

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)

Percellome データベースを利用した解析パイプライン

分担研究者 夏目 やよい  
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所  
バイオインフォマティクスプロジェクト  
研究員

研究要旨

マウス（C57BL/6, 12週齢、オス）にバルプロ酸ナトリウム（0, 50, 150, 500 mg/kg、  
溶媒：メチルセルロース 0.5%）を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に各臓器（脳：皮質及び  
海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓）を回収してマイクロアレイ解析に供した。Percellome法  
により正規化されたデータを入力として、Garudaガジェットを用いたパスウェイ解析を行  
い、バルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現への影響を各臓器で比較した。その結果、特  
に細胞周期関連遺伝子への影響が顕著であったが、複数の臓器で共通して認められる傾向  
（細胞周期、免疫応答関連遺伝子）においても時点は多様であり、一方で臓器特異的な傾  
向（RHO GTPase、rRNA転写、脂肪酸代謝関連遺伝子）も認められた。

**A. 研究目的**

Percellomeプロジェクトでは多  
岐にわたる化合物による遺伝子発現プ  
ロファイルの収集が続けられており、  
これらのデータを用いた毒性発現機構  
の推定を実現するためには解析環境の  
整備が必要である。一方、SBIが開発  
を進めている情報解析プラットフォーム  
であるGaruda [1]は、互換性のあ  
る対応ソフトウェアを自由に連結させ  
ることによりプログラミングなどの技

術を必要とすることなくデータ解析を  
行うことを可能としている。本研究で  
は、PercellomeデータをGaruda上で  
解析し、化合物の毒性発現機構の推定  
を行うと同時に、本ケーススタディー  
によってPercellomeデータの解析パ  
イプラインを構築することを目的とし  
ている。これにより、バイオインフォ  
マティクスの経験・技術の有無を問わ  
ずより多くの研究者がPercellomeデ

ータを利用できるようになると期待される。

## B. 研究方法

解析データには、バルプロ酸ナトリウムを投与したマウスの複数の臓器における遺伝子発現プロファイルを使用した。マウス (C57BL/6, 12週齢、オス) にバルプロ酸ナトリウム (0, 50, 150, 500 mg/kg、溶媒: メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に各臓器 (脳: 皮質及び海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓) を回収してマイクロアレイ解析

(Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供した。このデータはPercellome法[2]により正規化され、Percellomeデータとしてデータベース化されている。データベース内での該当するPercellomeデータ検索、処理時間及び濃度依存的に発現変動が見られる遺伝子 (DEG) のリスト及び発現量の抽出には、インハウスのソフトウェア (PercellomeDB index, MF Surface, Rsort) を使用した。次に、TargetMine

(<http://targetmine.mizuguchi-lab.org> [3, 4]) でヒトオーソログのリスト入手後にDAVID

(<https://david.ncifcrf.gov> [5, 6]) でEnsembl gene IDに変換した。DEGの機能解析にはGarudaを使用した。Garuda上ではガジェットと呼

ばれる対応ソフトウェアが多数搭載されている。その中で、Ensembl gene IDに対応するガジェットの検索にはNandiを使用した。入力したDEGと関連するパスウェイの検索とその描画に用いるXMLファイルのダウンロードにはBiocompendiumを使用し、このXMLファイルとPercellomeデータを用いてパスウェイ上の遺伝子の発現変動を可視化する際にはCytoscape [7-9]を使用した。XMLファイルの入手ができないパスウェイ (“Metabolic Pathway”) の可視化にはNaviCell [10-11]を使用し、遺伝子発現量は“InsoSigMap: map of functional redundancies between informative gene sets”のパスウェイにマッピングした。その他の関連パスウェイの検索にはReactome [12-13]およびTargetMineを使用した。

## C. 研究成果

ReactomeとTargetMineを用いたパスウェイ解析を行い、バルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現への影響を各臓器で比較した。その結果、特に細胞周期関連遺伝子への影響が顕著であったが、臓器によってその影響が認められる時点が異なっていた (海馬: 2時間、心臓: 4時間、腎臓: 24時間)。また、抗原プロセッシング (腎臓: 4時間) やIL-12刺激によるJAK-STAT経路の

活性化（肺：8時間）など、免疫反応に対する影響も認められた。このように複数の臓器で認められる遺伝子発現変動パターンに加えて、RHO GTPase（海馬：24時間）、RNAポリメラーゼIIIによるrRNA転写（肺：2時間）、脂肪酸代謝（肝臓：8時間）に関連する遺伝子の変動といった臓器特異的な影響も検出された。Biocompendiumを用いて入手可能なXMLファイルを検索し、Cytoscapeでこのような遺伝子発現変動のパターンを可視化したところ、腎臓における細胞周期関連遺伝子の発現変動は明瞭な処理時間・濃度依存性を示した。さらにNaviCellを用いて、肝臓における代謝関連遺伝子の発現変動を可視化したところ、特にミトコンドリア、脂肪酸代謝、エストロゲン応答に関連する遺伝子の発現変動が同様に明瞭な処理時間・濃度依存性を示した。

#### D. 考察

バルプロ酸ナトリウムは副作用として肝毒性を有することが知られているが、肝臓以外における遺伝子発現への影響はまだ十分に理解されているとは言い難い。本研究によって、バルプロ酸ナトリウム投与によって各臓器において異なる変動が起きることが確認された。特に、腎臓における影響が大きく、半減期よりもはるかに長い投与後24時間で最も変動が顕著であると

いう結果が得られた。これはバルプロ酸ナトリウムの代謝物による影響であると考えられ、臓器間で異なる応答性を理解するためにはその動態を考慮する必要があると考えられる。一方、細胞周期や免疫応答に関連する遺伝子は複数の臓器において発現変動が認められたが、このような共通パターンはバルプロ酸ナトリウムの毒性発現機構を推定するために有益な情報であると言える。今後はIL-12を介したJAK-STAT経路の活性化に対してバルプロ酸ナトリウムが与える影響について更に解析することを計画している。

Percellomeデータを効果的にGaruda上で解析するためには、現在使用可能なガジェットに加えて、①オーソログ検索・変換機能、及び②gene ID変換機能が必要であることが明らかになった。本研究ではウェブアプリケーションを使用した、解析環境の整備の観点からこれらの操作についてもGaruda上で可能であることが好ましい。この点については改善指針として既に共有済みであり、今後Garudaガジェットとして新たに開発を計画している。

#### E. 結論

バルプロ酸ナトリウムが遺伝子発現プロファイルに与える影響は、複数の臓器で共通して認められる傾向（細胞周期、免疫応答関連遺伝子）におい

ても時点は多様であり、一方で臓器特異的な傾向 (RHO GTPase、rRNA転写、脂肪酸代謝関連遺伝子) も認められる。これらを統合的に解釈するため、Garudaのガジェットを用いたシステム生物学的アプローチが有効であると考えられる (現在準備が進行中)。また、Garudaはガジェット間の互換性に改善の余地は残っているものの、解析プラットフォームとして十分にその機能を果たすことができることを確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

①Gordon Research Conference, Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2017.8.13-18, NH, USA)

“Quantitative systems toxicology approach by Percellome to investigate organ-specific reactions by administration of valproic acid in mice” (Poster)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno

②RECOMB/ISCB Conference on Regulatory & Systems Genomics with DREAM Challenges (2017.11.19-21, NY, USA)

“Assessment of the effect of valproic acid on organ-specific reactions in mice by analyzing quantitative Percellome toxicogenomics data” (Poster)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 【引用文献】

- [1] Ghosh, S., et al. *Nature Reviews Genetics* 12.12 (2011): 821-832.
- [2] Kanno, J., et al. *BMC genomics* 7.1 (2006): 64.
- [3] Chen, YA., et al. *PLoS One* 6.3 (2011): e17844.
- [4] Chen, YA., et al. *PLoS One* 9.6 (2014): e99030.
- [5] Huang, DW., et al. *Nature Protoc.* 4.1 (2009): 44-57.
- [6] Huang, DW., et al. *Nucleic Acids Res.* 37.1 (2009): 1-13.
- [7] Shannon, P., et al. *Genome Research* 13.11 (2003): 2498-504.
- [8] Rowan, C., et al. *Am Assoc Cancer Res Educ Book*

(2005): 12-16

[9] Cline, MS. Et al. *Nature Protoc.* 2.10 (2007):  
2366-82

[10] Kuperstein, I., *BMC Syst Biol* 7 (2013): 100.

[11] Bonnet, E., et al. *Nucleic Acids Res* 43 (2015):  
W560-W565.

[12] Milacic, M., et al. *Cancers (Basel)* 4.4 (2012):  
1180-211.

[13] Fabregat, A., et al. *Nucleic Acids Res* 44.D1  
(2016): D481-7.