

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 31/令和元年度 分担研究報告書

Percellome データベースを利用した解析パイプライン

研究分担者 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

今年度はヒトにおいて急性発汗や発熱などの症状を惹起するため使用が厳しく制限あるいは禁止されている殺虫剤であるペンタクロロフェノール（PCP）を投与したマウス肝臓におけるPercellomeデータを選択し、Garudaプラットフォームによる解析によってその毒性発現メカニズム推定を実施した。マウス（C57BL/6, 12週齢、オス）にPCP（0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%）を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に肝臓、腎臓を採取してマイクロアレイ解析に供した。Percellome法により正規化され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。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。

## A.研究目的

毒性発現メカニズムの推定における Percellome データおよび Garuda プラットフォームの有用性を示すため、Percellome データを Garuda プラットフォームによって解析することによりこれらの活用例を提示することを目的としている。今年度はヒトにおいて急性発汗や発熱などの症状を惹起するため使用が厳しく制限あるいは禁止されている殺虫剤であるペンタクロロフェノール（PCP）を投与したマウス肝臓における Percellome データを選択し、Garuda プラット

フォームによる解析によってその毒性発現メカニズム推定を実施することとした。

## B.研究方法

マウスに PCP（0, 10, 30, 100 mg/kg）を経口投与して一定時間後（2, 4, 8 あるいは 24 時間後）に摘出された肝臓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た。Per cell normalization 後に遺伝子発現が変動した遺伝子が選択された。当該遺伝

子リストは[1]より取得し、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 クラスタリングを STRING v11[2]を用いて実施した。

[1] Kanno J. et al., J. Toxicol. Sci. 2013;38(4): 643-654

[2] Szklarczyk, D., et al., (2018). Nucl Acid Res 47.D1: D607-613.

### C.研究結果

Reactome ガジェットによる pathway enrichment 解析の結果、PCP 投与から 24 時間後のマウス肝臓において 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[3]、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なった結果、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。この結果より、タンパク質相互作用情報より得られるグラフのクラスタリングによって検出されたサブネットワークに含まれる遺伝子群は、PCP 投与によって変動する遺伝子群の中でも特にインフルエンザなどの RNA ウイルス感染に関連の強いものであることが示唆された。

[3] Go SG., et al., (2008). Virus (in Japanese), 58(2), 97-104.

### D.考察

Garuda プラットフォームを用いた Percellome データ解析により、PCP 投与によって肝臓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[4]、本結果 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[1]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。

[4] Kato H. et al., *Nature*. 2006;441:101-5

## E. 結論

Garudaプラットフォームを用いたPercellomeデータ解析により、PCPの毒性発現機構の推定を行なった。

「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. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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.

Watanabe R, Ohashi R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-Kitatani Y, Nagao C, Mizuguchi K  
*Scientific reports* 9(1) 18782 2019

2) Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility.

Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Komura H, Mizuguchi K  
*Journal of pharmaceutical sciences* 108(11) 3630-3639  
2019

3) Computational Model To Predict the Fraction of Unbound Drug in the Brain.

Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Mizuguchi K  
*Journal of chemical information and modeling* 59(7)  
3251-3261 2019

4) B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- $\gamma$ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant.

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  
European journal of immunology 49(9) 1433-1440 2019

## 2. 学会発表

- ①) Pentachlorophenol affects RIG-1 antiviral pathway that produces type 1 interferon at the transcriptional level  
Natsume-Kitatani Y., Mizuguchi K., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Kanno J.

ISMB/ECCB 2019

バーゼル (スイス) , 2019/07/24

- 2) A study of gut microbial variations associated with phenotypic metadata in a healthy Japanese population  
Kawashima H., Miyachi M., Murakami H., Konishi K., Ohno H., Tanisawa K., Hosomi K., Mohsen A., Chen Y.A., Park J., Mizuguchi K., Natsume-Kitatani Y., Kunisawa J.

ISMB/ECCB 2019

バーゼル (スイス) , 2019/07/23

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

ISMB/ECCB 2019

バーゼル (スイス) , 2019/07/22

- ④) Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid  
Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J.

IUTOX2019

ホノルル (ハワイ) , 2019/07/16

- ⑤) Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測  
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  
第46回日本毒性学会学術年会  
徳島, 2019/06/28

- 6) 「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  
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  
第59回日本呼吸器学会学術講演会  
東京, 2019/04/14

## 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