

厚生労働科学研究費補助金

トキシコゲノミクス研究事業

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-001)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 漆谷 徹郎

平成19年(2007)4月

様式 A-1 (7)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 19 年 4 月 6 日

厚生労働大臣 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 II 601

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 18 年度厚生労働科学研究費補助金 (トキシコゲノミクス研究事業) に係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-001)

国庫補助金精算所要額 : 金 480,000,000 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研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

トキシコゲノミクス研究事業

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 漆谷 徹郎

平成19(2007)年4月

別添 2

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

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

漆谷徹郎 1

II. 分担研究報告

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

中山裕之 95

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 123

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

中釜斉 155

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 175

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 201

IV. 研究成果の刊行物・別刷 211

別添3

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）

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）医薬基盤研究所基盤的研究部トキシコゲノミクスプロジェクトリーダー

分担研究者 大野泰雄

国立医薬品食品衛生研究所副所長・プロジェクトリーダー

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である。この趣旨のもとに17の製薬企業の参加を得て、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：長尾拓 元国立医薬品食品衛生研究所所長）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た。目標とする150化合物についてはラット肝臓、ラット一次

培養肝細胞における遺伝子発現データ取得を完了し、データベースに格納した。また、腎臓に関しては、25化合物分の遺伝子データ、ヒト凍結肝細胞については120化合物分の遺伝子発現データ取得を完了した。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、解析システム、予測システムを完成し、TG-GATEsと命名した。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）をおいた。これらは安全性評価予測システムの構築のために必須な毒性発現機序の解析に有用な情報を供給した。

分担研究者

中山裕之	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
中釜 齊	国立がんセンター研究所・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。

最終年度の中心的な課題は、インフォマティクス、すなわち毒性予測システムの構築であり、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をシステムに反映させた。

B. 研究方法

トキシコゲノミクスプロジェクト（漆谷・大野）

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・解析を行った。合議により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18年度、目標とする150化合物に関する最終データセット（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、そのすべてについて厳密なQCを行った後にデータベースに格納する。

インフォマティクスに関しては、㈱日立製作所にシステム開発を委託したが、全体のコンセプトから各モジュールの細かい機能に至るまで、研究員との緊密なディスカッションの結果を随時反映させて行った。前年度までに統合データベース v. 3.0 を完成し、大規模クラスタリング、解析ツール、および生体予測システムとしてPAMを装備し、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た。このシステムは本プロジェクトのプロトコル（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が強く、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し、医薬品開発の現場において活用できるようなものとした。更に、解析・予測システムのグレードアップのため、主成分分析（PCA）とサポートベクターマシン（SVM）の機能を追加した。以上の変更、とくにシステムに柔軟性を持たせるという点については、データベース構造の根本的な変更が必要であった。

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、下記の分担研究によって達成した。

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（中山）：妊娠期および泌乳期のラットの肝臓、ブタ血清投与ラットの肝線維化病変における遺伝子発現プロファイルの変化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。本年度の研究においては、特異な基質選択性を示す腎有機アニオントランスポーターの機能をノックアウトマウスを用いたメタボローム解析により明らかにすることを企図した。

(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（中釜）

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、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、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いる。

(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（漆谷・大野）

前年度までに動物実験が完了したものは131化合物であり、本年度の初頭には全150物質の実験が完了した。遺伝子発現データの取得は本年度の秋に完了し、厳密なデータバリデーションの後にデータベースに格納した。ここで問題となったのは、GeneChipのバージョンの違いである。以前、ラットの遺伝子は230Aと230Bの二つのチップに分けて載せられており、初期30程度の化合物は230A chipを用いてデータを取得していた。その後AとBを統合した230 2.0 chipにバージョンアップされ、以後の化合物はすべて新 chip でデータ生成が行われてきた。化合物を横並びに比較する場合、バージョンの異なるチップが混入していると不便が生じること、特に初期化合物は毒性学的に重要な化合物が集中しており、バイオマーカー探索には、見落としを最小にしたいことなどの理由から、これら化合物による遺伝子発現変化を再度230 2.0 chipで取り直すことに決定した。

in vitroの実験は、ラット初代肝細胞については前年度までに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ていたが、本年度、全化合物について実験を完了し、データベースに格納した。

ヒト初代肝細胞については、昨年度まで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た。今年度もその状態が続き、さらに配分額が減額されたこともあり、最も情報の価値が低いこの領域のデータ取得を削減することとした。これまで薬物暴露2、8、24時間の3時点、用量水準低、中、高の3水準を採用していたが、昨年度までに得られたデータの解析から、暴露2時間後、および低用量処理群では、殆ど遺伝子発現変動が観察されていなかった。そこで暴露時間を8、24の2点とし、用量も中、高の2用量として、細胞数とチップ数の削減を図った。また、企業提供化合物（将来的にもデータ公開は行わない）や毒性の主ターゲットが腎臓である薬物も測定対象から外した。このようにして71化合物については2時点2用量のデータを取得し、合計120化合物に関するデータを取得し、すべてデータベースに格納した。

以上の遺伝子発現データとともに、血液生化学データ、病理画像、文献情報、関連する報告書類などは、すべて厳密な精度管理を行った上でデータベースに格納した。

前年度までに完成した統合データベースバージョン3.0を今年度は更にグレードアップした。昨年度までのシステムは本プロジェクトのプロトコル（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。登録や表示機能もそのようなプロトコルに特化し、かつ各種統計値も、前もって計算して格納したテーブルを備えていた。この

方式は、解析する速度の向上には大いに利するが、それ以外のプロトコールには対応できない。また、ラットやヒト以外の種を用いてデータを収集した場合には全く利用できないことになる。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、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、データベース構造、計算・検索アルゴリズム、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、年度の終わり近くまでプログラミング作業が続いた。そのために、システムを利用できる期間が大きく削がれたため、各薬物の作用解析やバイオマーカー探索が十分には行えなかったが、システムのグレードアップを最優先課題とした。

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改良

前年度末に導入を検討したロボットを使用したシステムGCASを、今年度は本格的に稼働させた。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ことが目的であったが、最大のメリットは、少量サンプルでも安定してGeneChip実験の遂行が可能になったことであり、特にヒト培養肝細胞のデータ取得に威力を発揮した。

(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った。ところが配分額が削減されたため、予定の化合物数を行うことが不可能になった。優先順位を議論し、肝障害予測を最優先とした。そこで、選定した17化合物のうち12を選び、合計25化合物について腎臓の解析を行った。

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からである。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遺伝子発現に与える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、この類の薬物として13化合物を選択し、高用量を用いた単回投与試験を追加することとした。

また、薬物投与はコーンオイルまたはメチルセルロースを溶媒として行ったが、投与操作や溶媒自体が遺伝子発現に与える影響を評価しないと正確な解析が不可能である。そこで、無処置群と溶媒投与のみを比較する実験を行い、遺伝子発現データを取得した。

(3) *in vivo*・*in vitro*試験

*in vivo*試験は初年度でプロトコルを確定させ、試験を進めた。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。最終年度までに使用した動物数24000、使用したGeneChip数も約24000枚である。

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ルを確定した。最終的にラットについて150化合物、ヒトについては120化合物についての発現データを取得し、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。

(4) データベース・バイオインフォマティクス

このシステム全体を Genomics-Assisted Toxicity Evaluation System developed by Toxicogenomics Project Japan (TG-GATEs) と命名した。GATEs = 複数の門、ということで、一元的な戦略のとり難い多様な「毒性」という実体に切り込むため

の、毒性学者に対する多くの入り口が用意されている柔軟なシステム、という意味がこめられている。将来マーカー遺伝子リストを蓄積させていけば予測の範囲が増大するであろうが、現状で代表的な表現型の予測率は80%を越える。

1. 遺伝子発現統合データベース

これは、*in vivo* と *in vitro* 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ている。各種解析で抽出したサンプルリストや、マーカー遺伝子リストもデータベースとして蓄積・参照する機能も装備した。また、各使用者独自のデータを格納・比較することが可能な外部データ取り込み機能も追加した。更に、将来的に外部データベースとの連携を考え、MAGE-ML 形式でマイクロアレイデータを出力する機能も装備した。

2. 解析システム

研究者による化合物の生体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。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な関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、多数のプロブセットからなる多数のマーカー遺伝子リストに対する応答性

を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、昨年度は Prediction Analysis of Microarray (PAM) を、今年度は Support Vector Machine (SVM) を開発した。システムでは、PAM の繰り返し計算を半自動化することによって、より効率的に判別分析を反復できるようにした。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として表す方法を開発し、予測結果を定量的に表現することを可能にした。SVM の判定結果も定量的に可視化することを可能とした。

昨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、最終年度にあたり、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した。

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たが、幸い後継プロジェクトの発足が具体化されてきたため、この課題は、後継プロジェクトにおいて検討することとした。

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(中山)

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 (中釜)

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、細胞外マトリッ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NCT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、現在ようやく検討の緒についたところである。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。本プロジェクトにおいては、少なくともin vivoにおける通常の肝毒性を検討する場合、通常のグローバルノーマライゼーションでもほぼ同様の解析が可能なが示されたため、処理の簡便性から、defaultではグローバルノーマライゼーションでの解析を行う事とした。しかしながら、腎臓のような、不均一な細胞構成からなる臓器における部位差を検討するような場合 (J. Toxicol. Sci. 31: 449-470, 2006に報告)、あるいは分担研究(菅野)のような場合など、そのメリットが高いことが見出されているため、すべてのデータはPercellomeによる補正を可能とした。ただし、現在のPercellome補正は、プロジェクト当初のものとは変換率が異なるため、すべて計算しなおす必要が出た。そこで、実際には、データベース中に空のテーブルを用意し、Percellome補正値を計算して格納するようなスクリプトを用意し、必要な場合にプログラムを走らせるという処置をとった。

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、種々困難な点があったものの、実験・データ格納が完了した。

今後の展望について: TG-GATEs が動物試験の効率化に有用であることは明らかであ

るが、臨床開発の成功確率の上昇を目指して、ヒトへの外挿が今後の最大の課題である。このために、後継プロジェクトにおいてTG-GATE sに種差のブリッジングを目指したコンテンツを追加していく予定である。また、米国ではゲノムクスデータを審査資料として採用する方針が固まっており、わが国も早急な対応が必要である。TG-GATE sは、そのレギュラトリーサイエンスへの応用も視野に入れている。

E. 結論

当初の計画通り150化合物についてのラットの毒性データと遺伝子発現データを統合データベースに格納し、解析システム、安全性予測システムからなるTG-GATE sを完成した。このシステムの活用により安全性試験の大幅な効率化が期待できる。また、基盤研究により得られた多くの成果は、毒性学の進歩に多大な貢献をした。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tetsuro Urushidani: "Prediction of hepatotoxicity based on the Toxicogenomics Project Database" in "Hepatotoxicity: From genomics to in vitro and in vivo models" ed. by Saura C. Sahu, John Wiley & Sons, 2007, in press

Tetsuro Urushidani and Taku Nagao. Toxicogenomics: The Japanese Initiative. in "Handbook of Toxicogenomics – Strategies and Applications. ed. by J. Borlak,

Wiley-VCH., p623-631, 2005.

K. Takashima, Y. Mizukawa, K. Morishita, M. Okuyama, T. Kasahara, N. Toritsuka, T. Miyagishima, T. Nagao, and T. Urushidani. 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.* 78: 2787-2796, 2006.

Naoki Kiyosawa, Kouji Shiwaku, Mitsuhiro Hirode, Ko Omura, Takeki Uehara, Toshinobu Shimizu, Yumiko Mizukawa, Toshikazu Miyagishima, Atsushi Ono, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Utilization of a one-dimensional score for surveying the chemical-induced changes in expression levels of multiple biomarker gene sets using a large-scale toxicogenomics database. *J. Toxicol. Sci.* 31: 433-448, 2006.

Kotaro Tamura, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Comparison of gene expression profiles among papilla, medulla and cortex in rat kidney. *J. Toxicol. Sci.* 31: 449-470, 2006.

Kotaro Tamura, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Profiling of gene expression in rat liver and rat primary cultured hepatocytes treated with peroxisome proliferators. *J. Toxicol. Sci.* 31: 471-490, 2006.

Katsumi Morishita, Yumiko Mizukawa, Toshihiko Kasahara, Manabu Okuyama, Kayoko Takashima, Naoki Toritsuka, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and

- Tetsuro Urushidani. Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen. *J. Toxicol. Sci.* 31: 491-508, 2006.
- Toshihiko Kasahara, Toshiko Miyazaki, Hiroyuki Nitta, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Evaluation of the methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. *J. Toxicol. Sci.* 31: 509-520, 2006
- He X.J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Changes in cytochrome P450 isozymes (CYPs) protein levels during lactation in rat liver. *Exp.Mol.Pathol.*, 79:224-228,2005.
- Doi K., Shinozuka J., and Sehata S. T-2 toxin and apoptosis. *J.Toxicol.Pathol.*, 19: 15-27. 2006.
- Nam, C., Woo, G. H., Uetsuka, K., Nakayama, H., and Doi, K. Histopathological changes in the brain of mouse fetuses by etoposide-administration. *Histol. Histopathol.* 21: 257-263 (2006)
- Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. Cell cycle death regulation of neural progenitor cells in the 5-azacytidine (5AzC)-treated developing fetal brain. *Exp. Neurol.* 198: 154-166 (2006)
- Woo, G. H., Bak, E. J., Nakayama, H., and Doi, K. Molecular mechanisms of hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in the mouse fetal brain. *Neurotoxicol. Teratol.* 28: 125-134 (2006)
- He, X. J., Doi, K., and Nakayama, H. Incontrovertible evidence of apoptosis in the SVZ and RMS in the MPTP model of Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65: 873-882 (2006)
- Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. *Brain Res.* 1088: 57-67 (2006)
- Nam, C., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. Etoposide induces apoptosis and cell cycle arrest of neuroepithelial cells in a p-53-related manner. *Neurotoxicol. Teratol.* 28: 664-672 (2006)
- Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Yasoshima, A., Nakayama, H., and Doi, K. Repair process of fetal brain after 5-azacytidine-induced damage. *Eur. J. Neurosci.* 24: 2758-2768 (2006)
- He, X. J., Yamauchi, H., Suzuki, K., Ueno, M., Nakayama, H., and Doi K. Gene expression profiles of drug-metabolizing enzymes (DMEs) in rat liver during pregnancy and lactation. *Exp. Mol. Pathol.* (in press)
- Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:F251-F261, 2006.

- Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, Muto T, Suzuki Y, Kanai Y, Hano H, Furusato M, Endou H: Prenatal 3,3',4,4',5'- pentachloro-biphenyl exposure modulates induction of rat hepatic CYP 1A1, 1B1, and AhR by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 210: 200-211, 2006..
- Tsuji K, Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Bouvet M, Endo H, Kanai Y, Yamashita K, Moossa AR, Hoffman RM: Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. *Cancer Res* 66: 303-306, 2006
- Nakanishi K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H, Hiroi S, Tominaga S, Mukai M, Ikeda E, Ozeki Y, Aida S, Kawai T: LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch.* 448: 142-150, 2006.
- Shigeta Y, Kanai Y, Chairoungdua A, Ahmed N, Sakamoto S, Matsuo H, Kim DK, Fujimura M, Anzai N, Mizoguchi K, Ueda T, Akakura K, Ichikawa T, Ito H, Endou H. A novel missense mutation of SLC7A9 frequent in Japanese cystinuria cases affecting the C-terminus of the transporter. *Kidney Int.* 69:1198-1206, 2006.
- Brandoni A, Villar SR, Picena JC, Anzai N, Endou H, Torres AM. Expression of rat renal cortical OAT1 and OAT3 in response to acute biliary obstruction. *Hepatology.* 43:1092-1100, 2006.
- Price KL, Sautin YY, Long DA, Zhang L, Miyazaki H, Mu W, Endou H, Johnson RJ. Human vascular smooth muscle cells express a urate transporter. *J Am Soc Nephrol.* 17:1791-1795, 2006
- Anzai N, Kanai Y, Endou H. Organic anion transporter family: current knowledge. *J Pharmacol Sci.* 100:411-426, 2006.
- Tomimatsu M, Aizawa Y, Chuganji Y, Ishizuka H, Fujita Y, Aizawa R, Abe H, Matsuda T, Itou Y, Nakanishi H, Ushiyama H, Higuchi T, Fujimoto T, Endou H, Iga D, Ohta K, Kuroda H. Treatment effects and predictors of a 24-week course of interferon alpha-2b plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 21:1177-1183, 2006
- Brandoni A, Anzai N, Kanai Y, Endou H, Torres AM. Renal elimination of p-aminohippurate (PAH) in response to three days of biliary obstruction in the rat. The role of OAT1 and OAT3. *Biochim Biophys Acta.* 1762:673-682, 2006
- Noshiro R, Anzai N, Sakata T, Miyazaki H, Terada T, Shin HJ, He X, Miura D, Inui K, Kanai Y, Endou H. The PDZ domain protein PDZK1 interacts with human peptide transporter PEPT2 and enhances its transport activity. *Kidney Int.* 70:275-282, 2006

- Nawashiro H, Otani N, Shinomiya N, Fukui S, Ooigawa H, Shima K, Matsuo H, Kanai Y, Endou H: L-type amino acid transporter 1 as a potential molecular target in human astrocytic tumors. *Int. J. Cancer* 119: 484-492, 2006.
- Kim SG, Kim HH, Kim HK, Kim CH, Chun HS, Kanai Y, Endou H, Kim do K: Differential expression and functional characterization of system L amino acid transporters in human normal osteoblast cells and osteogenic sarcoma cells. *Anticancer Res.* 26: 1989-1996, 2006.
- Asif AR, Ljubojevic M, Sabolic I, Shnitsar V, Metten M, Anzai N, Mueller GA, Burckhardt G, Hagos Y. Regulation of steroid hormone biosynthesis enzymes and organic anion transporters by forskolin and DHEAS treatment in adrenocortical cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291:E1351-E1359, 2006.
- Kim SG, Ahn YC, Yoon JH, Kim HK, Park SS, Ahn SG, Endou H, Kanai Y, Park JC, Kim do K.: Expression of amino acid transporter LAT1 and 4F2hc in the healing process after the implantation of a tooth ash and plaster of Paris mixture. *In Vivo.* 20: 591-597, 2006.
- Kim CH, Park KJ, Park JR, Kanai Y, Endou H, Park JC, Kim do K: The RNA interference of amino acid transporter LAT1 inhibits the growth of KB human oral cancer cells. *Anticancer Res.* 26: 2943-2948, 2006.
- Wakui S, Yokoo K, Muto T, Suzuki Y, Takahashi H, Furusato M, Hano H, Endou H, Kanai Y: Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis. *Lab Invest.* 86: 1172-1184, 2006.
- Ljubojevic M, Balen D, Breljak D, Kusan M, Anzai N, Bahn A, Burckhardt G, Sabolic I. Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292:F361-F372, 2007
- Anzai N, Kanai Y, Endou H. New Insights into Renal Transport of Urate. *Curr Opin Rheumatol.* 19:151-157, 2007
- Nilwarangkoon S, Anzai N, Shiraya K, Yu E, Islam R, Cha SH, Onozato ML, Miura D, Jutabha P, Tojo A, Kanai Y, Endou H: Role of Mouse Organic Anion Transporter 3 (mOat3) as a Basolateral Prostaglandin E(2) Transport Pathway. *J Pharmacol Sci.* 103:48-55, 2007.
- Kobayashi K, Ohnishi A, Promsuk J, Kanai Y, Endou H, Shiokawa Y, Nagane M: Enhanced tumor growth elicited by L-type amino acid transporter 1 in human malignant glioma cells. *Neurosurgery* in press.
- 安西尚彦、Promsuk Jutabha、武藤朋子、金井好克、遠藤 仁：セファロリジン投

与ヒト有機アニオントランスポーター1安定発現近位尿細管細胞 (S2-hOAT1) における網羅的遺伝子発現解析、腎とフリーラジカル第8集 芦田 明等編、東京医学社、2006, p.67-69

安西尚彦：抗不整脈薬の薬効及び体内動態に対するヒト有機カチオントランスポーター3 (OCT3)の遺伝子多型 (SNP) の影響、(財)中富健康科学振興財団・第17回研究助成業績集 平成18年度版、2006, p.67-69

安西尚彦、遠藤 仁：腎尿酸トランスポーターと血清尿酸値異常、医学のあゆみ 第一土曜特集「水・電解質異常の新展開」、216(9):685-691, 2006

平田 拓、金井好克：腎におけるプロスタグランジンシグナリングの新展開、Annual Review 2007 腎臓、中外医学社、2007, p.42-49

Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 27:162-169, 2006.

Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura Y, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H and Dohi T. Predominant Th2 helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int J Cancer*, 118:2232-2236, 2006.

Ogawa K, Masutani M, Kato K, Tang M,

Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T and Shirai T. Parp-1 deficiency does not enhance liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in mice. *Cancer Lett*, 236:32-38, 2006.

Gunji A, Uemura A, Tsutsumi M, Nozaki T, Kusuoka O, Omura K, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T, Masutani M. Parp-1 deficiency does not increase the frequency of tumors in the oral cavity and esophagus of ICR/129Sv mice by 4-nitroquinoline 1-oxide, a carcinogen producing bulky adducts. *Cancer Lett*, 241:87-92, 2006.

Nakagama H, Higuchi K, Tanaka E, Tsuchiya N, Nakashima K, Katahira M, and Fukuda H. Molecular mechanisms for maintenance of G-rich short tandem repeats capable of adopting G4 DNA structures. *Mutat Res.*, 25:598(1-2):120-131, 2006

Takahashi H, Masuda T, Schaefer K, Saubermann LJ, Fujisawa N, Fujisawa T, Fujita N, Yoneda M, Ikeda I, Shimamura T, Saito S, Tachibana M, Wada K, Nakagama H, Kadowaki T and Nakajima A. Inhibition of PPAR γ activity in esophageal carcinoma cells results in a drastic decrease of adhesive and invasive properties followed by an induction of apoptotic cell death. *Cancer Sci*, 97:854-860, 2006.

Uchida S, Kubo A, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y and Yamashita K. Amino acids C-terminal to the 14-3-3 binding motif in CDC25B affect the