

201428016A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 27(2015)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  
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にインフォマティクス技術開発ー  
(H24-化学-指定-006)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 27(2015)年3月

別添 1

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  
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  
(H24-化学-指定-006)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 27(2015)年 3 月



目 次

I. 総括研究報告書(別添 3)

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—

菅野 純 ..... 1

II. 分担研究報告書(別添 4)

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 ..... 67

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 ..... 117

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

相崎 健一 ..... 177

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 ..... 209

III. 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 5) ..... 277

IV. 研究成果の刊行物・別刷(別添 6) ..... 281

# 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  
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にインフォマティクス技術開発ー  
(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<sup>(\*)</sup> 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

(1) では、新型反復暴露<sup>(\*\*)</sup> が 2 種類の反応を遺伝子発現に及ぼすことが判明した。それは、過渡反応：暴露の都度に概ね 24 時間以内に収まる速い変化、及び、基線反応：暴露を重ねるに連れ、日を追って発現値の基線が徐々に移動する緩徐な反応である。平成 24 年度は四塩化炭素、平成 25 年度はバルプロ酸ナトリウムについて、単回暴露と新型反復暴露を比較解析し、過渡反応の振幅の増減と、基線反応の増減傾向が相関することを見出した。ただし四塩化炭素では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、バルプロ酸ナトリウムではそのような傾向は弱いという差異も認められた。本年度（平成 26 年度）はクロフィブレートにて同設計の新型反復暴露実験セットを行い、四塩化炭素と類似した基線反応関係を確認し、その上流に共通の分子機構が働いている強い可能性が示された。

(2) では、無処置野生型マウス全胚の胎生 6.25~9.75 日（12 時点）の網羅的トランスクリプトームデータを対象として、平成 25 年度で導入し、発生過程における代表的な遺伝子（Shh）のシグナルネットワークをモデルに最適化した手法を基にし

て、本年度は、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出する事を検討した。

(3) では、先行研究で開発したアルゴリズム、プログラムを基に、本年度は、マウスのみを対象としていた非 Percellome データの絶対量推定を、参照データベースに TGP の一部溶媒群データ(\*\*\*)を追加・拡充することにより、ラットにも拡大したほか、実験間の共通変動遺伝子を高速抽出するプログラム PercellomeExplorer の改良を進め、各化学物質に特異的な生体反応要素のハイスループット抽出解析を実現した。

(4) では、引き続き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、同時に開発したプログラムの Garuda(\*\*\*\*) 対応を進めた。本年度は遺伝子制御関係推定システムを Web-service の Inference cloud として提供できるように開発を行った。また、クラスタリングソフトウェア AGCT (A Geometric Clustering Tool) の Percellome データへの最適化や計算規模及び速度の向上を実施し、高速化を達成した。さらに Percellome データベースの、国際的なソフトウェアの共通基盤 Garuda Platform 上への実装を進め、そのソフトウェアを Garuda platform の一般公開バージョンとして配布を開始した。

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 4415079 号。

(\*\* ) 全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う。

(\*\*\* ) 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。

(\*\*\*\* ) 各種の生物学的研究ソフトウェアの Web 公開型統合プラットフォーム。

<http://www.garuda-alliance.org/>

研究分担者	相崎 健一 国立医薬品食品衛生研究所
北野 宏明 特定非営利活動法人	安全性生物試験研究センター
システム・バイオロジー研究	毒性部 第 1 室長
機構 会長	
北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所	研究協力者
安全性生物試験研究センター	Natalia Polouliakh ソニーコンピュータ
毒性部 第 5 室長	サイエンス研究所

## 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 :

平成 26 年度はクロフィブレート (Clofibrate; 分子量 : 242.7、Cas No. : 637-07-0、純度 98.0%、Enzo) 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 : 0.1%DMSO 含有 0.5%メチルセルロース水溶液)のクロフィブレートを、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) に肝を採取した。

単回暴露 ([0+1]) 時のクロフィブレートの投与量は 0、10、30、100 mg/kg とした。新型反復暴露である 14 日間反復暴露

( [14+1] ) 時のクロフィブレートの投与量は全例に対し 70 mg/kg、単回暴露は 0、10、30、100 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 で一晚浸漬し、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 (ライフテクノロジーズ・ジャパン社) 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、ビオチン化 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 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 sets) 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、ジゴキシゲニンでラベルした 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、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、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】

#### B3-1:参照データ

a) 遺伝子発現データ：Percellome プロジェクトで生成したマウスの遺伝子発現データ、及び TGP プロジェクトで生成したラットの遺伝子発現データを用いた。データ標準化(絶対量化)には Percellome 法を利用した。

b) 遺伝子のアノテーション情報：米 Affymetrix 社及び Gene Ontology Consortium、独 BIOBASE 社等が提供している情報を参照した。

#### B3-2:ソフトウェア作成に用いた開発言語及びコンポーネント

開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、Win32/64 開発は RAD (Rapid Application Development) 対応の Delphi ver.7 もしくは XE3 (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。Web アプリケーション開発には Delphi もしくは PHP、JavaScript を用いた。1 億件以下の小～中規模のデータベース処理に際して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の DBISAM (USA, Elevate Software, Inc.) を、一般的なグラフ描画には TeeChart (Spain, Steema Software SL) を利用した。また WebAPI の構築には DataSnap (USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。

#### B3-3: データ解析計算

主たる計算は独自に開発したプログラム

により実施した。検証は必要に応じて Excel (USA Microsoft Corporation) や R 言語 (オープンソース R Development Core Team) で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確認した。

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実施した。

### (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、システムバイオロジーをトキシコロジーに応用する研究であり、従来の手法ではとらえきれなかったネットワークを基盤とした毒性の理解を可能とする。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いかに集約するかに関する研究、そして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。この研究は、以下の項目に区分できる：

(4-1) 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

(4-2) 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

(4-3) 大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究

(4-4) Garuda Platform とその関連ソフトウェアの研究開発

#### 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

Percellome や多くの研究で利用されている遺伝子発現データを利用し、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研究を行う。現在、遺伝子発現データからのネットワーク抽出の研究は多く行われているが、その精度は高くない。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、これらの現存手法より、精度の高い手法を開発した。本研究では、この手法をさらに改良し、より精度の高いものに改良する。

#### 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

システム毒性学で重要なことは、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」されてしまうかを理解すること (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できるということ (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 で実現する。この研究項目では、ネットワークを制御することができ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。

#### 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。すでに我々は、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。この蓄積から、次のステップとして大量に存在する文献などの情報を、知的に集約し、モデル構築を行う研究手法などを提示し、可能な範囲で自動的にモデルを構築する情報を抽出する手法の開発が必要である。この研究項目では、このプロセスに関する研究とそのコンセプトを実証するソフトウェアの試作を行う。

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

本研究で開発される手法を実装するソフトウェアや Percellome などは、国内外の幅広い研究者に利用されることで、トキシコロジーに関連する研究の発展とその成果の利用を促進する必要がある。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 をトキシコロジーの分野へと応用することを可能とする一連の開発と普及・啓蒙を行う。

従来の手法では捕え切れなかったネットワークを基盤とした毒性の理解を可能と

するために、生体活動をシステムとして把握するシステムバイオロジーをトキシコロジーに応用した「システムトキシコロジー」解析基盤を開発する。その成果をライフサイエンスソフトウェアの国際的共通基盤（Garuda Platform）を介して国内外の研究者に提供し、国際的な研究活動を促進する。

### 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. 研究結果

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】

本年度はクロフィブレートについて、先行研究における四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウムの実験と同様の新型反復暴露実験を行い、[0+1]、[1+1]、[2+1]、[4+1]、及び[14+1]の5通りの反復投与期間の長短による過渡反応と基線反応のそれぞれの

推移と両反応の関連性の解析を肝について進めた。

過渡反応の有無（最終日の投与の影響の有無）に関わらず、約4,000の遺伝子に、有意な基線反応が認められ、うち1,700遺伝子に1回から14回反復に亘り基線の低下が認められた。この遺伝子群は既知遺伝子情報（IPA）により、ある特定の経路を構成する遺伝子を高率に含んでいることが判明した。また、過渡反応が基線反応の影響を受けるものと受けないものが混在していることが示された。

さらに3年間の研究を通じ、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレート の3化学物質の解析結果を総合し、基線反応と過渡反応の組み合わせによる遺伝子リストを完成させ、その経時的な変動を調節する上下流の遺伝子発現ネットワークを明らかにし、慢性毒性の分子背景の解明を進めた。その結果、①基線反応の強い抑制を示す遺伝子群の発現を支配する上流遺伝子群が3物質に共通していることが明らかになった事、②その更なる上流の候補遺伝子が単回投与から数個示唆された事、③新型反復暴露実験による過渡反応遺伝子群と基線反応遺伝子群の重なり具合が、化学物質固有であることから、この重なりの内容が反復毒性の予測に重要である可能性が示唆された事、が成果としてあげられた。

#### （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、発生過程において重要なマス

ター遺伝子は一般的に、この期間中に一過性、即ち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。  
胎児発生過程における遺伝子発現については、自律的な遺伝子発現が多く認められる為、遺伝子発現シグナルの流れを解析するのに適しているが、活発な細胞増殖や多様な細胞分化が同時並行で起こるため、従来技術では要素分析が困難であった。

そこで平成 25 年度に、微分解析（発現変動波を一階微分及び二階微分すること）で発現変動基点及び発現ピークの時点を設定する技術を開発し、モデルとして当初より採用している Shh 遺伝子シグナルネットワークに着目して最適化した条件設定及び抽出パラメータを基に、平成 26 年度は、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出する事を検討した。

無処置野生型マウス全胚の胎生 6.25～9.75 日（12 時点）の網羅的トランスクリプトームデータを対象に、全ての遺伝子発現変動につき、解析ソフト SeekESP\_s.exe を用いて、発現変動起点ごとに自動抽出後（発現変動起点における発現コピー数が 0.3 以上のものを選択）、目視により生物学的変動と考えられる 2,218 ps を抽出した。この目視の過程で、2,218 ps の内、胚採取開始時点である胎生 6.25 日において、多くの遺伝子（2,166 ps）の発現が認められる事を見いだした。また、発現のピークが単一の 1 峰性のものと、ふたつである 2 峰性のものに分類できる事が明らかとなっ

た。2 峰性の発現変動を示す遺伝子の場合、はじめの発現変動と次の発現変動とが重なり、境目が不明確となり、次の発現変動起点がどの時点となるのか定めることはできなかった。そこで本解析では、2 峰性の発現変動を示す遺伝子は選択せず、1 峰性の発現変動を示す遺伝子（60%、1,323 ps）について検討を進めた。具体的には、胎生 6.25 日において発現が認められない遺伝子の内、1 峰性を示す遺伝子は 47 ps、2 峰性を示すものは 5 ps、他方、胎生 6.25 日において発現が認められる遺伝子の内、1 峰性を示すものは 1,244 ps、2 峰性を示すものは 922 ps であった。この内、一例として、胎生 6.25 日での発現の有無に関わらず 1 峰性を示す遺伝子につき、発現変動起点ごとに抽出される遺伝子数を記載すると、胎生 6.50、6.75、7.25、7.50、7.75 及び 8.25 日ではそれぞれ、3、7、239、837、209 及び 28 ps となった。

### （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】

平成 26 年度は、マウスのみを対象としていた非 Percellome データの絶対量推定をラットにも拡大適用した。具体的には、医薬基盤研トキシコゲノミクスプロジェクト（TGP）のラットデータを利用し（TGP の発足時研究計画を当研究者らが Percellome 法を基軸に設計したため、そのデータは絶対量化が可能。ただし TGP では Percellome 法適用に必要な品質管理を行っていなかったため、溶媒群データを中心に Percellome 計算ソフトウェア SCal4 による品質チェックを行い、明らかな外部スパイク RNA 添加

ミスなどの大きな問題が無い 2072 枚の GeneChip データのみを収集した)、これらを Percellome 法により絶対量化し、SnCalc 参照データベースに追加・拡充することにより、ラットに於いても非 Percellome データの絶対量推定が可能となった(ただし、適用は TGP データと同様のトランスクリプトーム分布を有するデータに限定される)。また実験間の共通変動遺伝子の抽出など、多数の化学物質暴露データを用いた複雑な集合計算を簡便に行うためのソフトウェア PercellomeExplorer の改良を進め、各化学物質に特異的な生体反応要素のハイスループット解析を実現した。

#### (4) システムトキシコロジー解析基盤の研究開発【北野】

遺伝子制御関係推定アルゴリズムについては、複数の計算手法の組み合わせを利用するに当たって、データに応じた適切な手法の選択が重要である。そこで我々は、データの全体的な特徴で利用するアルゴリズム群を決定し、個別の因果関係に関して各々の手法からの推定信頼度を参照して、最終的な推定ネットワークを構築する方法を開発した。すなわち、データの特徴分析から、そのデータの解析に最適なアルゴリズム群を決定する段階と、そこで選択されたアルゴリズム群の推論結果から、同じデータにおいても推定信頼度が変わる側面を捉え、最も信頼度の高い相互作用の推定結果を集約する段階の 2 段階を経るものである。また、これらの成果は、Inference cloud という Web-Service の形で実装し、オンライン上で利用可能な形態にした。

状態制御遺伝子群推定アルゴリズムについては、事例としてプリオン病のデータを利用した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。ここでは、上で開発された遺伝子制御推定システムの推論結果をもとに、ネットワーク制御推定アルゴリズムを適応してその効果を確認するとともに手法の改良を行った。特に大規模なネットワークを扱うことを考慮して、個別遺伝子の制御可能性の推定に加え、多くの遺伝子を群として扱い、その遺伝子群の関係において制御可能性を推定するという手法を開発した。これにより、従来より大規模なネットワークの制御可能性の解析が可能となった。

さらにプロモーター領域の解析も付加するシステム SHOE を開発し、ゲノムデータの裏付けを基に制御ネットワークの推定を行うシステムも開発した。この過程において、全データからの用量選択、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加え、より正確な状態制御推定を可能とした。

大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究に関しては、文献情報からパスウェイ構築を効率化するために、パスウェイエディタ CellDesigner を改良し、パスウェイの各パスをモジュール化して扱えるように、グラフィックデータベースにモデルを格納する Ver. 5 の試作を行なった。この結果、大量データを扱う際の実行速度や安定性など



が向上した。

Garuda Platform は、国際的に非常に高い評価を得ており、普及は予想以上に順調に進んでいる。実際に、武田薬品工業株式会社が、2014 年度から導入するなど、普及が加速している。また、日本や欧州の製薬会社、化粧品会社、食品会社が強い興味を示しており、本研究のインパクトは大きいと考えられた。

#### 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、今年度は高脂血症治療薬として使用されているクロフィブレートについて、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウムと同様の実験を行った結果、反復暴露により基線の低下が認められた遺伝子群が属する遺伝子発現経路群は四塩化炭素のそれと酷似していることが確認された。他方、過渡反応については、四塩化炭素が基線反応の影響を強く受けたのに対し、クロフィブレートの過渡反応は基線反応の影響を受けないものの比率が多かった。

今後、慢性毒性の理解のための過渡反応と基線反応の分子機序解明に、特徴的な基線反応と過渡反応の両極端のパターンを示す四塩化炭素とバルプロ酸ナトリウム、その中間的な反応を示すクロフィブレートの三者の所見の差異を利用し、基線反応を引き起こす上流機構、転写制御領域の解析、基線反応と過渡反応の連鎖・非連鎖の分子基盤、等を分担研究者の協力のもとに推進する。また、単回暴露実験の結果の中から、反復暴露時の基線反応と過渡反応と

連関する、即ち、予測に使用可能な、所見の存否を明らかにする。

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おいては、微分関数の利用による発現変動基点及び発現ピークの時点を同定する技術を利用し、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的にシグナルネットワークを推定する事を検討した。自動抽出後の目視による検索の結果、発現のピークが1峰性のものと、2峰性のものに分類できる事が明らかとなったので、自動抽出と目視を組み合わせることで2回目のピークも含めたより網羅的な検索が実施できたものとする。1峰性を示す遺伝子につき、発現変動起点ごとに抽出される遺伝子数を検討した結果、発現変動起点が胎生 7.50 日に存在する遺伝子数が最も多い結果となった (Shh 遺伝子も含まれる)。この時期は中胚葉誘導や器官形成が活発な時期であり生物学的に妥当と考えられる。今後、2峰性を示す遺伝子の二つの発現変動起点の扱い方を確立しつつ、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ることで、発生初期過程に絡むシグナルネットワークの網羅的描出を計る。

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、新規アルゴリズムの開発や既存ソフトウェア、データベースの改良を行い、3年間を通じて、性能向上や適用範囲の拡大(汎用化)を実現した。特にマウスデータだけでなくラットデータにも解析対象を広げたこ

と、非 Percellome データについても絶対量推定がある程度の精度をもって可能になったことは、Percellome 技術の普及、利用拡大を推進し、以てトキシコゲノミクス研究の発展に寄与するものと期待される。また Percellome Explorer による共通要素や特異的要素の解析の効率化は、比較解析作業を補助し、シグナルネットワーク研究に役立つものと期待される。

システムトキシコロジー解析基盤の研究開発では、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 は、今後極めて重要なプロジェクトに成長すると考えられ、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者にとっても、重要な Platform であるとの認識が広まっている。この Garuda Platform にシステムトキシコロジー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える。

## E. 結論

本研究は 3 年間を通じ、ほぼ計画通りに進捗した。

平成 24 年度に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の基本的な関連性を見だし、平成 25 年度にバルプロ酸ナトリウム、平成 26 年度にクロフィブレートで、同様の解析を実施

し、大筋での同様の所見、及び、化学物質特有の所見を得た。この過渡反応と基線反応に関する知見は生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクス等の機序の関与が示唆されることから、これを明らかにすることは、反復毒性の分子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測法を開発するにあたり重要と考える。これらの研究成果は、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ものである。

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発現変動基点及び発現ピークの時点に着目する微分関数を利用した解析手法の開発と解析を進め、すでに Shh 遺伝子シグナルネットワークをモデルに、発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を網羅的に抽出が出来る事を報告したが、効率的に発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を抽出し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出し、信頼性と効率の向上と共に、応用範囲の拡充を目指す。

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、研究計画通りソフトウェア、データベースの改良・拡張を進め、網羅的遺伝子発現解析の効率向上を実現している。また初年度（平成 24 年度）に構築し、以来インターネット上で一般公開している Percellome WebAPI の提供により、Garuda 経由を中心に

Percellome データベースの利用が拡大しつつあり、引き続きサービスの継続や機能向上が求められている。

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研究については、システムバイオロジーを毒性学に応用しようとするものであり、そのために一連の方法論とソフトウェアを開発し、応用することにより、計画通り性能向上や機能拡張が進んだ。現在、この目標に対して、順調に展開している。すでに幾つかのソフトウェアが、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適用例を作る事や普及などの展開にも力を入れ、実用レベルでのシステム開発と世界的な普及に注力する計画である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR $\gamma$  signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development*. (2014);141(11):2260-70.

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. *Genomics*

*Data* 2: 296–298, 2014.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*. (2014);124(7):3061-74.

Maria Marti-Solano, Ewan Birney, Antoine Bril, Oscar Della Pasqua, Hiroaki Kitano, Barend Mons, Ioannis Xenarios and Ferran Sanz. Integrative knowledge management to enhance pharmaceutical R&D. *Nature Reviews Drug Discovery*. 13, 4, 239-240, Apr. 1, 2014.

Yoshiyuki ASAI; Takeshi ABE, Hideki OKA, Masao OKITA, Ken-ichi HAGIHARA, Samik GHOSH, Yukiko MATSUOKA, Yoshihisa KURACHI, Taishin NOMURA, Hiroaki KITANO. A Versatile Platform for Multilevel Modeling of Physiological Systems: SBML-PHML Hybrid Modeling and Simulation. *ABE Advanced Biomedical Engineering*. 3, 50-58, May 17, 2014.

Tokiko Watanabe, Eiryu Kawakami, Jason E. Shoemaker, Tiago J.S. Lopes, Yukiko Matsuoka, Yuriko Tomita, Hiroko Kozuka-Hata, Takeo Gorai, Tomoko Kuwahara, Eiji Takeda, Atsushi Nagata, Ryo Takano, Maki Kiso, Makoto Yamashita, Yuko Sakai-Tagawa, Hiroaki Katsura, Naoki Nonaka, Hiroko Fujii, Ken

Fujii, Yukihiro Sugita, Takeshi Noda, Hideo Goto, Satoshi Fukuyama, Shinji Watanabe, Gabriele Neumann, Masaaki Oyama, Hiroaki Kitano, and Yoshihiro Kawaoka. Influenza Virus-Host Interactome Screen as a Platform for Antiviral Drug Development. *Cell Host & Microbe*, 16, 6, 795-805, Dec.10, 2014.

Jablonska Agnieszka and Natalia Polouliakh In silico discovery of novel transcription factors regulated by mTOR pathway activities. *Frontier in Cell and Developmental Biology* ISSN: 2296-634X, DOI:10.3389/fcell. 2014.00023 Vol:2 No.23 June 3, 2014.

## 2. 学会発表

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014)(2014.9.9) Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

Satoshi KITAJIMA and Jun KANNO. Progress of Percellome Toxicogenomics Project

2014 Spring International Symposium of Korean Society of Toxicology. Samsung Convention Center, Seoul National University, Seoul 2014-05-23. Oral, invited.

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学—Percellome トキシコゲノミクスの進捗—、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25) 東京、シンポジウム 口演

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス—化学構造が異なる 3 物質の比較—、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.3) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗—新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析—、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2) 神戸、シンポジウム 口演

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、毒性の網羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日本毒性学会学術年会(2014.7.2)神戸、シンポジウム 口演

Jun Kanno, Progress in Japanese Percellome Project and incorporation of TGP data, 11th International Conference

of Environment Mutagens (11th ICEM), (2013.11.4) , Fos do Iguassu, Brazil, invited

Kitano, H. Frontiers of Systems Biology and Software Platform. Presentation at L'ORÉAL, L'ORÉAL Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France, Apr. 22, 2014. (invited)

Kitano, H, Multiscale disease systems modelling. 7th Noordwijkerhout Symposium on Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Systems Pharmacology: "SYSTEMS PHARMACOLOGY IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT", NH Conference Centre Leeuwenhorst, Noordwijkerhout, the Netherlands, Apr. 24, 2014. (invited)

北野宏明. システム毒性学の戦略とプラットフォーム技術. 第41回日本毒性学会学術年会 シンポジウム: 毒性オミクスー遺伝子発現ネットワークを標的とした、治療、毒性、及びそれらの評価の新動向ー, 神戸国際会議場, July 2, 2014. (invited)

Ghosh, S.; Kitano, H. Garuda: Fly to the future of biology. ISMB 2014, John B. Hynes Memorial Convention Center, Boston, USA, July 14, 2014.

Kitano, H. Systems Drug Discovery and Software Platform. Unlocking unique clinical research roadmaps using a

systems approach, ICSB 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Sep. 15, 2014.

Kitano, H. Systems Biology and Applications. ICSB 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Sep. 16, 2014. (invited)

Kitano, H. Garuda Platform: An integrated software solution for data-driven medical sciences. World Health Summit 2014, Federal Foreign Office, Berlin, Germany, Oct. 20, 2014. (invited)

## G. 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

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)

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

TTG4 菅野班 H26年度 総括 2012-02-13 version

1



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(3Rにも貢献)

2