

厚生労働行政推進調査事業費

化学物質リスク研究事業

新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
(H30-化学-指定-001)

平成30年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

令和元（2019）年 5月

目 次

I. 総括研究報告 新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による 有害性予測体系の構築 菅野 純	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データ ベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発 菅野 純	-----	19
2. 化学物質の反復曝露による毒性発現のエピジェネティ クス機構解析 北嶋 聡	-----	27
3. Percellome専用解析ソフトウェアの開発・改良 相崎 健一	-----	33
4. システム毒性解析の人工知能化 北野 宏明	-----	37
5. Percellomeデータベースを利用した解析パイプライン 夏目 やよい	-----	43
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	49

I . 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）
平成 30 年度 総括研究報告書

新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
(H30-化学-指定-001)

研究代表者 菅野 純

独立行政法人 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

特に先行研究（平成 24～29 年度）で実施した Percellome 法*を基盤とした「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のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、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 5 研究を実施した。

- (1) 短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による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毒性発現のエピジェネティクス機構解析
- (3) システム毒性解析の人工知能化
- (4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良
- (5) Percellome データベースを利用した解析パイプライン

(1) では、計画通りイミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンの 2 実験を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と上記の化学物質に特徴的な要素を抽出しつつある。特に先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の 2 物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性（神経毒性及び発癌性）に関わるシグナルネットワークが発動することが示された。

(2) では H30 年度にアセフェートのエピジェネティクス機構解析を予定していたが、バルプロ酸ナトリウム (VPA) に変更した。これはすでに VPA の単回及び反復投与の際の遺伝子発現データを有し、かつ、ヒストン脱アセチル化酵素 1(HDAC1)の阻害を介してヒストンのア

セチル化を増加させることが知られており、この性質が本研究分担課題における陽性対照物質としてより適切と考えられたことから変更を決定した。VPAのエピジェネティック機構解析としてヒストン修飾解析を実施したところ、一般認識であるヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)の阻害ではなく、H3K9me3がグローバルに阻害されているという、既存情報からの予想(HDAC阻害を介しH3K27Acが増加する)とは異なる結果を得た。

(3)では、AI化が可能と思われる工程として遺伝子発現データから候補遺伝子を抽出する工程を選定し、深層学習プロトタイプ(Deep Learning)を用いて膨大な遺伝子変動データから有意に変動した遺伝子を高精度で自動同定させる技術を開発し、正答率95%という優秀な成績を確認した。また解析パイプラインの中核として、先行研究によるSHOEとその関連ツールの連携を強化した。

(4)では、新型反復曝露実験における有意な基線反応抽出ソフトウェアの開発のため、Perclomeデータベースから基臓器・溶媒・サンプリング時間毎に溶媒群のトランスクリプトームデータを集めて参照データベースを構築し、基本アルゴリズムを生成した。また自動化のための解析計算用ソフトウェアBaselineComparison.exeを作成した。

(5)では解析パイプライン整備の一環として実際の解析プロセスを実行し、バルプロ酸ナトリウム(VPA)が脂肪酸代謝を制御する各種核内受容体の活性に影響すること、及び数理モデリング(ブーリアンネットワーク)によりこれらのシグナルクロストークをシミュレーションし、VPA投与がSREBP/PPARα比の上昇を介して肝毒性につながる可能性があること、を示した。

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。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。

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	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
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 部長	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 サブプロジェクトリーダー

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

長谷武志 特定非営利活動法人
システム・バイオロジー研究機構

Natalia Polouliakh 株式会社
ソニーコンピュータサイエンス
研究所

A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8.5 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融合し、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築を進める。

B. 研究方法

(1) 短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発【菅野】

●試薬及び動物：

イミダクロプリド (Imidacloprid; 分子量: 255.66、Cas No.: 138261-41-3、105827-78-9、純度 99.9%、富士フイルム和光純薬(株)) 及び、ジエチルニトロサミン

(Diethylnitrosamine; 分子量: 102.14、Cas No.: 55-18-5、純度 100%、東京化成工業(株)(単回曝露時はナカライテスク: 製造中止のため同等品を選択)) について、単回曝露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) 時のイミダクロプリド及びジエチルニトロサミンの曝露量はそれぞれ 0、10、30、100 mg/kg 及び 0、1、3、10 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、[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。イミダクロプリドの 4 回の全動物に対する反復曝露の用量は用量設定実験の結果 70mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の 0、10、30、100mg/kg とした。以下、同様に、ジエチルニトロサミンの 4 回反復投与の用量は 5mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、1、3、10mg/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) を用い溶媒はイミダクロプリドではコーンオイル (C8267、Sigma-Aldrich)、ジエチルニトロサミンでは 0.5%メチルセルロース (MC) (133-14255、富士フイルム和光純薬(株)) 水溶液とし、金属製胃ゾンデ (KN-348、夏目製作所) を用いて、イミダクロプリドではガラス製シリンジ、ジエチルニトロサミンではプラスチック製シリンジを用いて強制経口投与を行い、最終曝露の 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毒性発現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 ChIP-Seq

バルプロ酸ナトリウムを 14 日間反復投与した後、溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) 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) システム毒性解析の人工知能化【北野】

●深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

先行研究において開発した、多層(畳み込み層やプーリング層で構成される 18 層) からなる resnet モデル (Resnet は、画像分類で高い精度を示すことが多く、ImageNet2015 (<http://image-net.org/challenges/LSVRC/2015/>) における画像分類に関するコンペティションで、最も高い精度を示したモデルである (Kaming He et al. 2015, arXiv:1512)) を利用した深層学習システムをベースに、予測精度を向上させるためにトレーニング及び検証用の画像データ(遺伝子発現変動を示す 3 次元グラフ) セットを新たに作成した。この際、①ノイズの原因となる数値軸や文字を除去し、②3 次元グラフの描画角度を最適化、さらに③情報量を増やすために、グレーからフルカラーに変更し且つ画素数を大幅に増加させた。

なお深層学習システムのトレーニングとチューニングした予測器の予測精度検証には、熟練した研究者が逐一検証・分類 (Positive, Negative, Rough の 3 分類) した 3 次元グラフ画像データセットを重複しないよう二分して用いた。

●Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動強化

先行研究で開発を進めていた転写領域解析ソフトウェア SHOE の機能追加や改良を進め、また Percellome ガジェットを含む他の Garuda Platform 用ソフトウェア (Garuda ガジェット) との連動については、実データを利用した試験運用により、プログラム改良による効果を評価した。

(4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良【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。

(5) 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 (VPA) 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取得して使用した。このデータは、マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) に VPA (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) に供したもので、Percellome 法により正規化 (絶対量化) 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.mizuguchilab.org>) でヒトオーソログのリスト入手後に DAVID (<https://david.ncicrf.gov>) で Ensembl gene ID に変換した。DEG の機能解析には Garuda を使用した。VPA を投与したマウスの肝臓において発現が変動した遺伝子群を制御する核内受容体 (PPAR α 、SREBP, ER) を介したシグナル伝達のクロストークをシミュレーションするため、GINSim を用いてプーリアンネットワークを構築した。

倫理面への配慮

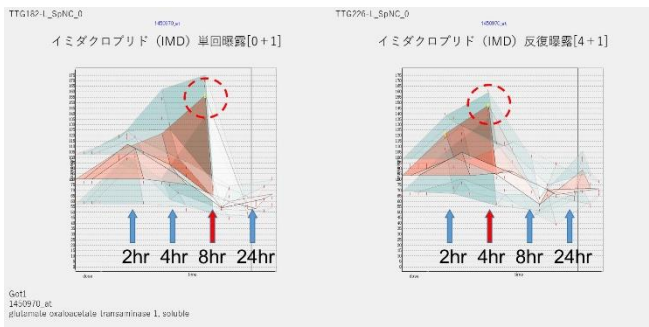
動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程(平成27年4月版))

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」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発【菅野】

平成30年度は、イミダクロプリド及びジエチルニトロサミンを検討した。尚、最終投与後2、4、8、24時間の早い変動を過渡反応(Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの上昇乃至低下の変動を基線反応(Baseline Response)と定義し解析を実施した。

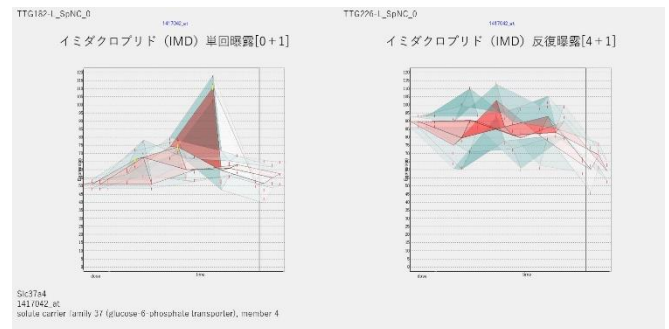


【単回に比して反復により発現ピークが早まる例を示す。GOT1遺伝子において、[0+1]で8時間目にあるピークが[4+1]において4時間目に早まっている(赤丸)。】

イミダクロプリド (IMD) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数(過渡反応を示す遺伝子)は単回曝露実験(以下、[0+1]と表記)において296、反復曝露実験(以下、[4+1]と表記)において80であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減

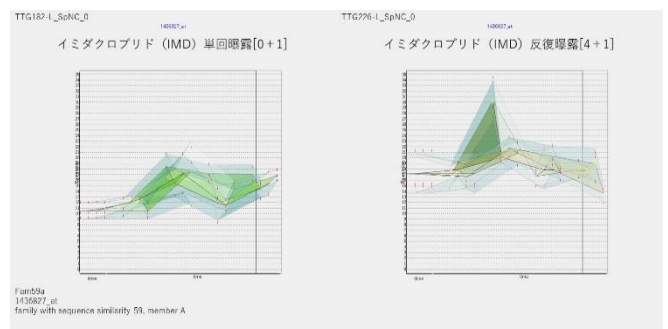
少していた。

[0+1]と[4+1]に共通する過渡反応遺伝子は42であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時に8時間ピークであった遺伝子が反復曝露時に4時間ピークに早まる傾向が明らかに認められた。この過渡遺伝子群からは、ニコチン拮抗剤ブチオン代謝系、ニコチン代謝系、アニリン代謝系等のネットワークがIPAにより抽出された。



【[0+1]でのピークが[4+1]において消失し基線反応が上昇している例】

[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は254あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これは、基線反応が四塩化炭素の際(EIF2系、小胞体ストレスシグナル)とは逆方向の現象であった。グルココルチコイド受容体系、ダイオキシン受容体系、等の核内受容体を介した、糖脂質代謝系へのシグナルネットワークが関与することが示唆された。

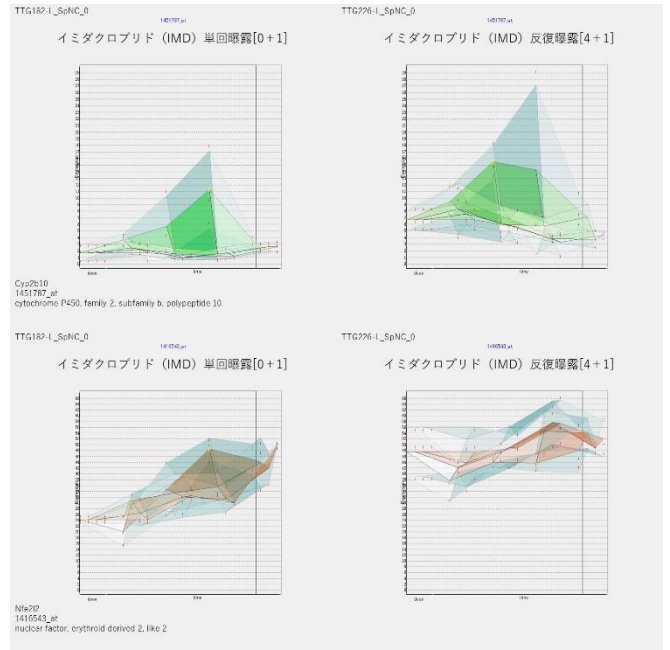


【[0+1]でピークが無く、[4+1]においてピークが現れ、基線反応が上昇している例】

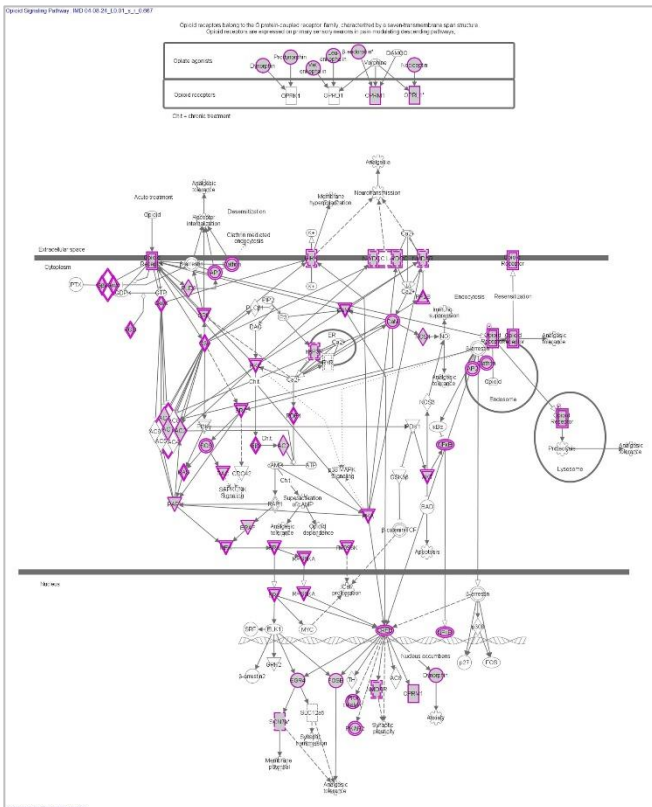
[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は48あり、その殆どに基

線反応の上昇を伴っていた。これらは、糖や脂質のグリコシル化に関わる系に属することが示唆された。

反復曝露が基線反応に及ぼす影響を、[0+1]と[4+1]の溶媒対照群同士の発現値を比較することで検出することができる。その結果、反復曝露により統計学的に有意に発現値が上昇した発現コピー数2以上の遺伝子は約 8,000、低下した遺伝子は約 90 であった。上昇した遺伝子群は、オピオイドシグナル系、神経軸索誘導系、神経炎症シグナル系などに関わるネットワークを含むことが示唆された。その上流にエストロゲン受容体系が関わることを示唆されたが、その詳細は現段階では不明である。なお、第 I 相、第 II 相代謝酵素の基線反応は上昇しており、反復曝露によるそれらの軽度の誘導がみられた



【代謝系への影響。Cyp2b10及びNfe2l2 (Nrf2) を示す。前者は、基線反応の上昇と過渡反応の上昇、後者は基線反応の上昇を認める】



【IMDによるオピオイドシグナル系の誘導 (IPAより)】

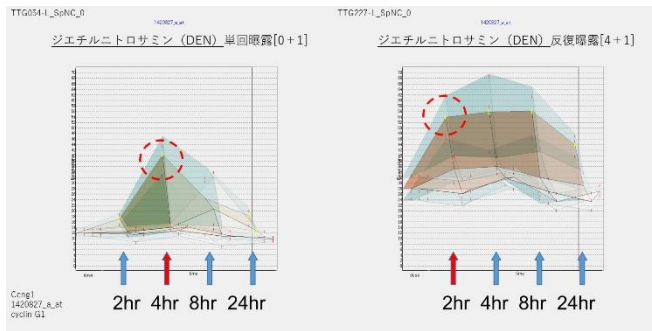
以上、イミダクロプリドはマウス肝において、ニコチンに関わる代謝系及びシグナル系を起動させるとともに、[0 + 1]と[4 + 1]の遺伝子発現プロファイルの比較により、神経毒性を示唆する結果を得た。分子機序について、特に標的分子機構の特定について、更なる解析を進める。

ジエチルニトロサミン (DEN) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数 (過渡反応を示す遺伝子) は単回曝露実験 (以下、[0 + 1]と表記) において 223、反復曝露実験 (以下、[4 + 1]と表記) において 77 であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 22 は、多くが[4+1]に共通する変動遺伝子であった。

[0+1]と[4+1]に共通する変動遺伝子は 18 であり、内 11 が発現上昇、7 が発現低下を示した。上昇した遺伝子群は、Ccng1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM

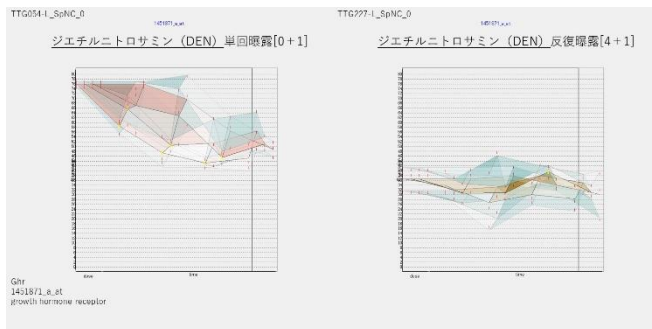
シグナルに関わる遺伝子群であった。これらは、[4+1]において、より早期に誘導がかかり発現値がより高



【DENによるCcng1(Cyclin G1)の誘導。[0+1]でのピークは、[4+1]により早まり、発現が持続するとともに基線反応が上昇している。】

値である傾向を示した。

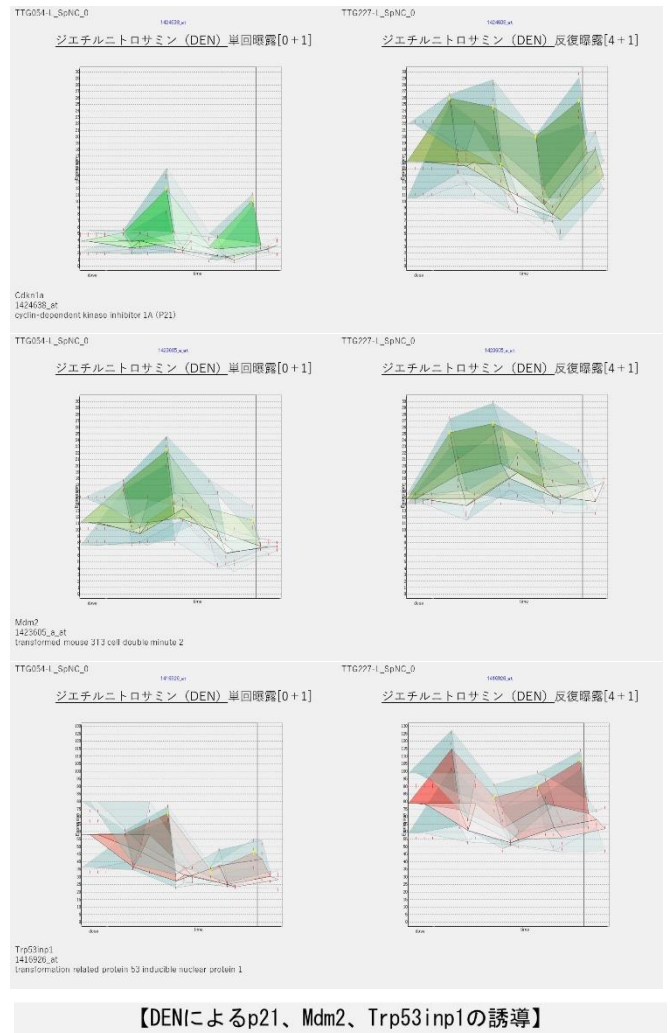
[0+1]で下降する過渡反応を示した遺伝子は 201 あり、その意義については現在解析中である。これらは、[4+1]において過渡反応は減弱乃至無反応であり、上昇に転じるものはなく、また、基線反応が上昇する



【[0+1]で下降ピークを示し、[4+1]でピーク消失し、基線反応が下降する例】

ものほとんどなかった。

[4+1]において変動した 77 遺伝子、うち 58 が発現上昇を示し、Ccng1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM シグナルに関わる遺伝子群であった。発がん性を示唆する p53 シグナリング、Rb 遺伝子シグナリング等の誘導が示された。



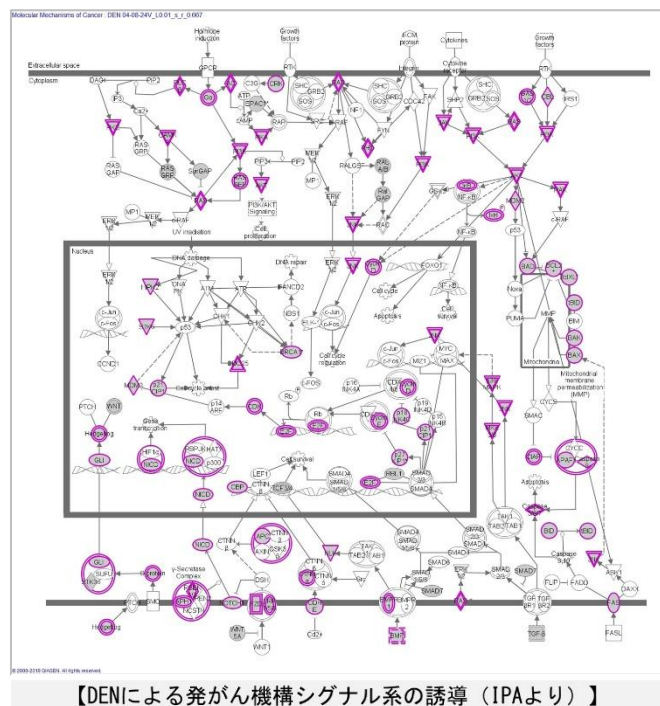
【DENによるp21、Mdm2、Trp53inp1の誘導】

[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は 205 あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これの分子機構は現段階で不明である。

[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は 59 あり、その殆どに基線反応の上昇を伴っていた。PXR などの核内受容体系に微弱なシグナルが流れる可能性が示唆されたが詳細は現段階で不明である。

反復曝露が基線反応に及ぼす影響を見るため、[0+1]と[4+1]の溶媒対照群同士の発現値を比較した。反復曝露により統計学的に有意に発現値が上昇した発現コピー数 2 以上の遺伝子は約 7,100、低下した遺

伝子は約 660 であった。上昇した遺伝子群は、p53 を上流とする発がん関連のネットワーク系、Wnt/ β -catenin シグナル系など、発がん系に加え、軸索誘導シグナル系など、神経毒性を示唆する系も発動していた。



NRF2 系は、[4+1]の基線反応が軽度上昇を示しており、第 II 相代謝酵素の弱い誘導がみられたが、第 I 相は誘導されていなかった。

基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、LXR、FXR 等、HNF4A、HNF1A、GR を上流に持つ核内受容体系シグナルを含んでいた。

以上、DEN はマウス肝において、反復曝露により発がん作用を示唆する p53 シグナル、Wnt/ β -catenin シグナル系等を強力に起動させることが確認された。

先行研究で、実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

(2) 化学物質の反復曝露による毒性発現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等の遺伝子発現修飾機構(所謂エピジェネティクス)に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。

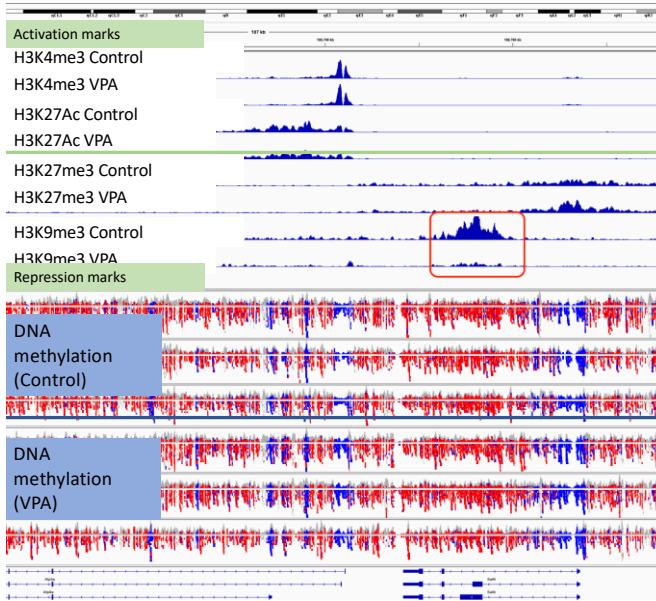
●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

平成 30 年度は、バルプロ酸ナトリウムを 14 日間反復投与した後、溶媒(0.5%メチルセルロース水溶液)を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒(0.5%メチルセルロース水溶液)を単回投与した 2 時間後のマウス肝臓を用いて、クロマチン免疫沈降(ChIP)を実施した。具体的には、H3K4me3 抗体、H3K27Ac 抗体、H3K27me3 抗体及び H3K9me3 抗体による 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、両者のヒストン修飾を網羅的に比較した。網羅的シーケンス解析を実施した結果は以下の通り。

まず各抗体についての溶媒対照群と反復投与群において認められたピーク数の比較においては、特に H3K9me3 のピーク数が 25.5%に減少しており、VPA の反復投与によって一般認識であるヒストン脱アセチル化酵素 1(HDAC1)の阻害ではなく、H3K9me3 が阻害されることが明らかになった。

また、先行研究で実施した四塩化炭素を 14 日間反復投与した際のマウス肝臓におけるヒストン修飾の解析をさらに進め、特に、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ている H3K27me3 は、反復投与により 13.8%もピーク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他、各ピークを網羅的に解析し、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2倍以上、もしくは1/2以下）したピーク数で、数の多い方のピーク数が20以上という条件にて抽出して、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した。

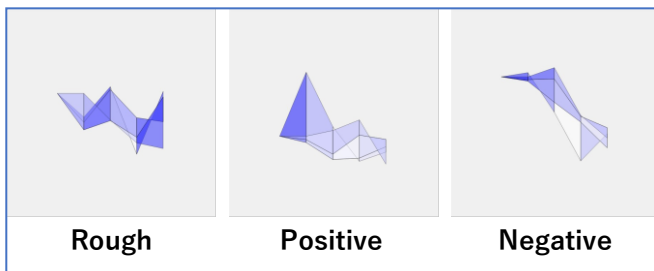


溶媒およびVPAの反復投与をおこなったマウス肝におけるChIP-seq解析およびDNAメチル化解析をまとめた一例 (Sa114)。図上半分の赤枠部分はH3K9me3の溶媒投与（枠内上段）およびVPA投与（枠内下段）を示しており、大幅なピークの低下が見られる。一方、図下半分のDNAのメチル化状態（赤=メチル化、青=非メチル化、n=3）には、VPA投与（上3列=対照、下3列=VPA投与群）による変化は見られない（先行研究結果）。

（3）システム毒性解析の人工知能化【北野】

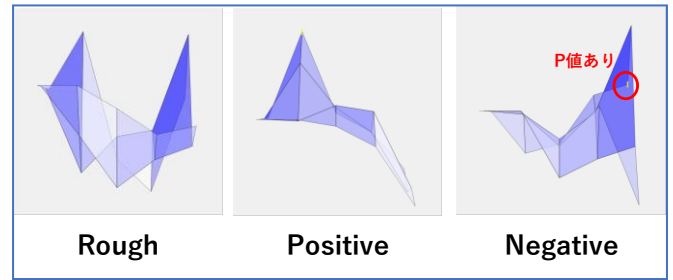
●深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

今年度は以下の4つの画像データセットを生成し、それぞれのデータセットを用いて、4つのdeep learningに基づく分類器を構築した。

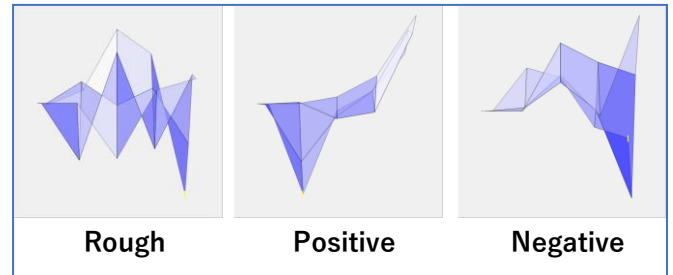


① 横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関するP

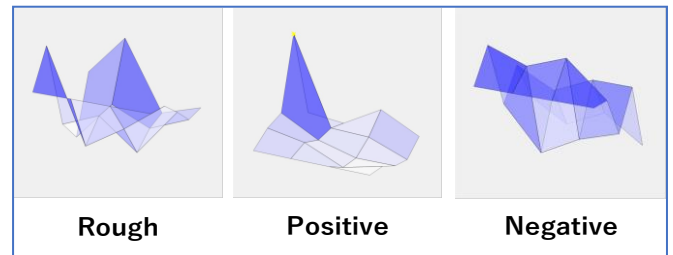
値の情報を含まない画像



② 横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関するP値の情報を含む画像

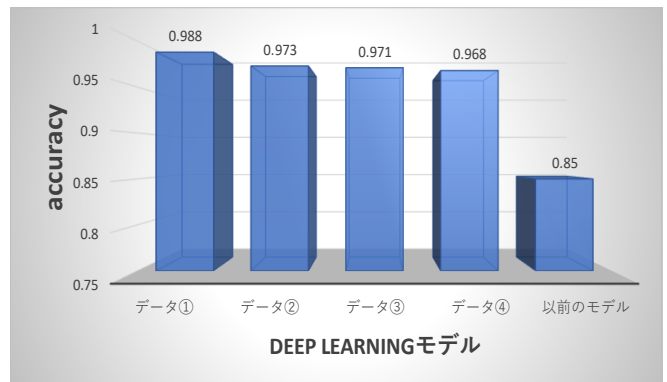


③ 画像データ②を、上下方向に反転させた画像



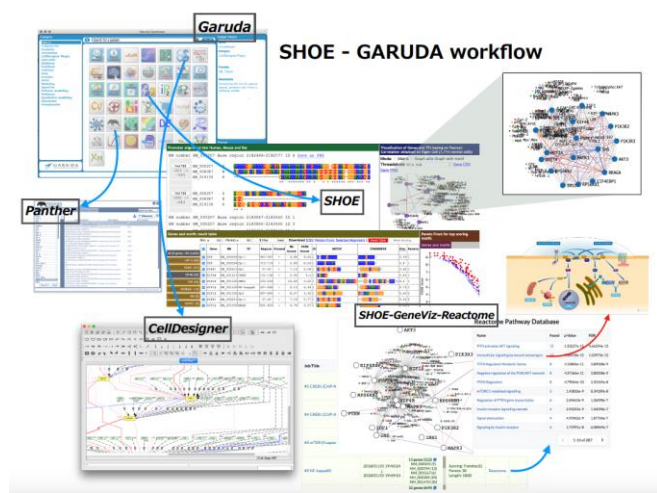
④ デフォルトの角度から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関するP値の情報を含む画像

構築した分類器に対して、5 fold cross validation を実施し、予測精度を検証した結果、先行研究による分類器の予測精度が85%程度の正答率であったのに対し、今年度構築した分類器では、いずれも95%以上の非常に優秀な正答率を示した（下図参照）。



●Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動強化

今年度強化した連携の流れの概略を下図に示す。



Garuda Platform 上で SHOE をハブとしたワークフローが拡大したことにより、SHOE と Percellome の連動も密になり、よりスムーズな解析が可能となった。

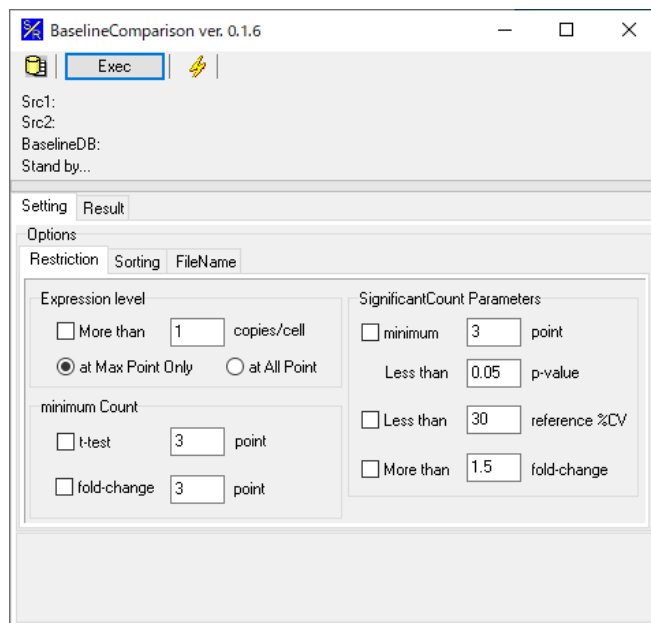
(4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良【相崎】

平成 30 年度は、現状ではマニュアル計算で行っている新型反復曝露実験の基線反応評価を自動化すべく、有意な基線反応変動を示す候補遺伝子を自動抽出するための解析ソフトウェアの開発を進めた。

具体的には、Percellome データベースから臓器・溶媒・サンプリング時間毎に溶媒群のトランスクリプトームデータを GeneChip 2312 枚分 収集し、プローブセット毎に%CV 値等の統計値を計算して、最も安定しているサンプリング時間を決定した。

基線反応評価基準としては、①溶媒群データが最も安定しているサンプリング時間の一時点参照、若しくは②%CV が閾値以下の複数のサンプリング時間参照、さらには③%CV に基づいたサンプリング時間毎の重み付けによる全時点参照、の三案の比較を進め、新型反復曝露実験の有意な基線反応を抽出するアルゴリズム

を生成した。またこれを実装した候補遺伝子の自動抽出ソフトウェア BaselineComparison.exe を開発した。



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

先行研究の成果より、バルプロ酸ナトリウム (VPA) 投与によって PPARα、SREBP、ER の活性が影響を受けることが見いだされた。PPARα は脂質代謝の制御に関わる核内受容体であり、脂肪酸の構造を有する VPA が PPARα のリガンドとして直接活性化に関わったことが考えられた。SREBP は脂肪酸やトリグリセリド、コレステロール産生の制御に関わっている。ER のリガンドであるエストラジオール 17β (E2) は ER 依存的に SREBP の発現を抑制し、トリグリセリドの蓄積に対しても抑制的に働くことが報告されている (Han, S., et al. *Hepatology* 59:1791(2014):1802)。これらのことから、上記の核内受容体は互いにクロストークしていることが強く示唆されている。一方、VPA は MAPK の活性化を介してエストロゲンに対する細胞の感受性を上げる (Jansen, MS., et al. *PNAS* 101.18 (2004): 7199-7204) ほか、逆にエストロゲン産生を抑制することが報告されている (Glister, C., et al. *PLoS One* 7.11

(2012):e49553)。このように、上記核内受容体のクロストークに対して VPA が何らかの作用を呈する可能性が示唆されているものの、その関係性は複雑で特定のタンパク質の活性に注目することでは VPA の作用を推定する事は困難であると考えられた。そのため、核内受容体のクロストークやそれに対する VPA の作用を数理モデリングによって表現し、シミュレーションをおこなうことで VPA が呈する肝毒性の分子メカニズムを推定することを試みた。まず、上記核内受容体が関与するシグナル伝達経路に含まれるタンパク質やリガンド結合などの反応の有無を 0 または 1 で表現し、制御関係（正の制御か、負の制御か）を表す矢印で連結させたネットワーク（ブーリアンネットワーク）を構築した。これを用いて VPA の有無とエストロゲンの影響のシミュレーションをおこなった結果、性別依存的に VPA 存在下で脂肪酸代謝が減弱する可能性が示唆された。

D. 考察

「短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発」においては、先行研究で実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

イミダクロプリド (IMD) は、ネオニコチノイド系の殺虫剤であり、昆虫のニコチン受容体に高親和性を有するが、哺乳類のニコチン受容体にもシグナルを流すデータが蓄積されている。本実験において、ニコチン系のシグナルネットワークを誘導し神経毒性を惹起することを示唆する解析結果が、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験のマウス肝からの遺伝子発現データの比較検

討から得られたことは、本試験系の網羅性と高感度性、高精細性を示すものと考えられる。

ジエチルニトロサミン (DEN) についても、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験の遺伝子発現データの比較検討から、発がん性を示す所見が確認され、その分子メカニズムを示唆する詳細な情報が得られたことも、本試験系の有意性を示すものと考えられる。

本年度研究成果により、新たな解析手法が利用可能となることから、先行研究のデータに対してもそれらを適用し、毒性標的とその上流ネットワークを過渡反応と基線反応の両面から更に深く解析する。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについても、反復曝露の実験プロトコルに差異があるものの、同様の検討を試みる予定である。

「化学物質の反復曝露による毒性発現のエピジェネティクス機構解析」においては、平成 30 年度は、ChIP-Seq により VPA 反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位が抽出され、基線反応の成立に関わる知見が得られた。当初、ヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる、という本研究分担課題における陽性対照物質のデータを得られると想定されたが、実際はヒストンのアセチル化 (H3K27Ac) は増加せず、むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。他方、H3K9me3 が 74.5% 低下することが明らかとなり、H3K27Ac の結果と比較するすると、少なくともマウス肝においては VPA は HDAC の阻害ではなく、H3K9me3 を阻害していることが示唆された。VPA により H3K9me3 阻害が起こるという新知見が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものとする。H3K9me3 などのヒストン修飾と DNA メチル化は、遺伝子発現を抑制的に制御している。本研究においては、グローバルに H3K9me3 が減少していることから、グローバルな遺伝子発現の活性化

が想定された。しかしながら、VPA の反復投与による基線反応に変化の起こる遺伝子、即ち、反復投与によって遺伝子発現が増加する遺伝子は多くない（数百遺伝子）。そこで、ヒストン修飾とともに遺伝子発現制御に関わる DNA メチル化に関して VPA の反復投与の結果を見ると、DNA メチル化には変化が起こっていない。そのことから、H3K9me3 はグローバルに低下するが、DNA メチル化による制御が残っており、今回の解析条件においては、H3K9me3 の低下は、遺伝子発現制御に対して「silent」な状態である可能性が考えられた。

「システム毒性解析の人工知能化」が重要となるのは、システム・レベルで毒性を理解するには、膨大な実験データを格納したデータベース、文献、数値モデルなどを統合的に解析する必要があるからである。先行研究で、我々は、個別機能の解析ツール群を構築し Garuda Platform 上において連動性を実現してきた。これらのツール群は今後もさらに拡充させる必要があるが、同時に、大規模かつ複雑なデータを意味のある形で解析するには、深層学習やテキストマイニングなども含めた一連の人工知能アルゴリズム群を連携させる必要がある。

その具体的な応用例として、深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別においては、今年度作成した分類器の予測精度は 95%以上の正答率という非常に良い成績を示し、昨年度の分類器の予測精度よりも 10%以上正答率が向上した。この結果から 3次元グラフ画像を適切に調整することで、分類器の予測精度が大幅に改善されることが明らかになり、大規模データの自動分類の実用化の目処が立ちつつある。今後は、未知のデータセットに対し分類器を適用し予測を行い、分類器をより精緻にチューニングしてゆく予定である。

Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動

強化については、SHOE の機能強化、他の Garuda ガジェットとの連携強化を通じて、Percellome データベースからの解析パイプラインの範囲が拡大し、よりスムーズなものになった。

今後は機能強化の一方、それらを人工知能化（人工知能技術の利用による自動化・効率化）する方策を検討し、開発マイルストーンの設定と一部の試験実装を試みる。

なお本分担研究は、最終的には、個別機能への深層学習の導入にとどまらず、解析プロセス自体の人工知能化にもチャレンジするものであり、劇的な解析能力の向上が期待される。

「Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良」については、新型反復曝露実験の基線反応評価の自動化を進めた。最終的には今回開発した計算評価手法を組み込んだ専用ソフトウェアを開発し、従来はマニュアル計算で行っていた処理を自動化・効率化・高速化する。これを以て、反復曝露の基線反応を示す遺伝子のデータベース化を促進し、単回曝露のトランスクリプトームデータを大量に収録する Percellome データベースと共に利用・解析することで、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築に大きく寄与すると考えられる。

「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、PPAR α や SREBP の活性と脂質代謝異常による疾患との間には連関が認められており、肥満患者において PPAR α /SREBP 比と脂肪肝の間に相関があることが報告されている (Pettinelli, P., et al. *Biochim Biophys Acta* 1792.11 (2009): 1080-1086)。両核内受容体の活性バランスの調整に ER が関与しており、バルプロ酸ナトリウムが ER リガンド量に影響を与えることが肝臓に於ける脂肪蓄積につながる可能性が示唆された。本結果は、脂質代謝異常が疑われる患者に対するバルプロ酸ナトリウム投与のリスク評価の

重要性を示していると言える。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発」については、先行研究で実施した化学物質とは用途や性質の異なる化学物質の解析を実施しているが、予想の通り、先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の2物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第I相第II相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有しており、構築中の反復毒性トランスクリプトームデータベースがカバーする範囲を広げることが出来た。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性、すなわち神経毒性及び発癌性、に関わるシグナルネットワークが発動することを捉え、僅か4日間の反復曝露で長期の反復毒性を推測する基礎データを取得できることを示唆した。

「化学物質の反復曝露による毒性発現のエピジェネティクス機構解析」については、平成30年度は、ChIP-Seqにより、HDAC1阻害剤として知られるVPAの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解析した結果、HDACの阻害ではなく、H3K9me3を阻害していることが示唆された。新たにVPAによりH3K9me3阻害が起こるという新発見が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものと考えられる。また、先行研究で実施した四塩化炭素を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さらに進めた。その結果、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。

今後は、VPAの反復投与による基線反応に変化の起

こる遺伝子に関して詳細にH3K9me3の低下との関与を解析する予定である。

「システム毒性解析の人工知能化」についても計画通り推移しており、特に深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別において今年度作成した分類器の予測精度は95%以上と非常に優秀な性能を示した。Garuda Platform上でのPercellomeとSHOEの連動も密になり、よりスムーズな解析が可能となった。今後は、この成果をさらに多くの解析プロセスに展開することを目指す。

「Percellome専用解析ソフトウェアの開発・改良」においては、平成30年度に新型反復曝露実験の基線反応評価の自動化ソフトウェアを開発した(本年度末までに完了見込み)ことで、反復曝露の基線反応を示す遺伝子のデータベース化の促進が見込まれる。これは反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築に大きく寄与すると期待される。

「Percellomeデータベースを利用した解析パイプライン」においては、Garudaプラットフォームを中心とした解析ツールの利用により、Percellomeデータから仮説創出が可能となった。Percellomeデータのようにより定量性に優れた遺伝子発現プロファイルはノイズが小さく、実験結果を解釈する上で重要な遺伝子の抽出においてアドバンテージが大きい。更に、Garudaプラットフォームは実験結果の解釈に向けて必要な情報を効率よく収集することができる。今年度の研究成果に見られるように、遺伝子発現変動から毒性発現の分子メカニズム推定にまで至る事が可能となったことから、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 (抜粋)

(1) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol.* 2019, 2: 57. doi:10.1038/s42003-019-0300-2.

(2) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudoh Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One.* 2018, 13(10): e0205702.

(3) Natalia Polouliakh, Paul Horton, Kazuhiro Shibana, Kodai Takata, Vanessa Ludwig, Samik Ghosh and Hiroaki Kitano Sequence homology in eukaryotes (SHOE): interactive visual tool for promoter analysis; *BMC Genomics* September 2018, 19: 715;

(4) Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fund Toxicol Sci* 2018, 5: 167-170

(5) Esaki, T., Watanabe, R., Kawashima, H., Ohashi, R., Natsume - Kitatani, Y., Nagao, C. & Mizuguchi, K. Data curation can improve the prediction accuracy of metabolic intrinsic clearance. *Molecular informatics.* 2018, 38: 1800086

(6) Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., Ohashi, R. & Mizuguchi, K. Predicting Fraction Unbound in Human Plasma

from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges. *Molecular pharmaceutics*, 2018, 15(11), 5302-5311.

(7) 夏目やよい, バイオメディカル・基礎から臨床への開発プロセス (2) 1) トランスレーショナルリサーチと機械学習, *医薬ジャーナル* 2018, 54(9): 2049-2053, ISSN: 0287-4741

(8) 長尾知生子、夏目やよい、水口賢司, 創薬における計算機の果たす役割 -プレジジョンメディスンに向けて-, *Presicion Medicine*, 2018, 1(1), 28-31

(9) Masuta, Y., Yamamoto, T., Natsume-Kitatani, Y., Kanuma, T., Moriishi, E., Kobiyama, K. & Ishii, K. J. An antigen-free, plasmacytoid dendritic cell-targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T cells in nonhuman primates. *The Journal of Immunology*, 2018, 200: 2067-2075

(10) Tanaka, M., Kobiyama, K., Honda, T., Uchio-Yamada, K., Natsume-Kitatani, Y., Mizuguchi, K. & Ishii, K. J. Essential role of CARD14 in murine experimental psoriasis. *The Journal of Immunology*, 2018, 200(1), 71-81.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima. Epigenetic Mechanism of Modification of Gene Expression Network by a Repeated Exposure to a Chemical. Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. The SOT 58th Annual Meeting, (2019.3.12), Baltimore, USA, Invited

Symposium.

(2) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for the prediction of acute and chronic toxicity. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP 2018 KYOTO), (2018,7,6), Kyoto, Japan, Joint Symposium between IUTOX and IUPHAR, Speaker

(3) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Ken-ichi Aisaki, Introduction to a Concept of “Signal Toxicity” for Broader Understanding of Mechanistic Toxicology. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand, KEYNOTE

(4) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, DSB Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the genome editing. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand, Oral

(5) Jun Kanno, Introduction to the Concept of “Signal Toxicity”. 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10), (2018.4.19), Belgrade, Serbia, Plenary

(6) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

(7) 北嶋 聡, 種村 健太郎, 菅野 純, シックハウスの症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入

暴露の際の海馬Percellomeトキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

(8) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

(9) 菅野 純, 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋 聡, 「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(10) 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, 水口賢司, 菅野純, TargetMineによる標的予測、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(11) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(12) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

⑬ Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano. DTOX: Deep neural network-based computational framework to analyze omics data in Toxicology. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 25, 2018.

⑭ Kitano, H. AI-driven systems toxicology. Toxicogenomics for Accelerated and Refined Hazard Identification of Chemicals (Joint Symposium between IUTOX and IUPHAR), 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto International Conference Center, Kyoto, July 6, 2018. (invited)

(15) 北野宏明. AI駆動型システム医学の展望. 山口大学第2回シンポジウム: 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, KKR山口あさくら, 山口, Aug. 4, 2018. (invited)

(16) Kitano, H. AI Grand Challenges. 2018年日台科学技術フォーラム, リージェント台北, 台湾, Sep. 10, 2018. (invited)

⑰ 北野宏明. 人工知能駆動型システム毒性学の展望. CBI学会2018年大会, タワーホール船堀, 東京, Oct. 9, 2018. (invited)

(18) 北野宏明. AI戦略とムーンショット. データサイエンティスト協会シンポジウム, JPタワーホール&カンファレンス東京, 東京, Oct. 19, 2018. (invited, keynote)

⑱ 夏目やよい, “Percellome toxicogenomics data handling by Garuda” OpenTox Asia 2018, (2018.5.24, 東京), (Poster)

⑳ Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid” AsiaTox 2018, (2018.6.18, Thailand), (Poster)

㉑ Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Inferred role of crosstalk between PPARα and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach” ISMB 2018, (2018.7.7, USA), (Poster)

㉒ 夏目やよい, “TargetMineによる標的予測” 第45回日本毒性学会学術年会, (2018.7.18, 大阪) (招待講演)

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

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
（H30-化学-指定-001）

平成 30 年度 分担研究報告書
短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による
反復曝露毒性予測技術の開発

菅野 純

独立行政法人 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

特に先行研究（平成 24～29 年度）で実施した Percellome 法*を基盤とした「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のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、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。

本分担研究は、短期間「新型」反復曝露実験**のデータと単回曝露実験のデータを対比解析することで、反復曝露毒性の予測技術を開発することを目的とする。平成 30 年度は計画通りイミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンの 2 実験を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と上記の化学物質に特徴的な要素を抽出しつつある。特に先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の 2 物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性（神経毒性及び発癌性）に関わるシグナルネットワークが発動することが示された。

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。実験の反復曝露と単回曝露の回数をともに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。

A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数（安全係数）を組み合わせた評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8.5 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融合し、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築を進める。

B. 研究方法

●試薬及び動物：

イミダクロプリド (Imidacloprid; 分子量: 255.66, Cas No.: 138261-41-3, 105827-78-9, 純度 99.9%, 富士フイルム和光純薬(株)) 及び、ジエチルニトロサミン (Diethylnitrosamine; 分子量: 102.14, Cas No.: 55-18-5, 純度 100%, 東京化成工業 (株) (単回曝露時はナカライテスク: 製造中止のため同等品を選択)) について、単回曝露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) 時のイミダクロプリド及びジエチルニトロサミンの曝露量はそれぞれ 0、10、30、100 mg/kg 及び 0、1、3、10 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、[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。イミダクロプリドの 4 回の全動物に対する反復曝露の用量は用量設定実験の結果 70mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様

の 0、10、30、100mg/kg とした。以下、同様に、ジエチルニトロサミンの 4 回反復投与の用量は 5mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、1、3、10mg/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) を用い溶媒はイミダクロプリドではコーンオイル (C8267, Sigma-Aldrich)、ジエチルニトロサミンでは 0.5%メチルセルロース (MC) (133-14255, 富士フイルム和光純薬 (株)) 水溶液とし、金属製胃ゾンデ (KN-348, 夏目製作所) を用いて、イミダクロプリドではガラス製シリンジ、ジエチルニトロサミンではプラスチック製シリンジを用いて強制経口投与を行い、最終曝露の 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、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。

倫理面への配慮

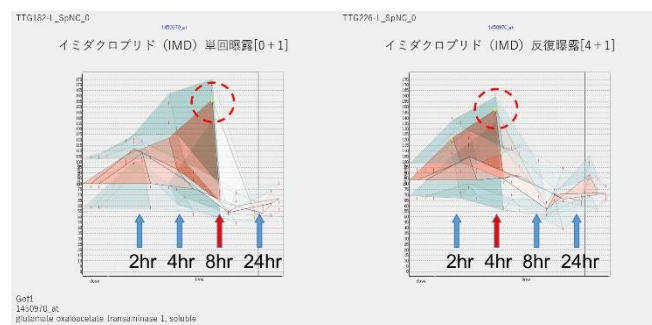
動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版))

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。

平成 30 年度は、イミダクロプリド及びジエチルニ

トロサミンを検討した。尚、最終投与後 2、4、8、24 時間の早い変動を過渡反応 (Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの上昇乃至低下の変動を基線反応 (Baseline Response) と定義し解析を実施した。

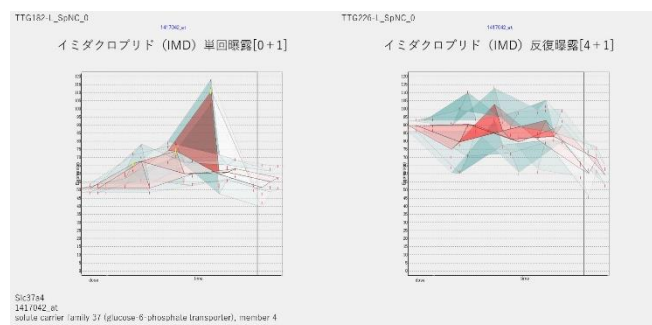


【単回に比して反復により発現ピークが早まる例を示す。GOT1 遺伝子において、[0+1] で 8 時間目にあるピークが [4+1] において 4 時間目に早まっている (赤丸)。】

イミダクロプリド (IMD) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数 (過渡反応を示す遺伝子) は単回曝露実験 (以下、[0+1] と表記) において 296、反復曝露実験 (以下、[4+1] と表記) において 80 であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

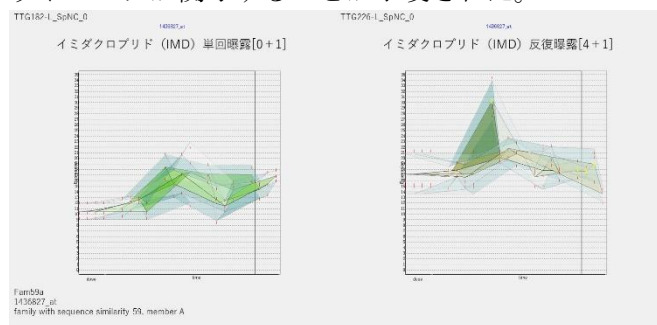
[0+1] と [4+1] に共通する過渡反応遺伝子は 42 であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時に 8 時間ピークであった遺伝子が反復曝露時に 4 時間ピークに早まる傾向が明らかに認められた。この過渡遺伝子群からは、ニコチン拮抗剤ブプチオン代謝系、ニコチン代謝系、アニリン代謝系等のネットワークが IPA により抽出された。

[0+1] においてのみ過渡反応が見られ、[4+1] にお



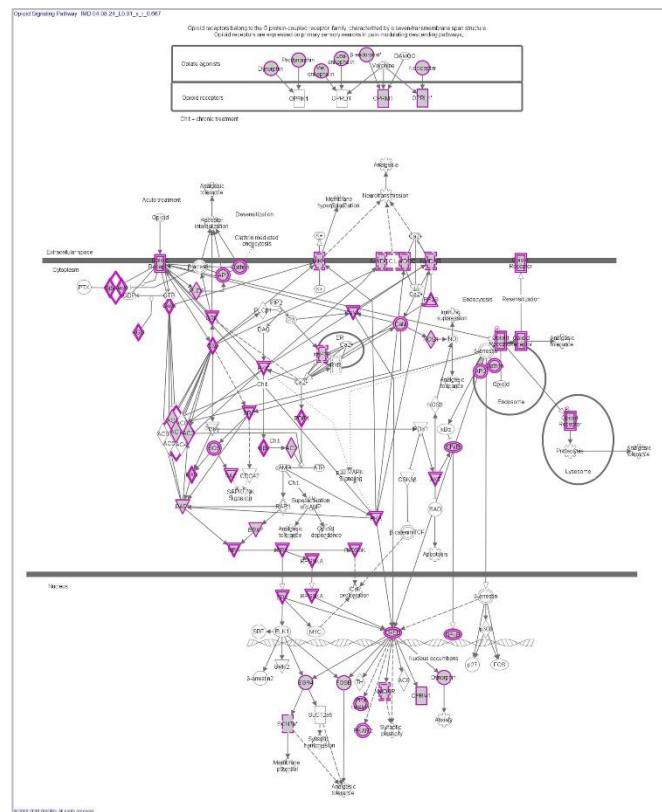
【 [0+1] でのピークが [4+1] において消失し基線反応が上昇している例】

いては過渡反応が消失した遺伝子は 254 あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これは、基線反応が四塩化炭素の際（EIF2 系、小胞体ストレスシグナル）とは逆方向の現象であった。グルココルチコイド受容体系、ダイオキシン受容体系、等の核内受容体を介した、糖脂質代謝系へのシグナルネットワークが関与することが示唆された。



【[0+1]でピークが無く、[4+1]においてピークが現れ、基線反応が上昇している例】

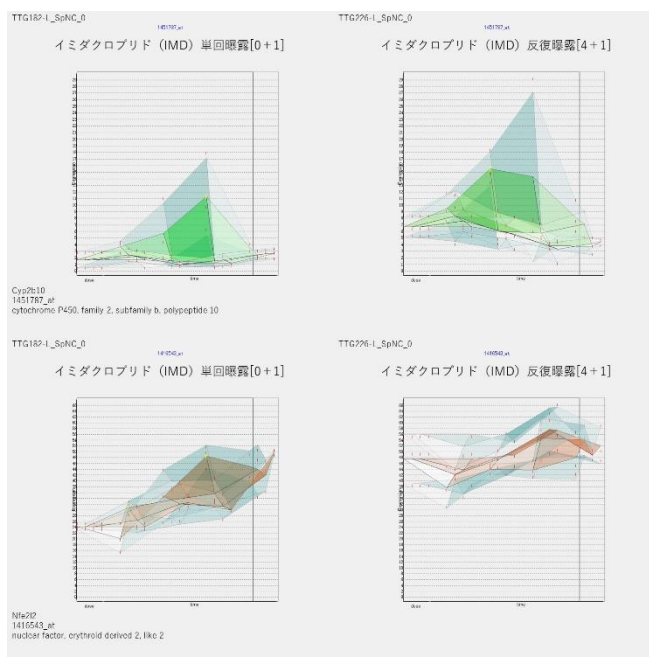
[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は 48 あり、その殆どに基線反応の上昇を伴っていた。これらは、糖や脂質のグ



【IMDによるオピオイドシグナル系の誘導（IPAより）】

リコシル化に関わる系に属することが示唆された。

反復曝露が基線反応に及ぼす影響を、[0+1]と[4+1]の溶媒対照群同士の発現値を比較することで検出することができる。その結果、反復曝露により統計学的に有意に発現値が上昇した発現コピー数 2 以上の遺伝子は約 8,000、低下した遺伝子は約 90 であった。上昇した遺伝子群は、オピオイドシグナル系、神経軸索誘導系、神経炎症シグナル系などに関わるネットワークを含むことが示唆された。その上流にエストロゲン受容体系が関与することが示唆されたが、その詳細は現段階では不明である。なお、第 I 相、第 II 相代謝酵素の基線反応は上昇しており、反復曝露によるそれらの軽度の誘導がみられた。



【代謝系への影響。Cyp2b10及びNfe212 (Nrf2) を示す。前者は、基線反応の上昇と過渡反応の上昇、後者は基線反応の上昇を認める】

以上、イミダクロプリドはマウス肝において、ニコチンに関わる代謝系及びシグナル系を起動させるとともに、[0+1]と[4+1]の遺伝子発現プロファイルの比較により、神経毒性を示唆する結果を得た。分子機序について、特に標的分子機構の特定について、更なる解析を進める。

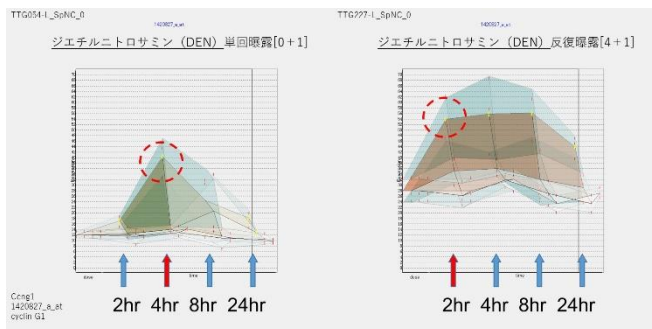
ジエチルニトロサミン (DEN) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数（過渡反応を示す遺伝子）は単回曝露実験（以下、[0+1]と表記）において 223、反復曝露実験（以下、[4+1]と表記）において 77 であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 22 は、多くが[4+1]に共通する変動遺伝子であった。

[0+1]と[4+1]に共通する変動遺伝子は 18 であり、内 11 が発現上昇、7 が発現低下を示した。上昇した遺伝子群は、Ccn1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM シグナルに関わる遺伝子群であった。これらは、[4+1]において、より早期に誘導がかかり発現値がより高値である傾向を示した。

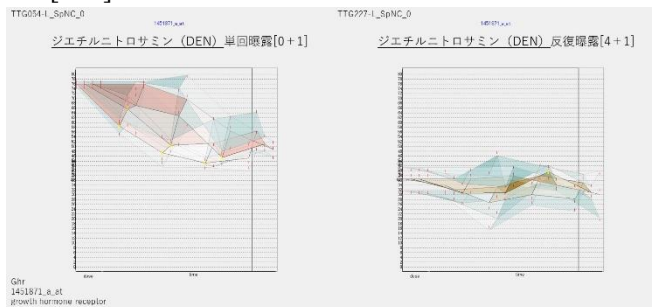
上昇に転じるものはなく、また、基線反応が上昇するものもほとんどなかった。

[4+1]において変動した 77 遺伝子、うち 58 が発現上昇を示し、Ccn1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM シグナルに関わる遺伝子群であった。発がん性を示唆する p53 シグナリング、Rb 遺伝子シグナリング等の誘導が示された。

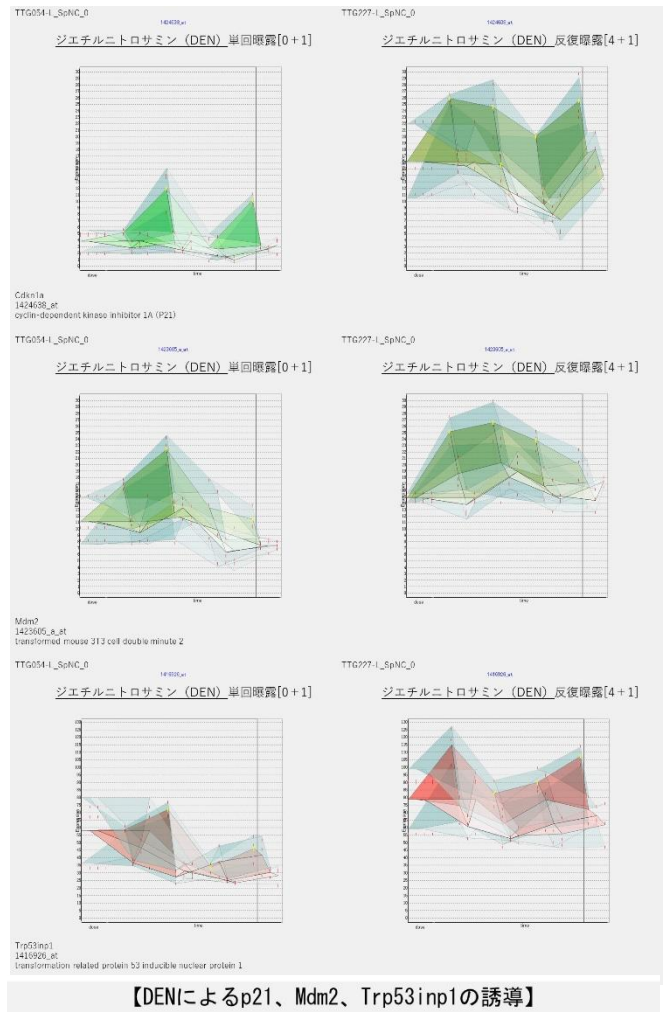


【DENによるCcn1(Cyclin G1)の誘導。[0+1]でのピークは、[4+1]により早まり、発現が持続するとともに基線反応が上昇している。】

[0+1]で下降する過渡反応を示した遺伝子は 201 あり、その意義については現在解析中である。これらは、[4+1]において過渡反応は減弱乃至無反応であり、



【[0+1]で下降ピークを示し、[4+1]でピーク消失し、基線反応が下降する例】



【DENによるp21、Mdm2、Trp53inp1の誘導】

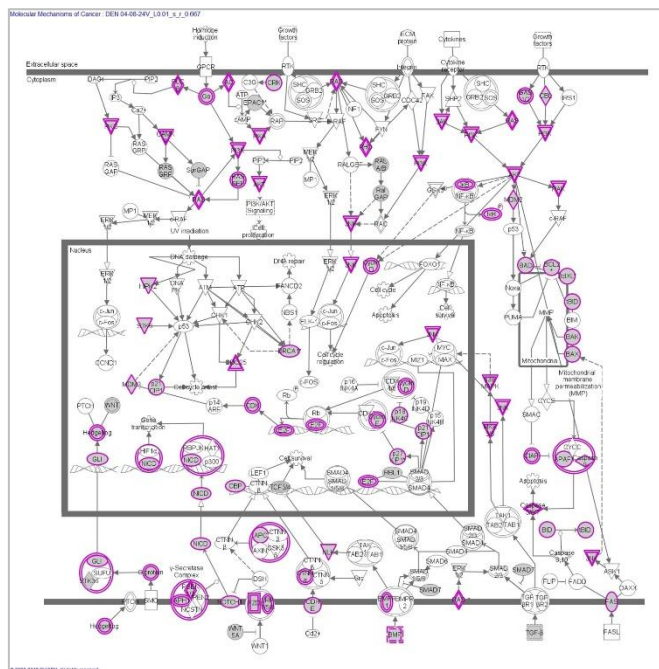
[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は 205 あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これの分子機構は現段階で不明である。

[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては

過渡反応が発現した遺伝子は 59 あり、その殆どに基線反応の上昇を伴っていた。PXR などの核内受容体系に微弱なシグナルが流れる可能性が示唆されたが詳細は現段階で不明である。

反復曝露が基線反応に及ぼす影響を見るため、[0+1]と[4+1]の溶媒対照群同士の発現値を比較した。反復曝露により統計学的に有意に発現値が上昇した発現コピー数 2 以上の遺伝子は約 7,100、低下した遺伝子は約 660 であった。上昇した遺伝子群は、p53 を上流とする発がん関連のネットワーク系、Wnt/ β -catenin シグナル系など、発がん系に加え、軸索誘導シグナル系など、神経毒性を示唆する系も発動していた。

NRF2 系は、[4+1]の基線反応が軽度上昇を示しており、第 II 相代謝酵素の弱い誘導がみられたが、第 I 相は誘導されていなかった。



【DENによる発がん機構シグナル系の誘導 (IPAより)】

基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、LXR、FXR 等、HNF4A、HNF1A、GR を上流に持つ核内受容体系シグナルを含んでいた。

以上、DEN はマウス肝において、反復曝露により発がん作用を示唆する p53 シグナル、Wnt/ β -catenin

シグナル系等を強力に起動させることが確認された。

先行研究で、実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

D. 考察

先行研究で実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

イミダクロプリド (IMD) は、ネオニコチノイド系の殺虫剤であり、昆虫のニコチン受容体に高親和性を有するが、哺乳類のニコチン受容体にもシグナルを流すデータが蓄積されている。本実験において、ニコチン系のシグナルネットワークを誘導し神経毒性を惹起することを示唆する解析結果が、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験のマウス肝からの遺伝子発現データの比較検討から得られたことは、本試験系の網羅性と高感性、高精細性を示すものと考えられる。

ジエチルニトロサミン (DEN) についても、最大耐量を下回るシグナル毒性量による単回と反復の曝露実験の遺伝子発現データの比較検討から、発がん性を示す所見が確認され、その分子メカニズムを示唆する詳細な情報が得られたことも、本試験系の有意性を示すものと考えられる。

本年度研究成果により、新たな解析手法が利用可能となることから、先行研究のデータに対してもそれらを適用し、毒性標的とその上流ネットワークを過渡反応と基線反応の両面から更に深く解析する。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについて

も、反復曝露の実験プロトコルに差異があるものの、同様の検討を試みる予定である。

E. 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。先行研究で実施した化学物質とは用途や性質の異なる化学物質の解析を実施しているが、予想の通り、先行研究で実施した化学物質に比べると、本年度の2物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第I相第II相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有しており、構築中の反復毒性トランスクリプトームデータベースがカバーする範囲を広げることが出来た。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性、すなわち神経毒性及び発癌性、に関わるシグナルネットワークが発動することを捉え、僅か4日間の反復曝露で長期の反復毒性を推測する基礎データを取得できることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. (2019) Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol*. 2019 Feb 8;2:57. doi:10.1038/s42003-019-0300-2.

(2) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N.

Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.

PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Jun Kanno, Introduction to the Concept of “Signal Toxicity”. 10th Congress of Toxicology in Developing

Countries (CTDC10), (2018.4.19), Belgrade, Serbia, Plenary

(2) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

(3) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano. DTOX: Deep neural network-based computational framework to analyze omics data in Toxicology. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 25, 2018.

(4) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Ken-ichi Aisaki, Introduction to a Concept of “Signal Toxicity” for Broader Understanding of Mechanistic Toxicology. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand, KEYNOTE

(5) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi. Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi, DSB Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the genome editing. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand,, Oral

(6) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid” AsiaTox 2018, (2018.6.18, Thailand), (Poster)

(7) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

(8) Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project for the prediction of acute and chronic toxicity. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP 2018 KYOTO), (2018,7,6), Kyoto, Japan, Joint Symposium between IUTOX and IUPHAR, Speaker

(9) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬Percellomeトキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

(10) 菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(11) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、水口賢司、菅野純、TargetMineによる標的予測、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(12) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(13) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose,

Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(14) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach” ISMB 2018, (2018.7.7, USA), (Poster)

(15) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima. Epigenetic Mechanism of Modification of Gene Expression Network by a Repeated Exposure to a Chemical. Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. The SOT 58th Annual Meeting, (2019.3.12), Baltimore, USA, Invited Symposium.

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

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
（H30-化学-指定-001）

平成30年度 分担研究報告書

分担研究課題：「化学物質の反復曝露による毒性発現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 部長
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5室 室長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確定係数（安全係数）を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。特に先行研究（平成24～29年度）で実施したPercellome法*を基盤とした「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のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、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、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、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。先行研究（平成24～29年度）での検討ではDNAメチル化状態よりも、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が強く示唆されたことから、この網羅的解析を中心に検討する。

平成30年度は当初、アセフェートの場合のエピジェネティクス機構解析を予定していたが、バルプロ酸ナトリウム（VPA）に変更した。この理由は、すでにVPAの単回及び反復投与の際の遺伝子発現データを有し、かつ、ヒストン脱アセチル化酵素1（HDAC1）の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させることが知られており、本研究分担課題における陽性対照物質としてより適切であると考えられるためである。VPAのエピジェネティック機構解析、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ーを組み合わせ、クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）法を利用して、VPA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網羅的解析を進めている。ChIPアッセイの際の抗体は、以下の4種、すなわち抗H3K4me3、抗H3K27me3、抗H3K27Ac、及び抗H3K9me3抗体を用いた。

解析の結果、VPAの反復投与によりH3K9me3がグローバルに阻害されるという、当初の予想とは違った結果が得られた。これは、肝においてH3K9me3を抑制する陽性対照物質としてVPAを利用できる新発見が得られたものと考えられる。

更に、先行研究で実施した四塩化炭素を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た。ヒストン修飾部位を有するものとして抽出された遺伝子リストについて、四塩化炭素の単回投与あるいは反復投与した際の発現変動を検討したところ、多くの遺伝子について、元々の発現量が少ない（コピー数が1以下）あるいは発現変動が認められない事がわかり、反復投与によりヒストン修飾の変化を経て発現変動する遺伝子を抽出する際には、当該遺伝子の発現量と発現変動を実際に確認する必要があることが明らかとなった。

（*） 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。

A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。即ち、先行研究にて構築済みの延べ8.5億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融合し、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築を進める。

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、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。先行研究(平成24~29年度)での検討ではDNAメチル化状態よりも、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が強く示唆されたことから、この網羅的解析を中心に検討する。

平成30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、バルプロ酸ナトリウム(VPA)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。ChIPアッセイの際の抗体は、以下の4種、すなわち抗H3K4me3、抗H3K27me3、抗H3K27Ac、及び抗H3K9me3抗体を用いた。

平成30年度は当初、アセフェートの場合のエピジェネティクス機構解析を予定していたが、バルプロ酸ナトリウム(VPA)に変更した。この理由は、すで

にVPAの単回及び反復投与の際の遺伝子発現データを有し、かつ、VPAがヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる事が知られており、本研究分担課題における陽性対照物質としてより適切であると考えられるためである。

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(Carbon tetrachloride: 分子量: 153.8、Cas No.: 56-23-5、純度99.8%、WAKO)またはバルプロ酸ナトリウム塩(VPA)(Sodium Valproate: 分子量: 166.19、Cas No.: 1069-66-5、純度>98%、シグマアルドリッチ)を14日間反復投与した際の肝サンプルを実験に用いた。

B-2: 次世代シーケンサを用いたChIP-Seq

VPAを14日間反復投与した翌日に溶媒(MC)投与2時間後のマウス肝および、溶媒(MC)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、四塩化炭素の場合は、「投与群: 計260 mg [160, 10及び100 mg]、溶媒群: 計320 mg [160, 180及び80 mg]」、VPAの場合は、「投与群: 計386 mg [207, 208及び

161 mg]、溶媒群：計 576 mg [129, 157 及び 100 mg]」を材料として、下記 4 種の抗体、すなわち 1) 4 μ l 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 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)、3) 4 μ g の H3K27Ac 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、4) 5 μ l 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 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 30 年度は、VPA (定用量: 100 mg/kg) 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 C57BL6/NCrSlc 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 [200 mg 以上] となるように、それぞれ 1 つにまとめた: 溶媒投与の場合は計 576 mg、VPA 投与の場合は計 386 mg となった)、まずクロマチン免疫沈降を行なった。H3K4me3 抗体、H3K27me3 抗体、H3K27Ac 抗体、H3K9me3 抗体の各抗体の場合の濃縮について確認中であり、これにより、ChIP は正常に行われたか否かが判断できる。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。

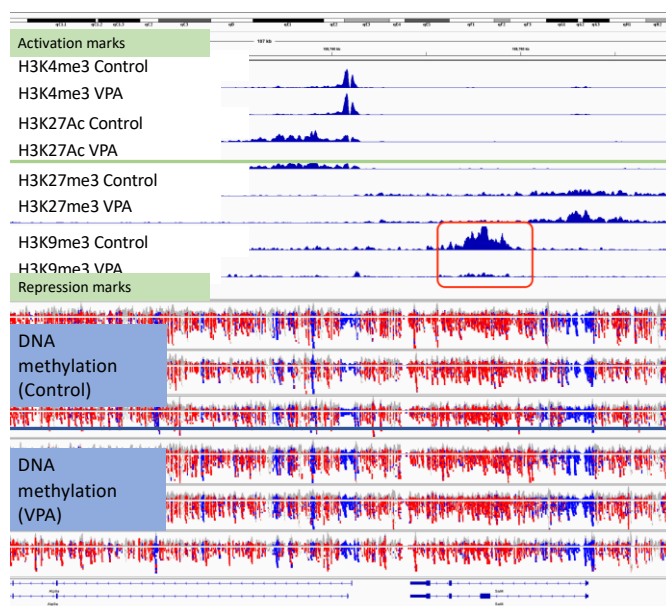
今回得られた VPA を 14 日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析結果は以下である。

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 (15, 883、15, 538)、
抗 H3K27Ac 抗体 (21, 006、19, 948)、
抗 H3K27me3 抗体 (19, 879、20, 382)、
抗 H3K9me3 抗体 (27, 786、7, 085)、

となっている。この内、特に H3K9me3 のピーク数が 27, 786 から 7, 085 へ、25.5%に減少しており、VPA の反復投与によって H3K9me3、即ちヒストンのエチル化が阻害されることが明らかになった (それぞれ、2.2%減少、5.0%減少、2.5%増加、及び 74.5%減少)【図 1】。他方、ヒストンのアセチル化 (H3K27Ac) は増加せず、

むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。これらの結果から、VPA の反復投与による基線反応の変化は、ヒストン修飾の変化で一部は説明できる可能性がある。今後、実際に ChIP-PCR などを行い確認する。



【図 1】溶媒および VPA の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析および DNA メチル化解析をまとめた一例 (Sa114)。図上半分の赤枠部分は H3K9me3 の溶媒投与 (枠内上段) および VPA 投与 (枠内下段) を示しており、大幅なピークの低下が見られる。一方、図下半分の DNA のメチル化状態 (赤=メチル化、青=非メチル化、n=3) には、VPA 投与 (上 3 列=対照、下 3 列=VPA 投与群) による変化は見られない (先行研究結果)。

なお、先行研究で実施した四塩化炭素を 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さらに進めた。

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)。したがって四塩化炭素の反復投与による基線反応の変化は、ヒストン修飾の変化で一部は説明できる可能性がある。今後、実際に ChIP-PCR などを行い確認する。

各 peak を網羅的に解析し、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 2 倍以上、もしくは 1/2 以下) した peak 数で、数の多い方の peak 数が 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 30 年度は、ChIP-Seq により VPA 反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位が抽出され、基線反応の成立に関わる知見が得られた。当初、VPA について、ヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる、という本研究分担課題における陽性対照物質のデータを得られると想定されたが、実際はヒストンのアセチル化 (H3K27Ac) は増加せず、むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。他方、H3K9me3 が 74.5% 低下することが明らかとなり、H3K27Ac の結果と比較

すると、少なくともマウス肝においてはVPAはHDACの阻害ではなく、H3K9me3を阻害していることが示唆された。新たにVPAによりH3K9me3阻害が起こるといふ知見が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものとする。H3K9me3などのヒストン修飾とDNAメチル化は、ともに、遺伝子発現を抑制的に制御している。本研究においては、グローバルにH3K9me3が減少していることから、グローバルな遺伝子発現の活性化が想定された。しかしながら、既に得られている遺伝子発現解析の結果を見ると、VPAの反復投与による基線反応に変化の起こる遺伝子、即ち、反復投与によって遺伝子発現が増加する遺伝子は多くない(数百遺伝子)。そこで、遺伝子発現制御に関わるDNAメチル化に関してVPAの反復投与の結果を見ると、DNAメチル化には変化が起こっていなかった【図1下半分】。そのことから、H3K9me3はグローバルに低下するが、DNAメチル化による制御が残っており、今回の解析条件においては、H3K9me3の低下は、遺伝子発現制御に対して「silent」な状態である可能性が考えられた。

また、先行研究により取得・解析済みの四塩化炭素におけるChIP-Seqデータと比較解析を進めることで、反復曝露時の過渡反応を修飾する基線反応の成立など、反復毒性の分子機序解析を促進するものと期待される。

なお、先行研究で実施した四塩化炭素を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さらに進めた。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。明らかにヒストン修飾に差異のある領域が複数見つかると、それらの領域(エンハンサー)の制御下の遺伝子群の発現などを解析する必要がある。そこでヒストン修飾部位を有するものとして抽出された遺伝子リストについて、四塩化炭素の単回投与あるいは反復投与した際の発現変動を検討したところ、多くの遺伝子について、元々の発現量が少

ない(コピー数が1以下)あるいは発現変動が認められない事がわかり、反復投与によりヒストン修飾の変化を経て発現変動する遺伝子を抽出する際には、当該遺伝子の発現量と発現変動を実際に確認する必要があることが明らかとなった。

今後、H3K9me3阻害の陽性対照物質と考えられるVPAを利用することにより、peak数の閾値をいくつ以上にしたがよいか等、ヒストン修飾変化の抽出条件を、より詳細に検討する必要があるものとする。なおサンプル数が1であるため、統計的な有意差による抽出はできない。

E. 結論

平成30年度は、ChIP-Seqにより、HDAC1阻害剤として知られるVPAの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解析した結果、HDACの阻害ではなく、H3K9me3を阻害していることが示唆された。VPAによりH3K9me3阻害が起こるといふ新見知が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものとする。また、先行研究で実施した四塩化炭素を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さらに進めた。その結果、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。

今後は、VPAの反復投与による基線反応に変化の起こる遺伝子に関して詳細にH3K9me3の低下との関与を解析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene

transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fund Toxicol Sci* 5: 167-170, 2018.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7.18.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7.19.)

夏目やよい、相崎健一、北嶋 聡、水口賢司、菅野 純、TargetMine による標的予測、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7.19.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

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）
新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
（H30-化学-指定-001）

平成 30 年度 分担研究報告書
Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良

研究分担者 相崎 健一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 第一室 室長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

特に先行研究（平成 24～29 年度）で実施した Percellome 法*を基盤とした「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のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、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本分担研究では、基盤技術開発の一環として Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良を進める。

平成 30 年度は、新型反復曝露実験において有意な基線反応を示す候補遺伝子の抽出ソフトウェアの開発のため、Percellome データベースから基臓器・溶媒・サンプリング時間毎に溶媒群のトランスクリプトームデータを集めて参照データベース（BaselineDB）を構築し、基本アルゴリズムを生成した。また解析計算用ソフトウェアを作成し、自動化のための改良を行った。

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。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。

A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数（安全係数）を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

本分担研究では特に、Percellome 専用解析ソフトウェアを開発して予測評価技術の基盤開発の一助とすると共に、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

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。

サンプルデータには、Percellome データベースに収録されている実際のトランスクリプトームデータを用いた。

候補遺伝子リストの機能解析には、Garuda platform や DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いた。

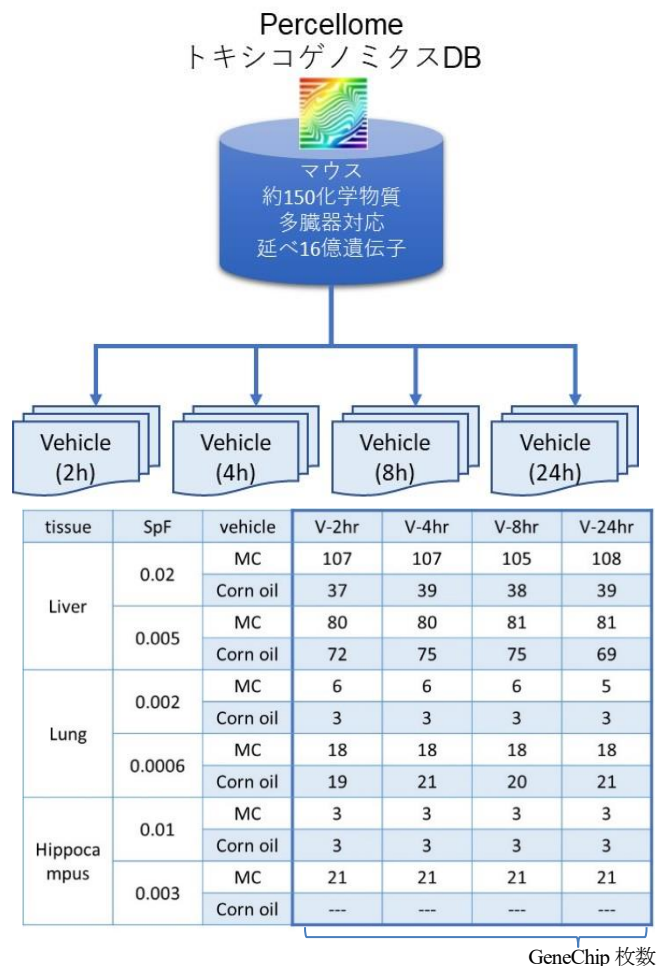
倫理面への配慮

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、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

平成 30 年度は、現状ではマニュアル計算で行っている新型反復曝露実験の基線反応評価を自動化すべく、有意な基線反応変動を示す候補遺伝子を抽出するための解析アルゴリズム及びそれを実装したソフトウェアの開発を進めた。

基線反応の変動評価は、新型反復曝露実験の溶媒群と単回曝露実験の溶媒群との比較が主となるため、Percellome データベースから単回投与実験の溶媒群のトランスクリプトームデータを GeneChip 2312 枚分収集 (延べ遺伝子数 約 9 億) し、臓器・溶媒・サンプリング時間、外部スパイク添加量係数 (SpikeFactor) 別に

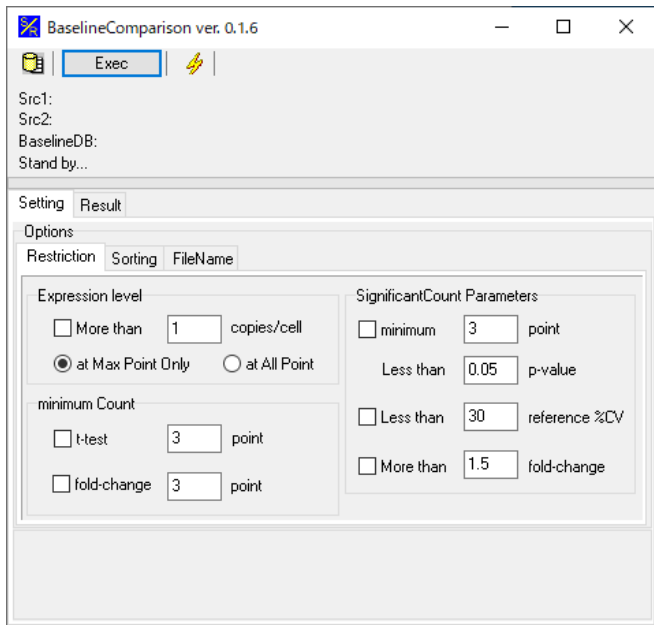


集計して%CV 値等の統計値をプローブセットごと計算し、また 2, 4, 8, 24 時間のサンプリング時点データ

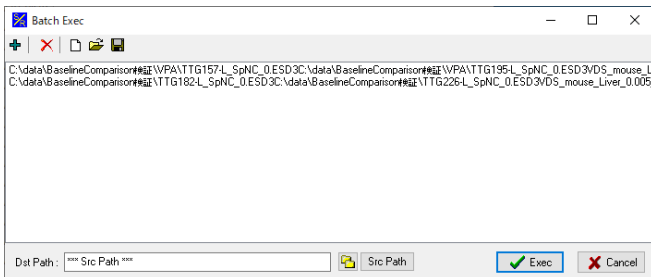
の中で、最も安定しているサンプリング時間を決定するなど、基線状態の基本性質を収録したデータベース (BaselineDB) を作成した。

基線反応の変動の評価基準としては発現レベルや t 検定に加え、BaselineDB を参照して①溶媒群データが最も安定しているサンプリング時間の一時点参照や②変動率が大きく %CV が閾値以下の複数時間参照、さらには③%CV に基づいたサンプリング時間毎の重み付けによる全時点参照指標、等、各値の評価指標としての有効性についての比較検討を進めた。

さらに、これらを高速一括計算するソフトウェア BaselineComparison.exe を開発した。



さらに複数の比較設定を登録し、自動一括計算する機能を追加した。



これにより、試行錯誤が必要なパラメータの最適化作業を効率化し、さらには至適条件にて全ての比較計算の自動処理を可能とした。

D. 考察

新型反復曝露実験の基線反応評価の自動化を進めた。最終的には今回開発した計算評価手法を組み込んだ専用ソフトウェアを開発し、従来はマニュアル計算で行っている処理を自動化・効率化・高速化した。これを以て、反復曝露の基線反応を示す遺伝子のデータベース化を促進し、単回曝露のトランスクリプトームデータを大量に収録する Percellome データベースと共に利用、解析することで、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築に大きく寄与すると考えられる。

E. 結論

本分担研究は、計画通りに進捗した。

平成 30 年度では新型反復曝露実験の基線反応評価の自動化ソフトウェアを開発したことで、反復曝露の基線反応を示す遺伝子のデータベース化の促進が見込まれる。これは反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築に大きく寄与すると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol 2, Article number: 57, 2019.

2. 学会発表 (抜粋)

① Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

② Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji

Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

(3) 菅野 純, 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(4) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、水口賢司、菅野純、TargetMineによる標的予測、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(5) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(6) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IA TA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(7) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano. DTOX: Deep neural network-based computational framework to analyze omics data in Toxicology. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 25, 2018.

(8) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S.,

Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Percellome meets Garuda: toxicogenomics approach to evaluate the toxicity of valproic acid” AsiaTox 2018, (2018.6.18, Thailand), (Poster)

(9) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Inferred role of crosstalk between PPAR α and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach” ISMB 2018, (2018.7.7, 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

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
（H30-化学-指定-001）
平成 30 年度 分担研究報告書

分担研究課題：システム毒性解析の人工知能化

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：

システム毒性では、一連の解析手順の高度な連携と同時に、大規模データベースから多くの情報を抽出し、それを解析へと結びつける必要がある。本分担研究では、深層学習（Deep Learning）を用いて膨大な遺伝子変動データから有意に変動した遺伝子を高精度で自動同定させる技術、ならびに解析パイプラインの連動強化を行った。

研究協力者：

長谷武志（システム・バイオロジー研究機構）
Natalia Polouliakh（ソニーCSL）

A. 研究目的

システム・レベルで毒性を理解するには、膨大な実験データを格納したデータベース、文献、数値モデルなどを統合的に解析する必要があり、大規模かつ複雑なデータを意味のある形で解析するには、深層学習（Deep Learning）やテキストマイニングなどを含めた一連の人工知能（AI）アルゴリズム群の連携が有効である。さらに、複数の解析ツールをスムーズに連動させる必要がある。本分担研究では、一連の解析過程の AI 化を実施し、ツール間連動を強化することで、高度な AI 駆動型システム毒性学基盤の構築を推進する。

B. 研究方法

システム・レベルで毒性を理解するには、膨大な実験データを格納したデータベース、文献、数値モデルなどを統合的に解析する必要があり、大規模かつ複雑なデータを意味のある形で解析するには、深層学習やテキストマイニングなどを含めた一連の人工知能（AI）アルゴリズム群の連携が有効である。本分担研究では、一連の解析過程の AI 化を実施する。

具体的には、H30年度は一連の解析工程から AI 化が可能と思われる工程を洗い出し、開発マイルストーンを設定する。また、その一部に関してのプロト

タイプを開発する。また先行研究による SHOE とその関連ツールを強化し、それらを AI 化する方策を策定、設計を行う。

H31 年度は開発マイルストーンに従い、深層学習とテキストマイニングを中核に Percellome データベースの AI 化を進める。また SHOE 及び関連ツールの強化を継続し、AI との連動を可能とする API の定義と実装を行う。

H32 年度は Percellome データベースの AI 化を完了し、公開を行う。また SHOE 及び関連ツールを用いた API 経由での AI モジュールとの連動を実現する。

C. 研究結果

I. 深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

近年、大規模かつ多次元的な遺伝子発現データが蓄積されつつあり、これらのデータを格納したデータベースが構築されている。特に、多様な要素が絡み合った、化合物毒性のメカニズムは極めて複雑である。Percellome 等の化合物毒性に関わる発現データベースは、この様な複雑性を内包している。したがって、Percellome から、有用な情報を抽出し活用するためには、この様なデータの複雑性を扱うことが出来る解析法が、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等では極めて困難である。

今まで、我々は、Deep Learning、および、その他の機械学習アルゴリズムを利用して、Percellome データベースから、一定の特徴量を認識して、有意な遺伝子を抽出するという問題を設置し、その実現可能性について検討を行ってきた。

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、または、数値で表す。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、分類を行ってきた (図1)。

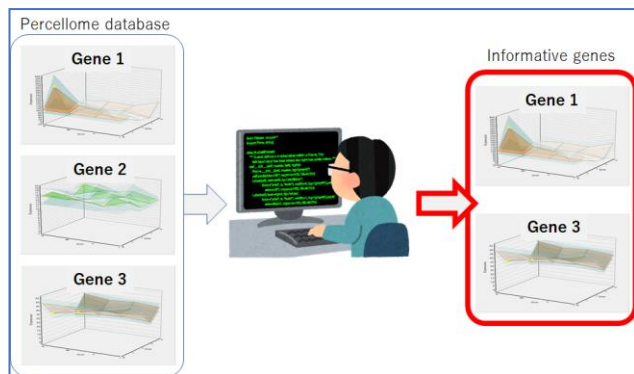


図1：専門家の visual inspection による、有意な遺伝子の同定

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以上のプロープ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、有意な遺伝子を分類するためには、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, Nature 529)。医療分野で最も成功している例としては、deep learningの技術を使用した医療画像データ解析であり、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, Nature 52)。また、最近では、発見が難しい、早期胃がんの自動検出を行う、deep learning モデル

が発表されている(Yoshimasa Sakai et al. 2018, 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society)。

そこで、昨年度 (H29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 に基づく分類器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。また、Percellome データベースの数値データを用いた、deep learning 以外の機械学習による分類器も作成し、その予測精度を検証した。

その結果、画像を用いて deep learning で分類を行った場合の方が、数値を用いて deep learning 以外の機械学習を用いて分類を行った場合よりも、判別結果に偏りが少なく、より適切に有意な遺伝子群を分類できることが分かった (図2)。

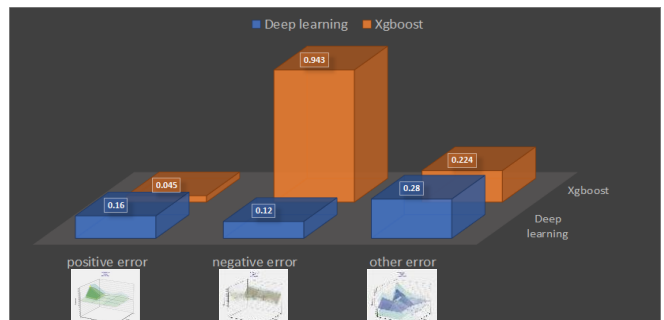


図2: deep learning に基づく分類器と、それ以外の機械学習モデル (Xgboost) に基づく分類器の、予測精度の比較：各分類器は、遺伝子を3つのクラス、positive class (化学物質により発現が up regulate されるクラス)、negative class (化学物質により発現が抑制されるクラス)、rough class (化学物質により up regulate も抑制もされないクラス)、に分類する。図のバーは、各分類器の、各クラスにおける、誤分類の割合を示している。青いバーに示すように、deep learning に基づく分類器では、各クラスの誤判定率は同様であった。一方、橙色のバーに示すように、deep learning 以外の機械学習に基づく (Xgboost) 分類器では、negative class の誤判定率が、94%と、非常に高い値を示した。

しかしながら、この様な deep learning に基づく分類器であっても、その予測精度は85%程度の正答率であり、実用化のためには、改良を加えてより高い精度の分類器を構築する必要がある。現在の我々の、deep learning に基づく分類器の精度が、85%の正答率にとどまっている原因としては、以下の3つの問題点が挙げられる。

問題点1：現在使用している画像データには、軸の情報や遺伝子名などの、ノイズの原因となる情報が含まれている（図3）。

問題点2：現在使用している画像データは、デフォルトの角度から見た、画像である。学習により適した角度がある可能性がある（図4）。

問題点3：現在使用している画像データはサイズが小さく（32×32ピクセル）、白黒である。

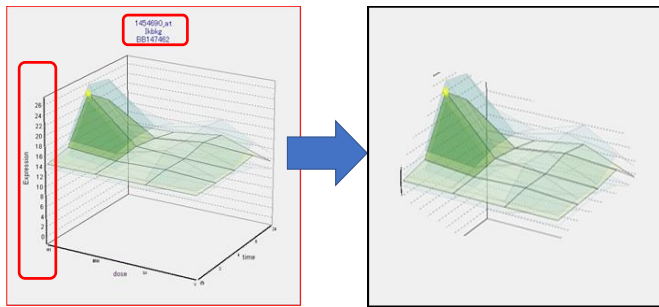
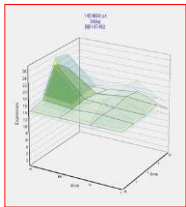


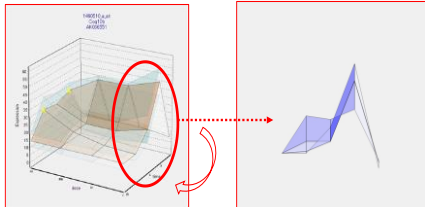
図3. ノイズの原因となる情報の削除：軸、遺伝子名、タイトルなどの余分な情報があり、これらが、予測精度を下げる原因となっていると考えられる。

H29年度の、我々のdeep learningモデルで使用した画像



デフォルトの角度からの画像

画像の回転



専門家は、遺伝子を分類するときには、画像を回転させて、見ている。

図4. 軸を回転させた画像の生成

これらの問題を解決するために、今年度（H30年度）、我々は、新しいトレーニングデータとなる画像セットを作成した。この画像セットには、軸の情報や遺伝子名などのノイズの原因となる情報が含まれない（図3）。更に、複数の角度から見た画像を生成し、複数のトレーニングデータを作成した。また、これらの画像セットの画像サイズを、500×500pixelとし、色をRGBカラーとした。これらのデータセットを用いて、deep learning モデルを精緻にチューニングし、分類器を作成した。その後、チューニングした分類器の精度の検証を行った。

画像データセットとしては今回、以下の4つの画像データセットを生成し、それぞれのデータセットを用いて、4つの deep learning に基づく分類器を構築した（図5, 6, 7, 8）。

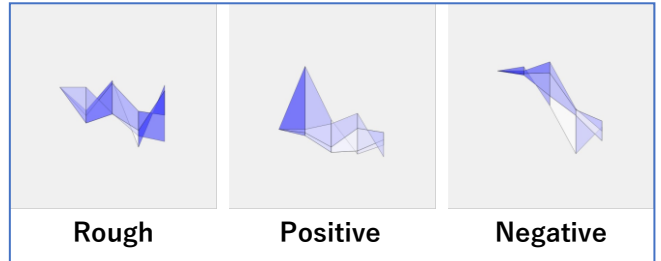


図5. 画像データ①:横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関する P 値の情報を含まない画像: 500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。各タイムポイント、化合物投与量下における、遺伝子発現量が有意に変化しているかどうかに関する情報 ($p < 0.05$) を含まない。Positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プロープに対応した画像データを作成した。

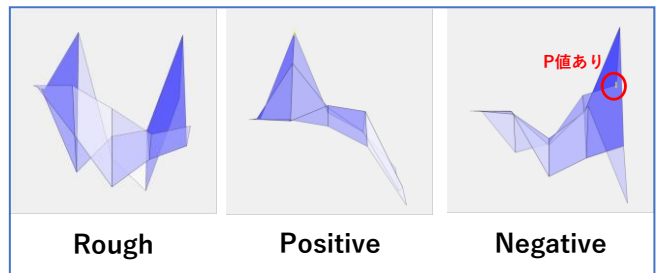


図6. 画像データ②:横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関する P 値の情報を含む画像: 500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。各タイムポイント、化合物投与量下における、遺伝子発現量が有意に変化しているかどうかに関する情報 ($p < 0.05$) を含む。Vehicle と比較して、あるタイムポイントと化合物投与量下において、遺伝子発現量が有意に変動をしている ($p < 0.05$) 場合、画像中にアスタリスクを表示した。Positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プロープに対応した画像データを作成した。

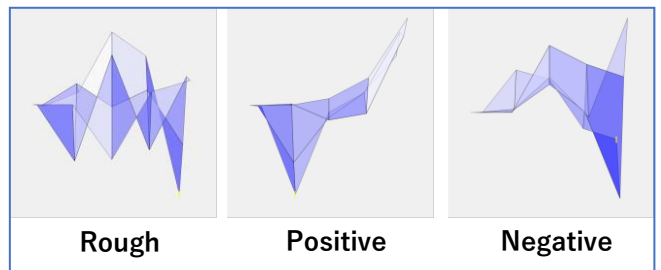


図7. 画像データ③:画像データ②を、上下方向に反転させた画像: 500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。各タイムポイント、化合物投与量下における、遺伝子発現量が有意に変化しているかどうかに関する情報 ($p < 0.05$) を含む。Vehicle と比較して、あるタイムポイントと化合物投与量

下において、遺伝子発現量が有意に変動をしている ($p < 0.05$) 場合、画像中にアスタリスクを表示した。Positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プロープに対応した画像データを作成した。

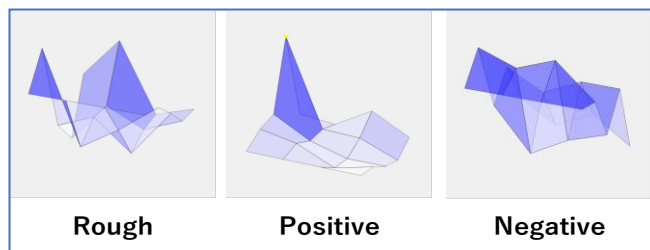


図 8. 画像データ④:デフォルトの角度から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関する P 値の情報を含む画像: 500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。各タイムポイント、化合物投与量下における、遺伝子発現量が有意に変化しているかどうかに関する情報 ($p < 0.05$) を含む。Vehicle と比較して、あるタイムポイントと化合物投与量下において、遺伝子発現量が有意に変動をしている ($p < 0.05$) 場合、画像中にアスタリスクを表示した。Positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プロープに対応した画像データを作成した。

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の開発に際しては今回、deep learning モデルとして 18 層 (畳み込み層やプーリング層) のレイヤーで構成される、resnet モデルを用いた(Kaming He et al. 2015, arXiv:1512)。Resnet は、画像分類で高い精度を示すことが多く、ImageNet2015 (<http://image-net.org/challenges/LSVRC/2015/>) における画像分類に関するコンペティションで、最も高い精度を示したモデルである(Kaming He et al. 2015, arXiv:1512)。今回、我々が作成した分類器は、Resnet の多数の層を活用して、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、3つのクラスに分類する。3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)、である (図 5, 6, 7, 8)。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、上記の画像データ①から④を用いて、4つの deep learning モデルに基づく、4つの分類器を構築した。構築した分類器に対して、5 fold cross validation を実施し、予測精度を検証した。図 9 に、各分類器の予測精度の検証結果を示す。

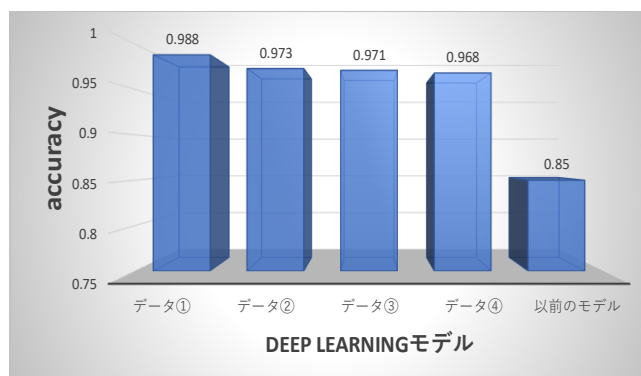


図 9. 予測精度: 各分類器の予測精度の比較を行った。それぞれの予測モデルの予測精度、正答率、をバーで表した。画像データ①を基にトレーニングを行った分類器の正答率は、98.8%と、非常に高い値を示した。

図 9 のように、データ①から④を基にトレーニングした分類器の予測精度は、先行研究の分類器の予測精度よりも、10%以上正答率が高く、95%以上の正答率という非常に良い予測精度を示した。以上の結果から、画像データからノイズとなる情報を削除し、3D 描画を適切な角度に調整することで、分類器の予測精度が大幅に改善されることが示された。

II. Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動

Garuda Platform 上で、Percellome DB と SHOE の連動をより密にした。図 10 に連動の概要を、そのあとに、一連の画面を示す。

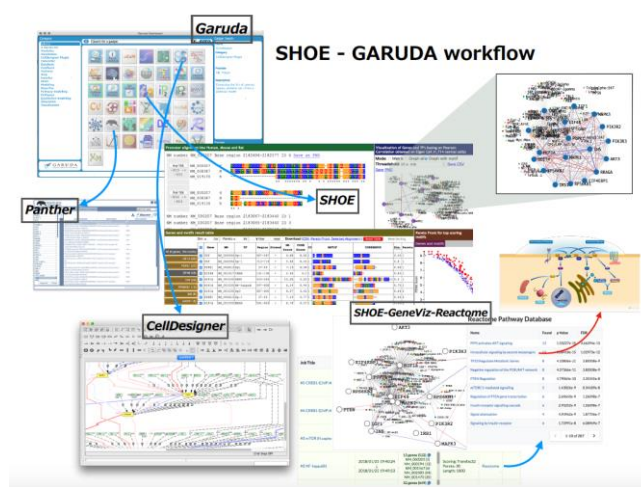


図 10. ソフトウェアの連動概要

2. Integration of ChIP-seq Array data into SHOE

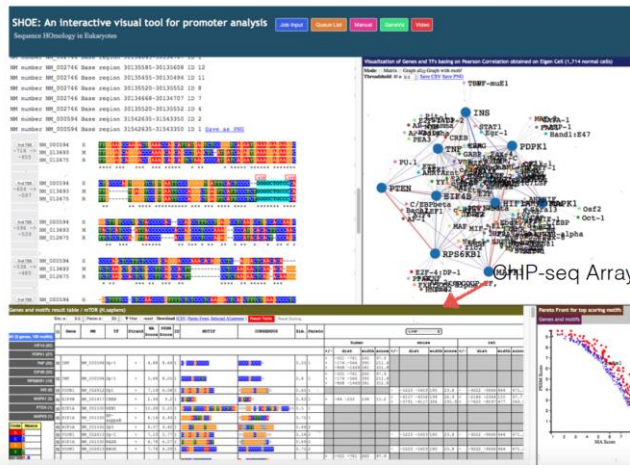


図 1 1. ChIP-seq アレイデータを導入した SHOE 画面

3. Integration of ChIP-seq Array data into SHOE

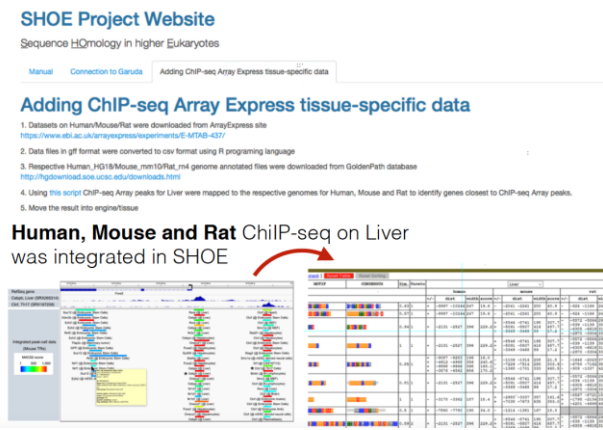


図 1 2. SHOE への ChIP-seq アレイデータの統合

Example 1 of ChIP-seq peak in Liver predicted by SHOE

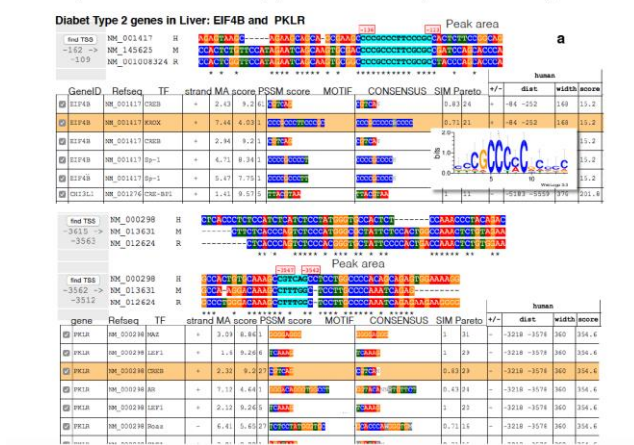


図 1 3. 解析結果例

D. 考察

深層学習は、Percellome データベースのような大規模な発現データの自動分類に有効であることがわかった。今後は、未知のデータセットに対し分類器を適用し予測を行い、予測結果を、専門家の目視による結果と比較する。これにより深層学習による分類結果と専門家の目視による分類結果との差異を基に、さらに、より精緻な分類器のチューニングが可能と考えられる。

E. 結論

今回の成果で、人手ではできなかった大規模の遺伝子発現と毒性への連動解析が可能となる。また、SHOE と Percellome の連動も密になり、よりスムーズな解析が可能となった。

今後は、この成果をフィードバックし、さらに高速且つ高精度の解析プロセスの展開を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① N Polouliakh. In Silico Transcription Factor Discovery via Bioinformatics Approach: Application on iPSC Reprogramming Resistant Genes. Leveraging Biomedical and Healthcare Data, 2019 – Elsevier
- ② Polouliakh N, Horton P, Shibani K, Takata K, Ludwig V, Ghosh S, Kitano H. Sequence homology in eukaryotes (SHOE): interactive visual tool for promoter analysis. BMC Genomics. 2018 Sep 27;19(1):715. doi: 10.1186/s12864-018-5101-3.

2. 学会発表

- ① Natalia Polouliakh. Garuda/Shoe and Percellome analytic workflow. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 24, 2018.
- ② Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano. DTOX: Deep neural network-based computational framework to analyze omics data in Toxicology. OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi Building, Tokyo, May 25, 2018.
- ③ Kitano, H. AI-driven systems toxicology. Toxicogenomics for Accelerated and Refined Hazard Identification of Chemicals (Joint Symposium between IUTOX and IUPHAR), 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto International Conference Center, Kyoto, July 6, 2018.

(invited)

- ④ 北野宏明. AI 駆動型システム医科学の展望. 山口大学第2回シンポジウム: 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, KKR 山口あさくら, 山口, Aug. 4, 2018. (invited)
- ⑤ Kitano, H. AI Grand Challenges. 2018 年日台科学技術フォーラム, リージェント台北, 台湾, Sep. 10, 2018. (invited)
- ⑥ 北野宏明. 人工知能駆動型システム毒性学の展望. CBI学会 2018 年大会, タワーホール船堀, 東京, Oct. 9, 2018. (invited)
- ⑦ 北野宏明. AI 戦略とムーンショット. データサイエンティスト協会シンポジウム, JP タワーホール&カンファレンス東京, 東京, Oct. 19, 2018. (invited, keynote)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）
平成 30 年度 分担研究報告書

新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
(H30-化学-指定-001)

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
サブプロジェクトリーダー

研究要旨

本分担研究は、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する。

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結果をPercellome法により正規化したデータを入力として、Garudaガジェットを用いたパスウェイ解析をおこなった結果、肝臓において脂質代謝関連の遺伝子変動が認められた。これらがPPARα、SREBP、ERといった核内受容体の標的遺伝子であったことから、これらの核内受容体を介したシグナル経路のクロストークとそれに対するバルプロ酸ナトリウムの作用を数理モデリングにより検証した。シミュレーションの結果、バルプロ酸ナトリウムがERリガンド量に与える影響により脂質代謝が減弱する可能性が示唆された。

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が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。昨年度の研究によって、バルプロ酸ナトリウム投与により肝臓において脂肪酸代謝に関連する遺伝子の発

現が変動することが見いだされた。更に、これらの遺伝子は各種核内受容体 (PPAR α 、SREBP、ER) の標的遺伝子であったことから、バルプロ酸ナトリウムの肝毒性にこれらの核内受容体が関与している可能性が示唆された。バルプロ酸ナトリウムは脂肪肝を含む肝毒性を呈することが既に知られているが、その分子メカニズムについては不明な点も残されている。そのため、今年度は上記核内受容体とバルプロ酸ナトリウム投与が肝毒性につながりうるのか数理モデリングによって検証し、Percellomeデータが毒性発現機構の推定に有効であることを示すことを目的とした。

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.mizuguchilab.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。バルプロ酸ナトリウムを投与したマウスの肝臓において発現が変動した遺伝子群を制御する核内受容体 (PPAR α 、SREBP、ER) を介したシグナル伝達のクロストークをシミュレーションするため、GINSim [7]を用いてブーリアンネットワークを構築した。

C. 研究成果

昨年度の研究成果より、バルプロ酸ナトリウム投与によってPPAR α 、SREBP、ERの活性が影響を受けることが見いだされた。PPAR α は脂質代謝の制御に関わる核内受容体であり、脂肪酸の構造を有するバルプロ酸ナトリウムがPPAR α のリガンドとして直接活性化に関わったことが考えられた。SREBPは脂肪酸やトリグリセリド、コレステロール産生の制御に関わっている。ERのリガンドであるエストラジオール17 β (E2) はER依存的にSREBPの発現を抑制し、トリグリセリドの蓄積に対しても抑制的に働くことが報告されている[8]。これらのことから、上記の核内受容体は互いにクロストークしていることが強く示唆されている。一方、バルプロ酸ナトリウムはMAPKの活性化を介してエストロゲンに対する細胞の感受性を上げる[9]ほか、逆にエストロゲン産生を抑制することが報告されている[10]。このように、上記核内受容体のクロストークに対してバルプロ酸ナトリウムが何らかの作用を呈する可能性が示唆されているものの、その関係性は複雑で特定のタンパク質の活性に注目することではバルプロ酸ナトリウムの作用を推定する事は困難であると考えられた。そのた

め、核内受容体のクロストークやそれに対するバルプロ酸ナトリウムの作用を数理モデリングによって表現し、シミュレーションをおこなうことでバルプロ酸ナトリウムが呈する肝毒性の分子メカニズムを推定することを試みた。まず、上記核内受容体が関与するシグナル伝達経路に含まれるタンパク質やリガンド結合などの反応の有無を0または1で表現し、制御関係（正の制御か、負の制御か）を表す矢印で連結させたネットワーク（ブーリアンネットワーク）を構築した。これを用いてバルプロ酸ナトリウムの有無とエストロゲンの影響のシミュレーションをおこなった結果、性別依存的にバルプロ酸ナトリウム存在下で脂肪酸代謝が減弱する可能性が示唆された。

D. 考察

PPAR α やSREBPの活性と脂質代謝異常による疾患との間には連関が認められており、肥満患者においてPPAR α /SREBP比と脂肪肝の間に相関があることが報告されている[11]。両核内受容体の活性バランスの調整にERが関与しており、バルプロ酸ナトリウムがERリガンド量に影響を与えることが肝臓に於ける脂肪蓄積につながる可能性が示唆された。本結果は、脂質代謝異常が疑われる患者に対するバルプロ酸ナトリウム投与のリスク評価の重要性を示していると言える。

E. 結論

Garudaプラットフォームを中心とした解析ツールの利用により、Percellomeデータから仮説創出が可能となった。Percellomeデータのように

定量性に優れた遺伝子発現プロファイルはノイズが小さく、実験結果を解釈する上で重要な遺伝子の抽出においてアドバンテージが大きい。更に、Garudaプラットフォームは実験結果の解釈に向けて必要な情報を効率よく収集することができる。今年度の研究成果に見られるように、遺伝子発現変動から毒性発現の分子メカニズム推定にまで至る事が可能となった。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

① 渡邊怜子, 江崎剛史, 夏目やよい, 佐藤朋広, 長尾知生子, 川島和, 水口賢司

「薬物動態・毒性予測のためのデータベースと創薬」

『マテリアルズ・インフォマティクスによる材料開発と活用集』、439-447、高薄一弘 編、株式会社技術情報協会、2019年1月31日刊

② 夏目やよい

バイオメディカル・基礎から臨床への開発プロセス (2) 1) トランスレーショナルリサーチと機械学習

医薬ジャーナル 54(9):2049-2053, 2018/12/14

ISSN: 0287-4741

③ Esaki, T., Watanabe, R., Kawashima, H., Ohashi, R., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., & Mizuguchi, K. (2018).

Data curation can improve the prediction accuracy

of metabolic intrinsic clearance. *Molecular informatics*.

- ④ Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., Ohashi, R., & Mizuguchi, K. (2018).

Predicting Fraction Unbound in Human Plasma from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges. *Molecular pharmaceutics*, 15(11), 5302-5311.

- ⑤ 長尾知生子、夏目やよい、水口賢司
創薬における計算機の果たす役割 -プレジ
ジョンメディシンに向けて-
Presicion Medicine, 1(1), 28-31, 2018

- ⑥ Masuta, Y., Yamamoto, T., Natsume-Kitatani, Y., Kanuma, T., Moriishi, E., Kobiyama, K., ... & Ishii, K. J. (2018).

An antigen-free, plasmacytoid dendritic cell-
targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T
cells in nonhuman primates. *The Journal of
Immunology*, j11701183.

- ⑦ Tanaka, M., Kobiyama, K., Honda, T.,
Uchio-Yamada, K., Natsume-Kitatani, Y.,
Mizuguchi, K., ... & Ishii, K. J. (2018).

Essential role of CARD14 in murine experimental
psoriasis. *The Journal of Immunology*, 200(1), 71-81.

2. 学会発表

- ① OpenTox Asia 2018
(2018.5.24, 東京)

“Percellome toxicogenomics data handling by
Garuda” (Poster)

○夏目やよい

- ② AsiaTox 2018
(2018.6.18, Thailand)

“Percellome meets Garuda: toxicogenomics
approach to evaluate the toxicity of valproic acid”
(Poster)

○Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S.,
Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J.

- ③ ISMB 2018
(2018.7.7, USA)

“Inferred role of crosstalk between PPARα and ER
signaling pathways in the toxicity of valproic acid:
systems toxicology approach” (Poster)

○Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S.,
Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J.

- ④ 日本微生物生態学会第32回大会
(2018.7.12, 沖縄)

“日本人を対象とした腸内細菌叢の大規模調査
(Investigation on large-scale gut microbiome of
Japanese)” (Poster)

○朴鐘旭, 谷澤薫平, 細見晃司, 川島和, モフセンア
タイエブ, 陳怡安, 大野治美, 小西可奈, 夏目やよい,
村上晴香, 國澤純, 宮地元彦, 水口賢司

- ⑤ 第45回日本毒性学会学術年会
(2018.7.18, 大阪)

“TargetMineによる標的予測” (招待講演)

○夏目やよい

⑥17th International Symposium on Microbial Ecology (2018.8.12, Germany)

“Large-scale analysis of the gut microbiome of healthy Japanese populations” (Poster)

○Park J., Tanisawa K., Hosomi K., Kawashima H., Mohsen A., Chen Y.A., Ohno H., Konishi K., Natsume-Kitatani Y., Murakami H., Kunisawa J., Miyachi M., Mizuguchi K.

⑦日本薬物動態学会第33回年会 (2018.10.02, 石川)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling 1. In silico prediction of fraction unbound in brain homogenate” (Poster)

○江崎剛史, 渡邊怜子, 大橋力也, 夏目やよい, 川島和, 長尾知生子, 水口賢司

⑧日本薬物動態学会第33回年会 (2018.10.02, 石川)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling 2. Prediction of renal elimination from chemical structure using predicted fraction unbound” (Poster)

○渡邊怜子, 江崎剛史, 川島和, 夏目やよい, 長尾知子, 大橋力也, 水口賢司

⑨CBI学会 (情報計算法学化学生物学会) 2018年大会 (2018.10.09, 東京)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling:10.

Prediction of renal clearance in humanutilizing structural information” (Poster)

○Watanabe R., Esaki T., Ohashi R., Natsume-Kitatani Y., Kawashima H., Nagao C., Ohashi R., Mizuguchi K.

⑩CBI学会 (情報計算法学化学生物学会) 2018年大会 (2018.10.09, 東京)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling: 9. Development of Regression Model of Unbound Fraction to Brain Homogenate from Chemical Structure” (Poster)

○Esaki T., Watanabe R., Ohashi R., Natsume-Kitatani Y., Kawashima H., Nagao C., Mizuguchi K.

⑪CBI学会 (情報計算法学化学生物学会) 2018年大会 (2018.10.09, 東京)

“Development of a pharmacokinetics prediction system using multiscale integrated modeling: 8. Web application and database consisting of curated public data and newly acquired experimental data” (Poster)

○Kawashima H., Watanabe R., Esaki T., Ohashi R., Satoh D., Nagao C., Natsume-Kitatani Y., Mizuguchi K.

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] Chaouiya C., et al. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 804:463-79
- [8] Han, S., et al. *Hepatology* 59:1791(2014):1802
- [9] Jansen, MS., et al. *PNAS* 101.18 (2004): 7199-7204
- [10] Glistler, C., et al. *PLoS One* 7.11 (2012):e49553
- [11] Pettinelli, P., et al. *Biochim Biophys Acta* 1792.11 (2009): 1080-1086

Ⅲ. 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
渡邊怜子, 江崎剛史, <u>夏目やよい</u> , 佐藤朋広, 長尾知生子, 川島和, 水口賢司	薬物動態・毒性予測のためのデータベースと創薬	高薄一弘	マテリアルズ・インフォマティクスによる材料開発と活用集	株式会社技術情報協会	東京都品川区西五反田2-29-5	東京都品川区西五反田2-29-5	439-447

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
Ono R, Yasuhiko Y, <u>Aisaki KI</u> , <u>Kitajima S</u> , <u>Kanno J</u> , Hirabayashi Y.	Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing.	Commun Biol.	2	57	2019
Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Araki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, <u>Kanno J</u> , Ishimaru N.	Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.	PLoS One.	13(10)	e0205702	2018
<u>Polouliakh N</u> , Horton P, Shibani K, Takata K, Ludwig V, Ghosh S, <u>Kitano H</u> .	Sequence homology in eukaryotes (SHOE): interactive visual tool for promoter analysis.	BMC Genomics.	19(1)	715	2018
Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, <u>Kitajima S</u> , Shibutani M, Furukawa S, Hirose A.	Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, tri sodium salt.	Fund Toxicol Sci	5	167-170	2018
Esaki, T., Watanabe, R., Kawashima, H., Ohashi, R., <u>Natsume - Kitatani, Y.</u> , Nagao, C. & Mizuguchi, K	Data curation can improve the prediction accuracy of metabolic intrinsic clearance. Molecular informatics	Molecular informatics	38	1800086	2018
Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , Nagao, C., Ohashi, R. & Mizuguchi, K.	Predicting Fraction Unbound in Human Plasma from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges	Molecular pharmaceuticals	15(11)	5302-5311 2018	2018
<u>夏目やよい</u>	バイオメディカル・基礎から臨床への開発プロセス (2) 1) トランスレーショナルリサーチと機械学習	医薬ジャーナル	54(9)	2049-2053	2018

長尾知生子、 <u>夏目やよい</u> 、水口賢司	創薬における計算機の果たす役割 -プレシジョンメディスンに向けて-	Presicion Medicine,	1(1)	28-31	2018
Masuta, Y., Yamamoto, T., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , Kanuma, T., Moriishi, E., Kobiyama, K. & Ishii, K. J.	An antigen-free, plasmacytoid dendritic cell-targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T cells in nonhuman primates.	The Journal of Immunology	200	2067-2075	2018
Tanaka, M., Kobiyama, K., Honda, T., Uchio-Yamada, K., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , Mizuguchi, K. & Ishii, K. J.	Essential role of CARD14 in murine experimental psoriasis.	The Journal of Immunology,	200	71-81	2018

厚生労働大臣 殿

機関名 独立行政法人 労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター

所属研究機関長 職 名 所 長

氏 名 菅野 純

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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）
2. 研究課題名 新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
3. 研究者名 （所属部局・職名）独立行政法人 労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター
（氏名・フリガナ）菅野 純 （カンノ ジュン）

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査の場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容：)

（留意事項） ・ 該当する□にチェックを入れること。
・ 分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
3. 研究者名 (所属部局・職名) 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部・部長
(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田 晴

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク 研究事業
- 2. 研究課題名 新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター 毒性部 室長
(氏名・フリガナ) 相崎 健一 (アイサキ ケンイチ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：遺伝子組換え実験安全管理規則)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

31年 4月 16日

厚生労働大臣
（国立医薬品食品衛生研究所長）殿
（国立保健医療科学院長）

機関名 特定非営利活動法人
システム・バイオロジー
所属研究機関長 職名 会長
氏名 北野 宏明

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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）
2. 研究課題名 新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
3. 研究者名 （所属部局・職名）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
（氏名・フリガナ）北野 宏明（キタノ ヒロアキ）

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称： ）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合はその理由： COI委員会未設置のため）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関： 日本バイオアッセイ研究センター）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月9日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立研究開発法人
医薬基盤・健康増進機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 米田 悦啓

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医薬基盤研究所・バイオインフォマティクスプロジェクト サブプロジェクトリーダー
(氏名・フリガナ) 夏目 やよい (ナツメ ヤヨイ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。