

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和3年度 分担研究報告書

Percellome データベースを利用した解析パイプライン

研究分担者 夏目 やよい

国立研究開発法人医薬基盤・健康・

栄養研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト

プロジェクトリーダー

研究要旨

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

A.研究目的

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

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

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

## B.研究方法

### 解析データ:

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

(Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0)に供した。マウス(C57BL/6, 12週齢、オス)にバルプロ酸ナトリウム(0, 50, 150, 500 mg/kg、溶媒:メチルセルロース 0.5%)を経口投与し、2, 4, 8, 24時間後に各臓器(脳:皮質及び海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓)を回収してマイクロアレイ解析(Affymetrix GeneChip Mouse

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

### データ解析:

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

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

## C.研究結果

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

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

#### D.考察

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

## E. 結論

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

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

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

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

## 2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

10). 夏目やよい, 「新薬創出を加速する人工知能の開発 全体概要・特発性肺線維症」官民研究開発投資拡大プログラム (PRISM) 「新薬創出を加速する人工知能の開発」令和二年度成果報告会 2021.7.20 オンライン

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

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

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

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

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

## G.知的所有権の取得状況

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