

200606043A

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

医薬品等の有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の
国際的標準化に関わる研究 (H18-特別-指定-023)

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 19 (2007) 年 3 月

別添1

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

医薬品等の有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の
国際的標準化に関わる研究 (H18-特別-指定-023)

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 菅野 純

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

医薬品等の有効性・安全性評価に資する

遺伝子発現解析の国際的標準化に関わる研究	1
菅野 純	
(資料1) 平成19年1月26日研究会議資料	6
(資料2) Proposed methods for testing and selecting the ERCC external RNA controls	17
(資料3) Standardization initiatives in the (eco)toxicogenomics domain: a review	50

別添3

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)

総括研究報告書

医薬品等の有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の国際的標準化に関わる研究

主任研究者 菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部・部長

研究要旨

医薬品等の有効性・安全性評価に係る非臨床試験及び臨床試験において、遺伝子発現情報を活用する際に課題となる遺伝子発現解析の標準化に資することを目的として、高密度マイクロアレイや定量的PCR等を用いた生物学的、薬理的あるいは毒性学的研究を実施している国内の研究者とAd hoc会合を行うことにより、遺伝子発現解析の標準化に関する国内の意見交換を行う。また、RNAの外部標準試薬を用いる場合に、標準試薬として求められる品質、品質管理、供給体制に関する情報収集や、国内における調査、知識の集約を行う。

さらに、国際的な動向を調査するとともに、米国等と技術的な情報交換等を進め、遺伝子発現解析の標準化に向けた活動への技術的関与を検討していく。

以上により、医薬品等の有効性・安全性評価に遺伝子発現情報を活用する際の条件設定等について、海外において急速に標準化に向けた活動が盛んになり事実上の国際標準(デファクト・スタンダード)になる可能性があることも想定し、活動当初から当該活動に対し関与し提言等を行い、今後の標準化に向けた課題抽出や条件設定を行った。

分担研究者

宇山佳明 (独) 医薬品医療機器総合機構

油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センター
教授

審査役代理

山口照英 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部
部長

A. 研究目的

米国を中心に急速に進みつつある「mRNA 測定に関わる標準化」に呼応して、国際的な動向を早急に調査するとともに国内での情報交換を行うことにより、遺伝子発現解析に関する標準化に向けた提言を行うとともに、国際的標準化活動への技術的関与を検討する。

矢本敬 三共株式会社安全性研究所
主席研究員

住田佳代 住友化学株式会社生物環境科学研究
所
主任研究員

B. 方法

国内の研究者との Ad hoc 会合により、遺伝子発現解析の標準化に関する国内の意見交換を行う。また、RNA の外部標準試薬を用いる場合に、標準試薬として求められる品質、品質管理、供給体制に関する情報収集や、知識の集約を行う。さらに、国際的な動向を調査するとともに、必要に応じて米国等と技術的な情報交換等を進め、国際的な遺伝子発現解析の標準化に向けた活動への技術的関与を検討する。

本研究が対象とするテーマは、『医薬品等の有効性・安全性評価に係る非臨床試験及び臨床試験において、遺伝子発現情報を活用する際に課題となる遺伝子発現解析の標準化』である。この問題には、少なくとも厚労省担当課及び(独)医薬品医療機器総合機構が窓口となる分野が含まれており、国外での ERCC (External RNA Control Consortium) と米国 NIST (National Institute of Standards and Technology) が活動を開始している内容と重なる部分がある(更に別途USFDAでも類似の活動が行われている)。そこで、国外に対して適切に対応する受け皿を設け、リードすべき部分については国内を可能な限り一本化して対処する体制を整えるために検討を行い、その解決に必要な提言(提案)をまとめる。

I. マイクロアレイ実施経験とデータ利用(審査や研究取りまとめ、等)経験者による問題点の抽出

1. 臨床関連
2. 創薬関連
3. 化学工業品関連
4. トキシコゲノミクス関連

II. RNA試薬・管理に関する専門的見地からの問題点の抽出

III. 行政対応における問題点の抽出

この為に、国内の研究者と情報交換を進め、必要に応じて会合を行うことにより、遺伝子発現解析の標準化に関する国内の情報の集約と問題点の抽出を行う。さらに、国際的な動向を調査するとともに、米国等と情報交換を進め、遺伝子発現解析の国際的標準化への関与を強めていく。

C. 結果

産学官協力のもと標準化技術導入の可能性が示された。国外の動向に遅れを取らぬためにも、現時点から標準化技術導入に向けた具体的な検討を開始することが望ましい。まずは関係する行政機関(厚生労働省や医薬品医療機器総合機構)に於いて検討会等を設け、議論の受け皿を用意した上で、ガイドラインを策定すべきであることが提案された。また、ガイドライン策定に際して、

- (1) 安全性確保と産業育成の観点から、現実的な運用規定策定を目指すこと
- (2) 申請側はもちろん、審査側の遺伝子発現解析技能も必要であり、担当者の技能向上の為に策を立てること
- (3) 審査に必要な遺伝子候補リストの提示など、遺伝子発現情報の隠蔽や操作を防ぐための対策を取ること
- (4) 国外の動向に留意し、可能な限り協力体制を確立すること
- (5) 実際に試験サンプルを用いて複数の協力機関・企業で測定を行い、生成されたデータを評価して、ガイドラインに則った審査が可能かどうか確認すること

等に留意する必要性が提起された。

D. 考察

本研究は、様々な専門領域のいずれも遺伝子発現解析技術に通じている研究者が分担す

ることで産学官の全ての関連分野に於ける遺伝子発現解析技術の利用状況を幅広く調査し、各領域における標準化の必要性及び実施の可能性を評価した。さらに標準化に必要な基本技術の選定と、運用上の問題点の洗い出しを行った。

●国内・国際動向について(分担:菅野、宇山)

医薬品等の有効性・安全性評価に関わる国内の主たる行政窓口は厚生労働省担当課及び(独)医薬品医療機器総合機構である。将来的な対応については調査検討中であるが、具体的な方針は確定していない(ただし医療診断機器としてのマイクロアレイについては将来の申請に備えて、ガイドライン作成に着手している)。現状でも治験の評価データとして使用することに問題はないが、個別対応となることが予想される。また評価データを蓄積することは行っておらず、評価のための標準データベースは存在しない。

一般論としては未知の毒性に対応するには、全遺伝子の発現情報の評価が必要であり、また提出されたゲノミクスデータを単独で評価するのは困難であるため、標準化はもちろん、参照すべき大規模な標準トキシコゲノミクスデータベースが必要になると考えられる。

国外では ERCC (External RNA Control Consortium)と米国 NIST (National Institute of Standards and Technology)が連携して標準化に向けた活動を開始している。更に米国 FDA でも標準化に向けた類似の活動を行っているほか、実際の医薬品審査の申請時にゲノミクスデータを任意に添付することを認めており、すでに提出例もあるとの情報を得て

いる。

●国内の臨床医療における遺伝子発現解析技術利用について(分担:油谷)

臨床医療に於ける遺伝子発現解析技術利用は未だ研究レベルであり、特に診断目的での利用は分析用の生体試料の量的・質的確保が困難であるため当面は現実的でない。現時点に於いては前臨床での利用が中心となっている。

しかしながら、基本的には測定技術の改良により問題解決可能と考えられ、長期的には臨床応用の可能性は高い。医学研究や診断目的での遺伝子発現解析技術に於いても、情報の蓄積や診断基準の統一のために標準化技術の開発が必要であり、現時点からの検討が望ましい。

●国内製薬企業の創薬過程での遺伝子発現解析技術利用について(分担:矢本)

創薬現場に於いても遺伝子発現解析技術は盛んに利用されている。しかしながら知的財産としての創薬情報の特殊性から、現在は創薬過程に於ける遺伝子発現解析技術利用は社内や関係機関に限定された規模で行われており、必ずしも標準化を必要としない。

一方、新薬の審査段階に於ける標準化の必要性は十分理解し得るものであり、行政側からの要請があれば標準化技術の導入には協力可能であると考えられる。

●国内化学工業企業の安全性確保活動での遺伝子発現解析技術利用について(分担:住田)

化学工業分野に於いても遺伝子発現解析

技術は利用されつつある。NEDO で開発したマイクロアレイもそれなりの性能（市販の CodeLink 社チップと同等性能と考えており、RT-PCR とのデータ相関性も認められた）を示しており、第一段階ながら特定目的（例えば発癌予測）のデータベースも構築され、引き続き応用研究を行っている。

現時点に於いて標準化の必要性は小さいが、将来的には複数ある遺伝子発現解析技術間でのデータ相互変換や安全性確保のための評価活動に於いて標準化が必要になるであろうことは提起されつつある。行政側からの要請があれば標準化技術の導入には協力可能であると考ええる。

●標準化に必要な基本技術の選定（分担：菅野）

遺伝子発現解析技術としては、以前から利用されている PCR やノーザンブロットに加え、スループット性能の高いマイクロアレイ技術が盛んに利用されている。マイクロアレイデータの標準化については様々な手法が報告されており、いずれも一長一短がある。

しかしながら標準化に於いてはデータの定量化や複数測定技術間でのデータ相互変換技術が必要であり、これらに対応したシステムとして Percellome 法と称する技術（遺伝子発現データを細胞一個あたりの mRNA 発現量をコピー数として求めるもの）が存在する。Percellome 法は国内で開発された技術であるが、ERCC での評価も良い。GSC と呼ばれる外部標準 RNA を利用するため高度な実験操作技術が必要であるが、幅広い実験条件に対応できる。またマウスに於ける約90化合物に関するトキシコゲノミクスデータベースが

構築されており、有効性・安全性評価のための標準データベースとして利用が可能であることも注目に値する。

●標準化技術の運用上の問題点について（分担：山口、菅野、矢本、住田）

標準化技術の運用に於いては、Percellome 法などで標準化のために用いられる RNA 試薬の取り扱いに細心の注意が求められる。これについては、RNA 試薬の製造・管理は既に実用化されており、技術的な問題は少ない。

また Percellome 法に於いては基本となる試料中の DNA 量測定過程が全自動化されつつあり、測定技術に於ける運用上の問題も解消されつつある。

一方、運用規則が極端に厳しく制定されてしまうと申請者側に過度の負担を強い、標準化技術導入の障害となり得るため、制度制定の際には留意が必要であると考ええる。

また、遺伝子発現解析の標準化研究は緒に着いたばかりであり、ガイドライン策定に際しては更なる国内の情報の集約と問題点の抽出が必要である。遺伝子発現解析の標準化に向けた活動に技術的に関与し、ファーマコゲノミクス関連のガイドライン案作成に資することを目的として、また、関係する行政機関（厚生労働省や医薬品医療機器総合機構）に於いて検討会等を設け、議論の受け皿を用意した上で、ガイドラインを策定すべきであると考ええる。

E. 結論

遺伝子発現解析の標準化研究は緒に着いたばかりであり、ガイドライン策定に際しては更なる国内の情報の集約と問題点の抽出が必要である。今後

も継続的に国際的な動向を調査するとともに、米国等と情報交換を進め、遺伝子発現解析の国際的標準化プロセスへの関与を強めていくことが望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

菅野 純、マイクロアレイや定量PCRから細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法の概略と生物研究への応用、九州大学医師研セミナー、2006 年 4 月 17 日、福岡

菅野 純、基礎と応用のリンケージ・ツールとしての Percellome System、第 95 回日本病理学会総会、2006 年 4 月 30 日-5 月 2 日、東京

菅野 純、マイクロアレイや定量PCRから細胞当たりの mRNA コピー数を得る Percellome 法*の概略と生物研究への応用、第 104 回熊本大学発生研・拠点形成 A セミナー、2006 年 6 月 5 日、熊本

菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋聡、中津則之、創薬とトキシコゲノミクス、第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 15 日、東京

菅野 純、Percellome Project の概要と展望、第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年 7

月 3-5 日、名古屋

菅野 純、Percellom トキシコゲノミクス・プロジェクトの概要と基礎生物学への応用、明治薬科大学オープンカレッジ、2006 年 8 月 7 日、東京

Kanno Jun, Aisaki Ken-ichi,

Igarashi Katsuhide, Nakatsu Noriyuki1, Kitajima

Satoshi, Kodama Yukio,

"PERCELLOME" TOXICOGENOMICS PROJECT FOR THE MECHANISM-BASED TOXICOLOGY, the SOT 46th Annual Meeting March 25-29, 2007

H. 知的財産所有権の出願・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

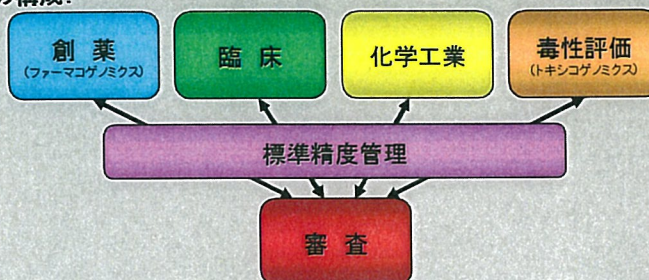
なし

申請課題名: 国際的整合性を旨とする有効性及び安全性における
遺伝子発現情報の標準化に関する研究

対象: 有効性・安全性評価の定量的・高精度指標の一つとしての遺伝子発現情報

目的: 遺伝子発現情報としてのmRNA測定値の標準化に必要な要件の調査研究

研究班の構成:



効果: 1. 開発、製造、有効性評価、安全性評価、及び審査の円滑推進
2. 国際的整合性の確保による国際的活動の円滑推進

1

Comparative and Functional Genomics
Comp Funct Genom 2004; 5: 633–641.
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/cfg.447



Conference Paper

Standardization initiatives in the (eco)toxicogenomics domain: a review

Susanna Assunta Sansone¹*, Norman Morrison², Philippe Rocca-Serra¹ and Jennifer Foster³

¹EMBL-EBI, The European Bioinformatics Institute, Cambridge CB1 0 1SD, UK

²The University of Manchester, Kilburn Building, School of Computer Science, Oxford Road, Manchester M13 9PL UK

³National Institute of Environmental Health Sciences, National Center for Toxicogenomics, Research Triangle Park, NC 27709, USA

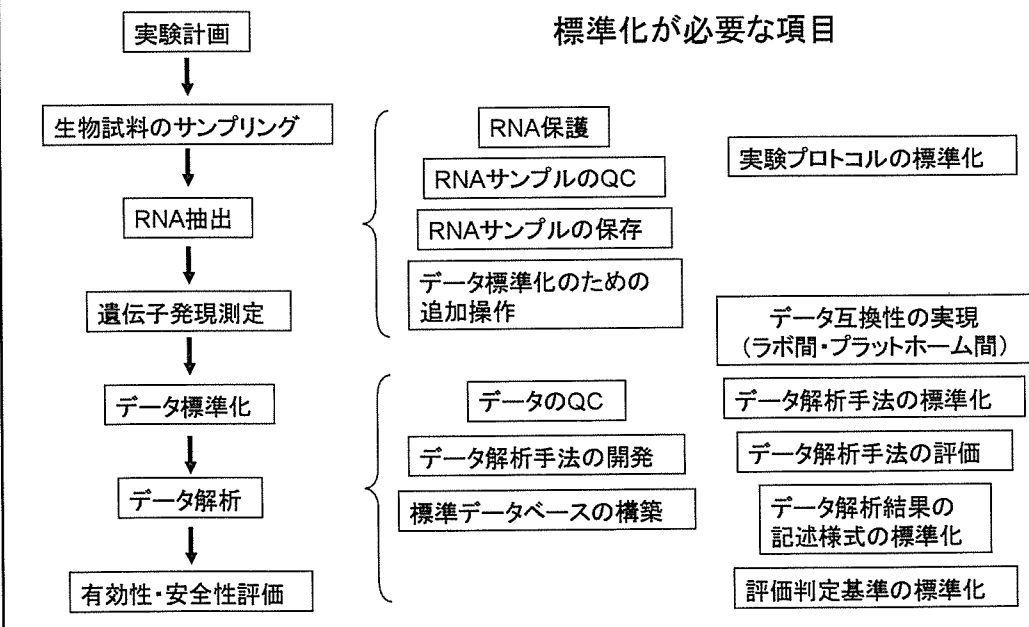
2

Table 1. The initiatives divided according to six broad categories

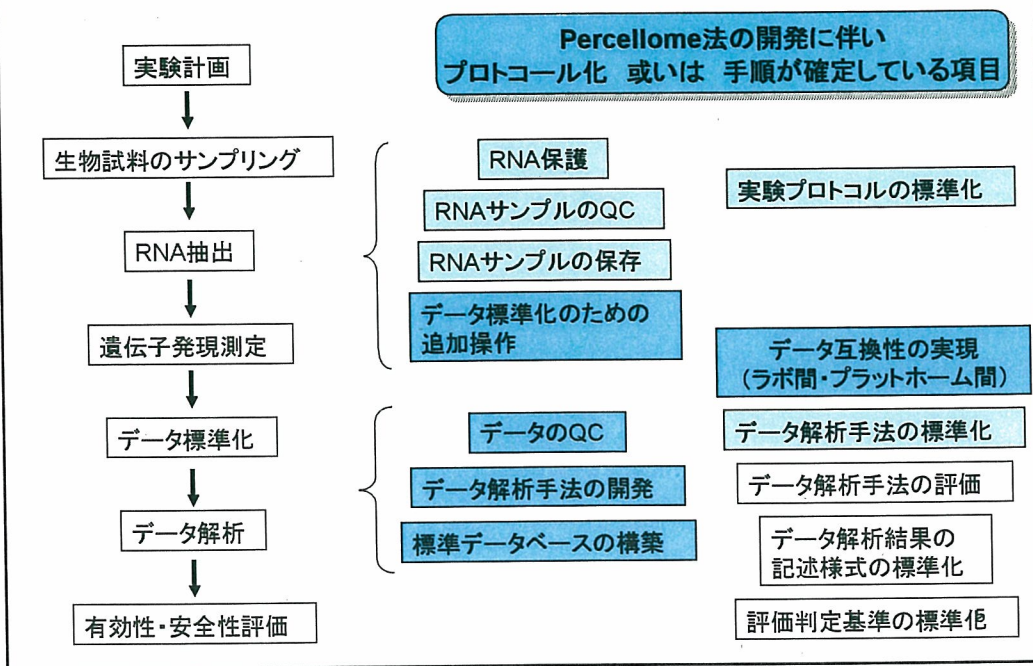
Category	Description	Acronym	Domain	URL
Omics technology communities	Academic grass roots communities that have joined forces with commercial vendors to create technology-driven standards	MGED	Microarray	http://www.mged.org
		PSI	Proteomics	http://psidev.sourceforge.net
		SMRS	Metabolomics and metabolomics	http://www.smrsgroup.org
Measurement and methods validations	Efforts focusing on validation programs and production of standard materials and methods	ECVAM	Array-based toxicogenomics	http://ecvam.jrc.cec.eu.int
		ERCC	Microarrays and quantitative RT-PCR	http://www.cstl.nist.gov/biotech/workshops/ERCC2004
		MARG	Microarray	http://www.abrf.org/index.cfm/group.s how/Microarray.30.htm
		ABRF MFB		http://www.mfbprog.org.uk
Regulatory driven discussion fora	Efforts aiming for a broader understanding and use of omics data, defining data models for data submission to regulators. That preserve the terms and observations used by the submitter	CDISC	Clinical data	http://www.cdisc.org
		PGx	Pharmacogenomics data	To be announced
		SEND	Animal toxicity data	http://www.cdisc.org/models/send/v1.5
Domain-driven discussion fora	Efforts aiming to a broader exchange and integration of toxicity and ecological data	DSSTox	Chemical toxicity data	http://www.epa.gov/nheerl/dsstox/
		SEEK	Ecological data	http://seek.ecoinformatics.org
World-wide organizations	Efforts producing internationally agreed instruments, decisions and recommendations or acting as facilitator	IPCS	Toxicogenomics (Eco)toxicogenomics	http://www.who.int/ipcs/en/
		NAS		http://dels.nas.edu/emerging-issues
		OECD BSC IEEE	Ecotoxicogenomics Bioscience	http://www.oecd.org http://www.csbcn.org
Infrastructure	Standards-compliant infrastructure assisting in development of useful and usable standards	ArrayExpress and Tox- MIAMExpress	Array-based data and toxicology endpoints values	http://www.ebi.ac.uk/array-express http://www.ebi.ac.uk/tox-miamexpress
		CEBS	Toxicogenomics	http://cebs.niehs.nih.gov
		CTD	Genes and proteins	http://ctd.mdibl.org
		maxd	Array-based data and environmental metadata	http://biolinf.man.ac.uk/microarray/maxd
		TIS (ArrayTrack)	Toxicogenomics	http://www.fda.gov/nctr/science/centers/toxicoinformatics/ArrayTrack

3

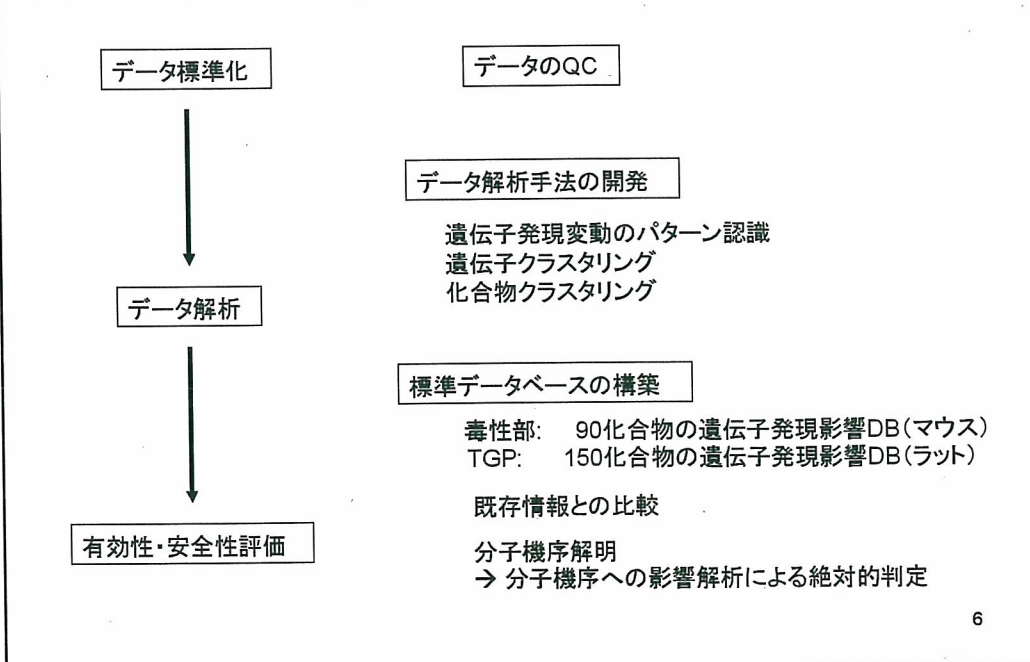
医薬品等の有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析



国衛研 毒性部での取り組み ~ Percellomeの開発・導入



国衛研 毒性部での取り組み ~ Percellome法の開発・導入



Methodology article

Open Access

"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays

Jun Kanno*^{†1}, Ken-ichi Aisaki^{†1}, Katsuhide Igarashi¹, Noriyuki Nakatsu¹, Atsushi Ono¹, Yukio Kodama¹ and Taku Nagao²

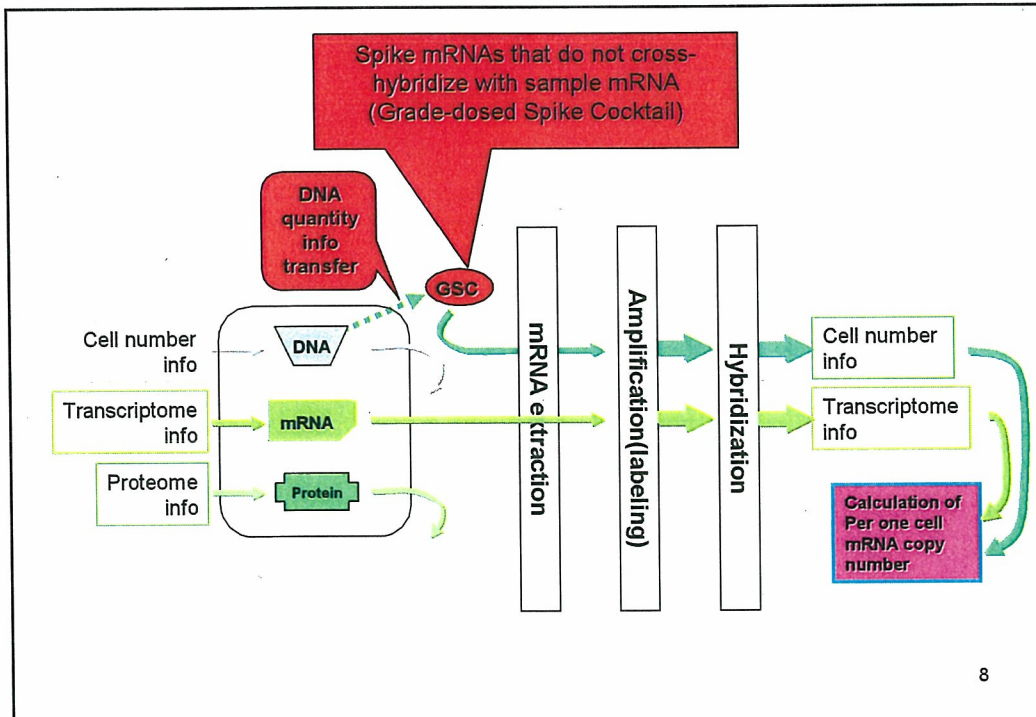
Address: ¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and ²President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email: Jun Kanno* - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - n-nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

* Corresponding author †Equal contributors

BMC Genomics. 2006 Mar 29;7(1):64
PMID: 16571132

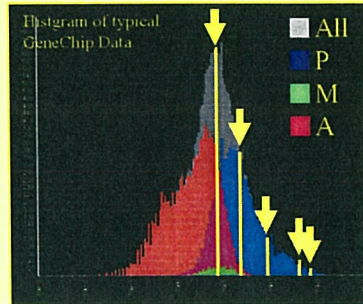
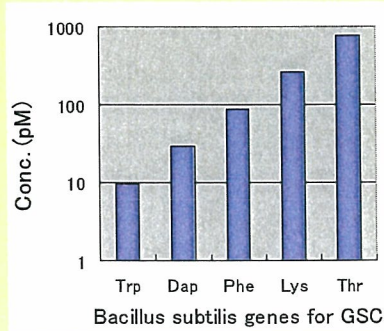
7



8

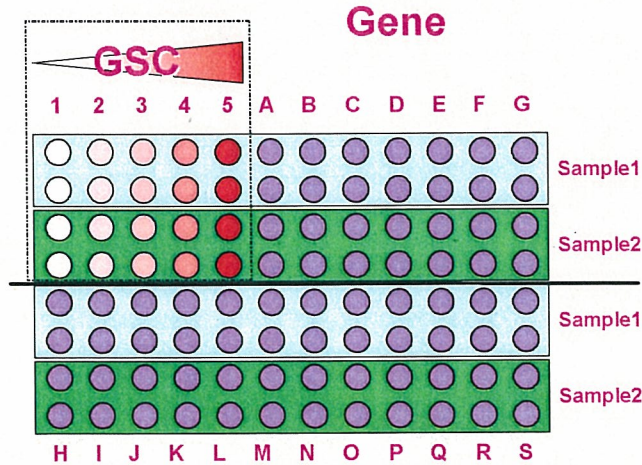
*** Grade-dosed Spike Cocktail (GSC)**

- Spike mRNAs that do not cross-hybridize with sample mRNA
- Affymetrix "Present" call data are covered by GSC range



Percellome Quantitative-PCR

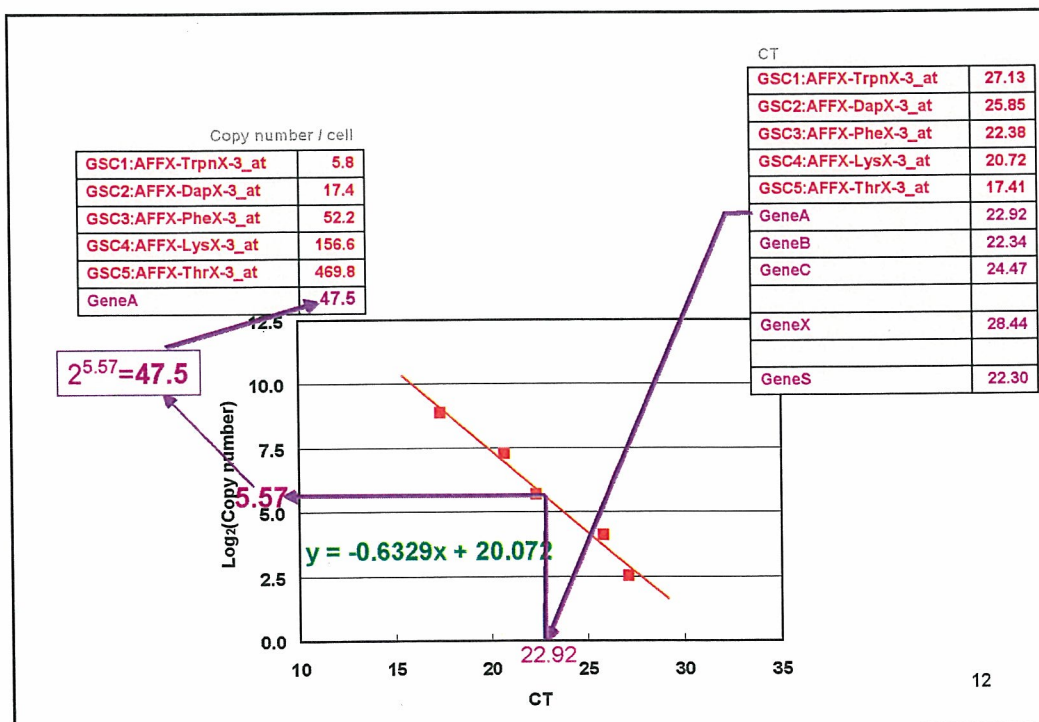
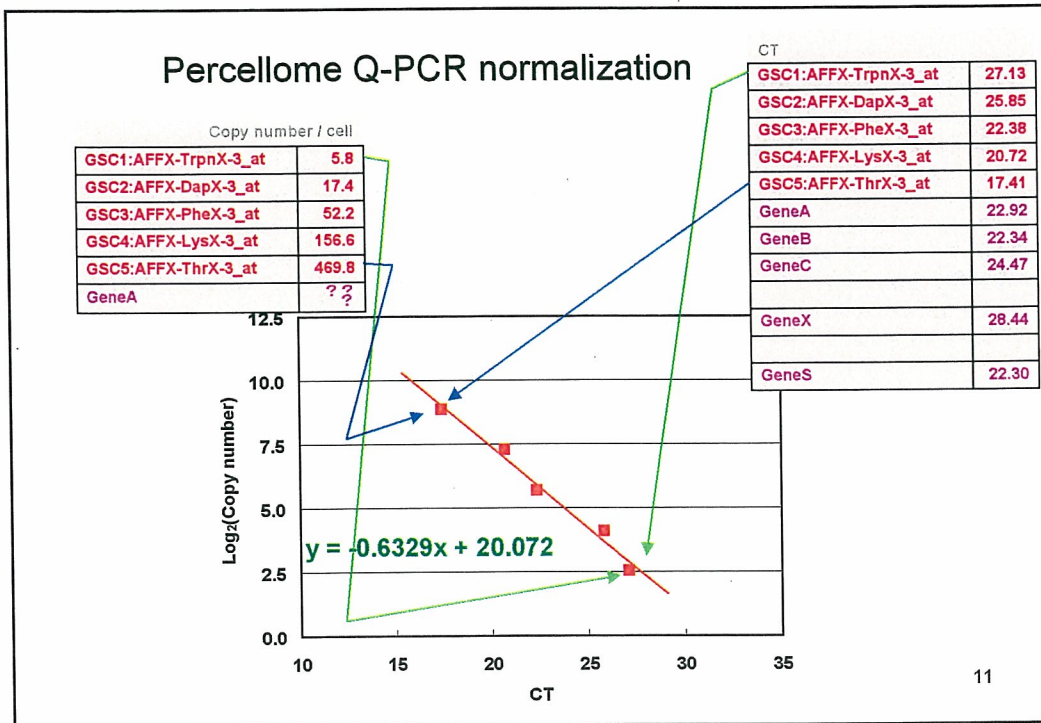
(by ABI PRISM 7900HT / SYBR Green)



30 plates for 60 samples

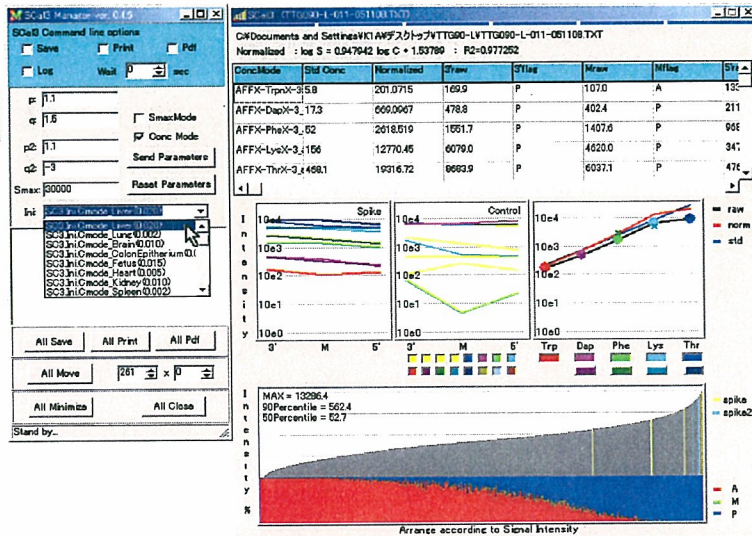
Gene





Percellome Normalization, calculation and QC (for microarray)

Sca3



13

Percellome 法の特長

遺伝子発現が細胞あたりのコピー数

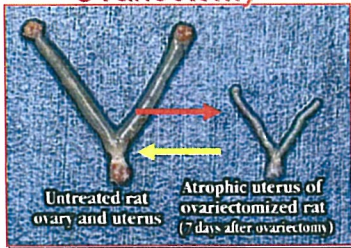


実験間のデータの直接比較が可能

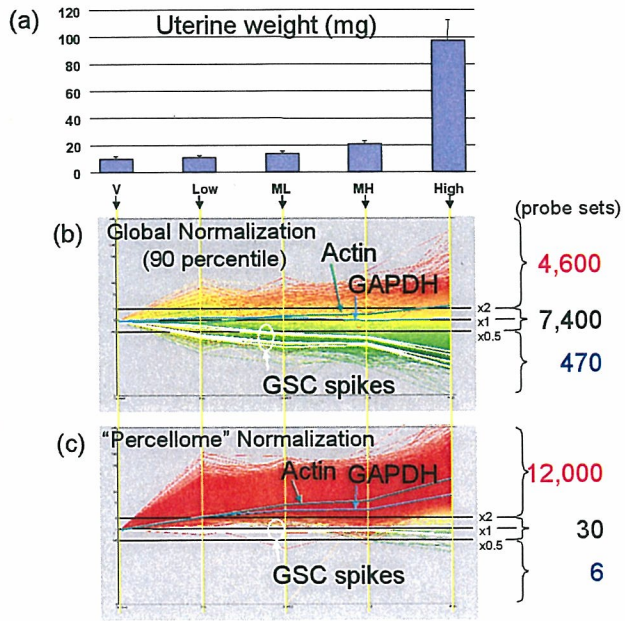
14

遺伝子発現プロファイルに依
存しない
Profile-independent
normalization

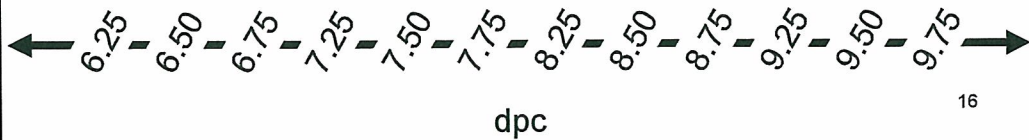
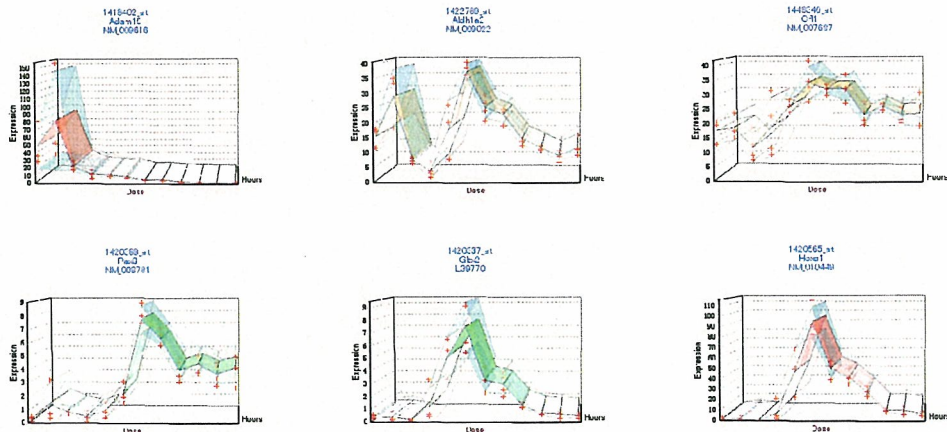
Ovariectomy



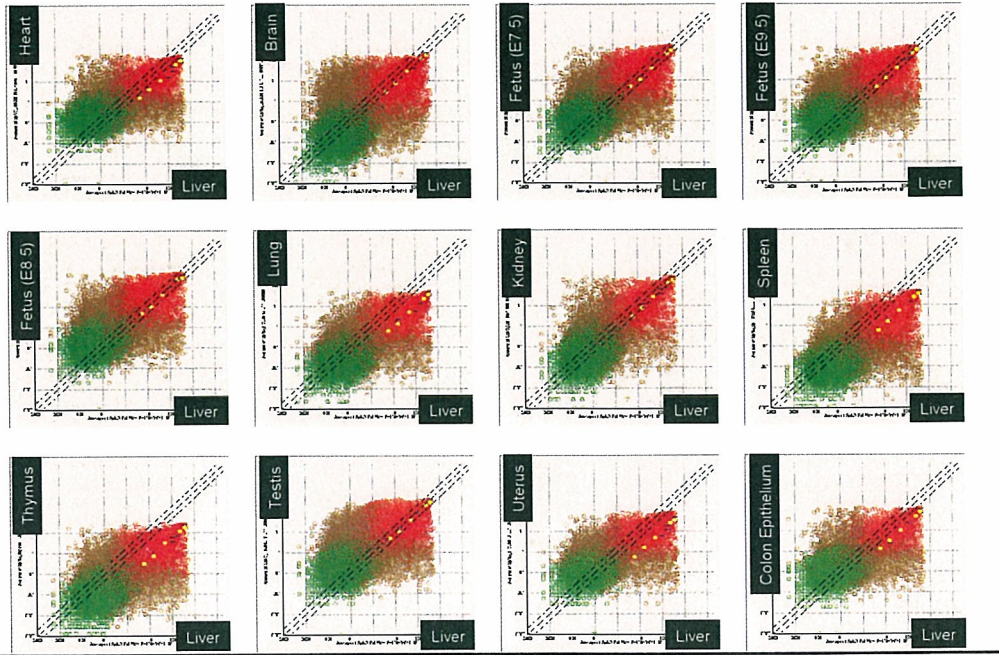
Untreated rat
ovary and uterus
Atrophic uterus of
ovariectomized rat
(7 days after ovariectomy)
Chemical (estrogenic)
effect



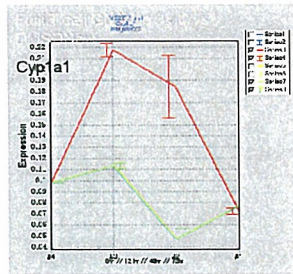
early development (normal, time course)



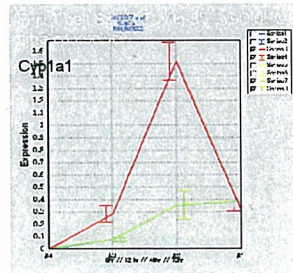
異った臓器間のデータ比較



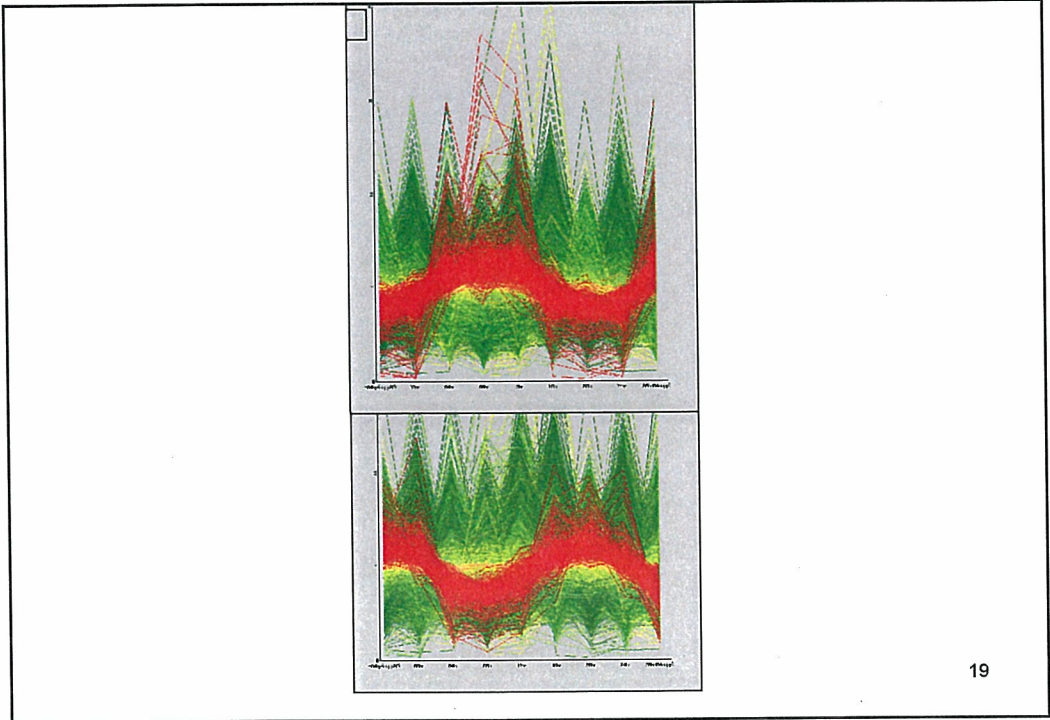
In vitro Experiment



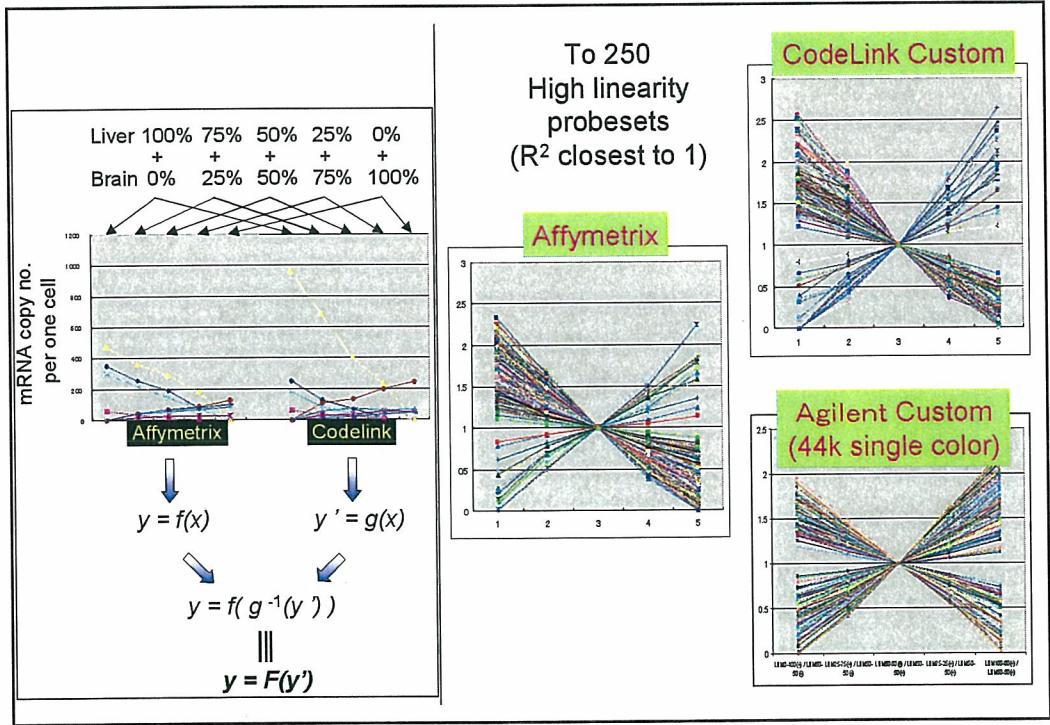
Global Normalization



Percellome



19



Agilent トキシコゲノミクス用 DNAマイクロアレイ
Perclomene Normalization 対応

アジレントテクノロジーから、Perclomene normalization に対応したトキシコゲノミクス用のマイクロアレイが登場しました！
高感度1色法と、マルチバックアレイによる低価格化で、アレイ実験のランニングコストを飛躍的に減少させることができます。



44,000スポットが収まった4枚の独立したアレイが、1枚のスライドグラスに集っています。
アレイ1枚あたり 約 28,000円
(当社従来比 最大60%コスト減)

もっと、Time courseやDoseの測定ポイントを増やしたい。もっと、繰り返し測定実験をやりたい。でもランニングコストが...
アジレントの最新インクジェット技術がその悩みを解決します。1枚のスライドグラスに、44,000スポットの独立したアレイを4枚並べたマルチバックアレイなら、アレイ1枚あたりの価格は3万円以下。トキシコゲノミクスプロジェクトで用いられている perclomene normalization に対応しています。

※異なるサンプルをハイブリダイゼーションできます。
ただしハイブリダイゼーションは同時に行う必要があります。

Agilent トキシコゲノミクス用アレイ



品名	フォーマット
Whole Human Genome - Perclomene Microarray	4 x 44K
Whole Mouse Genome - Perclomene Microarray	4 x 44K
Whole Rat Genome - Perclomene Microarray	4 x 44K

8月発売開始予定

※一部のAgilentにキョーエーでSumの保証ができません。
Future Extraction Software Rev.3.1へのアップデートが必要です。

Perclomene Normalization 参考文献
[BMC Genomics 7:64, 2006]
Jun Kanoe, Ken-ichi Aisaki, Katsuhisa Igarashi, Noriyuki Kohatsu, Atsushi Ono, Yusaku Kodama, Toyo Nogao
"Per-cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays.
Agilent Technologies

- 国内：
 - 臨床におけるmRNA測定の標準化に関する調査研究
 - 創薬過程でのmRNA測定の標準化に関する調査研究
 - 化学工業製品の安全性確保におけるmRNA測定の標準化に関する調査研究
 - 医薬品審査過程におけるmRNA情報の標準に関する調査研究
 - RNA等、基準物質の精度管理に関する調査研究
 - mRNA測定標準化手法に関する調査研究総括・トキシコゲノミクスの標準化に関する調査研究
- 国内拠点：並立？拠点化？ 予算的背景
 - ハードウェアの設置・維持
 - ソフト(データ)の生成・収集・解析支援・
- 国際：
 - 窓口
 - 並立
 - 一本化