

20080900/A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業(創薬バイオマーカー探索研究事業)

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業(創薬バイオマーカー探索研究事業)

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成21(2009)年4月

厚生労働大臣 殿

住 所 〒604-8215京都市中京区蛸薬師通西入
不動町173アワローズ四条烏丸503

フリカナ ウルタニテツロウ

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20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 400,000,000 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(創薬バイオマーカー探索研究事業)

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成21(2009)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	
1. 創薬基盤としての分子毒性学研究	----- 125
菅野純	
2. バイオマーカーの検証	----- 133
水川裕美子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 158
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 161

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進研究事業(創薬バイオマーカー探索研究))

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)

研究代表者 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・インフォマティクスプロジェクトリーダー

研究分担者 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医薬品審査におけるゲノミクスデータによる安全性評価への応用、の3点を達成しようとするものである。基盤研、国衛研、各企業の連携のもと、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。

安全性バイオマーカー開発に関しては、参加企業全社の協力を得て、バイオマーカーワーキンググループを設置し、本年度の目標であるグレードIVのバイオマーカー約20種の開発を達成した。種差の克服の戦略の一つとして、4種類の化合物について、ラットへの暴露実験を行い、末梢血において各化合物特異的な遺伝子発現変化を検出できた。施設間バリデーションについては、Affymetrix GeneChip 以外のプラットフォームについての再現性を検討した。本年度より、本プロジェクトと連携することを前提とした公

募研究が採択されたため、各研究者と研究推進委員会を組織し、今後の共同研究の準備に入った。

以上、TGPの成果を元に、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、バイオマーカー候補が続々と創出されてきており、前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。

研究分担者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部・部長
水川 裕美子 同志社女子大学薬学部・助教

A. 研究の目的

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、医薬基盤研究所、国立医薬品食品衛生研究所、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医薬品審査におけるゲノミクスデータによる安全性評価への応用、の3つの柱を置いている。本研究の必要性：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。

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医薬基盤研究所、国衛研、各企業の3者の共同プロジェクトとして運営する。研究分担者の大野はプロジェクトリーダーとして全体を統括し、研究分担者の菅野は、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・総合機構との連携を密にする。研究分担者の水川は研究代表者の本務先である同志社女子大学薬学部において、プロジェクトで創出されたバイオマーカー候補の検証をおこなう。

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提案を作成し、国際的に情報発信を行う、の3点を目標

としている。

初年度はまず、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。採血後リンパ球を密度勾配遠心で純化する操作を加えると、遺伝子発現に影響することが考えられ、全血をそのまま使用するか、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抽出を行うかの二者択一であった。前者には、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たが、十分に克服できること、更に後者の方法は、将来臨床の場に応用することを考えると、煩雑で採血室レベルでは対応が困難なことから、基本的には全血を用いた方法で行うこととした。本年度は、典型的かつ著明な肝毒性と肝遺伝子変化を呈する4種の化合物、すなわち、メタピリレン、チオアセタミド、クマリン、プロモベンゼンを通常のプロトコル（単回投与、3、6、9、24時間、連続投与3、7、14、28日）でラットに投与し、肝臓および全血の遺伝子発現をGeneChipにより網羅的に解析した。

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。前年度、GeneChipを用いたバリデーションを行い良好な結果を得たが、今年度はAgilentのChipを用い、他のプラットフォームでも施設間で安定した解析が可能かどうか検討した。

バイオマーカー創出に関しては、前

年度にバイオマーカーの定義をはっきりさせ、その戦略を確定した上でバイオマーカーワーキンググループを組織した。これにはプロジェクトメンバーの全企業が参加し、半期ごとに各1テーマ、総数26テーマを担当した。それぞれのテーマについて、基盤研究者がそれぞれ担当し、基盤研を中核とするネットワークを形成するとともに、企業サイドからワーキングのリーダー、サブリーダーを出して進捗管理をおこなった。

分担研究(水川)

上記プロジェクトでは、主にin silicoの技術によって、TG-GATEs内のデータからバイオマーカーを抽出するという戦略をとっている。このとき、仮説の検証、あるいは毒性学的メカニズムの裏づけにはきめ細かな解析的実験が必須である。医薬基盤研究所では遺伝子発現解析以外の実験設備がなく、また各企業にそのような実験を割り振ることも困難であり、勿論外部委託も難しい。そこで、個々の検証実験は主任研究者の本務先である同志社女子大学薬学部・水川助教が担当した。本年度は、以前抽出したグルタチオン枯渇マーカーの改良と、実際にグルタチオンを定量することによる検証、更には、血液ゲノミクスの支援として、ラットリンパ球一次培養系の確立を行った。

分担研究(菅野)

毒性予測に際して、実験動物からヒトへ外挿する際の要因の一つに、外来

化学物質の代謝機能の種差の問題が挙げられる。その中でも、代謝酵素の誘導に関わる重要な受容体であるPXR(マウスではPXR, mPXR; ヒトではSXR, hSXR)は、そのリガンド選択性に種差が大きいことが知られ、すでにいくつかの「ヒト化」動物が遺伝子改変技術により作出されている。しかし、それらは、導入したヒト型受容体の発現臓器が非生理的である、発現調節が非生理的である、などの問題があり、実験動物の全身諸臓器の毒性を網羅的に解析する目的には最適なものではない。

ヒト受容体hSXRのリガンド選択性を導入しつつ、全身諸臓器の毒性検討が可能なマウスモデルを作出するために、遺伝子相同組換え技術を用い、hSXRのリガンド結合ドメイン(LBD)のみをマウスのLBDと入れ替えたノックインマウス(hSXRki mouse)の作成が有望である。本マウスでは、マウスゲノム内に多数存在するcis-elementへの結合パターンに変化が生じないことに加え、転写開始点上流の配列が維持されることによりマウスPXR本来の発現組織分布がhSXRkiにおいても保たれることが見込まれる。これにより、hSXRkiの発現及び上流、下流の制御は野生型と同等で、リガンド特異性のみがヒト型化したマウスモデルが得られることが期待された。

C. 研究結果

(1) 安全性バイオマーカーの開発
最終年度までに30種以上のグレードⅢバイオマーカーを得るという目的達成の

為には、失敗を見越して、本年度までに20種以上のグレードIVバイオマーカーの開発が必要と考えられた。前年度からの継続研究で、年度最初には次の4種類のグレードIVマーカーが得られていた。

(1) 肝グルタチオン枯渇マーカー

肝細胞内グルタチオン低下時に発現増加する遺伝子群で、グルタチオン枯渇に基づく細胞障害性を主成分分析により判定できる

(2) 非遺伝子傷害性肝発がん物質判定マーカー

主に酸化ストレスに基づくと思われる機序による肝発がんリスクを、判別分析法(PAM)による陽性確率により定量的に示すマーカーである。通常は2年かかる発癌実験を、4週の連続実験で評価できる可能性を示した。

(3) 血中脂質低下マーカー

肝障害に起因する血中脂質の低下を、主成分分析により背景メカニズムに基づいて少なくとも2つに分類できる

(4) PPAR α アゴニスト

PPAR α アゴニスト活性に基づく肝肥大を主成分分析により評価できる。このマーカーは、*in vivo*のみでなく、*in vitro*にも適用可能である。

これらに加えて、本年度は新たに25種以上のテーマを設定して研究を行ったところ、現在までに次の19種のグレードIVマーカーを得た。これで累積数としては23種類となった。なお、これらの一部には、多施設での再現性が確認できたもの、すなわちグレードIIIとの判定が可能なものも含まれていたが、本年度は、バイオマーカーワーキンググループにおいて、グレードIII

としてオーソライズする作業を行っていないことから、成果としてグレードIIIマーカーを挙げることはしていない。本年度新たにテーマ設定をして得られたマーカーは以下の通りである。

(1) 肝グルタチオン枯渇予測マーカーI

前年度抽出したマーカーは、遺伝子数も141と多く、毒性学的機序も不明確であった。今回のマーカーは、わずか二つのプローブセットを用いてグルタチオンと共有結合を形成することによって肝細胞でグルタチオン枯渇を起こす化合物を判定できるものである。

(2) 肝グルタチオン枯渇予測マーカーII

このマーカーは14プローブセットからなり、肝細胞中のグルタチオン枯渇が生じるならば単回投与24時間以内のいずれの時点においても主成分分析で分離できるというものである。更に、このマーカーは、*in vivo*のみでなく *in vitro*でも有効である。なお、以上2つのマーカー開発・検証は分担研究者である水川によって行われた(後述)

(3) 胆汁鬱滞マーカーI

このマーカーは、39プローブセットからなり、反復投与によるデータを用いると、線形判別分析によって予測精度94%で薬剤誘起性胆汁鬱滞を検出できるというものである。

(4) 胆汁鬱滞マーカーII

連続投与により血中ビリルビン値が上昇した化合物に共通する遺伝子を抽出することにより、59プローブセットからなるマーカーを得た。これを用いたPCAをおこなうと、そのPC1によって、胆汁鬱滞リスクを定量的に評価することがで

きた。更に、高用量単回投与のデータを用いることにより、連続投与で発症する胆汁鬱滞を、24時間以内で予測できる可能性を示した。

(5) くもり硝子変性マーカー

肝臓にくもり硝子変性を共通に認める化合物で、変動している遺伝子を統計フィルターによって選別した。病理学へのアンカーリングをチューニングすることにより、24プローブセットを得た。この遺伝子セットを用い、線形判別分析法によりマーカー遺伝子セットをバリデートした。これと、80プローブセットからなる陰性化合物判別マーカーを組み合わせることによって、肝重量増加が生じたときのメカニズムをくもりガラス変性(酵素誘導型)と判定することが可能となる。

(6) 好酸性顆粒状変性マーカー

肝臓に好酸性顆粒状変性を共通に認める化合物で、変動している遺伝子を統計フィルターによって選別した。この遺伝子セットを用い、線形判別分析法によりマーカー遺伝子セットをバリデートした。これと、80プローブセットからなる陰性化合物判別マーカーを組み合わせることによって、肝重量増加が生じたときのメカニズムを好酸性顆粒状変性(PPARアゴニスト型)と判定することが可能となる。以後、肝重量増加を呈しながら5、6のどちらにも属さない化合物の判定について検討する必要がある。

(7) 腎尿細管障害診断マーカー

薬剤誘起性腎障害のうち、腎尿細管障害を起こした化合物に共通して変動する遺伝子群をフィルター法により抽出し、

線形判別分析器を構築した。検出力は90%であり、障害が発生するより低用量から陽性と判別でき、病理診断より感度の高いものであった。

(8) 腎尿細管障害予測マーカー

薬剤誘起性腎障害のうち、腎尿細管障害を起こした化合物において、早期から共通して変動する遺伝子群をフィルター法により抽出し、線形判別分析器を構築した。こうして選別した72個のマーカーによれば、腎尿細管障害が発生するはるか以前から陽性と判別でき、障害予測マーカーとして使用できる可能性が見出された。

(9) 肝臓での貧血診断マーカー

ラットでは成熟後も肝臓において髄外造血が見られるため、貧血が生じると、肝臓においても当然変化が生じる。薬剤性の貧血が生じ、網状赤血球数が上昇した化合物に関して、網状赤血球と関連して変動する肝臓の遺伝子を抽出し、マーカーとした。

(10) 血液での貧血診断マーカー

薬物による各種障害に伴って、貧血が見られることがある。これは網状赤血球の増加を伴い、血液を用いたトランスクリプトミクスにより判定できる可能性があった。後述の血液ゲノミクスのテーマにおいて得られたデータを用い、網状赤血球と関連のある遺伝子を抽出した。予測マーカーとしては困難が予想されるが、診断マーカーとしては使用可能であると判断された。

(11) リン脂質症マーカー I

これは78プローブセットからなり、現在臨床において適当なバイオマーカー

が存在していない肝臓リン脂質症リスクをもつ化合物を、PCAのPC1値によって分別するものである。このマーカーの特長は、空胞化を生じて、リン脂質症でないフェノタイプを区別できることがある。更に、通常リン脂質症は長期に連続投与して初めて発現する病変であるが、化合物によっては、単回高用量投与を受けたラット肝臓の24時間後の発現データを用いても判定できるという利点がある。

(12) リン脂質症マーカーII

これは、25プローブセットからなり、前者と異なって、遺伝的アルゴリズムによって抽出されたものである。これらは、単回投与のデータから4週間後の肝臓におけるリン脂質症誘発能を高精度で予測することができる。なお、このプローブセットには上記マーカーと共通なものはほとんど含まれず、異なる機序に基づくマーカーと考えられる。

(13) リン脂質症マーカーIII

これは、上2者と異なり、SVMを用いて、リン脂質症誘発リスクを判別するモデルを構築しようとしたものである。結果として、この判別器によってリン脂質症の線形判別は可能であったが、未だノイズが残っており、改良の余地がある。

(14) 肝脂肪化マーカーI

肝細胞に脂肪蓄積が見られた6種の化合物を陽性対照として抽出したプローブセットであり、TG-GATEsに標準装備されているPAMをもちい、高い精度で脂肪蓄積を判別する判別器が得られた。また、一部は脂肪蓄積より2週間前の時点でも陽性判定でき、予測マーカーとして使用

できる可能性が見出された。

(15) 肝脂肪化マーカーII

肝脂肪化を指標として学習セットを設定し、線形判別分析法を適用した。5 fold cross validationによる判別性能評価の結果、感度97%、特異性90%を得た。この判別器によりデータベース内全150化合物を検討すると、脂肪化について病理では不明瞭とされた化合物の一部が陽性と判定されたため、性能を評価する上で、これらの検証が必要である。

(16) 肝繊維化マーカー

データベース中、肝繊維化を生じた6種の化合物の発現データから、決定木手法を用いてマーカーを探索した。その結果、CC12, Lbp, Gstm4の3つの遺伝子を用いることにより、良好な診断結果が得られた。また、一部の化合物については、繊維化発症以前に陽性判定され、予測マーカーとしても有望であった。

(17) 非遺伝毒性化合物の肝発ガンマーカー

Ames試験陰性でありながら肝発癌性を示す化合物において有意に変動する遺伝子群を抽出し、これらを用いて判別分析(SVM)を行った。これにより、10~30程度のプローブセット、予測精度74%程度の判別期が得られた。今後これを改良していく。

(18) 転写因子関連マーカー

本マーカーは、他のマーカーと異なる戦略で抽出した。すなわち、酸化ストレス応答で重要な役割を果たすと考えられているNrf2を中心に、文献情報を基にしてその制御下にある遺伝子をリスト化した。こうして得た93プローブセットを

用いてデータベース内の化合物群を解析したところ、酸化ストレスによる肝障害惹起物質を分類することができた。

(1) 肝細胞壊死

反復投与の肝臓遺伝子発現データを用いて、肝細胞壊死の判別モデル (LDA 法) を構築し、112プローブセットを得た。テスト化合物における陽性判定率60%を達成するためには、擬陽性が10%生じる。以後、最適な閾値を設定することによりこれを改良する予定である。

なお、以上のグレードIVバイオマーカーは、一部は論文か学会発表として公表されており、残りはすべて、2009年の日本トキシコロジー学会にて発表予定である。

(2) 血液ゲノミクス

チオアセタミド、メタピリレン、クマリン、プロモベンゼンをラットにそれぞれ単回および反復経口投与し、単回投与後3、6、9、24時間および3、7、14、28日間反復投与後に剖検を実施したところ、AST、ALT 値の増加および肝細胞の壊死が単回投与6時間後および3日間反復投与後から認められ、特に高用量群においてより明確な変化が認められた。全血を用いた遺伝子発現解析の結果、4薬剤共通で変動を示す遺伝子が単回投与後で約30遺伝子、反復投与後で約880遺伝子が抽出され、これらの中には肝細胞壊死や炎症反応との関連が報告されている遺伝子が複数含まれていた。本検討により抽出された変動遺伝子セットは、肝細胞壊死を非侵襲的に検出あるいはモニターでき

る可能性があり、現在肝細胞壊死のマーカー遺伝子としての妥当性を確認する為の検討を進めている。

(3) 施設間バリデーション

前年度、アセトアミノフェンを投与されたラット肝臓標本を用いて、Affymetrix社のGeneChipによる遺伝子解析結果を参加企業間で比較検討した。参加企業はほぼ全社がこのシステムを導入しているが、トキシコゲノミクス技術をレギュラトリーサイエンスの基礎技術として定着させるためには、異なるプラットフォームの検討も必要である。今年度は、Agilent社のマイクロアレイを用い、前年度と同じプールされたサンプルを測定にかけた。膨大なデータのため、現在解析中であり、結果の提示は次年度になる。これらの結果がまとまり次第、医薬品機構との討議に入る予定である。

(4) 公募研究との連携

本指定研究は、「創薬バイオマーカー探索研究」に属する公募研究と連携をとって成果を上げることを当初計画に盛り込んでいる。公募研究の採択は本研究開始2年後の本年度から行われた。指定研究との連携を前提に採択された公募研究としては、自治医大・藤村教授、京都大学病院・増田講師および熊本大・水島教授による3件である。本年度の夏から秋にかけて、それぞれの研究代表者をバイオマーカーワーキングの会議に招聘し、データに基づいた意見交換を行い、また2008年12月には、合同の研究発表会を開催した(東京・渋谷、薬学会館)。こ

れを機会として、藤村教授、増田講師、水島教授、参加企業運営委員、研究代表者らからなる研究推進委員会を組織し、これを21年4月初めに開催予定とした。

(5) その他

種差のブリッジングを克服する戦略として、血液ゲノミクスとヒト型遺伝子導入動物のみで完全であるとは思われない。特に、グレードII（臨床に直接応用可能性のある）のバイオマーカーを考えたとき、他のテクノロジーの適用可能性を検討する必要がある。そこで、慶応大学の曾我教授に委託し、プロジェクトに保存してある、薬物を投与したラットから採取した血清サンプルのメタボロミクス解析を行った。現在結果の解析中であるが、有用なバイオマーカーが得られる可能性が見出されている。

今年度は、前プロジェクトで導入したコンピューターシステムの耐用年限が経過したため、システムリプレースメントを行った。システムの効率化のため、サーバーを整理し、開発環境と使用環境を分離した。TG-GATE s のシステム上の不具合や、使い勝手にかかわる問題点などを、TG-GATE s ワーキンググループで検討し、仕様にまとめる作業に入った。次年度は、これをシステムに組み込む予定である。

分担研究（水川）

化合物によるGSH枯渇のメカニズムとして、GSHと複合体を形成することによりGSHを消費するホロン（PHO）やジエチルマレイン酸（DEM）のようなタイプ（PHOタイプ）とGSHの合成を阻害するL-プロチオニンースルホキシミン（BSO）のような

タイプ（BSOタイプ）が知られている。メカニズムに基づくバイオマーカーを得るため、in vivoでのラット肝臓のGeneChipによる遺伝子発現データにおいて、各タイプごとに総GSH量の減少が起こった時点で有意に変動する遺伝子、および減少が生じた後に有意に変動する遺伝子を抽出した。これを17化合物の結果をもとにさらに検討した結果、実用的なマーカーとしてPHOタイプ特異的に変動するものが2プローブセット、PHO、BSOタイプ共通に変動するものが14プローブセット得られた。この遺伝子セットの特徴は、GSH枯渇が起こった後少なくとも投与24時間後までは発現変動が維持されるため、GSH枯渇の起こる時点にかかわらず変動の検出が可能であることである。これらの遺伝子の発現データを用いて主成分分析を行うと、GSH枯渇を引き起こすことが知られるPHO、DEM、BSO、プロモベンゼン（BBZ）、ニトロフラゾン（NFZ）、アセトアミノフェン（APAP）、クマリン（CMA）、メタピリレン（MP）などがGSH枯渇を起こさない化合物や対照群と明確に峻別され、これらはGSH枯渇マーカー候補遺伝子として期待できるものであった。

次にこの遺伝子セットがin vitroでも使用可能かどうか検討した。上記の例とは異なり、GSH枯渇を引き起こすことが知られている化合物は殆ど陽性と判定され、今回のマーカーの優秀性が証明された。しかしながら、典型的な陽性化合物のうち、APAP（0.2、1、5mM）とBBZ（0.008、0.04、0.2mM）は陰性と判定された。この矛盾の原因を解明するため、APAPおよび

BBZ 暴露による GSH 量の変化を測定した。

ラット培養肝細胞において、PHO (0、0.1、0.5mM)、APAP (0、3、10mM)、または BBZ (0、0.4、2mM) の暴露 3 時間後、PHO では総 GSH 量が大きく減少し、APAP、BBZ でも中用量では変化がなかったものの、高用量で減少する傾向がみられた。TGP1 で用いた *in vitro* の暴露濃度は、データベースの均一性を保つために、溶解度その他に基づいた一律の基準で決定されている。今回の高用量は BBZ に関しては TGP1 で用いた濃度の 10 倍、APAP でも 2 倍であることから、TGP1 で用いた濃度では GSH 枯渇が起こらなかったために GSH 枯渇バイオマーカー候補遺伝子の変動がみられなかった可能性が高いと考えられた。また *in vivo* の場合、PHO では投与 3 時間後に総 GSH 量が激しく減少した後緩やかに回復し、24 時間後には逆に増加したのに対し、BBZ では投与 9 時間後が総 GSH 量減少のピークで、やはり 24 時間後には増加したので、*in vitro* でもタイムコースをとるとさらに GSH 量の減少がみられる可能性がある。以上のように、データベースを用いた解析に関しては、細かい点に注目した詳細な検討が欠かせない。

TGP2 において、ヒトにおけるサンプル取得の容易さから種差のブリッジングに資することを旨としてラットの血液の遺伝子発現解析について検討されている。そこでこれに伴う解析が可能となるよう血球系細胞の *in vitro* の実験系として、PBMC 初代培養系を構築し、GeneChip を用いた遺伝子発現解析の系を立ち上げた。

分担研究 (菅野) :

ヒト受容体 hSXR のリガンド選択性を導入しつつ、全身諸臓器の毒性検討が可能なマウスモデルを作出するために、遺伝子相同組換え技術を用い、hSXR のリガンド結合ドメイン (LBD) のみをマウスの LBD と入れ替えたノックインマウス (hSXRki mouse) の作成が有望である。本マウスでは、マウスゲノム内に多数存在する *cis*-element への結合パターンに変化が生じないことに加え、転写開始点上流の配列が維持されることによりマウス PXR 本来の発現組織分布が hSXRki においても保たれることが見込まれる。これにより、hSXRki の発現及び上流、下流の制御は野生型と同等で、リガンド特異性のみがヒト型化したマウスモデルが得られる。

作成された hSXRki について、その臓器発現の分布を検討したところ、野生型マウスの mPXR 同様に保たれていること、hSXR 特異的リガンドである RIF (rifampicin) に対し反応し、mPXR 特異的リガンドである PCN (pregnenolone-16 α -Carbo-nitrile) には反応しないことが判明した。即ち、今回作成された hSXRki マウスは、ヒト型のリガンド特異性を有することが明らかとなった。このことから、本ノックインマウスは今後の hSXR リガンド特異性を反映した毒性研究を行うための有用なツールとなると期待される。

対照データとして、野生型マウス肝に対し PCN が誘発する遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、薬剤代謝酵素群を始めとする PXR 標的遺伝子群の同定と

それらの誘導パターンが得られた。

D. 考察

本プロジェクトの最終目標は、プロジェクトの定義で言うところのグレードⅢ（動物実験レベルにおいて、参加企業・研究施設内で再現性が担保されている、診断あるいは予測に有用なもの）のバイオマーカーを30種、そのうち1つ以上をグレードⅡ（臨床での診断あるいは予測に直接応用可能なもの）に育てることである。この目標を達成するため、本年度はグレードⅣ（現在データベースに保有するデータ内で合理的な診断・予測が可能な遺伝子リストとアルゴリズム）のバイオマーカーを20種程度得るという目標を立てた。最終的に19種が得られたが、その前年度から継続しているテーマによって4種類のマーカーセットが得られていることから、ほぼ予定通りに進捗している。

次年度の計画としては、これらグレードⅣのバイオマーカーをグレードⅢにあげることに、更にはグレードⅣの新しいマーカーを本年度と同程度の数創出することである。

本年度までの検討で、通常の病理学的フェノタイプに基づいた、フェノタイプアンカーリングの手法はほぼ出尽くした感がある。次年度は、異なる切り口でのマーカー探索に入りたい。たとえば、既知の毒性学的パスウェイに基づいた毒性機序解析マーカー、薬物に起因しない病理変化にともなう遺伝子変化を用いて、逆方向に薬物の毒性を評価するマーカー、*in vivo*と*in vitro*、あるいは*in vitro*におけるヒトとラットをブリッジングするマーカー、idiosyncrasyを克服するために、アレルギー性肝障害・

腎障害、あるいは病的状態と薬物投与を組み合わせたときの変動遺伝子などが考えられる。これら、広範囲な領域をカバーするグレードⅣのマーカーにチャレンジする予定である。

次年度の課題は、グレードⅣのマーカーをアップグレードする戦略である。グレードⅣのマーカーの抽出方法がそれぞれのテーマによって異なるため、当然アップグレードの方法もそれぞれ異なる。基本的には、再現性に関してはそれぞれのテーマを担当した企業において確認実験を担当してもらう予定となっている。ここで重要な点は、診断・予測に有用かつ再現性が認められるマーカーであっても、その毒性学的メカニズムの裏付けがついていない場合には創薬における利用価値と納得性が乏しいものになる。マーカー中の遺伝子が毒性発現にどのような役割を果たしているかは、文献上、あるいは確認実験によって明らかにしていく必要がある。これらのうち、外部委託が困難なものについては、分担研究者の水川が担当する。

グレードⅡのマーカーの開発に関しては、確実な戦略を設定することが今の段階では不可能である。これには次のような幾つかの可能性がある。まず、ラットの*in vivo*または*in vitro*で有用なマーカーセットが得られ、それをオルソログ変換したものがヒトの*in vitro*モデルで再現された場合、ラットで有用なマーカーセットの単純オルソログ変換ではヒトの*in vitro*モデルでは有用でないが、これを毒性学的パスウェイに基づいて修正したリストでは有用性が認められた場合、グレードⅡになる可能性がある。ただしこれらの場合、これを実証す

るのに困難が予想されるので、個別に戦略を設定する必要がある。また、血液ゲノミクスで得られたマーカーセットの内容に毒性学的な妥当性が認められた場合、あるいはメタボロミクスにおいて有用なマーカーの可能性が見いだされた場合は、臨床サンプルで直接検証することが可能である。ただし、本研究班においては臨床研究が行えないため、臨床における検証は、公募研究との連携で行いたい。そのため、前述のように公募研究の研究代表者とプロジェクトの運営委員からなる研究推進委員会を組織した。グレードIIのバイオマーカーの可能性が出てきた段階で、迅速に対応したい。

バリデーション試験に関しては、データ解析が終了していないので考察できないが、解析が終了次第、各種の問題点を洗い出し、医薬品機構との話し合いを組織する予定である。この場合、バイオマーカー候補とそのバリデーション、利用方法の詳細などについても検討する予定であり、次年度には会議体を組織したい。

E. 結論

前プロジェクトの成果であるTG-GATEsを最大限に活用して安全性バイオマーカーを創出するという本プロジェクトは、その明確な数値目標と創出のための戦略、およびそれに対処する体制が整った。最終目標のバイオマーカー開発の基礎となるバイオマーカー候補も、ほぼ予定通りの数が出そろってきた。分担研究、公募研究との連携も有効に機能しており、このまま最終目標に向かって着々と成果を上げていきたい。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Hirode, A. Horinouchi, T. Uehara, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, Y. Ohno, and T. Urushidani. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing elevation of bilirubin. *Hum. Exp. Toxicol.* In press.

M. Hirode, K. Omura, N. Kiyosawa, T. Uehara, T. Shimizu, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, Y. Ohno and T. Urushidani. Gene expression profiling in rat liver treated with various hepatotoxic-compounds inducing coagulopathy. *J. Toxicol. Sci.* in press

T. Uehara, M. Hirode, K. Omura, A. Ono, N. Kiyosawa, T. Shimizu, Y. Mizukawa, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani. A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology* 250:15-26, 2008.

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. 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.* 27:23-35, 2008.

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

2. 学会報告

Weihua Gao, Yumiko Mizukama, Hiroshi Yamada, Noriyuki Nakatsu, Yosuke Minowa, Yasuo Ohno, and Tetsuro Urushidani, "Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione-depletion related hepatotoxicity in rat liver." 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2009年3月, Baltimore, MD, USA

Yohsuke Minowa, Chiaki Kondo, Takeki Uehara, Yasushi Okuno, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Toshiyuki Maruyama, Ikuo Kato, Hiroshi Yamada, Yasuo Ohno, Tetsuro Urushidani. Identification of genomic biomarkers that predict future onset of drug-induced renal tubular injury. 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2009年3月, Baltimore, MD, USA

松田喬, 木上大輔, 田村幸太郎, 宇波明, 小堀正人, 漆谷徹郎, 大野泰雄
Prediction Model Construction for

Cholestasis by Toxicogenomics Approach
第36回構造活性相関シンポジウム, 神戸,
平成20年11月

漆谷徹郎 トキシコゲノミクス手法を用いた安全性バイオマーカー探索 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業: 創薬バイオマーカー探索研究事業 「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」研究成果発表会, 東京, 平成20年12月

水川裕美子 バイオマーカー候補遺伝子の検証 厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業: 創薬バイオマーカー探索研究事業 「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」研究成果発表会, 東京, 平成20年12月

中津 則之, 小野敦, 山田弘, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 大野泰雄 ラット肝臓における遺伝子発現測定実験の施設間バリデーション. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008年6月

高衛華, 中津則之, 箕輪洋介, 山田弘, 宮城島利一, 漆谷徹郎, 大野泰雄 メカニズムに基づくグルタチオン枯渇関連遺伝子バイオマーカー. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 2008年6月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

TGP2でのバイオマーカー探索戦略

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)

Toxicogenomics Projectの概要

