

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
平成 30 年度 総括研究報告書

新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
(H30-化学-指定-001)

研究代表者 菅野 純

独立行政法人 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

特に先行研究（平成 24～29 年度）で実施した Percellome 法*を基盤とした「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のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、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 5 研究を実施した。

- (1) 短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による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毒性発現のエピジェネティクス機構解析
- (3) システム毒性解析の人工知能化
- (4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良
- (5) Percellome データベースを利用した解析パイプライン

(1) では、計画通りイミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンの 2 実験を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と上記の化学物質に特徴的な要素を抽出しつつある。特に先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の 2 物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性（神経毒性及び発癌性）に関わるシグナルネットワークが発動することが示された。

(2) では H30 年度にアセフェートのエピジェネティクス機構解析を予定していたが、バルプロ酸ナトリウム (VPA) に変更した。これはすでに VPA の単回及び反復投与の際の遺伝子発現データを有し、かつ、ヒストン脱アセチル化酵素 1(HDAC1)の阻害を介してヒストンのア

セチル化を増加させることが知られており、この性質が本研究分担課題における陽性対照物質としてより適切と考えられたことから変更を決定した。VPAのエピジェネティック機構解析としてヒストン修飾解析を実施したところ、一般認識であるヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)の阻害ではなく、H3K9me3がグローバルに阻害されているという、既存情報からの予想(HDAC阻害を介しH3K27Acが増加する)とは異なる結果を得た。

(3)では、AI化が可能と思われる工程として遺伝子発現データから候補遺伝子を抽出する工程を選定し、深層学習プロトタイプ(Deep Learning)を用いて膨大な遺伝子変動データから有意に変動した遺伝子を高精度で自動同定させる技術を開発し、正答率95%という優秀な成績を確認した。また解析パイプラインの中核として、先行研究によるSHOEとその関連ツールの連携を強化した。

(4)では、新型反復曝露実験における有意な基線反応抽出ソフトウェアの開発のため、Perccellomeデータベースから基臓器・溶媒・サンプリング時間毎に溶媒群のトランスクリプトームデータを集めて参照データベースを構築し、基本アルゴリズムを生成した。また自動化のための解析計算用ソフトウェアBaselineComparison.exeを作成した。

(5)では解析パイプライン整備の一環として実際の解析プロセスを実行し、バルプロ酸ナトリウム(VPA)が脂肪酸代謝を制御する各種核内受容体の活性に影響すること、及び数理モデリング(ブーリアンネットワーク)によりこれらのシグナルクロストークをシミュレーションし、VPA投与がSREBP/PPARα比の上昇を介して肝毒性につながる可能性があること、を示した。

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。

(* 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。

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	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
-------	------------------------------------	-------	---

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 部長	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 サブプロジェクトリーダー
------	---	-------	--

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

長谷武志 特定非営利活動法人
システム・バイオロジー研究機構

Natalia Polouliakh 株式会社
ソニーコンピュータサイエンス
研究所

A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8.5 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融合し、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築を進める。

B. 研究方法

(1) 短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発【菅野】

●試薬及び動物：

イミダクロプリド (Imidacloprid; 分子量: 255.66, Cas No.: 138261-41-3, 105827-78-9, 純度 99.9%, 富士フイルム和光純薬(株)) 及び、ジエチルニトロサミン

(Diethylnitrosamine; 分子量: 102.14, Cas No.: 55-18-5, 純度 100%, 東京化成工業(株) (単回曝露時はナカライテスク: 製造中止のため同等品を選択)) について、単回曝露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) 時のイミダクロプリド及びジエチルニトロサミンの曝露量はそれぞれ 0、10、30、100 mg/kg 及び 0、1、3、10 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。イミダクロプリドの 4 回の全動物に対する反復曝露の用量は用量設定実験の結果 70mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の 0、10、30、100mg/kg とした。以下、同様に、ジエチルニトロサミンの 4 回反復投与の用量は 5mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、1、3、10mg/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) を用い溶媒はイミダクロプリドではコーンオイル (C8267, Sigma-Aldrich)、ジエチルニトロサミンでは 0.5%メチルセルロース (MC) (133-14255, 富士フイルム和光純薬(株)) 水溶液とし、金属製胃ゾンデ (KN-348, 夏目製作所) を用いて、イミダクロプリドではガラス製シリンジ、ジエチルニトロサミンではプラスチック製シリンジを用いて強制経口投与を行い、最終曝露の 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毒性発現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 ChIP-Seq

バルプロ酸ナトリウムを 14 日間反復投与した後、溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) 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 μg) を材料として、4 μl (30 μg) 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 μl (30 μg) 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 μl (30 μg) 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 μl (30 μg) 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) システム毒性解析の人工知能化【北野】

●深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

先行研究において開発した、多層(畳み込み層やプーリング層で構成される 18 層) からなる resnet モデル (Resnet は、画像分類で高い精度を示すことが多く、ImageNet2015 (<http://image-net.org/challenges/LSVRC/2015/>) における画像分類に関するコンペティションで、最も高い精度を示したモデルである (Kaming He et al. 2015, arXiv:1512)) を利用した深層学習システムをベースに、予測精度を向上させるためにトレーニング及び検証用の画像データ(遺伝子発現変動を示す 3 次元グラフ) セットを新たに作成した。この際、①ノイズの原因となる数値軸や文字を除去し、②3 次元グラフの描画角度を最適化、さらに③情報量を増やすために、グレーからフルカラーに変更し且つ画素数を大幅に増加させた。

なお深層学習システムのトレーニングとチューニングした予測器の予測精度検証には、熟練した研究者が逐一検証・分類 (Positive, Negative, Rough の 3 分類) した 3 次元グラフ画像データセットを重複しないよう二分して用いた。

●Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動強化

先行研究で開発を進めていた転写領域解析ソフトウェア SHOE の機能追加や改良を進め、また Percellome ガジェットを含む他の Garuda Platform 用ソフトウェア (Garuda ガジェット) との連動については、実データを利用した試験運用により、プログラム改良による効果を評価した。

(4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良【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。

(5) 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 (VPA) 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取得して使用した。このデータは、マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) に VPA (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) に供したもので、Percellome 法により正規化 (絶対量化) 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.mizuguchilab.org>) でヒトオーソログのリスト入手後に DAVID (<https://david.ncicrf.gov>) で Ensembl gene ID に変換した。DEG の機能解析には Garuda を使用した。VPA を投与したマウスの肝臓において発現が変動した遺伝子群を制御する核内受容体 (PPAR α 、SREBP, ER) を介したシグナル伝達のクロストークをシミュレーションするため、GINSim を用いてプーリアンネットワークを構築した。

倫理面への配慮

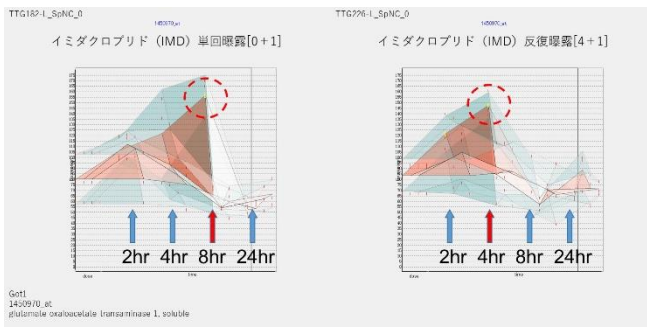
動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成27年4月版))

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」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発【菅野】

平成30年度は、イミダクロプリド及びジエチルニトロサミンを検討した。尚、最終投与後2、4、8、24時間の早い変動を過渡反応(Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの上昇乃至低下の変動を基線反応(Baseline Response)と定義し解析を実施した。

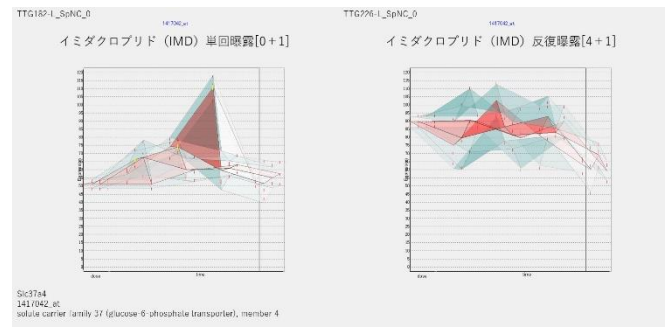


【単回に比して反復により発現ピークが早まる例を示す。GOT1遺伝子において、[0+1]で8時間目にあるピークが[4+1]において4時間目に早まっている(赤丸)。】

イミダクロプリド(IMD)では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数(過渡反応を示す遺伝子)は単回曝露実験(以下、[0+1]と表記)において296、反復曝露実験(以下、[4+1]と表記)において80であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減

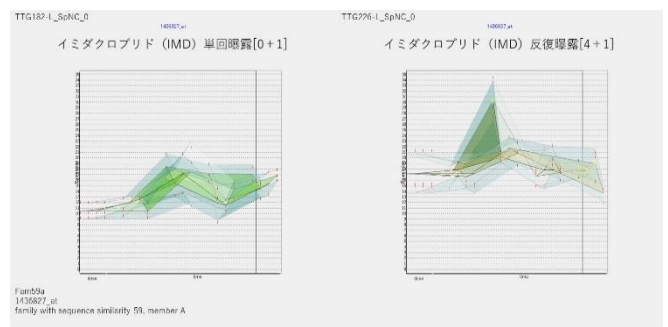
少していた。

[0+1]と[4+1]に共通する過渡反応遺伝子は42であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時に8時間ピークであった遺伝子が反復曝露時に4時間ピークに早まる傾向が明らかに認められた。この過渡遺伝子群からは、ニコチン拮抗剤ブチオン代謝系、ニコチン代謝系、アニリン代謝系等のネットワークがIPAにより抽出された。



【[0+1]でのピークが[4+1]において消失し基線反応が上昇している例】

[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は254あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これは、基線反応が四塩化炭素の際(EIF2系、小胞体ストレスシグナル)とは逆方向の現象であった。グルココルチコイド受容体系、ダイオキシン受容体系、等の核内受容体を介した、糖脂質代謝系へのシグナルネットワークが関与することが示唆された。

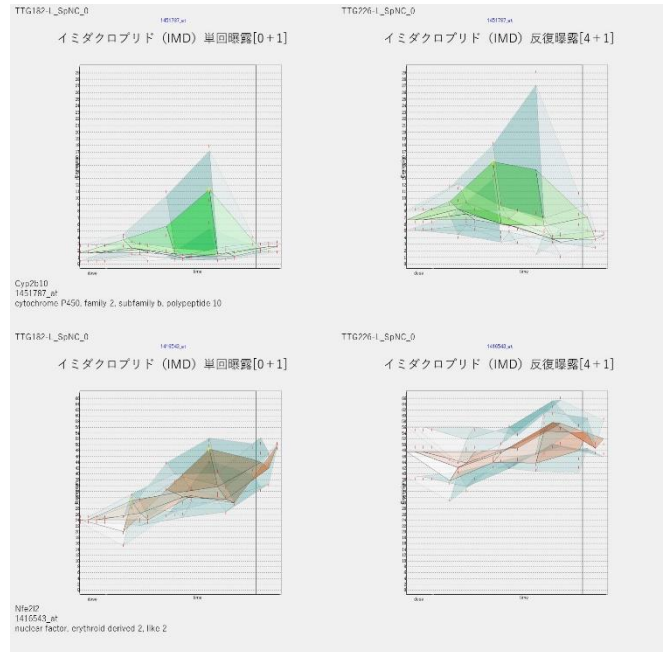


【[0+1]でピークが無く、[4+1]においてピークが現れ、基線反応が上昇している例】

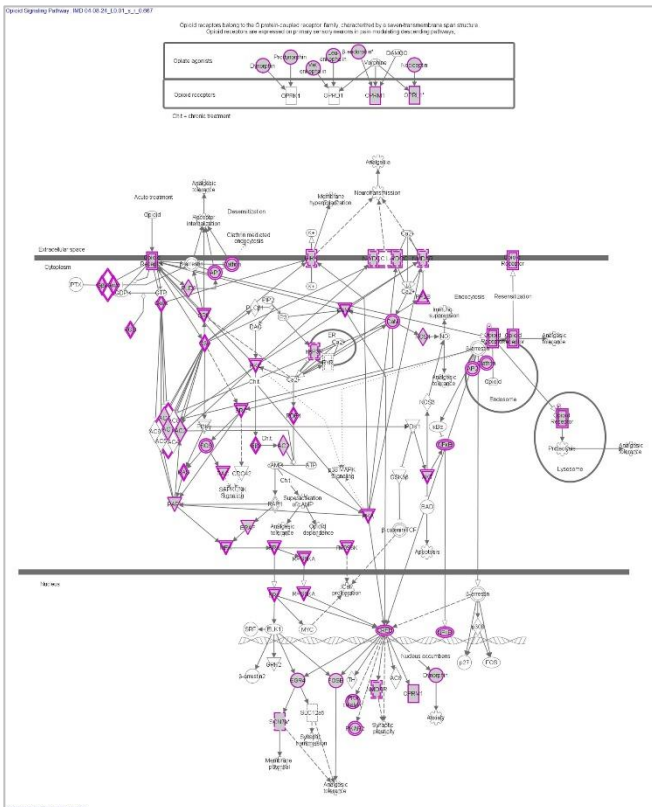
[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は48あり、その殆どに基

線反応の上昇を伴っていた。これらは、糖や脂質のグリコシル化に関わる系に属することが示唆された。

反復曝露が基線反応に及ぼす影響を、[0+1]と[4+1]の溶媒対照群同士の発現値を比較することで検出することができる。その結果、反復曝露により統計学的に有意に発現値が上昇した発現コピー数2以上の遺伝子は約 8,000、低下した遺伝子は約 90 であった。上昇した遺伝子群は、オピオイドシグナル系、神経軸索誘導系、神経炎症シグナル系などに関わるネットワークを含むことが示唆された。その上流にエストロゲン受容体系が関わることを示唆されたが、その詳細は現段階では不明である。なお、第 I 相、第 II 相代謝酵素の基線反応は上昇しており、反復曝露によるそれらの軽度の誘導がみられた



【代謝系への影響。Cyp2b10及びNfe2l2 (Nrf2) を示す。前者は、基線反応の上昇と過渡反応の上昇、後者は基線反応の上昇を認める】



【IMDによるオピオイドシグナル系の誘導 (IPAより)】

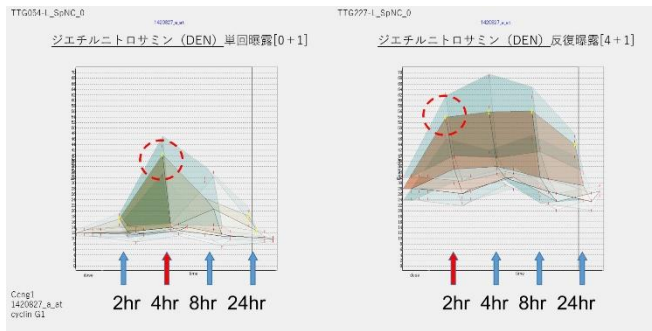
以上、イミダクロプリドはマウス肝において、ニコチンに関わる代謝系及びシグナル系を起動させるとともに、[0 + 1]と[4+1]の遺伝子発現プロファイルの比較により、神経毒性を示唆する結果を得た。分子機序について、特に標的分子機構の特定について、更なる解析を進める。

ジエチルニトロサミン (DEN) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数 (過渡反応を示す遺伝子) は単回曝露実験 (以下、[0+1]と表記) において 223、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 77 であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 22 は、多くが[4+1]に共通する変動遺伝子であった。

[0+1]と[4+1]に共通する変動遺伝子は 18 であり、内 11 が発現上昇、7 が発現低下を示した。上昇した遺伝子群は、Ccng1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM

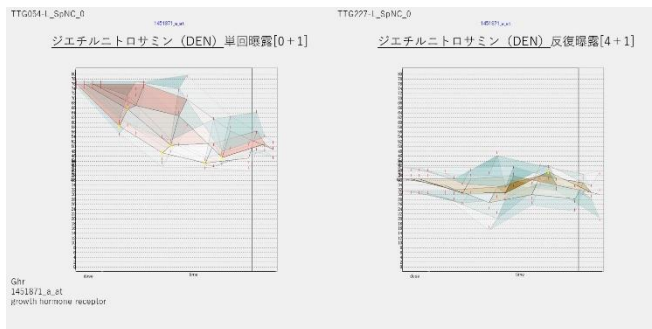
シグナルに関わる遺伝子群であった。これらは、[4+1]において、より早期に誘導がかかり発現値がより高



【DENによるCcng1(Cyclin G1)の誘導。[0+1]でのピークは、[4+1]により早まり、発現が持続するとともに基線反応が上昇している。】

値である傾向を示した。

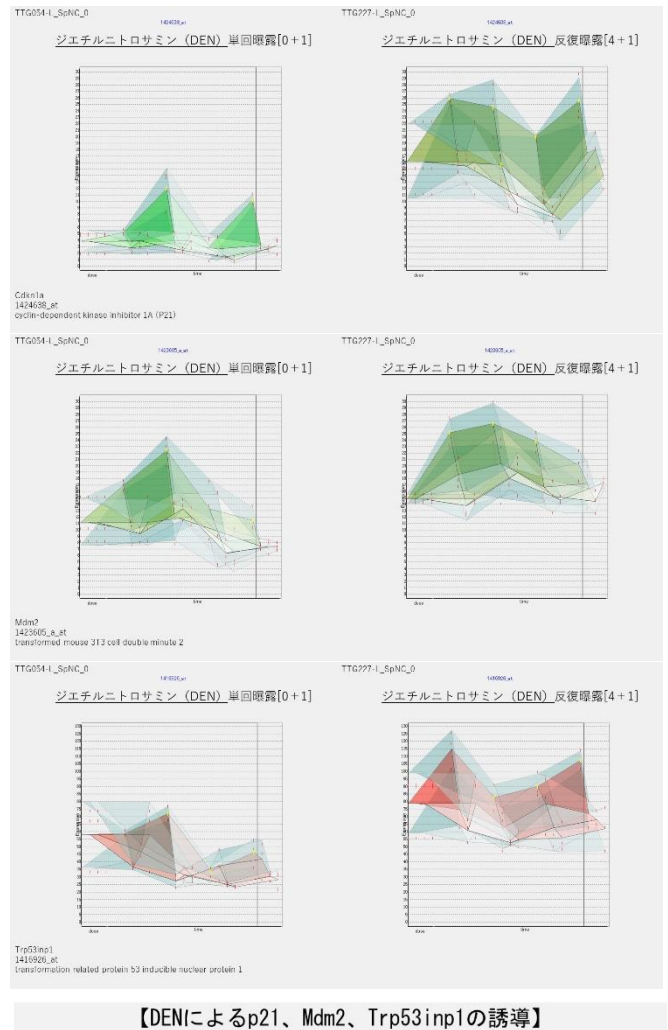
[0+1]で下降する過渡反応を示した遺伝子は 201 あり、その意義については現在解析中である。これらは、[4+1]において過渡反応は減弱乃至無反応であり、上昇に転じるものはなく、また、基線反応が上昇する



【[0+1]で下降ピークを示し、[4+1]でピーク消失し、基線反応が下降する例】

ものもほとんどなかった。

[4+1]において変動した 77 遺伝子、うち 58 が発現上昇を示し、Ccng1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM シグナルに関わる遺伝子群であった。発がん性を示唆する p53 シグナリング、Rb 遺伝子シグナリング等の誘導が示された。



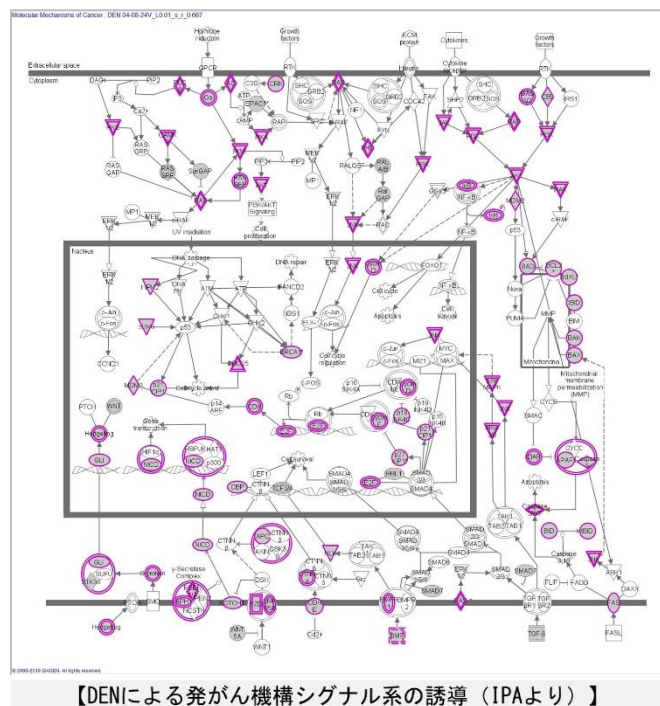
【DENによるp21、Mdm2、Trp53inp1の誘導】

[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は 205 あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これの分子機構は現段階で不明である。

[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は 59 あり、その殆どに基線反応の上昇を伴っていた。PXR などの核内受容体系に微弱なシグナルが流れる可能性が示唆されたが詳細は現段階で不明である。

反復曝露が基線反応に及ぼす影響を見るため、[0+1]と[4+1]の溶媒対照群同士の発現値を比較した。反復曝露により統計学的に有意に発現値が上昇した発現コピー数 2 以上の遺伝子は約 7,100、低下した遺

伝子は約 660 であった。上昇した遺伝子群は、p53 を上流とする発がん関連のネットワーク系、Wnt/ β -catenin シグナル系など、発がん系に加え、軸索誘導シグナル系など、神経毒性を示唆する系も発動していた。



NRF2 系は、[4+1]の基線反応が軽度上昇を示しており、第 II 相代謝酵素の弱い誘導がみられたが、第 I 相は誘導されていなかった。

基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、LXR、FXR 等、HNF4A、HNF1A、GR を上流に持つ核内受容体系シグナルを含んでいた。

以上、DEN はマウス肝において、反復曝露により発がん作用を示唆する p53 シグナル、Wnt/ β -catenin シグナル系等を強力に起動させることが確認された。

先行研究で、実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

(2) 化学物質の反復曝露による毒性発現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等の遺伝子発現修飾機構(所謂エピジェネティクス)に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エピジェネティックな変化を網羅的に検討する。

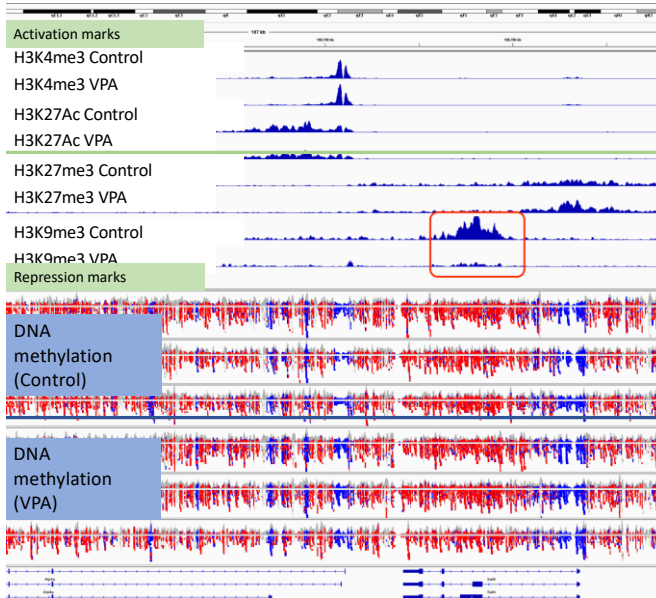
●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

平成 30 年度は、バルプロ酸ナトリウムを 14 日間反復投与した後、溶媒(0.5%メチルセルロース水溶液)を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒(0.5%メチルセルロース水溶液)を単回投与した 2 時間後のマウス肝臓を用いて、クロマチン免疫沈降(ChIP)を実施した。具体的には、H3K4me3 抗体、H3K27Ac 抗体、H3K27me3 抗体及び H3K9me3 抗体による 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、両者のヒストン修飾を網羅的に比較した。網羅的シーケンス解析を実施した結果は以下の通り。

まず各抗体についての溶媒対照群と反復投与群において認められたピーク数の比較においては、特に H3K9me3 のピーク数が 25.5%に減少しており、VPA の反復投与によって一般認識であるヒストン脱アセチル化酵素 1(HDAC1)の阻害ではなく、H3K9me3 が阻害されることが明らかになった。

また、先行研究で実施した四塩化炭素を 14 日間反復投与した際のマウス肝臓におけるヒストン修飾の解析をさらに進め、特に、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ている H3K27me3 は、反復投与により 13.8%もピーク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ことが示唆された他、各ピークを網羅的に解析し、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2倍以上、もしくは1/2以下）したピーク数で、数の多い方のピーク数が20以上という条件にて抽出して、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した。

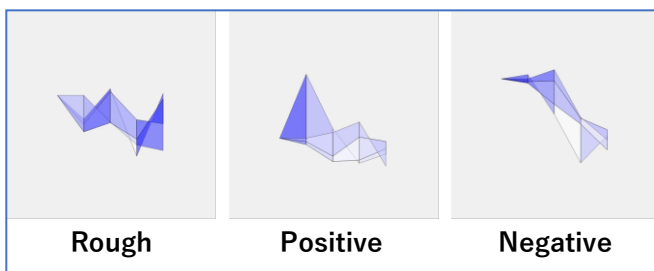


溶媒およびVPAの反復投与をおこなったマウス肝におけるChIP-seq解析およびDNAメチル化解析をまとめた一例 (Sa114)。図上半分の赤枠部分はH3K9me3の溶媒投与（枠内上段）およびVPA投与（枠内下段）を示しており、大幅なピークの低下が見られる。一方、図下半分のDNAのメチル化状態（赤＝メチル化、青＝非メチル化、n=3）には、VPA投与（上3列＝対照、下3列＝VPA投与群）による変化は見られない（先行研究結果）。

(3) システム毒性解析の人工知能化【北野】

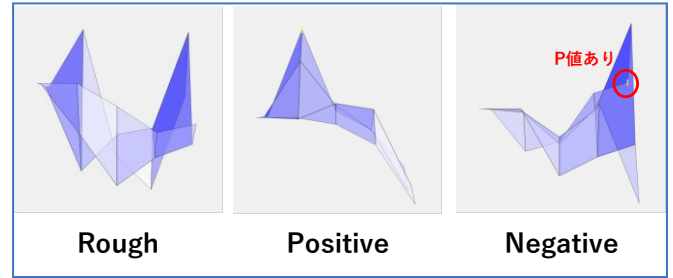
●深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

今年度は以下の4つの画像データセットを生成し、それぞれのデータセットを用いて、4つのdeep learningに基づく分類器を構築した。

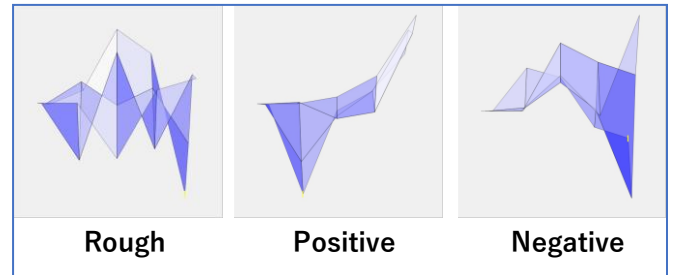


① 横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関するP

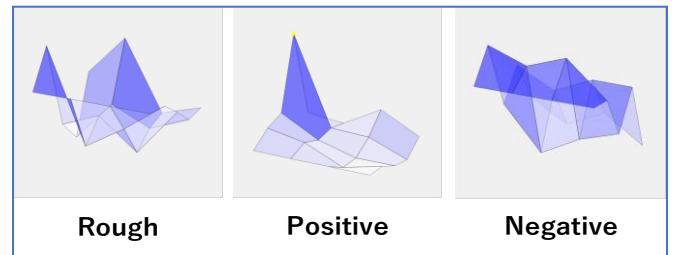
値の情報を含まない画像



② 横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関するP値の情報を含む画像

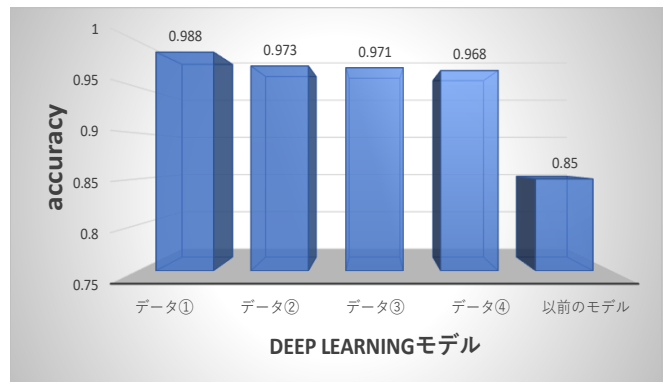


③ 画像データ②を、上下方向に反転させた画像



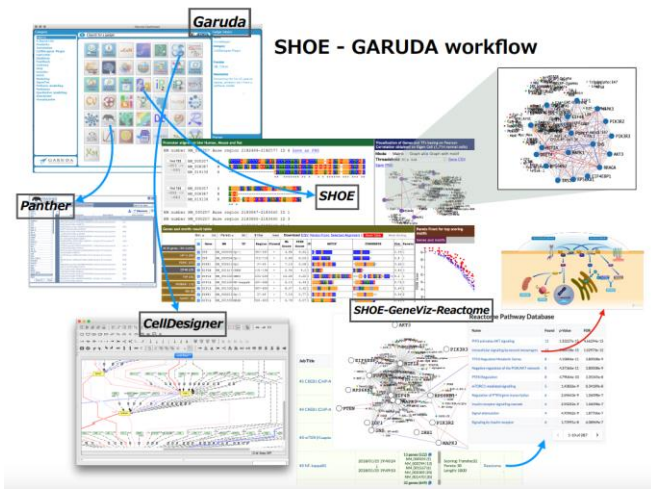
④ デフォルトの角度から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関するP値の情報を含む画像

構築した分類器に対して、5 fold cross validation を実施し、予測精度を検証した結果、先行研究による分類器の予測精度が85%程度の正答率であったのに対し、今年度構築した分類器では、いずれも95%以上の非常に優秀な正答率を示した（下図参照）。



●Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動強化

今年度強化した連携の流れの概略を下図に示す。



Garuda Platform 上で SHOE をハブとしたワークフローが拡大したことにより、SHOE と Percellome の連動も密になり、よりスムーズな解析が可能となった。

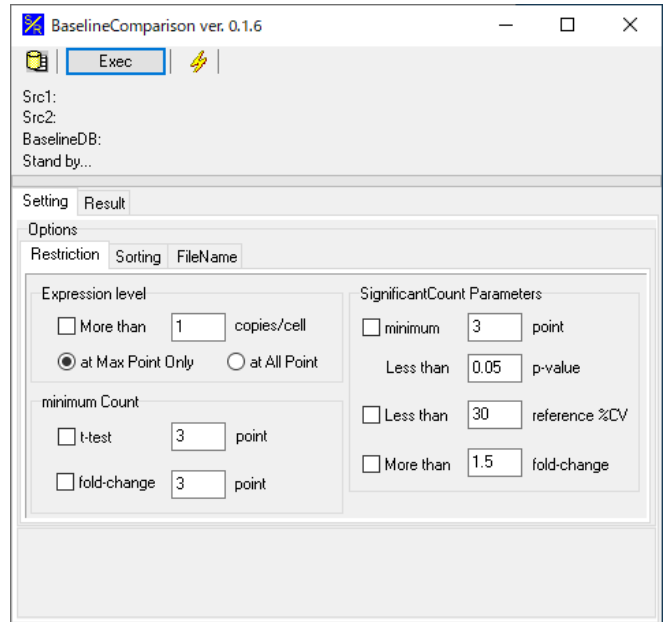
(4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良【相崎】

平成 30 年度は、現状ではマニュアル計算で行っている新型反復曝露実験の基線反応評価を自動化すべく、有意な基線反応変動を示す候補遺伝子を自動抽出するための解析ソフトウェアの開発を進めた。

具体的には、Percellome データベースから臓器・溶媒・サンプリング時間毎に溶媒群のトランスクリプトームデータを GeneChip 2312 枚分 収集し、プローブセット毎に%CV 値等の統計値を計算して、最も安定しているサンプリング時間を決定した。

基線反応評価基準としては、①溶媒群データが最も安定しているサンプリング時間の一時点参照、若しくは②%CV が閾値以下の複数のサンプリング時間参照、さらには③%CV に基づいたサンプリング時間毎の重み付けによる全時点参照、の三案の比較を進め、新型反復曝露実験の有意な基線反応を抽出するアルゴリズム

を生成した。またこれを実装した候補遺伝子の自動抽出ソフトウェア BaselineComparison.exe を開発した。



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

先行研究の成果より、バルプロ酸ナトリウム (VPA) 投与によって PPARα、SREBP、ER の活性が影響を受けることが見いだされた。PPARα は脂質代謝の制御に関わる核内受容体であり、脂肪酸の構造を有する VPA が PPARα のリガンドとして直接活性化に関わったことが考えられた。SREBP は脂肪酸やトリグリセリド、コレステロール産生の制御に関わっている。ER のリガンドであるエストラジオール 17β (E2) は ER 依存的に SREBP の発現を抑制し、トリグリセリドの蓄積に対しても抑制的に働くことが報告されている (Han, S., et al. *Hepatology* 59:1791(2014):1802)。これらのことから、上記の核内受容体は互いにクロストークしていることが強く示唆されている。一方、VPA は MAPK の活性化を介してエストロゲンに対する細胞の感受性を上げる (Jansen, MS., et al. *PNAS* 101.18 (2004): 7199-7204) ほか、逆にエストロゲン産生を抑制することが報告されている (Glister, C., et al. *PLoS One* 7.11

(2012):e49553)。このように、上記核内受容体のクロストークに対して VPA が何らかの作用を呈する可能性が示唆されているものの、その関係性は複雑で特定のタンパク質の活性に注目することでは VPA の作用を推定する事は困難であると考えられた。そのため、核内受容体のクロストークやそれに対する VPA の作用を数理モデリングによって表現し、シミュレーションをおこなうことで VPA が呈する肝毒性の分子メカニズムを推定することを試みた。まず、上記核内受容体が関与するシグナル伝達経路に含まれるタンパク質やリガンド結合などの反応の有無を 0 または 1 で表現し、制御関係（正の制御か、負の制御か）を表す矢印で連結させたネットワーク（ブーリアンネットワーク）を構築した。これを用いて VPA の有無とエストロゲンの影響のシミュレーションをおこなった結果、性別依存的に VPA 存在下で脂肪酸代謝が減弱する可能性が示唆された。

D. 考察

「短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発」においては、先行研究で実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

イミダクロプリド (IMD) は、ネオニコチノイド系の殺虫剤であり、昆虫のニコチン受容体に高親和性を有するが、哺乳類のニコチン受容体にもシグナルを流すデータが蓄積されている。本実験において、ニコチン系のシグナルネットワークを誘導し神経毒性を惹起することを示唆する解析結果が、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験のマウス肝からの遺伝子発現データの比較検

討から得られたことは、本試験系の網羅性と高感度性、高精細性を示すものと考えられる。

ジエチルニトロサミン (DEN) についても、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験の遺伝子発現データの比較検討から、発がん性を示す所見が確認され、その分子メカニズムを示唆する詳細な情報が得られたことも、本試験系の有意性を示すものと考えられる。

本年度研究成果により、新たな解析手法が利用可能となることから、先行研究のデータに対してもそれらを適用し、毒性標的とその上流ネットワークを過渡反応と基線反応の両面から更に深く解析する。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについても、反復曝露の実験プロトコルに差異があるものの、同様の検討を試みる予定である。

「化学物質の反復曝露による毒性発現のエピジェネティクス機構解析」においては、平成 30 年度は、ChIP-Seq により VPA 反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位が抽出され、基線反応の成立に関わる知見が得られた。当初、ヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる、という本研究分担課題における陽性対照物質のデータを得られると想定されたが、実際はヒストンのアセチル化 (H3K27Ac) は増加せず、むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。他方、H3K9me3 が 74.5% 低下することが明らかとなり、H3K27Ac の結果と比較するすると、少なくともマウス肝においては VPA は HDAC の阻害ではなく、H3K9me3 を阻害していることが示唆された。VPA により H3K9me3 阻害が起こるという新知見が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものとする。H3K9me3 などのヒストン修飾と DNA メチル化は、遺伝子発現を抑制的に制御している。本研究においては、グローバルに H3K9me3 が減少していることから、グローバルな遺伝子発現の活性化

が想定された。しかしながら、VPA の反復投与による基線反応に変化の起こる遺伝子、即ち、反復投与によって遺伝子発現が増加する遺伝子は多くない（数百遺伝子）。そこで、ヒストン修飾とともに遺伝子発現制御に関わる DNA メチル化に関して VPA の反復投与の結果を見ると、DNA メチル化には変化が起こっていない。そのことから、H3K9me3 はグローバルに低下するが、DNA メチル化による制御が残っており、今回の解析条件においては、H3K9me3 の低下は、遺伝子発現制御に対して「silent」な状態である可能性が考えられた。

「システム毒性解析の人工知能化」が重要となるのは、システム・レベルで毒性を理解するには、膨大な実験データを格納したデータベース、文献、数値モデルなどを統合的に解析する必要があるからである。先行研究で、我々は、個別機能の解析ツール群を構築し Garuda Platform 上において連動性を実現してきた。これらのツール群は今後もさらに拡充させる必要があるが、同時に、大規模かつ複雑なデータを意味のある形で解析するには、深層学習やテキストマイニングなども含めた一連の人工知能アルゴリズム群を連携させる必要がある。

その具体的な応用例として、深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別においては、今年度作成した分類器の予測精度は 95%以上の正答率という非常に良い成績を示し、昨年度の分類器の予測精度よりも 10%以上正答率が向上した。この結果から 3次元グラフ画像を適切に調整することで、分類器の予測精度が大幅に改善されることが明らかになり、大規模データの自動分類の実用化の目処が立ちつつある。今後は、未知のデータセットに対し分類器を適用し予測を行い、分類器をより精緻にチューニングしてゆく予定である。

Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動

強化については、SHOE の機能強化、他の Garuda ガジェットとの連携強化を通じて、Percellome データベースからの解析パイプラインの範囲が拡大し、よりスムーズなものになった。

今後は機能強化の一方、それらを人工知能化（人工知能技術の利用による自動化・効率化）する方策を検討し、開発マイルストーンの設定と一部の試験実装を試みる。

なお本分担研究は、最終的には、個別機能への深層学習の導入にとどまらず、解析プロセス自体の人工知能化にもチャレンジするものであり、劇的な解析能力の向上が期待される。

「Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良」については、新型反復曝露実験の基線反応評価の自動化を進めた。最終的には今回開発した計算評価手法を組み込んだ専用ソフトウェアを開発し、従来はマニュアル計算で行っていた処理を自動化・効率化・高速化する。これを以て、反復曝露の基線反応を示す遺伝子のデータベース化を促進し、単回曝露のトランスクリプトームデータを大量に収録する Percellome データベースと共に利用・解析することで、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築に大きく寄与すると考えられる。

「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、PPAR α や SREBP の活性と脂質代謝異常による疾患との間には連関が認められており、肥満患者において PPAR α /SREBP 比と脂肪肝の間に相関があることが報告されている (Pettinelli, P., et al. *Biochim Biophys Acta* 1792.11 (2009): 1080-1086)。両核内受容体の活性バランスの調整に ER が関与しており、バルプロ酸ナトリウムが ER リガンド量に影響を与えることが肝臓に於ける脂肪蓄積につながる可能性が示唆された。本結果は、脂質代謝異常が疑われる患者に対するバルプロ酸ナトリウム投与のリスク評価の

重要性を示していると言える。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発」については、先行研究で実施した化学物質とは用途や性質の異なる化学物質の解析を実施しているが、予想の通り、先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の2物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第I相第II相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有しており、構築中の反復毒性トランスクリプトームデータベースがカバーする範囲を広げることが出来た。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性、すなわち神経毒性及び発癌性、に関わるシグナルネットワークが発動することを捉え、僅か4日間の反復曝露で長期の反復毒性を推測する基礎データを取得できることを示唆した。

「化学物質の反復曝露による毒性発現のエピジェネティクス機構解析」については、平成30年度は、ChIP-Seqにより、HDAC1阻害剤として知られるVPAの反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位を抽出し解析した結果、HDACの阻害ではなく、H3K9me3を阻害していることが示唆された。新たにVPAによりH3K9me3阻害が起こるという新発見が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものと考えられる。また、先行研究で実施した四塩化炭素を14日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析をさらに進めた。その結果、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るが、四塩化炭素の14日間反復投与の際に、13.8%もpeak数が上昇していることから、H3K27me3が反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していることが示唆された。

今後は、VPAの反復投与による基線反応に変化の起

こる遺伝子に関して詳細にH3K9me3の低下との関与を解析する予定である。

「システム毒性解析の人工知能化」についても計画通り推移しており、特に深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別において今年度作成した分類器の予測精度は95%以上と非常に優秀な性能を示した。Garuda Platform上でのPercellomeとSHOEの連動も密になり、よりスムーズな解析が可能となった。今後は、この成果をさらに多くの解析プロセスに展開することを目指す。

「Percellome専用解析ソフトウェアの開発・改良」においては、平成30年度に新型反復曝露実験の基線反応評価の自動化ソフトウェアを開発した(本年度末までに完了見込み)ことで、反復曝露の基線反応を示す遺伝子のデータベース化の促進が見込まれる。これは反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築に大きく寄与すると期待される。

「Percellomeデータベースを利用した解析パイプライン」においては、Garudaプラットフォームを中心とした解析ツールの利用により、Percellomeデータから仮説創出が可能となった。Percellomeデータのようにより定量性に優れた遺伝子発現プロファイルはノイズが小さく、実験結果を解釈する上で重要な遺伝子の抽出においてアドバンテージが大きい。更に、Garudaプラットフォームは実験結果の解釈に向けて必要な情報を効率よく収集することができる。今年度の研究成果に見られるように、遺伝子発現変動から毒性発現の分子メカニズム推定にまで至る事が可能となったことから、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 (抜粋)

(1) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol.* 2019, 2: 57. doi:10.1038/s42003-019-0300-2.

(2) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudoh Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One.* 2018, 13(10): e0205702.

(3) Natalia Polouliakh, Paul Horton, Kazuhiro Shibana, Kodai Takata, Vanessa Ludwig, Samik Ghosh and Hiroaki Kitano Sequence homology in eukaryotes (SHOE): interactive visual tool for promoter analysis; *BMC Genomics* September 2018, 19: 715;

(4) Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fund Toxicol Sci* 2018, 5: 167-170

(5) Esaki, T., Watanabe, R., Kawashima, H., Ohashi, R., Natsume - Kitatani, Y., Nagao, C. & Mizuguchi, K. Data curation can improve the prediction accuracy of metabolic intrinsic clearance. *Molecular informatics.* 2018, 38: 1800086

(6) Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., Ohashi, R. & Mizuguchi, K. Predicting Fraction Unbound in Human Plasma

from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges. *Molecular pharmaceutics*, 2018, 15(11), 5302-5311.

(7) 夏目やよい, バイオメディカル・基礎から臨床への開発プロセス (2) 1) トランスレーショナルリサーチと機械学習, *医薬ジャーナル* 2018, 54(9): 2049-2053, ISSN: 0287-4741

(8) 長尾知生子、夏目やよい、水口賢司, 創薬における計算機の果たす役割 -プレジジョンメディスンに向けて-, *Presicion Medicine*, 2018, 1(1), 28-31

(9) Masuta, Y., Yamamoto, T., Natsume-Kitatani, Y., Kanuma, T., Moriishi, E., Kobiyama, K. & Ishii, K. J. An antigen-free, plasmacytoid dendritic cell-targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T cells in nonhuman primates. *The Journal of Immunology*, 2018, 200: 2067-2075

(10) Tanaka, M., Kobiyama, K., Honda, T., Uchio-Yamada, K., Natsume-Kitatani, Y., Mizuguchi, K. & Ishii, K. J. Essential role of CARD14 in murine experimental psoriasis. *The Journal of Immunology*, 2018, 200(1), 71-81.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima. Epigenetic Mechanism of Modification of Gene Expression Network by a Repeated Exposure to a Chemical. Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. The SOT 58th Annual Meeting, (2019.3.12), Baltimore, USA, Invited

Symposium.

(2) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for the prediction of acute and chronic toxicity. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP 2018 KYOTO), (2018,7,6), Kyoto, Japan, Joint Symposium between IUTOX and IUPHAR, Speaker

(3) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Ken-ichi Aisaki, Introduction to a Concept of “Signal Toxicity” for Broader Understanding of Mechanistic Toxicology. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand, KEYNOTE

(4) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, DSB Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the genome editing. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand, Oral

(5) Jun Kanno, Introduction to the Concept of “Signal Toxicity”. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10), (2018.4.19), Belgrade, Serbia, Plenary

(6) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

(7) 北嶋 聡, 種村 健太郎, 菅野 純, シックハウスの症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入

暴露の際の海馬Percellomeトキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

(8) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

(9) 菅野 純, 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋 聡, 「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(10) 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, 水口賢司, 菅野純, TargetMineによる標的予測、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(11) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(12) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

⑬ Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano.

DTOX: Deep neural network-based computational framework to analyze omics data in Toxicology. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 25, 2018.

⑭ Kitano, H. AI-driven systems toxicology. Toxicogenomics for Accelerated and Refined Hazard Identification of Chemicals (Joint Symposium between IUTOX and IUPHAR), 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto International Conference Center, Kyoto, July 6, 2018. (invited)

(15) 北野宏明. AI駆動型システム医学の展望. 山口大学第2回シンポジウム: 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, KKR山口あさくら, 山口, Aug. 4, 2018. (invited)

(16) Kitano, H. AI Grand Challenges. 2018年日台科学技術フォーラム, リージェント台北, 台湾, Sep. 10, 2018. (invited)

⑰ 北野宏明. 人工知能駆動型システム毒性学の展望. CBI学会2018年大会, タワーホール船堀, 東京, Oct. 9, 2018. (invited)

(18) 北野宏明. AI戦略とムーンショット. データサイエンティスト協会シンポジウム, JPタワーホール&カンファレンス東京, 東京, Oct. 19, 2018. (invited, keynote)

⑱ 夏目やよい, “Percellome toxicogenomics data handling by Garuda” OpenTox Asia 2018, (2018.5.24, 東京), (Poster)

⑳ Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid” AsiaTox 2018, (2018.6.18, Thailand), (Poster)

㉑ Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Inferred role of crosstalk between PPARα and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach” ISMB 2018, (2018.7.7, USA), (Poster)

㉒ 夏目やよい, “TargetMineによる標的予測” 第45回日本毒性学会学術年会, (2018.7.18, 大阪) (招待講演)

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