

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4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相崎 健一

令和5(2023)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	国立医薬品食品衛生研究所／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	国立医薬品食品衛生研究所／菅野 純	29
2. 反復曝露影響のエピゲノム機構解析	国立医薬品食品衛生研究所／北嶋 聡	39
3. システムバイオロジーによる毒性解析のAI化 特定非営利活動法人 システム・バイオロジー研究機構／北野 宏明		48
4. 統合ツール“Percellome Integrator”の開発	国立医薬品食品衛生研究所／相崎 健一	55
5. Percellome データベースを利用した解析パイプライン	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所／夏目 やよい	60
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		68
IV. 倫理審査等報告書の写し		74

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4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2年目となる令和4年度の進捗は以下の通り。

(1) では、令和4年度は、エストラゴールの4日間の新型反復曝露、及び、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)の4日間の新型反復曝露の2実験（以下、Estragole[4+1]及び

DEHP[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異なる要素を抽出した。Estragole [0+1]、及び Estragole[4+1]の遺伝子発現誘導は、ともに PPAR 下流の脂質代謝に関わる遺伝子が主体であったが、[4+1]により、発現遺伝子の総数は数倍に増加し、基線反応、及び、過渡反応が増強し発現のタイミングが早まる遺伝子を多く認めた。4 日間の反復曝露により小胞体ストレスなどを介しての細胞増殖シグナルの増強が示唆され、少なくともマウス肝に対する発癌性が Gene Ontology から強く示唆された。DEHP[4+1]についても GeneChip 解析を実施し網羅的な遺伝子発現データを得て先行研究による DEHP[0+1] (単回曝露) と比較するなどの解析を進めた。

(2) では、化学物質の反復投与影響によるエピジェネティック変化の解析を行っている。令和 3 年度には、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、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。

化学物質の反復投与においては、溶媒も反復投与される訳で、溶媒の反復影響によるエピジェネティック変化を考慮する必要があることから、令和 4 年度研究においては、メチルセルロース 14 日間反復曝露およびメチルセルロース単回曝露のエピゲノム解析を行った。その結果、サリドマイドの反復投与で検出されたエピジェネティック変化の多くが、溶媒影響によるものであることが明らかになった。しかしながら、一部においてはサリドマイドの反復曝露影響によるものであると想定される結果を得た。

(3) では、システム毒性学的手法として、大規模データベースから多くの情報を効率良く抽出し、それによってより規模の大きな網羅的解析を実施すべく、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、生物学的に有意な変化を呈した遺伝子を高精度且つ自動的に抽出する自動深層機械学習システムの開発を進めた。また転写制御解析ツール SHOE の改良を実施し、遺伝子発現データやヒストン修飾データの解析における連携強化を進めた。

(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、遺伝子発現データとエピゲノムデータの連携解析ユニットの開発、ゲノムデータ等の表示・解析モジュールのデザインを進めつつ、並行して変動遺伝子の自動抽出パイプラインの改良を実施した。

(5) では、既知の PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha) リガンドおよびこれまでの研究成果から PPAR α リガンドであることが示唆されている化学物質(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) に、一部シグナルが重複するフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) とフェノバルビタールを加えた 5 物質の相互解析を実施し、トランスクリプトーム情報及びエピゲノム情報を利用した効率的な解析モデルの構築を試みた。

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：

エストラゴール(分子量:148.20、Cas No.: 140-67-0、純度98%、Sigma-Aldrich)について、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。エストラゴール

の4回反復曝露の用量は70.0mg/kg、最終の単回曝露の用量は先行実験で実施した[0+1]実験と同様に0、10、30、100 mg/kgとした。

またフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)、分子量:390.56、Cas No.:117-81-7、純度98%以上、東京化成工業(株))について、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予定。

各曝露実験には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10µLを取り、DNA定量蛍光試薬Picogreenを用いてDNA含量を測定した。DNA含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合でSpike cocktail (Bacillus由来RNA5種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOLにより水層を得、RNeasyキットを用いて全RNAを抽出した。100ngを電気泳動しRNAの純度及び分解の有無を検討した。

●GeneChip 解析：

全RNA5µgを取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7プロモータが付加したオリゴdTプライマーを用いて逆転写しcDNAを合成し、得たcDNAをもとに第二鎖を合成し、二本鎖DNAとした。

次に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)

令和3年度研究対象サンプルとしては、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時間後のマウス肝を、令和4年度研究対象サンプルとしては、溶媒(0.5%メチルセルロース水溶液)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時間後のマウス肝を用いた。

上記サンプル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、1) 4 μl (30 μg) の抗ヒストン H3K4me3 抗体 (Active Motif, cat # 39159) (H3K4me3: 転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 4 トリメチル化)、2) 4 μl (30 μg) の H3K27Ac3 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac3: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、3) 4 μl (30 μg) の H3K27me3 抗体 (Active Motif, cat # 39155) (H3K27me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化)、4) 5 μl (30 μg) の H3K9me3 抗体 (Active Motif, cat # 39161) (H3K9me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 9 のトリメチル化)、および Input (抗体無しコントロール) を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。その際、サンプル間の補正を行うために、Drosophila のクロマチンが spike in として添加されている。ChIP 後の DNA は、それぞれの抗体に対する既知の陽性コントロールおよび陰性コントロールを qPCR により定量し、そのクロマチン免疫沈降の有効性の定量を行う。

クロマチン免疫沈降の有効性の確認ができた ChIP DNA より次世代シーケンサ解析用のライブラリを作成し、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 \times 時間 \times 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。

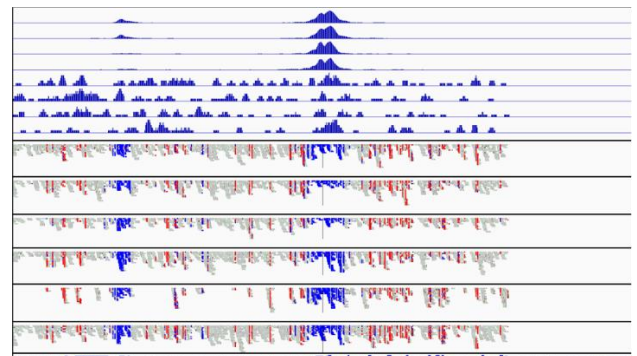


図. エピゲノム解析画像の例

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 \times 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)

この3群の内、化合物の毒性メカニズムを探索するために有意な意味の有る群は **suppression** 群と **induction** 群であるが、**induction** 群の画像の枚数が少なく、最も分類が難しい状況であった。

今回、この **induction** 群に対する訓練画像を増幅することを目的として、深層学習を基盤とした代表的な生成モデルである “Generative adversarial network (GAN)” の実装を行った(参考文献: Ian J. Goodfellow et al. (2014) Generative Adversarial Networks. <https://arxiv.org/abs/1406.2661>、及び Liu B et al. (2021) Towards Faster and Stabilized GAN Training for High-fidelity Few-shot Image Synthesis. <https://arxiv.org/abs/2101.04775>)。

●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。クラスター解析ライブラリとしては、従来 ClustalW を使用していたが、開発・サポート終了のため、Clusteral Omega に変更した。

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.3.9.1)を用いた。主な解析ライブラリとしては numpy (ver.1.19.5)、pandas (ver.1.2.1)、scikit-learn (ver.1.2.0)を、グラフ描画ライブラリとして matplotlib (ver.3.2.2) を用いた。

(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、エストラゴール、フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP)、フェノバルビタ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%)、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%)、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%)、DEHP (0, 200, 700, 2000 mg/kg、溶媒：corn oil)、フェノバルビタール (0, 15, 50, 150 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) をそれぞれ経口投与し、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>) 及び metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) を用いてエンリッチメント解析を行った。

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 4 年度は、エストラゴール (estragole) の新型反復曝露実験 (TTG245 : 70mg/kg を 4 日間曝露後、5 日目に 0, 10, 30, 100mg/kg) (Estragole[4+1]と表記)、及びフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (DEHP) の新型反復曝露実験 (TTG251 予定) (DEHP[4+1]と表記) を

実施し、GeneChip による肝の網羅的遺伝子発現解析を実施した。

① Estragole[0+1] (実験コード TTG147-L)

先行研究で実施した単回曝露実験 (以後 Estragole[0+1]と表記) の、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 39、20、65、12 であった。

Estragole は PPAR α のリガンドであることが知られており、2 時間目の 39 遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR α 及び PPAR δ を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Acot1、Acot2、Cyp4a31、Pdk4、等)。

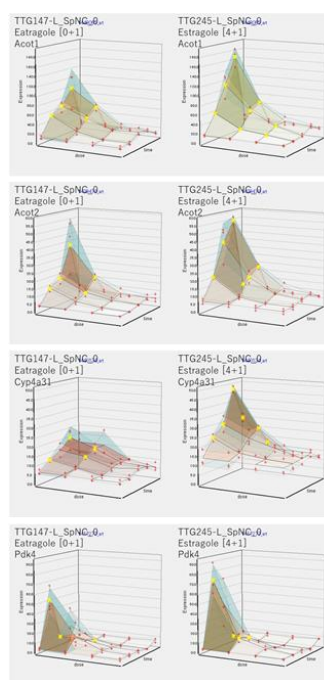


図 1 左[0+1] 右[4+1]にて Acot1、Acot2、Cyp4a31、Pdk4 を示す。

4 時間目に誘導開始され 4 時間目にピークとなる遺伝子は少なかった。4 時間目に誘導開始し 8 時間目にピークとなる遺伝子、及び 8 時間目に誘導開始された遺伝子は、PPAR α や PPAR δ の下流の脂質代謝、脂質合成に関わる遺伝子が含まれていることが示された (Abhd6、Gyk 等)。

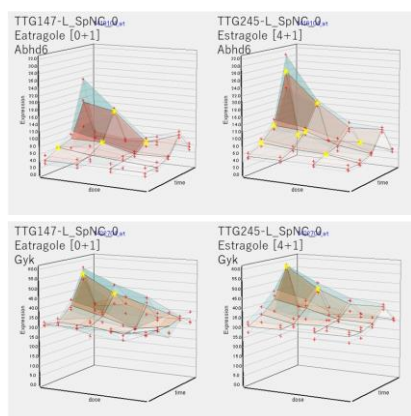


図2 左[0+1] 右[4+1]にて Abhd6、Gykを示す。

8 時間目に誘導開始された 65 遺伝子は PPAR α あるいは PPAR δ の下流の遺伝子が多く含まれていた (Acaa1、Por、Paqr7 等)。

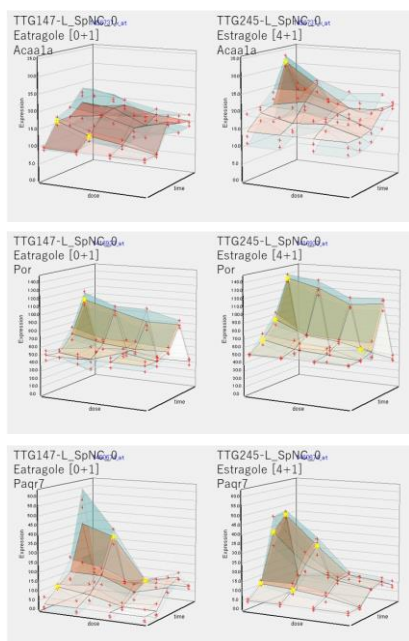


図3 左[0+1] 右[4+1]にて Acaa1、Por、Paqr7を示す。

24 時間目に誘導開始された 12 遺伝子は、反応が弱いものが多く PPAR α あるいは ESRR α の下流の遺伝子が含まれていた (Acat1、Ech1、Fabp2 等)。

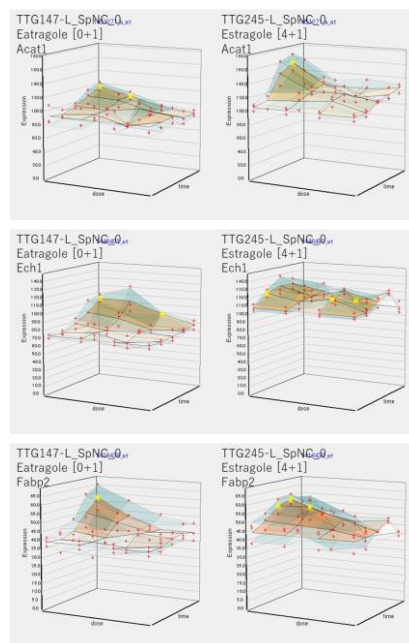


図4 左[0+1] 右[4+1]にて Acat1、Ech1、Fabp2を示す。

今までに検討した PPAR リガンド化学物質と比較すると、誘導遺伝子数は少なく、単回曝露の影響は 8 時間目をピークに収束する傾向が認められた。

② Estragole[4+1] (実験コード TTG245-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、183、146、176、0であった。

2時間目に誘導開始された遺伝子の数は、Estragole[0+1]の5倍近くに増加した、[0+1]と同様にPPARの下流の遺伝子が誘導される(上記 図1右側)ことに加え、[4+1]のみにおいて、小胞体ストレスシグナルが流れることが示唆された(Dnajc3、Hsp90b1、Mbtps1等)

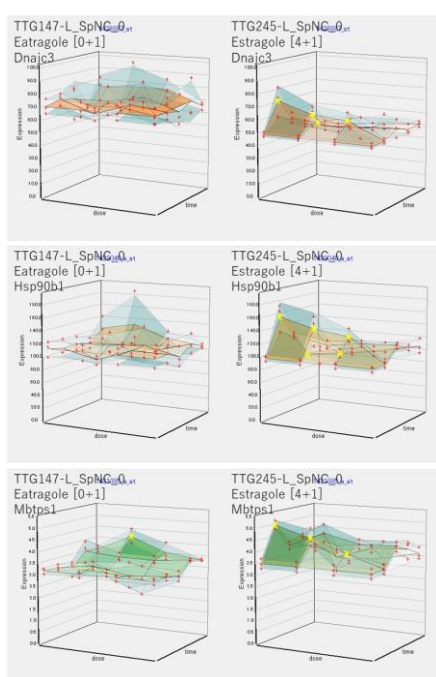


図5 左[0+1] 右[4+1]にてDnajc3、Hsp90b1、Mbtps1を示す。

これらの上流には、Xbp1、E1l2、Eif2ak3等が位置することが示唆された。

4時間目に誘導開始された遺伝子の数も、Estragole[0+1]の7倍近くに増加した。多くは脂質代謝に関わるPPAR α 、PPAR γ の下流の遺伝子であった(Abhd6、Ddhd2、Mgl1等)。

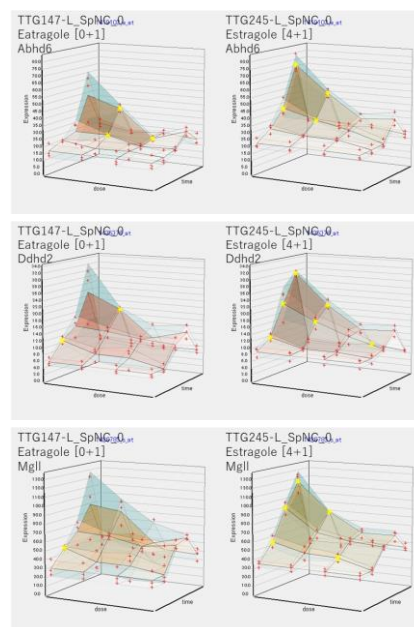


図6 左[0+1] 右[4+1]にてAbhd6、Ddhd2、Mgl1を示す。

8時間目に誘導開始された遺伝子の数も、Estragole[0+1]の3倍近くに増加した。多くは脂質代謝に関わるPPAR α 、PPAR γ の下流の遺伝子であった(Slc27a1、Acat1等)。これに加えて、Estrogen-mediated S-phase Entry (IPA analysis)に属するCnd1、Cdk2、Tfdp1などが誘導された。

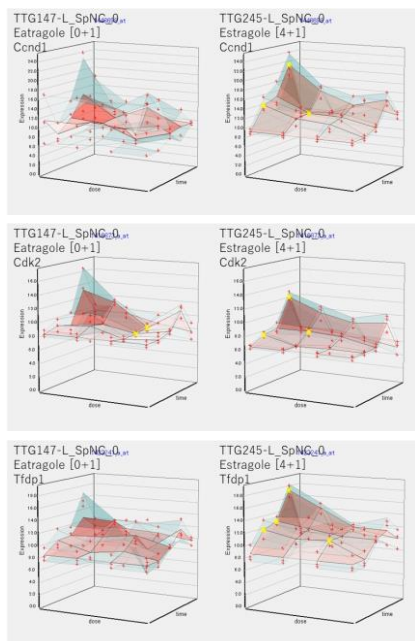


図7 左[0+1] 右[4+1]にてCcnd1、Cdk2、Tfdp1を示す。

24 時間目に誘導開始された遺伝子は Estragole[4+1]では認められなかった。後述する基線反応の解析の結果と関係するが、[0+1]と[4+1]とにおいて共に発現する遺伝子の多くについて、4 日間の反復曝露の結果、発現のタイミングが早まる現象が認められた。24 時間目に誘発される遺伝子がなくなった理由として、この現象が関与していることが示唆された。

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 $p < 0.05$ 、3 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 82、上昇した基線反応遺伝子は 197 であった。

基線反応 (Baseline Response) が低下した遺伝子群は、上流に PPAR を持たず、Chemokine Signaling や

Xenobiotic Metabolism Signaling に属する遺伝子が含まれていた (Arnt、Mapk1 等)。

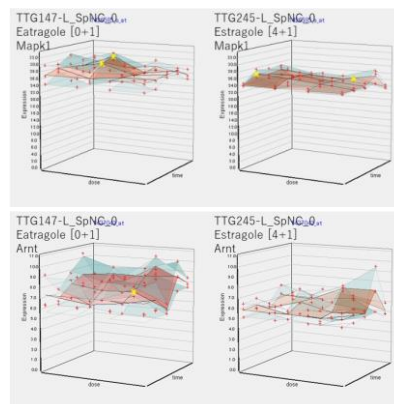


図8 左[0+1] 右[4+1]にてArnt、Mapk1を示す。

基線反応 (Baseline Response) が上昇した遺伝子群は、上流に PPAR α 、POR、ESR1 等を持ち、脂質代謝 (Cyp4a14、Retsat 等) の他、Wnt/ β -catenin Signaling (Csnk1d、Nr5a2 等) などの分裂促進等のシグナルが活性化していることが示唆された。

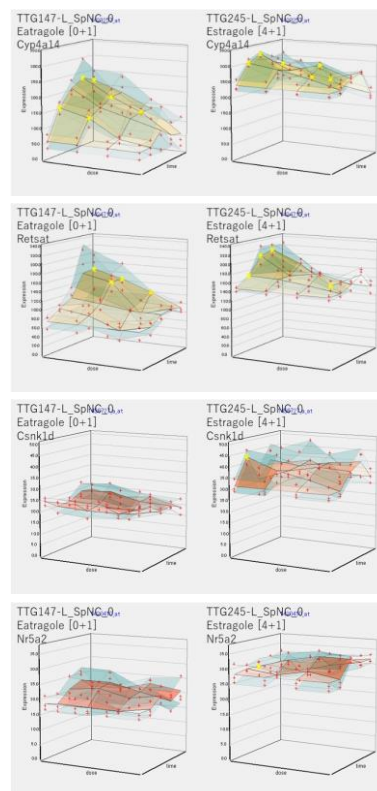


図9 左[0+1] 右[4+1]にてCyp4a14、Retsat、Csnk1d、Nr5a2を示す。

以上より、Estragole の 4 日間反復曝露は、PPAR 下流遺伝子の基線反応を上昇させ、一部の脂質代謝関連遺伝子の過渡反応も増強させ、発現のタイミングを早めた。また、反復曝露により小胞体ストレスなどを介した細胞増殖シグナルの増強も示唆された。

Gene Ontology 解析の結果、4 日間反復により、少なくともげっ歯類に於いて発癌性が強く示唆され、先行研究において解析した PPAR リガンド化学物質との詳細な比較解析を行った。

DEHP の新型反復曝露実験 (実験コード TTG251-L) については、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を終え、有意な変動を示す遺伝子の抽出と解析、および DEHP の単回曝露実験 (実験コード TTG098-L) との比較検討を進めた。

(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、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。

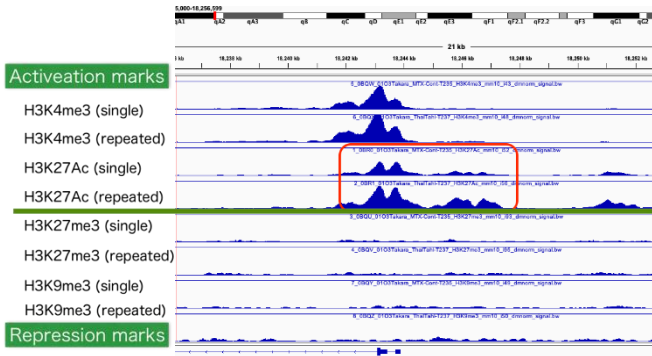
H3K4me3(活性型)が減少

log2(FoldChange)	Gene List	H3K4me3 down	Dist to Start	Position	start-end
-0.28	Fat1		1,643	upstream	chr8:41218600-41222999
-0.27	Cxcl5	12,644		in gene	chr15:102179400-102195799
-0.25	en1	95,704		in gene	chr7:74644800-74650799
-0.25	Cyp4a10	1,288		upstream	chr4:115513100-115520799
-0.25					chr7:14904000-149050399
-0.24					chr11:129400-11700999
-0.18	Paqr9	6,382		downstream	chr9:9554800-9558799
-0.18	Scav5	52,236		in gene	chr14:6171300-6172799
-0.15	Cyp4a14	242		in gene	chr4:11549200-11548599
-0.14	Cyp3a4	19,122		in gene	chr11:57700-11576399
-0.14	DnaI3, Yfp1	4844, 12064		in gene, upstream	chr10:728400-1078799
-0.17	Serp9	209,839		downstream	chr11:11770200-11748899
-0.12	en1	24,628		in gene	chr7:14410200-14410599
-0.11	Chn3	1,304		in gene	chr3:1039700-1036199
-0.17	Tnfr5, LOC10195969, Nph2	1991, 2033, 5436		upstream, downstream, upstream	chr1:15629700-15631399
-0.17	Ctseb2	36,015		downstream	chr6:864200-8662199
-0.17					chr4:7682500-7683199
-0.16	Sh3lc2	82,408		in gene	chr6:53184200-53218799
-0.16					chr7:139118400-13918399
-0.14					chr8:89014600-89011199

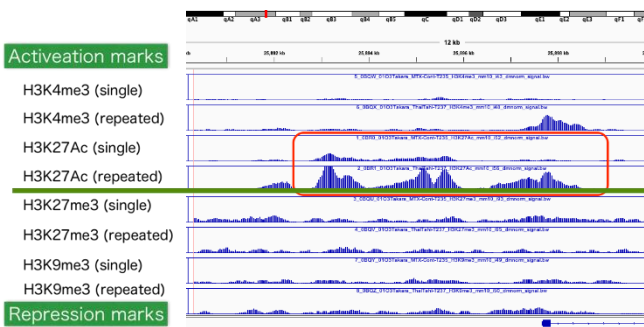
H3K4me3(活性型)が増加

log2(FoldChange)	Gene List	H3K4me3 up	Dist to Start	Position	start-end
0.33					chr19:38343200-3837199
0.30	Onec1	8,029		upstream	chr12:8117600-8119799
0.31	en1	5,971		in gene	chr12:1617600-1618099
0.31	I181051823Rn, M682	10756, 579		upstream, downstream	chr6:9336800-9337799
0.30	Cc3n	3,644		in gene	chr8:10029400-10029899
0.31	Nr2a2	22,908		downstream	chr12:262100-12297199
0.30	Zkscan3	11,885		upstream	chr6:4322800-4324799
0.29	Gm1551, Onec1	31362, 17878		downstream, in gene	chr9:748200-7488799
0.28	Arnt	29,419		in gene	chr1:8931300-8938399
0.29	Sto1a4	155,228		upstream	chr6:1418400-14188799
0.28	Hud3a	5,229		in gene	chr1:987800-98785199
0.28	Agk8, Zscan2	2905, 35250		in gene, downstream	chr7:12344100-12346799
0.28					chr12:29400-21301799
0.28	Panf, I181051823Rn	52245, 13291		in gene, downstream	chr17:2877700-2882799
0.28	Ar15	292,791		in gene	chr13:14982400-14982199
0.27	Cyp2b9	4,368		upstream	chr19:3927800-3928599
0.27	Cyp8b5	13,580		in gene	chr4:13416400-13416099
0.27	Serpina3k	3,213		in gene	chr12:10434200-1043499
0.26	Zfp70, Tmem131	19838, 157828		in gene, downstream	chr1:36780200-36783199
0.26					chr2:7396400-7397199

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。



令和 4 年度においては、新たに 0.5%メチルセルロース水溶液を 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。

これは、0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与により、ヒストン修飾が影響を受けるかどうかを明らかにすること、すなわち、溶媒影響があるのかを検証する目的で行なっている。

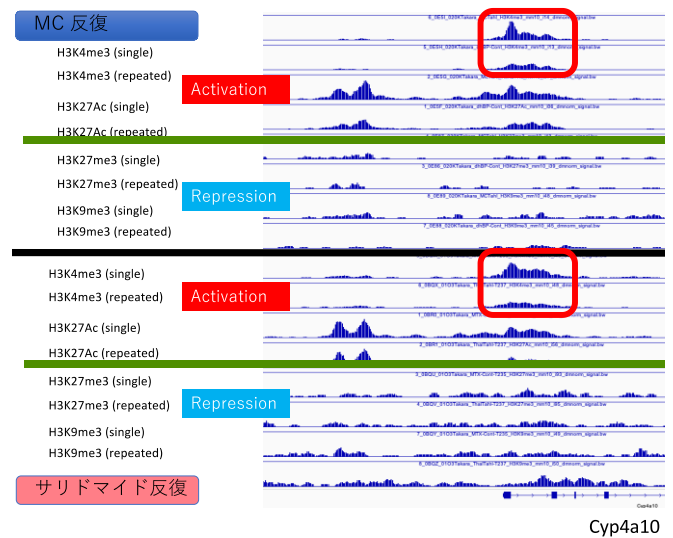
各抗体について、溶媒対照群と反復投与群において認められた各ピーク数はそれぞれ (以下、溶媒対照群、反復投与群)、

抗 H3K4me3 抗体 (17, 205、18, 566)、
抗 H3K27Ac 抗体 (24, 329、27, 259)、
抗 H3K27me3 抗体 (20, 289、22, 147)、
抗 H3K9me3 抗体 (18, 961、22, 803)、

となっている。この内、特に H3K9me3 のピーク数が 22, 803 から 18, 961 へ、26.8% 減少しており、溶媒である 0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与によって H3K9me3 が減少することが明らかになった (その他は、H3K4me3:7.3% 減少、H3K27Ac: 10.7% 減少、H3K27me3: 8.3% 減少)。したがって VPA の反復投与で見られた H3K9me3 のグローバルな抑制は、0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与が原因である可能性がある。

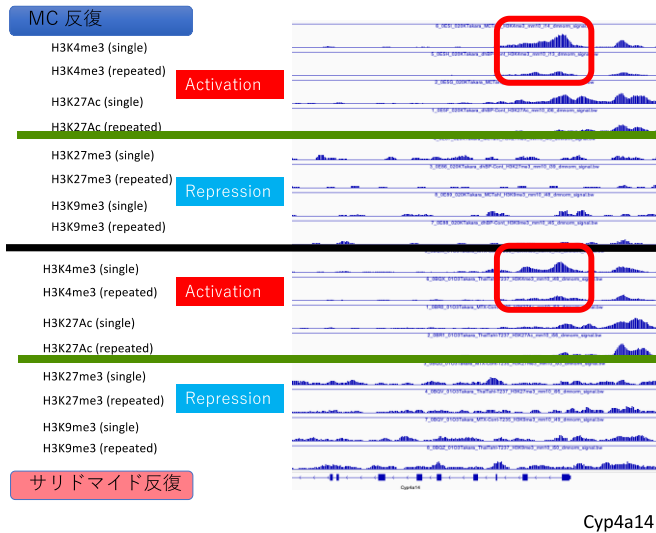
令和 3 年度研究においては、サリドマイドの反復投与において、多くの薬物代謝酵素の制御領域のヒストン修飾に変化が確認されたが、その多くが溶媒影響である可能性が明らかになった。個別のデータを以下に示す。

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 が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。

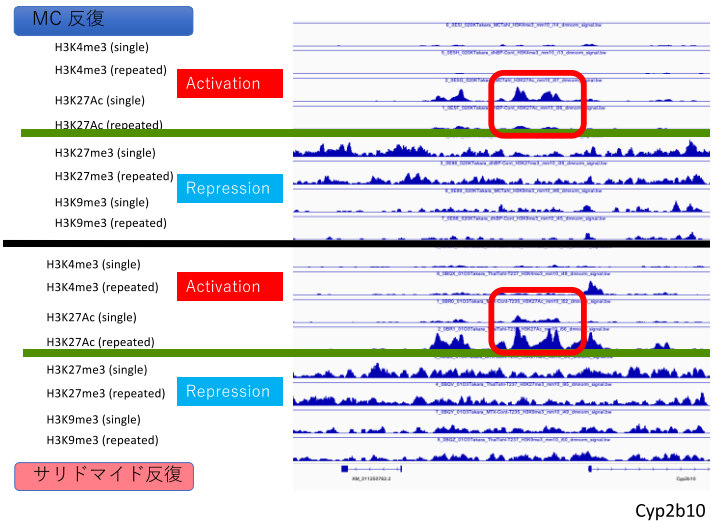


Cyp4a10

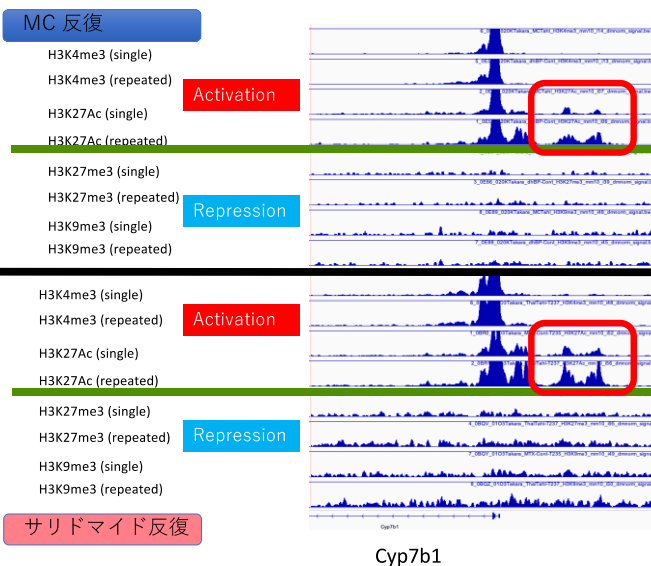
また、サリドマイドの反復によって、Cyp4a 14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



Cyp2b10 のプロモーター領域においては、サリドマイドの反復によって活性型ヒストン修飾である H3K27Ac および H3K4me3 が増加していたが、溶媒の反復投与とは、逆の相関を示すことが明らかとなった。



また、サリドマイドの反復によって、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 が増加していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



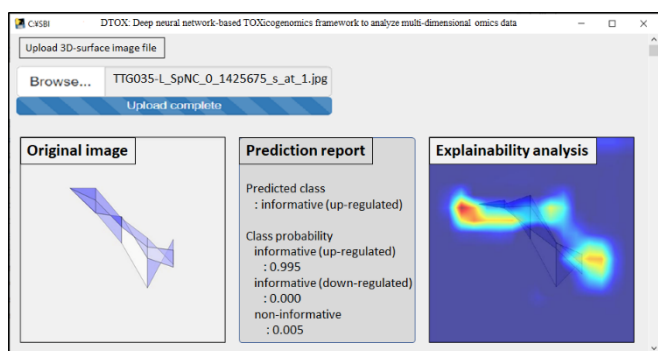
一方、多臓器ゲノム DNA メチル化解析については、Perccellome データベースに収録されている遺伝子発現データ分類を参照して、全ゲノム DNA メチル化解析を実施すべき肝以外の臓器を選別した。またこれらの臓器を対象とする全ゲノムバイサルファイト解析に必要なサンプル量や処理方法、試薬量等の条件を最適化した。

(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

先行研究で開発した深層学習モデル DTOX については、グラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) を実装し、試用とフィードバックによる改良を継続している。



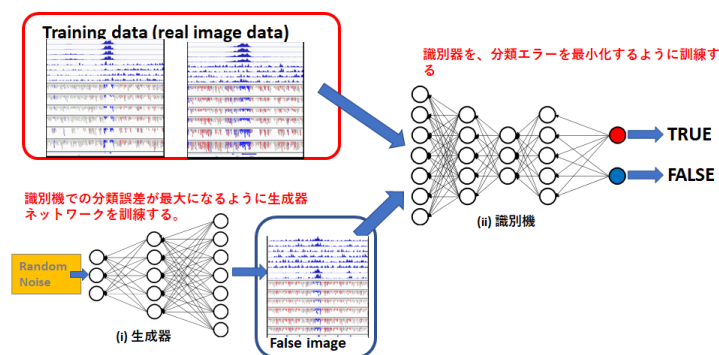
また DTOX に関する成果の原著論文を進めている。

● 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① suppression 群、② induction 群、③ non significant 群の三群に分類することを目的として、先行研究では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結果、構築した分類モデル全てで、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が、induction 群の画像が少なく、分類が難しい状況であった。

今年度はこの induction 群に対する訓練画像を増幅することを目的として、深層学習を基盤とした代表的な生成モデルである“Generative adversarial network (GAN)”の実装を行った。GAN は、下図に示すように、(i)生成器ネットワークと(ii)識別器ネットワークの2つのネットワークから構成されている。生成器ネットワークは、ランダムなノイズから偽の画像データを生成する。識別器は偽の画像データと

実物の画像データを比較する。比較により、生成器ネットワークによる画像データから、偽の画像を識別する。生成器ネットワークと識別器ネットワークが競い合う様に訓練が進んでいき、最終的に、GAN は実際の画像データと同様の特徴を持つ新規の画像を生成可能となる。しかしながら、GAN 自体を訓練するためにも、多くの画像データが必要であるという問題があった。そこで、今回は、GAN の改良版である“Fast GAN”の実装を行った(参考文献: Liu B et al. (2021) Towards Faster and Stabilized GAN Training for High-fidelity Few-shot Image Synthesis. <https://arxiv.org/abs/2101.04775>). Fast GAN では、識別器ネットワークに AutoEncoder を組み込んだ構造を採用している。その構造の中で、中間層の出力から元の画像を復元する Decoder を追加して、その復元誤差をロスに加えて効率の良い学習を実現しており、少ない訓練画像から、訓練画像と同様な性質を持つ画像を生成出来る。

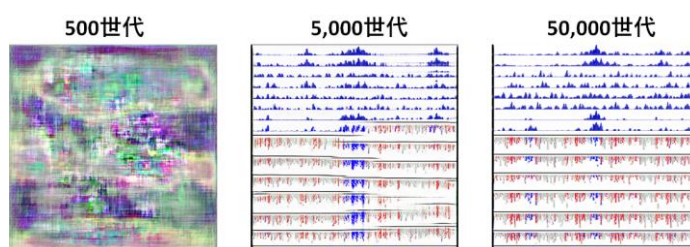


GAN の構造

今回、昨年度と同様に、我々はエピゲノム画像データを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。これらの深層学習アーキテクチャは、代表的な大規模画像データセット (1000 カテゴリーに分類できる 120 万枚の画像で構成される) である ImageNet dataset を用いてプレトレーニングされたものである。これらを、エピゲノム画像に対して転移学習を行

い、分類モデルを構築した。induction 群に対しては、訓練データとして、専門家から提供を受けた 457 枚の実データ画像に加えて、今年度実装を行った生成モデルで生成した画像 6,000 枚も、訓練データとして用いた。

実装した Fast GAN を使用し、induction 群の画像を生成するモデルの構築を行った。今回、生成モデルについて、500 世代、5,000 世代、50,000 世代の訓練を行い、その生成画像の特性について検証を行った（下図）。



Fast GAN による生成画像

図に示すように、500 世代では、ほぼ訓練画像の特徴を捉えられていない。5,000 世代では、訓練画像の主な特徴を捉えられてはいるものの、不鮮明な部分が存在しているが、50,000 世代では、ほぼ完全に訓練画像の特徴をとらえた画像を生成することができた。この結果は、この生成モデルを用いることにより、訓練画像データの生成のために必要であった専門家の労力と時間を、大幅に削減できる可能性があることを示している。

次に、50,000 世代のモデルを使用して、6,000 枚の induction 群の生成画像を生成し、深層学習モデルの訓練に用いた。

今回、エピゲノム修飾に関する実データ画像の内の 80% と、生成モデルで生成した画像を、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た。その後、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（下図）。図に示すように、構築した 7 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。しかしながら、構築した 7 種類のモデル全てで、induction 群を分類することが困難であった。

Resnet18

	induction	ns	supression
induction	0	1	91
ns	0	469	1
supression	0	3	1185

Alexnet

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	2	462	6
supression	2	13	1173

Resnet34

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	468	2
supression	0	2	1186

Densenet

	induction	ns	supression
induction	1	1	90
ns	0	467	3
supression	0	2	1186

Resnet50

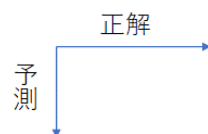
	induction	ns	supression
induction	0	1	91
ns	0	465	5
supression	0	2	1186

Squeezenet

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	467	3
supression	0	4	1184

Vgg18

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

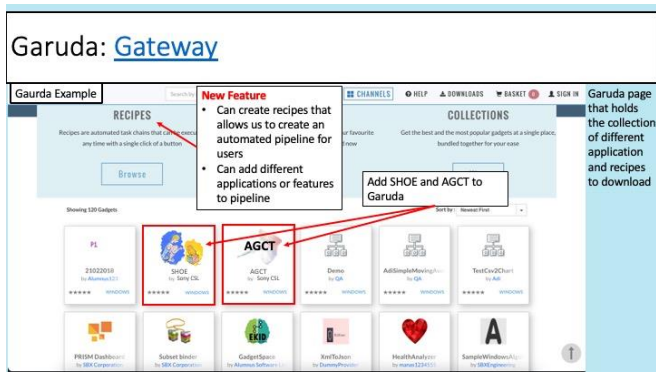


深層学習モデルの予測精度の検証

この結果から、induction 群の訓練画像を増幅するのみでは、これらの深層学習モデルは分類に十分な特徴量を抽出できていないことが示唆された。

●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

今年度は、Garuda Platform 上で、Percellome DB と SHOE の連動をより密にした。また他の Garuda Gadget との連動を強化し、解析パイプラインの構築を進めた。具体的には Garuda Gateway の上で動作連動を行うレシピ機能を利用して、連続的解析の自動化を行なった。これに合わせて SHOE と ACGT の Garuda 登録を進めた。

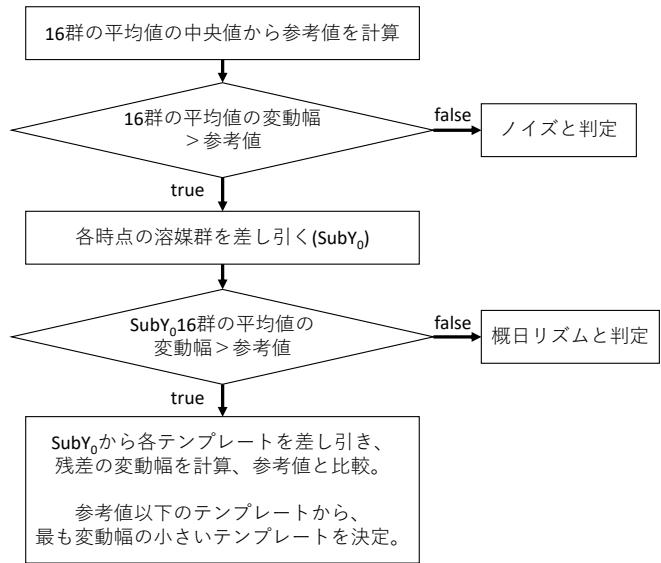


なおクラスター解析に関して今まで使用していた ClustralW がサポート終了のため、ClustralW から Clustral Omega に変更した。

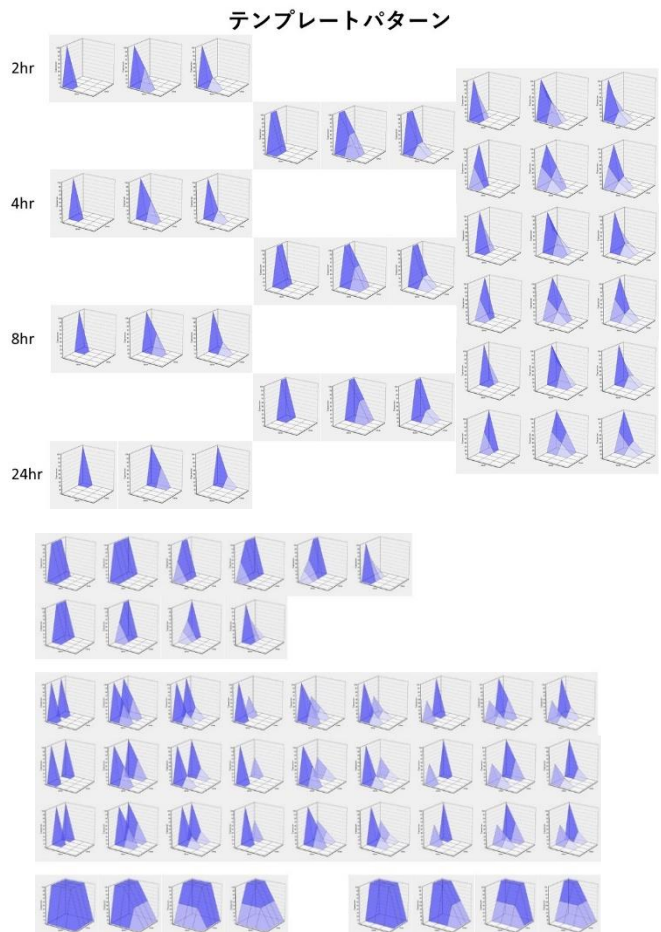
（４）統合ツール“Percellome Integrator”の開発【相崎】

今年度も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。研究計画初期のデザインのままでは、解析工程のボトルネック、即ち、化学物質曝露による発現変動遺伝子の抽出作業の効率化が不十分である可能性が浮上したため、新たに遺伝子発現の 3 次元パターン (Surface) の特徴分類アルゴリズムの開発を進めた。

具体的な効率化の内容としては、ノイズパターン除去の強化と、発現パターンからの自動時系列分類である。基本的なアルゴリズムは、①変動幅が参考値以下の Surface のノイズ判定、②溶媒群と投与群の比較による概日リズムパターンの自動判別、及び③時系列パターンや飽和パターンなどの「テンプレート」との比較による自動(時系列)分類、から構成される(下図)。

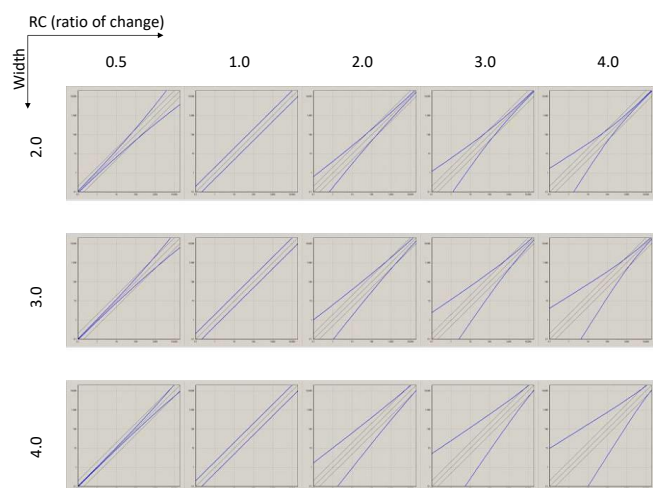


4 用量×4 時点の Surface の基本解析フロー



想定されるテンプレートを用意することにより、発現パターンの自動分類を実現する。ピーク数 1~2、ピーク時点、ピーク幅、立ち上がり方の組み合わせと、飽和パターンを合わせたテンプレート基本セットを示す。

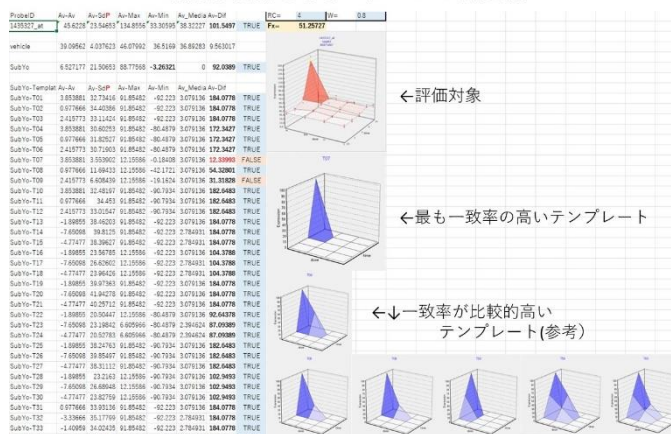
このとき参考値の算出は、単純な fold change ではなく、先行研究で考案した empirical な曲線（実際の Percellome 法により絶対量化した発現値の分散からパラメータを決定する指数関数（下図、Fx 曲線と仮称）を用いた。



対数グラフ上で、パラメータによって曲率に変化する Fx 曲線

例えば、下図のような 8 時間ピークの Surface については、概日リズムパターンではない、有意な変動幅を呈するピークであり、8 時間高用量ピークに分類された。

有意な変動を示すパターンの判別例



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

前年度までの我々の研究により、①バルプロ酸投与によって PPARα、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 PPARα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。Acot (Acyl-CoA thioesterase) といった PPARα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 PPARα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合成関連遺伝子の発現亢進が認められた。

以上を踏まえ、当該年度は更に 2 化合物を追加し、metascape を用いた遺伝子発現プロファイルの比較解析を行なった。その結果、a)クロフィブラートは PPARαの他にも PPARδ、PPARγ、PPARGc1a の活性化を介して幅広く脂質代謝関連遺伝子の発現を亢進させる他、Nrf1 や Esrra をも活性化する、b)バルプロ酸ナトリウムは遺伝子発現変動が大きいのが主に E2f1、E2f4 の活性化によるものであり、PPARαも活性化するもののその応答は小さく遅い、c)エストラゴールは PPARαの活性化を介した遺伝子発現亢進以外にも曝露 8 時間において脂質代謝に関連する遺伝子などが変動するが、後者は PPARα活性化とは別のメカニズムが疑われる、d)DEHP は PPARαの他にも PPARδ、PPARγ、PPARGc1a の活性化を介して幅広く脂質代謝関連遺伝子の発現を亢進させる他、Hif1a、Nfe2l2、Egr1 をも活性化する、e)PB は曝露 24 時間で Nrf2、Ahr、Hnfla、Srebp、Pxr といった様々な核内受容体が

活性化する、といった可能性を示唆する結果を得た。

D. 考察

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

【菅野】において、令和4年度は、エストラゴールの4日間の新型反復曝露、及び、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)の4日間の新型反復曝露の2実験(以下、Estragole[4+1]及びDEHP[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異なる要素を抽出した。

Estragole[4+1]の結果から、明らかな毒性所見を発揮しない用量において、4日間という短期の反復曝露によって、単回曝露とは大きく異なる変化を明らかにすることが出来た。特に、PPAR下流の遺伝子の基線反応と過渡反応が増強され、遺伝子発現のタイミングが早くなる傾向が明らかとなった。これに加えて小胞体ストレス等のシグナルが反復投与により活性化し細胞増殖等の発癌性等の毒性を示唆したことから、慢性毒性への外挿の可能性が示唆されたと考える。

「反復曝露影響のエピゲノム機構解析」【北嶋】の

令和3年度研究において、サリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析を行い、薬物代謝酵素の制御領域の多くで変化を捉えていたが、その変化が本当にサリドマイドの反復曝露による影響なのか、それとも溶媒の反復曝露による影響なのかを検証するために、令和4年度においては、サリドマイドの溶媒であるメチルセルロース水溶液(MC)の反復曝露影響の解析を行った結果、メチルセルロース水溶液(MC)の反復曝露による溶媒影響があることが想定された。

本年度の研究により、代表的な溶媒であるコーンオイルとメチルセルロースによる反復曝露影響が揃

うことになり、化学物質の反復曝露による遺伝子発現及びエピゲノム解析の精度がより一層向上すると期待される。

一方、肝以外の臓器のゲノムDNAメチル化解析については、解剖手順や実験条件を最適化し、Perccellomeデータベースに収録されているより多くのトランスクリプトームデータに対応すべく、肝臓に加えて、肺、海馬、腎をサンプリングすることとした。また、異常なメチル化DNAの混入を避けるために、近傍の組織サンプルから病理標本を作製し、炎症の有無などを確認するなどの細心の注意を以て解析を実施することにより、良質なリファレンスデータが得られるものと期待される。

「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DIOXにおいては一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインの精度を大きく上回る性能を達成したことから、深層学習は、大規模データの自動分類に有効であることがわかった。一方、エピゲノム解析への応用研究については、induction群の訓練用画像の不足から、一部の分類が困難であり、これを解消すべく使用した生成モデルFastGANが増幅したinduction群の訓練画像のみでは、深層学習モデルは分類に十分な特徴量を抽出できていないことが示された。

この原因としては、使用している深層学習アーキテクチャはImageNetでプレトレーニングしたものであり、これを転移学習するのみではエピゲノム画像分類に適した特徴量を抽出できていないためであると推察される。そこで、この問題を解決するために、①よりエピゲノム修飾画像に特化したモデルを構築すべく、転移学習ではなく、エピゲノム修飾の訓練画像のみで、一から深層学習モデルをトレーニングする試みと、②より有用な特徴量を抽出することを目的として、言語翻訳AIで活用されている

“attention layer”、特に医療画像分類で高い精度を上げている、attention layer の 1 種である、

“soft attention” (参考文献 : Datta K.S et al. (2021) Soft-Attention Improves Skin Cancer Classification Performance. <https://arxiv.org/abs/2105.03358>) の実装と深層学習モデルへの組み込み、を予定している。

「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については、ライブラリの組み込みテストを進めている。

遺伝子発現の 3 次元パターン (Surface) の特徴分類アルゴリズム開発については、期待されたノイズ除去と自動 (時系列) 分類の性能を満たしつつある。ノイズ除去が強すぎる傾向があるため、参考値の算出に利用した Fx 曲線の改良を進めており、現在のところ、パラメータを 1 つ追加することで、曲率調整の柔軟性を向上させ、過度の足切りが起こらない様にする事に成功している。

現在使用している RSort (Surface の凹凸を解析し、有意な変動を示す候補遺伝子を数理的に抽出する) と DTOX (北野分担研究者らによる AI。熟練研究者の判定を学習、再現する) で処理した後、研究者による最終的なヒューマンキュレーションの前に、本アルゴリズムの実装フィルターを挿入することで、データ解析工程の大幅な効率化が期待できる。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】については、前年度の研究では、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。その結果、

類似化合物との遺伝子発現プロファイルの比較が毒性発現メカニズム推定において有益であることが見出された。その結果を受けて、当該年度は化合物と曝露時間ごとに発現が変動した probe ID リストを作成し、遺伝子リストに変換したのちに metascape を用いたパターン比較を行なった。その結果、どのタイミングで発現亢進が起こるかによって数パターンに分割することが可能であり、そのパターンごとに上流因子解析を行うことで通常のエンリッチメント解析では見逃しがちな生体応答を捉え得ることが示唆された。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

「短期間「新型」反復曝露実験と単回曝露実験データベースの対比による反復曝露毒性予測技術の開発」【菅野】については、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が示唆された。

「反復曝露影響のエピゲノム機構解析」【北嶋】においては、代表的な溶媒であるメチルセルロース水溶液の反復曝露によるヒストン修飾解析を行った。この解析結果との比較から、サリドマイドの反復により検出されていた、薬物代謝酵素群のプロモーター領域にけるヒストン修飾の変動の多くは溶媒影響の可能性が示唆された。しかしながら、Cyp2b10 に関しては、溶媒影響ではないと考えられた。

また基盤データとなる肝以外の臓器のゲノム DNA メチル化解析については、サンプリングが完了した。

「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遺伝子

発現解析用 AI の実装ソフトウェアから、深層学習は、大規模データの自動分類に有効であることがわかったが、新たに開始したエピゲノム解析の AI 自動化の試みからは、充分量の訓練用画像が重要であることは当然として、その構造に関してはさらに精密なデザインが要求されることが分かった。

一方、解析プロセスの自動化については、初期段階であるが、極めて効率的であることが分かった。

今回の成果で、AI を使った高精度解析とその自動化への可能性が明確になり、課題も同定された。今後は、それらの課題の解決を行う。

「統合ツール“Percellome Integrator”の開発」【相崎】については、遺伝子発現データとエピゲノムデータの連携解析ユニットの開発、ゲノムデータ等の表示・解析モジュールのデザインを進めつつ、並行して変動遺伝子の自動抽出パイプラインの改良を行い、統合ツールがより機能的・実用的なものになることが期待される。

「Percellome データベースを利用した解析パイプライン」【夏目】においては既知の PPAR α リガンド、および PPAR α 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を曝露時間情報を元に分解することにより、時間を追うごとに変動する生体応答を捉え易くなることを確認した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Masako Saito, Kunihiko Otsuka, Yusuke Furukawa, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru: Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 2022; 192(11): 1559-1572. [doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.07.009].

(2) Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J. Toxicol. Sci.* 2023; 48(4): 211-219. [doi.org/10.2131/jts.48.211]

(3) Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and Satoshi Kitajima: Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(2): 57-64. [doi.org/10.2131/jts.48.57]

(4) Seiya Kanno, Yusuke Okubo, Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Satoshi Kitajima, Junji Fukuda: Establishment of a Developmental Toxicity Assay based on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption. *iScience.* 2022; 25(2): 103770. [doi.org/10.1016/j.isci.2022.103770]

- (5) Aisaki KI, Ono R, Kanno J, Kitajima S. [Percellome Project: research on molecular mechanisms of toxicological responses based on transcriptomics and epigenetics]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2022;157(3):200-206. [doi.org/10.1254/fpj.21122] (Japanese).
- (6) 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]
- (7) Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Ahmed M. El-Gazzar, Mohamed Abdelgied, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Randa Hussein Abd el Hady, Katsumi Fukamachi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Jiegou Xu, Shugo Suzuki, Aya Naiki-Ito, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda: Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol*. 2022; 19(1): 30. [doi.org/10.1186/s12989-022-00469-8].
- (8) Motoki Hojo, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Yukie Tada, Yukio Yamamoto, Kiyomi Ikushima, Ryota Inaba, Jin Suzuki, Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Norihiro Kobayashi, Makoto Ohnishi, Yuko Goto, Takamasa Numano, Hiroyuki Tsuda, David B. Alexander, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Akiko Inomata and Dai Nakae: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. *Part Fibre Toxicol*. 2022; 19(1):38. [doi.org/10.1186/s12989-022-00478-7].
- (9) Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki: Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer *Fundamental Toxicological Sciences* 2022; 9 (2): 37-46. [doi.org/10.2131/fts.9.37]
- (10) Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Edward J. Perkins, Hiroshi Yokozaki and Hiroki Sasaki: Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction. *Onco* 2023, 3(1), 13-25. [doi.org/10.3390/onco3010002]
- (11) Natalia Polouliakh, Takeshi Hase, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano: Toxicity Analysis of Pentachlorophenol Data with a Bioinformatics Tool Set. *Methods Mol Biol*. 2022;2486:105-125. [DOI: 10.1007/978-1-0716-2265-0_7]
- (12) Reiko Watanabe, Toshio Kawata, Shinya Ueda, Takumi Shinbo, Mitsuo Higashimori, Yayoi Natsume-Kitatani and Kenji Mizuguchi: Prediction of the Contribution Ratio of a Target Metabolic Enzyme to Clearance from Chemical Structure Information. *Molecular Pharmaceutics*. 2022; 20(1): 419-426. [doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00698]

(13) Michiru Otaki, Nozomi Hirane, Yayoi Natsume-Kitatani, Mari Nogami Itoh, Masanori Shindo, Yoichi Kurebayashi and Shin-Ichiro Nishimura: Mouse tissue glycome atlas 2022 highlights inter-organ variation in major N-glycan profiles. Scientific reports, 2022; 12: 17804. [doi.org/10.1038/s41598-022-21758-4]

(14) Sohrab, M. G., Duong, K. N., Masami, I., Topić, G., Natsume-Kitatani, Y., Kuroda, M., ... & Takamura, H. (2022, November). BiomedCurator: Data Curation for Biomedical Literature. In Proceedings of the 2nd Conference of the Asia-Pacific Chapter of the Association for Computational Linguistics and the 12th International Joint Conference on Natural Language Processing: System Demonstrations (pp. 63-71).

(15) Koji Hosomi, Mayu Saito, Jonguk Park, Haruka Murakami, Naoko Shibata, Masahiro Ando, Takahiro Nagatake, Kana Konishi, Harumi Ohno, Kumpei Tanisawa, Attayeb Mohsen, Yi-An Chen, Hitoshi Kawashima, Yayoi Natsume-Kitatani, Yoshimasa Oka, Hidenori Shimizu, Mari Furuta, Yoko Tojima, Kento Sawane, Azusa Saika, Saki Kondo, Yasunori Yonejima, Haruko Takeyama, Akira Matsutani, Kenji Mizuguchi, Motohiko Miyachi and Jun Kunisawa: Oral administration of Blautia wexlerae ameliorates obesity and type 2 diabetes via metabolic remodeling of the gut microbiota. Nature Communications, 2022; 13(1): 1-17. [doi.org/10.1038/s41467-022-32015-7]

(16) Kou Hioki, Tomoya Hayashi, Yayoi Natsume-Kitatani, Kouji Kobiyama, Burcu Temizoz, Hideo

Negishi, Hitomi Kawakami, Hiroyuki Fuchino, Etsushi Kuroda, Cevayir Coban, Nobuo Kawahara and Ken J. Ishii: Machine Learning-Assisted Screening of Herbal Medicine Extracts as Vaccine Adjuvants. Frontiers in Immunology, 2022; 13. [doi.org/10.3389/fimmu.2022.847616]

(17) ロドルフォ セバスチアン アジェンデス オソリオ、夏目やよい「機械学習を用いたアジュバント開発の新潮流」月刊ファインケミカル 2022; 51: 12

(18) 夏目やよい、水口賢司 第2節「生命情報科学からのAI創薬」革新的AI創薬 ～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～ 2022; 15-22, (株) エヌ・ティー・エス

(19) 夏目やよい 第3章 第1節「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」革新的AI創薬 ～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～ 2022; 107-112, (株) エヌ・ティー・エス

(20) 上田修功、夏目やよい 第5章 第3節「サブセット・バインディングによる患者層別化AIの開発」革新的AI創薬 ～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～ 2022; 235-244, (株) エヌ・ティー・エス

(21) 中村 恵宣、北村 英也、小倉 高志、夏目やよい、水口賢司 官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM) で構築する特発性肺線維症に対する創薬標的探索プラットフォームについて MEDCHEM NEWS 32(3) 119-123 (2022)

2. 学会発表

(1) 北嶋 聡:創薬研究における薬理－病理連携の必要性: 毒性学の立場から－食品トキシコゲミクスと薬理学－、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(2) 相崎健一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(3) 高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑介、種村健太郎、相崎健一、北嶋 聡: バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした急性毒性試験の近代化、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(4) 菅野純: 粉体吸入実験装置の考察. 第 13 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム、(2022.11.24)、ANA クラウンプラザホテル富山、シンポジウム、口演.

(5) 小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡: ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022. 11. 11 長崎 (口頭発表)

(6) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

(7) D. M. Saleh, W. T. Alexander, D. B.

Alexander, M. Abdelgaied, A. M. EL-Gazzar, O. H. Mohamed, S. Gunasekaran, T. Hirose, A. N. Ito, S. Suzuki, M. Gi, Y. Taquahashi, A. Hirose, J. Kanno, S. Tsuruoka, H. Tsuda: The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.20), Maastricht, The Netherlands Oral.

(8) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡: Percellome project からみた毒性 AI の展望. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(9) 五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、栗形麻樹子: ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験、第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 2)

(10) 五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、栗形麻樹子、北嶋 聡: 「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

(11) 齊藤洋克、種村健太郎、菅野純、北嶋聡: アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析－化学物質曝露影響から考える神経発達障害－第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(12) 菅野純: 「子供の毒性学: 脳高次機能の形成異常の諸要因」－イントロダクション－. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベン

ションセンター、シンポジウム、口演。

(13) 大久保佑亮, 菅野聖世, 北嶋 聡, 平林容子, 福田淳二: ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1)

(14) 前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長澤明道, 生嶋清美, 山本行男, 平松恭子, 矢野範男, 大貫文, 稲葉涼太, 鈴木仁, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 菅野純, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間間欠気管内投与によるラット発がん性試験。第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、ポスター。

(15) 高橋祐次, 横田理, 広瀬明彦, 菅野純: ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化。第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演。

(16) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察。第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演。

(17) 高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑亮、相崎健一、北嶋 聡: バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の致死性予測 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)

(18) 小野竜一, 山本 雄介, 成瀬 美衣, 田邊 思帆里, 吉岡 祐亮, 相崎 健一, 広瀬 明彦, 落谷 孝広, 平林 容子, 北嶋 聡 cfDNA による毒性評価 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.29.) 札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演。

(19) Ryuichi Ono. Horizontal Gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing. International Congress of Toxicology, Maastricht, October, 2022 (口頭発表; シンポジウムオーガナイザー)

(20) 小野 竜一、田埜 慶子, 安田 智, 佐藤 陽治, 内田 恵理子, 平林 容子, 北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022.11.11 長崎 (口頭発表)

(21) Ryuichi Ono. Toxicity Concerns of Exosome Products. American College of Toxicology, Denver, November, 2022 (invited)

(22) Jun Kanno: Comprehensive analysis of the gene expression networks in toxicology: single-versus repeated-dosing and organ-organ interaction. the first seminar of ASIATOX webinar series, (2022.6.25), Virtual, Oral.

(23) J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, and S. Kitajima: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals: Percellome Project 2022 Update. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.30), San Diego, USA, Poster.

(24) Y. Taquahashi, S. Yokota, K. Morita, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, M. Hojyo, A. Hirose, and J. Kanno: Preliminary Report of the Two-Year, Every Four-Week-Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study of the Multiwalled Carbon Nanotube in Male Mice. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.29), San Diego,

USA, Poster.

(25) D. M. Saleh, O. H. Ahmed, D. B. Alexander, W. T. Alexander, H. Takase, M. Ohnishi, S. Tomono, J. Kanno, A. Hirose, S. Takahashi, and H. Tsuda: Two-Year Study for the Assessment of the Carcinogenic and Toxic Effect of Double Walled Carbon Nanotubes in the Rat Lung after Intratracheal Instillation. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.29), San Diego, USA, Poster.

(26) 長谷武志、谷内江綾子、Samik Ghosh、北野宏明 : AI 駆動型オミックスデータ解析とそのシステム毒性学・創薬研究への応用. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンション

(27) 原侘奈、武田吉人、足立淳、夏目やよい、伊藤眞里、熊ノ郷淳「エクソソームの次世代プロテオミクスによる線維化性過敏性肺炎の新規バイオマーカー開発」第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/22 京都

(28) 網屋沙織、武田吉人、榎本貴俊、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 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都

(29) 白井雄也、武田吉人、榎本貴俊、足立雄一、網屋沙織、野田成美、菅泰彦、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 "PRISM" data reveal fibrotic biomarkers」第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都

(30) 夏目やよい、伊藤眞里、松村泰志、武田吉人、足立淳、熊ノ郷淳、水口賢司、上田修功「患者層別化 AI による特発性肺線維症の創薬標的提示に向けて」第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都

(31) 榎本貴俊、武田吉人、網屋沙織、足立雄一、新津敬之、原侘奈、野田成美、白井雄也、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り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 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都

(32) 夏目やよい「診察情報とオミックスデータを用いたデータ駆動的な患者層別化と創薬標的探索」、「新薬創出を加速する症例データベースの構築・拡充／創薬ターゲットの推定アルゴリズムの開発」令和3年度成果報告会 2022/5/12 オンライン

(33) 夏目やよい「診察情報とオミックスデータを用いたデータ駆動的な患者層別化と創薬標的探索～特発性肺線維症を例として～」第 4 回メディカル AI 学会学術集会 2022/6/10 宮城

(34) 夏目やよい、伊藤眞里、松村泰志、武田吉人、足立淳、熊ノ郷淳、水口賢司、上田修功「診療情報と紐付けられたプロテオームデータによる特発性肺線維症を対象としたデータ駆動的創薬標的探索」第 70 回質量分析総合討論会 2022/6/22 福岡

(35) 夏目やよい「臨床情報を用いたデータ駆動的な創薬標的探索」FRONTIERS OF ENGINEERING JAPAN 2022/6/24 長崎

(36) 夏目やよい「診療情報とオミックスデータを用いたデータ駆動的創薬標的探索～特発性肺線

維症に対する挑戦〜」第 49 回日本毒性学会学術
年会 2022/7/2 北海道

(37) 吉村華子、武田吉人、榎本貴俊、原伶
奈、菅泰彦、川崎貴裕、三宅浩太郎、白山敬
之、平田陽彦、小山正平、長友泉、岩堀幸太、
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気管支喘息、T2 炎症の新
規 BM 開発」第 43 回日本炎症・再生医学会
2022/7/6 兵庫

(38) Yayoi Natsume-Kitatani, Mari N Itoh, Yoshito
Takeda, Masataka Kuroda, Haruhiko Hirata, Kohtaro
Miyake, Takayuki Shiroyama, Yuya Shirai, Yoshimi
Noda, Yuichi Adachi, Takatoshi Enomoto, Saori
Amiya, Jun Adachi, Ryohei Narumi, Satoshi Muraoka,
Takeshi Tomonaga, Sadao Kurohashi, Fei Cheng,
Ribeka Tanaka, Shuntaro Yada, Eiji Aramaki, Shoko
Wakamiya, Yi-An Chen, Chihiro Higuchi, Yosui
Nojima, Takeshi Fujiwara, Chioko Nagao, Toshihiro
Takeda, Yasushi Matsumura, Kenji Mizuguchi,
Atsushi Kumanogoh, Naonori Ueda 「Data-driven
patient stratification and drug target discovery by
detecting paired itemsets from medical information
and omics data」ISMB2022 2022/7/11 アメリカ

③⑨ Yayoi Natsume-Kitatani 「Inference of
mechanisms of toxicity from omics data」The Open
Tox 2022 Virtual Conference 2022/9/12 オンライン

(40) Rodolfo S. Allendes Osorio, Johan T.
Nystroem-Persson, Yuji Kosugi, Kenji Mizuguchi,
Yayoi Natsume-Kitatani 「Panomicon, allowing
hetero-geneous multi-omics analysis on the web」
ECCB2022 2022/9/18 スペイン

④① Natsume-Kitatani Y, Aisaki K, Kitajima S,
Kanno J 「Comparative study of dynamic changes in

gene expression profiles induced by PPARα ligands」
ECCB2022 2022/9/18 スペイン

(42) 夏目やよい 「新薬創出を加速させる AI の開
発」第 81 回日本癌学会学術総会 2022/9/29 神奈
川

(43) 夏目やよい 「診療情報と生体分子の測定
データから薬の標的を探し出すために」ABCI Uer
Group ウェビナー 2022/10/14 オンライン

(44) 伊藤眞里、足立淳、武田吉人、黒田正孝、
朝長毅、武田理宏、松村泰志、夏目やよい、水口
賢司、熊ノ郷淳 「新薬創出を加速する人工知能の
開発」特発性肺線維症患者血清中エクソソーム内
プロテオームと診療情報を用いるデータ駆動的創
薬標的の探索」第9回日本細胞外小胞学会学術集
会 2022/10/25 東京

(45) Mari N Itoh, Yayoi Natsume-Kitatani,
Masataka Kuroda, Jun Adachi, Yi-An Chen, Kenji
Mizuguchi, Yoshito Takeda, Atsushi Kumanogoh,
Naonori Ueda 「Artificial Intelligence to Accelerate
New Drug Discovery: Target identification and drug
discovery by data-driven approach and experimental
validation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)」
CBI 学会 2022 年大会 2022/10/25 東京

(46) 夏目やよい 「診療情報の利活用とデータ駆
動的創薬標的探索」MD-DSC 研究会 2022/11/4
オンライン

(47) 渡邊怜子、河田敏生、上田真也、新保拓未、
東森光雄、夏目やよい、水口賢司 「化学構造情報
を用いた代謝酵素のクリアランスへの寄与率予測モ
デルの構築」日本薬物動態学会第 37 回年会
2022/11/8 神奈川

(48) 樋口千洋, 黒田正孝, 伊藤眞里, 長尾知生子, 水口賢司, 夏目やよい「PRISM 成果利用システム「峰」の構築」第 42 回 医療情報学連合大会 (第 23 回日本医療情報学会学術大会)2022/11/20 北海道

(49) 黒田正孝, 伊藤眞里, 夏目やよい, 鎌田英世, 深川明子, 武田吉人, 武田理宏, 松村泰志, 北村 英也, 丹羽崇, 岩澤多恵, 高橋陽子, 荒牧英治, 黒橋禎夫, 水口賢司, 小倉 高志, 熊ノ郷淳「臨床データの匿名加工情報作成に向けた検討-新薬創出を加速する人工知能の開発におけるデータ利用促進に向けて-」第42回 医療情報学連合大会 (第 23 回日本医療情報学会学術大会) 2022/11/20 北海道

⑤⑩ 夏目やよい「トランスクリプトームデータを用いた毒性発現メカニズムの推定」第5回医薬品毒性機序研究会 2022/12/9 東京

II. 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4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。

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、エストラゴールの4日間の新型反復曝露、及び、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)の4日間の新型反復曝露の2実験（以下、Estragole[4+1]及びDEHP[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異なる要素を抽出した。Estragole [0+1]、及び Estragole[4+1]の遺伝子発現誘導は、ともにPPAR 下流の脂質代謝に関わる遺伝子が主体であったが、[4+1]により、発現遺伝子の総数は数倍に増加し、基線反応、及び、過渡反応が増強し発現のタイミングが早まる遺伝子を多く認めた。4日間の反復曝露により小胞体ストレスなどを介しての細胞増殖シグナルの増強が示唆され、少なくともマウス肝に対する発癌性が Gene Ontology から強く示唆された。年度内に、先行研究にて解析した PPAR リガンド化学物質との比較を行う。DEHP[4+1]についても GeneChip 解析を実施し網羅的な遺伝子発現データを得て先行研究による DEHP[0+1]（単

回曝露)と比較するなどして解析を進めた。

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。

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

● 試薬及び動物：

エストラゴール(分子量：148.20、Cas No.: 140-67-

0、純度98%、Sigma-Aldrich)について、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。エストラゴールの4回反復曝露の用量は70.0mg/kg、最終の単回曝露の用量は先行実験で実施した[0+1]実験と同様に0、10、30、100 mg/kgとした。

またフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)、分子量：390.56、Cas No.: 117-81-7、純度98%以上、東京化成工業(株))について、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予定。

各曝露実験には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 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

●GeneChip 解析：

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。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

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。
 令和4年度は、エストラゴール(estragole)の新型反復曝露実験 (TTG245 : 70mg/kg を4日間曝露後、5日目に0, 10, 30, 100mg/kg) (Estragole[4+1]と表記)、及びフタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (DEHP)の新型反復曝露実験 (TTG251 予定) (DEHP[4+1]と表記)を実施し、GeneChipによる肝の網羅的遺伝子発現解析を実施した。

① Estragole[0+1] (実験コード TTG147-L)

先行研究で実施した単回曝露実験 (以後Estragole[0+1]と表記) の、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39、20、65、12であった。

EstragoleはPPAR α のリガンドであることが知られており、2時間目の39遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR α 及びPPAR δ を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Acot1、Acot2、Cyp4a31、Pdk4、等)。

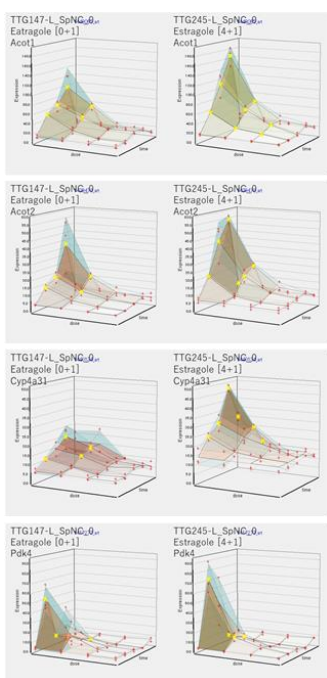


図1 左[0+1] 右[4+1]にてAcot1、Acot2、Cyp4a31、Pdk4を示す。

4時間目に誘導開始され4時間目にピークとなる遺伝子は少なかった。4時間目に誘導開始し8時間目にピークとなる遺伝子、及び8時間目に誘導開始された遺伝子は、PPAR α やPPAR δ の下流の脂質代謝、脂質合成に関わる遺伝子が含まれていることが示された (Abhd6、Gyk等)。

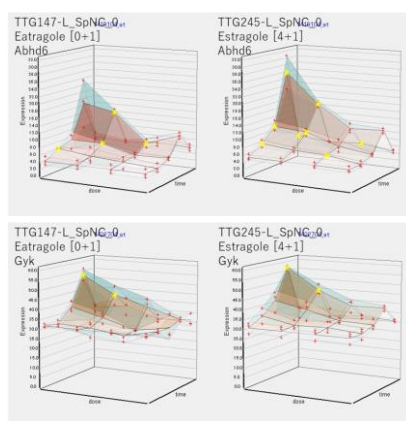


図2 左[0+1] 右[4+1]にてAbhd6、Gykを示す。

8時間目に誘導開始された65遺伝子はPPAR α あるいはPPAR δ の下流の遺伝子が多く含まれていた (Acaa1、Por、Paqr7等)。

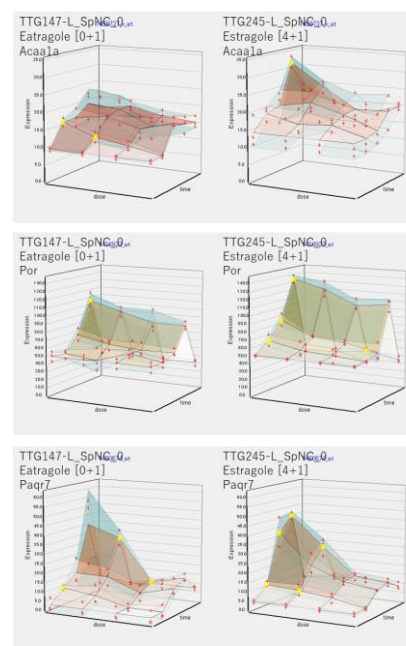


図3 左[0+1] 右[4+1]にてAcaa1、Por、Paqr7を示す。

24 時間目に誘導開始された 12 遺伝子は、反応が弱いものも多く PPAR α あるいは ESRRa の下流の遺伝子が含まれていた (Acat1、Ech1、Fabp2 等)。

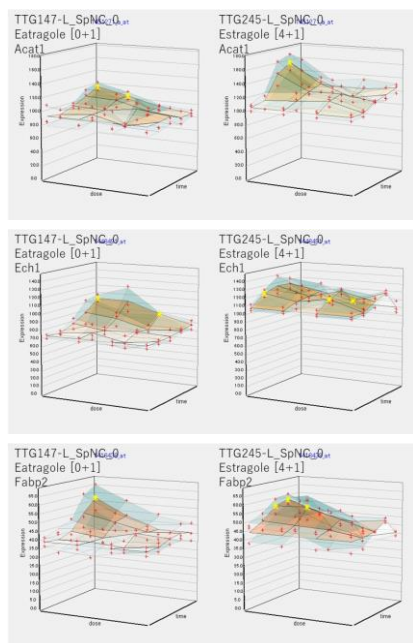


図4 左[0+1] 右[4+1]にてAcat1、Ech1、Fabp2を示す。

今までに検討した PPAR リガンド化学物質と比較すると、誘導遺伝子数は少なく、単回曝露の影響は 8 時間目をピークに収束する傾向が認められた。

② Estragole[4+1] (実験コード TtG245-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、183、146、176、0 であった。

2 時間目に誘導開始された遺伝子の数は、Estragole[0+1]の 5 倍近くに増加した、[0+1]と同様に PPAR の下流の遺伝子が誘導される(上記 図1右側) ことに加え、[4+1]のみにおいて、小胞体ストレスシグナルが流れることが示唆された (Dnajc3、Hsp90b1、Mbtps1 等)

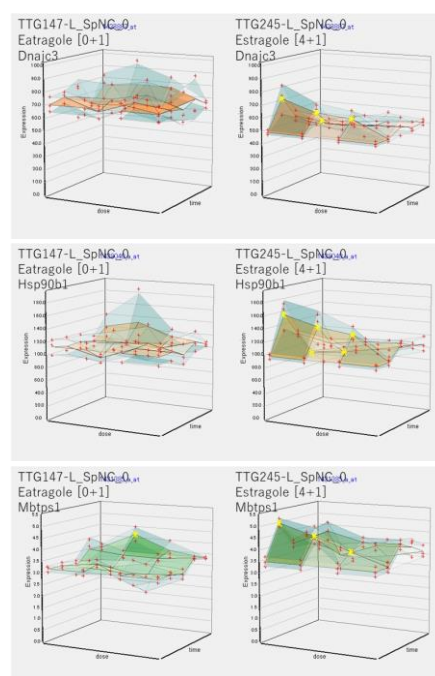


図5 左[0+1] 右[4+1]にてDnajc3、Hsp90b1、Mbtps1を示す。

これらの上流には、Xbp1、E1f2、Eif2ak3 等が位置することが示唆された。

4 時間目に誘導開始された遺伝子の数も、Estragole[0+1]の 7 倍近くに増加した。多くは脂質代謝に関わる PPAR α 、PPAR γ の下流の遺伝子であった (Abhd6、Ddhd2、Mgll 等)。

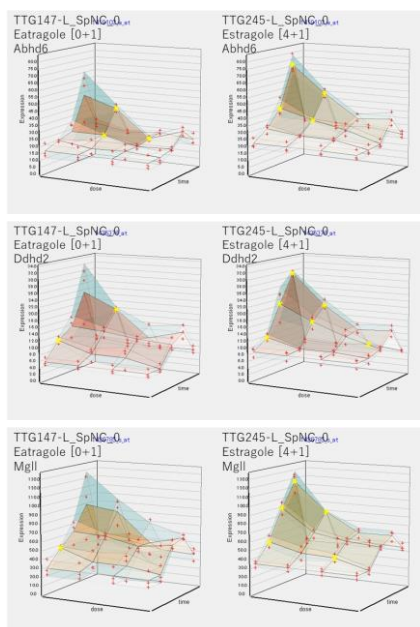


図6 左[0+1] 右[4+1]にて Abhd6、Ddhd2、Mgll を示す。

8 時間目に誘導開始された遺伝子の数も、Estragole[0+1]の 3 倍近くに増加した。多くは脂質代謝に関わる PPAR α 、PPAR γ の下流の遺伝子であった (Slc27a1、Acat1 等)。これに加えて、Estrogen-mediated S-phase Entry (IPA analysis) に属する Ccnd1、Cdk2、Tfdp1 などが誘導された。

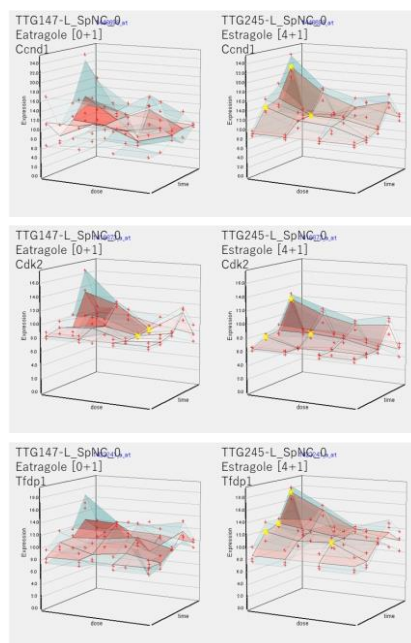


図7 左[0+1] 右[4+1]にて Ccnd1、Cdk2、Tfdp1 を示す。

24 時間目に誘導開始された遺伝子は Estragole[4+1]では認められなかった。後述する基線反応の解析の結果と関係するが、[0+1]と[4+1]とにおいて共に発現する遺伝子の多くについて、4 日間の反復曝露の結果、発現のタイミングが早まる現象が認められた。24 時間目に誘発される遺伝子がなくなった理由として、この現象が関与していることが示唆された。

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 $p < 0.05$ 、3 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 82、上昇した基線反応遺伝子は 197 であった。

基線反応 (Baseline Response) が低下した遺伝子群は、上流に PPAR を持たず、Chemokine Signaling や

Xenobiotic Metabolism Signaling に属する遺伝子が含まれていた (Arnt、Mapk1 等)。

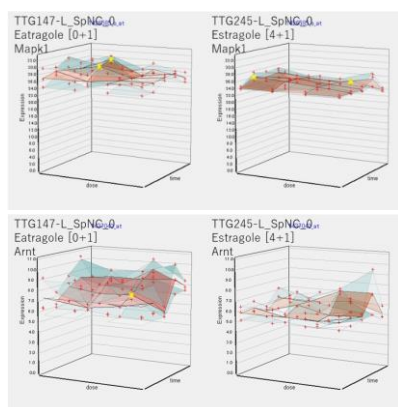


図8 左[0+1] 右[4+1]にてArnt、Mapk1を示す。

基線反応 (Baseline Response) が上昇した遺伝子群は、上流に PPAR α 、POR、ESR1 等を持ち、脂質代謝 (Cyp4a14、Retsat 等) の他、Wnt/ β -catenin Signaling (Csnk1d、Nr5a2 等) などの分裂促進等のシグナルが活性化していることが示唆された。

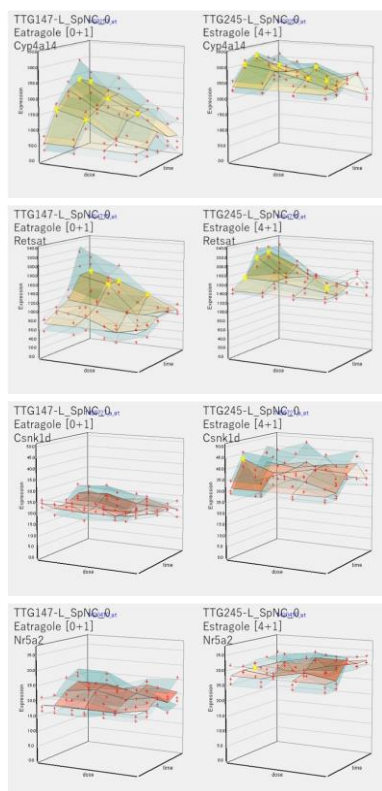


図9 左[0+1] 右[4+1]にてCyp4a14、Retsat、Csnk1d、Nr5a2を示す。

以上より、Estragole の4日間反復曝露は、PPAR 下流遺伝子の基線反応を上昇させ、一部の脂質代謝関連遺伝子の過渡反応も増強させ、発現のタイミングを早めた。また、反復曝露により小胞体ストレスなどを介した細胞増殖シグナルの増強も示唆された。Gene Ontology 解析の結果、4日間反復により、少なくともげっ歯類に於いて発癌性が強く示唆され、先行研究において解析した PPAR リガンド化学物質との詳細な比較解析を行った。

DEHP の新型反復曝露実験 (実験コード TTG251-L) については、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を終え、有意な変動を示す遺伝子の抽出と解析、および DEHP の単回曝露実験 (実験コード TTG098-L) との比較検討を進めた。

D. 考察

令和4年度は、エストラゴールの4日間の新型反復曝露、及び、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)の4日間の新型反復曝露の2実験(以下、Estragole[4+1]及びDEHP[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異なる要素を抽出した。

Estragole[4+1]の結果から、明らかな毒性所見を發揮しない用量において、4日間という短期の反復曝露によって、単回曝露とは大きく異なる変化を明らかにすることが出来た。特に、PPAR 下流の遺伝子の基線反応と過渡反応が増強され、遺伝子発現のタイミングが早くなる傾向が明らかとなった。これに加えて小胞体ストレス等のシグナルが反復投与により活性化し細胞増殖等の発癌性等の毒性を示唆したことから、慢性毒性への外挿の可能性が示唆されたと考える。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

先行研究の成果と同様に、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が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Masako Saito, Kunihiko Otsuka, Yusuke Furukawa, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru: Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 2022; 192(11): 1559-1572. [doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.07.009].

(2) Aisaki KI, Ono R, Kanno J, Kitajima S. [Percellome Project: research on molecular mechanisms of toxicological responses based on transcriptomics and epigenetics]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2022;157(3):200-206. [doi.org/10.1254/fpj.21122] (Japanese).

(3) Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Ahmed M. El-Gazzar, Mohamed Abdelgied, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Randa Hussein Abd el Hady, Katsumi Fukamachi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Jiegou Xu, Shugo Suzuki, Aya Naiki-Ito, Satoru Takahashi and

Hiroyuki Tsuda: Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol.* 2022; 19(1): 30. [doi.org/10.1186/s12989-022-00469-8].

(4) Motoki Hojo, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Yukie Tada, Yukio Yamamoto, Kiyomi Ikushima, Ryota Inaba, Jin Suzuki, Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Norihiko Kobayashi, Makoto Ohnishi, Yuko Goto, Takamasa Numano, Hiroyuki Tsuda, David B. Alexander, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Akiko Inomata and Dai Nakae: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. *Part Fibre Toxicol.* 2022; 19(1):38. [doi.org/10.1186/s12989-022-00478-7].

2. 学会発表

(1) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋 聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(2) 菅野純: 粉体吸入実験装置の考察. 第 13 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム、(2022.11.24)、ANA クラウンプラザホテル富山、シンポジウム、口演.

(3) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19),

Maastricht, The Netherlands Oral.

(4) D. M. Saleh, W. T. Alexander, D. B. Alexander, M. Abdelgaied, A. M. EL-Gazzar, O. H. Mohamed, S. Gunasekaran, T. Hirose, A. N. Ito, S. Suzuki, M. Gi, Y. Taquahashi, A. Hirose, J. Kanno, S. Tsuruoka, H. Tsuda: The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.20), Maastricht, The Netherlands Oral.

(5) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 Percellome project からみた毒性 AI の展望. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(6) 齊藤洋克, 種村健太郎, 菅野純, 北嶋聡: アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析—化学物質曝露影響から考える神経発達障害—第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(7) 菅野純:「子供の毒性学:脳高次機能の形成異常の諸要因」—イントロダクション—. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(8) 前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長澤明道, 生嶋清美, 山本行男, 平松恭子, 矢野範男, 大貫文, 稲葉涼太, 鈴木仁, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 菅野純, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大:多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の2年間間欠気管内投与によるラット発がん性試験. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、ポスター.

(9) 高橋祐次, 横田理, 広瀬明彦, 菅野純: ナノマテリアルの慢性吸入ばく露試験法の効率化. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(10) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(11) Jun Kanno: Comprehensive analysis of the gene expression networks in toxicology: single-versus repeated-dosing and organ-organ interaction. the first seminar of ASIATOX webinar series, (2022.6.25), Virtual, Oral.

(12) J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, and S. Kitajima: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals: Percellome Project 2022 Update. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.30), San Diego, USA, Poster.

(13) Y. Taquahashi, S. Yokota, K. Morita, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, M. Hojyo, A. Hirose, and J. Kanno: Preliminary Report of the Two-Year, Every Four-Week-Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study of the Multiwalled Carbon Nanotube in Male Mice. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.29), San Diego, USA, Poster.

(14) D. M. Saleh, O. H. Ahmed, D. B. Alexander, W. T. Alexander, H. Takase, M. Ohnishi, S. Tomono, J. Kanno, A. Hirose, S. Takahashi, and H. Tsuda: Two-Year Study for the Assessment of the

Carcinogenic and Toxic Effect of Double Walled Carbon Nanotubes in the Rat Lung after Intratracheal Instillation. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.29), San Diego, USA, Poster.

⑮ Natsume-Kitatani Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J「Comparative study of dynamic changes in gene expression profiles induced by PPARα ligands」
ECCB2022 2022/9/18 スペイン

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4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。

化学物質の反復投与においては、溶媒も反復投与される訳で、溶媒の反復影響によるエピジェネティック変化を考慮する必要があることから、令和4年度研究においては、メチルセルロース 14 日間反復曝露およびメチルセルロース単回曝露のエピゲノム解析を行った。その結果、サリドマイドの反復投与で検出されたエピジェネティック変化の多くが、溶媒影響によるものであることが明らかになった。しかしながら、一部においてはサリドマイドの反復曝露影響によるものであると想定される結果を得た。

(*) mRNA発現値を細胞 1 個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

(**) 全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う。実験の反復曝露と単回曝露の回数をもとに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。

A. 研究目的

本研究は、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)

【令和3年度研究対象サンプル】

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

【令和4年度研究対象サンプル】

溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) 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

上記サンプルのヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証した各マウス肝 (30 μ g) を材料として、1) 4 μ l (30 μ g) の抗ヒストン H3K4me3 抗体

(Active Motif, cat # 39159) (H3K4me3: 転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 4 トリメチル化)、2) 4 μ l (30 μ g) の H3K27Ac3 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac3: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、3) 4 μ l (30 μ g) の H3K27me3 抗体 (Active Motif, cat # 39155) (H3K27me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化)、4) 5 μ l (30 μ g) の H3K9me3 抗体 (Active Motif, cat # 39161) (H3K9me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 9 のトリメチル化)、および Input (抗体無しコントロール) を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。その際、サンプル間の補正を行うために、*Drosophila* のクロマチンが spike in として添加されている。ChIP 後の DNA は、それぞれの抗体に対する既知の陽性コントロールおよび陰性コントロールを qPCR により定量し、そのクロマチン免疫沈降の有効性の定量を行う。

クロマチン免疫沈降の有効性の確認ができた ChIP DNA より次世代シーケンサー解析用のライブラリを作成し、75 bp のシングルリードで網羅的シーケンス解析を行った。シーケンス結果は、マウス標準ゲノム (mm10) に対してマッピング後に *in silico* で 200 bp まで各リードを延長し、SICER アルゴリズムを用いてピークコール (ピーク検出) を行う。SICER アルゴリズムは default のパラメータ ($p=1e-7$ (narrow peak), $p=1e-1$ (broad peak)) を用いる。各サンプルは、*Drosophila* DNA 断片のリード数により補正を行う。

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ーを利用し、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 μ g) 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
-0.26	Egfr	1,643	upstream	chr4:41210600-41222999
-0.27	Cad6	2,844	in gene	chr5:102716600-102719999
-0.32	Lnc5	55,768	in gene	chr5:16446000-16459999
-0.35	Cyp4a10	1,286	upstream	chr4:155113000-15520799
-0.20				chr7:14540000-14550399
-0.19				chr6:11729000-11730999
-0.18	Papf9	6,382	downstream	chr9:9544800-9545899
-0.18	Scav5	52,296	in gene	chr4:65718600-65723799
-0.18	Cyp4b14	342	in gene	chr4:11448300-11449399
-0.16	Ctcf3	37,122	in gene	chr5:11527000-11527659
-0.16	Utp1	4844, 12064	in gene, upstream	chr4:10726600-10730999
-0.17	Igfbp9	209,308	downstream	chr1:11717000-11744099
-0.17	Egr3	24,493	in gene	chr7:14478000-14478599
-0.17	Ctcf2	3,304	in gene	chr1:11037600-11038199
-0.17	TorkL1, LOC10195948, Nph2	1951, 2033, 5436	upstream, downstream, upstream	chr1:15627200-15631399
-0.17	Gabb2	36,015	in gene	chr4:46947400-46952199
-0.17				chr4:7642500-7643199
-0.16				chr5:53184200-5318799
-0.16	H3k27c	82,408	in gene	chr7:139118400-13918399
-0.16				chr6:89014600-8901199

H3K27me3(抑制型)が増加

log2(repeat)	Gene List H3K27me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.28	GA3001, L106Rkl, Mtd1	13751, -11747	downstream, upstream	chr7:90737200-90745399
0.27	Tp53l1, Cacna3c	29446, 37584	downstream, in gene	chr7:25379400-25412999
0.27	Smc3, Dact1, Msr18k2, Lingo3, Lam7, Sppol2	21203, 8943, 6802, 8440, 19610, -19676	upstream, downstream, downstream, in gene, downstream, upstream	chr10:80221200-80283999
0.27	Egr1	20,057	in gene	chr7:90797200-9081199
0.27	Sac3l1	999, 13797	in gene, downstream	chr6:112557600-11258499
0.27	Fmrc1, T10002, Sphk4, Spnab3	13841, 23795, 31033	in gene, downstream, downstream	chr1:10116800-10163799
0.27	Utr1, LOC101605715, Mtr7	93395, -13258, 18192	in gene, upstream, downstream	chr1:27168400-27122999
0.27	Cmp1	4,219	in gene	chr6:37238600-3725299
0.27	Magflb, Cofn, F73Z4F1.01Rk, Lip2	36035, 2625, 9820, 28788	downstream, downstream, upstream, downstream	chr7:25183800-25127999
0.27	Gene1	4,950	upstream	chr7:21497200-2152399
0.27	Vsig15, Iqgms3, 4931400R18Rk, Gm2511	26148, 724, 16639, 29248	downstream, in gene, downstream, downstream	chr7:4347200-4350599
0.27	Lam3, Emilin3	32729, -1071	downstream, upstream	chr2:16093600-16092199
0.27	Gene2			chr15:2913600-2981199
0.27	Argef9D1	203,206	downstream	chr4:42412000-424051799
0.27	Gbb7, Nr3f3	21465, 27732	downstream, in gene	chr11:9848400-98472999
0.26	Gene1			chr4:131355200-131371199
0.26	Gene2	75,505	in gene	chr1:7214200-7164399
0.26	Dnm1, Msr19b	18005, 16839	in gene, downstream	chr2:3235400-32345199
0.26	Ror2	183,010	in gene	chr7:135311400-13529999
0.26	Snz2	1,485	in gene	chr7:85848200-8578499

H3K4me3(活性型)が増加

log2(repeat)	Gene List H3K4me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.39				chr9:38383200-3837199
0.38	Smc1c	4,009	upstream	chr2:210117800-8131999
0.37	Linc1	3,971	in gene	chr2:165116600-1651999
0.37	L10195329Rk, Mtd62	1,0744, 579	downstream, downstream	chr9:9336800-93373799
0.36	Cas3b	3,844	in gene	chr6:105974600-10598399
0.36	Mtfr1a	13,989	downstream	chr6:22296200-22297199
0.36	Dkb3c	11,885	upstream	chr4:4322800-43242799
0.29	Gm18551, Oneuc1	31362, 17878	downstream, in gene	chr9:7486600-7488799
0.29	Acar2	25,452	in gene	chr4:49381200-4938499
0.29	Snc1a4	16,278	upstream	chr6:11464000-11460799
0.29	Hud3b	5,229	in gene	chr3:9875600-98765199
0.29	Aqub1, Dscc2c1	2905, 35250	in gene, downstream	chr7:123441600-12348799
0.29				chr1:2228400-2230799
0.28	Pink1, PINK1, Rab32	52445, 13391	in gene, upstream	chr7:28277200-28292799
0.28	Art15	292,791	in gene	chr13:1448400-14492199
0.27	Cyp4a19	4,386	upstream	chr9:13977000-13978399
0.27	Cpfd6	15,846	in gene	chr4:18144000-18146099
0.27	Serpin3k3	3,213	in gene	chr12:10432400-104349199
0.26	Zap70, Tmem131	18938, 157828	in gene, downstream	chr1:36780200-36783199
0.26				chr3:1394600-1393199

H3K9me3(抑制型)が減少

log2(repeat)	Gene List H3K9me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.31	Cad6	95,578	in gene	chr10:70133200-70172199
-0.31	Cyp12	108,792	in gene	chr6:116617600-116620599
-0.31	Gene1	96,047	in gene	chr8:12160800-12164799
-0.30	Klnk3, Hmgn9d	5,071, 21057	upstream, downstream	chr7:53809500-5381199
-0.30	Wuc2	66,752	in gene	chr6:47913400-47934199
-0.30	Gm1891, Taz	93486, 26599	downstream, downstream	chr6:104213600-10421999
-0.29	Tsbl1	45,795	downstream	chr10:12152400-121557799
-0.29	Map3a1	45,261	in gene	chr1:71226200-1228799
-0.29	Cad6, F130116Z0Rk	99878, -1468	in gene, upstream	chr10:7018800-70200199
-0.29	Gm13013, Png9b	42949, 10568	upstream, upstream	chr9:55364600-5538199
-0.28	Yaf1, Cank2b	17141, 92849	downstream, in gene	chr1:5367600-5078199
-0.27	Cyp12	135,392	in gene	chr6:11657800-116615399
-0.27	Smc1b	66,563	in gene	chr7:29431600-29445199
-0.27	Pfkfb6	88,514	in gene	chr7:18625000-18628599
-0.27	Egr3, Siglec13	106822, 12769	downstream, in gene	chr18:78037200-78051199
-0.27	Wuc9	21,747	in gene	chr11:1445900-14463799
-0.27	Gene1	54,709	in gene	chr6:6606800-6607099
-0.27	Aphb2	66,918	in gene	chr6:6653600-66567199
-0.27	Art15, A300961.17Rk	330491, 26593	in gene, in gene	chr1:311414000-13133999
-0.27	Wuc9	669,442	in gene	chr8:11598000-11618199

H3K27Ac(活性型)が減少

log2(repeat)	Gene List H3K27Ac down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.44	Cad6	2,844	in gene	chr5:102716600-102719999
-0.40	Nr3f1	164,351	downstream	chr6:28894400-2889999
-0.39				chr2:165116600-16514999
-0.38	Papf9	6,382	downstream	chr9:9544800-9545899
-0.36	Nr3f1	254,201	in gene	chr6:2878800-2879399
-0.36	Kanad1, Decf6	4976, 42436	upstream, in gene	chr9:1021600-1028999
-0.34	Lnc1	55,768	in gene	chr5:1644600-1645999
-0.34				chr7:1454000-14550399
-0.34	Nmras1, Rpl2	129316, 2938	downstream, in gene	chr9:8242600-1041199
-0.31	Cd151a	34,967	in gene	chr4:7278600-7278799
-0.30				chr4:7642500-7643199
-0.30	Huh4, Cbl3, Fam32a	10231, 6938, -13931	downstream, in gene, upstream	chr6:7198400-7223399
-0.30	Ragap1	117,679	in gene	chr2:2973400-2974099
-0.30	Gm184	257,859	in gene	chr7:7474800-7474199
-0.30	L10195329Rk, Snc1a4	20105, 92327	downstream, in gene	chr4:4322800-43242799
-0.30	AW548542	3,759	in gene	chr5:119517000-119582199
-0.29	Gabb2	122,115	in gene	chr4:46884600-4687299
-0.29				chr1:3903800-39051199

H3K9me3(抑制型)が増加

log2(repeat)	Gene List H3K9me3	Dist to Start	Position	Start-end
0.24	Serpin3k1	3,213	in gene	chr12:10432400-104349199
0.24	Egr1, E230011510Rk	58496, 20003	in gene, downstream	chr1:12677900-1684399
0.24	Linc1, G53011006Rk	29462, -1982	in gene, upstream	chr6:18678600-18691199
0.23	Cas3b	3,844	in gene	chr6:105974600-10598399
0.23	Dnao1	27	upstream	chr7:28501800-28511199
0.23	Nr3f1a4	43,927	in gene	chr6:39637800-3964899
0.23	Krt11, Nhex	6396, 3258	downstream, in gene	chr9:3743100-3744399
0.19	Cyp4b1	2,461	upstream	chr8:1823500-1825699
0.18	Cyp4a24	1,214	in gene	chr19:4084600-4087199
0.18	Gene1	74,338	in gene	chr13:182100-1761199
0.18	Gm18551, Oneuc1	31362, 17878	downstream, in gene	chr9:7486600-7488799
0.18	Ash2l1, Eph3b3, Sm1, Aph3, Snc5a4	103196, 281, 6512, 15567, -15416	downstream, upstream, downstream, downstream, upstream	chr8:36655200-3667299
0.18	Fmrb4	92,327	in gene	chr10:5256800-10200199
0.18	L101910	1,082	in gene	chr9:93551800-9356099
0.18	GA3001, L106Rkl, Mtd1	13751, -11747	downstream, upstream	chr7:90737200-90745399
0.18	Gm1891	8,191	in gene	chr6:5948800-5947199
0.18	Gene1			chr12:185000-1785799
0.17	Igf1, Gm1984	38343, 1742	in gene, in gene	chr10:8783300-8793999
0.17	Nr1d2, Mntx1	10425, 57461	in gene, downstream	chr18:2827200-2828799
0.17	Lnc15, Dcp3b, Birc9	19073, 1725, 6880	downstream, in gene, upstream	chr2:2584200-2573799

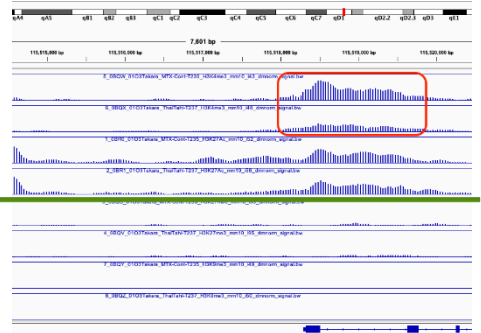
H3K27Ac(活性型)が増加

log2(repeat)	Gene List H3K27Ac up	Dist to Start	Position	Start-end
0.80	LOC10195993, Cyp2b10	1335, -13365	in gene, upstream	chr7:2585100-2591799
0.57				chr9:7432200-7433199
0.52				chr6:10294300-1029199
0.51	Relb3ap1	30,226	in gene	chr1:12789700-12790999
0.48				chr9:7432100-7433399
0.47				chr5:1823500-1825699
0.43	Pp2r2b1	34,027	in gene	chr5:6667900-6661559
0.42				chr9:18143200-18149399
0.42				chr1:1059800-10592199
0.42	Dkb3c	11,885	in gene	chr4:4322800-43242799
0.41	Mchr1, B43042B.04Rk	12800, 3563	downstream, in gene	chr13:8124200-8124399
0.40				chr9:3743200-37447199
0.40	Dkb3c	11,885	in gene	chr4:4322800-43242799
0.39	H3K4me3, Mtd1	16,835	downstream, in gene	chr1:2885300-2879379
0.39				chr5:11281800-5129999
0.39	Gm18551, Oneuc1	31362, 17878	downstream	chr9:7486600-7488799
0.38	Ctcf1	146,484	upstream, downstream	chr5:153139200-52204199
0.38	Maspe3k3, Cln8	12122, 5310	in gene	chr5:10728400-107310599
0.37	Foxp1	132,246	in gene	chr6:9930200-9930599
0.37				chr6:7487800-7487199

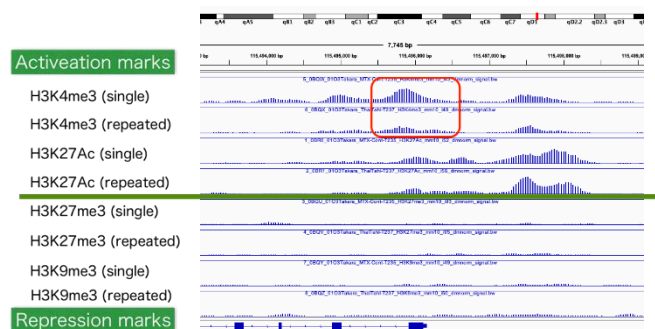
H3K27me3(抑制型)が減少

log2(repeat)	Gene List H3K27me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.36	Mtd1, Mtd1	1081, -3350	downstream, upstream	chr8:9416800-9418799
-0.36	Cyp4b10	27,095	in gene	chr7:25914800-25920799
-0.31				chr4:10294300-1029199
-0.24	LOC10195993, Cyp2b10	1335, -13365	in gene, upstream	chr7:2585100-2591799
-0.23	Gc	5,299	in gene	chr5:8843400-8847299
-0.22	Hsh, H3106E1.18Rk	19229, 2090	in gene, in gene	chr4:5213100-5214899
-0.21	Sep, Gm1648, F5	41935, -4582, 5340	downstream, upstream, in gene	chr1:16417800-164166599
-0.21				chr6:1561700-15625399
-0.19	Pp2r1	18,961	in gene	chr7:18073800-1808199
-0.19	P2rv1, P2rv4	59985, 3858	downstream, upstream	chr5:12295400-12271199
-0.19	Pp3j1c	2,005	in gene	chr1:36728200-3671999
-0.19	Mt1k, Gm19939	7101, -5584	in gene, upstream	chr5:1143200-5113799
-0.19	Cyp1, Cx, Cact3b	13264, 5667, 26538	downstream, in gene, downstream	chr10:2813300-12823199
-0.19	Mtd1	725	upstream	chr1:16642800-11846199
-0.19	Gm18933	29,145	downstream	chr6:89349400-8938399
-0.19	Hsh	116,869	in gene	chr6:373600-3828399
-0.19	Cy4b5	2,438	in gene	chr8:107145200-10716099
-0.18	Cy4b5	21,385	in gene	chr18:84847400-84888199
-0.18	Mtd17c-2, Mtd17b	25434, 28120	upstream, upstream	chr5:85851000-8571199
-0.18	Steadt	2,827	in gene	chr5:7651400-764399

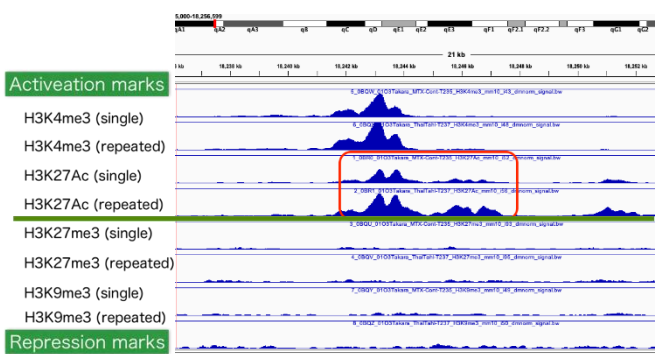
サリドマイドの反復によって、Cyp4a10のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾であるH3K4me3が低下していることが明らかになった。



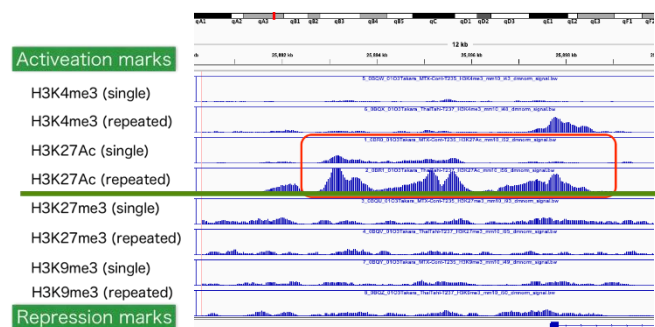
また、Cyp4a 14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。



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。

令和 4 年度においては、新たに 0.5%メチルセルロース水溶液を 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 μ g) を材料として、ヒストン修飾の解析を行なった。

これは、0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与により、ヒストン修飾が影響を受けるかどうかを明らかにすること、すなわち、溶媒影響があるのかを検証する目的で行なっている。

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

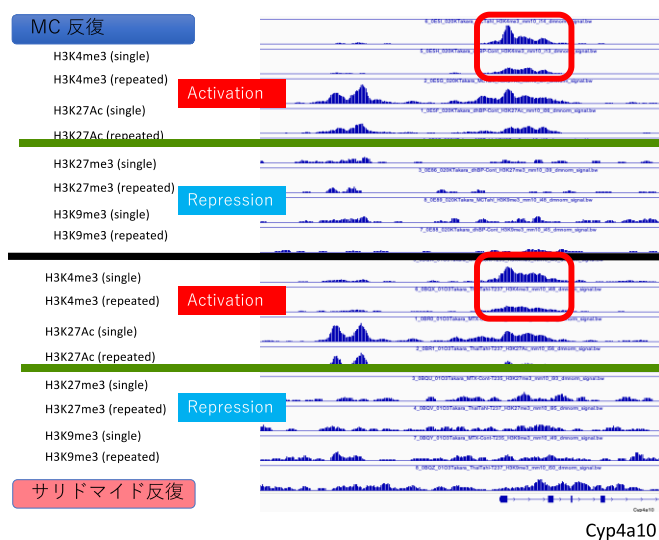
抗 H3K4me3 抗体 (17, 205、18, 566)、
 抗 H3K27Ac 抗体 (24, 329、27, 259)、
 抗 H3K27me3 抗体 (20, 289、22, 147)、
 抗 H3K9me3 抗体 (18, 961、22, 803)、

となっている。この内、特に H3K9me3 のピーク数が 22, 803 から 18, 961 へ、26.8% 減少しており、溶媒である 0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与によって H3K9me3 が減少することが明らかになった (その他は、H3K4me3:7.3% 減少、H3K27Ac: 10.7% 減少、H3K27me3: 8.3% 減少)。したがって VPA の反復投与で見られた H3K9me3 のグローバルな抑制は、0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与が原因である可能

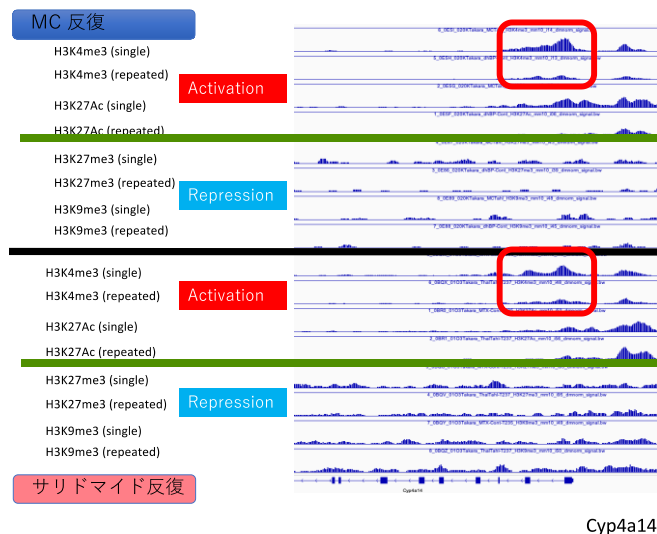
性がある。

令和3年度研究においては、サリドマイドの反復投与において、多くの薬物代謝酵素の制御領域のヒストン修飾に変化が確認されたが、その多くが溶媒影響である可能性が明らかになった。個別のデータを以下に示す。

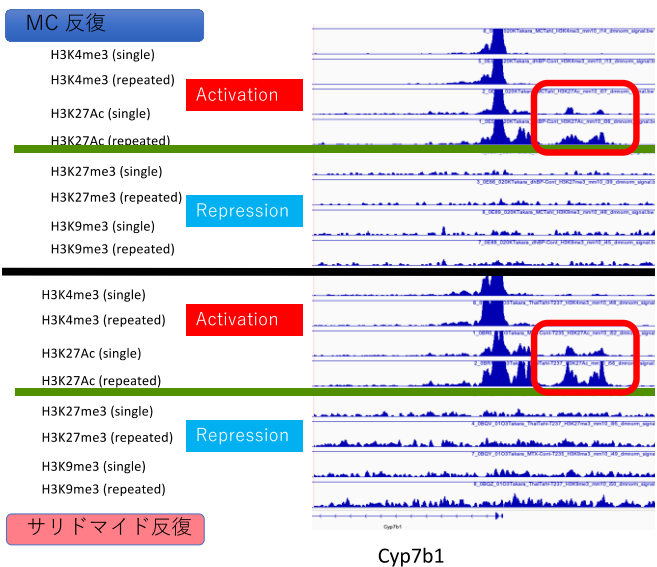
サリドマイドの反復によって、Cyp4a10のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾であるH3K4me3が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



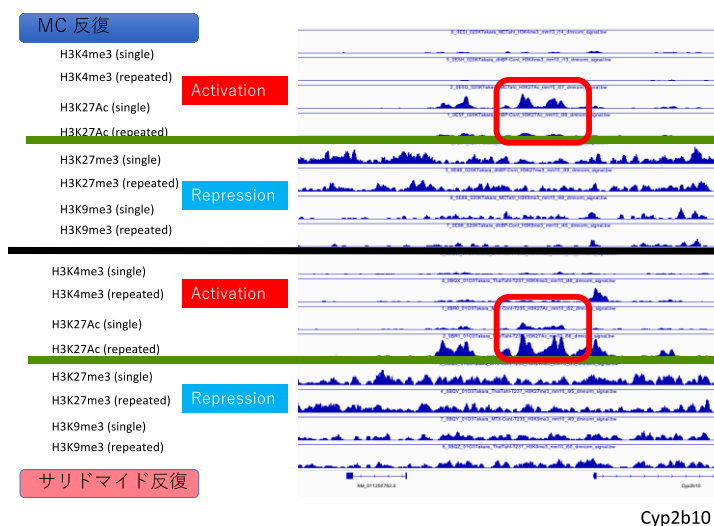
また、サリドマイドの反復によって、Cyp4a 14のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾であるH3K4me3が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



また、サリドマイドの反復によって、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が増加していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



Cyp2b10 のプロモーター領域においては、サリドマイドの反復によって活性型ヒストン修飾である H3K27Ac および H3K4me3 が増加していたが、溶媒の反復投与とは、逆の相関を示すことが明らかとなった。



D. 考察

令和3年度研究において、サリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析を行い、薬物代謝酵素の制御領域の多くで変化が見られていた。令和4年度においては、その変化が本当にサリドマイドの反復曝露による影響なのか、それとも溶媒の反復曝露による影響なのかを検証するために、サリドマイドの溶媒であるメチルセルロース水溶液 (MC) の反復曝露影響の解析を行った。

今年度の解析結果からは、メチルセルロース水溶液 (MC) の反復曝露による溶媒影響があることが想定される。

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ていたが、多くは溶媒影響の可能性はある。しかしながら、Cyp2b10 に関しては、溶媒影響ではないと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J. Toxicol. Sci.* 2023; 48(4): 211-219. [doi.org/10.2131/jts.48.211]
- (2) Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and Satoshi Kitajima: Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(2): 57-64. [doi.org/10.2131/jts.48.57]
- (3) Seiya Kanno, Yusuke Okubo, Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Satoshi Kitajima, Junji Fukuda: Establishment of a Developmental Toxicity Assay based on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption. *iScience.* 2022; 25(2): 103770. [doi.org/10.1016/j.isci.2022.103770]

(4) Aisaki KI, Ono R, Kanno J, Kitajima S. [Percellome Project: research on molecular mechanisms of toxicological responses based on transcriptomics and epigenetics]. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2022;157(3):200-206. [doi.org/10.1254/fpj.21122] (Japanese).

(5) 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]

(6) Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki: Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer Fundamental Toxicological Sciences 2022; 9 (2): 37-46. [doi.org/10.2131/fts.9.37]

(7) Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Edward J. Perkins, Hiroshi Yokozaki and Hiroki Sasaki: Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction. Onco 2023, 3(1), 13-25. [doi.org/10.3390/onco3010002]

2. 学会発表

(1) 相崎健一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(2) 高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑介、種村健太郎、相崎健一、北嶋 聡: バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした急性毒性試験の近代化、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(3) 小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022. 11. 11 長崎 (口頭発表)

(4) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

(5) 菅野 純、相崎健一、小野 竜一、北嶋 聡 Percellome project からみた毒性 AI の展望. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(6) 五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、栗形麻樹子: ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験、第 49 回日本毒性学会学術

年会 (2022.7.2)

- (7) 五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、栗形麻樹子、北嶋 聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)
- (8) 齊藤洋克、種村健太郎、菅野純、北嶋聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析—化学物質曝露影響から考える神経発達障害—第49回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.
- (9) 大久保佑亮、菅野聖世、北嶋 聡、平林容子、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)
- ⑩ 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察. 第49回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.
- (11) 高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑亮、相崎健一、北嶋 聡: バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の致死性予測 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)
- (12) 小野竜一、山本 雄介、成瀬 美衣、田邊 思帆里、吉岡 祐亮、相崎 健一、広瀬 明彦、落谷 孝広、平林 容子、北嶋 聡 cfDNA による毒性評価 第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.29.) 札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

- (13) Ryuichi Ono. Horizontal Gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing. International Congress of Toxicology, Maastricht, October, 2022 (口頭発表; シンポジウムオーガナイザー)
- (14) 小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第118回学術講演会 2022.11.11 長崎 (口頭発表)
- (15) Ryuichi Ono. Toxicity Concerns of Exosome Products. American College of Toxicology, Denver, Novembr, 2022 (invited)
- ⑪ J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, and S. Kitajima: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals: Percellome Project 2022 Update. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.30), San Diego, USA, Poster.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
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4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なった。

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。

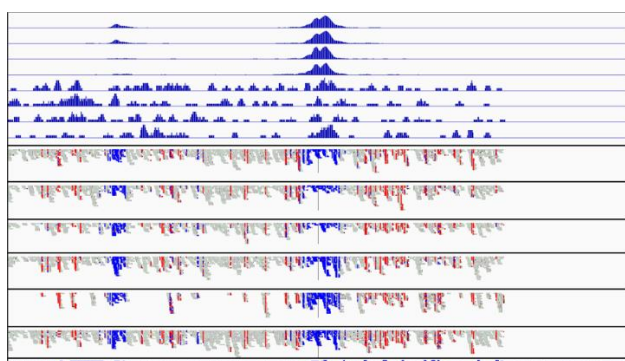


図. エピゲノム解析画像の例

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)

この 3 群の内、化合物の毒性メカニズムを探索するために有意な意味の有る群は **suppression 群** と **induction 群** であるが、**induction 群** の画像の枚数が少なく、最も分類が難しい状況であった。

今回、この **induction 群** に対する訓練画像を増幅することを目的として、深層学習を基盤とした代表的な生成モデルである“Generative adversarial network (GAN)”の実装を行った(参考文献 1)。

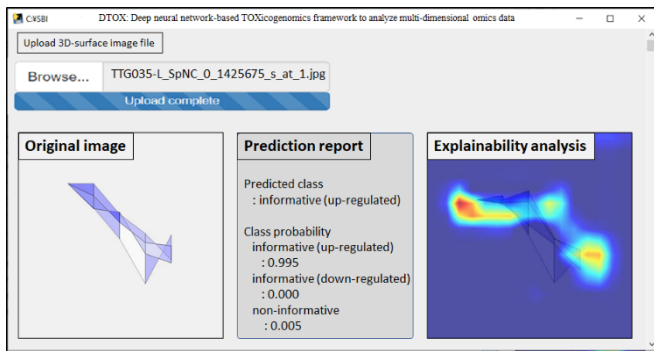
● 転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

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

先行研究で開発した深層学習モデル DTOX については、グラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) を実装し、試用とフィードバックによる改良を継続している。



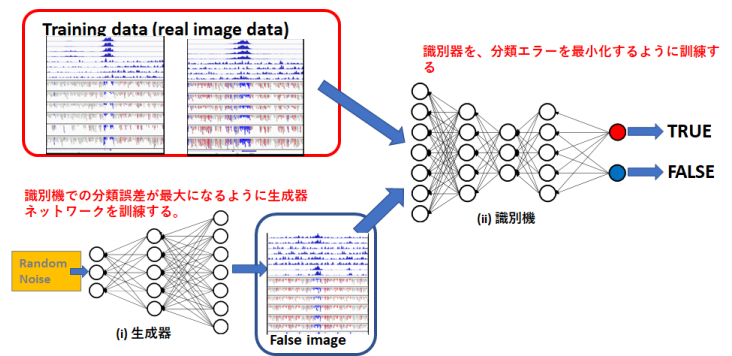
また DTOX に関する成果の原著論文を進めている。

● 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① suppression 群、② induction 群、③ non significant 群の三群に分類することを目的として、先行研究では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結果、構築した分類モデル全てで、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が、induction 群の画像が少なく、分類が難しい状況であった。

今年度はこの induction 群に対する訓練画像を増幅することを目的として、深層学習を基盤とした代表的な生成モデルである“Generative adversarial network (GAN)”の実装を行った。GAN は、下図に示すように、(i)生成器ネットワークと(ii)識別器ネットワークの 2 つのネットワークから構成されている。生成器ネットワークは、ランダムなノイズから偽の画像データを生成する。識別器は偽の画像データと実物の画像データを比較する。比較により、生成器ネットワークによる画像データから、偽の画像を識別する。生成器ネットワークと識別器ネットワークが競い合う様に訓練が進んでいき、最終的に、GAN は実際の画像データと同様の特性を持つ新規の画像を生成可能となる。しかしながら、GAN 自体を訓練するためにも、多くの画像データが必要であるとい

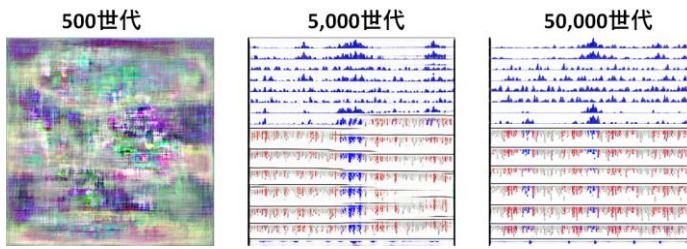
う問題があった。そこで、今回は、GAN の改良版である“Fast GAN”の実装を行った(参考文献 3)。Fast GAN では、識別器ネットワークに AutoEncoder を組み込んだ構造を採用している。その構造の中で、中間層の出力から元の画像を復元する Decoder を追加して、その復元誤差をロスに加えて効率の良い学習を実現しており、少ない訓練画像から、訓練画像と同様な性質を持つ画像を生成出来る。



GAN の構造

今回、昨年度と同様に、我々はエピゲノム画像データを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。これらの深層学習アーキテクチャは、代表的な大規模画像データセット (1000 カテゴリーに分類できる 120 万枚の画像で構成される) である ImageNet dataset を用いてプレトレーニングされたものである。これらを、エピゲノム画像に対して転移学習を行い、分類モデルを構築した。induction 群に対しては、訓練データとして、専門家から提供を受けた 457 枚の実データ画像に加えて、今年度実装を行った生成モデルで生成した画像 6,000 枚も、訓練データとして用いた。

実装した Fast GAN を使用し、induction 群の画像を生成するモデルの構築を行った。今回、生成モデルについて、500 世代、5,000 世代、50,000 世代の訓練を行い、その生成画像の特性について検証を行った (下図)。



Fast GAN による生成画像

図に示すように、500 世代では、ほぼ訓練画像の特徴を捉えられていない。5,000 世代では、訓練画像の主な特徴を捉えられてはいるものの、不鮮明な部分が存在しているが、50,000 世代では、ほぼ完全に訓練画像の特徴をとらえた画像を生成することができた。この結果は、この生成モデルを用いることにより、訓練画像データの生成のために必要であった専門家の労力と時間を、大幅に削減できる可能性があることを示している。

次に、50,000 世代のモデルを使用して、6,000 枚の induction 群の生成画像を生成し、深層学習モデルの訓練に用いた。今回、エピゲノム修飾に関する実データ画像の内の 80%と、生成モデルで生成した画像を、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た。その後、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(下図)。図に示すように、構築した 7 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。しかしながら、構築した 7 種類のモデル全てで、induction 群を分類することが困難であった。

Resnet18

	induction	ns	supression
induction	0	1	91
ns	0	469	1
supression	0	3	1185

Alexnet

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	2	462	6
supression	2	13	1173

Resnet34

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	468	2
supression	0	2	1186

Densenet

	induction	ns	supression
induction	1	1	90
ns	0	467	3
supression	0	2	1186

Resnet50

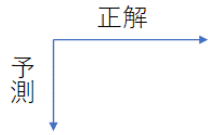
	induction	ns	supression
induction	0	1	91
ns	0	465	5
supression	0	2	1186

Squeezenet

	induction	ns	supression
induction	0	2	90
ns	0	467	3
supression	0	4	1184

Vgg18

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

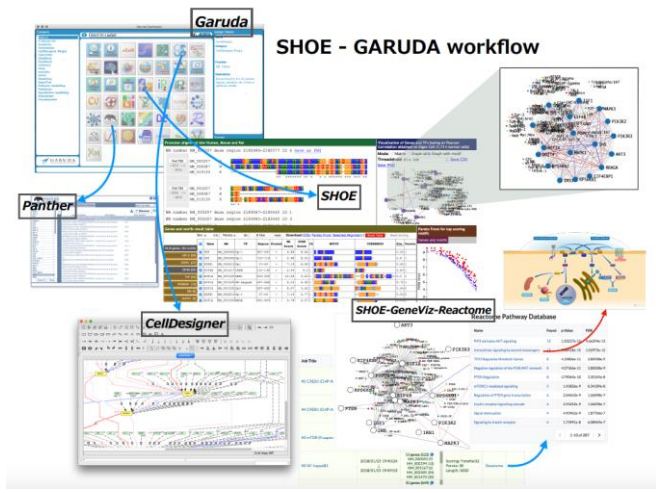


深層学習モデルの予測精度の検証

この結果から、induction 群の訓練画像を増幅するのみでは、これらの深層学習モデルは分類に十分な特徴量を抽出できていないことが示唆された。

●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

今年度は、Garuda Platform 上で、Percellome DB と SHOE の連動をより密にした。下図に連動の概要と、一連の画面を提示する。



SHOE: An interactive visual tool for promoter analysis
Sequence Homology in Eukaryotes

Promoter alignment for Human, Mouse and Rat / Human/Mouse

Visualization of Genes and TFs using Pearson Correlation obtained on Eigen Cell (L714 normal cells)

New 2-sequence alignment analysis visual.
• Will display H/M or H/R
• All other features are the same

Gene	MM	TP	strand	MM Score	MM Score [2]	NCBP	CONDENSED	Size (Peaks)	Select Tissue
ANKRD18B	+	+	+	4.196	2.705	0.000	0.000	0.0	0.0
ANKRD18B	+	+	+	4.196	4.196	0.000	0.000	0.0	0.0
ANKRD18B	+	+	+	4.196	4.196	0.000	0.000	0.0	0.0

また他の Garuda Gadget との連動を強化し、解析パイプラインの構築を進めた。具体的には Garuda Gateway の上で動作連動を行うレシピ機能を利用して、連続的解析の自動化を行なった。これに合わせて SHOE と ACGT の Garuda 登録を進めた。

2. Integration of ChIP-seq Array data into SHOE

SHOE: An interactive visual tool for promoter analysis
Sequence Homology in Eukaryotes

Visualization of Genes and TFs using Pearson Correlation obtained on Eigen Cell (L714 normal cells)

ChIP-seq Array

Garuda: Gateway

New Feature: Can create recipes that allows us to create an automated pipeline for users. Can add different applications or features to pipeline.

Add SHOE and AGCT to Garuda

Garuda page that holds the collection of different application and recipes to download

3. Integration of ChIP-seq Array data into SHOE

SHOE Project Website

Sequence Homology in Higher Eukaryotes

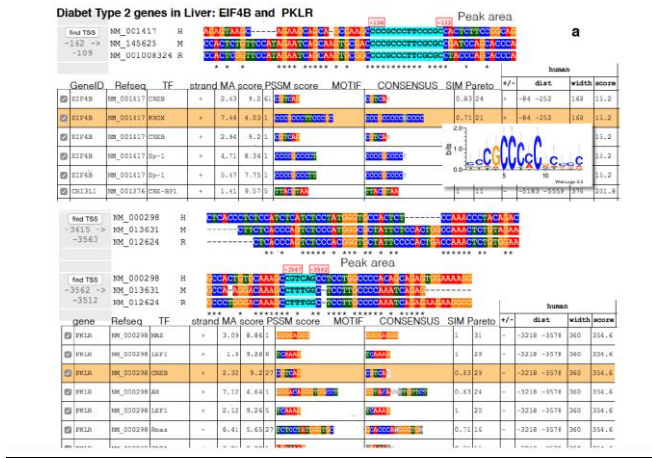
Manual Connection to Garuda Adding ChIP-seq Array Express tissue-specific data

Adding ChIP-seq Array Express tissue-specific data

- Datasets on Human/Mouse/Rat were downloaded from ArrayExpress site <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-437/>
- Data files in gtf format were converted to csv format using R programming language <http://ngdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html>
- Respective Human, HG18/Mouse, mm10/Rat, rn4 genome annotated files were downloaded from GoldenPath database <http://ngdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html>
- Using this script ChIP-seq Array peaks for Liver were mapped to the respective genomes for Human, Mouse and Rat to identify genes closest to ChIP-seq Array peaks.
- Move the result into engine/Issue

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

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



D. 考察

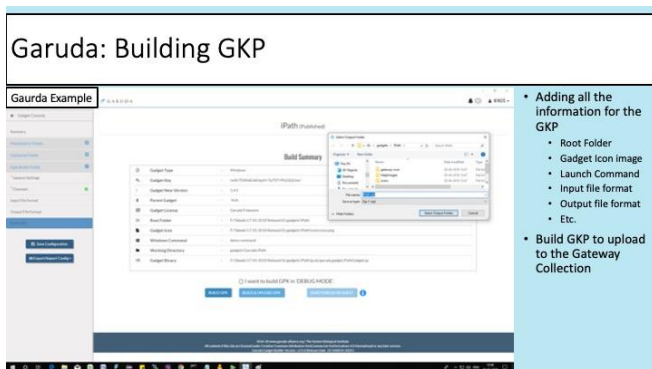
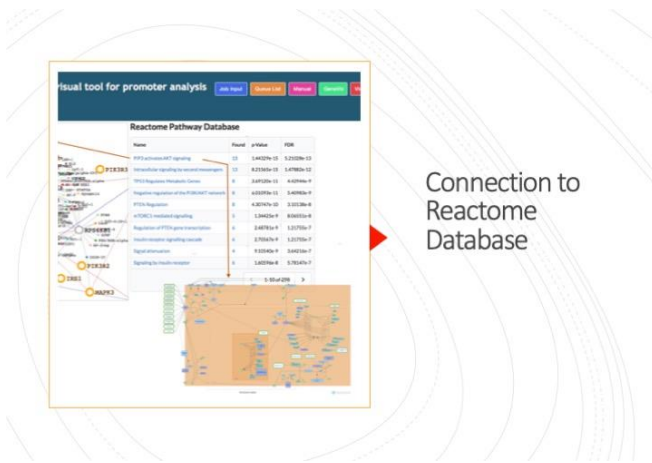
本分担研究においては、独自開発した深層学習遺伝子発現グラフ画像解析システム DTOX においては一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインの精度を大きく上回る性能を達成したことから、深層学習は、大規模データの自動分類に有効であることがわかった。

一方、エピゲノム解析への応用研究については、**induction** 群の訓練用画像の不足から、一部の分類が困難であり、これを解消すべく使用した生成モデル FastGAN が増幅した **induction** 群の訓練画像のみでは、深層学習モデルは分類に十分な特徴量を抽出できていないことが示された。

この原因としては、使用している深層学習アーキテクチャは **Image Net** でプレトレーニングしたものであり、これを転移学習するのみではエピゲノム画像分類に適した特徴量を抽出できていないためであると推察される。そこで、この問題を解決するために、①よりエピゲノム修飾画像に特化したモデルを構築すべく、転移学習ではなく、エピゲノム修飾の訓練画像のみで、一から深層学習モデルをトレーニングする試みと、②より有用な特徴量を抽出することを目的として、言語翻訳 AI で活用されている “attention layer”、特に医療画像分類で高い精度を上げている、attention layer の 1 種である、“soft attention” (参考文献 4) の実装と深層学習モデルへの組み込み、を予定している。

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遺伝子発現解析用 AI の実装ソフトウェアから、深層学習は、大規模データの自動分類に有効であることがわかったが、新たに開始したエピゲノム解析の AI 自動化の試みからは、充分量の訓練用画像が重要であることは当然として、その構



なおクラスター解析に関して今まで使用していた ClustalW がサポート終了のため、ClustalW から Clustal Omega に変更した。

造に関してはさらに精密なデザインが要求されることが分かった。

一方、解析プロセスの自動化については、初期段階であるが、極めて効率的であることが分かった。

今回の成果で、AI を使った高精度解析とその自動化への可能性が明確になり、課題も同定された。今後は、それらの課題の解決を行う。

(参考文献)

1. Ian J. Goodfellow et al. (2014) Generative Adversarial Networks. <https://arxiv.org/abs/1406.2661>
2. Vaswani A et al. (2017) Attention Is All You Need. <https://arxiv.org/abs/1706.03762>
3. Liu B et al. (2021) Towards Faster and Stabilized GAN Training for High-fidelity Few-shot Image Synthesis. <https://arxiv.org/abs/2101.04775>
4. Datta K.S et al. (2021) Soft-Attention Improves Skin Cancer Classification Performance. <https://arxiv.org/abs/2105.03358>

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Natalia Polouliakh, Takeshi Hase, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano: Toxicity Analysis of Pentachlorophenol Data with a Bioinformatics Tool Set. Methods Mol Biol. 2022;2486:105-125.
.[DOI: 10.1007/978-1-0716-2265-0_7]

2. 学会発表

- ① 長谷武志、谷内江綾子、Samik Ghosh、北野宏明: AI 駆動型オミックスデータ解析とそのシステム毒性学・創薬研究への応用. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
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4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。

本分担研究では、新型化学物質有害性評価系の実装に必要な全ゲノム配列を参照するPercellome 解析に最適化された統合ソフトウェアの開発を進める。

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、遺伝子発現データとエピゲノムデータの連携解析ユニットの開発、ゲノムデータ等の表示・解析モジュールのデザインを進めつつ、並行して変動遺伝子の自動抽出パイプラインの改良を実施した。

(*) 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に行う。

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、新型化学物質有害性評価系の実装に必要となる全ゲノム配列を参照する Percellome 解析に最適化された統合ソフトウェアの開発を進める。

B. 研究方法

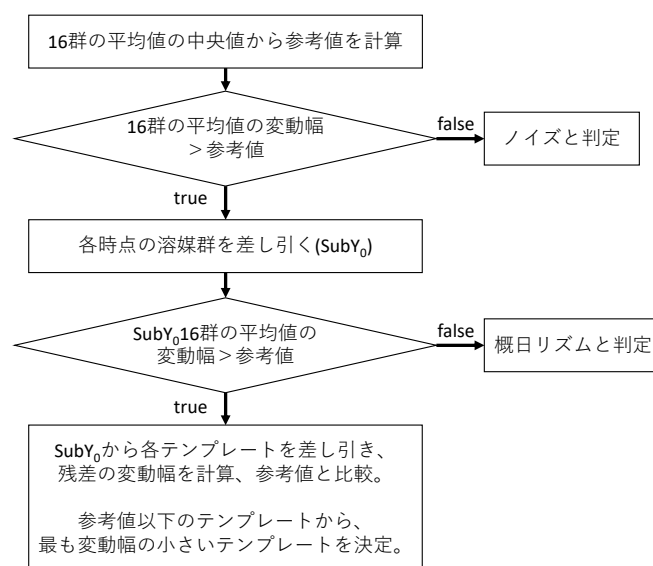
ソフトウェアの in house 開発に際しては、先行研究で開発したソフトウェアの改良の際は開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、Win32/64 開発及び Web アプリケーション開発は RAD (Rapid Application Development) 対応の Delphi (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。データベースエンジンには組込型の DBISAM (USA, Elevate Software, Inc.) を、一般的なグラフ描画には TeeChart (Spain, Steema 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.3.9.1)を用いた。主な解析ライブラリとしては numpy (ver.1.19.5)、pandas (ver.1.2.1)、scikit-learn (ver.1.2.0)を、グラフ描画ライブラリとして matplotlib (ver.3.2.2) を用いた。

C. 研究結果

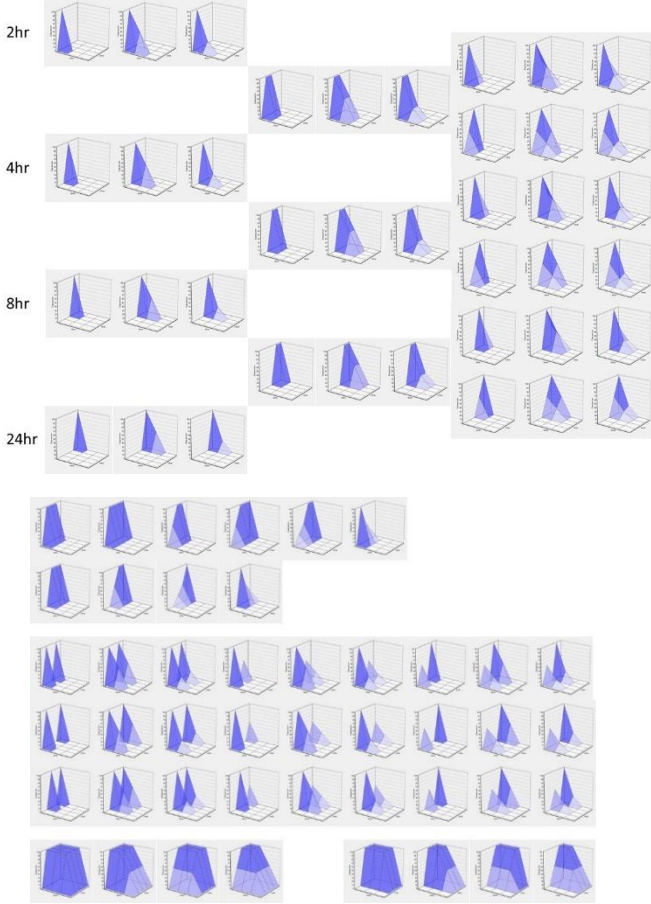
令和 4 年度も最終目標である新型化学物質有害性評価システムの解析コアの主要ユニットとしての、遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発を進めた。研究計画初期のデザインのままでは、解析工程のボトルネック、即ち、化学物質曝露による発現変動遺伝子の抽出作業の効率化が不十分である可能性が浮上したため、新たに遺伝子発現の 3 次元パターン (Surface) の特徴分類アルゴリズムの開発を進めた。

具体的な効率化の内容としては、ノイズパターン除去の強化と、発現パターンからの自動時系列分類である。基本的なアルゴリズムは、①変動幅が参考値以下の Surface のノイズ判定、②溶媒群と投与群の比較による概日リズムパターンの自動判別、及び③時系列パターンや飽和パターンなどの「テンプレート」との比較による自動 (時系列) 分類、から構成される (下図)。



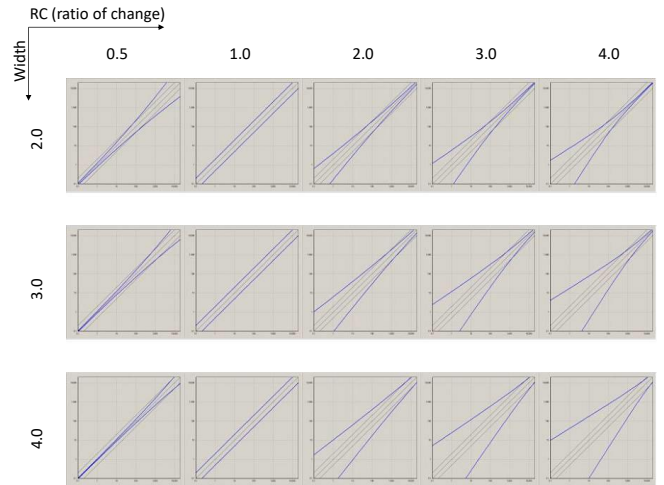
4 用量×4 時点の Surface の基本解析フロー

テンプレートパターン



想定されるテンプレートを用意することにより、発現パターンの自動分類を実現する。ピーク数 1~2、ピーク時点、ピーク幅、立ち上がり方の組み合わせと、飽和パターンを合わせたテンプレート基本セットを示す。

このとき参考値の算出は、単純な fold change ではなく、先行研究で考案した empirical な曲線（実際の Percellome 法により絶対量化した発現値の分散からパラメータを決定する指数関数（下図、Fx 曲線と仮称）を用いた。



対数グラフ上で、パラメータによって曲率に変化する Fx 曲線

例えば、下図のような 8 時間ピークの Surface (赤色で表示)については、概日リズムパターンではない、有意な変動幅を呈するピークであり、8 時間高用量ピークに分類された。

有意な変動を示すパターンの判定例

ProbedID	Au-Av	Au-SGP	Au-Max	Au-Min	Au-MedA	Au-Dif	TC	S	TTC	QS
1483337	45.6128	13.5463	134.8516	53.3056	58.3227	161.5497	TRUE	51.2577		
vehicle	39.0952	4.07623	48.0762	36.5169	36.8623	9.50117				
SubY0	6.52177	21.5083	68.7758	-3.26221	0	62.0390	TRUE			
SubY0-Temporal	Au-Av	Au-SGP	Au-Max	Au-Min	Au-MedA	Au-Dif				
SubY0-T01	0.03881	17.7316	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T02	0.07766	34.4638	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T03	2.42773	131.2424	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T04	0.053881	16.62253	61.8542	-60.4879	3.079136	172.3427	TRUE			
SubY0-T05	0.07766	11.82527	61.8542	-60.4879	3.079136	172.3427	TRUE			
SubY0-T06	2.42773	137.3953	61.8542	-60.4879	3.079136	172.3427	TRUE			
SubY0-T07	0.053881	6.53002	12.10586	-0.18408	3.079136	12.0969	FALSE			
SubY0-T08	0.07766	11.69423	12.10586	-0.17221	3.079136	54.32061	TRUE			
SubY0-T09	2.42773	140.6439	12.10586	-0.18224	3.079136	51.31263	FALSE			
SubY0-T10	0.053881	12.48197	61.8542	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T11	0.07766	34.463	61.8542	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T12	2.42773	130.247	61.8542	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T13	-1.68859	38.6203	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T14	-7.60208	39.8125	61.8542	-62.223	2.784931	184.0778	TRUE			
SubY0-T15	-4.71477	38.39627	61.8542	-62.223	2.784931	184.0778	TRUE			
SubY0-T16	-1.68859	13.98785	12.10586	-62.223	3.079136	104.3796	TRUE			
SubY0-T17	-7.60208	35.64962	12.10586	-62.223	2.784931	184.3796	TRUE			
SubY0-T18	-4.71477	23.96426	12.10586	-62.223	2.784931	104.3796	TRUE			
SubY0-T19	-1.68859	18.07383	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T20	-7.60208	11.84278	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T21	-4.71477	44.29712	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T22	-1.68859	20.56447	12.10586	-60.4879	3.079136	60.6378	TRUE			
SubY0-T23	-7.60208	21.98422	6.009564	-60.4879	2.104624	87.00380	TRUE			
SubY0-T24	-4.71477	10.55783	6.009564	-60.4879	2.104624	87.00380	TRUE			
SubY0-T25	-1.68859	18.24763	61.8542	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T26	-7.60208	18.85887	61.8542	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T27	-4.71477	38.81112	61.8542	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T28	-1.68859	22.243	12.10586	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T29	-7.60208	24.68468	12.10586	-60.7934	3.079136	182.5483	TRUE			
SubY0-T30	-4.71477	13.82759	12.10586	-60.7934	3.079136	102.9493	TRUE			
SubY0-T31	0.07766	13.91136	61.8542	-62.223	3.079136	184.0778	TRUE			
SubY0-T32	-3.53966	31.7719	61.8542	-62.223	2.784931	184.0778	TRUE			
SubY0-T33	-1.40059	24.02425	61.8542	-62.223	2.784931	184.0778	TRUE			

←評価対象

←最も一致率の高いテンプレート

←一致率が比較的高いテンプレート(参考)

D. 考察

統合ツール“Percellome Integrator”の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については、ライブラリの組み込みテストを進めている。

遺伝子発現の3次元パターン(Surface)の特徴分類アルゴリズム開発については、期待されたノイズ除去と自動(時系列)分類の性能を満たしつつある。ノイズ除去が強すぎる傾向があるため、参考値の算出に利用したFx曲線の改良を進めており、現在のところ、パラメータを1つ追加することで、曲率調整の柔軟性を向上させ、過度の足切りが起こらない様にする事に成功している。

現在使用しているRSort(Surfaceの凹凸を解析し、有意な変動を示す候補遺伝子を数的に抽出する)とDTox(北野分担研究者らによるAI。熟練研究者の判定を学習、再現する)で処理した後、研究者による最終的なヒューマンキュレーションの前に、本アルゴリズムの実装フィルターを挿入することで、データ解析工程の大幅な効率化が期待できる。

E. 結論

遺伝子発現データとエピゲノムデータの連携解析ユニットの開発、ゲノムデータ等の表示・解析モジュールのデザインを進めつつ、並行して変動遺伝子の自動抽出パイプラインの改良を行い、統合ツールがより機能的・実用的なものになることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Aisaki KI, Ono R, Kanno J, Kitajima S. [Percellome Project: research on molecular mechanisms of toxicological responses based on transcriptomics and epigenetics]. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2022;157(3):200-206. [doi.org/10.1254/fpj.21122] (Japanese).

(2) 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) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第96回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

② J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

③ 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡 Percellome project からみた毒性 AI の展望. 第49回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演。

④ 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピソードジェネティクスの考察. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(5) 高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑亮、相崎健一、北嶋 聡：バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の致死性予測 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)

(6) 小野竜一、山本 雄介、成瀬 美衣、田邊 思帆里、吉岡 祐亮、相崎 健一、広瀬 明彦、落谷 孝広、平林 容子、北嶋 聡 cfDNA による毒性評価 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.29.) 札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

⑦ J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, and S. Kitajima: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals: Percellome Project 2022 Update. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.30), San Diego, USA, Poster.

⑧ Natsume-Kitatani Y; Aisaki K; Kitajima S; Kanno J「Comparative study of dynamic changes in gene expression profiles induced by PPARα ligands」 ECCB2022 2022/9/18 スペイン

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4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

令和4年度は、既知の PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha) リガンドおよびこれまでの研究成果から PPAR α リガンドであることが示唆されている化学物質（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）に、一部シグナルが重複するフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）とフェノバルビタールを加えた5物質の相互解析を実施し、トランスクリプトーム情報及びエピゲノム情報を利用した効率的な解析モデルの構築を試みた。

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、前年度にも解析対象としていた既知の PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha) リガンドおよびこれまでの研究成果から PPAR α 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）に DEHP（フタル酸ジ（2-エチルヘキシル））及び PB（フェノバルビタール）を加えて遺伝子発現プロファイルの動的

変動を比較し、これら 5 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、化合物曝露が惹起する生体反応のカスケードを推定するワークフロー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、エストラゴール、DEHP または PB 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 Probe ID から遺伝子リストへの変換を行った。各種エンリッチメント解析には、TargetMine および metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1> [5]) を用いた。

C. 研究結果

前年度までの我々の研究により、①バルプロ酸投与によって PPAR α 、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 α 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。Acot (Acyl-CoA thioesterase) といった PPAR α 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 α 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。

以上を踏まえ、当該年度は更に2化合物を追加し、metascapeを用いた遺伝子発現プロファイルの比較解析を行なった。その結果、a)クロフィブラートはPPAR α の他にもPPAR δ 、PPAR γ 、PPARgc1aの活性化を介して幅広く脂質代謝関連遺伝子の発現を亢進させる他、Nrf1やEsrraをも活性化する、b)バルプロ酸ナトリウムは遺伝子発現変動が大きいのが主にE2f1、E2f4の活性化によるものであり、PPAR α も活性化するもののその応答は小さく遅い、c)エストラゴールはPPAR α の活性化を介した遺伝子発現亢進以外にも曝露8時間において脂質代謝に関連する遺伝子などが変動するが、後者はPPAR α 活性化とは別のメカニズムが疑われる、d)DEHPはPPAR α の他にもPPAR δ 、PPAR γ 、PPARgc1aの活性化を介して幅広く脂質代謝関連遺伝子の発現を亢

進させる他、Hif1a、Nfe2l2、Egr1をも活性化する、e)PBは曝露24時間でNrf2、Ahr、Hnf1a、Srebp、Pxrといった様々な核内受容体が活性化する、といった可能性を示唆する結果を得た。

D.考察

前年度の研究では、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。その結果、類似化合物との遺伝子発現プロファイルの比較が毒性発現メカニズム推定において有益であることが見出された。その結果を受けて、当該年度は化合物と曝露時間ごとに発現が変動したprobe IDリストを作成し、遺伝子リストに変換したのちにmetascapeを用いたパターン比較を行なった。その結果、どのタイミングで発現亢進が起こるによって数パターンに分割することが可能であり、そのパターンごとに上流因子解析を行うことで通常のエンリッチメント解析では見逃しがちな生体応答を捉え得る。

E. 結論

既知のPPAR α リガンド、およびPPAR α 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を曝露時間情報を元に分解することにより、時間を追うごとに変動する生体応答を捉え易くなることを確認した。

- [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.
- [5] Zhou, Y., et al. (2019). *Nature communications*, 10(1), 1-10.

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Reiko Watanabe, Toshio Kawata, Shinya Ueda, Takumi Shinbo, Mitsuo Higashimori, Yayoi Natsume-Kitatani and Kenji Mizuguchi: Prediction of the Contribution Ratio of a Target Metabolic Enzyme to Clearance from Chemical Structure Information. *Molecular Pharmaceutics*. 2022; 20(1): 419-426. [doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00698]
- (2) Michiru Otaki, Nozomi Hirane, Yayoi Natsume-Kitatani, Mari Nogami Itoh, Masanori Shindo, Yoichi Kurebayashi and Shin-Ichiro Nishimura: Mouse tissue glycome atlas 2022

highlights inter-organ variation in major N-glycan profiles. *Scientific reports*, 2022; 12: 17804. [doi.org/10.1038/s41598-022-21758-4]

- (3) Sohrab, M. G., Duong, K. N., Masami, I., Topić, G., Natsume-Kitatani, Y., Kuroda, M., ... & Takamura, H. (2022, November). BiomedCurator: Data Curation for Biomedical Literature. In Proceedings of the 2nd Conference of the Asia-Pacific Chapter of the Association for Computational Linguistics and the 12th International Joint Conference on Natural Language Processing: System Demonstrations (pp. 63-71).
- (4) Koji Hosomi, Mayu Saito, Jonguk Park, Haruka Murakami, Naoko Shibata, Masahiro Ando, Takahiro Nagatake, Kana Konishi, Harumi Ohno, Kumpei Tanisawa, Attayeb Mohsen, Yi-An Chen, Hitoshi Kawashima, Yayoi Natsume-Kitatani, Yoshimasa Oka, Hidenori Shimizu, Mari Furuta, Yoko Tojima, Kento Sawane, Azusa Saika, Saki Kondo, Yasunori Yonejima, Haruko Takeyama, Akira Matsutani, Kenji Mizuguchi, Motohiko Miyachi and Jun Kunisawa: Oral administration of *Blautia wexlerae* ameliorates obesity and type 2 diabetes via metabolic remodeling of the gut microbiota. *Nature Communications*,

2022; 13(1): 1-17.

[doi.org/10.1038/s41467-022-32015-7]

(5) Kou Hioki, Tomoya Hayashi, Yayoi Natsume-Kitatani, Kouji Kobiyama, Burcu Temizoz, Hideo Negishi, Hitomi Kawakami, Hiroyuki Fuchino, Etsushi Kuroda, Cevayir Coban, Nobuo Kawahara and Ken J. Ishii: Machine Learning-Assisted Screening of Herbal Medicine Extracts as Vaccine Adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 2022; 13.

[doi.org/10.3389/fimmu.2022.847616]

(6) ロドルフォ セバスチアン アジェンデス オソリオ、夏目やよい「機械学習を用いたアジュバント開発の新潮流」月刊ファインケミカル 2022; 51: 12

(7) 夏目やよい、水口賢司 第2節「生命情報科学からのAI創薬」革新的AI創薬 ～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～ 2022; 15-22, (株) エヌ・ティー・エス

(8) 夏目やよい 第3章 第1節「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」革新的AI創薬 ～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～ 2022; 107-112, (株) エヌ・ティー・エス

(9) 上田修功、夏目やよい 第5章 第3節「サブセット・バインディングによる患者層別化AIの開発」革新的AI創薬 ～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～ 2022; 235-244, (株) エヌ・ティー・エス

(10) 中村 恵宣、北村 英也、小倉高志、夏目やよい、水口賢司 官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM) で構築する特発性肺線維症に対する創薬標的探索プラットフォームについて *MEDCHEM NEWS* 32(3) 119-123 (2022)

2. 学会発表

(1) 原侘奈; 武田吉人; 足立淳; 夏目やよい; 伊藤眞里; 熊ノ郷淳 「エクソソームの次世代プロテオミクスによる線維化性過敏性肺炎の新規バイオマーカー開発」第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/22 京都

(2) 網屋沙織; 武田吉人; 榎本貴俊; 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 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都

- (3) 白井雄也; 武田吉人; 榎本貴俊; 足立雄一; 網屋沙織; 野田成美; 菅泰彦; 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 "PRISM" data reveal fibrotic biomarkers」第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都
- (4) 夏目やよい; 伊藤眞里; 松村泰志; 武田吉人; 足立淳; 熊ノ郷淳; 水口賢司; 上田修功「患者層別化 AI による特発性肺線維症の創薬標的提示に向けて」第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都
- (5) 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; 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り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 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都
- (6) 夏目やよい「診察情報とオミックスデータを用いたデータ駆動的な患者層別化と創薬標的探索」, 「新薬創出を加速する症例データベースの構築・拡充／創薬ターゲットの推定アルゴリズムの開発」令和3年度成果報告会 2022/5/12 オンライン
- (7) 夏目やよい「診察情報とオミックスデータを用いたデータ駆動的な患者層別化と創薬標的探索 ～特発性肺線維症を例として～」第 4 回メディカル AI 学会学術集会 2022/6/10 宮城
- (8) 夏目やよい; 伊藤眞里; 松村泰志; 武田吉人; 足立淳; 熊ノ郷淳; 水口賢司; 上田修功「診療情報と紐付けられたプロテオームデータによる特発性肺線維症を対象としたデータ駆動的創薬標的探索」第 70 回質量分析総合討論会 2022/6/22 福岡
- (9) 夏目やよい「臨床情報を用いたデータ駆動的な創薬標的探索」FRONTIERS OF ENGINEERING JAPAN 2022/6/24 長崎
- (10) 夏目やよい「診療情報とオミックスデータを用いたデータ駆動的創薬標的探索 ～特発性肺線維症に対する挑戦～」第 49 回日本毒性学会学術年会 2022/7/2 北海道
- (11) 吉村華子; 武田吉人; 榎本貴俊; 原伶奈; 菅泰彦; 川崎貴裕; 三宅浩太郎; 白山敬之; 平田陽彦; 小山正平; 長友泉; 岩堀幸太; 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気管支喘息 T2 炎症の新規 BM 開発」第 43 回日本炎症・再生医学会 2022/7/6 兵庫
- (12) Yayoi Natsume-Kitatani, Mari N Itoh, Yoshito Takeda, Masataka Kuroda,

Haruhiko Hirata, Kohtarō Miyake, Takayuki Shiroyama, Yuya Shirai, Yoshimi Noda, Yuichi Adachi, Takatoshi Enomoto, Saori Amiya, Jun Adachi, Ryohei Narumi, Satoshi Muraoka, Takeshi Tomonaga, Sadao Kurohashi, Fei Cheng, Ribeka Tanaka, Shuntaro Yada, Eiji Aramaki, Shoko Wakamiya, Yi-An Chen, Chihiro Higuchi, Yosui Nojima, Takeshi Fujiwara, Chioko Nagao, Toshihiro Takeda, Yasushi Matsumura, Kenji Mizuguchi, Atsushi Kumanogoh, Naonori Ueda「Data-driven patient stratification and drug target discovery by detecting paired itemsets from medical information and omics data」ISMB2022 2022/7/11 アメリカ

(13) Yayoi Natsume-Kitatani「Inference of mechanisms of toxicity from omics data」The Open Tox 2022 Virtual Conference 2022/9/12 オンライン

(14) Rodolfo S. Allendes Osorio; Johan T. Nystroem-Persson; Yuji Kosugi; Kenji Mizuguchi; Yayoi Natsume-Kitatani「Panomicon, allowing hetero-geneous multi-omics analysis on the web」ECCB2022 2022/9/18 スペイン

(15) Natsume-Kitatani Y; Aisaki K; Kitajima S; Kanno J「Comparative study of dynamic changes in gene expression profiles induced by PPARα ligands」ECCB2022 2022/9/18 スペイン

(16) 夏目やよい「新薬創出を加速させるAIの開発」第81回日本癌学会学術総会 2022/9/29 神奈川

(17) 夏目やよい「診療情報と生体分子の測定データから薬の標的を探し出すために」ABCI Uer Group ウェビナー 2022/10/14 オンライン

(18) 伊藤眞里; 足立淳; 武田吉人; 黒田正孝; 朝長毅; 武田理宏; 松村泰志; 夏目やよい; 水口賢司; 熊ノ郷淳「新薬創出を加速する人工知能の開発」特発性肺線維症患者血清中エクソソーム内プロテオームと診療情報を用いるデータ駆動的創薬標的の探索」第9回日本細胞外小胞学会学術集会 2022/10/25 東京

(19) Mari N Itoh; Yayoi Natsume-Kitatani; Masataka Kuroda; Jun Adachi; Yi-An Chen; Kenji Mizuguchi; Yoshito Takeda; Atsushi Kumanogoh; Naonori Ueda「Artificial Intelligence to Accelerate New Drug Discovery: Target identification and drug discovery by data-driven approach and experimental validation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)」CBI 学会 2022年大会 2022/10/25 東京

(20) 夏目やよい「診療情報の利活用とデータ駆動的創薬標的探索」MD-DSC研究会 2022/11/4 オンライン

(21) 渡邊怜子; 河田敏生; 上田真也;
新保拓未; 東森光雄; 夏目やよい; 水口
賢司「化学構造情報を用いた代謝酵素の
クリアランスへの寄与率予測モデルの構
築」日本薬物動態学会第 37 回年会
2022/11/8 神奈川

(22) 樋口千洋; 黒田正孝; 伊藤眞里;
長尾知生子; 水口賢司; 夏目やよい
「PRISM 成果利用システム「峰」の構築」
第 42 回 医療情報学連合大会 (第 23
回日本医療情報学会学術大会)
2022/11/20 北海道

(23) 黒田正孝; 伊藤眞里; 夏目やよ
い; 鎌田英世; 深川明子; 武田吉人; 武
田理宏; 松村泰志; 北村 英也; 丹羽崇;
岩澤多恵; 高橋陽子; 荒牧英治; 黒橋
禎夫; 水口賢司; 小倉 高志; 熊ノ郷淳
「臨床データの匿名加工情報作成に向け
た検討-新薬創出を加速する人工知能の
開発におけるデータ利用促進に向けて-」
第 42 回 医療情報学連合大会 (第 23
回日本医療情報学会学術大会)
2022/11/20 北海道

②④ 夏目やよい「トランスクリプトーム
データを用いた毒性発現メカニズムの推
定」第 5 回医薬品毒性機序研究会
2022/12/9 東京

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Mohammad Golam Sohrab, Khoa N.A. Duong, Ikeda Masami, Goran Topić, <u>Yayoi Natsume-Kitatani</u> , Masakata Kuroda, Mari Nogami Itoh, Hirova	BiomedCurator: Data Curation for Biomedical Literature	Maria Liakata, Wray Buntine	Proceedings of the 2nd Conference of the Asia-Pacific Chapter of the Association for Computational Linguistics and the 12th International Joint Conference on Natural Language Processing: System Demonstrations	Association for Computational Linguistics	Stroudsburg, USA	2022	63-71
<u>夏目やよい</u> 、水口賢司	第2節「生命情報科学からのAI創薬」	小長谷明彦	革新的AI創薬～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～	(株)エヌ・ティー・エス	東京	2022	15-22
<u>夏目やよい</u>	第3章 第1節「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」	小長谷明彦	革新的AI創薬～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～	(株)エヌ・ティー・エス	東京	2022	107-112
上田修功、 <u>夏目やよい</u>	第5章 第3節「サブセット・バイインディングによる患者層別化AIの開発」	小長谷明彦	革新的AI創薬～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～	(株)エヌ・ティー・エス	東京	2022	235-244

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
Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Masako Saito, Kunihiro Otsuka, Yusuke Furukawa, Yuhji Taquahashi, <u>Jun Kanno</u> , Naozumi Ishimaru	Exposure to Multiwall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF-κB Activation in Chronic Peritonitis.	Am J Pathol.	192	1559-1572	2022
Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, <u>Satoshi Kitajima</u> , <u>Jun Kanno</u> , Kentaro Tanemura	Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice.	J. Toxicol. Sci.	48	211-219	2022
Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and <u>Satoshi Kitajima</u>	Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system	J. Toxicol. Sci.	48	57-64	2023
Seiya Kanno, Yusuke Okubo, Tatsuto Kageyama, Lei Yan, <u>Satoshi Kitajima</u> , Junji Fukuda	Establishment of a Developmental Toxicity Assay based on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption.	iScience.	25	103770	2022

相崎 健一, 小野 竜一, 菅野 純, 北嶋 聡	Percellomeプロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求～	日本薬理学雑誌	157	200-206	2022
Yuhji Taquahashi, Shuji Tsuruoka, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, <u>Ken-ich Aisaki</u> , <u>Satoshi Kitajima</u>	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.	9	17-21	2022
Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Ahmed M. El-Gazzar, Mohamed Abdelgied, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Randa Hussein Abd el Hady, Katsumi Fukamachi, <u>Jun Kanno</u> , Akihiko Hirose, Jiegou Xu, Shugo Suzuki, Aya Naiki-Ito, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda	Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study.	Part Fibre Toxicol.	19	30	2022

Motoki Hojo, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Yukie Tada, Yukio Yamamoto, Kiyomi Ikushima, Ryota Inaba, Jin Suzuki, Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Norihiro Kobayashi, Makoto Ohnishi, Yuko Goto, Takamasa Numano, Hiroyuki Tsuda, David B. Alexander, <u>Jun Kanno</u> , Akihiko Hirose, Akiko Inomata and Dai Nakae	Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats.	Part Fibre Toxicol.	19	38	2022
Shihori Tanabe, Sabina Quader, <u>Ryuichi Ono</u> , Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki	Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer	Fundam. Toxicol. Sci.	9	37-46	2022
Shihori Tanabe, Sabina Quader, <u>Ryuichi Ono</u> , Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Edward J. Perkins, Hiroshi Yokozaki and Hiroki Sasaki	Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction	Onco	3	13-25	2023
<u>Natalia Polouliakh</u> , <u>Takeshi Hase</u> , Samik Ghosh, <u>Hiroaki Kitano</u>	Toxicity Analysis of Pentachlorophenol Data with a Bioinformatics Tool Set.	Methods Mol Biol.	2486	105-125	2022
Reiko Watanabe, Toshio Kawata, Shinya Ueda, Takumi Shinbo, Mitsuo Higashimori, <u>Yayoi Natsume-Kitatani</u> and Kenji Mizuguchi	Prediction of the Contribution Ratio of a Target Metabolic Enzyme to Clearance from Chemical Structure Information.	Molecular Pharmaceutics.	20	419-426	2022

Michiru Otaki, Nozomi Hirane, <u>Yayoi Natsume-Kitatani</u> , Mari Nogami Itoh, Masanori Shindo, Yoichi Kurebayashi and Shin-Ichiro Nishimura	Mouse tissue glycome atlas 2022 highlights inter-organ variation in major N-glycan profiles.	Scientific reports	12	17804	2022
Koji Hosomi, M ayu Saito, Jongu k Park, Haruka Murakami, Naok o Shibata, Masa hiro Ando, Taka hiro Nagatake, K ana Konishi, Har umi Ohno, Kum pei Tanisawa, At tayeb Mohsen, Yi-An Chen, Hit oshi Kawashima, <u>Yayoi Natsume-Kitatani</u> , Yoshim asa Oka, Hidenori Shimizu, Mari Furuta, Yoko T ojima, Kento Sa wane, Azusa Sai ka, Saki Kondo, Yasunori Yonej ima, Haruko Tak eyama, Akira M atsutani, Kenji Mizuguchi, Moto hiko Miyachi an d Jun Kunisawa	Oral administration of Bl autia wexlerae ameliorate s obesity and type 2 dia betes via metabolic remo deling of the gut microbi ota. Nature Communicati ons	Nature Communi cations	13	4477	2022
Kou Hioki, Tom oya Hayashi, <u>Ya yoi Natsume-Kit atani</u> , Kouji Kob iyama, Burcu Te mizoz, Hideo Ne gishi, Hitomi Ka wakami, Hiroyuk i Fuchino, Etsus hi Kuroda, Ceva yir Coban, Nobu o Kawahara and Ken J. Ishii	Machine Learning-Assiste d Screening of Herbal M edicine Extracts as Vacci ne Adjuvants.	Front. Immunol.	13	847616	2022

ロドルフォ セ バスチアン ア ジェンデス オ ソリオ、 <u>夏目 やよい</u>	機械学習を用いたアジュ バント開発の新潮流	月刊ファインケ ミカル	51	12	2022
中村 恵宣、北 村 英也、小倉 高志、 <u>夏目やよ い</u> 、水口賢司	官民研究開発投資拡大プ ログラム (PRISM) で構 築する特発性肺線維症に 対する創薬標的探索プ ラットフォームについて	MEDCHEM NEWS	32	119-123	2022

令和5年3月30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4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・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) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和5年3月30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4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) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

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4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) 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) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input 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。

令和5年3月30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4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・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。

令和5年 4月 3日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立研究開発法人
医薬基盤・健康・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4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。