

厚生労働行政推進調査事業費補助金

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 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

## 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 ..... 10

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 ..... 19

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 ..... 25

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 ..... 29

・ 研究成果の刊行に関する一覧表(別添 5) ..... 38

別添 3

# ・総括研究報告書

厚生労働行政推進調査事業費（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 客員研究員

研究要旨

本研究は、先行実施された Perce llome<sup>1</sup> 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<sup>2</sup>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、サリドマイド及び 5 -フルオロウラシルに対し「新型」反復暴露実験セットを実施した。四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、平成 27 年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。

( 2 ) では、平成 27 年度で実施した DNA メチル化解析手法の性能評価の結果により、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を採用して、四塩化炭素、クロフィプレートおよびバルプロ酸ナトリウム塩を 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に解析した。いずれの化学物質に於いても DNA メチル化状態が顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数、検出している。

( 3 ) では、平成 27 年度の成果（次世代シーケンサーによる RNA-Seq 及びデータ処理への Perce llome 手法適用）を採用し、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィプレート、アセトアミノフェンを 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、短鎖ノンコーディング RNA（成熟型マイクロ RNA：これは H29 年度に測定予定）を除く転写産物の発現量を測定し、反復暴露により変化した遺伝子を抽出した。

( 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 の開発を進め、実際のゲノムデータを用いた検証を進めた。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開発したソフトウェアの一層の強化(軽量化、高速化)と Garuda プラットフォーム<sup>4</sup>上への実装、一般リリースを進めた。

(5)では、Perce llome データベースのオンラインサイトのセキュリティ強化とミラーサイト設置を進め、また先行研究で開発した解析ソフトウェア群 MF-Tools について、最新 OS に対応したインストールパッケージを用意した。

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。

-----  
(\*1) 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。

(\*2) 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。

(\*3) 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。

(\*4) 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 第二室 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 室長

## 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:

サリドマイド (thalidomide; 分子量: 258.233、Cas No.: 50-35-1、純度 98.4%、Carbosynth)、5 - フルオロウラシル (5-fluorouracil (5-FU)、分子量: 130.077、Cas No.: 51-21-8、純度 99.8%、東京化成) 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)時のサリドマイド、フルオロウラシルの投与量はそれぞれ 0、100、300、1000 mg/kg、0、30、100、300 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。サリドマイドの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、70 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に 0、100、300、1000 mg/kg とし、5-FU 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、7 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に0、30、100、300 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、RNeasyキット(キアゲン社)に添付されるRLT bufferを添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の10 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、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。

#### 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、我々が開発したプログラム「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このプログラムは、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ものである。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 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。

Bisulfite処理後のDNA 500 ngを元に、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。なお、Bisulfite処理は、非メチル化シトシンのみをウラシルに変換する化学反応であり、メチル化シトシンはそのまま変換されない。よって、Bisulfite処理後のゲノム配列は、ワトソン鎖であるかクリック鎖であるかで一次配列は違い、さらにメチル化シトシンであるか非メチル化シトシンであるかでも1次配列は違ってくる。本研究ではこれらのゲノム配列の違いの条件を考慮した上で、適切にマッピング処理を実施した。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) 化学物質の反復曝露によるノンコーディング RNA の発現解析【相崎】

平成 27 年度に実施した最適化プロトコルにより、平成 28 年度は先ず成熟型マイクロ RNA 以外(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 とは定量性を保ったまま同時に精製出来ないため)の転写産物について次世代シーケンサーによる網羅的解析を進めた。

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ーは同社の TruSeq Stranded Total RNA 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、PerceIllumina 手法に最適化したカスタムゲノムを用意した上で、現在、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 PerceIllumina 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、分類器として使用する machine learning 手法を多数選定し、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。平成 28 年度には新たに 100 類以上の分類器を評価し、基準を満たすものを追加実装した。また特徴抽出アルゴリズムについても引き続き検討を行い、適切なものを実装した。性能評価に際しては、実際の大規模データを利用した。

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ソフトウェアのうち、特にプロモーター領域のホモロジー解析を行うツール SHOE の機能強化(軽量化及び高速化)を検討し、同時に Garuda Platform 準拠を完了した。

### **倫理面への配慮**

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医

薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成 27 年 4 月版))

## **C. 研究結果**

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

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

平成 28 年度は、「新型」反復曝露実験により、サリドマイド及び 5-フルオロウラシルの肝に対する反復影響を解析した。

サリドマイドは、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応がないか微弱な遺伝子が基線の上昇とともに過渡反応を明瞭に示すようになる遺伝子が多数認められた。このような遺伝子は、過渡反応のピークが 4~8 時間目のものであった。これに対し、反復曝露により、単回曝露時の過渡反応が消失または低下する遺伝子を少数ながら認めた。この遺伝子群は、単回曝露時に 2 時間目にピークを示す早期反応性の遺伝子であった。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。

5-フルオロウラシルについては、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応のある遺伝子が基線の変化なく過渡反応を消失ないし減ずる遺伝子が多数認められた。それらには、遺伝子発現を抑制的に調節する遺伝子が多く含まれていた。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。

### (2) 化学物質の反復曝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。

bisulfite 処理したゲノム DNA を Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を使用してライブラリーを作成し、次世代シーケンサー(Illumina NextSeq500)で高速シーケンスする全ゲノムバイサルファイト解析(WGBS)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（[0+1]）した際、及び 5 mg/kg の四塩化炭素を 14 日間反復投与（[14+1]）した際の肝サンプルについて WGBS 解析した。また基線反応の変化が著しかった四塩化炭素以外の物質、具体的には 70 mg/kg のクロフィプレート及びバルプロ酸ナトリウム塩を 14 日間反復投与（[14+1]）した際の肝サンプルについても同様に、溶媒（0.1%DMSO 添加 0.5%メチルセルロース）を単回投与（[0+1]）した際のもの、DNA メチル化状態を網羅的に比較解析した。いずれに於いても顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数検出している。なお、この微細に DNA メチル化状態が変化する領域を検出する手法として、Bismark および BSMAP を使用している。

### （ 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、成熟すると約 20bp 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。平成 27 年度のプロトコル検討により、生体サンプルからの RNA を精製する場合、RNA 鎖長により効率が異なり、定量性を保ったまま、短鎖の成熟型マイクロ RNA とそれ以外（mRNA や長鎖ノンコーディング RNA、マイクロ RNA 前駆体など）を同時に抽出する事は困難であることが判明している。そこで平成 28 年度はより多くの情報を取得することを優先し、スプライシングバリエーション情報も含むメッセンジャーRNA と長鎖ノンコーディング RNA など、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物の測定、解析を進め、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィプレート、アセトアミノフェンについて、次世代シーケンサーによる測定を実施した。なお短鎖となる成熟型マイクロ RNA については平成 29 年度に測定予定である。

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昨年度までに導入した、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を再度アップデートした上で、独自に構築した、データの整形、クオリティチェックからカスタムゲノムへのマッピング、転写産物毎の数値化までを自動実行する解析パイプラインを新しいGalaxy環境上に移植した。

### （ 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】

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、Perce llome 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、Perce llome 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。

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 の開発を進めてきたが、今年度は既に実装済みの 58 種類の分類器に加え、新たに 124 種類の分類器を追加実装し、計 182 種類の分類器の並列実行による多数決で、最終的な予測を行えるように改良を加えた。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/>)や化合物の構造情報とその化合物が抑制するシグナル伝達パスウェイに関するデータベース（TOX21、<https://tripod.nih.gov/tox21/challenge/>）を用いて、我々の解析パイプラインの精度の検証を行った。薬剤候補遺伝子を精度良く予測できることを確認した。

またデータに含まれるノイズを取り除き、予測の精度を向上させるために、特徴量抽出アルゴリズムとして 34 種類のアルゴリズムを実装した。

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データに含まれるノイズを取り除き、予測の精度を向上させるプログラム ACGT 及びプロモーター領域のホモロジー解析を行うプログラム SHOE の機能強化（軽量化、高速化）と Garuda 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するが、これを利用した TCDD と TCDF の発現解析を進めつつ、結果をフィードバックして ATCG の最適化を進めている。

また SHOE については一部の間接データの事前計算による軽量化やソースコードの見直しによる高速化といった機能強化を進めると共に、SHOE の Garuda 準拠を進め、一般配布バージョンをリリースした。

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

平成 28 年度は、Perce llome データベース公開サイトのセキュリティチェックを行い、RESTful サーバーアプリ

ケーションソフトウェアについて、セキュリティ強化対策を検討した。

またミラーサイト開設、一般公開準備を進めた。

また先行研究にて in house 開発した Windows 用 PerceLLome 専用解析ソフトウェアについては一括インストールパッケージを再構成し、最新バージョンの Windows にも対応した。

## 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。

平成 29 年度は、新型反復暴露実験を実施し、前 2 年間に得られた情報をもとに、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、四塩化炭素（平成 27 年度実施）あるいはクロロフィブレート、バルプロ酸ナトリウム塩（平成 28 年度実施）を 14 日間反復投与（[14+1]）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て、変化の見られた領域を抽出している。このような結果を蓄積すれば、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

理解が進むものとする。なお、Bisulfite 処理後のゲノム配列のマッピング計算は非常に複雑であり、1 サンプルあたり 1 週間ほどの時間が掛かるため、ボトルネックとなっているため、これについても解析パイプラインの最適化等、改善策を検討する。

「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、平成 27 年度のプロトコル最適化研究の過程で、マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いても成熟型マイクロ RNA の様な短鎖の転写産物と、メッセンジャー RNA や長鎖ノンコーディング RNA の様な長鎖の転写産物とを同時に網羅的且つ定量的に測定するのは困難であり、またマイクロ RNA 前駆体と成熟型マイクロ RNA の存在量に一定の相関関係が維持されている保証はないことが確認されているため、平成 28 年度はより情報量の多い長鎖の転写産物の網羅的・定量的測定を専ら実施した。取得したデータの品質は良好で、PerceLLome 法適用のための外部スパイク RNA も転写産物量に対して適量添加できていることを確認した。現在、詳細な解析計算を実行中であり、単回暴露[0+1]、14 日間反復暴露[14+1]、及び 4 日間新型反復暴露[4+1]の溶媒対照群のデータを比較することにより、純粋に反復暴露により発現誘導若しくは発現抑制を受けた転写産物の抽出を行い、反復暴露による基線反応の成立機序の解析を進める。

「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 の開発を継続し、精度や感度の性能向上を確認した。また一般公開に向けて既存の解析ソフトウェアの機能強化（軽量化、高速化）と Garuda Platform 準拠による他ソフトウェアとの連動性強化を実施し、一般向けの版をリリースしてオープン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、メインサイトのセキュリティ強化と並行してミラーサイト開設を進め、利用者の利便性を高めた。また先行研究で開発した独自ソフトウェアの最新 OS に対応したインストールパッケージを作成し、オンライン/オフラインに拠らず、より幅広い分野からの利用を促進することで、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。

「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、サリドマイド及び 5-フルオロウラ

シルに対し新型反復暴露実験セットを実施した。四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、平成 27 年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。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。

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、四塩化炭素或いはクロフィブレート<sup>®</sup>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、単回暴露[0+1]、14 日間反復暴露[14+1]、及び 4 日間新型反復暴露[4+1]の動物試験を実施した四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィブレート<sup>®</sup>について、成熟型マイクロ RNA を除く転写産物 (mRNA、長鎖ノンコーディング RNA、マイクロ RNA 前駆体など) の次世代シーケンサーによる網羅的定量測定を終え、反復暴露毒性に関与するノンコーディング RNA の抽出と機能解析のための解析計算を進めた。

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ついても予定通り推移しており、一般向けのリリース版も完成した。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、Percellome データベースのセキュリティ強化、ミラーサイト開設を中心に実施した。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)

(1) Kanno J. (2016) Introduction to the concept of signal toxicity. J Toxicol Sci. 2016;41(Special):SP105-SP109

(2) Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K., The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- B Signaling., Mol Cell. 2016 Oct

20;64(2):251-266.

(3) Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J., Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period., Front Neurosci. 2016 Jul 20;10:339.

(4) Fujimoto N, Kanno J., Increase in prostate stem cell antigen expression in prostatic hyperplasia induced by testosterone and 17 -estradiol in C57BL mice., J Steroid Biochem Mol Biol. 2016 Apr;158:56-62.

(5) Kun-Yi Hsin; Yukiko Matsuoka; Yoshiyuki Asai1; Kyota Kamiyoshi; Tokiko Watanabe; Yoshihiro Kawaoka and Hiroaki Kitano. systemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis. Nucleic Acids Research. 2016 Jul 8;44(W1):W507-13 doi: 10.1093/nar/gkw335, published online Apr. 29, 2016.

### 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, Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems biology, 第 105 回日本病理学会総会 (2016.5.13) 仙台、診療領域別講習特別プログラム、口演

(3) Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Jun KANNO, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral

exposure data for prediction of lung toxicity, 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29) 名古屋、日米毒性学会の交流促進プログラム、口演

(4) 菅野 純、社会に浸透した毒性学をめざして、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30) 名古屋、日本毒性学会 35 周年記念特別企画、口演

(5) 種村健太郎、古川佑介、北嶋 聡、菅野 純、キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行動影響解析、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30) 名古屋、一般演題、口演

(6) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復暴露の比較による予測性向上 -、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1) 名古屋、シンポジウム、口演

(7) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016)(2016.9.6)、Seville, Spain, poster

(8) Kanno J., Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of "signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology., 第 14 回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

(9) Kitajima S, Aisaki KI, Kanno J, Percellome project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement., 第 14 回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

(10) Tanemura K, Kanno J., Neurobehavioral

toxicity at adult period induced by pesticide exposure at juvenile period. 第 14 回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.5), Merida, Mexico, Symposium

(11) Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health., the 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016.11.29), Seoul, Korea, Invited

(12) 北野宏明. システム毒性. 第 105 回 日本病理学会総会, 診療領域別講習会特別プログラム 研究講演会 10, 病理学を基盤とした生物学・システムバイオロジーとの融合による毒性学の最適化: Phenomics から Genomics へ、そして Phenomics へ, 仙台国際センター, 宮城, May 13, 2016. (invited)

(13) 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ダ・プラットフォーム. 第 327 回 CBI 学会講演会 システムバイオロジーの最新動向, 東京大学山上会館, 東京, May 24, 2016. (invited)

(14) 北野宏明. Garuda Platform for Open Innovations in Systems Medicine. 第 43 回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「マルチオミックス解析から医療へ」, 東京大学医科学研究所附属病院, 東京, June 4, 2016. (invited)

(15) 北野宏明. 疾患とシステムバイオロジー. 第 17 回 Atherosclerosis and Biolipid Conference, ヒルトン東京お台場, 東京, Aug. 6, 2016. (invited)

(16) 北野宏明. システムバイオロジーの展開と Human Immunology への可能性. 第 44 回日本臨床免疫学会総会, 京王プラザホテル, 東京, Sep. 8, 2016. (invited)

(17) 北野宏明. システムバイオロジーの可能性.  
日本神経消化器病学会、消化器心身医学研究会、機能性ディスペプシア研究会、IBS 研究会 合同学術集会 2016, 北海道大学医学部学友会館 フラテ, 北海道, Sep. 9, 2016. (invited)

## 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

別添 4

# . 分担研究報告書

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客員研究員

研究要旨

本研究は、先行実施された Perce llome<sup>\*</sup>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<sup>\*\*</sup>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<sup>\*\*\*</sup>。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 28 年度はサリドマイド及び5-フルオロウラシルに対し同設計の「新型」反復暴露実験セットを実施した。四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、昨年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。

サリドマイドは、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応がないか微弱な遺伝子が基線の上昇とともに過渡反応を明瞭に示すようになる遺伝子が多数認められた。このような遺伝子は、過渡反応のピークが4~8時間目のものであった。これに対し、反復曝露により、単回曝露時の過渡反応が消失または低下する遺伝子を少数ながら認めた。この遺伝子群は、単回曝露時に2時間目にピークを示す早期反応性の遺伝子であった。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。

5-フルオロウラシルについては、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応のある遺伝子が基線の変化なく過渡反応を消失ないし減ずる遺伝子が多数認められた。それらには、遺伝子発現を抑制的に調節する遺伝子が多く含まれていた。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構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 :

サリドマイド (Thalidomide; 分子量 : 258.233、Cas No. : 50-35-1、純度 98.4%、Carbosynth) 及び、5 - フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-FU; 分子量 : 130.077、Cas No. : 51-21-8、純度 99.8%、東京化成) について、既に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) 時の投与量はそれぞれ 0、100、300、1000 mg/kg 及び 0、30、100、300 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。サリドマイドの 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 70 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様の 0、100、300、1000 mg/kg とした。5-FU 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、7 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様に 0、30、100、300 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。

### 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に行い、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)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。

なお、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)と定義したところであるが、本研究においても、これを使用した。

サリドマイド及び5-フルオロウラシルは、四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失する遺伝子が多いのに対し、昨年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。

サリドマイドは、反復曝露[4+1]実験により単回曝露[0+1]実験よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応がないか微弱な遺伝子が基線の上昇とともに過渡反応を明瞭に示すようになる遺伝子が多数認められた。このような遺伝子は、過渡反応のピークが4~8時間目のものであった。これに対し、[4+1]実験により、[0+1]実験の過渡反応が消失または低下する遺伝子を少数ながら認めた。この遺伝子群は、[0+1]実験で2時間目にピークを示す早期反応性の遺伝子であった。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさらに解析中である。(図1~4参照)

5-フルオロウラシルについては、反復曝露により単回曝露時よりも基線が上昇し、過渡反応が増強する遺伝子、及び、単回曝露時に過渡反応のある遺伝子が基線の変化なく過渡反応を消失ないし減ずる遺伝子が多数認められた。それらには、遺伝子発現を抑制的に調節する遺伝子が多く含まれていた。これらの特徴を説明する上流の遺伝子発現調節機構をさ

らに解析中である。(図5~8参照)

これらの[4+1]実験は、同一化学物質を投与しているA+A型の新型反復曝露実験であるが、4日間曝露する化学物質と5日目に曝露する化学物質が異なるA+B型の新型反復曝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

反復曝露影響の分子機序解析による、既存の単回曝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曝露実験により、単回曝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(曝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(単回曝露時の2、4、8、24時間のうちに発現が増加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ビ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、単回曝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。

平成29年度は、新型反復曝露実験を実施し、前2年間に得られた情報をもとに、単回曝露の毒性ネットワークとの比較解析結果から、反復曝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28年度に実施した、サリドマイド及び5-フルオロウラシルによる新型反復曝露解析では、大筋で先行研究と同様の所見、すなわち単回曝露時の過渡反応成分と反復曝露時の基線反応成分の基本的な関連性を見いだした。化学物質特有の傾向としては、四塩化炭素等の毒性物質では過渡反応が急速に消失

する遺伝子が多いのに対し、平成 27 年度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタールに引き続き、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果がえられた。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 29 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. 研究発表

### 1. 論文発表 (抜粋)

(1) Kanno J. (2016) Introduction to the concept of signal toxicity. *J Toxicol Sci.* 2016;41(Special):SP105-SP109

(2) Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K., The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- B Signaling., *Mol Cell.* 2016 Oct 20;64(2):251-266.

(3) Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J., Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period., *Front Neurosci.* 2016 Jul 20;10:339.

(4) Fujimoto N, Kanno J., Increase in prostate stem cell antigen expression in prostatic hyperplasia induced by testosterone and 17 $\beta$ -estradiol in C57BL mice., *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Apr;158:56-62.

### 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, Pathology-based optimization of toxicology by tie-ups with cutting-edge biology and systems biology, 第 105 回日本病理学会総会 (2016.5.13) 仙台、診療領域別講習特別プログラム、口演

(3) Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Jun KANNO, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity, 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6.29) 名古屋、日米毒性学会の交流促進プログラム、口演

(4) 菅野 純、社会に浸透した毒性学をめざして、第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6.30) 名古屋、日本毒性学会 35 周年記念特別企画、口演

(5) 種村健太郎、古川佑介、北嶋 聡、菅野 純、キシレンの経気道吸入暴露によるマウス行動影響解析、第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6.30) 名古屋、一般演題、口演

(6) 菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復暴露の比較による予測性向上 -、第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.7.1) 名古屋、シンポジウム、口演

(7) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016) (2016.9.6)、Seville, Spain, poster

(8) Kanno J., Introduction to the Percellome Project with special reference to the concept of

"signal toxicity", and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology., 第14回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

⑨ Kitajima S, Aisaki KI, Kanno J, Percellome project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement., 第14回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

(10) Tanemura K, Kanno J., Neurobehavioral toxicity at adult period induced by pesticide exposure at juvenile period. 第14回国際毒性学会( ICT2016 )(2016.10.5), Merida, Mexico, Symposium

⑪ Jun Kanno, The Concept of "Signal Toxicity" for the Planning of Research on Environmental Pollutants on Health., the 27th Korean Academy of Science and Technology (KAST) International Symposium (2016.11.29), Seoul, Korea, Invited

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

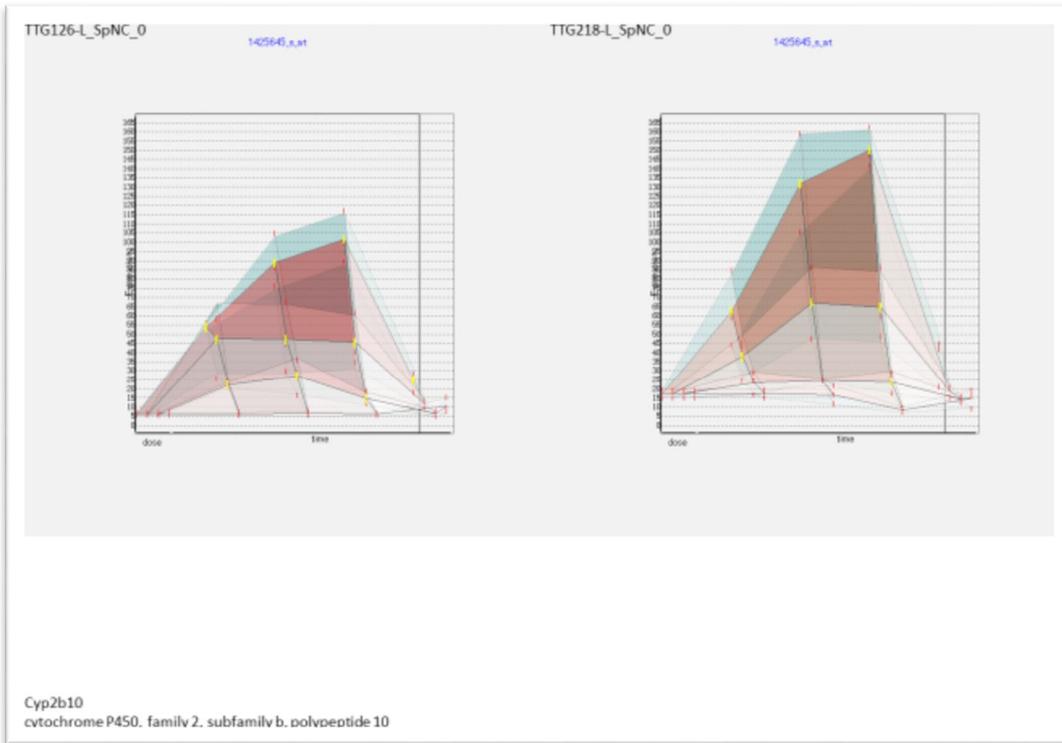
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

サリドマイド (左 [0+1]、右 [4+1])



]

図 1

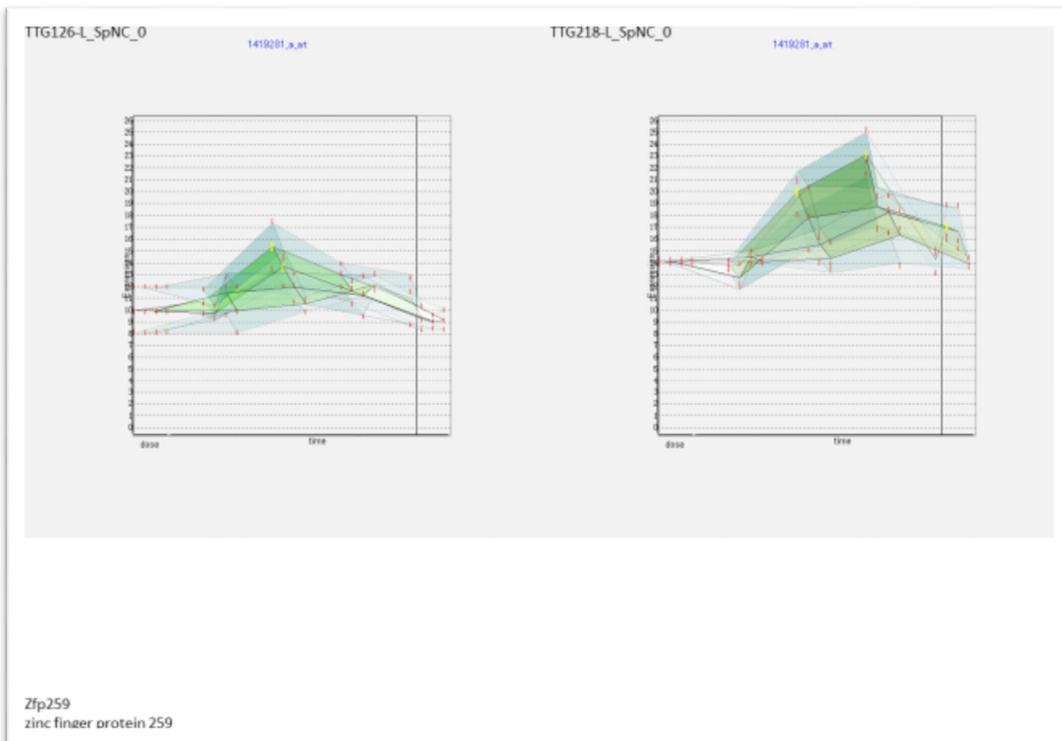
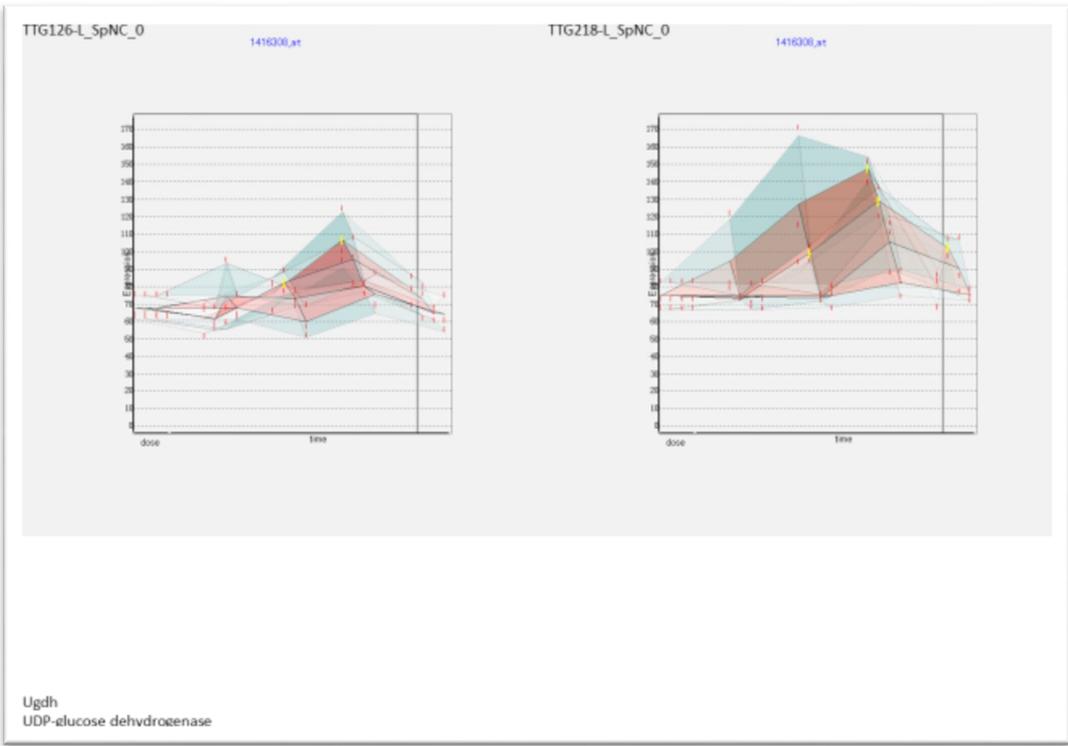
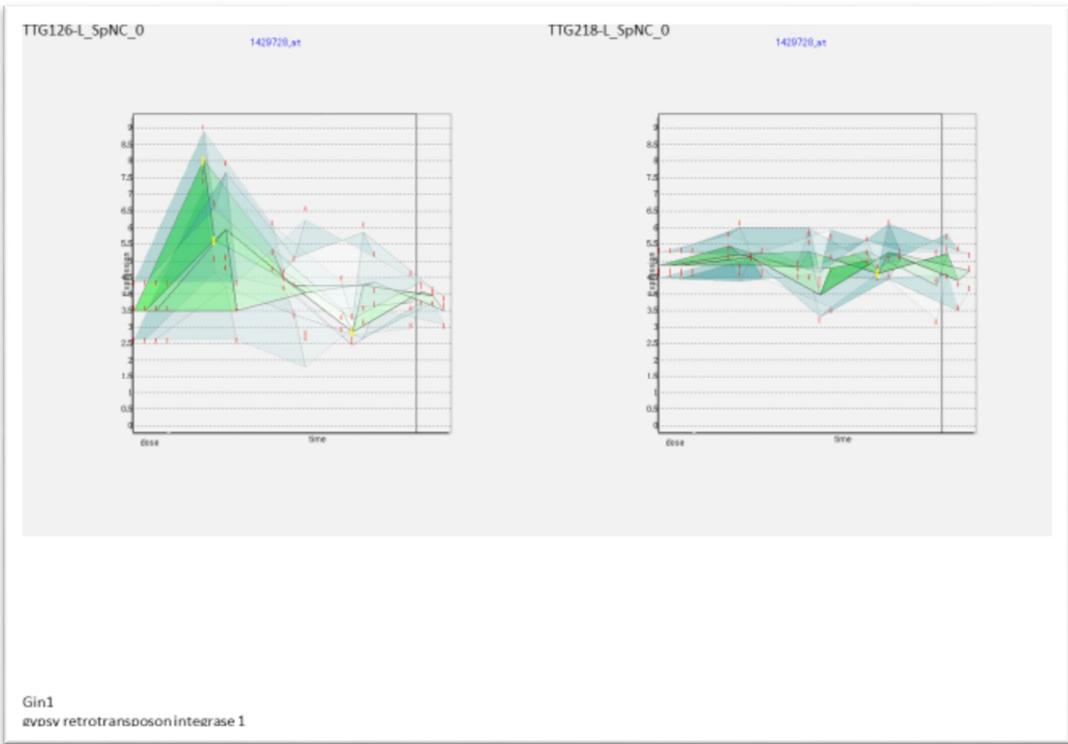


図 2



☒ 3



☒ 4

5 - フルオロウラシル (左 [0+1]、右 [4+1])

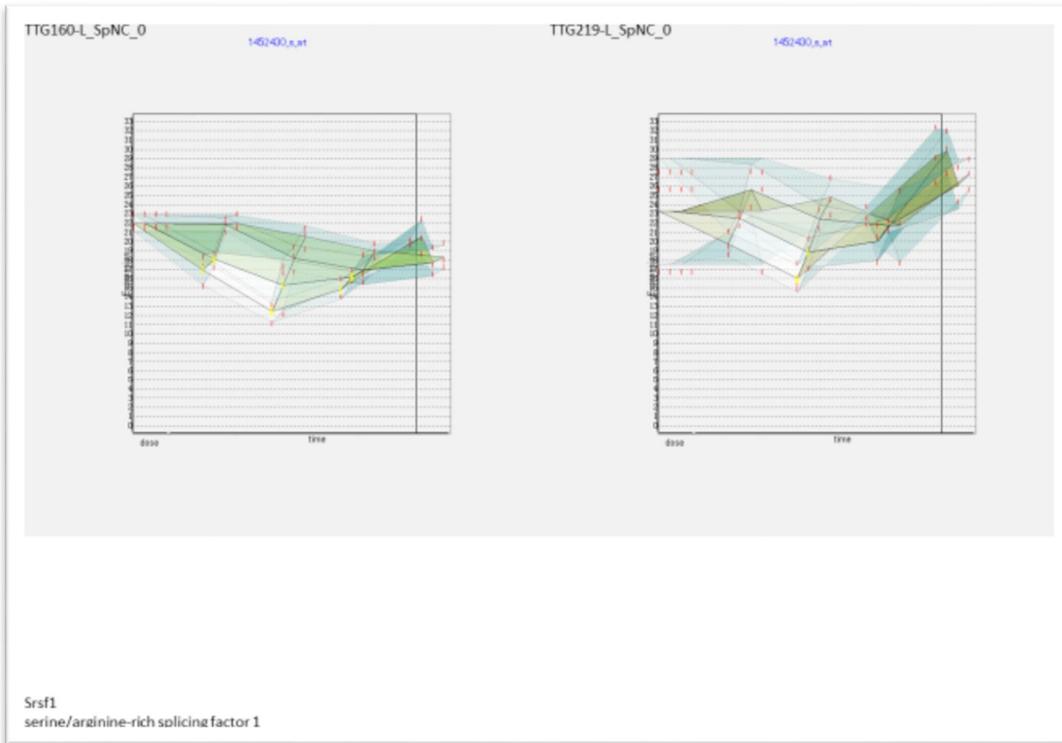


図 5

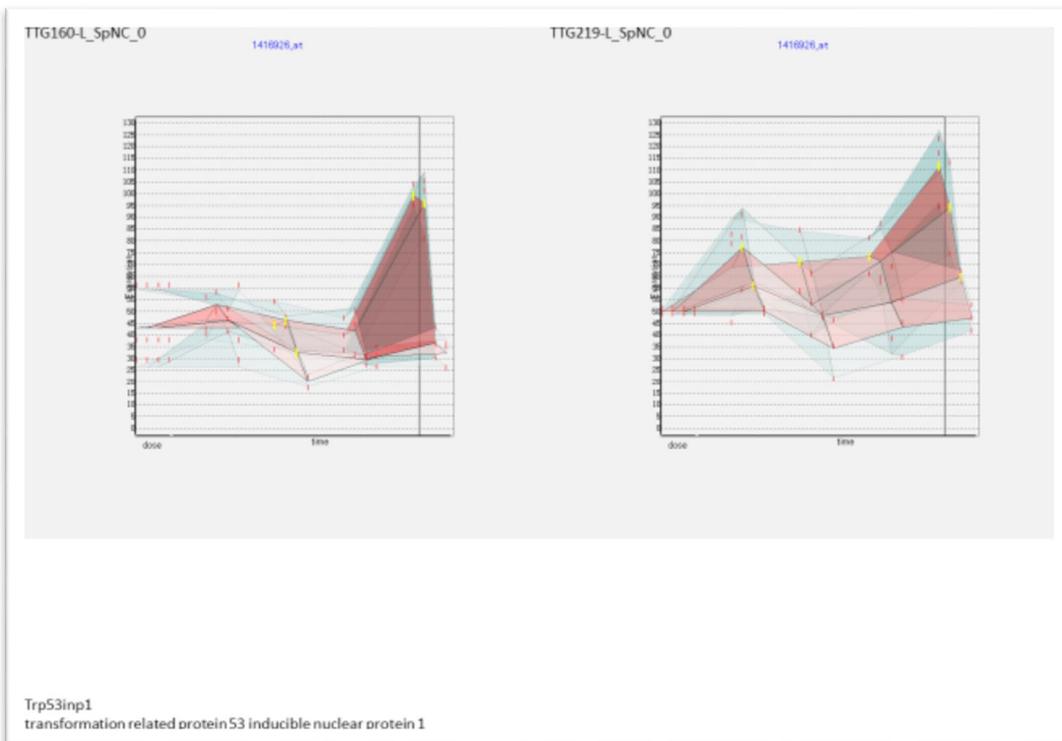


図 6

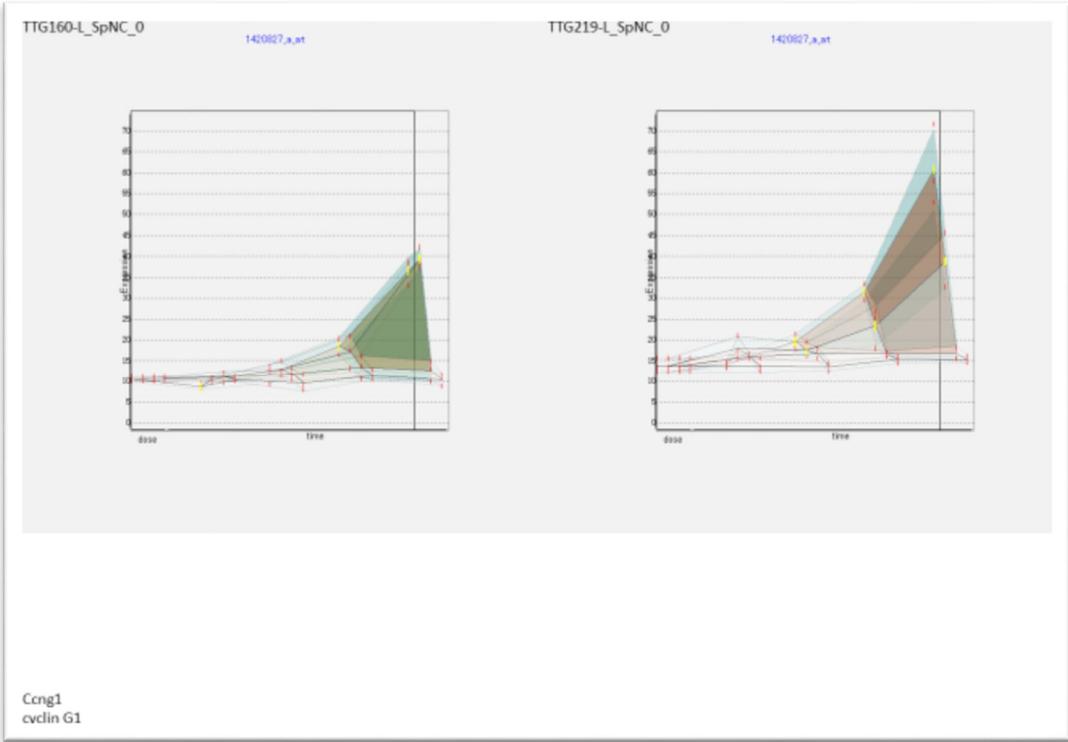


図 7

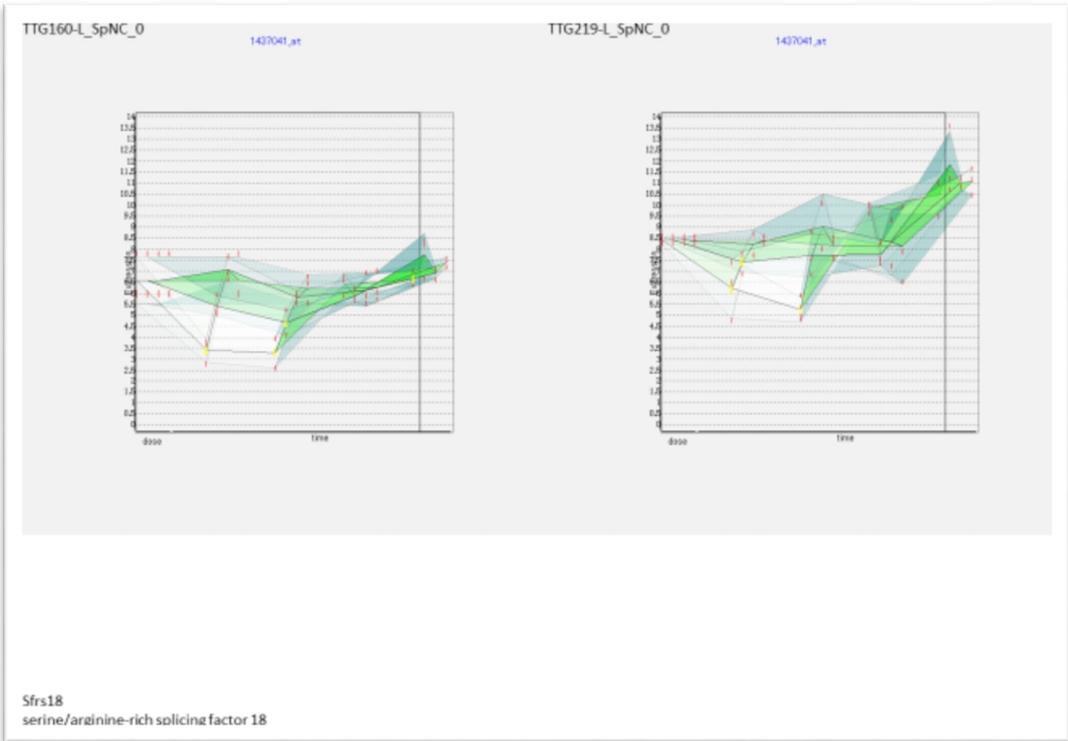


図 8

- 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)

## 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した結果、現時点では、DNAメチル化状態が顕著に変化している部位は見いだされていないが、引き続き微細にDNAメチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。

平成28年度は、クロフィブレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を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り、これまでに顕著に変化している部位は見いだされていないが、引き続き微細にDNAメチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。この微細にDNAメチル化状態が変化する領域を見出す手法として、BismarkおよびBSMAPを検討している。

（\*） 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が、平成28年度は、クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を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）あるいは C57BL6/NCrSlc（日本エスエルシー）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 [C8267、シグマ アルドリッチ社] または、0.5%メチルセルロース (MC) [133-17815、和光純薬工業]）を単回投与した際、あるいは四塩化炭素、クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 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 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。

#### 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 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。

#### (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

平成 27 年度は、まず本解析手法の性能評価を行った。その結果、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。具体的には、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。

加えて、得られたシーケンスのマッピング方法が適切か否かについての検討を行った。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、Mest 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。

続いて、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した。その結果、現時点では、DNA メチル化状態が顕著に変化している部位は見いだされていない

が、引き続き微細に DNA メチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。

平成 28 年度は、引き続き、クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態につき網羅的に検討した。

#### C-1: クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 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

本解析手法を用いて、12 週齢の雄性 C57BL/6J あるいは C57BL6/NCrSlc マウスについて、先行研究において取得済みの、溶媒(0.1%DMSO 添加 0.5%MC)を単回投与した際、及びクロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 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。解析の結果、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。その他、現時点では、DNA メチル化状態が顕著に変化している部位は見いだされていないが、引き続き微細に DNA メチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。

なお、Bisulfite 処理後のゲノム配列のマッピング計算は非常に複雑であり、1 サンプルあたり 1 週間ほどの時間が掛かり、解析上のボトルネックとなっているため、

これについても解析パイプラインの最適化等、今後、改善策を検討する。

#### D. 考察

現在までの結果では、化学物質を反復投与したマウスを N=3 で、網羅的に DNA メチル化解析を行っている。N=3 の全ての個体で DNA メチル化が変化する領域は見いだされていないが、N=1 および N=2 で DNA メチル化が変化する領域は得られている。網羅的に DNA メチル化解析を行っているが、シーケンスされる領域にはばらつきがあり、リード数の少ない領域も存在する。リード数が少ないことが原因で、N=3 で DNA メチル化が変化する領域を見いだせていない可能性も考えられる。対策としては、N=2 もしくは N=1 で検出させた DNA メチル化に変化が見出されたゲノム領域については、各領域ごとに個別に PCR プライマーを設計し、DNA メチル化をより詳細に解析する方法か、DNA メチル化が遺伝子発現に重要な領域として、CpG アイランドのゲノム DNA を濃縮した上で、DNA メチル化解析を行い、CpG アイランドのリード数を大幅に増やす（数十倍）方法が有効と考えられる。

#### E. 結論

平成 27 年度は、先ず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された。次いで、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した。その結果、顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数検出した。

平成 28 年度は、クロフィブレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態につき網羅的に解析した。その結果、四塩化炭素と同様に、顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数検出した。

平成 29 年度は、引き続き微細に DNA メチル化状態が変化する領域のスクリーニングを検討する。この微細に DNA メチル化状態が変化する領域を検出する手法として Bismark および BSMAP を検討中である。また、測定時間の短縮化に向け、解析パイプラインの最適化等、改善策を検討する。加えて、DNA メチル化には影響していないが、ヒストンアセチル化状態に影響している可能性も考えられることから、ヒストンアセチル化の網羅的解析についても検討を進める。

なお、次世代シーケンサーの試薬が ver2 にアップグレードしている為、この試薬の性能評価を行う目的で、ver1 の時と同様に 1 フローセルを使用して、2 サンプル（クロフィブレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩）の網羅的メチル化解析を行なう。

これらの検討結果により、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る。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and memory deficits in male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. *Front Neurosci* 10: 339- ,2016.

### 2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity.

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016.10.3), Merida, Mexico

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 -

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi

Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study.

The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016.9.6), Seville, Spain.

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純  
キシレンの経気道吸入曝露によるマウス行動影響解析

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30)

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純  
キシレン吸入曝露によるマウスへの中枢機能影響解析

第 159 回日本獣医学会学術集会(2016.9.)

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Double strand break repair by capture of unintentional sequences, an emerging new risk for the leading-edge technology.

Keystone Symposia Conference / Precision Genome Engineering (2017.1.10), Breckenridge, USA

## 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

厚生労働行政推進調査事業費（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<sup>1</sup> 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<sup>2</sup>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。

本分担研究では平成 27 年度と同様、引き続き ( a ) 化学物質の反復暴露におけるノンコーディング RNA(ncRNA)の発現変動解析、及び ( 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。

今年度、( a ) では、ncRNA のうち、長鎖 ncRNA など、成熟マイクロ RNA<sup>3</sup>以外の転写産物について total RNA-Seq による解析を進めた。平成 27 年度に測定済みの四塩化炭素[14+1]<sup>2</sup>の解析に加え、平成 28 年度は、四塩化炭素[4+1]やバルプロ酸ナトリウム塩[14+1]及び[4+1]、クロフィブレート[14+1]、アセトアミノフェン[4+1]について、total RNA-Seq を行い、発現変動解析を進め、有意な変動のあった転写産物、特に ncRNA を抽出した。

( b ) では、公開サイトの RESTful サーバアプリケーションソフトウェアのセキュリティ強化を進めた。

-----  
(\*1) 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。

(\*2) 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。表記については単回投与の場合を[0+1]、14日間反復投与し最終投与1回を行う場合を[4+1]と記す。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。

(\*3) 成熟マイクロRNAについては短鎖であるため他とは別に抽出する必要があるため平成29年度に先送りとした。

## 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

平成 27 年度に実施した最適化プロトコルにより、平成 28 年度は先ず成熟型マイクロ RNA 以外\*の転写産物について次世代シーケンサーによる網羅的解析を進めた(\*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、通常のメッセンジャー RNA ( mRNA ) や長鎖ノンコーディング RNA ( lincRNA ) と同時に定量性を保ったまま精製出来ないため)。

使用したマウス肝サンプルは、5mm 径の生検トレパンにより切り抜いた組織片をチューブに採取し、採取後すみやかに RNA later ( Ambion 社 ) を加えて 4 で一晩浸漬して、RNase を不活化、その後、-80 にて保存していたものである。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy Kit ( Qiagen ) 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、DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Graded-dose Spike cocktail ( Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を公比 3 で混合した溶液 ) を適量添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットにより全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無などの品質を確認した。

RNA-Seq には Illumina 社の次世代シーケンサー 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 を用いて、全 RNA から調整した。NextSeq500 によるシーケンス処理はメーカーの標準手順に従って実行した。

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 FPKM データは、マイクロアレイと同様に、SCal4.exe を用いて絶対量化した。データ解析にはマイクロアレイと同様に独自開発のソフトウェア群 ( MFtools ) を使用し、アノテーション付与には Ensembl BioMart を利用した。

## 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

### (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 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、成熟すると約 20bp 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。平成 27 年度のプロトコル検討により、生体サンプルからの RNA を精製する場合、RNA 鎖長により効率が異なり、定量性を保ったまま、短鎖の成熟型マイクロ RNA とそれ以外 ( mRNA や長鎖ノンコーディング RNA、マイクロ RNA 前駆体など ) を同時に抽出する事は困難であることが判明している。

そこで平成 28 年度はより多くの情報を取得することを優先し、スプライシングバリエーション情報も含むメッセンジャー RNA と長鎖ノンコーディング RNA など、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物の測定、解析を進め、四塩化炭素 ([ 14+1 ] 及び [ 4+1 ] )、バルブプロ酸ナトリウム塩 ([ 14+1 ] 及び [ 4+1 ] )、クロフィブレート ([ 14+1 ] )、アセトアミノフェン ([ 4+1 ] ) について、次世代シーケンサー NextSeq500 による測定を実施した。

シーケンスデータは bcl2fastq で FASTQ ファイルに変換した後、Tophat2 で GSC 配列を追加したマウスゲノム ( mm10 ) にマッピングし、Cufflinks にて FPKM 計算を行った。さらに破砕液の段階で DNA 含量に対応した量を添加した外部スパイク ( GSC ) の FPKM から疑似検量線を生成し絶対量化計算を行う一連の処理を、SCal4.exe を用いて実行した。

本研究では、反復暴露における基線反応の分子機序解

析を行うため、新型反復暴露プロトコルに従って化学物質を強制経口投与したマウスの肝臓サンプルのうち最終投与後 2 時間の溶媒群と、同じ溶媒を用いて単回投与実験を行ったマウスの肝臓サンプルのうち投与後 2 時間の溶媒群とを比較した。比較解析では、t 検定で有意 ( $p < 0.05$ ) となり、変動率が 1.5 倍若しくは 0.67 倍となる転写産物を抽出した(表 1)。

		total	lincRNA	miRNA	snRNA	snoRNA	
CCI4	14+1	Up	591	26	0	7	0
		Down	230	6	0	0	0
	4+1	Up	48	3		1	1
		Down	1056	29	1	8	2
VPA	14+1	Up	65	2	0	1	0
		Down	330	5	3	3	5
	4+1	Up	24	2	0	0	4
		Down	2260	50	3	2	2
Clofibrate	14+1	Up	239	13	0	1	3
		Down	443	19	0	7	0
Acetaminophen	4+1	Up	37	2	0	2	6
		Down	2817	62	1	2	1

表 1. 各化学物質の反復暴露によって基線反応に変動を呈した転写産物の件数

また、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、マッピングに用いるカスタムゲノムやアノテーション情報の最適化を進め、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の改良を進めた。

#### (b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

オンライン化された Percellome 専用解析ソフトウェアのうち、Percellome データベースを参照するソフトウェアは、Percellome 公開サイトに REST 形式でアクセスし、JSON フォーマットのデータを取得する。Percellome 公開サイトにおいて、この仕組みを担っている RESTful サーバーアプリケーションソフトウェアにおいて、潜在的なセキュリティリスクが発見されたため、この対処を進めた。

#### 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、クロフィブレートの新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。

平成 28 年度の研究の結果、長鎖 ncRNA (lincRNA) を中心として複数の転写産物を抽出したが、それらの大半は詳細が知られていないものが多く、反復暴露影響の成立機序への関与は不明であったため、引き続き情報収集を行う事とした。

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、基盤となる公開サイトのセキュリティ強化を進めたことで、利用者の利便性/安全性を向上させつつある。

#### 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 28 年度までに四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム塩、クロフィブレート、アセトアミノフェンによる新反復暴露の RNA-Seq を終え、成熟型マイクロ RNA 以外の転写産物についての発現データを得た。平成 29 年度は取得済みのデータの詳細な解析を進めつつ、成熟型マイクロ RNA の測定を行う。

「Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進」において、平成 28 年度は基盤となる公開システムのセキュリティ強化を進め、安定運用を維持した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表(抜粋)

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J., Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period., Front Neurosci. 2016

Jul 20;10:339.

## 2. 学会発表 (抜粋)

Satoshi KITAJIMA, Ken-ichi AISAKI, Jun KANNO, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity, 第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29) 名古屋、日米毒性学会の交流促進プログラム、口演

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復暴露の比較による予測性向上 -、第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1) 名古屋、シンポジウム、口演

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016) (2016.9.6)、Seville, Spain, poster

Kitajima S, Aisaki KI, Kanno J, Percellome project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement., 第 14 回国際毒性学会 (ICT2016) (2016.10.3), Merida, Mexico, Round table, Oral

## 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

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

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 の開発を進め、実際のゲノクスデータを用いた検証を進めた。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開発したソフトウェアの一層の強化(軽量化、高速化)と Garuda プラットフォーム上への実装、一般公開を進めた。

#### 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曝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。

#### B. 研究方法

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效果を考える際に、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な解析を行わざるを得ない。これが、今まで複合的な曝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曝露の計算予測ができると期待される。

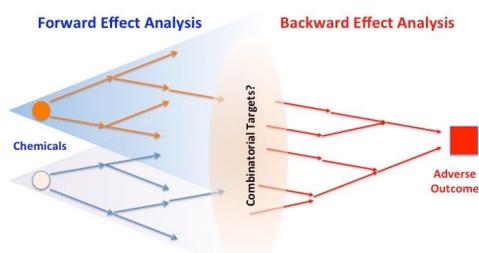


図 1 : Forward Effect Analysis と Backward Effect Analysis の融合

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。

#### (A) 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。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 レベルに連動させる必要がある。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。

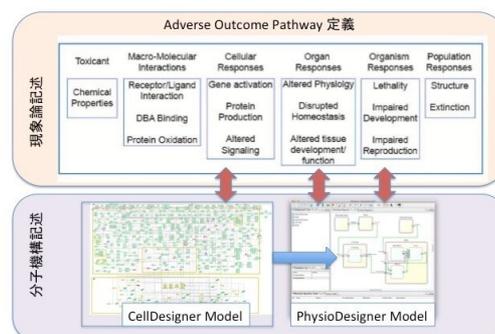


図 2 : 現象論的記述が主体の AOP 定義と分子機構記述モデルとの連携

#### (B) 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

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、複雑な毒性データのノイズに対処できる解析手法の確立を目的として、予測を行うのに適切でない情報を取り除く手法(特徴量抽出アルゴリズム)を実装した。また、データの複雑さに対してより適切に対処するために、多数の新しいmachine learningの手法の実装を行い、ensemble learning systemを拡張した。さらに、実装した特徴量抽出アルゴリズムとensemble learning systemの予測精度の検証を、化合物の構造情報とその化合物が抑制するシグナル伝達パスウェイに関するデータベースを用いて実施した。その結果、今回構築した解析システムにより、ある化合物の構造の情報から、その化合物がAhR nuclear receptorシグナリングパスウェイを抑制するかどうかについて、

精度の高い予測が出来ることを確認した。

#### (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とSHOEのGaruda Platform上への実装を行い、引き続き機能強化を行った。これらのソフトウェアの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。今回は、特にプロモーター領域のホモロジー解析を行うツールSHOEの機能強化(軽量化及び高速化)に注力した(図5)。

Garuda Dashboard



図4: Garuda Dashboard上のACGT, SHOEとこれらに密に連動するCellDesignerのアイコン

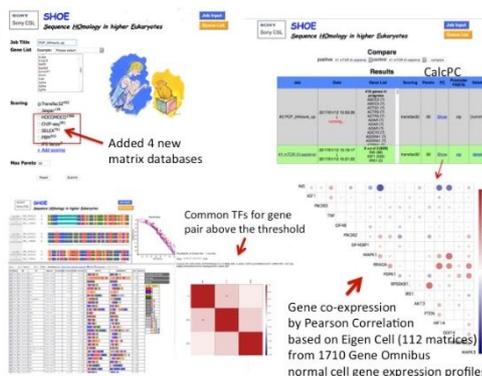


図5: SHOEの機能概要

### C. 研究結果

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



また、情報を絞り込むため、予測を行う際の計算量を低減させることが出来る。

今回、3 4 種の特徴量抽出アルゴリズムを実装した(表 2)。この内、10 種のアロリズムは、特徴の重要度を推定する、Relief アルゴリズムである(図 7)。

MyopicReliefF	UniformAccuracy	EqualGini
ReliefFavgC	UniformDKM	EqualHellinger
ReliefFbestK	UniformGini	EqualInf
ReliefFdistance	UniformInf	GainRatioCost
ReliefFexpC	Accuracy	ImpurityEuclid
ReliefFmerit	DistAngle	ImpurityHellinger
ReliefFpa	DistAUC	InfGain
ReliefFpe	DistEuclid	MDS
ReliefFmp	DistHellinger	
ReliefFsqrDistance	DKM	
ReliefKukar	DKMcost	
Relief	EqualDKM	

表 2 : 今回実装を行った特徴量抽出アルゴリズム

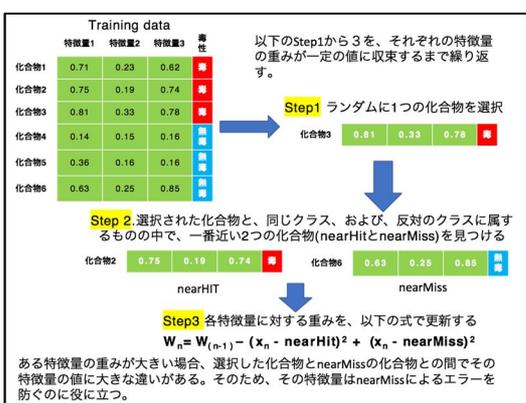


図 7 : 特徴量抽出アルゴリズム(Relief)

この図に示すように、Relief アルゴリズムは、3つの手順で構成される。まず、手順1では、データからランダムに1つの化合物を選択する。手順2では、選択された化合物と、同じクラス、および、反対のクラスに属するものの中で、一番近い2つの化合物(nearHit と nearMiss)を見つける。nearHit と nearMiss に注目するのは、この2つの分類は間違えやすく、この2つを正確に分類することが、精度の高い予測のために重要であるからである。この2つを正確に分類できる特徴量に、図7の式に従って、大きな重みをかける。手順3で、このウェイトを全ての特徴量について更新する。それぞれの特徴量の重みが一定の値に収束するまで、手順1、2、そして、3を繰り返す。

ある特徴量の重みが大きい場合、選択した化合物と nearMiss の化合物との間でその特徴量の値に大きな違いがある。そのため、その特徴量は nearMiss によるエラーを防ぐのに役に立つ。この例では、特徴量1が、nearHit と nearMiss を正確に区別するのに、最も有用なものとなる。

(A), (B)を統合した解析システムを構築した(図8)。この解析システムでは、まず、入力データに対して特徴量抽出を行う。その後、抽出した特徴量に対して、多数の machine learning アルゴリズムを並列で走らせ、その結果を統合して予測を行う。

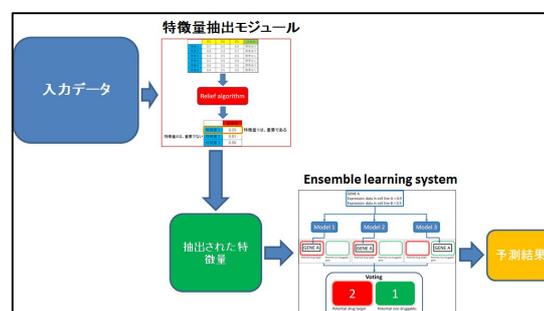


図 8 : 特徴量抽出と ensemble learning system を基にした統合解析システム

今回、化合物の構造情報とその化合物が抑制するシグナル伝達パスウェイに関するデータベース (TOX21, <https://tripod.nih.gov/tox21/challenge/>) を用いて、我々の解析パイプラインの精度の検証を行った(図9)。

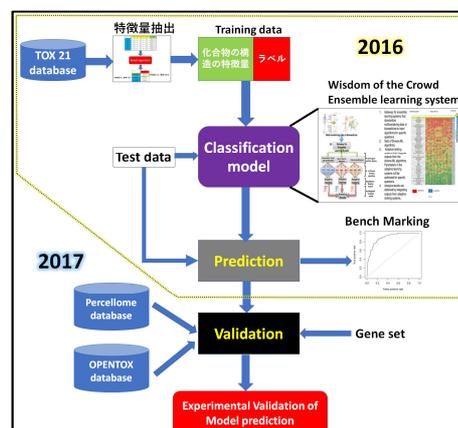


図 9 : Tox21 データベースを使用した解析システムの予測精度の検証

このデータベースには、12,707 の化合物 トレーニングデータとしては 12,040 化合物が、テストデータとしては 647 化合物が与えられている) の構造に関する情報と、これらの化合物が、AhR nuclear receptor signaling pathway を抑制するかどうかについての情報が含まれる。検証の結果、今回開発した、我々の解析システムの予測精度については、area under the ROC curve の値が 0.901 であった (図 10)。これは、TOX21 challenge 2014 の全参加チーム (35 チーム) の内、上位 4 位に位置する精度である (一位のチームが 6 つモデルを提出しているため、モデルでの順位は 9 位である)。以上の結果は、我々の解析システムが、ある化合物の構造の情報をもとに、その化合物がシグナル伝達パスウェイを抑制するかどうかについて、正確に予測出来る可能性があることを示唆する。

今後、実装した解析システムを、大規模な毒性データ (PerceLLome データベース) に対して使用し、それぞれの化合物の毒性に関わる重要遺伝子の推定に用いる予定である。また、2017 年度は、今年度に TOX21 データに対して作成したモデルの精度について、PerceLLome データや OPENTOX データなどの毒性に関するオミックスデータを用いて詳細に検証を行う (図 9)。さらに、今後、deep learning の手法を実装し、ensemble learning system の拡張を行う予定である。

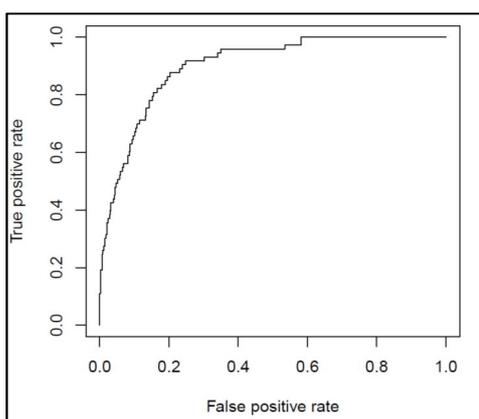


図 10 : 我々の解析システムの予測精度の検証結果

## (2) ゲノム解析とその関連データベースの整備

先行研究で作成したソフトウェアのうち、特にプロモーター領域のホモロジー解析を行うツール SHOE の機能強化 (軽量化及び高速化) を検討し、同時に Garuda Platform 準拠を完了した。

例えば、複数の遺伝子間の共通の MOTIF の柔軟な解析を可能とするなどの機能を拡張した。(図 11)

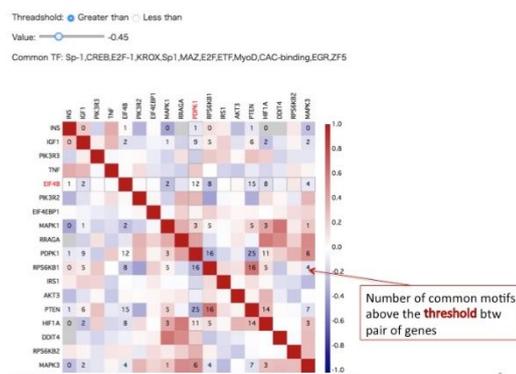


図 11 : SHOE の共通 MOTIF 解析機能

さらに、GARUDA 上に実装されたことにより、PerceLLome データベースから、SHOE に解析対象遺伝子群リストが、送られ、それらの共通 MOTIF 解析が実施される。(図 12)

## PerceLLome gadget sends data to SHOE

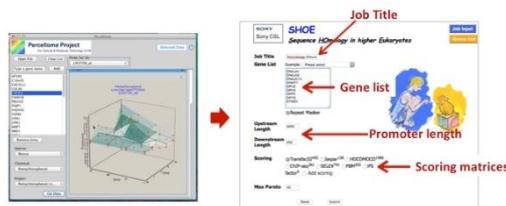


図 12 : PerceLLome から SHOE への連携

抽出された遺伝子リストを PerceLLome ガジェットから受け取った SHOE は、共通 MOTIF 解析、ホモロジー解析など一連の解析を行う。(図 13)

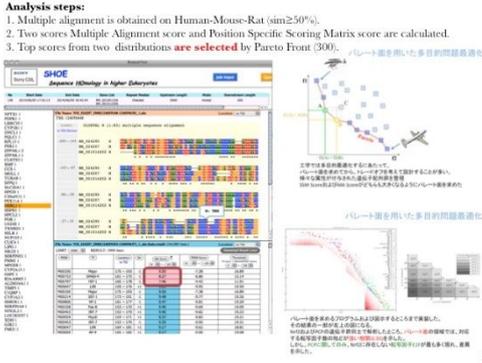


図 1 3 : SHOE での解析例

この結果を用いて、Reactome データベースから関連する Pathway のデータを取得して、それを CellDesigner に送り、Pathway 解析を可能とした。(図 1 4)

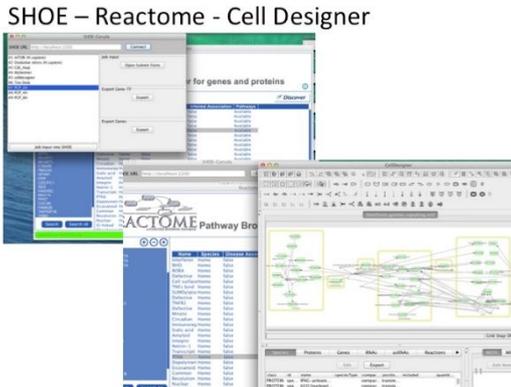


図 1 4 : SHOE-Reactome-CellDesigner の連携

この段階で、Percellome, Shoe, Reactome, CellDesigner という四つの別個に開発されたソフトウェアの連動が実現している。

さらに、この途中のプロセスで、特定の遺伝子に関する詳細情報を参照しようと思えば、Garuda 上の遺伝子関連データベースなどにアクセスし必要な情報を得ることができる。その一例として、SHOE から Wolfram alpha を利用している状態を示す (図 1 5)

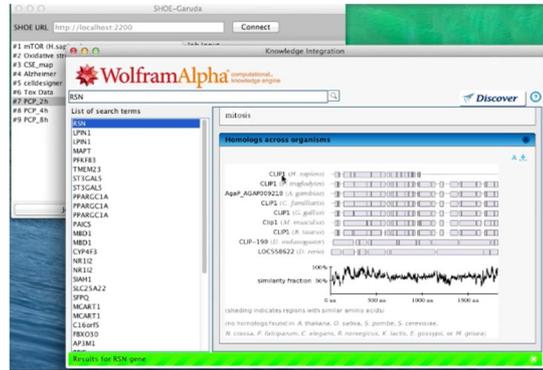


図 1 5 : SHOE から Wolfram Alpha を利用して、遺伝子関連情報を参照している。

さらに Garuda 2.0 では、これらの連続した作業プロセスのログがとられ、それをレシピ化することができる。(図 1 6)



図 1 6 : Garuda レシピ

さらに、ACGT に関して一連の機能強化を行った。ACGT は、Garuda platform に完全準拠となり広範なソフトウェア群との連動が可能となった。(図 1 7)

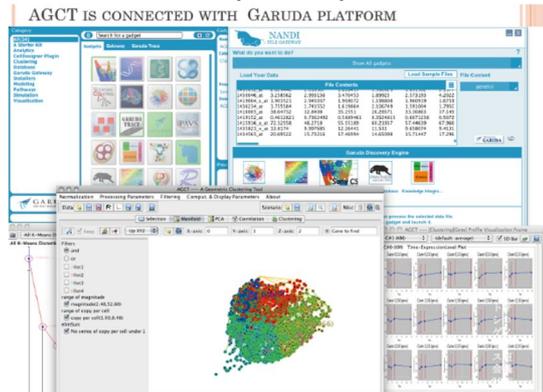


図 1 7 : Garuda 準拠した ACGT

また、従来の高次多様体の 3 次元表示から、2 次元上でのクラスタリング表示が可能となった。これにより、クラスター関連などから機能構造の推定などが容易になると

考えられる。(図18)

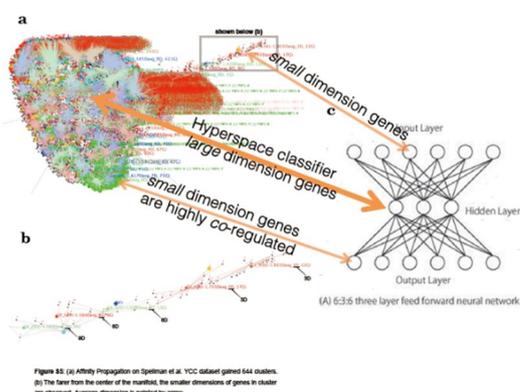


図18: ACGT解析から機能構造の推定

この際、詳細な議論のためには、精密な Pathway 解析が必要となるが、これは、すでに Garuda 化されている CellDesigner と連動することで、可能となる。

#### TCDD-TCDF GENE CLUSTERING AUTOMATICALLY LOADED ON CELLDISIGNER

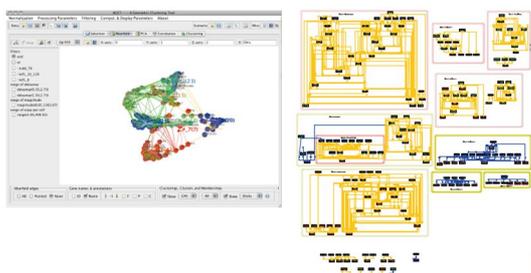


図19: ACGTでの解析から抽出された遺伝子群を CellDesigner 上にマッピングし精密な Pathway 解析を行う。

#### D. 考察

複雑な毒性機序の解析に対応する ensemble learning system の開発を継続し、精度や感度の性能向上を確認した。また一般公開に向けて既存の解析ソフトウェアの機能強化(軽量化、高速化)と Garuda Platform 準拠による他ソフトウェアとの連動性強化を実施し、一般向けの版をリリースしてオープン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。

#### E. 結論

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、一般向けのリリース版も完成した。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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kun-Yi Hsin; Yukiko Matsuoka; Yoshiyuki Asai<sup>1</sup>; Kyota Kamiyoshi; Tokiko Watanabe; Yoshihiro Kawaoka and Hiroaki Kitano. systemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis. Nucleic Acids Research. doi: 10.1093/nar/gkw335, published online Apr. 29, 2016.

##### 2. 学会発表

北野宏明. システム毒性. 第105回日本病理学会総会, 診療領域別講習会特別プログラム研究講演会10, 病理学を基盤とした生物学・システムバイオロジーとの融合による毒性学の最適化: Phenomics から Genomics へ、そして Phenomics へ, 仙台国際センター, 宮城, May 13, 2016. (invited)

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. 第327回CBI学会講演会 システムバイオロジーの最新動向, 東京大学山上会館, 東京, May 24, 2016. (invited)

北野宏明. Garuda Platform for Open Innovations in Systems Medicine. 第43回東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム「マルチオミックス解析から医療へ」, 東京大学医科学研究所附属病院, 東京, June 4, 2016. (invited)

北野宏明. 疾患とシステムバイオロジー. 第17回 Atherosclerosis and Biolipid Conference, ヒルトン東京お台場, 東京, Aug. 6, 2016. (invited)

北野宏明. システムバイオロジーの展

開と Human Immunology への可能性. 第  
44 回日本臨床免疫学会総会, 京王プラ  
ザホテル, 東京, Sep. 8, 2016.  
(invited)

北野宏明. システムバイオロジーの可  
能性. 日本神経消化器病学会、消化器  
心身医学研究会、機能性ディスペプシ  
ア研究会、IBS 研究会 合同学術集会  
2016, 北海道大学医学部学友会館 フ  
ラテ, 北海道, Sep. 9, 2016.  
(invited)

## G. 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kanno J.</u>	Introduction to the concept of signal toxicity.	J Toxicol Sci.	41	SP105-SP109	2016
Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, <u>Kanno J</u> , Tanaka K.	The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain }R regulates NF- B Signaling.	Mol Cell	64	251-266	2016
Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka M, <u>Aisaki K</u> , <u>Kitajima S</u> , Kitagawa M, <u>Kanno J.</u>	Learning and Memory Deficits in Male Adult Mice Treated with a Benzodiazepine Sleep-Inducing Drug during the Juvenile Period.	Front Neurosci.	10	339	2016
<u>Fujimoto N</u> , <u>Kanno J.</u>	Increase in prostate stem cell antigen expression in prostatic hyperplasia induced by testosterone and 17 -estradiol in C57BL mice.	J Steroid Biochem Mol Biol.	158	56-62	2016
Kun-Yi Hsin; Yukiko Matsuoka; Yoshiyuki Asai; Kyota Kamiyoshi; Tokiko Watanabe; Yoshihiro Kawaoka and <u>Hiroaki Kitano.</u>	systemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis.	Nucleic Acids Research	44	W507-W513	2016