

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18310025
 研究課題名（和文） マウス ES 細胞を用いた次世代影響予測システムの開発研究
 研究課題名（英文） Development study of the prediction system using mouse ES cells to detect next generation influences

研究代表者
 曾根（福田） 秀子（SONE(FUKUDA) HIDEKO）
 独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員
 研究者番号：60280715

研究成果の概要：マウス胚性幹細胞の多機能性を利用して、化学物質曝露による細胞の形態変化とその時の遺伝子発現量を計測し、遺伝子発現ネットワーク情報と曝露影響情報との関連付けを数理工学的に解析し、化学物質の曝露量や時間変化による分子間ネットワークの特徴づけを試みる。そして、化学物質ごとの遺伝子ネットワークのプロファイリングを作成し、毒性反応メカニズムの解明、化学物質の毒性予測及びリスク評価のための基盤資料とする。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

研究分野：総合領域・複合新領域

科研費の分科・細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：影響評価手法、健康影響評価、次世代環境影響評価

1. 研究開始当初の背景

化学物質をはじめとする環境因子への曝露がヒトを含む生物の健康に及ぼす影響について様々な研究がなされてきた。従来の実験動物を用いた最小影響量を求める手法では、ヒトの健康リスクへの外挿への利用には限界がある。個体・臓器・細胞レベルにおける影響についての断片的なデータから、生命現象のネットワークに基づいて、作用とその影響を予測するアルゴリズムを確立し、システム化する試みは、環境汚染物質の基準値を算定する上でも必須であり、これからの課題である。化学物質の生体影響をバイオインフ

オマティクスという情報科学で予測することは、動物実験の規模を縮小し、ヒトへの外挿過程における不確定要因の排除を可能とすると考えられる。影響を予測するためのアルゴリズムに、ベイジアンネットワーク理論が有用であるとの議論がなされている。

Leeら(2002)は、酵母における転写制御ネットワークの推定に関する研究や、マスター分子となる転写因子を基点としたネットワーク構造を構築した。Gardnerら(2003)は、発現パターンを最もよく説明できる最適な線型モデルを見つけ出すアルゴリズムを開発し、大腸菌のSOSシステムにおける9遺

伝子からなるネットワークの推定を行った。また、Pipelら(2001)や、Segalら(2003)は、マイクロアレイによる遺伝子の発現データを制御因子下にあるモジュール遺伝子群の既存モチーフ解析からサブネットワークを推定した。このように、海外では、生物事象のメカニズム解明に力点をおいてベジアンアルゴリズムを用いているようである。本提案のような化学物質の生体健康影響という政策的視点から、化学物質ごとのプロファイルリングを行い、予測システムに利用する研究は、本提案が初めてである。

2. 研究の目的

マウス胚性幹細胞(ES細胞)の多機能性を利用して、化学物質曝露による細胞の形態変化と遺伝子などの分子変化との関連付けを数理工学的に解析し、化学物質の曝露量や時間変化による分子間ネットワークの特徴付けを試みる。それにより、毒性反応メカニズムの解明、化学物質の毒性予測、リスク評価への応用に結びつける。

3. 研究の方法

(1) ES細胞から神経系への分化

GFP発現ベクターにCAGプロモーターを繋いで作製したGreen mouse FM131 mouse由来のマウス胚性幹細胞株(mES細胞, embryonic stem cells)であるB6G-2(理研)を、24穴プレート(Falcon)へ播種し、翌日からLIF非存在下、胚葉体用培地に交換し、分化を開始した(Day 0)。培養2日目と4日目にコントロール(0.1%EtOH)もしくは、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} nMのレチノイン酸(以下RA, all-trans-Retinoic acid, SIGMA)を添加した。分化開始から8日目に胚葉体を、再び神経細胞を特異的に誘導する基底膜上に播種しニューロスフィアから成熟神経細胞の誘導を行うため、Day 29まで培養した。形態情報と遺伝情報解析のサンプリングは、Day2、Day8、およびDay29で行った。

免疫染色は、プレート上に固定した神経細胞に特異的な抗原に対する抗体を反応させてその局在を証明する免疫細胞化学の手法の一つである蛍光抗体法を行った。一次抗体は、発生初期、後期の脳神経マーカーであるMAP2(Sigma)及び、グリア細胞マーカーであるGFAP(CHEMICON International)を使用した。2次抗体としてAlexa Fluor 568で標識されたanti-mouse IgG抗体(Invitrogen)を使用した。核染色には、 $2\mu\text{g/ml}$ のHoechst 33342 solution(Dojindo)を用いた。蛍光画像は、マルチチャンネル画像解析装置(IN Cell Analyzer 1000、GEヘルスケア)で解析を行った。

(2) ES細胞から血管内皮への分化

同様に、B6G2を用いた。最初に、血管内皮細胞分化を評価するために適切な条件を決定するための試験を行った。

条件1: ES細胞を接着させたまま血管内皮増殖因子(VEGF)を含むIMDM培地(血管分化培地)にて培養する方法、条件2: ES細胞を血管分化培地に浮遊して静置する方法、条件3: ES細胞を血管分化培地に浮遊して振揺する方法を試した。その結果、条件3が胚様体形成に最も適当であった。次に、胚様体から血管を出芽させるために適切な条件を検討した。条件1としてI型コラーゲンコート上にて5日間培養する方法、条件2としてI型コラーゲンコート上にて2日間培養した後、I型コラーゲンゲルを重層する方法、条件3として0.1%ゼラチン上にて5日間培養する方法を試した。その結果、血管の出芽率、観察の容易さなどから、条件3を用いることとした。この条件3の下、ES細胞をDMSO(溶媒)、ビスフェノールA(BPA: 10^{-7} - 10^{-5} M)、あるいはカルバリル(CAB: 10^{-7} - 10^{-5} M)を含む血管分化培地に浮遊して、2週間培養し胚様体を形成した。胚様体は、0.1%ゼラチンでコーティングした24穴培養プレートに移し5日間培養し、4%PFA固定後、血管内皮細胞マーカーPECAM-1に対する免疫染色を施し、蛍光実体顕微鏡下で観察、画像取得を行った。得られた画像は、画像解析ソフトWinRoofを用いて管腔の太さを計測した。

ポリ臭化ジフェニルエーテル47(BDE47)の試験でも、上記と同様に培養したマウスES細胞B6G2を用いた。胚様体形成は市販のマイクロスフィアアレイ(ウェル径 $600\mu\text{m}$)を用いて、DMSO、BDE 47(0.005、0.05、0.5、5、50 ng/ml)を含むDMEM培地中で行った。11日間の胚様体形成の後、0.1%ゼラチンでコーティングした24well培養プレートに移し10日間培養し、4%PFA固定後、血管内皮細胞マーカーvWFに対する免疫染色を施し、マルチチャンネル画像解析装置と蛍光実体顕微鏡を用いて画像取得および解析を行った。

(3) 遺伝子発現データの取得

培養細胞はPBSで洗浄後、QIAGEN, RNeasy mini kitを用いてRNAを抽出した。抽出したRNAはIllumina Beads array(MouseWG-6 Expression Beadchips)にて遺伝子発現データを取得した。これら遺伝子発現データは、遺伝子発現解析ソフトウェアGeneSpring GX10(Agilent Technologies)にて正規化、及びクラスターリング解析を行った。

(4) ベジアンアルゴリズムによる遺伝子間相互作用の構築

遺伝子ネットワーク解析には独自に作成したソフトウェアであるmpCEH(multiple profiles of cellular effects on Health)を

用いた。この mpCEH は、豊柴及び中山らによって報告された TAO Gen (Theoretical Algorithm for Optimal Gene interaction networks) を基にしたアルゴリズムをより最適化したものである。この TAOGEN は、特に遺伝子発現の変化のような連続して起こる事象において有効な予測が可能である。ベイジアンネットワーク (マルコフ連鎖モンテカルロシミュレーション) において予測される確率は2つの遺伝子間のみ成立する。2つの遺伝子間の相互関係はそれぞれの遺伝子発現データから β 値 (確率値) を算出することで導いた。 β 値と確率頻度をグラフに示した場合、グラフ下面積がプラス側に偏っている場合、その2つの遺伝子は促進関係にあり、逆にマイナス側に偏った場合は抑制関係にあるとした。選定した遺伝子セットの遺伝子全てのペアにおいて、上記の計算を繰り返すことで最終的なネットワークを描いた。時系列変化や用量の変化のデータを解析セットとして、化学物質ごとのプロファイリングを行った。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞の神経系及び血管系への分化と細胞形態変化のイメージング

EB、MAP2陽性細胞、GFAP陽性細胞の面積について数値化し、解析を行った。その結果、Day29ではDay8と比較するとEBの面積が小さくなっていることが分かった(図1)。29日目のEBは、神経塊となっており全体がMAP2陽性である。MAP2陽性細胞、GFAP陽性細胞の面積に関しては、Day29でRA濃度依存的に増加した。このことは、神経系への分化が進んでいることを示唆している。

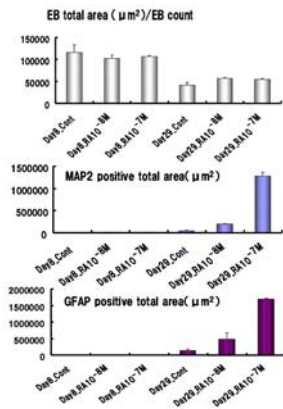


図1. レチノイン酸の神経分化への影響:細胞形態の数値データ

血管内皮細胞系への分化については、BPA、CAB、BDE47について解析を行った(図2)。BPA添加群では、管腔の太さに明らかな差はみられなかった。しかしどの濃度においても、形成された管腔は、DMSO添加群に比べて疎なネットワークと、胚様体の外周に沿うような形

態を示し、BPAが血管のネットワーク形成に影響を及ぼしていることが示唆された。CAB添加群では、管腔の太さが濃度依存的に細くなっていた。また、DMSO添加群に比べて疎なネットワークが観察され、CABが血管の形成過程を攪乱していることが示された。

BDE47添加群では、InCell Analyzerによる解析の結果、血管の占める面積が濃度依存的に減少し、逆に神経の占める面積が濃度依存的に増加していることが解った。また、血管の長さも濃度依存的に減少しているのに対し、神経の長さや分岐の数が濃度依存的に増加していた。血管の面積の減少は特に顕著で、5 ng/ml及び50 ng/mlの添加群ではほとんど検出されなかった。蛍光実体顕微鏡での観察においても、5 ng/ml及び50 ng/mlでは、血管の形成がみとめられなかった。(図2)

以上から、マウス ES 細胞から血管内皮細胞の分化系において、化学物質が及ぼす影響を、形態を基に評価できる可能性が示された。

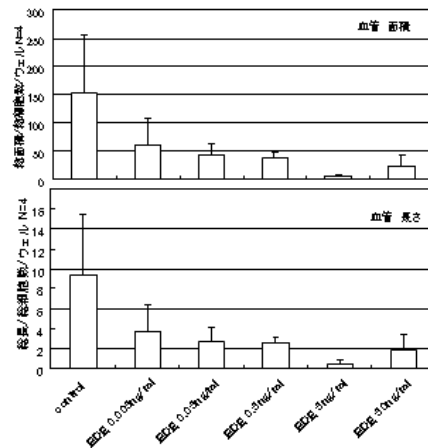


図2. BDE-47による血管内皮細胞分化への影響:細胞形態の数値データ

(2) ベイジアンアルゴリズムによる遺伝子間相互作用の構築

はじめに、遺伝子セットの違いによる遺伝子ネットワーク構造の変化について検討した。ES細胞から神経系分化過程での遺伝子発現の変化がTAO-Genを用いたネットワークによってどのように表されるか、実際に解析を行った。まず、ES細胞から神経系への分化を分かりやすく見るために文献を基に①ES細胞に特異的な多能性維持に関与する遺伝子群(Nanog, Pou5f1, Zfp42)、②神経系分化に関与する遺伝子群(Fgfr1, Olig2, Sox2)、③成熟神経細胞に特異的に発現する遺伝子群(Gfap, Map2, Nestin, Tuj1)に加え、④今回神経系への分化誘導に用いたRAに対する核内レセプター遺伝子群(RARa, RARb, RARg)を加え、文献ベースの遺伝子セットとした。

この文献ベースの遺伝子リストを用いて、始めに TAO-Gen が導き出す遺伝子ネットワークが生物学的な根拠と一致し得るかどうかを検討した。Day0, 2 では ES 細胞の多能性維持として働く遺伝子 SOX2, Nanog が様々な遺伝子を調節しているネットワークになっている。Day8 になると Nanog, Pou5f1 (Oct3/4) が中心的なネットワークとなり、RA 添加群では RAR 群が他の遺伝子を調節することが多く見られ RA 添加影響がネットワークに現れているものと考えられた。Day29 では神経分化マーカー遺伝子は常に活性化調節を受け、RA 添加しているものでは GFAP が中心的に作用しているネットワークとなっており、神経系への分化で増加した分化マーカー遺伝子がさらに他の遺伝子に作用するようになる。つまり、神経系への分化がかなり進んだ状態であることが反映されている。

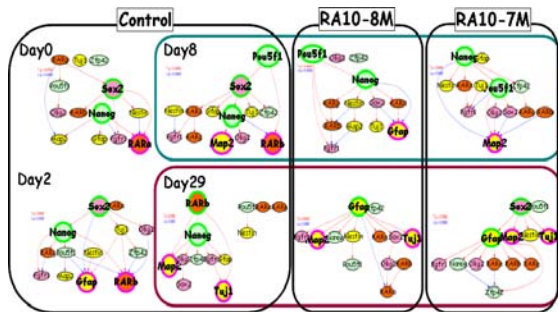


図4. 文献ベース遺伝子リストでのネットワーク

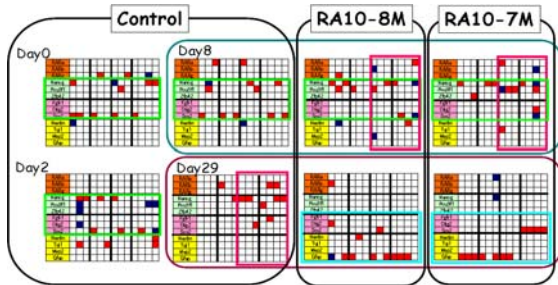


図5. ネットワークのマトリックス展開

遺伝子ネットワークは遺伝子同士の関係を見るためには有効であるが、その後の類型化を考慮すると、ネットワークを直感的に識別できるようなものにする必要がある。そこで、これらのネットワークをマトリックスに展開する処理を行った。その結果、ネットワークでは矢印により示されていた遺伝子同士の関係は、マトリックス上では赤 (正の関係) または青 (負の関係) のボックスで示し、Day0 から Day8 にかけてネットワークのパスは多能性関連遺伝子、神経分化関連遺伝子を親ノードとする部分に集中した (緑枠)。RA を添加すると神経系分化関連遺伝子、神経分化マーカー遺伝子を調節する方向のパスが増えた (赤枠)。Day29 コントロールでは Day8 の赤枠

部分に集中するようになり、RA 添加により神経系分化関連遺伝子が親ノードとなる領域にパスが収束した (青枠)。これらの結果から遺伝子発現データを用いて、mpCEC システム基に行った遺伝子ネットワーク解析が ES 細胞から神経系の分化への分化を正確に反映することが可能であることが示唆された。さらに、遺伝子発現パターンの変化から遺伝子セットを選択し、4つのカテゴリー (MAPK 関連遺伝子群: Map2k1, Mapk1, Mapk3, Pla2y6, Rps6ka1, She1、転写因子関連遺伝子群: Atbf1, Cdy1, Rhog, Rif1, Sall1, Smarcd1、神経分化関連遺伝子群: Fos, Gbx2, Hras1, Raf1, Sox2、神経分化マーカー遺伝子群: Gfap, Map2, Nestin, Tuji1) に分類し、遺伝子ネットワーク解析を行った (図6)。Day0, Day2, Day8 コントロールまでは全体にパスが散らばっているが、Day8, RA 添加では転写因子、神経分化関連遺伝子群が親ノードとなる部分 (緑枠)、神経分化関連遺伝子およびマーカー遺伝子が子ノードとなる部分 (赤枠) にパスが集まった。更に Day29 になると RA 添加群では赤枠で囲んだ部分から青枠で囲まれた神経分化関連遺伝子およびマーカー遺伝子が親ノードになる部分へと移行していく。この変化は文献ベースでの遺伝子リストで行った解析と同様の傾向であることから、遺伝子発現パターンから機械的に抽出した遺伝子リストにおいても神経への各分化段階を反映した遺伝子ネットワークを描くことが出来た。

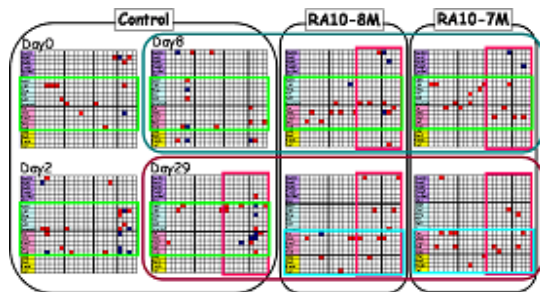


図6. 発現パターンから選別した遺伝子セットによるネットワークマトリックス展開

さらに、Day2, Day8 及び Day29 の分化段階ごとの時系列変化のネットワークを同じ遺伝子セットで解析したところ、各カテゴリーの遺伝子が全て神経分化に関与した遺伝子にパスが伸びており、Day0 から Day29 までの各段階の要素が1つにまとめられた結果となった (図7)。その中でもコントロールでは神経系分化関連遺伝子群、神経分化マーカー遺伝子にパスが集中しているのに対し、RA 添加したものは更に集約されてほとんどのパスが神経分化マーカーに集まっている。分化マーカー遺伝子の発現は神経分化の最終段階

でもあり、RAを添加した群はより神経系への分化が誘導されていると考えられる。この結果からもRA添加により神経系への分化が強く誘導されていることが示された。各経時段階でのマトリックスと時系列をまとめたマトリックスを組み合わせるにより、より正確な分化評価が可能になると考えられた。

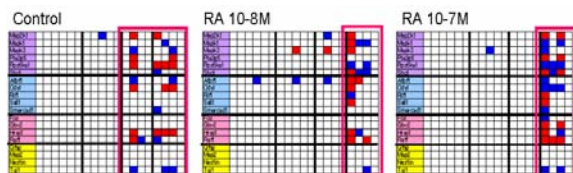


図7. 時系列変化 (Day2→Day8→Day29) を反映させたネットワークのマトリックス展開

(3) 考察及び今後の展望

今回の研究期間内では、予測システムを構築するまでには、至らなかったが、図8に示したように、4種の異なる化学物質のネットワークが構築できた。これは、図6のDay8に相当するが、RAとは異なるネットワークでこれらの化学物質は、神経分化にはあまり影響がないことが予測される。今後、このようなデータを蓄積して化学物質のプロファイリングに関する整備が完成できれば、生命現象のネットワークに基づいた作用とその影響を予測しうるシステムが構築できる。

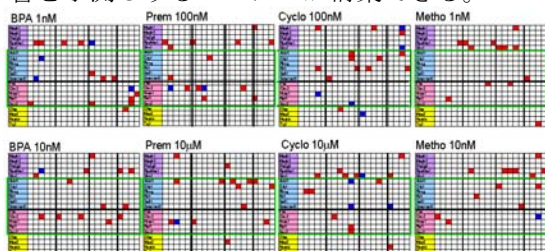


図8. 化学物質のネットワーク解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Toyoshiba H, Sone H, Yamanaka T, Parham FM, Irwin RD, Boorman GA, Portier CJ: Gene interaction network analysis suggests differences between high and low doses of acetaminophen. *Toxicol Appl Pharmacol.* Sep 15;215(3):306-16 (2006). (査読あり)
- ② Tanaka J, Yonemoto J, Zaha H, Kiyama R and Sone H: Estrogen-responsive genes newly found to be modified by TCDD exposure in human cell lines and mouse systems. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 30;272(1-2):38-49 (2007). (査読あり)
- ③ Portier CJ, Toyoshiba H, Sone H, Parham F, Irwin RD, Boorman GA. Comparative analysis of gene networks at

multiple doses and time points in livers of rats exposed to acetaminophen. *ALTEX.* ;23 Suppl:380-4 (2006). (査読あり)

- ④ Kakeyama M, Sone H, Tohyama C. Perinatal exposure of female rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces central precocious puberty in the offspring. *J Endocrinol.* May;197(2):351-8 (2008). (査読あり)

- ⑤ 曾根秀子、米元純三: 環境化学物質の子どもへの健康影響を探る-男児生殖器異常症のインフォマティクスを用いた疾患感受性遺伝子の探索、一塩基多型SNPを指標として、*バイオフィリア* 4(2):25-29. (2008) (査読なし)

〔学会発表〕(計16件)

- ① 曾根秀子、豊柴博義: 遺伝子ネットワーク推定を利用した環境化学物質及び薬剤の類型化手法の開発に関する研究、第65回日本癌学会学術総会、横浜(2006).
- ② 曾根秀子、座波ひろ子、黄倉雅広、米元純三: 発がんに関わる内分泌かく乱化学物質の影響予測システム構築に関する研究、環境ホルモン学会第9回研究発表会、東京(2006).
- ③ 永野麗子、小池上 繁、今西 哲、座波ひろこ、米元純三、曾根秀子。レチノイン酸によるマウスES細胞の分化・増殖への影響に関する研究 環境ホルモン学会第10回研究発表会 12, 埼玉(2007).
- ④ Koikegami S and Sone H. Bayesian Network Analysis on Cell Morphology. 日本バイオインフォマティクス学会 12, 東京(2007).
- ⑤ Sone H: A Framework for the Development of a Prediction System for Determining the Effects of Exposure to Environmental Chemicals on Children's Health. *International Science Forum on Computational Toxicology.* May, (2007).
- ⑥ Ohsako S, Nishikawa D, Ogi S, Hamada K, Sone H. A Microarray-Oriented Dioxin-Response Gene Database (DRGdb) Built in the National Institute for Environmental Studies, Japan. *International Science Forum on Computational Toxicology, North Carolina, USA* (2007)
- ⑦ Nagano R, Shigeru K, Imanishi S, Ohsako S, Zaha H, Ohkura M, Yonemoto J, and Sone H. Cellular image profiling of neural differentiation pattern of mouse embryonic stem cells with morphological information. 第41回日本発生生物学会、徳島(2008)
- ⑧ 赤沼宏美、永野麗子、小池上繁、今西哲

、豊柴博義、黄倉雅広、曾根秀子。ES細胞から神経系の分化過程における遺伝子ネットワーク解析。第11回日本内分泌攪乱化学物質学会，東京（2008）。

⑨ 永野麗子、小池上 繁、今西 哲、赤沼宏美、宮崎 航、大迫誠一郎、黄倉雅広、曾根秀子。マウスES細胞を用いたマルチプロファイリング技術による化学物質の影響評価の開発。第11回日本内分泌攪乱化学物質学会 東京（2008）。

⑩ 今西哲・米元純三・曾根秀子。ヒト血管内皮細胞とマウスES細胞を用いたペルメトリンの血管毒性の評価 第11回日本内分泌攪乱化学物質学会東京（2008）。

⑪ 曾根秀子 黄倉雅広化学物質の毒性予測及びリスク評価手法確立のための基盤システムの構築 第4回日本バイオインフォマティクス学会：オントロジー研究会（2008）。

⑫ Sone H and Yonemoto J. A Genome Informatics and Epidemiological Study Identifies Alleles in Arnt2 associated with Risk of Hypospadias and Micropenis. 28th Int. Symp. Halogenat. Persistent Org. pollut.-Dioxin 2008, Birmingham (2008)。

⑬ Akanuma H, Nagano R, Imanishi S, Toyoshiba H, Sone H. Stage-Specific Gene profiling during neural differentiation of mouse embryonic stem cells. 48th Annual Meeting of Society of Toxicology. Baltimore (2008)。

〔図書〕（計3件）

① Sone H, Miyabara Y, Fukuda T, Okura M, Ohsako S, Yonemoto J. (2008) Does maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induce glutathione S-transferase-positive hepatic foci in adult rats?, In: Morita M. ed., Persistent organic Pollutants (POPS) Research in Asia, 257-261.

② Sone H, Imanishi S, Nagano R, Akanuma H, Fukuda T, Ohsako S. (2009) Gene Expression Signatures of Environmental Chemicals in Cancer and in Developmental Disorders. In “XIV Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International”, MEDIMOND SRL Publ., 245-251.

③ Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T and Sone H. (2009) High-Performance Gene Expression Module Analysis Tool and Its Application to Chemical Toxicity Data. In : Furuseki H. ed., Reverse chemical genetics, Humana Press Publ.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：胎生プログラミングに対する影響を評価するための方法

発明者：曾根秀子、永野麗子、大迫誠一郎、宮崎航、今西哲、赤沼宏美

権利者：国立環境研究所

種類：特願

番号：2009-081497

出願年月日：平成21年3月30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 秀子 (SONE HIDEKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員

研究者番号：60280715

(2) 研究分担者

永野 麗子 (NAGANO REIKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・NIES ポスドクフェロー

研究者番号：20455249

（従事期間：2008.4～2009.3）

今西 聡 (IMANISHI SATOSHI)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・NIES ポスドクフェロー

研究者番号：50462479

（従事期間：2007.4～2009.3）

座波 ひろ子 (ZAHA HIROKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・NIES アシスタントフェロー

研究者番号：10391111

（従事期間：2006.4～2008.3）

山崎 新 (YAMZAKI SHIN)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・研究員

研究者番号：80391168

（従事期間：2006.9～2007.3）

豊柴 博義 (TOYOSHIBA HIROYOSHI)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・NIES ポスドクフェロー

研究者番号：40315073

（従事期間：2006.4～2006.9）

(3) 連携研究者

赤沼 宏美 (AKANUMA HIROMI)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・NIES アシスタントフェロー

研究者番号：70534155

大迫 誠一郎 (OHSAKO SEIICHIROH)

東京大学大学院医学系研究科・疾患生命工学センター・准教授

研究者番号：00274837