

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 31/令和元年度 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、クロルピリフォス、及び、5-アザシチジンの 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た。特に先行研究で実施した化学物質と比較すると、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子の農薬であるアセフェートと類似した傾向が明らかとなった。5-アザシチジンが反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系（小胞体ストレス等）、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導するという点では、5-フルオロウラシル、及び、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を行う予定である。なお、当

初、パクリタキセルで反復曝露実験を実施する予定であったが、パクリタキセルの納品に時間がかかることと、購入費用が非常に高価であることから保留とし、翌年度実施予定であったクロルピリフォスを優先して実施した。

(2) では平成 31/令和元年度にジエチルニトロサミンのエピジェネティクス機構解析を予定していたが、クロフィブレートに変更した。これは昨年度検討したバルプロ酸ナトリウムの PPAR $\alpha$  作用との差分を確認する必要があると考えたことから、PPAR $\alpha$  の陽性対照物質であるクロフィブレートに変更、優先して実施した。具体的には、クロマチン免疫沈降アッセイと次世代シーケンサを組み合わせた、クロマチン免疫沈降シーケンス法を利用して、クロフィブレートを 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網羅的解析を進めた結果、クロフィブレートの反復投与により、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 のゲノムワイドな亢進を明らかにした。また、バルプロ酸ナトリウムの反復投与の結果の再解析により、バルプロ酸ナトリウムにおいても、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進が起こっていることを確認できた。クロフィブレートとバルプロ酸ナトリウムは、PPAR $\alpha$  作用という点で共通していることから、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進は、PPAR $\alpha$  作用によるものと示唆された。一方、バルプロ酸ナトリウムの反復投与による H3K9me3 のゲノムワイドな低下は、PPAR $\alpha$  作用以外によるものと考えられた。

(3) では、従来、律速段階となっていた Percellome データから有意に変動した遺伝子を専門的判断に基づき網羅的に抽出する作業を完全自動化する「自動深層機械学習システム」の開発を進め、多数のモデルの予測結果の統合により精度のより一層の向上を実現しつつある。また予測モデルの判断基準を調べるため explainability model (grad cam) を導入し、モデルの最適化を進めた。さらに、転写制御領域の解析ソフトウェア SHOE と Garuda Platform の連携を中心に、複数の解析ツールを使ったパイプラインの機能強化を達成した。

(4) では、計画通り、Percellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer を、オンラインサービスとして提供するために、内部データ構造を抜本的に再設計して高速化を果たすなど、必要なシステム開発を進めた。

(5) では、ペンタクロロフェノール曝露による肝のトランスクリプトームについて、先行研究により構成しつつある解析パイプラインを用いて解析を進めた結果、ペンタクロロフェノールによる急性症状（発汗・発熱）が RIG-1 パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起されることが示唆された。

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
- 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
- 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  
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、代表的物質についての DNA メチル化及びヒストン修飾情報を加え、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：

クロルピリフォス (Chlorpyrifos; 分子量: 350.59、Cas No.: 2921-88-2、純度 98%、富士フィルム和光純薬株式会社 (製造元: Toronto Research Chemicals))、及び、5-アザシチジン (5-azacytidine; 分子量: 244.21、Cas No.: 320-67-2、純度 >99%、Sigma-Aldrich) 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) 時のクロルピリフォス (CPF) 及び 5-アザシチジン (AZC) の曝露量はそれぞれ 0、3、10、30 mg/kg 及び 0、0.3、1、3 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。CPF 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 20mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の 0、3、10、30mg/kg とした。以下、同様に、AZC の 4 回反復投与の用量は 2mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、0.3、1、3mg/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 CPF、AZC、共に 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、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。採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晚浸漬し、RNase を不活化した。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、RNeasy 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碎液を調製した。得られた破碎液の 10  $\mu$ L 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  $\mu$ g 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クロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-Seq)

クロフィブレート (70mg/kg) を 14 日間反復投与した後、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1%DMSO 水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝および、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1%DMSO 水溶液) を単回投与した 2 時間後のマウス肝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 (30  $\mu$ g) を材料として、1) 4  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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) 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) Deep Residual Learning for Image Recognition. arXiv:1512.03385.)) 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、平成 30 年度は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。平成 31/令和元年度はさらに④10 種の描画角度から 3 次元グラフを作成し、トレーニング画像数を 10 倍に増加させることで、深層学習による分類器の一層の精度向上を試みた。また構築した深層学習モデルが、画像のどの部分に着目して判別を行っているかを調べるため、最新の explainability model (grad cam : R. R. Selvaraju, M. et al (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7) を実装してモデルの解析を行った。

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 の機能追加や改良として、特に将来的な機能拡張 (AI など) を想定した API の定義と実装を進めた。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】

先行研究においてマウスにペンタクロロフェノール (0、10、30、100 mg/kg) を経口投与し 2、4、8 及び 24 時間後に摘出した肝を用いて遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより測定し、Percellome 法による normalization 後に遺伝子発現が変動した遺伝子を網羅的に選択した遺伝子リスト (Kanno J. et al., J. Toxicol. Sci. 2013;38(4): 643-654) を、Garuda プラットフォームへの入力データとして用いた。Garuda プラットフォーム上において、使用したガジェット (Garuda プラットフォームで連結され、相互に入出力データを共有可能となったソフトウェアの総称) は Nandi (使用可能なガジェットの提示)、Gene ID converter (遺伝子 ID 変換ツール)、Reactome (pathway enrichment 解析)、PercellomeDB (遺伝子発現の時間依存的・濃度依存的変動を表す 3D プロットの作成) である。また、当該遺伝子リストを用いて、翻訳により産生されるタンパク質の相互作用情報をグラフとして表現し、その構造から相互作用の強いクラスターを検出する MCL クラスターリングを STRING v11 (Szklarczyk, D., et al., (2018) . Nucl Acid Res 47.D1: D607-613.) を用いて実施した。

#### 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

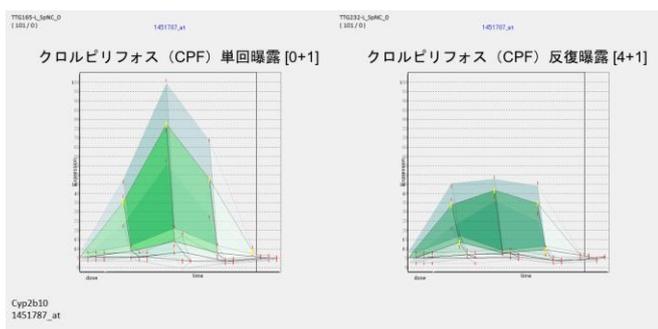
当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

#### (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 31/令和元年度は、クロルピリフォス (CPF)、及び、5-アザシチジン (AZC) 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。

クロルピリフォス (CPF) 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 298、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 60 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。

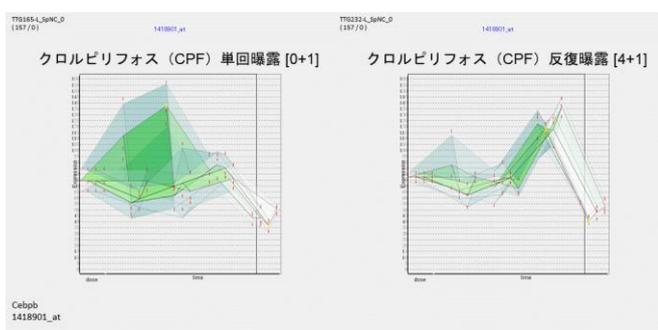
[0+1]と[4+1]に共通する過渡反応遺伝子は 10 であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時によりも反復曝露時に過渡反応が減弱する傾向が見られた。



【共通する遺伝子 Cyp2b10。基線の変化は見られず過渡反応が減弱している】

基線反応の変化はこの共通 10 遺伝子および、発現コピー数が 3 以上の全ての遺伝子において変動は少なかった。共通 10 遺伝子に特徴的なネットワークは抽出されなかった。

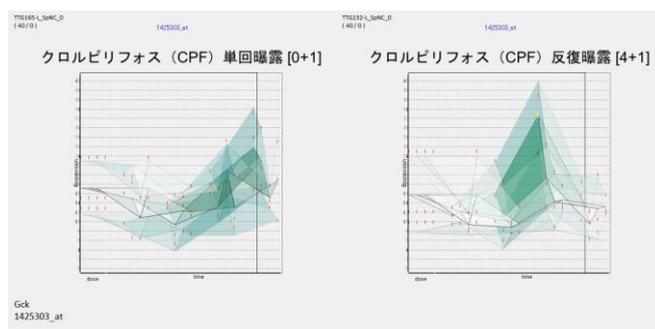
[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は 288 あり、それらは[4+1]における基線反応に弱いながら低下の傾向がみられた。これらの遺伝子はビタミン D 受容体系、PXR 受容体系、グルココルチコイド受容体系、甲状腺ホルモン受容体系等の核内受容体を介したシグナルネットワークに属する遺伝子が含まれ、その上流にグルココルチコイド受容体の作用、グルカゴン等の介在が示唆された。これらは投与後 2~4 時間において顕著に誘導された遺伝子群が示すものであった。24 時間目に発現する遺伝子数は僅かであった。



【ビタミン D 受容体系に属する Cebpb。2-4 時間目の過渡反応が反復曝露により消失している。】

[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 50 あり、弱い基線反応

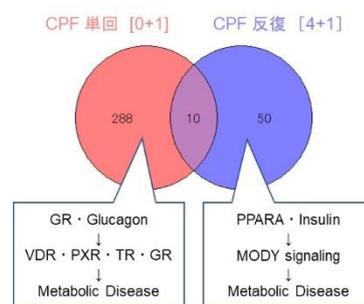
の上昇傾向を伴って Glut2 (Slc2a2)、GCK、などが発現変動を示した。この発現変動遺伝子リストからは、MODY シグナル (Maturity Onset Diabetes of Young ; 若年発症型成人型糖尿病) 及び糖代謝系が IPA により抽出され、その上流に PPARA (発現抑制)、insulin などが挙げられた。



【糖代謝に関わる Gck が反復曝露により誘導された。】

反復曝露が基線反応に及ぼす影響は CPF の場合は、軽微ながら上昇作用 (210 遺伝子) を有し、コレステロール代謝に関わる遺伝子群が含まれる。

以上、CPF はマウス肝において、グルココルチコイド受容体系へのシグナル入力に反応して、ビタミン D、PXR、甲状腺ホルモン受容体系に作動性を示すとともに、PPAR $\alpha$  の系に抑制的に働くことが示唆され、反復投与により糖代謝異常が遷延する可能性が示唆された。

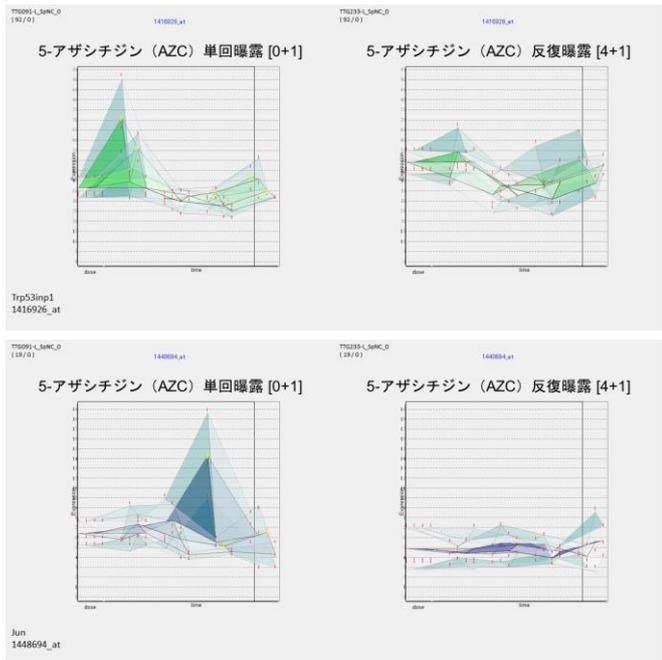


【CPF の単回と反復曝露との遺伝子発現の関係の概略を示す。】

CPF がグルココルチコイド受容体シグナル、グルカゴン系、糖代謝系に影響を与えるという本解析結

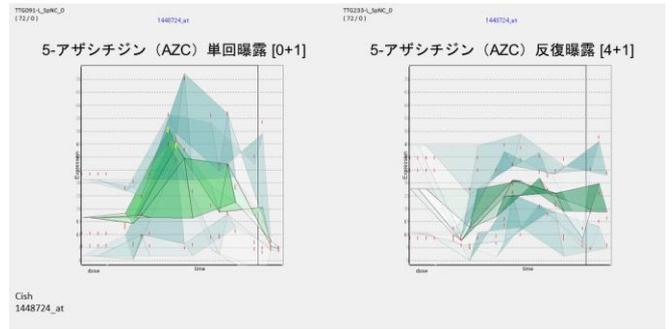
果と、ヒトや実験動物に対して CPF の比較的長期の曝露が血糖値を上昇させる、或いは、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、及び肥満と関係するという報告との関係の解析を更に進める。一方、小胞体ストレスなどの“一般的”な毒性を示唆する変化の誘導は弱かった。糖代謝等について、先行研究で実施したアセフェート、昨年度実施したイミダクロプリドとの対比解析をも進める。

5-アザシチジン (AZC) 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24、反復曝露実験(以下、[4+1]と表記)において28であり、共通する遺伝子が認められなかった。



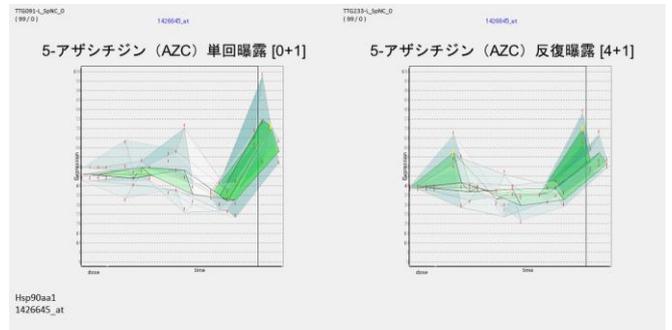
【p53 シグナル系に属する Trp53inp1、Jun を示す。反復により過渡反応は消失している。】

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 24 は、[4+1]と共通性が無く、p53 を上流とするシグナル系と、TLR9 や TLR3 を上流とする JAK/STAT シグナル系などが IPA により抽出された。



【JAK/STAT 系に属する Cish。“ノイズ”が多い遺伝子であるが、反復により過渡反応のピークが消失している。】

[4+1]において変動した 28 遺伝子は、[0+1]と共通性が無く、ユビキチン化系のものを少数含んでいた。



【蛋白ユビキチン化の系に含まれる Hsp90aa1。微弱ながら 2 時間目の誘導が認められる】

[0+1]も[4+1]も共に、過渡反応の 2 時間目からシグナル系が作動することから、弱いながら標的の比較的明瞭な系に対する活性を、代謝を受けない状態で発揮することが確認された。

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細胞当たりの発現コピー数が 3 以上の遺伝子は約 600、低下した遺伝子は約 1,500 であった。上昇した遺伝子群には、特定のシグナル系および上流因子は見いだせなかった。

基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、IPA 分析におけるミトコンドリア機能不全、酸化的リン酸化、EIF-2 シグナル系への強い影響が示された。また、LXR 系、上流に RICTOR、あるいは HNF4A、を上流に持つ系シグナルを含んでいた。

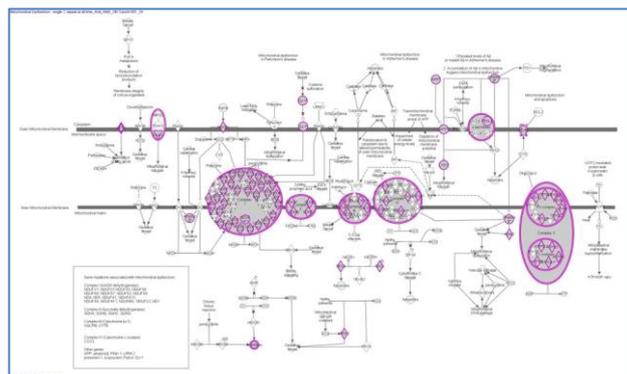
Top Canonical Pathways	
Name	p-value
Mitochondrial Dysfunction	1.26E-52
Oxidative Phosphorylation	1.17E-51
EIF2 Signaling	1.01E-48
Sirtuin Signaling Pathway	7.97E-32
LXR/RXR Activation	1.92E-21

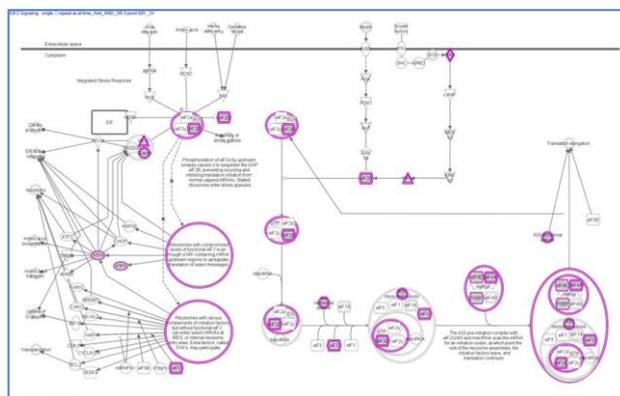
Top Upstream Regulators	
Name	p-value
RICTOR	2.05E-107
HNF4A	9.32E-59
1,2-dithiol-3-thione	3.26E-55
TLE3	1.41E-48
5-fluorouracil	2.80E-45

【基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群の IPA 分析結果】

以上、AZC はマウス肝において、4 日間の 2mg/kg の反復経口投与により強力に、ミトコンドリア機能障害に関わる諸因子（トランスポーター、NADH ユビキチン酸化還元酵素などのミトコンドリア呼吸鎖酵素）、EIF2 シグナル系、等を抑制することが確認された。



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）のミトコンドリア機能マップ中の位置を示す（IPA 解析）】



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）の EIF-2 シグナル系のマップ中の位置を示す（IPA 解析）】

## （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】

反復曝露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した。

### ●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

平成 31/令和元年度は、クロフィブレート（定用量：70 mg/kg）を 14 日間反復投与（[14+1]）した際、及び溶媒（0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液）を単回投与した際の 12 週齢の雄性 C57BL6/NCrSlc マウスの肝サンプルについて（投与 2 時間後のもの、それぞれ n=3、これを必要サンプル重量[200 mg 以上]となるように、それぞれ 1 つにまとめた）、クロマチン免疫沈降（ChIP）を行った。H3K4me3 抗体、H3K27me3 抗体、H3K27Ac 抗体、H3K9me3 抗体の各抗体の場合の濃縮について確認し、ChIP が正常に行われたと判断した。これらの ChIP 済み DNA よりライブラリーを作成し、次世代シーケンスによる 75bp のシングルリードの網羅的シーケンス解析を行った。

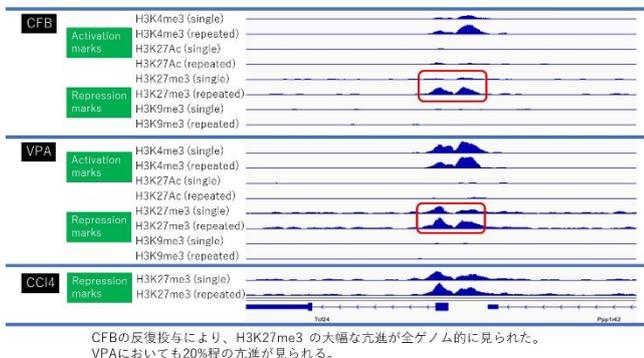
今回得られたクロフィブレート（CFB）を 14 日間

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結果は以下である。

各抗体について、溶媒対照群と反復投与群において認められた各ピーク数はそれぞれ（以下、溶媒対照群、反復投与群）、

抗 H3K4me3 抗体（18,185、19,425）、  
抗 H3K27Ac 抗体（21,740、16,450）、  
抗 H3K27me3 抗体（8,650、20,770）、  
抗 H3K9me3 抗体（21,847、20,583）、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数が 8,650 から 20,770 へ、140.1% 増加しており、CFB の反復投与によって H3K27me3 が亢進されることが明らかになった【下図】。したがって CFB の反復投与による基線反応の変化は、ヒストン修飾の変化で一部は説明できる可能性がある。今後、実際に ChIP-PCR などを行い確認する。



【溶媒およびクロフィプレート(CFB)の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、溶媒およびバルプロ酸ナトリウム(VPA)の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、さらに、溶媒および四塩化炭素(CCl4)の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析をまとめた一例 (Tcf24 遺伝子および Pppar42 遺伝子のプロモータ領域)。図中の赤枠部分は、H3K27me3 の溶媒投与（枠内上段）および CFB、VPA、および CCl4 の反復投与（枠内下段）を示しており、CFB および VPA において大幅なピークの亢進が見られる。一方、CCl4 の反復投与において大幅な亢進は見られなかった】

なお、CFB の反復投与において、H3K4me3、H3K27me3、H3K27Ac、H3K9me3 の各 peak 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 peak 数で、数の多い方の peak 数が 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（63、15）、  
抗 H3K27Ac 抗体（28、66）、  
抗 H3K27me3 抗体（12198、0）、  
抗 H3K9me3 抗体（1、321）、

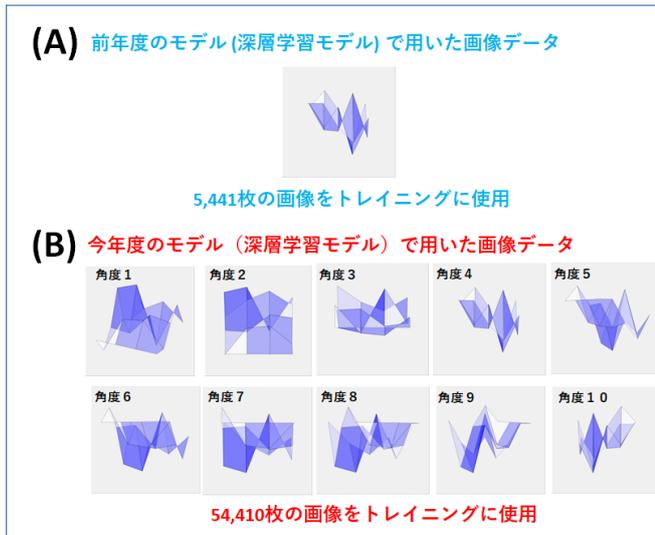
という解析結果となった。このように、反復投与によりゲノムワイドな変化（増加）をヒストン修飾（H3K27me3）が示すことを明らかにした。

実際に、H3K27me3 が反復投与により増加した遺伝子の大半が基線反応の低下を伴っており、逆に反復投与により基線反応が有意に上昇した少数の遺伝子のプロモータ領域に該当すると考えられる位置のヒストンの変化には H3K27me3 の増加は見られず、他の発現誘導を示唆する変化を伴っていた。

### （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

平成 30 年度に深層学習を用いた 3 次元グラフの画像解析システムを構築し、生物学的に有意な遺伝子を高い精度で分類することに成功した。ただし新規データに適用すると、有意判定される遺伝子数が非常に多くなる（絞り込みが不十分）という問題があった。これを改善するため、平成 31/令和元年度は多様な描画角度から 3 次元グラフを作成し、トレイニング画像数を 10 倍に増加させることで、深層学習による分類器の一層の精度向上を試みた。



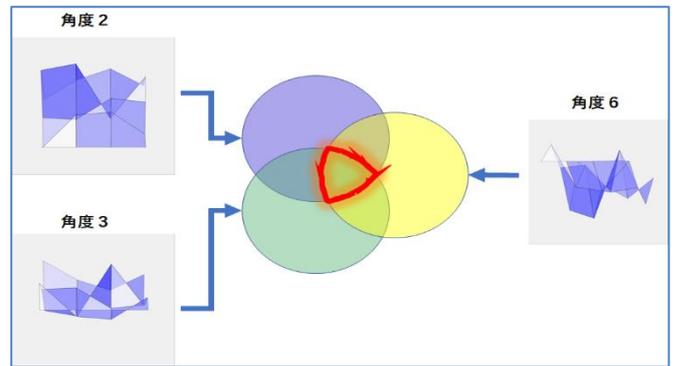
【深層学習のトレーニングに用いた、画像データ (A) 前年度の深層学習モデルのトレーニング画像データ。500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プローブに対応した、5,441 枚の画像データを作成した。(B)今年度の深層学習モデルのトレーニングデータ。500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。それぞれの角度について、positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プローブに対応した、5,441 枚の画像データ (合計 54,410 個) を作成した。】

具体的には上図の通り 10 種の角度からみた画像データに対する、10 種の深層学習モデルを構築し、構築したモデルに対して、5 fold cross validation を実施して予測精度の検証を行った。



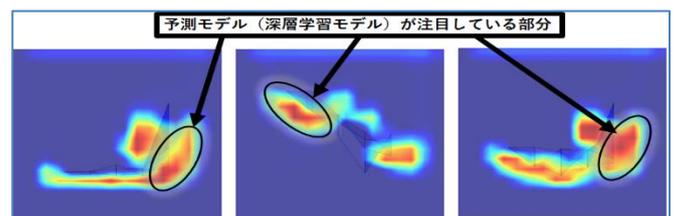
【多様な描画角度から作成した 3 次元グラフをトレーニングに用いた分類器の予測精度：各予測モデルの予測精度、正答率、を表した (代表例)。作成した 10 種のモデル全てが、高い予測精度 (94%以上の正解率) を示した。】

その結果、作成した 10 種のモデル全てが、高い予測精度 (94%以上の正解率) を示した。この結果から、これらのモデルを適切に組み合わせることで、高い精度を保ったまま有意な遺伝子を絞り込むことができる可能性が示唆された。



【複数の深層学習を組み合わせる有意な遺伝子を絞り込むための computational pipeline】

また機械学習の予測モデルの判断基準を明確にするため、explainability model (grad cam : R. R. Selvaraju, M. et al. (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7) を実装してモデルの解析を行った。



【Explanatory model (Grad cam) による深層学習モデルの解析の結果：深層学習モデルは、赤く強調されている所に着目して、判別を行っている。】

この結果、上図に示すように、構築した機械学習モデルにおいても、専門家と同様、3次元グラフのピークの立ち上がり部分に着目して (黒丸内)、判別を行っていることが明らかになった。

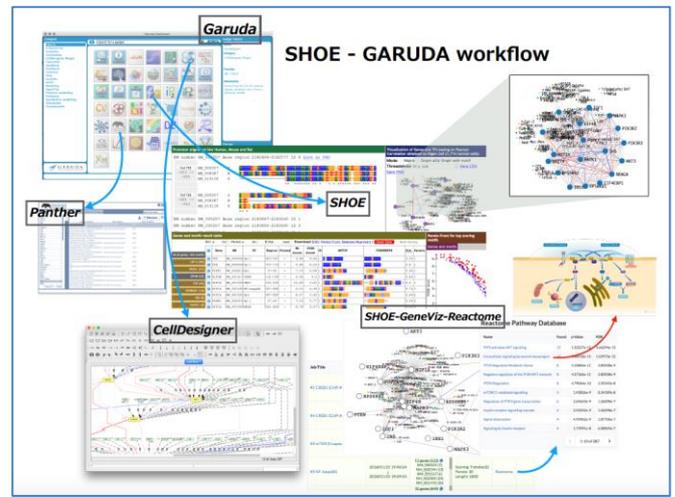
### ●Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動強化

今年度実施した SHOE の機能強化としては、ChIP-Seq

データを参照データベースに統合し、解析対象の領域拡大と精度向上が実現した。

また三種（ヒト,マウス,ラット）共通配列というデフォルト条件は厳しすぎる場合があったため、ヒト-マウス若しくはヒト-ラットの二種共通という条件設定を可能とした。

今後の AI 活用を想定した API の定義と実装を検討し、上のような機能強化を実施した結果、下記のように解析ワークフローがより一層強化された。



Garuda Platform 上で SHOE をハブとしたワークフローが拡大・強化されたことにより、SHOE と Percellome の連動も密になり、その他の複数の解析ソフトウェアとの連動も加わり、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】

今年度はPercellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer を、オンラインサービス (WebAPI)として提供するためのシステム開発を進めた。

現状では、比較解析の度に大容量データを参照し高い計算コストを掛けてクエリ処理を実行するため PercellomeExplorer はクライアント PC 上でのみ稼働しているが、これをオンラインサービスとして提供するためには、クエリ毎にサーバーサイドで生じる計算負荷の大幅な軽減と、実用的な応答時間を実現するための処理時間の大幅短縮（百分の一以下）、を両立させる必要があった。

サーバー性能の強化やソフトウェアの最適化、通信速度の高速化等にも限界があり、従来の設計では実用的な時間内で応答するなどの要件を満たせなかったため、内部データ構造を抜本的に設計し直した。設計変更後は主要な計算を経た最終段階の中間データを保持・参

照するようにした結果、クエリ受付から結果表示まで5～30秒程度の高速化を果たし、実用的なオンラインサービスに足る性能の実現に成功した。

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

Reactome ガジェットによる pathway enrichment 解析の結果、ペンタクロロフェノール投与から24時間後のマウス肝において RIG-1 抗ウイルスパスウェイに関連する遺伝子の発現が変動していることが示唆された。RIG-1 抗ウイルスパスウェイの活性化はタイプ I インターフェロンの誘導に繋がる。さらに、インターフェロン  $\alpha/\beta$  シグナリングパスウェイに関連する遺伝子の変動も同様に認められた。RIG-1 は短鎖 dsRNAs や 5'-三リン酸化 ssRNAs を認識することが既に報告されており (Go SG., et al., (2008). *Virus (in Japanese)*, 58(2), 97-104.)、上記 RNA を有するウイルスとしてインフルエンザウイルスやセンダイウイルス、日本脳炎ウイルスが知られている。次に、STRING を用いて相互作用のあるタンパク質のネットワークに対して MCL クラスタリングを行った結果、互いに密に相互作用をしているサブネットワークが検出された。当該サブネットワークに含まれる遺伝子に対して TargetMine による各種 enrichment 解析を実施した結果、RNA ウイルス感染に関連するパスウェイが検出された。さらに、disease enrichment 解析により当該サブネットワークにはインフルエンザに関連する遺伝子が多く認められることが示された。

#### 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」  
【菅野】においては、先行研究で実施した 8 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 (5FU)、アセフェート (APT)、ペンタクロロフェノール (PCP)、イミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンと、本年度の 2 物質を比較すると、クロルピリフォス (CPF) は APT に類似していた。糖代謝に対する急性及び慢性的な影響が示唆された。5-アザシチジン (AZC) は、基線反応の変化した遺伝子群が属する遺伝子発現経路が、5FU や PCP と類似していたが、それらの実際に発現の方向が逆であった。すなわち、AZC は反復曝露により遺伝子発現が低下するが、5FU と PCP は増加する。しかし、過渡反応は 5FU では増強するのに対して、PCP では減弱する傾向を示すことから、いずれもが独自の遺伝子発現機構を持つことが示唆された。

本年度研究成果により、新たな解析手法やツールが利用可能となったことから、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。特に、これらの化学物質における変動遺伝子のリストの差分を手掛かりに、既に得ている対照群動物のエピゲノム情報や、エンハンサー・プロモータ領域の特性から (SHOE 等を活用)、時系列に沿った遺伝子発現制御機構の詳細の分析 (AGCT 活用を含む) を進める。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについての同様の検討も新たなツールを用いて試みる予定である。

「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」【北嶋】においては、平成 31/令和元年度は、ChIP-Seq によりクロフィブレート (CFB) 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新たな知見が得られた。当初、平成 30 年度に行ったバルプロ酸ナトリウム (VPA) の反復投与のヒストン修飾解析は、VPA による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 は、PPAR $\alpha$  作用を持つことから、VPA による H3K9me3 阻害が、PPAR $\alpha$  シグナルを介して起こるかどうかは重要な課題である。そこで、平成 31/令和元年度は、VPA 同様に PPAR $\alpha$  作用を持つ CFB を反復投与したマウスの肝における ChIP-Seq 解析を行い、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進という結果を得た。そこで、VPA の反復投与とは共通項を探索するために、VPA の反復投与における H3K27me3 の再解析を行った結果、ピーク値に 20% 程の亢進が見られた。よって、VPA の反復投与で見られた H3K9me3 阻害は、PPAR $\alpha$  作用によるものではないが、H3K27me3 の 20% ほどの亢進については、PPAR $\alpha$  作用によるものと考えられる。

なお、溶媒投与群と CFB、VPA、および四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) の反復投与群の比較において、CFB で大幅な H3K27me3 ピークの亢進が見られるが、CFB の溶媒と同じ組成の溶媒の単回投与サンプルでのみ、H3K27me3 のピーク的大幅に減少しているとも考えられる。よって、CFB の溶媒である 0.5% MC+0.1% DMSO のヒストン修飾に及ぼす影響についても詳細に解析する必要がある。

「システム毒性解析の人工知能化」【北野】において実施した深層学習については、大規模データの自動分類において有効であることが一層明らかになった。平成 31/令和元年度に実施した 3 次元グラフの形状を複数の描画角度から作図した画像を学習データとして利用することで、深層学習のトレーニング

効果が深まり、より精緻に分類器のチューニングを行うことが可能であることが分かった。

「Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良」【相崎】については、Percellome データベースの全体を対象とする網羅的比較解析という、より高度な活用を促進する枠組みの構築が完了した。現状は充分実用になっているとはいえ、比較解析の基となるプロジェクト毎の特徴データの抽出を数理的な自動処理で行っているため、ある程度のノイズ混入を許容しているが、今後は分担研究「システム毒性解析の人工知能化」で進められている「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」の成果利用により、より高精度の解析結果が得られると期待される。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】については、Garuda プラットフォームを用いた Percellome データ解析により、ペントクロロフェノール (PCP) 投与によって肝においてインフルエンザ発症時と同様の遺伝子発現変動が起きることが示された。さらに、この応答には抗ウイルスパスウェイとして機能している RIG-1 パスウェイに関連する遺伝子が含まれることが示唆された。つまり、PCP 投与により RIG-1 を介した抗ウイルス応答が惹起され、その結果としてポジティブフィードバックにより RIG-1 パスウェイに関連する遺伝子の発現が亢進するといった分子メカニズムが働いたのではないかと考えられる。実際、インフルエンザウイルスは RIG-1 によって認識されることが既に報告されており (Kato H. et al., *Nature*. 2006;441:101-5)、本結果は PCP による発汗・発熱が RIG-1 パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起されるという可能性を提示するものであると言える。遺伝子リストを取得した Kanno J. et al., *J. Toxicol. Sci.* 2013;38(4): 643-654 においては、enrichment 解析を IPA

(Ingenuity pathway analysis, Ingenuity Systems, Inc. Redwood City, CA, USA) を用いて実施しており、Garuda を用いた解析と同じく PCP 投与後 24hr においてインターフェロンシグナリングパスウェイに関連する遺伝子の発現変動を検出している。更に、“Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response” や “Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Virus” といった抗ウイルス応答に関連するパスウェイについても同様に検出しており、本解析結果は既報内容と矛盾のないものであることを確認した。一方、IPA ではこれらのパスウェイに関連する遺伝子がどのような分子メカニズムによって発現亢進に至ったかを提示するには至っておらず、RIG-1 の関与の可能性を示唆する本解析結果が新規に見出したものである。このことから、Garuda は IPA に代表される有償ソフトに勝るとも劣らぬパフォーマンスでデータ解析を行うことが可能であり、この Garuda に Percellome を連結させた意義は大きいと言える。

## 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」【菅野】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、先行研究で実施した化学物質と比較すると、本年度の2物質のうち、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子農薬であるアセフェートと糖代謝系への影響を含めて類似する傾向が明らかとなった。5-アザシチジンは、反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系（小胞体ストレス等）、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導す

るといふ点では、5-フルオロウラシル、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を更に進める。

以上より、明瞭な毒性発現が誘発されない用量における僅か4日間の反復曝露により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が示唆されたと考える。

「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」【北嶋】については、ChIP-Seqにより、クロフィブレート (CFB) 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、H3K27me3 がゲノムワイドに亢進していることが示唆された。平成30年度に ChIP-seq 解析を行った HDAC の阻害剤であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) の反復投与により、H3K27Ac ではなく、H3K9me3 阻害が起こるといふ新知見が得られており、この H3K9me3 阻害が PPAR $\alpha$  作用によるものではないことが、CFB の解析から明らかにできた意義は大きい。

今後は、CFB、VPA による H3K27me3 の亢進作用がこれらの化学物質の反復投与による基線反応に変化にどう影響をしているかを更に詳細に解析する予定である。

「システム毒性解析の人工知能化」【北野】については計画通り推移しており、今回の成果で、人手ではできなかったスケールの遺伝子発現と毒性への連動解析が可能になると期待される。また、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。今後は、これら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」【相崎】においては計画通り、Percellome データベ

スをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer をオンラインサービス (WebAPI) として提供するために、内部データ構造を根本的に再設計して高速化を果たすなどして、必要なシステム開発を進めた。これにより Percellome データベースの高度な活用及び、より一層の利用促進が見込まれる。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】においては、Garuda プラットフォームを用いた Percellome データ解析により、ペンタクロロフェノール(PCP)の毒性発現機構の推定を行った。

「PCP による発汗・発熱が RIG-1 パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起される」という知見を事前知識に頼ることなくデータから抽出することに成功しており、Garuda プラットフォームや Percellome データがシステム毒性学の実践において有用な資源となることを示す成果であると言える。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (抜粋)

(1) Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y. CYP3A4 induction in the liver and intestine of PXR/CYP3A-humanized mice: approaches by mass spectrometry imaging and portal blood analysis. *Mol Pharmacol*. 2019 Aug 27. pii: mol.119.117333. doi: 10.1124/mol.119.117333.

(2) 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.

(3) Gupta V, Crudu A, Matsuoka Y, Ghosh S, Rozot R, Marat X, Jäger S, Kitano H, Breton L. Multi-dimensional computational pipeline for large-scale deep screening of compound effect assessment: an in silico case study on ageing-related compounds. *npj Syst Biol Appl* 5, 42 2019.

(4) Uchida S, Asai Y, Kariya Y, Tsumoto K, Hibino H, Honma M, Abe T, Nin F, Kurata Y, Furutani K, Suzuki H, Kitano H, Inoue R, Kurachi Y. Integrative and theoretical research on the architecture of a biological system and its disorder *J Physiol Sci* 69 433 2019

(5) Kato Y, Tabata K, Kimura T, Yachie-Kinoshita A, Ozawa Y, Yamada K, Ito J, Tachino S, Hori Y, Matsuki M, Matsuoka Y, Ghosh S, Kitano H, Funahashi Y. Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8+ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway *PLOS ONE* doi.org/10.1371/journal.pone.0212513

(6) Polouliakh N. In Silico Transcription Factor Discovery via Bioinformatics Approach: Application on iPSC Reprogramming Resistant Genes. *Leveraging Biomedical and Healthcare Data*, 2019 - Elsevier

(7) Watanabe R, Ohashi R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-Kitatani Y, Nagao C, Mizuguchi K. Development of an in silico prediction system of human renal excretion and clearance from chemical structure information incorporating fraction unbound in plasma as

a descriptor. Scientific reports 9(1) 18782 2019

(8) Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Komura H, Mizuguchi K. Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility. Journal of pharmaceutical sciences 108(11) 3630-3639 2019

(9) Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Mizuguchi K. Computational Model To Predict the Fraction of Unbound Drug in the Brain. Journal of chemical information and modeling 59(7) 3251-3261 2019

(10) Lee MSJ, Natsume-Kitatani Y, Temizoz B, Fujita Y, Konishi A, Matsuda K, Igari Y, Tsukui T, Kobiyama K, Kuroda E, Onishi M, Marichal T, Ise W, Inoue T, Kurosaki T, Mizuguchi K, Akira S, Ishii KJ, Coban C. B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- $\gamma$ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant. European journal of immunology 49(9) 1433-1440 2019

## 2. 学会発表 (抜粋)

(1) Kanno J, Aisaki K, Ono R, Kitajima S. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), (2020.3.15-19) Anaheim, USA, ePoster.

(2) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European

Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster.

(3) Ono R, Kitajima S, Aisaki K, Kanno J. Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts

(4) Kanno J, Aisaki K, Ono R, Kitajima S. 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.

(5) Natsume-Kitatani Y, Mizuguchi K, Aisaki K, Kitajima S, Ghosh S, Kitano H, Kanno J. Pentachlorophenol affects RIG-1 antiviral pathway that produces type 1 interferon at the transcriptional level ISMB/ECCB 2019 バーゼル (スイス), 2019/07/24

(6) Kawashima H, Miyachi M, Murakami H, Konishi K, Ohno H, Tanisawa K, Hosomi K, Mohsen A, Chen YA, Park J, Mizuguchi K, Natsume-Kitatani Y, Kunisawa J. A study of gut microbial variations associated with phenotypic metadata in a healthy Japanese population ISMB/ECCB 2019 バーゼル (スイス), 2019/07/23

(7) Watanabe R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-Kitatani Y, Nagao C, Ohashi R, Komura H, Mizuguchi K. Development of DruMAP, Drug metabolism and pharmacokinetics Analysis Platform

ISMB/ECCB 2019 バーゼル (スイス) , 2019/07/22

⑧ Natsume-Kitatani Y, Aisaki K, Kitajima S, Ghosh S, Kitano H, Mizuguchi K, Kanno J. Cross Talks among PPAR $\alpha$ , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid IUTOX2019 ホノルル (ハワイ) , 2019/07/16

⑨ 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Gosh Samik, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純 Garudaプラットフォームによる多角的毒性予測 第46回日本毒性学会 学術年会 徳島, 2019/06/28

(10) 伊藤真里, 武田吉人, 木田博, 木庭太郎, 野島陽水, 藤原大, 長尾知生子, 夏目やよい, 武田理宏, 松村泰志, 熊ノ郷淳, 水口賢司 「新薬創出を加速する人工知能の開発」特発性肺線維症への取り組み  
第59回日本呼吸器学会学術講演会  
東京, 2019/04/14

## H. 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