

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価

予測システムの構築とその基盤に関する研究

(H14-トキシコー001)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長尾 拓

平成16年(2004)4月

様式 A-1 (4)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成16年4月7日

厚生労働大臣 坂口 力 殿

住所

フリガナ ナガオ タク

研究者 氏名 長尾 拓

(所属機関 国立医薬品食品衛生研究所)

平成15年度厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)に関する研究事業を完了したので次の通り報告する。

研究課題名(課題番号) : トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究(H14-トキシコー001)

国庫補助金精算所要額 : 金690,000,000円也

1. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要版およびこれを入力した CD-ROM (別添1の通り)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添6の通り)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
(総括研究報告書, 分担研究報告書の中に書式に従って記入した)
8. 健康危険情報
なし

別添 1

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生労働科学研究費補助金

研究事業名=萌芽的先端医療技術推進研究事業

研究課題名=トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=690,000,000

研究期間（西暦）=2002-2006

研究年度（西暦）=2003

主任研究者名=長尾拓（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究者名=漆谷徹郎（国立医薬品食品衛生研究所）、土井邦雄（東京大学大学院農学生命科学研究科）、遠藤仁（杏林大学医学部）、若林敬二（国立がんセンター研究所）、菅野純（国立医薬品食品衛生研究所）

研究目的=本研究は、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質安全性データベースを作成し、インフォマティクス技術を活用した創薬過程における安全性の早期予測システムを構築することを目的とする。

従来、実験動物における毒性をヒトに外挿することによって医薬品の安全性の予測を行ってきたが、それには科学的な限界があり、確実なものでなかった。より安全で近代的な医薬品の開発には、従来の方法が持つ限界の克服が必要である。一方、今までの創薬の現場においては、その過程で得られた毒性データが体系立って蓄積されることはなく、その様なデータの蓄積と利用に対しては潜在的な要求が創薬の側からも、安全性確保の側からも存在していた。本研究の到達目標は、*in vivo*及び*in vitro*のモデル系において、化合物の暴露により誘発される遺伝子発現の網羅的なプロファイルをデータベース化し、これを基に、化合物の安全性を従来の毒性試験よりも正確かつ詳細に予測するシステムを開発することにある。本研究の遂行によって、

ヒトにおける副作用の早期予測、臨床における医薬品の予期せぬ副作用発現率の低下、及び、より安全性の高い医薬品の創製、またそれによる創薬の効率化（迅速化、経済化）が期待される。

研究方法=本プロジェクトは国立医薬品食品衛生研究所を核とした「産学官連携」の形態を取る大規模プロジェクト（プロジェクトリーダー：長尾）である。その運営は、被検物質暴露実験及びデータベース・インフォマティクス開発等の委託を含め、主任研究者（長尾）・分担研究者（漆谷）を主体とする本研究班と参加企業との協調・協議の上で進められる。本研究の目的のために選択された約150化学物質（合議により選択）を対象に、小型実験動物（ラットを主体とする）を用いた暴露実験を行い、肝・腎を主標的として、発現プロファイルを可能な限り多数の遺伝子について採取する。同時に得られる、遺伝子発現データと個別対応の付いた古典的毒性学データ（病理組織、血液生化学データなど）、更に関連する化合物情報、文献情報等も解析の上整理する。これらのデータを逐次、電子ファイリングし、毒性統合データベースを構築する。また本プロジェクトの特徴である「臨床開発段階で動物実験では予測し得なかった副作用のために開発を中止した薬物」の参加企業からの提供も開始された。インフォマティクス関係では、遺伝子発現・病理・化合物情報統合データベースの初期バージョンが完成し、解析エンジンの一つである大規模クラスタリングの試用が開始された。以降、得られたデータの解析結果を基に、基盤的分担研究の成果を取り入れつつ安全性評価予測システムの構築に向かって行く。

結果と考察=平成14年度に確立した手法を基に、本年度は着実にデータの蓄積がなされた。用量設定試験を含めて、*in vivo*の実験に着手した化合物は約60、うち、発現データが得られているものは約30である。*in vitro*の実験は、ラット初代肝細胞の実験完了が約10、ヒト初代肝細胞の実験は、ちょうど本試験を開始したところである。

現在 *in vivo* データのうち、単回投与・連続投与、血液学・生化学データ、病理データのフルセットが統合データベースに格納されたのは、25化合物である。遺伝子発現データに関して、その再現性、定量性、普遍性を検討したところ、非常に良好な結果が得られ、データベース中のデータの品質が、かなり高いことが確認された。

また本年度末に、統合データベースのバージョン 1.5 の試用が開始された。大量の遺伝子発現データと関連する情報を検索の上、解析のためにダウンロードする機能、および大規模クラスタリングの機能が装備され、以後の年度におけるデータ解析に大きな力となる。以後、初期データを用いて、毒性予測システムのプロトタイプを構築し、解析・予測アルゴリズムの開発・改良を行っていく予定である。

本プロジェクトで完成予定のデータベースは、その質と量に関して、世界に例をみないものである。現在、トキシコゲノミクス関係のデータベースは、世界的には2つの方向性を持っている。一つは、世界中の種々の機関に別個に存在しているデータを結びつけて巨大なネットワークを構築し、これを解析することによって安全性予測を達成しようというものであり、もう一方は、一機関で得られる限定されたプロトコルのデータのみを集積するというストラテジーである。しかしながらこれらにはそれぞれ問題があり、予測性の向上に苦慮しているところである。これらに対し、本プロジェクトで構築を目指しているデータベースにおいては、約150種類の化合物それぞれについての遺伝子発現解析に、ラットへの単回投与3用量4時点、連続投与3用量4時点、更にラットとヒトの培養肝細胞における3用量4時点という、充実した実験プロトコルを採用し、かつ生化学・病理学データも対応したものを得ている。これにより、種々の毒性プロファイルをもつ化合物についても対応が可能となる。更に、計画された化合物は、毒性学上古典的なものを殆ど含んでおり、これほどの完全なデータセットが揃っている場所は世界に類をみない。まさに、医薬品安全性学上の標準的アーカイヴとして、貴重な財産となるにちがいない。

更に本プロジェクトの特長として、遺伝子発現解析における強力な標準化戦略の実施が挙げられる。これは、従来の「発現比」に依らず、細胞当たりmRNA絶対量の測定を可能としたものである。今年度、その実用性・有用性を更に確認することができた。

これまでに実験プロトコル・化合物選択基準を確定させ、データ取得とその格納が軌道に乗り、データベース構築に関しては順調に進行している。今後は、その蓄積されたデータを基に、安全性評価予測システムの構築が課題となる。そのためには、プロジェクトで得られたデータばかりでなく、基盤的分担研究で得られた先端的な成果を取り入れつつ、毒性発現機序解析に支えられたシステムを作り上げて行かねばならない。この目的から、毒性研究者とコンピュータ科学者が共同で解析・研究するワーキンググループを設置したところである。

本プロジェクトは産官共同プロジェクトである性格上、プロジェクトの成果に関して、具体的データの対外発表は差し控えていた。しかしながら、社会に対する貢献・説明責任を果たすために、本年度以降は、積極的に対外発表を推し進めていくという路線を決定した。

分担研究としては、以下のような成果が得られた。

(1) 薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究 (土井)

PCN および PB 投与により、母体肝・胎盤・胎児肝にそれぞれ特徴的な病理学的・生化学的变化が認められ、薬物代謝酵素関連遺伝子発現のそれぞれに特徴的な変化が見いだされた。また 5AzC 投与妊娠ラットの胎児終脳 ventricular zone (VZ) において、5AzC が S 期の神経上皮細胞に取り込まれた後に DNA 傷害を起こし、p53 を介した p21 による細胞周期停

止 (G1 期) やアポトーシスを惹起することを示唆する所見が得られた。このとき、アミノ酸関連遺伝子、細胞分裂関連遺伝子、p53 転写標的遺伝子、細胞周期関連遺伝子、増殖関連遺伝子、免疫関連遺伝子、細胞外基質、血管関連蛋白遺伝子、HIF-1 の転写標的遺伝子、解糖系酵素遺伝子等、多くの遺伝子の発現変動が観測された。また、T-2 toxin 投与妊娠ラットの胎児終脳 ventricular zone (VZ) でも、神経上皮細胞のアポトーシスが観測されたが、シグナル伝達関連遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、MAPK シグナル伝達系、アポトーシスおよび増殖関連遺伝子等、多くの遺伝子の発現変動が観測された。NMDA、HU、および Ara-C についても、胎児中枢神経および胎盤毒性の性状とその発現機構の一部を明らかにした。

(2) 化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究 (遠藤)

データベースより有機アニオントランスポーターOAT1 類似配列を見出し、ヒトOAT7cDNA の塩基配列を決定した。種々の解析により OAT7 は肝細胞側底膜に存在する有機アニオントランスポーターであり、外来性異物やステロイドホルモンの硫酸抱合体を主に輸送基質とするものであることが明らかとなった。

前年度の研究において同定した新規アミノ酸トランスポーターLAT3 の塩基配列を用い、データベース検索を行った結果、LAT3 類似の新規配列 (LAT4 と命名) が得られ、腎及び胎盤でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送に関わることが示唆された。

LAT1 は、正常組織における発現が脳、胎盤、骨髄、精巣等に限られ、胎児肝において強発現するが、成体肝において発現は検出されない。LAT1 の部分配列は、機能未同定の癌関連配列 TAI としてすでに報告されていた。そこでヒト腫瘍細胞株及びヒト悪性腫瘍組織での発現を検討したところ、多種のヒト腫瘍細胞株や悪性腫瘍組織で発現が亢進しており、LAT1 が腫瘍細胞に発現の亢進するシステム L の分子実体であることが明らかになった。更に、古典的システム L 抑制薬 BCH 及び LAT1 特異的なアンチセンスオリゴ DNA は、検討したヒト腫瘍細胞株 (30 種類) のほとんどに対して、その増殖を濃度依存的に抑制した。また、癌移植マウスにおいて BCH や LAT1 アンチセンスオリゴ DNA により腫瘍抑制効果が得られた。構造活性相関の解析に基づき化合物デザインを行い、BCH に比し LAT1 への親和性が約 1,000 倍高い 2 種の新規化合物 KYT0193 及び KYT0206 を得た。両者ともにアミノ酸取り込み阻害活性に相当する増殖抑制効果、抗腫瘍効果を示した。

(3) 大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究 (若林)

PhIP、IQ、MeIQ、Glu-P-1、MeIQx、Trp-P-2を、「短期投与方法」によりラットに投与すると、前5者はACFを誘発した。投与開始後、3及び6週での大腸粘膜での遺伝子発現を網羅的に解析し

たところ、HCAにより発現量が抑えられた遺伝子が多かったが、これはHCAの肝毒性の反映と考えられた。大腸発がん物質に特異的に発現変動している遺伝子の探索を行い、特異的な10個の遺伝子を見いだしたが、これらは代謝関連遺伝子や転写因子、細胞増殖や炎症反応に関与している遺伝子であった。

ラット小腸上皮細胞由来 IEC-6 細胞では、IL-1 β や LPS 刺激をしても iNOS の発現はほとんど認められない。この細胞に、K-ras 遺伝子のコドン 12 番の変異体を導入し、IL-1 β や LPS で刺激時すると iNOS が顕著に誘導されることが明らかとなった。軟寒天培地でのコロニー形成は、IL-1 β や LPS 刺激により増加し、これは NOS 阻害剤によって減少した。

(4) 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究 (菅野)

恒常性を維持する機構の一例として、circadian rhythm について解析を行った。代表的な circadian 遺伝子で rhythm が観測できたが、この解析を「各時間における vehicle control に対する比」を用いて行うと rhythm はみられなくなることから、Percellome による解析法の利点が明らかとなった。次に、ダイオキシンレセプター(Ahr)を介する TCDD により発現が誘導される既知の遺伝子について解析したところ、多くの遺伝子について特徴的な時間依存的・用量依存的発現パターンを検出することができた。

癌細胞を低酸素と E2 または TGF による同時刺激し、VEGF の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR で測定し、特徴的な変化を検出した。

HL60 細胞において、レチノイン酸及び DMSO 処理により遺伝子発現強度の変化する多数の遺伝子を見いだした。分化した細胞にて発現の上昇している遺伝子には、イムノグロブリン、インターロイキン関連遺伝子、CD44 をはじめとする 6 種の血球膜抗原の発現も亢進した。

8 週齢のマウスに関して検討を行った結果、老化促進マウスにて発現の上昇する遺伝子 41、減少している遺伝子 34 を特定した。このうち発現の上昇した遺伝子としては、melanoma antigen、減少した遺伝子としては transthyretin が注目された。

結論＝プロジェクト本体としては、「5 年間 150 物質」目標達成に向けて、データ取得を行い、データベース構築に力を注いだ結果、ほぼスケジュール通りの進捗が得られている。また、安全性評価予測システムの構築に向かって、インフォマティクスの質的向上のために設置した基盤的分担研究もそれぞれの成果を得ている。今後計画に従って研究を進め、利用価値の高いデータベースの完成と、安全性早期予測システムの構築を達成したい。

別添 2

厚生労働科学研究費補助金総括・分担研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

研究題名（課題番号）：トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システム
の構築とその基盤に関する研究
(H14-トキシコー001)

平成15年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 長尾 拓

平成16（2003）年4月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤 に関する研究	・ ・ ・ ・ 1
長尾 拓, 漆谷徹郎	

II. 分担研究報告書

1. 薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究 土井邦雄	・ ・ ・ ・ 27
2. 化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究 遠藤 仁	・ ・ ・ ・ 49
3. 大腸の前がん病変および腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究 若林敬二	・ ・ ・ ・ 69
4. 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究 菅野 純	・ ・ ・ ・ 77

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・ ・ ・ ・ 105
---------------------	-------------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	・ ・ ・ ・ 111
-----------------	-------------

別添 4

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に
関する研究

主任研究者 長尾拓 国立医薬品食品衛生研究所・所長

分担研究者 漆谷徹郎 国立医薬品食品衛生研究所・プロジェクト長

研究要旨

本研究は、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質安全性データベースを作成し、インフォマティクス技術を活用した創薬過程における安全性の早期予測システムを構築することを目的とする。具体的には、代表的な肝障害・腎障害発現物質を対象とし、ラットあるいは培養細胞系における遺伝子発現変化の網羅的なプロファイル生成と、古典的手法による毒性指標を取得し、これを大規模データベースとして構築する。現在、医薬品の有害作用情報は、基礎・臨床データが氾濫しているものの、利用可能なものとしての形態をなしておらず、世界的に統一したデータベース化が叫ばれている。しかしながら、現在世の中に流布している情報は、プラットフォームの違いにより安全性予測システムの構築に耐えるほどのデータの質を持ち得ていない。本プロジェクトは、教科書的な臓器障害物質から新規開発医薬品までの各種薬物について、ラットに対する単回投与の経時変化、連続投与の経日変化、さらには種差のブリッジングのためのラット肝臓一次培養細胞とヒト肝臓一次培養細胞の暴露実験を行い、現在利用可能なテクノロジーを駆使して毒性情報の完全なセットを得ようとするものである。このデータベースは、我が国のみならず、世界的に見ても類を見ない、医薬品安全性学史上画期的なものといえる。このデータベースを基にすれば、新規医薬品候補物質の安全性を、従来の毒性試験よりも、正確に、かつ、詳細に予測するシステムを開発することが可能なはずである。この趣旨のもとに企業参加を得て、国立医薬品食品衛生研究所を核とした「産学官連携」の形態を取る大規模プロジェクト（プロジェクトリーダー：長尾）が形成された。その運営は、被検物質暴露実験及びデータベース・インフォマティクス開発等の委託を含め、主任研究者（長尾）・分担研究者（漆谷）を主体とする本研究班と参加企業との協調・協議の上で進められている。本年度までに、約60化合物についてのデータ生成が完了または進行中である。また本プロジェクトの特徴である「臨床開発段階で動物実験では予測し得なかった副作用のために開発を中止した薬物」の参加企業からの提供も開始された。インフォマティクス関係では、遺伝子発現・病理・化合物情報統合データベースの初期バージョンが完成し、解析エンジンとしての大規模クラスタリングの試用が開始された。また、本プロジェクトの基盤を支える研究として、基盤的分担研究（肝毒性、腎毒性、発がん性、及び恒常性維持機構

を標的とした毒性)をおいている。本プロジェクトの最終目標である安全性評価予測システムの構築のためには、毒性発現機序に裏付けられた遺伝子発現解析の知識の集積が必須であり、その成果をプロジェクトの推進に次々と取り入れつつある。

分担研究者

土井邦雄	東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
遠藤仁	杏林大学医学部・教授
若林敬二	国立がんセンター研究所がん予防研究部・部長
菅野純	国立医薬品食品衛生研究所毒性部・部長

A. 研究の目的

本本研究は、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質安全性データベースを作成し、インフォマティクス技術を活用した創薬過程における安全性の早期予測システムを構築することを目的とする。

従来、実験動物における毒性をヒトに外挿することによって医薬品の安全性の予測を行ってきたが、それには科学的な限界があり、必ずしも確実なものでなかった。より安全で近代的な医薬品の開発には、従来の方法が持つ限界の克服が必要である。一方、今までの創薬の現場においては、その過程で得られた毒性データが体系立って蓄積されることはなく、その様なデータの蓄積と利用に対しては潜在的な要求が創薬の側からも、安全性確保の側からも存在していた。従来は主に形態学のレベルで解析されてきた安全性が、ゲノム創薬と同じ技術水準を応用する事により分子レベルの作用機序を基にして、より正確にあるいは早期に解析される事も望まれていた。更に、安全性確保の面における最重要課題、すなわち実験動物間、及びそれらとヒトとの間の種差の問題に対する科学的な解決が模索さ

れてきていた。これらの問題を包括的に解決する方策としては、化合物投与に対する網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクスの構築が有効であることは内外の研究活動の方向性が示すところである。

本研究の到達目標は、*in vivo*及び*in vitro*のモデル系において、化合物の暴露により誘発される遺伝子発現の網羅的なプロファイルをデータベース化し、これを基に、化合物の安全性を従来の毒性試験よりも正確かつ詳細に予測するシステムを開発することにある。本研究の遂行によって、ヒトにおける副作用の早期予測、臨床における医薬品の予期せぬ副作用発現率の低下、及び、より安全性の高い医薬品の創製、またそれによる創薬の効率化（迅速化、経済化）が期待される。インフォマティクスの基礎となる蓄積データで、最も注目され、有用性が高いと思われるものは、過去に「予期せぬ毒性、すなわち、開発段階では検出されなかった毒性がヒトに投与して初めて顕在化した」為に「開発中止、あるいは販売中止となった医薬品・医薬品候補物質」であるが、本年度より、この範疇の化合物

も参加企業から提供を開始した。

本年度以降の研究進捗に置いて中心的な課題は、毒性予測システムの構築の基礎を固めることである。そのためには、毒性発現メカニズム解析の裏付けに基づいた知見を集積することが必要である。この目的で置いた基盤研究との連携により、肝毒性、腎毒性、発がん、恒常性維持機構における分子メカニズムに関する新知見が次々と集積され、これを順次取り入れていくことによって、予測システムへの構築をはかりたい。

B. 研究方法

トキシコゲノミクスプロジェクト（長尾・漆谷）

目的達成の為に、本プロジェクトに「発現解析データ生成部門」、「データベース・インフォマティクス部門」、「データ・システム精度管理部門」、「病理・毒性評価部門」、及び「知的財産・総務部門」を設け、データの収集・解析を行っている。合議により5年間で約150化学物質を選択し、ラットおよび培養系を用いた暴露実験を行い、肝・腎を主標的として発現プロファイルを可能な限り多数の遺伝子について採取し、データベースを構築する。同時に得られる、遺伝子発現データと個別対応の付いた古典的毒性学データ（病理組織、血液生化学データなど）、更に関連する化合物情報、文献情報等も解析の上整理する。並行して、インフォマティクスを駆使し、多数のモジュールからなる解析・予測システムを構築する。ここにパスウェイ解析や基盤研究で得られた成果をフィード

バックし、システムの充実・精度向上を図る。

今年度までに、約60化合物の暴露実験を行ってきた。その一部についてはすでに最終データセット（単回・連続投与の肝臓における遺伝子発現データ、血液生化学・肝臓病理学データ）を取得し、データベースに順次格納中である。また、「臨床開発段階で動物実験では予測し得なかった副作用のために開発を中止した薬物」に関しては、数化合物を決定し手続きを開始した。試験管内暴露系に関しては、ラット一次培養肝細胞系のプロトコルを確立し、暴露実験を開始した。ヒト培養肝細胞に関しては平成15年10月国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を得、予試験を開始し、プロトコルを確立した。

インフォマティクスに関して、本年度までに大規模クラスタリングを可能とする計算環境が整った。予測システムの基本設計を行い、各計算・解析・予測モジュールを順次開発していく予定である。その際、基盤研究で得られる種々の知見を各モジュールに反映させていく。

以上の研究は、良質で充実したデータベースの構築に主眼を置いているが、これらデータの解析とそれに基づく予測システムの構築には、最先端の毒性発現機序研究の裏付けが必要不可欠である。また、データベースはラット肝臓を主なターゲットにしているが、種々の異なった生理的条件下や、その他の臓器における毒性応答の解析も重要な情報といえる。これらについては、

分担研究による成果を順次フィードバックさせていく。

分担研究

(1) 薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究 (土井)

この研究では特に次の2点について検討を行っている。まず、妊娠動物における毒性発現機構を考える上で、CYP 誘導剤投与ラットの母体肝・胎盤・胎児肝における薬物代謝研連遺伝子の発現プロファイルを明らかにすることである。これは、同一個体内で種々の環境に置かれた臓器特異的な反応を遺伝子発現プロファイリングで評価しようとする挑戦的な試みである。第2点は、胎児神経毒性を遺伝子発現プロファイリングによって評価する試みであり、臨床的に重要な神経毒性の解析は、本プロジェクトを補完するものとして重要である。

(2) 化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究 (遠藤)

本研究では、薬物及び毒性化合物の輸送を担当する有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸等の細胞膜輸送体の分子同定及び機能解析を中心に行っている。プロジェクトでは、遺伝子発現を網羅的に定量化しているが、得られるデータのうち、毒性発現に関連の深い因子として、薬物トランスポーター関連遺伝子の解析は最重点課題のひとつである。しかしながら、薬物トランスポーターがすべて明らかになっているわけではない現在、データベース中のデータの解釈には自ずから限界がある。ゲノム上の機能未同定の遺伝子機能は、やはり個別に解析していくしか

方法がない。本研究では、あらたなトランスポーターを複数同定し、その機能が毒性発現に重要であることを示すことで、プロジェクトの基盤を支える役割を担っている。

(3) 大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究 (若林)

本研究では、種々のがん原性物質により誘発されるラットの発がんモデルを用いて、化合物特異的な遺伝子発現プロファイル変化を検討している。プロジェクトでは、主に肝毒性をターゲットとしているが、毒性発現機構は非常に複雑で、多くの要因に左右され、特徴的なシグナル経路を抽出することには困難がある。一方、発がんという現象は、決して単純とはいえないが、少なくとも最終的なフェノタイプとして異常な細胞増殖に帰結すること、これまでの研究で、遺伝子発現プロファイリングによりがん細胞の特徴付けに成功している例が多いことなどから、モデル系として有用であると考えられる。本研究は、種々の要因により変動する発がん性を遺伝子プロファイリングによる予測システムを構築することを最終目的としており、本プロジェクトの目標である肝毒性予測システム構築に、大きな寄与が期待される。

(4) 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究 (菅野)

本研究は、本プロジェクトの技術的基盤をなすものである。第1に、本プロジェクトでの大きな特徴となっている、スパイクを用いたGeneChipによるmRNA発現量の細胞当たり絶対量を定量可能とする技術の開発である。これはPercellomeと名付けられたが、この方式の採用によつ

て、多くの利点を得られている。第2に、古典的毒性学が行ってきた方法論、すなわち高用量暴露下でのフェノタイプから低用量（臨床用量）の安全性を予測するという方法は、生体の恒常性維持機構が働くため、限界があることが明らかとなってきた。これはトキシコゲノミクス手法を採用しても克服できないという問題があった。本研究では、Percellomeによって初めて解析可能となった恒常性維持機構に関与する遺伝子群の発現変動をマウスを用いて詳細に検討したものである。本年度はそのモデルケースとしてサーカディアンリズム遺伝子群、ダイオキシン暴露時の恒常性維持機構に関与する遺伝子群を解析した。さらにその応用として、培養腫瘍細胞における血管新生の検討、ヒト培養細胞HL60の分化誘導の検討、老化促進マウスの原因遺伝子探索などを行った。本研究は、プロジェクトの技術基盤を支え、予測システム構築においてもその理論的基盤の一つを供給するものである。

C. 研究結果

トキシコゲノミクスプロジェクト（長尾・漆谷）

平成14年度に確立した手法を基に、本年度は着実にデータの蓄積がなされた。用量設定試験を含めて、*in vivo*の実験に着手した化合物は約60、うち、発現データが得られているものは約30である。*in vitro*の実験は、ラット初代肝細胞の実験完了が約10、ヒト初代肝細胞の実験は、ちょうど本試験を開始したところである。

現在 *in vivo* データのうち、単回投与・

連続投与、血液学・生化学データ、病理データのフルセットが統合データベースに格納されたのは、25化合物である。これらのデータに関して、その再現性、定量性、普遍性を検討したところ、非常に良好な結果が得られ、データベース中のデータの品質が、かなり高いことが確認された。この一部については、本年度のアメリカトキシコロジー学会で報告した。

また本年度末に、統合データベースのバージョン1.5の試用が開始された。現在は国衛研内部LANでの使用に限られているが、さらなるバージョンアップの上、将来のインターネットを介したデータ公開の準備段階と位置づけられる。大量の遺伝子発現データと関連する情報を検索の上、解析のためにダウンロードする機能が、および大規模クラスタリングの機能が装備され、以後の年度におけるデータ解析に大きな力となろう。以後、初期データを用いて、毒性予測システムのプロトタイプを構築し、解析・予測アルゴリズムの開発・改良を行っていく予定である。以後の年度で得られるデータを逐次組み入れていくとき、仮想的な予測を行い、予測結果と実際のデータとつきあわせることによって、その予測アルゴリズムを評価し、フィードバックを重ねていくことによって、予測精度を向上させていく予定である。

以下に、各項目についての成果を述べる。

(1) 遺伝子発現解析実験のパリデーションと改良

国立医薬品食品衛生研究所28号館3階に、トキシコゲノミクスプロジェクト研

研究室を設置し、RNA抽出装置、Affymetrix社GeneChip遺伝子発現解析装置等の機器の配備、調整と整備を行い、共同プロジェクトとしての「産」の参加メンバーと共に実験手技を確立、種々の標準作業書を作成し、遺伝子発現データのバリデーションを行い、実験データを収集している。また、発現データの精度管理、定量的PCRによる遺伝子発現値の定量性の確認などに関して、種々の方法を検討し、評価法を確立した。また、本年度、本プロジェクトで使用しているGeneChipにバージョンアップがあり、これに伴い解析装置のバージョンアップを行った。また、新製品RAE230-2チップの互換性・再現性についての国際的βテスト（全世界で5施設）に参加し、旧チップとのブリッジに関する検討を行った。

(2) 被験化合物選定

本プロジェクトの戦略として重要課題である被験化合物については、ラットとヒトとの毒性を考慮して、前年度までに約60化合物を選定し決定した。また、本プロジェクトの特徴である、「臨床開発段階で動物実験では予測し得なかった副作用のために開発中止をやむなくされた薬物」に関しては、厚生労働省研究開発振興課長、およびプロジェクトリーダーより参加企業17社に宛てて依頼状を送付、約20化合物について、提供の申し入れがあった。これら化合物について、順次実験を行うための手続きが進行中である。

(3) *in vivo*・*in vitro*試験

*in vivo*試験は前年度までにプロトコルは確定し、試験を進めている。用量は溶媒対照+3用量とし、単回投与試験は、投与後3、6、9、24時間後剖検。連続投与試験は、同用量を3、7、14、28日連続投与後剖検。例数は5例とし、

うち3例を遺伝子発現解析に用いる。すなわち、1化合物当たり動物数140、GeneChip解析数96である。本年度から、データ取得のスピードアップを企図して、動物実験委託施設を2施設から4施設へ増やした。

ラット初代培養肝細胞による試験は、本年度にプロトコルを確定し、試験を進めている。ヒト初代培養肝細胞による試験は、本年度に国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を得、プロトコルを確定し、本試験に進むところである。

(4) データベース・バイオインフォマティクス

前年度に、共同プロジェクトとしての「産」の参加メンバーと「データベース・バイオインフォマティクス部門」と共に遺伝子発現実験管理システムの構築を行った。更に化合物情報、動物試験情報、遺伝子発現解析情報を蓄積する「遺伝子発現統合データベースシステム・バージョン1.0」を開発した。本年度は、試用中であつた実験管理システムを完成し、すべての実験について、実施から精度管理・データ保存に至るまでをすべてコンピュータの管理のもとで遂行する体制が整った。最終年度までに得られるすべての遺伝子発現データ、病理・生化学データ、化合物データ、および関連情報を格納し、かつ大規模クラスタリングを行う環境を整えるため、遺伝子発現統合データベースシステムのバージョン1.5の構成を行い、その試用を開始した。更に、バイオインフォマティクスチームを構成し、ハードウェア整備を行い、アルゴリズム開発に着手した。

次に、本プロジェクトの基盤を支える研究としてプロジェクトと連携して実施し

た班研究の結果の概要を以下の(1)～(4)に記した。

(1)薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究(土井)

(1)-1 CYP 誘導剤投与による母体肝・胎盤・胎児肝における薬物代謝関連遺伝子の発現プロファイル

PCN および PB 投与により、母体肝・胎盤・胎児肝にそれぞれ特徴的な病理学的・生化学的変化が認められ、マイクロアレイ解析によって、薬物代謝酵素関連遺伝子発現のそれぞれに特徴的な変化が見いだされた。

(1)-2 胎児中枢神経毒性

5AzC 投与妊娠ラットの胎児終脳 ventricular zone (VZ)において、5AzC が S 期の神経上皮細胞に取り込まれた後に DNA 傷害を起こし、投与 12 時間後には p53 を介した p21 による細胞周期停止 (G1 期) やアポトーシスを惹起することを示唆する所見が得られた。同時に行ったマイクロアレイ解析では、アミノ酸関連遺伝子、細胞分裂関連遺伝子、p53 転写標的遺伝子、細胞周期関連遺伝子、増殖関連遺伝子、免疫関連遺伝子、細胞外基質、血管関連蛋白遺伝子、HIF-1 の転写標的遺伝子、解糖系酵素遺伝子等、多くの遺伝子の発現変動が観測された。また、T-2 toxin 投与妊娠ラットの胎児終脳 ventricular zone (VZ)でも、神経上皮細胞のアポトーシスが観測されたが、同時に行ったマイクロアレイ解析では、シグナル伝達関連遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子、MAPK

シグナル伝達系、アポトーシスおよび増殖関連遺伝子等、多くの遺伝子の発現変動が観測された。

(1)-3 妊娠動物における化学物質誘発病変の性状に関する予備検討

NMDA、HU、および Ara-C について、胎児中枢神経および胎盤毒性の性状とその発現機構の一部を明らかにした。

(2)化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究(遠藤)

(2)-1 硫酸抱合体を選択的に輸送する有機アニオントランスポーター-OAT7 の同定

データベースより有機アニオントランスポーター-OAT1 類似配列を見出し、ヒト OAT7cDNA の塩基配列を決定した。

OAT7 は、ヒト有機アニオントランスポーター-OAT1 と 42%、ラット有機アニオントランスポーター-OAT2 と 35%、ヒト有機アニオントランスポーター-OAT3 と 41%、ヒト有機アニオントランスポーター-OAT4 と 46% のアミノ酸配列の相同性を有していた。種々の解析により OAT7 は肝細胞側底膜(類洞側膜)に存在する有機アニオントランスポーターであり、外来性異物やステロイドホルモンの硫酸抱合体を主に輸送基質とするものであることが明らかとなった。

(2)-2 腎に発現する新規アミノ酸トランスポーター-LAT4 の同定と解析。

平成 14 年度の研究において同定した新規アミノ酸トランスポーター-LAT3 の塩基配列を用い、データベース検索を行った結果、LAT3 類似の新規配列(LAT4 と命名)が得られた。LAT4 は、LAT3 と 58% の相同性を示すタンパク質であり、腎及

び胎盤でのアミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送に関わることが示唆された。

(2)-3 悪性腫瘍のアミノ酸トランスポーターの抑制による細胞増殖抑制効果。

LAT1 は、正常組織における発現は、脳、胎盤、骨髄、精巣等に限られ、胎児肝において強発現するが、成体肝において発現は検出されない。LAT1 の部分配列は、機能未同定の癌関連配列 TAI としてすでに報告されていた。そこでヒト腫瘍細胞株及びヒト悪性腫瘍組織での発現を検討したところ、多種のヒト腫瘍細胞株や悪性腫瘍組織で発現が亢進しており、LAT1 が腫瘍細胞に発現の亢進するシステム L の分子実体であることが明らかになった。

腫瘍細胞増殖における LAT1 の役割を検討する目的で、古典的システム L 抑制薬 BCH 及び LAT1 特異的なアンチセンスオリゴ DNA の腫瘍細胞増殖に対する効果を検討した。BCH は、検討したヒト腫瘍細胞株（30種類）のほとんどに対して、その増殖を濃度依存的に抑制した。LAT1 のアンチセンスオリゴ DNA を用いても同様な結果が得られた。また、癌移植マウスにおいて BCH や LAT1 アンチセンスオリゴ DNA により腫瘍抑制効果が得られた。

LAT1 選択的な高親和性抑制薬の創製を目的として、構造活性相関の解析に基づき化合物デザインを行い、BCH に比し LAT1 への親和性が約 1,000 倍高い 2 種の新規化合物 KYT0193 及び KYT0206 を得た。両者ともにアミノ酸取り込み阻害活性に相当する増殖抑制効果、抗腫瘍効果を示した。

(3) 大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究（若林）

(3)-1 種々の HCA の「短期投与方法」による ACF の誘発と発現変動する遺伝子群の網羅的解析

PhIP、IQ、MeIQ、Glu-P-1、MeIQx、Trp-P-2 を、「短期投与方法」によりラットに投与すると、前 5 者は ACF を誘発した。投与開始後、3 及び 6 週での大腸粘膜での遺伝子発現を網羅的に解析したところ、HCA により発現量が抑えられた遺伝子が多かったが、これは HCA の肝毒性の反映と考えられた。

次に、大腸発がん物質に特異的に発現変動している遺伝子の探索を行った。種々検討の結果、特異的な 10 個の遺伝子を見いだしたが、これらは代謝関連遺伝子や転写因子、細胞増殖や炎症反応に関与している遺伝子であった。

(3)-2 K-ras 遺伝子の変異を導入した培養細胞の IL-1 β 及び LPS 刺激による iNOS の発現の解析

ラット小腸上皮細胞由来 IEC-6 細胞では、IL-1 β や LPS 刺激をしても iNOS の発現はほとんど認められない。この細胞に、K-ras 遺伝子のコドン 12 番の変異体を導入し、IL-1 β や LPS 刺激時の iNOS の発現をイムノプロットにより調べた。その結果、iNOS が顕著に誘導されることが明らかとなった。軟寒天培地でのコロニー形成は、IL-1 β や LPS 刺激により増加し、これは NOS 阻害剤によって減少した。

(4) 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究（菅野）

(4)-1 モデルとしての Circadian rhythm

及び TCDD 暴露時における恒常性維持機構に関連する遺伝子群の解析に関する研究

恒常性を維持する機構の一例として、化学物質投与などとは非依存的な circadian rhythm について解析を行った。この恒常性維持機構には Bmal1, Clock, Per, Cry ファミリーなど多くの遺伝子が複雑に関連していることが報告されている。これら代表的な遺伝子の発現パターンを検討した結果 8 時間に Dbp, Per, 及び Cry の発現上昇、Clock 及び E4bp4 の発現低下が観察された。この解析を「各時間における vehicle control に対する比」を用いて行くと circadian rhythm はみられなくなることから、Percellome による解析法の利点の一つが明らかとなった。

次に、ダイオキシンレセプター(Ahr)を介する TCDD により発現が誘導される既知の遺伝子について解析したところ、多くの遺伝子について特徴的な時間依存的・用量依存的発現パターンを検出することができた。

(4)-2 恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討

細胞を低酸素と E2 または TGF による同時刺激し、VEGF の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR で測定した。VEGF mRNA の発現量は、低酸素刺激で約 2 倍増加し、ここに Estradiol の作用が加わると、約 4.3 倍の増加となった。この効果は、ER アンタゴニストで抑制されなかった。一方、低酸素下に TGF- β 1 を作用させた群では、約 4 倍の発現量の増加が観察され

た。これらの機序を検討する準備として、reference gene のプライマー設計を行った。低酸素下で VEGF の発現量を増加させる他の外因性因子の選択も行い、現在それらの作用条件の検討中である。

(4)-3 HL60 細胞を使った分化に関する遺伝子の検索

レチノイン酸及び DMSO 処理により遺伝子発現強度の変化する多数の遺伝子を見いだした。分化した細胞にて発現の上昇している遺伝子には、イムノグロブリン、インターロイキン関連遺伝子、CD44 をはじめとする 6 種の血球膜抗原の発現も亢進した。次に HL-60 細胞と HL-60RG 細胞を比較し、発現差のある遺伝子群を検出できた。これには、外部刺激に対して応答する遺伝子群が多く含まれていることがわかった。

(4)-4 老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索

8 週齢のマウスに関して検討を行った結果、老化促進マウスにて発現の上昇する遺伝子 41、減少している遺伝子 34 を特定した。このうち発現の上昇した遺伝子としては、melanoma antigen、減少した遺伝子としては transthyretin が注目された。

D. 考察

本プロジェクトは以下の 3 点をその特長としている。

1. 本プロジェクトで完成予定のデータベースは、その質と量に関して、世界に例をみないものである。現在、トキシコゲノミクス関係のデータベースは、世界的には 2 つの方向性を持っている。一つは、世界中

の種々の機関に別個に存在しているトランスクリプトームのデータ、臨床・非臨床データを結びつけて巨大なネットワークを構築し、これを解析することによって安全性予測を達成しようというもので、米国のNIEHSを中心とした、国が関与するプロジェクトがこの方式をとっている。しかしながら、このストラテジーには限界が見えてきている。それは、各種毒性データの統一化がなされておらず、記述的であることに加え、最大の問題として、トランスクリプトームデータの標準化がなされていないために、異なったデータベースを統合することが非常に困難であることが指摘されている。これは、既存のデータベースであっても、これから構築されるデータベースでも同様である。すなわち、データの質が高くないと、いくら巨大化したところで有効な予測は不可能であるということである。第二の方向性は、一機関で得られるデータのみを集積するというストラテジーであり、各製薬会社やベンチャー企業で採用されている。この場合、限られた数の化合物を限られたプロトコールで暴露実験し、それに基づいて予測システムを構築するため、データの統一性がとれており、一定の成功例が報告されつつある。しかしながらこの方式は、ある特定の化合物にたまたま有効であっても、種々の毒性プロファイルをもつ化合物群、特に毒性未知の化合物に適用可能であるとは思われず、新規化合物の安全性予測には疑問が残る。また、その機関でのデータしか扱えないという問題点もある。これらに対し、本プロジェクトで構築を目指しているデータベースは、約150種類の化合物それぞれについての遺伝子発現解析は、ラットへの単回投与3用量4時点、連続投与3用量4時点、更にラットとヒトの

培養肝細胞における3用量4時点という、充実した実験プロトコールを適用し、かつ生化学・病理学データも対応したものを得るという、まさにトランスクリプトームと毒性フェノタイプの両者の完全なセットを含むものである。これにより、種々の毒性プロファイルをもつ化合物についても対応が可能となるであろう。更に、本プロジェクトで選択された初期化合物は、毒性学上古典的なものの殆どが含まれているが、これほどの完全なデータセットが揃っている場所は世界に類をみない。まさに、毒性学上の標準的アーカイブとして、貴重な財産となるにちがいない。

2. 第二点として、遺伝子発現解析における強力な標準化戦略の実施が挙げられる。これは、従来の「発現比」に依らず、細胞当たりmRNA絶対量の測定を可能としたものである。今年度、これをPercellomeと命名し、その実用性・有用性を確認した。プロジェクト開始直後より、Percellomeによる標準化によって、再現性、定量性の向上が確認されていた。特に今年度はGeneChipのバージョンアップがなされたが、従来であると、データベースの均一性を保つために旧チップの使用を余儀なくされるか、不均一なデータベースを構築するかのどちらかであった。本年度末、全世界でのβテストに参加してチェックした結果、スムーズに新チップに移行できたことは、異なるプラットフォーム間、あるいはマイクロアレイの新旧バージョン間のデータ互換性を確保するための「橋渡し戦略」が奏効しつつあることの証明である。

3. 第三点として、プロジェクトで検討する約150種類の化合物に「開発段階では検出されなかった毒性がヒトに投与して初めて顕在化した」為に「開発中止、あるいは