

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 -

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

平成 30 (2018) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告		
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 -	-----	1
菅野 純		
II . 分担研究報告		
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	-----	19
菅野 純		
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	-----	25
北嶋 聡		
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Perce llome専用解析ソフトウェアの		
オンライン化促進	-----	36
相崎 健一		
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	-----	42
北野 宏明		
5 . Perce llomeデータベースを利用した解析パイプライン	-----	50
夏目 やよい		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	55

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
平成 29 年度 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
— 新型反復曝露実験と単回曝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 Percellome*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。

特に平成 24～26 年度に実施した「新型」反復曝露実験**により、化学物質の反復投与による生体影響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曝露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

この技術開発の為に、分子生物学・分子毒性学の専門家とバイオインフォマティクスの専門家の緊密な共同研究体制の下、以下の 6 研究を実施した。

- (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
- (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
- (3) 化学物質の反復曝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) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進
- (6) Percellome データベースを利用した解析パイプライン

(1) では、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 ナトリウム、平成 28 年度のサリドマイド及びフルオロウラシル (5-FU) に続き、平成 29 年度はアセフェート及び五塩化フェノールに対し「新型」反復曝露実験セット、網羅的遺伝子発現解析を行い、前者は反復による影響が軽微な事例、及び、後者は単回曝露で過渡反応を示した遺伝子の発現が、反復曝露により常時誘導状態へと移行する機序の存在を示唆する事例を得て、今までの小胞体ストレス系に加え、ミトコンドリア/代謝系、細胞回転制御系、など、複数の系の相互作用によるより複雑な制御の存在が示唆された。

(2) では、平成 28 年度までに DNA メチル化解析手法の性能評価、最適化を行い、Accel-

NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサを用いた手法により、四塩化炭素、クロフィブレート、バルプロ酸ナトリウムによる DNA メチル化状態を網羅的に検討した。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領域は見いだされなかったが、微細に DNA メチル化状態が変化した領域を複数抽出した。平成 29 年度は化学物質の反復投与がヒストンのメチル化・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、この網羅的解析をおこなった。具体的には、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイと次世代シーケンサを組み合わせ、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) 法を利用して、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析を進め、有意な変動を示す領域を捉えた。

(3) では、平成 28 年度までに短鎖 RNA-Seq のための最適化と、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレート、アセトアミノフェンについて、RNA-Seq 解析を進め、発現変動を呈したメッセンジャーRNA や長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) を中心とした転写産物を抽出した。平成 29 年度は 20bp 前後の短鎖となる成熟型 miRNA を対象とした RNA-Seq (miRNA-Seq) を四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレート、アセトアミノフェンについて進めた。平成 28 年度の lncRNA の測定結果を合わせて解析し、反復曝露の成立機序への関与が推測された分子の網羅的抽出と、それらによる分子機序の詳細検討を進めた。

(4) では、毒性機序の複雑性に対応すべく、平成 28 年度までは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、実際のゲノミクスデータを小数用いた検証を進めた。平成 29 年度はさらに deep learning system を導入し、Perccellome データの自動解析の実現のための基盤開発を進めた。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 in house 開発した解析ソフトウェアのより一層の強化 (軽量化、高速化) と Garuda プラットフォーム****上への実装を進め、一般公開を開始した。

(5) では、継続的に Perccellome データベース及び公開サイトのセキュリティ強化を中心とした改良を進め、研究成果のデータベースの公開を維持しつつ、平成 29 年度には実際の攻撃を模したペネトレーションテストを通過した。また先行研究で開発した解析ソフトウェア群 MF-Tools については、平成 29 年度には要となる解析ソフトウェア PerccellomeExplorer のオンライン化について検討を行い、基本的な構成方針を定めた。

(6) は、開発したシステムの実用性検証のため、平成 29 年度に追加された分担研究であるが、モデルとしてバルプロ酸ナトリウムの多臓器における遺伝子発現データを採用し、in house 開発の解析ソフトウェアや Garuda ガジェットを利用して一連の解析を実際に行い、新規知見を得た。またこの過程で判明した改善指針は研究班内で共有し、今後のソフトウェアアップデートに反映する。

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。実験の反復曝露と単回曝露の回数をもとに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。
 - (***) 先行3年間の研究により、反復曝露による生体影響は分子レベルでは、曝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オンライン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

夏目やよい 国立研究開発法人医薬基盤・健康・
栄養研究所 バイオインフォマ
ティクスプロジェクト
研究員

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6.5億遺伝子発現情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベースと単回曝露時の毒性ネットワーク解析技術を基盤に、これらを維持・拡充しつつ、反復曝露のネットワーク解析、及び、その予測評価技術を開発する。ここにインフォマティクス専門家によるシステムトキシコロジーの概念を導入し、反復曝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】

●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 (Phenobarbital sodium salt; 分子量: 254.22、Cas No.: 57-30-7、純度 99%以上、Sigma-Aldrich)、サリドマイド (thalidomide; 分子量: 258.23、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: 130.08、Cas No.: 51-21-8、純度 99.8%、東京化成)、五塩化フェノール (pentachlorophenol (PCP); 分子量 266.34、Cas No.: 87-86-5、純度 99.7%、和光純薬)、アセフェート (acephate; 分子量: 183.2、Cas No.: 30560-19-1、純度 99.5%、和光純薬) について、単回投与の既存データの解析を進めた。単回曝露 (0 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記) 時の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、サリドマイド、フルオロウラシル、五塩化フェノール、アセフェートの投与量はそれぞれ 0、18、60、180 mg/kg 及び 0、15、50、150 mg/kg、0、

100、300、1000 mg/kg、0、30、100、300 mg/kg、0、10、30、100 mg/kg、0、7、20、70 mg/kg である。

「新型」反復曝露実験を、4 日間反復曝露 (4 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[14+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、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の 0、18、60、180 mg/kg とした。以下、同様に、フェノバルビタール ナトリウムの 4 回反復投与の用量は 30 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、15、50、150 mg/kg、サリドマイドの 4 回反復投与の用量は 700 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、100、300、1000 mg/kg、5-フルオロウラシルの 4 回反復投与用量は 7 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、30、100、300 mg/kg、五塩化フェノール 4 回反復投与の用量は 70 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、10、30、100 mg/kg アセフェート 4 回反復投与の用量は 10 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、7、20、70 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%メチルセルローズ水溶液とし、金属ゾンデ及びガラス製シリンジ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。

●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°C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°C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。

●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、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られた肝サンプルについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現データを、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトウェアは、各遺伝子 (probe set: ps) につき、用量、経時変化及び遺伝子の発現コピー数を各軸とした 3 次元グラフにおいて、発現を表す平面の凹凸を評価し、全ての ps を生物学的に有意な順に並び替えるソフトである。これにより抽出された、有意に変動する ps について目視による選択を行い、生物学的に有意と判定される変化を示した ps を解析に使用した。シグナルネットワークの探索は、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.) を用いて検討した。

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

●次世代シーケンサを用いた 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 °C 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 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。

●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

四塩化炭素を14日間反復投与した後、溶媒(コーンオイル)を投与し2時間後のマウス肝臓および、溶媒(コーンオイル)を単回投与した2時間後のマウス肝臓のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証し、反復曝露によるクロマチン修飾の変化を明らかにする。各マウス肝臓(30 µg)を材料として、4 µl (30 µg)の抗ヒストン H3K4me3 抗体 (Active Motif, cat # 39159) (H3K4me3: 転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 4 トリメチル化)、2) 4 µl (30 µg) の H3K27Ac3 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac3: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、3) 4 µl (30 µg) の H3K27me3 抗体 (Active Motif, cat # 39155) (H3K27me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化)、4) 5 µl (30 µg) の H3K9me3 抗体 (Active Motif, cat # 39161) (H3K9me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 9 のトリメチル化)、および Input (抗体無しコントロール) を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。その際、サンプル間の補正を行うために、*Drosophila* のクロマチンが spike in として添加されている。ChIP 後の DNA は、それぞれの抗体に対する既知の陽性コントロールおよび陰性コントロールを qPCR により定量し、そのクロマチン免疫沈降の有効性の定量を行う。

クロマチン免疫沈降の有効性の確認ができた ChIP DNA より次世代シーケンサ解析用のライブラリーを作成し、75 bp のシングルリードで網羅的シーケンサ解析を行った。シーケンス結果は、マウス標準ゲノ

ム (mm10) に対してマッピング後に in silico で 200 bp まで各リードを延長し、SICER アルゴリズムを用いてピークコール (ピーク検出) を行う。SICER アルゴリズムは default のパラメータ ($p=1e-7$ (narrow peak), $p=1e-1$ (broad peak)) を用いる。各サンプルは、*Drosophila* DNA 断片のリード数により補正を行う。

(3) 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】

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、本分担研究は、まず各 total RNA 抽出キットの RNA 鎖長別の収率、品質、及び再現性の評価から始めた。平成 27 年度には、RNA 抽出キットである RNeasy Kit (Qiagen)、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN)、ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics) や、次世代シーケンサーメーカー製のライブラリ調整キット TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation Kit 及び TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit を用いて、収率や品質などを参考に、最適化を行った。平成 28 年度は前年度に最適化したプロトコルを用い、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による網羅的解析を進めた。平成 29 年度は 20bp 前後の短鎖 RNA である成熟型マイクロ RNA の次世代シーケンサを用いた発現変動解析を実施するため、先ず短鎖 RNA で構成される専用 Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類を基に短鎖 RNA 5 種を合成し、これらの濃度を変えて混合した溶液) を調整した。さらにこの専用 Spike cocktail を添加して成熟型マイクロ RNA の定量発現変動解析を進めた。

次世代シーケンサには Illumina 社の NextSeq500 を用いた。シーケンサするライブラリーは同社の TruSeq

シリーズを用いて作成した。なお totalRNA から短鎖 RNA を抽出する際は BluePipin (SageScience) を使用した。

次世代シーケンサデータの数值化等、データ処理には、Percellome 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 (長鎖 RNA 解析の場合) 或いは、Bowtie2、Cufflinks (短鎖 RNA 解析の場合) を利用した。Cufflinks から出力された FPKM データは Percellome 手法による絶対量化計算は、マイクロアレイのデータ処理と同様に、独自開発の SCal4.exe 若しくは AGNCalc.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】

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

(a) 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。しかしながら、この様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。

平成 28 年度までの Ensemble Learning 手法に加え、平成 29 年度は、Deep Learning 手法を利用して、Percellome データベースから、一定の特徴量を認識して分類する問題を設置して、その実現可能性を検討した。

Percellome データベースでは、化学物質投与下の遺伝子の発現情報を画像で表す。これまで、Percellome データベースの解析では、化学物質投与下における有意な遺伝子を同定するために、長年経験とトレーニングを積んできた研究者が、それぞれの遺伝子の発現パターンの画像を目視にて判別を行ってきた。しかしながら、Percellome データベースは、100 以上の化学物質それぞれに対し、40,000 以上のプローブの発現データが含まれており、400 万以上の発現データを記述した画像で構成されている。この様な、大量の画像の全てを目視で有意な遺伝子を判別するためには、多大な労力と時間が必要となる。

ところで、近年、機械学習の手法の発展は目覚ましく、機械学習を用いた画像解析の手法も数多く開発されつつある。特に、deep learning の手法の発展はめざましく、分野によっては、人間の能力を超えつつある (David Silver et al (2006) Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. Nature 529:484 – 489.)。例えば、deep learning の技術を使用した画像解析については、非常に高精度に皮膚がんの分類を行うことのできる deep learning モデルが、発表されている (Andre Esteva et al. (2017) Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. Nature 52:115-118)。

そこで、平成 29 年度、我々は、Percellome データベースの画像データから、効率良く有意な遺伝子を判別する手法の構築を目的として、最新の多数の層で構成される deep learning algorithm を用いた、画像解析システムの実装を行った。実装した deep learning に基づく画像解析システムの予測精度の検証を、熟練した研究者が目視判別によって作成した画像データセットを用いて行った。

(2) ゲノム解析とその関連データベースの整備
毒性分子機序解析を高精度で効率良く進めるためには、ゲノム関連のデータベースとの連携をより緊密にし、例えば、上記 Deep Learning で、同定された遺伝子リストなどからネットワークや転写因子群 (TFs) を同定して、そこから毒性の推定を行うなど

の一連の処理が必要となる。

この領域では、従来から開発を行っていた SHOE の Garuda プラットフォーム上への実装を引き続き行い、さらに機能強化と連携の拡大を行い、同時に Garuda プラットフォーム準拠を完了して、これらの一連の処理に関わる連携を実現した。

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

ソフトウェアの in house 開発に際しては、開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、Win32/64 開発は RAD (Rapid Application Development) 対応の Delphi (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。データベースエンジンには組込型の DBISAM (USA, Elevate Software, Inc.) を、一般的なグラフ描画には TeeChart (Spain, Steema Software SL) を利用した。

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

解析データとしては Percellome データベースより、バルプロ酸ナトリウムを投与したマウスの複数の臓器における遺伝子発現プロファイルを使用した。これらのデータはマウス (C57BL/6、12 週齢、オス) にバルプロ酸ナトリウム (0、50、150、500 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2,4,8,24 時間後に脳 (大脳皮質及び海馬)、肺、心臓、肝臓、腎臓を回収してマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供して生成したものである。このデータは Percellome 法により正規化され、Percellome データとしてデータベース化されている。データベース内での該当する Percellome データ検索、処理時間及び濃度依存的に発現変動が見られる遺伝子 (DEG) のリスト及び発現量の抽出には、in house ソフトウェア (PercellomeDB index、MF Surface、Rsort) を使用した。次に、TargetMine (<http://targetmine.mizuguchilab.org>) でヒトオーソログのリスト入手後に DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>)

で Ensembl gene ID に変換した。DEG の機能解析には Garuda プラットフォームを使用した。Garuda プラットフォーム上ではガジェットと呼ばれる対応ソフトウェアが多数搭載されている。その中で、Ensembl gene ID に対応するガジェットの検索には Nandi を使用した。入力した DEG と関連するパスウェイの検索とその描画に用いる XML ファイルのダウンロードには Biocompendium を使用し、この XML ファイルと Percellome データを用いてパスウェイ上の遺伝子の発現変動を可視化する際には Cytoscape を使用した。XML ファイルの入手ができないパスウェイ (“Metabolic Pathway”) の可視化には NaviCell を使用し、遺伝子発現量は “InsoSigMap: map of functional redundancies between informative gene sets” のパスウェイにマッピングした。その他の関連パスウェイの検索には Reactome および TargetMine を使用した。

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

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 29 年度は、アセフェート及び五塩化フェノールを検討した。

アセフェートは、反復曝露 [4+1] 実験も単回曝露 [0+1] 実験とほぼ同等の基線を維持している遺伝子が殆どであり、過渡反応を示す遺伝子のリスト及

び、それらの過渡反応の大きさには殆ど変化がなかった。これは、基線反応が増加を示す遺伝子にも低下を示す遺伝子にも該当する所見である。[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は殆ど認められなかった。その中であって、代謝酵素の一部については[4+1]において過渡反応が減弱するものが認められた。

2 時間目の誘導の上流に PXR/SXR 及び GR が位置し、時間の経過とともに PPAR も作動する様子が示された。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が変動することから、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響を示唆する遺伝子リストが含まれるとの出力が IPA 解析により得られた。また、発がん性を示唆する遺伝子群の発現誘導を伴っていた。

五塩化フェノールについては、殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線反応が上昇すること、基線反応上昇を示した遺伝子は単回曝露時に過渡反応を示したものと、及び、示さなかった遺伝子を多数含み、四塩化炭素の解析の際と同様に、その上流に RICTOR、HNF4A、NRF2 が位置し、EIF2 シグナル、ミトコンドリア機能異常、ユビキチン化経路の遺伝子発現に関わり、小胞体ストレスが誘発されていることが明らかとなった。尚、[0+1] の五塩化フェノールに特徴的であったインターフェロンシグナル遺伝子群はそのすべての過渡反応は[4+1]実験においては消失し、その多くは有意な基線反応の上昇を示していた。すなわち、この系の遺伝子群は、反復投与により常時誘導状態に置かれた可能性が示唆された(但し、実験の実施時期が離れていることから最終的な定量的確認は、少数の動物を用いての再現実験を必要とする可能性がある)。

注目されるのは、4 日間反復曝露により 5 日目の曝露に対する反応性が、単回時と大幅に変化した状態における、[4+1] 実験の 24 時間目に誘導される遺伝子群はインターフェロンシグナル系に属さないものの、その上流に、IRF7、IRF3、PTGER4 など、[0+1] 実験の際の上流と共通の因子が抽出される点で

あり、その共通性の解析を進める必要がある。

今回、五塩化フェノールが、過渡反応の消失という点で四塩化炭素類似の反応を示すことが判明したが、その基線反応の方向が逆である可能性があることから、常時誘導状態の存在とその成立機序の解析が新たな課題として浮上した。

(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(所謂エピジェネティクス)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を利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてエピジェネティックな変化を網羅的に検討する。

●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

四塩化炭素を 14 日間反復投与した後、溶媒(コーンオイル)を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒(コーンオイル)を単回投与した 2 時間後のマウス肝臓よりクロマチン免疫沈降を行なった結果、H3K4me3 抗体に関行った 22 倍、H3K27Ac 抗体に関しては 202 倍、H3K27me3 抗体に関しては 49 倍、H3K9me3 抗体に関しては 15 倍の濃縮が確認されたので、ChIP は正常に行われたと判断された。これらの ChIP 済み DNA よりライブラリーを作成し、次世代シーケンサによる 75bp のシングルリードの網羅的シーケンス解析を行ない、現在データについて解析中である。今までに得られた有効なデータは、H3K4me3 抗体に関してはコントロールが 16500 peaks 反復投与群が 15996 peaks、H3K27Ac 抗体に関してはコントロールが 20379 peaks、反復投与群が 20826 peaks、H3K27me3 抗体に関してはコントロールが 20927 peaks、反復投与群が 23816 peaks、H3K9me3 抗体に関してはコントロールが 29756 peaks、反復投与群が 31046 peaks となっている。H3K27me3 は、DNA メチル化非依存的に遺伝子発現

を抑制することが知られ、反復投与により 13%も peak 数が上昇していることから、反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していると考えられる。各 peak の網羅的解析に際して、溶媒対照群に対して増加あるいは減少(具体的にはそれぞれピーク高(各ピークにおける頂点部分においてマッピングされたリード数)が2倍以上、もしくは1/2以下)で、いずれかの高さ20以上、という条件にて抽出したところ、それぞれ(以下括弧内はピーク数で[増加、減少]をあらわす)、

抗 H3K4me3 抗体 (48、19)、
抗 H3K27Ac 抗体 (191、50)、
抗 H3K27me3 抗体 (160、1)、
抗 H3K9me3 抗体 (627、6)、

という解析結果となった。このように、反復投与により有意な変化(増加あるいは減少)を示すヒストン修飾部位を抽出できた。

(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】

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。平成 27、28 年度の検討により、主に生体サンプルからの RNA を精製する際の RNA 鎖の長短による抽出効率の差異のため、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) を同時に測定する事が困難であることが判明し、先にメッセンジャー RNA や長鎖ノンコーディング RNA を中心とした長鎖 RNA の測定を行った。平成 29 年度には、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレート、アセトアミノフェンの新型反復曝露実験によるマウス

肝サンプルについて、短鎖 RNA である成熟型マイクロ RNA の網羅的・定量的測定を次世代シーケンサにより実施した結果、成熟型 miRNA については反復毒性成立に関連する可能性がある転写産物として、延べ 148 の候補を抽出した。平成 28 年度までに取得した長鎖転写産物の網羅的発現データと合わせ、反復曝露による基線反応の成立機序などの網羅的解析を進めた。

(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】

(1) 大規模データ解析技術の開発

今年度、最新の deep learning algorithm (resnet アルゴリズム、Kaiming He (2015) Deep Residual Learning for Image Recognition. arXiv: 1512.03385) を用いて、遺伝子の発現パターンを記述した画像データから自動で特徴量を抽出し、それぞれの遺伝子が有意かどうかを判別する、画像解析システムの構築を行った。このシステムは、画像データ(トレーニングデータとテストデータ)の前処理を行うコンポーネント(このコンポーネントでは、オリジナルの、遺伝子発現を記述した RGB 画像を、グレースケール画像へ変換する。その後、グレースケール画像のサイズの縮小を行う)、deep learning に基づく画像データから有意な遺伝子を予測する分類器を構築するコンポーネント(このコンポーネントは、多数の層(畳み込み層やプーリング層等)で構成される。層の数としては、18 層、または、34 層、または、50 層、または、152 層とした。これらの層を用いて、画像データから、特徴量の自動抽出を行う。その後、最後の層において、抽出した特徴量に基づき、それぞれの遺伝子を、4つのクラスに分類する。4つのクラスは、positive class (化学物質により発現が up regulate されるクラス)、negative class (化学物質により発現が抑制されるクラス)、rough class (化学物質により up regulate も抑制もされないクラス)、intermediate class (positive または negative class と rough class の間のクラス)、である。ここでは positive と negative class に分類された

遺伝子を有意な遺伝子と予測されるものとした)、そして、構築した分類器の予測精度の検証を行うコンポーネント、で構成される。今回、熟練した研究者が、実際に目で見てクラス分けをした画像データを用いた。全データの内、75 パーセントの画像を、分類器を作成するためのトレーニングデータとして、残りの25 パーセントを、作成した分類器の予測精度を評価するための、テストデータとして用いた。

その結果、18 層で構成される deep learning アルゴリズムを用いた場合、予測の正解率は 83 パーセントと、高い正答率を示した。この結果は、我々の deep learning に基づく画像解析システムにより、有意な遺伝子を高い精度で推測できることを示唆する。しかしながら、34 層、50 層、152 層の場合の正答率は、0.76、0.7、0.72 と、より層の浅い 18 層の場合よりも低かった。この結果は、層を厚くしすぎると、トレーニングデータに対して過学習を起こしてしまう可能性を示唆している。また、18 層の場合について、4 クラスそれぞれに対する、予測精度の検証を行った。その結果、positive class、negative class、intermediate class のエラーの割合は、12~16 パーセントであり、クラス間で大きな差はなかった。しかしながら、rough class のエラーの割合は、28 パーセントであり、他のクラスよりも予測精度が低かった。このことから、rough class の判別は、他の class よりも困難であることが示唆される。この原因としては、rough class (有意でない遺伝子) に分類される遺伝子が大部分であり、このクラスには、多様な発現変動パターンを示す多様な遺伝子が含まれるためである、と考えられる。

(2) ゲノム解析とその関連データベースの整備

先行研究にて独立システムとして in house 開発された転写領域解析ソフトウェア SHOE を起点とした一連の処理を実現した。まず、SHOE 自体は、Garuda プラットフォームの Gadget のみならず、Cloud Service としても提供可能となった。さらに SHOE の結果から、CellDesigner に連動させ、遺伝子—転写因子マッ

プの表示が可能となり、さらに複数の解析結果をマージし、より全体を俯瞰できる遺伝子—転写因子マップを構築することも可能となった。

またこの拡大されたマップから、遺伝子と転写因子を抽出し、抽出されたリストから Percellome DB や Reactome DB へとアクセスし、関連するデータなどにアクセスするなど、これらの一連の解析を続けると極めて大きなネットワークが形成される。そこで、我々は、大規模ネットワークに対応できる可視化ツール GeneViz を開発した。

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

平成 27,28 年度、研究成果のデータベースの公開を維持しつつ、継続的に Percellome データベース及び公開サイトのセキュリティ強化を中心とした改良を進めていたが、平成 29 年度に実施されたペネトレーションテスト(外部からの攻撃アクセスを模した試験)に通過した。

また先行研究で開発した解析ソフトウェア群 MF-Tools については、平成 28 年度までに大半のソフトウェアについてはオンライン化に際しての再編成や実装方法の検討を終えていたが、PercellomeExplorer については、オンライン化に際して解決しなければならない問題(巨大な参照データベースの保存場所と大量のデータ処理の負担分配)について検討を行い、基本的な構成設計を終えた。

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

Reactome と TargetMine を用いたパスウェイ解析を行い、バルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現への影響を各臓器で比較した。その結果、特に細胞周期関連遺伝子への影響が顕著であったが、臓器によってその影響が認められる時点が異なっていた(海馬:2 時間、心臓:4 時間、腎臓:24 時間)。また、抗原プロセッシング(腎臓:4 時間)や IL-12 刺激による JAK-STAT 経路の活性化(肺:8 時間)など、免疫反応に

対する影響も認められた。このように複数の臓器で認められる遺伝子発現変動パターンに加えて、RHO GTPase (海馬：24 時間)、RNA ポリメラーゼ III による rRNA 転写 (肺：2 時間)、脂肪酸代謝 (肝臓：8 時間) に関連する遺伝子の変動といった臓器特異的な影響も検出された。Biocompendium を用いて入手可能な XML ファイルを検索し、Cytoscape でこのような遺伝子発現変動のパターンを可視化したところ、腎臓における細胞周期関連遺伝子の発現変動は明瞭な処理時間・濃度依存性を示した。さらに NaviCell を用いて、肝臓における代謝関連遺伝子の発現変動を可視化したところ、特にミトコンドリア、脂肪酸代謝、エストロゲン応答に関連する遺伝子の発現変動が同様に明瞭な処理時間・濃度依存性を示した。

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。四塩化炭素は反復曝露により基線反応が低下し、過渡反応が減弱乃至消失する遺伝子が多数を占め、それらは小胞体ストレスと関わることで強く示唆された。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と単回曝露実験データベースからの反復毒性予測に重要と考えられた。本研究 (2) の次世代シーケンサを

用いた DNA メチル化及びヒストン修飾の解析によると、遺伝子発現に抑制的に働く H3K27 のメチル化が亢進している可能性が示唆され、反復曝露による遺伝子発現ネットワーク (特に上流) との関係を検討した。

五塩化フェノール (平成 29 年度実施) においては、単回曝露において発現誘導されたインターフェロニングナル遺伝子群、及び、NRF2 下流遺伝子群が、4 日間反復投与により過渡反応としての発現誘導を殆ど失った。これに対して、基線反応は上昇する傾向があり、反復曝露により常時誘導状態が形成された可能性が示唆された。アセフェート (平成 29 年度実施) では、単回曝露で発現上昇及び発現抑制の過渡反応を示した遺伝子の殆どが、反復曝露後においても同様の過渡反応を示した。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が含まれており、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響を示唆する遺伝子リストが含まれるとの出力が IPA により得られた点が興味深い。

以上から、四塩化炭素に代表される遺伝子発現抑制型の化学物質、比較的毒性が低いと考えられる医薬品に代表される反復曝露により遺伝子発現がほぼ不変な物質、特徴的な毒性が知られる医薬品等に見られた反復投与により遺伝子発現の程度と種類が増大する傾向にある物質、等に、化学物質が分類される可能性、及び、分子機序として小胞体ストレス系、ミトコンドリア/代謝系、細胞回転制御系、など、複数の系の相互作用による複雑な「過渡反応・基線反応制御」が存在する可能性、が示唆された。

更に、単回曝露の毒性ネットワークとの比較解析を進め、複数の制御系の上流に注目しての反復曝露による生体影響の分子機序の解析をさらに進めることで反復曝露の分子機構の解明とより詳細・高精度な類型化を進めることが出来ると期待される。また、ここまでの解析の結果から、多臓器に異なった標的を有する化学物質、及び、発がん性物質 (遺伝子障害性物質) の [4+1] 反復曝露情報の補充が望まれることが示唆された。

「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」においては、平成 27、28 年度に実施した DNA メチル化解析に加え、平成 29 年度は ChIP-Seq によりヒストン修飾に関する解析を進めた。反復曝露により有意な変化を示すヒストン修飾サイトを抽出しつつあり、基線反応の成立に関わる知見が得られるものと期待される。

「化学物質の反復曝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を用いても成熟型マイクロ RNA (miRNA) の様な短鎖の転写産物と、メッセンジャー RNA (mRNA) や長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) 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たため、平成 28 年度は長鎖転写産物の網羅的・定量的測定を先行して実施した。平成 29 年度は短鎖 RNA 測定専用の外部スパイク RNA カクテルを調製した上で、成熟型 miRNA の網羅的・定量的測定を次世代シーケンサを用いて実施して、前年度までに取得した lncRNA などの転写産物の網羅的発現データと併せ、反復曝露による基線反応の成立機序の解析を進めた。

「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」においては、複雑な毒性機序の解析には大規模データベースを柔軟に検索し、さらに高度な遺伝子動態から注目すべき遺伝子群を自動的に同定する技術が必要である。今回、我々は、Deep Learning を用いた手法でこれを実現し、その精度を確認した。また従来から開発を行っていた SHOE に関しては、その機能強化（軽量化、高速化）をさらに進めると同時に、Garuda プラットフォーム準拠による他ソフトウェアとの連動性強化をさらに推し進めた。これらの結果、解析パイプラインの人工知

能駆動化の可能性が見えてきた。

「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、公開サイトのセキュリティ強化を中心に運用し、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群 (MF-tools) についても最新 OS に対応したインストールパッケージを作成し提供を再開したことで、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した。MF-tools のオンライン化についても移行が最も困難と予想された PercellomeExplorer についても設計方針が立ったことで、今後の移行作業の効率化が期待できる。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」については、バルプロ酸ナトリウム投与によって各臓器において異なる変動が起きることが確認された。特に、腎臓における影響が大きく、半減期よりもはるかに長い投与後 24 時間で最も変動が顕著であるという結果が得られた。これはバルプロ酸ナトリウムの代謝物による影響であると考えられ、臓器間で異なる応答性を理解するためにはその動態を考慮する必要があると考えられる。一方、細胞周期や免疫応答に関連する遺伝子は複数の臓器において発現変動が認められたが、このような共通パターンはバルプロ酸ナトリウムの毒性発現機構を推定するために有益な情報であると言える。今後は IL-12 を介した JAK-STAT 経路の活性化に対してバルプロ酸が与える影響について更に解析することを計画している。

Percellome データを効果的に Garuda プラットフォーム上で解析するためには、現在使用可能なガジェットに加えて、①オーソログ検索・変換機能、及び②gene ID 変換機能が必要であることが明らかになった。平成 29 年度の解析ではウェブアプリケーションを使用したのが、解析環境の整備の観点からこれらの操作についても Garuda プラットフォーム上で可能であることが好ましい。この点については改善指針として既に共有済みであり、今後 Garuda ガジェットとしての新規開発を検討する。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

3年間の研究期間中にアセトアミノフェン、フェノバルビタール、サリドマイド、5-フルオロウラシル、五塩化フェノール、及びアセフェートによる新型反復曝露実験を完了し、遺伝子発現データの詳細解析を進めたところ、より多彩な基線反応・過渡反応が認められ、現段階で大きく3種類に反応が分類されることが示唆された。今後、可能であれば、これらに多臓器に異なった標的性を示す化学物質、及び、遺伝子障害性物質のプロファイルを追加確認して体系化を進めたい。この過渡反応・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、現段階では主にヒストン修飾であると考えられる、の関与が示唆される。このエピジェネティクス修飾を制御する分子機構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る。

次世代シーケンサによる DNA メチル化状態の網羅的な解析、ヒストン修飾変化の解析が計画通り実施可能となり、有意な変動を特にヒストン修飾において抽出しつつある。今後さらに、遺伝子発現変動との関連性を解析し、反復曝露による基線反応成立への関与を明らかにしていく。

ノンコーディング RNA の発現解析は、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレート、アセトアミノフェンについて、平成28年までに長鎖RNAの転写産物(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による網羅的定量測定を、平成29年度に短鎖RNAの転写産物である成熟型マイクロRNAの次世代シーケンサによる網羅的定量測定を終え、反復曝露毒性に関与する可能性があるノンコーディングRNAの網羅的な抽出に成功した。これらの情報から、反復曝露による毒性機序の解析がより進捗するものと期待される。

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、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 データベース及び公開サイトのセキュリティ強化、及び inhouse 開発したソフトウェアの提供、オンライン化のための基本設計を実現した。引き続き研究成果の速やかな社会還元を推進してゆく。

Percellome データベースを利用した解析パイプラインの研究においては、Percellome データベースの特徴でもある遺伝子発現データの絶対量化によって複数臓器での遺伝子発現の同時比較の有用性が示され、またその解析においては Garuda ガジェットを用いたシステム生物学的アプローチが有効であると考えられた。また、Garuda プラットフォームはガジェット間の互換性に改善の余地は残っているものの、解析プラットフォームとして十分にその機能を果たすことができることを確認した。

以上、少数の動物を用いた短期間の試験を基盤とした網羅的な化学物質の安全性評価・予測システムの実用化の基盤が確立したと考える。今後、データ及び解析手法、解析ツールの公開を通して、また、可能であれば、不足しているいくつかのデータの収集と継続的な解析サポート体制を通して、本研究により構築されたシステムが広く活用される段階に到達するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Grealley J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdicizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A. Applying 'omics technologies in chemical

s risk assessment: Report of an ECETOC workshop. Regul Toxicol Pharmacol. 2017 Dec;91 Suppl 1:S3-S13.

(2) Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J. Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128.

(3) Archana Bajpai, Takashi Ishii, Kosuke Miyauchi, Vipul Gupta, Yuka Nishio-Masaie, Yuki Shimizu-Yoshida, Masato Kubo and Hiroaki Kitano. Insights into gene expression profiles induced by Socs3 depletion in keratinocytes Scientific Reports 7, Article number: 15830 (2017), doi:10.1038/s41598-017-16155-1.

(4) Akinori Nishi, Katsuya Ohbuchi, Hirotaka Kushi da, Takashi Matsumoto, Keiko Lee, Haruo Kuroki, Shigeki Nabeshima, Chika Shimobori, Nagisa Komokata, Hitomi Kanno, Naoko Tsuchiya, Makoto Zushi, Tomohisa Hattori, Masahiro Yamamoto, Yoshio Kase, Yukiko Matsuoka and Hiroaki Kitano. Deconstructing the traditional Japanese medicine “Kampo”: compounds, metabolites and pharmacological profile of maoto, a remedy for flu-like symptoms. npj Systems Biology and Applications 3, Article number: 32 (2017), doi:10.1038/s41540-017-0032-1.

(5) Caron, E., Roncagalli, R., Hase, T., Wolski, W. E., Choi, M., Menoita, M.G., Durand, S., García-Blesa, A., Fierro-Monti, I., Sajic, T., Heusel, M., Weiss, T., Malissen, M., Schlapbach, R., Collins, B.C., Ghosh, S., Kitano, H., Aebersold, R., Malissen, B., Precise Temporal Profiling of Signaling Complexes in Primary Cells Using SWATH Mass Spectrometry. Cell Reports 18, 3219–3226 (2017).

(6) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Suheendra K. Palaniappan, and Hiroaki Kitano (Chapter 13. Cancer Network Medicine), Network Medicine - Complex Systems in Human Disease and Therapeutics (Joseph Loscalzo, Albert-László Barabási, and Edwin K. Silverman (Eds.)), Harvard University Press 2017 ISBN 9780674436534

(7) Kitano, H. Biological Complexity and the need for Computational Approaches. Philosophy of Systems Biology: Perspectives from Scientists and Philosophers (Sara Green ed., Springer), 169-180, Mar. 21, 2017. (book chapter)

(8) 北野宏明. ブロックチェーンの活路は人工知能との連携にあり. ハーバード・ビジネス・レビュー, 2017年8月号, 24-37, Aug. 1, 2017.

(9) 北野宏明. ノーベル・チューリング・チャレンジ: 人工知能による科学的発見の再定義と生命科学の加速をめざして. 実験医学別冊「あなたのラボにAI (人工知能) × ロボットがやってくる」, 22-31, Dec. 15, 2017.

(10) 北野宏明. システム論とデータ駆動分析から可能となる老化研究. 実験医学増刊号「総力戦で挑む老化・寿命研究」, 35, 20, 115-123, Dec. 15, 2017.

2. 学会発表 (抜粋)

① Jun Kanno, Introduction to a concept of “Signal Toxicity” for broader research planning to promote precision medicine and healthy aging. The 33rd Joint Annual Conference of Biomedical Science, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan R.O.C. (2018.03.24-25).

(2) 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, (2017.1.8), Keystone Symposium Conference / Precision Genome Engineering, Colorado, USA, poster

③ 相崎健一、小野竜一、北嶋聡、菅野純、反復曝露試験におけるncRNA発現変動とDNAメチル化修飾の解析,第44回日本毒性学会学術年会(2017.7.11)横浜, 口演

(4) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Double strand break repair by capture of unintentional sequences and a novel mechanism of genome evolution, The 4th JSEV Annual Meeting (2017.8.30) Hirosaki, Japan, poster

(5) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017.5.17.), Daejeon, Korea

(6) 菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第20回研究発表会、(2017.12.12) 神戸、特別講演

(7) Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop , (2017.12.4) NC USA, Plenary

(8) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic pr

ediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote

(9) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia(2017.9.13) poster

⑩ Kitano, H. Nobel Turing Challenge. International workshop "From Genetic Networks to a Cellular Wiring Diagram", Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo, Apr. 26, 2017. (invited)

(11) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: The Day AI win The Nobel Prize and Future of Civilization. LCSB seminar, Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, Luxembourg, May 11, 2017. (invited)

(12) 北野宏明.AI駆動生命科学イノベーションとグランドチャレンジ.AI×Life Science シンポジウム, 日本橋三井ホール, 東京, May 17, 2017. (Plenary talk)40
Kitano, H. Impacts of Artificial Intelligence for Pharmaceutical Industry: Disruptive Innovations in Scientific Discovery and Biomedical Sciences. The FIP 6th Pharmaceutical Sciences World Congress 2017(PSWC 2017), Stockholm Masan, Stockholm, Sweden, May 21, 2017. (Plenary talk)

(13) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI, Robotics, and Systems Biology. ICRA 2017, Sands Expo and Convention Centre, Singapore, May 31, 2017. (Plenary talk)

(14) 北野宏明. 人工知能による医療革命. 山口大学シンポジウム「人工知能・システム医学による難治性疾患への新たな挑戦」, ANA クラウンプラザホテル

宇部, 山口, June 24, 2017. (invited)

(15) 北野宏明. 人工知能とグランドチャレンジ : RoboCup から Nobel Turing Challenge まで. 第1回 AI・人工知能 EXPO, 東京ビッグサイト, 東京, June 28, 2017. (Plenary talk)

(16) 北野宏明. 人工知能によるシステム・トキシコロジーの加速. 第44回日本毒性学会学術年会, パシフィコ横浜, 神奈川, July 11, 2017. (invited)

(17) 北野宏明. Nobel Turing Challenge. THE NEW TEXT CONFERENCE, 虎ノ門ヒルズ, 東京, July 25, 2017. (invited)

(18) Kitano, H. Systems Biology: Tools and Integrated Platforms for the 3Rs. 10th World Congress on Alternatives and Animals in the Life Sciences, Washington State Convention Center, Seattle, USA, Aug. 23, 2017. (Plenary talk)

(19) 北野宏明. 人工知能が切り拓く新たながん研究. 第76回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 神奈川, Sep. 29, 2017. (invited)

(20) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Objectives and Implications. Symposium on AI and Society, Toranomon Hills, Tokyo, Oct. 10, 2017. (Keynote)

(21) 北野宏明. System Biology, Data and AI. 第4回日本橋ライフサイエンスシンポジウム, 日本橋ライフサイエンスハブ, 東京, Oct. 14, 2017. (invited)

(22) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI, Robotics, and Systems Biology. DSAA2017 - The 4th IEEE International Conference on Data Science and Advanced Analytics, Shinagawa Prince Hotel, Tokyo, Oct. 20, 2017. (Keynote)

(23) Kitano, H. Noble Turing Challenge. JSPS-IVA Seminar “The Nobel Turing Challenge – When will the first Nobel Prize be awarded for AI?”, IVA's Conference Centre, Stockholm, Sweden, Oct. 25, 2017. (invited)

(24) Kitano, H. Nobel Turing Challenge. OECD conference ‘AI: Intelligent Machines: Smart Policies’, OECD, Paris, France, Oct. 26, 2017. (invited)

(25) 北野宏明. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI and Systems Biology. 平成29年度日本バイオインフォマティクス学会・生命システム理論研究会「AIを用いた細胞システムの解明に向けて」, 京都大学iPS細胞研究所, 京都, Dec. 15, 2017. (invited)

(26) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno, “Quantitative systems toxicology approach by Percellome to investigate organ-specific reactions by administration of valproic acid in mice” Gordon Research Conference, Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2017.8.13-18, NH, USA) (Poster)

(27) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno, “Assessment of the effect of valproic acid on organ-specific reactions in mice by analyzing quantitative Percellome toxicogenomics data”, RECOMB/ISCB Conference on Regulatory & Systems Genomics with DREAM Challenges (2017.11.19-21, NY, USA) (Poster)

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成 29 年度 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 Percellome*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 Percellome 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 29 年度はアセフェート及び五塩化フェノールに対し「新型」反復暴露実験セット、網羅的遺伝子発現解析を行い、詳細解析を進めた。先行研究において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、昨年度までのアセトアミノフェン、フェノバルビタール、サリドマイド及び5-フルオロウラシルに引き続き、むしろ過渡反応としての発現が増加する遺伝子が多く、基線反応も上昇する場合が多いという結果がえられた。

アセフェートは、反復曝露と単回曝露の差が極めて少ない特徴を有していた。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が変動することから、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響が示唆された点が注目される。また、発がん性を示唆する遺伝子群の発現誘導を伴っており、反復曝露により増強する傾向が見られた。

五塩化フェノールにおいては、反復曝露により殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線反応が上昇する特徴を有していた。その上流に RICTOR、HNF4A、NRF2 が位置し、EIF2 シグナル等が活性化する小胞体ストレスに関わる点で四塩化炭素と類似していた。尚、単回曝露時に特徴的であったインターフェロンシグナル遺伝子群は、反復曝露により過渡反応は消失するとともに有意な基線上昇を示していた。反復投与により常時誘導状態が誘導

される機序の解析が新たな課題として浮上した。

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。

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。

本分担研究では、「新型」反復暴露実験を実施し、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のためのデータ取得と解析を行う事を目的とする。

B. 研究方法

B1-1: 試薬及び動物 :

アセフェート (acephate ; 分子量 : 183.2、Cas No. : 30560-19-1、純度 99.5%、和光純薬) 及び、五塩化フェノール (pentachlorophenol (PCP); 分子量 266.34、

Cas No. : 87-86-5、純度 99.7%、和光純薬) 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、7、20、70 mg/kg 及び 0、10、30、100 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) のプロトコールにて実施した。アセフェートの 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 10 mg/kg、最終の単回暴露の用量は[0+1]実験と同様の 0、7、20、70 mg/kg とした。五塩化フェノールの 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、10、30、100 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°C 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°C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°Cにて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin（PE）ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られた肝サンプルについて、我々が開発した Percellome 手法（遺伝子発現値の絶対化手法）を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現データを、我々が開発した「RSort」を用いて、網羅的に解析した。このソフトは、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）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。

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 度のアセトアミノフェン及びフェノバルビタール、平成 28 年度に実施したサリドマイド及び 5-フルオロウラシルは、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。

アセフェートは、反復曝露 [4+1] 実験も単回曝露 [0+1] 実験とほぼ同等の基線を維持している遺伝子が殆どであり、過渡反応を示す遺伝子のリスト及び、それらの過渡反応の大きさには殆ど変化がなかった。これは、過渡反応が増加を示す遺伝子にも発現が低下を示す遺伝子にも該当する所見である。その中であって、代謝酵素の一部については [4+1] において過渡反応が減弱するものが認められた。[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は殆ど認められなかった。

2時間目の誘導の上流に PXR/SXR 及び GR が位置し、時間の経過とともに PPAR も作動する様子が示された。Jun などの神経系においても重要な遺伝子群が変動することから、肝でのプロファイルを観測しているにも拘らず中枢神経影響を示唆する遺伝子リストが含まれるとの出力がデータベース照合 (IPA) により得られた。急ぎ他の向神経作用のある化学物質の肝プロファイルを精査する計画である。また、発がん性を示唆する遺伝子群の発現誘導を伴っており、その発現ネットワークの解析を進める。

五塩化フェノールについては、殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線が上昇すること、基線上昇を示した遺伝子は、四塩化炭素の反復暴露において過渡反応が消失し、基線が低下した遺伝子群を含み、四塩化炭素の解析の際と同様に、上流に RICTOR、HNF4A、NRF2 が位置し、EIF2 シグナル、ミトコンドリア機能異常、ユビキチン化経路の遺伝子発現に関わり、小胞体ストレスが誘発されていることが明らかとなった。

尚、[0+1] の五塩化フェノールに特徴的であったインターフェロンシグナル遺伝子群はそのすべての過渡反応は反復曝露により消失し、その多くは有意な基線上昇を示していた。すなわち、この系の遺伝子群は、反復投与により常時誘導状態に置かれた可能性が示唆された (但し、実験の実施時期が離れていることから最終的な定量的確認は、少数の動物を用いての再現実験を必要とする可能性がある)。更に注目されるのは、4日間反復曝露により5日目の曝露に対する反応性が、単回時と大幅に変化した状態における、[4+1] 実験の24時間目に誘導される遺伝子群はインターフェロンシグナル系の属さないものの、その上流に、IRF7、IRF3、PTGER4 など、[0+1] 実験の際の上流と共通の因子が抽出される点であり、その共通性の解析を進める必要がある。

今回、五塩化フェノールが、過渡反応の消失という点で四塩化炭素類似の反応を示すことが判明したが、その基線反応の方向が逆である可能性があることから、常時誘導状態の存在とその成立機序の解析が新たな課題として浮上した。

以上より、複数の制御系が関与する事が明らかとなり、基線反応と過渡反応の組み合わせによる、それらの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。その中で、反応が増加する遺伝子群が存在することから、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。これに加え、今回、アセフェートが、肝のプロファイルにおいて、中枢神経影響と発がん性を示唆されたことは、多臓器関連に関わる所見として今後の解析の導入に利用可能であると考えられた。また、五塩化フェノールにおいて、基線反応の変動方

向が四塩化炭素と逆となった点について、詳細に解析する必要がある。四塩化炭素と類似の反応を示した化学物質を先行研究において複数解析（トリブチル錫、ディート、クロフィブレート）しており、それらとの対比も行う。

過渡反応と基線反応の連関を規定する分子機序として小胞体ストレス系、ミトコンドリア/代謝系、細胞回転制御系、など、複数の系の相互作用による複雑な制御の存在が本研究により示唆された。これらの複数の制御系の上流に注目した解析をさらに進めることで反復曝露の分子機構の解明が進むことが期待される。

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及びフェノバルビター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る。

平成 28 年度のサリドマイド及びフルオロウラシル(5-FU)においては、さらに、むしろ発現が増加する遺伝子が多いという結果が得られたのに対し、平成 29 年度のアセフェートは単回曝露で発現変動した遺伝子が、反復においてもほぼ同様に発現変動しており、基線反応が殆ど見られないこと、肝のプロファイルにも拘わらず中枢神経毒性を示唆する遺伝子群が変動すること、五塩化フェノールにおいては、殆どの遺伝子の過渡反応が消失し、基線が上昇すること、基線上昇を示した遺伝子は、四塩化炭素と同様の遺伝子群を含み、小

胞体ストレスが誘発されていること、単回曝露時に特徴的に誘導されたインターフェロニングナル系遺伝子群は、反復曝露により過渡反応を消失しつつ常時誘発状態に移行した可能性が示唆されるという従来に加えて新たな反応事例を得た。今後とも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したい。

更に、従来知識に照らしても、今までに本研究及び先行研究において解析してきた化学物質とは特徴異なる低分子化学物質について同様の実験・解析を実施できれば、反復曝露 [4+1] 実験の結果からの予測評価精度の更なる向上が見込めると考える。特に、多臓器に異なった標的を有する化学物質、発がん性物質（遺伝子障害性物質）の曝露情報の補充が望まれることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

(1) Buesen R, Chorley BN, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Greally J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Jennen D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauer UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollefsen KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A., (2017) Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop. Regul Toxicol Pharmacol. 2017 Dec;91 Suppl 1:S3-S13.

2. 学会発表 (抜粋)

- (1) Jun Kanno, Introduction to a concept of “Signal Toxicity” for broader research planning to promote precision medicine and healthy aging. The 33rd Joint Annual Conference of Biomedical Science, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan R.O.C. (2018.03.24-25).
- (2) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project., SOT2018, San Antonio, USA (2018.03.11-15)
- (3) 菅野 純、「シグナルかく乱」による「シグナル毒性」としての内分泌かく乱化学物質問題、環境ホルモン学会第 20 回研究発表会、(2017.12.12) 神戸、特別講演
- (4) Jun Kanno, Broadening Perspective from Endocrine Signaling to Receptor-Mediated Signaling, Endocrine Disruption Strategies Workshop, (2017.12.4) NC USA, Plenary
- (5) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote
- (6) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017.9.13) poster EUROTOX (第 52 回欧州毒性学会、EUROTOX2016) (2016.9.6)、Seville, Spain, poster
- (7) 相崎健一、小野竜一、北嶋聡、菅野純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析 (第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月 11 日)、口演
- (8) 菅野 純、シグナル毒性としての中樞神経系に対する低用量化学物質ばく露影響 (第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年 7 月 12 日)、口演

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29年度厚生労働行政推進調査事業費
(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 第二室 室長
研究協力者 小野竜一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第五室 室長

研究要旨

本研究は、先行実施されたPercellome*トキシコゲノミクス研究を基盤に、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に解析を行い、DNAメチル化状態が変化する領域を複数検出した。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を検討した。

平成29年度は、ヒストンのメチル化・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、この網羅的解析をおこなった。具体的には、クロマチン免疫沈降（ChIP）アッセイと次世代シーケンサを組み合わせた、クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）法を利用して、四塩化炭素を14日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析を進め、詳細解析中である。ChIPアッセイの際の抗体は、以下の4種、すなわち抗H3K4me3、抗H3K27Ac、抗H3K27me3、及び抗H3K9me3抗体を用いた。

(*） 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。

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ム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。

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ことから、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、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検討した。

一方、平成29年度は、クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）法を利用して、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ヒストン修飾の解析を進めた。

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 °C 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 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。

B-4: 次世代シーケンサーを用いた ChIP-Seq

四塩化炭素を 14 日間反復投与した翌日に溶媒 (コーンオイル) 投与 2 時間後のマウス肝および、溶媒 (コーンオイル) を単回投与 2 時間後のマウス肝のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証し、反復投与によるクロマチン修飾の変化を明らかにする。

本 ChIP-Seq 解析は、タカラバイオ株式会社・バイオメディカルセンター・高速シーケンス解析受託受付担当経由で、Active Motif 社 (米国) に委託した。

各マウス肝 (30 μ g クロマチン調整液) (各 n=1) (必要サンプル重量を超えるように、投与群、溶媒群ともに各 3 例をそれぞれ 1 つにまとめた。必要サンプル量: 200~500 mg の凍結組織重量のところ、投与群: 計 260 mg [160, 10 及び 100 mg]、溶媒群: 計 320 mg [160, 180 及び 80 mg]) を材料として、下記 4 種の抗体、すなわち 1) 4 μ l (30 μ g) の抗ヒストン H3K4me3 抗体 (Active Motif, cat # 39159) (H3K4me3: 転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 4 トリメチル化)、2) 4 μ l (30 μ g) の H3K27Ac3 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac3: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、3) 4 μ l (30 μ g) の H3K27me3 抗体 (Active Motif, cat # 39155) (H3K27me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化)、4) 5 μ l (30 μ g) の H3K9me3 抗体 (Active Motif, cat # 39161) (H3K9me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 9 のトリメチル化)、および Input (抗体無しコン

トロール)を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)を行った。その際、サンプル間の補正を行うために、Drosophila のクロマチンが spike in として添加されている。ChIP 後の DNA は、それぞれの抗体に対する既知の陽性コントロールおよび陰性コントロールを qPCR により定量し、そのクロマチン免疫沈降の有効性の定量を行なう。

クロマチン免疫沈降の有効性の確認ができた ChIP DNA より次世代シーケンサ解析用のライブラリーを作成し、75 bp のシングルリードで網羅的シーケンス解析を行った。シーケンス結果は、マウス標準ゲノム(mm10)に対してマッピング後に in silico で 200 bp まで各リードを延長し、SICER アルゴリズムを用いてピークコール(ピーク検出)を行なう。SICER アルゴリズムは default のパラメータ ($p=1e-7$ (narrow peak), $p=1e-1$ (broad peak))を用いる。各サンプルは、Drosophila DNA 断片のリード数により補正を行なう。

(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、triming 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の、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([0+1])した際、及び四塩化炭素を 14 日間反復投与([14+1])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（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。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、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 のクロフィブ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（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比較解析した。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、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。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。

平成 29 年度は、四塩化炭素を 14 日間反復投与([14+1])した際、及び溶媒（コーンオイル）を単回投与した際の 12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの肝サンプルについて（投与 2 時間後のもの、それぞれ n=3、これを必要サンプル重量となるように、それぞれ 1 つにまとめた）、まずクロマチン免疫沈降を行なった結果、H3K4me3 抗体に関しては 122 倍、H3K27Ac 抗体に関しては 202 倍、H3K27me3 抗体に関しては 49 倍、H3K9me3 抗体に関しては 15 倍の濃縮が確認されたので、ChIP は正常に行われたと判断された。これらの ChIP 済み DNA よりライブラリーを作成し、次世代シーケンスによる 75 bp のシングルリードの網羅的シーケンス解析を行ない、現在データについて解析中である。

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

抗 H3K4me3 抗体 (16, 500、15, 996)、
抗 H3K27Ac 抗体 (20, 379、20, 826)、
抗 H3K27me3 抗体 (20, 927、23, 816)、
抗 H3K9me3 抗体 (29, 756、31, 046)、

となっている。この内特に H3K27me3 は、DNA メチル化非依存的に遺伝子発現を抑制することが知られ、反復投与により 13.8%も peak 数が上昇していることから、反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していることが示唆された(それぞれ、3.1%減少、2.2%増加、13.8%増加、及び4.3%増加)。

各 peak の網羅的解析に際して、溶媒対照群に対して増加あるいは減少(具体的にはそれぞれピーク高(各ピークにおける頂点部分においてマッピングされたリード数)が2倍以上、もしくは1/2以下)で、いずれかの高さ20以上、という条件にて抽出したところ、それぞれ(以下括弧内はピーク数で[増加、減少]をあらわす)、

抗 H3K4me3 抗体 (48、19)、
抗 H3K27Ac 抗体 (191、50)、
抗 H3K27me3 抗体 (160、1)、
抗 H3K9me3 抗体 (627、6)、

という解析結果となった。このように、反復投与により有意な変化(増加あるいは減少)を示すヒストン修飾部位を抽出できた。

D. 考察

平成27年度は、本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)あるいはクロフィブレート及び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る。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せていないが、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ので、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ことが必要となる可能性も考えられる。また、DNAメチル化が遺伝子発現に重要な領域は、CpGアイランド周辺と想定されることから、アジレント・テクノロジー株式会社のSure-Selectテクノロジーを用いてCpGアイランドのゲノムのみを濃縮した上で、網羅的にDNAメチル化解析を行うことで、CpGアイランドのリード数を大幅に増やす(数十倍)ことが可能となるので、検討の余地はある。

平成29年度は、ChIP-Seqにより反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位を抽出しつつあり、基線反応の成立に関わる知見が得られるものと期待される。

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できた。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、DNA メチル化状態につき網羅的に解析中であり、現時点では、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の見出す手法として 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。

平成 29 年度は、ChIP-Seq により反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位を抽出し、より詳細な解析により、基線反応の成立に関わる知見が得られるものと期待される。これまでに得られた示唆として、H3K27me3 は、DNA メチル化非依存的に遺伝子発現を抑制することが知られるが、四塩化炭素の 14 日間反復投与の際に、

13.8%も peak 数が上昇していることから、H3K27me3 が反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していることが示唆された。

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する。

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.

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, Kentaro Tanemura, Jun Kanno, Neurobehavioral toxicity at adult period induced by neonicotinoid pesticides exposure at juvenile period of male mice. (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki Interferon signaling chemical, pentachlorophenol, identified by Percellome Toxicogenomics Project. (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, Double Strand Break Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the Leading-Edge Technology, (2018.3.12) SOT 2018, San Antonio, USA, poster

Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, , Satoshi Kitajima, Jun Kanno Yoji Sato and Yoko Hirabayashi, An emerging new possible risk of genome editing for human gene therapy, (2018.1.31) Keystone Symposia Conference / Precision Genome Editing with Programmable Nuclease, Colorado, USA, poster

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, (2017.1.8), Keystone Symposia Conference / Precision Genome Engineering, Colorado, USA, poster

相崎健一、小野竜一、北嶋聡、菅野純, 反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析, 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017.7.11) 横浜, 口演

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Double strand break repair by capture of unintentional sequences and a novel mechanism of genome evolution, The 4th JSEV Annual Meeting (2017.8.30) Hirosaki, Japan, poster

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda Platform as a tool for Open Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017.5.17.), Daejeon, Korea

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals

identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia(2017. 9. 13) poster

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.)

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曝露の
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
なし

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
—新型反復曝露実験と単回曝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)

化学物質の反復曝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

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 Percellome^{*1} 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」反復曝露実験^{*2}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曝露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。本分担研究では研究計画通り（a）化学物質の反復曝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）Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進、を行った。

平成27年度、（a）では20bp前後の短鎖である成熟マイクロ RNA を、Percellome 法に対応した上で、効率よく可能な限り誤差が生じない様に組織破碎液から抽出し、また正確に定量し品質管理することが出来るようプロトコルの最適化を行い、これらを以て四塩化炭素[14+1]の RNA-Seq を実行した。（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。

平成28年度、（a）では、ncRNAのうち、長鎖 ncRNA など、成熟マイクロ RNA^{*3}以外の転写産物について次世代シーケンサーによる total RNA-Seq 解析を進めた。平成27年度に測定済みの四塩化炭素[14+1]^{*2}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 サーバーアプリケーションソフトウェアのセキュリティー強化を進めた。

平成29年度、（a）では、次世代シーケンサーによる短鎖 RNA シーケンスに最適化した外部スパイク RNA カクテルを調整し、短鎖となる成熟型マイクロ RNA (miRNA)^{*3}について miRNA-Seq

解析を進め、四塩化炭素[14+1]及び[4+1]、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]の測定を終え、平成28年度の長鎖ノンコーディング RNA の発現変動データと併せて、反復曝露毒性の成立に係わる可能性のある遺伝子の解析を行った。(b)では、公開サイトのセキュリティ強化を進め、セキュリティ監査(ペネトレーションテスト)を通過した。また代表的な in house 開発のソフトウェアである PercellomeExplorer のオンライン化に際して解決しなければならない問題(巨大な参照データベースの保存場所と大量のデータ処理の負担分配)について検討を行った。

-
- (*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、反復曝露による生体影響は分子レベルでは、曝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、別途、平成29年度に実施した。

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、化学物質の反復曝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 Percellome 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) 化学物質の反復曝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 (miRNA) 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。これはノンコーディング 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 (lncRNA) と同時に定量性を保ったまま精製出来ないためである。

平成29年度は成熟型マイクロ RNA の発現変動解析に取り組んだ。先ず短鎖 RNA で構成される miRNA 測定専用のスパイクカクテル (Bacillus 由来 RNA 5種類を基に24merの単鎖 RNA 5種を合成し、これらの濃度を変えて混合した溶液) を調整した。この際、Dicer, Drosha にて処理される通常の成熟型 miRNA と同様に3'端をヒドロキシル基修飾し、5'端をリン酸化修飾した。カクテルの濃度調整は、totalRNA-Seq に用いる通常のスパイク RNA カクテルのモル濃度に合わせて実施した。

四塩化炭素[14+1]及び[4+1]、バルプロ酸ナトリウム[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]の各サンプルのホモジナイズ液のDNA含量に比例して短鎖専用スパイクカクテルを添加し

て成熟型 miRNA-Seq ライブラリを調整し、次世代シーケンサーにて測定した。

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℃ で一晚浸漬して、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 mRNA 用若しくは上記の miRNA 用のスパイクカクテル (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、RNeasy 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。なお miRNA-Seq ライブラリ調整の際には、断片長を揃えるために自動 DNA 断片ゲル抽出装置 BluePippin (米 SageScience) を使用した。

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短鎖 RNA 用試薬、TruSeq Small RNA Library Prep 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值化等、データ処理には、Percellome 手法に対応させたカスタムゲノムを用意した上で、Bowtie2, 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 若しくは AGSCalc.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 の情報を利用した。

(b) Percellome 専用解析ソフトウェアのオンライン化促進

ソフトウェアの in house 開発に際しては、開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、Win32/64 開発は RAD (Rapid Application Development) 対応の Delphi (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。データベースエンジンには組込型の DBISAM (USA, Elevate Software, Inc.) を、一般的なグラフ描画には TeeChart (Spain, Steema Software SL) を利用した。

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) 化学物質の反復曝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 (miRNA) 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 miRNA とそれ以外 (mRNA や長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)、miRNA 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た。

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 mRNA と lncRNA など、成熟型 miRNA 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、Illumina 次世代シーケンサーNextSeq500による測定を実施した。

引き続き平成 29 年度は成熟型 miRNA 用の外部 RNA スパイクカクテルを調整し、それを添加して、四塩化炭素([14+1]及び[4+1])、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、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 若しくは Bowtie2 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。さらに破碎液の段階で 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。短鎖 RNA を対象とした RNA-Seq(miRNA-Seq)では、miRNA と類似配列のあるスパイク RNA の測定値が安定しなかったため、全サンプルで比較的安定していたスパイク RNA 1 種の測定値を参照する AGNCalc.exe を用いて、絶対量化計算を行った。

本研究では、反復曝露における基線反応の分子機序解析を行うため、新型反復曝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ところ、mRNA 及び長鎖 ncRNA (lncRNA) の比較解析では t 検定で有意 ($p < 0.05$) となり、発現変動率が 1.5 倍以上若しくは 0.67 倍以下となる転写産物を抽出した(表 1)。有意な変動を示した lncRNA として延べ 219 の候補を抽出した。

			total	lncRNA	miRNA	snRNA	snoRNA
CCI4	14+1	Up	591	26	0	7	0
		Down	230	6	0	0	0
	4+1	Up	48	3	0	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. 各化学物質の反復曝露によって基線反応の変動を呈した長鎖転写産物の件数

成熟型 miRNA-Seq の比較解析では、系統誤差が大きさを考慮し、t 検定で有意 ($p < 0.05$) となり、変動率が 2.0 倍以上若しくは 0.5 倍以下となる転写産物を抽出した(表 2)。有意な変動を示した成熟型 miRNA として延べ 148 の候補を抽出した。

			total	miRNA	snRNA	snoRNA
CCI4	14+1	Up	264	7	0	1
		Down	357	15	0	0
	4+1	Up	285	2	0	1
		Down	261	3	0	3
VPA	14+1	Up	143	4	0	1
		Down	234	6	0	0
	4+1	Up	69	3	0	1
		Down	701	40	1	17
Clofibrate	14+1	Up	332	30	0	8
		Down	129	12	3	4
Acetaminophen	4+1	Up	243	16	0	7
		Down	439	10	2	4

表 2. 各化学物質の反復曝露によって基線反応の変動を呈した短鎖転写産物の件数

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 を運用し、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、平成 29 年度には成熟型 miRNA-Seq 用の解析計算パイプラインを新たに作成した。

(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存在していた潜在的なセキュリティリスクを解消し、セキュリティ監査(ペネトレーションテスト)を通過した。

また比較解析用ソフトウェア Percellome Explorer.exe の専用データベースにトランスクリプトームデータを追加し、類似評価精度を向上させるとともに、このソフトウェア化のオンライン化に際して問題になる案件(巨大な参照データベースの保存場所と大量のデータ処理の負担分配)について、いくつかのモデル想定して、各条件での処理速度、通信データ量、配布形態等を検討し、オンライン版の設計を進めた。

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曝露実験により、単回曝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(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)と過渡反応成分(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 年度の研究で抽出した複数の長鎖 ncRNA (lncRNA) に加え、平成 29 年度は成熟型 miRNA を中心とした短鎖 RNA の定量評価及び抽出成功した。これらの転写産物の多くは詳細が知られておらず、反復曝露影響の成立機序への具体的な関与機序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一通り終えた。今後、セキュアなミラーサイトの開設を予定しており、利用者の利便性/安全性の向上が期待される。また Percellome Explorer のオンライン化について具体的な検討を行い、単純なサーバークライアントモデルではサーバー側の負荷が大きすぎる事を確認した。このため、UI 部分の Garuda Gadget 化などのサーバー負荷が大きくなるモデルで設計を進めることとした。

E. 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「化学物質の反復曝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、クロフィブレード、アセトアミノフェンによる新型反復曝露の totalRNA-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 年度は短鎖 RNA の定量測定のための外部スパイク RNA カクテルを調整した上で、totalRNA-Seq と同一サンプルから短鎖 RNA を抽出し、成熟型マイクロ RNA の測定を行った。これらの結果、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブレード、アセトアミノフェンの4化学物質の反復曝露による毒性機序に関わる転写産物の網羅的な抽出に成功し、反復曝露の毒性機序に関わると予想されるシグナルネ

ネットワーク候補の抽出など詳細解析が進んだ。

「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 29 年度も基盤となる公開システムのセキュリティー強化を進め、セキュリティー監査（ペネトレーションテスト）を通過するなど、安定運用を維持した。また PercellomeExplorer のオンライン化手法の方針が定まり、開発に向けた準備が整った。

F. 研究発表

1. 論文発表（抜粋）

なし

2. 学会発表（抜粋）

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, (2017.1.8), Keystone Symposia Conference / Precision Genome Engineering, Colorado, USA, poster

相崎健一、小野竜一、北嶋聡、菅野純、反復曝露試験における ncRNA 発現変動と DNA メチル化修飾の解析, 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017. 7. 11) 横浜, 口演

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Double strand break repair by capture of unintentional sequences and a novel mechanism of genome evolution, The 4th JSEV Annual Meeting (2017.8.30) Hirosaki, Japan, poster

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Progress of Percellome Toxicogenomics Project, and the use of Garuda platform as a tool for Open

Toxicology. OpenTox Asia Conference 2017 (2017.5.17.), Daejeon, Korea

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for the mechanistic prediction of chemical toxicity., the 8th National Congress of Toxicology (V-III CSOT), (2017.10.16) Jinan, China, keynote

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Interferon signaling chemicals identified by Percellome Toxicogenomics Project., Eurotox 2017, Bratislava, Slovakia (2017.9.13) poster

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29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 に加え、deep learning system の開発を進め、実際のゲノミ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。

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、主要な毒性に関係す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的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。

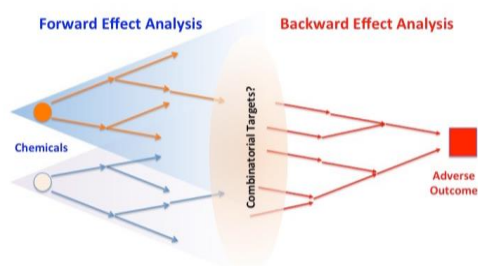


図 1 : Forward Effect Analysis と Backward Effect Analysis の融合

この一連の処理を行うには、複数のソフトウェアの連動が必須であり、本研究では、これに関わる一連のソフトウェアの開発を行う。

(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** レベルに連関させる必要がある。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。

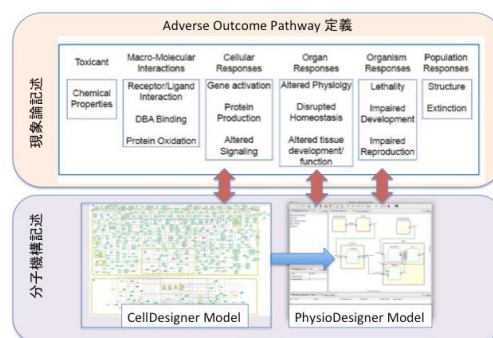


図 2 : 現象論的記述が主体の **AOP** 定義と分子機構記述モデルとの連携

(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

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。しかしながら、この様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。

前年度の Ensemble Learning 手法に引き続き、今年度は、Deep Learning を利用して、Percellomeデータベースから、一定の特徴量を認識して分類する問題を設置して、その実現可能性を検討した。

Percellomeデータベースでは、化学物質投与下の遺伝子の発現情報を画像で表す。これまで、Percellomeデータベースの解析では、化学物質投与下における有意な遺伝子を同定するために、長年経験とトレーニングを積んできた研究者が、それぞれの遺伝子の発現パターンの画像を目で見て、判別を行ってきた (図4)。

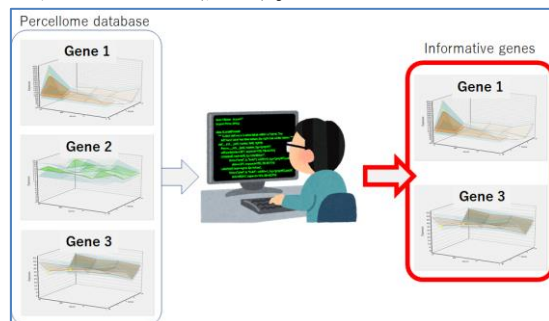


図4：Visual inspectionによる、有意な遺伝子の同定

しかしながら、Percellomeデータベースは、100以上の化学物質それぞれに対し、40,000以上のプローブの発現データが含まれており、400万以上の発現データを記述した画像で構成されている。この様な、大量の画像の全てを目で見て、有意な遺伝子を判別するためには、多大な労力と時間が必要となる。

ところで、近年、機械学習の手法の発展は目覚ましく、機械学習を用いた画像解析の手法も数多く開発されつつある。特に、deep learningの手法の発展はめざましく、分野によっては、人間の能力を超

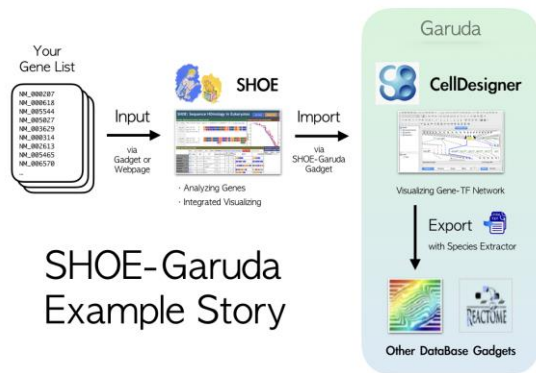
えつつある (David Silver et al (2006) Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. Nature 529:484 – 489.)。例えば、deep learningの技術を使用した画像解析については、非常に高精度に皮膚がんの分類を行うことのできる deep learning モデルが、発表されている (Andre Esteva et al. (2017) Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. Nature 52:115-118)。

そこで、今年度、我々は、percellomeデータベースの画像データから、効率良く有意な遺伝子を判別する手法の構築を目的として、最新の多数の層で構成される deep learning algorithm を用いた、画像解析システムの実装を行った。実装した deep learning に基づく画像解析システムの予測精度の検証を、熟練した研究者が目で見えて作成した画像データセットを用いて行った。その結果、今回実装した画像解析システムにより、percellomeデータベースの画像データから、有意な遺伝子の判別を、高い精度で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

同時に、ゲノム関連のデータベースとの連携をより緊密にし、例えば、上記 Deep Learning で、同定された遺伝子リストなどからネットワークや転写因子群 (TFs) を同定し、そこから毒性の推定を行うなどの一連の処理が必要となる。

この領域では、従来から開発を行っていたSHOEのGaruda Platform上への実装を引き続き行い、さらに機能強化と連携の拡大を行い、この一連の処理に関わる連携を実現した (図5)。



SHOE-Garuda Example Story

図5：SHOE-GARUDA 連携の強化

C. 研究結果

(1) 大規模データ解析技術の開発
今年度、最新の deep learning algorithm (resnet アルゴリズム, Kaiming He (2015) Deep Residual Learning for Image Recognition. arXiv:1512.03385) を用いて、遺伝子の発現パターンを記述した画像データから自動で特徴量を抽出し、それぞれの遺伝子が有意かどうかを判別する、画像解析システムの構築を行った (図6)。このシステムは、画像データ (トレーニングデータとテストデータ) の前処理を行うコンポーネント、deep learning に基づく画像データから有意な遺伝子を予測する分類器を構築するコンポーネント、そして、構築した分類器の予測精度の検証を行うコンポーネント、で構成される。

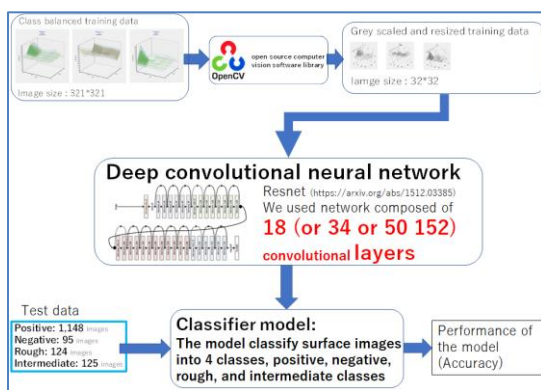


図6：deep learning algorithm を用いた、画像解析システム

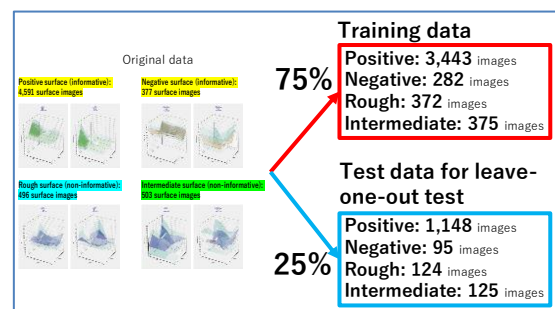
画像データの前処理を行うコンポーネント：このコンポーネントでは、オリジナルの、遺伝子発現を記述した RGB 画像を、グレースケール画像へ変換する。その後、

グレースケール画像のサイズの縮小を行う。

deep learning に基づく画像データから有意な遺伝子を予測する分類器を構築するコンポーネント：このコンポーネントは、多数の層 (畳み込み層やプーリング層等) で構成される。層の数としては、18 層、または、34 層、または、50 層、または、152 層とした。これらの層を用いて、画像データから、特徴量の自動抽出を行う。その後、最後の層において、抽出した特徴量に基づき、それぞれの遺伝子を、4つのクラスに分類する。4つのクラスは、positive class (化学物質により発現が up regulate されるクラス)、negative class (化学物質により発現が抑制されるクラス)、rough class (化学物質により up regulate も抑制もされないクラス)、intermediate class (positive または negative class と rough class の間のクラス)、である (図7)。Positive と negative class に分類された遺伝子が、有意な遺伝子と予測されるものである。

今回、熟練した研究者が、実際に目で見てクラス分けをした画像データを用いた。全データの内、75 パーセントの画像を、分類器を作成するためのトレーニングデータとして、残りの 25 パーセントを、作成した分類器の予測精度を評価するための、テストデータとして用いた (図7)。

図7：テストデータとトレーニングデータ



その結果、18 層で構成される deep learning アルゴリズムを用いた場合、予測の正解率は 83 パーセントと、高い正答率を示した (図8)。この結果は、我々の deep learning に基づく画像解析システム

により、有意な遺伝子を高い精度で推測できることを示唆する。しかしながら、34層、50層、152層の場合の正答率は、0.76、0.7、0.72と、より層の浅い18層の場合よりも低かった。この結果は、層を厚くしすぎると、トレーニングデータに対して過学習を起こしてしまう可能性を示唆している。

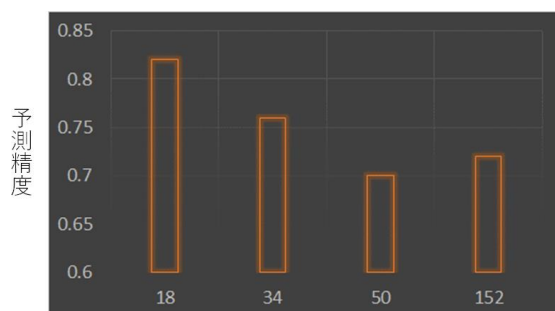


図8：18層、34層、50層、152層の deep learning model を用いた場合の予測精度

また、18層の場合について、4クラスそれぞれに対する、予測精度の検証を行った(図9)。その結果、positive class、negative class、intermediate class のエラーの割合は、12～16パーセントであり、クラス間で大きな差はなかった。しかしながら、rough class のエラーの割合は、28パーセントであり、他のクラスよりも予測精度が低かった。このことから、rough class の判別は、他の class よりも困難であることが示唆される。この原因としては、rough class (有意でない遺伝子) に分類される遺伝子が大部分であり、このクラスには、多様な発現変動パターンを示す多様な遺伝子が含まれるためである、と考えられる。

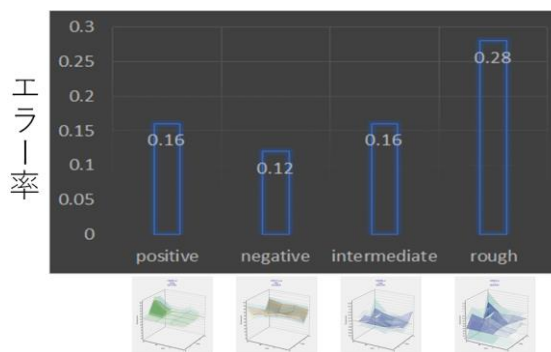


図9：18の deep learning model を用いた場合の、4つのクラスそれぞれの予測精度

今後は、構築した画像解析システムに改良を加え、より高精度な分類器の構築を進める。例えば、現在、deep learning モデルを作る際には、ひとつの角度からみた画像データしか用いていないが、研究者は、角度を変えながら見て判別しているので、より高精度なモデルの構築のために、多様な角度の画像データを用いて予測を行うシステムの構築を進める。

(2) ゲノム解析とその関連データベースの整備

今年度はSHOEを起点とした一連の処理を実現した。まず、SHOE 自体は、Garuda Platform の Gadget のみならず、Cloud Service としても提供可能となった(図10)。どちらも同様の検索結果が表示される(図11)。

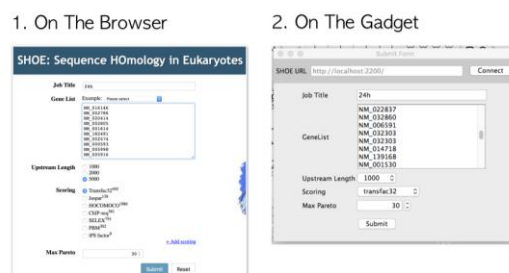


図10：SHOE の Cloud Version (左)と Garuda Gadget Version(右) (遺伝子リスト指定画面)

SHOE calculates Transcription Factors, Scores, etc ...

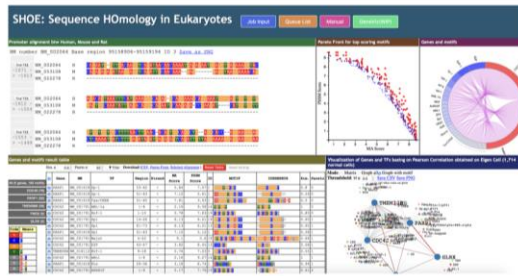


図 1 1 : SHOE 検索結果表示画面

さらに SHOE の結果から、CellDesigner に連動させ、遺伝子-転写因子マップの表示が可能となった(図 1 2)。

Import Results to CellDesigner in Garuda

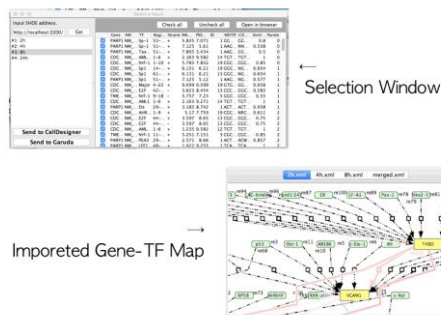


図 1 2 : SHOE-CellDesigner 連携: SHOE の結果から遺伝子・転写因子マップが検索され表示される

さらに複数の解析結果をマージし、より全体を俯瞰できる遺伝子-転写因子マップを構築することも可能となった(図 1 3)。

Working with CellDesigner Gadgets

Merged multiple maps with Merge Model gadget

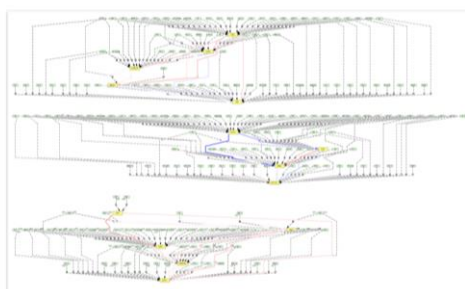


図 1 3 : 複数の解析結果をマージし、俯瞰的な遺伝子・転写因子マップを構成する

またこの拡大されたマップから、遺伝子と転写因子を抽出する(図 1 4)。

Species Extractor extracts Genes & TFs from the map

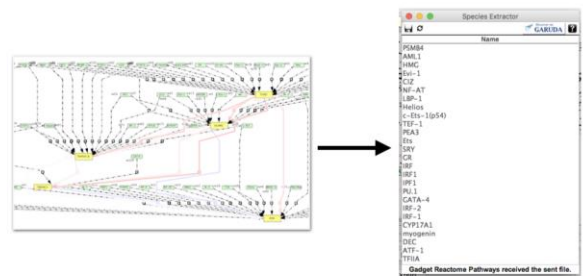


図 1 4 : 俯瞰的マップから、遺伝子・転写因子のリストを抽出する

抽出されたリストから Percellome DB や Reactome DB へとアクセスし、関連するデータなどにアクセスする(図 1 5)。

Extracted Genes & TFs can be also imported other gadgets

Example:

Percellome: searches elements from Percellome Project DataBase

REACTOME Pathways: searches Reactome Pathway for genes and proteins



図 1 5 : Percellome や Reactome へと連動する。

これらの一連の解析を続けると極めて大きなネットワークが形成される。そこで、我々は、これに対応できる可視化ツールを開発した(図 1 6)。

[New Feature] GeneViz

Gene-TF Map Visualizer on the SHOE Web

Features

- Visualizing Multiple Maps
- Importing results from SHOE
- Finding common elements through maps
- Search elements
- Search by Attributes (receptor ...)

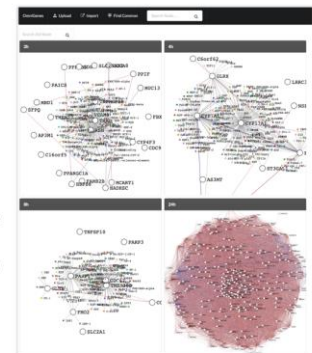


図 1 6 : 複雑なネットワークに対応する可視化ツール GeneViz

D. 考察

複雑な毒性機序の解析には、大規模データベースを柔軟に検索し、さらに高度な遺伝子動態から注目すべき遺伝子群を自動的に同定する技術が必要である。今回、我々は、Deep Learning を用いた手法でこれを実現し、その精度を確認した。また従来から開発を行っていたSHOEに関しては、その機能強化(軽量化、高速化)をさらに進めると同時に、Garuda Platform 準拠による他ソフトウェアとの連動性強化をさらに推し進めた。これらの結果、解析パイプラインの人工知能駆動化の可能性が見えてきた。

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

- ① Nozomu Yachie; Robotic Biology Consortium; Tohru Natsume. Robotic crowd biology with Maholo LabDroids. *Nature biotechnology*. 35, 4, 310-312, April 2017.
- ② 北野宏明. ブロックチェーンの活路は人工知能との連携にあり. *ハーバード・ビジネス・レビュー*, 2017年8月号, 24-37, Aug. 1, 2017.
- ③ 北野宏明. ノーベル・チューリング・チャレンジ: 人工知能による科学的発見の再定義と生命科学の加速をめざして. *実験医学別冊「あなたのラボに AI (人工知能) × ロボットがやってくる」*, 22-31, Dec. 15, 2017.
- ④ 北野宏明. システム論とデータ駆動分析から可能となる老化研究. *実験医学増刊号「総力戦で挑む老化・寿命研究」*, 35, 20, 115-123, Dec. 15, 2017.

2. 学会発表

- ① Kitano, H. Nobel Turing Challenge. International workshop "From Genetic Networks to a Cellular Wiring Diagram", Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo, Apr. 26, 2017. (invited)
- ② Kitano, H. Nobel Turing Challenge: The Day AI win The Nobel Prize and Future of Civilization. LCSB seminar, Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, Luxembourg, May 11, 2017. (invited)
- ③ 北野宏明. AI 駆動生命科学イノベーションとグランドチャレンジ. AI × Life Science シンポジウム, 日本橋三井ホール, 東京, May 17, 2017. (Plenary talk)
- ④ Kitano, H. Impacts of Artificial Intelligence for Pharmaceutical Industry: Disruptive Innovations in Scientific Discovery and Biomedical Sciences. The FIP 6th Pharmaceutical Sciences World Congress 2017(PSWC 2017), Stockholm Masaan, Stockholm, Sweden, May 21, 2017. (Plenary talk)
- ⑤ Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI, Robotics, and Systems Biology. ICRA 2017, Sands Expo and Convention Centre, Singapore, May 31, 2017. (Plenary talk)
- ⑥ 北野宏明. 人工知能による医療革命. 山口大学シンポジウム「人工知能・システム医学による難治性疾患への新たな挑戦」, ANA クラウンプラザホテル宇部, 山口, June 24, 2017. (invited)
- ⑦ 北野宏明. 人工知能とグランドチャレンジ: RoboCup から Nobel Turing Challenge まで. 第1回 AI・人工知能 EXPO, 東京ビッグサイト, 東京, June 28, 2017. (Plenary talk)
- ⑧ 北野宏明. 人工知能によるシステム・トキシコロジーの加速. 第44回日本毒性学会学術年会, パシフィコ横浜, 神奈川, July 11, 2017. (invited)
- ⑨ 北野宏明. Nobel Turing Challenge. THE NEW TEXT CONFERENCE, 虎ノ門ヒルズ, 東京, July 25, 2017. (invited)
- ⑩ Kitano, H. Systems Biology: Tools and Integrated Platforms for the 3Rs. 10th World Congress on Alternatives and

Animals in the Life Sciences, Washington State Convention Center, Seattle, USA, Aug. 23, 2017. (Plenary talk)

- ⑪ 北野宏明. 人工知能が切り拓く新たながん研究. 第76回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 神奈川, Sep. 29, 2017. (invited)
- ⑫ Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Objectives and Implications. Symposium on AI and Society, Toranomon Hills, Tokyo, Oct. 10, 2017. (Keynote)
- ⑬ 北野宏明. System Biology, Data and AI. 第4回日本橋ライフサイエンスシンポジウム, 日本橋ライフサイエンスハブ, 東京, Oct. 14, 2017. (invited)
- ⑭ Kitano, H. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI, Robotics, and Systems Biology. DSAA2017 - The 4th IEEE International Conference on Data Science and Advanced Analytics, Shinagawa Prince Hotel, Tokyo, Oct. 20, 2017. (Keynote)
- ⑮ Kitano, H. Noble Turing Challenge. JSPS-IVA Seminar “The Nobel Turing Challenge - When will the first Nobel Prize be awarded for AI?”, IVA's Conference Centre, Stockholm, Sweden, Oct. 25, 2017. (invited)
- ⑯ Kitano, H. Nobel Turing Challenge. OECD conference ‘AI: Intelligent Machines: Smart Policies’, OECD, Paris, France, Oct. 26, 2017. (invited)
- ⑰ 北野宏明. Nobel Turing Challenge: Grand Challenge of AI and Systems Biology. 平成29年度日本バイオインフォマティクス学会・生命システム理論研究会「AIを用いた細胞システムの解明に向けて」, 京都大学 iPS 細胞研究所, 京都, Dec. 15, 2017. (invited)

G. 知的財産権の取得状況
なし

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
— 新型反復曝露実験と単回曝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)

Percellome データベースを利用した解析パイプライン

分担研究者 夏目 やよい
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
バイオインフォマティクスプロジェクト
研究員

研究要旨

マウス（C57BL/6, 12週齢、オス）にバルプロ酸ナトリウム（0, 50, 150, 500 mg/kg、
溶媒：メチルセルロース 0.5%）を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に各臓器（脳：皮質及び
海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓）を回収してマイクロアレイ解析に供した。Percellome法
により正規化されたデータを入力として、Garudaガジェットを用いたパスウェイ解析を行
い、バルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現への影響を各臓器で比較した。その結果、特
に細胞周期関連遺伝子への影響が顕著であったが、複数の臓器で共通して認められる傾向
（細胞周期、免疫応答関連遺伝子）においても時点は多様であり、一方で臓器特異的な傾
向（RHO GTPase、rRNA転写、脂肪酸代謝関連遺伝子）も認められた。

A. 研究目的

Percellomeプロジェクトでは多
岐にわたる化合物による遺伝子発現プ
ロファイルの収集が続けられており、
これらのデータを用いた毒性発現機構
の推定を実現するためには解析環境の
整備が必要である。一方、SBIが開発
を進めている情報解析プラットフォーム
であるGaruda [1]は、互換性のあ
る対応ソフトウェアを自由に連結させ
ることによりプログラミングなどの技

術を必要とすることなくデータ解析を
行うことを可能としている。本研究で
は、PercellomeデータをGaruda上で
解析し、化合物の毒性発現機構の推定
を行うと同時に、本ケーススタディー
によってPercellomeデータの解析パ
イプラインを構築することを目的とし
ている。これにより、バイオインフォ
マティクスの経験・技術の有無を問わ
ずより多くの研究者がPercellomeデ

ータを利用できるようになると期待される。

B. 研究方法

解析データには、バルプロ酸ナトリウムを投与したマウスの複数の臓器における遺伝子発現プロファイルを使用した。マウス (C57BL/6, 12週齢、オス) にバルプロ酸ナトリウム (0, 50, 150, 500 mg/kg、溶媒: メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に各臓器 (脳: 皮質及び海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓) を回収してマイクロアレイ解析

(Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供した。このデータはPercellome法[2]により正規化され、Percellomeデータとしてデータベース化されている。データベース内での該当するPercellomeデータ検索、処理時間及び濃度依存的に発現変動が見られる遺伝子 (DEG) のリスト及び発現量の抽出には、インハウスのソフトウェア (PercellomeDB index、MF Surface、Rsort) を使用した。次に、TargetMine

(<http://targetmine.mizuguchi-lab.org> [3, 4]) でヒトオーソログのリスト入手後にDAVID

(<https://david.ncifcrf.gov> [5, 6]) でEnsembl gene IDに変換した。DEGの機能解析にはGarudaを使用した。Garuda上ではガジェットと呼

ばれる対応ソフトウェアが多数搭載されている。その中で、Ensembl gene IDに対応するガジェットの検索にはNandiを使用した。入力したDEGと関連するパスウェイの検索とその描画に用いるXMLファイルのダウンロードにはBiocompendiumを使用し、このXMLファイルとPercellomeデータを用いてパスウェイ上の遺伝子の発現変動を可視化する際にはCytoscape [7-9]を使用した。XMLファイルの入手ができないパスウェイ (“Metabolic Pathway”) の可視化にはNaviCell [10-11]を使用し、遺伝子発現量は“InsoSigMap: map of functional redundancies between informative gene sets”のパスウェイにマッピングした。その他の関連パスウェイの検索にはReactome [12-13]およびTargetMineを使用した。

C. 研究成果

ReactomeとTargetMineを用いたパスウェイ解析を行い、バルプロ酸ナトリウムによる遺伝子発現への影響を各臓器で比較した。その結果、特に細胞周期関連遺伝子への影響が顕著であったが、臓器によってその影響が認められる時点が異なっていた (海馬: 2時間、心臓: 4時間、腎臓: 24時間)。また、抗原プロセッシング (腎臓: 4時間) やIL-12刺激によるJAK-STAT経路の

活性化（肺：8時間）など、免疫反応に対する影響も認められた。このように複数の臓器で認められる遺伝子発現変動パターンに加えて、RHO GTPase（海馬：24時間）、RNAポリメラーゼIIIによるrRNA転写（肺：2時間）、脂肪酸代謝（肝臓：8時間）に関連する遺伝子の変動といった臓器特異的な影響も検出された。Biocompendiumを用いて入手可能なXMLファイルを検索し、Cytoscapeでこのような遺伝子発現変動のパターンを可視化したところ、腎臓における細胞周期関連遺伝子の発現変動は明瞭な処理時間・濃度依存性を示した。さらにNaviCellを用いて、肝臓における代謝関連遺伝子の発現変動を可視化したところ、特にミトコンドリア、脂肪酸代謝、エストロゲン応答に関連する遺伝子の発現変動が同様に明瞭な処理時間・濃度依存性を示した。

D. 考察

バルプロ酸ナトリウムは副作用として肝毒性を有することが知られているが、肝臓以外における遺伝子発現への影響はまだ十分に理解されているとは言い難い。本研究によって、バルプロ酸ナトリウム投与によって各臓器において異なる変動が起きることが確認された。特に、腎臓における影響が大きく、半減期よりもはるかに長い投与後24時間で最も変動が顕著であると

いう結果が得られた。これはバルプロ酸ナトリウムの代謝物による影響であると考えられ、臓器間で異なる応答性を理解するためにはその動態を考慮する必要があると考えられる。一方、細胞周期や免疫応答に関連する遺伝子は複数の臓器において発現変動が認められたが、このような共通パターンはバルプロ酸ナトリウムの毒性発現機構を推定するために有益な情報であると言える。今後はIL-12を介したJAK-STAT経路の活性化に対してバルプロ酸ナトリウムが与える影響について更に解析することを計画している。

Percellomeデータを効果的にGaruda上で解析するためには、現在使用可能なガジェットに加えて、①オーソログ検索・変換機能、及び②gene ID変換機能が必要であることが明らかになった。本研究ではウェブアプリケーションを使用した、解析環境の整備の観点からこれらの操作についてもGaruda上で可能であることが好ましい。この点については改善指針として既に共有済みであり、今後Garudaガジェットとして新たに開発を計画している。

E. 結論

バルプロ酸ナトリウムが遺伝子発現プロファイルに与える影響は、複数の臓器で共通して認められる傾向（細胞周期、免疫応答関連遺伝子）におい

ても時点は多様であり、一方で臓器特異的な傾向 (RHO GTPase、rRNA転写、脂肪酸代謝関連遺伝子) も認められる。これらを統合的に解釈するため、Garudaのガジェットを用いたシステム生物学的アプローチが有効であると考えられる (現在準備が進行中)。また、Garudaはガジェット間の互換性に改善の余地は残っているものの、解析プラットフォームとして十分にその機能を果たすことができることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

①Gordon Research Conference, Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2017.8.13-18, NH, USA)

“Quantitative systems toxicology approach by Percellome to investigate organ-specific reactions by administration of valproic acid in mice” (Poster)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno

②RECOMB/ISCB Conference on Regulatory & Systems Genomics with DREAM Challenges (2017.11.19-21, NY, USA)

“Assessment of the effect of valproic acid on organ-specific reactions in mice by analyzing quantitative Percellome toxicogenomics data” (Poster)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, and Jun Kanno

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

【引用文献】

- [1] Ghosh, S., et al. *Nature Reviews Genetics* 12.12 (2011): 821-832.
- [2] Kanno, J., et al. *BMC genomics* 7.1 (2006): 64.
- [3] Chen, YA., et al. *PLoS One* 6.3 (2011): e17844.
- [4] Chen, YA., et al. *PLoS One* 9.6 (2014): e99030.
- [5] Huang, DW., et al. *Nature Protoc.* 4.1 (2009): 44-57.
- [6] Huang, DW., et al. *Nucleic Acids Res.* 37.1 (2009): 1-13.
- [7] Shannon, P., et al. *Genome Research* 13.11 (2003): 2498-504.
- [8] Rowan, C., et al. *Am Assoc Cancer Res Educ Book*

(2005): 12-16

[9] Cline, MS. Et al. *Nature Protoc.* 2.10 (2007):
2366-82

[10] Kuperstein, I., *BMC Syst Biol* 7 (2013): 100.

[11] Bonnet, E., et al. *Nucleic Acids Res* 43 (2015):
W560-W565.

[12] Milacic, M., et al. *Cancers (Basel)* 4.4 (2012):
1180-211.

[13] Fabregat, A., et al. *Nucleic Acids Res* 44.D1
(2016): D481-7.

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Takeshi Hase, Samik Ghosh, Sucheendran K. Palaniappan, and Hiroaki Kitano	Cancer Network Medicine	Joseph Loscalzo, Albert-László Barabási, and Edwin K. Silverman	Network Medicine - Complex Systems in Human Disease and Therapeutics	Harvard University Press	USA	2017	Chapter 13
Kitano, H.	Biological Complexity and the need for Computational Approaches.	Sara Green	Philosophy of Systems Biology: Perspectives from Scientists and Philosophers	Springer	Germany	2017	169-180

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
Buesen R, Chorley BA, N, da Silva Lima B, Daston G, Deferme L, Ebbels T, Gant TW, Goetz A, Grealley J, Gribaldo L, Hackermüller J, Hubesch B, Johnson D, Johnson K, Kanno J, Kauffmann HM, Laffont M, McMullen P, Meehan R, Pemberton M, Perdichizzi S, Piersma AH, Sauey UG, Schmidt K, Seitz H, Sumida K, Tollens KE, Tong W, Tralau T, van Ravenzwaay B, Weber RJM, Worth A, Yauk C, Poole A.	Applying 'omics technologies in chemicals risk assessment: Report of an ECETOC workshop.	Regul Toxicol Pharmacol.	91 Suppl 1	S3-S13	2017
Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J.	Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration.	J Toxicol Sci.	42(2)	121-128	2017
Archana Bajpai, Takashi Ishii, Kosuke Miyayuchi, Vipul Gupta, Yuka Nishio-Masaikane, Yuki Shimizu-Yoshida, Masato Kubo and Hiroaki Kitano.	Insights into gene expression profiles induced by Socs3 depletion in keratinocytes	Scientific Reports	7	Article number: 15830	2017
Akinori Nishi, Katsuya Ohbuchi, Hirotaka Kushida, Takashi Matsumoto, Keiko Lee, Haruo Kuroki, Shigeaki Nabeshima, Chikashi Himobori, Nagisa Komokata, Hitomi Kanno, Naoko Tsuchiya, Makoto Zushi, Tomohisa Hattori, Masahiro Yamamoto, Yoshio Kase, Yukiko Matsuoka and Hiroaki Kitano.	Deconstructing the traditional Japanese medicine "Kampo": compounds, metabolites and pharmacological profiles of maoto, a remedy for flu-like symptoms,	npj Systems Biology and Applications	3	Article number: 32	2017

Caron, E., Roncagalli, R., Hase, T., Woloski, W.E., Choi, M., Menoita, M.G., Duran, S., García-Blesa, A., Fierro-Monti, I., Sajic, T., Heusel, M., Weiss, T., Malissen, M., Schlapbach, R., Collins, B.C., Ghosh, S., Kitano, H.	Precise Temporal Profiling of Signaling Complexes in Primary Cells Using SWATH Mass Spectrometry.	Cell Reports	18	3219-3226	2017
北野宏明	ブロックチェーンの活路は人工知能との連携にあり	ハーバード・ビジネス・レビュー	8	24-37	2017
北野宏明	あなたのラボにAI（人工知能）×ロボットがやってくる」, ノーベル・チューリング・チャレンジ:人工知能による科学的発見の再定義と生命科学の加速をめざして,	実験医学別冊	12月別冊	22-31	2017
北野宏明	システム論とデータ駆動分析から可能となる老化研究	実験医学増刊号「総力戦で挑む老化・寿命研究」	35 (20)	115-123	2017