

201133003B

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

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

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

平成 21 年度～23 年度 総合研究報告書

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. 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

..... 14

国立環境研究所 環境リスク研究センター 曾根 秀子

2. ES 細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシン毒性解析

..... 37

産業技術総合研究所 生命情報工学センター 藤渕 航

3. ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究

..... 53

東京大学 疾患生命工学センター 大迫 誠一郎

4. 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

..... 62

東京大学 疾患生命工学センター 大迫 誠一郎

(補足) トキシコゲノミクスデータ解析：類型化・ランキング・次元削減

..... 71

産業技術総合研究所 生命情報工学センター Jean-Francois Pessiot, Wataru Fujibuchi

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研究開発を行った。特に確率推論の一種であるベイジアンネットワーク解析を用いて、化学物質影響を形態ネットワークとして捉える試み（下記 1）、複数の化学物質の影響をサポートベクターマシンで判別予測する際の確率推論の利用（下記 2）、化合物影響の種間差を評価（下記 3）に応用した。

1) **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。サリドマイドをヒト ES 細胞（KhES-3）由来の胚様体（EB）に曝露した場合、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) **ES 細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシン毒性解析**：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、未知の化合物の生体への影響を高性能に予測する新しい一連の手法を開発した。特に、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 のマーカー候補遺伝子を選択した。その 10 遺伝子で 20 種の毒性化合物の予測を行った結果、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。さらに、ベイジアンネットワークを推定し、入力ベクトルに加えることで予測率が向上する結果が得られた。本手法の成功

は、ES 細胞を用いた発達毒性試験の精度向上に確率推論（ベイジアンネット解析）の利用が有効であることを示している。

3) ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究：被験化合物としてメチル水銀を用い、ヒト ES 細胞試験の有効性を検討した。ヒト ES 細胞ならびにマウス ES 細胞から分化させた未分化神経細胞にメチル水銀を曝露し細胞死、形態変化、分化マーカー遺伝子への影響を比較した。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、兩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ヒト ES 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り、ヒト細胞への影響がマウスより低濃度から出ることが示された。

4) 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。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 の低下が認められ、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： 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
- 永野麗子 国立環境研究所 環境リスク研究センター NIES ポスドクフェロー
- 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： ES 細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシン毒性解析

- 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
- 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

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

- 大迫誠一郎 東京大学 疾患生命工学センター 准教授
- 何小明 東京大学 疾患生命工学センター 特任研究員
- 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

### サブテーマ 4： 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）を利用した。

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の標準化を実施した。

サブテーマ 1) 「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」では、近年臨床上問題となっているサリドマイドの胎児期影響の時期特異性を、後発性の細胞形態に及ぼす影響として確率推論によるネットワーク化により評価を試みた。

サブテーマ 2) 「ES 細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシン毒性解析」では、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、未知の化合物の生体への影響を高性能に予測する判別装置（サポートベクターマシン）を開発した。この際に確率推論で求めた遺伝子ネットワークを入力ベクトルに加え、予測率の向上が認められるか試験した。

サブテーマ 3) 「ES 細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究」では、マウスならびにヒト ES 細胞から神経細胞を分化させる際に類似の分化ステージでメチル水銀を曝露することで観察される細胞への分化影響を確率推論モデルで比較することで有害化学物質の種間差に関する評価が可能か試みた。

サブテーマ 4) 「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」では、確率推論モデルの適応にまで至らなかったが、次世代発達毒性が顕著である TCDD を用いることで曝露ステージの違いによる晩発影響の差を初めてヒト ES 細胞で試験した。

ヒト幹細胞試験あるいは多能性幹細胞試験は、発達毒性試験や種間差の問題を解決する手法として国際的にも多くの期待が掛けられている。しかし、分化の制御や最終段階で評価手法に多くの問題点を残している。本研究課題はそれらを克服するための試金石と言える。

## B. 研究方法

### サブテーマ 1： 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、サリドマイドの濃度は $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ （マイクロアレイ比較解析には $10^{-7}M$ のみ）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。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、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： ES細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシン毒性解析

1. 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. 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： 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

ヒトES細胞はKhES-3株を使用し、定法の維持培養後、胚様体（EB）の形成にはマイクロスフィアアレイ（MSA; 1020 holes,  $\phi$ 300  $\mu$ m/hole）を用いた。Day9にNIM培地に交換、Day11で形成されたEBをオルチニン/ラミニン（O/L）コートプレートにNPM培地を用いて播種、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、マウスES細胞にはGreen mouse FM131 mouseから樹立したB6G-2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。EB形成は同じくMSAを使用、



Day9 で形成された EB を O/L コートプレートに播種した。Day11 で NIM 培地に交換 Day23 に到達するまで培養し続けた。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 Day27 から最終培養到達時点の Day50 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 Day12 から最終培養到達時点の Day23 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。

**サブテーマ 4： 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。EB の形成のための播種時点（Day0）から 24 時間、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD、0.1nM-10nM）を添加した。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。

### （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： 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。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た。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動し、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た。全体的に、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： ES 細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシン毒性解析**

1. 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から正準相関解析を用い、教師なしに自動的に相関最大化に基づいて、各化合物と相関のある遺伝子を抽出、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：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。予測はこれまでに予備的に実施した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。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： ES細胞試験における化学物質影響の種間・細胞間比較に関する研究**

メチル水銀は10 nMからマウス胚様体(EB)の生存率を低下させる作用を示したが、生存した神経細胞の dendrite 伸長には影響がなかった。一方ヒトEBでは、

10 nMメチル水銀は生存率には影響がないものの、分化した神経細胞の dendrite 伸長には1nMから統計学的に有意な抑制効果を示した。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種と形態情報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。

**サブテーマ4： 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： 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

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 間のネットワーク解析をサリドマイドの初期曝露と後期曝露の影響の特徴づけとして実施した。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： ES 細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシンの毒性解析

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。

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

メチル水銀曝露は低濃度（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デンドライト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。

### サブテーマ 4： 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

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。ヒトにおいての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るものであると考えられる。

## E. 結論

### サブテーマ 1： 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： ES 細胞試験における遺伝子ネットワークを入力に用いた未知毒性化合物のサポートベクターマシン毒性解析

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： 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

ヒトとマウス ES 細胞のメチル水銀に対する影響解析から、評価法とする確率推論モデルは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示唆された。

### サブテーマ 4： 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. Kawakami T, Ito T, Ohsako S, Shiizaki Y, Murakami Y, Hirowatari K, Sato M, and Tohyama C. Possible Involvement of arylhydrocarbon receptor variants in TCDD-induced thymic atrophy and XRE-dependent transcriptional activity in Wistar Hannover GALAS rats. *J Toxicol Sci* 34, 209-220, (2009).
  11. Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, and Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacol* 77, 660-669, (2009).
  12. 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).
  13. 大迫誠一郎、プログラムされる“病”の新たな仮説-環境化学物質による代謝系遺伝子の次世代エピゲノム変化、科学、岩波書店、984-989、(2009).
- 曾根秀子 : 研究分担者**
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, Shiraiishi 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 and Invertebrates*. Hoboken, NJ., Wiley-Blackwell, March, in press (書籍) (2011).
  8. 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).
  9. Sone H, Akanuma H, and Fukuda T. Oxygenomics in environmental stress. *Redox Rep* 15(3), 98-114, (Review) (2010).
  10. 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).
  11. 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).
  12. 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).
13. Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, and Sone H. High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577, 55-65, (2009).
14. Sone H, Imanishi S, Nagano R, Akanuma H, Fukuda T, and Ohsako S. Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In: Biophys.Soc.China (BSC)ed. The Roles of Free radicals in Biology and Medicine. *Medimond S.r.l.*, 45-52, (2009).
15. 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. *JSBi*, (2011).
4. Pessiot JF, Kim H, and Fujibuchi W. Learning similarity functions for multi-platform gene expression data. *SIG-BIO*, (2011).
5. Pessiot JF, and Fujibuchi W. A ranking-based alternative to the discriminant analysis framework. *Behaviormetric Society of Japan*, (2011).
6. Miura K, Fujibuchi W, and Sasaki I. Review: Alternative pre-mRNA splicing in digestive tract malignancy. *Cancer Sci* 102(2), 309-316, (2011).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. Miura K., Kinouchi M., Ishida K., Fujibuchi W., Naitoh T., Ogawa H., Ando
- 藤渕 航 : 研究分担者**
1. Pessiot JF, Kim H, and Fujibuchi W. Pairwise Ranking Component Analysis, submitted to *Knowledge and Information Systems* (under revision review).
2. Hatano A, Chiba H, Moesa HA, Taniguchi T, Nagaie S, Yamanegi K, Takai-Igarashi T, Tanaka H, and Fujibuchi W. CELLPEDIA: a repository for human cell information for cell studies and differentiation analyses. *Database* bar046, (2011).
3. 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*

- 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).
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. 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. *Proceedings of Critical Assessment of Massive Data Analysis 2009*, 4-11, (2009).
  14. Fujibuchi W, Chiba H, Akiyama H, and Shiku H. Designing Pyro-Primer Sequences Using a Simulated Annealing Algorithm, to Critically Target mRNAs in Quantitative Cell Analysis. *Proceedings of the 6'th International Forum on Postgenome Technologies*, 253-257, (2009).
  15. Karasawa H, Miura K, Fujibuchi W, Ishida K, Kaneko N, Kinouchi M, Okabe M, Ando T, Murata Y, Sasaki H, Takami K, Yamamura A, Shibata C, and Sasaki I. Down-regulation of cIAP2 enhances 5-FU sensitivity through the apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Sci*, 100, 903-913, (2009).
  16. 百石弘澄、杉原稔、諏訪牧子、加藤毅、山名早人、藤渕航 2-way prediction 法による GPCR リガンドの結合予測、2009-BIO-18、No.2、(2009).
  17. 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、3171-3174、(2010).
  18. 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).
  19. 加藤毅、藤渕航 Kernel Classification Methods for Cancer Microarray Data, *Medical Biostatistics for Complex Diseases*, Wiley-Blackwell, 279-303, (2010).
  20. Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, and Sone H. High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577, 55-65, (2009).
- ## 2. 学会発表
- 各研究分担報告書に記載。
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西聡、赤沼宏美、宮崎航。「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」。特願 2009-81497（識別番号 100078662）(2009)
  2. 大迫誠一郎、栗田尚佳。「CpGメチル化頻



- 度の変動をゲノムワイドに比較解析するためのDNA試料作成方法」. 米国仮出願（出願番号:61/309971）（2010）
3. 藤渕航、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

## 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系の確立のため、ヒト胚性幹細胞から胚様体、神経分化への培養条件を検討確立した。そして、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が予測された。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

さらに、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。

### 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）の培養条件を詳細に検討した。

### B. 研究方法

#### 1) ヒト ES 細胞の維持培養

##### 1-1) 生命倫理の遵守

本研究で使用したヒト胚性幹細胞株（hES 細胞：human Embryonic stem cells）は、京大再生医科学研究所幹細胞センターの末盛博文博士から提供された KhES-3（男性）株を使用した。ヒト ES 細胞の全ての培養操作は、文部科学省の「ヒト ES 細胞の樹立及び

使用に関する指針」および国立環境研究所の医学研究倫理審査委員会の「国立環境研究所ヒト ES 細胞使用研究倫理規定」に基づいて行われた。

#### 1-2) ヒト ES 細胞株、多能性維持培養

ヒト ES 細胞は、京大のプロトコルに基づきマウスの線維芽細胞 (MEF) をフィーダー細胞として、播種し、その上に ES 細胞を重層して維持培養を行った。ヒト ES 細胞は、ヒト ES 維持培地 (DMEM/F12, 20% (vol/vol) Knockout Serum Replacement (KSR), 5 ng/ml recombinant human bFGF (Wako), 0.1mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 2mM glutamine, 0.1mM nonessential amino acids (NEAA) ) で、MEF ( $0.3 \times 10^5$  cells/ml) 上で 3% CO<sub>2</sub> 濃度で維持培養を行った。継代は hES の集合塊 (クランプ) を、ヒト ES 細胞乖離液 (0.25% trypsin, 0.1mg/ml collagenase IV, 20% KSR, 1mM CaCl<sub>2</sub>) で 37°C、7 分間反応させた。2 倍量のヒト ES 培地をディッシュに加え、ヒト ES 細胞のクランプは、数回のピペッティングにて 10-20 個程度の小さなクランプに砕いた。継代のスピリット比は、1:4 で行った。ヒト ES 細胞の凍結保存は、ガラス化法を用いた。ヒト ES 細胞は、4°C で冷やした 1ml のヒト ES 細胞保存液、2M DMSO, 1M acetamide, 3M polypropylene glycol の入った 2ml の cryogenic tube (BD Labware) に懸濁し、速やかに液体窒素に入れて急速凍結を行った。

#### 1-3) Rock 阻害剤の処理とヒト ES 細胞の単一分散培養法

次に、ヒト ES 細胞から胚様態を形成するために無フィーダー分散培養法を行った。ここで注意すべき点は、ヒト ES 細胞は、酵素処理等で単一分散すると 90% 以上はアポトーシスを起こして死滅するため、理研の笹井グループが世界で始めて開発した Rock 阻害剤 (Y-27632) を用いた単一分散培養法を導入した。予め MEF 上で培養しているヒト ES 細胞に 10 $\mu$ M Y-27632 を添加し、37°C/3% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 時間培養する。通常の継代時と同様に、細胞のクランプを剥がし細胞懸

濁液を 15ml 遠心管に回収する。1000rpm で 5 分間遠心後、上清を可能な限り吸引除去する。10 $\mu$ M の Y-27632、5ng/ml bFGF を添加したヒト ES 維持培地に懸濁し、0.1%ゼラチンコートをしたディッシュに細胞懸濁液を播種する。37°C /3% CO<sub>2</sub> 条件下で 2 時間培養する。この間 MEF はディッシュに接着するため浮遊している細胞塊を回収することで、MEF と ES 細胞を分離することが出来る。1000 rpm で 1 分間の遠心後、上清を可能な限り吸引除去する。PBS で細胞塊を懸濁し、再度 1000 rpm、1 分間の遠心後、上清を可能な限り吸引除去する。TrypLe Select を 1ml 添加し 37°C で 5 分間程度インキュベートを行う。数回のピペッティングを行い、細胞塊を単細胞に分散する。分散細胞液にヒト ES 細胞維持培地を 5 ml 添加した。1000 rpm、5 分間遠心後、上清を可能な限り吸引除去する。胚様体培地に懸濁する。10 $\mu$ M Y-27632 を添加する。

#### 2) ヒト ES 細胞から胚様体形成の諸条件に関する検討-各種マイクロスフィアプレートの検討

胚様体形成及び神経細胞の分化培養：胚様体形成のデバイスには、Hydro CELL (Hydro, CellSeed Inc)、Aggrewell (Aggre, STEMCELL TECHNOLOGIES)、96-well roundlow binding plate (Nunc) の 3 社のディッシュ及びプレートを使用した。Hydro は独自のナノ表面設計技術を応用した超親水性ポリマーをウェル表面に固定したもので、細胞が全く接着しないことから ES の胚様体形成や、スフィロイド形成に多く用いられている。Aggre は 24 プレートのウェル表面に 1050 個の特殊なマイクロウェルが刻まれており、ES 細胞懸濁液を加えるだけで細胞が各マイクロウェルに分散し、均一な大きさの胚様体を形成させることが出来る。また、細胞懸濁液の密度を調整することで胚様体の大きさを変えることも可能となる (50 ~ 3000 cells/micro well)。Nunc 96-well round low binding plate は各ウェルに決まった数の ES 細胞を入れることで、均一な大きさの胚様体を形成することが出来る。1 ウェルにつき 1 つの胚様体を形成するため、3000 cells