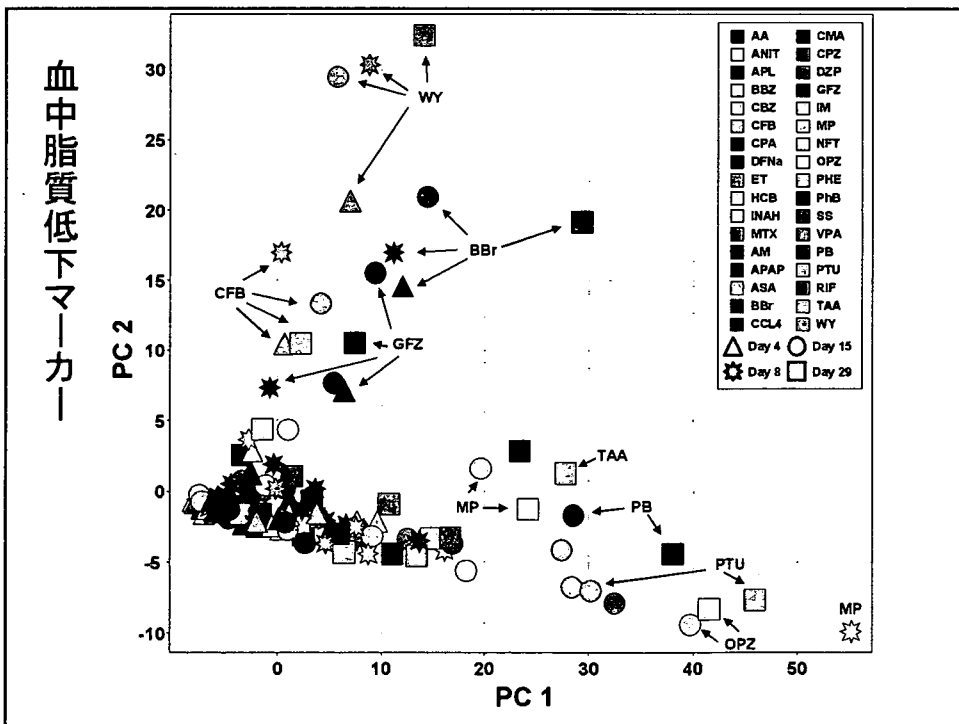
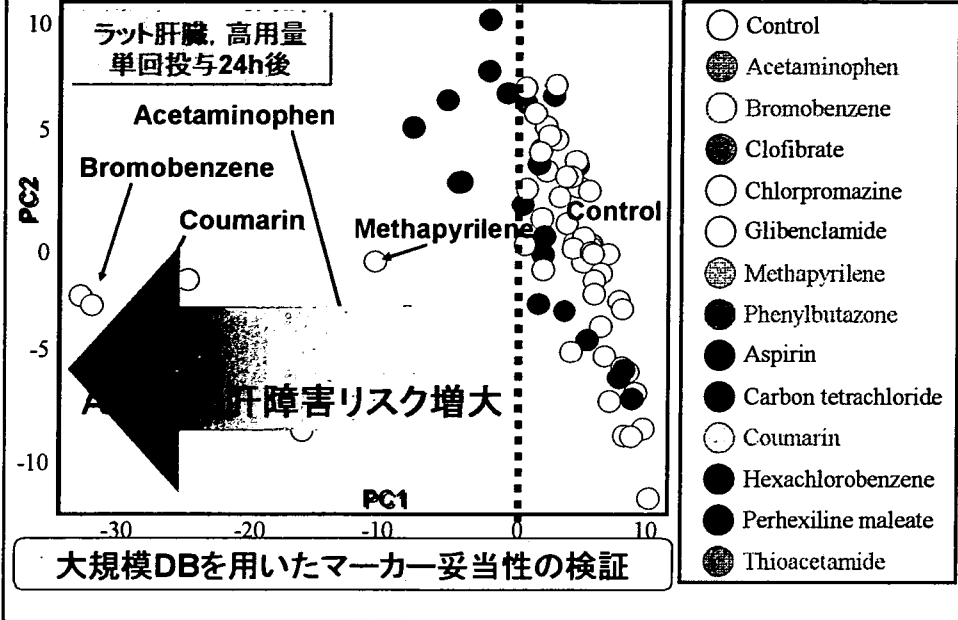
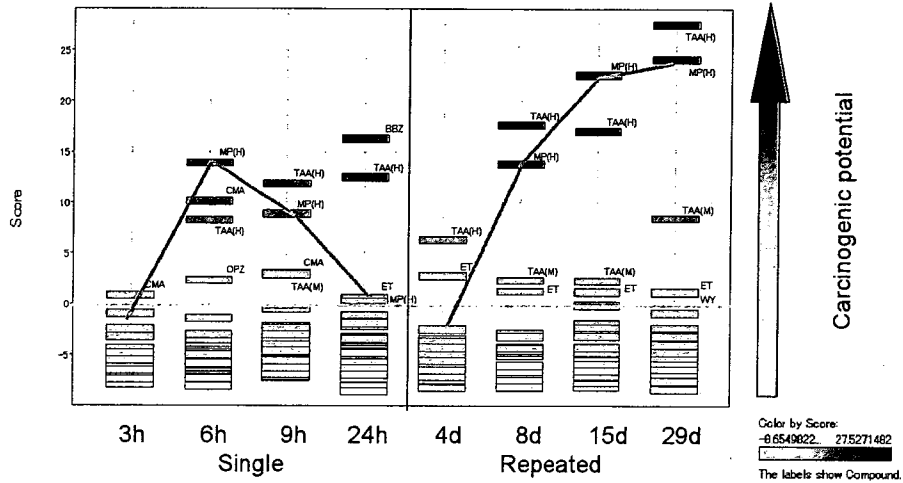


解析例：薬剤起因性肝臓グルタチオン欠乏評価



Visualization by "PAM Prediction Score"
 $= \text{Log}_{10} [\text{class probability (positive)} / \text{class probability (negative)}]$

Prediction Score < 0 : Negative
 0 < Prediction Score : Positive

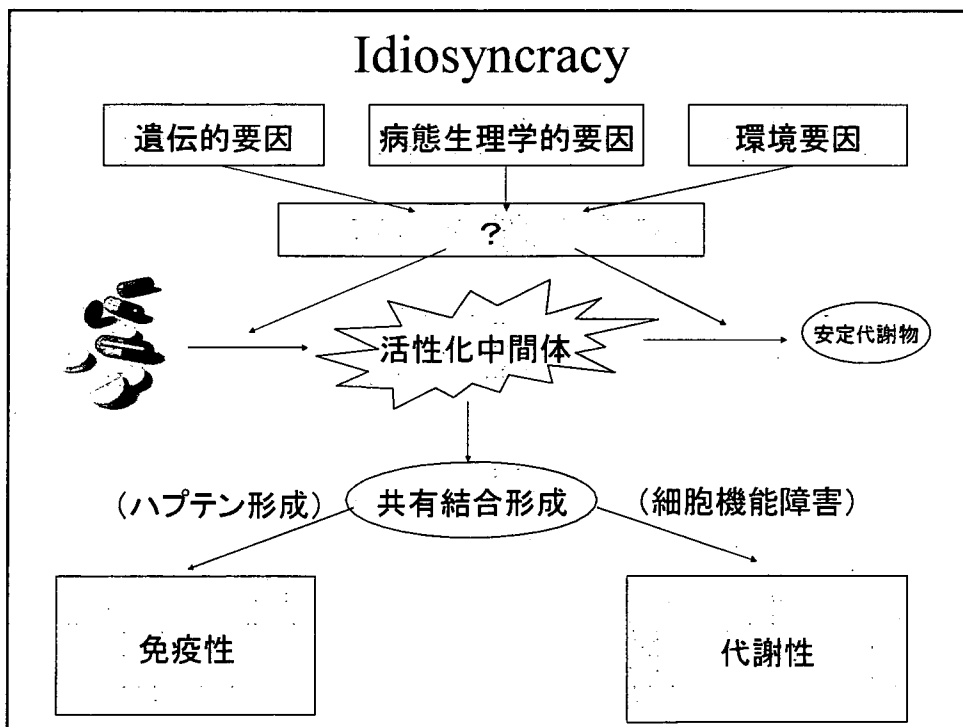


解析・予測のストラテジー

- フェノタイプアンカーリング
 病理変化の標準化(?)
- バイオマーカー遺伝子リストの取得
 一覧性のよいビューワーの開発
- 判別分析
 PAM, SVM: 予測結果の定量的表示
- 主成分分析
 予測結果の定量的表示
 → 毒性メカニズムに基づいた予測

TG-GATEsでできること・できないこと

- ラットを用いた安全性試験の効率化
臨床における副作用減に貢献？
臨床の副作用を反映しているか？
- ラットにおける毒性メカニズムの推定
ヒトに外挿できるか？
- ラットにおけるバイオマーカー候補の提案
臨床応用が可能か？



Inflammation and Drug Idiosyncrasy—Is There a Connection?

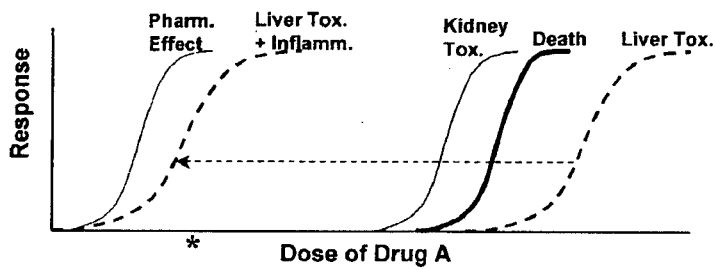
ROBERT A. ROTH, JAMES P. LUYENDYK, JANE F. MADDOX, and PATRICIA E. GANEY

Department of Pharmacology and Toxicology, Institute for Environmental Toxicology, National Food Safety and Toxicology Center, Michigan State University, East Lansing, Michigan

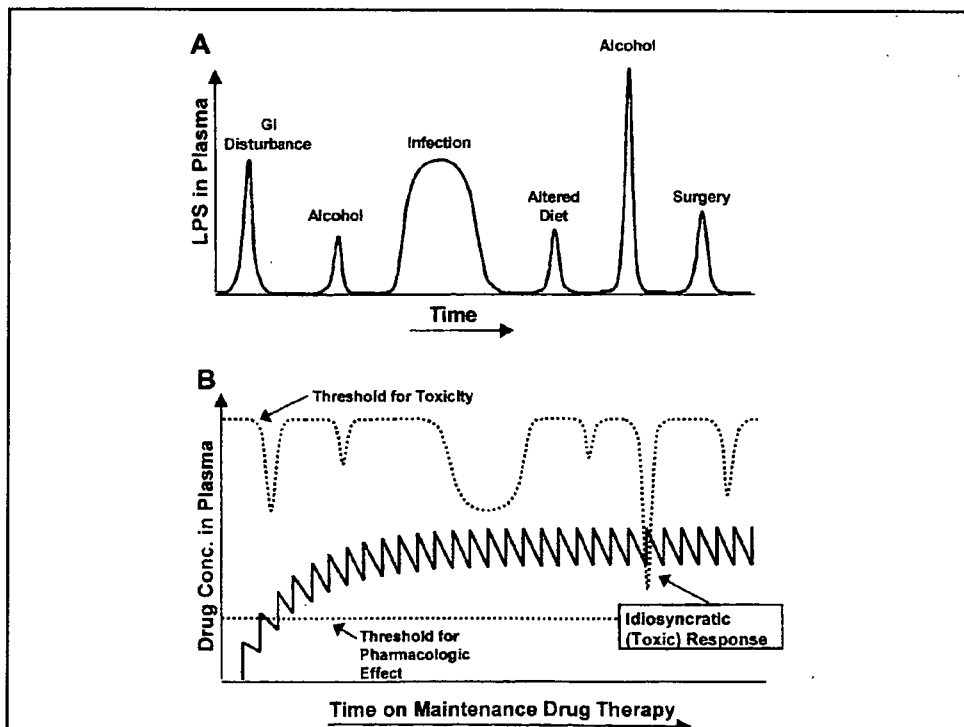
Received June 4, 2003; accepted July 1, 2003

ABSTRACT

"Drug idiosyncrasy occur in a small relationship to dose quent target for t about mechanisms p otheses that the drug metabolism p cific immune resp c few drugs does c mechanisms, how e ships that charac the possibility that renders tissues pe



Commonplace als indicate tissue sen- ations have ation during toxicity and eaction that ' response). diosyncrasy 1 results of /ledge gaps d be widely

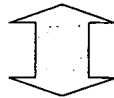


トランスクリプトームによる毒性メカニズム解析の問題点

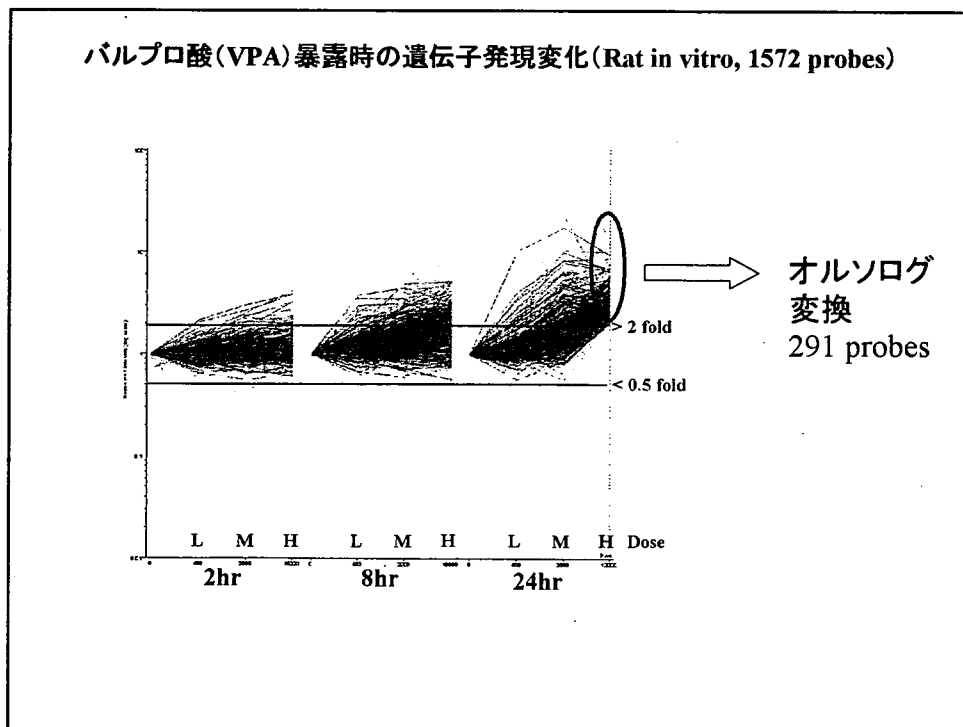
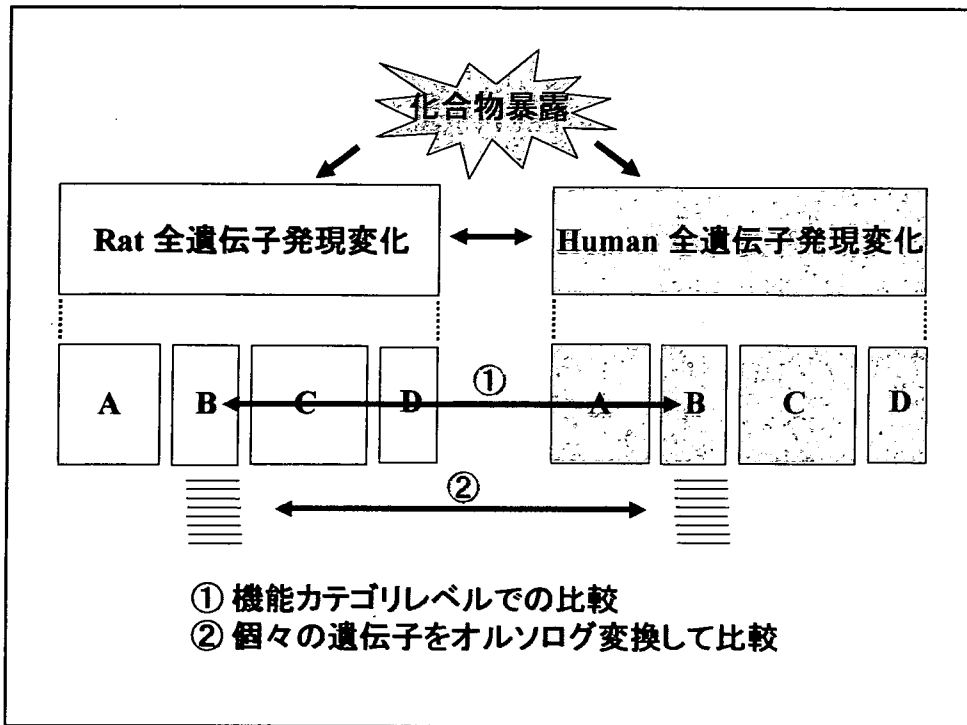
発現量の低いもの
時間・空間的制御
機能タンパク質の二次的修飾
タンパク質相互作用
データの再現性
機能未知遺伝子
発現制御領域未知遺伝子
In vivo, vitroの乖離
種差

例: バルプロ酸

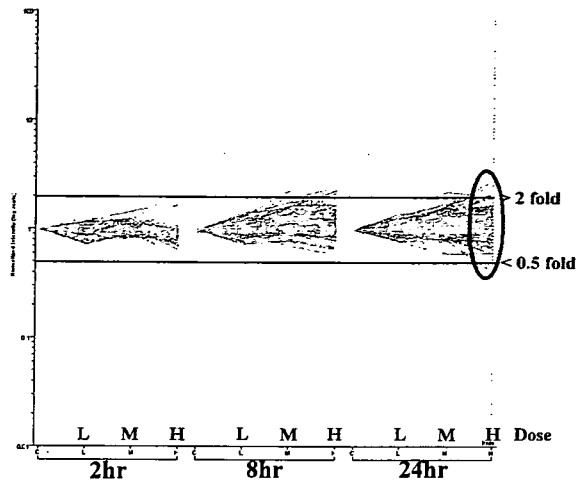
- ラット in vitro から変動遺伝子の抽出
- オーソログ変換 → ヒト in vitro で変動遺伝子
共通性少ない



- 遺伝子機能別に対応を見ると共通性見出せる



バルプロ酸(VPA)暴露時の遺伝子発現変化(Human in vitro, 291 probes)



Rat 1572 probes を機械的にオルソログ変換した291 probesの
遺伝子発現変化→変動の傾向は一致していない。

VPA暴露時発現量増加遺伝子(24 hrs)のGOカテゴリ分類

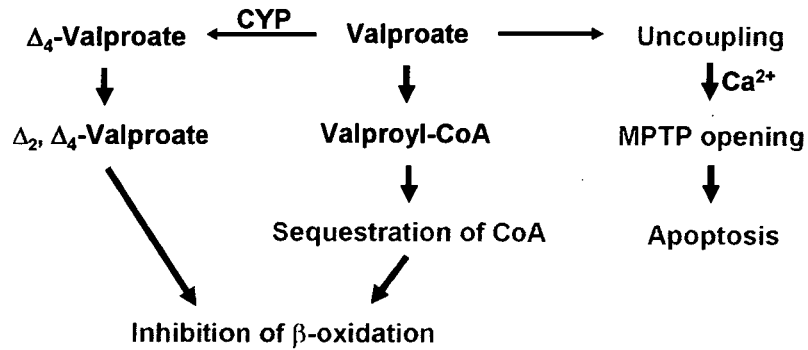
GO terms		P-value
GO:0016491	oxidoreductase activity	0.000394
GO:0006629	lipid metabolism	0.00229
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.00624
GO:0019752	carboxylic acid metabolism	0.00624
GO:0006082	organic acid metabolism	0.00624
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.00838
GO:0004497	monooxygenase activity	0.00838
GO:0006118	electron transport	0.00874
GO:0042598	vesicular fraction	0.0123
GO:0005792	microsome	0.0245

(Fisher's exact test)

●:CYPを含む、酸化還元反応に関与する遺伝子群

□:代謝関連の遺伝子群(主として脂質代謝系)

VPAの毒性メカニズム



VPAはミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化の阻害および呼吸鎖不全を引き起こす。脂質代謝およびストレス応答遺伝子を含む酸化還元酵素のGOカテゴリに有意な変化が見られたことは上記のメカニズムと合致する。

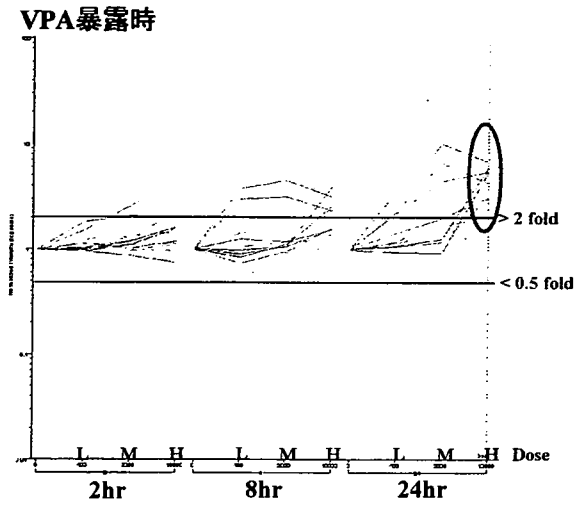
VPA暴露時変動遺伝子の脂質関連GOカテゴリのP-value

GO terms		Rat vivo	Rat vitro	Human
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.0115	0.00180	0.000659
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.0115	0.00172	1.29E-07
GO:0006629	lipid metabolism	0.0244	0.0186	1.29E-07
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	0.0512	0.0158	0.342
GO:0019395	fatty acid oxidation	0.0677	0.135	0.174

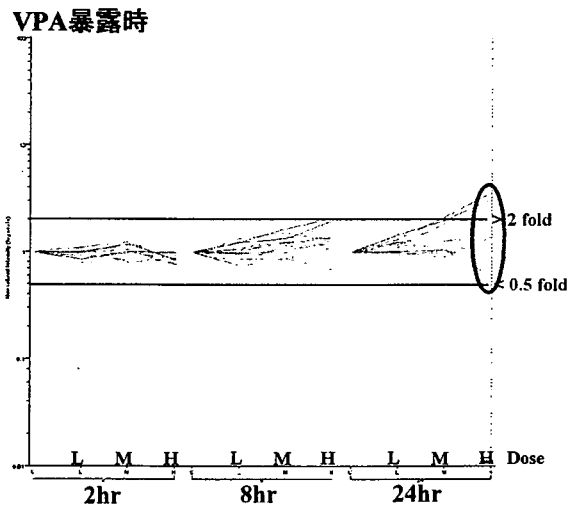
(P-value by Fisher's exact test)

機能カテゴリレベルでの比較では各実験系の間で比較的良い対応関係が見られる。

Rat における脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動

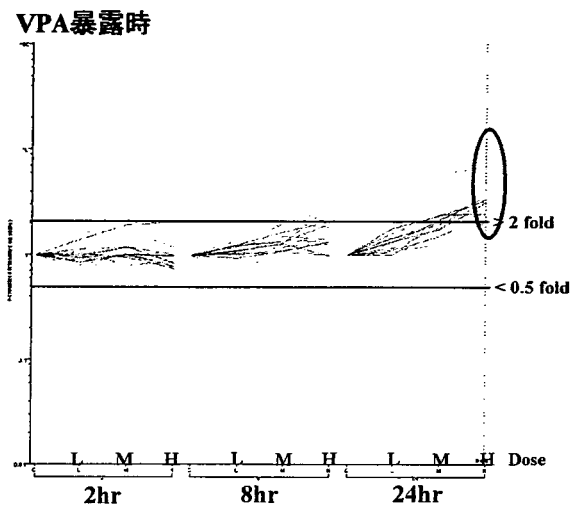


Human におけるオルソログ変換遺伝子の変動



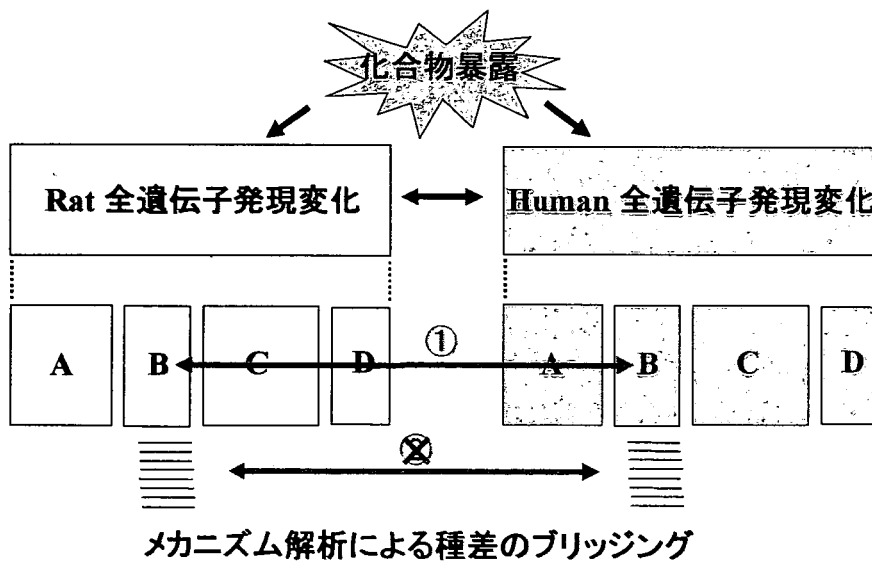
あるカテゴリに着目してオルソログ変換を行った場合でも
変動の傾向は一致していない。

Human における脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動



同一カテゴリ内でHuman独自に変動遺伝子を抽出した場合

In vitro Rat ⇔ Human 遺伝子発現変化の比較



⇔ 毒性学的な機能が解明されている遺伝子は少ない

ヒトとラット：種差のブリッジングをどうするか

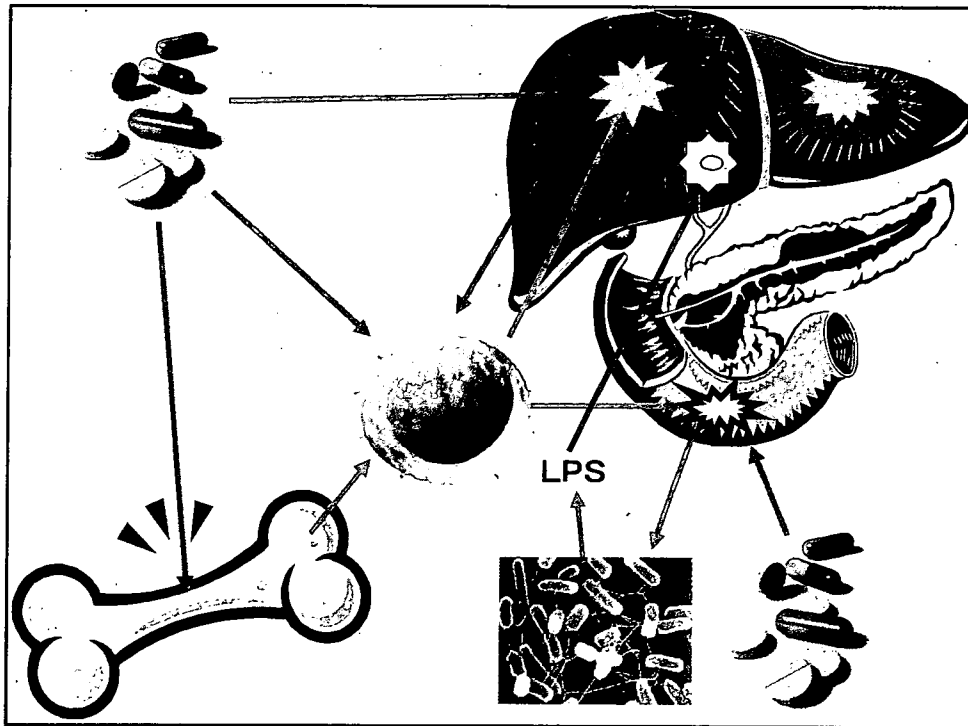
1. Primary Cultured Cellで比較する
TGP1で採用
2. ES細胞を用いる
機が熟していない
3. Human Cell Lineを用いる
HepG2を検討したが却下
4. Toxicological Pathwayで推定する
知識の蓄積乏しい
5. 血球細胞を用いる
技術的に可能か？

ポストTGPの課題？



トキシコゲノミクス・インフォマティクス プロジェクト(TGP2) H19~H23

- TGP1の成果(TG-GATEs)を活用してバイオマーカー候補を創出する
- トキシコゲノミクス手法の施設間バリデーションを行い、レギュレーションへの応用の基盤を整備する
- 血球を用いたトランスクリプトームで種差の壁に挑戦する



Blood gene expression signatures predict exposure levels

PNAS November 13, 2007 vol. 104, no. 4, 18211–1821

P. R. Bushal¹, A. N. Hainlath¹, J. Li¹, L. Huang¹, J. W. Chou¹, G. A. Boorman², D. E. Malarkey¹, C. D. Hucula¹, S. M. Ward³, R. E. Wilson⁴, R. D. Fannin⁵, M. W. Russo⁶, P. B. Watkins⁶, R. W. Tennant^{6*}, and R. S. Poulse^{1,2*}

¹Biomarkers Branch, ²Immunotoxicology and Cancer Group, Environmental Toxicology Program, ³Microarray Group, ⁴Cancer Biology Group, National Institute of Environmental Health Sciences, P.O. Box 12233, Research Triangle Park, NC 27709; ⁵Department of Pathology, Laboratory for Health, Research Triangle Park, NC 27709; and ⁶Department of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599

Edited by Mark J. Grondin, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, and approved September 21, 2007 (received for review July 25, 2007)

To respond to potential adverse exposures properly, health care providers need accurate indicators of exposure levels. The indicators are particularly important in the case of acetaminophen (APAP) intoxication, the leading cause of liver failure in the U.S. We hypothesized that gene expression patterns derived from blood cells would provide useful indicators of acute exposure levels. To test this hypothesis, we used a blood gene expression data set from rats exposed to APAP to train classifiers in two prediction algorithms and to extract patterns for prediction using a profiling algorithm. Prediction accuracy was tested on a blinded, independent rat blood test data set and ranged from 88.9% to 95.8%. Genomic markers outperformed predictions based on traditional clinical parameters. The expression profiles of the predictor genes from the patterns extracted from the blood exhibited remarkable (97% accuracy) transissue APAP exposure prediction when liver gene expression data were used as a test set. Analysis of human samples revealed separation of APAP-intoxicated patients from control individuals based on blood expression levels of human orthologs of the rat discriminatory genes. The major biological signal in the discriminating genes was activation of an inflammatory response after exposure to toxic doses of APAP. These results support the hypothesis that gene expression data from peripheral blood cells can provide valuable information about exposure levels, well before liver damage is detected by classical parameters. It also supports the potential use of genomic markers in the blood as surrogates for clinical markers of potential acute liver damage.

harmful levels of an agent based solely on gene expression data obtained from blood cells. Prediction algorithms used classification and a pattern-based method (Fig. 1). Emphasis was given to the utilization of genomic markers for times after exposure that preceded clinical signs of injury. We used a rat model to generate a training data set consisting of genomic, clinical chemistry, histopathology, and hematology data. These measurements were analyzed for criteria that allowed discrimination of exposure levels that would not be injurious to the liver, i.e., "nontoxic" or "subtoxic," from levels that would be expected to result in serious liver injury, i.e., "toxic." Subsequently, these criteria were used to predict the exposure level of independent, blinded test samples. The accuracy of prediction was compared between the various measurements.

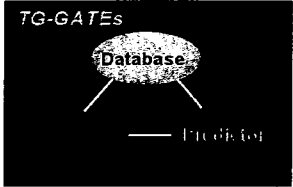
Our study demonstrates that the accuracy of prediction with gene expression data is significantly better than prediction based on clinical chemistry, hematology, or histopathology. Our results also demonstrate that blood gene expression data are sufficient to predict exposure to harmful levels of APAP. In addition, analysis of human samples revealed separation of APAP-intoxicated patients from control individuals based on blood expression levels of human orthologs of the rat discriminatory genes. The results suggest that such a gene expression signature could be useful and supports further testing to determine the extent that such indicators can be translated into the clinical setting for surveying individuals presenting with APAP intoxication.

Results

創薬(安全性)バイオマーカーの開発

→わが国の新薬開発の加速化・効率化

指定研究 製薬企業14社との共同研究
2007~



安全性バイオマーカーの開発
安全性 in vitro評価系(*)
血液の遺伝子発現解析(*)
安全性メカニズムの解析
プロテオミクス・メタボノミクス

トランスクリプトームデータバリデーション
ガイダンス案の作成

安全性バイオマーカー開発
探索研究の効率化
+ 臨床試験の効率化

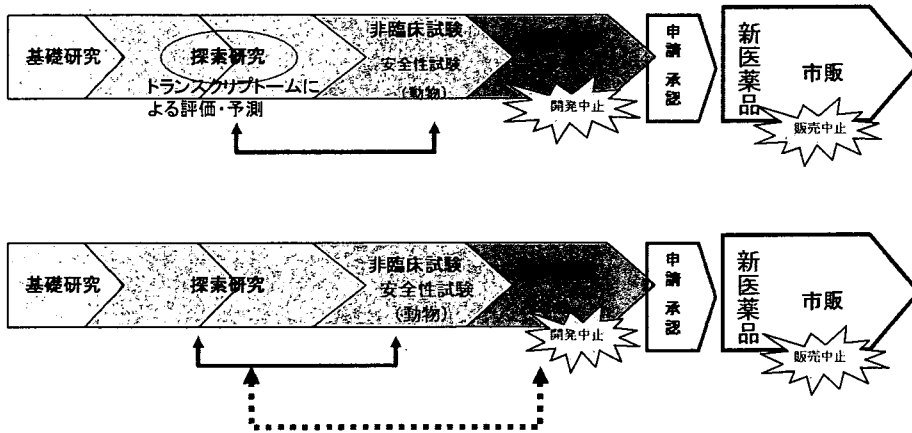
+

レギュラトリーサイエンス
の基盤確立

安全で有効な
医薬品の創製
国際競争力の向上

新薬開発の効率化・加速化に向けて

創薬研究 (Critical Path) 9~17年(製薬協)



トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト (TGP2)

リーダー 大野泰雄・国衛研副所長

サブリーダー： 漆谷徹郎

宮城島利一

参画研究員

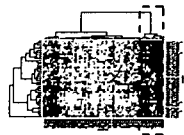
(トキシコゲノミクスプロジェクト(TGP)からの累積、50音順)

相崎健一、五十嵐勝秀、井手照一郎、上田浩之、上原健城、
大野美恵、大村功、奥野恭史、奥山学、小野敦、柿内太、
笠原利彦、菅野純、清澤直樹、小宮雅信、高衛華、渋谷淳、
清水俊敦、常塚創、佐伯欣之、塩飽恒史、鈴木孝昌、高島佳
代子、田村幸太郎、戸塚裕彦、富田裕之、鳥塚尚樹、中津則
之、新田浩之、橋本智、花田貴宣、広瀬明彦、廣出充洋、
瓶子昌幸、細入剛彦、松下智哉、水川裕美子、箕輪洋介、
宮崎登志子、村松高道、森敦、森下克美、山下智也



**第1期トキシゲノミクスプロジェクトの
成果と今後
— バイオマーカーの探索 —**

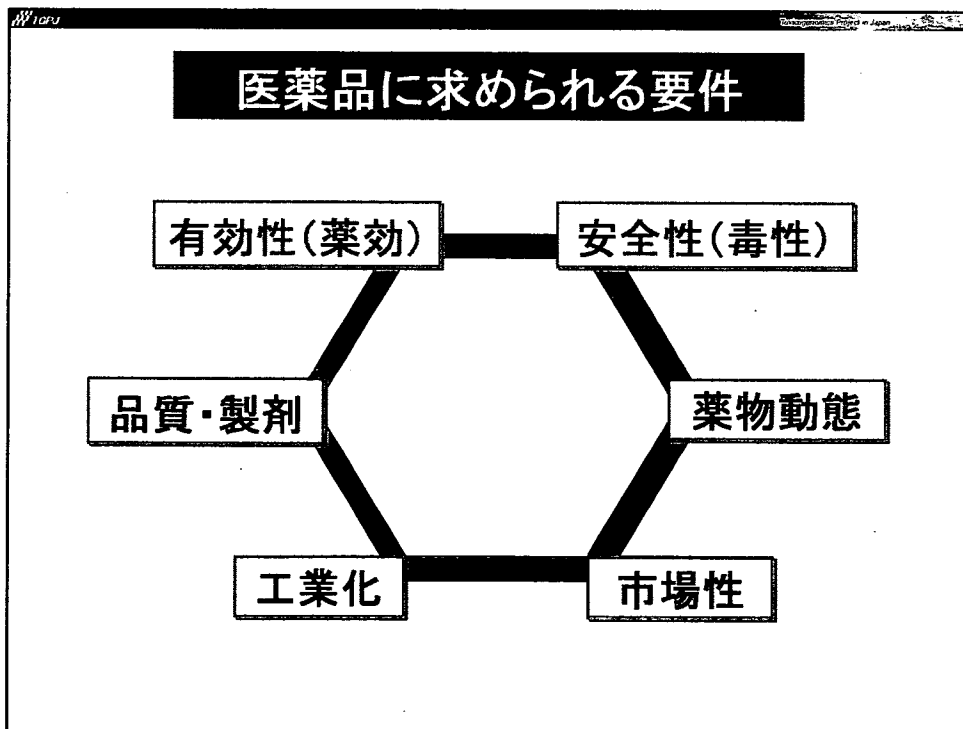
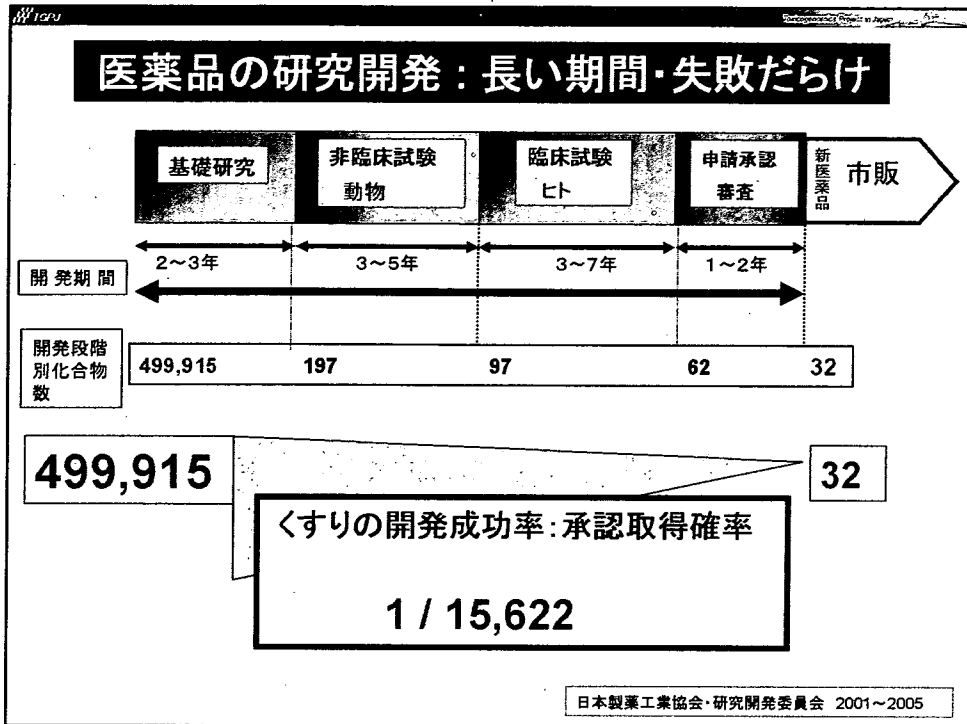
大野泰雄
(国立医薬品食品衛生研究所)

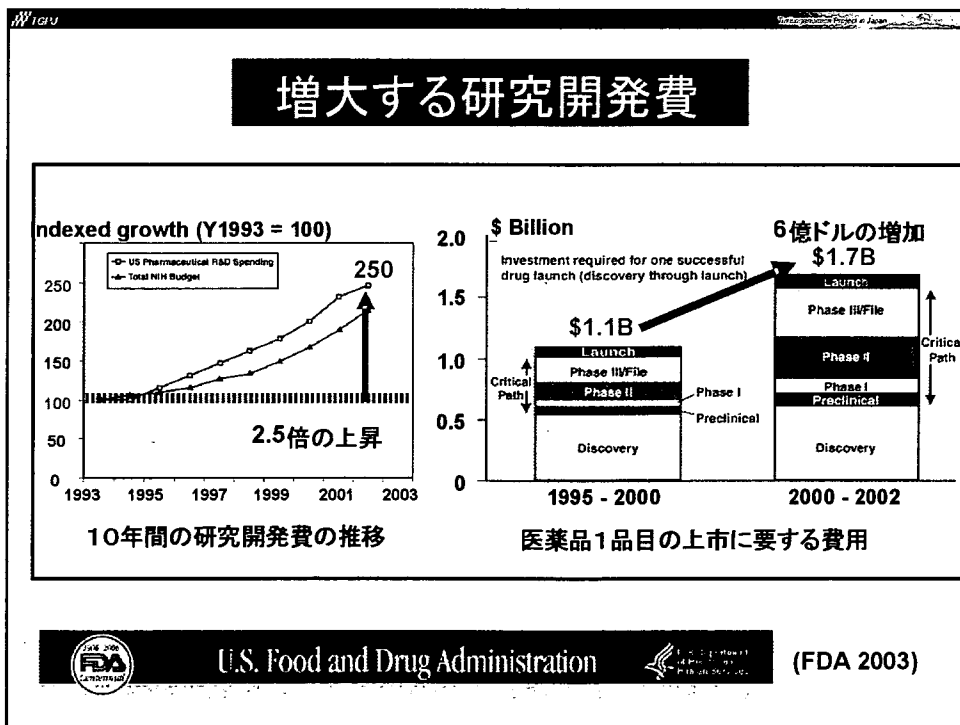
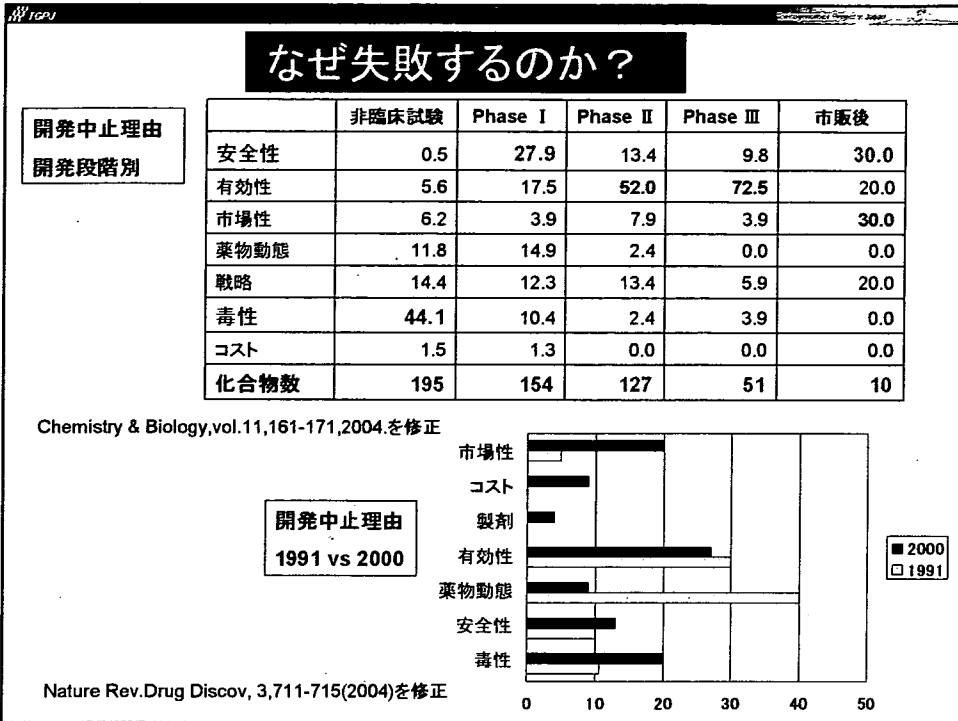


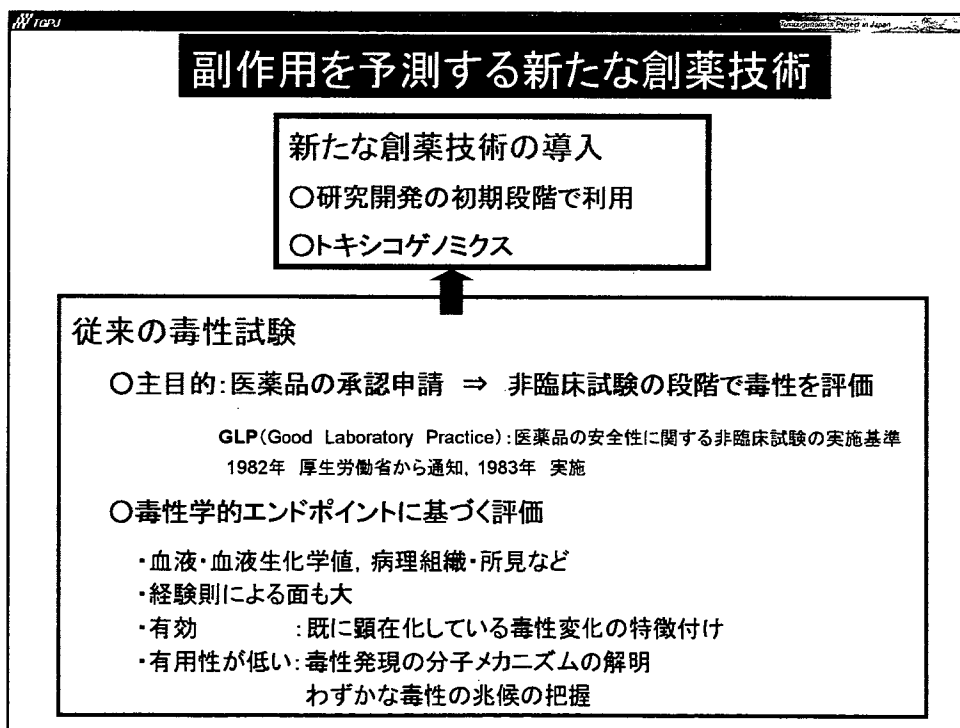
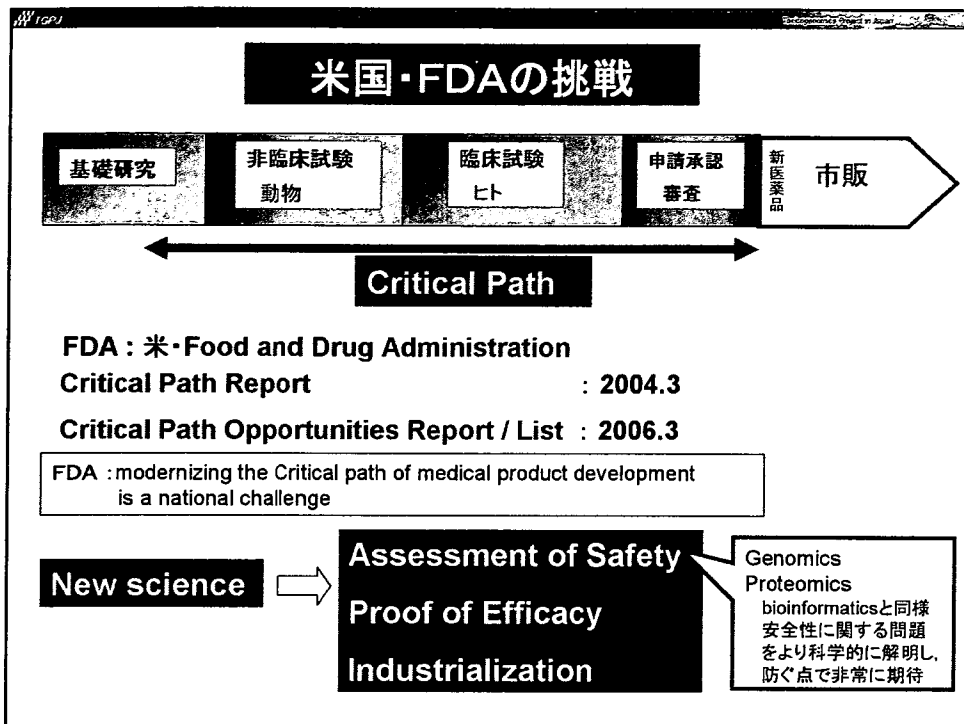
2008年1月24日 第9回創業ビジョンシンポジウム

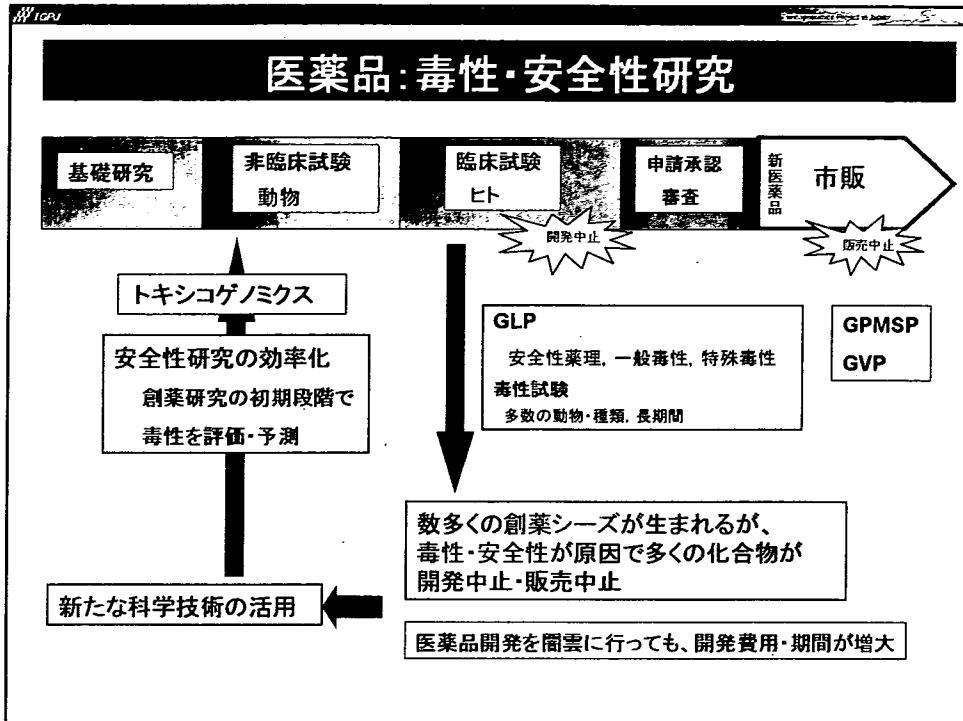


**トキシゲノミクス
背景**









トキシコゲノミクス

トキシコゲノミクスとは

化合物の遺伝子発現の変化を捉えて、毒性を評価・予測

期待: 1. 毒性発現の分子メカニズムの解明
2. 毒性発現リスクの早期評価・予測
3. 実験動物データのヒトへの外挿精度向上

トキシコゲノミクス研究の流れ

- 化合物を動物に投与, 細胞に暴露
⇒ 化合物の選択
- 動物の臓器, 細胞における遺伝子発現の変化を網羅的に解析
⇒ DNAマイクロアレイの技術
- 得られた遺伝子発現データをプロファイリング
⇒ インフォマティシャンとトキシコロジストの連携



トキシコゲノミクスプロジェクト(TGP) 研究成果

期間:平成14(2002)年度~平成18(2006)年度

目的

- 良質な毒性学データ、遺伝子発現データの取得
- 大規模安全性データベースの構築
- 毒性を評価・予測するシステムの開発



- 研究開発の初期段階で利用
⇒ 研究開発の効率化、期間の短縮
- より安全性の高い医薬品の創製