

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究

トキシコゲノミクスデータベースを活用した
毒性メカニズムに基づく医薬品安全性評価に関する研究

(H19-トキシコ-指定-001)

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 漆谷 徹郎

平成20(2008)年4月

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
依屋町 290 アスヴェル京都御所前 II 601

フリカ ナ ウルダニテツロウ

研究者 氏 名 漆谷 徹郎 印

(所属機関 独立行政法人医薬基盤研究所)

平成19年度厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)に係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データベースを活用した毒性メカニズムに基づく
医薬品安全性評価に関する研究(H19-トキシコ-指定-001)

国庫補助金精算所要額 : 金 355,000,000 円也(うち間接経費 0 円)

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

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

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究

トキシコゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく
医薬品安全性評価に関する研究（H19-トキシコ-指定-001）

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 漆谷 徹郎

平成20（2008）年4月

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データベースを活用した毒性メカニズムに基づく 医薬品安全性評価に関する研究	1
漆谷徹郎・大野泰雄	
II. 分担研究報告	
創薬基盤としての分子毒性学研究	82
菅野純	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	92
IV. 研究成果の刊行物・別刷	97

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究)

総括研究報告書

トキシコゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく
医薬品安全性評価に関する研究(H19-トキシコ-指定-001)

主任研究者 漆谷 徹郎

独立行政法人医薬基盤研究所基盤研究部トキシコゲノミクス・インフォマティ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

平成14～18年度に行われた「トキシコゲノミクスプロジェクト」(TGP)において、約150の医薬品を中心とした化合物を投与したラット肝臓・腎臓について、トキシコゲノミクスデータベース・解析システム・安全性予測システムを構築し、TG-GATEsと命名した。本研究はTG-GATEsを最大限に活用し、①安全性予測の向上・安全性バイオマーカーの開発、②ゲノミクスデータからのヒトの副作用予測性の向上、③医薬品審査での安全性評価におけるゲノミクスデータの応用、の3点を達成しようとするものである。独立行政法人医薬基盤研究所(基盤研)、国立医薬品食品衛生研究所(国衛研)、参加企業13社の連携のもと、TG-GATEsシステムの維持・管理・改良、情報の更新を行うとともに、①システムをフル稼働してバイオマーカーを得る②ラットとヒトの種差を克服する一手段として末梢血のトランスクリプトームによる予測の可能性を検討しつつ、他の手法の可能性を探る、③ゲノミクスデータをレギュラトリーサイエンスへ応用するための一歩として、バリデーション試験を行う。種差のブリッジングに関しては、国衛研のヒト型マウスを用いた研究を分担研究として補完した。

プロジェクトにおいて計算用サーバーを導入し、データベース中の全データの標準化の検討を行った。また、本研究で目標とするバイオマーカーの定義を明確化し、研究方針を決定した。本年度は4種類の候補を得た。ラット末梢血遺伝子発現測定のプロトコールを確立し、4種類の化合物について、肝臓の病変を血球における遺伝子発現が反映しうるかの検討を行った。データ解析が終了するのが来年度6月ごろであり、評価はそ

れ以降に下すことになる。施設間バリデーションについては、計10社の参画を得て、少なくとも参加企業内では標準操作手順書（SOP）の違いがあっても遺伝子発現データの互換性は非常に高いことが示された。分担研究においては、薬剤代謝に大きな役割を果たすPXR受容体をヒト型に変換したマウスの作成に成功した。

以上、TGPの成果を基に、これを活用する体制が整った。バリデーションの結果を含め、TG-GATEsの質・量は十分高いことが確認され、バイオマーカー抽出戦略も確定されたことから、非臨床における利用価値の高いマーカーが得られると期待できる。これを臨床応用可能なものに高めることが今後の課題である。

分担研究者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部・部長

A. 研究目的

本研究は、平成14年度～平成18年度に行われたトキシコゲノミクスプロジェクトの成果の上に立つ、新たな5年計画の官民共同プロジェクトであり、基盤研、国衛研、および製薬企業13社が共同してこれにあたる。前プロジェクトにおいては、150の医薬品を中心とした化合物について、ラット肝臓を標的としたトキシコゲノミクスデータベース・解析システム・安全性予測システムを備えた統合システムを構築し、TG-GATEsと命名した。本研究は、このTG-GATEsを最大限に活用し、①毒性メカニズム解析に基づく非臨床安全性予測の向上・安全性バイオマーカーの開発、②ゲノミクスデータからのヒトの副作用予測性の向上、③医薬品審査での安全性評価におけるゲノミクスデータの応用、の3つの柱を置いている。

TG-GATEsの完成により、少なくともラッ

トの肝毒性の安全性予測に関しては格段の改良が達成できた。しかし臨床におけるすべての臓器の安全性を反映しているかどうかについては課題が残されている。この種差・臓器の壁を克服するには、TG-GATEsを活用し、毒性メカニズムの裏づけを持ったバイオマーカー候補の探索を行うことが急務であり、更にヒトへのブリッジングを企図した、臨床サンプルに適用可能な解析法の開発も必要である。現在欧米では、トキシコゲノミクス手法をレギュラトリーサイエンスに応用する動きが加速している (<http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/>)。このような状況下、わが国として世界に誇るTG-GATEsを基盤に、日本発のグローバルスタンダードを提案すべき状況にある。

TG-GATEsは、医薬品中心であり、同一ブラットホームで得られた極めて品質の高いデータが集積され、十分な用量・時点をもつプロトコールで行われた、という点で、

国内外の他のデータベースに比べて群を抜いた優位性をもつ。これらのデータに最新のインフォマティクス技術を適用することにより、上質な成果が期待できる。また、本研究は、単に新たな知識を得るだけでなく、トキシコゲノミクス手法というものを標準化し、医薬品審査に利用可能なものにするという、レギュラトリーサイエンスとしても最先端の課題に、世界に先駆けて挑戦しようとするものである。

本プロジェクトの主目的は、バイオマーカー探索により、非臨床試験における安全性予測の合理化・加速化である。しかしながら、いくら非臨床試験の合理化・加速化を図ったところで、これが臨床での安全性の担保につながらなくては意味が薄い。従って、本プロジェクトではできる限りヒトへの外挿性を意識している。プロジェクト本体はラットのトランスクリプトームが中心であるため限界があるが、次年度からは公募研究との連携によってこの面での発展を図っていききたい。また、本研究のなかに、分担研究としてヒト型遺伝子をもつマウスの利用研究を置き、この面を補完している。

B. 研究方法

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト (漆谷・大野)

本研究は、製薬企業の参画を得た官民共同プロジェクトである。申請者漆谷が所属する基盤研、国衛研、参加企業（13社）の3者の共同プロジェクトとして運営する。分担研究者の大野はプロジェ

クトリーダーとして全体を統括し、分担研究者の菅野は、ヒトへのブリッジング研究を担当する。また、医薬品審査への適用を視野に入れ、厚生労働省・独立行政法人医薬品医療機器総合機構（医薬品機構）との連携を密にする。前期TGPでは、厚生科学研究費と参加企業からの共同研究費はほぼ1：1であったが、本プロジェクトの場合はそれが約2：1であり、企業研究費の割合が少なくなっている。

5年の研究期間を通じて、①毒性メカニズム解析に基づいた安全性バイオマーカーの開発のため、システムをフル稼働し、これに検証実験を組み合わせる、②ヒトの副作用予測性の向上のため、臨床応用可能な血液サンプルを用いたトランスクリプトームでの予測の基盤を築く、③医薬品審査におけるゲノミクスデータによる安全性評価のガイダンス案を作成し、国際的に情報発信を行う、の3点を目標としている。

プロジェクトの組織と方針

平成19年度はまず、組織の構成を行った。基本的にはTGPの組織を継承したが、細かい変更を行った。今回のプロジェクトがTGPと最も異なる点は、研究員の問題である。TGPでは、実際の研究に携わる研究員は、プロジェクト参加企業から順番に派遣され、4～6名が常駐していたが、今回はそれがない。したがって、参加企業のことを研究内容に反映させ、かつ研究を効果的に進めるために、工夫が必要であった。プ

プロジェクト開始前から、基盤研、国衛研、参加企業代表者からなる研究内容準備委員会を設置し議論をした結果、以下のような組織とした。

まず、最高議決機関として「運営委員会」を設け、その下に基盤研を中心とした「トキシコゲノミクス・インフォマティクス研究部門」を設けた。さらに、企業との共同研究を効果的に推進するために「研究連絡委員会」と「ゲノミクス」「インフォマティクス」「バリデーション」「TG-GATE s」の各ワーキンググループを設け、それぞれの問題に関して討議した。また、研究とは別に、企画・契約ワーキンググループと、知的財産・総務部門を設けた。さらに、企業からの研究員が基盤研に派遣されないという部分を補うため、参加企業有志および国衛研のメンバーによる「研究支援部門」を設け、実際の研究の進め方、およびデータ解析の支援を得る体制を整えた。

バイオマーカー探索の戦略

FDAによるCritical Path Initiativeの発表以来、医薬品開発の領域においてバイオマーカーの重要性の認識が特に高まった。しかしながら、バイオマーカーの定義に関しては、注目する領域によってさまざまであり、混乱が生じている。そこでまず、研究を開始するにあたって本プロジェクトで探索すべきバイオマーカーの定義を明確化し、この5年間のプロジェクトでどのようなバイオマーカーをどれだけ得るのか

という目標を設定した。研究支援部門、およびゲノミクス・インフォマティクスワーキンググループで議論した結果、以下のような結論を得た。

まず、バイオマーカーを以下の4つのグレードに分類した。

グレードIV：TG-GATE sの内部データの範囲内において、ラットの毒性に関する診断・予測に有効であることが実証された遺伝子リスト。

グレードIII：プロジェクト内部以外のプラットフォームでラットの診断・予測に有効であることが実証された遺伝子リスト。

グレードII：臨床での毒性に関する診断・予測に有効であることが示唆された複数の遺伝子リストとそれに付随したアルゴリズム。

グレードI：臨床での毒性に関する診断・予測に有効であることが示唆された単一ないしごく少数の遺伝子

臨床研究を含まない現在のプロジェクトでは、グレードIのバイオマーカーを得ることは不可能である。そこで、プロジェクトではグレードIIIのバイオマーカーを多く得ることを目指し、これにより非臨床試験の大幅な効率化を図ることとし、これをグレードIIにあげる戦略については別項目とした。グレードIIIのバイオマーカーとしては、5年間で30種を目標とした。このうち1～2種をグレードIIにあげることができれば、大成功といえる。

種差のブリッジング

非臨床試験の結果を臨床に適用するには大きな種差の壁がある。特に、本プロジェクトでは組織の遺伝子発現データをもとに安全性評価を行っているため、その結果を臨床に持っていくには困難が多い。これを克服するには、次に示す多くの可能性が考えられる。

- ①ヒト由来の株化細胞を用いたin vitro試験を利用する
- ②ヒト由来の一次培養細胞を用いたin vitro試験を利用する
- ③ヒト由来のES細胞あるいはiPS細胞を用いたin vitro試験を利用する
- ④ヒト型組織や遺伝子を持った動物を用いたin vivo試験を利用する
- ⑤動物試験の毒性発現機序を解析し、ヒトとの共通性を見出す
- ⑥臨床で採取可能なサンプルでの測定を行う
- ⑦患者からバイオプシーによって直接サンプルを得る。

以上のうち、7は問題外であるが、残りの6つも、それぞれ問題が多い。1、2のin vitro試験は、もったもあらふれた戦略であるが、株化細胞は元の組織の性質をほとんど保持しておらず、応用性は低い。TGPでは、ヒト凍結肝細胞の暴露実験を行い、ラット一次培養細胞の暴露実験をラットのin vivo実験とのブリッジングに利用するという戦略を採用した。しかしながら、データ解析を進めてみると、ヒトとラットの種差も大きい、in vivoとin vitroの差もそれに匹敵するほど大きいものであることが明らかとなってきた。すなわち、たとえin vitroで種差のブリッジングができたとしても、それをin vivoに翻訳することが困難なの

である。3は、将来はともかく現在の技術レベルでは臨床とのギャップが大きく、実用には耐えない。4については、少なくとも毒性のある一面を評価するには有用な方法と考えられる。そこで、プロジェクトの一員である国衛研毒性部菅野部長を班員とし、ヒト型遺伝子ノックインマウスを開発してこれを安全性研究に応用しようと企図した（後述）。

現在、最も可能性の高いのが5と6であろう。5は毒性学の進歩に寄与するとともに、最も着実な方法であるが、非常に時間がかかり、また臨床における検証が困難である。一方、6が可能となればこれは有力な武器になる。現在、遺伝子発現が測定可能な侵襲性の低い臨床サンプルとしては、血液中のリンパ球が唯一のものといつてよい

（皮膚や口腔内粘膜の細胞は、肝臓や腎臓の毒性学的変化を反映するとは期待できない）。そこで、もしリンパ球の遺伝子発現変化が投与された医薬品の薬理作用・毒作用を反映するとすれば、これをラットのin vivoのデータと比較することによって、ブリッジングが可能となることが期待される。

当初計画では血液サンプルでの遺伝子解析は、その実用性が未知であるため慎重に行うこととし、多くの化合物の実験を行う前に、予測性がどの程度かを種々検討する予定であった。ところが、米国でかなり先行した研究が行われていることが判明したため、早期に本格的な検討に着手することとした。

バリデーション試験

本プロジェクトで確立を目指しているバイオマーカーは、その性格から遺伝子発現データである。いくらTG-GATEs内のデータの組み合わせで毒性の診断・予測アルゴリズムを得たとしても、遺伝子発現データが他の施設で再現できなかつたら、創薬に役立てることはできない。従って、少なくとも参加企業内ではデータの互換性・再現性があることが担保されていなければならない。また、将来的に遺伝子発現データを申請データなど、レギュラトリーサイエンスへの応用を考えた場合、ことなる施設、プラットフォーム、プロトコールなどがデータに与える影響を検討することは必須である。米国におけるMAQCなどの活動によって最近では考え方も改まってきたが、マイクロアレイデータそのものに信頼性や再現性が乏しいという意見も根強くあり、バリデーション試験は必須と考えられる。

今回は、施設間変動と施設内変動の両者を評価するために、次のようなプロトコールを採用した。

サンプル：CROにおいて、溶媒（メチルセルロース）、アセトアミノフェン 300mg/kg (sub-tox dose), または 1000mg/kg (tox dose) をSDラット (N=5) に経口投与し、24時間後に肝臓を摘出してRNA-Laterで処理した。これを基盤研においてホモジナイズし、そのホモジネートをバリデーション試験に参画した10社に送付した。各社においては、それぞれのSOPに従ってRNA抽出

とGeneChip解析を行った。測定は、各群5例のうち、1番の動物に関しては同一サンプルをtriplicateで測定し、施設内誤差を見積もった。GeneChipデータはAffymetrix Microarray Suite 5.0で解析し、normalizationはGlobal meanを採用した。また、基盤研で行った測定のうち1セットはPercellome法で行い、外因性に与えた多段階希釈標準RNAが測定に与える影響について検討した。

インフォマティクス研究

膨大なデータに関する標準化手法比較などの基礎的な計算を行うため、新たに計算サーバーを導入し、全データを扱える環境を整えた。これを用いて、次のような一斉計算をとまなうテーマを設定した。

- ・TG-GATEsに登録された24000枚以上のGeneChipの全データに対する標準化手法の比較検討
- ・TG-GATEsに登録された血液学・血液化学の全データに対する標準化の検討
- ・腎毒性誘発化合物の早期毒性予測と毒性マーカーの抽出
- ・PPAR α アゴニストに特徴的な毒性予測のモデル化の検討

分担研究：創薬基盤としての分子毒性学研究（菅野）

薬物代謝において、齧歯類ではPXR、ヒトではSXRと呼ばれる核内受容体が外来異物センサーとして存在し、CYP3A等の発

現誘導を制御する。CYP3Aは医薬品の代謝においてもっとも重要性が高いが、PXRとSXRはリガンド結合領域 (LBD) の種差が大きく、齧歯類を用いた試験でのヒトへの外挿を阻んでいる。マウスPXRのLBDをヒトSXRのものに変えればヒト型の活性化パターンを示すマウスが作製されることは容易に期待することができ、すでに、いくつかモデルマウスが作られているが、毒性評価に利用する為には問題があった。そこで、LBDの部分のみをヒト型化し、DBDを含むそれ以外の部分はマウス型のままとするノックインマウスを作製することとした。具体的には、LBDのみをヒト型化したキメラタンパク質 (mhSXR) をコードするcDNAをマウスPXR遺伝子座のExon3にknock-inし、作製されたマウスが実際にヒトSXR特異的リガンドに対する反応を示すか否かを検証した。

C. 研究結果

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト (漆谷・大野)

バイオマーカー探索

本年度は、グレードIVのバイオマーカー、すなわちプロジェクト内部でのバイオマーカー候補遺伝子リストとして、次の4種類を提出した。

(1) グルタチオン枯渇マーカー：グルタチオン枯渇剤phoroneを投与したラット肝臓において、経時的にグルタチオン量と遺伝子発現変化を同時測定し、グルタチオンの低下に相関して上

昇する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、グルタチオン枯渇リスクを持つと思われる薬物群が第1主成分方向に分離された。現在この遺伝子群のうち、有効性の高いものに絞り込む作業が進行中である。

(2) 脂質低下マーカー：各種薬物のうち、連続投与において血清中の脂質が低下していた薬物に共通して肝臓で変動する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、PPAR α に関連すると思われる化合物群と、CARに関連すると思われる化合物群に分離できた。すなわち、脂質低下という同じフェノタイプを示す化合物でも、その作用機序を区別することができた。現在この遺伝子群のうち、有効性の高いものに絞り込む作業が進行中である。

(3) フォスホオリピドーシスマーカー：薬剤性のフォスホオリピドーシスは肝臓のみでなく肺や腎臓など多くの臓器におこりうるが、臨床での適当なサロゲートマーカーが存在せず、薬物開発上の問題となっており、その予測マーカーの開発や発現機序解明は急務である。データベース中に存在する化合物のうち、連投によりフォスホオリピドーシスを発生させた化合物に共通する遺伝子を抽出した。これらの遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、その第一主成分値は、フォスホオリピドーシスとよく相関した。特に、病理組織上紛らわしい所見を出す化合物も主成分分析により区別でき、また、連続

投与でフォスホオリピドシスを発生させる化合物も、用量を増加させればまだ病変の出ない単回投与24時間後の遺伝子変化を主成分分析することにより病変発生を予測できた。現在この遺伝子群のうち、有効性の高いものに絞り込む作業が進行中である。

(4) PPAR α アゴニスト判別マーカー：代表的な3種類のPPAR α アゴニストに共通して肝臓で変動する遺伝子群を抽出した。この遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、代表的なPPAR α 以外にも数種の化合物が分離されたが、これらは文献的にPPAR α アゴニスト作用が報告されたものであった。すなわち、このマーカー遺伝子群は、未知の化合物のPPAR α 活性を検出できる可能性がある。また、これら遺伝子群を用いると、ラット一次培養肝細胞においてもPPAR α 活性を検出することができた。すなわち、培養細胞系を用いた種差のブリッジングができる可能性がある。現在この遺伝子群のうち、有効性の高いものに絞り込む作業が進行中である。

以上4種類のマーカー候補に関しては、改良以前の状態で論文として報告した。

種差のブリッジング

種差のブリッジングの一つの方策として、リンパ球における遺伝子発現解析の可能性を探ることとし、まず、ラット末梢血における遺伝子発現解析プロトコルを確立した。ラット末梢血

のマイクロアレイ解析法としては現在、3つの方法が存在している。一つは薬物投与した動物から得られた血液を密度勾配遠心により分離し、得られたリンパ球分画からmRNAを抽出してマイクロアレイ解析を行うというものである。これはリンパ球のみの遺伝子発現を測定することが可能であり、当然感度も高くなる。しかし一方で、薬物暴露後に長い操作が入るため、これが遺伝子発現に影響を与えて、データの質が落ちる懸念がある。第2の方法は、特殊なフィルター上にリンパ球をトラップして直後に固定し、RNA抽出を行うものである。これは前法に比べて分離操作が遺伝子発現に与える影響を最小限にでき、操作も簡単で実験者によるばらつきが少ないという利点がある。しかしながら、分離されたリンパ球のダメージは大きく、これを暴露実験に用いることができない。初期検討では単離されたリンパ球に対する薬物の直接作用と比較検討する必要があり、リンパ球分離をすれば第1の方法をとらざるを得ない。もう一つの方法は、全血からそのままRNA抽出を行うというものである。この場合、操作は簡単であるが、大量に存在する赤血球由来のグロビンRNAを除く操作が必要になり、これによる発現解析への影響が懸念される。以上のことから、まず第1法と第3法を比較検討することとし、第2法は次年度以降の検討課題とした。

まず第1法による発現解析をCROに委託したところ、分離されるリンパ球の純度に大きなばらつきがあり、実用

に耐えないことが判明した。その原因については以後プロジェクト内で再検討する予定であるが、事実上この方式での実験が不可能となった。一方、全血を用いた検討では、アセトアミノフェン暴露動物を用いたところ、肝障害との関連性は以降の問題としても、少なくとも薬物による遺伝子発現変化を捉えることが可能であった。

以上、全血を用いた遺伝子発現解析が可能となったので、次に薬物を投与したラットにおいて、薬物特有な発現変化が末梢血において認められるか否かの検討を行った。この目的には、データベース中、肝臓において特徴的な病理学的変化を示した3つの化合物を選択し、TGPと同様なプロトコールに従ってサンプルを採取した。その化合物とは、チオアセタミド、メタピリレン、クマリン、およびプロモベンゼンである。本年度中に動物実験・RNA抽出は完了したが、GeneChip解析は完了していない。全部のデータが出揃うのは2008年6月ごろを予定している。データ解析の結果、化合物で特徴的な遺伝子発現プロファイルが認められた場合、他の化合物に関しても暴露実験を行い、データベースに格納していく予定である。

末梢血のトランスクリプトーム解析は、種差のブリッジングに対するチャレンジングな一手段に過ぎず、これのみで可能であるとは断言できない。他の手段も当然講じておく必要がある。その一つとして、ヒト型遺伝子を備えたマウスの利用がある。これは分担研

究の項に詳述するが、マウスの薬物代謝酵素をヒト型に置き換え、少なくとも薬物代謝における種差に関してこれを克服しようとするものである。

データベースコンテンツの充実

ラットのデータに基づく安全性評価の精度を向上させ、go/no goの納得性を与えるため、さらに臨床への外挿性の向上を与えるためには、単なるフィンガープリンティングによる診断・予測でなく、毒性学的メカニズムの裏づけが必須である。TG-GATEsのコンテンツは、医薬品が中心であるため、医薬品の開発のリファレンスとしては有用であるが、それぞれについての毒性メカニズムが明らかになっているものは多くない。従って、毒性学的メカニズム解析を行うためには、メカニズムの明らか化合物の暴露実験を行い、これをリファレンスとして用いることが重要である。そこで、本年度はそのような化合物として、rosiglitazone (PPAR γ 受容体刺激)、rotenone (ミトコンドリア呼吸阻害)、dexamethazone (ステロイド受容体刺激)、lipopolysaccharide (感染・炎症のモデル)を行った。現在データ取得は完了し、GeneChipデータの解析中である。

また、TGPにおいては、150すべての化合物投与実験において肝臓だけでなく、腎臓のサンプルも保存しておいた。予算の関係上、TGPでは25化合物分のGeneChip解析しか行えず、腎毒性診断・予測モデルにはほとんど手をつ

けることができなかった。肝臓の解析結果から、30種以上の化合物パネルがそろった状態で急激に有用な情報が得られるという感触が得られている。そこで、本プロジェクトにおいて、前プロジェクトの貴重な遺産である腎臓サンプルについて点も解析を行うこととした。

本年度は、腎臓に病理変化の現れた以下の8化合物を選択し、順次 GeneChip解析を行っている。それは、triamterene, enalapril, captopril, caffeine, acetaminophen, hexachlorobenzene, allopurinol, acetazolamideである。

施設間バリデーション

遺伝子発現実験の施設間バリデーションを目的とし、標準サンプルを参加企業10社に配布した。結果の詳細は別添資料としたが、結論から言うと、本プロジェクトの参加企業内では GeneChip を用いた遺伝子発現実験の再現性は非常に高く、プロジェクトで抽出されたバイオマーカー遺伝子リストに関しては、少なくともプロジェクト参加企業内では再現性を持つものとして薬物開発において有用であろうことが期待された。

具体的には、まずスクッタープロット解析により、どの施設内、施設間でも再現性・一致性が良好であることが明らかとなった。これは、SOPの多少の違いがあっても、最終的な発現データにはあまり大きな影響を与えないことを示している。また、TGPでは標準的な方法とし

て、枯草菌の段階希釈 RNA を添加した Percellome 法を採用しているが、この操作の有無によっても測定結果に影響を与えないことが確認できた。

すべてのサンプルを対象にした遺伝子発現値の施設間の相関性は、全遺伝子を用いた場合、悪くても0.91以上であったが、AffymetrixのPMA callのpresenceに絞って相関性を評価した場合（すなわち、肝臓で発現が確認できたプローブセットに限った場合）、相関係数は悪くても0.98以上と非常に改良された。

次に、薬物効果・毒性の検出にどのような施設間変動が起こりうるかのシミュレーションを行った。まず全遺伝子を用いた階層クラスタリングでは、毒性量のアセトアミノフェン投与群は明瞭に区別できたが、低用量群の分離は悪く、適当なフィルタリングによる遺伝子選別、すなわちマーカー遺伝子の抽出が必須であることが考えられた。遺伝子のフィルタリング法としてt検定と対照群に対する比率の2つが汎用されている。p<0.05で抽出される遺伝子群の施設間相関性はそれほど高くなく、また、1.5倍以上の変動率で抽出される遺伝子群も、同様あるいはそれに劣る相関性であった。さらに、この2つの方法で得られる遺伝子群間の共通遺伝子はt検定で1/3、比率で2/3に過ぎなかった。これは、1チップあたり3万以上のプローブセット数を考えれば悪い数字ではないが、施設間で再現性のあるバイオマーカー抽出を目標とする場合、注意すべき点であろう。また、上記二つの方法で得られる共通遺伝子に関して施設間相関性を評価すると、

それぞれ単独のものとはほとんど同程度の相関性しか得られず、all presenceのすべてのプローブセットの相関よりかなり悪い値であった。このことは、もともと発現値自体に問題のあるプローブセット (absence, marginal cell) を加えてしまうと、ノイズが大きくなり、Nの少ない状況での発現値の統計処理によっては再現性のあるデータを得ることが困難である、ということを示している。この問題を解決するために、各データを対照群に対するlog₂ (比率) に変換し、施設間相関をみたところ、施設間でほぼ完全に一致するデータが得られた。このことは、対照群に対する変化を正規化してやれば、遺伝子発現データは十分に施設間で交換性が取れることを意味する。また、このような変換をしたときの個々の遺伝子発現値をみると、特定のプローブセットに関しては、用量反応関係にある発現値の各群におけるばらつきの程度まで施設間で一致していた。一方、プローブセットによっては、各群におけるばらつきはまちまちになっている例が認められた。すなわち、管理された状況下においては、優れたプローブセットに関して、厳密に施設間の再現性のあるデータが取得できることが証明された。また、再現性のあるバイオマーカーを得るためには、遺伝子抽出手法とともに、施設間再現性のあるプローブセットの選択も重要な点であることが判明した。

以上の結果はまだ解析中のものであるが、以後さらに綿密な解析を進めたい。また今回の結果は、Affymetrix GeneChipという単一プラットフォームのものであ

った。遺伝子発現解析データをレギュラトリーサイエンスに適用していくには、他社のプラットフォームでの検証が必須であろう。これは次年度以降の課題とした。

遺伝子発現データのバリデーションは将来の申請データとしての使用を視野にしている。この意味から、医薬品機構との関係は重要である。初期の方針決定の段階から連携が必須と考え、同機構のゲノミクスグループと定期的にミーティングをもっている。

インフォマティクス研究

GeneChip データを扱うとき、最も基本的な問題として、画像値を発現値に変換する方式の選択がある。TGP では基本的にMAS5を採用してきたが、他の標準化方式との比較は行っておらず、以前からの課題であった。他の方式とは、RMA とGCRMAであるが、TG-GATEsのデータ規模であると、通常のマシンスペックでは取り扱えないほどのデータ量となる。そこで新たに計算サーバーを導入した。入札等の手続きに時間がかかり、最終的に納品されたのが2007年末であったため、年度内に成果を得ることができておらず、次年度での課題である。

また、マシンスペックの改良に伴って、全化合物を用いた相関解析や判別分析の計算が可能となった。そこでまず、フェノタイプアンカーリングの手段として、血液学・血液化学のデータと相関、あるいは基準値内・外の判別を行える遺伝子群を抽出する方法を全

化合物に対して適用する可能性が考えられた。しかしそのためには、TG-GATEsに登録された血液学・血液化学の全データ、あるいは病理組織標本の定量化データが、全データにおいて標準化されている必要がある。この問題はデータベースの本質にかかわるものであり、種々の検討を重ねているところである。

全化合物に関しての病理データの標準化には問題が残されているため、ケーススタディーとして、腎毒性誘発化合物の早期毒性予測と毒性マーカーの抽出を行った。データベース中、病理組織学的に尿細管壊死を起こす化合物から相関する遺伝子を抽出したところ、マーカー遺伝子候補が得られた。内容的には、KIM-1を初めとする腎障害時に特徴的に変動すると報告のある遺伝子群が得られた。新規性は得られなかったが、本データベースの優秀性が確認でき、また少なくとも尿細管壊死の診断と予測に関しては、非常に汎用性のあるマーカーが得られることが確実視された。

また、別のモデルケースとしてPPAR α アゴニストに特徴的な遺伝子群の抽出を試みた。相関解析を用いて、時間依存的な特徴抽出を試みたが、PPAR α アゴニストは特徴が際立ちすぎ、かえって効率的なマーカー抽出には向いていないことが明らかとなった。

また、バイオマーカー候補（グレードIV）をグレードIIIにアップさせる戦略についても検討した。グレードIIIとは、少なくともプロジェクト参加企業内で再現性がある診断・予測マーカーである。今

回行ったバリデーション試験で、発現量の低いプローブセットや、発現量は高くても再現性の劣るプローブセットが認められることから、バイオマーカーリストからこれらを除去する必要がある。また、一つの機能をもつリストに含まれるバイオマーカー遺伝子の数は、多いほうが結果に頑強性がもたらされるが、実用的には1桁、最大でも2桁にとどめることが望ましいと考えられる。この方針の下に、グレードIVのグルタチオン枯渇マーカー遺伝子に関して、種々の方法で遺伝子の取捨選択を行い、2桁あるいは1桁に絞込んだ。次年度はこれらを検証に回す予定である。

TG-GATEsに組み込まれている、解析システム・予測システムに関しては、現在のところ、大きな仕様変更の希望は集まっていない。データ解析が進んでいった段階でこれをTG-GATEsに反映させる必要が生じた場合にはシステム開発を進めるが、少なくとも来年度までは現状のままとし、TG-GATEs外のツールとして開発したものを適宜組み込んでいくということとしている。

分担研究:創薬基盤としての分子毒性学研究(菅野)

(1) hSXR-KI mouseの作出

マウスLBDの代わりにヒトLBDを持つhSXR mRNAを発現するノックインマウス作製用ターゲティングベクターを構築するために、マウスPXRのexon 3にヒトSXRのcDNAを連結した。このベクターをC57BL/6とCBAのF1由来のES細胞クロ

ーンである TT2 に導入し、サザンブロッティングによって相同組み換えが確認された 2 クローンから得られたキメラマウスを ICR 系マウスと交配し、Cre を CAG promoter 制御下に恒常的に発現するマウスと交配し、Neor を失ったマウスを選別した。このマウスを C57BL/6 CrSlc に少なくとも 4 回バッククロスし、ホモ体を得た。

(2) hSXR の組織発現パターンの検討

mhSXR の組織発現パターンを定量 RT-PCR によって検討した。脳、胸腺、心、肺、肝、胃、脾、腎、小腸及び精巣の 10 臓器について検討したところ、発現パターンは野生型と一致した。

(3) ヒト型化リガンド反応性の検討

このマウスがヒト型化反応を示すか否かを、ヒト特異的 agonist として RIF を、マウス特異的 agonist として PCN を用いて検討した結果、肝、小腸粘膜ともに RIF で発現誘導されるが PCN では誘導されないという、典型的なヒト型反応を示すことが確認された。次に、肝での発現誘導を組織学的に検討するため、CYP3A11 mRNA に対する in situ hybridization を行ったところ、野生型での PCN による発現誘導と同様の、肝小葉中心静脈周囲を起点とする発現上昇が、ヒト型マウスで RIF 投与によって認められた。以上のことから、hSXR-ノックインマウスは LBD ノックイン設計であるため、マウス本来の PXR 発現と同じ発現パターンを期待することができ、種差を考慮した網羅的な毒性研究における応用範囲が今までのもののうちで最も広いツールであると考えられる。

D. 考察

本プロジェクトで取得すべきバイオマーカーの具体的内容を明らかにし、今後の研究の進め方に関しての方針が整った。

TG-GATE s は基盤研において使用するだけでなく、TGP 終了時に成果物として参加企業各社へ配布されているので、参加企業がこれを使用して独立にバイオマーカー探索を行うことが可能である。この利点を最大限に生かし、次年度からは各社2つずつのテーマに手分けして探索を行うことを考えている。このペースで行えば、失敗を見込んで、プロジェクト終了時までには約 30 のグレード III バイオマーカーの取得は可能であると期待できる。

プロジェクトにおけるバイオマーカーの定義は、その再現性と汎用性にのみ注目しているが、その使用目的により内容は大きく異なる。創薬の初期段階において In vitro のハイスループットスクリーニングにおいてラフに毒性学的パスウェイをチェックするものから、非臨床試験の最終段階で臨床で起こりうるフェノタイプを精度よく予測するものまで、また、注目するフェノタイプや毒性の種類も千差万別であり、それぞれについて診断マーカーか予測マーカーかの違いもある。いずれにしてもバイオマーカーは創薬の加速化と合理化に資することが必須であるから、各企業のニーズに直結している必要がある。その意味からも、参加企業がそれぞれ開発マインドの存在する領域に関するバイオマーカー開発を分担するという本プロジェクトの方式は最も成果の上がるものと期待できよう。

バイオマーカー探索は世界的な要請である。欧米では主要な製薬会社と規制当局が参加したバイオマーカーコンソーシアムが動き始めており、2008年3月のSociety of Toxicologyでは、企業主体の発表が相次いでいる。少なくとも欧米では安全性バイオマーカーを各企業で抱え込むことなく、知識を共有し、創薬の場で使用に耐えるものにしていこうという明確な方針が打ち出されている。現在は、知的財産権保護の観点から、参加企業に情報公開の意欲が薄い、グローバルな潮流にわが国の創薬研究が乗り遅れないためにも、プロジェクト参加企業から世界に向かって情報発信することを視野に入れておく必要がある。

E. 結論

TGPの成果を基に、これを活用する体制が整った。バリデーションの結果を含め、TG-GATE s の質・量は十分高いことが確認され、バイオマーカー抽出戦略も確定されたことから、非臨床における利用価値の高いマーカーが得られると期待できる。これを臨床応用可能なものに高めることが次年度以降の課題である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

T. Uehara, N. Kiyosawa, T. Shimizu, K. Omura, M. Hirode, T. Imazawa, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani. Species Differences in

Coumarin-Induced Hepatotoxicity as an Example of How Toxicogenomics Help Assessing Risks for Human. *Hum. Exp. Toxicol.* 2008, in press.

M. Hirode, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, Y. Ohno, and T. Urushidani. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, Feb 14; Epub ahead of print

T. Uehara, N. Kiyosawa, M. Hirode, K. Omura, T. Shimizu, A. Ono, Y. Mizukawa, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani. Gene Expression Profiling of Methapyrilene-Induced Hepatotoxicity in Rat. *J. Toxicol. Sci.* 33:37-50, 2008.

T. Urushidani. Prediction of Heptatotoxicity Based on the Toxicogenomics Database. in "Heptatotoxicity: from Genomics to in vitro and in vivo Models" Ed. by S. C. Sahu, John Wiley & Sons, 2008, pp.507-529

S. Sakai, R. Matsuda, R. Adachi, H. Akiyama, T. Maitani, Y. Ohno, M. Oka, A. Abe, K. Seiki, H. Oda, K. Shiomi, A. Urisu. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed food. *J. AOAC International* 91, 123-129, 2008

T. Oguchi, M. Onishi, Y. Chikagawa, Y. Minegichi, T. Kodama, H. Akiyama, Y. Ohno, S. Futo, A. Hino, S. Furui, K. Kitta.

Development of event-specific quantitation method for GA21 maize, which is a GM event without CaMV35S promoter. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 49, 16-22, 2008

T. Ashikaga, H. Sakaguchi, K. Okamoto, M. Mizuno, J. Sato, T. Yamada, M. Yoshida, N. Ota, S. Hasegawa, T. Kodama, Y. Okamoto, H. Kuwahara, N. Kosaka, S. Sono, and Y. Ohno. Assessment of the human cell line activation test (h-CLAT) for skin sensitization; Results of the first Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 27-35, 2008.

H. Kojima, T. Ando, K. Inagaki, M. Ohhira, T. Kosaka, Y. Nakamura, H. Torishima, N. Morikawa, J. Kanno, M. Kuboki, M. Genno, M. Nokata, T. Harada, T. Morimoto, I. Yoshimura, Y. Ohno: Validation of human skin models for skin corrosivity tests in Japan. *AATEX* 13, 36-44, 2008

K. Omura, N. Kiyosawa, T. Uehara, M. Hirode, T. Shimizu, T. Miyagishima, A. Ono, T. Nagao, T. Urushidani. Gene Expression Profiling of Rat Liver Treated with Serum Triglyceride-Decreasing Compounds. *J. Toxicol. Sci.* 32: 387-399, 2007.

N. Kiyosawa, T. Uehara, W. Gao, K. Omura, M. Hirode, T. Shimizu, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani. Identification of Glutathione Depletion-Responsive Genes Using Phorone-Treated Rat Liver. *J. Toxicol. Sci.* 32:469-486, 2007

漆谷徹郎 医薬品安全性研究の動向～マイクロドーズ試験を含めて～ 新薬展望 2008 44 : 229-234、2008

漆谷徹郎 レクチャーノート トキシコゲノミクスプロジェクト(2) *Drug Metab. Pharmacokinet.* 22(2): 13-15, 2007

大野泰雄：日本薬理学会の奨める動物実験-苦痛の評価と軽減-「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針：日本薬理学雑誌 129, 5-9, 2007.

Y. Shinozaki, Y. Sato, S. Koizumi, Y. Ohno, T. Nagao and K. Inoue. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* 147(1):153-63 (2007)

Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K.: beta-Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* 1150:108-120. 2007.

S. Ichida, H. Tanabe, Y. Shinozaki, S. Koyano, H. Kagechika, K. Shudo, S. Ozawa, J. Sawada, Y. Ohno, K. Inoue. How DNA microarray technology contributes to the retinoid evaluation. *Vitamin A: New Research.*

Ed. By I. T. Loesing pp. 71-92. 2007.

大野泰雄：動物福祉と動物実験代替法への考慮の必要性について。Biophilia 3, 4-5 (2007)

大野泰雄、小野俊介：マイクロドーズ試験ガイドランスの検討について、医薬品研究 38, 623-638, 2007.

大野泰雄：動物実験代替法の国際動向。Fragrance Journal 10, 20-28 (2007)

内藤真策、古田 盛、吉田武美、北田光一、笛木 修、海野 修、大野泰雄、小野寺博志、河村信之、黒川美佐男、佐上文郎、篠田和俊、中澤隆弘、山崎恒義：医薬品開発における代謝物の安全性評価についての考え方。医薬品研究 38, 495-498 (2007)

Naito S., Furuta S., Yoshida T., Kitada K., Fueki O., Unno T., Ohno Y., Onodera H., Kawamura N., Kurokawa M., Sagami F., Shinoda K., Nakazawa T., Yamazaki T.: Current opinion: Safety evaluation of drug metabolites in development of pharmaceuticals. J. Toxicol. Sci. 32, 329-341 (2007)

Seiki K., Oda H., Yoshioka H., Sakai S., Urisu A., Akiyama H., Ohno Y.: A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. J. Agric. Food Chem. 55(23): 9345-50 (2007)

大野泰雄：WC6（第6回国際動物実験代替法会議）を終えて。日本動物実験代替法学会 News Letter. 34, 2-4. 2007.

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. Cell, 130:811-823, 2007.

Nakatsu N, Nakamura T, Yamazaki K, Sadahiro S, Makuuchi H, Kanno J, Yamori T. Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. Mol Pharmacol. 2007 Aug 16

Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, Kanno J, Kanno H. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. Exp Hematol, 35:1190-1200, 2007.

Kato Y, Ikushiro S, Takiguchi R, Haraguchi K, Koga N, Uchida S, Sakaki T, Yamada S, Kanno J, Degawa M. A novel mechanism for polychlorinated biphenyl-induced decrease in serum thyroxine level in rats.