

なし

3. その他

なし

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 —  
 (H27-化学-指定-001)

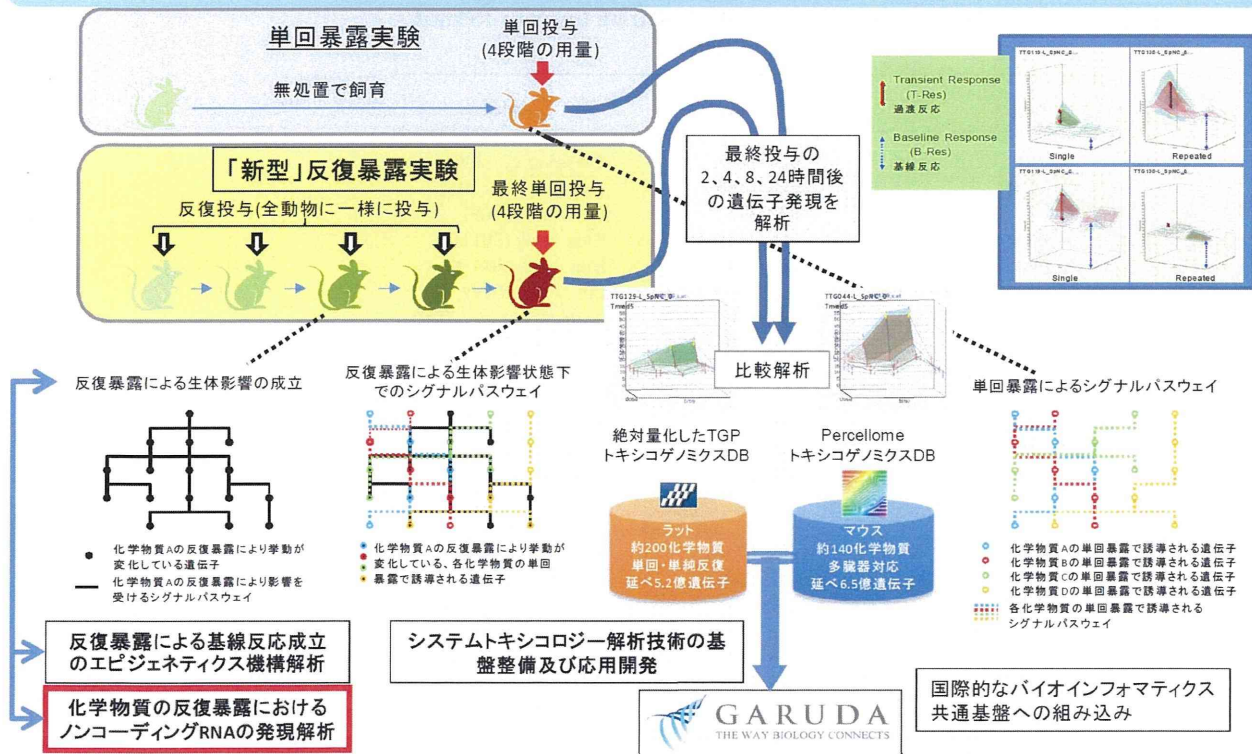
## 化学物質の反復暴露によるノンコーディングRNAの発現解析 及び Percellome専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

相崎 健一

国立医薬品食品衛生研究所  
 安全性生物試験研究センター  
 毒性部 第一室

1

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 —



2

# non-coding RNAは化学物質暴露による 毒性機序に関与する

Table 1 Summary of the miRNA expression associated with various toxicants

Effect	Toxicants	Upregulated miRNAs	Downregulated miRNAs	Involved mRNAs	References
Physical	Silver nanoparticle		miR-219-5p miR-654-3p	MT1F, TRIB3 EDGL1	Eom et al. (2014)
	Silica nanoparticle	miR-122, miR-192, miR-194			Nagano et al. (2013)
Biological	$\alpha$ -synuclein A $\beta$ peptides	miR-7, miR-153	let-7i, miR-9, miR-20b, miR-30c, miR-148b, miR-181c		Doxakis (2010), Mouradian (2012) Hébert et al. (2008, 2009), Schonrock et al. (2010)
	Alcohol	miR-30a-5p		BDNF	Miranda (2014)
Chemical	Methyl mercury chloride	miR-141, miR-196b, miR-302b, miR-367, miR-372			Nerini-Molteni et al. (2012)
	Sodium valproate		miR-124a, miR-128, miR-137		Smirnova et al. (2014)
	Tobacco	Cluster miR-132-212			Molina-Pinelo et al. (2014)
	Benzene	let-7d, miR-10b, miR-34a, miR-185, miR- 423-5p-2	miR-27b, miR-130a, miR-133a, miR-142-5p, miR-223, miR-320b, miR-543		Bai et al. (2014)
	Lead	miR-34b, miR-34c, miR-204, miR-211, miR-448, miR-449a	miR-494		An et al. (2014)
Other dimensions					
Dose and length of exposure	Formaldehyde	miR-125b	miR-142-3p let-7, miR-10b		Rager et al. (2014) Fry et al. (2014)
	Ozone	miR-25, miR-132, miR-143, miR-145, miR-199a*, miR-199b-5p, miR-222, miR-223, miR-424, miR-582-5p			
	Cocaine	miR-30a*, miR-134, miR-152, miR- 199a-3p, miR409-3p, miR-504	miR-133b, miR-144, miR-191		Chen et al. (2013)
	Cisplatin	miR-34a	miR-122	FOXO3 SIRT1	Lee et al. (2014)

Arch Toxicol (2015) 89:319-325

3

TABLE 2  
Nuclear Receptors and Drug Metabolizing Enzymes-Related  
MicroRNAs

Target	miRNA	Reference
PXR	miR-148a	Takagi <i>et al.</i> (2008)
VDR	miR-125b	Mohri <i>et al.</i> (2009)
	miR-27b	Pan <i>et al.</i> (2009)
	miR-21, miR-27b	Kida <i>et al.</i> (2011)
PPAR $\alpha$	miR-27a	Kim <i>et al.</i> (2010)
PPAR $\gamma$		Lin <i>et al.</i> (2009)
	miR-27b	Karbiener <i>et al.</i> (2009)
RXR $\alpha$ (rat)	miR-130	Lee <i>et al.</i> (2010)
	miR-27	Ji <i>et al.</i> (2009)
HIF-1 $\alpha$	miR-17	Taguchi <i>et al.</i> (2008)
HNF4 $\alpha$	miR-24a, miR-34	Takagi <i>et al.</i> (2010)
ER $\alpha$	miR-206	Adams <i>et al.</i> (2007)
	miR-221/222	Zhao <i>et al.</i> (2008)
	miR-22	Xiong <i>et al.</i> (2010)
	miR-18, miR-124a	Vreugdenhil <i>et al.</i> (2009)
GR	miR-27b	Tsuchiya <i>et al.</i> (2006)
CYP1B1	miR-126*	Kalsheuer <i>et al.</i> (2008)
CYP2A3 (rat)	miR-378	Mohri <i>et al.</i> (2010)
CYP2E1	miR-27b	Pan <i>et al.</i> (2009a)
CYP3A4	miR-125b	Komagata <i>et al.</i> (2009)
CYP24A1	miR-24	Mishra <i>et al.</i> (2007)
DHFR	miR-631	Yu <i>et al.</i> (2010)
SULT1A1	miR-298, miR-370	Fukushima <i>et al.</i> (2007)
Thioredoxin reductase	miR-17*	Xu <i>et al.</i> (2010)
Mitochondrial antioxidant enzymes		

Toxicol Sci 123(1), 1-14 2011

4



# non-coding RNAの種類

non-coding RNA カテゴリー	長さ (nt)	分布	既知機能
リボソーム RNA (rRNA)	120 ~ 4700	全生物種	翻訳
トランスファー RNA (tRNA)	70 ~ 100	全生物種	翻訳
核内低分子 RNA (snRNA)	70 ~ 350	真核生物	スプライシング、mRNA プロセッシング
核小体低分子 RNA (snoRNA)	70 ~ 300	真核生物、古細菌	RNA 修飾、rRNA プロセッシング
miRNA	21 ~ 25	真核生物	翻訳制御、mRNA 安定性制御
siRNA			
piRNA			
mRNA 型 ncRNA	24 ~ 30	真核生物	ゲノム安定性制御
	数百~数十万	真核生物	転写制御、Splicing 制御、輸送制御

5

## マウスゲノム情報(Mus\_musculus\_GRCm38.83 / Ensembl) Top10

gene_biotype	count of transcript
protein_coding	82460
processed_pseudogene	5954
<b>* lincRNA</b> (long intervening ncRNA)	<b>4868</b>
antisense	2817
<b>* miRNA</b>	<b>2250</b>
unprocessed_pseudogene	2165
TEC To be Experimentally Confirmed	1924
processed_transcript	1825
<b>* snoRNA</b> (核小体低分子RNA)	<b>1537</b>
<b>* snRNA</b> (核内低分子RNA)	<b>1386</b>

全レコード数 = 110379

6

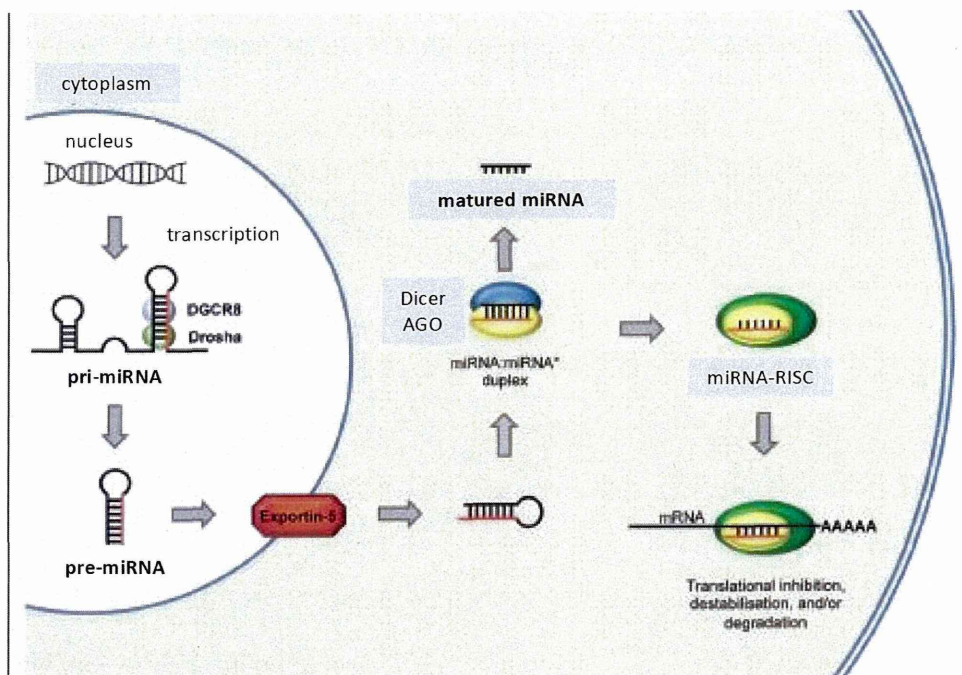
マウスゲノム情報(Mus\_musculus\_GRCm38.83 / Ensembl)に含まれているnon-coding RNA annotation

gene_biotype	count of transcript
* lincRNA (long intervening ncRNA)	4868
* miRNA	2250
* snoRNA (核小体低分子RNA)	1537
* snRNA (核内低分子RNA)	1386
rRNA	354
sense_intronic	251
scaRNA	51
sense_overlapping	27
Mt_tRNA	22
ribozyme	22
Mt_rRNA	2
sRNA	2
macro_lincRNA	1

合計 = 10773 (全体の9.8%)

7

## miRNAの成熟過程



8



# non-coding RNAの種類

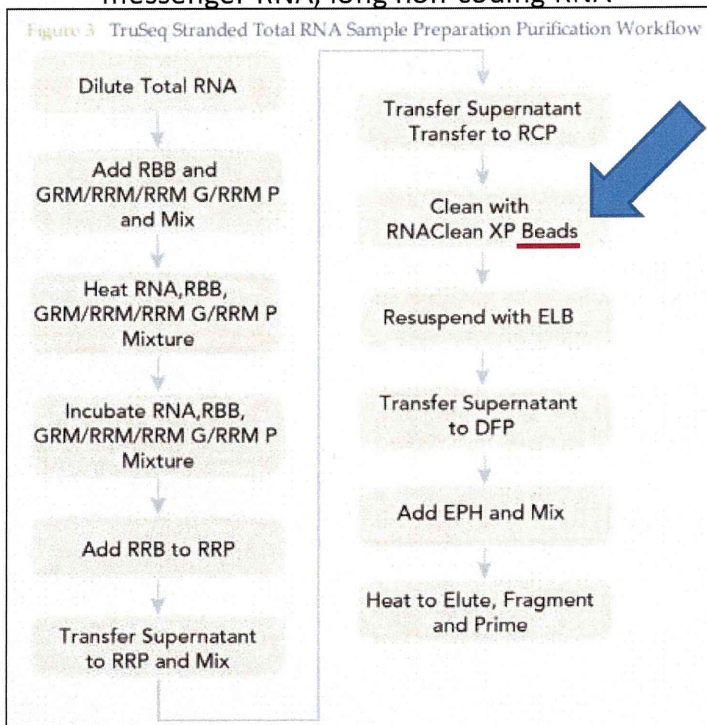
non-coding RNA カテゴリー	長さ (nt)	分布	既知機能		
リボソーム RNA (rRNA)	120 ~ 4700	全生物種	翻訳		
トランスファー RNA (tRNA)	70 ~ 100	全生物種	翻訳		
核内低分子 RNA (snRNA)	70 ~ 350	真核生物	スプライシング、mRNA プロセッシング		
核小体低分子 RNA (snoRNA)	70 ~ 300	真核生物、古細菌	RNA 修飾、rRNA プロセッシング		
miRNA	21 ~ 25	真核生物	翻訳制御、mRNA 安定性制御		
siRNA				真核生物	感染防御、mRNA 安定性制御
piRNA					
mRNA 型 ncRNA	数百~数十万	真核生物	転写制御、Splicing 制御、輸送制御		

次世代シーケンサは、由来に拠らず核酸配列を読み取ることが出来るが、定量解析を行うためには、相応の注意が必要。

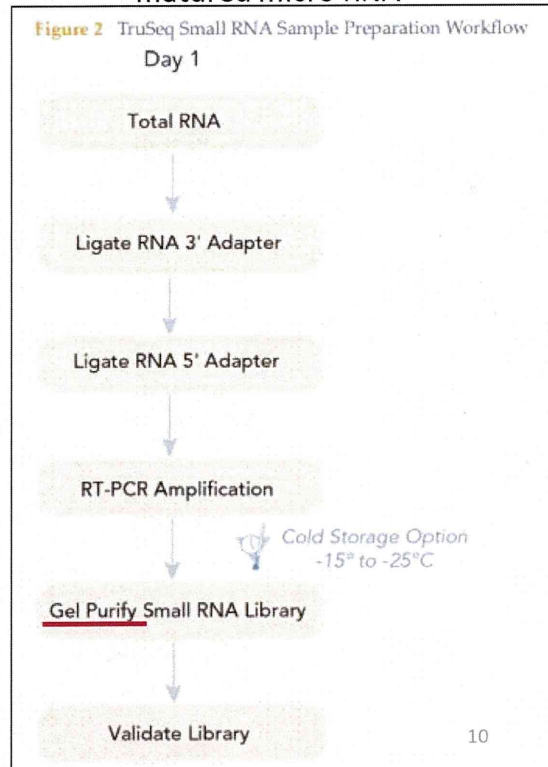
9

## NGS Library preparation

### messenger RNA, long non-coding RNA

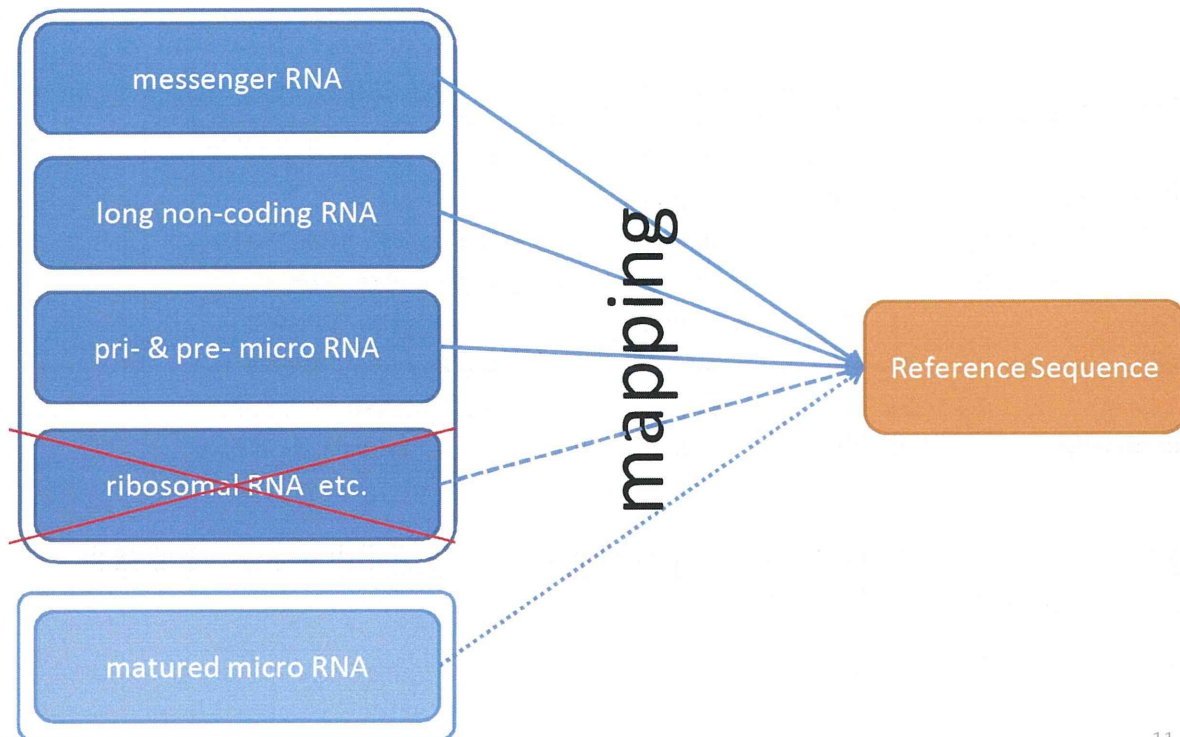


### matured micro RNA



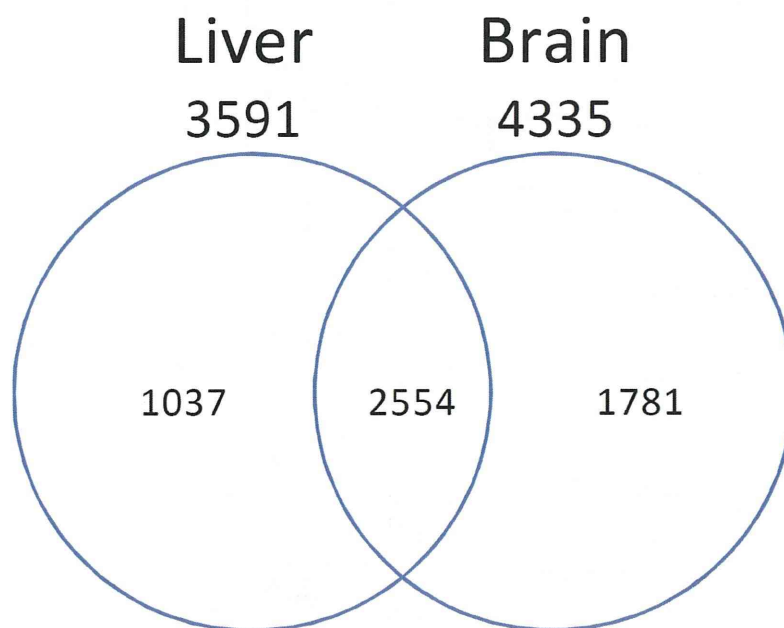
10

# read データの mapping 処理



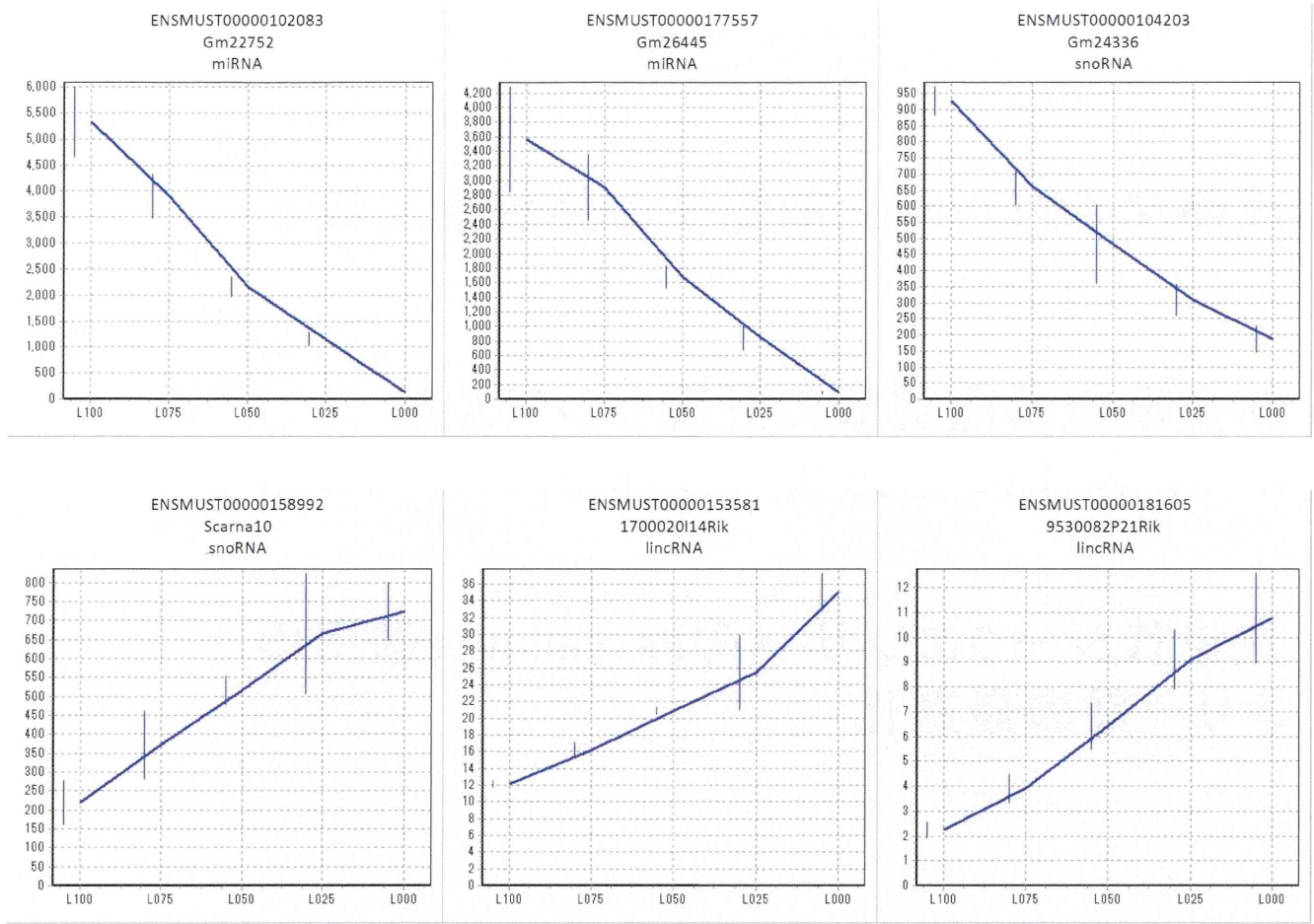
11

## Liver, Brainで検出されたncRNA



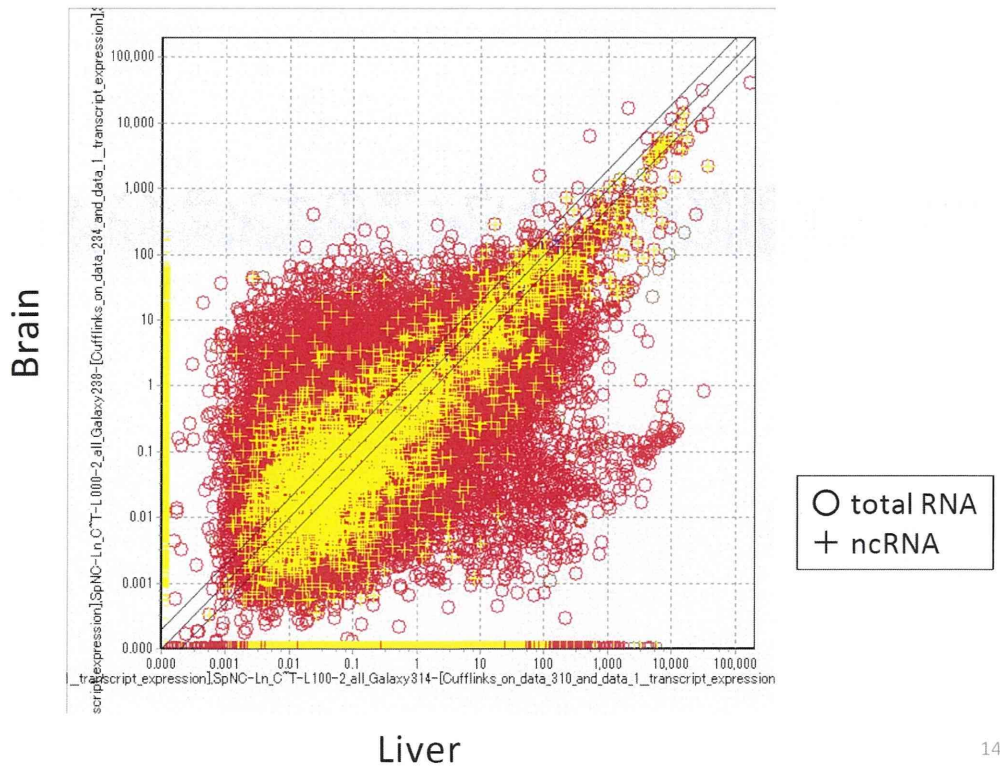
12





13

# ncRNAの発現レベル



14



## 研究計画

---

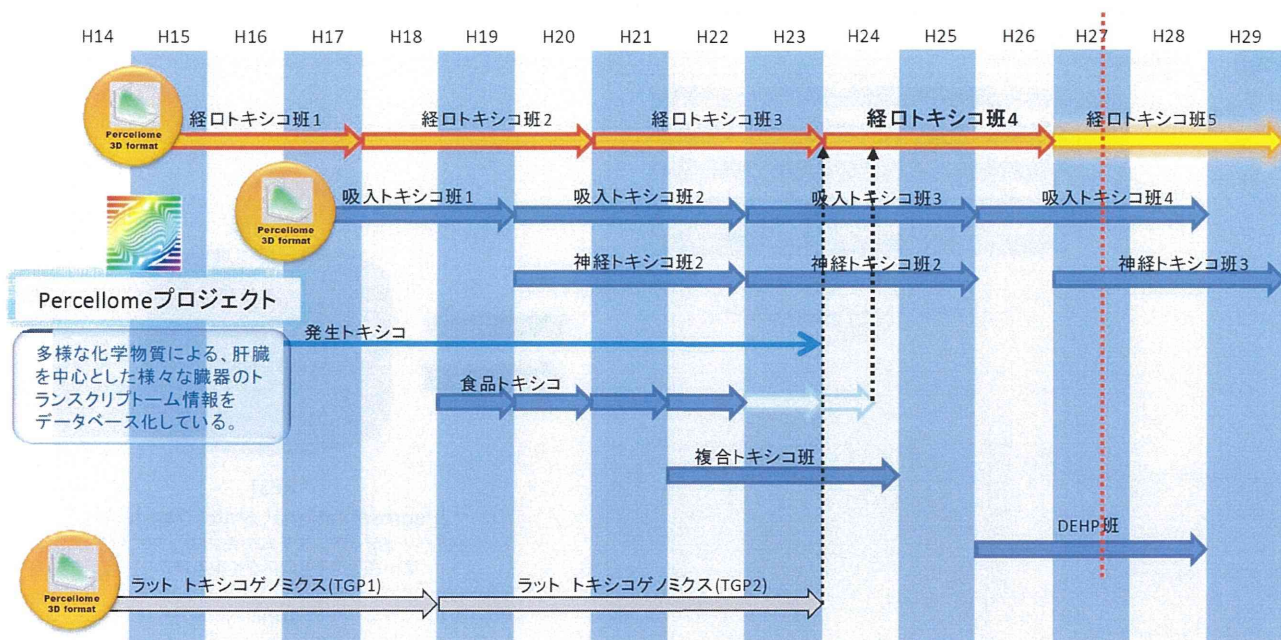
- 成熟マイクロRNAと前駆体の発現量比較
- 新型反復暴露実験の肝臓サンプルのncRNA解析(四塩化炭素、バルプロ酸、クロフィブレート)
- 次世代シーケンサへのPercellome適用のより一層の最適化

15

**Percellome専用解析ソフトウェアのオンライン化促進**

16

# 毒性部が展開するトキシコゲノミクス研究



これらすべての研究が絶対値化したデータを利用=利点:相互の直接比較が可能である

17

## Percellomeデータベース

- 151化学物質、延べ377データセット (mouseのみ、2015.12現在)

1. 1,2,3-Triazole	51. Daizein	102. Nerolidol
2. 1,2,4-Triazole	52. Deet	103. N-ethyl-N-nitrosourea
3. 1,2-Dichloro-3-nitrobenzene	53. DEHP	104. N-Methylaniline
4. 2,4-dinitrophenol	54. Dexamethasone	105. N-Phthalylglutamic acid imide
5. 2-Aminomethylpyridine	55. Diazinon	106. Omeprazole
6. 2-Chloro-4,6-dimethylaniline	56. Dibutyltin dichloride	107. Paditaxel (Taxol)
7. 2-Vinylpyridine	57. Diethylnitrosamine	108. Paraquat dichloride
8. 3-Amino-1H-1,2,4-triazole	58. Diethylstilbestrol	109. PCB153
9. 3-methylcholanthrene	59. Digitoxin	110. PCN
10. 4-amino-2,6-dichlorophenol	60. DMSO	111. p-Dichlorobenzene
11. 4-Ethylnitrobenzene	61. Domoic acid	112. Pentachlorophenol
12. 5-Fluorouracil	62. Doxorubicin	113. Permethrin
13. 5-Pregnen-3beta-ol-20-one-16alpha-carbonitrile	63. Estragole	114. Phenobarbital sodium
14. 9-cis-retinoic acid	64. Ethanol	115. Phenytoin
15. Acephate	65. Ethynyl estradiol	116. Phytol
16. Acetaldehyde	66. FD&C Blue No.1(Food Blue No.1)	117. Pyriproxyfen
17. Acetaminophen	67. Fenobucarb	118. Red No.102
18. Agaritine	68. FKS06	119. Red No.105
19. All trans retinoic acid	69. Food Red No.104	120. Red No.225
20. Aloe arborescens extract	70. Food Red No.40 (Allura Red AC)	121. Red No.501
21. Alpha lipoic acid	71. Food Yellow No.4(FD & C Yellow No.5)	122. Reserpine:uterotrophic
22. Alprazolam	72. Formaldehyde	123. Rifampicin
23. Aluminum ammonium sulfate	73. Formalin	124. serum
24. Aluminum lactate	74. Forskolin	125. Sesame seed oil unsaponified matter
25. Aluminum sulfate	75. Fullerene	126. Sodium Arsenite
26. AraC	76. Genistein	127. Sodium Dehydroacetate
27. Asbestos(crocidolite)	77. Genistin	128. Sorafenib Tosylate
28. Aspirin	78. Glycyrrhizin2K	129. Styrene
29. ATRA	79. Green No.204 (Pyranine Conc)	130. Tamiflu (Oseltamivir)
30. Azacytidine	80. Hepatectomy	131. Tamoxifen
31. Benzene	81. Houltuynia extract	132. Tar dye
32. Bisphenol A	82. Hydroxyglutric Acid	133. TCDD(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin)
33. Black No.401	83. Ibotenic acid	134. TCDF(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran)
34. Bromobenzene	84. Ibuprofen (dl-pisobutylhydratropic acid)	135. Tebufenozide
35. BTAZ2440 (2-(2-Hydroxy-5-methylphenyl)benzotriazole)	85. Imidacloprid	136. Testosterone propionate
36. BTAZ3147 (2-(2-Hydroxy-5-tert-octylphenyl)benzotriazole)	86. Indigo	137. Tetradecane
37. BTAZ3846 (2-Benzotriazole-2-yl 4,6-di-tert-butylphenol)	87. Indigo Carmine	138. Thaldomide
38. BTAZ3864 (2-(3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole)	88. Isoniazid	139. Toluene
39. BTAZ3896 (2-(5-Chloro-2-benzotriazolyl)-6-tert-butyl-p-cresol )	89. Kanamycin monosulfate	140. Transplatin
40. BTAZ7032 (2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-methyl-1-phenylethyl)phenol)	90. Levohydroxine	141. Triazolam
41. Caffeine	91. Maltol	142. Tributyltin chloride
42. Carbaryl	92. Mastic	143. Troglitazone
43. CCl4	93. MC (C57BL/6NCrj)	144. Valproic acid sodium salt
44. Chlorpyrifos	94. MEHP	145. Vat Red II(D&C Red No.30)
45. Cisplatin	95. Menthyl Valerate	146. Verbenone
46. Citric acid-calcium salt	96. Methanol	147. Violet No.201
47. Clofibrate	97. Methoprene	148. Violet No.401
48. Coenzyme Q10	98. Methoprene acid	149. Warfarin
49. Curcumin	99. Methyl dihydrojasmonate	150. Xylene
50. Cyclopamine	100. Monocrotaline	151. Ziram
	101. Monofluoroacetic Acid	

18