200940001B

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

国際的整合性を目指す有効性及び安全性に於ける遺伝子発現情報の標準化に関する研究
（H19-医薬-一般-001）

平成 19～21 年度　総合研究報告書

研究代表者　菅野　純

平成 22(2010)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

国際的整合性を目指す有効性及び安全性に於ける遺伝子発現情報の標準化に関する研究
(H19-医薬-一般-001)

平成 19～21 年度　総合研究報告書

研究代表者　菅野　純

平成 22(2010)年 3 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

国際的整合性を目指す有効性及び安全性に於ける遺伝子発現情報の標準化に関する研究

（H19-医薬-一般-001）

平成 19 年度～21 年度　総合研究報告書

研究代表者　菅野　純

平成 22（2010）年　3 月

別添 2

目　次

Ⅰ．総合研究報告書
医薬品等の有効性・安全性評価に資する遺伝子発現解析の
国際的標準化に関わる研究 …… 1
菅野　純

(資料 1) RNA 標準化年表 …… 15

(資料 2) Percellome プロジェクトの進捗 …… 17

(資料 3) 厚労省通達「ゲノム薬理学における用語集について」 …… 31

(資料 4) ICH E15
"DEFINITIONS FOR GENOMIC BIOMARKERS,
PHARMACOGENOMICS, PHARMACOGENETICS,
GENOMIC DATA AND SAMPLE CODING
CATEGORIES" …… 41

(資料 5) ICH E16
"GENOMIC BIOMARKERS RELATED TO DRUG RESPONSE:
CONTEXT, STRUCTURE AND FORMAT OF
QUALIFICATION" …… 51

(資料 6) 書籍「非臨床試験－ガイドラインへの対応と新しい試み－」目次 …… 63

Ⅱ．研究成果の刊行に関する一覧表 …… 77

Ⅲ．研究成果の刊行物・別刷 …… 79

別添 3

Ⅰ．総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

総合研究報告書

国際的整合性を目指す有効性及び安全性に於ける遺伝子発現情報の標準化に関する研究

(H19-医薬-一般-001)

研究代表者 菅野 純

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・部長

研究要旨

医薬品を始めとする人の身体が摂取し得る物質等の有効性・安全性評価に於いて、遺伝子発現情報を活用する際に課題となる遺伝子発現解析の標準化に資することを目的として、高密度マイクロアレイや定量的 PCR 等を用いた生物学的、薬理学的あるいは毒性学的研究を実施している国内の研究者と情報交換を行い、また、関連有識者、研究者を招聘し、Ad hoc 会合を行うことにより、遺伝子発現解析の標準化に関する国内の意見交換を行う。また、RNA の外部標準試薬を用いる場合に、標準試薬として求められる品質、品質管理、供給体制に関する情報収集や、国内に於ける情報交換、知識の集約を行う。

さらに、国際的な動向を調査するとともに、米国等と技術的な情報交換等を進め、米国に於ける遺伝子発現解析の標準化に向けた活動への技術的関与を検討していく。

以上により、医薬品等の有効性・安全性評価に遺伝子発現情報を活用する際の条件設定等について、海外に於いて急速に標準化に向けた活動が盛んになり事実上の国際標準(デファクト・スタンダード)になる可能性があることも想定し、活動当初から当該活動に対し関与し提言等を行い、今後の標準化に向けた課題抽出や条件設定の提言等を行う。

3 年間の研究活動を通じ、医薬品等の有効性・安全性評価に遺伝子発現情報を活用する際の標準プロトコル作成に向けた課題抽出や条件設定検討、特に厚生労働行政の医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業に於いて、安全性・有効性および品質の評価に科学的合理性を付与するための研究を強力にサポートし、これを通じて保健衛生および国民生活の質の向上の一助となった。

本研究期間中、基礎・基盤研究における様々な遺伝子発現研究の進捗を吸収した MAQC,ERCC 等の国際標準化団体の活動も結実し始めている。これに呼応して国内外の規制当局に於ける対応体制も整いつつあり、本研究班の当初の目的はほぼ達成された。

研究分担者
油谷 浩幸　東京大学先端科学技術研究センター
　　ゲノムサイエンス部門
　　教授
山口 照英　国立医薬品食品衛生研究所
　　生物薬品部
　　部長
矢本 敬　　第一三共株式会社 安全性研究所
　　第七グループ長
住田 佳代　住友化学株式会社
　　生物環境科学研究所
　　主席研究員
山田 弘　　(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
　　サブプロジェクトリーダー
宇山 佳明　(独)医薬品医療機器総合機構
　　新薬審査第三部
　　審査役

A. 研究目的

本研究は、主に米国を中心に急速に進みつつある「mRNA 測定に関わる標準化」に呼応して、国際的な動向を調査し、国内での情報交換により、遺伝子発現解析に関する標準化に向けた提言を行うとともに、国際的標準化に向けた活動への技術的関与を検討することを目的とする。

遺伝子発現解析技術については、医薬品等の有効性・安全性評価に係る非臨床試験及び臨床試験に於いて、遺伝子発現情報の活用が急速に進展しつつある一方で、従来の遺伝子発現解析は相対的な基準が用いられてきたことから、その標準化が国際的な問題となっている。

平成18年に米国が遺伝子情報解析の標準化に向けた検討を開始し、ERCC (External RNA Control Consortium) が中心となり標準化に向けた検討が、またこれと連動して、米国 NIST (National Institute of Standards and Technology) がRNAライブラリーの構築に向けた活動を開始した。これらが事実上の国際標準になることが想定されている。Percellome Project の実績等により国立医薬品食品衛生研究所(国衛研)に参加要請等が届いたことから、当初から積極的に関与している。これにより国際的動向を把握し、今後の国際的標準化に向けた検討に我が国の意向を反映することが可能となる。また現在国内で検討を進めているファーマコゲノミクス関連のガイダンス案に資することも可能となる。

これに対し国内では、国衛研に於いて、RNA 等の生物試薬の品質管理等に関する中心的研究を実施し、また製薬企業 17 社と連携して開始したプロジェクト(現在は(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に移管)や、Percellome Project における定量的標準化の経験を有しており、RNA 等の標準品の品質管理面と、実際の運用に関わる生物学的定量性判定の両面が揃っている。

本研究の特色・独創性は、研究レベルで用いられてきた高密度マイクロアレイや定量的 RT-PCR 等による遺伝子発現情報を、医薬品等の有効性・安全性評価に適用する際に問題となる、それらの遺伝子発現解析の標準化に関する問題点を整理することである。また、各班員は医療・創薬・化学工業製品・毒性・精度管理、行政の各方向を網羅する布陣をとっている。

B. 方法

医薬品を始めとする人の身体が摂取し得る物質等の有効性・安全性評価に於いて、遺伝子発現情報を活用する際に課題となる遺伝子発現解析の標準化に資することを目的として、高密度マイクロアレイや定量的 PCR 等を用いた生物学的、薬理学的あるいは毒性学的研究を実施している国内の研究者と情報交換を行い、また、関連有

識者、研究者を招聘し、Ad hoc 会合を行うことにより、遺伝子発現解析の標準化に関する国内の意見交換を行う。平成 20 年度からは国衛研 Percellome プロジェクトと同規模のラットトキシコゲノミクスデータベースを有する(独)医薬基盤研の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)の山田弘サブリーダーを分担研究者に迎え、共同研究体制をさらに推進するほか、両者のデータベースを組み合わせ、毒性評価の基盤となる標準化データベースの構築を検討する。また(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)にて行われているファーマコゲノミクス利用に関する取り組みを通じた標準化方針の検討を行う。

RNA の外部標準試薬の実用化に向けた対応としては、標準試薬として求められる品質、品質管理、供給体制に関する情報収集や、国内に於ける情報交換、知識の集約を行う。

さらに、継続的に活動している米国 MAQC や ERCC、OECD といった国際的な動向を調査するとともに、これらと技術的な情報交換等を進め、国際社会に於ける遺伝子発現解析の標準化に向けた活動への技術的関与を検討していく。

以上により、医薬品等の有効性・安全性評価に遺伝子発現情報を活用する際の条件設定等について、海外に於いて急速に標準化に向けた活動が盛んになり事実上の国際標準(デファクト・スタンダード)になる可能性があることも想定し、活動当初から当該活動に対し関与し提言等を行い、今後の標準化に向けた課題抽出や条件設定の提言等を行う。

本研究において幅広い情報収集を確実に行うために、各班員は医療、創薬、化学工業製品、毒性、精度管理、行政の各方向を網羅する布陣を配し、以下の項目に焦点を当て、分担課題に対応した調査を進めた。

I. マイクロアレイ実施経験とデータ利用(審査や研究取りまとめ、等)経験者による問題点の抽出

1.臨床関連: 東京大学・先端研 油谷浩幸 教授

2.創薬関連: 三共・安全性研究所 矢本 敬 第七グループ長

3.化学工業品関連: 住友化学・生物環境科学研究所 住田佳代 主任研究員

4.トキシコゲノミクス関連:国衛研・毒性部 菅野 純 部長、 医薬基盤研・TGP 山田 弘 サブリーダー

II. RNA 試薬・管理に関する専門的見地からの問題点の抽出

5.国衛研・生物薬品部 山口照英 部長

III. 行政対応における問題点の抽出

6.(独)医薬品医療機器総合機構 宇山佳明 審査役

7.オブザーバー厚労省側担当: 医薬食品局審査管理課 担当専門官

C. 結果

本研究の開始時点で、マイクロアレイや定量 PCR 等の測定技術を中心とした遺伝子発現解析技術の向上・普及は目覚ましく、医薬品・食品(サプリメントなど)・工業化学物質等の開発や安全性評価に於いても利用されつつあった。米国では FDA が医薬品審査にゲノミクスデータを利用しようと検討を進め、既に医薬品審査でのゲノミクスデータの任意添付を始めており、また欧州 EMEAも米FDAと同様にガイドラインの検討を開始していた。我が国に於いても医薬品等の審査過程でのゲノミクス活用検討が始められており、新技術への対応が急務であった。

そこで本研究では、遺伝子発現情報を医薬品・食品・工業化学物質等の有効性や安全性を

評価するための定量的かつ高精度の指標として利用するために必要な RNA 標準化要件や関連情報を調査することとし、特にゲノミクス情報を用いた医薬品等審査に於いて国際的な整合性を確保することに重点を置いて(国内外で同じ評価基準を持っていれば安全性の確保や審査の迅速化などに有効であるため)、厚生労働省・日本政府が方針を定めるための基礎情報を提供した。

(1)RNA 標準化に関する技術・活動(担当:菅野、山田)

(A)RNA標準化技術

新規化学物質の安全性評価に利用するための RNA 標準化技術は、以下の特性を有する必要がある。

(a)定量 RT-PCR や種々のマイクロアレイに共通して適用可能なこと

(b)測定の時期・場所に拠らず普遍的な尺度に基づくこと

(c)測定の再現性があること

(d)操作が平易であること

様々な標準化技術が提唱されているが、研究期間を通じ、これらの条件に最も良く適合するのは、細胞1個あたりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法(菅野純ら、2006)であった。即ち a～c の条件を満たし、d についても分注ロボットによる完全自動化がほぼ完成していることに加え、本手法を利用した化合物曝露実験がマウス・ラットに於いて実施され、100 種類以上の化合物によるトランスクリプトームデータベースが既に構築されており、医薬品等の審査過程において参照可能であることが特記される。

平成21年度には日本国特許として登録され、技術保護体制も整った。また同年、米国 ERCC・NIST が共同で発表した外部標準用 RNA 試薬(平成22年度に配布開始予定)にも対応可能であり、今後の幅広い活用が期待される。

(B)RNA解析技術について

研究期間を通じて、遺伝子発現解析用マイクロアレイの市場シェアは変わらず Affymetrix 優位であり、Agilent が次点であった。

国衛研・毒性部では最近、クロスハイブリダイゼーション補正技術(MLANG)を確立しつつあり、定量 PCR や次世代シークエンサによる遺伝子発現データとのより高度な互換性実現に向け、実用化を急いでいる。

一方、次世代高速シークエンサ技術は急速に改良が進み、遺伝子発現解析用としても実用段階に達しつつある。平成20年度の段階では全 mRNA を定量 PCR 相当の感度をもって測定するには速度的に性能不足であり、結果的にスプライシングバリアントの網羅的な検出は困難であったが、平成 22～23 年には定量 PCR に匹敵する精度・ダイナミックレンジとマイクロアレイを上回る網羅性を満たす基本性能が実現する見込みである。

なお本技術については、ライブラリ作成などの Wet 操作に起因する誤差発生が懸念されており、系統誤差への対策が必要であるが、今後の標準プロトコル改良により改善されてゆく可能性が高い。

ランニングコストは年々低下しており、今後数年でマイクロアレイと同程度のコストパフォーマンスを実現できる見込みである。次世代高速シークエンサ技術の普及後、マイクロアレイとの使い分けは結局コスト問題に落ち着くと予測される。

今後、シークエンス処理(次世代高速シークエンサ)とハイブリダイゼーション処理(マイクロアレ

イ)とのデータ相互互換性の確立についても検討が必要である。

(C)RNA標準化活動

RNA 標準化を謳う団体は国内外に複数あり、様々な立場で活動しているが、技術的には米国を中心に進められている。

(a)国内動向

国内では製薬企業 13 社と医薬基盤研究所、国立医薬品食品衛生研究所からなる民官共同研究、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)がレギュラトリーサイエンスへの基盤整備として遺伝子発現解析のバリデーションやガイドライン案策定を目指している。TGP2 の拠り所となっている厚生労働科学研究には菅野が分担研究者として参画しており、情報交換や RNA 標準化に関する共同研究の可能性を検討中であり、平成20年度からはTGP2のサブリーダー 山田弘博士を分担研究者に迎え、調査範囲を拡大した。

(a－1)Percellomeプロジェクト

国衛研の Percellome プロジェクトでは強制経口(単回投与・反復投与 and/or 多臓器サンプリング)実験、シックハウス症候群物質を中心とした吸入暴露(単回暴露・反復暴露)、個体発生時暴露に関する研究、および化合物暴露による急性および遅発性の行動影響解析などを継続的に進め、平成21年度末にはマウスを中心としたトキシコゲノミクスデータベース(Percellome データベース)は強制経口実験で100以上の化学物質、吸入暴露実験で10以上の化学物質のデータ規模となり、延べ遺伝子数にして4億5千万を超えた。

一般公開されている Web 版 Percellome データベースは平成21年度までに100名超の研究者を中心とした登録ユーザーを国内外から集め活用された。H21 年度に旧システムの使用を終了し、RNA 標準化にも活用可能な高機能のユーザーインターフェイスを実現すべく、in house 開発に移行し、平成 22 年度初めには新システムの運用を開始する予定である。

データ解析技術開発としては独自に開発した tmf Clustering と RSort の活用により、効率よく全遺伝子を網羅的に解析することが可能となった。実際に、Phenotype independent の暴露条件(低用量条件)での遺伝子発現情報を既知情報(Pubmed, OMIM)と照合することで、毒性機序における重要な分子の解明や毒性発現に関与するシグナルネットワークの抽出に成功した例(サリドマイドの分子毒性機序研究)もある。

平成 21 年度からは新たに Percellome データベースを活用したバイオインフォマティクス研究を開始し、システム・バイオロジー研究機構(SBI)北野宏明博士らとの共同研究に注力している。

(a－2)TGP2 による RNA 標準化研究

平成 20 年度、TGP2 では RNA 標準化のための基本的な技術評価の一環として、Affimetrix GeneChip を用いて遺伝子発現を測定した時の施設内・施設間での相関について評価を行った。サンプルは、acetaminophen を 0、300、1,000mg/kg の用量で単回投与し、24 時間後に採取したラットの肝臓を用いた。採取した肝臓のホモジネートをTGP2参加企業に配布し、各施設での SOP に従って遺伝子発現データを取得した。取得したデータは標準化した後、相関係数、t 検定、Fold Change 等、各種手法により遺伝子発現の解析を行った。その結果、どの施設でも施設内での変動は小さく、多少の SOP の差異があっても殆ど遺伝子発現データに影響を与えることなく、良好な施設間での相関が示されることが確認

された。検討結果の中からは、"absent"のプローブセットを除外すると相関が非常に改良されること、発現データを log2 変換することにより薬物影響の施設間差が小さくなること等が明らかとなった。

平成 21 年度は、Agilent マイクロアレイを用いて同様のバリデーション試験を行った。サンプルは、0、300、1000mg/kg の acetaminophen を単回経口投与し、24 時間後に採取したラットの肝臓を用いた。その結果、Agilent マイクロアレイを用いた場合においても、良好な施設内再現性及び施設間再現性が示された。遺伝子ごとにみた場合、施設間で共通して発現変動を示す遺伝子(2 倍以上変動、$p<0.01$ or 0.05)は 60～80%程度であった。一方、IPA の Canonical Pathway による解析で上位 21 位までにランクされた Pathway については、その内の 20 Pathway が全施設で選択された。Affymetrix と Agilent マイクロアレイのプラットフォーム間比較を行ったところ、発現値で比較したときの相関は低いものの、対照群に対する発現比で比較した場合には高い相関が認められた。以上より、発現比を用いることにより、異なるプラットフォーム間における遺伝子発現データの比較も可能であると結論付けた。

これまでの検討結果より、設計の悪い遺伝子プローブが存在する場合、Ratio で値を取り扱う際において control 群の発現値が低い場合、Ratio で値を取り扱う際において発現値が高く飽和していると考えられる場合等では、個々の遺伝子の発現変動を論じる際に注意が必要になるものと考えられた。

以上の研究成果については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の関係者と情報共有を行った。現在、バリデーション試験の成績について、論文化の作業を進めている。

(a－2)各領域でのRNA標準化動向

臨床医療領域、創薬領域、化学工業品製造領域に於いては、国民生活の安全を守り、未知の毒性に対応するためには網羅的なゲノミクスデータ添付が必要であって、必然的にデータや解析技術の標準化技術の導入が審査側で必要となることについて大筋で理解が得られているものの、各分野での自発的な標準化技術の導入については消極的であり、行政による取りまとめを求める意見もあった。

行政、特に医薬品評価段階でのファーマコゲノミクス利用については、(独)医薬品医療機器総合機構(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency、PMDA)が準備を進め、平成 21 年度の時点でFDA、EMEAとの三極協力体制の構築に成功している。

(b)国際動向

海外での主要な関連団体は、MicroArray Quality Control Project(MAQC、米)および External RNA Consortium(ERCC、米)であり、European Medicines Agency(EMEA、欧)も標準化に関連した活動を開始している。特に MAQC や ERCC はマイクロアレイメーカー、試薬メーカー、製薬企業、アカデミア、行政が参加する強力な団体であり、論文等の目立ったアウトプットはなかったものの、計画を着実に進めつつ、face-to-face ミーティングを定期開催し、他国・他団体の情報も積極的に取り込んでいる(例えば平成 19 年度には Percellome プロジェクトのヒアリングを行っている)。

平成20年には RNA 測定技術の遷移の先駆けとして、MAQC がマイクロアレイ関連の研究を事実上終え、次世代シークエンサ技術を利用した RNA 測定技術の評価・標準化(SEQC)に重点を移している。ただし、先端的な研究機関での次世代シーク

エンサの導入は増えてきているものの、国内外の一般的な研究機関や企業においては直ちにマイクロアレイが次世代シークエンサに置き換えられるような状況にはなく、とりわけ遺伝子発現解析分野での導入はSEQCによる評価や技術進歩(スループット性の向上や初期および運用時コストの削減)を待っているものと予想される。

一方、ERCCでは外部標準RNAライブラリに関する開発・評価研究をほぼ終え、これをUS National Institute of Standards and Technology (NIST)がstandard reference materialとして平成22年内も供給を開始する予定となった。これにより研究施設間のデータ共有や様々なプラットホーム間のデータ互換性確立など、様々なRNA標準化が進むものと期待される。

また日米EU医薬品規制調和国際会議(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use、ICH)では、平成19年にE15:「ゲノム薬理学に関する用語の定義(Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data and Sample Coding Categories)」、平成20年にE16:「薬物応答と関連するゲノムバイオマーカー(Genomic Biomarkers Related to Drug Response: Context, Structure and Format of Qualification Submissions)」に続いて、ゲノミクスデータ利用のためのガイドラインをICH E17ベースで検討中である。

トシキコゲノミクス関連の国際活動としては、Extended OECD/IPCS Advisory Group on Toxicogenomics会議が毎年開かれた。この国際会議はIn vitro試験を中心としたトキシコゲノミクス技術の開発を目指すOECD拡大アドバイザリーグループ(OECD Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics)であり、米国ToxCastの活用を想定している。

平成20年度は1)US ToxCast Programの Phase I及びその他の国における high throughput／high content screeningに関する情報共有、2)molecular screeningに関するレギュラトリーサイエンスからの潜在的な要望と応用方法についての確認、3)Molecular Screening Projectに対する参加国及び関係機関の今後の連携のあり方や次のステップに向けたに合意の形成、を主題に開催された。

i) Potential Regulatory Needs and Applications of the Molecular Screening

EPAからmolecular screeningの利点として、使用動物数の削減やコスト低減、評価に要する時間の短縮があげられ、パスウェイあるいは毒性メカニズムの解釈に有用であると報告された。ToxCastの進捗状況については、Phase Iで14種のHPV化合物について評価を実施しており、Phase IIではHPV、MPV化合物の他にナノマテリアルについても計画されるとのことであった。

ii) Report from the U.S. ToxCast Program

ToxCast Programでの主要な取り組みは、毒性メカニズムの解明とその成果を応用したHTS assay開発、ケミカルライブラリーのスクリーニング、ToxCastが導き出す結果とin vivoデータとの比較とのことである。今後の検討課題としては、特に代謝物の評価が取りあげられていた。

iii) Report from member countries and stakeholders on Advances in HTS & HCS for Prioritizing Environmental Chemicals

情報共有として、以下の報告があった。

・Toxicogenomics in the Netherlands: Jos Kleinjans、Maastricht University、Netherlands

・Assessing Exposure-Dose-Toxicity Relationships within the EPA's ToxCast Program:

Mel Anderson、 The Hamner Institute

・The rat two-generation reproductive toxicity study: Aldert Piersma、Netherlands

・National Toxicogenomics Program in National Institute of Toxicological Research:Sue Nie Park、NITR/KFDA

・CALUX® bioassays for human biomonitoring: Peter Benish、 Biodetection Systems BV.

・Transgenic Xenopus as a small model organism for detecting endocrine disruption: Barbara Demeneix、 Muséum National d'Histoire Naturelle、France.

iv) Initial discussion about the Molecular Screening Project

Molecular Screening Projectにおける対象化合物の選択基準に関する議論が行われ、ヒトでのデータが取得可能なものの重視や、US、カナダ、EU で進行中のレギュラトリプログラムに即したものといった意見が提起された。対象となる毒性パスウェイとしては、主要な代謝系の他、PPAR-alpha、Thyroid Receptor、Sensitization/Immunotoxicity といったものが挙げられた。

また次のステップに向けて以下のサブグループを組織することが提案された。

・Thyroid Signaling

・Cancer Epigenetics

・PPAR alpha

・Sensitization/Immunotoxicity

・Databases

・Chemical Nomination

・Developmental and Reproductive Effects

全体を通して、まだ Molecular screening に genomics データを活用する提案はなく、現段階では、むしろ混乱するので積極的には利用しないとの考えが大勢を占めていた。

平成21年は11カ国(Canada, France, Germany, Hungary, Italy, Japan, Korea, Netherlands, Norway, UK, US)及び3団体(EC(European Commission), BIAC(Business and Industry Advisory Committee), OECD)からの出席者を集め、米国 ToxCast 計画 Phase1～Phase2 の進展や関連活動に関する情報共有を行った他、環境毒性スクリーニングに関する各国状況について重点的に議論した。

この会議で、ToxCast が Phasel として、320化学物質について467項目にわたるハイスループットin vitro 試験を終えたこと、及び引き続きナノマテリアルや著名な化学物質についてパイロットもしくはバリデーションを目的に試験を行うことが報告された。今後、当アドバイザリーグループの中に編成されているサブグループ(Chemicals Nomination group)において、Phase II で評価する化合物の選択及び優先順位に係る検討が行われることになった。

(2)医薬品審査過程における RNA 標準化に関する調査(担当:宇山)

国際的には、米国 FDA が平成19年6月にファーマコゲノミクス(PGx)遺伝子検査を申請するにあたってのポイントを示すガイダンスを公表し、欧州 EMEA との合同会議、PGx に関するワークショップなどを積極的に開催していた。

EMEA では、平成 19 年 11 月に信頼性の高い PGx データを収集するためのポイントに関してコンセプトペーパーを公表していた。

(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)は平成19年7月及び10月にはバイオマーカーのバリデーションに関する FDA/EMEA 合同会議に PMDA がオブザーバーとして初めて参加し、これを契機に PMDA、FDA、EMEA の三極による定期的な情報交換も行われるようになり、以来ファ

ーマコゲノミクス(PGx)に関連する行政的な取り組みが着実に進められている。

日本においては、平成20年4月に「DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標」が、平成20年9月には「ゲノム薬理学を利用した治験について」が、それぞれ厚生労働省から通知され、日本におけるゲノム薬理学を利用した治験等の基盤が整備されつつある。またPMDAではゲノム薬理学に関する企業との非公式な意見交換が活発に行われていた経緯もあり、ゲノム薬理学及びバイオマーカーに関する対面助言制度の新設が検討され、平成21年1月にはパブリックコメントが募集された。

また日本臨床薬理学会に依頼していた「医薬品評価におけるファーマコゲノミクスの利用に関する現状と課題に関する報告書」の作成にも協力し、最終的な報告書が最近公表された。

本研究終了時点(平成21年度)において、将来のゲノミクス解析のためのサンプルやデータを治験段階で採取することを推奨するエージェンシーは世界的にも未だないが、病理などの他の関連情報と同様に、提出されたゲノミクスデータの利用および共有化は、PMDA,FDA,EMEA中心で実現しつつある。

以上のように、ファーマコゲノミクス(PGx)に関連する行政的な取り組みは着実に進められており、今後も、海外での動向等を注視しながら、本邦での取り組みを検討していく必要がある。

(3)国内の臨床医療における遺伝子発現解析技術利用について(担当:油谷)

測定コストの問題やサンプル収集の問題(臨床サンプル量は少なく、マイクロアレイ測定を実施するには足りない事が多い)から、遺伝子発現情報の臨床応用は依然として研究レベルに止まっている。

臨床領域での遺伝子発現解析技術応用は依然探索的な研究用途に限定されている。DNA解析技術の応用は、がん治療などいくつかの利用例がある。DNAサンプルであれば、臨床現場においても試料取得を安定して実施することが可能であり、先ずはmutation等を対象としたテーラーメイド医療が主流となるだろう。

Preclinicalな遺伝子発現解析技術の応用について、ヒトを対象とするならばiPSやin vitroでのアプローチとなるが、その場合、遺伝子発現解析プロトコール自体の標準化よりも、むしろ評価実験に用いる細胞株調整など培養系の標準化のほうが困難であろう。

次世代シークエンサの急速な性能向上により、コスト面でも個々人の全ゲノム解読が現実的になりつつあるため、今後も医療においては多型解析など遺伝子解析応用が主流となるだろう。

なお次世代シークエンサはイルミナがトップシェアを維持し、ライフテクノロジー(旧ABI)が追従。解読速度は平成22年度中に100GB/runに達する見込みで、全ゲノム解析には十分な性能に到達しつつあるが、遺伝子発現解析への応用にはなお解読速度の向上が必要。PCR増幅やライブラリ作成等のバイアス発生要因への対策も考慮しなければならず、デジタルだからといって必ずしも絶対発現量が直読できるわけではない点に留意しなければならない。

(4)国内製薬企業の創薬過程での遺伝子発現解析技術利用について(担当:矢本)

創薬部門および安全性評価部門においては遺伝子発現解析技術の利用は順調に拡大しているが、得られた情報は社内利用に限定され、

特殊なケース(in vitro 実験など)を除き、Percellome 等の標準化技術が利用されるケースは少ない。

技術レベルは一定水準にあり、制度制定により標準化技術導入が必要になった場合、比較的速やかに導入が進むと考えられる。

マイクロアレイ技術の応用はすでに成熟期を迎えており、創薬を中心に利用されている。次世代シークエンサの導入については各社とも検討を始めているが、必ずしも遺伝子発現解析を目的としていない。

海外に比べ本邦では、薬物安全性評価のためのトキシコゲノミクスデータ共有など、毒性(安全性)に関する情報交換のための業界内体制が整っておらず、産業振興や国民の安全・安全のためにも行政サイドの関与を期待したい。

(a)製薬企業における遺伝子発現解析の現状

第一三共株式会社安全性研究所における取り組みを具体例として引用しつつ報告する。

サンプル調整およびRNA取り扱いについては、第一三共株式会社安全性研究所では他社と同様に組織からの総 RNA 抽出には Qiagen 社 RNeasy キットおよび Invitrogen 社 Trizol 試薬を、またRNAの品質チェックに関しても国内外で広く普及している Agilent 社の Bioanalyzer を用いて検討を行っており、実験プロトコールおよび RNA の品質検査に関しては、事実上標準化が進んでいると考えられる。

定量的 RT-PCR 法に関しては、検量線サンプル数、検量線の傾きの幅と相関係数、ハウスキーピング遺伝子の選択などで議論が必要であり、またマイクロアレイ解析に関してはアレイプラットフォームに起因するデータの相違や試験情報、サンプル情報の注釈付けに関する規準の曖昧さに加え、製薬企業で広く普及している Affymetrix 社の GeneChip システムに限っても、cRNA 伸長反応の確認、プローブレベルデータの解析法の選択(MAS5, GCRMA など)、統計処理法、データベース間のデータ互換性を高めるためのデータ解析法等に関して、さらに議論が必要と考えられる。

第一三共株式会社安全性研究所ではマイクロアレイデータの薬物安全性評価のために、グルタチオン枯渇を評価するための毒性バイオマーカー遺伝子の選抜、および複数の毒性バイオマーカー遺伝子リストを用いた毒性エンドポイントごとのスコア計算・活用に関する解析に取り組んでいる。各社で行っている同様の研究成果が広く紹介され、遺伝子発現解析の標準化が進むことによって、こうした基礎データが薬物安全性評価に際して有用な情報となり得る。

(b)マイクロアレイデータに基づいた毒性バイオマーカーのバリデーション

本件に関する取り組みは欧米が先行しているが、日本においても何かモデルケースを一つ作って産官学共同研究を実施すべきである。このような経験は薬物安全性評価のためのトキシコゲノミクスデータの生成・比較解析等の標準化に貢献し、製薬企業、規制当局双方に意義があるだろう。

(5)国内化学工業企業の安全性確保活動での遺伝子発現解析技術利用について(担当:住田)

国内化学工業企業の安全性確保活動において遺伝子発現解析技術は利用される方向に進んでいるものの、社内利用など非常に限定されている。そのため、未だ遺伝子発現解析の標準化のレベルには至っていない。

先にNEDOで開発した発がん性予測について、

プロジェクト終了後、その性能の検証や汎用性の評価が実施されており、予測法の改良なども含めた応用研究が進んでいる。標準化関連事項として、NEDO プロジェクトにおける遺伝子発現解析の施設間バリデーション試験結果が報告され、同一プラットフォーム・プロトコールに従って取得されたデータは施設ごとに著しく異なるものではなく、データの比較解析に耐え得るものであることが示唆された。

化学工業界における製品の安全性確保に関して、mRNA 測定は依然として統一的な標準化のレベルに至っていない。現状、試料からの total RNA 抽出、抽出された total RNA の品質確認、それに続くマイクロアレイや定量的 RT-PCR を用いた遺伝子の発現量測定、データの品質確認は、国内外で広く普及している機器を用い、また、提供されているプロトコールあるいは基準に従って実施しており、局所的な標準化はある程度進んでいると考えられる。しかしながら、アレイプラットフォーム間でデータが異なる、あるいは、アレイプラットフォームが同一であってもデータ処理法などの違いによりデータが異なるといった場合があり、より詳細に実験ステップ毎の基準を設定し、統計処理法やデータ解析法等に関して、さらなる標準化が必要である。

一方、遺伝子発現解析技術は、社内で蓄積された遺伝子発現データをベースとした開発化合物の安全性評価において活用されつつある。具体的には、開発早期における化合物の毒性予測や診断、毒性発現機構の解明、毒性既知化合物との作用同等性や作用差別化が主なものである。

例えば住友化学生物環境科学研究所では、現在、毒性予測や診断においては、発がん性予測が先行しており、発がん性予測モデルの構築や病理診断マーカーの探索を行い、総合的な開発判断早期化の一助としている。利用可能なデータベースを拡張することにより、予測精度がさらに向上すると考えられることから、データベース間の互換性を高めるためにも実験プロトコールとデータ処理法の両面で統一的な標準化が必須であると思われる。遺伝子発現データは、開発化合物が呈する毒性に関して、毒性回避へのフィードバックやプロアクティブな対応のための発現機構解明やその作用同等性の評価に有用な情報となりつつある。また、毒性研究で主に使用されるラットやマウスよりもさらにヒト遺伝子との類似性が高い霊長類であるマーモセットのマイクロアレイを独自に作製し、毒性学的により精緻な評価を目指している。

平成21年度においても化学工業製品、特に、農薬などの登録に関わる当局からは未だトキシコゲノミクスデータをリスクアセスメントに利用するにあたって特別なガイダンスは示されていない。しかしながら、米国 EPA による官報(2010 年 1 月 13 日付け)によると、ガイダンスを示しているわけではないが、トキシコゲノミクスデータを場合によっては weight-of-evidence を基本として利用することを奨励している。そこで、トキシコゲノミクスデータをリスクアセスメントに利用するにあたっての系統だったアプローチを開発すること、また、Case Study(モデル化合物:ジブチルフタレート(可塑剤))を提示することを目的にプロジェクトを実施し、その報告書を開示している。現在、この報告書を参考にしながら必要な要件や試験デザインを検討し、トキシコゲノミクスデータのリスクアセスメントへの利用を進めている。

(6)RNA 標準化運用上の技術的問題点について(担当:山口)

標準化技術の運用に於いては、Percellome 法などで RNA 標準化のために用いられる RNA 試薬の製造・供給体制、保存状態、品質のバリデーション等、取り扱いには細心の注意が求められる。

このうち、RNA 試薬の製造・管理技術は既に実用化されており、技術的な問題は少ない。特に米 MAQC、米 ERCC では試薬メーカーが複数参加するコンソーシアム体勢で標準化検討を進めており、実運用の際には必要な RNA 試薬は市販製品として安定供給されるであろう。

むしろ測定を行う現場での保存や品質チェックのプロセスを規格化することが求められるが、運用規則が極端に厳しくなり標準化技術導入の支障にならぬよう配慮する必要がある。

E. 結論

国内外における mRNA 測定・評価の標準化に関する動向を調査し、並行してトキシコゲノミクスにおける mRNA 標準化技術の開発・最適化を試みた。

3 年間の研究活動を通じ、医薬品等の有効性・安全性評価に遺伝子発現情報を活用する際の標準プロトコル作成に向けた課題抽出や条件設定検討、特に厚生労働行政の医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業に於いて、安全性・有効性および品質の評価に科学的合理性を付与するための研究を強力にサポートし、これを通じて保健衛生および国民生活の質の向上の一助となった。

本研究期間中、国際的な mRNA 標準化団体(米 MAQC、米 ERCC 等)は公式な成果発表(論文発表)を行わなかったが、標準化に関する議論は既にまとまりつつあり、基礎・基盤研究における様々な遺伝子発現研究の成果を吸収した MAQC,ERCC 等の標準化団体の活動も結実し始めている。これに呼応して ICH E15～E17 を軸にした国内外の規制当局に於ける対応体制への取り組みも着実に進められるようになり、本研究班の当初の目的はほぼ達成された。

今後も継続的に最新の研究・技術情報を行政サイドに還元する必要があるが、実務的な研究班・研究体制の立ち上げについては関係当局(厚生労働省医薬食品局審査管理課等)と協議する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sanosaka T, Namihira M, Asano H, Kohyama J, Aisaki K, Igarashi K, Kanno J, Nakashima K. Identification of genes that restrict astrocyte differentiation of midgestational neural precursor cells. Neuroscience (2008) 155(3):780-8

Niida A, Smith AD, Imoto S, Tsutsumi S, Aburatani H, Zhang MQ, Akiyama T. Integrative bioinformatics analysis of transcriptional regulatory programs in breast cancer cells. BMC Bioinformatics. (2008) 9:404.

Sekiguchi N, Kawauchi S, Furuya T, Inaba N, Matsuda K, Ando S, Ogasawara M, Aburatani H, Kameda H, Amano K, Abe T, Ito S, Takeuchi T. Messenger ribonucleic acid expression profile in peripheral blood cells from RA patients following treatment with an anti-TNF-alpha monoclonal antibody, infliximab. Rheumatology (Oxford). (2008)

47(6):780-8.

Ishiguro A, Toyoshima S & Uyama Y, Current Japanese regulatory situations of pharmacogenomics in drug administration, Exp Review Clin Pharmacol, 1: 505-514, 2008

森和彦、宇山佳明: 国際共同治験の基本的考え方について, 医薬品研究, 39: 557-575, 2008

2. 学会発表

菅野　純、トキシコゲノミクス(Percellome Project)を基盤とした分子毒性学の展開の試み、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月26日、東京、口演

北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、口演

菅野 純、相﨑健一、Percellomeトキシコゲノミクスプロジェクトの進捗ーインフォマティクス構築へー、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

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. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

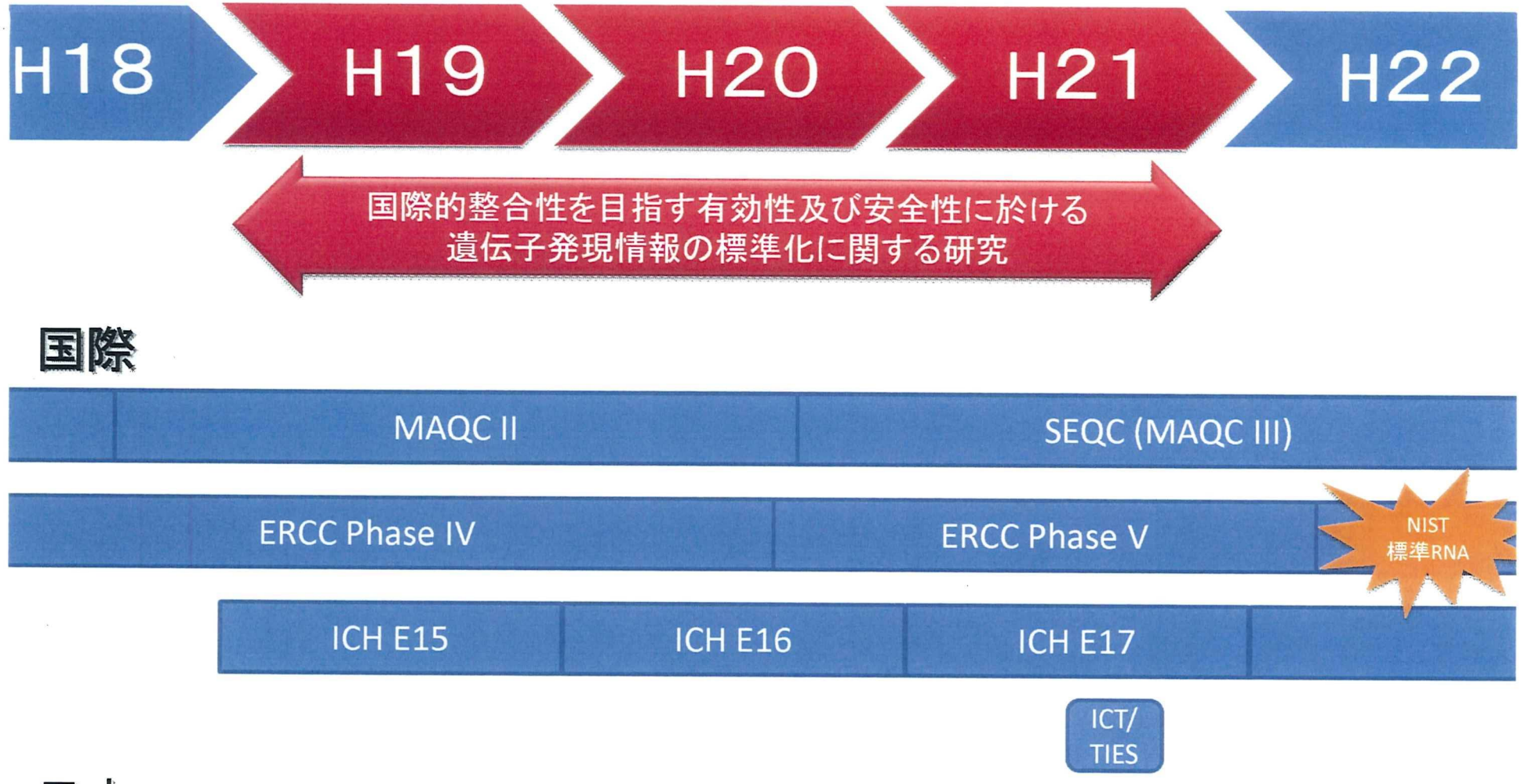
特許第4415079号、2009年12月4日登録、遺伝子の絶対発現量測定方法

2. 実用新案登録

なし

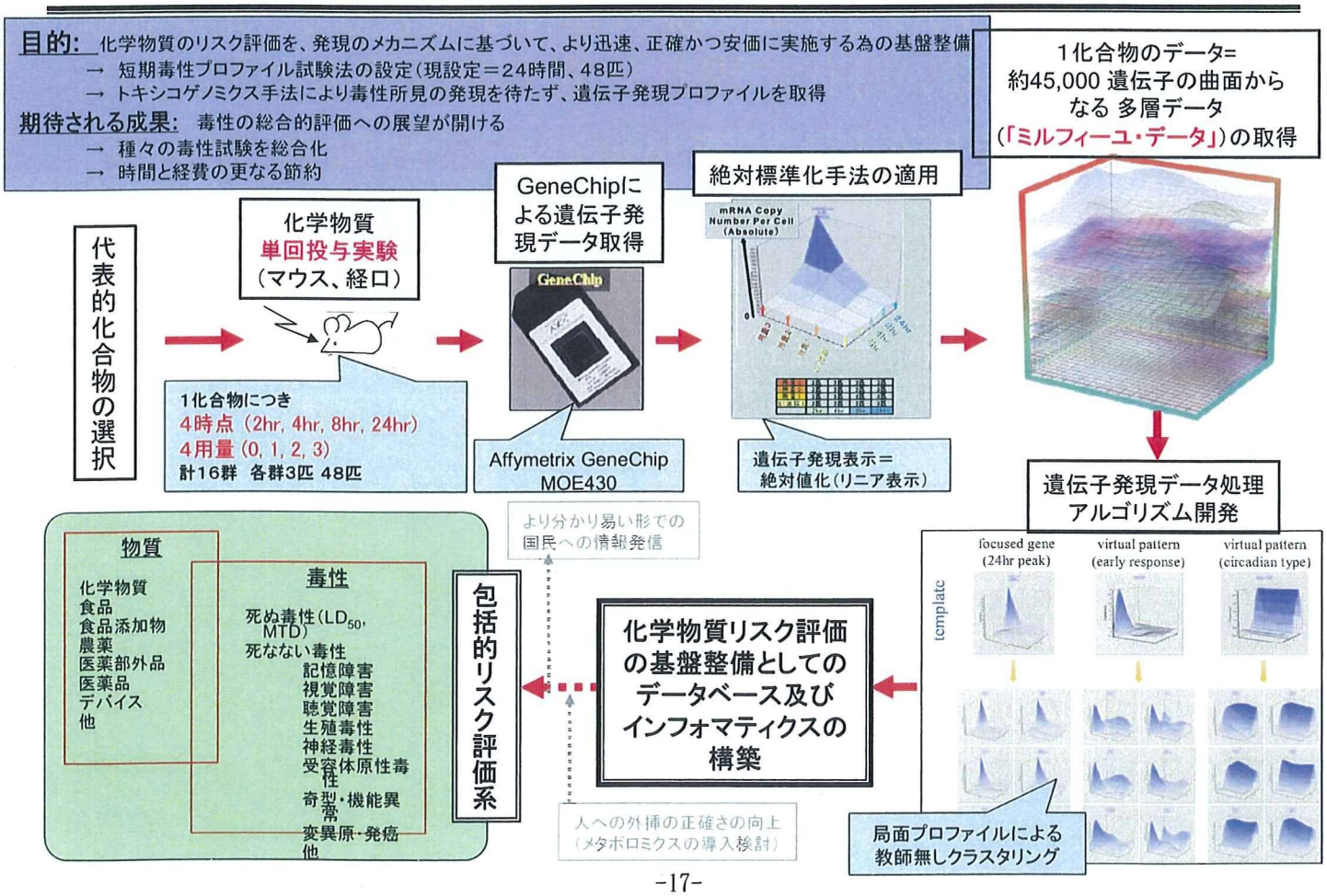
3. その他

なし


H18
H19
H20
H21
H22
国際的整合性を目指す有効性及び安全性に於ける
遺伝子発現情報の標準化に関する研究
国際
MAQC II
SEQC (MAQC III)
ERCC Phase IV
ERCC Phase V
NIST
標準RNA
ICH E15
ICH E16
ICH E17
ICT/
TIES
日本
Percellome project (mouse toxicogenomics database / bioinformatics)
Percellome
特許登録
Percellome DB Web System #1
System #2
TGP2 (rat toxicogenomics database / bioinformatics)

Percellome（パーセローム）トキシコゲノミクスに関する研究

トキシコゲノミクス・データベースを構築（約100化学物質、3億5,000万データ）

- 単回（急性）暴露プロトコール
- マウス肝の初期応答
- 解析のための視覚化ツールとクラスタリング解析法を開発

Percellome（パーセローム）トキシコゲノミクスに関する研究