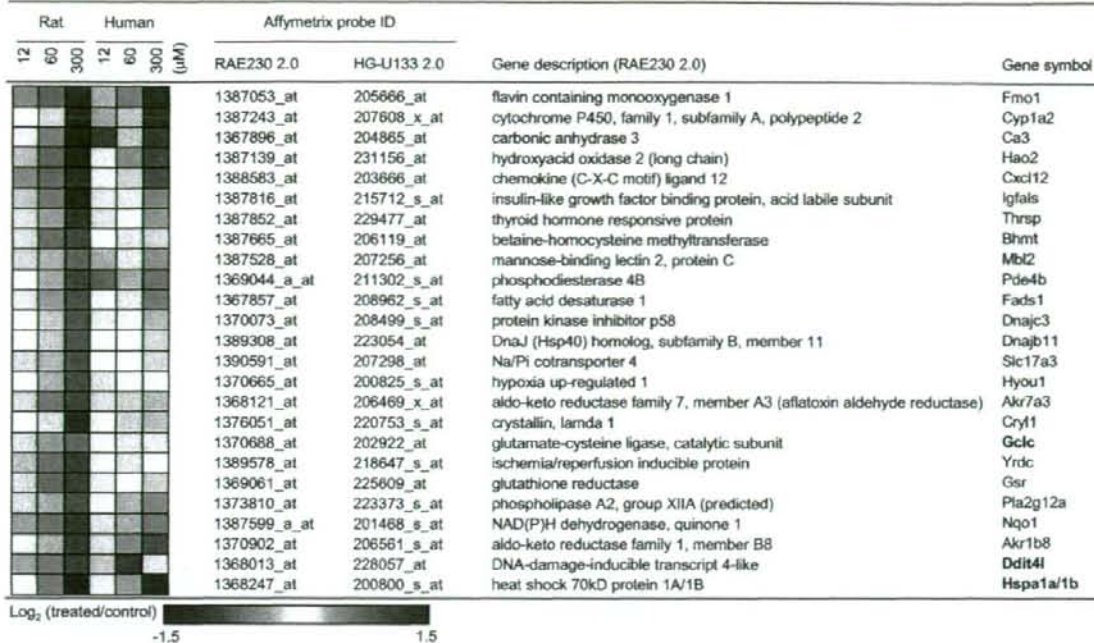
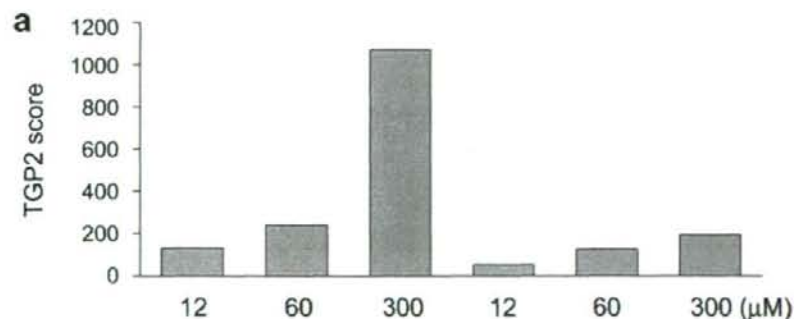


ラット⇔ヒト オルソログ変換

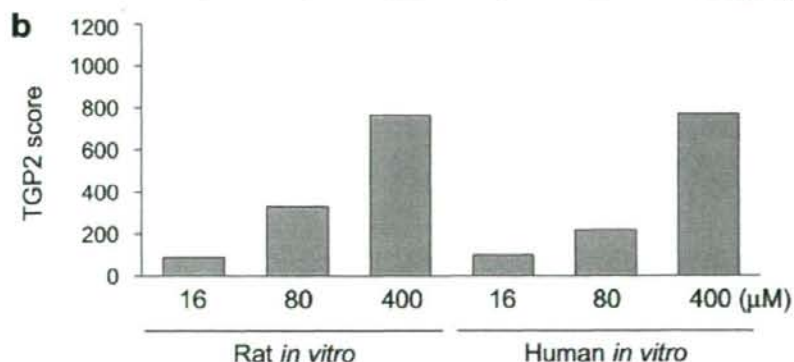


TGP2スコアを用いてスコア化

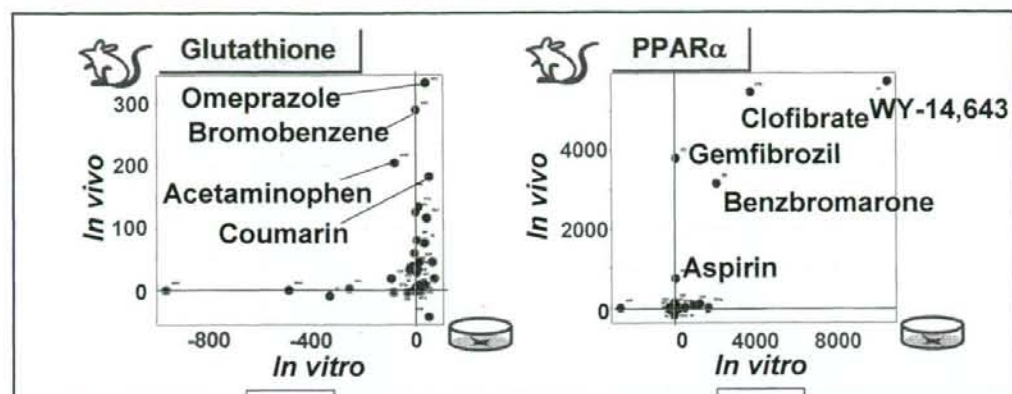
Coumarin



Diclofenac



マーカー遺伝子のin vivo - in vitro相関性



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

Kiyosawa et al., J. Toxicol. Sci. 31: 433-, 2006.

ヒトとラット:種差のブリッジングをどうするか

1. Human Cell Line...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

ヒトとラット：種差のブリッジングをどうするか

1. Human Cell Line・・・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

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

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
		2	C 2
		3	C 3
Low	300	5	C 4
			C 5
			L 1a
			L 1b
			L 1c
High	1000	5	L 2
			L 3
			L 4
			L 5
			H 1a
High	1000	5	H 1b
			H 1c
			H 2
			H 3
			H 4
High	1000	5	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

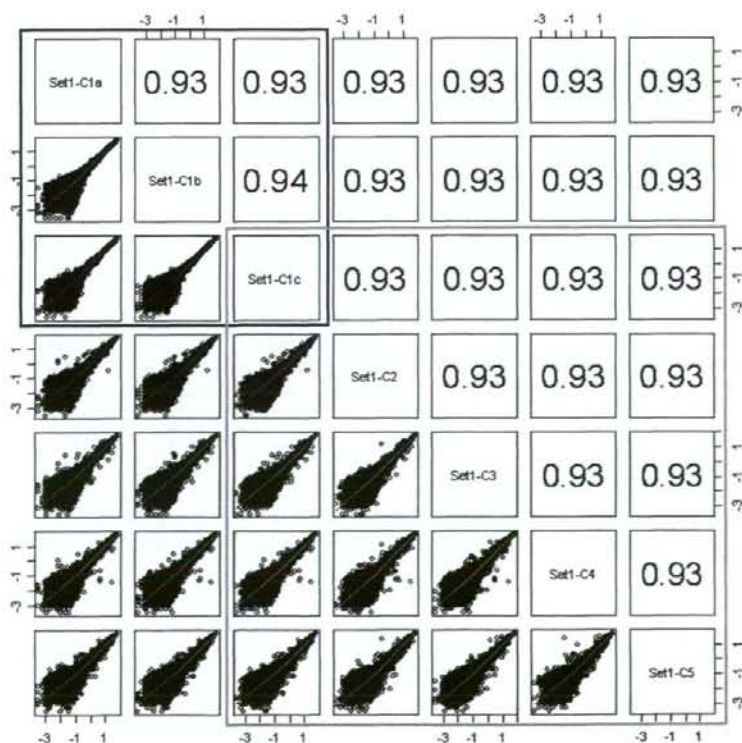
Normalization : Global mean

SET ID	SOP type	wash & stain	RNA QC	4 or 15c OD 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

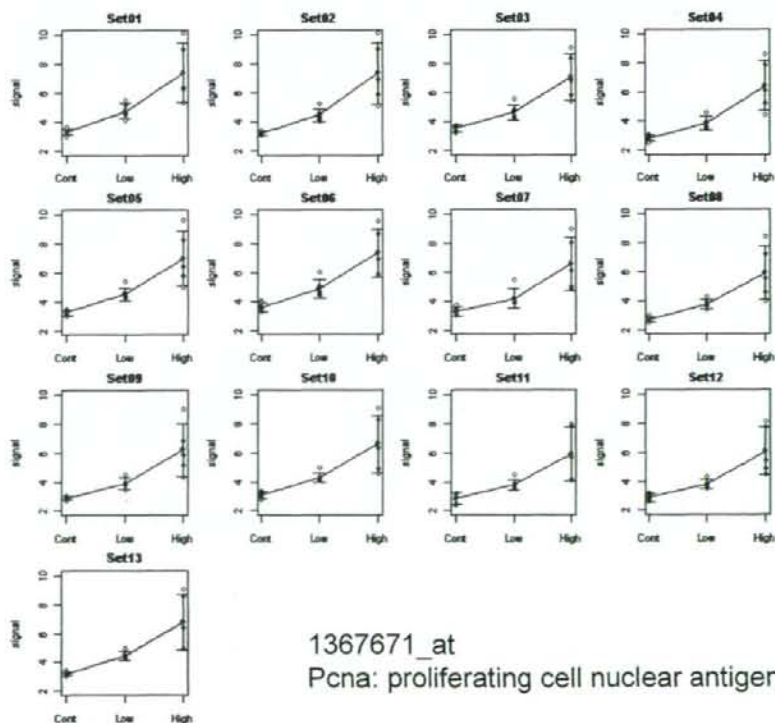
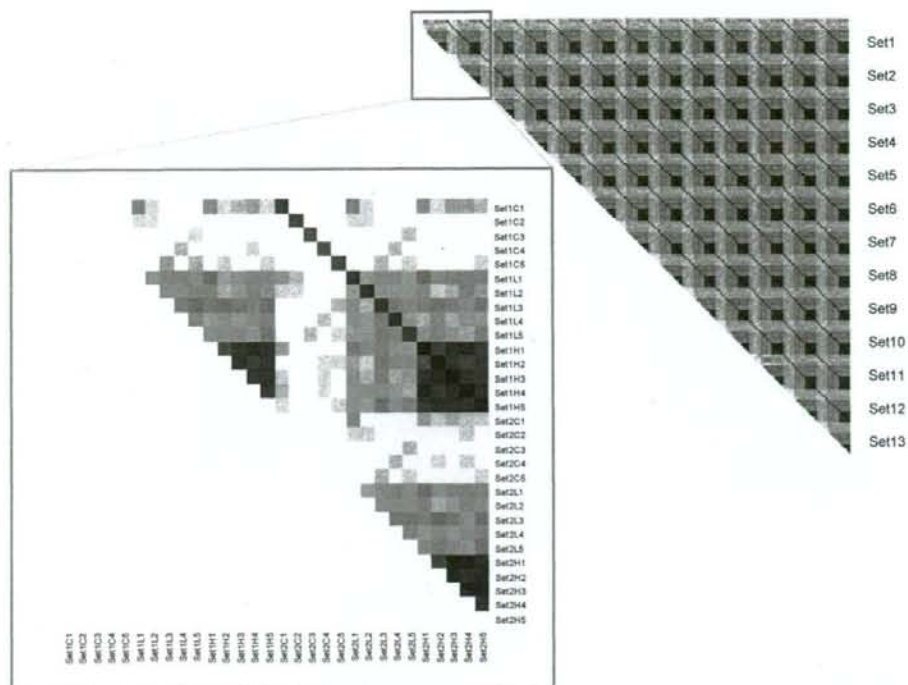
Summary of single dose animal study for samples of TGP validation stud

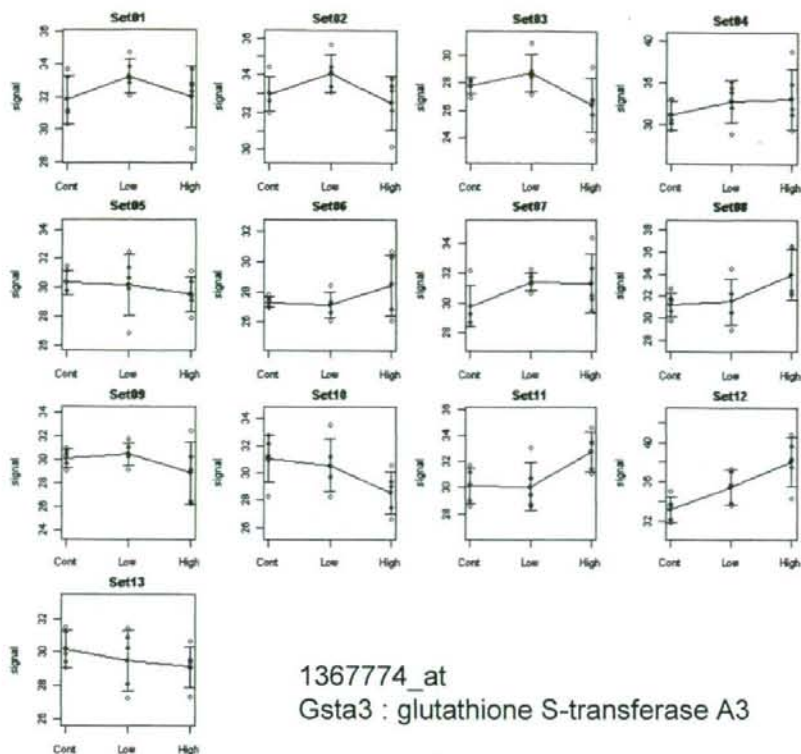
Compound		Acetaminophen		
Species, strain, initial age, sex		Rat [Cr:CD(SD)], 6 week, Male		
Dose (mg/kg)		Vehicle	300	1,000
No. of animals		5	5	5
No. of died animals		0	0	0
Clinical signs		(-)	(-)	(-)
Body weight (% of control)		(-)	(-)	(-)
Body weight gain (g)		5.9	3.8	-6.7
Food consumption (% of control)		(-)	(-)	158
Hematology (% of control)				
Ret		(-)	~83	~82
Blood chemistry (% of control)				
K		(-)	(-)	~116
IP		(-)	(-)	~124
LDH		(-)	(-)	~146
Terminal body weight (% of control)		(-)	(-)	(-)
Absolute organ weight (% of control)				
Liver		(-)	(-)	(-)
Spleen		(-)	(-)	~80
Relative organ weight (% of control)				
Liver		(-)	~108	(-)
Spleen		(-)	(-)	(-)

Histopathology (±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+: severe)			
Liver			
Change, acidophilic, Hepatocyte, Centriolobular	(-)	(-)	4/5(+)
Cellular infiltration, Centriolobular	(-)	(-)	3/5(+)
Necrosis, Hepatocyte	(-)	(-)	1/5(+), 1/5(2+)
Hypertrophy, Hepatocyte, Centriolobular	(-)	(-)	1/5(+)
Spleen			
Bone marrow	(-)	(-)	(-)
Lymph node	(-)	(-)	(-)



Inter-laboratory correlation of the log2ratio value





バリデーション試験の結論

1. TGP参加企業内では、SOPの多少の違いがあってもGeneChipデータの再現性には影響しない
2. "absent"のプローブセットを除外すると相関は非常に改良される
3. 発現データをlog2変換すると、薬物影響の施設間差はほとんどなくなる
4. TGP参加企業内では、GeneChipデータの施設間差は生物学的な変動より小さい

将来的な課題

Idiosyncrasy

- ・ Dose independent, unpredictable
- ・ 1/1,000 ~ 1/100,000

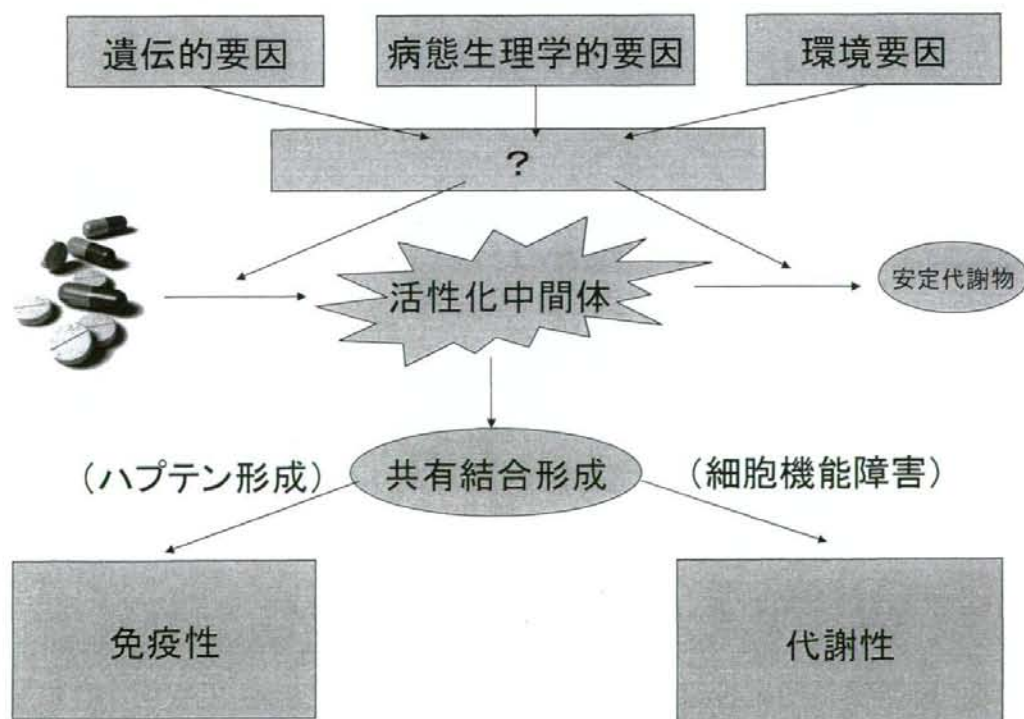
Troglitazone, isoniazid, ...

- ・ アレルギー性
adduct 形成の評価

- ・ 代謝性
Troglitazone

TIPS 22(6) 298-305, 2001

Idiosyncrasy



Perspectives in Pharmacology

Inflammation and Drug Idiosyncrasy—Is There a Connection?

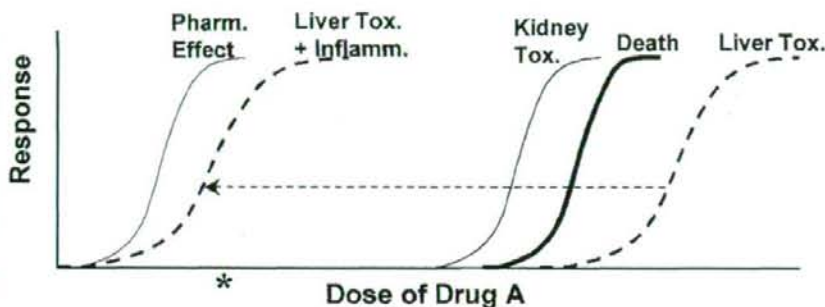
ROBERT A. ROTH, JAMES P. LUYENDYK, JANE F. MADDOX, and PATRICIA E. GANEY

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

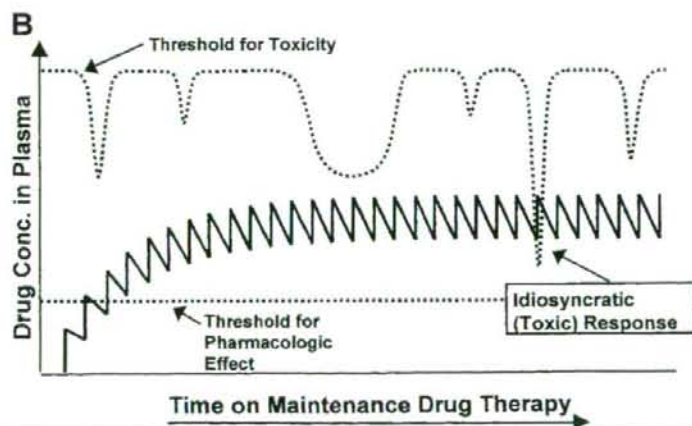
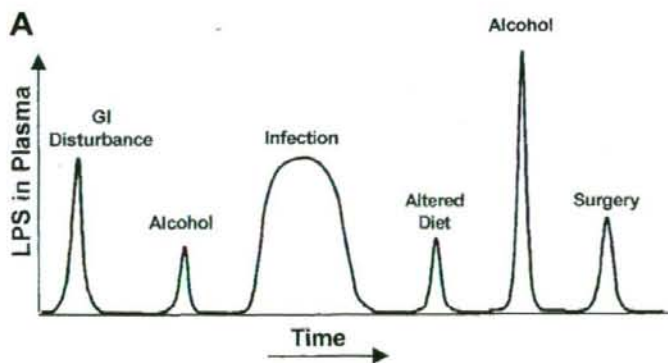
Received June 4, 2003; accepted July 1, 2003

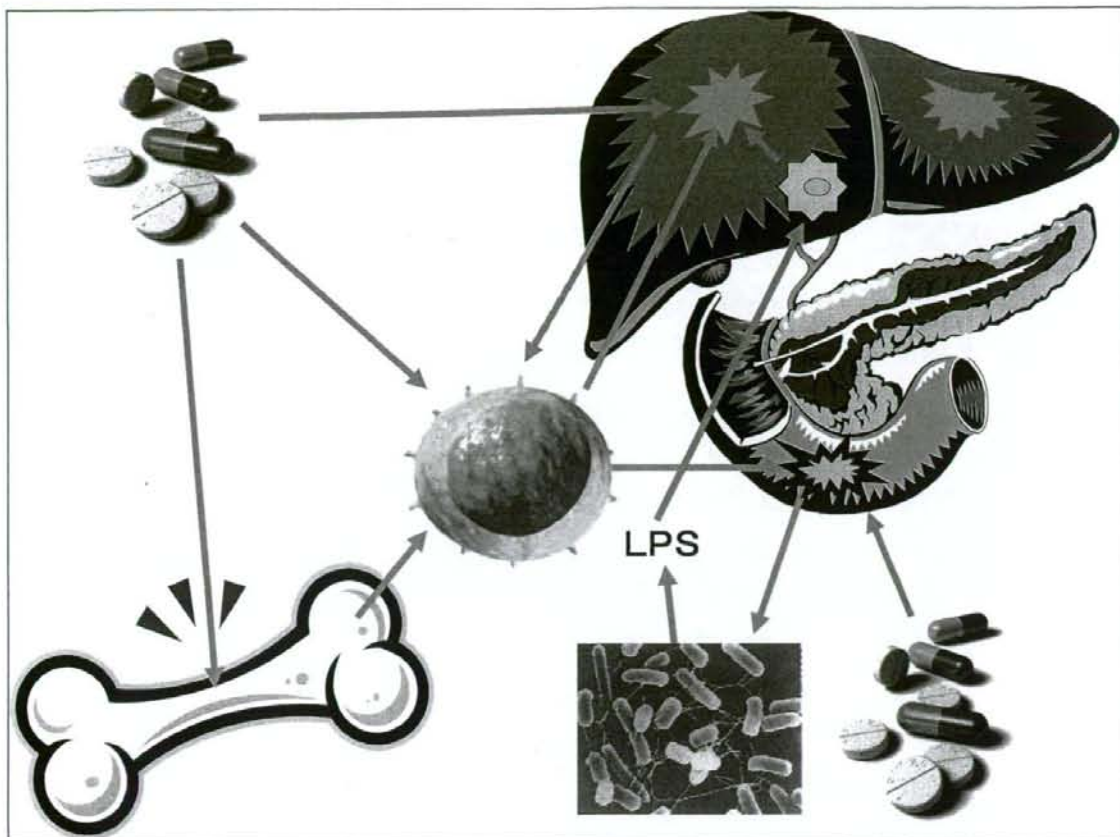
ABSTRACT

"Drug idiosyncrasy occur in a small relationship to dose target for t about mechanisms potheses that the drug metabolism p fic immune respo few drugs does cc mechanisms, how ships that charact the possibility that renders tissues pe



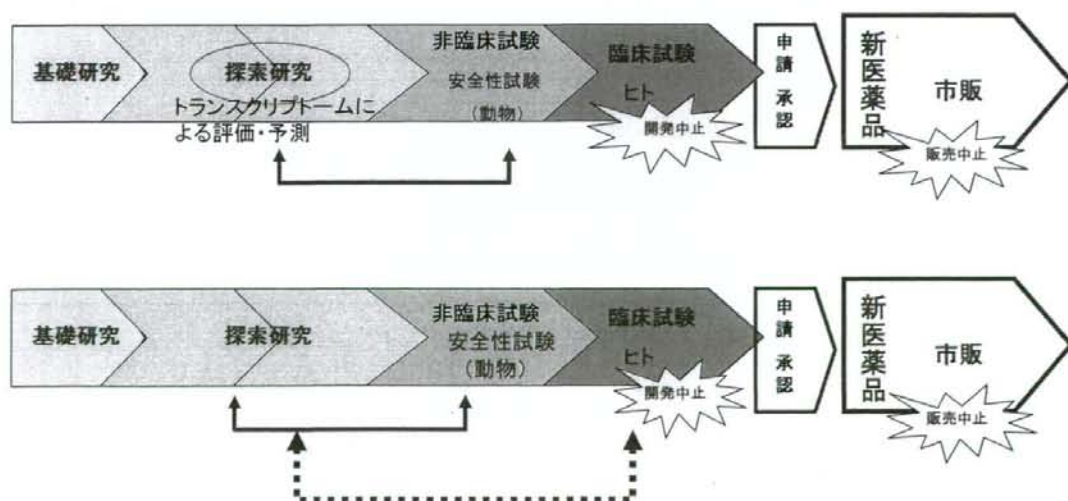
Commonplace als indicate tissue sensations have ation during toxicity and eaction that ' response). idiosyncrasy i results of ledge gaps d be widely





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)



TGP2共同研究体制

- リーダー : 大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所副所長)
- サブリーダー : 漆谷徹郎(基盤研プロジェクトリーダー、同志社女子大)
- 基盤研サブプロジェクトリーダー : 山田弘(研究部門長・知的財産総務部門長)
- 基盤研顧問 : 奥野恭史(京都大学)
- 医薬基盤研究所: 中津則之、箕輪洋介、五十嵐芳暢、高衛華
- 国立医薬品食品衛生研究所: 菅野純(研究分担者)、小野敦
- 同志社女子大学薬学部: 水川裕美子(研究分担者)
- 製薬企業13社: アステラス、エーザイ、大塚、小野、キッセイ、三和化学、塩野義、住友化学、第一三共、大日本住友、武田、田辺三菱、中外
- バイオマーカーWG: 森下克美(リーダー・大塚)、住田佳代(サブリーダー・住友)、堀之内彰(サブリーダー・武田)、清水俊敦(サブリーダー・田辺三菱)
- 血液ゲノミクスWG: 神吉将之(リーダー・アステラス)
- TG-GATEsWG: 小野敦(リーダー・国立衛研)、新田浩之(リーダー・小野)
- 研究支援部門: 小野敦、矢本敬(第一三共)、新田浩之(小野)、廣出充洋(武田)、上原健城(塩野義)、宇波明(アステラス)、柿内太(エーザイ)

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

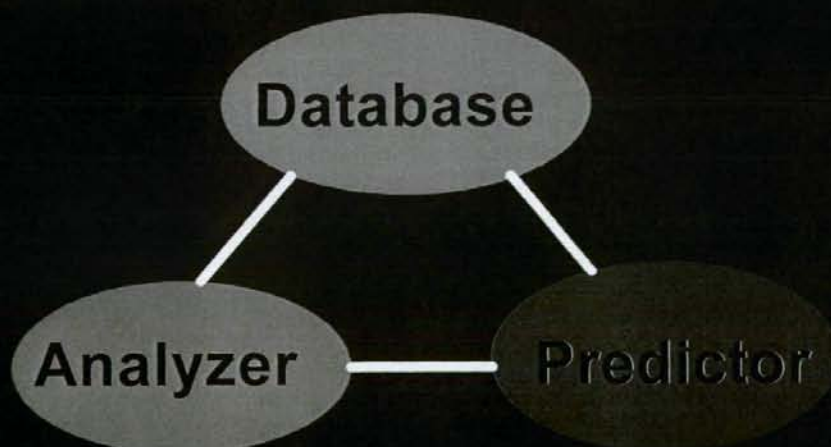
「トキシコゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく
医薬品安全性評価に関する研究」

(独)医薬基盤研究所
トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト

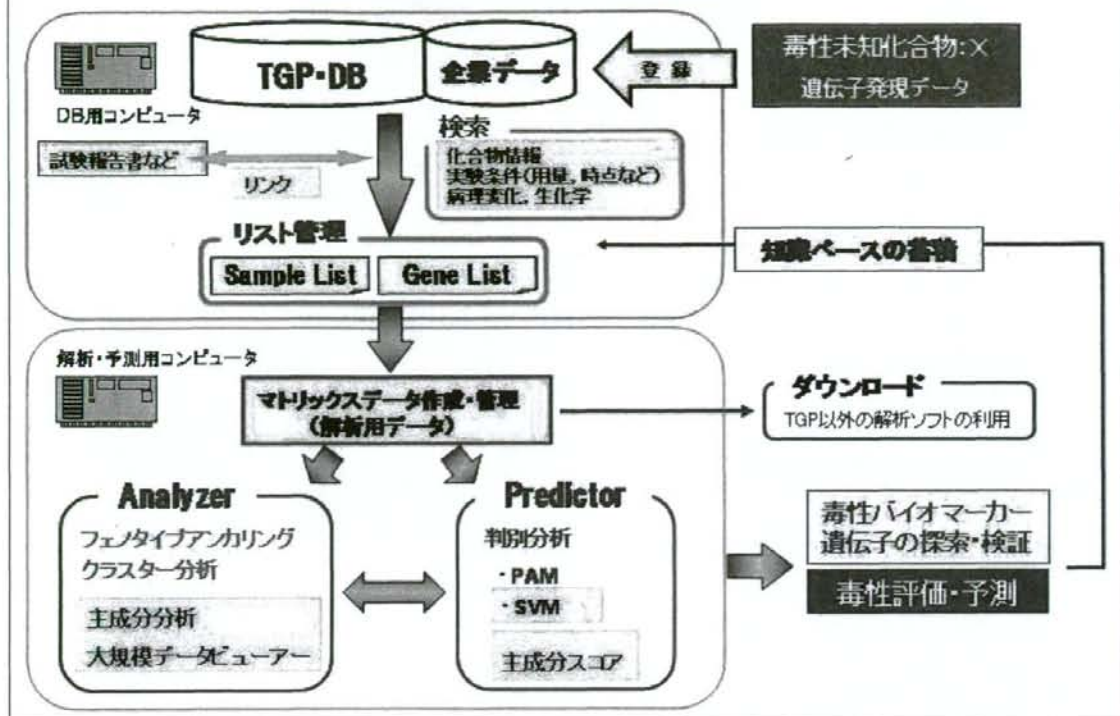
2008. 12. 19

Genomics-Assisted Toxicity Evaluation System
created by Toxicogenomics Project Japan

TG-GATEs

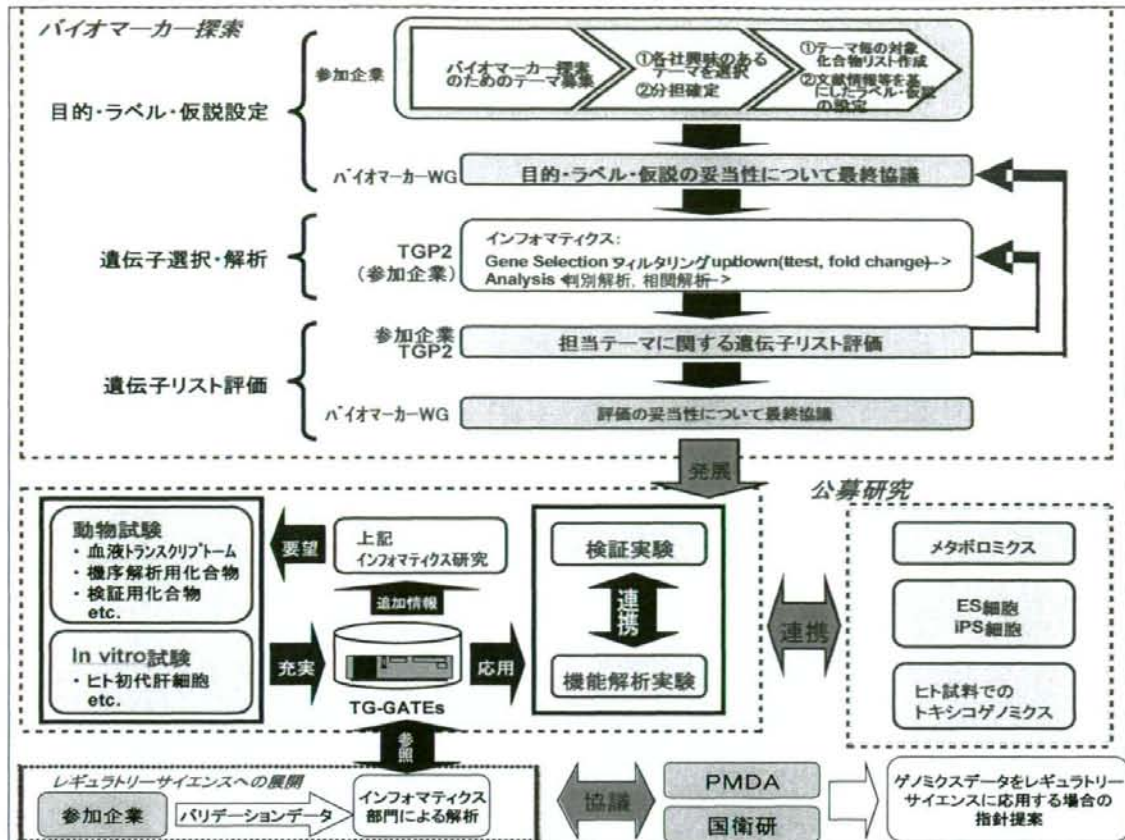


TG-GATEs



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

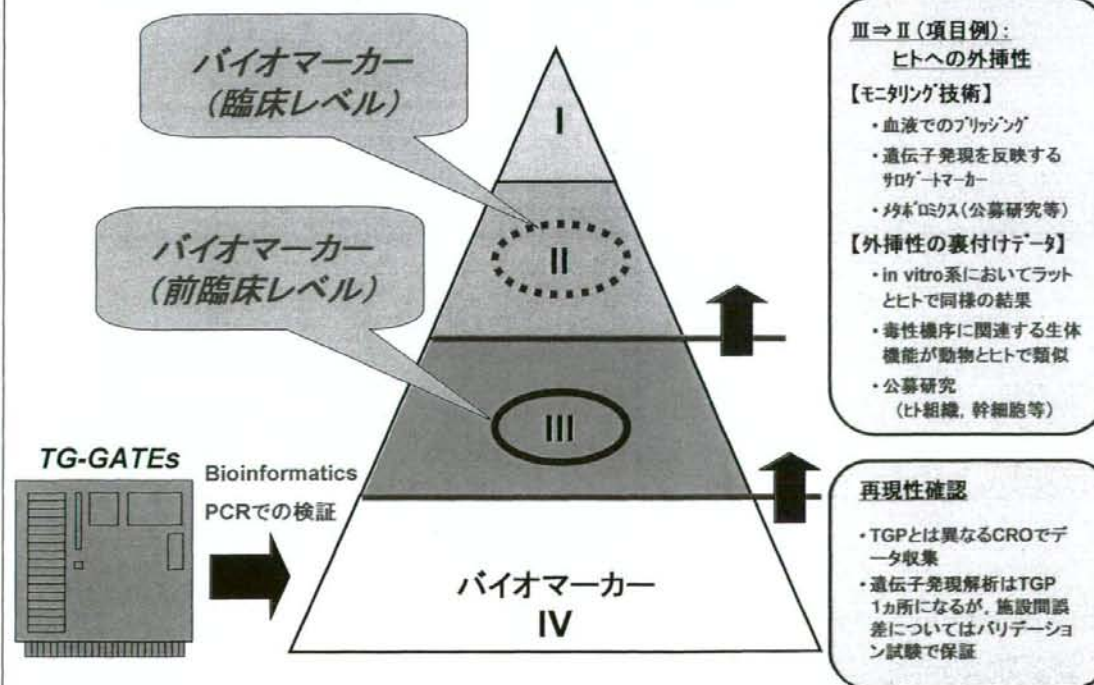
- 1) TGP1の成果(TG-GATEs)を活用してバイオマーカー候補を創出する:目標 30種
- 2) トランスクリプトームで種差の壁に挑戦する
- 3) トキシコゲノミクス手法の施設間バリデーションを行い、レギュラトリーサイエンスへの応用の基盤を整備する

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

バイオマーカー探索のためのテーマ

<病理フェノタイプ>

- 肝細胞壊死
- 再生
- 胆汁うっ滞
 - ・ 胆汁うっ滞型
 - ・ 肝原性
- 肝細胞肥大
 - ・ 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)

<分子メカニズムPathway>

- 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
- TNF α シグナル
- 細胞周期
- 特発性

<毒性発現時期>

- APR (Acute Phase Response)

<代謝物>

- 反応性代謝物

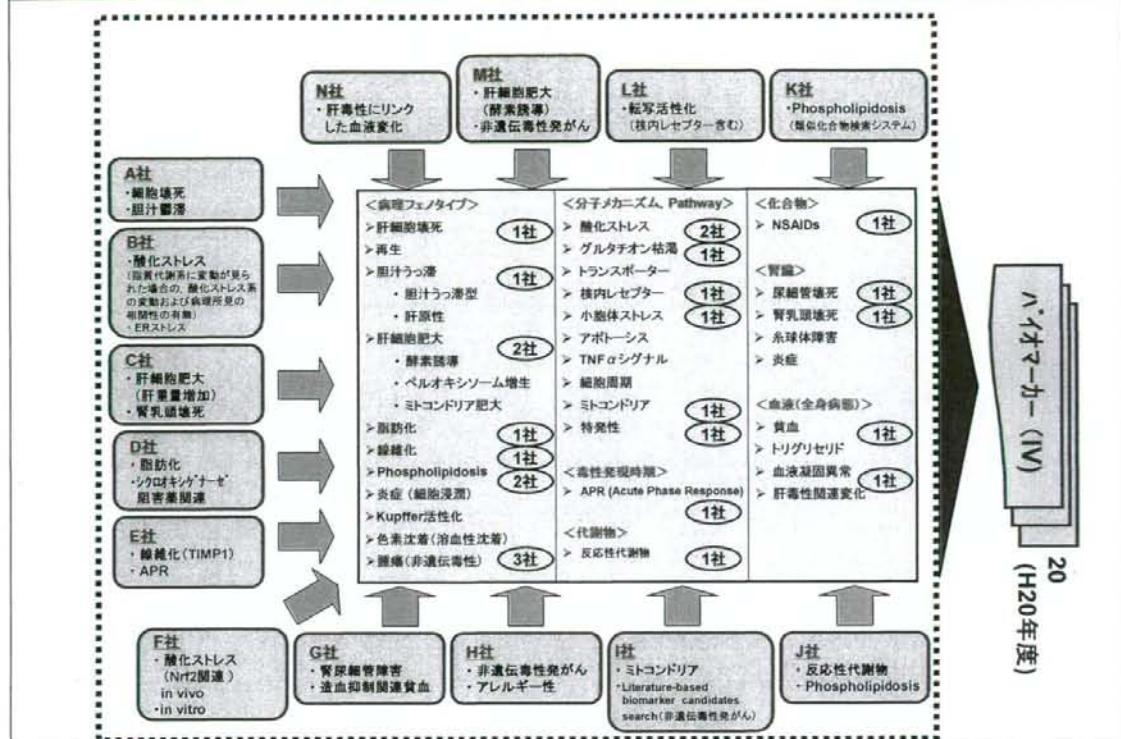
<腎臓>

- 尿細管壊死
- 腎乳頭壊死
- 糸球体障害
- 炎症

<血液(全身病態)>

- 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



バイオマーカーIV～Ⅲのリスト(2008年12月時点)

第1期テーマ

1. グルタチオン枯渇リスク x2
2. Phospholipidosis x2
3. 胆汁鬱滞 x2
4. くもり硝子変性
5. 好酸性顆粒状変性
6. 腎尿細管障害診断・・・Ⅲ
7. 腎尿細管障害予測・・・Ⅲ
8. 肝臓での貧血診断
9. 血液での貧血診断
10. 非遺伝子傷害性肝発ガン x2

14

検証中: 肝脂肪化、肝繊維化、Nrf2関与酸化ストレス、代謝酵素誘導

第2期テーマ進行中