

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）  
令和2年度 分担研究報告書

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

Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良

研究分担者：相崎 健一  
国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター 毒性部  
室長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数（安全係数）を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

先行研究で実施した Percellome 法\*を基盤とした「新型」反復曝露実験\*\*により、化学物質の反復投与による遺伝子発現変動のデータベース構築が進みつつある。単回投与による遺伝子発現変動のデータベースと共にこれを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復曝露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

この技術開発の為に本分担研究では、基盤技術開発の一環として Percellome 専用解析ソフトウェアの開発・改良を進めた。

平成30年度は、新型反復曝露実験において有意な基線反応を示す候補遺伝子の抽出ソフトウェアの開発のため、Percellome データベースから臓器・溶媒・サンプリング時間毎に溶媒群のトランスクリプトームデータを集めて基線反応データベース（BaselineDB）を構築し、基本アルゴリズムを生成した。また解析計算用ソフトウェア（BaselineComparison）を作成し、自動化のための改良を行った。

令和元年度は、Percellome データベースをフル活用する網羅的比較解析ソフトウェア PercellomeExplorer を、オンラインサービス（WebAPI）として提供するためのシステム開発を進めた。オリジナル（クライアント PC 版）の PercellomeExplorer の内部データ構造を抜本的に再設計した結果、実用的なオンラインサービスに足る性能の実現に成功した。

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

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

- 
- (\*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。
  - (\*\*) 全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一に行う。実験の反復曝露と単回曝露の回数をもとに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。

## A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数（安全係数）を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。

本分担研究では特に、Percellome 専用解析ソフトウェアを開発して予測評価技術の基盤開発の一助とすると共に、オンライン化を進めて研究成果の速やかな社会還元を目指す。

## B. 研究方法

ソフトウェアの in house 開発に際しては、開発効率と生成する実行バイナリの実行速度を重視して、Win32/64 開発及び Web アプリケーション開発は RAD (Rapid Application Development) 対応の Delphi (Object Pascal 言語、USA, Embarcadero Technologies, Inc.) を用いた。データベースエンジンには組込型の DBISAM (USA, Elevate Software, Inc.) を、一般的なグラフ描画には TeeChart (Spain, Steema Software SL) を利用した。

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

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

## C. 研究結果

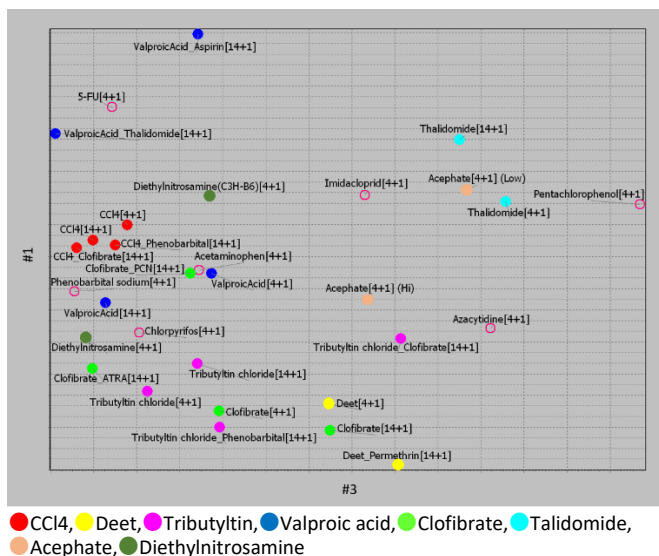
当初計画に沿って研究を行い、下記の成果を得た。今年度は、まず先行研究から本研究を通じて実施した全ての反復曝露実験の集大成として反復曝露基線反応データベースを構築した。具体的には平成 30 年度（本研究一年目）に in house 開発した BaselineComparison を利用して、本年度までに GeneChip 解析を行った新型反復曝露実験データセット 30 件より、有意な反応を示した遺伝子リストを生成した。false negative を減らすために、抽出条件は最大発現レベル 1 コピー/細胞以上、且つ、基線を構成する 4 時点データポイントのうち 3 カ所以上で  $p < 0.05$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

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

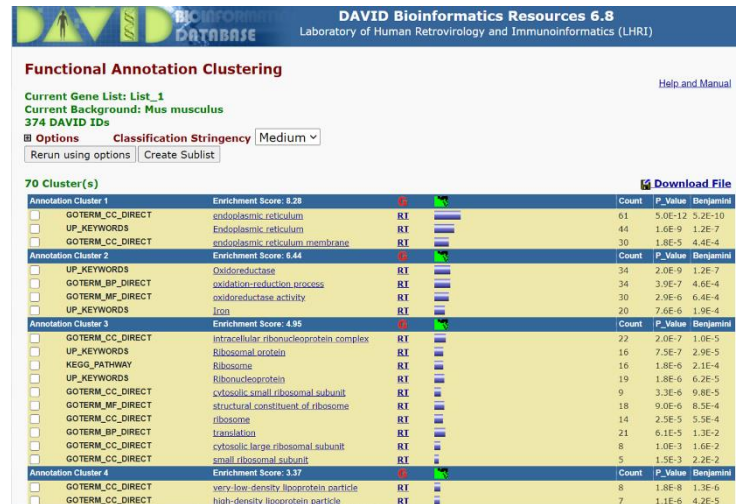
\* 投与量が異なる

\*\* strainが異なる

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



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



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

## D. 考察

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

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

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

## E. 結論

本研究は、ほぼ計画通りに進捗した。

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

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

## F. 研究発表 (3年間分)

### 1. 論文発表

#### ●令和2年度

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

#### ●令和元年度

(2) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. Commun Biol. 2019, 2: 57. [DOI:10.1038/s42003-019-0300-2]

#### ●平成30年度

なし

### 2. 学会発表

#### ●令和2年度

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

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

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

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

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

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

●令和元年度

(7) Kanno J, Aisaki K, Ono R, Kitajima S. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeated Exposure to Chemicals: Percellome Project Update. Society of Toxicology (SOT) 59th Annual Meeting (SOT2020), (2020.3.15-19) Anaheim, USA, ePoster.

(8) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki K, Kitajima S, Kanno J,

Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.9), Helsinki, Finland, Poster.

(9) Ono R, Kitajima S, Aisaki K, Kanno J. Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts

(10) Kanno J, Aisaki K, Ono R, Kitajima S. Epigenetic Mechanism of Modification of Gene Expression Network by a Repeated Exposure to a Chemical. Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. The SOT 58th Annual Meeting, (2019.3.12), Baltimore, USA, Invited Symposium.

(11) Natsume-Kitatani Y, Mizuguchi K, Aisaki K, Kitajima S, Ghosh S, Kitano H, Kanno J. Pentachlorophenol affects RIG-1 antiviral pathway that produces type 1 interferon at the transcriptional level ISMB/ECCB 2019 パーゼル (スイス), 2019/07/24

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

(13) 夏目 やよい, 相崎 健一, 北嶋 聡, Gosh Samik, 北野 宏明, 水口 賢司, 菅野 純 Garudaプラットフォームによる多角的毒性予測 第46回日

●平成 30 年度

(14) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima. Epigenetic Mechanism of Modification of Gene Expression Network by a Repeated Exposure to a Chemical. Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. The SOT 58th Annual Meeting, (2019.3.12), Baltimore, USA, Invited Symposium.

(15) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Kentaro Tanemura, Ken-ichi Aisaki, Introduction to a Concept of “Signal Toxicity” for Broader Understanding of Mechanistic Toxicology. The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX 2018), (2018.6.17), Pattaya, Thailand, KEYNOTE

(16) Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

(17) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR $\alpha$  and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

(18) 菅野 純, 小野 竜一, 相崎 健一, 北嶋 聡, 「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反

応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—, 第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(19) 夏目 やよい, 相崎 健一, 北嶋 聡, 水口 賢司, 菅野 純, TargetMineによる標的予測, 第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19.)

(20) Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

(21) Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IA TA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

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

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

⑳ Natsume-Kitatani Y., Aisaki K., Kitajima S., Ghosh S., Kitano H., Mizuguchi K., Kanno J. “Inferred role of crosstalk between PPARα and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach” ISMB 2018, (2018.7.7, USA), (Poster)

## **G. 知的所有権の取得状況**

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし