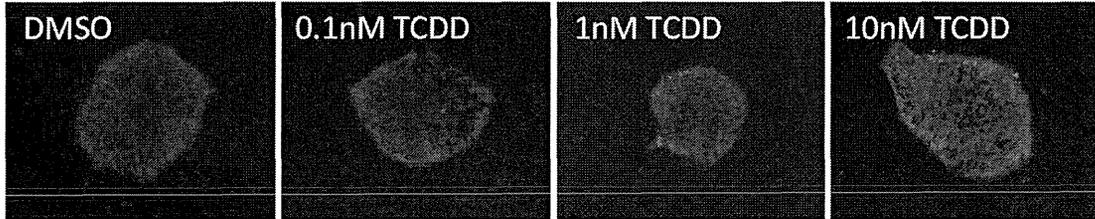
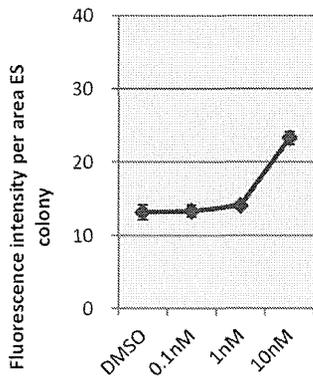


A



B



C

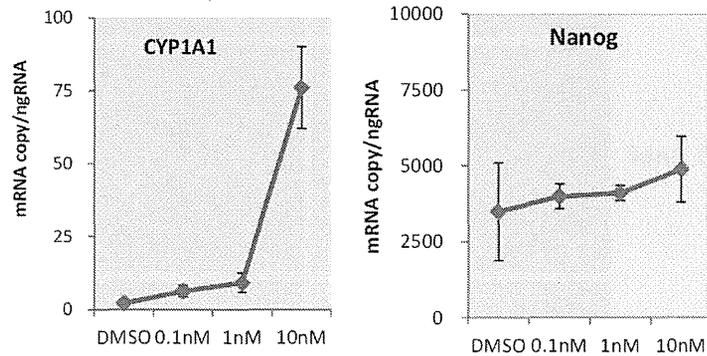


図3. 安定導入ES細胞（Khes1-CYPEGFP）のTCDDに対する反応性。

（A）維持培養条件下でTCDDを0.1、1、10 nMで曝露したところ、10 nM TCDDでEGFPの蛍光強度が増加することが示された。（B）Image-Jによる蛍光強度の定量解析したところ、10 nMで約2倍に増加することがわかった。（C）トータルRNAの解析でも10 nM TCDDの曝露で内因性のヒトCYP1A1 mRNAレベルが上昇していた。未分化マーカーであるNANOGには変化がなかった。

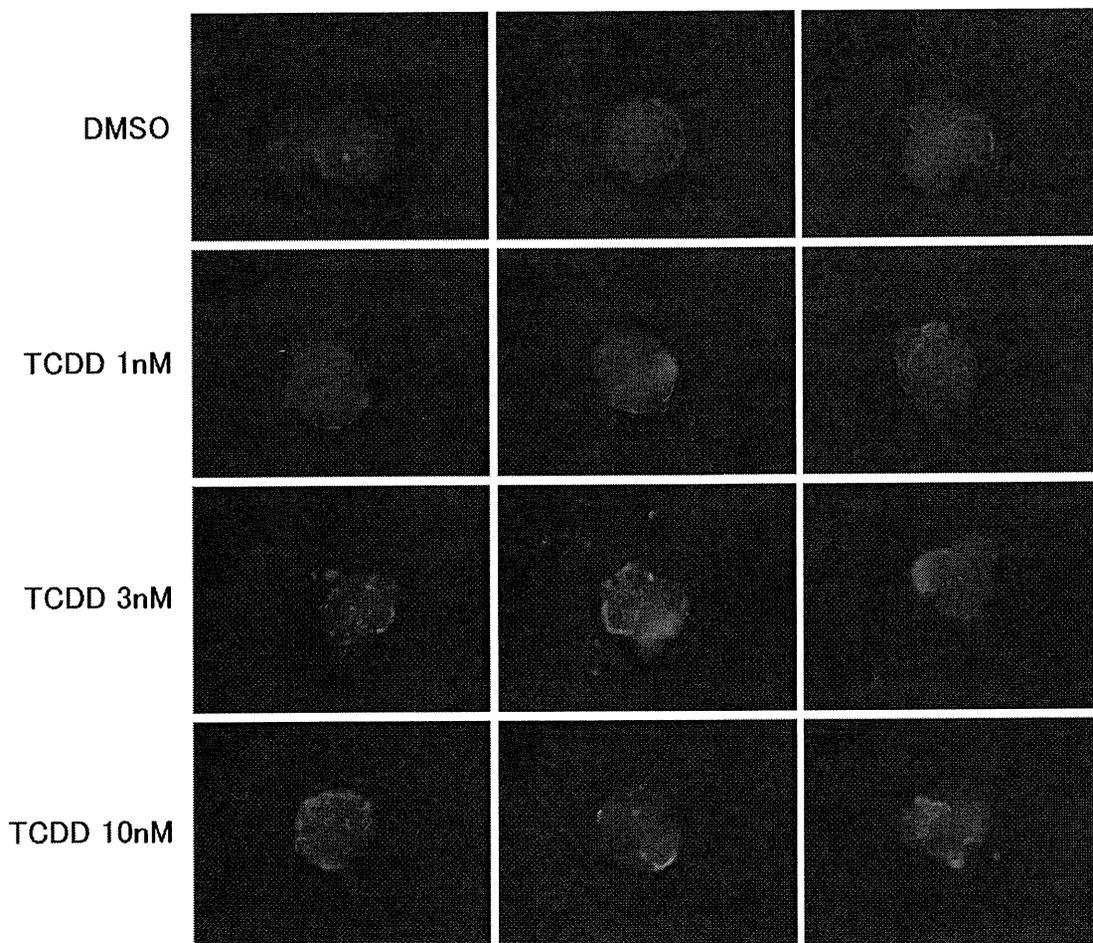


図 4. 安定導入 ES 細胞 (KhES1-CYPEGFP) からの EB 形成過程における TCDD に対する反応性。

KhES1-CYPEGFP 細胞を用い EB 形成を SUMILON PrimeSurface 96U プレート上で実施した。EB 形成開始 8 日目に、TCDD を 0.3、1、3、10、30 nM で曝露し経時的に蛍光観察を行ったところ、3 nM 以上の TCDD で EB の表面に EGFP 強度の強い細胞が観察されることがわかった。この強陽性細胞は時間の経過とともに増えていくこともわかった。

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築

研究分担者 曾根秀子 国立環境研究所 室長

研究要旨

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築するために、MAP2 プロモーターで2種のレポーター遺伝子をドライブしたプラスミド(MAP2-MLNCG)を構築し、そのプラスミドの有効性を検討した。その結果、ヒト H9 株 ES 細胞由来の神経前駆細胞(hPNC)に MAP2-MLNCG を導入し、神経細胞分化後に発光活性および蛍光イメージングシグナルを測定したところ、分化に伴う若干の蛍光イメージングシグナル指標の上昇が認められた。この結果より、MAP2-MLNCG-hPNC 神経細胞株構築の道筋ができた。

A. 研究目的

ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞など)を利用した応用研究は、我が国において重点的に推進すべき科学技術分野となった。臨床応用に分化細胞を利用するには、まだまだ多くの技術上の課題があるが、創薬や毒性試験への応用は早期に実現できるものとして期待されている。多能性幹細胞の利点は発生の極めて初期の生体内の発生全過程を再現できる点にあるが、ヒト ES/iPS 細胞を用いた実用性の高い評価系の報告はまだ少ない。

我々研究グループはこれまで厚生労働科学研究費の支援を頂き、確率推論モデルを応用した種々の化学物質影響予測法の開発に取り組んできた。我々が考案した新規概念である **Multi-parametric profiling network** は細胞や個体発生過程における化学物質の曝露初期の遺伝子変動が、成熟後に生じると考えられる病態や表現型にどのように影響を及ぼすのかを数理的に予測する方法で、本年度、国際誌への公表とプレスリリースを行った(Nagano et al., 2012, He et al., 2012)。

本研究では、すでに確立されているヒト多能性幹細胞を用いた神経系細胞の分化培養に加えて、肝細胞分化培養系を新たに導入し、同一環境、同一曝露系による比較解析を行う。使用する全てのヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞を遺伝子改変でハイスループットイメージング用に加工し、複数のドナー株ならびに系統株を同一線上に配置した曝露試験を行う。予測法としては確率推論を融合

したサポートベクター回帰法を適応し、これにより「ヒト多能性幹細胞試験バッテリー」を構築する。

期待される効果として、毒性が懸念される化学物質のヒトへの影響を発生レベルでスクリーニングできるため、大量の化学物質の安全基準に関わる試験データをデータベース化出来る。公的研究施設に多能性幹細胞試験センターを設け情報を公開していく場合、重要なことは一試験の単価を極力抑えるべきで、今回提案する新規マーカーの選択や形態指標、バイオインフォマティクスによる影響予測の有効性の検討はそのため重要である。また、我々の実施している研究プロトコルは OECD テストガイドラインへ提案も可能であると考えられ、特にヒト細胞への影響という点で化学物質リスク事業のみならず創薬分野にも貢献できると思われる。

B. 研究方法

本研究で使用したヒト胚性幹細胞(H9 細胞)由来神経前駆細胞株は、米ジェロン社から購入した。hMAP2 のプロモーター領域は、Kumar et al (Nucleic Acids Research, 2006)の報告に準じて、hMAP2 ゲノム DNA の-1854 から+369 の領域を増幅し、pGL3-Metluc-copGFP-Neo プラスミドに組み込むため、以下のプライマーを作成した。

hMAP2F:TGGCCTTTTTGGTTCTCATCGAA

hMAP2R:AGACAAGCTGAAGAATCTACCGA

XhoI-hMAP2:gaattggctcgagTGGCCTTTTTGGTTCTC

ATCGAAtt

hMAP2-HindIII:acggttcaagcttAGACAAGCTGAAGAA

Tctaccgaaac

HindIII-MetLuc-copGFP-Neo cassette(F) :

gagtgAAGCTTccaccatggacatcaagtggt

MetLuc-copGFP-Neo cassette-XbaI(R) :

GTCAGTtctagaaTCAGAAGAACTCGTCAAGAA

ヒトのゲノムは正常皮膚細胞及び乳がん細胞株 MCF7 からそれぞれ抽出した。ヒトゲノムを鋳型に、hMAP2F、hMAP2R プライマーと KOD FX(TOYOBO) を用いて MAP2 のプロモーター領域を増幅したのち、内側に作成したプライマー XhoIhMAP2 と hMAP2HindIII を用いてさらに PCR 増幅を行った。PCR 産物を XhoI と HindIII で消化したものと、pGL3-Basic プラスミドを XhoI と HindIII で消化したものをライゲーションし、大腸菌 (XL-1Blue) に導入後増幅し pGL3-hMAP2 を回収した。

次に Metluc-copGFP-Neo in pJ204 プラスミドを鋳型にして HindIII-MetLuc-copGFP-Neo cassette(F)、MetLuc-copGFP-Neo cassette-XbaI(R) プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物を HindIII と XbaI で消化し、pGL3-hMAP2 を HindIII と XbaI で消化したものとライゲーションし、大腸菌に導入後増幅させ、pGL3-hMAP2-Metluc-copGFP-Neo プラスミドを回収した。

(倫理面への配慮)

ヒトES細胞の培養操作は、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。

C. 研究結果

hMAP2 promoter 領域の同定には、正常皮膚細胞及び乳がん細胞株 MCF7 由来のゲノムを用いて配列解析を行った。その結果、ヒト皮膚細胞と MCF7 は同一であるが、Nuclei Acid 及び NCBI に記載の配列とは、異なっていた。しかし、ヒト皮膚細胞と MCF7 の2種で同一の配列であったため、図1に示した配列を pGL3-

Metluc-copGFP-Neo に挿入した(図2)。H9 細胞由来神経前駆細胞を培養し、hNPC(ヒト神経前駆細胞)を 48 ウェルプレートに播種し、80%コンフルエントになるように増殖培地で培養した。Neon (Life Technologies) を用いて pGL3-hMAP2-Metluc-copGFP-Neo プラスミドのエレクトロポレーションを行い、作成したプラスミドを hNPC に導入した。遺伝子導入後 8 日目に分化培地に変えて培養を行い、さらに 15 日後に G418 を添加し、細胞のセレクションを行った。また、遺伝子導入翌日より、各ポイントにおいて培養液をとり、Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay(Clontech) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った(図3)。神経細胞分化後に発光活性および蛍光イメージングシグナルを測定したところ、分化に伴う若干の蛍光イメージングシグナル指標の上昇が認められた。現在、再現性を確認中である。

D. 考察

本研究は、ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築するために、hMAP2 プロモーターで 2 種のレポータージーンをドライブしたプラスミド(MAP2-MLNCG)を構築し、そのプラスミドの有効性を検討した。このアッセイ系の問題は、未分化細胞が神経の分化細胞に分化したときに、レポーターたんぱく質の発現活性をみるため、増殖期で細胞のセレクションができない点である。また、hMAP2 遺伝子そのものが巨大であり、どのような転写機構で発現されるのかといった基本情報がほとんど報告されていなく、Kumar et al (Nucleic Acids Research, 2006)の報告のみである。今後、当研究室でもプロモーター領域を変えた検討が必要かもしれない。

E. 結論

ハイスループットアッセイに最適化したヒト多能性細胞由来神経分化細胞の構築するために、MAP2 プロモーターで 2 種のレポータージーンをドライブしたプラスミド(MAP2-MLNCG)を構築し、そのプラスミドの有効性を検討した。その結果、ヒト H9 株 ES 細胞由来の神経前駆細胞(hPNC)に MAP2-MLNCG を導入し、神経細胞分化後に発光活性および蛍光イメージングシグナルを測定した

ところ、分化に伴う若干の蛍光イメージングシグナル指標の上昇が認められた。この結果より、MAP2-MLNCG-hPNC 神経細胞株構築の道筋ができた。

F. 健康危険情報

特に記載する項目はない

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Qin XY, Sone H, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Hisada A, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T. Individual variation of the genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One*. 7(12):e52756 (2012).
- 2) Fukuda T, Kurita J, Saito T, Yuasa K, Kurita M, Donai K, Nitto H, Soichi M, Nishimori K, Uchida T, Isogai E, Onuma M, Sone H, Oseko N, Inoue-Murayama M. Efficient establishment of primary fibroblast cultures from the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 48(10):660-665 (2012).
- 3) Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, Sone H. Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: a combined study of metabolomics and morphological analysis. *Neurotoxicology*. 33(5):1375-1380 (2012).
- 4) Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, Sone H. Identification of Stage-Specific Gene Expression Signatures in Response to Retinoic Acid during the Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Front Genet*. 3:141 (2012).
- 5) Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H. Association of

variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet*. 57(7):434-441 (2012).

- 6) Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T, Sone H. Identification of novel low-dose bisphenol a targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS One*. 7(5):e36711 (2012).
- 7) He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin XY, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, Ohsako S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol Lett*. 212(1):1-10 (2012).
- 8) Nagano R, Akanuma H, Qin XY, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, 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).
- 9) Qin XY, Fukuda T, Yang L, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, 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).
- 10) Sone H, Tin-Tin WS, Qin XY, Akanuma H and Imanishi S. IN: Learning Disabilities. Environmental Chemical Substances in Relation to Neurodevelopmental Disorders: A Systematic Literature Review, Chapter 16, InTech Europe (2012).

2. 学会発表

- 1) 曾根秀子, 赤沼宏美, 秦咸陽, 曾勤, 南齋ひろ子, 吉永淳, 大迫誠一郎: ヒト ES 細胞由来胚様体を用いた化学物質の神経発生影響評価に関する研究の影響評価に関する研究. 第 15 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会(東京、2012).
- 2) Sone H., Qin X.Y., Yoshinaga J., Ohsako S., Qin X. Novel Approach to Developmental Neurotoxicity

Testing Using Human Embryonic Stem Cells. シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来(東京、2012).

3) 米元純三,河原純子,曾根秀子,服部 達也,松村徹,洲鎌盛一,濱口真奈,大矢幸弘：保存臍帯中 OH - PCB 濃度と 5 歳児の身体発達との関係. 第 15 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会(東京、2012).

4) 曾根秀子,赤沼宏美,黒河佳香,南齋ひろ子,山崎将嗣,平野靖史郎 PAMAM デンドリマーのヒト ES 由来胚様体及び神経系分化細胞への分子送達に関する研究 第 28 回日本 DDS 学会学術集会 (札幌、2012).

5) 曾根秀子,黒河佳香,山崎将嗣,平野靖史郎 ヒト細胞におけるナノサイズ PAMAM デンドリマーの光学的観察と細胞内挙動 第 39 回日本毒性学会学術年会 (仙台、2012).

6) Sone H.,Nagano R.,Akanuma H.,Taniguchi T.,Imanishi S.,Fujibuchi W.,Ohsako S.

Multi-parametric profiling network based on gene

expression and phenotype data: a novel approach to developmental neurotoxicity testing. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (仙台、2012).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、今西 聡、赤沼宏美、宮崎 航。「胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法」特願 2009-81497, (2009).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
研究分担報告書

TGGCCTTTTTGGTTCTCATCGAATTTTGCTCCATTCACCTGGTTGCTAACAATGCTGTAAAAATTAACCTATTTATTGACATTTTT
CTCCTTCCCTTTTCCCCAGGAAATAAATGCAGGAAATTATCCACACTTAACCTCCCTACACAAGGGCACTGTAAAAATAGGGATATTCA
ACTGCTAATTTTCAGTTGCTAACATGGAGGGGATACAGATTATGCCAAAGATTGAATTCTCTGCCTGGGCCCTCAGGGACTGAAAAGCC
CCAGGACCAAGCTGGTTGCCACCTCCTTTTGCTTTTGTATGTAAATAGATTGCCCCAGAAATCACATTTCTAATTCTCTGTTTTTTTTT
TTCTTTTTCTCTTGTAAGGAAAAATGGCCAAGTGCATAATTATAACTGTTAAAAAGGGTATTGAATTTTCTGTAGGAAAATATACATAAA
TATATGCATTTCTTTAATGAAGATATTTATTTTGGAAATATAAATAAGCAATATGCGATAGTTAAAAATATTGTAATTATCTGCCAATGACAA
AACATCAACAAATCTCTGATGTCCTTAATGCAGATAATAAAAAATCCCATAAACTAGTATTTAGTCATGTCCAGTTTGTGTAGCTTAACT
TGTTTGTAAATCCTATATGCCTGAAAACCTGTTTCTCTATTTAAGCGGT
TCTGGCATTAAACAAAAGGAGACCAGATGATGACATTCATAGGCTGATAGACTCGACTCCTGGGGACACACTTGGATGGAGGCAATTA
AAATGCCTGTCAGGCATTTGGTACCAGAAGCCCCTATGGCAAACCGCTAAATCGTAAAGTGAGGGCTGCATCCTATTGTGAGTGAATGA
TGGCGGAGCTGAGTGGCTTGTTCATCTCTCGAAAATTCTGAGACTAGTGAGCTCTCTCCCTCTCTCCCACTCGCCTTATTTTCTGTT
CGCCACTGCGGGGACTTCTAATTTGCAGCTTCCCTTTCCCCGGCACACACAGACACGAGCTGGTGGCTTGCAGACTGCGTCTGTCTG
GAGCTAGAGAGCCAGAGAGCCAGCCTGTGGGGATAATGCTCCCGGAGAAGGATTCTGCAGCAGTTCTCAAAGGCTAGACTTGAGTG
GTATTGCTGCATATGCGCTGGTAATGGTTTGGGGCTTTTAAATTTTATTCGTTTCATTTTCAATTCGTTTTTCATAGGATGTGCTTTATGTA
ATCTCAGAGTAAAGATCTTTTAAAAATTCATTTATGAGCTTCCCTAAATATTCAAGTACTGCATTTTTTTTTGTGCTACAGACCTCCAGGCAT
AGATTTATTTTGTAGTATAAAGAATGCATTTGCTTACTGGTGAGTTATAATTTTTGATATTTAGTTAACAAATCCATATATATATATATAT
ATGTTCTTTTTGTTTTGTTTCGGTAGATTCTTCAGCTTGCT

図1 pGEM-MetlucCopGFPNeo に導入の hMAP2 プロモーター領域の配列

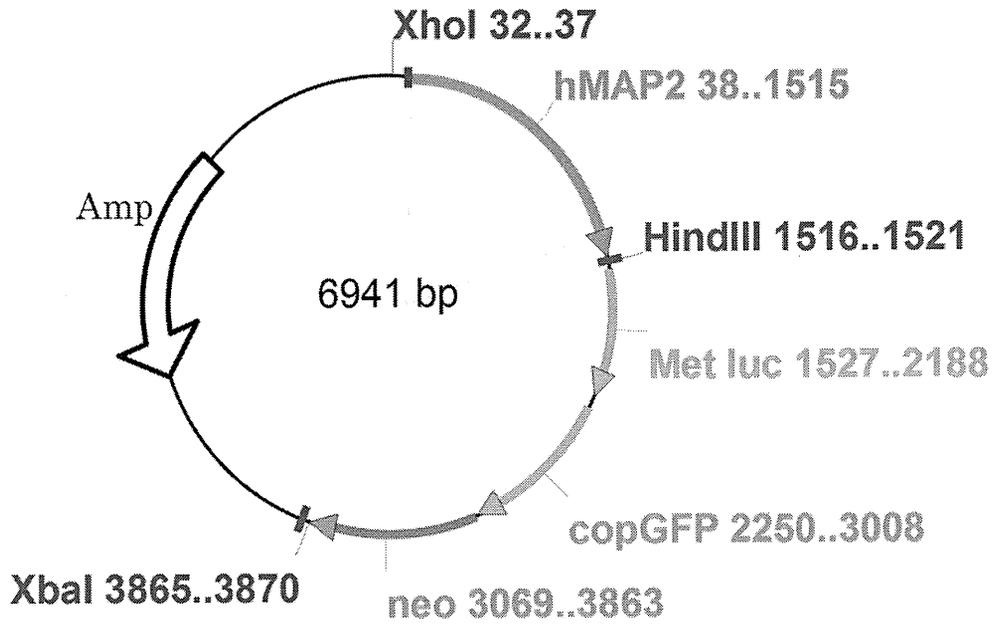


図2 導入プラスミドの概略図

実験スケジュール

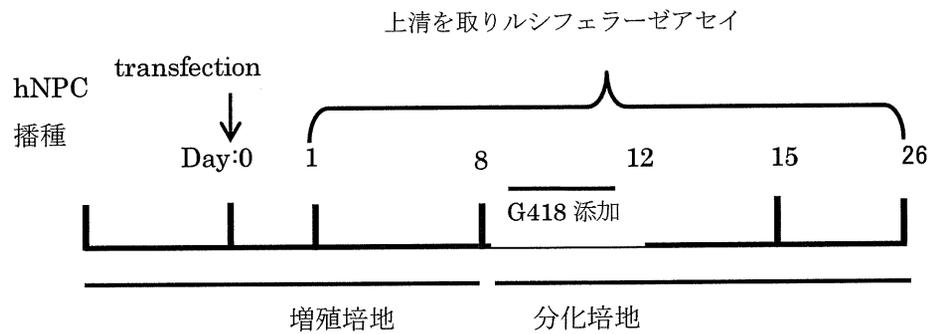


図3 MAP2-MLNCG-hPNC 株樹立確認のためのアッセイ概略

ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における遺伝子発現情報の抽出に関する研究

研究分担者

藤 淵 航

京都大学 教授

研究要旨

複数の株種からなる ES 細胞並びに iPS 細胞に同一環境、同一曝露系を用いた一連の化合物毒性試験技術が確立されたことを想定した場合の遺伝子発現情報マイニング技術について研究を行った。その結果、1) 新しい遺伝子発現順位に基づくロバストな主成分空間学習法を開発し、従来よりもクラスタリング精度を向上させた、2) 新型の遺伝子ネットワーク予測法である構造方程式モデルを用いた毒性ネットワーク推定を行った。さらに、毒性試験のハイスループット能力を上げるため、多数の株種を一度に効率的に遺伝子発現解析できる技術として DNA バーコードを用いたマルチプレックスシングルセル RNA-seq 法の検討を行い、例として iPS 細胞研究所で入手可能な 5 種の幹細胞（201B7, 454C2, 253G1, KhES1, KhES3）を 15 個ずつ用いた遺伝子発現解析をわずか 1 回のシーケンサーランで測定可能にした。

A. 研究目的

本研究では過去3年間の厚生労働科研究費研究におけるヒト毒性化学物質の機械学習による判別分析の高精度化を実現した結果を踏まえての後継プロジェクトであり、ハイスループットの毒性バッテリー試験を行う多能性幹細胞システムを開発するものである。我々のグループは他の研究グループで取得した遺伝子発現データおよび発生マーカーの検出画像を受け取り、発生の段階で人体に有害な毒性物質の種類及びその程度をサポートベクター回帰などの機械学習を用いて予測するインフォマティクス手法を開発する。また、iPS 細胞研究所の利点を生かして東京大学と共に多様な多能性幹細胞からの簡便なハイスループット遺伝子発現解析を行う技術を開発する。

B. 研究方法

1) 新しい遺伝子発現順位に基づくロバストな主成分空間学習法

マイクロアレイ等遺伝子発現データの正規化はデータ統合解析上の問題であり、遺伝子の発現順位を用いた解析がロバストであるとのコンセンサスがある。

しかし、順位データによる多変量解析法はまだ未開拓の分野なため、我々は新規に検索エラーを最小化する線形マッピングの手法を開発した。

2) 構造方程式モデルを用いた毒性ネットワーク推定

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捉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を試す必要がある。これまで用いていた GGM(グラフィカルガウシアンモデル)、CrossR(交差相関係数)に加え、未知のネットワーク構造因子を発見可能な構造方程式モデルからの遺伝子ネットワーク推定法を開発した。

3) DNA バーコードを用いたマルチプレックスシングルセル RNA-seq 法の検討

遺伝子ネットワークの推定には遺伝子数の約 4 倍のデータ点が必要であり、1 化合物種につき 10 遺伝子なら、5 濃度 4 時点 2 リピートで 400 点のデータが必要とされ、20 化合物ならコントロールなども合わせて約 10,000 点近いデータを測定することになり、

実験者への負担が大きかった。そこで、シングルセルを用いた手法により、1度のシーケンサー解析で96細胞データを取得することができるマルチプレックスRNA-seq手法の開発を試みた。

（倫理面への配慮）

京都大学医学研究科では「医の倫理委員会」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る遺伝子発現データの情報解析については、倫理委員会で承認の必要がないと判断され、倫理面での問題は無い。また、今回のES細胞及びiPS細胞の実験利用についても、我々が所属のiPS細胞研究所で提出している「ヒトES細胞からの血球・神経分化に関する研究」に内包され、またiPS細胞の所内利用指針に基づいて研究を行っているため倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

1) 新しい遺伝子発現順位に基づくロバストな主成分空間学習法

遺伝子発現データの正規化に対して有効な手段として発現順位を用いた解析が用いられている。我々は、遺伝子発現順位データを用いて、類似遺伝子発現パターン検索を行う場合での線形重み学習を行い、検索のエラー率を最小化する主成分空間学習法 PARCA (Pairwise Ranking Component Analysis) 法を開発し、論文誌に報告した (論文1)。本手法と従来の手法である LDA (線形判別解析)、PCA (主成分分析)、NCA (近傍成分分析) と比較して特にカテゴリーデータの空間分離が優れている結果が得られた (図1)。本手法を、例として iPS 細胞の遺伝子発現データ 73 マイクロアレイに使用したところ、12 マルチプラットフォームからなる混成データセットであっても iPS 細胞の由来細胞による違いを検出する能力が最も高いことが判明した (表1)。

Distance function	Ranking error
ED	0.70
PD	0.66
SD	0.93
NCA	0.58
PARCA	0.06

表1 : 10種の由来細胞の異なる iPS 細胞のうち fetal skin fibroblast 由来 50 データのみを検索した結果 ED: Euclidean Distance、PD: Pearson Distance、SD: Spearman Distance、NCA: Neighborhood Component Analysis、PARCA: Pairwise Ranking Component Analysis

2) 構造方程式モデルを用いた毒性ネットワーク推定

昨年度までに開発して用いた①ベイジアン、②GGM、③CrossRを用いたネットワーク手法に加えて、新しく「構造方程式モデル」と呼ばれる手法によるネットワーク推定を行った。本手法は遺伝子ネットワークにおける遺伝子間の依存関係をダイレクトに最尤推定する手法であり、得られたネットワークはデータを如実に反映している (図2)。

データには、一昨年度の15化合物を用いて、9遺伝子 (GATA2, Lmx1A, MAP2, Nanog, Nestin, Nodal, Oct3/4, Pax6 and Tuj1) のネットワークを推定した。本研究を国際学会 GLOBAL HEALTH 2012 に投稿したところ、ベストペーパー賞を受賞した。(論文4)。結果として、化合物のうち、Acrylamide、Diethylnitrosamine、Thalidomideについて詳細な遺伝子ネットワーク図が得られた (図3)。

3) DNA バーコードを用いたマルチプレックスシングルセル RNA-seq 法の検討

遺伝子ネットワークの推定には膨大な測定点が必要となる。そこで、シングルセルを用いた手法により、1度のシーケンサー解析で96細胞データを取得することができるマルチプレックスRNA-seq手法の開発を行った。我々が取った手法はDNAバーコードを細胞と共に入れて由来細胞を識別できる手法である。我々と同じアイデアでSwedenのLinnarssonのグループが既に論文を報告していたため、部分的に共同研究することで効率的な技術開発を行った。

その結果、5種の幹細胞 (201B7, 454C2, 253G1, KhES1, KhES3) 及びマウスフィーダー細胞 (SNL76/7) を15個ずつ用いた遺伝子発現解析をわずか1回のシーケンサーランで測定可能にした (図4)。しかし、

取得した mRNA の収率が十分でないため、手法に改良が必要なことが示唆された。また、収量が十分であった 6 遺伝子を用いてベイジアンネットワークを推定することにも成功した。本手法は、これまで PCR の限界である遺伝子選択の制約を解除できるものであり、多数の株種を一度に効率的に網羅的遺伝子発現解析できるハイスループット技術として期待される。

D. 考察

今年度は前年度までの「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」をさらに発展させたハイスループット型の多種幹細胞による毒性予測バッテリーシステムの開発を開始した。東京大学、国立環境研究所で選択した幹細胞株にマーカー遺伝子を導入し、化学物質の曝露実験を行う予定であるが、その後の遺伝子発現解析は京都大学が東京大学と担当することになっている。

そこで、今年度は、(1) 高性能な毒性分類のための情報的手法 2 つ (PARCA 及び構造方程式モデル) を利用した手法を開発し、(2) ハイスループット遺伝子発現解析実現のためのマルチプレックスシングルセル解析技術の予備研究を行った。平成 25 年度は遺伝子発現解析を開始するため、本技術を洗練・統合し使用できるようにしなくてはならない。予定されている iPS 細胞 2 株、ES 細胞 6 株の計 8 株でそれぞれ 18 個の遺伝子からなるネットワークを描かせるためには、 $8 \times (18 \times 4) = 576$ シングルセル解析ができる必要がある。96 細胞システムなら 6 プレートで済む。計算すると、1 細胞中の mRNA 分子 10^7 個を 50bp でシーケンスするため、等量の外部標準 RNA と合わせて計 $10^9 = 1\text{Gbp}$ が生産されることになる。HiSeq2000 のスループットが 600Gb であることから、理論上、600 個までのシングルセルは 1 ランで解析できることになり、今回の毒性試験バッテリーシステムのスペックを満たす。しかし、これは 1 化合物についての計算であり、予定されている 22 化合物では 22 ランが必要であり、不可能である。今後はターゲットシーケンシング等と

組み合わせて効率化を図ることを計画している。

E. 結論

前年度までの最先端の ES 細胞毒性試験システムによる研究成果を踏まえて、さらにハイスループットで毒性を予測するシステムを構築することが本プロジェクトの課題である。今回の高度な情報解析技術及び次世代シーケンシング技術はこの難題を超える可能性を示唆したものであり、今後の研究の発展が期待できる。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Pessiot, J.F., Kim, H., Fujibuchi, W., Pairwise Ranking Component Analysis, *Knowledge and Information Systems* (on-line accepted).
2. Kinouchi, M., Miura, K., Mizoi, T., Ishida, K., Fujibuchi, W., Sasaki, H., Ohnuma, S., Saito, K., Katayose, Y., Naitoh, T., Motoi, F., Shiiba, K., Egawa, S., Shibata, C., Unno, M., Infiltration of CD40-Positive Tumor-Associated Macrophages Indicates a Favorable Prognosis in Colorectal Cancer Patients, *Hepatogastroenterology*, 60(121) (on-line accepted).
3. Pessiot, J.F., Wong, P.S., Maruyama, T., Morioka, R., Aburatani, S., Tanaka, M., Fujibuchi, W., The impact of collapsing data on microarray analysis and DILI prediction, *Landis Bioscience*, 1(3): 1-7 (2013).
4. Aburatani, S., Fujibuchi, W., Application of Structural Equation Modeling for Inferring Toxicity-Dependent Regulation in Human Embryonic Stem Cells, *GLOBAL HEALTH 2012, The First International Conference on Global Health Challenges*, 27-32 (2012)(Best Paper Award).
5. Aburatani, S., Fujibuchi, W., Inference of Specific Gene Regulation by Environmental Chemicals in Human Embryonic Stem Cells, *Journal of Molecular Biology Research*, 2(1): 54-64 (2012).

6. Miura, K., Fujibuchi, W., Unno, M., Review: Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer, *Carcinogenesis*, 33(12): 2311-2319 (2012).
7. Miura, K., Fujibuchi, W., Unno, M., Review: Splice variants in apoptotic pathway, *Experimental Oncology*, 34(3): 212-217 (2012).
8. He, X., Imanishi, S., Sone, H., Nagano, R., Qin, X-Y., Yoshinaga, J., Akanuma, H., Yamane, J., Fujibuchi, W., Ohsako, S., Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells, *Toxicology Letters*, 212: 1-10 (2012).
9. Miura, K., Ishida, K., Fujibuchi, W., Ito, A., Niikura, H., Ogawa, H., Sasaki, I., Differentiating rectal carcinoma by an immunohistological analysis of carcinomas of pelvic organs based on the NCBI Literature Survey and the Human Protein Atlas database, *Surgery Today*, 42: 515-525 (2012).
10. Hamada, S., Satoh, K., Fujibuchi, W., Hirota, M., Kanno, A., Unno, J., Masamune, A., Kikuta, K., Kume, K., Shimosegawa, T., MiR-126 Acts as a Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer Cells via the Regulation of ADAM9, *Molecular Cancer Research*, 10(1): 3-10 (2012).

2. 学会発表

1. 【依頼講演】 藤渕航、iPS 細胞研究所 (CiRA)の紹介と展望、第33回BIO研究発表会、東北大学大学院情報科学研究科、2013年、3月、仙台
2. 田中道廣、藤渕航、RNA-seq 解析における多群間比較に対応した正規化法、第33回BIO研究発表会、東北大学大学院情報科学研究科、2013年、3月、仙台
3. 【招待講演】 藤渕航、幹細胞インフォマティクス、化学研究所シンポジウム、京都大学化学研究所、2013年、1月、京都
4. 【invited talk】 Wataru Fujibuchi, More Massive Data for Single Cell Informatics and Next Generation Drug Discovery, Bioinformatics week in Odaiba 2012 (BiWO 2012), AIST, 2012, November, Tokyo.
5. Junko Yamane, Michihiro Tanaka, Wataru Fujibuchi,

Standardization of human iPS cells with single cell technology, poster presentation at International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, Kyoto Research Park, 2012, November, Kyoto.

6. 藤渕航、幹細胞インフォマティクスと新しい創薬毒性予測、CiRA2012 mini symposium、京都大学、2012年、10月、京都

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
無し

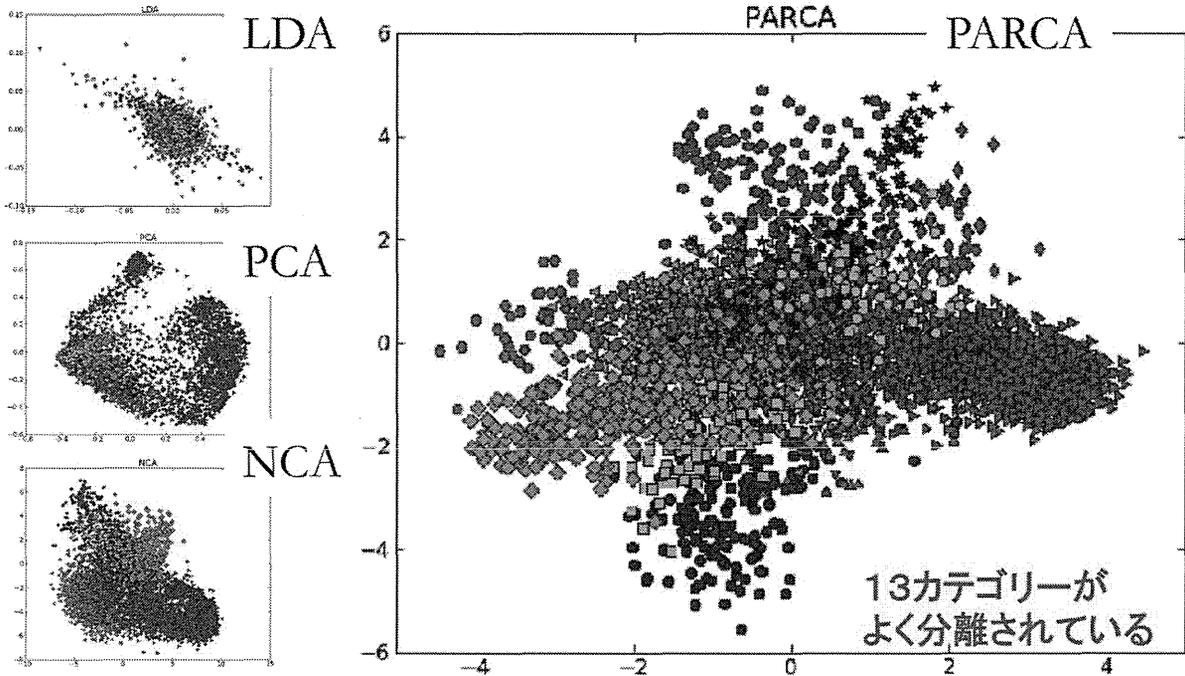


図1：PARCAによる順位データの主成分空間マッピング

Dataset: Reuters (ロイター新聞、13categories、12,887articles)。LDA: Linear Discriminant Analysis (線形判別解析)、PCA: Principal Component Analysis (主成分分析)、NCA: Neighborhood Component Analysis (近傍成分分析)、PARCA: Pairwise Ranking Component Analysis。

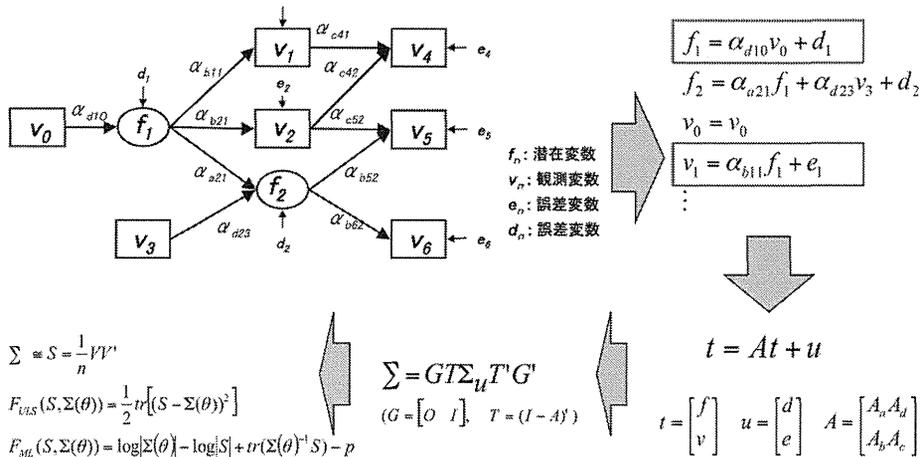


図2: 構造方程式モデリングによる遺伝子ネットワークの最尤推定の概念図

モデルには遺伝子だけでなく遺伝子の間をつなぐ潜在変数(例えばタンパク質など)を入れることもでき、モデルの共分散行列とデータの共分散行列の線形差を最小化している。

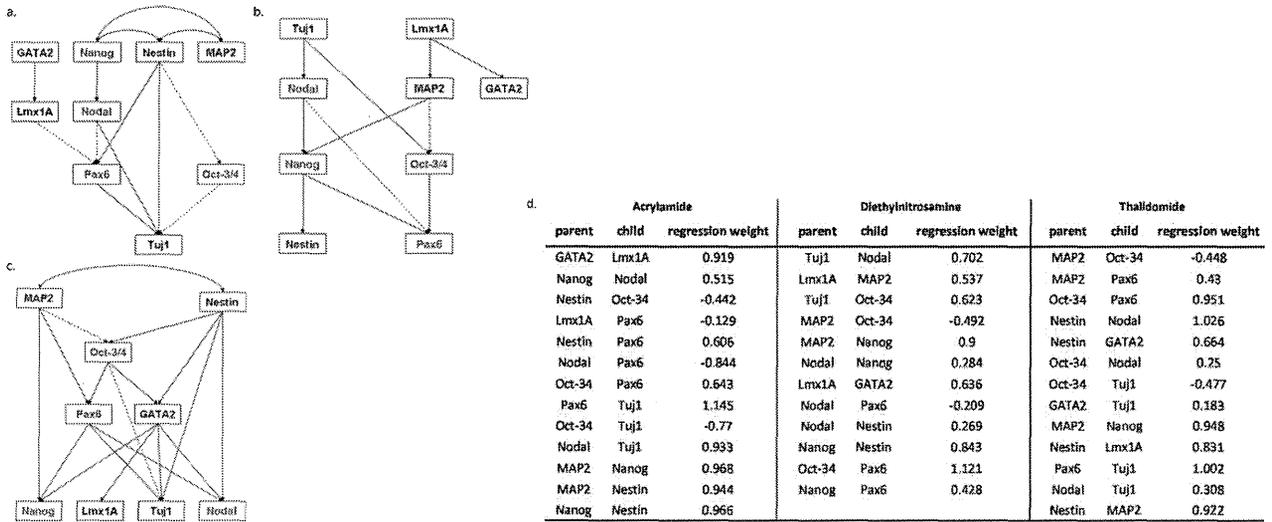


図3: 構造方程式モデリングによるES細胞に曝露した化学物質の影響遺伝子ネットワーク

正の制御は実線、負の制御には破線で示してある。(a) Acrylamide model、(b) Diethylnitrosamine model、(c) Thalidomide model。(d) 最適化したモデルの依存関係の重み係数。

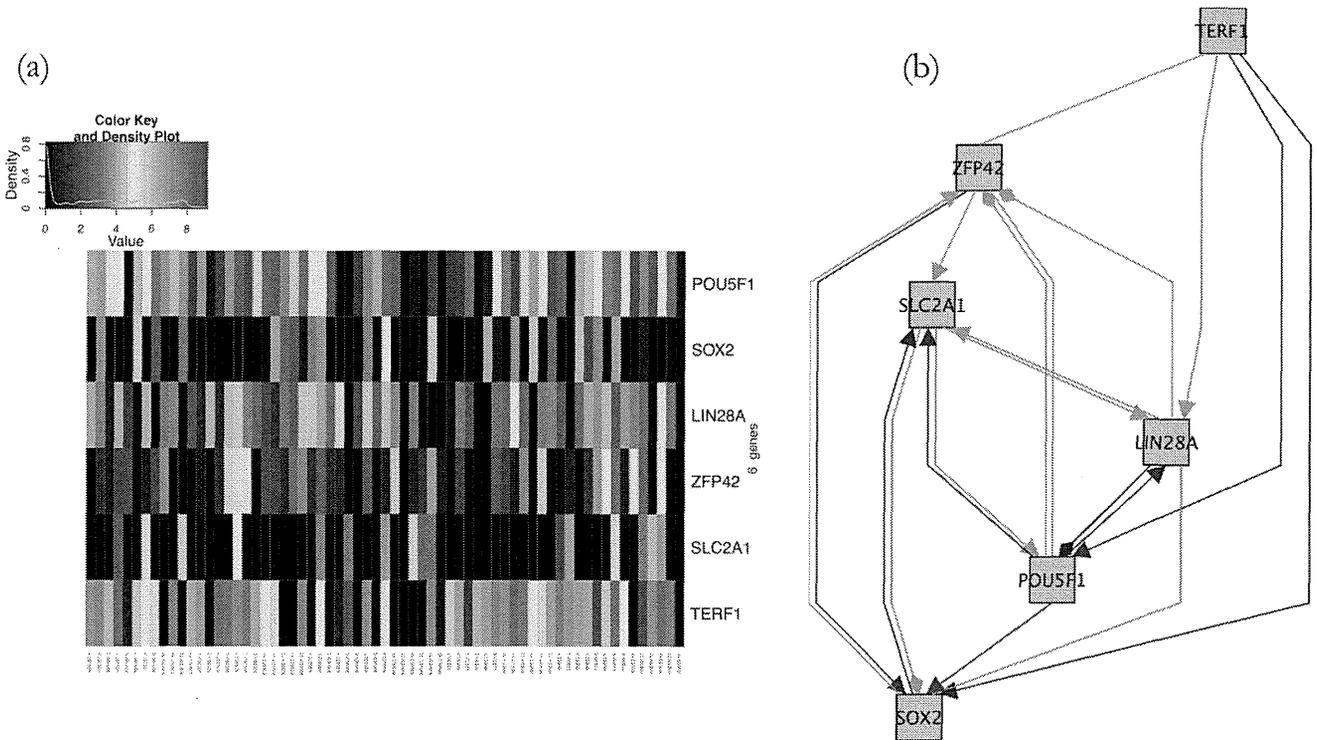


図4: 96細胞同時シングルセル解析技術による未分化マーカー関連遺伝子と遺伝子ネットワーク

(a) 5種の幹細胞（201B7, 454C2, 253G1, KhES1, KhES3）及びマウスフィーダー細胞（SNL76/7）を15個ずつ同時にRNA-seqした結果から幹細胞で収量の高かった6遺伝子について示した。(b) 幹細胞全てのデータを用いてベイジアンネットワーク法により推定した遺伝子ネットワーク。

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Sugai E, Yoshioka W, Kakeyama M, Ohsako S, Tohyama C	In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet	<i>J Applied Toxicol</i>			in press
Kurita H, Ohsako S, Hashimoto S, Yoshinaga J, Tohyama C	Prenatal zinc deficiency-dependent epigenetic alterations of mouse metallothionein-2 gene	<i>J Nutr Biochem</i>	24	256-266	2013
Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, Sone H.	Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: A combined study of metabolomics and morphological analysis	<i>Neurotoxicology</i>	33(5)	1375-1380	2012
Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, Sone H	Identification of stage-specific gene expression signatures in response to retinoic acid during the neural differentiation of mouse embryonic stem cells.	<i>Front Genet.</i>	3	141	2012
He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin XY, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, Ohsako S.	Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells.	<i>Toxicol Lett.</i>	212(1)	1-10	2012
Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Fujisawa N, Kawaguchi T, Ohsako S, Hara S, Uematsu S, Akira S, Tohyama C	Critical role of mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin	<i>Toxicol Sci</i>	127	547-554	2012
Nagano R, Akanuma H, Qin XY, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, Sone H.	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
Qin XY, Sone H, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Hisada A, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T	Individual variation of the genetic response to bisphenol A in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients.	<i>PLoS One.</i>	7(12)	e52756	2012
Fukuda T, Kurita J, Saito T, Yuasa K, Kurita M, Donai K, Nitto H, Soichi M, Nishimori K, Uchida T, Isogai E, Onuma M, Sone H, Oseko N, Inoue-Murayama M.	Efficient establishment of primary fibroblast cultures from the hawksbill sea turtle (<i>Eretmochelys imbricata</i>).	<i>In Vitro Cell Dev Biol Anim</i>	48(10)	660-665	2012
Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H.	Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias.	<i>J Hum Genet.</i>	57(7)	434-441	2012

Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Fukami M, Ogata T, Sone H.	Identification of novel low-dose bisphenol A targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients.	<i>PLoS One</i>	7(5)	e36711	2012
Qin XY, Fukuda T, Yang L, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Sone H.	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
Sone H, Tin-Tin WS, Qin XY, Akanuma H and Imanishi S.	IN: Learning Disabilities. Environmental Chemical Substances in Relation to Neurodevelopmental Disorders:A Systematic Literature Review	<i>InTech Europe</i>	Chapter 16	313-342	2012
Pessiot JF, Kim H, Fujibuchi W	Pairwise ranking component analysis	<i>Knowledge and Information Systems</i>			on-line accepted
Kinouchi M, Miura K, Mizoi T, Ishida K, Fujibuchi W, Sasaki H, Ohnuma S, Saito K, Katayose Y, Naitoh T, Motoi F, Shiiba K, Egawa S, Shibata C, Unno M	Infiltration of CD40-Positive Tumor-Associated Macrophages Indicates a Favorable Prognosis in Colorectal Cancer Patients	<i>Hepatogastroenterology</i>	60(121)		on-line accepted
Pessiot JF, Wong PS, Maruyama T, Morioka R, Aburatani S, Tanaka M, Fujibuchi W	The impact of collapsing data on microarray analysis and DILI prediction	<i>Landis Bioscience</i>	1(3)	1-7	2013
Aburatani S, Fujibuchi W	Application of Structural Equation Modeling for Inferring Toxicity-Dependent Regulation in Human Embryonic Stem Cells	<i>GLOBAL HEALTH 2012, The First International Conference on Global Health Challenges</i>		27-32	2012
Aburatani S, Fujibuchi W	Inference of Specific Gene Regulation by Environmental Chemicals in Human Embryonic Stem Cells	<i>Journal of Molecular Biology Research</i>	2(1)	54-64	2012
Miura K, Fujibuchi W, Unno M	Review: Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer	<i>Carcinogenesis</i>	33(12)	2311-2319	2012
Miura K, Fujibuchi W, Unno M	Review: Splice variants in apoptotic pathway	<i>Experimental Oncology</i>	34(3)	212-217	2012
Miura K, Ishida K, Fujibuchi W, Ito A, Niikura H, Ogawa H, Sasaki I	Differentiating rectal carcinoma by an immunohistological analysis of carcinomas of pelvic organs based on the NCBI Literature Survey and the Human Protein Atlas database	<i>Surgery Today</i>	42	515-525	2012
Hamada S, Satoh K, Fujibuchi W, Hirota M, Kanno A, Unno J, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Shimosegawa T	MiR-126 Acts as a Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer Cells via the Regulation of ADAM9	<i>Molecular Cancer Research</i>	10(1)	3-10	2012

別紙 4

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤渕航	マイクロアレイ解析の基本	秋山 徹 / 監 井元清哉、 河府和義、 藤渕航 / 編	バイオ実験に絶対使える 統計の基本 Q&A	羊土社	日本	2012	57-77

研究成果の刊行物・別刷



Prenatal zinc deficiency-dependent epigenetic alterations of mouse metallothionein-2 gene[☆]

Hisaka Kurita^a, Seiichiroh Ohsako^a, Shin-ichi Hashimoto^b, Jun Yoshinaga^c, Chiharu Tohyama^{a,*}

^aLaboratory of Environmental Health Sciences, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^bDepartment of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

^cDepartment of Environmental Studies, The University of Tokyo, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, Japan

Received 14 February 2012; received in revised form 29 April 2012; accepted 7 May 2012

Abstract

Zinc (Zn) deficiency *in utero* has been shown to cause a variety of disease states in children in developing countries, which prompted us to formulate the hypothesis that fetal epigenetic alterations are induced by zinc deficiency *in utero*. Focusing on metallothionein (MT), a protein that contributes to Zn transport and homeostasis, we studied whether and how the prenatal Zn status affects gene expression. Pregnant mice were fed low-Zn (IU-LZ, 5.0 µg Zn/g) or control (IU-CZ, 35 µg Zn/g) diet *ad libitum* from gestation day 8 until delivery, with a regular diet thereafter. Bisulfite genomic sequencing for DNA methylation and chromatin immunoprecipitation assay for histone modifications were performed on the *MT2* promoter region. We found that 5-week-old IU-LZ mice administered cadmium (Cd) (5.0 mg/kg b.w.) have an elevated abundance of *MT2* mRNA compared with IU-CZ mice. Alteration of histone modifications in the *MT2* promoter region having metal responsive elements (MREs) was observed in 1-day-old and 5-week-old IU-LZ mice compared with IU-CZ mice. In addition, prolongation of MTF1 binding to the *MT2* promoter region in 5-week-old IU-LZ mice upon Cd exposure is considered to contribute to the enhanced *MT2* induction. In conclusion, we found for the first time that Zn deficiency *in utero* induces fetal epigenetic alterations and that these changes are being stored as an epigenetic memory until adulthood.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: DNA methylation; Epigenetics; Histone modification; Metallothionein; Zinc

1. Introduction

The malnutritional status *in utero* has been shown to affect the progeny's health and disease states later in life in humans as well as in laboratory animals. Low-birth-weight babies resulted from prenatal malnutrition can be a risk factor for lifestyle-related diseases, such as ischemic heart disease and diabetes [1–4]. This hypothesis has been widely acknowledged and expanded to the concept, named 'Developmental origins of health and disease (DOHaD)' [5]. Recently, rats that were grown under low-protein nutritional conditions *in utero*, or had intrauterine growth retardation have been shown to develop hypertension or type 2 diabetes later in adulthood [6–9]. Moreover, a plethora of published works have shown that extrinsic conditions *in utero*, such as nutrition and environmental chemicals, affect the propensity of the fetus to develop disease states later in adulthood

[10–12]. Although the underlying mechanism is still under intensive investigation, there is a widely-acknowledged view that epigenetic alterations, namely, DNA methylation (the covalent addition of a methyl group to the 5'-carbon of cytosine in the CpG dinucleotide) and histone modification (methylation, acetylation, phosphorylation, ADP-ribosylation, and ubiquitination), play a pivotal role in the expression of particular genes, which will subsequently alter the physiological status of the whole organism. Gene expression is suppressed by DNA methylation of the promoter region of a given gene [13], whereas histone modifications regulate chromatin structure and alter gene activity [14]. Such epigenetic alterations could be inherited by succeeding generations [15].

Experimentally, a few studies have shown that zinc (Zn) restriction during pregnancy induces disease states later in life. Rats grown under prenatal or postnatal Zn restriction have been reported to develop hypertension [16] and impairments of learning and memory [17,18] later in adulthood. Pregnant mice fed a Zn-deficient diet *in utero* have shown persistent immunodeficiency for three succeeding generations [19]. Zn is an essential trace element and a key component of approximately 300 enzymes in various types of tissues [20,21]. Zn deficiency induces various disease states in humans, such as immunodeficiency, developmental disorders, alopecia, dysgeusia, skin disorders and anemia. Vegetarians [22], elderly

[☆] Grants and Funding Sources: This study was supported by a Grant-in-Aid for Challenging Exploratory Research (21651022) from the Japan Society for Promotion of Science (JSPS) (to CT) and Research Fellowships for Young Scientists (224083) from JSPS and Global COE Program "Medical System Innovation on Multidisciplinary Integration" from MEXT, Japan (to HK).

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5841 1431; fax: +81 3 5841 1434.

E-mail address: mtohyama@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp (C. Tohyama).