

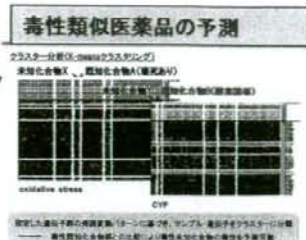
TGP Analyzer・Predictor

主成分分析



毒性未知化合物 X

クラスター分析

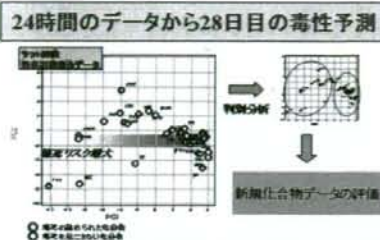


Analyzer・Predictor

医薬品候補化合物の選択

- ・毒性の種類・強さの予測
- ・毒性類似医薬品の予測
- ・毒性予測
- ・単回データ(24時間)から反復データ(28日)の毒性予測
- ・in vivo - in vitroの反応性比較

判別分析

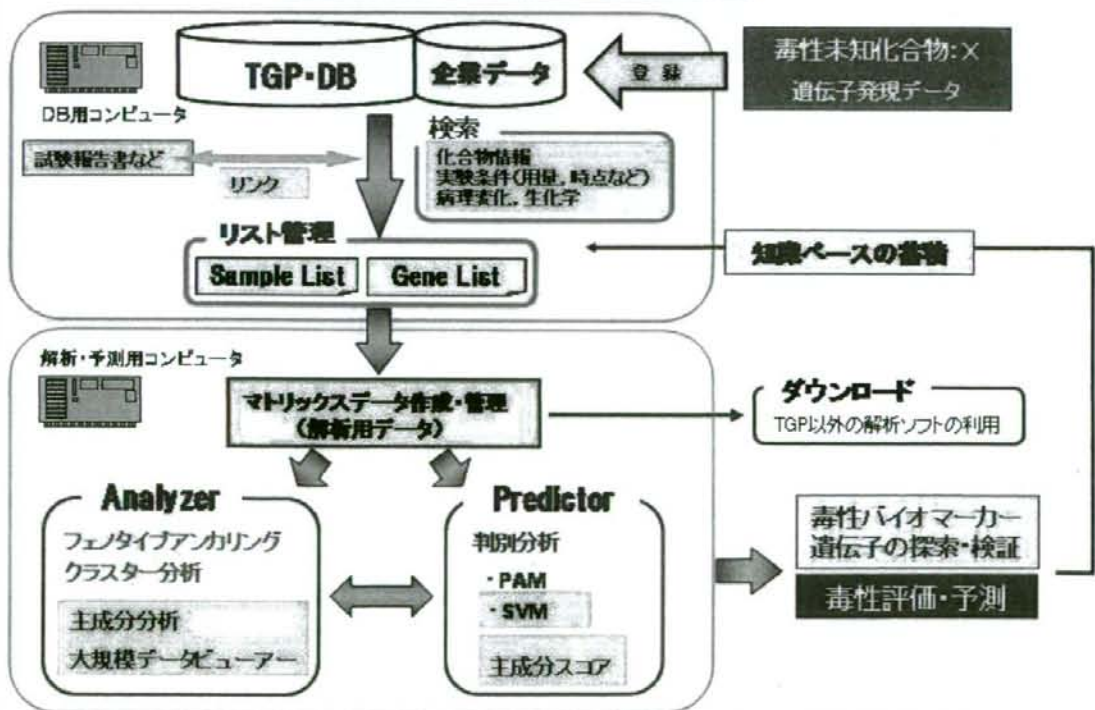


大規模データビューワ

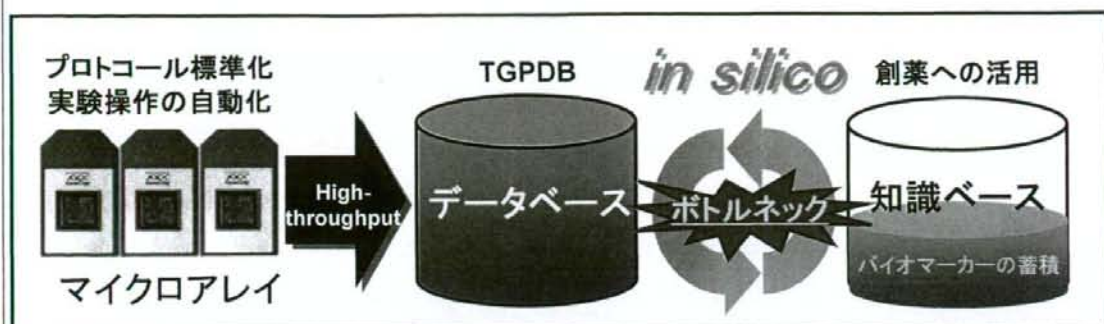


医薬品研究開発の初期段階における候補化合物の効率的な毒性スクリーニング

TG-GATEs



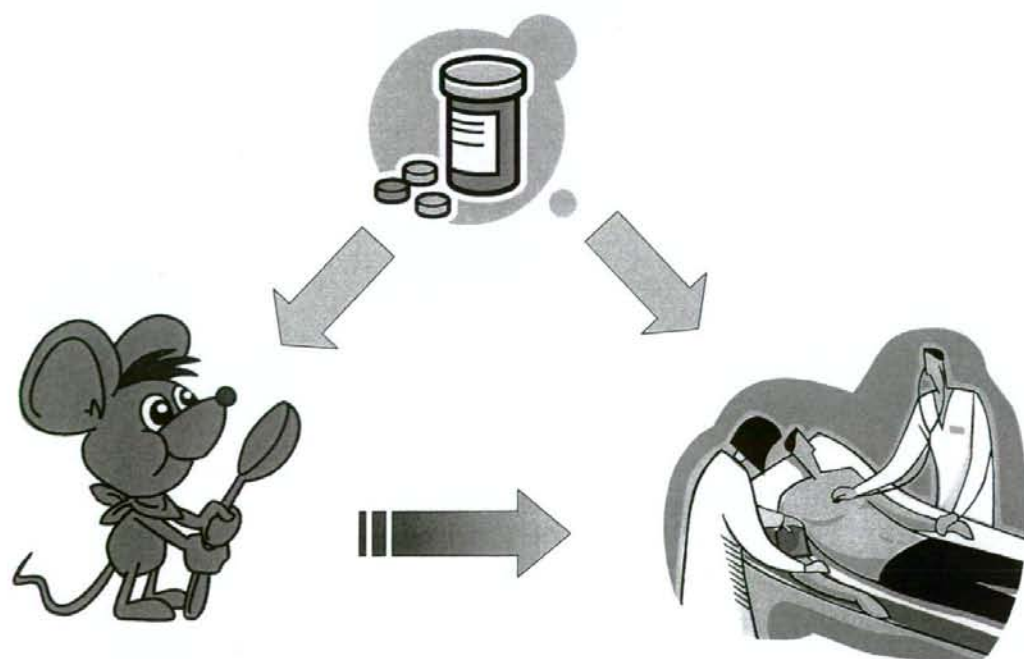
トキシコゲノミクス研究のボトルネック



マイクロアレイ技術の発達により、網羅的遺伝子発現データ取得のスループットは劇的に向上した一方で、データベースからの知識探索・活用は自動化できないためにスループットは低い

TGP大規模DBの資源を有効活用するため、
知識(バイオマーカー遺伝子セット)を効率的に探索・活用
する必要性

種差の壁



世界の動向

米国

- 2005 Guidance for Industry –Pharmacogenomics Data Submission-
FDA:トキシコゲノミクス関連のデータ取扱いに関するガイダンスの公表
- 2005 MicroArray Quality Control (MAQC)
FDA,関連企業:マイクロアレイ技術の標準化検討開始
- 2006 Liver Toxicity Biomaker Study
Predictive Safety Testing Consortium
FDA,製薬企業など:肝毒性予測マーカーなどの開発に着手

欧州

- 2006 The InnoMed consortium
製薬企業、大学など:毒性予測システムの開発に着手

日本

- 2002 トキシコゲノミクスプロジェクト開始
- 2005 厚生労働省:ファーマコゲノミクス関連のデータ提供などに関するガイダンスの公表
- 2007 ポストトキシコゲノミクスプロジェクト開始

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

- 1) 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
- 2) トランスクリプトームで種差の壁に挑戦する
- 3) 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、レギュラトリーサイエンスへの応用の基盤を整備する

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

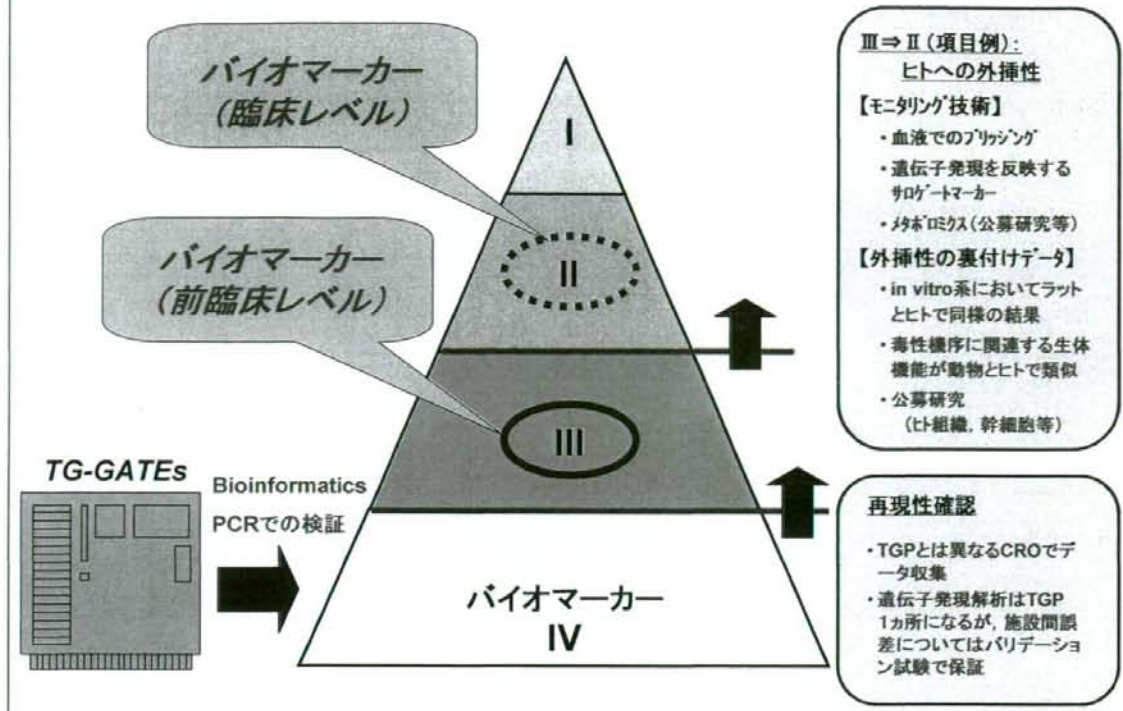
- 1) TGP1の成果(TG-GATEs)を活用してバイオマーカー候補を創出する:目標 30種
- 2) トランスクリプトームで種差の壁に挑戦する
- 3) トキシコゲノミクス手法の施設間バリデーションを行い、レギュラトリーサイエンスへの応用の基盤を整備する

バイオマーカーの定義(FDA)

- ・ A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.

バイオマーカーとは生物学的プロセスや病理学的プロセス、あるいは治療に対する薬理的な反応の指標として客観的に測定・評価される項目である。

バイオマーカー探索の概要

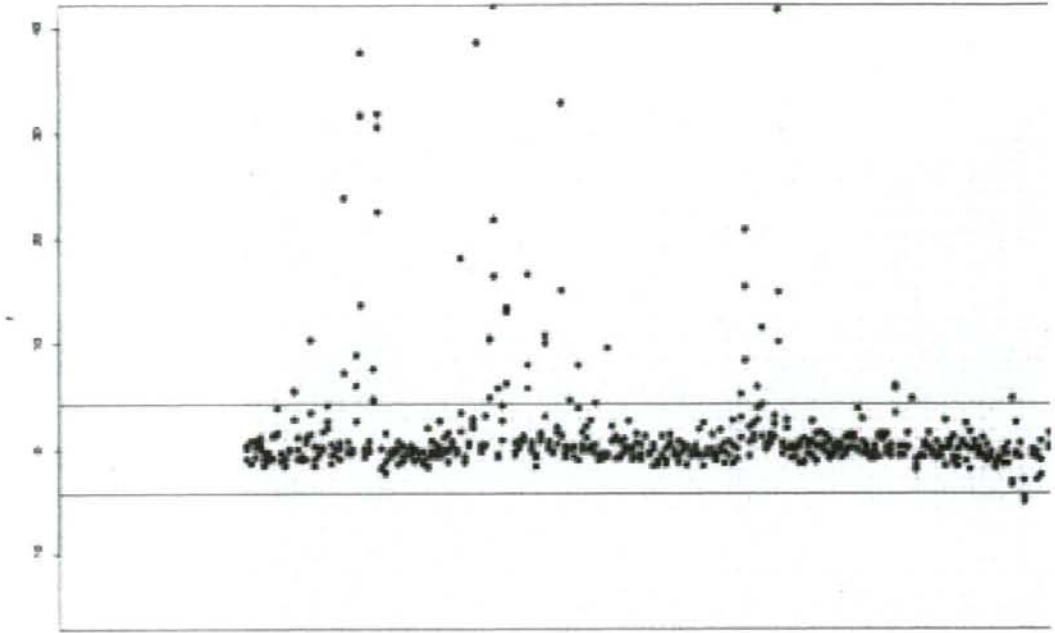


解析・予測のストラテジー

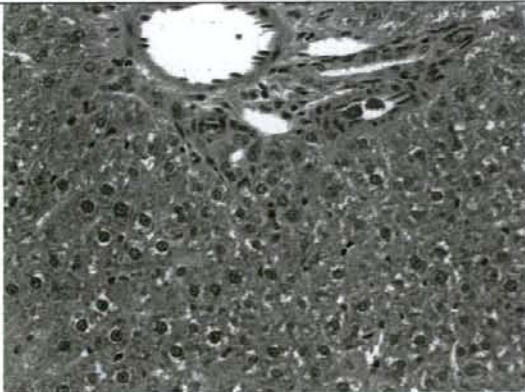
- ・ フェノタイプアンカーリング
血液生化学、病理変化の標準化(?)
 - ・ バイオマーカー遺伝子リストの取得
参加企業の創薬ニーズ
 - ・ 判別分析
PAM, SVM: 予測結果の定量的表示
 - ・ 主成分分析
予測結果の定量的表示
- 毒性メカニズムに基づいた予測

逸脱酵素

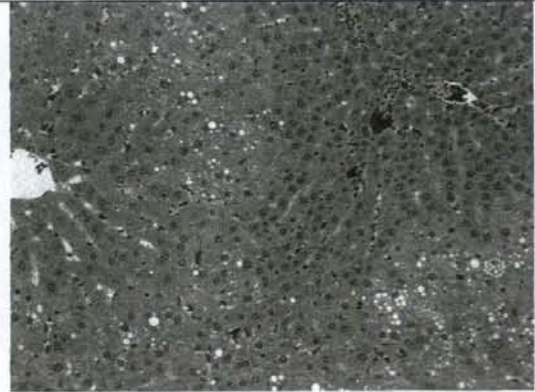
ALP(U/L)



13

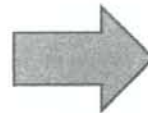


Compound: imipramine
Dose: High
Sacrificed Day: 15D (Repeat)
Histopathological Finding: Vacuolization,
cytoplasmic/Kupffer cell
069rep_14dH4014_LIV1.jpg



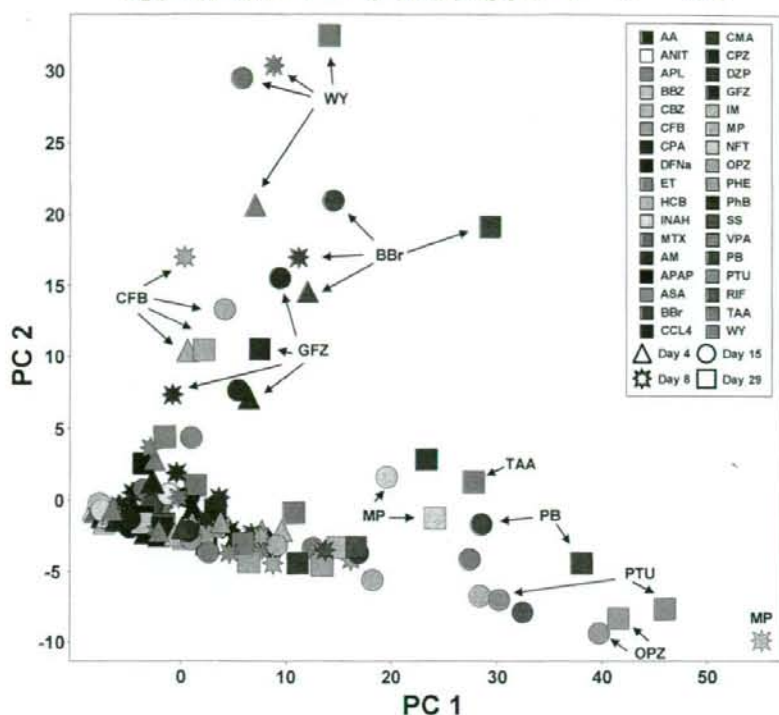
Compound: imipramine
Dose: High
Sacrificed Day: 29D (Repeat)
Histopathological Finding:
Hypertrophy/Centrilobular; Vacuolization,
cytoplasmic/Midlobular
069rep_28dH4019_LIV1.jpg

Morphology	4			8			15			29		
	Dose (mg/kg)			Dose (mg/kg)			Dose (mg/kg)			Dose (mg/kg)		
	15	50	150	15	50	150	15	50	150	15	50	150
Hepatocyte / Single cell necrosis	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2
very slight			1			1			1			2
Hepatocyte, centrilobular / Hypertrophy	0	0	0	0	0	3	0	0	5	0	0	5
very slight						3			2			1
slight									3			4
Hepatocyte / Inclusion body, intracytoplasmic	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5
very slight						5			2			
slight									3			2
moderate												3
Hepatocyte, centrilobular / Degeneration, vacuolar	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
very slight												2
slight												1
moderate												3



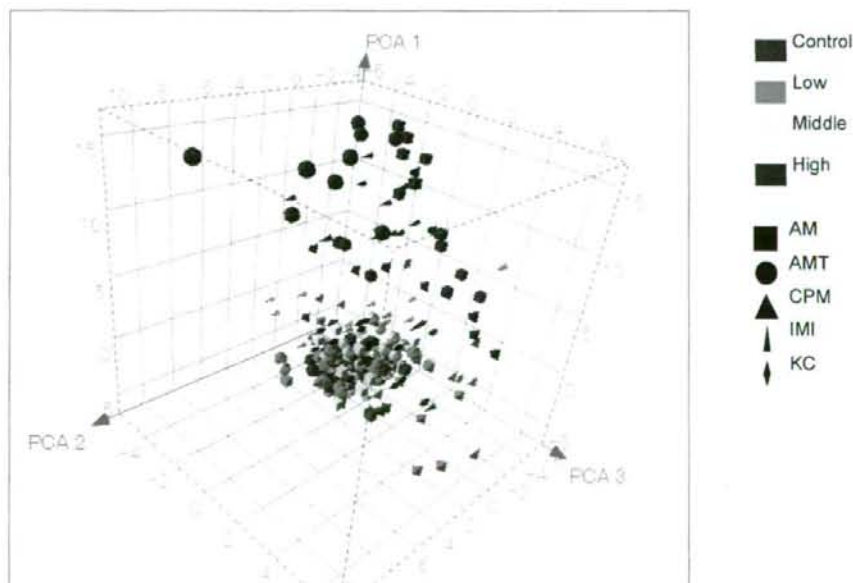
標準化?

解析例: 血中脂質低下マーカー



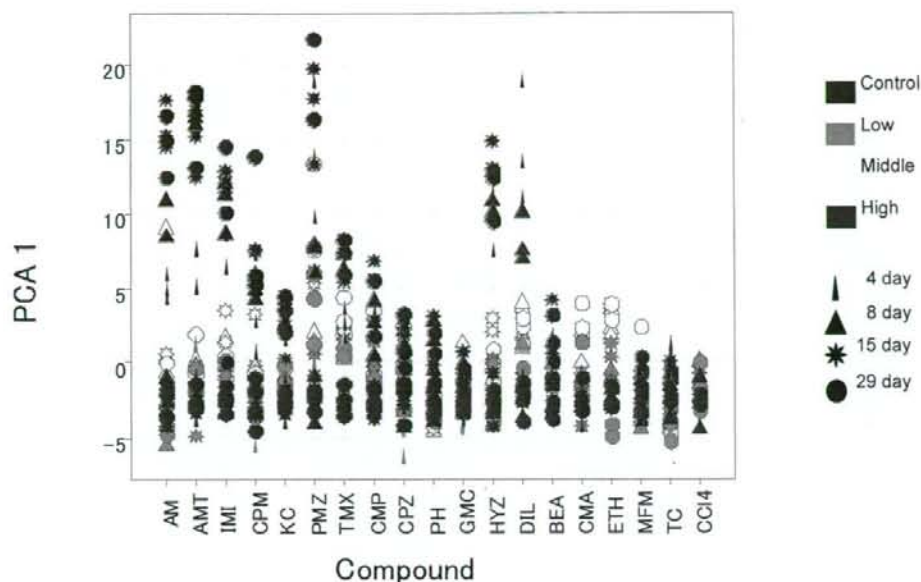
Omura et al., J. Toxicol. Sci. 32:387- 2007

解析例: phospholipidosis のリスク評価



Hirode et al., Toxicol Appl. Pharmacol. 229:290- 2008

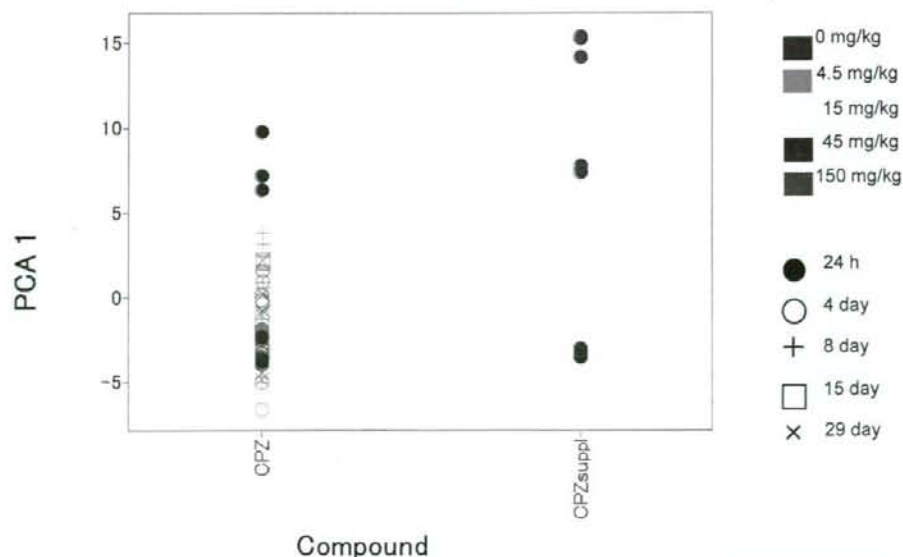
解析例: phospholipidosis のリスク評価



Hirode et al., Toxicol Appl. Pharmacol. 229:290- 2008

解析例: phospholipidosis のリスク評価

高用量を用いると、単回投与でも予測可能

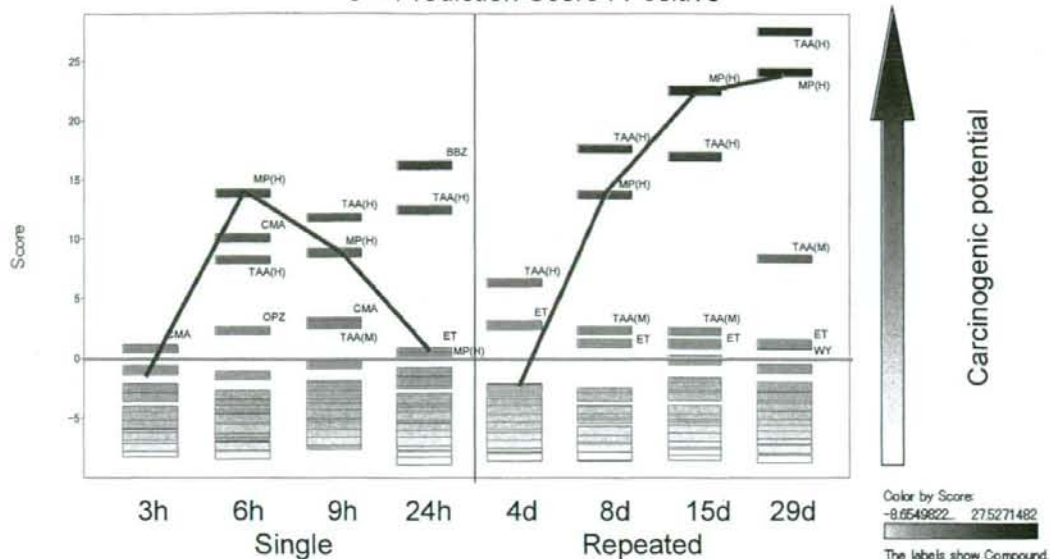


Hirode et al., Toxicol Appl. Pharmacol. 229:290- 2008

解析例：非遺伝子傷害性発がん物質予測(PAM)

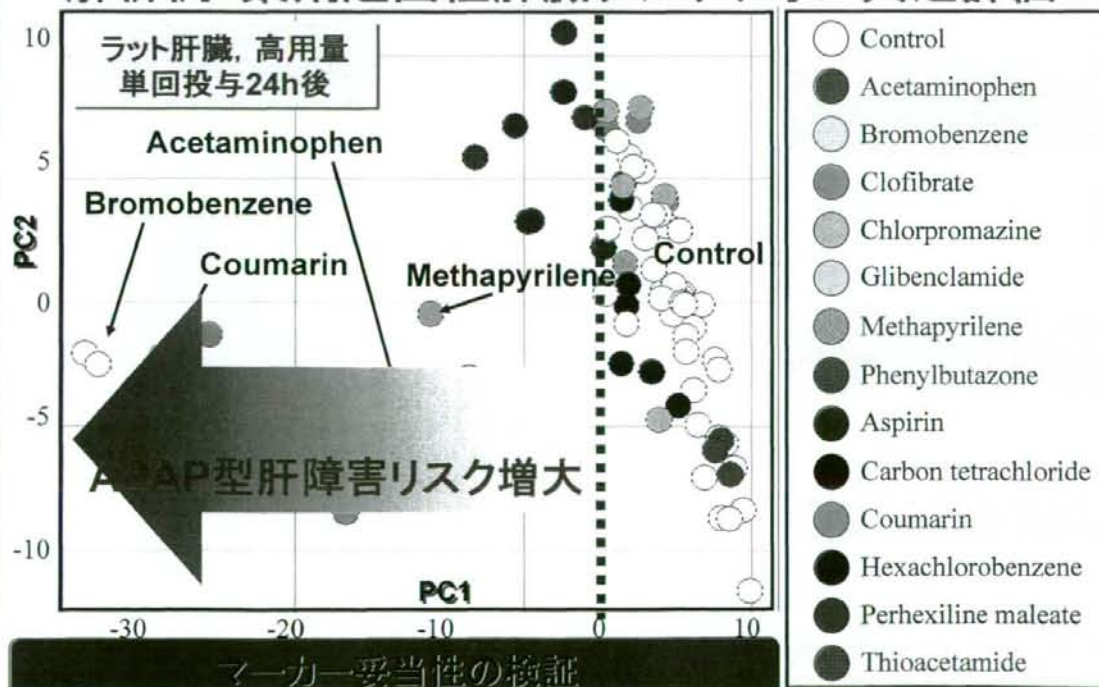
Prediction Score < 0 : Negative

0 < Prediction Score : Positive

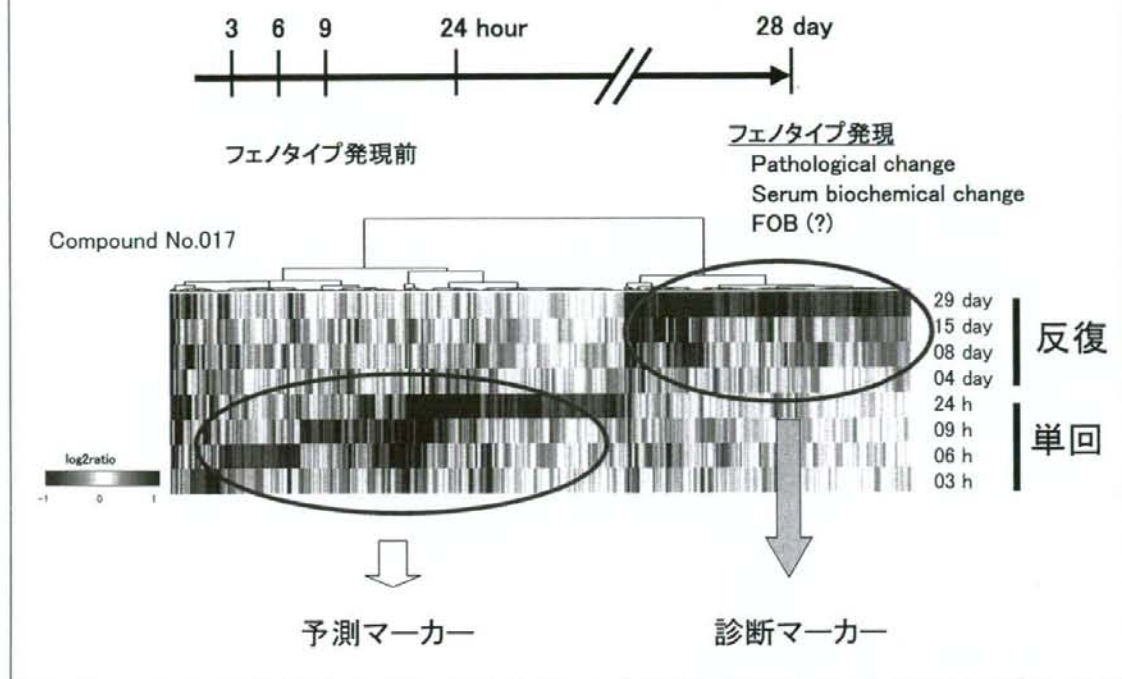


Uehara et al., Toxicology 250:15- 2008

解析例：薬剤起因性肝臓グルタチオン欠乏評価



時間依存的な遺伝子発現変化とその使い分け

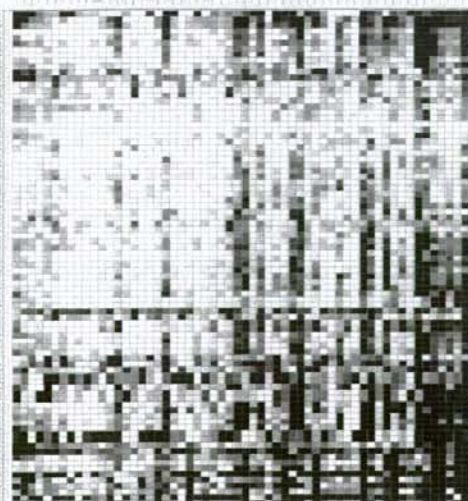


バイオマーカーを活用した化合物評価

スコア低 ← → スコア高

横軸：化合物

縦軸：バイオマーカー



バイオマーカーレベルのプロファイル
類似性評価：「Knowledge array」

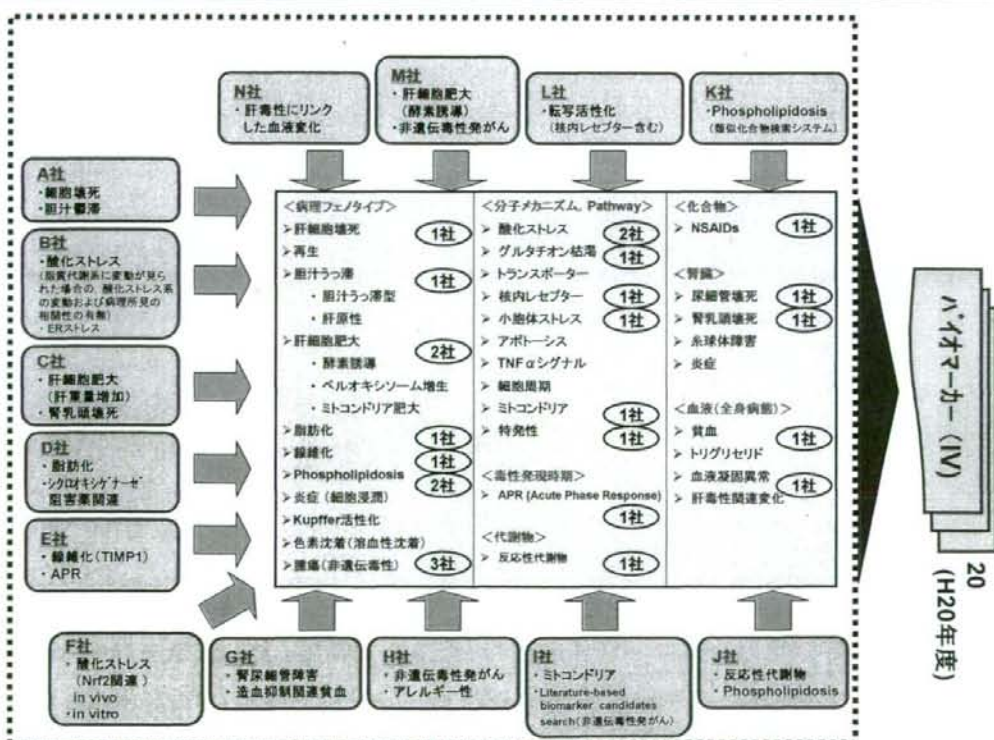
Sig Gene Hypertrophy & ALT modified Single Posi-Nega
uehara_033AM_H_welch0.05_fold1.5_down_15and29D
mat_lipidosis_down_050427
TAA Single Pearson minus less 0.6

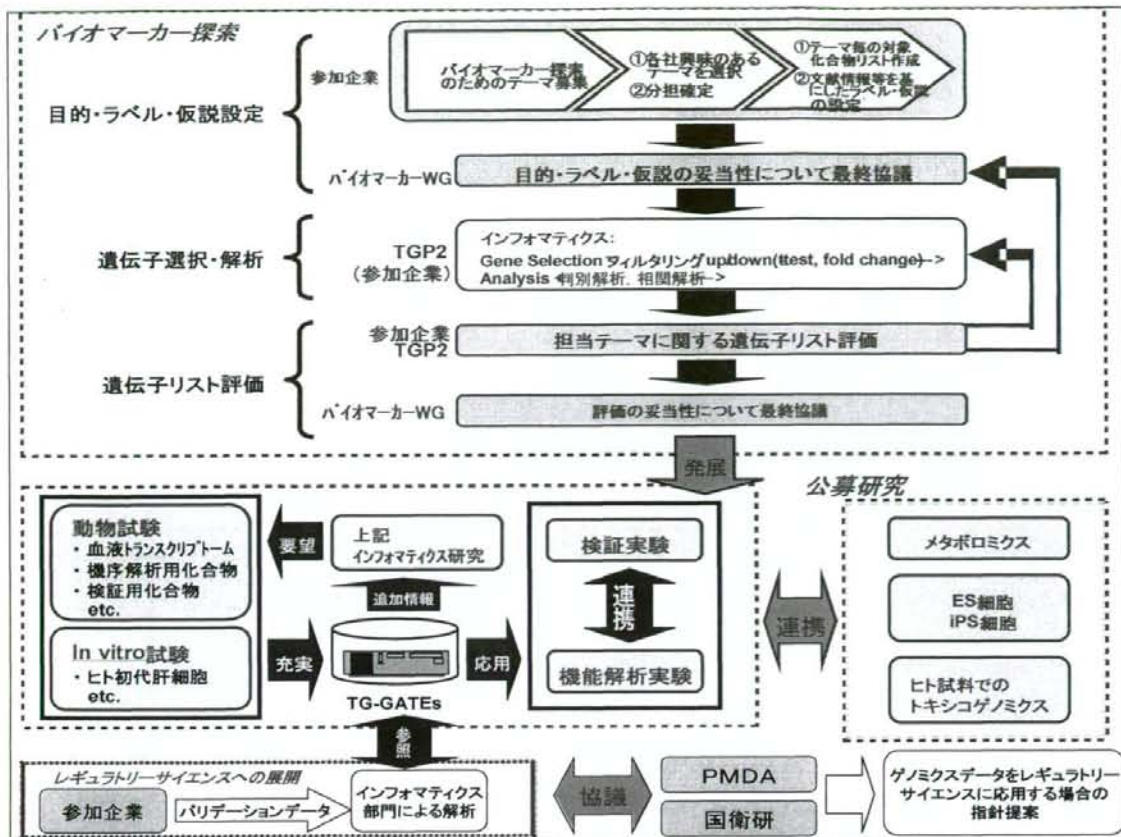
PPAR α Specific Gene
Sig Gene Cellular Infiltration & ALT 24H Posi-Nega
uehara_033AM_H_welch0.05_fold1.5_up_15Dand29D
BBR Repeat TG inverse association 163 gene
酸化ストレス
Sig 90gene AND APAP 8H_24H same change
vitro_cluster1
Sig gene necrosis & ALT UP modified Single
ONO PPAR α single24h
Hamp
Tamura PPARalpha SigGene

バイオマーカー探索のためのテーマ

<p><病理フェノタイプ></p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ 肝細胞壊死 ➢ 再生 ➢ 胆汁うっ滞 <ul style="list-style-type: none"> ・胆汁うっ滞型 ・肝原性 ➢ 肝細胞肥大 <ul style="list-style-type: none"> ・酵素誘導 ・ペルオキシソーム増生 ・ミトコンドリア肥大 ➢ 脂肪化 ➢ 線維化 ➢ Phospholipidosis ➢ 炎症(細胞浸潤) ➢ Kupffer活性化 ➢ 色素沈着(溶血性沈着) ➢ 腫瘍(非遺伝毒性) 	<p><分子メカニズムPathway></p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ 酸化ストレス ➢ グルタチオン枯渇 ➢ トランスポーター ➢ 核内レセプター ➢ 小胞体ストレス ➢ アポトーシス ➢ TNFαシグナル ➢ 細胞周期 ➢ 特異性 <p><毒性発現時期></p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ APR (Acute Phase Response) <p><代謝物></p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ 反応性代謝物 	<p><腎臓></p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ 尿管壊死 ➢ 腎乳頭壊死 ➢ 糸球体障害 ➢ 炎症 <p><血液(全身病態)></p> <ul style="list-style-type: none"> ➢ 貧血 ➢ トリグリセリド ➢ 血液凝固異常 ➢ 肝毒性関連変化
--	--	---

H20年度研究計画





望ましいバイオマーカー遺伝子リストとは？

1. 再現性
2. 頑強性
3. 臨床への外挿性
4. 汎用性
5. 数(?)



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

- 1) 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
- 2) トランスクリプトームで種差の壁に挑戦する
- 3) 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、レギュラトリーサイエンスへの応用の基盤を整備する

ヒト→ラット:種差のブリッジング戦略

1. Human Cell Line・・・TGP1でHepG2を検討したが却下
2. Primary Cultured Cellで比較・・・TGP1で採用
3. ヒト型遺伝子導入動物・・・分担研究(菅野)
4. ES, iPS細胞・・・機が熟していない(?)
5. Toxicological Pathwayで推定・・・知識の蓄積乏しい
6. 血球細胞を用いる・・・技術的に可能か?
7. 臨床研究・・・TGP内では困難→公募研究との連携

ヒト→ラット:種差のブリッジをどうするか

1. Human Cell Line・・・TGP1でHepG2を検討したが却下
2. Primary Cultured Cellで比較・・・TGP1で採用
3. ヒト型遺伝子導入動物・・・分担研究(菅野)
4. ES, iPS細胞・・・機が熟していない(?)
5. Toxicological Pathwayで推定・・・知識の蓄積乏しい
6. 血球細胞を用いる・・・技術的に可能か?
7. 臨床研究・・・TGP内では困難→公募研究との連携

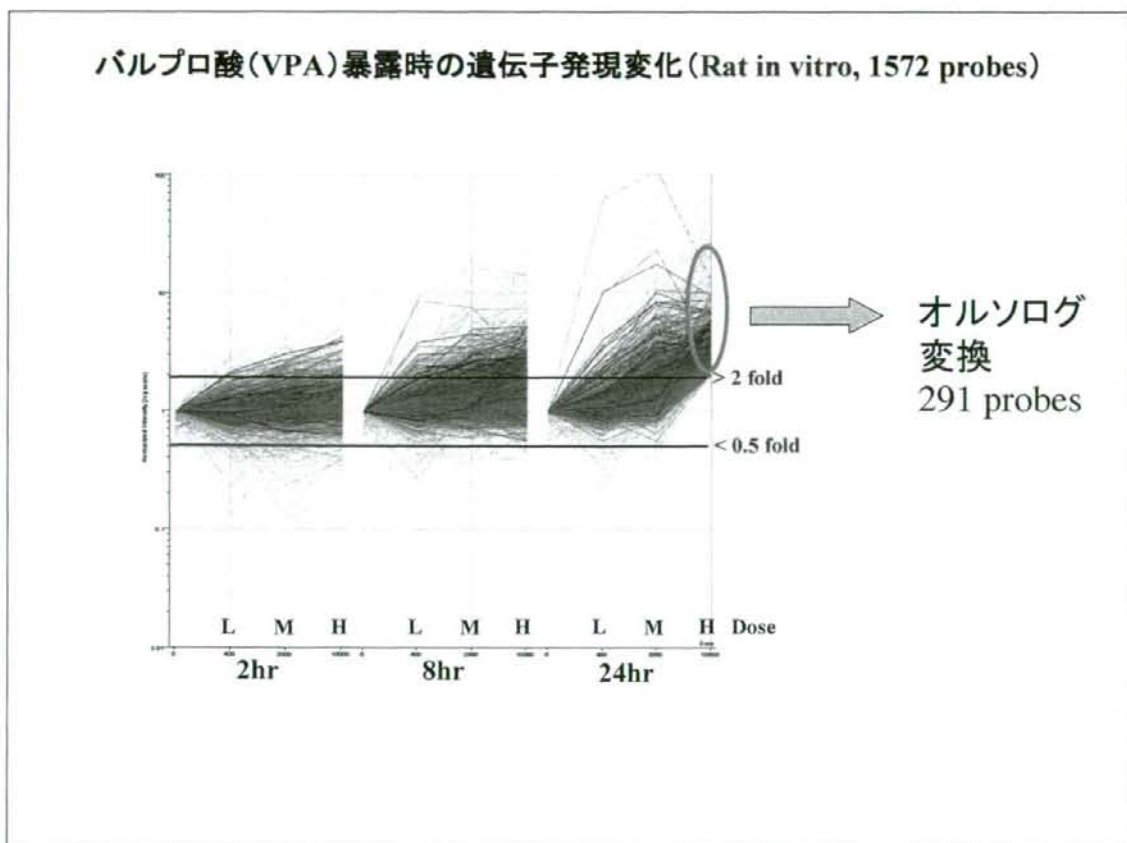
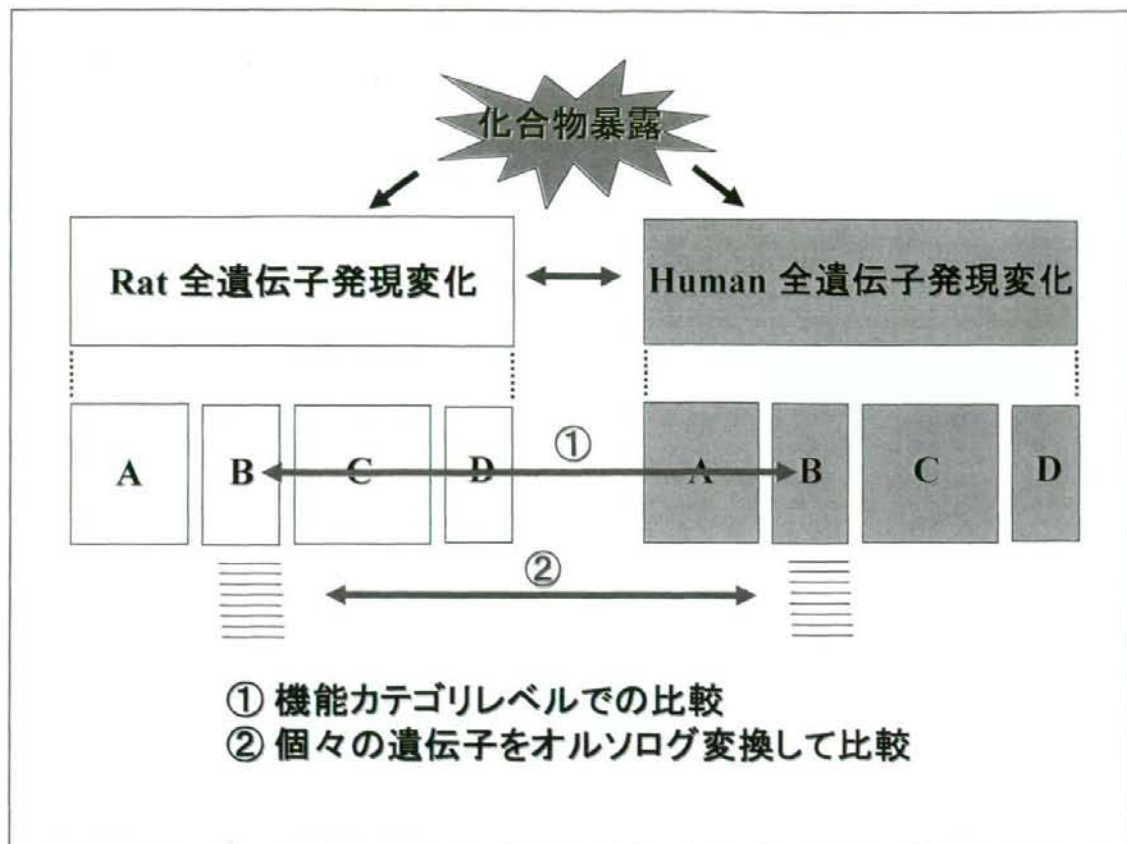
例1:バルプロ酸

- ・ ラットin vitroから変動遺伝子を抽出
- ・ オルソログ変換→ヒトin vitroの変動遺伝子と比較
共通性少ない

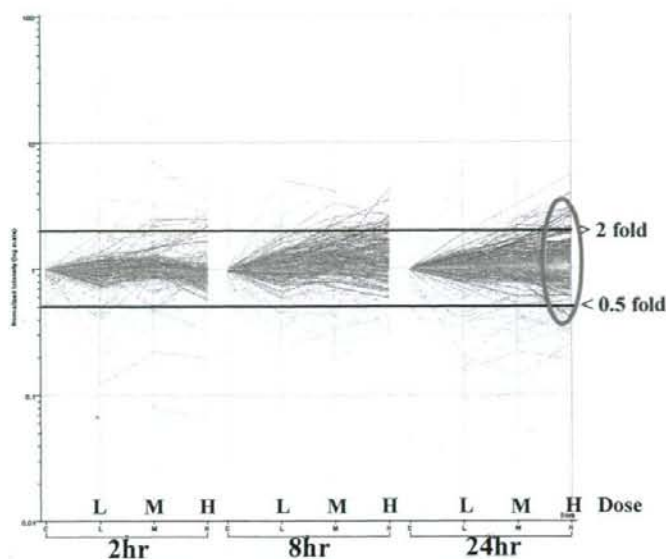


- ・ 遺伝子機能別に対応を見ると共通性見出せる

Shimizu et al., unpublished



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

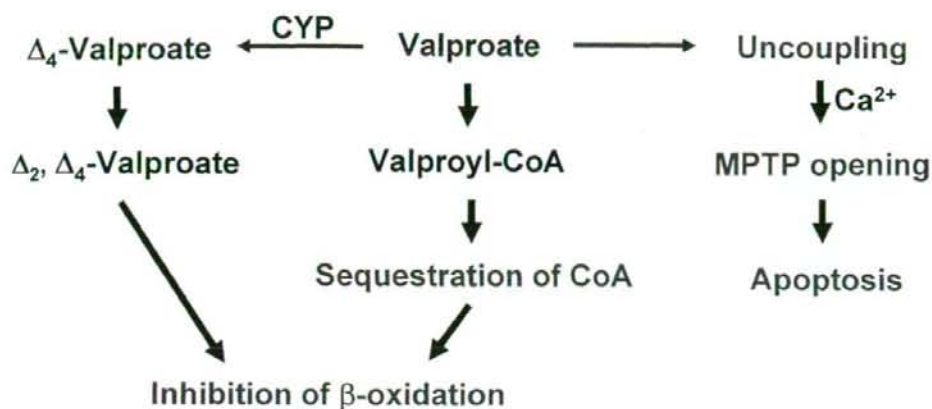
GO terms		P-value
GO:0016491	oxidoreductase activity	0.000394
GO:0006629	lipid metabolism	0.00229
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.00624
GO:0019752	carboxylic acid metabolism	0.00624
GO:0006082	organic acid metabolism	0.00624
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.00838
GO:0004497	monooxygenase activity	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。

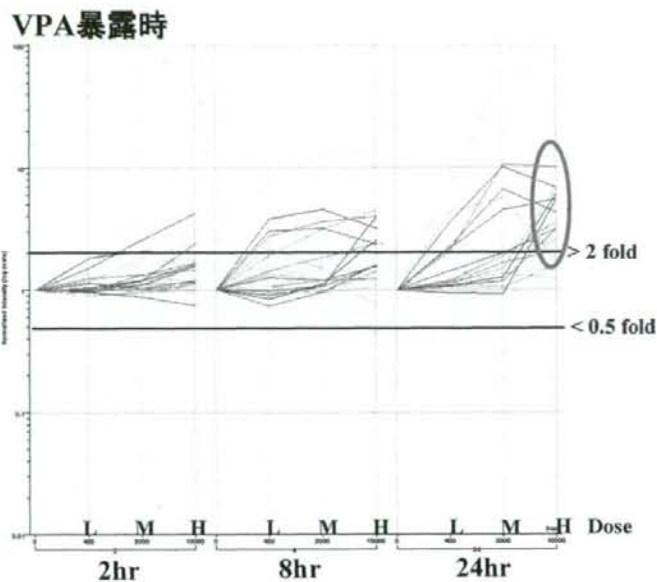
VPA暴露時変動遺伝子の脂質関連GOカテゴリのP-value

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

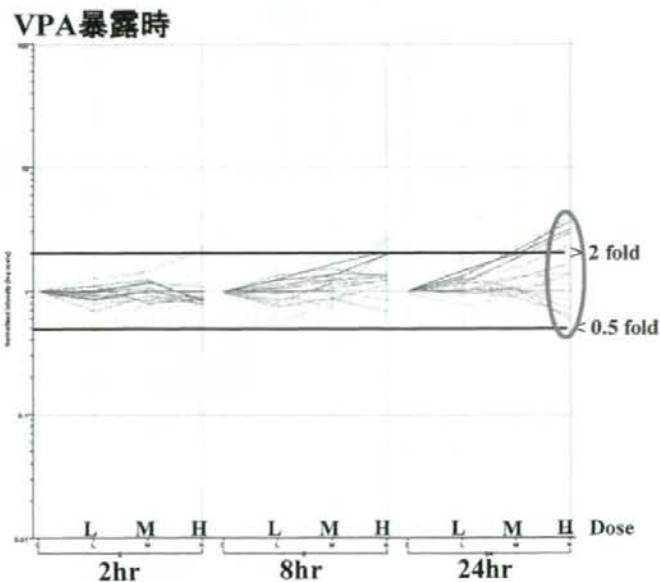
(P-value by Fisher's exact test)

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

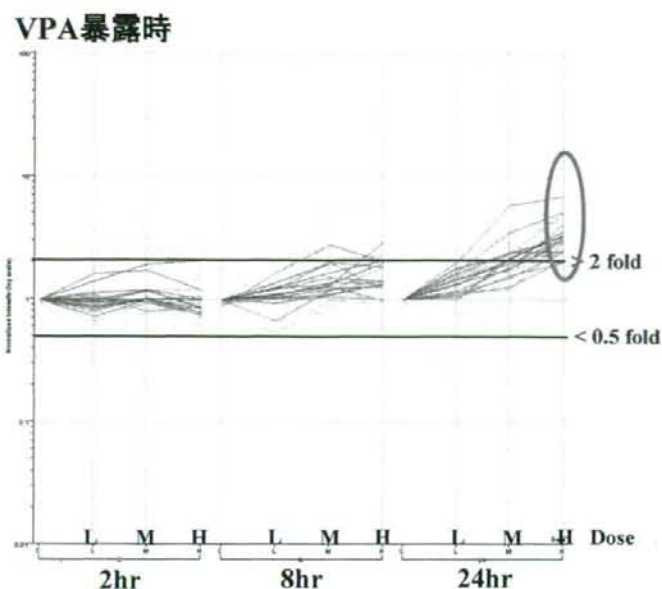


Human におけるオルソログ変換遺伝子の変動



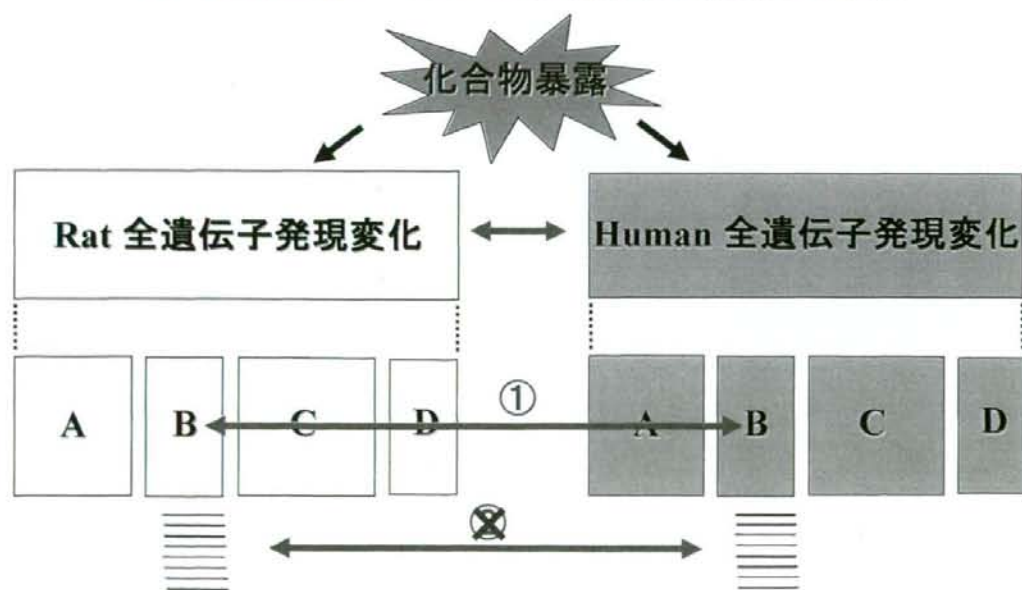
あるカテゴリに着目してオルソログ変換を行った場合でも
変動の傾向は一致していない。

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 \Leftrightarrow 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ならば可能か？

