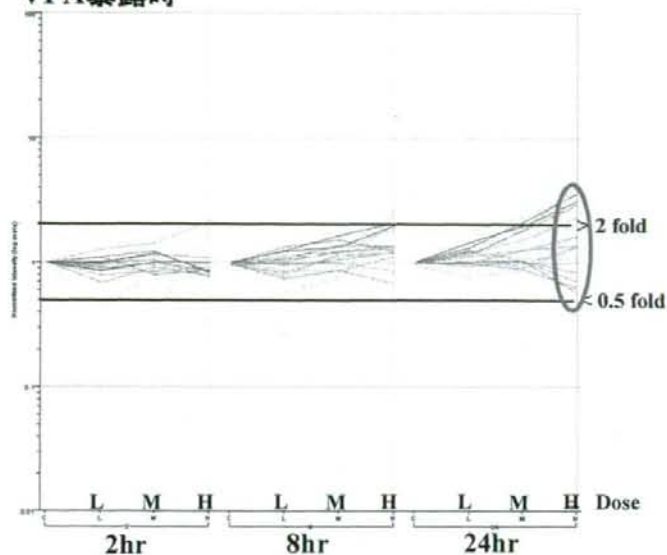


Human におけるオルソログ変換遺伝子の変動

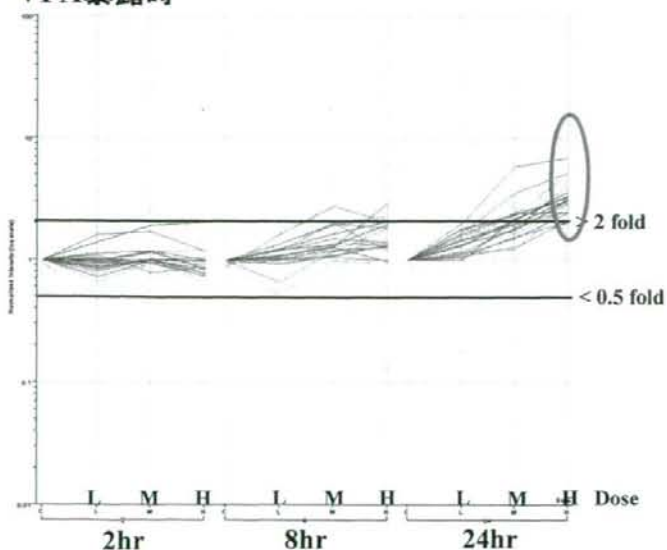
VPA 暴露時



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。

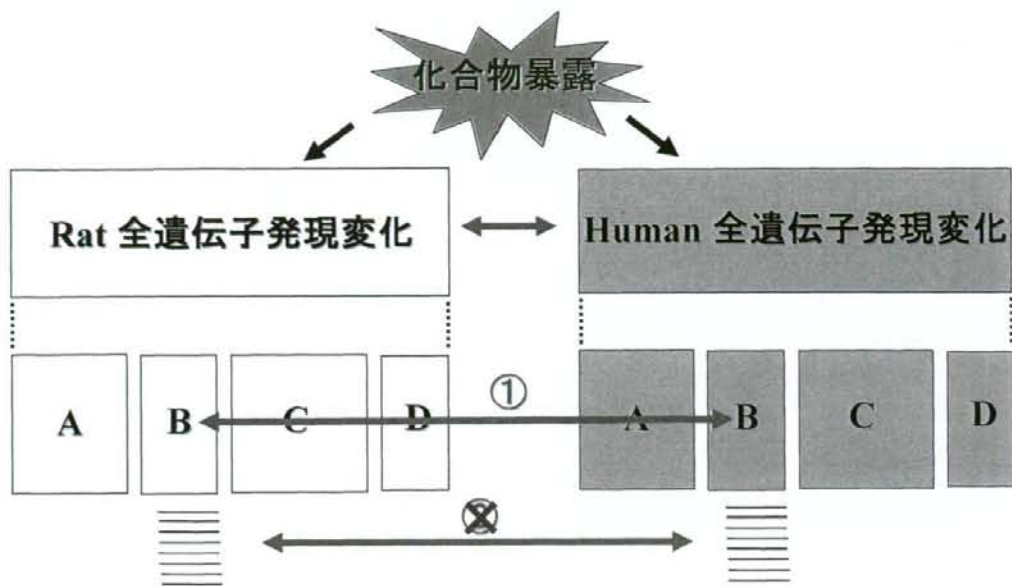
Human における脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動

VPA 暴露時



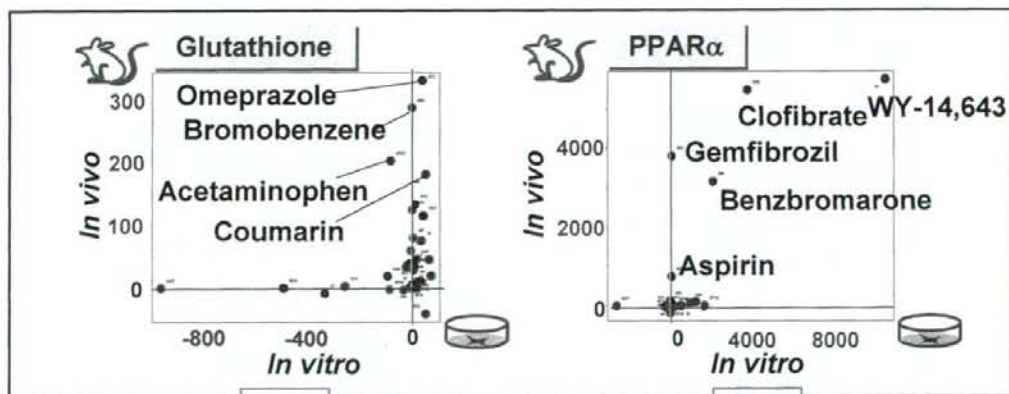
同一カテゴリ内でHuman独自に変動遺伝子を抽出した場合

データ解析事例2-In vitro Rat ⇔ Human 遺伝子発現変化の比較



メカニズム解析による種差のブリッジング

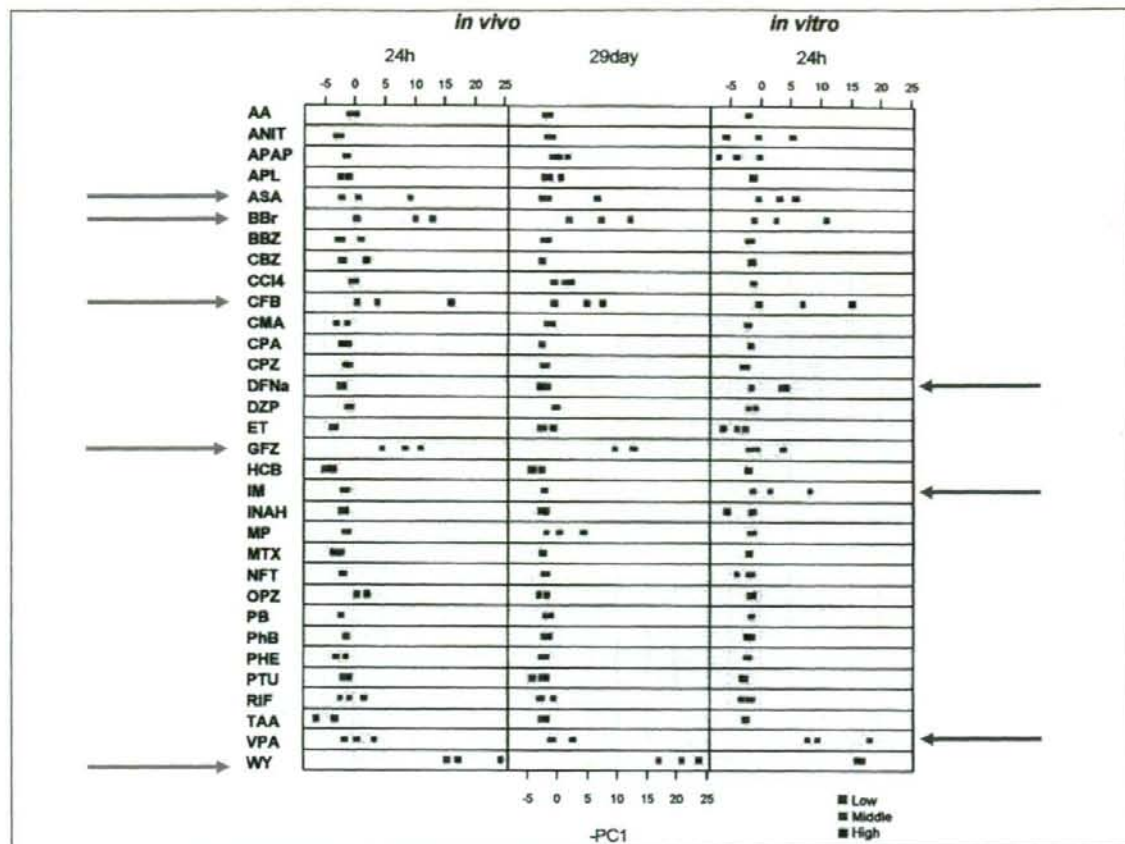
バイオマーカーを活用した化合物評価



グルタチオン欠乏評価マーカー:
*in vivo*と*in vitro*の相関低

PPAR α 制御下遺伝子セット:
*in vivo*と*in vitro*の相関高

*in vivo*評価を*in vitro*系にスケールダウンするための
バイオマーカー探索への活用?



免疫毒性とゲノミクス解析

- 免疫担当臓器に対する毒性解析
 - 胸腺毒性
 - 骨髄毒性
- 免疫反応の関与する肝・腎毒性
 - 炎症細胞浸潤
 - Kupffer cell関与
 - idiosyncrasy

Mechanisms of Benzene-Induced Hematotoxicity and Leukemogenicity: cDNA Microarray Analyses Using Mouse Bone Marrow Tissue

Byung-Il Yoon,¹ Guang-Xun Li,¹ Kunio Kitada,² Yasushi Kawasaki,¹ Katsuhide Igarashi,¹ Yukio Kodama,¹ Tomoaki Inoue,² Kazuko Kobayashi,² Jun Kanno,¹ Dae-Yong Kim,³ Tohru Inoue,⁴ and Yoko Hirabayashi¹

¹Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan; ²Kamakura Research Labs, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Kamakura, Japan; ³Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine and Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea; ⁴Biological Safety and Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

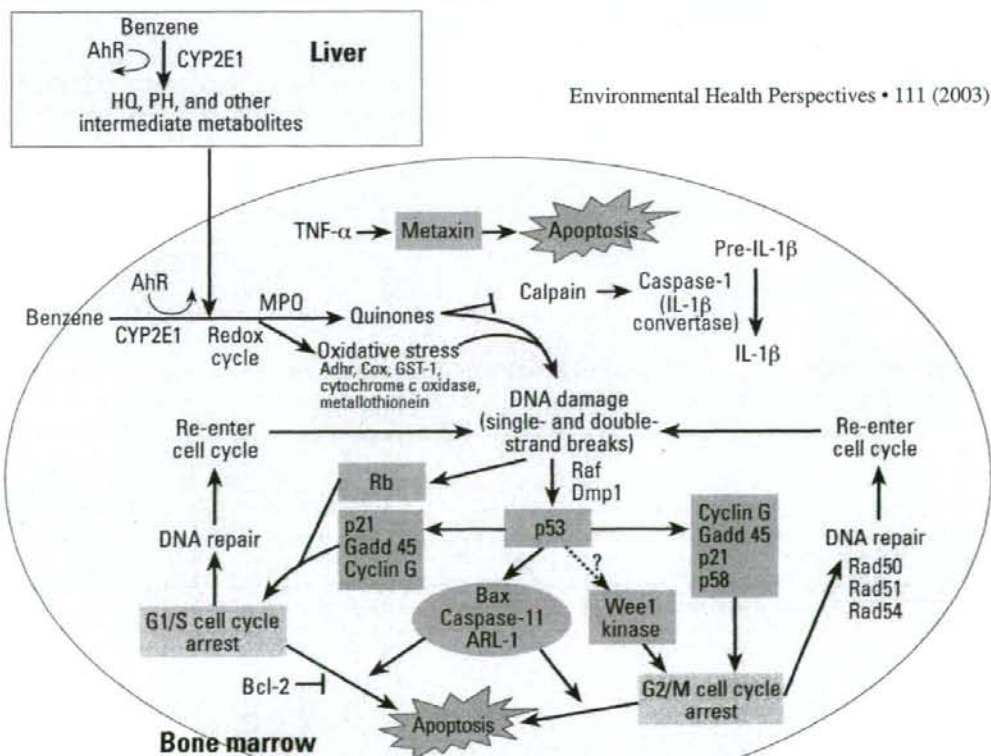
Environmental Health Perspectives • VOLUME 111 | NUMBER 11 | August 2003

Although the mechanisms underlying benzene-induced toxicity and leukemogenicity are not yet fully understood, they are likely to be complicated by various pathways, including those of metabolism, growth factor regulation, oxidative stress, DNA damage, cell cycle regulation, and programmed cell death. With this as a background, we performed cDNA microarray analyses on mouse bone marrow tissue during and after a 2-week benzene exposure by inhalation. Our goal was to clarify the mechanisms underlying the hematotoxicity and leukemogenicity induced by benzene at the level of altered underlying expression. Because a few researchers have postulated that the cell cycle regulation mediated by p53 is a critical event for benzene-induced hematotoxicity, the present study was carried out using p53-knockout (KO) mice and C57BL/6 mice. On the basis of the results of large-scale gene expression studies, we conclude the following: *a*) Benzene induces DNA damage in cells at any phase of the cell cycle through myeloperoxidase and in the redox cycle, resulting in p53 expression through *Raf-1* and cyclin D-interacting myb-like protein 1. *b*) For G1/S cell cycle arrest, the p53-mediated pathway through p21 is involved, as well as the pRb gene-mediated pathway. *c*) Alteration of *cyclin G1* and *Wee-1 kinase* genes may be related to the G2/M arrest induced by benzene exposure. *d*) DNA repair genes such as *Rad50* and *Rad51* are markedly downregulated in p53-KO mice. *e*) p53-mediated caspase 11 activation, aside from p53-mediated *Bax* gene induction, may be an important pathway for cellular apoptosis after benzene exposure. Our results strongly suggest that the dysfunction of the p53 gene, possibly caused by strong and repeated genetic and epigenetic effects of benzene on candidate leukemia cells, may induce fatal problems such as those of cell cycle checkpoint, apoptosis, and the DNA repair system, finally resulting in hemopoietic malignancies. Our cDNA microarray data provide valuable information for future investigations of the mechanisms underlying the toxicity and leukemogenicity of benzene. **Key words:** apoptosis, benzene, cDNA microarray, cell cycle, DNA damage, DNA repair, hematotoxicity, leukemia, oxidative stress, p53-knockout mice. *Environ Health Perspect* 111:1411–1420 (2003). doi:10.1289/ehp.6164 available via <http://dx.doi.org/> [Online 5 August 2003]

1990). This mechanism of multimetabolite genotoxicity is another unique aspect of benzene that distinguishes it from other chemicals in terms of the mechanism of its toxicity and carcinogenicity. Benzene metabolites subsequently undergo secondary activation by myeloperoxidase (MPO) that is present at high levels in the bone marrow tissue. This results in the production of genotoxic quinones and reactive oxygen species, thereby inducing not only hemopoietic cellular damage (Farris et al. 1997; Kolachana et al. 1993; Lee and Garner 1991; Smith et al. 1989) but also the dysfunction of bone marrow stromal cells (Niculescu et al. 1995).

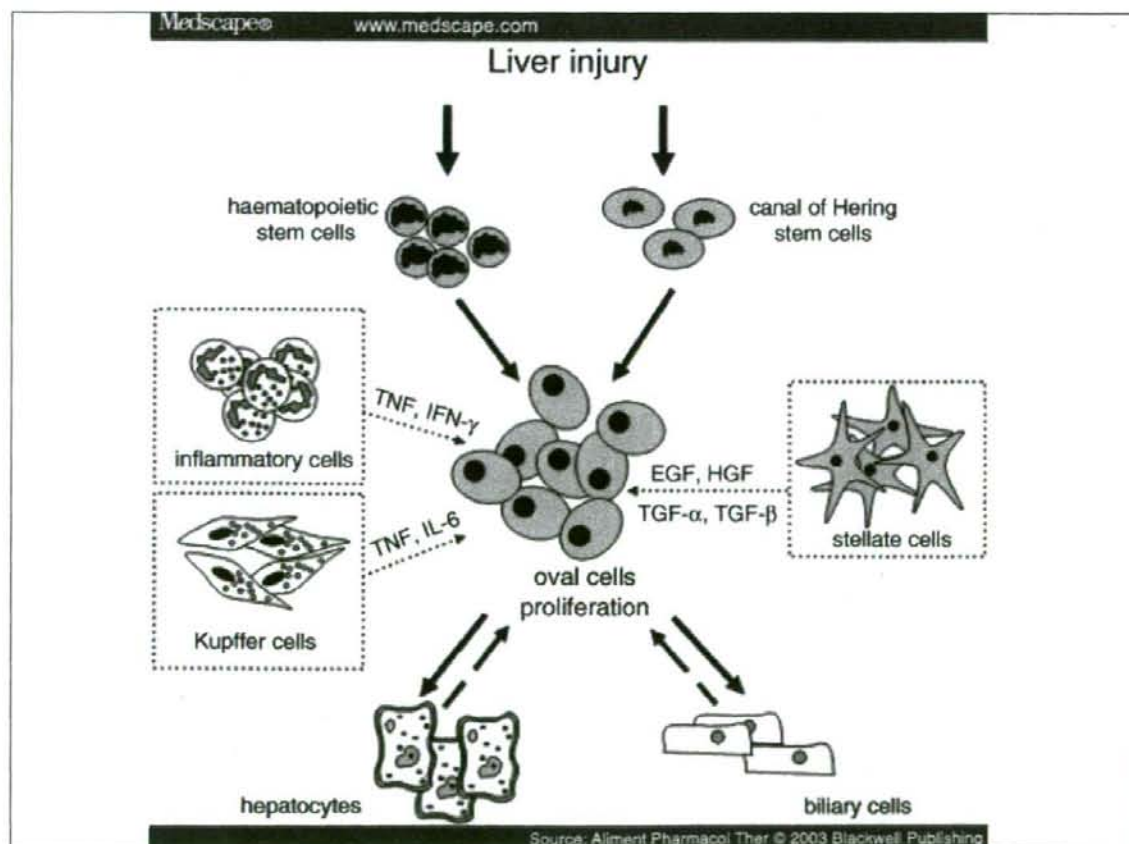
Exposure duration and dose are also important factors in determining benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity (Cronkite et al. 1989; Snyder and Kalf 1994), which may be related to the limited capacity of enzymes for benzene metabolism and to the dynamic responses of hemopoietic microenvironmental conditions against the adverse effects of benzene.

Despite intensive studies over several decades, the mechanisms underlying benzene-induced hematotoxicity and leuke-



免疫毒性とゲノミクス解析

- 免疫担当臓器に対する毒性解析
 - 胸腺毒性
 - 骨髄毒性
- 免疫反応の関与する肝・腎毒性
 - 炎症細胞浸潤
 - Kupffer cell関与
 - idiosyncrasy



免疫毒性とゲノクス解析

- 免疫担当臓器に対する毒性解析

胸腺毒性

骨髄毒性

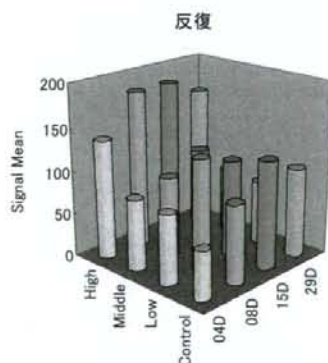
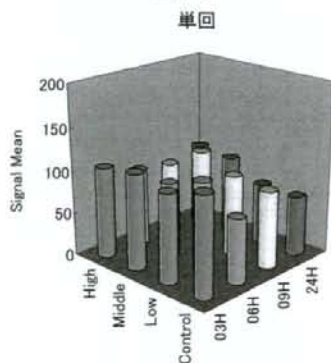
- 免疫反応の関与する肝・腎毒性

炎症細胞浸潤

Kupffer cell関与

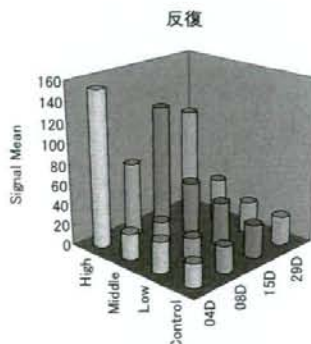
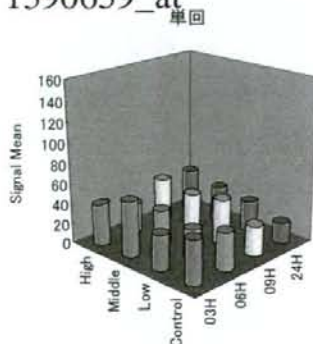
idiosyncrasy

CD44 1387952_a_at



CCl4

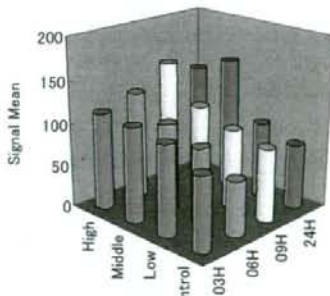
CD44 1390659_at



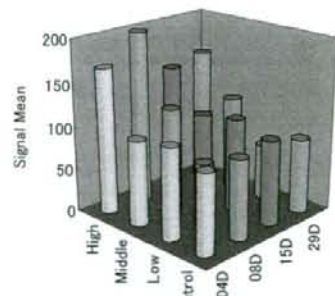
CCl4	Time	4 day			8day			15day			25day		
		30	100	300	30	100	300	30	100	300	30	100	300
Dose		mg/kg			mg/kg			mg/kg			mg/kg		
Liver	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Centriobular / Cellular infiltration		0	5	5	2	5	5	5	5	5	5	5	5
minimal			5	5	2	5	5	5	5	5	5	5	5
Centriobular / Degeneration, fatty		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
minimal		4		1	1			1					
slight		1	5	4	4	5	4	4	5	4	5	4	2
moderate							1			1		1	2
severe													1
Centriobular / Degeneration, hydropic		0	3	4	0	2	4	1	5	5	2	4	5
minimal			2			1	4	1	5	3	2	2	
slight			1	3		1				2		2	5
moderate				1									
Centriobular / Fibrosis		0	0	0	0	0	0	0	5	4	3	5	5
minimal									5	4	3	5	5

CD44 1387952_a_at

単回

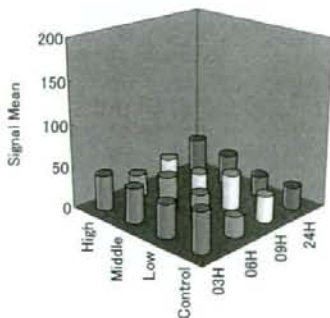


反復



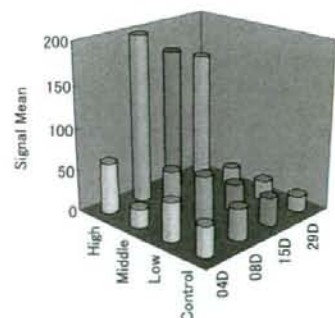
CD44 1390659_a_at

単回



α -Naphthylisothiocyanate

反復



ANIT	Time	4 day				8 day				15 day				29 day			
	Dose	0	1.5	5	15	0	1.5	5	15	0	1.5	5	15	0	1.5	5	15
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Liver	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Hepatocyte / Change, acidophilic	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	3	0	0	0	0
	minimal				3				5				2				
	slight				2							1					
	Periportal / Cellular infiltration	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5
	minimal				5				4			5					5
	slight							1									
	Periportal / Fibrosis	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	0	3	0	0	0	1
	minimal				4				4			3					1
	Periportal / Proliferation, bile duct	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5
	minimal				4				4			1					1
	slight							1			4						4
	Cellular infiltration	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	minimal						1										
	Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	2	0	0	4
	minimal							2				3	2				4

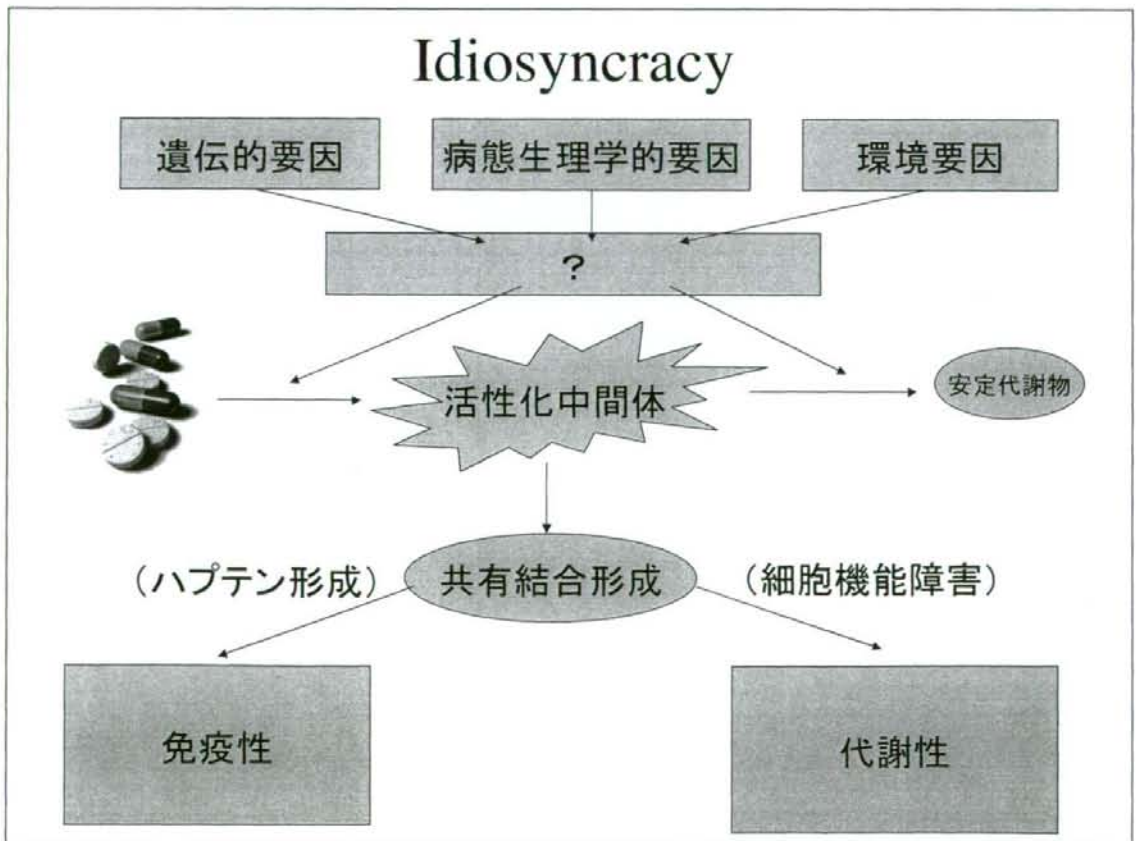
免疫毒性とゲノミクス解析

- 免疫担当臓器に対する毒性解析
 - 胸腺毒性
 - 骨髄毒性
- 免疫反応の関与する肝・腎毒性
 - 炎症細胞浸潤
 - Kupffer cell関与
 - idiosyncrasy

Idiosyncrasy

- Dose independent, unpredictable
- 1/1,000 ~ 1/100,000
Troglitazone, isoniazid, ...
- アレルギー性
adduct 形成の評価
- 代謝性
Troglitazone

TIPS 22(6) 298-305, 2001



Troglitazone-Induced Hepatic Necrosis in an Animal Model of Silent Genetic Mitochondrial Abnormalities

Michie M. K. Ong,* Calivarathan Latchoumycandane,* and Urs A. Boelsterli*¹

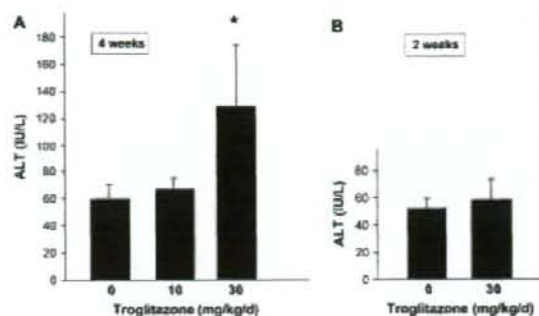
*Department of Pharmacology, Yong Loo Lin School of Medicine, and ¹Department of Pharmacology, Faculty of Science, National University of Singapore, Singapore 117 597

Received September 6, 2006; accepted November 29, 2006

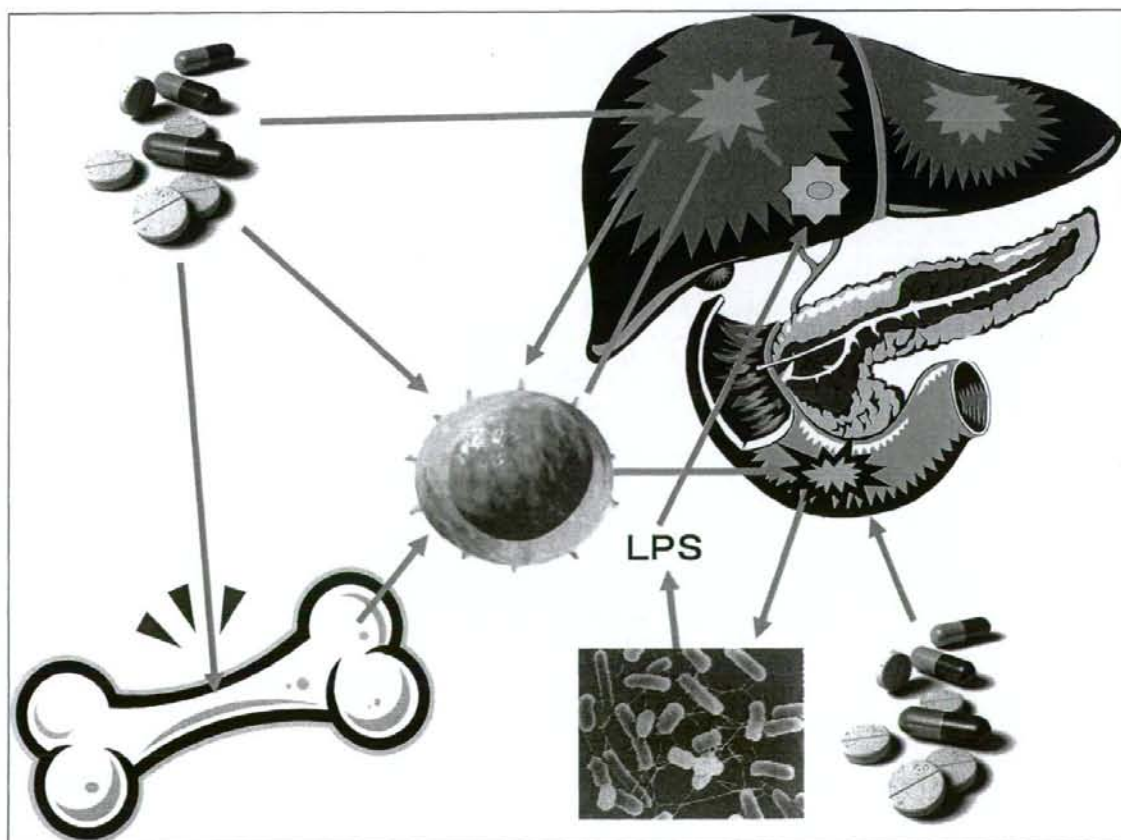
ONG, LATCHOUMYCADANE, AND BOELSTERLI

TABLE 1
 Hepatotoxicity Score in Wild-Type and *Sod2*^{+/-} Mice
 Treated with Troglitazone for 4 Weeks

Treatment	Histopathology scores				
	0	1+	2+	3+	4+
<i>Sod2</i> ^{+/+}					
Vehicle control (n = 5)	5	0	0	0	0
Troglitazone 30 mg/kg/day (n = 5)	5	0	0	0	0
<i>Sod2</i> ^{+/-}					
Vehicle control (n = 7)	7	0	0	0	0
Troglitazone 10 mg/kg/day (n = 7)	3	4	0	0	0
Troglitazone 30 mg/kg/day (n = 14)	2	7	3	2	0



SOD^{+/-} mouse



Perspectives in Pharmacology

Inflammation and Drug Idiosyncrasy—Is There a Connection?

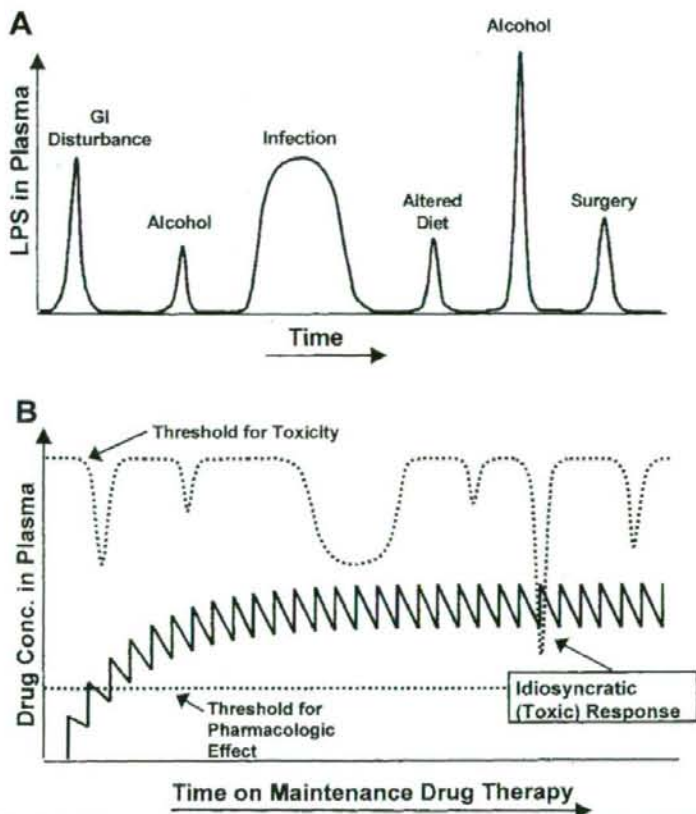
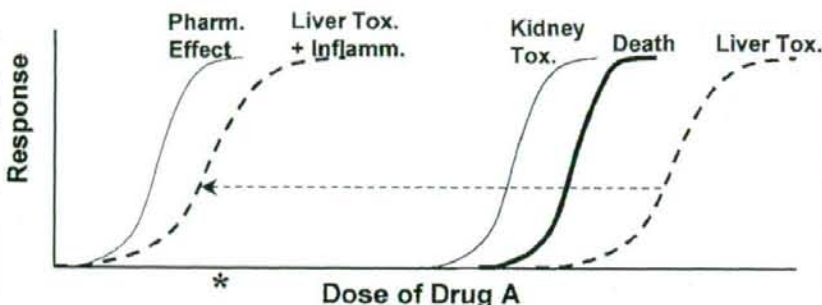
ROBERT A. ROTH, JAMES P. LUYENDYK, JANE F. MADDOX, and PATRICIA E. GANEY

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 frequent target for t about mechanisms potheses that the drug metabolism p cific immune respo few drugs does cc mechanisms, how ships that charact the possibility that renders tissues pe



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？

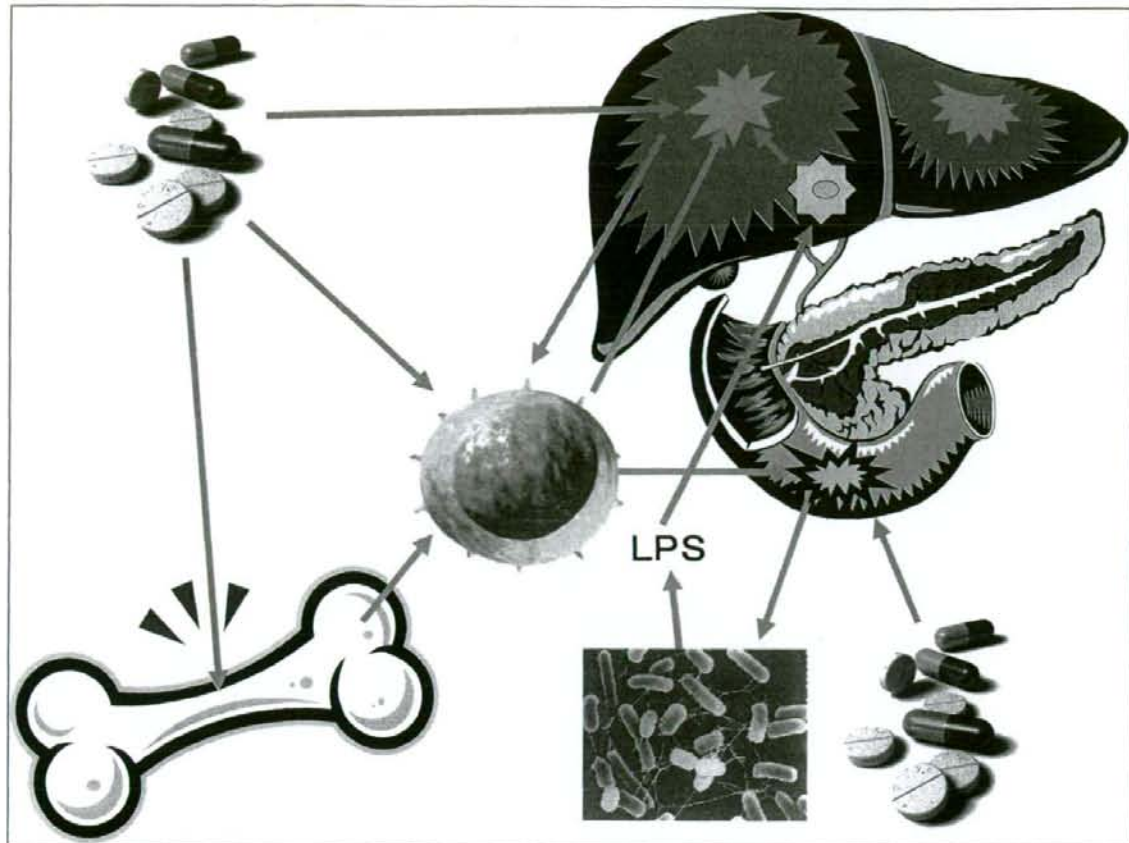


ポストTGPの課題？

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



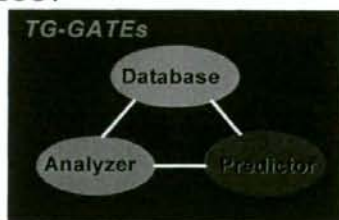
創薬(安全性)バイオマーカーの開発

→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

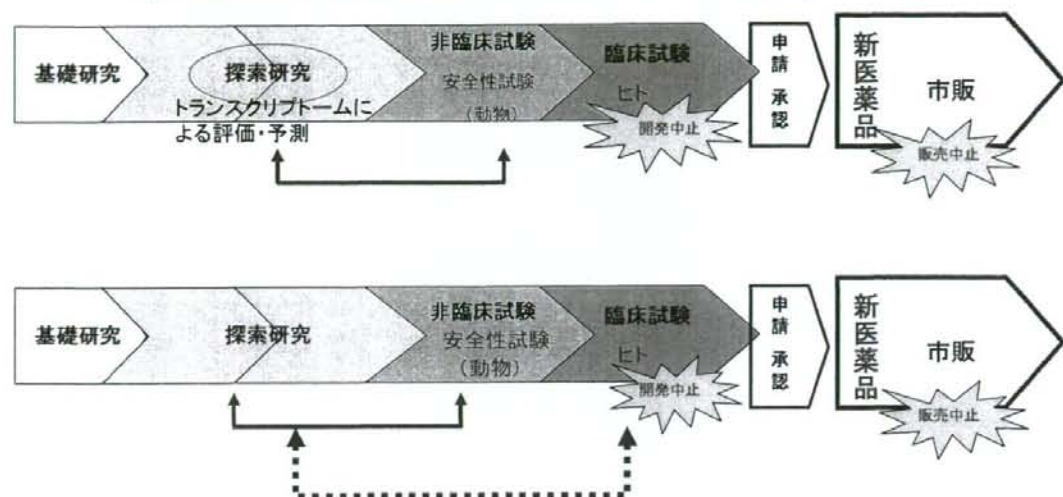


レギュラトリーサイエンス
 の基盤確立

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 山田弘

参画研究員

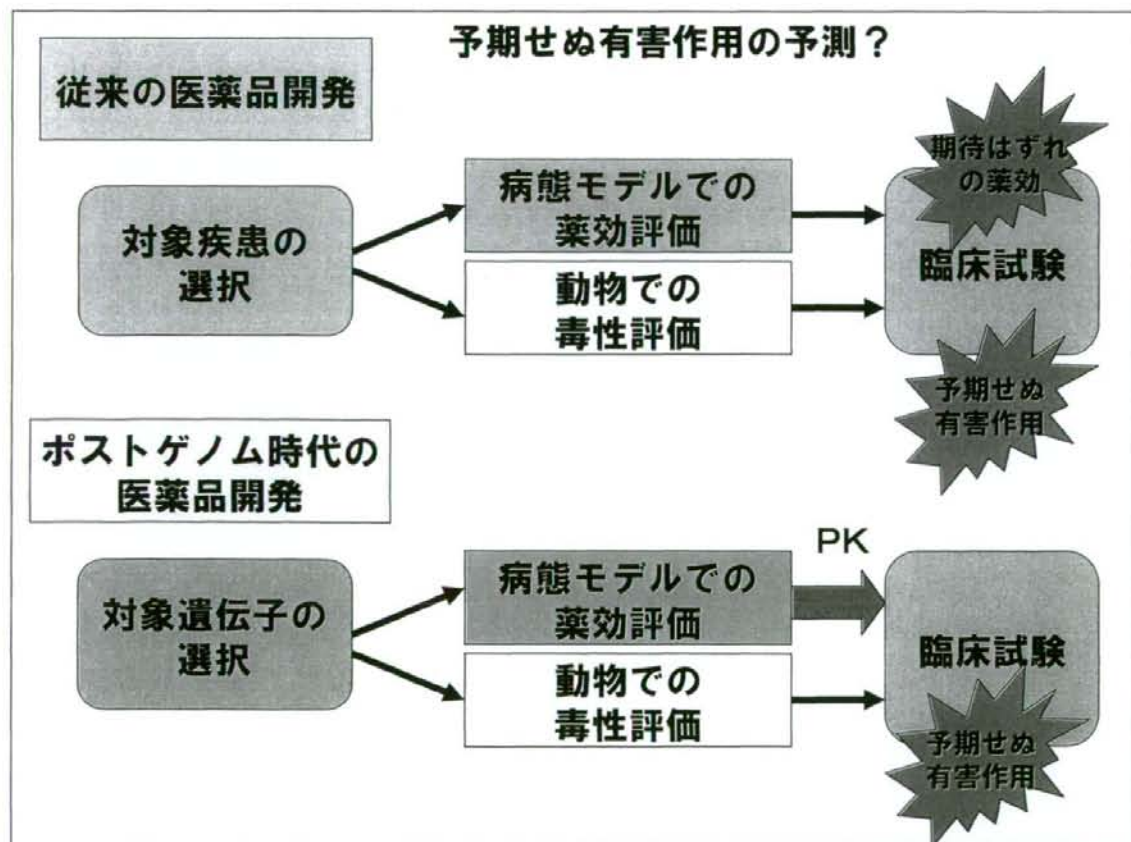
相崎健一、五十嵐勝秀、井手照一郎、上田浩之、上原健城、大野美恵、大村功、奥野恭史、奥山学、小野敦、柿内太、笠原利彦、菅野純、清澤直樹、小宮雅信、高衛華、渋谷淳、清水俊敦、常塚創、佐伯欣之、塩飽恒史、鈴木孝昌、高島佳代子、田村幸太郎、戸塚裕彦、富田裕之、鳥塚尚樹、中津則之、新田浩之、橋本智、花田貴宣、広瀬明彦、廣出充洋、瓶子昌幸、細入剛彦、松下智哉、水川裕美子、箕輪洋介、宮崎登志子、村松高道、森敦、森下克美、山下智也

トキシゲノミクス手法を用いた 安全性バイオマーカー探索

(独)医薬基盤研究所
トキシゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト
同志社女子大学薬学部病態生理学

漆谷徹郎

研究発表会 2008. 12. 8



トキシコゲノミクス Toxicogenomics

Gene ジーン: 遺伝子

Genome ゲノム: 遺伝子全体

Genomics ゲノミクス: 遺伝子全体を扱う学問・技術

+

Toxicology トキシコロジー

トキシコゲノミクス Toxicogenomics

2つのストラテジー

1. ゲノミクス Genomics

臨床においてジェノタイプと作用・副作用(疾患)の関連を解明

例) 副作用=目的変数、遺伝子=説明変数としたロジスティック回帰分析によるオッズ比の計算

臨床に直結、説明変数にぶれがない \longleftrightarrow 新薬には適用できない

2. トランスクリプトミクス Transcriptomics

マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

新薬に適用できる \longleftrightarrow 臨床から遠い、説明変数に生物学的なぶれがある

第1期 トキシコゲノミクスプロジェクト(TGP1) H14~18年度



立ち上げ

プロジェクトリーダー:長尾拓・国衛研所長
 国立医薬品食品衛生研究所・菅野毒性部長

プロジェクト本拠:

国立医薬品食品衛生研究所(東京・用賀)

平成16年度まで

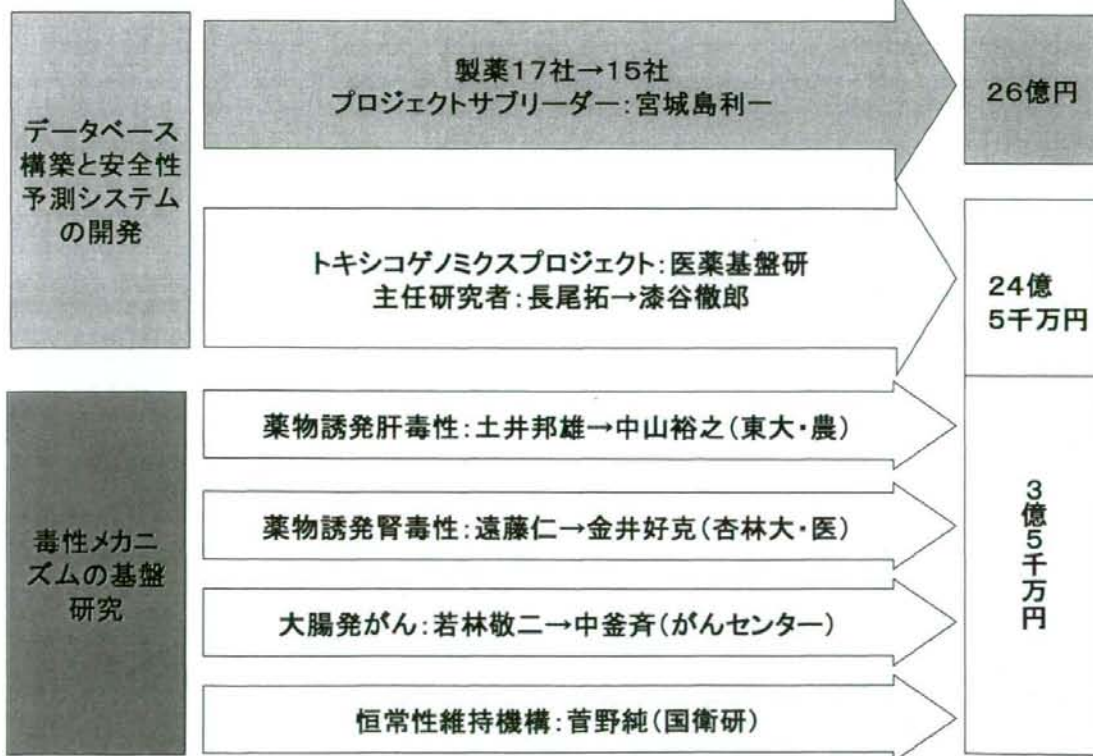
医薬基盤研究所(大阪・茨木市彩都)

平成17年度より

参加企業

中外製薬、第一製薬、大日本製薬、エーザイ、藤沢薬品、キッセイ薬品、三菱ウェルファーマ、持田製薬、大塚製薬、小野薬品、三共、三和化学、塩野義製薬、住友製薬、武田薬品、田辺製薬、山之内製薬

研究組織:プロジェクトリーダー 大野泰雄・国衛研副所長



プロジェクトの特徴

- 1) 定量性に優れたAffymetrix社GeneChipを採用。DNA量に基づいたSpike RNAを添加して細胞1個あたりのmRNA量を評価する手法も採用
- 2) 全被検化合物 150は標準的医薬品が中心であり、臨床で副作用が明らかとなり開発・市販中止となった薬物や、企業提供の独自化合物を多く含む
- 3) 十分な用量・時間設定のもとに得られた各種毒性学的データのフルセットを、遺伝子発現データとリンクさせ、かつ関連情報と有機的に結びつけ、統合データベースとして構築する
- 4) 種差のブリッジングを考慮している

完成したデータベース規模

化合物数：150

動物数：24,000匹

GeneChip数：24,000

測定遺伝子数：約800,000,000

測定検査値：2,880,000項目

病理組織標本：48,000

TGP2 Toxicogenomics Informatics Project in Japan



ホーム | TGP2概要 | 研究内容 | TGP2研究成果 | リンク | お問い合わせ

TGP2の研究成果

TGP2の研究成果の一部を公開していきます。

- 被験化合物一覧
- 動物試験
- 遺伝子発現解析に使用したDNAマイクロアレイ
- 投稿論文

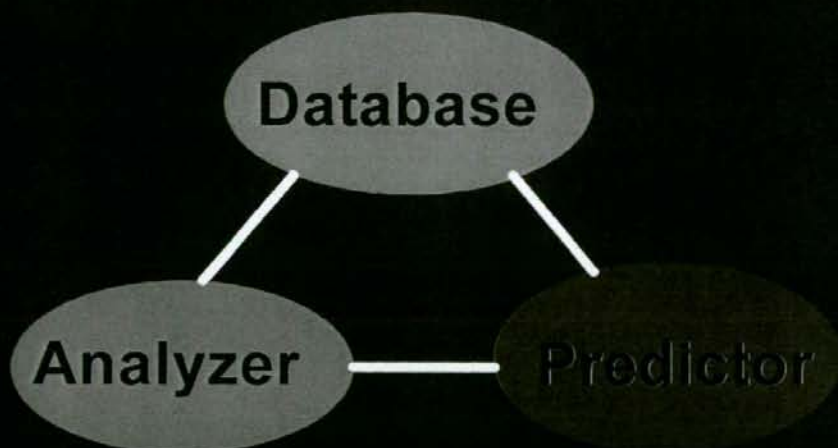
被験化合物一覧

TGPおよびTGP2で遺伝子発現解析を実施した化合物の一覧です。

化合物名 (日)	化合物名 (英)	薬効分類
アカルトース	Acarbose	代謝性医薬品
アマチオプリン	Amthioprine	代謝性医薬品
アジマリン	Ajmaline	循環器系薬
アスピリン	Aspirin	中枢神経系、血液・体液用薬
アセトazolamイド	Acetazolamide	循環器系薬

Genomics-Assisted Toxicity Evaluation System created by Toxicogenomics Project Japan

TG-GATEs



検索：実験条件、血液生化学値・病理データ

化合物情報
—文献情報・化合物名・IDなど

実験情報
—動物種
—iv vivo/in vitro
—溶媒
—CRO
—アレイの種類
—時点
—投与量群
etc

病理変化
—部位・種類・強さを組み合わせて検索

血液生化学検査など
—検定の有意性や測定値、項目を組み合わせて検索

追加パラメーター
—追加測定した各種項目を追加登録・検索

条件の保存
—検索条件を保存して再検索

化合物情報

薬効、構造式、動物での毒性、ヒトでの副作用

Compound Identification

103-60-0
7767-75-7
acetaminophen
N-(4-aminophenyl)acetamide
paracetamol, 4-acetamidophenol
103-60-0

Toxicity

Species	Toxicity
Human	Diverticulis hepatitis, fatal hepatitis necrosis 1
Rat	Hepatotoxicity 10
Other	Mouse: Hepatotoxicity 0; 13, Mouse: Hepatitis necrosis 13, Acute renal failure 2, Transient scoliosis 2
Human	Acute renal failure 2, Transient scoliosis 2
Rat	Cell damage of S2 segment proximal tubule 22, Nephrotoxicity 22
Other	Mouse: Hepatotoxicity 9, Mouse: Cell damage of S1 and S2 tubules 22

Reference

Ref. No.	Author	Year	Page	Journal	
1	Goodman & Gilman 13 (1976)	1966	89-98	856	Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed., New York: Macmillan Publishing Co., Inc.
2	Goodman & Gilman 13 (1976)	1966	89-98	702	Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed., New York: Macmillan Publishing Co., Inc.
3	Goodwin 16	1976	14	212	Journal of Pharmaceutical Sciences
4	Goodwin 16	1976	14	212	Journal of Pharmaceutical Sciences
5	Goodwin 16	1976	14	212	Journal of Pharmaceutical Sciences
6	Goodwin 16	1976	14	212	Journal of Pharmaceutical Sciences
7	Goodwin 16	1976	14	212	Journal of Pharmaceutical Sciences
8	Goodwin 16	1976	14	212	Journal of Pharmaceutical Sciences
9	Goodwin 16	1976	14	212	Journal of Pharmaceutical Sciences

Probable Mechanism

Human: Mitochondrial dysfunction; Human: Peroxisome formation; Human: Reactive metabolite formation and protein binding; Human: Inactivation of cytochrome oxidase by prostaglandin synthetase; Human: Cell damage and necrosis; Human: Metabolism or excretion; Human: Covalent binding or addition of the reactive (SH) intermediate of acetaminophen to cellular proteins; Human: Acetaminophen is a true substrate for metabolic activation.

Drug Metabolism