

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14年度～平成18年度総合研究報告書

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総合研究報告書

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 14 年度から実施した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 3, 140, 000, 000 円也

1. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙 (別添 1 のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書目次 (別添 2 のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書 (別添 3 のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 4 のとおり)
5. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
(総合研究報告書の中に書式に従って記入した。)

別添1

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙

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14年度～平成18年度総合研究報告書

主任研究者 漆谷 徹郎

平成19(2007)年4月

目 次

I. 総合研究報告書：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

トキシコゲノミクスデータベース・データ解析・予測システムの構築

漆谷徹郎・大野泰雄・長尾拓	1
(資料1) 図表	

基盤研究

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・中山裕之	133
(資料2) 図表	

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

遠藤仁・金井好克	169
(資料3) 図表	

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

若林啓二・中釜齊	243
(資料4) 図表	

恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究

菅野純	271
(資料5) 図表	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	361
--------------------	-----

III. 研究成果の刊行物・別刷	381
------------------	-----

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）

総合研究報告書

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

独立行政法人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

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有効利用すれば、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。目的達成のため、企業参加を得て、国立医薬品食品衛生研究所を核とした「産連携」の形態をとる大規模プロジェクトが形成された。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。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多くの情報をもたらした。

分担研究者

大野泰雄	国立医薬品食品衛生研究所・副所長
長尾 拓	(前) 国立医薬品食品衛生研究所・所長
中山裕之	東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
土井邦雄	(前) 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
遠藤 仁	(前) 杏林大学医学部・教授
中釜 斉	国立がんセンター研究所・部長
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。合理的な毒性予測システムの構築のためには、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、研究班に肝毒性、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基盤研究をおき、他の生物学領域にくらべ遅れがちな毒性学に関する新知見を収集し、システムに反映させた。

B. 研究方法

トキシコゲノミクスデータベース・データ解析・予測システムの構築を目的としたトキシコゲノミクスプロジェクト（漆谷・大野）

本研究班は、トキシコゲノミクスデータベース・データ解析・予測システムの構築を目的とした官民共同のトキシコゲノミクスプロジェクト (TGP) をコアとし、データ解析・予測システムの基盤となる毒性学的知見の充実を目的とした4つの機関における基盤研究として組織された。

TGP発足当時は国立医薬品食品衛生研究所と製薬17社との共同研究の形をとり、厚生科学研究費とほぼ同額の共同研究費を各企業が分担して供出し、運営に当たった。また、本プロジェクトの特長は、参加各企業が研究員を派遣したことである。これによって、人件費が削減され、研究費の殆どをデータベース構築に割くことができた。

目的達成の為に、参加17社との協力のもと、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。データ・インフォマティクス部門は、(株)日立製作所に業務委託した。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こととした。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した。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した。ここにパス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、というのが全体の運営方針であった。他のバイオインフォマティクス領域に比して、毒性学領域のナレッジの蓄積は明らかに劣っている。毒性メカニズムの詳細が不明なままでは有効な予測システムの構築が困難なことは自明であった。従って、TGPの外側に、基盤研究として4つの研究組織をおき、厚生労働科学研究費の11%を配分し、システム構築にフィードバックすることによって、解析・予測システムの充実を図った。以下に各年度ごとの方法の変遷を述べる。

平成14年度：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、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、さらに実験器具・備品・試薬を整備した。また、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った。発現解析の実験操作を行う技術員7名の教育を実施し、実働体制の整備を完了し、実際の実験データの収集を開始した。

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選定については、初期5化合物(TGP-001～TGP-005)はトキシコゲノミクス準備委員会で決定し、また、第6化合物以降(TGP-006～)は、トキシコゲノ

ミクス準備委員会でリストアップした化合物を中心にラットとヒトとの毒性を考慮して研究内容WGで選定し順次決定していった。14年度は、6週齢及び12週齢の肝機能の差異の検討を含め、アセトアミノフェンについては単回投与実験(5用量5時点、25群、各群3匹)実験と反復投与(5用量4時点、20群、各群3匹)実験、イソニアジド、及び四塩化炭素については単回投与実験をおこない、遺伝子発現解析をおこなった。

in vivo試験に関して、実験手技、サンプルの送受方法及びin vivo試験情報のデータフォーマット等の確立及び統一を図った。また、データの品質を確保するため、すべての動物実験はGLPに準じておこなわれたが、以後の各年度で定期的に動物実験受託機関の査察をおこなった。

in vitro試験に関しては、HepG2細胞を用いた予備試験、一次培養細胞を用いた予備試験を実施し、どの系が最も適当かどうかの検討をおこなった。

データベース・バイオインフォマティクスに関しては共同プロジェクトとしての「産」の参加メンバーと「データベース・インフォマティクス部門」と共に遺伝子発現実験管理システムの構築及び化合物情報、動物試験情報、遺伝子発現解析情報を蓄積する遺伝子発現統合データベースシステムのバージョン1.0を開発した。トキシコゲノミクス専用ネットワーク(28号館遺伝子発現施設-トキシコゲノミクスプロジェクト間)を構築し、統合データベースシステムを運用するサーバーを導入してコンピュータの利用環境を整備した。また、遺伝子発現解析用

ソフトウェア (GeneSpring, SpotFire) を導入し、それらの機能を検証した。

平成15年度

化合物暴露実験を継続し、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、データベースに順次格納していった。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」の参加企業からの提供手続きを開始した。試験管内暴露系に関しては、ラット一次培養肝細胞系のプロトコルを確立し、暴露実験を開始した。ヒト培養肝細胞に関しては平成15年10月国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を得、予試験を開始し、プロトコルを確立した。

インフォマティクスに関して、大規模クラスタリング (階層クラスタリング、K-means クラスタリング、自己組織化マップ) を可能とする計算環境を整え、予測システムの基本設計を行い、各計算・解析・予測モジュールを順次検討していった。

平成16年度

それまでに確立した手法を基に、着実なデータの蓄積を継続した。前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。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、各種統計テーブルや病理データ等の格納場所を装備した。開発の中心となる

予測システムに関しては、変更の困難な本システムを最初から構築するのは非能率的であり、研究的な開発にはなじまないと考え、デスクトップ環境で作動するプロトタイプとしてエクセルマクロプログラムを開発し、解析検討会でこれらを改良していった。

当該年度の最大の問題は、プロジェクト本体が、独立行政法人医薬基盤研究所 (大阪府茨木市彩都) へ移転するため、その引越しの準備、プロジェクトに医薬基盤研が参入するための契約関係などの業務であった。また、使用する GeneChip の変更も行った (結果の項参照)

平成17年度

データの蓄積を継続した。年度初めに実験設備すべてを東京用賀の国立医薬品食品衛生研究所から大阪府茨木市彩都の独立行政法人医薬基盤研究所に移設したため、実験全体のバリデーションをまず行った。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、当該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た。

また、安全性予測の戦略を立てる場合、毒性メカニズムが明らかな薬物のトランスクリプトームデータが必須である。

そこで、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を主に解析、in vitroデータはオプション）を実施した。

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。当該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。更に、前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。

これまで開発してきた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。

平成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、これに厳密なQCを施してデータベースに格納することを最大の目標とした。

試験管内暴露系に関しては、ラット初代肝細胞の実験は150物質とするが、ヒト初代肝細胞は120化合物を施行することとした（結果の項参照）。

インフォマティクスに関して、将来の汎用性を視野に入れ、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。

本研究での核となるプロジェクトに関しては、発足当初、主任研究者である国立医薬品食品衛生研究所・長尾拓所長がプロジェクトリーダーを勤めていた。その後、平成17年度より研究のコアが医薬基盤研究所に移動したのを期に、プロジェクトのサブリーダーであった漆谷徹郎・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に主任研究者を変更し、長尾プロジェクトリーダーを班員とした。また、平成18年度には長尾所長が内閣府食品安全委員会に異動したため、プロジェクトリーダーを国立医薬品食品衛生研究所・大野泰雄副所長に変更し、同時に班員とした。

安全性予測システム構築のための基盤研究としての分担研究

(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

本分担研究は、プロジェクト本体の主目的が、医薬品の肝毒性の早期予測であることから、中心的役割を果たすものである。既に述べたように、毒性予測には毒性発現メカニズムの解析が必須である。しかし、各種薬物を投与した肝臓のトランスクリプトーム解析のみではなかなかメカニズム解析までは困難であり、別の工夫が必要となる。本分担研究では、妊娠動物や糖尿病動物など、各種擾乱が加わった状態で投与された肝毒性物質に応答する肝臓のトランスクリプトーム解析をおこなうことによって、毒性メカニズムに迫ろうとするものである。なお、本研究発足時の班員であった土井邦雄・東京大学教授は、定年退官のため、平成17年度で班員を退いた。研究の継続性を確保するため、18年度は同講座の後任である中山裕之教授を班員とした。

(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

本分担研究は、プロジェクト本体のもう一つの目的が、医薬品の腎毒性の早期予測であることから立案された。腎臓の毒性学的な特徴として、トランスポーターの存在がある。これは医薬品の安全性を考えると最も重要になってくる。プロジェクト発足当時、腎臓におけるトランスポーターはクローニング・機能解明の真っ最中であり、解明に最も力を注ぐべき領域であった。本分担研究では、腎のトランスポーターの同定、機能解析、さらにトランスポーター介在毒性を検討することによって、腎臓の毒性発現機序解明に寄与するものである。なお、本研究発足時の班員であった遠藤仁・

杏林大学教授は、定年退官のため、平成16年度で班員を退いた。研究の継続性を担保するため、同講座の後任である金井好克教授を班員とした。

(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（中签）

プロジェクト本体の最終目標は、トランスクリプトームデータからの早期毒性予測である。肝・腎毒性は広範なフェノタイプを含むため、システムとしては複雑なものにならざるを得ないが、予測システムの戦略を考えると、フェノタイプとしてはより純粋な、発がん機構を標的とした予測戦略を参考にするのが効率的であると考えられた。本分担研究では、大腸がんの化学発がん機構をトランスクリプトーム解析により評価し、化学物質による発がん性予測をおこなおうとする試みであり、そのストラテジーをプロジェクト本体の毒性予測に応用しようとするものである。なお、本研究発足時の班員であった若林敬二・国立がんセンター副所長は、本務多忙のため、平成17年度で班員を退いた。研究の継続性を担保するため、同所の中釜斉・生化学部長を班員とした。

(4) 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究

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。恒常性維持機構として、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などを行った。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った。

C. 研究結果

トキシコゲノミクスデータベース・データ解析・予測システムの構築を目的としたトキシコゲノミクスプロジェクト（漆谷・大野）

本研究は、同一プラットフォームにおける管理されたプロトコールのもと、均質で上質なデータを蓄積することによって有用なデータベースを作成することが主要な目的である。従って、当初決定された研究方法は基本的には変更すべきでない。しかしながら、プロジェクト推進中に以下のような変更を余儀なくされた。

第1は、GeneChipの新バージョンの出現である。プロジェクト開始時、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（約16000遺伝子に対応）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が発売された。これを用いれば同一コストで全遺伝子（32000）の定量が可能であり、製薬企業・各研究所にお

いて将来的に本データベースへデータを追加する場合、230 2.0 chipを使用することは確実であった。この時点でラット *in vivo* 試験の肝臓のデータは、約35化合物分まで収集が終了していた。これらのデータと、これ以降に収集する残りの115化合物のデータを直接比較することが困難になることは予想されたが、*in vitro* の本試験には入っていなかったこと、230 2.0 chipを用いた場合のメリットが大きいと考えられたことなどから、平成15年度末、230 2.0 chipへと変更した。

その後のデータ解析において、特に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場合のあること、特に初期におこなった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、また、初期化合物のデータは、技術的に未熟であったことから、データの質が、後期のものより劣る、などの理由から、最終18年度においては、これら初期の化合物による遺伝子発現変化を再度230 2.0 chipで測定しなおすこととした。従って、最終的には、150化合物すべてにおいて230 2.0 chipによる測定データがデータベースに格納された。

これら初期化合物の230A chipによるデータは、無駄になったわけでは決していない。異なるチップ間の比較、保存サンプルの再現性など、重要な情報を供給するものとして、以降、詳細に検討すべきものである。

第2は、ヒト凍結肝細胞についての問

題であった。本研究では米国より輸入された細胞を使用した。代表的な薬物代謝酵素に異常がなく、培養器への接着率が高く、かつ大量の細胞数が含まれるロットを確保するのが非常に困難であった。その理由から、平成17年度までに49化合物の完了にとどまっていた。最終年度である18年度に入ってもその状態が続き、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。それまで *in vitro* のプロトコールとしては薬物暴露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、前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見られていない例が多かった。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、総計120化合物について、2時点2用量のデータを取得することとした。

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。

5年間のプロジェクトは、データベース・解析・予測システムという最終目標に向かって推進された。従って、年度ごとに分割して述べることはせず、最終成果物に関しての記述をおこなう。

(1) 遺伝子発現データ

*in vivo*試験は初年度でプロトコールを確定させ、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日連続投与後剖検した。用量決定に際しては、まず文献値などから選定した複数用量を用いて7日の連続投与による予試験をおこない、全身症状から最高用量を決定し、ここから $\sqrt{10}$ の公比で減じた。基本方針は、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た。これにより、ある化合物について、ある用量の投与は、28日間続ければおこるフェノタイプがデータベース中に見出せる、ということが保障される。ただし、代謝拮抗薬のように、連続投与により極端にLD50値が低下するような薬物では、最初から単回投与の投与量を増加させた。

例数は5例とし、うち3例を遺伝子発現解析に用いた。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、予試験を繰り返し、プロトコールを確定した。基本的には予試験において処置24時間後の細胞死亡率に従って最高濃度を決定し、ここから公比5で減じた。培養細胞の実験の場合、同一濃度・時間における複数点の測定は生物学的なばらつきを反映するとは考えられないため、各点においては2ウェル (duplicate) の測定とした。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。

本プロジェクトの特長として、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。実験開始当初、毒性発現時のような極端な条件下では遺伝子発現が極端に変動し、グローバル補正では発現値を標準化できないのではという危惧があり、percellome補正を併用して解析を行ってきた。しかしながら、データが蓄積されるにつれ、明瞭なフェノタイプが認められる条件下であっても、少なくともin vivoの肝臓においての薬物影響を対照群との比較において解析する場合は、グローバル補正で問題なく行えることが確認できた。従って本プロジェクトの基本的な解析はグローバル補正法に基づいて行なうこととし、システムもそれを中心に組み立てられている。ただし、組織や器官が異なる場合の解析にはpercellome補正法が有用である場合が見出されており（これは論文として報告した）必要に応じて細胞（DNA）当たりの発現量を計算できる環境を整えた。プロジェクト開始時に採用していた計算方式は、17年度に論文化されたときに変更されたため、当初のデータテーブルは使用できなくなった。再計算は非常に長期間コンピュータを占有するため、最終成果物としては、空のテーブルと、percellome補正をおこなうスクリプトとし、必要に応じてプログラムを走らせるという方式とした。

(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たため、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。

それまでのデータを解析していく過程で、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た。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。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の実験を行い、遺伝子発現データを取得した。

(3) データベース・バイオインフォマティクス

平成17年度までに、統合データベースバージョン3.0は完成していた。しかし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開発したものであった。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、これを参照する方式をとっていた。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、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、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。

このようにして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が完成し、Genomics Assisted Toxicity Evaluation System developed by Toxicogenomics Project Japan, 略してTG-GATEs と名づけた。このシステムは、データベース、解析システム、予測システムの3部から構成される。

1. 遺伝子発現統合データベース

これは、in vivo の遺伝子発現データ、および 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を備えている。また、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、多数のプローブセット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すことのできるツールとして、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、Prediction Analysis of Microarray (PAM) と Support Vector Machine (SVM) を採用した。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てある。

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。詳細は後に個別に掲載した。

(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・中山)

薬物誘発性のげっ歯類肝病変について、その発現機構を肝病変と遺伝子発現プロファイルとの時間的・空間的対応関係に即して解析した。その結果、(1) 妊娠および授乳時のラット肝臓における薬物代謝酵素 (CYP など) の動態が明らかになった。(2) ラットの胎盤、母体肝臓および胎児肝臓では CYP3A1 が妊娠期間を通じて発現し、胎盤ではとくに栄養膜巨細胞に常在していた。(3) 妊娠ラットに T-2 toxin を投与すると、母体肝臓、胎盤および胎児肝臓にアポトーシスが生じ、これらの組織に共通して、酸化ストレス関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、脂質代謝および薬物代謝関連遺伝子の発現が変化した。(4) 高用量ニトロフラゾン (NF) はフリーラジカルの関与による肝細胞壊死を惹起し、低用量 NF は肝細胞 mitogen としての作用した。この際、c-jun、c-myc、TNF- α の発現の増加がみられた。

(5) プ血清投与ラットでは肝線維化が認められ、MHC class II 関連遺伝子、炎症関連遺伝子、ストレス/細胞傷害関連遺伝子、分泌産物および増殖反応タンパク

関連遺伝子の発現増加が認められた。

(6) ストレプトゾトシン (SZ) 投与マウスの肝では肝細胞のミトコンドリアと核、および胆管上皮が傷害され、脂質過酸化、細胞分裂抑制および apoptosis 関連遺伝子の発現増加が観察された。

(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 (輸送体) 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。トランスポーターは、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の透過を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、あるいは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子である。腎臓には、広い基質選択性を有し異物排除や、薬物やその代謝産物の排泄に関わる一群のトランスポーター (多選択性トランスポーター) が存在するが、その広い基質選択性のためにそれらが毒性物質の細胞内侵入の経路となる。そのため、トランスポーターの存在が特定の化学物質の腎毒性発現の重要な要因となる。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* で行い得る評価系は、化合物の腎毒性予測において必須のものとなる。その目的のためには、腎尿細管の多選択性トランスポーターの全分子を明らかにし、化学物質の尿細管細胞への侵入経路の全貌を明らかにすること、及びトランスポ

ーター介在毒性に関する DNA マイクロアレイ解析を行い、毒性発現機序を明らかにすることが必要となる。本研究は、以上の2点を鑑み、腎尿細管の多選択性トランスポーターの全貌の解明、及びトランスポーター介在毒性の *in vitro* の評価系の確立を目的とした検討を行った。本研究により、腎近位尿細管の多選択性トランスポーターの全体像が把握され、トランスポーター介在毒性の *in vitro* の評価系が確立された。これを用い、腎毒性を惹起するモデル化合物としてのセファロリジンとオクラトキシン A の腎毒性発現に関わるパスウェイが明らかになった。

(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)

PhIP 或いは AOM 投与により発現誘導する遺伝子を比較すると両者の共通性は低かった。8種のHCAを投与し、ACF誘発性及び大腸における遺伝子発現をゲノムワイドに解析した。階層型クラスター解析の結果、これらHCAは3個のクラスターに分類された。ACF誘発性を示さないTrp-P-2は、3種の大腸発がん性HCAと同一のクラスターを形成し、また、発現誘導のパターンにも相同性が認められた。Trp-P-2の飼料中の濃度を増量して「短期間歇投与方法」を適用した結果、*dysplastic ACF*は誘発されたが、大腸腫瘍は誘発されなかった。GSEAで更に解析した結果、炎症やストレスに関与する遺伝子群が、HCA類の大腸発がん性に寄与している可能性が示唆された。K-ras遺伝子変異を導入した培養細胞では、IL-1 β 及びLPS刺激によるiNOSの発現が昂進し、遺伝子変異の有無で大腸がんに影響す

る因子への反応性が変化する可能性がある。AOM 誘発マウス及びラットの大腸発がんは PGE2 受容体 EP1,2,4 が促進的に、EP3 が抑制的に関与し、発がん過程により発現が変化した。マウスの 2 段階皮膚発がんモデルにおいて、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と示唆された。

(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。研究開始当初、培養細胞、マウス個体(モデルマウスを含む)を用い、多角的に各研究者の専門分野に関連したテーマを設定し、A) アリルハイドロカーボン受容体 (Aryl hydrocarbon receptor, Ahr) 作動性化学物暴露時に於ける恒常性維持機構に関連する遺伝子群に関する研究、B) 恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討、C) HL60 細胞を使った分化に関係する遺伝子の検索、D) 老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索、を行った。それにより、広範な実験系に対しての遺伝子発現解析の実効性を確認するとともに、体系的アプローチとして「発生」と「発現」について、そのノウハウを受けて、研究期間の後半に於いて、E) 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、及び、F) 発がんプロモーション過程に

於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。

A) AhR 作動性化学物質研究については、TCDD, TCDF, 3-MC, Indigo の 4 種類の化学物質がマウス肝に於いて共通の遺伝子群の発現変化を引き起こすことを明らかにした。B) 血管新生に関する検討では、*in vivo* に於いて血管新生が亢進した状態を *in vitro* の系で再現することを試み、MCF-7 細胞に対し低酸素条件を付与することで血管新生促進因子の一つ VEGF の発現が上昇することを確認した。一方で、C) HL60 細胞を用いた分化関連遺伝子検索では、複数回の実験で再現性のある結果を得ることは困難であるが明らかとなり、培養細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析に於ける実験条件の厳密な制御の重要性が認識された。D) 老化促進 (SAM) マウスの原因遺伝子の検索に於いては、老化促進マウスに於いて発現の高い遺伝子として melanoma antigen が、低い遺伝子として transthyretin が見出された。E) エピジェネティック制御機構障害研究については、胎児神経幹細胞に関する 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、及び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)を構築し、それを活用し、経胎盤的に AzaC を暴露した胎児終脳の Percellome 解析を行った。その結果、AzaC によりインターフェロン応答遺伝子群の発現が上昇すること、それが Stat1 遺伝子プロモーターに存在する CpG island の脱メチル化がきっかけになっている可能性があることを明らかにした。F) 発がんプロモーション研究では、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、マイクロ

ダイセクション法とマイクロアレイ法の併用による腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を行った。まず、DHPN誘発ラット甲状腺発がんモデルを用いて、kojic acid (KA)による発がんプロモーション早期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。更に、濾胞上皮限局性過形成 (FFCH)、腺腫、腺がん部位特異的な遺伝子発現解析を行った。その結果、「非腫瘍部」に比し、「FFCH+腺腫」または「腺がん」で5倍以上の発現の増減を認めた遺伝子数は、「FFCH+腺腫」では各々1、5個、「腺がん」では各々22、12個であった。腫瘍共通に同様の発現変動が認められたものは各々16、2個であった。腫瘍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、KAによる腫瘍進展過程には、鉄や銅の輸送亢進、IL-6 が関与する補体の活性化、がん抑制作用の破綻や癌遺伝子の活性化の関与する可能性のあることが示唆された。Sufadimethoxine(SDM)を用いて同じ時期での遺伝子発現プロファイルを検討した結果、細胞骨格関連遺伝子のうち、モーター蛋白質あるいはその機能調節に関与する kinesin family member 3C、phosphatase and actin regulator、細胞接着因子である cadherin 2、細胞外マトリックスを構成する microfibrillar-associated protein 2、matrix Gla protein、fibulin 1 等が得られ、甲状腺発がん過程の早期から機能異常を示すものと考えられた。次にラットの代表的な肝発がんプロモーターである phenobarbital (PB)について、発がんプロモーション早期(投与 6 週

目)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、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、PBによるプロモーション 6 週目の肝臓では initiate されている細胞が少なく、主に細胞増殖活性の低い肝細胞から構成されていることを反映していると考えられた。一方で、鉄を介した細胞機能の亢進を示唆する鉄輸送蛋白質 transferrin の truncated form である hemiferrin の発現増加、Trans-Golgi network で機能する syntaxin-6 や PI4K の発現変動、PI4K と共に phosphoinositide シグナリングの異常を示唆する dual specificity phosphatase の発現減少、IGF-1 の細胞増殖作用に対して促進あるいは抑制に機能する IGFBP-1 の発現減少等が見出された。

D. 考察

本プロジェクトで完成したデータベースは、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。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

るのである。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。

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、17化合物に関してデータが得られた。これは新規化合物の開発初期段階での毒性予測のモデルケースとして、利用価値の高いデータである。

TG-GATEsと命名した、今回完成したシステムは、これをフルに稼働させて解析を進め、マーカー遺伝子リストを蓄積させていけば予測の範囲と精度が加速度的に向上することが期待できる。システムの完成が年度末に近かったため、まだマーカーの蓄積が十分ではないが、現状で代表的な表現型の予測率は80%を越えている（添付資料参照）。

以上の研究は、良質で充実したデータベ