

## 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

研究分担者

藤 淵 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

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。昨年度は毒性予測に用いる 9 遺伝子は実験研究者の経験に基づいて選択したが、今回は経験的なマーカー遺伝子を全く用いず、わずか 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 遺伝子を選択した。その 10 遺伝子で 20 種の毒性化合物の予測を行った結果、昨年度の経験に基づいて選択された予測と同様に神経毒、発癌毒、変異原性のどのカテゴリにおいても 90%以上の高性能な予測率が得られた。

### 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。今年度は最終年度であり、これまでの研究を踏まえてより現実的な手法やプロトコルの開発を目指す。

### B. 研究方法

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、毒性カテゴリ一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) 遺伝子ネットワークの予測率への影響解析

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（図 1）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 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。

（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) 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（図2）。また、各固有値において寄与率の高い遺伝子を1～数个ずつ計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、日本バイオインフォマティクス学会で口頭発表に採択され報告を行った（論文3）。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（表1）。

| Toxic Category | #Data | Random | SVM   | BN+    | GGM+  | CrossR+ |
|----------------|-------|--------|-------|--------|-------|---------|
| 神経毒性判定         | 10/30 | 66.6%  | 90.0% | 93.3%  | 86.7% | 96.7%   |
| 発癌毒性判定         | 14/30 | 53.3%  | 96.6% | 100.0% | 96.6% | 100.0%  |

表1：3種の遺伝子ネットワーク予測法（RX-TAOgen, GGM, CrossR）での15毒性化合物におけるSVM予測率向上の比較

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リポート計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。機械学習には時間がかかりまだ全てが終了していないため、現在はベイジアンのみ結果を記載した

（表2）。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。

| Toxic Category | #Data | Random | SVM    | BN+    | GGM+ | CrossR+ |
|----------------|-------|--------|--------|--------|------|---------|
| 神経毒性判定         | 18/40 | 55.0%  | 87.5%  | 90.0%  | -    | -       |
| 発癌毒性判定         | 12/40 | 70.0%  | 100.0% | 100.0% | -    | -       |
| 変異原性判定         | 10/40 | 75.0%  | 87.5%  | 95.0%  | -    | -       |

表2：3種の遺伝子ネットワーク予測法（RX-TAOgen, GGM, CrossR）での20毒性化合物におけるSVM予測率向上の比較

### D. 考察

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ない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。

### E. 結論

本研究予算で使用できる毒性化合物の種類は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。

## 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, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Pairwise Ranking Component Analysis, submitted to *Knowledge and Information Systems* (under revision review).
2. CELLPEDIA: a repository for human cell information for cell studies and differentiation analyses, Hatano, A., Chiba, H., Moesa, H.A., Taniguchi, T., Nagaie, S., Yamanegi, K., Takai, T., Tanaka, H., \*Fujibuchi, W., *Database*, 2011:bar046.
3. Prediction of Chemical Toxicity by Network-based SVM on ES-cell Validation System, \*Fujibuchi, W., Aburatani, S., Yamane, J., Imanishi, S., Akanuma, H., Sone, H., Ohsako, S., *The Proceedings of the 2011 Joint Conference of CBI-Society and JSBi*, Nov. (2011).
4. A ranking-based alternative to the discriminant analysis framework, Jean-Francois Pessiot, Wataru Fujibuchi, *Behaviormetric Society of Japan*, 2011.
5. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Learning similarity functions for multi-platform microarray data, *SIG-BIO*, 2011.
6. Review: Alternative pre-mRNA splicing in digestive tract malignancy. Miura K, Fujibuchi W, Sasaki I. *Cancer Sci.* 102(2):309-16 (2011).
7. In search of true reads: A classification approach to next generation sequencing data, E. Wijaya, J.F. Pessiot, M.C. Frith, W. Fujibuchi, K. Asai & P. Horton, *Intl. Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshops*, 37:561-6 (2011).
2. 学会発表
  1. Towards iPS cell drug discovery—Prediction of chemical toxicity by gene network learning based on ES cell validation system, *Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression*, CSHL, New York, 2012.
  2. 平成 23 年度 第 11 回 産総研・産技研 LS-BT 合同研究発表会、「幹細胞インフォマティクスによる化合物毒性予測」、産業技術総合研究所(2012)
  3. 幹細胞インフォマティクスによる化合物毒性予測、平成 23 年度 第 11 回 産総研・産技研 LS-BT 合同研究発表会ポスターセッション、産業技術総合研究所(2012)
  4. Wataru Fujibuchi, Towards iPS cell drug discovery: prediction of chemical toxicity based on gene network learning, CBRC Workshop 2011, Feb. 2012, Tokyo.
  5. Prediction of Chemical Toxicity by Gene Network Learning on ES-cell Validation System, Wataru Fujibuchi, Sachiyo Aburatani, Junko Yamane, Satoshi Imanishi, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, poster presentation at CBRC Workshop 2011, Feb. 2012, Tokyo.
  6. CELLPEDIA: a repository for human cell information for cell studies and differentiation analyses, Akiko Hatano, Hirokazu Chiba, Harry Amri Moesa, Takeaki Taniguchi, Satoshi Nagaie, Koji Yamanegi, Takako Takai-Igarashi, Hiroshi Tanaka, Wataru Fujibuchi, poster presentation at CBRC Workshop 2011, Feb. 2012, Tokyo.
  7. Reverse Engineering of Genetic Regulatory Networks, Jean-francois Pessiot, Wataru Fujibuchi, poster presentation at CBRC Workshop 2011, Feb. 2012, Tokyo.
  8. Prediction of Chemical Toxicity by Network-based SVM on ES-cell Validation System, \*Fujibuchi, W., Aburatani, S., Yamane, J., Imanishi, S., Akanuma, H., Sone, H., Ohsako, S., poster presentation at the 2011 Joint Conference of CBI-Society and JSBi, Nov. 2011, Kobe.

9. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Learning similarity functions for gene expression data, poster presentation at LS-BT, (2011) February, Tsukuba.
10. Jean-Francois Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi, Learning similarity functions for multi-platform microarray data, oral presentation at SIG-BIO, (2011) March, Kyoto.
11. Wataru Fujibuchi, Takeaki Taniguchi, Hideko Sone, Seiichiro Ohsako, Analysis of toxic effects on ES cell differentiation by integrated gene networks, poster presentation at CBRC, (2011) 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

改良版 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)

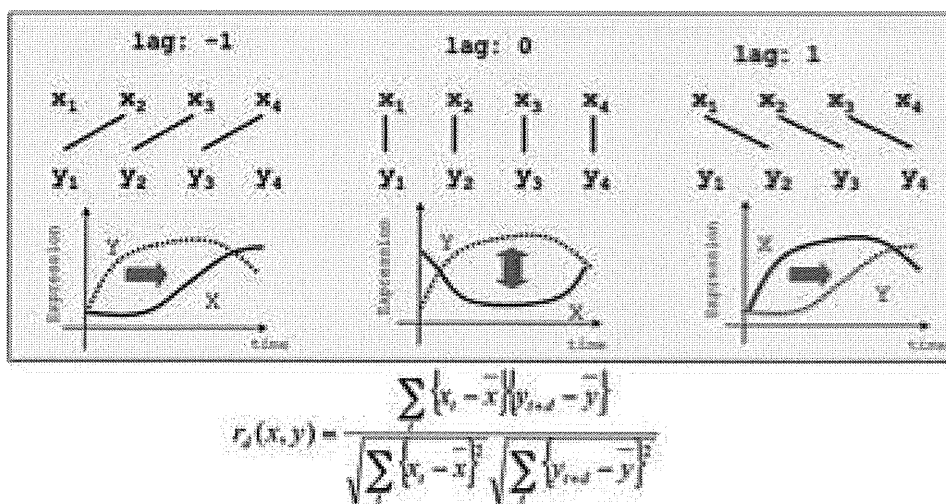
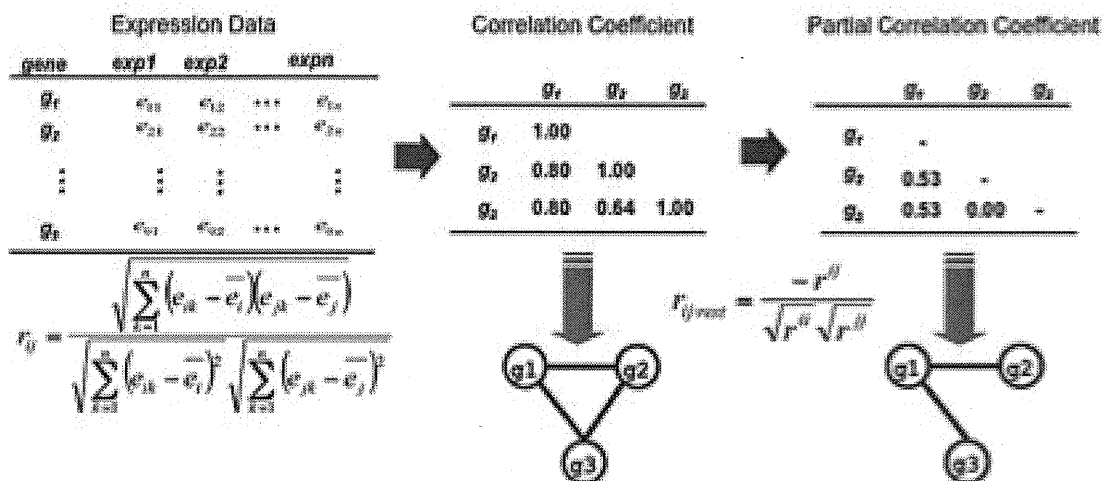


図1：グラフィカルガウシアンモデル（上）と交差相関係数（下）

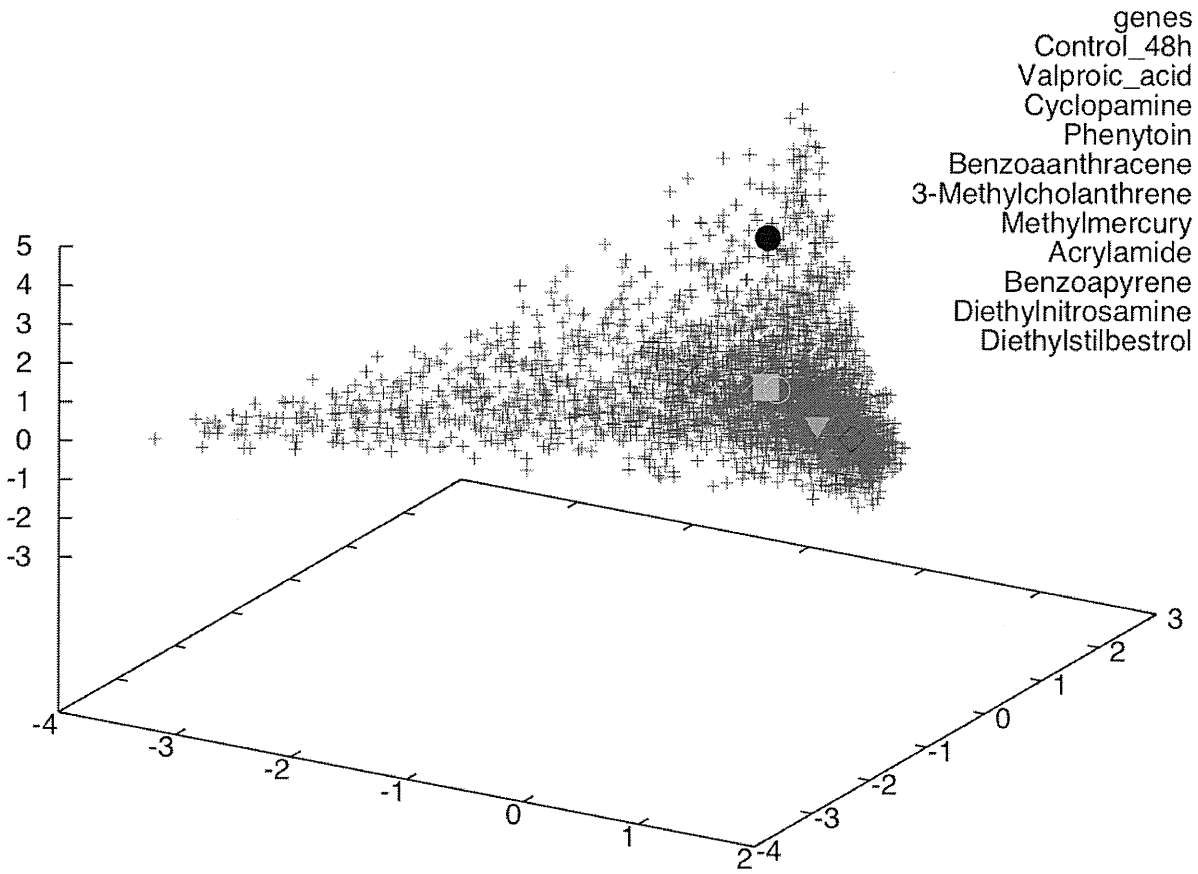


図2: 正準相関解析による10種(+コントロール)の化合物マイクロアレイデータと特徴遺伝子(赤い点)の第3固有値空間による可視化

## 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

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

アリールハイドロカーボン受容体（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ると催奇形性等の様々な生体影響を引き起こす。ここではヒト ES 細胞を用いた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。

ヒト ES 細胞（KhES-1）を MEF を用いて増殖させ EB 形成させた。ES 細胞のプレート播種直後（Day0）から 24 時間、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin（TCDD、0.1 nM-10 nM）に曝露した。また、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。Day10 でオルニチンラミニ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 で再播種し、Day40 まで培養して神経系細胞集団を分化させた。対照群の細胞では Day35 での TCDD 曝露も行った。

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。Oct3/4 や神経系分化マーカーである Map2 の発現にも TCDD 曝露 24 時間目ならびに Day40 での TCDD による変動は認められなかった。Day9 曝露群を Day25 まで神経誘導培養した結果、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ており、NESTIN、MTAP2 のレベルが高く、SOX17、FOXA2 の低下が著しいことがわかった。

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を示唆している。

### A. 研究目的

環境汚染化学物質のなかでもダイオキシン類は、急性毒性として皮膚の塩素ザソウや肝機能異常による消耗性症候群とそれに引き続く死亡を伴う、極めて毒性の強い化合物である。特に胎児期曝露の場合では数ナノグラムの単回摂取でも生まれてくる個体の不可逆的变化、すなわち生殖次世代影響として種々の影響を示すことが知られている。これら生殖発生学的影響（催奇形性・胎仔死亡・生殖機能異常・行動異常等）は、高感受性と言う点からリスク

管理上注視すべき指標である。しかし各指標とも発生学的な病態発生の分子機構は未知な部分が多い。上記の現象はダイオキシン受容体であるアリールハイドロカーボン受容体（Ahr）のノックアウトマウスで見られないことから、Ahr がプライマリーの標的分子であることは間違いない。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、生体防御に必須で有り、正常な個体発生過程において不可欠な遺伝子である。ここでは、我々の保持するヒト ES 細胞を用いた神

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。培養系の種々の分化ステージで曝露し、十分に分化した細胞との比較を通じて個体発生過程のダイオキシンによる影響を、初めてヒトを対象として解析する試みを行った。

#### （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にて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。

### B. 研究方法

ヒトES細胞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-1株（XX 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MEF除去後にSUMILON PrimeSurface 96U（住友ベークライト社製）を用いた（図1）。簡単には、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、 $9.0 \times 10^3$ 個/wellのhES細胞をSUMILON PrimeSurface 96Uに播種した（Day0）（図1）。この播種時点から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（NIM）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（O/L）コートプレートに播種、Day12から神経増殖培地（NPM）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た（図1）。対照群の細胞ではDay35でのTCDD曝露も行った（図1）。

各ステージ曝露後24時間目のRNAを回収し、*Pou5f1*, *Mtap2*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Ahr*, *Actb* の mRNA を定量 RT-PCR で測定した。また培養28日目（Day28）および最終段階（Day40）のRNAを回収し、*Mtap2*, *Gfap*, *Nes*, *Th*, *Sox17*, *Foxa2*, *Pdgfr*, *Kdr*,

*Ahr*, *Actb* の mRNA を定量 RT-PCR で測定した。またMAP2抗体（デンドライトマーカー）およびTH抗体（ドパミン神経マーカー）による免疫染色とHoechst 33342による核染色を施し神経系細胞の分化状態を観察した。

### C. 研究結果

*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（図2）。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（図2）。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（図3）。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（図4）。

### D. 考察

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



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

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

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nagano R., Akanuma H., Qin X-Y., 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, 187-207, (2012).
2. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, Toyoshiba H, and Ohsako S. Effects of Methylmercury Exposure on Neuronal Differentiation on Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Toxicol Lett* (in press) (2012).
3. Ohsako S. Perinatal exposure to environmental chemicals induces epigenomic changes in offspring. *Genes Environ* 33, 43-49, (2011).
4. Alam MS., Ohsako S., Tay TW., Tsunekawa N., Kanai N., 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).

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).

### 2. 学会発表

1. 大迫誠一郎, 山根順子, 今西哲, 遠山千春. ヒト ES 細胞を用いた神経系誘導培養系における Ahr アゴニストの影響. 第 11 回日本再生医療学会総会, 横浜 (2012) 6 月 12 日
2. Seiichiroh Ohsako, Junko Yamane, Satoshi Imanishi, Chiharu Tohyama Effects of Ahr agonist on neuronal cell differentiation from human ES cells. The 10th Annual Meeting of International

- Society for Stem Cell Research, June 2012,  
Yokohama, Japan
3. 大迫誠一郎, 永野麗子, 何小明, 今西哲, 赤沼宏美, 山根順子, 藤渕航, 曾根秀子. 胚性幹細胞試験を用いたメチル水銀の神経発生毒性の影響評価. 第 82 回日本衛生学会、京都 (2012) 3 月
  4. 大迫誠一郎. 環境汚染化学物質の周産期曝露による表現型変化—エピジェネティクスと環境毒性学—. 日本獣医学会、さいたま (2012) 3 月 28 日大宮ソニックシティ
  5. 大迫誠一郎. 環境汚染物質の胎生期曝露による生後の化学発癌感受性亢進とエピゲノム変化. シンポジウム「環境に起因する疾患エピゲノム変化」日本人類遺伝学会、千葉 (2011) 11 月 10 日幕張メッセ
  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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. Hideko Sone, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Seichiroh Ohsako. Multi-profiling analysis in neuronal cells derived from embryonic stem cells to identify fetal programming. The 12<sup>th</sup> International Congress of Toxicology. 2010
  12. 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
  13. 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
  14. 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)  
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. その他

なし

2. 実用新案登録

なし

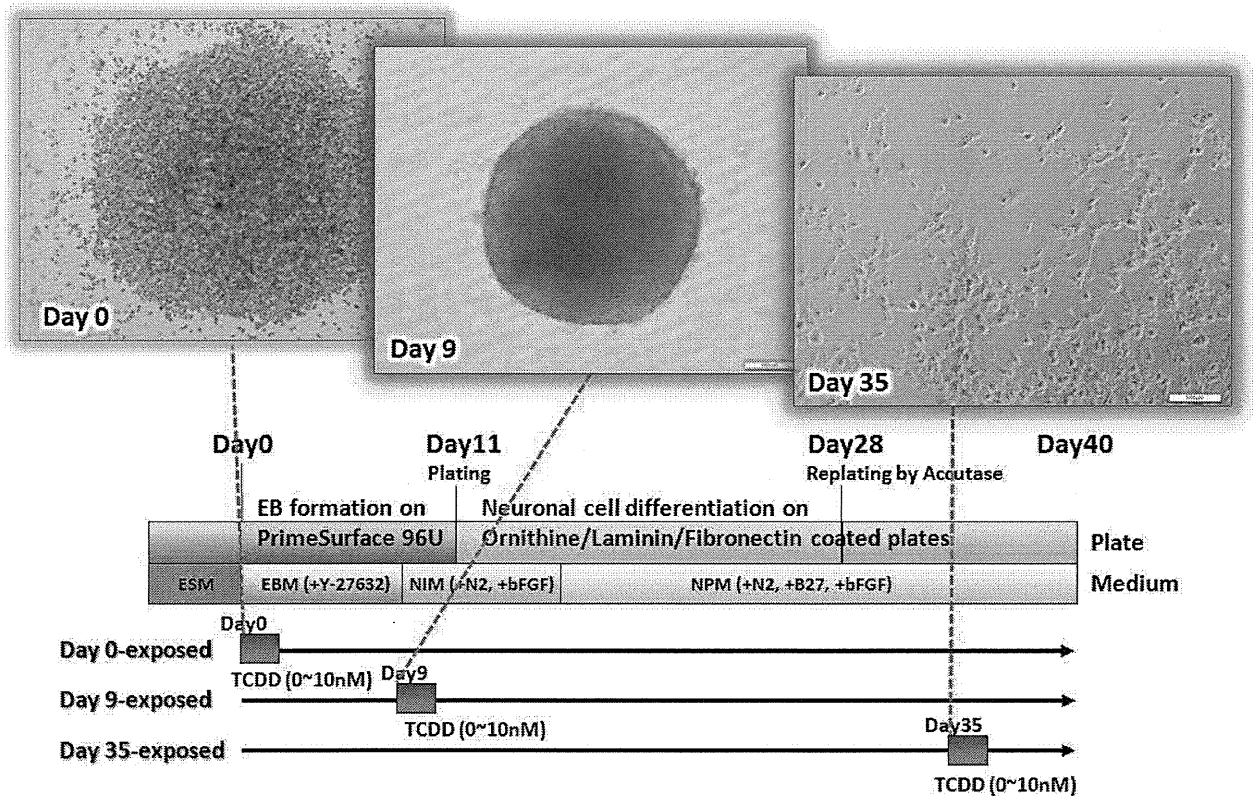


図 1. 培養スケジュールと TCDD 曝露時期。

KhES-1 を MEF との共培養で増幅した（培養液 ES 培地（ESM））。十分なクランプ形成を確認し、解離液で MEF を分離してシングルセルとした。これを EB 形成デバイスである SUMILON PrimeSurface 96U に播種し Day0 とした。この段階で TCDD を 24 時間曝露した群、Day9 から 24 時間曝露した群を設けた。培養液には Rock 阻害剤 Y-27632 を添加した EB 培地を Day8 まで使用した。Day9 からは NIM に変更し神経幹細胞誘導を行った。Day15 から NPM に換え、Day28 で再播種し、Day40 まで神経細胞誘導を行った。Day35 で TCDD を曝露する群も設けた。

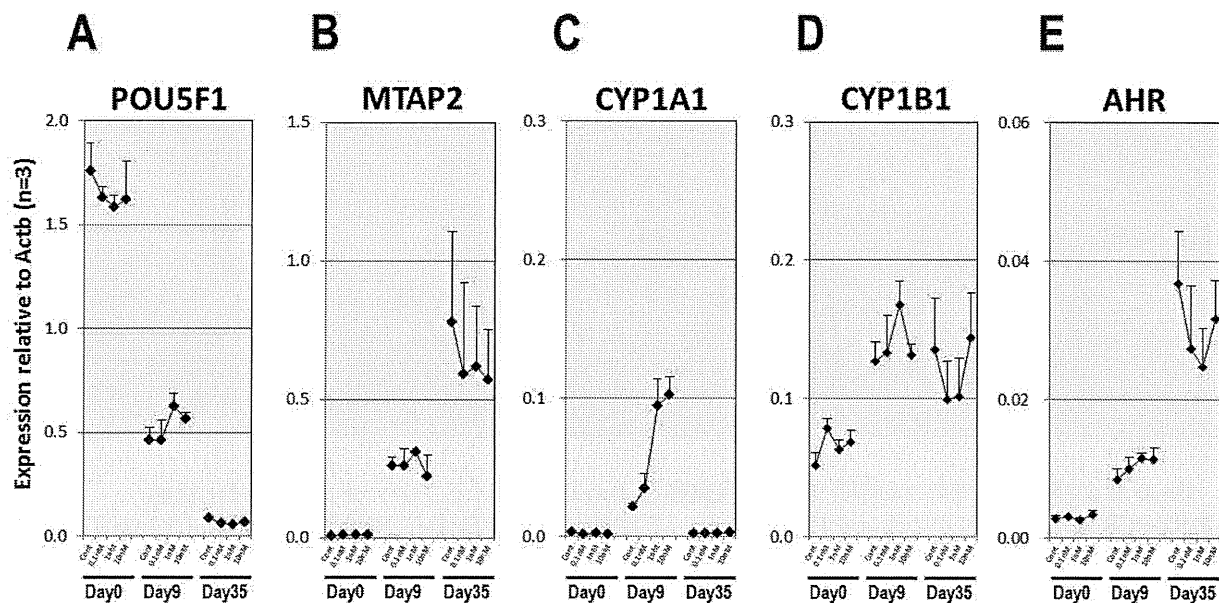


図 2. 各曝露ステージにおける分化マーカーとダイオキシンファミリー遺伝子の変動。

定量 RT-PCR 法でベータアクチンを内部標準として定量した。A) *Pou5f1*. B) *Mtap2*. C) *Cyp1a1*. D) *Cyp1b1*. E) *Ahr*. 幹細胞マーカーである *Pou5f1* および神経細胞デンドライトマーカーである *Mtap2* の発現が分化ステージを各々減少と増加しており分化培養系は成立していることがうかがわれる。ダイオキシンバイオマーカーである *Cyp1a1* は Day9 でのみ反応することがわかり、ES 細胞や十分に分化した神経細胞では誘導がかからないことがわかった。

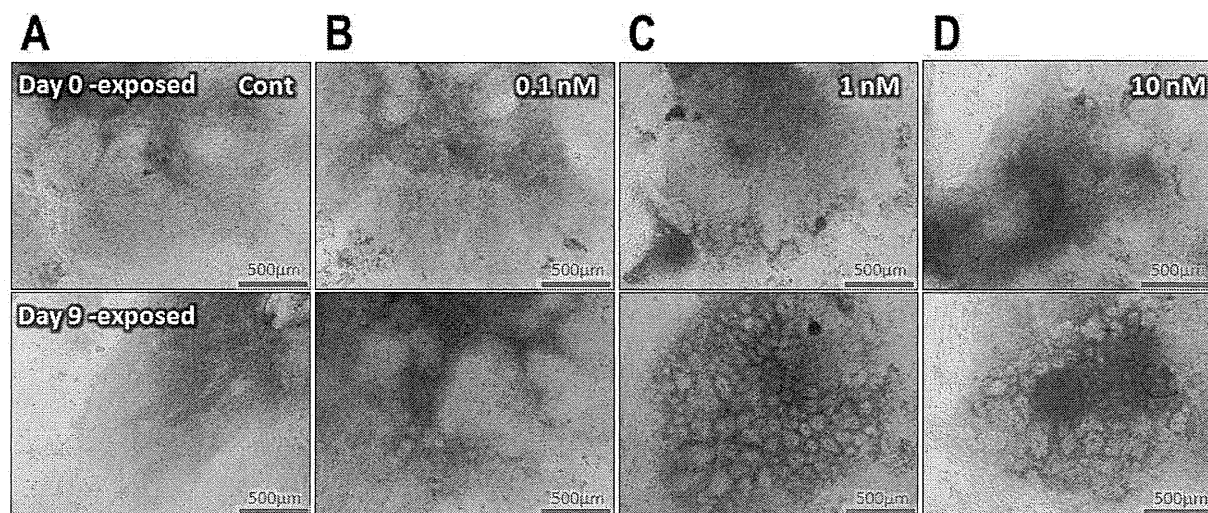


図3. Day0 および Day9 での 24 時間 TCDD 曝露後の Day25 におけるプレート上での分化状態。  
定量 RT-PCR 法でベータアクチンを内部標準として定量した。A) DMSO. B) 0.1nM TCDD. C) 1nM TCDD. D) 10nM TCDD. 上段 (Day0 曝露)。下段 (Day9 曝露)。肉眼的に観察されるニューラルロゼッタが Day9 曝露群 (1nM および 10nM) で多くなるのがわかった。

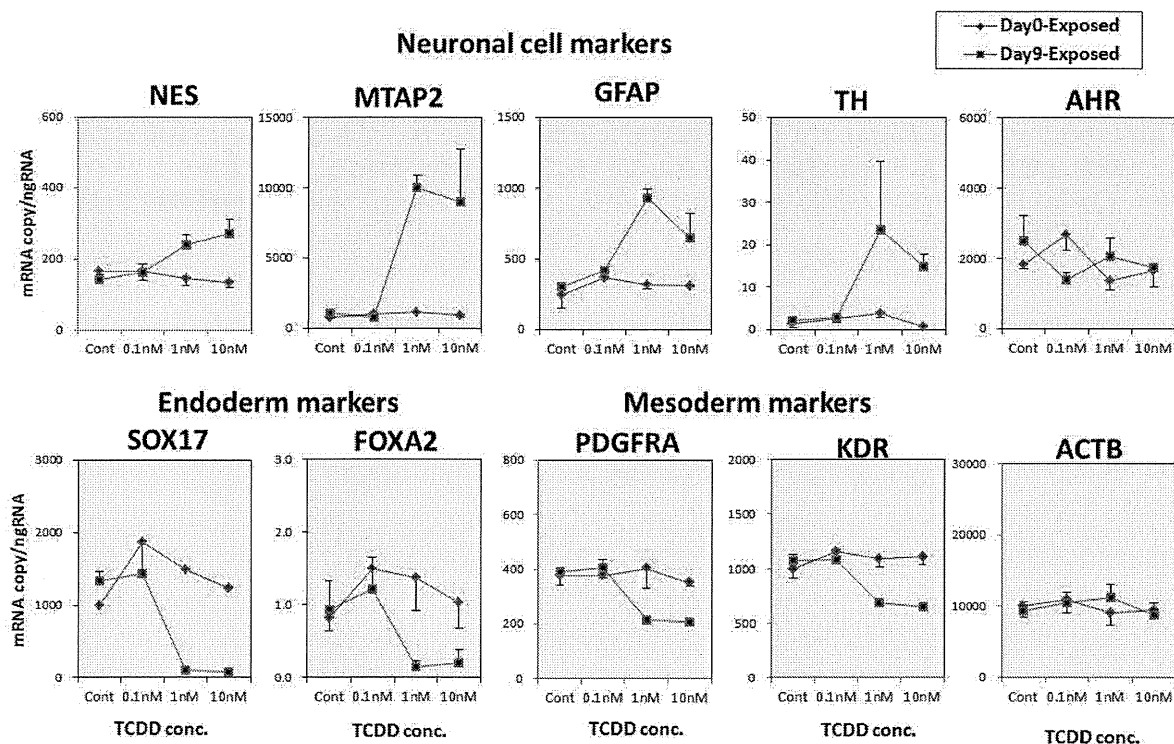


図4. Day0 および Day9 での 24 時間 TCDD 曝露後の Day28 における分化マーカー遺伝子レベル。  
定量 RT-PCR 法でコピー数を測定した。神経細胞マーカー (*Nes*, *Mtap2*, *Gfap*, *Th*)、内胚葉マーカー (*Sox17*, *Foxa2*)、中胚葉マーカー (*Pdgr*, *Kdr*) および (*Ahr*, *Actb*) のレベルを測定した。Day9 曝露 (1nM および 10nM TCDD) で神経細胞マーカーの上昇と内胚葉および中胚葉マーカーの減少が著しいことがわかった。

## 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      |
|---|---|-------------------------|---------|-----------|----------|
| Satoshi Imanishi, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, Toshifumi Yamamoto, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Hiroaki Shiraishi, Hidekazu Fujimaki, Hideko Sone        | Prenatal Exposure to Permethrin Influences Vascular Development of Fetal Brain and Adult Behavior in Mice Offspring.  | <i>Environ Tox</i>      |         |           | in press |
| Xiaoming He, Satoshi Imanishi, Hideko Sone, Reiko Nagano, Xian-Yang Qin, Jun Yoshinaga, Hiromi Akanuma, Junko Yamane, Wataru Fujibuchi, Seiichiroh Ohsako | Effects of Methylmercury Exposure on Neuronal Differentiation on Mouse and Human Embryonic Stem Cells.  | <i>Toxicol Lett</i>     |         |           | in press |
| Reiko Nagano, Hiromi Akanuma, Xian-Yang Qin, Satoshi Imanishi, Hiroyoshi Toyoshiba, Jun Yoshinaga, Seiichiroh Ohsako, Hideko Sone                         | Multi-Parametric Profiling Network Based on Gene Expression and Phenotype Data: A Novel Approach to Developmental Neurotoxicity Testing.  | <i>Int J Mol Sci</i>    | 13 (1)  | 187-207   | 2012     |
| Xian-Yang Qin, Tomokazu Fukuda, Linqing Yang, Hiroko Zaha, Hiromi Akanuma, Qin Zeng, Jun Yoshinaga, Hideko Sone   | Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells.   | <i>Cancer Biol Ther</i> | 13 (5)  | 296-306   | 2012     |
| Xian-Yang Qin, Feifei Wei, Jun Yoshinaga, Junzo Yonemoto, Masaru Tanokura, Hideko Sone  | siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells. | <i>FEBS Lett</i>        | 585(20) | 3310-3315 | 2011     |
| Xian-Yang Qin, Hiroko Zaha, Reiko Nagano, Jun Yoshinaga, Junzo Yonemoto, Hideko Sone  | Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism.     | <i>Toxicol Lett</i>     | 206 (2) | 152-157   | 2011     |

|   |   |  |     |             |          |
|---|---|--|-----|-------------|----------|
| 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     |
| 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 in environmental stress.  | <i>Redox Reports</i>                   | 15  | 98-114      | 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     |
| Wataru Yoshioka, Keiko Aida-Yasuoka, Nozomi Fujisawa, Tatsuya Kawaguchi, Seiichiroh Ohsako, Shuntaro Hara, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Chiharu Tohyama | Critical role of mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin.  | <i>Toxicol Sci</i>                     |     |             | in press |
| Seiichiroh Ohsako   | Perinatal exposure to environmental chemicals induces epigenomic changes in offspring.  | <i>Genes Environ</i>                   | 33  | 43-49       | 2011     |
| 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  | 186-193     | 2010     |



|   |   |   |        |         |                       |
|---|---|---|--------|---------|-----------------------|
| Seiichiroh Ohsako, Noriho Fukuzawa, Ryuta Ishimura, Takashige Kawakami, Qing Wu, Reiko Nagano, Hiroko Zaha, Hideko Sone, Jyunzo 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, 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                  |
| 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                  |
| Jean-François Pessiot, Hyeryung Kim, Wataru Fujibuchi   | Pairwise Ranking Component Analysis   | <i>Knowledge and Information Systems</i>                                    |        |         | under revision review |
| Akiko Hatano, Hirokazu Chiba, Harry Amri Moesa, Takeaki Taniguchi, Satoshi Nagaie, Koji Yamanegi, Takako Takai-Igarashi, Hiroshi Tanaka, Wataru Fujibuchi   | CELLPEDIA: a repository for human cell information for cell studies and differentiation analyses  | <i>Database</i>   | bar046 |         | 2011                  |
| Wataru Fujibuchi, Sachiyo Aburatani, Junko Yamane, Satoshi Imanishi, Hiromi Akanuma, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako   | Prediction of Chemical Toxicity by Network-based SVM on ES-cell Validation System   | <i>The Proceedings of the 2011 Joint Conference of CBI-Society and JSBi</i> |        |         | 2011                  |

|  |   |   |             |           |      |
|--|---|---|-------------|-----------|------|
| Jean-François Pessiot,<br>Hyeryung Kim, Wataru<br>Fujibuchi  | Learning similarity functions for<br>multi-platform gene expression data  | <i>SIG-BIO</i>  |             |           | 2011 |
| Jean-François Pessiot, Wataru<br>Fujibuchi   | A ranking-based alternative to the<br>discriminant analysis framework   | <i>Behaviormetric<br/>Society of Japan</i>  |             |           | 2011 |
| Koh Miura, Wataru Fujibuchi,<br>Iwao Sasaki  | Review: Alternative pre-mRNA<br>splicing in digestive tract<br>malignancy.  | <i>Cancer Sci</i>   | 102(2)      | 309-316   | 2011 |
| Edward Wijaya,<br>Jean-François Pessiot, Martin<br>C. Frith, Wataru Fujibuchi,<br>Kiyoshi Asai, Paul Horton  | In search of true reads: A<br>classification approach to next<br>generation sequencing data<br>selection  | <i>Intl. Conference<br/>on<br/>Bioinformatics<br/>and Biomedicine<br/>Workshops</i> | 37          | 561-566   | 2011 |
| Jean-François Pessiot,<br>Hirokazu Chiba, Hiroto<br>Hyakkoku, Takeaki<br>Taniguchi, Wataru Fujibuchi   | PeakRegressor identifies composite<br>sequence motifs responsible for<br>STAT1 binding sites and their<br>potential rSNPs                             | <i>PLoS ONE</i>   | 5           | e11881    | 2010 |
| Yuki Tochigi, Natsuko Sato,<br>Takehiko Sahara, Chun Wu,<br>Shinya Saito, Tsutomu Irie,<br>Wataru Fujibuchi, Takako,<br>Goda, Ryoichi Yamaji,<br>Masahiro Ogawa, Yoshihiro<br>Ohmiya, Satoru Ohgiya            | Sensitive and convenient yeast<br>reporter assay for high-throughput<br>analysis by using a secretory<br>luciferase from <i>Cypridina noctiluca</i> . | <i>Anal Chem</i>  | 82          | 5768-5776 | 2010 |
| Koh Miura, Makoto Kinouchi,<br>Kazuyuki Ishida, Wataru<br>Fujibuchi, Takeshi Naitoh,<br>Hitoshi Ogawa, Toshinori<br>Ando, Nobuki Yazaki,<br>Kazuhiro Watanabe, Sho<br>Haneda, Chikashi Shibata,<br>Iwao Sasaki | 5-FU Metabolism in Cancer and<br>Orally-Administrable 5-FU Drugs  | <i>Cancers</i>  | 2           | 1717-1730 | 2010 |
| 幡野晶子、Harry Amri<br>Moesa、千葉啓和、谷口丈晃、<br>永家聖、山根木康嗣、藤渕<br>航   | 細胞分化解析を目指した網羅的<br>ヒト細胞データベース<br>「CELLPEDIA」   | <i>情報処理学会研<br/>究報告</i>  | 2010-BIO-20 | No.12     | 2010 |

別紙 4

|                         |   |                |             |      |      |
|-------------------------|---|----------------|-------------|------|------|
| 金蕙鈴、加藤毅、茂櫛薫、<br>田中博、藤渕航 | 正則化正準相関解析を用いた抗<br>がん剤の影響 による共通ハズウ<br>エイ解析 | 情報処理学会研<br>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<br>編集者名  | 書籍名   | 出版社名  | 出版地 | 出版<br>年 | ページ       |
|-----------------------------------|--|--|---|---|-----|---------|-----------|
| Hideko Sone,<br>Hiromi<br>Akanuma | Oxidative<br>Stress-Mediated<br>Signaling Pathways by<br>Environmental<br>Stressors. Signaling in<br>Vertebrates and<br>Invertebrates. | In: Tahira<br>Farooqui and<br>Akhlq A.<br>Farooqui<br>editors. | Molecular<br>Aspects of<br>Oxidative<br>Stress on<br>Cell | Hoboken, NJ.,<br>Wiley-Blackw<br>ell, March |     | 2011    | 175-194   |
| 大迫誠一郎                             | エピジェネティクス<br>と環境医学   | 松島・酒<br>井・遠山ら<br>編   | 分子予防環<br>境医学  | 本の泉社  | 日本  | 2010    | 568-575   |
| 千葉啓和、藤渕<br>航                      | 細胞情報解析に役立<br>つツール-幹細胞研究<br>の進展とその創薬応<br>用に向けて  |  | 実験医学  |   | 日本  | 2010    | 3171-3174 |
| 藤渕航                               | シミュレーテッドア<br>ニールンクによる多<br>重プライマー配列デ<br>ザイン法  | 神原秀記、<br>松永是、上<br>田充美  | シングルセ<br>ル解析の最<br>前線                                      | シーエムシ<br>ー出版                                | 日本  | 2010    | 265-273   |
| 加藤毅、藤渕航                           | Kernel Classification<br>Methods for Cancer<br>Microarray Data   | Frank<br>Emmert-Stre<br>ib and<br>Matthias<br>Dehmer           | Medical<br>Biostatistics<br>for Complex<br>Diseases       | Wiley-Blackw<br>ell                         | ドイツ | 2010    | 279-303   |