

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
- 網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発 -  
(H24-化学-指定-006)

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 27(2015)年3月

## 目 次

### ・ 総括研究報告書(別添 3)

化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究

- 網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発 -

菅野 純 ..... 1

### ・ 分担研究報告書(別添 4)

1. 反復暴露実験の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースから  
の反復毒性予測の性能評価

菅野 純 ..... 67

2. 胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの  
網羅的解析

北嶋 聡 ..... 117

3. Percellome 3次元データ等の為に専用解析ソフトウェアの開発研究

相崎 健一 ..... 177

4. システムトキシコロジー解析基盤の研究開発

北野 宏明 ..... 209

・ 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 5) ..... 277

・ 研究成果の刊行物・別刷(別添 6) ..... 281

**厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）**  
**総括研究報告書**

**化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究**  
**- 網羅的定量的大規模トキシゲノミクスデータベースの維持・拡充と毒**  
**性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発 -**  
**（H24-化学-指定-006）**

**研究代表者 菅野 純**

**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**

**研究要旨**

本研究は、先行実施された Percellome<sup>(\*)</sup> トキシゲノミクス研究を基盤に、分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。この為に、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4研究を実施した。

- （1）反復暴露実験の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価
- （2）胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析
- （3）Percellome 3次元データ等の為に専用解析ソフトウェアの開発研究
- （4）システムトキシコロジー解析基盤の研究開発

（1）では、新型反復暴露<sup>(\*\*)</sup>が2種類の反応を遺伝子発現に及ぼすことが判明した。それは、過渡反応：暴露の都度に概ね24時間以内に収まる速い変化、及び、基線反応：暴露を重ねるに連れ、日を追って発現値の基線が徐々に移動する緩やかな反応である。平成24年度は四塩化炭素、平成25年度はバルプロ酸ナトリウムについて、単回暴露と新型反復暴露を比較解析し、過渡反応の振幅の増減と、基線反応の増減傾向が相関することを見出した。ただし四塩化炭素では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、バルプロ酸ナトリウムではそのような傾向は弱いという差異も認められた。本年度（平成26年度）はクロフィブレートにて同設計の新型反復暴露実験セットを行い、四塩化炭素と類似した基線反応関係を確認し、その上流に共通の分子機構が働いている強い可能性が示された。

（2）では、無処置野生型マウス全胚の胎生6.25～9.75日（12時点）の網羅的トランスクリプトームデータを対象として、平成25年度で導入し、発生過程における代表的な遺伝子（Shh）のシグナルネットワークをモデルに最適化した手法を基にし

て、本年度は、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出する事を検討した。

(3)では、先行研究で開発したアルゴリズム、プログラムを基に、本年度は、マウスのみを対象としていた非 Percellome データの絶対量推定を、参照データベースに TGP の一部溶媒群データ(\*\*\*)を追加・拡充することにより、ラットにも拡大したほか、実験間の共通変動遺伝子を高速抽出するプログラム PercellomeExplorer の改良を進め、各化学物質に特異的な生体反応要素のハイスループット抽出解析を実現した。

(4)では、引き続き遺伝子制御関係推定アルゴリズム及び状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの性能向上と機能実装を進め、同時に開発したプログラムの Garuda\*\*\*\* 対応を進めた。本年度は遺伝子制御関係推定システムを Web-service の Inference cloud として提供できるように開発を行った。また、クラスタリングソフトウェア AGCT (A Geometric Clustering Tool) の Percellome データへの最適化や計算規模及び速度の向上を実施し、高速化を達成した。さらに Percellome データベースの、国際的なソフトウェアの共通基盤 Garuda Platform 上への実装を進め、そのソフトウェアを Garuda platform の一般公開バージョンとして配布を開始した。

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」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。特許 4415079 号。

(\*\*) 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。

(\*\*\*) TGP はその発足時に当研究者らが Percellome 法を基軸に設計したものであり、その生データから絶対量化や後述の 3 次元波面表示・解析が可能である。

(\*\*\*\*) 各種の生物学的研究ソフトウェアの Web 公開型統合プラットフォーム。  
<http://www.garuda-alliance.org/>

#### 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 第 5 室長

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 1 室長

#### 研究協力者

Natalia Polouliakh 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、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した毒性評価手法の迅速化、高度化、及びその実用の為のインフォマティクス開発を目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 5.8 億遺伝子情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベース (TGDB) と単回暴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、反復暴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導入し、網羅的毒性予測評価システムの機能強化と精度向上を図る。

## B . 研究方法

### (1) 反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価【菅野】

B1-1: 試薬及び動物 :

平成 26 年度はクロフィブレート (Clofibrate; 分子量 : 242.7、Cas No. : 637-07-0、純度 98.0%、Enzo) について既存データの解析を進めた。また新たに 12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に 4 用量 (溶媒 : 0.1% DMSO 含有 0.5% メチルセルロース水溶液) のクロフィブレートを、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、経時的 (投与 2、4、8 及び 24 時間後) に肝を採取した。

単回暴露 ( [0+1] ) 時のクロフィブレートの投与量は 0、10、30、100 mg/kg とした。新型反復暴露である 14 日間反復暴露

( [14+1] ) 時のクロフィブレートの投与量は全例に対し 70 mg/kg、単回暴露は 0、10、30、100 mg/kg とした。

B1-2: Total RNA の分離精製 :

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4 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 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  $\mu$ 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 (ライフテクノロジーズ・ジャパン社) 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。

B1-3: 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、ピオチン化 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 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45 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。また、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 ) 胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析【北嶋】

### B2-1:無処置野生型マウス胚・全胚の RNA 採取

C57BL/6CrSlc マウス ( 日本エスエルシー ) を実験に用いた ( プラグが確認された日の 15 時を胎生 0.5 日とした ) 。経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚 ( 全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した ) を 1 腹分ブールした RNA サンプルを用い、マイクロアレイ ( Affymetrix GeneChip

Mouse Genome 430 2.0 ) を用いて、網羅的遺伝子発現変動解析を検討することにより、遺伝子発現経時データベース ( 胎生 6.25 ~ 9.75 日、TIME POINT : 12 点 ) を作製した。マウス胚は、直接、1% の 2-メルカプトエタノール含有 RLT バッファー ( QIAGEN 社 ) に変性・溶解させた。

### B2-2:全胚サンプルの cDNA 合成

全胚サンプルについては、2 段階増幅により cDNA を得た。すなわち、全 RNA の 100ng をとり、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を得、2 本鎖とした後、T7 RNA ポリメラーゼ ( Ambion 社 ) を用いて cRNA を合成 ( この段階ではビオチン化塩基は用いない ) した ( 増幅 1 回目 ) 。その cRNA を鋳型に random primer を用いて逆転写して cDNA を得て 2 本鎖とし、T7 RNA ポリメラーゼ ( ENZO 社 ) を用い、ビオチン化 CTP、UTP 共存下で cRNA を合成、断片化した後、GeneChip へのハイブリダイゼーションに供した。

### B2-3:Whole mount ISH

当該プローブセット ( ps ) について GeneChip にて使用している塩基配列を調べ、その配列を基に、ジゴキシゲニンでラベルした dNTP を用いて RNA プローブを作製した。作製した RNA プローブを用いて、固定後プロテナーゼ K 処理したマウス胚とハイブリダイゼーションを行い、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色は BM purple で行った。

### (3) Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究【相崎】

#### B3-1:参照データ

a) 遺伝子発現データ: Percellome プロジェクトで生成したマウスの遺伝子発現データ、及び TGP プロジェクトで生成したラットの遺伝子発現データを用いた。データ標準化(絶対量化)には Percellome 法を利用した。

b) 遺伝子のアノテーション情報: 米 Affymetrix 社及び Gene Ontology Consortium、独 BIOBASE 社等が提供している情報を参照した。

#### B3-2:ソフトウェア作成に用いた開発言語及びコンポーネント

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 ver.7 もしくは XE3 (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.)を用いた。Web アプリケーション開発には Delphi もしくは PHP、JavaScript を用いた。1 億件以下の小~中規模のデータベース処理に際しては組み込み型リレーショナルデータベースコンポーネントの 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。また WebAPI の構築には DataSnap (USA, Embarcadero Technologies, Inc.)を用いた。

#### B3-3: データ解析計算

主たる計算は独自に開発したプログラム

により実施した。検証は必要に応じて Excel (USA Microsoft Corporation) や R 言語 (オープンソース R Development Core Team) で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確認した。

大規模計算が必要な場合は、高速データベースエンジンである Teradata データベース (日本 Teradata 社) を装備する研究計算用サーバーシステム (MF サーバシステム) にアプリケーションソフトウェアを移植して実施した。

### (4) システムトキシコロジー解析基盤の研究開発【北野】

本研究は、システムバイオロジーをトキシコロジーに応用する研究であり、従来の手法ではとらえきれなかったネットワークを基盤とした毒性の理解を可能とする。このため、大規模データを利用する手法と大規模文献情報などをいかに集約するかに関する研究、そしてそれらを統合的なプラットフォームに実装し広く利用できるようにする研究によって構成される。この研究は、以下の項目に区分できる:

(4-1) 大規模データからの遺伝子制御関係推定アルゴリズムの開発と改良

(4-2) 大規模データからの状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの開発と改良

(4-3) 大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究

(4-4) Garuda Platform とその関連ソフトウェアの研究開発

#### B4-1: 大規模データからの遺伝子制御関係推定アルゴリズムの開発と改良

Percellome や多くの研究で利用されている遺伝子発現データを利用し、遺伝子間の発現変動の相互関係と因果関係ネットワークの構築を可能とする手法の研究を行う。現在、遺伝子発現データからのネットワーク抽出の研究は多く行われているが、その精度は高くない。例えば、広く使われているベイズ統計を利用した方法は、比較的少数の遺伝子に対して大量のデータが存在するときには適切な方法とは言えない。このような状況では、相互情報量 (Mutual Information) を利用する手法の方が適しているが、その計算の具体的な手法により、推定結果の精度などは大きく違ってくる。我々は、既に、複数の計算手法の組み合わせを利用して、これらの現存手法より、精度の高い手法を開発した。本研究では、この手法をさらに改良し、より精度の高いものに改良する。

#### B4-2: 大規模データからの状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの開発と改良

システム毒性学で重要なことは、ネットワークとして記述された生体システムが、毒性物質の影響でどのように「制御」されてしまうかを理解すること (フォワードアナリシス) であり、また、ネットワークを特定の状態に遷移させた原因は、どの遺伝子群への影響によるものであるかを特定できるということ (バックワードアナリシス) である。フォワードアナリシスは、研究項目 4-1 と 4-3 で実現する。この研究項目では、ネットワークを制御することができる遺伝子群の同定を大規模データから

行う手法の研究を行う。

#### B4-3: 大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究

フォワードアナリシスでは、大規模データのみならず、大量の文献やデータベースなどを総動員して精度の高い分子相互作用ネットワークと遺伝子制御ネットワークを構築する必要がある。すでに我々は、これらに関係するソフトウェアである CellDesigner や Payao などを構築して、このプロセスの効率化と高精度モデルの構築ノウハウを蓄えてきた。この蓄積から、次のステップとして大量に存在する文献などの情報を、知的に集約し、モデル構築を行う研究手法などを提示し、可能な範囲で自動的にモデルを構築する情報を抽出する手法の開発が必要である。この研究項目では、このプロセスに関する研究とそのコンセプトを実証するソフトウェアの試作を行う。

#### B4-4: Garuda Platform に準拠する毒性解析ソフトウェアの開発

本研究で開発される手法を実装するソフトウェアや Percellome などは、国内外の幅広い研究者に利用されることで、トキシコロジーに関連する研究の発展とその成果の利用を促進する必要がある。我々は、国際的なソフトウェアの共通基盤として Garuda Platform を開発している。ここでは、この Garuda Platform をトキシコロジーの分野へと応用することを可能とする一連の開発と普及・啓蒙を行う。

従来手法では捕え切れなかったネットワークを基盤とした毒性の理解を可能と



するために、生体活動をシステムとして把握するシステムバイオロジーをトキシコロジーに応用した「システムトキシコロジー」解析基盤を開発する。その成果をライフサイエンスソフトウェアの国際的共通基盤（Garuda Platform）を介して国内外の研究者に提供し、国際的な研究活動を促進する。

### 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・動物実験の適正な実施に関する規程（平成19年4月版）及び国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行う。）

## 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）反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価【菅野】

本年度はクロフィブレートについて、先行研究における四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウムの実験と同様の新型反復暴露実験を行い、[0+1]、[1+1]、[2+1]、[4+1]、及び[14+1]の5通りの反復投与期間の長短による過渡反応と基線反応のそれぞれの

推移と両反応の関連性の解析を肝について進めた。

過渡反応の有無（最終日の投与の影響の有無）に関わらず、約4,000の遺伝子に、有意な基線反応が認められ、うち1,700遺伝子に1回から14回反復に亘り基線の低下が認められた。この遺伝子群は既知遺伝子情報（IPA）により、ある特定の経路を構成する遺伝子を高率に含んでいることが判明した。また、過渡反応が基線反応の影響を受けるものと受けないものが混在していることが示された。

さらに3年間の研究を通じ、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレートの3化学物質の解析結果を総合し、基線反応と過渡反応の組み合わせによる遺伝子リストを完成させ、その経時的な変動を調節する上下流の遺伝子発現ネットワークを明らかにし、慢性毒性の分子背景の解明を進めた。その結果、基線反応の強い抑制を示す遺伝子群の発現を支配する上流遺伝子群が3物質に共通していることが明らかになった事、その更なる上流の候補遺伝子が単回投与から数個示唆された事、

新型反復暴露実験による過渡反応遺伝子群と基線反応遺伝子群の重なり具合が、化学物質固有であることから、この重なりの内容が反復毒性の予測に重要である可能性が示唆された事、が成果としてあげられた。

### （2）胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析【北嶋】

本研究は、発生過程において重要なマス

ター遺伝子は一般的に、この期間中に一過性、即ち単相性の発現を示し、一群の下流遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の形質の形態形成を制御することを利用して

いる。  
胎児発生過程における遺伝子発現については、自律的な遺伝子発現が多く認められる為、遺伝子発現シグナルの流れを解析するのに適しているが、活発な細胞増殖や多様な細胞分化が同時並行で起こるため、従来技術では要素分析が困難であった。

そこで平成 25 年度に、微分解析(発現変動波を一階微分及び二階微分すること)で発現変動基点及び発現ピークの時点を設定する技術を開発し、モデルとして当初より採用している Shh 遺伝子シグナルネットワークに着目して最適化した条件設定及び抽出パラメータを基に、平成 26 年度は、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出する事を検討した。

無処置野生型マウス全胚の胎生 6.25 ~ 9.75 日(12 時点)の網羅的トランスクリプトームデータを対象に、全ての遺伝子発現変動につき、解析ソフト SeekESP\_s.exe を用いて、発現変動起点ごとに自動抽出後(発現変動起点における発現コピー数が 0.3 以上のものを選択)目視により生物学的変動と考えられる 2,218 ps を抽出した。この目視の過程で、2,218 ps の内、胚採取開始時点である胎生 6.25 日において、多くの遺伝子(2,166 ps)の発現が認められる事を見いだした。また、発現のピークが単一の 1 峰性のものと、ふたつである 2 峰性のものに分類できる事が明らかとなっ

た。2 峰性の発現変動を示す遺伝子の場合、はじめの発現変動と次の発現変動とが重なり、境目が不明確となり、次の発現変動起点がどの時点となるのか定めることはできなかった。そこで本解析では、2 峰性の発現変動を示す遺伝子は選択せず、1 峰性の発現変動を示す遺伝子(60%、1,323 ps)について検討を進めた。具体的には、胎生 6.25 日において発現が認められない遺伝子の内、1 峰性を示す遺伝子は 47 ps、2 峰性を示すものは 5 ps、他方、胎生 6.25 日において発現が認められる遺伝子の内、1 峰性を示すものは 1,244 ps、2 峰性を示すものは 922 ps であった。この内、一例として、胎生 6.25 日での発現の有無に関わらず 1 峰性を示す遺伝子につき、発現変動起点ごとに抽出される遺伝子数を記載すると、胎生 6.50、6.75、7.25、7.50、7.75 及び 8.25 日ではそれぞれ、3、7、239、837、209 及び 28 ps となった。

### (3) Percellome 3 次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究【相崎】

平成 26 年度は、マウスのみを対象としていた非 Percellome データの絶対量推定をラットにも拡大適用した。具体的には、医薬基盤研トキシコゲノミクスプロジェクト(TGP)のラットデータを利用し(TGPの発足時研究計画を当研究者らが Percellome 法を基軸に設計したため、そのデータは絶対量化が可能。ただし TGP では Percellome 法適用に必要な品質管理を行っていなかったため、溶媒群データを中心に Percellome 計算ソフトウェア SCal4 による品質チェックを行い、明らかな外部スパイク RNA 添加

ミスなどの大きな問題が無い 2072 枚の GeneChip データのみを収集した)、これらを Percellome 法により絶対量化し、SnCalc 参照データベースに追加・拡充することにより、ラットに於いても非 Percellome データの絶対量推定が可能となった(ただし、適用は TGP データと同様のトランスクリプトーム分布を有するデータに限定される)。また実験間の共通変動遺伝子の抽出など、多数の化学物質暴露データを用いた複雑な集合計算を簡便に行うためのソフトウェア PercellomeExplorer の改良を進め、各化学物質に特異的な生体反応要素のハイスループット解析を実現した。

#### (4) システムトキシコロジー解析基盤の研究開発【北野】

遺伝子制御関係推定アルゴリズムについては、複数の計算手法の組み合わせを利用するに当たって、データに応じた適切な手法の選択が重要である。そこで我々は、データの全体的な特徴で利用するアルゴリズム群を決定し、個別の因果関係に関して各々の手法からの推定信頼度を参照して、最終的な推定ネットワークを構築する方法を開発した。すなわち、データの特徴分析から、そのデータの解析に最適なアルゴリズム群を決定する段階と、そこで選択されたアルゴリズム群の推論結果から、同じデータにおいても推定信頼度が変わる側面を捉え、最も信頼度の高い相互作用の推定結果を集約する段階の 2 段階を経るものである。また、これらの成果は、Inference cloud という Web-Service の形で実装し、オンライン上で利用可能な形態にした。

状態制御遺伝子群推定アルゴリズムについては、実例としてプリオン病のデータを利用した遺伝子相互作用ネットワークの分析から、プリオン病と同等の遺伝子発現変化を生じさせる少数のドライバー遺伝子を同定し、その効果をシミュレーションで確認している。ここでは、上で開発された遺伝子制御推定システムの推論結果をもとに、ネットワーク制御推定アルゴリズムを適応してその効果を確認するとともに手法の改良を行った。特に大規模なネットワークを扱うことを考慮して、個別遺伝子の制御可能性の推定に加え、多くの遺伝子を群として扱い、その遺伝子群の関係において制御可能性を推定するという手法を開発した。これにより、従来より大規模なネットワークの制御可能性の解析が可能となった。

さらにプロモーター領域の解析も付加するシステム SHOE を開発し、ゲノムデータの裏付けを基に制御ネットワークの推定を行うシステムも開発した。この過程において、全データからの用量選択、細胞選択、時計遺伝子効果削除、スペクトラルクラスタリングや主成分分析の表示の上で 6 つのアルゴリズムによるクラスタリング等の機能を加え、より正確な状態制御推定を可能とした。

大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究に関しては、文献情報からパスウェイ構築を効率化するために、パスウェイエディタ CellDesigner を改良し、パスウェイの各パスをモジュール化して扱えるように、グラフィックデータベースにモデルを格納する Ver. 5 の試作を行なった。この結果、大量データを扱う際の実行速度や安定性など

が向上した。

Garuda Platform は、国際的に非常に高い評価を得ており、普及は予想以上に順調に進んでいる。実際に、武田薬品工業株式会社が、2014 年度から導入するなど、普及が加速している。また、日本や欧州の製薬会社、化粧品会社、食品会社が強い興味を示しており、本研究のインパクトは大きいと考えられた。

#### D . 考察

反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価においては、今年度は高脂血症治療薬として使用されているクロフィブレートについて、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウムと同様の実験を行った結果、反復暴露により基線の低下が認められた遺伝子群が属する遺伝子発現経路群は四塩化炭素のそれと酷似していることが確認された。他方、過渡反応については、四塩化炭素が基線反応の影響を強く受けたのに対し、クロフィブレートの過渡反応は基線反応の影響を受けないものの比率が多かった。

今後、慢性毒性の理解のための過渡反応と基線反応の分子機序解明に、特徴的な基線反応と過渡反応の両極端のパターンを示す四塩化炭素とバルプロ酸ナトリウム、その中間的な反応を示すクロフィブレートの三者の所見の差異を利用し、基線反応を引き起こす上流機構、転写制御領域の解析、基線反応と過渡反応の連鎖・非連鎖の分子基盤、等を分担研究者の協力のもとに推進する。また、単回暴露実験の結果の中から、反復暴露時の基線反応と過渡反応と

連関する、即ち、予測に使用可能な、所見の存否を明らかにする。

胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析においては、微分関数の利用による発現変動基点及び発現ピークの時点を同定する技術を利用し、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的にシグナルネットワークを推定する事を検討した。自動抽出後の目視による検索の結果、発現のピークが1峰性のものと、2峰性のものに分類できる事が明らかとなったので、自動抽出と目視を組み合わせることで2回目のピークも含めたより網羅的な検索が実施できたものとする。1峰性を示す遺伝子につき、発現変動起点ごとに抽出される遺伝子数を検討した結果、発現変動起点が胎生 7.50 日に存在する遺伝子数が最も多い結果となった (Shh 遺伝子も含まれる)。この時期は中胚葉誘導や器官形成が活発な時期であり生物学的に妥当と考えられる。今後、2峰性を示す遺伝子の二つの発現変動起点の扱い方を確立しつつ、発現の局在を検討する whole mount ISH ならびに *in silico* プロモーター解析を組み合わせるの、発生初期過程に絡むシグナルネットワークの網羅的描出を計る。

Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究においては、新規アルゴリズムの開発や既存ソフトウェア、データベースの改良を行い、3年間を通じて、性能向上や適用範囲の拡大(汎用化)を実現した。特にマウスデータだけでなくラットデータにも解析対象を広げたこ

と、非 Percellome データについても絶対量推定がある程度の精度をもって可能になったことは、Percellome 技術の普及、利用拡大を推進し、以てトキシコゲノミクス研究の発展に寄与するものと期待される。また Percellome Explorer による共通要素や特異的要素の解析の効率化は、比較解析作業を補助し、シグナルネットワーク研究に役立つものと期待される。

システムトキシコロジー解析基盤の研究開発では、毒性学にシステムバイオロジーを適用する一連の手法が具体的な形となってきており、複数のソフトウエアの連動が実現されつつある。特に Garuda は、今後極めて重要なプロジェクトに成長すると考えられ、ソフトウエアを開発する側の研究者のみならず、ユーザとなる製薬企業や生命科学の基礎研究に携わる者にとっても、重要な Platform であるとの認識が広まっている。この Garuda Platform にシステムトキシコロジーの研究を可能とするソフトウエア群を実現する事は、今後の研究の展開にとって非常に重要であると考ええる。

## E . 結論

本研究は 3 年間を通じ、ほぼ計画通りに進捗した。

平成 24 年度に実施した四塩化炭素による新型反復暴露解析では、単回暴露時の過渡反応成分と反復暴露時の基線反応成分の基本的な関連性を見だし、平成 25 年度にバルプロ酸ナトリウム、平成 26 年度にクロフィプレートで、同様の解析を実施

し、大筋での同様の所見、及び、化学物質特有の所見を得た。この過渡反応と基線反応に関する知見は生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクス等の機序の関与が示唆されることから、これを明らかにすることは、反復毒性の分子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測法を開発するにあたり重要と考える。これらの研究成果は、単回暴露（急性）の毒性ネットワーク解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価技術の開発を推進するものである。

胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析については発現変動基点及び発現ピークの時点に着目する微分関数を利用した解析手法の開発と解析を進め、すでに Shh 遺伝子シグナルネットワークをモデルに、発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を網羅的に抽出が出来る事を報告したが、効率的に発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を抽出し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出し、信頼性と効率の向上と共に、応用範囲の拡充を目指す。

Percellome 3 次元データ等の為の専用解析ソフトウエアの開発研究では、研究計画通りソフトウエア、データベースの改良・拡張を進め、網羅的遺伝子発現解析の効率向上を実現している。また初年度（平成 24 年度）に構築し、以来インターネット上で一般公開している Percellome WebAPI の提供により、Garuda 経由を中心に

Percellome データベースの利用が拡大しつつあり、引き続きサービスの継続や機能向上が求められている。

遺伝子制御関係推定アルゴリズム及び状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの研究については、システムバイオロジーを毒性学に応用しようとするものであり、そのために一連の方法論とソフトウェアを開発し、応用することにより、計画通り性能向上や機能拡張が進んだ。現在、この目標に対して、順調に展開している。すでに幾つかのソフトウェアが、Garuda Platform 上に実装され連動するなどの成果をあげている。今後、これらのソフトウェアを利用した具体的適用例を作る事や普及などの展開にも力を入れ、実用レベルでのシステム開発と世界的な普及に注力する計画である。

## **F . 健康危険情報**

特になし

## **G . 研究発表**

### **1 . 論文発表**

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR $\gamma$  signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development*. (2014);141(11):2260-70.

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. *Genomics*

*Data* 2: 296–298, 2014.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*. (2014);124(7):3061-74.

Maria Marti-Solano, Ewan Birney, Antoine Bril, Oscar Della Pasqua, Hiroaki Kitano, Barend Mons, Ioannis Xenarios and Ferran Sanz. Integrative knowledge management to enhance pharmaceutical R&D. *Nature Reviews Drug Discovery*. 13, 4, 239-240, Apr. 1, 2014.

Yoshiyuki ASAI; Takeshi ABE, Hideki OKA, Masao OKITA, Ken-ichi HAGIHARA, Samik GHOSH, Yukiko MATSUOKA, Yoshihisa KURACHI, Taishin NOMURA, Hiroaki KITANO. A Versatile Platform for Multilevel Modeling of Physiological Systems: SBML-PHML Hybrid Modeling and Simulation. *ABE Advanced Biomedical Engineering*. 3, 50-58, May 17, 2014.

Tokiko Watanabe, Eiryo Kawakami, Jason E. Shoemaker, Tiago J.S. Lopes, Yukiko Matsuoka, Yuriko Tomita, Hiroko Kozuka-Hata, Takeo Gorai, Tomoko Kuwahara, Eiji Takeda, Atsushi Nagata, Ryo Takano, Maki Kiso, Makoto Yamashita, Yuko Sakai-Tagawa, Hiroaki Katsura, Naoki Nonaka, Hiroko Fujii, Ken

Fujii, Yukihiro Sugita, Takeshi Noda, Hideo Goto, Satoshi Fukuyama, Shinji Watanabe, Gabriele Neumann, Masaaki Oyama, Hiroaki Kitano, and Yoshihiro Kawaoka. Influenza Virus-Host Interactome Screen as a Platform for Antiviral Drug Development. *Cell Host & Microbe*, 16, 6, 795-805, Dec.10, 2014.

Jablonska Agnieszka and Natalia Polouliakh In silico discovery of novel transcription factors regulated by mTOR pathway activities. *Frontier in Cell and Developmental Biology* ISSN: 2296-634X, DOI:10.3389/fcell. 2014.00023 Vol:2 No.23 June 3, 2014.

## 2 . 学会発表

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014)(2014.9.9) Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences( WC9 )(2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

Satoshi KITAJIMA and Jun KANNO. Progress of Percellome Toxicogenomics Project

2014 Spring International Symposium of Korean Society of Toxicology. Samsung Convention Center, Seoul National University, Seoul 2014-05-23. Oral, invited.

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学 Percellome トキシコゲノミクスの進捗 、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25) 東京、シンポジウム 口演

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス - 化学構造が異なる 3 物質の比較 - 、第 41 回日本毒性学会学術年会 ( 2014.7.3 ) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析 、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2) 神戸、シンポジウム 口演

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、毒性の網羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日本毒性学会学術年会(2014.7.2)神戸、シンポジウム 口演

Jun Kanno, Progress in Japanese Percellome Project and incorporation of TGP data, 11th International Conference

of Environment Mutagens ( 11th ICEM), (2013.11.4) , Fos do Iguassu, Brazil, invited

Kitano, H. Frontiers of Systems Biology and Software Platform. Presentation at L'ORÉAL, L'ORÉAL Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France, Apr. 22, 2014. (invited)

Kitano, H, Multiscale disease systems modelling. 7th Noordwijkerhout Symposium on Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Systems Pharmacology: “SYSTEMS PHARMACOLOGY IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT”, NH Conference Centre Leeuwenhorst, Noordwijkerhout, the Netherlands, Apr. 24, 2014. (invited)

北野宏明. システム毒性学の戦略とプラットフォーム技術. 第 41 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム：毒性オミクス - 遺伝子発現ネットワークを標的とした、治療、毒性、及びそれらの評価の新動向 -, 神戸国際会議場, July 2, 2014. (invited)

Ghosh, S.; Kitano, H. Garuda: Fly to the future of biology. ISMB 2014, John B. Hynes Memorial Convention Center, Boston, USA, July 14, 2014.

Kitano, H. Systems Drug Discovery and Software Platform. Unlocking unique clinical research roadmaps using a

systems approach, ICSB 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Sep. 15, 2014.

Kitano, H. Systems Biology and Applications. ICSB 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Sep. 16, 2014. (invited)

Kitano, H. Garuda Platform: An integrated software solution for data-driven medical sciences. World Health Summit 2014, Federal Foreign Office, Berlin, Germany, Oct. 20, 2014. (invited)

## **G . 知的所有権の取得状況**

### **1 . 特許取得**

特許第 5177712 号、2013 年 1 月 18 日登録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究所、NTT データ、発明者：菅野純、相崎健一ら、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

### **2 . 実用新案登録**

なし

### **3 . その他**

なし



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

「化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
- 網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化のためのインフォマティクス技術開発 - 」  
（H24-化学-指定-006）

分担研究課題：「反復暴露実験の分子機序解析による、既存の単回暴露  
実験データベースからの反復毒性予測の性能評価」

研究代表者 菅野 純

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

## 研究要旨

本研究は、先行実施された Percellome(\*)トキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。これに際し本分担研究では、新型反復暴露実験(\*\*)の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の技術開発を行う。

先行研究による単回暴露実験と新型反復暴露実験の比較解析結果から、新型反復暴露が2種類の反応を遺伝子発現に及ぼすことが判明した。それは、過渡反応：暴露の都度に概ね24時間以内に収まる速い変化、及び、基線反応：暴露を重ねるに連れ、日を追って発現値の基線が徐々に移動する緩徐な反応である。さらに平成24年度、25年度に実施した四塩化炭素及びバルプロ酸ナトリウムにおける新型反復暴露実験の解析結果から、新型反復暴露で過渡反応の振幅が増減した遺伝子では、それらの基線反応も同様の増減傾向を示すことを見出した。ただし、四塩化炭素では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、バルプロ酸ではそのような傾向は弱いという差異が認められた。

今年度（平成26年度）はクロフィプレートにて同設計の新型反復暴露実験セットを行い、四塩化炭素と類似した過渡反応 - 基線反応関係を確認した。またそれらのシグナルネットワーク解析の結果、それらの上流に共通の分子機構が働いている強い可能性が示された。

(\*) 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。特許取得済み。

(\*\*) 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。

## A . 研究目的

本研究は、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した毒性評価手法の迅速化、高度化、及びその実用の為のインフォマティクス開発を目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 5.8 億遺伝子情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベース (TGDB) と単回暴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、反復暴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導入し、網羅的毒性予測評価システムの機能強化と精度向上を図る。

## B . 研究方法

(1) 反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価【菅野】

B1-1: 試薬及び動物 :

本年度 (平成 26 年度) はクロフィブレート (Clofibrate; 分子量 : 242.7、Cas No. : 637-07-0、純度 98.0%、Enzo) について既存データの解析を進めた。また新たに 12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールスリバー) に 4 用量 (溶媒 : 0.1% DMSO 含有 0.5% メチルセルロース水溶液) のクロフ

ィブレードを、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、経時的 (投与 2、4、8 及び 24 時間後) に肝を採取した。

単回暴露 ([0+1]) 時のクロフィブレードの投与量は 0、10、30、100 mg/kg とした。新型反復暴露である 14 日間反復暴露 ([14+1]) 時のクロフィブレードの投与量は全例に対し 70 mg/kg、単回暴露は 0、10、30、100 mg/kg とした。

B1-2: Total RNA の分離精製 :

マウス組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4 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 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  $\mu$ 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 (ライフテクノロジーズ・ジャパン社) 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。

B1-3:GeneChip 解析：

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、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 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45 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。また、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。

## 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・動物実験の適正な実施に関する規程 ( 平成 19 年 4 月版 ) 及び国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行う。 )

## C . 研究結果

平成 26 年度はクロフィプレートについて同様の新型反復暴露実験を行い、[0+1]、[1+1]、[2+1]、[4+1]、及び[14+1]の 5 通りの反復投与期間の長短による過渡反応と基線反応のそれぞれの推移と両反応の関連性の解析を肝について進めた。

過渡反応の有無( 最終日の投与の影響の有無 ) に関わらず、約 4,000 の遺伝子に、有意な基線反応が認められ、うち 1,700 遺伝子に 1 回から 14 回反復に亘り基線の低下が認められた。この遺伝子群は既知遺伝子情報 ( IPA ) により、四塩化炭素と共通する特定の経路を構成する遺伝子を高率に含んでいることが判明した。また、過渡反応が基線反応の影響を受けるものは比較的少数であり、受けないものが多いことが判明した。

H24 年度に実施した四塩化炭素、及び平成 25 年度に実施したバルブプロ酸ナトリウムの解析結果を加え、これら 3 化学物質の解析結果を総合し、基線反応と過渡反応の組み合わせによる遺伝子リストを完成させ、その経時的な変動を調節する上下流の遺伝

子発現ネットワークを明らかにし、慢性毒性の分子背景の解明を進めた。その結果、

基線反応の強い抑制を示す遺伝子群の発現を支配する上流遺伝子群が 3 物質に共通していることが明らかになった事、その更なる上流の候補遺伝子が単回投与から数個示唆された事、新型反復暴露実験による過渡反応遺伝子群と基線反応遺伝子群の重なり具合が、化学物質固有であることから、この重なりの内容が反復毒性の予測に重要である可能性が示唆された事、が成果としてあげられた。

#### D . 考察

本年度は高脂血症治療薬として使用されているクロフィブレートについても新型反復暴露実験を行った結果、反復暴露により基線の低下が認められた遺伝子群が属する遺伝子発現経路群は四塩化炭素のそれ（単回暴露時に発現変動した遺伝子のほぼ全てについて、基線反応成分（暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン（基線）が徐々に変動する反応成分）は、過渡反応成分（単回暴露時の 2, 4, 8, 24 時間のうちに発現が変動する速い変化の成分）が増加する場合は増加、減弱する場合は減少すること）と酷似していることが確認された。他方、過渡反応については、四塩化炭素が基線反応の影響を強く受けたのに対し、クロフィブレートの過渡反応は基線反応の影響を受けないものの比率が多かった。

他方、クロフィブレートは治療薬として利用されているものの、四塩化炭素とバルプロ酸ナトリウムの関係と同様、クロフィブレートとバルプロ酸ナトリウムの比較解析に於いて共通要素や共通特性はあまり見ら

れなかった。

今後、慢性毒性の理解のための過渡反応と基線反応の分子機序解明に、特徴的な基線反応と過渡反応の両極端のパターンを示す四塩化炭素とバルプロ酸ナトリウム、その中間的な反応を示すクロフィブレートの三者の所見の差異を利用し、基線反応を引き起こす上流機構、転写制御領域の解析、基線反応と過渡反応の連鎖・非連鎖の分子基盤、等を分担研究者の協力のもとに推進する。また、単回暴露実験の結果の中から、反復暴露時の基線反応と過渡反応と関連する、即ち、予測に使用可能な、所見の存否を明らかにする。

#### E . 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。新型反復暴露実験を実施した四塩化炭素（平成 24 年度）、バルプロ酸ナトリウム（平成 25 年度）及びクロフィブレート（平成 26 年度）の 3 化学物質の解析結果から、大筋に於いて、単回暴露時の過渡反応成分と反復暴露時の基線反応成分の基本的な関連性が共通していることを見いだしつつ、各化学物質特有の所見を得た。この過渡反応と基線反応に関する知見は生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクス等の機序の関与が示唆されることから、これを明らかにすることは、反復毒性の分子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測法を開発するにあたり重要と考える。これらの研究成果は、単回暴露（急性）の毒性ネットワーク解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価技術の開発を推進するとともに、その予測精度の把握と、1 乃至 4 日間の先行反

復暴露を行うプロトコール（上記において [1+1] 或いは [4+1] と表記したもの）による高精度の慢性毒性予測補填の技術開発の可能性をも明らかにするものである。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR $\gamma$  signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development*. (2014);141(11):2260-70.

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. *Genomics Data* 2: 296–298, 2014.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*. (2014);124(7):3061-74.

### 2 . 学会発表

Jun Kanno, “ Taquann” Dispersion Method with Direct Injection Whole-Body Inhalation System for Engineered Nano Materials Toxicity Studies, the 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3.25) San Diego, USA, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014)(2014.9.9) Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences ( WC9 ) (2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学 Percellome トキシコゲノミクスの進捗 、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25) 東京、シンポジウム

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス - 化学構造が異なる 3 物質の比較 - 、第 41 回日本毒性学会学術年会 ( 2014.7.3 ) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析 、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2) 神戸、シンポジウム

北嶋 聡、種村健太郎、菅野 純、毒性の網

羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク  
描出と動的バイオマーカー抽出、第 41 回日  
本毒性学会学術年会(2014.7.2)神戸、シンポ  
ジウム

## **G . 知的所有権の取得状況**

### **1 . 特許取得**

特許第 5177712 号、2013 年 1 月 18 日登  
録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究  
所、NTT データ、発明者：菅野純、相崎  
健一ら、「競合的ハイブリダイゼーション  
における遺伝子データの補正方法及び補  
正装置」

### **2 . 実用新案登録**

なし

### **3 . その他**

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

「化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
- 網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化のためのインフォマティクス技術開発 - 」  
（H24-化学-指定-006）

分担研究課題：「胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現  
ネットワークの網羅的解析」

研究分担者 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・第五室長

## 研究要旨

本研究は、先行実施されたPerce llomeトキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。本分担研究では、網羅的解析の一つのモデル事例として、自律的な遺伝子発現に着目し、これが多く認められる胎児発生過程に焦点をあて、この過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークを網羅的に解析することを目的とする。

平成24年度は、無処置野生型マウス全胚の胎生6.25~9.75日（12時点）の網羅的トランスクリプトームデータを対象として、全期間を1周期と仮想して周波数解析を実施した結果、経時的に離れた関連遺伝子のうち発現パターンが異なるものについて、高調波（ハーモニクス）成分の扱いによる効率の良い抽出法についての課題が残った。これは、発現の立ち上がりの勾配に着目すれば解決する可能性を見だし、発現値の微分解析を実施し、その有用性、及び転写制御の時系列評価では、発現ピークよりも、発現が開始する時点が重要であること等を確認した。平成25年度は、3次元Spline補間とその微分関数を利用し、一階微分及び二階微分により発現変動起点及び発現ピークの時点を同定する技術の開発を進め、Shh遺伝子シグナルネットワークを局所モデルとして、発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を網羅的に抽出が出来る事を示し、その過程において、Shhの標的遺伝子であるGli遺伝子の発現は、Shhの受容体を介さずにTGF $\beta$ 2-Smad3を介して制御されるという、発生初期における非標準的（non-canonical）な新たなShhシグナル制御系を見いだした可能性を報告した。

平成26年度は、この発現変動起点候補を抽出する技術を用いて、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークの描出について検討した。発現変動起点が胎生8.25日の遺伝子について、*in silico*のプロモーター解析及びwhole mount ISH データベースを利用し局在情報を加味して解析した結果、発生過程に絡むシグナルネットワークを効率よく描出することができた。この手法により変動を示すすべての遺伝子について同様にシグナルネットワークの描出が可能となったと考えられた。これらの結果により、胎児発生時の遺伝子発現ネットワークの網羅的解析手法とそれに資するの為の網羅的かつ有効なデータの抽出と発現パターンによる分類が完了し、全体像描出の為の最も重要な段階を完了した。更に、Shhでの手法をモデルとした網羅的解析を進めるとともに執筆準備を開始した。

## A. 研究目的

本研究は、先行実施されたPerCellomeトキシコゲノミクス研究を基盤に、化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。本分担研究では、自律的な遺伝子発現に着目し、これが多く認められる胎児発生過程に焦点をあて、この過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークを網羅的に解析することを目的とする。

マスター遺伝子は一般的に、生物の個体発生において、他の一群の遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の形質の形態形成を制御する遺伝子を指すが、ここでは組織特異的転写因子(組織分化マーカー)あるいは組織の発生・分化に必須な遺伝子も含むこととした。発生過程でのマスター遺伝子に着目した理由として、多くのマスター遺伝子は頭記の発生期間中に一過性、即ち単相性に発現し、空間的に特定の部位に局限して発現するため、この自律的な経時変化を示す要素のモデルに適している事、加え

て、生物の個体発生において、他の一群の遺伝子に連鎖的な発現を誘発し、特定の形質の形態形成を制御する遺伝子であることから、発生関連遺伝子の中でも重要な遺伝子である事が挙げられる。

先行3年間研究では、自律的な遺伝子発現が認められる発生過程や概日リズムの局所遺伝子ネットワークの描出を目的として検討した。このために、取得・構築済みの野生型マウス胚、マウスES(胚性幹)・EB(胚葉体)分化系及び、成熟期マウス肝および視交叉上核(SCN)の遺伝子発現の経時データベースを活用し、トランスクリプトームデータから遺伝子発現ネットワークを描出するための基本的な技術開発を行った。特に概日変動における自律的な遺伝子発現については、遺伝子発現の経時変化の「周期性」に着目し、遺伝子発現変動をフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関解析を行うという、効率的で網羅性の高い結果を得られる方法を見出すことができた。

他方、胎児発生過程における遺伝子発現については、自律的な遺伝子発現が多く認



められる為、遺伝子発現シグナルの流れを解析するのに適しているが、活発な細胞増殖や多様な細胞分化が同時並行で起こるため、従来技術では要素分析が困難であった。

初年度（平成24年度）は、経時データベースを有する胎生6.25～9.75日の遺伝子発現変動を1周期と仮想して、周波数解析を実施した。各時点4サンプルのデータを1サンプルずつの4周期に展開し、その周期性を持って、それがマスター遺伝子候補であるか否かの程度を推定するパラメータとする試みである。周期性を検討する為、データベース中の全ての遺伝子発現変動を、フーリエ変換を利用する独自の解析ソフトMF Wave analyzerを用いてフーリエ変換した上で、その波長分布についてピアソン相関等の解析をおこなった。モデルとして、既知のShh（四肢や、脳・脊髄正中線構造などのデザイン形成に關与）及びNkx2-5遺伝子（心筋前駆細胞マーカーであり、心臓発生過程に關与）が關与するシグナルネットワークを選択し、本解析手法の性能評価を検討した。その結果、既知關連遺伝子の多くは検出可能であったが、経時的に離れた關連遺伝子のうち発現パターンが異なるものについての、高調波（ハーモニクス）成分の扱いによる効率の良い抽出についての課題が残った。この解決として、発現の立ち上がりの勾配に着目する方策の可能性を見だし、一階微分及び二階微分を暫定的に適用し、既存情報と整合性のある結果を得たことから、その有用性が示唆された。

そこで昨年度（平成25年度）は、3次元Spline補間とその微分関数を利用し、遺伝子毎に発現変動起点候補と発現ピークの時点を抽出する技術を開発し解析を行うこと

とした。モデルとして初年度に検討したShh遺伝子シグナルネットワークに着目し、条件設定及び抽出パラメータの最適化を検討後に解析したところ、Shhシグナル關連候補遺伝子として8,306 psが自動抽出され、この内、目視により生物学的変動と考えられるものとして648 psが抽出された。この中には、Shhシグナルと關連することが報告されているIrs1、Foxf1、Foxc2、Ccnd1遺伝子等が含まれ、またTgfシグナルが、Shhの受容体を介さずに、Shhの標的遺伝子であるGli遺伝子の発現を制御する可能性を示唆する結果を得、発生初期における非標準的な(non-canonical)新たなShhシグナル制御系を見出した可能性を報告した。

平成26年度は、平成25年度の成果を踏まえ、この発現変動基点及び発現ピークの時点を同定する技術を利用しつつ、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークを描出する事を検討する事とした。

## B. 研究方法

### 無処置野生型マウス胚・全胚の網羅的トランスクリプトームデータ：

C57BL/6CrSlc マウス(日本エスエルシー)を実験に用いた(プラグが確認された日の15時を胎生0.5日とした)。経時的にサンプリングした各ステージのマウス胚(全胚、ただし卵黄嚢膜は除去した)を1腹分プールしたRNAサンプルを用い、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて、網羅的遺伝子発現変動解析を検討することにより、遺伝子発現経時データベース [胎生 6.25-9.75 日] (TIME

POINT : 12 点) を作製した。マウス胚は、直接、1% の 2-メルカプトエタノール含有 RLT バッファー (QIAGEN 社) に変性・溶解させた。RLT バッファーは、RNeasy キット (QIAGEN 社) に含まれる。

#### Total RNA の分離精製

RNA 抽出にあたっては、サンプルの入った RLT buffer 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、RNeasy 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。

全胚サンプルについては、2 段階増幅により cDNA を得た。すなわち、全 RNA の 100ng にとり、T7 プロモーターの付加したオリゴ dT プライマーを用い逆転写し cDNA を得、2 本鎖とした後、T7 RNA ポリメラーゼ (Ambion 社) を用いて cRNA を合成 (この段階ではピオチン化塩基は用いない) した (増幅 1 回目)。その cRNA を鋳型に random primer を用いて逆転写して cDNA を得、2 本鎖にし、T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社) を用い、ピオチン化 CTP, UTP 共存下 cRNA を合成し、断片化した後、GeneChip へのハイブリダイゼーションに供した。

#### 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ールに従い、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、ピオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 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 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。

発現変動起点候補と発現ピークの時点を抽出する解析は、3 次元 Spline 補間とその微分関数を利用する独自の解析ソフト SeekESP を用いて実施した。遺伝子発現変動は、独自の解析ソフト MF analyzer を用いて解析した。

#### whole mount ISH

当該プローブセット (ps) について GeneChip にて使用している塩基配列を調べ、その配列を基に、ジゴキシゲニンでラベルした dNTP を用いて RNA プローブを作製した。作製した RNA プローブを用いて、固定後プロテナーゼ K 処理したマウス胚とハイブリダイゼーションをおこない、検出は抗ジゴキシゲニン抗体、発色は BM purple でおこなった。

#### **(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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」。

## C. 研究結果及び考察

### C-1: 発現変動起点ごとの遺伝子の抽出：

無処置野生型マウス全胚の胎生 6.25 ~ 9.75 日 (12 時点) の網羅的トランスクリプトームデータを対象に、全ての遺伝子発現変動につき、解析ソフト SeekESP\_s.exe を用いて、発現変動起点ごとに自動抽出した。この際、発現変動起点における発現コピー数が 0.3 以上のものを選択した。その結果、発現変動起点別に、全部で 4,395 プローブセット (PS) が抽出された。次いでこの中から、生物学的変動と考えられる遺伝子を抽出するために、解析ソフト MF analyzer で描出した Surface グラフにおける目視により検討した。その結果、2,218 ps を抽出することができた。この検討時に 1) 本トランスクリプトームデータの開始点である胎生 6.25 日に、ほぼ全ての遺伝子において発現が認められる事 (98%、2,166 ps)、2) 胎生 6.25 日時点で発現変動あるいは発現のピークを示し、その後に再び発現変動する (二峰性) 遺伝子が多い事 (40%、895ps) が明らかとなった。二峰性の発現変動を示す遺伝子の場合、はじめの発現変動と次の発現変動とが重なり、境目が不明確となり、次の発現変動起点がどの時点となるのか定めることはできなかった。そこで本解析では、二峰性の発現変動を示す遺伝子は選択せず、一峰性の発現変動を示す遺伝子 (60%、1,323 ps) について検討を進めることとした。図 1 に、二峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Met 遺伝子、一峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Aldob 遺伝子の発現変動を示す。

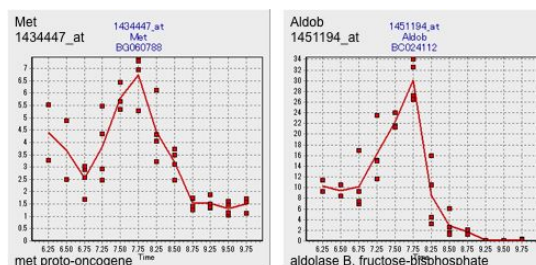


図 1 無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベースにおける二峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Met 遺伝子 (左) 一峰性の発現変動を示す遺伝子の例として Aldob 遺伝子 (右) の発現変動：

グラフの線は各平均値を結び、点は各データの素点を表す (n=2~4)。縦軸は、発現コピー数、横軸は胎齢 (各胎生 6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 日) を表す。

得られた、目視による生物学的変動と考えられる遺伝子の内、一峰性を示す遺伝子 1,323 ps について、発現変動起点別に遺伝子数を記すと以下の通りとなった。なお解析ソフト SeekESP\_s.exe を用いて、発現変動起点ごとに自動抽出した際、発現変動起点が胎生 8.50、8.75、9.25、9.50、9.75 のものは得られなかった。この理由として、これらの場合、発現ピークが定まらない為、抽出されなかったものと考えられた。

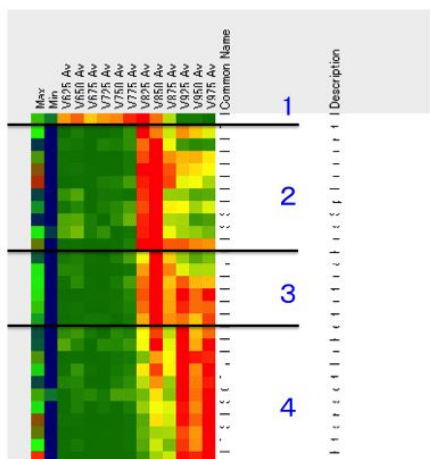
発現変動起点	遺伝子数(ps)
6.50	3
6.75	7
7.25	239
7.50	837
7.75	209
8.25	28
計	1,323

表に示した通り、発現変動起点が胎生 7.50 の遺伝子数が最も多い事が明らかとなった。

次いで、発現制御因子とその標的遺伝子の発現変動は、発現変動起点は前者が早い、発現変動パターンは両者で似ているとの仮説から、発現変動起点について、遺伝子の発現変動パターン毎に分類し、それぞれについて、プロモーター解析(*in silico*)及び、wholamount ISH による発現の空間局在を検討することにより、胎児発生過程に 関与する遺伝子発現ネットワーク情報の網羅的導出の検討をおこなった。まず、発現変動起点がもっとも遅い 8.25 日の場合について解析する事とした。

#### C-2: 発現変動起点が胎生 8.25 日の場合の検討:

発現変動起点が胎生 8.25 日を示す 28 ps について、発現変動パターンにより、下記の通り、4 つのグループに分類した。横軸は胎齢を示しており、各色は、赤、オレンジ、黄色、黄緑、緑、青緑、青の順に発現量が多い事を示している。



各グループそれぞれについて、含まれている遺伝子の発現調節因子の探索の為に、プロモーター解析(*in silico*)を、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)における Upstream Analysis を用いて検討した。当該遺伝子について、転写調節する上流遺伝子が得られるが、その中から、発現変動起点が、当該遺伝子のものの直前の観測時点のもの、またその発現変動起点以降の発現変動パターンが当該遺伝子のものと似ているものを選択した。

グループ 1 の遺伝子では上流遺伝子は得られなかった。グループ 2 の遺伝子では、上流遺伝子として多くのものが得られたが、この内、発現変動起点が胎生 7.75 日で、発現変動が当該遺伝子と似たものを示すものとして、発現変動が一峰性を示す Sox10(当該遺伝子 PLP1、RET)、Tnnt2(当該遺伝子 Myh7)、Zfpm2 (Fog2)(当該遺伝子 MYH6、MYH7) 遺伝子、及び二峰性を示す Myocd(当該遺伝子 MYH6、MYH7)、Foxp1(当該遺伝子 MYH6、MYH7) 遺伝子の計 5 つの上流遺伝子が得られた。グループ 3 では上流遺伝子は得られなかった。グループ 4 では、発現変動が二峰性を示す Snai2(当該遺伝子 Cxcl12 [SDF1]) の一つの上流遺伝子が得られた。

上流遺伝子と当該遺伝子の発現の空間的局在が一致もしくは隣接しないと、当該遺伝子発現は、上流遺伝子により制御されないと考えられる為、上記 6 遺伝子について、マウス胚における発現の空間的局在につき、Pubmed 検索による文献調査あるいは公開データベース Emage

(<http://www.emouseatlas.org/emagewebap>)

p/pages/emap\_gene\_browser.jsf)による検索をおこなった。発現変動起点以降の胎生約 9.5~10.5 日の胚では、上記当該遺伝子の発現は全て、上流遺伝子の発現部位と同様な、あるいは隣接して限局する空間的発現パターンが認められた。したがって、当該遺伝子はこの時期の発生過程において、各上流遺伝子のシグナルネットワークに属し機能しているものと考えられる。この内、上流遺伝子 Sox10 と Ret 遺伝子の whole mount ISH による空間的発現パターンを図 2 に示す。

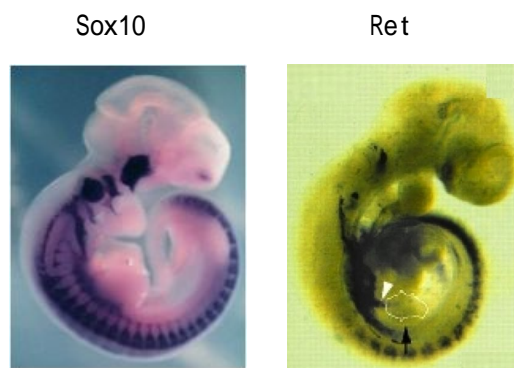


図 2 マウス全胚における Sox10 (左) 及び Ret (右) 遺伝子の発現 (胎生 9.5 日)

したがって、発現変動起点が胎生 8.25 日の 28 ps について本解析を検討したところ、それぞれの当該遺伝子の転写調節する上流遺伝子が得られ、下記のシグナルネットワークが得られた。

上流遺伝子	当該遺伝子
Sox10	Plp1*, Ret
Tnnt2	Myh7*
Zfp2	Myh6*, Myh7*
Myocd	Myh6*, Myh7*
Foxp1	Myh6, Myh7

Snai2 Cxcl12\*

当該遺伝子に\*印がついているものは、Pubmed 検索にて、マウス初期胚において、上流遺伝子による当該遺伝子の転写調節に関する報告が見いだされなかったものであり、未報告と考えられるものである。

以上、発現変動起点が胎生 8.25 日を示す 28 ps について解析を進めたが、本解析手法により、その他の発現変動起点の遺伝子についても同様なシグナルネットワークの描出が可能と考える。

### C-3: 転写調節上の、より上流のシグナルネットワークの描出:

次いで、これまで得られたシグナルネットワークについて、転写調節上の、より上流の遺伝子の探索とシグナルネットワークの描出の検討をおこなった。一例として、「Tnnt2 Myh7」のネットワークにつき検討した。Tnnt2 遺伝子は、発現変動起点が胎生 7.75 日の遺伝子リスト(209 ps)中に存在した。発現変動起点が胎生 7.75 日の遺伝子リストは、発現変動パターンにより 9 つのグループに分類でき、Tnnt2 遺伝子はグループ 7 の中に存在した。このグループ 7 について、プロモーター解析 (*in silico*) を検討したところ、発現変動起点が胎生 7.50 日で、発現変動が当該遺伝子と似たものを示すものとして、発現変動が一峰性を示す Gata4 遺伝子 (当該遺伝子 ACTC1、ACTN2、ANKRD1、ATP2A2、MYL4、TNNT2) 及び二峰性を示す Tbx5 (当該遺伝子 ACTC1、ACTN2、ANKRD1、ATP2A2、MYL4、TNNT2) Mef2c (当該遺伝子 ACTC1、ACTN2、ATP2A2、MYL4、TNNI1、TNNT2) 遺伝子の計 3 つの上流遺伝子が得られた。この 3 遺伝子について、マウス胚に



おける発現の空間的局在につき、Pubmed 検索による文献調査あるいは公開データベース Emage による検索をおこなった。発現変動起点以降の胎生約 9.5~10.5 日の胚では、上記当該遺伝子の発現は全て、上流遺伝子の発現部位と同様な、あるいは隣接して限局する空間的発現パターンが認められた。したがって、当該遺伝子はこの時期の発生過程において、各上流遺伝子のシグナルネットワークに属し機能しているものと考ええる。この内、上流遺伝子 Gata4 と Tnnt2 遺伝子の whole mount ISH による空間的発現パターンを図 3 に示す。

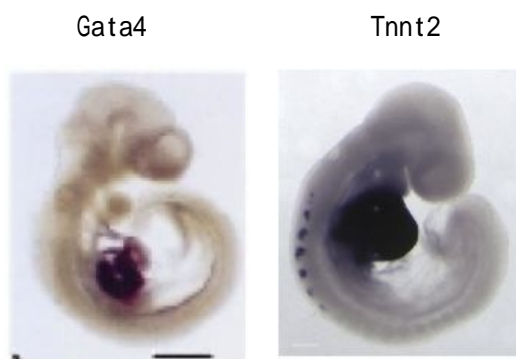


図 3 マウス全胚における Gata4 (左) 及び Tnnt2 (右) 遺伝子の発現 (胎生 9.5 日)

したがって、「Tnnt2 Myh7」のネットワークの上流遺伝子として Gata4、Tbx5 及び Mef2c 遺伝子が見いだされ、結果として下記のシグナルネットワークが得られた。

Gata4, Tbx5, Mef2c Tnnt2 Myh7

この点、この GATA4、Mef2c、Tbx5 の 3 遺伝子をマウス線維芽細胞に導入することにより、誘導心筋細胞 (iCM 細胞) を作製し

たとの報告 (Ieda M et al, Cell 142(3): 375-386, 2010) があり、本解析結果は、この iCM 細胞作製の際のシグナルネットワークの一端を見いだした可能性がある。

以上の結果から、*in silico* のプロモーター解析及び whole mount ISH データベースの利用しつつ、発現変動起点に着目した本解析手法により、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークの描出シグナルネットワークを効率的に描出することができるものと考ええる。

他方、本解析では、発現ピークが二回、すなわち二峰性の発現変動を示す遺伝子については、発現変動起点が不明確であることから、遺伝子リストから除外している。

さらに詳細なシグナルネットワークの描出に向けて、今後は、2 回目の発現変動起点も含めて抽出する技術開発、条件設定及び抽出パラメータの最適化を検討する必要があるものと考ええる。

#### D. 結論

胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析については発現変動基点及び発現ピークの時点に着目する微分関数を利用した解析手法の開発と解析を進め、すでに昨年度 (平成 25 年度) に Shh 遺伝子シグナルネットワークをモデルに、発生過程のマスター遺伝子である可能性の高い遺伝子を網羅的に抽出が出来る事を報告したが、今年度 (平成 26 年度) は、全ての発現変動起点について候補遺伝子を抽出・分類し、網羅的に発生初期過程に絡むシグナルネットワークの描出について検討した。発現変動起点が胎生 8.25 日の遺伝子について検討した

結果、報告されていない発生過程に絡むシグナルネットワークを効率よく描出することができた。その他の発現変動起点の遺伝子についても同様なシグナルネットワークの描出が可能と考える。これらの結果により、胎児発生時の遺伝子発現ネットワークの網羅的解析手法とそれに資するの為の網羅的かつ有効なデータの抽出と発現パターンによる分類が完了し、全体像描出の為の最も重要な段階を完了した。更に、Shhでの手法をモデルとした網羅的解析を進めるとともに執筆準備を開始した。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J and Blumberg B, Active Repression by RAR Signaling is Required for Vertebrate Axial Elongation. Development 141(11): 2260-2270, 2014.

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. Genomics Data 2: 296-298, 2014.

### 2. 学会発表

Kitajima S and Kanno J, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, 2014 Spring International Symposium of Korean Society of Toxicology (KSOT) (2014.5.22) Seoul, Korea.

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純

毒性の網羅的把握のための遺伝子発現ネットワーク描出と動的バイオマーカー抽出、第41回日本毒性学会学術年会(2014.7.2)

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純 シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス-化学構造が異なる3物質の比較-、第41回日本毒性学会学術年会(2014.7.3)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡 Percellome Project の進捗-新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析-、第41回日本毒性学会学術年会(2014.7.2)

相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純 遺伝子発現からみた毒性学 - Percellome トキシコゲノミクスの進捗 -、第36回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25)

Kanno J, Aisaki K and Kitajima S, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014.8.27) Prague, Czech Republic

Kanno J, Aisaki K and Kitajima S, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014)(2014.9.9) Edinburgh, UK

古川佑介、種村健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、  
菅野 純

アセチルコリンエステラーゼ阻害作用をも  
つ殺虫剤の暴露による遅発性の中樞神経影  
響の比較、第 17 回環境ホルモン学会研究発  
表会(2014.12.10)

**F. 知的財産所有権の出願・登録状況（予  
定も含む）**

**1. 特許取得**

なし

**2. 実用新案登録**

なし

**3. その他**

なし



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

「化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
- 網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化のためのインフォマティクス技術開発 - 」  
（H24-化学-指定-006）

分担研究課題：「Perce llome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究」

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・第一室長

## 研究要旨

先行研究に於いて遺伝子発現データの絶対量化技術である Perce llome 手法（特許 4415079 号）を実用化し、既に約 140 の化学物質による遺伝子発現変動情報を収録して現在もさらに拡張しつつある網羅的遺伝子発現情報データベース（Perce llome データベース）を構築している。この高精度大規模データベースの有効活用には、時間×暴露用量×遺伝子発現量からなる遺伝子発現変動情報を生物学者によるデータ把握が容易な 3次元波動面（Surface グラフ）に変換して解析する直感的で効率のよい手法（"Millefeuille"（ミルフィーユ、MF）データ処理）を採用している。本分担研究では、Perce llome 手法や Surface グラフの特徴を活かし、遺伝子発現反応の網羅的解析を効率良く行うためのプログラムの開発・改良を行い、トキシコゲノミクス技術を利用した毒性予測・評価システムの実用化を推進する。

平成 24 年度は、Perce llome 法の適用を以て、医薬基盤研・トキシコゲノミクスプロジェクト（TGP）のラットデータを、マウスデータからなる Perce llome データベースに結合し、統合トキシコゲノミクスデータベースの構築を進めた。また非 Perce llome データの絶対量推定ソフトウェア SnCalc.exe の開発に着手した。さらに Perce llome データベースシステムの WebAPI を開発し、ライフサイエンス研究用ソフトウェアの国際共通プラットフォーム GARUDA プロジェクト等、外部の学術・行政システムからのオンラインアクセスを可能にする本格的な一般公開の準備を整えた。

平成 25 年度は各班員のデータ解析の効率と精度の向上を優先して平成 26 年度予定の計画を実施し、候補遺伝子抽出プログラム RSort に新規フィルタールーチンを追加して自動抽出精度を向上させたほか、経時変化データ等の線グラフ表示デ

ータを対象とした発現変動起点の自動抽出アルゴリズムの新規開発や、適用対象がマウスに限定されていた SnCalc.exe のラットデータへの適用の可能性を検討し、また Percellome データベース一般公開システムの WebAPI の機能拡張を実行した。

本年度（平成 26 年度）は、SnCalc.exe による非 Percellome データの絶対量推定を、参照データベースにラット単回投与データに適用拡大すべく、医薬基盤研トキシコゲノミクスプロジェクト（TGP）の単回投与実験の溶媒群データ<sup>(\*)</sup>を SnCalc リファレンスデータベースに追加・拡充し、絶対量推定性能を確認したほか、遺伝子発現変動評価の標準値とすべく、SnCalc リファレンスデータベースから溶媒別の標準溶媒コントロールデータを生成した。また実験間の共通変動遺伝子を高速抽出するプログラム PercellomeExplorer を改良を進め、各化学物質に特異的な生体反応要素のハイスループット抽出解析を実現した。さらに Percellome 専用解析ソフトウェア群の基本ツールとなっている MFSurface.exe のユーザーインターフェイス、特に解析結果保存機能の拡充を行うなど、本研究班で開発してきた諸ソフトウェアが、より一層ユーザー本位の解析ツールとなるよう改良作業を行った。

-----  
(\*)TGP はその発足時に当研究者らが Percellome 法を基軸に設計したものであり、その生データから絶対量化や後述の 3 次元波面表示・解析が可能である。

## A. 研究目的

本研究班が化学物質による生体影響の分子メカニズムに依拠した毒性評価手法の実用化の推進の為にインフォマティクス開発を目指す中において、本分担研究は、その中核を成す約 140 の化学物質による遺伝子発現変動情報を絶対量化して収録している高精度大規模遺伝子発現情報データベース（Percellome データベース）を活用し、遺伝子発現反応の網羅的解析を効率良く行うためのプログラムの開発・改良を実施する。

## B. 研究方法

### B-1: 参照データ

遺伝子発現データとしては、Percellome プロジェクトで生成したマウスの遺伝子発現データ、および TGP プロジェクトで生成したラットの遺伝子発現データを用いた。デー

タ標準化には Percellome 法を利用した。

遺伝子のアノテーション情報：米 Affymetrix 社および Gene Ontology Consortium、独 BIOBASE 等が提供している情報を参照した。

### B-2: ソフトウェア作成に用いた開発言語及びコンポーネント

コンパイルを繰り返す実験的な開発における作業効率と、生成するソフトウェアの実行速度を重視して、Win32/64 開発は RAD (Rapid Application Development) 対応の Delphi ver.7 もしくは XE3、XE5 (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。Web アプリケーション開発には Delphi もしくは PHP、JavaScript を用いた。1 億件以下の小～中規模のデータベース処理に際しては組み込

み型リレーショナルデータベースコンポーネントの 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。また WebAPI の構築には DataSnap (USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。

### B-3: データ解析計算

主たる計算は独自に開発したプログラムにより実施した。検証は必要に応じて Excel (USA Microsoft Corporation) や R 言語 (オープンソース R Development Core Team) で実施し、浮動小数点誤差以上の乖離がないことを確認した。

大規模計算が必要な場合は、高速データベースエンジンである Teradata データベース (日本 Teradata 社) を装備する研究計算用サーバーシステム (MF サーバシステム; NTT コムウェア・NTT データ) にアプリケーションソフトウェアを移植して実施した。

## C. 研究結果

平成 24 年度は、化学物質評価用の遺伝子発現データベースの有用性を高めるために、医薬基盤研トキシコゲノミクスプロジェクト (TGP) のラットデータをマウスの遺伝子発現データからなる Percellome データベースに統合すべく、マウスとラットのデータをシームレスに一括解析する手法 (マウス-ラットの相同遺伝子対を一意に示す統合 ID とその効率的な処理アルゴリズム) を生成し、TGP データを Percellome 変換 (絶対量化) した上で、Percellome データベースとの統合を進めた。

またデータベース及び解析ツールの公

開に向け、Percellome 化せずに取得した外部のマイクロアレイデータ (以下、非 Percellome データ) と Percellome 絶対量化データとの比較を可能にする絶対量推定ソフトウェア SnCalc を開発した。加えて、外部研究システムから直接、Percellome データベースを利用するための WebAPI を作成し、運用を開始した。

平成 25 年度は、各班員のデータ解析の効率と精度の向上を優先して計画当初は平成 26 年度予定であった研究を実施した。即ち、候補遺伝子抽出プログラム RSort の改良を行い、偽陰性データの発生数を数個 ~ 200 個程度に抑えつつ、偽陽性データを従来版 RSort よりも数百 ~ 2000 個程度の削減することに成功した。また、適用対象がマウスに限定されていた SnCalc.exe のラットデータへの適用の可能性を検討したのに加え、平成 24 年度に作成した Percellome 公開用 Web サーバーの REST (現時点で最も普及しているソフトウェアアーキテクチャの 1 つ) インターフェイスについて、当該システムを利用したオンライン解析能力を向上させるべく、機能を拡張し、RSort で抽出した候補遺伝子リストをインターネット経由で提供するなどの機能強化を行った。

平成 26 年度は、非 Percellome データの絶対量推定プログラム SnCalc をラットにも拡大適用した。その為に、以下の手順を踏んだ。TGP は、その発足に際し当研究者らが Percellome 法を基軸に設計したものであり、そのラットデータには絶対量化に必要な情報が含まれているが、運営上、Percellome 法の実施に必要な品質管理を行っていなかったため、本研究において溶媒群データを中心に Percellome 計算ソフト

ウエア SCal4 による品質チェックを追加的に行い、データ品質に大きな問題がない 2072 枚分のラット GeneChip データを収集した。これを利用し、SnCalc が必要とする参照データベースを拡充することにより、ラットに於いても非 Percellome データの絶対量推定を可能とした(ただし、適用は TGP データと同様のトランスクリプトーム分布を有するデータに限定される)。

また拡充された SnCalc リファレンスデータベースを有効活用し、遺伝子発現変動評価の標準値とすべく、溶媒別の標準溶媒コントロールデータを生成した。これは本研究班本テーマの新型反復暴露試験の解析において、基線反応の変動の有無を評価する際の標準値とした。

さらに実験間の共通変動遺伝子の抽出など、多数の化学物質暴露データを用いた複雑な集合計算を簡便に行うためのソフトウェア PercellomeExplorer の改良を進め、各化学物質に特異的な生体反応要素のハイスループット抽出解析を実現したほか、Percellome 専用解析ソフトウェア群の基本ツールとなっている MFSurface.exe のユーザーインターフェイス、特に解析結果保存機能の拡充を行った(図)。これらにより、本研究班で開発してきた諸ソフトウェアが、より一層ユーザー本位の解析ツールとなった。

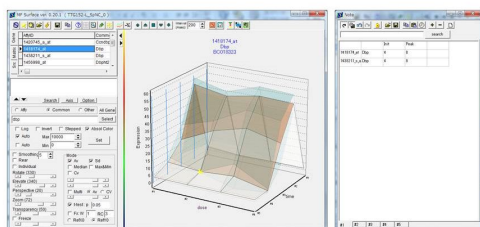


図. 解析結果保存機能を拡充した MFSurface.exe

## D. 考察

Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究においては、3年間を通じて新規アルゴリズムの開発や既存ソフトウェア、データベースの改良を行い、性能向上や適用範囲の拡大(汎用化)を実現した。

特にマウスデータだけでなくラットデータにも解析対象を広げたこと、非 Percellome データについても絶対量推定がある程度の精度をもって可能になったことは、Percellome 技術の普及、利用拡大を推進し、以てトキシコゲノミクス研究の発展に寄与するものと期待される。

本年度は、今までの研究の総まとめとして、解析対象となるデータを拡大し、評価基準となるような標準データをデータベースから生成し、開発した解析用ソフトウェアのユーザーインターフェイスの改良を行って、解析効率・精度の向上に努めた。

今後は、動作環境の拡大も視野に、GARUDA(北野宏明博士らが進める各種の生物学的研究ソフトウェアの Web 公開型統合プラットフォーム <http://www.garuda-alliance.org>) を介したオンライン化や PercellomeDB の WebAPI の強化を進める。

## E. 結論

Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究では、平成 24 年度成果の異種動物由来のデータ統合技術や絶対量化されていない非 Percellome データの絶対量推定技術、及び RSort 技術、PercellomeExplorer 技術の改良により、網

羅的遺伝子発現解析の効率向上を推進している。

また平成 24 年度から継続的に公開している Percellome データベース一般公開システムの WebAPI の改良・強化により、GARUDA 等、外部のオンライン解析ソフトウェアからも、本研究班の成果にアクセス出来るようになり、Percellome データベースの一層の普及と、毒性や創薬といった研究分野の解析能力・効率の向上が期待される。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development.* (2014);141(11):2260-70.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest.* (2014);124(7):3061-74.

### 2 . 学会発表

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014)(2014.9.9) Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics

project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学 Percellome トキシコゲノミクスの進捗、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25) 東京、シンポジウム

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス - 化学構造が異なる 3 物質の比較 -、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.3) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2) 神戸、シンポジウム

## G . 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

### 1 . 特許取得

なし

### 2 . 実用新案登録

なし

### 3 . その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

「化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
- 網羅的定量的大規模トキシコゲノミクスデータベースの維持・拡充と  
毒性予測評価システムの実用化の為にインフォマティクス技術開発 -」  
(H24-化学-指定-006)

分担研究課題：「システムトキシコロジー解析基盤の研究開発」

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

## 研究要旨

本研究では、システムバイオロジーをトキシコロジーに応用し、大規模かつ網羅的なデータを有効に利用し、化学物質の毒性の機序の理解を推進すると同時に、遺伝子発現データに反映される生理学的影響から、その原因物質が、遺伝子制御ネットワークのどの部分に影響を及ぼしているのかなどを同定する手法を開発した。これは、昨年度に開発された複数のアルゴリズムの併用を行う方式の遺伝子制御関係推定アルゴリズムであり、現状での最も優れた方式と同等の結果を安定的に維持することに成功したほか、情報エントロピーの計算より最適なアルゴリズムの組み合わせを探索し、動的に推論エンジンを構築する技術を実現した。さらに、このシステムを Inference cloud として Web-service として提供できるように開発を行った。また、クラスタリングソフトウェア (AGCT) の Percellome データへの最適化や計算規模及び速度の向上を実施し、高速化を達成した。さらに、Percellome データベースの、国際的なソフトウェアの共通基盤 Garuda Platform 上への実装を進め、そのソフトウェアを Garuda platform の一般公開バージョンとして配布を開始した。

## A. 研究目的

本研究では、大規模かつ網羅的なデータを有効に利用し、化学物質の毒性の機序の理解を推進すると同時に、遺伝子発現データに反映される生理学的影響から、その原因物質が、遺伝子制御ネットワークのどの部分に影響を及ぼしているのかなどを同定する手法を開発した。この手法によって、大量の文献情報などから集約したボトムアップな知識の集積によって毒性の機序が理

解できると同時に、大規模データから毒性に関連して変動する遺伝子群の同定とそれらの相互作用関係、さらには、各々の生理学的影響または毒性に相関すると思われる遺伝子の変動に対して、それらの上流に存在するどの遺伝子群やどの遺伝子群を制御する転写因子や受容体が重要であるかを判別することが出来る。

同時に、これら一連の手法は、ソフトウ

エアとして実現し、広く利用されることが望ましい。そこで、我々が、提唱し、開発が進んでいる、Garuda Common Platformに準拠した一連のソフトウェアツールを開発した。

## B. 研究方法

本研究は、システムバイオロジーをトキシコロジーに応用する研究であり、従来の手法ではとらえきれなかったネットワークを基盤とした毒性の理解を可能とする。このため、大規模データを利用する手法と大規模文献情報などをいかに集約するかに関する研究、そしてそれらを統合的なプラットフォームに実装し広く利用できるようにする研究によって構成される。よって、この研究は、以下の項目に区分できる：

- (1) 大規模データからの遺伝子制御関係推定アルゴリズムの開発と改良
- (2) 大規模データからの状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの開発と改良
- (3) 大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究
- (4) Garuda Platform とその関連ソフトウェアの研究開発

## C. 研究成果

1: 大規模データからの遺伝子制御関係推定アルゴリズムの開発と改良

Percellome や多くの研究で利用されている遺伝子発現データを利用し、遺伝子間の発現変動の相互関係と因果関係ネットワークの構築を可能とする手法の研究を行っ

た。現在、遺伝子発現データからのネットワーク抽出の研究は多く行われているが、その精度は高くない。例えば、広く使われているベイズ統計を利用した方法は、比較的少数の遺伝子に対して大量のデータが存在するときには適切な方法とは言えない。このような状況では、相互情報量 (Mutual Information) を利用する手法の方が適しているが、その計算の具体的な手法により、推定結果の精度などは大きく違ってくる。我々では、既に、複数の計算手法の組み合わせを利用して、これらの現存手法より、精度の高い手法を開発した。

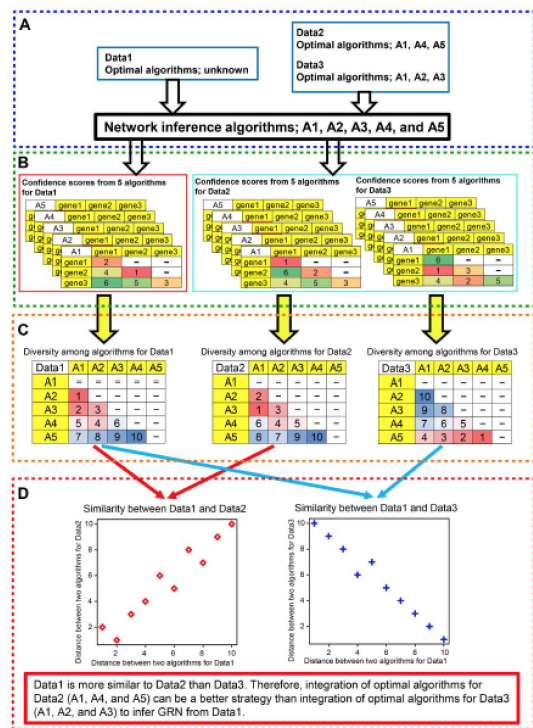


図 1：データの特徴分析から最適アルゴリズム群を決定



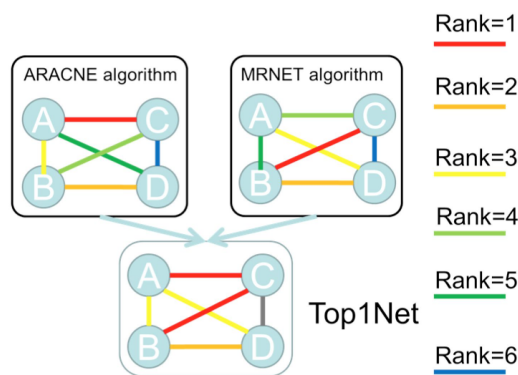


図 2：最適アルゴリズム群内の複数の手法からの遺伝子制御ネットワーク推定方法

推定アルゴリズムの手法の違いにより、どのようなデータにはどのアルゴリズムが最も適切かが違う。そこで、我々の手法では、データの全体的な特徴で利用するアルゴリズム群を決定し、個別の因果関係に関して各々の手法からの推定信頼度を参照して、最終的な推定ネットワークを構築する方法を開発した。

すなわち、我々の手法は、データの特徴分析から、そのデータの解析に最適なアルゴリズム群を決定する段階（図 1）と、そこで選択されたアルゴリズム群の推論結果から、同じデータにおいても推定信頼度が変わる側面を捉え、最も信頼度の高い相互作用の推定結果を集約する段階（図 2）の 2 段階を経る。

実際に、図 3 に示したように、アルゴリズムごとにどの相互作用の推定信頼度が高くなるかは、顕著に違いが現れる。

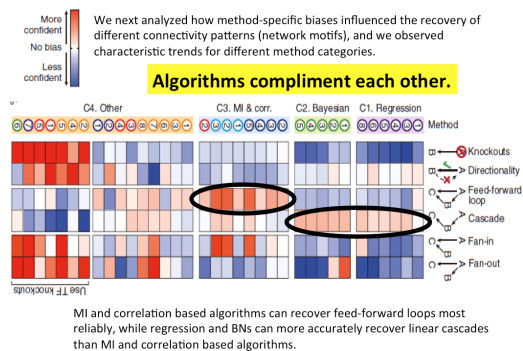


図 3：推定された相互作用の信頼度マップ

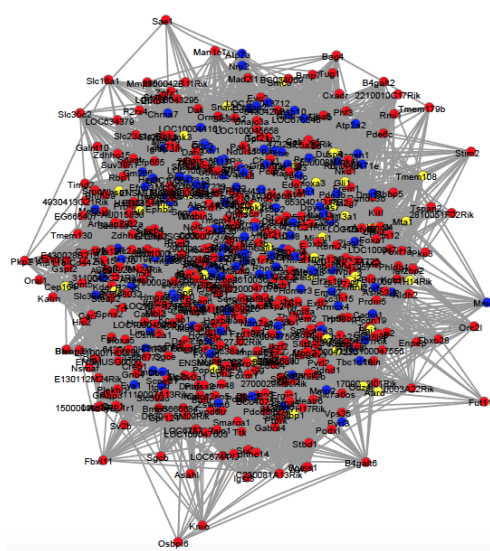


図 4：推定された遺伝子制御ネットワーク

また、これらの成果は、Inference cloud という Web-Service の形で実装し、オンライン上で利用可能な形態にした(図 5)。

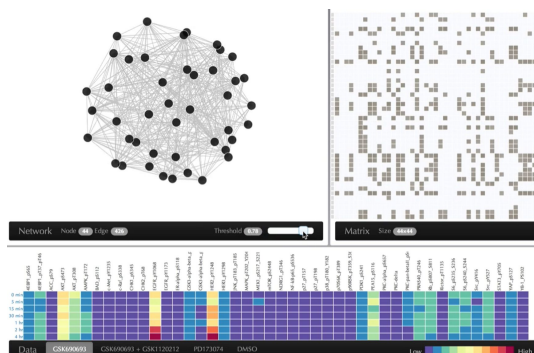


図 5：Inference Cloud の画面例



このような手法開発は、継続的に改良を重ねていくことが重要であり、今後とも研究は継続される。しかし、ここまでの成果で、この方式の利点と実用性に一定の目処が立ったと考えている。

## 2: 大規模データからの状態制御遺伝子群推定アルゴリズムの開発と改良

システム毒性学で重要なことは、ネットワークとして記述された生体システムが、毒性物質の影響でどのように「制御」されてしまうかを理解すること（フォワードアナリシス）であり、また、ネットワークを特定の状態に遷移させた原因は、どの遺伝子群への影響によるものであるかを特定できるということ（バックワードアナリシス）である。フォワードアナリシスは、研究項目1と3で実現する。この研究項目では、ネットワークを制御することができる遺伝子群の同定を大規模データから行う手法の研究を行った。

我々は、すでにプリオン病のデータを利用して、遺伝子相互作用ネットワークの分析から、プリオン病と同等の遺伝子発現変化を生じさせる少数のドライバー遺伝子を同定し、その効果をシミュレーションで確認している。ここでは、前項で開発された遺伝子制御推定システムの推論結果をもとに、ネットワーク制御推定アルゴリズムを適応してその効果を確認するとともに手法の改良を行った。

特に大規模なネットワークを扱うことを考慮して、個別遺伝子の制御可能性の推定に加え、多くの遺伝子を群として扱い、その遺伝子群の関係において制御可能性を

推定するという手法を開発した（図6）。これにより、従来より大規模なネットワークの制御可能性の解析が可能となった。

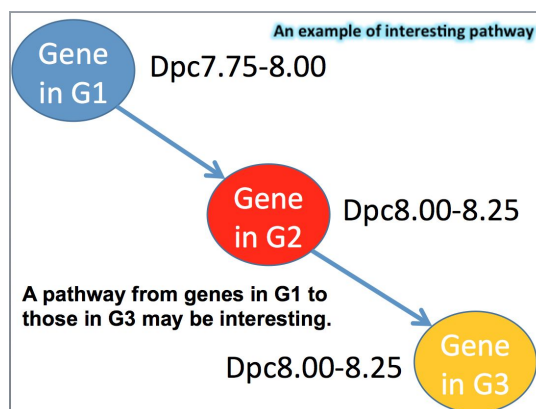


図6：遺伝子群レベルでの制御可能性推定

さらにプロモーター領域の解析も付加するシステム SHOE を開発し、ゲノムデータの裏付けを基に制御ネットワークの推定を行うシステムも開発した。図7には、そのシステムの解析結果の可視化として、特定の遺伝子群から別の遺伝子への制御可能性分布を、図8には、転写因子から遺伝子群への制御可能性分布を可視化したものを示している。この過程において、全データからの用量選択、細胞選択、時計遺伝子効果削除、スペクトラルクラスタリングや主成分分析の表示の上で6つのアルゴリズムによるクラスタリング等の機能を加え、より正確な状態制御推定を可能とした。

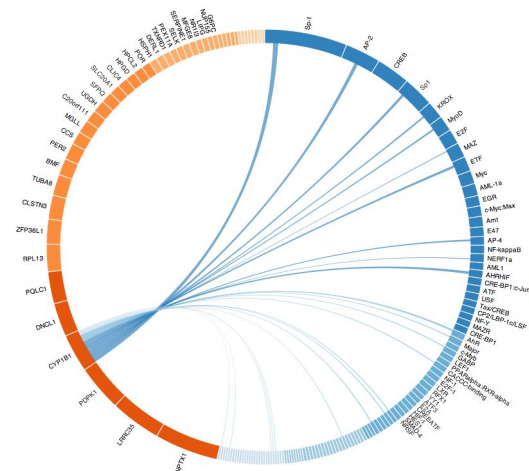


図7：特定の遺伝子群から別の遺伝子群への制御可能性分布の可視化

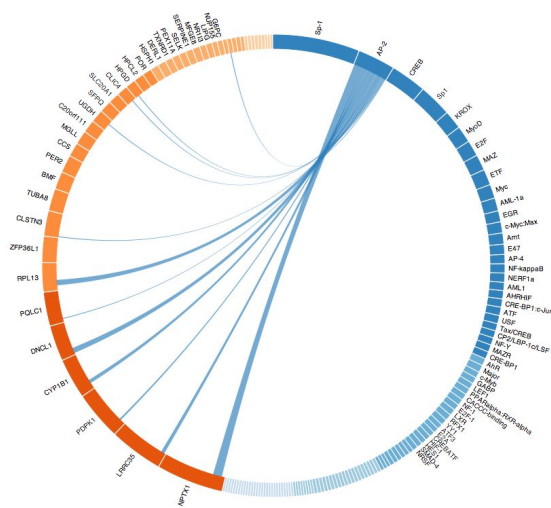


図8：転写因子から遺伝子群への制御可能性分布の可視化

### 3: 大規模文献情報などの集約手法と伝達手法の研究

フォワードアナリシスでは、大規模データのみならず、大量の文献やデータベースなどを総動員して精度の高い分子相互作用ネットワークと遺伝子制御ネットワークを構築する必要がある。すでに我々は、これらに關係するソフトウェアである

CellDesigner や Payao などを構築して、このプロセスの効率化と高精度モデルの構築ノウハウを蓄えてきた。この蓄積から、次のステップとして大量に存在する文献などの情報を、知的に集約し、モデル構築を行う研究手法などを提示し、可能な範囲で自動的にモデルを構築する情報を抽出する手法の開発が必要であると結論している。これに関しては、文献情報からパスウェイ構築を効率化するために、パスウェイエディタ CellDesigner を改良し、パスウェイの各パスをモジュール化して扱えるように、グラフィックデータベースにモデルを格納する Ver. 5 の試作を行ない、基本的なソフトウェア構成を確認し、大量データを扱う実行速度や安定性などが確認された。

### 4: Garuda Platform に準拠する毒性解析ソフトウェアの開発

本研究で開発される手法を実装するソフトウェアや Percellome などは、国内外の幅広い研究者に利用されることで、トキシコロジーに關連する研究の発展とその成果の利用を促進する必要がある。我々は、国際的なソフトウェアの共通基盤として Garuda Platform を開発している。ここでは、この Garuda Platform をトキシコロジーの分野へと応用することを可能とする一連の開発と普及・啓蒙を行った。

従来の手法では捕え切れなかったネットワークを基盤とした毒性の理解を可能とするために、生体活動をシステムとして把握するシステムバイオロジーをトキシコロジーに應用した「システムトキシコロジー」

解析基盤を開発し、その成果をライフサイエンスソフトウェアの国際的共通基盤（Garuda Platform）を介して国内外の研究者に提供し、国際的な研究活動を促進した。Garuda Platform は、国際的に非常に高い評価を得ており、普及は予想以上に順調に進んでいる。実際に、武田薬品工業株式会社が、2014年度から導入するなど、普及が加速している。また、日本や欧州の製薬会社、化粧品会社、食品会社が大きな興味を示しており、本研究のインパクトは大きなものがあると感じている。

#### D. 考察

毒性学にシステムバイオロジーを適用する一連の手法が具体的な形となってきており、複数のソフトウェアの連動が実現されつつある。特に、Garuda は、今後極めて重要なプロジェクトに成長すると思われる。ソフトウェアを開発する側の研究者のみならず、ユーザとなる製薬企業や生命科学の基礎研究に携わるものにとっても、重要な Platform であるとの認識が広まっている。この Garuda Platform にシステム毒性学の研究を可能とするソフトウェア群を実現する事は、今後の研究の展開にとって非常に重要であると考えられる。

#### E. 結論

本研究は、システムバイオロジーを毒性学に応用しようとするものであり、そのために一連の方法論とソフトウェアを開発し、応用するものである。現在、この目標に対して、順調に展開している。すでに幾つかのソフトウェアが、Garuda Platform 上に実装され連動するなどの成果をあげている。

今後、これらのソフトウェアを利用した具体的な適用例を作る事や普及などの展開にも力を入れ、実用レベルでのシステム開発と世界的な普及に力を入れたい。

#### F. 研究発表

##### (1) 論文発表

1. Maria Marti-Solano, Ewan Birney, Antoine Bril, Oscar Della Pasqua, Hiroaki Kitano, Barend Mons, Ioannis Xenarios and Ferran Sanz. Integrative knowledge management to enhance pharmaceutical R&D. Nature Reviews Drug Discovery. 13, 4, 239-240, Apr. 1, 2014.
2. Yoshiyuki ASAI; Takeshi ABE, Hideki OKA, Masao OKITA, Ken-ichi HAGIHARA, Samik GHOSH, Yukiko MATSUOKA, Yoshihisa KURACHI, Taishin NOMURA, Hiroaki KITANO. A Versatile Platform for Multilevel Modeling of Physiological Systems: SBML-PHML Hybrid Modeling and Simulation. ABE Advanced Biomedical Engineering. 3, 50-58, May 17, 2014.
3. Tokiko Watanabe, Eiryō Kawakami, Jason E. Shoemaker, Tiago J.S. Lopes, Yukiko Matsuoka, Yuriko Tomita, Hiroko Kozuka-Hata, Takeo Gorai, Tomoko Kuwahara, Eiji Takeda, Atsushi Nagata, Ryo Takano, Maki Kiso, Makoto Yamashita, Yuko Sakai-Tagawa, Hiroaki Katsura, Naoki Nonaka, Hiroko Fujii, Ken Fujii, Yukihiko Sugita, Takeshi Noda, Hideo Goto, Satoshi Fukuyama, Shinji

Watanabe, Gabriele Neumann, Masaaki Oyama, Hiroaki Kitano, and Yoshihiro Kawaoka. Influenza Virus-Host Interactome Screen as a Platform for Antiviral Drug Development. Cell Host & Microbe, 16, 6, 795-805, Dec.10, 2014.

4. Jablonska Agnieszka and Natalia Polouliakh In silico discovery of novel transcription factors regulated by mTOR pathway activities. Frontier in Cell and Developmental Biology ISSN: 2296-634X, DOI:10.3389/fcell. 2014.00023 Vol:2 No.23 June 3, 2014.

## (2) 学会発表

1. Kitano, H. Frontiers of Systems Biology and Software Platform. Presentation at L' ORÉAL, L' ORÉAL Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France, Apr. 22, 2014. (invited)
2. Kitano, H, Multiscale disease systems modelling. 7th Noordwijkerhout Symposium on Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Systems Pharmacology: " SYSTEMS PHARMACOLOGY IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT ", NH Conference Centre Leeuwenhorst, Noordwijkerhout, the Netherlands, Apr. 24, 2014. (invited)
3. 北野宏明. システム毒性学の戦略とプラットフォーム技術. 第 41 回日本毒性学 会学術年会 シンポジウム: 毒性オミクス - 遺伝子発現ネットワークを

標的とした、治療、毒性、及びそれらの評価の新動向 - , 神戸国際会議場, July 2, 2014. (invited)

4. Ghosh, S.; Kitano, H. Garuda: Fly to the future of biology. ISMB 2014, John B. Hynes Memorial Convention Center, Boston, USA, July 14, 2014.
5. Kitano, H. Systems Drug Discovery and Software Platform. Unlocking unique clinical research roadmaps using a systems approach, ICSB 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Sep. 15, 2014.
6. Kitano, H. Systems Biology and Applications. ICSB 2014, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Sep. 16, 2014. (invited)
7. Kitano, H. Garuda Platform: An integrated software solution for data-driven medical sciences. World Health Summit 2014, Federal Foreign Office, Berlin, Germany, Oct. 20, 2014. (invited)

## G . 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

### 1 . 特許取得

なし

### 2 . 実用新案登録

なし

### 3 . その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B.	Active repression by RAR $\gamma$ signaling is required for vertebrate axial elongation.	Development	141 (11)	2260 - 2270	2014
Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K, Kanno J and Nakamura T	Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage.	Genomics Data	2	296 - 298	2014
Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T.	Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors.	J Clin Invest.	124 (7)	3061 - 3074	2014
Maria Marti-Solano, Ewan Birney, Antoine Bril, Oscar Della Pasqua, Hiroaki Kitano, Barend Mons, Ioannis Xenarios and Ferran Sanz	Integrative knowledge management to enhance pharmaceutical R&D.	Nature Reviews Drug Discovery	13 (4)	239 - 240	2014
Yoshiyuki ASAI; Takeshi ABE, Hideki OKA, Masao OKITA, Ken-ichi HAGIHARA, Samik GHOSH, Yukiko MATSUOKA, Yoshihisa KURACHI, Taishin NOMURA, Hiroaki KITANO	A Versatile Platform for Multilevel Modeling of Physiological Systems: SBML-PHML Hybrid Modeling and Simulation.	ABE Advanced Biomedical Engineering	3	50 - 58	2014
Tokiko Watanabe, Eiryō Kawakami, Jason E. Shoemaker, Tiago J.S. Lopes, Yukiko Matsuoka, Yuriko Tomita, Hiroko Kozuka-Hata, Takeo Gorai,	Influenza Virus-Host Interactome Screen as a Platform for Antiviral Drug Development	Cell Host & Microbe	16 (6)	795 - 805	2014

<p>Tomoko Kuwahara, Eiji Takeda, Atsushi Nagata, Ryo Takano, Maki Kiso, Makoto Yamashita, Yuko Sakai-Tagawa, Hiroaki Katsura, Naoki Nonaka, Hiroko Fujii, Ken Fujii, Yukihiko Sugita, Takeshi Noda, Hideo Goto, Satoshi Fukuyama, Shinji Watanabe, Gabriele Neumann, Masaaki Oyama, Hiroaki Kitano, and Yoshihiro Kawaoka</p>					
<p>Jablonska Agnieszka and Natalia Polouliakh</p>	<p>In silico discovery of novel transcription factors regulated by mTOR pathway activities</p>	<p>Frontier in Cell and Developmental Biology ISSN: 2296-634X, DOI:10.3389 /fcell.</p>	<p>2 (23)</p>	<p>1 - 9</p>	<p>2014</p>