

$P(C_A)$ は、親ノードの化合物が、子ノード A に分類される確率である。この値は、0 の時最小となりこのとき、二つの子ノードは属性値で完全にサンプルを分類する。大きければ大きいほど、分類の精度が悪い。

今回用いたデータセットは、発ガン性の有無が長期毒性試験で確認されている 51 個の化合物をラットに連続経口投与し、ラットマイクロアレイ RGU-34A (Affymetrix 社) を用いて 1,3,7,14,28 日目の肝臓を採取し、8000 遺伝子の発現プロファイルを解析した。Leave one out cross validation (LOOCV) 法を用いて、生成された木の予測精度を検証した。

2 ラット肝における薬物投与後の遺伝子発現プロファイル解析

アセトアミノフェン 0.3g/kg、2.0g/kg 経口投与を行ったラットおよび Control ラットを投与 48 時間後に剖検し、摘出した肝臓より RNA を抽出し、肝組織における遺伝子発現変動を検討した。Total RNA を精製して T7 RNA ポリメラーゼを用いて cRNA を合成・標識し、アレイにハイブリダイゼーションした。発現プロファイルに用いた GeneChipRAE230A および 230B アレイにはトランスポーター遺伝子は 22 遺伝子が搭載されていた。(倫理面への配慮)

本年度の研究計画ではヒトケノムのケノタイピングは施行しない。

C 研究結果

1 薬物投与後時系列データの解析アルゴリズムの開発

LOOCV 法では、51 回の施行のうち、最初に取り除いた 1 つのサンプルを正確に分類できたのは 41 個で、80.4% の正確さだった。各回の施行で、決定木を作るのに使われる遺伝子は少しずつ違うか、全体では 25 個の遺伝子を分類に使われる遺伝子として抽出した。手法の有効性を確かめるために、51 サンプルにランダムに発ガン性の有無の属性値を付与した結果、予測精度は 41.2% にまで低下した。

2 ラット肝における薬物投与後の遺伝子発現プロファイル解析

0.3g/kg で発現低下と判断されたのは Abcg5、2.0g/kg で発現低下と判断されたのは Abcb11、Abcc2、Abcc6 の 3 遺伝子であり、Abcc3 については増加していた (図 2)。

D. 考察

決定木を用いたデータマイニングが、DNA マイクロアレイの時系列データの解析に応用できることが示された。ランダムに属性値を割り当てた場合、予測精度が 1/2 程度にまで低下することから、マイニング手法は有効に機能して、遺伝子発現の差異を捉えているものと考えられる。さらにデータの前処理やノード分割の条件を変えることで予測精度を向上できると期待される。今回は、ノードを分割する際に、特定のタイムポイントと 1 つの遺伝子の発現値に着目しているが、今後は発現値の時系列データとうしの比較が出来るように手法を改良する必要がある。サンプルが少ないこともあり、決定木を生成する際にリストアップされた遺伝子は 25 個と少ないか、これらの遺伝子が発ガンとどのように関連しているかは今後の検討課題である。

今後の最優先課題は、データの時系列としての特性をそのまま使った解析手法の開発である。これは、再帰的にノードを分割して行く際、どのような分類手法を使うかという問題になる。機械学習の分野では、様々な分類手法が提案されている。中でも support vector machine (SVM) は遺伝子発現情報の解析にも広く用いられている。決定木を生成する際、SVM を使ってノードの分割を定義する方法を次年度において開発してゆく予定である。

E. 結論

トキシコゲノミクス的手法として注目されているマイクロアレイ解析について 2 項目の検討を行った。1) 薬物を投与したラット肝からの遺伝子発現プロファイルを時系列データについて、決定木を含むマイニング手法について検討した。2) アセトアミノフェン投与 48 時間後のラット肝臓において、0.3g/kg で発現低下したのは Abcg5、2.0g/kg で発現低下は Abcb11、Abcc2、Abcc6 の 3 遺伝子、Abcc3 は増加していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe A, Hippo Y, Tamguchi H, Iwanari H, Yashiro M, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H An Opposing View on WWOX Protein Function as a Tumor Suppressor Cancer Res 63(24) 8629-8633 2003

- 2) Ge X, Tsutsumi S, **Aburatani H**, Iwata S
Reducing false positives in molecular pattern recognition *Genome Informatics* 14 34-43, 2003
 - 3) Mizukami M, Hasegawa H, Kohro T, Toko H, Kudoh T, Zou YZ, **Aburatani H**, Komuro I
Gene expression profile revealed different effects of angiotensin II receptor blockade and angiotensin-converting enzyme inhibitor on heart failure *Journal of cardiovascular pharmacology* 42 S1-S6, Suppl 1 2003
 - 4) Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, **Aburatani H**, Sugiyama Y
Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier High affinity transporter for thyroxine *J Biol Chem.* 278(44) 43489-95, 2003
 - 5) Satoh T, Baba M, Nakatsuka D, Ishikawa Y, **Aburatani H**, Furuta K, Ishikawa T, Hatanaka H, Suzuki M, Watanabe Y
Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects of cyclopentenone prostaglandin derivatives under oxidative stress *Eur J Neurosci* 17(11) 2249-2255 2003
 - 6) Shimizu H, Taniguchi H, Hippo Y, Hayashizaki Y, **Aburatani H**, Ishikawa T
Characterization of the mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human ABCC12 *Gene* 310 17-28 2003
 - 7) Fujiwara Y, Yokoyama M, Sawada R, Seyama Y, Ishii M, Tsutsumi S, **Aburatani H**, Hanaka S, Itakura H, Matsumoto A,
Analysis of comprehensive effects of polyunsaturated fatty acid on mRNA expression using a GeneChip *J Nutr Sci Vitaminol*, 49 125-132 2003
 - 8) Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, **Aburatani H**.
Expression Imbalance Map A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions *Physiol Genomics* 13 31-46, 2003
- 総説**
- 1 油谷浩幸、平井久丸、杉山雄一 ポストゲノム時代の医療(鼎談) *現代医療* 35(7) 1428-1443, 2003
 - 2 油谷浩幸 ケノム創薬とプロテオミクス *Medical Briefs in Cancer* 8(3) 10-11, 2003
- 2.学会発表**
- 1 BioEXPOセミナー(東京)5/15 遺伝子発現解析を用いた創薬研究への展開
 - 2 Amersham Biosciences Symposium 2003(東京・大阪)6/18・19 トランスクリプトーム解析による疾病解析の現状
 - 3 第5回国際ゲノム会議(横浜)6/27 Transcriptome to Integrated Biology
 - 4 第14回 南大阪がん研究会(近畿大)10/16マイクロアレイ解析の疾患医療への応用
 - 5 関東腎研究会(東京)1/17 Clinical genomics マイクロアレイ解析の医療への応用
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)**
- 1.特許取得**
なし
 - 2.実用新案登録**
なし
 - 3.その他**
なし

図1 決定木を用いたデータマイニングの方法

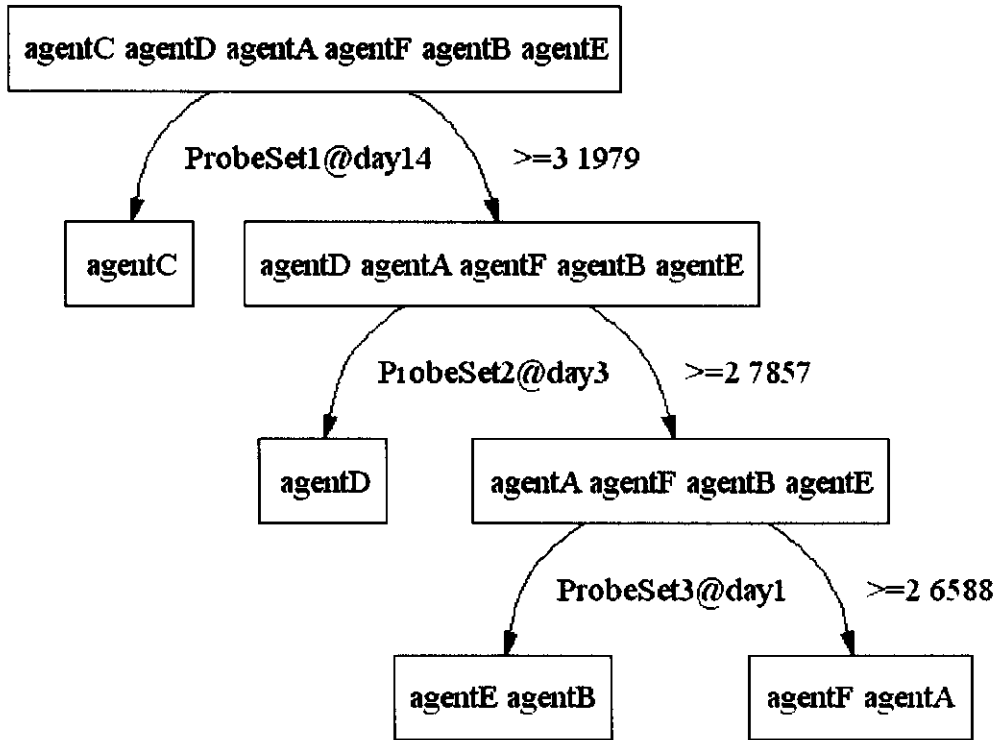
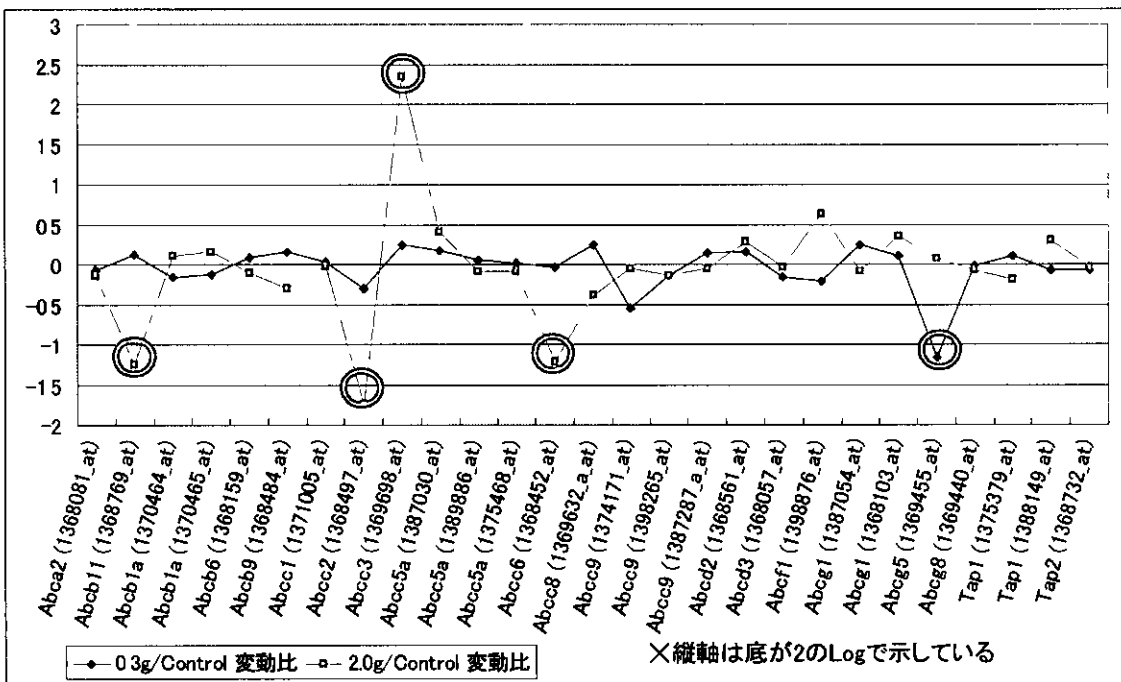


図2 アセトアミノフェン投与 48 時間後の ABC トランスポーター遺伝子の発現変動



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）
分担研究報告書

医薬品・化学物質のデータベース化に関する研究

分担研究者 中田 琴子（国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部）

研究要旨

医薬品や毒性研究の情報基盤整備のために、医薬品や内分泌かく乱化学物質等の体内標的として酵素やトランスポータに関する種々のデータを収集整理してデータベース化した。医薬品/化学物質と体内標的の構造データ、結合親和性、細胞内信号伝達情報、SNP 情報等を含め、体内標的と薬物相互作用解析の基礎データを提供する。

A. 研究目的

医薬品や毒性研究の情報基盤整備のためにこれまで受容体データベース、内分泌かく乱物質のための結合親和性データベース、薬物代謝酵素チトクローム P450 関連知識ベース等を開発してきた。この情報基盤をさらに拡充するため、本研究では体内標的として酵素およびトランスポータについて分子レベル解析用のデータを収集整理してデータベースを構築する。

また核内受容体等パラダイマティックな標的とりガンドについての結合親和性について生物実験値および理論計算値の比較検討を含め、細胞内信号伝達から遺伝子発現までのパスウェイについて究明する。

B. 研究方法

医薬品・化学物質のデータベースを構築し、データ解析を行う。

- 1) 受容体データベースの内容更新
- 2) 酵素データベースの修正・更新
- 3) トランスポータデータベースの修正・更新
- 4) 薬効別分類（日本公定書協会編 医薬品一般名称辞典 1996）に基づく医薬品の標的データベース構築
- 5) (4)の標的データベースから(1)、(2)、(3)の処置を施したデータベースにリンクする。
- 6) 受容体と医薬品等リガンドとの結合親和性について実験値および理論計算値を比較検討する。

- 7) 核内受容体（PPAR と LXR）標的遺伝子の探索法検討。既存の代表的なモチーフ検索プログラムである期待値最大法(Multiple Expectation maximization for Motif Elicitation / Motif Alignment & Search Tool, MEME/MAST) および隠れマルコフモデル(HMMER) を用いてその有用性を検討し、さらに応答配列検索プログラム (MC3) の開発を試みる。

C. 結果

医薬品の標的データベース

医薬品を薬効別に分類した標的データベースを構築し、試験的に Web 化した。

<http://moldb.nihs.go.jp/tgdb/>

個々の医薬品の 3 次元構造については東京薬科大学薬学部土橋研究室で開発・公開している「3 次元医薬品構造データベース(3DPSD)」

にリンクした。医薬品の標的については、受容体データベース、酵素データベースにリンクした。

結合親和性について

受容体データベース中の結合親和性データについて、東京大学生産技術研究所の戦略ソフトウェアプロジェクトにおいて中田グループが開発 公開した「タンパク質-化学物質相互作用解析支援のためのデータベース KiBank」にリンクした。酵素やトランスポータに関する結合親和性等については検討中である。

標的遺伝子の *in silico* 探索法について

MEME/MAST および HMMER について、PPAR および LXR の標的遺伝子探索を試みたところ、どちらも単独で検出するのはむずかしいことが判明した。LXR についてプロモータ配列を解析したところ MC3 による検出率が最良で ABC トランスポータ 6 個と CYP 7 個の標的遺伝子とその LXR 応答配列の位置を *in silico* で同定できた。

D. 考察

標的データベース中の医薬品については、現在日本の医薬品 (JAN) のみ含めたが、今後欧米の医薬品についても含めていく予定である。標的については対応付けが未完で更新中である。酵素やトランスポータの 3 次元構造についての実験結果が増加することを期待している。

受容体とリガンドの結合親和性について、これまで内分泌かく乱物質のための結合親和性データベース (BADB) 中の相対的結合親和性 (Relative binding affinity) を用いていたが、異なる論文間での比較を可能にするため、KiBank 中の inhibition constant (Ki) を採用することにした。

標的遺伝子の *in silico* 探索を行い、LXR について新たに ABC トランスポータ 6 個、CYP 7 個の標的遺伝子とその応答配列の位置を同定したが、実際に機能するか否かは実験により確かめる必要がある。既知応答配列を LXR α と LXR β にわけると高い精度のマルコフ連鎖モデルを構築することができるが、検索に十分なモデルを構築するためには既知応答配列を多数収集する必要がある。また応答配列の下流についてはイントロン内を解析する必要があるなどの問題を含んでいる。今後さらに詳細を検討していきたい。

E. 結論

医薬品の標的データベースについては、今のところ日本の医薬品のみ限定されているが、3 次元構造を含む医薬品情報と標的情報を対応づけた。酵素データベースおよびトランスポータ・データベースについては構造や結合親和性データについて、今後充実させていきたい。受容体データベース中の結合親和性データについて、現状は実験値のみであるが、最近有用性が示されてきた非経験的フラグメント分子軌道法 (ab initio FMO) を用いた計算結果等も含めたい。標的遺伝子についても実験値のみでなく *in silico* 探索法を確率させて、予測結果も記載していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Toda, K., Ishida, S., Nakata, K., Matsuda, R., Shigemoto-Mogami, Y., Ozawa, S., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K. and Hayashi, Y. Improvement in Reliability of Probabilistic Test of Significant Differences in GeneChip Experiments Anal Sci (in press)
- Fukuzawa, K., Kitaura, K., Nakata, K., Kamunuma, T and Nakano, T. Fragment molecular orbital study of the binding energy of ligands to the estrogen receptor Pure Appl Chem. 75, 2405-2410, 2003
- Toda, K., Ishida, S., Nakata, K., Matsuda, R., Shigemoto-Mogami, Y., Fujishita, K., Ozawa, S., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K., Hayashi, Y. Test of significant differences with *a priori* probability in microarray experiments Analytical Sciences, 19, 1529-1535, 2003
- Shimizu, T., Ochiai, H., Asell, F., Yokono, Y., Kikuchi, Y., Nitta, M., Hama, Y., Yamaguchi, S., Hashimoto, M., Taki, K., Nakata, K., Aida, Y., Ohashi, A., Ozawa, N. Bioinformatics Research on Inter-racial Difference in Drug Metabolism II Analysis on Relationship between Enzyme Activities of CYP2D6 and CYP2C19 and their Relevant Genotypes Drug Metabolism and Pharmacokinetics 18, 71-78, 2003
- Kamunuma, T and Nakata, K. Global Information Network on Chemicals Toxicology 190, 93-103, 2003

2. 学会発表

- 愛澤昌宏、小野寺賢司、張軍衛、甘利真司、岩澤義郎、中野達也、中田琴子 KiBank タンパク質-化学物質相互作用解析支援データベース、日本薬学会第 124 回年会、(大阪、2004 年 3 月)
- Nakata, K., Momose, H., Tanaka, Y., Tanaka, H. and Kamunuma, T. Extension of Receptor Database and Drug Targets Biophysical Society 48th Annual Meeting (Baltimore, Feb 2004)
- Nakata, K., Tokunaga, M., Komiyama, N. and Kamunuma, T. From Drug Target to Pathways New Horizons in Molecular Sciences and Systems An

Integrated Approach. (Okinawa, Oct 2003)

Zhang, J MAizawa, M Onodera, K., Amari, S, Iwasawa, Y, **Nakata, K.** KiBank A Database for Molecular Interaction Analysis between Proteins and Chemicals Chem-Bio Informatics Society 4th Annual Meeting (Tokyo, Sep 2003)

百瀬大樹、神沼二真、田中義智、中田琴子、田中博 核内受容体 PPAR の標的遺伝子の探索、CBI学会第4回年会(東京、2003年9月)

- ・田中義智、神沼二真、百瀬大樹、中田琴子、田中博 医薬品の相互作用に関連した核内受容体の標的遺伝子の探索、CBI学会第4回年会(東京、

2003年9月)

- ・**Nakata, K.**, Saithoh, R, Tokunaga, M A Transporter Database as a Drug Target Database The 4th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects (Fuku, 2003 5)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

別紙5

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ishikawa T	Multidrug Resistance Genetics of ABC Transporters	Cooper, D N	Nature Encyclopedia of the Human Genome, vol 4,	Nature Publishing Group,	London	2003	154-160
石川智久			ケノム創薬と未来産業	エルゼビア ジャパン	東京	2003	総ページ94

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	
Mitomo H Kasamatsu, S Ito, K, Ikegami Y, and Ishikawa T	A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 critical role of Arg-482 in Methotrexate transport	Biochem J	373,	767-774	2003	
Shimizu H Taniguchi, H, Hippou, Y Yashizaki, Y, Aburatani, H and Ishikawa, T	Characterization of mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue to human ABCC12	Gene,	310,	17-28	2003	
Ishikawa T Kasamatsu, S, Hagiwara Y, Mitomo H Kato R and Sumino Y	Expression and Functional Characterization of Human ABC Transporter ABCG2 Variants in Insect Cells	Drug Metabol and Pharmacokin,	18,	194-202	2003	
Takayanagi S and Ishikawa, T	Molecular Identification and Characterization of Rat Abcc1 cDNA Existence of two splicing variants and species difference	J of Exp Ther and Oncol,	3,	136-146,	2003	
Sano K Yoshikawa M Hayakawa S, Ikegami Y Yoshida H Ishikawa, T, Sawada, S, and Tanabe, S	Simple non-ion-paired high performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of carboxylate and lactone forms of 14 new camptothecin derivatives	J Chromatogr B,	795	25-34	2003	
Onishi, Y, Hirano, H, Nakata, K Oosumi K Nagakura, M Tarui, S and Ishikawa, T	High-speed screening and structure-activity relationship analysis for the substrate specificity of P-glycoprotein (ABCB1)	Chem-Bio Informatics J,	3,	175-193	2003	
Satoh T, Baba, M, Nakatsuka D, Ishikawa, Y Aburatani H Furuta, K Ishikawa, T, Hatanaka, H, Suzuki, M and Watanabe, Y	Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects of cyclopentenone prostaglandin derivatives under oxidative stress	Eur J Neurosci	17,	2249-2255	2003	
Watanabe, A, Hippo Y, Taniguchi H Iwanari H Yashiro M Hirakawa K Kodama T and Aburatani, H	An Opposing View on WWOX Protein Function as a Tumor Suppressor	Cancer Res	63	24,	8629-8633	2003
Ge X Tsutsumi S Aburatani, H, and Iwata, S	Reducing false positives in molecular pattern recognition	Genome Informatics	14	34-43,	2003	
Mizukami, M, Hasegawa, H, Kohro, T Toko H Kudoh, T, Zou YZ, Aburatani, H, and Komuro, I	Gene expression profile revealed different effects of angiotensin II receptor blockade and angiotensin-converting enzyme inhibitor on heart failure	Journal of cardiovascular pharmacology	42,	S1-S6	2003	
Sugiyama, D Kusuvara, H, Taniguchi, H Ishikawa S Nozaki Y Aburatani H and Sugiyama Y	Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier High affinity transporter for thyroxine	J Biol Chem	278(44)	43489-95	2003	
Fujiwara, Y, Yokoyama, M, Sawada, R, Seyama, Y, Ishii, M, Tsutsumi S Aburatani, H, Hanaka, S, Itakura, H, and Matsumoto A	Analysis of comprehensive effects of polyunsaturated fatty acid on mRNA expression using a GeneChip	J Nutr Sci Vitaminol	49	125-132,	2003	
Kano M Nishimura K Ishikawa S, Tsutsumi S Hirota K Hirose M and Aburatani, H	Expression Imbalance Map A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance Regions	Physiol Genomics	13	31-46,	2003	
油谷浩幸 平井久丸 杉山雄一	ホストケノム時代の医療 (鼎談)	現代医療	35(7),	1428-1443	2003	

別紙5

油谷浩幸	ゲノム創薬とプロテオミクス	Medical Briefs in Cancer	8(3),	10-11	2003
Fukuzawa K, Kitaura, K, Nakata K, Kamunuma, T, and Nakano, T	Fragment molecular orbital study of the binding energy of ligands to the estrogen receptor	Pure Appl Chem	75,	2405-2410	2003
Toda, K, Ishida, S, Nakata, K, Matsuda R, Shigemoto-M, Y, Ozawa S, Sawada, J, Inoue, K, Shudo K and Hayashi Y	Test of significant differences with a priori probability in micro-array experiments	Analytical Sciences	19,	1529-1535	2003
Shimizu T, Ochiai, H, Asell, F, Yokono Y, Kikuchi, Y, Nitta M, Hama, Y, Yamaguchi S, Hashimoto M, Takai K, Nakata K, Aida Y, Ohashi A and Ozawa N	Bioinformatics Research on Inter-racial Difference in Drug Metabolism II Analysis on Relationship between Enzyme Activities of CYP2D6 and CYP2C19 and their Relevant Genotypes	Drug Metabolism and Pharmacokinetics	18,	71-78	2003
Kamunuma T and Nakata, K	Global information network on chemicals (GINC) and its Asian component	Toxicology	190,	93-103	2003