

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 分担研究報告書

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)

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
サブプロジェクトリーダー

研究要旨

本分担研究は、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する。

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結果をPercellome法により正規化し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おこなった結果、肝臓において脂質代謝関連の遺伝子変動が認められた。これらがPPARα、SREBP、ERといった核内受容体の標的遺伝子であったことから、これらの核内受容体を介したシグナル経路のクロストークとそれに対するバルプロ酸ナトリウムの作用を数理モデリングにより検証した。シミュレーションの結果、バルプロ酸ナトリウムがERリガンド量に与える影響により脂質代謝が減弱する可能性が示唆された。

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が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。昨年度の研究によって、バルプロ酸ナトリウム投与により肝臓において脂肪酸代謝に関連する遺伝子の発

現が変動することが見いだされた。更に、これらの遺伝子は各種核内受容体 (PPAR α 、SREBP、ER) の標的遺伝子であったことから、バルプロ酸ナトリウムの肝毒性にこれらの核内受容体が関与している可能性が示唆された。バルプロ酸ナトリウムは脂肪肝を含む肝毒性を呈することが既に知られているが、その分子メカニズムについては不明な点も残されている。そのため、今年度は上記核内受容体とバルプロ酸ナトリウム投与が肝毒性につながりうるのか数理モデリングによって検証し、Percellomeデータが毒性発現機構の推定に有効であることを示すことを目的とした。

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.mizuguchilab.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。バルプロ酸ナトリウム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 [7]を用いてブーリアンネットワークを構築した。

C. 研究成果

昨年度の研究成果より、バルプロ酸ナトリウム投与によってPPAR α 、SREBP、ERの活性が影響を受けることが見いだされた。PPAR α 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バルプロ酸ナトリウムがPPAR α 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17 β (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[8]。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、バルプロ酸ナトリウムは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[9]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[10]。このように、上記核内受容体のクロストークに対してバルプロ酸ナトリウム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バルプロ酸ナトリウム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バルプロ酸ナトリウム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バルプロ酸ナトリウム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。これを用いてバルプロ酸ナトリウム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、性別依存的にバルプロ酸ナトリウム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

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[11]。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

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

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。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

① 渡邊怜子, 江崎剛史, 夏目やよい, 佐藤朋広, 長尾知生子, 川島和, 水口賢司

「薬物動態・毒性予測のためのデータベースと創薬」

『マテリアルズ・インフォマティクスによる材料開発と活用集』、439-447、高薄一弘 編、株式会社技術情報協会、2019年1月31日刊

② 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 54(9):2049-2053, 2018/12/14

ISSN: 0287-4741

③ Esaki, T., Watanabe, R., Kawashima, H., Ohashi, R., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., & Mizuguchi, K. (2018).

Data curation can improve the prediction accuracy

of metabolic intrinsic clearance. *Molecular informatics*.

- ④ Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., Ohashi, R., & Mizuguchi, K. (2018).

Predicting Fraction Unbound in Human Plasma from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges. *Molecular pharmaceutics*, 15(11), 5302-5311.

- ⑤ 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
ジョンメディシンに向けて-
Presicion Medicine, 1(1), 28-31, 2018

- ⑥ Masuta, Y., Yamamoto, T., Natsume-Kitatani, Y., Kanuma, T., Moriishi, E., Kobiyama, K., ... & Ishii, K. J. (2018).

An antigen-free, plasmacytoid dendritic cell-
targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T
cells in nonhuman primates. *The Journal of
Immunology*, j11701183.

- ⑦ Tanaka, M., Kobiyama, K., Honda, T.,
Uchio-Yamada, K., Natsume-Kitatani, Y.,
Mizuguchi, K., ... & Ishii, K. J. (2018).

Essential role of CARD14 in murine experimental
psoriasis. *The Journal of Immunology*, 200(1), 71-81.

2. 学会発表

- ① OpenTox Asia 2018
(2018.5.24, 東京)

“Percellome toxicogenomics data handling by
Garuda” (Poster)

○夏目やよい

- ② AsiaTox 2018
(2018.6.18, Thailand)

“Percellome meets Garuda: toxicogenomics
approach to evaluate the toxicity of valproic acid”
(Poster)

○Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S.,
Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J.

- ③ ISMB 2018
(2018.7.7, USA)

“Inferred role of crosstalk between PPARα and ER
signaling pathways in the toxicity of valproic acid:
systems toxicology approach” (Poster)

○Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S.,
Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J.

- ④ 日本微生物生態学会第32回大会
(2018.7.12, 沖縄)

“日本人を対象とした腸内細菌叢の大規模調査
(Investigation on large-scale gut microbiome of
Japanese)” (Poster)

○朴鐘旭, 谷澤薫平, 細見晃司, 川島和, モフセンア
タイエブ, 陳怡安, 大野治美, 小西可奈, 夏目やよい,
村上晴香, 國澤純, 宮地元彦, 水口賢司

- ⑤ 第45回日本毒性学会学術年会
(2018.7.18, 大阪)

“TargetMineによる標的予測” (招待講演)

○夏目やよい

⑥17th International Symposium on Microbial Ecology (2018.8.12, Germany)

“Large-scale analysis of the gut microbiome of healthy Japanese populations” (Poster)

○Park J., Tanisawa K., Hosomi K., Kawashima H., Mohsen A., Chen Y.A., Ohno H., Konishi K., Natsume-Kitatani Y., Murakami H., Kunisawa J., Miyachi M., Mizuguchi K.

⑦日本薬物動態学会第33回年会 (2018.10.02, 石川)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling 1. In silico prediction of fraction unbound in brain homogenate” (Poster)

○江崎剛史, 渡邊怜子, 大橋力也, 夏目やよい, 川島和, 長尾知生子, 水口賢司

⑧日本薬物動態学会第33回年会 (2018.10.02, 石川)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling 2. Prediction of renal elimination from chemical structure using predicted fraction unbound” (Poster)

○渡邊怜子, 江崎剛史, 川島和, 夏目やよい, 長尾知子, 大橋力也, 水口賢司

⑨CBI学会 (情報計算法学化学生物学会) 2018年大会 (2018.10.09, 東京)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling:10.

Prediction of renal clearance in humanutilizing structural information” (Poster)

○Watanabe R., Esaki T., Ohashi R., Natsume-Kitatani Y., Kawashima H., Nagao C., Ohashi R., Mizuguchi K.

⑩CBI学会 (情報計算法学化学生物学会) 2018年大会 (2018.10.09, 東京)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling: 9. Development of Regression Model of Unbound Fraction to Brain Homogenate from Chemical Structure” (Poster)

○Esaki T., Watanabe R., Ohashi R., Natsume-Kitatani Y., Kawashima H., Nagao C., Mizuguchi K.

⑪CBI学会 (情報計算法学化学生物学会) 2018年大会 (2018.10.09, 東京)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling: 8. Web application and database consisting of curated public data and newly acquired experimental data” (Poster)

○Kawashima H., Watanabe R., Esaki T., Ohashi R., Satoh D., Nagao C., Natsume-Kitatani Y., Mizuguchi K.

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] Chaouiya C., et al. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 804:463-79
- [8] Han, S., et al. *Hepatology* 59:1791(2014):1802
- [9] Jansen, MS., et al. *PNAS* 101.18 (2004): 7199-7204
- [10] Glistler, C., et al. *PLoS One* 7.11 (2012):e49553
- [11] Pettinelli, P., et al. *Biochim Biophys Acta* 1792.11 (2009): 1080-1086