

- Tanokura M, and 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, 1375-1380, (2012).
9. Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, **Ohsako S**, and 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).
10. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin X-Y, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, and **Ohsako S**. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol Lett* 212, 1-10, (2012).
11. Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Fujisawa N, Kawaguchi T, **Ohsako S**, Hara S, Uematsu S, Akira S, and Tohyama C. Critical role of mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Sci* 127, 547-554, (2012).
12. Nagano R, Akanuma H, Qin X-Y, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, **Ohsako S**, and Sone H. Multi-parametric profiling network based on gene expression and phenotype data: A novel approach to developmental neurotoxicity testing. *Int J Mol Sci* 13, 187-207, (2012).
2. 学会発表
1. Sailendra Nath Sarma, Masanobu Kohda, **Seiichiroh Ohsako**, Dopaminergic neuronal differentiation visualized by human embryonic stem cell-line carrying rat tyrosine hydroxylase-EGFP transgene. 第42回日本毒性学会、神戸 (2014).
2. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Reiko Nagano, Hideko Sone, **Seiichiroh Ohsako**, and Wataru Fujibuchi. Prediction of Developmental Neurotoxic Effects using Human Pluripotent Stem Cells. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences iPS Cells in Drug Discovery& Development. CiRA International Symposium. Kyoto (2014).
3. **Seiichiroh Ohsako**. Generation of the human ES cell line driven by dioxin responsive reporter gene. The 11st Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Bostin, (2013).
4. Keiko Aida-Yasuoka, Wataru Yoshioka, Tatsuya Kawaguchi, **Seiichiroh Ohsako**, Chiharu Tohyama. Microsomal prostaglandin E synthase-1 plays an important role in strain-difference in the onset of TCDD-induced hydronephrosis in mice. ICT2013, Korea (2013).
5. 相田圭子、吉岡亘、川口達也、大迫誠一郎、遠山千春. ダイオキシン経母乳曝露による新生仔水腎症発症の原因遺伝子 microsomal prostaglandin E2 synthase-1 の誘導におけるマウス系統差について日本毒性学会 (2013).
6. Keiko Aida-Yasuoka, Wataru Yoshioka, Tatsuya Kawaguchi, **Seiichiroh Ohsako**, Chiharu Tohyama, Resistance to dioxin-induced hydronephrosis in a mouse strain having unresponsive microsomal prostaglandin E synthase-1. SOT2013 (2013).
7. **Seiichiroh Ohsako**, Junko Yamane, Chiharu Tohyama. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the neuronal differentiation system using human embryonic stem cells. Dioxin2012, Carinz (2012).
8. **Seiichiroh Ohsako**, Junko Yamane, Satoshi Imanishi, Chiharu Tohyama Effects of Ahr agonist on neuronal cell differentiation from human ES cells. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2012, Yokohama (2012).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

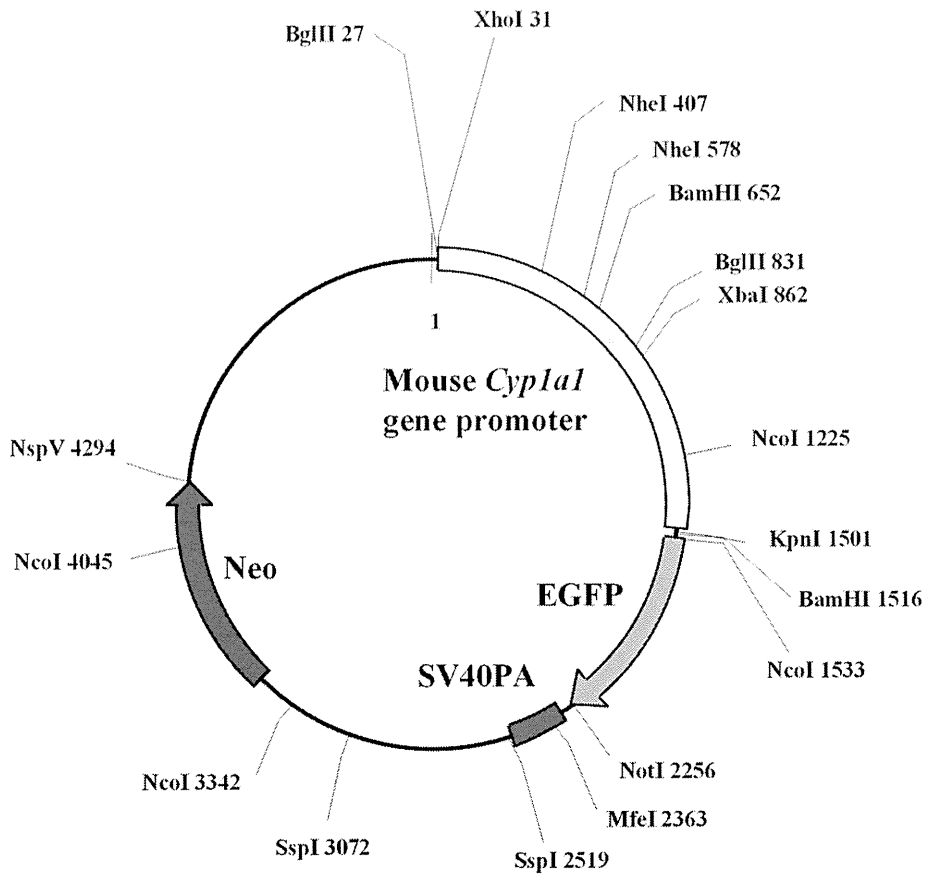


図 1. KhES1CYPEGFP 作成用導入遺伝子

C57BL/6J マウスのゲノム DNA より *Cyp1a1* 遺伝子プロモーター（転写開始点上流-1534 からエクソン 1 の +23）を PCR で増幅し、pGL3-basic ベクター（Promega 社）の *MluI*-*XhoI* サイトにクローニングした。このプラスミドから *SacI*-*XhoI* フラグメント（1465 bp）を制限酵素で切り出し、Neo 発現カセットを持つ、pEGFP-1 ベクター（CLONTECH 社）の *SacI*-*SalI* サイトにクローニングした。

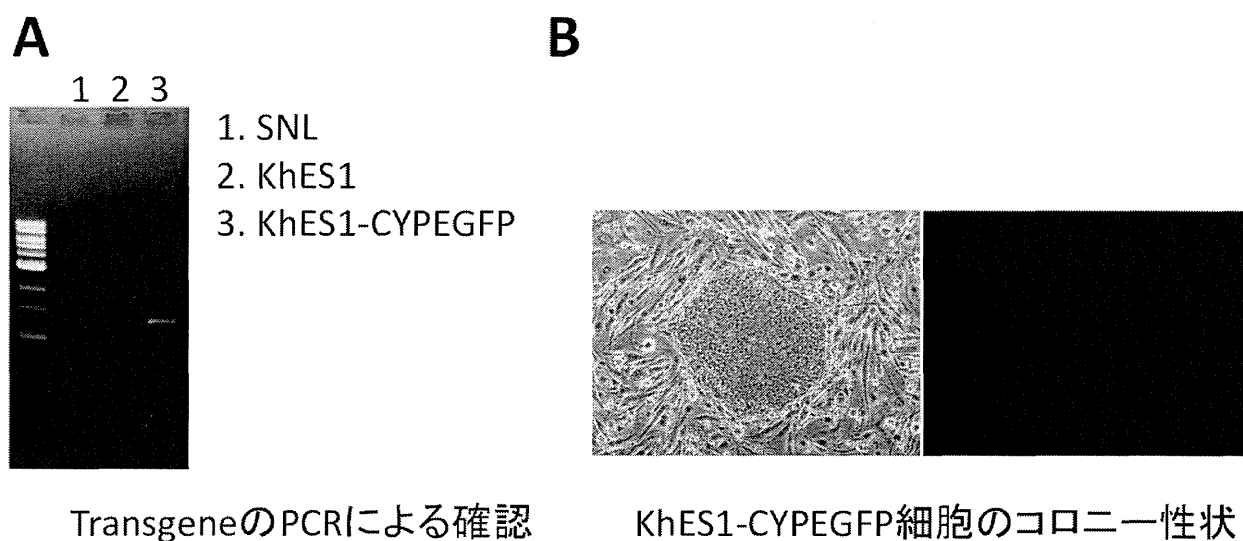


図 2. 安定導入 ES 細胞 (KhES1CYEGFP) の性状

図 1 のプラスミドをリニアライズし、PCR-purification kit (QIAGEN) で精製した DNA を、ヒト ES 細胞 (KhES1) へ Lipofectamine-LTX (Invitrogen 社) でリポフェクションにより遺伝子導入、G418 によるセレクションを行った。(A) G418 耐性細胞に目的のレポーター遺伝子が安定導入されているか、ゲノム DNA を抽出して導入遺伝子プライマー (Forward primer, Cyp1a1; reverse primer, EGFP) で検討した。(B) このヒト ES 細胞は、クローン化する以前に一部のコロニーで ES 維持培養条件下でも EGFP の弱い蛍光を発していた。

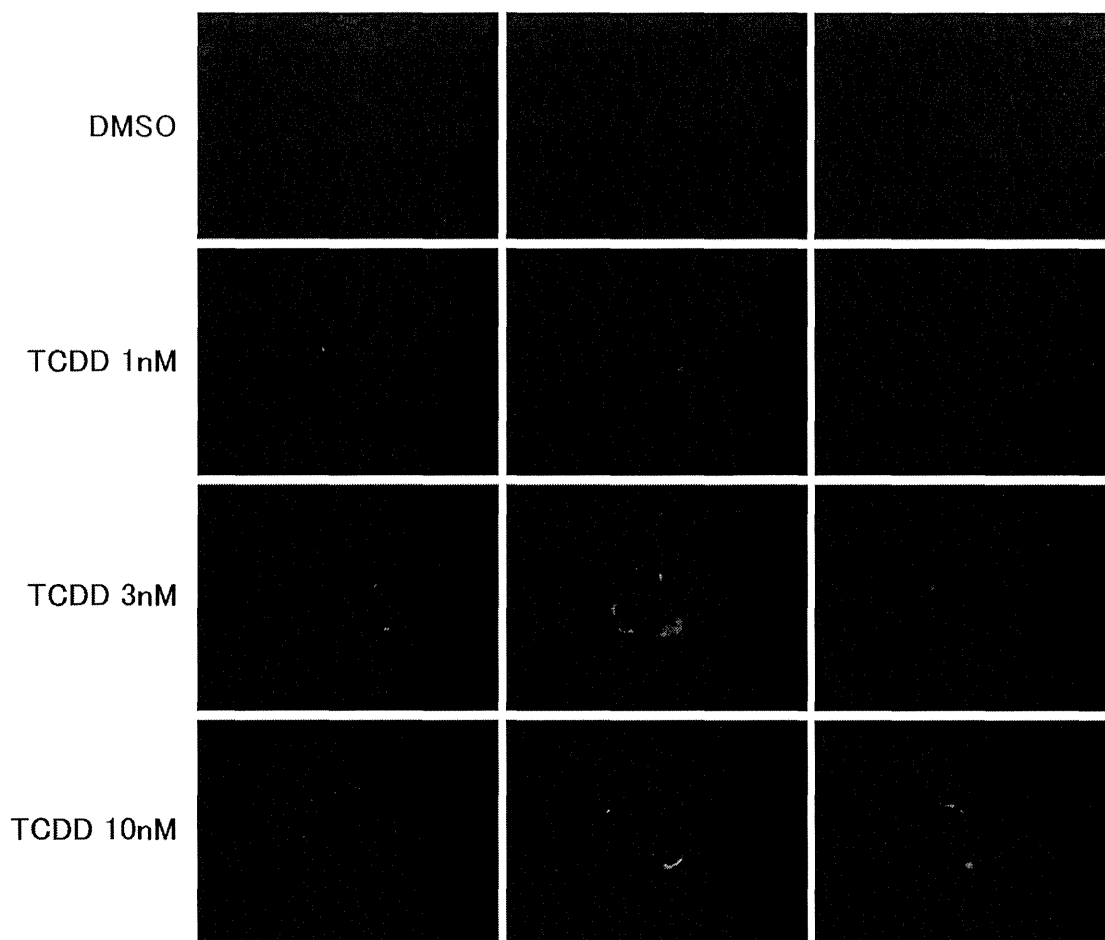


図 3. 安定導入 ES 細胞 (KhES1CYPEGFP) からの EB 形成過程における TCDD に対する反応性

KhES1CYPEGFP 細胞を用い EB 形成を SUMILON PrimeSurfase 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。

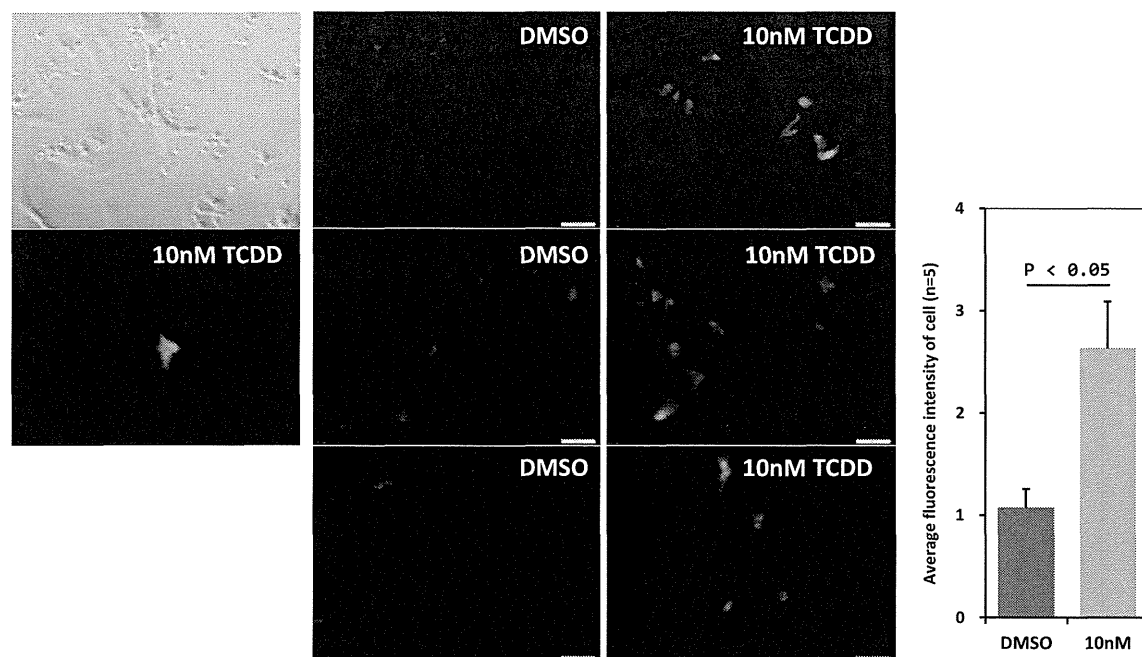


図 4. 分化させた Khes1CYP1A2EGFP の TCDD に対する反応性

肝細胞分化条件下で TCDD を 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。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。

ハイスループットアッセイに向けたニューロスフィアアッセイの最適化および神経細胞分化マーカー導入ヒト NPC の構築に関する研究

研究分担者

曾根秀子

国立環境研究所 環境リスク研究センター 室長

研究要旨

ヒト多能性幹細胞バッテリー構築に向けて、ハイスループットアッセイに最適化したヒト胚性幹細胞（H9 細胞）由来神経前駆細胞株（hNPC）を用いた以下の実験を行った。

1) ハイスループットアッセイ最適化に向けたニューロスフィアアッセイに関する検討： hNPC の三次元培養によるニューロスフィアを形成させ、ハイスループットアッセイに最適化した短期ニューロスフィアアッセイの条件を検討した。影響評価の検討には、Benzo[a]pyrene (BaP) 及び 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Azadc) の 2 種類の化学物質を使用し、用量反応関係を調べた。その結果アッセイは 10 日間で終了し、多検体同時解析可能なアッセイ条件も見出した。これにより化学物質の影響を定量的に把握することができるニューロスフィアアッセイを確立した。

2) ハイスループットアッセイ最適化に向けた神経系細胞分化マーカー導入ヒト hNPC の加工： 分化後の神経細胞をライブイメージング出来るように、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 1 kb 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コンストラクト hMAP2-metluc-Neo-copGFP、TH-metluc-Neo-copGFP 及び TH-pEGFP を作成した。MAP2 に関しては通常の遺伝子導入を、TH 遺伝子については、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) ゲノム編集手法により hNPC に遺伝子導入を実施した。その結果、神経細胞分化 40 日後において、MAP2-リポーター遺伝子 hMAP2-metluc-Neo-copGFP 及び TH-pEGFP を導入した場合に、PCR によるゲノムの導入が確認できた。この結果より、神経前駆細胞を用いた神経特異的分子のモニタリングの道筋ができた。

A. 研究目的

化学物質の安全性・有害性評価における多能性幹細胞の利点は、生体内の発生初期の過程を再現できる点にあるが、化学物質の安全性・有害性評価のためのヒト ES/iPS 細胞を用いた実用性の高いハイスループット評価系の報告はほとんど報告されていない。本分

担研究では、ヒト多能性幹細胞を用いた試験系再現性向上のためにハイスループットアッセイに向けたニューロスフィア形成法の最適化をヒト由来神経幹細胞（hNPC）を用いて各種の実験で実施した。

このような最適化は、毒性が懸念される大量の化学物質のヒトへの影響を、将来的に大規模スクリーニング

するために必須で有る。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により重要である。また、我々の実施している研究プロトコルは ECVAM や JaCVAM テストガイドラインへ提案できるような標準プロトコルの作成も視野にいれる。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

1) ハイスループットアッセイ最適化に向けたニューロスフィアアッセイに関する検討

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(hNPC)は、米 EMD Millipore 社から購入した。hNPC 細胞を常法に従って培養し、ニューロスフィアアッセイに必要な量を増殖培養後、丸底 96 ウェルプレート (Nunc-Falcon) の 1 ウェルあたり 3000~6000 個細胞で播種、5~7 日間培養し、その後、平面底の 24 ウェルプレートもしくは 48 ウェルプレートに 1 スフィア/ウェルになるように再播種した。神経分化培地で 5~7 日間さらに培養後、4%PFA で固定、核染色をして、MAP2 抗体で染色し、マルチチャンネル自動画像解析装置 (INCell-Analyzer 1000) により、神経突起伸長を定量化した。さらに、スフィア自体の大きさを測定するために、対物レンズ 4 倍率でスフィア全体を撮影(オリンパス社製)して画像を取得後、Image J でスフィアの面積を定量した。アッセイの評価のため、Benzo[a]pyrene (BaP) 及び 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Azadc) (Sigma) を最終濃度 0.1%DMSO に溶解して、細胞培養の培地中に添加した。

2) ハイスループットアッセイ最適化に向けた神経系細胞分化マーカー導入ヒト hNPC の加工

Kumarら(Nucleic Acids Res, 2006)の報告に準じて、hMAP2 ゲノム DNA の-1854 から+369 の領域を組み込んだ Metluc-copGFP-Neo コンストラクトを 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。プラスミドの細胞への導入の確認のため、培養 29-34 日目のゲノム DNA を抽出した。

TALEN による遺伝子編集の試みのために、まずドナーパミンニューロンに発現している 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。次に、目的の TH ゲノムに挿入するため、ドナー DNA、5' arm-Metluc-copGFP-neo-3' arm あるいは 5' arm-pEGFP-3' arm を独自に作成した。これらは TALEN による hs_TH_T01 領域切断の際に、切断領域と相補的配列を両端に持つ。Trans it Neural (MIR2140) を用いたリポフェクションあるいはエレクトロポレーションによる遺伝子導入で、導入後 27 日まで、あるいは 37 日ないし 50 日まで分化培養した。ゲノム DNA の抽出及び PCR による確認を行った。

(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

1) ハイスループットアッセイ最適化に向けたニューロスフィアアッセイに関する検討

ニューロスフィアアッセイの確立のために、薄くて丈夫なマトリックスの検討、ニューロスフィアに最適な 1 ウェルあたりの細胞数、スフィア形成と分化期間の長さに関して基礎検討を行った。まず、マトリックスの検討では、我々の先行研究において二次元の培養ではあるが、ラミニン 511 (LN511) が従来のポリオルニチン-ラミニン (PL-O-LN111) より神経分化が適当であることを見出し、これを使用してきたが、3 次元培養のスフィアアッセイにおい

でも同様であるかどうかを4種の細胞外マトリックス蛋白質のコートプレートを作成して検討した。その結果、LN511が含有されているコートプレートでは、十分に神経突起が伸展し、更に、固定→洗浄→免疫染色という多段階の行程を経ても型崩れしなかった（図1）。しかし、細胞あたりの神経突起伸長とスフィアコアから外側への遊走はポリオルニチン-ラミニン111+ラミニン511（PL-O-LN111+511）が最も大きかった（図2）。ニューロスフィアに最適な1ウェルあたりの細胞数では、3000個と6000個で検討したが、6000個のほうが、再現性、均一性が高かった。スフィア形成と分化期間の長さに関する検討では、スフィア形成期間が長いほど、分化培地に移した後の細胞遊走能は高いことがわかったが、一方で細胞遊走能が高すぎると、解析のための細胞固定→免疫染色の行程には再現性が悪く、結果的にスフィア形成期間を5日間と、分化期間を5日間ないし6日間とする計10-11日間のアッセイを確立した。さらに、BaP及び5-Azadcのそれぞれ、3用量をスフィア形成2日後に添加し3日間培養し、その後、化学物質のない分化培地で培養し、影響を調べた。その結果、両物質とも、量依存的にスフィアコアからの神経細胞の遊走を抑制し、コアの増殖も抑制されることが観察された。

2) ハイスループットアッセイ最適化に向けた神経系細胞分化マーカー導入ヒトhNPCの加工

ヒトMAP2遺伝子に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。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604-bp長にMAP2とMetlucの両側にprimerを設計し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。

次に、THのエクソン1直後領域へのTALEN編集

では、ドナーベクター5'arm-pEGFP-3'armで、導入3日、7、8日後には、EGFP蛍光が観察されたが、37及び50日ではほとんど観察できなかった（図3）。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TH-f2 primerとpEGFP-r2 primerでは目的サイズの位置に明瞭なバンドを得た（図3）。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ことを示している。

D. 考察

1) ハイスループットアッセイ最適化に向けたニューロスフィアアッセイに関する検討

ハイスループット化には、再現性と定量性が求められる。そのため、1ウェル1スフィアでアッセイすることを考案した。96ウェルプレートでスフィアを作成し、ウェルの中心にスフィアを置いて、顕微鏡観察を行うためには、96ウェルプレートよりも、48ウェルプレートの方が再現性よく、スフィアをおくことができ、また定量性もあるため、後者で化学物質の影響を評価した。しかし今後、ロボットアッセイ機器の導入が可能になれば、384ウェルレベルまで解析が可能になるものと考えられた。

2) ハイスループットアッセイ最適化に向けた神経系細胞分化マーカー導入ヒトhNPCの加工

ヒト神経細胞の分化を指標としたハイスループッ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プロモーターもしくはドーパミン神経特異的マーカーであるTHプロモーターに蛍光タンパクレポーターを組み込んだコンストラクトのhNPCへの遺伝子導入を行った。神経細胞分化30日付近での細胞において、ハイスループッ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。分泌型ルシフェラーゼであるMetlucも導入されているため培養上清で発光を測定したが、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

ハイスループットアッセイ最適化のために、hNPC を用いて各種の実験を行った。1) 短期のニューロスフィアアッセイを確立し、化学物質曝露による評価を行い、アッセイの有用性を提示した。2) Map2 および TH 遺伝子のエクソン 1 直後領域に蛍光レポーター結合したコンストラクト DNA 導入、およびTALENによるゲノム編集での導入を試みたが、分化後に十分な強さの蛍光を持つ細胞はできないこと、編集も確認できないことがわかった。

F. 健康危険情報

特に記載する項目はない

G. 研究発表

1. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, Sone H, **Ohsako S**, and Fujibuchi W. Prediction of developmental chemical toxicity by support vector machines with gene networks in a human embryonic stem cell validation system. (*Nucleic Acids Res*, submitted).
2. Goodson III WH et al (**Sone H**, 54 of 139). Assessing the Carcinogenic Potential of Low Dose Exposures to Chemical Mixtures in the Environment: The Challenge. *Carcinogenesis*, in press (2015).
3. Donai K, Inagaki A, So KH, Kuroda K, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T. Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions. *Cytotechnology*. 67(2):191-197, (2015).
4. Win-Shwe TT, **Sone H**, Kurokawa Y, Zeng Y, Zeng Q, Nitta H, Hirano S. Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. *Toxicol Lett*, 228(3):207-215, (2014).
5. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, Nakajima T, **Sone H**. Peroxisome

- proliferator-activated receptor α mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. *Toxicol Lett*, 228(3):235-240, (2014).
6. 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).
 7. 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).
 8. 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).
 9. 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*. 443(1):104-12, (2013).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
- 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).
 - 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).
 - 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).
 - 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).
 - 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).
 - 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).
 - 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).
 - 勤、山崎浩史. ヒト肝細胞 HepaRG における環境化学物質の細胞毒性と薬物代謝酵素誘導能について. 環境フォーラム 2014. 11 月つくば
 - Wenlong WANG, Qin ZENG, Hiroko NANSAI, Kuniya ABE, **Hideko SONE**. Detection of epigenetic effects induced by environmental chemicals in mouse ES cells harboring GFP-MBD-Ins. 環境フォーラム 2014. 11 月つくば
 - 曾根秀子, 曾洋, 南齋ひろ子. ベイジアンネットワーク解析によるナノマテリアルの毒性予測に関する研究. 第 3 回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2014) (2014) 10 月仙台
 - 曾根秀子. 化学物質による健康影響を予測する統合システム HEALS の紹介. アカデミックフォーラム 2014 東京
 - 曾根秀子. ベイジアンネットワーク解析による毒性影響の予測. 第 1 回「計算毒性学」研究会, 2014、東京
 - Kurokawa Y, Tin-Tin Win-Shwe, Zeng Y, Zeng Q, Hirano S, **Sone H**. Intracellular distribution of Alexa 488 labeled-PAMAM-NH2 in human cells for prediction of permeability into blood-brain barrier. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2014).
 - Zeng Y, Kurokawa Y, Tin-Tin Win-Shwe, Zeng Q, Hirano S, **Sone H**. Effects of Core C2 PAMAM Dendrimer on neuronal differentiation in human neuronal progenitor cells. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2013).
 - Hideko Sone**, Yoshika Kurokawa, Tin-Tin Win-Shwe, Yang Zeng, Qin Zeng, Seishiro Hirano. 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 (2013).
 - Tin-Tin Win-Shwe, **Hideko Sone**, Yoshika Kurokawa, Yang Zeng, Qin Zeng, Hiroshi Nitta, Seishiro Hirano. Biological effects and biodistribution of PAMAM-NH2 dendrimers in a mouse brain and human ES cell-derived neurons. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (2013).
 - Hideko Sone**, Masami Ishido, Hirano Seishiro. Gene expression profiling in the mouse lung exposed to
- ## 2. 学会発表
- 曾根秀子、村山典恵、王文龍、南齋ひろ子、曾

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 (2013).

11. Bunryu Oh, Mitsuru Tada, **Hideko Sone**. 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 (2013).
12. 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. 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 (2013).

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).

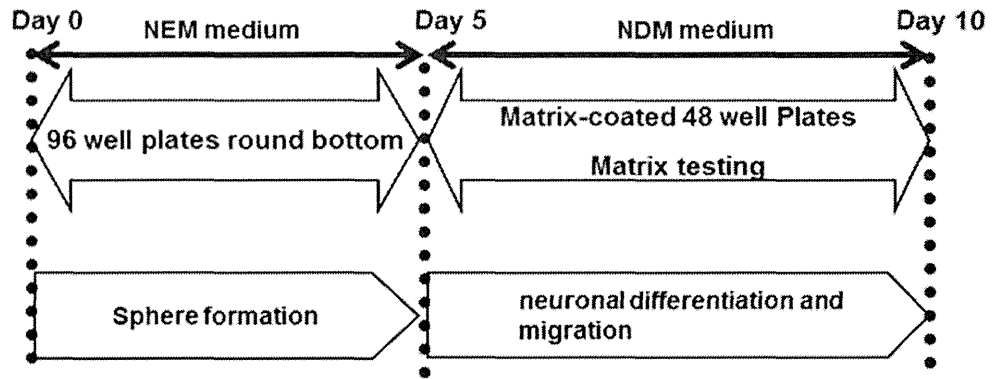
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A



B

Coated 48 well Plates on Day 8

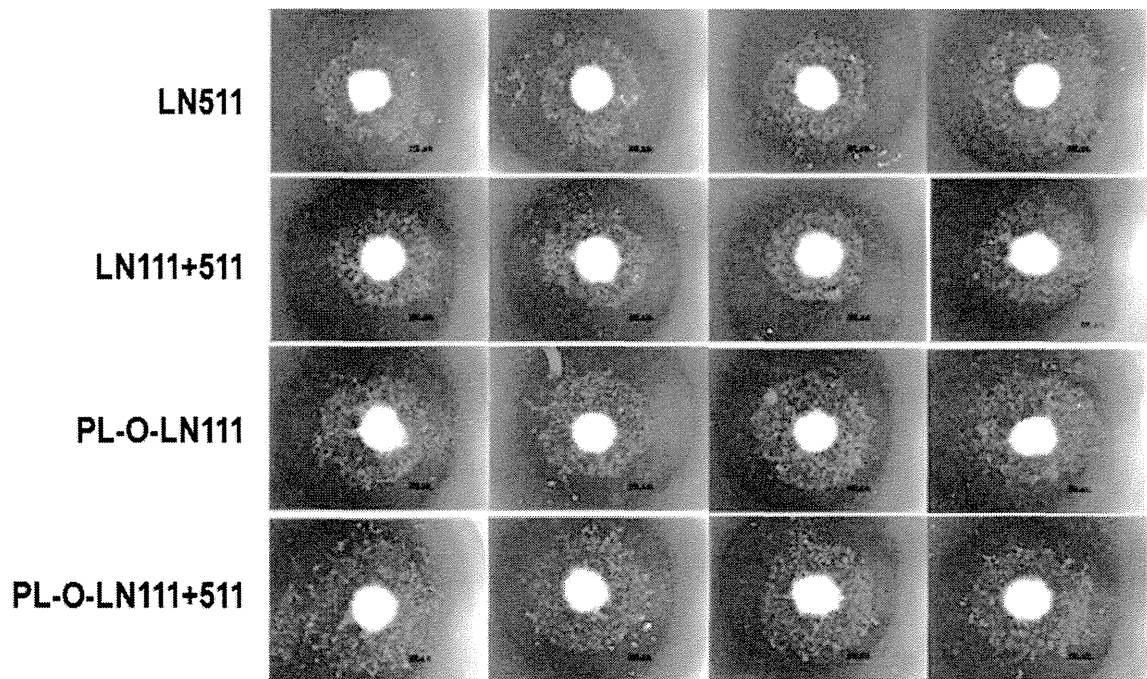


図 1. ヒト神経前駆細胞を用いたニューロスフィアアッセイプロトコル(A)及び最適な細胞外マトリックスの検討(B)
LN511, ラミニン 511; LN111+511, ラミニン 111+ラミニン 511, PL-O-LN111, ポリオールニチン+ラミニン 111; PL-O-LN111+511, ポリオールニチン+ラミニン 111+ラミニン 511

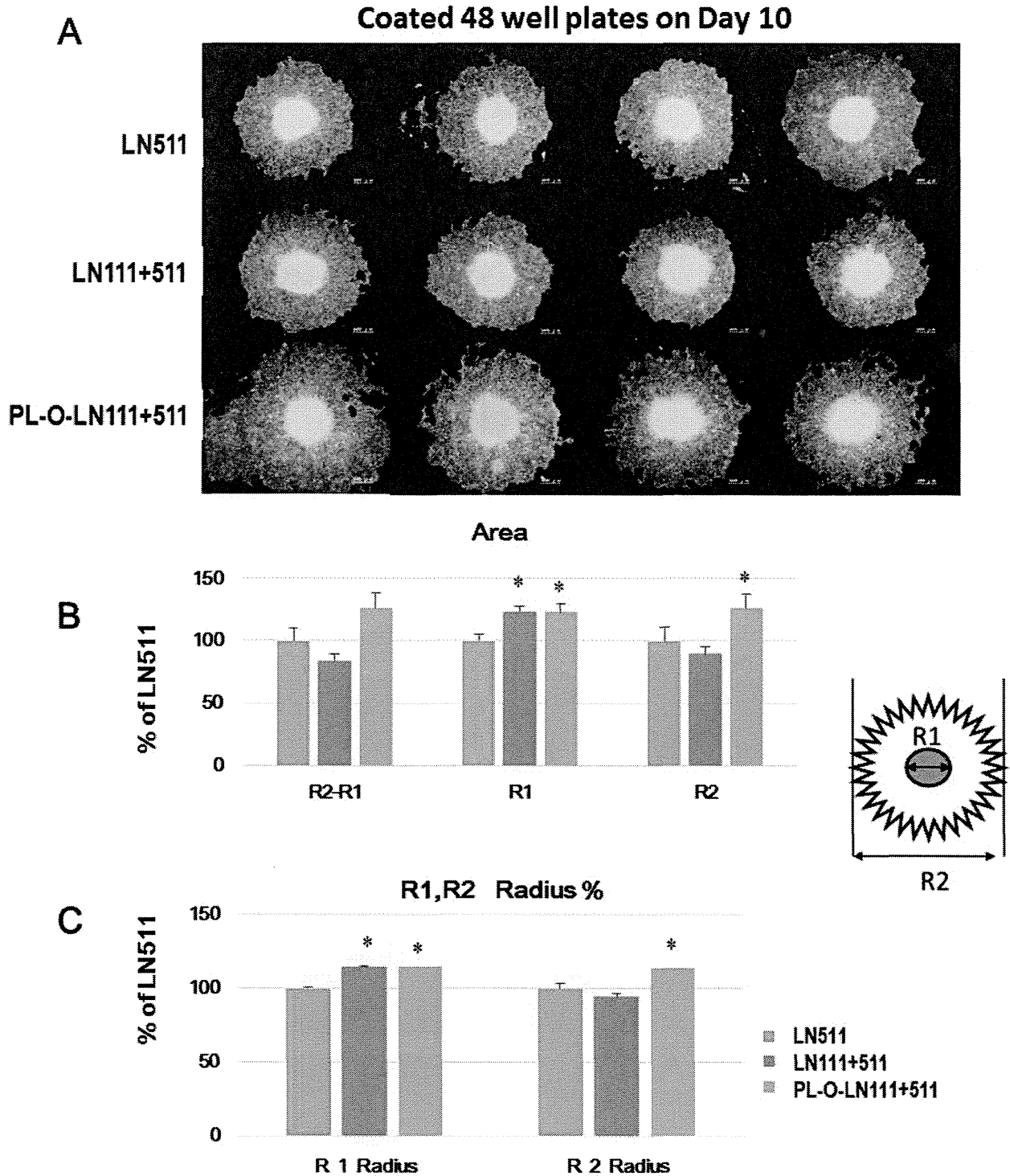
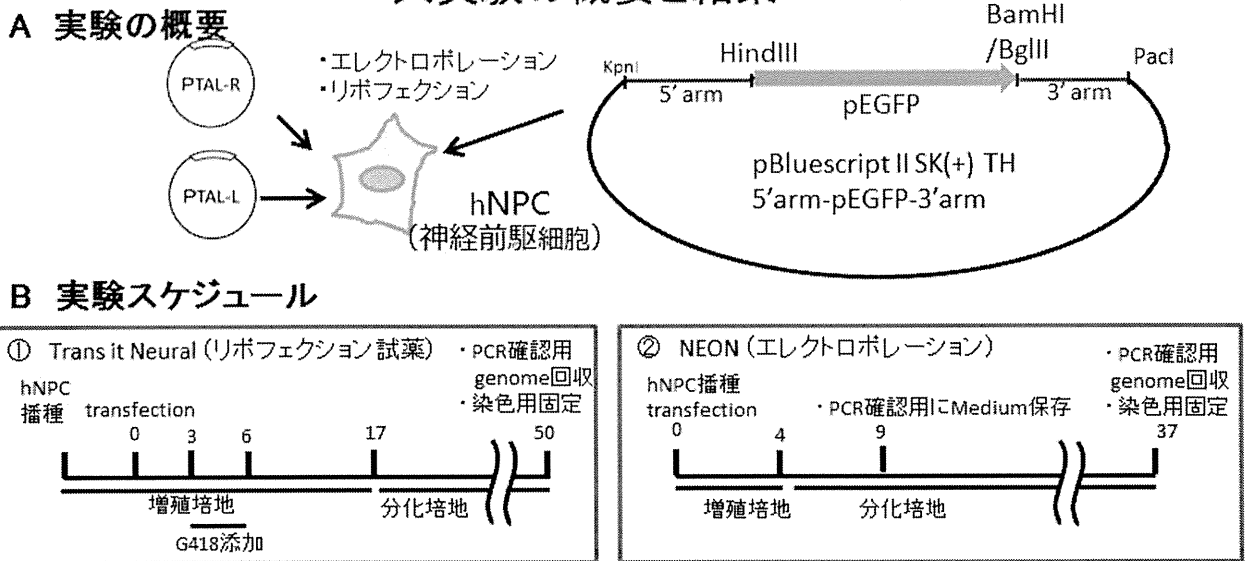


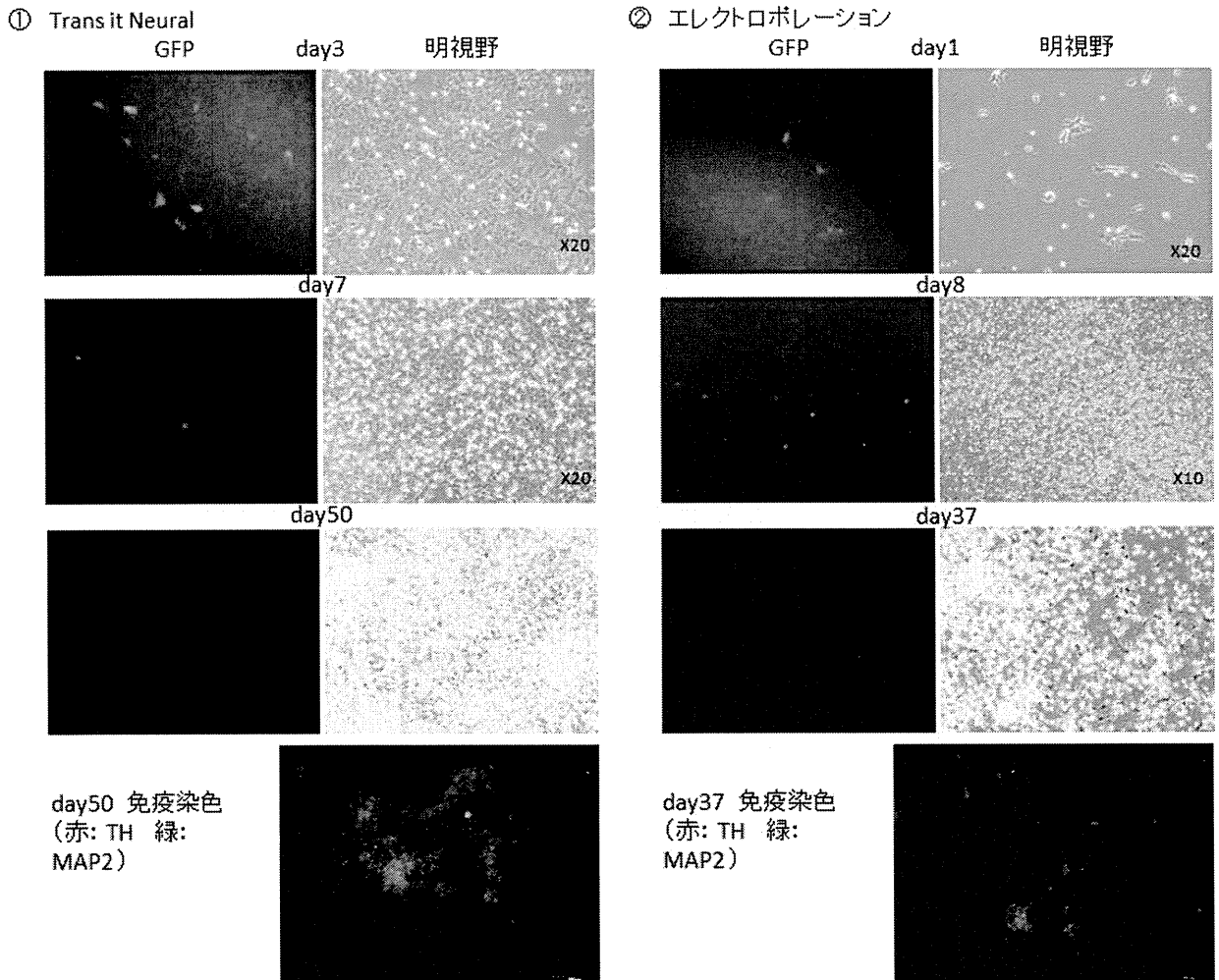
図 2. 最適な細胞外マトリックスの検討

(A) 各種細胞外マトリックスにおける分化後のニューロスフィアの形態。(B) ニューロスフィアの面積定量 (n=4)、LN511 からの有意差 (*, $P < 0.05$)。 (C) ニューロスフィアの半径定量 (n=4)、LN511 からの有意差 (*, $P < 0.05$)。

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



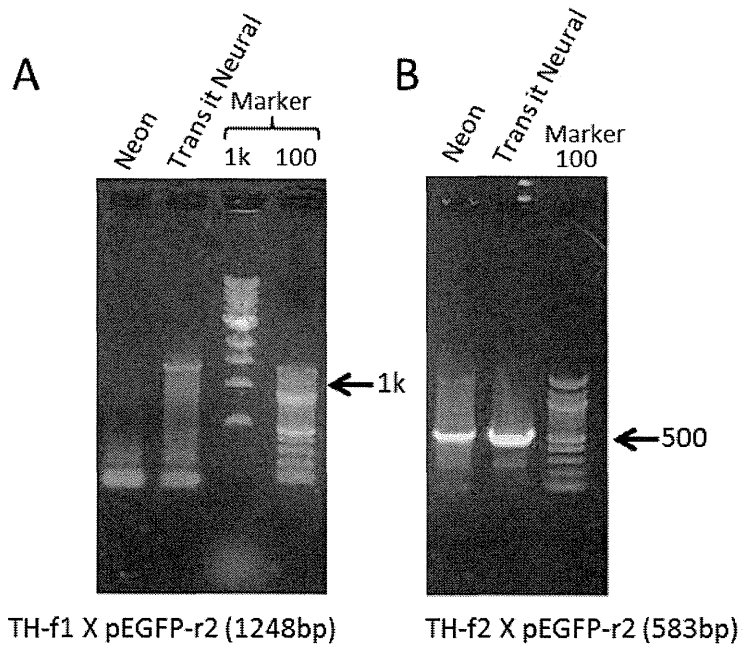
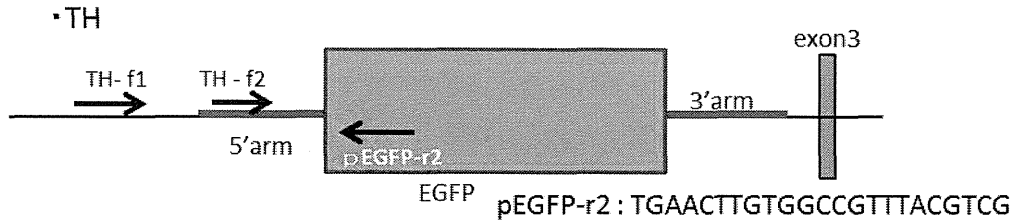
C 神経特異的タンパク質の免疫化学染色



(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構築のための情報解析パイプラインに関する研究

研究分担者

藤 淵 航

京都大学 教授

研究要旨

ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験技術を実現化する上で、重要となるデータの情報解析パイプラインの構築を行った。その結果、1) 多変量解析によるマーカー遺伝子の抽出、2) qRT-PCR 実験データのバッチノイズ除去、3) レプリカ交換法 10 並列によるベジアンネットワーク推定、4) サポートベクターマシン (SVM) による毒性推定、の一連のパイプラインを用いて予測率 97%以上の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「ヒト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ことを可能とする一連の高性能かつ実用に耐えうるインフォマティクス手法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、多種細胞からの大量な毒性試験データが産生された場合に最も必要となるハイスループットの毒性解析パイプラインの構築を目指し、qRT-PCR による ES 細胞測定値の産生から僅か1日で予測まで行うシステムの構築を目指した。

1) ES 細胞から多変量解析によるマーカー遺伝子の抽出

毒性化合物に対して十分な生物学的応答を行う遺伝子を抽出するため、ES 細胞において 10 化合物 (valproic acid, cyclopamine, phenytoin, methylmercury, acrylamide, benzo[a]anthracene, 3-methylcholanthrene,

benzo[a]pyrene, diethylnitrosamine, diethylstilbestrol) 及び 1 コントロール実験を用いて、Correspondence Analysis (CA; Benzécri, 1973) を行った。CA の原理については、図 1 に示した。実際には、R/Bioconductor の MASS ライブラリに含まれている `corresp` 関数を使用した。これにより、11 の固有値が得られ、それぞれから、以下の 4 つの基準を満たす遺伝子 10 個を選択した。

- i) signal detection P-value < 0.1 for three or more samples
- ii) encoded protein is a transcription factor
- iii) within the top 20 highest (or lowest for negative) weights in each principal component
- iv) abundantly expressed in hESCs, as determined by qRT-PCR analysis.

抜き出した 10 の遺伝子を図 2 に示した。

2) qRT-PCR 実験データのバッチノイズ除去

qRT-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。開発した手法は、R/Bioconductor の `limma` ライブラリに含まれている経験的ベイズ法に基づく線形回帰法を下記の方程式に基づいて行った。

$$g_i = \sum_j a_{i,j} G_{i,j} + \sum_k b_{i,k} B_{i,k} + e_i$$

ここで、 i , g_i , $G_{i,j}$, e_i は遺伝子番号、発現量、ケミカル効果、バッチ効果、ガウスノイズを示している。内部標準の 11 遺伝子、4 時間点、計 44 の遺伝子番号 i について、 j は 22 化合物 + 1 コントロール、 k は 10 プレートを表している。 $a_{i,j}$ と $b_{i,k}$ のそれぞれ 1 つは 0 でない値を取る。この式で推定された「バッチ効果」の項を元データより引き去ることでバッチ効果を軽減したデータが得られる。

図3にバッチノイズ除去を行う前、行った場合のデータ間の相関係数ヒートマップを示した。

3) レプリカ交換法 10 並列によるベイジアンネットワーク推定

ベイジアンネットワーク法による遺伝子ネットワーク推定を高速で安定に行うために開発した 8 コアのレプリカ交換 TAOgen アルゴリズムを用いたが、さらに初期値の依存を軽減するためこれを 10 並列でランさせて、最も高い尤度を示した解を使用した。レプリカ交換法とは、

$$r = \frac{f(T_l, B_l, S_l | g; C_{l+1})}{f(T_l, B_l, S_l | g; C_l)} \times \frac{f(T_{l+1}, B_{l+1}, S_{l+1} | g; C_l)}{f(T_{l+1}, B_{l+1}, S_{l+1} | g; C_{l+1})}$$

の式で表現されるように、 l 系列と $l+1$ 系列でそれぞれ事後確率 f を計算し、その比 r がある閾値より大きい場合にこの 2 系列を交換するものである。今回の r は random に $[0,1]$ の値を取った。

図4に推定された 22 化合物の遺伝子ネットワーク図を示した。

4) サポートベクターマシンによる毒性判定

サポートベクターマシンにはカーネルと呼ばれる非線形の空間にマッピングして予測を高性能化する核心の部分がある。今回のシステムでは、カーネルに線形だけでなく、幾つもの非線形カーネル (polynomial, RBF, EKM, Saigo, ME) を用いている。また、予測を公正に行うため、同じ化合物のデータは 2 リピートずつ測定しているが、片方だけを学習に用いたりせず、同じ化合物データは全て抜いて学習させる Leave-One-Chemical-Out-Prediction (LOCOP) を行っている。

図 5 に 3 化合物カテゴリーのリストとその濃度を示した。また、図 6 に遺伝子ネットワークを考慮した予測スキームを示した。また、図 7 に 3 化合物グループ (神経毒性、非

遺伝的発ガン性、遺伝的発ガン性) について予測を行った結果を示した。

(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、倫理面での問題はない。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。

また、今年度から開始された「倫理審査状況及び利益相反の管理について」の所属機関長からの書類を厚生労働大臣宛て提出している。

C. 研究結果

1) ES 細胞から多変量解析によるマーカー遺伝子の抽出

Correspondence Analysis を用いて 11 サンプルから既述した基準を用いて 10 遺伝子を各コンポーネントから正負の重みが高い 20 位以内から選択した (図 2)。これらの遺伝子は、*NANOG*, *SOX2*, *DMTF1*, *ZNF208*, *ADRM1*, *TRIB1*, *CRY1*, *SMAD7*, *SMAD6*, *VHL1* であった。それぞれを選択したコンポーネントでは、第 1 コンポーネントが最も多かった。それぞれの遺伝子で最初に現れたコンポーネントを考えると第 1~6 コンポーネントから選択されており、合理的な結果であると考えられる。

2) qRT-PCR 実験データのバッチノイズ除去

qRT-PCR は 96 well のプレートを用いて実験することが通常起こり、10 プレートを用いた毒性試験データは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るため、これを定式化しノイズレベルの係数を線形回帰した結果、生データとは異なる補正した数値データが得られた。これを元に濃度別の化合物間で総当たりの相関係数を比較して、補正前と比較した (図 3)。その結果、補正前と補正後では相関が減少する領域と増加する領域の両方が観測された。減

少しした部分はバッチ効果が数値の大部分を占めていたことによる擬似相関だったと考えられる。逆に相関が増加した部分は異なるプレート間で相関が減少していたのが補正されたと考えられる。この補正の効果は毒性カテゴリー予測にも影響し、qRT-PCR のみでの予測では、バッチノイズを除去した方がどのカテゴリーも予測が良くなっている（図7）。

3) レプリカ交換法 10 並列によるベイジアンネットワーク推定

レプリカ交換法を用いたことで最終的な尤度が安定した値を取るネットワークを推定していることが経時変化を視測することで得られている。10 サンプル毎にレプリカ交換を行い、20,000 回の交換を 10 並列で行って最も高い尤度となったネットワークを図4に示した。この結果からは、各毒性カテゴリーで顕著に保存されたネットワーク構造は発見できなかった。これは、各毒性カテゴリーという主観的な分類では遺伝子発現パターンを反映することにならないことを示唆している。換言すれば、毒性カテゴリーでは分類が粗いため、サブカテゴリーに分類することも考えられる。

4) サポートベクターマシンによる毒性判定

サポートベクターマシンのカーネル 6 種類について、10 遺伝子×4 時間点×5 濃度=200 の組み合わせで得られた数値データを特徴量のセットとした。特徴量を得るために使用した既知の化合物 20 種+未知 2 種とその濃度については、図5に示した。それぞれの化合物から得られた 200 の特徴量 (22 次元) をテスト化合物を抜いたデータセットで t 検定を行って特徴量のランク付けを行い、これを 1 つずつ増やしながら最高予測値を得た。また、10 遺伝子×10 遺伝子のエッジから得られる 100 の重みについても、先述した 200 特徴量に加えてから t 検定することで、特徴の選択を繰り返した（図6）。その結果、図7のような高予測率を得た。

D. 考察

遺伝子ネットワークを利用した生命現象の予測は幾つか報告がある（Chung et al 2007, Rapaport et al

2007）。Chung らの論文では、スペクトルクラスタリングに基づいてノイズを軽減する方法で予測率を改善している。また、Rapaport らの論文では、タンパク質相互作用ネットワークから小さなサブネットワークを作成しておき、そのサブネットワークにある遺伝子群の発現が乳がんと関連しているもの（マーカー）を抜き出すということで、単なる t 分布などのマーカー遺伝子選択による予測などに比べて異なるデータセットにもロバストな予測法となることが報告されている。

我々の手法は、単純に遺伝子発現データではなく、そこから遺伝子ネットワーク構造を推定し、そのエッジの重みを直接に SVM に用いる点が異なっている。これは、遺伝子のノイズを軽減したり、マーカー選択法を変更するのではなく、2 遺伝子間の関連性の変化をマーカーにしているため、構造情報を直接に取り込んでいることになると考えられる。

E. 結論

3 年間の研究を通じて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からのマルチプロファイリングデータから、ノイズを軽減し、ベイズ統計に基づくネットワーク構造の推定を迅速に行い、毒性物質の晩発影響を 97% 以上の高性能に予測することを可能とする実用に耐えうる一連のインフォマティクスパイプラインの開発を完成した。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, Sone H, Ohsako S, and Fujibuchi W. Prediction of developmental chemical toxicity by support vector machines with gene networks in a human embryonic stem cell validation system. (*Nucleic Acids Res*, submitted).
2. 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).

3. Akiyama H, Ueda Y, Nobumasa H, Ooshima H, Ishizawa Y, Kitahiro K, Miyagawa I, Watanabe K, Nakamura T, Tanaka R, Yamamoto N, Nakae H, Kawase M, Gemma N, Sekiguchi Y, **Fujibuchi W**, Matoba R. A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms, *Analytical Biochemistry*, 472: 75–83 (2015).
 4. Wong PS, Tanaka M, Sunaga Y, Tanaka M, Taniguchi T, Yoshino T, Tanaka T, **Fujibuchi W**, Aburatani S. Tracking difference in gene expression in a time-course experiment using gene set enrichment analysis. *PLoS One*, 9(9): e107629 (2014).
 5. 加藤有己、桜井都衣、**藤渕航** 「ヒト細胞からのビッグデータの情報管理と情報解析技術」ビッグデータの収集、調査、分析と活用事例（書籍）pp249-254 (2014).
 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（書籍）pp176-184 (2014).
 7. Pessiot JF, Kim H, **Fujibuchi W**. Pairwise Ranking Component Analysis. *Knowledge and Information Systems*, 36(2): 459-487 (2013).
 8. 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. *PLoS One*, 8(9): e73205 (2013).
 9. 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. *Systems Biomedicine*, 1(3): 1-7 (2013).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).
 14. Miura K, **Fujibuchi W**, Unno M. Review: Splice isoforms as therapeutic targets for colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 33(12): 2311-2319 (2012).
 15. Miura K, **Fujibuchi W**, Unno M. Review: Splice variants in apoptotic pathway. *Experimental Oncology*, 34(3): 212-217 (2012).
 16. 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).
 17. 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).
 18. 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).
 19. **藤渕航** 「マイクロアレイ解析の基本」、バイオ実験に絶対使える 統計の基本 Q&A（書籍）pp57-77 (2012).
- ## 2. 学会発表
1. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Tsuyoshi Kato, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, and **Wataru Fujibuchi**. Prediction of Developmental Chemical Toxicity by Support Vector Machines with Gene Networks in Human Embryonic Stem Cell

- Validation System, The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Biocience, 2015, January, Osaka.
2. Kunie Sakurai, Junko Yamane, Kenta Kobayashi, Koji Yamanegi, Takeaki Taniguchi, Yuki Kato and **Wataru Fujibuchi**. Stem Cell Informatics Database: a framework for a new repository on single cell assay data and diverse knowledge of human cells. GIW/ISCB-Asia 2014, December, Tokyo.
 3. **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.
 4. 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.
 5. Michihiro Tanaka, Junko Yamane, Kenichi Tanaka, Kenta Kobayashi, **Wataru Fujibuchi**, Bioinformatics resources for cell standardization at single-cell resolution, poster presentation at The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.
 6. 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 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.
 7. 【依頼講演】 藤渕航、iPS 細胞と元素周期表の密接な関係、第296回京都化学者クラブ、京都大学楽友会館、2015年、2月、京都
 8. 【招待講演】 藤渕航、幹細胞インフォマティクス、第6回平成26年度 HPCI セミナー「予測する生命科学・医療および創薬基盤」、産業技術総合研究所ゲノム情報研究センター、2014年、11月、東京
 9. 【招待講演】 **Wataru Fujibuchi**, "SHOGoiN DB: Insights into the new generation of human omics databases", Workshop: Cell-focused data: Integration, organization, and applications, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Germany, Nov. 2014.
 10. 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.
 11. 【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
 12. 【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
 13. 【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
 14. 【招待講演】 **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.
 15. 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.
 16. 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
 17. 【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
 18. 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
 19. 【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