

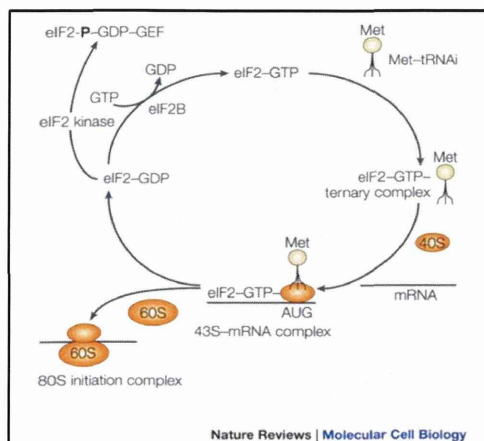
● 基線反応のメカニズムに、『エピジェネティックな制御』を想定

基線反応が低下した化合物

- 四塩化炭素
- クロフィプレート
- トリブチル錫

低下した遺伝子のリストが共通であった。

- eIF2回路/ 酸化的リン酸化/ ミトコンドリア
- 上流にRICTOR/ HNF4A

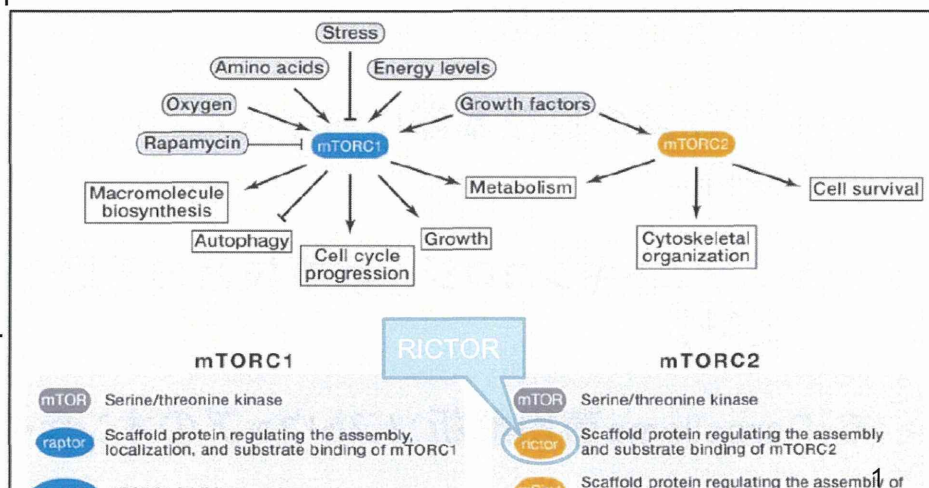


Cell

mTOR Signaling in Growth Control and Disease

Mathieu Laplante^{1,2,3,4} and David M. Sabatini^{1,2,3,*}

¹Whitehead Institute for Biomedical Research, Nine Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, USA
²Howard Hughes Medical Institute, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA
³Koch Center for Integrative Cancer Research at MIT, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA



厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

まとめ

- 反復投与によるB-ResとT-Resの関係、B-Resの誘導機構に関して、共通的分分子メカニズムの存在が示唆された。
- Eif2 → RICTOR
- 組み合わせデータからのネットワーク抽出を加速する。
- 数日反復暴露による慢性影響の高精度予測の可能性が視野に入りつつあると考える。

申請研究の課題

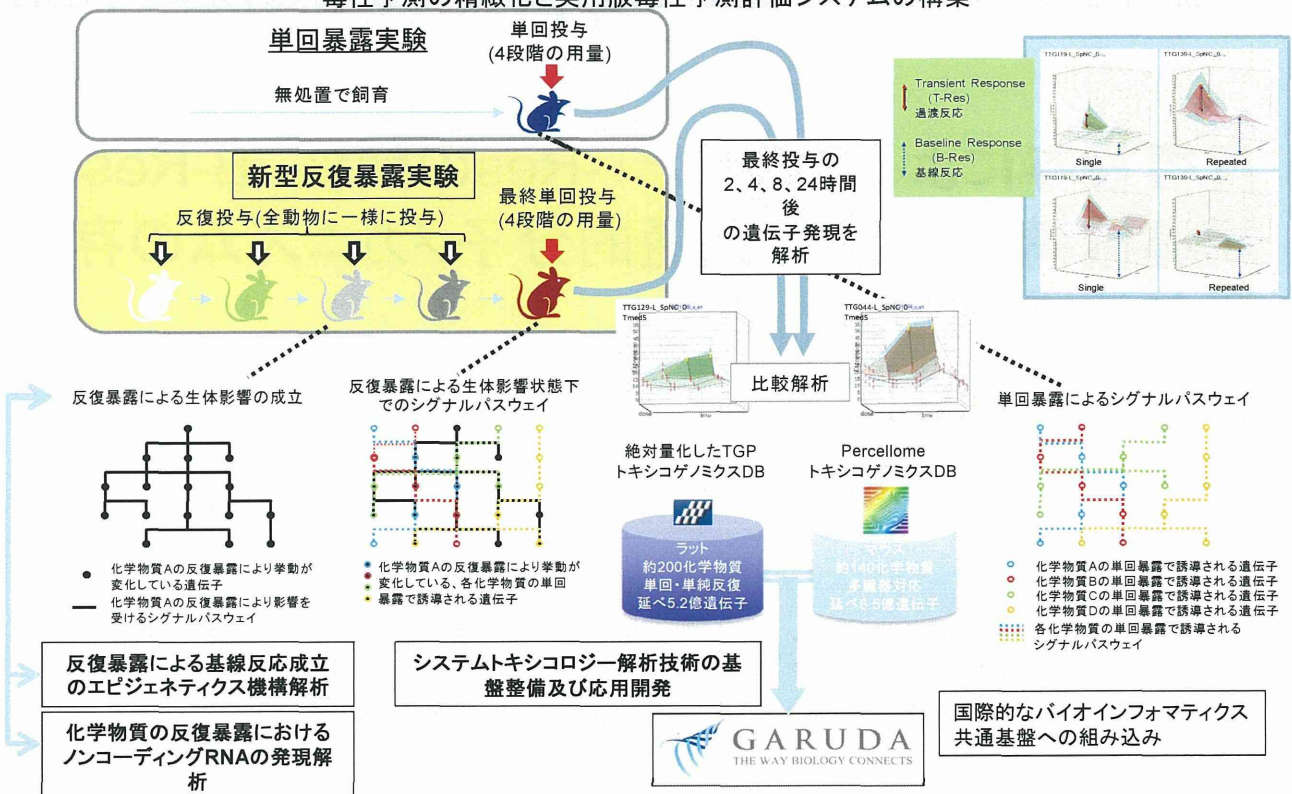
- (1) 短期間反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発 【菅野】
- (2) 化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析 【北嶋】
- (3) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディングRNAの発現解析 【相崎】
- (4) システムトキシロジー解析技術の基盤整備及び応用開発 【北野】
- (5) Percellome専用解析ソフトウェアのオンライン化促進 【相崎】

3

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

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

— 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 —



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、化学物質の毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進める

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

4

(1) 短期間反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発【菅野】

「新型反復暴露」

反復+単回

「過渡反応」

「基線反応」

①A+A実験

②A+B実験

フェノバルビタール(pb)

アセトアミノフェン(aa)

サリドマイド(th)、

五塩化フェノール(pcp)、

5-FU(5fu)、

アセフェート(acp)、

バルプロ酸(vpa)、

四塩化炭素(ccl)

	反 復		単 回
H27	フェノバルビタール(pb)	→	フェノバルビタール(pb)
	アセトアミノフェン(aa)	→	アセトアミノフェン(aa)
	5-FU(5fu)	→	サリドマイド(th)
	五塩化フェノール(pcp)	→	バルプロ酸(vpa)
H28	サリドマイド(th)	→	サリドマイド(th)
	五塩化フェノール(pcp)	→	五塩化フェノール(pcp)
	五塩化フェノール(pcp)	→	バルプロ酸(vpa)
	アセトアミノフェン(aa)	→	五塩化フェノール(pcp)
H29	5-FU(5fu)	→	5-FU(5fu)
	アセフェート(acp)	→	アセフェート(acp)
	未定*	→	未定*
	未定*	→	未定*

*: 前年度までの結果に基づき決定

5

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

(2) 化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析【北嶋】

(3) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディングRNAの発現解析【相崎】

●DNAメチル化とヒストン修飾解析を反復暴露マウス肝に実施。

●ノンコーディングRNAの解析を反復暴露マウス肝に実施。

H27年度: 四塩化炭素(先行研究データあり)。

H28年度: 基線反応の著しかった物質。

H29年度: 3年間で、基線反応の著しかった物質。3年間のデータを統合解析。

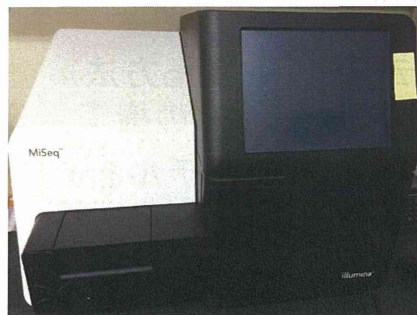
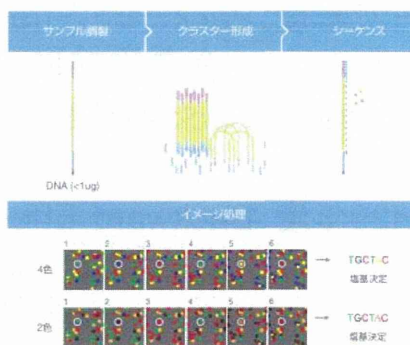


図1: 4色および2色チャンネルを使ったSBSテクノロジーのイメージ検出と塩基決定



4色チャンネルのSBSでは、塩基ごとに異なる蛍光色素を採るため、4つのイメージが必要です。対照的に、2色チャンネルのSBSでは、2つのイメージだけで4つの塩基を決定することができます。

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

次世代シーケンサによるnon-coding RNAおよびepigenetics解析

～ 反復暴露影響へのncRNA、epigeneticsの関与を解析する。

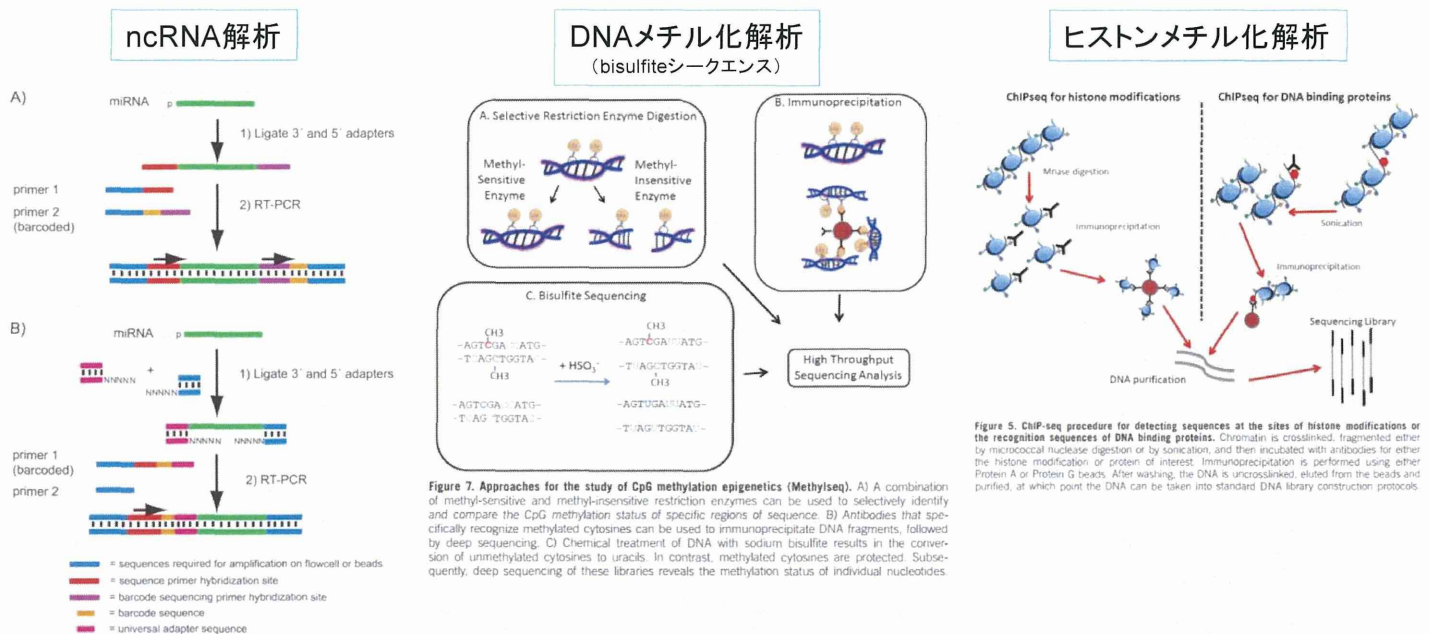


Figure 7. Approaches for the study of CpG methylation epigenetics (Methylseq). A) A combination of methyl-sensitive and methyl-insensitive restriction enzymes can be used to selectively identify and compare the CpG methylation status of specific regions of sequence. B) Antibodies that specifically recognize methylated cytosines can be used to immunoprecipitate DNA fragments, followed by deep sequencing. C) Chemical treatment of DNA with sodium bisulfite results in the conversion of unmethylated cytosines to uracils. In contrast, methylated cytosines are protected. Subsequently, deep sequencing of these libraries reveals the methylation status of individual nucleotides.

Figure 5. ChIP-seq procedure for detecting sequences at the sites of histone modifications or the recognition sequences of DNA binding proteins. Chromatin is crosslinked, fragmented either by micrococcal nuclease digestion or by sonication, and then incubated with antibodies for either the histone modification or protein of interest. Immunoprecipitation is performed using either Protein A or Protein G beads. After washing, the DNA is uncrosslinked, eluted from the beads and purified, at which point the DNA can be taken into standard DNA library construction protocols.

Figure 3. Library preparation workflow for miRNA-seq. A) The Illumina workflow ligates a 3' adenylated DNA adapter to the 3' end of miRNA in a total RNA sample. Then, an RNA adapter is ligated to the 5' end of the miRNA. The double-ligated products are RT-PCR amplified to introduce barcodes for multiplex applications and generate sequencing libraries. The first read sequences the insert miRNA, a second and separate sequencing read is necessary to sequence the barcode. B) Ion Torrent's workflow uses an RNA ligase to attach 5' and 3' adapters composed of hybrid RNA-DNA duplexes. An RT-PCR reaction amplifies the sample and introduces the barcodes to the library construct. In this method, the barcode and the miRNA insert are sequenced in a single read.

7

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

(4) システムトキシコロジー解析技術の基盤整備及び応用開発【北野】

構築済みの生体内分子相互作用ネットワークを大規模データから推定する方式を基盤に、

- 毒性アウトカムに関連するモデルを構築し、その挙動を予測する技術と情報基盤群の開発を行う。
- Adverse Outcome Pathway(AOP)を生理学的変化の誘発過程を概念化したネットワーク化知識体系として定義し、分子間相互作用ネットワークモデルと連動、分子レベルや遺伝子レベルのモデルでの予測をAOPレベルに連関させる。
- 今までの成果を統合運用し、実用的なGaruda Systems Toxicology Terminalを開発

H27年度: Backward Effect Analysis手法(毒性アウトカムから原因に遡る方法)の基礎検討、プロトタイプ開発、及びAOPモデルDRAFT1.0の構築。

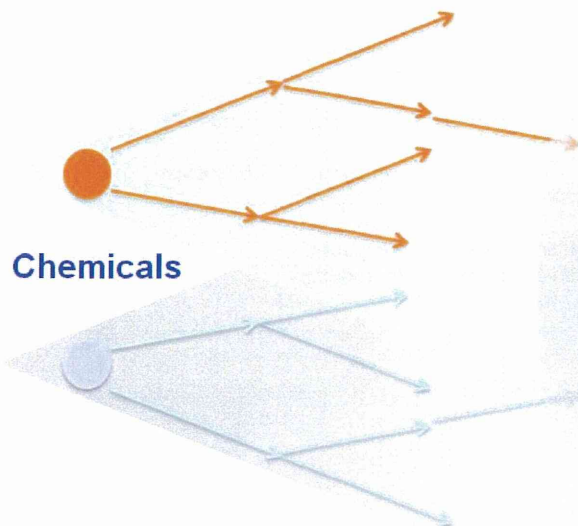
H28年度: Backward Effect Analysisのモデル適用と検証、及びAOPモデルと分子ネットワークモデルの統合。

H29年度: Backward Effect AnalysisとForward Effect Analysis(化学物質からその影響を予測する方法)の統合、及びAOPモデルと分子ネットワークモデルの統合、改良版の開発。

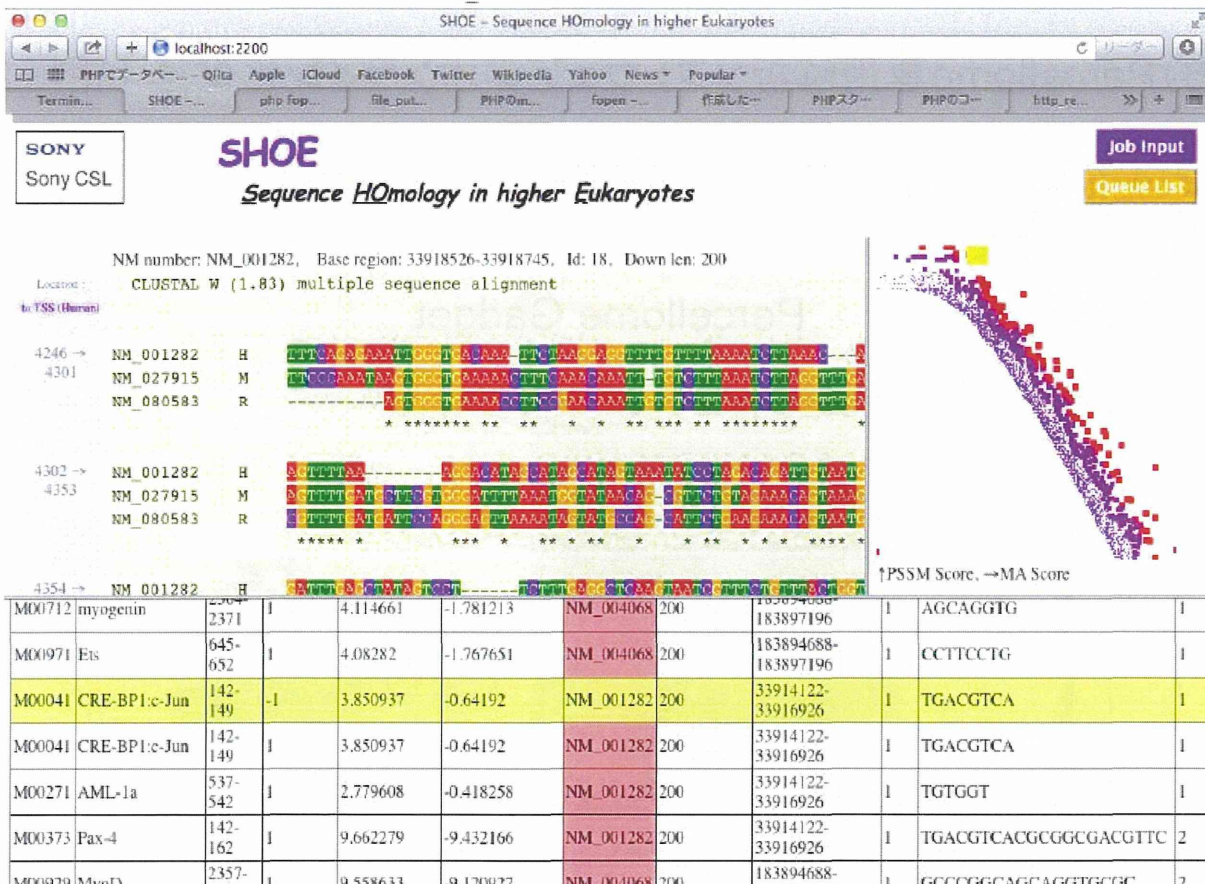
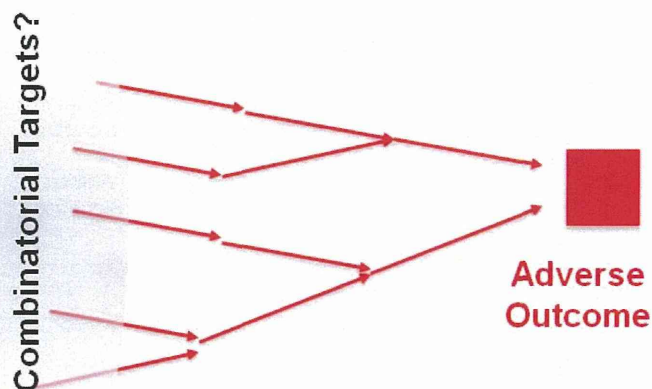
1

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

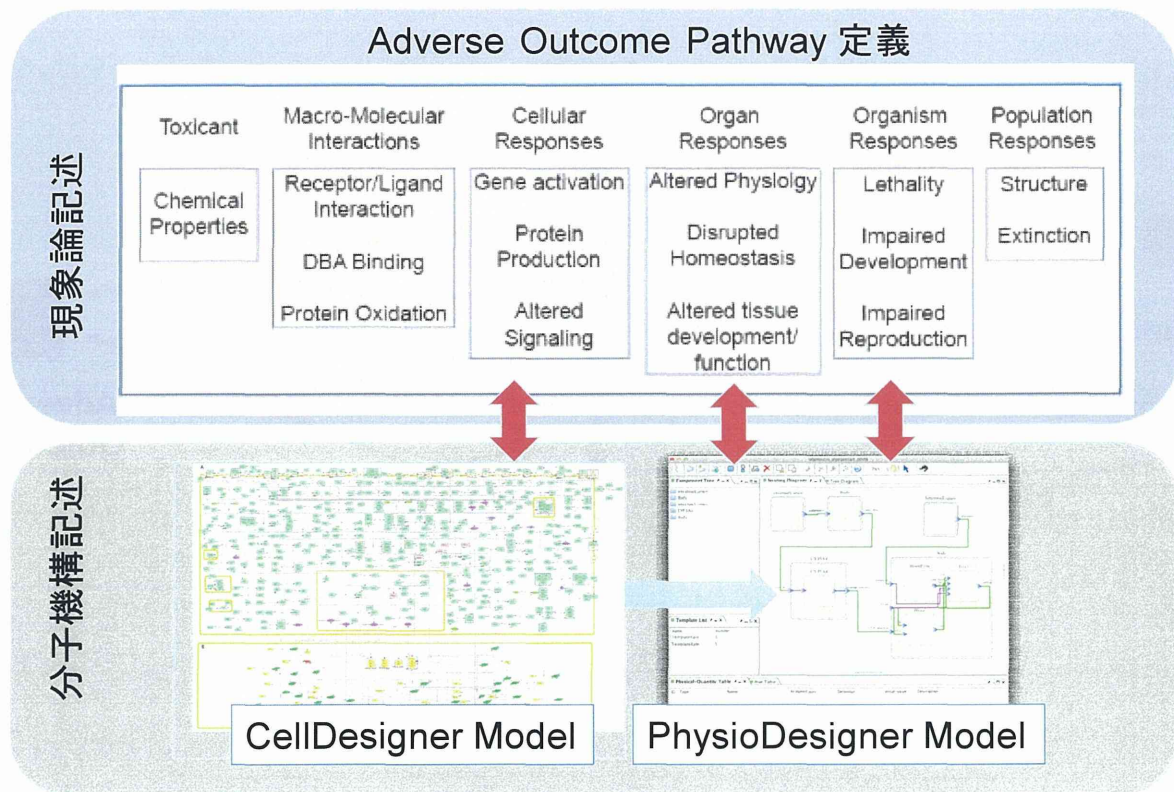
Forward Effect Analysis



Backward Effect Analysis



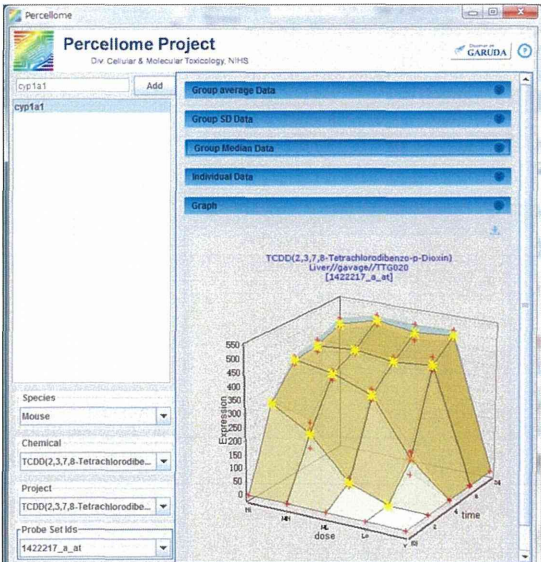
Integration with APO

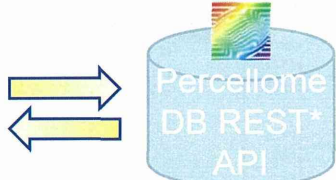


(5) Percellome専用解析ソフトウェアのオンライン化促進【相崎】

上記(4)の進捗に応じ、ソフトウェアの拡張とGarudaシステムを念頭に置いたオンライン化を促進。

Percellome Gadget



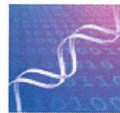
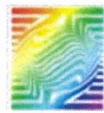
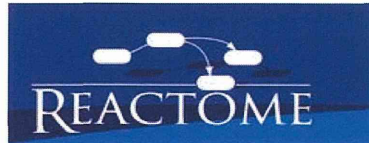
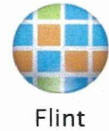


Percellome DB REST API

*REST
ハイパーメディアシステムのためのソフトウェアアーキテクチャのスタイルのひとつ

API
アプリケーション(ユーザのプログラム)がOS等の公開機能を使うためのインターフェース。

Garuda Alliance



6

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

事後評価コメント(1)

学術的観点

- 特許取得により、大勢の研究者が同様の研究をする場合に、使用できなくなる心配は無いのでしょうか。
防衛特許の意味合いが強く、むしろ、周知していただき、少なくともアカデミアには無償で使っていただく考えです。
- 反復暴露影響の解析において四塩化炭素とバルプロ酸を選択した理由がわからない。特に前者は代謝変換物等の活性も考慮せねばなくなる。
代謝については、経費と人的制限から、実施してきていないが、重要性は認識はしており、今後検討したい。現在まで、時間経過とともに遺伝子発現プロファイルが変化する際に、その上流遺伝子を追跡することで、間接的に代謝過程の概要が把握可能となりつつある。
四塩化炭素は、計画開始当初に肝障害のモデル物質の一つとして検討リストに入れたのが始まりである。単回暴露時のデータを解析した結果、代謝を介さないとされる早期の反応が認められるとともに、全く異なる機構によると考えられる反復暴露時の強力な作用が認められている。経時的に、酸化ストレス応答、代謝酵素、トランスポータ、等が観測され、間接的に状況が把握されつつある。今後、代謝との関係を詰めてゆきたい。
バルプロ酸は、反復投与される薬剤で肝機能障害が報告される、低分子の多標的物質であり、また、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤とも謳われていることから、多標的物質の一つとして検討リストに入れたものである。真標的物質としては、ダイオキシンなどの既知受容体のリガンド分子を用意した。
バルプロ酸は、単回と反復での差が殆どない、という特異的な性質を有していたため、四塩化炭素とは対照的な物質である点で、検討を継続しているものである。
- (1)の反復暴露の研究において、薬物代謝の変化による、血中濃度、組織濃度への影響を調べる必要があった。
前述のごとく、代謝に関わる測定については、経費と人的制限から、実施してきていないが、重要性は認識はしており、今後検討したい。経時的な遺伝子発現プロファイル変化が、上流遺伝子→代謝酵素誘導を明確に示す場合があり、間接的に代謝過程の概要が把握可能となりつつある。解析の結果、薬剤代謝測定が必須であると考えられた際には、今後、検討した。

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

7

事後評価コメント(2)

- 当然かもしれないが、専門用語が溢れており、それに対するもう少し分かりやすい説明があるとより良いものとなったと思われる。

今後、注意いたします。

行政的観点

- 他の研究者や研究機関との学術的な連携を模索する姿勢に比べ、行政的観点が希薄とも言えるくらい少ない。今後、研究の進展に伴いそのような観点があらわれてくることを期待したい。国民等のこの問題に関する「非専門家」にも分かりやすい表現と言った点に関する配慮がもう少し払われるべきではないであろうか。

現在、今までの研究成果を活用しての、OECD の Cooperative Chemicals Assessment Programme (CoCAP) へのデータ提供、OECDの別の活動(Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics)におけるAOPへの文書提出を準備しているなど、急速に行政対応へ向けての活動を展開中ですが、Garuda システムへの更なる組み込みの含め、更に加速させたく存じます。

非専門家への分かりやすい表現について、今後、注意いたします。

効率的観点

- 現時点では、専門誌への発表が少ない。

執筆を急ぎます。

- 「ばくろ」の漢字表記は「暴露」ではなく「曝露」とすべきではないか。

「ばくろ」の表記については、厚生労働省が表記として「暴露」を使用しているところから、それに従って使用しております。

1

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

(1) 短期間反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発【菅野】

「新型反復暴露」

反復+単回

「過渡反応」

「基線反応」

①A+A実験

②A+B実験

フェノバルビタール(pb)

アセトアミノフェン(aa)

サリドマイド(th)、

五塩化フェノール(pcp)、

5-FU(5fu)、

アセフェート(acp)、

バルプロ酸(vpa)、

四塩化炭素(ccl)

	反 復		単 回
H27	フェノバルビタール(pb)	→	フェノバルビタール(pb)
	アセトアミノフェン(aa)	→	アセトアミノフェン(aa)
	5-FU(5fu)	→	サリドマイド(th)
	五塩化フェノール(pcp)	→	バルプロ酸(vpa)
H28	サリドマイド(th)	→	サリドマイド(th)
	五塩化フェノール(pcp)	→	五塩化フェノール(pcp)
	五塩化フェノール(pcp)	→	バルプロ酸(vpa)
	アセトアミノフェン(aa)	→	五塩化フェノール(pcp)
H29	5-FU(5fu)	→	5-FU(5fu)
	アセフェート(acp)	→	アセフェート(acp)
	未定*	→	未定*
	未定*	→	未定*

*: 前年度までの結果に基づき決定

2

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

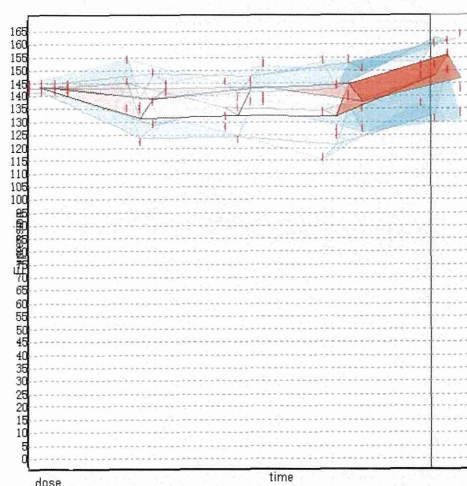
溶媒対照群の発現量を
[0+1] と [4+1]
の間で比較し、
Down したものを。

3

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

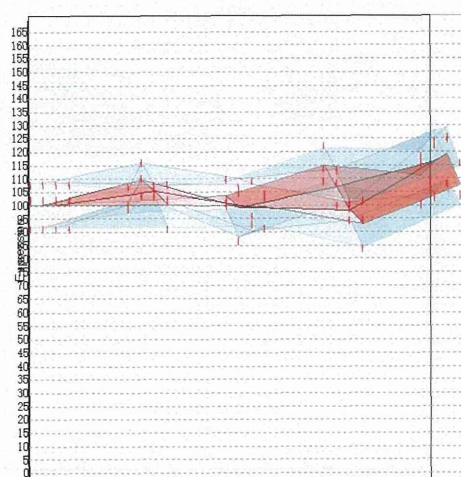
TTG035-L_SpNC_0

1415692_s_at



TTG211-L

1415692_s_at



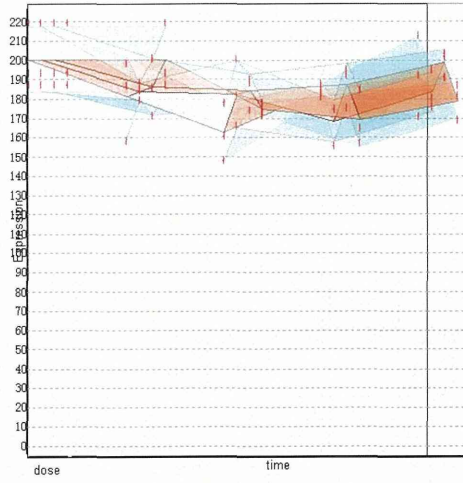
Canx
calnexin

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

4

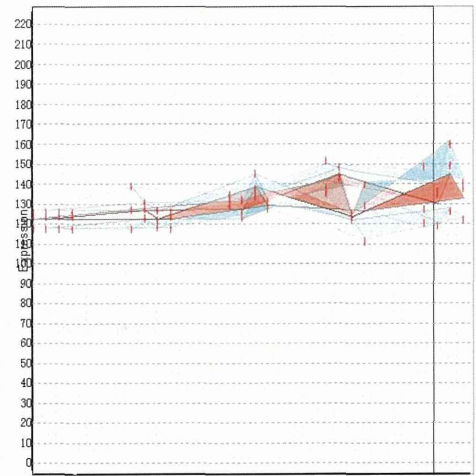
TTG035-L_SpNC_0

1416546_a_at



TTG211-L

1416546_a_at



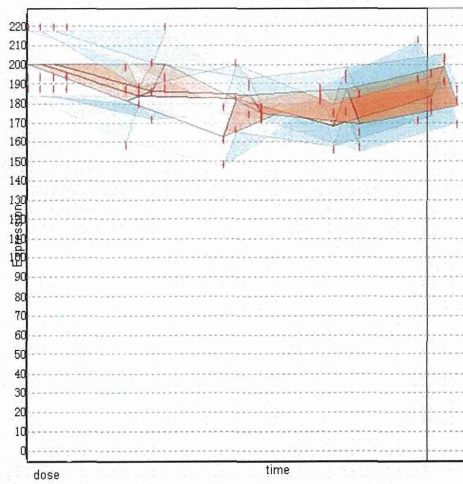
Rpl6
ribosomal protein L6

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

5

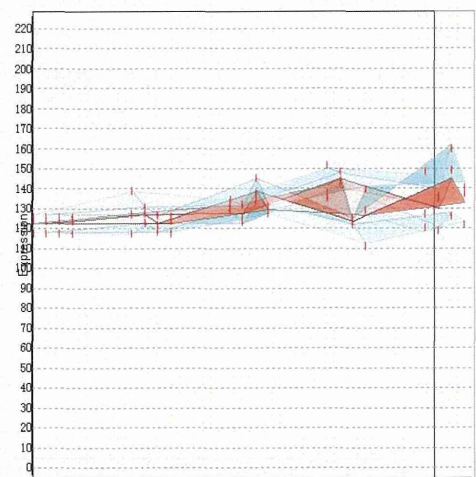
TTG035-L_SpNC_0

1416546_a_at



TTG211-L

1416546_a_at



Rpl6
ribosomal protein L6

厚労科研 Percellome 班会議 2016-02-03

6