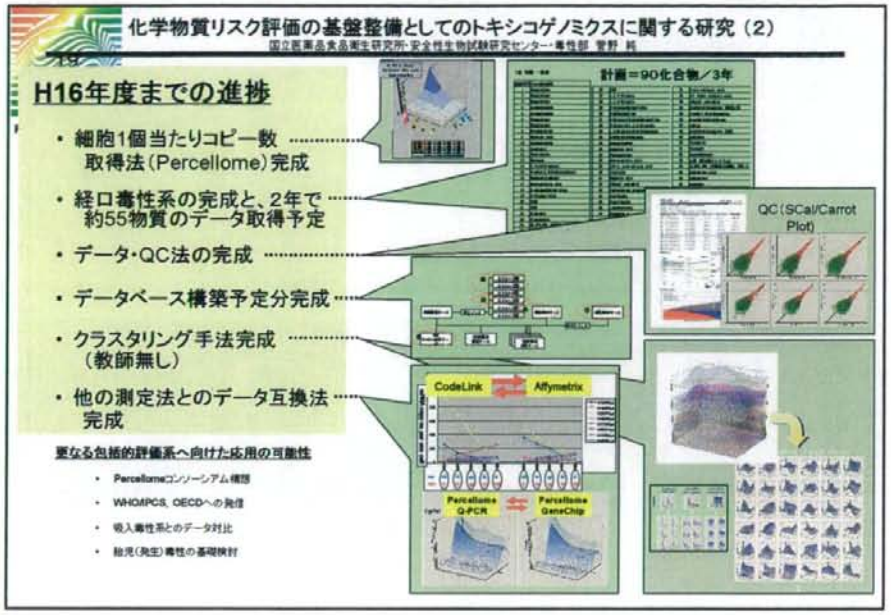
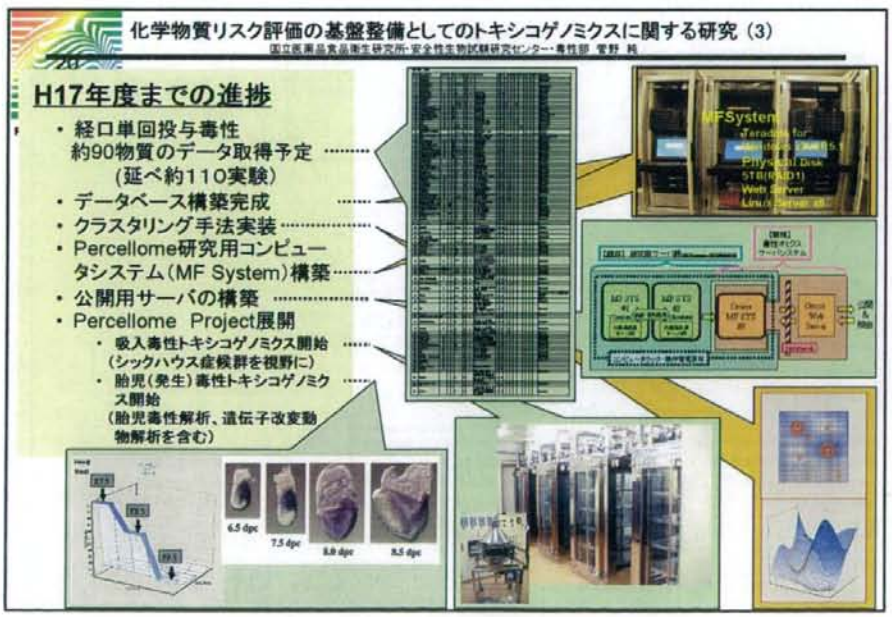

化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究（2）
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 菅野 純
H16年度までの進捗
・細胞1個当たりコピー数取得法（Percellome）完成
・経口毒性系の完成と、2年で約55物質のデータ取得予定
・データ・QC法の完成
・データベース構築予定分完成
・クラスタリング手法完成（教師無し）
・他の測定法とのデータ互換法完成
更なる包括的評価系へ向けた応用の可能性
・Percellomeコンソーシアム構想
・WHO/IPCS、OECDへの発信
・吸入毒性系とのデータ対比
・胎児（発生）毒性の基礎検討
計画＝90化合物／3年
QC（SCal/Carrot Plot）
CodeLink
Affymetrix
Percellome Q-PCR
Percellome GeneChip

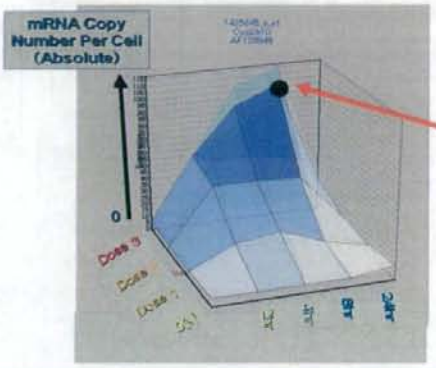

化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究（3）
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 菅野 純
H17年度までの進捗
・経口単回投与毒性約90物質のデータ取得予定（延べ約110実験）
・データベース構築完成
・クラスタリング手法実装
・Percellome研究用コンピュータシステム（MF System）構築
・公開用サーバの構築
・Percellome Project展開
・吸入毒性トキシコゲノミクス開始（シックハウス症候群を視野に）
・胎児（発生）毒性トキシコゲノミクス開始（胎児毒性解析、遺伝子改変動物解析を含む）
6.5 dpc
7.5 dpc
8.0 dpc
8.5 dpc

21

Percellome Project

Millefeuille data (MF surface data)

All groups can be plotted to a single 3D graph with Z-axis as "copy number per cell"



One chemical data is made of 4x4x3=48 animals

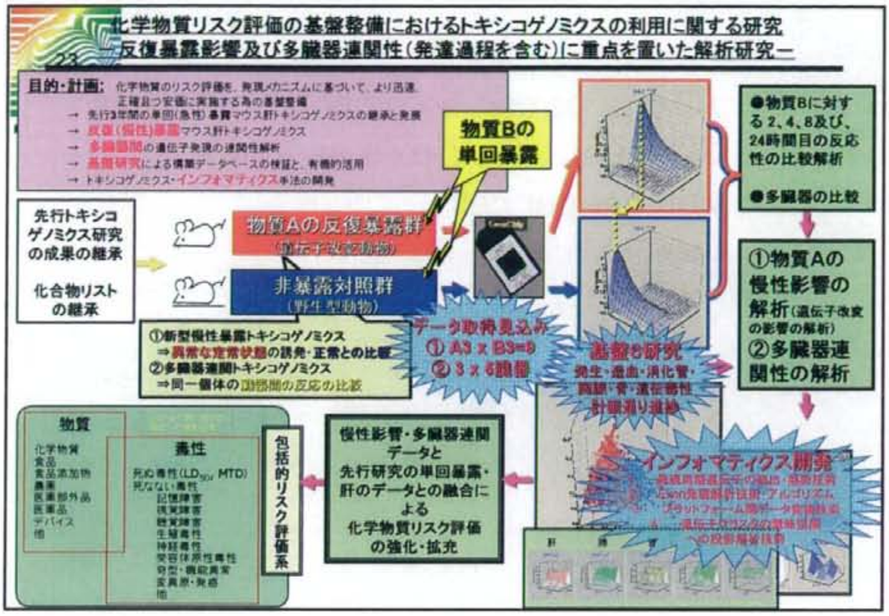
Triplicate per point (three GeneChips) Mean ±SD

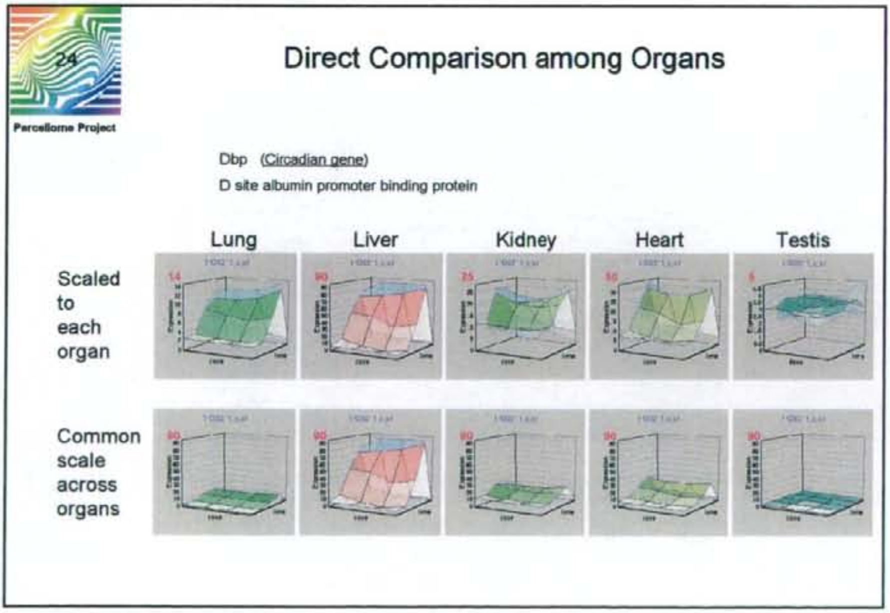
22

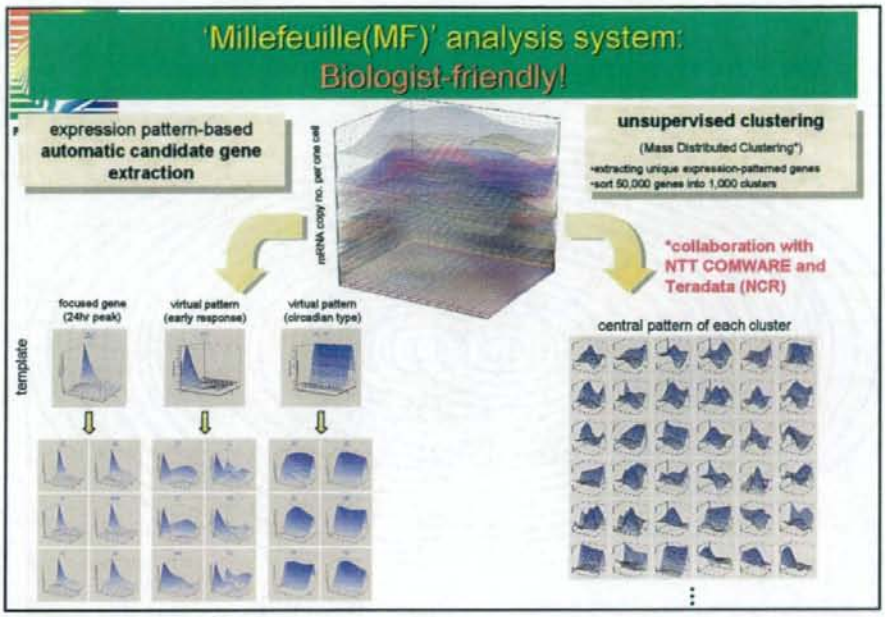
Percellome Project

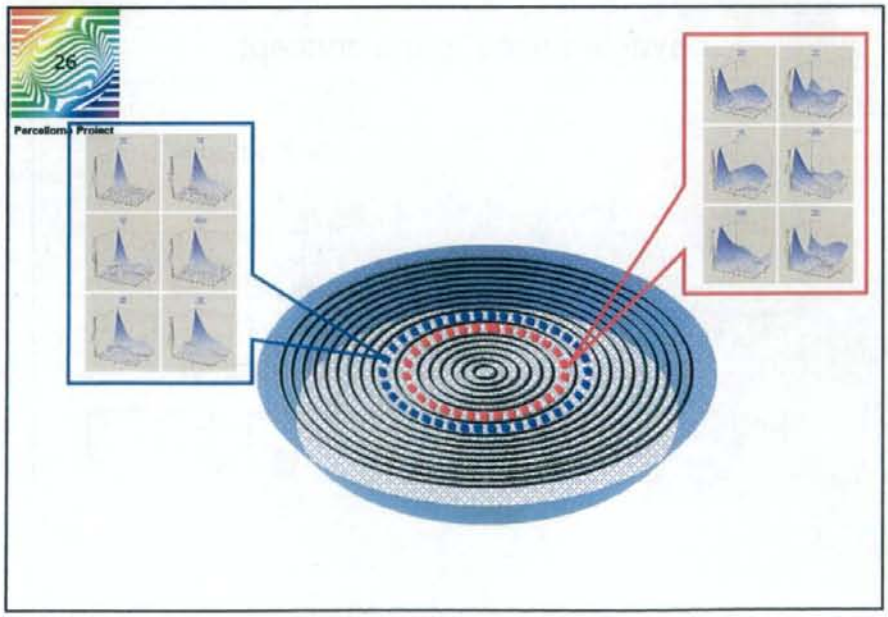
Data base Chemicals: Category classification (2006.3)

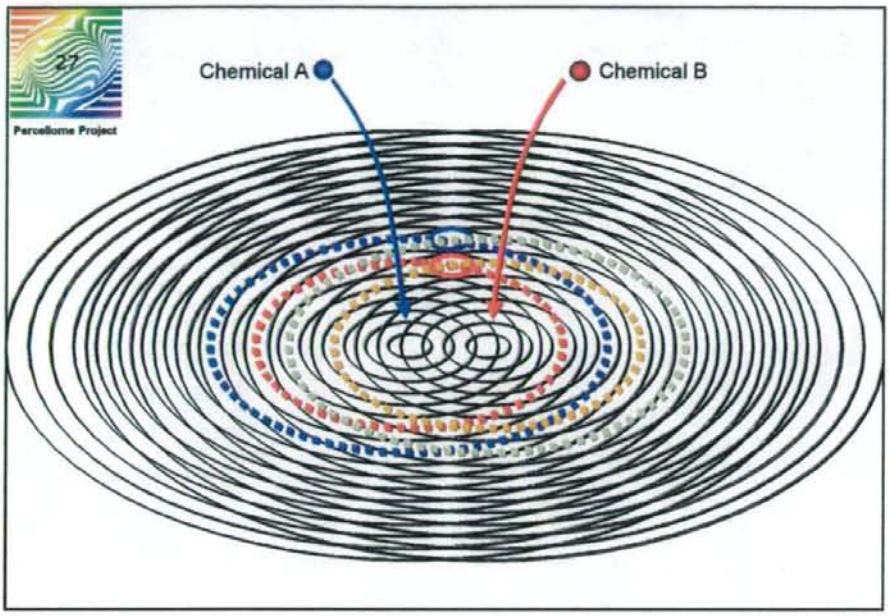
Medicine	Isoniazid	Chemicals related to Chemical Substances Control Law in Japan	2,4-dinitrophenol
	Cisplatin		4-amino-2,6-dichlorophenol
	(Tranxplatin)		Pentachlorophenol
	Acetaminophen		2-Aminoaminethylpyridine
	Aspirin		3-Vinylpyridine
	Ibuprofen		1,2,3-Triazole
	Dexamethasone		1,2,4-Triazole
	Omeprazole		3-Amino-1H-1,2,4-triazole
	Phenobarbital		N,N-dimethylaniline
	Valproic Acid		2-Chloro-4,6-dimethylaniline
	Thalidomide		1,2-Dichloro-3-nitrobenzene
	Sodium arsenite ($NaAsO_2$)		4-Ethylnitrobenzene
	Diethylstilbestrol		
	Tamoxifen	Industrial chemicals	Toluene
	Paclitaxel (Taxol)		Bromobenzene
	Phenytoin		Carbon tetrachloride
	Rifampicin		Methanol
	PCN		DMSO
	AraC		Tributyltin
			Bisphenol A
Agricultural chemicals	Paraquat		MEHP
	Methoprene		DEHP
	Pyriproxyfen		Fullerene
	Tebufenozide		Indigo
	Acephate		
	Carbaryl	DNA demethylating drugs	Azacytidine
	Warfarin		
	Fenvalerate		
	Deet	Inhalational toxic chemicals	Formaldehyde
			Acetaldehyde
Food-derived chemicals	Citric acid		
	Hydroxycitric Acid	Agonists on nuclear receptor	Ethynyl estradiol
	Forskolin		Testosterone propionate
	Caffeine		Clofibrate
	Monocrotaline		Troglitazone
	Ethanol		Levothyroxine
	Coenzyme Q10		All trans retinoic acid
	Genistein		9-cis retinoic acid
	Genistin		Methoprene acid
	Daidzin		TCDD
			TCDF
Mutagen	Diethylnitrosamine		3-methylcholanthrene
	N-ethyl-N-nitrosourea		

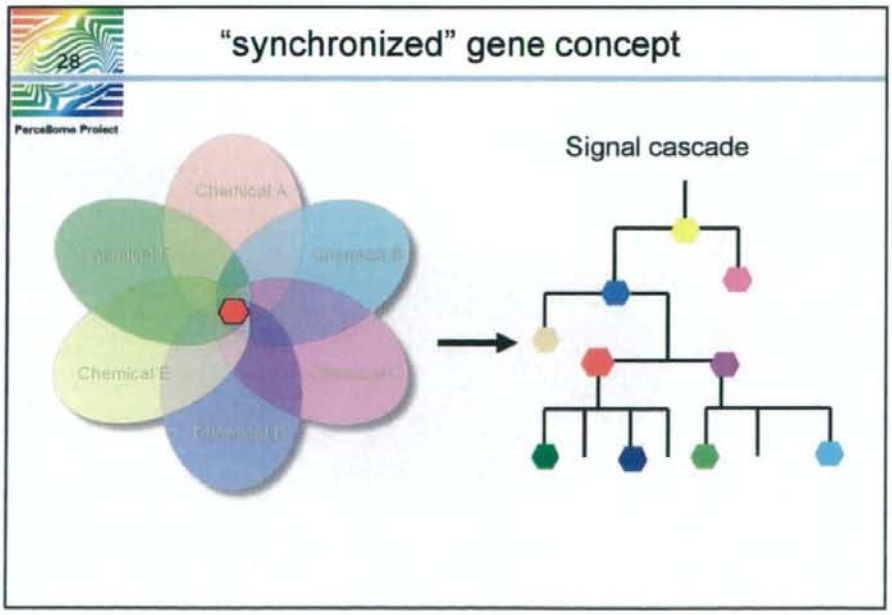

23
化学物質リスク評価の基盤整備におけるトキシコゲノミクスの利用に関する研究
ー反復暴露影響及び多臓器連関性（発達過程を含む）に重点を置いた解析研究ー
目的・計画:
物質Bの
単回暴露
先行トキシコゲノミクス研究の成果の継承
化合物リストの継承
物質Aの反復暴露群
非暴露対照群
（野生型動物）
①新型慢性暴露トキシコゲノミクス
②多臓器連関トキシコゲノミクス
●物質Bに対する2、4、8及び、24時間目の反応性の比較解析
●多臓器の比較
①物質Aの慢性影響の解析（遺伝子改変の影響の解析）
②多臓器連関性の解析
インフォマティクス開発
物質
化学物質
食品
食品添加物
農薬
医薬部外品
医薬品
デバイス
他
毒性
死ぬ毒性(LD50, MTD)
死なない毒性
他
包括的リスク評価系
慢性影響・多臓器連関データと先行研究の単回暴露・肝のデータとの融合による化学物質リスク評価の強化・拡充

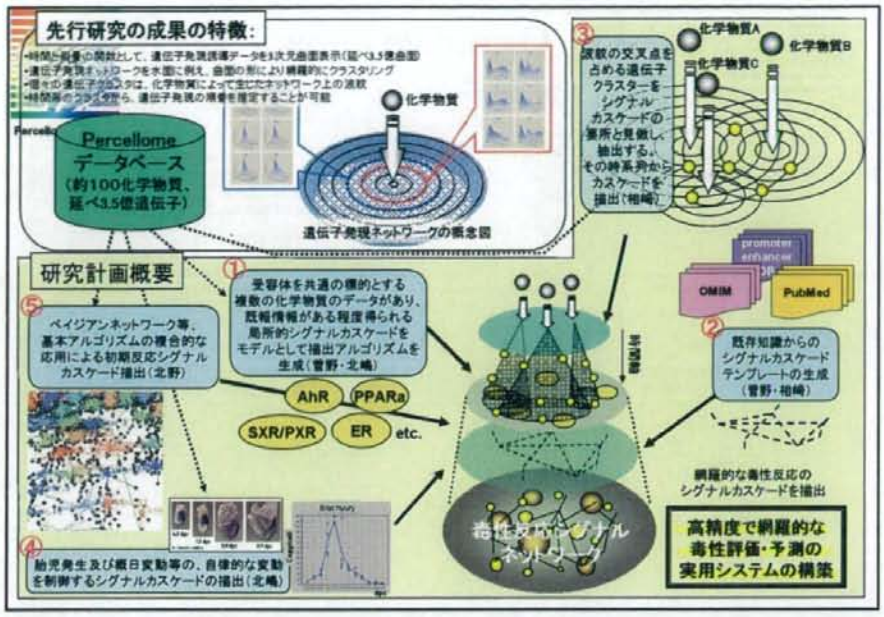

24
Percellome Project
Direct Comparison among Organs
Dbp (Circadian gene)
D site albumin promoter binding protein
Lung
Liver
Kidney
Heart
Testis
Scaled to each organ
Common scale across organs

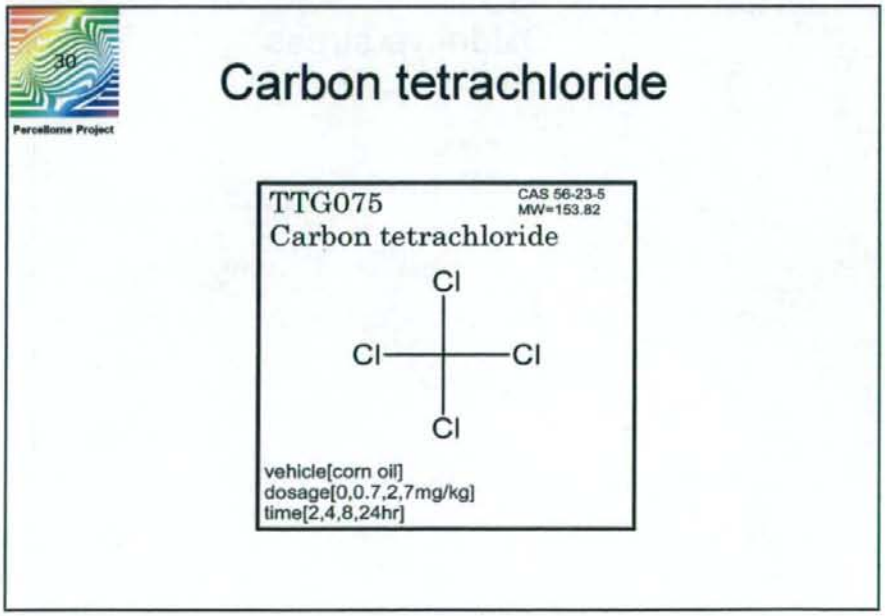

'Millefeuille(MF)' analysis system:
Biologist-friendly!
expression pattern-based
automatic candidate gene
extraction
mRNA copy no. per one cell
unsupervised clustering
(Mass Distributed Clustering*)
•extracting unique expression-patterned genes
•sort 50,000 genes into 1,000 clusters
*collaboration with
NTT COMWARE and
Teradata (NCR)
focused gene
(24hr peak)
virtual pattern
(early response)
virtual pattern
(circadian type)
template
central pattern of each cluster

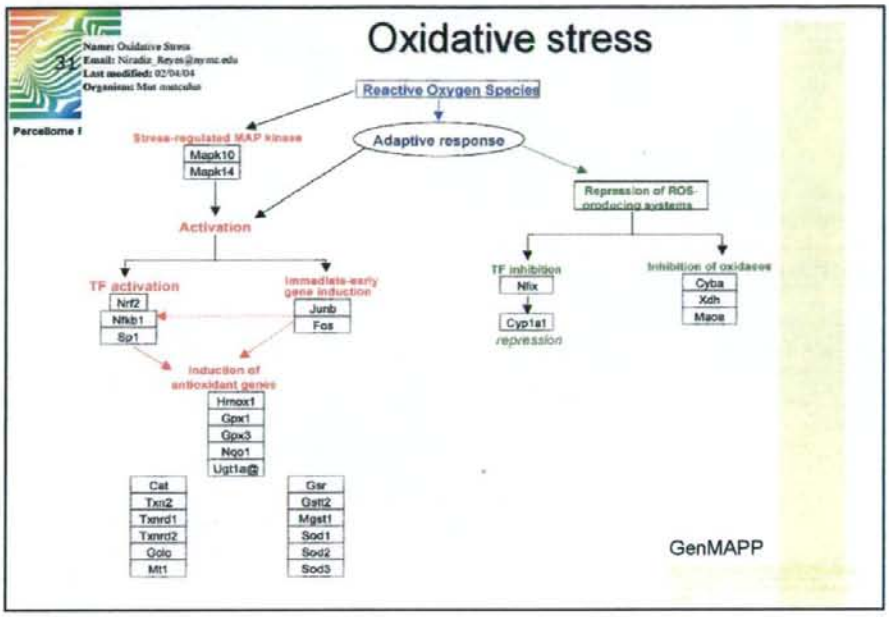

26
Percellome Project

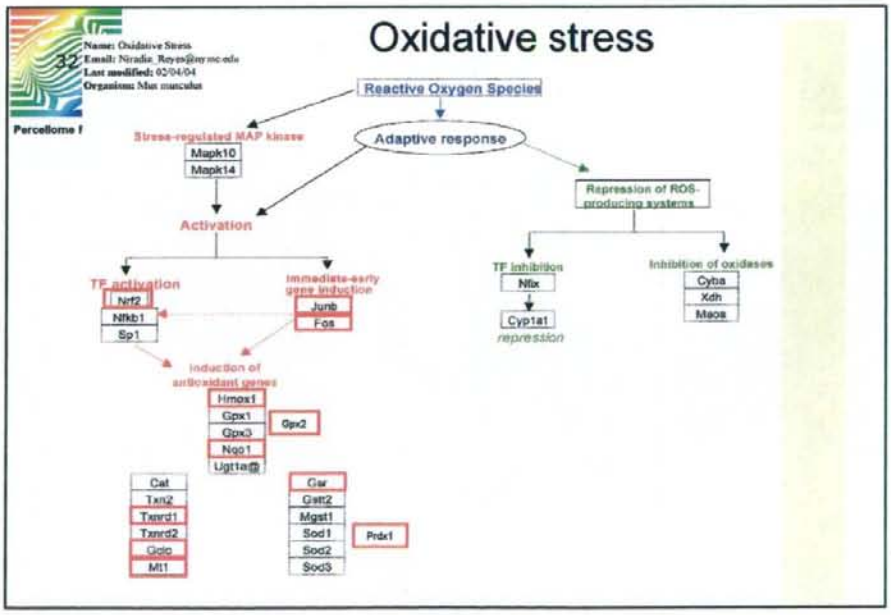

27
PerceBome Project
Chemical A
Chemical B

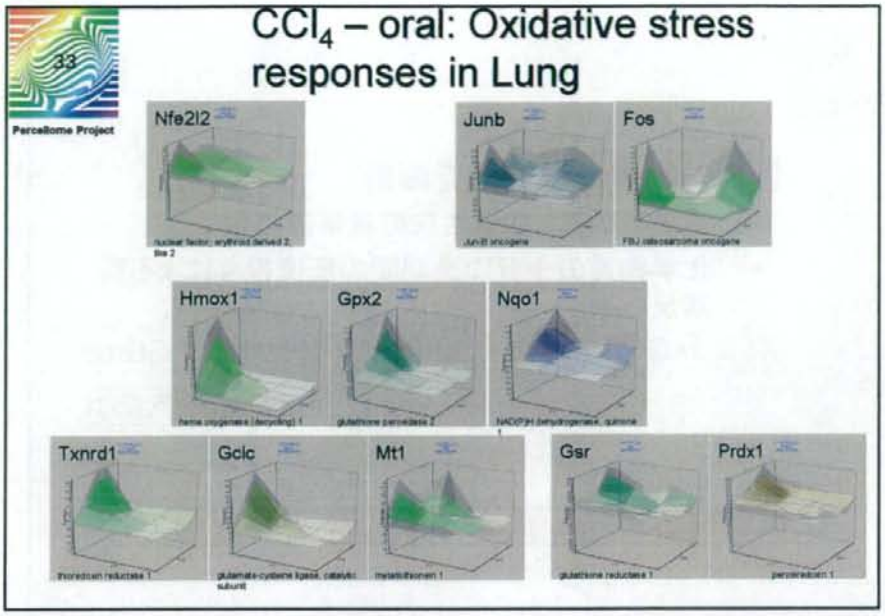

28
PerceBome Project
"synchronized" gene concept
Signal cascade
Chemical A
Chemical E

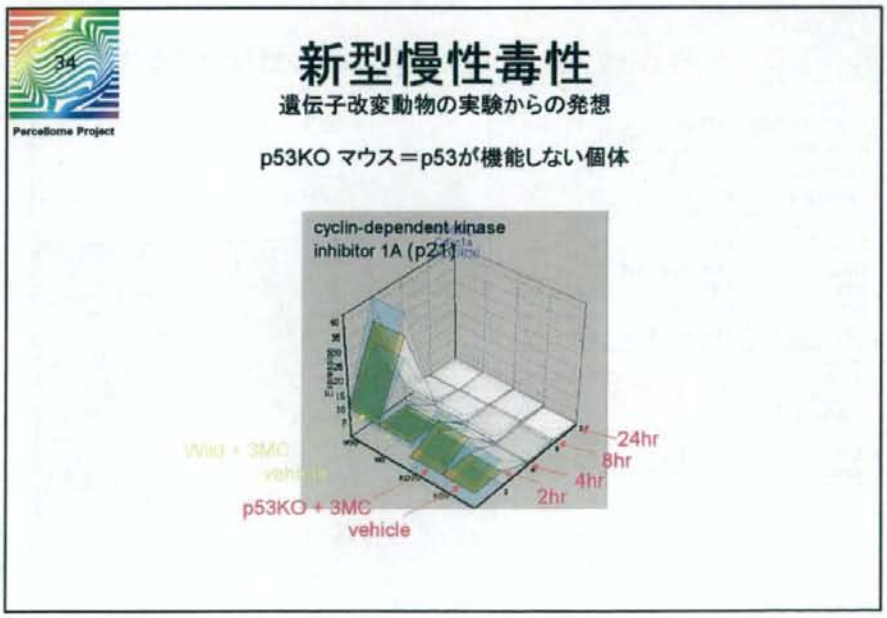

先行研究の成果の特徴:
Percellome
データベース
(約100化学物質、
延べ3.5億遺伝子)
化学物質
遺伝子発現ネットワークの概念図
化学物質A
化学物質B
化学物質C
研究計画概要
受容体を共通の標的とする
複数の化学物質のデータがあり、
既報情報がある程度得られる
局所的シグナルカスケードを
モデルとして抽出アルゴリズムを
生成(菅野・北嶋)
AhR
PPARa
SXR/PXR
ER
etc.
ベイジアンネットワーク等、
基本アルゴリズムの複合的な
応用による初期反応シグナル
カスケード抽出(北野)
既存知識からの
シグナルカスケード
テンプレートの生成
(菅野・柚崎)
OMIM
PubMed
網羅的な毒性反応の
シグナルカスケードを抽出
高精度で網羅的な
毒性評価・予測の
実用システムの構築

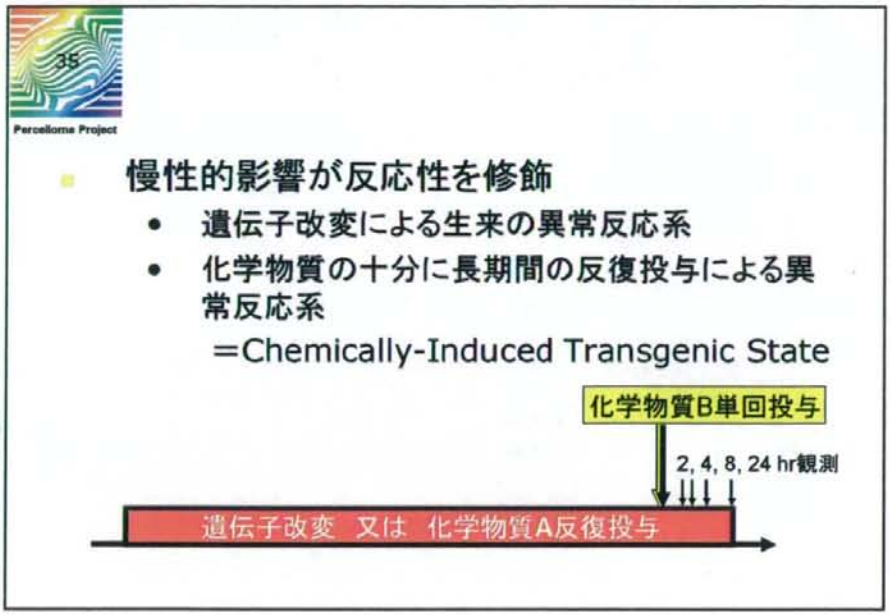

30
Percellome Project
Carbon tetrachloride
TTG075
CAS 56-23-5
MW=153.82
Carbon tetrachloride
Cl
Cl
Cl
Cl
vehicle[corn oil]
dosage[0,0.7,2,7mg/kg]
time[2,4,8,24hr]

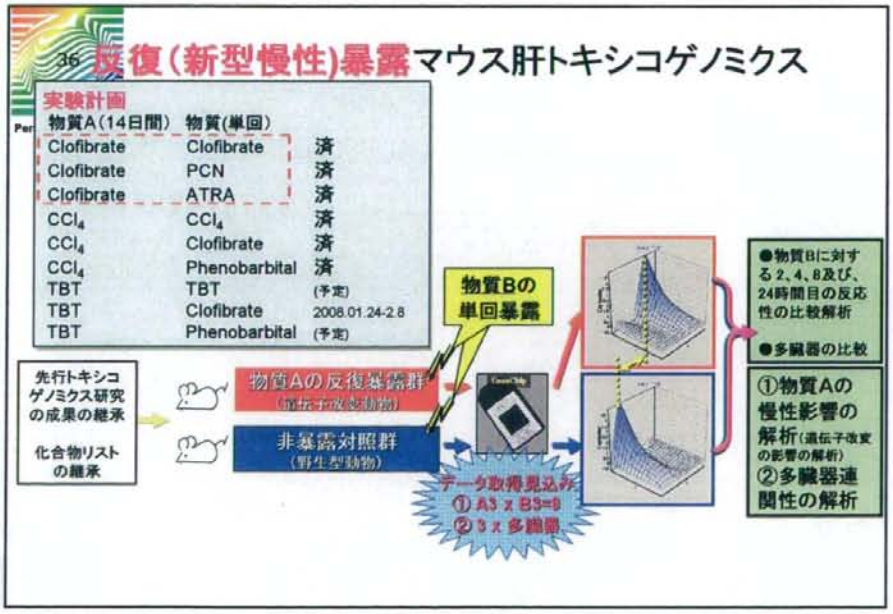

Name: Oxidative Stress
Email: Niradiz_Reyes@nymc.edu
Last modified: 02/04/04
Organism: Mus musculus
Percellome I
31
Oxidative stress
Reactive Oxygen Species
Adaptive response
Stress-regulated MAP kinase
Mapk10
Mapk14
Repression of ROS-producing systems
Activation
TF activation
Nrf2
Nfkb1
Sp1
Immediate-early gene induction
Junb
Fos
TF inhibition
Nfix
Cyp1a1
repression
Inhibition of oxidases
Cyba
Xdh
Maoa
Induction of antioxidant genes
Hmox1
Gpx1
Gpx3
Nqo1
Ugt1a6
Cat
Txn2
Txnrd1
Txnrd2
Glo1
Mt1
Gsr
Gstt2
Mgst1
Sod1
Sod2
Sod3
GenMAPP


Name: Oxidative Stress
Email: Niradiz_Reyes@nymc.edu
Last modified: 02/04/04
Organism: Mus musculus
Percellome I
32
Oxidative stress
Reactive Oxygen Species
Adaptive response
Stress-regulated MAP kinase
Mapk10
Mapk14
Repression of ROS-producing systems
Activation
TF activation
Nrf2
Nfkb1
Sp1
Immediate-early gene induction
Junb
Fos
TF inhibition
Nfix
Cyp1a1
repression
Inhibition of oxidases
Cyba
Xdh
Maoa
Induction of antioxidant genes
Hmox1
Gpx1
Gpx3
Nqo1
Ugt1a6
Gpx2
Cat
Txn2
Txnrd1
Txnrd2
Glo1
Mt1
Gsr
Gstt2
Mgst1
Sod1
Sod2
Sod3
Prdx1


33
Percellome Project
CCl_4 – oral: Oxidative stress responses in Lung
Nfe2l2
Junb
Fos
Hmox1
Gpx2
Nqo1
Txnrd1
Gclc
Mt1
Gsr
Prdx1


34
Percellome Project
新型慢性毒性
遺伝子改変動物の実験からの発想
p53KO マウス＝p53が機能しない個体
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)
Wild + 3MC vehicle
p53KO + 3MC vehicle
24hr
8hr
4hr
2hr


35
Percellome Project
慢性的影響が反応性を修飾
遺伝子改変による生来の異常反応系
化学物質の十分に長期間の反復投与による異常反応系
=Chemically-Induced Transgenic State
化学物質B単回投与
2, 4, 8, 24 hr観測
遺伝子改変 又は 化学物質A反復投与


36
反復(新型慢性)暴露マウス肝トキシコゲノミクス
実験計画
物質A(14日間) 物質(単回)
Clofibrate Clofibrate 済
Clofibrate PCN 済
Clofibrate ATRA 済
CCl4 CCl4 済
CCl4 Clofibrate 済
CCl4 Phenobarbital 済
TBT TBT (予定)
TBT Clofibrate 2008.01.24-2.8
TBT Phenobarbital (予定)
物質Bの単回暴露
先行トキシコゲノミクス研究の成果の継承
化合物リストの継承
物質Aの反復暴露群
非暴露対照群
(野生型動物)
データ取得見込み
①A3 x B3=9
②3 x 多臓器
●物質Bに対する2、4、8及び、24時間目の反応性の比較解析
●多臓器の比較
①物質Aの慢性影響の解析(遺伝子改変の影響の解析)
②多臓器連関性の解析

Lung Percellome by Inhalation and Oral gavage

Exposure experiments by Drs. K.Nagano (Bioassay), K.Tsujimura (CERI) and Y. Ogawa (NIHS)

Chemicals tested for Lung Transcriptome in Percellome Project


Formaldehyde


Acetaldehyde

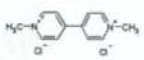

Benzene


Bromobenzene


Toluene

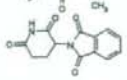

Xylene

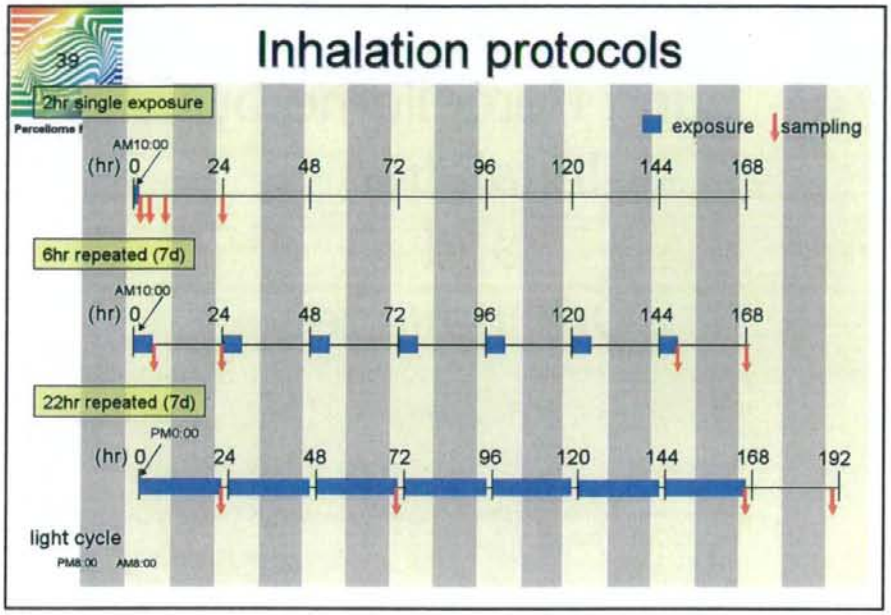

Carbon tetrachloride

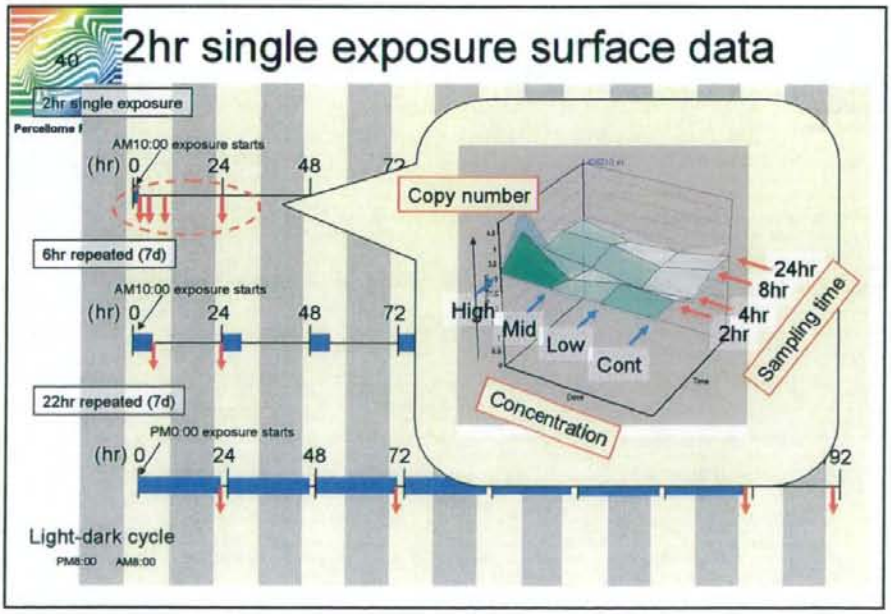

Paraquat

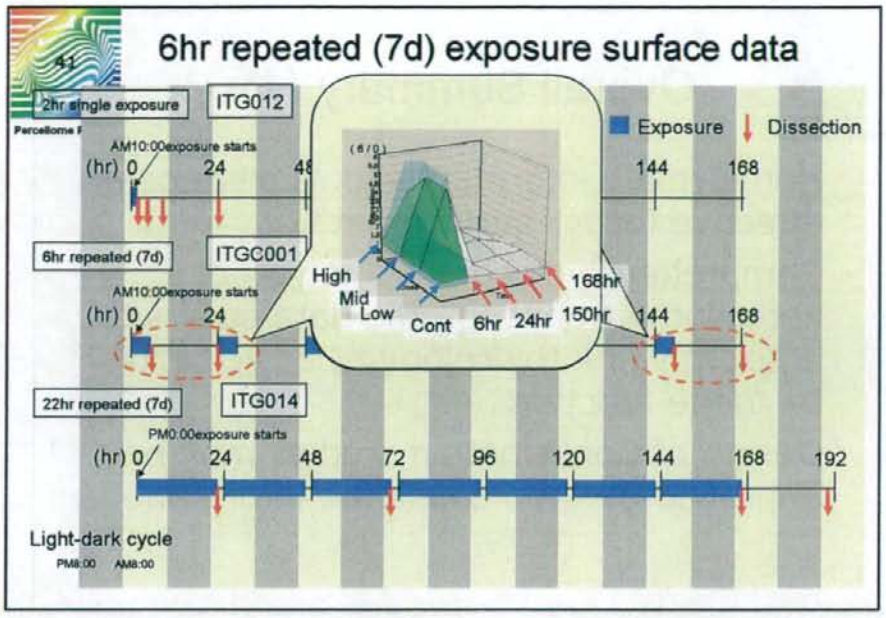

Monocrotaline

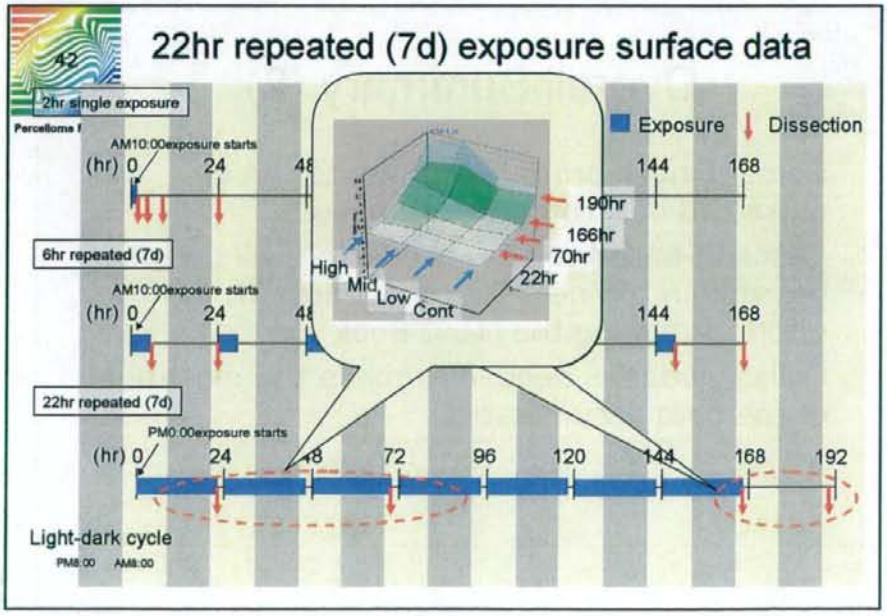

Caffeine


Thalidomide


Inhalation protocols
2hr single exposure
exposure
sampling
AM10:00
(hr) 0
24
48
72
96
120
144
168
6hr repeated (7d)
AM10:00
(hr) 0
24
48
72
96
120
144
168
22hr repeated (7d)
PM0:00
(hr) 0
24
48
72
96
120
144
168
192
light cycle
PM8:00
AM8:00


2hr single exposure surface data
2hr single exposure
AM10:00 exposure starts
(hr) 0
24
48
72
Copy number
6hr repeated (7d)
AM10:00 exposure starts
(hr) 0
24
48
72
High
Mid
Low
Cont
24hr
8hr
4hr
2hr
Sampling time
Concentration
22hr repeated (7d)
PM0:00 exposure starts
(hr) 0
24
48
72
92
Light-dark cycle
PM8:00
AM8:00


41
6hr repeated (7d) exposure surface data
2hr single exposure
ITG012
Exposure
Dissection
AM10:00exposure starts
(hr) 0
24
144
168
6hr repeated (7d)
ITGC001
High
Mid
Low
Cont
6hr
24hr
168hr
150hr
22hr repeated (7d)
ITG014
PM0:00exposure starts
48
72
96
120
192
Light-dark cycle
PM8:00
AM8:00


42
22hr repeated (7d) exposure surface data
2hr single exposure
Exposure
Dissection
AM10:00exposure starts
(hr) 0
24
144
168
190hr
166hr
70hr
22hr
6hr repeated (7d)
High
Mid
Low
Cont
22hr repeated (7d)
PM0:00exposure starts
48
72
96
120
192
Light-dark cycle
PM8:00
AM8:00

Overall Summary (1)

- Home-made informatics tools have been effective for MF surface data.
- Comprehensive search/ analysis of Percellome transcriptome data seems to efficiently link toxicology to basic biology by "gene function".
- Design of Confirmation studies may be improved by the Percellome information.

Overall Summary (2)

- Some "Finger-print" type outputs can be extracted out from the database.
- Cascade-based toxicity prediction will become possible in the near future, along with the effort of making the "Text Book".
- Collaboration is needed to make the most out of the data accumulated.

Development of Percellome (2001~)

Jun Kanno, MD, PhD
Katsuhide Igarashi, PhD
Ken-ichi Aisaki, MD, PhD
Atsushi Ono, PhD
Tomoko Ando, Ms
Noriko Moriyama, Ms
Yuko Kondo, Ms
Yuko Nakamura, Ms
Maki Abe, Ms

Millefeuille Softwares

Ken-ichi Aisaki, MD, PhD

IT collaboration

NTT COMWARE
with Teradata, NCR
(Shinya Matsumoto, Bun-ichi Tajima)

Percellome Projects (2003~)

Ken-ichi Aisaki, MD, PhD
Katsuhide Igarashi, PhD
Noriyuki Nakatsu, PhD
Yukio Kodama, DVM
Tomoko Ando, Ms
Noriko Moriyama, Ms
Yuko Kondo, Ms
Yuko Nakamura, Ms
Maki Abe, Ms
Kenta Yoshiki, Mr
Nae Matsuda, DVM
Chiyuri Aoyagi, Ms
Kouichi Morita, Mr
Ayako Imai, Ms
Shinobu Watanabe, Ms
Masaki Tsuji, Mr
Yusuke Furukawa, Mr
Kiyoshi Sekita, VMD
Yukio Ogawa, DVM (Inhalation)
Satoshi Kitajima DVM, PhD (Fetus)
Kentaro Tanemura DVM, PhD

NIHS TGP (with 17 Pharm) startup group (~summer 2002)

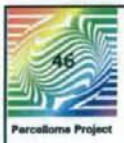
Akihiko Hirose	Risk Assess/ BSRC/ NIHS
Takayoshi Suzuki	Mutagen/ BSRC/ NIHS
Makoto Shibutani	Path/ BSRC/ NIHS
Katsuhide Igarashi	Tox/BSRC/NIHS
Atsushi Ono	Tox/BSRC/NIHS
Ken-ichi Aisaki	Tox/BSRC/NIHS
Jun Kanno	Tox/BSRC/NIHS

Percellome Collaborator Scientists

Dr. Shigeaki Kato
Dr. Yoshiaki Fujii-Kuriyama
Dr. Bruce Blumberg
Dr. Hironobu Sasano
Dr. Yumiko Saga
Dr. Seiichi Hashimoto
Dr. Yasufumi Shigeyoshi
and others

Grants

Ministry of Health, Labor, and Welfare (MHLW) Grant-in-Aid H15-kagaku-002, H14-Toxico-001, H13-seikatsu-012, H18-kagaku ippann-001& MOE



END

RNA標準化研究班・班会議資料

Daiichi-Sankyo

薬物安全性評価への遺伝子発現解析技術の活用

2009年1月22日

第一三共株式会社　安全性研究所
清澤直樹・矢本敬

Daiichi-Sankyo

1．遺伝子発現解析の現状（第一三共株式会社・安全研の例）

遺伝子発現解析

- **RNA抽出**
  - RNeasy Kit (Qiagen)
  - Trizol Reagent (Invitrogen)
- **RNA品質チェック**
  - Bioanalyzer (Agilent)
- **マイクロアレイ解析**
  - GeneChipシステム (Affymetrix)
- **QRT-PCR解析**
  - TaqMan解析 (ABI 7500 Real Time PCR System)

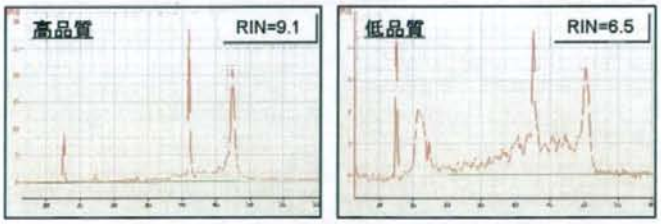
データ信頼性・互換性を念頭に置き、
国際的に事実上の標準となっているシステムを使用

2

RNA抽出～品質チェック

- Total RNAの抽出
  - A_{260}/A_{280}：1.8～2.3を採用
  - RNA integrity number (RIN)：5以上を採用

(Schroeder *et al.*, BMC Mol Biol. 2006 Jan 31;7:3)

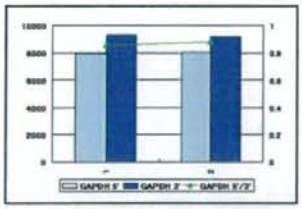


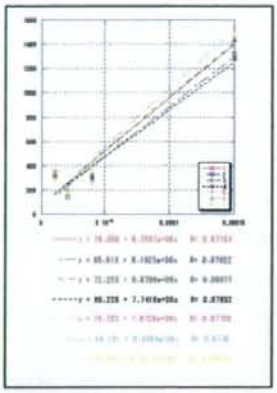
RINの活用は急速に普及しており、事実上標準化に近づいている印象

3

マイクロアレイ解析（GeneChip）

- cRNA増幅曲線チェック
  - サンプル間の増幅具合を確認
- 数値化：MAS5解析
  - GAPDH 5'/3'：通常0.8～1.2を採用
- 標準化：グローバル補正



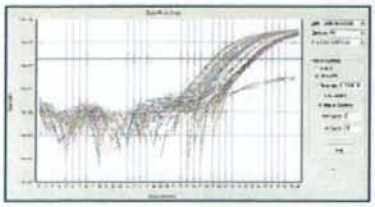


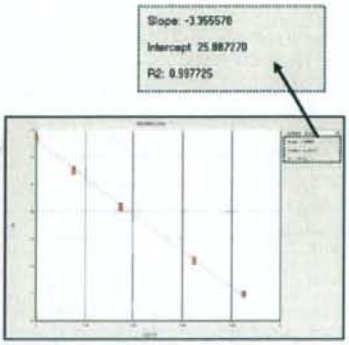
いずれの要素も、データ互換性に関する検討は必要

4

TaqMan解析

- 検量線：5段階希釈サンプル
  - 例：X2, X5, X20, X50, X100
- 測定サンプル：データを3連で測定
- 内部標準遺伝子：GAPDH、β-actin
  - 通常ABI社の標準キットを使用





マイクロアレイに比較すると互換性は高いと考えられるが、slope、プライマー/プローブ設計、threshold設定等に関する標準化議論は必要か？

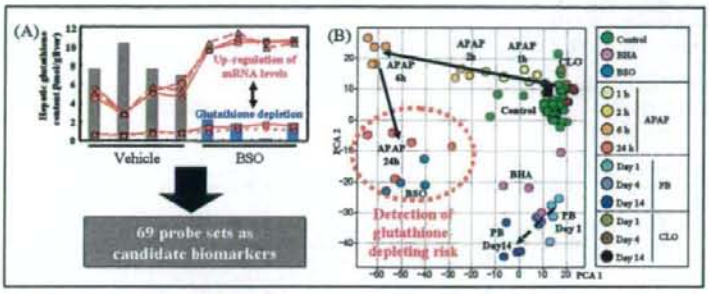
5

まとめ

- RNA抽出～品質チェック工程に関しては、試薬、機器および取得データのQC評価の標準化が進んでおり、研究施設間の互換性は高いと考えられる
  - ここまではほぼ標準化が達成されていると考えて良い？
- QRT-PCR（TaqMan解析、SYBR Green法など）
  - プライマー/プローブ設計法、データ解析法、品質チェック等に関するガイダンスが必要？
- マイクロアレイ解析に関しては、各種アレイプラットフォームの違いに加え、スキャナーのレーザー強度、数値化アルゴリズム、統計解析手法等に関する標準化が必要
  - データ互換性を高めるためには、試験情報、サンプルのアノテーション情報記載（MIAME基準など）をより厳格に規定する必要があるものの、現実的な人的・金銭的コストとの兼ね合い検討が必須
- TG-GATEs等の外部データベースや、各種文献に記載される毒性バイオマーカー候補遺伝子の相互活用のため、遺伝子発現解析データの互換性を高める努力が必要
  - 欧米で進んでいる「新規毒性バイオマーカーバリデーション」のような産官学共同の研究協力を、何か一つのモデルケースを作って実施・経験できれば理想的？

2．トキシコゲノミクスデータの活用例

「バイオマーカー」探索および活用例



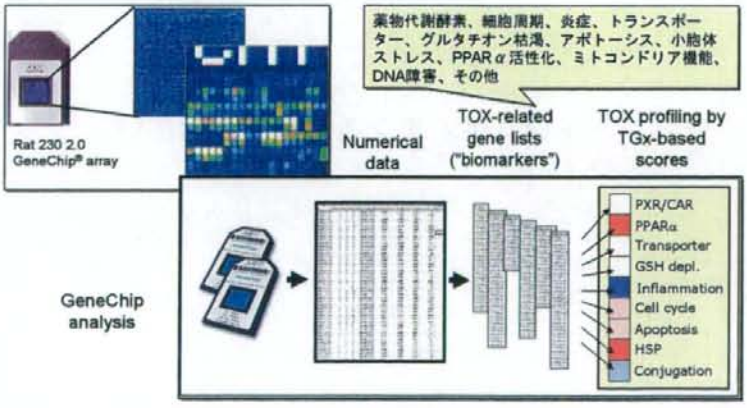
(A) Identification of glutathione depletion-responsive genes

(B) Assessment of glutathione depletion-related hepatotoxicity

Identification and utilization of TGx biomarker gene sets

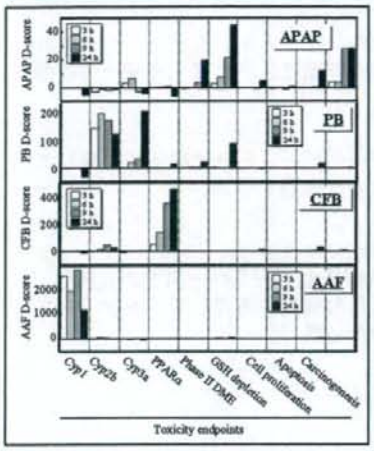
8

毒性エンドポイントのスコア化による解析



9

毒性エンドポイントのスコア化による解析



Acetaminophen (APAP):
Hepatotoxicity associated with GSH-depletion

Phenobarbital (PB):
Cyp2b/3a induction by CAR activation

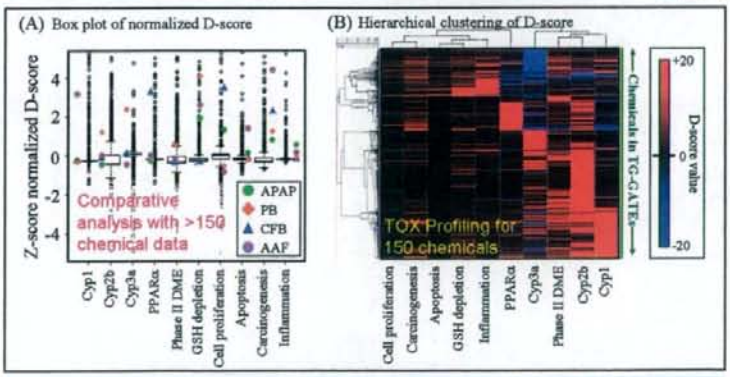
Clofibrate (CFB):
PPARα activation

Acetamidofluorene (AAF):
Hepatic carcinogen, possibly related with strong *Cyp1a* induction

Efficient detection of stimulated TOX endpoints by appropriate TGx biomarker and scoring method

10

毒性エンドポイントのスコア化による解析



Quantitative and comparative TOX evaluation using TG-GATEs
(> 150 chemicals with multiple dosage levels and time points)

11