

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
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）

平成 30 年度 分担研究報告書
Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良

研究分担者 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、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本分担研究では、基盤技術開発の一環として Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良を進める。

平成 30 年度は、新型反復曝露実験において有意な基線反応を示す候補遺伝子の抽出ソフトウェアの開発のため、Percellome 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（BaselineDB）を構築し、基本アルゴリズムを生成した。また解析計算用ソフトウェアを作成し、自動化のための改良を行った。

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。

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。

本分担研究では特に、Percellome 専用解析ソフトウェアを開発して予測評価技術の基盤開発の一助とすると共に、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

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。

サンプルデータには、Percellome データベースに収録されている実際のトランスクリプトームデータを用いた。

候補遺伝子リストの機能解析には、Garuda platform や DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いた。

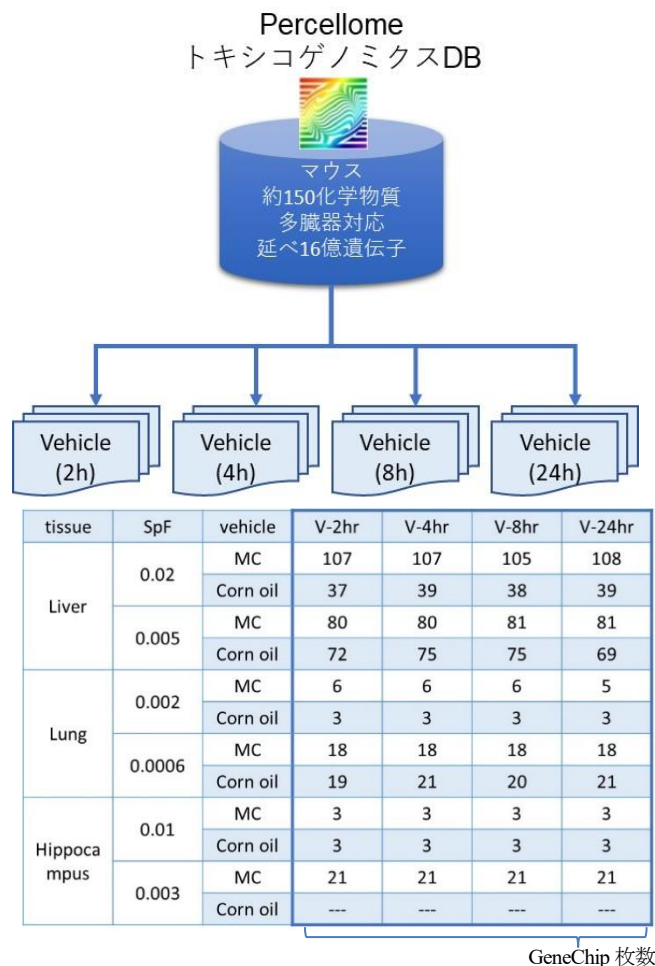
倫理面への配慮

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

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抽出するための解析アルゴリズム及びそれを実装したソフトウェアの開発を進めた。

基線反応の変動評価は、新型反復曝露実験の溶媒群と単回曝露実験の溶媒群との比較が主となるため、Percellome データベースから単回投与実験の溶媒群のトランスクリプトームデータを GeneChip 2312 枚分収集 (延べ遺伝子数 約 9 億) し、臓器・溶媒・サンプリング時間、外部スパイク添加量係数 (SpikeFactor) 別に

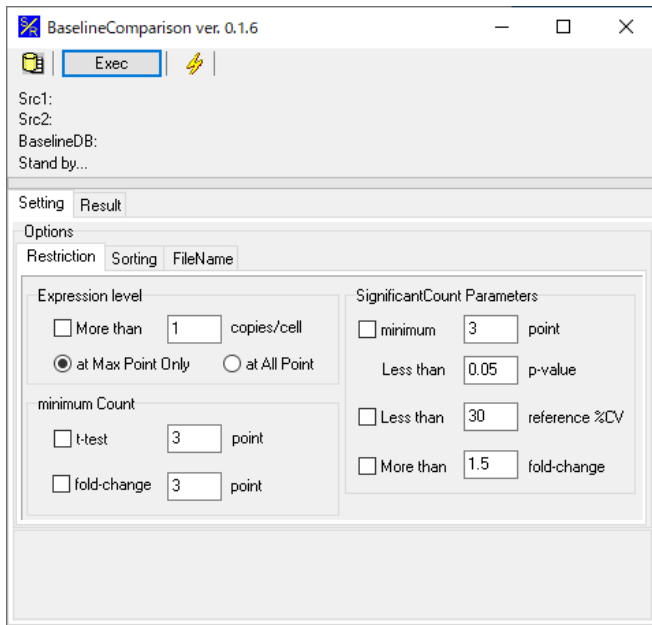


集計して%CV 値等の統計値をプローブセットごと計算し、また 2, 4, 8, 24 時間のサンプリング時点データ

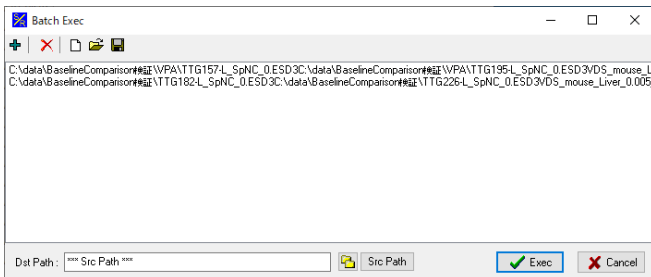
の中で、最も安定しているサンプリング時間を決定するなど、基線状態の基本性質を収録したデータベース (BaselineDB) を作成した。

基線反応の変動の評価基準としては発現レベルや t 検定に加え、BaselineDB を参照して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や②変動率が大きく %CV が閾値以下の複数時間参照、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指標、等、各値の評価指標としての有効性についての比較検討を進めた。

さらに、これらを高速一括計算するソフトウェア BaselineComparison.exe を開発した。



さらに複数の比較設定を登録し、自動一括計算する機能を追加した。



これにより、試行錯誤が必要なパラメータの最適化作業を効率化し、さらには至適条件にて全ての比較計算の自動処理を可能とした。

D. 考察

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る処理を自動化・効率化・高速化した。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。

E. 結論

本分担研究は、計画通りに進捗した。

平成 30 年度では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。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol 2, Article number: 57, 2019.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) 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

(2) 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

(3) 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.)

(4) 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.)

(5) 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

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

(7) 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.

(8) 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)

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