

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)

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅野 純

令和3（2021）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 | ----- | 21 |
| 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 | ----- | 31 |
| 3. Percellome専用解析ソフトウェアの開発・改良 相崎 健一 | ----- | 39 |
| 4. システム毒性解析の人工知能化 北野 宏明 | ----- | 46 |
| 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 | ----- | 53 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 58 |

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
令和2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
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
客員研究員

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。

特に先行研究から引き続き実施した、Percellome 法*を基盤とする「新型」反復曝露実験**の蓄積により遂に大規模解析を実施可能なデータ量を確保し、化学物質の反復投与による生体影響のデータベース化が実現した。単回曝露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短縮・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

本研究班の最終年度となる令和2年度の進捗は以下の通り。

(1) では、メトトレキサート及び、サリドマイドの新型反復プロトコルの2実験を実施し、遺伝子発現解析を進めて反復曝露に共通の要素と各々の化学物質に特徴的な要素を抽出した。メトトレキサートは、特に先行研究で実施した化学物質と比較すると、発現変動する遺伝子数が過渡反応、基線反応ともに少なかったが、特徴的な変化として、ヘモグロビン関連遺伝子（Hba-a1/Hba-a2、Hbb-b1/Hbb-b2 等）及びヘプチジン(Hamp2)の発現への

影響が認められ、今後詳細な解析を進めるが、メトトレキサートによる酸化ストレス低下のシグナルが、ヘモグロビン合成抑制に働き、鉄欠乏状態類似の状況を誘発し、ヘプチジンの発現を代償性に誘発した可能性が示唆された。サリドマイドについては、反復曝露による2時間目のシグナル系遺伝子の過渡反応の抑制傾向及び、NRF2系を介した酸化ストレス系の基線反応の増強を確認した。なお、3年前の研究計画ではN-エチル-N-ニトロソウレア、及び、パクリタキセルの実験を予定していたが、これまでの解析結果に鑑み、細胞増殖への影響がより強い化学物質を選択した方が適切と判断したため、上記の化学物質に変更することとした。

(2)では、令和元年度までのChIP-Seq解析で認められた化学物質の反復投与によるヒストン修飾の変化に、溶媒の反復投与がどのように且つどの程度影響しているか、を網羅的に評価するために、令和2年度は溶媒(コーンオイル)を14日間反復投与した際のマウス肝のエピジェネティクス測定を実施・解析した。その結果、四塩化炭素の反復投与の際に認められたヒストン修飾の変化の多くは、コーンオイル(溶媒)の反復投与の影響ではないことが明らかとなった。一方、コーンオイルの反復投与においても、ヒストン修飾の変化が起こる領域が同様に単離されたことから、本溶媒による影響も確実に存在することも明らかとなった。

(3)では、従来は解析工程の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逐一抽出している作業をAIによって完全自動化する「自動深層学習システム」の開発を進めている。本年度も新たな学習用データを追加して予測精度のより一層の向上を実現した。また予測モデルの判断基準を可視化するexplainability model(grad cam)を参考にモデルの最適化を進めた上で、これらを組み込んだユーザーフレンドリーなGUIを実装した解析プログラムを開発した。さらに、遺伝子発現パターンによるクラスタリングソフトウェアAGCTと転写制御領域の解析ソフトウェアSHOEの改良を重ね、Garuda Platformのソフトウェア等、複数の解析ツールを使った統合パイプラインを構築・強化した。

(4)では、平成30年度にin house開発したBaselineComparisonソフトウェアを利用して「反復曝露基線反応データベース」を構築し、基線反応による化学物質クラスタリングなどのデータベース全体を対象とする解析を行ってデータベースの性能や新型反復曝露プロトコルの妥当性を確認した。また本データベースを早期にオンライン提供すべく、令和元年度と同様、オンライン公開に必要なWebアプリケーションのアップデートを進めた。

(5)では、当初予定していたペンタクロロフェノール解析については昨年度中に前倒しで終了したため、本年度はマウスにおいて肝発がん性が報告されているエストラゴール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、エストラゴールは特異性の高いPPAR α リガンドであることが示唆された。PPAR α のリガンドがげっ歯類において肝発がん性を呈することはこれまでも多数報告されており、マウスにおけるエストラゴールの肝発がんについてもPPAR α 活性化によることが推測された。

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 第5室 室長

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：

メトトレキサート(Methotrexate; 分子量：454.44、

Cas No.: 59-05-2、純度>98%、富士フイルム和光純薬(株)、及びサリドマイド(Thalidomide; 分子量: 258.23、Cas No.: 50-35-1、純度>99%、Carbosynth)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)時のメトトレキサート(MTX)及びサリドマイドの曝露量はそれぞれ0、100、300、1,000 mg/kg及び0、100、300、1,000 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。MTXの4回反復投与の用量は100mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に0、100、300、1,000 mg/kgとした。サリドマイドに関しては14回反復投与を実施し、この際の投与用量は700mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に0、100、300、1,000 mg/kgとした。12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)を用い溶媒はMTX及びサリドマイド、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℃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℃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、RNeasyキットを用いて全RNAを抽出した。100ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

●GeneChip 解析 :

全RNA5µg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T7RNAポリメラーゼ(ENZO社キット)を用い、ビオチン化UTP、CTPを共存させつつcRNAを合成した。cRNAはアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bpとなるよう断片化し、GeneChipターゲット液とした。GeneChipにはMouse Genome 430 2.0(マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは45℃にて18時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られた肝サンプルについて、我々が開発したPerccellome手法(遺伝子発現値の絶対量化手法)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。これにより自動抽出されたpsから、さらに専門家によるVisual Selectionを行い、生物学的に有意と判定される変化を示したpsを厳選して解析に使用した。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)

溶媒として使用しているコーンオイル (C8267、Sigma-Aldrich) を 14 日間反復投与した後、コーンオイルを投与し 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

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 DTOX を構築した。この深層学習モデルでは、有意な遺伝子のうち、化学物質曝露により発現が上昇する (up-regulate) ものを positive 群、低下する (down-regulate) ものを negative 群、さらに有意で無い遺伝子は、non-significant 群として予測する。平成 31/令和元年度には多様な描画角度から 3 次元グラフを作成して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精度を大幅に向上させた。令和 2 年度はさらに特殊パターン (飽和パターンや溶媒群に変動のあるパターンなど) を追加してトレーニングを実施した。

また、DTOX システムに対して、ユーザーが使いやすいグラフィカルユーザーインターフェース (GUI) の実装を進めた。GUI は、python の代表的な GUI 作成用のモジュールである、PYQT5 と、Qt designer を用いて作成を進めた。

DTOX の性能比較のためには、一般的な変動遺伝子解析 (DEG: differential expression gene analysis) を利用した。DEG では、投与量が 0 で時間が 0 の場合のデータをコントロール群とし、その他の条件下においてコントロール群と比較して有意に遺伝子発現が大きい若しくは小さい遺伝子群を、その条件下において有意であると見なした。有意性の検定では、t-test で求めた p 値に対して多重検定補正を実行して FDR を求め、FDR < 0.05 である場合に有意であるとした。コントロール以外に 15 条件あるが、15 条件の内、1 条件以上において FDR < 0.05 で log2 Fold change が 1 以上の遺伝子 (ただし、log2 Fold change が -1 以下となる場合が無い場合) を positive 群とした。一方、15

条件の内、1条件以上において $FDR < 0.05$ で \log_2 Fold change が-1 以下の遺伝子（ただし、 \log_2 Fold change が 1 以上となる場合が無い場合）を negative 群とした。positive 群でも negative 群でも無い遺伝子を、non-significant 群とした。

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

転写領域解析ソフトウェア SHOE 及びクラスタリングソフトウェア AGCT の開発は、Java 言語 (USA, Oracle Inc.) で行った。Garuda Platform 用ソフトウェア (Garuda ガジェット) の開発や他の Garuda ガジェットとの連動については、GarudaDevPack を使用した。性能評価や試験運用には、Percellome データベースより実際の化学物質曝露による遺伝子発現時系列データを用いた。生成クラスタのパスウェイ解析には Ingenuity Pathway Analysis (Germany, QIAGEN) を使用した。

(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 開発及び Web アプリケーション開発は 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。

反復曝露基線反応データベースの構築に際しては、平成 30 年度 (本研究一年目) に in house 開発した BaselineComparison ソフトウェアを使用した。本データベースに収録された全データを対象とする化学物質クラスタリングは Google Colaboratory (Jupyter core ver.4.5.0, jupyter notebook ver.5.2.2) 上で Python (ver.3.6.9) 及び解析ライブラリ numpy (ver.1.19.4)、pandas (ver.1.1.5)、scikit-

learn (ver.0.22.2.psot1) を用いて実行した。抽出された遺伝子群のアノテーション解析は DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 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エストラゴール (0, 10, 30, 100 mg/kg BW) 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 Kanno J. et al., J. Toxicol. Sci. 2013;38(4): 643-654 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)、biocompendium (pathway enrichment 解析)、iPATH3 (代謝パスウェイ可視化)、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。更に、データ解析には TargetMine (創薬標的探索支援データウェアハウス、<https://targetmine.mizuguchilab.org/targetmine/begin.do>) や Reactome web 版 (パスウェイブラウザ、<https://reactome.org/>) も併用した。エストラゴール投与により発現変動が認められる遺伝子は、投与量・処理時間・発現量を軸にとった 3D プロットの形状より専門家によって選択された。

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。

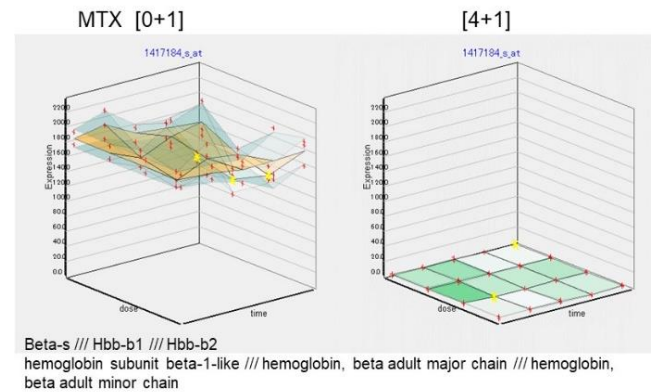
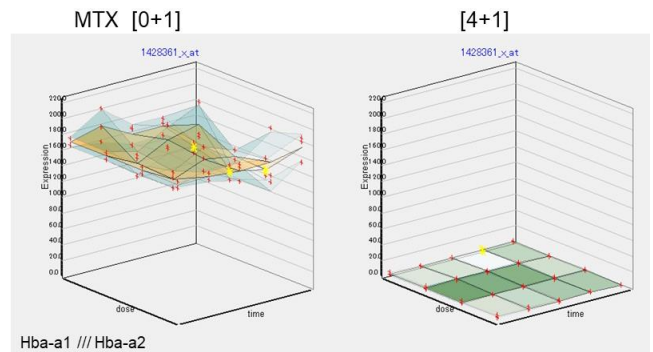
(1) 短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発【菅野】

令和2年度は、メトトレキサート及び、サリドマイドを検討した。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。

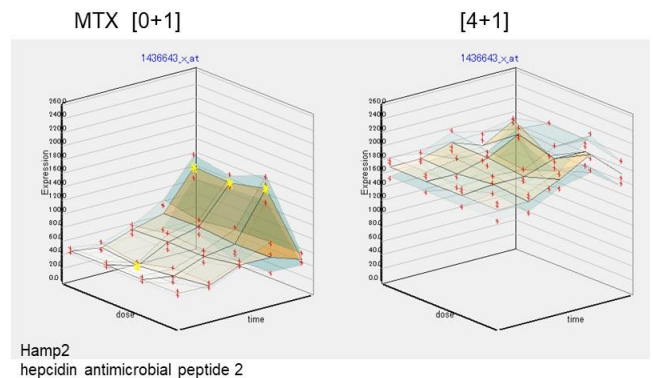
メトトレキサートの新型反復プロトコルの2実験([4+1])を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と各々の化学物質に特徴的な要素を抽出した。メトトレキサートは、特に先行研究で実施した化学物質と比較すると、発現変動する遺伝子数が過渡反応、基線反応ともに少なかったが、特徴的な変化として、ヘモグロビン関連遺伝子(Hba-a1/Hba-a2、Hbb-b1/Hbb-b2等)とヘプチジン(hepcidin、Hamp2)の発現への影響が認められた。

ヘモグロビンの産生は赤血球系の細胞に限られるという定説は、2010年ごろより変化し、肺、脳、腎、肝等の非赤血球系の組織における産生が報告される様になっており、本実験の結果は、その様な知見に合致するものであると考えられた。

本実験では、メトトレキサートの4日間反復投与により、ヘモグロビン遺伝子発現が200コピー/細胞から、数コピー/細胞まで低下していた。



これに対し、ヘプチジンは、4日間反復投与により発現が上昇した。



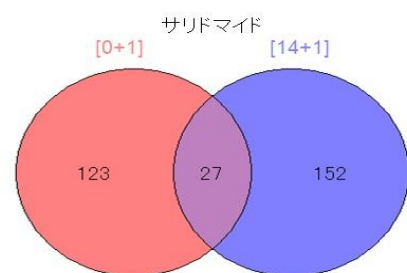
ヘプチジンは肝にて合成される因子で、小腸上皮、骨髄、或いは鉄処理に当たる脾臓マクロファージなどの細胞膜上のFerroportin(Scf40A1)が鉄のトランスポーターであると同時にヘプチジンの受容体として機能し、体内の鉄の恒常性を維持する機構の中心的機能を有しているとされる。遺伝的ヘモジデロシス疾患の解析によりヘプチジン欠乏状態はヘモジ

デローシスを誘発し、過剰産生状態は、慢性炎症等に
伴う状況での鉄欠乏性貧血が該当するとされている。

メトトレキサートの作用に一酸化窒素 (NO) 合成
阻害が指摘されており、酸化ストレスの低下に寄
与すると考えられる。他方、非アルコール性脂肪性肝
炎 NASH のヒト肝における知見等から、肝において
ヘモグロビン合成が酸化ストレスにより誘導され、
これはエリスロポイエチン制御によらず、肝細胞内
の制御によることが示唆されている。また、ヘモグロ
ビンは酸素輸送の他、NO を結合し血中から NO を除
去する NO スカベンジ作用 (一酸化炭素によりヘモ
グロビンから NO が放出される現象あり) が報告さ
れている。

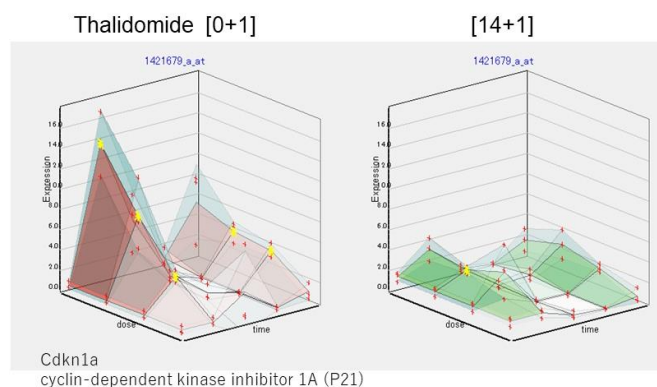
詳細な機構解析が必要であるが、現段階において、
肝細胞内においてメトトレキサートによる酸化ス
トレス低下のシグナルが、ヘモグロビン合成抑制に
働き、鉄欠乏状態類似の状況を誘発し、ヘプチジンの
発現を代償性に誘発した可能性が指摘される。

Thal の [14+1] による発現変動遺伝子の数は 179 で
あり、[0+1] の 150 に比して若干増加した。

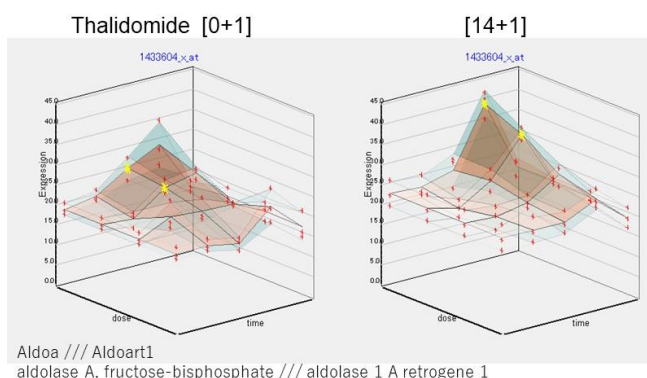


[0+1] において
発現し、[14+1] に
おいて発現しな
くなった遺伝子
は 2 時間目に発
現する遺伝子が
主体であり、
PXR/RXR、GR 等

の核内受容体を介して早期シグナル系の遺伝子群で
あった。下に Cdkn1a を示す。



逆に [0+1] において発現しておらず、[14+1] におい
て発現した遺伝子は 8 時間目にピークを有する遺伝
子が主体であり、NRF2 を介した酸化ストレス反応
系の遺伝子が増加し、フェロプトーシス等、細胞障害
に関わるシグナル系の遺伝子が含まれていた。



14 日間の反復投与により徐々に発現値が偏倚する
基線反応の解析の結果、基線が上昇した遺伝子数は
336、下降した遺伝子数は 53 であった。上昇した遺
伝子群には、グルタチオンを介した解毒、FXR/RXR
活性化、等の代謝系に関わる遺伝子が含まれていた。

より強い化学物質を選択した方が適切と判断したため、上記の化学物質に変更することとした。

(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】

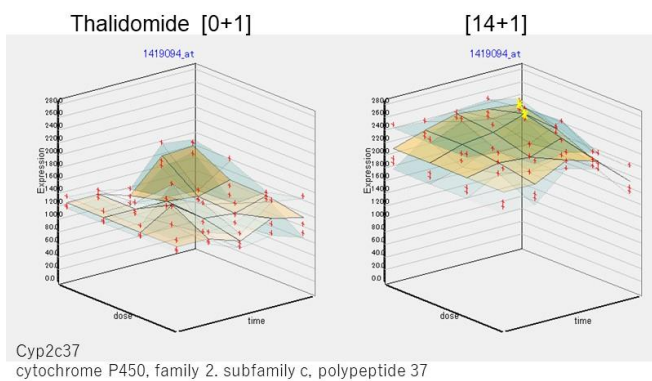
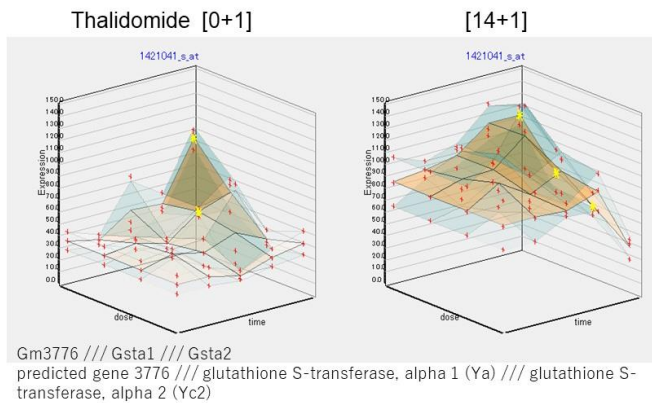
反復曝露時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾等の遺伝子発現修飾機構(所謂エピジェネティクス)が関わる可能性が指摘される事から、本分担研究では次世代シーケンサを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてエピジェネティックな変化を網羅的に検討した。

今までに延べ 30 件の新型反復曝露実験を行い本年度データベース化するが、これを利用して全データを横断的に解析する際、より純粋に試験化学物質の曝露影響を評価するため、溶媒影響の詳細を明らかにしておく必要があると考えられる。

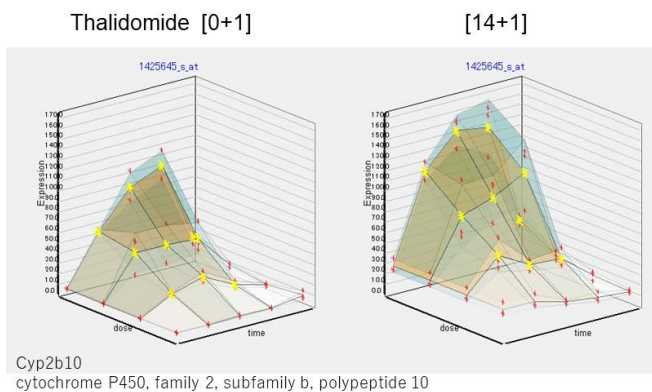
今回は脂溶性の化学物質を投与する際に溶媒として使用するコーンオイル自体の反復曝露影響について解析した。我々の先行研究である四塩化炭素の反復投与によるヒストン修飾への影響を解析した際には、溶媒として、コーンオイルを使用していたことから、得られた結果の比較検討を行った。

その結果、四塩化炭素の反復投与により見られていたヒストン修飾の変化の多くは、コーンオイルの反復投与では見られないことから、溶媒の反復投与による影響ではなく、四塩化炭素そのものの反復投与の影響によると結論できた。

しかし、コーンオイルの反復投与によって、四塩化炭素の反復投与と同じ挙動を示す領域も存在する。これは、コーンオイルの反復投与による影響を見ていたと結論できる。

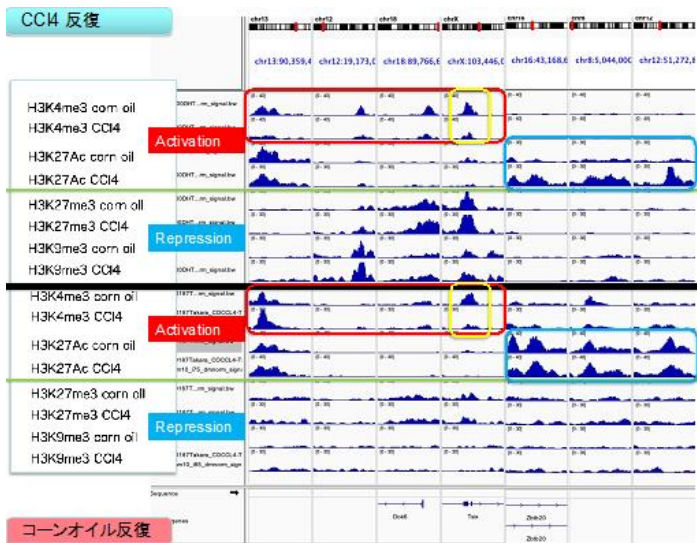


下図の Cyp2b10 の様に、基線の上昇と共に、過渡反応も増強する例も見られた。



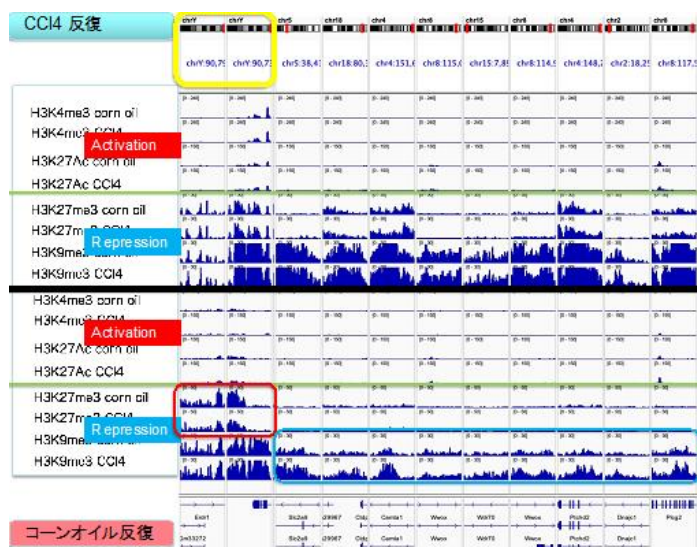
下降した遺伝子群には特徴がはっきりせず文献情報的な意味づけは困難であった。

なお、3年前の研究計画ではN-エチル-N-ニトロソウレア、及び、パクリタキセルの実験を予定していたが、これまでの解析結果に鑑み、細胞増殖への影響が



四塩化炭素の反復投与によって、ヒストン修飾が抑制される領域（赤枠）および亢進する領域（青枠）は、コーンオイルの反復投与によって変化しないことから、これらの原因は四塩化炭素の反復投与影響と結論できる。しかし、黄色枠の領域では、コーンオイルの反復投与によっても同じ挙動を示すので、溶媒影響であると結論できる。

また、四塩化炭素の反復投与では差が顕著ではなかったが、コーンオイルの反復投与を行うことで、コーンオイルの反復投与影響が起こる領域が多く存在することもわかった。



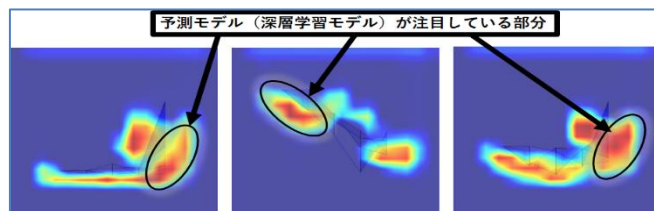
コーンオイルの反復投与によって、H3K9me3 の亢進する領域が顕著となった（青枠部分）。赤枠部分を含め、明らかな溶媒影響を示す領域も存在する。

(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

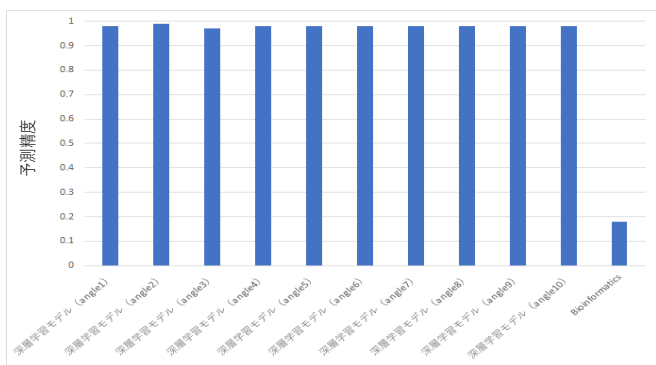
平成 30 年度に深層学習を用いて開発した 3 次元グラフの画像解析システム DTOX は、専門家の判断を訓練データとして用いた深層学習モデルによって画像を解析し、各遺伝子を発現上昇、発現低下、それ以外に分類する。平成 31/令和元年度も多様な描画角度から 3 次元グラフを作成しトレーニング画像数を 10 倍に増加させることで、DTOX による分類精度を大幅に向上させ、令和 2 年度も特殊パターン（飽和パターンや溶媒群に変動のあるパターンなど）を追加してトレーニングすることで、分類器の精度と網羅性を向上させた。

また機械学習の予測モデルの判断基準を明確にする 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) を導入してモデルの最適化を進めた。



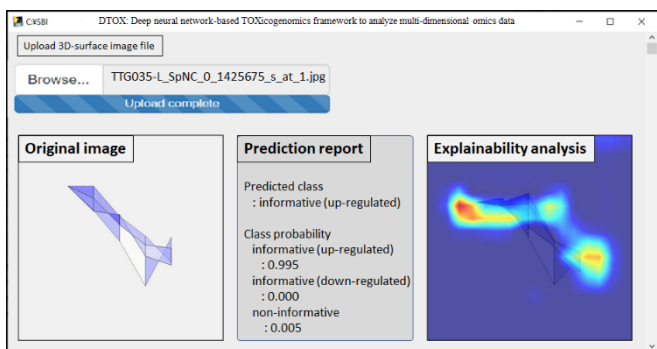
【Explanatory model (Grad cam) による深層学習モデルの解析の結果：深層学習モデルは、赤く強調されている所に着目して、判別を行っている。】

深層学習モデルによる DTOX と、一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインとの予測精度の比較を行った結果、下図に示すように、深層学習モデルは 97%以上の高い正解率を示したが、バイオインフォマティクス解析パイプラインは 18%と非常に低い正解率であった。



深層学習モデル DTOMX の予測精度と一般的なバイオインフォマティクス解析パイプライン(右端)の予測精度の比較

また研究者等のユーザーが使いやすいグラフィカルユーザーインターフェイス(GUI)の実装を進めた。現時点での GUI デザインは下図の通り。

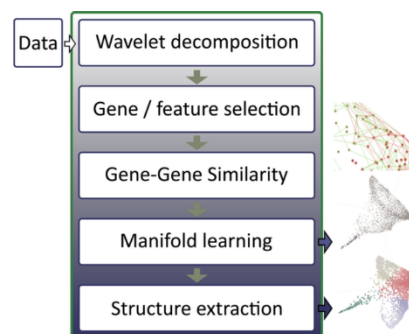


このインターフェースデザインでは、まず Browse ボタンをクリックして、遺伝子の三次元画像ファイルを選択し読み込む。読み込んだ画像は、Original image のサブウィンドウ(左側)に表示され、同時に画像解析システム中の深層学習モデルで解析され、予測が行われる。予測結果は、Prediction report のサブウィンドウ(中央)に表示される。この画像の例では、この遺伝子は化学物質により up-regulation されている確率が 0.995 であると予測されている。また、深層学習モデルの判断根拠に関する解析も行われ、その結果は、Explainability analysis サブウィンドウ(右側)に表示される。判断根拠とされた画像領域は赤色でハイライトされる。現在、本年度内に完成させるべく、開発を進めている。

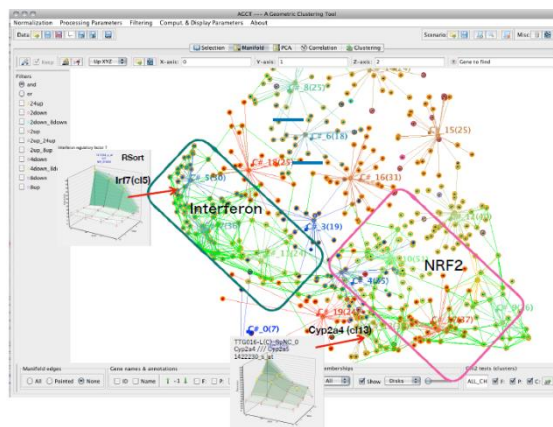
●Garuda Platform 上での Percellome と SHOE の連動強化

今年度は、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 の改良に加え、別途開発していたクラスタリングソフトウェア AGCT の整備を完了し、性能評価の上、論文発表を行った。

AGCT は時系列データとしてトランスクリプトームデータを評価してクラスタリング計算を行う。解析ワークフローは右図の通り。



性能評価のために Percellome データベースに収録されている Pentachlorophenol(PCP)の単回投与データセットから有意な変動を示した 513 プローブセットの時系列データを抽出し、これを用いて教師なしクラスタリングを実行した。



この結果、Affinity Propagation method では 21 クラスタが生成され、特に Interferon signaling 関係の遺伝子が集まった 3 クラスタと NRF2 関係の遺伝子が集まった 4 クラスタを得た。これは菅野らが 2013 年に報告した論文 (DOI: 10.2131/jts.38.643) と一致するものであり、

解析精度を維持しつつ解析工程の効率化に成功したものである。

また Garuda プラットフォームをハブにして、SHOE や AGCT、その他の Garuda ガジェットの連携を整備し、動作を確認した。

A new Toxicology gadget to connect SHOE, Target Mine and Reactome



(4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良 【相崎】

今年度は、まず平成 24 年以來の集大成として反復曝露基線反応データベースを構築した。具体的には平成 30 年度（本研究一年目）に in house 開発した BaselineComparison を利用して、本年度までに GeneChip 解析を行った新型反復曝露実験データセット 30 件より、有意な反応を示した遺伝子リストを生成した。false negative を減らすために、抽出条件は最大発現レベル 1 コピー/細胞以上、且つ、基線を構成する 4 時点データポイントのうち 3 カ所以上で $p < 0.05$ の有意差を示し、尚且つ、同様に基線を構成する 4 時点データポイントのうち 3 カ所以上で 1.5 倍以上の発現変動比を示すもの、と比較的緩い設定にした。全データセットのリストと、各データセットにおける抽出遺伝子数は次表の通り。

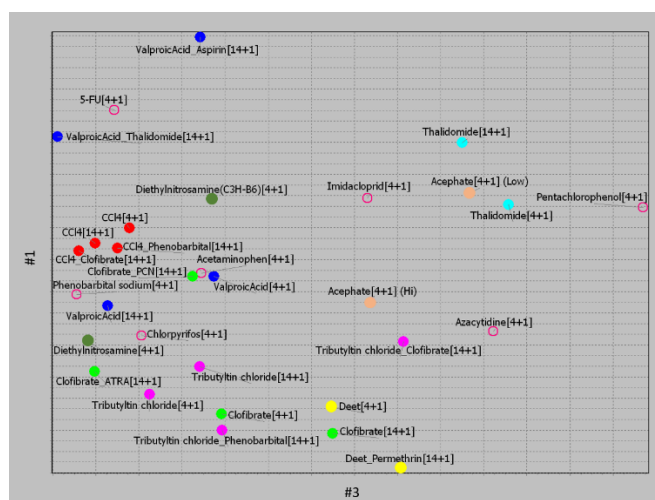
| 反復曝露 | 最終日単回曝露 | 反復期間 | BaselineComparison 出力件数 | strain |
|---------------------------|---------------------------|--------|-------------------------|---------|
| 5-fluorouracil | 5-fluorouracil | [4+1] | 2582 | C57BL/6 |
| Acephate | Acephate | [4+1] | 397, 479* | C57BL/6 |
| Acetaminophen | Acetaminophen | [4+1] | 940 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Valproic acid sodium salt | [4+1] | 389 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Valproic acid sodium salt | [14+1] | 30 | C57BL/6 |
| Azacytidine | Azacytidine | [4+1] | 960 | C57BL/6 |
| CCI4 | CCI4 | [4+1] | 1198 | C57BL/6 |
| CCI4 | CCI4 | [14+1] | 2466 | C57BL/6 |
| Chlorpyrifos | Chlorpyrifos | [4+1] | 568 | C57BL/6 |
| Clofibrate | Clofibrate | [4+1] | 2582 | C57BL/6 |
| Clofibrate | Clofibrate | [14+1] | 4614 | C57BL/6 |
| Deet | Deet | [4+1] | 3546 | C57BL/6 |
| Diethylnitrosamine | Diethylnitrosamine | [4+1] | 1555 | C57BL/6 |
| Diethylnitrosamine | Diethylnitrosamine | [4+1] | 3295 | C3H** |
| Imidacloprid | Imidacloprid | [4+1] | 3296 | C57BL/6 |
| Pentachlorophenol | Pentachlorophenol | [4+1] | 6710 | C57BL/6 |
| Phenobarbital sodium | Phenobarbital sodium | [4+1] | 3075 | C57BL/6 |
| Thalidomide | Thalidomide | [4+1] | 646 | C57BL/6 |
| Thalidomide | Thalidomide | [14+1] | 217 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Tributyltin chloride | [4+1] | 1387 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Tributyltin chloride | [14+1] | 1515 | C57BL/6 |

| 新型反復曝露 (A + B型) | | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------|------|---------|
| CCI4 | Clofibrate | [14+1] | 966 | C57BL/6 |
| CCI4 | Phenobarbital | [14+1] | 979 | C57BL/6 |
| Clofibrate | Pregnenolone Carbonitrile | [14+1] | 1401 | C57BL/6 |
| Clofibrate | All-trans retinoic acid | [14+1] | 1359 | C57BL/6 |
| Deet | Permethrin | [14+1] | 4914 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Clofibrate | [14+1] | 4953 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Phenobarbital | [14+1] | 1910 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Aspirin | [14+1] | 207 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Thalidomide | [14+1] | 87 | C57BL/6 |

* 投与量が異なる

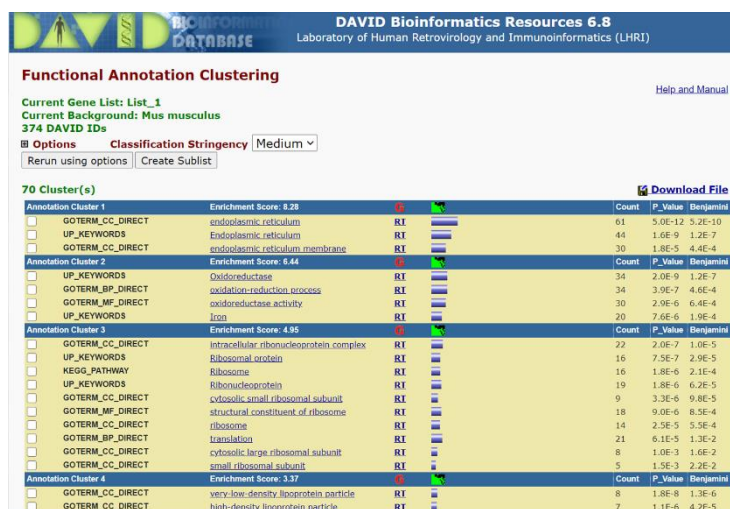
** strainが異なる

本データベースに登録された反復曝露データセット 30 件の概要を調べるため、反復曝露時に有意な基線反応を示す遺伝子としてデータベースに登録されている 22426 種類、延べ 59747 プロブセットの出現頻度を集計し、これを元に主成分解析を行い、第 1 から第 3 成分により化学物質のクラスタを図示した。



● CCI4, ● Deet, ● Tributyltin, ● Valproic acid, ● Clofibrate, ● Thalidomide, ● Acephate, ● Diethylnitrosamine

次に30件のデータセットのうち10件以上において反応した遺伝子についてアノテーション解析を行ったところ、小胞体反応、或いは酸化ストレス応答に関連する遺伝子が多いことが示唆された（下図）。



さらに本データベースを早期にオンライン提供すべく、令和元年度（本研究二年目）と同様、オンライン公開に必要な Web アプリケーションのアップデートを進めた。

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

Reactome ガジェットや bioCompendum ガジェットによる pathway enrichment 解析の結果、エストロゲン投与から 2 時間後のマウス肝臓において PPAR α の活性化を介した脂質代謝関連遺伝子の発現誘導が起こっている事が示唆された。その後、PPAR α の活性化を示す遺伝子発現パターンはエストロゲン投与から 4、8 時間後の肝臓においても一番強いシグナルとして認められた。しかし、エストロゲン投与から 24 時間後においては主に PPAR α 活性化による脂質代謝関連遺伝子の発現変動が認められなくなり、目立った特徴的な発現パターンが消失した。全タイムポイントにおいてそれ以外に特徴的な遺伝子発現

パターンは認められず、PPAR α に対する特異性の高さが伺える。

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、クロルピリフォス (CPF)、5-アザシチジン (AZC) と比較すると、メトトレキサート (MTX) は、発現変動する遺伝子数が過渡反応、基線反応ともに非常に少なかったが、特徴的な変化として、ヘモグロビン関連遺伝子及び、ヘプチジンの発現への影響が認められた。この変化の分子機構の詳細な解析を進めるが、現段階において、肝細胞内において、メトトレキサートが酸化ストレスのシグナルを介して、ヘモグロビン合成抑制に働くこと、このヘモグロビン合成への影響は、鉄代謝を直接的に攪乱したのではなく、NO 等の炎症メディエータ、或いは、酸化ストレスのレベルを変動させたことによる影響であることが示唆された。その際のメディエータとしてヘプチジン合成の誘導が関与していると考えられた。

本年度研究成果により、メトトレキサートについては今まで検討した化学物質には認められなかった新たな遺伝子発現ネットワークが描出された。また、解析手法やツールの利用範囲が拡充したことから、これらの結果を、先行研究のデータに対しても還元して、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精度よく、網羅的に解析する。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、ヘモグロビン遺伝子の様な、クラスターとしての発現調整を

受けている遺伝子群の遺伝子発現制御機構の詳細の分析 (SHOE、AGCT 活用、GARUDA 活用を含む) を追加して進める。サリドマイドについては、反復投与により NRF2 系などを介した酸化ストレス応答の増強、細胞・組織障害を示唆するネットワークの活性化がより明瞭となり、その上流のシグナル伝達ネットワークの詳細について、今後予定される網羅的エピジェネティクス解析により明らかにする予定である。

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引き続き試みる予定である。

「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、令和2年度は、脂溶性の化学物質を投与する際、溶媒として使用するコーンオイルを14日間反復曝露した際の肝サンプルのChIP-Seq解析により有意な変化を示すヒストン修飾部位を抽出し、コーンオイルを溶媒とした四塩化炭素の反復曝露実験でのChIP-Seq解析結果と比較することで、純粋に基線反応の成立に関わる分子機序の解析を行った。四塩化炭素の反復投与の際に認められたヒストン修飾変化の多くが、溶媒影響ではなく、四塩化炭素の反復投与が原因であることが明らかになった。

しかし、コーンオイルの反復投与によって、四塩化炭素の反復投与と同じヒストン修飾変化の挙動を示す領域も存在することから、コーンオイル(溶媒)による影響も確かに存在することが明らかとなった。

加えて、コーンオイルの反復投与で顕著なヒストン修飾変化が起こる領域が明らかになった。コーンオイルは、脂溶性の化学物質であり、その反復投与によって、脂質代謝に異常が起こる可能性が想定されるため、今後、この面からの解析を検討する。

「システム毒性解析の人工知能化」【北野】においては、本研究で開発した深層学習画像解析システム DTOX の予測精度は、一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインの精度を大きく上回ることが判った。これは、DTOX の深層学習モデルは、研究者が Visual Selection の際に評価している領域を着目して判定していることから、トレーニングにより人の判断のパターンを上手く捉えることで、高い精度を実現している可能性を示唆している。深層学習モデルの精度はデータの数に依存するため、更なる精度の向上を目指して、トレーニングデータの追加増強を進め、これをもとに、深層学習モデルの再チューニングを進める。

「Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良」【相崎】については、本研究一年目に in house 開発した BaselineComparison プログラムを使用して、本研究及び先行研究で生成した15化学物質・30データセットの新型反復曝露実験データセットより、反復曝露基線反応データベースを構築した。本データベースに収録された全データセットを使用した化学物質クラスタリングでは、反復曝露した化学物質毎に境界明瞭なクラスタが形成されており、反復曝露によるトランスクリプトーム変化を直接示す基線反応のデータベースとしての高い精度を示唆した。また[4+1]と[14+1]の反復実験を実施している4化学物質のうち3化学物質のクラスタが纏まったことから、14日間反復実験を4日間反復実験で代替できる可能性が高まった。なお例外となった Clofibrate については、Clofibrate[14+1]と同条件で Clofibrate を14日間反復曝露したA+Bタイプの2実験(A+Bタイプの実験とは、A物質=Clofibrateを14日間にわたり全群に一定量を反復曝露し、15日目に単回曝露プロトコルでB物質として Pregnenolone Carbonitrile (PCN)又は All-trans retinoic acid (ATRA)を投与した実験。但しA+Bタイプの実

験においても、基線反応解析には15日目の単回曝露時の溶媒群を用いるため、基線反応にはB物質投与の影響はなく、A+AタイプのClofibrate[14+1]と同等のサンプルとなる)がClofibrate[4+1]の近傍でクラスタを形成すること、また念のため、A+AタイプのClofibrate[14+1]について遺伝子機能解析を行ったところ、Clofibrate[4+1]に比して大きな差異はなく、Clofibrate[14+1]及びClofibrate[4+1]のいずれにおいても同様のHistone修飾関係遺伝子の発現変動が確認されたことから、Clofibrateにおいても基本的には他の化学物質と同様に14日間反復実験を4日間反復実験で代替できる可能性が示唆された。

「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プラットフォームなど複数のツールを用いたPercellomeデータ解析により、ツール特異的に検出される遺伝子発現パターンを除いて信頼度の高いパターンのみ注目すると、エストラゴールによって発現変動が引き起こされる遺伝子はPPAR α によって発現制御されるもののみが顕著であった。PPAR α のリガンドがげっ歯類において肝発がん性を呈することはこれまでも多数報告されており、マウスにおけるエストラゴールの肝発がんについてもPPAR α 活性化によることが推測される。一方、これまでにバルプロ酸などの他のPPAR α リガンド(であることが示唆される低分子化合物)についてPercellomeデータ解析を実施した結果と比較しても、エストラゴールのPPAR α リガンドとしての特異性が高いことが示された。

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例として、医薬品として用いられている物質の内、作用標的が広いと考えられるものについて、本年度は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、メトトレキサートについては発現変動する遺伝子数が少ないものの、今までのデータには無い特徴的な遺伝子発現ネットワークとして、ヘモグロビン関連遺伝子及び、鉄の恒常性維持機構に関わるヘプチジンの発現への影響が認められた。詳細な解析を進めるが、現段階において、肝細胞内においてメトトレキサートが酸化ストレスのシグナルを介してヘモグロビン合成の抑制に働き、NOを含む酸化ストレスの変動を介してヘプチジン遺伝子発現の誘導を来したものと考えられた。

本年度研究成果により、新たな遺伝子発現ネットワークが描出され、既に得ている対照群動物のDNAメチル化やヒストン修飾のエピゲノム情報を参照することで、ヘモグロビン遺伝子の様な遺伝子クラスター制御に関する分析も進めることが可能となったと考える。サリドマイドの14日間反復曝露についても、反復投与によりNRF2系を介した酸化ストレスの増強が明確となり、シグナル伝達の上流から下流の各種の病態予測との関係を含め、分子レベルでの解析を進める。

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、溶媒として用いるコーンオイル自体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、コーンオイルを溶媒として使用した新型反復曝露実験及びChIP-Seq解析を行った化学物質である四塩化炭素のそれと比較解析した。その結

果、純粋に化学物質のみの反復曝露によるヒストン修飾変化を確認できた他、コーンオイル（溶媒）の反復曝露による影響として、H3K9me3 の亢進が起る領域が存在することを明らかにした。

今後は、反復曝露によるエピジェネティックな変化を試験化学物質と溶媒に分解して純粋な変動遺伝子のみによるシグナル解析、或いはコーンオイル以外の溶媒についての検討も加える予定である。

「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、一般の毒性学研究者にも使いやすい GUI を備えた解析ソフトウェアの導入により、遺伝子発現解析工程の効率と精度の向上が見込まれ、従来は困難であった規模の毒性シグナル連動解析が可能になると期待される。また、SHOE と Percellome の連動解析においても AGCT によるクラスタリング工程を前処理に加えることにより分解能と効率が向上し、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】においては本研究と先行研究の成果物である解析ソフトウェア及び 15 化学物質・30 データセットの新型反復曝露実験データセットより、反復曝露基線反応データベースを構築した。全データベースを使用した化学物質クラスタリングの結果は、反復曝露トランスクリプトームデータベースとして高い性能を示すとともに、新型反復曝露実験プロトコルにより 14 日間反復曝露試験を 4 日間反復曝露試験で代替できる可能性を示唆した。今後は基線反応データベースを利用した分子毒性機序解析や深層学習アルゴリズム等を用いた、単回曝露トランスクリプトームデータから[4+1]の新型反復曝露トランスクリプトームデータの推測を試みる。

「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、エストラゴールの毒性発現機構の推定を行なった。「エストラゴールは遺伝子発現レベルにおいては PPAR α の活性化が主な生理活性であり、PPAR α 活性化はげっ歯類では肝発がんにつながるもののヒトにおいては健康上のリスクは高くないことが示唆される」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。

以上、本年度を加えた 3 年間の研究により、単回曝露実験、及び、4 日間程度の短期間の「新型反復曝露実験」における「過渡反応」と「基線反応」の吟味により、反復曝露による慢性影響の分子機構を明らかにすることが可能であること、及び、その解析の迅速化に必要なソフトウェア群開発、データ公開環境整備、人工知能 (AI)、特に深層学習 (Deep Learning) を導入した専門家判断 (Expert Judge) を支援する環境の開発が進んだことで、毒性評価・予測システムの構築の方向性が更に明瞭になったと考える。

今後、包括的な分子毒性学的な解析を進めると共に、更に、AI 先端技術の導入・活用を行い、分子機序に基づいた毒性評価・予測システムの完成を目指す。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 登田 美桜、北嶋 聡、マリンバイオトキシノー
フグ毒のリスク評価について、中毒研究(Jpn. J.
Clin. Toxicol.) 2020, 34, 58–62

(2) Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa,
Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya,
Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi: Novel
hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle
(EV)-associated miRNAs induced by CCl4. Toxicol
Rep. 2020; 7: 685-692.
[DOI 10.1016/j.toxrep.2020.05.002].

(3) Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Satoshi Kitajima,
Kentaro Tanemura: Effect of Vitamin E deficiency on
spermatogenesis in mice and its similarity to aging.
Reproductive Toxicology 2020; 98: 225-232.
[DOI: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

(4) Nock R, Poluliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell CR,
Heimhofer C, Shibana K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima
S, Kanno J, Akama K, Kitano H, A Geometric
Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner
cluster structures of time-series gene expressions.
PLOS ONE 2020, 15(7): e0233755.
[DOI: 10.1371/journal.pone.0233755]

(5) Osorio, R. S. A., Nyström-Persson, J. T., Nojima, Y.,
Kosugi, Y., Mizuguchi, K., & Natsume-Kitatani, Y.
Panomicon: A web-based environment for interactive,
visual analysis of multi-omics data. Heliyon, 2020, 6(8),
e04618. [DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04618]

(6) Esaki, T., Horinouchi, T., Natsume-Kitatani, Y.,

Nojima, Y., Sakane, I., & Mastsui, H. Estimation of
relationships between chemical substructures and
antibiotic resistance-related gene expression in bacteria:
Adapting a canonical correlation analysis for small
sample data of gathered features using consensus
clustering. Chem-Bio Informatics Journal, 2020, 20, 58-
61. [DOI: 10.1273/cbij.20.58]

(7) Chen, Y. A., Park, J., Natsume-Kitatani, Y.,
Kawashima, H., Mohsen, A., Hosomi, K., ... & Miyachi,
M. MANTA, an integrative database and analysis
platform that relates microbiome and phenotypic data.
PLOS ONE, 2020, 15(12), e0243609.
[DOI: 10.1371/journal.pone.0243609]

(8) 夏目 やよい, 水口 賢司, 新薬創出を加速する
AIの開発, Precision Medicine, 2020, Vol.3 No.5, PP.10-
13 (410–413) , 株式会社北隆館

2. 学会発表

(1) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and
Satoshi Kitajima、Comprehensive Histone, DNA
methylation, and mRNA expression analysis of murine
liver repeatedly exposure to Chemicals - Percellome
Project 2021 update - The SOT 60th Annual Meeting,
(2021.3.), Web meeting, USA, e-poster.

(2) 菅野 純、外来性化学物質 (xenobiotics) により
誘発される生体反応の分子機構解析と創薬加速、第
3回医薬品毒性機序研究会 (2021-01-15)

(3) 菅野 純、発生発達期暴露による情動認知行動
毒性の背景とその評価系に関する国際的動向。第
47回日本毒性学会学術年会・シンポジウム
(2020.6.30)、オンライン、口演

(4) 菅野 純、シグナル毒性の概念とその拡張. 第47回日本毒性学会学術年会・ワークショップ(2020.7.1)、オンライン、口演

(5) 菅野 純、職場環境における化学物質の毒性発現機構の多様性と評価・管理の連関性に関する一考察、第289回日本産業衛生学会 関東地方会例会(2020. 8.29)、口演

(6) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima、Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS(2020.10.2), Special lecture, Online, Oral presentation.

(7) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (2020.11.12-13) e-poster.

(8) 種村 健太郎、菅野 純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) オンライン 口演

(9) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(10) 高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(11) 種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドローモイ酸投与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2～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(12) 齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(13) 種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(14) 菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(15) 小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(16) 大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(17) 相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of

PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第47回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン、口演

(18) Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima、CRISPR/Cas9システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非意図的変異、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(19) 原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロジェン受容体 α 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第113回日本繁殖生物学会大会(2020.9.25.)、オンライン

(20) 五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栗形麻樹子、北嶋聡、CRISPR/Cas9のゲノム編集によるノックインマウス作製時に認められたオンターゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24.)、オンライン

(21) 北嶋聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第18回食品安全フォーラム(2020.11.27.)

(22) Samik GHOSH, Takeshi HASE, Ayako YACHIE, Sucheendra Kumar PALANIAPPAN (2020) Towards an optimal dose of AI in biomedicine and healthcare. 第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(23) 夏目 やよい「解析ツールを用いたオミックスデータからの知識抽出とその精度管理」第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(24) 夏目 やよい「新薬創出を加速する人工知能の開発 全体概要・特発性肺線維症」令和元年度PRISM成果報告会(2020/7/20) オンライン

(25) 夏目 やよい「臨床情報からのデータ駆動的な患者層別化に向けて」2020年日本バイオインフォマティクス学会年会・第9回生命医薬情報学連合大会(2020/09/01) オンライン

(26) (夏目 やよい)「オーファン医薬品開発における臨床情報とAIの活用について ～特発性肺線維症を例に～」希少疾病用医薬品等の開発振興に係る説明会(2020/10/28) オンライン

(27) Tsuyoshi Esaki, Takaaki Horinouchi, Yayoi Natsume-Kitatani, Yosui Nojima, Iwao Sakane, Hidetoshi Matsui. Estimation of relationships between chemical substructures and gene expression antibiotic-resistance of bacteria: Adapting canonical correlation analysis for small sample data by gathered features using consensus clustering. CBI学会2020年大会(2020/10/30) オンライン

(28) 夏目 やよい「官民研究開発投資拡大プログラムPRISM 創薬AI社会実装への展望」IQVIAジャパンメディアセミナー(2020/12/8) オンライン

II. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2021-13264

発明者：夏目やよい、上田修功

発明の名称：複数の項目を関係付けるための方法、システム、およびプログラム

出願人：医薬基盤・健康・栄養研究所、理化学研究所

出願日：2021年1月29日

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）
令和2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）

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
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
客員研究員

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。

本分担研究では、メトトレキサート及び、サリドマイドの新型反復プロトコル*の2実験（[4+1]及び[14+1]）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各々の化学物質に特徴的な要素を抽出した。メトトレキサートは、特に先行研究で実施した化学物質と比較すると、発現変動する遺伝子数が過渡反応、基線反応ともに少なかったが、特徴的な変化として、ヘモグロビン関連遺伝子（Hba-a1/Hba-a2、Hbb-b1/Hbb-b2 等）及びヘプチジン（Hamp2）の発現への影響が認められ、今後詳細な解析を進めるが、メトトレキサートによる酸化ストレス低下のシグナルが、ヘモグロビン合成抑制に働き、鉄欠乏状態類似の状況を誘発し、ヘプチジンの発現を代償性に誘発した可能性が指摘された。サリドマイドについては、反復曝露による2時間目のシグナル系遺伝子の過渡反応の抑制傾向及び、NRF2系を介した酸化ストレス系の基線反応の増強を確認した。なお、3年前の研究計画ではN-エチル-N-ニトロソウレア、及び、パクリタキセルの実験を予定していたが、これまでの解析結果に鑑み、細胞増殖への影響がより強い化学物質を選択した方が適切と判断したため、上記の化学物質に変更することとした。

(*) 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、代表的物質について反復曝露のネットワーク解析を行って、毒性機序の解明及び、その予測評価技術を開発する。

B. 研究方法

● 試薬及び動物：

メトトレキサート (Methotrexate; 分子量：454.44、Cas No.: 59-05-2、純度>98%、富士フイルム和光純薬(株)、以下 MTX)、及びサリドマイド (Thalidomide; 分子量：258.23、Cas No.: 50-35-1、純度>99%、Carbosynth、以下 Thal) 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 MTX)及び Thal の曝露量はそれぞれ 0、100、300、1,000 mg/kg 及び、0、100、300、1,000 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。MTX の 4 回反復投与の用量は 100mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、100、300、1,000 mg/kg とした。Thal に関しては 14 回反復投与 (14 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[14+1]と表記) を実施し、この際の投与用量は 700mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、100、300、1,000 mg/kg とした。12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (日

本チャールスリバー)を用い溶媒は MTX 及び Thal、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、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量化手法) 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。これにより自動抽出された ps から、さらに専門家による Visual Selection を行い、生物学的に有意と判定される変化を示した ps を厳選して解析に使用した。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

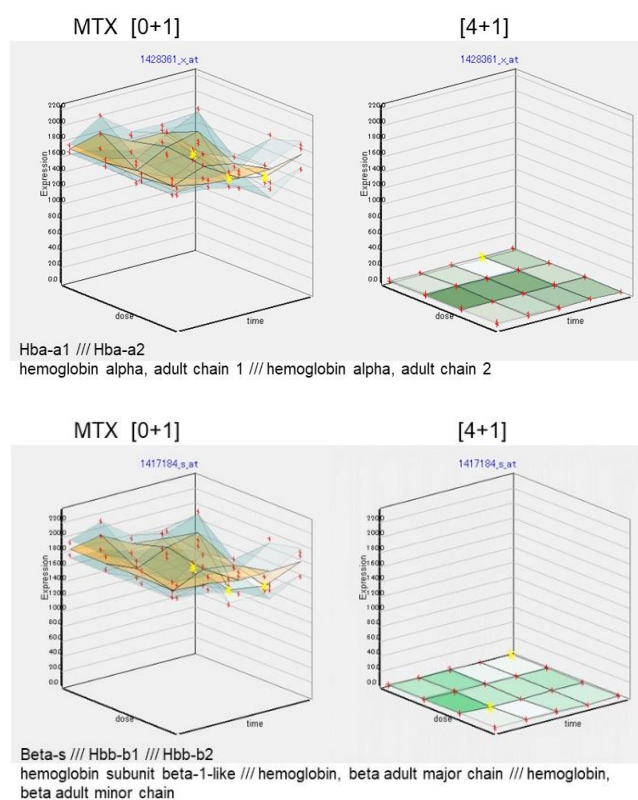
当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

令和 2 年度は、MTX 及び、Thal 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。

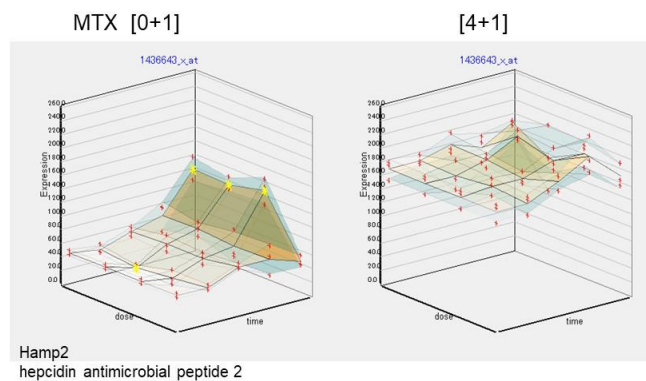
MTX の新型反復プロトコルの実験 ([4+1]) を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と各々の化学物質に特徴的な要素を抽出した。MTX は、特に先行研究で実施した化学物質と比較すると、発現変動する遺伝子数が過渡反応、基線反応ともに少なかったが、特徴的な変化として、ヘモグロビン関連遺伝子 (Hba-a1/Hba-a2、Hbb-b1/Hbb-b2 等) とヘプチジン (hepcidin、Hamp2) の発現への影響が認められた。

ヘモグロビンの産生は赤血球系の細胞に限られるという定説は、2010 年ごろより変化し、肺、脳、腎、肝等の非赤血球系の組織における産生が報告される様になっており、本実験の結果は、その様な知見に合致するものであると考えられた。

本実験では、上図の様に MTX の 4 日間反復投与により、ヘモグロビン遺伝子発現が 200 コピー/細胞から、数コピー/細胞まで低下していた。



これに対し、下図の様にヘプチジンは、4日間反復投与により発現が上昇した。ヘプチジンは肝にて合



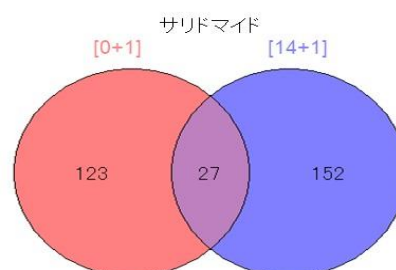
成される因子で、小腸上皮、骨髄、或いは鉄処理に当たる脾臓マクロファージなどの細胞膜上のFerroportin (Scl40A1) が鉄のトランスポーターであると同時にヘプチジンの受容体として機能し、体内の鉄の恒常性を維持する機構の中心的機能を有しているとされる。遺伝的ヘモジデロース疾患の解析によりヘプチジン欠乏状態はヘモジデロースを誘発し、過剰産生状態は、慢性炎症等に伴う状況での鉄欠乏性貧血が該当するとされている。

MTX の作用に一酸化窒素 (NO) 合成阻害が指摘されており、酸化ストレスの低下に寄与すると考えられる。他方、非アルコール性脂肪性肝炎 NASH のヒト肝における知見等から、肝においてヘモグロビン合成が酸化ストレスにより誘導され、これはエリスロポイエチン制御によらず、肝細胞内の制御によることが示唆されている。また、ヘモグロビンは酸素輸送の他、NO を結合し血中から NO を除去する NO スカベンジ作用 (一酸化炭素によりヘモグロビンから NO が放出される現象あり) が報告されている。

詳細な機構解析が必要であるが、現段階において、肝細胞内において MTX による酸化ストレス低下のシグナルが、ヘモグロビン合成抑制に働き、鉄欠乏状態類似の状況を誘発し、ヘプチジンの発現を代償性に誘発した可能性が指摘される。

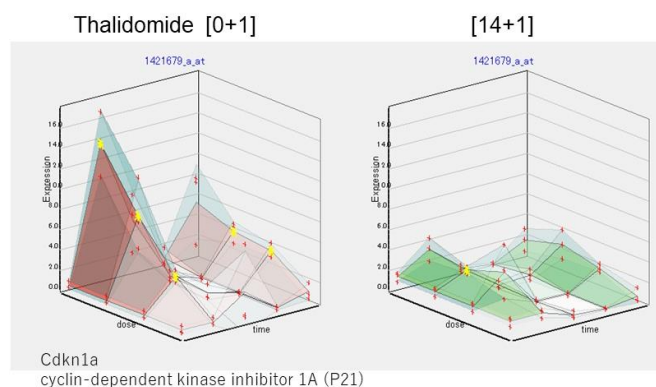
Thal の[14+1]による発現変動遺伝子の数は 179 で

あり、[0+1]の 150 に比して若干増加した。

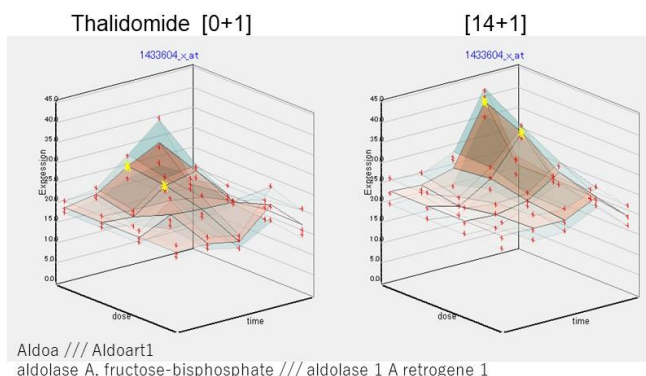


[0+1]において発現し、[14+1]において発現しなくなった遺伝子は 2 時間目に発現する遺伝子が主体であり、PXR/RXR、GR 等

の核内受容体を介して早期シグナル系の遺伝子群であった。下に Cdkn1a を示す。

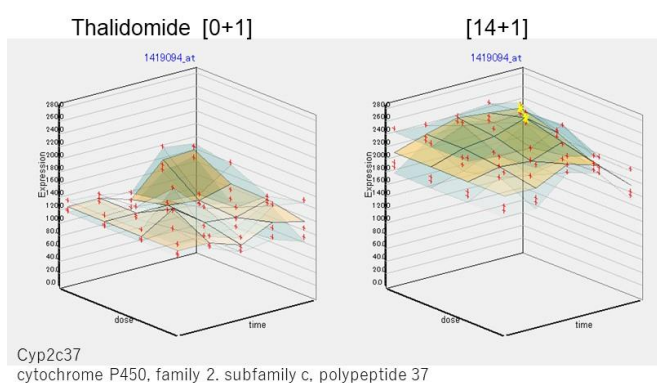
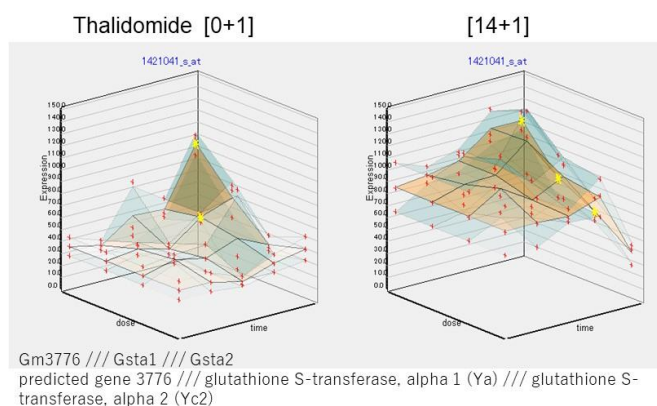


逆に[0+1]において発現しておらず、[14+1]において発現した遺伝子は 8 時間目にピークを有する遺伝子が主体であり、NRF2 を介した酸化ストレス反応系の遺伝子が増加し、フェロプトーシス等、細胞障害に関わるシグナル系の遺伝子が含まれていた。

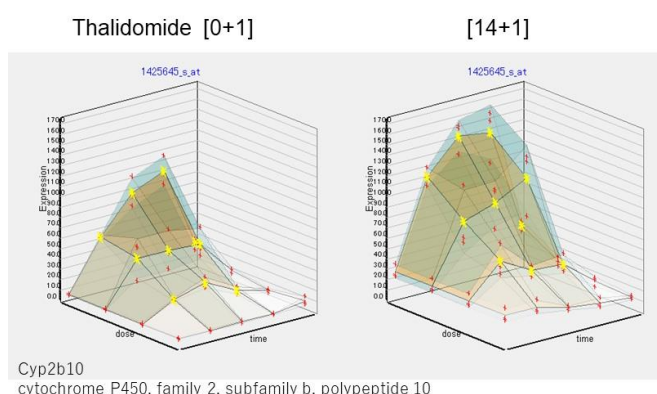


14 日間の反復投与により徐々に発現値が偏倚する基線反応の解析の結果、基線が上昇した遺伝子数は

336、下降した遺伝子数は 53 であった。上昇した遺伝子群には、グルタチオンを介した解毒、FXR/RXR 活性化、等の代謝系に関わる遺伝子が含まれていた。



下図の Cyp2b10 の様に、基線の上昇と共に、過渡反応も増強する例も見られた。



下降した遺伝子群には特徴がはっきりせず文献情報的な意味づけは困難であった。

なお、3年前の研究計画ではN-エチル-N-ニトロソウレア、及び、パクリタキセルの実験を予定していた

が、これまでの解析結果に鑑み、細胞増殖への影響がより強い化学物質を選択した方が適切と判断したため、上記の化学物質に変更することとした。

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、Thal、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、クロルピリフォス (CPF)、5-アザシチジン (AZC) と比較すると、MTX (MTX) は、発現変動する遺伝子数が過渡反応、基線反応ともに非常に少なかったが、特徴的な変化として、ヘモグロビン関連遺伝子及び、ヘプチジンの発現への影響が認められた。この変化の分子機構の詳細な解析を進めるが、現段階において、肝細胞内において、MTXが酸化ストレスのシグナルを介して、ヘモグロビン合成抑制に働くこと、このヘモグロビン合成への影響は、鉄代謝を直接的に攪乱したのではなく、NO等の炎症メディエータ、或いは、酸化ストレスのレベルを変動させたことによる影響であることが示唆された。その際のメディエータとしてヘプチジン合成の誘導が関与していると考えられた。

本年度研究成果により、MTXについては今まで検討した化学物質には認められなかった新たな遺伝子発現ネットワークが描出された。また、解析手法やツールの利用範囲が拡充したことから、これらの結果を、先行研究のデータに対しても還元して、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精度よく、網羅的に解析する。既に得ている対照群動物のエピゲノム情報 (WGBSによる網羅的DNAメチル化情報、ChIP-Seqによる網羅的ヒストン修飾情報) や、エンハンサー・プロモータ領域の特性から、ヘモグロビン遺伝子の様な、クラスターとしての発現調整を受けている遺伝子群の遺伝子発現

制御機構の詳細の分析(SHOE、AGCT活用、GARUDA活用を含む)を追加して進める。Thal については、反復投与により NRF2 系などを介した酸化ストレス応答の増強、細胞・組織障害を示唆するネットワークの活性化がより明瞭となり、その上流のシグナル伝達ネットワークの詳細が、今後予定される網羅的エピジェネティクス解析により明らかにする予定である。

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引き続き試みる予定である。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。今期中盤に問題となった COVID-19 による試薬等の納品遅延による影響はほぼ回復した。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例として、医薬品として用いられている物質の内、作用標的が広いと考えられるものについて、本年度は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、MTX については発現変動する遺伝子数が少ないものの、今までのデータには無い特徴的な遺伝子発現ネットワークとして、ヘモグロビン関連遺伝子及び、鉄の恒常性維持機構に関わるヘプチジンの発現への影響が認められた。詳細な解析を進めるが、現段階において、肝細胞内において MTX が酸化ストレスのシグナルを介してヘモグロビン合成の抑制に働き、NO を含む酸化ストレスの変動を介してヘプチジン遺伝子発現の誘導を来したものと考えられた。

本年度研究成果により、新たな遺伝子発現ネットワークが描出され、既に得ている対照群動物の DNA メチル化やヒストン修飾のエピゲノム情報を参照することで、ヘモグロビン遺伝子の様な遺伝子クラスター制御に関する分析も進めることが可能と

なったと考える。Thal の 14 日間反復曝露についても反復投与により NRF2 系を介した酸化ストレスの増強が明確となり、シグナル伝達の上流から下流の各種の病態予測との関係を含め、分子レベルでの解析を進める。

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、あるいは 14 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 (3 年間分)

1. 論文発表

●令和 2 年度

(1) Nock R, Poluliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell CR, Heimhofer C, Shibani K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama K, Kitano H., A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. PLOS ONE 15(7): e0233755. 2020

[DOI: 10.1371/journal.pone.0233755]

●令和元年度

(2) 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]

(3) 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]

●平成 30 年度

(4) 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, 13(10): e0205702.

[DOI: 10.1371/journal.pone.0205702]

2. 学会発表

●令和 2 年度

(1) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima、Comprehensive Histone, DNA methylation, and mRNA expression analysis of murine liver repeatedly exposure to Chemicals - Percellome Project 2021 update - The SOT 60th Annual Meeting, (2021.3.), Web meeting, USA, e-poster.

(2) 菅野 純、外来性化学物質 (xenobiotics) により誘発される生体反応の分子機構解析と創薬加速 第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021-01-15)

(3) 菅野 純、発生発達期暴露による情動認知行動毒性の背景とその評価系に関する国際的動向. 第 47 回日本毒性学会学術年会・シンポジウム (2020.6.30)、オンライン、口演

(4) 菅野 純、シグナル毒性の概念とその拡張. 第 47 回日本毒性学会学術年会・ワークショップ (2020.7.1)、オンライン、口演

(5) 菅野 純、職場環境における化学物質の毒性発現機構の多様性と評価・管理の連関性に関する一考察、第 289 回 日本産業衛生学会 関東地方会

例会 (2020. 8.29) 、口演

(6) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima、Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS(2020.10.2), Special lecture, Online, Oral presentation.

(7) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (2020.11.12-13) e-poster.

(8) .種村 健太郎、菅野 純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) オンライン 口演

(9) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(10) 種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドローモイ酸投与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2 ～、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(11) 齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第 47 回日本毒性学会学術年会

(2020.6.29.) オンライン

(12) 種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(13) 菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(14) 小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(15) 相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第47回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン、口演

(16) 原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロゲン受容体 α 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子発現プロファイル解析、第113回日本繁殖生物学会大会(2020.9.25.)、オンライン

●令和元年度

(17) 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.

(18) 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.

(19) 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

(20) 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.

(21) 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

(22) 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

(23) 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

●平成 30 年度

(24) 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.

(25) 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

(26) 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

(27) 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

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

(29) 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

(30) 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.)

(31) 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

(32) 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.)

(33) 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.)

③④ 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

③⑤ 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

③⑥ 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.

③⑦ 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)

③⑧ 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)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働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）

令和2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。

令和2年度は、令和元年度までの ChIP-Seq 解析で認められた化学物質の反復投与によるヒストン修飾の変化に、実験に使用した溶媒の反復投与がどのように且つ、どの程度影響しているか、について網羅的に評価するために、使用した溶媒の一種である「コーンオイル」のみを反復投与した際のマウス肝のエピジェネティクス測定を実施・解析し、比較検討した。具体的には、クロマチン免疫沈降アッセイ（ChIP）と次世代シーケンサーを組み合わせたクロマチン免疫沈降シーケンス法（ChIP-Seq）を利用して、コーンオイルを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を網羅的に解析し、検討した。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。

解析の結果、四塩化炭素の反復投与の際に認められたヒストン修飾の変化の多くは、コーンオイル（溶媒）の反復投与の影響ではないことが明らかとなった。一方、コーンオイルの反復投与においても、ヒストン修飾の変化が起こる領域が同様に単離されたことから、本溶媒による影響も確実に存在することも明らかとなった。今後は、コーンオイル以外の溶媒についての検討も加える予定である。

(*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

(**) 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。

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。令和 2 年度は、令和元年度までの ChIP-Seq 解析で認められた化学物質の反復投与によるヒストン修飾の変化に、実験に使用した溶媒の反復投与がどのように且つ、どの程度影響しているか、について網羅的に評価するために、使用した溶媒の一種である「コーンオイル」のみを反復投与した際のマウス肝のエピジェネティクス測定を実施・解析し、比較検討した

B. 研究方法

●次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降シーケンス法（ChIP-Seq）

溶媒として使用しているコーンオイル（C8267、Sigma-Aldrich）を 14 日間反復投与した後、コーンオイルを投与し 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ー解析用のライブラリを作成し、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。

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・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

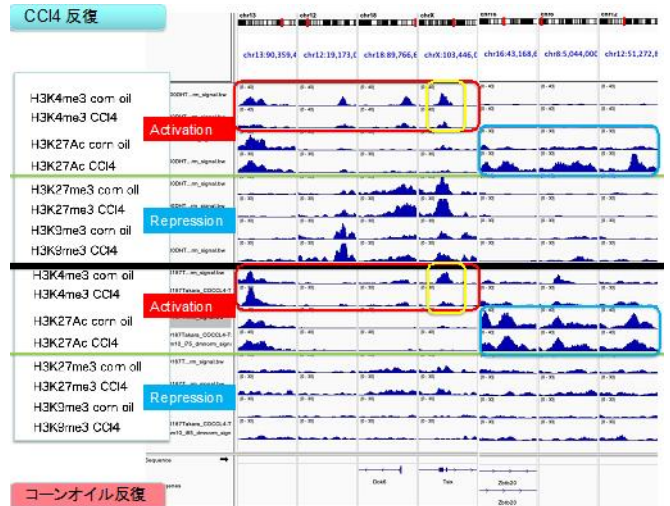
反復曝露時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾等の遺伝子発現修飾機構 (所謂エピジェネティクス) が関わる可能性が指摘される事から、本分担研究では次世代シーケンサを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてエピジェネティックな変化を網羅的に検討する。

今までに延べ 30 件の新型反復曝露実験を行い本年度データベース化するが、これを利用して全データを横断的に解析する際、より純粋に試験化学物質の曝露影響を評価するため、溶媒影響の詳細を明らかにしておく必要があると考えられる。今回は脂溶性の化学物質を投与する際に溶媒として使用するコーンオイル自体の反復曝露影響について解析した。我々の先行研究である四塩化炭素の反復投与によるヒストン修飾への影響を解析した際には、溶媒として、コーンオイルを使用していたことから、得られた結果の比較検討を行った。

その結果、四塩化炭素の反復投与により見られていたヒストン修飾の変化の多くは、コーンオイルの反復投与では見られないことから、溶媒の反復投与

による影響ではなく、四塩化炭素そのものの反復投与の影響によると結論できた。

しかし、コーンオイルの反復投与によって、四塩化炭素の反復投与と同じ挙動を示す領域も存在する。これは、コーンオイルの反復投与による影響を見ていたと結論できる。



図：四塩化炭素の反復投与によって、ヒストン修飾が抑制される領域 (赤枠) および亢進する領域 (青枠) は、コーンオイルの反復投与によっても変化しないことから、これらの原因は四塩化炭素の反復投与影響と結論できる。しかし、黄色枠の領域では、コーンオイルの反復投与によっても同じ挙動を示すので、溶媒影響であると結論できる。

また、四塩化炭素の反復投与では差が顕著ではなかったが、コーンオイルの反復投与を行うことで、コーンオイルの反復投与影響が起こる領域が多く存在することもわかった。

[DOI: 10.1016/j.reprotox.2020.10.003].

Toxicol Sci 2018, 5: 167-170 [DOI: 10.2131/fts.5.167]

(3) Nock R, Poluliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell CR, Heimhofer C, Shibana K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama K, Kitano H, A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. PLOS ONE 2020, 15(7): e0233755.

[DOI: 10.1371/journal.pone.0233755]

(4) Osorio, R. S. A., Nyström-Persson, J. T., Nojima, Y., Kosugi, Y., Mizuguchi, K., & Natsume-Kitatani, Y. Panomicon: A web-based environment for interactive, visual analysis of multi-omics data. Heliyon, 2020, 6(8), e04618. [DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04618]

●令和元年度

(6) 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 13, 56. pii: mol.119.117333. [DOI: 10.1124/mol.119.117333]

(7) 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]

●平成 30 年度

(8) 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

2. 学会発表

●令和 2 年度

(1) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima, Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS (2020.10.2), Special lecture, Online, Oral presentation.

(2) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(3) 高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(4) 種村 健太郎、佐々木 貴熙、齊藤 洋克、高橋 祐次、北嶋 聡、菅野 純、発達期マウスへのドーモイ酸投与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2～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(5) 齊藤 洋克、原 健士朗、富永 貴志、中島 欽一、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量ペルメトリンの早期慢性ばく露による成熟後の雄マウス行動影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(6) 種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情

動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

⑦ 菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

⑧ 小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(9) 大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

⑩ 相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第47回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン、口演

(11) Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima、CRISPR/Cas9システムを用いたマウス受精卵のゲノム編集におけるオンターゲットの多様な非意図的変異、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(12) 原唯香、平舘裕希、原健士朗、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、エストロジェン受容体 α 非翻訳領域遺伝子改変マウスの学習記憶不全と遺伝子

発現プロファイル解析、第113回日本繁殖生物学会大会(2020.9.25.)、オンライン

(13) 五十嵐智女、安彦行人、小野竜一、高橋雄、栞形麻樹子、北嶋聡、CRISPR/Cas9のゲノム編集によるノックインマウス作製時に認められたオンターゲットの多様な非意図的変異、日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会(2020.11.24.)、オンライン

⑭ 北嶋 聡、食品トキシコゲノミクスと毒性予測、第18回食品安全フォーラム(2020.11.27.)

●令和元年度

⑮ 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.

(16) 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.

⑰ 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

⑱ 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.

(19) 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

(20) 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

(21) 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

●平成 30 年度

(22) 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.

(23) 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

(24) 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

(25) 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

(26) 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.)

(27) 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

⑳ 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
に一、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

㉑ 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.)

㉒ Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono,
Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Proje
ct: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54t
h Congress of the European Societies of Toxicolo
gy (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belg
ium

㉓ Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi
Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko H
irose, Category Assessment of Repeated-dose Hepa
totoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD I
ATA Case Studies Project in 2016, the 54th Cong
ress of the European Societies of Toxicology (EU
ROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

㉔ Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki,
Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Hiroaki Kitano.
DToX: Deep neural network-based computation
al framework to analyze omics data in Toxicology.
OPENTOX ASIA 2018, Asahi Seimei Otemachi
Building, Tokyo, May 25, 2018.

㉕ Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S.,
Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “P
ercellome meets Garuda: toxicogenomics approach
to evaluate the toxicity of valproic acid” AsiaTo
x 2018, (2018.6.18, Thailand), (Poster)

㉖ Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S.,
Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “I
nferred role of crosstalk between PPARα and ER
signaling pathways in the toxicity of valproic aci
d: systems toxicology approach” ISMB 2018, (201
8.7.7, 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（化学物質リスク研究事業）
令和2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 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

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。

先行研究で実施した 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遺伝子発現変動のデータベース構築が進みつつある。単回投与による遺伝子発現変動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・改良を進めた。

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基線反応データベース（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（BaselineComparison）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 の内部データ構造を抜本的に再設計した結果、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。

令和2年度は、平成30年度に in house 開発した BaselineComparison ソフトウェアを利用して「反復曝露基線反応データベース」を構築し、基線反応による化学物質クラスタリングなどの、Percellome データベース全体を対象とする解析を行ってデータベースの性能や新型反復曝

露プロトコルの妥当性を確認した。また本データベースを早期にオンライン提供すべく、令和元年度と同様、オンライン公開に必要な Web アプリケーションのアップデートを進めた。

-
- (*) 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 開発及び Web アプリケーション開発は 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。

反復曝露基線反応データベースの構築に際しては、平成 30 年度（本研究一年目）に in house 開発した BaselineComparison ソフトウェアを使用した。本データベースに収録された全データを対象とする化学物質クラスタリングは Google Colaboratory (Jupyter core ver.4.5.0、

jupyter notebook ver.5.2.2)上で Python (ver.3.6.9)及び解析ライブラリ numpy (ver.1.19.4)、pandas (ver.1.1.5)、scikit-learn (ver.0.22.2.psot1)を用いて実行した。抽出された遺伝子群のアノテーション解析は DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) を利用した。

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。

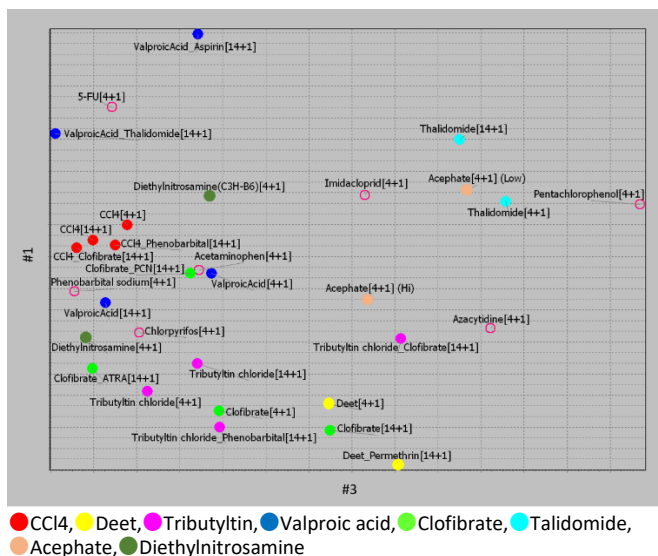
今年度は、まず先行研究から本研究を通じて実施した全ての反復曝露実験の集大成として反復曝露基線反応データベースを構築した。具体的には平成 30 年度（本研究一年目）に in house 開発した BaselineComparison を利用して、本年度までに GeneChip 解析を行った新型反復曝露実験データセット 30 件より、有意な反応を示した遺伝子リストを生成した。false negative を減らすために、抽出条件は最大発現レベル 1 コピー/細胞以上、且つ、基線を構成する 4 時点データポイントのうち 3 カ所以上で $p < 0.05$ の有意差を示し、尚且つ、同様に基線を構成する 4 時点データポイントのうち 3 カ所以上で 1.5 倍以上の発現変動比を示すもの、という比較的緩い設定にした。全データセットのリストと、各データセットにおける抽出遺伝子数は下表の通り。

| 新型反復曝露 (A + A型) | | | | |
|---------------------------|---------------------------|--------|----------------------------|---------|
| 反復曝露 | 最終日単回曝露 | 反復期間 | BaselineComparison 出力件数 | strain |
| 5-fluorouracil | 5-fluorouracil | [4+1] | 2582 | C57BL/6 |
| Acephate | Acephate | [4+1] | 397, 479* | C57BL/6 |
| Acetaminophen | Acetaminophen | [4+1] | 940 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Valproic acid sodium salt | [4+1] | 389 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Valproic acid sodium salt | [14+1] | 30 | C57BL/6 |
| Azacytidine | Azacytidine | [4+1] | 960 | C57BL/6 |
| CCl4 | CCl4 | [4+1] | 1198 | C57BL/6 |
| CCl4 | CCl4 | [14+1] | 2466 | C57BL/6 |
| Chlorpyrifos | Chlorpyrifos | [4+1] | 568 | C57BL/6 |
| Clofibrate | Clofibrate | [4+1] | 2582 | C57BL/6 |
| Clofibrate | Clofibrate | [14+1] | 4614 | C57BL/6 |
| Deet | Deet | [4+1] | 3546 | C57BL/6 |
| Diethylnitrosamine | Diethylnitrosamine | [4+1] | 1555 | C57BL/6 |
| Diethylnitrosamine | Diethylnitrosamine | [4+1] | 3295 | C3H** |
| Imidacloprid | Imidacloprid | [4+1] | 3296 | C57BL/6 |
| Pentachlorophenol | Pentachlorophenol | [4+1] | 6710 | C57BL/6 |
| Phenobarbital sodium | Phenobarbital sodium | [4+1] | 3075 | C57BL/6 |
| Thalidomide | Thalidomide | [4+1] | 646 | C57BL/6 |
| Thalidomide | Thalidomide | [14+1] | 217 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Tributyltin chloride | [4+1] | 1387 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Tributyltin chloride | [14+1] | 1515 | C57BL/6 |
| 新型反復曝露 (A + B型) | | | | |
| CCl4 | Clofibrate | [14+1] | 966 | C57BL/6 |
| CCl4 | Phenobarbital | [14+1] | 979 | C57BL/6 |
| Clofibrate | Pregnenolone Carbonitrile | [14+1] | 1401 | C57BL/6 |
| Clofibrate | All-trans retinoic acid | [14+1] | 1359 | C57BL/6 |
| Deet | Permethrin | [14+1] | 4914 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Clofibrate | [14+1] | 4953 | C57BL/6 |
| Tributyltin chloride | Phenobarbital | [14+1] | 1910 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Aspirin | [14+1] | 207 | C57BL/6 |
| Valproic acid sodium salt | Thalidomide | [14+1] | 87 | C57BL/6 |

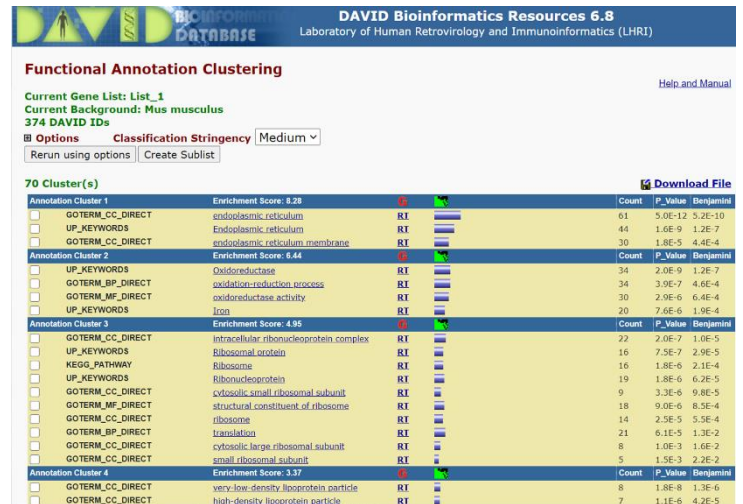
* 投与量が異なる

** strainが異なる

本データベースに登録された反復曝露データセット 30 件の概要を調べるため、反復曝露時に有意な基線反応を示す遺伝子としてデータベースに登録されている 22426 種類、延べ 59747 プローブセットの出現頻度を集計し、これを元に主成分解析を行い、代表例として第 1 成分と第 3 成分により化学物質のクラスタを図示した。



次に 30 件のデータセットのうち 10 件以上において反応した遺伝子についてアノテーション解析を行ったところ、小胞体反応、或いは酸化ストレス応答に関する遺伝子が多いことが示唆された (下図)。



さらに本データベースを早期にオンライン提供すべく、令和元年度 (本研究二年目) と同様、オンライン公開に必要な Web アプリケーションのアップデートを進めた。

D. 考察

本研究一年目に in house 開発した BaselineComparison プログラムを使用して、本研究及び先行研究で生成した 15 化学物質・30 データセットの新型反復曝露実験データより、反復曝露基線反応データベースを構築した。本データベースに収録された全データセットを使用した化学物質クラスタリングでは、反復曝露した化学物質毎に明瞭なクラスタが形成されており、反復曝露によるトランスクリプトーム変化を直接示す基線反応のデータベースとしての高い精度を示した。また [4+1] と [14+1] の反復実験を実施している 4 化学物質のうち 3 化学物

質のクラスタが纏まったことから、14日間反復実験を4日間反復実験で代替できる可能性が高まった。

なお例外となった Clofibrate については、Clofibrate[14+1]と同条件で Clofibrate を14日間反復曝露した A+B タイプの2実験 (A+B タイプの実験とは、A物質=Clofibrate を14日間にわたり全群に一定量を反復曝露し、15日目に単回曝露プロトコルでB物質として Pregnenolone Carbonitrile (PCN)又は All-trans retinoic acid (ATRA)を投与した実験。但し A+B タイプの実験においても、基線反応解析には15日目の単回曝露時の溶媒群を用いるため、基線反応にはB物質投与の影響はなく、A+Aタイプの Clofibrate[14+1]と同等のサンプルとなる)が Clofibrate[4+1]の近傍でクラスタを形成すること、また念のため、A+Aタイプの Clofibrate[14+1]について遺伝子機能解析を行ったところ、Clofibrate[4+1]に比して大きな差異はなく、Clofibrate[14+1]及び Clofibrate[4+1]のいずれにおいても同様の Histone 修飾関係遺伝子の発現変動が確認されたことから、Clofibrate においても基本的には他の化学物質と同様に14日間反復実験を4日間反復実験で代替できる可能性が示唆された。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

本研究と先行研究の成果物である解析ソフトウェア及び15化学物質・30データセットの新型反復曝露実験データセットより、反復曝露基線反応データベースを構築した。全データベースを使用した化学物質クラスタリングの結果は、反復曝露トランスクリプトームデータベースとして高い性能を示すとともに、新型反復曝露実験プロトコルにより14日間反復曝露試験を4日間反復曝露試験で代替できる可能性を示唆した。今後は基線反応データベースを利用した分子毒性機序解析や深層学習アルゴリズム等を

用いた、単回曝露トランスクリプトームデータから[4+1]の新型反復曝露トランスクリプトームデータの推測を試みる。

F. 研究発表 (3年間分)

1. 論文発表

●令和2年度

(1) Nock R, Poluliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell CR, Heimhofer C, Shibani K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama K, Kitano H., A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. PLOS ONE 2020 15(7): e0233755. [DOI: 10.1371/journal.pone.0233755]

●令和元年度

(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]

●平成30年度

なし

2. 学会発表

●令和2年度

(1) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima, Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS(2020.10.2), Special lecture, Online, Oral presentation.

(2) 高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) オンライン

(3) 種村 健太郎、齊藤 洋克、古川 佑介、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(4) 菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、小野 竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(5) 小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化、第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

(6) 相崎 健一、長谷 武志、北嶋 聡、小野 竜一、北野 宏明、菅野 純、Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research、第47回日本毒性学会学術年会(2020.7.1.) オンライン、口演

●令和元年度

(7) 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.

(8) 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.

(9) 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

(10) 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.

(11) 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 パーゼル (スイス), 2019/07/24

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

(13) 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

●平成 30 年度

(14) 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.

(15) 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

(16) 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

(17) 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

(18) 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.)

(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.)

(20) 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

(21) 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

(22) 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.

(23) 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)

②④ 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)

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）
令和2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)

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、従来、解析工程の律速段階となっていた、Perccellome 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逐一抽出する作業を完全自動化すべく、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実施している。

本年度も新たな学習用データを追加して予測能力のより一層の向上を実現した。また予測モデルの判断基準を可視化する explainability model (grad cam)を参考にモデルの最適化を進めた上で、これらを組み込んだユーザーフレンドリな GUI を実装した解析ソフトウェアを開発した。さらに、遺伝子発現パターンによるクラスタリングソフトウェア AGCT と転写制御領域の解析ソフトウェア SHOE の改良を重ね、Garuda Platform のソフトウェア等、複数の解析ツールを使った統合パイプラインを構築・強化した。

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

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 DTOX を構築した。この深層学習モデルでは、有意な遺伝子のうち、化学物質曝露により発現が上昇する(up-regulate)ものを positive 群、低下する(down-regulate)ものを negative 群、さらに有意で無い遺伝子は、non-significant 群として予測する。平成 31/令和元年度には多様な描画角度から 3 次元グラフを作成して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精度を大幅に向上させた。令和 2 年度はさらに特殊パターン（飽和パターンや溶媒群に変動のあるパターンなど）を追加してトレーニングを実施した。

また、DTOX システムに対して、ユーザーが使いやすいグラフィカルユーザーインターフェース(GUI)の実装を進めた。GUI は、python の代表的な GUI 作成用のモジュールである、PYQT5 と、Qt designer を用いて作成を進めた。

DTOX の性能比較のためには、一般的な変動遺伝子解析(DEG: differential expression gene analysis)を利用した。DEG では、投与量が 0 で時間が 0 の場合のデータをコントロール群とし、その他の条件下においてコントロール群と比較して有意に遺伝子発現が大きい若しくは小さい遺伝子群を、その条件下において有意であると見なした。有意性の検定では、t-test で求めた p 値に対して多重検定補正を実行して FDR を求め、FDR < 0.05 である場合に有意であるとした。コントロール以外に 15 条件あるが、15 条件の内、1 条件以上において FDR < 0.05 で log₂ Fold change が 1 以上の遺伝子（ただし、log₂ Fold change が -1 以下となる場合が無い場合）を positive 群とした。一方、15 条件の内、1 条件以上において FDR < 0.05 で log₂ Fold change が -1 以下の遺伝子（ただし、log₂ Fold

change が 1 以上となる場合が無い場合）を negative 群とした。positive 群でも negative 群でも無い遺伝子を、non-significant 群とした。

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

転写領域解析ソフトウェア SHOE 及びクラスタリングソフトウェア AGCT の開発は、Java 言語 (USA, Oracle Inc.) で行った。Garuda Platform 用ソフトウェア (Garuda ガジェット) の開発や他の Garuda ガジェットとの連動については、GarudaDevPack を使用した。性能評価や試験運用には、Percellome データベースより実際の化学物質曝露による遺伝子発現時系列データを用いた。生成クラスタのパスウェイ解析には Ingenuity Pathway Analysis (Germany, QIAGEN)を使用した。

C. 研究結果

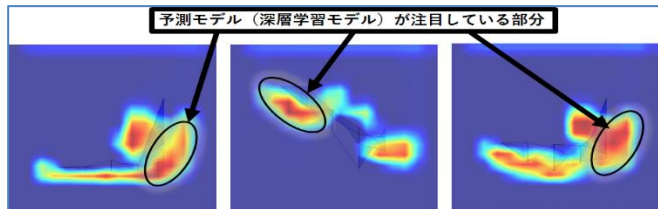
当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

●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て開発した 3 次元グラフの画像解析システム DTOX は、専門家の判断を訓練データとして用いた深層学習モデルによって画像を解析し、各遺伝子を発現上昇、発現低下、それ以外に分類する。平成 31/令和元年度も多様な描画角度から 3 次元グラフを作成してトレーニング画像数を 10 倍に増加させることで、DTOX による分類精度を大幅に向上させ、令和 2 年度も特殊パターン（飽和パターンや溶媒群に変動のあるパターンなど）を追加してトレーニングすることで、分類器の精度と網羅性を向上させた。

また機械学習の予測モデルの判断基準を明確にする explainability model (grad cam : R. R. Selvaraju, M. et al. (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep

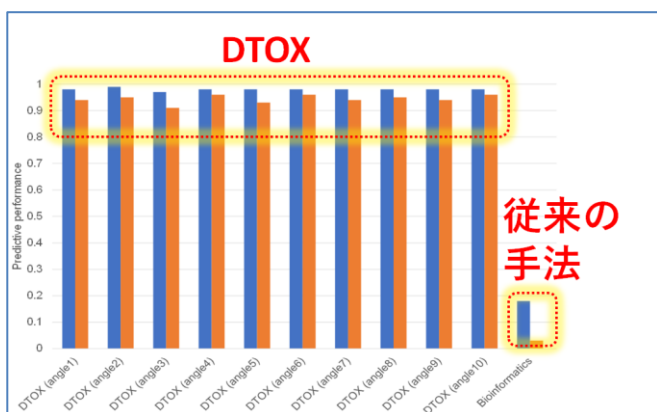
Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7) を導入してモデルの最適化を進めた。



【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。】

深層学習モデルによる DTOX と、一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインとの予測精度の比較を行った結果、下図に示すように、深層学習モデルは 97% 以上の高い正解率を示したが、バイオインフォマティクス解析パイプラインは 18% と非常に低い正解率であった。このことから、我々の深層学習モデル DTOX は、一般的に使用されてきた手法と比べて、より高精度に化合物投与下で影響を受ける遺伝子群を探索できることが示された。

以上の結果から、DTOX を解析パイプラインに組み込むことにより、遺伝子群の探索の精度を大幅に改善することが出来るので、その下流のメカニズムに関する解析 (パスウェイ解析等) をより高精度に行うことが出来るようになることが期待される。



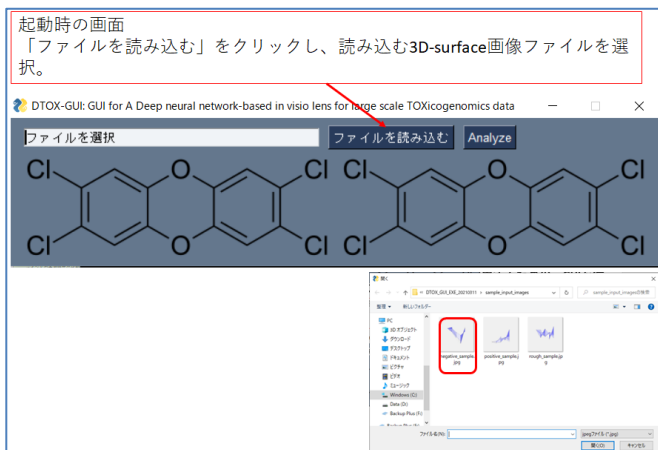
深層学習モデル DTOX の予測精度と一般的なバイオインフォマティクス解析パイプライン(右端)の予測精度の比較

ところで、H3 1 年度の段階では、深層学習モデル DTOX には、グラフィカルユーザーインターフェース (GUI) は実装されておらず、また、DTOX を使用した解析には、深層学習計算を実施するための特殊な計算環境を整える必要があった。そのため、深層学習モデル DTOX を、ユーザーの計算環境にインストールし実行するためには、コンピューターサイエンスと深層学習の専門知識を備えた専門家のサポートが必要不可欠であった。この問題点は、DTOX を研究者等のユーザーが使用するための、大きな障害となっていた。

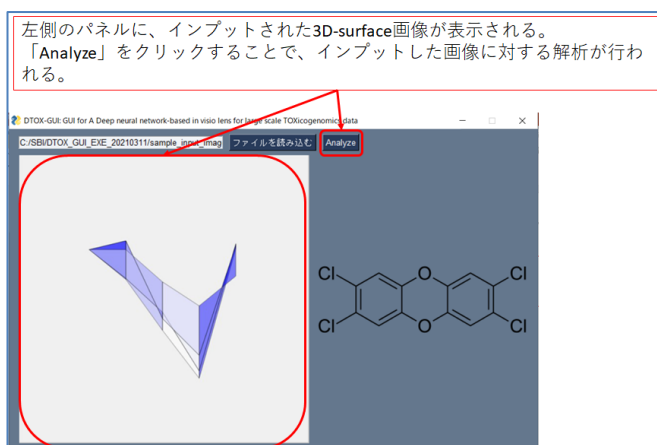
そこで、R2 年度は、研究者等のユーザーが使いやすい GUI の実装を進めた。特に、DTOX で必要なプログラム群とトレーニング済みの予測モデルを圧縮し組み込むことにより、ユーザーの計算環境に依存せず実行可能な、GUI ソフトウェアとして実装を行った。具体的には、研究者等のユーザーは、exe 形式のファイルをクリックするのみで、深層学習モデル DTOX を使用した GUI を利用できる。



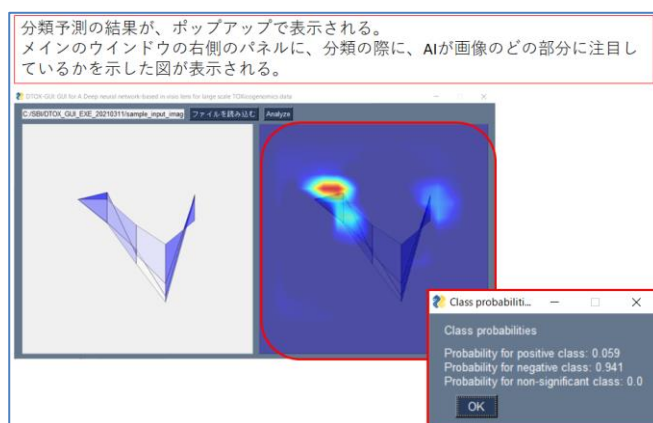
DTOX の GUI では、まず“ファイルを読み込む”ボタンをクリックして、遺伝子の三次元画像ファイルを選択し読み込む。



読み込んだ画像は、の左側のサブウィンドウに表示される。その後、“Analyze” ボタンをクリックすることで、読み込んだ画像に対して、深層学習を用いた解析が実行され予測が行われる。



予測結果はポップアップウィンドウに表示され、一方、深層学習モデルの判断根拠に関する解析の結果は右側のサブウィンドウに表示される。

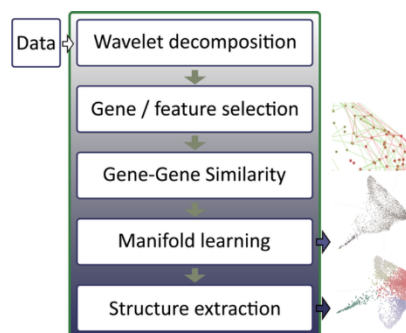


この画像の例では、この遺伝子は化学物質により down-regulation されている確率(negative class の class probability)が 0.941 であると予測されている。また、判断根拠とされた画像領域は赤色でハイライトされている。

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

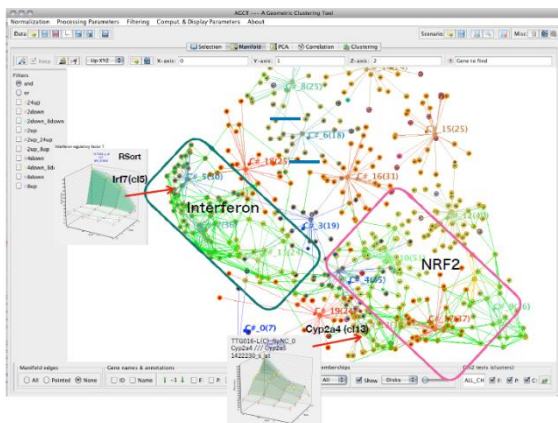
今年度は、先行研究で開発を進めていた転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良に加え、別途開発していたクラスタリングソフトウェア AGCT の整備を完了し、性能評価の上、論文発表を行った。

AGCT は時系列データとしてトランスクリプトームデータを評価してクラスタリング計算を行う。解析ワークフローは次の通り。



性能評価のために Percellome データベースに収録されている Pentachlorophenol(PCP)の単回投与データセットから有意な変動を示した 513 プローブセットの時系列データを抽出し、これを用いて教師なしクラスタリング

を実行した。



この結果、Affinity Propagation method では 21 クラスターが生成され、特に Interferon signaling 関係の遺伝子が集まった 3 クラスターと NRF2 関係の遺伝子が集まった 4 クラスターを得た。これは菅野らが 2013 年に報告した論文 (DOI: 10.2131/jts.38.643) と一致するものであり、解析精度を維持しつつ解析工程の効率化に成功したものである。

また Garuda プラットフォームをハブにして、SHOE や AGCT、その他の Garuda ガジェットの連携を整備し、動作を確認した。

A new Toxicology gadget to connect SHOE, Target Mine and Reactome



D. 考察

本研究で開発した深層学習画像解析システム DTOX の予測精度は、一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインの精度を大きく上回ることが判った。これは、DTOX の深層学習モデルは、研究者が Visual Selection の際に評価している領域を着目して判定していることから、トレーニングにより人の判断のパターンを上手く捉えることで、高い精度を実現している可能性を示唆している。深層学習モデルの精度はデータの数に依存するため、更なる精度の向上を目指して、トレーニングデータの追加増強を進め、これをもとに、深層学習モデルの再チューニングを進める。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

一般の毒性学研究者にも使いやすい GUI を備えた解析ソフトウェアの導入により、遺伝子発現解析工程の効率と精度の向上が見込まれ、従来は困難であった規模の毒性シグナル連動解析が可能になると期待される。また、SHOE と Percellome の連動解析においても AGCT によるクラスタリング工程を前処理に加えることにより分解能と効率が向上し、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。

F. 研究発表 (3 年間分)

1. 論文発表

●令和 2 年度

(1) Nock R, Poluliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell CR, Heimhofer C, Shibani K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama K, Kitano H, A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. PLOS ONE 15(7): e0233755. 2020

[doi: 10.1371/journal.pone.0233755]

●令和元年度

(2) 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.

(3) 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

(4) 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

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

●平成 30 年度

(6) 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;

2. 学会発表

●令和 2 年度

(1) Samik GHOSH, Takeshi HASE, Ayako YACHIE, Sucheendra Kumar PALANIAPPAN (2020) Towards an optimal dose of AI in biomedicine and healthcare. 第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) オンライン

●令和元年度

(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 バーゼル (スイス)*, 2019/07/24

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

(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 徳島, 2019/06/28

●平成 30 年度

(5) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPARα 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*

⑥ 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.

⑦ 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)

(8) 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)

(9) 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)

⑩ 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)

(11) 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)

⑫ 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（化学物質リスク研究事業）
令和二年度 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

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、マウスにおいて肝発がん性が報告されているエストラゴルの Percellome データ解析を行った。マウスにエストラゴル（0, 10, 30, 100 mg/kg BW）を経口投与して一定時間後（2, 4, 8 あるいは 24 時間後）に摘出された肝臓における遺伝子発現プロファイルを Garuda に搭載された様々なガジェットで解析した結果、エストラゴルは特異性の高い PPAR α リガンドであることが示唆された。PPAR α のリガンドがげっ歯類において肝発がん性を呈することはこれまでも多数報告されており、マウスにおけるエストラゴルの肝発がんについても PPAR α 活性化によることが推測される。

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。今年度はハーブのフェンネルやタラゴン、バジルなどの香草に含まれるフェニルプロパンの一種であり、食品や医薬品に香料として使用されているエストラゴルを選択

した。エストラゴルはマウスにおいて肝発がん性が報告されている。エストラゴルを投与したマウス肝臓における Percellome データを Garuda プラットフォームによる解析に供し、それ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

マウスにエストラゴル(0, 10, 30, 100 mg/kg BW)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を選択された。エストラゴル投与により発現変動が認められる遺伝子は、投与量・処理時間・発現量を軸にとった 3D プロットの形状より専門家によって選択され、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)、biocompendium (pathway enrichment 解析)、iPATH3(代謝パスウェイ可視化)、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。更に、データ解析には TargetMine(創薬標的探索支援データウェアハウス、<https://targetmine.mizuguchilab.org/>) や Reactome web 版(パスウェイブラウザ、<https://reactome.org/>)も併用した。

C. 研究結果

Reactome ガジェットや bioCompendium ガジェットによる pathway enrichment 解析の結果、エストラゴル投与から 2 時間後のマウス肝臓において PPAR α の活性化を介した脂質代謝関連遺伝子の発現誘導が起こっている事が示唆された。その後、PPAR α の活性化を示す遺伝子発現パターンはエストラゴル投与から 4, 8 時間後の肝臓においても一番強いシグナルとして認められた。しかし、エストラゴル投与から 24 時間後においては主に PPAR α 活性化による脂質代謝関連遺伝子の発現変動が認められなくなり、目立った特徴的な発現パターンが消失した。全タイムポイントにおいてそれ以外に特徴的な遺伝子発現パターンは認められず、PPAR α に対する特異性の高さが伺える。

D. 考察

Garuda プラットフォームなど複数のツールを用いた Percellome データ解析により、ツール特異的に検出される遺伝子発現パターンを除いて信頼度の高いパターンだけに注目すると、エストラゴルによって発現変動が引き起こされる遺伝子は PPAR α によって発現制御されるもののみが顕著であった。PPAR α のリガンドがげっ歯類において肝発がん性を呈することはこれまでも多数報告されており、マウスにおけるエストラゴルの肝発がんについても PPAR α 活性化によることが推測される。一方、これ

までにバルプロ酸などの他の PPAR α リガンド（であることが示唆される低分子化合物）について Percellome データ解析を実施した結果と比較しても、エストラゴルの PPAR α リガンドとしての特異性が高いことが示された。PPAR α のリガンドがげっ歯類において肝発ガン性を呈する一方、ヒトにおいては同様の現象が認められないことはこれまでも良く知られている。更に、エストラゴルはこれまでに解析を行った他の PPAR α リガンド（バルプロ酸）と比較しても PPAR α への特異性が高く PPAR α シグナル以外のシグナル経路に対する影響が認められないことから、これらのことを踏まえるとエストラゴルの肝発ガン性はヒトにおいて健康上のリスクとなる可能性が低いことが考えられる。

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、エストラゴルの毒性発現機構の推定を行なった。「エストラゴルは遺伝子発現レベルにおいては PPAR α の活性化が主な生理活性であり、PPAR α 活性化はげっ歯類では肝発がんにつながるもののヒトにおいては健康上のリスクは高くないことが示唆される」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

Watanabe, R., Esaki, T., Ohashi, R., Kuroda, M., Kawashima, H., Komura, H., Natsume-Kitatani, Y., & Mizuguchi, K. (2021). Development of an In Silico Prediction Model for P-glycoprotein Efflux Potential in Brain Capillary Endothelial Cells toward the Prediction of Brain Penetration. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 2725-2738
[DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c02011].

Osorio, R. S. A., Nyström-Persson, J. T., Nojima, Y., Kosugi, Y., Mizuguchi, K., & Natsume-Kitatani, Y. (2020). Panomicon: A web-based environment for interactive, visual analysis of multi-omics data. *Heliyon*, 6(8), e04618.
[DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04618]

Esaki, T., Horinouchi, T., Natsume-Kitatani, Y., Nojima, Y., Sakane, I., & Mastsui, H. (2020). Estimation of relationships between chemical substructures and antibiotic resistance-related gene expression in bacteria: Adapting a canonical correlation analysis for small sample data of gathered features using consensus clustering. *Chem-Bio Informatics Journal*, 20, 58-61.
[DOI: 10.1273/cbij.20.58]

Chen, Y. A., Park, J., Natsume-Kitatani, Y., Kawashima, H., Mohsen, A., Hosomi, K., ... & Miyachi, M. (2020). MANTA, an integrative database

and analysis platform that relates microbiome and phenotypic data. *PloS one*, 15(12), e0243609.

[DOI: 10.1371/journal.pone.0243609]

夏目やよい, 水口賢司, 新薬創出を加速する AI の開発, *Precision Medicine*, Vol.3 No.5, PP.10-13 (410-413), 株式会社北隆館, 2020

2. 学会発表

「解析ツールを用いたオミックスデータからの知識抽出とその精度管理」

第 47 回日本毒性学会学術年会

○ 夏目やよい

オンライン, 2020/06/30

「新薬創出を加速する人工知能の開発 全体概要・特発性肺線維症」

○ 夏目やよい

令和元年度 PRISM 成果報告会

オンライン, 2020/7/20

「臨床情報からのデータ駆動的な患者層別化に向けて」

○ 夏目やよい

2020 年日本バイオインフォマティクス学会年会・第

9 回生命医薬情報学連合大会

オンライン, 2020/09/01

「オーファン医薬品開発における臨床情報と AI の活用について ～特発性肺線維症を例に～」

○ 夏目やよい

希少疾病用医薬品等の開発振興に係る説明会
オンライン, 2020/10/28

Estimation of relationships between chemical substructures and gene expression

antibiotic-resistance of bacteria: Adapting canonical correlation analysis for small sample data by gathered features using consensus clustering.

○ Tsuyoshi Esaki, Takaaki Horinouchi, Yayoi Natsume-Kitatani, Yosui Nojima, Iwao Sakane, Hidetoshi Matsui.

CBI 学会 2020 年大会

オンライン, 2020/10/30

「官民研究開発投資拡大プログラム PRISM 創薬 AI 社会実装への展望」

○ 夏目やよい

IQVIA ジャパンメディアセミナー

オンライン, 2020/12/8

G.知的所有権の取得状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2021-13264

発明者：

夏目やよい、上田修功

発明の名称：

複数の項目を関係付ける

ための方法、システム、

およびプログラム

出願人：

医薬基盤・健康・栄養研究所、

理化学研究所

出願日：2021年1月29日

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

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 |
|---|--|------------------------------|----|-----------|------|
| 登田 美桜、北嶋 聡 | マリンバイオトキシノーフグ毒のリスク評価について | 中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.) | 34 | 58-62 | 2021 |
| Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi | Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4. | Toxicol Rep. | 7 | 685-692 | 2020 |
| Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura | Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging. | Reproductive Toxicology | 98 | 225-232 | 2020 |
| Nock R, Poluliakh N, Nielsen F, Oka K, Connell CR, Heimhofer C, Shibana K, Ghosh S, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J, Akama K, Kitano H. | A Geometric Clustering Tool (AGCT) to robustly unravel the inner cluster structures of time-series gene expressions. | PLOS ONE | 15 | e0233755 | 2020 |
| Osorio, R. S. A., Nyström-Persson, J. T., Nojima, Y., Kosugi, Y., Mizuguchi, K., & Natsume-Kitatani, Y. | Panomicon: A web-based environment for interactive, visual analysis of multi-omics data. | Heliyon | 6 | e04618 | 2020 |
| Esaki, T., Horinouchi, T., Natsume-Kitatani, Y., Nojima, Y., Sakane, I., & Mastsui, H. | Estimation of relationships between chemical substructures and antibiotic resistance-related gene expression in bacteria: Adapting a canonical correlation analysis for small sample data of gathered features using consensus clustering. | Chem-Bio Informatics Journal | 20 | 58-61 | 2020 |
| Chen, Y. A., Park, J., Natsume-Kitatani, Y., Kawashima, H., Mohsen, A., Hosomi, K., ... & Miyachi, M. | MANTA, an integrative database and analysis platform that relates microbiome and phenotypic data. | PLOS ONE | 15 | e0243609. | 2020 |

| | | | | | |
|-------------------|----------------|--------------------|---|-------|------|
| 夏目 やよい, 水口 賢 司 | 新薬創出を加速するAIの開発 | Precision Medicine | 3 | 10-13 | 2020 |
|-------------------|----------------|--------------------|---|-------|------|

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 合田 幸広

次の職員の令和2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安全性予測評価部・客員研究員
(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 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。

令和3年 3 月 29 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 合田 幸広

次の職員の令和2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。

令和3年 3 月 29 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 合田 幸広

次の職員の令和2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 特定非営利活動法人
システム・バイオロジー研究機構

所属研究機関長 職 名 会長

氏 名 北野 宏明

次の職員の令和2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) 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：遺伝子組換え実験安全管理規則) | <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: 国立医薬品食品衛生研究所) |
| 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 国立研究開発法人
医薬基盤・健康・栄養研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 米田 悦啓

次の職員の令和2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) 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。