



Percellome トキシコゲノミクスの実用に向けての進捗

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

菅野 純

トキシコゲノミクスを必要とする理由 (研究目的と期待される成果)

1. 毒性学の近代化:安全係数からの脱却
2. 多数ある標的の一括取り扱い

多種類ある毒性試験法

(2年かかるもの、億単位の経費のかかるもの)

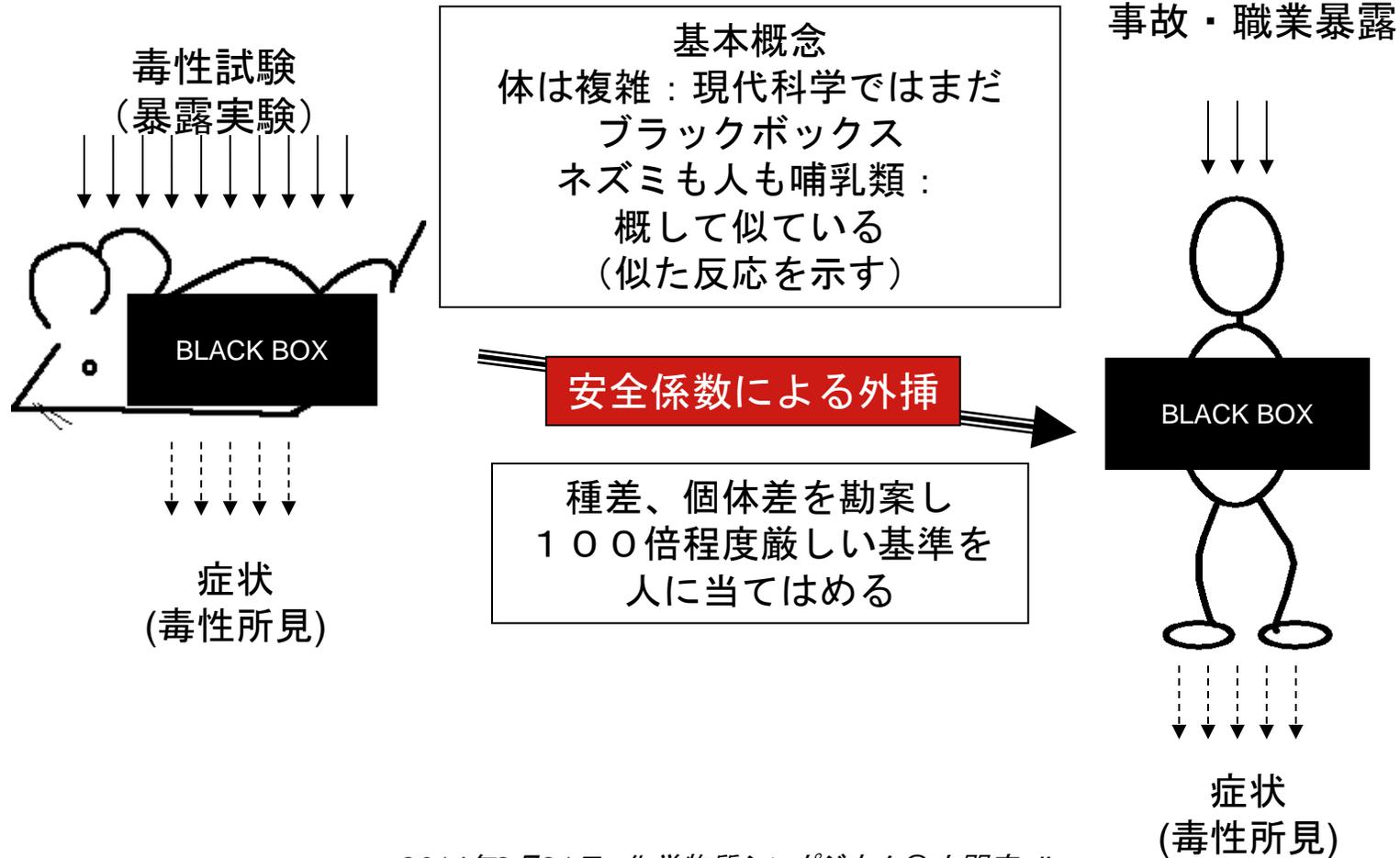
3. より正確に、より早く、より安く (3Rにも貢献)

目 次

- Percellome Project 背景・概要
- 解析方法・ツール
- 解析例 エストラゴール・PCP
- 新型反復暴露実験
- 胎児発生をモデルとしたネットワーク解析
- Percellomeデータ解析用Software 開発
- システムトキシコロジー研究 Garuda Platform

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)(H24-化学-指定-006)等による

動物実験(毒性試験) 齧歯類(ラット・マウス)などを用いる =人の身代わりとして



種差・個体差 (胎児・小児・成人・老人の差を含む)
を如何に科学的に取り扱うか？
(近代化)

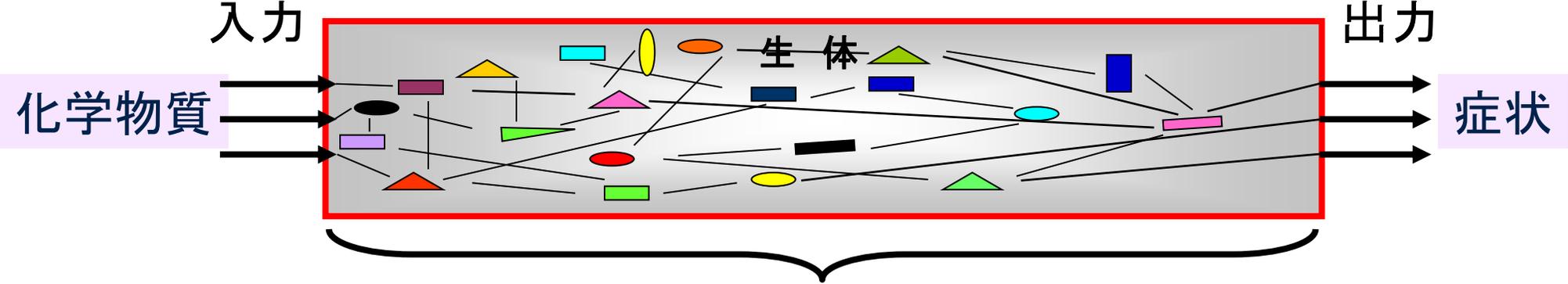
生体反応のメカニズムに
基づいた毒性評価



ブラックボックスの中身の解明



ブラックボックスの中身の解明



毒性学: 予期せぬ変化も見逃せない → 網羅性が必須

↓
全遺伝子の発現情報を用いた遺伝子発現カスケードの描出

↓
 生体反応のメカニズムによる毒性の理解

- DNA → mRNA → たんぱく質 → 形質発現
 - トキシコゲノミクス
 - トキシコプロテオミクス
 - » 毒性病理学 (形態学・機能学)
-

• DNA → mRNA → たんぱく質 → 形質発現

• トキシコゲノミクス

• トキシコプロテオミクス

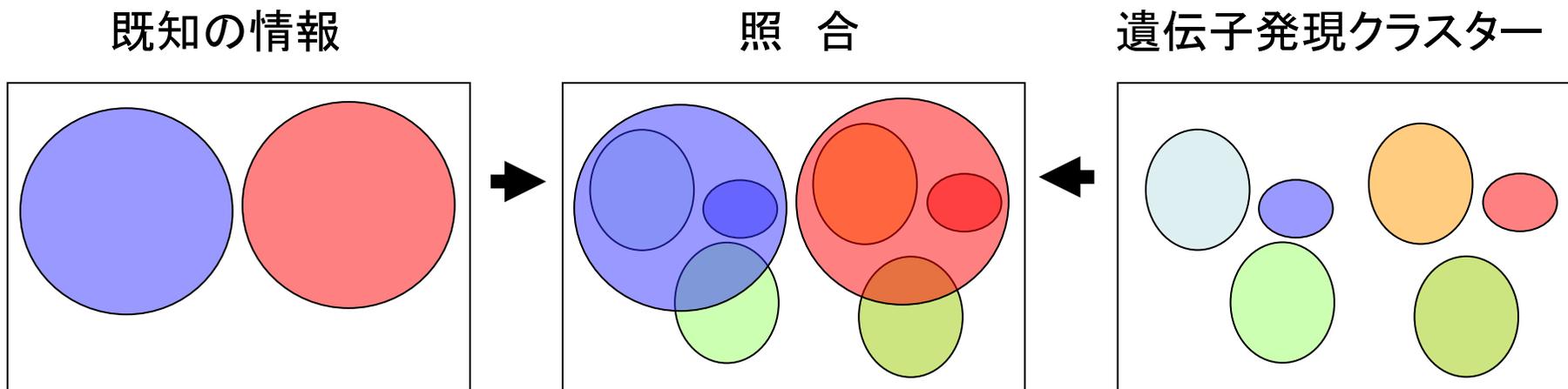
» 毒性病理学 (形態学・機能学; Phenomics)

網羅性、ハイスループット性、信頼性に優れた技術が利用可能
(cDNAマイクロアレイ技術)
【全ゲノムが解読されたことが背景にある】

形質非依存的アプローチ phenotype情報を用いない方法の必要性

例え話： ウイルス肝炎

- ひと昔前：A型、B型、non-A non-B型
 - データを 3通りに分類してきた
- 少し前：C型の出現、
 - データを、4通りに分類し直し
- 遺伝子発現情報は、いまは未認識の「分類」を含んでいる。
 - 既知情報で分類してしまう弊害： 新分類の発見を障害する



トキシコゲノミクスは現行毒性学にとって、光学顕微鏡
しかない時代に現れた電子顕微鏡のようなもの。

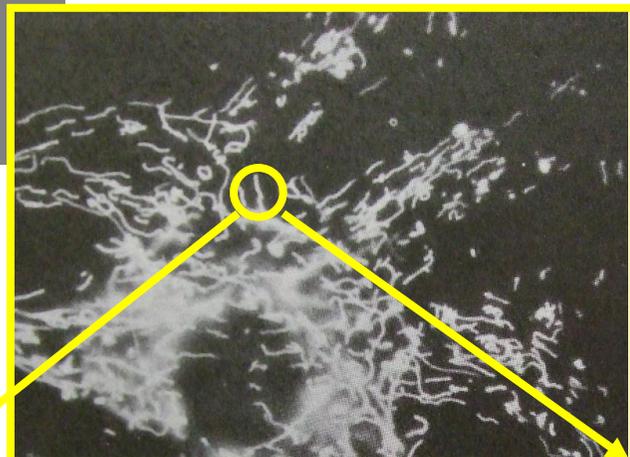
その実用化には、皆が納得する「教科書」が必要。

電子顕微鏡の教科書や図譜が出来るまでに、10~20年。
研究者が多数の電子顕微鏡写真をアーカイブ化した。

トキシコゲノミクスは、電子顕微鏡のような立場。
多数のデータを基に、「教科書」を書く必要がある。

データを蓄積するには、標準化が必須。
→Percellome法を開発した。

↓
数万種類のmRNAの各々を、細胞一個当たりのコピー
数として測定。



Methodology article

Open Access**"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays**Jun Kanno^{*†1}, Ken-ichi Aisaki^{†1}, Katsuhide Igarashi¹, Noriyuki Nakatsu¹,
Atsushi Ono¹, Yukio Kodama¹ and Taku Nagao²Address: ¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and ²President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno* - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - n-nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - Atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

* Corresponding author †Equal contributors

Open Access**on line journal: *BMC Genomics. 2006 Mar 29;7(1):64******PMID: 16571132***

Fetus (Developmental) toxicogenomics (Percellome)

Embryoid Body



1d 1.5d 2d 2.5d 3d

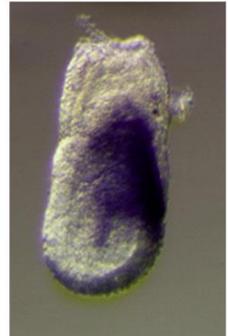


3.5d 4d 4.5d 5d 5.5d

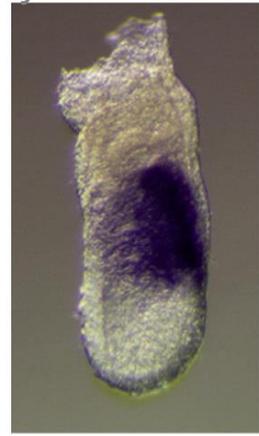


6d 6.5d 7d

Mouse Embryo



6.5 dpc



7.5 dpc



8.0 dpc



8.5 dpc

Four Yamanaka iPS genes

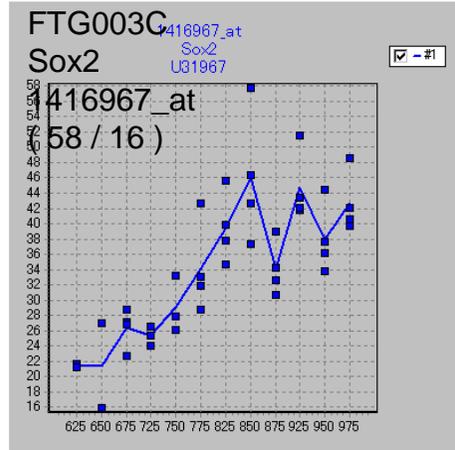
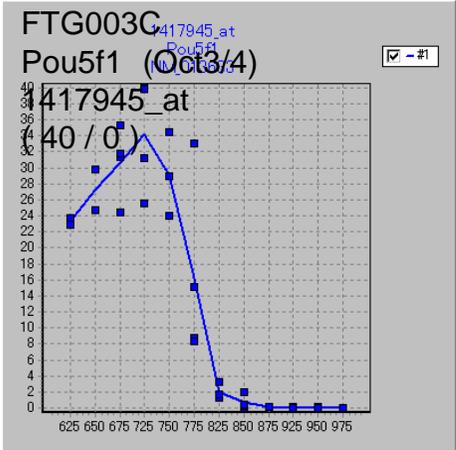
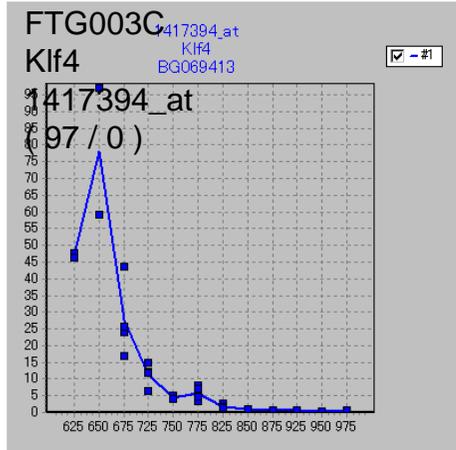
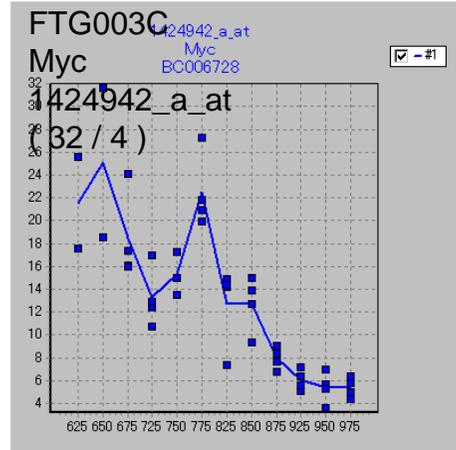
Whole Embryo

Myc

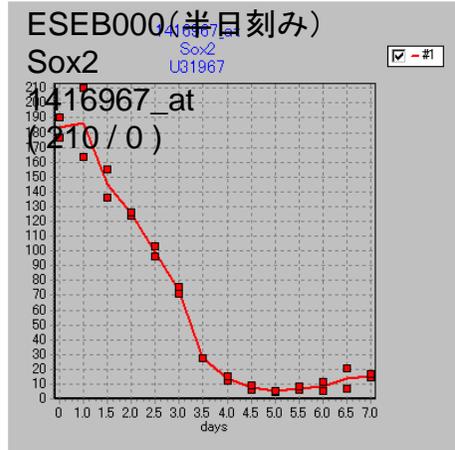
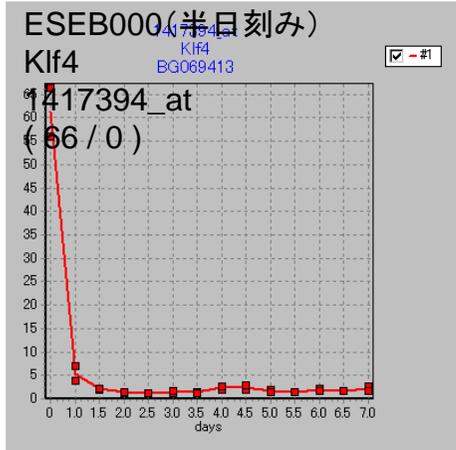
Klf4

Oct3/4

Sox2



Embryoid Body

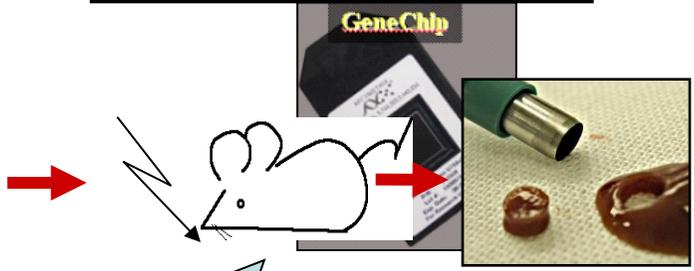


定型的プロトコール

1点3匹のデータ
平均±1sd平面で表示

代表的化合物を選択

化学物質の投与実験
(マウス、経口、吸入、他)

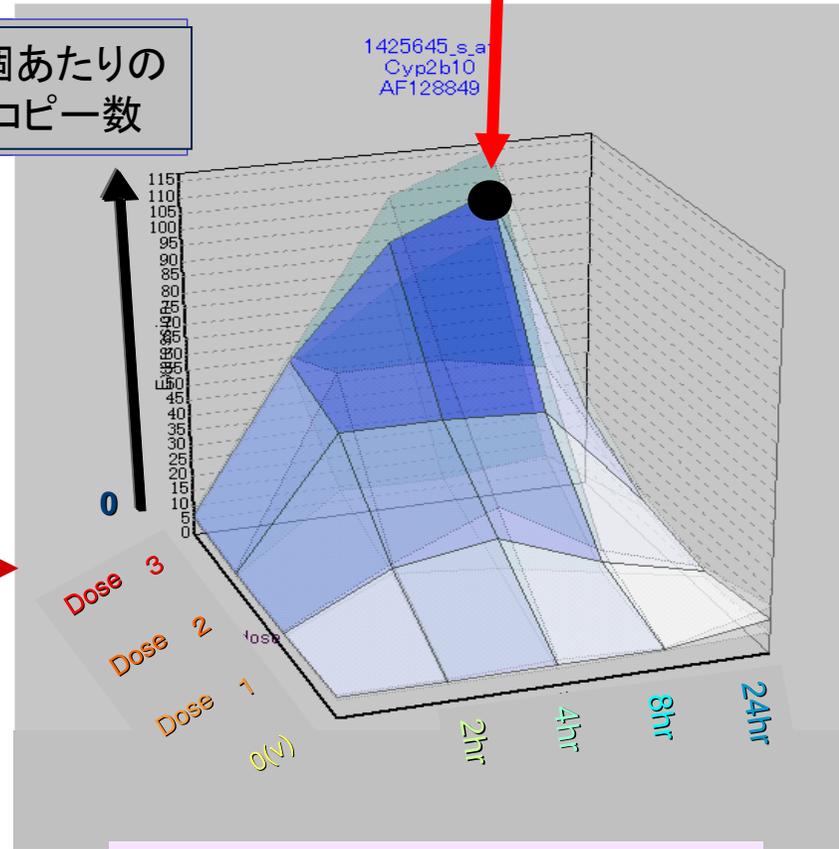


1化合物につき
4時点 (2hr, 4hr, 8hr, 24hr)
4用量 (0, 1, 2, 3)
計16群 各群3匹
合計48匹
より、肝、腎、肺、脳などを採取

網羅的に遺伝子発現データを取得

Affymetrix GeneChip
MOE430
約45,000のmRNA情報が一期に得られる

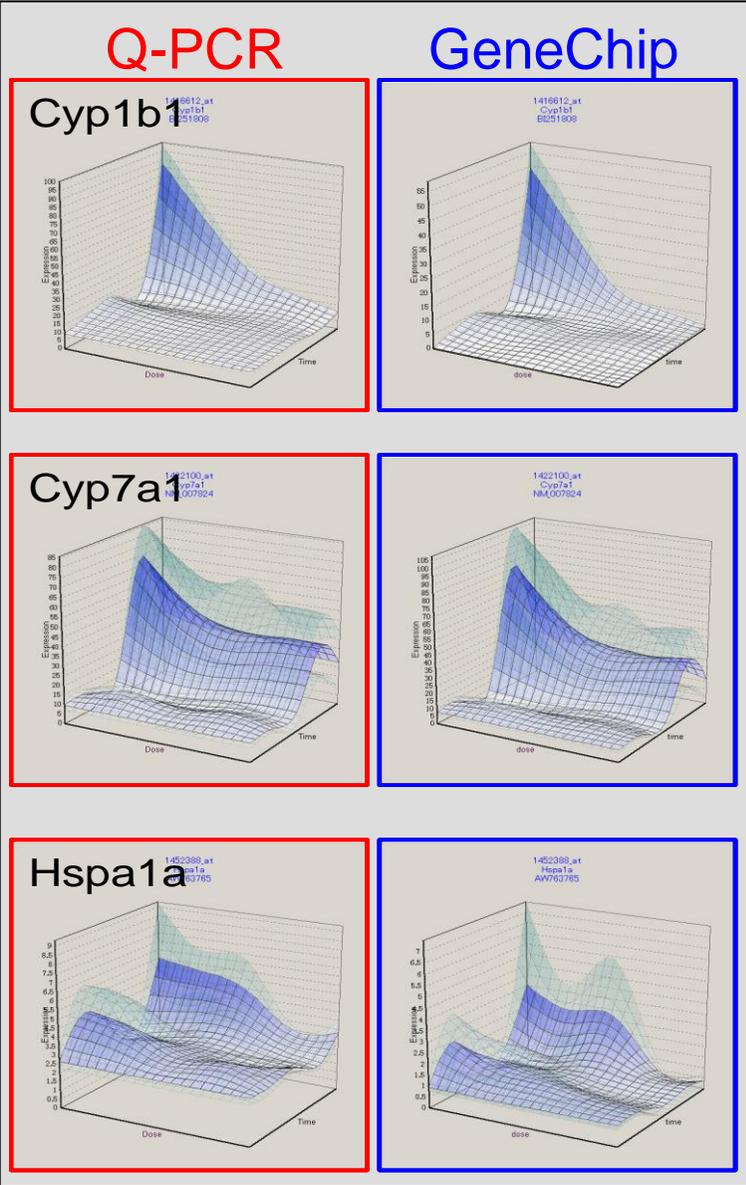
細胞1個あたりの
mRNAコピー数



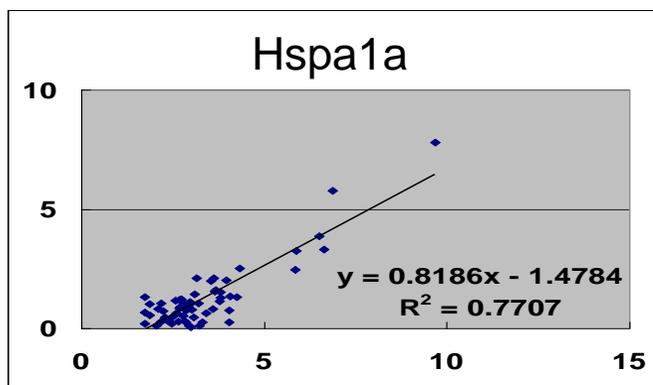
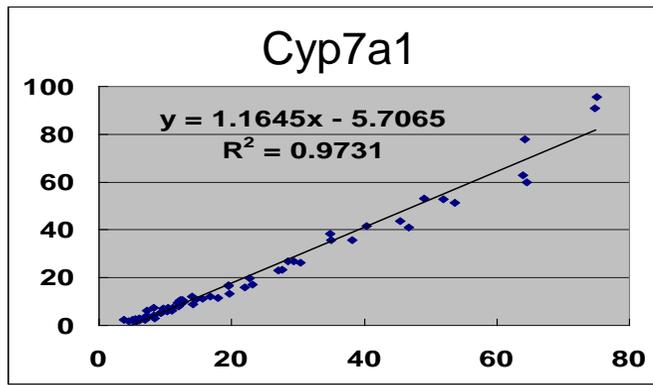
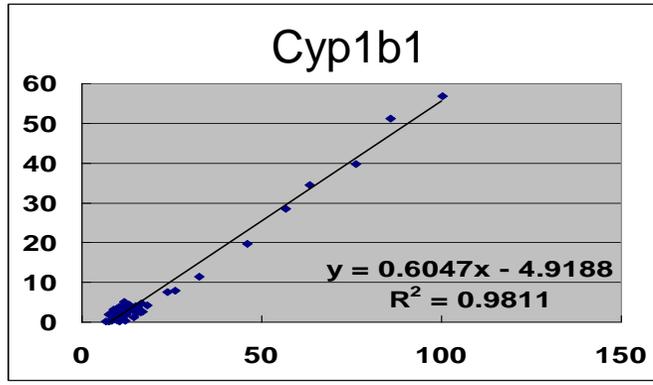
このような曲面データが
一期に約45,000枚
得られる
(約3万遺伝子の発現情報に相当)

Percellome Q-PCR versus GeneChip

TCDD /// 5x4 n=3, 60 sample /// GSC(5)+19 primer pair set1

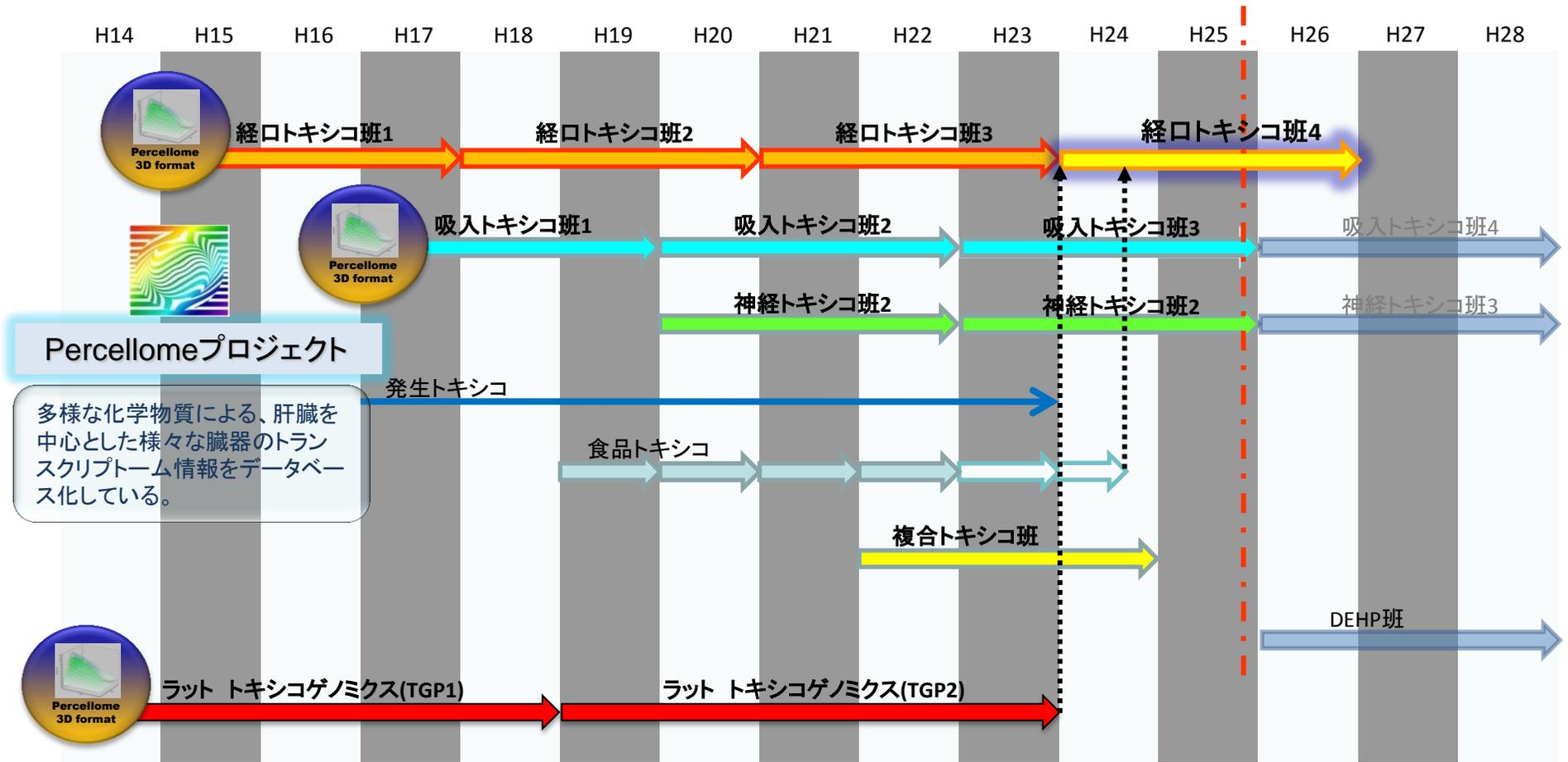


↑ Copy number by GeneChip



→ Copy number by Q-PCR

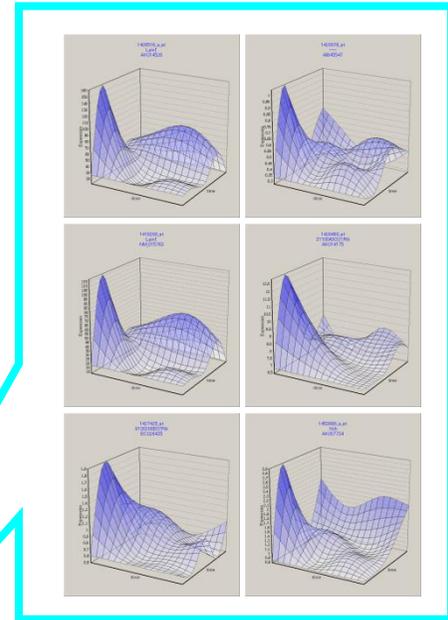
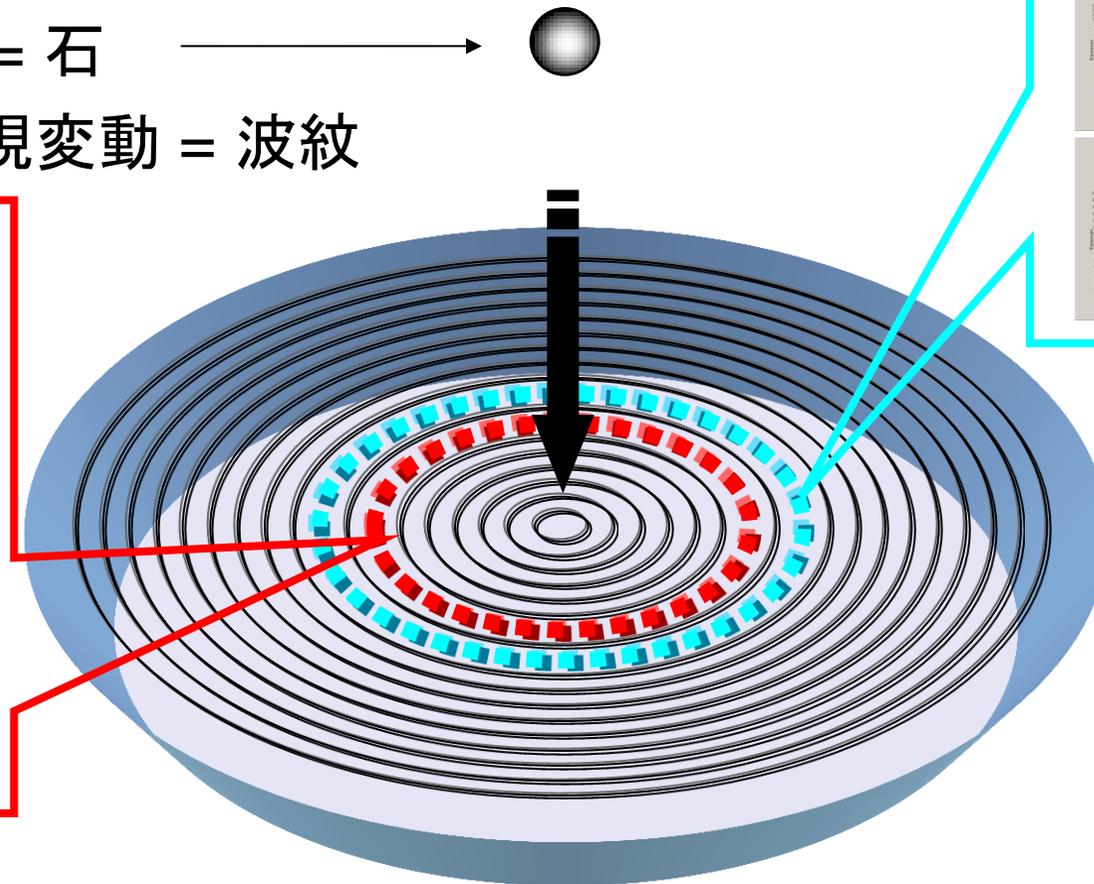
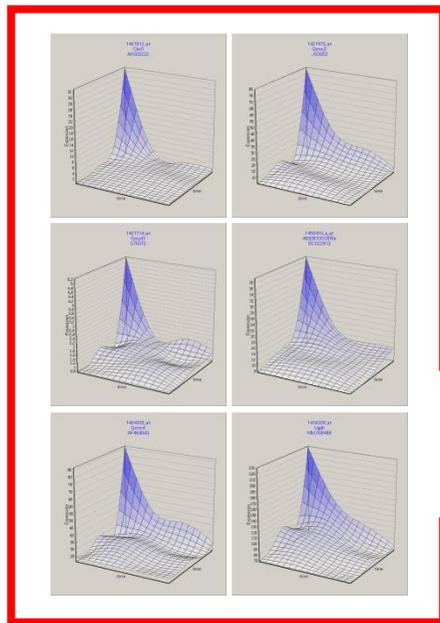
毒性部が展開するトキシコゲノミクス研究



これらすべての研究が絶対値化したデータを利用＝利点：相互の直接比較が可能である

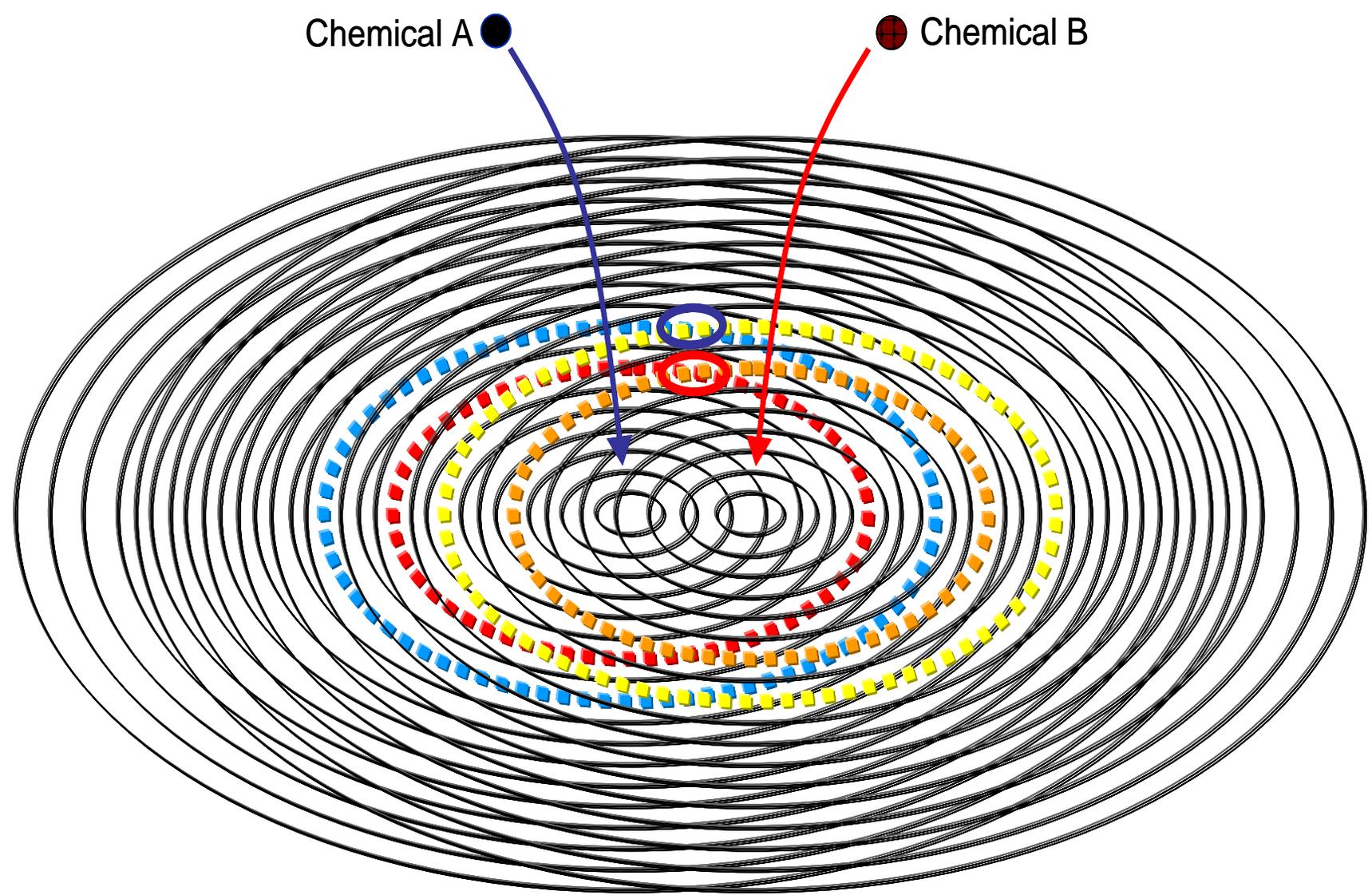
- 単回暴露実験
- Gene Network = 水面

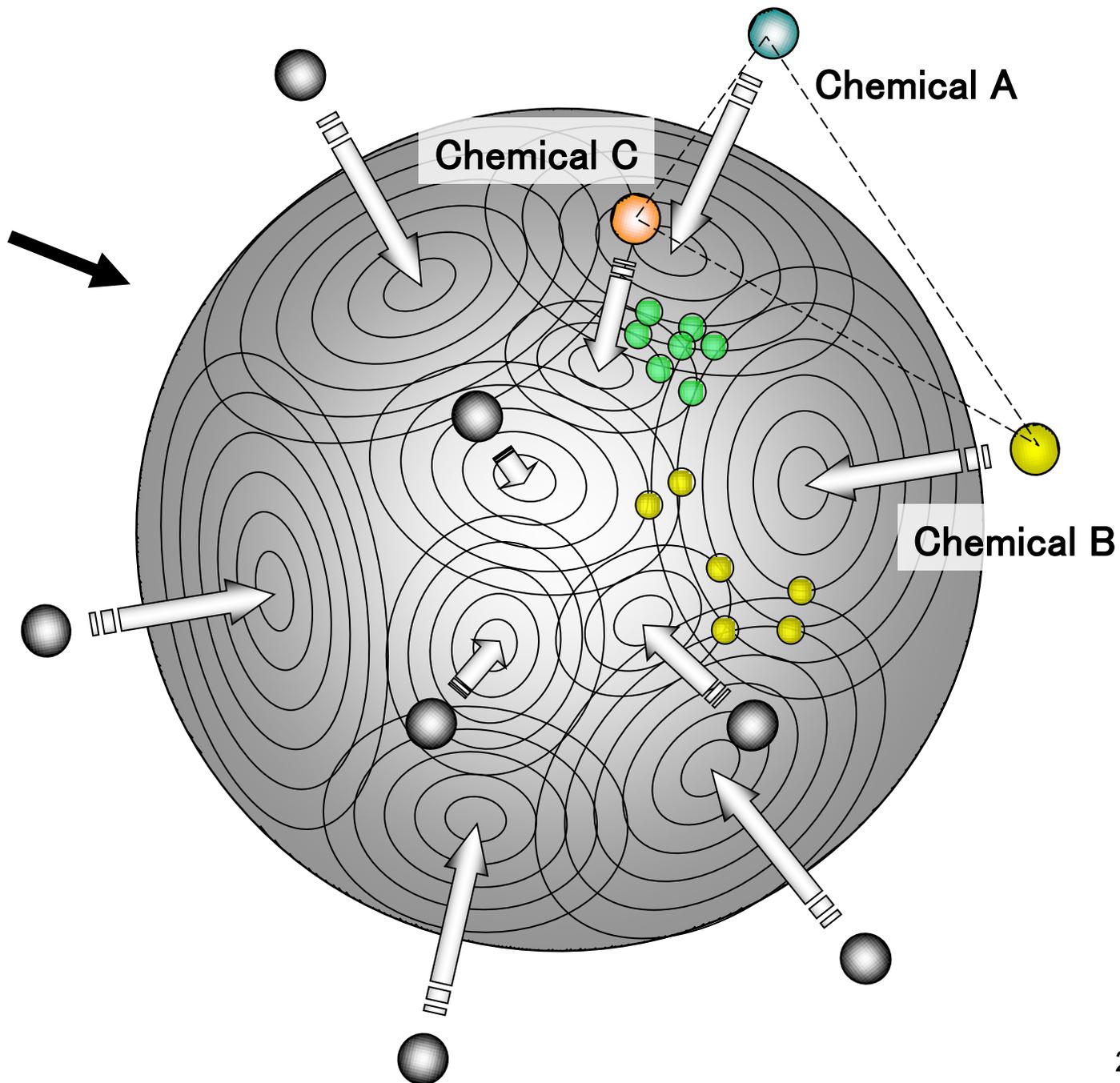
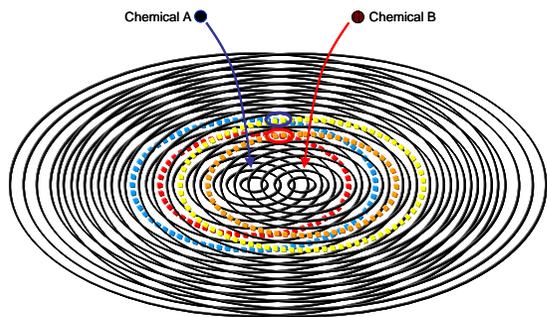
- 化学物質 = 石 \longrightarrow 
- 遺伝子発現変動 = 波紋



Chemical \rightarrow Protein etc. \rightarrow **Gene** \rightarrow Protein \rightarrow **Gene** \rightarrow Protein \rightarrow

Acephate	DMSO	Paclitaxel (Taxol)
Acetaldehyde	Domoic acid	Paraquat dichloride
Acetaminophen	Estragole	Pentachlorophenol
Agaritin	Ethanol	Permethrin
Alpha lipoic acid	4-Ethylnitrobenzene	Phenobarbital sodium
3-Amino-1H-1,2,4-triazole	Ethynyl estradiol	Phenytoin
4-amino-2,6-dichlorophenol	FK506	Phytol
2-Aminomethylpyridine	Formalin	5-Pregnen-3beta-ol-20-one-16alpha-carbonitrile
AraC	Forskolin	Pyriproxyfen
Aspirin	Fullerene	9-cis retinoic acid
Azacytidine	Genistein	All trans retinoic acid
Benzene	Genistin	Rifampicin
Bisphenol A	Glycyrrhizin2K	Sodium Arsenite
Bromobenzene	Hydroxycitric Acid	Sodium Dehydroacetate
Caffeine	Hydroxycitric Acid	Tamoxifen
Carbaryl	Ibuprofen (dl-p-isobutylhydratropic acid)	TCDD(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin)
Carbon tetrachloride	Indigo	TCDF(2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran)
2-Chloro-4,6-dimethylaniline	Isoniazid	Tebufenozide
Cisplatin	Kanamycin monosulfate	Testosterone propionate
Citric acid-calcium salt	Levothyroxine	Thalidomide
Clofibrate	Maltol	Toluene
Coenzyme Q10	MEHP	Transplatin
Curcumin	Menthyl Valerate	1,2,3-Triazole
Daizein	Methanol	1,2,4-Triazole
Deet	Methoprene	Tributyltin chloride
DEHP	Methoprene acid	Troglitazone
Dexamethasone	Methyl dihydro jasmonate	Valproic acid sodium salt
Dibutyltin dichloride	3-methylcholanthrene	Verbenone
1,2-Dichloro-3-nitrobenzene	Monocrotaline	2-Vinylpyridine
Diethylnitrosamine (C57BL/6)	Nerolidol	Warfarin
Diethylstilbestrol	N-ethyl-N-nitrosourea	青色1号 Blue No.1
Digitoxin	N-Methylaniline	青色2号 Blue No.2
2,4-dinitrophenol	Omeprazole	赤色40号 Red No.40
		赤色226号 Red No.226



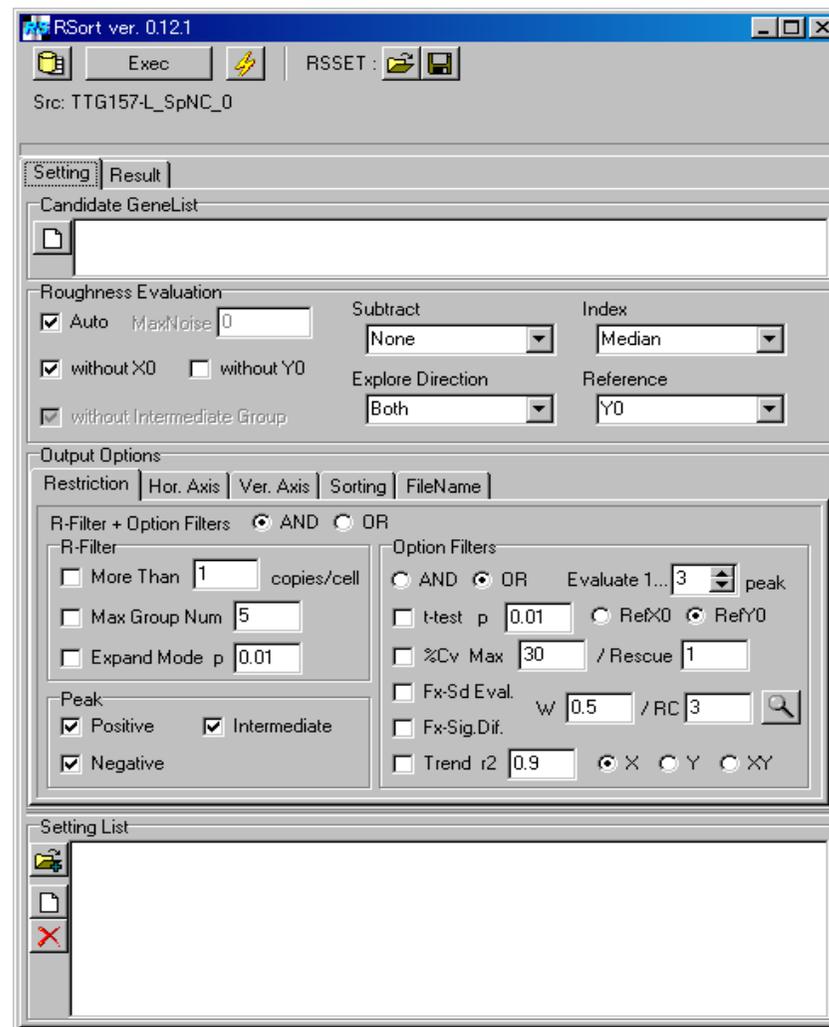


RSort Program by Ken-ichi Aisaki

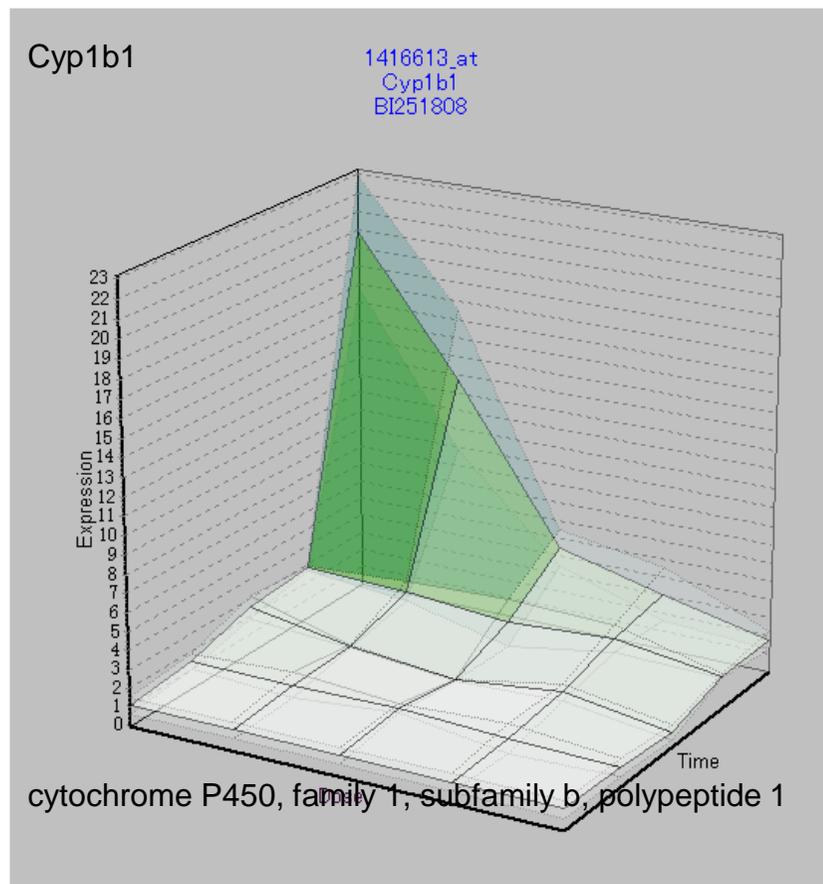


- 遺伝子発現を3次元曲面として表示した「Surface」グラフの凸凹の程度 (Roughness) とピークの位置などを評価して、候補遺伝子リストの並べ替えを行うアルゴリズム

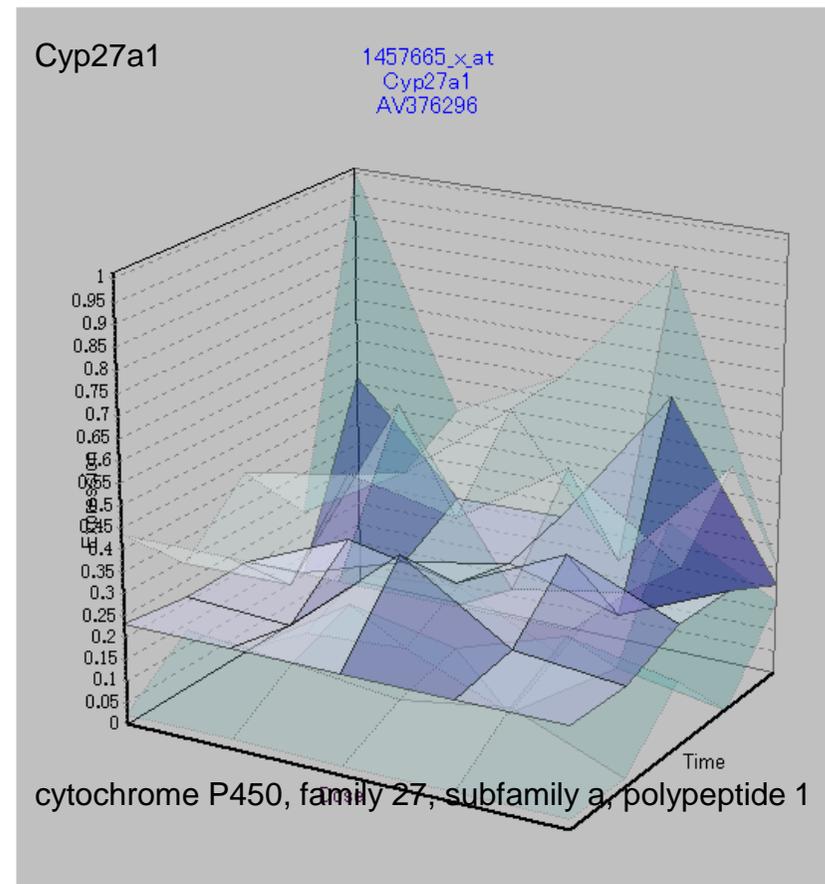
- Up、Downの両方を検出
- 計算処理が軽い



mRNAの変動として見た場合
生体反応として確からしい曲面



mRNAの変動として見た場合
ノイズと見られる曲面

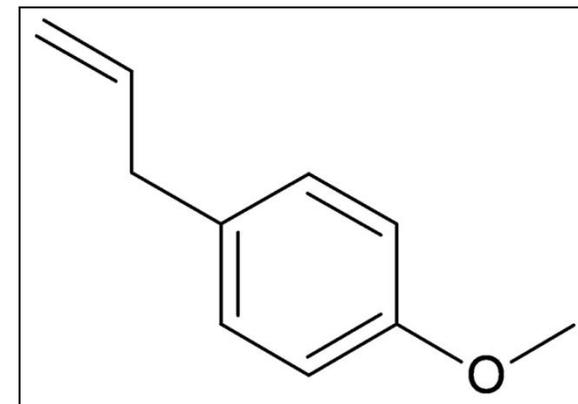


香料 エストラゴール

estragole

(1-allyl-4-methoxybenzene)

(CAS No.: 140-67-0)



タラゴン (tarragon) の主成分, バジル精油 (essential oils of basil), and others.

高用量でげっ歯類に肝発がん性を発揮する (JECFA)

Kanno *et al.*, Application of Percellome Toxicogenomics to Food Safety
In: Issues in Toxicology No.11. Hormone-Disruptive Chemical Contaminants in Food.
Eds. Ingemar Pongratz and Vikstroem Bergander
Royal Society of Chemistry, London, pp. 184-198 (2012)

PercellomeExplorer Program by K Aisaki

Percellome Explorer ver. 0.2.16 : PDBEx_RSort_Expand_H_Std-Med

Denominato Target * Candida

Universe List
Restriction <277/277> Jump estrago

PrjID	Name	Condition	CP	GL	Descriptio	Surface	Tissue	TimeCourse
225	TTG144-L	Tributyltin x Ph	1527	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Liver	0
226	TTG145-L	Tributyltin x Trib	754	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Liver	0
227	TTG146-CX	Forskolin	1311	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Brain Cortex	0
228	TTG146-G	Forskolin	431	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Lung	0
229	TTG146-H	Forskolin	537	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Heart	0
230	TTG146-K	Forskolin	520	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Kidney	0
231	TTG146-L	Forskolin	974	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Liver	0
232	TTG147-G	Estragole	162	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	Liver	0
233	TTG147-L	Estragole	720	(MEMO)	(MEMO)	C:¥MEDB¥Surfa	Liver	0

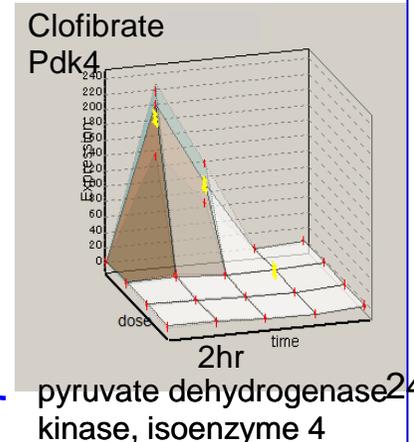
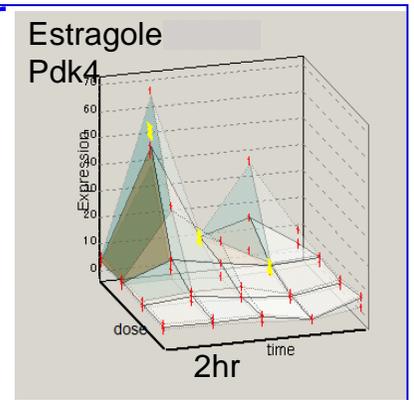
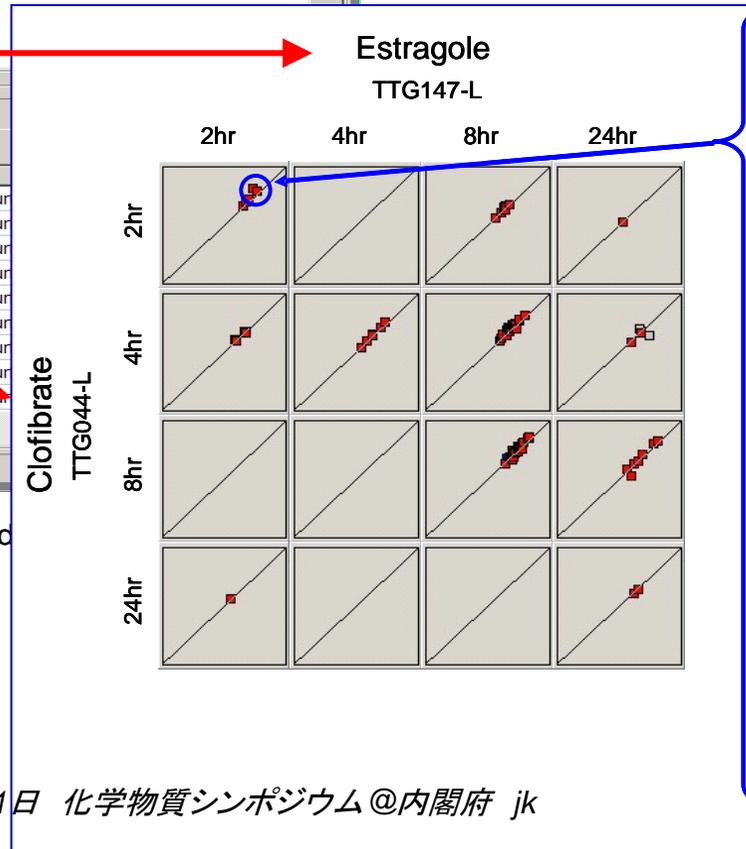
Matching List
vs TTG147-L // Estragole

Strict Matching Draw

Name	Condition	Num	Cor	GL	Surface1	Surface2
TTG147-L	Estragole	720	13.889	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
TTG118-L	Clofibrate x Clofibrate *	69	0.732	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
TTG044-L	Clofibrate	81	0.688	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
TTG129-L	CCl4 x Clofibrate *	63	0.68	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
TTG098-L	DEHP	126	0.642	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
TTG104-L	MEHP	114	0.642	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
ITG021-G	Tetradecane (2hr x 1day) *	7	0.617	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
TTG134-L	Nerolidol	18	0.61	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur
TTG141-L	Tributyltin x Clofibrate *	88	0.602	(MEMO)	C:¥MFDB¥Surfa	C:¥MFDB¥Sur

Stand by.....

上段、下段の任意のペアについて
発現ピーク毎のPSを表示可能で、
個々のPS同士のSurfaceデータを
参照することが出来る。



*:Performed

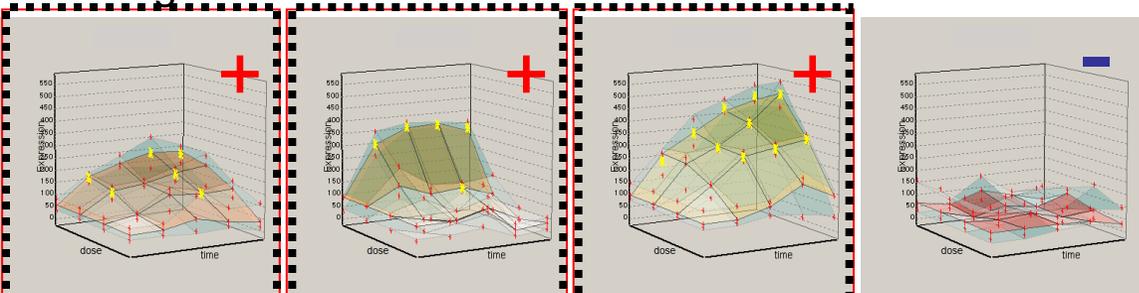
Cyp4a14
 cytochrome P450,
 family 4,
 subfamily a,
 polypeptide 14

Estragole

Clofibrate

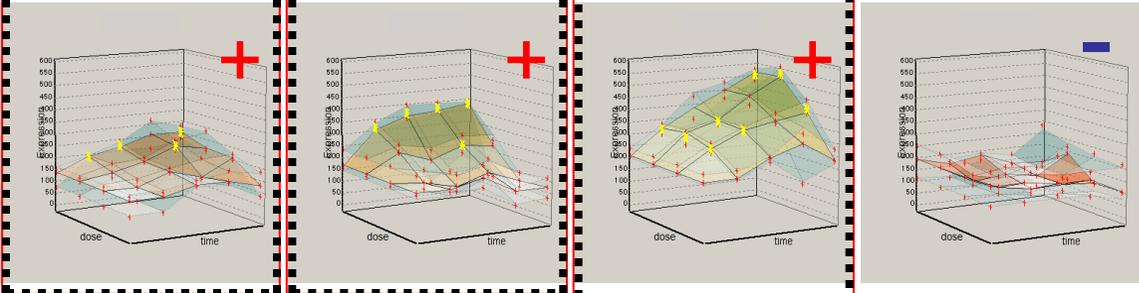
DEHP

Phenobarbital

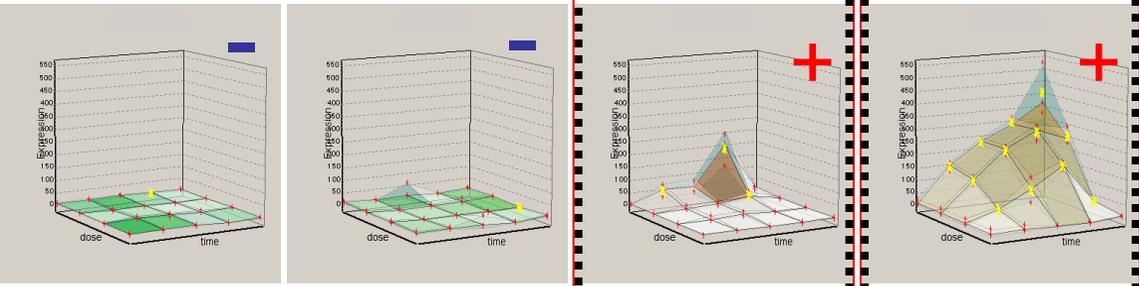


} PPAR α

Cyp4a10
 cytochrome P450,
 family 4,
 subfamily a,
 polypeptide 10 ///
 polypeptide 31 ///
 LOC100044218

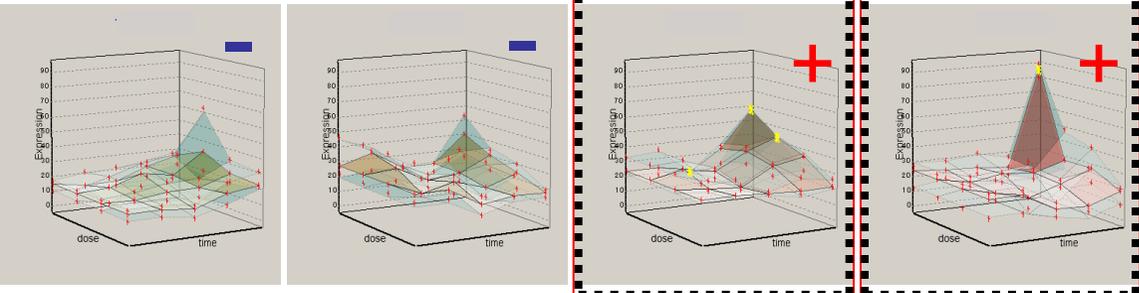


Cyp2b10
 cytochrome P450,
 family 2,
 subfamily b,
 polypeptide 10



} CAR

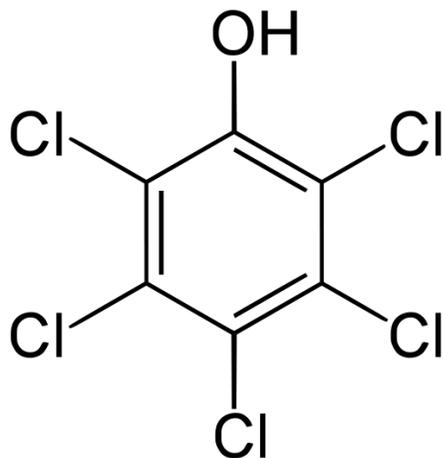
Cyp51
 cytochrome P450,
 family 51



Pentachlorophenol

五塩化フェノール

(PCP)



殺菌剤
除草剤
防腐
シロアリ駆除
水虫薬

失効

急性毒性:

肝、腎、血液、肺、神経、免疫、消化管障害
発熱、大量発汗、非協調運動、筋攣縮、昏睡

慢性毒性:

肝障害、腎障害、神経障害
肝発がん性(動物発癌性試験)、

毒性を分析すると、

一般毒性／器質的 (肝細胞障害など)
フェノール毒(タンパク凝固など)ビラン
その他、全身症状

一般毒性／非器質的
(発熱、大量発汗など)

J Tox Sci (2013) 38:643-654.

Figure 2

Percellome Explorer ver. 0.4.8 : PDBEx_RSort_Expand_H_G3_Std-Av

MOE430v2

Data RR Table

Universe List <168/286>

PrjID	Name	Condition	CP	GL	Description	Surface	Tissue	TimeCourse
55	TTG010-L	Acetaminophen	2337	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
56	TTG014-L	"2,4-dinitrophenol	742	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
57	TTG015-L	"4-amino-2,6-d	444	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
58	TTG016-L	Pentachlorophenol	1992	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
59	TTG016-L(C)	Pentachlorophenol	5720	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
60	TTG019-L	2-Vinylpyridine	1282	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
61	TTG020-L	"TCDD(2,3,7,8	2182	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
64	TTG023-L	Transplatin	677	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0
65	TTG026-L	"TCDF(2,3,7,8	1125	(MEMC	(MEMC C:~MFDB~Surf	Liver		0

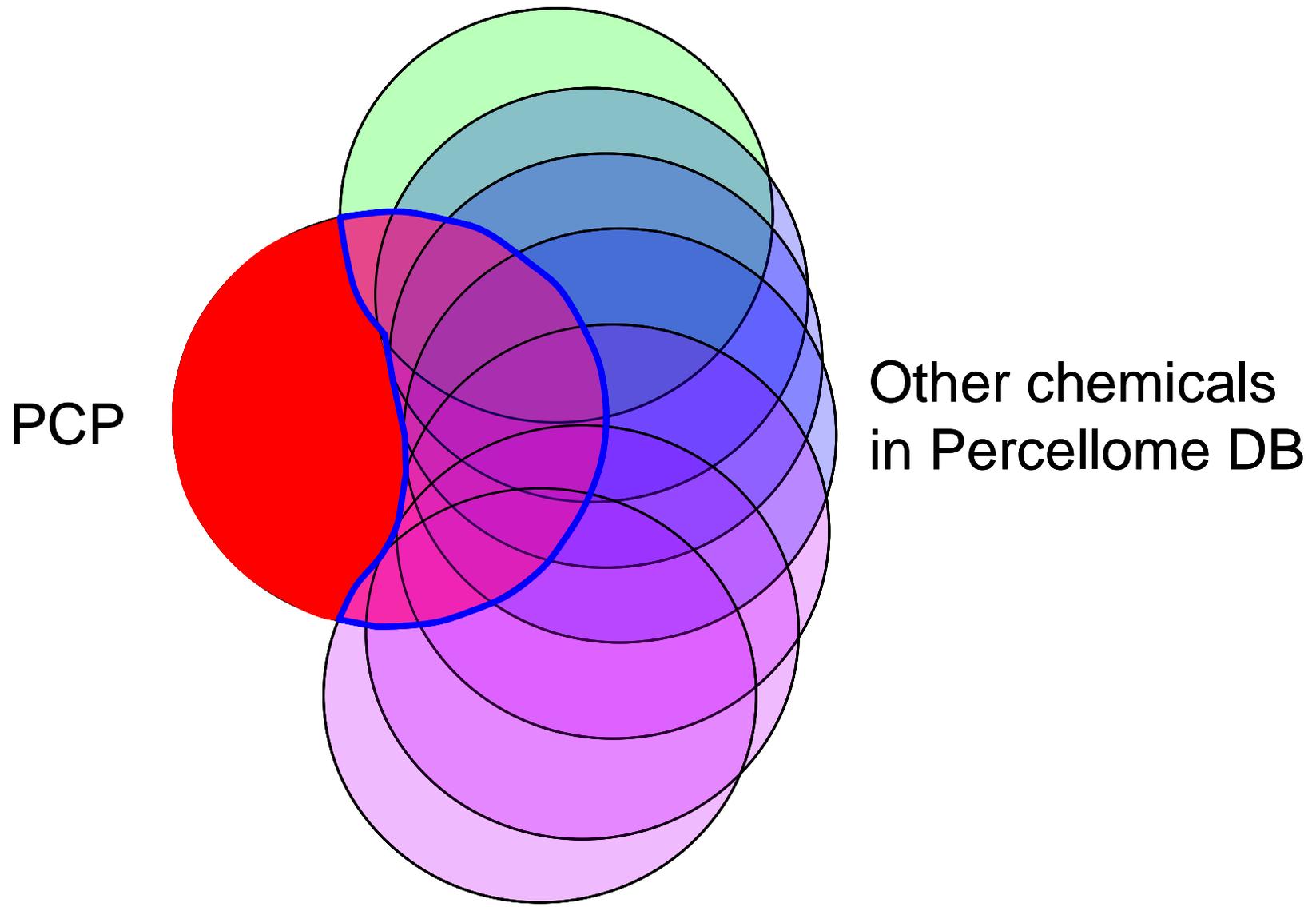
Matching List vs TTG016-L(C) // Pentachlorophenol

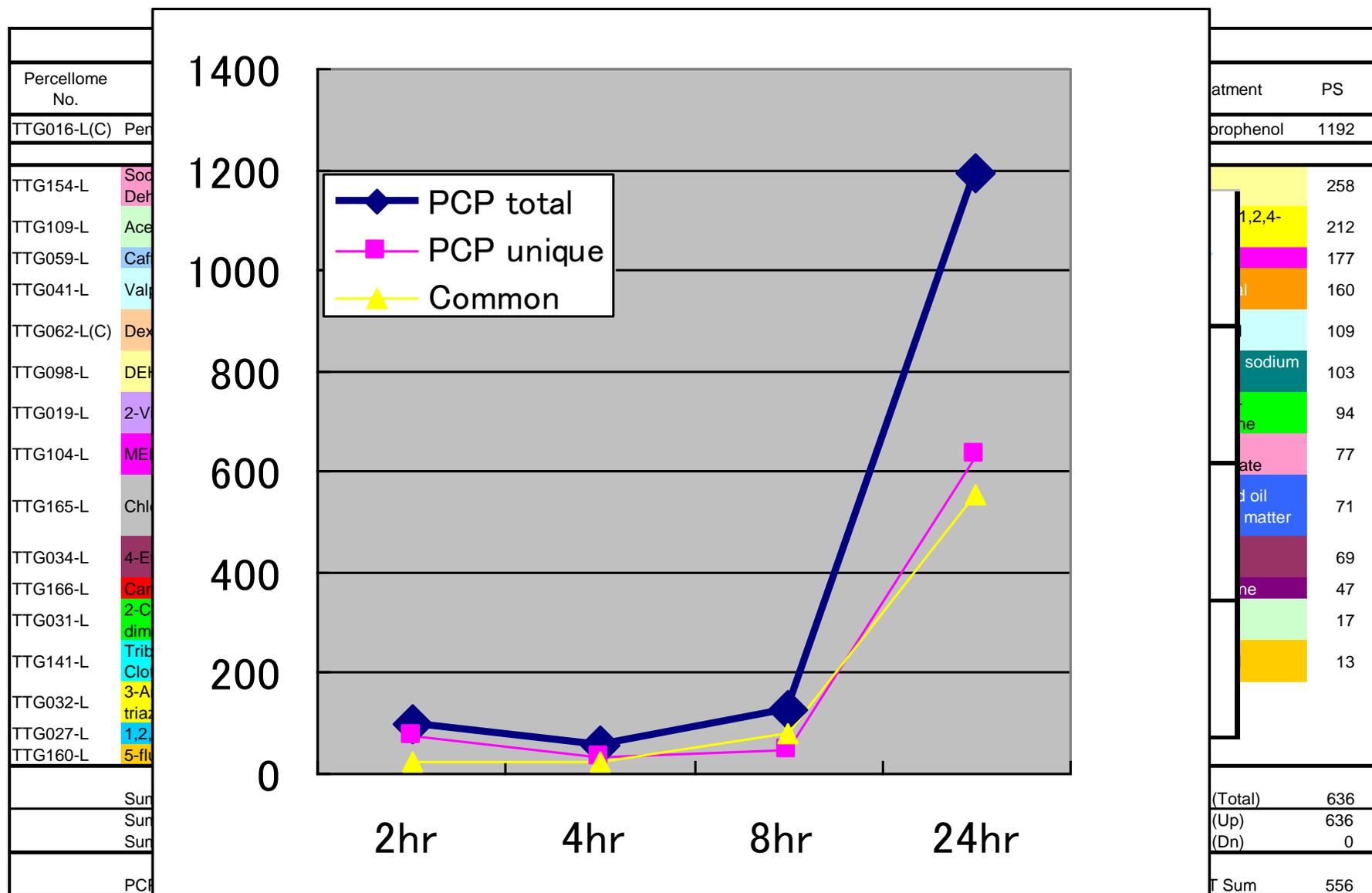
Strict Matching Draw

Name	Condition	Num	Cor	GL	Surface1	Surface2	Tissue
TTG016-L(C)	Pentachlorophenol	5720	100	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
TTG173-L	TCDD/AhRKO	1124	9.65	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
▶ TTG041-L	Valproic Acid	1103	19.283	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
TTG154-L	Sodium Dehydroacetate	1093	19.108	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
TTG098-L	DEHP	1055	18.444	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
TTG104-L	MEHP	975	17.045	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
TTG032-L	"3-Amino-1H-1,2,4-triazole	958	16.748	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
TTG037-L	Phenobarbital	871	15.227	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver
TTG141-L	Tributyltin x Clofibrate	857	14.983	(MEMC	C:~MFDB~Surf	C:~MFDB~Surf	Liver

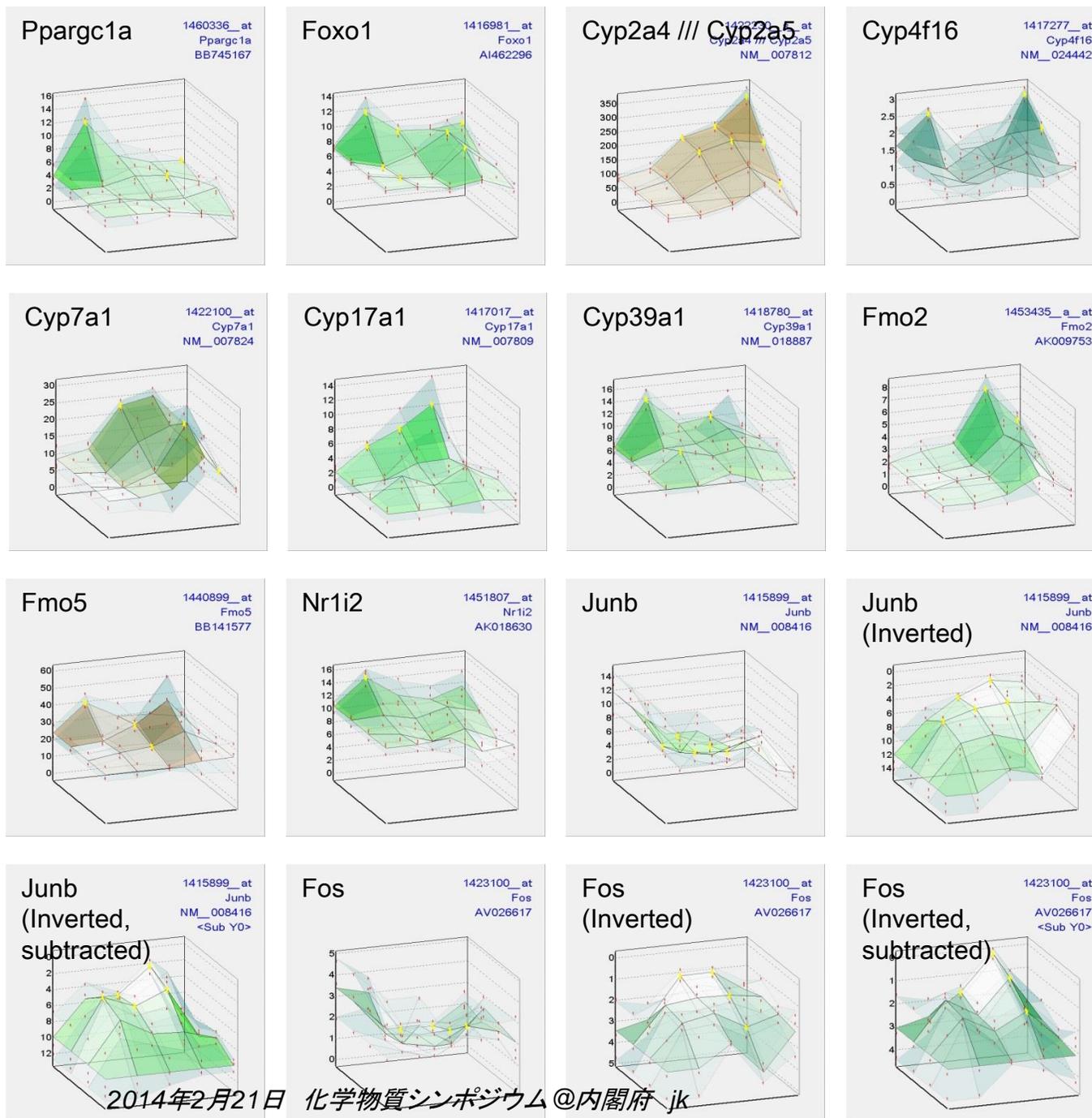
0 ps
Stand by.....

Kanno et al. J Tox Sci (2013) 38:643-654.

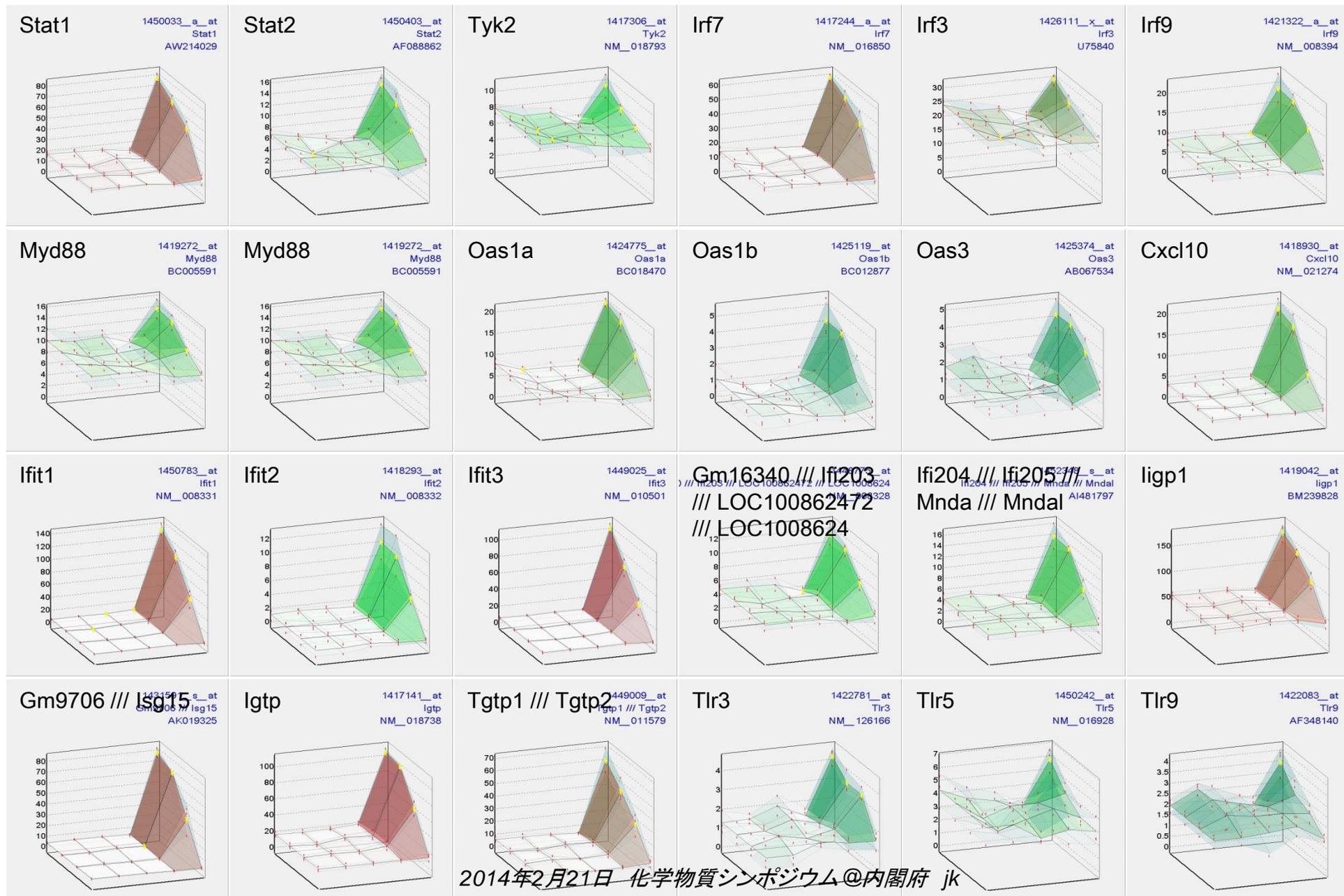


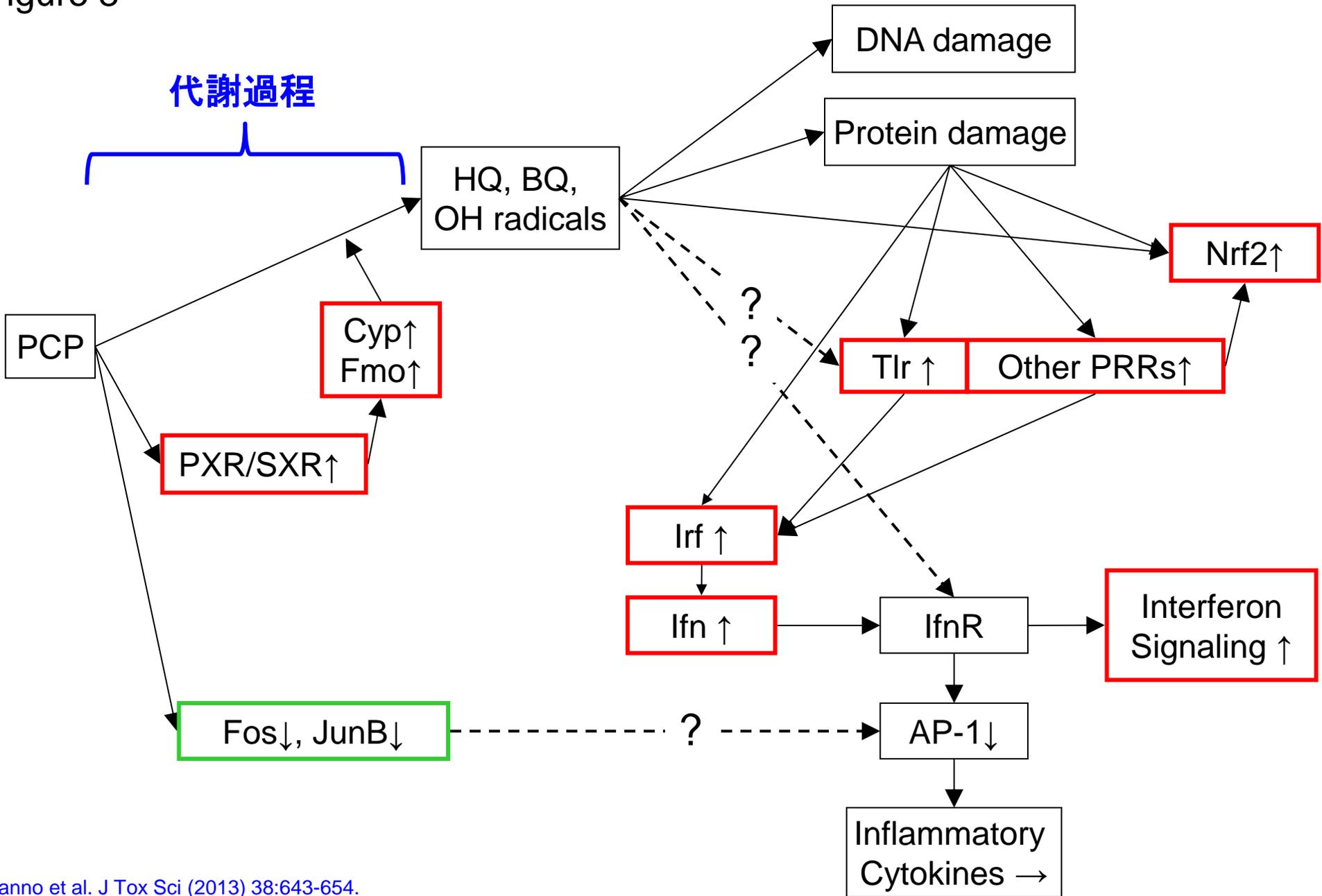


Genes Induced at 2, 4 or 8 hr



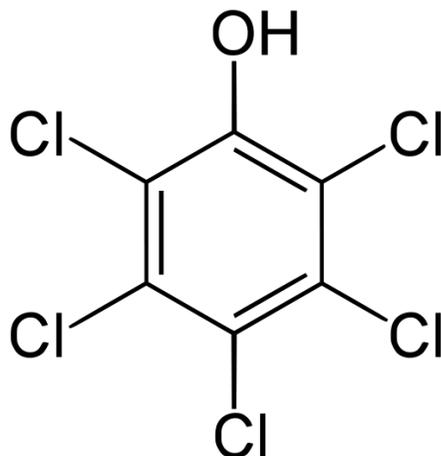
Genes induced at 24 hr (unique to PCP)





Pentachlorophenol
(PCP)

J Tox Sci (2013) 38:643-654.



急性毒性:

肝、腎、血液、肺、神経、免疫、消化管障害
発熱、大量発汗、非協調運動、筋攣縮、昏睡

慢性毒性:

肝障害、腎障害、神経障害
肝発がん性(動物発癌性試験)、

殺菌剤
除草剤
防腐
シロアリ駆除
水虫薬

失効

毒 **インフルエンザ様症状** (毒)

フェノール毒(タンパク凝固など)ピラン
その他、全身症状

一般毒性 / 非器質的
(発熱、大量発汗など)

反復暴露の新しい概念 New Concept of Repeated Dose

【新型反復暴露実験】

反復投与の意味の考察

ヒント: 遺伝子改変動物の反応を解析する

野生型マウス



単回投与

遺伝子改変マウス



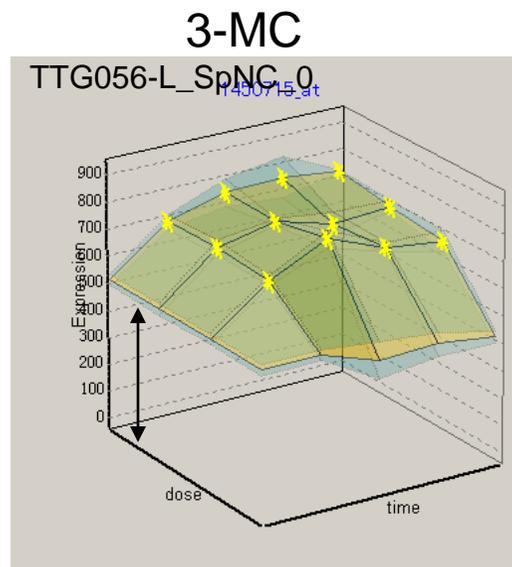
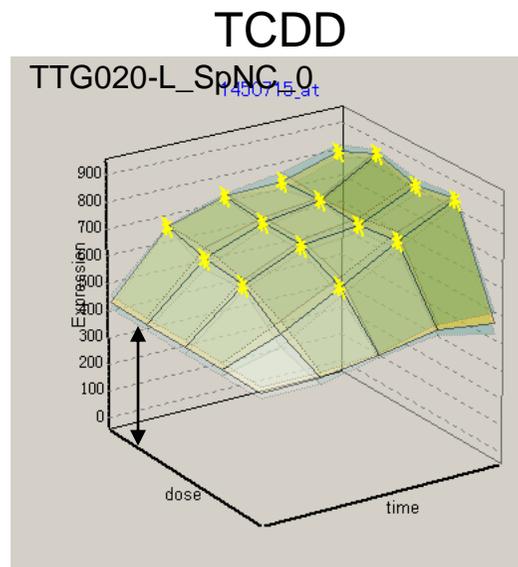
単回投与

Cyp1a2

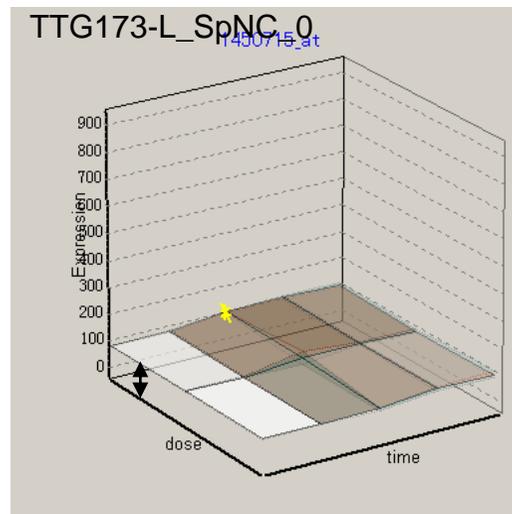
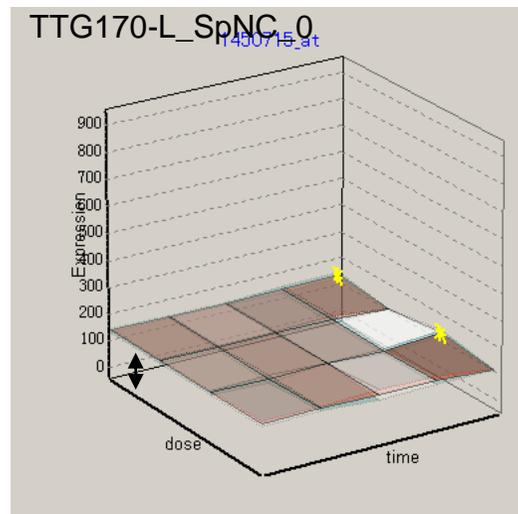
NM_009993

cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2

Wild type mouse



AhR KO mouse

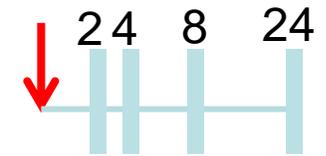


単回投与 vs 反復投与後の反応

(TTG119-G)

(TTG130-G)

単回投与後の反応 (“TTG1 type”) [0+1]

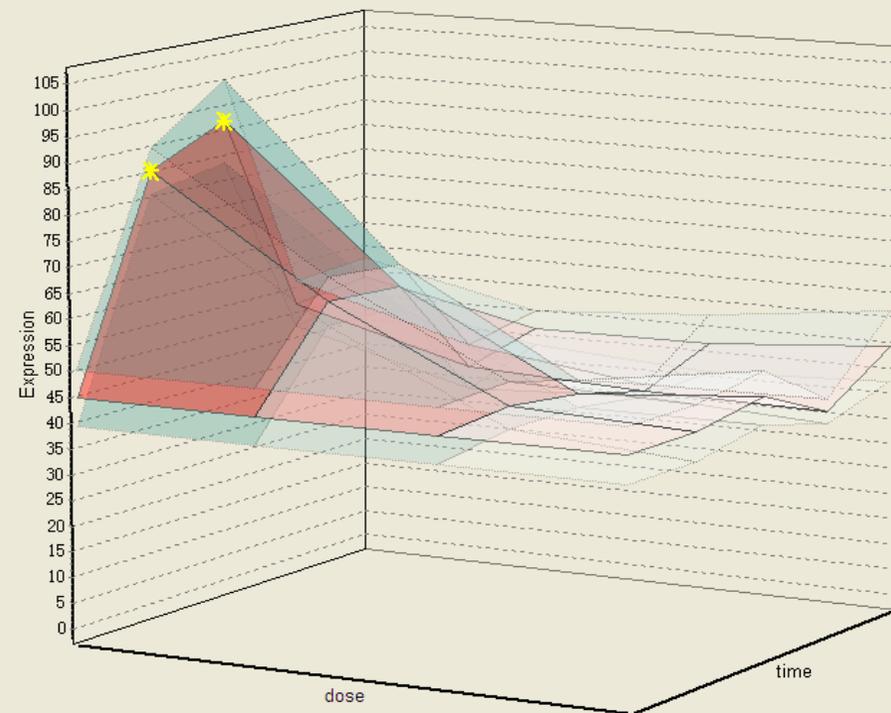
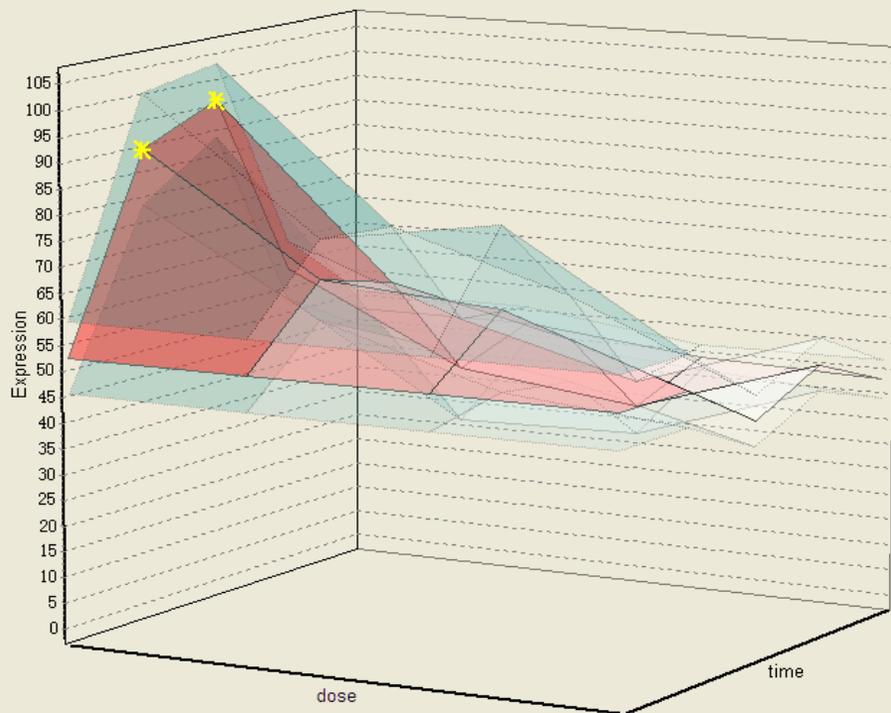


単回投与

反復投与後の反応 (“TTG2 type”) [14+1]



反復投与（全群単一用量）



Tgoln1 /// Tgoln2
trans-golgi network protein /// trans-golgi network protein 2

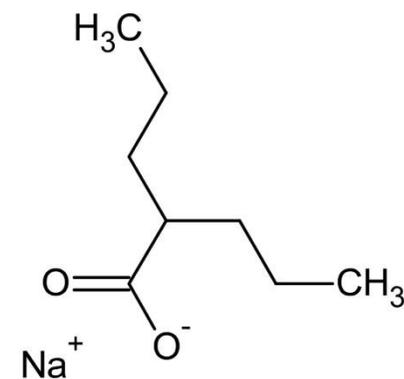
VPA single

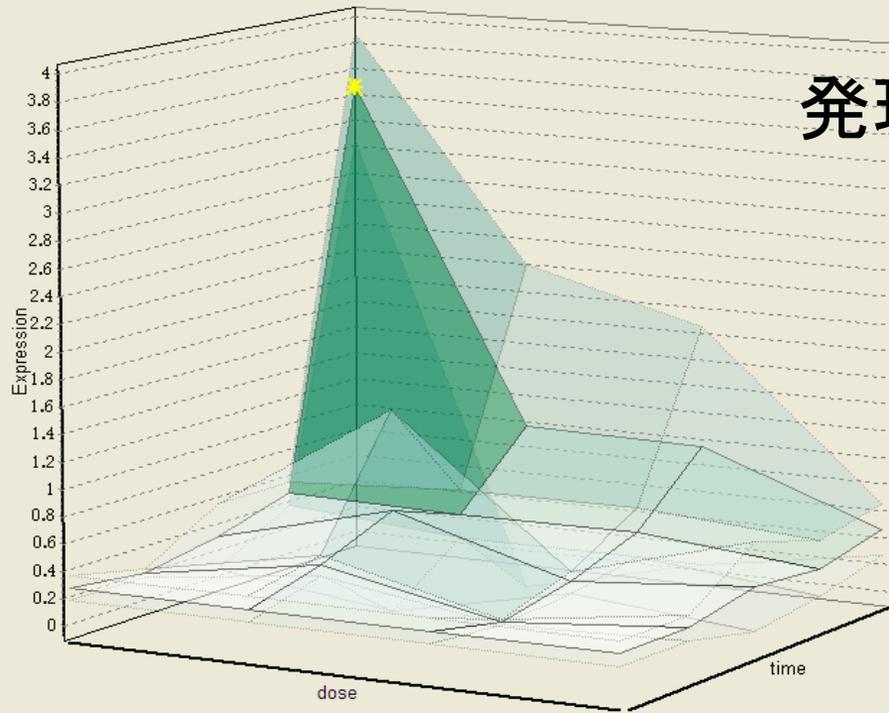
バルプロ酸ナトリウム
[Valproic acid sodium salt: VPA]

単回投与
[0, 50, 150, 500 mg/kg]

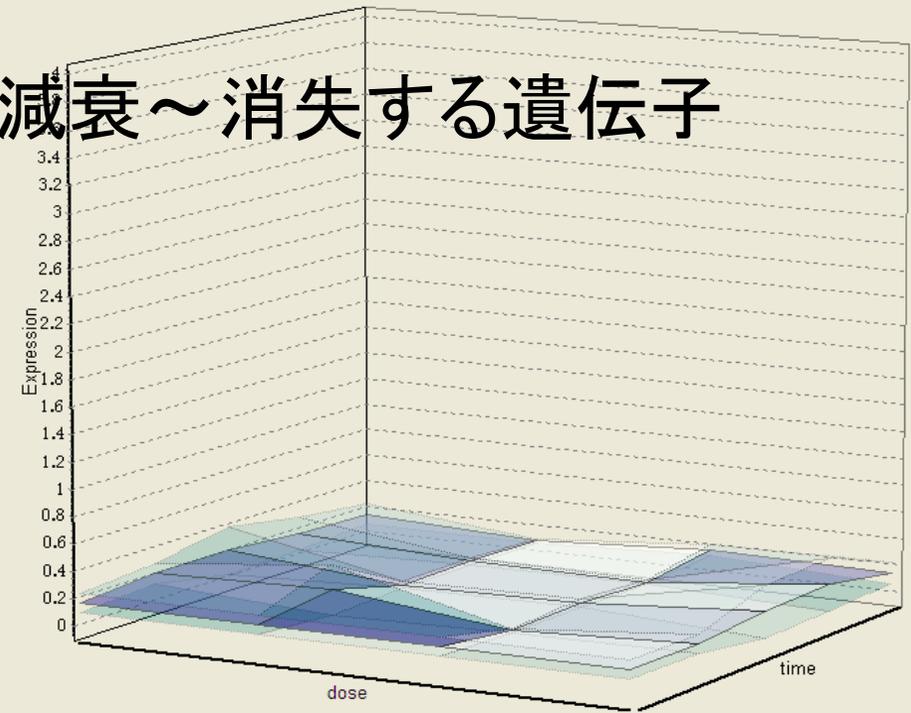
反復後 単回投与
100 mg/kg (for 14 days) + [0, 50, 150, 500 mg/kg]

VPA repeat





発現が減衰～消失する遺伝子



Ubqln1
ubiquilin-like

CCl₄ single

CCl₄ repeat

四塩化炭素

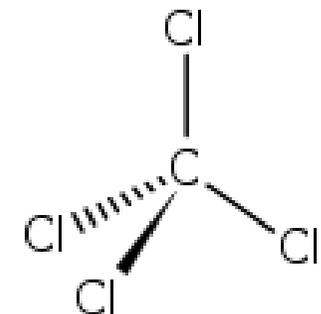
[Carbon tetrachloride: CCl₄]

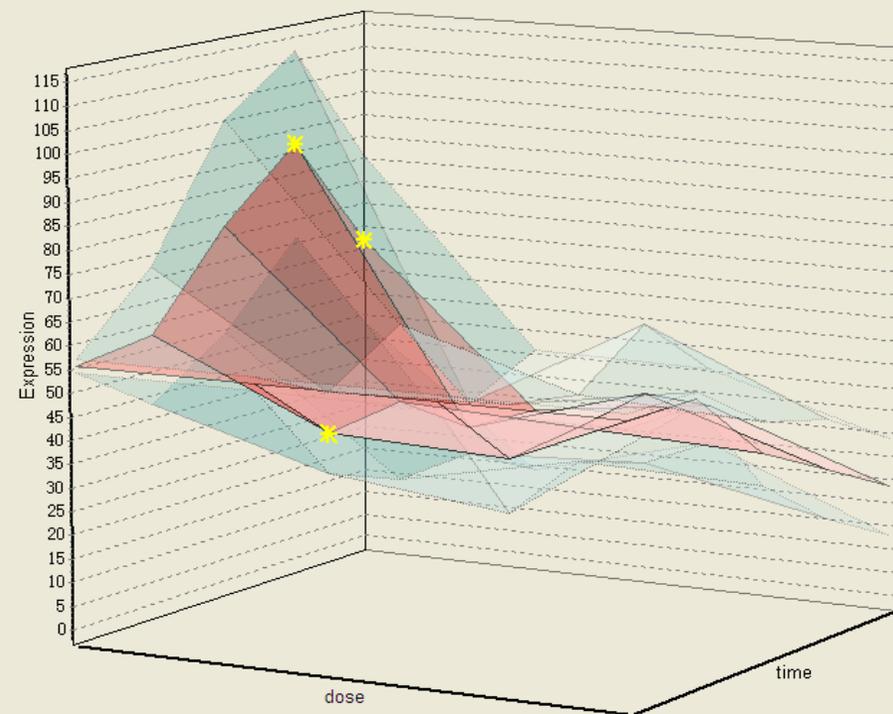
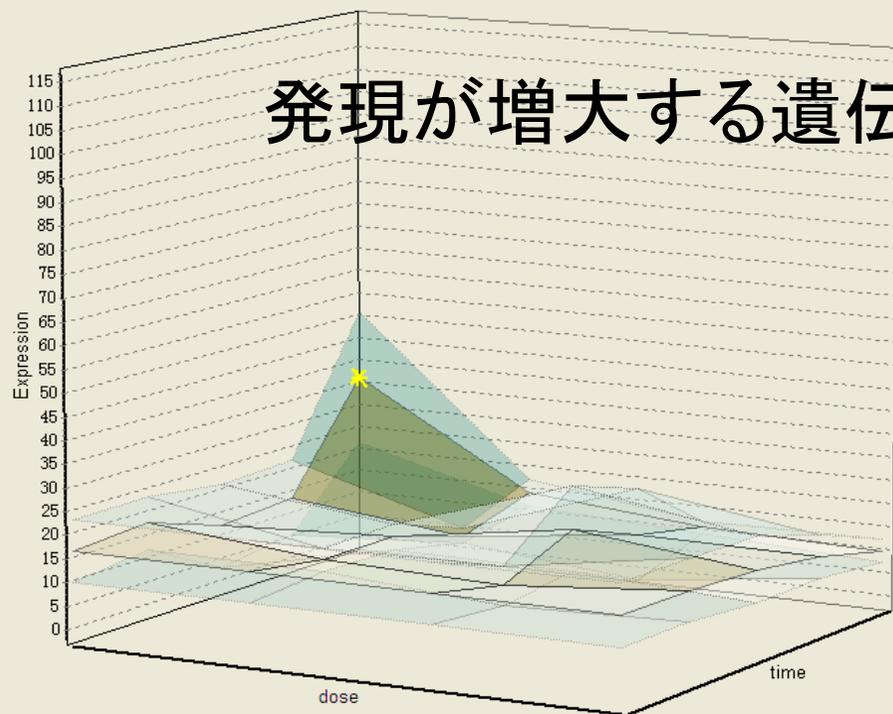
単回投与

[0, 0.7, 2, 7 mg/kg]

反復後 単回投与

5 mg/kg (for 14 days) + [0, 0.7, 2, 7 mg/kg]





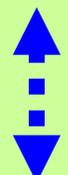
Serpina7
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7

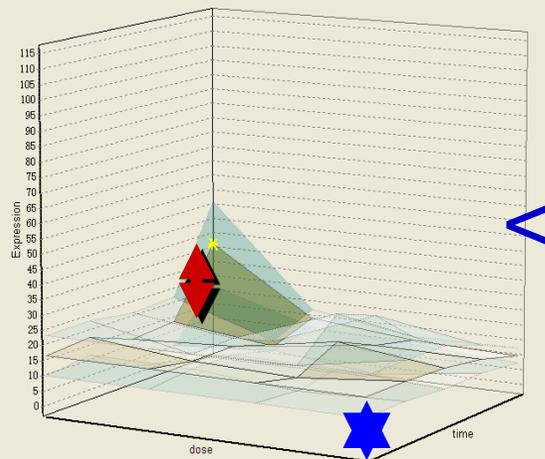
CCl₄ single

CCl₄ repeat

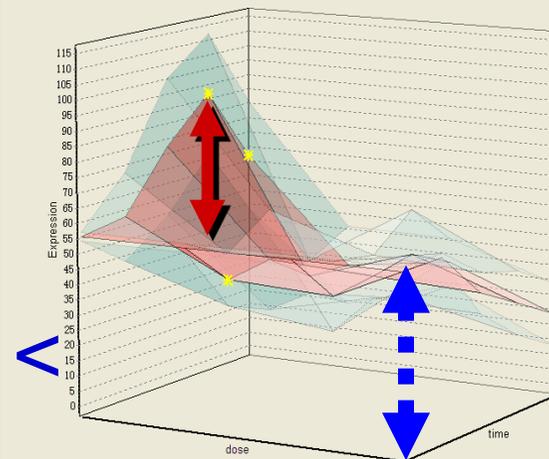
用語定義 Definition


Transient Response
 (T-Res)
 過渡反応

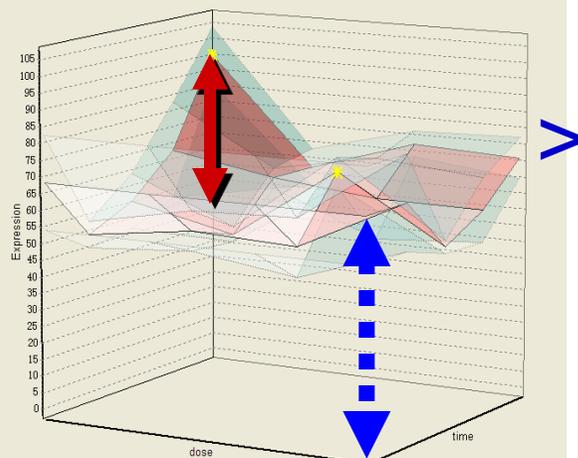

Baseline Response
 (B-Res)
 基線反応

TTG119-L_SpNC_0_{145017_at}

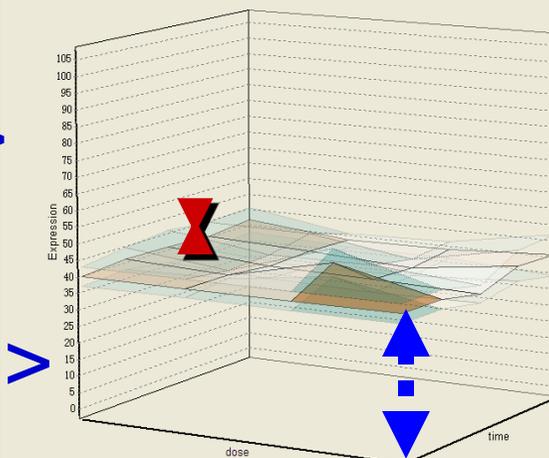
Single

TTG130-L_SpNC_0_{145017_at}

Repeated

TTG119-L_SpNC_0_{145001_x_at}

Single

TTG130-L_SpNC_0_{145001_x_at}

Repeated

新型反復暴露実験で示唆されたこと

■ 示唆される法則

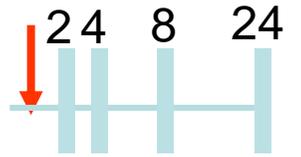
Baseline が 下がり Transient Resp が低下～消失する
Baseline が 上がり Transient Resp が増強する

■ 課題

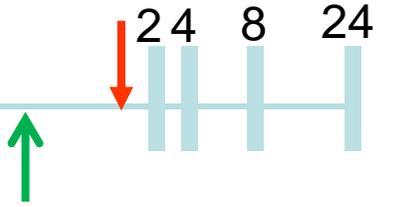
- Baseline の変動がどの様に完成するか。
 - 経時的観察
- Baseline: up/ down (unchanged) を示す遺伝子の上流は？
- 反復暴露する化学物質と最後に投与する化学物質が異なる場合の影響の様態

A+A' Protocol

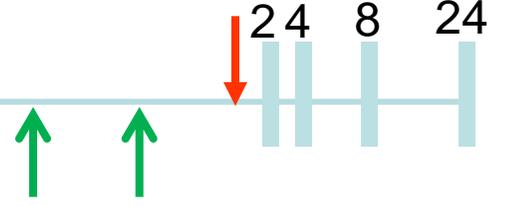
[0 + 1]



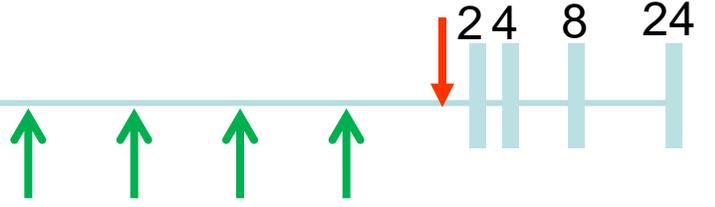
[1 + 1]



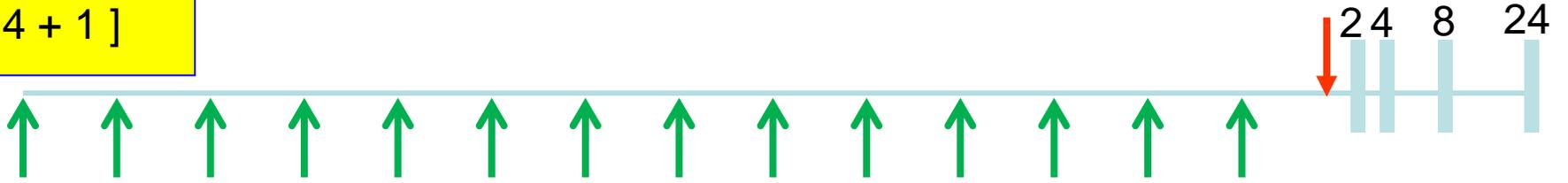
[2 + 1]



[4 + 1]



[14 + 1]



四塩化炭素

[0 + 1]

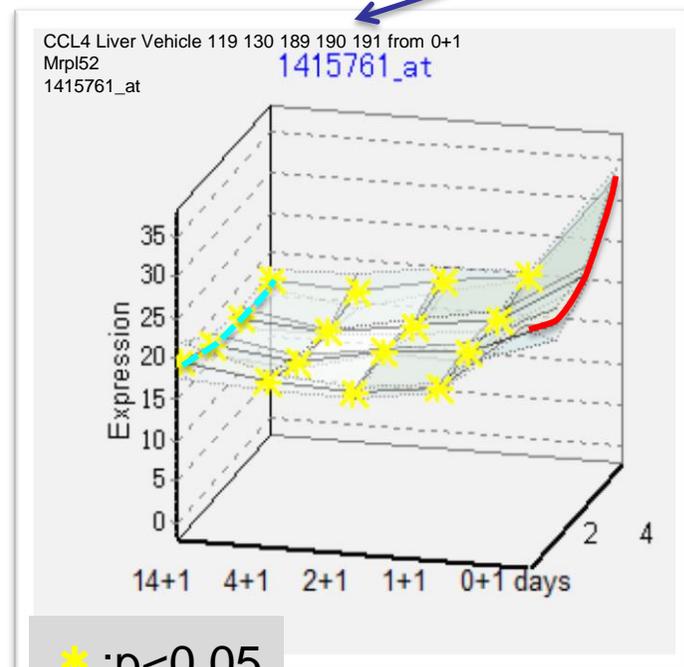
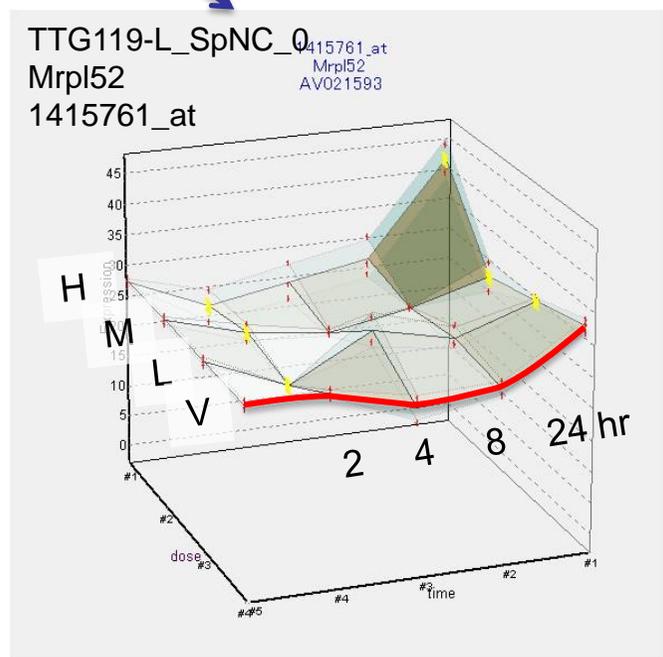
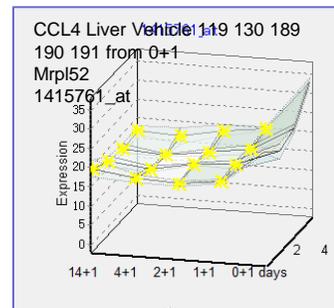
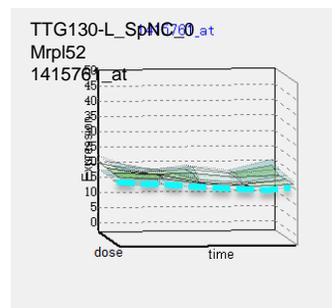
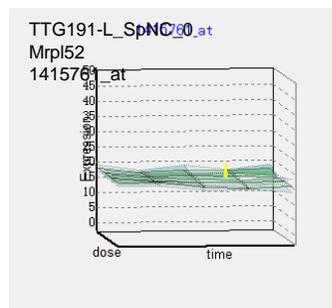
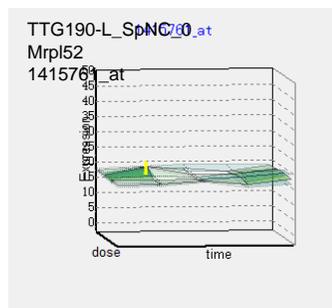
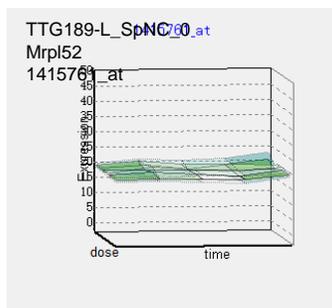
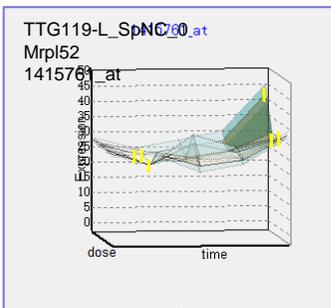
[1 + 1]

[2 + 1]

[4 + 1]

[14 + 1]

Vehicle



* :p<0.05

四塩化炭素

[0 + 1]

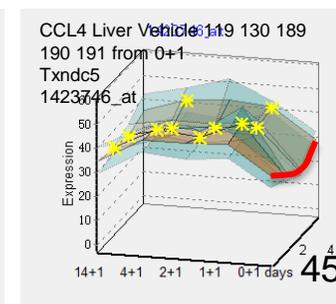
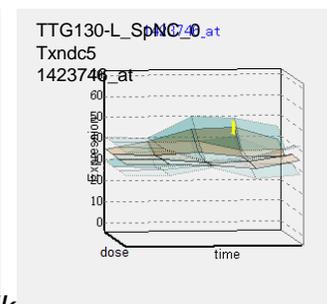
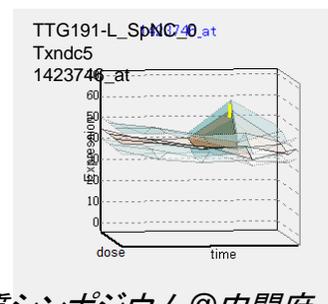
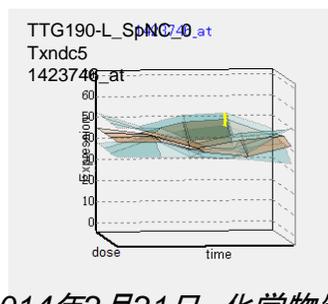
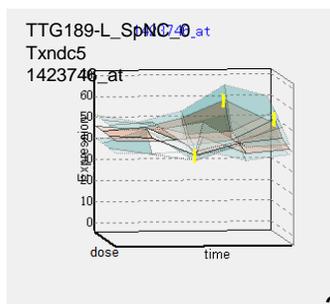
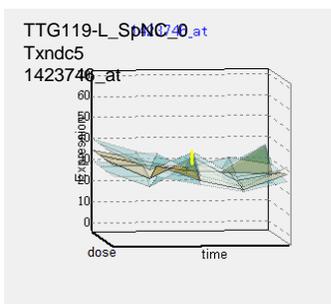
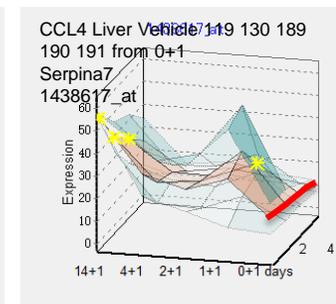
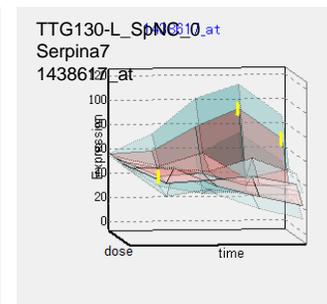
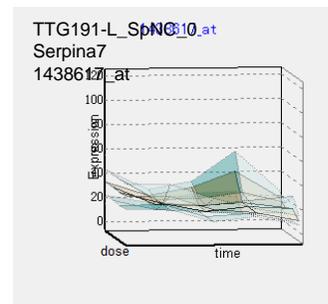
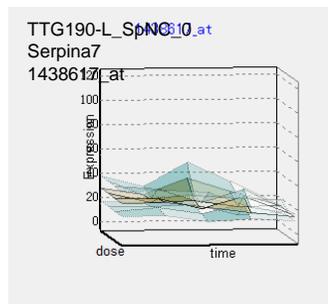
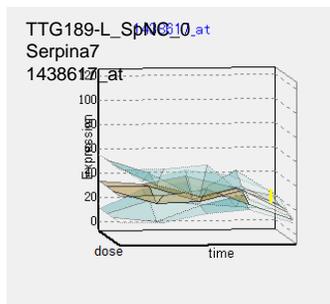
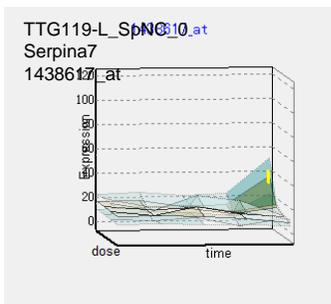
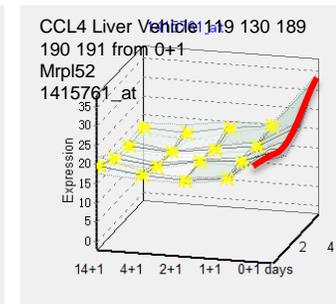
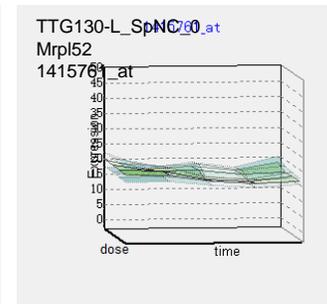
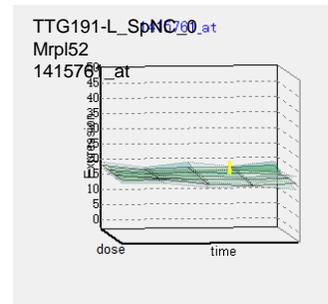
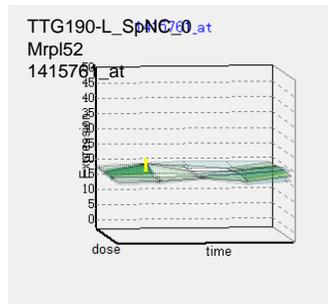
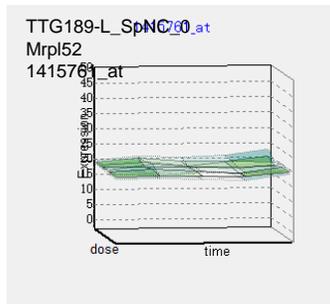
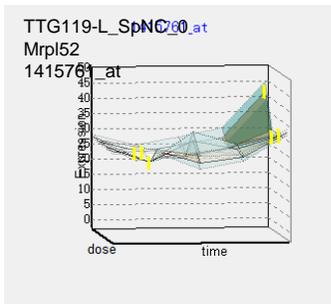
[1 + 1]

[2 + 1]

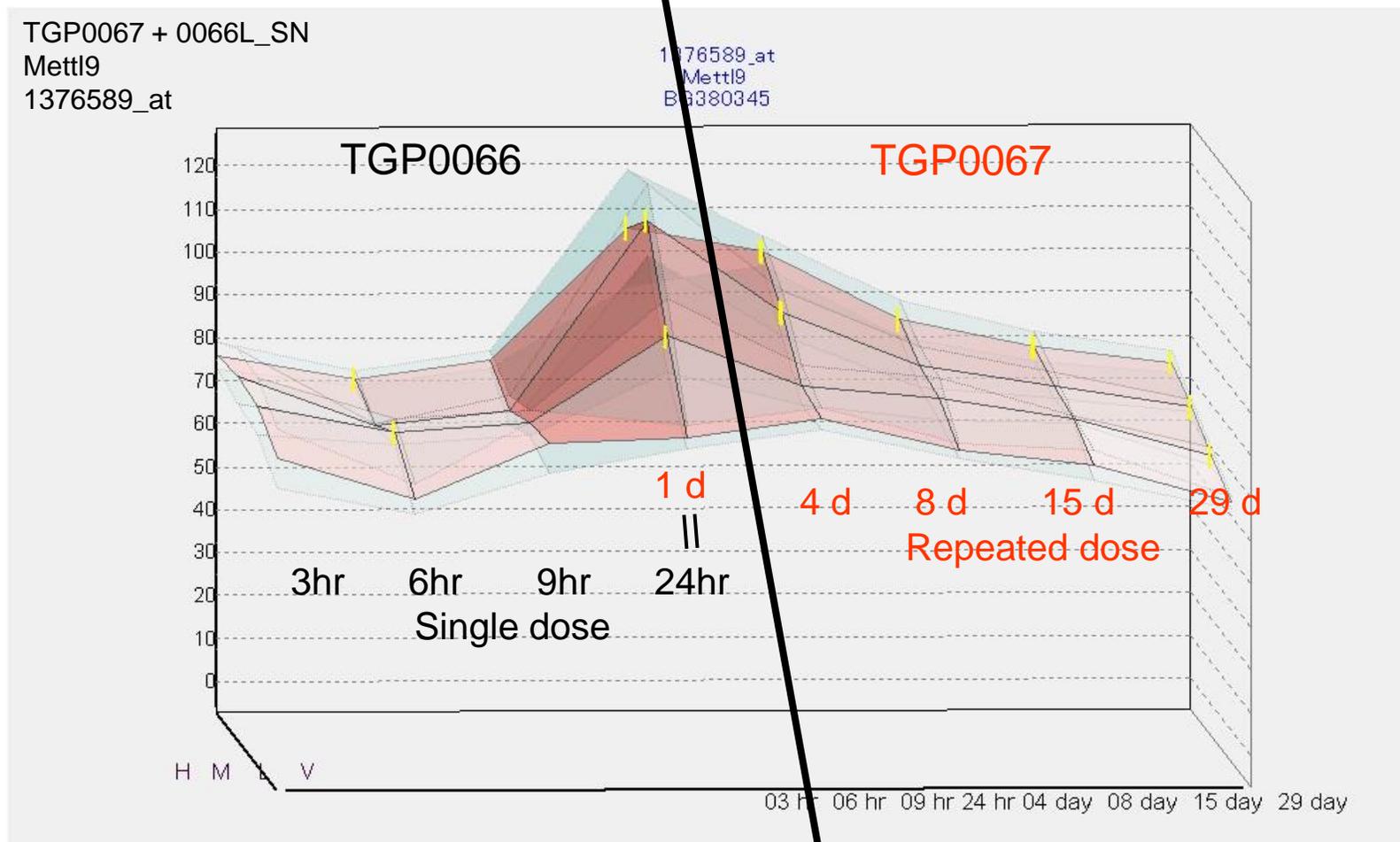
[4 + 1]

[14 + 1]

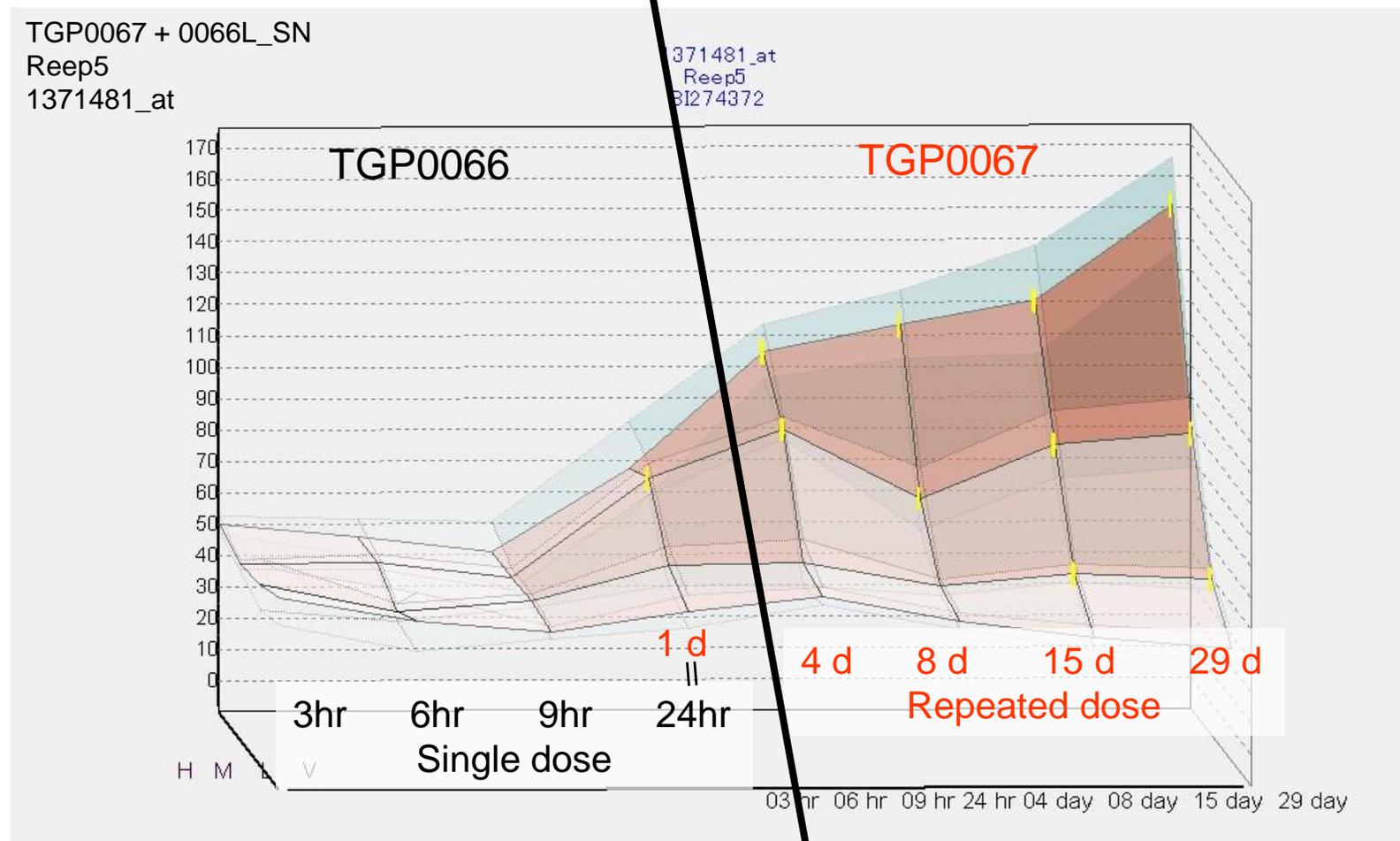
Vehicle



TGP Rat 四塩化炭素 データ (Percellome変換後に解析)



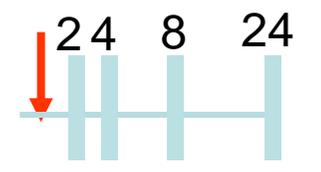
Desensitization $\hat{=}$ Reduced Baseline Response



Hypersensitization $\hat{=}$ Elevated Baseline Response

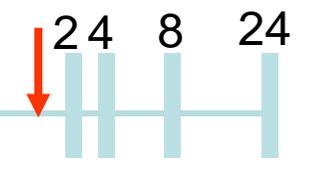
A+A' Protocol

バルプロ酸ナトリウム

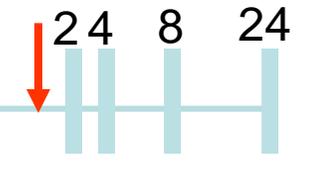


[0 + 1]

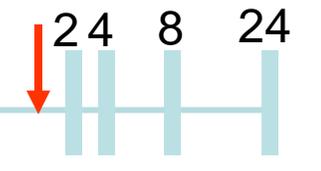
[1 + 1] 実施中



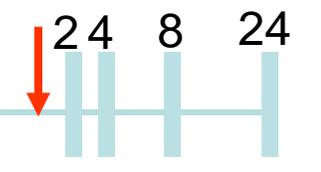
[2 + 1]



[4 + 1]



[14 + 1]



バルプロ酸ナトリウム

[1 + 1]

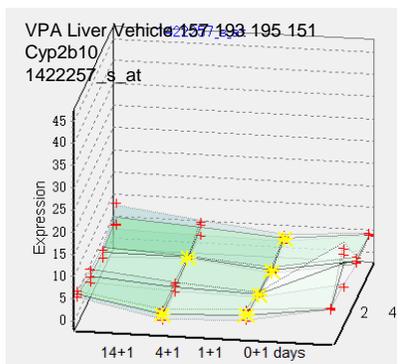
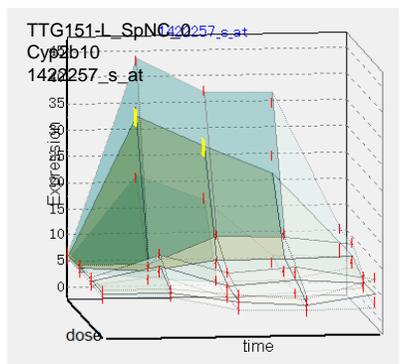
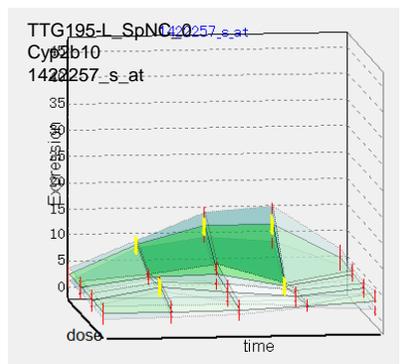
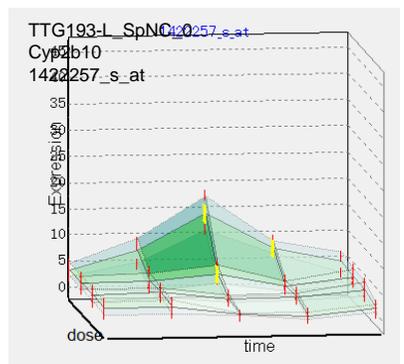
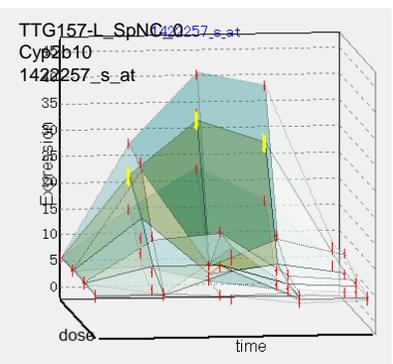
[0 + 1]

[2 + 1]

[4 + 1]

[14 + 1]

Vehicle



新型反復暴露実験 結果

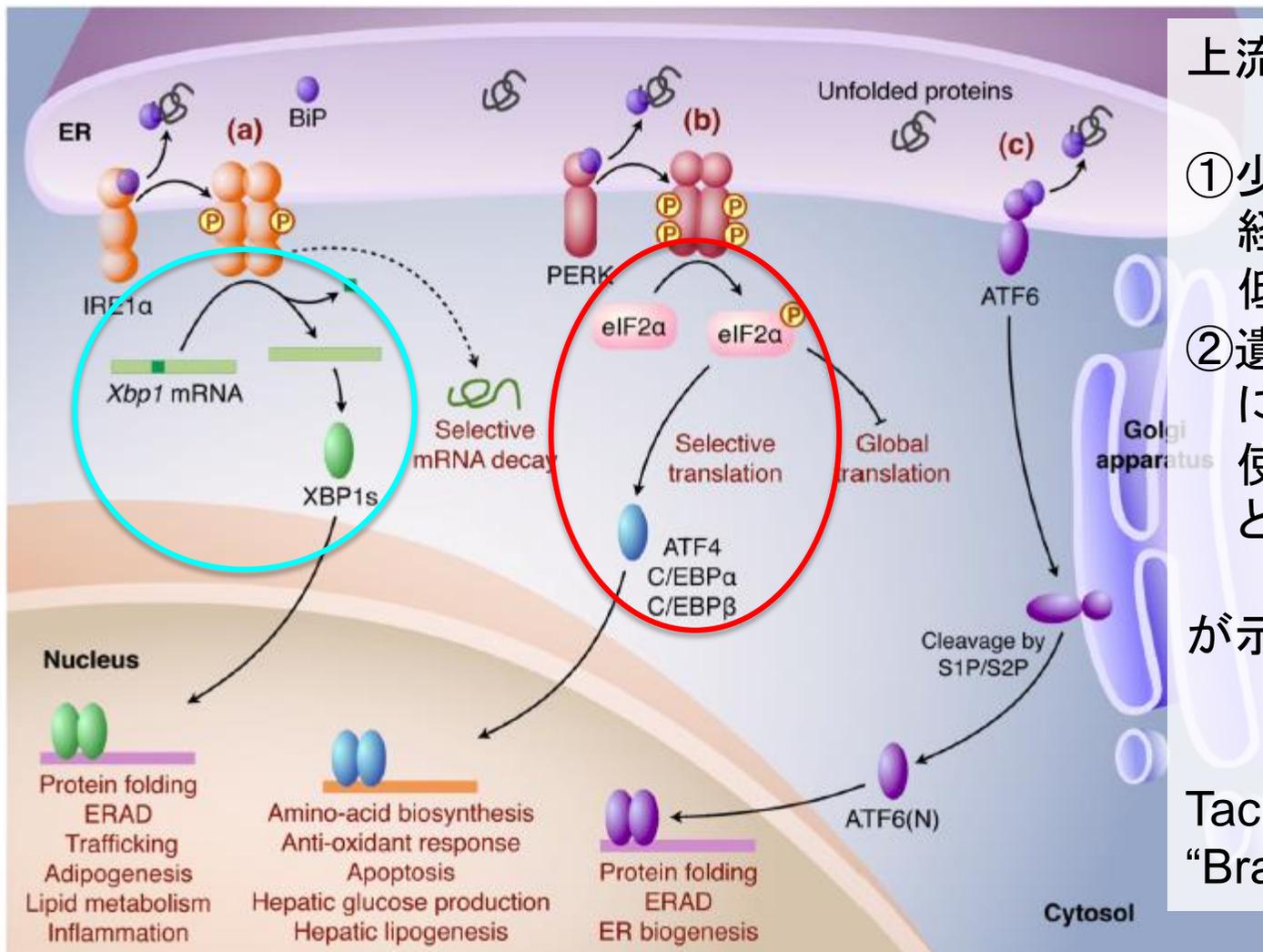
四塩化炭素

- 単回暴露で発現変動した遺伝子の多くは、反復暴露後に反応減弱ないし消失し、基線も低下傾向だった。
- 反復暴露により反応が増強する少数の遺伝子では、基線が上昇傾向だった。
- これらの変化は、多くの遺伝子で [1+1] において完成していた。

反復暴露により、過渡反応が急速に消失する遺伝子が多い。

バルプロ酸ナトリウム

- 反復暴露後も過渡反応が消失しない遺伝子数が多い。
- 一旦発現が抑制されるものの、[14+1]で再び基線上昇、過渡反応回復の遺伝子あり
- 基線反応・過渡反応共に反復暴露に影響されない遺伝子あり



上流遺伝子の解析の結果、

- ①少なくとも、小胞体ストレス経路が、Baseline Respの低下の上流にあること、
- ②遺伝子発現の誘導パターンにより Xbp1 と eIF2 の使い分けが行われていること

が示唆された。

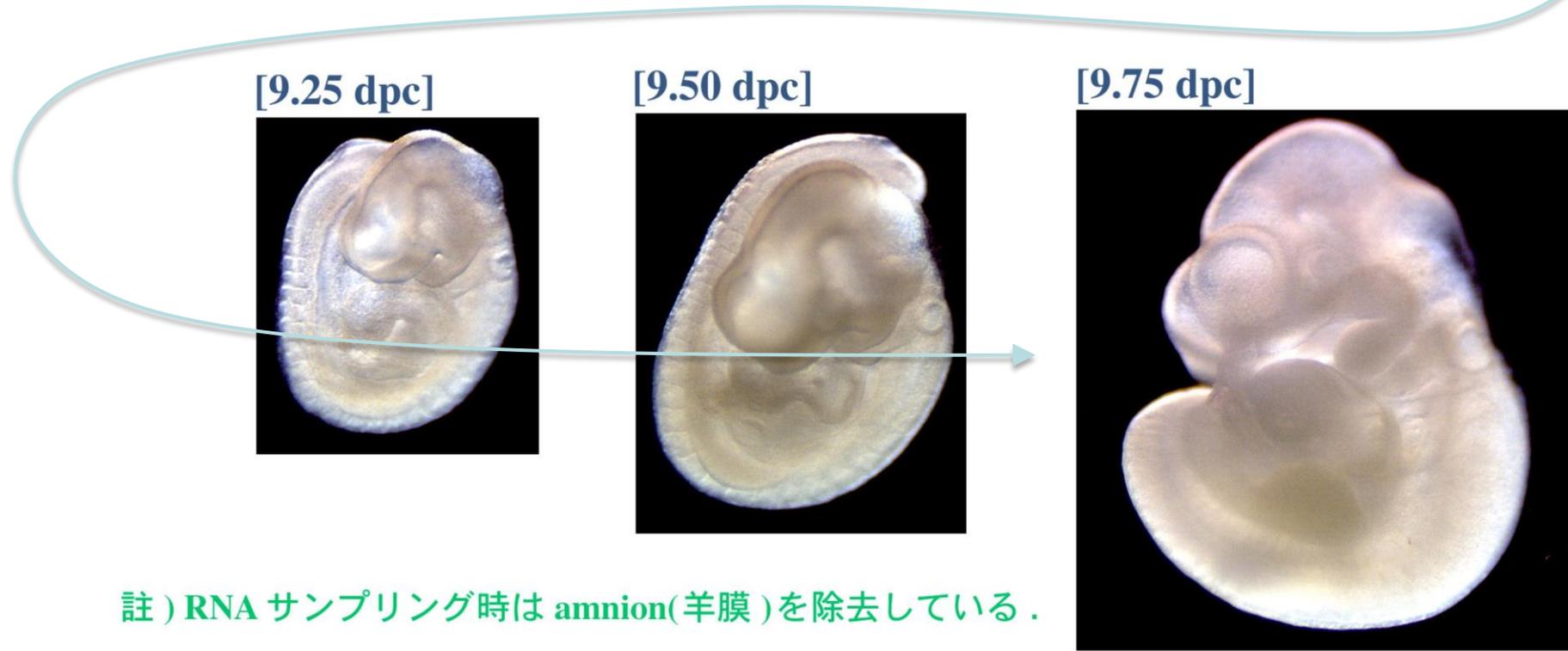
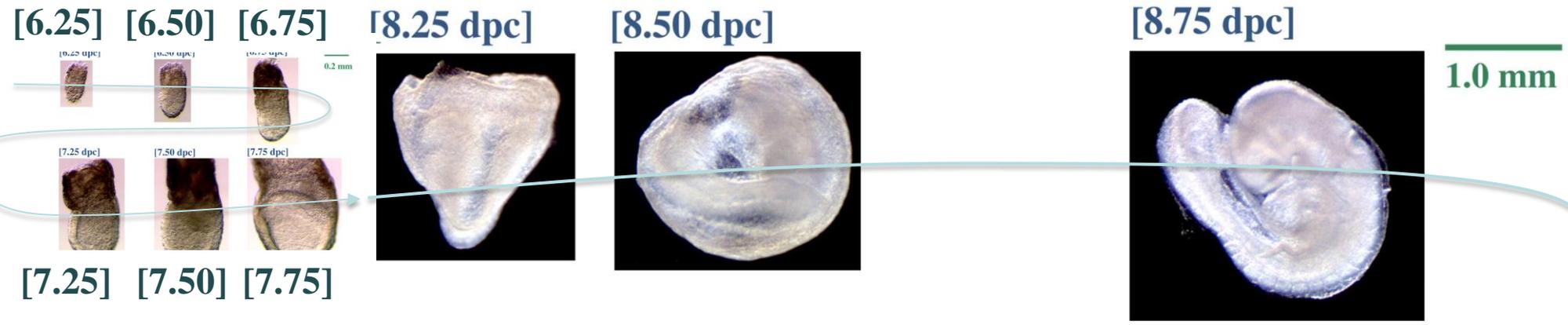
Tachyphylaxis ?
“Brady”phylaxis ?

新型反復：まとめ

- 反復投与による B-Res と T-Res の関係、B-Res の誘導機構に関して、化学物質に依らない共通的分子メカニズムの存在が示唆された。
- B-Res に2通り以上の機構が存在することが示唆された：
Xbp1 および eIF2。
- 組み合わせデータからのネットワーク抽出を加速する。
- 数日反復暴露による慢性影響の高精度予測の可能性が視野に入りつつあると考える。

マウス胎生6.25-9.75日胚 [C57BL/6CrSlc] 12時点

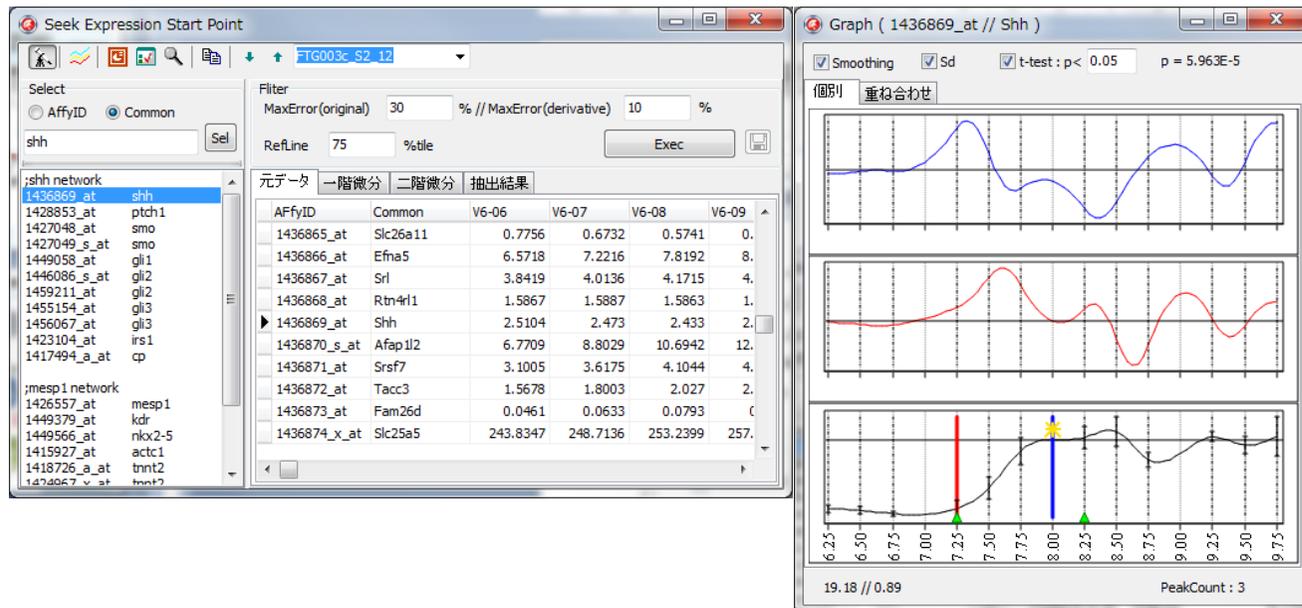
胎生6.25、6.50、6.75、7.25、7.50、7.75、8.25、8.50、8.75、9.25、9.50、9.75



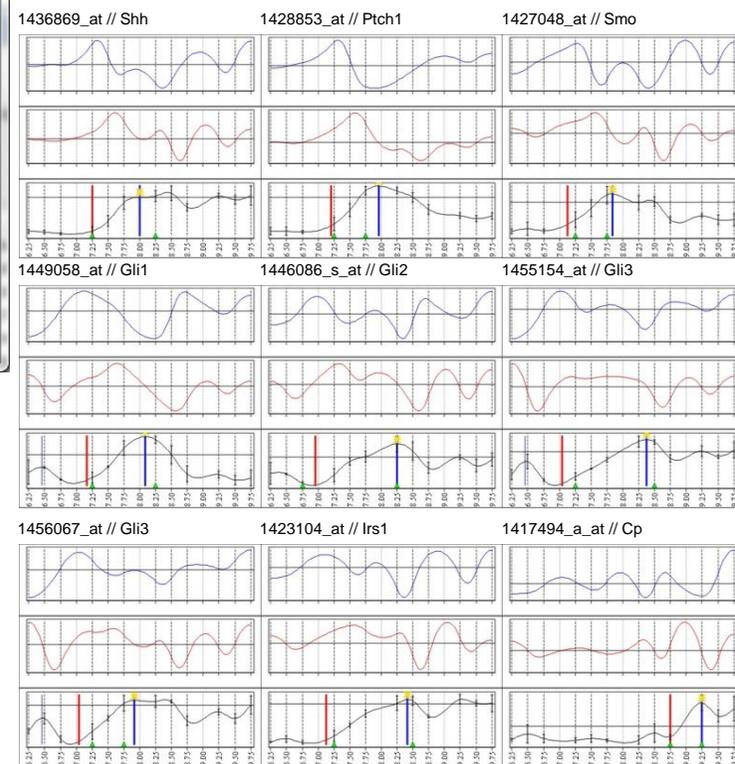
註) RNA サンプルング時は amnion(羊膜)を除去している.

胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした 遺伝子発現ネットワークの網羅的解析

微分解析による発現変動起点の検出



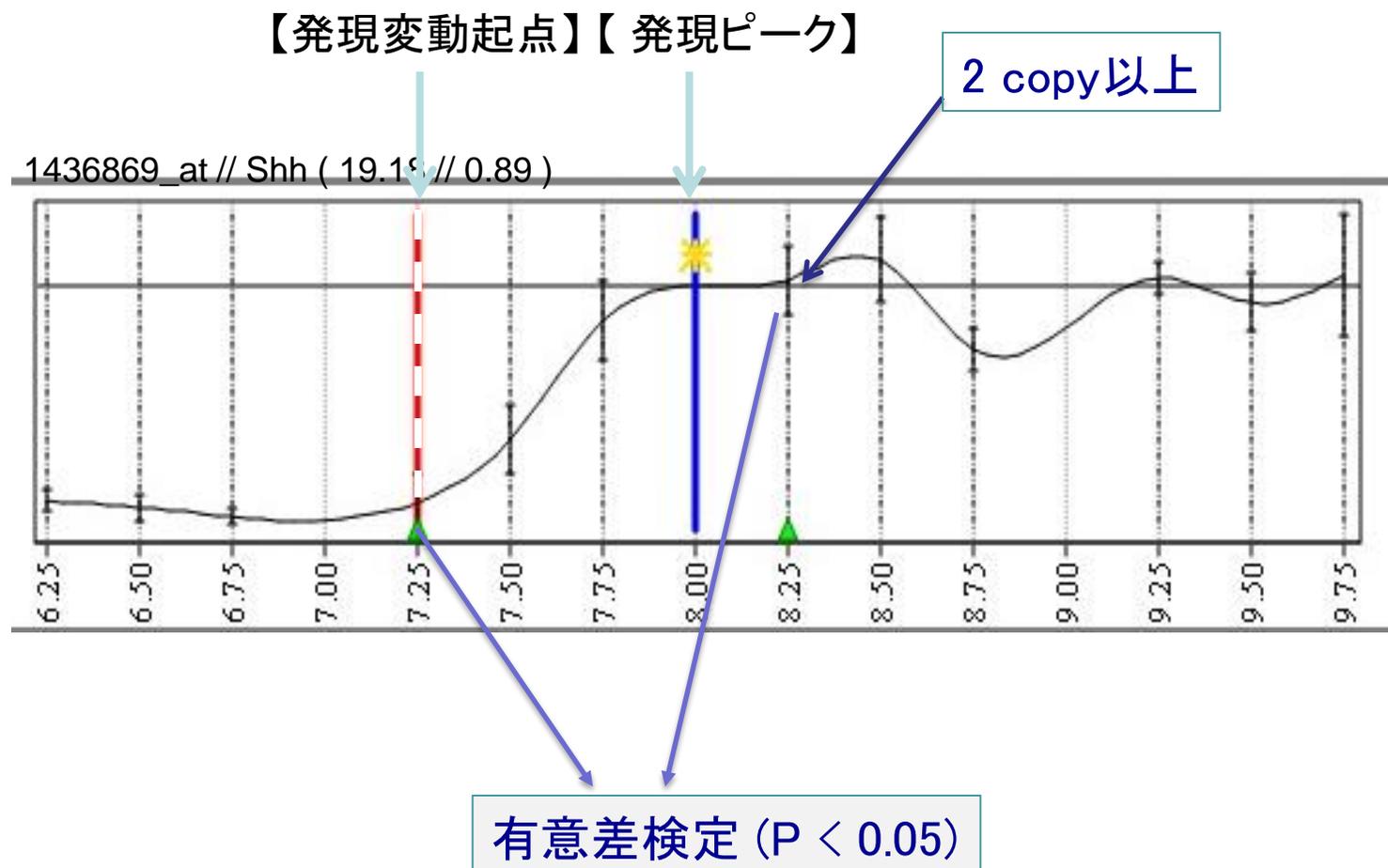
【発現変動起点】と【発現ピーク】による、
候補遺伝子の抽出、及び、シグナルネット
ワーク解析



[抽出条件]

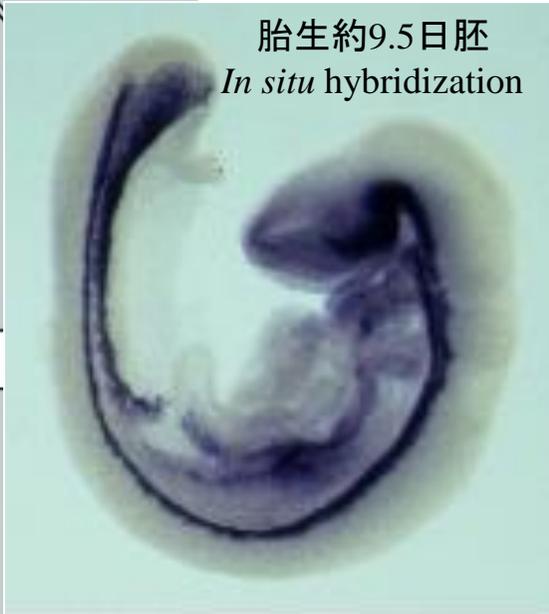
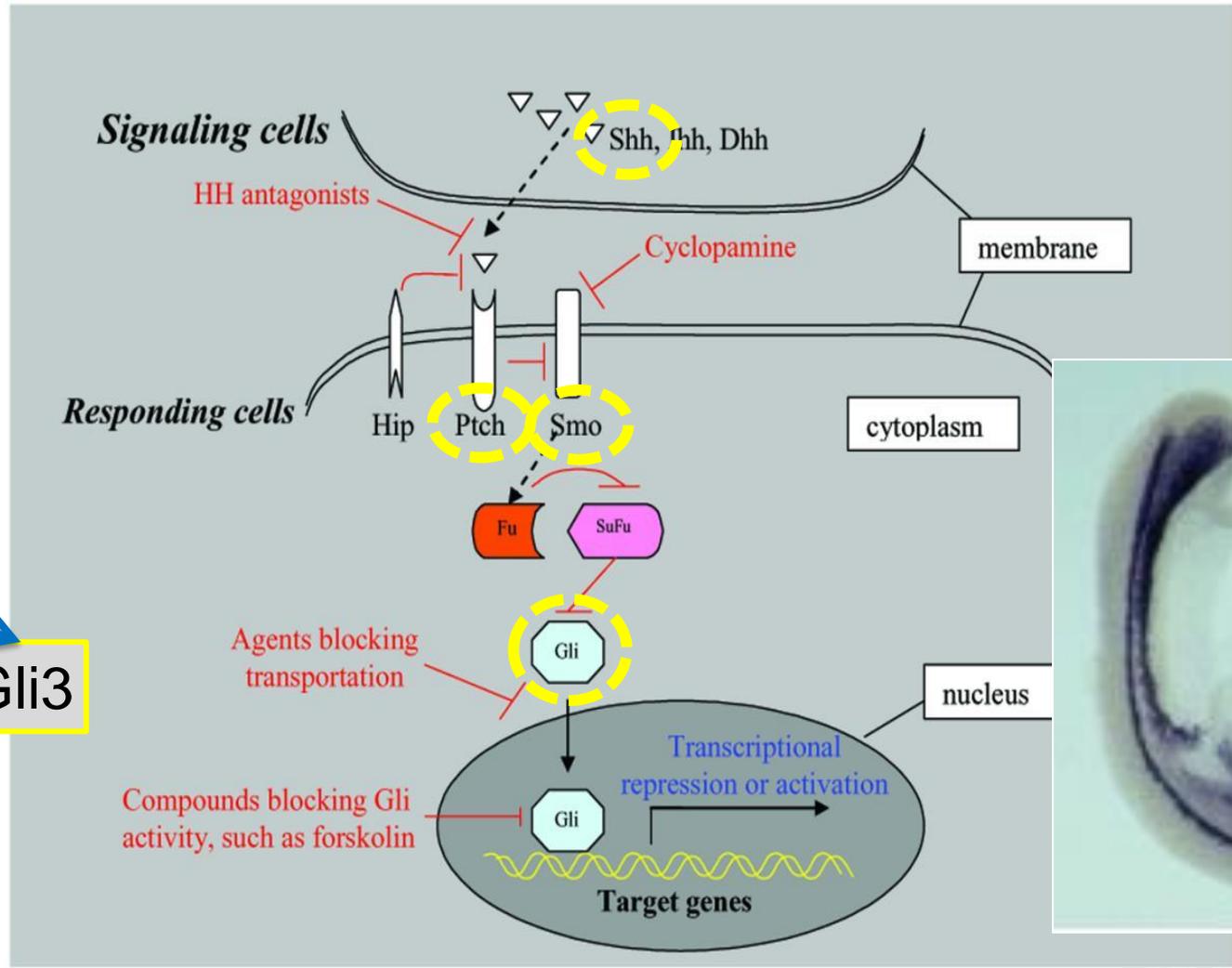
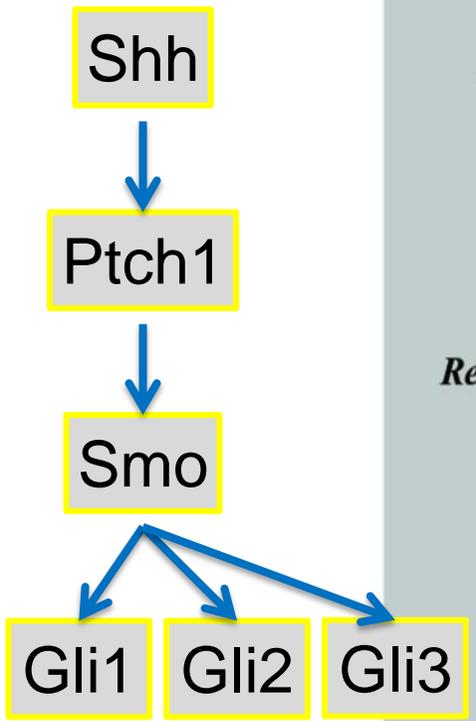
- ・発現ピークの時点の発現コピー数(平均値)が2コピー／細胞以上
- ・発現変動起点と発現ピークの発現に有意差 ($p < 0.05$)

→ 9,311 psが抽出



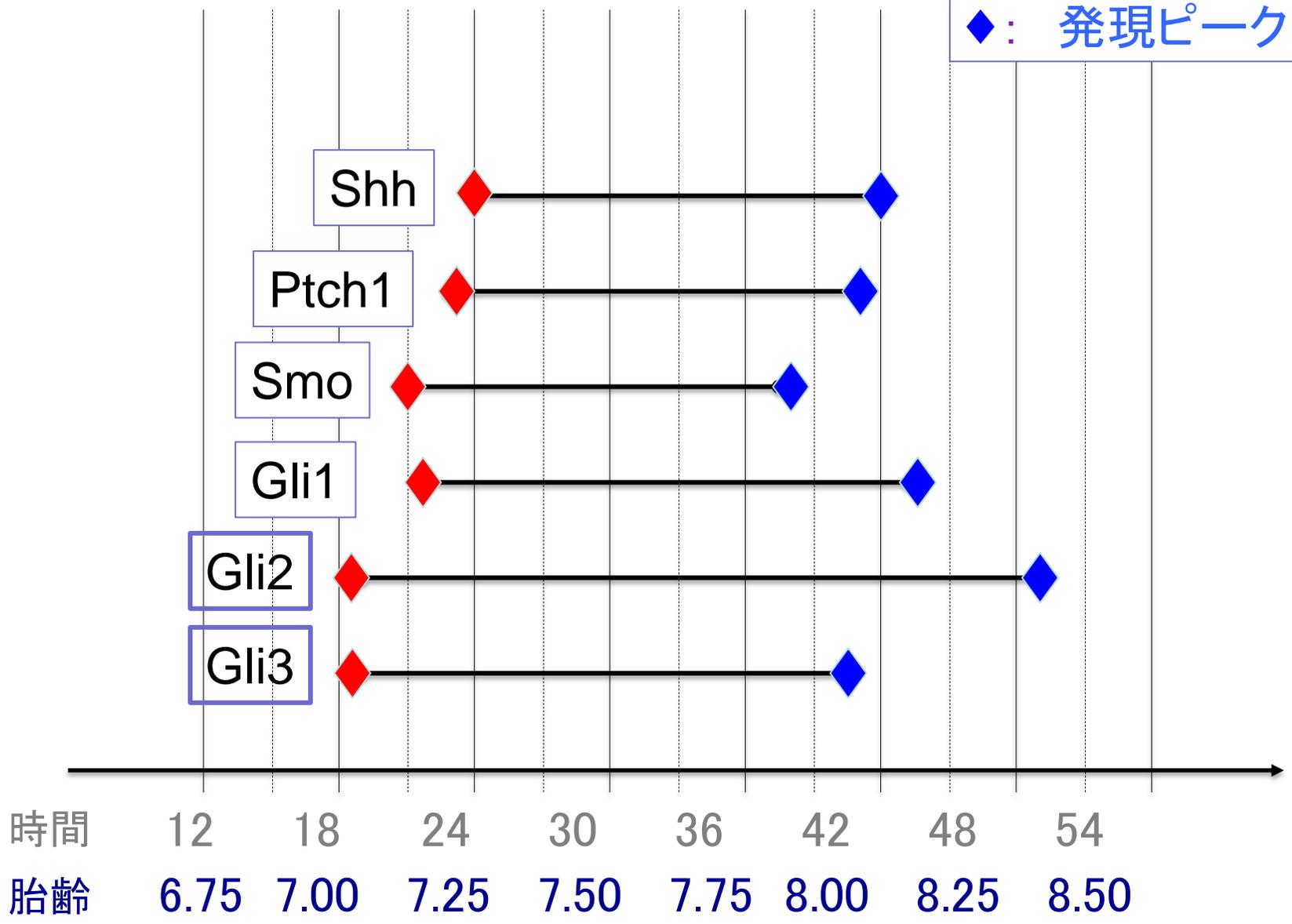
モデル： ソニックヘッジホッグ (shh) シグナル

シグナルの流れ

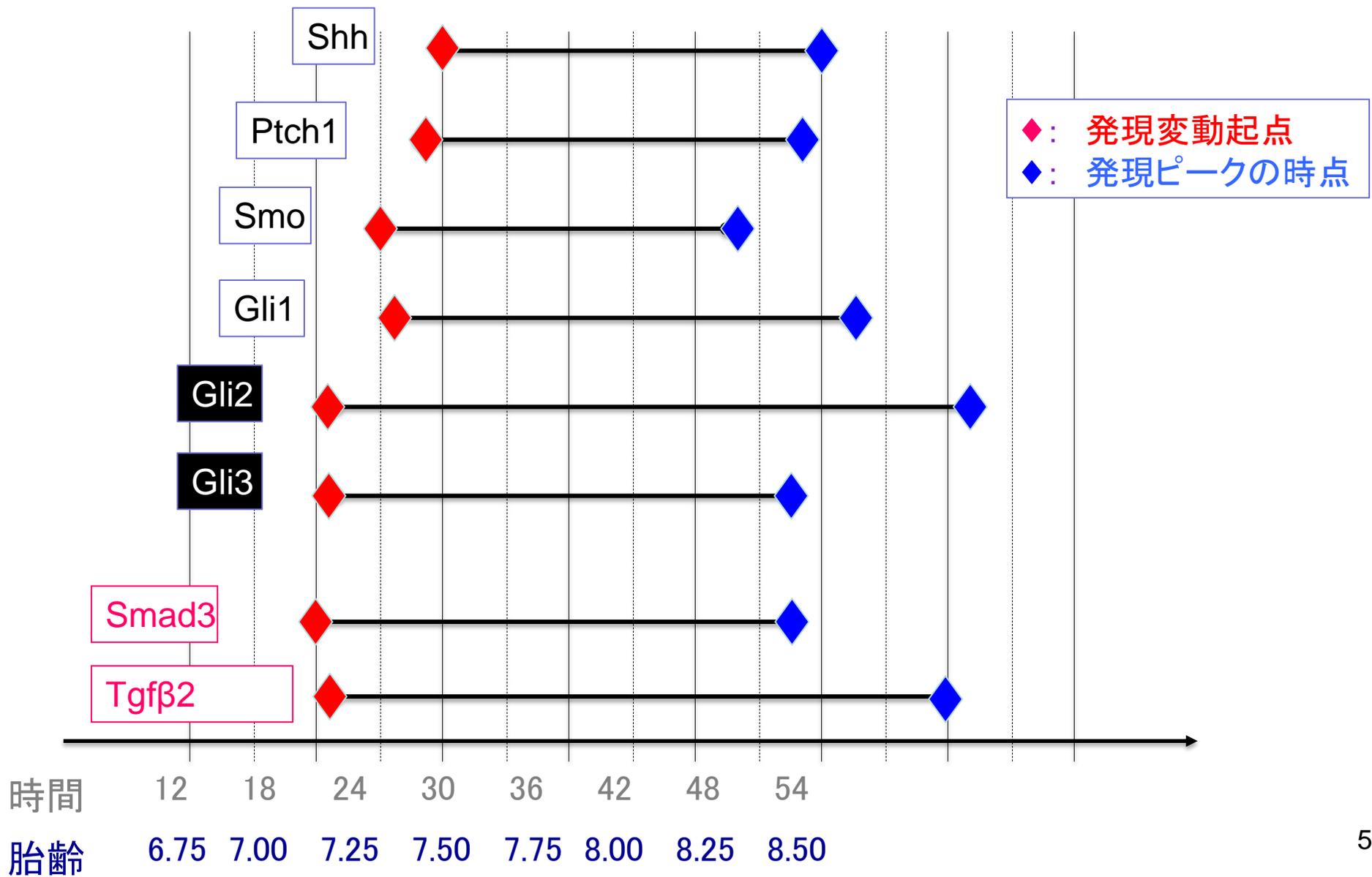


Breast Cancer Research

◆ : 発現変動起点
◆ : 発現ピークの時点



Shhの受容体を介さないGli遺伝子の発現制御因子の探索(*in silico*) = SMAD3 (TGFβシグナル)



胎児発生過程の遺伝子発現ネットワークの解析：まとめ

- Shhシグナルを構成する遺伝子のmRNA発現順位はシグナルの流れと逆であった ⇒ 胎児発生において一般化されるか否か、確認が必要がある。
- Gli (Gli2、Gli3) は、Shh遺伝子発現に先だって、Smad3・Tgfβ2に誘導される可能性が示された。
- Shhシグナル系に対する発生毒性の標的分子には、自系の構成因子に加え、構成因子の発現を制御する系の構成因子を考慮する必要があることが示唆された。

- 吸入Percellome: 肺・肝・中枢神経(海馬)
- 中枢神経Percellome: 情動認知行動異常

「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」にて 指針値が策定された化学物質

物質	CAS.No	室内濃度指針値
ホルムアルデヒド	50-00-0	0.08ppm (100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
トルエン	108-88-3	0.07ppm (260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
キシレン	1330-20-7	0.20ppm (870 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、
パラジクロルベンゼン	106-46-7	0.04 ppm (240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
キシレンの異性体⇒ エチルベンゼン	100-41-4	0.88 ppm (3800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
スチレン	100-42-5	0.05 ppm (220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
クロルピリホス	2921-88-2	0.07 ppb (1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)小児は0.007ppb
☆ フタル酸ジ-n-ブチル	84-74-2	0.02ppm (220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
テトラデカン	629-59-4	0.04ppm(330 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
☆ フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	117-81-7	7.6ppb(120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
ダイアジノン	333-41-5	0.02ppb (0.29 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
アセトアルデヒド	75-07-0	0.03 ppm (48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
フェノブカルブ	3766-81-2	3.8ppb (33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)

☆: 気化できず今後検討

発生機

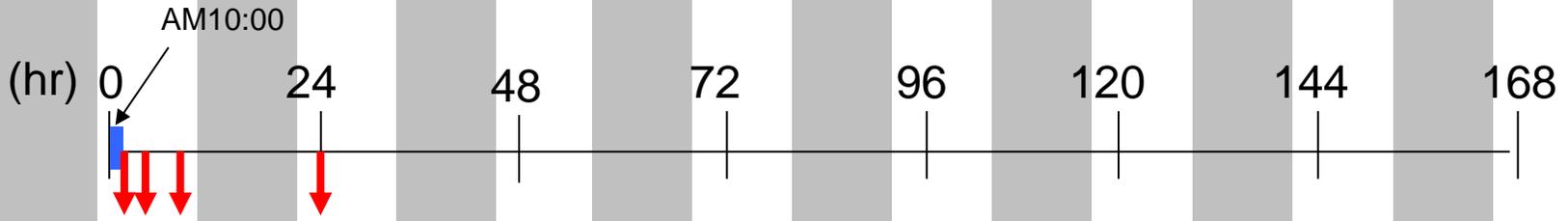


暴露チャンバー

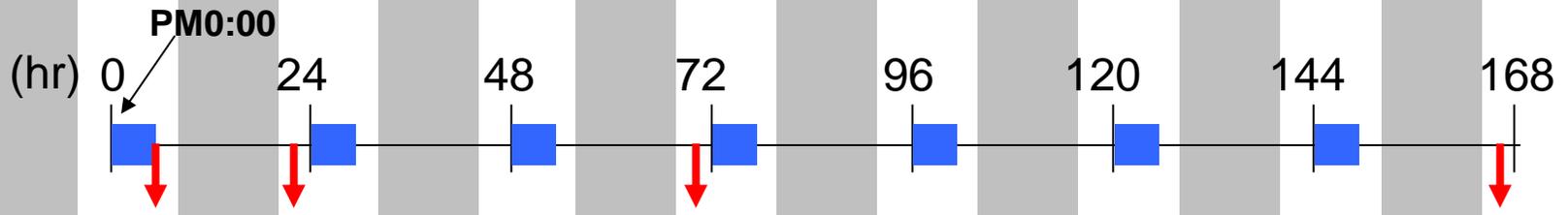


吸入暴露プロトコル 3種類

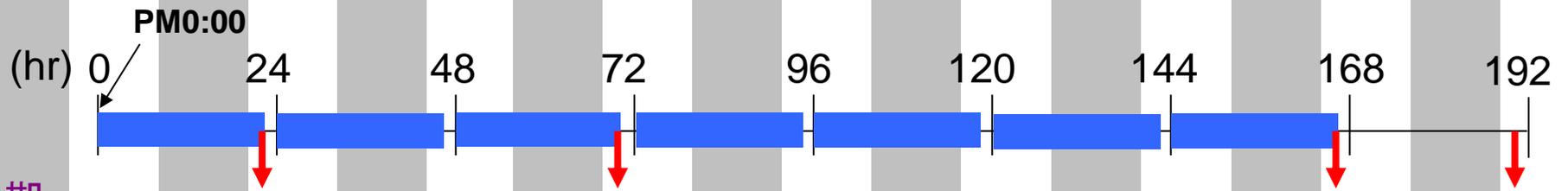
2時間単回暴露実験



6時間×7日間反復暴露実験



2 2時間×7日間反復暴露実験

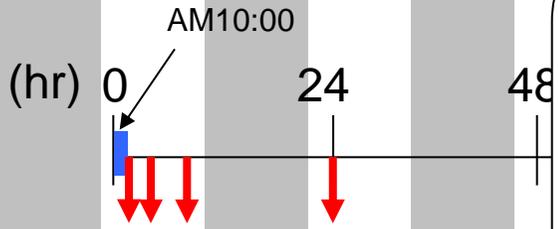


照明周期

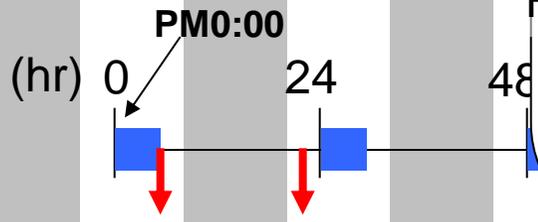
PM8:00 AM8:00

2 2時間 × 7日間反復暴露実験 = 生活暴露モデル

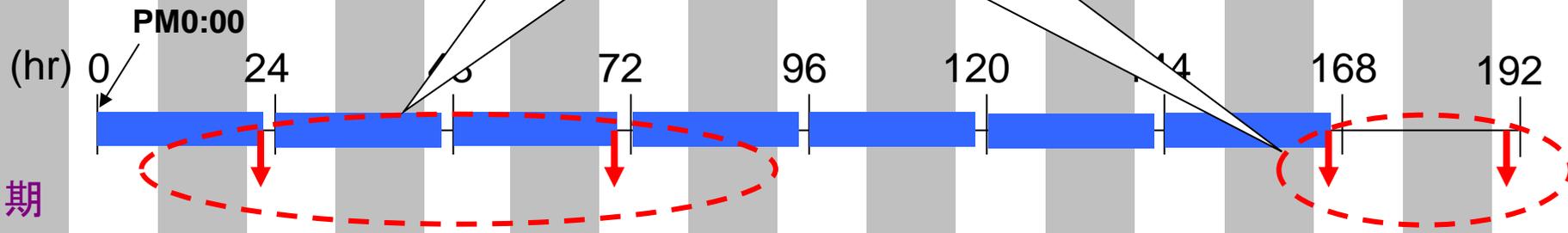
2時間単回暴露実験



6時間 × 7日間反復暴露実験

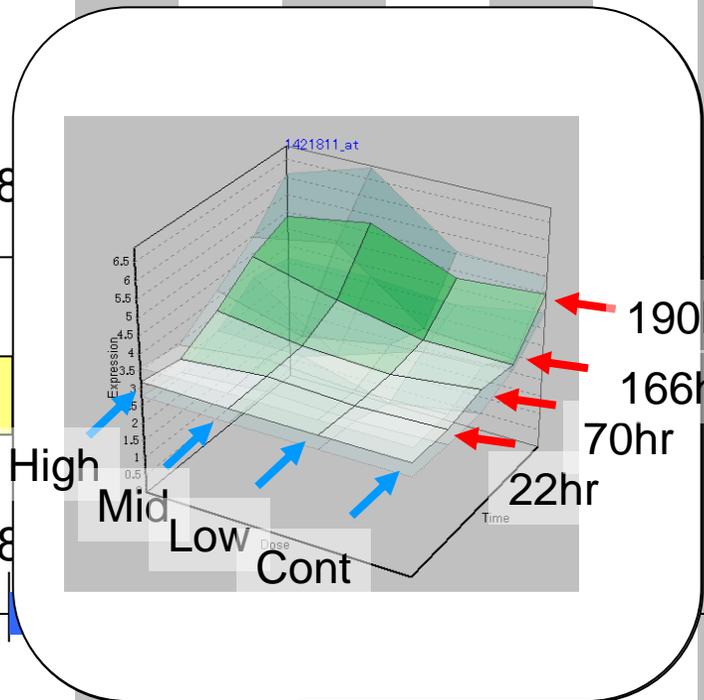


2 2時間 × 7日間反復暴露実験



照明周期

PM8:00 AM8:00



■ 暴露 ↓ サンプル採取

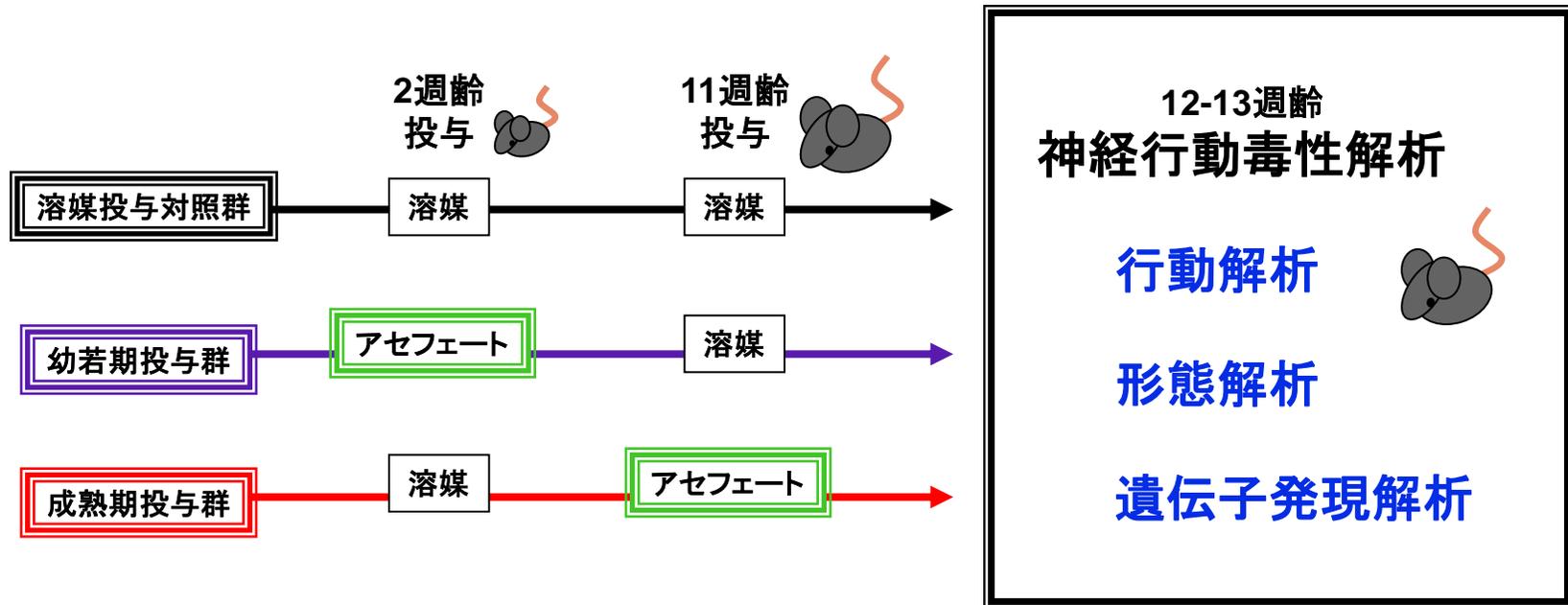
144 168

144 168

暴露22、70、166、190時間後に観測 [時刻：10時、10時、10時、10時]

中枢影響解析

幼若期及び成熟期アセフェート(7、20、70 mg/kg)
単回強制経口投与



行動解析

遺伝子改変マウスの行動解析で実績があり、
比較的短時間で、判りやすい結果が得られる試験を選択した。



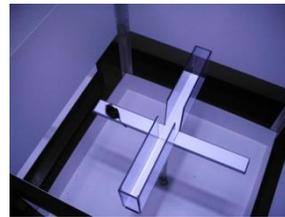
オープンフィールド
試験

第1週
水曜日



明暗
往来試験

第1週
木曜日



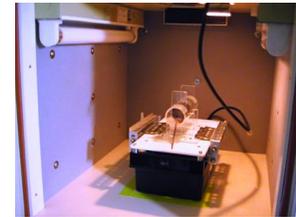
高架式十字
迷路試験

第1週
金曜日



条件付け
学習記憶試験

第2週
月～水曜日

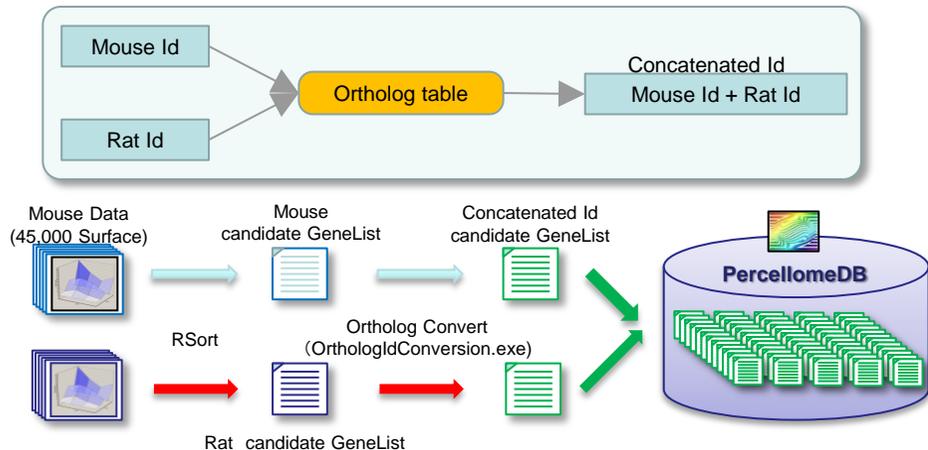


プレパルス驚愕反応
抑制試験

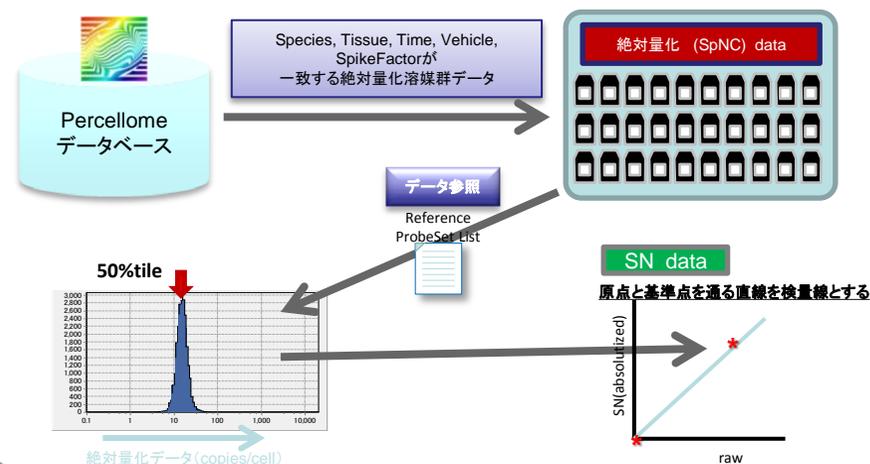
第2週
木曜日

Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究

異種由来の遺伝子発現データの統合処理



非Percellomeデータの絶対量推計

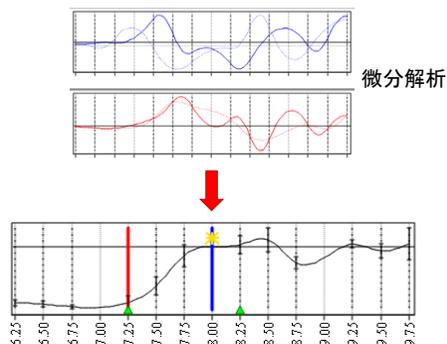


候補遺伝子自動抽出プログラムの改良

a) RSortのupdate
Graph Density (GD) filterの追加



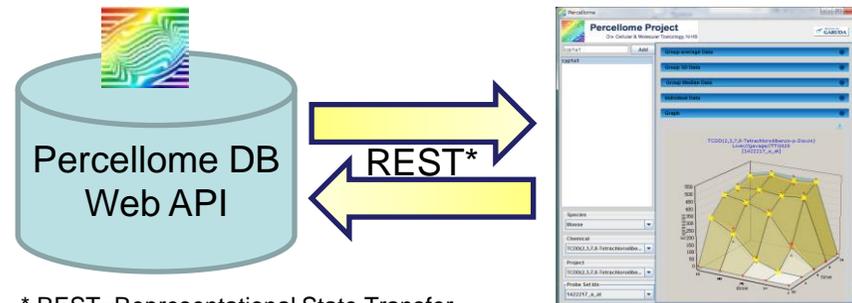
b) 発現変動起点の自動検出アルゴリズムの開発



Percellome公開サーバーの機能拡張

データベース参照例)

http://percellome.nihs.go.jp/PDBR/v1.dll/ds/rest/tools/Surface/6/1422217_a_at/ASIT/N/330-340-50-1/A-0-N/400-400-8

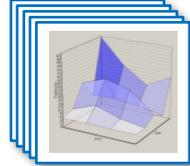


* REST=Representational State Transfer
ハイパーメディア システムのための
ソフトウェアアーキテクチャのスタイルのひとつ



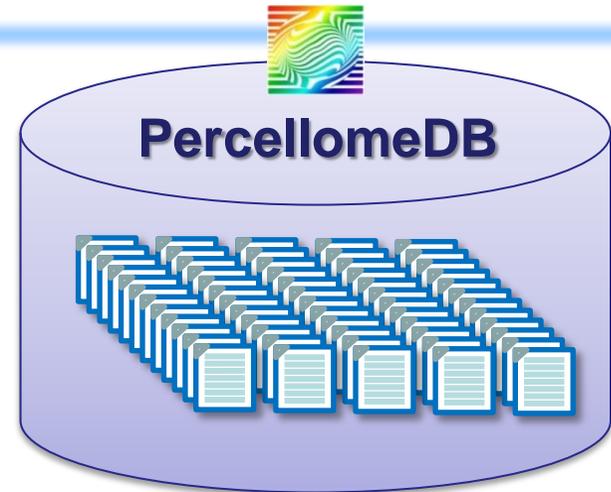
Percellome Explorer

Project Data
(45,000 Surface)

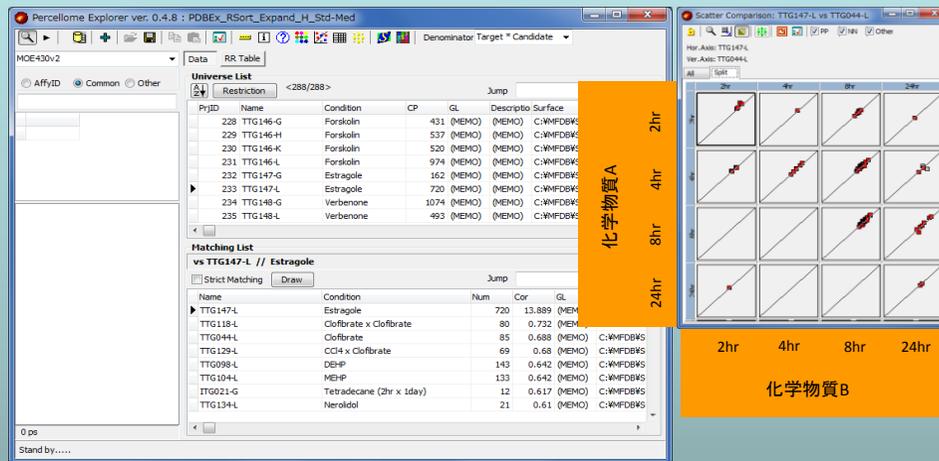


RSort

candidate GeneList

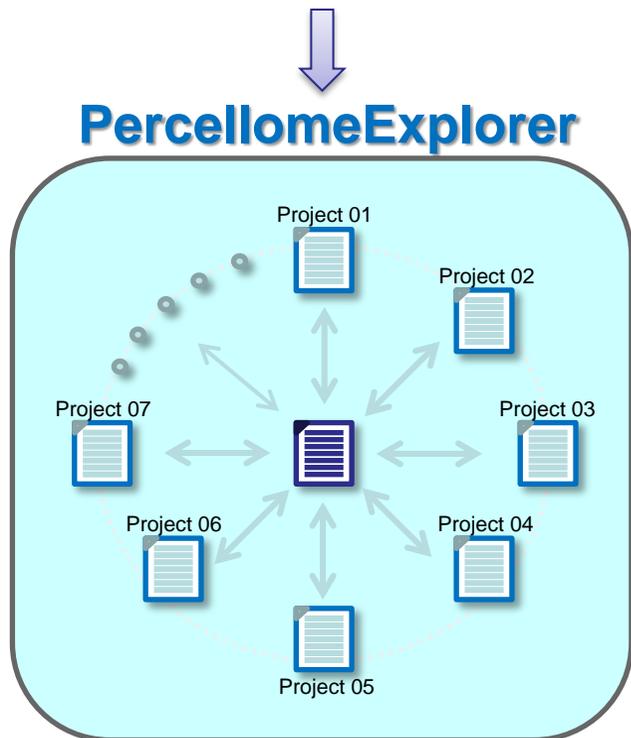


Percellome Explorer



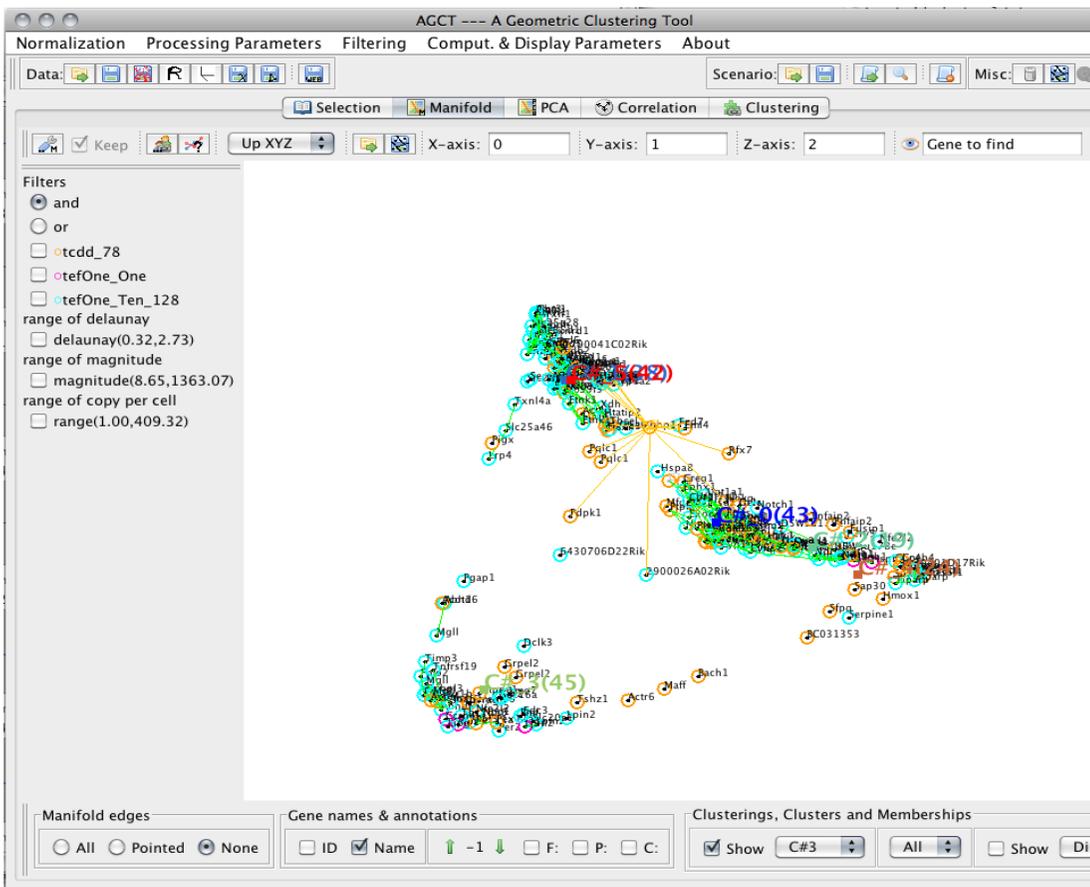
Percellome Explorer : 各実験プロジェクトにおいて発現変動する候補遺伝子 (ps) についての総当たり比較を自動化し、短時間で効率良く、解析計算を行う共通変動遺伝子の高速抽出・評価用の解析プログラム。

本プログラムにより、Percellomeデータベースの全データ（全288実験プロジェクト/119化合物[2012年6月時点]）を対象とした化学物質暴露影響の比較解析が数クリックで容易に実施できる。



Percellome data clustered

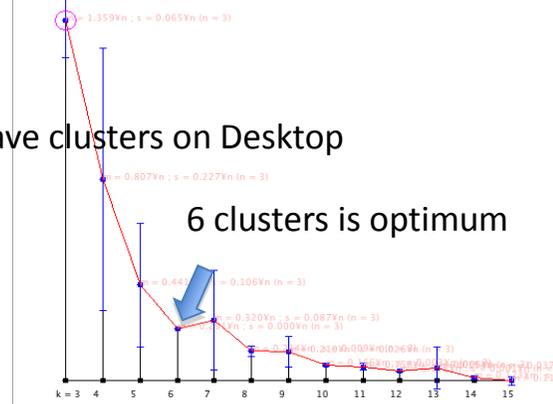
Clustering 212 selected probes, which are three types of labels.
 TCDD only (78). TCDD-TCDF (TEF=1.0, 6), TCDD-TCDF (TEF=0.1, 128)



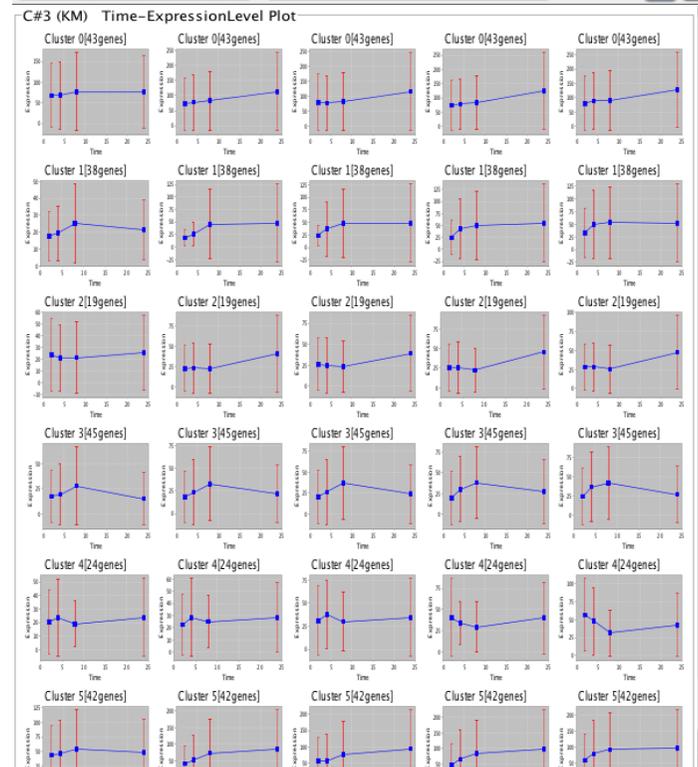
All K-Means Distortions = $f(K)$ (regardless of -Point)

Save clusters on Desktop

6 clusters is optimum



C#3 (KM) (default: average) SD Bar



オルソログ制御領域分析ソフトウェアSHOE

BrowserTest

SONY Sony CSL

SHOE
Sequence HOmology in higher Eukaryotes

Job Input Queue List

No	Start Date	End Date	Gene List	Repeat Masker	Upstream Length	Mode	Downstream Length	Scoring
90	2013/05/29 15:58:54	2013/05/29 16:09:46	NM_001002239 NM_001013785	Checked	5000	mode2	500	transfac32

90

PROMOTER (14 genes)

- NM_001002239_5000.fasta
- NM_007438_5000.fasta
- NM_007647_5000.fasta
- NM_007812_5000.fasta
- NM_008945_5000.fasta
- NM_009177_5000.fasta
- NM_009997_5000.fasta
- NM_010756_5000.fasta
- NM_020577_5000.fasta
- NM_024473_5000.fasta
- NM_029573_5000.fasta
- NM_053108_5000.fasta
- NM_173038_5000.fasta
- NM_198326_5000.fasta

ALIGNMENT (11 genes)

- NM_001002239_5000[47023155-47023893]_1.aln
- NM_007438_5000[30070913-30071039]_1.aln
- NM_007812_5000[41389032-41389185]_2.aln
- NM_007812_5000[41391026-41392019]_1.aln
- NM_008945_5000[151371966-151372261]_1.aln
- NM_009177_5000[134584555-134584732]_1.aln
- NM_009997_5000[41591777-41594866]_1.aln
- NM_010756_5000[79889885-79890101]_1.aln
- NM_024473_5000[24721755-24723215]_1.aln

① Genes RPL17
~7,000個

② Genes orth aln

TSS

③

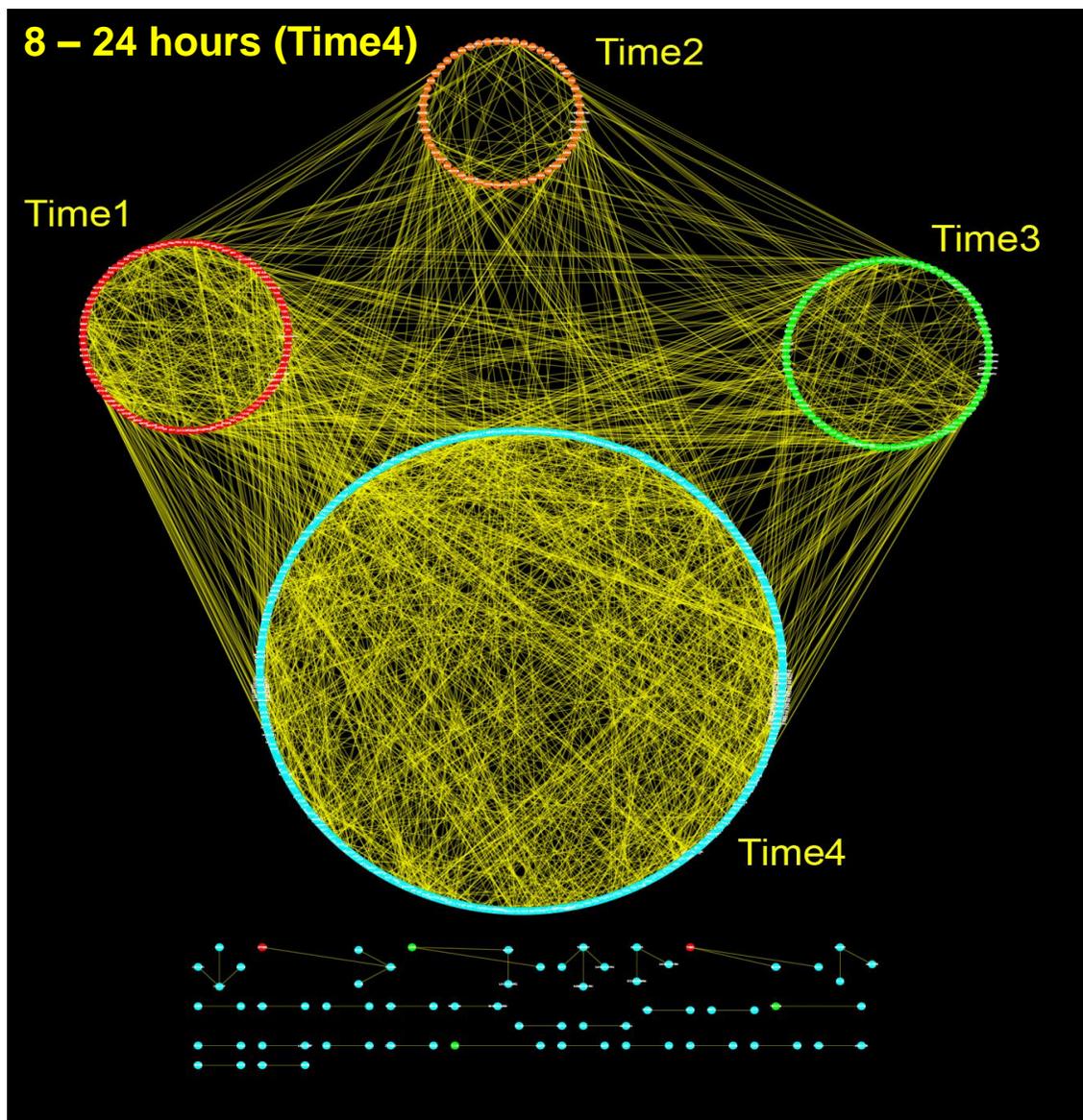
Location	Str	MA Score	PSSM Score	Threshold
47019085 ~ 47019036				
47019035 ~ 47018986				
47018985 ~ 47018936				
47018935 ~ 47018886				
47018885 ~ 47018836				
47018835 ~ 47018786				
47018785 ~ 47018736				
47018735 ~ 47018686				
47018685 ~ 47018636				
47018635 ~ 47018586				
47018585 ~ 47018536				
47018535 ~ 47018486				

File Name: NM_001002239_5000[47023276-47023862]_1_aln.fasta.result (224,797 lines.) Location to TSS

LIMIT 50

PSSM	TF	Location to TSS	Str	MA Score	PSSM Score	Threshold
M00193	NF-1	211 ~ 228	+1	9.30	-9.64	18.95
M00991	CDX	210 ~ 227	+1	9.04	-9.62	18.67
M00531	NERF1a	214 ~ 231	+1	8.89	-9.92	18.82
M01023	HSF1	212 ~ 228	+1	8.73	-9.68	18.42
M00528	PPAR	210 ~ 226	+1	8.69	-9.03	17.73
M00528	PPAR	211 ~ 227	+1	8.69	-9.90	18.60
M00526	GCNF	217 ~ 234	+1	8.63	-8.07	16.71

遺伝子制御関係推定アルゴリズムの開発



Red nodes, 0-2 hours (Time1)

Orange nodes, 2-4 hours (Time2)

Green nodes, 4-8 hours (Time3)

Blue nodes, 8-24 hours (Time4)

Time1、Time2、Time3の遺伝子から、Time4の遺伝子へ、多くのリンクが出ている。



Garuda Alliance

www.garuda-alliance.org

国際的な研究用ソフトウェアの共通基盤

The screenshot shows the Garuda Alliance website interface. At the top left is the Garuda logo with the tagline "THE WAY BIOLOGY CONNECTS". Below it is a navigation menu with items: Home, Overview, Garuda Alliance Members, Garuda Resources, User Stories, News/Topics, Events, and Developer Center. A search bar is located in the top right corner. Below the navigation menu is a large banner titled "About Garuda Alliance" with a "More" button. To the right of the banner are login buttons for "Garuda Alliance Member Center Log in" and "Garuda Developer Center Log in", along with a "Create an account" link. Below these is a green button that says "Developers Center will open in 2012" with an upward arrow. The "User Stories" section features two flowcharts. The first flowchart, titled "User Stories", shows a process starting with "Annotated data sets" leading to "Define the scope of deep curation", then "Deep curation using CellDesigner", "Fulfilled annotated pathways", and "Parameter optimization using genetic algorithms". The second flowchart shows a cycle involving "Merge molecular interaction maps", "Update molecular interaction maps based on community feedback", "Associate pathway components in CellDesigner and other schemas", "Register pathways Payer-OSDD community platform", "Pathway analysis", and "Use link mining tools for biological literature and databases". The "News/Topics" section on the right lists "Topics Introducing Garuda" dated 7 November, 2011, and "News New Garuda-Alliance.org site open for preview!" dated 29 September, 2011.

Garuda Alliance (snapshot May 2013)





MOU Number 225-12-8000

MEMORANDUM OF UNDERSTANDING
BETWEEN
U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
THE FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
Center for Drug Evaluation and Research
Office of Clinical Pharmacology
And
The Systems Biology Institute

I. Purpose

The United States Food and Drug Administration (FDA) and the Systems Biology Institute (SBI) share interests in promoting scientific progress through knowledge exchange of scientific capital in pharmacology and translational research. This Memorandum of Understanding (MOU) establishes the terms for collaboration to promote these shared interests, which can be pursued through a variety of programs including collaborative education and research.



Systems Pharmacology for the Prediction of Tyrosine Kinase Inhibitor non-QT Cardiotoxicity



SBI to provide software platform and computational systems biology expertise

Interlinked with tranSMART Data repository system (originally from Johnson & Johnson)

Industrial participants: Merck, Pfizer, AstraZeneca, Novartis, Amgen,



Garuda DashBoard

Garuda Dashboard

Search for a gadget

Category

All(30)

- A Starter Kit
- Analytics
- Annotation
- CellDesigner Plugin
- Database
- Feedback
- Help
- Installers
- Kinetic modeling
- Modeling
- Pathways
- Simulation
- Store
- Visualization

Gadgets Gateway Garuda Trace

About Garuda Getting Started NETWORK CONTROL Cytoscape Installation GARUDA TRACE Feedback PAVS GENES PANTHER Xm iP2

Gadget Details

Name
About Garuda

Category
Help
A Starter Kit

Provider
SBI, Tokyo

Description
Why, How and What is Garuda? A peek into the platform and the journey so far.

Preview

What is Garuda?

Finder File Edit View Go Window Help

Garuda Dashboard

Category

All(31)
A Starter Kit
Analytics
CellDesigner Plugin
Database
Garuda Gateway
Help
Model Building
Modeling
Pathways
Simulation
Takeda
Visualization
Web Search

Search for a gadget

Gadget Details

Name
About Garuda
Category
Help

Provider
SBI
Description
What is Garuda? This is learning tool about Garuda.

Preview

What is Garuda?

Garuda
THE WAY BIOLOGY CONNECTS

ip2

Welcome to Garuda

開発したプログラムのGaruda統合

The image displays the Garuda software interface, which is a comprehensive platform for biological data analysis. The main window is titled "NANDI FILE GATEWAY" and features a search bar and a "What do you want to do?" section with options like "Load Your Data" and "Load Sample Files". A table of "File Contents" is visible, listing various data files with their respective sizes and paths.

Below the main window, there are several smaller windows and panels:

- AGCT --- A Geometric Clustering Tool:** This window shows the "Normalization" and "Processing Parameters" tabs. It includes a "Data" section with various icons and a "Scenario" dropdown. The "Clustering" tab is active, showing a 3D visualization of a gene network with nodes and edges. The axes are labeled X-axis: 0, Y-axis: 1, and Z-axis: 2. A "Gene to find" field is also present.
- Filters:** A panel on the left of the AGCT window lists various filtering options:
 - and/or
 - list1, list2, list3, list4
 - range of magnitude: magnitude(2.48,52.60)
 - range of copy per cell: copy per cell(1.00,8.48)
 - elimSurc: No series of copy per cell under 1
- AGCT --- [Clustering]Gene Profile Visualization Frame:** This window shows a grid of "Time-ExpressionLevel Plot" for various clusters. The clusters are labeled as C#0 (KM), C#1 (KM), C#2 (KM), C#3 (KM), C#4 (KM), C#5 (KM), C#6 (KM), C#7 (KM), C#8 (KM), C#9 (KM), C#10 (KM), C#11 (KM), C#12 (KM), C#13 (KM), C#14 (KM), C#15 (KM), C#16 (KM), C#17 (KM), C#18 (KM), C#19 (KM), C#20 (KM), C#21 (KM), C#22 (KM), C#23 (KM), C#24 (KM), C#25 (KM), C#26 (KM), C#27 (KM), C#28 (KM), C#29 (KM), C#30 (KM), C#31 (KM), C#32 (KM), C#33 (KM), C#34 (KM), C#35 (KM), C#36 (KM), C#37 (KM), C#38 (KM), C#39 (KM), C#40 (KM), C#41 (KM), C#42 (KM), C#43 (KM), C#44 (KM), C#45 (KM), C#46 (KM), C#47 (KM), C#48 (KM), C#49 (KM), C#50 (KM), C#51 (KM), C#52 (KM), C#53 (KM), C#54 (KM), C#55 (KM), C#56 (KM), C#57 (KM), C#58 (KM), C#59 (KM), C#60 (KM), C#61 (KM), C#62 (KM), C#63 (KM), C#64 (KM), C#65 (KM), C#66 (KM), C#67 (KM), C#68 (KM), C#69 (KM), C#70 (KM), C#71 (KM), C#72 (KM), C#73 (KM), C#74 (KM), C#75 (KM), C#76 (KM), C#77 (KM), C#78 (KM), C#79 (KM), C#80 (KM), C#81 (KM), C#82 (KM), C#83 (KM), C#84 (KM), C#85 (KM), C#86 (KM), C#87 (KM), C#88 (KM), C#89 (KM), C#90 (KM), C#91 (KM), C#92 (KM), C#93 (KM), C#94 (KM), C#95 (KM), C#96 (KM), C#97 (KM), C#98 (KM), C#99 (KM).

小括

- 新型反復暴露解析: 過渡反応と基線反応の関係を明らかにする。
 - 毒性学的に新規性が高い所見、エピジェネティクス等の機序の関与が示唆される。
 - 反復毒性の分子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露データからの予測に重要。
- 胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析:
 - 微分解析手法が有効である。
 - 発生毒性の標的分子群の新たな選定法が示唆された。
- Percellome 3次元データ等の為の専用解析ソフトウェアの開発研究
 - 異種動物データ統合技術 / 非Percellomeデータの絶対量推定技術 / RSort改 / WebAPI改良
- システムトキシコロジー解析基盤の研究開発:
 - 状態制御遺伝子群推定アルゴリズムAGCT
 - オルソログ制御領域分析ソフトウェアSHOE
 - 遺伝子制御関係推定アルゴリズム
 - Web公開 / Garuda Platform実装

まとめ と メッセージ

[一般的に一つの化学物質は6つ以上の標的を持つ]

- 時間経過の情報を含めた、遺伝子発現ネットワークの網羅的な描出の準備が整いつつある
 - To Describe biological effect of the chemical by the combination of dynamic network
- TGPのrat data と Percellome Project の mouse dataの統合が進んでいる
 - Join rat data base to mouse data base by PercellomeExplorere program
- Percellomeデータを、その解析ソフトウェアと共にGarudaシステム上に公開する準備を進めている。
 - Accelerate/ Synergize analysis speed by world wide users

実用化へ

- Web上へのデータと解析ツールの公開
 - Garuda Alliance への展開
- 多数の化学物質の、迅速かつ安価な評価システム
 - 化審法: カテゴリー評価
 - 既存点検
 - 化審法
 - その他: 職業暴露・家庭暴露
- 創薬支援
 - 非臨床試験の高精度化(網羅性・メカニズム)、迅速化、経費節減

化審法・新規化学物質・既存点検

- 化審法：ハザード評価からリスク評価へ
 - 暴露評価の導入
 - 「類似」した物質の暴露量を集計しなくてよいのか！

化審法・新規化学物質・既存点検

- 化審法：ハザード評価からリスク評価へ
 - 暴露評価の導入
 - 「類似」した物質の暴露量を集計しなくてよいのか！
 - 集計することとなった前例＝ダイオキシン類
 - Dioxin
 - Dibenzofurane
 - Coplanar PCB
 - AhRを介した作用 TEFs (Toxic equivalency factors)
 - 2,3,7,8-TCDDを最強の1とし、他を0.1などと計算

化審法・新規化学物質・既存点検

- 化審法：ハザード評価からリスク評価へ
 - 暴露評価の導入
 - 「類似」した物質の暴露量を集計しなくてよいのか！
 - カテゴリー評価
 - 「類似」は、何について？

化審法・新規化学物質・既存点検等の カテゴリー評価に対する Percellomeトキシコゲノミクスの親和性

- 化審法: ハザード評価からリスク評価へ
 - カテゴリー評価・「類似」性
 - これらのPercellome data解析による網羅的な(見落としの無い)評価
- 既存点検
 - 単回暴露から複数回暴露の短期・小規模Percellome試験による、急性毒性及び慢性毒性の迅速予測(カテゴリー化)
- 安く、迅速、精密(網羅性担保)

現状と今後の予定

似た動的ネットワークを持つ化学物質の選択



似ていない動的ネットワークを持つ化学物質の選択



動的ネットワークのカタログ作成



単回暴露と反復暴露の関係の動的ネットワーク記述
動的ネットワークの重ね合わせによる網羅的な(見落としのない)毒性同定



少数の動物の短期実験による迅速な網羅的・包括的な毒性予測
複合毒性予測(カテゴリー評価を含む)

Percellome 法開発 (2001~)

Jun Kanno, MD, PhD
 Katsuhide Igarashi, PhD
 Ken-ichi Aisaki, MD, PhD
 Atsushi Ono, PhD
 Tomoko Ando, Ms
 Noriko Moriyama, Ms
 Yuko Kondo, Ms
 Yuko Nakamura, Ms
 Maki Abe, Ms



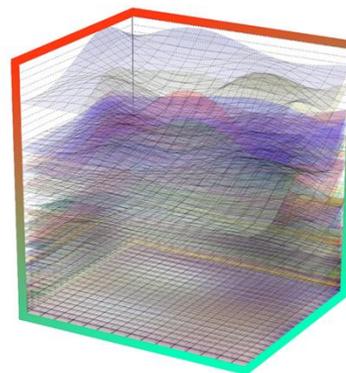
Percellome Projects (2003~)

国立衛研・毒性部内

Jun Kanno, MD, PhD
 Ken-ichi Aisaki, MD, PhD
 Katsuhide Igarashi, PhD
 Noriyuki Nakatsu, PhD
 Yukio Kodama, DVM
 Tomoko Ando, Ms
 Noriko Moriyama, Ms
 Yuko Kondo, Ms
 Yuko Nakamura, Ms
 Maki Abe, Ms
 Kenta Yoshiki, Mr
 Nae Matsuda, DVM
 Chiyuri Aoyagi, Ms
 Koichi Morita, Mr
 Ayako Imai, Ms
 Shinobu Watanabe, Ms
 Masaki Tsuji, Mr
 Yusuke Furukawa, Mr
 Maki Otsuka, Ms
 Hisako Aihara, Ms
 Minobu Hojo, Ms
 Rie Katagiri, Ms
 Kiyoshi Sekita, DVM
 Yukio Ogawa, DVM (Inhalation)
 Satoshi Kitajima DVM, PhD (Fetus)
 Kentaro Tanemura DVM, PhD
 Atsuya Takagi, DVM, PhD
 Yuhji Taquahashi, DVM, PhD

国立衛研/基盤研 TG Project 立ち上げグループ (~summer 2002) (with 17 Pharm)

Akihiko Hirose	Risk Assess/ BSRC/ NIHS
Takayoshi Suzuki	Mutagen/ BSRC/ NIHS
Makoto Shibutani	Path/ BSRC/ NIHS
Katsuhide Igarashi	Tox/BSRC/NIHS
Atsushi Ono	Tox/BSRC/NIHS
Ken-ichi Aisaki	Tox/BSRC/NIHS
Jun Kanno	Tox/BSRC/NIHS



Systems Biology

Dr. Hiroaki Kitano, SBI
 Dr. Natalia Polouliakh, SBI
 Dr. Samik Ghosh, SBI

Grants

Ministry of Health, Labor, and
 Welfare (MHLW) Grant-in-Aid, &
 others

Millefeuille Softwares

Ken-ichi Aisaki, MD, PhD

IT collaboration

NTT COMWARE,
 NTT Data
 with Teradata, NCR
 (Shinya Matsumoto,
 Bun-ichi Tajima)