

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Kentaro  
Tanemura, Hirotugu Asano, Kinichi  
Nakashima, Glucocorticoid induces  
expression of astrocyte marker GFAP  
mRNA in mouse neural stem cells. 14th  
International Congress of  
Endocrinology, 2010. 3. 29, Kyoto,  
poster

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

菅野純

特許第4415079号、2009年12  
月4日登録、遺伝子の絶対発現量測定  
方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 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

(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  
同志社女子大学薬学部病態生理学

漆谷徹郎

研究発表会 2009. 12. 11

## 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

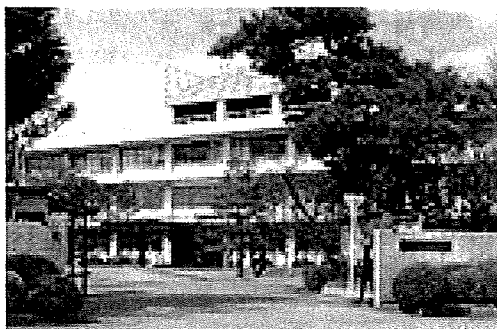
臨床に直結、説明変数にぶれがない  $\longleftrightarrow$  新薬には適用できない

#### 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

## 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

<http://www.tgp.nibio.go.jp/seika.html>

TGP2 Toxicogenomics Informatics Project in Japan



ホーム

TGP2概要

研究内容

TGP研究成果

リンク

会員専用

### TGPの研究成果

TGP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

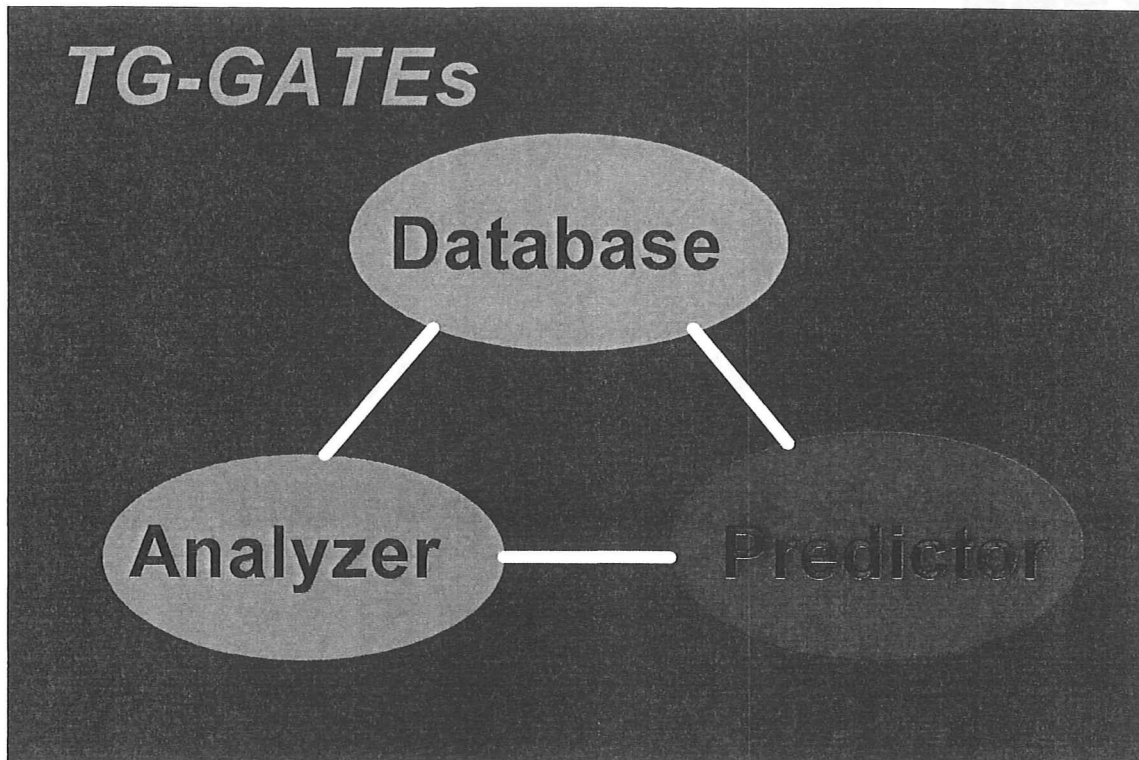
投稿論文

### 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。

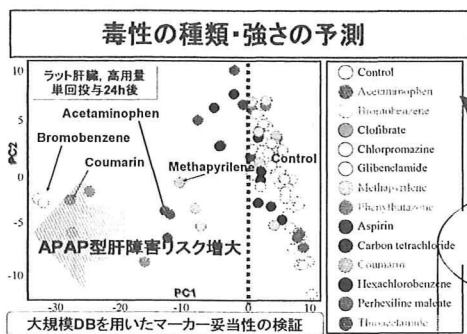
化合物名 (目)	化合物名 (英)	薬効分類
アカルボース	Acarbose	代謝性医薬品
アザチオプリン	Azathioprine	代謝性医薬品
アジマリン	Ajmaline	循環器官用薬
アスピリン	Aspirin	中枢神経系、血液・体液用薬
アセクゾラミド	Acefazolamide	循環器官用薬

# Genomics-Assisted Toxicity Evaluation System created by Toxicogenomics Project Japan



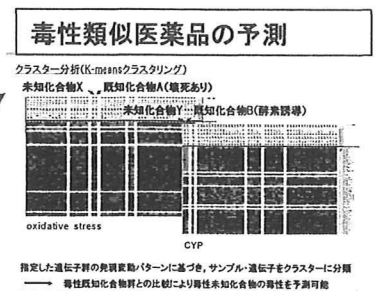
## TGP Analyzer · Predictor

主成分分析



毒性未知化合物 X

クラスター分析

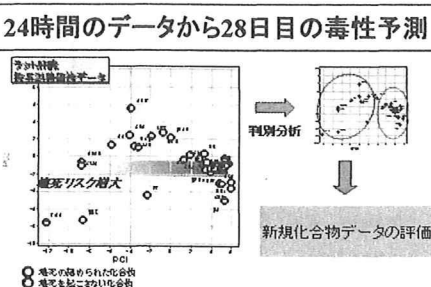


Analyzer · Predictor

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

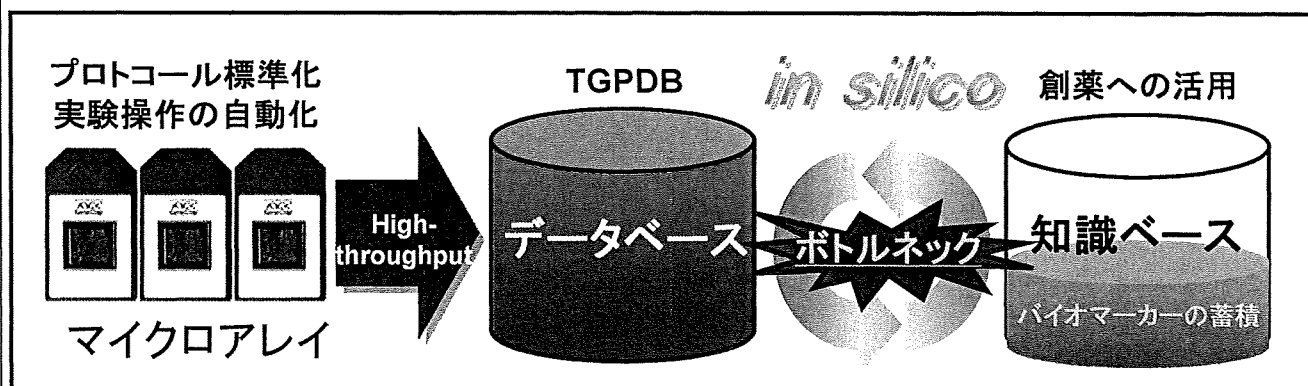


大規模データビューワ



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

# 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

## 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

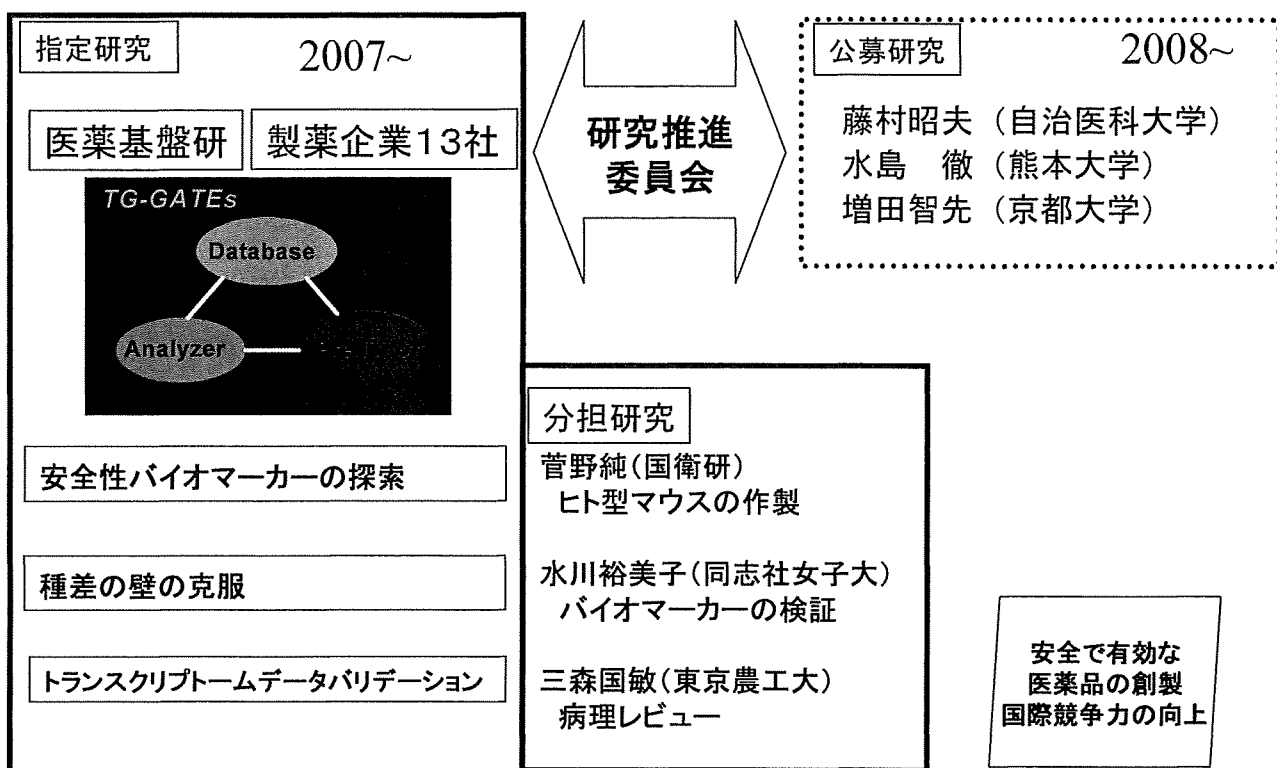
# トキシコゲノミクス・インフォマティクス プロジェクト(TGP2)

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

## 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



# 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

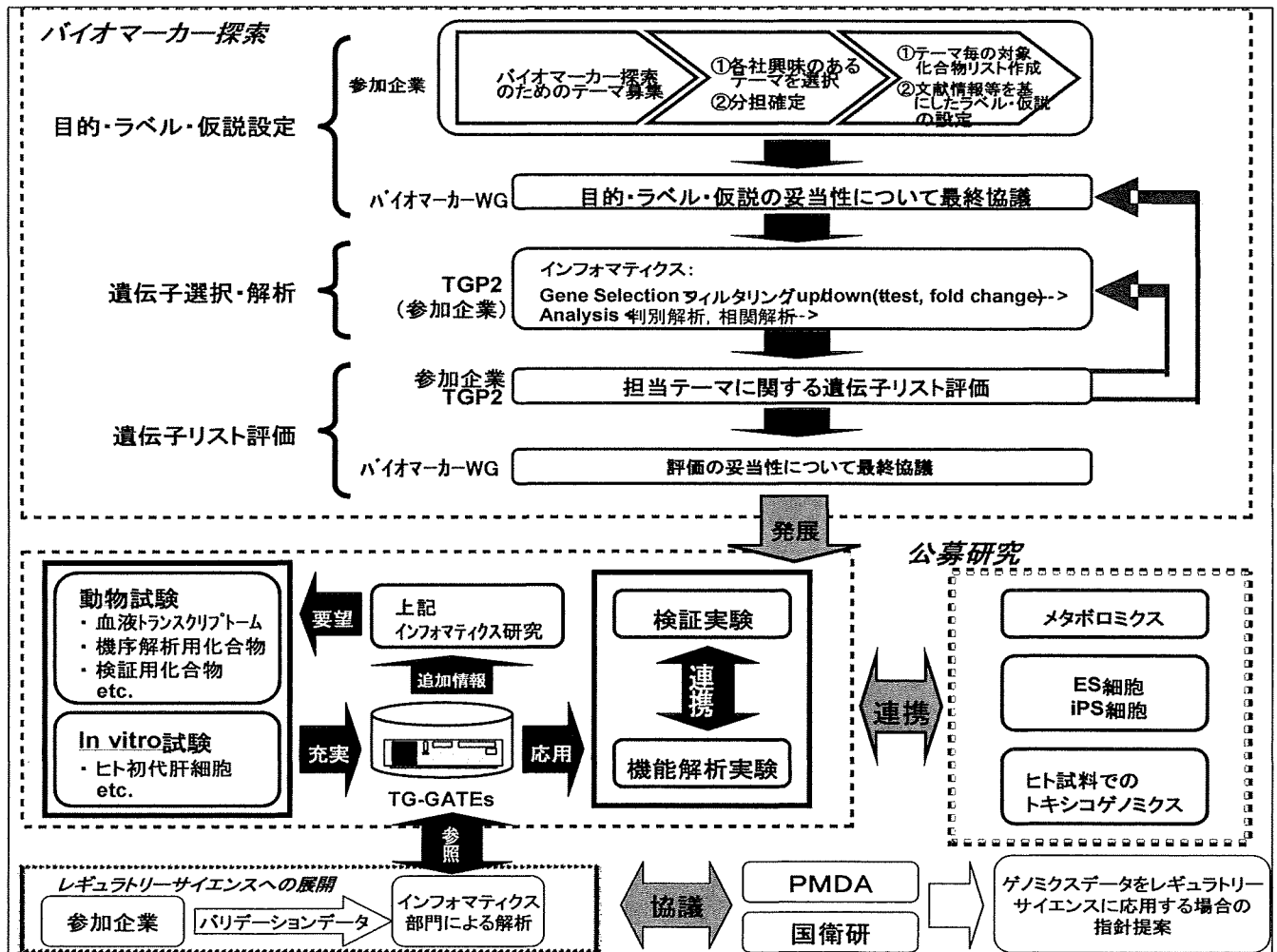
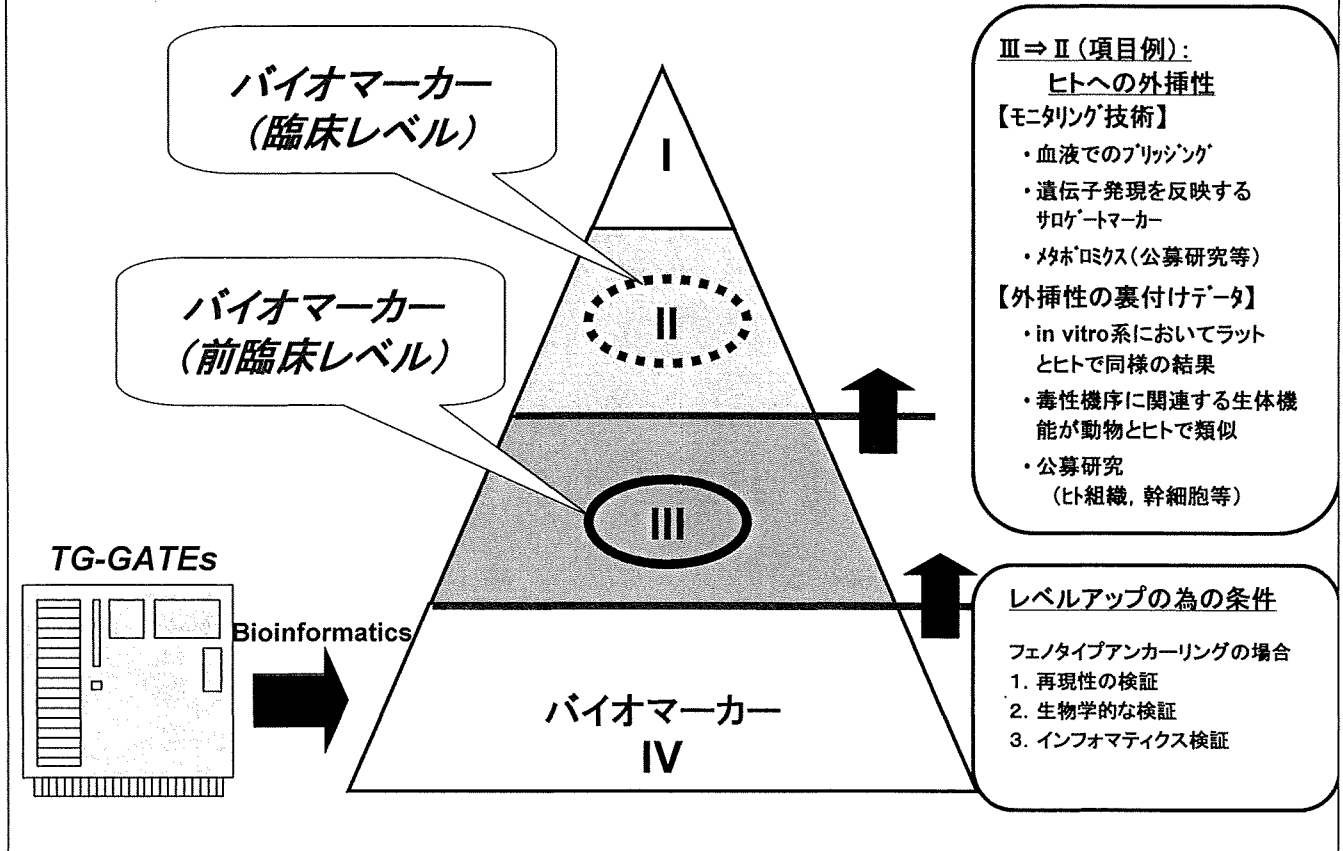
## バイオマーカーの定義(FDA)

- ・ 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



# バイオマーカー取得のストラテジー

チームA: フェノタイプアンカーリング

病理対応型バイオマーカーの取得と検証

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、病態モデルのデータ

他チームのメカニズム解析支援

チームC: 培養細胞

培養細胞のデータからバイオマーカー取得

チームD: その他の戦略

## 研究成果 (1/5)

マーカー (IV)	内容
1 肝グルタチオン枯渇マーカー	肝細胞内グルタチオン低下時に発現増加する遺伝子群で、グルタチオン枯渇に基づく細胞障害性を主成分分析により判定できる。
2 非遺伝子傷害性肝発がん物質判定マーカー	主に酸化ストレスに基づくと思われる機序による肝発がんリスクを、判別分析法(PAM)による陽性確率により定量的に示すマーカーである。通常は2年かかる発癌実験を、4週の連投実験で評価できる可能性を示した。
3 血中脂質低下マーカー	肝障害に起因する血中脂質の低下を、主成分分析により背景メカニズムに基づいて少なくとも2つに分類できる。
4 PPAR $\alpha$ アゴニスト	PPAR $\alpha$ アゴニスト活性に基づく肝肥大を主成分分析により評価できる。このマーカーは、in vivoのみでなく、in vitroにも適用可能である。
5 肝グルタチオン枯渇予測マーカーI	1に示したマーカーは、遺伝子数も141と多く、毒性学的機序も不明確であった。今回のマーカーは、わずか二つのプローブセットを用いてグルタチオンと共有結合を形成することによっ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。
6 肝グルタチオン枯渇予測マーカーII	このマーカーは14プローブセットからなり、肝細胞中のグルタチオン枯渇が生じるならば単回投与24時間以内のいずれの時点においても主成分分析で分離できるというものである。更に、このマーカーは、in vivoのみでなくin vitroでも有効である。

## 研究成果 (2/5)

マーカー (IV)	内容
7 胆汁鬱滞マーカー I	このマーカーは、39プローブセットからなり、反復投与によるデータを用いると、線形判別分析によって予測精度94%で薬剤誘起性胆汁鬱滞を検出できるというものである。
8 胆汁鬱滞マーカー II	連続投与により血中ビリルビン値が上昇した化合物に共通する遺伝子を抽出することにより、59プローブセットからなるマーカーを得た。これを用いたPCAをおこなうと、そのPC1によって、胆汁鬱滞リスクを定量的に評価することができた。更に、高用量単回投与のデータを用いることにより、連続投与で発症する胆汁鬱滞を、24時間以内で予測できる可能性を示した。
9 くもり硝子変性マーカー	肝臓にくもり硝子変性を共通に認める化合物で、変動している遺伝子を統計フィルターによって選別した。病理学へのアンカーリングをチューニングすることにより、24プローブセットを得た。この遺伝子セットを用い、線形判別分析法によりマーカー遺伝子セットをバリデートした。これと、80プローブセットからなる陰性化合物判別マーカーを組み合わせることによって、肝重量増加が生じたときのメカニズムをくもりガラス変性(酵素誘導型)と判定することが可能となる。
10 好酸性顆粒状変性マーカー	肝臓に好酸性顆粒状変性を共通に認める化合物で、変動している遺伝子を統計フィルターによって選別した。この遺伝子セットを用い、線形判別分析法によりマーカー遺伝子セットをバリデートした。これと、80プローブセットからなる陰性化合物判別マーカーを組み合わせることによって、肝重量増加が生じたときのメカニズムを好酸性顆粒状変性(PPARアゴニスト型)と判定することが可能となる。以後、肝重量増加を呈しながら5, 6のどちらにも属さない化合物の判定について検討する必要がある。

## 研究成果 (3/5)

マーカー (IV)	内容
11 腎尿細管障害診断マーカー	薬剤誘起性腎障害のうち、腎尿細管障害を起こした化合物に共通して変動する遺伝子群をフィルター法により抽出し、線形判別分析器を構築した。検出力は90%であり、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。
12 腎尿細管障害予測マーカー	薬剤誘起性腎障害のうち、腎尿細管障害を起こした化合物において、早期から共通して変動する遺伝子群をフィルター法により抽出し、線形判別分析器を構築した。こうして選別した72個のマーカーによれば、腎尿細管障害が発生するはるか以前から陽性と判別でき、障害予測マーカーとして使用できる可能性が見出された。
13 肝臓での貧血診断マーカー	ラットでは成熟後も肝臓において髄外造血が見られるため、貧血が生じると、肝臓においても当然変化が生じる。薬剤性の貧血が生じ、網状赤血球数が増加した化合物に関して、網状赤血球と相関して変動する肝臓の遺伝子を抽出し、マーカーとした。
14 血液での貧血診断マーカー	薬物による各種障害に伴って、貧血が見られることがある。これは網状赤血球の増加を伴い、血液を用いたトランスクリプトミクスにより判定できる可能性があった。後述の血液ゲノミクスのテーマにおいて得られたデータを用い、網状赤血球と相関のある遺伝子を抽出した。予測マーカーとしては困難が予想されるが、診断マーカーとしては使用可能であると判断された。

## 研究成果 (4/5)

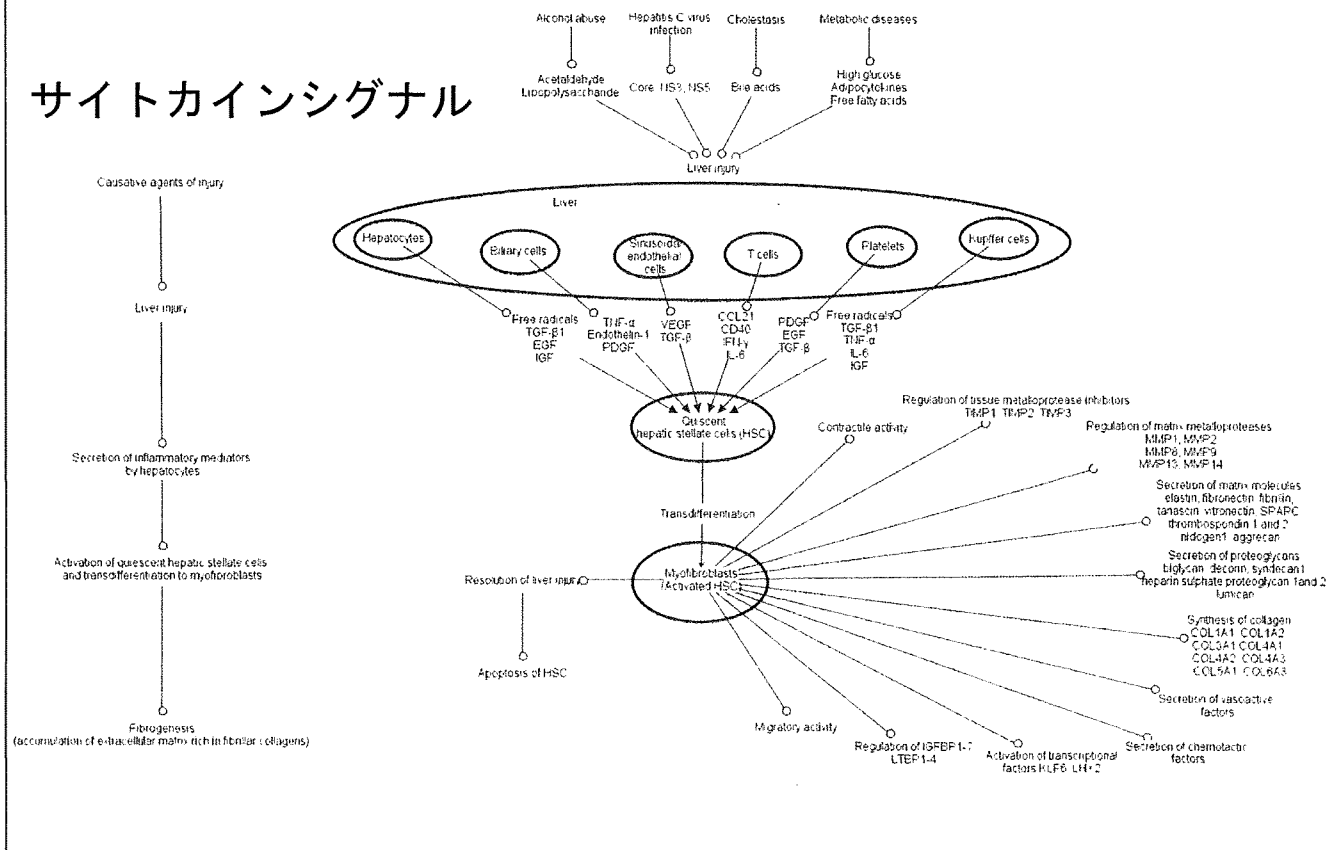
マーカー (IV)	内容
15 リン脂質症マーカー I	これは78プローブセットからなり、現在臨床において適当なバイオマーカーが存在していない肝臓リン脂質症リスクをもつ化合物を、PCAのPC1値によって分別するものである。このマーカーの特長は、空胞化を生じて、リン脂質症でないフェノタイプを区別できることがある。更に、通常リン脂質症は長期に連続投与して初めて発現する病変であるが、化合物によっては、単回高用量投与を受けたラット肝臓の24時間後の発現データを用いても判定できるという利点がある。
16 リン脂質症マーカー II	これは、25プローブセットからなり、前者と異なって、遺伝的アルゴリズムによ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週間後の肝臓におけるリン脂質症誘発能を高精度で予測することができる。なお、このプローブセットには上記マーカーと共通なものはほとんど含まれず、異なる機序に基づくマーカーと考えられる。
17 リン脂質症マーカー III	これは、上2者と異なり、SVMを用いて、リン脂質症誘発リスクを判別するモデルを構築しようとしたものである。結果として、この判別器によってリン脂質症の線形判別は可能であったが、未だノイズが残っており、改良の余地がある。
18 肝脂肪化マーカー I	肝細胞に脂肪蓄積が見られた6種の化合物を陽性対照として抽出したプローブセットであり、TG-GATEsに標準装備されているPAMをもちい、高い精度で脂肪蓄積を判別する判別器が得られた。また、一部は脂肪蓄積より2週間前の時点でも陽性判定でき、予測マーカーとして使用できる可能性が見出された。
19 肝脂肪化マーカー II	肝脂肪化を指標として学習セットを設定し、線形判別分析法を適用した。5 fold cross validationによる判別性能評価の結果、感度97%、特異性90%を得た。この判別器によりデータベース内全150化合物を検討すると、脂肪化について病理では不明瞭とされた化合物の一部が陽性と判定されたため、性能を評価する上で、これらの検証が必要である。

## 研究成果 (5/5)

マーカー (IV)	内容
20 肝繊維化マーカー	データベース中、肝繊維化を生じた6種の化合物の発現データから、決定木手法を用いてマーカーを探索した。その結果、CCl2, Lbp, Gstm4の3つの遺伝子を用いることにより、良好な診断結果が得られた。また、一部の化合物については、繊維化発症以前に陽性判定され、予測マーカーとしても有望であった。
21 非遺伝毒性化合物の肝発ガンマーカー	Ames試験陰性でありながら肝発癌性を示す化合物において有意に変動する遺伝子群を抽出し、これらを用いて判別分析(SVM)を行った。これにより、10~30程度のプローブセット、予測精度74%程度の判別期が得られた。今後これを改良していく。
22 転写因子関連マーカー	本マーカーは、他のマーカーと異なる戦略で抽出した。すなわち、酸化ストレス応答で重要な役割を果たすと考えられているNrf2を中心に、文献情報を基にしてその制御下にある遺伝子をリスト化した。こうして得た93プローブセットを用いてデータベース内の化合物群を解析したところ、酸化ストレスによる肝障害惹起物質を分類することができた。
23 肝細胞壊死	反復投与の肝臓遺伝子発現データを用いて、肝細胞壊死の判別モデル(LDA法)を構築し、112プローブセットを得た。テスト化合物における陽性判定率60%を達成するためには、擬陽性が10%生じる。以後、最適な閾値を設定することによりこれを改良する予定である。

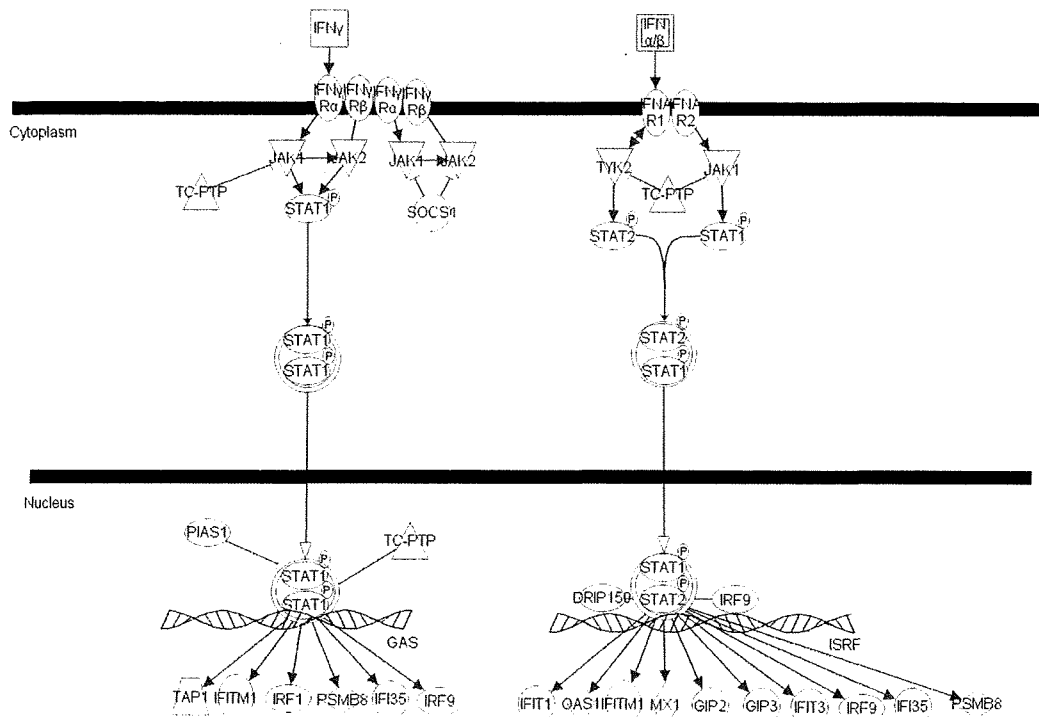
# シグナルパスウェイからのマーカー抽出

## サイトカインシグナル

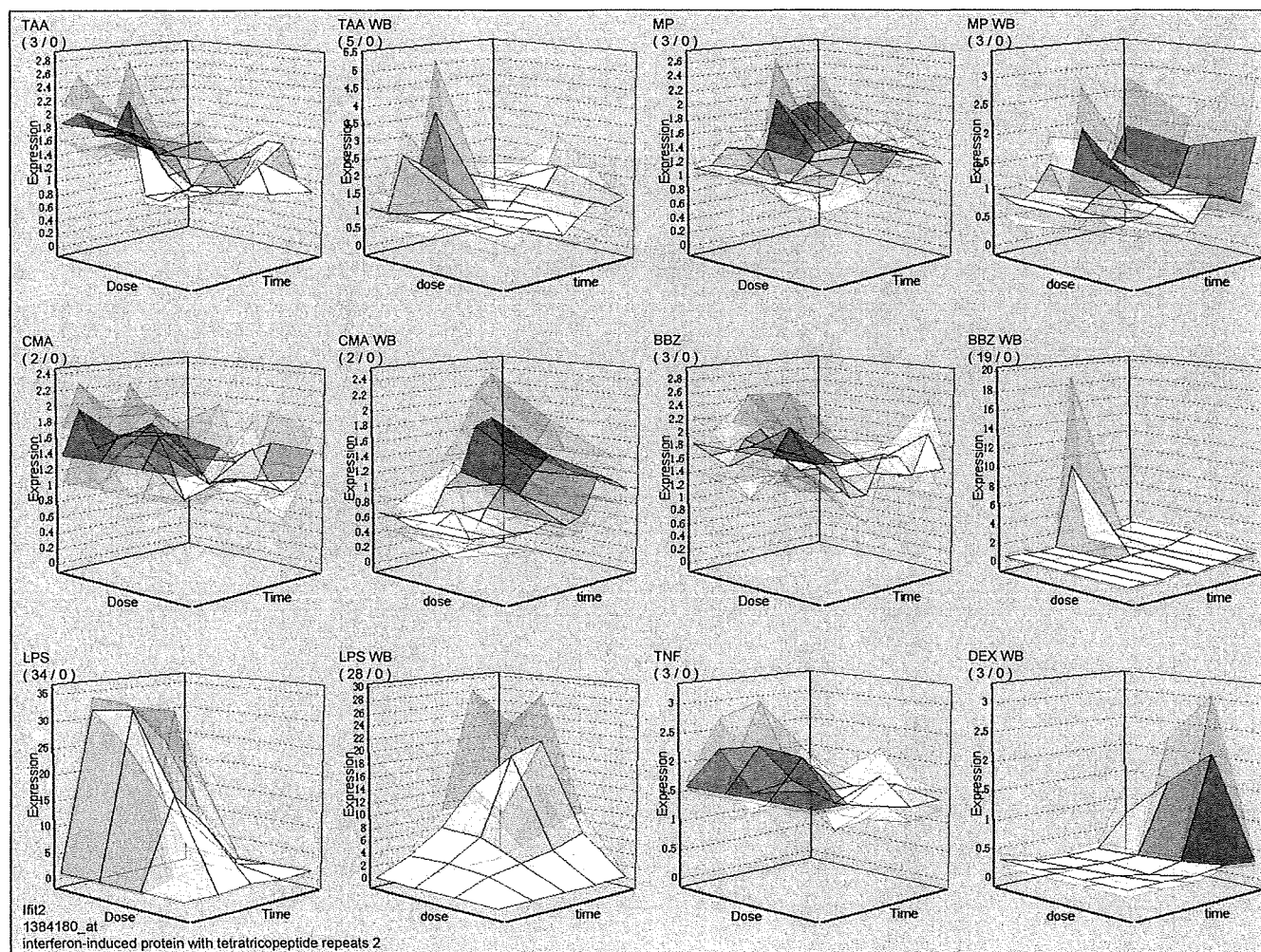
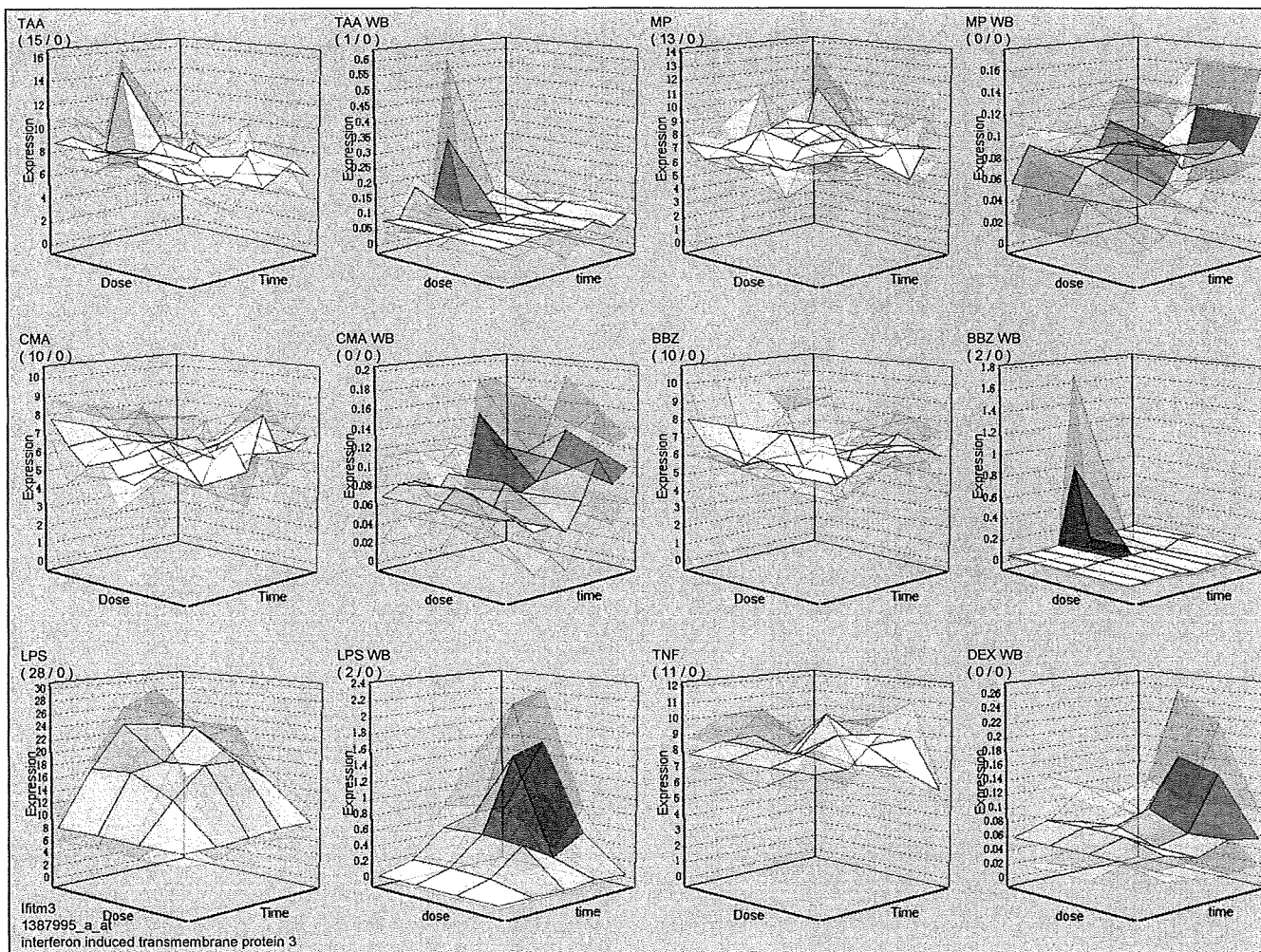


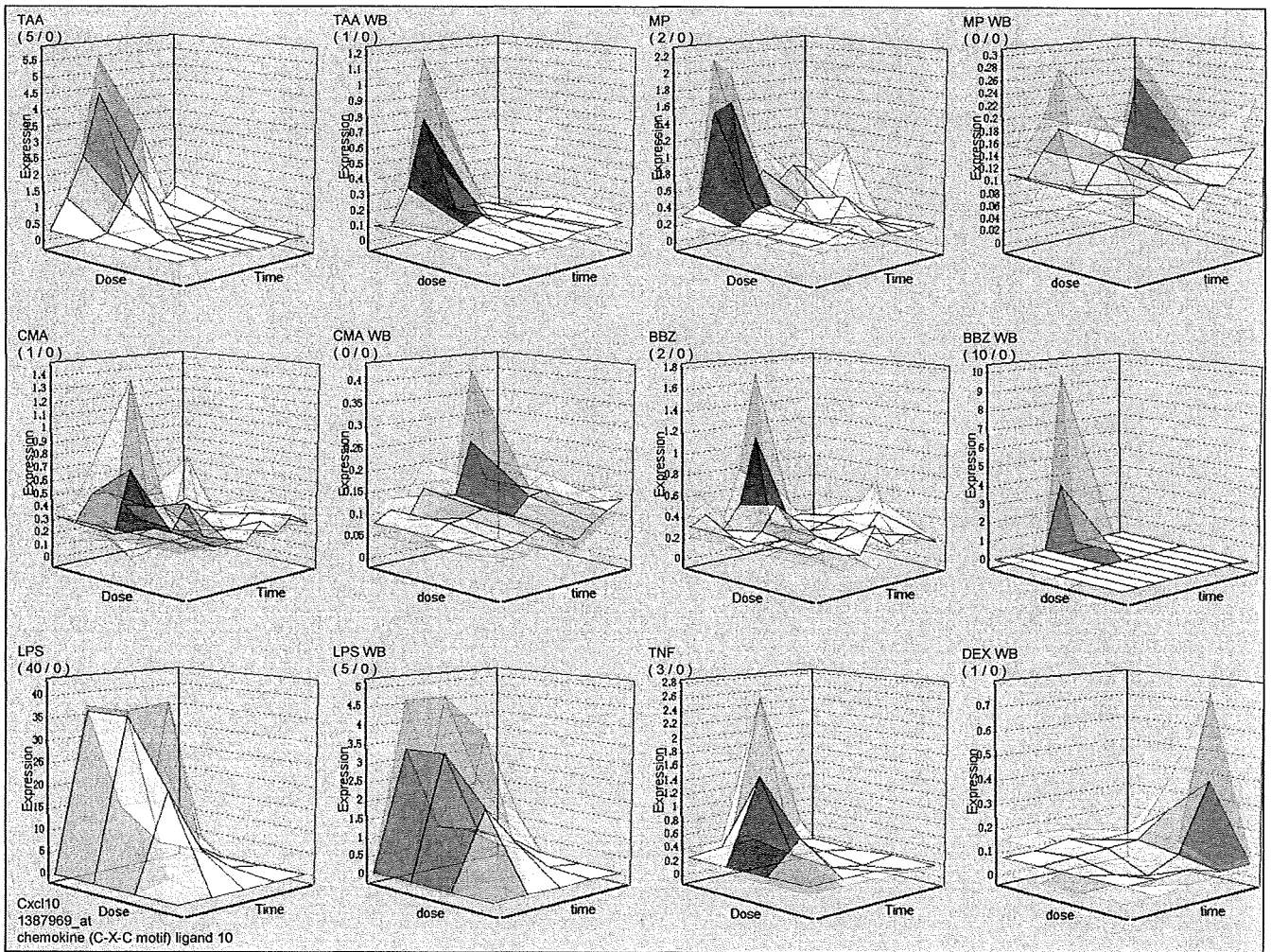
# Interferon Signaling

Interferon Signaling









# 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

## 2) トランスクリプトームで種差の壁に挑戦する

## 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・2で採用
3. ES, iPS細胞・・・機が熟していない(?)→スーパー特区
4. ヒト型遺伝子導入動物・・・分担研究(菅野)
5. Toxicological Pathwayで推定・・・知識の蓄積これから
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

### 血液による臓器障害性診断・予測

1. 血液サンプルを用いたトランスクリプトミクス
  - \* 代表的な肝障害物質による薬物特異的な発現変動を観察
  - \* 網状赤血球変動の影響をキャンセルする方法の検討
2. 末梢血中mRNAを指標とした臓器障害バイオマーカー  
Toxicological Sciences 2008 106(2):538-545
3. 末梢血miRNAを指標とした臓器障害バイオマーカー  
PNAS 2009 106:4402-4407
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  
グレードII、グレードIのマーカー候補各1



# 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. 目的と適用限界の明確性
4. メカニズム解明に寄与

- 
5. 結果の定量的表示
  6. 数？ ←チップを用いる意味

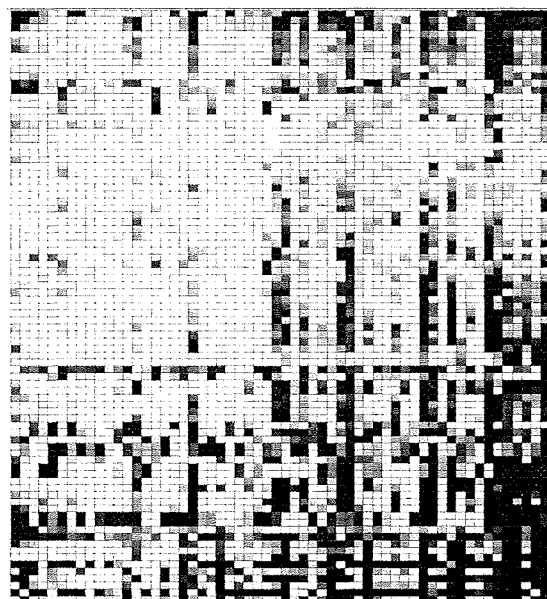
## バイオマーカーを活用した化合物評価

スコア低 ← → スコア高

横軸：化合物

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

縦軸：バイオマーカー



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 $\alpha$  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 $\alpha$  single24h  
Hamp  
Tamura PPAR $\alpha$  SigGene

# 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(TAC-GATES)を活用してバイオ  
マーカー候補を創出する

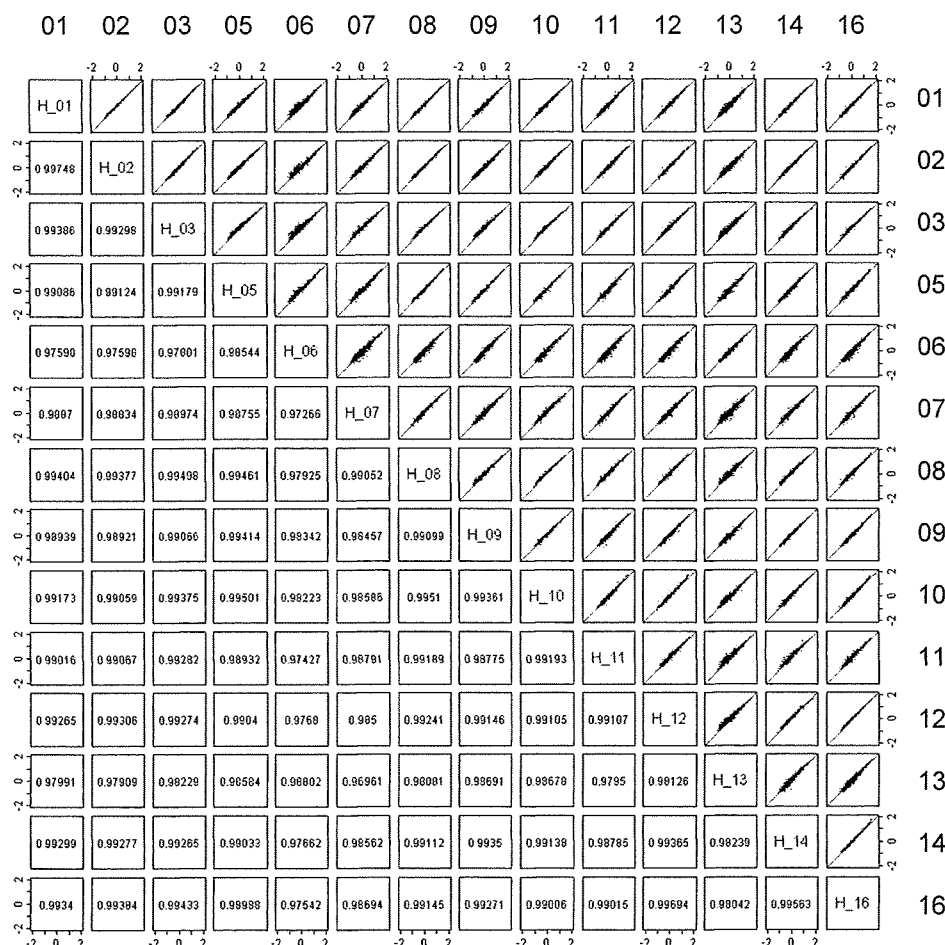
2) トランスクリプトームで種差の壁に挑戦する

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

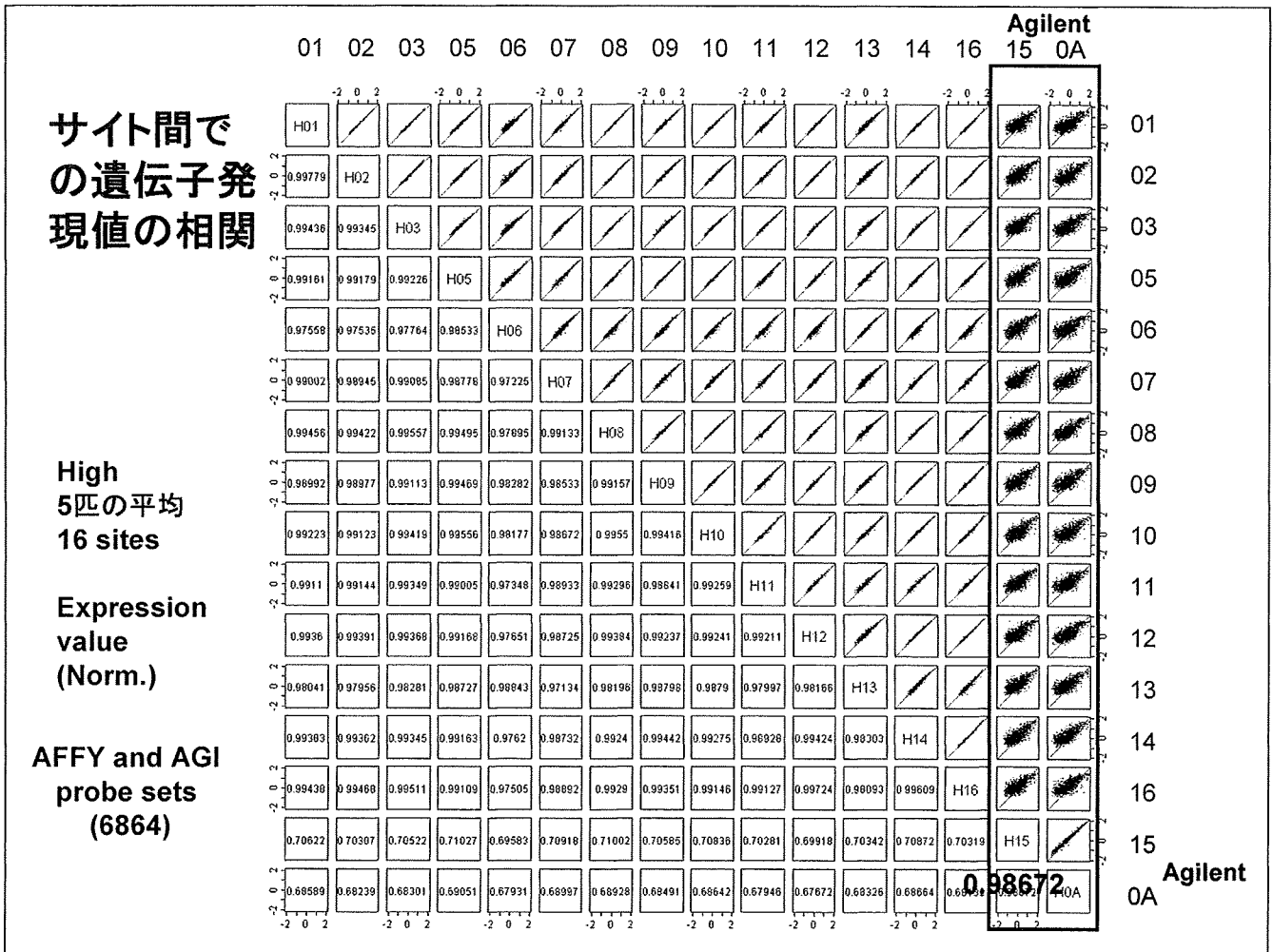
サイト間で  
の遺伝子発  
現値の相関

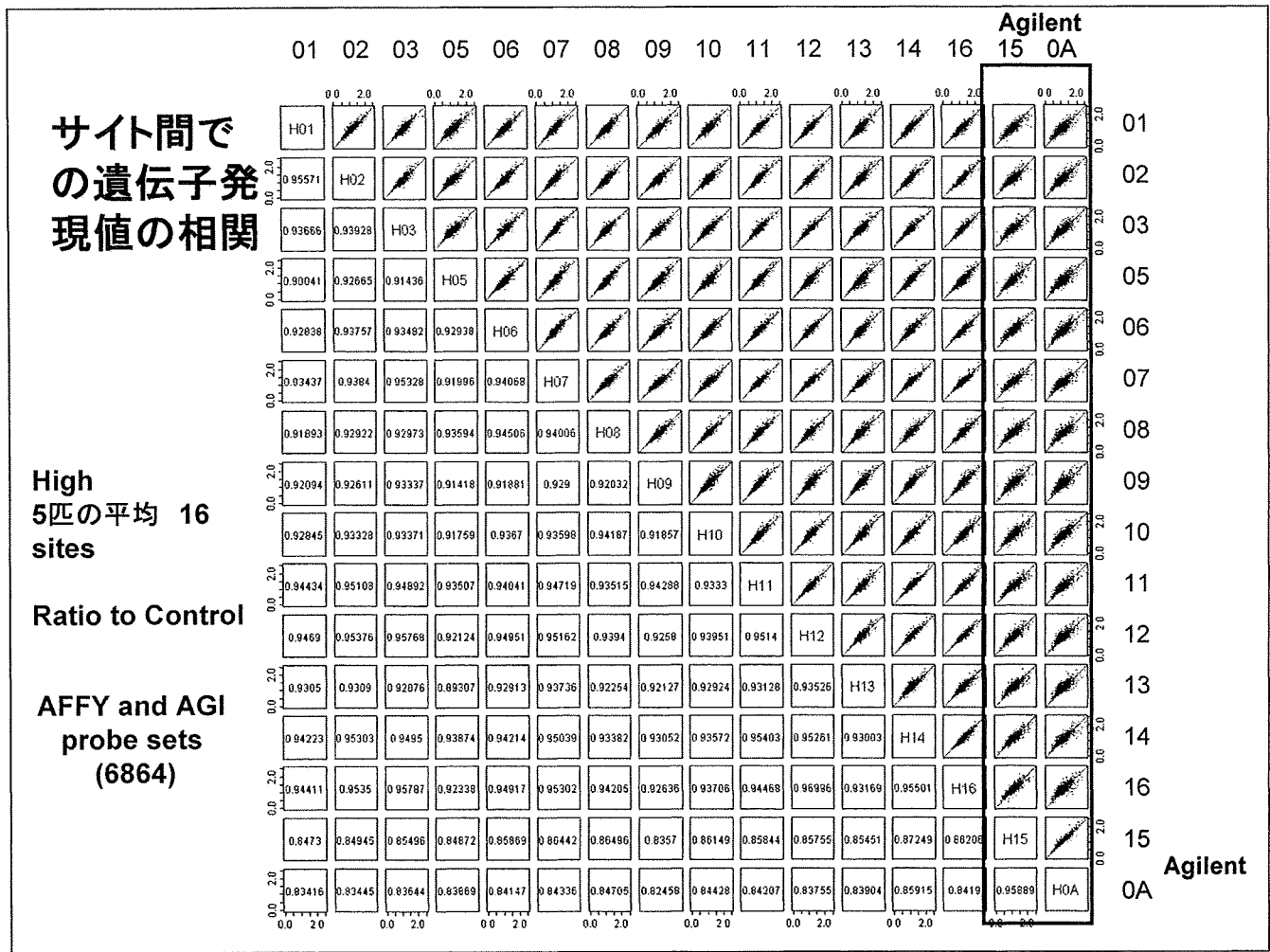
High  
5匹の平均  
14 sites  
all present call  
(10210)

Expression value  
(Norm.)



# Phase II: Multi-Platform Analysis (Agilent, 2 sites) 2008 - 2009





## 既報\*のアセトアミノフェン 応答遺伝子の発現値の比較

\* J. Toxicol. Sci. 2007, 32, 469-486.