

200909009A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成22(2010)年5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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成22(2010)年5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

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成22（2010）年 5月

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 | 70 |
| 菅野純 | |
| 2. バイオマーカー候補遺伝子の検証 | 78 |
| 水川裕美子 | |
| 3. 病理学的診断の検証 | 85 |
| 三森国敏 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 87 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 90 |

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))
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

研究代表者 漆谷 徹郎
独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤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

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。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) 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 点の達成を目標としている。医薬基盤研究所 (基盤研)、国立医薬品食品衛生研究所 (国立衛研)、製薬企業 13 社の連携のもと、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、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り、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った。種差のブリッジングに関しては、国立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、参加製薬企業全 13 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、目標であるグレードⅢのバイオマーカー 30 種のうち 10 種の開発を達成した。また、グレードⅡのバイオマーカーを、候補も含めて 3 種開発し、この領域では目標を大きく上回った。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として Agilent による発現解析を行い、対照群に対する発現変動を指標とすれば、薬物特異的な毒性学的変化は再現性よく捉えられることが示された。

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、利用価値の高い安全性マーカーが

続々と創出されてきている。

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
三森国敏 東京農工大学・教授

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、同一プラットフォ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ールで行われた、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。

本研究班の主体は、官民共同プロジェクトであるが、上記課題を達成するためには、プロジェクトの内部では困難な場合も生じてくる。一つは、バイオマーカーを見出す過程で、メカニズム解析や細部での検証実験が必要となる場合である。

そのような際には小回りの効く対応が必要であるため、その備えとして研究代表者の本務地である同志社女子大学薬学部病態生理学研究室・水川助教を研究分担者とした。また、本課題の大きな目標の一つである種差の克服に関しては、多方面からのアプローチが必要であるが、有力な方法としてヒト型遺伝子をもつ動物の利用がある。この方面での先端技術をもつ国立医薬品食品衛生研究所・菅野毒性部長が研究分担者として参加している。更に、TG-GATEsのコンテンツに関しては、前プロジェクト終了後3年間は公開せずに、参加企業の知財を保護するという契約がなされていた。次年度は、データベースを公開する時期に当たっており、その準備も行う必要があった。データベースの公開に際して、問題の一つが病理診断の不統一であった。プロジェクト内部では、複数回のレビューを行ったが、全データを統一することは困難で、限定的な使い方を余儀なくされていた。これは、内部におけるフェノタイプアンカーリングなどの場合、担当者が該当部分を精査すれば良かったのであるが、病理データを公開するとなると、いわば毒性病理の教科書的な性格を帯びるため、是非とも専門家による全体精査が必要であった。この目的で、東京農工大・三森教授が研究分担者として参画している。

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。研究代表者漆

谷が所属する医薬基盤研究所、国立医薬品食品衛生研究所、参加企業 13 社の 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とともに、血液で得られる限り多くの情報を有効利用して、バイオマーカーを見出す努力を継続する、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基盤形成を行い、国際的に情報発信を行う、の 3 点を目標としている。

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

渉管理をおこなった。バイオマーカー創出戦略にあわせ、今年度からワーキンググループのチームを次の4つに再編成した。

チームA：フェノタイプアンカーリングや病理対応型バイオマーカーの取得と検証

基本的にはこれまでの戦略を継承する。また、他のチームから提案されたバイオマーカーに関して、フェノタイプの面からの検証を担当する。

チームB：メカニズムに基づく遺伝子リストの取得

既知の毒性学的パスウェイ、メカニズム既知化合物のデータ、あるいは病態モデルのデータからのマーカー提案を行う。また、他のチームから提案されたバイオマーカーに関して、メカニズム解析を支援する。

チームC：培養細胞

培養細胞のデータからのバイオマーカー取得を目指す。とくに本年度は、変動の観察された遺伝子数が絶対的に不足している化合物に関して高濃度補遺試験を遂行することを主目的とする。

チームD：その他の戦略

上記以外のあらゆる手段の利用可能性を検討する。本年度は特に、メタボロミクス（慶応大学・曾我教授の研究室に委託）、血中のmiRNAの測定（PNAS 2009 106:4402-4407）、血中のmRNAの測定（Toxicol. Sci. 2008 106:538-545）などの方法が、肝毒性マーカー創出に有用かどうかを検討した。

以上の4グループとは別に、血液ワーキンググループを組織し、臨床で利用可能

なサンプルである血液を用いたトランスクリプトミクスの利用可能性の検討を継続している。これまでに、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。サンプルとしては勾配遠心で純化したリンパ球、特殊フィルター上にトラップしたリンパ球および全血をそのまま使用するものの3つが考えられたが、検討の結果、基本的には全血を用いた方法で行うこととし、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（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。初年度、GeneChipを用いたバリデーションを行い良好な結果を得たが、次年度は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。本年度はそのデータを解析し、これをどのように実用的な情報に落とし込むかの検討に入った。

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の実験が必須である。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、個々の検証実験は研究代表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、(1)ラット肝細胞in vitroモデルを用いたGSH枯渇マーカー候補遺伝子の検証のため、肝細胞初代培養を用いた遺伝子発現解析とGSH量測定 (2)血球系in vitroモデルとしてのラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築 (3)ラット肝細胞初代培養系におけるリン脂質症検出系の構築、の3点が行われた。

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(hSXRkimouse)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の発現および上流、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。

ここで得られたマウスを用いた毒性評価系として、肝マイクロスフェア培養法を採用した。コラゲナーゼ灌流法によって肝細胞を回収し、マイクロスフェアアレイ(ステムバイオメソッド社)中で培養し、肝スフェロイドを形成させた。また、付着培養の場合は、コラーゲンをコートした24well容器に肝細胞を播いた。

全体の解析手法はBMC genomics 2006, 7, 64の方法に従った。簡略に記すと、細胞をRLT buffer (Qiagen GmbH, Germany)にて破碎した後、DNA量を測定し、それに応じてspike RNA cocktailを添加した。その破碎液からtotal RNAを精製し、逆転写反応にてcDNAとし、各遺伝子に対するprimerを用いて定量RT-PCRを行い、spike RNA量を基準にコピー数に変換した。

分担研究(三森)

昨年度のTGP2運営委員会において、2010年度中でのデータ公開が決定された。遺伝子発現データは膨大であるた

め、電子媒体の利用は必須である。一方、古典的な毒性病理データに関しては、冊子体でのデータ提供の方が研究者において使い勝手がよい。これは毒性病理学の優れた教科書になるはずのものなので、診断は確定させておかなばならない。データベース中の病理データは、複数のCROによる多人数による判定結果であり、統一が取れていない。この、毒性病理学における貴重なデータを後世に残すため、一人の専門家によるレビューが必要と考え、三森が担当した。

各化学物質により誘発された肝臓と腎臓における毒性病変の組織診断とその組織所見が撮影された組織写真640件をレビューし、診断名の適切性および写真との整合性を調査した。また、研究成果報告書に記載された所見について、同じ病変について同一用語を用いて診断しているかについても調査した。組織写真から病理診断が適切になされているか否か判定が難しいものについては、そのHE染色標本を取り寄せ、顕微鏡を用いて、その診断が適切であるか否かを確認した。さらに、HE染色標本のみでは診断困難なものについては、パラフィンブロックを取り寄せ、組織切片を作成して、種々の抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。

C. 研究結果

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)

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、失敗を見越して、毎年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、本年度当初には23種類のグレードIVマーカーが得られていた。今年度末までには、累計36種のグレードIVマーカーが得られた。

追加実験や外部データを参照することにより、グレードIIIマーカーとしての提案がなされたものに対して、ワーキンググループによる検討を加え、10個がグレードIIIマーカーとして認定された。

(1) 腎尿細管障害診断マーカー

統計選別した遺伝子により構築された線形判別器である。5-fold cross validationによる判別精度検証を実施した結果、偽陽性率が約10%のとき、検出力は90%となった。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。前年度グレードIVであったが、担当企業内部による検証実験で再現性が確保され、グレードIIIと認定された。

(2) 腎尿細管障害予測マーカー

統計選別した遺伝子により構築された線形判別器である。腎障害が発生する用量より低用量で、かつ障害発生より前の時点で判別可能な、予測マーカーとして利用可能である。また、KIM-1などの、報告されているマーカーと比較しても感度や特異度が優れていた。前年度グレードIVであったが、担当企業内部による検証実験で再現性が確保され、グレードIIIと認定された。

(3) 肝臓での造血抑制に起因した貧血

診断マーカー

ラットに貧血が生じているときに、それが肝臓での髄外造血の障害であるのか否かを診断する遺伝子群である。これ単独での使用意義はそれほど高くないが、GeneChip解析をする場合は、すべての遺伝子が測定されるので、その中から毒性学的に意味のあるマーカーリストは多いほどよいと考えられる。

(4) リン脂質症マーカー

これは、25プローブセットからなり、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週間後のリン脂質症誘発能を高精度で予測することができる。前年度グレードIVとして認定されていたが、検証用化合物の追加実験によって再現性が証明され、グレードIIIが認定された。

(5) グルタチオン枯渇マーカー I

このマーカーは、わずか三つのプローブセットを用いることによって、グルタチオンと共有結合を形成し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。更に、単回投与でグルタチオン枯渇が生じる場合は、一旦低下したのちにリバウンドで増加するケースが多く、適当な測定時点を決定することが難しい。このマーカーの場合は、一旦グルタチオンが低下したエピソードがあれば、低下期間中ばかりでなく、リバウンドが生じている24時間後でも陽性判定可能である。これは前年度グレードIVと認定されていたが、公共データベースのデータを用いて再現性が確認できたため、グレ

ードIIIと認定された。

(6) グルタチオン枯渇マーカー II

このマーカーは14プローブセットから成り、いかなる機序によるものであってもグルタチオン枯渇をおこす化合物を陽性判定できる。時点も問わないというメリットをもつ。これも前年度グレードIVと認定されていたが、公共データベースのデータを用いて再現性が確認できたため、グレードIIIと認定された。

(7) ERストレスマーカー

これは、それまでのフェノタイプアンカーリングとは異なる戦略で得られたものである。すなわち、ERストレスに関係があるとする文献情報のある遺伝子のリストを作成し、これを用いてデータベース内の化合物をスコア化したところ、ERストレスを惹起すると考えられる化合物群を弁別することができた。メカニズムと分別結果の両方に文献的裏付けがあることから、グレードIIIとして認定された。

(8) 胆管増生マーカー

このマーカーは95遺伝子からなる判別器であり、8日連投以降では特異度97%以上の判別精度で胆管増生が判定できるものである。マーカーには細胞増殖関連にマップされるもの、また胆管のマーカーであるkeratin19が含まれており、毒性メカニズムの裏付けがとれている。また4種の化合物を用いた追加実験により正しい判定結果が得られたため、再現性有りとし、グレードIIIとして認定された。

残りの2つのマーカーは、血液ゲノミクス関連で見出されたグレードIIまたはIの

ものであり、次項で述べる。

2. 血液ゲノミクス

これは、臨床で利用可能なサンプルである血液を用いて、臓器障害を診断・予測しようというものであり、測定対象が種を越えて存在していればグレードⅡ以上のバイオマーカーとなりうる領域である。本項に関しては次の4つの戦略をとった。

(1) 血液サンプルを用いたトランスクリプトミクス

前年度までに、全血を用いたトランスクリプトミクスにおいて、代表的な肝障害物質(メタピリレン、チオアセタミド、クマリン、プロモベンゼン)による薬物特異的な発現変動を観察していた。しかしながら、全血における遺伝子発現変化は、網状赤血球の影響を受けることが分かっており、かつ、薬物によって網状赤血球の割合が変化することもわかっている。遺伝子発現変化が、肝障害に起因するものか、貧血の結果によるものなのかを区別することが難しい場合も出てくる。そこで、網状赤血球変動の影響をインフォマティクス手法によりキャンセルする方法の検討を行った。

(2) 末梢血中 mRNA を指標とした臓器障害バイオマーカー

細胞が破壊されて血中に漏出する成分は、細胞障害マーカーとして有用である。勿論、肝障害には、AST、ALTなどの古典的なバイオマーカーが存在するが、これらより特異性・感度が高ければ十分に利用価値がある。最近、臓器特異的蛋白質をコードする mRNA が血中に漏出するの

を測定する方法が報告された。プロジェクトには、データベースに格納されているデータの基になった動物の血漿サンプルはすべて保存されている。これを有効利用するため、臓器特異的蛋白質の測定系を立ち上げるグループを編成した。

(3) 末梢血 miRNA を指標とした臓器障害バイオマーカー

マウスにおいて、ある種の miRNA は、組織特異的かつ血中で安定であり、細胞障害の診断に有効である可能性が指摘されている。これが、ラットにおいても有用であるか否かを検討するため、プロジェクトで保存されている、血漿サンプルを有効利用することを考えた。しかし、予備試験において、ヘパリン添加血漿は、miRNA の定量 PCR を擾乱することが見出されたため、抗凝血剤を変更した暴露実験を行い、測定を開始した。

(4) 血漿サンプルのメタボロミクスとトランスクリプトミクスの融合

前述のように、プロジェクトでは過去に行った150種以上の化合物の暴露試験におけるラット血漿サンプルを凍結保存している。この資源を有効利用するため、アセトアミノフェン処置サンプルのメタボローム解析を行うこととした。測定は慶応大学・曾我教授の研究室に外注した。

当初の目的は、曾我教授がマウスを用いて報告したアセトアミノフェン型グルタチオン枯渇マーカーであるオフタルミン酸が、ラットでもマーカーたりうるか、という点の検証であった。

解析の結果、オフタルミン酸は、ラットにおいても十分にグルタチオン枯渇マーカーとなりうることを確認された。更

にその解析の過程で、肝臓における遺伝子発現解析結果と、血漿メタボロームをつき合わせることによって、新たな2つのバイオマーカー候補を見出した。これらはその性質上、グレードIIあるいはグレードIのマーカーとして十分であると考えられた。現在、これらについては特許申請準備中である。

メタボロミクスが有用な技術であることが明らかとなったことから、これを腎障害へ応用することを考え、腎障害物質処理動物の血漿メタボロームを曾我研に依頼した。その結果、肝臓および腎臓の遺伝子発現プロファイルと総合することによって、グレードIIの可能性のあるバイオマーカーを見出すに至っている。

3. バリデーション

前年度、TG-GATEs 内の遺伝子発現データ取得に用いた GeneChip を用いる限りにおいては、参加企業間で品質の保証されたデータが取得できることが示されていた。しかしながら、遺伝子発現解析をレギュラトリーサイエンス領域で活用するためには、異なるプラットフォームも利用可能でなければならない。前年度末に、同一サンプル（対照およびアセトアミノフェン投与群）を Agilent 社のチップを用い、2箇所異なる場所で測定・解析した。

Agilent 社チップと GeneChip 間にはプローブ設計に大きな差があるため、直接比較できる遺伝子は 6864 であった。従って、両者の比較はこの遺伝子に絞って行った。その結果、2箇所間の Agilent チップ間の一致性は高かったが、当然のこ

とながら、GeneChip との一致は低いものであった。しかしながら、データを「対照群に対する比」に変換すると、両者の相関は Agilent 社間と遜色ない程度まで改善した。

アセトアミノフェンにより変動が報告されている遺伝子群を両チップ間で個々に比較してみたところ、発現の絶対値には大きな差があったが、データを「対照群に対する比」に変換すると、類似した値になる場合が多く見られた。しかし中には、プローブ設計が悪いと考えられる遺伝子、プローブが飽和していると考えられる遺伝子が散見され、実際の解析には注意が必要と考えられた。

この2つの異なるプラットフォームにおける遺伝子発現解析結果が生物学的に同等の解釈を与えるか否かを検討するため、まず、前年度行った GeneChip 14 サイト、Agilent 2 サイト、計 16 サイトでの変動遺伝子を IPA Canonical Pathway 解析し、結果を $-\log P$ 値に変換して順位変動グラフを作成した。すると、上位 21 位までにランクされた Pathway については、その 20 Pathway が全サイトで選択された。すなわち、薬剤応答性遺伝子に関しては、発現比を用いると異なるプラットフォーム間の比較も可能であると結論付けられた。

以上の解析は、それぞれのプラットフォームにおいて厳密なプロトコールの統一と実施が必須である。そのノウハウを創薬に携わる者が共有することは重要であると考え、前プロトコールを手順書として公刊することとし、バリデーションワーキンググループによって編集作業に入

った。

分担研究 (水川)

1. ラット肝細胞 in vitro モデルを用いた GSH 枯渇マーカー候補遺伝子の検証

14プローブセットからなる GSH 枯渇マーカーについては、in vivo で有用であることが示され、グレードⅢと認定された。当初このマーカーは、in vitro でも有用であると期待されたが、GSH 枯渇陽性化合物の中で例外的に APAP と BBZ が in vitro で陰性と判定された。これらの化合物について in vitro で実際に GSH 枯渇が起こらないのであれば、このマーカーは in vivo でも利用可能であるため、この部分の検証が行われた。ラット肝細胞を単離・培養し、PHO(0, 0.1, 0.5 mM)、APAP(0, 3, 10 mM)、または BBZ(0, 0.4, 2 mM)を曝露した実験では、陽性対照の PHO のみでなく、時間経過は異なるものの、APAP や BBZ でも GSH 枯渇が観測できる用量・時点が見出された。その時点・用量での遺伝子発現解析が行われ、APAP では in vitro でも上記マーカーの有用性が認められたのに対し、BBZ では、実際に GSH 枯渇が観測されているにもかかわらずマーカーでの判定は陰性のままであった。BBZ 投与下のデータの Gene Ontology 解析において、転写関連遺伝子の低下が大きいことが示された。すなわち、in vitro において GSH 枯渇を惹起するに必要な高濃度 BBZ により転写関連遺伝子の発現低下が起こり、バイオマーカー候補遺伝子の発現増大が起こりにくくなっていた可能性が考えられた。

2. 血球系 in vitro モデルとしてのラッ

ト末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築

昨年度構築したラット PBMC の初代培養系を用い、培養の時間経過による遺伝子発現変動が検討された。6 週齢、12 週齢由来の細胞ともに時間経過を追って発現が増大した遺伝子数の方が減少した遺伝子数よりも多いこと、6 週齢と 12 週齢の比較では、12 週齢よりも 6 週齢の発現が高い遺伝子数が若干多いことが観測された。また、Gene Ontology 解析では 12 週齢由来の細胞でアポトーシス関連遺伝子が多く、一方 6 週齢では陽イオン輸送関連遺伝子及びアポトーシスを負に制御する遺伝子が多いことが判明した。

3. ラット肝細胞初代培養系におけるリン脂質症検出系の構築

ラット肝臓より肝細胞を単離・培養し、リン脂質症を起こすことが知られているプロプラノロールを陽性対照とし、測定条件が決定された。以後、データベースに格納されている各化合物について、in vitro でのリン脂質症との対応の検討を継続していく。

分担研究 (菅野)

1. mPXR に作用する可能性のある化学物質の抽出

マウスの PXR(mPXR)を活性化し、ヒトの PXR(hPXR)を活性化しない PCN について、研究分担者が既に構築しているデータベースを参照することにより、PCN によって発現が上昇する遺伝子として、よく知られた Cyp3a11 に加え、Cyp2b10、Ces6、Gstm3 が見出された。これらを mPXR 活性化のマーカー遺伝子として、PCN 同

様の発現上昇を示す化学物質を検索したところ、Phenytoin、Thalidomide、Phenobarbital が抽出された。

2. 肝スフェロイドの検討

ヒト特異的 agonist として RIF を、マウス特異的 agonist として PCN を用いて、上記化学物質の hPXR への作用を、肝スフェロイドを用い mPXR と比較して検討した実験において、典型的なヒト型反応を示すことが確認された。

3. 肝スフェロイドを用いた候補化学物質作用の検討

以上の結果に基づき、Phenytoin、Thalidomide、Phenobarbital を肝スフェロイドに暴露し、Cyp3a11、Ces6、Cyp2b10、Gstm3 を定量 RT-PCR (Percellome PCR) にて測定したところ、Phenytoin は野生型で CYP3A11、CES6、CYP2B10、GSTM3 の誘導作用を示す一方、hPXRki では作用を示さなかった。Thalidomide は野生型で CYP3A11、CES6、CYP2B10、GSTM3 の誘導作用を示す一方、hPXRki には作用を示さなかった。Phenobarbital は、hPXRki の方でより低い濃度から誘導作用が認められた。

以上のように、検討した 3 種の化学物質は mPXR と hPXR に対し、異なる作用を示した。

分担研究 (三森)

組織写真 640 件をレビューした結果、試験実施施設間で、用語・鑑別基準の不統一、病変発生部位の不明確さなどが多く認められ、更に見逃せない数の誤診が認められた。また、病理評価に耐えない品質の組織写真も散見された。

以上の問題点を解決するため、用語の統一、鑑別基準の統一が行われ、また病変発生部位が特定された。更に種々の病理所見について、その根拠を確認するため、各種染色が行われた。

D. 考察

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)

1. 安全性バイオマーカーの開発

これまでの戦略では、フェノタイプアンカーリング、すなわち、病理・生化学的変化に対応した診断・予測マーカーに力を入れてきた。この方式は、毒性学的に重要かつ有用なマーカー獲得には有利な方法であるが、欠点もある。まず、フェノタイプに依存した診断・予測では、旧来の毒性学的手法に比べて圧倒的な優位性を期待できないことである。たとえば ALT の活性と同程度の信頼性と感度をもつマーカーを新たに開発したとしても、トキシコゲノミクスを行う必要性は必ずしもない。勿論、GeneChip を使った解析では、すべての遺伝子発現が測定されてしまうので、一枚のチップから多くの情報を得ることに意味がないわけではない。しかしながら、これではトキシコゲノミクス手法が安全性研究にパラダイムシフトをもたらすほどのインパクトは持ち得ない。

第2の問題は、フェノタイプアンカーリングでは毒性学的メカニズムに迫る場合、不満が残る点である。あるフェノタイプに相関して発現変動するような遺伝子を計算科学的に選抜すると、その生物学的意味とは無関係に、偶然そのようなパターンをとる遺伝子が抽出されてくる。こ

れに対して恣意的な選別を加えるべきではないが、逆に、選別されて来た遺伝子すべてを毒性学的メカニズムに組み入れようとするのもまた誤りを導いてしまう。現在、遺伝子の役割に関する我々の知識の不足、特に毒性学的パスウェイにおけるそれは大きく、限界がある。

このような状況下、21年度後半、および次年度計画では、逆方向の戦略、すなわち、既知の毒性学的メカニズムに基づいたマーカーを構築し、これがデータベース中の化合物分類に有効かどうか検証するという方法も取り入れることとした。

2. 血液ゲノミクス

血液を対象としたトランスクリプトミクスから臓器毒性を診断あるいは予測するという事は、理論的には可能性があるにしても、現実的には大きな困難が予想される。その意味から、本テーマに関してはより慎重な基礎データ収集を行ってきた。今年度までに、ラットにおいて肝毒性と関連する可能性のある発現変動が全血で見られること、血球組成、特にデータに大きく干渉する網状赤血球組成の影響を計算科学的に除去する目途が立った。

これまでの研究により、当然ながら特異的変動を示す遺伝子群は、サイトカイン関連遺伝子が多く認められている。このことは、サイトカインネットワークに関してラットとヒトとの間の種差の壁を克服する必要性を示している。この点も最終年度までに解決しておく必要のある課題であろう。

3. バリデーション

TGP および本プロジェクトが開始された当時、世界、特に米国 FDA の趨勢は、トキシコゲノミクス手法を申請データに積極的に取り込もうとするものであった。しかしながら、全世界で行われた研究結果から、単純にゲノミクスデータを組み込んだところで、問題の解決にはならないことが見えてきた。最近の FDA を筆頭とするトレンドは、ゲノミクス手法も、バイオマーカーという形に落とし込まないと、その有用性は担保できない、というものになってきたといえよう。

TGP2 発足当時は、ゲノミクスデータ取得とその解析法の標準化が喫緊の課題であり、PMDA 等と協力しながら、TG-GATEs をベースとしてこれを世界に発信することを一つの目標としてきた。しかしながら、上記の状況から、むしろ良質のバイオマーカーを多数提案することこそが緊急の課題であることが明らかとなり、現在のように、バイオマーカー創出に最大限の力を注ぐこととした。

勿論、その基盤となるデータ取得とその解析は重要な問題であり、バリデーション WG において、標準的な手法を纏め上げるという方針を決定したところである。

分担研究 (水川)

本研究は、メインプロジェクトにおいて提案されるバイオマーカーの検証が目的であり、その内容はプロジェクト本体に依存する。プロジェクト本体では、有用と思われる *in vivo* の phospholipidosis マーカーが3種類も提案されているが、それ以上の検証は不可

能な状態である。そこで、in vitro での phospholipidosis の系を立ち上げ、それに対処する。類似の戦略は他のマーカーにも順次適用していく予定である。特に、血液ゲノミクスで指摘したサイトカインネットワークの種差に関する問題はここで扱う予定である。

分担研究（菅野）

今年度の検討により、hPXRki mouse と、肝初代培養系（肝スフェロイド系）を用いることで、化学物質の hPXR への作用を効率的に調べることが出来ることが示された。

国立衛研毒性部には野生型マウスを対象にした化学物質の肝遺伝子発現データベース（Percellome database）が存在し、これを活用することによって、mPXR を活性化することが示唆された化学物質、Phenytoin、Thalidomide、Phenobarbital が見出され mPXR、hPXR への作用の程度が実際に異なることが明らかになった。hPXRki mouse は今後 hPXR 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して活用されていくことが期待される。また、国立衛研毒性部の Percellome database と TG-GATE s という異なるデータベースを活用することにより、更なる発展が期待できることを意味する。

分担研究（三森）

今回の研究によって、病理診断を業とするものによる診断でも多くの問題点が指摘された。これは動物を用いた安全性試験の根幹にかかわる問題である。TG-GATE s に格

納されているデータはいわば毒性試験の教科書となるべきものであり、次年度のデータ公開に向けて、この領域で模範となるべきものにしたい。

E. 結論

プロジェクト本体において、グレードIVの安全性バイオマーカーを累積で36種開発した。そのうち10種は、異なる施設や外部データにおいて再現性が見られ、グレードIIIと認定された。更には、メタボロミクスとゲノミクスを組み合わせることによって、グレードIIまたはIと評価できるマーカーが2種得られ、特許化の検討に入った。グレードII以上のマーカーが複数得られたことは大きな成果である。

分担研究との連携のもとに、バイオマーカー創出の目標達成に目処が立った。以降、更に良質のバイオマーカー創出を目指し、また、データベース公開に向かった作業を進めたい。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

漆谷徹郎、大野泰雄

Takeki Uehara, Atsushi Ono, Mitsuhiro Hirode, Naoki Kiyosawa, Ko Omura, Toshinobu Shimizu, Yumiko Mizukawa, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao and Tetsuro Urushidani. A Toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology* 250:15-26, 2008.

M. Hirode, A. Horinouchi, T. Uehara, A. Ono, T. Miyagishima, H. Yamada, T. Nagao, Y. Ohno, T. Urushidani. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing elevation of bilirubin. *Human Exp. Toxicol.* 28: 231-244, 2009

Mitsuhiro Hirode, Ko Omura, Naoki Kiyosawa, Takeki Uehara, Toshinobu Shimizu, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, Yasuo Ohno and Tetsuro Urushidani. Gene expression profiling in rat liver treated with various hepatotoxic-compounds inducing coagulopathy. *The Journal of Toxicological Sciences* 34 (3) 281-293, 2009

Chiaki Kondo, Yosuke Minowa, Takeki Uehara, Yasushi Okuno, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Toshiyuki Maruyama, Ikuo Kato, Jyoji Yamate, Hiroshi Yamada, Yasuo Ohno and Tetsuro Urushidani. Identification of genomic biomarkers for concurrent diagnosis of drug-induced renal tubular injury using a large-scale toxicogenomics database. *Toxicology* 265:15-26, 2009

Uehara T, Ono A, Maruyama T, Kato I, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T. The Japanese toxicogenomics project: Application of toxicogenomics. *Mol Nutr Food Res.* 54(2):218-227, 2010

漆谷徹郎 トキシコゲノミクス 日本薬

理学雑誌 133:112-116, 2009.

A. Sanbuissho, M. Yoshida, S. Hisada, F. Sagami, S. Kudo, T. Kumazawa, M. Ube, S. Komatsu, Y. Ohno. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity by repeated-dose and fertility studies in female rats. *J. Toxicol Sci.* 34: SP1-SP22, 2009.

M. Yoshida, A. Sanbuissho, S. Hisada, M. Takahashi, Y. Ohno, A. Nishikawa. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *J. Toxicol Sci.* 34: SP189-SP197, 2009.

大野泰雄 マイクロドーズ臨床試験に必要な非臨床試験データ 臨床薬理 41:9-16, 2010.

大野泰雄 日本薬理学会の動物実験指針と動物実験の第三者評価について 実践行動薬理学 日本薬理学会編、金芳堂 pp.337-347 2010

水川裕美子

Takeki Uehara, Atsushi Ono, Mitsuhiro Hirode, Naoki Kiyosawa, Ko Omura, Toshinobu Shimizu, Yumiko Mizukawa, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao and Tetsuro Urushidani. A Toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats. *Toxicology* 250:15-26, 2008.

菅野純

Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. *Environmetrics* 2009; 20:1-13.

Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y. Neonatal exposure to low-dose 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J Immunol.* 2009 182(10):6576-6586.

Upham BL, Park JS, Babica P, Sovadinova I, Rummel AM, Trosko JE, Hirose A, Hasegawa R, Kanno J, Sai K. Structure-activity-dependent regulation of cell communication by perfluorinated fatty acids using in vivo and in vitro model systems. *Environ Health Perspect.* 2009 Apr;117(4):545-51.

2. 学会発表

漆谷徹郎、大野泰雄

神吉 将之, 中津 則之, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. ラット血液における肝毒性由来遺伝子マーカー候補の探索. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

木上 大輔, 松田 喬, 田村 幸太郎, 大村 功, 神吉 将之, 宇波 明, 小堀 正人, 渡部 浩治, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. ラットにおける胆汁鬱滞に関連した遺伝子マーカー探索と判別

モデル構築. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

弓立 恭寛, 青木 幹雄, 箕輪 洋介, 山田 徹, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄, 木村 徹. 単回経口投与ラット肝臓の遺伝子発現変動プロファイルを用いた化合物のリン脂質誘発能の評価. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

五十嵐芳暢, 箕輪洋介, 奥野恭史, 中津則之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎. パスウェイ情報を用いた遺伝子発現プロファイルの網羅的な比較と可視化の検討. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

中津 則之, 山田 弘. バイオマーカー探索に向けたトキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクトにおけるアプローチ. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

南 圭一, 新田 浩之, 箕輪 洋介, 小西 幹夫, 七野 裕, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. TG-GATEsを用いた薬物誘導性の肝脂肪化予測マーカーの探索. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

K. Abe-Tomizawa, Y. Minowa, K. Morishita, H. Yamada, T. Urushidani and Y. Ohno. Use of toxicogenomics for discrimination between the types of liver weight increase. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

清水 俊敦, 中津 則之, 小野 敦, 奥野 恭史, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. TGP データベースを利用したラット肝臓における Nrf2 制御下遺伝子の発現解析. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

上原健城, 箕輪洋介, 近藤千晶, 中津則之, 奥野恭史, 小野敦, 五十嵐芳暢, 丸山敏之, 加藤育雄, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎. トキシコゲノミクスによる薬剤誘発性腎尿細管障害の評価マーカーの探索. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

箕輪 洋介, 上原 健城, 近藤 千晶, 中津 則之, 奥野 恭史, 小野 敦, 五十嵐 芳暢, 丸山 敏之, 加藤 育雄, 山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹郎. トキシコゲノミクスによる薬剤誘発性腎尿細管障害の予測マーカーの探索. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

半田 千彰, 中津 則之, 赤羽 敏, 山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹郎. ラットにおける肝線維化を誘導する化合物の遺伝子発現解析. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

山田 文博, 箕輪 洋介, 住田 佳代, 片岡 正樹, 斎藤 幸一, 漆谷 徹郎, 山田 弘, 大野 泰雄. 非遺伝毒性化合物に対する肝発がん性マーカー遺伝子の探索. 第36回日本トキシコロジー学会学術年会

Noriyuki Nakatsu, Hiroshi Yamada, Tetsuro Urushidani, Atsushi Ono, Yasuo Ohno. Multicenter validation study of gene expression in rat liver. 第32回分子生物学会年会

Yoshinobu Igarashi, Yasushi Okuno, Yosuke Minowa, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Hiroshi Yamada, Yasuo Ohno, Tetsuro Urushidani. The comparison of toxicogenomics data using the gene set enrichment analysis for bridging between in vivo and in vitro. The 45th Annual meeting of Society of Toxicology, 2010.

箕輪洋介、中津則之、小野敦、神吉将之、奥野恭史、山田弘、大野泰雄、漆谷徹郎. Discrimination between gene expression changes in blood that arise from liver necrosis and fluctuation of hematocytes using canonical correlation analysis. The 45th Annual meeting of Society of Toxicology, 2010.

菅野純
菅野 純、相崎健一、Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトの進捗—インフォマティクス構築へ—、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、2009年7月7日、岩手、口演

菅野 純、分子メカニズムとヒト影響を結ぶツールとしてのパーセローム系の開発、第3回 In vivo 実験医学シンポジウム、学士会館、平成21年12月9日