

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)

総合研究報告書

研究代表者 相崎 健一

令和6(2024)年 5月

目 次

I. 総合研究報告 トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による 新型化学物質有害性評価系の実装研究 相崎 健一	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	65

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

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、毒性の分子生物学的機序に基づいて、現行の不確実係数（安全係数）を利用する数量的な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する。方法として、マイクロアレイ（GeneChip）と次世代シーケンサを用いて分子生物学的な情報の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の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た。

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**による情報の蓄積により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した網羅的情報をデータベースに反映することにより、評価系の解析精度を向上させる。既に構築済みの単回曝露実験のデータベースと共にこれを利用することで、現状で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と効率化を検証した。

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

本研究班の進捗は以下の通り。

- (1) の令和3年度には、ペルフルオロオクタン酸（PFOA）の単回曝露、及び、4日間

の新型反復曝露の2実験（以下、PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]と表記）を実施し、遺伝子発現解析を進めて単回曝露、反復曝露に共通の要素と各々の曝露条件に特徴的な要素を抽出した。PFOA[0+1]及びPFOA[4+1]の遺伝子発現誘導は、2時間目の誘導遺伝子数が少なく、24時間目に向けてその数が増加することが示された。基本的にPPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ を上流にもつ遺伝子が誘導されたが、2時間目に誘導された遺伝子には、NR1H2 (PXR)、あるいは、immediate early genes (IEG)の発現機構にかかわるシグナルの関与が示唆された。8時間以降は、PPARの下流の因子、SCL27A2などを介した系の動員が示唆された。また、Gadd45bをはじめ、DNA障害、RNA障害、タンパク合成障害、等、を示唆する反応が見られた。24時間目に向けて、癌関連、ユビキチン関連、及びNRF2系が含まれていた。この中にCAR下流のCyp2B10も含まれ、それらの誘導までの8時間以上の潜伏期の存在が注目された。これらに加え、PFOA[4+1]においては、Sirtuinシグナル、ミトコンドリア障害などの系の動員が示唆された。また、4日間の反復により発現が有意に低下した119の遺伝子を解析した結果、HOTAIR (long non-coding RNA) 制御回路、14-3-3回路などへの影響が示唆され、遺伝子発現、及び、タンパク合成機構への広範な影響の可能性が示唆された。

(1)の令和4年度には、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。

(1)の令和5年度には、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(DEHP)、プロモベンゼン(BrBenz)および2-ビニルピリジン(2-VP)の4日間の新型反復曝露（以下、[4+1]と表記）の遺伝子発現解析を実施し、単回曝露[0+1]と共通の要素と異なる要素の抽出、及び、基線反応の増減に関わる要素を抽出した。

DEHP[4+1]は、同じくPPARのリガンドとして知られる前年度のestragoleとは基線反応に対する影響が異なっていた。DEHP[4+1]はPPAR下流の遺伝子の基線反応を下げることを示唆され、これはestragole[4+1]とは逆の方向であった。肝発がん性を示唆する点では共有であった。

BrBenz[4+1]は、タンパク質翻訳に関わる遺伝子群(真核生物翻訳開始因子(Eif: eukaryotic translation initiation factor))の強力な抑制効果を発揮することが示された。この作用により肝、および、翻訳に関する機作に共通性を有する諸臓器に対する広範な毒性を発揮するこ

とが考察された。

2-VP[4+1]は、GCR (Glucocorticoid receptor)、NRF2 系、グルタチオン、チオレドキシニン系、PPAR α による脂質代謝、PXR、AhR、CAR を介しての広範な標的に対する酸化的ストレスに対抗する因子の増強を誘導することが示唆された。2-VP で報告されている中枢毒性に対する予測に関しては、Percellome database に収録されている神経毒性物質との比較検討を進めるが、肝において神経関連の遺伝子の発現抑制を確認することが可能であった。

いずれも、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、単回曝露とは異なった広範囲な変化が誘発されることを明らかにすることが出来た。反復投与により活性化、あるいは抑制された遺伝子群の網羅的な分析とメタデータを組み合わせることにより短期試験の結果から慢性毒性への外挿の可能性が示唆された。

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

(2)の令和4年度には、化学物質の反復投与においては、溶媒も反復投与されることから、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と判断し、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、溶媒影響が有意に認められことが明らかとなりサリドマイドの反復曝露影響によるデータを補正する必要があり、また補正が可能であることが示された。

(2)の令和5年度には、メチルセルロース14日間反復曝露のヒストン修飾解析の追加解析を行い、令和4年度発見したCyp遺伝子群での変化に加え、Car遺伝子群など、他の遺伝子領域においても有意な変化が確認された。他方、サリドマイド影響の可逆性検討のため、サリドマイド14日間反復曝露、15日目から14日間無処置の休薬期間を置いた実験を実施したところ、サリドマイドの明らかなエピジェネティクス影響は、休薬することで、元に戻ることが明らかになった。

(3)では、令和3年度から令和5年度を通して、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、それによって更に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。加えて全ゲノム領域のヒストン修飾及びDNAメチル化を画像(*in visio*手法)を用いて自動判別する技術の開発を進めた。また転写制御解析ツールSHOEの改良を実施し、遺伝子発現データとヒストン修飾などエピゲノム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。令和3年度には、解析ユニット構築に使用するライブラリの選定を進めつつ、本ユニットの基本情報となる GeneChip プロブセット 4 万 5 千件のマウスゲノム配列(mm10)上へのマッピングを実施した。令和4年度には、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実施した。令和5年度には、解析モジュールのデザインを終え、コンセプトモデルを作成した。また変動遺伝子の自動抽出パイプラインの改良を継続し、基準となるテンプレートコレクションの充実を図った。

(5) の令和3年度には、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3種 (クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウム、エストラゴール) の遺伝子発現プロファイルの動的変動を比較し、これら3種に共通するパターンや固有に認められるパターンを検出することにより、Perccellome データの効果的な活用方法を検討した。

(5) の令和4年度には、既知の PPAR α 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。

(5) の令和5年度には、既知の Ahr (Aryl hydrocarbon receptor) リガンドである TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) と、同様の遺伝子発現変動を示す化学物質として複数のタール色素(赤色 225 号、501 号、505 号)を選択し、その遺伝子発現プロファイルの比較解析を実施し、タール色素によるシグナル変動を解析すると共に、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解析モデルの構築・評価を進めた。

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た次の日の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。最終曝露後に生じる早い変動を過渡反応 (Transient Response) 、反復曝露で引き起こされるベースラインの上昇、或いは、低下を基線反応 (Baseline Response) と定義した。

研究分担者

- 北野 宏明 特定非営利活動法人
システム・バイオロジー研究機構
会長
- 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部 部長
- 夏目やよい 国立研究開発法人医薬基盤・健康・
栄養研究所 バイオインフォマ
ティクスプロジェクト
プロジェクトリーダー
- 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部 客員研究員

研究協力者

- 小野 竜一 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部 第五室 室長
- 長谷 武志 特定非営利活動法人
システム・バイオロジー研究機構
- Natalia Polouliakh 株式会社ソニーコンピュータ
サイエンス研究所

A. 研究目的

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

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8 億 5 千万遺

伝子発現情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベースと単回曝露及び反復曝露の毒性ネットワーク解析技術を基盤に、これらを維持・拡充しつつ、さらに臓器別のゲノム DNA メチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシコロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

B. 研究方法

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

●試薬及び動物：

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA: Pentadecafluorooctanoic Acid; 分子量：414.07、Cas No.: 335-67-1、純度 99.7%、東京化成工業 (株)) について、単回曝露 (0 日間反復曝露後に単回曝露、以降、PFOA[0+1]と表記) 及び 4 日間「新型」反復曝露 (4 日間反復曝露後に単回曝露、以降、PFOA[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。PFOA の単回曝露時の用量は 0、1、3、10 mg/kg とし、4 回反復曝露の用量は 0.1mg/kg、最終の単回曝露の用量は[0+1]実験と同様に 0、1、3、10 mg/kg とした。溶媒はコーンオイル (C8267、Sigma-Aldrich) とした。

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、Estragole[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。溶媒はコー

ンオイル (C8267、Sigma-Aldrich) 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、DEHP[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。DEHP の 4 回反復曝露の用量は 200mg/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、200、700、2,000 mg/kg とした。溶媒はコーンオイル (C8267、Sigma-Aldrich) とした。

ブロモベンゼン (Bromobenzene(BrBenz)、分子量: 157.01、Cas No.: 108-86-1、純度 98%以上、富士フィルム和光純薬 (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、BrBenz[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。BrBenz の 4 回反復曝露の用量は 50mg/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、7、20、70 mg/kg とした。溶媒はコーンオイル (C8267、Sigma-Aldrich) とした。

2-ビニルピリジン(2-Vinylpyridine(2-VP)、分子量: 105.14、Cas No.: 100-69-6、純度 97%以上、富士フィルム和光純薬 (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、2-VP[4+1]と表記) のプロトコルにて実施した。2-VP の 4 回反復曝露の用量は 200mg/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、20、70、200 mg/kg とした。溶媒は 0.5%メチルセルロース (MC) (133-14255、富士フィルム和光純薬 (株)) 水溶液とした。

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、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°C で一晩浸漬し、RNase を不活化した。その後、RNA 抽出操作までは -80°C にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 µL を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

●GeneChip 解析 :

全 RNA 5 µg を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモータが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。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、令和 5 年度研究対象サンプルとしては、サリドマイド影響の可逆性検討のため、サリドマイド (700mg/kg) を 14 日間反復投与した後、15 日目から 14 日間無処置、29 日目に溶媒 (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 μ g) を材料として、1) 4 μ l (30 μ g) の抗ヒストン H3K4me3 抗体 (Active Motif, cat # 39159) (H3K4me3: 転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 4 トリメチル化)、2) 4 μ l (30 μ g) の H3K27Ac3 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac3: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、3) 4 μ l (30 μ g) の H3K27me3 抗体 (Active Motif, cat # 39155)

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

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

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

●深層学習を用いたエピゲノム解析データからの有

有意なエピゲノム修飾の判別

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

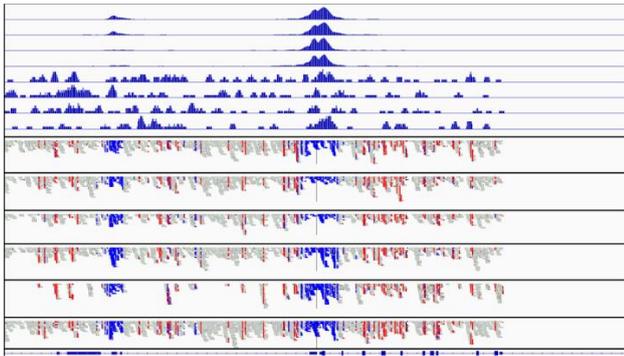


図. エピゲノム解析画像の例
上から8行で示される分布がクロマチン修飾の状況を表しており、下から8行のプロットがメチル化の状況を表している。横軸は配列の位置を表している。メチル化については、青いプロットがメチル化されていない状態を表している。

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

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

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

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

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

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

●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

SHOE の開発は、Java 言語 (USA, Oracle Inc.) で行った。Garuda Platform 用ソフトウェア (Garuda ガジェット) の開発や他の Garuda ガジェットとの連動については、GarudaDevPack を使用した。性能評価や試験運用には、Percellome データベースより実際の化学物質曝露による遺伝子発現時系列データを用いた。

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

ソフトウェアの in house 開発に際しては、先行研究で開発したソフトウェアの改良の際は開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、Win32/64 開発及び Web アプリケーション開発は RAD (Rapid Application Development) 対応の Delphi (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。データベースエンジンには組込型の DBISAM (USA, Elevate Software, Inc.) を、一般的なグラフ描画には TeeChart (Spain, Steema Software SL) を利用した。新たに開発するソフトウェアについては、ライブラリが充実している Python (ver.3.6.9)を用いた。主な解析ライブラリとしては numpy (ver.1.19.4)、pandas (ver.1.1.5)、scikit-learn (ver.0.22.2.psot1)を用いた。

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

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

●解析データ：

令和3年度は、クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウムまたはエストラゴールを曝露したマウスの肝における遺伝子発現プロファイルを使用した。

令和4年度は、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。

令和5年度は、TCDD、タール色素である赤色225号、赤色501号、赤色505号のいずれか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。

具体的には、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%)、TCDD(0, 1.23, 3.70, 11.11, 33.33 µg/kg、溶媒：コーンオイル)、赤色225号(0, 30, 100, 300 mg/kg、溶媒：コーンオイル)、赤色501号(0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：コーンオイル)、赤色505号(0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：コーンオイル)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>)を用いてエンリッチメント解析を行った。分割した遺伝子リスト間の重複を可視化する為に intervene (<https://asntech.shinyapps.io/intervene>)を用いてベン図を作成した。

倫理面への配慮

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

C. 研究結果

当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。

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

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

① PFOA[0+1] (実験コードTTG243-L)

単回曝露後、2、4、8、24時間目に増加を開始した遺

伝子の数は、それぞれ 32、179、167、503 であった。
 PFOA は PPAR α のリガンドであることが知られており、2 時間目の 32 遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR δ 及び PPAR α を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Acot1、Pdk4、Plin2 等、図 R3-1)。

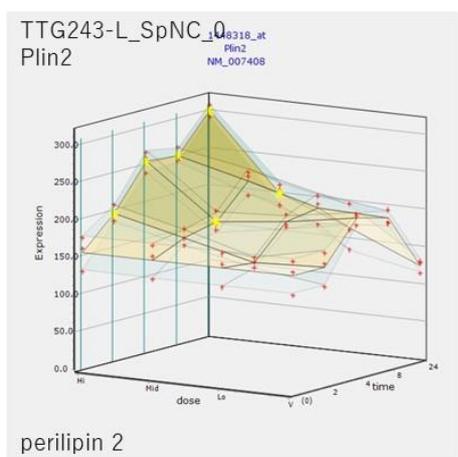
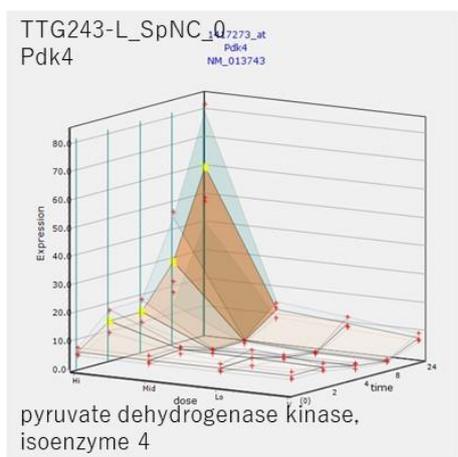
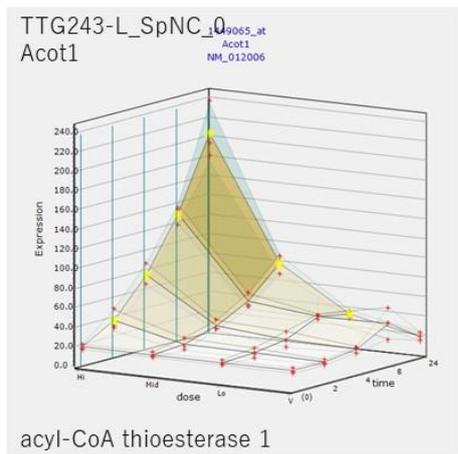


図 R3-1 Acot1、Pdk4、Plin2

先行研究において解析した PPAR α のリガンドであるクロフィブラートの遺伝子リストとの差分を解析すると、2 時間目の遺伝子群には、PPAR α の下流以外に、Dusp1 などの immediate early gene (IEG) の系のシグナルが起動していることも示された (Dusp1、Jun 等、図 R3-2)。

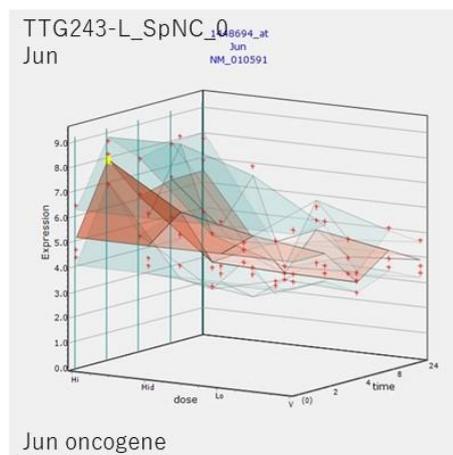
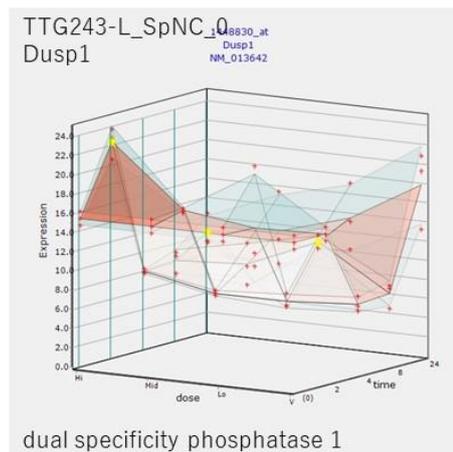


図 R3-2 Dusp1、Jun

4 時間目に誘導開始された 179 遺伝子には、PPAR α 、PPAR δ 、及び PPAR γ の下流のものが多く含まれていた。(Acot2、Acot8 等、図 R3-3)。

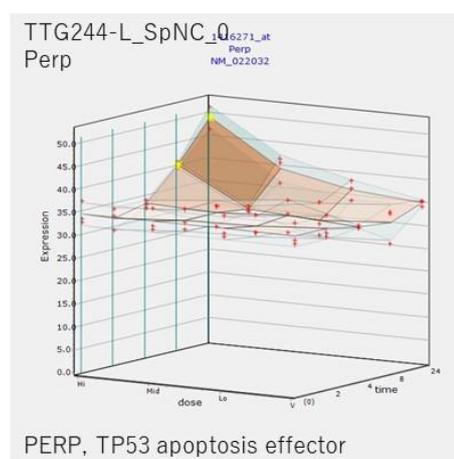
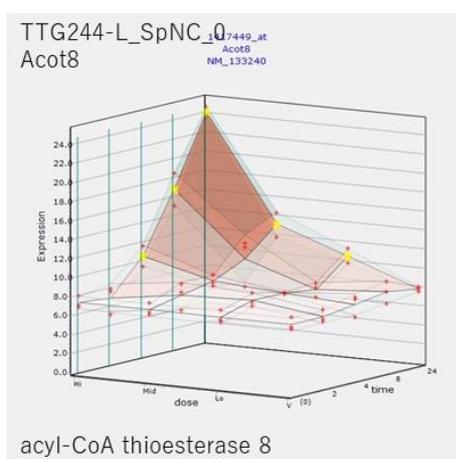
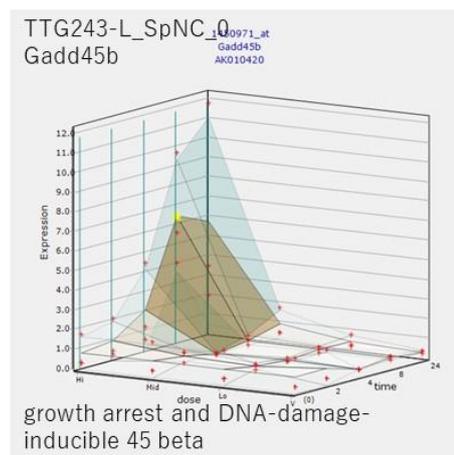
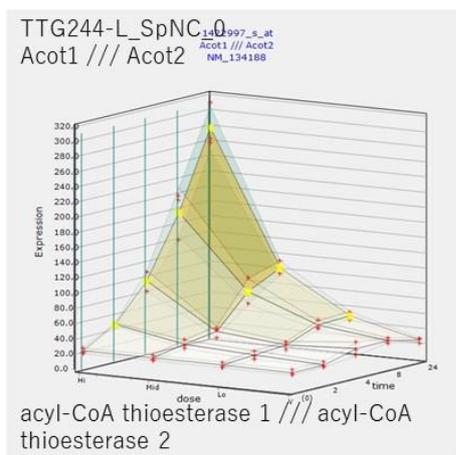


図 R3-3 Acot2、Acot8

8 時間目に誘導開始された 167 遺伝子は、PPAR α の下流の SCL27A2 などの因子の下流に位置する遺伝子のほか、TGF β 1 の下流の遺伝子、DNA、RNA、タンパクに対する傷害に反応する系の遺伝子が含まれていることが示唆された (Gadd45b、Perp、Abcg2 等、図 R3-4)。

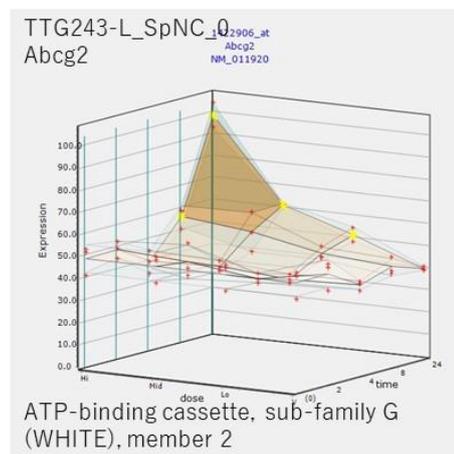


図 R3-4 Gadd45b、Perp、Abcg2

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

た (Cyp2b10、Gsr、Gstm4、Nfe2l2 等、図 R3-5)。

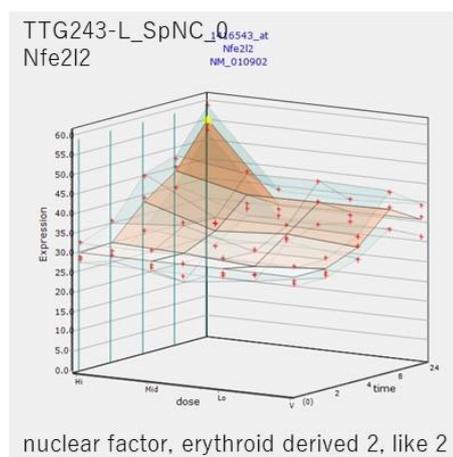
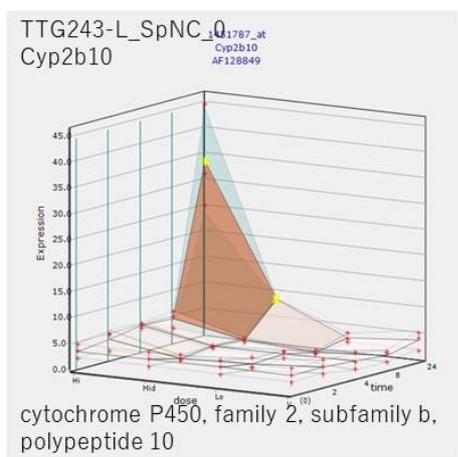
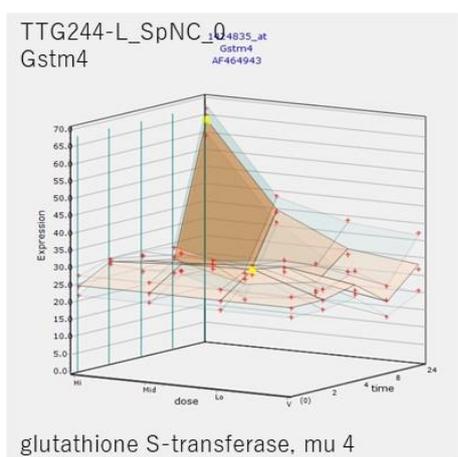
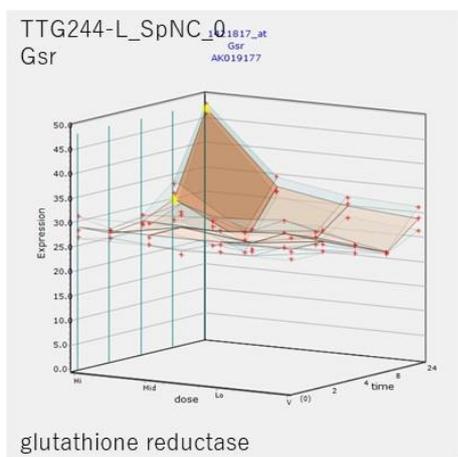


図 R3-5 Cyp2b10、Gsr、Gstm4、Nfe2l2



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

② PFOA[4+1] (実験コード TTG244-L)

最終曝露終了後、2、4、8、24 時間目に発現増加を開始した遺伝子の数は、22、127、751、581 であった。2 時間目には、PXR 下流、TNF 下流の遺伝子が含まれていた (ALAS1、TXNIP 等、図 R3-6)。

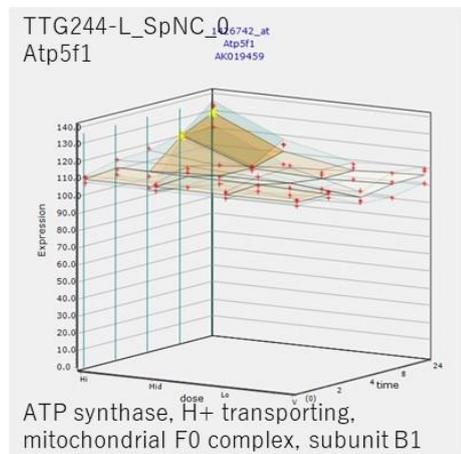
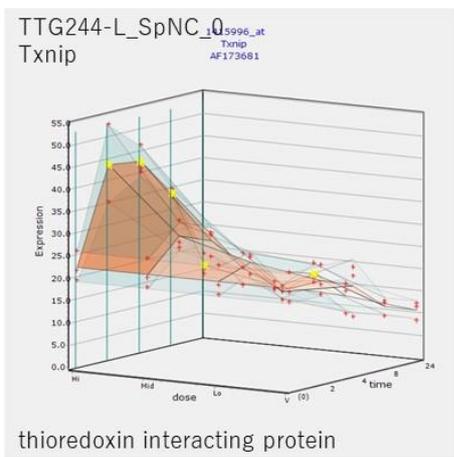
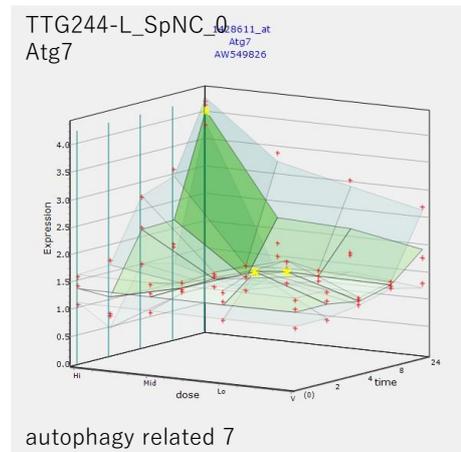
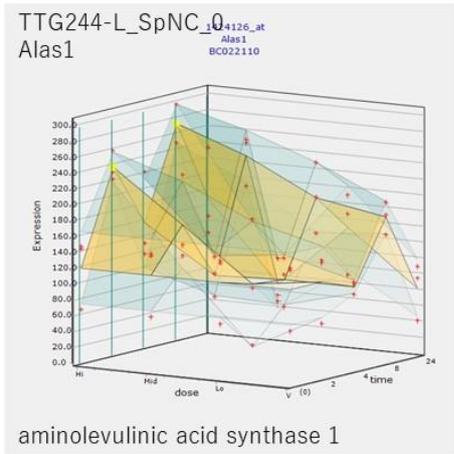


図 R3-6 Alas1、Txnip

誘導された遺伝子の多くは、PFOA[0+1]と共通であった。

PFOA[0+1]では発現誘導されず、PFOA[4+1]に特徴的に発現したものとして、Sirtuin シグナル系、ミトコンドリア障害、酸化リン酸化などが示された (Agt7、Atp5f1、Ndufa5 等、図 R3-7)

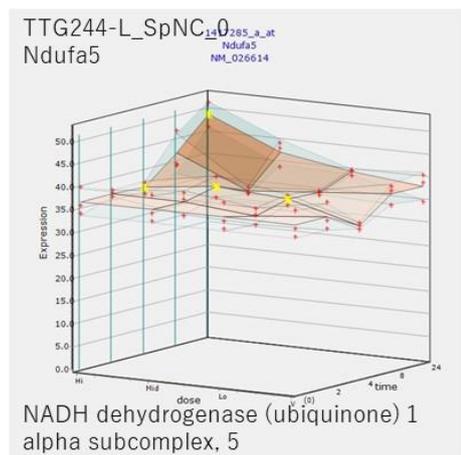


図 R3-7 Agt7、Atp5f1、Ndufa5

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

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

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

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

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 R4-1)。

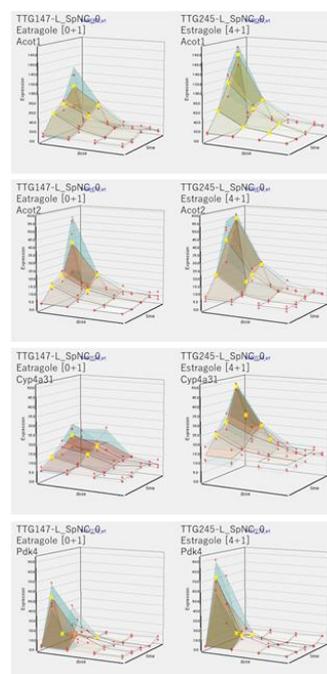


図 R4-1 Estragole 左[0+1] 右[4+1]にて Acot1、Acot2、Cyp4a31、Pdk4 を示す。

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 R4-2)。

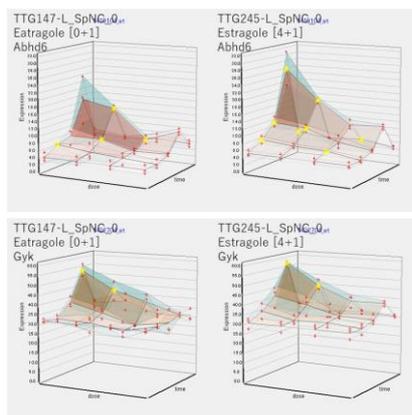


図 R4-2 Estragole 左[0+1] 右[4+1] にて Abhd6、Gyk を示す。

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 R4-3)。

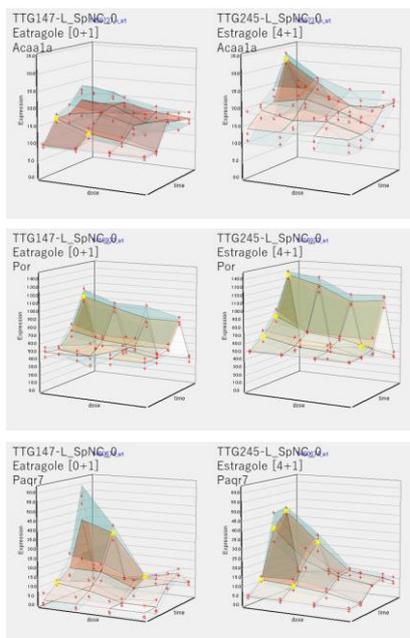


図 R4-3 Estragole 左[0+1] 右[4+1] にて Acaa1、Por、Paqr7 を示す。

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 R4-4)。

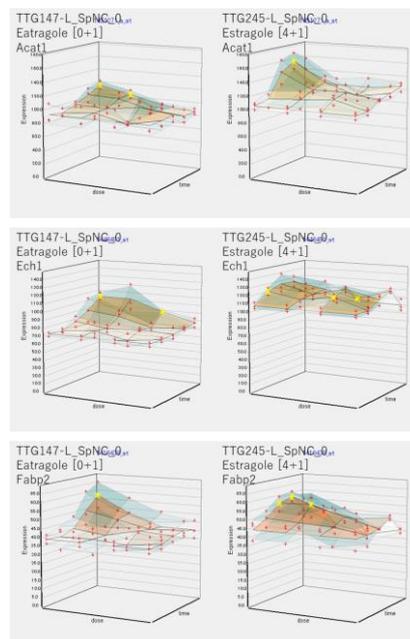


図 R4-4 Estragole 左[0+1] 右[4+1] にて Acat1、Ech1、Fabp2 を示す。

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。

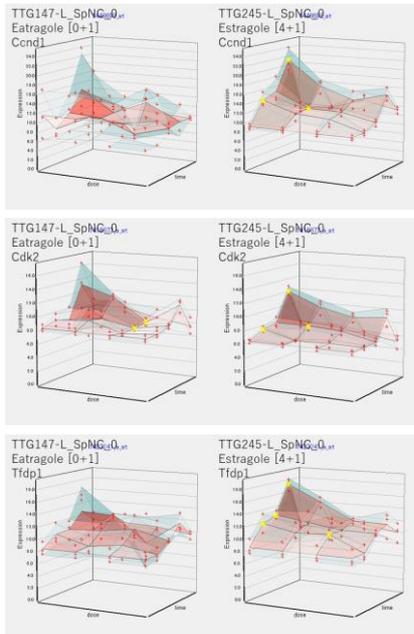


図 R4-7 Estragole 左[0+1] 右[4+1] にて Ccnd1、Cdk2、Tfdp1 を示す。

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 (Armt、Mapk1 等、図 R4-8)。

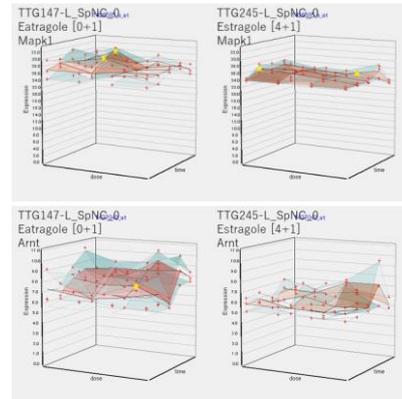


図 R4-8 Estragole 左[0+1] 右[4+1] にて Armt、Mapk1 を示す。

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 R4-9)。

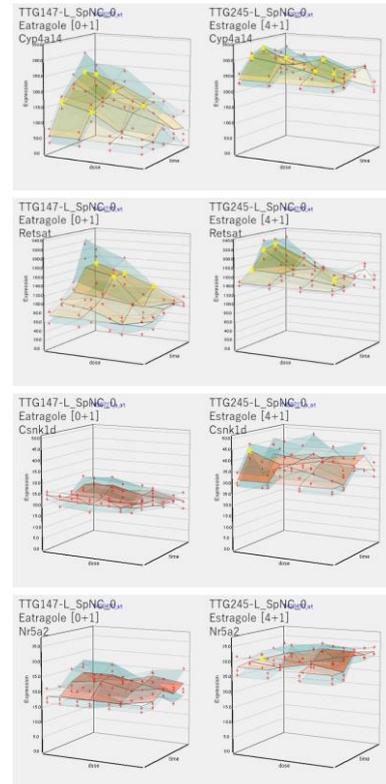


図 R4-9 Estragole 左[0+1] 右[4+1] にて Cyp4a14、Retsat、Csnk1d、Nr5a2 を示す。

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。

令和 5 年度は、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-L) (DEHP[4+1]と表記) に対する GeneChip による肝の網羅的遺伝子発現解析を実施し、単回曝露実験 (TTG098-L) の肝の網羅的遺伝子発現解析結果を再評価・更新し、それとの比較を行った。

① DEHP[0+1] (実験コード TTG098-L)

先行研究で実施した単回曝露実験（以後 DEHP[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 131、302、786、140 であった。

DEHP 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 131 遺伝子には、それに合致する所見として、PPAR α 、PPAR δ 、NR3C1 (グルココルチコイド受容体)、PPAR γ 等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Abcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14 等、図 R5-1)。

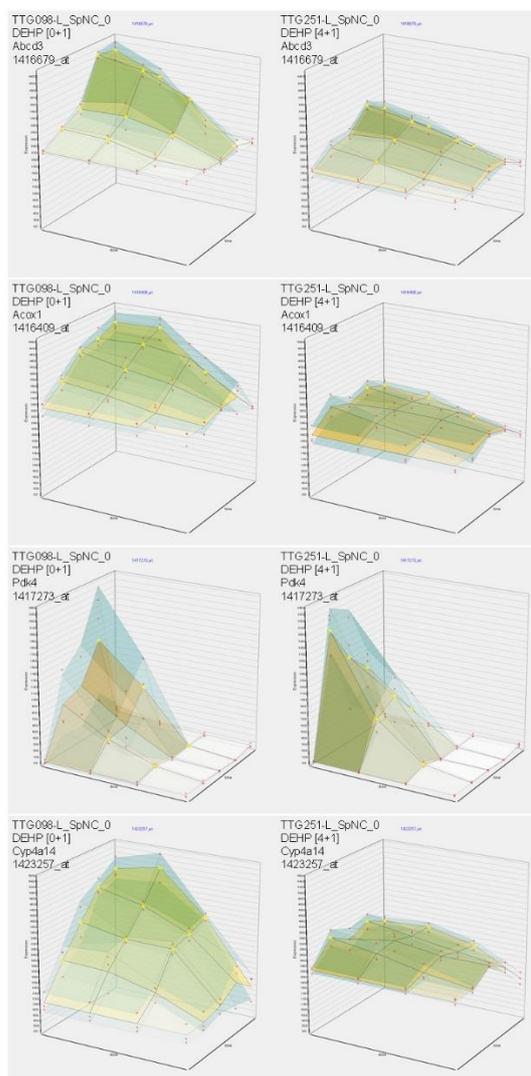


図 R5-1 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にて Abcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14 を示す。

4 時間目に誘導開始される遺伝子数は 302 で、PPAR α 、PPAR γ に加えて、Hnf4a (NR2A1)、Myc、Nfe2l2 (Nrf2) 等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Abcc2、Casp8、Eif4A1、Srxn1 等、図 R5-2)。

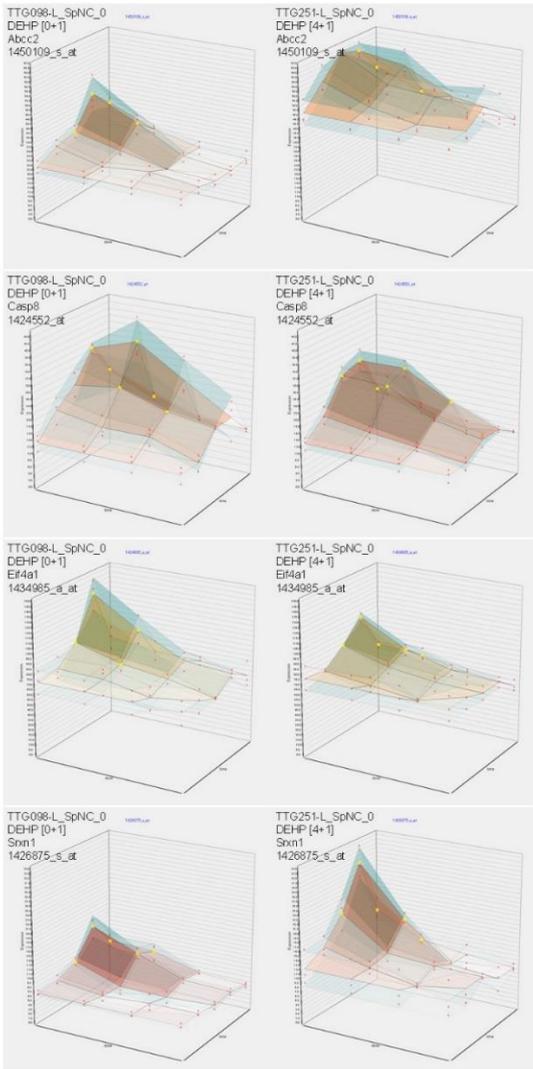


図 R5-2 DEHP 左[0+1] 右[4+1] にて Abcc2、Casp8、Eif4A1、Srxn1 を示す。

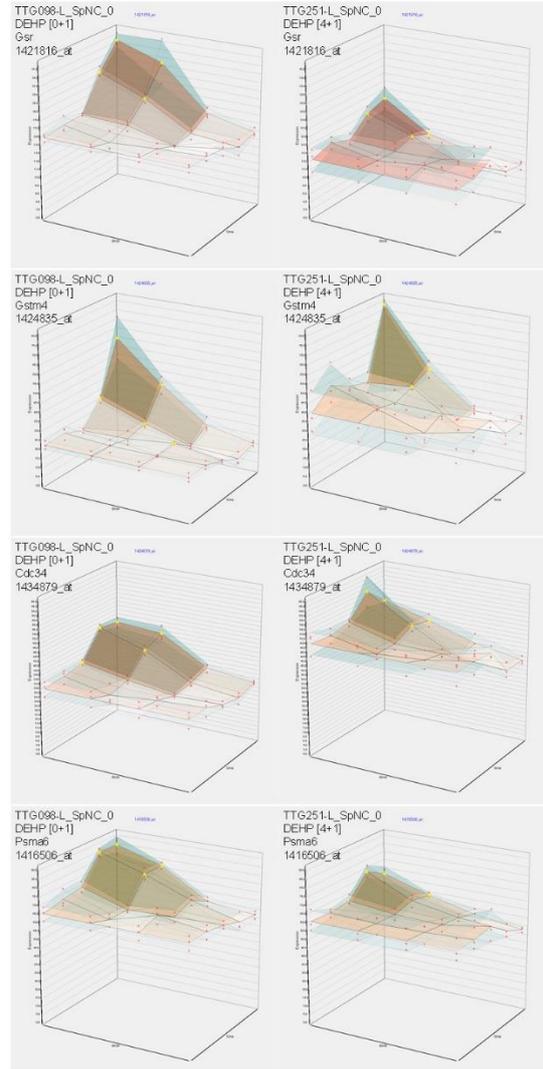


図 R5-3 DEHP 左[0+1] 右[4+1] にて Gsr、Gstm4、Cdc34、Psma6 を示す。

8 時間目に誘導開始された遺伝子は 786 で、PPAR α に加えて Nfe2l2 (Nrf2)、Myc、p53 等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (Gsr、Gstm4、Cdc34、Psma6 等、図 R5-3)。

24 時間目に誘導開始された 140 遺伝子は、PPAR α に加え、Mlxipl、p53、Ctnnb1 を上流に持つものが多かった (図 R5-4)。

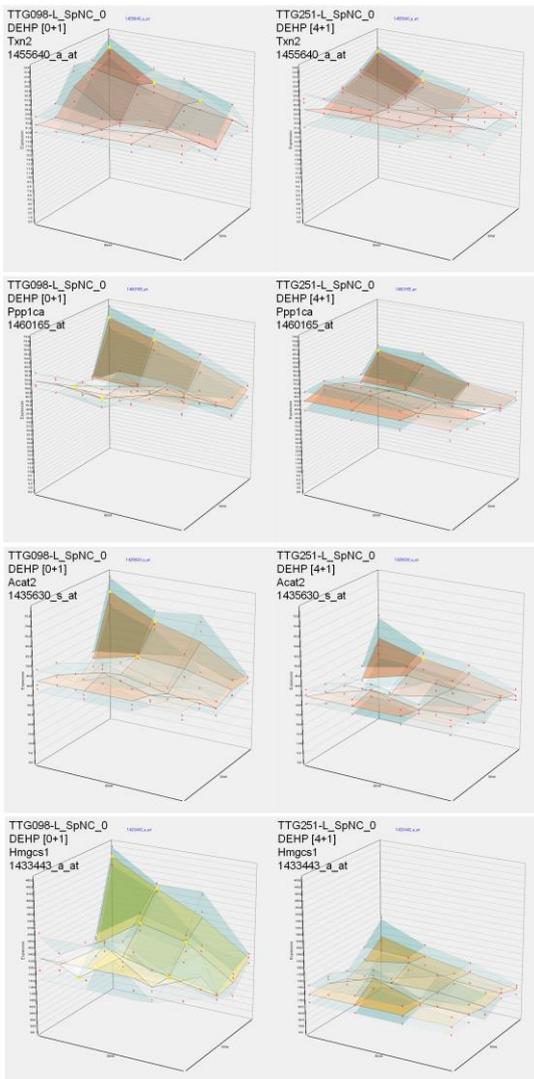


図 R5-4 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にて Tnx2、Ppp1ca、Acat2、Hmgcs1を示す。

② DEHP[4+1] (実験コード TTG251-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、127、349、362、29 であった。

2 時間目に誘導開始された遺伝子は、DEHP[0+1]とほぼ同様であり、PPAR α 、PPAR δ 、NR3C1 (グルココルチコイド受容体)、PPAR γ 等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた(図 1 参照 Abcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14)。加えて、[4+1]において、Hnf4a (NR2A1)、STAT5B、PTEN を上流とするいくつかの遺伝子において、発現のタイミングが若干早まることが示唆さ

れた (Acs11、Hif1a、Vnn1、Lpcat3 等、図 R5-5)。

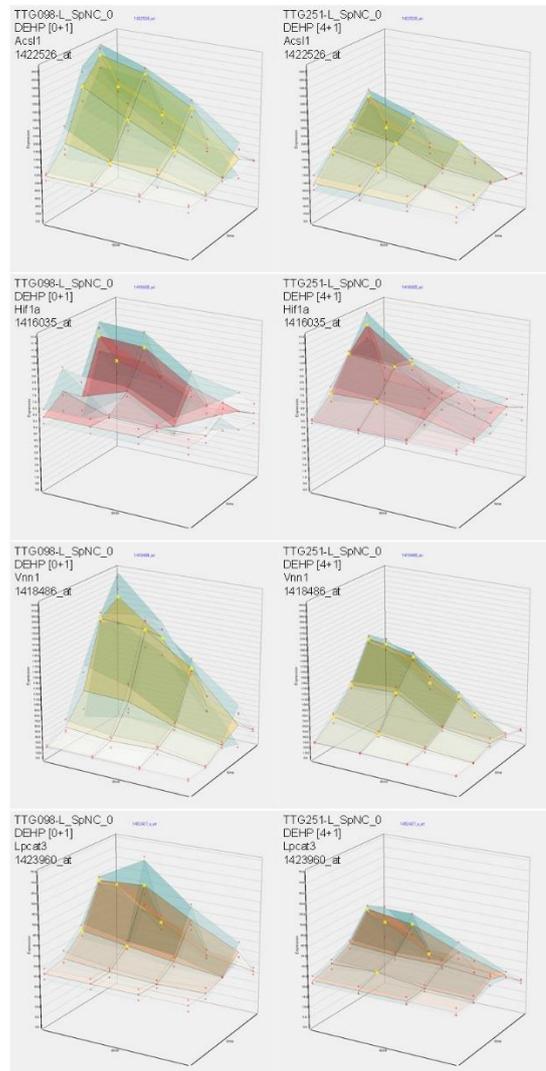


図 R5-5 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にて Acs11、Hif1a、Vnn1、Lpcat3を示す。P>0.05 の有意差を示す黄色*の位置が右[4+1]の方が 2 時間早くなっている。

4 時間目に誘導開始された遺伝子の数は、DEHP[0+1]とほぼ同等で、PPAR α 、Hnf4a (NR2A1)、PPAR γ などの下流の遺伝子であった(図 R5-2 参照)。加えて、[4+1]において、PPAR α 、PPAR γ 、Nr1i2(PXR)などの下流で、発現時期が若干早まる遺伝子を認めた(図 R5-6)。

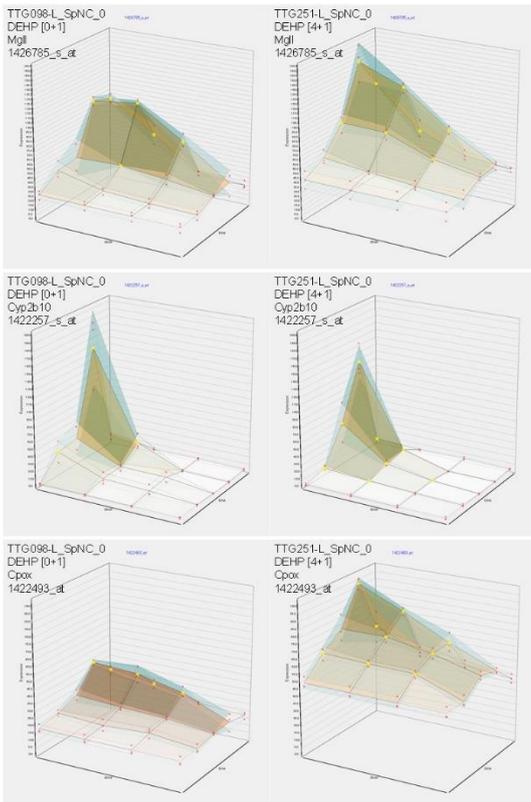


図 R5-6 DEHP 左[0+1] 右[4+1] にて Mgl1、Cyp2b10、Cpxc を示す。
P>0.05 の有意差を示す黄色*の位置が右[4+1]の方が2時間早くなっている。

8 時間目に誘導開始された遺伝子の数は、DEHP[0+1]の約半数で、脂質代謝に関わる PPAR α の他、p53、Nfe2l2 (Nrf2)、Hnf4a (NR2A1)、Rictor、Nfe2l1 等に属する下流遺伝子も誘導されていた (図 R5-7 及び図 R5-3 参照)。 $[4+1]$ に特有の遺伝子発現は少数であった。

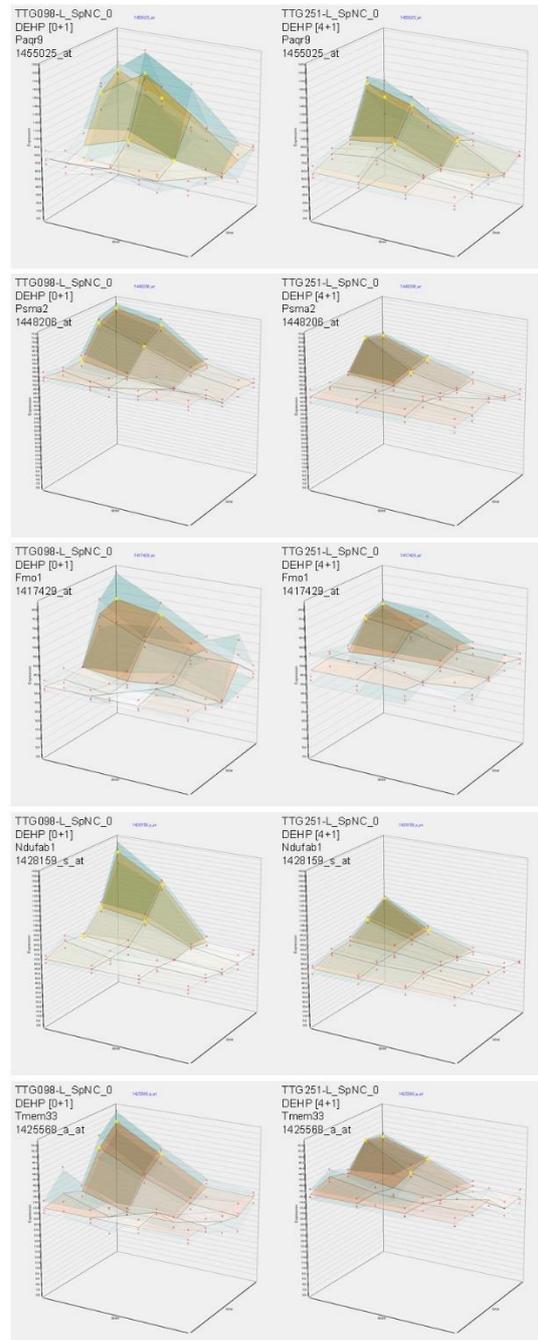


図 R5-7 DEHP 左[0+1] 右[4+1] にて Paqr9、Psma2、Fmo1、Ndufab1、Tmem33 を示す。

24 時間目に誘導開始された遺伝子は[0+1]よりやや少なかった。 $[4+1]$ に特有に遺伝子発現は明らかでなかった (図 R5-7)。

図 R5-8 に示す様に、DEHP においては、4 日間の反復投与の遺伝子発現開始時ごとの誘導遺伝子数には

大きな差はなかった。

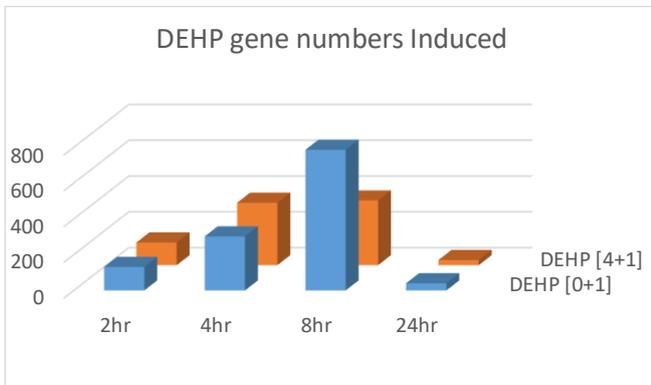


図 R5-8 DEHP[0+1]と[4+1]の誘発開始時間による遺伝子数の比較

③ DEHP[0+1]とDEHP[4+1]の比較

次に最終曝露後 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 281、上昇した基線反応遺伝子は 1450 であった。

[4+1]の基線反応 (Baseline Response) が[0+1]より低下した遺伝子群は、上流に PPAR α 、Myc、Hnf4a (NR2A1) 等を持ち、コレステロール合成系 (DHCR24 signaling) や脂質代謝系 (LXR/RXR activation) に属する遺伝子が含まれていた (図 R5-9)。

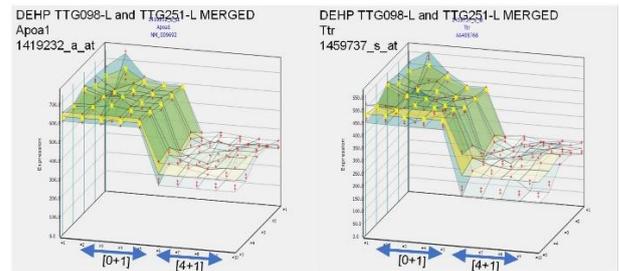


図 R5-9 DEHP [4+1]と[0+1]の 3 次元グラフを左右隣り合わせにして、基線反応を強調した表示にて Apo1l、Ttr を示す (興行きは 2、4、8、24 時間)。

基線反応 (Baseline Response) が[4+1]にて上昇した遺伝子群は、上流に PPAR を含まず、Esr、Kras、p53 等を持ち、酸化ストレスからオートファジーやライソゾームへの活性化に関わるシグナル (CLEAR Signaling)、RHO、および YAP1 にかかわる Hippo 系が活性化していることが示唆された (図 R5-10)。

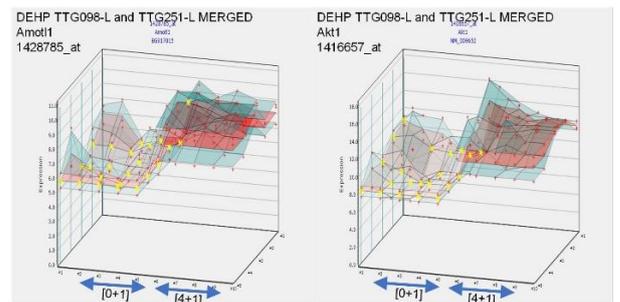


図 R5-10 DEHP [4+1]と[0+1]の 3 次元グラフを左右隣り合わせにして、基線反応を強調した表示にて Amot1l、Akt1 を示す (興行きは 2、4、8、24 時間)。

以上より、DEHP の 4 日間反復曝露は、PPAR の直下でない遺伝子群の基線反応を上昇させ、酸化ストレス、増殖、臓器肥大などに関わる反応の増強が示唆された。IPA の Gene Ontology 解析においても Cancer や Gene expression などが上位を占めた。

他方、基線反応が低下した遺伝子群は、Hnf4a (NR2A1)、Myc、PPAR α を上流に持ち、脂質代謝系に関わる遺伝子群を含んでいた。何等かの Negative feedback 機構が示唆されるため、解析を進める。この点については、基線反応が低下した遺伝子の過渡反応が減弱する傾向が認められ、上流に PPAR 系と

peroxisome 形成に関わる因子の存在が示唆され、ジェネティック、特にヒストン修飾が関与する可能性が示唆されたことから、合わせて考察を進める。

少なくともげっ歯類に於いて発癌性が強く示唆された。先行研究において解析した PPAR リガンド化学物質との比較解析を追加し、ヒトへの外挿についても検討を進める。

④ BrBenz [0+1] (実験コード TTG074-L)

先行研究で実施した単回曝露実験 (以後 BrBenz [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 9、30、27、1 であった。

BrBenz は 2 時間目に、Hmox1、Mbd1 の発現誘導がみられ (図 R5-11)、上流には MC3R、DRD5 などの G タンパク質共役型受容体や膜受容体の関与が弱いながら示唆されたがそれらのシグナル伝達系の 4 時間目以降の発現誘導への関与について、今後検討する。

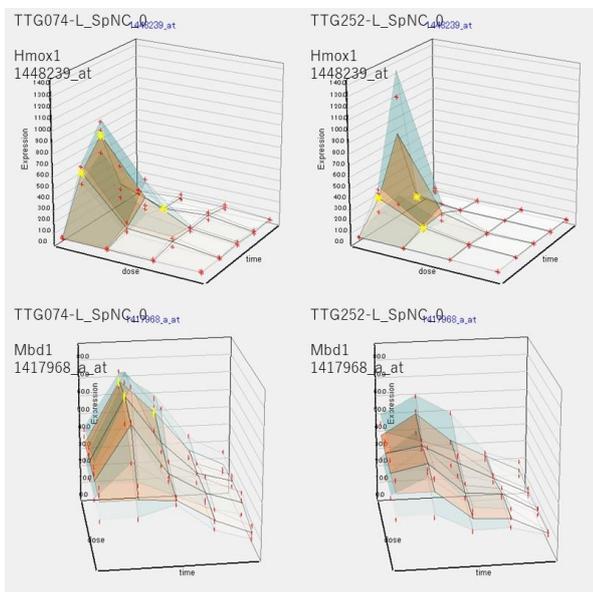


図 R5-11 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Hmox1、MDB1 を示す。

4 時間目より、Cyp2a4、Ikbkg、Txnrd1、Entpd5、Ubt2b35 など NRF2 系及び一部 NR1i3 (CAR) 系の誘導が開始され (図 R5-12)、8 時間に向けて、グルタ

チオン、第 II 相の代謝酵素の誘導が開始された (図 R5-13)。

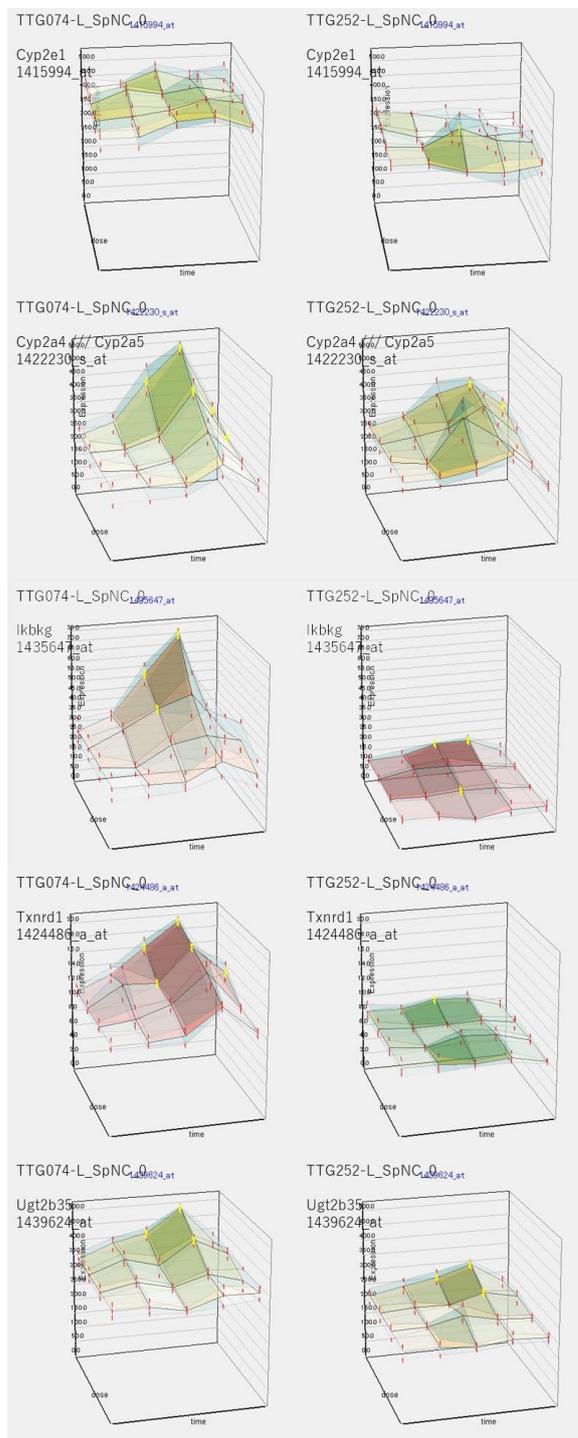


図 R5-12 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Cyp2e1、Cyp2a4、Ikbkg、Txnrd1、Ugt2b35 を示す。

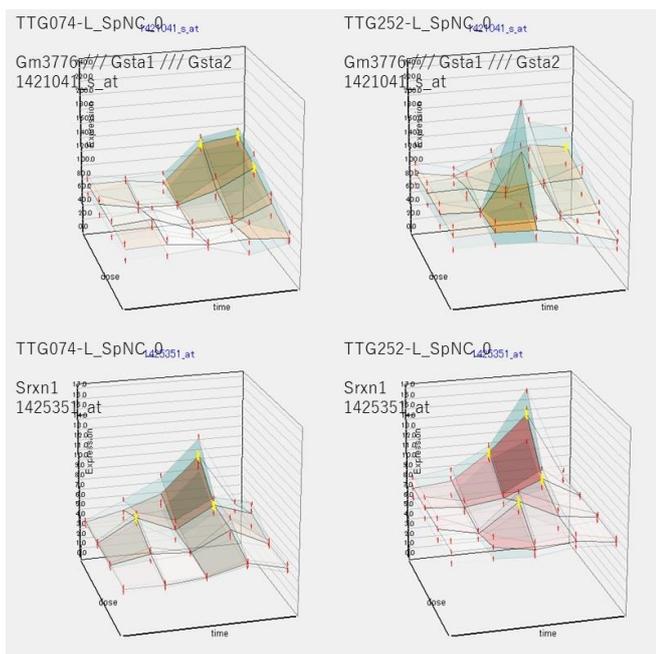


図 R5-13 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Gsta1/2, Srxn1 を示す。

これは、Cyp2e1 などの常時発現 P450 により BrBenz が代謝を受け、順次、第 II 相代謝酵素を誘導した可能性を示唆すると考えられた。IPA による解析においては、下表の様に、

Name	p-value
NFE2L2 regulating antioxidant/ detoxification enzymes	1.49E-12
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1.63E-12
Xenobiotic Metabolism General Signaling Pathway	1.13E-05
Glutathione Biosynthesis	1.25E-05
NLR signaling pathways	2.11E-04

が示され、その上流因子として、

Upstream Regulator	p-value of overlap
TXNRD1	1.26E-18
GSR	2.40E-17
SQSTM1	9.09E-15
NFE2L2	9.65E-15
ALDH3A2	6.52E-11

が挙げられた。

以上、BrBenz は核内受容体にほぼ結合することなく、Cyp2 系統により代謝が開始され、NRF2 系を活性化し、Cyp2a4 などの第 I 相、グルタチオン抱合系などの第 II 相の代謝経路を活性化することが示唆された。その過程で、NR1H3 (CAR) 下流の活性化も示

唆された。示唆される肝毒性としてはグルタチオン枯渇によるものが挙げられる。

⑤ BrBenz [4+1] (実験コード TTG252-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、3、36、69、1 であった。

2 時間目に誘導開始された遺伝子は少なく、解析は難しいが、4 時間目、8 時間目の発現遺伝子は、基本的に BrBenz[0+1] と類似していた (図 R5-12, R5-13 参照)。

⑥ BrBenz [0+1] と BrBenz [4+1] の比較

図 R5-14 に示す様に、BrBenz においては、4 日間の反復投与の遺伝子発現開始時ごとの誘導の傾向には大きな差はなかったが、8 時間目の遺伝子数が増加していた。

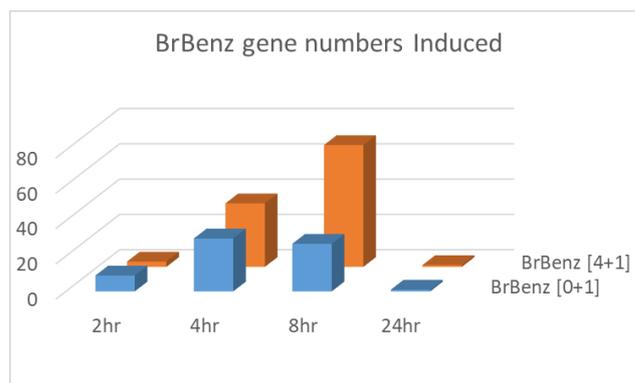


図 R5-14 BrBenz [0+1] と [4+1] の誘発開始時間による遺伝子数の比較

時間経過による遺伝子数の変化は、ほぼ同一であり、内容的にも図 R5-15 に示すように、誘発される遺伝子の Canonical Pathway、上流遺伝子は、ほぼ共通であった (TTG074-L が [0+1]、TTG252-L が [4+1])。

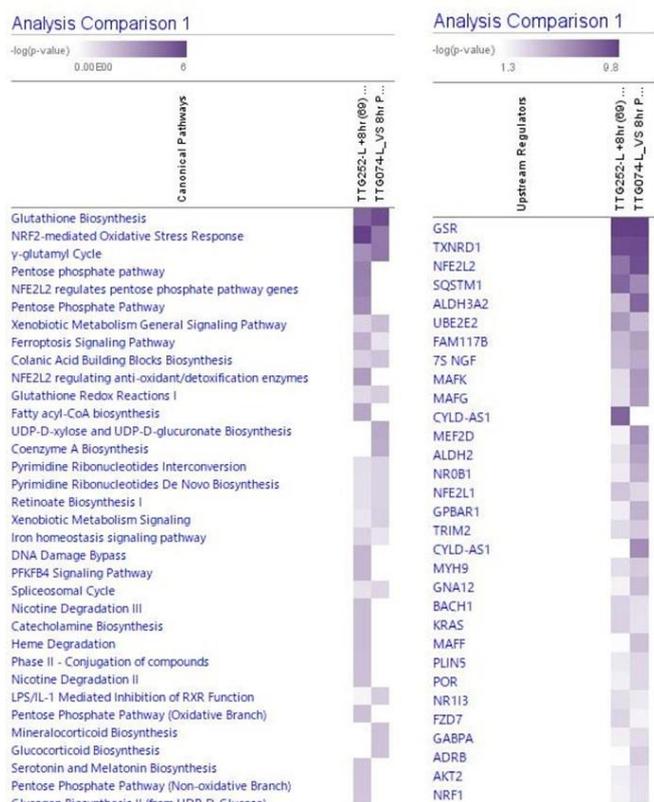


図 R5-15 BrBenz [0+1]と[4+1]の Canonical Pathway と Upstream Genes の比較 (IPA)。(TTG074-L が[0+1]、TTG252-L が[4+1])

次に最終曝露後 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 2774、上昇した基線反応遺伝子は 291 であった。

[4+1]の基線反応が[0+1]より低下した遺伝子群は、HNF4a、Rictor などの上流遺伝子の発現低下とともに (図 R5-16)、リボゾーム蛋白系 (Rpl: ribosomal protein L)、真核生物翻訳開始因子 (Eif: eukaryotic translation initiation factor) などの、翻訳に関わる遺伝子群の発現強力な抑制効果が観測された (図 R5-17)。

Upstream Genes

Name	p-value
HNF4A	4.98E-85
RICTOR	1.16E-81
MYC	6.07E-49
UQCC3	6.08E-47
LARP1	9.47E-47

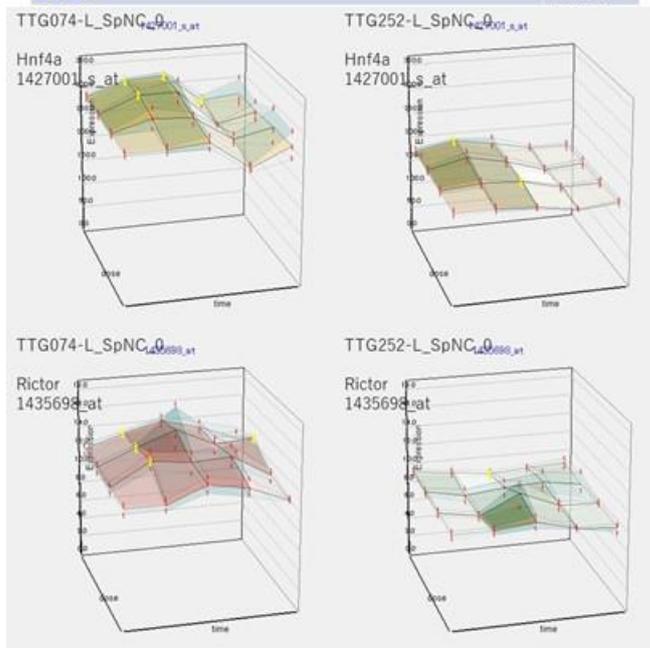


図 R5-16 BrBenz 上流遺伝子の IPA による解析結果の抜粋、および、BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Hnf4a、Rictor を示す。

Canonical Pathways

Name	p-value
Eukaryotic Translation Initiation	6.37E-57
SRP-dependent cotranslational proteintargeting to membrane	1.15E-54
Selenoamino acid metabolism	1.63E-51
Eukaryotic Translation Termination	5.74E-48
Eukaryotic Translation Elongation	1.72E-47

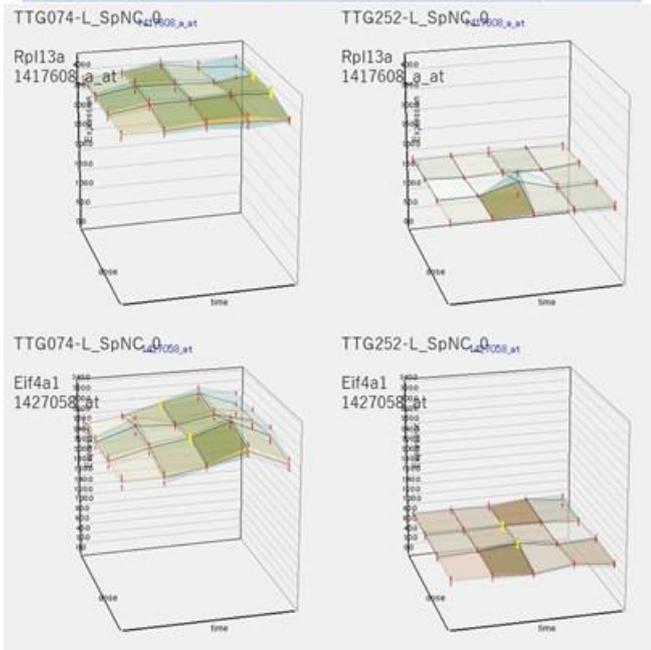


図 R5-17 BrBenz 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Rpl3a、Eif4a1 を示す。

Eukaryotic Translation Elongation に関しても、抑制がみられた。その中で、Eef1a1 は肝において高発現することが知られ、それが抑制されており、これと相補的 (reciprocal) に発現することが知られている Eef1a2 は発現が増強していた (図 R5-18)。

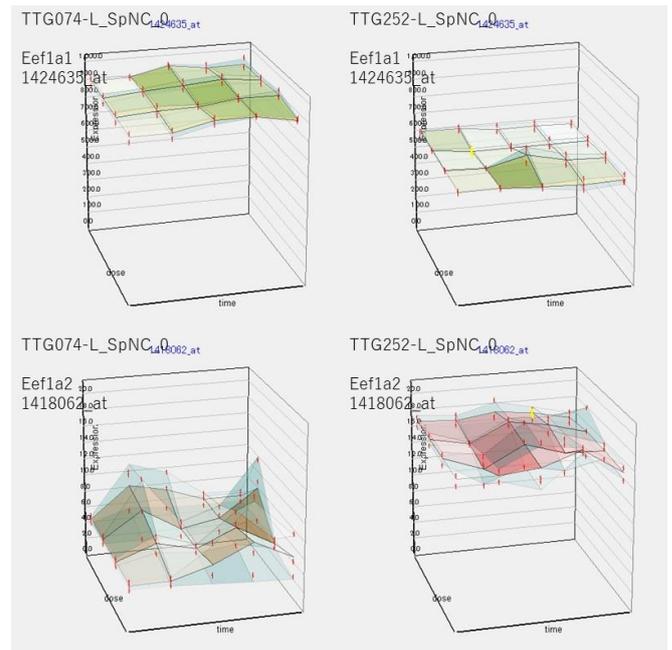


図 R5-18 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Eef1a1、Eef1a2 を示す。

以上より、BrBenz の 4 日間反復曝露は、直後に受容体系にシグナルを入れる作用は限定的で Hmox1 を含むごく少数の遺伝子の発現を、G 蛋白共役受容体や膜受容体を介して誘導するとともに、常時発現している P450 (Cyp2e1) などにより代謝され NRF2 系を介しての第 II 相代謝酵素の誘導を惹起し、反復投与により、タンパク質翻訳に関わる遺伝子群の強力な抑制効果を発揮することが示された。この作用により肝、および、翻訳に関する機作に共通性を有する諸臓器に対する広範な毒性を発揮することが考察された。

⑦ 2-VP [0+1] (実験コード TTG019-L)

先行研究で実施した単回曝露実験 (以後 2-VP[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 86、98、104、42 であった。

2-VP は、2 時間目に GCR (Glucocorticoid receptor) を介したシグナルを惹起した (図 R5-19)。

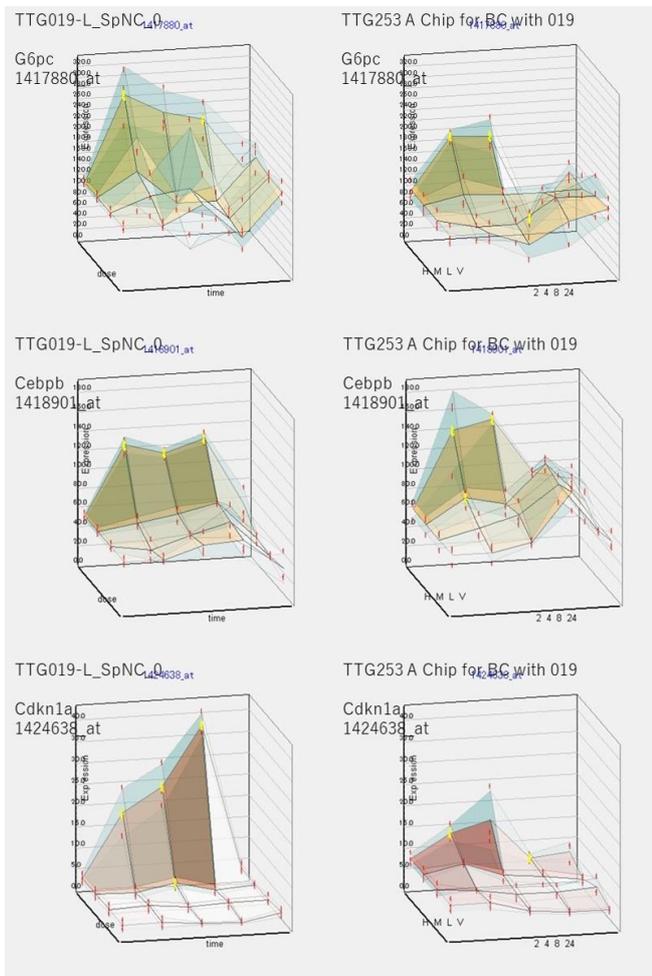


図 R5-19 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にてG6pc、Cebpb、Cdkn1a(p21)を示す。

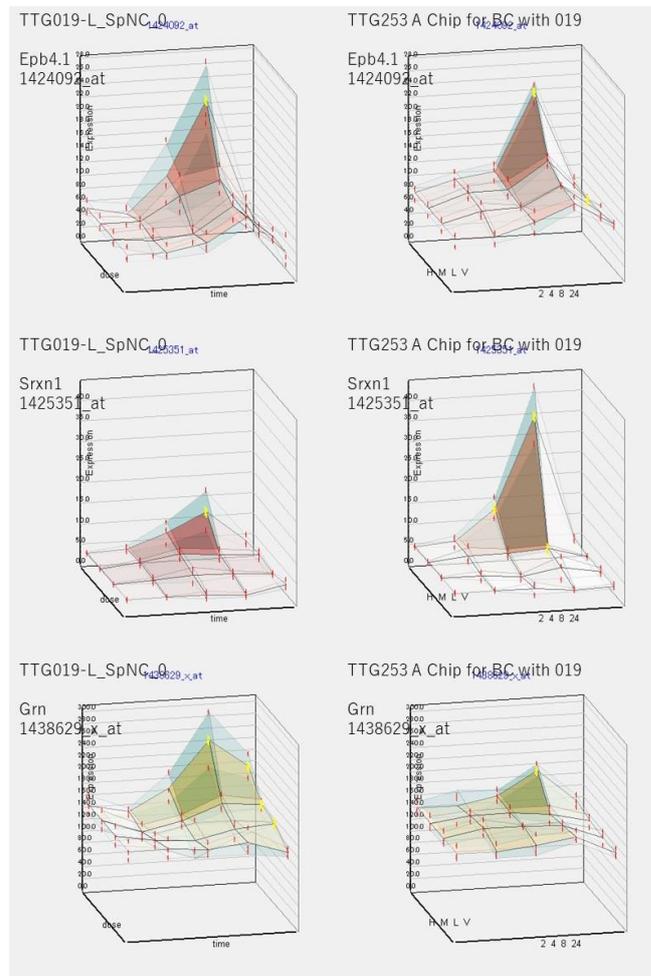


図 R5-20 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にてEpb4.1、Srxn1(sulfiredoxin 1)、Grn(granulin)を示す。

4 時間目に NRF2 系を惹起し、グルタチオン、チオレドキシニン系を誘導し(図 R5-20)、8 時間目に PPAR α による脂質代謝に影響した(図 R5-21)。24 時間目に PXR、AhR、CAR にもシグナルを入れる経過を辿り、広範な標的に対する酸化ストレスを含む障害が示唆された(図 R5-22)。

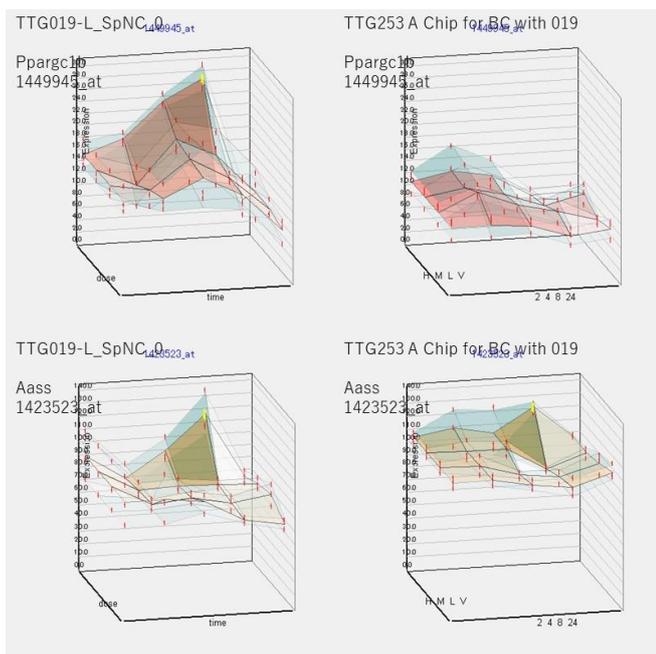


図 R5-21 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Pparg1b、Aass を示す。

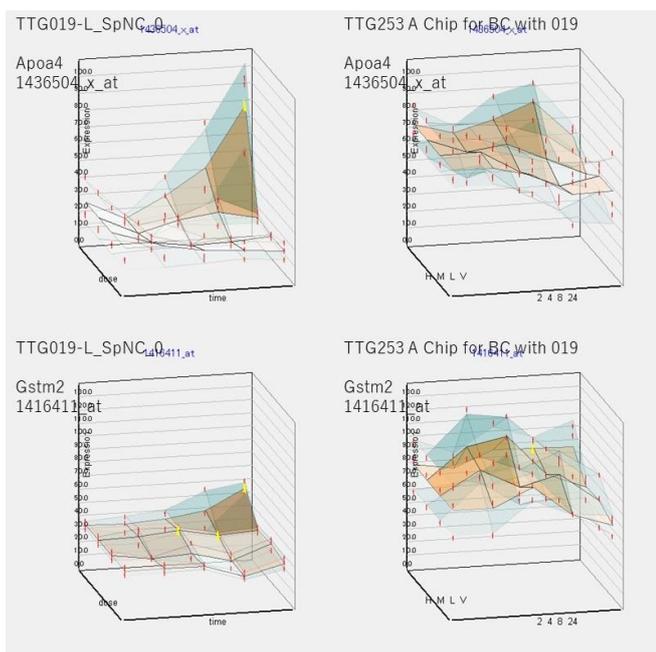


図 R5-22 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Apoa4、Gstm2 を示す。

⑧ 2-VP [4+1] (実験コード TTG253-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、67、37、19、0であった。

2 時間目に誘導開始された遺伝子は[0+1]と類似し

ていたが、過渡反応の低下傾向がみられた。4 時間目の誘導遺伝子数は半減したが、酸化的ストレスに対抗する因子の過渡反応が増強する傾向がみられた。8 時間目の発現遺伝子はさらに減少したが、NRF2 系の基線反応と過渡反応が増強する傾向がみられた (図 R5-19, R5-20, R5-21 参照)。

⑨ 2-VP [0+1]と 2-VP [4+1]の比較

図 R5-23 に示す様に、2-VP においては、4 日間の反復投与の遺伝子発現開始時ごとの誘導遺伝子数は減少の傾向を示し、特に 24 時間に向かって減少傾向が増強した。

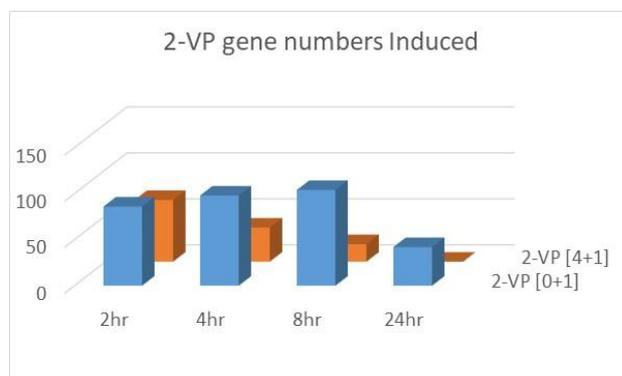


図 R5-23 2-VP [0+1]と[4+1]の誘発開始時間による遺伝子数の比較

Canonical Pathway と上流遺伝子について IPA による解析した結果においても、誘導される系および、上流遺伝子に大きな差はみられなかった (図 R5-24 (◇TTG019-Lが[0+1]、TTG253-Lが[4+1])。)

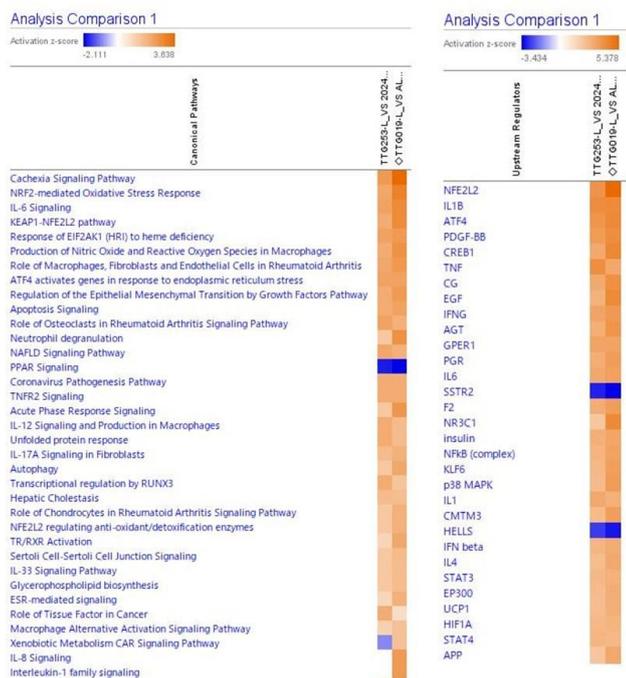


図 R5-24 2-VP [0+1]と[4+1]の Canonical Pathway と Upstream Genes の比較 (IPA)。(<TTG019-Lが[0+1]、TTG253-Lが[4+1])。

次に最終曝露後 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 2373、上昇した基線反応遺伝子は 1269 であった。ここから、TTG019-L が MOE430 A Chip を使用している点と、Spike Factor が TTG019-L と TTG253-L とで異なる点を補正すると、反復曝露による基線反応の低下が 1130 遺伝子、上昇が 657 遺伝子と判定された。

[4+1]の基線反応が[0+1]より低下した遺伝子群は、上流に Hnf4a、ESR1、Nrf2、Rictor、Catenin b1、My などを持ち (図 R5-25)、Eif2 シグナル (真核生物翻訳開始因子 (Eif: eukaryotic translation initiation factor))

系の低下を引き起こした。これらにはインスリン調整を含む系の低下が含まれている (Pax6、Fosl2、Ern1、Apob、Plg、図 R5-26)。

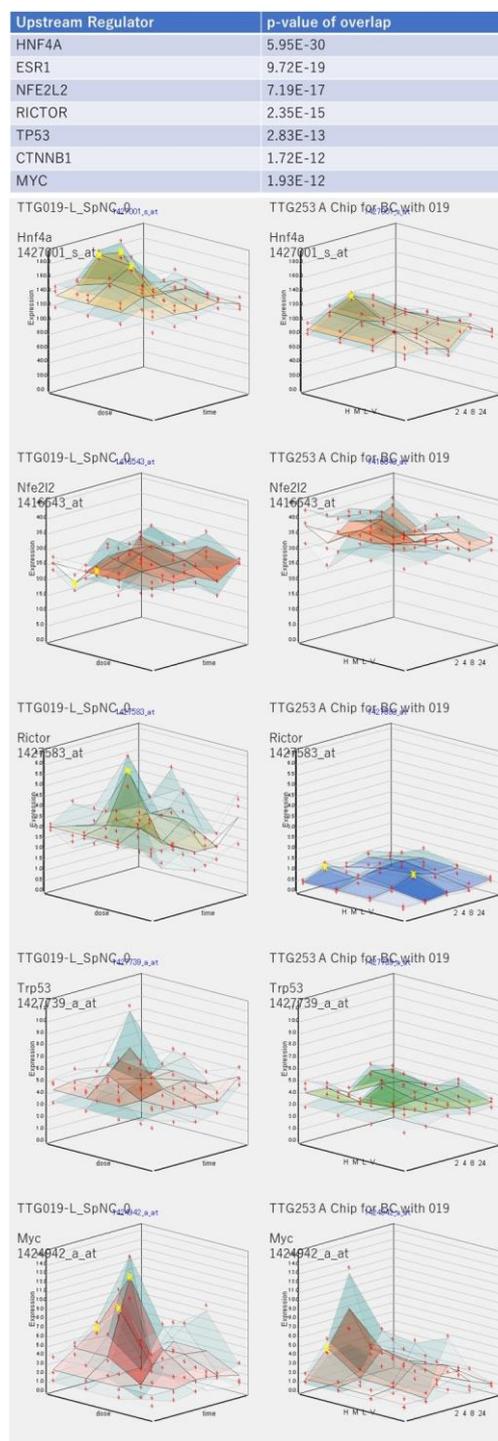


図 R5-25 2-VP 上流遺伝子の IPA による解析結果の抜粋、および、2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Hnf4a、Nrf2、Rictor、p53、Myc を示す。

Canonical Pathways

Name	p-value
EIF2 Signaling	4.63E-14
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	2.19E-11
Huntington's Disease Signaling	4.08E-11
Eukaryotic Translation Initiation	1.47E-10
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	2.51E-10

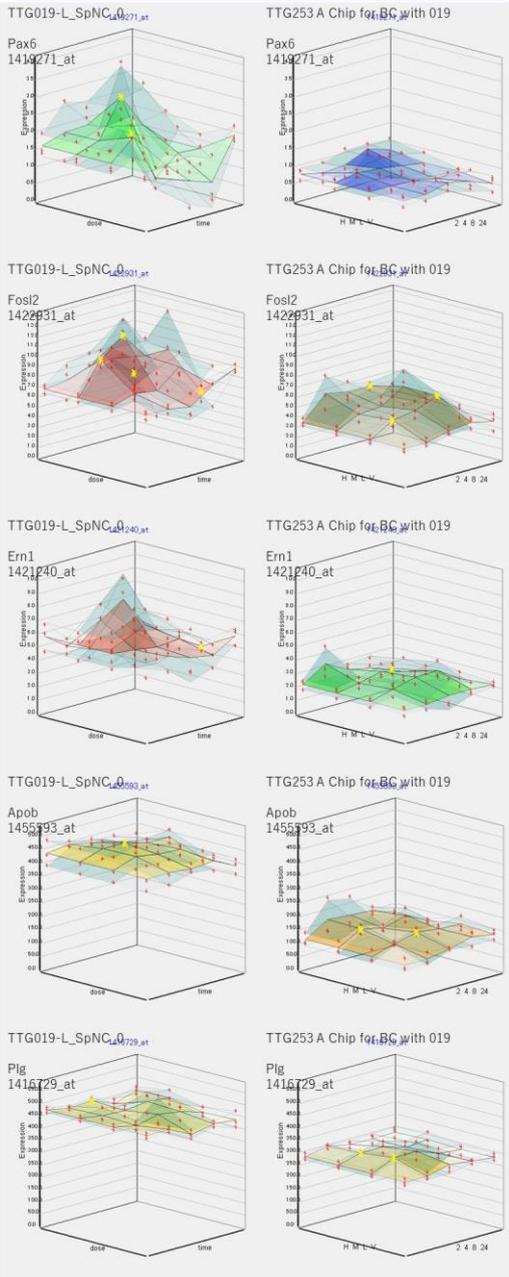


図 R5-26 2-VP 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および 2-VP 左 [0+1] 右[4+1]にて Pax6、Fosl2、Ern1、Apob、Plg を示す。

[4+1]の基線反応が[0+1]より上昇した遺伝子群は、上流に p53、Hnf4a、Tgfb1、E2f1、Nrf2 などを持ち、Nrf2 系（第 II 相代謝酵素系）を含む代謝系と、ストレス応答系の増強をみとめた。細胞増殖系に関わる

シグナルは軽度の増進が示唆された（図 R5-27）。

Canonical Pathways

Name	p-value
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	3.63E-10
Xenobiotic Metabolism PXR Signaling Pathway	3.38E-08
Mitotic Metaphase and Anaphase	3.70E-08
Cell Cycle Checkpoints	4.78E-07
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.02E-06

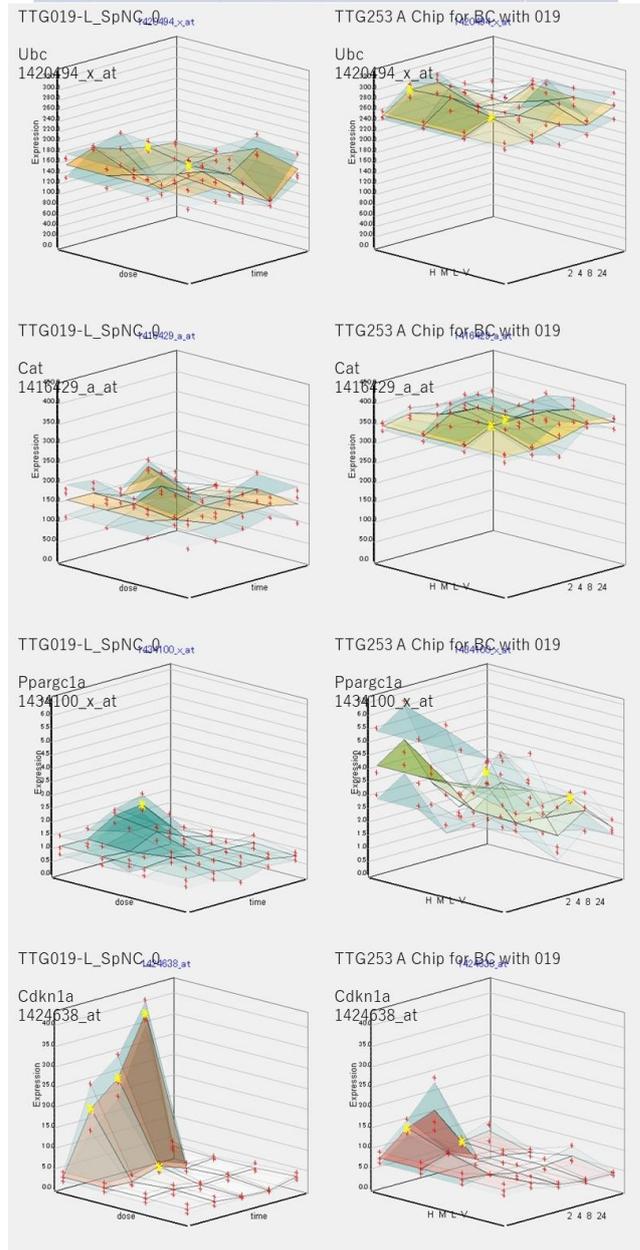


図 R5-27 2-VP 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および 2-VP 左 [0+1] 右[4+1]にて Ubc、Catalase、Ppargc1a、Cdkn1a (p21) を示す。

以上より、2-VP の 4 日間反復曝露は、GCR (Glucocorticoid receptor)、NRF2 系、グルタチオン、

チオレドキシシン系、PPAR α による脂質代謝、PXR、AhR、CAR を介しての広範な標的に対する酸化的ストレスに対抗する因子の増強を誘導することが示唆された。

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。

(2) 反復曝露影響のエピゲノム機構解析【北嶋】

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

令和3年度においては、新たにサリドマイド(700mg/kg)を14日間反復曝露した後、溶媒(0.5%メチルセルロース水溶液)を投与し2時間後のマウス肝および、0.5%メチルセルロース水溶液を単回投与した2時間後のマウス肝のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証した各マウス肝(30 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)、

であった。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

H3K4me3(活性型)が減少

log2(ratio)	Gene List	H3K4me3 down	Dist to Start	Position	start-end
-0.28	Fat1	1,843		upstream	chr8:41228600-4122939
-0.27	Csmd	2,844		in gene	chr15:102176600-102195799
-0.25	cut	55,704		in gene	chr7:74444600-74450799
-0.25	Cyp4a10	1,288		upstream	chr4:115513500-115520799
-0.20					chr7:145040000-145050399
-0.18					chr6:117296000-117300999
-0.18	Paqr9	6,382		downstream	chr9:95548600-95583799
-0.18	Scav5	52,298		in gene	chr4:65713600-65723799
-0.18	Cyp4a14	342		in gene	chr4:115492000-115498399
-0.18	cut	15,122		in gene	chr11:17370200-173716999
-0.18	Dn1, Tgfr1	4844, 13064		in gene, upstream	chr4:10729600-107307999
-0.17	Scav9	209,839		downstream	chr11:17370200-173748999
-0.17	cut	24,429		in gene	chr7:84470500-144724099
-0.17	Chn3	1,304		in gene	chr13:20357600-20361399
-0.17	Fat5, LOC1105989, Nhs2	1951, 2033, 5436		upstream, downstream, upstream	chr1:156297200-156313399
-0.17	Gabbr2	36,015		in gene	chr4:68484200-684921399
-0.17					chr4:76242500-762831399
-0.16					chr6:53194200-53219799
-0.16	Sk32c	82,408		in gene	chr7:139118400-139183399
-0.16					chr6:89016600-890511399

H3K4me3(活性型)が増加

log2(ratio)	Gene List	H3K4me3 up	Dist to Start	Position	start-end
0.39					chr19:38382000-38375199
0.38	Smoc1	8,509		upstream	chr12:81017600-81019799
0.35	cut	9,971		in gene	chr12:8174600-10589399
0.35	R10538238k, Mtr82	10756, 579		upstream, downstream	chr6:693368600-693373799
0.30	Cux3b	3,844		in gene	chr6:102076400-102083999
0.30	Mafk2a	22,968		downstream	chr12:2925200-112912199
0.30	Zk600	11,885		upstream	chr6:43228000-43242799
0.29	Gm14551, Onecut1	31362, 17878		downstream, in gene	chr9:74862000-74888799
0.29	Acat2	25,452		in gene	chr4:49361000-49364399
0.29	Shc1a4	15,829		upstream	chr4:1844000-141889799
0.29	Hud3b3	5,229		in gene, downstream	chr8:78706600-98765199
0.29	Apob, Zscan2	2905, 35250		in gene, downstream	chr7:123441000-123468799
0.28					chr12:294600-21301799
0.28	Panf, R10513A238k	52245, 13291		in gene, downstream	chr7:2827200-28292799
0.28	Ar15	292,791		in gene	chr13:14882400-148921399
0.27	Cyp2b9	4,366		upstream	chr9:29278000-29295399
0.27	Cyp6b5	13,588		in gene	chr4:13416400-134160599
0.27	Serpina3k	3,213		in gene	chr12:104334200-104349199
0.26	Zap70, Tmem131	19838, 157828		in gene, downstream	chr1:36780200-367831399
0.26					chr12:7396600-739721399

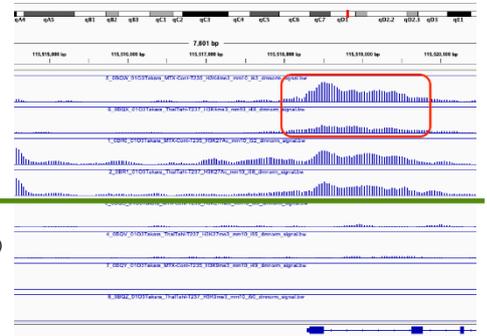
H3K27Ac(活性型)が減少

log2 ratio	Gene List	H3K27Ac down	Dist to Start	Position	start-end
-0.41	Csmd	2,844		in gene	chr15:102176600-102195799
-0.40	cut	416,351		downstream	chr4:28834200-28899399
-0.38					chr9:95538400-955445399
-0.38	Paqr9	6,382		downstream	chr9:95548600-95583799
-0.38	Scv1	294,051		in gene	chr6:29728800-29739999
-0.38	Scv2, Dcck6	4753, 47356		upstream, in gene	chr1:86116400-118308399
-0.38	Cxcl1	55,704		in gene	chr5:74444600-74450799
-0.34					chr7:145040000-145050399
-0.34					chr4:76813600-76819799
-0.34	Nmna3, Rbp1	129316, 2938		downstream, in gene	chr9:98420600-984311399
-0.31					chr6:117296000-117300999
-0.31	Col15a1	34,987		in gene	chr4:47238600-47247399
-0.31					chr6:76825200-76839199
-0.31	Hud2, Ch3, Fam32a	16231, 8938, 13831		downstream, in gene, upstream	chr6:72198600-72171399
-0.30	Rargr1	117,679		in gene	chr2:29734000-29740799
-0.30	Zkmc14	297,899		in gene	chr7:75148800-751491399
-0.30	R1059248k, Slc13a4	20100, 35327		downstream, in gene	chr6:35270200-35275399
-0.30	AWS49542	3,759		in gene	chr6:119571000-119582199
-0.29	Gabbr2	127,115		in gene	chr4:68484200-684921399
-0.29					chr1:190030000-190041799

H3K27Ac(活性型)が増加

hg2!repeat	Gene List H3K27Ac up	Dist to Start	Position	Start-end
0.00	LOC10195993, Cyp2b10	1535, -13365	in gene, upstream	chr7:25851000-25917599
0.07				chr9:74522000-74531199
0.10				chr3:17188000-17189799
0.51	Rab3gap1	30,226	in gene	chr1:127897000-127900999
0.44				chr9:74331400-74333999
0.44	Cyp2b10	2,483	upstream	chr8:8237000-18235599
0.41	Prp21	34,027	in gene	chr15:564607000-564615999
0.42				chr18:18145200-18149399
0.42				chr11:18588800-18592199
0.42	Omb2d	54,215	in gene	chr16:43232000-43237799
0.41	Mch1, B430426.069k	12900, 3563	downstream, in gene	chr15:8124200-81254999
0.40				chr19:37452000-37467199
0.40				chr16:43228000-43242799
0.39	EB19471M019k	11,845	upstream	chr11:28893000-28703799
0.39				chr15:1288800-51280999
0.39	Gm1551, Onecut1	31362, 17878	downstream	chr9:7486800-74897799
0.38	Cat	146,484	upstream, downstream	chr15:5131200-51304199
0.38	Mapkapk3, Cuh	-12122, 5310	in gene	chr5:10729400-107310999
0.37	Foxp1	132,246	in gene	chr6:9930200-99305999
0.37				chr9:74670800-74674799

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



- Activation marks
- H3K4me3 (single)
- H3K4me3 (repeated)
- H3K27Ac (single)
- H3K27Ac (repeated)
- H3K27me3 (single)
- H3K27me3 (repeated)
- H3K9me3 (single)
- H3K9me3 (repeated)
- Repression marks

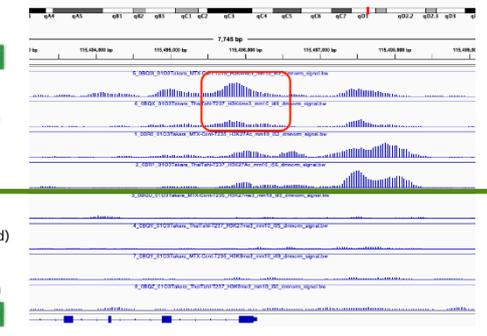
また、Cyp4a 14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。

H3K27me3(抑制型)が減少

hg2!repeat	Gene List H3K27me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.36	Mt, Mt1	1081, -3390	downstream, upstream	chr8:94166800-94184799
-0.30	Cyp2b10	27,035	in gene	chr7:25918800-25920799
-0.34				chr6:102643800-102651999
-0.24	LOC10195993, Cyp2b10	1535, -13365	in gene, upstream	chr7:25851000-25917599
-0.23	Tc	5,299	in gene	chr5:8943400-89470799
-0.23	Hb1, C11046161.099k	18020, 2060	in gene, in gene	chr8:8124300-81248999
-0.21	Sox1, Gm16548, F5	41935, -4582, 5340	downstream, upstream, in gene	chr11:28893000-28703799
-0.21	Prp1	38,981	in gene	chr6:15617000-15625999
-0.19	Foxl1, P24	99840, -3658	downstream, upstream	chr1:190140000-190159999
-0.19	Ppp1c1c	2,005	in gene	chr19:3672800-36739999
-0.19	Prk1c, Gm19939	7101, -5564	in gene, upstream	chr8:5116200-51137999
-0.19	Cyp1c, Cx, Cc1b1a	10460, 5667, 76538	downstream, in gene, downstream	chr10:12831000-128321999
-0.19	Maf1a1	725	upstream	chr4:116642800-116619999
-0.19	Gm19933	29,145	downstream	chr6:6934800-69383999
-0.19	Hb1	115,809	in gene	chr4:40237400-40242999
-0.18	Cy4b	2,438	in gene	chr8:107483200-107160999
-0.18	Cy4a	21,385	in gene	chr18:84847400-84888199
-0.18	Mafk1c2, Mafk1f	25424, -26120	upstream, upstream	chr19:896511000-85711999
-0.18	Ube2a	1,937	in gene	chr6:7954400-79569999

H3K27me3(抑制型)が増加

hg2!repeat	Gene List H3K27me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.29	S3300110069k, Mt1	13751, -11747	downstream, upstream	chr7:90737200-90745399
0.23	Foxl1, Cavin3	28446, 37584	downstream, in gene	chr7:25918800-25412999
0.23	Foxl1, Cavin3, Mt1982, Ling1c, Lm7, Spz2b	22131, 8943, 6802, 8440, 19610, -19676	downstream, downstream, in gene, downstream, upstream	chr10:12831000-128321999
0.23	Cd1c1	10,057	in gene	chr7:9072700-90813799
0.21	Tac1b, T1900340249k	999, 13797	in gene, downstream	chr5:112957800-112945999
0.21	Foxl1, T1900210496k, Spz2b2	12840, 20769, 35633	in gene, downstream, downstream	chr11:10318000-103191999
0.21	Sox1, LOC101959718, Mt1	47995, -13258, 19192	in gene, upstream, downstream	chr11:27186400-27122999
0.21	Cmp1	4,219	in gene	chr5:7238600-72329999
0.21	Mgfr1, Cvh, 4732471.0191k, Lip1	50035, 5255, -9820, 28788	downstream, downstream, upstream, downstream	chr7:2538100-25372999
0.21	Gm1c1	4,899	upstream	chr7:74471200-77213999
0.21	Igfb1, Igfb1c, 4931408819k, Gm2511	26148, 724, 16839, 24248	downstream, in gene, downstream, downstream	chr7:3447200-34505999
0.21	Lip1c, Emk1b	32729, -1071	downstream, upstream	chr12:60993800-160929199
0.21				chr5:7991000-79941999
0.20	Ankrd4f10	203,006	downstream	chr4:14041000-140513799
0.20	Gm1c7, Hnf3	21465, 77732	downstream, in gene	chr11:98443600-98472999
0.20				chr4:21195200-13171199
0.20	Dmnd1, Mv199a	18005, 16839	in gene, downstream	chr10:3232400-32345199
0.20	Ruc2	183,918	in gene	chr13:5114000-51129999
0.20	Uaz	1,853	in gene	chr17:85648200-85104999



- Activation marks
- H3K4me3 (single)
- H3K4me3 (repeated)
- H3K27Ac (single)
- H3K27Ac (repeated)
- H3K27me3 (single)
- H3K27me3 (repeated)
- H3K9me3 (single)
- H3K9me3 (repeated)
- Repression marks

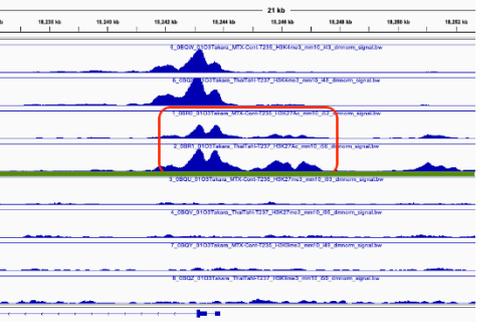
また、Cyp7b1 のプロモーター領域においては、活性型ヒストン修飾である H3K27Ac が増加していることが明らかになった。

H3K9me3(抑制型)が減少

hg2!repeat	Gene List H3K9me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.31	Ccd8f	55,578	in gene	chr10:70133200-70172199
-0.31	Cy2f	158,792	in gene	chr8:116417800-116430599
-0.31	Foxo1	38,467	in gene	chr11:1452800-145467199
-0.30	Klhl3, Hmna1d	-5071, 21057	upstream, downstream	chr13:5809500-58119599
-0.30	Wnc2	86,792	in gene	chr8:7913400-47934199
-0.30	Hmna3, Tkl2	51448, 38659	downstream, downstream	chr8:14213000-142139999
-0.29	Tkl1	45,785	downstream	chr10:12152400-121557799
-0.29	Map3k4	45,261	in gene	chr17:1228300-12283799
-0.29	Ccd8c, E1300150209k	29876, -11688	in gene, upstream	chr10:70133200-70201199
-0.28	Gm1933, Fupb1	4490, -15058	upstream, upstream	chr8:3834800-38381999
-0.28	Yak1, Cam2b	17141, 92849	downstream, in gene	chr11:5967400-59781999
-0.27	Cy2f	135,292	in gene	chr8:116578800-116615999
-0.27	Cy2f1b	66,861	in gene	chr7:2943200-2944599
-0.27	Prkca	86,514	in gene	chr17:8625000-86282999
-0.27	Foxl1, Slic1c1	10602, 12769	downstream, in gene	chr8:78037200-78051799
-0.27	Wnc2	21,747	in gene	chr8:1448000-14463799
-0.27				chr16:9008300-90129999
-0.27	Apob2	66,918	in gene	chr5:6653600-66567199
-0.27	Ar1c, A4300901179k	130491, 26593	in gene, in gene	chr11:14114000-114139999
-0.27	Wnc2	69,467	in gene	chr16:1508000-151181999

H3K9me3(抑制型)が増加

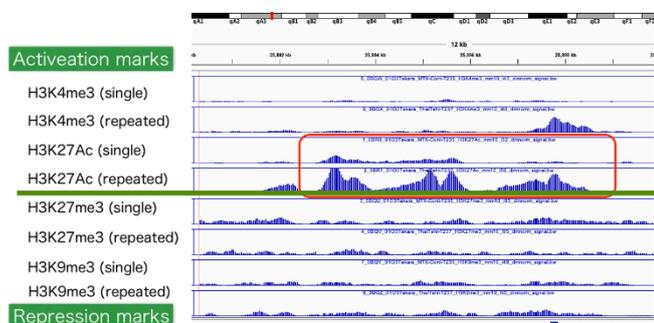
hg2!repeat	Gene List H3K9me3	Dist to Start	Position	Start-end
0.24	Tegs1a3k	3,213	in gene	chr12:10433400-104349199
0.24	Epf1, E290151159k	56496, 20003	in gene, downstream	chr11:1677500-1684399
0.22	Mt1, OS300110069k	195652, -1382	in gene, upstream	chr4:14971600-149831199
0.21	Ces1b	3,644	in gene	chr8:105076400-105083999
0.21	Dusp1	27	upstream	chr17:28591800-28515199
0.21	Tact1b1	41,827	in gene	chr7:3631700-3634999
0.19	Kl11, Irbx9	61696, 3258	downstream, in gene	chr19:37431800-37444599
0.19	Cyp7b1	2,483	upstream	chr18:8238000-18235999
0.19	Ar1c	1,011	in gene	chr17:60861800-40877199
0.19	Ar1c1	54,338	in gene	chr13:13882400-431903799
0.18	Gm1551, Onecut1	31362, 17878	downstream, in gene	chr9:7486800-74887799
0.18	Ar1c1, E1826a3, Srs1, Apb3, S1c35a1	103196, -261, 4512, 15567, -15416	downstream, upstream, downstream, downstream, upstream	chr18:36854200-36872399
0.18	Ar1c1	519,257	in gene	chr6:5026800-50269199
0.18	S100a10	1,062	in gene	chr19:93551800-93565999
0.18	S3300110069k, Mt1	13751, -11747	downstream, upstream	chr7:90737200-90745399
0.18	Spz1b	8,191	in gene	chr6:102643800-102651999
0.18				chr11:12189000-121897999
0.17	gr1, Gm19894	38343, 1742	in gene, in gene	chr10:87853800-87389999
0.17	Nr121, Mvans1	10425, 57461	in gene, downstream	chr18:3877200-38298799
0.17	Lnc10, Cpe2a3, Bmyc	19073, 1176, -9080	downstream, in gene, upstream	chr12:2568200-25112799



- Activation marks
- H3K4me3 (single)
- H3K4me3 (repeated)
- H3K27Ac (single)
- H3K27Ac (repeated)
- H3K27me3 (single)
- H3K27me3 (repeated)
- H3K9me3 (single)
- H3K9me3 (repeated)
- Repression marks

さらに、Cyp2b10 のプロモーター領域においても、

活性化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 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。

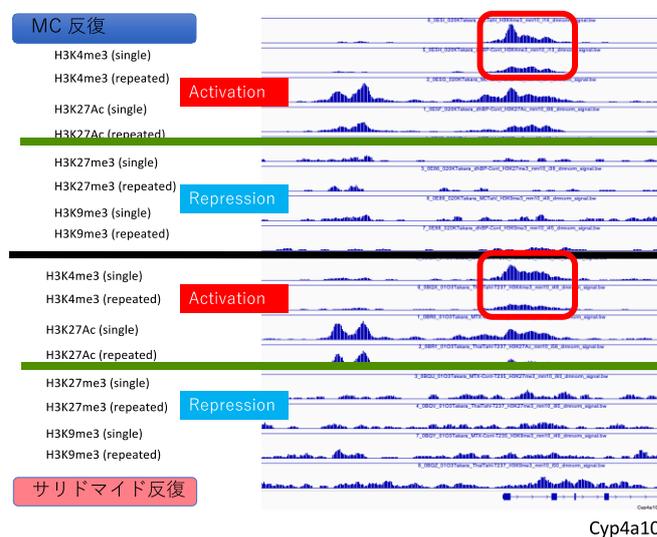
各抗体について、溶媒対照群と反復投与群において認められた各ピーク数はそれぞれ (以下、溶媒対照群、反復投与群)、

- 抗 H3K4me3 抗体 (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)、

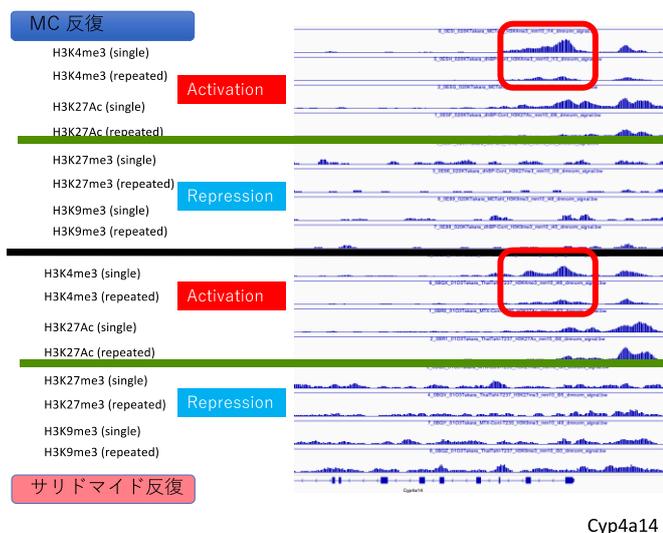
であった。この内、特に H3K9me3 のピーク数が 22, 803 から 18, 961 へ、26.8% 減少しており、溶媒である 0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与によって H3K9me3 が減少することが明らかになった (その他は、H3K4me3:7.3% 減少、H3K27Ac: 10.7% 減少、H3K27me3: 8.3% 減少)。したがって VPA の反復投与で見られた H3K9me3 のグローバルな抑制は、0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与が原因である可能性がある。

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。

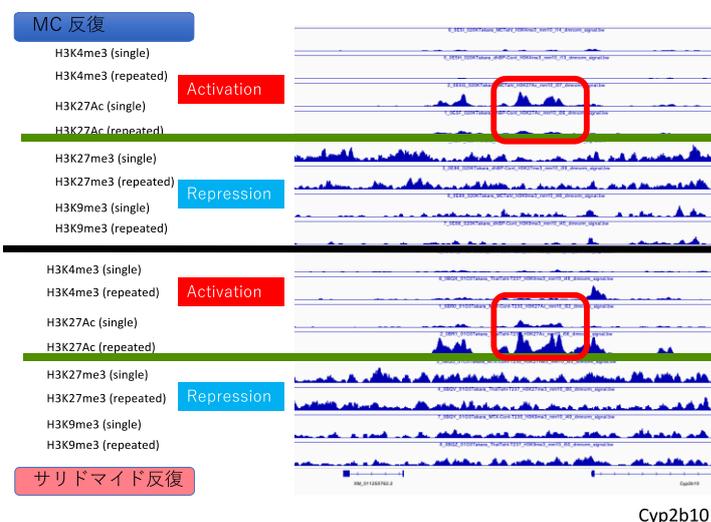
サリドマイドの反復によって、Cyp4a10 のプロモーター領域において、活性化型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



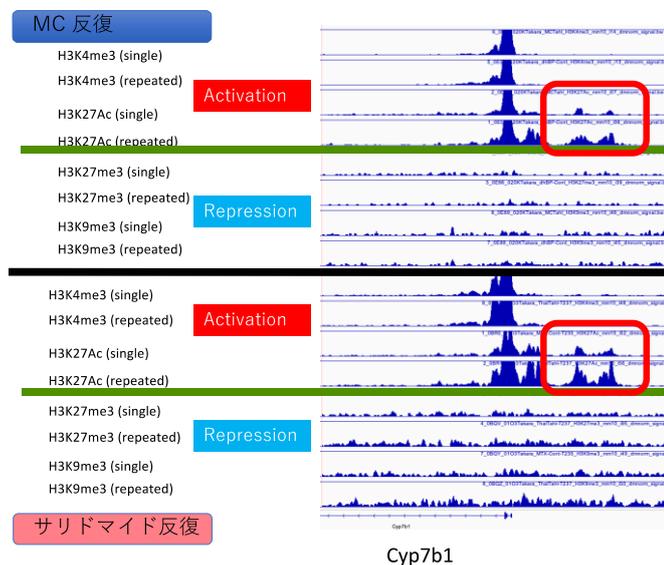
また、サリドマイドの反復によって、Cyp4a 14 のプロモーター領域においても、活性化型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



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増加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。

令和 5 年度においては、まずメチルセルロース (MC) 14 日間反復曝露および MC 単回曝露のエピゲノム解析の追加解析を行なった。

探索範囲を拡大したところ、その他の遺伝子領域においても顕著な変化が見られた。中でも Car (carbonic anhydrase) 遺伝子群に関連した H3K27Ac が、大きな領域において、MC の反復投与により増加していることがわかったが、サリドマイドの反復投与 (令和 3 年度に測定) においては増加していないことが判明した。

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

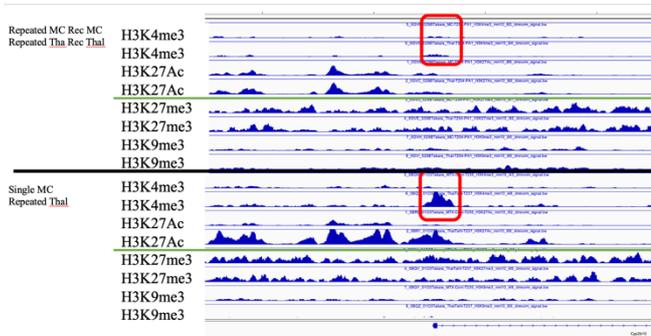
エピジェネティックな状態の変化がこのようにクラスターを形成し、大きな領域で制御されているこ

とから、インスレーターのような制御が存在されている可能性がある。

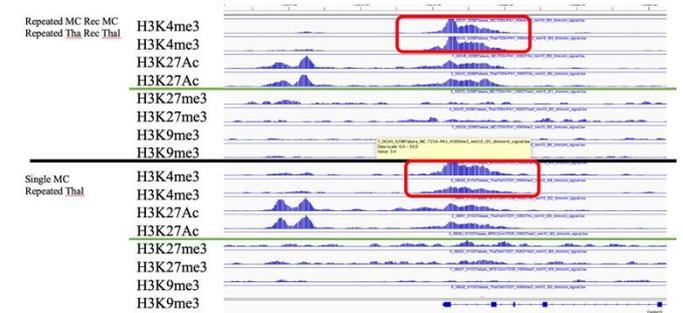


次に、令和5年度において新たに、サリドマイド影響の可逆性検討のため、サリドマイド14日間反復曝露、15日目から14日間無処置、29日目サリドマイド4用量単回曝露の実験を実施した。

その結果、下図の通り、サリドマイド反復でH3K4me3が誘導されていた領域において、休薬することで元に戻る領域があることがわかった。

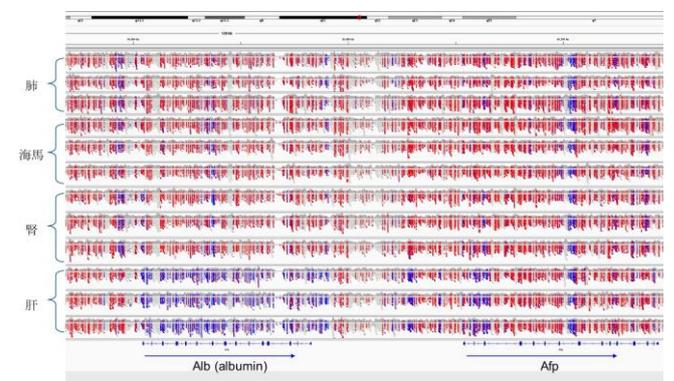


さらに、下図の通り、サリドマイド反復でH3K4me3が抑制されていたが、休薬することで元に戻る領域があることも明らかになった。



一方、多臓器ゲノムDNAメチル化解析の網羅的なについては、肝、肺、腎、海馬の臓器サンプルを採取し、全ゲノムバイサルファイト解析に代わり、より効率が良いとされる全ゲノムメチル解析(酵素法、EM-Seq)を採用して実施した。従来法であるバイサルファイト法で得たデータと比較した結果、一般的なEM-Seqの評価通り、より高精度のデータであることを確認した。

予備的な解析の結果、エンハンサープロモータ領域のDNAメチル化の状況と遺伝子発現の間に、良好な相関関係が認められた(albumin遺伝子を示す;青:脱メチル化、赤:メチル化)。



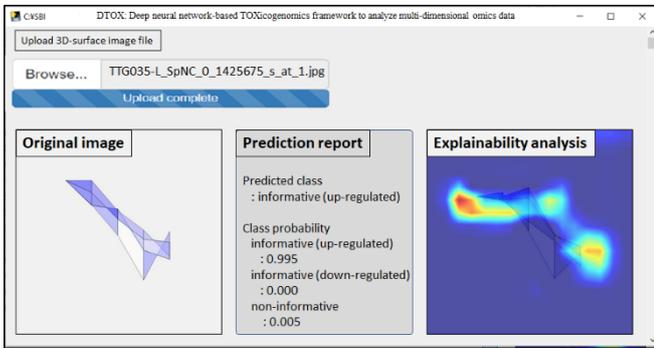
(3) システムバイオロジーによる毒性解析の AI 化
【北野】

令和 3 年度の研究結果は以下の通り。

●深層学習を用いた大規模遺伝子発現データベースからの重要遺伝子群の判別

トレーニング等に使用していないデータセットに対し、先行研究で開発した深層学習モデル DTOX を適用して予測を実行し、その結果を専門家の判定結果と比較して、予測が食い違った遺伝子の 3 次元グラフ画像を集め、追加学習を試みた。例数が少なかつたためか、その効果は大きなものでは無かったが、過学習等の悪影響も起こらず、深層学習モデルによる DTOX の予測精度は、一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインによる予測精度を大きく上回った。

また研究者等のユーザーが使いやすいグラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) の実装及び改良を進めた。



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

習モデルの判断根拠に関する解析も行われ、その結果は、Explainability analysis サブウィンドウ(右側)に表示される。判断根拠とされた画像領域は赤色でハイライトされる。

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

●深層学習を用いたエピゲノム解析データからの有意なエピゲノム修飾の判別

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

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

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

た。

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

	induction	ns	supression
Resnet18	induction 0 3 89	ns 0 466 4	supression 0 4 1184
Resnet34	induction 0 2 90	ns 0 468 2	supression 0 3 1185
Resnet50	induction 0 2 90	ns 0 465 5	supression 0 3 1185
Alexnet	induction 0 2 90	ns 0 461 6	supression 0 4 1184
Densnet121	induction 0 3 89	ns 0 466 4	supression 0 2 1186
Sqeeznet1.0	induction 0 1 91	ns 0 465 5	supression 0 4 1184
vgg16	induction 0 3 89	ns 0 467 3	supression 0 3 1185
vgg19	induction 0 1 91	ns 3 464 3	supression 0 3 1185

図 A

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

induction 群の分類不調の原因を調べるために、構築した深層学習モデルが画像のどの部分に着目して分類を行っているのかを示すべく、代表的な explainability model (grad cam: R. R. Selvaraju, M. et al (2019) Grad-CAM: Visual Explanations from Deep Networks via Gradient-Based Localization. Int J Comput Vis doi:10.1007/s11263-019-01228-7) を用いて深層学習モデルの解

析を行った。解析結果は、図Bの様に示され、深層学習モデルが図中の明るい部分に着目して分類を行っていることが示された。

pred. class: 2, actual class: supression

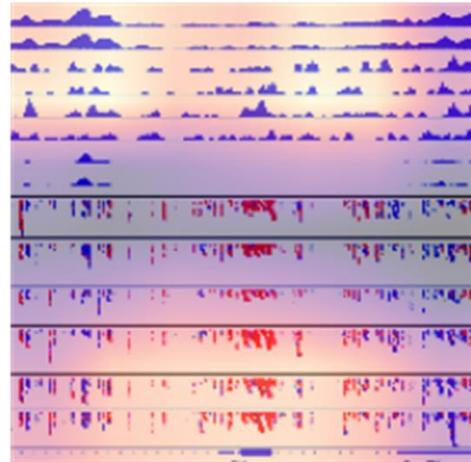


図 B

●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

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

令和 4 年度の研究結果は以下の通り。

●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

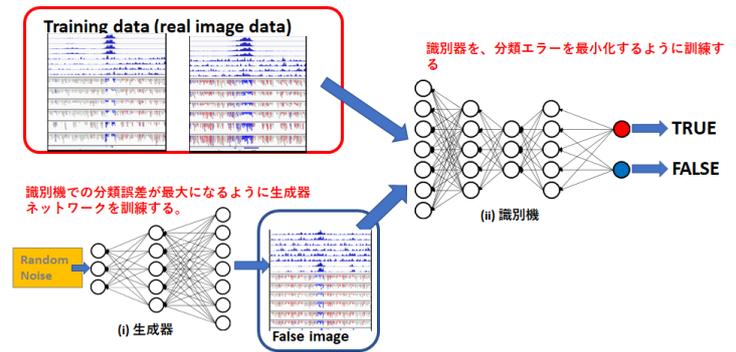
先行研究で開発した深層学習モデル DTOX については、グラフィカルユーザーインターフェイス(GUI)を実装し、試用とフィードバックによる改良を継続した。また DTOX に関する成果の原著論文文化を進めた。

●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、令和3年度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。

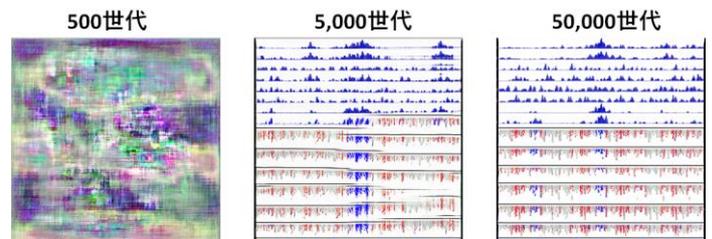
令和4年度はこの induction 群に対する訓練画像を増幅することを目的として、深層学習を基盤とした代表的な生成モデルである“Generative adversarial network (GAN)”の実装を行った。GAN は、図Cに示すように、(i)生成器ネットワークと(ii)識別器ネットワークの2つのネットワークから構成されている。生成器ネットワークは、ランダムなノイズから偽の画像データを生成する。識別器は偽の画像データと実物の画像データを比較する。比較により、生成器ネットワークによる画像データから、偽の画像を識別する。生成器ネットワークと識別器ネットワークが競い合う様に訓練が進んでいき、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。



図C GAN の構造

今回、令和3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、令和4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(図D)。



図D Fast GAN による生成画像

図D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、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（図E）。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

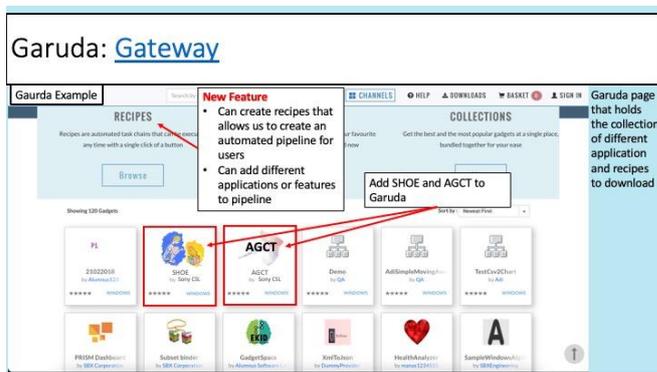


図E 深層学習モデルの予測精度の検証

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

令和4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、ClustalW から Clusteral Omega に変更した。

令和 5 年度の研究成果は以下の通り。
 エピゲノム解析画像を①suppression 群、②induction 群、③non significant 群の三群に分類することを目的として、代表的な CNN および transformer を基盤とした、2 段階モデル (図 F) によるエピゲノムデータの解析フレームワークを構築した。

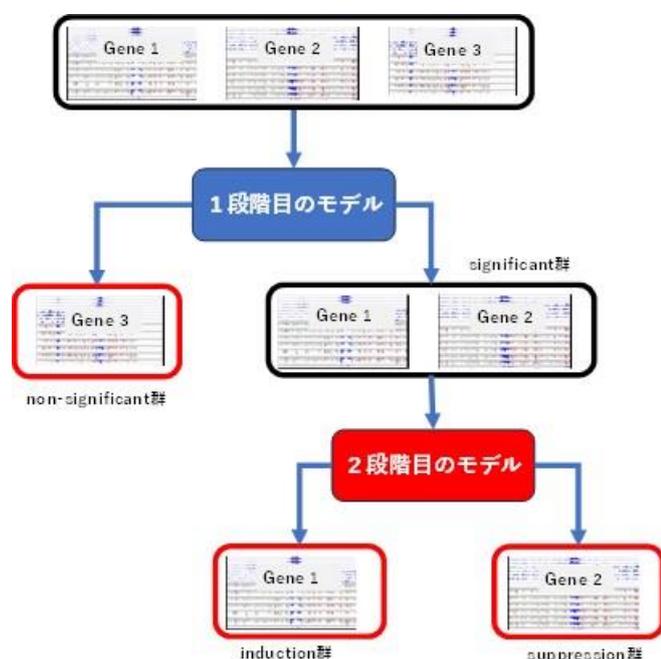


図 F. 2 段階モデルによるエピゲノムデータの分類フレームワーク

図 F に示すように、1 段階目のモデルでは、non significant 群とそれ以外の群 (significant 群) を分ける 2 値分類を行う。そこで、1 段階目のモデルについては、induction 群と suppression 群をまとめて significant 群とし、Resnet-18 アーキテクチャを用いて構築を行った。1 段階目のモデルについては、エピゲノム画像データの内、モデルの構築に使用をしていない残りの 20% のデータをテストデータとして用いて分類精度の検証を行った。図 G に示すように、1 段階目のモデルは、テストデータに対して、正確に non

significant 群、significant 群を分類できることが示された。

		予測	
		non significant	significant
正解	non significant	470	0
	significant	3	1277

図 G. 1 段階目のモデルの予測精度の検証結果

2 段階目のモデルでは、1 段階目で significant 群と判定されたデータを、induction 群、または、suppression 群へと、2 値分類する。2 段階目のモデルを構築するために、図 H に示す深層学習アーキテクチャを実装した。実装には、python の代表的な深層学習用のモジュールである、pytorch、timm、および、torchvision を用いた。

アーキテクチャ	基盤技術	発表年度	被引用回数	参考文献
Resnet-18	CNN	2015	195932	https://arxiv.org/abs/1512.03385
ConvNext	CNN	2022	3056	https://arxiv.org/abs/2201.03545
Vision transformer	transformer	2020	27687	https://arxiv.org/abs/2010.11929
Swin transformer	transformer	2022	949	https://ieeexplore.ieee.org/document/9879380
MaxVt	transformer	2022	268	https://arxiv.org/abs/2204.01697

図 H. モデル構築に使用した深層学習アーキテクチャ 被引用回数については google scholar の情報に基づき記載した

2 段階目のモデルについては、エピゲノム画像データの 80%、および、生成 AI により生成した画像データを用いて構築を行い、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。図 I に示すように特に、5 つのモデルの中で、Resnet-18 が最も高い分類性能を示したが、induction 群と suppression 群を十分に正しく分類することはできなかった。この結果は、エピゲノム修飾データの全体画像を用いた場合、significant 群の中で suppression と induction を正確に分類することは、困難であることを示唆する。

Resnet-18			ConvNext		
	induction	suppression		induction	suppression
induction	31	61	induction	13	79
suppression	128	1060	suppression	148	1040

Vision transformer			Swin transformer		
	induction	suppression		induction	suppression
induction	33	59	induction	92	0
suppression	296	892	suppression	1188	0

Max transformer		
	induction	suppression
induction	0	92
suppression	0	1188

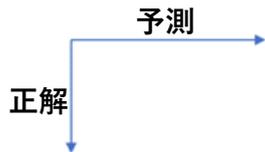


図 I. 2段階目のモデルの予測精度の検証結果

さらに、1段階目のモデルについて、Non_significant 群と significant 群を分類する判断根拠を探索するため、最新の explainability model (XGrad-Cam) を実装し解析を行った。図 J に示すように、深層学習モデルは、図中の赤および黄色の部分に着目して分類を行っている。Significant 群を分類する際には、クロマチン修飾のみに着目している場合 (図 J - A の中央図)、メチレーションのみに着目している場合 (図 J - A の左図)、そして、クロマチン修飾とメチレーションの両者に着目している場合が存在した (図 J - A の右図)。一方、non-significant 群を分類する際には、クロマチン修飾のみに着目している場合 (図 J - B の左図)、そして、クロマチン修飾とメチレーションの両者に着目している場合が存在した (図 J - B の中央図、右図)。以上の結果は、エピゲノム修飾のうち、クロマチン修飾のみが遺伝子発現に影響が及ぶ場合、および、メチレーションのみが遺伝子発現に影響を与える場合、が存在する可能性があることを示唆する。

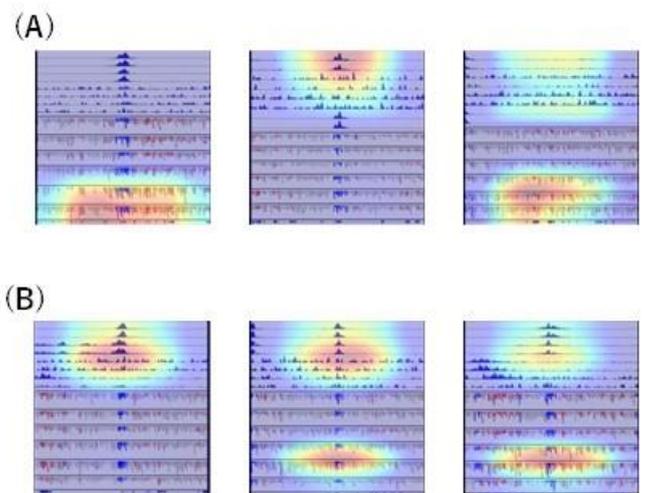
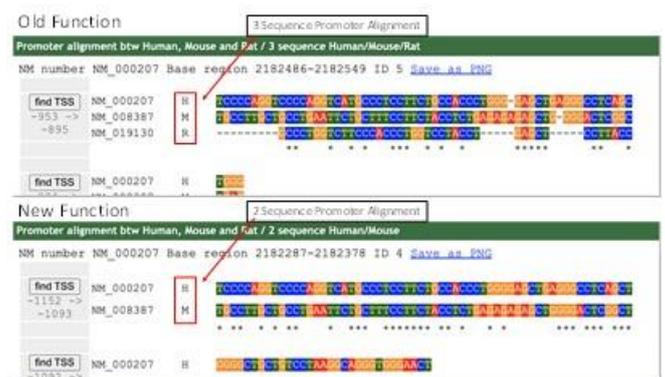


図 J. 1段階目の深層学習モデル (significant 群と non-significant 群を分類するモデル) の判断根拠の可視化 (A) significant 群に対する判断根拠の可視化結果 (B) non-significant 群に対する判断根拠の可視化結果

●転写領域解析ソフトウェア SHOE の改良

令和 5 年度も、SHOE の機能強化を継続し、その性能を評価した。具体的には、当初 Human/Rat/Mouse の全てでプロモーター配列が保存されていないと候補から落とされていたところを、Human/Mouse 若しくは Human/Rat で保存されていれば候補に残すようにした。



SHOE Updated Feature: 2-Sequence Alignment



Human/Mouse 若しくは Human/Rat の 2 種アライメントに対応した新機能画面

また Garuda Platform 上で、Percellome DB の利用に適した解析パイプラインの構築を進め、SHOE と他の Garuda Gadget との連携も強化した。



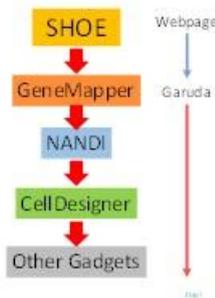
Garudification

GeneMapper is an UI that pulls data from SHOE and sends it to Garuda

- Current Garudification design is simpler and less complex to implement
- GeneMapper connects to SHOE to pull data
- SHOE is independent to Garuda
- GeneMapper is connected to Garuda and can send SHOE's data to other Gadgets



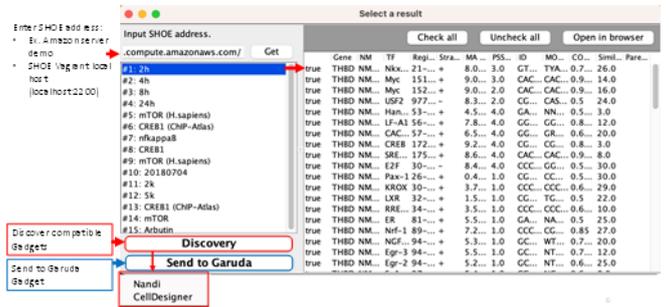
Garuda 対応と解析パイプラインの流れ



実際のパイプラインの流れは以下の通り。



GeneMapper UI



GeneMapper UI



Send to NANDI SHOE data → GeneMapper → NANDI → Gadget

NANDI loads data and sends it to other compatible Gadgets

GeneMapper and NANDI are connecting

Issue to correct: Data not being attached when sent



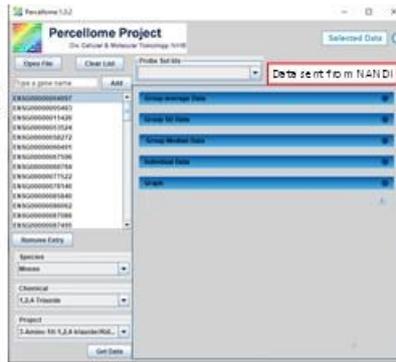
Percellome

SHOE data → GeneMapper →

NANDI → Percellome (others)

Example:

- Connecting to Percellome Gadget



実際のデータで解析を試みて、Garuda Gadget 運動による解析パイプラインの性能や使い勝手の評価を進めた。

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

令和3年度は、最終目標である新型化学物質有害性評価システムの解析コアの主要ユニットとしての、遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発を進めた。これに組み込むライブラリの選定を進めつつ、データ解析ユニット運用の基盤となるデータ群の結合に必要な情報(基盤情報)の整備を進めた。

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

定性)、ライセンス、依存関係、コンフリクト状況の確認を行なった。

基盤情報の整備では、最重要と考えられる項目として、主要データの大半を占める遺伝子発現データを生成したマイクロアレイ GeneChip Mouse Genome 430 2.0 のプローブ 50 万件の最新のマウスリファレンスゲノム (mm10)上での座標の確定であるが、作業効率の観点から、11~25 本のプローブ群からなるプローブセット 4.5 万件の座標確定作業を進めた。各プローブセットのターゲット配列はメーカーが提供する fasta フォーマットの配列データ Mouse430_2_target より取得し、python スクリプトにより fastq 形式に変換した。mm10 へのマッピングは、BWA の mem オプションにて実施した。この結果、45101 件の target 配列のうち、複数領域にマッピングされたものが 785 件、マッピングされなかったものが 457 件あった。またマッピングされたものでも、メーカーが提供している Mouse430_2.mm10.bed の情報、具体的には染色体番号がマッピング結果と異なるものが 1320 件あった。Mouse430_2.mm10.bed で複数の領域 (2~12 箇所) にマッピングされていたプローブセット 785 件と合わせ、少なくとも 2105 件 (全プローブセットの 4.7%) については、個別の手動調整が必要であることが明らかになった。

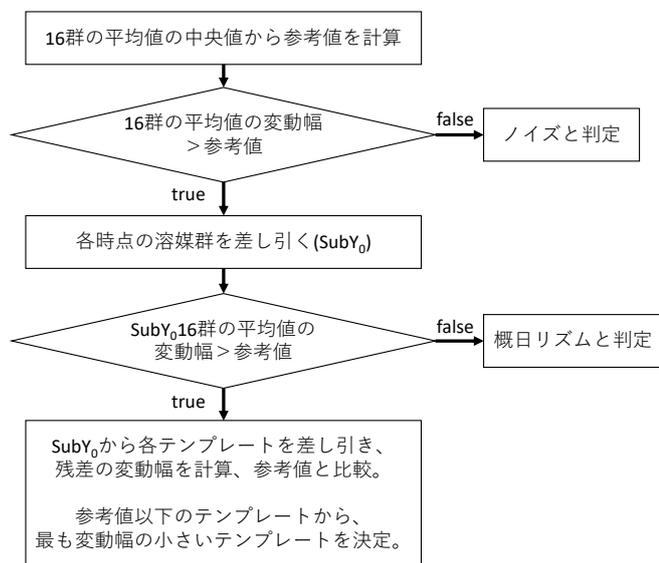
個別に調査したところ、BWA によりマッピングされた染色体と、メーカー情報での染色体が異なるプローブセットの多くは、複数のエクソンを含む領域に設計されていることが確認された。

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

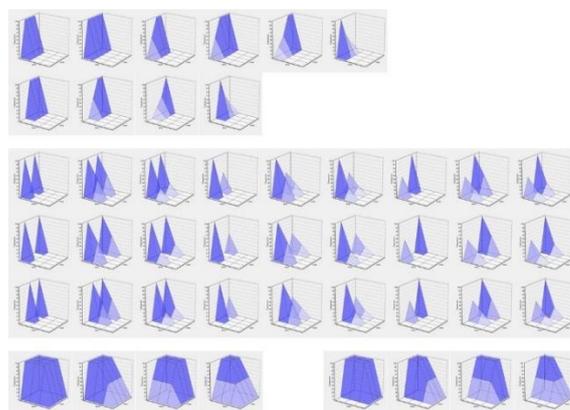
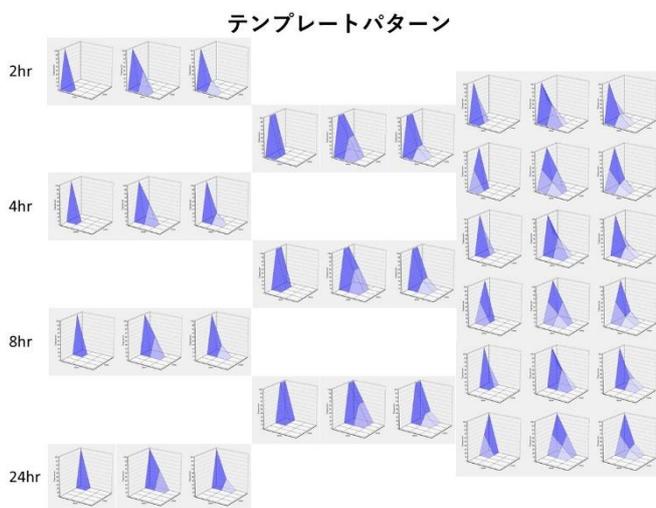
令和4年度も最終目標である新型化学物質有害性評価システムの解析コアの主要ユニットとしての、遺伝子発現とエピゲノムのデータ解析ユニットの開発を進めた。研究計画初期のデザインのままでは、解析工程

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)。

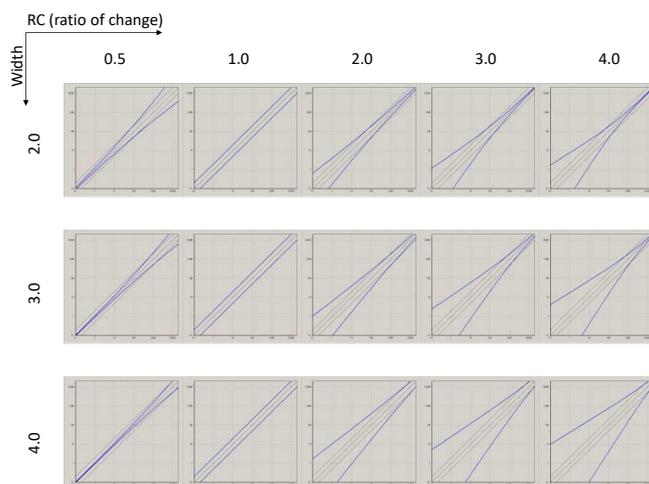


4用量×4時点のSurfaceの基本解析フロー



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。

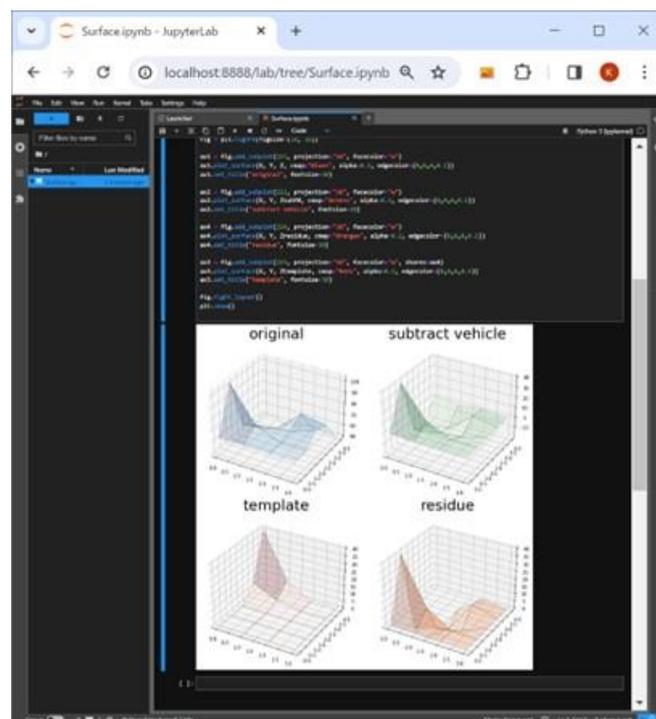
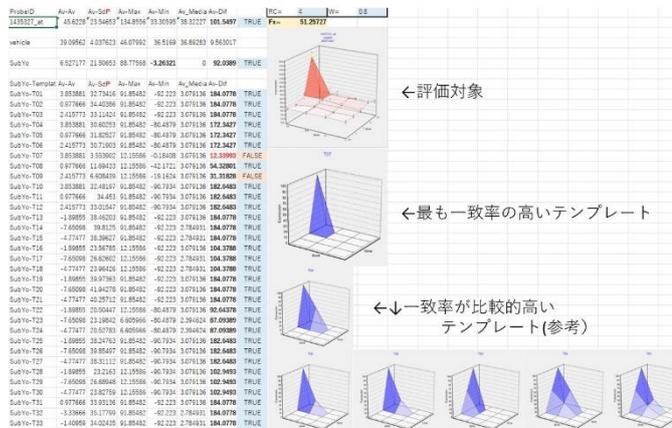
このとき参考値の算出は、単純な fold change ではなく、先行研究で考案した empirical な曲線(実際の Percellome 法により絶対量化した発現値の分散からパラメータを決定する指数関数(下図、Fx 曲線と仮称)を用いた。



対数グラフ上で、パラメータによって曲率が変わる 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



令和5年度も引き続き、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、データ解析ユニットの開発を進めた。

今回、コンセプトモデルのプラットフォームとしては、実行した Python コードと出力結果を記録しつつ、容易に様々な試行を実行可能、つまり探索的解析に適した Jupyter Notebook/Lab を採用した。

ある程度定型化した処理については、雛形となるソースコード(スクリプト)を集めたリポジトリを整備する。プログラミングできないユーザーでも、これらを Jupyter Notebook/Lab に読み込み実行すれば、解析処理が実行され、計算結果の数値が出力され、数値やグラフ・画像がソースコードに続けて出力、表示される。

ここに考察などのメモを追加することも可能であり、電子的な実験ノートとしての活用が期待される。

これら、ソースコード(プログラム/スクリプト)とその実行結果、実験ノートを一括して、専用ファイル形式(.ipynb)で保存できる。このファイル形式は基本的にはテキストデータで、現在は勿論、将来的にも可用性が高く、ファイルが開けないなどといった事態に陥ることもなく、記録データ形式としては理想的なものである。

また昨年度に引き続き、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については、分類指標となるテンプレートのコレクションの網羅的な作成を進めた。具体的には、クラスタリングを行い、各クラスターのセントロイドを代表パターンとして採用した。今回は、密度準拠クラスタリングアルゴリズムである DBSCAN を用い、主要なパターンを収集した。

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

令和3年度には、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3種(クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウム、エストラゴール)の遺伝子発現プロファイルの動的変動を比較し、これら3種に共通するパターンや固有に認められるパターンを検出することにより、Percellomeデータの効果的な活用方法を検討した。

クロフィブラートは高脂質血症治療剤であり、PPAR α を介した脂肪酸 β 酸化の亢進などによりトリグリセリドやVLDLの減少やHDLコレステロールを誘導すると考えられている。また、これまでの我々の研究により、①バルプロ酸ナトリウム曝露によってPPAR 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。そこで、これらの化学物質で発現が亢進する遺伝子の比較を行い、PPAR α の活性化に係る共通項や差異について考察した。その結果、Acot (Acyl-CoA thioesterase) といったPPAR 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。バルプロ酸ナトリウムでは2,4時間の時点で転写や細胞周期に関連する遺伝子の発現が亢進し、少し遅れて脂質代謝関連遺伝子の亢進のピークが認められた。また、クロフィブラートでは曝露4時間の時点でリボソーム生合成関連遺伝子の発現亢進が認められた。これらの遺伝子ではパスウェイレベルのエンリッチメントは認められずGene Ontologyレベルでのエンリッチメントが検出されて

いることから、PPAR α 活性化に伴う生体応答である可能性が考えられる。

令和3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、令和4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 、PPAR $\text{gcl}\alpha$ 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 、PPAR $\text{gcl}\alpha$ 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。

令和5年度は、TCDDとタール色素(赤色225号、501号、505号では)変動する遺伝子の重複が大きい傾向にあったが、赤色501号は比較的固有の遺伝子変動が認められた。Gene ontologyなどによるエンリッチメント解析の結果、「mmu00982:Drug metabolism - cytochrome P450 - Mus musculus (house mouse)」が全ての化学物質において最も有意にエンリッチしていたほか、共通してNADP代謝、エストロゲン代謝、レチノール代謝、ベンゼン環を含む化合物の代謝、ヘム分解、ファイトケミカル応答におけるNfe2l2活性化といった機能を有する遺伝子の発現変動が認められた。TRRUST (Transcriptional Regulatory Relationships Unraveled by Sentence-based Text mining)による転写制御ネットワークの解析の結果、TCDDは既知情報と矛盾なくAhrやArntを介した転写制御のトリガーとなっていることが示されたが、タール色素全てにおいて同様にAhrやArntの活性化を示唆する結果が得られた。さらに、Nfe2l2やJunもこれら全ての化学物質によって活性化されることが示された。赤色501号は他にもNFkB1、RelAなど多数の転写因子の活性化を引き起こすことが明らかとなった。MCODE (Molecular Complex Detection) アルゴリズムによって、個別の化学物質におけるタンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) ネットワーク内において密に連結されたタンパク質のgene ontologyを解析した結果、1) TCDDでは「mmu00830: Retinol metabolism」「mmu00980: Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450」「mmu05204: Chemical carcinogenesis - DNA adducts」に関連する遺伝子の産物が密に相互作用をしており、その傾向は赤色505号と類似している、2) 赤色225号ではそれに加えて「mmu00830: Retinol metabolism」「GO:0006805: xenobiotic metabolic process」

「GO:0071466: cellular response to xenobiotic stimulus」に関連する遺伝子の産物が密に相互作用をしている、3) 赤色501号ではそれらに加えてさらに「mmu04010: MAPK signaling pathway」「GO:0035335: peptidyl-tyrosine dephosphorylation」「R-MMU-168164: Toll Like Receptor (TLR3) Cascade」に関連する遺伝子の産物が密に相互作用をしているほか、「mmu04210: Apoptosis」「mmu04530: Tight junction」「mmu05132: Salmonella infection」に関連する遺伝子の産物が密に相互作用をしている、という結果が得られた。

D. 考察

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

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

合する。

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

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

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。

令和 5 年度は、DEHP、BrBenz および 2-VP の 4 日

間の新型反復曝露 (以下、[4+1] と表記) の遺伝子発現解析を単回曝露[0+1] と共通の要素と異なる要素の抽出及び、基線反応の増減に関わる要素を抽出した。

DEHP[4+1] の結果は、PPAR のリガンドとして知られる前年度の estragole とは基線反応に対する影響が異なっていた。DEHP[4+1] は PPAR 下流の遺伝子の基線反応を下げることを示唆され、これは estragole[4+1] とは逆の方向であった。詳細な比較検討をさらに進めるが、肝発がん性を示唆する点では共有であった。

BrBenz[4+1] は、タンパク質翻訳に関わる遺伝子群の強力な抑制効果を発揮することが示された。この作用により肝、および、翻訳に関する機作に共通性を有する諸臓器に対する広範な毒性を発揮することが考察された。

2-VP[4+1] は、Gcr (Glucocorticoid receptor)、Nrf2 系、グルタチオン、チオレドキシシン系、PPAR α による脂質代謝、PXR、AhR、Car を介しての広範な標的に対する酸化的ストレスに対抗する因子の増強を誘導することが示唆された。2-VP で報告されている中枢毒性に対する予測に関しては、Perccellome database に収録されている神経毒性物質との比較検討を進めるが、肝における関連遺伝子の発現変動は下図の様に確認することが可能である。

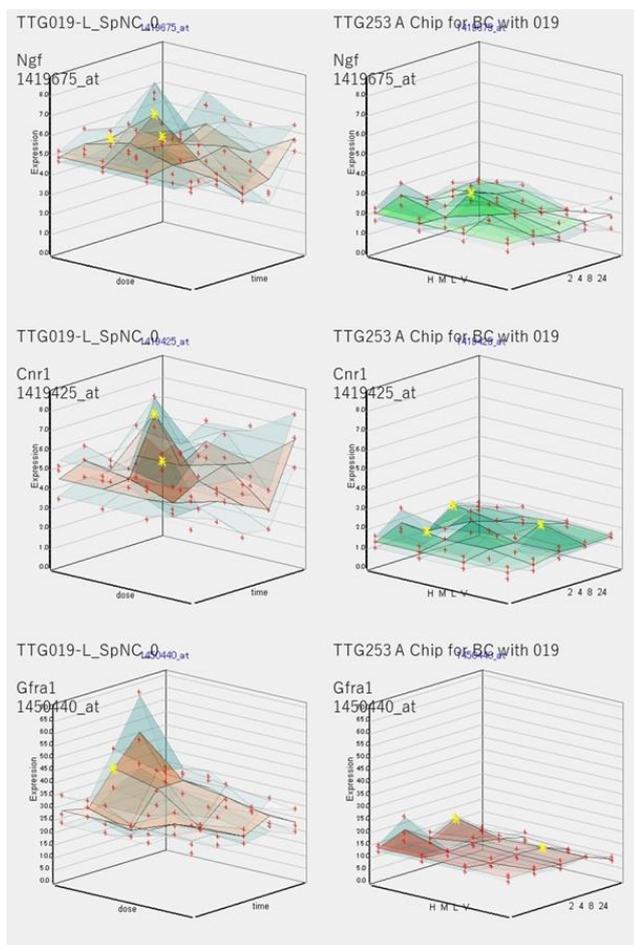


図 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて、Nerve growth factor、cannabinoid receptor 1 (brain)、glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 を示す。

いずれの3物質とも、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、単回曝露とは異なる変化を明らかにすることが出来た。個々の物質の特性に依存して、反復投与により活性化ないし抑制された遺伝子群について、その付帯情報を導入することで慢性毒性への外挿の可能性が示唆された。その際、Gene ontology (GO)が共通な化学物質が抽出されても、詳細にその内容を確認すると、変動の増減の方向が逆である場合、GOの組み合わせ、特に重なり合う遺伝子群が異なる場合があり、GOの段階での記述では化学物質ごとの毒性機序が説明できない幾つかの様式があることが示唆された。今後、AIの導入による Percellome database 内

での多角的な詳細解析およびメタデータとの照合の高次元での促進と実用化を目指す予定である。

「反復曝露影響のエピゲノム機構解析」【北嶋】において、令和3年度はサリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析データを取得した。これにはサリドマイドの反復曝露影によるエピゲノム影響の解析を行う直接的な意義だけでなく、サリドマイドの溶媒はメチルセルロース水溶液 (MC) であることから副次的な意義を有していた。即ち、先行研究において VPA の反復曝露によりグローバルな H3K9me3 の低下が見られていることから、これが溶媒影響かどうか、溶媒が同じ MC であるサリドマイドの反復曝露の解析結果から判別可能と考えられたことによる。

令和4年度において、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明らかとなり、先行研究によるコーンオイルの反復曝露影響の結果と合わせて、代表的な2種の溶媒の反復曝露影響の情報が揃ったことになる。この基礎的な情報により、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。

令和5年度は、サリドマイドの反復投与により誘導および抑制された H3K4me3 が、休薬によって元に戻る領域があることがわかった。尚、同様のばく露実験が幼若動物に行われていた場合、サリドマイドの休薬によっても、エピジェネティクス影響がそのまま維持される可能性が考えられ、今後の検討課題とした。

一方、肝以外の代表的な臓器のゲノム DNA メチル化の網羅的な解析については、解剖手順や実験条件を最適化し、Percellome データベースに収録され

ている多くのトランスクリプトームデータに対応すべく、肝に加えて、肺、海馬、腎の正常組織をサンプリングし、受託機関にてEM-Seq(酵素法)を実施した。この際、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した。これらによって、肝だけでなく、肺、海馬、腎においても良質なゲノムDNAメチル化のリファレンスデータが得られた。これらは今後の各臓器の解析精度の向上、および多臓器間の関連性に関する解析の精度の向上が期待される。予備的解析においては、エンハンサープロモータ領域のDNAメチル化の状況と遺伝子発現の間に、良好な相関関係が確認されている。

「システムバイオロジーによる毒性解析のAI化」

【北野】の令和3年度研究においては、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D_{TOX}の予測精度をより一層高め、一般的なバイオインフォマティクス解析パイプラインの精度を大きく上回る性能を示した。これは、D_{TOX}の深層学習モデルが、研究者によるヒューマンキュレーションの際に評価している領域を着目して判定していることから、トレーニングにより人の判断のパターンを上手く捉えることで、高い精度を実現している可能性を示唆している。

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

<https://arxiv.org/abs/1406.2661>)を活用して、**induction**群の訓練用画像の増幅を進めた。

令和4年度研究では、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D_{TOX}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: 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、を検討する。

令和5年度研究では、エピゲノム解析において、深層学習モデルは、反復曝露によるエピゲノム修飾の内、遺伝子発現に影響がある修飾を分類できる可能性があることが示唆された。しかしながら、エピゲノム修飾の全体画像を用いた場合、**induction**群、**suppression**群の分類は困難であることが分かった。ま

た、最新の explainability model を使用した深層学習モデルの解析を行ったところ、深層学習モデルでは、遺伝子発現に影響がある修飾を分類するときに、エピゲノム修飾画像の中の、(i)クロマチン修飾に関する画像部分のみに着目して分類している場合、(ii)メチレーションに関する画像部分のみに着目して分類を行っている場合、があることがわかった。これらの結果は、エピゲノム修飾のうち、クロマチン修飾のみが遺伝子発現に影響が及ぶ場合、および、メチレーションのみが遺伝子発現に影響を与える場合、が存在する可能性があることを示唆する。そこで、suppression 群と induction 群をより正確に分類することを目的として、今後、①画像のクロマチン修飾部分のみ（下図の画像の上半分）を用いて、suppression と induction の分類を行うモデルの構築、および、②画像のメチレーション部分のみ（下図の画像の下半分）を用いて、深層学習モデルの構築、を進める予定である。

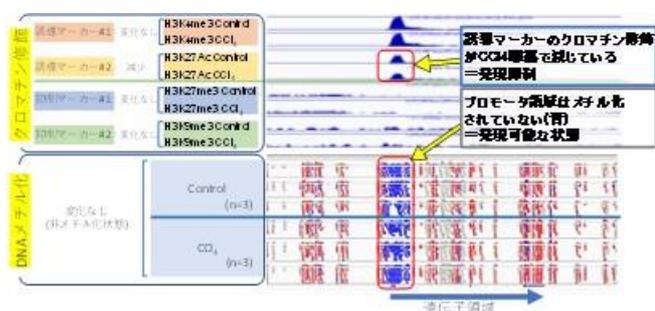


図. エピゲノム修飾に関する画像の例
画像の上部に描画されている分布がクロマチン修飾の状況を表しており、下部に描画されているプロットがメチル化の状況を表している。横軸はゲノム配列における位置を表している。メチル化については、青いプロットがメチル化されていない状態を表している。

一方、転写領域解析パイプラインの改良については、SHOE の機能追加により解析対象の候補数が増加した。また Garuda 化も終え、他のガジェット(解析ソフトウェア)との連携も蜜となり、より実用的となった。

「統合ツール“Percellome Integrator”の開発」【相崎】について、令和3年度に実施した新型化学物質有害性評価システムの解析コア開発のための開発用ライ

ブラリ探索は順調に推移した。検討課題としては、データの可視化に際して、従来の様式より効果的な表現の検討が挙げられた。特にグラフや解析図等の可視化手法については、分担研究「システムバイオロジーによる毒性解析のAI化」での学習用画像としての利用を前提として、特徴を捉えやすい表現形式となるよう考慮する必要がある。

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

令和4年度は、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を進め、期待されたノイズ除去と自動(時系列)分類の性能にほぼ達した。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、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た。

数理的に 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独自開発の RSort と、DIOX(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、特徴分類アルゴリズムの実装フィルターを挿入することで、研究者による最終的なヒューマンキュレーションの大幅な効率化が期待できる。

令和5年度は、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コンセプトモデルの作成を終えた。システムのメンテナンス性、拡張性、ユーザー利便性、及び、完全再現性を実現するための記録保持、即ち使用プログラムのバージョン管理、解析パラ

メータの保存、解析計算過程の記録、解析結果の保存、実験ノートの保存、の全てに対応しうる環境として、Jupyter Notebook/Lab を選択するのは、オープンソース及びオープンサイエンスの流れに沿った適切なものと考えられる。また専用ファイル形式.ipynb が基本的にテキストデータであることは、将来的な技術変遷にも対応しうる利点である。GUI に慣れたエンドユーザーにとって、ソースコードとの距離が近い事は当初、戸惑うかもしれないが、必要なければ書き換える必要が無くブラックボックスとして扱えば良い事が分かれば、直ぐに対応が可能であると思われる。また実験・解析記録として、実行したソースコードと計算結果（グラフや画像を含む）、考察などのメモを残すことの出来る Markdown データがオールインワンで揃っている.ipynb ファイルは、ほぼ完全な記録と成りうる。

今後は解析用プログラム（スクリプト）のリポジトリを充実させ、十分なセキュリティを考慮した上で、GitHub などオンラインリポジトリとの連携も考える。また研究が進み、完全に定型化した工程については、ユーザー利便性が増すなら、そのソースコードを基に Electron、Elm などを活用して独立起動可能なアプリケーションソフトウェアに纏めることとする。

Garuda Platform との連携についてはまだ実現できていないが、アダプタとなる Gadget を作成することで実現可能であり、優先的に開発を進める。

遺伝子発現の3次元パターン(Surface)の特徴分類については、テンプレートライブラリの網羅的な拡充にも目処が立ち、早期の実用化が可能である。当初は Percellome Integrator のスクリプトリポジトリに加えることで最適化を兼ねた早期稼働を目指す。

なお今回実施したクラスタリングによる代表パターンの抽出方法では、孤立パターン（クラスタを形成しないもの）を抽出する事が出来ないため、クラスタを形成しなかったパターンから何らかの方法でノイズを除外し、残ったパターンから生物学的に

有意な変動パターンを取得する方法の開発も進める。

「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、令和3年度の研究では、どの時点において発現亢進が認められたかのパターンごとに細かく遺伝子リストを分割し、それぞれに対してエンリッチメント解析を行うことで曝露時間の情報をどのように活用するのが効果的かを検討した。今回はTargetMineを用いたパスウェイ・Gene Ontologyレベルでのエンリッチメント解析を元に化学物質曝露によって惹起される生体応答を分析したが、従来のエンリッチメント解析では毒性学研究に最適とは言い難い問題点も浮き彫りになった。つまり、PPARα活性化のように核内受容体を介した遺伝子発現誘導は比較的検出しやすい一方、二次的に惹起される生体応答を検出するためには遺伝子発現変動のパターンに基づいた分類により入力する遺伝子リストの「磨き上げ」が重要であることと、その解釈にはより深いドメイン知識が必要であることを指す。クロフィブラート曝露によるリボソーム生合成関連遺伝子の発現亢進がこれにあたるが、このような応答をする遺伝子はその化学物質の生理活性強度を評価する上で有用である可能性が示唆され、遺伝子発現プロファイルから毒性発現メカニズムを推定する上でパスウェイやGene Ontologyとは異なる階層のオントロジーの必要性を支持する結果であると言える。

令和4年度の研究では、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。

令和5年度の研究では、赤色225号、501号、505号の遺伝子発現プロファイルをTCDDと比較した結果、全てAhrやArntを活性化することでCYPの発現誘導をしているということに加えて、Nfe2l2やJunも活性化されることが示された。Nfe2l2はNrf2とも呼ばれる酸化ストレス応答の転写因子であり、AhrやArntと同じく薬剤代謝酵素の発現に寄与していると思われる。赤色501号はこれらの転写因子の活性化に加えて、免疫パスウェイに関連する遺伝子の変動が認められており、これが赤色501号に見られる固有の変動パターンに起因していると考えられる。

E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

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

【菅野】については、令和3年度単回曝露、及び反復曝露実験を行ったPFOAは、先行研究で実施した化学物質比較して毒性の強いものであり、遺伝子発現解析からもそれを説明する毒性シグナルネットワークの挙動が示唆された。反復曝露による影響が単回曝露の影響と比較して急激に増悪する例として注目すべきものであり、更に精緻な分子機序解析を進める。

令和4年度の、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では、ともにPPAR下流の脂質代謝に関わる遺伝子発現が主体であったが、[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。

令和5年度のブロモベンゼンの4日間の新型反復曝露では、タンパク質翻訳に関わる遺伝子群(真核生物翻訳開始因子(Eif: eukaryotic translation initiation factor))の強力な抑制効果を発揮することが示された。この作用により肝、および、翻訳に関する機作に共通性を有する諸臓器に対する広範な毒性を発揮することが考察された。また2-ビニルピリジンの4日間の新型反復曝露では、GCR (Glucocorticoid receptor)、NRF2系、グルタチオン、チオレドキシン系、PPAR α による脂質代謝、PXR、AhR、CARを介しての広範な標的に対する酸化的ストレスに対抗する因子の増強を誘導することが示唆され、肝において神経関連の遺伝子の発現抑制を確認することが可能であった。

これらの解析結果は僅か4日間の反復曝露により長期の反復毒性を推測する基礎データを取得できること、即ち新型反復曝露実験プロトコルとPercellome法に基づく網羅的解析技術による、短期間試験での反復曝露毒性の予測の実現可能性が高いことを示唆している。

「反復曝露影響のエピゲノム機構解析」【北嶋】の令和3年度研究においては、サリドマイドの反復により、薬物代謝酵素群のプロモーター領域において、ヒストン修飾の変動が検出された。これは、発現誘導または抑制状態がエピジェネティックな変化により、固定されたとも考えられる。サリドマイドの反復投与により43.4%の増加が見られたH3K27me3について、変化のあった領域にどのような共通性があるのかを明らかにする必要がある。また、肝臓以外の臓器のゲノムDNAメチル化解析方法については、基本的には先行研究で実施した肝臓での解析方法と同等と確認された。

令和4年度研究では、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。エピジェネティックな状態変化が遺伝子クラスターを形成し、大きな領域で制御されているこ

とが示唆された。またメチルセルロースの解析結果との比較から、令和3年度に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。今後のデータ解析において、溶媒影響を補正することが可能となったと考えられた。

令和5年度研究では、ヒストン修飾の可逆性を検討するため、サリドマイド14日間反復曝露の後、14日間の無処置期間を設け、29日目にサリドマイド4用量単回曝露の実験を実施し、サリドマイドの反復曝露影響によって生じたエピジェネティクス影響の一部が、休薬によって元に戻る領域があることが明らかになった。

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、EM-Seq法により、より高精度なリファレンスデータを得た。

「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解析用ソフトウェアは実用の段階に至り、論文も発表した。新たに開始したエピゲノム解析のAI自動化についても、十分な訓練用画像があれば、より正確に反復曝露により遺伝子発現に影響を与えるエピゲノム修飾を予測できることが示唆されている。ただし、訓練用画像データ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ている。不足しているカテゴリをAIで増幅する手法(Generative adversarial network)の活用も試みた。explainability modelを利用することでAIが注目している要素が判明したので、今後は重要な領域別のモデル構築を進め、実用レベルの予測性能を目指す。

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。

一連の成果で、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った。

「統合ツール“Percellome Integrator”の開発」**【相崎】**については、令和5年度にはデータ解析ユニットのコンセプトモデルの作成を終えた。また基盤となる情報、とりわけGeneChip Mouse Genome 430 2.0のプロブセットのtarget座標情報について整備した。さらには変動遺伝子の自動抽出パイプラインの改良を行い、この際参照するテンプレートライブラリを充実させることで、解析工程の効率化が期待される。

「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PPARαリガンド、およびPPARαリガンドであることが示唆されている化学物質が惹起する遺伝子発現変動パターンの比較により、化学物質の曝露時間情報の有効活用が毒性発現メカニズム推定において重要であることが見出された。さらに、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。

この解析技術を元に、AhR関連の遺伝子発現変動を示すTCDDとタール色素(赤色225号、501号、505号)の包括的な解析を実施したところ、Ahr/Arntの活性化や酸化ストレスを介したNfe2l3の活性化による薬剤代謝酵素の誘導が起こること、さらに、赤色501号はNFκBなど免疫応答の活性化も併せて誘導し、比較した他の化学物質よりも多様な遺伝子に対して影響を及ぼすことを明らかにした。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie. DTox: A Deep neural network-based in visio lens for large scale Toxicogenomics data. *J. Toxicol. Sci.* 2024; 49(3): 105-115. [doi.org/10.2131/jts.49.105].
- (2) Yu Takahashi, Ryota Wakabayashi, Satoshi Kitajima, Hideho Uchiyama: Epichordal vertebral column formation in *Xenopus laevis*. *J Morphol*, 2023; 285: e21664. [doi.org/10.1002/jmor.21664]
- (3) 五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡: 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向, 月刊「食品衛生研究」, 2023; 通巻885号 (73巻12号), 公益社団法人日本食品衛生協会 (東京)
- (4) Satoshi Yokota, Tomohiko Wakayama, Hidenobu Miyaso, Kousuke Suga, Masakatsu Fujinoki, Satoru Kaneko, Satoshi Kitajima: Reactive Blue 2 Labels Protamine in Late-Haploid Spermatids and Spermatozoa and Can Be Used for Toxicity Evaluation. *Andrologia*, 2023; 2023: 7364862 [doi.org/10.1155/2023/7364862]
- (5) Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41: 1142-1156. [doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]
- (6) Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front. Neurosci.* 2023; 17: 1239808. [doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]
- (7) Hirokatsu Saito, Satoshi Yokota, Satoshi Kitajima: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem.* 2023; 125(5): 152046. [doi.org/10.1016/j.acthis.2023.152046]
- (8) Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 203-210. [doi.org/10.2131/jts.48.203]
- (9) Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82. [doi.org/10.2131/fts.10.69]
- (10) Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 59-68. [doi.org/10.2131/fts.10.59]
- (11) Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): 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]
- (12) Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi, 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]
- (13) 齊藤洋克、北嶋聡: 化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, 化学物質と環境:化学物質と環境との調和をめざす情報誌, 184, 3-6, 2024
- (14) Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]
- (15) 菅野純、相崎健一、北嶋聡: 遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測, 単行本「化学物質の複合影響と健康リスク評価」, 2024; 第2章 複合曝露による毒性の評価手法 第1節, 67p, 医歯薬出版(東京) [ISBN: 978-4-263-73220-5]
- (16) Zahm S, Bonde JP, Chiu WA, Hoppin J, Kanno J, Abdallah M, Blystone CR, Calkins MM, Dong GH, Dorman DC, Fry R, Guo H, Haug LS, Hofmann JN, Iwasaki M, Machala M, Mancini FR, Maria-Engler SS, Møller P, Ng JC, Pallardy M, Post GB, Salihovic S, Schlezinger J, Soshilov A, Steenland K, Steffensen IL, Tryndyak V, White A, Woskie S, Fletcher T, Ahmadi A, Ahmadi N, Benbrahim-Tallaa L, Bijoux W, Chittiboyina S, de Conti A, Facchin C, Madia F, Mattock H, Merdas M, Pasqual E, Suonio E, Viegas S, Zupunski L, Wedekind R, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid and

- perfluorooctanesulfonic acid. *Lancet Oncol*, 2024; 25(1): 16-17. [doi:10.1016/S1470-2045(23)00622-8. Epub 2023 Nov 30]
- (17) Kishi M, Hayashi T, Mitani K, Tsuboshima K, Kurihara M, Hosoya M, Sekimoto Y, Okura MK, Mitsuishi Y, Okada Y, Kanno J, Yao T, Takahashi K, Seyama K. Clinicopathological Impacts of Expression of Neuronal Markers in Lymphangioliomyomatosis. *Am J Surg Pathol*. 2023; 47(11): 1252-1260. [doi: 10.1097/PAS.0000000000002113]
- (18) Motomu Shimizu, Motoki Hojo, Kiyomi Ikushima, Yukio Yamamoto, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Naozumi Ishimaru, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Jin Suzuki, Akiko Inomata, Dai Nakae. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci*. 2023; 48(12): 617-639. [doi: 10.2131/jts.48.617]
- (19) González-Pech RA, Li VY, Garcia V, Boville E, Mammone M, Kitano H, Ritchie KB, Medina M. The Evolution, Assembly, and Dynamics of Marine Holobionts. *Ann Rev Mar Sci*. 2024; 16: 443-466. [doi:10.1146/annurev-marine-022123-104345]
- (20) Mori T, Takase T, Lan KC, Yamane J, Alev C, Kimura A, Osafune K, Yamashita JK, Akutsu T, Kitano H, Fujibuchi W. eSPRESSO: topological clustering of single-cell transcriptomics data to reveal informative genes for spatio-temporal architectures of cells. *BMC Bioinformatics*. 2023 Jun 15; 24(1): 252. [doi:10.1186/s12859-023-05355-4]
- (21) Tomoto, M., Mineharu, Y., Sato, N., Tamada, Y., Nogami-Itoh, M., Kuroda, M., Adachi, J., Takeda, Y., Mizuguchi, K., Kumanogoh, A., Natsume-Kitatani, Y., Okuno, Y.: Idiopathic pulmonary fibrosis-specific Bayesian network integrating extracellular vesicle proteome and clinical information. *Scientific Reports*, 2024; 14: 1315. [doi:10.1038/s41598-023-50905-8]
- (22) Kozawa, S., Tejima, K., Takagi, S., Kuroda, M., Nogami-Itoh, M., Kitamura, H., ... Natsume-Kitatani, Y. & Sato, T. N.: Latent inter-organ mechanism of idiopathic pulmonary fibrosis unveiled by a generative computational approach. *Scientific Reports*, 2023; 13: 21981. [doi: 10.1038/s41598-023-49281-0]
- (23) Kawashima, H., Watanabe, R., Esaki, T., Kuroda, M., Nagao, C., Natsume-Kitatani, Y., ... & Mizuguchi, K. DruMAP: A novel drug metabolism and pharmacokinetics analysis platform. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2023; 66(14): 9697-9709. [doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c00481]
- (24) Sohrab, M. G., Duong, K., Topić, G., Ikeda, M., Nagano, N., Natsume-Kitatani, Y., ... & Takamura, H. Disease Network Constructor: a Pathway Extraction and Visualization. In *Proceedings of the 61st Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics (Volume 3: System Demonstrations)* (pp. 549-557) 2023.
- (25) 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].
- (26) 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]
- (27) 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]
- (28) 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]
- (29) 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).
- (30) 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]
- (31) 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].
- (32) 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].
- (33) 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]
- (34) 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]
- ③⑤ 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]
- (36) 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]
- (37) 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]
- (38) 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).
- (39) 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]
- (40) 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]
- (41) 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
- (42) 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
- (43) 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
- (44) 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
- (45) 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)
- (46) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. Yamazaki, H., Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci.* 2021; 46: 553-560.[doi.org/10.2131/jts.46.553]
- (47) Yuhji Taquahashi, Hirokatsu Saito, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 169-175.[doi.org/10.2131/fts.8.169]
- (48) Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 161-167.[doi.org/10.2131/fts.8.161]
- (49) Eiichi Yamamoto, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Hirokatsu Saito, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Futoshi Sato, Satoshi Kitajima, Kumiko Ogawa, Ken-ichi Izutsu, Yoshiro Saito, Yoko Hirabayashi, Yasuo Iimura, Masamitsu Honma, Haruhiro Okuda, Yukihiro Goda: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 2021; 595: 120241.[doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120241]
- (50) Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. *Development.* 2021 Oct 1;148(19): Epub 2021 Oct 4. [DOI: 10.1242/dev.193664].
- (51) Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. Epub 2021 May 2.[DOI: 10.1111/cas.14873]
- (52) Kitano, H. Nobel Turing Challenge: creating the engine for scientific discovery. *npj Syst Biol Appl.* 7, 29 (2021).[DOI: 10.1038/s41540-021-00189-3]
- (53) Ostaszewski M, Niarakis A, Mazein A, Kuperstein I, Phair R, Orta-Resendiz A, Singh V, Aghamiri SS, Acencio ML, Glaab E, Ruepp A, Fobo G, Montrone C, Brauner B, Frishman G, Monraz Gómez LC, Somers J, Hoch M, Kumar Gupta S, Scheel J, Borlinghaus H, Czauderna T, Schreiber F, Montagud A, Ponce de Leon M, Funahashi A, Hiki Y, Hiroi N, Yamada TG, Dräger A, Renz A, Naveez M, Bocskei Z, Messina F, Börnigen D, Fergusson L, Conti M, Rameil M, Nakonecni V, Vanhoefer J, Schmiester L, Wang M, Ackerman EE, Shoemaker JE, Zucker J, Oxford K, Teuton J, Kocakaya E, Summak GY, Hanspers K, Kutmon M, Coort S, Eijssen L, Ehrhart F, Rex DAB, Slenter D, Martens M, Pham N, Haw R, Jassal B, Matthews L, Orlic-Milacic M, Senff Ribeiro A, Rothfels K, Shamovsky V, Stephan R, Sevilla C, Varusai T, Ravel JM, Fraser R, Ortseifen V, Marchesi S, Gawron P, Smula E, Heirendt L, Satagopam V, Wu G, Riutta A, Golebiewski M, Owen S, Goble C, Hu X, Overall RW, Maier D, Bauch A, Gyori BM, Bachman JA, Vega C, Grouès V, Vazquez M, Porras P, Licata L, Iannuccelli M, Sacco F, Nesterova A, Yuryev A, de Waard A, Turei D, Luna A, Babur O, Soliman S, Valdeolivas A, Esteban-Medina M, Peña-Chilet M, Rian K, Helikar T, Puniya BL, Modos D, Treveil A, Olbei M, De Meulder B, Ballereau S, Dugourd A, Naldi A, Noël V, Calzone L, Sander C, Demir E, Korcsmaros T, Freeman TC, Augé F, Beckmann JS, Hasenauer J, Wolkenhauer O, Wilighagen EL, Pico AR, Evelo CT, Gillespie ME, Stein LD, Hermjakob H, D'Eustachio P, Saez-Rodriguez J, Dopazo J, Valencia A, Kitano H, Barillot E, Auffray C, Balling R, Schneider R; COVID-19 Disease Map Community. COVID19 Disease Map, a computational knowledge repository of virus-host interaction mechanisms. *Mol Syst Biol.* 2021 Oct;17(10):e10387. PMID: 34664389. [DOI: 10.15252/msb.202110387]
- (54) 夏目 やよい, 機械学習によって加速される次世代アジュバント開発, 医学のあゆみ 279(10) 961-964 2021
- (55) 夏目 やよい, 榎林陽一, 新薬創出を加速する人工知能の開発 ～データ駆動型創薬ターゲット探索プラットフォームの構築～, あいみつく vol. 42(3) 58-63 2021

2. 学会発表

- (1) Jun Kanno, Keynote Lecture: Molecular toxicology in health and diseases, The 13 th National Conference in Toxicology (NCT13), Thai Society of Toxicology, (2023.08.06), Bangkok, Oral.

- (2) Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Miho Kobayashi, Tetsuro Watabe, and Satoshi Kitajima. Basic lung responses to multiwall carbon nanotubes monitored in mouse whole body inhalation studies. Symposium: Nanosafety and Nanotoxicology. ASIATOX-X, (2023.7.18), Taipei, Taiwan, Oral.
- (3) 菅野純: 日本毒性学会における国際的な知名度の向上と国際連携の推進、及び、国際水準による学術振興－国際連携活動の勧め－. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.20)、横浜、佐藤哲男賞受賞講演、口演
- (4) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡: 新型反復曝露実験による PFOA の毒性発現分析－ Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して－. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、横浜、口演
- (5) 菅野純: 毒性オミクスフォーラム. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、横浜、イーブニングフォーラム、パネリスト
- (6) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、菅野純: PPAR alphaリガンドが惹起する遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、横浜、口演
- (7) 北嶋聡: 生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、パシフィコ横浜、口演
- (8) Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Maki Kuwagata, Satoshi Kitajima: Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, (2023.7.17), Taiwan
- (9) 長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋聡、桑形麻樹子: LC-MS/MS を用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション. 第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜
- (10) 高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎 浩史、北嶋聡、桑形麻樹子: ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価. 第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.20)、横浜、ポスター
- (11) 桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋聡: ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発毒性発現リスクの解明. 第63回日本先天異常学会学術集会、(2023.7.28)、ポスター
- (12) Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hiroshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. EUROTOX2023. (2023.9.10)、スロベニア
- (13) 北嶋聡: トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第1回付加体科学部会研究会 2023、岡山、(2023.9.26)
- (14) 北嶋聡: 分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発～食品トキシコゲノミクスを例に～、第9回 浜松毒性試験フォーラム 基調講演、浜松、(2023.10.27)
- (15) 北嶋聡: 職域における環境因子による健康影響～化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究～、第38回日本健康科学学会学術大会、東京、(2023.12.2)
- (16) 小野竜一、cfDNAメチル化とエクソソームRNAを毒性指標としたリキッドバイオプシー、第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.21) 横浜
- (17) 小野竜一、エクソソームを介した遺伝子水平伝搬、第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.22) 横浜
- (18) Ryuichi Ono, Liquid biopsy using cfDNA methylation and EV-associated miRNA as a toxicity biomarker, The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, (2023.7.19), Taipei、招待講演
- (19) Ryuichi Ono, Extracellular Vesicles (EVs) as Novel Toxicity Biomarkers, The 10th 63RD ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, (2024.3.14), Salt Lake City、招待講演
- (20) 北野宏明「AIがもたらす科学の発見」LINK-J & デンマーク王国大使館主催 ライフサイエンスセミナー『データがつくる生命科学』～AIと時系列データが生み出すパワー、(2023.6.27)、東京、招待講演
- (21) 長谷武志「深層学習を基盤としたオミックスデータ解析とその創薬・毒性学研究への応用」2023年日本バイオインフォマティクス学会年会・第12回生命医薬情報学連合大会、(2023.9.9)、千葉、招待講演
- (22) 長谷武志「AI駆動型の創薬・生命・医学研究の最新動向」 AI創薬・ケモインフォマティクスセミナー、(2023.11.24)、オンライン、招待講演
- (23) 北野宏明「Nobel Turning Challenge～Creating the Engine for Scientific Discovery～」キヤノン財団リユニオン2023、(2023.12.15)、東京、特別講演
- (24) 北野宏明「複雑なシステムを理解するサイエンスとテクノロジー: AI駆動型システム生物学への展開」第59回日本東洋心身医学研究会、(2024.3.9)、東京、特別講演
- (25) 白井雄也、武田吉人、榎本貴俊、足立雄一、野田成美、平田陽彦、足立淳、夏目やよい、伊藤真里、熊ノ郷淳: 「PRISM」データから見えてきた新たな線維化バイオマーカー、第63回日本呼吸器学会学術講演会
- (26) 原伶奈、武田吉人、足立淳、夏目やよい、伊藤真里、井上義一、広瀬雅樹、熊ノ郷淳: エクソ

- ソームのプロテオミクスによる線維性過敏性肺炎の新規バイオマーカー開発、第63回日本呼吸器学会学術講演会
- (27) 北村英也、丹羽崇、馬場智尚、奥寺康司、伊藤薫、夏目やよい、小倉高志:間接性肺炎における Precision Medicineのためのクライオ生検の可能性と有効性、第63回日本呼吸器学会学術講演会
- (28) 夏目やよい、ゲノムとAI:データ駆動的アプローチが描く次世代創薬、ヒトゲノム解毒20周年記念JBAオープンセミナー
- (29) 伊藤真里、武田吉人、黒田正孝、荒牧英治、黒橋禎夫、武田理宏、梁川雅弘、富山憲幸、松村泰志、足立淳、水口 賢司、上田修功、熊ノ郷淳、夏目やよい:「新薬創出を加速する人工知能の開発」:IPF患者臨床データからの創薬標的への知識処理、第63回日本呼吸器学会学術講演会
- (30) 吉村華子、武田吉人、榎本貴俊、原伶奈、山本真、内藤裕二郎、二見誠真史、白山敬之、平田陽彦、小山正平、長友泉、岩堀幸太、足立淳、夏目やよい、伊藤真里、熊ノ郷淳:エクソソームの次世代プロテオミクスによる気管支喘息T2炎症の新規BM開発、第63回日本呼吸器学会学術講演会
- (31) 矢野雄一、赤木健一郎、夏目やよい、黒田正孝、伊藤真里、樋口千洋、上野賢也、丹尾真理子:グラフデータセットの機械学習適合性を評価する指標の提案のためのデータセットによるリンク予測結果の違いについての考察、人工知能学会全国大会 (第37回)
- (32) 夏目やよい:「新薬創出を加速する症例データベースの構築・拡充/創薬ターゲットアルゴリズムの開発」(PRISM創薬AI)、第12回ゲノム医療協議会
- (33) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno: Comparative analysis of gene expression profiles induced by chemicals with the same target molecule, ISMB/ECCB 2023
- (34) 夏目やよい:AI創薬研究から見たエクソソームの魅力、日本製薬工業協会講演会
- (35) 夏目やよい:セッション Interdisciplinary-immunologyで座長、第21回あわじ感染と免疫国際フォーラム
- (36) 夏目やよい:診療情報と紐づけられたオミックスデータに対する疾患インフォマティクス、IIBMP2023 ワークショップ
- (37) Chihiro Higuchi, Masataka Kuroda, Mari Ito, Chioko Nagao, Kenji Mizuguchi, Yayoi Natsume: "Mine" AI Platform for Drug Discovery and Target Discovery, IIBMP2023
- (38) 夏目やよい:デジタル時代のデータ駆動的創薬標的探索、第48回製剤創剤セミナー
- (39) 夏目やよい:アジュバントデータベース:データ駆動的な次世代アジュバント開発を目指して、第27回日本ワクチン学会第64回日本臨床ウイルス学会合同学術集会
- (40) 伊藤真里、武田吉人、足立淳、黒田正孝、夏目やよい、水口賢司、熊ノ郷淳:EVプロテオミクスと血清・尿メタボロミクスを組み合わせた統合ネットワーク解析によるIPF特有のパスウェイの探索、第10回日本細胞外小胞学会学術集会
- (41) Mari N Itoh, Yoshito Takeda, Jun Adachi, Masataka Kuroda, Yayoi Natsume-Kitatani, Atsushi Kumanogoh, Kenji Mizuguchi: Integrated network analysis combining EV's proteomics and serum/urine metabolomics to explore IPF-specific pathways, CBI学会2023年大会
- (42) 夏目やよい:AIと共に実現する新しい創薬・医療のかたち、日本学術会議生物系薬学分科会公開シンポジウム
- (43) 夏目やよい:アジュバント・キャリア技術支援としてのデータベース構築、近未来ワクチンフォーラム
- (44) 夏目やよい:AI・バイオインフォマティクス活用によるTR研究の迅速化・確度向上、ファームステージ
- (45) 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 -食品トキシコゲノミクスと薬理学-,第96回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜
- (46) 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
- (47) 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
- (48) 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.
- (49) 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)
- (50) 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.
- (51) 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.
- (52) 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.
- (53) 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)
- (54) 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)
- (55) 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.
- (56) 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.
- (57) 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)
- (58) 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.
- (59) 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.
- (60) 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.
- (61) 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)
- (62) 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.
- (63) 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)
- (64) 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)
- (65) Ryuichi Ono. Toxicity Concerns of Exosome Products. American College of Toxicology, Denver, Novembr, 2022 (invited)
- (66) 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.
- (67) 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.
- (68) 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.
- (69) 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.
- (70) 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
- (71) 原伶奈、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

- (72)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
- (73)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
- (74)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
- (75)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
- (76)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
- (77)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
- (78)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
- (79)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
- (80)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
- (81)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
- (82)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
- (83)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
- (84)Rodolfo S. Allendes Osorio, Johan T. Nystroem-Persson, Yuji Kosugi, Kenji Mizuguchi, Yayoi Natsume-Kitatani 「Panomicon, allowing heterogeneous multi-omics analysis on the web」 ECCB2022 2022/9/18 スペイン
- (85)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
- (86)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
- (87)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
- (88)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
- (89)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
- (90)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
- (91)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
- (92)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
- (93) 黒田正孝, 伊藤真里, 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
- (94) 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
- (95) Jun Kanno, Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. ASIATOX-IX, (2021.10.22), Virtual, Oral
- (96) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima, Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress, (2021.9.29), Oral
- (97) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (98) 石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純、ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (99) 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (100) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (101) 菅野純、「子供の毒性学：脳の発達を中心に」-イントロダクション-。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (102) 齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価-発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に-。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (103) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (104) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純：PPAR α リガンドの比較毒性オミクス。第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演
- (105) J. Kanno, K. AISAKI, R. ONO, S. KITAJIMA, Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral
- (106) 菅野純、外来性化学物質(xenobiotics)により誘発される生体反応の分子機構解析と創薬加速、第3回医薬品毒性機序研究会、(2021.1.15)、online meeting、口演
- (107) 種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) Web 口演
- (108) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (2020.11.12-13) e-poster.
- (109) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima, Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Special lecture, Web, Oral presentation.
- (110) 北野宏明、「AIで変わる毒性学、変わらない毒性学」、第48回日本毒性学会学術年会、日本毒性学会、神戸(オンライン)、July 7, 2021(invited)
- (111) 夏目やよい、伊藤真里、松村泰志、武田吉人、熊ノ郷淳、水口賢司、上田修功「特発性肺線維症に対する創薬標的探索を目指した人工知能の開発」第61回日本呼吸器学会学術講演会 2021.4.24 オンライン
- (112) 榎本貴俊、武田吉人、綱屋沙織、足立雄一、新津敬之、原侘奈、野田成美、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、伊藤真里、夏目やよい、熊ノ郷淳、次世代プロテオミクスによる進行性線維化を伴う間質性肺疾患の新規バイオマーカー探索(PRISM)、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (113) 白井雄也、武田吉人、足立雄一、榎本貴俊、綱屋沙織、野田成美、福島清春、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、夏目やよい、伊藤真里、熊ノ郷淳、「PRISM」データから見えてきた新たな線維化バイオマーカー、第61回日本呼吸器学会学術講演会、Web開催、2021.4.24
- (114) 野田成美、武田吉人、綱屋沙織、足立雄一、榎本貴俊、原侘奈、新津敬之、白井雄也、白山敬之、三宅浩太郎、平田陽彦、足立淳、夏目やよい、伊藤真里、熊ノ郷淳、次世代プロテオミクスによる上葉優位型肺線維症の新規バイオ

- マーカー探索(PRISM), 第61回日本呼吸器学会
学術講演会, Web開催, 2021.4.24
- (115) 網屋沙織, 武田吉人, 足立雄一, 榎本貴俊, 新
津敬之, 野田成美, 原伶奈, 白井雄也, 白山敬
之, 三宅浩太郎, 平田陽彦, 足立淳, 伊藤眞里,
夏目やよい, 熊ノ郷淳, エクソソームの次世代
プロテオミクスによるサルコイドーシスの新
規バイオマーカー探索(PRISM), 第61回日本呼
吸器学会学術講演会, Web開催, 2021.4.24
- (116) 夏目やよい, 伊藤眞里, 松村泰志, 武田吉人,
熊ノ郷淳, 水口賢司, 野田成美, 上田修功, 特発
性肺線維症に対する創薬標的探索を目指した
人工知能の開発, 第61回日本呼吸器学会学術
講演会, Web開催, 2021.4.24
- (117) 足立雄一, 武田吉人, 榎本貴俊, 網屋沙織, 野
田成美, 原伶奈, 新津敬之, 白井雄也, 福島清
春, 白山敬之, 三宅浩太郎, 平田陽彦, 夏目や
よい, 足立淳, 伊藤眞里, 熊ノ郷淳, 次世代プロ
テオミクスとバイオインフォマティクスが紐
解IPFとNSIPの病態解明, 第61回日本呼吸器学
会学術講演会, Web開催, 2021.4.24
- (118) 夏目やよい, 相崎健一, 北嶋聡, Samik GHOSH,
北野宏明, 水口賢司, 菅野純, 毒性オミクスに
おけるエピジェネティクス情報を加えた人工
知能解析 PPAR α リガンドの比較毒性オミ
クス, 第48回日本毒性学会学術年会, Web開催,
2021.7.7
- (119) 渡邊怜子, 大橋力也, 黒田正孝, 小村弘, 川島
和, 江崎剛史, 夏目・北谷やよい, 水口賢司, 化
学構造情報を用いた薬物動態パラメータ評価
のためのインシリコ予測モデルの開発, 第48
回日本毒性学会学術年会, Web開催, 2021.7.7-9
- (120) 夏目 やよい「新薬創出を加速する人工知能の
開発 全体概要・特発性肺線維症」官民研究開
発投資拡大プログラム (PRISM) 令和二年度成
果報告会 (2021/7/20) オンライン
- (121) 夏目 やよい「トランスクリプトームデータか
らの毒性発現メカニズム推定と安全性評価」第
三回scChemRISC研究会 招待講演 2021.10.12
横浜
- (122) 夏目 やよい「新薬創出を加速する人工知能の
開発 ～臨床情報を活用した創薬標的探索～」
CBI学会2021大会 プレナリー講演「国内AI創
薬の最前線」2021.10.28 オンライン
- (123) 夏目 やよい「アジュバントデータベースとそ
の活用から見える次世代アジュバント開発」第
15回次世代アジュバント研究会 招待講演
2022.1.25 オンライン
- (124) 夏目やよい, データ駆動型安全性評価の諸問
題, 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有
化コンソーシアム2022年度年会, 京都, 2022.3.1

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
菅野純、 相崎健一、 北嶋聡	遺伝子発現を指標 とした毒性評価・ 予測	青木康展、 青山博昭	化学物質の複合影響 と健康リスク評価	医歯薬出版	東京	2024	67
Mohammad Golam Sohrab, Khoan A. Duong, Ikeda Masami, Goran Topić, Yayoi Natsume- Kitatani, Masakata Kuroda, Mari Nogami Itoh, Hiroya Takamura	BiomedCurator: Data Curation for Biomedical Literature	Maria Liakata, Wray Buntine	Proceedings of the 2 nd 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 Comp utational Linguistics	Stroudsburg, USA	2022	63-71
夏目やよい、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 知能をもたらす創薬 研究の未来像～	(株)エヌ・エ ティー・エ ス	東京	2022	15-22
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」	小長谷 明 彦	革新的AI創薬 ～医 療ビッグデータ、人工 知能をもたらす創薬 研究の未来像～	(株)エヌ・エ ティー・エ ス	東京	2022	107-112
上田修功、 夏目やよ い	第5章 第3節 「サブセット・パ 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 知能をもたらす創薬 研究の未来像～	(株)エヌ・エ 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
<u>Takeshi Hase</u> , Samik Ghosh, <u>Ken-ichi Aisaki</u> , <u>Satoshi Kitajima</u> , <u>Jun Kanno</u> , <u>Hiroaki Kitano</u> , Ayako Yachie	DTox: A Deep neural network-based in visio lens for large scale Toxicogenomics data.	J. Toxicol. Sci.	49	105-115	2024
Yu Takahashi, Ryota Wakabayashi, <u>Satoshi Kitajima</u> , Hideho Uchiyama	Epichordal vertebral column formation in <i>Xenopus laevis</i> .	J Morphol	285	e21664	2024
五十嵐智女、西村拓也、 <u>北嶋聡</u>	細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向	月刊「食品衛生研究」	73	-	2023
Satoshi Yokota, Tomohiko Wakayama, Hidenobu Miyaso, Kousuke Suga, Masakatsu Fujinoki, Satoru Kaneko, <u>Satoshi Kitajima</u>	Reactive Blue 2 Labels Protamine in Late-Haploid Spermatis and Spermatozoa and Can Be Used for Toxicity Evaluation.	Andrologia	2023	7364862	2023
Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, <u>Satoshi Kitajima</u> , Hiroshi Nishina	Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation.	Stem Cells,	41	1142-1156	2023
Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, <u>Satoshi Kitajima</u> , <u>Jun Kanno</u> , Kentaro Tanemura	Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life.	Front. Neurosci.	17	1239808	2023
Hirokatsu Saito, Satoshi Yokota, <u>Satoshi Kitajima</u>	Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction.	Acta Histochem.	125	152046	2023

Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, <u>Jun Kanno</u> , <u>Satoshi Kitajima</u> (*co-first author)	Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood.	J Toxicol Sci.	48	203-210	2023
Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, <u>Satoshi Kitajima</u>	A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats	Fundam. Toxicol. Sci.	10	69-82	2023
Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, <u>Satoshi Kitajima</u>	A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats	Fundam. Toxicol. Sci.	10	59-68	2023
Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, <u>Satoshi Kitajima</u> , <u>Jun Kanno</u> , Kentaro Tanemura (*co-first author)	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	2023
Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi, <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
齊藤洋克、 <u>北嶋 聡</u>	化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, 化学物質と環境	化学物質と環境との調和をめざす情報誌	184	3-6	2024

Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse, Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, <u>Satoshi Kitajima</u>	Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice.	Fundam. Toxicol. Sci.	11	37-56	2024
Zahm S, Bonde JP, Chiu WA, Hoppin J, <u>Kanno J</u> , Abdallah M, Blystone CR, Calkins MM, Dong GH, Dorman DC, Fry R, Guo H, Haug LS, Hofmann JN, Iwasaki M, Machala M, Mancini FR, Maria-Engler SS, Møller P, Ng JC, Pallardy M, Post GB, Salihovic S, Schlezinger J, Soshilov A, Steenland K, Steffensen IL, Tryndyak V, White A, Woskie S, Fletcher T, Ahmadi A, Ahmadi N, Benbrahim-Tallaa L, Bijoux W, Chittiboyina S, de Conti A, Facchin C, Madia F, Mattock H, Merdas M, Pasqual E, Suonio E, Viegas S, Zupunski L, Wedekind R, Schubauer-Berigan MK.	Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid.	Lancet Oncol	25	16-17	2024
Kishi M, Hayashi T, Mitani K, Tsuboshima K, Kurihara M, Hosoya M, Sekimoto Y, Okura MK, Mitsuishi Y, Okada Y, <u>Kanno J</u> , Yao T, Takahashi K, Seyama K.	Clinicopathological Impacts of Expression of Neuronal Markers in Lymphangioliomyomatosis.	Am J Surg Pathol.	47	1252-1260	2023

Motomu Shimizu, Motoki Hojo, Kiyomi Ikushima, Yukio Yamamoto, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Naozumi Ishimaru, Yuhji Taquahashi, <u>Jun Kanno</u> , Akihiko Hirose, Jin Suzuki, Akiko Inomata, Dai Nakae.	Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7.	J Toxicol Sci.	48	617-639	2023
González-Pech RA, Li VY, García V, Boville E, Mammone M, <u>Kitano H</u> , Ritchie KB, Medina M.	The Evolution, Assembly, and Dynamics of Marine Holobionts.	Ann Rev Mar Sci.	16	443-466	2024
Mori T, Takase T, Lan KC, Yamane J, Alev C, Kimura A, Osafune K, Yamashita JK, Akutsu T, <u>Kitano H</u> , Fujibuchi W.	eSPRESSO: topological clustering of single-cell transcriptomics data to reveal informative genes for spatio-temporal architectures of cells.	BMC Bioinformatics.	24	252	2023
Tomoto, M., Mineharu, Y., Sato, N., Tamada, Y., Nogami-Itoh, M., Kuroda, M., Adachi, J., Takeda, Y., Mizuguchi, K., Kumanogoh, A., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , Okuno, Y.	Idiopathic pulmonary fibrosis-specific Bayesian network integrating extracellular vesicle proteome and clinical information	Sci Rep	14	1315	2024
Kozawa, S., Tejima, K., Takagi, S., Kuroda, M., Nogami-Itoh, M., Kitamura, H., ... <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> & Sato, T. N.	Latent inter-organ mechanism of idiopathic pulmonary fibrosis unveiled by a generative computational approach.	Sci Rep	13	21981	2023
Kawashima, H., Watanabe, R., Esaki, T., Kuroda, M., Nagao, C., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , ... & Mizuguchi, K.	DruMAP: A novel drug metabolism and pharmacokinetics analysis platform.	J Med Chem	66	9697-9709	2023

Sohrab, M. G., Duong, K., Topić, G., Ikeda, M., Nagano, N., <u>Natsume-Kitatani, Y.</u> , ... & Takamura, H.	Disease Network Constructor: a Pathway Extraction and Visualization.	In Proceedings of the 61st Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics	3	549-557	2023
Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Mami Sato, Masako Saito, Kunihiko 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
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
<u>相崎 健一</u> , <u>小野 竜二</u> , <u>菅野 純</u> , <u>北嶋 聡</u>	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, 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, <u>Yayoi Natsume-Kitatani</u> , Y oshimasa 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 <i>Blautia wexlerae</i> ameliorates obesity and type 2 diabetes via metabolic remodeling of the gut microbiota. Nature Communications	Nature Communications	13	4477	2022
Kou Hioki, Tomoya Hayashi, <u>Yayoi Natsume-Kitatani</u> , 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.	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
Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., <u>Kitajima, S.</u> , Yamazaki, H.	Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species.	J Toxicol Sci.	46	553-560	2021
Yuhji Taquahashi, Hirokatsu Saito, Makiko Kuwagata, <u>Satoshi Kitajima</u>	Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals.	Fundam. Toxicol. Sci.	8	169-175	2021

Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, <u>Satoshi Kitajima</u>	Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system.	Fundam. Toxicol. Sci.	8	161-167	2021
Eiichi Yamamoto, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Hirokatsu Saito, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Futoshi Sato, <u>Satoshi Kitajima</u> , Kumiko Ogawa, Ken-ichi Izutsu, Yoshiro Saito, Yoko Hirabayashi, Yasuo Iimura, Masamitsu Honma, Haruhiro Okuda, Yukihiro Goda	Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging.	Int J Pharmaceutics	595	120241	2021
Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Suga Y, <u>Kanno J.</u>	Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways.	Development	148	dev193664	2021
Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, <u>Kanno J.</u> , Hirose A, Nakae D.	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins.	Cancer Sci.	112	2185-2198	2021
<u>Kitano, H.</u>	Nobel Turing Challenge: creating the engine for scientific discovery.	npj Syst Biol Appl.	7	29	2021

<p>Ostaszewski M, Niarakis A, Mazein A, Kuperstein I, Phair R, Orta-Resendiz A, Singh V, Aghamiri SS, Acencio ML, Glaab E, Ruepp A, Fobo G, Montrone C, Brauner B, Frishman G, Monraz Gómez LC, Somers J, Hoch M, Kumar Gupta S, Scheel J, Borlinghaus H, Czauderna T, Schreiber F, Montagud A, Ponce de Leon M, Funahashi A, Hiki Y, Hiroi N, Yamada TG, Dräger A, Renz A, Naveez M, Bocskei Z, Messina F, Börmigen D, Fergusson L, Conti M, Rameil M, Nakonecni V, Vanhoeyer J, Schmiester L, Wang M, Ackermann EE, Shoemaker JE, Zucker J, Oxford K, Teuton J, Kocakaya E, Summak GY, Hanspers K, Kutmon M, Coort S, Eijssen L, Ehrhart F, Rex DAB, Slenter D, Martens M, Pham N, Haw R, Jassal B, Mathews L, Orlic-Milacic M, Senff Ribeiro A, Rothfels K, Shamovsky V, Stephan R, Sevilla C, Varusai T, Ravel JM, Fraser R, Orseifen V, Marchesi S, Gawron P, Smulka E, Heirendt L, Satagopam V, Wu G, Rütta A, Golebiewski M, Owen S, Goble C, Hu X, Overall RW, Maier D, Bauch A, Gyori BM, Bachman JA, Vega C, Grouès V, Vazquez M, Porras P, Licata L, Iannuccelli M, Sacco F, Nesterova A, Yuryev A, de Waard A, Turei D, Luna A, Babur O, Soliman S, Valdeolivas A, Esteban-Medina M, Peña-Chilet M, Rian K, Helikar T, Puniya BL, Modos D, Treveil A, Olbei M, De Meulder B, Ballereau S, Dugourd A, Naldi A, Noël V, Calzone L, Sander C, Demir E, Korcsmaros T, Freeman TC, Augé F, Beckmann JS, Hasenauer J, Wolkenhauer O, Wilighagen EL, Pico AR, Evelo CT, Gillespie ME, Stein LD, Hermjakob H, D'Eustachio P, Saez-Rodriguez J, Dopazo J, Valencia A, <u>Kitano H</u>, Barillot E, Auffray C, Balling R, Schneider R</p>	<p>COVID-19 Disease Map Community. COVID19 Disease Map, a computational knowledge repository of virus-host interaction mechanisms.</p>	<p>Mol Syst Biol.</p>	<p>17</p>	<p>e10387</p>	<p>2021</p>
<p><u>夏目 やよい</u></p>	<p>機械学習によって加速される次世代アジュバント開発</p>	<p>医学のあゆみ</p>	<p>279</p>	<p>961-964</p>	<p>2021</p>
<p><u>夏目 やよい</u>, 榎林陽一</p>	<p>新薬創出を加速する人工知能の開発～データ駆動型創薬ターゲット探索プラットフォームの構築～</p>	<p>あいみつく</p>	<p>42</p>	<p>58-63</p>	<p>2021</p>