

は、Neon (Invitrogen MPK1025)を使用した。

**実験 II.** Th-TALEN の作成とドナーベクター 5'-Metluc-copGFP-neo-3' を活用した hNPC への導入  
ドーパミンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域 (hs\_TH\_T01) を特異的に切断する TALEN 右側ベクター PTAL-R (pTAL-CMVn-021157) と左側ベクター PTAL-L (pTAL-CMVn-020432) を Sigma 社で作成した。TALEN による hs\_TH\_T01 領域の切断の際に、切断領域と相補的配列を両端に持つ組み込む DNA 断片 5' TH-Metluc-copGFP-neo-3' を作成し、ドナーベクター pBluescriptIISK(+) に組み込んだ。作成した pBluescriptIISK(+)/TH-metluc-Neo-copGFP プラスミドを hNPC 細胞にトランスフェクション試薬 Trans it Neural (MIR2140)を用いて導入し、導入後 27 日まで分化培養した。プラスミドの細胞への導入確認のため、培養 20 日目の細胞を回収した。ゲノム DNA の抽出及び PCR は、実験 I と同様の試薬を用いた。

**実験 III.** ドナーベクター 5' arm-pEGFP-3' arm の導入  
今度はドナーベクターを変えて実験 II と同様のゲノム編集実験を行った。TALEN による hs\_TH\_T01 領域の切断の際に、切断領域と相補的配列を両端に持つ組み込む DNA 断片 5' arm-pEGFP-3' arm を作成し、ドナーベクター pBluescriptIISK(+) に組み込んだ。作成した pBluescriptIISK(+)/TH-pEGFP プラスミドは、hNPC 細胞にエレクトロポレーションまたは、トランスフェクションで導入し、導入後、37 日ないし 50 日まで分化培養した。プラスミドの細胞への導入の確認のための細胞回収は、培養終了時に行った。ゲノム DNA の抽出及び PCR は、実験 I と同様の試薬を用いた。

#### （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。尚、平成 25 年度に行われた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、分化細胞であり、生命倫理的問題のない細胞である。

#### C. 研究結果

##### 実験 I. pGL3-hMAP2-metluc-Neo-copGFP の導入

昨年作成した pGL3-hMAP2-Metluc-copGFP-Neo プラスミドを hNPC 細胞にエレクトロポレーションで導入し、導入後、29～43 日まで分化培養した。その実験概要と結果を図 1 に示した。43 日の神経分化の様子を MAP2 抗体による蛍光免疫化学染色で観察すると、十分に神経突起が伸長した様子が得られた。しかし、GFP の蛍光は非常に微弱であった。さらに、ゲノム DNA を回収して、HindIII 制限酵素切断部位を含む 604bp 長に MAP2 と Metluc の両側に primer を設計し (hMap2-f: AGTGAGCTCTCTCCC TCTCTCC、Metluc-r2: GTCGACTTCGCTGTACC AGAGC) PCR による細胞内のプラスミド導入の確認を行ったところ、目的サイズの箇所に強いバンドを得た。この結果から、プラスミドは、十分に細胞内に導入されたものと考えられた。

**実験 II.** Th-TALEN の作成とドナーベクター 5' arm-Metluc-copGFP-neo-3' arm を活用した hNPC への導入  
次に、ドーパミンニューロンに特異的に発現している Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域 (hs\_TH\_T01) に、pBluescriptIISK(+)/TH-metluc-Neo-copGFP プラスミドを TALEN 編集と同時に、トランスフェクション試薬で導入し、導入後 27 日まで分化培養した。プラスミドの細胞への導入確認は、培養 20 日目で行ったところ、図 2D に示した通り 5' arm 外側に設計した primer TH-f1 と Metluc-R2 で PCR を行った場合は、明瞭なバンドが得られなかった。一方、内側 primer である TH-f2 と Metluc-R2 で PCR を行った場合は、目的サイズに濃いバンドが得られた。この結果は、ドナーベクタープラスミドは、十分に細胞内に導入されたものの、ゲノム編集は十分でない可能性が示唆された。尚、トランスフェクション後 23 日以降は細胞が育たなかった。

**実験 III.** ドナーベクター 5' arm-pEGFP-3' arm の導入  
今度はドナーベクターを変えて実験 II と同様のゲノム編集実験を行った。TALEN による hs\_TH\_T01 領域の切断の際に組み込むドナーベクターとして、pBluescriptIISK(+)/TH-pEGFP プラスミドを作成した。ドナーベクターの導入にはエレクトロポレーションまたは、

試薬によるトランスフェクションの二通りを行った。導入後、37 日ないし 50 日まで分化培養した様子を図 3C に示した。導入 3 日、7、8 日後には、GFP の蛍光が観察されたが、37 及び 50 日では、観察できなかった。しかし、TH 及び MAP2 抗体で免疫染色すると両抗体で染色される神経細胞を確認した。さらに、プラスミド導入後 29 ないし 34 日目の細胞を回収し、PCR によりゲノム DNA の確認を行ったところ、5' arm 外側の配列で作成した TH-f1 primer と内側 pEGFP-r2 primer では目的サイズの位置にバンドはみられなかったが、5' arm 内側の primer TH-f2 と pEGFP-r2 primer では目的サイズの位置に明瞭なバンドを得た。この結果は、実験 II の場合と同様にドナーベクタープラスミドは、十分に細胞内に導入されたものの、ゲノム編集は十分でない可能性が示唆された。

#### D. 考察

本研究では、ヒト神経細胞の分化を指標としたハイスループトアッセイを構築するために、神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質である Map2 もしくはドーパミン神経特異的マーカーである TH 遺伝子に緑色蛍光タンパク質遺伝子を結合したリポーター遺伝子をヒト H9 株 ES 細胞由来の神経前駆細胞(hPNC)に組み込んだ。MAP2-リポーター遺伝子 hMAP2-metluc-NeocopGFP に関しては、未だ安定株は採れていない。我々は、神経細胞分化 30 日付近での細胞において、hMAP2 プラスミドが細胞に導入されたことを確認したが、ハイスループトにイメージングできるような強い蛍光シグナルは確認できなかった。また、このプラスミドは、Metluc が導入されているので、培養上清を取って発光を測定したが、強いシグナルは得られなかった。トランスフェクション後 7 日までは細胞の蛍光シグナルを確認しているため、分化が進むと外来 MAP2 プロモーター領域のエピジェネティック変化が起きるのかもしれない。TH-pEGFP を導入した場合も同様な現象が起きていると思われる。

#### E. 結論

ハイスループ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を構築するために、神経細胞の樹状突起マーカーで微小管結合タンパク質である Map2 の転写

開始点より 1kb 上流領域もしくはドーパミン神経特異的マーカーである TH 遺伝子のエクソン1直後領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子を結合したリポーター発現ベクターを作成し、ヒト H9 株 ES 細胞由来の神経前駆細胞(hPNC)を用いて、MAP2 に関しては、通常の遺伝子導入を、TH 遺伝子については、ゲノム編集手法により遺伝子導入を実施した。神経分化後の細胞において、いずれのプラスミドも導入されていることをゲノムの PCR で確認できた。しかしながら、蛍光シグナルは弱く、今後の改善が必要と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特に記載する項目はない

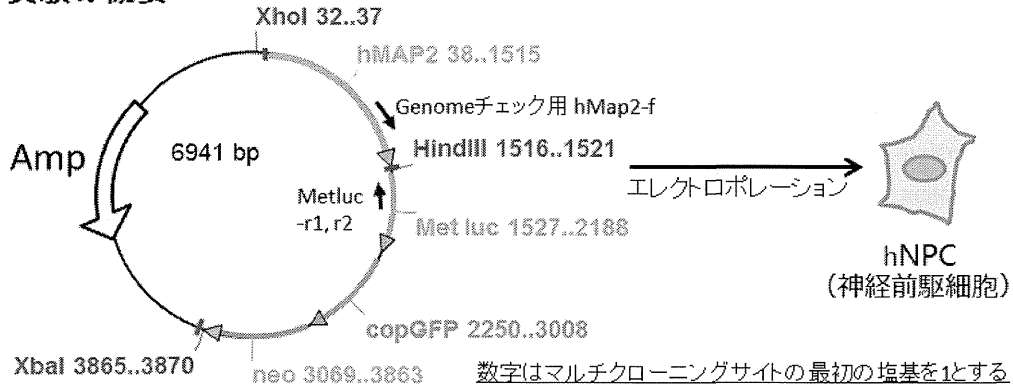
#### G. 研究発表

1. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Nansai H, Fukuda T, Hayashi Y, Nasu T, Sone H. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. *Toxicology Letters, in press.*
2. Win-Shwe TT, Sone H, Kurokawa Y, Zeng Q, Zeng Y, Nitta H, Hirano S. Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. *Toxicology Letters, in press.*
3. Win-Shwe TT, Fujitani Y, Sone H, Furuyama A, Nitta H, Hirano S. Effects of acute single intranasal instillation of secondary organic aerosol on neurological and immunological biomarkers in the brain and lung of BALB/c mice. *J Toxicol Sci. Feb;38(1):71-82, 2013.*
4. Imanishi S, Okura M, Zaha H, Yamamoto T, Akanuma H, Nagano R, Shiraishi H, Fujimaki H, Sone H. Prenatal exposure to permethrin influences vascular development of fetal brain and adult behavior in mice offspring. *Environ Toxicol. 28(11):617-29, 2013.*
5. Fukuda T, Katayama M, Kinoshita K, Kasugai T, Okamoto H, Kobayashi K, Kurita M, Soichi M, Donai K, Uchida T, Onuma M, Sone H, Isogai E,

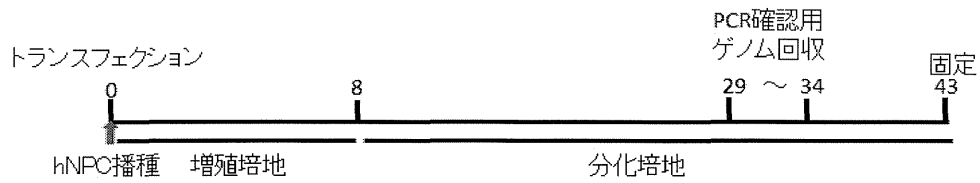
- Inoue-Murayama M. Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013
6. Donai K, Kuroda K, Guo Y, So KH, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. *Anal Biochem.* 2013 Dec 1;443(1):104-12.
- 2. 学会発表**
1. Y Kurokawa, Tin-Tin Win-Shwe, Y Zeng, Q Zeng, S Hirano, H Sone. 2013, Intracellular distribution of Alexa 488 labeled-PAMAM-NH<sub>2</sub> in human cells for prediction of permeability into blood-brain barrier. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health
2. Y Zeng, Y Kurokawa, Tin-Tin Win-Shwe, Q Zeng, S Hirano, H Sone. 2013, Effects of Core C2 PAMAM Dendrimer on neuronal differentiation in human neuronal progenitor cells. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health
3. Hideko Sone, Yoshika Kurokawa, Tin-Tin Win-Shwe, Yang Zeng, Qin Zeng, Seishiro Hirano. 2013, Determinations of PAMAM particles in culture media by using scanning probe microscopy techniques for the exposure assessment. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health
4. Tin-Tin Win-Shwe, Hideko Sone, Yoshika Kurokawa, Yang Zeng, Qin Zeng, Hiroshi Nitta, Seishiro Hirano. 2013, Biological effects and biodistribution of PAMAM-NH<sub>2</sub> dendrimers in a mouse brain and human ES cell-derived neurons. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health.
5. Hideko Sone, Masami Ishido, Hirano Seishiro. 2013, Gene expression profiling in the mouse lung exposed to secondary organic aerosol derived from diesel exhaust. 第72回日本癌学会, 日本癌学会学術総会プログラム集
6. Bunryu Oh, Mitsuru Tada, Hideko Sone. 2013, ヒト副腎癌細胞 H295R 及び乳がん細胞 MCF7 を用いた環境媒体成分のインパクト評価に関する研究 日本内分泌攪乱化学物質学会 日本内分泌攪乱化学物質学会研究集会要旨集.
7. 仲峰宏政, 桂真理, 曾勤, 曾洋, 南齋ひろ子, 鍛冶利幸, 曾根秀子, 秋光信佳. 2013, ヒト ES 細胞を用いた神経分化モデルに対する放射線影響の評価, 日本内分泌攪乱化学物質学会, 日本内分泌攪乱化学物質学会研究集会要旨集.
8. 黄倉雅広, 南齋ひろ子, 伊藤智彦, 曾根秀子. 2013, 健康影響予測システム HEALS を用いたフタル酸エステル類の量反応関係解析とメカニズム予測. 日本内分泌攪乱化学物質学会 日本内分泌攪乱化学物質学会研究集会要旨集.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- 1. 特許出願**  
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～出願・審査中).
- 2. 実用新案登録**  
なし
- 3. その他**  
なし

図1. pGL3-hMAP2-metluc-Neo-copGFPのhNPCへの導入実験

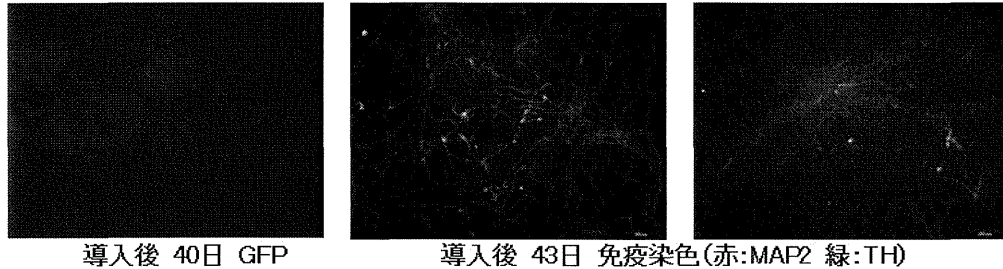
A 実験の概要



B 実験スケジュール



C 神経特異的タンパク質の免疫化学染色



D PCRによるゲノムDNA中の導入プラスミド断片の確認

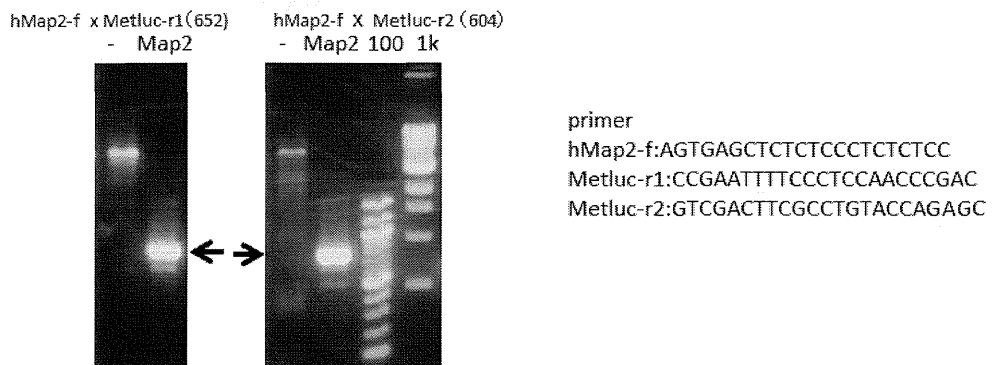
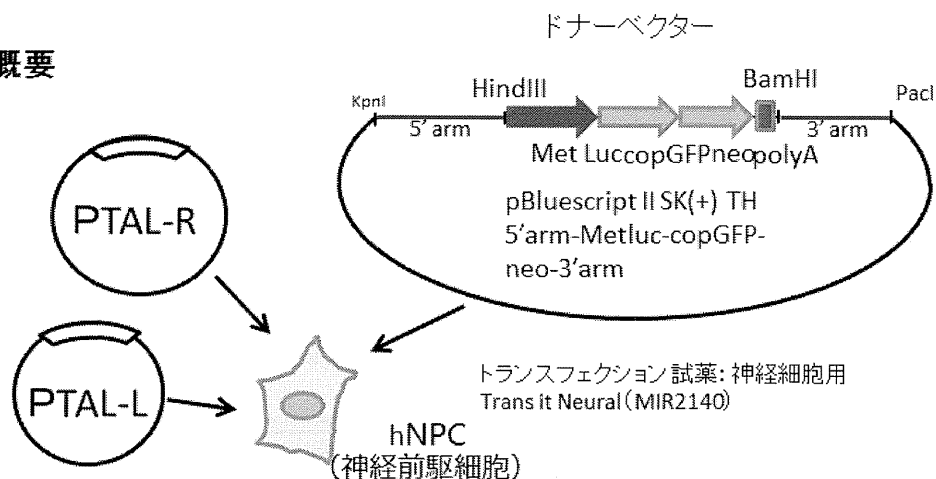
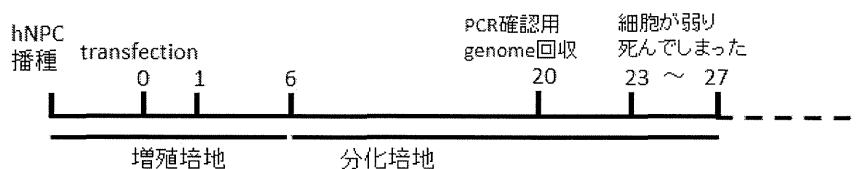


図2. Th-TALENの作成とドナーベクター5'arm-Metluc-copGFP-neo-3'armを活用したhNPCへの導入実験の概要と結果

A 実験の概要



B 実験スケジュール



C PCRによるゲノムDNA中の導入プラスミド断片の確認

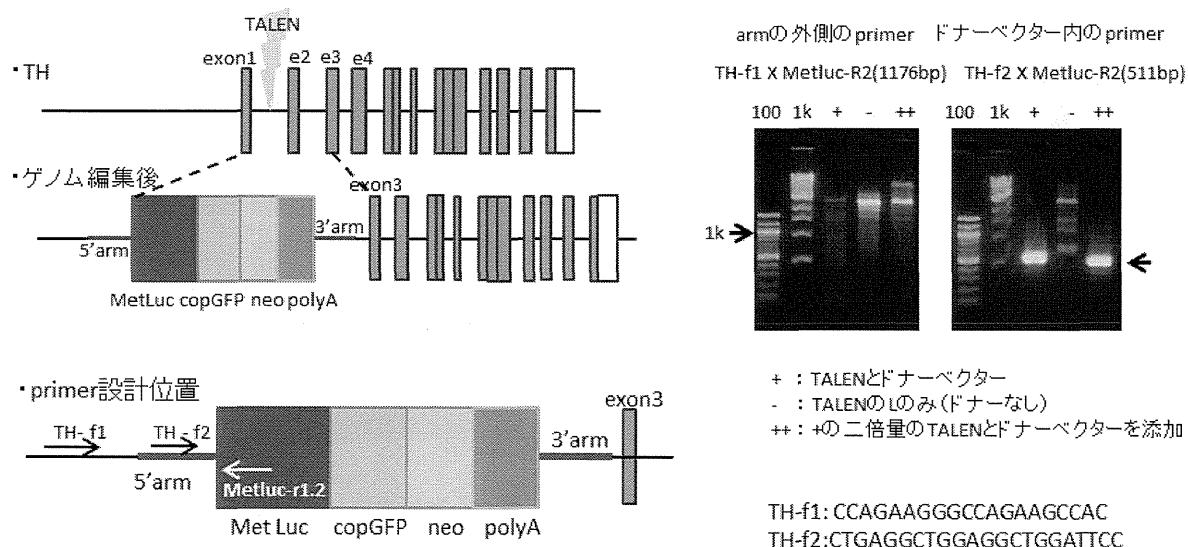
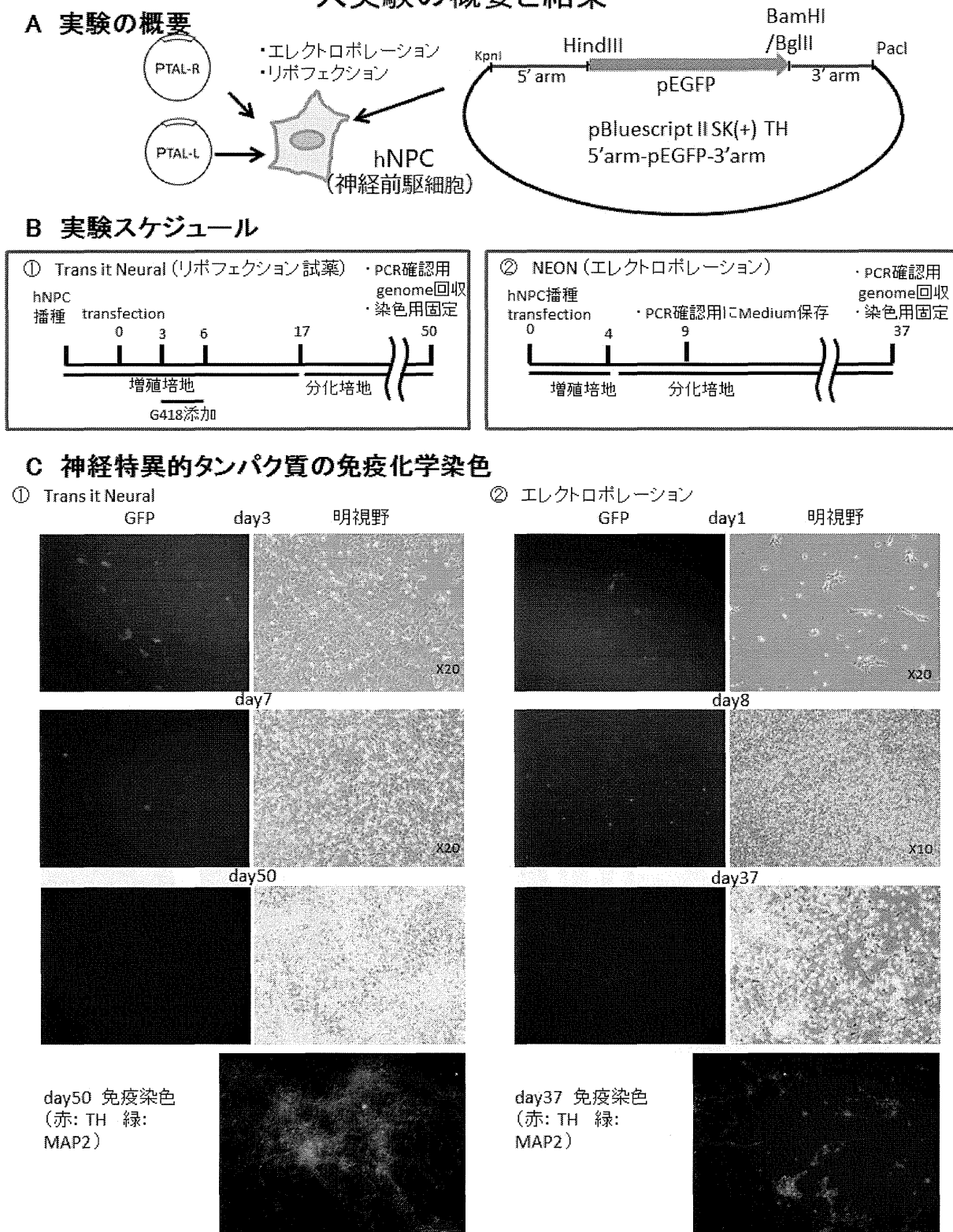


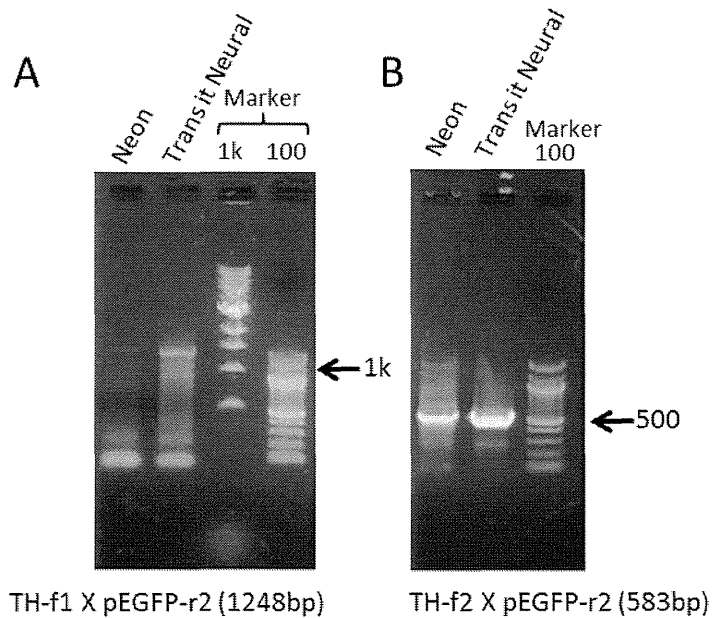
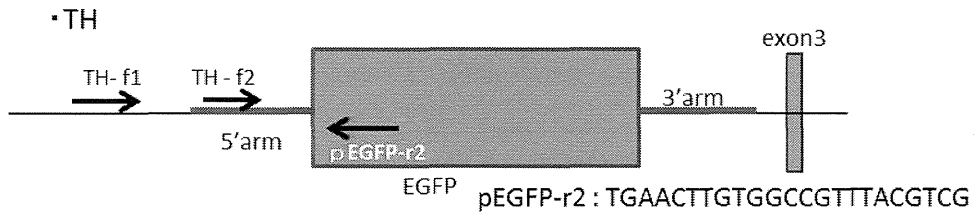
図3. ドナーベクター5'arm-pEGFP-3'armの変更とhNPCへの導入実験の概要と結果



(図3の続き)

D PCRによるゲノムDNA中の導入プラスミド断片の確認

・予測されるゲノム編集後のTH遺伝子構造（設計されたプライマーを表示）



## ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験における測定の標準化に関する研究

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を実現化する上で、重要となるヒト細胞の標準化及びデータの正規化について研究を行った。その結果、1) マルチプレックスシングルセル解析に基づく ES/iPS 細胞及び分化細胞の標準化に重要な知見として、平均値解析だけではわからない細胞株間の遺伝子発現ゆらぎの違いが存在すること。また、データの正規化として、2) 経験的ベイズ法を用いた線形モデルを用いて RT-PCR のバッチに依存するノイズを除去し、データの標準化を格段に向上させる手法を開発し、これを用いて高性能な毒性予測に至る可能性があることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究は、2009-2011 年度に実施した厚生労働科学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高精度な判別分析の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試験を実現するための多能性幹細胞バッテリーシステムを開発するものである。我々のグループは幹細胞や分化細胞からのマルチプロファイリングデータを受け取り、ベイズ統計に基づく多因子ネットワーク構造の推定を行うと共に、サポートベクター回帰を用いて毒性物質の晩発影響を予測するインフォマティクス手法を開発し、iPS 細胞研究所の利点を活かした新しい細胞解析技術を開発することを目標としている。特に今年度は「毒性試験の標準化」を実現する上で重要なヒト細胞の規格化並びに 96 well プレートなどによるバッチ効果を除去する手法について検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1) シングルセル解析に基づくヒト細胞の標準化の検討

ES/iPS 細胞及び分化細胞などヒト細胞は個性があることが知られており、実験上のゆらぎを創出してしまふことが問題視されている。細胞を用いた毒性試験

にはこれらのゆらぎができるだけ少ない「標準細胞」を用いた実験系の開発が急務である。我々は、昨年度より、バーコード識別に基づくマルチプレックスシングルセルトランスクリプトーム手法を確立し、ヒト細胞が持つゆらぎの実態解明と問題解決に取り組んだ。

#### 2) 経験的ベイズ法を用いた線形モデルによるデータノイズ除去法の開発

RT-PCR やマイクロアレイ等遺伝子発現データの正規化は既知の問題であり、特にバッチ効果によるノイズが出易い傾向がある。これを除去するにはデータ値をテクニカルノイズとバイオロジカルな実測値からなる方程式でモデル化することでテクニカルノイズ部分だけを引き去ることを可能とし、データの純度を高める手法を開発した。

#### (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ない。

### C. 研究結果

#### 1) シングルセル解析に基づくヒト細胞の標準化の検討

昨年度に開発したマルチプレックスシングルセルトランスクリプトーム法を利用して ES 細胞株(WA09)、iPS 細胞株(201B-7, 305A-1, 409B-2)、MSC、及び一次培養細胞での分化細胞 (Adipocyte, Chondrocyte, Fibroblast HDF1388)を解析した。元データによる測定値への影響を考慮し、細胞株は全て Caucasian かつ女性株を選択した。主成分分析 (PCA) の結果 (図 1 a) から細胞集団の中にはこれまでの平均値的な解析だけではわからなかった、発現分布が互いに重なっている細胞種があり(Chondrocyte と HDF1388 や MSC と Chondrocyte など)、正しい毒性反応を見るには、まず、正しく細胞を選別する方法を開発することが必要であることが判明した。

また、ES/iPS 細胞間での PCA 分布は、多少のクラスターはあるものの、分布がほぼ等しく差が顕著ではなかった。しかし、個々の遺伝子の発現量の変動パターンを解析した結果、アルギニン合成経路に関わる遺伝子 *ASS1* の分布が iPS 細胞 3 株中、201B-7 株のみ異なるなど、毒性測定をした場合に iPS 細胞株間で差が出る可能性があることが示唆された (図 1 b)。

#### 2) 経験的ベイズ法を用いた線形モデルによるデータノイズ除去法の開発

RT-PCR は 96 もしくは 386 well のプレートを用いて実験することが通常起こりうる状況である。2011 年に行った前回の我々の 10 プレートを用いた毒性試験データもこの影響を受けてプレート毎に遺伝子発現が類似性を持つバッチ効果が観察された (図 2 a)。これを除去するため、線形モデルによる形式化を行った。

$$\text{For gene } i, \quad y_i = \sum_{ik} c_{ik} + \sum_{ij} b_{ij} + e_i$$

$$c : \text{chemicals}, b : \text{batch effect}, e : \text{noise} \sim N(0, \sigma_i^2)$$

最後の項  $e_i$  はゆらぎノイズであり、経験的ベイズ適合法を用いる R Bioconductor パッケージの limma ライブラリを用いて線形モデル推定を行った。推定された  $b$  項を差し引くと、ノイズはかなり軽減されることが、相関係数ヒートマップよりも確認された (図 2 b)。この方法を用いた神経毒性、DNA 変異原性、発ガン毒性の 3 カテゴリーの予測では、我々の開発した遺伝子ネットワーク付加する方法を用いることで、92.5-97.5% とこれまでよりも高予測率を達成した (表 1)。

毒性カテゴリー	#Data	Random	SVM	BN+
神経毒性	18/40	55.0%	80.0%	97.5%
発ガン毒性	12/40	70.0%	100.0%	97.5%
DNA 変異原性	10/40	75.0%	85.0%	92.5%

### D. 考察

シングルセル解析によって毒性測定を行う場合に iPS 細胞間で差が出る可能性があることが示唆された。これは、最近の論文 (Shimamoto et al. *PLOS One*, Apr. 09, 2014) などでも、樹立した iPS 細胞間ではメチル化などエピゲノム状態が高品質な iPS 細胞の作成に重要と示唆されており、今後はメチル化状態による iPS 細胞の標準化が 1 つの重要な因子となることが示された。このため、平成 26 年度はシングルセルでのメチル化解析法の開発を始める予定である。

生物学実験では、通常、生物そのものに起因する数値に技術的なノイズが含まれた数値を測定しており、正確な解析を妨げている。毒性学においても例外でなく、これを除去して精密な解析を行うことが必要とされる。これまでマイクロアレイ解析で使用されてきた線形モデルの手法を活用することで実際の測定において均一で高品質なデータを得られる可能性が高くなったと考えられる。

## E. 結論

前年度、確立したハイスループットのシングルセルトランスクリプトーム解析法を利用して、ES/iPS細胞及び分化細胞の標準化に関する知見が得られた。また、得られたデータについてノイズを考慮してモデル化を行うことで高品質な結果を得られることが示唆された。次年度は細胞の標準化に重要と考えられるメチル化状態の解析が必要であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 山根順子、丸山徹、藤渕航、単細胞技術に基づくiPS細胞の標準化、*生体の科学*、65(2): 154-158 (2014).
2. Nakano, S., Ikebe, E., Tsukamoto, Y., Wang, Y., Matsumoto, T., Mitsui, T., Yahiro, T., Inoue, K., Kawazato, H., Yasuda, A., Ito, K., Yokoyama, S., Takahashi, N., Hori, M., Shimada, T., Moriyama, M., Kubota, T., Ono, K., Fujibuchi, W., Jeang, K.T., Iha, H., Nishizono, A., Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice, *PLoS One*, 8(9): e73205 (2013).
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, *Systems Biomedicine*, 1(3): 1-7 (2013).
4. Aburatani, S., Fujibuchi, W., Yamane, J., Imanishi, S., Nagano, R., Sone, H., Ohsako, S., Inference of Gene Regulatory Networks to Detect Toxicity-Specific Effects in Human Embryonic Stem Cells, *International Journal On Advances in Life Sciences*, 5(1&2): 103-114 (2013).
5. 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): 83-88 (2013).

6. 藤渕航、iPS細胞からのビッグデータの情報セキュリティと創薬、医療への活用、生命のビッグデータ利用の最前線、176-184 (2014)。(書籍)

### 2. 学会発表

1. Wataru Fujibuchi, SHOGoin- Human omics database for the generation of iPS and normal cells, poster presentation at Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory, 2014, March, New York.
2. Junko Yamane, Michihiro Tanaka, Wataru Fujibuchi, Standardization of human iPS and ES cells using single-cell transcriptome analysis, poster presentation at Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory, 2014, March, New York.
3. Michihiro Tanaka, Junko Yamane, Kenichi Tanaka, Kenta Kobayashi, Wataru Fujibuchi, Bioinformatics resources for cell standardization at single-cell resolution, poster presentation at The 7<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.
4. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Reiko Nagano, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, Wataru Fujibuchi, Prediction of Developmental Neurotoxic Effects using Human Pluripotent Stem Cells, poster presentation at The 7<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.

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

5. Junko Yamane, Michihiro Tanaka, Wataru Fujibuchi,  
Single-cell RNA-seq analysis of human iPS and ES  
cells, poster presentation at Bioinformatics week in  
Odaiba 2013 (BiWO 2013), AIST, 2013, September,  
Tokyo.
6. 【招待講演】 藤渕航、幹細胞と遺伝子ネットワーク  
を活用した化学物質の毒性評価と細胞分化解析へ  
の応用、第5回ヒトES細胞使用研究倫理研修会、  
国立環境研究所、2014年、3月、茨城
7. 【招待講演】 藤渕航、iPS細胞からのビッグデータ  
の情報管理と再生医療への活用、京都バイオ計測  
センターシンポジウム「生命のビッグデータの解釈と  
その社会への展開」、京都リサーチパーク1号館4  
階サイエンスホール、2013年、7月、京都
8. 【招待講演】 藤渕航、幹細胞インフォマティクス、  
JMAC(特定非営利活動法人バイオチップコンソー  
シアム)主催、第56回ワーキンググループ会議、  
R3C貸会議室NOF新宿南口ビル、2013年、6月、  
東京

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

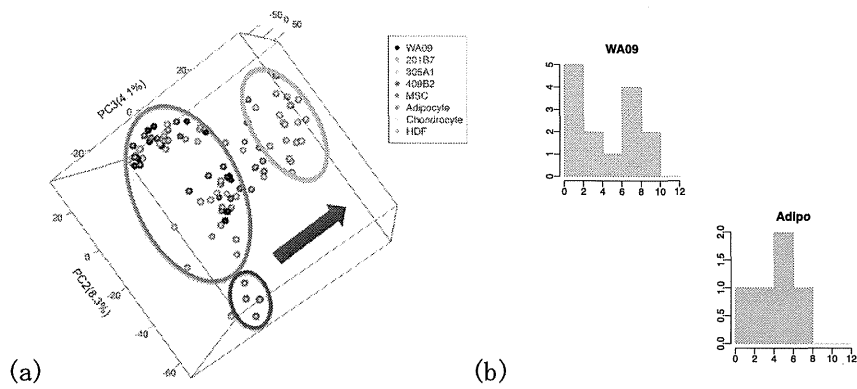


図1：8ヒト細胞株シングルセル遺伝子発現データの主成分分析（PCA）と ASS1 発現分布  
ES 細胞株(WA09)、iPS 細胞株(201B-7, 305A-1, 409B-2)、MSC、及び一次培養細胞での分化細胞(Adipocyte, Chondrocyte, Fibroblast HDF1388)のシングルセル遺伝子発現解析。a) 平均値解析だけではわからなかった、発現分布が互いに重なっている細胞種（Chondrocyte と HDF1388 や MSC と Chondrocyte など）や、b) ASS1 遺伝子発現の変動パターンが iPS 細胞中で異なる 201B-7 株が観察されている。

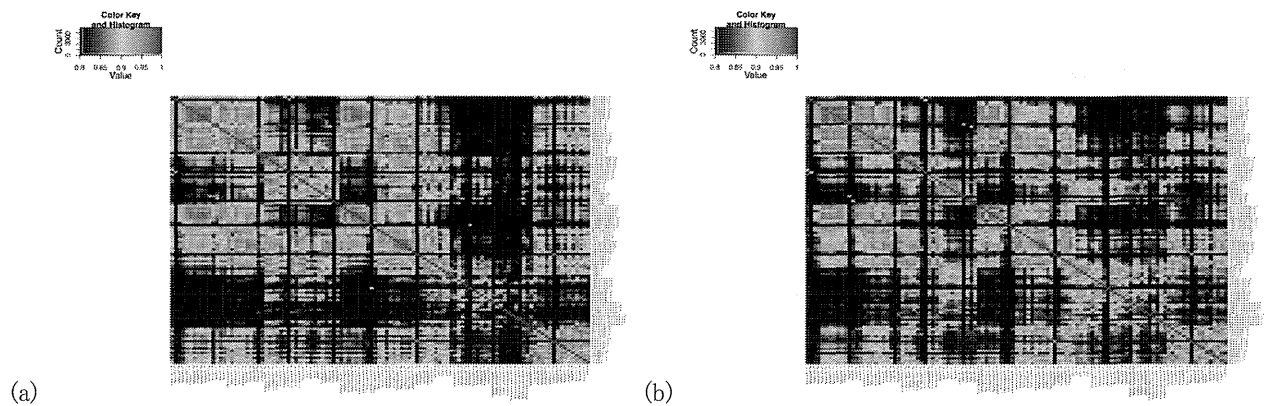


図2:経験的ベイズ法による線形モデリングを利用したノイズ除去

96 well x 10 プレートを用いた RT-PCR 毒性試験データから 22 化合物間でのピアソン相関係数。(a) ノイズ除去前には、バッチ効果ノイズによる同じ大きさの類似遺伝子発現データが得られてしまっているが、(b) ノイズ除去後にはこれが軽減され、より小さな化合物単位での類似遺伝子発現データが増えている。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 別紙 4

## 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
Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, Yagi T.	Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands.	<i>Mol Pharmacol</i>	85(2)	279-289	2014
Alam MS, Ohsako S, Kanai Y, Kurohmaru M.	Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats.	<i>Acta Histochemical</i>	116(3)	474-480	2014
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>	34(3)	296-306	2014
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
Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Nansai H, Fukuda T, Hayashi Y, Nasu T, Sone H.	Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math> mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian <i>Esr1</i> expression in female mice.	<i>Toxicology Letters</i>			in press.
Win-Shwe TT, Sone H, Kurokawa Y, Zeng Q, Zeng Y, Nitta H, Hirano S.	Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation.	<i>Toxicology Letters</i>			in press.
Win-Shwe TT, Fujitani Y, Sone H, Furuyama A, Nitta H, Hirano S.	Effects of acute single intranasal instillation of secondary organic aerosol on neurological and immunological biomarkers in the brain and lung of BALB/c mice.	<i>J Toxicol Sci.</i>	38(1)	71-82	2013

## 別紙 4

Imanishi S, Okura M, Zaha H, Yamamoto T, Akanuma H, Nagano R, Shiraishi H, Fujimaki H, Sone H.	Prenatal exposure to permethrin influences vascular development of fetal brain and adult behavior in mice offspring.	<i>Environ Toxicol.</i>	28(11)	617-629	2013
Fukuda T, Katayama M, Kinoshita K, Kasugai T, Okamoto H, Kobayashi K, Kurita M, Soichi M, Donai K, Uchida T, Onuma M, Sone H, Isogai E, Inoue-Murayama M.	Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle ( <i>Lepidochelys olivacea</i> ).	<i>In Vitro Cell Dev Biol Anim.</i>			2013
Donai K, Kuroda K, Guo Y, So KH, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T.	Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines.	<i>Anal Biochem.</i>	443(1)	104-112.	2013
山根順子、丸山徹、藤渕航	単細胞技術に基づく iPS 細胞の標準化	<i>生体の科学</i>	65(2)	154-158	2014
Nakano S, Ikebe E, Tsukamoto Y, Wang Y, Matsumoto T, Mitsui T, Yahiro T, Inoue K, Kawazato H, Yasuda A, Ito K, Yokoyama S, Takahashi N, Hori M, Shimada T, Moriyama M, Kubota T, Ono K, Fujibuchi W, Jeang KT, Iha H, Nishizono, A.	Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice	<i>PLoS One</i>	8(9)	e73205	2013

## 別紙 4

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>Systems Biomedicine</i>	1(3)	1-7	2013
Aburatani S, Fujibuchi W, Yamane J, Imanishi S, Nagano R, Sone H, Ohsako S.	Inference of Gene Regulatory Networks to Detect Toxicity-Specific Effects in Human Embryonic Stem Cells	<i>International Journal On Advances in Life Sciences</i>	5(1&2)	103-114	2013
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)	83-88	2013



## 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	iPS 細胞からのビッグデータの情報セキュリティと創薬、医療への活用	植田充美	生命のビッグデータ利用の最前線	シーエムシー出版	日本	2014	176-184

研究成果の刊行物・別刷り

# Identification of Amino Acid Residues in the Ligand-Binding Domain of the Aryl Hydrocarbon Receptor Causing the Species-Specific Response to Omeprazole: Possible Determinants for Binding Putative Endogenous Ligands<sup>§</sup>

Kazuhiro Shiizaki, Seiichiroh Ohsako, Masanobu Kawanishi, and Takashi Yagi

*Division of Cancer Development System, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan (K.S.); Division of Environmental Health Sciences, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan (S.O.); Department of Life Science, Dongguk University, Seoul, Korea (T.Y.); and Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan (M.K., T.Y.)*

Received July 29, 2013; accepted November 21, 2013

## ABSTRACT

Omeprazole (OME) induces the expression of genes encoding drug-metabolizing enzymes, such as CYP1A1, via activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) both in vivo and in vitro. However, the precise mechanism of OME-mediated AhR activation is still under investigation. While elucidating species-specific susceptibility to dioxin, we found that OME-mediated AhR activation was mammalian species specific. Moreover, we previously reported that OME has inhibitory activity toward CYP1A1 enzymes. From these observations, we speculated that OME-mediated AhR target gene transcription is due to AhR activation by increasing amounts of putative AhR ligands in serum by inhibition of CYP1A1 activity. We compared the amino acid sequences of OME-sensitive rabbit AhR and nonsensitive mouse AhR to identify the residues responsible for the species-specific

response. Chimeric AhRs were constructed by exchanging domains between mouse and rabbit AhRs to define the region required for the response to OME. OME-mediated transactivation was observed only with the chimeric AhR that included the ligand-binding domain (LBD) of the rabbit AhR. Site-directed mutagenesis revealed three amino acids (M328, T353, and F367) in the rabbit AhR that were responsible for OME-mediated transactivation. Replacing these residues with those of the mouse AhR abolished the response of the rabbit AhR. In contrast, substitutions of these amino acids with those of the rabbit AhR altered nonsensitive mouse AhR to become sensitive to OME. These results suggest that OME-mediated AhR activation requires a specific structure within LBD that is probably essential for binding with enigmatic endogenous ligands.

## Introduction

Omeprazole (OME), a benzimidazole derivative, is a potent suppressor of gastric acid secretion and has been used to treat gastroesophageal reflux disease and duodenal ulcers (Lind et al., 1983). In human hepatoma cells and liver cells, OME is known to induce CYP1A1 and CYP1A2 (Diaz et al., 1990; Curipedrosa et al., 1994; Krusekopf et al., 1997; Yoshinari et al., 2008). The transactivation of these genes is known to be mediated by a ligand-dependent transcriptional factor, aryl hydrocarbon receptor (AhR) and AhR nuclear translocator (Arnt) (Burbach et al., 1992; Reyes et al., 1992). The AhR/Arnt heterodimer binds to the specific nucleic acid sequence known

as the xenobiotic response element (XRE), which is located in the 5'-flanking region of CYP1A1 gene and other AhR target genes (Denison et al., 1989). Although it is generally accepted that ligand binding is a key determinant for AhR-mediated transcriptional activity, even in the absence of exogenous ligands (Chang and Puga, 1998; Murray et al., 2005; Shiizaki et al., 2005), some reports have shown that OME induces CYP1A1 expression without binding to AhR using competitive binding assays (Daujat et al., 1992; Dzeletovic et al., 1997). Similar to typical AhR ligands, OME induces translocation of the AhR/Arnt complex to the nucleus, and the complex binds to the XRE of the *Cyp1a1* enhancer region (Quattrochi and Tukey, 1993; Yoshinari et al., 2008). Therefore, OME is considered to activate AhR through a pathway other than ligand binding. Several reports have shown that the protein tyrosine kinase (PTK) pathway is involved in CYP1A1 induction by OME in rat and human hepatoma cells (Backlund et al., 1997; Kikuchi et al., 1998; Lemaire et al., 2004; Backlund and Ingelman-Sundberg, 2005). OME-mediated AhR signaling has been shown

This research was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (S) [Grants 18101002, 18101003]; (C) [Grant 23590162] from MEXT Japan; and in part, by the Environmental Technology Development Fund to S.O. from the Ministry of the Environment.

[dx.doi.org/10.1124/mol.113.088856](http://dx.doi.org/10.1124/mol.113.088856)

§ This article has supplemental material available at [molpharm.aspetjournals.org](http://molpharm.aspetjournals.org).

**ABBREVIATIONS:** AhR, aryl hydrocarbon receptor; Arnt, AhR nuclear translocator; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; FICZ, 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole; ITE, 2-(1*H*-indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolecarboxylic acid methyl ester; LBD, ligand-binding domain; luciferin-CEE, luciferin 6'-chloroethyl ether; 3MC, 3-methylcholanthrene; MEM, minimum essential medium; OME, omeprazole; P450, cytochrome P450; PTK, protein tyrosine kinase; *Rluc*, *Renilla* luciferase; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; XRE, xenobiotic response element.

to be attenuated by *c-src* kinase inhibitors or by expression of the dominant negative *c-src* protein. Furthermore, it has been suggested that the tyrosine residue at amino acid position 320 in the human AhR is a putative phosphorylation site required for OME-mediated AhR activation (Backlund and Ingelman-Sundberg, 2004). However, the molecular mechanisms of OME-mediated AhR activation have not been completely elucidated. In addition, OME-mediated AhR activation has been reported to be species-specific (Kikuchi et al., 1995, Dzeletovic et al., 1997). CYP1A1 induction by OME has been demonstrated in human, but not in mouse, primary hepatocytes and hepatoma cell lines. However, the PTK pathway appears to be unrelated to this interspecies difference because the tyrosine 320 residue is conserved in mouse and human AhRs. By fusing mouse and human hepatoma cells, a gene locus was assigned as a human-specific gene responsible for CYP1A1 induction by OME (Kikuchi et al., 2002). However, specific genes exhibiting response to OME have not been identified. Thus, the mechanism underlying species-specific differences in OME-mediated AhR activation remains unclear. Elucidating such a mechanism could lead to a better understanding of OME-mediated AhR activation.

Recent studies have shown that AhR has physiologic roles such as anti-inflammation and T-cell differentiation (Kimura et al., 2008; Quintana et al., 2008). These discoveries led to suggestions of using AhR ligands for chemotherapy. For example, a selective AhR modulator that exhibits anti-inflammatory properties without XRE-dependent xenobiotic gene expression has been proposed (Murray et al., 2010). Because some AhR ligands are already used in human therapy and because OME-mediated AhR activation is unique, OME and other imidazole compounds may be candidates for selective AhR modulators. Elucidation of the molecular mechanism of OME-mediated AhR activation will be important for such applications.

Recently, a report showed that AhR activation by CYP1A1-inhibiting chemicals is caused by an indirect mechanism involving disruption of the clearance of endogenous ligands (Wincent et al., 2012). We speculated that OME-mediated AhR activation is due to this indirect mechanism because OME is one of the CYP1A1-inhibiting chemicals (Shiizaki et al., 2008). Species-specific response to TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) is considered to be due to differences in the AhR molecular structure responsible for the ligand binding affinity (Bohonowych and Denison, 2007), although this topic is controversial. If a putative ligand is related to OME-mediated AhR activation, a species-specific OME response would be generated because of the affinity of the putative ligand conferred by the AhR structure, as well as response to TCDD. In addition, the structural differences in AhR will be due to particular amino acid residues.

In this study, we used AhRs derived from various laboratory animals and humans to demonstrate that species-specific activation by OME depends on specific amino acids within the AhR amino acid sequences.

## Materials and Methods

**Chemicals.** Omeprazole, 3-methylcholanthrene (3MC), ellipticine, kynurenic acid, and 2-(1*H*-indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolocarboxylic acid methyl ester (ITE) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). TCDD (>99.5% purity) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA).  $\beta$ -Naphthoflavone was purchased from Wako Pure

Chemical (Osaka, Japan). Indirubin was provided by Dr. Tomonari Matsuda (Kyoto University, Kyoto, Japan). FICZ (6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole) was purchased from Biomol International LP (Plymouth Meeting, PA). All chemicals were dissolved in dimethylsulfoxide and added to media. The final concentration of dimethylsulfoxide was adjusted to 0.1% (v/v) in culture media.

**CYP1A1 Activity Determined by Cytochrome P450-Glo Assays.** CYP1A1 activity was determined using a cytochrome P450 (P450)-Glo CYP1A1 Assay (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Sf9 cell microsomes containing recombinant human CYP1A1 were purchased from Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). In brief, an aliquot (0.5 pmol) of microsomes was mixed with 100 mM KPO<sub>4</sub> buffer (25  $\mu$ l) containing 120  $\mu$ M of luciferin 6'-chloroethyl ether (luciferin-CEE). Then, OME (final concentration 0.5–100  $\mu$ M) or ellipticine (final concentration 0.1–10  $\mu$ M) was added to reaction cocktails and incubated at 37°C for 10 minutes. After preincubation, 25  $\mu$ l of 2 $\times$  NADPH-regenerating system solution (2.6 mM NADP<sup>+</sup>, 6.6 mM glucose-6-phosphate, 0.4 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>) was added and incubated at 37°C for 30 minutes. Luciferin obtained after conversion of luciferin-CEE by CYP1A1 was detected by adding the Luciferin Detection Reagent included in the assay kit, and luminescence was detected using the Wallac Arvo SX Multi-Label counter (PerkinElmer, Boston, MA).

**Plasmid Construction.** The reporter plasmid pX4TK-Luc, which includes the firefly luciferase gene under the control of four copies of XRE and the thymidine kinase promoter, was a gift from K. Sogawa (Tohoku University, Sendai, Japan). The expression plasmids containing AhR cDNAs from six mammalian species were constructed as follows. cDNAs were prepared from mouse (*Mus musculus*, strain C57BL), human (*Homo sapiens*), rat (*Rattus norvegicus*, Holtzman), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*, New Zealand White), hamster (*Mesocricetus auratus*, Syrian), and guinea pig (*Cavia porcellus*, Hartley). The open reading frames of each AhR were amplified by reverse-transcription polymerase chain reaction and inserted into the MluI and XhoI sites of the pCI-neo vector (Clontech, Palo Alto, CA). To construct the chimeric mouse/rabbit AhRs, AhR cDNA fragments based on the mouse and rabbit AhR ligand-binding domains (LBDs) (Fukunaga et al., 1995) were individually amplified, joined by overlapping polymerase chain reaction, and subcloned into the pCI-neo vector. Single point mutations were generated using a QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). All primers used in this study are shown in Supplemental Table 1.

**Cell Cultures and Transfection.** The human epithelial carcinoma cell line HeLa and murine hepatoma cell lines Hepa1c1c and its derivative c12 were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). HeLa cells were grown in minimum essential medium (MEM) containing 10% charcoal-stripped fetal bovine serum (FBS) and 1 $\times$  Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA). Hepa1c1c and c12 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% charcoal-stripped FBS and 1 $\times$  Antibiotic-Antimycotic. All cultures were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Transfection was performed by a liposome method. In brief, 1  $\mu$ g of plasmid DNA and 4  $\mu$ l of Plus reagent (Invitrogen) were combined in 200  $\mu$ l of OPTI-MEM (Invitrogen). After incubation for 15 minutes, 2  $\mu$ l of Lipofectamine reagent (Invitrogen), diluted with 200  $\mu$ l OPTI-MEM, was added. The cells were plated in six-well tissue culture plates at 30%–40% confluence a day before transfection. Liposomes were added in serum-free medium for 3 hours and then replaced with MEM or DMEM containing 10% charcoal-stripped FBS without 1 $\times$  Antibiotic-Antimycotic.

**Luciferase Assay.** The effects of OME and typical AhR agonists on XRE-dependent transcriptional activity were evaluated by cotransfecting the AhR expression plasmid, the reporter plasmid pX4TK-Luc (Mimura et al., 1999), and the *Renilla* luciferase (*Rluc*) expression vector pRL-CMV (Promega) into cells. The transfected cells were washed with cold phosphate-buffered saline and lysed in 25  $\mu$ l of 1 $\times$  passive lysis buffer (Promega). Aliquots (10  $\mu$ l) of the