
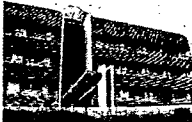


産官共同プロジェクト

国立医薬品食品衛生研究所
 平成14年度(2002)～平成18年度(2006)



(独)医薬基盤研究所
 National Institute of Biomedical Innovation
 平成17年度(2005)～平成18年度(2006)

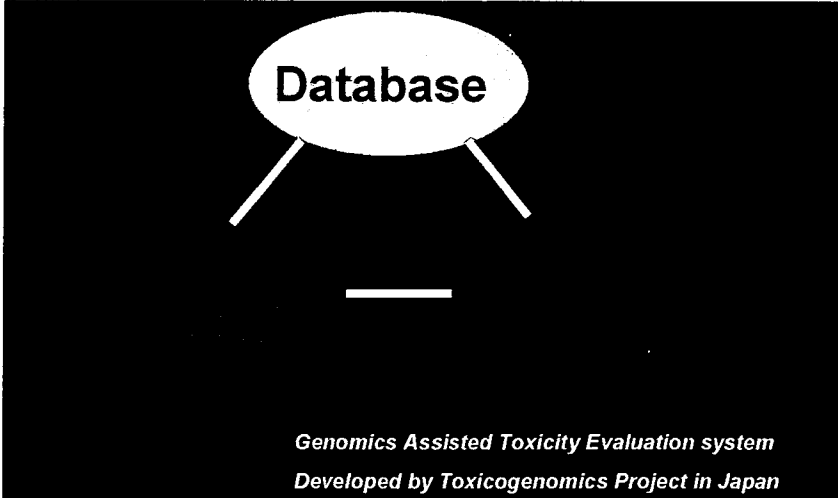


エーザイ
 大塚製薬
 小野薬品工業
 キッセイ薬品工業
 三共
 三和化学研究所
 塩野義製薬
 住友製薬 ⇒ 大日本住友製薬
 大日本製薬 ⇒ 大日本住友製薬
 第一製薬
 武田薬品工業
 田辺製薬
 中外製薬
 藤沢薬品工業 ⇒ アステラス製薬
 山之内製薬 ⇒ アステラス製薬
 三菱ウエルファーマ
 持田製薬

TGP研究成果 TG-GATES

トキシゲノミクス研究に特化したデータの管理・検索、解析、毒性予測に対応する独自システムを開発

Database



*Genomics Assisted Toxicity Evaluation system
 Developed by Toxicogenomics Project in Japan*

TG-GATEs Database

データ量・品質：世界最大規模のトキシコゲノミクスデータ
データ数：約8億件

化合物 150

医薬品	118
開発中止化合物	17
肝・腎臓障害化合物	15

対象臓器
肝臓・腎臓

遺伝子発現データ

GeneChip：25,000枚

ラット	約 30,000遺伝子
ヒト	約 50,000遺伝子

高品質
同一プラットフォーム
厳密な精度管理

毒性試験

in vivo試験 ラット
用量：4、時点：4

in vitro試験 ラット肝細胞
ヒト肝細胞
用量：4、時点：3

毒性学データ

動物数：25,000匹
毒性学データ：
体重・臓器重量、血液学・血液化学
病理所見、病理画像
病理組織標本：50,000枚

高品質
GLP準拠
同一プロトコル

データ量
豊富な実験条件
多様な測定項目
膨大な生データ
すべての用量・
時点でデータ取得

遺伝子アノテーション情報

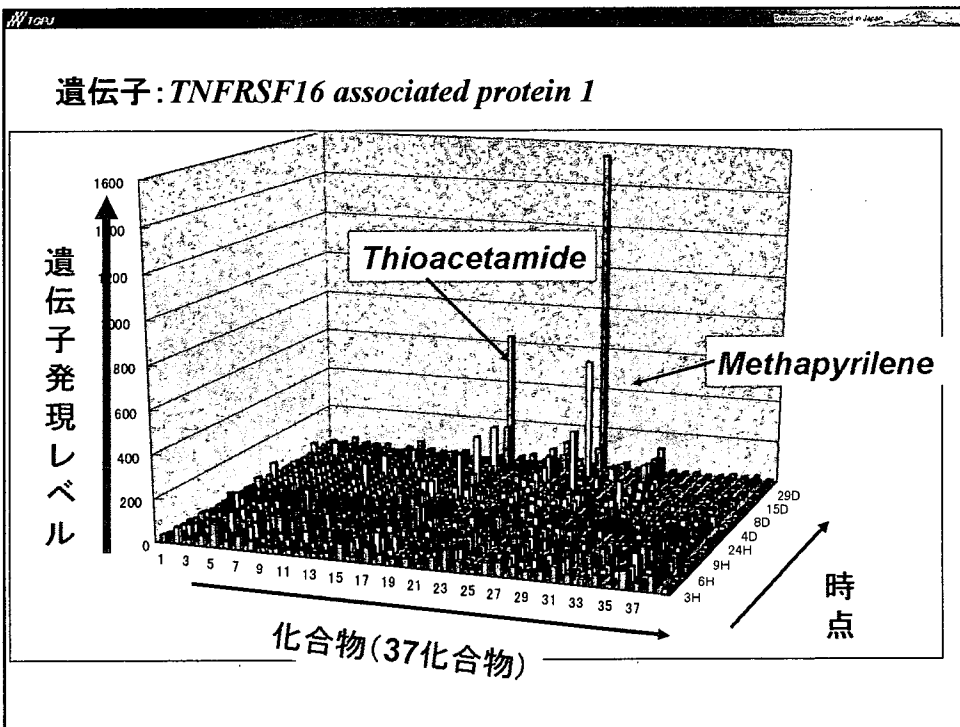
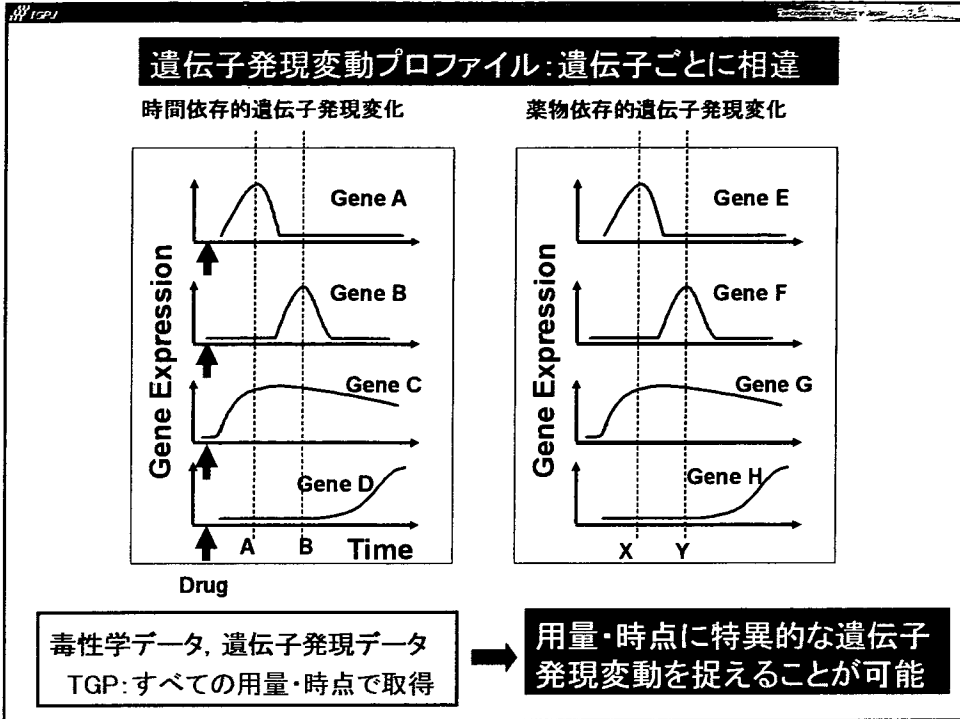
TGP 毒性学データ

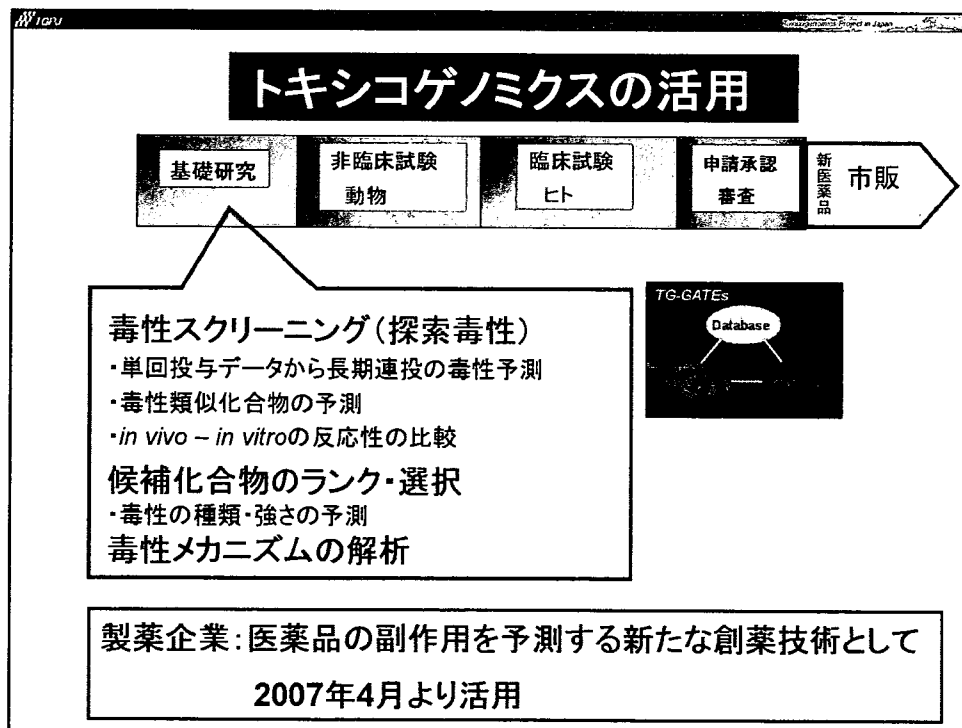
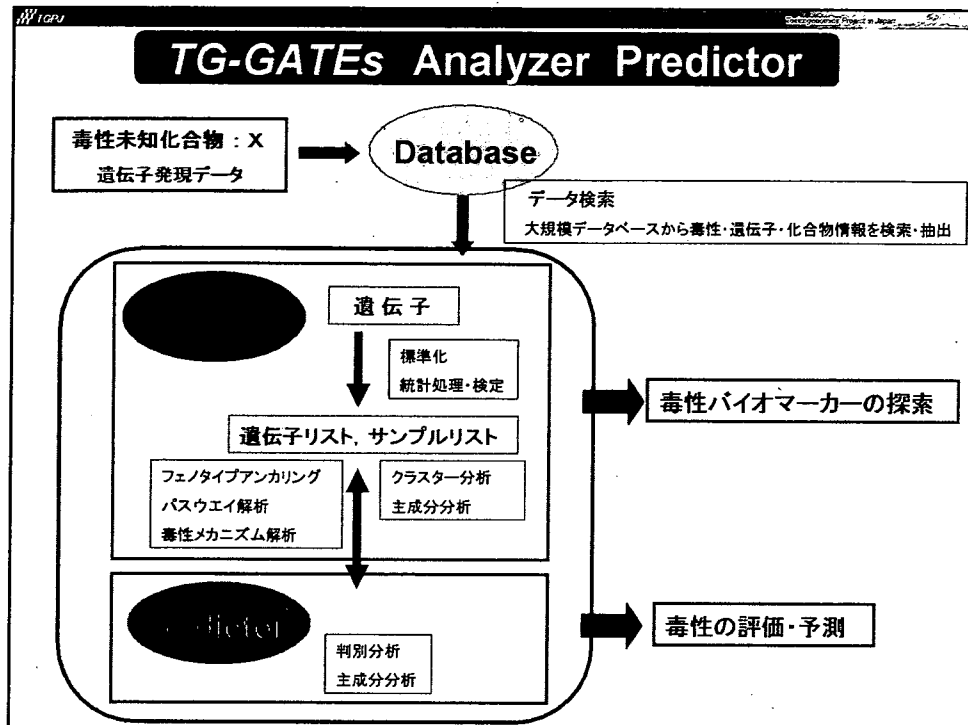
オメプラゾール：病理

100 mg/kg	3hr	6hr	9hr	1day	4day	8day	15day	29day
Pathological Findings								
Periportal / Change, eosinophilic Necrosis		minimal			minimal	minimal		
Centrilobular / Hypertrophy							moderate(2)	
Portal / Cellular infiltration								
Cellular infiltration						minimal		

300 mg/kg	3hr	6hr	9hr	1day	4day	8day	15day	29day
Pathological Findings								
Periportal / Change, eosinophilic Necrosis		minimal	minimal				minimal	
Centrilobular / Hypertrophy							moderate(1)	moderate(4)
Portal / Cellular infiltration							minimal	
Cellular infiltration							minimal	

1000 mg/kg	3hr	6hr	9hr	1day	4day	8day	15day	29day
Pathological Findings								
Periportal / Change, eosinophilic Necrosis			moderate(2)					
Centrilobular / Hypertrophy		minimal					moderate(1)	severe moderate(5)
Portal / Cellular infiltration							minimal	
Cellular infiltration							minimal	







毒性の評価・予測例

グルタチオン枯渇毒性バイオマーカー (アセトアミノフェン型肝障害)

Identification of Glutathione Depletion-Responsive
Genes Using Phorone-Treated Rat Liver

J. Toxicol. Sci. 32:469-486, 2007

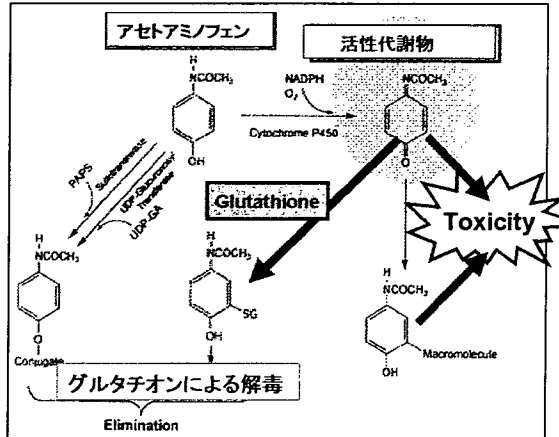
アセトアミノフェン型肝障害

アセトアミノフェン(APAP):
肝臓で活性代謝物を生成し、
グルタチオン抱合により、解毒化

高用量アセトアミノフェン投与:
グルタチオン枯渇を引き起こし、
活性代謝物の解毒化が進まず
肝細胞障害の大きな要因

グルタチオン枯渇剤(フォロン)を
用い、肝臓グルタチオン含量に
逆相関する発現変動を示す遺伝
子セット

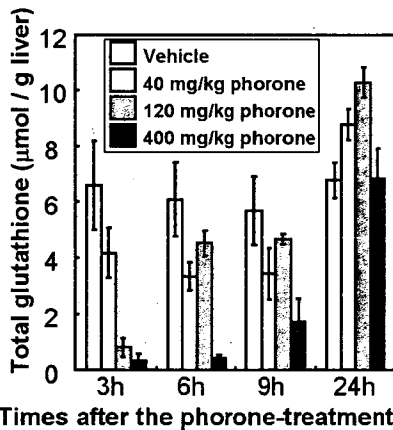
遺伝子セットを用い、主成分分析



Drug Metab Dispos 2003,31(12):1499-506

アセトアミノフェン型の肝障害の予測

グルタチオン含量に逆相関する発現変動を示す遺伝子セット



グルタチオン含量に逆相関した
発現変動を示す遺伝子セット161を選別

グルタチオン枯渇応答遺伝子リスト

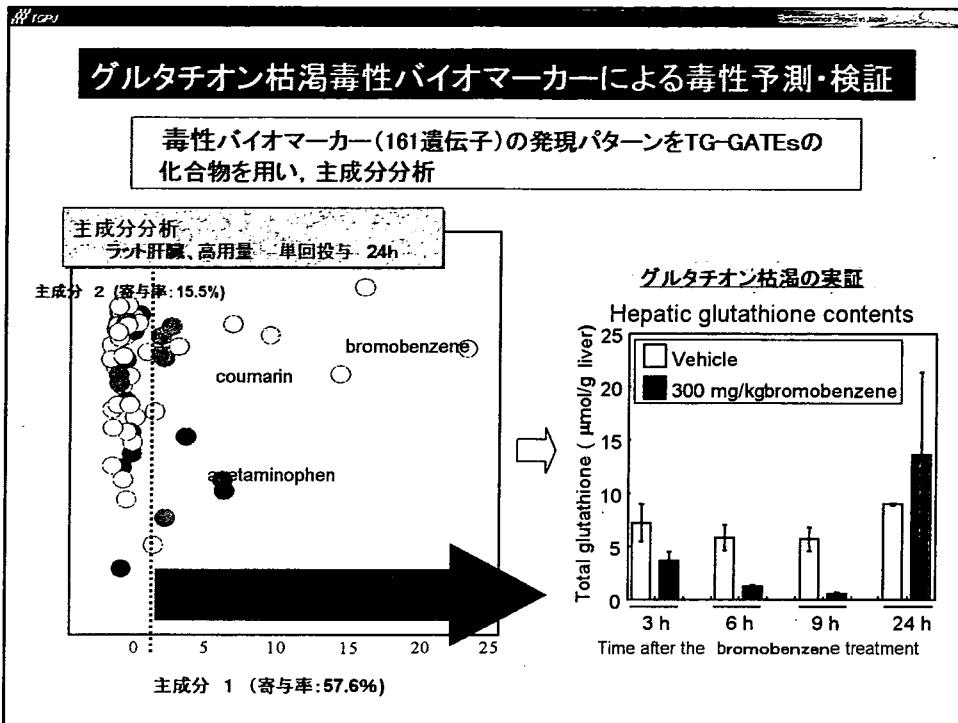
Antioxidant and phase II drug metabolizing enzymes
Oxidative stress markers

1368007_at	-0.602	-0.388	carbonyl reductase 1
1367221_at	-0.720	-0.712	GTP cyclohydrolase 1
1368502_at	-0.702	-0.650	GTP cyclohydrolase 1
1370030_at	-0.570	-0.448	glutamate cysteine ligase, modifier subunit
1370080_at	-0.611	-0.609	heme oxygenase (bicycling) 1
1367282_at	-0.680	-0.588	heat shock 221Da protein 8
1368721_at	-0.747	-0.660	heat shock 221Da protein 8
1368578_at	-0.649	-0.562	ischemia/reperfusion inducible protein
1372510_at	-0.588	-0.578	Sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)
1368761_at	-0.800	-0.471	thioredoxin reductase 1
1368958_at	-0.666	-0.459	thioredoxin reductase 1

Transporter

1374423_at	-0.711	-0.688	Hippocampus abundant gene transcript 1 (predicted)
1370594_at	-0.856	-0.578	nucleosporin 153
1367603_at	-0.430	-0.523	nucleosporin 54
1371754_at	-0.350	-0.497	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 9
1368099_at	-0.356	-0.567	solute carrier family 30 (cilio transporter), member 1
1370285_at	-0.858	-0.813	solute carrier family 38, member 2
1368771_at	-0.851	-0.520	solute carrier family 3 (anion exchanger), member 2
1367190_at	-0.728	-0.455	solute carrier family 39 (non-regulated transporter), member 1
1367693_at	-0.731	-0.601	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
1368772_at	-0.909	-0.473	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
1373767_at	-0.619	-0.513	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
1368301_at	-0.780	-0.700	solute carrier family 11 (anion exchanger), member 9

毒性バイオマーカー候補

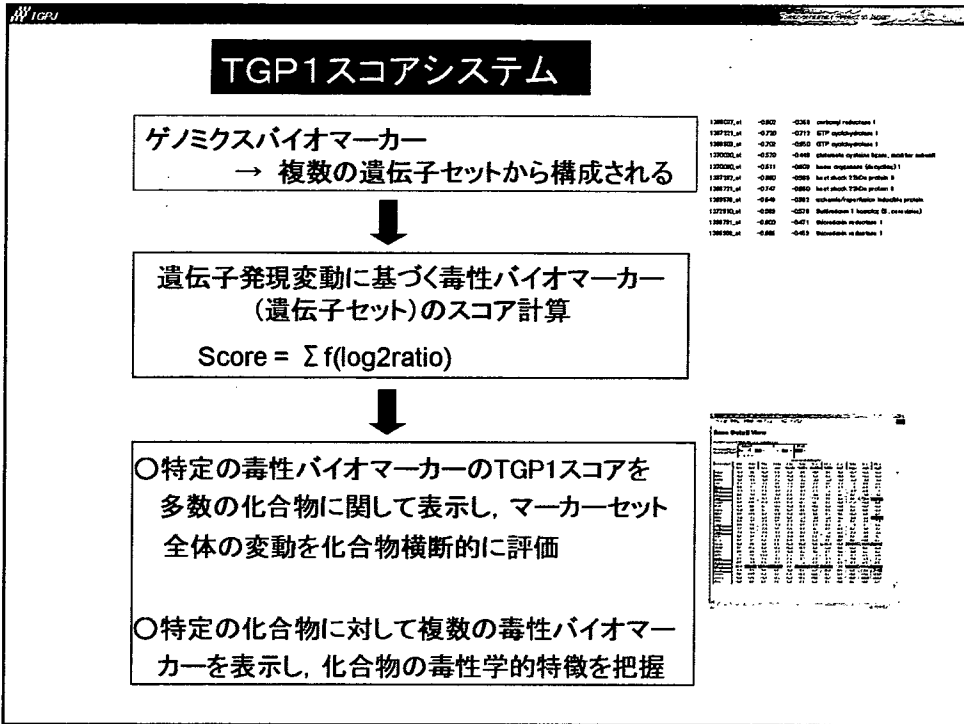


TGP1スコア

**遺伝子発現変動に基づいた毒性
バイオマーカーのスコア化**

Utilization of a One-Dimensional Score for Surveying Chemical-Induced Changes in Expression Levels of Multiple Biomarker Gene Sets Using a Large-Scale Toxicogenomics Database

J. Toxicol. Sci. 31: 433-448, 2006



特定のバイオマーカーのTGP1スコアを多数の化合物に表示

Dose Time	COM_NAME/MARKER_NAME	低用量		中用量		高用量	
		単回投与	反復投与	単回投与	反復投与	単回投与	反復投与
		REP01	REP02	REP01	REP02	REP01	REP02
	ARAP	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	INAH	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	CCM	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	FB	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	VPA	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	CFB	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
化合物	毒性バイオマーカー	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
		PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	ARA	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	IM	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	CPZ	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	TAA	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	CHZ	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	DFN	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	NFI	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	BB	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	HCB	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	DIP	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	CPA	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	HP	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	PHE	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	CMA	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	APL	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	FTU	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO
	WY	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO	PEO

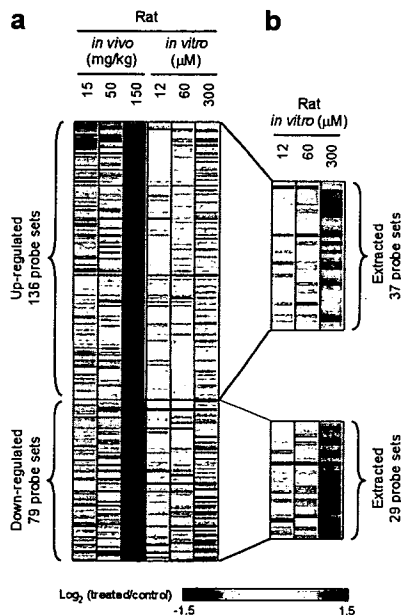
各マーカー遺伝子リストに対する応答性を個々の遺伝子を参照することなく概観することが可能

肝毒性の種差の予測

Species-Specific Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity as an Example Toxicogenomics-Based Approach to Assessing

Hum. Exp. Toxicol. 2008, in press.

in vivoでクマリンで変動した遺伝子のうち、in vitroでも確実に変動した遺伝子を抽出



クマリン:ラットでヒトに比べ強い肝毒性

ラットin vivoで用量依存的に大きく変動している遺伝子合計215プローブセットを抽出

これらプローブセットについて、in vitroにおいても用量依存的に変動している遺伝子合計66プローブセットを抽出

それぞれについて、オルソログ変換してブリッジング

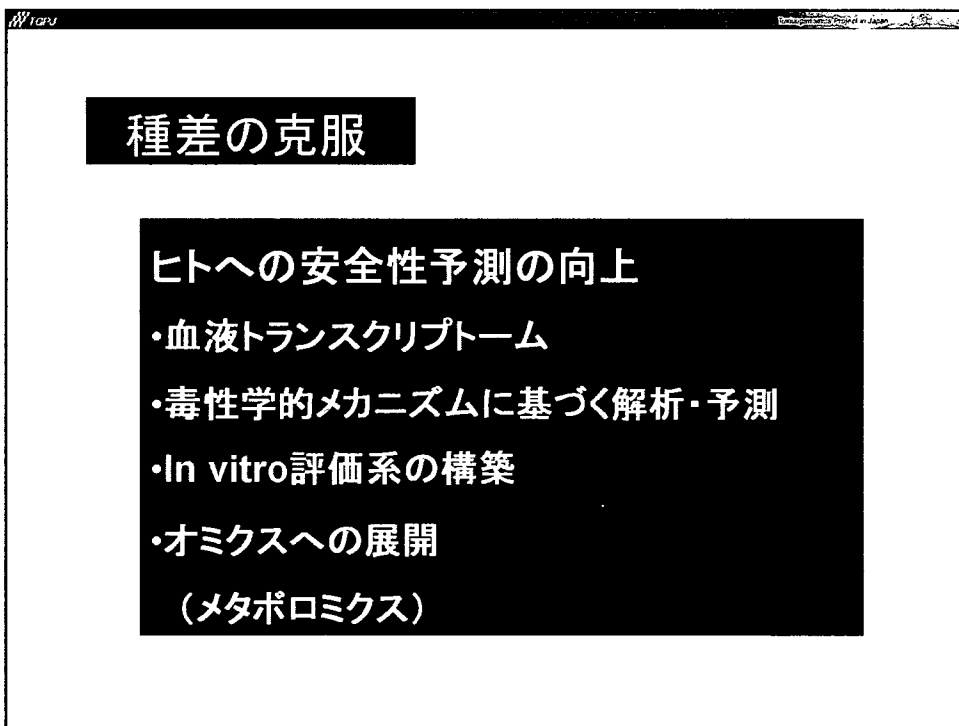
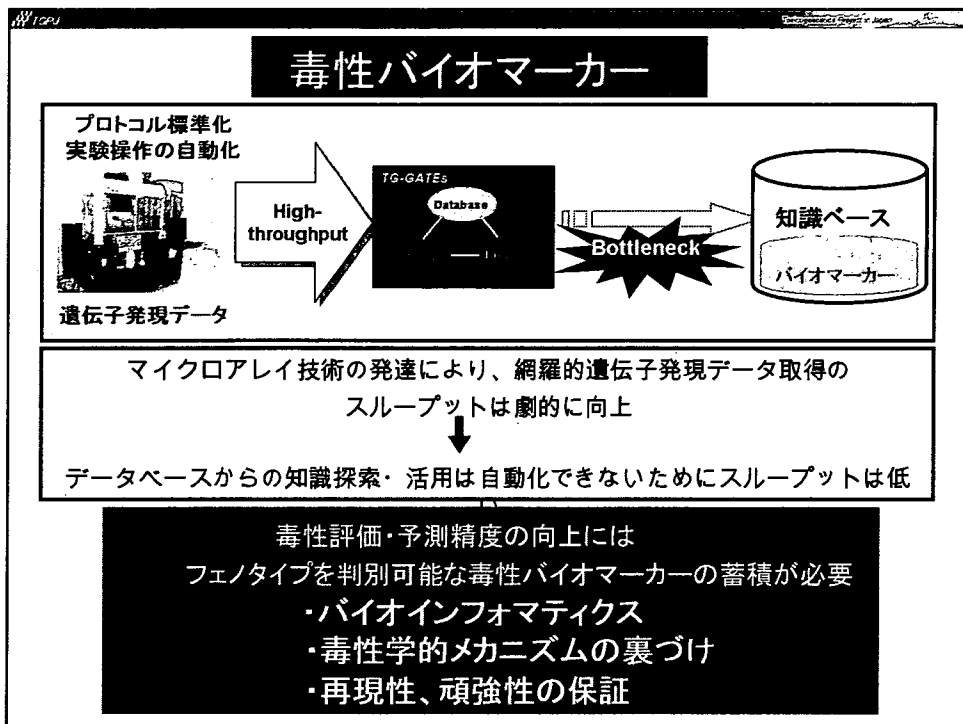


トキシコゲノミクス研究

今後

課題

- 質の高い毒性バイオマーカーの確立
- 種差の克服
- レギュラとリーサイエンスの基盤整備



レギュラトリーサイエンス

米・FDA

- ・The External RNA Control Consortium (ERCC)
- ・MicroArray Quality Control (MAQC)

目的：マイクロアレイデータの信頼性について検証
 結論：Nature Biotechnology, September 8, 2006 に誌上発表

- ・標準化された手順(SOP)に従うことで、プラットフォーム間互換性、測定サイト間でのデータ互換性は十分確保
- ・マイクロアレイデータは、信頼性が高い

- ・Critical Path Opportunities Report / LIST
Predictive Safety Testing Consortium (PSTC)
- ・Guidance for Industry Pharmacogenomics Data Submission

・遺伝子発現データ生成試験：バリデーション試験

・遺伝子発現解析に関する申請資料用ガイダンス案

医薬品：毒性・安全性研究

基礎研究 → 非臨床試験 動物 → 臨床試験 ヒト → 申請承認 審査 → 新医薬品 市販

創薬初期段階の安全性試験の効率化

- ・単回投与から28日反復投与の毒性予測
- ・医薬品候補化合物の選択

TG-GATES Database

動物愛護

臨床で起こりうる毒性の予見
臨床試験の効率化

- ・毒性バイオマーカーの探索・検証
- ・種差の克服
- 血液
- 毒性メカニズム解析
- メタボロミクス
- ヒト臨床データとの比較解析

レギュラトリーサイエンス
バリデーション試験

第1期：2002.6～2006.3
トキシゲノミクスプロジェクト

第2期：2007.4～
トキシゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト

トキシゲノミクスプロジェクト

リーダー : 大野泰雄(国衛研) ← 長尾拓(国衛研)

サブリーダー: 漆谷徹郎(同志社女子大・薬)

宮城島利一

参画研究員

国衛研

相崎健一, 五十嵐勝秀, 小野敦, 菅野純, 渋谷淳, 鈴木孝昌, 広瀬明彦, 水川裕美子
参加企業

井手照一郎, 上田浩之, 上原健城, 大村功, 奥山学, 柿内太, 笠原利彦, 清澤直樹,
小宮雅信, 清水俊敦, 佐伯欣之, 高島佳代子, 田村幸太郎, 鳥塚尚樹, 新田浩之,
花田貴宣, 廣出充洋, 瓶子昌幸, 松下智哉, 宮崎登志子, 森下克美

技術員

阿久井洋美, 浅利奈美, 上田晴子, 太田聖子, 荻田裕美, 金英樹, 高衛華, 近藤千晶,
鈴木康哲, 鳥海尚恵, 中園敬介, 西嶋光生, 早川尚吾, 速水信弘, 深井浩未, 福角勇人,
山内滋子, 弓田いづみ, 與田直也, 了戒由宇子

日立製作所

大野美恵, 塩飽恒史, 常塚創, 戸塚裕彦, 富田裕之, 橋本智, 細入剛彦, 村松高道, 森敦,
山下智也

**TGP2 Validation Study for
Toxicogenomics**

**Phase I:
Multi-site analysis of GeneChip
2007 -**

Participants Laboratories of TGP validation study

Astellas Pharma Inc.
Daiichi Sankyo Co., Ltd.
Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.
Eisai Co., Ltd.
Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation
Ono Pharmaceutical Co., Ltd.
Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.
Sanwa Kagaku Kenkyusho Co.,Ltd
Shionogi & Co., Ltd.
Takeda Pharmaceutical Co., Ltd.
Toxicogenomics Project

Alphabetical order

Tissue samples of TGP validation study

Group	Dose	Animal No.	Sample No.
Control	0	1	C 1a
			C 1b
			C 1c
	0	2	C 2
	0	3	C 3
0	4	C 4	
Low	300	5	C 5
			L 1a
			L 1b
			L 1c
			L 2
High	1000	5	L 3
			L 4
			L 5
			H 1a
			H 1b
High	1000	2	H 1c
			H 2
			H 3
			H 4
			H 5

Animal Study: CRO

Crj: CD(SD) IGS rat
 Acetaminophen 0, 300, 1000 mg/kg (n=5)
 Sampling 24h after dosing



Tissue homogenate: TGP

*Three aliquots was prepared from one of each group.



RNA extraction

GeneChip analysis : Each site
 Rat Genome 230 2.0



Low data process: Each site

Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5.0)



Analysis: TGP & Each site

Normalization : Global mean

SET ID	SOP type	wash & stain	RNA QC	4 or 15oCOD measurement	300rpm QC after fragmentation
1	TGP	self	Gel	15 Multiscanspectrum +	Gel
2	TGP	self	Gel	15 Multiscanspectrum +	Gel
3	TGP	self	Bioanalyzer 2100	4 Nano Drop -	Bioanalyzer 2100
4	TGP	kit	Bioanalyzer 2100	15 Nano Drop -	Gel
5	TGP	kit	Bioanalyzer 2100	4 Nano Drop -	-
6	Original	self	Bioanalyzer 2100	4 Hitachi U-2000 -	-
7	TGP	kit	Bioanalyzer 2100	4 Beckman DU 640 -	-
8	TGP	kit	Bioanalyzer 2100	4 Shimadzu UV2450 -	-
9	TGP	kit	Bioanalyzer 2100	4 Nano Drop -	-
10	TGP	self	Bioanalyzer 2100	4 NanoDrop -	Bioanalyzer 2100
11	Original	kit	Bioanalyzer 2100	15 Nano Drop -	Bioanalyzer 2100
12	TGP	self	Bioanalyzer 2100	4 Nano Drop -	Bioanalyzer 2100
13	Original	kit	Bioanalyzer 2100	4 NanoDrop -	Bioanalyzer 2100

Summary of single dose animal study for samples of TGP validation stud

Compound	Acetaminophen		
	Rel [Cr:CD(SD)], 6 week, Male		
Dose (mg/kg)	Vehicle	300	1,000
No. of animals	5	5	5
No. of died animals	0	0	0
Clinical signs	(-)	(-)	(-)
Body weight (% of control)	(-)	(-)	(-)
Body weight gain (g)	5.9	3.9	14.7
Food consumption (% of control)	(-)	(-)	158
Hematology (% of control)			
Ret	(-)	~82	~82
Blood chemistry (% of control)			
K	(-)	(-)	~116
TP	(-)	(-)	~124
LDH	(-)	(-)	~166
Terminal body weight (% of control)	(-)	(-)	(-)
Absolute organ weight (% of control)			
Liver	(-)	(-)	(-)
Spleen	(-)	(-)	~80
Relative organ weight (% of control)			
Liver	(-)	~106	(-)
Spleen	(-)	(-)	(-)
Histopathology (±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: severe)			
Liver			
Change, acidophilic, Hepatocyte	(-)	(-)	4/5(+)
Centrilobular	(-)	(-)	(-)
Cellular infiltration, Centrilobular	(-)	(-)	3/5(+)
Necrosis, Hepatocyte	(-)	(-)	1/5(+), 2/5(2+)
Hypertrophy, Hepatocyte	(-)	(-)	1/5(+)
Centrilobular	(-)	(-)	(-)
Spleen	(-)	(-)	(-)
Bone marrow	(-)	(-)	(-)
Lymph node	(-)	(-)	(-)

