

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5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5年度は、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た。その結果、本解析で用いた全ての化学物質について 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。さらに、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。

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变化から「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、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を選択し、これらの遺伝子発現プロファイルの動的变化を比較することで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：

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。マウ

ス (C57BL/6, 12 週齢、オス) に TCDD (0, 1.23, 3.70, 11.11, 33.33 μ g/kg、溶媒：コーンオイル) 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) に赤色 225 号 (0, 30, 100, 300 mg/kg、溶媒：コーンオイル) 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) に赤色 501 号 (0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：コーンオイル) 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) に赤色 505 号 (0, 10, 30, 100 mg/kg、溶媒：コーンオイル) 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、RSort プログラムによる遺伝子発現の 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) の並べ替えの後、共同研究者が形状より生物学的変動を示すものをあらかじめ網羅的に選択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> [4]) を用いた。

C. 研究結果

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

赤色225号、501号、505号の遺伝子発現プロファイルと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。

引用文献

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

E. 結論

TCDD とタール色素 (赤色 225 号、501 号、505 号) では、Ahr/Arnt の活性化や酸化ストレスを介した

Nfe2l2 の活性化による薬剤代謝酵素の誘導が起こる。さらに、赤色 501 号は NFkB 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. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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*, accepted, 2024.
- (2) 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*, accepted, 2023
- (3) 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.
- (4) 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.

2. 学会発表

- (1) 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)、パシフィコ横浜 会議センター、イーブニングフォーラム、口演
- (2) 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
- (3) 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

- (4) 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
- (5) 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
- (6) 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
- (7) 吉村華子、武田吉人、榎本貴俊、原伶奈、山本真、内藤裕二朗、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
- (8) 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)
- (9) 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
- (10) 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
- (11) 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
- (12) 夏目やよい: セッションII Interdisciplinary-immunologyで座長、第21回あわじ感染と免疫国際フォーラム
- (13) 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
- (14) Chihiro Higuchi、Masataka Kuroda、Mari Ito、Chioko Nagao、Kenji Mizuguchi、Yayoi Natsume: “Mine” AI Platform for Drug Discovery and Target Discovery、IIBMP2023
- (15) 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
- (16) 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

- (17) 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
- (18) 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
- (19) 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
- (20) 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
- (21) 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

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