

201236020A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
—網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発—  
(H24-化学-指定-006)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 25(2013)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
—網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発—

(H24-化学-指定-006)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 25(2013)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
－網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発－

(H24-化学-指定-006)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 25(2013)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究	
ー網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と 毒性予測評価システムの実用化の為のインフォマティクス技術開発ー	
菅野 純	..... 1
II. 分担研究報告書	
1. 反復暴露実験の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースから の反復毒性予測の性能評価	
菅野 純	..... 49
2. 胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの 網羅的解析	
北嶋 聡	..... 161
3. Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究	
相崎 健一	..... 233
4. システム・トキシコロジー解析基盤の研究開発	
北野 宏明	..... 267
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 307
IV. 研究成果の刊行物・別刷	..... 309

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
— 網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と毒性  
予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発 —  
(H24-化学-指定-006)

研究代表者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

研究要旨

本研究は、先行実施された Percellome\*トキシコゲノミクス研究を基盤に、分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。この為に、分子生物学・分子毒性学の専門家とバイオインフォマティクスの専門家の緊密な共同研究体制の下、以下の4研究を実施した。

- (1) 反復暴露実験の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価
- (2) 胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析
- (3) Percellome 3次元データ等の為に専用解析ソフトウェアの開発研究
- (4) システムトキシコロジー解析基盤の研究開発

これらの基盤として、先行研究にて構築済みの延べ 5.8 億遺伝子情報からなる Percellome マウス・トキシコゲノミクスデータベース (TGDB) に、医薬基盤研トキシコゲノミクスプロジェクト (TGP) のラットデータ\*\*を Percellome 変換 (遺伝子発現値の絶対量化と精度確認) した後、統合して2種の動物からなる TGDB を構築する。これをリソースとし、開発済みの単回暴露 (急性) の毒性ネットワーク解析技術を強化し、反復暴露による生体影響の解析及びその予測評価技術を開発する。ここにインフォマティクス専門家によるシステムトキシコロジーを導入し、網羅的毒性予測評価システムの機能強化を図る。

今年度は、四塩化炭素の新型反復暴露実験・解析の結果、過渡反応 (暴露の都度変化を示す反応) と基線反応 (暴露が回を重ねるに連れて発現値の基線が徐々に変化する反応) の分離、及び、両反応の関連性についての新規の基本現象を明らかにした。胎児発生過程の網羅的解析において、周波数解析と微分解析の性能と限界を評価し、より高性能のアルゴリズムを開発するための要点を見いだした。Percellome 専用解析ソフトウェア開発に関しては、TGP データ統合・解析のためのソフトウェア、Percellome TGDB を利用しての一般データの絶対量推定ソフトウェア、Percellome データベース公開用 WebAPI などの開発を行った。さらにシステムトキシコロジー解析基盤の研究開発では、遺伝子制御関係推定アルゴリズム及び状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの性能向上と機能実装を進め、その一部はライフサイエンス研究用ソフトウェアの国際共通プラットフォーム Garuda Platform 上に実装された。

尚、動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施した。

(\*) mRNA 発現値を細胞 1 個当たりのコピー数として絶対定量する方法。特許取得済み。

(\*\*) TGP はその発足時に当研究者らが Percellome 法を基軸に設計したものであり、その生データから絶対量化や後述の3次元波面表示・解析が可能である。

## 研究分担者

北野 宏明 特定非営利活動法人  
システム・バイオロジー研究機構 会長  
北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部 第5室長  
相崎 健一 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部 第1室長

### A. 研究目的

本研究は、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した毒性評価手法の迅速化、高度化、及びその実用の為のインフォマティクス開発を目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 5.8 億遺伝子情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベース (TGDB) と単回暴露時の毒性ネットワーク解析技術を基盤に、これらを維持・拡充しつつ、反復暴露のネットワーク解析、及び、その予測評価技術を開発する。ここにインフォマティクス専門家によるシステムトキシコロジーの概念を導入し、網羅的毒性予測評価システムの機能強化と精度向上を図る。

### B. 研究方法

#### (1) 反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価【菅野】

##### B1-1: 試薬及び動物:

四塩化炭素 (Carbon tetrachloride; 分子量: 153.8, Cas No. : 56-23-5、純度 99.8%、Wako) について既存データの解析を進めた。また新たに 12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に 4 用量 (溶媒: コーンオイル) の四塩化炭素を、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、経時的 (投与 2、4、8 及び 24 時間後) に肝及び肺を採取した。

単回暴露 (0 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[0+1] と表記) 時の四塩化炭素の投与量は [0、0.7、2、7 mg/kg] とした。新型反復暴露である 14 日間反復暴露 (14 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[14+1] と表記) 時の四塩化炭素の投与量は全例に対し 5 mg/kg、単回暴露は 0、0.7、2、7 mg/kg とした。

##### B1-2: Total RNA の分離精製:

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晩浸漬し、RNase を不活化する。肝は 5mm 径の生検トレパンにより 3 ヶ所を各々別チューブに採取した。その後、RNA 抽出操作までは -80°C に

て保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RN easy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

##### B1-3: GeneChip 解析:

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ピオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られた肝サンプルについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現データを、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面の凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。また、シグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

#### (2) 胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析【北嶋】

##### B2-1: 無処置野生型マウス胚・全胚の RNA 採取

C57BL/6CrSlc マウス (日本エスエルシー) を実験に用いた (プラグが確認された日の 15 時を胎生 0.5 日とした)。経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚 (全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した) を 1 腹分プールした RNA サンプルを用い、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて、網羅的遺伝子発現変動解析を検討することに

より、遺伝子発現経時データベース [胎生 6.25-9.75 日] (TIME POINT : 12 点) を作製した。マウス胚は、直接、1% の 2-メルカプトエタノール含有 RLT バッファー (QIAGEN 社) に変性・溶解させた。

#### B2-2: 全胚サンプルの cDNA 合成

全胚サンプルについては、2 段階増幅により cDNA を得た。すなわち、全 RNA の 100ng をとり、T7 プロモーターの付加したオリゴdTプライマーを用い逆転写し cDNA を得、2 本鎖とした後、T7 RNA ポリメラーゼ (Ambion 社) を用いて cRNA を合成 (この段階ではビオチン化塩基は用いない) した (増幅 1 回目)。その cRNA を鋳型に random primer を用いて逆転写して cDNA を得て 2 本鎖とし、T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社) を用い、ビオチン化 CTP、UTP 共存下で cRNA を合成、断片化した後、GeneChip へのハイブリダイゼーションに供した。

#### B2-3: whole mount ISH

当該プローブセット (ps) について GeneChip にて使用している塩基配列を調べ、その配列を基に、ジゴキシンゲンでラベルした dNTP を用いて RNA プローブを作製した。作製した RNA プローブを用いて、固定後プロテナーゼ K 処理したマウス胚とハイブリダイゼーションを行い、検出は抗ジゴキシンゲン抗体、発色は BM purple で行った。

### (3) Percellome 3 次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究【相崎】

#### B3-1: 開発言語及びコンポーネント

開発言語には、研究的なプログラミング (研究成果のフィードバックを重視した柔軟な仕様設計や機能拡張の実施) に適した、つまり構造化・オブジェクト化といったプログラム言語仕様や生成したプログラムの実行速度だけでなく、実行プログラムの生成 (コンパイル) 速度も速い Delphi 言語 (=object pascal 言語、開発環境としては Borland Delphi2012 もしくは Delphi XE2) を使用した。また一般的なグラフ描画には TeeChart VCL コンポーネント (Steema 社) を、1 億件以下の小～中規模のデータベース処理には組み込み型リレーショナルデータベースコンポーネントである DBISAM (ElevateSoftware 社) を利用して、プログラム開発の効率化を図った。

#### B3-2: 大規模計算

大規模計算が必要な場合は、高速データベースエンジンである Teradata データベース (日本 Teradata 社) を装備する研究計算用サーバーシステム (MF サ

ーバーシステム) にアプリケーションソフトウェアを移植して、解析処理を行った。

### (4) システムトキシコロジー解析基盤の研究開発【北野】

本研究は、従来の手法ではとらえきれていなかった、毒性のネットワーク構造を解明するために、システムバイオロジーの概念・解析技術を毒性学に応用し、システムトキシコロジーの構築を行うものである。このため、大規模データを利用する手法と大規模文献情報などを集約するための手法、及びそれらを統合的なプラットフォームに実装し広く利用できるようにする研究によって構成される。

システムトキシコロジーで重要なことは、ネットワークとして記述された生体システムが、毒性物質の影響でどのように「制御」されているかを理解すること (フォワードアナリシス) であり、また、ネットワークを特定の状態に遷移させた原因は、どの遺伝子群への影響によるものであるかを特定すること (バックワードアナリシス) である。フォワードアナリシスは研究項目 4-1 と 4-3 で、バックワードアナリシスは研究項目 4-2 で実現する。

#### B4-1: 大規模データからの遺伝子制御関係推定アルゴリズムの開発と改良

遺伝子発現データから遺伝子間の発現変動の相互関係と因果関係ネットワークの構築を可能とする手法の開発においては、代表的なアルゴリズムを中心に、解析結果の精度を指標として適切な手法を選定する。例えば、広く使われているベイズ統計を利用した方法は、比較的少数の遺伝子に対して大量のデータが存在するときには適切な方法とは言えない。このような状況では、相互情報量 (Mutual Information) を利用する手法の方が適しているが、その計算の具体的な手法により、推定結果の精度などは大きく違ってくる。我々は、既に、複数の計算手法の組み合わせを利用して、現存手法より、精度の高い手法を開発した。本研究では、この手法を基に最適化を行い、より精度の高いものに改良する。同時に、発現の位相差、時間差、ゲノム情報などを統合し、相関関係ではなく因果関係に関するネットワークを高精度で構築可能な手法の開発を行う。

#### B4-2: 大規模データからの状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの開発と改良

この研究項目では、ネットワークを制御する遺伝子群の同定を大規模データから行う手法の研究を行う。



我々は、すでにプリオン病のデータを利用して、遺伝子相互作用ネットワークの分析から、プリオン病と同等の遺伝子発現変化を生じさせる少数のドライバー遺伝子を同定し、その効果をシミュレーションで確認している。同時に、発病した状態に対応するネットワークを、正常な状態に戻す制御を可能とする別の数個の遺伝子を同定する手法も開発しているが H23 年度現在、この手法は研究の初期段階であり、その計算手法や予測精度、応用範囲など、多くの研究の余地が残されている。本研究では、遺伝子制御ネットワークの変化だけでは無く、影響を及ぼすドライバー遺伝子の同定とそれに関わる転写因子や受容体の同定などを含め、この手法をシステムトキシコロジーに最適化する。

#### B4-3: 大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究

フォワードアナリシスでは、大規模データのみならず、大量の文献やデータベースなどを総動員して精度の高い分子相互作用ネットワークと遺伝子制御ネットワークを構築する必要がある。既に我々は、これらに関係するソフトウェアである CellDesigner や Payao などを構築して、このプロセスの効率化と高精度モデルの構築ノウハウを蓄えてきた。本研究項目では、既存技術を基盤として、大量に存在する文献などの情報を集約し、可能な範囲で自動的にモデル構築を行う手法の開発などを行う。

#### B4-4: Garuda Platform に準拠する毒性解析ソフトウェアの開発

本研究の成果（開発した手法を実装するソフトウェアや Percellome データベース）などを、国内外の幅広い研究者に提供することで、毒性に関連する研究の発展を促進できる。我々は、国際的なソフトウェアの共通基盤として Garuda Platform を開発している。ここでは、この Garuda Platform を毒性分野へ応用するための一連の開発と普及・啓蒙を行う。

#### 倫理面への配慮

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。（国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程（平成 19 年 4 月版）及び国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行う。）

#### C. 研究成果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

##### (1) 反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価【菅野】

#### C1-1: 四塩化炭素の単回暴露時の肝及び肺での網羅的遺伝子発現変動解析

単回暴露（[0+1]）時、肝で発現が増加するものとして 265 ps が見いだされた。現時点ではシグナルネットワークとしては、タンパクのユビキチン化が見いだされ、有害事象として、細胞内の変性蛋白の増加による細胞障害が考えられた。尚、薬物代謝酵素遺伝子では、Cyp1a1 遺伝子のみ発現増加が認められた

肝で発現が減少するものとしては 19 ps が見いだされたが、現時点では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

肺で発現が増加するものとして 118 ps が見いだされた。現時点では、タンパクのユビキチン化、Nrf2 を介する酸化ストレス、グルタチオン代謝、及び炎症メディエーターである Ptgs2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)、及び Ltb4dh (leukotriene B4 12-hydroxyl dehydrogenase) が見いだされた。このことから有害事象として、酸化ストレス及び細胞内の変性蛋白の増加による細胞障害、炎症が考えられた。

肺で発現が減少するものとして 12 ps が見いだされた。現時点では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

#### C1-2: 四塩化炭素の14日間反復暴露時の肝及び肺での網羅的遺伝子発現変動解析

14 日間反復暴露（[14+1]）時、肝で発現が増加するものとして 279 ps が見いだされた。[0+1]と異なる遺伝子群が誘導されていたが、現時点では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

肝で発現が減少するものとして 14 ps が見いだされた。現時点では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

肺で発現が増加するものとして 127 ps が見いだされた。単回暴露時と異なる遺伝子群が誘導されていたが、現時点では特定のシグナルネットワークは抽出されなかった。

#### C1-3: 四塩化炭素の[0+1]及び[14+1]の肝及び肺での網羅的遺伝子発現変動の比較解析

肝での比較：

[0+1]時（増加：258 ps、減少：19 ps）と[14+1]時（増加：272 ps、減少：4 ps）に発現変動が認められた遺伝子について比較したところ、共通するのは、増加分では7 psのみ、他方、減少分では認められず、両者の発現プロファイルは大きく異なることが明らかとなった。このことから、[0+1]にて発現変動した遺伝子は、[14+1]では発現が抑制された可能性が示唆された。詳細に確認したところ、[0+1]時に発現変動した遺伝子の約8割が、[14+1]では発現が顕著に抑制されることが明らかとなった。この中には[0+1]に認められたユビキチン化関連遺伝子が含まれ、ユビキチン化亢進による細胞障害は、反復投与により減弱する可能性が示唆された。

また基線反応成分（回を重ねるに連れて発現値の基線が徐々に移動する反応成分）は、[0+1]の発現変動（過渡反応）が増加する場合は増加、減弱する場合は減少することを見いだした。

肺での比較：

[0+1]（増加：111 ps、減少：12 ps）と[14+1]（増加：120 ps、減少：4 ps）において発現変動が認められた遺伝子について比較したところ、共通するのは、増加分では7 psのみで、減少分では認められず、両者の発現プロファイルは似ていないことが明らかとなった。

肝と同様に詳細解析したところ、肺でも[0+1]にて発現変動した遺伝子の約6割が、[14+1]では発現が顕著に減弱することが明らかとなった。

[0+1]に認められたタンパクのユビキチン化、Nrf2を介する酸化ストレス、グルタチオン代謝、及び炎症メディエーターの産生に関連する遺伝子の発現は、[14+1]では顕著に減弱したことから、これらの亢進による細胞障害は、反復暴露により減弱する可能性が示唆された。

またこの際、肝の場合と同様に肺においても、これらの遺伝子のほぼ全てについて、基線反応は、過渡反応が増加する場合は増加、減弱する場合は減少することを見いだした。

#### C1-4: 四塩化炭素の2及び4日間反復暴露時と単回暴露時の、肝及び肺での遺伝子発現変動の比較解析

[0+1]時と比較して[14+1]時に「過渡反応成分が顕著に減弱する遺伝子が多く、また基線反応成分は、肝及び肺共に、過渡反応が増加する場合は増加、減少する場合は減少する傾向があったが、この事象の成立過程を明らかにする目的で、四塩化炭素の2日間([2+1])及び4日間([4+1])反復暴露実験を実施し、反復回数と基線反応、過渡反応の関係を検討した。

その結果、肝、肺共に、[14+1]により発現が著しく減弱した遺伝子のほぼ全ての発現は、[2+1]、及び[4+1]において既に著しく減弱しており、基線も既にながらむ傾向にあった。一方、[14+1]により発現が著しく増強した遺伝子については、基線反応（ベースライン）は上がる傾向で、過渡反応には移行像が認められた。

以上から、四塩化炭素の新型反復暴露実験[14+1]時に過渡反応成分が減少した遺伝子は、既に2日間の反復暴露において過渡反応成分の減少が完成する事が明らかとなった。そこで投与期間をさらに短くし1日間([1+1])の反復暴露実験を実施中である。

#### C1-5: 四塩化炭素の反復暴露により、単回投与時の発現が影響を受ける遺伝子についての、*in silico* プロモーター解析

四塩化炭素の反復暴露により、単回投与時の発現が影響を受ける遺伝子の転写開始点上流において共通する転写因子の有無を *in silico* プロモーター解析により検討した(データベース TRANSFAC と解析ソフト geneXplain、独自の集計ソフト TFCOUNT.exe を使用)。

その結果、全ての候補遺伝子に共通する転写因子結合部位として、肝において顕著に発現が減少した遺伝子(全219 ps)について4種、発現が増加した遺伝子(全20 ps)について3種、肺において顕著に発現が減少した遺伝子(全73 ps)について10種、発現が増加した遺伝子(全6 ps)については2種、が見いだされた。

これらの結合部位に結合する転写因子の遺伝子について、単回投与時の発現変動を検討したところ、優位な発現変動は認められなかった。このため、四塩化炭素の反復暴露により、単回投与時の発現が影響を受ける遺伝子が、同じ転写制御を受ける機序が存在する可能性は否定されないこと、そしてその場合、この制御因子のタンパクレベルでの機能が重要である可能性が示唆された。

尚、四塩化炭素14日間先行投与後にクロフィブレート(CF)あるいはフェノバルビタール(PB)を単回投与したデータを解析したところ、四塩化炭素により基線反応が低下した遺伝子においてはCFやPBによる過渡反応も抑制される傾向が確認された。

#### (2) 胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析【北嶋】

本研究は、発生過程に於いて重要なマスター遺伝子は一般的に、この期間中に単相性の発現を示し、一群の下流遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の

形質の形態形成を制御することを利用している。各時点4サンプルのデータを1サンプルずつの4周期に展開し、その周期性を持って、それがマスター遺伝子候補であるか否かの程度を推定するパラメータとする試みである。周期性を検討する為に、遺伝子発現変動をフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関等の解析をおこなった。

C2-1:胎生 6.25~9.75 日の遺伝子発現変動を1周期と仮想した際の、Shh 遺伝子を基とした周波数解析

モデルとして、先ずシグナルネットワークが、ある程度既知の Shh 遺伝子を選択した。このネットワークには、Ptch1、Smo、Gli 遺伝子が関与する。胎生 6.25 から 9.75 日の無処置野生型マウス・全胚 RNA サンプルから得た遺伝子発現経時データベース (TIME POINT: 12 点)における、Shh 関連遺伝子の発現変動と胎生 9.5 日胚における発現局在を whole mount ISH にて調べ、既存情報との一致を確認した。

次いで、胎児の遺伝子発現経時データベース (TIME POINT: 12 点) が存在する胎生 6.25 から 9.75 日の 3.50 日間を1周期と仮想し、周波数解析の是非を検討した。即ち、データベース中の全ての遺伝子発現変動を、フーリエ変換を利用する独自の解析ソフト MF Wave analyzer.exe で解析した。この際、解析精度向上の為に、胎生 6.25 から 9.75 日 (3.50 日間) の胎児の遺伝子発現経時データベースを平均値として扱わず、個体毎に並べ仮想的に4周期 (= 14 日間) として扱った。その結果、Shh 遺伝子の発現変動の波長分布は 3.50 日間周期を中心に、1.75 時間周期等の要素も存在していた。

標準化(normalize)した波長分布について Shh 遺伝子を基としたピアソン相関解析を行い、既知の Shh シグナル関連遺伝子 (Ptch1、Smo、Gli 遺伝子) が皆、含まれるような相関係数を検討したところ、相関係数が 0.9 以上という条件で、既知の Shh シグナル関連遺伝子が抽出されてくることがわかったが、同条件では 7,039 ps の遺伝子が抽出された。

周波数解析は周波数に着目した解析であり、直接、遺伝子発現の経時パターンを反映したものではないため、どの程度、発現パターンを反映しているのか検討した。その結果、Shh 遺伝子が含まれる胎生 8.50 日で最大ピークを呈する群では、周波数に着目した解析であっても、遺伝子の発現パターンを反映したものが抽出できていることが確認された。他方、胎生 8.5 日以前に最大ピークを呈する群の場合、発現パターンがテンプレート(この場合 Shh 遺伝子)とかなり異なるものが抽出されてきた。この原因として、データベース上の時期が胎生 6.25-9.75 日と限られ

ていることによると考えられたため、発現パターンを標準化しピーク特性を評価する手法の導入を検討する。

次に、Shh シグナルは「Shh→Ptch1→Smo→Gli」の順に発現が生じる事が知られており、この確認のため、これらの Shh 関連遺伝子は、発現の最大ピークがどの時点に分類されているのか検討した。その結果、最大ピークを示す時点は、既知のネットワーク構成と逆となった。これは遺伝子の発火時点と最大ピーク時点がずれているためと考えられ、発現の最大ピークだけを指標に解析していく手法では不十分であることが明らかとなった。転写過程では、発現ピークを与える時点よりも、発現の開始時期の方が重要であるため、発現の立ち上がりの勾配(微分値等)を考慮すれば解決する可能性が高いものと考えられ、これらについての微分及び2回微分を Whole Embryo および ES・EB 検体について試験的に検討した。暫定的結論として、Shh 系は既存情報による発現順番と異なる因子があり、観測期間内に収まっていない可能性からマイクロアレイのクロスハイブリダイゼーションの可能性まで、さまざまな要因が指摘される可能性があり、今後、ISH との対比を含む確認作業が必要であると考えられた。

さらに、この発現の最大ピークを示す時点の情報でシグナルネットワークを検索できるか否か検討した。Shh 関連遺伝子の発現ピークを与える時点以降の胎生 9.25 日に発現の最大ピークを示す遺伝子 (80 ps) について、Shh シグナルとの関連を PubMed を用いて検索した。その結果、Irs1 (insulin receptor substrate 1)、及び Cp (ceruloplasmin) 遺伝子といった、2つの新たな Shh 関連遺伝子を見いだす事ができた。今後、発現の局在を検討する whole mount ISH ならびに *in silico* プロモーター解析を組み合わせ、抽出精度の向上を計る。

C2-2:胎生 6.25~9.75 日の遺伝子発現変動を1周期と仮想した際の、Nkx2-5 遺伝子を基とした周波数解析

続いてモデルとして、シグナルネットワークがある程度既知の Nkx2-5 遺伝子を選択した。このネットワークには、Mesp1、Kdr、Actc1、Tnnt2 遺伝子が関与する。胎生 6.25 から 9.75 日の無処置野生型マウス・全胚 RNA サンプルから得た遺伝子発現経時データベース (TIME POINT: 12 点)における、Nkx2-5 関連遺伝子の発現変動と胎生 9.5 日胚における発現局在を whole mount ISH にて調べ、既存情報との一致を確認した。

次いで Shh 関連ネットワークでの検討と同様に、胎児の遺伝子発現経時データベース (TIME POINT:

12点)が存在する胎生 6.25 から 9.75 日の 3.50 日間のデータを用いて周波数解析の是非を検討し、同様の性能評価結果を得た。これについても、微分及び2回微分を Whole Embryo および ES・EB 検体について試験的に検討した結果、Mesp1 を最上流とする nkx2-5 を含む系は観測期間内に収まっており、既存情報と整合性のある結果を示したと考えられた。

### (3) Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究【相崎】

平成 24 年度はデータベースの拡充と公開に向けた取り組みを重点的に実施した。

#### C3-1: 異種データの統合アルゴリズム

まずトキシコゲノミクスによる将来の毒性予測/評価システムに於いて基盤となる Percellome データベースを拡充するために、Percellome 法を適用して実施された医薬基盤研・トキシコゲノミクスプロジェクト (TGP) のラットデータの統合を検討した。マウスとラットの組み合わせの様に異種由来のデータを一括して扱う場合、相同遺伝子 (オルソログ遺伝子) 対を利用して結合するが、この対応は一般的に多対多関係であるため、そのままではデータ処理計算量が大幅に増大し、また解析結果に偏りや重複要素が発生して、データ処理が混乱する。さらにマウス、ラットのマイクロアレイの設計で、一部の遺伝子に複数のプローブセットが用意されていることも事態を一層複雑化させてしまう。このため先ず、共通遺伝子名毎にデータを集約してデータを識別する方法を試行したが、複数の発現変動データを要約 (summarize) するにしても、個々の発現データをそのままに識別子重複を許容するにしても、解析処理の混乱を回避できなかった。特に元の個別情報への参照が、要約過程での情報集約により困難になることが致命的であった。そこで次に、多対多対応のそれぞれにユニークな識別子 (統合 ID) を設定して処理し、必要に応じて summarize する方式を試行したところ、一部に相同遺伝子対応関係の多寡によるバイアスが残るものの、全般的には精度・速度のバランスの取れた解析処理が可能となった。

そこで順次 TGP ラットデータの Percellome 化を進めた。Percellome 化した TGP ラットデータは、全て Surface グラフデータセットに変換し、先行研究で開発した RSort プログラム (個々の遺伝子の発現変動で、Surface グラフ (3次元波動面) の凹凸が少ないパターンを示す遺伝子、つまり、より強力もしくはよりユニークな発現制御を受ける遺伝子を自動抽出するソフトウェア) にてラットのプローブセット ID

からなる候補遺伝子リストを生成した。これを上記の統合 ID に変換してから、類似発現変動評価用ソフトウェア Percellome Explorer の専用データベースにインポートして、解析性能 (精度や処理速度) を評価した。その結果、種差の影響が最も強いものの、化学物質投与による種差を超えた共通影響が検出可能であり、計算処理速度も特段の劣化が無いなど、実用に耐える性能を有することが確認できた。

#### C3-2: 絶対量推定アルゴリズム

次に、Percellome データベース及び解析プログラムの公開に伴い、その汎用性を強化すべく、Percellome 法を適用していない外部のマイクロアレイデータとの比較を可能とする技術の開発を試みた。基礎調査として、Percellome データベースの全データを照会したところ、実験条件が類似したデータ間では全遺伝子の発現量はある範囲に収まり、またヒストグラムパターンも高～中発現域において類似することが分かった。そこで、全遺伝子データを発現量順に並べ、ある一定の順位にあるプローブセットを中心に数百から数千の範囲のプローブセットをリストアップして基準値候補を得られないか検討した。その結果、いわゆる Housekeeping 遺伝子を含め、安定した基準点になり得る遺伝子候補は無いものの、Percellome プロジェクトの実験条件設定の場合、90%tile のプローブセットを中心に、前後 500 プローブセットずつ、計 1001 個のプローブセットを基準値候補として、Percellome データベース内の同条件データを対象に、基準値候補のプローブセットの絶対量データを数万から数十万集め、その中央値を推定絶対量基準値とすることで、精度良く絶対量推定を行うことができることを見いだした。この推定プロセスは手作業で行うにはあまりにも煩雑であるため、これを自動化する絶対量推定ソフトウェア SnCalc.exe を開発し、さらに数百の絶対量推定プロセスを実行して推定計算の精度を確認した。

本推計アルゴリズムは原理的に全遺伝子の発現量分布が類似している Percellome データを照会する必要があるため、そのデータ照会が正しいかどうか、つまり全遺伝子の発現量分布が類似しているかどうかを検証するためのソフトウェア DDComp.exe も作成した。

#### C3-3: Percellome WebAPI の開発

さらに、Percellome データベースにインターネット経由でアクセスし、絶対量データや Surface グラフを参照するために必要となるゲートウェイとして、現時点で最も普及しているプロトコルの 1 つ、REST (Representational State Transfer) に準拠した

WebAPI を設計・構築し、Percellome 公開用 Web サーバーに実装した。これにより、ライフサイエンス研究用ソフトウェアの国際共通プラットフォーム GARUDA プロジェクト等、外部の学術・行政システムからのオンラインアクセスを可能にする本格的な一般公開の準備を整えた。

#### (4) システムトキシコロジー解析基盤の研究開発 【北野】

##### C4-1: 遺伝子制御関係推定アルゴリズム

遺伝子制御関係推定アルゴリズムでは、複数のアルゴリズムの併用を行う方式を開発し、現状での最も優れた方式と同等の結果を安定的に維持することに成功した。さらに、より一層の大規模化に備え、この性能を維持しつつ、情報エントロピーを利用しながら計算量を減少させる手法を開発した。

##### C4-2: 状態制御遺伝子群推定アルゴリズム

状態制御遺伝子群推定アルゴリズムに関しては、以前から開発している A Gene geometric Clustering Tool (AGCT) で Percellome データの特徴を考慮に入れた解析を容易に実行できるようにするための開発を行った。具体的には、全データからのドーズ選択（細胞選択）、時計遺伝子効果削除、スペクトラルクラスタリングや主成分分析の表示の上で6つのアルゴリズムによるクラスタリング等の機能を追加した。これらの機能では Percellome データのニーズに則し、事前データ削除を行わずに全データを計算した後、必要な部分だけをユーザが取り出せるようになっている。更に大規模データをより短時間で計算できるようにした。

制御遺伝子群の同定についての予備検討では、幾つかの事例において、実験的に確認されている遺伝子群と合致することなどを確認した。

##### C4-3: Garuda Platform 対応

さらに、Garuda Platform の開発者向けパッケージの配布開始（2013年2月）にあわせ、ネットワークの推定や AGCT など一連のアプリケーションを Garuda に準拠し、毒性学に利用できるように対応したほか、オルソログ制御領域分析ソフトウェア SHOE (Sequence Homology in Higher Eukaryotes) に関してはオンラインで Garuda 経由にてサービス提供できるように準備を進めた。また Percellome DB の Garuda 上への実装に協力し、Percellome DB の国際的普及への準備を行った。

#### D. 考察

反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価においては、肝及び肺における四塩化炭素の新型反復暴露実験により、単回暴露時に発現変動した遺伝子のほぼ全てについて、基線反応成分（暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン（基線）が徐々に変動する反応成分）は、過渡反応成分（単回暴露時の 2, 4, 8, 24 時間のうちに発現が変動する成分）が増加する場合は増加、減弱する場合は減少することを見いだした。

この過渡反応と基線反応の連関性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高く、加えてこの分子機序を明らかにすることは、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測を行うにあたり重要と考えられる。

胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析においては、周波数解析（高速フーリエ変換）の性能と限界、微分関数の利用、及び胎児発生過程における発現解析の要点（例えば転写制御の時系列評価では、発現ピークを与える時点よりも、発現が開始する時点に注目しなければならないこと、など）の抽出に成功した。このノウハウは化学物質による遺伝子発現解析においても重要と考えられる。

Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究においては、本年度生成した異種データ統合アルゴリズムにより、TGP ラットデータの Percellome マウスデータベースへの統合が実現する他、より広範囲の化学物質-遺伝子発現情報が利用可能となり、種間で保存されている毒性ネットワークの抽出など、従来にない成果が得られるものと期待される。また本技術は原理的にマウス-ラット間だけでなく、マウス-ヒト間のデータ結合も可能であるため、解析結果のヒトへの外挿を取り組みに当たっても有用な技術である。

絶対量推定ソフトウェア SnCalc.exe の適用には前提条件があるものの、Percellome 法に準拠せず取得されたマウスデータであっても絶対量推定し、Percellome データベースと数値レベルで直接比較できる可能性を提供した。これは膨大な量の既存データの有効活用に繋がる革新的な成果であり、Percellome データベースの有用性を飛躍的に高める。

現在はマウスのみが対象となっているが、TGP ラットデータの完全統合の暁には、ラットデータについても推定計算が可能になる予定であり、創薬や毒性試験分野における膨大な既存ラットデータの有効活

用が見込まれる。

これらの成果を外部の研究システムから自由に利用できるように構築した Percellome WebAPI は、行政施策への貢献や学術研究、特に共同研究の推進効果が見込まれる。本 WebAPI には今後も新たな解析情報・機能の追加を予定しており、継続的により一層の利用拡大と社会貢献を目指す。

システムトキシコロジー解析基盤の研究開発においては、毒性学にシステムバイオロジーを適用する一連の手法が具体的な形となってきており、複数のソフトウェアの連動が実現されつつある。

特に Garuda Platform は、今後極めて重要なプロジェクトに成長すると思われる。ソフトウェアを開発する側の研究者のみならず、ユーザとなる製薬企業や生命科学の基礎研究に携わるものにとっても、重要な Platform であるとの認識が広がっている。この Garuda Platform にシステム毒性学の研究を可能とするソフトウェア群を実現する事は、今後の研究の展開にとって非常に重要であると考えられる。

## E. 結論

本研究は、今年度（平成 24 年度）、ほぼ計画通りに進捗した。

今年度実施した、四塩化炭素による新型反復暴露解析では、単回暴露時の過渡反応成分と反復暴露時の基線反応成分（回を重ねるに連れて発現値の基線を徐々に移動させる成分）の基本的な関連性を見いだしたが、この知見は生物学的・毒性学的に新規性が高い発見であり、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測を行うにあたり、この分子機序を明らかにすることが重要と考える。

来年度は、バルプロ酸ナトリウムについて同様の実験・解析を実施し、単回暴露（急性）の毒性ネットワーク解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価技術の開発を推進する。

胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析については、周波数解析手法の拡大適用でも、ある程度の解析性能が確認されたが、今後は、明らかになった解析上の要点（発現ピークの評価方法など）を反映させた微分関数等の組み合わせを検討し、より信頼性と効率の良い解析アルゴリズムの開発を検討する。

Percellome 3 次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究では、今年度の成果により、データベースの拡充と公開に向けた準備が整った。

Percellome データベースに統合した TGP ラットデータの利用については、既に RSort.exe や PercellomeExplorer.exe 等、主要な解析ソフトウエ

アの対応アップデートをほぼ終えており、シームレスな解析操作が可能となっている。これらの成果は本研究班の反復暴露解析へ即時還元し、解析情報の精度向上や有効情報の生成に貢献する見込みである。

今後、積極的な情報提供及び共同研究の推進を行い、トキシコゲノミクス技術による毒性予測・評価システムの実用化に向けた取り組みを一層加速させる。

システムトキシコロジー解析基盤の研究開発も順調に推移した。

遺伝子制御関係推定アルゴリズム及び状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの性能向上や機能拡張が進んでいるほか、それらの実装ソフトウェアの幾つかは、ライフサイエンス研究用ソフトウェアの国際共通プラットフォーム Garuda Platform 上に実装され連動するなどの成果をあげている。今後、これらのソフトウェアを利用した具体的な適用例の作成や普及などにも注力する。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y. (2012) Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase. *Diabetes*. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]

Abe S, Kurata M, Suzuki S, Yamamoto K, Aisaki K, Kanno J, Kitagawa M. (2012) Minichromosome maintenance 2 bound with retroviral Gp70 is localized to cytoplasm and enhances DNA-damage-induced apoptosis. *PLoS One*. 7(6):e40129.

Swedenborg E, Kotka M, Seifert M, Kanno J, Pongratz I, Rüttgen J. (2012) The aryl hydrocarbon receptor ligands 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3-methylcholanthrene regulate distinct genetic networks. *Mol Cell Endocrinol*. 362(1-2):39-47. doi: 10.1016/j.mce.2012.05.006

Fujimoto H, Woo GH, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M. (2012) Increased cellular distribution of vimentin and Ret in the cingulum induced by developmental

hypothyroidism in rat offspring maternally exposed to anti-thyroid agents. *Reprod Toxicol.* 34(1):93-100.

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. (2012) Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence. *J Toxicol Sci.* 37(2):373-80.

Martin H. Schaefer; Tiago J. S. Lopes, Nancy Mah, Jason E. Shoemaker, Yukiko Matsuoka, Jean-Fred Fontaine, Caroline Louis-Jeune, Amie J. Einfeld, Gabriele Neumann, Carol Perez-Iratxeta, Yoshihiro Kawaoka, Hiroaki Kitano, Miguel A. Andrade-Navarro. Adding Protein Context to the Human Protein-Protein Interaction Network to Reveal Meaningful Interactions. *PLOS Computational Biology.* 9, 1, 2013.

Crespo, I.; Roomp, K.; Jurkowski, W.; Kitano, H.; del Sol, A. Gene regulatory network analysis supports inflammation as a key neurodegeneration process in prion disease. *BMC Systems Biology,* 6:132, 2012.

Shoemaker, J.; Fukuyama, S.; Einfeld, A. J.; Muramoto, Y.; Watanabe, S.; Watanabe, T.; Matsuoka, Y.; Kitano, H.; Kawaoka, Y. Integrated network analysis reveals a novel role for the cell cycle in 2009 pandemic influenza virus-induced inflammation in macaque lungs. *BMC Systems Biology,* 6:117, 2012.

Shoemaker, J. E., Lopes, T. J., Ghosh, S., Matsuoka, Y., Kawaoka, Y., Kitano, H. CTen: a web-based platform for identifying enriched cell types from heterogeneous microarray data. *BMC Genomics,* 13 (1): 460, 2012.

Martijn P. van Iersel, Alice C. Villegger, Tobias Czauderna, Sarah E. Boyd, Frank T. Bergmann, Augustin Luna, Emek Demir, Anatoly Sorokin, Ugur Dogrusoz, Yukiko Matsuoka, Akira Funahashi, Mirit I. Aladjem, Huaiyu Mi, Stuart L. Moodie, Hiroaki Kitano Nicolas Le Novere, and Falk

Schreiber. Software support for SBGN maps: SBGN-ML and LibSBGN. *Bioinformatics.* 28 (15): 2016-21, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/bts270, published online May 10, 2012.

Carl-Fredrik Tiger, Falko Krause, Gunnar Cedersund, Robert Palmér, Edda Klipp, Stefan Hohmann, Hiroaki Kitano and Marcus Krantz. A framework for mapping, visualisation and automatic model creation of signal-transduction networks. *Molecular Systems Biology.* 8: 578, April 24, 2012.

## 2. 学会発表

北嶋 聡、高橋 祐次、五十嵐 勝秀、相崎 健一、菅野 純  
Percellome 網羅的定量的トキシコゲノミクス、平成 24 年度公益社団法人日本実験動物学会 維持会員懇談会 (2012. 11. 16)

田中美和、山崎ゆかり、菅野陽平、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野 純、中村卓郎、ユーイング肉腫モデルマウスを用いた発生起原の同定と遺伝子発現解析、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、東京、一般口演

Jun Kanno, Modernization and Harmonization of Toxicology; an Approach by Percellome Toxicogenomics, 2012 Global Summit on Regulatory Science - Modernizing Toxicology (2012. 5. 11) Hangzhou, People's Republic of China, Invited

菅野 純、Percellome Project: 組織、臓器、種を跨いで、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日、仙台、シンポジウム

種村健太郎、古川佑介、大塚まき、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、佐藤英明、菅野 純、発生一発達期の神経シグナルかく乱による遅発中枢影響解析—幼弱期マウスへのイボテン酸投与による成熟期の脳高次機能障害について—、2012 年 7 月 17 日、仙台、シンポジウム

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、菅野 純、食品の安全性確認に向けた Percellome トキシコゲノミクスの適用—香料エストラゴールの場合—、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日、仙台、

一般口演

富永貴志、富永洋子、五十嵐勝秀、種村健太郎、菅野 純、中島欽一、妊娠期投与による胎生期バルブプロ酸暴露マウスは学習記憶異常と海馬抑制系の減弱を示す、第39回日本毒性学会学術年会、2012年7月19日、仙台、一般口演

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Katsuhide IGARASHI and Jun KANNO, Application of Percellome Toxicogenomics approach to food safety in case of a flavor, estragole, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology(2012.7.20) Sendai, Symposium

菅野 純、創薬とトキシコゲノミクスーPercellome Project の進捗とその応用性ー、医薬基盤研究所公開セミナー、大阪、2012年10月30日

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Kentaro Tanemura, Endocrine disruptor as receptor mediated signal toxicity. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer (2012.11.16) Kanazawa, invited

Katsuhide Igarashi, Noriko Moriyama, Kentaro Tanemura, Maki Otsuka, Yusuke Furukawa, Hirotsugu Asano, Kinichi Nakashima and Jun Kanno, Glucocorticoid Receptor (GR) enhances the astrocytic differentiation of neural stem cells via LIF-STAT3-GFAP pathway by a ligand dependent binding of GR to STAT3 at the STAT3 responsive element of GFAP promoter, 15th International Congress on Hormonal Steroids and Homones & Cancer (2012.11.16) Kanazawa, poster

Jun Kanno, Cancer risk and the nuclear disaster in Japan, The 7th Princess Chulabhorn International Science Congress Cancer: from Basic Research to Cure (2012.11.30) Bangkok, Thailand, invited

Natalia Polouliakh and Hiroaki Kitano

“Discovery of gene network by clustering and promoter analysis. The Journal of Toxicological Sciences ISBN:0388-1350 Vol:37 (Supplement 1) S31. The Japanese Society of Toxicology.

Kitano, H. Will engineering play the lead role in drug discovery in 2030? BioMelbourne breakfast, Cinema 1, Melbourne, Australia, June 5. (invited)

Kitano, H. Software Platform for Systems Drug Discovery. Bio-IT World Asia Conference 2012, Marina Bay Sands, Singapore, June 8, 2012. (invited)

Kitano, H. Systems Drug Design and Garuda Software Platform. Network Biology SIG: On the Analysis and Visualization of Network in Biology (NetBio SIG), ISMB 2012, Long Beach Convention Center, USA, July 13, 2012. (invited)

Kitano, H. HD-Physiology, Garuda, and Computational drug side-effects prediction. Talk at FDA, FDA, Silver Spring, USA, July 17, 2012. (invited)

Kitano, H. Biological Robustness. Seminar at University of Toronto, University of Toronto, Canada, Aug. 20, 2012. (invited)

Kitano, H. Systems Biology powered by Artificial Intelligence. PRICAI-2012: 12th Pacific Rim International Conference on Artificial Intelligence (via skype, invited), Pullman Hotel, Kuching, Malaysia, Sep. 7, 2012. (invited)

Kitano, H. VPH in industrial research. VPH 2012, Savoy Place, London, UK, Sep. 20, 2012. (invited)

北野宏明. システム創薬とGarudaプラットフォームの概要. BioJapan 2012, パシフィコ横浜, Oct. 11, 2012, (invited)

Kitano, H. Systems biomedicine and their computational platforms. FOSBE 2012, Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Oct. 21, 2012. (invited keynote)

北野宏明. システムバイオロジー概論. 第6回 KAST システムバイオロジー講座, かながわサイエンスパーク, Nov. 2, 2012. (invited)



Kitano, H. "Systems Toxicology", An invited Talk at DSTO, Defence Science and Technology Organisation (DSTO), Department of Defence, Australian Government, Melbourne, Australia, Dec. 4, 2012. (invited)

北野宏明. Data-Driven Network-Based Biomarker Discovery. 第35回日本分子生物学会年会 バイオテクノロジーセミナー, 福岡国際会議場, Dec. 12, 2012. (invited)

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

特許第5177712号、2013年1月18日登録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究所、NTT データ、発明者：菅野純、相崎健一ら、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

H24-化学-指定-006

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究—網羅的  
定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と毒性予測  
評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発—

研究代表者

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部  
菅野 純



Percellome Project

## トキシコゲノミクスを必要とする理由 (研究目的と期待される成果)

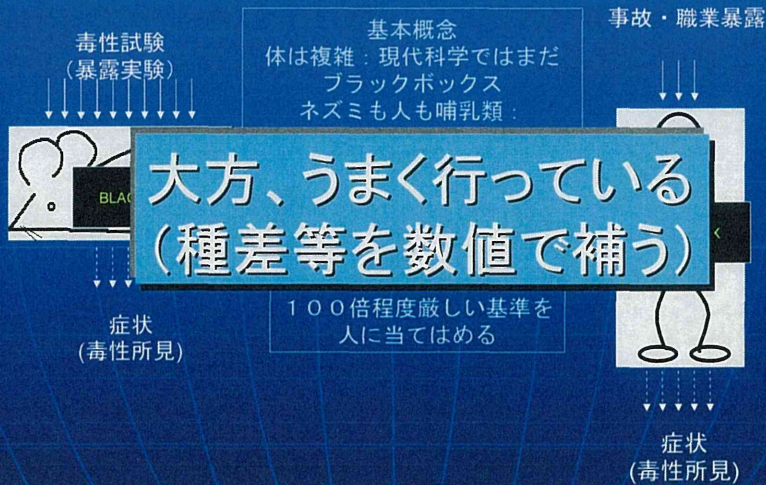
1. 毒性学の近代化:安全係数からの脱却
2. 多数ある標的の一括取り扱い  
多種類ある毒性試験法  
(2年かかるもの、億単位の経費のかかるもの)
3. より正確に、より早く、より安く



## 動物実験(毒性試験) 齧歯類(ラット・マウス)などを用いる ＝人の身代わりとして



## 動物実験(毒性試験) 齧歯類(ラット・マウス)などを用いる ＝人の身代わりとして





動物実験(毒性試験)  
齧歯類(ラット・マウス)などを用いる  
=人の身代わりとして

うまく行かなかった代表例



サリドマイド

マウス・ラットでは催奇形性なし  
人で催奇形性(アザラシ肢症)あり

症状  
(毒性所見)



種差・個体差(胎児・小児・成人・老人の差を含む)  
を如何に科学的に取り扱うか?  
(近代化)

生体反応のメカニズムに  
基づいた毒性評価



ブラックボックスの中身の解明