

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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  
- 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  
Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

分担研究者 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 室長

研究要旨

本研究は、先行実施された Perce llome<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。

特に先行3年間に実施した「新型」反復暴露実験<sup>\*\*</sup>により、化学物質の反復投与による生体影響が分子レベルにおいて数日で定常化する所見を複数見出した<sup>\*\*\*</sup>。これを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復暴露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究では、(a) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現変動解析、および (b) Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進、を行った。

(a) では、ノンコーディング RNA のうち、成熟マイクロ RNA については短鎖であるゆえの誤差発生を低減する目的で抽出・測定方法の検討を行った。また本分担研究で主な解析手段となる次世代シーケンサーによる RNA-Seq について、ライブラリ調整段階からシーケンス後のデータ処理段階まで Perce llome 手法適用の最適化を進め、実用レベルのデータ処理パイプラインを構築した。これらの最適化技術を適用し、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、解析中である。

(b) では、各ソフトウェアを機能単位で評価し、オンライン化に即して再編成を行いつつ、実装方法を検討した。またこれらソフトウェアを職務著作物として届け出、併せてエンドユーザーに提供する際のライセンスを選定した。

-----  
(\* ) 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。

(\*\* ) 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。

(\*\*\* ) 先行3年間の研究により、反復暴露による生体影響は分子レベルでは、暴露の都度の変化を示す成分である「過渡反応」と、回を重ねるに連れ発現値の基線を徐々に移動させる成分である「基線反応」に分けて解釈できることが判明している。

A . 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評価手法を、生体反応の分子メカニズムに基づいて迅速

化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技術と統合して実用化する事を目的とする。

特に本分担研究では、ノンコーディング RNA の発現

変動解析を以て、化学物質の反復暴露による基線反応の分子機序の解明を目的とする。また併行して、既存のPerce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化を進めて研究成果の速やかな社会還元を目指す。

## B . 研究方法

### ( a ) 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

ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA は成熟すると 20bp 前後の短鎖となるため、通常の mRNA や長鎖ノンコーディング RNA とは生体サンプルからの精製効率が異なる。そこで RNA-Seq に用いる total RNA を抽出する方法を選定するために、マイクロアレイと同様のプロトコル( RNeasy Kit (QIAGEN)を使用) の他、 Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics)を用いて RNA を抽出し、BioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer (Life Technologies)、Nanodrop (Thermo Scientific)によって収量及び品質、サイズ分布等を評価した。

具体的には、マウス肝を 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、採取後すみやかに RNA later ( Ambion 社) に 4 で一晚浸漬して、RNase を不活化する。その後、RNA 抽出操作までは-80 にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、各 RNA 精製キットのホモジナイズバッファを添加し、ジルコニアビーズ及び MM300 ( Retsch )を用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定し、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 種類の濃度を公比 3 で混合した溶液) を添加し、TRIZOL 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。

次世代シーケンサーには Illumina 社の NextSeq500 を用いた。シーケンスするライブラリは同社の TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 或いは TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit を用いて作成した。

次世代シーケンサーデータの数値化等、データ処理には、Perce llome 手法に対応させたカスタムゲノムを用意した上で、RNA-Seq 解析ソフトウェアの主流となっている Tophat、Cufflinks を利用した。Cufflinks から出力された raw データの絶対量計算は、独自開発の ConvertTET.exe でフォーマット変換した後、マイクロアレイと同様に、SCal4.exe を用いた。

## 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の配慮を十分行い、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・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版) )

## C . 研究結果

### ( a ) 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

#### 1) 短鎖 RNA 抽出の検討

ノンコーディング RNA とはタンパク質をコードしない RNA の総称であり、メッセンジャーRNA(mRNA) と同等の長鎖を有するものから、成熟すると 20bp 前後の短鎖となるマイクロ RNA まで、様々な長さの RNA 分子を含む概念である。生体サンプルからの精製効率は RNA 鎖長により異なるため、まず total RNA 抽出キット各々の RNA 鎖長別の収率、品質、及び再現性を評価した。マイクロアレイ用の total RNA を抽出するために使用してきた RNeasy Kit(Qiagen)の他、同一サンプルから DNA と RNA を同時に抽出する事の出来る Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics)を用いて total RNA を抽出した結果、mRNA 等の長鎖 RNA の抽出効率や品質については、製品間に大きな差異はなかったが、短鎖 RNA の抽出効率は製品間で差が見られた。

また次世代シーケンサーのメーカー推奨のライブラリ合成キット TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 及び TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina) の標準プロトコルにおいて、RNA 鎖長による選別が掛かることが判明した。つまり成熟型マイクロ RNA 専用のライブラリー合成キットを用いない限り、短鎖 RNA ( 或いはそれ由来の cDNA) は各プロトコルの精製ステップで相当量が失われることが判明した。

#### 2) 次世代シーケンサーによる RNA-Seq への Perce llome 手法の適用

データの高精度化を実現し、尚且つ既存のマイクロアレイデータとのブリッジングを行うために、次世代シーケンサーによる RNA-Seq についても、Perce llome 手法を適用し、RNA 発現量の絶対量計算を試みた。

Perce llome Wet プロトコルで最も重要な Perce llome 用外部 RNA スパイクカクテル ( 枯草菌ゲノム配列由来の RNA スパイク 5 種を公比 3 の異なる濃度で混合した

もの。GSC)の添加プロトコルについては、マイクロアレイと同じ方法で可能であることを確認した。スパイク添加量についてもデータレベルでの検討を行った結果、マイクロアレイと同じ添加比率を採用すべきであること、すなわち GSC の RNA スパイク 5 種のうち最も多い RNA スパイクであってもトランスクリプトーム全体に対して過剰ではなく RNA-Seq のリードを無駄にしていること、及び 1 サンプルあたりの総リード数が少なくなり低発現 RNA の検出が難しくなる 10 サンプル/フローセルのマルチプレックス解析においても、GSC の RNA スパイク 5 種のうち最も少ない RNA スパイクを検出できていること、を確認した。

一方、シーケンス後の数値化に際しては、枯草菌ゲノム由来の配列を持つ GSC の RNA スパイク 5 種の発現量計算方法の検討を行った。従来、マウスゲノムと枯草菌ゲノムの双方に対して独立にマッピングを実施していたが、計算時間が倍化し計算処理効率が悪かった。またマッピングソフトウェアのパラメータ設定によってはミスマッピングが発生する恐れもあり、特に RNA スパイク定量に際して誤差発生懸念があった。

そこで平成 27 年度はマウスゲノム配列 mm10 に RNA スパイク 5 種の配列を追加したカスタムゲノムを作成し、一括マッピングする手法を検討した。この手法でもミスマッピングの懸念が残るが、マウスゲノム mm10 に対してマッピングした結果とカスタムゲノムに対してマッピングした結果を比較し、問題ないことを確認した。

さらに、Linux のコマンドライン操作に精通していない Wet 研究者でもデータ処理を簡便に行えるよう、ローカルサーバーに構築したグラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) ベースの Web 統合プラットフォーム Galaxy 上で、カスタムゲノムへのマッピングを中心に、アダプタ配列の除去やクオリティチェック、転写産物毎の数値化の各プロセスを包含・自動化した解析パイプラインを作成した。

上記成果を反映した上で、引き続き、先行研究において取得済みの、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに溶媒 (コーンオイル) を単回投与した肝サンプル、及び同様のマウスに四塩化炭素を 14 日間反復投与した肝サンプルについて、全種類の RNA を網羅的に解析中である。

#### (b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

先行研究にて in house 開発した Percellome 専用解析ソフトウェアは ほぼ全て Delphi 言語にて記述した Windows 専用プログラム (Win32) であり、オンラ

イン化や Garuda 準拠が容易ではないため、本研究では、これらソフトウェアを Java 等のコンピュータ言語に移植することになる。また取り扱うデータ容量に制限のないローカルプログラムに比し、オンラインプログラムでは通常、サーバーサイドに保持可能なデータ量や、サーバー/クライアント間のデータ通信量に制限がかかるため、既存のプログラムを単純にそのまま移植するのではなく、機能単位に分解して必要な機能のみを移植したり、データ内容や形式などを見直して軽量化する必要がある。

そこで平成 27 年度は機能別に優先順位を割り振り、データ処理内容を吟味して、毒性評価・予測に必要な情報提供が優先されるよう、開発スケジュールの調整を行った。具体的には、既存のオンライン Percellome データベースを拡張することとし、RSort プログラムによる候補遺伝子リスト提供、及び Percellome Explorer プログラムの化合物間比較結果を参照する機能の追加を優先することとした。また Percellome による絶対量化計算や、Percellome 非対応データの絶対量推計計算を行うサービスについても提供方法を検討することとした。

これと並行して、オンライン Percellome データベースからエンドユーザーが引き出したデータの取り扱いや配布したソフトウェアの使用ライセンスを明確化すべく、これらソフトウェアを正式に職務著作物として届け出るとともに、エンドユーザーに提供する際のライセンスとして、Creative Commons License や Apache License ver.2 を選定した。

#### **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、先行研究において、肝 (及び一部、肺) における四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレードの新型反復暴露実験により、単回暴露時に発現変動した遺伝子の多くについて、基線反応成分 (暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン (基線) が徐々に変動する反応成分) と過渡反応成分 (単回暴露時の 2, 4, 8, 24 時間のうちに発現が変動する速い変化の成分) との関連性が見いだされた。反復投与により発現量が増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられ、むしろ、エピジェネティクス分子機序の関与が示唆されたことから、これを確認すべく、北嶋聡分担研究者が化学物質の反復投与による DNA メチル化変動等を網羅的に解析しているに合わせ、本分担研究では、エピジェネティクスとの関連性が明らかになりつつあるノンコーディング RNA の発現変動解析

を進めた。

類似配列の多いマイクロ RNA 群を含む、ノンコーディング RNA の検出は、マイクロアレイより次世代シーケンサの利用が効果的であり、本研究では先行研究でマイクロアレイ解析を実施する際に重要な役割を果たした Percellome 手法を次世代シーケンサによる RNA-Seq に適用することにより、データの高精度化やプラットフォーム間データ比較を実現しつつある。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析においては、total RNA サンプルから次世代シーケンサ用のライブラリを作成する過程で核酸鎖長による抽出効率の差異が大きく、成熟型マイクロ RNA をメッセンジャー RNA や長鎖ノンコーディング RNA と同時に定量するのは困難であることが確認された。しかしマイクロ RNA 前駆体であれば成熟型より長いため同時測定可能であること、また RNA-Seq の原理上、前駆体由来のリードカウントと成熟型由来のリードカウントを厳密に分解することは難しいこと、から、他の RNA と同時にマイクロ RNA 前駆体の定量を行いつつ、成熟マイクロ RNA を独立に測定して、前駆体と成熟型の存在量に相関関係があるかどうかを検証することとした。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進については、権利や利用ライセンス関係の整理を進めたことで、より幅広い分野から利用されるようになり、安全性評価技術の普及による国民生活の安全性確保の強化が期待される。

## E . 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析については、平成 27 年度で測定基盤の整備をほぼ終えた。測定・解析中の四塩化炭素反復暴露に引き続き、平成 28 年度からは他の化学物質の反復暴露実験についても解析を進め、反復暴露毒性に関与するノンコーディング RNA の抽出と機序解析を進める。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進においても、平成 27 年度、データやソフトウェアの利用ライセンスを明確化した。引き続き研究成果の速やかな社会還元を推進してゆく。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表 ( 抜粋 )

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR 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.

### 2. 学会発表 ( 抜粋 )

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, "Signal Toxicity" to study Endocrine Disruptors Issues and Children's Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー(Dynamic Biomarker)のカタログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純

シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

**G．知的所有権の取得状況**

**1．特許取得**

なし

**2．実用新案登録**

なし

**3．その他**

なし