

厚生労働行政推進調査事業費

化学物質リスク研究事業

トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による

新型化学物質有害性評価系の実装研究

(21KD2001)

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

令和4(2022)年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告 トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による 新型化学物質有害性評価系の実装研究 相崎 健一	-----	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	-----	25
2. 反復曝露影響のエピゲノム機構解析 北嶋 聡	-----	35
3. システムバイオロジーによる毒性解析のAI化 北野 宏明	-----	42
4. 統合ツール“Percellome Integrator”の開発 相崎 健一	-----	48
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	-----	59

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3年度 総括研究報告書

トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
(21KD2001)

研究代表者 相崎 健一  
国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター 毒性部  
第一室 室長

### 研究要旨

本研究は、毒性の分子機序に基づいて、現行の不確実係数（安全係数）を利用する有害性評価手法を補強し、より迅速で、高精度且つ省動物を具現化した新たな有害性評価系の開発を目標として、マイクロアレイ（GeneChip）と次世代シーケンサを用いて基盤となる遺伝子発現及びエピゲノムの網羅的データを得つつ、独自開発のソフトウェア群による化学物質の生体影響の網羅的分析法の体系化を行い、これに、毒性学・分子生物学に精通したデータサイエンス専門家を擁して、システムバイオロジー及び人工知能（AI）技術を融合した新たな有害性評価系の開発を進める。

特に先行研究において、Percellome 法\*を基盤とする「新型」反復曝露実験\*\*の蓄積によりプロトタイプを構築した、化学物質の反復曝露による生体影響のデータベースについては、溶媒の反復曝露影響や、反復曝露影響の可逆性・非可逆性を遺伝子単位で取得、反映することにより、解析精度を向上させる。単回曝露のデータベースと共にこれを利用することで、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の期間短縮・効率化を検討する。

これらの技術開発の為に、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) 反復曝露影響のエピゲノム機構解析
- (3) システムバイオロジーによる毒性解析のAI化
- (4) 統合ツール“Percellome Integrator”の開発
- (5) Percellome データベースを利用した解析パイプライン

本研究班の初年度となる令和3年度の進捗は以下の通り。

(1) では、ペルフルオロオクタン酸（PFOA）の単回曝露、及び、4日間の新型反復曝露の2実験（以下、PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]と表記）を実施し、遺伝子発現解析を進め

て単回曝露、反復曝露に共通の要素と各々の曝露条件に特徴的な要素を抽出した。PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]の遺伝子発現誘導は、2時間目の誘導遺伝子数が少なく、24時間目に向けてその数が増加することが示された。基本的にPPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ を上流にもつ遺伝子が誘導されたが、2時間目に誘導された遺伝子には、NR1I2 (PXR)、あるいは、immediate early genes (IEG) の発現機構にかかわるシグナルの関与が示唆された。8時間以降は、PPARの下流の因子、SCL27A2などを介した系の動員が示唆された。また、Gadd45bをはじめ、DNA障害、RNA障害、タンパク合成障害、等、を示唆する反応が見られた。24時間目に向けて、癌関連、ユビキチン関連、及びNRF2系が含まれていた。この中にCAR下流のCyp2B10も含まれ、それらの誘導までの8時間以上の潜伏期の存在が注目された。これらに加え、PFOA[4+1]においては、Sirtuinシグナル、ミトコンドリア障害などの系の動員が示唆された。また、両実験の溶媒対照群の遺伝子発現値の差は、4日間の反復曝露の効果(基線反応)を示しており、定時点の内、3時点乃至4時点で、反復により発現が有意に低下(1.25倍、t検定で $p < 0.05$ )した119の基線反応遺伝子を解析した結果、HOTAIR(long non-coding RNA)制御回路、14-3-3回路などへの影響が示唆され、遺伝子発現、及び、タンパク合成機構への広範な影響の可能性が示唆された。更に精緻な解析を進める。

(2)では、サリドマイドの14日間反復曝露によるヒストン修飾解析をChIP-Seq法により解析する実験を実施した。サリドマイドの反復によって、Cyp4a10のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾であるH3K4me3が低下していることが明らかになった。また、Cyp4a14のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾であるH3K4me3が低下していることが明らかになった。また、Cyp7b1のプロモーター領域においては、活性型ヒストン修飾であるH3K27Acが増加していることが明らかになった。また次年度以降、多臓器のゲノムDNAメチル化解析を本格的に実施するにあたり、組織保存条件やデータ解析に際して解決しなければならない技術的問題の対応策の検討を進めている。

(3)では、システム毒性学的手法として、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べく、深層学習(Deep Learning)を用いて膨大な遺伝子変動データやエピゲノムデータから、有意に変動した遺伝子を高精度で自動同定させる技術開発ならびに解析パイプラインの連動強化を行なった。

(4)では、新型化学物質有害性評価システムの解析コアの主要ユニットとしての、遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発を進めた。これに組み込むライブラリの選定を進めつつ、本ユニットの基本情報となるGeneChipプローブセット4万5千件の最新マウスゲノム(mm10)上へのマッピングを実施した。

(5)では、既知のPPAR $\alpha$ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha)リガンドおよびこれまでの研究成果からPPAR $\alpha$ リガンドであることが示唆されている化学物質3種(クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウム、エストラゴール)の遺伝子発現プロファイルの動的変動を比較し、これら3種に共通するパターンや固有に認められるパターンを検出することにより、



Percellome データの効果的な活用方法を検討した。

尚、動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」（動物実験承認番号 365）に従い実施した。

- 
- (\*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。
  - (\*\*) 全動物に同量の検体を反復曝露し、遺伝子発現測定直前の曝露時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終曝露を一回行う。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
- 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  
プロジェクトリーダー
- 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

## 研究協力者

- 小野 竜一 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部 第五室 室長
- 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、独自構築したトキシコゲノミクス・データベース (DB) にインフォマティクス、及び、人工知能 (AI) を拡大適用し、化学物質が実験動物に惹起する遺伝子発現変動等の分子毒性学情報から、科学的根拠に基づく有害性予測評価手法を確立する。これにより「安全係数」を用いる従来の有害性評価手法を補強するとともに、迅速、高精度、省動物を具現化する新たな評価システムを構築することを目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ8億5千万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及び反復曝露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、さらに臓器別のゲノムDNAメチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシコロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

## 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：

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA: Pentadecafluorooctanoic Acid; 分子量：414.07、Cas No.: 335-67-1、純度 99.7%、東京化成工業 (株)) について、単回曝露 (0 日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記) 及び 4 日間「新型」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。PFOA の単回曝露時の用量は 0、1、3、10 mg/kg とし、4 回反復曝露の用量は 0.1mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、1、3、10 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) を用い溶媒はコーンオイル (C8267、Sigma-Aldrich) とし、金属製胃ゾンデ (KN-348、夏目製作所) と、ガラス製シリンジを用いて強制経口曝露を行い、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 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℃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。肝サンプルからこの様にして得られたデータについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対量化手法) を適用して絶対量化した後に網羅的遺伝子発現解析を行った。先ず我々が開発した「RSort」ソフトウェアを用いて、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 を数理的に有意な変動を示す順に自動的に並び替えた。このリストの上位のものから専門家による 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 を網羅性を維持しつつ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) 反復曝露影響のエピゲノム機構解析【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)

サリドマイド (700mg/kg) 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 時間後のマウス肝および、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  $\mu$ g) を材料として、1) 4  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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) システムバイオロジーによる毒性解析の AI 化

#### 【北野】

● 深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

先行研究で開発した、深層学習を用いた 3 次元グラフの画像解析システム DTOX について改良、即ち特

異パターンの追加学習と GUI 実装の改良を進めた。

追加学習用の画像セットは、遺伝子発現を用量×時間×発現量 (Percellome 法により細胞 1 個あたりの mRNA コピー数に換算したデータ) の 3 次元グラフに描画したものをを用いた。また GUI 実装は、python の代表的な GUI 作成用のモジュールである、PYQT5 と、QtDesigner を用いて改良を進めた。

● 深層学習を用いたエピゲノム解析データからの有意なエピゲノム修飾の判別

エピゲノム解析では、曝露下の遺伝子のエピゲノム修飾 (ヒストン修飾およびゲノム DNA メチル化の状態) を、下図に示すような解析画像として表示し、研究者の判断を助けている。

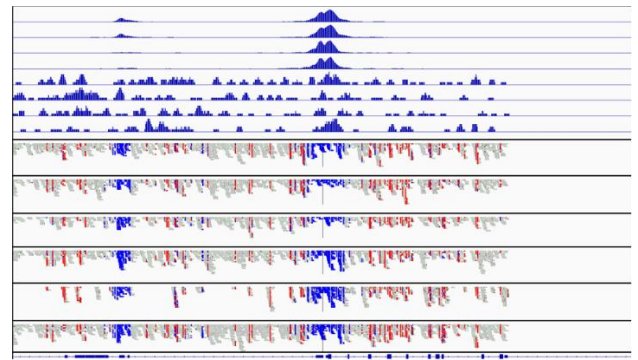


図. エピゲノム解析画像の例  
上から 8 行で示される分布がクロマチン修飾の状況を表しており、下から 8 行のプロットがメチル化の状況を表している。横軸は配列の位置を表している。メチル化については、青いプロットがメチル化されていない状態を表している。

有意なエピゲノム修飾を同定するために、長年の経験を積んできた研究者が、それぞれの遺伝子に対するエピゲノム解析画像を検討し、分類を行ってきた。しかしながら、化学物質数×遺伝子数の解析画像が存在し、網羅的に有意なエピゲノム修飾を同定するには、多大な時間と労力が必要となっている。これを解決すべく、エピゲノムデータ (解析画像) から、効率良く有意なエピゲノム修飾を判別する手法の構築を目的として、深層学習モデルの構築を行った。

深層学習モデルの訓練には、専門家により分類されたエピゲノム解析画像を訓練データとして用いた。このエピゲノム画像データは、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブラートの新型反復曝露と

単回曝露において得られたものである。各遺伝子に対するエピゲノム解析画像を、専門家が視覚的に検証して、以下の3群に分類している。

① **suppression** 群：反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が抑制されたもの (5,937 画像)

② **induction** 群：反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が誘導されたもの (457 画像)

③ **non significant** 群：反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が有意な変動をしめさなかったもの (2,349 画像)

エピゲノム画像データの 80%をトレーニングデータとして用いて深層学習モデルを構築し、残りの 20%のデータをテストデータとして用いて構築したモデルの分類精度の検証を行った。

#### ●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

SHOE 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。

#### (4) 統合ツール “Percellome Integrator” の開発【相崎】

ソフトウェアの in house 開発に際しては、先行研究で開発したソフトウェアの改良の際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。新たに開発するソフトウェアについては、ライブラリが充実している Python (ver.3.6.9)を用

いた。主な解析ライブラリとしては numpy (ver.1.19.4)、pandas (ver.1.1.5)、scikit-learn (ver.0.22.2.post1)を用いた。

また GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブセットのマウスゲノム上へのマッピングには BWA(Li H. and Durbin R. (2009) Bioinformatics, 25:1754-60.) ver 0.7.12-r1039 を使用した。

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

##### ●解析データ：

クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウムまたはエストラゴールを曝露したマウスの肝における遺伝子発現プロファイルを使用した。マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) にクロフィブラート (0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2,4,8,24 時間後に肝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。マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) にバルプロ酸ナトリウム (0, 50, 150, 500 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2,4,8,24 時間後に各臓器 (脳：皮質及び海馬、肺、心、肝、腎) 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。マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) にエストラゴール (0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2,4,8,24 時間後に肝を回収してマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供した。これらのデータは Percellome 法により正規化され、Percellome データとしてデータベース化されている。

##### ●データ解析：

曝露時間及び曝露用量依存的に発現変動が見られる遺伝子 (DEG) のリストは、遺伝子発現の 3D プロット (曝露用量、曝露時間、細胞一個あたりの mRNA コピー推定量を三方向の軸に取ったプロット) の形状より毒性学の専門家があらかじめ作成してい

たものを利用した。次に、遺伝子発現が亢進する時点のパターンごとに遺伝子リストを分割し、TargetMine (<http://targetmine.mizuguchilab.org>) を用いてエンリッチメント解析を行った。分割した遺伝子リスト間の重複を可視化する為に intervene (<https://asntech.shinyapps.io/intervene>) を用いてベン図を作成した。

### 倫理面への配慮

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

### C. 研究結果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

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

令和3年度は、ペルフルオロオクタン酸(PFOA)の単回曝露実験(TTG243:0, 1, 3, 10mg/kg)及びA+A実験(TTG244:0.1mg/kgを4日間曝露後、5日目に0, 1, 3, 10mg/kg)を行い(PFOA[0+1]、及び、PFOA[4+1]と表記)、GeneChipによる肝の網羅的遺伝子発現解析を実施した。尚、PFOA[4+1]における4日間反復曝露の用量が0.1mg/kgと低値である理由は、曝露中及び終了後24時間以内のマウス全身状態及び、肝重量変化を指標とした毒性が、単回曝露に比し反復曝露において著しく増強したためである。

#### ① PFOA[0+1] (実験コード TTG243-L)

単回曝露後、2、4、8、24時間目に増加を開始した遺

伝子の数は、それぞれ32、179、167、503であった。PFOAはPPAR $\alpha$ のリガンドであることが知られており、2時間目の32遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR $\delta$ 及びPPAR $\alpha$ を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた(Acot1、Pdk4、Plin2等)。

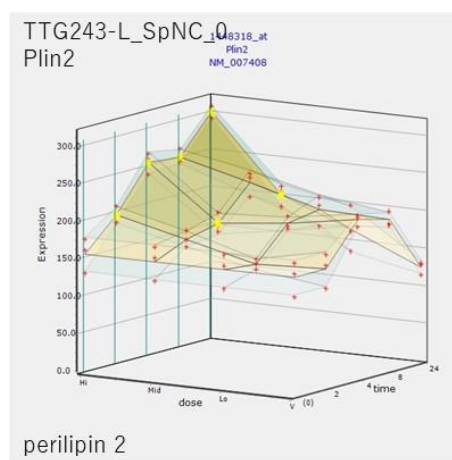
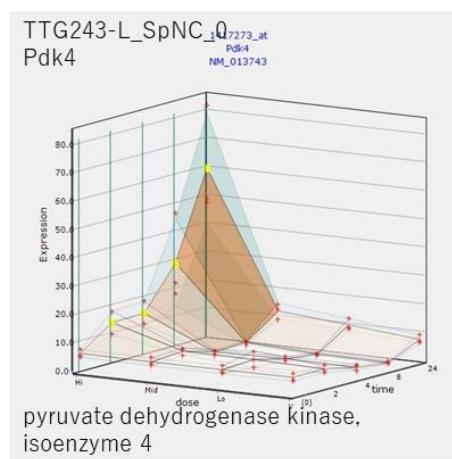
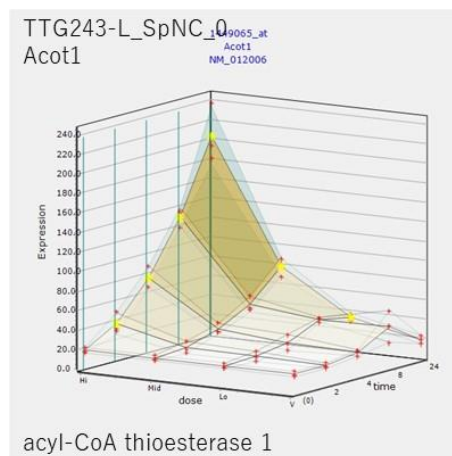


図 Acot1、Pdk4、Plin2



先行研究において解析した PPAR $\alpha$  のリガンドであるクロフィブラートの遺伝子リストとの差分を解析すると、2 時間目の遺伝子群には、PPAR $\alpha$  の下流以外に、Dusp1 などの immediate early gene (IEG) の系のシグナルが起動していることも示された (Dusp1、Jun 等)。

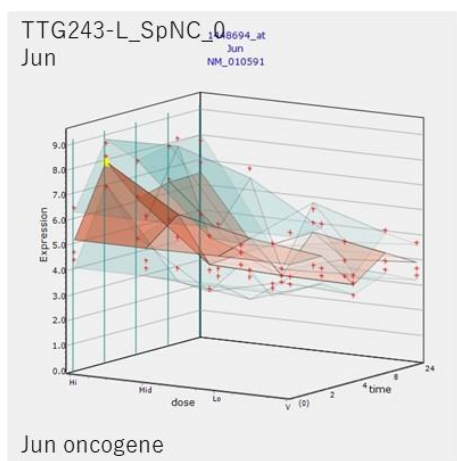
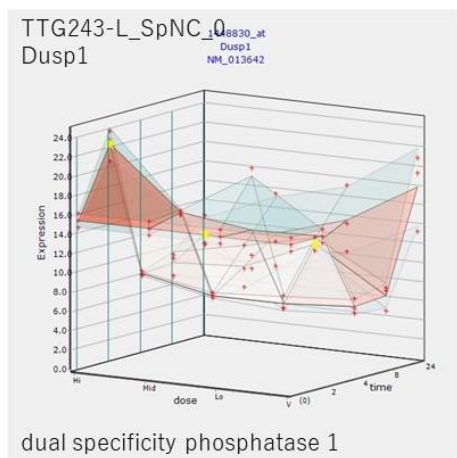


図 Dusp1、Jun

4 時間目に誘導開始された 179 遺伝子には、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、及び PPAR $\gamma$  の下流のものが多く含まれていた。(Acot2、Acot8 等)。

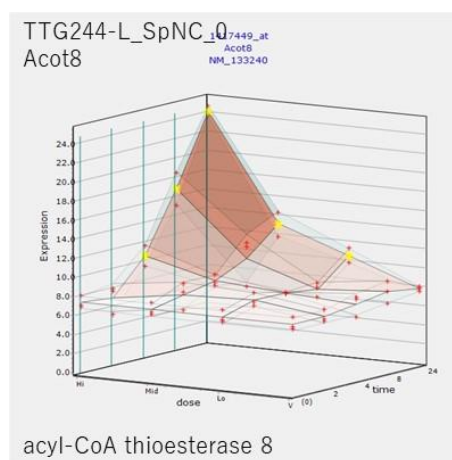
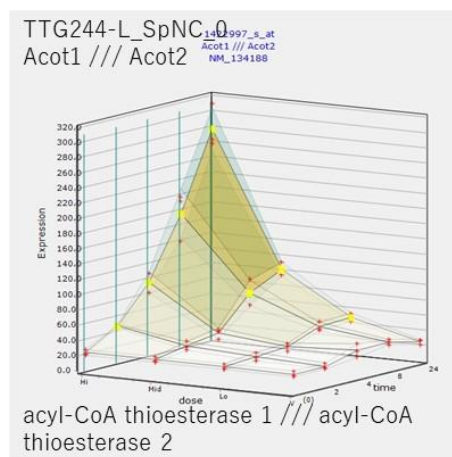
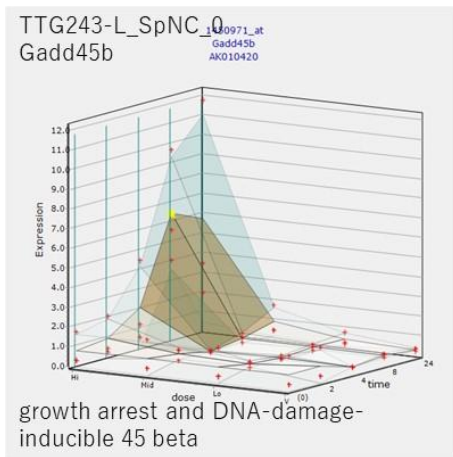
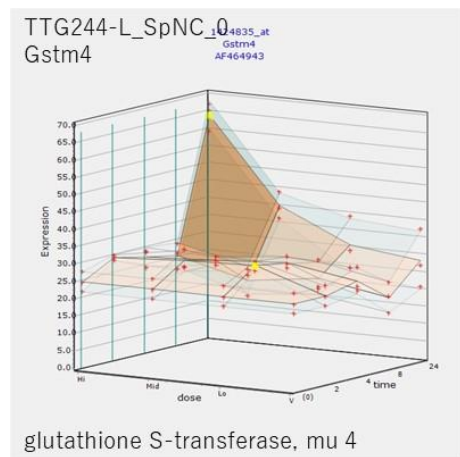
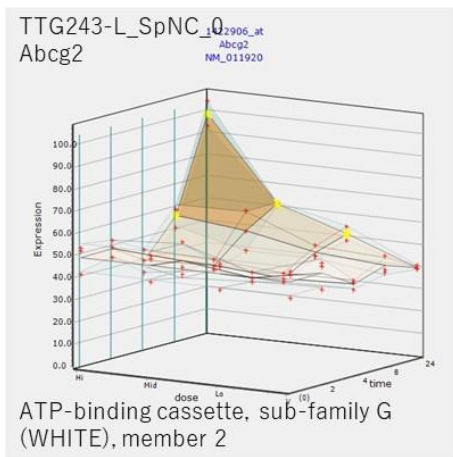
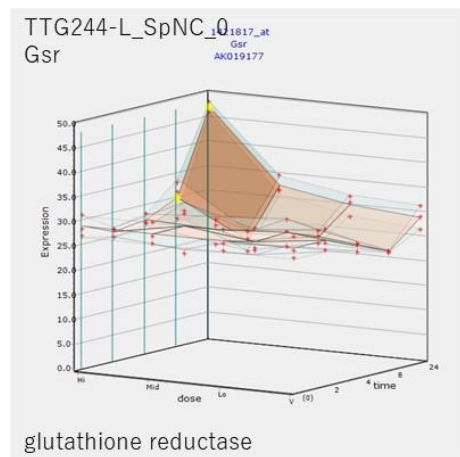
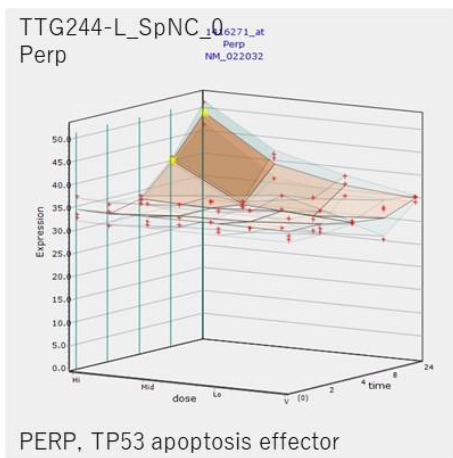
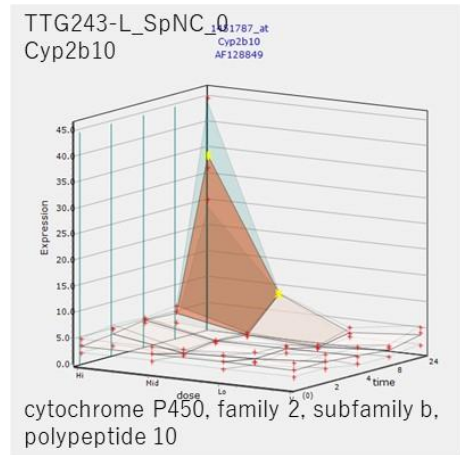


図 Acot2、Acot8

8 時間目に誘導開始された 167 遺伝子は、PPAR $\alpha$  の下流の SCL27A2 などの因子の下流に位置する遺伝子のほか、TGF $\beta$ 1 の下流の遺伝子、DNA、RNA、タンパクに対する傷害に反応する系の遺伝子が含まれていることが示唆された (Gadd45b、Perp、Abcg2 等)。



た (Cyp2b10、GSR、GSTM4、NFE2L2 等)。



☒ Gadd45b、Perp、Abcg2

24 時間目に誘導開始された 503 遺伝子は、癌関連、ユビキチン関連、及び NRF2 系が含まれていた。この中に CAR 下流の Cyp2B10 も含まれ、それらの誘導までに 8 時間以上の潜伏期があることが注目され

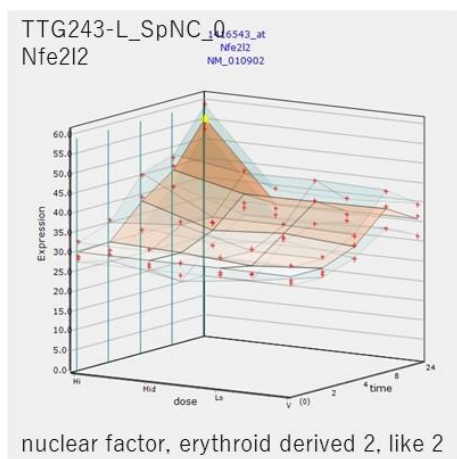
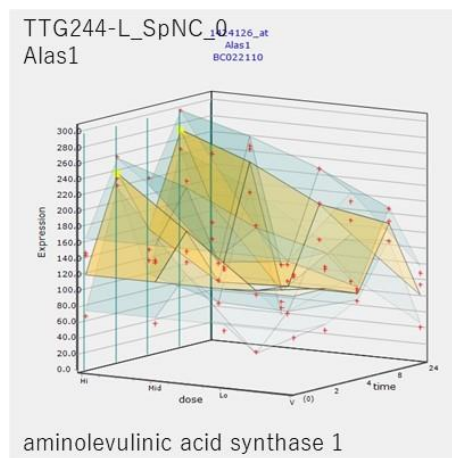


図 Cyp2b10、GSR、GSTM4、NFE2L2



aminolevulinic acid synthase 1

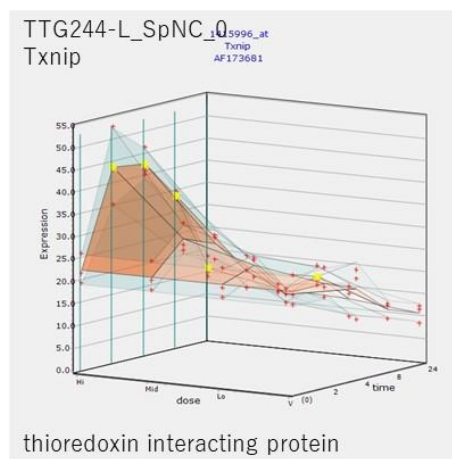


図 ALAS1、TXNIP

今までに測定した化学物質においては Cyp2b10 は 2 時間~4 時間目に誘導が開始しており、24 時間目まで誘導が開始しない例は PFOA が初めてであった。曝露直後のシグナル受容体からの下流遺伝子への誘導に時間がかかっているか、或いは、何らかの代謝産物が後半の遺伝子の誘導に寄与している可能性が示唆されるが、PFOA は難分解性であり、少なくともラットでは代謝されることは無いと報告されている。尚、Gsr、Gstm4 は Nrf2 の下流と考えられ、24 時間目まで誘導が開始しない例は比較的多くの化学物質で測定されていることから、これらとは別途の制御ネットワークが存在する可能性が示唆された。

## ② PFOA[4+1] (実験コード TTG244-L)

最終曝露終了後、2、4、8、24 時間目に発現増加を開始した遺伝子の数は、22、127、751、581 であった。2 時間目には、PXR 下流、TNF 下流の遺伝子が含まれていた (ALAS1、TXNIP 等)。

誘導された遺伝子の多くは、PFOA[0+1]と共通であった。

PFOA[0+1]では発現誘導されず、PFOA[4+1]に特徴的に発現したのものとして、Sirtuin シグナル系、ミトコンドリア障害、酸化的リン酸化などが示された (Agt7、Atp5fl、Ndufa5 等)



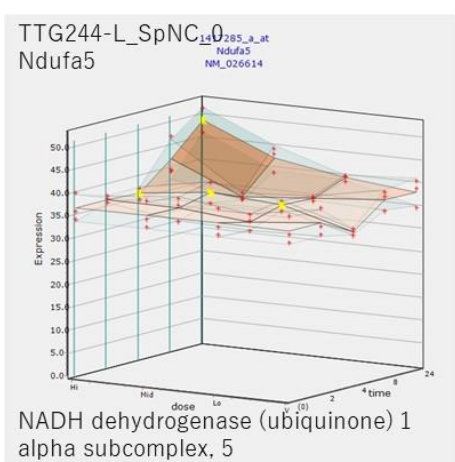
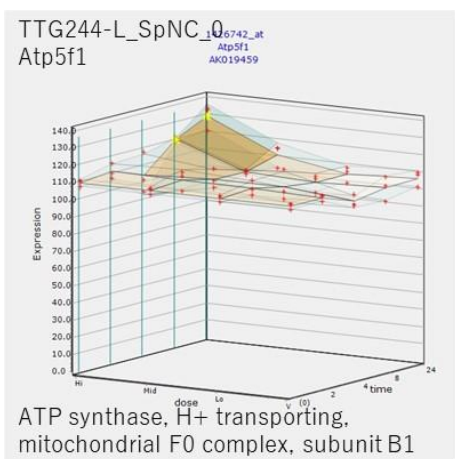
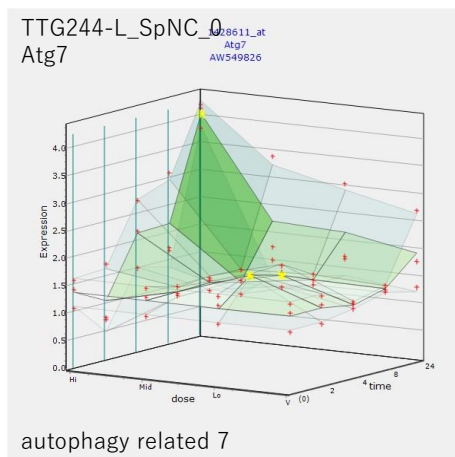


図 Atg7、Atp5f1、Ndufa5

その他の遺伝子は、PFOA[0+1]と類似のものが多く含まれていたが、PFOA[4+1]の方が、発現するタイミングが早まる傾向が見られ(667中、不変のもの341、

早くなったもの256、遅くなったもの70)、早くなった遺伝子群にはNrf2が上流に位置するものが多い傾向が認められた。

③最終曝露後2、4、8、24時間に生じる早い変動を過渡反応(Transient Response)とし、反復曝露で引き起こされるベースラインの上昇、或いは、低下の変動を基線反応(Baseline Response)と定義して、その解析を実施した。

4日間反復曝露により誘発された基線反応の解析を行った。測定4時点の内、3時点乃至4時点で、反復により発現が有意に低下(1.5倍、t検定で $p < 0.05$ 、1コピー/細胞以上)した基線反応遺伝子(ソフトウェア“Baseline Comparison”による計算結果)は39、上昇した遺伝子は5と少なかった。低下した遺伝子群は、HOTAIR(long non-coding RNA)制御回路などへの影響が示唆された。選択条件を1.25倍、t検定で $p < 0.05$ に緩和した場合は、基線反応が低下した遺伝子は119あり、HOTAIR(long non-coding RNA)制御回路、14-3-3回路などへの影響が示唆され、遺伝子発現、及び、タンパク合成機構への広範な影響の可能性が示唆された。この所見からも、0.1mg/kgの用量においてPFOAの4日間反復曝露が基本的な生命維持機構に強く影響する可能性が示唆された。更に精緻な解析を進める。上昇した遺伝子は13と少なく、有意な情報は得られなかった。

## (2) 反復曝露影響のエピゲノム機構解析【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、反復経口曝露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。

令和3年度においては、新たにサリドマイド(700mg/kg)を14日間反復曝露した後、溶媒(0.5%

メチルセルロース水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝および、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 μg) を材料として、ヒストン修飾の解析を行なった。

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

抗 H3K4me3 抗体 (15, 923、16, 870)、  
 抗 H3K27Ac 抗体 (24, 003、23, 484)、  
 抗 H3K27me3 抗体 (15, 339、22, 000)、  
 抗 H3K9me3 抗体 (18, 930、15, 667)、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数が 15, 339 から 22, 000 へ、43. 4% 増加しており、サリドマイドの反復投与によって H3K27me3 が亢進することが明らかになった (その他は、H3K4me3: 5. 9 % 増加、H3K27Ac: 2. 2 % 減少、H3K9me3: 17. 2 % 減少)。したがってサリドマイド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。

また、各種抗体を用いた ChIP-seq 解析の結果により、溶媒対照群と反復投与群の間で、ピークの値の変動が大きかった領域の上位 20 領域とそれらのマッピング結果の一例を以下に示す。

各ヒストン修飾において変動の大きかった領域の上位には、薬剤代謝酵素である Cyp が数多く含まれていた。

### H3K4me3(活性型)が減少

log2(repeat)	Gene List	H3K4me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.28	Fat1	1.643		upstream	chr4:41219800-41222900
-0.27	Csmd	2.844		in gene	chr15:102119600-102195700
-0.21	Ctcf	95.704		in gene	chr7:74443600-74453700
-0.20	Cyp4b10	1.288		upstream	chr4:115513100-115520700
-0.20					chr7:145040000-145050300
-0.18	Fcgr2	6.382		downstream	chr4:11794000-11795000
-0.18	Scav5	52.296		in gene	chr4:65713600-65723700
-0.18	Cyp4b14	142		in gene	chr4:115491000-115498300
-0.18	Ctcf	25.122		in gene	chr1:1217000-12170300
-0.18	Dnf1, Tgfr1	4844, 12064		in gene, upstream	chr4:10729600-10730700
-0.17	Sap9	209.938		downstream	chr1:11737000-11744800
-0.17	Apo1	24.499		in gene	chr7:14472600-14474000
-0.17	Ctcf	1.004		in gene	chr13:10319600-10361300
-0.17	Tcf4b, LOC101059868, Nph2	-1951, 2033, -5436		upstream, downstream, upstream	chr1:156297100-15631300
-0.17	Gabbr2	36.015		in gene	chr4:46949200-46962100
-0.17					chr4:78425200-78430000
-0.16					chr6:53194200-53219700
-0.16	Smk3c	82.408		in gene	chr7:139114000-13918300
-0.16					chr6:89024600-89051100

### H3K4me3(活性型)が増加

log2(repeat)	Gene List	H3K4me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.38					chr19:38363200-38375100
0.38	Smoc1	8.009		upstream	chr12:81017600-81019700
0.31	Ctcf	5.972		in gene	chr1:21627400-21628300
0.31	18105038239k, Msi2	-10758, 579		upstream, downstream	chr1:63336800-6337700
0.30	Cx3b	3.644		in gene	chr4:10507600-10509300
0.30	Mafk2a	23.989		downstream	chr4:22920200-22921700
0.30	Zfp520	-11.885		upstream	chr16:4322800-4324700
0.29	Gm1551, Oneuc1	31362, 17878		downstream, in gene	chr9:7486800-74868700
0.29	Acat2	29.452		in gene	chr4:49818100-49819400
0.28	Scav1a	156.229		upstream	chr4:14186400-141868700
0.28	Hud3b3	5.229		in gene	chr1:98750600-98761500
0.28	Aspl, Zscan2	2905, 35250		in gene, downstream	chr7:12345100-12346700
0.28					chr1:21293600-21293700
0.28	Ppard, 18100134236k	52245, 13291		in gene, downstream	chr7:128277100-12832700
0.28	Ar15	292.791		in gene	chr13:14082400-140828100
0.27	Cyp2b9	4.386		upstream	chr19:397900-3995300
0.27	Ctcf	15.586		in gene	chr1:144400-14140000
0.27	Serpina3k	3.213		in gene	chr12:10433400-104349100
0.26	Zfp75, Tmem31	19838, 187828		in gene, downstream	chr1:36780200-36783100
0.26					chr2:73894200-73921700

### H3K27Ac(活性型)が減少

log2 ratio	Gene List	H3K27Ac down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.44	Csmd	2.844		in gene	chr15:102119600-102195700
-0.44	Smc1	416.351		downstream	chr4:28884400-28888900
-0.43					chr9:9533600-9534400
-0.38	Fcgr2	6.382		downstream	chr4:9554800-95558700
-0.38	Sap9	294.091		in gene	chr4:2872800-2873900
-0.38	Fcgr2, Dock6	4753, 47336		upstream, in gene	chr12:801800-2148000
-0.34	Lw1	95.704		in gene	chr5:74443600-74453700
-0.34					chr7:14504000-145050300
-0.34					chr4:7681500-7682500
-0.31	Hmox1, Rpl1	129316, 2938		downstream, in gene	chr4:98479600-98481100
-0.31					chr6:11729400-11730000
-0.31	Ccl5a1	34.987		in gene	chr4:47238600-47247300
-0.31					chr4:78425200-78430000
-0.30	Hah2a, Ch3, Fam32a	18231, 8938, -13831		downstream, in gene, upstream	chr6:72198400-7221300
-0.30	Ragap1	117.679		in gene	chr2:2973400-2974000
-0.30	Ctcf	297.899		in gene	chr17:74800-5745100
-0.30	1810503249k, Sct13a4	20108, 39327		downstream, in gene	chr4:8927000-10387500
-0.29	AWS4942	3.759		in gene	chr1:11957100-119582100
-0.29	Gabbr2	127.116		in gene	chr4:46868600-46872500
-0.29					chr1:39003600-390051700

### H3K27Ac(活性型)が増加

log2(repeat)	Gene List	H3K27Ac up	Dist to Start	Position	Start-end
0.30	LOC101059853, Cyp2b10	1535, -13865		in gene, upstream	chr7:25851800-2587500
0.31					chr9:7452000-7453100
0.31					chr12:74800-74807100
0.31	Rah3ap1	30.228		in gene	chr1:12789700-12790000
0.41					chr6:74321400-7433300
0.41	Cyp2b9	1.462		in gene, in gene	chr19:397900-3995300
0.41	Pf4f001	14.027		in gene	chr15:6660700-6661500
0.42					chr19:18145200-18149300
0.42					chr1:11584600-115847100
0.42	Zfp520	94.215		in gene	chr16:4322800-4324700
0.41	Mchr1, B430426106Rk	12800, 3563		downstream, in gene	chr15:8124200-8125400
0.40					chr19:3745200-37467100
0.40	Zfp520	-11.885		upstream	chr16:4322800-4324700
0.38	2810471M19k	16.635		downstream, in gene	chr1:2869300-2870700
0.39					chr4:5128800-5129000
0.38	Gm1551, Oneuc1	31362, 17878		downstream, in gene	chr9:7486800-74868700
0.38	Fat1	146.481		upstream, downstream	chr1:53195200-53204100
0.38	Mapkap3, Cih	-12122, 5310		in gene	chr4:10729400-10731000
0.37	Fcgr1	132.246		in gene	chr4:9930200-9930900
0.37					chr7:7447800-74474700

### H3K27me3(抑制型)が減少

log2(repeat)	Gene List	H3K27me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.36	M2, M1	3081, -3390		downstream, upstream	chr8:8416600-84184700
-0.36	Cyp2b9	27.039		in gene	chr17:2907800-2909700
-0.21					chr4:10243600-10265100
-0.21	LOC101059853, Cyp2b10	1535, -13865		in gene, upstream	chr7:25851800-2587500
-0.20	Gc	5.299		in gene	chr4:89434400-8943700
-0.21	Mh, 2102067139k	48309, 1000		in gene, in gene	chr4:8241600-1140000
-0.21	Scp, Gm16548, F5	41935, -4982, 5340		downstream, upstream, in gene	chr1:164147800-16416600
-0.21					chr6:15617000-1562500
-0.19	Pf2v7, Pf2v4	59988, -3658		in gene	chr1:19012600-19019000
-0.18	Fcgr1c2	2.005		downstream, upstream	chr12:826900-12721200
-0.18	Fcgr1c2	2.005		in gene	chr19:3872800-3873900
-0.18	Pf18, Gm19939	7101, -5504		in gene, upstream	chr18:1116200-1113100
-0.18	Ctcf, Cc, Cccl2a	21460, 5667, 26538		downstream, in gene, downstream	chr10:12833800-128353100
-0.18	Acat1a	-725		upstream	chr4:116642800-116641900
-0.18	Gm1033	29.145		downstream	chr8:6934900-6938300
-0.18	Mh	115.609		in gene	chr4:8241600-8402000
-0.18	Ctcf	2.438		in gene	chr6:107145200-107160000
-0.18	Cy55	21.385		in gene	chr18:84847400-84888100
-0.18	Mharr1-2, Mharr7b	25404, -26120		upstream, upstream	chr15:85661000-85711300
-0.18	Ctcf	2.927		in gene	chr6:7907400-7908300

### H3K27me3(抑制型)が増加

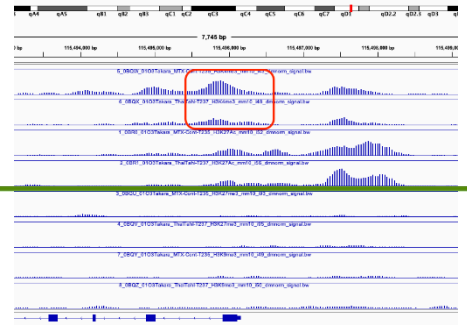
hg2(repeat)	Gene List H3K27me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.29	AS30011008R6, Mxi1	13751, -11747	downstream, upstream	chr7:90737200-90745399
0.25	Tp53, Ccna3h	25846, 37584	downstream, in gene	chr7:25379400-25412999
0.33	Top2, Ccna1, Mxi19a2, Ling3, Lmnb7, Spplb3	22121, 9943, 6802, 8440, 19610, -19670	upstream, downstream, downstream, in gene, downstream, upstream	chr10:50621200-50649999
0.22	Ctcf1	20057	in gene	chr7:90737200-90813799
0.21	SceB1, TPO03AG24R6	999, 13787	in gene, downstream	chr5:112537800-112545999
0.21	Fucci1, TPO021946R6, Spata32	13841, 21799, 10813	in gene, downstream, downstream	chr11:103184000-103207799
0.22	Top2, Ccna1, Mxi19a2, Ling3, Mxi1	9795, -13255, 10152	in gene, upstream, downstream	chr17:271484000-27152999
0.21	Cmp3	4,218	in gene	chr5:3729800-37292999
0.21	Magh1, Ctnb, 4732471.01R6, Lipe	60035, 2525, -3620, 28788	downstream, downstream, upstream, downstream	chr7:25361800-25372999
0.21	Gm5	4299	upstream	chr7:2744700-27523999
0.21	Vgll3, Iqgof5, 493140081R6, Gm2511	26148, 724, 16439, 29248	downstream, in gene, downstream, downstream	chr7:4347200-4356999
0.21	Linc3, Emln3	10729, -1071	downstream, upstream	chr2:160933600-160923199
0.21				chr2:57916000-79841199
0.20	Arhgap10	203,008	downstream	chr4:44941000-140513799
0.20	Gm7b, Hnf3	21465, 77732	downstream, in gene	chr11:8644800-9472999
0.20	Gm4	75,505	in gene	chr4:11395200-113717199
0.20	Gm4	16005, 16839	in gene, downstream	chr12:2232400-2241199
0.20	Ons1, Mir199b	183,910	in gene	chr2:3232400-32345199
0.20	Rou2	183,910	in gene	chr13:5114400-51129999
0.20	Hnf2	1,659	in gene	chr7:28488200-89704999

#### Activation marks

- H3K4me3 (single)
- H3K4me3 (repeated)
- H3K27Ac (single)
- H3K27Ac (repeated)

#### Repression marks

- H3K27me3 (single)
- H3K27me3 (repeated)
- H3K9me3 (single)
- H3K9me3 (repeated)



### H3K9me3(抑制型)が減少

hg2(repeat)	Gene List H3K9me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.31	Ccd8b	55,578	in gene	chr10:70133200-70172199
-0.31	Cytl2	108,792	in gene	chr8:116617800-116630999
-0.31	Wess	98,047	in gene	chr8:11623800-116467199
-0.30	KH3, Hmnpa2	5071, 21957	upstream, downstream	chr13:5895400-58119599
-0.30	Wec2	66,752	in gene	chr8:47913400-47934199
-0.30	Hmnb1, Tkl2	11486, 24559	downstream, downstream	chr8:10421000-104209999
-0.29	Tkl1	45,785	downstream	chr10:21214200-121557799
-0.29	Map3k4	45,261	in gene	chr7:1226300-12283799
-0.29	Ccd8a, Z1101182R6	99876, -11648	in gene, upstream	chr10:7014800-7020199
-0.29	Gm1033, Parg1	4940, -10568	upstream, upstream	chr5:2644800-36241599
-0.28	Yklf, Cam2b	17141, 92849	downstream, in gene	chr11:5967600-5978199
-0.27	Cytl2	135,392	in gene	chr8:11657800-116615999
-0.27	Egfp1b3	65,967	in gene	chr7:29432800-29454199
-0.27	Pfau	96,514	in gene	chr7:8621000-86292999
-0.27	Egfp, Siglec15	106032, 12769	downstream, in gene	chr8:78027000-78051799
-0.27	Wess	21,747	in gene	chr11:445900-114487799
-0.27	Gm4	16005, 16839	in gene, downstream	chr12:2232400-2241199
-0.27	Apbb2	66,918	in gene	chr5:6653600-66567199
-0.27	Ar15, AK3009L17R6	130491, 26593	in gene, in gene	chr13:1414000-134139999
-0.27	Wess	69,447	in gene	chr11:508000-13118199

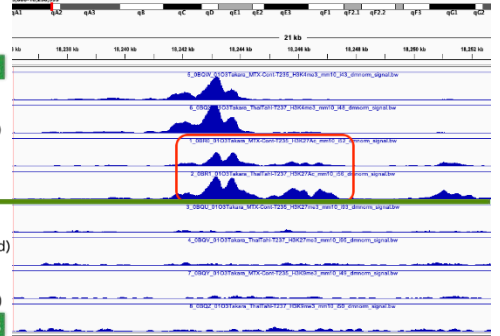
また、Cyp7b1のプロモーター領域においては、活性型ヒストン修飾である H3K27Ac が増加していることが明らかになった。

#### Activation marks

- H3K4me3 (single)
- H3K4me3 (repeated)
- H3K27Ac (single)
- H3K27Ac (repeated)

#### Repression marks

- H3K27me3 (single)
- H3K27me3 (repeated)
- H3K9me3 (single)
- H3K9me3 (repeated)



### H3K9me3(抑制型)が増加

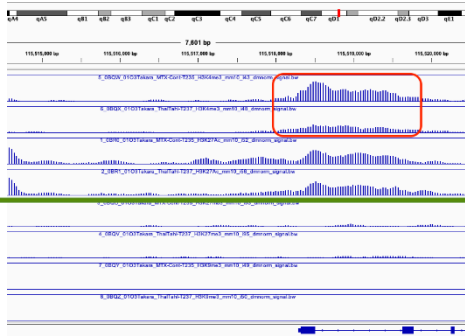
hg2(repeat)	Gene List H3K9me3	Dist to Start	Position	Start-end
0.24	Serpin3k	3,213	in gene	chr12:10433400-104349199
0.24	Egr, E23001515R6	68494, 20003	in gene, downstream	chr11:1677500-16844399
0.22	Mxi1, OS30011008R6	276452, -1382	in gene, upstream	chr6:15957600-160681199
0.21	Cc3b	1,644	in gene	chr6:10507600-105098399
0.21	Duqg1	27	upstream	chr7:28591800-28515199
0.21	Tcf12a14	44,520	in gene	chr6:36531600-36549999
0.19	Klf1, Hnf4a	61696, 3258	downstream, in gene	chr10:37431800-37444399
0.19	Cyp7b1	2,463	upstream	chr3:1823300-18236999
0.19	Cyp55a	1,014	in gene	chr9:4008400-40077199
0.19	Klf2	14,438	in gene	chr16:30063600-30127999
0.18	Gm18551, Oncu1	13182, 17878	downstream, in gene	chr9:7486800-74887799
0.18	Ankhd1, Elnh3a, Srsf1, Apbb3, Sbc35a	103196, -261, 4512, 15567, -15418	downstream, upstream, downstream, downstream, upstream	chr8:3665200-36672999
0.18	Hnf4a	132,257	in gene	chr4:10264800-10260199
0.18	Hnf4a10	1,082	in gene	chr9:93951800-93969999
0.18	AS30011008R6, Mxi1	13751, -11747	downstream, upstream	chr7:90737200-90745399
0.18	Sprr3	8,191	in gene	chr6:5949800-59472999
0.18				chr13:1800000-12187799
0.17	Gm15884	36343, 3742	in gene, in gene	chr10:87853800-87369999
0.17	Nr1h2, Meant3	10420, 57461	in gene, downstream	chr8:3827200-38286799
0.17	Linc10, Dpca3a, Bmy	13073, 3126, -5080	downstream, in gene, upstream	chr6:2562300-2513799

サリドマイドの反復によって、Cyp4a10のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。

#### Activation marks

- H3K4me3 (single)
- H3K4me3 (repeated)
- H3K27Ac (single)
- H3K27Ac (repeated)
- H3K27me3 (single)
- H3K27me3 (repeated)
- H3K9me3 (single)
- H3K9me3 (repeated)

#### Repression marks



また、Cyp4a14のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。

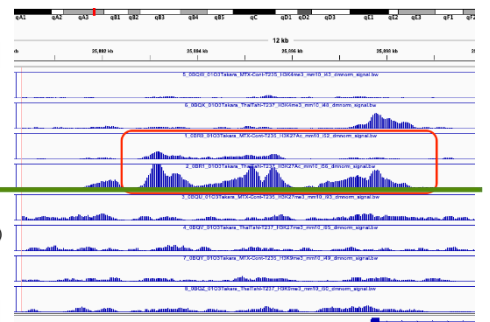
さらに、Cyp2b10のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K27Ac および H3K4me3 が増加していることが明らかになった。

#### Activation marks

- H3K4me3 (single)
- H3K4me3 (repeated)
- H3K27Ac (single)
- H3K27Ac (repeated)

#### Repression marks

- H3K27me3 (single)
- H3K27me3 (repeated)
- H3K9me3 (single)
- H3K9me3 (repeated)



一方、肝臓以外の臓器のゲノム DNA のメチル化解析方法については、各種臓器よりゲノム DNA を抽出した後は、基本的には先行研究でプロトコルを確立している肝臓での全ゲノムバイサルファイト解析方法と同じと確認された。

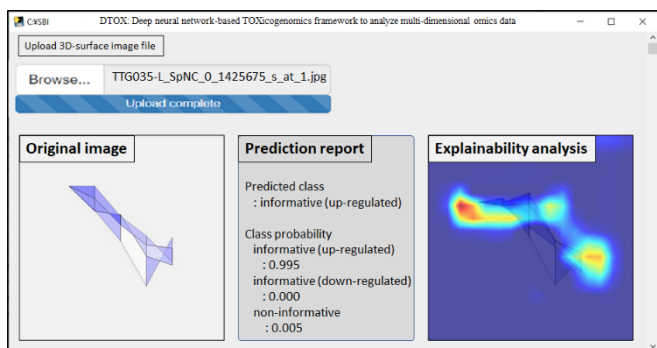
### (3) システムバイオロジーによる毒性解析の AI 化

#### 【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

トレーニング等に使用していないデータセットに対し、先行研究で開発した深層学習モデル DTOX を適用して予測を実行し、その結果を専門家の判定結果と比較して、予測が食い違った遺伝子の 3 次元グラフ画像を集め、追加学習を試みた。例数が少なかつたためか、その効果は大きなものでは無かったが、過学習等の悪影響も起こらず、深層学習モデルによる 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による予測精度を大きく上回った。

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) の実装及び改良を進めた。



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、連続処理機能やその際のレポート作成機能の実装を検討しているほか、DTOX に関する成果の原著論文文化を進めている。

#### ●深層学習を用いたエピゲノム解析データからの有意なエピゲノム修飾の判別

エピゲノム解析画像を①suppression 群、②induction 群、③non significant 群の三群に分類することを目的として、多様な深層学習アーキテクチャに基づく分類モデルを構築した。使用した深層学習アーキテクチャは 8 種類であり、それらの内最も複雑なものは 121 層のレイヤーで構築されている (下表)。

これらの深層学習アーキテクチャは、1000 カテゴリに分類できる 120 万枚の画像で構成されるデータ (ImageNet dataset) を用いてプレトレーニングされたものである。このプレトレーニングされた深層学習アーキテクチャを、上記のエピゲノム解析画像に対して転移学習を行うことで、分類モデルを構築した。

エピゲノム解析画像データの 80% をトレーニングデータとして用いて深層学習モデルを構築し、残りの 20% のデータをテストデータとして用いて構築したモデルの分類精度の検証を行った結果、下図に示すように、構築した 8 種の分類モデル全てで、non-significant 群と、それ以外の 2 群を正確に分類することが出来た。



	induction	ns	supression
induction	0	3	89
ns	0	466	4
supression	0	4	1184

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	468	2
supression	0	3	1185

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	465	5
supression	0	3	1185

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	461	6
supression	0	4	1184

	induction	ns	supression
induction	0	3	89
ns	0	467	3
supression	0	3	1185

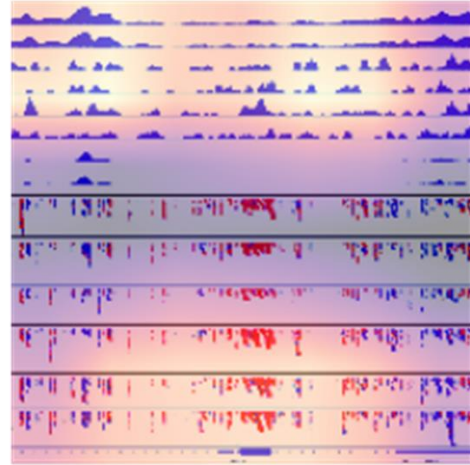
  

	induction	ns	supression
induction	0	1	91
ns	0	464	3
supression	0	3	1185

このことは、構築した深層学習モデルは、有意なエピゲノム解析画像を正確に抽出できる、つまりは、反復曝露により生じるエピゲノム修飾の中でも遺伝子変動に影響を与えるものを見分けることが出来る可能性を示唆している。また、supression 群も、8種の深層学習モデル全てで、正確に分類することが出来た。しかしながら、構築した8種類のモデル全てで、induction 群を分類することが出来なかった。

induction 群の分類不調の原因を調べるために、構築した深層学習モデルが画像のどの部分に着目して分類を行っているのかを示すべく、代表的な 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) を用いて深層学習モデルの解析を行った。解析結果は、下図の様に示され、深層学習モデルが図中の明るい部分に着目して分類を行っていることが示された。

pred. class: 2, actual class: supression



現在、専門家と協力し、着目している部分の生物学的な解釈を進めている。

#### ●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

今年度は、GARUDA プラットフォーム上で動作する SHOE ガジェットの開発や、SHOE 本体の機能追

深層学習アーキテクチャ	層の数	参考文献
resnet18	18	<a href="https://arxiv.org/abs/1512.03385">https://arxiv.org/abs/1512.03385</a>
resnet34	34	<a href="https://arxiv.org/abs/1512.03385">https://arxiv.org/abs/1512.03385</a>
resnet50	50	<a href="https://arxiv.org/abs/1512.03385">https://arxiv.org/abs/1512.03385</a>
alexnet	8	<a href="https://dl.acm.org/doi/10.1145/3065386">https://dl.acm.org/doi/10.1145/3065386</a>
densnet121	121	<a href="https://arxiv.org/abs/1608.06993">https://arxiv.org/abs/1608.06993</a>
squeeznet_0	15	<a href="https://arxiv.org/pdf/1602.07360v3.pdf">https://arxiv.org/pdf/1602.07360v3.pdf</a>
vgg16	16	<a href="https://arxiv.org/abs/1409.1556">https://arxiv.org/abs/1409.1556</a>
vgg19	19	<a href="https://arxiv.org/abs/1409.1556">https://arxiv.org/abs/1409.1556</a>

加などを進めた。また一部の環境でインストールできないなどの事例があったため、原因調査と対応策の検討を進めている(今年度内に完了する見込み)。

#### (4) 統合ツール “Percellome Integrator” の開発【相崎】

最終目標である新型化学物質有害性評価システムの解析コアの主要ユニットとしての、遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発を進めた。これに組み込むライブラリの選定を進めつつ、データ解析ユニット運用の基盤となるデータ群の結合に必要な情報(基盤情報)の整備を進めた。

遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発に際しては、Percellome 法などの独自技術の実装部分を除き、実績のある公開ライブラリの利用が望ましい。有用なライブラリは多数リリースされているが、今回の調査では、バイオデータ全般の処理が可能な biopython (<https://biopython.org/>)、有力なゲノムブラウザである IGV (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>)の開発グループがリリースしている組み込み用 JavaScript ライブラリ igv.js (<https://github.com/igvteam/igv.js>)とその Jupyter 用ラッパー ipyigv (<https://github.com/QuantStack/ipyigv>)を中心に、その他のバイオ系データに対応可能な可視化ライブラリとして、HiGlass (<https://higlass.io/>)、Plotly (<https://plotly.com/graphing-libraries/>)などの機能や動作性能(処理速度、安定性)、ライセンス、依存関係、コンフリクト状況の確認を行なった。

基盤情報の整備では、最重要と考えられる項目として、主要データの大半を占める遺伝子発現データを生成したマイクロアレイ GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブ 50 万件の最新のマウスリファレンスゲノム (mm10)上での座標の確定であるが、作業効率の観点から、11~25本のプローブ群からなるプローブセット 4.5 万件の座標確定作業を進めた。各プローブセットのターゲット配列はメーカーが提供する fasta フォーマットの配列データ Mouse430\_2\_target より取得し、python スクリプトにより fastq 形式に変換した。mm10へのマッピングは、BWA の mem オプションにて実施した。この結果、45101 件の target 配列のうち、複数領域にマッ

ピングされたものが 785 件、マッピングされなかったものが 457 件あった。またマッピングされたものでも、メーカーが提供している Mouse430\_2.mm10.bed の情報、具体的には染色体番号がマッピング結果と異なるものが 1320 件あった。Mouse430\_2.mm10.bed で複数の領域 (2~12 箇所) にマッピングされていたプローブセット 785 件と合わせ、少なくとも 2105 件 (全プローブセットの 4.7%) については、個別の手動調整が必要であることが明らかになった。

個別に調査したところ、BWA によりマッピングされた染色体と、メーカー情報での染色体が異なるプローブセットの多くは、複数のエクソンを含む領域に設計されていることが確認された。

ただし、一部のプローブセットでは、元来の遺伝子座と異なる染色体上の領域をターゲットに設計されていることも判明しており、解析精度を高めるためには丁寧な確認作業が必要であった。

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

クロフィブラートは高脂質血症治療剤であり、PPAR $\alpha$ を介した脂肪酸 $\beta$ 酸化の亢進などによりトリグリセリドやVLDLの減少やHDLコレステロールを誘導すると考えられている。また、これまでの我々の研究により、①バルプロ酸ナトリウム曝露によって PPAR $\alpha$ 、SREBP、ERのクロストークが影響を受けること、②エストラゴールは特異性の高いPPAR $\alpha$ リガンドである可能性があることが既に見いだされている。そこで、これらの化学物質で発現が亢進する遺伝子の比較を行い、PPAR $\alpha$ の活性化に係る共通項や差異について考察した。その結果、Acot (Acyl-CoA thioesterase) といったPPAR $\alpha$ 標的遺伝子は共通して2,4,8時間で発現亢進が認められており PPAR $\alpha$ の活性化は数時間保たれていること、3種の化学物質によって発現が亢進する遺伝子リストで重複は大きくないこと、その一方で発現亢進が認められる遺伝子

のうちエンリッチメント解析で検出される共通機能を有するものは3種の化学物質間で似通っていることが見出された。バルプロ酸ナトリウムでは2,4時間の時点で転写や細胞周期に関連する遺伝子の発現が亢進し、少し遅れて脂質代謝関連遺伝子の亢進のピークが認められた。また、クロフィブラートでは曝露4時間の時点でリボソーム生合成関連遺伝子の発現亢進が認められた。これらの遺伝子ではパスイレベルのエンリッチメントは認められずGene Ontologyレベルでのエンリッチメントが検出されていることから、PPAR $\alpha$ 活性化に伴う生体応答である可能性が考えられる。

#### 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、令和3年度は、ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の単回曝露実験 (PFOA[0+1]と表記) 及び4日間の新型反復曝露実験 (PFOA[4+1]と表記) を行った。4日間の反復曝露の用量は、予備実験の結果から 0.1 mg/kg とし、単回曝露の用量 (0, 1, 3, 10mg/kg) に比し低値となった。これは反復曝露中、及び、終了後 24 時間以内のマウス全身状態及び、肝重量変化を指標とした毒性が、単回曝露に比し反復曝露において著しく増強したためである。遺伝子発現の解析結果、PFOA[4+1]ではPFOA[0+1]と類似のものが多く含まれていたが、PFOA[4+1]の方が、発現するタイミングが早まる、或いは、反応が増強する傾向が見られた。PFOA[4+1]の発現変動遺伝子からPFOA[0+1]のそれを差し引いた遺伝子リストの解析からは 0.1 mg/kg と低濃度ながら4日間の反復曝露により、Sirtuin シグナル系、ミトコンドリア障害、酸化リン酸化等の系が、基線反応の低下を示した遺伝子のリストからは、タンパク合成、ミトコンドリア機能、細胞増殖、等の基本的な生命維持機構に強く影響

する可能性が示され、これは反復曝露によるマウスの全身状態、肝重量変化といった毒性の増悪にも整合する。

また PFOA は PPAR $\alpha$ のリガンドであることが知られており、実際に単回曝露 2 時間目に誘導が開始される 32 遺伝子は PPAR $\delta$  及び PPAR $\alpha$ を上流に持つものであった。しかしながら遺伝子発現誘導数は時間が経過するほどに増加しており、このことから曝露直後のシグナル受容体からの下流遺伝子への誘導に時間がかかっているか、シグナル受容体からの継続的な刺激の増強による現象であるか、或いは、何らかの代謝産物が後半の遺伝子の誘導に寄与している可能性が示唆された。但し、PFOA は難分解性であり、ラットでは代謝されることは無いと報告されているため、マウスでも同様と考えられる。尚、代謝されない難分解性の受容体リガンドの代表的な例であるダイオキシンの単回曝露時の遺伝子発現誘導の様態と比較したところ、PFOA の経過とは異なっていた。

これらの PFOA に誘導された反応は、反復曝露による明らかな増悪例として注目すべきものであり、更に精緻な分子機序解析を進める。

「反復曝露影響のエピゲノム機構解析」【北嶋】に

において、令和3年度はサリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析データが得られる予定である。これにはサリドマイドの反復曝露影によるエピゲノム影響の解析といった直接的な意義だけでなく、サリドマイドの溶媒はメチルセルロース水溶液 (MC) であることから副次的な意義が認められている。即ち、先行研究において VPA の反復曝露によりグローバルな H3K9me3 の低下が見られていることから、これが溶媒影響かどうか、溶媒が同じ MC であるサリドマイドの反復曝露の解析結果から判別可能と考えられる。もしグローバルな H3K9me3 の低下が溶媒影響であった場合は、MC がよく利用される溶媒であるだけに影響が大きいと予

想されるため、MCの反復曝露影響の詳細解析を速やかに実施すべく、来年度はMCの反復曝露影響について検討予定である。

さらに今年度のサリドマイド反復曝露の解析結果においては、各種薬物代謝酵素のプロモーター領域において、ヒストン修飾に大きな変動がみられた。

これは、サリドマイドという薬物により、発現が誘導および抑制され、そのままエピジェネティック修飾も固定されたのではないかと考えられる。

今後は、これらのヒストン修飾が、サリドマイドの反復を止めることで元に戻りうるのかを検証するための良い対象遺伝子となるのではないかと考えられる。

以上の通り、今年度は、個別の領域の解析を行ったが、ゲノムワイドには、H3K27me3のピーク数が、サリドマイドの反復投与により43.4%増加していることに関して、その原因の解明を行いたい。

一方、肝臓以外の臓器のゲノムDNAのメチル化解析方法については、各種臓器よりゲノムDNAを抽出した後は、基本的には先行研究でプロトコルを確立している肝臓での全ゲノムバイサルファイト解析方法と同じと確認されたが、サンプリング可能な臓器片の量や、臓器を構成する細胞種の多寡、細胞種ごとの存在比率やエピゲノムに関連しているであろう細胞種毎の分化状態など、組織片全体をホモジナイズして解析する際に問題となり得る要素の検討を継続する必要がある。

「システムバイオロジーによる毒性解析のAI化」  
**【北野】**においては、独自開発した深層学習遺伝子発現グラフ画像解析システム DTOX の予測精度をより一層高め、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性能を示した。これは、DTOXの深層学習モデルが、研究者によるヒューマンキュレーション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。

エピゲノム解析においても、深層学習モデルは、反復曝露によるエピゲノム修飾の内、遺伝子発現に影響がある修飾を見分けることが出来る可能性があることが示唆された。今回、**suppression**群を正確に分類することが出来たが **induction**群を見分けることはできなかったが、これは、**induction**群の訓練用画像の枚数が少なく、**induction**群に関する情報が十分に学習できていないことが原因であると考えられる。現在、この問題に対処するために、画像の生成モデル (Generative adversarial network; Ian J. Goodfellow et al. (2014) Generative Adversarial Networks. <https://arxiv.org/abs/1406.2661>) を活用して、**induction**群の訓練用画像の増幅を進めている。

「統合ツール “Percellome Integrator” の開発」**【相崎】**については、開発準備はほぼ計画通りに進行している。新型化学物質有害性評価システムの解析コア開発のための開発用ライブラリ探索は順調で、必要な機能の大半は発見済みである。検討課題としては、データの可視化に際して、従来の様式より効果的な表現の検討が挙げられる。特にグラフや解析図等の可視化手法については、分担研究「システムバイオロジーによる毒性解析のAI化」での学習用画像としての利用を前提として、特徴を捉えやすい表現形式となるよう考慮している。

GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブセットのマウスゲノム mm10 上へのマッピングについては、メーカーから提供されている座標情報との乖離が少数ながら確認され、逐一、整合処理を行った。このマッピング情報はデータ群の結合に必要なだけでなく、GeneChipの遺伝子発現データと次世代シーケンサを用いた RNA-Seq の遺伝子発現データとの相互データ変換の精度向上にも寄与する重要な基盤情報となるため、整合処理は慎重かつ正確に進めた。



「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、当該年度の研究では、どの時点において発現亢進が認められたかのパターンごとに細かく遺伝子リストを分割し、それぞれに対してエンリッチメント解析を行うことで曝露時間の情報をどのように活用するのが効果的かを検討した。今回はTargetMineを用いたパスウェイ・Gene Ontologyレベルでのエンリッチメント解析を元に化学物質曝露によって惹起される生体応答を分析したが、従来のエンリッチメント解析では毒性学研究に最適とは言い難い問題点も浮き彫りになった。つまり、PPARα活性化のように核内受容体を介した遺伝子発現誘導は比較的検出しやすい一方、二次的に惹起される生体応答を検出するためには遺伝子発現変動のパターンに基づいた分類により入力する遺伝子リストの「磨き上げ」が重要であることと、その解釈にはより深いドメイン知識が必要であることを指す。クロフィブラート曝露によるリボソーム生合成関連遺伝子の発現亢進がこれにあたるが、このような応答をする遺伝子はその化学物質の生理活性強度を評価する上で有用である可能性が示唆され、遺伝子発現プロファイルから毒性発現メカニズムを推定する上でパスウェイやGene Ontologyとは異なる階層のオントロジーの必要性を支持する結果であると言える。

## **E. 結論**

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発」【菅野】については、今年度単回曝露、及び反復曝露実験を行った PFOA は、先行研究で実施した化学物質比較して毒性の強いものであり、遺伝子発現解析からもそれを説明しうる毒性シグナルネットワークの挙動が示唆された。反復曝露による明らかな増悪

例として注目すべきものであり、更に精緻な分子機序解析を進める。

また PFOA の解析結果は僅か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、即ち新型反復曝露実験プロトコルと Percellome 法に基づく網羅的解析技術による、短期間試験での反復曝露毒性の予測の実現可能性が高いことを示唆している。

「反復曝露影響のエピゲノム機構解析」【北嶋】においては、サリドマイドの反復により、薬物代謝酵素群のプロモーター領域において、ヒストン修飾の変動が検出された。これは、発現誘導または抑制状態がエピジェネティックな変化により、固定されたとも考えられる。2年目においては、サリドマイドの反復投与により 43.4% の増加が見られた H3K27me3 について、変化のあった領域にどのような共通性があるのかを明らかにする必要がある。また、肝臓以外の臓器のゲノム DNA メチル化解析方法については、基本的には先行研究で実施した肝臓での解析方法と同等と確認され、次年度以降、適切な臓器を選定の上、適切に実施してゆく予定である。

「システムバイオロジーによる毒性解析の AI 化」【北野】については先行研究により開発した解析用ソフトウェアは実用の段階に進みつつある。また新たに開始したエピゲノム解析の AI 自動化についても、十分な訓練用画像があれば、より正確に反復曝露により遺伝子発現に影響を与えうるエピゲノム修飾を予測できることが示唆されている。現在不足しているカテゴリ（反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が誘導されるもの）の遺伝子は実データにおいて他のカテゴリより少ないため、今後は不足している訓練用画像を AI で増幅する手法（Generative adversarial network）の活用などにより深層学習モデルの訓練状況を改善し、実用レベルの予測性能を目指す。

#### 「統合ツール“Percellome Integrator”の開発」【相崎】

については、必要な機能に対応した主なライブラリについての情報収集を終えた。また基盤となる情報、とりわけ GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブセットの target 座標情報について整備した。来年度からの本格的な開発への前処理は整ったと考えられる。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】においては既知の PPAR $\alpha$  リガンド、および PPAR $\alpha$  リガンドであることが示唆されている化学物質が惹起する遺伝子発現変動パターンの比較により、化学物質の曝露時間情報の有効活用が毒性発現メカニズム推定において重要であることが見出された。また、毒性学に特化したエンリッチメント解析の開発が望まれる。

#### **F. 健康危機情報**

なし

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

(1) Yuhji Taquahashi, Shuji Tsuruoka, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2022; 9: 17-21.[doi.org/10.2131/fts.9.17]

(2) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. Yamazaki, H., Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci.*

2021; 46: 553-560.[doi.org/10.2131/jts.46.553]

(3) Yuhji Taquahashi, Hirokatsu Saito, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 169-175.[doi.org/10.2131/fts.8.169]

(4) Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 161-167.[doi.org/10.2131/fts.8.161]

(5) Eiichi Yamamoto, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Hirokatsu Saito, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Futoshi Sato, Satoshi Kitajima, Kumiko Ogawa, Ken-ichi Izutsu, Yoshiro Saito, Yoko Hirabayashi, Yasuo Iimura, Masamitsu Honma, Haruhiro Okuda, Yukihiro Goda: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 2021; 595: 120241.[doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120241]

(6) Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. *Development.* 2021 Oct 1;148(19): Epub 2021 Oct 4. [DOI: 10.1242/dev.193664].

- (7) Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. Epub 2021 May 2.[DOI: 10.1111/cas.14873]
- (8) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: creating the engine for scientific discovery. *npj Syst Biol Appl.* 7, 29 (2021).[DOI: 10.1038/s41540-021-00189-3]
- (9) Ostaszewski M, Niarakis A, Mazein A, Kuperstein I, Phair R, Orta-Resendiz A, Singh V, Aghamiri SS, Acencio ML, Glaab E, Ruepp A, Fobo G, Montrone C, Brauner B, Frishman G, Monraz Gómez LC, Somers J, Hoch M, Kumar Gupta S, Scheel J, Borlinghaus H, Czuderna T, Schreiber F, Montagud A, Ponce de Leon M, Funahashi A, Hiki Y, Hiroi N, Yamada TG, Dräger A, Renz A, Naveez M, Bocskei Z, Messina F, Börnigen D, Fergusson L, Conti M, Rameil M, Nakonecni V, Vanhoefer J, Schmiester L, Wang M, Ackerman EE, Shoemaker JE, Zucker J, Oxford K, Teuton J, Kocakaya E, Summak GY, Hanspers K, Kutmon M, Coort S, Eijssen L, Ehrhart F, Rex DAB, Slenter D, Martens M, Pham N, Haw R, Jassal B, Matthews L, Orlic-Milacic M, Senff Ribeiro A, Rothfels K, Shamovsky V, Stephan R, Sevilla C, Varusai T, Ravel JM, Fraser R, Ortseifen V, Marchesi S, Gawron P, Smula E, Heirendt L, Satagopam V, Wu G, Riutta A, Golebiewski M, Owen S, Goble C, Hu X, Overall RW, Maier D, Bauch A, Gyori BM, Bachman JA, Vega C, Grouès V, Vazquez M, Porras P, Licata L, Iannuccelli M, Sacco F, Nesterova A, Yuryev A, de Waard A, Turei D, Luna A, Babur O, Soliman S, Valdeolivas A, Esteban-Medina M, Peña-Chilet M, Rian K, Helikar T, Puniya BL, Modos D, Treveil A, Olbei M, De Meulder B, Ballereau S, Dugourd A, Naldi A, Noël V, Calzone L, Sander C, Demir E, Korcsmaros T, Freeman TC, Augé F, Beckmann JS, Hasenauer J, Wolkenhauer O, Wilighagen EL, Pico AR, Evelo CT, Gillespie ME, Stein LD, Hermjakob H, D'Eustachio P, Saez-Rodriguez J, Dopazo J, Valencia A, Kitano H, Barillot E, Auffray C, Balling R, Schneider R; COVID-19 Disease Map Community. COVID19 Disease Map, a computational knowledge repository of virus-host interaction mechanisms. *Mol Syst Biol.* 2021 Oct;17(10):e10387. PMID: 34664389. [DOI: 10.15252/msb.202110387]
- (10) 夏目 やよい, 機械学習によって加速される次世代アジュバント開発, 医学のあゆみ 279(10) 961-964 2021
- (11) 夏目 やよい, 榎林陽一, 新薬創出を加速する人工知能の開発 ～データ駆動型創薬ターゲット探索プラットフォームの構築～, あいみつく vol. 42(3) 58-63 2021

## 2. 学会発表

- (1) Jun Kanno, Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. ASIATOX-IX, (2021.10.22)、Virtual、Oral
- (2) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima, Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral
- (3) 菅野純, 北嶋聡, 相崎健一, 齊藤洋克, 種村健太郎, 肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際

会議場、シンポジウム、口演

(4) 石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純、ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(5) 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(6) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(7) 菅野純、「子供の毒性学：脳の発達を中心に」ーイントロダクションー。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(8) 齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価ー発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心にー。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(9) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(10) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純：PPAR $\alpha$ リ

ガンドの比較毒性オミクス。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(11) J. KANNO、K. AISAKI、R. ONO、S. KITAJIMA、Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

(12) 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、(2021.1.15)、online meeting、口演

(13) 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) Web 口演

(14) 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.

(15) 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, Special lecture, Web, Oral presentation.

(16) 北野宏明、「AIで変わる毒性学、変わらない毒性学」、第48回日本毒性学会学術年会、日本毒性学会、神戸(オンライン)、July 7, 2021(invited)

- (17) 夏目やよい、伊藤眞里、松村泰志、武田吉人、熊ノ郷淳、水口賢司、上田修功「特発性肺線維症に対する創薬標的探索を目指した人工知能の開発」第61回日本呼吸器学会学術講演会 2021.4.24 オンライン
- (18) 榎本貴俊、武田吉人、網屋沙織、足立雄一、新津敬之、原伶奈、野田成美、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、伊藤眞里、夏目やよい、熊ノ郷淳、次世代プロテオミクスによる進行性線維化を伴う間質性肺疾患の新規バイオマーカー探索(PRISM)、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (19) 白井雄也、武田吉人、足立雄一、榎本貴俊、網屋沙織、野田成美、福島清春、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、夏目やよい、伊藤眞里、熊ノ郷淳、「PRISM」データから見えてきた新たな線維化バイオマーカー、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (20) 野田成美、武田吉人、網屋沙織、足立雄一、榎本貴俊、原伶奈、新津敬之、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、夏目やよい、伊藤眞里、熊ノ郷淳、次世代プロテオミクスによる上葉優位型肺線維症の新規バイオマーカー探索(PRISM)、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (21) 網屋沙織、武田吉人、足立雄一、榎本貴俊、新津敬之、野田成美、原伶奈、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、伊藤眞里、夏目やよい、熊ノ郷淳、エクソソームの次世代プロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー探索(PRISM)、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (22) 夏目やよい、伊藤眞里、松村泰志、武田吉人、熊ノ郷淳、水口賢司、野田成美、上田修功、特発性肺線維症に対する創薬標的探索を目指した人工知能の開発、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (23) 足立雄一、武田吉人、榎本貴俊、網屋沙織、野田成美、原伶奈、新津敬之、白井雄也、福島清春、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、夏目やよい、足立淳、伊藤眞里、熊ノ郷淳、次世代プロテオミクスとバイオインフォマティクスが紐解IPFとNSIPの病態解明、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (24) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純、毒性オミクスにおけるエピジェネティクス情報を加えた人工知能解析 PPAR $\alpha$  リガンドの比較毒性オミクス、第48回日本毒性学会学術年会、Web開催、2021.7.7
- (25) 渡邊怜子、大橋力也、黒田正孝、小村弘、川島和、江崎剛史、夏目・北谷やよい、水口賢司、化学構造情報を用いた薬物動態パラメータ評価のためのインシリコ予測モデルの開発、第48回日本毒性学会学術年会、Web開催、2021.7.7-9
- (26) 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」官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM) 令和二年度成果報告会 (2021/7/20) オンライン
- (27) 夏目やよい「トランスクリプトームデータからの毒性発現メカニズム推定と安全性評価」第三回scChemRISC研究会 招待講演 2021.10.12 横浜

(28) 夏目 やよい 「新薬創出を加速する人工知能の開発 ～臨床情報を活用した創薬標的探索～」  
CBI学会2021大会 プレナリー講演「国内AI創薬の最前線」 2021.10.28 オンライン

(29) 夏目 やよい 「アジュバントデータベースとその活用から見える次世代アジュバント開発」第15回次世代アジュバント研究会 招待講演  
2022.1.25 オンライン

(30) 夏目やよい, データ駆動型安全性評価の諸問題, 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム2022年度年会, 京都, 2022.3.1

## 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）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和3年度 分担研究報告書

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

研究分担者 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、毒性の分子機序に基づいて、現行の不確実係数（安全係数）を利用する有害性評価手法を補強し、より迅速で、高精度且つ省動物を具現化した新たな有害性評価系の開発を目標として、マイクロアレイ（GeneChip）と次世代シーケンサを用いて基盤となる遺伝子発現及びエピゲノムの網羅的データを得つつ、独自開発のソフトウェア群による化学物質の生体影響の網羅的分析法の体系化を行い、これに、毒性学・分子生物学に精通したデータサイエンス専門家を擁して、システムバイオロジー及び人工知能（AI）技術を融合した新たな有害性評価系の開発を進める。

令和3年度は、ペルフルオロオクタン酸（PFOA）の単回曝露、及び、4日間の新型反復曝露の2実験（以下、PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]と表記）を実施し、遺伝子発現解析を進めて単回曝露、反復曝露に共通の要素と各々の曝露条件に特徴的な要素を抽出した。PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]の遺伝子発現誘導は、2時間目の誘導遺伝子数が少なく、24時間目に向けてその数が増加することが示された。基本的にPPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ を上流にもつ遺伝子が誘導されたが、2時間目に誘導された遺伝子には、NR1I2（PXR）、あるいは、immediate early genes（IEG）の発現機構にかかわるシグナルの関与が示唆された。8時間以降は、PPARの下流の因子、SCL27A2などを介した系の動員が示唆された。また、Gadd45bをはじめ、DNA障害、RNA障害、タンパク合成障害、等、を示唆する反応が見られた。24時間目に向けて、癌関連、ユビキチン関連、及びNRF2系が含まれていた。この中にCAR下流のCyp2B10も含まれ、それらの誘導までの8時間以上の潜伏期の存在が注目された。これらに加え、PFOA[4+1]においては、Sirtuinシグナル、ミトコンドリア障害などの系の動員が示唆された。また、両実験の溶媒対照群の遺伝子発現値の差は、4日間の反復曝露の効果（基線反応）を示しており、定時点の内、3時点乃至4時点で、反復により発現が有意に低下（1.25倍、t検定で $p<0.05$ ）した119の基線反応遺伝子を解析した結果、HOTAIR（long non-coding RNA）制御回路、14-3-3回路などへの影響が示唆され、

遺伝子発現、及び、タンパク合成機構への広範な影響の可能性が示唆された。更に精緻な解析を進める。

尚、動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」(動物実験承認番号 365) に従い実施した。

(\*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

(\*\*) 全動物に同量の検体を反復曝露し、遺伝子発現測定直前の曝露時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終曝露を一回行う。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、独自構築したトキシコゲノミクス・データベース (DB) にインフォマティクス、及び、人工知能 (AI) を拡大適用し、化学物質が実験動物に惹起する遺伝子発現変動等の分子毒性学情報から、科学的根拠に基づく有害性予測評価手法を確立する。これにより「安全係数」を用いる従来の有害性評価手法を補強するとともに、迅速、高精度、省動物を具現化する新たな評価システムを構築することを目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ8億5千万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及び反復曝露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、さらに臓器別のゲノムDNAメチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

## B. 研究方法

### ● 試薬及び動物：

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA: Pentadecafluorooctanoic Acid; 分子量：414.07、Cas No.: 335-67-1、純

度99.7%、東京化成工業(株))について、単回曝露

(0日間反復曝露後に単回曝露、以降、[0+1]と表記)及び4日間「新型」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。PFOAの単回曝露時の用量は0、1、3、10 mg/kgとし、4回反復曝露の用量は0.1 mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に0、1、3、10 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)を用い溶媒はコーンオイル(C8267、Sigma-Aldrich)とし、金属製胃ゾンデ(KN-348、夏目製作所)と、ガラス製シリンジを用いて強制経口曝露を行い、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RNA5種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOLにより水



層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

#### ●GeneChip 解析：

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモータが付加したオリゴ 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。肝サンプルからこの様にして得られたデータについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対量化手法) を適用して絶対量化した後に網羅的遺伝子発現解析を行った。先ず我々が開発した「RSort」ソフトウェアを用いて、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 を数理的に有意な変動を示す順に自動的に並び替えた。このリストの上位のものから専門家による 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 を網羅性を維持しつつ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

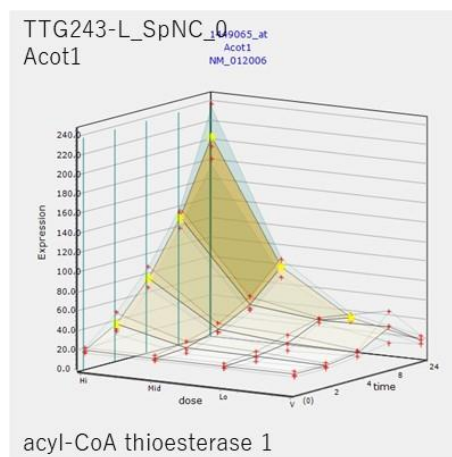
動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版))

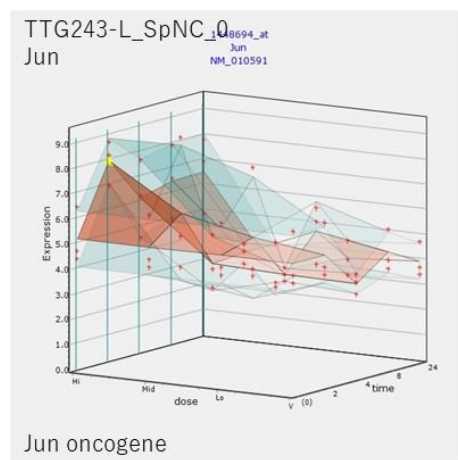
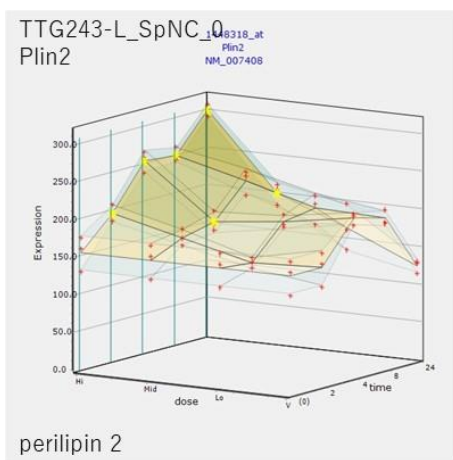
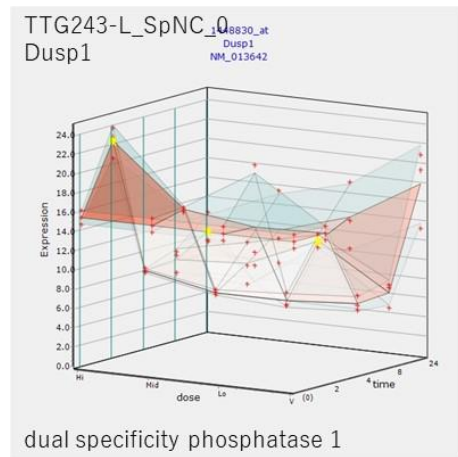
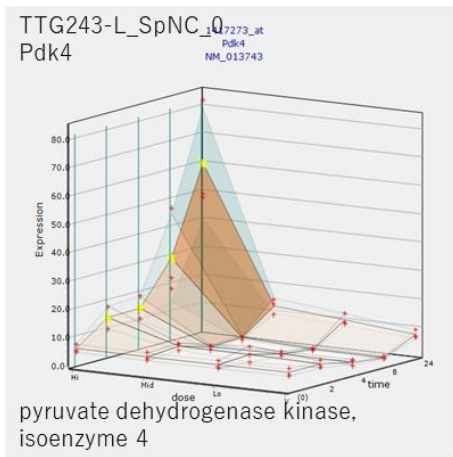
### C. 研究結果

令和 3 年度は、ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の単回曝露実験 (TTG243 : 0, 1, 3, 10mg/kg) 及び A+A 実験 (TTG244 : 0.1mg/kg を 4 日間曝露後、5 日目に 0, 1, 3, 10mg/kg) を行い (PFOA[0+1]、及び、PFOA[4+1] と表記)、GeneChip による肝の網羅的遺伝子発現解析を実施した。尚、PFOA[4+1]における 4 日間反復曝露の用量が 0.1 mg/kg と低値である理由は、曝露中及び終了後 24 時間以内のマウス全身状態及び、肝重量変化を指標とした毒性が、単回曝露に比し反復曝露において著しく増強したためである。

#### ① PFOA[0+1] (実験コード TTG243-L)

単回曝露後、2、4、8、24 時間目に増加を開始した遺伝子の数は、それぞれ 32、179、167、503 であった。PFOA は PPAR $\alpha$  のリガンドであることが知られており、2 時間目の 32 遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR $\delta$  及び PPAR $\alpha$  を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Acot1、Pdk4、Plin2 等)。



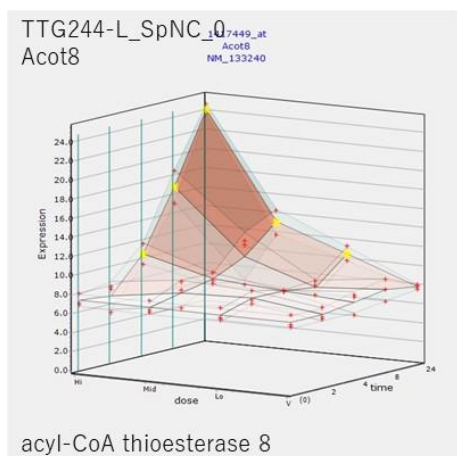
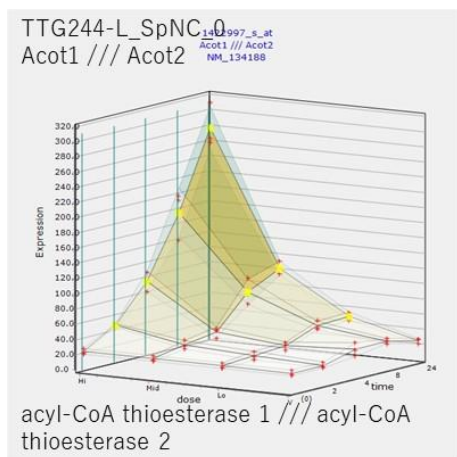


☒ Acot1、Pdk4、Plin2

☒ Dusp1、Jun

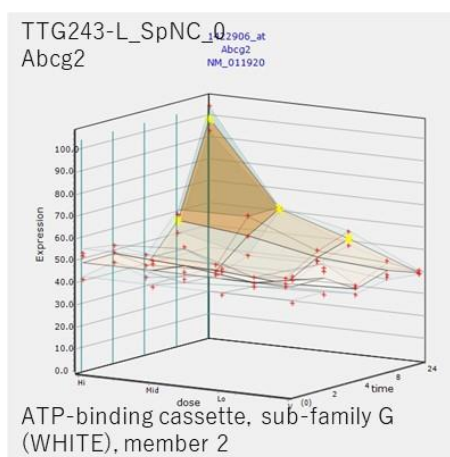
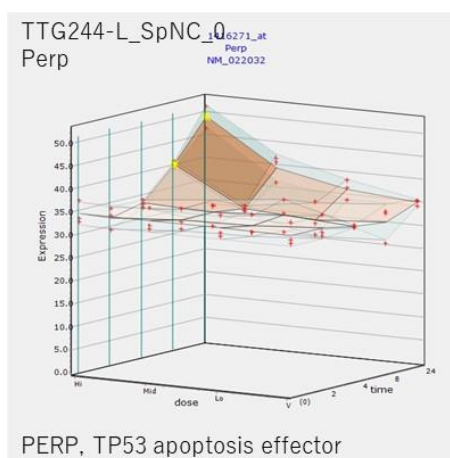
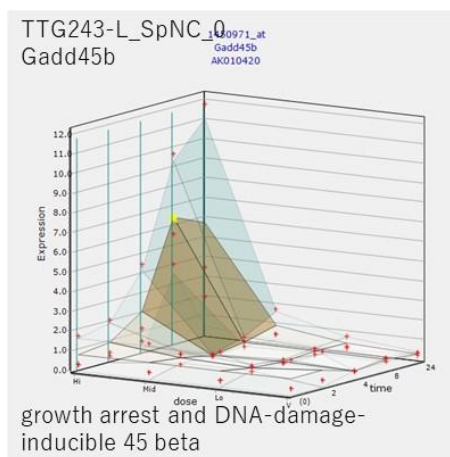
先行研究において解析した PPAR $\alpha$  のリガンドであるクロフィブラートの遺伝子リストとの差分を解析すると、2 時間目の遺伝子群には、PPAR $\alpha$  の下流以外に、Dusp1 などの immediate early gene (IEG) の系のシグナルが起動していることも示された (Dusp1、Jun 等)。

4 時間目に誘導開始された 179 遺伝子には、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、及び PPAR $\gamma$  の下流のものが多く含まれていた。(Acot2、Acot8 等)。



☒ Acot2、Acot8

8 時間目に誘導開始された 167 遺伝子は、PPAR $\alpha$  の下流の SCL27A2 などの因子の下流に位置する遺伝子のほか、TGF $\beta$ 1 の下流の遺伝子、DNA、RNA、タンパクに対する傷害に反応する系の遺伝子が含まれていることが示唆された (Gadd45b、Perp、Abcg2 等)。



☒ Gadd45b、Perp、Abcg2

24 時間目に誘導開始された 503 遺伝子は、癌関連、ユビキチン関連、及び NRF2 系が含まれていた。この中に CAR 下流の Cyp2B10 も含まれ、それらの誘導までに 8 時間以上の潜伏期があることが注目された (Cyp2b10、GSR、GSTM4、NFE2L2 等)。

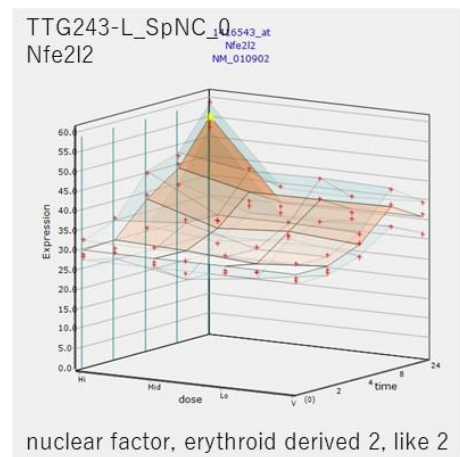
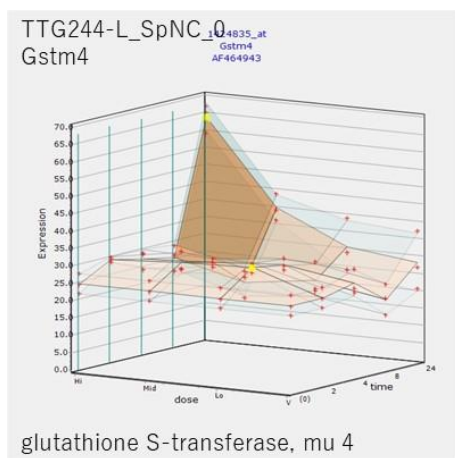
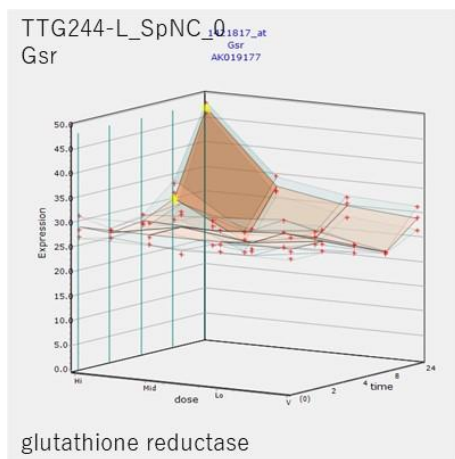
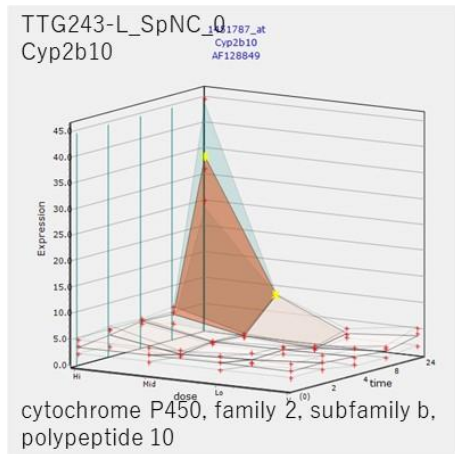


図 Cyp2b10、GSR、GSTM4、NFE2L2

今までに測定した化学物質においては Cyp2b10 は 2 時間~4 時間目に誘導が開始しており、24 時間目まで誘導が開始しない例は PFOA が初めてであった。曝露直後のシグナル受容体からの下流遺伝子への誘導に時間がかかっているか、或いは、何らかの代謝産物が後半の遺伝子の誘導に寄与している可能性が示唆されるが、PFOA は難分解性であり、少なくともラットでは代謝されることは無いと報告されている。尚、Gsr、Gstm4 は Nrf2 の下流と考えられ、24 時間目まで誘導が開始しない例は比較的多くの化学物質で測定されていることから、これらとは別途の制御ネットワークが存在する可能性が示唆された。



② PFOA[4+1] (実験コード TTG244-L)

最終曝露終了後、2、4、8、24 時間目に発現増加を開始した遺伝子の数は、22、127、751、581 であった。2 時間目には、PXR 下流、TNF 下流の遺伝子が含まれていた (ALAS1、TXNIP 等)。

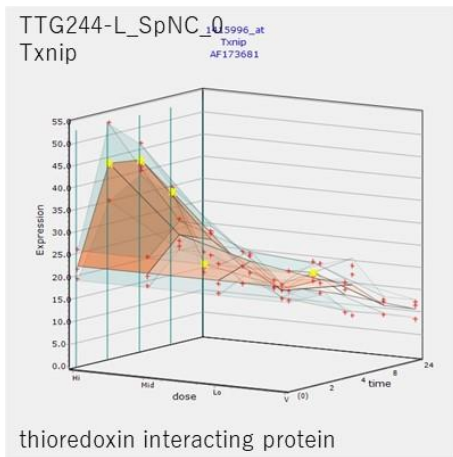
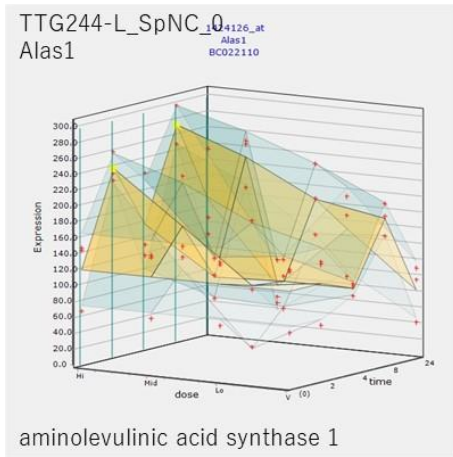


図 ALAS1、TXNIP

誘導された遺伝子の多くは、PFOA[0+1]と共通であった。

PFOA[0+1]では発現誘導されず、PFOA[4+1]に特徴的に発現したものとして、Sirtuin シグナル系、ミトコンドリア障害、酸化的リン酸化などが示された (Agt7、Atp5f1、Ndufa5 等)

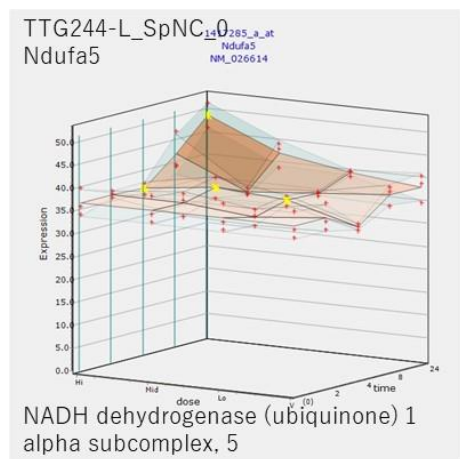
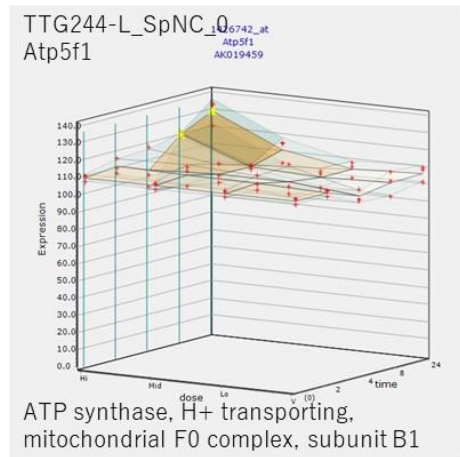
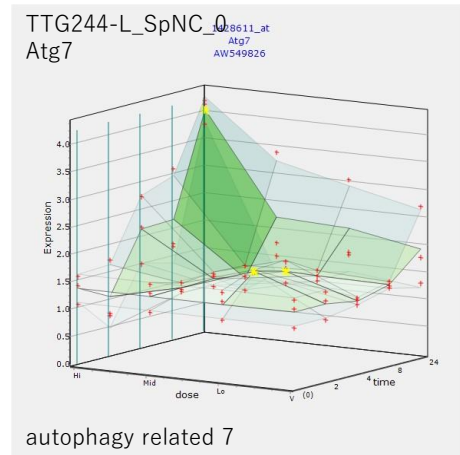


図 Agt7、Atp5f1、Ndufa5

その他の遺伝子は、PFOA[0+1]と類似のものが多く含まれていたが、PFOA[4+1]の方が、発現するタイミングが早まる傾向が見られ(667中、不変のもの341、

早くなったもの 256、遅くなったもの 70)、早くなった遺伝子群には Nrf2 が上流に位置するものが多い傾向が認められた。

③最終曝露後 2、4、8、24 時間に生じる早い変動を過渡反応 (Transient Response) とし、反復曝露で引き起こされるベースラインの上昇、或いは、低下の変動を基線反応 (Baseline Response) と定義して、その解析を実施した。

4 日間反復曝露により誘発された基線反応の解析を行った。測定 4 時点の内、3 時点乃至 4 時点で、反復により発現が有意に低下 (1.5 倍、t 検定で  $p < 0.05$ 、1 コピー/細胞以上) した基線反応遺伝子 (ソフトウェア“Baseline Comparison”による計算結果) は 39、上昇した遺伝子は 5 と少なかった。低下した遺伝子群は、HOTAIR (long non-coding RNA) 制御回路などへの影響が示唆された。選択条件を 1.25 倍、t 検定で  $p < 0.05$  に緩和した場合は、基線反応が低下した遺伝子は 119 あり、HOTAIR (long non-coding RNA) 制御回路、14-3-3 回路などへの影響が示唆され、遺伝子発現、及び、タンパク合成機構への広範な影響の可能性が示唆された。この所見からも、0.1mg/kg の用量において PFOA の 4 日間反復曝露が基本的な生命維持機構に強く影響する可能性が示唆された。更に精緻な解析を進める。上昇した遺伝子は 13 と少なく、有意な情報は得られなかった。

#### D. 考察

令和 3 年度は、ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の単回曝露実験 (PFOA[0+1]と表記) 及び 4 日間の新型反復曝露実験 (PFOA[4+1]と表記) を行った。4 日間の反復曝露の用量は、予備実験の結果から 0.1 mg/kg とし、単回曝露の用量 (0, 1, 3, 10mg/kg) に比し低値となった。これは反復曝露中、及び、終了後 24 時間以内のマウス全身状態及び、肝重量変化を指標

とした毒性が、単回曝露に比し反復曝露において著しく増強したためである。遺伝子発現の解析結果、PFOA[4+1]では PFOA[0+1]と類似のものが多く含まれていたが、PFOA[4+1]の方が、発現するタイミングが早まる、或いは、反応が増強する傾向が見られた。PFOA[4+1]の発現変動遺伝子から PFOA[0+1]のそれを差し引いた遺伝子リストの解析からは 0.1 mg/kg と低濃度ながら 4 日間の反復曝露により、Sirtuin シグナル系、ミトコンドリア障害、酸化的リン酸化等の系が、基線反応の低下を示した遺伝子のリストからは、タンパク合成、ミトコンドリア機能、細胞増殖、等の基本的な生命維持機構に強く影響する可能性が示され、これは反復曝露によるマウスの全身状態、肝重量変化といった毒性の増悪にも整合する。

また PFOA は PPAR $\alpha$ のリガンドであることが知られており、実際に単回曝露 2 時間目に誘導が開始される 32 遺伝子は PPAR $\delta$  及び PPAR $\alpha$ を上流に持つものであった。しかしながら遺伝子発現誘導数は時間が経過するほどに増加しており、このことから曝露直後のシグナル受容体からの下流遺伝子への誘導に時間がかかっているか、シグナル受容体からの継続的な刺激の増強による現象であるか、或いは、何らかの代謝産物が後半の遺伝子の誘導に寄与している可能性が示唆された。但し、PFOA は難分解性であり、ラットでは代謝されることは無いと報告されているため、マウスでも同様と考えられる。尚、代謝されない難分解性の受容体リガンドの代表的な例であるダイオキシンの単回曝露時の遺伝子発現誘導の様態と比較したところ、PFOA の経過とは異なっていた。

これらの PFOA に誘導された反応は、反復曝露による明らかな増悪例として注目すべきものであり、更に精緻な分子機序解析を進める。

#### E. 結論

今年度、単回曝露、及び反復曝露実験を行った

PFOA は、先行研究で実施した化学物質比較して毒性の強いものであり、遺伝子発現解析からもそれを説明しうる毒性シグナルネットワークの挙動が示唆された。反復曝露による明らかな増悪例として注目すべきものであり、更に精緻な分子機序解析を進める。

また PFOA の解析結果は僅か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、即ち新型反復曝露実験プロトコルと Percellome 法に基づく網羅的解析技術による、短期間試験での反復曝露毒性の予測の実現可能性が高いことを示唆している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. *Development*. 2021 Oct 1;148(19): Epub 2021 Oct 4. [DOI: 10.1242/dev.193664].

(2) Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci*. 2021 Jun;112(6):2185-2198. Epub 2021 May 2.[DOI: 10.1111/cas.14873]

### 2. 学会発表

(1) Jun Kanno、Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. ASIATOX-IX, (2021.10.22)、Virtual、Oral

(2) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima、Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral

(3) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(4) 石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純、ナノマテリアルの吸入曝露による肺免疫応答と線維化の分子機構. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(5) 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(6) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(7) 菅野純、「子供の毒性学：脳の発達を中心に」ーイントロダクションー. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(8) 齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価ー発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析

を中心にー. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑨) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑩) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純：PPAR $\alpha$ リガンドの比較毒性オミクス. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑪) J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, S. KITAJIMA , Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

(12) 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、(2021.1.15)、online meeting、口演

(13) 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) Web 口演

(14) 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.

⑮) 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, Special lecture, Web, Oral presentation.

## 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）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和3年度 分担研究報告書

反復曝露影響のエピゲノム機構解析

研究分担者 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

研究協力者 小野 竜一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
毒性部 第五室 室長

**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指とする。特に先行研究（平成24～29年度）で実施した Percellome 法\*を基盤とした「新型」反復曝露実験\*\*により、化学物質の反復投与による生体影響のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復曝露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

本分担研究では、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾や DNA メチル化等の遺伝子発現修飾機構（所謂 Epigenetics）が関わる可能性が指摘される事から、次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてヒストン修飾や DNA メチル化状態を網羅的に検討することを目的とする。先行研究での検討では 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3年度は、サリドマイドの14日間反復曝露によるヒストン修飾解析を ChIP-Seq 法により解析する実験を実施した。サリドマイドの反復によって、Cyp4a10 のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。また、Cyp4a14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。また、Cyp7b1 のプロモーター領域においては、活

性型ヒストン修飾である H3K27Ac が増加していることが明らかになった。また次年度以降、多臓器のゲノム DNA メチル化解析を本格的に実施するにあたり、組織保存条件やデータ解析に際して解決しなければならない技術的問題の対応策の検討を進めている。

-----  
(\*） 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、独自構築したトキシコゲノミクス・データベース (DB) にインフォマティクス、及び、人工知能 (AI) を拡大適用し、化学物質が実験動物に惹起する遺伝子発現変動等の分子毒性学情報から、科学的根拠に基づく有害性予測評価手法を確立する。これにより「安全係数」を用いる従来の有害性評価手法を補強するとともに、迅速、高精度、省動物を具現化する新たな評価システムを構築することを目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8 億 5 千万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及び反復曝露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、さらに臓器別のゲノム DNA メチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシコロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

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。

## 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)

サリドマイド (700mg/kg) 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 時間後のマウス肝および、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  $\mu$ g) を材料として、1) 4  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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。

### 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、反復経口曝露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。

令和 3 年度においては、新たにサリドマイド (700mg/kg) を 14 日間反復曝露した後、溶媒 (0.5% メチルセルロース水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝および、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 μg) を材料として、ヒストン修飾の解析を行なった。

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

抗 H3K4me3 抗体 (15, 923、16, 870)、  
 抗 H3K27Ac 抗体 (24, 003、23, 484)、  
 抗 H3K27me3 抗体 (15, 339、22, 000)、  
 抗 H3K9me3 抗体 (18, 930、15, 667)、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数が 15, 339 から 22, 000 へ、43. 4% 増加しており、サリドマイドの反復投与によって H3K27me3 が亢進することが明らかになった (その他は、H3K4me3: 5. 9 % 増加、H3K27Ac: 2. 2 % 減少、H3K9me3: 17. 2 % 減少)。したがってサリドマイド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。

また、各種抗体を用いた ChIP-seq 解析の結果により、溶媒対照群と反復投与群の間で、ピークの値の変動が大きかった領域の上位 20 領域とそれらのマッピング結果の一例を以下に示す。

各ヒストン修飾において変動の大きかった領域の上位には、薬剤代謝酵素である Cyp が数多く含まれていた。

#### H3K4me3(活性型)が減少

log2(Fold)	Gene List	H3K4me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.28	Fat1		1,843	upstream	chr6:41218600-41222999
-0.27	Cxcl5	2,844		in gene	chr15:102176600-102195799
-0.25	cut	95,704		in gene	chr7:74644800-146500799
-0.25	Cyp4a10	1,288		upstream	chr4:115513200-115520799
-0.25					chr7:145040000-145050399
-0.24					chr11:1294000-11700999
-0.18	Paqr9	6,382		downstream	chr9:9554800-95583799
-0.18	Scav5l	52,236		in gene	chr14:60713600-60727799
-0.17	Cyp4a14	342		in gene	chr4:11549200-115498399
-0.16	Cttnb1	15,122		in gene	chr9:115279000-115278399
-0.14	Dna1, Tfp1	4844, 12064		in gene, upstream	chr10:10728400-10730799
-0.17	Serp9	209,839		downstream	chr11:121737000-117488999
-0.12	Acn1	24,639		in gene	chr7:14410200-14474099
-0.11	Chn3	1,304		in gene	chr3:10397600-10381399
-0.17	Tnfrsf, LOC10195989, Nph2	1951, 2033, 5438		upstream, downstream, upstream	chr1:156297200-156313399
-0.17	Ccnd2	36,015		downstream	chr6:684200-68621399
-0.17					chr4:74825100-74831399
-0.16					chr6:53184200-53218799
-0.16	Skyl2c	82,408		in gene	chr7:139118400-139183399
-0.14					chr6:6616400-660511399

#### H3K4me3(活性型)が増加

log2(Fold)	Gene List	H3K4me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.33					chr19:38343200-38375199
0.30	Emoc1	8,009		upstream	chr12:8117600-81013799
0.31	amt	5,971		in gene	chr12:16516600-16508399
0.30	1810053823Rn, M682	-10756, 579		upstream, downstream	chr16:93364800-93373799
0.30	Ccna3b	3,644		in gene	chr6:100079400-100088399
0.30	Hnf4a	22,908		downstream	chr12:2625200-12297199
0.30	Zkscan3	-11,885		upstream	chr6:4322800-43027799
0.29	Gm14551, Orncut1	31362, 17876		downstream, in gene	chr6:74802800-74808799
0.29	Arnt2	29,452		in gene	chr6:493100-49384399
0.29	Hha1a4	155,228		upstream	chr6:14186400-141880799
0.29	Hnf3b3	5,229		in gene	chr3:5875600-58765199
0.28	Apob, Zkscan2	2905, 35250		in gene, downstream	chr7:12344100-123468799
0.28					chr12:213400-21301799
0.28	Pseud, 1810013A23Rn	52245, 13291		in gene, downstream	chr17:28277200-28292799
0.28	Ar15	292,791		in gene	chr13:14882400-148921399
0.27	Skyl2b	4,386		upstream	chr9:39278000-392829399
0.27	Ccnd8	13,588		in gene	chr4:13416400-134160099
0.27	Serpina3k	3,213		in gene	chr12:10434200-104348199
0.26	Zfp76, Tmem131	19838, 187828		in gene, downstream	chr1:36780200-367831399
0.24					chr12:2386200-138721399

### H3K27Ac(活性型)が減少

log2(ratio)	Gene List	H3K27Ac down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.44	Ctcf		2,844	in gene	chr15:102176600-102195799
-0.40	Snf1		416,351	downstream	chr6:28894400-28898999
-0.39	Snf1		955,800	downstream	chr5:95548000-95583799
-0.38	Page8		6,382	downstream	chr6:2873800-2873999
-0.38	Snf1		254,051	in gene	chr9:21801800-21809999
-0.38	Kans2, Dcc1d		4793, 47139	upstream, in gene	chr2:34448000-34459799
-0.36	Lmo1		55,704	in gene	chr7:145040000-14505399
-0.34	Snf1		129,116	downstream, in gene	chr4:78818000-78824999
-0.32	Hmna3, Rbp1		129,116, 2938	downstream, in gene	chr8:94240000-94241199
-0.31	Ctcf		34,987	in gene	chr4:4723800-47247399
-0.30	Hmna2, Ck3, Fam32a		18231, 6938, 13381	downstream, in gene, upstream	chr4:76652000-76659799
-0.30	Rappat1		117,679	in gene	chr7:2194800-2213399
-0.30	Zfhx14		257,899	in gene	chr2:29734000-29740799
-0.30	R1105B238a, Sic13a4		20190, 19327	downstream, in gene	chr6:3627000-36273399
-0.30	AW59542		3,759	in gene	chr5:19571000-19582199
-0.29	Gabb2		122,115	in gene	chr4:4684800-4687399
-0.29					chr1:20078000-20081799

### H3K9me3(抑制型)が増加

log2(ratio)	Gene List	H3K9me3	Dist to Start	Position	Start-end
0.24	Serpinak		3,213	in gene	chr12:10433400-10434999
0.24	Egr1, E2F0015159ik		58496, 20003	in gene, downstream	chr1:116719000-11684399
0.23	Taf11, G530011006ik		295623, 1982	in gene, upstream	chr1:169978000-169983199
0.21	Cash3		1,644	in gene	chr6:105076400-10508399
0.21	Dusp1		27	upstream	chr17:26591800-2659199
0.21	Tsc1e4		43,827	in gene	chr6:36537800-36544999
0.19	Relb1, Rfx8		82596, 3258	downstream, in gene	chr19:32431800-32443399
0.19	Cyp7a1		2,461	upstream	chr1:18235800-18256599
0.19	Cyp24a4		1,014	in gene	chr19:40088400-40077199
0.18	Aid		24,338	in gene	chr19:1882400-1890799
0.18	Gm1651, Oneuc1		11362, 17978	downstream, in gene	chr9:74860800-74889799
0.18	Arad1, Ehfep3, Sm1, Apbb3, Sls35a4		103196, -261, 6512, 15567, -15416	downstream, upstream, downstream, downstream, upstream	chr18:36655200-36672399
0.18	Pcna4		323,257	in gene	chr4:10546800-10549199
0.18	S10a19		1,982	in gene	chr6:89311800-89369799
0.18	G30011006ik, Mcd1		13751, -11747	downstream, upstream	chr17:9073200-90745399
0.18	Gpn33		8,191	in gene	chr6:59408800-59427399
0.18					chr12:185000-12189799
0.17	Gtl1, Gm1989a		36343, 1742	in gene, in gene	chr10:9793300-9793999
0.17	Nr12, Maa1b1		10423, 57461	in gene, downstream	chr16:3827200-38298799
0.17	Cnr1d, Opa2b, Rmyc		19073, 1729, 5880	downstream, in gene, upstream	chr2:2962800-29718799

### H3K27Ac(活性型)が増加

log2(ratio)	Gene List	H3K27Ac up	Dist to Start	Position	Start-end
0.80	LOC10105993, Cyp2b10		1535, -13385	in gene, upstream	chr7:29851000-29917999
0.57					chr9:7452000-7453199
0.52					chr7:178800-1788199
0.51	Rah3gap1		30,226	in gene	chr11:27897000-27900999
0.44					chr9:74321400-7433399
0.44	Mybl1		2,461	chr18:2823800-2823999	
0.43	Phc2p1		34,027	in gene	chr15:56607000-56615599
0.42					chr19:18145200-18149399
0.42					chr11:1054800-1059199
0.42	Dm2d		54,215	in gene	chr16:4326200-4326799
0.41	Moh1, R430426.069ik		12800, 3563	downstream, in gene	chr15:8124200-8125499
0.40	Dm2d		11,885	upstream	chr19:37452000-37467199
0.39	R110471M019a		16,835	downstream, in gene	chr11:2883800-2879799
0.38					chr5:1288800-5129099
0.38	Phf15, Oneuc1		11362, 17978	downstream	chr7:486800-7489799
0.38	Cat		146,484	upstream, downstream	chr15:3183200-3204199
0.38	Mashpak3, Cich1		-12122, 5310	in gene	chr5:107283400-107310599
0.37	Foxp1		132,246	in gene	chr6:99300200-9930999
0.37					chr9:7487800-74874799

### H3K27me3(抑制型)が減少

log2(ratio)	Gene List	H3K27me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.36	Miz1, Msi1		3081, -3390	downstream, upstream	chr8:94166800-94184799
-0.30	Cyp2b10		27,035	in gene	chr7:25914800-25920799
-0.24	LOC10105993, Cyp2b10		1535, -13385	in gene, upstream	chr7:29851000-29917999
-0.23	Ts		6,299	in gene	chr5:8943400-89470799
-0.22	Hm1, D110616189ik		16200, 2000	in gene, in gene	chr18:2183200-21834199
-0.21	Seg, Gm16848, F5		41935, -4582, 5340	downstream, upstream, in gene	chr1:16417800-164166599
-0.21					chr6:15617000-15625399
-0.19	Pfwi1, Pf2a		58,961	in gene	chr11:19010400-190159799
-0.19	Ppp13c		39984, -3858	downstream, upstream	chr15:2786800-12217199
-0.19	Ppp13c		2,005	in gene	chr19:36728200-3673999
-0.19	Phf15, Gm19939		7101, -5564	in gene, upstream	chr8:1116200-5113799
-0.19	Cyp2b1, Cx, Cyp2b1a		31660, 5667, 26538	upstream	chr10:12813800-12826199
-0.19	Msi1		725	upstream	chr4:16642800-1666199
-0.19	Gm13033		29,145	downstream	chr6:6934800-69383399
-0.19	Ts		135,809	in gene	chr6:8271400-82402999
-0.18	Cybb		2,438	in gene	chr6:27483200-27489799
-0.18	Cy4b		21,385	in gene	chr18:84847400-84888199
-0.18	Mifal7c-2, Mifal7b		25434, -26120	upstream, upstream	chr19:85651000-85711999
-0.18	Stewart		1,921	in gene	chr6:7951400-796399

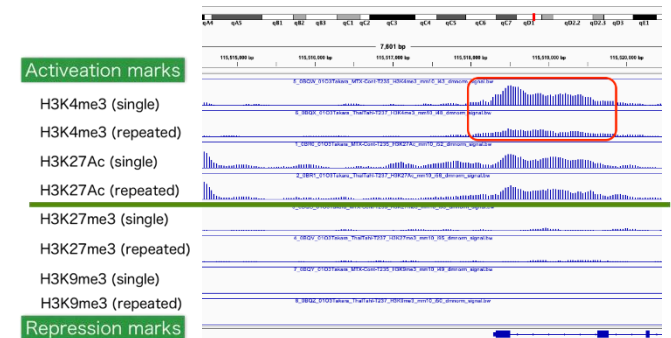
### H3K27me3(抑制型)が増加

log2(ratio)	Gene List	H3K27me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.29	G30011006ik, Mcd1		13751, -11747	downstream, upstream	chr17:9073200-90745399
0.29	Eng1, Casar1		2844, 37884	downstream, in gene	chr17:2579400-25412999
0.27	Chc1, Msi192, Ling3, Lm7, Spp2b		22181, 8843, 8802, 6480, 19610, -19678	upstream, downstream, downstream, in gene, downstream, upstream	chr10:6281600-6284999
0.27	Cnr1		20,057	in gene	chr7:8079700-80813799
0.21	Ser1, T300340249ik		999, 13797	in gene, downstream	chr5:12597800-12594999
0.21	Prmt1, T30027049ik, Spah3		1844, 23719, 33823	in gene, downstream, downstream	chr10:6281600-6284999
0.21	Prp1, LOC101059718, Msi1		57195, -13259, 19152	in gene, upstream, downstream	chr17:27186400-2712999
0.21	Cmp1		4,219	in gene	chr5:3723800-3725299
0.21	Mag1b, Cmh, 472471.019ik, Lipe		50935, 2525, -9620, 28788	downstream, downstream, upstream, downstream	chr7:25361800-25372999
0.21	Gm1		6,890	upstream	chr17:2447000-2753399
0.21	Hig13, Iglon5, 49314068189ik, Gm2511		26148, 724, 16639, 29248	downstream, in gene, downstream, downstream	chr7:4347400-4356599
0.21	lnc1, Emln3		32726, -3071	downstream, upstream	chr2:6099800-16092199
0.21					chr5:7931000-7941199
0.20	Ankaf1d1		203,006	downstream	chr4:14041000-140513799
0.20	Gtbf, Hnf1b		21465, 77732	downstream, in gene	chr11:98443600-98472999
0.20					chr4:1126500-13197199
0.20	Gm1		75,505	in gene	chr17:27434200-27441399
0.20	Dm1, Msi199a		18005, 16839	in gene, downstream	chr2:32324400-32345199
0.20	Hnf1b		163,910	in gene	chr13:5114400-5112999
0.20	Hnf1b		1,851	in gene	chr17:1664800-16718799

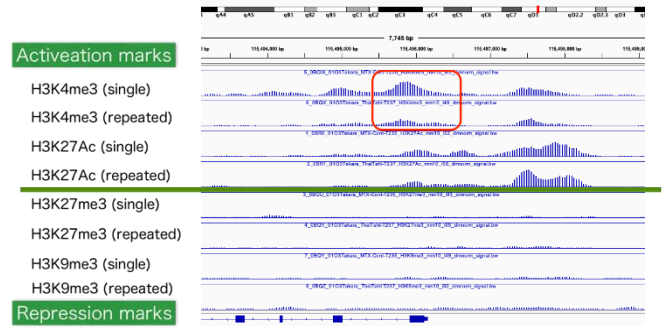
### H3K9me3(抑制型)が減少

log2(ratio)	Gene List	H3K9me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.31	Ctdb9		35,578	in gene	chr10:70133200-70272199
-0.31	Cy2c		198,792	in gene	chr6:10417800-10420999
-0.31	Prmt5		38,047	in gene	chr1:1452800-14547399
-0.30	Klhl3, Hmnpa2		-5071, 21957	upstream, downstream	chr11:5809400-58119599
-0.30	Wec2		66,792	in gene	chr8:4791400-47934199
-0.30	Hmna3, Tk2		91486, 26559	downstream, downstream	chr15:1213000-12610999
-0.29	Tbk1		45,795	downstream	chr10:12152400-12155799
-0.29	Mag3b4		45,261	in gene	chr17:1228300-12283799
-0.29	Eng1, D110118209ik		16976, -11668	in gene, upstream	chr10:70133200-70272199
-0.28	Gm13263, Page8		4945, -25068	upstream, upstream	chr15:36348400-36381599
-0.28	Yk6, Cam2b		17141, 92849	downstream, in gene	chr11:5967600-5978199
-0.27	Cy2c		135,392	in gene	chr6:10417800-10421599
-0.27	Spa13		66,961	in gene	chr16:81200-2846199
-0.27	Prca		86,514	in gene	chr17:8625000-86282999
-0.27	Eng1, Siglec13		106023, 12769	downstream, in gene	chr18:7802700-78051799
-0.27	Wec2		21,747	in gene	chr11:444800-11463799
-0.27					chr16:9008300-90122999
-0.27	Apbb2		66,918	in gene	chr5:6653800-66567199
-0.27	Ar15, A4300901179ik		33049, 26593	in gene, in gene	chr13:1141400-114130999
-0.27	Prca		89,447	in gene	chr16:1508000-15116199

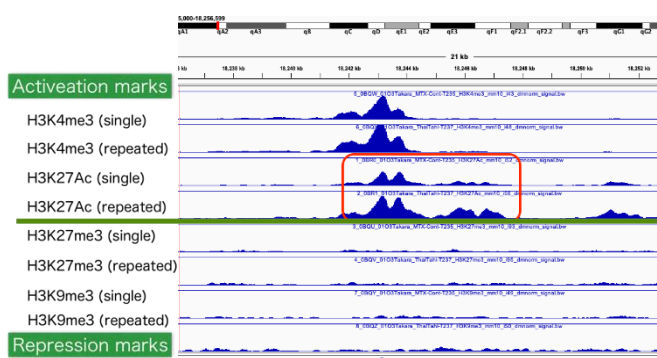
サリドマイドの反復によって、Cyp4a10 のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。



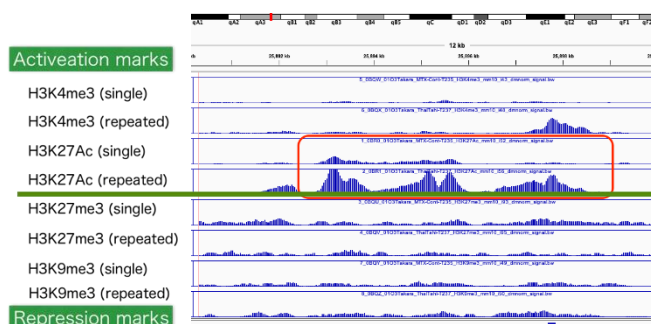
また、Cyp4a 14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。



また、Cyp7b1 のプロモーター領域においては、活性型ヒストン修飾である H3K27Ac が増加していることが明らかになった。



さらに、Cyp2b10 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K27Ac および H3K4me3 が増加していることが明らかになった。



一方、肝臓以外の臓器のゲノム DNA のメチル化解析方法については、各種臓器よりゲノム DNA を抽出した後は、基本的には先行研究でプロトコールを確立している肝臓での全ゲノムバイサルファイト解析方法と同じと確認された。

## D. 考察

令和 3 年度はサリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析データが得られる予定である。これにはサリドマイドの反復曝露影によるエピゲノム影響の解析といった直接的な意義だけでなく、サリドマイドの溶媒はメチルセルロース水溶液 (MC) であることから副次的な意義が認められている。即ち、先行研究において VPA の反復曝露によりグローバルな H3K9me3 の低下が見られていることから、これが溶媒影響かどうか、溶媒が同じ MC であるサリドマイドの反復曝露の解析結果から判別可能と考えられる。もしグローバルな H3K9me3 の低下が溶媒影響であった場合は、MC がよく利用される溶媒であるだけに影響が大きいと予想されるため、MC の反復曝露影響の詳細解析を速やかに実施すべく、来年度は MC の反復曝露影響について検討予定である。

さらに今年度のサリドマイド反復曝露の解析結果においては、各種薬物代謝酵素のプロモーター領域において、ヒストン修飾に大きな変動がみられた。

これは、サリドマイドという薬物により、発現が誘導および抑制され、そのままエピジェネティック修飾も固定されたのではないかと考えられる。

今後は、これらのヒストン修飾が、サリドマイドの反復を止めることで元に戻りうるのかを検証するための良い対象遺伝子となるのではないかと考えられる。

今年度は、個別の領域の解析を行ったが、ゲノムワイドには、H3K27me3 のピーク数が、サリドマイドの反復投与により 43.4% 増加していることに関して、その原因の解明を行いたい。

一方、肝臓以外の臓器のゲノム DNA のメチル化解析方法については、各種臓器よりゲノム DNA を抽出した後は、基本的には先行研究でプロトコールを確

立している肝臓での全ゲノムバイサルファイト解析方法と同じと確認されたが、サンプリング可能な臓器片の量や、臓器を構成する細胞種の多寡、細胞種ごとの存在比率やエピゲノムに関連しているであろう細胞種毎の分化状態など、組織片全体をホモジナイズして解析する際に問題となり得る要素の検討を継続する必要がある。

## E. 結論

サリドマイドの反復により、薬物代謝酵素群のプロモーター領域において、ヒストン修飾の変動が検出された。これは、発現誘導または抑制状態がエピジェネティックな変化により、固定されたとも考えられる。2年目においては、サリドマイドの反復投与により43.4%の増加が見られたH3K27me3について、変化のあった領域にどのような共通性があるのかを明らかにする必要がある。また、肝臓以外の臓器のゲノムDNAメチル化解析方法については、基本的には先行研究で実施した肝臓での解析方法と同等と確認され、次年度以降、適切な臓器を選定の上、適切に実施してゆく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. Yamazaki, H., Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci.* 2021; 46: 553-560.[doi.org/10.2131/jts.46.553]
- (2) Yuhji Taquahashi, Hirokatsu Saito, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Development of an

inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 169-175.[doi.org/10.2131/fts.8.169]

- (3) Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 161-167.[doi.org/10.2131/fts.8.161]

- (4) Eiichi Yamamoto, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Hirokatsu Saito, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Futoshi Sato, Satoshi Kitajima, Kumiko Ogawa, Ken-ichi Izutsu, Yoshiro Saito, Yoko Hirabayashi, Yasuo Iimura, Masamitsu Honma, Haruhiro Okuda, Yukihiro Goda: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 2021; 595: 120241.[doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120241]

### 2. 学会発表

- (1) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima, Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral
- (2) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(3) 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(4) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(5) 齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価－発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に－. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑥ 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑦ 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純：PPAR $\alpha$  リガンドの比較毒性オミクス. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

⑧ J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, S. KITAJIMA, Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

⑨ 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, Special lecture, Web, Oral presentation.

## 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）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和3年度 分担研究報告書

システムバイオロジーによる毒性解析のAI化

研究分担者 北野 宏明

特定非営利活動法人 システム・バイオロジー研究機構  
会長

**研究要旨**

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

**研究協力者**

長谷 武志 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**

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**

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

●深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

先行研究で開発した、深層学習を用いた3次元グラフの画像解析システム DTOX について改良、即ち特異パターンの追加学習と GUI 実装の改良を進めた。

追加学習用の画像セットは、遺伝子発現を用量×時間×発現量 (Percellome 法により細胞 1 個あたりの mRNA コピー数に換算したデータ) の 3 次元グラフに描画したものをを用いた。また GUI 実装は、python



の代表的な GUI 作成用のモジュールである、PYQT5 と、Qt designer を用いて改良を進めた。

### ● 深層学習を用いたエピゲノム解析データからの有意なエピゲノム修飾の判別

エピゲノム解析では、曝露下の遺伝子のエピゲノム修飾（ヒストン修飾およびゲノム DNA メチル化の状態）を、下図に示すような解析画像として表示し、研究者の判断を助けている。

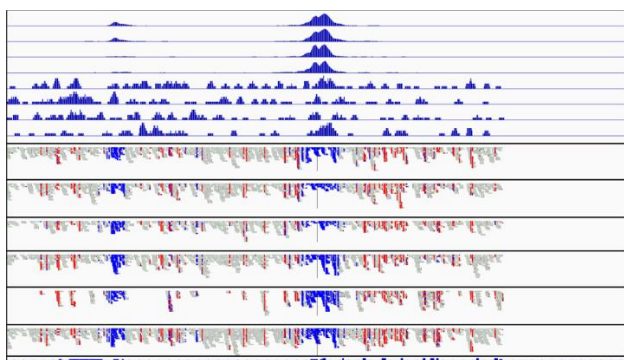


図. エピゲノム解析画像の例  
上から 8 行で示される分布がクロマチン修飾の状況を表しており、下から 8 行のプロットがメチル化の状況を表している。横軸は配列の位置を表している。メチル化については、青いプロットがメチル化されていない状態を表している。

有意なエピゲノム修飾を同定するために、長年の経験を積んできた研究者が、それぞれの遺伝子に対するエピゲノム解析画像を検討し、分類を行ってきた。しかしながら、化学物質数×遺伝子数の解析画像が存在し、網羅的に有意なエピゲノム修飾を同定するには、多大な時間と労力が必要となっている。これを解決すべく、エピゲノムデータ（解析画像）から、効率良く有意なエピゲノム修飾を判別する手法の構築を目的として、深層学習モデルの構築を行った。

深層学習モデルの訓練には、専門家により分類されたエピゲノム解析画像を訓練データとして用いた。このエピゲノム画像データは、四塩化炭素、バルプロ酸ナトリウム、クロフィブラートの新型反復曝露と単回曝露において得られたものである。各遺伝子に対するエピゲノム解析画像を、専門家が視覚的に検証して、以下の 3 群に分類している。

- ① **suppression 群**：反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が抑制されたもの（5,937 画像）
- ② **induction 群**：反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が誘導されたもの（457 画像）
- ③ **non significant 群**：反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が有意な変動をしめさなかったもの（2,349 画像）

エピゲノム画像データの 80% をトレーニングデータとして用いて深層学習モデルを構築し、残りの 20% のデータをテストデータとして用いて構築したモデルの分類精度の検証を行った。

### ● 転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

SHOE 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。

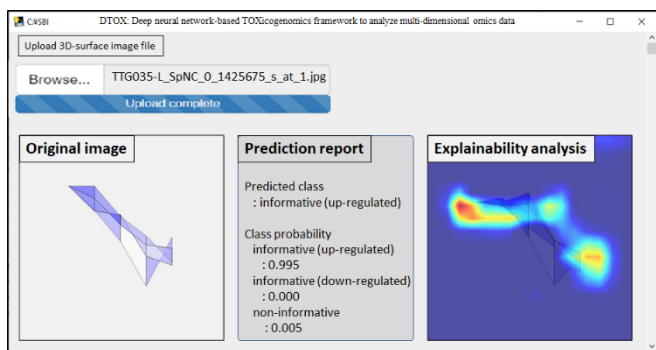
## C. 研究結果

### ● 深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

トレーニング等に使用していないデータセットに対し、先行研究で開発した深層学習モデル DTOX を適用して予測を実行し、その結果を専門家の判定結果と比較して、予測が食い違った遺伝子の 3 次元グラフ画像を集め、追加学習を試みた。例数が少なかったためか、その効果は大きなものでは無かったが、過学習等の悪影響も起こらず、深層学習モデルによる 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による予測精度を大きく上回った。

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) の実装及び改

良を進めた。



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、連続処理機能やその際のレポート作成機能の実装を検討しているほか、DTOX に関する成果の原著論文を進めている。

(参考文献)

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

## ●深層学習を用いたエピゲノム解析データからの有意なエピゲノム修飾の判別

エピゲノム解析画像を①suppression 群、②induction 群、③non significant 群の三群に分類することを目的として、多様な深層学習アーキテクチャに基づく分類モデルを構築した。使用した深層学習アーキテクチャは 8 種類であり、それらの内最も複雑なものは 121 層のレイヤーで構築されている (下表)。

深層学習アーキテクチャ	層の数	参考文献
resnet18	18	<a href="https://arxiv.org/abs/1512.03385">https://arxiv.org/abs/1512.03385</a>
resnet34	34	<a href="https://arxiv.org/abs/1512.03385">https://arxiv.org/abs/1512.03385</a>
resnet50	50	<a href="https://arxiv.org/abs/1512.03385">https://arxiv.org/abs/1512.03385</a>
alexnet	8	<a href="https://dl.acm.org/doi/10.1145/3065386">https://dl.acm.org/doi/10.1145/3065386</a>
densnet121	121	<a href="https://arxiv.org/abs/1608.06993">https://arxiv.org/abs/1608.06993</a>
squeezenet_0	15	<a href="https://arxiv.org/pdf/1602.07360v3.pdf">https://arxiv.org/pdf/1602.07360v3.pdf</a>
vgg16	16	<a href="https://arxiv.org/abs/1409.1556">https://arxiv.org/abs/1409.1556</a>
vgg19	19	<a href="https://arxiv.org/abs/1409.1556">https://arxiv.org/abs/1409.1556</a>

これらの深層学習アーキテクチャは、1000 カテゴリに分類できる 120 万枚の画像で構成されるデータ (ImageNet dataset) を用いてプレトレーニングされたものである。このプレトレーニングされた深層学習アーキテクチャを、上記のエピゲノム解析画像に対して転移学習を行うことで、分類モデルを構築した。

エピゲノム解析画像データの 80% をトレーニングデータとして用いて深層学習モデルを構築し、残りの 20% のデータをテストデータとして用いて構築したモデルの分類精度の検証を行った結果、下図に示すように、構築した 8 種の分類モデル全てで、non-significant 群と、それ以外の 2 群を正確に分類することが出来た。

	induction	ns	supression
induction	0	3	89
ns	0	466	4
supression	0	4	1184

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	468	2
supression	0	3	1185

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	465	5
supression	0	3	1185

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	461	9
supression	0	4	1184

	induction	ns	supression
induction	0	3	89
ns	0	466	4
supression	0	2	1185

	induction	ns	supression
induction	0	1	91
ns	0	465	5
supression	0	4	1184

	induction	ns	supression
induction	0	3	89
ns	0	467	3
supression	0	3	1185

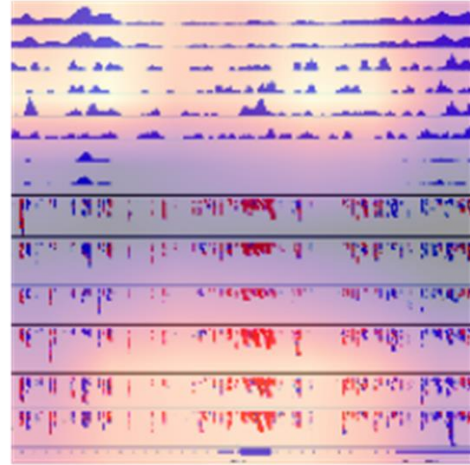
  

	induction	ns	supression
induction	0	1	91
ns	3	464	3
supression	0	3	1185

このことは、構築した深層学習モデルは、有意なエピゲノム解析画像を正確に抽出できる、つまりは、反復暴露により生じるエピゲノム修飾の中でも遺伝子変動に影響を与えるものを見分けることが出来る可能性を示唆している。また、supression 群も、8種の深層学習モデル全てで、正確に分類することが出来た。しかしながら、構築した8種類のモデル全てで、induction 群を分類することが出来なかった。

induction 群の分類不調の原因を調べるために、構築した深層学習モデルが画像のどの部分に着目して分類を行っているのかを示すべく、代表的な 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) を用いて深層学習モデルの解析を行った。解析結果は、下図の様に示され、深層学習モデルが図中の明るい部分に着目して分類を行っていることが示された。

pred. class: 2, actual class: supression



現在、専門家と協力し、着目している部分の生物学的な解釈を進めている。

(参考文献)

1. Andre Esteva et al. (2017) Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. Nature 52:115-118.
2. 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
3. Ian J. Goodfellow et al. (2014) Generative Adversarial Networks. <https://arxiv.org/abs/1406.2661>

#### ●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

今年度は、GARUDA プラットフォーム上で動作する SHOE ガジェットの開発や、SHOE 本体の機能追加などを進めた。また一部の環境でインストールできないなどの事例があったため、原因調査と対応策の検討を進めた。

#### D. 考察

本分担研究においては、独自開発した深層学習遺伝子発現グラフ画像解析システム DTOX の予測精度をより一層高め、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性能を示した。これは、DTOX の深層学習モデルが、研究者によるヒューマンキュレーションの際に評価している領域に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。

エピゲノム解析においても、深層学習モデルは、反復曝露によるエピゲノム修飾の内、遺伝子発現に影響がある修飾を見分けることが出来る可能性があることが示唆された。今回、**suppression** 群を正確に分類することが出来たが **induction** 群を見分けることはできなかった。これは、**induction** 群の訓練用画像の枚数が少なく、**induction** 群に関する情報が十分に学習できていないことが原因であると考えられる。現在、この問題に対処するために、画像の生成モデル (Generative adversarial network; Ian J. Goodfellow et al. (2014) Generative Adversarial Networks. <https://arxiv.org/abs/1406.2661>) を活用して、**induction** 群の訓練用画像の増幅を進めている。

## E. 結論

本分担研究についてはほぼ計画通り推移した。先行研究により開発した解析用ソフトウェアは実用の段階に進みつつある。また新たに開始したエピゲノム解析の AI 自動化についても、十分な訓練用画像があれば、より正確に反復曝露により遺伝子発現に影響を与えるエピゲノム修飾を予測できることが示唆されている。現在不足しているカテゴリ (反復曝露によるエピゲノム修飾により、遺伝子発現が誘導されるもの) の遺伝子は実データにおいて他のカテゴリより少ないため、今後は不足している訓練用画像を AI で増幅する手法 (Generative adversarial network) の活用などにより深層学習モデルの訓練状況を改善し、実用レベルの予測性能を目指す。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) [Kitano, H.](#) Nobel Turing Challenge: creating the engine for scientific discovery. *npj Syst Biol Appl.* 7, 29 (2021).[DOI: 10.1038/s41540-021-00189-3]
- (2) Ostaszewski M, Niarakis A, Mazein A, Kuperstein I, Phair R, Orta-Resendiz A, Singh V, Aghamiri SS, Acencio ML, Glaab E, Ruepp A, Fobo G, Montrone C, Brauner B, Frishman G, Monraz Gómez LC, Somers J, Hoch M, Kumar Gupta S, Scheel J, Borlinghaus H, Czauderna T, Schreiber F, Montagud A, Ponce de Leon M, Funahashi A, Hiki Y, Hiroi N, Yamada TG, Dräger A, Renz A, Naveez M, Bocskei Z, Messina F, Börnigen D, Fergusson L, Conti M, Rameil M, Nakonecni V, Vanhoefer J, Schmiester L, Wang M, Ackerman EE, Shoemaker JE, Zucker J, Oxford K, Teuton J, Kocakaya E, Summak GY, Hanspers K, Kutmon M, Coort S, Eijssen L, Ehrhart F, Rex DAB, Slenter D, Martens M, Pham N, Haw R, Jassal B, Matthews L, Orlic-Milacic M, Senff Ribeiro A, Rothfels K, Shamovsky V, Stephan R, Sevilla C, Varusai T, Ravel JM, Fraser R, Ortseifen V, Marchesi S, Gawron P, Smula E, Heirendt L, Satagopam V, Wu G, Riutta A, Golebiewski M, Owen S, Goble C, Hu X, Overall RW, Maier D, Bauch A, Gyori BM, Bachman JA, Vega C, Grouès V, Vazquez M, Porras P, Licata L, Iannuccelli M, Sacco F, Nesterova A, Yuryev A, de Waard A, Turei D, Luna A, Babur O, Soliman S, Valdeolivas A, Esteban-Medina M, Peña-Chilet M, Rian K, Helikar T, Puniya BL, Modos D, Treveil A, Olbei M, De Meulder B, Ballereau S, Dugourd A, Naldi A, Noël V, Calzone L, Sander C, Demir E, Korcsmaros T, Freeman TC, Augé F, Beckmann JS, Hasenauer J, Wolkenhauer O, Wilighagen EL, Pico AR, Evelo CT, Gillespie ME, Stein LD, Hermjakob H, D'Eustachio P, Saez-Rodriguez J, Dopazo

J, Valencia A, Kitano H, Barillot E, Auffray C, Balling R, Schneider R; COVID-19 Disease Map Community. COVID19 Disease Map, a computational knowledge repository of virus-host interaction mechanisms. Mol Syst Biol. 2021 Oct;17(10):e10387. PMID: 34664389. [DOI: 10.15252/msb.202110387]

## 2. 学会発表

① 北野宏明, 「AI で変わる毒性学、変わらない毒性学」, 第 48 回 日本毒性学会学術年会, 日本毒性学会, 神戸(オンライン), July 7, 2021(invited)

## 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）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和3年度 分担研究報告書

統合ツール “Percellome Integrator” の開発

研究分担者 相崎 健一

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター 毒性部  
第一室 室長

研究要旨

本研究は、毒性の分子機序に基づいて、現行の不確実係数（安全係数）を利用する有害性評価手法を補強し、より迅速で、高精度且つ省動物を具現化した新たな有害性評価系の開発を目標として、マイクロアレイ（GeneChip）と次世代シーケンサを用いて基盤となる遺伝子発現及びエピゲノムの網羅的データを得つつ、独自開発のソフトウェア群による化学物質の生体影響の網羅的分析法の体系化を行い、これに、毒性学・分子生物学に精通したデータサイエンス専門家を擁して、システムバイオロジー及び人工知能（AI）技術を融合した新たな有害性評価系の開発を進める。

特に先行研究において、Percellome 法\*を基盤とする「新型」反復曝露実験\*\*の蓄積によりプロトタイプを構築した、化学物質の反復曝露による生体影響のデータベースについては、溶媒の反復曝露影響や、反復曝露影響の可逆性・非可逆性を遺伝子単位で取得、反映することにより、解析精度を向上させる。単回曝露のデータベースと共にこれを利用することで、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の期間短縮・効率化を検討する。

令和4年度は、新型化学物質有害性評価システムの解析コアの主要ユニットとしての、遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発を進めた。これに組み込むライブラリの選定を進めつつ、本ユニットの基本情報となる GeneChip プローブセット 4 万 5 千件の最新マウスゲノム（mm10）上へのマッピングを実施した。

-----  
(\*) 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曝露し、遺伝子発現測定直前の曝露時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終曝露を一回行う。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、独自構築したトキシコゲノミクス・データベース (DB) にインフォマティクス、及び、人工知能 (AI) を拡大適用し、化学物質が実験動物に惹起する遺伝子発現変動等の分子毒性学情報から、科学的根拠に基づく有害性予測評価手法を確立する。これにより「安全係数」を用いる従来の有害性評価手法を補強するとともに、迅速、高精度、省動物を具現化する新たな評価システムを構築することを目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8 億 5 千万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及び反復曝露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、さらに臓器別のゲノム DNA メチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシコロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

## B. 研究方法

ソフトウェアの in house 開発に際しては、先行研究で開発したソフトウェアの改良の際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。新たに開発するソフトウェアについては、ライブラリが充実している Python (ver.3.6.9) を用いた。主な解析ライブラリとしては numpy (ver.1.19.4)、

pandas (ver.1.1.5)、scikit-learn (ver.0.22.2.post1)を用いた。

また GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブセットのマウスゲノム上へのマッピングには BWA(Li H. and Durbin R. (2009) Bioinformatics, 25:1754-60.) ver 0.7.12-r1039 を使用した。

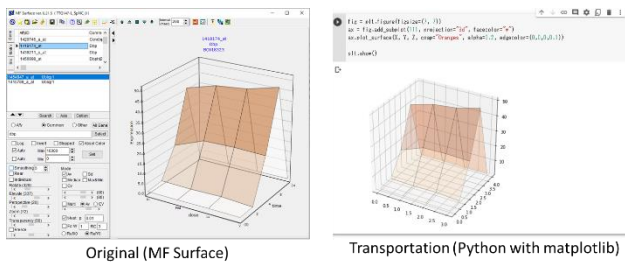
## C. 研究結果

最終目標である新型化学物質有害性評価システムの解析コアの主要ユニットとしての、遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発を進めた。これに組み込むライブラリの選定を進めつつ、データ解析ユニット運用の基盤となるデータ群の結合に必要な情報(基盤情報)の整備を進めた。

遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発に際しては、Percellome 法などの独自技術の実装部分を除き、実績のある公開ライブラリの利用が望ましい。有用なライブラリは多数リリースされているが、今回の調査では、バイオデータ全般の処理が可能な biopython (<https://biopython.org/>)、有力なゲノムブラウザである IGV (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>)の開発グループがリリースしている組み込み用 JavaScript ライブラリ igv.js (<https://github.com/igvteam/igv.js>)とその Jupyter 用ラッパー ipyigv (<https://github.com/QuantStack/ipyigv>)を中心に、その他のバイオ系データに対応可能な可視化ライブラリとして、HiGlass (<https://higlass.io/>)、Plotly (<https://plotly.com/graphing-libraries/>)などの機能や動作性能(処理速度、安定性)、ライセンス、依存関係、コンフリクト状況の確認を行なった。

例えば、ヒューマンキュレーションで多用している「Surface グラフ」については、先行研究で in house 開発した MF Surface.exe の描画と同等の 3D グラフを代表的なグラフ描画ライブラリ matplotlib で高い再現性で同等機能を移植可能であることを確認した。





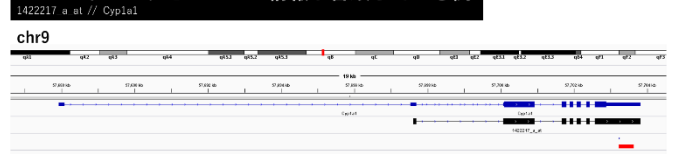
Original (MF Surface)

Transportation (Python with matplotlib)

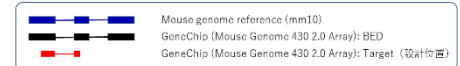
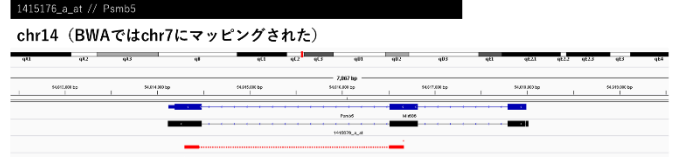
基盤情報の整備では、最重要と考えられる項目として、主要データの大半を占める遺伝子発現データを生成したマイクロアレイ GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブ 50 万件の最新のマウスリファレンスゲノム (mm10) 上での座標の確定であるが、作業効率の観点から、11~25 本のプローブ群からなるプローブセット 4.5 万件の座標確定作業を進めた。各プローブセットのターゲット配列はメーカーが提供する fasta フォーマットの配列データ Mouse430\_2\_target より取得し、python スクリプトにより fastq 形式に変換した。mm10 へのマッピングは、BWA の mem オプションにて実施した。この結果、45101 件の target 配列のうち、複数領域にマッピングされたものが 785 件、マッピングされなかったものが 457 件あった。またマッピングされたものでも、メーカーが提供している Mouse430\_2.mm10.bed の情報、具体的には染色体番号がマッピング結果と異なるものが 1320 件あった。Mouse430\_2.mm10.bed で複数の領域 (2~12 箇所) にマッピングされていたプローブセット 785 件と合わせ、少なくとも 2105 件 (全プローブセットの 4.7%) については、個別の手動調整が必要であることが明らかになった。

個別に調査したところ、BWA によりマッピングされた染色体と、メーカー情報での染色体が異なるプローブセットの多くは、複数のエクソンを含む領域に設計されていることが確認された。

#### BWAマッピングとメーカー情報が合致している例



#### BWAマッピングとメーカー情報に齟齬がある例



ただし、一部のプローブセットでは、元来の遺伝子座と異なる染色体上の領域をターゲットに設計されていることも判明しており、解析精度を高めるためには丁寧な確認作業が必要であった。

## D. 考察

開発準備はほぼ計画通りに進行している。新型化学物質有害性評価システムの解析コア開発のための開発用ライブラリ探索は順調で、必要な機能の大半は発見済みである。検討課題としては、データの可視化に際して、従来の様式より効果的な表現の検討が挙げられる。特にグラフや解析図等の可視化手法については、分担研究「システムバイオロジーによる毒性解析の AI 化」での学習用画像としての利用を前提として、特徴を捉えやすい表現形式となるよう考慮している。

GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブセットのマウスゲノム mm10 上へのマッピングについては、メーカーから提供されている座標情報との乖離が少数ながら確認され、逐一、整合処理を行った。このマッピング情報はデータ群の結合に必要なだけでなく、GeneChip の遺伝子発現データと次世代シーケンサを用いた RNA-Seq の遺伝子発現データとの相互データ変換の精度向上にも寄与する重要な基盤情報となるため、整合処理は慎重かつ正確に進めた。

## E. 結論

本分担研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

必要な機能に対応した主なライブラリについての情報収集を終えた。また基盤となる情報、とりわけ GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブセットの target 座標情報について整備した。来年度からの本格的な開発への前処理は整ったと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Yuhji Taquahashi, Shuji Tsuruoka, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2022; 9: 17-21.[doi.org/10.2131/fts.9.17]

### 2. 学会発表

(1) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima, Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral

(2) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(3) 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(4) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、ト

ランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(5) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(6) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純：PPAR $\alpha$  リガンドの比較毒性オミクス。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(7) J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, S. KITAJIMA, Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

(8) 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、(2021.1.15)、online meeting、口演

(9) 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, Special lecture, Web, Oral presentation.

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）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和3年度 分担研究報告書

Percellome データベースを利用した解析パイプライン

研究分担者 夏目 やよい

国立研究開発法人医薬基盤・健康・

栄養研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト

プロジェクトリーダー

研究要旨

当該年度は、既知の PPAR $\alpha$ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha)リガンドおよびこれまでの研究成果から PPAR $\alpha$ リガンドであることが示唆されている化学物質3種（クロフィブラート、バルプロ酸、エストラゴール）の遺伝子発現プロファイルの動的変動を比較し、これら3種に共通するパターンや固有に認められるパターンを検出した。その結果、PPAR $\alpha$ 標的遺伝子は共通して2,4,8時間で発現亢進が認められていること、3種の化学物質によって発現が亢進する遺伝子リストで重複は大きくないこと、その一方で発現亢進が認められる遺伝子のうちエンリッチメント解析で検出される共通機能を有するものは3種の化学物質間で似通っていることが見出された。また、PPAR $\alpha$ 活性化のように核内受容体を介した遺伝子発現誘導は比較的検出しやすい一方、二次的に惹起される生体応答を検出するためには、遺伝子発現変動のパターンに基づいた分類や深いドメイン知識が必要となることが示唆された。遺伝子発現プロファイルから毒性発現メカニズムを推定する上でパスウェイや Gene Ontology とは異なる階層のオントロジーの必要性を支持する結果であると言える。

A.研究目的

毒性を呈する化学物質が惹起する遺伝子発現プロファイル（マイクロアレイデータ）を収集し、定量的な比較を可能とする為に細胞一個あたりの mRNA コピー数を推定するプロセスを加えた Percellome データベースは、化学物質による毒性発現機

構を遺伝子発現カスケードから解明する為に有用なリソースである。本データベースにはマウスへの曝露用量、曝露時間ごとに遺伝子発現量（推定される細胞一個あたりの mRNA コピー数）が格納されており、遺伝子発現量の動的変化から「どのような分子ネットワークの変動が化学物質曝露と

関連づけられるか」を抽出することができる。当該年度は、既知の PPAR $\alpha$ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha)リガンドおよびこれまでの研究成果から PPAR $\alpha$ リガンドであることが示唆されている化学物質3種(クロフィブラート、バルプロ酸、エストラゴール)の遺伝子発現プロファイルの動的変動を比較し、これら3種に共通するパターンや固有に認められるパターンを検出することにより、Percellomeデータの効果的な活用方法を検討することを研究目的とした。

## B.研究方法

### 解析データ:

クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウムまたはエストラゴールを投与したマウスの肝臓における遺伝子発現プロファイルを使用した。マウス(C57BL/6, 12週齢、オス)にクロフィブラート(0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒:メチルセルロース 0.5%)を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に肝臓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。マウス(C57BL/6, 12週齢、オス)にバルプロ酸ナトリウム(0, 50, 150, 500 mg/kg、溶媒:メチルセルロース 0.5%)を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に各臓器(脳:皮質及び海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓)を回収してマイクロアレイ解析(Affymetrix GeneChip Mouse

Genome 430 2.0)に供した。マウス(C57BL/6, 12週齢、オス)にエストラゴール(0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒:メチルセルロース 0.5%)を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に肝臓を回収してマイクロアレイ解析(Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0)に供した。これらのデータはPercellome法[1]により正規化され、Percellomeデータとしてデータベース化されている。

### データ解析:

曝露時間及び曝露用量依存的に発現変動が見られる遺伝子(DEG)のリストは、遺伝子発現の3Dプロット(曝露用量、曝露時間、細胞一個あたりのmRNAコピー推定量を三方向の軸に取ったプロット)の形状より毒性学の専門家があらかじめ作成していたものを利用した。次に、遺伝子発現が亢進する時点のパターンごとに遺伝子リストを分割し、TargetMine

(<http://targetmine.mizuguchilab.org> [2, 3])を用いてエンリッチメント解析を行った。分割した遺伝子リスト間の重複を可視化する為に intervene (<https://asntech.shinyapps.io/intervene> [4])を用いてベン図を作成した。

## C.研究結果

クロフィブラートは高脂質血症治療剤であり、PPAR $\alpha$ を介した脂肪酸 $\beta$ 酸化の亢進などによりトリグリセリドやVLDLの減少や

HDLコレステロールを誘導すると考えられている。また、これまでの我々の研究により、①バルプロ酸投与によってPPAR $\alpha$ 、SREBP、ERのクロストークが影響を受けること、②エストラゴールは特異性の高いPPAR $\alpha$ リガンドである可能性があることが既に見いだされている。そこで、これらの化学物質で発現が亢進する遺伝子の比較を行い、PPAR $\alpha$ の活性化に係る共通項や差異について考察した。その結果、Acot (Acyl-CoA thioesterase) といったPPAR $\alpha$ 標的遺伝子は共通して2,4,8時間で発現亢進が認められておりPPAR $\alpha$ の活性化は数時間保たれていること、3種の化学物質によって発現が亢進する遺伝子リストで重複は大きくないこと、その一方で発現亢進が認められる遺伝子のうちエンリッチメント解析で検出される共通機能を有するものは3種の化学物質間で似通っていることが見出された。バルプロ酸では2,4時間の時点で転写や細胞周期に関連する遺伝子の発現が亢進し、少し遅れて脂質代謝関連遺伝子の亢進のピークが認められた。また、クロフィブラートでは曝露4時間の時点でリボソーム生合成関連遺伝子の発現亢進が認められた。これらの遺伝子ではパスウェイレベルのエンリッチメントは認められずGene Ontologyレベルでのエンリッチメントが検出されていることから、PPAR $\alpha$ 活性化に伴う生体応答である可能性が考えられる。

#### D.考察

当該年度の研究では、どの時点において発現亢進が認められたかのパターンごとに細かく遺伝子リストを分割し、それぞれに対してエンリッチメント解析を行うことで曝露時間の情報をどのように活用するのが効果的かを検討した。今回はTargetMineを用いたパスウェイ・Gene Ontologyレベルでのエンリッチメント解析を元に化学物質曝露によって惹起される生体応答を分析したが、従来のエンリッチメント解析では毒性学研究に最適とは言い難い問題点も浮き彫りになった。つまり、PPAR $\alpha$ 活性化のように核内受容体を介した遺伝子発現誘導は比較的検出しやすい一方、二次的に惹起される生体応答を検出するためには遺伝子発現変動のパターンに基づいた分類により入力する遺伝子リストの「磨き上げ」が重要であることと、その解釈にはより深いドメイン知識が必要であることを指す。クロフィブラート曝露によるリボソーム生合成関連遺伝子の発現亢進がこれにあたるが、このような応答をする遺伝子はその化学物質の生理活性強度を評価する上で有用である可能性が示唆され、遺伝子発現プロファイルから毒性発現メカニズムを推定する上でパスウェイやGene Ontologyとは異なる階層のオントロジーの必要性を支持する結果であると言える。

## E. 結論

既知のPPARαリガンド、およびPPARαリガンドであることが示唆されている化学物質が惹起する遺伝子発現変動パターンの比較により、化学物質の曝露時間情報の有効活用が毒性発現メカニズム推定において重要であることが見出された。また、毒性学に特化したエンリッチメント解析の開発が望まれる。

- [1] Kanno, J., et al. *BMC genomics* 7.1 (2006): 64.  
[2] Chen, YA., et al. *PLoS One* 6.3 (2011): e17844.  
[3] Chen, YA., et al. *PLoS One* 9.6 (2014): e99030.  
[4] Khan, A., & Mathelier, A. *BMC bioinformatics*, (2017):18(1), 1-8.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1). 夏目やよい, 機械学習によって加速される次世代アジュバント開発, 医学のあゆみ vol.279 No. 10 2021/12
- 2). 夏目やよい, 榎林陽一, 新薬創出を加速する人工知能の開発 ~データ駆動型創薬ターゲット探索プラットフォームの構築~ あいみつく vol. 42-43(2021)
- 3). Hosomi K., Saito M., Park J., Murakami H., Shibata N., Ando M., Nagatake T., Konishi K., Tanisawa K., Mohsen A., Chen Y.A., Kawashima H.,

Natsume-Kitatani Y., Oka Y., Shimizu H., Furuta M., Tojima Y., Sawane K., Saika A., Yonejima Y., Takeyama H., Matsutani A., Mizuguchi K., Miyachi M. and Kunisawa, J. (2022). Unique metabolic profiles of *Blautia wexlerae* achieve beneficial effects for the control of obesity and type 2 diabetes. 27 January 2022, PREPRINT available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1259439/v1]

- 4). Natsume-Kitatani Y., Itoh M.N., Takeda Y., Kuroda M., Hirata H., Miyake K., Shiroyama T., Shirai Y., Noda Y., Adachi Y., Enomoto T., Amiya S., Adachi J., Narumi R., Muraoka S., Tomonaga T., Kurohashi S., Cheng F., Tanaka R., Yada S., Aramaki E., Wakamiya S., Chen Y.A., Higuchi C., Nojima Y., Fujiwara T., Nagao C., Matsumura Y., Mizuguchi K., Kumanogoh A. and Ueda N. Data-driven patient stratification and drug target discovery by using medical information and serum proteome data of idiopathic pulmonary fibrosis patients, 29 March 2022, PREPRINT (Version 2) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-405195/v2]



- 5). Hioki K., Hayashi T., Natsume-Kitatani Y., Kobiyama K., Temizoz B., Negishi H., Kawakami H., Fuchino H., Kuroda E., Coban C., Kawahara N., Ishii K.J., Machine learning-assisted screening of herbal medicine extracts as vaccine adjuvants, *Frontiers in Immunology* (accepted)

## 2. 学会発表

- 1). 夏目やよい、伊藤眞里、松村泰志、武田吉人、熊ノ郷淳、水口賢司、上田修功、「特発性肺線維症に対する創薬標的探索を目指した人工知能の開発」第61回日本呼吸器学会学術講演会 2021.4.24 オンライン
- 2). 榎本貴俊、武田吉人、網屋沙織、足立雄一、新津敬之、原伶奈、野田成美、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、伊藤眞里、夏目やよい、熊ノ郷淳、次世代プロテオミクスによる進行性線維化を伴う間質性肺疾患の新規バイオマーカー探索 (PRISM), 第61回日本呼吸器学会学術講演会, Web開催, 2021. 4. 24
- 3). 白井雄也、武田吉人、足立雄一、榎本貴俊、網屋沙織、野田成美、福島清春、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、夏目やよい、伊藤眞里、熊ノ郷淳、「PRISM」データから見えて

きた新たな線維化バイオマーカー, 第61回日本呼吸器学会学術講演会, Web開催, 2021. 4. 24

- 4). 野田成美、武田吉人、網屋沙織、足立雄一、榎本貴俊、原伶奈、新津敬之、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、夏目やよい、伊藤眞里、熊ノ郷淳、次世代プロテオミクスによる上葉優位型肺線維症の新規バイオマーカー探索 (PRISM), 第61回日本呼吸器学会学術講演会, Web開催, 2021. 4. 24
- 5). 網屋沙織、武田吉人、足立雄一、榎本貴俊、新津敬之、野田成美、原伶奈、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、伊藤眞里、夏目やよい、熊ノ郷淳、エクソソームの次世代プロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー探索 (PRISM), 第61回日本呼吸器学会学術講演会, Web開催, 2021. 4. 24
- 6). 夏目やよい、伊藤眞里、松村泰志、武田吉人、熊ノ郷淳、水口賢司、野田成美、上田修功、特発性肺線維症に対する創薬標的探索を目指した人工知能の開発, 第61回日本呼吸器学会学術講演会, Web開催, 2021. 4. 24
- 7). 足立雄一、武田吉人、榎本貴俊、網屋沙織、野田成美、原伶奈、新津敬之、白

井雄也, 福島清春, 白山敬之, 三宅浩太郎, 平田陽彦, 夏目やよい, 足立淳, 伊藤眞里, 熊ノ郷淳, 次世代プロテオミクスとバイオインフォマティクスが紐解 IPF と NSIP の病態解明, 第 61 回日本呼吸器学会学術講演会, Web 開催, 2021.4.24

8). 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Samik GHOSH, 北野宏明, 水口賢司, 菅野純, 毒性オミクスにおけるエピジェネティクス情報を加えた人工知能解析 PPAR $\alpha$  リガンドの比較毒性オミクス, 第 48 回日本毒性学会学術年会, Web 開催, 2021.7.7

9). 渡邊怜子, 大橋力也, 黒田正孝, 小村弘, 川島和, 江崎剛史, 夏目・北谷やよい, 水口賢司, 化学構造情報を用いた薬物動態パラメータ評価のためのインシリコ予測モデルの開発, 第 48 回日本毒性学会学術年会, Web 開催, 2021.7.7-9

10). 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」官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM) 「新薬創出を加速する人工知能の開発」令和二年度成果報告会 2021.7.20 オンライン

11). 夏目やよい, 「トランスクリプトームデータからの毒性発現メカニズム推定

と安全性評価」 第三回 scChemRISC 研究会 招待講演 2021.10.12 横浜

12). 夏目やよい, 「新薬創出を加速する人工知能の開発 ～臨床情報を活用した創薬標的探索～」 CBI 学会 2021 大会 プレナリー講演「国内 AI 創薬の最前線」 2021.10.28 オンライン

13). 夏目やよい, 「アジュバントデータベースとその活用から見える次世代アジュバント開発」 第 15 回次世代アジュバント研究会 招待講演 2022.1.25 オンライン

14). 夏目やよい, データ駆動型安全性評価の諸問題, 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム 2022 年度年会, 京都, 2022.3.1

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

## Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., <u>Kitajima, S.</u> Yamazaki, H.	Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species.	J Toxicol Sci.	46	553-560	2021
Yuhji Taquahashi, Hirokatsu Saito, Makiko Kuwagata, <u>Satoshi Kitajima</u>	Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals.	Fundam. Toxicol. Sci.	8	169-175	2021
Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, <u>Satoshi Kitajima</u>	Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system.	Fundam. Toxicol. Sci.	8	161-167	2021

<p>Eiichi Yamamoto, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Hirokatsu Saito, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Futoshi Sato, <u>Satoshi Kitajima</u>, Kumiko Ogawa, Ken-ichi Izutsu, Yoshiro Saito, Yoko Hirabayashi, Yasuo Imura, Masamitsu Honma,</p>	<p>Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1-<math>\mu</math>m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging.</p>	<p>Int J Pharmaceutics</p>	<p>595</p>	<p>120241</p>	<p>2021</p>
<p>Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, <u>Kanno J.</u></p>	<p>Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways.</p>	<p>Development</p>	<p>148</p>	<p>dev193664</p>	<p>2021</p>
<p>Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, <u>Kanno J</u>, Hirose A, Nakae D.</p>	<p>Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins.</p>	<p>Cancer Sci.</p>	<p>112</p>	<p>2185-2198</p>	<p>2021</p>
<p><u>Kitano, H.</u></p>	<p>Nobel Turing Challenge: creating the engine for scientific discovery.</p>	<p>npj Syst Biol Appl.</p>	<p>7</p>	<p>29</p>	<p>2021</p>

<p>Ostaszewski M, Niarakis A, Mazein A, Kuperstein I, Phair R, Orta-Resendiz A, Singh V, Aghamiri SS, Acencio ML, Glaab E, Ruepp A, Fobo G, Montrone C, Brauner B, Frishman G, Monraz Gómez LC, Somers J, Hoch M, Kumar Gupta S, Scheel J, Borlinghaus H, Czauderna T, Schreiber F, Montagud A, Ponce de Leon M, Funahashi A, Hiki Y, Hiroi N, Yamada TG, Dräger A, Renz A, Naveez M, Boeskei Z, Messina F, Börmigen D, Fergusson L, Conti M, Rameil M, Nakonecni V, Vanhoefer J, Schmiester L, Wang M, Ackerman EE, Shoemaker JE, Zucker J, Oxford K, Teuton J, Kocakaya E, Summak GY, Hanspers K, Kuttmon M, Coort S, Eijssen L, Ehrhart F, Rex DAB, Slenter D, Martens M, Pham N, Haw R, Jassal B, Matthews L, Orlic-Milacic M, Senff Ribeiro A, Rothfels K, Shamovsky V, Stephan R, Sevilla C, Varusai T, Ravel JM, Fraser R, Ortseifen V, Marchesi S, Gawron P, Smula E, Heirendt L, Satagopam V, Wu G, Riutta A, Golebiewski M, Owen S, Goble C, Hu X, Overall RW, Maier D, Bauch A, Gyori BM, Bachman JA, Vega C, Grouès V, Vazquez M, Porras P, Licata L, Iannuccelli M, Sacco F, Nesterova A, Yuryev A, de Waard A, Turei D, Luna A, Babur O, Soliman S, Valdeolivas A, Esteban-Medina M, Peña-Chilet M, Rian K, Helikar T, Puniya BL, Modos D, Treveil A, Olbei M, De Meulder B, Ballereau S, Dugourd A, Naldi A, Noël V, Calzone L, Sander C, Demir E, Korcsmaros T, Freeman TC, Augé F, Beckmann JS, Hasenauer J, Wolkenhauer O, Wilighagen EL, Pico AR, Evelo CT, Gillespie ME, Stein LD, Hermjakob H, D'Eustachio P, Saez-Rodriguez J, Dopazo J, Valencia A, <u>Kitano H</u>, Barillot E, Auffray C, Balling R, Schneider R</p>	<p><b>COVID-19 Disease Map Community. COVID19 Disease Map, a computational knowledge repository of virus-host interaction mechanisms.</b></p>	<p>Mol Syst Biol.</p>	<p>17</p>	<p>e10387</p>	<p>2021</p>
---	---	-----------------------	-----------	---------------	-------------

夏目 やよい	機械学習によって加速される次世代アジュバント開発	医学のあゆみ	279	961-964	2021
夏目 やよい, 榎林陽一	新薬創出を加速する人工知能の開発 ~データ駆動型創薬ターゲット探索プラットフォームの構築~	あいみつく	42	58-63	2021

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3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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による新型化学物質有害性評価系の実装研究

- 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：遺伝子組換え実験安全管理規則)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□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3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。

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3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 化学物質リスク研究事業2. 研究課題名 トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による新型化学物質有害性評価系の実装研究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・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

## 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

## 6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□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  
 (国立医薬品食品衛生研究所長) 殿  
 (国立保健医療科学院長)

機関名 国立研究開発法人  
 医薬基盤・健康・栄養研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 中村 祐輔

次の職員の令和3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 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による新型化学物質有害性評価系の実装研究
- 研究者名 (所属部署・職名) バイオインフォマティクスプロジェクト・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
- 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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4年3月31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3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 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による新型化学物質有害性評価系の実装研究

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・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称: )	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

#### 5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

#### 6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□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。