

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長尾 拓

平成17年(2005)4月

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長尾 拓

平成17年(2005)4月

様式A-1 (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成17年4月8日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

住 所 153-0051 東京都目黒区上目黒4-36-21
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16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)に関わる研究事業を完了したので次のとおり報告する。

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 640,000,000 円也

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 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)
7. 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・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16年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 長尾 拓

平成17（2005）年4月

別添2

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 39
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
金井好克 75
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 139
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 165

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 213

IV. 研究成果の刊行物・別刷 219

別添3

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医薬基盤研究施設・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の必要性が叫ばれている。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100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」も参加企業から提供され、順調に実験が進行している。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1.5を改良・増補し、バージョン2.0にグレードアップするとともに、解析用ツ

ル、生体予測システムのプロトタイプを作成し、将来の本格的システム構築を目指して試用版の検討を開始した。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
金井好克	杏林大学医学部・教授
若林敬二	国立がんセンター研究所・副所長
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受け、10化合物について実験が終了または進行中である。

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100化合物の暴露実験を行ってきた。その一部（約60化合物）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、データベースに格納した。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、10化合物について実験が終了または進行中である。試験管内暴露系に関しては、ラット初代肝細胞の実験完了が約60化合物、ヒト初代肝細胞は約50化合物が完了した。

インフォマティクスに関して、前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。本年度は解析ツール、および生体予測システムのプロトタイプを構築し、試用版として次年度にその性能を詳細に検証していく予定である。これらツール群はエクセルベースで構築した。それは、実際のデータに適用してみて、細かな修正や改良に即時に対応することができ、将来の本格システム構築時により完成度の高い設計が可能となると考えたからである。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）：Streptozotocin による糖尿病誘発マウスにおける肝毒性の性状に関する *in vivo* と *in vitro* の比較，nitrofurazone による肝細胞 mitogen 作用の発現機構の解析，ethylnitrosourea による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析を行い、プロジェクト本体における肝毒性発現機序解析を補完することによって、予測システムの精度向上を企図した。

(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（金井）

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、とくに本年度以降解析が開始される腎臓毒性の解析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って、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するものである。本年度はそのモデルケースとしてAhR作動性化学物質の恒常性維持機構に関与する遺伝子群の発現変動解析、及びその応用として、恒常性維持に関わるエピジェネティック制御機構障害の神経幹細胞をモデルにした研究、発がんプロモーション過程の甲状腺・自律性差の解析にかかる検討を行った。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)

前年度までに確立した手法を基に、本年度も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100、うち、発

現データが得られているものは約80である。in vitro の実験は、ラット初代肝細胞の実験完了が約60化合物、ヒト初代肝細胞は約50化合物が完了した。

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、約60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。

また平成15年度に完成した統合データベースのバージョン1.5は、検討を加え、バージョン2.0にグレードアップした。バージョン1.5において達成された機能、すなわち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3種の大規模クラスタリングの機能に加え、各種統計テーブルが装備され、また検証用の定量的PCRデータ、および病理組織標本の画像データ、更に予測に必要なマーカー遺伝子リストをそれぞれ格納する機能を実装した。これらにより、以降の年度におけるデータ解析に大きな力となる。今年度は更に、データ解析に有用なツール類、および毒性予測システムのプロトタイプをエクセルベースで構築し、その試用を開始した。その時点までに得られているデータを用いて、解析・予測アルゴリズムの開発・改良を行い、次年度における本格システムへのグレードアップに備える。

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バ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きた。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。来年度よりプロジェクト本体を国立医薬品食品衛生研究所から独立行政法人医薬基盤研究所へ移設する必要から、本年度末に機械設備の移動を行い、実験フローの再立ち上げとバリデーションを行っている。また、昨年度、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、新製品RAE230-2.0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ングに関する検討を行ったが、それ以後IVTキットの変更、フルイディクスプロトコール変更など、細かな技術的な変更が続いた。これらの変更による功罪について検討を行い、データベースの一貫性を担保しつつプロトコールの改良を続けてきた。

(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、今年度までに約100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」に関して参加企業16社から提供をうけ、既に10化合物について実験に着手している。

(3) *in vivo*・*in vitro*試験

*in vivo*試験は前年度までにプロトコールは確定し、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。昨年度から、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施設へ増やしている。

ラット初代培養肝細胞およびヒト初代培養肝細胞による試験は、昨年度にプロトコールを確定し、本年度はラットについて約60, ヒトについては約50化合物の実験が終了している。

(4) データベース・バイオインフォマティクス

トキシコゲノミクスプロジェクト統合データベースシステムは、完成時には以下の3つの部分から構成される。

1. 遺伝子発現統合データベース

これは、in vitro の遺伝子発現データ群、および in vivo の遺伝子発現データを、関連する病理・生化学データ、化合物情報、病理組織写真などと関連づけて蓄積し、ユーザーの希望するデータを効率よく引き出すことのできるインターフェースを備える。また、次の2項目に対応するための各種統計テーブルも装備する。

2. 解析システム

研究者による化合物作用の理解を助けるため、各種統計解析ツール、クラスタリング解析ツール、および結果を可視化するツールからなる。本年度までに、3種類の大規模クラスタリングツールは実装したが、その他の解析ツールに関しては本年度はエクセルベースの試用版とし、将来の本格稼働に備えて改良を重ねることとした。

3. 生体作用予測システム

病理組織所見や血液生化学所見と遺伝子発現変化を関連づけるアンカーリングツール、生体予測に有用な遺伝子リストを編集・登録するツール、新規データをクエリーとして登録できる機能を備えた生体作用予測ツールについて、本年度はエクセルベースの試用版を完成させ、来年度以降実際のデータを用いた検討を繰り返すことによりアルゴリズムの改良・見直しを行い、最終的な本格稼働に備えることとした。

以上、本システムが完成した暁には、データベース中のデータを選択或いはユーザー独自データをアップロードし、データベース内の情報を用いてその内容を解析したり、生体作用を予測したりし、

その結果を研究者にわかりやすい形で表示することが可能となる。今年度未着手であって次年度から重点的に行うべき課題として、ラットおよびヒト一次培養肝細胞を用いた種差のブリッジングがある。来年度中に基本的な戦略を策定し、ブリッジングツールのプロトタイプを構築する予定である。

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)

本年度はまず、streptozotocin による肝毒性の性状をラットのin vivoと in vitroで比較・検討した。Streptozotocin により糖尿病が発症している状態において、in vivoでの肝細胞はミトコンドリアの膨化やリン脂質過酸化物の増加を主徴とする形態変化を示したが、in vitroにおいては核クロマチンのマージネーションが特徴的であり、相違が見られた。しかしながら、マイクロアレイ解析によれば、細胞周期停止関連遺伝子、アポトーシス促進関連遺伝子およびストレス反応/異物代謝関連遺伝子のup-regulation ならびに、糖、脂質およびタンパク質代謝関連遺伝子のdown-regulation という、in vivo, in vitro 両者でよく相関した変動パターンを示した。このことは、本プロジェクトの主戦略の一つである、in vitroモデルを用い

た種差のブリッジングに対して大きな寄与をするものである。

次に、プロジェクト本体で採用されている試験化合物の中からnitrofurazoneを選択してその初期応答を検討した。nitrofurazone投与直後には肝細胞障害は認められず、細胞増殖作用が認められ、これは細胞内グルタチオン濃度を上げ、抗酸化剤としても作用するN-acetylcysteinの投与で抑制された。マイクロアレイ解析により、nitrofurazone投与直後に*c-jun*, *c-myc*が増加し、続いて*TNF- α* および*TGF- α* が増加、その後*c-Ha-ras*, *cyclin E*が増加すること、またこれらの遺伝子の発現増加はNACの投与で抑制された。これらの点も本プロジェクトデータベース内のデータ解析に大きな寄与をするものである。

さらに、本プロジェクトを補完する目的で、DNA 傷害物質 ethylnitrosourea (ENU) による胎児中枢神経の傷害期および修復期における遺伝子発現プロファイルを明らかにした。傷害期に増加を示す遺伝子としてアポトーシスや細胞周期停止に関与する p53 標的遺伝子、修復期に増加を示す遺伝子として増殖促進関連遺伝子 (Id) および osteopontin 遺伝子、傷害期に発現減少を示す遺伝子としてコレステロール生合成関連遺伝子等を見いだした。

(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 (金井)

本年度の研究により、プロスタグランジン系化合物を輸送する腎特異的な

有機アニオントランスポーターUST6、腎、脳に発現する広い基質選択性を示す有機アニオントランスポーターOAT10、精巣に発現する有機アニオントランスポーターOAT11、腎、脳を中心とした発現を示す有機アニオントランスポーターOAT12、及びアミノ酸類似構造を持つ毒性化学物質の輸送経路となる多選択性のアミノ酸トランスポーターB⁰AT1の5種の新規トランスポーターが同定された。また本研究により、腫瘍細胞増殖抑制効果を有する構造の異なるアミノ酸トランスポーター阻害物質による増殖抑制効果のDNAマイクロアレイ解析により、化合物の効果発現の細胞内機序の一端が明らかとなった。プロジェクト本体では腎臓の遺伝子発現解析はまだ本格稼働していないが、これらの研究結果は次年度以降の腎臓の解析に大きな寄与をするものと考えられる。

(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)

ラットでの大腸発がん性が認められていない3種類のHCA類 (Trp-P-2, MeA α C, A α C) について、「短期投与法」によるACFの誘発性を検討し、MeA α Cでも低頻度ながらACFが誘発されること、Trp-P-2の遺伝子発現プロファイルは、階層型クラスター解析の結果、大腸発がん性を示すMeIQ α と一つのクラスターを形成することを明らかにした。Trp-P-2及びMeA α Cは、「短期間歇投与法」を用いることにより大腸発がん性を示す可能性が示唆された。

又、大腸がん組織においてPGE₂受容体EP₃の発現低下が起きていることを見出した。以上の研究は、発がんに関与する重要な遺伝子変位の解明や発がん感受性を規定する遺伝的要因の解明による発がん高危険度群の掌握から、発がん予測を企図したもので、この戦略は同時に、遺伝子発現プロファイルから一般的な臓器毒性を予測しようとするプロジェクト本体の目標のモデルケースとなるべきものでもある。

(4) 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究 (菅野)

“Percellome”手法を適用した濃度・時間的な遺伝子発現誘導を検討した結果、恒常性維持に関与すると考えられる遺伝子群の発現誘導を確認できた。今後更にプロモーター解析等各種解析を組み合わせることにより、恒常性維持機構に関連する遺伝子群の制御回路の解明が進むことが期待される。次に、神経幹細胞をモデルとしたエピジェネティック制御機構障害の研究では、化学物質によりエピジェネティック制御機構が破綻した場合の複雑な変化を、本手法で初めて検出することができた。また、発がんプロセスの甲状腺・自律性差の解析では、ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて今後の発がん過程特異的な遺伝子群を得るための条件が整った。以上により、局所恒常性維持機構に関する情報を得る方策への展開が期待される。

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、この戦略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戦略であり、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。特に昨年度はGeneChipのバージョンアップがなされ、今年度はIVTキットやフルイディクスプロトコルの変更があったが、従来であると、データベースの均一性を保つために旧プロトコル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。

ム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ー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、あるいは販売中止となった医薬品・医薬品候補物質」、副作用情報が公示されている医薬品等を含めて検討する点である。これもまた、世界に例を見ない試みであり、種々困難な点はあったものの、現在約10化合物に関して実験が終了或いは進行中である。

次年度以降の課題

本年度までにおいて、実験プロトコル・化合物選択基準を確定させ、データ取得・品質管理、およびデータ格納が軌道に乗り、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（肝毒性（土井）、腎毒性（金井）、発がん性（若林）、及び恒常性維持機構を標的とした毒性（菅野））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、その成果の元に解析システム、生体予測システムのプロトタイプを設計することができた。更に、委託研究期間ごとにまち

まちであった病理組織評価を統一するためのワーキンググループを設置し、フェノタイプに関連づけた遺伝子変化の抽出の精度向上を図った。

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、具体的データの对外発表は差し控えていた。しかしながら昨年度、社会に対する貢献・説明責任を果たすためには積極的な对外発表が必要であるとの意見が強まり、对外発表を推し進めていくという路線を決定した。そこで本年度は内外のトキシコロジー関連学会で15題を超える研究発表を行い、かつ研究報告会の開催をおこなうことによって本プロジェクトの宣伝に努めた。

E. 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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 学会報告

漆谷徹郎：トキシコゲノミクスプロジェクトの現状と展望，第31回日本トキシコロジー学会学術年会，大阪，平成16年7月6日。

森下克美，笠原利彦，奥山学，高島佳代子，鳥塚尚樹，漆谷徹郎，宮城島利一，長尾拓：アセトアミノフェン単回経口投与後のラット肝臓における遺伝子発現変化と週令差，第31回日本トキシコロジー学会学術年会，大阪，平成16年7月6日。

奥山学，笠原利彦，高島佳代子，森下克美，鳥塚尚樹，宮城島利一，漆谷徹郎，長尾拓：フェノバルビタール暴露後の遺伝子発現のin vivoとin vitro間での比較，第31回日本トキシコロジー学会学術年会，大阪，平成16年7月6日。

笠原利彦，鳥塚尚樹，奥山学，高島佳代子，森下克美，鈴木孝昌，漆谷徹郎，宮城島利一，長尾拓：血清含有及び無血清培地で培養したラット初代肝細胞における経時的遺伝子発現変化のDNAマイクロアレイによる解析，第31回日本トキシコロジー学会学術年会，大阪，平成16年7月6日。

鳥塚尚樹，笠原利彦，森下克美，奥山学，高島佳代子，鈴木孝昌，宮城島利一，漆谷徹郎，長尾拓：ラット初代培養肝細胞における遺伝子発現に対する細胞毒性の影響のDNAマイクロアレイによる解析，第31回日本トキシコロジー学会学術年会，大阪，平成16年7月6日。

高島佳代子, 森下克美, 奥山学, 笠原利彦, 鳥塚尚樹, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 長尾拓: 投与媒体の差による遺伝子発現への影響についての DNA マイクロアレイによる解析, 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪, 平成 16 年 7 月 6 日.

長尾拓: Toxicogenomics Initiative in Japan, 国際臨床薬理学会, オーストラリア, 平成 16 年 8 月 2 日.

長尾拓: トキシコゲノミクス -現状と臨床薬理学への応用, 日本臨床薬理学会, 静岡, 平成 16 年 9 月 17 日.

長尾拓: トキシコゲノミクスプロジェクトの特徴と進捗, 千里ライフサイエンスセミナー (ヒト安全性予測システムの現状と今後の展開), 大阪, 平成 16 年 9 月 28 日.

漆谷徹郎: Toxicogenomics Project in Japan — Present and Beyond, Toxicogenomics International Forum 2004, 京都, 平成 16 年 10 月 12 日

漆谷徹郎: トキシコゲノミクスプロジェクトの現状と展望, 安全性評価研究会冬のセミナー, 東京, 平成 16 年 12 月 11 日

漆谷徹郎: トキシコゲノミクスプロジェクトの現状と展望—1. 遺伝子発現解析. トキシコゲノミクス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・報告会. 東京, 平成17年 1月25日.

T. Matsushita, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao: Gene Expression Profiling In Rat Liver And Hepatocytes Treated With Ethionine — Analysis of The Data in The Toxicogenomics Project in Japan, 44th Society of Toxicology, New Orleans, March 7 2005.

K. Tamura, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao: Gene Expression Profiling in Rat Liver And Hepatocytes Treated With Fibric Acids — Analysis of The Data in The Toxicogenomics Project in Japan, 44th Society of Toxicology, New Orleans, March 7 2005.

H. Ueda, T. Kasahara, H. Totsuka, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao: Extraction of Genes With Stable Expression in Rat Liver Treated With Various Compounds — Analysis of The Data In The Toxicogenomics Project In Japan. 44th Society of Toxicology, New Orleans, March 7 2005.

H. Nitta, H. Totsuka, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao: Evaluation of The Background Data Obtained in The Toxicogenomics Project in Japan. 44th Society of Toxicology, New Orleans, March 9 2005.

Y. Mizukawa, T. Miyagishima, T. Urushidani, T. Nagao: Thioacetamide and Methapyrilene Showed a Unique Gene Expression Profile Among The Chemicals in

The Toxicogenomics Project in Japan. 44th
Society of Toxicology, New Orleans, March 9
2005.

水川裕美子, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 長
尾拓: オメプラゾール投与によるラット
肝臓の遺伝子発現プロファイルトキシ
コゲノミクスプロジェクトのデータによ
る解析. 第78回日本薬理学会年会, 平
成17年3月24日

Woo G.H., Bak E.J., Uetsuka K.,
Nakayama H., and Doi K. Hydroxyurea
(HU)-induced apoptosis and changes in
apoptosis-related genes expression in
the mouse fetal lung. JSTP/IFSTP
Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

Takai H., Ito T., Tatsuyama K., Suzuki
M., Katayama K., and Doi K. Neuronal
cell death in the fetal rat spinal cord
following NMDA-treatment to dams.
JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18,
2004, Kobe.

Sehata S., Kiyosawa N., Makino T.,
Atsumi F., Ito K., Yamoto T., Teranishi
M., Manabe S., Uetsuka K., Nakayama H.,
and Doi K. T-2 toxin-induced changes
in the rat fetal brain. JSTP/IFSTP
Joint Meeting, Feb. 15-18, 2004, Kobe.

Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H., and
Doi K. Porcine-serum-induced hepatic
fibrosis in Brown Norway rats.
JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18,

2004, Kobe.

Ueno M., katayama K., Nakayama H., and
Doi K. Analysis of cell cycle,
migration and apoptosis of neuronal
stem cell in the 5-azacytidine
(5AzC)-treated rat fetal brain.
JSTP/IFSTP Joint Meeting, Feb. 15-18,
2004, Kobe.

白井真人, 中山裕之, 上塚浩司, 土井邦
雄「イヌの脳の加齢による遺伝子発現プ
ロファイルの変化」第137回日本獣医
学会、2004年4月2-4日、藤沢

山内啓史, 片山圭一, 上野将紀, 上塚浩
司, 中山裕之, 土井邦雄「ラットにおけ
る 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine
の胎児中枢神経毒性と p53 の関与」第9
3回日本病理学会、2004年6月9-
11日、札幌

馬場也須子, 中山裕之, 土井邦雄「ラッ
トブタ血清誘発肝線維化モデルにおける
免疫グロブリンの変化」第93回日本病
理学会、2004年6月9-11日、札
幌

Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H., and
Doi K. Porcine-serum-induced hepatic
fibrosis in Brown Norway and Wistar
rats. The 23rd Annual Society of
Toxicologic Pathology, June 13-17,
Salt Lake City, USA.

Uetsuka K., Yamauchi H., Nakayama H.,

and Doi K. Impaired liver regeneration in db/db mice after 2/3 partial hepatectomy. The 23rd Annual Society of Toxicologic Pathology, June 13-17, Salt Lake City, USA.

Woo G.H., Katayama K., Bak, E.J., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in fetal mouse. The 23rd Annual Society of Toxicologic Pathology, June 13-17, Salt Lake City, USA.

Ueno M., Katayama K., Nakayama H., and Doi K. Delay in translocation of neuronal stem cells due to chemical-induced cell cycle arrest. The 15th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Aug. 4-7, 2004, Edinburgh, Scotland.

三上貴史、上野将紀、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「Ochratoxin A による胎仔中枢神経毒性に関する検索」第138回日本獣医学会。2004年9月10-12日、札幌

篠塚淳子、瀬畑信哉、鈴木雅実、石上紀明、アルバレンケ・ステラ・マリス、鳥海 亘、土井邦雄「T-2 トキシンによる多細胞種でのアポトーシス」第21回日本毒性病理学会、2005年1月20-21日、浜松

He X. J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Effects of pregnancy on CYPs

protein expression in rat liver. 第21回日本毒性病理学会、2005年1月20-21日、浜松

瀬畑信哉、清沢直樹、渥美房子、伊藤和美、矢本 敬、寺西宗広、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「T-2 toxin 投与妊娠ラットの肝臓、胎盤および胎児肝臓病変のマイクロアレイ解析」第21回日本毒性病理学会、2005年1月20-21日、浜松

馬場也須子、土井邦雄「ラットブタ血清誘発肝線維化モデルにおける線維化関連因子の変化」第21回日本毒性病理学会、2005年1月20-21日、浜松

金井好克: アミノ酸トランスポーター抑制による抗腫瘍効果の検討。第8回がん分子標的治療研究会総会、鹿児島、平成16年5月13日。

安西尚彦、宮崎博喜、平田 拓、金井好克、遠藤 仁: マルチバレントPDZ ドメインタンパク質 PDZK1 による尿酸トランスポーターURAT1 の輸送機能調節、第81回日本生理学会大会、札幌、平成16年6月2日。

Shin Ho Jung, 土田浩生, 安西尚彦, 榎本 篤, Cha Seok Ho, 金井好克, 遠藤 仁: Identification of a novel organic anion transporter mediating carnitine transport in mouse liver and kidney. 第110回日本薬理学会関東部会、静岡、平成16年6月5日。

Javan Mohamad, 金井好克, Arthit Chairoungdua, 坂本 信一, Islam Rafiqul, 安西尚彦, 遠藤 仁: 中性アミノ酸トランスポーター-LAT1 結合タンパク質によるヒト膀胱癌由来 T24 細胞のアミノ酸輸送活性調節. 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪, 平成 16 年 7 月 7 日.

Golam Ferdous, Ellapan Babu, Arthit Chairoungdua, 安西尚彦, 金井好克, 遠藤仁: 新規輸送系 L アミノ酸トランスポーターの同定とメチル水銀輸送特性の検討. 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪, 平成 16 年 7 月 7 日.

金井好克: 尿細管機能異常症の基礎. 第 26 回腎臓セミナー, 東京, 平成 16 年 8 月 28 日.

Sakata T, Anzai N, Jutabha P, Enomoto A, Hirata T, Yokoyama H, Cha S.H, Miyazaki H, Kanai Y and Endou H: Molecular identification of a novel renal apical organic anion transporter OAT5 that transports the mycotoxin ochratoxin A. ICT-X, Tampere, Finland, July 11-15, 2004.

Hirata T, Kanai Y, Matsuda A, Iribe Y, Kim DK, Islam R, Muto T, Chairoungdua A, Kohno M, Hasegawa M and Endou H: Variation of gene expression profile by the inhibition of single molecular

target LAT1, system L amino acid transporter in laryngeal squamouscell-carcinoma cells. ICT-X, Tampere, Finland, July 11-15, 2004.

平田 拓, 金井好克, Promsuk Jutabha, Arthit Chairoungdua, Ellappan Babu, 安西尚彦, 小泉昭夫, 遠藤 仁: ヒトゲノム塩基配列情報をもとにしたポジショナルクローニングによる上皮型アミノ酸輸送系 B0 の分子同定及び Hartnup 病関連変異の実証. 分子腎臓研究会第 10 回研究発表会, 目白, 東京, 平成 16 年 9 月 14 日.

Anzai N, Miyazaki H, Chairoungdua A, Enomoto A, Hirata T, Sakamoto S, Kanai Y and Endou H: The multivalent PDZ domain-containing protein PDZK1 modulates transport activity of renal urate-anion exchanger URAT1 via its C-terminal. Transporters 2004, Cambridge, Great Britain, Sept 2-5, 2004.

Kanai Y and Endou H: Amino acid transporters in cancer: A target for anti-cancer therapy. The 17th Korea-Japan joint seminar on Pharmacology, Jeonju, Korea, Oct 1, 2004.

Shin HJ, Anzai N, Enomoto A, Kim DK, Kanai Y and Endou H: Functional characterization and tissue localization of SLC22 organic anion transporter OAT7. The 17th Korea-Japan joint seminar on Pharmacology, Jeonju,