

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 漆谷 徹郎

平成18年(2006)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18年4月8日

厚生労働大臣 川崎 二郎 殿

住所 〒604-0966 京都市中京区夷川通富小路西入
俵屋町290 アスヴェル京都御所前II601

フリガナ ウルシダニテツロウ
研究者 氏名 漆谷 徹郎
(所属機関 独立行政法人医薬基盤研究所)

平成17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17年度 総括・分担研究報告書
主任研究者 漆谷 徹郎

平成18（2006）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
漆谷徹郎、長尾 拓	
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	・ ・ ・ ・ 53
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	・ ・ ・ ・ 91
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	・ ・ ・ ・ 131
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	・ ・ ・ ・ 137
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	・ ・ ・ ・ 175
IV. 研究成果の刊行物・別刷	・ ・ ・ ・ 181

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 漆谷徹郎

(独) 医薬基盤研究所・トキシゲノミクスプロジェクトリーダー

分担研究者 長尾拓

国立医薬品食品衛生研究所・所長

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。その後、独立行政法人医薬基盤研究所も参画し、プロジェクトはこの三者によって推進されている。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（漆谷）・分担研究者（長尾）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、目標とする150化合物については動物への暴露実験が終了し、遺伝子発現データ取得が進行中である。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バージョン3.0の運用を開始した。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、この範疇の化合物も参加企業から提供を受け、17化合物について実験が完了した。また、予定された150化合物以外に、毒性メカニズム解析用として、9化合物を選び、単回投与実験を行って、代表的な毒性パスウェイにかかわる遺伝子群の動きを把握した。

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（漆谷・長尾）

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。

最終年度までに、目標とする150化合物最終データセット（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するためには、本年度中に少なくとも150化合物の予試験までは終了しておく必要があった。150化合物には、参加企業から提供された「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」17化合物が含まれている。

試験管内暴露系に関しては、ラット初代肝細胞の実験を完了することを目標とした。ヒト初代肝細胞は適切なロットを使用することが最も重要である。これは米国の頒布業者により適当な大型ロットが確保できるか否かにかかっ

ている。實際上、本年度は適当なロットが殆ど得られなかったので、暴露試験・遺伝子発現解析は49化合物にとどまった。また、フルスケール（ラット単回投与4用量4時点、連続投与4用量4時点、ラット・ヒト一次培養肝細胞）を行う150化合物とは別に、毒性機序解析用として、9化合物11試験（ラット単回投与肝臓のみ解析）を行った。

インフォマティクスに関して、前年度までに統合データベースv.2.0を完成し、大規模クラスタリングを可能とする計算環境が整い、解析ツール、および生体予測システムのプロトタイプ（エクセルマクロ）を構築し、試用版としてその性能を詳細に検証してきた。今年度はそれら機能に加え、サンプルリストマネージャー、遺伝子リストマネージャー、化合物文献情報格納機能、外部データ取り込み機能を追加してv.3.0にグレードアップすることとした。今年度は更に、昨年度開発した解析システム、予測システムのプロトタイプを改良した上、WEB化して本システムに組み入れることとした。

本年度のシステムは本プロジェクトのプロトコール（ラット、単回・反復それぞれ4用量4時点と、ヒト・ラット培養肝細胞4用量3時点）に特化したものとしての開発が目標であった。しかしながら、本システムの将来の利用を考えたとき、汎用性を持たせるべきであるという意見も強く、最終年度はラット以外の種、用量・時点を自由に設定できるシステムにグレードアップすることを検討課題に

設定した。また、プロジェクト終了3年後のデータベース公開を実現するための問題点を検討するワーキンググループも設置した。

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）

化合物の腎毒性にはトランスポーター介在毒性が重要な位置を占め、その *in vitro* の評価系の確立が、*in vivo* における化合物の腎毒性予測のために必須である。

このようなトランスポーターが媒介する毒性機構（トランスポーター介在毒性）が、種々の腎毒性物質のin vivoでの毒性発現の背景にあり、その評価をin vitroでできる評価系は、化合物の腎毒性予測において必須のものとなる。本年度は、腎有機アニオントランスポーター安定発現細胞を用いて、セファロリジンとオクラトキシンAのトランスポーター介在毒性をin vitroで再現できる評価系を確立し、これを用いてマイクロアレイ解析を行う。また、全トランスポーター遺伝子の機能の解明は、腎毒性評価の精度を高めるための必須の要請であり、本研究においても、この要請に従い、機能未同定のトランスポーター遺伝子の機能解析を平行させている。

(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、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目標の150化合物を達成した。そのうち、動物実験が本年

度中にすべて完了したものは131化合物であり、残りの現在進行中の実験も、最終年度の初頭に完了する予定である。in vitroの実験は、ラット初代肝細胞については全150化合物の暴露実験が完了し、遺伝子発現解析も140化合物まで終了、データベースには76化合物分が格納された。ヒト初代肝細胞については、本年度は良好なロットが確保できなかったため49化合物の完了にとどまっている。

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、約80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、普遍性を継続的に検討し、データベース中のデータの品質が、かなり高いことを定期的に確認している。

また平成16年度に完成した統合データベースバージョン2.0に装備した遺伝子発現データダウンロード機能、および3種の大規模クラスタリングの機能、各種統計テーブルや病理データ格納機能に加え、サンプルリストマネージャー、遺伝子リストマネージャー、化合物文献情報格納機能、外部データ取り込み機能を追加してv.3.0にグレードアップした。今年度は更に、昨年度開発した解析システム、予測システムのプロトタイプを改良した上、WEB化して本システムに組み入れた。新規に開発して組み入れたシステムの中で特筆すべきものは、マーカー遺伝子群の発現変動をスコア化して一覧できるベースビュー、判別分析の Prediction Analysis of Microarray (PAM)を繰り返して行って最適化し、予測率を化合物群での

相対位置として可視化するビューアなどがある。また、データベース構造の根本的な見直しを行い、検索速度の向上を目指したワーキンググループを設置し、一定の成果を上げた。本年度のシステムは本プロジェクトのプロトコール(ラット、単回・反復それぞれ4用量4時点と、ヒト・ラット培養肝細胞4用量3時点)に特化したものとして開発した。しかしながら、本システムの将来の利用を考えたとき、汎用性を持たせるべきであるという結論に達し、最終年度はラット以外の種、用量・時点を自由に設定できるシステムにグレードアップすることとした。そのためには、計算・検索アルゴリズムや、インターフェース部分に大きな変更を加える必要性が出てきたため、本年度のシステム開発と平行して、最終年度版のシステムの基本設計を行った。また、プロジェクト終了3年後のデータベース公開を実現するための問題点を検討するワーキンググループも設置し、具体的な検討に入った。

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

本年度初頭には、前年度までトキシコゲノミクスプロジェクト研究室を置き、RNA抽出装置、Affymetrix社GeneChip遺伝子発現解析装置等の機器設置していた国立医薬品食品衛生研究所28号館3階から、医薬基盤研究所の2階への移動が行われた。機器の移動その他に伴って予想される実験データの変動を最小限にするため

に、データのバリデーションを行い、継続性を確保した。また、遺伝子発現データ取得の根幹にかかわる諸問題について、Affymetrix社の担当者と頻繁に会合を持ち、問題解決に努めた。また、年度末には米国Affymetrix本社を研究員とともに訪問し、技術的な問題について会合を持った。

また、発現データ取得のスピードアップ、およびテクニシャン間のデータのブレを最小限にするため、最終年度に向かってロボットを使用したシステムGCASの導入のための基礎検討を行った。

(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、今年度までに全150化合物を選定し決定した。このうち腎臓を主たるターゲットとして選んだ薬物は13であり、残りの137化合物は肝障害を主なターゲットとしたものである。ただし、肝障害を主なターゲットとして選定した薬物の中に、腎障害を同時に発症する薬物も多く含まれているため、このうち、17化合物を選定して腎臓の遺伝子発現解析を行い、腎臓のトランスクリプトームとしては最終年度までに30化合物分を行う予定である。本年度は腎臓については6化合物分の解析を終えた。一方、腎障害を主なターゲットとして選んだ化合物を投与した動物の肝臓については、サンプルの採取は行っているため、時間と予算の許す限り、最終年度までに解析を行いたい。

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、17化合物についてすでに実験を完了あるいは着手している。

以上の化合物は、医薬品が多く、医薬品開発に使用するためのデータベースとして勿論非常に有用なものである。しかし、医薬品はその薬理作用は明らかでも、その副作用の詳細なメカニズムが必ずしも明らかになっているとは限らない。非教師付分類法による毒性予測には限界があり、毒性メカニズムやフェノタイプに関連した変化との関連付けも、同時に必要とされる場所である。そこで、予定された150化合物以外に、毒性メカニズム解析用として、9化合物を選び、単回投与実験を行って、代表的な毒性パスウェイにかかわる遺伝子群の動きを把握した。これらは、グルタチオン枯渇試薬であるphorone, BSO, diethylmaleate, 肝臓における重要な病理学的シグナルであるTNF α 、LPS, galactosamine, ER-stressorであるtunicamycin, 細胞骨格擾乱剤であるPhalloidinの化合物である。なお、TNF α 、とLPSはgalactosamineとの併用試験も行ったので、全体では11試験を施行した。これらについての解析はまだ終了していないが、グルタチオン枯渇試薬の結果から、グルタチオン枯渇マーカー遺伝子セットが抽出でき、またTNF α 、LPS, galactosamineからは、TNF α 関連マーカー遺伝子セットが抽出でき、これらを毒性パスウェイに基づいた毒性予測マーカーとして使用可能なことが示唆され、米国毒科学会で報告した。

更に、これまでのデータを解析していく

と、いくつか問題が明らかとなった。本プロジェクトの用量設定は、28日間の連続投与で死亡例がなく、その時点でのフェノタイプが観察できるということを最優先として行われている。これは非常に重要な点であって、ある用量を連続投与していけば必ずあるフェノタイプが生じているということが担保されている状態であって初めて、短期連投あるいは単回投与での遺伝子発現データからの予測が可能となる。しかしながら、薬物自体、あるいはそれによる障害が蓄積する型の薬物は、28日間連投できる用量では単回投与の影響が余りに小さく、単回投与の遺伝子発現解析では非常に限られた情報しか得られないという例が散見された。そこで、データをオーバービューして、この類の薬物について、高用量を用いた単回投与試験を追加することとした。

(3) *in vivo*・*in vitro*試験

*in vivo*試験は初年度でプロトコールは確定させ、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。現在まですべて投与量設定試験以降の段階まで進んでいるが、暴露試験が完了したものが131化合物、うち遺伝子発現解析が終了したものが108化合物であり、データQCを完了してデータベースに格納したものが80化合物分である。

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、一昨年度にプロトコールを確定した。本年度までにラットについて全150化合物の暴露試験が終了し、うち遺伝子発現解析が終了したものが140化合物、データQCを完了してデータベースに格納したものが76化合物分である。ヒトについては本年は良好なロットが得られず、49化合物の実験が終了したにとどまっている。これらはすべてデータQCを完了してデータベースに格納した。

最終年度に向けて、GeneChipによる解析を加速しなければならないが、拙速はデータの質に悪影響を与え、避けねばならない。最近、Affymetrixは、高度に自動化されたシステムGeneChip Array System (GCAS)を開発した。これは、サンプル処理速度が加速されるばかりでなく、テクニシャンの個人差によるデータのぶれも抑えられるため、有望なシステムである。最終年度での採用を視野に入れて、その予備検討とバリデーションを行った。

(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。前年度のv.2.0をアップグレードし、v.3.0の完成をみた。

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。今年度追加した機能は、以下の通りである。各種解析で抽出したサンプルリストを加工・保存・検索することのできる、サンプルリストマネージャー、各種解析で抽出した遺伝子プローブリストを加工・保存・検索することのできる、遺伝子リストマネージャー、化合物文献情報格納機能、外部データ取り込み機能である。また、全体的な問題として、データベースからの遺伝子発現データのダウンロード速度が遅くて実用的でないという問題があり、これに関するワーキンググループを設置して検討し、速度の向上をはかることができた。

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。前年度までに、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エクセルベースの試用版として検討を加えていたが、本年度これらを改良の上、web化し、本システムに組み込んだ。基本となる設計思想は、研究者が注目する化合物について、その関連データをシームレスに検索・表示・ダウンロードできること、マーカー遺伝子に関して大まかな動きや、他の化合物との相対的關係が簡便に見通せること、そこから詳細な解析にシームレスに移れること、である。そのために、多数のプローブからなるマーカー遺伝子リストを複数にわたって一

度に見渡せるツールとして、2種類のスコア化法を開発し、解析システムに組み込んだ。

3. 生体作用予測システム

マーカー遺伝子リストのスコア化によって、目的の化合物のデータベース中の相対位置が表示される部分は、生体作用予測の一部をなすものである。また、判別分析法を予測システムとして組み込むこととし、本年度は Prediction Analysis of Microarray (PAM) を中心に開発した。PAM は、トレーニングによって、判別に最適な遺伝子リストを抽出できるため、フェノタイプが明らかな化合物群を判別するのに有用な方法である。システムでは、繰り返し計算を自動化することによって、より効率的に判別分析を行えるようにした。また、予測確率をスコア化することによって、マーカー遺伝子リストに対する当該化合物の判別結果をデータベース中の化合物内での相対位置を表す方法を開発し、予測結果を定量的に表現することができるようになった。

予備的検討では、Support Vector Machine (SVM) も有用であり、また PAM と併用することによって予測の精度が向上することが示唆されているので、次年度に向けて、SVM もシステムに組み込む予定である。さらに、フェノタイプが明瞭でない領域についての解析には非教師付分析法である主成分分析が有用であることが示唆されたので、次年度にはこれもシステムに組み込むべく、仕様の検討に入っている。

もう一つ今年度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った。

現在のところ、システムとしては、オーソログ変換ツールを実装した。また、マーカー遺伝子リストに関しては、オーソログ変換を自動化することによってラット *in vivo*, *in vitro*, ヒト *in vitro* のデータを同時に一画面で表示することができるようになった。このツールを活用することによって、マーカー遺伝子を、*in vivo* と *in vitro* のブリッジング可能／不可能、ラットとヒトのブリッジング可能／不可能というカテゴリーに分類し、予測に反映していくという戦略が考えられた。

現在、データの蓄積速度に比して解析速度が追いつかない状態である。今年度、本システムが稼動を始めたので、解析が加速されることが期待される。当面は、フェノタイプアンカーリングツールと PAM の組み合わせを中心に、毒性発現機序に密接に関連した有用なマーカー遺伝子リストを多数抽出してデータベースに格納していく予定である。

また、本年度特に問題になった点として、統合データベースシステムの汎用性がある。本年度のシステムは当然ながら本プロジェクトのプロトコール(ラット、単回・反復それぞれ4用量4時点と、ヒト・ラット培養肝細胞4用量3時点)に特化したものである。しかしながら、本システムの将来の利用を考えたとき、汎用性を持たせるべきであるという意見が強かった。そこで、最終年度はラット以外の種、用量・時点を自由に設定できるシステムにグレードアップすることを計画し、その基本設計を行った。これには

現在のプログラム構造に大きな変更が加わることが避けられないため、本年度のシステム開発と並行して、次年度開発分の仕様について細部にわたる検討を繰り返し、一部は本年度中に先行して開発を行った。

本プロジェクトは官民共同プロジェクトであるため、データの利用はプロジェクト終了後3年間出資企業に優先されるが、その後公共データベースとして広く利用されていくことが期待される。3年後のデータベース公開に向けて、その具体的方法を検討するワーキンググループをプロジェクト内に設置し、最終年度までに具体的な方策を立案することとした。

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)

本年度は一連の薬物誘発肝病変に関する検索に加え、以下の3点を検討した。

(1) CYP の発現を誘導する薬剤(Phenobarbital)投与による母体肝—胎盤—胎児肝における遺伝子およびタンパク質の発現プロファイルを検討し、母体肝ではPB投与によってCYP3AとCYP2B1が誘導され、CYP2D1が有意に減少するのに対し、胎盤では対照群と処置群の両方でCYP3A1タンパク質のみが発現しており、薬物による誘導がかからないという現象を見出した。(2) 妊娠・泌乳が母体肝における遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響を検討するため、cDNA microarray解析によ

り約 16,000 の遺伝子を調べたところ、妊娠時期に応じた特有の変化を見出した。

(3) 肝毒性を示す薬物 (cytosine arabinoside) を用いて他臓器 (胎児中枢神経系と胎盤) における毒性発現機構について検索したところ、p53 の変動に加えて p21, cyclin G1 などの p53 転写標的遺伝子の変動が検出された。以上の結果は、プロジェクトの肝障害発現予測戦略に寄与するものである。

(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 (金井)

本年度は、腎有機アニオントランスポーター安定発現細胞を用いて、セファロリジンとオクラトキシン A のトランスポーター介在毒性を in vitro で再現できる評価系を確立した。これを用いマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現変動の観点から本評価系の有用性を実証した。さらに、マイクロアレイ解析により、セファロリジンのトランスポーター介在毒性には酸化ストレスがその背景にあることが実証された。

また、全トランスポーター遺伝子の機能の解明は、腎毒性評価の精度を高めるための必須の要請であり、本研究においても、この要請に従い、機能未同定のトランスポーター遺伝子の機能解析を平行させている。本年度の研究において、特異な基質選択性を示す 2 種の新たな腎有機アニオントランスポーターが明らかになった。以上の結果は、プロジェクトの腎障害物質の解析・毒性発現予測に大きく寄与すると考えられた。

(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)

本研究は、環境中の種々の変異原・がん原性物質により誘発される動物の発がんモデルを用いて、化合物特異的な遺伝子発現と遺伝子発現プロファイルの経時的変化、及びその用量相関性、発がん感受性の異なる動物系統における発現プロファイルの差異について GeneChip (Affymetrix) を用いた包括的解析を行い、発がんに重要な遺伝子変化の解明、既知化合物の低用量曝露による発がん性の予測、化合物曝露後の早期段階での遺伝的指標による発がん性予測を最終目標とする。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。昨年度、ラットでの大腸発がん性が認められていないヘテロ彩クリックアミンである 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 MeIQx と一つのクラスターを形成することを明らかにした。そこで Trp-P-2 (400 ppm) を F344 ラットに投与すると、投与開始後 32 週めでは、PhIP, MeIQ, IQ と同程度の異型腺管 (ACF-D ; ACF detected by differential staining) の誘発性を示し、本戦略の有用性が示唆された。又、前年度、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ことを受けて、EP₃ 欠損マウスを用いて、2 段階皮膚発がんモデルを検討した。EP₃ 欠損マウスでは扁平上皮がんが発生せず良性の角化棘細胞腫が発生したことより、EP₃ 受容体の発現は、扁平上皮がんへの進展に重要であることが示唆された。

(4)恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究（菅野）

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課題として、恒常性維持機構に係わる遺伝子発現データの解析、及びその検証に必要な生物学的基礎研究を行った。昨年度に引き続き、(1)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と(2)発がんプロモーション過程における甲状腺及び肝の自律性の変調についての解析を実施した。エピジェネティック制御機構障害研究については、胎児神経幹細胞の2種類の基盤データベース(胎児終脳発生に伴う遺伝子発現変化網羅的データベース、発生時期の異なる神経幹細胞遺伝子発現網羅的データベース)整備に加え、経胎盤的に AzaC を暴露した胎児終脳の Percellome 解析を行って、AzaC 投与により DNA へのメチル基供与体である S-adenosyl methionine 量に変化が生じ、Rsd2 の発現上昇が引き起こされた可能性を示唆した。発がんプロモーション過程の解析については、発がん性を招来する恒常性破綻の機序を明らかにする目的で、ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、Kojic Acid による発がん過程特異的な発現変動遺伝子のプロファイリングを行った結果、腫瘍性細胞増殖や血管新生の活性化、TGF- β シグナリングの抑制、カドヘリンや APC の制御破綻を示唆する発現変動が見出された。甲状腺機能低下作用に起因する甲状腺発がんに共通する遺伝子発現変動から、モーター蛋白質あるいはその機能調節に関与する分子、細胞接着因子、細胞外マトリクス構成蛋白質が標的遺伝子と考えられた。

Phenobarbital による発がんプロモーション早期特異的な標的遺伝子として、細胞増殖抑制に関与する Wee-1 kinase や Pregnancy-induced growth inhibitor の発現増加が見出された。一方で、鉄を介した細胞機能の亢進、Trans-Golgi network で機能するシグナリングの変化、phosphoinositide シグナリングの異常を示唆する発現変動等が見出された。

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。現在、遅ればせながら、米国を中心に、トランスクリプトームデータの標準化の動きがあるが、実用はまだ先の話であろう。この問題は、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ふ、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ヴとして、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。Percellomeと命名されたこの方式は、使用例の拡大によりその実用性・有用性が確認されていくであろう。

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17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本システム稼動にまで至った。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によりフェノタイプに関連づけた遺伝子変化の抽出の精度が向上している。問題は、最終年度に結果が出る化合物に関して、遺伝子発現解析、データQC、病理組織評価を経た後で漸く詳細な解析が可能になる点である。これはある意味では有効に利用することもできる。すなわち、来年度前半で予測システムのストラテジーを確立しておき、そこに新たに加わる化合物のデータを仮想的新規開発化合物のそれと見做して、予測精度を評価する、という戦略である。

現在のところ、ラット連続投与試験の結果を単回投与試験の遺伝子発現解析によって効率よく予測するという面において、本データベースは有効に機能する可能性が高い。現在の最大の問題は、種差のブリッジングである。現在のストラテジーである程度のシステムは構築可能であるが、それがどの程度の精度を持っているかは、実際の臨床サンプルでの検証実験が不可能である以上、理論的に言って、評価不能である。この点は、本プロジェクトを超えた問題として残される。

更に、本年度別の問題が発生した。前述のように、本プロジェクトは官民共同プロジェクトであり、参加企業の権利を保護するためにプロジェクト終了後3年間はデータベースを公開しないことが契約上うたわれている。しかし、半分が公的資金であることから、対外発表を全く制限するのは問題であるということから、平成16年度の

運営委員会である程度の対外発表は行っていくという方針が決定された。その路線に沿って、研究内容の論文化も推進するという決定がされた。しかしながら、トランスクリプトームの研究を論文化する場合、元になった遺伝子発現データはすべて公共データベースに置くということを要求する雑誌が多く、非公開のデータベースを基にした論文は実際上発表が非常に困難な状況である。また、3年後の公開にしても、電子データをそのまま利用しやすい形で供給すれば、世界中の営利企業が非常に短期間で獲得してしまうことになり、本邦の納税者に対して利益還元になりえないという疑問も残る。これらについても、プロジェクト内のワーキンググループによる検討課題である。

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。最終年度に向かって研究を進め、利用価値の高いデータベースの完成と、高精度の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. 論文発表

Takashima K, Mizukawa Y, Morishita K, Okuyama M, Kasahara T, Toritsuka N, Miyagishima T, Nagao T, Urushidani T. Effect of the difference in vehicles on gene expression in the rat liver—analysis of the control data in the Toxicogenomics Project Database. *Life Sci.*, 2006, in press.

Ito K., Kajikawa S., Nii A., Hanada T., and Doi K. Nitrofurazone-induced gene expressions in rat hepatocytes and their modification by N-acethylcysteine. *Exp. Toxicol.Pathol.*, in press.

Katayama K., Ueno M., Yamauchi H., Nakayama H., and Doi K. Microarray analysis of genes in the fetal central nervous system after ethylnitrosourea administration. *Develop.Reprod.Toxicol.*, in press.

Ejiri N., Katayama K., Kiyosawa N., Baba Y., and Doi K. Microarray analysis on CYPs expression in pregnant rats after treatment with pregnerolone-16alpha-carbonitrile and Phenobarbital. *Exp.Mol.Pathol.*, 78, 71-77, 2005.

Ejiri N., Katayama K., and Doi K. Induction of cytochrome P450 isozymes by phenobarbital in pregnant rat fetal livers and placenta. *Exp.Mol.Pathol.*, 78,150-155, 2005.

Kume E., Aruga C., Takahashi K., Miwa S., Ito M., Fujimura H., Toriumi W., Kitamura

K., and Doi K. Gene expression profiling in streptozotocin treated mouse liver using DNA microarray. *Exp.Toxicol.Pathol.*, 56,235-244, 2005.

Kume E., Aruga C., Takahashi K., Miwa S., Dekura E., Ito M., Fujimura H., Toriumi W., and Doi K. Morphological and gene expression analysis in mouse primary culturehepatocytes exposed to streptozotocin. *Exp.Toxicol.Pathol.*, 56,245-253, 2005.

Katayama K., Ueno M., Yamauchi H., Nagata T., Nakayama H., and Doi K. Ethylnitrosourea induces neural progenitor cell apoptosis after S-phase accumulation in a p53-dependent manner. *Neurobiol.Dis.*, 18, 218-225, 2005.

He X.J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp.Mol.Pathol.*, 78,64-70,2005.

Park SY, Kim JK, Kim IJ, Choi BK, Jung KY, Lee S, Park KJ, Chairoungdua A, Kanai Y, Endou H and Kim DK: Reabsorption of neutral amino acids mediated by amino acid transporter LAT2 and TAT1 in the basolateral membrane of proximal tubule. *Arch Pharm Res* 28(4): 421-432, 2005.

Yoon JH, Kim IJ, Kim H, Kim HJ, Jeong MJ, Ahn SG, Kim SA, Lee CH, Choi BK, Kim JK, Jung KY, Lee S, Kanai Y, Endou H, Kim do

- K: Amino acid transport system L is differently expressed in human normal oral keratinocytes and human oral cancer cells. *Cancer Lett.* 222: 237-245, 2005.
- Anzai N, Jutabha P, Kanai Y and Endou H: Integrated physiology and proximal tubular organic anion transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14: 472-479, 2005.
- Anzai N, Jutabha P, Enomoto A, Yokoyama H, Nonoguchi H, Hirata T, Shiraya K, Xin H, Cha SH, Takeda M, Miyazaki H, Sakata T, Tomita K, Igarashi T, Kanaai Y and Endou H: Functional Characterization of rat organic anion transporter 5 (*Slc 22a19*) at the apical membrane of renal proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 534-544, 2005.
- Miyazaki H, Anzai N, Ekaratonawong S, Sakata T, Shin HJ, Jutabha P, Hirata T, Xin H, Nonotuchi H, Tomita K, Kanai Y and Endou H: Modulation of renal apical organic anion transporter 4 function by two PDZ domain-containing proteins. *J. Am. Soc Nephrol* 16: 3498-3506, 2005.
- Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, Muto T, Suzuki Y, Kanai Y, Hano H, Furusato M, Endou H: CYP1 and AhR expression in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinoma of rats prenatally exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Toxicology* 211: 231-241, 2005.
- Yasuoka Y, Kawada H, Suzuki Y, Sato M, Endou H, Obinata M, Kawahara K: Establishment of a Mouse Macula Densa Cell Line with an nNOS Promoter Driving EGFP Expression.. *Jpn J Physiol.* 55: 365-372, 2005.
- Sawamiphak S, Sophasan S, Endou H, Boonchird C: Functional expression of the rat organic anion transporter 1 (rOAT1) in *Saccharomyces cerevisiae*.. *Biochim Biophys Acta.* 1720: 44-51, 2005.
- Villar SR, Brandoni A, Anzai N, Endou H, Torres AM.: Altered expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to bilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 68: 2704-2713, 2005.
- Enomoto A, Endou H: Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin Exp Nephrol.* 9: 195-205, 2005.
- Kang DH, Han L, Ouyang X, Kahn AM, Kanellis J, Li P, Feng L, Nakagawa T, Watanabe S, Hosoyamada M, Endou H, Lipkowitz M, Abramson R, Mu W, Johnson RJ: Uric acid causes vascular smooth muscle cell proliferation by entering cells via a functional urate transporter. *Am J Nephrol.* 25: 425-433, 2005.
- Tahara H, Kusuhara H, Endou H, Koepsell H, Imaoka T, Fuse E, Sugiyama Y: A species difference in the transport activities of H2 receptor antagonists by rat and human renal organic anion and cation transporters. *J Pharmacol Exp Ther.* 315: 337-345, 2005.
- Srimaroeng C, Jutabha P, Pritchard JB,