

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

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)

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 Percellome*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。

特に平成 24～26 年度に実施した「新型」反復曝露実験**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。

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 6 研究を実施した。

- (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
- (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
- (3) 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) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進
- (6) Percellome データベースを利用した解析パイプライン

(1) では、平成 27 年度はアセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウムに対し「新型」反復曝露実験セット ([4+1]及び[0+1]**) を行い、先行研究での四塩化炭素と類似した過渡反応—基線反応関係を確認した。但し、四塩化炭素では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、アセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウムではむしろ発現が増加する遺伝子が多いという差異が認められた。それにも関わらず、反復曝露による遺伝子発現変化の基盤的分子機構には、EIF2 シグナル等を主体とする小胞体ストレスが存在しており、この変化は NRF2 の下流で mTOR シグナルの関与のもとに誘導されることが示唆された。平成 28 年度はサリドマイド及び 5-フルオロウラシル (5-FU)

に対し「新型」反復曝露実験セット、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、アセトアミノフェン、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を得た。平成 29 年度はアセフェート及び五塩化フェノールに対し「新型」反復曝露実験セット、網羅的遺伝子発現解析を行い、前者は反復による影響が軽微な事例、及び、後者は単回曝露で過渡反応を示した遺伝子の発現が、反復曝露により常時誘導状態へと移行する機序の存在を示唆する事例を得て、今までの小胞体ストレス系に加え、ミトコンドリア／代謝系、細胞回転制御系、など、複数の系の相互作用によるより複雑な制御の存在が示唆された。

(2) では、平成 27 年度は DNA メチル化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を用いた手法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認した。引き続き、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、本解析手法を適用し DNA メチル化状態を網羅に解析した結果、現時点では、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なかったが、微細に DNA メチル化状態が変化した領域を複数抽出した。平成 28 年度はクロフィブレートおよびバルプロ酸ナトリウムを 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、本解析手法を適用し DNA メチル化状態を網羅的に解析を行い、DNA メチル化状態が変化する領域を探索した結果、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数検出した。平成 29 年度は次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq によりヒストン修飾の解析を進め、有意な変動を示す領域を捉えた。

(3) では、平成 27 年度に、ノンコーディング RNA のうち、特に成熟マイクロ RNA については、短鎖であるための発生する系統誤差を低減すべく、先ず抽出・測定方法の最適化を行った。また次世代シーケンサによる RNA-Seq については、ライブラリー調整段階からシーケンス後のデータ処理段階まで Percellome 手法を適用し、その最適化を進めて、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した。平成 28 年度は四塩化炭素と同様に、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレートについて、RNA-Seq 解析を進め、発現変動を呈したメッセンジャーRNA や長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) を中心とした転写産物を抽出した。平成 29 年度は 20bp 前後の短鎖となる成熟型 miRNA を対象とした RNA-Seq (miRNA-Seq) を進めた。miRNA-Seq 専用のスパイクカクテルを調整し、これを適用して、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]) における、miRNA-Seq を行って、平成 28 年度の lncRNA の測定結果を合わせ、網羅的に解析して、反復曝露の成立機序に関連する分子の抽出と分子機序について検討した。

(4) では、毒性機序の複雑性に対応すべく、平成 27 年度より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、平成 28 年度は実際のゲノムデータを小数用いた検証を進め、平成 29 年度はさらに実際のゲノムデータを複数一括で用いて性能等の最適化を進めた。ゲノム解析とその関連データベースの整備としては平成 27 年度より継続的に、先行研究で開発したソフトウェアのより一層の強化（軽量化、高速化）と Garuda プラ

ットフォーム****上への実装、一般公開を進めた。

(5)では、平成27年度より継続的にPercellomeデータベース及び公開サイトのセキュリティ強化を中心とした改良を進め、研究成果のデータベースの公開を維持した。また先行研究で開発した解析ソフトウェア群MF-Toolsについては、平成27年度に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年度には最新OSに対応したインストールパッケージを用意した。平成29年度には解析ソフトウェアPercellomeExplorerのオンライン化の検討を進めつつ、専用データベースの拡充を実施した。

(6)は、開発したシステムの実用性検証のため、平成29年度に追加された分担研究であるが、モデルとしてバルプロ酸ナトリウムの多臓器における遺伝子発現データを採用し、in house開発の解析ソフトウェアやGarudaガジェットを利用して一連の解析を実際に行い、新規知見を得た。またこの過程で判明した改善指針は研究班内で共有し、今後のソフトウェアアップデートに反映する。

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。

-
- (*) 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。実験の反復曝露と単回曝露の回数をもとに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。
 - (***) 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。
 - (****) 各種の生物学的研究ソフトウェアのオンライン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

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6.5億遺伝子発現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曝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、反復曝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、反復曝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】

●試薬及び動物：

アセトアミノフェン (Acetaminophen; 分子量: 151.17、Cas No.: 103-90-2、純度 99%以上、Sigma-Aldrich) 及び、フェノバルビタール ナトリウム (Phenobarbital sodium salt; 分子量: 254.22、Cas No.: 57-30-7、純度 99%以上、Sigma-Aldrich)、サリドマイド (thalidomide; 分子量: 258.23、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: 130.08、Cas No.: 51-21-8、純度 99.8%、東京化成)、五塩化フェノール (pentachlorophenol (PCP); 分子量 266.34、Cas No.: 87-86-5、純度 99.7%、和光純薬)、アセフェート (acephate; 分子量: 183.2、Cas No.: 30560-19-1、純度 99.5%、和光純薬) について、単回投与の既存データの解析を進めた。単回曝露 (0 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記) 時のアセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム、サリドマイド、フルオロウラシル、五塩化フェノール、アセフェートの投与量はそれぞれ 0、18、60、180 mg/kg 及び 0、15、50、150 mg/kg、0、

100、300、1000 mg/kg、0、30、100、300 mg/kg、0、10、30、100 mg/kg、0、7、20、70 mg/kg である。

「新型」反復曝露実験を、4 日間反復曝露 (4 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。アセトアミノフェンの 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 120 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の 0、18、60、180 mg/kg とした。以下、同様に、フェノバルビタール ナトリウムの 4 回反復投与の用量は 30 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、15、50、150 mg/kg、サリドマイドの 4 回反復投与の用量は 700 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、100、300、1000 mg/kg、5-フルオロウラシルの 4 回反復投与用量は 7 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、30、100、300 mg/kg、五塩化フェノール 4 回反復投与の用量は 70 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、10、30、100 mg/kg アセフェート 4 回反復投与の用量は 10 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、7、20、70 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%メチルセルローズ水溶液とし、金属ゾンデ及びガラス製シリンジ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。

●Total RNA の分離精製：

マウス肝組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C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°Cにて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RN easy 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砕液を調製した。得られた破砕液の 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、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。

●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、ビオチン化 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°C 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「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトウェアは、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ソフトである。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】

●次世代シーケンサを用いた 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 °C O/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 を用いて、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) を用いて、Illumina 社の次世代シーケンサ 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。

●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

四塩化炭素を 14 日間反復投与した後、溶媒（コーンオイル）を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒（コーンオイル）を単回投与した 2 時間後のマウス肝臓のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証し、反復曝露によるクロマチン修飾の変化を明らかにする。各マウス肝臓（30 μ g）を材料として、4 μ l（30 μ g）の抗ヒストン H3K4me3 抗体（Active Motif, cat # 39159）（H3K4me3：転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 4 トリメチル化）、2） 4 μ l（30 μ g）の H3K27Ac3 抗体（Active Motif, cat # 39133）（H3K27Ac3: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化）、3） 4 μ l（30 μ g）の H3K27me3 抗体（Active Motif, cat # 39155）（H3K27me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化）、4） 5 μ l（30 μ g）の H3K9me3 抗体（Active Motif, cat # 39161）（H3K9me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 9 のトリメチル化）、および Input（抗体無しコントロール）を用いてクロマチン免疫沈降（ChIP）を行った。その際、サンプル間の補正を行うために、Drosophila のクロマチンが spike in として添加されている。ChIP 後の DNA は、それぞれの抗体に対する既知の陽性コントロールおよび陰性コントロールを qPCR により定量し、そのクロマチン免疫沈降の有効性の定量を行う。

クロマチン免疫沈降の有効性の確認ができた ChIP DNA より次世代シーケンサ解析用のライブラリーを作成し、75 bp のシングルリードで網羅的シーケンス解析を行った。シーケンス結果は、マウス標準ゲノム（mm10）に対してマッピング後に in silico で 200 bp まで各リードを延長し、SICER アルゴリズムを用いてピークコール（ピーク検出）を行う。SICER アルゴリズムは default のパラメータ（ $p=1e-7$ （narrow

peak）, $p=1e-1$ （broad peak））を用いる。各サンプルは、Drosophila DNA 断片のリード数により補正を行う。

（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】

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 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。RNA 鎖長により生体サンプルからの精製効率が異なるため、本分担研究は、まず各 total RNA 抽出キットの RNA 鎖長別の収率、品質、及び再現性の評価から始めた。平成 27 年度には、RNA 抽出キットである RNeasy Kit（Qiagen）、Allprep DNA/RNA Mini Kit（QIAGEN）、ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit（Epigenetics）や、次世代シーケンサーメーカー製のライブラリ調整キット TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 及び TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit を用いて、収率や品質などを参考に、最適化を行った。平成 28 年度は前年度に最適化したプロトコルを用い、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物について次世代シーケンサによる網羅的解析を進めた。平成 29 年度は 20bp 前後の短鎖 RNA である成熟型マイクロ RNA の次世代シーケンサを用いた発現変動解析を実施するため、先ず短鎖 RNA で構成される専用 Spike cocktail（Bacillus 由来 RNA 5 種類を基に短鎖 RNA 5 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。さらにこの専用 Spike cocktail を添加して成熟型マイクロ RNA の定量発現変動解析を進めた。

次世代シーケンサには 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 シリーズを用いて作成した。なお totalRNA から短鎖 RNA を抽出する際は BluePipin（SageScience）を使用した。

次世代シーケンサデータの数値化等、データ処理に

は、Percellome 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（長鎖 RNA 解析の場合）或いは、Bowtie2、Cufflinks（短鎖 RNA 解析の場合）を利用した。Cufflinks から出力された FPKM データは Percellome 手法による絶対量化計算は、マイクロアレイのデータ処理と同様に、独自開発の SCal4.exe 若しくは AGNCalc.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】

本分担研究で成し遂げようとしている目標は広範であり、多元的アプローチとそれらを統合することが必要となる。そのため、（a）大規模データ解析技術の開発と（b）ゲノム解析とその関連データベースの整備を行った。

（a）大規模データ解析技術の開発

近年、大規模かつ多次元的な生物学データが蓄積されつつある。特に、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、Percellome 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、Percellome データベースから、有用な情報を抽出するためには、この様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。しかしながら、この様な複雑性の高いデータから有用な情報を引き出すことは、従来の研究で用いられてきた統計解析法などでは不可能である。

このようなデータの複雑性に対処するために、Machine learning の手法が活用されつつある。しかしながら、一つの Machine learning の手法のみを使用するだけでは、複雑性の高いデータの全貌を捉えることはできず、適切な解析は難しい。

この様な問題に対しては、ensemble learning と呼ばれる、多数の machine learning アルゴリズムを統合する手法が有用である。実際に、多数の machine learning の手法を統合した IBM Watson は、Jeopardy クイズショーにおいて、人間のチャンピオンに勝利

するという成果を上げている。

そこで、平成 27 年～28 年度においては、大規模な毒性データの複雑性に対応できる解析手法の確立を目的として、多数の machine learning の手法の実装を行い、さらに、これらの手法を統合して解析を行う ensemble learning system の開発を行った。

平成 29 年度は、Deep Learning 手法を利用して、Percellome データベースから、一定の特徴量を認識して分類する問題を設置して、その実現可能性を検討した。Percellome データベースでは、化学物質投与下の遺伝子の発現情報を画像で表す。これまで、Percellome データベースの解析では、化学物質投与下における有意な遺伝子を同定するために、長年経験とトレーニングを積んできた研究者が、それぞれの遺伝子の発現パターンの画像を目視にて判別を行ってきた。しかしながら、Percellome データベースは、100 以上の化学物質それぞれに対し、40,000 以上のプローブの発現データが含まれており、400 万以上の発現データを記述した画像で構成されている。この様な、大量の画像の全てを目視で有意な遺伝子を判別するためには、多大な労力と時間が必要となる。

ところで、近年、機械学習の手法の発展は目覚ましく、機械学習を用いた画像解析の手法も数多く開発されつつある。特に、deep learning の手法の発展はめざましく、分野によっては、人間の能力を超えつつある (David Silver et al (2006) Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. Nature 529:484 – 489.)。例えば、deep learning の技術を使用した画像解析については、非常に高精度に皮膚がんの分類を行うことのできる deep learning モデルが、発表されている (Andre Esteva et al. (2017) Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. Nature 52:115-118)。

そこで、Percellome データベースの画像データから、効率良く有意な遺伝子を判別する手法の構築を目的として、最新の多数の層で構成される deep learning algorithm を用いた、画像解析システムの実装を行っ

た。実装した deep learning に基づく画像解析システムの予測精度の検証を、熟練した研究者が目視判別によって作成した画像データセットを用いて行った。

(2) ゲノム解析とその関連データベースの整備
毒性分子機序解析を高精度で効率良く進めるためには、ゲノム関連のデータベースとの連携をより緊密にし、例えば、上記 Deep Learning で、同定された遺伝子リストなどからネットワークや転写因子群 (TFs) を同定して、そこから毒性の推定を行うなどの一連の処理が必要となる。

この領域では、従来から開発を行っていた SHOE の Garuda プラットフォーム上への実装を引き続き行い、さらに機能強化と連携の拡大を行い、同時に Garuda プラットフォーム準拠を完了して、これらの一連の処理に関わる連携を実現した。

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

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。

(6) Percellome データベースを利用した解析パイプライン【夏目】

解析データとしては Percellome データベースより、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。これらのデータはマウス (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 時間後に脳 (大脳皮質及び海馬)、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) に供して生成したものである。このデータは Percellome 法により正規化され、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、in house ソフトウェア (PercellomeDB index、MF Surface、Rsort) を使用した。次に、TargetMine (<http://targetmine.mizuguchilab.org>) でヒトオーソログのリスト入手後に DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) で Ensembl gene ID に変換した。DEG の機能解析には Garuda プラットフォームを使用した。Garuda プラットフォーム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 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 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 および TargetMine を使用した。

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 27 年度は、アセトアミノフェン、及びフェノバルビタール ナトリウムの研究を行い、下記の成果を得た。

アセトアミノフェンについて解析した結果、4 日間の反復投与後の単回曝露の [4+1] 実験では、単回曝露のみの [0+1] 実験の場合に比べて、反応（過渡反応）が減弱ないし消失する遺伝子が少数、過渡反応が増強する遺伝子が比較的多数認められた。また、その際に溶媒対照群の発現値から読み取れるところの基線反応が、過渡反応が減弱した遺伝子では低下し、過渡反応が増強した遺伝子では上昇する傾向が認められ、この結果は先行研究と同様であったが、例外も認められた。先行研究において、最終投与後 2、4、8、24 時間の変動を過渡反応 (Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの変動を基線反応 (Baseline Response) と定義したが、その各々の特性及び両者の関連性について、現段階では、反復曝露により基線反応が低下した遺伝子群は、先行研究での四塩化炭素等の場合とほぼ同様遺伝子群を含むことが確認された。ただし、その多くは過渡反応を示さない遺伝子であった。過渡反応を示す遺伝子の基線反応は、先行研究の四塩化炭素等に比較すると、アセトアミノフェンではその連動性は弱い傾向にあり、発現が増加、減少、及び同等である遺伝子が基線反応の増・減・不変と一致しない場合があるという特徴が明らかとなった。

アセトアミノフェンは、先行研究で実施した 600mg/kg、180mg/kg、60mg/kg の 3 用量での単回経口投与実験 (TTG010-L、GeneChip MOE430A) における投与後、2、4、8、24 時間目に肝病理検査及び遺伝子発現測定を実施) では、600 mg/kg においてのみ 4 時間後から 24 時間に向けて進行性の肝小葉中心性壊

死が誘発された。その 2 時間前の、投与後 2 時間目に p53 シグナル、NRF2 を介した酸化ストレス応答、ERK/MAPK、JAK/STAT 等のネットワーク遺伝子群の発現誘導、すなわち細胞障害応答、増殖応答、炎症シグナル応答といった細胞障害に対する急性応答が認められた。180mg/kg 以下では、小葉中心性壊死及び、上記のネットワークの遺伝子発現は殆ど認められなかった。今回、[4+1] 実験の 4 日間の反復曝露用量は 120 mg/kg とし、5 日目の曝露用量は、180 mg/kg、60mg/kg、18mg/kg (TTG211-L) であり、いずれも小葉中心性壊死を引き起こさない用量域とした。また、これと比較する単回曝露実験データは、180 mg/kg、60mg/kg、18mg/kg の用量で実施した実験 (TTG035-L) のものを用いた (反復曝露実験と同じバージョンの GeneChip、MOE430.2 を用いて、小葉中心性壊死を起こさない用量域で再実施したもの)。TTG035-L の遺伝子発現プロファイルは、TTG010-L の 180 mg/kg 以下の群のプロファイルとほぼ同様で、投与により発現変動した遺伝子数は約 80 とデータベース中の他の化学物質と比較して少なく、且つ、8 時間までに反応が収束した。変動遺伝子として、PXR/RXR や GR を介した弱い肝毒性を示唆するものが抽出されたが、小葉中心性壊死を起こさない用量域では肝毒性が非常に低いことを確認し得た。この様な背景において、4 日間、小葉中心性壊死用量を下回る 120mg/kg の 4 日間反復投与により、5 日目の投与による遺伝子発現変動は、ほぼ TTG035-L と同等であるが、若干増加し約 170 遺伝子であり、増加した遺伝子は、NRF2 を介した酸化ストレス応答、タンパクユビキチン系路、GR 応答系等に属していた。基線反応は、低下に動く遺伝子を約 390 認め、これらは、EIF2 シグナル系、ミトコンドリア機能障害、FXR/RXR 活性化、LXR/RXR 活性化、酸化リン酸化に関わり、その上流に、RICTOR、MYCN、HNF4A、NRF2 等が位置しており、四塩化炭素や、フェノバルビタールなどと共通する、小胞体ストレス応答が生じる事、加えて、ミトコンドリアと脂質代謝へ影響する可能性が示された。

従来、アセトアミノフェン過剰摂取による肝の急性

障害（肝小葉中心性壊死に相当）が、グルタチオン枯渇による活性代謝物の蓄積により生じる事例以外の、慢性毒性に関わる情報が少ないが、ほぼ唯一、間質性肺炎、あるいは薬剤性肺炎といった肺障害が報告されている。通常、連投後に発症していることから、肝壊死量以下で発症していると考えられ、今回の反復投与で認められたストレス応答等の影響が関連するか否かが注目される。今回、肺の遺伝子発現を検討していないが、肺と肝を同時に解析可能な他の化学物質のうち同様の遺伝子発現プロファイルを肝で認めるものの、肺プロファイルを解析することで、その可能性を検討できるものとする。

フェノバルビタール ナトリウムの新型曝露実験のデータ解析を進めた結果、①四塩化炭素とは異なり、基線が低下する遺伝子が少ない（約 250）ことが判明した。EIF2 シグナル等を主体とする小胞体ストレスの存在が明らかとなりこれは四塩化炭素と共通する所見であった。基線低下には PPARA を介した FXR、LXR の系、急性炎症の際に動く系が関与する可能性が示された。②[0+1]と[4+1]の間で比較したところ、基線が上昇するものが多かった（約 2,000）。そして、その多くは過渡反応が増強するものであった。これらは、NRF2、Myc、p53、PXR/SXR、CAR などを上流に持つ遺伝子群であることが示唆された。③基線反応にも過渡反応にも変化がないものも認められた。これらは、NRF2 の他に、RICTOR と Myc が上流にあり、EIF2 シグナルの関与が示されており、四塩化炭素の場合と異なり、細胞増殖に傾いている可能性が示された。

平成 28 年度にはサリドマイドと 5-フルオロウラシル新型曝露実験のデータ解析を進めた。

サリドマイドは、単回曝露 [0+1] 実験では、2、4、8 時目の反応が見られ、24 時間目の反応はほとんどなかった。この反応は、グルタチオンによる解毒系、NRF2 酸化ストレス応答、グルココルチコイド受容体 (GR) を上流にもつ急性炎症応答、が中心である。これに対し、反復曝露 [4+1] 実験により単回曝露 [0+1] 実験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。NRF2 酸化ストレス応答、PXR/RXR 系活性化、等が中心で、上流に GR、NRF2 等が位置する。これらは、過渡反応の変化に関わらず基線反応が反復曝露 [4+1] 実験において上昇する遺伝子群と一部重複するが、それに加えて、RICTOR、MYCN 等を上流にもつ小胞体ストレス応答も含まれている。この点は、上述の PB やアセトアミノフェンと共通する。

[4+1] 実験により、[0+1] 実験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、[0+1] 実験で 2 時間目にピークを示す即時応答遺伝子系の急性炎症反応性の遺伝子であった。これらは、反復曝露により、選択的に反応性（過渡反応）を停止することが明らかとなった（定常的発現は維持される）。先行研究において Thalidomide は、急性ストレスを 2 時間目から諸臓器に誘発するが、反復により、小胞体ストレス、ミトコンドリア障害、Sirtuin シグナル系への影響が表れ、代謝への直接的作用が加わると考えられる。いずれも臓器共通性と特異性が存在し、サリドマイドの多彩な薬効標的、及び毒性標的の分子基盤を説明するものと考えられた。

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反応が上昇し、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反応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。前者は、基線上昇のみを示す遺伝子群として HNF4A、RICTOR、MYCN など上流にもつ EIF2 シグナル、ミトコンドリア機能障害、ユビキチン系、酸化的リン酸化、といった小胞体ストレスに関わる反応を基礎としていた。これに対し、過渡反応の増強を示す遺伝子群は、p53 シグナル、細胞回転 (G2/M チェックポイント機能)、などに属していた。この様に、殺細胞性に向かう抗がん剤としての機能が確認されるとともに、

直接的な発がん性に向かう分子機構が目立たない特徴が確認された。

平成 29 年度は、アセフェート及び五塩化フェノールを検討した。

アセフェートは、反復曝露 [4+1] 実験も単回曝露 [0+1] 実験とほぼ同等の基線を維持している遺伝子が殆どであり、過渡反応を示す遺伝子のリスト及び、それらの過渡反応の大きさには殆ど変化がなかった。これは、基線反応が増加を示す遺伝子にも低下を示す遺伝子にも該当する所見である。[4+1] 実験により、[0+1] 実験の過渡反応が消失または低下する遺伝子は殆ど認められなかった。その中であって、代謝酵素の一部については [4+1] において過渡反応が減弱するものが認められた。

2 時間目の誘導の上流に PXR/SXR 及び GR が位置し、時間の経過とともに PPAR も作動する様子が示された。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が変動することから、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響を示唆する遺伝子リストが含まれるとの出力が IPA 解析により得られた。また、発がん性を示唆する遺伝子群の発現誘導を伴っていた。

五塩化フェノールについては、殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線反応が上昇すること、基線反応上昇を示した遺伝子は単回曝露時に過渡反応を示したものと、及び、示さなかった遺伝子を多数含み、四塩化炭素の解析の際と同様に、その上流に RICTOR、HNF4A、NRF2 が位置し、EIF2 シグナル、ミトコンドリア機能異常、ユビキチン化経路の遺伝子発現に関わり、小胞体ストレスが誘発されていることが明らかとなった。なお、[0+1] の五塩化フェノールに特徴的であったインターフェロンシグナル遺伝子群はそのすべての過渡反応は [4+1] 実験においては消失し、その多くは有意な基線反応の上昇を示していた。すなわち、この系の遺伝子群は、反復投与により常時誘導状態に置かれた可能性が示唆された(但し、実験の実施時期が離れていることから最終的な定量的確認は、少数の動物を用いての再現実験を必要とする

可能性がある)。

注目されるのは、4 日間反復曝露により 5 日目の曝露に対する反応性が、単回時と大幅に変化した状態における、[4+1] 実験の 24 時間目に誘導される遺伝子群はインターフェロンシグナル系に属さないものの、その上流に、IRF7、IRF3、PTGER4 など、[0+1] 実験の際の上流と共通の因子が抽出される点であり、その共通性の解析を進める必要がある。

今回、五塩化フェノールが、過渡反応の消失という点で四塩化炭素類似の反応を示すことが判明したが、その基線反応の方向が逆である可能性があることから、常時誘導状態の存在とその成立機序の解析が新たな課題として浮上した。

(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。

●次世代シーケンサを用いた whole genome bisulfite sequencing

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 (Illumina NextSeq500) で高速シーケンスする全ゲノムバイサルファイ解析 (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 のクロフィブレート及びバルプロ酸ナトリウムを 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。

●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

四塩化炭素を 14 日間反復投与した後、溶媒 (コーンオイル) を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒 (コーンオイル) を単回投与した 2 時間後のマウス肝臓よりクロマチン免疫沈降を行なった結果、H3K4me3 抗体に関与した 22 倍、H3K27Ac 抗体に関しては 202 倍、H3K27me3 抗体に関しては 49 倍、H3K9me3 抗体に関しては 15 倍の濃縮が確認されたので、ChIP は正常に行われたと判断された。これらの ChIP 済み DNA よりライブラリーを作成し、次世代シーケンサによる 75bp のシングルリードの網羅的シーケンス解析を行ない、現在データについて解析中である。今までに得られた有効なデータは、H3K4me3 抗体に関してはコントロールが 16500 peaks 反復投与群が 15996 peaks、H3K27Ac 抗体に関してはコントロールが 20379 peaks、反復投与群が 20826 peaks、H3K27me3 抗体に関してはコントロールが 20927 peaks、反復投与群が 23816 peaks、H3K9me3 抗体に関してはコントロールが 29756 peaks、反復投与群が 31046 peaks となっている。H3K27me3 は、DNA メチル化非依存的に遺伝子発現を抑制することが知られ、反復投与により 13% も peak 数が上昇していることから、反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していると考えられる。各 peak の網羅的解析に際して、溶媒対照群に対して増加あるいは減少 (具体的にはそれぞれピーク高 (各ピークにおける頂点部分においてマッピングされたリード数) が 2 倍以上、もしくは 1/2 以下) で、いずれ

かの高さ 20 以上、という条件にて抽出したところ、それぞれ (以下括弧内はピーク数で[増加、減少]をあらわす)、

抗 H3K4me3 抗体 (48、19)、
抗 H3K27Ac 抗体 (191、50)、
抗 H3K27me3 抗体 (160、1)、
抗 H3K9me3 抗体 (627、6)、

という解析結果となった。このように、反復投与により有意な変化 (増加あるいは減少) を示すヒストン修飾部位を抽出できた。

(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】

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 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。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 鎖長により抽出効率が異なり、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、クロフィブレートについて、次世代シーケンサによる測定を実施し、変動した転写産物、特に lncRNA については延べ 219 の候補を抽出した。

平成 29 年度は短鎖である成熟型マイクロ RNA の網羅的・定量的測定を次世代シーケンサにより実施して、成熟型 miRNA については延べ 148 の候補を抽出した。

前年度までに取得した長鎖転写産物の網羅的発現データと合わせ、反復曝露による基線反応の成立機序などの網羅的解析を進めた。

(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】

(1) 大規模データ解析技術の開発

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、Percellome 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、Percellome データベースから有用な情報を抽出するためには、この様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。

平成 27 年度は、多数の machine learning の手法を統合して解析を行う、ensemble learning system の開発を行った。今回実装を行った machine learning の手法は、

(1) クラスの予測を行う分類器、(2) 数値の予測を行うアルゴリズム、の二種類に分類される。

(1) の分類器は、例えば、遺伝子の各種 cell line における発現データを入力データとして、それぞれの遺伝子が“薬剤ターゲット候補”か“薬剤ターゲット候補で無い”などの予測を行うものである。一方、

(2) の数値の予測を行うアルゴリズムは、例としては、各患者の健康診断データ(年齢や肥満度など)から、一年後の血糖値の数値の予測を行うものである。

今回、我々は、全部で 58 種の分類器の手法を実装した。また、これらの 58 種のアルゴリズムを並列に実行し、結果を統合して予測を行うシステムの開発を行った。例えば 3 つのアルゴリズムを並列に実行している場合、3 つのアルゴリズムは、それぞれ、遺伝子 A が、“薬剤候補となる”か“薬剤候補とならない”かの予測を行っている。その後、この 3 つのアルゴリズムの多数決を取って、最終的な予測を行う。

今回実装したシステムを、大規模な薬剤投与下における発現データ (cmap, <https://www.broadinstitute.org/cmap/>) に対して使用し、薬剤候補遺伝子を正確に予測できることを確認した。このシステムは、遺伝子や

化合物が毒性を出すかどうかの予測や、パスウェイが毒性に関わっているかどうかについての予測に対し応用可能であり、これらに対しても精度の高い予測が出来ると期待される。

さらに、計 120 種の数値予測の machine learning の手法を実装し、これらの 120 種のアルゴリズムを並列に実行し、結果を統合して最終的な予測を行う ensemble learning system の開発を行った。このシステムは、ある化合物の、各種セルラインなどに対する薬剤としての有効性の値 (IC50) や、毒性の程度を表す値などの予測に応用可能である。性能評価については、多次元のマルチオミックスデータ (DREAM10, AstraZeneca-Sanger Drug Combination Prediction DREAM Challenge; <https://www.synapse.org/#!Synapse:syn4231880/wiki/235645>) などに対してこのシステムを適用し、薬剤併用による synergy score の予測が正確に出来るかどうかといった検証を行い、一定の性能を有することを確認した。

平成 28 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い、薬剤候補遺伝子を正確に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。

平成 29 年度においては、最新の deep learning algorithm (resnet アルゴリズム、Kaiming He (2015) Deep Residual Learning for Image Recognition. arXiv: 1512.03385) を用いて、遺伝子の発現パターンを記述した画像データから自動で特徴量を抽出し、それぞれの遺伝子が有意かどうかを判別する、画像解析シ

システムの構築を行った。このシステムは、画像データ（トレーニングデータとテストデータ）の前処理を行うコンポーネント（このコンポーネントでは、オリジナルの、遺伝子発現を記述した RGB 画像を、グレースケール画像へ変換する。その後、グレースケール画像のサイズの縮小を行う）、**deep learning** に基づく画像データから有意な遺伝子を予測する分類器を構築するコンポーネント（このコンポーネントは、多数の層（畳み込み層やプーリング層等）で構成される。層の数としては、18 層、または、34 層、または、50 層、または、152 層とした。これらの層を用いて、画像データから、特徴量の自動抽出を行う。その後、最後の層において、抽出した特徴量に基づき、それぞれの遺伝子を、4 つのクラスに分類する。4 つのクラスは、**positive class**（化学物質により発現が **up regulate** されるクラス）、**negative class**（化学物質により発現が抑制されるクラス）、**rough class**（化学物質により **up regulate** も抑制もされないクラス）、**intermediate class**（**positive** または **negative class** と **rough class** の間のクラス）、である。ここでは **positive** と **negative class** に分類された遺伝子を有意な遺伝子と予測されるものとした）、そして、構築した分類器の予測精度の検証を行うコンポーネント、で構成される。今回、熟練した研究者が、実際に目で見てクラス分けをした画像データを用いた。全データの内、75 パーセントの画像を、分類器を作成するためのトレーニングデータとして、残りの 25 パーセントを、作成した分類期の予測精度を評価するための、テストデータとして用いた。

その結果、18 層で構成される **deep learning** アルゴリズムを用いた場合、予測の正解率は 83 パーセントと、高い正答率を示した。この結果は、我々の **deep learning** に基づく画像解析システムにより、有意な遺伝子を高い精度で推測できることを示唆する。しかしながら、34 層、50 層、152 層の場合の正答率は、0.76、0.7、0.72 と、より層の浅い 18 層の場合よりも低かった。この結果は、層を厚くしすぎると、トレーニングデータに対して過学習を起こしてしまう可能

性を示唆している。また、18 層の場合について、4 クラスそれぞれに対する、予測精度の検証を行った。その結果、**positive class**、**negative class**、**intermediate class** のエラーの割合は、12~16 パーセントであり、クラス間で大きな差はなかった。しかしながら、**rough class** のエラーの割合は、28 パーセントであり、他のクラスよりも予測精度が低かった。このことから、**rough class** の判別は、他の **class** よりも困難であることが示唆される。この原因としては、**rough class**（有意でない遺伝子）に分類される遺伝子が大部分であり、このクラスには、多様な発現変動パターンを示す多様な遺伝子が含まれるためである、と考えられる。

(2) ゲノム解析とその関連データベースの整備
先行研究にて独立システムとして **in house** 開発された転写領域解析ソフトウェア **SHOE** を起点とした一連の処理を実現した。まず、**SHOE** 自体は、**Garuda** プラットフォームの **Gadget** のみならず、**Cloud Service** としても提供可能となった。さらに **SHOE** の結果から、**CellDesigner** に連動させ、遺伝子—転写因子マップの表示が可能となり、さらに複数の解析結果をマージし、より全体を俯瞰できる遺伝子—転写因子マップを構築することも可能となった。

またこの拡大されたマップから、遺伝子と転写因子を抽出し、抽出されたリストから **Percellome DB** や **Reactome DB** へとアクセスし、関連するデータなどにアクセスするなど、これらの一連の解析を続けると極めて大きなネットワークが形成される。そこで、我々は、大規模ネットワークに対応できる可視化ツール **GeneViz** を開発した。

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

平成 27~29 年度、研究成果のデータベースの公開を維持しつつ、継続的に **Percellome** データベース及び公開サイトのセキュリティ強化を中心とした改良を進めていたが、平成 29 年度には外部からの攻撃アクセス

を模したペネトレーションテストに通過した。

また先行研究で開発した解析ソフトウェア群 MF-Tools については、平成 27 年度に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 年度には最新 OS に対応したインストールパッケージを用意した。

また MF-tools の 1 つ、PercellomeExplorer については、専用データベースへのデータ追加・拡充を行ってより多くの化学物質データについて、一括で比較解析できる様にするとともに、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。

(6) Percellome データベースを利用した解析パイプライン【夏目】

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

「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、肝及び肺における四塩化炭素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ほぼ全てについて、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）は、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）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。四塩化炭素は反復曝露により基線反応が低下し、過渡反応が減弱乃至消失する遺伝子が多数を占め、それらは小胞体ストレスと関わるのが強く示唆された。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と単回曝露実験データベースからの反復毒性予測に重要と考えられた。本研究（2）の次世代シーケンサを用いた DNA メチル化及びヒストン修飾の解析によると、遺伝子発現に抑制的に働く H3K27 のメチル化が亢進している可能性が示唆され、反復曝露による遺伝子発現ネットワーク（特に上流）との関係を検討した。

これに対して、解熱鎮痛薬として使用されるアセトアミノフェン（平成 27 年度実施）は、基線反応と過渡反応の関係は四塩化炭素と類似しているが、過渡反応としての発現増加する遺伝子の数が多いという特徴が見られた。この特徴は、治療薬として反復投与される化学物質の特性として注目される。また、小葉中心性壊死を惹起しない用量での小胞体ス

トレス、ミトコンドリア影響の存在が推定された。

抗てんかん薬フェノバルビタール ナトリウム（平成 27 年度実施）は、反復投与により基線の変化しない、あるいは基線が上昇する遺伝子での過渡応答が変化しない、あるいは増強する遺伝子が大半を占め、それらは細胞増殖に関わる傾向を示した。サリドマイド（平成 28 年度実施）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共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又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急性炎症反応性の遺伝子であった。5-フルオロウラシル（平成 28 年度実施）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無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。五塩化フェノール（平成 29 年度実施）においては、単回曝露において発現誘導されたインターフェロン・シグナル遺伝子群、及び、NRF2 下流遺伝子群が 4 日間反復投与により、過渡反応としての発現誘導を殆ど失った。これに対して、基線反応は上昇する傾向があり、反復曝露により常時誘導状態が形成された可能性が示唆された。アセフェート（平成 29 年度実施）では、単回曝露で発現上昇及び発現抑制の過渡反応を示した遺伝子の殆どが、反復曝露後においても同様の過渡反応を示した。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が含まれており、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響を示唆する遺伝子リストが含まれるとの出力が IPA により得られた点が興味深い。

以上から、四塩化炭素に代表される遺伝子発現抑制型の化学物質、比較的毒性が低いと考えられる医

薬品に代表される反復曝露により遺伝子発現がほぼ不変な物質、特徴的な毒性が知られる医薬品等に見られた反復投与により遺伝子発現の程度と種類が増大する傾向にある物質、等に、化学物質が分類される可能性、及び、分子機序として小胞体ストレス系、ミトコンドリア/代謝系、細胞回転制御系、など、複数の系の相互作用による複雑な「過渡反応・基線反応制御」が存在する可能性、が示唆された。

更に、単回曝露の毒性ネットワークとの比較解析を進め、複数の制御系の上流に注目しての反復曝露による生体影響の分子機序の解析をさらに進めることで反復曝露の分子機構の解明とより詳細・高精度の類型化を進めることが出来ると期待される。また、ここまでの解析の結果から、多臓器に異なった標的を有する化学物質、及び、発がん性物質（遺伝子障害性物質）の[4+1]反復曝露情報の補充が望まれることが示唆された。

「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」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）あるいはクロフィブレート及びバルプロ酸ナトリウム（平成 28 年度実施）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中であり、この結果により、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（所謂エピジェネティクス）の関与について明らかになるものと考ええる。平成 29 年度は、ChIP-Seq により反復曝露により有意な変化を示すヒストン修飾サイトを抽出しつつあり、基線反応の成立に関わる知見が得られるものと期待される。

「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」においては、平成27年度のプロジェクト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を用いても成熟型マイクロRNA

(miRNA)の様な短鎖の転写産物と、メッセンジャーRNA (mRNA) や長鎖ノンコーディングRNA

(lncRNA)の様な長鎖の転写産物とを同時に網羅的か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たため、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・定量的測定を先行して実施した。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カクテルもマイクロアレイと同じものの使用が可能で、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。単回曝露[0+1]、14日間反復曝露[14+1]、及び4日間新型反復曝露[4+1]の溶媒対照群のデータを比較することにより、純粋に反復曝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、反復曝露による基線反応の成立機序の解析を進めた。平成29年度は短鎖RNA測定専用の外部スパイクRNAカクテルを用意した上で、成熟型miRNAの網羅的・定量的測定を次世代シーケンサを用いて実施して、前年度までに取得したlncRNAなどの転写産物の網羅的発現データと併せ、反復曝露による基線反応の成立機序の解析を進めた。

「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」においては、複雑な毒性機序の解析には大規模データベースを柔軟に検索し、さらに高度な遺伝子動態から注目すべき遺伝子群を自動的に同定する技術が必要である。本研究では、Ensemble Learning や Deep Learning を用いた手法でこれを実現し、その精度を確認した。また従来から開発を行っていたSHOEに関しては、その機能強化(軽量化、高速化)をさらに進めると同時に、Garudaプラットフォーム準拠による他ソフトウェアとの連動性強化をさらに推し進めた。これらの結果、解析パ

イプラインの人工知能駆動化の可能性が見えてきた。

「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、公開サイトのセキュリティ強化を中心に運用し、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群(MF-tools)についても最新OSに対応したインストールパッケージを作成し提供を再開したことで、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した。MF-toolsのオンライン化についても移行が最も困難と予想されたPercellomeExplorerについても設計方針が立ったことで、今後の移行作業の効率化が期待できる。これらにより、安全性評価技術(データベース、ソフトウェア)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。

「Percellomeデータベースを利用した解析パイプライン」については、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プラットフォーム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。平成29年度の解析ではウェブアプリケーションを使用したのが、解析環境の整備の観点からこれらの操作について

も Garuda プラットフォーム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 ガジェットとしての新規開発を検討する。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

アセトアミノフェン、フェノバルビタール、サリドマイド、5-フルオロウラシル、五塩化フェノール、及びアセフェートによる新型反復曝露実験を完了し、遺伝子発現データの詳細解析を進めたところ、より多彩な基線反応・過渡反応が認められ、現段階で大きく3種類に反応が分類されることが示唆された。今後、可能であれば、これらに多臓器に異なった標的性を示す化学物質、及び、遺伝子障害性物質のプロファイルを追加確認して体系化を進めたい。この過渡反応・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、現段階では主にヒストン修飾であると考えられる、の関与が示唆される。このエピジェネティクス修飾を制御する分子機構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、単回曝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。

次世代シーケンサによる DNA メチル化状態の網羅的な解析、ヒストン修飾変化の解析が計画通り実施可能となり、有意な変動を特にヒストン修飾において抽出しつつある。今後さらに、遺伝子発現変動との関連性を解析し、反復曝露による基線反応成立への関与を明らかにしていく。

ノンコーディング RNA の発現解析は、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレート、アセトアミノフェンについて、平成 28 年までに長鎖 RNA の転写産物 (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による網羅的定量測定を、平成 29 年度に短鎖 RNA の転写産物である成熟型マイクロ RNA の次世代シーケンサによる網羅的定量測定を終え、反復曝露毒性に関与するノ

ンコーディング RNA の網羅的な抽出に成功した。これらの情報から、反復曝露による毒性機序の解析がより進捗するものと期待される。

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 データベース及び公開サイトのセキュリティ強化、及び in house 開発したソフトウェアの提供、オンライン化のための基本設計を実現した。引き続き研究成果の速やかな社会還元を推進してゆく。

Percellome データベースを利用した解析パイプラインの研究においては、Percellome データベースの特徴でもある遺伝子発現データの絶対量化によって複数臓器での遺伝子発現の同時比較の有用性が示され、またその解析においては Garuda 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た。また、Garuda プラットフォーム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。

以上、少数の動物を用いた短期間の試験を基盤とした網羅的な化学物質の安全性評価・予測システムの実用化の基盤が確立したと考える。今後、データ及び解析手法、解析ツールの公開を通して、また、可能であれば、不足しているいくつかのデータの収集と継続的な解析サポート体制を通して、本研究により構築されたシステムが広く活用される段階に到達するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laff

ont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A. Applying 'omics technologies in chemical risk assessment: Report of an ECETOC workshop. Regul Toxicol Pharmacol. 2017 Dec;91 Suppl 1:S3-S13.

(2) Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J. Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128.

(3) Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K., The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling., Mol Cell. 2016 Oct 20; 64(2):251-266.

(4) 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.

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

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

(7) Kanno J., [Biomechanism-based innovation of toxicology by the fundamental concept of "Signal

Toxicity"]. Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. 2015;(133):21-8. Review. Japanese.

(8) Archana Bajpai, Takashi Ishii, Kosuke Miyauchi, Vipul Gupta, Yuka Nishio-Masaie, Yuki Shimizu-Yoshida, Masato Kubo and Hiroaki Kitano. Insights into gene expression profiles induced by Socs3 depletion in keratinocytes Scientific Reports 7, Article number: 15830 (2017), doi:10.1038/s41598-017-16155-1.

(9) Akinori Nishi, Katsuya Ohbuchi, Hirotaka Kushi da, Takashi Matsumoto, Keiko Lee, Haruo Kuroki, Shigeki Nabeshima, Chika Shimobori, Nagisa Komokata, Hitomi Kanno, Naoko Tsuchiya, Makoto Zushi, Tomohisa Hattori, Masahiro Yamamoto, Yoshio Kase, Yukiko Matsuoka and Hiroaki Kitano. Deconstructing the traditional Japanese medicine "Kampo": compounds, metabolites and pharmacological profile of maoto, a remedy for flu-like symptoms. npj Systems Biology and Applications 3, Article number: 32 (2017), doi:10.1038/s41540-017-0032-1.

(10) Caron, E., Roncagalli, R., Hase, T., Wolski, W. E., Choi, M., Menoita, M.G., Durand, S., García-Blesa, A., Fierro-Monti, I., Sajic, T., Heusel, M., Weiss, T., Malissen, M., Schlapbach, R., Collins, B.C., Ghosh, S., Kitano, H., Aebersold, R., Malissen, B., Precise Temporal Profiling of Signaling Complexes in Primary Cells Using SWATH Mass Spectrometry. Cell Reports 18, 3219–3226 (2017).

(11) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Sucheendra K. Palaniappan, and Hiroaki Kitano (Chapter 13. Cancer Network Medicine), Network Medicine - Complex Systems in Human Disease and Therapeutics (Joseph Loscalzo, Albert-László Barabási, and Edwin K. Sil

erman (Eds.)), Harvard University Press 2017 ISBN 9780674436534

(12) Kitano, H. Biological Complexity and the need for Computational Approaches. *Philosophy of Systems Biology: Perspectives from Scientists and Philosophers* (Sara Green ed., Springer), 169-180, Mar. 21, 2017. (book chapter)

(13) 北野宏明. ブロックチェーンの活路は人工知能との連携にあり. *ハーバード・ビジネス・レビュー*, 2017年8月号, 24-37, Aug. 1, 2017.

(14) 北野宏明. ノーベル・チューリング・チャレンジ: 人工知能による科学的発見の再定義と生命科学の加速をめざして. *実験医学別冊「あなたのラボにAI (人工知能) ×ロボットがやってくる」*, 22-31, Dec. 15, 2017.

(15) 北野宏明. システム論とデータ駆動分析から可能となる老化研究. *実験医学増刊号「総力戦で挑む老化・寿命研究」*, 35, 20, 115-123, Dec. 15, 2017.

(16) Hsin KY, Matsuoka Y, Asai Y, Kamiyoshi K, Watanabe T, Kawaoka Y, Kitano H. systemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W507-13

(17) Kitano H. Artificial Intelligence to Win the Nobel Prize and Beyond: Creating the Engine for Scientific Discovery. *AI Magazine*, 2016;37(1)

(18) Hird N., Ghosh S., Kitano H. Digital health revolution: perfect storm or perfect opportunity for pharmaceutical R&D? *Drug Discovery Today*. 2016;21

(6):900-911

(19) Hieu T Nim, Milena B Furtado, Mauro W Costa, Nadia A Rosenthal, Hiroaki Kitano and Sarah E Boyd. VISIONET: intuitive visualisation of overlapping transcription factor networks, with applications in cardiogenic gene discovery. *BMC Bioinformatics*. 2016;16,141,

⑳ 北野宏明. システム・トキシコロジーの展開. *QIGEN eyes*. 2015, 12, 7-9.

㉑ 北野宏明. システム・トキシコロジーの展開 (第2回) . *QIGEN eyes*. 2015;13, 7-9.

(22) Tiago J. S. Lopes, Jason E. Shoemaker, Yukiko Matsuoka, Yoshihiro Kawaoka, Hiroaki Kitano. Identifying problematic drugs based on the characteristics of their targets. *frontiers in Pharmacology*. 2015; 6, 186

㉒ Matsuoka, Y.; Fujita, K.; Ghosh, S.; Kitano, H. Weaving Knowledge into Biological Pathways in a Collaborative Manner. *Computational Systems Toxicology* (eds. Julia Hoeng and Manuel C. Peitsch, Humana Press, Springer), 2015; 181-208.

(24) Kitano, H. Accelerating systems biology research and its real world deployment. *npj Systems Biology and Applications*, 1, doi:10.1038/npjbsa.2015.9, Sep. 28, 2015.

㉓ Takahiro Amemiya, Masashi Honma, Yoshiaki Kariya, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Yoshihisa Kurachi, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Yukio Honma, Darrel R Abernethy, Haruki Kume & Hiroshi Suzuki. Elucidation of the molecular mechanisms underlying adverse reactions associated with a kinase i

inhibitor using systems toxicology. *npj Systems Biology and Applications*, 1, doi:10.1038/npjbsa.2015.5, Sep. 28, 2015.

2. 学会発表 (抜粋)

① Jun Kanno, Introduction to a concept of “Signal Toxicity” for broader research planning to promote precision medicine and healthy aging. The 33rd Joint Annual Conference of Biomedical Science, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan R.O.C. (2018.03.24-25).

(2) 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 Symposium Conference / Precision Genome Engineering, Colorado, USA, poster

(3) 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

(4) 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) Hiroasaki, Japan, poster

(5) 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

(6) 菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第20回研究発表会、(2017.12.12) 神戸、特別講演

(7) Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop , (2017.12.4) NC USA, Plenary

(8) 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

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

⑩ 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

⑪ 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

⑫ 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

(13) 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

(14) 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曝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

(15) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、Percellome Projectの進捗 -単回および新型反復曝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

(16) 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

(17) 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

(18) 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

(19) 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

(20) 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

(21) 菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性 -毒性学的観点からの考察-(2015. 12. 12)、日本動物実験代替法学会第 28 回大会、横浜、特別講演

(22) 菅野 純
OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み
環境ホルモン学会第 18 回研究発表会(2015. 12. 11)

(23) Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium

(24) Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral

(25) Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations.-with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brussels, Oral

(26) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium

- (27) 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
- (28) 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
- (29) 菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期曝露-遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について (2015. 8. 20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー (EXTEND2010)、東京、セミナー
- (30) 菅野 純、種村健太郎、ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるかー有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の発現実験よりー (2015. 7. 17)、第 37 回日本中毒学会総会・学術集会、和歌山、シンポジウム
- (31) 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)
- (32) 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曝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)
- (33) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純
医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究
第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6. 29)
- (34) 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
- (35) Jun Kanno, Construction of “Dynamic Biomarkers” by Percellome Toxicology based on a new Concept of “Signal Toxicity” , The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6.25),Jeju, Korea
- (36) Kitano, H. Nobel Turing Challenge. International workshop "From Genetic Networks to a Cellular Wiring Diagram", Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo, Apr. 26, 2017. (invited)
- (37) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: The Day AI win The Nobel Prize and Future of Civilization. LCSB seminar, Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, Luxembourg, May 11, 2017. (invited)
- (38) 北野宏明. AI 駆動生命科学イノベーションとグランドチャレンジ. AI×Life Science シンポジウム, 日本橋三井ホール, 東京, May 17, 2017. (Plenary talk)40
Kitano, H. Impacts of Artificial Intelligence for Pharmaceutical Industry: Disruptive Innovations in Scientific Discovery and Biomedical Sciences. The FIP 6th Pharmaceutical Sciences World Congress 2017(PSWC 2017), Stockholm Masaan, Stockholm, Sweden, May 21, 2017. (Plenary talk)

- (39) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI, Robotics, and Systems Biology. ICRA 2017, Sands Expo and Convention Centre, Singapore, May 31, 2017. (Plenary talk)
- (40) 北野宏明. 人工知能による医療革命. 山口大学シンポジウム「人工知能・システム医学による難治性疾患への新たな挑戦」, ANA クラウンプラザホテル宇部, 山口, June 24, 2017. (invited)
- (41) 北野宏明. 人工知能とグランドチャレンジ: RoboCup から Nobel Turing Challenge まで. 第1回 AI・人工知能 EXPO, 東京ビッグサイト, 東京, June 28, 2017. (Plenary talk)
- (42) 北野宏明. 人工知能によるシステム・トキシコロジーの加速. 第44回日本毒性学会学術年会, パシフィコ横浜, 神奈川, July 11, 2017. (invited)
- (43) 北野宏明. Nobel Turing Challenge. THE NEW TEXT CONFERENCE, 虎ノ門ヒルズ, 東京, July 25, 2017. (invited)
- (44) Kitano, H. Systems Biology: Tools and Integrated Platforms for the 3Rs. 10th World Congress on Alternatives and Animals in the Life Sciences, Washington State Convention Center, Seattle, USA, Aug. 23, 2017. (Plenary talk)
- (45) 北野宏明. 人工知能が切り拓く新たながん研究. 第76回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 神奈川, Sep. 29, 2017. (invited)
- (46) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Objectives and Implications. Symposium on AI and Society, Toranomon Hills, Tokyo, Oct. 10, 2017. (Keynote)
- (47) 北野宏明. System Biology, Data and AI. 第4回日本橋ライフサイエンスシンポジウム, 日本橋ライフサイエンスハブ, 東京, Oct. 14, 2017. (invited)
- (48) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI, Robotics, and Systems Biology. DSAA2017 - The 4th IEEE International Conference on Data Science and Advanced Analytics, Shinagawa Prince Hotel, Tokyo, Oct. 20, 2017. (Keynote)
- (49) Kitano, H. Noble Turing Challenge. JSPS-IVA Seminar “The Nobel Turing Challenge – When will the first Nobel Prize be awarded for AI?”, IVA's Conference Centre, Stockholm, Sweden, Oct. 25, 2017. (invited)
- (50) Kitano, H. Nobel Turing Challenge. OECD conference ‘AI: Intelligent Machines: Smart Policies’, OECD, Paris, France, Oct. 26, 2017. (invited)
- (51) 北野宏明. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI and Systems Biology. 平成29年度日本バイオインフォマティクス学会・生命システム理論研究会「AIを用いた細胞システムの解明に向けて」, 京都大学iPS細胞研究所, 京都, Dec. 15, 2017. (invited)
- (52) 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)
- (53) 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ーダ・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)

(54) 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)

(55) 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)

(56) 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)

(57) 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)

(58) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno, “Quantitative systems toxicology approach by Percellome to investigate organ-specific reactions by administration of valproic acid in mice” Gordon Research Conference, Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2017.8.13-18, NH, USA) (Poster)

(59) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno, “Assessment of the effect of valproic acid on organ-specific reactions in mice by analyzing quantitative Percellome toxicogenomics data”, RECOMB/ISCB Conference on Regulatory & Systems Genomics with DREAM Challenges (2017.11.19-21, NY, USA) (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