

厚生労働行政推進調査事業費（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
—新型反復曝露実験と単回曝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)

化学物質の反復曝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

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 Percellome^{*1} 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」反復曝露実験^{*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曝露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。本分担研究では研究計画通り（a）化学物質の反復曝露におけるノンコーディング RNA(ncRNA)の発現変動解析、及び（b）Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進、を行った。

平成27年度、（a）では20bp前後の短鎖である成熟マイクロRNAを、Percellome法に対応した上で、効率よく可能な限り誤差が生じない様に組織破砕液から抽出し、また正確に定量し品質管理することが出来るようプロトコルの最適化を行い、これらを以て四塩化炭素[14+1]のRNA-Seqを実行した。（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。

平成28年度、（a）では、ncRNAのうち、長鎖ncRNAなど、成熟マイクロRNA^{*3}以外の転写産物について次世代シーケンサーによるtotal RNA-Seq解析を進めた。平成27年度に測定済みの四塩化炭素[14+1]^{*2}の解析に加え、平成28年度は、四塩化炭素[4+1]やバルプロ酸ナトリウム塩[14+1]及び[4+1]、クロフィブレート[14+1]、アセトアミノフェン[4+1]について、total RNA-Seqを行い、発現変動解析を進め、有意な変動のあった転写産物、特にncRNAを抽出した。

（b）では、公開サイトのRESTful サーバーアプリケーションソフトウェアのセキュリティー強化を進めた。

平成29年度、（a）では、次世代シーケンサーによる短鎖RNAシーケンスに最適化した外部スパイクRNAカクテルを調整し、短鎖となる成熟型マイクロRNA(miRNA)^{*3}についてmiRNA-Seq

解析を進め、四塩化炭素[14+1]及び[4+1]、バルプロ酸ナトリウム塩[14+1]及び[4+1]、クロフィブレート[14+1]、アセトアミノフェン[4+1]の測定を終え、平成28年度の長鎖ノンコーディングRNAの発現変動データと併せて、反復曝露毒性の成立に係わる可能性のある遺伝子の解析を行った。(b)では、公開サイトのセキュリティ強化を進め、セキュリティ監査(ペネトレーションテスト)を通過した。また代表的な in house 開発のソフトウェアである PercellomeExplorer のオンライン化に際して解決しなければならない問題(巨大な参照データベースの保存場所と大量のデータ処理の負担分配)について検討を行った。

-
- (*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。表記については単回投与の場合を[0+1]、14日間反復投与し最終投与1回を行う場合を[4+1]と記す。先行3年間の研究により、反復曝露による生体影響は分子レベルでは、曝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。
 - (*3) 成熟マイクロRNAについては短鎖であるため他とは別に抽出する必要があるため、別途、平成29年度に実施した。

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、化学物質の反復曝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Percellome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) 化学物質の反復曝露によるノンコーディングRNAの発現解析

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(miRNA)以外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。これはノンコーディング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、通常のメッセンジャーRNA(mRNA)や長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)と同時に定量性を保ったまま精製出来ないためである。

平成29年度は成熟型マイクロRNAの発現変動解析に取り組んだ。先ず短鎖RNAで構成されるmiRNA測定専用のスパイクカクテル(Bacillus由来RNA5種類を基に24merの単鎖RNA5種を合成し、これらの濃度を変えて混合した溶液)を調整した。この際、Dicer, Droshaにて処理される通常の成熟型miRNAと同様に3'端をヒドロキシル基修飾し、5'端をリン酸化修飾した。カクテルの濃度調整は、totalRNA-Seqに用いる通常のスパイクRNAカクテルのモル濃度に合わせて実施した。

四塩化炭素[14+1]及び[4+1]、バルプロ酸ナトリウム[14+1]及び[4+1]、クロフィブレート[14+1]、アセトアミノフェン[4+1]の各サンプルのホモジナイズ液のDNA含量に比例して短鎖専用スパイクカクテルを添加し

て成熟型 miRNA-Seq ライブラリを調整し、次世代シーケンサーにて測定した。

使用したマウス肝サンプルは、5mm 径の生検トレパンにより切り抜いた組織片をチューブに採取し、採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) を加えて 4℃ で一晩浸漬して、RNase を不活化、その後、-80℃にて保存していたものである。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy Kit (Qiagen) 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 mRNA 用若しくは上記の miRNA 用のスパイクカクテル (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を公比 3 で混合した溶液) を適量添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットにより全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無などの品質を確認した。なお miRNA-Seq ライブラリ調整の際には、断片長を揃えるために自動 DNA 断片ゲル抽出装置 BluePippin (米 SageScience) を使用した。

RNA-Seq には Illumina 社の次世代シーケンサー NextSeq500 を用いた。シーケンスするライブラリは同社の短鎖 RNA 用試薬、TruSeq Small RNA Library Prep Kit を用いて、全 RNA から調整した。NextSeq500 によるシーケンス処理はメーカーの標準手順に従って実行した。

次世代シーケンサーデータの数值化等、データ処理には、Percellome 手法に対応させたカスタムゲノムを用意した上で、Bowtie2, Cufflinks を利用した。Cufflinks から出力された FPKM データは、マイクロアレイと同様に、SCal4.exe 若しくは AGSCalc.exe を用いて絶対量化した。データ解析にはマイクロアレイと同様に独自開発のソフトウェア群 (MFtools) を使用し、アノテーション付与には Ensembl BioMart の情報を利用した。

(b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

ソフトウェアの in house 開発に際しては、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 (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。データベースエンジンには組込型の 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。

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) 化学物質の反復曝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 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 (miRNA) 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 miRNA とそれ以外 (mRNA や長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)、miRNA 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た。

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 mRNA と lncRNA など、成熟型 miRNA 以外の転写産物の

測定、解析を進め、四塩化炭素([14+1]及び[4+1])、バルプロ酸ナトリウム塩([14+1]及び[4+1])、クロフィブレート([14+1])、アセトアミノフェン([4+1])について、Illumina 次世代シーケンサーNextSeq500による測定を実施した。

引き続き平成 29 年度は成熟型 miRNA 用の外部 RNA スパイクカクテルを調整し、それを添加して、四塩化炭素([14+1]及び[4+1])、バルプロ酸ナトリウム塩([14+1]及び[4+1])、クロフィブレート([14+1])、アセトアミノフェン([4+1])について、次世代シーケンサーNextSeq500による測定を実施した。

シーケンスデータは bcl2fastq で FASTQ ファイルに変換した後、Tophat2 若しくは Bowtie2 で GSC 配列を追加したマウスゲノム (mm10) にマッピングし、Cufflinks にて FPKM 計算を行った。さらに破碎液の段階で DNA 含量に対応した量を添加した外部スパイク (GSC) の FPKM から疑似検量線を生成し絶対量計算を行う一連の処理を、SCal4.exe を用いて実行した。短鎖 RNA を対象とした RNA-Seq(miRNA-Seq)では、miRNA と類似配列のあるスパイク RNA の測定値が安定しなかったため、全サンプルで比較的安定していたスパイク RNA 1 種の測定値を参照する AGNCalc.exe を用いて、絶対量計算を行った。

本研究では、反復曝露における基線反応の分子機序解析を行うため、新型反復曝露プロトコルに従って化学物質を強制経口投与したマウスの肝臓サンプルのうち最終投与後 2 時間の溶媒群と、同じ溶媒を用いて単回投与実験を行ったマウスの肝臓サンプルのうち投与後 2 時間の溶媒群とを比較したところ、mRNA 及び長鎖 ncRNA (lncRNA) の比較解析では t 検定で有意 (p<0.05) となり、発現変動率が 1.5 倍以上若しくは 0.67 倍以下となる転写産物を抽出した(表 1)。有意な変動を示した lncRNA として延べ 219 の候補を抽出した。

			total	lncRNA	miRNA	snRNA	snoRNA
CCI4	14+1	Up	591	26	0	7	0
		Down	230	6	0	0	0
	4+1	Up	48	3	0	1	1
		Down	1056	29	1	8	2
VPA	14+1	Up	65	2	0	1	0
		Down	330	5	3	3	5
	4+1	Up	24	2	0	0	4
		Down	2260	50	3	2	2
Clofibrate	14+1	Up	239	13	0	1	3
		Down	443	19	0	7	0
Acetaminophen	4+1	Up	37	2	0	2	6
		Down	2817	62	1	2	1

表 1. 各化学物質の反復曝露によって基線反応の変動を呈した長鎖転写産物の件数

成熟型 miRNA-Seq の比較解析では、系統誤差が大きさを考慮し、t 検定で有意 (p<0.05) となり、変動率が 2.0 倍以上若しくは 0.5 倍以下となる転写産物を抽出した(表 2)。有意な変動を示した成熟型 miRNA として延べ 148 の候補を抽出した。

			total	miRNA	snRNA	snoRNA
CCI4	14+1	Up	264	7	0	1
		Down	357	15	0	0
	4+1	Up	285	2	0	1
		Down	261	3	0	3
VPA	14+1	Up	143	4	0	1
		Down	234	6	0	0
	4+1	Up	69	3	0	1
		Down	701	40	1	17
Clofibrate	14+1	Up	332	30	0	8
		Down	129	12	3	4
Acetaminophen	4+1	Up	243	16	0	7
		Down	439	10	2	4

表 2. 各化学物質の反復曝露によって基線反応の変動を呈した短鎖転写産物の件数

また、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 を運用し、マッピングに用いるカスタムゲノムやアノテーション情報の最適化を進め、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の改良を進め、平成 29 年度には成熟型 miRNA-Seq 用の解析計算パイプラインを新たに作成した。

(b)Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

オンライン化された Percellome 専用解析ソフトウェアのうち、Percellome データベースを参照するソフトウェアは、Percellome 公開サイトに REST 形式でアクセスし、JSON フォーマットのデータを取得する。Percellome 公開サイトにおいて、この仕組みを担っている RESTful サーバーアプリケーションソフトウェアにおいて存在していた潜在的なセキュリティリスクを解消し、セキュリティ監査(ペネトレーションテスト)を通過した。

また比較解析用ソフトウェア Percellome Explorer.exe の専用データベースにトランスクリプトームデータを追加し、類似評価精度を向上させるとともに、このソフトウェア化のオンライン化に際して問題になる案件(巨大な参照データベースの保存場所と大量のデータ処理の負担分配)について、いくつかのモデル想定して、各条件での処理速度、通信データ量、配布形態等を検討し、オンライン版の設計を進めた。

D. 考察

反復曝露影響の分子機序解析による、既存の単回曝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曝露実験により、単回曝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(曝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(単回曝露時の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。

平成 28 年度の研究で抽出した複数の長鎖 ncRNA (lncRNA) に加え、平成 29 年度は成熟型 miRNA を中心とした短鎖 RNA の定量評価及び抽出成功した。これらの転写産物の多くは詳細が知られておらず、反復曝露影響の成立機序への具体的な関与機序は不明であったため、引き続き情報収集を行う事とした。

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、基盤となる公開サイトのセキュリティ強化を一通り終えた。今後、セキュアなミラーサイトの開設を予定しており、利用者の利便性/安全性の向上が期待される。また Percellome Explorer のオンライン化について具体的な検討を行い、単純なサーバークライアントモデルではサーバー側の負荷が大きすぎる事を確認した。このため、UI 部分の Garuda Gadget 化などのサーバー負荷が大きくなるモデルで設計を進めることとした。

E. 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「化学物質の反復曝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 28 年度までに四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレード、アセトアミノフェンによる新型反復曝露の totalRNA-Seq を終え、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物についての発現データを得た。平成 29 年度は短鎖 RNA の定量測定のための外部スパイク RNA カクテルを調整した上で、totalRNA-Seq と同一サンプルから短鎖 RNA を抽出し、成熟型マイクロ RNA の測定を行った。これらの結果、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレード、アセトアミノフェンの4化学物質の反復曝露による毒性機序に関わる転写産物の網羅的な抽出に成功し、反復曝露の毒性機序に関わると予想されるシグナルネ

ネットワーク候補の抽出など詳細解析が進んだ。

「Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進」において、平成 29 年度も基盤となる公開システムのセキュリティー強化を進め、セキュリティー監査（ペネトレーションテスト）を通過するなど、安定運用を維持した。また PercellomeExplorer のオンライン化手法の方針が定まり、開発に向けた準備が整った。

F. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

なし

2. 学会発表（抜粋）

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Double strand break repair by capture of unintentional sequences, an emerging new risk for the leading-edge technology, (2017.1.8), Keystone Symposia Conference / Precision Genome Engineering, Colorado, USA, poster

相崎健一、小野竜一、北嶋聡、菅野純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析, 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017. 7. 11) 横浜, 口演

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Double strand break repair by capture of unintentional sequences and a novel mechanism of genome evolution, The 4th JSEV Annual Meeting (2017.8.30) Hirosaki, Japan, poster

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda platform as a tool for Open

Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017. 5. 17.), Daejeon, Korea

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017.9.13) poster

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