

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

- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比
による毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -

(H27-化学-指定-001)

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 28(2016)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

- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による
毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -

菅野 純 1

・ 分担研究報告書(別添 4)

1. 「新型」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性
予測技術の開発

菅野 純 47

2. 化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析

北嶋 聡 61

3. 化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析
及び Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

相崎 健一 93

4. システムトキシコロジー解析技術の基盤整備及び応用開発

北野 宏明 111

・ 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 5) 159

・ 研究成果の刊行物・別刷(別添 6) 161

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
- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による
毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -
（H27-化学-指定-001）

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 Perce llome^{*}トキシコ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。

特に先行3年間に実施した「新型」反復暴露実験^{**}により、化学物質の反復投与による生体影響が分子レベルにおいて数日で定常化する所見を複数見出した^{***}。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暴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」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発
- （2）化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析
- （3）化学物質の反復暴露におけるノンコーディングRNAの発現変動解析
- （4）システムトキシコロジー解析技術の基盤整備及び応用開発
- （5）Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

（1）では、平成27年度はアセトアミノフェン及びフェノバルビタールナトリウム塩に対し同設計の「新型」反復暴露実験セットを行い、先行研究での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。注目すべきは、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、アセトアミノフェン及びフェノバルビタールナトリウム塩ではむしろ発現が増加する遺伝子が多いという差異が認められた。それにも関わらず、反復暴露による遺伝子発現変化の基盤的分子機構には、EIF2シグナル等を主体とする小胞体ストレスの存在が明らかとなった。この変化はNRF2の下流でmTORシグナルの関与のもとに誘導されることが示唆された。詳細をさらに解析中である。

（2）では、平成27年度はDNAメチル化解析手法の性能評価を行った結果、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kitを利用する次世代シーケンサーを用いた手法により、DNAメチル化状態を網羅的に検討できることが確認した。引き続き、四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルについて、本解析手法を適用しDNAメチル化状態を網羅的に解析中である。

（3）では、ノンコーディングRNAのうち、成熟マイクロRNAについては短鎖であるための誤差発生を低減するために抽出・測定方法の検討を行った。また本分担研究で主な解析手段となる次世代シーケンサーによるRNA-Seqについて、ライブラリ調整段階からシーケンス後のデータ処理段階までPerce llome手法適用の最適化を進め、実用レベルのデータ処理パイプラインを構築した。これらの最適化技術を適用し、四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サン

ブルについて、解析中である。

(4)では、毒性機序の複雑性に対応すべく、大規模データ解析技術の開発として ensemble learning system の開発を、ゲノム解析とその関連データベースの整備として先行研究で開発したソフトウェアの強化と Garuda プラットフォーム**** 上への実装を進めた。

(5)では、各ソフトウェアを機能単位で評価し、オンライン化に即して再編成を行いつつ、実装方法を検討した。またこれらソフトウェアを職務著作物として届け出、併せてエンドユーザーに提供する際のライセンスを選定した。

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」(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。

(***) 先行3年間の研究により、反復暴露による生体影響は分子レベルでは、暴露の都度の変化を示す成分である「過渡反応」と、回を重ねるに連れ発現値の基線を徐々に移動させる成分である「基線反応」に分けて解釈できることが判明している。

(****) 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 第五室 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 第一室 室長

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 第五室 主任研究官

A . 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評価手法を、生体反応の分子メカニズムに基づいて迅速化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技術と統合して実用化する事を目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 6.5 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、反復暴露にも対応する網羅的毒性予測評価システムの構築を進める。

B . 研究方法

(1) 短期間「新型」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発【菅野】

B1-1: 試薬及び動物 :

アセトアミノフェン (Acetaminophen; 分子量 : 151.17、Cas No.: 103-90-2、純度 99%以上、Sigma-Aldrich) 及び、フェノバルビタール ナトリウム塩 (Phenobarbital sodium salt; 分子量 : 254.22、Cas No.: 57-30-7、純度 99%以上、Sigma-Aldrich) について、単回投与の既存データの解析を進めた。単回暴露 (0 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[0+1]と表記) 時のアセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩の投与量はそれぞれ 0、18、60、180 mg/kg 及び 0、15、50、150 mg/kg である。

「新型」反復暴露実験を、4 日間反復暴露 (4 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[14+1]と表記) のプロ

トコールにて実施した。アセトアミノフェンの4回の全動物に対する反復投与の用量は用量設定実験の結果 120 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様の0、18、60、180 mg/kgとし、フェノバルビタール ナトリウム塩の4回の全動物に対する反復投与の用量は用量設定実験の結果、30 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に0、15、50、150 mg/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0.5%メチルセルロース水溶液とし、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、最終投与の2、4、8及び24時間後に肝を採取した。

B1-2: Total RNA の分離精製 :

マウス肝組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に4 で一晚浸漬し、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 µL 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。

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、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 (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。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。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) 化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析【北嶋】

B2-1: 次世代シーケンサーを用いた whole genome bisulfite sequencing

12週齢の雄性 C57BL/6J マウス(日本チャールスリバー)について、先行研究において取得済みの、溶媒(コーンオイル)を単回投与した際、あるいは四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルを実験に用いた。また本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス(4週齢)の肝サンプルを実験に用いた。

肝サンプルを、ProK (10mg/ml) 55 O/N 処理後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿、及び70%エタノール洗浄により、DNA を抽出、精製した。抽出した DNA は Pico Green dsDNA 定量試薬 (Thermo) を用いて DNA 濃度を決定し、DNA 500 ng を用いて bisulfite 処理を EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research 社) により行った。

Bisulfite 処理後の DNA 500 ng を用いて、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) を用いて、Illumina 社の次世代シーケンサー NextSeq500 用の whole genome bisulfite sequencing に対応したライブラリーを作成した。ライブラリーは、0.2 N NaOH による denature を行った後に、NextSeq500 v1 試薬に付属の HT1 溶液を用いて 1.8 pM に希釈し、コントロールとして phiX ライブラリーを20%加えてシーケンスを行った。シーケンス反応は、dual index (8bp x 2), 151 cycle single read の設定とした。シーケンス終了後は、bcl2fastq ソフトウェアにより fastq ファイルを生成し、fastq groomer ソフトウェアによる grooming を行った後に、マッピングソフト bowtie2 による bisulfite 処理済みのマウスゲノム (MM10) に対してマッピングを行った。マッピング後は、シーケンス可視化ソフト IGV の bisulfite mode を用いて DNA メチル化を解析した。

(3) 化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析【相崎】

ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA は成熟すると 20bp 前後の短鎖となるため、通常の mRNA や長鎖ノンコーディング RNA とは生体サンプルからの精製効率が異なる。そこで RNA-Seq に用いる total RNA を抽出する方法を選定するために、マイクロアレイと同様のプロトコル(上記 B1-2)の他、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics) を用いて RNA を抽出し、BioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer (Life Technologies)、Nanodrop (Thermo Scientific) を用いて収量及び品質、サイズ分布等を評価した。

次世代シーケンサーには Illumina 社の NextSeq500 を用いた。シーケンスするライブラリは同社の TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 及び TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit を用いて作成した。

次世代シーケンサーデータの数値化等、データ処理には、PerceLome 手法に対応させたカスタムゲノムを用意した上で、RNA-Seq 解析ソフトウェアの主流となっている Tophat, Cufflinks を利用した。Cufflinks から出力された raw データの絶対量化計算はマイクロアレイと同様に、独自開発の SCal4.exe を用いた。

(4) システムトキシコロジー解析技術の基盤整備及び応用開発【北野】

大規模データ解析技術の開発としては、多数の machine learning の手法を選定し、これらを統合して複雑性の高いデータの解析を可能とする、ensemble learning system を開発した。

性能評価に際しては、大規模な薬剤投与下における発現データ (cmap, <https://www.broadinstitute.org/cmap/>) を利用し、薬剤候補遺伝子の予測精度を指標とした。

ゲノム解析とその関連データベースの整備としては、先行研究で作成した転写解析ツール ACGT と、プロモーター領域のホモロジー解析ツール SHOE の機能強化と、Garuda Platform 準拠を進めた。

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」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発【菅野】

平成 27 年度は、「新型」反復暴露実験により、アセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩の肝に対する反復影響を検討した。

アセトアミノフェンについて解析した結果、4 日間の反復投与後の単回暴露では、単回暴露のみの場合に比べて、反応が減弱ないし消失する遺伝子が少数、反応が増強する遺伝子が比較的多数認められた。また、その際に溶媒対照群の発現値から読み取れるところのベースラインが、反応が減弱した遺伝子では低下し、反応が増強した遺伝子では上昇する傾向が認められ、この結果は先行研究と同様であったが、例外も認められた。先行研究において、最終投与後 2、4、8、24 時間の変動を過渡反応(Transient Response) 反復投与で引き起こされるベースラインの変動を基線反応(Baseline Response)と定義したが、その各々の特性及び両者の関連性について更に解析を進めている。現段階では、反復暴露により基線反応が低下した遺伝子群は、先行研究での四塩化炭素等の場合とほぼ同様遺伝子群を含むことが確認された。ただし、その多くは過渡反応を示さない遺伝子であった。過渡反応を示す遺伝子の基線反応は、先行研究の四塩化炭素等に比較すると、アセトアミノフェンではその連動性は弱い傾向にあり、発現が増加、減少、及び同等である遺伝子が基線反応の増・減・不変と一致しない場合があるという特徴が明らかとなった。それらの遺伝子群の特徴について更なる解析を実施中である。

フェノバルビタール ナトリウム塩の新型暴露実験のデータ解析は途上にあるが、結果はアセトアミノフェンと同様の傾向を示した。詳細な解析を継続するが、反復暴露による遺伝子発現変化の基盤的分子機構には、EIF2 シグナル等を主体とする小胞体ストレスの存在が明らかとなり、これは四塩化炭素と共通する所見であった。尚、初期の PXR/SXR、CAR のシグナルネットワークの発動に前後し、GADD45 などの細胞増殖、修復、アポトーシス関連のシグナルが単回暴露と同様、あるいは、増幅傾向をもって反復暴露においても維持されていることが示された。これはアセトアミノフェンには見られない反応である。

これらの解析と、既存の反復暴露後に異なった化学

物質を単回暴露した新型反復毒性実験の結果との対比を進め、ネットワーク交叉に関する情報を得る。

これらを総合し、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る計画である。

(2) 化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析【北嶋】

反復投与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や DNA メチル化等の遺伝子発現修飾機構(所謂 Epigenetics)が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ーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについて DNA メチル化状態を網羅的に検討する。

平成 27 年度は、まず本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス(4 週齢)の肝サンプルを実験に用いた。C57BL/6J と JF1 系統間には系統間に約 1 千万の一塩基多型(SNPs)が存在する。このサンプルを用いる事で、親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知のインプリンティング遺伝子の DNA メチル化について、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。

凍結肝サンプルよりゲノム DNA を抽出し、bisulfite 処理後、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用いてライブラリを作成後、NextSeq500 V1 試薬(150 cycles)を用いて whole genome bisulfite シーケンスを行った結果、Q30 値(シーケンスのエラー率が 0.1% 以下の比率)は、80.0%、計 2 億 8 千万リードの出力を得た。また、得られたシーケンスリードをマウスゲノム(MM10)に対してマップさせたところ、8 千万リードがマップし、シーケンスの depth はおよそ 20x であった。57BL/6J マウス及び JF1 マウスの遺伝子多型を用いて、既知の父性発現インプリンティング遺伝子である Peg10 及び Mest の DMR (Differentially Methylated Region)にマップされるリードの親由来を解析したところ、全てのメチル化されたシーケンスリードは 57BL/6J マウス由来であり、また、全ての非メチル化されたシーケンスリードは JF1 マウス由来であることが確認できた。この結果より、ゲノム DNA の bisulfite 処理は完全に行われており、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。

引き続き本解析手法を用いて、12 週齢の雄性

C57BL/6J マウスについて、先行研究において取得済みの、溶媒(コーンオイル)を単回投与した際、及び四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析中であり、平成 27 年度中に解析が終了する見通しである。

平成 28 年度は、基線反応の変化が著しかった四塩化炭素以外の物質を反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析する。

(3) 化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析【相崎】

ノンコーディング RNA とはタンパク質をコードしない RNA の総称であり、メッセンジャー RNA(mRNA)と同等の長さを有するものから、成熟すると 20bp 前後の短鎖となるマイクロ RNA まで、様々な長さの RNA 分子を含む概念である。RNA 鎖長により生体サンプルからの精製効率が異なるため、まず各 total RNA 抽出キットの RNA 鎖長別の収率、品質、及び再現性を評価した。マイクロアレイ用の total RNA を抽出するために長年使用してきた RNeasy Kit(Qiagen)の他、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics)を用いて total RNA を抽出した結果、mRNA 等の長鎖 RNA の抽出効率や品質については、製品間に大きな差異はなかったが、短鎖 RNA の抽出効率は製品間で差が見られた。

また次世代シーケンサーのメーカー推奨のライブラリ作成プロトコル(Illumina 社の TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 及び TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit)において、RNA 鎖長による選別が掛かることが判明した。つまり専用プロトコルを用いない限り、短鎖 RNA は各プロトコルの精製ステップで相当量が失われることが判明した。

並行して、RNA 発現量の絶対量計算を施してデータの高精度化を実現し、尚且つ既存のマイクロアレイデータとのブリッジングを行うために、次世代シーケンサーによる RNA-Seq についても、Perce llome 手法を適用した。

Wet プロトコルで最も重要な Perce llome 外部 RNA スパイクカクテル(枯草菌ゲノム配列由来の RNA5 種を異なる濃度で混合したもの。GSC)の添加については、マイクロアレイと同じプロトコルで可能であることを確認した。スパイク添加量についてもデータレベルでの最終検討を行った結果、マイクロアレイと同じ添加比率を採用すべきであること、すなわち GSC の RNA5 種のうち最も多い RNA スパイクであってもトランスクリプトーム全体に対して過剰ではなくリードを無駄にしていな

いこと、及び総リード数が少なくなり低発現 RNA の検出が難しくなる 10 サンプル/フローセルのマルチプレックス解析においても、GSC の RNA5 種のうち最も少ない RNA スパイクを検出できていること、を確認した。

一方、シーケンス後の数値化に際しては、枯草菌ゲノム由来の配列を持つ GSC の RNA スパイク 5 種の定量方法の検討を行った。従来、マウスゲノムと枯草菌ゲノムの双方に対して独立にマッピングを実施していたが、計算時間が倍化し計算処理効率が悪かった。またマッピングソフトウェアのパラメータ設定によってはミスマッピングが発生する恐れもあり、特に RNA スパイク定量に際して誤差発生懸念があった。

そこで平成 27 年度はマウスゲノム mm10 に RNA スパイク 5 種の配列のみを追加したカスタムゲノムを作成し、一括マッピングする手法を検討した。この手法でもミスマッピングの懸念が残るが、マウスゲノム mm10 に対してマッピングした結果とカスタムゲノムに対してマッピングした結果を比較し、問題ないことを確認した。

さらに、Linux のコマンドライン操作に精通していない Wet 研究者でもデータ処理を簡便に行えるよう、グラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) ベースの Web 統合プラットフォーム Galaxy 上で、カスタムゲノムへのマッピングを中心に、アダプタ配列の除去やクオリティチェック、転写産物毎の数値化の各プロセスを包含した解析パイプラインを構築し、自動化した。

上記成果を反映した上で、引き続き、先行研究において取得済みの、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに溶媒 (コーンオイル) を単回投与した肝サンプル、及び同様のマウスに四塩化炭素を 14 日間反復投与した肝サンプルについて、全種類の RNA を網羅的に解析中である。

(4) システムトキシコロジー解析技術の基盤整備及び応用開発【北野】

化合物が毒性を引き起こすメカニズムは非常に複雑であり、Percellome 等の化合物の毒性に関する発現データベースは、この複雑性を内包している。したがって、Percellome データベースから有用な情報を抽出するためには、この様なデータの複雑性に対処できる解析法が必要不可欠である。

これを実現するために、多数の machine learning 手法を統合して解析を行う ensemble learning system の開発を行った。今回実装を行った machine learning の手法は、(1) クラスの予測を行う分類器、(2) 数値の予測を行うアルゴリズム、の二種類に分類される。

(1) としては 58 種類の分類器を実装し、多数決

を取って、最終的な予測を行うこととした。このシステムを、大規模な薬剤投与下における発現データ (cmap, <https://www.broadinstitute.org/cmap/>) に対して使用し、薬剤候補遺伝子を正確に予測できることを確認した。

(2) としては 120 種の数値予測の machine learning 手法を実装し、これらを並列実行して最終的な予測を行うシステムを開発した。今後、多次元のマルチオミックスデータ (DREAM10, AstraZeneca-Sanger Drug Combination Prediction DREAM Challenge; <https://www.synapse.org/#!Synapse:syn4231880/wiki/235645>) に対してこのシステムを適用し、薬剤併用による synergy score の予測が正確に出来るかどうかの検証を行う予定である。

さらにゲノム解析の一環として、先行研究で作成した転写解析ツール ACGT とプロモーター領域のホモロジー解析を行う SHOE の機能強化と Garuda への準拠を行った。

ACGT は転写産物の動態から遺伝子間の相互作用を情報幾何学的に推定し、可視化する。これにより、ACGT で解析した遺伝子相互作用のうち重要な部分を、既存の大規模知識ベースや Pathway map 上に投射することで生体内での影響の推定が容易になった。これを利用して、TCDD と TCDF の発現データを解析したところ、毒性面での同一性・差異を Pathway 上にマップして解析することができた。

また SHOE の機能強化、具体的には解析精度の向上やデータベースの整備とともに遺伝子とそれに対する転写因子のゲノム上での位置を可視化するなどの改良を実施した。さらに SHOE も Garuda に準拠することで、他のツールとの連携を強化した。

(5) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進【相崎】

先行研究にて in house 開発した Percellome 専用解析ソフトウェアはほぼすべて Delphi 言語にて記述した Windows 専用プログラムであるため、本研究にてオンライン化や Garuda 準拠を進めるに当たっては、基本的に Java 等のコンピュータ言語に移植することになる。また取り扱うデータ容量に制限のないローカルプログラムに比し、オンラインプログラムでは通常、サーバーサイドに保持可能なデータ量や、サーバー/クライアント間のデータ通信量に制限がかかるため、既存のプログラムを単純にそのまま移植するのではなく、必要な機能単位に分解して移植したり、データ内容や形式などを見直し軽量化する必要がある。

そこで平成 27 年度は機能別に優先順位を割り振り、

データ処理内容を吟味して、毒性評価・予測に必要な情報提供が優先されるよう、開発スケジュールの調整を行った。具体的には、既存のオンライン Percellome データベースを拡張することとし、Rsort による候補遺伝子リスト及び Percellome Explorer の化合物比較結果を参照する機能の追加を優先することとした。また Percellome による絶対量化計算や、Percellome 非対応データの絶対量推計計算を行うサービスについても提供方法を検討することとした。

これと並行して、オンライン Percellome データベースからエンドユーザーが引き出したデータの取り扱いや配布したソフトウェアの使用ライセンスを明確化すべく、これらソフトウェアを正式に職務著作物として届け出るとともに、エンドユーザーに提供する際のライセンスとして、Creative Commons License や Apache License ver.2 を選定した。

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、先行研究において、肝及び肺における四塩化炭素の新型反復暴露実験により、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を見いだした。増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられた。むしろ、この過渡反応と基線反応の連関性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクスに関わる分子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られる。

H27 年度は解熱鎮痛薬として使用されているアセトアミノフェンにおいて同様の実験を行ったところ、四塩化炭素で見られた所見と基本的に同傾向であるものの、発現増加する遺伝子の数が多いという特徴が見られた。この特徴は、治療薬として反復投与されている化学物質の特性として、長期のアセトアミノフェン服用による肝障害と関連する可能性があり注目され、引き続き関係するシグナルネットワークを含め解析中である。また抗てんかん薬フェノバルビタール ナトリウム塩についても解析を進め、単回暴露と反復暴露との差異を含め、共通点と相違点が整理されつつある。

平成 28 年度は、5-FU の一定用量を 4 日間反復暴露後 5 日目にサリドマイドを単回暴露(4 用量)した際、及び五塩化フェノールの一定用量を 4 日間反復暴露後 5 日目にバルプロ酸ナトリウムを単回暴露(4 用量)した際の解析を実施し、単回暴露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価精度の向上を目指す。

化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析においては、平成 27 年度は本解析手法の性能評価を行った結果、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。引き続き、平成 27 年度中に解析終了の見込みで、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析中であり、この結果により、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立への、当該遺伝子の DNA メチル化による遺伝子発現修飾機構(所謂 Epigenetics)の関与について明らかになるものと考えられる。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析においては、成熟型マイクロ RNA をメッセンジャー RNA や長鎖ノンコーディング RNA と同時に測定するのは困難であることが確認された。しかしマイクロ RNA 前駆体であれば成熟型より長いため同時測定可能であること、また RNA-Seq の原理上、前駆体由来のリードカウントと成熟型由来のリードカウントを厳密に分解することは難しいこと、から、当面は他の RNA と同時にマイクロ RNA 前駆体の定量を行いつつ、成熟マイクロ RNA を独立に測定して、前駆体と成熟型の存在量に相関関係があるかどうかを検証することとした。

システムトキシコロジー解析技術の基盤整備及び応用開発においては、複雑な毒性機序の解析に対応する ensemble learning system の開発を行い、開発者が得意とする薬剤候補遺伝子等の検証データを参照することにより、所定の性能を有することを確認した。また既存の解析ソフトウェアの機能強化と Garuda 準拠による他ソフトウェアとの連動性強化を実施し、オープンな環境における毒性解析パイプラインの構築に向け、大きく進展した。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進については、権利や利用ライセンス関係の整理を進めたことで、より幅広い分野から利用されるようになり、安全性評価技術の普及による国民生活の安全性確保の強化が期待される。

E . 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

平成 27 年度に実施した、アセトアミノフェンによる新型反復暴露解析では、大筋で先行研究と同様の所見、すなわち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、また、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。

平成 28 年度も、別の化学物質について同様の実験・解析を実施し、単回暴露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価精度の向上を目指す。

化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス機構解析においては、Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた、本解析手法の性能評価を行い、DNA メチル化状態を網羅的に解析できることが明らかとなった。今後は、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析し、反復暴露による基線反応成立への関与を明らかにしていく。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析については、平成 27 年度で測定基盤の整備をほぼ終えた。測定・解析中の四塩化炭素反復暴露に引き続き、平成 28 年度からは他の化学物質についても解析を進め、反復暴露毒性に関与するノンコーディング RNA の抽出と機能解析を進める。

システムトキシコロジー解析技術の基盤整備及び応用開発についても予定通り推移しており、これらを基盤にプロジェクトの最終目標の達成、即ち毒性解析パイプラインの構築を進める。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進においても、平成 27 年度、データやソフトウェアの利用ライセンスを明確化した。引き続き研究成果の速やかな社会還元を推進してゆく。

F . 健康危険情報 なし

G . 研究発表

1 . 論文発表 (抜粋)

(1) Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following

Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports*. 2015 Dec 8;5(6):996-1009.

(2) Hieu T Nim, Milena B Furtado, Mauro W Costa, Nadia A Rosenthal, Hiroaki Kitano and Sarah E Boyd. VISIONET: intuitive visualisation of overlapping transcription factor networks, with applications in cardiogenic gene discovery. *BMC Bioinformatics*. 16, 141, doi:10.1186/s12859-015-0578-0, May 1, 2015.

(3) 北野宏明. システム・トキシコロジーの展開. *QIGEN eyes*. 12, 7-9, May 14, 2015.

(4) 北野宏明. システム・トキシコロジーの展開 (第 2 回) . *QIGEN eyes*. 13, 7-9, Aug. 27, 2015.

(5) Tiago J. S. Lopes, Jason E. Shoemaker, Yukiko Matsuoka, Yoshihiro Kawaoka, Hiroaki Kitano. Identifying problematic drugs based on the characteristics of their targets. *frontiers in Pharmacology*. 6, 186, doi: 10.3389/fphar.2015.00186, Sep. 1, 2015.

(6) Matsuoka, Y.; Fujita, K.; Ghosh, S.; Kitano, H. Weaving Knowledge into Biological Pathways in a Collaborative Manner. *Computational Systems Toxicology* (eds. Julia Hoeng and Manuel C. Peitsch, Humana Press, Springer), 181-208, Sep. 14, 2015.

(7) Kitano, H. Accelerating systems biology research and its real world deployment. *npj Systems Biology and Applications*, 1, 15009, doi:10.1038/npjbsa.2015.9, Sep. 28, 2015.

(8) Takahiro Amemiya, Masashi Honma, Yoshiaki Kariya, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Yoshihisa Kurachi, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Yukio Homma, Darrel R Abernethy, Haruki Kume & Hiroshi Suzuki. Elucidation of the molecular mechanisms underlying adverse reactions associated with a kinase inhibitor using systems toxicology. *npj Systems Biology and Applications*, 1, 15005, doi:10.1038/npjbsa.2015.5, Sep. 28, 2015.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of

Repeated Dose Study (2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster

(2) 菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性 - 毒性学的観点からの考察 - (2015.12.12)、日本動物実験代替法学会第 28 回大会、横浜、特別講演

(3) 菅野 純
OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み
環境ホルモン学会第 18 回研究発表会(2015.12.11)

(4) Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium

(5) Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brusseis, Oral

(6) Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations.-with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop "The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity", Brusseis, Oral

(7) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium

(8) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, "Signal Toxicity" to study Endocrine Disruptors Issues and Children's Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

(9) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki,

Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

(10) 菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期暴露-遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について (2015.8.20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)、東京、セミナー

(11) 菅野 純、種村健太郎、ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるか - 有機リン剤等暴露後の遅発性毒性の発現実験より - (2015.7.17)、第 37 回日本中毒学会総会・学術集会、和歌山、シンポジウム

(12) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡
Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー(Dynamic Biomarker)のカタログ化とその毒性予測利用
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

(13) 北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純
シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

(14) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純
医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.29)

(15) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

(16) Jun Kanno, Construction of "Dynamic Biomarkers" by Percellome Toxicology based on a new Concept of "Signal Toxicity", The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6.25), Jeju, Korea

(17) Kitano, H. The Day AI wins the Nobel Prize. 1st Think X Symposium Theme: Smart Healthcare for Smart Nation, Infuse Theatre at Fusionopolis, Singapore, Apr. 9, 2015.

(18) 北野宏明. システムトキシコロジーの情報基盤としての Garuda Platform. 第 42 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム:「エピゲノミクス・ゲノミクス解析の進展と適応拡大する毒性オミクス」, ホテル日航金沢, July 1, 2015. (invited)

(19) 北野宏明. Garuda Platform: Innovations in Computational Platform for Drug Discovery and Digital Health. 第 31 回創薬セミナー. 大津プリンスホテル, July 22, 2015. (invited)

(20) Kitano, H. Computational Systems Toxicology Approach Using the Garuda Platform. Workshop on Pharmacological Mechanism-Based Drug Safety Prediction: Integrated Computational Approaches for Problem Solving of Systems Comprised of Multiple Levels of Biological Organization, from Drug Exposure to Clinical Phenotype, FDA White Oak Facility, Silver Spring, USA, Aug. 6, 2015. (invited)

(21) 北野宏明. システム医科学におけるオープンイノベーションを促進するガルーダ・プラットフォーム. JASIS 2015 先端診断イノベーションゾーン, 幕張メッセ, Sep. 3, 2015. (invited keynote)

(22) 北野宏明. 人工知能がノーベル賞を獲る日: 科学的発見のエンジンを作る. 日本バイオインフォマティクス学会年会・生命医薬情報学連合大会, 一般公開シンポジウム: 生命科学データベースと人工知能・ロボティクスの拓く未来, 京都大学宇治キャンパス, Oct. 31, 2015. (invited)

(23) 北野宏明. システム医科学におけるオープンイノベーションを促進するガルーダ・プラットフォーム. 日本薬物動態学会 第 30 回年会 東京, タワーホール船堀, Nov. 14, 2015. (invited)

(24) Kitano, H. Recent progress in Systems Biology. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

(25) Thierry D.G.A. Mondeel, Christian Linke, Adriana Supady, Anastasia Chasapi, Wolfram

Liebermeister, Mart Loog, Ioannis Xenarios, Hiroaki Kitano and Matteo Barberis. Deciphering the design principles of dynamic cell cycle control. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

(26) Huipeng Li, Elise Courtois, Debarka Sengupta, Say Li Kong, Charlene Kang, Yuliana Tan, Clarinda Chua, Chew Min Hoe, Lai Jiunn Heng, Ng Chee Yung, Dennis Koh, Tan Wah Siew, Mark Wong Te Ching, Yongli Hu, Samik Ghosh, Axel Hillmer, Hiroaki Kitano, Lawrence Wee, Daniel Tan, Iain Tan, Paul Robson and Shyam Prabhakar. Single cell RNA-seq analysis of tumor and microenvironment heterogeneity in colorectal cancer. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

(27) Akira Funahashi, Yukiko Matsuoka, Samik Ghosh, Noriko Hiroi and Hiroaki Kitano. CellDesigner: A modelling tool for biochemical networks. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

(28) Archana Bajpai, Takashi Ishii, Miyauchi Koichi, Masato Kubo and Hiroaki Kitano. Dysregulation of suppressor of cytokine signaling 3 in keratinocytes cause hyper-activation of Ap-1 related genes and develop hyperplasia like phenotype. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

(29) Kun-Yi Hsin; Yukiko Matsuoka; Tokiko Watanabe; Yoshihiro Kawaoka and Hiroaki Kitano. In-silico approach in assessing anti-influenza agents and their targets using comprehensive pathway map (FluMap). ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015. (poster presentation)

(30) Ghosh, S.; Matsuoka, Y.; Kitano, H. Garuda Platform and Its Applications in Biomedical Research. ICSB2015 Workshop, BioNetVisa, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore (NUS), Singapore, Nov. 25, 2015.

(31) 北野宏明. ガルーダ・プラットフォーム: 創薬、デジタルヘルスのための革新的情報基盤システム. 武田薬品 京都大学医学部附属病院合同シンポジウム: 日本におけるデジタルヘルス -現状と将来展望-, 京都大学医学部創立百周年記念施設芝蘭会館 稲盛ホール, 京都, Dec. 4, 2015. (invited)

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

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 - 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による 毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 - (H27-化学-指定-001)

「新型」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発

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 Perce llome^{*}トキシコ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。

特に先行3年間に実施した「新型」反復暴露実験^{**}により、化学物質の反復投与による生体影響が分子レベルにおいて数日で定常化する所見を複数見出した^{***}。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暴露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究では、「新型」反復暴露実験を実施して基盤となる Perce llome データベースを拡充すると共に、短期間の「新型」反復暴露実験と既存の単回暴露実験データベースからの反復暴露毒性予測技術の開発を行う。

平成 27 年度はアセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩に対し同設計の「新型」反復暴露実験セットを実施し、先行研究での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。注目すべきは、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、アセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩ではむしろ発現が増加する遺伝子が多いという差異が認められた。それにも関わらず、反復暴露による遺伝子発現変化の基盤的分子機構には、EIF2 シグナル等を主体とする小胞体ストレスの存在が明らかとなった。この変化は NRF2 の下流で mTOR シグナルの関与のもとに誘導されることが示唆された。詳細をさらに解析中である。

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。

(***) 先行3年間の研究により、反復暴露による生体影響は分子レベルでは、暴露の都度の変化を示す成分である「過渡反応」と、回を重ねるに連れ発現値の基線を徐々に移動させる成分である「基線反応」に分けて解釈できることが判明している。

A . 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評

価手法を、生体反応の分子メカニズムに基いて迅速化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技

術と統合して実用化する事を目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 6.5 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、反復暴露にも対応する網羅的毒性予測評価システムの構築を進める。

B . 研究方法

B1-1: 試薬及び動物 :

アセトアミノフェン (Acetaminophen; 分子量 : 151.17、Cas No.: 103-90-2、純度 99 % 以上、Sigma-Aldrich) 及び、フェノバルビタール ナトリウム塩 (Phenobarbital sodium salt; 分子量 : 254.22、Cas No.: 57-30-7、純度 99% 以上、Sigma-Aldrich) について、既の実施済みの単回投与のデータの解析を進めた。単回暴露 (0 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[0+1] と表記) 時のアセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩の投与量はそれぞれ 0、18、60、180 mg/kg 及び 0、15、50、150 mg/kg である。

「新型」反復暴露実験を、4 日間反復暴露 (4 日間反復暴露後に単回暴露、以降、[4+1] と表記) のプロトコルにて実施した。アセトアミノフェンの 4 回の全動物に対する反復投与の用量は用量設定実験の結果 120 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様の 0、18、60、180 mg/kg とした。フェノバルビタール ナトリウム塩の 4 回の全動物に対する反復投与の用量は用量設定実験の結果、30 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に 0、15、50、150 mg/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 0.5% メチルセルロース水溶液とし、金属ゾンデを用いて強制経口投与を行い、最終投与の 2、4、8 及び 24 時間後に肝を採取した。

B1-2: Total RNA の分離精製 :

マウス肝組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4 で一晚浸漬し、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 μ 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。

B1-3: GeneChip 解析 :

全 RNA 5 μ 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、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 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。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。

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。

アセトアミノフェンについて解析した結果、4 日間の反復投与後の単回暴露の [4 + 1] 実験では、単回暴露のみの [0 + 1] 実験の場合に比べて、反応が減弱ないし消失する遺伝子が少数、反応が増強する遺

伝子が比較的多数認められた。また、その際に溶媒対照群の発現値から読み取れるところのベースラインが、反応が減弱した遺伝子では低下し、反応が増強した遺伝子では上昇する傾向が認められ、この結果は先行研究と同様であったが、例外も認められた。先行研究において、最終投与後 2、4、8、24 時間の変動を過渡反応 (Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの変動を基線反応 (Baseline Response) と定義したが、その各々の特性及び両者の関連性について更に解析を進めている。現段階では、反復暴露により基線反応が低下した遺伝子群は、先行研究での四塩化炭素等の場合とほぼ同様遺伝子群を含むことが確認された。ただし、その多くは過渡反応を示さない遺伝子であった。過渡反応を示す遺伝子の基線反応は、先行研究の四塩化炭素等に比較すると、アセトアミノフェンではその運動性は弱い傾向にあり、発現が増加、減少、及び同等である遺伝子が基線反応の増・減・不変と一致しない場合があるという特徴が明らかとなった。それらの遺伝子群の特徴について更なる解析を実施中である。

フェノバルビタール ナトリウム塩の新型暴露実験のデータの解析も途上にあるが、結果はアセトアミノフェンと同様の傾向を示した。詳細な解析を継続するが、反復暴露による遺伝子発現変化の基盤的分子機構には、EIF2 シグナル等を主体とする小胞体ストレスの存在が明らかとなり、これは四塩化炭素と共通する所見であった。尚、初期の PXR/SXR、CAR のシグナルネットワークの発動に前後し、GADD45 などの細胞増殖、修復、アポトーシス関連のシグナルが単回暴露と同様、あるいは、増幅傾向をもって反復暴露においても維持されていることが示された。これはアセトアミノフェンには見られない反応である。

これらの [4+1] 実験は、同一化学物質を投与している A+A 型の新型反復暴露実験であるが、4 日間暴露する化学物質と 5 日目に暴露する化学物質が異なる A+B 型の新型反復暴露実験の結果を既に得ている組み合わせがあり、その結果との対比を進め、ネットワーク交叉に関する、より詳細な遺伝子ネットワーク情報を得る。

これらを総合し、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る計画である。

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、先行研究において、肝及び肺における四塩化炭素の新型反復暴露実験により、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を見いだした。増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられた。むしろ、この過渡反応と基線反応の連関性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクスに関わる分子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られる。

H27 年度は解熱鎮痛薬として使用され、毒性学的に過剰投与により肝の小葉中心性壊死を誘発することが知られているアセトアミノフェンにおいて同様の実験を行ったところ、四塩化炭素で見られた所見と基本的に同傾向であるものの、発現増加する遺伝子の数が多いという特徴が見られた。この特徴は、治療薬として反復投与されている化学物質の特性として、長期のアセトアミノフェン服用による肝障害と関連する可能性があり注目され、引き続き関係するシグナルネットワークを含め解析中である。また抗てんかん薬フェノバルビタール ナトリウム塩についても解析を進め、単回暴露と反復暴露との差異を含め、共通点と相違点が整理されつつある。注目される点として、細胞増殖、修復、アポトーシス関連のシグナルが単回暴露と同様、あるいは、増幅傾向をもって認められたことが挙げられる。

平成 28 年度は、5-FU の一定用量を 4 日間反復暴露後 5 日目にサリドマイドを単回暴露 (4 用量) した際、及び五塩化フェノールの一定用量を 4 日間反復暴露後 5 日目にバルプロ酸ナトリウムを単回暴露 (4 用量) した際の解析を実施し、単回暴露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価精度の向上を目指す。

E . 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

平成 27 年度に実施した、アセトアミノフェン及びフェノバルビタール ナトリウム塩による新型反復暴露解析では、大筋で先行研究と同様の所見、すなわち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、また、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。

平成 28 年度も、別の化学物質について同様の実験・解析を実施し、単回暴露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復暴露による生体影響の予測評価精度の向上を目指す。

F．健康危険情報 なし

G．研究発表

1．論文発表（抜粋）

(1) Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. Stem Cell Reports. 2015 Dec 8;5(6):996-1009.

2．学会発表（抜粋）

(1) Jun Kanno, Percellome Project for Mechanistic Analysis of Chronic Toxicity by a New Concept of Repeated Dose Study (2016.3.16), Society of Toxicology 55th Annual Meeting, New Orleans, USA, poster

(2) 菅野 純、代替試験法の問題点と今後の方向性 - 毒性学的観点からの考察-(2015.12.12)、日本動物実験代替法学会第 28 回大会、横浜、特別講演

(3) 菅野 純
OECD EDTA-AG/EAGMST における AOP と、Toxicogenomic 応用の試み
環境ホルモン学会第 18 回研究発表会(2015.12.11)

(4) Jun Kanno, Satoshi Kitajima and Kentaro Tanemura, The Concept of “Signal Toxicity” for the Planning of Research on Endocrine Disrupting Chemicals Issues (2015.12.1), The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse", Okazaki, Symposium

(5) Jun Kanno, Introduction of Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", (2015.11.12) ECETOC Workshop “The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity”, Brussels, Oral

(6) Jun Kanno, The concept of "repeated exposure" and possible links to epigenetic regulations.-with repeated dose studies introducing baseline responses and transient responses with possible link to epigenetics, (2015.11.12) ECETOC Workshop “The Role of Epigenetics in Reproductive Toxicity”, Brussels, Oral

(7) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project (2015.11.10), 9th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC9), Natal, Brazil, Symposium

(8) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, “Signal Toxicity” to study Endocrine Disruptors Issues and Children’s Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

(9) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

(10) 菅野 純、シグナル毒性の概念の、内分泌かく乱化学物質問題や関連する「低用量、早期暴露-遅発影響」型の毒性の研究計画への導入について (2015.8.20)、環境省平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー(EXTEND2010)、東京、セミナー

(11) 菅野 純、種村健太郎、ヒトの急性中毒症状を動物実験で再現できるか - 有機リン剤等曝露後の遅発性毒性の発現実験より - (2015.7.17)、第 37 回日本中毒学会総会・学術集会、和歌山、シンポジウム

(12) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.7.1)

(13) 北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純
シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6.30)

(14) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純
医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究

第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6.29)

(15) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

(16) Jun Kanno, Construction of “ Dynamic Biomarkers ” by Percellome Toxicology based on a new Concept of “ Signal Toxicity ” , The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2015) (2015.6.25), Jeju, Korea

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

平成27年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H27-化学-指定-001）
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
- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による毒性予測
の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -

分担研究報告書

分担研究課題：「化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス
機構解析」

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	小野竜一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

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、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。反復投与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やDNAメチル化等の遺伝子発現修飾機構（所謂Epigenetics）が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ーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてヒストン修飾やDNAメチル化状態を網羅的に検討することを目的とする。

平成27年度は、まず次世代シーケンサーを利用するDNAメチル化解析手法の性能評価を陽性対照サンプルを用いて行った。陽性対照サンプルとして、雄性C57BL/6Jと雌性JF1とのF1マウス（4週齢）の肝サンプルを実験に用いた。C57BL/6JとJF1系統間には系統間に約1千万の一塩基多型(SNPs)が存在する。このサンプルを用いる事で、親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知のインプリンティング遺伝子のDNAメチル化について、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。加えて、DNAのメチル化の測定法としてPost-bisulfite adaptor-tagging (PBAT)法が知られているが、この手法と最近になって市販された、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kitを用いる手法（Accel-NGS法）との比較検討もおこなった。

検討の結果、PBAT法よりも、Accel-NGS法の方が、網羅的にDNAメチル化状態を把握できる事が明らかとなった。またC57BL/6Jマウス及びJF1マウスの遺伝子多型を用いて、既知の父性発現インプリンティング遺伝子であるPeg10及びMestのDMR (Differentially Methylated Region)にマップされるリードの親由来を解析したところ、全てのメチル化されたシーケンスリードはC57BL/6Jマウス由来であり、他方、全ての非メチル化されたシーケンスリードはJF1マウス由来であることが確認できたことから、ゲノムDNAのbisulfite処理は完全に行われており、Accel-NGS法を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNAメチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。

引き続き本解析手法を用いて、先行研究において取得済みの、溶媒（コーンオイル）を単回投与した際、及び四塩化炭素を14日間反復投与した際の、12週齢の雄性C57BL/6Jマウスの肝サンプルについて、DNAメチル化状態を網羅的に解析中であり、平成27年度中に解析が終了する見通しである。

(*) 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。

A. 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評価手法を、生体反応の分子メカニズムに基づいて迅速化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技術と統合して実用化する事を目的とする。即ち、先行研究にて構築済みの延べ6.5億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、反復暴露にも対応する網羅的毒性予測評価システムの構築を進める。

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、先行研究において、肝及び肺における四塩化炭素の新型反復暴露実験により、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を見いだした。増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられた。むしろ、この過渡反応と基線反応の関連性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクスに関わる分子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られる。

本分担研究では、反復投与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やDNAメチル化等の遺伝子発現修飾機構（所謂、Epigenetics）が関わる可能性が指摘される事から、この可能性を検討する為、次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてヒストン修飾やDNAメチル化状態を網羅的に検討することを目的とする。平成27年度は、次世代シーケンサーを利用するDNAメチル化解析手法の性能評価と、先行研究において取得済みの、四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルのDNAメチル化状態につき網羅的に検討した。

B. 研究方法

B-1: サンプル

12週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）について、先行研究において取得済みの、溶媒（コーンオイル）を単回投与した際、あるいは四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルを実験に用いた。また本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス（4週齢）の肝サンプルを実験に用いた。

B-2: bisulfite 処理

肝サンプルを、ProK (10mg/ml) 55 0/N 処理後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿、及び 70 % エタノール洗浄により、DNA を抽出、精製した。抽出した DNA は Pico Green dsDNA 定量試薬 (Thermo) を用いて DNA 濃度を決定し、DNA

500 ng を用いて bisulfite 処理を EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research 社) により行った。

B-3: 次世代シーケンサーを用いた whole genome bisulfite sequencing

Bisulfite 処理後の DNA 500 ng 用いて、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) を用いて、Illumina 社の次世代シーケンサー NextSeq500 用の whole genome bisulfite sequencing に対応したライブラリーを作成した。ライブラリーは、0.2 N NaOH による denature を行った後に、NextSeq500 v1 試薬に付属の HT1 溶液を用いて 1.8 pM に希釈し、コントロールとして phiX ライブラリーを 20% 加えてシーケンスを行った。シーケンス反応は、dual index (8bp x 2), 151 cycle single read の設定とした。シーケンス終了後は、bcl2fastq ソフトウェアにより fastq ファイルを生成し、fastq groomer ソフトウェアによる grooming を行った後に、マッピングソフト bowtie2 による bisulfite 処理済みのマウスゲノム (MM10) に対してマッピングを行った。マッピング後は、シーケンス可視化ソフト IGV の bisulfite mode を用いて DNA メチル化を解析した。

(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、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 27 年 4 月版)」。

C. 研究結果及び考察

C-1: 次世代シーケンサーを利用する DNA メチル化解析手法の性能評価

反復投与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や DNA メチル化等の遺伝子発現修飾機構 (所謂 Epigenetics) が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ーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについて DNA メチル化状態を網羅的に検討する。

平成 27 年度は、まず本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス (4 週齢) の肝サンプルを実験に用いた。C57BL/6J と JF1 系統間には系統間に約 1 千万の一塩基多型 (SNPs) が存在する。このサンプルを用いる事で、親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知のインプリンティング遺伝子の DNA メチル化について、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。

加えて、DNA のメチル化の測定法として Post-bisulfite adaptor-tagging (PBAT) 法が知られているが、この手法と最近になって市販された、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用いる手法 (Accel-NGS 法) との比較検討もおこなった。1 枚のフローセルを用いてシーケンスを行い、得られたシーケンス数は、PBAT 法で、およそ 1.6 億リードに対し、Accel-NGS 法では 2.7 億リードと、Accel-NGS 法の方が 1.7 倍多いシーケンスが得られた。また、得られたシーケンスをマウスゲノムに対してマッピングすると、PBAT 法では 3 千万リード、他方 Accel-NGS 法ではおよそ 1.4 億リードと、Accel-NGS 法の方がおよそ 5 倍のシーケンスリードをマッピングできた。この結果は、

ランダムプライミングによってアダプターを付加する PBAT 法よりも、酵素によってアダプターを付加する Accel-NGS 法の方が次世代シーケンスライブラリーの作製効率が高いことを意味している。以上のことから、PBAT 法よりも、Accel-NGS 法の方が、網羅的に DNA メチル化状態を把握できる事が明らかとなった。

上記の通り、Accel-NGS 法では、1.4 億リードのシーケンスがマップされたことから、各 150bp の長さがあるので、総計 210 億塩基対のシーケンスを得た計算であり、マウスゲノムのリピートを除いた部分はおよそ 12 億塩基対であることから、約 20 倍の depth でシーケンスができる。網羅的メチル解析にあたり、1 サンプルあたり、約 10 倍の depth でシーケンスする必要がある為、1 フローセルあたり 2 サンプルまでシーケンス可能である。

次いで、陽性対照サンプルを用いた解析を検討した。凍結肝サンプルよりゲノム DNA を抽出し、bisulfite 処理後、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用いてライブラリを作成後、NextSeq500 V1 試薬 (150 cycles) を用いて whole genome bisulfite シーケンスを行った結果、Q30 値 (シーケンスのエラー率が 0.1% 以下の比率) は、80.0%、計 2 億 8 千万リードの出力を得た。また、得られたシーケンスリードをマウスゲノム (MM10) に対してマップさせたところ、8 千万リードがマップし、シーケンスの depth はおよそ 20x であった。C57BL/6J マウス及び JF1 マウスの遺伝子多型を用いて、既知の父性発現インプリンティング遺伝子である Peg10 及び Mest の DMR (Differentially Methylated Region) にマ

ップされるリードの親由来を解析したところ、全てのメチル化されたシーケンスリードは C57BL/6J マウス由来であり、また、全ての非メチル化されたシーケンスリードは JF1 マウス由来であることが確認できた。この結果より、ゲノム DNA の bisulfite 処理は完全に行われており、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。

C-2: 四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルにおける DNA メチル化状態の網羅的な解析

引き続き本解析手法を用いて、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスについて、先行研究において取得済みの、溶媒 (コーンオイル) を単回投与した際、及び四塩化炭素を 14 日間反復投与した際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) DNA メチル化状態を網羅的に解析した。現在までに、これら全てのサンプルのシーケンスを終了しており、Q30 値は全てのサンプルで 70%を超える出力を得た。得られたシーケンスを、quality による trimming のある場合とない場合でマッピング率の検討を行なったところ、Q20 以上の塩基が 90%以上で trimming を行なった結果、51505499 リードがマップされ、trimming をしない場合は 77454276 リードがマップされた。マッピングの効率を上げるためにシングルリードで 150bp をシーケンスしているため、多少 quality の低い塩基があってもマッピング可能であると考えられる。また、陽性対照部位であるインプリンティング遺伝子、

Peg10 遺伝子の DMR 部位を観測したところ、通常のインプリント型メチル化をしており、bisulfite 処理などに問題はないと考える。

基線反応の変動が認められる遺伝子上流に位置すると考えられる Rictor、E2f1 および Xbp1 遺伝子について、プロモーター部位の DNA メチル化状態について検討したところ、大きな変化は認められなかった。引き続き、網羅的な解析を検討中であり、今年度中に解析を終了する予定である。

D. 結論

平成 27 年度は本解析手法の性能評価を行った結果、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。引き続き、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析中であり、平成 27 年度中に解析終了の見込みである。この結果により、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立への、当該遺伝子の DNA メチル化による遺伝子発現修飾機構（所謂 Epigenetics）の関与について明らかになるものとする。来年度は、先行研究あるいは今年度研究において、基線反応の著しかった物質を反復投与した際の肝サンプルについて、同様な検討を実施する予定である。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ono R., Ishii M., Fujihara Y., Kitazawa M.,

Usami T., Kaneko-Ishino T., Kanno J., Ikawa M., Ishino F. Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. Scientific Reports 2015 Jul 28;5:12281.

Irie M., Yoshikawa M., Ono R., Iwafune H., Furuse T., Yamada I., Wakana S., Yamashita Y., Abe T., Ishino F., Kaneko-Ishino T. Cognitive Function Related to the Sirh11/Zcchc16 Gene Acquired from an LTR Retrotransposon in Eutherians. PLoS Genetics 2015 Sep 24;11(9):e1005521.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純

医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純

シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

Ono, R.

Double strand break repair by capture of retrotransposon and mRNA sequences via reverse transcription in the mouse zygote. FASEB "Mobile DNA in Mammalian Genomes", Palm Beach (2015.6.)

H. 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

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
- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の
対比による毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -
(H27-化学-指定-001)

化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析
及び
Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

分担研究者 相崎 健一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 第一室 室長

研究要旨

本研究は、先行実施された Perce llome^{*}トキシコ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。

特に先行3年間に実施した「新型」反復暴露実験^{**}により、化学物質の反復投与による生体影響が分子レベルにおいて数日で定常化する所見を複数見出した^{***}。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暴露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究では、(a) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現変動解析、および (b) Perce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進、を行った。

(a) では、ノンコーディング RNA のうち、成熟マイクロ RNA については短鎖であるゆえの誤差発生を低減する目的で抽出・測定方法の検討を行った。また本分担研究で主な解析手段となる次世代シーケンサーによる RNA-Seq について、ライブラリ調整段階からシーケンス後のデータ処理段階まで Perce llome 手法適用の最適化を進め、実用レベルのデータ処理パイプラインを構築した。これらの最適化技術を適用し、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、解析中である。

(b) では、各ソフトウェアを機能単位で評価し、オンライン化に即して再編成を行いつつ、実装方法を検討した。またこれらソフトウェアを職務著作物として届け出、併せてエンドユーザーに提供する際のライセンスを選定した。

(*) 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。

(***) 先行3年間の研究により、反復暴露による生体影響は分子レベルでは、暴露の都度の変化を示す成分である「過渡反応」と、回を重ねるに連れ発現値の基線を徐々に移動させる成分である「基線反応」に分けて解釈できることが判明している。

A . 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評価手法を、生体反応の分子メカニズムに基づいて迅速

化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技術と統合して実用化する事を目的とする。

特に本分担研究では、ノンコーディング RNA の発現

変動解析を以て、化学物質の反復暴露による基線反応の分子機序の解明を目的とする。また併行して、既存のPerce llome 専用解析ソフトウェアのオンライン化を進めて研究成果の速やかな社会還元を目指す。

B . 研究方法

(a) 化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析

ノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA は成熟すると 20bp 前後の短鎖となるため、通常の mRNA や長鎖ノンコーディング RNA とは生体サンプルからの精製効率が異なる。そこで RNA-Seq に用いる total RNA を抽出する方法を選定するために、マイクロアレイと同様のプロトコル(RNeasy Kit (QIAGEN)を使用) の他、 Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics)を用いて RNA を抽出し、BioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer (Life Technologies)、Nanodrop (Thermo Scientific)によって収量及び品質、サイズ分布等を評価した。

具体的には、マウス肝を 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、採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4 で一晚浸漬して、RNase を不活化する。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、各 RNA 精製キットのホモジナイズバッファを添加し、ジルコニアビーズ及び MM300 (Retsch)を用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定し、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 種類の濃度を公比 3 で混合した溶液) 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。

次世代シーケンサーには Illumina 社の NextSeq500 を用いた。シーケンスするライブラリは同社の TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 或いは TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit を用いて作成した。

次世代シーケンサーデータの数値化等、データ処理には、Perce llome 手法に対応させたカスタムゲノムを用意した上で、RNA-Seq 解析ソフトウェアの主流となっている Tophat、Cufflinks を利用した。Cufflinks から出力された raw データの絶対量計算は、独自開発の ConvertTET.exe でフォーマット変換した後、マイクロアレイと同様に、SCal4.exe を用いた。

倫理面への配慮

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、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

(a) 化学物質の反復暴露によるノンコーディング RNA の発現解析

) 短鎖 RNA 抽出の検討

ノンコーディング RNA とはタンパク質をコードしない RNA の総称であり、メッセンジャーRNA(mRNA) と同等の長鎖を有するものから、成熟すると 20bp 前後の短鎖となるマイクロ RNA まで、様々な長さの RNA 分子を含む概念である。生体サンプルからの精製効率は RNA 鎖長により異なるため、まず total RNA 抽出キット各々の RNA 鎖長別の収率、品質、及び再現性を評価した。マイクロアレイ用の total RNA を抽出するために使用してきた RNeasy Kit(Qiagen)の他、同一サンプルから DNA と RNA を同時に抽出する事の出来る Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics)を用いて total RNA を抽出した結果、mRNA 等の長鎖 RNA の抽出効率や品質については、製品間に大きな差異はなかったが、短鎖 RNA の抽出効率は製品間で差が見られた。

また次世代シーケンサーのメーカー推奨のライブラリ合成キット TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 及び TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina) の標準プロトコルにおいて、RNA 鎖長による選別が掛かることが判明した。つまり成熟型マイクロ RNA 専用のライブラリー合成キットを用いない限り、短鎖 RNA (或いはそれ由来の cDNA) は各プロトコルの精製ステップで相当量が失われることが判明した。

) 次世代シーケンサーによる RNA-Seq への Perce llome 手法の適用

データの高精度化を実現し、尚且つ既存のマイクロアレイデータとのブリッジングを行うために、次世代シーケンサーによる RNA-Seq についても、Perce llome 手法を適用し、RNA 発現量の絶対量計算を試みた。

Perce llome Wet プロトコルで最も重要な Perce llome 用外部 RNA スパイクカクテル (枯草菌ゲノム配列由来の RNA スパイク 5 種を公比 3 の異なる濃度で混合した

もの。GSC)の添加プロトコルについては、マイクロアレイと同じ方法で可能であることを確認した。スパイク添加量についてもデータレベルでの検討を行った結果、マイクロアレイと同じ添加比率を採用すべきであること、すなわち GSC の RNA スパイク 5 種のうち最も多い RNA スパイクであってもトランスクリプトーム全体に対して過剰ではなく RNA-Seq のリードを無駄にしていること、及び 1 サンプルあたりの総リード数が少なくなり低発現 RNA の検出が難しくなる 10 サンプル/フローセルのマルチプレックス解析においても、GSC の RNA スパイク 5 種のうち最も少ない RNA スパイクを検出できていること、を確認した。

一方、シーケンス後の数値化に際しては、枯草菌ゲノム由来の配列を持つ GSC の RNA スパイク 5 種の発現量計算方法の検討を行った。従来、マウスゲノムと枯草菌ゲノムの双方に対して独立にマッピングを実施していたが、計算時間が倍化し計算処理効率が悪かった。またマッピングソフトウェアのパラメータ設定によってはミスマッピングが発生する恐れもあり、特に RNA スパイク定量に際して誤差発生懸念があった。

そこで平成 27 年度はマウスゲノム配列 mm10 に RNA スパイク 5 種の配列を追加したカスタムゲノムを作成し、一括マッピングする手法を検討した。この手法でもミスマッピングの懸念が残るが、マウスゲノム mm10 に対してマッピングした結果とカスタムゲノムに対してマッピングした結果を比較し、問題ないことを確認した。

さらに、Linux のコマンドライン操作に精通していない Wet 研究者でもデータ処理を簡便に行えるよう、ローカルサーバーに構築したグラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) ベースの Web 統合プラットフォーム Galaxy 上で、カスタムゲノムへのマッピングを中心に、アダプタ配列の除去やクオリティチェック、転写産物毎の数値化の各プロセスを包含・自動化した解析パイプラインを作成した。

上記成果を反映した上で、引き続き、先行研究において取得済みの、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに溶媒 (コーンオイル) を単回投与した肝サンプル、及び同様のマウスに四塩化炭素を 14 日間反復投与した肝サンプルについて、全種類の RNA を網羅的に解析中である。

(b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

先行研究にて in house 開発した Percellome 専用解析ソフトウェアは ほぼ全て Delphi 言語にて記述した Windows 専用プログラム (Win32) であり、オンラ

イン化や Garuda 準拠が容易ではないため、本研究では、これらソフトウェアを Java 等のコンピュータ言語に移植することになる。また取り扱うデータ容量に制限のないローカルプログラムに比し、オンラインプログラムでは通常、サーバーサイドに保持可能なデータ量や、サーバー/クライアント間のデータ通信量に制限がかかるため、既存のプログラムを単純にそのまま移植するのではなく、機能単位に分解して必要な機能のみを移植したり、データ内容や形式などを見直して軽量化する必要がある。

そこで平成 27 年度は機能別に優先順位を割り振り、データ処理内容を吟味して、毒性評価・予測に必要な情報提供が優先されるよう、開発スケジュールの調整を行った。具体的には、既存のオンライン Percellome データベースを拡張することとし、RSort プログラムによる候補遺伝子リスト提供、及び Percellome Explorer プログラムの化合物間比較結果を参照する機能の追加を優先することとした。また Percellome による絶対量化計算や、Percellome 非対応データの絶対量推計計算を行うサービスについても提供方法を検討することとした。

これと並行して、オンライン Percellome データベースからエンドユーザーが引き出したデータの取り扱いや配布したソフトウェアの使用ライセンスを明確化すべく、これらソフトウェアを正式に職務著作物として届け出るとともに、エンドユーザーに提供する際のライセンスとして、Creative Commons License や Apache License ver.2 を選定した。

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、先行研究において、肝 (及び一部、肺) における四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレードの新型反復暴露実験により、単回暴露時に発現変動した遺伝子の多くについて、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) と過渡反応成分 (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) との関連性が見いだされた。反復投与により発現量が増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられ、むしろ、エピジェネティクス分子機序の関与が示唆されたことから、これを確認すべく、北嶋聡分担研究者が化学物質の反復投与による DNA メチル化変動等を網羅的に解析しているに合わせ、本分担研究では、エピジェネティクスとの関連性が明らかになりつつあるノンコーディング RNA の発現変動解析

を進めた。

類似配列の多いマイクロ RNA 群を含む、ノンコーディング RNA の検出は、マイクロアレイより次世代シーケンサの利用が効果的であり、本研究では先行研究でマイクロアレイ解析を実施する際に重要な役割を果たした Percellome 手法を次世代シーケンサによる RNA-Seq に適用することにより、データの高精度化やプラットフォーム間データ比較を実現しつつある。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析においては、total RNA サンプルから次世代シーケンサ用のライブラリを作成する過程で核酸鎖長による抽出効率の差異が大きく、成熟型マイクロ RNA をメッセンジャー RNA や長鎖ノンコーディング RNA と同時に定量するのは困難であることが確認された。しかしマイクロ RNA 前駆体であれば成熟型より長いため同時測定可能であること、また RNA-Seq の原理上、前駆体由来のリードカウントと成熟型由来のリードカウントを厳密に分解することは難しいこと、から、他の RNA と同時にマイクロ RNA 前駆体の定量を行いつつ、成熟マイクロ RNA を独立に測定して、前駆体と成熟型の存在量に相関関係があるかどうかを検証することとした。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進については、権利や利用ライセンス関係の整理を進めたことで、より幅広い分野から利用されるようになり、安全性評価技術の普及による国民生活の安全性確保の強化が期待される。

E . 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA の発現解析については、平成 27 年度で測定基盤の整備をほぼ終えた。測定・解析中の四塩化炭素反復暴露に引き続き、平成 28 年度からは他の化学物質の反復暴露実験についても解析を進め、反復暴露毒性に関与するノンコーディング RNA の抽出と機序解析を進める。

Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進においても、平成 27 年度、データやソフトウェアの利用ライセンスを明確化した。引き続き研究成果の速やかな社会還元を推進してゆく。

F . 研究発表

1 . 論文発表 (抜粋)

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, 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 (抜粋)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura and Ken-ichi Aisaki, "Signal Toxicity" to study Endocrine Disruptors Issues and Children's Toxicology, and to make molecular-based linkage with Classical Toxicology (2015.10.29), 2nd Malaysian Congress of Toxicology(MyCOT2015), Chulan Kuala Lumpur, Malaysia, Keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー(Dynamic Biomarker)のカタログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純

シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

G．知的所有権の取得状況

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

平成 27 年度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
- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による毒性予測の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -

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」

研究要旨：

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

A. 研究目的

本研究は、これまでの蓄積を基盤に、システム毒性学のさらなる発展と実用レベルに達する成熟化を目指し、その中で本プロジェクトの成果を国際的に大きく普及させることを目指していく。特に、本研究フェーズでは、技術実証のフェーズから、より現実的な応用を意識し、広範な化学物質の低濃度長期反復暴露時の生体毒性の計算機予測を可能とし、OECD AOP (Adverse Outcome Pathway)との連動性を高めた解析技術を開発する。

ここまでの研究では、解析の基本技術の開発を中心に行ってきたが、生体内分子相互作用ネットワークは、大規模データからの推定を行う方式であった。しかし、広範な毒性予測を行うには、事前に高精度な計算モデルを構築し、そのモデルと大規模データから推定された分子間相互作用の変化を比較参照しながらより精度の高い毒性予測を行う必要がある。さらに、マウスでの実験結果と人間での違いや、マウスを利用した毒性試験ができない場合に、どのように

人間での毒性リスクを予測するかの技術を開発することがより重要性を増している。

そこで本研究計画では、主要な毒性に係るアウトカムに関連するモデルを構築し、その挙動を予測するための技術と情報基盤群の開発を行うこととする。これは、これまでのプロジェクトが、最初に特定の化学物質を取り上げ、その影響を順次解析するという流れで研究を進めたアプローチとは、逆のアプローチであり、毒性アウトカム(Adverse Outcome)という生理学的な結果から、それを引き起こす原因にさかのぼるという方法論である(図1)。すでに、今までの研究で、化学物質からその影響を予測する方法は、一定の開発が進められており、その方法のさらなる洗練化は継続する必要があるものの、この段階で、逆側からのアプローチを新たに導入することで、全体の解析系が確実に連動し、実用的な結果をもたらすことをより確実にすると考える。また、複数の化学物質の複合的効果を考える際に、Forward Effect Analysisのみでは、検討すべきターゲットの範囲が広範にな

ると同時に、実際に Adverse Outcome として関連するターゲットはそのごく一部であるという極めて非効率的な解析を行わざるを得ない。これが、今まで複合的な暴露に対して計算論的アプローチが十分な有効性を持ちにくかった理由の一つである。しかし、実際には知りたい Adverse Outcome は明確に定義することができ、そのような結果をもたらすであろう遺伝子や分子の変動は、一定の組み合わせに限定することが可能である。その組み合わせが、ある程度広範囲にわたる場合においても、その範囲が定義されることは非常に重要である。これは、例えば、代謝工学で使われる Metabolic Flux Analysis(FBA)などの制約駆動型システム状態分析手法を、逆方向に利用するというイメージである。この考えをもとに、AOP の中間段階の分子の変動や遺伝子変動の注意すべきパターンを類型化し、そこから、複数の候補化合物の組み合わせを使った Forward Effect Analysis を実行することで、より効率的かつ精度の高い複合暴露の計算予測ができると期待される。

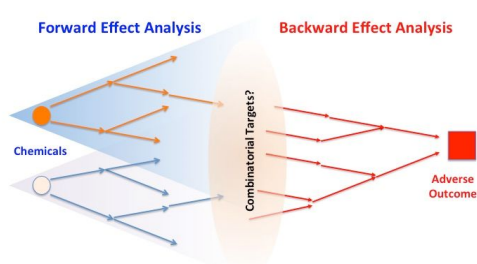


図 1 : Forward Effect Analysis と Backward Effect Analysis の融合

精密な計算機モデルとしては、(1)ミトコンドリアモデル、(2)肝毒性モデル、(3)皮膚毒性モデルを構築する。初期モデルは、文献情報やデータベースな

どを利用して構築し、次の段階で、Percellome も含めた実験データを利用して精度向上を図る。このモデルは、分子間相互作用と遺伝子制御ネットワークを包含する大規模なモデルとなる。すでに我々は、EGFR Pathway, TLR Pathway, mTOR Pathway, Parkinson's Disease Pathway など高精度モデルの構築の経験があり、この経験とそこで開発した一連の技術を毒性モデルの開発に応用する。

(C) AOP 連携

Adverse Outcome Pathway(AOP) は、Pathway の名称を使っているものの、分子間相互作用ネットワークのレベルでの Pathway ではなく、より抽象的な、生理学的変化がどのように引き起こされるかを概念化したネットワーク化知識体系である。そこで、一連の毒性に関連する AOP を Garuda Platform 上におけるツールである PhysioDesigner で定義し、分子間相互作用ネットワークモデル構築ツールである CellDesigner によるモデルと連動させる。ここで重要なのが、分子レベルや遺伝子レベルでのどのような変動が、AOP レベルでの変動に関連するのかの同定と検証である。

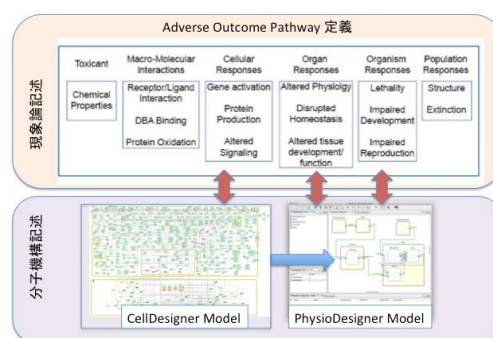


図 2 : 現象論的記述が主体の AOP 定義と分子機構記述モデルとの連携

AOP レベルの記述が、生理学的なレベルで

あるので、最終的に分子レベルや遺伝子レベルのモデルでの予測を AOP レベルに関連させる必要がある。逆に、これが実現できれば、マウス実験からのヒトでの影響推定やマウスを使わない場合でのヒトでの影響推定を可能とする技術に一步踏み出すことができる。

(D) Garuda Systems Toxicology Platform の開発

これらの研究と今までの研究成果を統合的に運用し、さらに実用的な毒性予測研究に資することができるプラットフォームを開発する。基盤は、これまでの研究で開発をしている Garuda Platform として、そこに毒性研究に特化したツール群、データベースなどを装備し、標準運用手順(Standard Operating Procedure)を定義する。これによって、標準的な毒性の計算機予測の手順が定義される。これらの機能を実現したシステムは、Garuda Systems Toxicology Terminal として実用化される。(図3)



図 3 : Garuda Systems Toxicology Terminal

B. 研究方法

本課題で、成し遂げようとしている目標は広範であり、多元的アプローチとそれらを統合することが必要となる。そのため、(1)

大規模データ解析技術の開発と(2)ゲノム解析とその関連データベースの整備を行った。

(1) 大規模データ解析技術の開発

近年、大規模かつ多次元的な生物学データが蓄積されつつある。特に、化合物が毒性を引き起こすメカニズムは非常に複雑であり、Percellome 等の化合物の毒性に関する発現データベースは、この複雑性を内包している。したがって、Percellome データベースから、有用な情報を抽出するためには、このようなデータの複雑性に対処できる解析法が必要不可欠である。しかしながら、このような複雑性の高いデータから有用な情報を引き出すことは、従来の研究で用いられてきた統計解析法などでは不可能である。

このようなデータの複雑性に対処するために、Machine learning の手法が活用されつつある。しかしながら、一つの Machine learning の手法のみを使用するだけでは、複雑性の高いデータの全貌を捉えることはできず、適切な解析は難しい。

このような問題に対しては、ensemble learning と呼ばれる、多数の machine learning アルゴリズムを統合する手法が有用である。実際に、多数の machine learning の手法を統合した IBM Watson は、Jeopardy クイズショーにおいて、人間のチャンピオンに勝利するという成果を上げている。

そこで、今年度、我々は、大規模な毒性データの複雑性に対応できる解析手法の確立を目的として、多数の machine learning の手法の実装を行い、さらに、これらの手法を統合して解析を行う ensemble learning system の開発を行った。

(2) ゲノム解析とその関連データベースの整備

この領域では、従来から開発を行っていた ACGT (図 4) と SHOE (図 5) の強化と Garuda Platform 上への実装を行った。

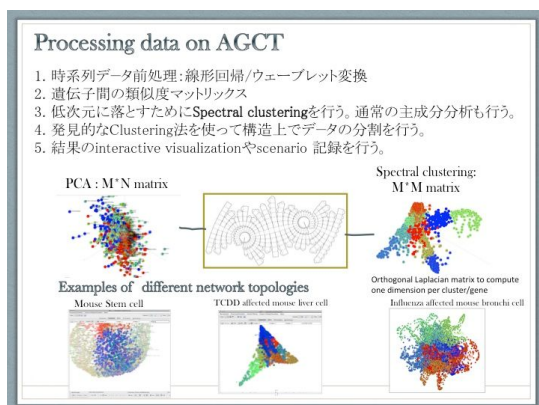


図 4: ACGT

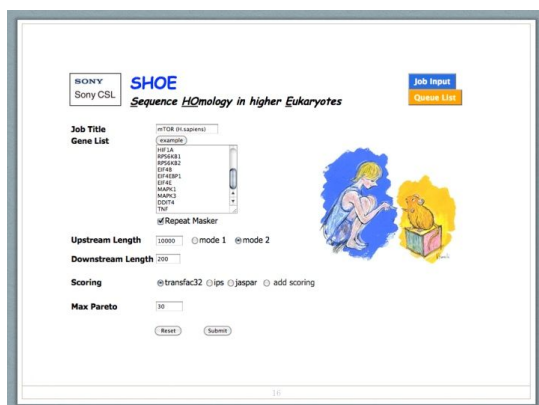


図 5: SHOE

これらソフトウェアの Garuda Platform への対応により、より広範な毒性解析パイプラインの構築が可能となる。

C. 研究結果

(1) 大規模データ解析技術の開発

今回、多数の machine learning の手法を統合して解析を行う、ensemble learning system の開発を行った。今回実装を行った machine learning の手法は、(1) クラス

の予測を行う分類器、(2) 数値の予測を行うアルゴリズム、の二種類に分類される。

(1) の分類器は、例えば、図 6 に示すように、遺伝子の各種 cell line における発現データを入力データとして、それぞれの遺伝子が“薬剤ターゲット候補”か“薬剤ターゲット候補で無い”などの予測を行うものである。一方、(2) の数値の予測を行うアルゴリズムは、例としては、図 7 のように、各患者の健康診断データ(年齢や肥満度など)から、一年後の血糖値の数値の予測を行うものである。

今回、我々は、全部で 58 種(表 1) の分類器の手法を実装した。また、これらの 58 種のアルゴリズムを並列に実行し、結果を統合して予測を行うシステムの開発を行った(図 8)。図 2 の例は、3 つのアルゴリズムを並列に実行している場合である。この例では、3 つのアルゴリズムは、それぞれ、遺伝子 A が、“薬剤候補となる”か“薬剤候補とならない”かの予測を行っている。その後、この 3 つのアルゴリズムの多数決を取って、最終的な予測を行う。

今回実装したシステムを、大規模な薬剤投与下における発現データ (cmap, <https://www.broadinstitute.org/cmap/>) に対して使用し、薬剤候補遺伝子を正確に予測できることを確認した。このシステムは、遺伝子や化合物が毒性を出すかどうかの予測や、パスウェイが毒性に関わっているかどうかについての予測に対し応用可能であり、これらに対しても精度の高い予測が出来ると期待される。

とで生体内での影響の推定が容易になった。
 (図 1 1)

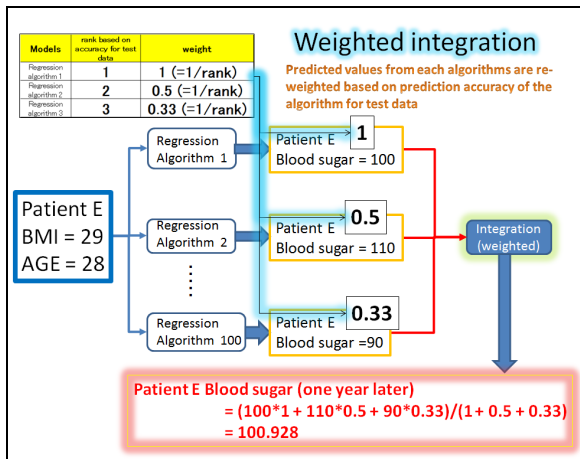


図 9 . 複数の数値予測アルゴリズムを統合した ensemble learning system

(2) ゲノム解析とその関連データベースの整備

ゲノム解析の一環として ACGT と SHOE の強化と Garuda への準拠を行った。ACGT は、転写解析ツールであり、転写産物の動態から遺伝子間の相互作用を情報幾何学的に推定し、可視化する。このツールの Garuda 準拠が完了した。(図 1 0)

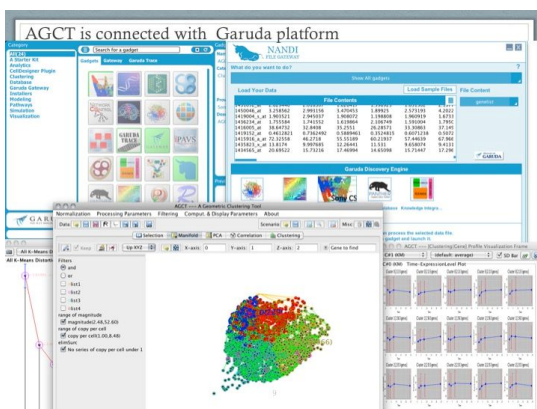


図 1 0 : Garuda に準拠した ACGT

これにより、ACGT で解析した遺伝子相互作用のうち重要な部分を、既存の大規模知識ベースや Pathway map 上に投射するこ

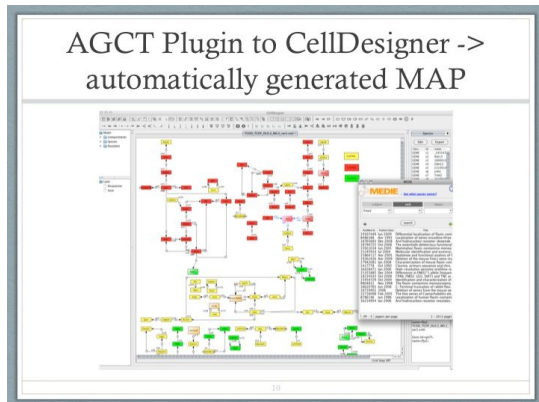


図 1 1 : ACGT-CellDesigner 連携

この機能を利用して、TCDD と TCDF の毒性面での同一性・差異を Pathway 上にマップして解析することができた。(図 1 2)

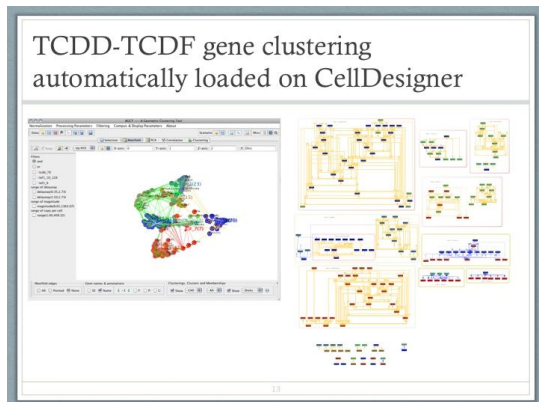


図 1 2 : 連携機能を使った TCDD-TCDF の毒性解析例

さらにホモロジー解析を行う SHOE の機能強化を行った。(図 1 3)



図 1 3 : SHOE の機能強化 : ホモロジー解析機能の強化

これは解析精度の向上やデータベースの整備とともに遺伝子とそれに対する転写因子のゲノム上での位置を可視化するなどの機能を強化した。(図 1 4)

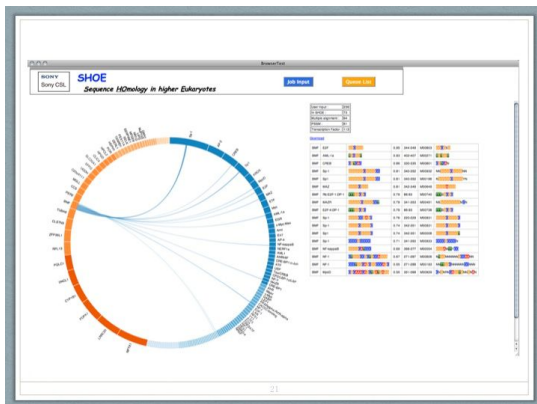


図 1 4 : 転写因子のゲノム上の位置の表示

さらに SHOE も Garuda に準拠することで、他ツールとの連携を強化した。(図 1 5)

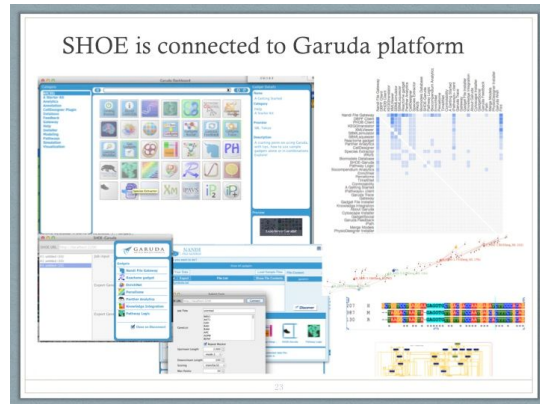


図 1 5 : Garuda に準拠した SHOE

D. 考察

各々の機能の強化、Garuda 準拠による運動性の強化は、毒性パイプラインの構築において目覚ましい効果があることが確認された。

E. 結論

本年度の成果は、概ね順調であり、これを基盤に最終的なプロジェクトの目標を達成する道筋がより明確になった。

F. 健康危険情報なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hieu T Nim, Milena B Furtado, Mauro W Costa, Nadia A Rosenthal, Hiroaki Kitano and Sarah E Boyd. VISIONET: intuitive visualisation of overlapping transcription factor networks, with applications in cardiogenic gene discovery. BMC Bioinformatics. 16, 141, doi:10.1186/s12859-015-0578-0, May 1, 2015.

北野宏明. システム・トキシコロジーの展開. QIGEN eyes. 12, 7-9, May 14,

2015.

北野宏明. システム・トキシコロジーの展開 (第2回). QIGEN eyes. 13, 7-9, Aug. 27, 2015.

Tiago J. S. Lopes, Jason E. Shoemaker, Yukiko Matsuoka, Yoshihiro Kawaoka, Hiroaki Kitano. Identifying problematic drugs based on the characteristics of their targets. *frontiers in Pharmacology*. 6, 186, doi: 10.3389/fphar.2015.00186, Sep. 1, 2015.

Matsuoka, Y.; Fujita, K.; Ghosh, S.; Kitano, H. Weaving Knowledge into Biological Pathways in a Collaborative Manner. *Computational Systems Toxicology* (eds. Julia Hoeng and Manuel C. Peitsch, Humana Press, Springer), 181-208, Sep. 14, 2015.

Kitano, H. Accelerating systems biology research and its real world deployment. *npj Systems Biology and Applications*, 1, doi:10.1038/npjbsa.2015.9, Sep. 28, 2015.

Takahiro Amemiya, Masashi Honma, Yoshiaki Kariya, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Yoshihisa Kurachi, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Yukio Homma, Darrel R Abernethy, Haruki Kume & Hiroshi Suzuki. Elucidation of the molecular mechanisms underlying adverse reactions associated with a kinase inhibitor using systems toxicology. *npj Systems Biology and Applications*, 1, doi:10.1038/npjbsa.2015.5, Sep. 28, 2015.

2. 学会発表

Kitano, H. The Day AI wins the Nobel Prize. 1st Think X Symposium Theme: Smart Healthcare for Smart Nation, Infuse Theatre at Fusionopolis, Singapore, Apr. 9, 2015.

北野宏明. システムトキシコロジーの情報基盤としての Garuda Platform. 第42回日本毒性学会学術年会 シンポジウム:「エピゲノミクス・ゲノミクス解

析の進展と適応拡大する毒性オミクス」, ホテル日航金沢, July 1, 2015. (invited)

北野宏明. Garuda Platform: Innovations in Computational Platform for Drug Discovery and Digital Health. 第31回創薬セミナー. 大津プリンスホテル, July 22, 2015. (invited)

Kitano, H. Computational Systems Toxicology Approach Using the Garuda Platform. Workshop on Pharmacological Mechanism-Based Drug Safety Prediction: Integrated Computational Approaches for Problem Solving of Systems Comprised of Multiple Levels of Biological Organization, from Drug Exposure to Clinical Phenotype, FDA White Oak Facility, Silver Spring, USA, Aug. 6, 2015. (invited)

北野宏明. システム医学におけるオープンイノベーションを促進する Garuda Platform. JASIS 2015 先端診断イノベーションゾーン, 幕張メッセ, Sep. 3, 2015. (invited keynote)

北野宏明. 人工知能がノーベル賞を獲る日: 科学的発見のエンジンを作る. 日本バイオインフォマティクス学会年会・生命医薬情報学連合大会, 一般公開シンポジウム: 生命科学データベースと人工知能・ロボティクスの拓く未来, 京都大学宇治キャンパス, Oct. 31, 2015. (invited)

北野宏明. システム医学におけるオープンイノベーションを促進する Garuda Platform. 日本薬物動態学会 第30回年会 東京, タワーホール船堀, Nov. 14, 2015. (invited)

Kitano, H. Recent progress in Systems Biology. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

Thierry D.G.A. Mondeel, Christian Linke, Adriana Supady, Anastasia Chasapi, Wolfram Liebermeister, Mart Loog, Ioannis Xenarios, Hiroaki Kitano and Matteo Barberis. Deciphering the design

principles of dynamic cell cycle control. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

Huipeng Li, Elise Courtois, Debarka Sengupta, Say Li Kong, Charlene Kang, Yuliana Tan, Clarinda Chua, Chew Min Hoe, Lai Jiunn Herng, Ng Chee Yung, Dennis Koh, Tan Wah Siew, Mark Wong Te Ching, Yongli Hu, Samik Ghosh, Axel Hillmer, Hiroaki Kitano, Lawrence Wee, Daniel Tan, Iain Tan, Paul Robson and Shyam Prabhakar. Single cell RNA-seq analysis of tumor and microenvironment heterogeneity in colorectal cancer. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

Akira Funahashi, Yukiko Matsuoka, Samik Ghosh, Noriko Hiroi and Hiroaki Kitano. CellDesigner: A modelling tool for biochemical networks. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

Archana Bajpai, Takashi Ishii, Miyauchi Koichi, Masato Kubo and Hiroaki Kitano. Dysregulation of suppressor of cytokine signaling 3 in keratinocytes cause hyper-activation of Ap-1 related genes and develop hyperplasia like phenotype. ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015.

Kun-Yi Hsin; Yukiko Matsuoka; Tokiko Watanabe; Yoshihiro Kawaoka and Hiroaki Kitano. In-silico approach in assessing anti-influenza agents and their targets using comprehensive pathway map (FluMap). ICSB 2015, Biopolis, Singapore, Nov. 23, 2015. (poster presentation)

Ghosh, S.; Matsuoka, Y.; Kitano, H. Garuda Platform and Its Applications in Biomedical Research. ICSB2015 Workshop, BioNetVisa, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore (NUS), Singapore, Nov. 25, 2015.

北野宏明. ガルーダ・プラットフォーム：創薬、デジタルヘルスのための革新的情報基盤システム. 武田薬品 京

都大学医学部附属病院合同シンポジウム：日本におけるデジタルヘルス -現状と将来展望-, 京都大学医学部創立百周年記念施設芝蘭会館 稲盛ホール, 京都, Dec. 4, 2015. (invited)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K.	Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid.	Stem Cell Reports	5(6)	996 - 1009	2015
Hieu T Nim, Milena B Furtado, Mauro W Costa, Nadia A Rosenthal, Hiroaki Kitano and Sarah E Boyd.	VISIONET: intuitive visualisation of overlapping transcription factor networks, with applications in cardiogenic gene discovery.	BMC Bioinformatics	16	141	2015
北野宏明	システム・トキシコロジーの展開.	QIGEN eyes	12	7 - 9	2015
北野宏明	システム・トキシコロジーの展開(第2回).	QIGEN eyes	13	7 - 9	2015

Tiago J. S. Lopes, Jason E. Shoemaker, Yukiko Matsuoka, Yoshihiro Kawaoka, Hiroaki Kitano.	Identifying problematic drugs based on the characteristics of their targets.	frontiers in Pharmacology	6	186	2015
Matsuoka, Y.; Fujita, K.; Ghosh, S.; Kitano, H.	Weaving Knowledge into Biological Pathways in a Collaborative Manner.	Computational Systems Toxicology		181 - 208	2015
Kitano, H.	Accelerating systems biology research and its real world deployment.	npj Systems Biology and Applications	1	150 09	2015
Takahiro Amemiya, Masashi Honma, Yoshiaki Kariya, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Yoshihisa Kurachi, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Yukio Homma, Darrel R Abernethy, Haruki Kume & Hiroshi Suzuki.	Elucidation of the molecular mechanisms underlying adverse reactions associated with a kinase inhibitor using systems toxicology.	npj Systems Biology and Applications	1	150 05	2015