

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31/令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

令和2（2020）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	-----	45
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 31/令和元年度 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、クロルピリフォス、及び、5-アザシチジンの 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た。特に先行研究で実施した化学物質と比較すると、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子の農薬であるアセフェートと類似した傾向が明らかとなった。5-アザシチジンが反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系（小胞体ストレス等）、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導するという点では、5-フルオロウラシル、及び、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を行う予定である。なお、当

初、パクリタキセルで反復曝露実験を実施する予定であったが、パクリタキセルの納品に時間がかかることと、購入費用が非常に高価であることから保留とし、翌年度実施予定であったクロルピリフォスを優先して実施した。

(2) では平成 31/令和元年度にジエチルニトロサミンのエピジェネティクス機構解析を予定していたが、クロフィブレートに変更した。これは昨年度検討したバルプロ酸ナトリウムの PPAR α 作用との差分を確認する必要があると考えたことから、PPAR α の陽性対照物質であるクロフィブレートに変更、優先して実施した。具体的には、クロマチン免疫沈降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法を利用して、クロフィブレートを 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た結果、クロフィブレートの反復投与により、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 のゲノムワイドな亢進を明らかにした。また、バルプロ酸ナトリウムの反復投与の結果の再解析により、バルプロ酸ナトリウムにおいても、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進が起こっていることを確認できた。クロフィブレートとバルプロ酸ナトリウムは、PPAR α 作用という点で共通していることから、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進は、PPAR α 作用によるものと示唆された。一方、バルプロ酸ナトリウムの反復投与による H3K9me3 のゲノムワイドな低下は、PPAR α 作用以外によるものと考えられた。

(3) では、従来、律速段階となっていた Percellome データから有意に変動した遺伝子を専門的判断に基づき網羅的に抽出する作業を完全自動化する「自動深層機械学習システム」の開発を進め、多数のモデルの予測結果の統合により精度のより一層の向上を実現しつつある。また予測モデルの判断基準を調べるため explainability model (grad cam) を導入し、モデルの最適化を進めた。さらに、転写制御領域の解析ソフトウェア SHOE と Garuda Platform の連携を中心に、複数の解析ツールを使ったパイプラインの機能強化を達成した。

(4) では、計画通り、Percellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer を、オンラインサービスとして提供するために、内部データ構造を抜本的に再設計して高速化を果たすなど、必要なシステム開発を進めた。

(5) では、ペンタクロロフェノール曝露による肝のトランスクリプトームについて、先行研究により構成しつつある解析パイプラインを用いて解析を進めた結果、ペンタクロロフェノールによる急性症状（発汗・発熱）が RIG-1 パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起されることが示唆された。

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
- 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
- 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
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、代表的物質についての DNA メチル化及びヒストン修飾情報を加え、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：

クロルピリフォス (Chlorpyrifos; 分子量: 350.59、Cas No.: 2921-88-2、純度 98%、富士フイルム和光純薬株式会社 (製造元: Toronto Research Chemicals))、及び、5-アザシチジン (5-azacytidine; 分子量: 244.21、Cas No.: 320-67-2、純度 >99%、Sigma-Aldrich) 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) 時のクロルピリフォス (CPF) 及び 5-アザシチジン (AZC) の曝露量はそれぞれ 0、3、10、30 mg/kg 及び 0、0.3、1、3 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。CPF 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 20mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の 0、3、10、30mg/kg とした。以下、同様に、AZC の 4 回反復投与の用量は 2mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、0.3、1、3mg/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 CPF、AZC、共に 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、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。採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4°C で一晚浸漬し、RNase を不活化した。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、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

●GeneChip 解析：

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモータが付加したオリゴ 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クロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-Seq)

クロフィブレート (70mg/kg) を 14 日間反復投与した後、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1%DMSO 水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝および、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1%DMSO 水溶液) を単回投与した 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 (30 μ g) を材料として、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) Deep Residual Learning for Image Recognition. arXiv:1512.03385.)) 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、平成 30 年度は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。平成 31/令和元年度はさらに④10 種の描画角度から 3 次元グラフを作成し、トレーニング画像数を 10 倍に増加させることで、深層学習による分類器の一層の精度向上を試みた。また構築した深層学習モデルが、画像のどの部分に着目して判別を行っているかを調べるため、最新の explainability model (grad cam : R. R. Selvaraju, M. et al (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7) を実装してモデルの解析を行った。

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 の機能追加や改良として、特に将来的な機能拡張 (AI など) を想定した API の定義と実装を進めた。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】

先行研究においてマウスにペンタクロロフェノール (0、10、30、100 mg/kg) を経口投与し 2、4、8 及び 24 時間後に摘出した肝を用いて遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより測定し、Percellome 法による normalization 後に遺伝子発現が変動した遺伝子を網羅的に選択した遺伝子リスト (Kanno J. et al., J. Toxicol. Sci. 2013;38(4): 643-654) を、Garuda プラットフォームへの入力データとして用いた。Garuda プラットフォーム上において、使用したガジェット (Garuda プラットフォームで連結され、相互に入出力データを共有可能となったソフトウェアの総称) は Nandi (使用可能なガジェットの提示)、Gene ID converter (遺伝子 ID 変換ツール)、Reactome (pathway enrichment 解析)、PercellomeDB (遺伝子発現の時間依存的・濃度依存的変動を表す 3D プロットの作成) である。また、当該遺伝子リストを用いて、翻訳により産生されるタンパク質の相互作用情報をグラフとして表現し、その構造から相互作用の強いクラスターを検出する MCL クラスターリングを STRING v11 (Szklarczyk, D., et al., (2018) . Nucl Acid Res 47.D1: D607-613.) を用いて実施した。

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

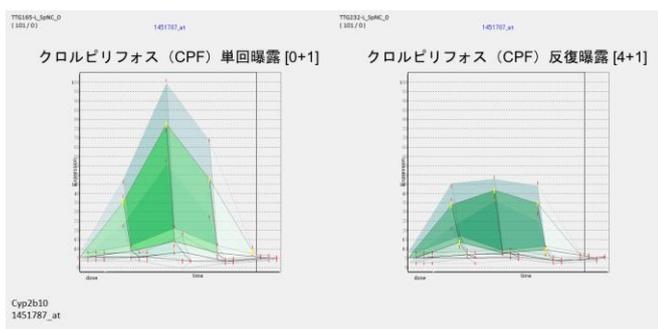
当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

(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 31/令和元年度は、クロルピリフォス (CPF)、及び、5-アザシチジン (AZC) 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。

クロルピリフォス (CPF) 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 298、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 60 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。

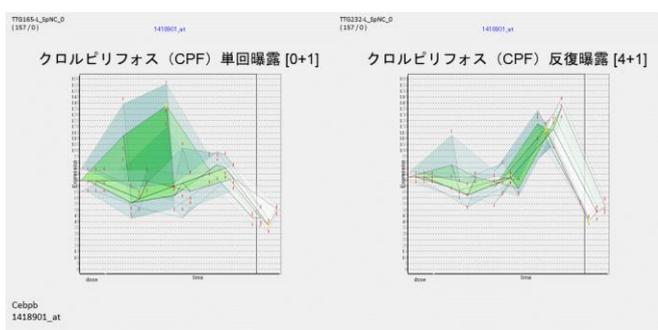
[0+1]と[4+1]に共通する過渡反応遺伝子は 10 であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時によりも反復曝露時に過渡反応が減弱する傾向が見られた。



【共通する遺伝子 Cyp2b10。基線の変化は見られず過渡反応が減弱している】

基線反応の変化はこの共通 10 遺伝子および、発現コピー数が 3 以上の全ての遺伝子において変動は少なかった。共通 10 遺伝子に特徴的なネットワークは抽出されなかった。

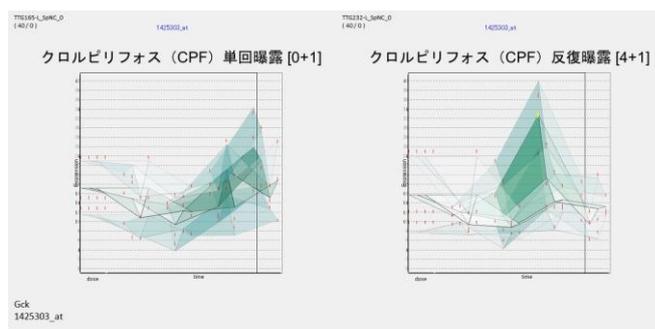
[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は 288 あり、それらは[4+1]における基線反応に弱いながら低下の傾向がみられた。これらの遺伝子はビタミン D 受容体系、PXR 受容体系、グルココルチコイド受容体系、甲状腺ホルモン受容体系等の核内受容体を介したシグナルネットワークに属する遺伝子が含まれ、その上流にグルココルチコイド受容体の作用、グルカゴン等の介在が示唆された。これらは投与後 2~4 時間において顕著に誘導された遺伝子群が示すものであった。24 時間目に発現する遺伝子数は僅かであった。



【ビタミン D 受容体系に属する Cebpb。2~4 時間目の過渡反応が反復曝露により消失している。】

[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 50 あり、弱い基線反応

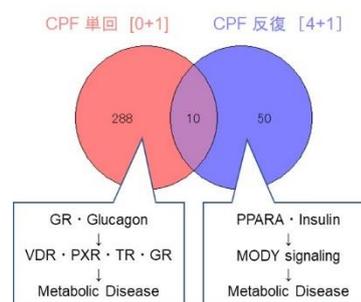
の上昇傾向を伴って Glut2 (Slc2a2)、GCK、などが発現変動を示した。この発現変動遺伝子リストからは、MODY シグナル (Maturity Onset Diabetes of Young ; 若年発症型成人型糖尿病) 及び糖代謝系が IPA により抽出され、その上流に PPARA (発現抑制)、insulin などが挙げられた。



【糖代謝に関わる Gck が反復曝露により誘導された。】

反復曝露が基線反応に及ぼす影響は CPF の場合は、軽微ながら上昇作用 (210 遺伝子) を有し、コレステロール代謝に関わる遺伝子群が含まれる。

以上、CPF はマウス肝において、グルココルチコイド受容体系へのシグナル入力に反応して、ビタミン D、PXR、甲状腺ホルモン受容体系に作動性を示すとともに、PPAR α の系に抑制的に働くことが示唆され、反復投与により糖代謝異常が遷延する可能性が示唆された。

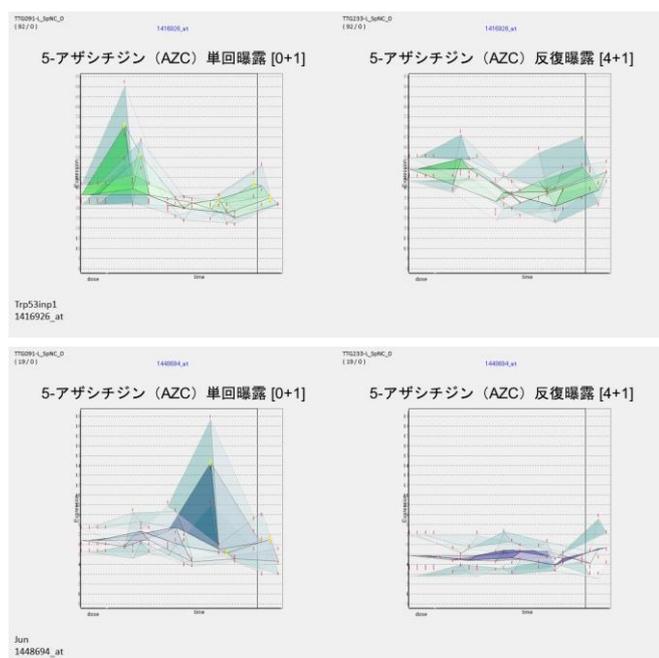


【CPF の単回と反復曝露との遺伝子発現の関係の概略を示す。】

CPF がグルココルチコイド受容体シグナル、グルカゴン系、糖代謝系に影響を与えるという本解析結

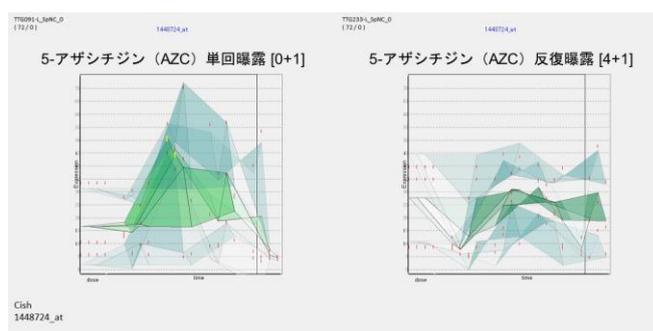
果と、ヒトや実験動物に対して CPF の比較的長期の曝露が血糖値を上昇させる、或いは、II 型糖尿病、妊娠性糖尿病、及び肥満と関係するという報告との関係の解析を更に進める。一方、小胞体ストレスなどの“一般的”な毒性を示唆する変化の誘導は弱かった。糖代謝等について、先行研究で実施したアセフェート、昨年度実施したイミダクロプリドとの対比解析をも進める。

5-アザシチジン (AZC) 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24、反復曝露実験(以下、[4+1]と表記)において28であり、共通する遺伝子が認められなかった。



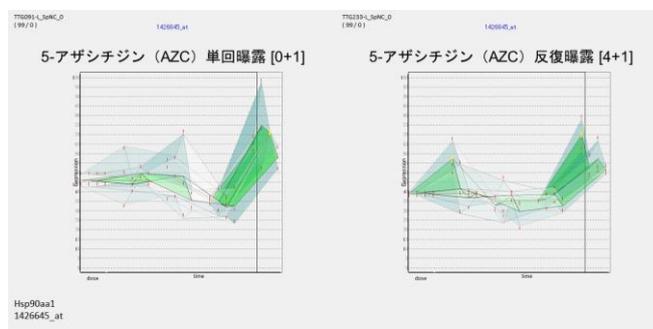
【p53 シグナル系に属する Trp53inp1、Jun を示す。反復により過渡反応は消失している。】

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 24 は、[4+1]と共通性が無く、p53 を上流とするシグナル系と、TLR9 や TLR3 を上流とする JAK/STAT シグナル系などが IPA により抽出された。



【JAK/STAT 系に属する Cish。“ノイズ”が多い遺伝子であるが、反復により過渡反応のピークが消失している。】

[4+1]において変動した 28 遺伝子は、[0+1]と共通性が無く、ユビキチン化系のものを少数含んでいた。



【蛋白ユビキチン化の系に含まれる Hsp90aa1。微弱ながら 2 時間目の誘導が認められる】

[0+1]も[4+1]も共に、過渡反応の 2 時間目からシグナル系が作動することから、弱いながら標的の比較的明瞭な系に対する活性を、代謝を受けない状態で発揮することが確認された。

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細胞当たりの発現コピー数が 3 以上の遺伝子は約 600、低下した遺伝子は約 1,500 であった。上昇した遺伝子群には、特定のシグナル系および上流因子は見いだせなかった。

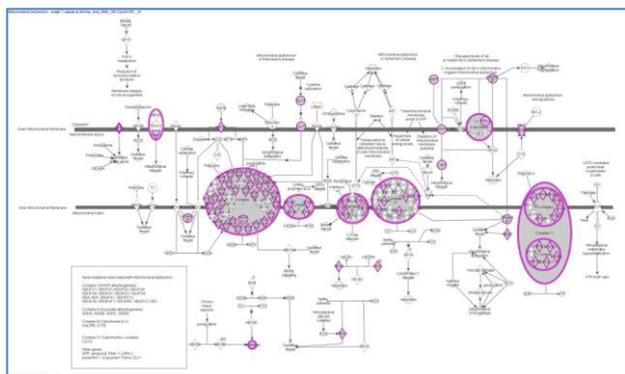
基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、IPA 分析におけるミトコンドリア機能不全、酸化的リン酸化、EIF-2 シグナル系への強い影響が示された。また、LXR 系、上流に RICTOR、あるいは HNF4A、を上流に持つ系シグナルを含んでいた。

Top Canonical Pathways	
Name	p-value
Mitochondrial Dysfunction	1.26E-52
Oxidative Phosphorylation	1.17E-51
EIF2 Signaling	1.01E-48
Sirtuin Signaling Pathway	7.97E-32
LXR/RXR Activation	1.92E-21

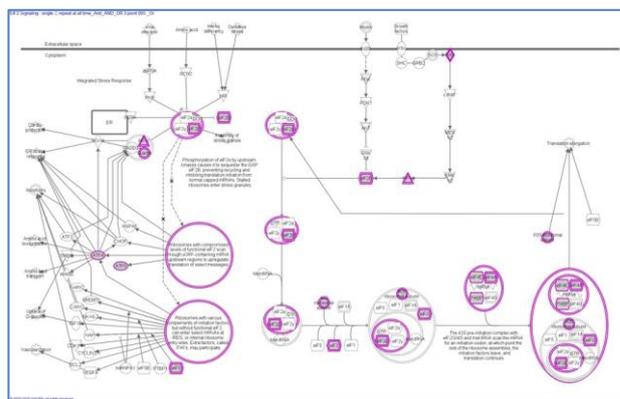
Top Upstream Regulators	
Name	p-value
RICTOR	2.05E-107
HNF4A	9.32E-59
1,2-dithiol-3-thione	3.26E-55
TLE3	1.41E-48
5-fluorouracil	2.80E-45

【基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群の IPA 分析結果】

以上、AZC はマウス肝において、4 日間の 2mg/kg の反復経口投与により強力に、ミトコンドリア機能障害に関わる諸因子（トランスポーター、NADH ユビキチン酸化還元酵素などのミトコンドリア呼吸鎖酵素）、EIF2 シグナル系、等を抑制することが確認された。



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）のミトコンドリア機能マップ中の位置を示す（IPA 解析）】



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）の EIF-2 シグナル系のマップ中の位置を示す（IPA 解析）】

（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】

反復曝露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）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した。

●次世代シーケンサを用いた ChIP-Seq

平成 31/令和元年度は、クロフィブレート（定用量：70 mg/kg）を 14 日間反復投与（[14+1]）した際、及び溶媒（0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液）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）、クロマチン免疫沈降（ChIP）を行った。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し、ChIP が正常に行われたと判断した。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 75bp のシングルリードの網羅的シーケンス解析を行った。

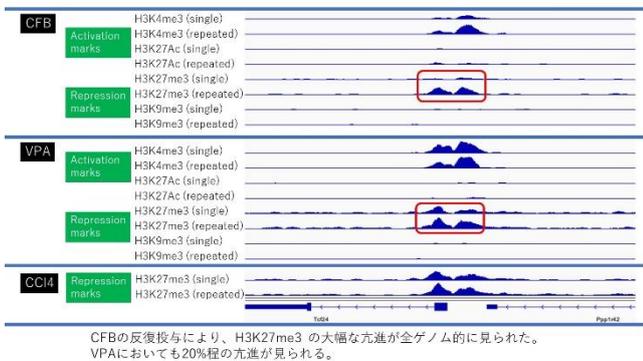
今回得られたクロフィブレート（CFB）を 14 日間

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（18,185、19,425）、
抗 H3K27Ac 抗体（21,740、16,450）、
抗 H3K27me3 抗体（8,650、20,770）、
抗 H3K9me3 抗体（21,847、20,583）、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数が 8,650 から 20,770 へ、140.1% 増加しており、CFB の反復投与によって H3K27me3 が亢進されることが明らかになった【下図】。したがって CFB 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。



【溶媒およびクロフィプレート(CFB)の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、溶媒およびバルプロ酸ナトリウム(VPA)の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、さらに、溶媒および四塩化炭素(CCl4)の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析をまとめた一例 (Tcf24 遺伝子および Pppar42 遺伝子のプロモータ領域)。図中の赤枠部分は、H3K27me3 の溶媒投与（枠内上段）および CFB, VPA, および CCl4 の反復投与（枠内下段）を示しており、CFB および VPA において大幅なピークの亢進が見られる。一方、CCl4 の反復投与において大幅な亢進は見られなかった】

なお、CFB の反復投与において、H3K4me3、H3K27me3、H3K27Ac、H3K9me3 の各 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（63、15）、
抗 H3K27Ac 抗体（28、66）、
抗 H3K27me3 抗体（12198、0）、
抗 H3K9me3 抗体（1、321）、

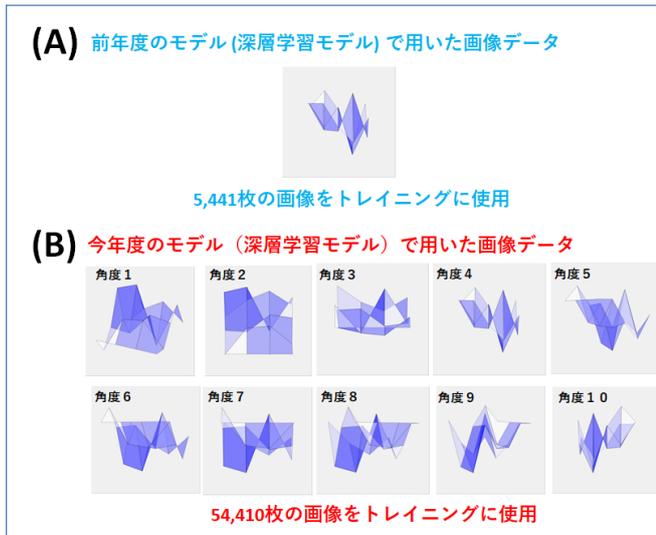
という解析結果となった。このように、反復投与によりゲノムワイドな変化（増加）をヒストン修飾（H3K27me3）が示すことを明らかにした。

実際に、H3K27me3 が反復投与により増加した遺伝子の大半が基線反応の低下を伴っており、逆に反復投与により基線反応が有意に上昇した少数の遺伝子のプロモータ領域に該当すると考えられる位置のヒストンの変化には H3K27me3 の増加は見られず、他の発現誘導を示唆する変化を伴っていた。

（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

平成 30 年度に深層学習を用いた 3 次元グラフの画像解析システムを構築し、生物学的に有意な遺伝子を高い精度で分類することに成功した。ただし新規データに適用すると、有意判定される遺伝子数が非常に多くなる（絞り込みが不十分）という問題があった。これを改善するため、平成 31/令和元年度は多様な描画角度から 3 次元グラフを作成し、トレイニング画像数を 10 倍に増加させることで、深層学習による分類器の一層の精度向上を試みた。



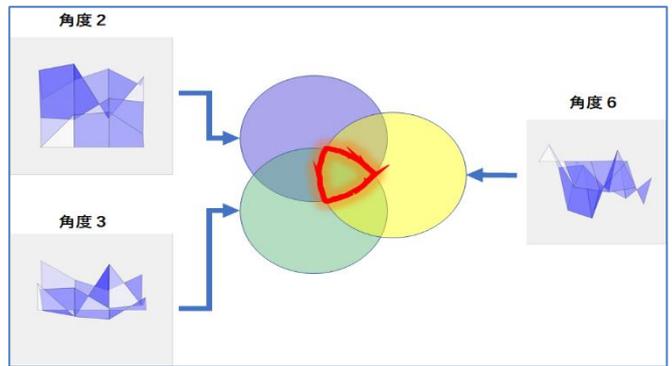
【深層学習のトレーニングに用いた、画像データ (A) 前年度の深層学習モデルのトレーニング画像データ。500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プローブに対応した、5,441 枚の画像データを作成した。(B)今年度の深層学習モデルのトレーニングデータ。500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。それぞれの角度について、positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プローブに対応した、5,441 枚の画像データ (合計 54,410 個) を作成した。】

具体的には上図の通り 10 種の角度からみた画像データに対する、10 種の深層学習モデルを構築し、構築したモデルに対して、5 fold cross validation を実施して予測精度の検証を行った。



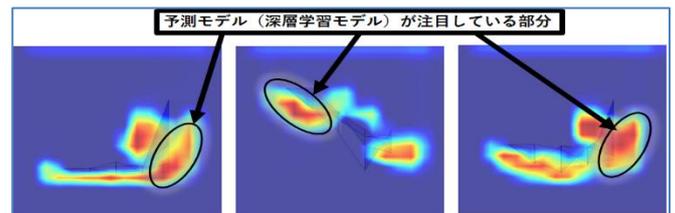
【多様な描画角度から作成した 3 次元グラフをトレーニングに用いた分類器の予測精度：各予測モデルの予測精度、正答率、を表した (代表例)。作成した 10 種のモデル全てが、高い予測精度 (94%以上の正解率) を示した。】

その結果、作成した 10 種のモデル全てが、高い予測精度 (94%以上の正解率) を示した。この結果から、これらのモデルを適切に組み合わせることで、高い精度を保ったまま有意な遺伝子を絞り込むことができる可能性が示唆された。



【複数の深層学習を組み合わせる有意な遺伝子を絞り込むための computational pipeline】

また機械学習の予測モデルの判断基準を明確にするため、explainability model (grad cam : R. R. Selvaraju, M. et al. (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7) を実装してモデルの解析を行った。



【Explanatory model (Grad cam) による深層学習モデルの解析の結果：深層学習モデルは、赤く強調されている所に着目して、判別を行っている。】

この結果、上図に示すように、構築した機械学習モデルにおいても、専門家と同様、3次元グラフのピークの立ち上がり部分に着目して (黒丸内)、判別を行っていることが明らかになった。

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

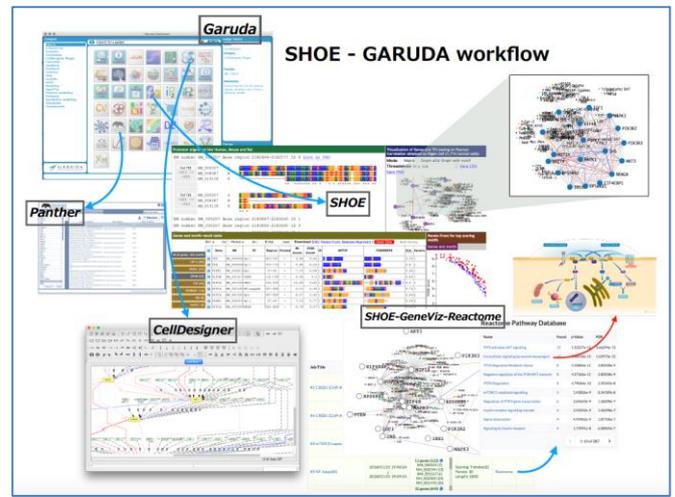
今年度実施した SHOE の機能強化としては、ChIP-Seq

データを参照データベースに統合し、解析対象の領域拡大と精度向上が実現した。

また三種（ヒト,マウス,ラット）共通配列というデフォルト条件は厳しすぎる場合があったため、ヒト-マウス若しくはヒト-ラットの二種共通という条件設定を可能とした。

	Human	Mouse	Rat
Human	AACTAAGG-GCCCGCAGGGGAGAGTAATTAAGCCCTAATTAGGAGTAAATGGAGGGGA		
Mouse	AATTAAMATGCTCACTGGGAGAAITAA---AGGGTCACTGGAGATAATGAAGAGGC		
Rat	-----AGAGGTAAGT---GGCA		
Human	GAGCGAAGAGCCCTCTACTCTTGGCCCTGAGGGAAAGAGGTTTCTCTCACTGCTT		
Mouse	G-CAAAAGAGCCTGCTTATTCTTGGCCCTAGGGGAGAGAGTTTCTCTCTCTTCCCA		
Rat	GATAATAGCCCTGCTTATTCTTGGCCCTAGGGGAGAGGAGTTTCTCTCTTCCCA		

今後の AI 活用を想定した API の定義と実装を検討し、上のような機能強化を実施した結果、下記のように解析ワークフローがより一層強化された。



Garuda Platform 上で SHOE をハブとしたワークフローが拡大・強化されたことにより、SHOE と Percellome の連動も密になり、その他の複数の解析ソフトウェアとの連動も加わり、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】

今年度はPercellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer を、オンラインサービス (WebAPI)として提供するためのシステム開発を進めた。

現状では、比較解析の度に大容量データを参照し高い計算コストを掛けてクエリ処理を実行するため PercellomeExplorer はクライアント PC 上でのみ稼働しているが、これをオンラインサービスとして提供するためには、クエリ毎にサーバーサイドで生じる計算負荷の大幅な軽減と、実用的な応答時間を実現するための処理時間の大幅短縮（百分の一以下）、を両立させる必要があった。

サーバー性能の強化やソフトウェアの最適化、通信速度の高速化等にも限界があり、従来の設計では実用的な時間内で応答するなどの要件を満たせなかったため、内部データ構造を抜本的に設計し直した。設計変更後は主要な計算を経た最終段階の中間データを保持・参

照するようにした結果、クエリ受付から結果表示まで5〜30秒程度の高速化を果たし、実用的なオンラインサービスに足る性能の実現に成功した。

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

Reactome ガジェットによる pathway enrichment 解析の結果、ペンタクロロフェノール投与から24時間後のマウス肝において RIG-1 抗ウイルスパスウェイに関連する遺伝子の発現が変動していることが示唆された。RIG-1 抗ウイルスパスウェイの活性化はタイプ I インターフェロンの誘導に繋がる。さらに、インターフェロン α/β シグナリングパスウェイに関連する遺伝子の変動も同様に認められた。RIG-1 は短鎖 dsRNAs や 5'-三リン酸化 ssRNAs を認識することが既に報告されており (Go SG., et al., (2008). *Virus (in Japanese)*, 58(2), 97-104.)、上記 RNA を有するウイルスとしてインフルエンザウイルスやセンダイウイルス、日本脳炎ウイルスが知られている。次に、STRING を用いて相互作用のあるタンパク質のネットワークに対して MCL クラスタリングを行った結果、互いに密に相互作用をしているサブネットワークが検出された。当該サブネットワークに含まれる遺伝子に対して TargetMine による各種 enrichment 解析を実施した結果、RNA ウイルス感染に関連するパスウェイが検出された。さらに、disease enrichment 解析により当該サブネットワークにはインフルエンザに関連する遺伝子が多く認められることが示された。

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」
【菅野】においては、先行研究で実施した 8 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 (5FU)、アセフェート (APT)、ペンタクロロフェノール (PCP)、イミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンと、本年度の 2 物質を比較すると、クロルピリフォス (CPF) は APT に類似していた。糖代謝に対する急性及び慢性的な影響が示唆された。5-アザシチジン (AZC) は、基線反応の変化した遺伝子群が属する遺伝子発現経路が、5FU や PCP と類似していたが、それらの実際に発現の方向が逆であった。すなわち、AZC は反復曝露により遺伝子発現が低下するが、5FU と PCP は増加する。しかし、過渡反応は 5FU では増強するのに対して、PCP では減弱する傾向を示すことから、いずれもが独自の遺伝子発現機構を持つことが示唆された。

本年度研究成果により、新たな解析手法やツールが利用可能となったことから、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。特に、これらの化学物質における変動遺伝子のリストの差分を手掛かりに、既に得ている対照群動物のエピゲノム情報や、エンハンサー・プロモータ領域の特性から (SHOE 等を活用)、時系列に沿った遺伝子発現制御機構の詳細の分析 (AGCT 活用を含む) を進める。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについての同様の検討も新たなツールを用いて試みる予定である。

「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」【北嶋】においては、平成 31/令和元年度は、ChIP-Seq によりクロフィブレート (CFB) 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新たな知見が得られた。当初、平成 30 年度に行ったバルプロ酸ナトリウム (VPA) の反復投与のヒストン修飾解析は、VPA による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。

VPA は、PPAR α 作用を持つことから、VPA による H3K9me3 阻害が、PPAR α シグナルを介して起こるかどうかは重要な課題である。そこで、平成 31/令和元年度は、VPA 同様に PPAR α 作用を持つ CFB を反復投与したマウスの肝における ChIP-Seq 解析を行い、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進という結果を得た。そこで、VPA の反復投与とは共通項を探索するために、VPA の反復投与における H3K27me3 の再解析を行った結果、ピーク値に 20% 程の亢進が見られた。よって、VPA の反復投与で見られた H3K9me3 阻害は、PPAR α 作用によるものではないが、H3K27me3 の 20% ほどの亢進については、PPAR α 作用によるものと考えられる。

なお、溶媒投与群と CFB、VPA、および四塩化炭素 (CCl₄) の反復投与群の比較において、CFB で大幅な H3K27me3 ピークの亢進が見られるが、CFB の溶媒と同じ組成の溶媒の単回投与サンプルでのみ、H3K27me3 のピーク的大幅に減少しているとも考えられる。よって、CFB の溶媒である 0.5% MC+0.1% DMSO のヒストン修飾に及ぼす影響についても詳細に解析する必要がある。

「システム毒性解析の人工知能化」【北野】において実施した深層学習については、大規模データの自動分類において有効であることが一層明らかになった。平成 31/令和元年度に実施した 3 次元グラフの形状を複数の描画角度から作図した画像を学習データとして利用することで、深層学習のトレーニング

効果が深まり、より精緻に分類器のチューニングを行うことが可能であることが分かった。

「Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良」【相崎】については、Percellome データベースの全体を対象とする網羅的比較解析という、より高度な活用を促進する枠組みの構築が完了した。現状は充分実用になっているとはいえ、比較解析の基となるプロジェクト毎の特徴データの抽出を数理的な自動処理で行っているため、ある程度のノイズ混入を許容しているが、今後は分担研究「システム毒性解析の人工知能化」で進められている「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」の成果利用により、より高精度の解析結果が得られると期待される。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】については、Garuda プラットフォームを用いた Percellome データ解析により、ペントクロロフェノール (PCP) 投与によって肝においてインフルエンザ発症時と同様の遺伝子発現変動が起きることが示された。さらに、この応答には抗ウイルスパスウェイとして機能している RIG-1 パスウェイに関連する遺伝子が含まれることが示唆された。つまり、PCP 投与により RIG-1 を介した抗ウイルス応答が惹起され、その結果としてポジティブフィードバックにより RIG-1 パスウェイに関連する遺伝子の発現が亢進するといった分子メカニズムが働いたのではないかと考えられる。実際、インフルエンザウイルスは RIG-1 によって認識されることが既に報告されており (Kato H. et al., *Nature*. 2006;441:101-5)、本結果は PCP による発汗・発熱が RIG-1 パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起されるという可能性を提示するものであると言える。遺伝子リストを取得した Kanno J. et al., *J. Toxicol. Sci.* 2013;38(4): 643-654 においては、enrichment 解析を IPA

(Ingenuity pathway analysis, Ingenuity Systems, Inc. Redwood City, CA, USA) を用いて実施しており、Garuda を用いた解析と同じく PCP 投与後 24hr においてインターフェロンシグナリングパスウェイに関連する遺伝子の発現変動を検出している。更に、“Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response” や “Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Virus” といった抗ウイルス応答に関連するパスウェイについても同様に検出しており、本解析結果は既報内容と矛盾のないものであることを確認した。一方、IPA ではこれらのパスウェイに関連する遺伝子がどのような分子メカニズムによって発現亢進に至ったかを提示するには至っておらず、RIG-1 の関与の可能性を示唆する本解析結果が新規に見出したものである。このことから、Garuda は IPA に代表される有償ソフトに勝るとも劣らぬパフォーマンスでデータ解析を行うことが可能であり、この Garuda に Percellome を連結させた意義は大きいと言える。

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」【菅野】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、先行研究で実施した化学物質と比較すると、本年度の2物質のうち、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子農薬であるアセフェートと糖代謝系への影響を含めて類似する傾向が明らかとなった。5-アザシチジンは、反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系（小胞体ストレス等）、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導す

るといふ点では、5-フルオロウラシル、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を更に進める。

以上より、明瞭な毒性発現が誘発されない用量における僅か4日間の反復曝露により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が示唆されたと考える。

「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」【北嶋】については、ChIP-Seq により、クロフィブレート (CFB) 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、H3K27me3 がゲノムワイドに亢進していることが示唆された。平成30年度に ChIP-seq 解析を行った HDAC の阻害剤であるバルプロ酸ナトリウム (VPA) の反復投与により、H3K27Ac ではなく、H3K9me3 阻害が起こるといふ新知見が得られており、この H3K9me3 阻害が PPAR α 作用によるものではないことが、CFB の解析から明らかにできた意義は大きい。

今後は、CFB、VPA による H3K27me3 の亢進作用がこれらの化学物質の反復投与による基線反応に変化にどう影響をしているかを更に詳細に解析する予定である。

「システム毒性解析の人工知能化」【北野】については計画通り推移しており、今回の成果で、人手ではできなかったスケールの遺伝子発現と毒性への連動解析が可能になると期待される。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、これら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」【相崎】においては計画通り、Percellome データベ

スをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer をオンラインサービス (WebAPI) として提供するために、内部データ構造を根本的に再設計して高速化を果たすなどして、必要なシステム開発を進めた。これにより Percellome データベースの高度な活用及び、より一層の利用促進が見込まれる。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】においては、Garuda プラットフォームを用いた Percellome データ解析により、ペンタクロロフェノール(PCP)の毒性発現機構の推定を行った。

「PCP による発汗・発熱が RIG-1 パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起される」という知見を事前知識に頼ることなくデータから抽出することに成功しており、Garuda プラットフォームや Percellome データがシステム毒性学の実践において有用な資源となることを示す成果であると言える。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y. CYP3A4 induction in the liver and intestine of PXR/CYP3A-humanized mice: approaches by mass spectrometry imaging and portal blood analysis. *Mol Pharmacol*. 2019 Aug 27. pii: mol.119.117333. doi: 10.1124/mol.119.117333.

(2) 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.

(3) Gupta V, Crudu A, Matsuoka Y, Ghosh S, Rozot R, Marat X, Jäger S, Kitano H, Breton L. Multi-dimensional computational pipeline for large-scale deep screening of compound effect assessment: an in silico case study on ageing-related compounds. *npj Syst Biol Appl* 5, 42 2019.

(4) Uchida S, Asai Y, Kariya Y, Tsumoto K, Hibino H, Honma M, Abe T, Nin F, Kurata Y, Furutani K, Suzuki H, Kitano H, Inoue R, Kurachi Y. Integrative and theoretical research on the architecture of a biological system and its disorder *J Physiol Sci* 69 433 2019

(5) Kato Y, Tabata K, Kimura T, Yachie-Kinoshita A, Ozawa Y, Yamada K, Ito J, Tachino S, Hori Y, Matsuki M, Matsuoka Y, Ghosh S, Kitano H, Funahashi Y. Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8+ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway *PLOS ONE* doi.org/10.1371/journal.pone.0212513

(6) Polouliakh N. In Silico Transcription Factor Discovery via Bioinformatics Approach: Application on iPSC Reprogramming Resistant Genes. *Leveraging Biomedical and Healthcare Data, 2019 - Elsevier*

(7) Watanabe R, Ohashi R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-Kitatani Y, Nagao C, Mizuguchi K. Development of an in silico prediction system of human renal excretion and clearance from chemical structure information incorporating fraction unbound in plasma as

a descriptor. Scientific reports 9(1) 18782 2019

(8) Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Komura H, Mizuguchi K. Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility. Journal of pharmaceutical sciences 108(11) 3630-3639 2019

(9) Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Mizuguchi K. Computational Model To Predict the Fraction of Unbound Drug in the Brain. Journal of chemical information and modeling 59(7) 3251-3261 2019

(10) Lee MSJ, Natsume-Kitatani Y, Temizoz B, Fujita Y, Konishi A, Matsuda K, Igari Y, Tsukui T, Kobiyama K, Kuroda E, Onishi M, Marichal T, Ise W, Inoue T, Kurosaki T, Mizuguchi K, Akira S, Ishii KJ, Coban C. B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- γ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant. European journal of immunology 49(9) 1433-1440 2019

2. 学会発表 (抜粋)

(1) Kanno J, Aisaki K, Ono R, Kitajima S. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), (2020.3.15-19) Anaheim, USA, ePoster.

(2) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European

Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster.

(3) Ono R, Kitajima S, Aisaki K, Kanno J. Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts

(4) Kanno J, Aisaki K, Ono R, Kitajima S. 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.

(5) Natsume-Kitatani Y, Mizuguchi K, Aisaki K, Kitajima S, Ghosh S, Kitano H, Kanno J. Pentachlorophenol affects RIG-1 antiviral pathway that produces type 1 interferon at the transcriptional level ISMB/ECCB 2019 バーゼル (スイス), 2019/07/24

(6) Kawashima H, Miyachi M, Murakami H, Konishi K, Ohno H, Tanisawa K, Hosomi K, Mohsen A, Chen YA, Park J, Mizuguchi K, Natsume-Kitatani Y, Kunisawa J. A study of gut microbial variations associated with phenotypic metadata in a healthy Japanese population ISMB/ECCB 2019 バーゼル (スイス), 2019/07/23

(7) Watanabe R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-Kitatani Y, Nagao C, Ohashi R, Komura H, Mizuguchi K. Development of DruMAP, Drug metabolism and pharmacokinetics Analysis Platform

ISMB/ECCB 2019 バーゼル (スイス) , 2019/07/22

⑧ Natsume-Kitatani Y, Aisaki K, Kitajima S, Ghosh S, Kitano H, Mizuguchi K, Kanno J. Cross Talks among PPAR α , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid IUTOX2019 ホノルル (ハワイ) , 2019/07/16

⑨ 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Gosh Samik, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純 Garudaプラットフォームによる多角的毒性予測 第46回日本毒性学会 学術年会 徳島, 2019/06/28

⑩ 伊藤真里, 武田吉人, 木田博, 木庭太郎, 野島陽水, 藤原大, 長尾知生子, 夏目やよい, 武田理宏, 松村泰志, 熊ノ郷淳, 水口賢司 「新薬創出を加速する人工知能の開発」特発性肺線維症への取り組み
第59回日本呼吸器学会学術講演会
東京, 2019/04/14

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

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 31/令和元年度 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

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。

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 31/令和元年度は、クロルピリフォス、及び、5-アザシチジンの 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と比較すると、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子の農薬であるアセフェートと類似した傾向が明らかとなった。5-アザシチジンが反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系（小胞体ストレス等）、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導するという点では、5-フルオロウラシル、及び、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を更に進める。なお、当初、パクリタキセルで実施する予定であったが、納期に時間がかかることと、購入費用が非常に高価であることから保留とし、翌年度予定であったクロルピリフォスを優先して実施した。

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。

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、代表的物質についてのDNAメチル化及びヒストン修飾情報を加え、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：

クロルピリフォス(Chlorpyrifos; 分子量:350.59、Cas No.:2921-88-2、純度98%、富士フイルム和光純薬株式会社(製造元:Toronto Research Chemicals))、及び、5-アザシチジン(5-azacytidine; 分子量:244.21、Cas No.:320-67-2、純度>99%、Sigma-Aldrich)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)時のクロルピリフォス及び5-アザシチジンの曝露量は

それぞれ0、3、10、30mg/kg及び0、0.3、1、3mg/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。クロルピリフォスの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20mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の0、3、10、30mg/kgとした。以下、同様に、5-アザシチジンの4回反復投与の用量は2mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に0、0.3、1、3mg/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)を用い溶媒はクロルピリフォスで、5-アザシチジン共に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、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。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10µL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RNA5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))

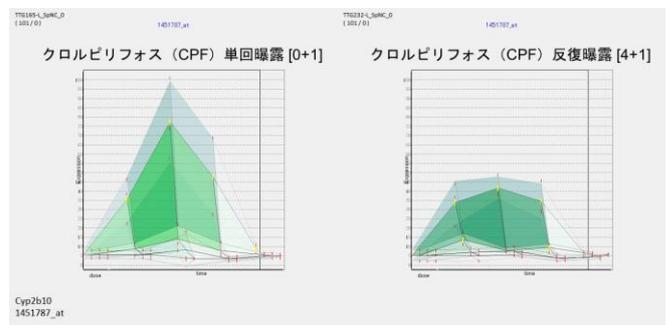
C. 研究結果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

平成 31/令和 01 年度は、クロルピリフォス (CPF)、及び、5-アザシチジン (AZC) 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。

クロルピリフォス (CPF) 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 298、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 60 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。

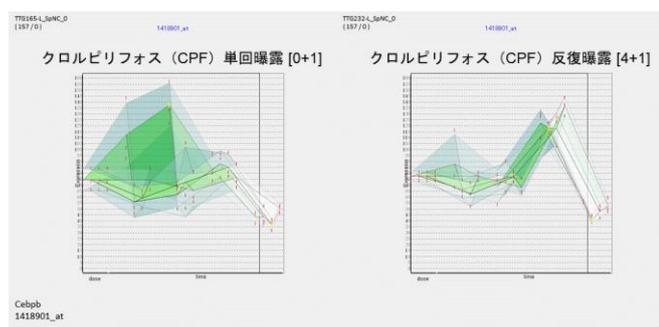
[0+1]と[4+1]に共通する過渡反応遺伝子は 10 であり、基線反応と過渡反応の間の規則性は不明瞭であったが、単回曝露時によりも反復曝露時に過渡反応が減弱する傾向が見られた。



【共通する遺伝子 Cyp2b10。基線の変化は見られず過渡反応が減弱している】

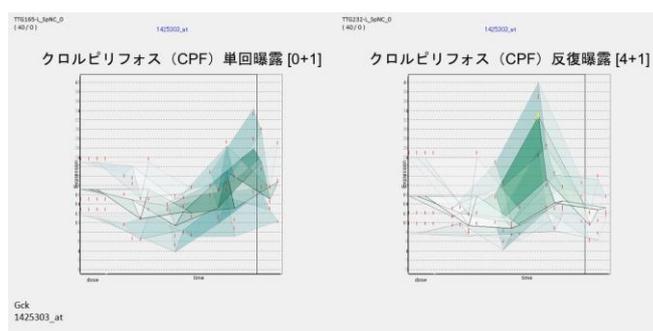
基線反応の変化はこの共通 10 遺伝子および、発現コピー数が 3 以上の全ての遺伝子において変動は少なかった。共通 10 遺伝子に特徴的なネットワークは抽出されなかった。

[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 288 あり、それらは[4+1]における基線反応に弱いながら低下の傾向がみられた。これらの遺伝子はビタミン D 受容体系、PXR 受容体系、グルココルチコイド受容体系、甲状腺ホルモン受容体系等の核内受容体を介したシグナルネットワークに属する遺伝子が含まれ、その上流にグルココルチコイド受容体の作用、グルカゴン等の介在が示唆された。これらは投与後 2~4 時間において顕著に誘導された遺伝子群が示すものであった。24 時間目に発現する遺伝子数は僅かであった。



【ビタミン D 受容体系に属する Cebpb。2~4 時間目の過渡反応が反復曝露により消失している。】

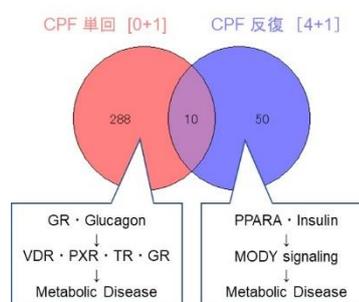
[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は 50 あり、弱い基線反応の上昇傾向を伴って Glut2 (Slc2a2)、GCK、などが発現変動を示した。この発現変動遺伝子リストからは、MODY シグナル (Maturity Onset Diabetes of Young ; 若年発症型成人型糖尿病) 及び糖代謝系が IPA により抽出され、その上流に PPARA (発現抑制)、insulin などが挙げられた。



【糖代謝に関わる Gck が反復曝露により誘導された。】

反復曝露が基線反応に及ぼす影響は CPF の場合は、軽微ながら上昇作用 (210 遺伝子) を有し、コレステロール代謝に関わる遺伝子群が含まれる。

以上、CPF はマウス肝において、グルココルチコイド受容体系へのシグナル入力に反応して、ビタミン D、PXR、甲状腺ホルモン受容体系に作動性を示すとともに、PPARα の系に抑制的に働くことが示唆され、反復投与により糖代謝異常が遷延する可能性が示唆された。

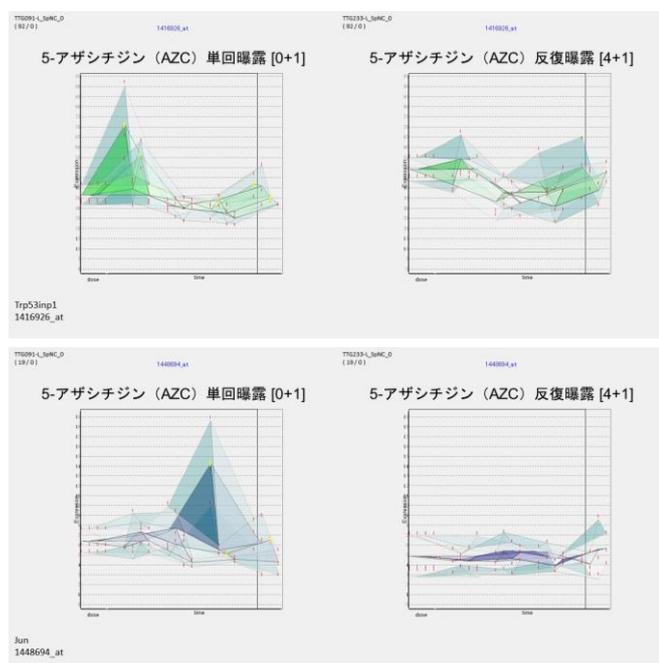


【CPF の単回と反復曝露との遺伝子発現の関係の概略を示す。】

CPF がグルココルチコイド受容体シグナル、グルカゴン系、糖代謝系に影響を与えるという本解析結果と、ヒトや実験動物に対して CPF の比較的長期の曝露が血糖値を上昇させる、或いは、II型糖尿病、妊娠性糖尿病、及び肥満と関係するという報告との関係の解析を更に進める。一方、小胞体ストレスなどの“一般的”な毒性を示唆する変化の誘導は弱かった。

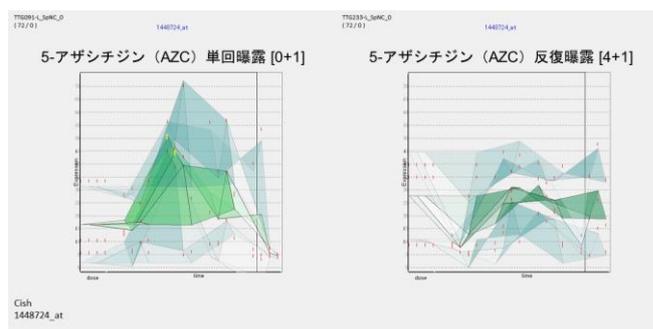
糖代謝等について、先行研究で実施したアセフェート、昨年度実施したイミダクロプリドとの対比解析をも進める。

5-アザシチジン (AZC) 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 24、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 28 であり、共通する遺伝子が認められなかった。



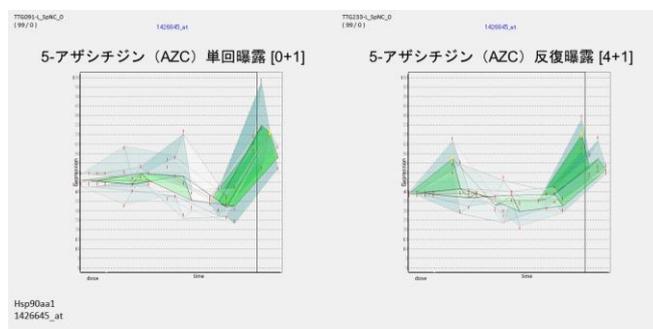
【p53 シグナル系に属する Trp53inp1、Jun を示す。反復により過渡反応は消失している。】

[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 24 は、[4+1]と共通性が無く、p53 を上流とするシグナル系と、TLR 9や TLR 3を上流とする JAK/STAT シグナル系などが IPA により抽出された。



【JAK/STAT 系に属する Cish。“ノイズ”が多い遺伝子であるが、反復により過渡反応のピークが消失している。】

[4+1]において変動した 28 遺伝子は、[0+1]と共通性が無く、ユビキチン化系のものを少数含んでいた。



【蛋白ユビキチン化の系に含まれる Hsp90aa1。微弱ながら 2 時間目の誘導が認められる】

[0+1]も[4+1]も共に、過渡反応の 2 時間目からシグナル系が作動することから、弱いながら標的の比較的明瞭な系に対する活性を、代謝を受けない状態で発揮することが確認された。

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細胞当たりの発現コピー数が 3 以上の遺伝子は約 600、低下した遺伝子は約 1,500 であった。上昇した遺伝子群には、特定のシグナル系および上流因子は見いだせなかった。

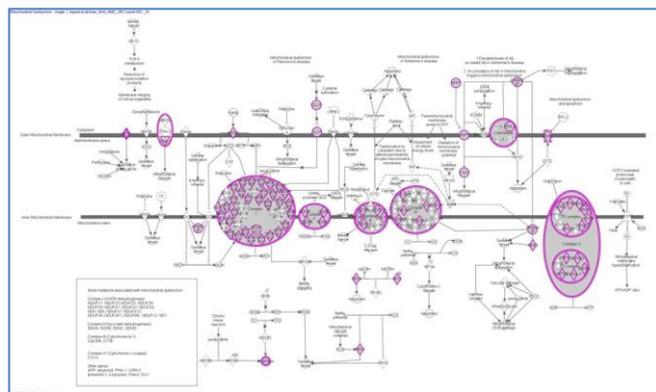
基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群は、IPA 分析におけるミトコンドリア機能不全、酸化的リン酸化、EIF-2 シグナル系への強い影響が示された。また、LXR 系、上流に RICTOR、あるいは HNF4A、を上流に持つ系シグナルを含んでいた。

Top Canonical Pathways	
Name	p-value
Mitochondrial Dysfunction	1.26E-52
Oxidative Phosphorylation	1.17E-51
EIF2 Signaling	1.01E-48
Sirtuin Signaling Pathway	7.97E-32
LXR/RXR Activation	1.92E-21

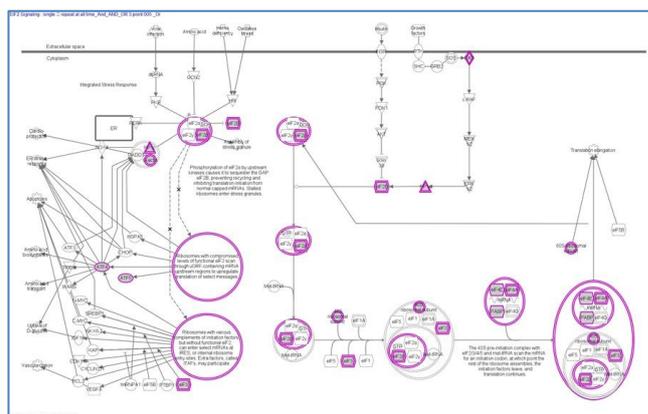
Top Upstream Regulators	
Name	p-value
RICTOR	2.05E-107
HNF4A	9.32E-59
1,2-dithiol-3-thione	3.26E-55
TLE3	1.41E-48
5-fluorouracil	2.80E-45

【基線反応が反復曝露により低下した遺伝子群の IPA 分析結果】

以上、AZC はマウス肝において、4 日間の 2mg/kg の反復経口投与により強力に、ミトコンドリア機能障害に関わる諸因子（トランスポーター、NADH ユビキチン酸化還元酵素などのミトコンドリア呼吸鎖酵素）、EIF2 シグナル系、等を抑制することが確認された。



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）のミトコンドリア機能マップ中の位置を示す（IPA 解析）】



【AZC 反復曝露により低下した遺伝子（赤色）の EIF-2 シグナル系のマップ中の位置を示す（IPA 解析）】

D. 考察

先行研究で実施した 8 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 (5FU)、アセフェート (APT)、ペンタクロロフェノール (PCP)、イミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンと、本年度の 2 物質を比較すると、クロルピリフォス (CPF) は APT に類似していた。糖代謝に対する急性及び慢性的な影響が示唆された。5-アザシチジン (AZC) は、基線反応の変化した遺伝子群が属する遺伝子発現経路が、5FU や PCP と類似していたが、それらの実際に発現の方向が逆であった。すなわち、AZC は反復曝露により遺伝子発現が低下するが、5FU と PCP は増加する。しかし、過渡反応は 5FU では増強するのに対して、PCP では減弱する傾向を示すことから、いずれもが独自の遺伝子発現機構を持つことが示唆された。

本年度研究成果により、新たな解析手法やツールが利用可能となったことから、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。特に、これらの化学物質における変動遺伝子のリストの差分を手掛かりに、既に得ている対照群動物のエピゲノム情報や、エンハンサー・プロモータ領域の特性から (SHOE 等を活用)、時系列

に沿った遺伝子発現制御機構の詳細の分析 (AGCT 活用を含む) を進める。また、ラットのトキシコゲノミクスデータについての同様の検討も新たなツールを用いて試みる予定である。

E. 結論

本研究は、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、先行研究で実施した化学物質と比較すると、本年度の2物質のうち、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示唆され、同じく低分子農薬であるアセフェートと糖代謝系への影響を含めて類似する傾向が明らかとなった。5-アザシチジンは、反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2 シグナル系 (小胞体ストレス等)、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導するという点では、5-フルオロウラシル、ペンタクロロフェノールに類似する。しかし、遺伝子発現の方向が逆である点が注目され、既知の毒性や薬効との関係とともに更なる解析を更に進める。

以上より、明瞭な毒性発現が誘発されない用量における僅か4日間の反復曝露により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が示唆されたと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

(1) Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y. (2019) CYP3A4 induction in the liver and intestine of PXR/CYP3A-humanized mice:

approaches by mass spectrometry imaging and portal blood analysis. *Mol Pharmacol*. 2019 Aug 27. pii: mol.119.117333. doi: 10.1124/mol.119.117333.

(2) 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. 学会発表 (抜粋)

① J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), (2020.3.15-19) Anaheim, USA, ePoster.

② R. Ono, Y. Yasuhiko, K. Aisaki, S. Kitajima, J. Kanno, Y. Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster.

③ Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, and Jun Kanno Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts, Oral presentation.

④ Jun Kanno, Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, and Ken-ichi Aisaki., Analysis of the effect of epigenetic modification on gene expression by the newly designed

repeated dose study – progress report of the Percellome Project. Gordon Research Conference: Cellular and Molecular Mechanisms of Toxicity (2019.8.11-16), Proctor Academy, NH, USA, Poster.

(5) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura., The Concept of “Signal Toxicity” for the Mechanistic Analysis of So-Called Low Dose Effect and Delayed Effect after Perinatal Exposure. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.17), Hawaii, USA, Poster

(6) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno., Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster.

(7) 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中樞神経影響の評価の現状 「シグナル毒性」の概念と子どもの毒性学. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(8) 種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 幹細胞分化から見る子どもの毒性学: シグナル毒性としての中樞神経影響の評価の現状 低用量化学物質の周産期ばく露による情動認知行動毒性～子どもの毒性学に向けた評価系開発の現在～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(9) 菅野純, 北嶋聡, 相崎健一, 小野竜一, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Percellome トキシコゲノミクスのエピ

ジェネティクス基盤 — 「新型」 反復曝露試験の解析—. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(10) 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Samik Gosh, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純, エピジェネティクス解析と人工知能による毒性オミクスの展開 Ga rudaプラットフォームによる多角的毒性予測. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.28), 徳島, シンポジウム, 口演

(11) 小野竜一, 相崎健一, 北嶋聡, 菅野純, 毒性エピゲノミクスの新潮流 Percellomeプロジェクトから見えてきたエピジェネティクス影響. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.27), 徳島, シンポジウム, 口演

(12) 種村健太郎, 北嶋聡, 菅野純, 日本中毒学会合同シンポジウム: 海産毒 リビジテッド 発生期マウスへの神経シグナル異常による成熟後の神経行動毒性発現～海産毒による異常誘発モデルとしての検討～. 第46回日本毒性学会学術年会, (2019.6.26), 徳島, シンポジウム, 口演

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

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31/令和元年度 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31/令和元年度は当初、ジエチルニトロサミン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、クロフィブレートに変更した。これは、昨年度検討したバルプロ酸ナトリウムのPPAR α 作用との差分を確認する必要があると考えたことから、PPAR α の陽性対照物質であるクロフィブレートに変更、優先して実施したためである。クロフィブレート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、クロフィブレートを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、クロフィブレードの反復投与により、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のゲノムワイドな亢進を明らかにした。また、バルプロ酸ナトリウムの反復投与の結果の再解析により、バルプロ酸ナトリウムにおいても、H3K27me3のゲノムワイドな亢進が起こっていることを確認できた。クロフィブレードとバルプロ酸ナトリウムは、PPAR α 作用という点で共通していることから、H3K27me3のゲノムワイドな亢進は、PPAR α 作用によるものと示唆された。一方、バルプロ酸ナトリウムの反復投与によるH3K9me3のゲノムワイドな低下は、PPAR α 作用以外によるものと考えられた。

(*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

(**) 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31/令和元年度は、クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)法を利用して、クロフィブレードを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31/令和元年度は、当初、ジエチルニトロサミン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、クロフィブレードに変更した。これは、昨年度検討したバルプロ酸ナトリウムのPPAR α 作用との差分を確認する必要があると考えたことから、PPAR α の陽性対照物質であるクロフィブレードに変更、優先して実施したためである。

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

一) について、先行研究において取得済みの、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) を単回投与した際、あるいはクロフィブレート (Clofibrate : 分子量 : 242.7、Cas No.: 637-07-0、BIOMOL) 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

クロフィブレートを 14 日間反復投与した翌日に溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) 投与 2 時間後のマウス肝および、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) 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]」、バルプロ酸ナトリウムの場合は、「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。

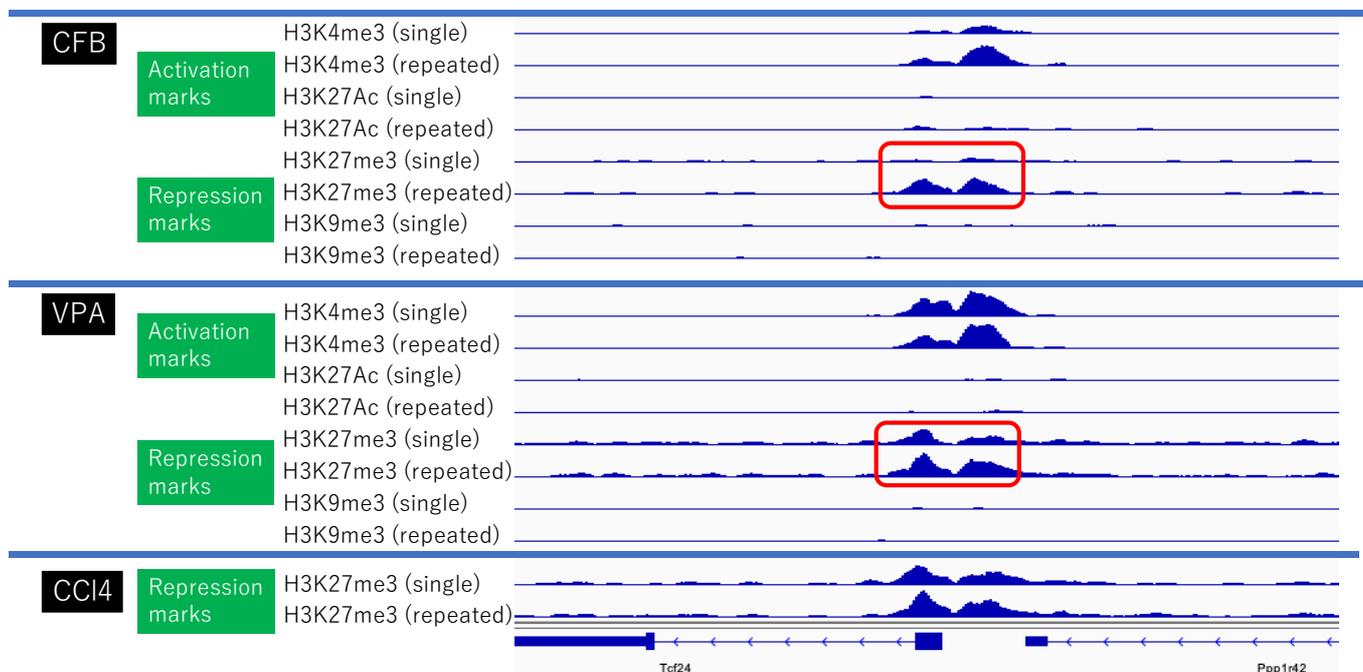
(倫理面への配慮)

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 31/令和元年度は、クロフィブレート (定用量 : 70 mg/kg) を 14 日間反復投与 ([14+1]) した際、及び溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) 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 つにまとめたて、クロマチン免疫沈降を行なった。H3K4me3



CFBの反復投与により、H3K27me3 の大幅な亢進が全ゲノム的に見られた。
VPAにおいても20%程の亢進が見られる。

【図1】 溶媒およびクロフィブレート（CFB）の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、溶媒およびバルブ
ロ酸ナトリウム（VPA）の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、さらに、溶媒および四塩化炭素（CCl4）
の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析をまとめた一例（Tcf24 遺伝子および Pppar42 遺伝子のプロモータ
ー領域）。図中の赤枠部分は、H3K27me3 の溶媒投与（枠内上段）および CFB, VPA, および CCl4 の反復投与（枠内下段）
を示しており、CFB および VPA において大幅なピークの亢進が見られる。一方、CCl4 の反復投与において大幅な亢進は
見られなかった。

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。

今回得られたクロフィブレート（CFB）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（18,185、19,425）、
抗 H3K27Ac 抗体（21,740、16,450）、

抗 H3K27me3 抗体（8,650、20,770）、
抗 H3K9me3 抗体（21,847、20,583）、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数
が 8,650 から 20,770 へ、140.1% 増加しており、CFB
の反復投与によって H3K27me3 が亢進されることが
明らかになった【図1】。したがって CFB 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。

なお、CFB の反復投与において、H3K4me3、
H3K27me3、H3K27Ac、H3K9me3 の各 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 (63、15)、
抗 H3K27Ac 抗体 (28、66)、
抗 H3K27me3 抗体 (12198、0)、
抗 H3K9me3 抗体 (1、321)、

という解析結果となった。このように、反復投与によりゲノムワイドな変化(増加)をヒストン修飾(H3K27me3)が示すことを明らかにした。実際に、H3K27me3 が反復投与により増加した遺伝子の大半が基線反応の低下を伴っており、逆に反復投与により基線反応が有意に上昇した少数の遺伝子のプロモータ領域に該当すると考えられる位置のヒストンの変化には H3K27me3 の増加は見られず、他の発現誘導を示唆する変化を伴っていた。

D. 考察

平成 31/令和元年度は、ChIP-Seq によりクロフィブレート (CFB) 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新たな知見が得られた。当初、平成 30 年度に行ったバルプロ酸ナトリウム (VPA) の反復投与のヒストン修飾解析は、VPA による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。

VPA は、PPAR α 作用を持つことから、VPA による H3K9me3 阻害が、PPAR α シグナルを介して起こるか

否かは重要な課題である。そこで、平成 31/令和元年度は、VPA 同様に PPAR α 作用を持つクロフィブレートを反復投与したマウスの肝における ChIP-Seq 解析を行い、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進という結果を得た。そこで、VPA の反復投与とは共通項を探索するために、VPA の反復投与における H3K27me3 の再解析を行った結果、ピーク値に 20 % 程の亢進が見られた。よって、VPA の反復投与で見られた H3K9me3 阻害は、PPAR α 作用によるものではないが、H3K27me3 の 20 % ほどの亢進については、PPAR α 作用によるものと考えられる。

図 1 にもあるように、溶媒投与群と CFB、VPA、および四塩化炭素の反復投与群の比較において、CFB で大幅な H3K27me3 ピークの亢進が見られるが、CFB の溶媒と同じ組成の溶媒の単回投与でのみ、H3K27me3 のピーク的大幅に減少しているとも考えられる。よって、CFB の溶媒である 0.5 % MC + 0.1 % DMSO のヒストン修飾に及ぼす影響についても詳細に解析する必要がある。

E. 結論

平成 31/令和元年度は、ChIP-Seq により、クロフィブレート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、H3K27me3 がゲノムワイドに亢進していることが示唆された。平成 30 年度に ChIP-seq 解析を行った HDAC の阻害剤である VPA の反復投与により、H3K27Ac ではなく、H3K9me3 阻害が起こるといった新知見が得られており、この H3K9me3 阻害が PPAR α 作用によるものでないことが、クロフィブレートの解析から明らかにできた意義は大きい。

今後は、クロフィブレート、バルプロ酸ナトリウムによる H3K27me3 の亢進作用がこれらの化学物質の反復投与による基線反応に変化にどう影響をしているかを詳細に解析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(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. 学会発表

① Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, and Jun Kanno Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts

② 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.

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 31/令和元年度 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指とする。

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。

令和元年度は、Percellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer を、オンラインサービス（WebAPI）として提供するためのシステム開発を進めた。オリジナル（クライアント PC 版）の PercellomeExplorer は比較解析の都度、大容量データを参照し、高い計算コストを掛けてクエリー処理を実行しているが、これをオンラインサービスとして提供するためには、クエリー毎にサーバーサイドで生じる計算負荷の大幅な軽減と、実用的な応答時間を実現するための処理時間の大幅短縮（百分の一以下）、を両立させる必要があった。このため内部データ構造を抜本的に再設計し、主要な計算を経た最終段階の中間データを保持・参照するようにした結果、実用的なオンラインサービスに足る性能の実現に成功した。

(*) 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。

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。

作成・改良した Web アプリケーションの動作確認は、Garuda platform を利用した。

倫理面への配慮

トランスクリプトームデータを得るための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

令和元年度は、Percellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer を、オンラインサービス (WebAPI) として提供するためのシステム開発を進めた。

プロトタイプとなるソフトウェア (PercellomeExplorer) は、任意の GeneList との比較解析にも対応する汎用性を重視した設計となっているため、比較解析の都度、大容量データを総当たりで参照・計算している。この処理は高い計算コストを要するため PercellomeExplorer はクライアント PC 上でのみ稼働している。

これをオンラインサービスとして提供するためには、比較解析毎にサーバーサイドで生じる計算負荷の大幅な軽減と、実用的な応答時間を実現するための処理時間の大幅短縮（百分の一以下）、を実現する必要がある。

サーバー性能の強化や通信速度の高速化、WebAPI ソフトウェアの最適化等にも限界があり、プロトタイプ (クライアント PC 版 PercellomeExplorer) の設計では実用的なオンラインサービスとしての要件を満たせなかった。

このため今年度は、PercellomeExplorer の内部データ構造を抜本的に見直した。具体的には主要な計算を経た最終段階のデータを保持・参照するようにした。また任意の GeneList との比較解析機能については主要計算の事前処理が行えないため、内部データ構造を最適化してもサーバーでの計算処理時間を短縮できないことから、サーバーでは行わずクライアント PC 側で計算できるように必要な比較データを JSON 形式で提供するように仕様を変更することとした。

最適化の結果、クエリー受付～結果表示まで 5～30 秒程度の高速化を果たし、実用的なオンラインサービスに足る性能の実現に成功した。

これらと並行して、セキュリティ強化の観点からサー

バー OS の更新 (WindowsServer2008 R2 から WindowsServer2016) を行うとともに、WebAPI ソフトウェアの不具合 (Surface グラフの描画異常等) についての修正を実施した。

D. 考察

Percellome データベースの全体を対象とする網羅的比較解析という、より高度な活用を促進する枠組みの構築が完了した。現状の PercellomeExplorer でも充分実用になっているとはいえ、比較解析の基となるプロジェクト毎の特徴データの抽出を数理的な自動処理 (独自開発の RSort.exe を使用) で行っているため、ある程度のノイズ混入を許容しているが、今後は分担研究「システム毒性解析の人工知能化」で進められている「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」の AI を利用したより正確な特徴データ抽出手法という成果利用により、PercellomeExplorer においても より高精度の解析結果が得られると期待される。

E. 結論

本分担研究は、計画通りに進捗した。

Percellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer をオンラインサービス (WebAPI) として提供するために、内部データ構造を抜本的に再設計して高速化を果たすなどして、必要なシステム開発を進めた。これにより Percellome データベースの高度な活用及び、より一層の利用促進が見込まれる。

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) Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, and Jun Kanno Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts

(2) Natsume-Kitatani Y., Mizuguchi K., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Kanno J. Pentachlorophenol affects RIG-1 antiviral pathway that produces type 1 interferon at the transcriptional level, ISMB/ECCB 2019, 2019/07/24, Basel, Switzerland

(3) Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J., Cross Talks among PPAR α , SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid, IUTOX2019, 2019/07/16, Honolulu, USA

(4) 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Gosh Samik, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純, Garudaプラットフォームによる多角的毒性予測, 第46回日本毒性学会学術年会, 2019/06/28, 徳島

(5) 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 31/令和元年度 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

研究協力者：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）

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、ならびに転写制御領域の解析ソフトウェア SHOE と GarudaPlatform の連携を中心に解析パイプラインの機能強化を行なった。

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

●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) Deep Residual Learning for Image Recognition. arXiv:1512.03385.)) 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、H30 年度は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。H31/R01年度はさらに④10種の描画角度から3次元グラフを作成し、トレーニング画像数を10倍に増加させることで、深層学習による分類器の一層の精度向上を試みた。また構築した深層学習モデルが、画像のどの部分に着目して判別を行っているかを調べるため、最新の explainability model (grad cam : R. R. Selvaraju, M. et al (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7)を実装してモデルの解析を行った。

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 の機能追加や改良として、特に将来的な機能拡張 (AI など) を想定した API の定義と実装を進めた。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。

C. 研究結果

●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したデータベースが構築されている。特に、Percellome 等の化合物毒性に関わる発現データベースは、多様な要素が絡み合った、化合物毒性のメカニズムを調査するのに有用である。しかしながら、このような複雑性の高いデータから有用な情報を引き出すことは、従来の研究で用いられてきた統計解析法等では極めて困難である。そこで、我々は、機械学習アルゴリズム、特に深層学習の手法を利用して、Percellome データベースから、有用な特徴量を認識して、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重ねてきた。

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に変動する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検討し、分類を行ってきた (図1)。

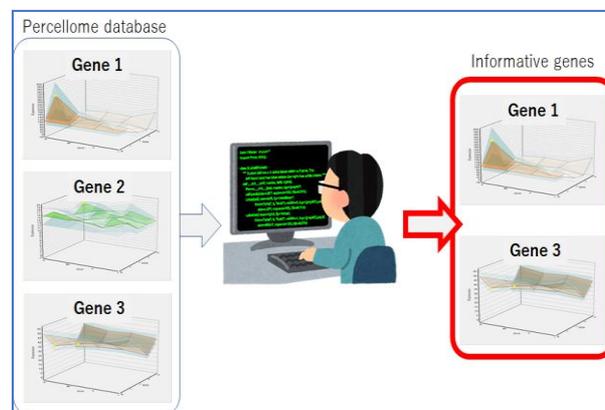


図1：専門家の Visual inspection による、有意な遺伝子の同定

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 以上のプローブの発現情報が含まれており、400 万以上のプローブの発現情報に対応した 400 万以上の画像データで構成されている。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ってしまう。

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、深層学習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(参考文献 1)。医療分野で最も成功している例としては、深層学習の技術を使用した医療画像データ解析であり、高精度に皮膚がんの分類が出来る深層学習モデルが、発表されている(参考文献 2)。また、最近では、発見が困難であり、早期胃がんの自動検出に対しても、深層学習モデルが応用されている(参考文献 3)。

そこで、昨年度 (H30 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深層学習の手法を用いた、画像解析システムの実装を行った。実装した深層学習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。検証の結果、我々が構築した深層学習モデルは、高精度で有意な遺伝子を分類できることが分った。

しかしながら、新規データに対して適用した場合、有意であると予測された遺伝子数が非常に多く、十分な絞り込みが出来ないという問題があった。また、従来のモデルは、一つの角度からみた画像のみ

を用いていたため (図 2 A)、専門家と比較して、十分な情報を捉えていない可能性があった。

そこで、今年度は、多様な角度からみた画像 (図 2 B) を用いて、多数の深層学習モデルを作成した。

さらに、作成した多数の深層学習モデルの予測結果を統合し、有意な遺伝子を絞り込むための、computational pipeline を構築した。また、今年度に構築した深層学習モデルが、画像のどの部分に着目して判別を行っているかについて調べるために、最新の解析手法を実装してモデルの解析を行った。

画像データセットとしては今回、10 種の角度からみた 10 種の画像データセット (図 2 B) を生成し、それぞれのデータセットを用いて、10 個の深層学習に基づく分類器を構築した。



図 2. 深層学習のトレーニングに用いた、画像データ
(A) 前年度の深層学習モデルのトレーニング画像データ。500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プローブに対応した、5,441 枚の画像データを作成した。(B)今年度の深層学習モデルのトレーニングデータ。500×500 ピクセルのサイズの、RGB カラー画像。それぞれの角度について、positive、negative、other クラスのデータとして、4,591、377、496 プローブに対応した、5,441 枚の画像データ (合計 54,410 個) を作成した。

深層学習に基づく、画像データから有意な遺伝子を

予測する分類器：今回、深層学習モデルとしては、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(参考文献4)。Resnetは、画像分類で高い精度を示すことが報告されている(参考文献4)。今回、我々が作成した分類器は、Resnetの多数の畳み込み層を用いて、画像データから、特徴量を自動で抽出する。その後、最後の層において、抽出した特徴量を組み合わせてスコアを算出し、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。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10種の角度からみた画像データに対する、10種の深層学習モデルを構築した。構築したモデルに対して、5 fold cross validation を実施し、予測精度の検証を行った。図3に、10種の深層学習モデルの予測精度の検証結果を示す。



図3. 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。作成した10種のモデル全てが、高い予測精度（94%以上の正解率）を示した。

上図のように、作成した10種のモデル全てが、高い予測精度（94%以上の正解率）を示した。この結果から、これらのモデルを適切に組み合わせることで、高い精度を保ったまま有意な遺伝子を絞り込むことができる可能性が示唆される。

そこで、今年度、複数のモデルの予測で共通する遺伝子群に着目して遺伝子を絞り込む、computational pipelineの構築を行った(図4)。図4では、3種の角度からみた画像でトレーニングした3種の深層学習モデルの予測結果を組み合わせた、有意な遺伝子の絞り込みについて示している。それぞれの円が、それぞれのモデルで抽出された有意な遺伝子群を表しており、これらの円の重なる部分に着目することで（赤い枠線で囲まれた領域）、有意な遺伝子群を絞り込むことが出来る。現在、深層学習モデルの組み合わせのパターンや閾値など、遺伝子を絞り込むために適した条件の探索を進めている。

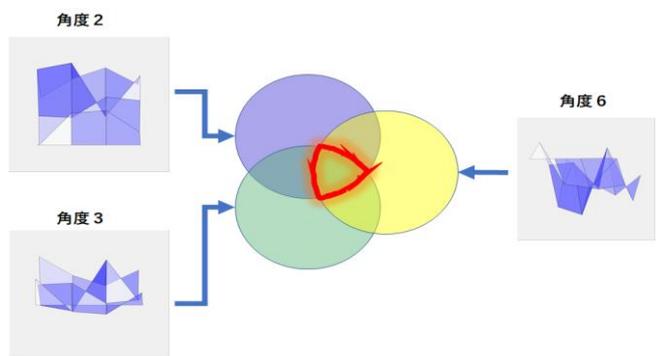


図4：複数の深層学習を組み合わせ有意な遺伝子を絞り込むための computational pipeline

ところで、最近、機械学習の予測モデルの判断基準を調べるための、explainability modelに関する研究が、注目を浴びている(参考文献5)。そこで、我々は、今年度に構築した深層学習モデルが、画像のどの部分に着目して判別を行っているかを調べる

ため、最新の explainability model (grad cam : 参考文献6)を実装してモデルの解析を行った。その結果、図5に示すように、専門家も着目しているピークの立ち上がりの部分に着目して（黒丸内）、判別を行っていることが明らかになった。

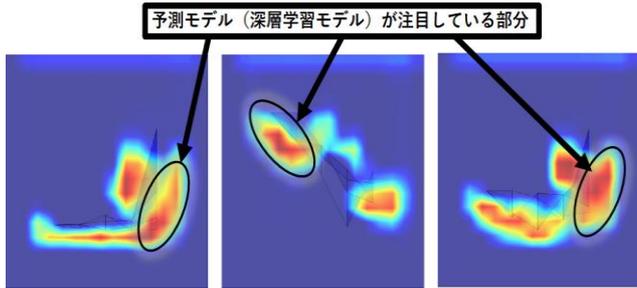


図5. Explanatory model (Grad cam) による深層学習モデルの解析の結果：深層学習モデルは、赤く強調されている所に着目して、判別を行っている。

今後は、未知のデータセットに対し、今回構築した複数の深層学習モデルを統合した computational pipeline を適用し予測を行い、予測結果を、共同研究者による visual inspection を実施し、比較する予定である。Visual inspection の結果を基に、さらに、より精緻に computational pipeline における絞り込みの条件の調整を進める。

(参考文献)

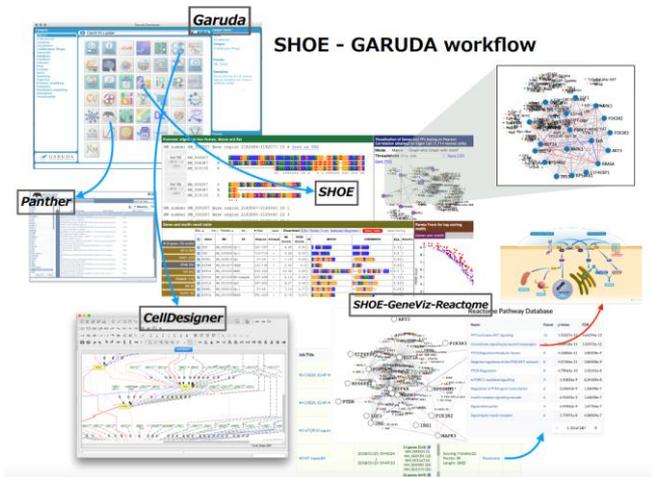
1. David Silver et al (2006) Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. Nature 529:484 – 489.
2. Andre Esteva et al. (2017) Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. Nature 52:115-118.
3. Yoshimasa Sakai, Satoko Takemoto, Keisuke Hori, Masaomi Nishimura, Hiroaki Ikematsu, Tomonori Yano and Hideo Yokota (2018) "Automatic detection of early gastric cancer in endoscopic images using a transferring convolutional neural network", 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.
4. Kaming He et al (2015) Deep Residual Learning for Image Recognition. arXiv:1512.03385.

5. Leilani H Gilpin et al (2018) Explaining Explanations: An Overview of Interpretability of Machine Learning. arXiv:1806.00069 [cs.AI]
6. R. R. Selvaraju, M. et al (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7

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

Garuda Platform 上で、Percellome DB と SHOE の連動をより密にした。

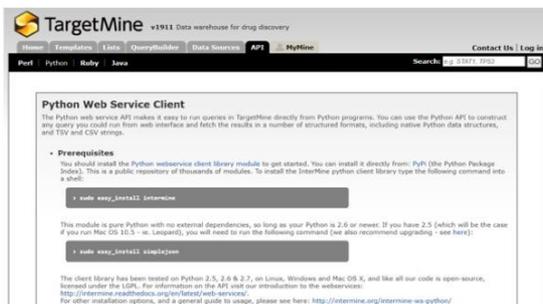
下に連動の概要を、そのあとに、一連の画面を提示する。



SHOE では、複数の解析ソフトウェアと連動し、効率的な解析フローを実現している。

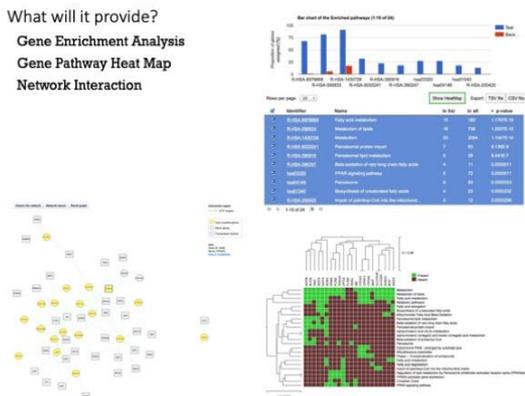
How to connect SHOE to the TargetMine database?

Using the TargetMine provided API Using Python **Under construction (2019)**



さらに、TargetMine への連動性を確保した。TargetMine は、医薬基盤研の開発するソフトウェアであり、創薬に関連する情報を提供し有用である。

What will it provide?
Gene Enrichment Analysis
Gene Pathway Heat Map
Network Interaction



その他、Gene Enrichment 解析、Gene-Pathway Heat Map などのソフトウェアとの連動も可能である。

D. 考察

深層学習は、大規模データの自動分類に有効であることがわかった。データの形状を複数の角度から学習データとして利用することで、より精緻に分類器のチューニングを行うことが可能であることが分かった。

E. 結論

今回の成果で、人手ではできなかったスケール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、この成果をさらに解析プロセスに展開を目指す。

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 V Gupta, A Crudu, Y Matsuoka, S Ghosh, R Rozot, X Marat, S Jäger, H Kitano, L Breton Multi-dimensional computational pipeline for large-scale deep screening of compound effect assessment: an in silico case study on ageing-related compounds. npj Syst Biol Appl 5, 42 (2019).
- ③ S Uchida, Y Asai, Y Kariya, K Tsumoto, H Hibino, M Honma, T Abe, F Nin, Y Kurata, K Furutani, H Suzuki, H Kitano, R Inoue, Y Kurachi Integrative and theoretical research on the architecture of a biological system and its disorder J Physiol Sci 69 433 2019
- ④ Y Kato, K Tabata, T Kimura, A Yachie-Kinoshita, Y Ozawa, K Yamada, J Ito, S Tachino, Y Hori, M

Matsuki, Y Matsuoka, S Ghosh, H Kitano, Y Funahashi Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8+ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway PLOS ONE doi.org/10.1371/journal.pone.0212513

- ⑤ Polouliakh N, Horton P, Shibana 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 Ayako Yachie (2018) PREDICTIVE SYSTEMS TOXICOLOGY: CHALLENGES IN MECHANISTIC MODELING AND STRUCTURE-BASED ASSESSMENT. OPENTOX ASIA 2018 2018/5/25
- ④ Vipul Gupta (2018) GARUDA: AN INTEGRATED ANALYTICS PLATFORM TOWARDS TOXICITY ASSESSMENT AND BEYOND. OPENTOX ASIA

2018 2018/5/25

- ⑤ Samik Ghosh (2018) NEW HORIZONS IN COMPUTATIONAL TOXICOLOGY. OPENTOX ASIA 2018 2018/5/25
- ⑥ 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)
- ⑦ 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)
- ⑧ 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)
- ⑨ 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)
- ⑩ 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）
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 31/令和元年度 分担研究報告書

Percellome データベースを利用した解析パイプライン

研究分担者 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

今年度はヒトにおいて急性発汗や発熱などの症状を惹起するため使用が厳しく制限あるいは禁止されている殺虫剤であるペンタクロロフェノール（PCP）を投与したマウス肝臓におけるPercellomeデータを選択し、Garudaプラットフォームによる解析によってその毒性発現メカニズム推定を実施した。マウス（C57BL/6, 12週齢、オス）にPCP（0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%）を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に肝臓、腎臓を採取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おこなった結果、肝臓においてRIG-1抗ウイルスパスウェイに関連する遺伝子の発現が変動していることが示唆された。本結果はPCPによる発汗・発熱がRIG-1パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起されるという可能性を提示するものであると言える。

A.研究目的

毒性発現メカニズムの推定における Percellome データおよび Garuda プラットフォームの有用性を示すため、Percellome データを Garuda プラットフォームによって解析することによりこれらの活用例を提示することを目的としている。今年度はヒトにおいて急性発汗や発熱などの症状を惹起するため使用が厳しく制限あるいは禁止されている殺虫剤であるペンタクロロフェノール（PCP）を投与したマウス肝臓における Percellome データを選択し、Garuda プラット

フォームによる解析によってその毒性発現メカニズム推定を実施することとした。

B.研究方法

マウスに PCP（0, 10, 30, 100 mg/kg）を経口投与して一定時間後（2, 4, 8 あるいは 24 時間後）に摘出された肝臓を用いて遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより測定した。Per cell normalization 後に遺伝子発現が変動した遺伝子が選択された。当該遺伝

子リストは[1]より取得し、Garuda プラットフォームへの入力データとして用いた。Garuda プラットフォーム上において、使用したガジェット (Garuda プラットフォームで連結され、相互に入出力データを共有可能となったソフトウェアの総称) は Nandi (使用可能なガジェットの提示)、Gene ID converter (遺伝子 ID 変換ツール)、Reactome (pathway enrichment 解析)、PercellomeDB (遺伝子発現の時間依存的・濃度依存的変動を表す 3D プロットの作成) である。また、当該遺伝子リストを用いて、翻訳により産生されるタンパク質の相互作用情報をグラフとして表現し、その構造から相互作用の強いクラスターを検出する MCL クラスタリングを STRING v11[2]を用いて実施した。

[1] Kanno J. et al., J. Toxicol. Sci. 2013;38(4): 643-654

[2] Szklarczyk, D., et al., (2018). Nucl Acid Res 47.D1: D607-613.

C.研究結果

Reactome ガジェットによる pathway enrichment 解析の結果、PCP 投与から 24 時間後のマウス肝臓において RIG-1 抗ウイルスパスウェイに関連する遺伝子の発現が変動していることが示唆された。RIG-1 抗ウイルスパスウェイの活性化はタイプ I インターフェロンの誘導に繋がる。さらに、インターフェロン α/β シグナリングパスウェイに関連する遺伝子の変動も同様に認められた。RIG-1 は短鎖 dsRNAs や 5'-三リン酸化 ssRNAs を認識することが既に報告されており[3]、上記 RNA を有するウイルスとしてインフルエンザウイルスやセンダイウイルス、日本脳炎ウイルスが知られている。次に、STRING を用いて相互作用のあるタンパク質のネットワークに対して MCL

クラスタリングを行なった結果、互いに密に相互作用をしているサブネットワークが検出された。当該サブネットワークに含まれる遺伝子に対して

TargetMine による各種 enrichment 解析を実施した結果、RNA ウイルス感染に関連するパスウェイが検出された。さらに、disease enrichment 解析により当該サブネットワークにはインフルエンザに関連する遺伝子が多く認められることが示された。この結果より、タンパク質相互作用情報より得られるグラフのクラスタリングによって検出されたサブネットワークに含まれる遺伝子群は、PCP 投与によって変動する遺伝子群の中でも特にインフルエンザなどの RNA ウイルス感染に関連の強いものであることが示唆された。

[3] Go SG., et al., (2008). Virus (in Japanese), 58(2), 97-104.

D.考察

Garuda プラットフォームを用いた Percellome データ解析により、PCP 投与によって肝臓においてインフルエンザ発症時と同様の遺伝子発現変動が起きることが示された。さらに、この応答には抗ウイルスパスウェイとして機能している RIG-1 パスウェイに関連する遺伝子が含まれることが示唆された。つまり、PCP 投与により RIG-1 を介した抗ウイルス応答が惹起され、その結果としてポジティブフィードバックにより RIG-1 パスウェイに関連する遺伝子の発現が亢進するといった分子メカニズムが働いたのではないかと考えられる。実際、インフルエンザウイルスは RIG-1 によって認識されることが既に報告されており[4]、本結果 PCP による発汗・発熱が RIG-1 パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機

構によって惹起されるという可能性を提示するものであると言える。遺伝子リストを取得した[1]においては、enrichment解析をIPA (Ingenuity pathway analysis, Ingenuity Systems, Inc. Redwood City, CA, USA)を用いて実施しており、Garudaを用いた解析と同じくPCP投与後24hrにおいてインターフェロンシグナリングパスウェイに関連する遺伝子の発現変動を検出している。更に、”Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response”や”Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Virus”といった抗ウイルス応答に関連するパスウェイについても同様に検出しており、本解析結果は既報内容と矛盾のないものであることを確認した。一方、IPAではこれらのパスウェイに関連する遺伝子がどのような分子メカニズムによって発現亢進に至ったかを提示するには至っておらず、RIG-1の関与の可能性を示唆する本解析結果が新規に見出したものである。このことから、GarudaはIPAに代表される有償ソフトに勝るとも劣らぬパフォーマンスでデータ解析を行うことが可能であり、このGarudaにPercellomeを連結させた意義は大きいと言える。

[4] Kato H. et al., *Nature*. 2006;441:101-5

E. 結論

Garudaプラットフォームを用いたPercellomeデータ解析により、PCPの毒性発現機構の推定を行なった。

「PCPによる発汗・発熱がRIG-1パスウェイ活性化を介した抗ウイルス応答と類似した機構によって惹起される」という知見を事前知識に頼ることなくデータから抽出することに成功しており、GarudaプラットフォームやPercellomeデータがシステム毒性学の実践において有用な資源となることを示す成果で

あると言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Development of an in silico prediction system of human renal excretion and clearance from chemical structure information incorporating fraction unbound in plasma as a descriptor.

Watanabe R, Ohashi R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-Kitatani Y, Nagao C, Mizuguchi K
Scientific reports 9(1) 18782 2019

2) Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility.

Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Komura H, Mizuguchi K
Journal of pharmaceutical sciences 108(11) 3630-3639 2019

3) Computational Model To Predict the Fraction of Unbound Drug in the Brain.

Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Mizuguchi K
Journal of chemical information and modeling 59(7) 3251-3261 2019

4) B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- γ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant.

Lee MSJ, Natsume-Kitatani Y, Temizoz B, Fujita Y, Konishi A, Matsuda K, Igari Y, Tsukui T, Kobiyama K,

Kuroda E, Onishi M, Marichal T, Ise W, Inoue T,
Kurosaki T, Mizuguchi K, Akira S, Ishii KJ, Coban C
European journal of immunology 49(9) 1433-1440 2019

2. 学会発表

- ①) Pentachlorophenol affects RIG-1 antiviral pathway that produces type 1 interferon at the transcriptional level
Natsume-Kitatani Y., Mizuguchi K., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Kanno J.

ISMB/ECCB 2019

バーゼル (スイス) , 2019/07/24

- 2) A study of gut microbial variations associated with phenotypic metadata in a healthy Japanese population
Kawashima H., Miyachi M., Murakami H., Konishi K., Ohno H., Tanisawa K., Hosomi K., Mohsen A., Chen Y.A., Park J., Mizuguchi K., Natsume-Kitatani Y., Kunisawa J.

ISMB/ECCB 2019

バーゼル (スイス) , 2019/07/23

- 3) Development of DruMAP, Drug metabolism and pharmacokinetics Analysis Platform
Watanabe R., Esaki T., Kawashima H., Natsume-Kitatani Y., Nagao C., Ohashi R., Komura H., Mizuguchi K.

ISMB/ECCB 2019

バーゼル (スイス) , 2019/07/22

- ④) Cross Talks among PPARα, SREBP, and ER Signaling Pathways in the Side Effect of Valproic Acid
Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J.

IUTOX2019

ホノルル (ハワイ) , 2019/07/16

- ⑤) Garuda プラットフォームによる多角的毒性予測
夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Gosh Samik, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純
第46回日本毒性学会学術年会
徳島, 2019/06/28

- 6) 「新薬創出を加速する人工知能の開発」特発性肺線維症への取り組み
伊藤真里, 武田吉人, 木田博, 木庭太郎, 野島陽水, 藤原大, 長尾知生子, 夏目やよい, 武田理宏, 松村泰志, 熊ノ郷淳, 水口賢司
第59回日本呼吸器学会学術講演会
東京, 2019/04/14

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

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
<u>Polouliakh N</u>	In Silico Transcription Factor Discovery via Bioinformatics Approach: Application on iPSC Reprogramming Resistant Genes	F Kobeissy, K Wang, FA. Zaraket	Leveraging Biomedical and Healthcare Data	Academic Press, Elsevier	Amsterdam, Netherlands	2019	183-193

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
Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, <u>Kitajima S</u> , <u>Kanno J</u> , Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.	CYP3A4 induction in the liver and intestine of PXR/CYP3A-humanized mice: approaches by mass spectrometry imaging and portal blood analysis.	Mol Pharmacol.		doi: 10.1124/mol.119.117333.	2019
<u>Ono R</u> , 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
Gupta V, Crudu A, Matsuoka Y, Ghosh S, Rozot R, Marat X, Jäger S, <u>Kitano H</u> , Breton L	Multi-dimensional computational pipeline for large-scale deep screening of compound effect assessment: an in silico case study on ageing-related compounds.	npj Syst Biol Appl	5	42	2019
Uchida S, Asai Y, Kariya Y, Tsumoto K, Hibino H, Honma M, Abe T, Nin F, Kurata Y, Furutani K, Suzuki H, <u>Kitano H</u> , Inoue R, Kurachi Y	Integrative and theoretical research on the architecture of a biological system and its disorder	J Physiol Sci	69	433	2019

Kato Y, Tabata K, Kimura T, Yachie-Kinoshita A, Ozawa Y, Yamada K, Ito J, Tachino S, Hori Y, Matsuki M, Matsuoka Y, Ghosh S, <u>Kitano H</u> , Funahashi Y	Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8+ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway	PLOS ONE	doi.org/10.1371/journal.pone.0212513		2019
Watanabe R, Ohashi R, Esaki T, Kawashima H, <u>Natsume-Kitatani Y</u> , Nagao C, Mizuguchi K	Development of an in silico prediction system of human renal excretion and clearance from chemical structure information incorporating fraction unbound in plasma as a descriptor.	Scientific reports	9	18782	2019
Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, <u>Natsume-Kitatani Y</u> , Kawashima H, Nagao C, Komura H, Mizuguchi K	Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility.	Journal of pharmaceutical sciences	108	3630	2019
Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, <u>Natsume-Kitatani Y</u> , Kawashima H, Nagao C, Mizuguchi K	Computational Model To Predict the Fraction of Unbound Drug in the Brain.	Journal of chemical information and modeling	59	3251	2019
Lee MSJ, <u>Natsume-Kitatani Y</u> , Temizoz B, Fujita Y, Konishi A, Matsuda K, Igari Y, Tsukui T, Kobiyama K, Kuroda E, Onishi M, Marichal T, Ise W, Inoue T, Kurosaki T, Mizuguchi K, Akira S, Ishii KJ, Coban C	B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- γ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant.	European journal of immunology	49	1433	2019

令和2年 3月 31日

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
所属研究機関長 職名 日本バイオアッセイ研究センター 所長代理
氏名 相磯 成

次の職員の令和元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
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所長
(氏名・フリガナ) 菅野 純

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"/>	公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	<input checked="" 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。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生
 所属研究機関長 職名 所長
 氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元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。

- 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
- 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
- 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・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) ・該当する口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。

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

次の職員の令和元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) 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) ・該当する口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。

令和2年 3月 31日

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
所属研究機関長 職名 所長代理
氏名 相磯成

次の職員の令和元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
- 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
(氏名・フリガナ) 北野 宏明

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"/>	公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	<input checked="" 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。

令和2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・健康増進研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 米田 悦彦

次の職員の令和元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) 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。