

厚生労働行政推進調査事業費

化学物質リスク研究事業

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

平成30年度～令和2年度 総合研究報告書

研究代表者 菅野 純

令和3（2021）年 5月

目 次

I. 総合研究報告 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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	41

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

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の反復曝露実験の結果を利用する事により、現在の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3年間の成果は以下の通り。

(1) の平成30年度は、イミダクロプリド、及び、ジエチルニトロサミンの2実験を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と上記の化学物質に特徴的な要素を抽出した。先行研究で実施した化学物質に比べると、この2物質は小胞体ストレス系を誘導せず、第I相、第II相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。また両化学物質とも、反復曝露によりそれぞれの特性、即ち、神経毒性及び発癌性に関わるシグナルネッ

トワークが発動することが示された。

令和元年度は、クロルピリフォス、及び、5-アザシチジンの2実験を実施した。先行研究で実施した化学物質との比較では、クロルピリフォスは核内受容体系に作用することで遺伝子発現誘導が開始することが示され、同じく低分子の農薬であるアセフェートと類似した傾向が明らかとなった。5-アザシチジンが反復投与により誘導する基線反応は、ミトコンドリア機能、EIF-2シグナル系（小胞体ストレス等）、蛋白ユビキチン化系に属する遺伝子からなっており、これらの系の変化を誘導するという点では、5-フルオロウラシル、及び、ペンタクロロフェノールに類似していた。しかし、遺伝子発現の増減方向が逆である点が注目された。

令和2年度は、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実験を実施した。メトトレキサートは、先行研究で実施した化学物質との比較においては、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、メトトレキサートによる酸化的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系を介した酸化的ストレス系の基線反応の増強を確認した。なお、2年目はパクリタキセルで反復曝露実験を実施する予定であったが、パクリタキセルの納品に時間がかかることと、購入費用が非常に高価であることから保留とし、3年目実施予定であったクロルピリフォスを優先して実施した。また、当初、3年目に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、そ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)の平成30年度は、当初、アセフェートのエピジェネティクス機構解析を予定していたが、バルプロ酸ナトリウム（VPA）に変更した。これはすでにVPAの単回及び反復投与の際の遺伝子発現データを有し、かつ、ヒストン脱アセチル化酵素1（HDAC1）の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる、という本研究課題における陽性対照物質と考えられたからである。VPAのエピジェネティック機構解析としてヒストン修飾解析を実施したところ、一般認識であるヒストン脱アセチル化酵素1（HDAC1）の阻害ではなく、H3K9me3がグローバルに阻害されているという、既存情報からの予想（HDAC阻害を介しH3K27Acが増える）とは異なる結果を得た。

令和元年度は、当初、ジエチルニトロサミンのエピジェネティクス機構解析を予定していたが、クロフィブラートに変更した。これは平成30年度検討したバルプロ酸ナトリウムのPPAR α 作用との差分を確認する必要があると考えたことから、PPAR α の陽性対照物質であるクロフィブラートを優先して実施したためである。具体的には、クロマチン免疫沈降アッセイと次世代シーケンサを組み合わせた、クロマチン免疫沈降シーケンス法を利用して、

クロフィブラートを 14 日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の網羅的解析を進めた結果、クロフィブラートの反復投与により、DNA メチル化非依存的に遺伝子発現を抑制することが知られている H3K27me3 のゲノムワイドな亢進を明らかにした。また、バルプロ酸ナトリウムの反復投与の結果の再解析により、バルプロ酸ナトリウムにおいても、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進が起きていることを確認できた。クロフィブラートとバルプロ酸ナトリウムは、PPAR α 作用という点で共通していることから、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進は、PPAR α 作用によるものと示唆された。一方、バルプロ酸ナトリウムの反復投与による H3K9me3 のゲノムワイドな低下は、PPAR α 作用以外によるものと考えられた。

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、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 年度は溶媒のコーンオイルを 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、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定されたことから、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) の平成 30 年度は、AI 化が可能と思われる工程として遺伝子発現データから候補遺伝子を抽出する工程を選定し、深層学習プロトタイプ (Deep Learning) を用いて膨大な遺伝子変動データから有意に変動した遺伝子を高精度で自動同定させる技術を開発し、正答率 95% という優秀な成績を確認した。また解析パイプラインの中核として、先行研究による SHOE とその関連ツールの連携を強化した。

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

令和 2 年度は、引き続き上記の「自動深層機械学習システム」の開発を進め、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 explainability model (grad cam) を参考に、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) の平成 30 年度は、型反復曝露実験における有意な基線反応抽出ソフトウェアの開発のため、Percellome データベースから基臓器・溶媒・サンプリング時間毎に溶媒群のトランスクリプトームデータを集めて参照データベースを構築し、基本アルゴリズムを生成した。また自動化のための解析計算用ソフトウェア BaselineComparison を作成した。

令和元年度は、Percellome データベースを包括的に活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer をオンラインサービスとして提供するために必要なシステム開発を、内部データ構造を抜本的に再設計して高速化を果たすなどの対策と共に進めた。

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) の平成30年度は、解析パイプライン整備の一環として汎用性が高いと考えられる解析プロセスを実行し、バルプロ酸ナトリウム (VPA) が脂肪酸代謝を制御する各種核内受容体の活性に影響すること、及び数理モデリング (ブーリアンネットワーク) によりこれらのシグナルクロストークをシミュレーションし、VPA 投与が SREBP/PPAR α 比の上昇を介して肝毒性につながる可能性があることを示した。

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

令和2年度では、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：

平成30年度は、イミダクロプリド (Imidacloprid; 分子量：255.66、Cas No.: 138261-41-3、105827-78-9、純度99.9%、富士フィルム和光純薬(株)) 及び、ジエチルニトロサミン (Diethylnitrosamine; 分子量:102.14、Cas No.: 55-18-5、純度100%、東京化成工業(株) (単回曝露時はナカライテスク：製造中止のため同等品を選択)) について、単回曝露の既存データの解析を進めた。単回曝露 (0日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記) 時のイミダクロプリド及びジエチルニトロサミンの曝露量はそれぞれ0、10、30、100 mg/kg 及び0、1、3、10 mg/kg である。

「新型」反復曝露実験を、4日間反復曝露 (4日間反復曝露後に単回曝露、以降、[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。イミダクロプリドの4回の全動物に対する反復曝露の用量は用量設定実験の結果70mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の0、10、30、100mg/kgとした。以下、同様に、ジエチルニトロサミンの4回反復投与の用量は5mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に0、1、3、10mg/kgとした。溶媒はイミダクロプリドではコーンオイル (C8267、Sigma-Aldrich)、ジエチルニトロサミンでは0.5%メチルセルロース (MC) (133-14255、富士フィルム和光純薬(株)) 水溶液とした。

令和元年度は、クロルピリフォス (Chlorpyrifos; 分子量：350.59、Cas No.: 2921-88-2、純度98%、富士フィルム和光純薬株式会社 (製造元：Toronto Research

Chemicals))、及び、5-アザシチジン (5-azacytidine; 分子量: 244.21、Cas No.: 320-67-2、純度>99%、Sigma-Aldrich) について、単回曝露の既存データの解析を進めた。単回曝露 (0 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記) 時のクロルピリフォス (CPF) 及び 5-アザシチジン (AZC) の曝露量はそれぞれ 0、3、10、30 mg/kg 及び 0、0.3、1、3 mg/kg である。

「新型」反復曝露実験を、4 日間反復曝露 (4 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。CPF の 4 回の全動物に対する反復曝露の用量は用量設定実験の結果 20mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様の 0、3、10、30mg/kg とした。以下、同様に、AZC の 4 回反復投与の用量は 2mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、0.3、1、3mg/kg とした。溶媒は CPF、AZC、共に 0.5%メチルセルロース (MC) (133-14255、富士フイルム和光純薬 (株)) 水溶液とした。

令和 2 年度は、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 (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。また「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。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、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。

(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)

平成 30 年度は、バルプロ酸ナトリウムを 14 日間反復投与した後、溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) を単回投与した 2 時間後のマウス肝臓のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証した。

令和元年度は、クロフィブラート (70mg/kg) を 14 日間反復投与した後、溶媒 (0.5%メチルセルロース +0.1% DMSO 水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝臓および、溶媒 (0.5%メチルセルロース +0.1% DMSO 水溶液) を単回投与した 2 時間後のマウス肝臓のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証した。

令和 2 年度は、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 時間後のマウス肝臓

のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証した。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サ解析を行った。シーケンサ結果は、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、DIOX 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。

DIOX 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 \log_2 Fold change が 1 以上の遺伝子（ただし、 \log_2 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.post1) 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】

平成 30 年度は、解析データとしては、Percellome データベースよりバルブプロ酸ナトリウム (VPA) を投

与したマウスの複数の臓器における遺伝子発現プロファイルを取得して使用した。このデータは、マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) に VPA (0, 50, 150, 500 mg/kg、溶媒: メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2,4,8,24 時間後に各臓器 (脳: 皮質及び海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓) を回収してマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供したもので、Percellome 法により正規化 (絶対量化) されている。データベース内での該当する Percellome データ検索、処理時間及び濃度依存的に発現変動が見られる遺伝子 (DEG) のリスト及び発現量の抽出には、インハウスのソフトウェア (PercellomeDB index, MF Surface, Rsort) を使用した。次に、TargetMine (<https://targetmine.mizuguchilab.org>) でヒトオーソログのリスト入手後に DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) で Ensembl gene ID に変換した。DEG の機能解析には Garuda を使用した。VPA を投与したマウスの肝臓において発現が変動した遺伝子群を制御する核内受容体 (PPAR α 、SREBP、ER) を介したシグナル伝達のクロストークをシミュレーションするため、GINSim を用いてブーリアンネットワークを構築した。

令和元年度は、先行研究においてマウスにペンタクロロフェノール (0, 10, 30, 100 mg/kg) を経口投与し 2, 4, 8 及び 24 時間後に摘出した肝を用いて遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより測定し、Percellome 法による normalization 後に遺伝子発現が変動した遺伝子を網羅的に選択した遺伝子リスト (Kanno J. et al., J. Toxicol. Sci. 2013;38(4): 643-654) を、Garuda プラットフォームへの入力データとして用いた。Garuda プラットフォーム上において、使用したガジェット (Garuda プラットフォームで連結され、相互に入出力データを共有可能なソフトウェアの総称) は Nandi (使用可能なガジェットの提示)、Gene ID converter (遺伝子 ID 変換ツール)、Reactome (pathway enrichment 解析)、

PercellomeDB (遺伝子発現の時間依存的・濃度依存的変動を表す 3D プロットの作成) である。また、当該遺伝子リストを用いて、翻訳により産生されるタンパク質の相互作用情報をグラフとして表現し、その構造から相互作用の強いクラスターを検出する MCL クラスタリングを STRING v11 (Szklarczyk, D., et al., (2018) . Nucl Acid Res 47.D1: D607-613.) を用いて実施した。

令和 2 年度は、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な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

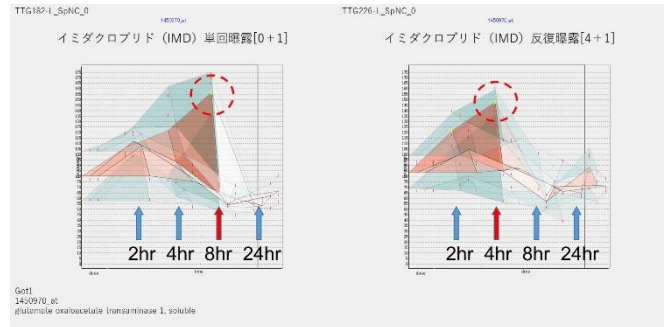
当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

(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】

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

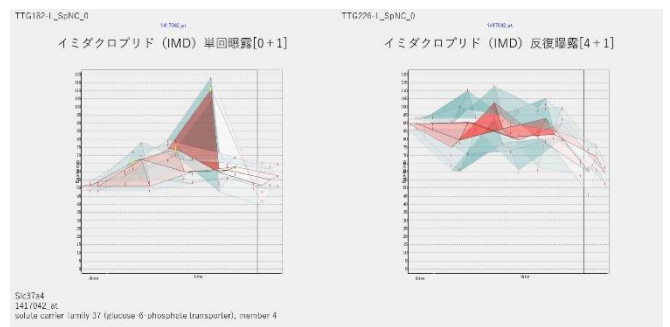
イミダクロプリド(IMD)では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数(過渡反応を示す遺伝子)は単回曝露実験(以下、[0+1]と表記)において296、反復曝露実験(以下、[4+1]と表記)において80であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

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



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

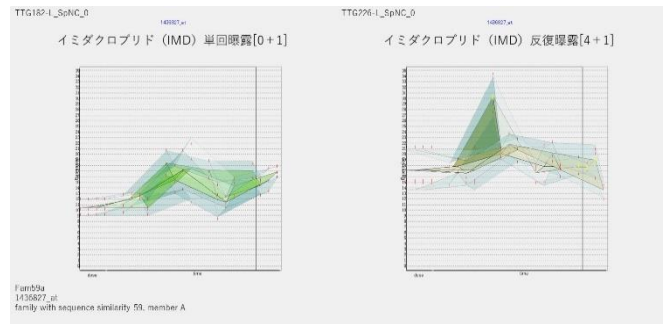
[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は254あり、それらは[4+1]における基線反応に上昇がみられた。これは、基線反応が四塩化炭素の際(EIF2系、小胞体ストレスシグナル)とは逆方向の現象であった。グルココルチコイド受容体系、ダイオキシシン受容体系、等の



【[0+1]でのピークが[4+1]において消失し基線反応が上昇している例】

核内受容体を介した、糖脂質代謝系へのシグナルネットワークが関与することが示唆された。

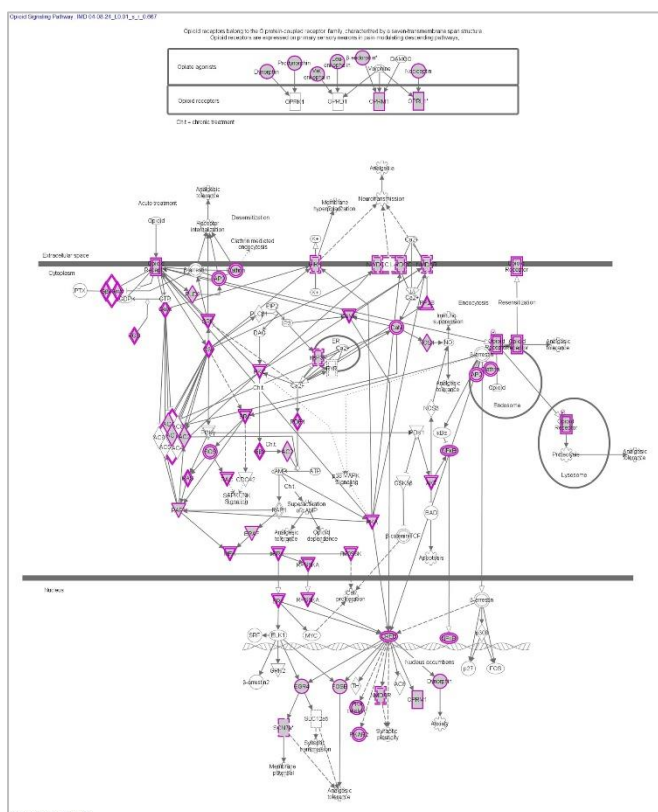
[0+1]において過渡反応がなく、[4+1]においては過渡反応が発現した遺伝子は48あり、その殆どに基



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

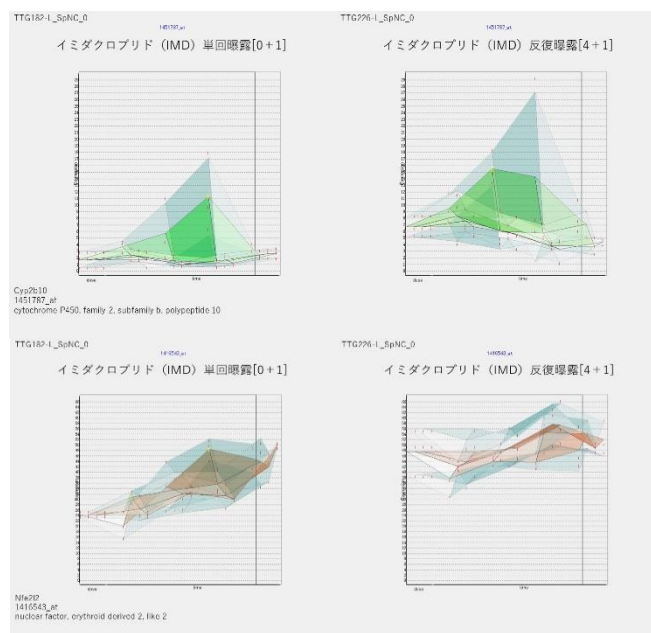
線反応の上昇を伴っていた。これらは、糖や脂質のグリコシル化に関わる系に属することが示唆された。

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



【IMDによるオピオイドシグナル系の誘導（IPAより）】

以上、イミダクロプリドはマウス肝において、ニコチンに関わる代謝系及びシグナル系を起動させるとともに、[0 + 1]と[4+1]の遺伝子発現プロファイル



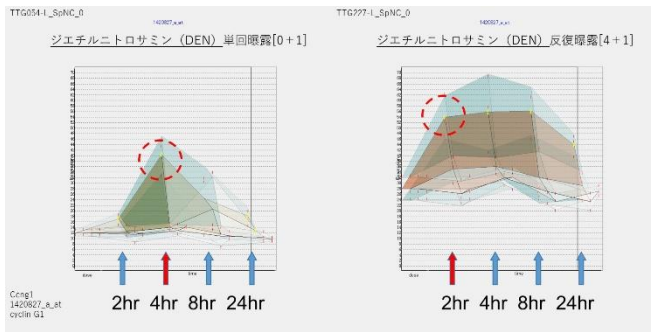
【代謝系への影響。Cyp2b10及びNfe2l2 (Nrf2) を示す。前者は、基線反応の上昇と過渡反応の上昇、後者は基線反応の上昇を認める】

の比較により、神経毒性を示唆する結果を得た。分子機序について、特に標的分子機構の特定について、更なる解析を進める。

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

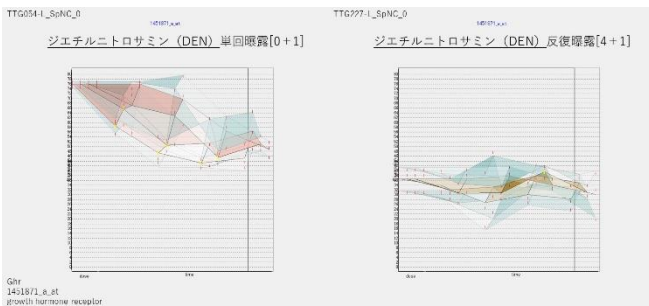
[0+1]で上昇する過渡反応を示した遺伝子 22 は、多くが[4+1]に共通する変動遺伝子であった。

[0+1]と[4+1]に共通する変動遺伝子は 18 であり、内 11 が発現上昇、7 が発現低下を示した。上昇した遺伝子群は、Ceng1 (cyclin G1)、Cdkn1a (p21)、Mdm2、Trp53inp1 (p53 inducible nuclear protein 1) を含む、p53 シグナル系、DNA ダメージチェックポイント、ATM シグナルに関わる遺伝子群であった。これらは、[4+1]において、より早期に誘導がかかり発現値がより高値である傾向を示した。



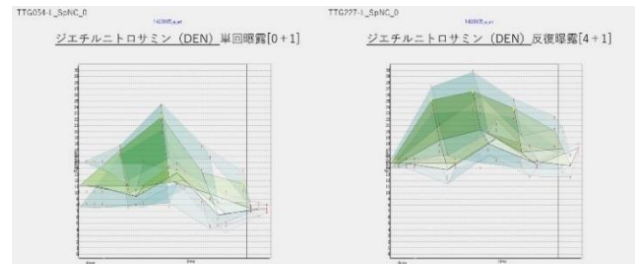
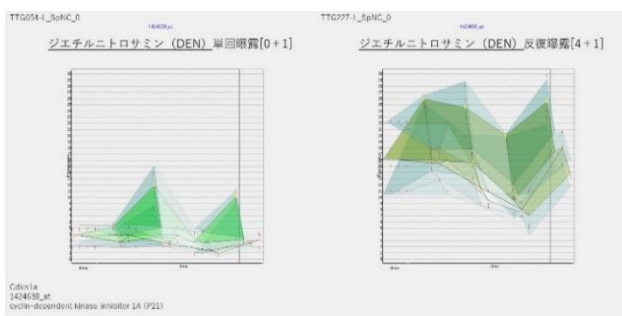
【DENによるCcng1(Cyclin G1)の誘導。[0+1]でのピークは、[4+1]により早まり、発現が持続するとともに基線反応が上昇している。】

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

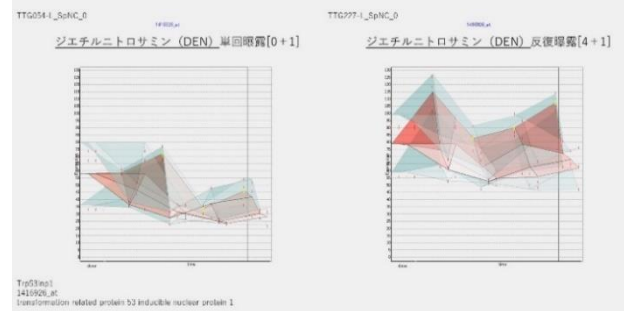


【[0+1]で下降ピークを示し、[4+1]でピーク消失し、基線反応が下降する例】

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



Mdm2
1423605_a_at
transformed mouse 2B2 cell double minute 2

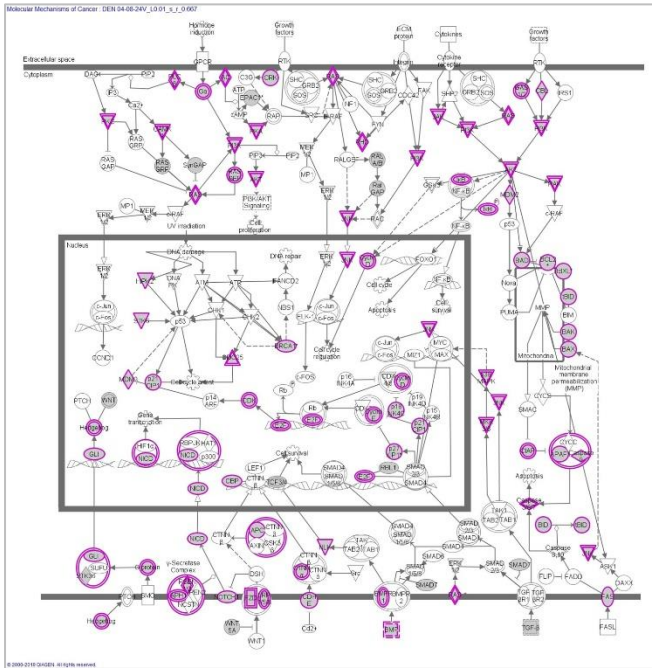


【DENによるp21、Mdm2、Trp53inp1の誘導】

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

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

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



【DENIによる発がん機構シグナル系の誘導 (IPAより)】

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

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

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

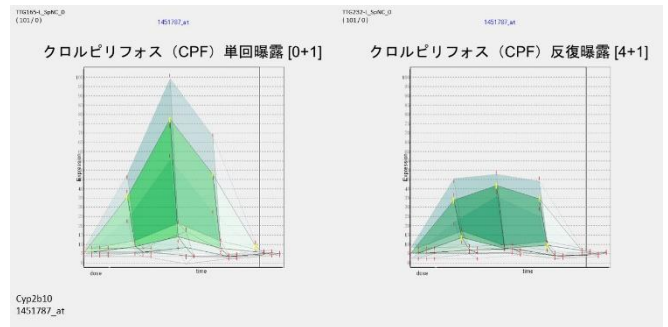
先行研究で、実施した 6 物質、アセトアミノフェン、フェノバルビタールナトリウム、サリドマイド、5-フルオロウラシル、アセフェート、及び五塩化フェノールと比較すると、本年度の 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相、第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

令和元年度は、クロルピリフォス (CPF)、及び、5-アザシチジン (AZC) を検討した。尚、最終投与後 2、4、8、24 時間の早い変動を過渡反応 (Transient Response)、反復投与で引き起こされるベースラインの上昇乃至低下の変動を基線反応 (Baseline Response)

と定義し解析を実施した。

令和元年度は、クロルピリフォス (CPF)、及び、5-アザシチジン (AZC) を検討した。クロルピリフォス (CPF) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数 (過渡反応を示す遺伝子) は単回曝露実験 (以下、[0+1]と表記) において 298、反復曝露実験 (以下、[4+1]と表記) において 60 であり、反復曝露により過渡反応を示す遺伝子数が減少していた。

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

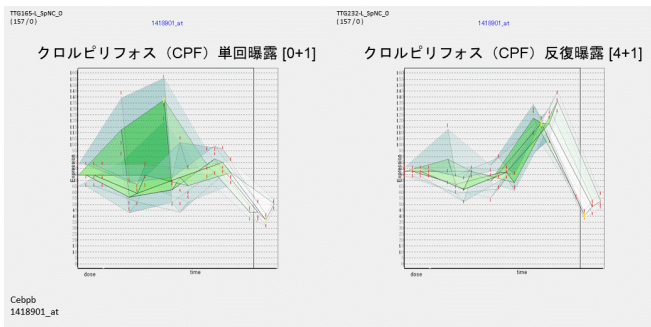


【共通する遺伝子 Cyp2b10。基線の変化は見られず過渡反応が減弱している】

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

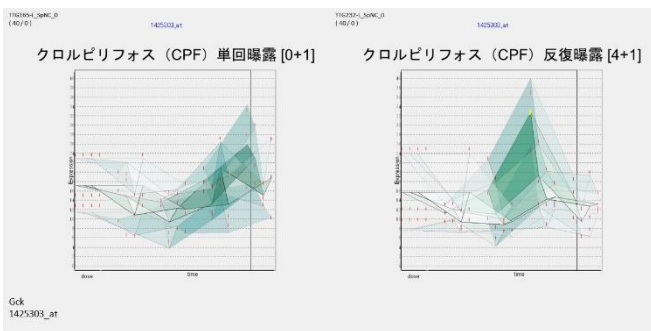
[0+1]においてのみ過渡反応が見られ、[4+1]においては過渡反応が消失した遺伝子は 288 あり、それらは[4+1]における基線反応に弱いながら低下の傾向がみられた。これらの遺伝子はビタミン D 受容体系、PXR 受容体系、グルコルチコイド受容体系、甲状腺ホルモン受容体系等の核内受容体を介したシグナルネットワークに属する遺伝子が含まれ、その上流にグルコルチコイド受容体の作用、グルカゴ

ン等の介在が示唆された。これらは投与後2~4時間において顕著に誘導された遺伝子群が示すものであった。24時間目に発現する遺伝子数は僅かであった。



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

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

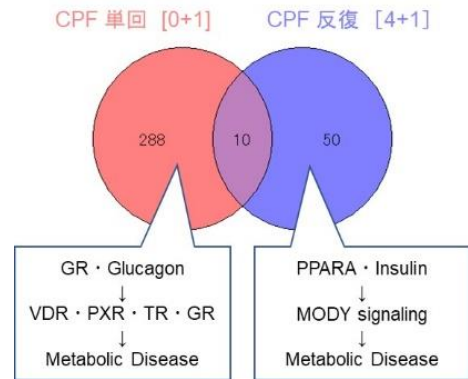


糖代謝に関わるGckが反復曝露により誘導された。】

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

以上、CPFはマウス肝において、グルココルチコイド受容体系へのシグナル入力に反応して、ビタミンD、PXR、甲状腺ホルモン受容体系に作動性を示す

とともに、PPAR α の系に抑制的に働くことが示唆され、反復投与により糖代謝異常が遷延する可能性が示唆された。

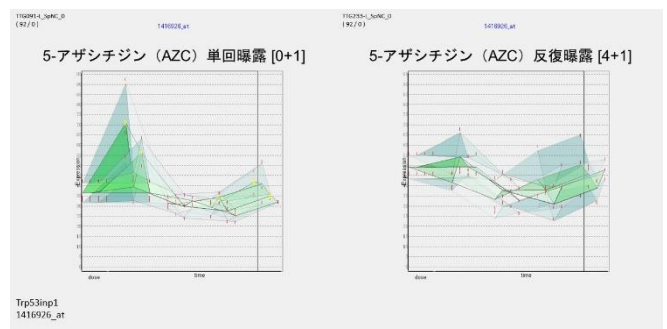


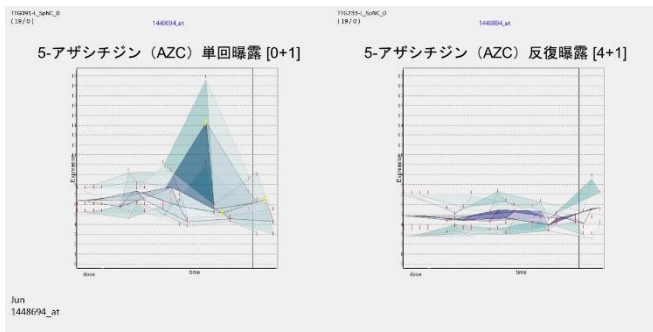
【CPFの単回と反復曝露との遺伝子発現の関係の概略を示す。】

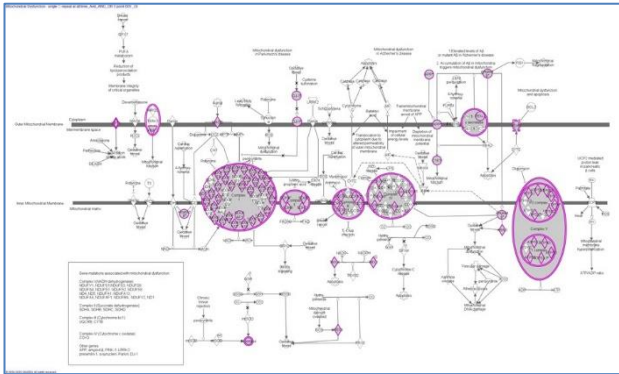
CPFがグルココルチコイド受容体シグナル、グルカゴン系、糖代謝系に影響を与えるという本解析結果と、ヒトや実験動物に対してCPFの比較的長期の曝露が血糖値を上昇させる、或いは、II型糖尿病、妊娠性糖尿病、及び肥満と関係するという報告との関係の解析を更に進める。一方、小胞体ストレスなどの“一般的”な毒性を示唆する変化の誘導は弱かった。

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

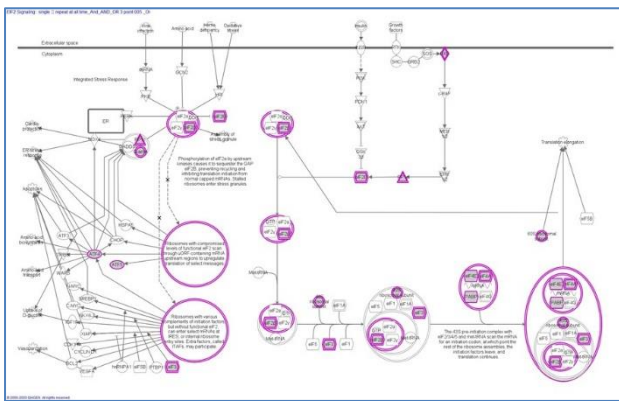
5-アザシチジン (AZC) では、生物学的に有意と判断された変動遺伝子数(過渡反応を示す遺伝子)は単回曝露実験(以下、[0+1]と表記)において24、反復曝露実験(以下、[4+1]と表記)において28であり、共通する遺伝子が認められなかった。







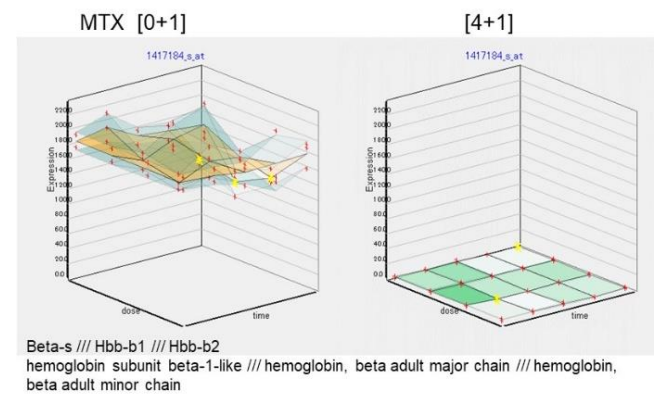
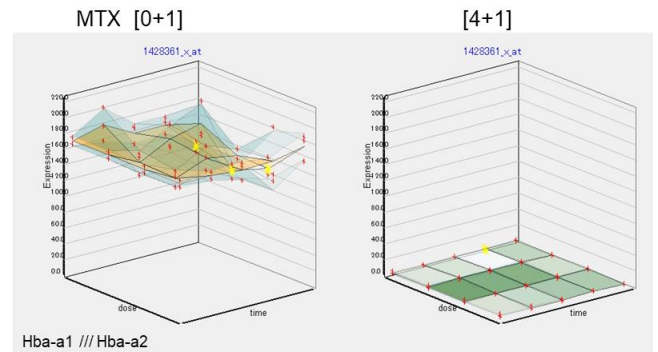
【AZC 反復曝露により低下した遺伝子 (赤色) のミトコンドリア機能マップ中の位置を示す (IPA 解析)】



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

令和2年度は、メトトレキサート (MTX) 及び、サリドマイド (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。

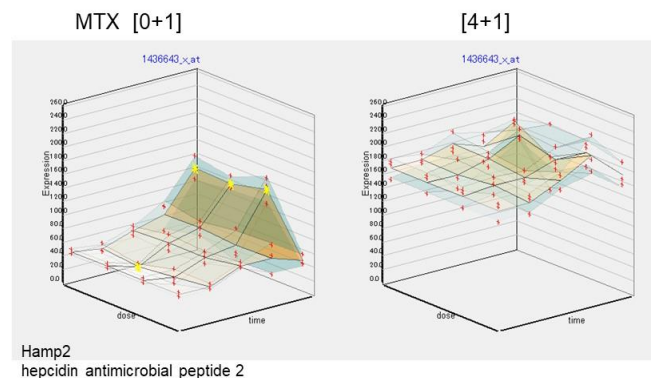
MTX の新型反復プロトコルの 2 実験 ([4+1]) を実施し、遺伝子発現解析を進め、反復曝露に共通の要素と各々の化学物質に特徴的な要素を抽出した。MTX は、特に先行研究で実施した化学物質と比較すると、発現変動する遺伝子数が過渡反応、基線反応ともに少なかったが、特徴的な変化として、ヘモグロビン関連遺伝子 (Hba-a1/Hba-a2、Hbb-b1/Hbb-b2 等) とヘプチジン (hepcidin、Hamp2) の発現への影響が認められた。



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、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、ヘプチジンは、4 日間反復投与により発現が上昇した。

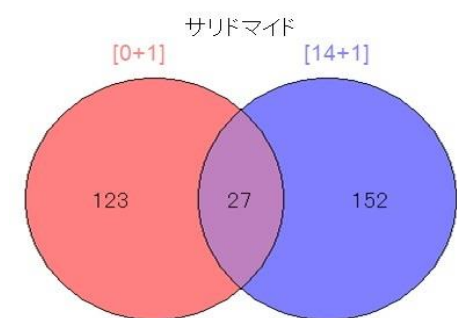


ヘプチジンは肝にて合成される因子で、小腸上皮、骨髄、或いは鉄処理に当たる脾臓マクロファージなどの細胞膜上の **Ferroportin (Scl40A1)** が鉄のトランスポーターであると同時にヘプチジンの受容体として機能し、体内の鉄の恒常性を維持する機構の中心的機能を有しているとされる。遺伝的ヘモジデロシス疾患の解析によりヘプチジン欠乏状態はヘモジデロシスを誘発し、過剰産生状態は、慢性炎症等に伴う状況での鉄欠乏性貧血が該当するとされている。

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。

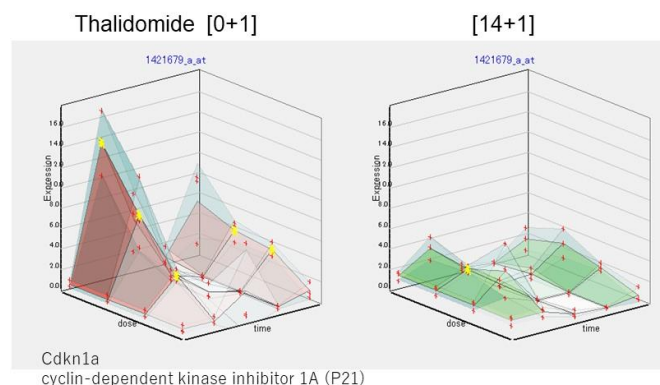
詳細な機構解析が必要であるが、現段階において、肝細胞内において MTX による酸化ストレス低下のシグナルが、ヘモグロビン合成抑制に働き、鉄欠乏状態類似の状況を誘発し、ヘプチジンの発現を代償性に誘発した可能性が指摘される。

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。

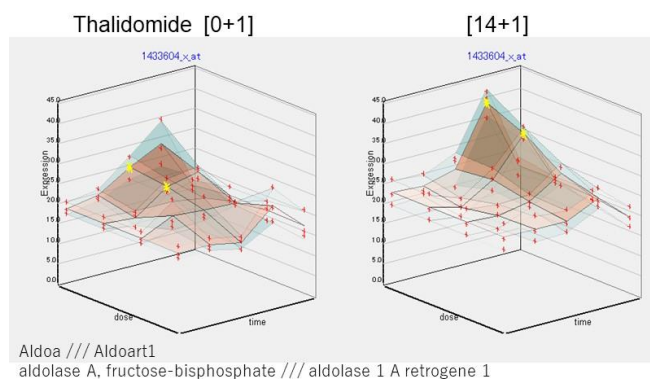


主体であり、PXR/RXR、GR 等の核内受容体を介して

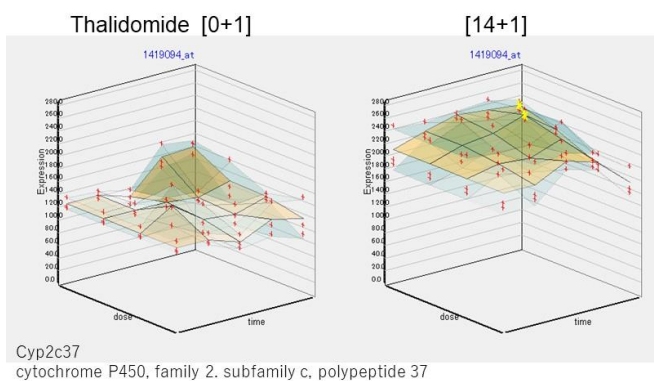
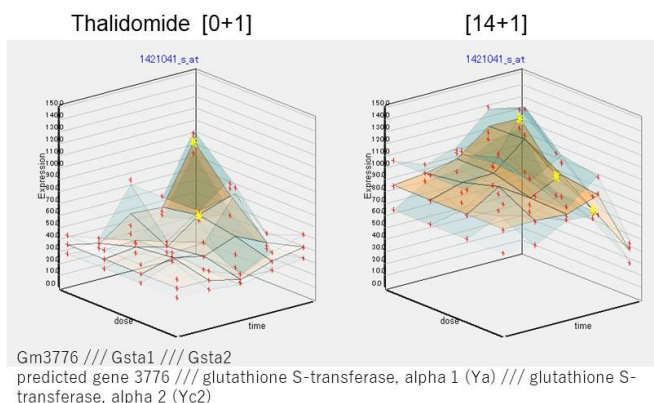
早期シグナル系の遺伝子群であった。下に **Cdkn1a** を示す。



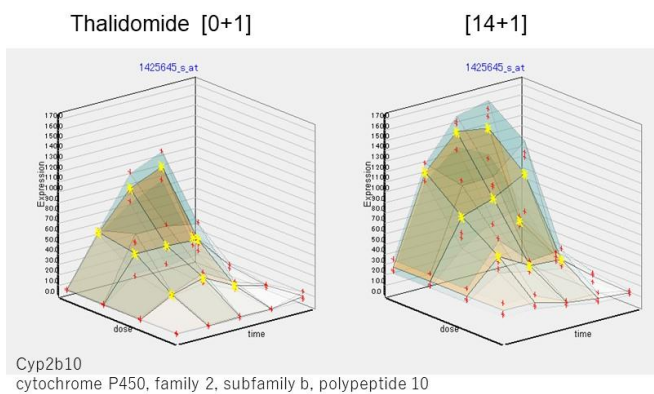
逆に [0+1] において発現しておらず、[14+1] において発現した遺伝子は 8 時間目にピークを有する遺伝子が主体であり、NRF2 を介した酸化ストレス反応系の遺伝子が増加し、フェロプトーシス等、細胞障害に関わるシグナル系の遺伝子が含まれていた。



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。

(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】

平成30年度は、バルプロ酸ナトリウムを14日間反復曝露したマウス肝臓および、溶媒（0.5%メチルセルロース水溶液）を単回投与した2時間後のマウス肝臓を用いて、クロマチン免疫沈降（ChIP）を実施した。この結果、まず各抗体についての溶媒対照群と反復投与群において認められたピーク数の比較においては、特に H3K9me3 のピーク数が 25.5%に減少しており、VPA の反復投与によって一般認識であるヒストン脱アセチル化酵素 1(HDAC1)の阻害ではなく、H3K9me3 が阻害されることが明らかになった。

また、先行研究で実施した四塩化炭素を14日間反復投与した際のマウス肝臓サンプルにおけるヒストン修飾の解析をさらに進めたところ、特に、DNAメチル化非依存的に遺伝子発現を抑制することが知られている H3K27me3 は、反復投与により 13.8%もピーク数が上昇していることから、反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していることが示唆された他、各ピークを網羅的に解析し、溶媒対照群に対して増加あるいは減少（具体的にはそれぞれ2倍以上、もしくは1/2以下）したピーク数で、数の多い方のピーク数が20以上という条件にて抽出して、反復投与により有意な変化（増加あるいは減少）を示すヒストン修飾部位を抽出した。

令和元年度は、クロフィブラート（定用量：70 mg/kg）を14日間反復投与([14+1])した際、及び溶媒（0.5%メチルセルロース+0.1%DMSO水溶液）を単回投与した際の12週齢の雄性 C57BL6/NCrSlc マウスの肝臓サンプルについて（投与2時間後のもの、それぞれ n=3、これを必要サンプル重量[200 mg 以上]となるように、それぞれ1つにまとめた）、クロマチン免疫沈降(ChIP)を行った。H3K4me3 抗体、H3K27me3 抗体、H3K27Ac 抗体、H3K9me3 抗体の各抗体の場合の濃縮について確認し、ChIP が正常に行われたと判断した。これらの ChIP 済み DNA よりライブラリ

を作成し、次世代シーケンスによる 75bp のシングルリードの網羅的シーケンス解析を行った。

今回得られたクロフィブラート (CFB) を 14 日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析結果は以下である。

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

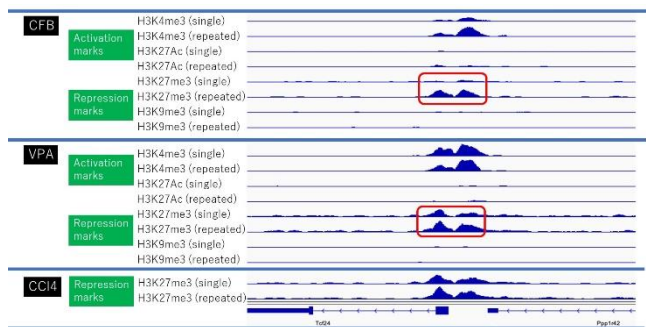
抗 H3K4me3 抗体 (18,185、19,425)、

抗 H3K27Ac 抗体 (21,740、16,450)、

抗 H3K27me3 抗体 (8,650、20,770)、

抗 H3K9me3 抗体 (21,847、20,583)、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数が 8,650 から 20,770 へ、140.1% 増加しており、CFB の反復投与によって H3K27me3 が亢進されることが明らかになった【下図】。したがって CFB の反復投与による基線反応の変化は、ヒストン修飾の変化で一部は説明できる可能性がある。今後、実際に ChIP-PCR などを行い確認する。



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

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

なお、CFB の反復投与において、H3K4me3、H3K27me3、H3K27Ac、H3K9me3 の各 peak を網羅

的に解析し、溶媒対照群に対して増加あるいは減少 (具体的にはそれぞれ 2 倍以上、もしくは 1/2 以下) した peak 数で、数の多い方の peak 数が 20 以上という条件にて抽出したところ、それぞれ (以下括弧内はピーク数で[増加、減少]をあらわす)、

抗 H3K4me3 抗体 (63、15)、

抗 H3K27Ac 抗体 (28、66)、

抗 H3K27me3 抗体 (12198、0)、

抗 H3K9me3 抗体 (1、321)、

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

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

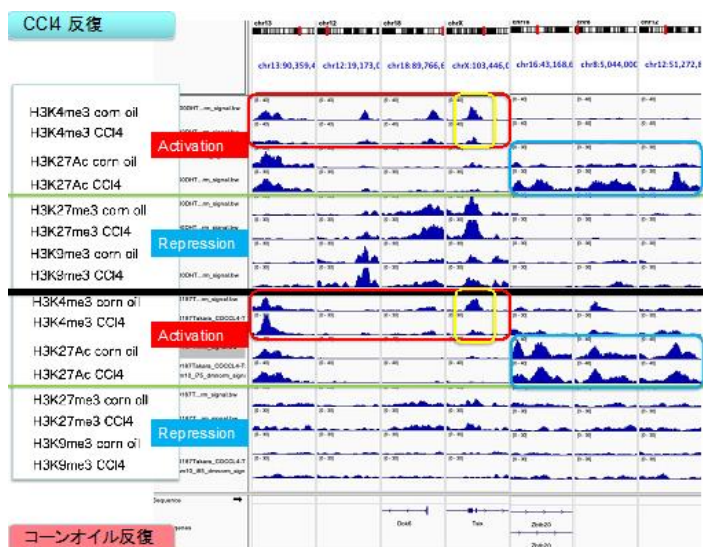
令和 2 年度は、反復曝露時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾等の遺伝子発現修飾機構 (所謂エピジェネティクス) が関わる可能性が指摘されることから、本分担研究では次世代シーケンサを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてエピジェネティックな変化を網羅的に検討した。

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。

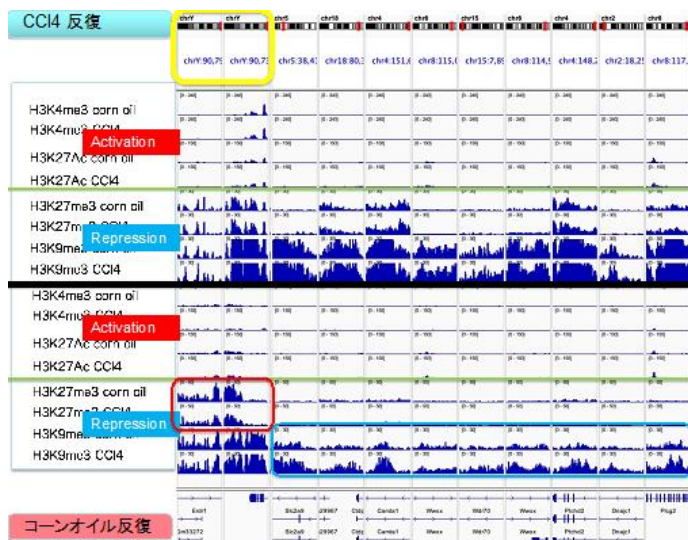
その結果、四塩化炭素の反復投与により見られていたヒストン修飾の変化の多くは、コーンオイルの反復投与では見られないことから、溶媒の反復投与による影響ではなく、四塩化炭素そのものの反復投与の影響によると結論できた。

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。



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は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。

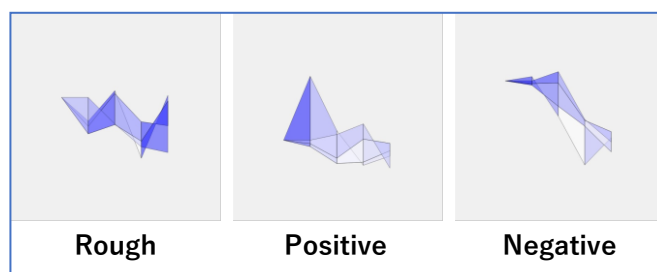


コーンオイルの反復投与によって、H3K9me3 の亢進する領域が顕著となった（青枠部分）。赤枠部分を含め、明らかな溶媒影響を示す領域も存在する。

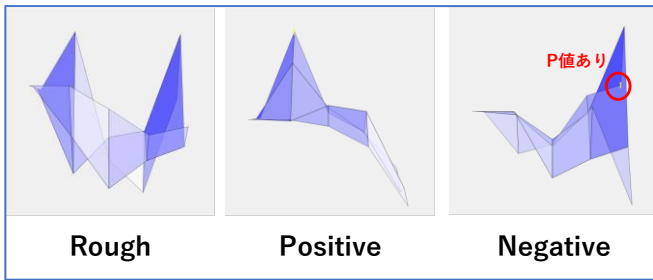
(3) システム毒性解析の人工知能化【北野】

●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

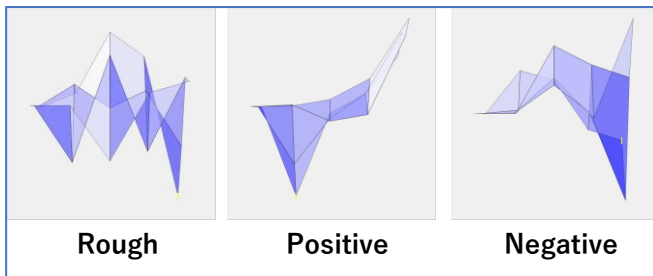
平成 30 年度は、以下の 4 つの画像データセットを生成し、それぞれのデータセットを用いて、4 つの deep learning に基づく分類器を構築した。



① 横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関する P 値の情報を含まない画像



② 横の方向から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関する P 値の情報を含む画像

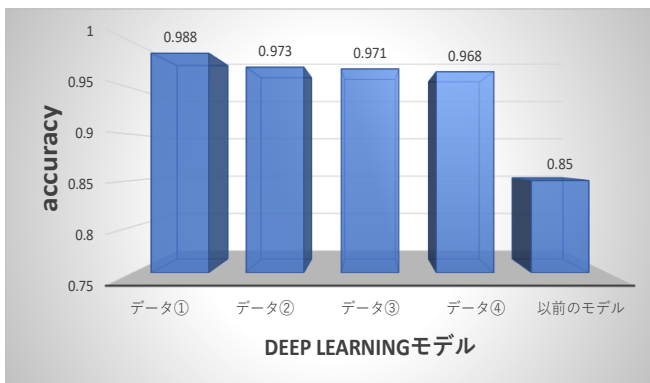


③ 画像データ②を、上下方向に反転させた画像

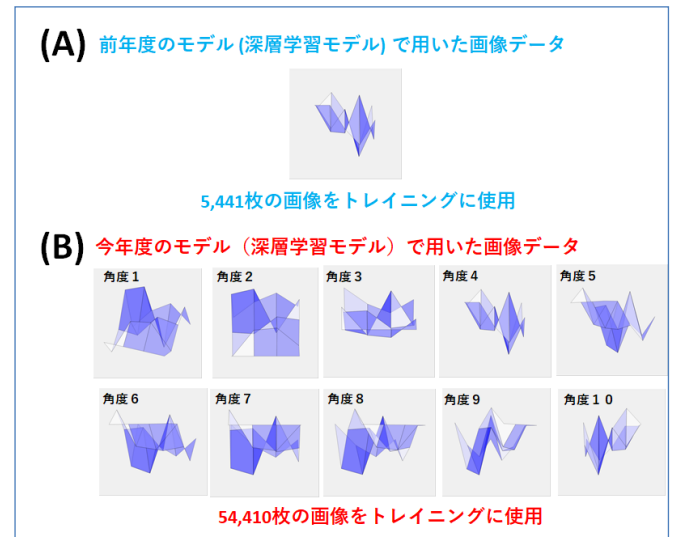


④ デフォルトの角度から見た画像で、遺伝子発現量の変動に関する P 値の情報を含む画像

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

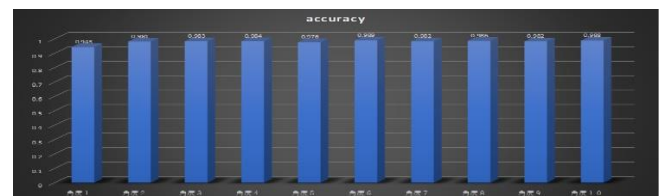


令和元年度は、多様な描画角度から 3 次元グラフを作成し、トレーニング画像数を 10 倍に増加させることで、深層学習による分類器の一層の精度向上を試みた。



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

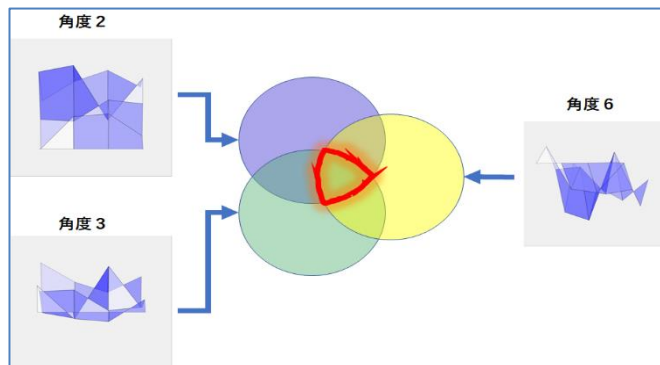
具体的には上図の通り 10 種の角度からみた画像データに対する、10 種の深層学習モデルを構築し、構築したモデルに対して、5 fold cross validation を実施して予測精度の検証を行った。



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

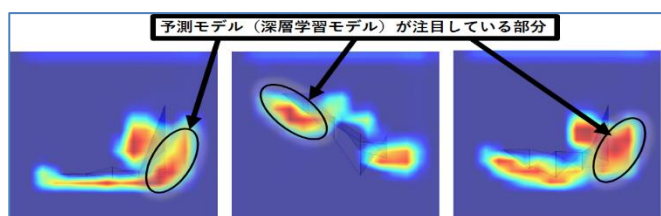
その結果、作成した 10 種のモデル全てが、高い予測精度（94%以上の正解率）を示した。この結果から、

これらのモデルを適切に組み合わせることで、高い精度を保ったまま有意な遺伝子を絞り込むことができる可能性が示唆された。



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

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



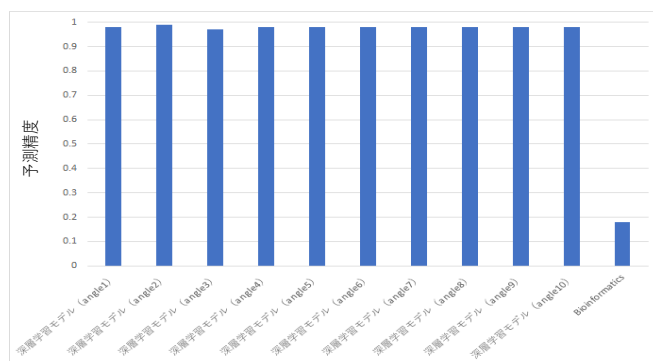
【Explanatory model (Grad cam) による深層学習モデルの解析の結果：深層学習モデルは、赤く強調されている所に着目して、判別を行っている。】

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

令和2年度は、飽和パターンや溶媒群に変動のあるパターンなどの特殊パターン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。

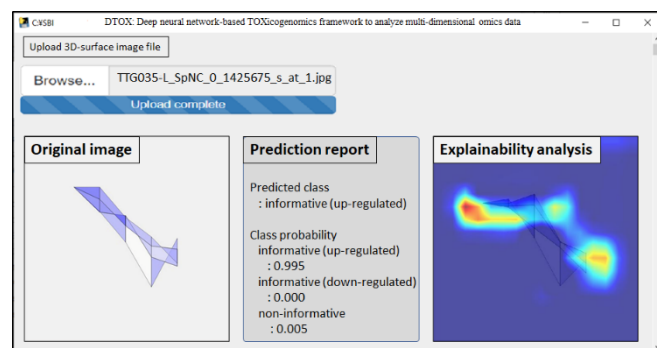
深層学習モデルによる DTOX と、一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインとの予測精度

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 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

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。

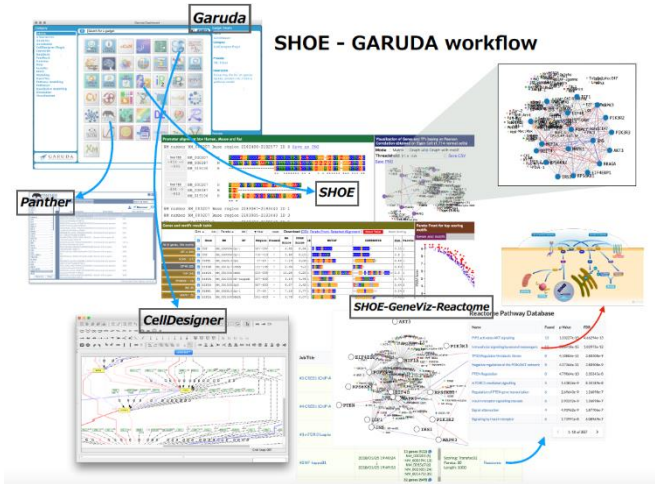


このインターフェースデザインでは、まず **Browse** ボタンをクリックして、遺伝子の三次元画像ファイルを選択し読み込む。読み込んだ画像は、**Original image** のサブウィンドウ (左側) に表示され、同時に画像解析システム中の深層学習モデルで解析され、予測が行われる。予測結果は、**Prediction report** のサブウィンド (中央) に表示される。この画像の例では、この遺伝子は化学物質により **up-regulation** されている確率が **0.995** であると予測されている。また、深層学習モデルの判断根拠に関する解析も行われ、その

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 の連携強化

平成 30 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 とライフサイエンスソフトウェアの国際的共通基盤 Garuda Platform の連携強化を行った。連携の流れは下図の通り。



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

令和元年度は、SHOE の参照データベースに ChIP-Seq データを統合し、解析対象の領域拡大と精度向上を実現した。

3. Integration of ChIP-seq Array data into SHOE

SHOE Project Website
Sequence H2Qmology in higher Eukaryotes

Manual Connection to Garuda Adding ChIP-seq Array Express tissue-specific data

Adding ChIP-seq Array Express tissue-specific data

- Datasets on Human/Mouse/Rat were downloaded from ArrayExpress site <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-437/>
- Data files in gtf format were converted to csv format using R programming language
- Respective Human_HG19/Mouse_mm10/Rat_rn4 genome annotated files were downloaded from GoldenPath database <http://hgdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html>
- Using this script ChIP-seq Array peaks for Liver were mapped to the respective genomes for Human, Mouse and Rat to identify genes closest to ChIP-seq Array peaks.
- Move the result into engine/tissue

Human, Mouse and Rat ChIP-seq on Liver was integrated in SHOE

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

2. Pairwise alignment
Two Genome analysis part is under construction (2019)

Human-Mouse Human-Rat

```

Human-Mouse:
230 240 250 260 270 280
ACCTAAGGCCCCAGGGAGAGTAAATTAAGCCCTAATTAAGGAGTAAAGGGGGG
11 1111 1 1111 11 1 111 11 11 1111 111 11 111111
AATTAATAATCTACTGAG--GATTAAGGCTACTGAGATGATGAGAGGAGG
650 660 670 680 690 700

Human-Rat:
270 280 290 300 310 320
GTATGAGGGGAGAGAGAGAGAGGCTCTTACTCTTGGCCCTCAGGAGAGAGATT
111 111111111 1111 11 11111111
AGAGTACTGAGATATGAGCTCCCTTACTCTTGGCCCTCAGGAGAGAGATT
11510 11520 11530 11540 11550 11560

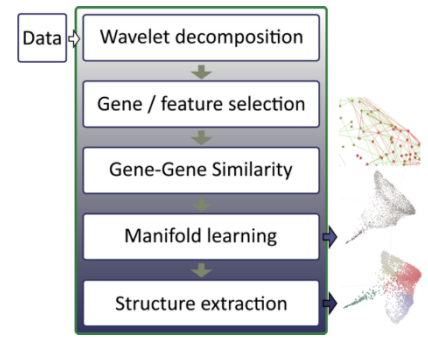
Multiple alignment:
Human: AACTAAG-GCCCCAGGGAGAGTAAATTAAGCCCTAATTAAGGAGTAAAGGGGGG
Mouse: AATTAATAATGCTACTGAGAGATTA---AGGCTCACTGAGATGATGAGAGAGG
Rat: -----AGAGTACT-----GGCA

Human: GACGAGAGGCCCTTACTCTTGGCCCTCAGGAGAGAGATTCTCTCTACTGCT
Mouse: G-CAAAAGAGCCCTGCTTTACTCTTGGCCCTCAGGAGAGAGATTGCTCTCTTGGCA
Rat: GATAATACGCTGCTTAACTCTTGGCCCTCAGGAGAGAGATTGCTCTCTTGGCA
  
```

また今後の AI 活用を想定した API の定義と実装を検討し機能強化を実施した結果、SHOE と Percellome の連携だけでなく、その他の複数の解析ソフトウェアとの連携も加わり、よりスムーズな解析が可能となった。

令和 2 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



(4) Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良
【相崎】

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

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

基線反応評価基準としては、①溶媒群データが最も安定しているサンプリング時間の一時点参照、若しくは②%CV が閾値以下の複数のサンプリング時間参照、さらには③%CV に基づいたサンプリング時間毎の重み付けによる全時点参照、の三案の比較を進め、新型反復曝露実験の有意な基線反応を抽出するアルゴリズムを生成した。またこれを実装した候補遺伝子の自動抽出ソフトウェア BaselineComparison.exe を開発した。

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。

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

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

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

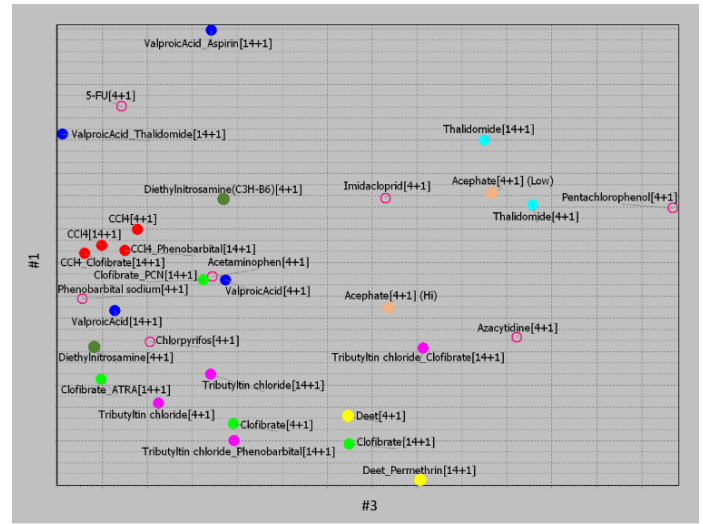
令和2年度は、まず平成24年以降の集大成として反復曝露基線反応データベースを構築した。具体的には平成30年度（本研究一年目）にin house開発したBaselineComparisonを利用して、GeneChip解析済みの新型反復曝露実験データセット30件より、有意な反応を示した遺伝子リストを生成した。false negativeを減らすために、抽出条件は最大発現レベル1コピー/細胞以上、且つ、基線を構成する4時点データポイントのうち3カ所以上でp<0.05の有意差を示し、尚且つ、同様に基線を構成する4時点データポイントのうち3カ所以上で1.5倍以上の発現変動比を示すもの、と比較的緩い設定にした。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。

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

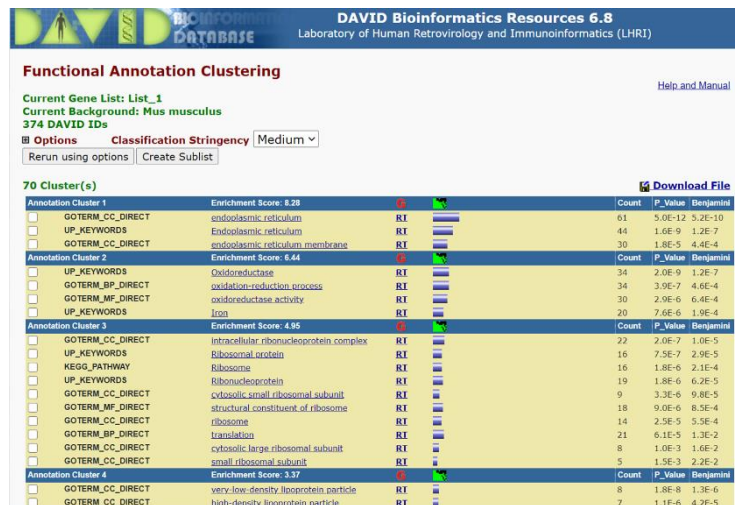
** strainが異なる

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、第1から第3成分により化学物質のクラスターを図示した。



● CCl4, ● 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、或いは酸化的ストレス応答に関与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】

平成 30 年度は、バルプロ酸ナトリウム (VPA) について、解析パイプラインを実行したところ、投与によって PPAR α 、SREBP、ER の活性が影響を受けることが見いだされた。PPAR α は脂質代謝の制御に関わる核内受容体であり、脂肪酸の構造を有する VPA が PPAR α のリガンドとして直接活性化に関わったことが考えられた。SREBP は脂肪酸やトリグリセリド、コレステロール産生の制御に関与しており、また ER のリガンドであるエストラジオール 17 β (E2) は ER 依存的に SREBP の発現を抑制し、トリグリセリドの蓄積に対しても抑制的に働くことが報告されている (Han, S., et al. *Hepatology* 59:1791(2014):1802)。これらのことから、上記の核内受容体は互いにクロストークしていることが強く示唆された。一方、VPA は MAPK の活性化を介してエストロゲンに対する細胞の感受性を上げる (Jansen, MS., et al. *PNAS* 101.18 (2004): 7199-7204) ほか、逆にエストロゲン産生を抑制することが報告されている (Glistler, C., et al. *PLoS One* 7.11 (2012):e49553)。このように、上記核内受容体のクロストークに対して VPA が何らかの作用を呈する可能性が示唆されているものの、その関係性は複雑で特定のタンパク質の活性に注目することでは VPA の作用を推定する事は困難であると考えられた。そのため、核内受容体のクロストークやそれに対する VPA の作用を数理モデリングによって表現し、シミュレーションをおこなうことで VPA が呈する肝毒性の分子メカニズムを推定することを試みた。まず、上記核内受容体に関与するシグナル伝達経路に含まれるタンパク質やリガンド結合などの反応の有無を 0 または 1 で表現し、制御関係（正の制御か、負の制

御か）を表す矢印で連結させたネットワーク（ブリーアンネットワーク）を構築した。これを用いて VPA の有無とエストロゲンの影響のシミュレーションをおこなった結果、性別依存的に VPA 存在下で脂肪酸代謝が減弱する可能性が示唆された。

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

令和 2 年度は、Reactome ガジェットや bioCompendium ガジェットによる pathway enrichment 解析の結果、エストラジオール投与から 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ール投与から 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、エストラゴール投与から 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た。

D. 考察

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

【菅野】において、平成 30 年度に実施したイミダクロプリド (IMD) とジエチルニトロサミン (DEN) を先行研究で実施済みの化学物質と比較すると、これらの 2 物質は、小胞体ストレス系を誘導せず、第 I 相第 II 相代謝酵素系の誘導も軽度であるという特徴を有していた。

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

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

令和元年度に実施した、クロルピリフォス (CPF) とクロルピリフォス (CPF) について、先行研究で実施済みの化学物質と比較すると、クロルピリフォス (CPF) はアセフェート (APT) に類似していた。糖代謝に対する急性及び慢性的な影響が示唆された。クロルピリフォス (CPF) は、基線反応の変化した遺伝子群が属する遺伝子発現経路が、5-フルオロウラシル (5FU) やペンタクロロフェノール (PCP) と類似していたが、それらの実際に発現の増減方向が逆であった。すなわち、5-アザシチジン (AZC) は反復曝露により遺伝子発現が低下するが、5FU と PCP は増加する。しかし、過渡反応は 5FU では増強するのに対して、PCP では減弱する傾向を示すことから、いずれもが独自の遺伝子発現機構を持つことが示唆された。

令和 2 年度に実施した、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。

Thal については、反復投与により NRF2 系などを介した酸化的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。

「化学物質の反復曝露による毒性発現のエピジェネティクス機構解析」【北嶋】においては、平成 30 年度は、ChIP-Seq により VPA 反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位が抽出され、基線反応の成立に関わる知見が得られた。当初、ヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる、という本研究分担課題における陽性対照物質のデータを得られると想定されたが、実際はヒストンのアセチル化

(H3K27Ac) は増加せず、むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。他方、H3K9me3 が 74.5%低下することが明らかとなり、H3K27Ac の結果と比較するすると、少なくともマウス肝において VPA は HDAC の阻害ではなく、H3K9me3 を阻害していることが示唆された。新たに VPA により H3K9me3 阻害が起こるという新知見が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものとする。

H3K9me3 などのヒストン修飾と DNA メチル化は、遺伝子発現を抑制的に制御している。本研究においては、グローバルに H3K9me3 が減少していることから、グローバルな遺伝子発現の活性化が想定された。しかしながら、VPA の反復投与による基線反応

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

令和元年度は、クロフィブラート (CFB) 反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位が抽出され、基線反応の成立に関わる新たな知見が得られた。当初、平成 30 年度に行ったバルプロ酸ナトリウム (VPA) の反復投与のヒストン修飾解析は、VPA によるヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる、という本研究分担課題における陽性対照物質のデータを得られると想定されたが、実際はヒストンのアセチル化 (H3K27Ac) は増加せず、むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。他方、H3K9me3 が 74.5%低下することが明らかとなり、H3K27Ac の結果と比較するすると、少なくともマウス肝において VPA は HDAC の阻害ではなく、H3K9me3 を阻害していることが示唆された。

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

の 20% ほどの亢進については、PPAR α 作用によるものと考えられる。

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

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】が重要となるのは、システム・レベルで毒性を理解するには、膨大な実験データを格納したデータベース、文献、数値モデルなどを統合的に解析する必要があるからで

ある。先行研究で、我々は、個別機能の解析ツール群を構築し Garuda Platform 上において連動性を実現してきた。これらのツール群は今後もさらに拡充させる必要があるが、同時に、大規模かつ複雑なデータを意味のある形で解析するには、深層学習やテキストマイニングなども含めた一連の人工知能アルゴリズム群を連携させる必要がある。

その具体的な応用例として、深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別においては、平成 30 年度に作成した分類器の予測精度は 95% 以上の正答率という非常に良い成績を示し、先行研究の分類器の予測精度よりも 10% 以上正答率が向上した。この結果から 3 次元グラフ画像を適切に調整することで、分類器の予測精度が大幅に改善されることが明らかになり、大規模データの自動分類の実用化の目処が立ちつつあった。

令和元年度に実施した、3 次元グラフの形状を複数の描画角度から作図した画像を学習データとして利用することで、深層学習のトレーニング効果が深まり、より精緻に分類器のチューニングを行うことが可能であることが分かった。

令和 2 年度は、飽和パターンや溶媒群に変動のあるパターンなどの特殊パターン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。

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、今後も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。

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

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

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

「Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良」【相崎】については、平成 30 年度に新型反復曝露実験の基線反応評価を行う BaselineComparison プログラムを in house 開発し、令和 2 年度にはこれを使用して、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た複数の化学物質で、同一クラスタに[4+1]と[14+1]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示唆された。

また令和元年度には、オンラインで Percellome データベースの全体を対象とする網羅的比較解析するという、より高度な活用を促進する枠組みの構築が完了した。現状では比較解析の基となるプロジェクト毎の特徴データの抽出を数理的な自動処理で行っているため、充分実用になっているとはいえ、ある程度のノ

イズ混入を許容しているが、今後は分担研究「システム毒性解析の人工知能化」で進められている「深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別」の成果利用により、より高精度の解析結果が得られると期待される。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】については、

PPAR α や SREBP の活性と脂質代謝異常による疾患との間には連関が認められており、肥満患者において PPAR α /SREBP 比と脂肪肝の間に相関があることが報告されている (Pettinelli, P., et al. *Biochim Biophys Acta* 1792.11 (2009): 1080-1086)。両核内受容体の活性バランスの調整に ER が関与しており、平成 30 年度の解析により、バルプロ酸ナトリウムが ER リガンド量に影響を与えることが肝臓に於ける脂肪蓄積につながる可能性が示唆された。本結果は、脂質代謝異常が疑われる患者に対するバルプロ酸ナトリウム投与のリスク評価の重要性を示していると言える。

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

2013;38(4): 643-654 においては、enrichment 解析を IPA (Ingenuity pathway analysis, Ingenuity Systems, Inc. Redwood City, CA, USA) を用いて実施しており、Garuda を用いた解析と同じく PCP 投与後 24hr においてインターフェロンシグナリングパスウェイに関連する遺伝子の発現変動を検出している。更に、“Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response” や “Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Virus” といった抗ウイルス応答に関連するパスウェイについても同様に検出しており、本解析結果は既報内容と矛盾のないものであることを確認した。一方、IPA ではこれらのパスウェイに関連する遺伝子がどのような分子メカニズムによって発現亢進に至ったかを提示するには至っておらず、RIG-1 の関与の可能性を示唆する本解析結果が新規に見出したものである。このことから、Garuda は IPA に代表される有償ソフトに勝るとも劣らぬパフォーマンスでデータ解析を行うことが可能であり、この Garuda に Percellome を連結させた意義は大きいと言える。

令和2年度は、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的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 を含む酸化的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 系を介した酸化的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、先行研

究による全ゲノム DNA メチル化解析 (WGBS) データと、平成 30 年度のバルプロ酸ナトリウム、令和元年度のクロフィブラートの ChIP-Seq 解析結果を統合解析した結果、反復曝露による毒性機序におけるエピジェネティクス機構の関与やその重要性がより一層明らかになった。

令和 2 年度には、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て、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。今後、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り、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とに分解し、純粋な変動遺伝子のみによるシグナル解析を可能にする。

「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 データ解析を主軸とした解析パイプラインにより、バルプロ酸ナトリウム、ペントクロロフェノール、エストラゴールの毒性発現機構の推定を行った。他の解析手法による毒性発現機構に関する知見を、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 データベース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. 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ー、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., & Mastui, 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

●令和元年度

(9) 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]

(10) 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]

(11) 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* 2019, Appl 5, 42 [DOI: 10.1038/s41540-019-0119-y]

(12) 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* 2019 69 433 [DIO: 10.1007/s12576-019-00667-8]

(13) 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: 10.1371/journal.pone.0212513]

(14) Polouliakh N. In Silico Transcription Factor Discovery via Bioinformatics Approach: Application on iPSC Reprogramming Resistant Genes. Leveraging Biomedical and Healthcare Data, 2019 - Elsevier [DOI:10.1016/B978-0-12-809556-0.00013-7]

(15) Watanabe R, Ohashi R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-Kitatani Y, Nagao C, Mizuguchi K. Development of an in silico prediction system of human renal excretion and clearance from chemical structure information incorporating fraction unbound in plasma as a descriptor. *Scientific reports* 2019 9(1) 18782 [DOI: 10.1038/s41598-019-55325-1]

(16) Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Komura H, Mizuguchi K. Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility. *Journal of pharmaceutical sciences* 2019 108(11) 3630-3639 [DOI: 10.1016/j.xphs.2019.07.014]

(17) Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, Natsume-Kitatani Y, Kawashima H, Nagao C, Mizuguchi K. Computational Model To Predict the Fraction of Unbound Drug in the Brain. *Journal of chemical information and modeling* 2019 59(7) 3251-3261 [DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00180]

(18) Lee MSJ, Natsume-Kitatani Y, Temizoz B, Fujita Y, Konishi A, Matsuda K, Igari Y, Tsukui T, Kobiyama K, Kuroda E, Onishi M, Marichal T, Ise W, Inoue T, Kurosaki T, Mizuguchi K, Akira S, Ishii KJ, Coban C. B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- γ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant. *European journal of immunology* 2019 49(9) 1433-1440 [DOI: 10.1002/eji.201848084]

●平成 30 年度

(19) 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]

(20) Natalia Polouliakh, Paul Horton, Kazuhiro Shibani, 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; [DOI: 10.1186/s12864-018-5101-3]

(21) Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. Fund Toxicol Sci 2018, 5: 167-170 [DOI: 10.2131/fts.5.167]

(22) Esaki, T., Watanabe, R., Kawashima, H., Ohashi, R., Natsume - Kitatani, Y., Nagao, C. & Mizuguchi, K. Data curation can improve the prediction accuracy of metabolic intrinsic clearance. Molecular informatics. 2018, 38: 1800086 [DOI: 10.1002/minf.201800086]

(23) Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., Natsume-Kitatani, Y., Nagao, C., Ohashi, R. & Mizuguchi, K. Predicting Fraction Unbound in Human Plasma from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges. Molecular pharmaceutics, 2018, 15(11), 5302-5311. [DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00785]

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

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

(26) Masuta, Y., Yamamoto, T., Natsume-Kitatani, Y., Kanuma, T., Moriishi, E., Kobiyama, K. & Ishii, K. J. An antigen-free, plasmacytoid dendritic cell-targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T cells in nonhuman primates. The Journal of Immunology, 2018, 200: 2067-2075 [DOI: 10.4049/jimmunol.1701183]

(27) Tanaka, M., Kobiyama, K., Honda, T., Uchio-Yamada, K., Natsume-Kitatani, Y., Mizuguchi, K. & Ishii, K. J. Essential role of CARD14 in murine experimental psoriasis. The Journal of Immunology, 2018, 200(1), 71-81. [DOI: 10.4049/jimmunol.1700995]

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) 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 竜二、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、小野竜二、高橋雄、葉形麻樹子、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

●令和元年度

(29) 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.

(30) 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.

(31) 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

(32) 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.

(33) 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

(34) Kawashima H, Miyachi M, Murakami H, Konishi K,
Ohno H, Tanisawa K, Hosomi K, Mohsen A, Chen YA,
Park J, Mizuguchi K, Natsume-Kitatani Y, Kunisawa J.
A study of gut microbial variations associated with

phenotypic metadata in a healthy Japanese population
ISMB/ECCB 2019 バーゼル (スイス) , 2019/07/23

(35) Watanabe R, Esaki T, Kawashima H, Natsume-
Kitatani Y, Nagao C, Ohashi R, Komura H, Mizuguchi K.
Development of DruMAP, Drug metabolism and
pharmacokinetics Analysis Platform ISMB/ECCB
2019 バーゼル (スイス) , 2019/07/22

(36) 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

(37) 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

(38) 伊藤 眞里, 武田 吉人, 木田 博, 木庭 太郎, 野
島 陽水, 藤原 大, 長尾 知生子, 夏目 やよい, 武田
理宏, 松村 泰志, 熊ノ郷 淳, 水口 賢司 「新薬創出
を加速する人工知能の開発」 特発性肺線維症への取
り組み 第59回日本呼吸器学会学術講演会 東京,
2019/04/14

●平成30年度

(39) 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.

(40) 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

(41) 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

(42) 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

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

(44) 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

(45) 北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウスの症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中

枢影響予測と情動認知行動解析、第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.18.)

(46) 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

(47) 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.)

(48) 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.)

(49) 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

(50) 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

(51) 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.

(52) 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)

(53) 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)

(54) 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)

(55) 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)

(56) 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)

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

(58) 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)

(59) 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)

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Polouliakh N</u>	In Silico Transcription Factor Discovery via Bioinformatics Approach: Application on iPSC Reprogramming Resistant Genes	F Kobeissy, K Wang, FA. Zaraket	Leveraging Biomedical and Healthcare Data	Academic Press, Elsevier	Amsterdam, Netherlands	2019	183-193

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
登田 美桜、北嶋 聡	マリンバイオトキシソーフグ毒のリスク評価についてー	中毒研究(Jpn. J. Clin. Toxicol.)	34	58-62	2021
<u>Ryuichi Ono</u> , Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Mie Naruse, Makiko Kuwagata, Takahiro Ochiya, <u>Satoshi Kitajima</u> , Yoko Hirabayashi	Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4.	Toxicol Rep.	7	685-692	2020
Hirokatsu Saito, Kenshiro Hara, <u>Satoshi Kitajima</u> , Kentaro Tanemura	Effect of Vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging.	Reproductive Toxicology	98	225-232	2020
Nock R, <u>Polouliakh N</u> , Nielsen F, Oka K, Connell CR, Heimhofer C, Shibanai K, Ghosh S, <u>Aisaki K</u> , <u>Kitajima S</u> , <u>Kanno J</u> , Akama K, <u>Kitano H</u>	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., & <u>Natsume-Kitatani Y.</u>	Panomicon: A web-based environment for interactive, visual analysis of multi-omics data.	Heliyon	6	e04618	2020

Esaki, T., Horinouchi, T., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , Nojima, Y., Sakane, I., & Matsui, 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., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , 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
<u>夏目 やよい</u> , 水口 賢司	新薬創出を加速するAIの開発	Precision Medicine	3	10-13	2020
Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, <u>Kitajima S.</u> , <u>Kanno J.</u> , Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.	CYP3A4 induction in the liver and intestine of PXR/CYP3A-humanized mice: approaches by mass spectrometry imaging and portal blood analysis.	Mol Pharmacol.	13	56	2019
<u>Ono R.</u> , Yasuhiko Y, <u>Aisaki KI.</u> , <u>Kitajima S.</u> , <u>Kanno J.</u> , Hirabayashi Y.	Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing.	Commun Biol.	2	57	2019
Gupta V, Crudu A, Matsuoka Y, Ghosh S, Rozot R, Marat X, Jäger S, <u>Kitano H.</u> , Breton L	Multi-dimensional computational pipeline for large-scale deep screening of compound effect assessment: an in silico case study on ageing-related compounds.	npj Syst Biol Appl	5	42	2019
Uchida S, Asai Y, Kariya Y, Tsumoto K, Hibino H, Honma M, Abe T, Nin F, Kurata Y, Furutani K, Suzuki H, <u>Kitano H.</u> , Inoue R, Kurachi Y	Integrative and theoretical research on the architecture of a biological system and its disorder	J Physiol Sci	69	433	2019

Kato Y, Tabata K, Kimura T, Yachie-Kinoshita A, Ozawa Y, Yamada K, Ito J, Tachino S, Hori Y, Matsuki M, Matsuoka Y, Ghosh S, <u>Kitano H</u> , Funahashi Y	Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8+ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway	PLOS ONE	14	e0212513	2019
Watanabe R, Ohashi R, Esaki T, Kawashima H, <u>Natsume-Kitata ni Y</u> , Nagao C, Mizuguchi K	Development of an in silico prediction system of human renal excretion and clearance from chemical structure information incorporating fraction unbound in plasma as a descriptor.	Scientific reports	9	18782	2019
Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, <u>Natsume-Kitata ni Y</u> , Kawashima H, Nagao C, Komura H, Mizuguchi K	Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility.	Journal of pharmaceutical sciences	108	3630	2019
Esaki T, Ohashi R, Watanabe R, <u>Natsume-Kitata ni Y</u> , Kawashima H, Nagao C, Mizuguchi K	Computational Model To Predict the Fraction of Unbound Drug in the Brain.	Journal of chemical information and modeling	59	3251	2019
Lee MSJ, <u>Natsume-Kitata ni Y</u> , Temizoz B, Fujita Y, Konishi A, Matsuda K, Igari Y, Tsukui T, Kobiyama K, Kuroda E, Onishi M, Marichal T, Ise W, Inoue T, Kurosaki T, Mizuguchi K, Akira S, Ishii KJ, Coban C	B cell-intrinsic MyD88 signaling controls IFN- γ -mediated early IgG2c class switching in mice in response to a particulate adjuvant.	European journal of immunology	49	1433	2019

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, <u>Kanno</u> J, Ishimaru N.	Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.	PLoS One.	13(10)	e0205702	2018
<u>Polouliakh N.</u> Horton P, Shibanai K, Takata K, Ludwig V, Ghosh S, <u>Kitano H.</u>	Sequence homology in eukaryotes (SHOE): interactive visual tool for promoter analysis.	BMC Genomics.	19(1)	715	2018
Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, <u>Kitajima S.</u> Shibutani M, Furukawa S, Hirose A.	Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt.	Fund Toxicol Sci	5	167-170	2018
Esaki, T., Watanabe, R., Kawashima, H., Ohashi, R., <u>Natsume -</u> <u>Kitatani, Y.</u> , Nagao, C. & Mizuguchi, K	Data curation can improve the prediction accuracy of metabolic intrinsic clearance. Molecular informatics	Molecular informatics	38	1800086	2018
Watanabe, R., Esaki, T., Kawashima, H., <u>Natsume-Kitata</u> <u>ni, Y.</u> , Nagao, C., Ohashi, R. & Mizuguchi, K.	Predicting Fraction Unbound in Human Plasma from Chemical Structure: Improved Accuracy in the Low Value Ranges	Molecular pharmaceutics	15(11)	5302-5311	2018
<u>夏目やよい</u>	バイオメディカル・基礎から臨床への開 発プロセス (2) 1) トランスレーショ ナルリサーチと機械学習	医薬ジャーナル	54(9)	2049-2053	2018
長尾知生子、 <u>夏目</u> <u>やよい</u> 、水口賢司	創薬における計算機の果たす役割 - プ レシジョンメディスンに向けて -	Presicion Medicine,	1(1)	28-31	2018

Masuta, Y., Yamamoto, T., <u>Natsume-Kitata</u> <u>ni</u> , Y., Kanuma, T., Moriishi, E., Kobiyama, K. & Ishii, K. J.	An antigen-free, plasmacytoid dendritic cell-targeting immunotherapy to bolster memory CD8+ T cells in nonhuman primates.	The Journal of Immunology	200	2067-2075	2018
Tanaka, M., Kobiyama, K., Honda, T., Uchio-Yamada, K., <u>Natsume-Kitata</u> <u>ni</u> , Y., Mizuguchi, K. & Ishii, K. J.	Essential role of CARD14 in murine experimental psoriasis.	The Journal of Immunology,	200	71-81	2018