引き起こす。ヒトES細胞を用い、神経系細胞発生過程においてダイオキシンによるAhrの活性化の影響を調べた。Ahr活性化のバイオマーカーである

CYP1A1 の誘導は、形成された EB に対する曝露で認められ、未分化 ES 細胞や分化した神経系細胞では認められなかった。24 時間曝露後 ES 細胞や分化神経系細胞への 24 時間曝露では、その後神経系細胞に分化誘導させた際の分化マーカーへの影響はなかったが、EB に対する曝露ではその後のニューラルロゼッタの形成率が対照群や他の処理群より上昇し、NESTIN、MTAP2 のレベルが高く、SOX17、FOXA2 の低下することがわかった。今回の結果より、EB 形成後期の神経系誘導条件では TCDD に対する反応性が他のステージより高く、またその結果として内胚葉系の細胞の分化を阻害し、外胚葉系の細胞の分化率を上昇させることが示唆された。

共同研究者

サブテーマ 1： サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成

○曾根秀子 国立環境研究所 環境リスク研究センター 主任研究員

○赤沼宏美 国立環境研究所 環境リスク研究センター NIES アシスタントフェロー

サブテーマ 2： 限定 ES 細胞毒性試験における遺伝子発現情報からの一般化に関する研究

○藤渕航 産業技術総合研究所 生命情報工学センター チーム長

サブテーマ 3： ヒト ES 細胞の培養ステージの違いにダイオキシン（TCDD）曝露の晩発的影響

○大迫誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授

○今西哲 東京大学 疾患生命工学センター 特任研究員

○山根順子 東京大学 疾患生命工学センター 特任研究員

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。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ことを目的とする。

B. 研究方法

サブテーマ 1： サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成：ヒト ES 細胞（KhES-3 株）は京都大学プロトコルに基づき維持培養を行った。サリドマイドの濃度は $10^{-7}M$ とし、胚様態形成期を初期曝露、神経分化後の曝露を後期曝露とした。0.01% DMSO をコントロールとして、初期曝露、及び後期曝露での遺伝子変動をマイクロアレイ（Agilent Technologies, SurePrint G3 Human GE 8x60 1color）にて測定を行った。ベイジアンネットワーク解析には、コントロールに比

べ 2 倍以上変動した遺伝子を自己組織化マップ（Self-Organizing Map, SOM）にて 30 のクラスターに分類し、各クラスターに分類された遺伝子に関して統計的に有意なアノテーション遺伝子を選別した。

サブテーマ 2： 限定 ES 細胞毒性試験における遺伝子発現情報からの一般化に関する研究： 1） 限定毒性マイクロアレイからのマーカー遺伝子の探索： 10 種のマイクロアレイデータ（発達神経毒性 5 種、変異原性 5 種）から、多変量統計解析の手法の 1 つである正準相関解析（または対応分析と呼ばれる）を用いて、毒性カテゴリー名は情報として加えず（教師なし）に自動的に相関最大化に基づいて、各化合物（場合によっては化合物群）と相関のある遺伝子を抽出した。2） これまで用いたベイジアンネットワークの推定だけでは、本当に遺伝子ネットワークが情報を加えているのか不明なため、異なる手法による遺伝子ネットワークでも予測率が増減するかを試す必要がある。ここでは GGM（グラフィカルガウシアンモデル）と、CrossR（交差相関係数）を用いた遺伝子ネットワークを加えた場合の SVM 毒性予測への影響も試験した。3） 探索したマーカー遺伝子での 20 化合物毒性予測： 上述の正準相関解析を元に得られた 10 マーカー遺伝子を用いた 20 化合物によるヒト ES 細胞（KhES3）に対する大規模曝露試験を行った（東京大学）。のべ約 9768 データを用い産業技術総合研究所で上記遺伝子ネットワークによる予測を行い、昨年度の経験による遺伝子マーカー選択での 15 化合物予測の結果と比較した。

サブテーマ 3： ヒト ES 細胞の培養ステージの違いにダイオキシン（TCDD）曝露の晩発的影響： ヒト ES 細胞は（KhES-1 株）を使用、ES 細胞の維持分化には 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 MEF 除去後に SUMILON PrimeSurfase 96U を用い、播種時点（Day0）から 24 時間、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD、0.1nM-10nM）を添加した EB 培地で EB 形成を行った。Day8 で神経誘導培地に変更し Day9 で TCDD

に曝露した群も設けた。形成された EB を Day10 でオルニチンラミニンコートプレートに播種、Day12 から神経増殖培地に変え、Day28 で再播種、Day40 まで培養して神経系細胞集団を分化させ。対照群の細胞では Day35 での TCDD 曝露も行った。各ステージ曝露後 24 時間目の RNA を回収、また Day28 および最終段階（Day40）の RNA を回収し各種 mRNA を定量 RT-PCR で測定した。また MAP2 および TH による免疫染色を施し神経系細胞の分化状態を観察した。

（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： サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成： サリドマイド曝露により変動した遺伝子を GO により分類し、代表的な GO をノードとしてベイジアンネットワーク解析を行った。初期曝露のネットワークでは、胚様体（EB）分化に関連した遺伝子群がネットワークの上位に位置し、Forebrain 関連の遺伝子や、Proliferation に関する遺伝子群と正の相関を示している。さらに、Proliferation も Embryonic と正の相関関係にあり、サリドマイドの曝露により細胞数が増加することが予測される。また、Proliferation は Transcription や Neuro-System 関連遺伝子とも正の相関を示している。Chemical, Proliferation, Transcription, Neuro-System の関連性を見ると、サリドマイドの添加により、Chemical 応答関連遺伝子が増加し、細胞増殖を促し、最終的に転写活性、および神経系の誘導が促進されることが

示唆される。全体でみると、Embryonic（胎生）や Forebrain（前頭脳）の GO が Neuro-system（神経システム）を抑制する関係にあること予測された。一方、後期曝露のネットワークでは、Embryonic に代わり Necrosis が上位にきており、Neuro-System や Neurogenesis を抑制することが示された。

サブテーマ 2： 限定 ES 細胞毒性試験における遺伝子発現情報からの一般化に関する研究： 1) 限定毒性マイクロアレイからのマーカー遺伝子の探索：10 種のマイクロアレイデータ（発達神経毒性 5 種、変異原性 5 種）から、多変量統計解析の手法の 1 つである正準相関解析（または対応分析と呼ばれる）を用いて、毒性カテゴリー名は情報として加えず（教師なし）に自動的に相関最大化に基づいて、各化合物（場合によっては化合物群）と相関のある遺伝子を抽出した。これにより、固有値空間に毒性化合物と遺伝子の関係が視覚化できた。また、各固有値において寄与率の高い遺伝子を 1～数個ずつ計 10 遺伝子を毒性マーカー候補として選択した。2) 遺伝子ネットワークの予測率への影響解析：昨年度まで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 以外に GGM と CrossR を用いた予測を行った。予測は昨年度の 15 化合物に対して行い、結果を RX-TAOgen と比較した。その結果、3 種の遺伝子ネットワークのうち、CrossR（交差相関係数）を用いたものが最も予測率が向上した。3) 探索したマーカー遺伝子での 20 化合物毒性予測：正準相関解析に基づいて選択した 10 遺伝子での大規模 RT-PCR による 20 化合物（各 2 リピート計 40 サンプルデータ）の SVM 予測を上記と同じように 3 種の遺伝子ネットワークを使用した方法を用いて行った。その結果、ベイジアンネットワークを用いると予測率が向上すること、及び予測率は 3 種のどのカテゴリー（発達神経毒性、発癌毒性、変異原性）においても 90-100% と非常に高い予測率を示した。

サブテーマ 3： ヒト ES 細胞の培養ステージの違いにダイオキシン（TCDD）曝露の晩発的影響：Ahr 活性化のバイオマーカーである CYP1A1 の誘

導は Day9 曝露のみで認められ、Day0 曝露群と Day35 曝露群での反応性は認められなかった。Day40 まで培養した結果、どの曝露群においても神経系の十分な分化が認められた。Day40 までの培養で Pou5f1 や神経系分化マーカーである Mtap2 の発現には Day0 曝露群でも Day35 曝露群でも TCDD による変動は認められなかった。しかし、Day9 曝露群を Day25 まで神経誘導培養した段階でのニューラルロゼッタ（胚児の神経管と同義の構造体）の形成率が対照群や他の処理群より上昇していることが観察された。そこで Day28 における培養系から RNA を採取し、神経細胞マーカーならびに胚葉系マーカーの発現レベルを見たところ、Mtap2, Gfap, Th のレベルが 1nM 以上の TCDD 曝露群で高く、Sox17, Foxa2, Pdgfr, Kdr のレベルが 1nM 以上の TCDD 曝露群で著しく低下していることがわかった。

D. 考察

サブテーマ 1： サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成：本研究では、GO 解析による同一クラスター内の複数の遺伝子を同調して変動する遺伝子群と位置づけ、GO 間のネットワークを解析した。この独自の試みを実施するために、サリドマイドの初期曝露と後期曝露の影響の特徴づけを行った。その結果、初期曝露と後期曝露では影響を受ける遺伝子群が異なり、さらに曝露によって反応した遺伝子群の相互関係も異なることが可視的にわかった。GO を用いたベイジアンネットワークは、本研究が初めての試みであるが、個々の遺伝子ネットワークと異なり、影響の様子が俯瞰できるため化合物による生体影響や病態をより説明しやすいと考えられた。

サブテーマ 2： 限定 ES 細胞毒性試験における遺伝子発現情報からの一般化に関する研究：単純に SVM だけを用いるよりも遺伝子ネットワークを用いた方が、予測率が向上する結果が得られたのは学術的に意義が高い。ベイジアンネットワークによる予測率の向上は安定している。また、経験的選択遺伝子による交差相関法による劇的な予測率の上

昇は興味深い。可能性として、経験的選択遺伝子は数学的に相関のあまりない遺伝子を選んでいるため、単純な相関係数に基づく GGM では相関が検出できずに予測が却って悪くなったのかも知れない。

また、今回、10 化合物のマイクロアレイだけで知識を入れずに遺伝子の選択法を行った。それにも関わらず 90%以上と非常に高性能な予測率が得られたことは、ES 細胞を用いるだけで少数の化合物からしか遺伝子発現の挙動が得られていなくても、未知の化合物の影響を予測することが可能だと示唆を与えている。この結果は統合的な ES 細胞系による化合物毒性予測のパイプラインを組み上げることができ、本研究の目的を十分に達したと考えられる。

サブテーマ 3： ヒト ES 細胞の培養ステージの違いにダイオキシン (TCDD) 曝露の晩発的影響： 今回の結果は、EB 形成後期の神経系誘導条件では TCDD に対する反応性が他のステージより高いことを示している。またその結果として内胚葉系ならびに中胚葉系の細胞の分化が阻害され、外胚葉系の細胞の分化率を上昇させることを示唆している。発生過程のヒト胚児では神経を形成する外胚葉系の細胞群より、むしろ中内胚葉系の細胞の感受性が高く、分化あるいは増殖の阻害が起きるものと考えられた。マウスやラットにおけるダイオキシン胎児期曝露試験では各種の脳発達影響が報告されている。ヒトにおける影響がいかなるものか定かでないが、仮に影響があると想定した場合、それは神経系細胞意外の他の細胞を構成する胚葉系の分化増殖に変化が生じた結果間接的に起きるものであると考えられる。

E. 結論

サブテーマ 1： サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成： 評価法として導入するベイズ推定モデルにおいては、検討したサリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク解析で、個々の遺伝子発現変動だけではなく、遺伝子オントロジー (GO) 解析の有用性が認められた。

サブテーマ 2： 限定 ES 細胞毒性試験における遺伝子発現情報からの一般化に関する研究： 本研究予算で使用できる毒性化合物の種類が当初の計画書よりも大幅に縮小せざるを得なかったが、機械学習に用いる学習量の必要最低ラインで研究を遂行し、概ね優れた結果が得られた。全体を統合して予測するシステムも原型が完成した。

サブテーマ 3： ヒト ES 細胞の培養ステージの違いにダイオキシン (TCDD) 曝露の晩発的影響： ヒト ES 細胞からの神経系細胞分化培養系を用いてダイオキシン (TCDD) の分化に及ぼす影響を初めて検討した。ヒトにおいて TCDD は神経系の細胞の分化増殖を阻害せず、むしろ相対的に分化率を増加させた。

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. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin XY, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, and Ohsako S. Effects of Methylmercury Exposure on Neuronal Differentiation on Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Toxicol Lett* (2012) (in press)
2. Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Fujisawa N, Kawaguchi T, Ohsako S, Hara S, Uematsu S, Akira S, and Tohyama C. Critical role of mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Sci* (2012) (in press).
3. Nagano R, Akanuma H, Qin XY, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, and Sone H. Multi-Parametric Profiling Network Based on Gene Expression and Phenotype Data: A Novel Approach to Developmental Neurotoxicity Testing. *Int J Mol Sci* 13(1), 187-207, (2012).
4. Ohsako S. Perinatal exposure to environmental

- chemicals induces epigenomic changes in offspring. *Genes Environ* 33, 43-49, (2011).
5. 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).
 6. 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).
 7. 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).
 8. 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).
 9. Alam MS, Ohsako S, Tay TW, Tsunegawa N, Kanai Y, and Kurohmaru M. Di(n-butyl) phthalate induces vimentin filaments disruption in rat Sertoli cells: A possible relation with spermatogenic cell apoptosis. *Anatomia Histologia Embryologia* 39, 189-193, (2010).
 10. 大迫誠一郎、エピジェネティクスと環境医学、分子予防環境医学、本の泉社、568-575、(2010).
 1. Qin XY, Fukuda T, Yang L, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, and Sone H. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 13(5), 296-306, (2012).
 2. Nagano R, Akanuma H, Qin XY, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, and Sone H. Multi-Parametric Profiling Network Based on Gene Expression and Phenotype Data: A Novel Approach to Developmental Neurotoxicity Testing. *Int J Mol Sci* 13(1), 187-207, (2012).
 3. Qin XY, Wei F, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, and Sone H. siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 585(20), 3310-3315, (2011).
 4. Qin XY, Zaha H, Nagano R, Yoshinaga J, Yonemoto J, and Sone H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol Lett* 206(2), 152-157, (2011).
 5. Imanishi S, Okura M, Zaha H, Yamamoto T, Akanuma H, Nagano R, Shiraishi H, Fujimaki H, and Sone H. Prenatal Exposure to Permethrin influences Vascular Development of Fetal Brain and Adult Behavior in Mice Offspring. *Environ Tox* (2012) (in press).
 6. Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, and Takahashi T. In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16331-16335, (2010).
 7. Sone H and Akanuma H. Oxidative Stress-Mediated Signaling Pathways by Environmental Stressors. In: Tahira Farooqui and Akhlaq A. Farooqui editors. *Molecular Aspects of Oxidative Stress on Cell Signaling in Vertebrates*

曾根秀子 : 研究分担者

- and Invertebrates. Hoboken, NJ., Wiley-Blackwell, March, in press (書籍) (2011).
- 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(3), 636-643, (2010).
 - Sone H, Akanuma H, and Fukuda T. Oxygenomics in environmental stress. *Redox Rep* 15(3), 98-114, (Review) (2010).
 - 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).
 - Sone H, Fukuda T, Toyoshiba H, Yamanaka T, Perham F, Portier CJ. 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).
 - 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).
 - human cell information for cell studies and differentiation analyses. *Database* bar046, (2011).
 - Fujibuchi W, Aburatani S, Yamane J, Imanishi S, Akanuma H, Sone H, and Ohsako S. Prediction of Chemical Toxicity by Network-based SVM on ES-cell Validation System. *The Proceedings of the 2011 Joint Conference of CBI-Society and JSBi*, (2011).
 - Pessiot JF, Kim H, and Fujibuchi W. Learning similarity functions for multi-platform gene expression data. *SIG-BIO*, (2011).
 - Pessiot JF, and Fujibuchi W. A ranking-based alternative to the discriminant analysis framework. *Behaviormetric Society of Japan*, (2011).
 - Miura K, Fujibuchi W, and Sasaki I. Review: Alternative pre-mRNA splicing in digestive tract malignancy. *Cancer Sci* 102(2), 309-316, (2011).
 - Wijaya E, Pessiot JF, Frith MC, Fujibuchi W, Asai K, and Horton P. In Search of True Reads: A Classification Approach to Next Generation Sequencing Data. *Intl. Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops*. 37, 561-566, (2010).
 - Pessiot JF, Chiba H, Hyakkoku H, Taniguchi T, and Fujibuchi W. PeakRegressor identifies composite sequence motifs responsible for STAT1 binding sites and their potential rSNPs. *PLoS ONE*, 5(8), e11881, (2010).
 - Tochigi Y, Sato N, Sahara T, Wu C, Saito S, Irie T, Fujibuchi W, Goda T, Yamaji R, Ogawa M, Ohmiya Y, and Ohgiya S. Sensitive and convenient yeast reporter assay for high-throughput analysis by using a secretory luciferase from *Cypridina noctiluca*. *Anal Chem* 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. Cell Death and Cancer (Edited by Prof. Samali A) 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs, *Cancers*
- 藤 航 : 研究分担者**
- Pessiot JF, Kim H, and Fujibuchi H. Pairwise Ranking Component Analysis, submitted to *Knowledge and Information Systems* (under revision review).
 - Hatano A, Chiba H, Moesa HA, Taniguchi T, Nagaie S, Yamanegi K, Takai-Igarashi T, Tanaka H, and Fujibuchi W. CELLPEDIA: a repository for

Special Issue, 2, 1717-1730, (2010).

11. 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」、2010-BIO-20、No.12、(2010).
12. 金蕙鈴、加藤毅、茂櫛薫、田中博、藤渕航 正規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、2010-BIO-20、No.9、(2010).
13. 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).
14. 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、シーエムシー出版、265-273、(2010).
15. 加藤毅、藤渕航 Kernel Classification Methods for Cancer Microarray Data, Medical Biostatistics for Complex Diseases, Wiley-Blackwell, 279-303, (2010).

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

1. 曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西哲、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)

分担研究報告書

サリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク作成

研究分担者

曾根 秀子

独立行政法人国立環境研究所 主任研究員

研究要旨

化学物質の安全性評価において、重要な課題であるヒトへの生体影響予測を可能にするシステムの確立のため、ヒト胚性幹細胞試験 (EST) を利用した影響評価のためのデータ適応法の標準化に関する研究を、サリドマイドをモデル化合物として、神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワークを作成し、影響の特性を検討した。KhES-3由来胚様体にサリドマイドを曝露した場合、神経上皮細胞分化後に曝露した場合のRNA サンプルをマイクロアレイで mRNA 発現解析を行い、遺伝子オントロジー(GO)を自己組織化マップによって類型化し、アノテーション間のネットワーク解析を試みたところ、初期曝露では、Embryonic (胎生) や Forebrain(前頭脳)の GO が Neuro-system(神経システム)を抑制する関係にあること予測された。一方、後期曝露では、Necrosis(壊死)の GO が Neuro-System や Neurogenesis (神経新生) の GO を抑制する関係にある事を見出し、初期と後期曝露で作用メカニズムが異なることが示唆された。

赤沼宏美

独立行政法人国立環境研究所・NIES 准特別研究員

A. 研究目的

ヒト胚性幹 (ES) 細胞から神経細胞への分化系を活用した化学物質の安全性評価プロトコルの標準化のためには、陽性化合物を活用した基盤研究が必須である。

催奇形性を示す化合物として報告されてきたサリドマイドは、近年になって、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。サリドマイドの催奇形性は、曝露時期により多様であることが知られている。ヒトでの四肢損傷は、7週以降の曝露で多発し、一方、知能発達や知覚神経障害は、妊娠 20-24 日目の曝露で頻発することが報告されている。これまでの研究において、ドーパミンニューロン分化前の未成熟神経細胞の時期にサリドマイ

ドを曝露すると、MAP2 陽性神経細胞が増加し、細胞障害を引き起こすメチオニン代謝中間体の一物質であるシスチンも上昇することを見出した。さらに、胎児毒性を有するサリドマイドをドーパミンニューロン分化時期に曝露し、神経細胞系列の細胞形態変化とメチオニン代謝の影響を解析したところ、分化前曝露の影響と異なっていた。本研究の最終目標は、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ことである。

そこで本年度は、ヒト ES 細胞から神経細胞の分化過程は多段階である事を踏まえ、サリドマイドをモデル化合物として、曝露時期の違いによる神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワークを作成し、影響の特性を検討した。

B. 研究方法

ヒトES細胞 (KhES-3 株) は京都大学プロトコルに基づき維持培養を行った。神経分化及び、サリドマイドの曝露時期は図 1 に示した通りである。サリドマイドの濃度は $10^{-7}M$ とし、胚様態形成期を初期曝露、神

経分化後の曝露を後期曝露とした。0.01% DMSOをコントロールとして、初期曝露、及び後期曝露での遺伝子変動をマイクロアレイ (Agilent Technologies, SurePrint G3 Human GE 8x60 1color) にて測定を行った。ベイジアンネットワーク解析にはまずコントロールに比べ2倍以上変動した遺伝子を抽出し、続いて自己組織化マップ (Self-Organizing Map, SOM) にて30のクラスターに分類し、各クラスターに分類された遺伝子に関して統計的に有意な ($p < 0.01$) アノテーション (生物学的な意味づけ) 遺伝子を選別した。

(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。

C. 研究結果

遺伝子オントロジー (GO) 解析の結果を図3に示した。各クラスターにおいて、解析に用いた遺伝子のコントロールに対する変動値 (対数変化倍率) を図4から図12に示した。このデータを基に、サリドマイド曝露により変動した遺伝子をGOにより分類し、代表的なGOをノードとしてベイジアンネットワーク解析を行った (図3)。解析に用いた値はコントロールに対する比であることから、初期曝露、後期曝露のネットワークの違いは遺伝子発現の変動の違いと言える。初期曝露のネットワークでは、胚様体 (EB) 分化に関連した遺伝子群がネットワークの上位に位置し、Forebrain関連の遺伝子や、Proliferationに関する遺伝子群と正の相関を示している。さらに、ProliferationもEmbryonicと正の相関関係にあり、サリドマイドの曝露により細胞数が増加することが予測される。また、ProliferationはTranscriptionやNeuro-System関連遺伝子とも正の相関を示している。Chemical, Proliferation, Transcription, Neuro-Systemの関連性を見ると、サリドマイドの添加により、Chemical応答関連遺伝子が増加し、細胞増殖を促し、最終的に転写活性、および神経系の誘導が促進されることが示唆される。全体で見ると、Embryonic (胎生) やForebrain (前頭脳) のGOがNeuro-system (神経システム) を抑制する関係にあることが予測された。一方、後期曝露

のネットワークでは、Embryonicに代わりNecrosisが上位にきており、Neuro-SystemやNeurogenesisを抑制することが示された。

D. 考察

今年度の研究では、GO解析による同一クラスター内の遺伝子を同調して変動する遺伝子群と位置づけ、GO間のネットワークを解析することにより、サリドマイドの初期曝露と後期曝露の影響の特徴づけを行った。その結果、初期曝露と後期曝露で影響を受ける遺伝子群が異なり、さらに曝露によって反応した遺伝子群の相互関係が異なることが可視的にわかった。GOを用いたベイジアンネットワークは、本研究が初めての試みであるが、個々の遺伝子ネットワークと異なり、影響の様子が俯瞰できるため化合物による生体影響や病態をより説明しやすいと考えられた。

E. 結論

本研究課題で検討したサリドマイドの神経系分化影響に関する表現型構成要素間ネットワーク解析により、評価法として導入するベイズ推定モデルにおいては、個々の遺伝子発現変動だけではなく、遺伝子オントロジー (GO) 解析の有用性が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表 (2010~)

Nagano R., Akanuma H., Qin X.Y., Imanishi S., Toyoshima H., Yoshinaga J., Ohsako S. and Sone H. Multi-Parametric Profiling Network Based on Gene Expression and Phenotype Data: A Novel Approach to Developmental Neurotoxicity Testing. *Int J Mol Sci* 13(1), 187-207, (2012).

Qin X.Y., Fukuda T., Yang L., Zaha H., Akanuma H., Zeng Q., Yoshinaga J. and Sone H. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 13(5), 296-306, (2012).

Qin X.Y., Wei F.F., Yoshinaga J., Yonemoto J., Tanokuru M. and Sone H. siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects

- hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells. *FEBS Lett* (2011) 585(20):3310-3315.
- Imanishi S., Okura M., Zaha H., Yamamoto T., Akanuma H., Nagano R., Shiraishi H., Fujimaki H. and **Sone H.** Prenatal Exposure to Permethrin Influences Vascular Development of Fetal Brain and Adult Behavior in Mice Offspring. *Environ Tox* (2011) <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.20758/abstract> *in press*.
- Qin X.Y., Zaha H., Nagano R., Yoshinaga J., Yonemoto J. and **Sone H.** Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol Lett* (2011) 206 (2): 152-157.
- Sone H.** and Akanuma H. Oxidative stress-mediated signaling pathways by environmental stressors. In *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular aspects of cell signaling*. (2011) (eds) Farooqui T and Farooqui AA. Wiley-Blackwell, 13:175-195.
- Sone H.**, Akanuma H., and Fukuda T. Oxygenomics in environmental stress. *Redox Rep* 15(3):98-114, (2010).
- Mitsubishi T., Yonemoto J., **Sone H.**, Kosuge Y., Kosaki K., and Takahashi T. In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 14;107(37), 16331-16335; (2010).
- 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(1), 115-123, (2010).
- Sone H.**, Fukuda T., Toyoshiba H., Yamanaka T., Perham F., and 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).
- 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).
2. 学会発表 (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回環境ホルモン学会 12月、東京 (2010)
- 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回環境ホルモン学会 12月、東京 (2010)
- Hideko Sone**, Hiromi Akanuma, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, **Wataru Fujibuchi**, Takeaki Taniguchi, Reiko Nagano, **Seiichiroh Ohsako**. Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks. CBI2010, 9月、東京(2010)
- Hiromi Akanuma, **Hideko Sone**, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, **Wataru Fujibuchi**, Takeaki Taniguchi. Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and toxicity information by using O-PLS CBRC2010, 9月、東京(2010)
- 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細胞を用いた神経分化系におけるメチル水銀の毒性影響評価、第37回日本トキシコロジー学会、6月、沖縄(2010)
- 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37回日本トキシコロジー学会、6月、沖縄(2010)
- 秦咸陽、座波ひろ子、永野麗子、吉永淳、米元純三、**曾**

根秀子. 男児生殖疾患感受性遺伝子ARNT2 とエストロゲン様内分泌かく乱物質との関連、第 80 回日本衛生学会学術総会 5 月、仙台(2010)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西哲、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).

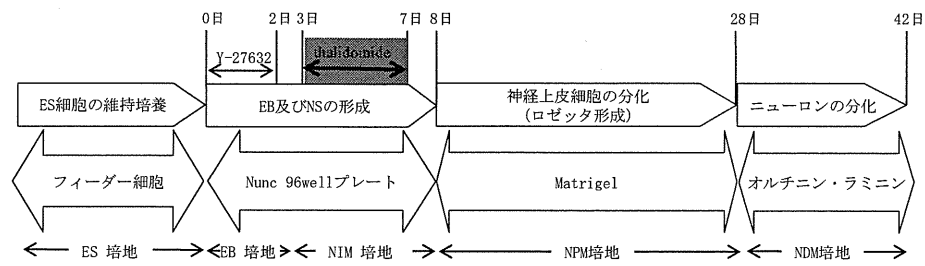
2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

A



B

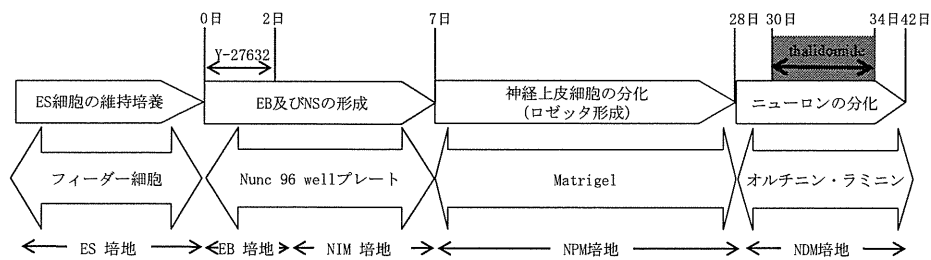


図1. 被験物質サリドマイドの曝露プロトコル
 A: 初期曝露に関する培養実験プロトコル-1、B : 後期曝露
 に関する培養実験プロトコル-2

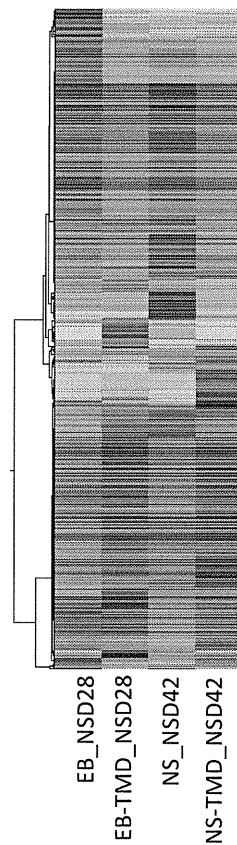


図2. サリドマイド曝露による遺伝子発現の変動

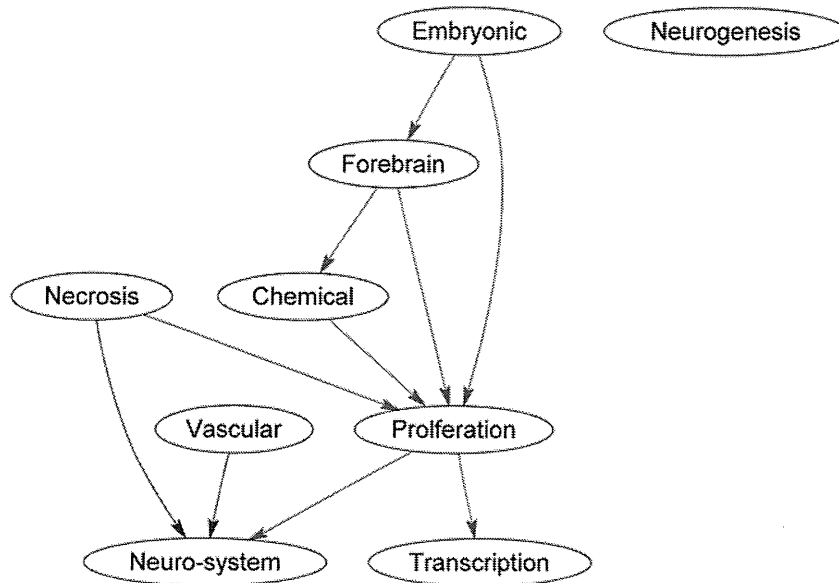
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

Cluster	GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count
C-6	GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	4.69E-10	18
	GO:0001568	blood vessel development	3.36E-08	14
	GO:0001944	vasculature development	5.34E-08	14
	GO:0001525	<u>angiogenesis</u>	1.25E-06	10
	GO:0048706	<u>embryonic skeletal system development</u>	1.78E-06	4
C-11	GO:0006259 GO:0055132	<u>DNA metabolic process</u>	3.87E-10	25
	GO:0003677	<u>DNA binding</u>	7.09E-09	61
	GO:0006260 GO:0055133	<u>DNA replication</u>	2.30E-08	15
	GO:0003676	<u>nucleic acid binding</u>	2.59E-05	64
	GO:0045449 GO:0061019	<u>regulation of transcription</u>	2.66E-04	24
C-12	GO:0001501	<u>skeletal system development</u>	5.20E-16	33
	GO:0003779	<u>actin binding</u>	8.51E-11	31
	GO:0048706	<u>embryonic skeletal system development</u>	4.06E-07	11
	GO:0048598 GO:0048828	<u>embryonic morphogenesis</u>	5.76E-07	10
	GO:0009790 GO:0009795	<u>embryo development</u>	2.84E-06	15
	GO:0048562	<u>embryonic organ morphogenesis</u>	1.55E-04	10
C-13	GO:0005515 GO:0045308	<u>protein binding</u>	2.52E-15	338
	GO:0023052	<u>signaling</u>	1.79E-09	109
	GO:0032570	<u>response to progesterone stimulus</u>	8.67E-05	6
	GO:0042221	<u>response to chemical stimulus</u>	1.08E-04	27
	GO:0001666	<u>response to hypoxia</u>	3.71E-04	14
C-19	GO:0008285	<u>negative regulation of cell proliferation</u>	3.37E-05	18
	GO:0005737	<u>cytoplasm</u>	4.76E-05	141
	GO:0005516	<u>calmodulin binding</u>	5.53E-05	13
	GO:0016192 GO:0006899	<u>vesicle-mediated transport</u>	1.17E-04	7
	GO:0042127	<u>regulation of cell proliferation</u>	1.60E-04	20
C-22	GO:0007417	<u>central nervous system development</u>	3.45E-07	13
	GO:0007399	<u>nervous system development</u>	3.96E-07	24
	GO:0007420	<u>brain development</u>	1.61E-06	8
	GO:0030900	<u>forebrain development</u>	7.24E-06	3
	GO:0030030	<u>cell projection organization</u>	1.78E-05	2
C-25	GO:0005031 GO:0005032 GO:0005033	<u>tumor necrosis factor receptor activity</u>	6.66E-06	3
	GO:0043120	<u>tumor necrosis factor binding</u>	9.13E-06	3
	GO:0005035	<u>death receptor activity</u>	1.21E-05	3
	GO:0033209	<u>tumor necrosis factor-mediated signaling pathway</u>	4.43E-05	3
C-26	GO:0060850	<u>regulation of transcription involved in cell fate commitment</u>	5.63E-06	2
	GO:0021882	<u>regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in forebrain neuron fate commitment</u>	3.02E-05	2
	GO:0021893	<u>cerebral cortex GABAergic interneuron fate commitment</u>	3.02E-05	2
	GO:0021898	<u>commitment of multipotent stem cells to neuronal lineage in forebrain</u>	3.02E-05	2
	GO:0021879	<u>forebrain neuron differentiation</u>	3.47E-05	3
	GO:0030182	<u>neuron differentiation</u>	4.46E-08	2
C-28	GO:0048699	<u>generation of neurons</u>	6.45E-08	2
	GO:0022008	<u>neurogenesis</u>	2.01E-07	2
	GO:0007399	<u>nervous system development</u>	4.57E-07	8
	GO:0045202	<u>synapse</u>	6.47E-06	12

図3. 自己組織化マップ解析によるサリドマイドで変動した遺伝子オントロジー (GO) の一覧

下線は、ネットワーク解析に用いたGOを示す。

EB_TMD



NS_TMD

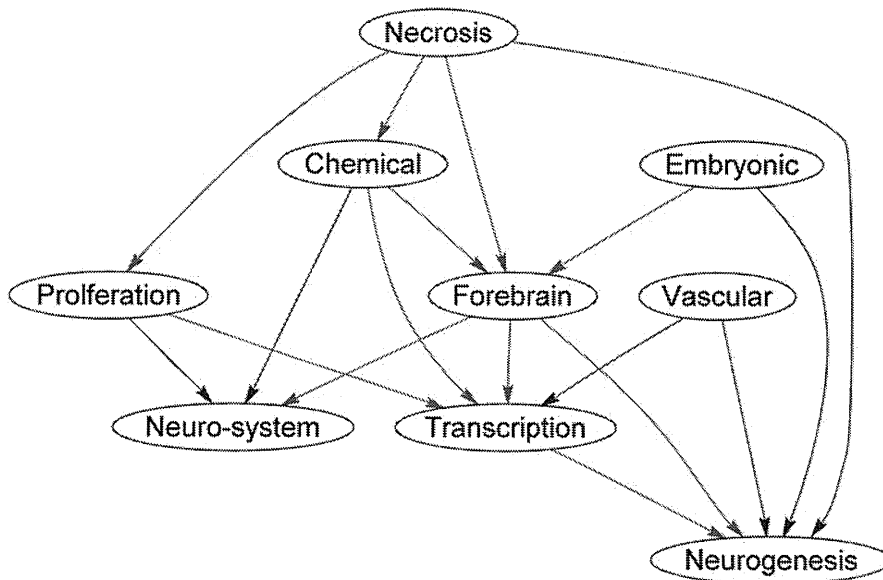


図4. ベイジアンネットワーク解析結果
EB_TMDは、初期曝露； NS_TMDは、後期曝露