

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

令和4年度 分担研究報告書

Percellome データベースを利用した解析パイプライン

研究分担者 夏目 やよい

国立研究開発法人医薬基盤・健康・

栄養研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト

プロジェクトリーダー

## 研究要旨

令和4年度は、既知の PPAR $\alpha$  (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（クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウム、エストラゴール）に、一部シグナルが重複するフタル酸ジ（2-エチルヘキシル）とフェノバルビタールを加えた5物質の相互解析を実施し、トランスクリプトーム情報及びエピゲノム情報を利用した効率的な解析モデルの構築を試みた。

## A. 研究目的

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

Percellome データベースは、化学物質による毒性発現機構を遺伝子発現カスケードから解明する為に有用なリソースである。本データベースにはマウスへの曝露用量、曝露時間ごとに遺伝子発現量（推定される細胞一個あたりの mRNA コピー数）が格納されており、遺伝子発現

量の動的変化から「どのような分子ネットワークの変動が化学物質曝露と関連づけられるか」を抽出することができる。当該年度は、前年度にも解析対象としていた既知の PPAR $\alpha$  (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）に DEHP（フタル酸ジ（2-エチルヘキシル））及び PB（フェノバルビタール）を加えて遺伝子発現プロファイルの動的

変動を比較し、これら 5 種に共通するパターンや固有に認められるパターンを検出することにより、化合物曝露が惹起する生体反応のカスケードを推定するワークフローを検討することを研究目的とした。

## B. 研究方法

### 解析データ：

クロフィブラート、バルプロ酸ナトリウム、エストラゴール、DEHP または PB を投与したマウスの肝臓における遺伝子発現プロファイルを使用した。マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) にクロフィブラート (0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2, 4, 8, 24 時間後に肝臓を回収してマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供した。マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) にバルプロ酸ナトリウム (0, 50, 150, 500 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2, 4, 8, 24 時間後に各臓器 (脳：皮質及び海馬、肺、心臓、肝臓、腎臓) を回収してマイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供した。マウス (C57BL/6, 12 週齢、オス) にエストラゴール (0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：メチルセルロース 0.5%) を経口投与し、2, 4, 8, 24 時間後に肝臓を回収してマイクロアレイ解析 (Affymetrix

GeneChip Mouse Genome 430 2.0) に供した。これらのデータは Percellome 法 [1] により正規化され、Percellome データとしてデータベース化されている。

### データ解析：

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

(<http://targetmine.mizuguchilab.org> [2, 3]) を用いて Probe ID から遺伝子リストへの変換を行った。各種エンリッチメント解析には、TargetMine および metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1> [5]) を用いた。

## C. 研究結果

前年度までの我々の研究により、①バルプロ酸投与によって PPAR $\alpha$ 、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。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。

以上を踏まえ、当該年度は更に2化合物を追加し、metascapeを用いた遺伝子発現プロファイルの比較解析を行なった。その結果、a)クロフィブラートはPPAR $\alpha$ の他にもPPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、PPARgc1aの活性化を介して幅広く脂質代謝関連遺伝子の発現を亢進させる他、Nrf1やEsrraをも活性化する、b)バルプロ酸ナトリウムは遺伝子発現変動が大きいのが主にE2f1、E2f4の活性化によるものであり、PPAR $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 活性化とは別のメカニズムが疑われる、d)DEHPはPPAR $\alpha$ の他にもPPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、PPARgc1aの活性化を介して幅広く脂質代謝関連遺伝子の発現を亢

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

#### D.考察

前年度の研究では、どの時点において発現亢進が認められたかのパターンごとに細かく遺伝子リストを分割し、それぞれに対してエンリッチメント解析を行うことで曝露時間の情報をどのように活用するのが効果的かを検討した。その結果、類似化合物との遺伝子発現プロファイルの比較が毒性発現メカニズム推定において有益であることが見出された。その結果を受けて、当該年度は化合物と曝露時間ごとに発現が変動したprobe IDリストを作成し、遺伝子リストに変換したのちにmetascapeを用いたパターン比較を行なった。その結果、どのタイミングで発現亢進が起こるによって数パターンに分割することが可能であり、そのパターンごとに上流因子解析を行うことで通常のエンリッチメント解析では見逃しがちな生体応答を捉え得る。

## E. 結論

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

- [1] Kanno, J., et al. *BMC genomics* 7.1 (2006): 64.
- [2] Chen, YA., et al. *PLoS One* 6.3 (2011): e17844.
- [3] Chen, YA., et al. *PLoS One* 9.6 (2014): e99030.
- [4] Khan, A., Mathelier, A. *BMC bioinformatics*, (2017):18(1), 1-8.
- [5] Zhou, Y., et al. (2019). *Nature communications*, 10(1), 1-10.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Reiko Watanabe, Toshio Kawata, Shinya Ueda, Takumi Shinbo, Mitsuo Higashimori, Yayoi Natsume-Kitatani and Kenji Mizuguchi: Prediction of the Contribution Ratio of a Target Metabolic Enzyme to Clearance from Chemical Structure Information. *Molecular Pharmaceutics*. 2022; 20(1): 419-426.

[doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00698]

(2) Michiru Otaki, Nozomi Hirane, Yayoi Natsume-Kitatani, Mari Nogami Itoh, Masanori Shindo, Yoichi Kurebayashi and Shin-Ichiro Nishimura: Mouse tissue glycome atlas 2022

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

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

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

2022; 13(1): 1-17.

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

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

[doi.org/10.3389/fimmu.2022.847616]

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

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

(8) 夏目やよい 第3章 第1節「新薬創出を加速する人工知能の開発 -臨床情報を活用した創薬標的探索」革新的AI創薬 ～医療ビッグデータ、人工知能がもたらす創薬研究の未来像～ 2022; 107-112, (株) エヌ・ティー・エス

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

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

## 2. 学会発表

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

(2) 網屋沙織; 武田吉人; 榎本貴俊; 白井雄也; 白山敬之; 三宅浩太郎; 平田陽彦; 足立淳; 伊藤眞里; 夏目やよい; 熊ノ郷淳「エクソソームの次世代プロテオミクスによるサルコイドーシスの新規バイオマーカー探索(PRISM)」第 62 回日本呼吸器学会学術講演会 2022/4/23 京都

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし