

20010958

— 別添2 —

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

医薬品等の副作用又は医療用具の不具合情報の収集
及び活用に関する研究

2001年度厚生科学研究費

医薬安全総合研究事業

主任研究者 中野 達也

(国立医薬品食品衛生研究所)

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

医薬品等の副作用又は医療用具の不具合情報の収集及び活用に関する研究

主任研究者 中野 達也 国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部 主任研究官

研究要旨 医薬品に関する国外国内の厳選されたインターネット上のサイトを対象として、独自の検索エンジンによって、柔軟な使い方のできる有用情報提供システムを開発して公開利用実験を行なった。また、我が国で一般名が付けられた殆ど全ての医薬品に関して、構造式などの識別基本情報をデジタル化し、データベースとして、実験的にインターネットで公開した。さらに、代表的な薬物代謝酵素であるチトクロームP450 (CYP) に関する知識のデータベースを開発し、相互作用警告など副作用防止に役立てる可能性を検討した。さらに、医薬品と受容体タンパク質との結合の構造活性相関 (QSAR) についても検討した。

分担研究者：

中野 達也 国立医薬品食品衛生研究所 化学物質情報部 主任研究官

「統合情報計算基盤環境の構築」

山本 直樹 東京医科歯科大学医学部微生物学教室 教授

「臨床データの収集と解析」

杉山 雄一 東京大学薬学部製剤設計学教室 教授

「薬物動態データの収集」

佐藤 均 昭和大学薬学部臨床分子薬品学教室 教授

「薬物動態データのシステム化」

A. 研究目的

医薬品の副作用情報に関しては、有用適切な情報を速やかに収集し、医療従事者に迅速に提供することが最重要な課題である。報告者らは1994年以来、国立医薬品食品衛生研究所のインターネット接続環境を整備しながら、薬のガイド（一般向けの薬の説明書）、PharmWeb（ワールドワイドの薬のネットワーク）のミラーサイト、コクランセンターのシステムティックレビューの日本語版の掲載、その他の医薬品関連情報の提供を試みてきたが、先駆的な試みとして好評を博してきた。本研究では、こうした経験をベースとして、国外国内で公開されているインターネット上の厳選された関連情報サイトを探索し、それらで提供されている情報を、一般あるいは関係者だけに、提供するシステムを開発することを第一の目的とした。

この研究と並行して、医薬品の副作用や相互作用に関する分子構造に基づく解析（いわゆる構造活性相関、QSAR）や予測の基盤整備を指向した研究を進めることとした。そのために従来は印刷物にとどまっていた、わが国で一般名が付けられた殆ど全ての医薬品に関する名称と構造の基本情報をデジタル化し、これをさらにデータベースとして開発することにした。また、薬物の副作用や相互作用を分子レベルの知見から解析予測するために、代表的な薬物代謝酵素であるチトクローム

P450(CYP)と薬物との相互作用に関するデータ(知識)ベースを開発することとした。さらに、これらの薬物が標的とする生体内の受容体や、それらの薬物が標的に結合したことによる細胞応答の様子を分子レベルで追跡するコンピュータシステムを検討することとした。

B. 研究方法

検索エンジンの開発に関してはWeb上にある、(1)WHOのような国際機関や各国の政府や主要な学術研究機関が出している医薬品安全性情報、(2)主要学術文献や雑誌、(3)専門家が運営しているニュースグループやメーリングリストなど、国内外の信頼のおけるサイトを厳選し、これらのサイトが提供している情報を、検索エンジンを用いて自動的に収集するシステムを開発した。検索エンジンには、最初、UNIX上で動く商品ソフトウェアであるOpen Textをベースに、フリーウェアである収集ロボットWgetを組み合わせたシステムを用いたが、PDFファイルを対象にできないこと、収集サイトの数に上限があることなどの問題があることがわかったので、途中で、アドイン研究所の商品ソフトであるFlex Searchを改良したものに切り替えた。また高次かつ柔軟な検索機能をもたせるために、パスワードを必要とするサイトに自動的にパスワードを送ってコンテンツを収集する方法や、医学用語集であるMedDRA/Jを組み込んで、類縁語を辿った柔軟な検索方法を開発した。

医薬品の一般名と構造データベースの開発については、JAN (Japanese Accepted Names for Pharmaceuticals)のすべてを電子メディアとすることを目標として、一般名、構造式、化学名、分子式、分子量、CAS登録番号などの関連情報をデータ項目とし、これをマイクロソフト社のACCESSを用いてインハウスのデータベースを作成し、これをIIS (Internet Information Server)を用いてインターネットで公開した。

医薬品のADME(吸収、分布、代謝、排泄)に関する知見に関しては、チトクロームP450(CYP)の多様なサブファミリーについての知見を整理し、薬物間相互作用を解析予測するための参照データベースを開発した。次に反応速度論的な解析ができるより深いモデルを作成するためのパラメータを集めたデータベースを開発した。

構造活性相関解析(QSAR)の研究としては、核内受容体の一つであるエストロゲン受容体と医薬品を含む各種のリガンドとの結合性を新しく開発している分子計算手法(非経験的フラグメントMO法)で検討した。またマイクロアレイやSAGE(Serial Analysis of Gene Expression)によって得られる包括的遺伝子発現プロファイルから、シグナリングパスウェイに関する新知見を引き出すための新しいデータ解析法を確立し、その信頼性についての評価を実験によって行った。

C. 研究結果

本研究の第1の目的であるインターネット上に公開されている副作用を含む医薬品の有用サイトを対象とした情報収集と提供システムは、国立医薬品食品衛生研究所のwebサーバマシンで研究の初年度にあたる平成11年より実験的に公開(<http://www.nihs.go.jp/dig/searchengine.html>)利用に呈してきた。この実験システムは、逐次改良を重ねたが、その主なものは、収集サイトの見直し、検索エンジンの機能改善、検索用語としてMedDRA/Jなど専門用語の辞書を利用して柔軟性をもたせること、などである。この結果は所期の目標どおり、一応満足すべきものであった。ただ、パスワードを要求するサイトに対するパスワードの自動入力方式でアクセスしたサイトは、多くない。また、MedDRA/Jを用いた検索は、ライセンスの制約からインハウスでのみの試験的な使用にとどまっている。

我が国で承認された医薬品の一般名称(JAN)のデータベースは、本研究においてプロトタイプを開発したが、1996年以後に名称が付けられた医薬品をすべて電子化するためには、かなりの

労力を要する仕事であることがわかった。そのため、本研究の担当者（神沼、中野）は、国立医薬品食品衛生研究所有機化学部宮田直樹部長の全面的な協力を得て、第十四改正日本薬局方の日本名、英名、日本名別名、構造式、分子式、分子量、化学名、CAS 登録番号、および本品記載(基原、成分の含量規定、表示規定)のデータベース化と1996年以降の JAN の電子化の作業を平成12年から行い、本年度（平成13年度）で、この2つの目標を達成し、それぞれ試験的に（<http://molddb.nihs.go.jp/jp/>, <http://molddb.nihs.go.jp/jan/>）で公開している。

薬物代謝酵素 P450 による薬物相互作用の知識ベースの開発では、最初の目標とした P450 の多様な分子種と、それらを誘導する薬物、それらによって代謝を受ける薬物、その作用を阻害する薬物についてリレーショナル・データベースの形で整理し、平成11年度からウェブで公開している（<http://molddb.nihs.go.jp/p450/p450db.html>）。ここでは、臨床上重要な相互作用事例についても、P450 の分子種または医薬品名から検索可能とした。さらに、平成13年度からは、東京大学薬学部製剤設計学教室杉山雄一教授や昭和大学薬学部臨床分子薬品学教室佐藤均教授らが、研究に参加し、さらに深い酵素反応の速度論的なモデルを基礎とするパラメータを加えたデータベースのプロトタイプが開発され、現在国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部の web サーバ上で稼動している（<http://molddb.nihs.go.jp/cyp/>）。このデータベースについても公開の準備を進めている。

これらのデータベースは、本研究には含まれていないが、同じ国立医薬品食品衛生研究所化学物質情報部中田琴子室長らによって研究開発されている、受容体など薬物の標的となる生体分子や細胞信号伝達系に関するデータベース（<http://impact.nihs.go.jp/RDB.html>）とのリンクすることが試みられている。

構造活性解析に関しては、医薬品の標的となる受容体タンパク質の立体構造が既知の場合として、X線解析の構造が公表されているエストロゲン受容体（ α および β ）に関して、リガンドとの結合性について、産業技術総合研究所計算科学研究部門量子モデリング研究グループ北浦和夫グループ長と共同で開発した非経験的フラグメント MO 法による結合エネルギーと、実験から得られた結合能とを比較し、高い相関を得ている。これらの結果は計算手法とモデルの妥当性を示すものであり、同様な計算をレチノイン酸（ビタミン A）受容体などの核内受容体を標的とする薬剤の結合性評価について試みている。

遺伝子発現プロファイルからより有益な情報を引き出すために新しいデータ解析法については、これを EBERs 発現細胞・コントロール細胞に対する SAGE データに対して適用した。まず EBERs 発現細胞とコントロール細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、EBERs 発現細胞とコントロール細胞で発現が亢進していた遺伝子を上位から 50 ずつ抽出した。次にそれぞれの遺伝子のプロモーター配列をヒトゲノム配列データベースから抽出し、それぞれの配列にどのような転写因子結合モチーフが含まれているかを調べた。EBERs 発現細胞とコントロール細胞で現れる転写因子結合モチーフを整理したところ、EBERs 発現細胞では転写因子 Pax ファミリーと、それとは別の転写因子ファミリー（転写因子(A)とする）が特異的に活性化されていることが推察された。

D. 考察

本研究の第一の目標は、インターネット上に分散して存在している医薬品の副作用などの対策に有用な情報を収集、提供するシステムを開発することであった。ある視点からインターネット上の有用なサイトを選択して、そこで提供されている情報を検索できるようにするシステムは一般にポータル(サイト)と呼ばれる。本研究が進行している間にも、こうしたポータルへの関心は高まり、YahooやGoogleなどの多くの商業サイトが、市場を争うようになった。その中には特定の分野に絞った情報提供を始めているものもある。また、専門家が参加した各種の団体が情報提供を始めており、状況は本研究を企画した頃とはくらべものにならないほど進歩している。

しかし、われわれの開発したシステムはそれらでは代替され得ない。その理由は、対象となるサイトを選別するのに専門知識と経験が必要なことであり、また検索機能も用語や辞書を用いることで高次なものにしているからである。しかし、例えば米国のFDAのホームページからの情報提供に比べれば、今回開発したシステムは規模の点で著しく見劣りすることは否めない。また、インターネット上に存在している情報を自動的にかつ定期的に探索して、関係者に警告をメールで送るシステムは、まだ開発できていない。さらに、ポータルが成功するためには、使い続けられていく必要がある、それには、専門家が継続的に関わるサービスシステムが必要である。本研究はこうしたシステムの有効性と問題的を知る上で有用であったが、PDFファイルの扱いや、パスワードが必要とされるサイトにパスワードを自動的に送付して情報を収集する方法などの技術的な研究を含め、本格的なシステムの開発と運用は将来の課題である。

医薬品の一般名については、第十四改正日本局方 (JP14) と医薬品一般名称辞典 1996年版 (JAN1996) およびそれ以後に一般名が付けられた医薬品についてはほぼすべて収録したものが完成している。今後は、JANに掲載される医薬品の構造式及び化学名を JP14 のルールに従ったものに改訂していく必要がある。また更新をどうするかが大きな問題である。薬物代謝酵素に関しては CYP の知識ベースだけが開発されているが、他の酵素への拡張が課題である。また、現在採録されているデータは、各分子種ごとの誘導剤、基質、阻害剤、対処法や代替薬などであるが、今後は P450 を含め、代謝全体の系が把握できるようなパスウェイに関する記述モデルが必要である。

構造活性相関 (QSAR) については、フラグメント MO 法による精密なエネルギー計算を核内受容体を標的とする薬物に適用して一部成功したが、今後は同様なアプローチをより多くの場合に適用することが課題である。また、結合モードを解析するためには、現在のフラグメント MO 法に構造最適化機能を付加しなければならない。現在この手法の開発は、別の研究プロジェクトとして進められているので、それが完成すれば予測精度を改良することができるようになると期待されている。

現在までのところ、EBERs 発現細胞とコントロール細胞の遺伝子発現プロファイルに対し手作業で小規模に行った解析結果については良い感触を得ているので、次は今まで手作業で行っていた部分をプログラム化し、隠れマルコフモデルによるプロモーター領域抽出も含めて処理できるソフトウェアの開発を行う。このソフトウェアの信頼性を EBERs 発現細胞とコントロール細胞の遺伝子発現プロファイルとこれらの細胞を用いた実験によって評価し、さらに標的分子に対するアンチセンスオリゴ DNA やデオキシ DNA の有効性も評価する。その上でその他の癌や HIV 感染、自己免疫疾患等の難治性疾患にこの方法を適用していきたい。

E. 結論

1990年代の生物医学研究は、2つの大波に洗われた。最初の波は1994年頃から湧き上がったインターネット・ウェブ革命であり、第2の大波が2000年6月にピークに達したヒトゲノム解析計画の進展である。本研究の第1の目標は、インターネット上にある医薬品の副作用を含む有用情報を調査し、これに独自の情報コンテンツを加えた情報提供システムを構築することであったが、これはまさに第1の波によって生まれた課題であった。また、医薬品と標的との結合とそれが引き金になる生体反応の分子レベルでの精密な記述は、いわゆるゲノム創薬やポスト・ゲノム時代の医薬品研究の基盤であり、ゲノム革命の申し子である。この意味で、本研究の第2の課題は、ゲノム解析計画の進歩と軌を一にしている。ただ、ゲノム創薬や SNP s などポストゲノム研究には、大きな研究費が投じられている割には、本研究で取り上げた、医薬品基本情報の電子化や上市後の情報の活用、標的の同定や薬物が標的に結合した後の信号の流れ (Post Binding Signal Transition Pathway 解析) などに関しては、まだ関心が低く、残念ながら研究費も少ない。本研究の意義は、医薬品研究の歴史的な転換点において、昨日よりは明日の課題に焦点を合わせたことに

ある。その証拠には、本研究は、その途中で多くの協力者がでてきたことである。本件研究で残された課題は、こうした協力者の参加をえて、よりスケールを大きくして取り組むべきであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- K. Nakata, T. Takai-Igarashi and T. Kaminuma: Development of A Receptor Database: Application to the Endocrine Disruptor Problem. *Bioinformatics*, vol.15, pp.544-552 (1999)
- T. Kaminuma, T. Takai-Igarashi, T. Nakano, and K. Nakata: Modeling of Signaling Pathways for Endocrine Disruptors, *BioSystems*, 55, 23-31 (2000)
- Ishikawa K, Janssens W, Banor JS, Shinno T, Piedade J, Sata T, Ampofo WK, Brandful JA, Koyanagi Y, Yamamoto N, Canas-Ferreira WF, Adu-Sarkodie Y, Kurata T. Genetic Analysis of HIV Type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Nov 20;17(17):1661-3.
- Tanaka R, Yoshida A, Murakami T, Baba E, Lichtenfeld J, Omori T, Kimura T, Tsurutani N, Fujii N, Wang ZX, Peiper SC, Yamamoto N, Tanaka Y. Unique monoclonal antibody recognizing the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection. *J Virol*. 2001 Dec;75(23):11534-43.
- Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Kanamoto T, Gotoh K, Kanbara K, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Synthesis and evaluation of bifunctional anti-HIV agents based on specific CXCR4 antagonists-AZT conjugation. *Bioorg Med Chem*. 2001 Aug;9(8):2179-87.
- Takahoko M, Tobiume M, Ishikawa K, Ampofo W, Yamamoto N, Matsuda M, Tatsumi M. Infectious DNA clone of HIV type 1 A/G recombinant (CRF02_AG) replicable in peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Jul 20;17(11):1083-7.
- Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, Kodama E, Matsuoka M, Hattori T, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 Jul 23;11(14):1897-902.
- Baba E, Takahashi Y, Lichtenfeld J, Tanaka R, Yoshida A, Sugamura K, Yamamoto N, Tanaka Y. Functional CD4 T cells after intercellular molecular transfer of OX40 ligand. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):875-83.
- Takahashi Y, Tanaka Y, Yamashita A, Koyanagi Y, Nakamura M, Yamamoto N. OX40 stimulation by gp34/OX40 ligand enhances productive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 2001 Aug;75(15):6748-57.
- Handema R, Terunuma H, Kasolo F, Kasai H, Sichone M, Mulundu G, Deng X, Ichiyama K, Mitarai S, Honda M, Yamamoto N, Ito M. Emergence of new HIV-1 subtypes other than Subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 May 20;17(8):759-63.
- Takahashi K, Baba S, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. Two basic regions of NCp7 are sufficient for conformational conversion of HIV-1 dimerization initiation site from kissing-loop dimer to extended-duplex dimer. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):31274-8.
- Kusagawa S, Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Sata T, Ishikawa K, Nagai Y, Tatsumi M. Isolation and characterization of a full-length molecular DNA clone of Ghanaian HIV type 1 intersubtype A/G recombinant CRF02_AG, which is replication competent in a restricted host range. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 May 1;17(7):649-55.
- Owada T, Motomura T, Miyashita-Ogawa Y, Kawada-Homma M, Onishi M, Matondo P, Terunuma H,

- Numazaki Y, Yamashita S, Yamamoto N. Antibody masking renders HIV-1 resistant to cationic membrane filtration through alteration of its electrostatic characteristics. *J Virol Methods*. 2001 May;94(1-2):15-24.
- Ueki M, Watanabe S, Saitoh T, Nakashima H, Yamamoto N, Ogawara H. Synthesis and chain length-anti-HIV activity relationship of fully N- and O-sulfated homooligomers of tyrosine. *Bioorg Med Chem*. 2001 Feb;9(2):487-92.
 - Ueki M, Watanabe S, Ishii Y, Okunaka O, Uchino K, Saitoh T, Higashi K, Nakashima H, Yamamoto N, Ogawara H. Synthesis and anti-HIV activity of nonatyrosine N- and O1-9-decasulfate. *Bioorg Med Chem*. 2001 Feb;9(2):477-86.
 - Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J Exp Med*. 2001 Mar 5;193(5):651-60.
 - Tamamura H, Sugioka M, Odagaki Y, Omagari A, Kan Y, Oishi S, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Hamanaka N, Otaka A, Fujii N. Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 Feb 12;11(3):359-62.
 - フラグメント分子軌道法プログラム ABINIT-MP における 2 電子積分ルーチンの高速化ならびに並列化と性能評価; 稲富雄一, 中野達也, 北浦和夫, 長嶋雲兵, 情報処理学会論文誌: ハイパフォーマンスコンピューティングシステム, 42 (2001), 28-35.
 - Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential; T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, K. Fukuzawa, Y. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.* 351 (2002) 475-480.

2. 学会発表

- Nakata, K., Takai, T., Nakano, T. and Kaminuma, T. : Receptor Database (RDB): As an Analytical Tool. RECOMB 2000 (2000, 4 東京)
- Nakata, K., Takai, T., Nakano, T. and Kaminuma, T.: Receptor Database (RDB) as an analytical tool for the drug design. International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. (2000, 8, Novosibirsk)
- 鈴木聡子, 川出達, 瀧明子, 長谷川式子, 山本美智子, 中野達也, 宮田直樹, 神沼二真: 医薬品一般名称のデータベース化, CBI 学会(2000.7)
- 高井貴子, 徳永雅彦, 中田琴子, 神沼二真: 公開 SNPs データの自動収集システム, CBI 学会(2000.7)
- Takako Takai-Igarashi and Tsuguchika Kaminuma : Cell Signaling Networks Database and its Application to Medicinal Biology, CBI 学会(2000.7)
- 高井貴子, 徳永雅彦, 中野達也, 中田琴子, 神沼二真: MOBI-DICS 開発における生体影響データベースの統合, CBI 学会(2000.7)
- 山本美智子, 高井貴子, 中野達也, 會田喜崇, 濱義昌, 落合宏英, 清水広, 斉藤竜太, 小沢直記, 橋本宗弘, 神沼二真: 薬物代謝酵素チトクローム P450 関連知識ベース, CBI 学会(2000.7)
- 鈴木 聡子, 横山 美和, 川出 達, 瀧 明子, 長谷川 式子, 山本 美智子, 小峰 啓, 中野 達也, 宮田 直樹, 神沼 二真: 医薬品一般名称のデータベース化(その2)、第 23 回情報化学討論会(2000.10 京都)
- 小谷野 和郎, 中野 達也, 神沼 二真: CoMFA を用いたダイオキシン類の構造活性相関解析、第 28 回構造活性相関シンポジウム (2000.10 京都)

- ・ 福澤 薫, 小谷野 和郎, 中野 達也, 中田 琴子, 神沼 二真: エストロゲン受容体リガンド結合エネルギーの計算による予測、第28回構造活性相関シンポジウム (2000.10 京都)
- ・ K. Nakata, T. Nakano T. Takai and T. Kaminuma :Pharmacoinformatics Infrastructure for Genome Based Personalized Medicine , Genome Workshop (12.2000)
- ・ Kotoko Nakata, T. Nakano, K. Fukuzawa, K. Koyano and T. Kaminuma: MODE OF ACTION ANALYSIS OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS. American Biophysical Society Meeting (2001, 2.17-21, Boston)
- ・ 山本美智子、落合宏英、會田喜崇、濱義昌、小沢直記、高井貴子、中田琴子、神沼二真: 薬物代謝酵素チトクローム(CYP)P450 相互作用データベース、薬学会 (2001.3)
- ・ 佐藤 均, 薬物相互作用予測を目的とするCYPのキネティック・データベース構築, 第217回CBI研究講演会 (2002年3月)
- ・ N.Yamamoto et al., A duodenally absorbable CXCR4 antagonist, KRH-1636,exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity in vivo and in vitro.第15回日本エイズ学会集会 (東京)

G.知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案
なし
3. その他
著作権など (衛研への報告状況)

- ・ フラグメント分子軌道法プログラム ABINIT-MP

別添3-1

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

臨床データの収集と解析

遺伝子発現プロファイルからシグナリングパスウェイを推進する
新しいアプローチ

2001年度厚生科学研究費

医薬安全総合研究事業

分担研究者 山本 直樹

(東京医科歯科大学医学部微生物学教室)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

臨床データの収集と解析

遺伝子発現プロファイルからシグナリングパスウェイを推進する新しいアプローチ

分担研究者 山本 直樹 東京医科歯科大学教授
協力研究者 山本 典生 東京医科歯科大学助手

研究要旨

マイクロアレイや SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)によって得られる包括的遺伝子発現プロファイルから、シグナリングパスウェイに関する新知見を引き出すための新しいデータ解析法を確立し、その信頼性についての評価を実験によって行った。今回は、ウイルス発癌のモデルを用いたが、今後さらに癌細胞やウイルス感染細胞の遺伝子発現プロファイルに本法を応用して、これらの疾患を治療するための標的分子同定を目指す。

A. 研究目的

マイクロアレイや SAGE などの包括的遺伝子発現解析では、その解析法性格上、非常に大量のデータを扱うこととなる。この大量のデータからいかにして有用な情報を抽出するかという問題は、マイクロアレイや SAGE における重要な問題である。本研究はこの問題に対する一つの答えになりうると考えられる。ポストゲノムシーケンズ時代を迎え、包括的遺伝子発現解析はますます盛んに行われると予想されるが、そのような状況からも今回のア

プローチは大きな意味を持つものと期待される。

B. 研究方法

マイクロアレイや SAGE 等のトランスクリプトーム解析データを処理するためのソフトウェアを開発し、すでに得られているトランスクリプトーム解析データ（EBERs 発現細胞とコントロール細胞の SAGE データ）に対してこのソフトウェアによる処理を行った。ソフトウェアの信頼性をゲルシフトアッセイ（EMSA）、ウエスタンブロット等によって確認した。

(倫理面への配慮)

試験管内の実験が主であること、すでに樹立され実験にも頻用されている細胞株を用いていること、また動物実験もワシントン条約を遵守していることから、特に倫理的に問題となるような内容は含まれていないと考えられる。

C. 研究結果

遺伝子発現プロファイルからより有益な情報を引き出すために新しいデータ解析法を考案し、この解析法を EBVs 発現細胞・コントロール細胞に対する SAGE データに対して適用した。まず EBVs 発現細胞とコントロール細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、EBVs 発現細胞とコントロール細胞で発現が亢進していた遺伝子を上位から 50 ずつ抽出した。次にそれぞれの遺伝子のプロモーター配列をヒトゲノム配列データベースから抽出し、それぞれの配列にどのような転写因子結合モチーフが含まれているかを調べた。EBVs 発現細胞とコントロール細胞で現れる転写因子結合モチーフを整理したところ、EBVs 発現細胞では転写因子 Pax ファミリーと、それとは別の転写因子ファミリー (転写因子(A)とする) が特異的に活性化されていることが推察された。

非常に興味深いことに、これら 2 つの転写因子ファミリーが活性化されるまでのシグナリングパスウェイを文献

や CSNDB からの情報によって上流へとさかのぼっていったところ、2 つのシグナリングパスウェイがあるひとつの分子(シグナル伝達分子(B)とする)で交わることが明らかとなった。このことから、EBV の持つ癌遺伝子の 1 つと考えられる EBVs が、この分子に働きかけて特異的な転写因子の活性化を引き起こし、細胞を悪性化するとの仮説が考えられた。

EBVs 発現細胞において推定した通りの転写因子が活性化されているか、ゲルシフトアッセイ等の実験によって検討したところ、実際にその通りであることが確認できた。この結果は、今回用いた新しい手法の有効性を示すものであると考えられる。また 2 つの転写因子ファミリーが活性化されるまでのシグナリングパスウェイの交点に位置するある分子と EBVs の相互作用については現在実験を行っているところである。

D. 考察

これまでのデータ処理はインターネット上のサイトやマイクロソフトエクセルを用いて行ったが、このままではそれぞれの遺伝子発現プロファイルについて解析を行うのにあまりにも膨大な時間がかかり過ぎ、大規模な処理を行うことができなかった。そこで現在、これらの処理を効率良く行うために必要なプログラムおよびデータベースを構築中である。

プロモーター領域の抽出については mRNA のすぐ上流を抽出するという方法をとっていたが、これに関しては改善の余地がまだ残されていると思われる。さらに推定の精度をあげるため、オリゴキャップ法によって得られた転写開始点およびプロモーター領域の情報に対して隠れマルコフモデルを用い、プロモーター領域の抽出を再度行う準備を進めている。

これまで研究代表者の所属する研究室では、新しい SAGE 法の開発を行いその確立に成功した。この方法は SAGE の原法に比べてプロファイルの信頼性が大きく向上しているという利点があり、また原法では難しかった 3'RACE による新規遺伝子のクローニングを容易に行うことができる点でも非常に有用な方法である。この方法を用いることによって、より信頼性の高い活性化転写因子プロファイルの構築とシグナリングパスウェイの推定が可能になると思われる。

現在までのところ、EBERs 発現細胞とコントロール細胞の遺伝子発現プロファイルに対し手作業で小規模に行った解析結果については良い感触を得ているので、次は今まで手作業で行っていた部分をプログラム化し、隠れマルコフモデルによるプロモーター領域抽出も含めて処理できるソフトウェアの開発を行う。このソフトウェアの信頼性を EBERs 発現細胞とコントロール細胞

の遺伝子発現プロファイルとこれらの細胞を用いた実験によって評価し、さらに標的分子に対するアンチセンスオリゴ DNA やデコイ DNA の有効性も評価する。その上でその他の癌や HIV 感染、自己免疫疾患等の難治性疾患にこの方法を適用していきたい。

E. 結論

現在、AMD3100 や T22、TAK703 などの臨床応用が進められており、新しい作用機序の抗 HIV-1 薬として期待されている。AMD3100 は米国でフェーズ 2 まで進んだにもかかわらず、副作用のために脱落したということである。本当に薬を作ることの厳しさを感じる。本研究では、内服可能な CXCR4 antagonist のリード化合物を見いだしたので、実用化をめざして、今後も最適化合物の絞り込みに総力を結集したい。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Ishikawa K, Janssens W, Banor JS, Shinno T, Piedade J, Sata T, Ampofo WK, Brandful JA, Koyanagi Y, Yamamoto N, Canas-Ferreira WF, Adu-Sarkodie Y, Kurata T. Genetic Analysis of HIV Type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Nov 20;17(17):1661-3.
- 2: Tanaka R, Yoshida A, Murakami T, Baba E, Lichtenfeld J, Omori T, Kimura T, Tsurutani N, Fujii N, Wang ZX, Peiper SC, Yamamoto N, Tanaka Y. Unique monoclonal antibody recognizing

the third extracellular loop of CXCR4 induces lymphocyte agglutination and enhances human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and productive infection. *J Virol.* 2001 Dec;75(23):11534-43.

3: Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Kanamoto T, Gotoh K, Kanbara K, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Synthesis and evaluation of bifunctional anti-HIV agents based on specific CXCR4 antagonists-AZT conjugation. *Bioorg Med Chem.* 2001 Aug;9(8):2179-87.

4: Takahoko M, Tobiume M, Ishikawa K, Ampofo W, Yamamoto N, Matsuda M, Tatsumi M. Infectious DNA clone of HIV type 1 A/G recombinant (CRF02_AG) replicable in peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 Jul 20;17(11):1083-7.

5: Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, Kodama E, Matsuoka M, Hattori T, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A, Fujii N. Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001 Jul 23;11(14):1897-902.

6: Baba E, Takahashi Y, Lichtenfeld J, Tanaka R, Yoshida A, Sugamura K, Yamamoto N, Tanaka Y. Functional CD4 T cells after intercellular molecular transfer of OX40 ligand. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):875-83.

7: Takahashi Y, Tanaka Y, Yamashita A, Koyanagi Y, Nakamura M, Yamamoto N. OX40 stimulation by gp34/OX40 ligand enhances productive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 2001 Aug;75(15):6748-57.

8: Handema R, Terunuma H, Kasolo F, Kasai H, Sichone M, Mulundu G, Deng X, Ichiyama K, Mitarai S, Honda M, Yamamoto N, Ito M. Emergence of new HIV-1 subtypes other than Subtype C among antenatal women in Lusaka, Zambia. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 May 20;17(8):759-63.

9: Takahashi K, Baba S, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. Two basic regions of NCp7 are sufficient for conformational conversion of HIV-1 dimerization initiation site from kissing-loop dimer to extended-duplex dimer. *J Biol Chem.* 2001 Aug 17;276(33):31274-8.

10: Kusagawa S, Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Sata T, Ishikawa K, Nagai Y, Tatsumi M. Isolation and characterization of a full-length molecular DNA clone of Ghanaian HIV type 1 intersubtype A/G recombinant CRF02_AG, which is replication competent in a restricted host range. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 May 1;17(7):649-55.

11: Owada T, Motomura T, Miyashita-Ogawa Y, Kawada-Homma M, Onishi M, Matondo P, Terunuma H, Numazaki Y, Yamashita S, Yamamoto N. Antibody masking renders HIV-1 resistant to cationic membrane filtration through

alteration of its electrostatic characteristics. *J Virol Methods*. 2001 May;94(1-2):15-24.

12: Ueki M, Watanabe S, Saitoh T, Nakashima H, Yamamoto N, Ogawara H. Synthesis and chain length-anti-HIV activity relationship of fully N- and O-sulfated homooligomers of tyrosine. *Bioorg Med Chem*. 2001 Feb;9(2):487-92.

13: Ueki M, Watanabe S, Ishii Y, Okunaka O, Uchino K, Saitoh T, Higashi K, Nakashima H, Yamamoto N, Ogawara H. Synthesis and anti-HIV activity of nonatyrosine N- and O1-9-decasulfate. *Bioorg Med Chem*. 2001

Feb;9(2):477-86.14: Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J Exp Med*. 2001 Mar 5;193(5):651-60.

15: Tamamura H, Sugioka M, Odagaki Y, Omagari A, Kan Y, Oishi S, Nakashima H, Yamamoto N, Peiper SC, Hamanaka N, Otake A, Fujii N. Conformational study of a highly specific CXCR4 inhibitor, T140, disclosing the close proximity of its intrinsic pharmacophores associated with strong anti-HIV activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001 Feb 12;11(3):359-62.

2. 学会発表

1:N.Yamamoto et al., A duodenally absorbable CXCR4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent

and selective anti-HIV-1 activity in vivo and in vitro.第15回日本エイズ学会集会 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添3-2

厚生科学研究費補助金分担研究報告書

薬物動態データの収集

2001年度厚生科学研究費

医薬安全総合研究事業

分担研究者 杉山 雄一

(東京大学大学院薬学系研究科製剤設計教室)

厚生科学研究費補助金(医薬総合研究事業)
(分担)研究報告書

医薬品等の副作用又は医療用具の不具合情報の収集及び活用に関する研究

薬物動態データの収集

分担研究者 杉山 雄一 東京大学薬学部製剤設計学教室 教授

研究要旨

医薬品による副作用は、極めて大きな社会的損失をもたらす。医薬品副作用が生じる主な要因の一つとして、薬物相互作用による代謝酵素阻害(血中薬物濃度の上昇)が挙げられる。代謝酵素、特にシトクローム P450 (CYP) の阻害を起こす薬物相互作用に関してはこれまでに多くの研究がある。*In vitro* 実験から得られる情報から臨床的に起こり得る相互作用の程度を予測する方法としては、東京大学薬学部・杉山らにより提唱された生理学的モデルと予測式が世界的に広く知られている(Pharmacol. Rev. 50: 388-411, 1998)。この方法を実際を使用して薬物相互作用の程度を推定するためには、阻害剤の代謝パラメータ (K_i) と肝臓内濃度 (I) などの情報が必要となる。そこで本研究では、そのような CYP の相互作用特性に関する知識データベースを構築した。本データベースは、被阻害薬、阻害薬、あるいは CYP 分子種のいずれからでも相互作用データを検索することができ、以下のような活用が期待される。1) 臨床における薬物相互作用の危険性を事前に予測する、2) 医薬候補品を探索する過程でその化合物の薬物代謝上のリスクを早期に評価し、リスクが認められた場合にはそれを回避してドラッグデザインするという、薬物動態因子を組み込んだ探索的な創薬研究に活用する。

A. 目的

医薬品による副作用は、極めて大きな社会的損失をもたらす。米国健康管理研究局のレポート (<http://www.ahrq.gov/qual/aderia/aderia.htm>) によれば、薬害の被害者は、全米で年間 77 万人以上、副作用の対処に要した病院のコストは全米で年間 1.6~5.6 億ドルに上ると推計されている。医薬品副作用が生じる主な要因のひとつとして、薬物相互作用による代謝酵素阻害(血中薬物濃度の上昇)がある。代謝酵素阻害を起こす薬物相互作用に関してはこれまでに多くの研究があるが、*in vitro* 実験から得られる情報から臨床的に起こり得る相互作用の程度を定量的に予測するためには、阻害剤の代謝パラメータ (K_i) と肝臓内非結合型濃度 (I_u) から Eq.1 で示すような式によって阻害率 (R) を計算する方法が最も一般的である。

$$R = I_u/K_i \quad (\text{Eq. 1})$$

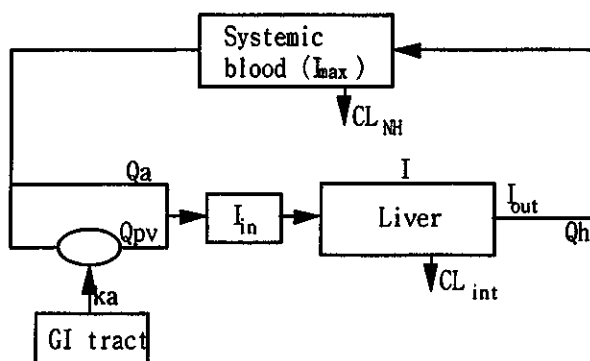
ただし、 I_u は酵素近傍における阻害剤の非結合型濃度、 K は肝ミクロソーム等を用いた *in vitro* 代謝試験で得られる阻害定数を示す。本研究では、Eq.1 を用いて薬物相互作用を定量的に予測するために必要な各種動態パラメータを文献から収集し、データベース化することで、臨床および薬物開発のニーズに供することを目的とした。

B. 研究方法

1) *In vitro* 阻害定数 (K_i) の情報収集:

ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝試験により算出された K_i 値を文献から集めた。相手の基質および CYP isozyme の種類を記載し、複数の報告がある場合はそれらを列挙した。代謝阻害様式が競合阻害あるいは非競合阻害であるかどうかを確認した。文献情報が見つからない場合、"microsome, CYP, P450, cytochrome, metabolism を or で結んだもの" と化合物名とを and で結ん

図1. 阻害剤経口投与後の肝臓入口における濃度 (I_{in}) を見積もるための生理学的モデル



で検索した。また、 K_i 値が報告されていないものに関しては、 K_m 値を使用した。

2) 体内動態の情報収集：

健康人に単回経口投与したときの最大血漿中濃度 (I_{max}) を文献から集め、体内動態が線形であると仮定して、常用量投与後の I_{max} に換算した。また、ヒトにおける血漿中蛋白非結合型分率 (f_u) を文献から集めた。

3) *In vivo* における相互作用の程度 ($I_{in,u}/K_i$) の計算：

被阻害剤の血中濃度上昇率 (R) を見積もるためには、Eq. 1 において肝臓内の非結合型阻害剤濃度 (I_u) の値を推定する必要があるが、ヒトにおいて I_u の正確な値を見積もることは困難なため、肝動脈血と門脈血が合流して肝臓へ流入する部分の血中最大非結合型濃度 ($I_{in,u}$) を I_u の最大値と近似した。そして、以下の式 Eq. 2 により最大門脈血漿中濃度 ($I_{in,u}$) を算出し、 $I_{in,u}/K_i$ を求めた。本推定法は東京大学薬学部の杉山らにより初めて提唱され (*Pharmacol. Rev.* 50: 388-411, 1998)、現在世界的に最もよく用いられている方法である。

$$I_{in,u} = (I_{max} + k_a \cdot D \cdot F_a / Q_h) \times f_u \quad (\text{Eq. 2})$$

I_{max} は阻害剤の循環血中最大濃度、 k_a は消化管からの吸収速度定数、 D は投与量、 F_a は吸収率、 Q_h は肝血流量、 f_u は血中非結合型分率をあらわす。ただし、 $k_a=0.1/\text{min}$ 、 $F_a=1$ 、 $Q_h=1610\text{ml}/\text{min}$ とし、 D には経口での一回常用量を代入した。報告値に範囲がある場合は、範囲をつけて計算した。

4) *In vivo* の相互作用の情報収集：

その阻害剤が関与するヒト *in vivo* での薬物間相互作用の報告を集め、相手の基質、相互作用の程度 (AUC 上昇率等) および阻害剤の投与量 (投与条件) を記載した。基質の代謝に主に関与する CYP isozyme と尿中未変化体排泄率についても、わかる範囲で記載した。また、相互作用がみられなかった、という報告についても記載した。代謝物にも代謝阻害活性が見られるものについては、代謝物の K_i 値や体内動態も考慮した。

5) 分子量の計算：

各医薬品の分子量は、1999 年原子量表をもとに算出した。

実際のデータベース化は、この研究班の分担研究者である、昭和大学薬学部臨床分子薬品学教室 佐藤 均教授らのグループと共同して行った。

倫理面への配慮

本研究では、論文・学会発表など公的に報告済みのデータを扱ったため、倫理面への配慮は該当しない。ただし、文献書誌データなどの情報ソースを明示した。

C. 研究結果

構築した CYP キネティック・データベース (URL: <http://molddb.nihs.go.jp/cyp/>) の初期画面を図 2 に示した。阻害薬、被阻害薬、および CYP アイソフォームの名前から、インターネット上で迅速にデータベースを検索することができた。ただし、現時点では一般名 (英名) でのみ検索を可能とした

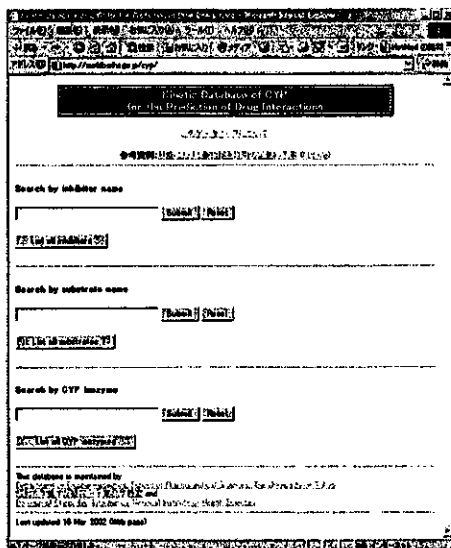


図2. 構築した CYP キネティック・データベースの初期画面

また、“List all inhibitors” や “List all substrates” をクリックすると、すべての阻害薬あるいは被阻害薬の一覧リストを見ることができるよう設定した。例として、図3には、阻害薬として “diazepam” と入力したときの検索結果を示す。

CYP DB
 Search Keyword: Diazepam

Diazepam
 Molecular Weight (Medicinal Form): 284.75
 Molecular Weight (Drug Itself): 284.75
 Enzyme: CYP3A4

	Value	Unit	Comment	Reference
Dose	10	mg		
	35.1185	mcM	calculated	
Imax	277	mcg/L		E.J.Drug.Metab.Pharmacokinet. 16,161-170,1991
	0.973	mcM	from Excel	
	0.9727	mcM	calculated	
fu (unbound fraction)	0.032			J.Pharmacobi-Dyn. 6,757-766,1985
Therapeutic Dose	2-5	mg		
	17.5592	mcM	calculated	
lin,max,u	0.1009	mcM	calculated	

in vitro

Substrate	Reaction or Products	Ki (mcM)	lin,max,u/Ki	Comment	Type	Enzyme	Reference
Codeine	glucuronidation	180					Br.J.Clin.Pharmacol. 34,256-261,1992
Codeine	o-demethylation	0		no inhibition			Eur.J.Drug.Metab.Pharmacokinet. 17,115-120,1992
Coumarin	7-hydroxylation	> 200					Arch.Biochem.Biophys. 341,47-61,1997
Imipramine	N-demethylation	0		no inhibition			Br.J.Clin.Pharmacol. 34,256-261,1992
Methadone	N-demethylation	50					Chem.Res.Toxicol. 9,365-373,1996

Pharmacokinetic Interaction in vivo

Substrate	Dose	Results of interaction (AUC X)	Comment	Enzyme	Reference
Fluvoxamine	diazepam 10 mg+fluvoxamine 100-150 mg	0		CYP2C9	Clin. Pharmacol.Ther 56,471-476,1994
Quinidine	diazepam 10 mg+quinidine 250 mg	1	no significant effect	CYP3A4	Drug Metabol Drug Interact. 12,45-51,1995
Zotepine	diazepam 10 mg/day 4day+zotepine 199(80-340) mg /day	1.3		CYP3A4	Psychopharmacol. 127,311-314,1996

Last updated: 17 Aug. 2001 (Web page)

図3. CYP キネティック・データベースにおいて、阻害薬として diazepam を入力したときの検索結果

D. 考察

ソリブジン事件以来、薬物相互作用による副作用の発現は臨床において大きな注意が喚起されてきた。医薬品機構による「医薬品情報提供ホームページ」(1999年より運営開始)は、重要な医薬品情報を迅速かつ広域に医療従事者および一般国民に提供することに大きく貢献している。また薬物相互作用は近年、臨床現場のみならず、医薬品開発においても重要視されている。厚生労働省によるガイドライン「医薬品の臨床薬物動態試験について(2001)」においても、相互作用の発現機序を考慮し、その定量的評価が可能となるように適切な薬物動態パラメータを指標として選択することが明記された。

本研究では、CYPの相互作用特性に関する知識データベースを構築した。インターネット上で公開されたCYPに関する知識データベースとしては、これまでに米国のFlockhart博士が構築したホームペ

ージ (<http://www.dml.georgetown.edu/depts/pharmacology/davetab.html>) および Krishna 博士によるもの (http://griffin.vcu.edu/~gkrishna/PK/p450_txt.html) が有名である。わが国では、本格的な CYP データベースとしては本ホームページが最初と思われる。医薬品の副作用、相互作用の情報については、薬物動態特性 (ADMET) 全体から見ていく必要があり、今後、そのような情報基盤が国内で整備されていくことが必須であろう。これは、最終的に Evidence に基づいた Patient-oriented な適切な薬物治療につながると思われる。

E. 結論

本研究では、肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 実験データ (Ki 値) と薬物動態データ (最高血中濃度など) から臨床的に起こり得る相互作用の程度を予測するための方法論 (*Pharmacol. Rev.* 50: 388-411, 1998) を利用するための知識データベースを構築した。本データベースを活用すれば、臨床における薬物相互作用の危険性を事前に予測したり、医薬候補品を探索する過程でその化合物の薬物代謝上のリスクを早期に評価したりすることが可能となると考えられる。

。

F. 研究発表

1. 論文発表

現在論文作成中投稿中のため、未確定。

2. 学会発表

第 217 回 CBI 研究講演会 (2002 年 3 月)

別添 3 - 3

厚生科学研究費補助金総括研究報告書

薬物動態データのシステム化

2001 年度厚生科学研究費

医薬安全総合研究事業

分担研究者 佐藤 均

(昭和大学薬学部臨床分子薬品学教室)