

別添 3

・総括研究報告書

厚生労働行政推進調査事業費（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
- 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)

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 客員研究員

研究要旨

本研究は、先行実施された Perce llome¹ 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²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。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。

この技術開発の為に、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 5 研究を実施した。

- (1) 短期間「新型」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
- (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
- (3) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現変動解析
- (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
- (5) Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

(1) では、サリドマイド及び 5 -フルオロウラシルに対し「新型」反復暴露実験セットを実施した。四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、平成 27 年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。

(2) では、平成 27 年度で実施した DNA メチル化解析手法の性能評価の結果により、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を採用して、四塩化炭素、クロフィプレートおよびバルプロ酸ナトリウム塩を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅に解析した。いずれの化学物質に於いても DNA メチル化状態が顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数、検出している。

(3) では、平成 27 年度の成果（次世代シーケンサーによる RNA-Seq 及びデータ処理への Perce llome 手法適用）を採用し、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィプレート、アセトアミノフェンを 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、短鎖ノンコーディング RNA（成熟型マイクロ RNA：これは H29 年度に測定予定）を除く転写産物の発現量を測定し、反復暴露により変化した遺伝子を抽出した。

(4) では、毒性機序の複雑性に対応すべく、大規模データ解析技術の開発として ensemble learning system の開発を進め、実際のゲノムデータを用いた検証を進めた。ゲノム解析

とその関連データベースの整備としては先行研究で開発したソフトウェアの一層の強化(軽量化、高速化)と Garuda プラットフォーム⁴上への実装、一般リリースを進めた。

(5)では、Perce llome データベースのオンラインサイトのセキュリティ強化とミラーサイト設置を進め、また先行研究で開発した解析ソフトウェア群 MF-Tools について、最新 OS に対応したインストールパッケージを用意した。

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」(動物実験承認番号 365)に従い実施した。

(*1) 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。

(*2) 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。

(*3) 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。

(*4) 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

北野 宏明 特定非営利活動法人
システム・バイオロジー研究機構 会長
北嶋 聡 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 第二室 室長
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

研究協力者

小野 竜一 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 第五室 室長

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。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 6.5 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、反復暴露にも対応する網羅的毒性予測評価システムの構築を進める。

B . 研究方法

(1) 短期間「新型」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】

B1-1: 試薬及び動物:

サリドマイド (thalidomide; 分子量: 258.233、Cas No. : 50-35-1、純度 98.4%、Carbosynth)、5 - フルオロウラシル (5-fluorouracil (5-FU)、分子量: 130.077、Cas No. : 51-21-8、純度 99.8%、東京化成) について、単回投与の既存データの解析を進めた。単回暴露(0日間反復暴露後に単回暴露、以降、[0+1]と表記)時のサリドマイド、フルオロウラシルの投与量はそれぞれ 0、100、300、1000 mg/kg、0、30、100、300 mg/kg である。

「新型」反復暴露実験を、4日間反復暴露(4日間反復暴露後に単回暴露、以降、[4+1]と表記)のプロトコルにて実施した。サリドマイドの4回の全動物に対する反復投与の用量は用量設定実験の結果、70 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に0、100、300、1000 mg/kg とし、5-FU の4回の全動物に

対する反復投与の用量は用量設定実験の結果、7 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に0、30、100、300 mg/kgとした。12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)を用い溶媒は0.5%メチルセルロース水溶液とし、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、最終投与の2、4、8及び24時間後に肝を採取した。

B1-2: Total RNAの分離精製:

マウス肝組織を採取後すみやかにRNAlater (Ambion社)に4で一晩浸漬し、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にて保存した。抽出に当たっては、RNA laterを除いた後、RNeasy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により水層を得、RNeasy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、ピオチン化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(マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは45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、我々が開発したプログラム「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このプログラムは、各遺伝子(probe set: ps)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ものである。これにより抽出された、有意に変動するpsについて

目視による選択を行い、生物学的に有意と判定される変化を示したpsを解析に使用した。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) 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】

B2-1: 次世代シーケンサーを用いた whole genome bisulfite sequencing

12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)について、先行研究において取得済みの、溶媒(コーンオイル)を単回投与した際、あるいは四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルを実験に用いた。また本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性C57BL/6Jと雌性JF1とのF1マウス(4週齢)の肝サンプルを実験に用いた。

肝サンプルを、ProK (10mg/ml) 55 0/N処理後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿、及び70%エタノール洗浄により、DNAを抽出、精製した。抽出したDNAはPico Green dsDNA定量試薬(Thermo)を用いてDNA濃度を決定し、DNA 500 ngを用いてbisulfite処理をEZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research社)により行った。

Bisulfite処理後のDNA 500 ngを元に、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift社)を用いて、Illumina社の次世代シーケンサーNextSeq500用のwhole genome bisulfite sequencingに対応したライブラリーを作成した。ライブラリーは、0.2 N NaOHによるdenatureを行った後に、NextSeq500 v1試薬に付属のHT1溶液を用いて1.8 pMに希釈し、コントロールとしてphiXライブラリーを20%加えてシーケンスを行った。シーケンス反応は、dual index (8bp x 2), 151 cycle single readの設定とした。シーケンス終了後は、bcl2fastqソフトウェアによりfastqファイルを生成し、fastq groomerソフトウェアによるgroomingを行った後に、マッピングソフトbowtie2によるbisulfite処理済みのマウスゲノム(MM10)に対してマッピングを行った。なお、Bisulfite処理は、非メチル化シトシンのみをウラシルに変換する化学反応であり、メチル化シトシンはそのまま変換されない。よって、Bisulfite処理後のゲノム配列は、ワトソン鎖であるかクリック鎖であるかで一次配列は違い、さらにメチル化シトシンであるか非メチル化シトシンであるかでも1次配列は違ってくる。本研究ではこれらのゲノム配列の違いの条件を考慮した上で、適切にマッピング処理を実施した。マッピング後は、シーケ

ンス可視化ソフト IGV の bisulfite mode を用いて DNA メチル化を解析した。

(3) 化学物質の反復曝露によるノンコーディング RNA の発現解析【相崎】

平成 27 年度に実施した最適化プロトコルにより、平成 28 年度は先ず成熟型マイクロ RNA 以外(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 とは定量性を保ったまま同時に精製出来ないため)の転写産物について次世代シーケンサーによる網羅的解析を進めた。

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ーは同社の TruSeq Stranded Total RNA 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 手法に最適化したカスタムゲノムを用意した上で、現在、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 Perce llome 絶対量化計算はマイクロアレイと同様に、独自開発の SCal4.exe を用いた。

(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】

大規模データ解析技術の開発としては、分類器として使用する machine learning 手法を多数選定し、これらを統合して複雑性の高いデータの解析を可能とする、ensemble learning system を開発した。平成 28 年度には新たに 100 類以上の分類器を評価し、基準を満たすものを追加実装した。また特徴抽出アルゴリズムについても引き続き検討を行い、適切なものを実装した。性能評価に際しては、実際の大規模データを利用した。

ゲノム解析とその関連データベースの整備としては、先行研究で作成したソフトウェアのうち、特にプロモーター領域のホモロジー解析を行うツール SHOE の機能強化(軽量化及び高速化)を検討し、同時に Garuda Platform 準拠を完了した。

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

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

(1) 短期間「新型」反復曝露実験と既存の単回曝露実験データベースからの反復曝露毒性予測技術の開発【菅野】

平成 28 年度は、「新型」反復曝露実験により、サリドマイド及び 5-フルオロウラシルの肝に対する反復影響を解析した。

サリドマイドは、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応がないか微弱な遺伝子が基線の上昇とともに過渡反応を明瞭に示すようになる遺伝子が多数認められた。このような遺伝子は、過渡反応のピークが 4~8 時間目のものであった。これに対し、反復曝露により、単回曝露時の過渡反応が消失または低下する遺伝子を少数ながら認めた。この遺伝子群は、単回曝露時に 2 時間目にピークを示す早期反応性の遺伝子であった。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。

5-フルオロウラシルについては、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応のある遺伝子が基線の変化なく過渡反応を消失ないし減ずる遺伝子が多数認められた。それらには、遺伝子発現を抑制的に調節する遺伝子が多く含まれていた。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。

(2) 化学物質の反復曝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】

反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾や DNA メチル化等の遺伝子発現修飾機構(所謂 Epigenetics)が関わる可能性が指摘される事から、本分担研究では次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについて DNA メチル化状態を網羅的に検討する。

bisulfite 処理したゲノム DNA を Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を使用してライブラリーを作成し、次世代シーケンサー(Illumina NextSeq500)で高速シーケンスする全ゲノムバイサルファイト解析(WGBS)手法を用いて、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスについて、先行研究において取得

済みの、溶媒（コーンオイル）を単回投与（[0+1]）した際、及び 5 mg/kg の四塩化炭素を 14 日間反復投与（[14+1]）した際の肝サンプルについて WGBS 解析した。また基線反応の変化が著しかった四塩化炭素以外の物質、具体的には 70 mg/kg のクロフィプレート及びバルプロ酸ナトリウム塩を 14 日間反復投与（[14+1]）した際の肝サンプルについても同様に、溶媒（0.1%DMSO 添加 0.5%メチルセルロース）を単回投与（[0+1]）した際のもの、DNA メチル化状態を網羅的に比較解析した。いずれに於いても顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数検出している。なお、この微細に DNA メチル化状態が変化する領域を検出する手法として、Bismark および BSMAP を使用している。

（ 3 ） 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【相崎】

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)と同等の長さを有するものから、成熟すると約 20bp 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。平成 27 年度のプロトコル検討により、生体サンプルからの RNA を精製する場合、RNA 鎖長により効率が異なり、定量性を保ったまま、短鎖の成熟型マイクロ RNA とそれ以外（mRNA や長鎖ノンコーディング RNA、マイクロ RNA 前駆体など）を同時に抽出する事は困難であることが判明している。そこで平成 28 年度はより多くの情報を取得することを優先し、スプライシングバリエーション情報も含むメッセンジャーRNA と長鎖ノンコーディング RNA など、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物の測定、解析を進め、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィプレート、アセトアミノフェンについて、次世代シーケンサーによる測定を実施した。なお短鎖となる成熟型マイクロ RNA については平成 29 年度に測定予定である。

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昨年度までに導入した、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を再度アップデートした上で、独自に構築した、データの整形、クオリティチェックからカスタムゲノムへのマッピング、転写産物毎の数値化までを自動実行する解析パイプラインを新しいGalaxy環境上に移植した。

（ 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】

化合物が毒性を引き起こすメカニズムは非常に複雑であり、Perce llome 等の化合物の毒性に関する発現データベースは、この複雑性を内包している。したがって、Perce llome データベースから有用な情報を抽出するためには、このようなデータの複雑性に対処できる解析法が必要不可欠である。

これを実現するために、多数の machine learning 手法を統合して解析を行う ensemble learning system の開発を進めてきたが、今年度は既に実装済みの 58 種類の分類器に加え、新たに 124 種類の分類器を追加実装し、計 182 種類の分類器の並列実行による多数決で、最終的な予測を行えるように改良を加えた。このシステムを、大規模な薬剤投与下における発現データ(cmap, <https://www.broadinstitute.org/cmap/>)や化合物の構造情報とその化合物が抑制するシグナル伝達パスウェイに関するデータベース（TOX21, <https://tripod.nih.gov/tox21/challenge/>)を用いて、我々の解析パイプラインの精度の検証を行った。薬剤候補遺伝子を精度良く予測できることを確認した。

またデータに含まれるノイズを取り除き、予測の精度を向上させるために、特徴量抽出アルゴリズムとして 34 種類のアルゴリズムを実装した。

さらにゲノム解析の一環として、先行研究で作成した転写解析ツールデータに含まれるノイズを取り除き、予測の精度を向上させるプログラム ACGT 及びプロモーター領域のホモロジー解析を行うプログラム SHOE の機能強化(軽量化、高速化)と Garuda 準拠を行った。

ACGT は転写産物の動態から遺伝子間の相互作用を情報幾何学的に推定し、可視化する。これにより、ACGT で解析した遺伝子相互作用のうち重要な部分を、既存の大規模知識ベースや Pathway map 上に投射することで生体内での影響の推定が容易にするが、これを利用した TCDD と TCDF の発現解析を進めつつ、結果をフィードバックして ATCG の最適化を進めている。

また SHOE については一部の間接データの事前計算による軽量化やソースコードの見直しによる高速化といった機能強化を進めると共に、SHOE の Garuda 準拠を進め、一般配布バージョンをリリースした。

（ 5 ） Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進【相崎】

平成 28 年度は、Perce llome データベース公開サイトのセキュリティチェックを行い、RESTful サーバーアプリ

ケーションソフトウェアについて、セキュリティ強化対策を検討した。

またミラーサイト開設、一般公開準備を進めた。

また先行研究にて in house 開発した Windows 用 PerceLLome 専用解析ソフトウェアについては一括インストールパッケージを再構成し、最新バージョンの Windows にも対応した。

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、肝及び肺における四塩化炭素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ほぼ全てについて、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）は、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）が増加する場合は増加、減弱する場合は減少することを見いだした。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た。むしろ、この過渡反応と基線反応の連関性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクスに関わる分子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られる。

平成 29 年度は、新型反復暴露実験を実施し、前 2 年間に得られた情報をもとに、単回暴露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価精度の向上を目指す。

「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」においては、平成 27 年度は本解析手法の性能評価を行った結果、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。引き続き、四塩化炭素（平成 27 年度実施）あるいはクロロフィブレート、バルプロ酸ナトリウム塩（平成 28 年度実施）を 14 日間反復投与（[14+1]）した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析して、変化の見られた領域を抽出している。このような結果を蓄積すれば、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立への、当該遺伝子の DNA メチル化による遺伝子発現修飾機構（所謂 Epigenetics）の関与について

理解が進むものとする。なお、Bisulfite 処理後のゲノム配列のマッピング計算は非常に複雑であり、1 サンプルあたり 1 週間ほどの時間が掛かるため、ボトルネックとなっているため、これについても解析パイプラインの最適化等、改善策を検討する。

「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、平成 27 年度のプロトコル最適化研究の過程で、マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いても成熟型マイクロ RNA の様な短鎖の転写産物と、メッセンジャー RNA や長鎖ノンコーディング RNA の様な長鎖の転写産物とを同時に網羅的且つ定量的に測定するのは困難であり、またマイクロ RNA 前駆体と成熟型マイクロ RNA の存在量に一定の相関関係が維持されている保証はないことが確認されているため、平成 28 年度はより情報量の多い長鎖の転写産物の網羅的・定量的測定を専ら実施した。取得したデータの品質は良好で、PerceLLome 法適用のための外部スパイク RNA も転写産物量に対して適量添加できていることを確認した。現在、詳細な解析計算を実行中であり、単回暴露[0+1]、14 日間反復暴露[14+1]、及び 4 日間新型反復暴露[4+1]の溶媒対照群のデータを比較することにより、純粋に反復暴露により発現誘導若しくは発現抑制を受けた転写産物の抽出を行い、反復暴露による基線反応の成立機序の解析を進める。

「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」においては、複雑な毒性機序の解析に対応する ensemble learning system の開発を継続し、精度や感度の性能向上を確認した。また一般公開に向けて既存の解析ソフトウェアの機能強化（軽量化、高速化）と Garuda Platform 準拠による他ソフトウェアとの連動性強化を実施し、一般向けの版をリリースしてオープン環境における毒性解析パイプラインの構築に向け、大きく進展した。

「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、メインサイトのセキュリティ強化と並行してミラーサイト開設を進め、利用者の利便性を高めた。また先行研究で開発した独自ソフトウェアの最新 OS に対応したインストールパッケージを作成し、オンライン/オフラインに拠らず、より幅広い分野からの利用を促進することで、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

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「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、サリドマイド及び 5-フルオロウラ

シルに対し新型反復暴露実験セットを実施した。四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、平成 27 年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。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。

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においては、Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用い、四塩化炭素或いはクロフィブレート を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析し、反復暴露による基線反応成立への関与を明らかにしていく。

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、単回暴露[0+1]、14 日間反復暴露[14+1]、及び 4 日間新型反復暴露[4+1]の動物試験を実施した四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィブレートについて、成熟型マイクロ RNA を除く転写産物 (mRNA、長鎖ノンコーディング RNA、マイクロ RNA 前駆体など) の次世代シーケンサーによる網羅的定量測定を終え、反復暴露毒性に関与するノンコーディング RNA の抽出と機能解析のための解析計算を進めた。

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についても予定通り推移しており、一般向けのリリース版も完成した。これらを基盤にプロジェクトの最終目標の達成、即ち毒性解析パイプラインの構築を進める。

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、Percellome データベースのセキュリティ強化、ミラーサイト開設を中心に実施した。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)

(1) Kanno J. (2016) Introduction to the concept of signal toxicity. J Toxicol Sci. 2016;41(Special):SP105-SP109

(2) Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K., The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- B Signaling., Mol Cell. 2016 Oct

20;64(2):251-266.

(3) Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J., Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period., Front Neurosci. 2016 Jul 20;10:339.

(4) Fujimoto N, Kanno J., Increase in prostate stem cell antigen expression in prostatic hyperplasia induced by testosterone and 17 -estradiol in C57BL mice., J Steroid Biochem Mol Biol. 2016 Apr;158:56-62.

(5) Kun-Yi Hsin; Yukiko Matsuoka; Yoshiyuki Asai1; Kyota Kamiyoshi; Tokiko Watanabe; Yoshihiro Kawaoka and Hiroaki Kitano. systemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis. Nucleic Acids Research. 2016 Jul 8;44(W1):W507-13 doi: 10.1093/nar/gkw335, published online Apr. 29, 2016.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study (2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster

(2) 菅野 純, Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems biology, 第 105 回日本病理学会総会 (2016.5.13) 仙台、診療領域別講習特別プログラム、口演

(3) Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Jun KANNO, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral

exposure data for prediction of lung toxicity, 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29) 名古屋、日米毒性学会の交流促進プログラム、口演

(4) 菅野 純、社会に浸透した毒性学をめざして、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30) 名古屋、日本毒性学会 35 周年記念特別企画、口演

(5) 種村健太郎、古川佑介、北嶋 聡、菅野 純、キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行動影響解析、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30) 名古屋、一般演題、口演

(6) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復暴露の比較による予測性向上 -、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1) 名古屋、シンポジウム、口演

(7) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016)(2016.9.6)、Seville, Spain, poster

(8) Kanno J., Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology., 第 14 回国際毒性学会(ICT2016)(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

(9) Kitajima S, Aisaki KI, Kanno J, Percellome project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement., 第 14 回国際毒性学会(ICT2016)(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

(10) Tanemura K, Kanno J., Neurobehavioral

toxicity at adult period induced by pesticide exposure at juvenile period. 第 14 回国際毒性学会(ICT2016)(2016.10.5), Merida, Mexico, Symposium

(11) Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health., the 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016.11.29), Seoul, Korea, Invited

(12) 北野宏明. システム毒性. 第 105 回 日本病理学会総会, 診療領域別講習会特別プログラム 研究講演会 10, 病理学を基盤とした生物学・システムバイオロジーとの融合による毒性学の最適化: Phenomics から Genomics へ、そして Phenomics へ, 仙台国際センター, 宮城, May 13, 2016. (invited)

(13) 北野宏明. システム医科学におけるオープンイノベーションを促進するガルダ・プラットフォーム. 第 327 回 CBI 学会講演会 システムバイオロジーの最新動向, 東京大学山上会館, 東京, May 24, 2016. (invited)

(14) 北野宏明. Garuda Platform for Open Innovations in Systems Medicine. 第 43 回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「マルチオミックス解析から医療へ」, 東京大学医科学研究所附属病院, 東京, June 4, 2016. (invited)

(15) 北野宏明. 疾患とシステムバイオロジー. 第 17 回 Atherosclerosis and Biolipid Conference, ヒルトン東京お台場, 東京, Aug. 6, 2016. (invited)

(16) 北野宏明. システムバイオロジーの展開と Human Immunology への可能性. 第 44 回日本臨床免疫学会総会, 京王プラザホテル, 東京, Sep. 8, 2016. (invited)

(17) 北野宏明. システムバイオロジーの可能性.
日本神経消化器病学会、消化器心身医学研究会、機能性ディスペプシア研究会、IBS 研究会 合同学術集会 2016, 北海道大学医学部学友会館 フラテ, 北海道, Sep. 9, 2016. (invited)

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