

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5年度 総括研究報告書

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\*\*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、現段階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と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3年目となる令和5年度の成果見込みは以下の通り。

(1) では、令和5年度は、フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)(DEHP)、ブロモベンゼン(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が示唆され、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、チオレドキシン系、PPAR $\alpha$ 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)では、化学物質の反復投与影響によるエピジェネティック変化の解析を行った。令和3年度は、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実施、令和4年度研究は、溶媒の反復影響によるエピジェネティック変化を評価すべく、メチルセルロース14日間反復曝露のヒストン修飾解析を行い、サリドマイドの反復投与で検出されたヒストン修飾の変化の内、Cyp 遺伝子群での変化が溶媒の影響であることを示した。また Car 遺伝子群などの遺伝子領域においても溶媒影響が見られた。令和5年度は、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、サリドマイド反復曝露による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となった。

(3)では、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、それを基に更に規模の大きな網羅的解析を実施する手法として、深層学習(Deep Learning)を用いた、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開発を進めた。また転写制御解析ツールとして開発した「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の連携強化を進めた。

(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、テンプレートコレクションの充実を図った。

(5) では、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・評価を試みた。

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、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。

## 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：

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、[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。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)を用い溶媒はコーンオイル(C8267、Sigma-Aldrich)とし、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。

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、[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。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)を用い溶媒はコーンオイル(C8267、Sigma-Aldrich)とし、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。

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、[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。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、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径の生検トレビンにより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℃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℃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10µL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RNA5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、RNeasy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RNA5µg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 5 年度は、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てヒストン修飾解析を実施している。

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  $\mu$ g) を材料として、1) 4  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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  $\mu$ l (30  $\mu$ 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。

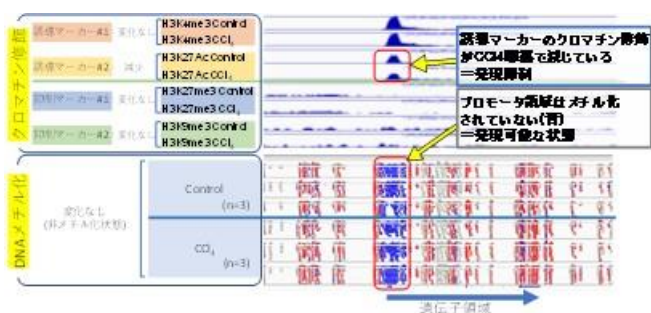
クロマチン免疫沈降の有効性の確認ができた ChIP DNA より次世代シーケンサ解析用のライブラリを作成し、75 bp のシングルリードで網羅的シーケンス解析を行った。シーケンス結果は、マウス標準ゲノム (mm10) に対してマッピング後に in silico で 200 bp まで各リードを延長し、SICER アルゴリズムを用いてピークコール (ピーク検出) を行う。SICER アルゴリズムは default のパラメータ ( $p=1e-7$  (narrow peak),  $p=1e-1$  (broad peak)) を用いる。各サンプルは、Drosophila DNA 断片のリード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

複雑な遺伝子制御ネットワークのかく乱により引

き起こされる化合物毒性のメカニズムの解明には、反復投与（または単回暴露）により引き起こされる“クロマチン修飾とメチル化（エピゲノム修飾）”に関する情報が必要不可欠である。本研究では、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・毒性部から提供を受けたエピゲノム修飾に関するデータ（エピゲノムデータ）を用いて、深層学習を基盤とした解析システムの構築を進めている。



図A. 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。

このデータでは、化合物の反復投与（および単回暴露）により引き起こされる遺伝子のエピゲノム修飾を、図Aのような画像として表現している。このような画像をこれまで、長年経験とトレーニングを積んできた研究者が目で見ても検出し、エピゲノム修飾が遺伝子発現に影響を与えているかどうかの分類を行ってきた。しかしながら、個々の化合物の反復投与と実験に対して遺伝子数と等量の画像が存在するため、解析には多大な時間と労力が必要な状況であった。

このような問題を解決するために、本研究課題（令和3年度から5年度）において、我々は、様々な画像解析のタスクにおいて高い性能が報告されている“深層学習”を基盤とした、エピゲノムデータの解析システムの構築を進めている。深層学習を用いることにより、専門家の目視での情報の統合および判断を行っている工程について、偏奇のない網羅的且つ高速な自動化を行うことが出来る可能性がある。

提供を受けた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暴露と単回暴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：反復暴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：反復暴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：反復暴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）

この3群の内、化合物の毒性メカニズムを探索するために有意な意味の有る群は **suppression** 群と **induction** 群である。

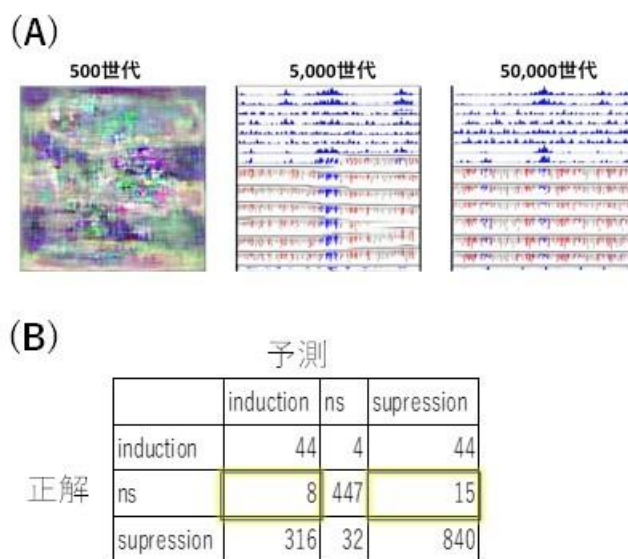
本研究課題において、初年度（令和3年度）は、提供を受けたエピゲノム画像データを訓練データとして用いて、8種の畳み込み層を基盤とした深層学習アーキテクチャ（CNN, convolutional neural network）に基づく深層学習モデルを構築し、上記の3群（**induction** 群、**suppression** 群、および、**non-significant** 群）の予測精度の評価を行った。具体的には、エピゲノム画像データの80%をトレーニングデータとして用いて深層学習モデルを構築し、残りの20%のデータをテストデータとして用いて構築したモデルの分類精度の検証を行った。分類精度の検証の結果、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群を正確に分類できることを確認できた（図B）。この結果は、構築した深層学習モデルは、反復暴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。しかしながら、構築した8種類のモデル全てで、**suppression** 群と、**induction** 群を分類することが出来なかった。これは、**induction**

群に対する訓練用画像の枚数が少なく、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た。また、大量の訓練画像の生成のためには、多大な専門家の労力と時間が必要であるため、induction 群の訓練画像の増幅が難しい状況であった。

		予測		
正解		→		
		induction	ns	supression
<b>Resnet18</b>				
	induction	0	3	89
	ns	0	466	4
	supression	0	4	1184
<b>Resnet34</b>				
	induction	0	2	90
	ns	0	468	2
	supression	0	3	1185
<b>Resnet50</b>				
	induction	0	2	90
	ns	0	465	5
	supression	0	3	1185
<b>Alexnet</b>				
	induction	0	2	90
	ns	0	461	9
	supression	0	4	1184
<b>Densnet121</b>				
	induction	0	3	89
	ns	0	466	4
	supression	0	2	1185
<b>Sqeeznet1.0</b>				
	induction	0	1	91
	ns	0	465	5
	supression	0	4	1184
<b>vgg16</b>				
	induction	0	3	89
	ns	0	467	3
	supression	0	3	1185
<b>vgg19</b>				
	induction	0	1	91
	ns	3	464	3
	supression	0	3	1185

図B. 代表的な CNN による分類性能の検証結果

そこで、本研究課題の2年目（令和4年度）は、以上の問題に対処するために、画像の生成モデル（Generative adversarial network : 1. Bingchen Liu, Yizhe Zhu, Kunpeng Song, Ahmed Elgammal (2021) Towards Faster and Stabilized GAN Training for High-fidelity Few-shot Image Synthesis. arXiv:2101.04775）の実装を行い、訓練画像(induction 群)の増幅を行った。生成モデルにより、実際の画像と見分けが付かない程度の、高品質な画像の生成に成功した(図C-A)。さらに、CNNに加えて、vision transformer を基盤とした深層学習アーキテクチャの実装も行った。増幅した訓練画像を使用して、代表的な深層学習アーキテクチャを基盤とした分類モデルの構築を行い、その予測精度について検証を行った。しかしながら、増幅した訓練データを用いて構築した深層学習モデルであっても、induction 群、と、supression 群を見分けることは困難であった。特に、ほぼ完全に分類できていた non-significant 群についても、supression 群、または、induction 群と誤判定するものが生じてしまった(図C-B)。



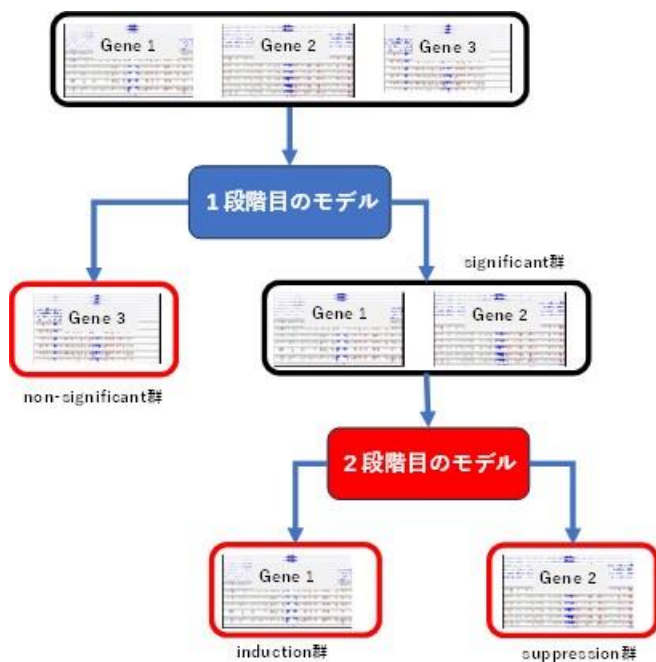
図C. 生成A Iによる画像の増幅と増幅画像を訓練データに追加した場合の予測精度の検証結果。(A) 生成A Iにより生成された画像 (B) 予測精度 (vision transformer)

上記の non-significant 群の誤判定の問題は、令和3年度に作成した増幅したデータを用いないモデルで non-significant 群を正確に分けることが出来たことから、以下の様に2段階のモデルを構築することで解決できる。

1段階目のモデル：non-significant 群とそれ以外の群を分類する深層学習モデル

2段階目のモデル：induction 群と supression 群を二値分類する深層学習モデル

具体的には、図Dに示すように、まず、1段階目のモデルで non-significant 群を分類し、残りの画像を、2段階目のモデルで、induction 群、supression 群に分類する。この様にすることにより、non-significant 群を、induction 群または supression 群に誤判定することを避けることが出来る。



図D. 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

そこで、今年度は、この2段階モデルの構築を行った。また、Induction 群、suppression 群を分類する2段階目のモデルについては、より高精度の分類を達成することを目的として、最新の CNN を基盤としたアーキテクチャ (ConvNeXt)、および、transformer を基盤とした最新のアーキテクチャ (SwinTransformer、MaxVit) の実装を追加した。さらに、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かを調べるために、最新の explainability model (XGrad-Cam : 2. Ruigang Fu, Qingyong Hu, Xiaohu Dong, Yulan Guo, Yinghui Gao, Biao Li (2020) Axiom-based Grad-CAM: Towards Accurate Visualization and Explanation of CNNs. arXiv:2008.02312)を導入して深層学習モデルの解析を行った。

#### ●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 言語 (ver.3.9.1) を使用した。主な解析ライブラリとしては numpy (ver.1.19.5)、pandas (ver.1.2.1)、scikit-learn (ver.1.2.0)を、グラフ描画ライブラリとして matplotlib (ver.3.3.4) を用いた。

#### (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：

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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、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  $\text{mg}/\text{kg}$ 、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> [Chen, YA., et al. PLoS One 6.3 (2011): e17844., Chen, YA., et al. PLoS One 9.6 (2014): e99030.]) 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> [Zhou, Y., et al. (2019). Nature communications, 10(1), 1-10.]) を用いた。

#### 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的配慮を十分行い、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】

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 $\alpha$  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 $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、NR3C1 (グルココルチコイド受容体)、PPAR $\gamma$  等を上流に持つ遺伝子が誘導開始していた (図 1 : Abcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14 等)。

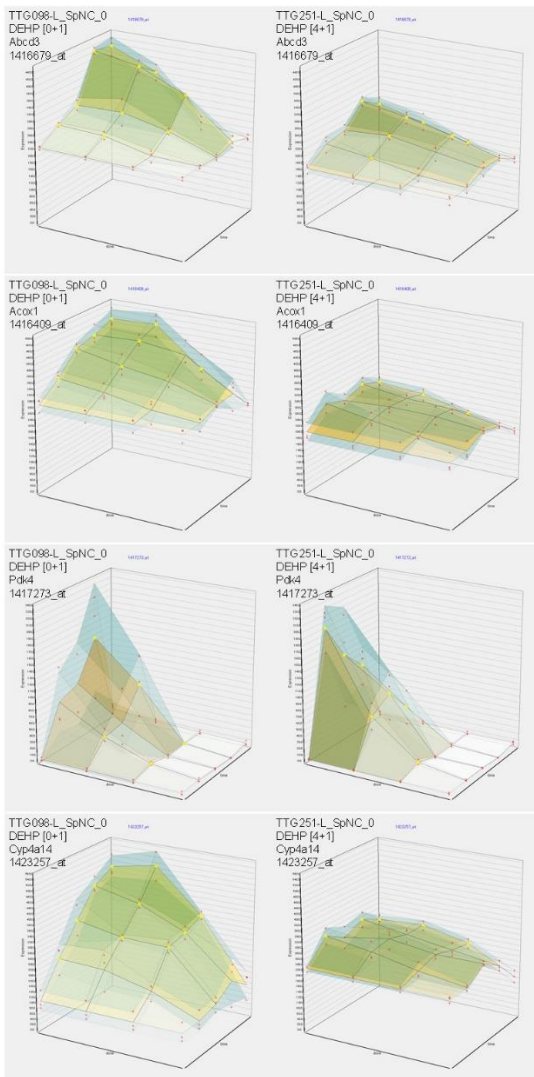


図1 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にて Abcd3、Acox1、Pdk4、Cyp4a14を示す。

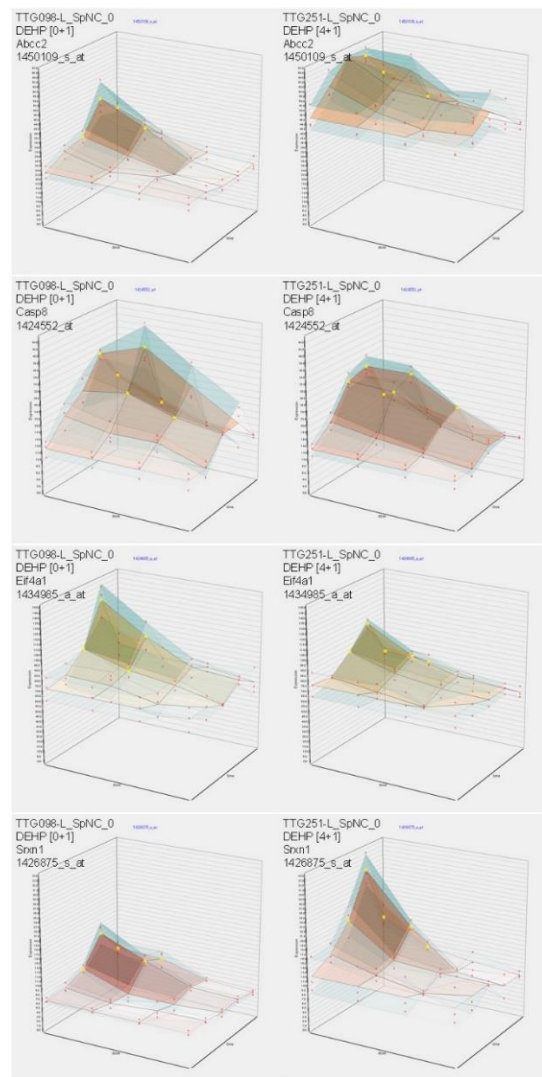


図2 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にて Abcc2、Casp8、Eif4A1、Srxn1を示す。

4 時間目に誘導開始される遺伝子数は 302 で、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 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 (図 2 : Abcc2、Casp8、Eif4A1、Srxn1 等)。

8 時間目に誘導開始された遺伝子は 786 で、PPAR $\alpha$ 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、Psm6 等)。

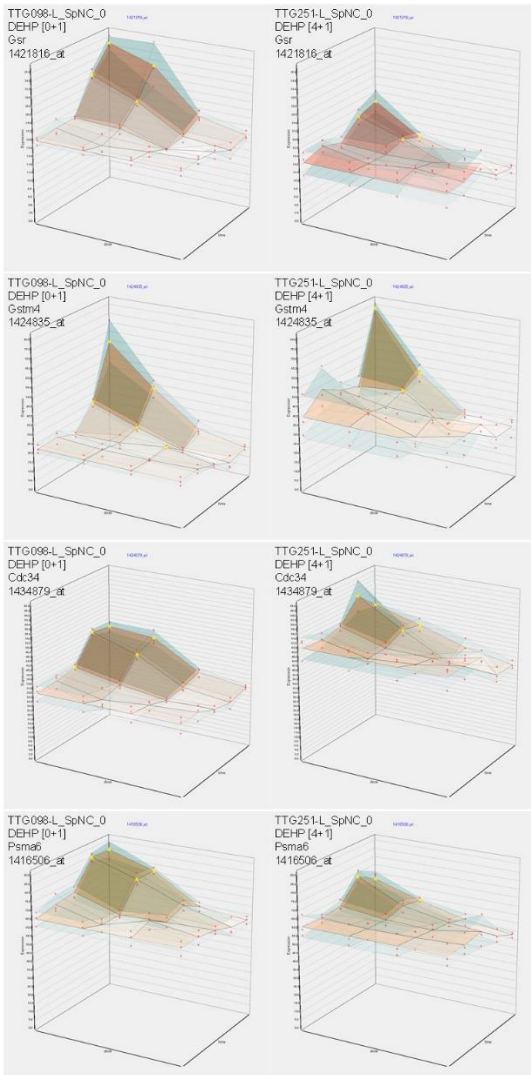


図3 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にてGsr、Gstm4、Cdc34、Psma6を示す。

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

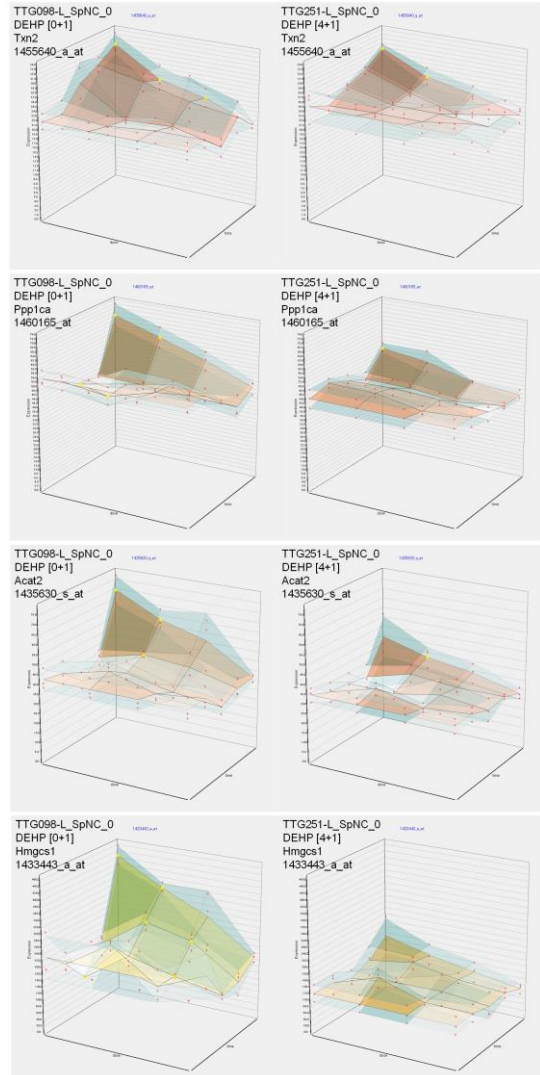


図4 DEHP 左[0+1] 右[4+1]にてTnx2、Ppp1ca、Acat2、Hmgcs1を示す。

## 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 $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、NR3C1(グルココルチコイド受容体)、PPAR $\gamma$ 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)。

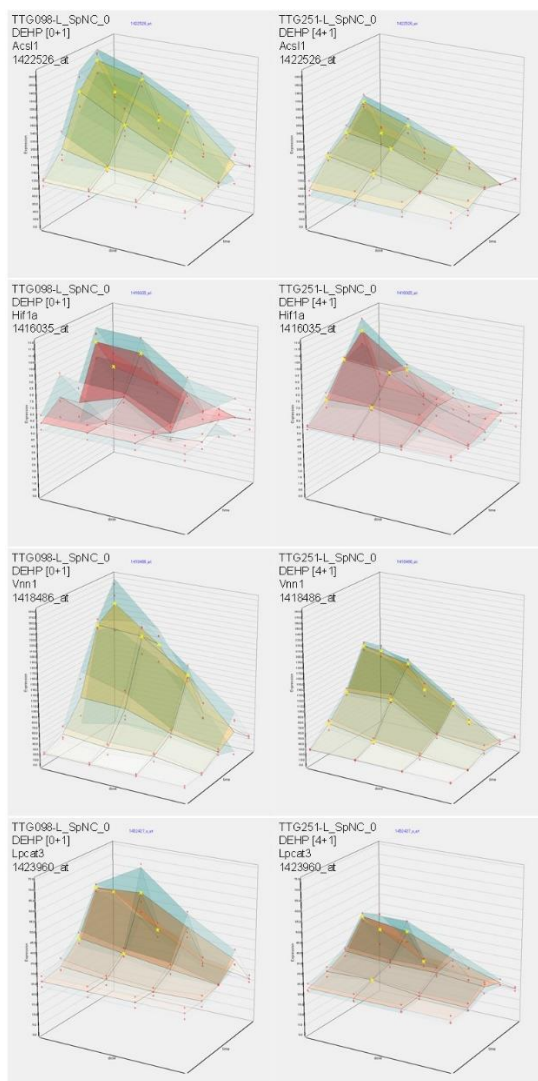


図5 DEHP左[0+1] 右[4+1]にてAcs11、Hif1a、Vnn1、Lpcat3を示す。P>0.05の有意差を示す黄色\*の位置が右[4+1]の方が2時間早くなっている。

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 $\alpha$ 、Hnf4a (NR2A1)、PPAR $\gamma$ などの下流の遺伝子であった (図2参照)。加えて、[4+1]において、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、Nr1i2(PXR)などの下流で、発現時期が若干早まる遺伝子をも認めた (図6)。

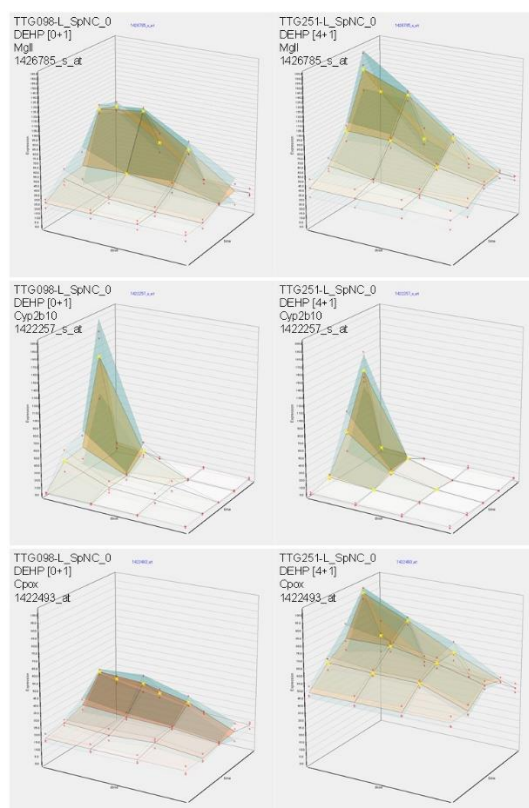


図6 DEHP左[0+1] 右[4+1]にてMgl1、Cyp2b10、Cpxを示す。P>0.05の有意差を示す黄色\*の位置が右[4+1]の方が2時間早くなっている。

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 $\alpha$ 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7及び図3参照)。 $[4+1]$ に特有の遺伝子発現は少数であった。

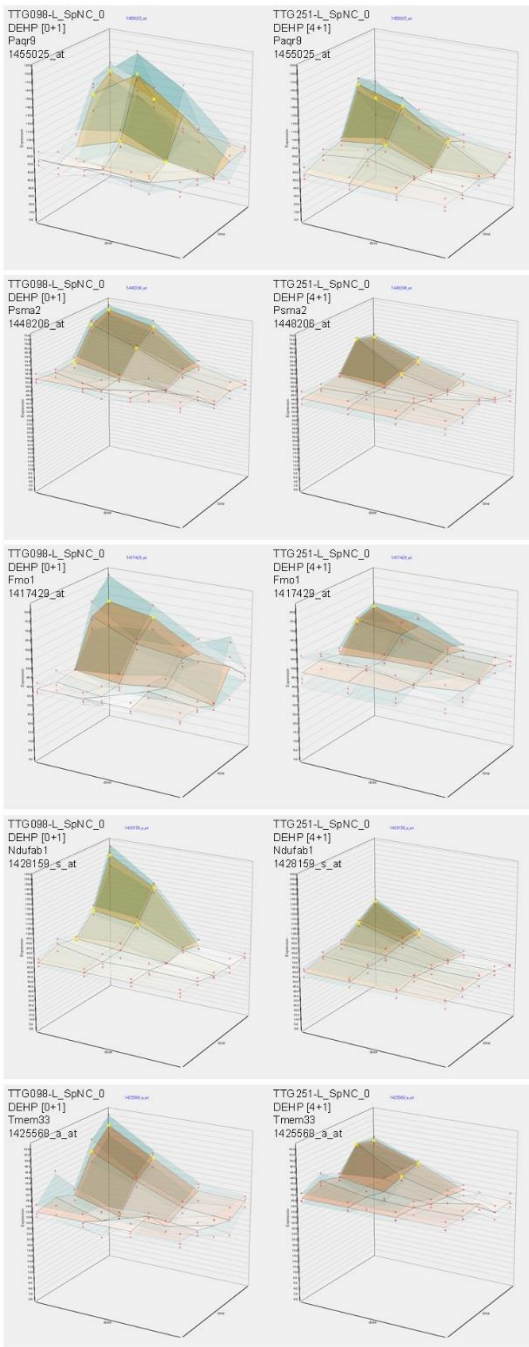


図7 DEHP左[0+1] 右[4+1]にてPaqr9、Psma2、Fmo1、Ndufab1、Tmem33を示す。

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7)。

図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。

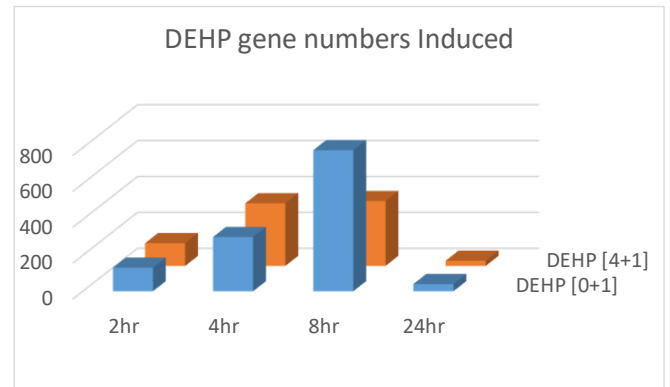


図8 DEHP[0+1]と[4+1]の誘発開始時間による遺伝子数の比較

### 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 $\alpha$ 、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9)。

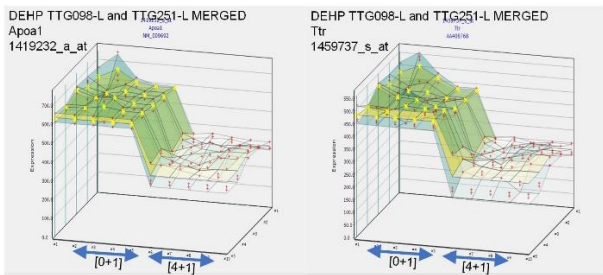


図9 DEHP [4+1]と[0+1]の3次元グラフを左右隣り合わせにして、基線反応を強調した表示にて Apo1、Ttr を示す（奥行きは 2, 4, 8, 24 時間）。

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 10）。

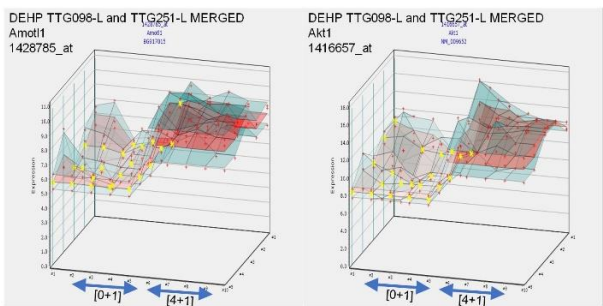


図 10 DEHP [4+1]と[0+1]の3次元グラフを左右隣り合わせにして、基線反応を強調した表示にて Amot1、Akt1 を示す（奥行きは 2, 4, 8, 24 時間）。

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 $\alpha$ 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 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。

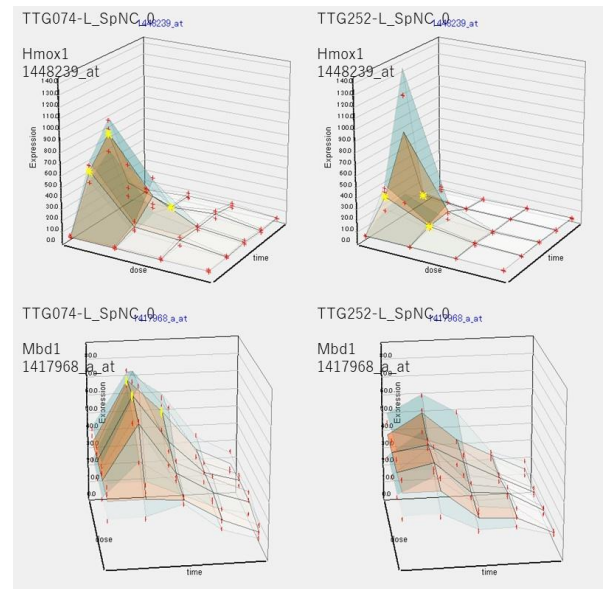


図 11 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Hmox1、MDB1 を示す。

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 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 13)。

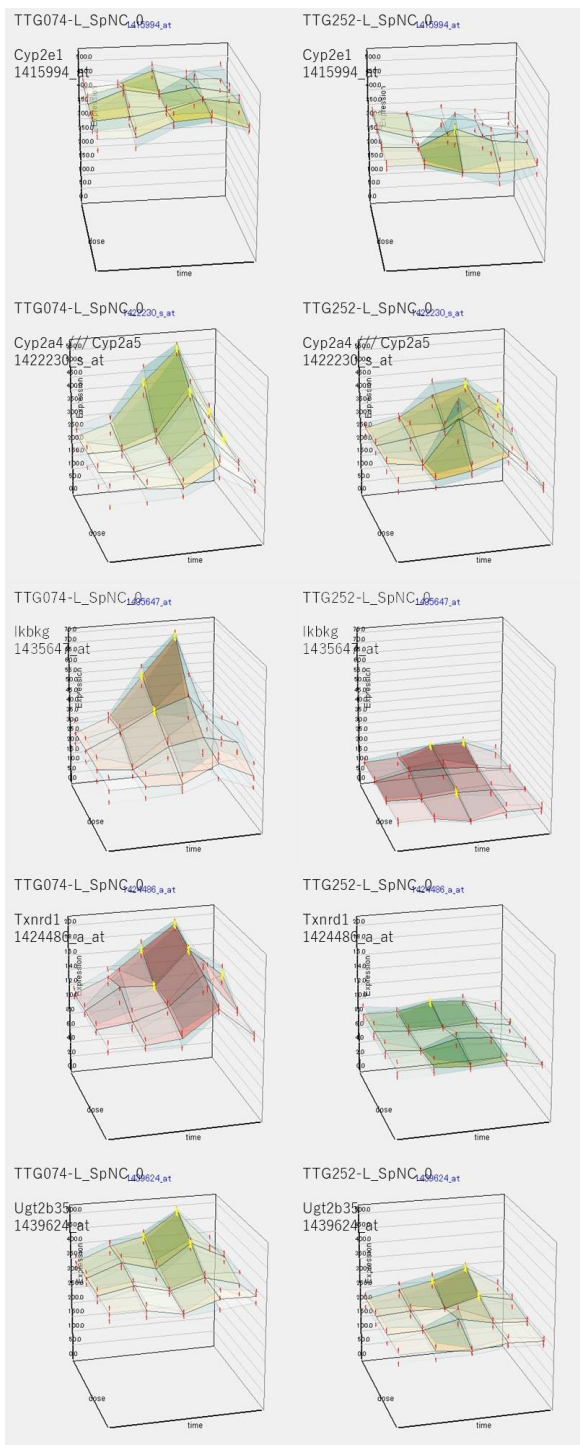


図 12 BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Cyp2e1、Cyp2a4、Ikbkg、Txnrd1、Ugt2b35 を示す。

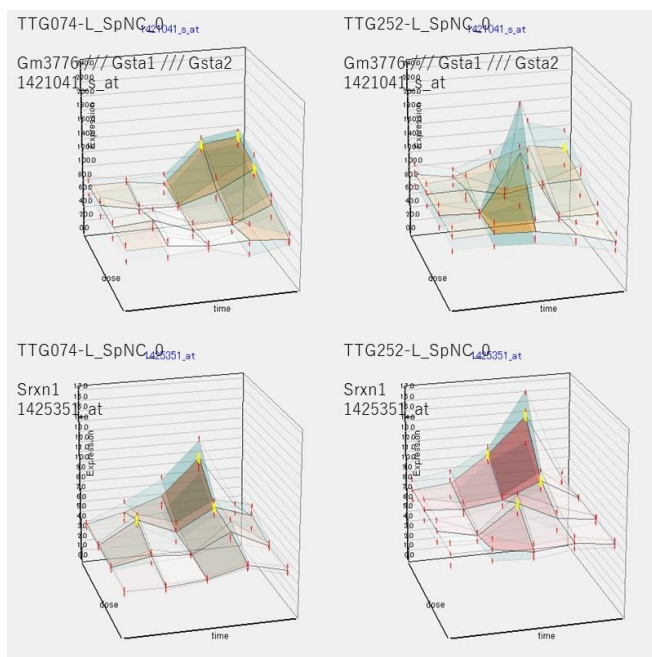


図 13 BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Gsta1/2、Srxn1 を示す。

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 は核内受容体には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、NR1I3 (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 12,13 参照)。

⑥ **BrBenz [0+1] と BrBenz [4+1] の比較**

図 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。

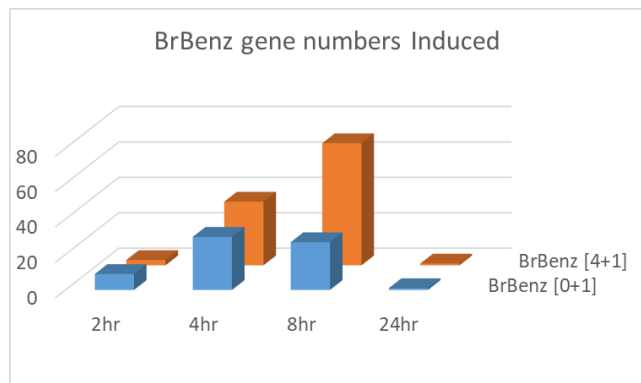


図 14 BrBenz [0+1] と [4+1] の誘発開始時間による遺伝子数の比較

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 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])。

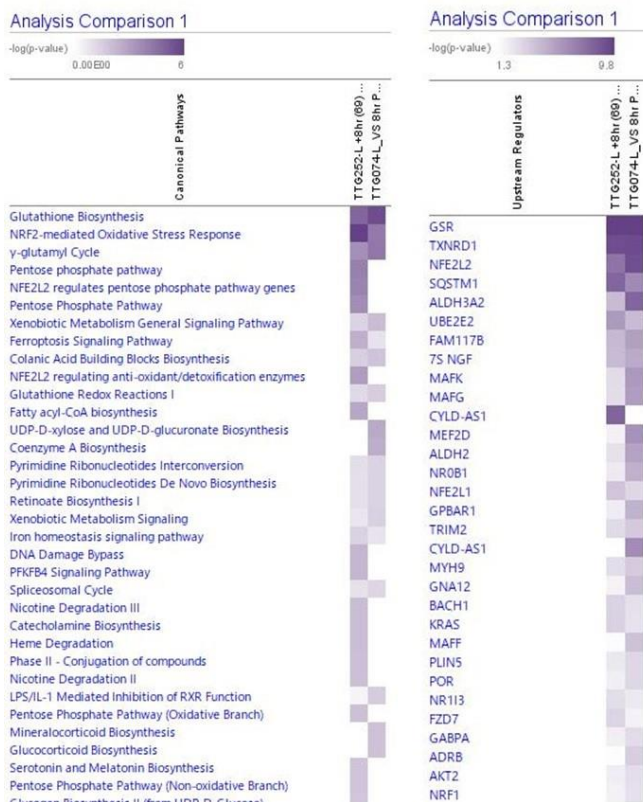


図 15 BrBenz [0+1] と [4+1] の Canonical Pathway と Upstream Genes の比較 (IPA)。(TTG074-L が [0+1]、TTG252-L が [4+1])

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 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 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

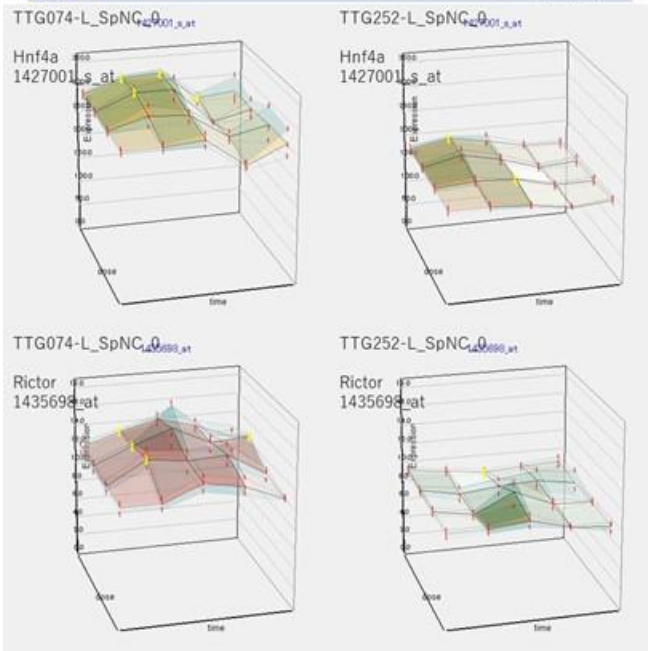


図 16 BrBenz 上流遺伝子の IPA による解析結果の抜粋、および、BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Hnf4a、Rictor を示す。

**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

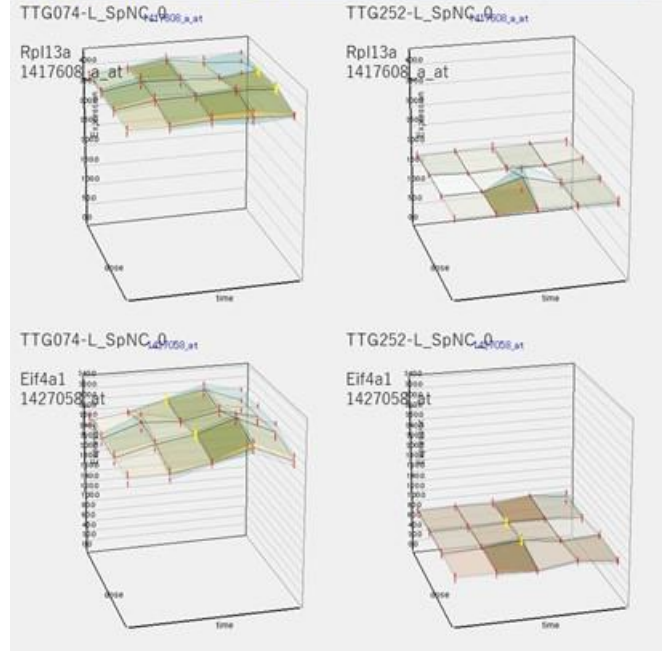


図 17 BrBenz 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および BrBenz 左[0+1] 右[4+1] にて Rpl3a、Eif4a1 を示す。

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 18)。

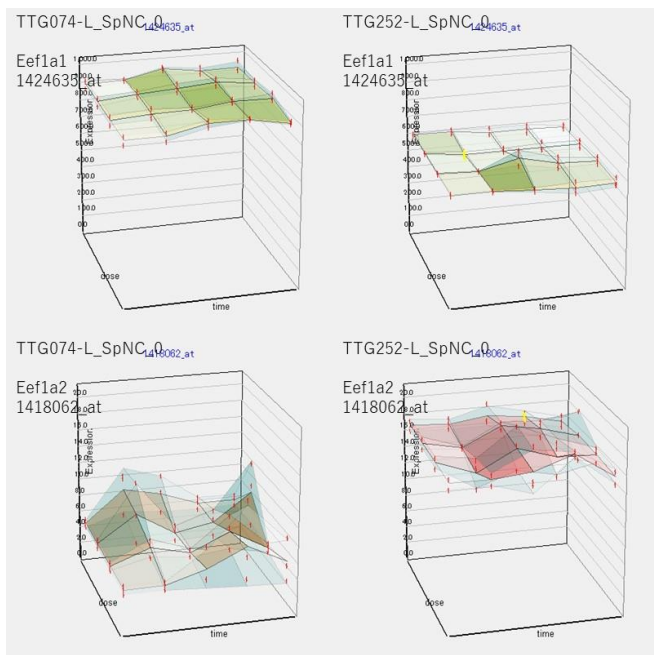


図 18 BrBenz 左[0+1] 右[4+1]にて Eef1a1、Eef1a2 を示す。

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 19)。

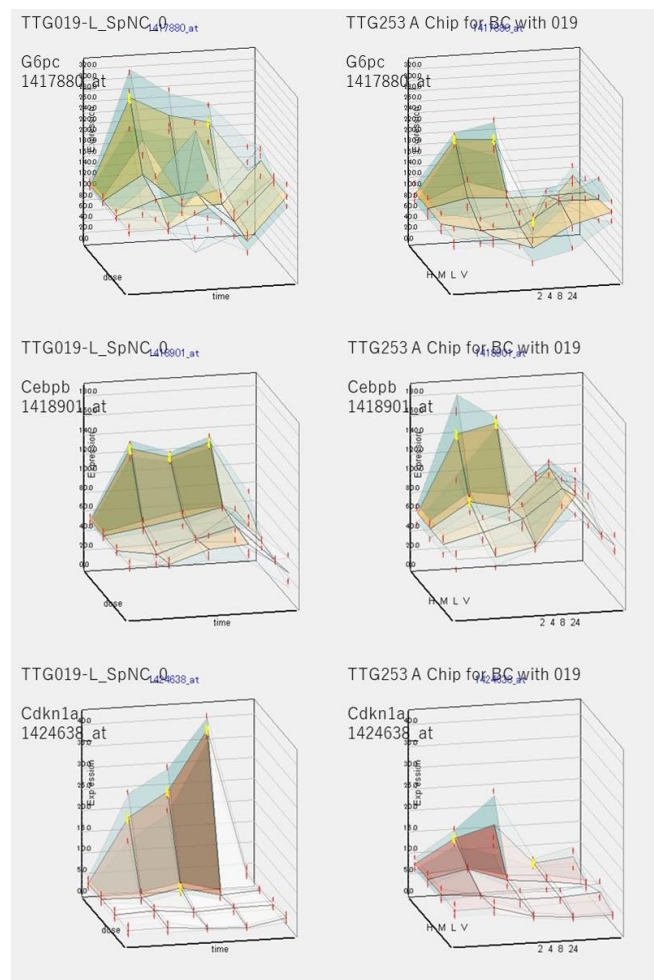


図 19 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて G6pc、Cebpb、Cdkn1a(p21)を示す。

4 時間目に NRF2 系を惹起し、グルタチオン、チオレドキシシン系を誘導し (図 20)、8 時間目に PPAR $\alpha$  による脂質代謝に影響した (図 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的ストレスを含む障害が示唆された (図 22)。

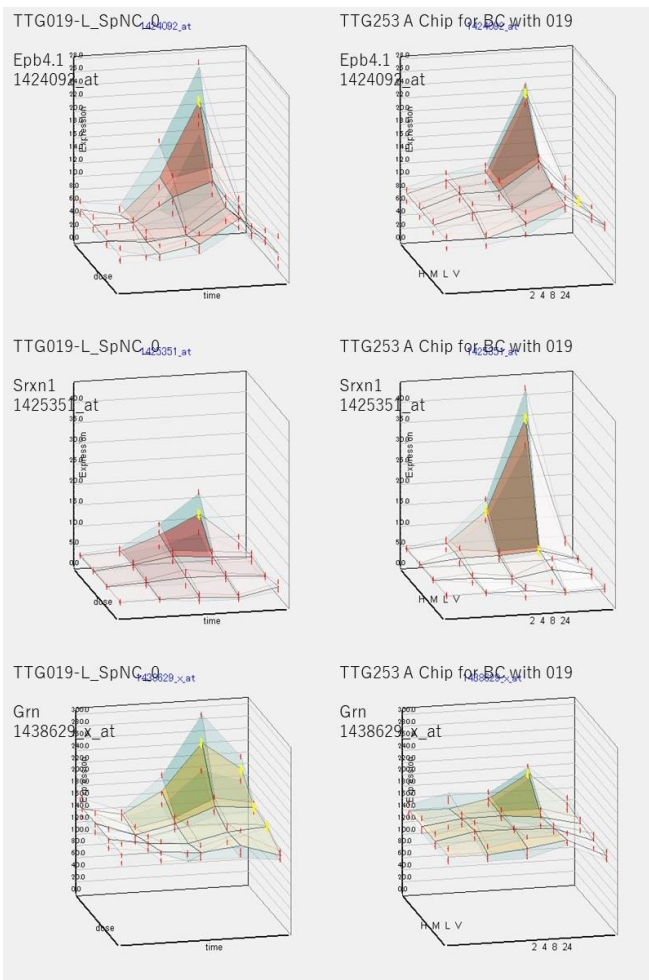


図 20 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Epb4.1、Srxn1(sulfiredoxin 1)、Grn(granulin)を示す。

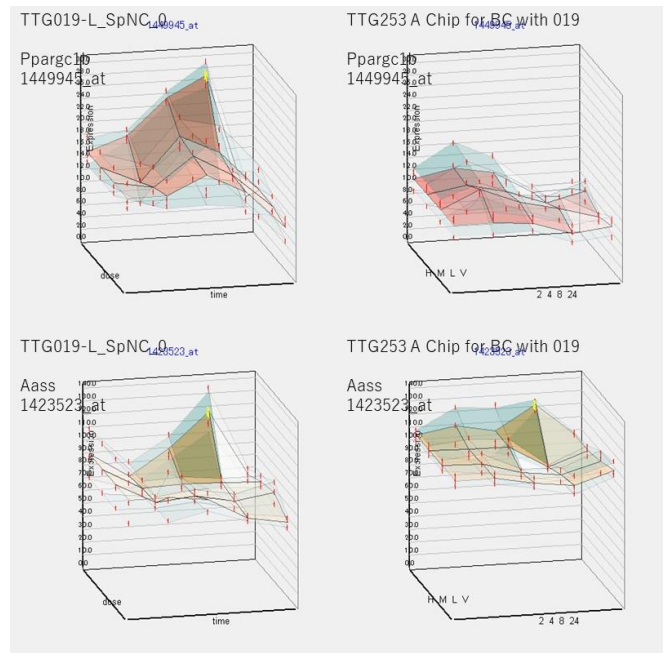


図 21 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Pparg1b、Aass を示す。

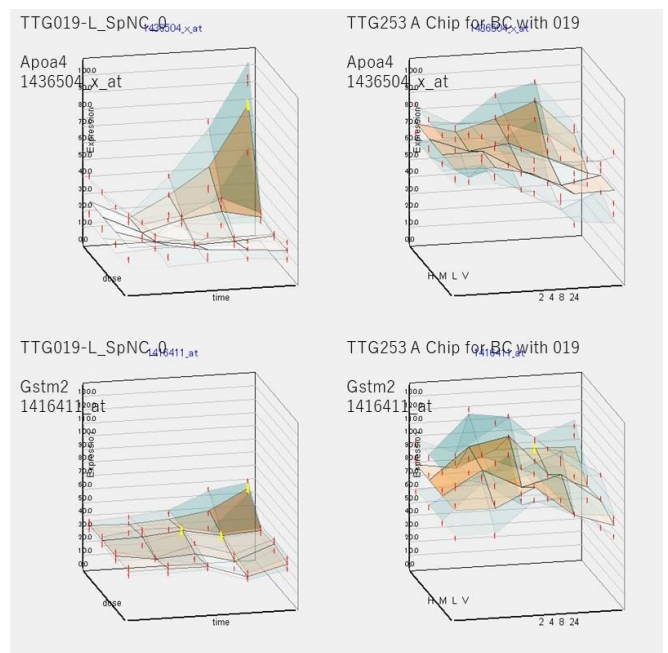


図 22 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Apo4、Gstm2 を示す。

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 19,20,21 参照)。

⑨ 2-VP [0+1]と 2-VP [4+1]の比較

図 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。

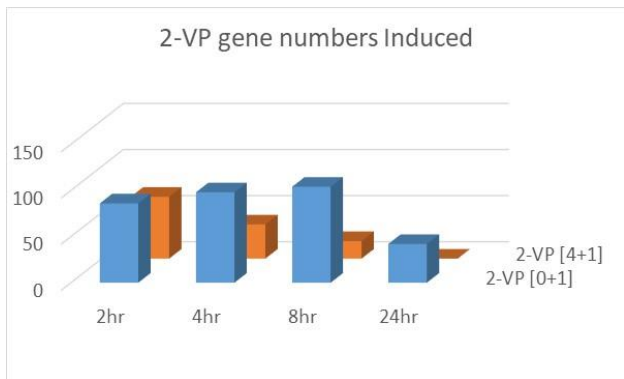


図 23 2-VP [0+1]と[4+1]の誘発開始時間による遺伝子数の比較

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 24 (◇ TTG019-L が[0+1]、TTG253-L が[4+1]))。

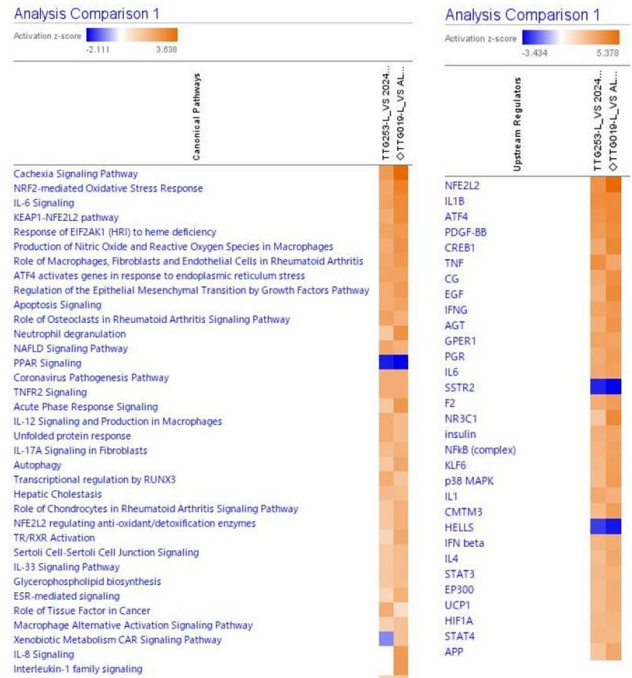


図 24 2-VP [0+1]と[4+1]の Canonical Pathway と Upstream Genes の比較 (IPA)。 (◇TTG019-L が[0+1]、TTG253-L が[4+1])。

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 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(図26、Pax6、Fosl2、Ern1、Apob、Plg)。

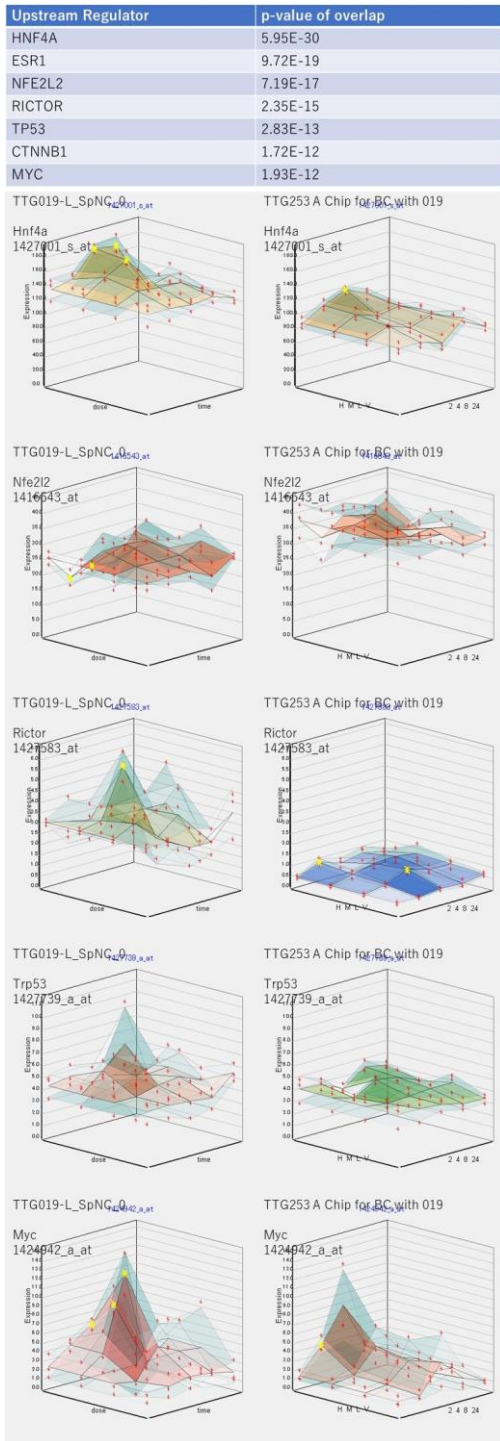


図25 2-VP 上流遺伝子の IPA による解析結果の抜粋、および、2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Hnf4a、Nrf2、Rictor、p53、Myc を示す。

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

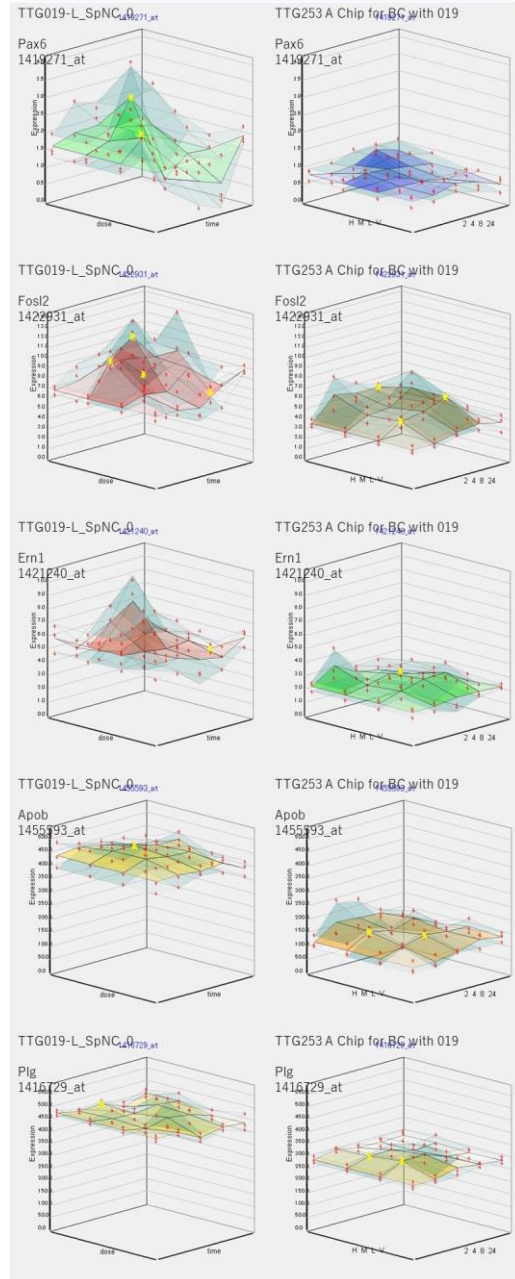


図26 2-VP 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて Pax6、Fosl2、Ern1、Apob、Plg を示す。

[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 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

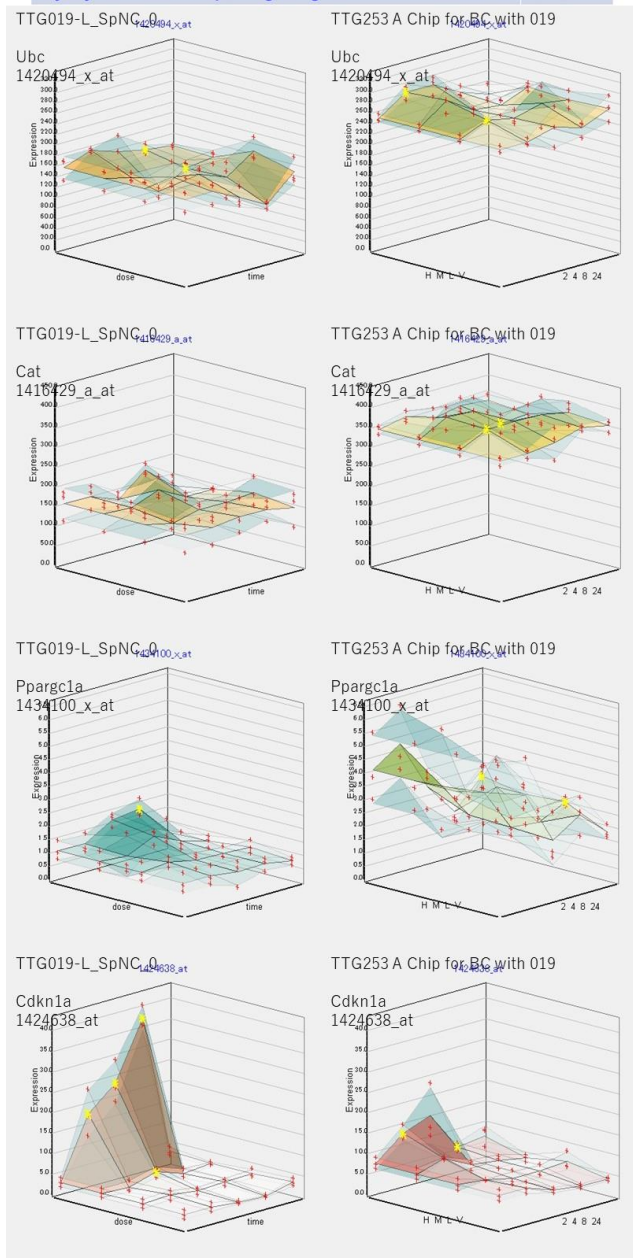


図 27 2-VP 発現系の IPA による解析結果の抜粋、および 2-VP 左 [0+1] 右[4+1]にて Ubc、Catalase、Pparg1a、Cdkn1a (p21) を示す。

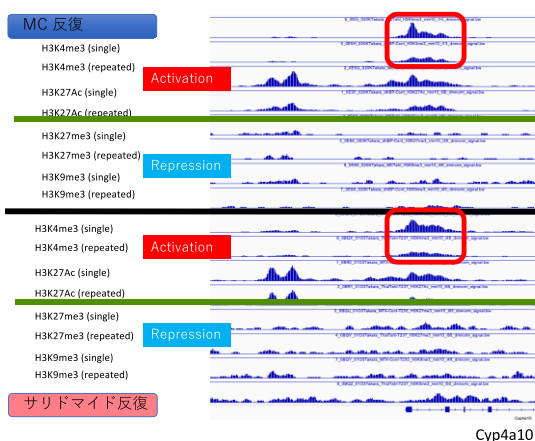
以上より、2-VP の 4 日間反復曝露は、GCR (Glucocorticoid receptor)、NRF2 系、グルタチオン、

チオレドキシシン系、PPAR $\alpha$ 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。

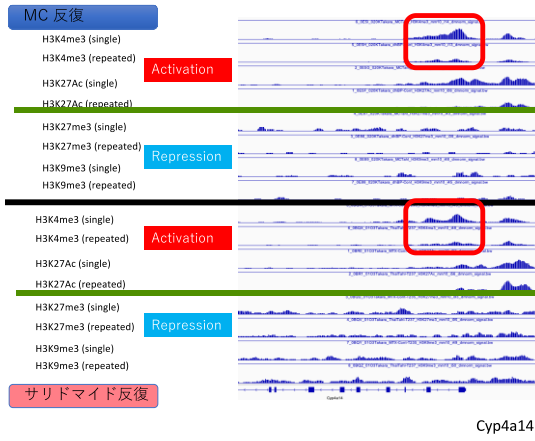
## (2) 反復曝露影響のエピゲノム機構解析【北嶋】

令和 4 年度に測定したメチルセルロース (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。昨年度、多くの Cyp 遺伝子群が MC の反復投与により、そのエピジェネティック状態に変化が生じることを報告していた(下図)。

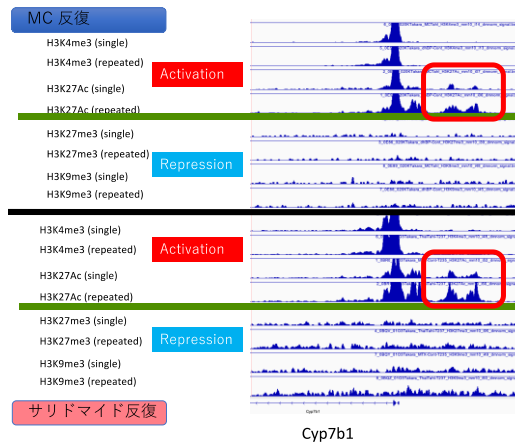
### Cyp4a10



### Cyp4a14

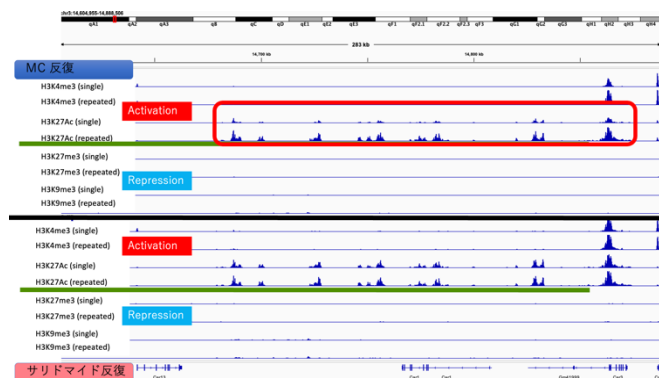


## Cyp7b1



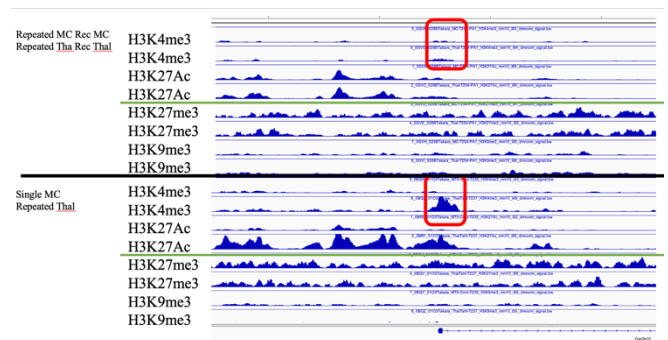
探索範囲を拡大したところ、その他の遺伝子領域においても顕著な変化が見られた。中でも Car (carbonic anhydrase) 遺伝子群に関連した H3K27Ac が、大きな領域において、MC の反復投与により増加していることがわかったが、サリドマイドの反復投与(令和 3 年度に測定)においては増加していないことが判明した。

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している可能性がある。

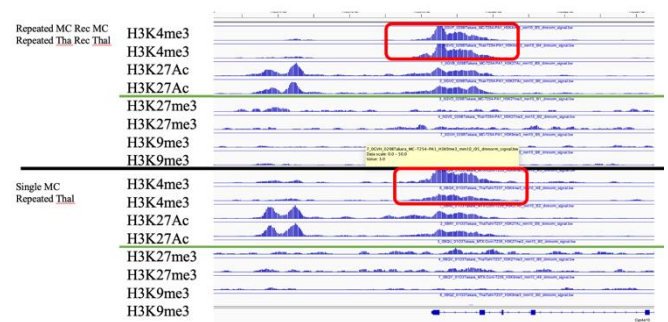


令和 5 年度は、サリドマイド影響の可逆性検討のため、サリドマイド 14 日間反復曝露、15 日目から 14 日間無処置、29 日目サリドマイド 4 用量単回曝露の実験を実施した。

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。

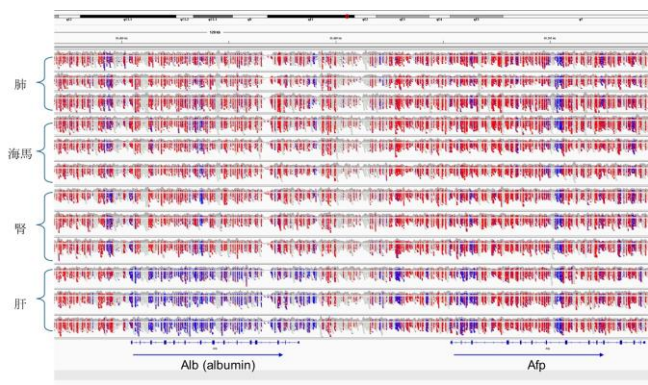


さらに、下図の通り、サリドマイド反復で H3K4me3 が抑制されていたが、休薬することで元に戻る領域があることも明らかになった。



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、より効率が良く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】

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 D) 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 D 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 E 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 E. 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 F 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	<a href="https://arxiv.org/abs/1512.03385">https://arxiv.org/abs/1512.03385</a>
ConvNext	CNN	2022	3056	<a href="https://arxiv.org/abs/2201.03545">https://arxiv.org/abs/2201.03545</a>
Vision transformer	transformer	2020	27687	<a href="https://arxiv.org/abs/2010.11929">https://arxiv.org/abs/2010.11929</a>
Swin transformer	transformer	2022	949	<a href="https://ieeexplore.ieee.org/document/9879380">https://ieeexplore.ieee.org/document/9879380</a>
MaxVt	transformer	2022	268	<a href="https://arxiv.org/abs/2204.01697">https://arxiv.org/abs/2204.01697</a>

図 F. 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 G 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。



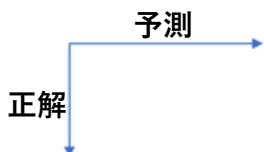
Resnet-18			ConvNext		
	induction	suppression		induction	suppression
induction	31	61	induction	13	79
suppression	128	1060	suppression	148	1040

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

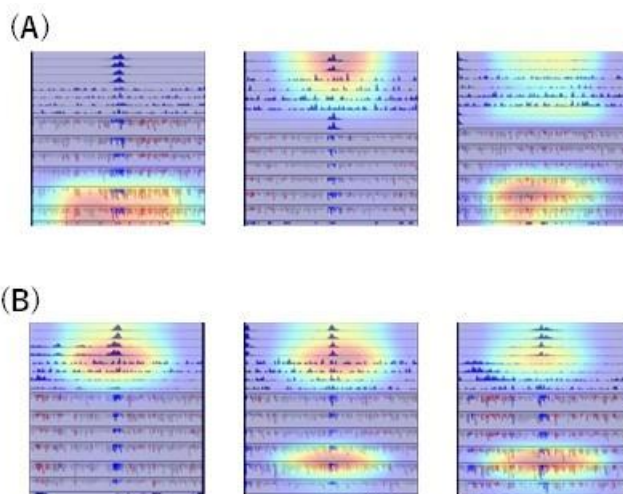
  

Max transformer		
	induction	suppression
induction	0	92
suppression	0	1188



図G. 2段階目のモデルの予測精度の検証結果

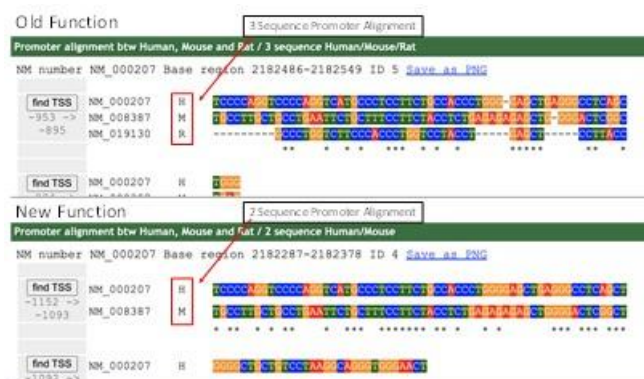
さらに、1段階目のモデルについて、Non\_significant 群と significant 群を分類する判断根拠を探索するため、最新の explainability model (XGrad-Cam) を実装し解析を行った。図Hに示すように、深層学習モデルは、図中の赤および黄色の部分に着目して分類を行っている。Significant 群を分類する際には、クロマチン修飾のみに着目している場合 (図H-Aの中央図)、メチレーションのみに着目している場合 (図H-Aの左図)、そして、クロマチン修飾とメチレーションの両者に着目している場合が存在した (図H-Aの右図)。一方、non-significant 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H-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H-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ぼされる場合、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H. 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

今年度は、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

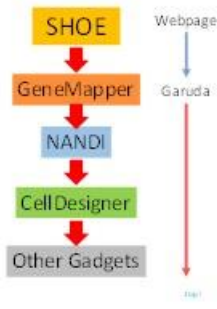
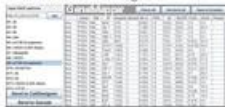
また Garuda Platform 上で、Percellome DB の利用に適した解析パイプラインの構築を進め、SHOE と他の Garuda Gadget との連携も強化した。



## Garudification

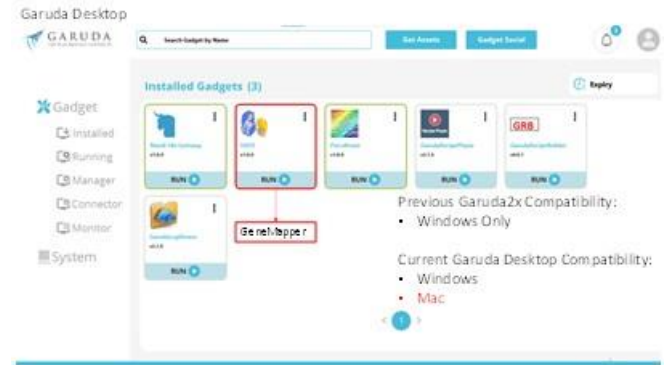
GeneMapper is an UI that pulls data from SHOE and sends it to Garuda

- 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 **Discover**

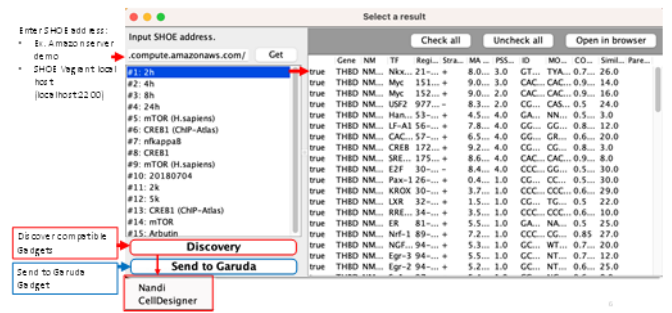


Garuda 対応と解析パイプラインの流れ

実際のパイプラインの流れは以下の通り。



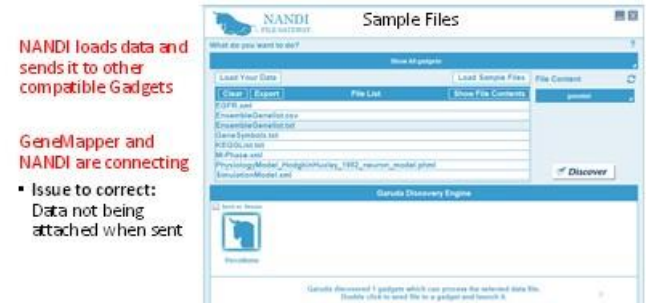
## GeneMapper UI



## GeneMapper UI



Send to NANDI SHOE data → GeneMapper → NANDI → Gadget

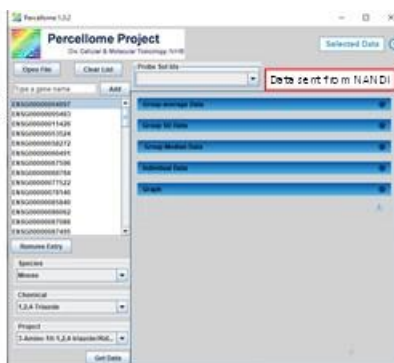


## Percellome

SHOE data → GeneMapper →  
NANDI → Percellome (others)

Example:

- Connecting to Percellome Gadget



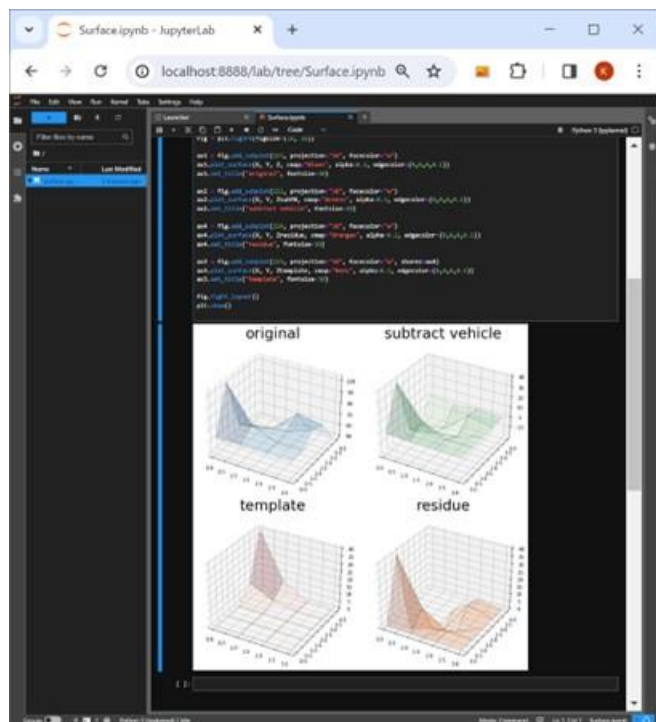
実際のデータで解析を試みて、Garuda Gadget 連動による解析パイプラインの性能や使い勝手の評価を進めた。

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

今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、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】

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 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、チオレドキシニン系、PPAR $\alpha$ 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、肝における関連遺伝子の発現変動は下図 28 の様に確認することが可能である。

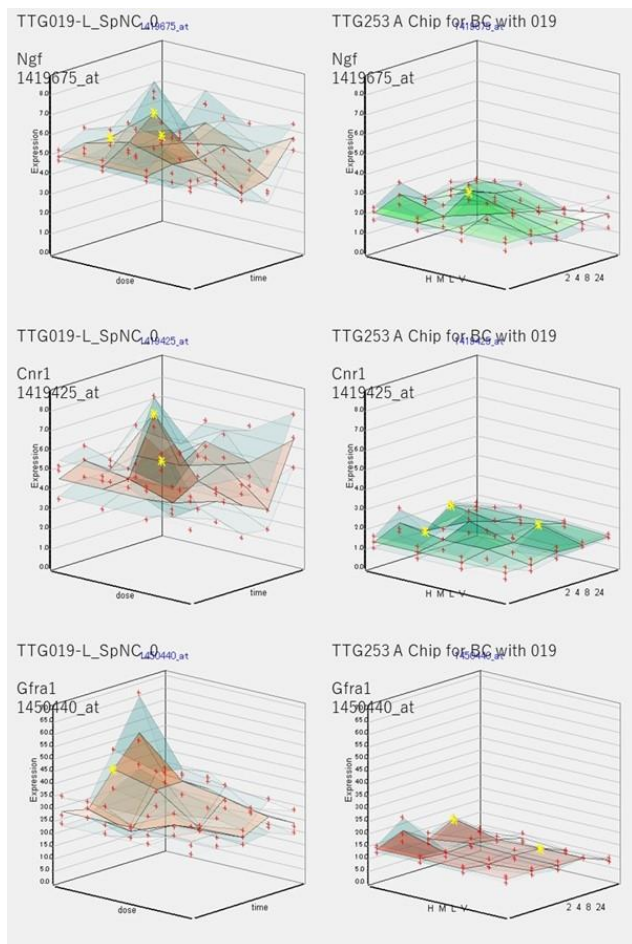


図 28 2-VP 左[0+1] 右[4+1]にて、Nerve growth factor、cannabinoid receptor 1 (brain)、glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 を示す。

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】の令和 3 年度研究において、サリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析を行い、薬物代謝酵素の制御領域の多くで変化を捉えていたが、その変化が本当にサリドマイドの反復曝露による影響なのか、それとも溶媒の反復曝露による影響なのかを検証するために、令和 4 年度は、溶媒として使用してい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。その結果、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存在することが想定されていたが、昨年度発見した Cyp 遺伝子群だけでなく、今年度は Car 遺伝子群への影響を確認した。さらに、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、肝臓に加えて、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。これによって、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】においては、本研究課題で行った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 (図A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 (図A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。

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】については、開発はほぼ計画通りに進行している。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は、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、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、今回のデータからも僅か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、化学物質ごとの特性が明らかになる点を含めて、高いことが示唆された。

「反復曝露影響のエピゲノム機構解析」【北嶋】に

おいては、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の詳細解析が進み、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。

さらに、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られた。

「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、先行研究で開発した遺伝子発現解析用 AI の論文を発表した。

エピゲノム解析の AI 自動化の試みでは、AI が注目している要素を explainability model を利用することで明らかにするなど、深層学習が大規模データの自動分類に有効であることが示された。また AI が注視する領域が判明したので、今後は重要な領域別のモデル構築を進める。

転写領域解析ソフトウェア SHOE については、機能強化の結果、実際の遺伝子発現解析でも利用しやすくなった。SHOE の Garuda 対応も終え、他の Garuda Gadget との連携もシームレスに実行できるようになった。

「統合ツール“Percellome Integrator”の開発」【相崎】については、新型化学物質有害性評価システムの解析コア主要ユニットとしての、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。現在のワークフローに適応した、探索的解析に最も適した設計となった。多方面で実績のある Jupyter Notebook/Lab ベースとすることで、解析履歴の保存が難しかった *in silico* の解析操作について、より完全性の高い記録が可能で、尚且つユーザービリティの高いシステムの実現が期待される。

「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 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. 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.

## 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, Makiko 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生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, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible ter-atogenic effects mediated by seminal plasma ex-posed to thalidomide in rabbits. EURO TOX2023. (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) 伊藤眞里、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、伊藤眞里、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) 伊藤眞里、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

## 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