

201010009A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成23(2011)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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成 23 (2011) 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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成23（2011）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. バイオマーカー候補遺伝子の検証	-----	109
水川裕美子		
2. 創薬基盤としての分子毒性学研究	-----	131
菅野純		
3. トキシコジェノミクス・プロジェクトにより実施された毒性試験における 病理組織学的検査所見についての検証	-----	181
三森国敏		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	197
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	199

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

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(Genomics Assisted Toxicity Evaluation System developed by Toxicogenomics Project Japan)と命名した。本研究(「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))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 点を達成しようとするものである。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)および製薬企業 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、メタボロミクスとゲノミクスを融合させた新規手法を推進した。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。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、プロトコール集の編纂を開始した。また、前プロジェクトからの懸案事項であるデータ公開に関しては、2011 年 2 月、Open TG-GATEs という形で Web 上の公開を果たし、また書籍の形態としての毒性データ集の編纂作業も完了した。

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 16 種の開発を達成した。また、グレードⅠ、Ⅱのバイオマーカーを 2 種開発し、この領域では目標を上回った。

研究分担者

菅野純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長
水川裕美子 同志社女子大学薬学部・助教
三森国敏 東京農工大学大学院・教授

A. 研究目的

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。

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（TGP2）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。本年度は、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た。

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および製薬企業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

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、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て活動を継続している。これにはプロジェクトメンバーの全13社が参加し、原則として半期ごとに各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捗管理をおこなった。バイオマーカー創出戦略にあわせ、バイオマーカーワーキンググループ内に

次の5つの検討チームを編成した。

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。これまでに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してきたが、本年度は本格的にバイオマーカー抽出に着手した。

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。これまでの研究で、特に、メタボロミクスとゲノミクスの融合が強力な戦略であることが見いだされたため、メタボロミクスを慶応大学・曾我教授の研究室に委託して、データを得、マーカー抽出に応用した。また、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) などの方法を、肝毒性マーカー創出に応用できる可能性を検討した。

チームE：これはバイオマーカー抽出が目的ではなく、前記4グループで得た成果を、統合システムであるTG-GATEsに組み込むためのインフォマティクスを検討するものである。

以上の5チームとは別に、血液ゲノミクス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、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ところ、肝臓壊死を示唆する可能性のある遺伝子セットが抽出された。ただし、血液ゲノミクスは網状赤血球の変動に影響されること、また、肝臓以外の臓器障害を反映した変化を切り分ける必要があることが課題としてあげられたため、肝障害や網状赤血球数変動を起こさず、腎障害のみを起こす条件の6試験を行い、検証を行うこととした。

前年度までに完了したバリデーション試験に関して、データ解析もほぼ終了し、現在は投稿準備中である。また、バリデーションワーキンググループにより、トランスクリプトームによる毒性試験に関する留意点をまとめたプロトコル集を英文で執筆し、投稿する準備に入った。

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-GATE s 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。前年度までに抽出されたマーカーのうち、

(1) ラット肝臓におけるGSH枯渇を枯渇時点によらず検出できるマーカー候補遺伝子セットを抽出したが、この遺伝子セット、(2) 中性脂質低下メカニズム判定マーカー、(3) peroxysome proliferator-activated receptor (PPAR) α 活性化マーカーについて、公共データベースを用いた検証を行った。また、薬剤性リン脂質症予測のバイオマーカー候補遺伝子について、検証のためのin vitro検出系をラット肝細胞初代培養系を用いて構築し、in vitroにおけるマーカー候補遺伝子セットの抽出を試みた。またin vivoのマーカー候補遺伝子セットはTGP2において複数提案されているが、その一つについて外部データを用いた検証を行った。

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。

前年度までに、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) を作製し、本マウスのPXRリガンドに対する全身臓器のトランスクリプトーム解析を行った。PXRリガンドとして、mPXRに対する選択性が高い

Pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) と、hPXRに対する選択性が高い Rifampicin (RIF) を用い、脳(海馬)、胸腺、肺、肝、腎、小腸、精巣の7臓器について、Percellome法を適用したトランスクリプトーム解析を実施した。

分担研究（三森）

一昨年度の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ければならない。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、昨年度より三森が担当した。

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。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。HE染色標本で、脂肪変性ないし空胞変性と診断された化学物質の毒性試験については、ズダンブラックBとオイルレッドO染色を実施してその本態が何であるかを検索した。当該化合物は以下の14化合物である：diltiazem、thioacetamide、methapyrilene、amiodarone、imipramine、amitriptyline、clomipramine、ethambutol、

acetamidofluorene、lomustine、ketoconazole、chlormezanone、ethionine、naphthyl isothiocyanate

(倫理面への配慮)

本研究において行うヒト凍結肝細胞の実験は、研究委託先で行われるため、その施設の倫理規定に従っている。規定上は不要であるが、医薬基盤研究所の倫理委員会の承認も得ている。また、これまでのプロジェクトにおいて使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、各研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、プロトコルを決定した国立衛研はそのモデル施設となっている。本研究において動物を使用する際もそのプロトコルは継承される。実験自体は研究委託先で行われるため、その施設の倫理規定に従っている。

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は、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37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46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、累計16種がグレードⅢマーカーとして認定された。以下に、本年度新しくグレードⅢ以上のマーカーとして認定されたものを記す。

(1) 炎症を中心とした肝線維化マーカー

肝線維化は、慢性的な肝の炎症の最終像であり、短期の試験では予測が困難なフェノタイプである。典型的な肝線維化惹起物質である四塩化炭素を手がかりとして、炎症・繊維化のパスウェイから決定木法によりモデルを構築した。ここで選抜された遺伝子群は、炎症に伴う繊維化の機序として妥当な細胞外マトリックス分解抑制およびコラーゲンの生合成促進関連遺伝子を含んでおり、生物学的妥当性が示された。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) 繊維形成を中心とした肝繊維化マーカー

前項のマーカーは高度の炎症に伴う繊維化を判定・予測するものであるが、本マーカーは高度の炎症を伴わない繊維化を判定・予測するものである。遺伝子抽出はやはり決定木法で行い、抽出された遺伝子は繊維形成のパスウェイにのっており、生物学的妥当性が担保された。前年度グレードⅣであったが、追加化合物投与による検証実験、電子顕微鏡による繊維化の確認実験等で再現性が確保され、グレードⅢと認定された。

(3) リン脂質症マーカー

前年度までグレードⅣであったが、外部データベースによる検証で再現性が確保され、グレードⅢと認定された。これは、連続投与により肝のリン脂質症陽性と判定された化合物群において共通に変動する遺伝子を抽出し、主成分分析によってリン脂質症陽性化合物を分離できるというものである。特徴としては、リン脂質症のフェノタイプの発現は最も早くて3日の連続投与を必要とするが、本マーカーを用いると、高用量の投与によって単回投与24時間後でも発症を予測することができる点にある。

(4) 細胞障害型遺伝毒性および非遺伝毒性発がんマーカー（反復）

これは、肝発がんが報告されている化合物に共通して発現変動する遺伝子をフィルタリングし、判別分析法により遺伝子を選別したものである。当初は遺伝毒性化合物と非遺伝毒性化合物を分別することを目指したが、*in vivo*の状態では非遺伝毒性と遺伝毒性は明瞭には区別できないことが判明し、医薬品に多い細胞障害型発がん性を判定するマーカーとした。通常発がん試験は2～3年を要し、時間とコストがかかるが、このマーカーは4週間以内に高い感度と特異度で発がん性を判定できる。また、マーカー遺伝子群をネットワーク解析すると、細胞増殖、細胞死、DNA修復、癌関連遺伝子が多く含まれ、生物学的裏付けも十分であった。また、NEDOの公開データを適用することによって再現性も担保でき、グレードⅢと認定された。

(5) 細胞障害型遺伝毒性および非遺伝毒性発がんマーカー (単回)

これは当初、遺伝毒性発がん物質は、早期にDNA障害を惹起することから、単回投与で遺伝毒性物質を判別する試みから始まった。検討の結果、遺伝毒性物質とDNA障害を伴う非遺伝発がん物質の区別はできなかったが、単回投与のデータからこの両者を高精度に判別可能な判別モデルが構築できた。通常年単位の時間がかかる発がん試験を、単回投与で予測できることは、非常な進歩といえる。マーカー遺伝子としては細胞死、特にp53関連遺伝子が選別されており、生物学的裏付けも十分であった。また、NEDOの公開データを適用することによって再現性も担保でき、グレードⅢと認定された。

(6) 遺伝毒性発がんマーカー

前項と異なり、Ames試験陽性の遺伝毒性発がん物質に着目し、4週間連続投与のデータから判別分析によりマーカー遺伝子を抽出したものである。この判別モデルは、データベース中の全化合物およびNEDOの公開データベース中のデータを用いても再現性が認められ、グレードⅢと認定された。

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つの戦略をとっている。

(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、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ことが可能になったため、肝細胞壊死マーカーを抽出する可能性が開かれた。暫定的なマーカーの再現性・妥当性を検討するため、今年度は追加化合物として次の6試験を行った: フェニルブタゾン (単回) 2-プロモエチルアミン (単回) ゲンタマイシン (反復) トリアムテレン (反復) アロプリロール (反復) N-フェニルアントラニル酸 (反復)。

これらはすべて、肝障害や貧血(網状赤血球の増加)を生じさせず、腎障害のみを生じる条件である。これにより、肝障害特異的な遺伝子変化を多臓器障害による変化から区別することが期待される。以後、壊死陽性/陰性区別可能なマーカー探索、既知マーカー (AST/ALT) との比較、毒性発現メカニズムとの関連について検討していく。

(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。まずこれを有効利用しようとしたが、ヘパリン血ではPCRがうまくかからないため、方法の改良が必要であった。そこで、新たに試験を行い、4遺伝子 (Alb, Ambp, Apoh, Gc) により肝障害を高感度に評価できる感触を得た。そこで、新たにアセトアミノフェン、ANIT、ベンズブロマロン、高脂肪食の試験を行い、これらの肝障害を上記4遺伝子で評価する実験が進行中である。

(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、新たに抗凝血剤を変更した暴露実験を行った。プロムベンゼン、チオアセタミド、LPS による肝障害惹起条件下、7種類の miRNA を検討したところ、rno-miR-122 および rno-miR-192 が最も高感度なマーカーであった。この後、各 miRNA の臓器特異性が問題となるため、各組織の miRNA を網羅的に定量する実験を計画している。

(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。

前年度は、曾我教授の提唱したアセトアミノフェン型肝障害のマウスのバイオマーカーとしてのオフトルミン酸が、ラットでも有用であることの確認と、2つのグレードIIあるいはグレードIのマーカーを抽出した。

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

前年度までに、ラット肝のトランスクリプトミクスのバリデーションが完了した。現在、バリデーションワーキンググループにおいてプロトコール集 (英文) を作成中である。

4. データベース公開

本年度の最大の課題は、各方面からの期待が大きかったデータベース公開であった。公開は2つの方法で行うこととした。まず、使い勝手を考えて、毒性データをまとめたものと、病理組織写真をペアにして印刷物として刊行すること。これは研究分担者の三森により病理診断のレビューを行って統一化を図るとともに、毒性概要を表としてまとめたものを編集し、出版社に渡した。23年度はじめには

公刊される予定である。

次に、遺伝子発現データの公開である。プロジェクトメンバーには TG-GATEs のクローンが保存されるが、公共データベースとして、TG-GATEs のシステムごと公開することは物理的に不可能である。永続的にデータを保持する仕組みがなくてはならないが、これは世界的に見て NCBI ぐらいしか存在しない。我が国の科学研究費と日本企業の共同研究費の成果物であるので、是非とも国産の公共データベースに収録すべきであるとの意見が強かった。そこで、現在はまだ完成をみていないが、計画中である省庁横断的な統合データベース構想 (DBCLS) に参画し、ここに遺伝子発現データと毒性データをアーカイブすることとした。しかしこれは、毒性フェノタイプと関連づけた遺伝子発現データをサーチすることはできないため、特にアカデミアのユーザーには使い勝手が悪いものとなる。そこで、簡易検索機能を付けたデータベースを開発し、これを Open TG-GATEs と名付けた。このデータベースは、医薬基盤研究所のホームページに掲載した。アドレスは <http://toxico.nibio.go.jp> である。

分担研究 (水川)

1. 外部データを用いた GSH 枯渇マーカー候補遺伝子の検証

GEO に登録されたデータのうち、GSE8858 データセットに含まれるデータを用いて検証を行った。その結果、GSH 枯渇を引き起こす APAP やメタピリレン (MP) は TGP1 スコアの値が高く、GSH 枯渇を起こさないエチルコハク酸エリスロマ

イシン (EME)、イソニアジド (INAH)、ペニシラミン (PEN) では TGP1 スコアは上昇せず、TG-GATEs のデータのみならず、外部データにおいてもこの遺伝子セットは有用であることが明らかとなった。

2. 中性脂質低下のメカニズム判定マーカー候補遺伝子セットの検証

以前提案された 218 プローブセットから 38 プローブセットに絞り込み、そのデータを用いて再び PCA を行ったところ、PPAR α 活性化と CAR 活性化の分離が悪くなり、元々のモデルに不備があったと考えられた。

3. PPAR α 活性化マーカー候補遺伝子セットの外部データを用いた検証

GEO から、単回投与 24 時間後のラット肝臓もしくは 24 時間曝露後のラット初代培養肝細胞で取得されたデータを選び、29 プローブセット (プラットフォームの異なるデータの場合は共通に存在する遺伝子のデータのみ) を用いて検証を行ったところ、外部データでも十分な再現性が得られた。この後、判別分析による至適条件を選び、グレード III マーカーとして提案する予定である。

4. リン脂質症マーカー候補遺伝子セットの外部データを用いた検証と in vitro マーカー候補遺伝子セットの抽出

TGP2 ではリン脂質症に関するバイオマーカー候補遺伝子セットが 3 種報告されているが、これらに共通する遺伝子は数少ないことから、リン脂質症マーカーについても検討を行うこととした。まず、外部データによる検証がなされていなかった遺伝子セットの一つについて、GEO に登録された外部データを用いて検証し

たところ、矛盾なく、グレードⅢとして認定された。

またリン脂質症のマーカー候補で in vitro に適用可能なものは今のところないため、in vitro の系を構築して in vivo のマーカー候補と合わせて検証を行うことを目指した。昨年度フェノタイプ検出実験系を構築したので、今年度はそれを用いて多くの化合物についてアッセイを行い、その結果をもとに判別分析を利用してマーカー候補抽出した。

分担研究（菅野）

(1) 肝、小腸における PXR 応答の確認

まず、PXR 応答臓器であることが知られている肝、小腸について、PCN, RIF が少なくとも肝、小腸において予想通り PXR を、その LBD の種差に従って活性化していることが確認された。

(2) 全身臓器のトランスクリプトーム解析

各臓器のトランスクリプトーム解析を、Affymetrix 社の GeneChip (Mouse Genome 430 2.0) を用いた Percellome 法を用いて実施した。その結果、まず複数の既存の PXR 標的遺伝子が肝もしくは小腸で PXR 依存型発現変動を示すことが確認された。肝、小腸において発現変動を示すプローブセット数が多く、変動幅の大きいプローブセットが認められた。一方、肝、小腸以外の臓器では変動幅が大きいプローブセットは見出されなかった。また肝、小腸でも候補プローブセットの重なりは小さいこと、他の臓器においても同様であることが判明した。

(3) プロモーター解析

PXR 依存型発現変動遺伝子のプロモーター配列を解析し、発現を制御する転写因子結合配列の候補抽出を試みたところ、GSTM1, 3, 4 に RXR, KLF, SP1 の結合配列がクラスター様に存在することが見出された。また、肝、小腸で共通して PXR 依存型発現変動を示す遺伝子のプロモーターを調べたところ、HOMF, CART の結合配列が共通して見出された。このことにより、PXR 依存型発現変動を示す遺伝子群のプロモーターに必ずしも PXRE が存在するわけではないことが判明した。

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・生化学的变化に対応した診断・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

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手法に迫る場合、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別すると、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手法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、特に毒性学的手法におけるそれは大きく、限界がある。

このような状況下、今年度以降では、逆方向の戦略、すなわち、既知の毒性学的手法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。また、トランスクリプトミクスに他のオミクス技術を融合させたトキシコパノミクスは非常に強力

な戦略であることが明らかとなっており、特にバイオマーカーの生物学的意義付けに有力な情報を与えてくれるメタボロミクスの併用を推し進めることとした。

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。この戦略は勿論、ラットの全血のトランスクリプトームがラットの臓器毒性評価に有効であることを、ヒトの血液サンプルに外挿することが最終目標である。今年度までの研究により、当然ながら特異的な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。

更にこの戦略において、血中の他の遺伝子情報、すなわち miRNA と逸脱 mRNA の定量も有望なバイオマーカーを与える可能性が見えてきた。

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。

4. データベース公開

簡易探索機能つきデータベースである Open TG-GATEs は 2011 年 2 月 25 日正午公開された (<http://toxico.nibio.go.jp>)。統合データベース DBCLS への登録も完了し、2011 年 3 月 18 日より公開を始めた (<http://dbarchive.biosciencedbc.jp>)。印刷版の毒性データ集も印刷を待つのみとなっている。最終年度はこれの英語版も刊行したい。

分担研究 (水川)

GSH 枯渇マーカー候補および PPAR α 活性化マーカー候補遺伝子セットの外部データによる検証では、おおむね TG-GATEs のデータと一致した判定結果が得られており、検証に用いた遺伝子セットが TG-GATEs 内のみならず、普遍的に適用できることがわかった。

中性脂質低下のメカニズム判定マーカーについては、遺伝子の絞り込みを試みたがうまくいかなかった。この原因としては、両メカニズムで共通に変動する遺伝子の変動幅の違いがメカニズムの判定に大きく寄与していたなどが考えられたが、この遺伝子セットをマーカーとして利用可能にするためには別の手法での検討が必要であることがわかった。

今回作成した *in vitro* の判別子では、トレーニングセットについては比較的よい判別率が得られたが、テストセットについては陽性と判定されたがリン脂質症の情報のない化合物が多く存在するため、今後さらにフェノタイプアッセイを行って検証を続ける必要がある。

分担研究 (菅野)

hPXRki マウスを用いた全身臓器を対象にしたトランスクリプトーム解析によって、PXR 依存型発現変動を示す遺伝子が多い臓器は肝及び小腸であることが明らかになった。今後は応答細胞が臓器内の特定の細胞に限られる可能性も考慮しつつ、*In situ hybridization* などによる局在解析を含めた慎重な解析を進める必要があると考えられる。

PXR 依存型発現変動を示す遺伝子のプロモーター配列を解析した結果、必ずしも PXR が結合する配列が見出されるわけでは無かった。検索した数 kb のプロモーター領域外に PXR 結合配列が存在する可能性もあるが、PXR が他の DNA 結合性タンパク質と協調して転写を制御している可能性もあり、PXR の機能メカニズムの観点から有用な情報である。

分担研究 (三森)

今回のレビュー結果から、トキシコゲノミクスデータベース内に格納されている病理所見を横断検索して活用する場合は、病理学を理解した専門家により、検索したい病変の同義語も含めて検索してもらう必要がある。また、化学物質により誘発された病変を試験実施施設の鏡検担当者が見逃している場合があるので、トキシコゲノミクスデータベース内に格納されている病理所見のみから横断検索すると、重要な誘発病変の記載が欠落していることも考えられるので、十分な注意が必要である。今回のレビュー結果は、トキシコゲノミクスプロジェクトのデータ集として発刊される「毒性試験データ集」に、全ての検索化学物質において誘発された病変の組織写真と一緒に、それらの誘発病変の病理用語を統一した正誤表的なリストを添付することにより反映する予定である。

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46種開発した。そのうち16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、そのうち1つは特許を出願した。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。更に、懸案事項であったデータベースのWeb上での公開を達成した。以降、最終年度に向かって更に良質のバイオマーカー創出を目指し

たい。

なお、本プロジェクトは官民共同プロジェクトとして着々と成果を上げつつあり、これが評価され、第8回産学官連携功労者表彰（日本学術会議会長賞，平成22年度）を受けた。これも、本プロジェクトの運営が成功裏に進行していることの表れであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

漆谷徹郎、大野泰雄

Sumida K, Igarashi Y, Toritsuka N, Matsushita T, Abe-Tomizawa K, Aoki M, Urushidani T, Yamada H, Ohno Y. Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* Feb 21. [Epub ahead of print] 2011

Yasushi Okuno, Yohsuke Minowa, Hiroshi Yamada, Yasuo Ohno and Tetsuro Urushidani. In Silico Toxicology Prediction Using Toxicogenomics Data. In "Handbook of Systems Toxicology" ed. by Daniel A. Casciano, Saura C. Sahu, John Wiley & Sons, 2011 pp. 591-598.

漆谷徹郎 毒性評価 トキシコゲノミクス 「バイオチップ実用化ハンドブック」金子周一、堀池靖浩監修、NTS, 2010, pp. 268-274

Weihua Gao, Yumiko Mizukawa, Noriyuki Nakatsua, Yosuke Minowaa, Hiroshi Yamadaa, Yasuo Ohno and Tetsuro Urushidani. Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione depletion-related hepatotoxicity in rats. *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247(3) 211-221, 2010.

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. トランスレーショナルリサーチ④ トキシコゲノミクスプロジェクトと安全性試験. *日本薬理学会雑誌* 136(1) 46-49, 2010

水川裕美子

Weihua Gao, Yumiko Mizukawa, Noriyuki Nakatsua, Yosuke Minowaa, Hiroshi Yamadaa, Yasuo Ohno and Tetsuro Urushidani. Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione depletion-related hepatotoxicity in rats. *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247(3) 211-221, 2010.

菅野純

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y., NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 23;107

(8) :3594-9.

Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y., Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus., *Biol Reprod.* 2011 Apr;84 (4) :734-42. Epub 2010 Dec 1

Yoshida T, Sekine T, Aisaki KI, Mikami T, Kanno J, Okayasu I., CITED2 is activated in ulcerative colitis and induces p53-dependent apoptosis in response to butyric acid., *J Gastroenterol.* 2010 Dec 17.

2. 学会発表

漆谷徹郎、大野泰雄

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 49th 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 49th Annual meeting of Society of Toxicology, 2010.

神吉 将之, 太田 聖子, 南 圭一, 中津 則之, 五十嵐 芳暢, 堀之内 彰, 小野 敦, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. 血漿中 miRNA の網羅的解析による肝障害バイオマーカー創出の取り組み. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

Kaori ABE-TOMIZAWA, Yohsuke MINOWA, Katsumi MORISHITA, Hiroshi YAMADA, Tetsuro URUSHIDANI, Yasuo OHNO. Use of toxicogenomic profiling in single-dose studies for predicting the type of liver weight increase. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

五十嵐 芳暢, 清澤 直樹, 南 圭一, 神吉 将之, 太田 聖子, 堀之内 彰, 小野 敦, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. 遺伝子発現情報を用いたメカニズムベースのグルタチオン枯渇評価系の構築. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

棚治 隆史, 奥山 学, 田川 義章, 松本 幸治, 小野 敦, 山田 弘, 大野 泰雄. TGP データベースを利用した肝細胞壊死を伴わない血中 ALT 上昇バイオマーカーの探索. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

上田 晴子, 上原 健城, 箕輪 洋介, 中津 則之, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. ラット腎臓における尿細管障害マーカー遺伝子の発現変動の局在に関する研究. 第

37 回日本トキシコロジー学会学術年会

清澤 直樹, 新野 訓代, 渡辺 恭子, 眞鍋 淳, 三分一 厚司, 小野 敦, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄, 矢本 敬. トキシコゲノミクスデータベースを用いた遺伝子セットレベルのネットワーク解析. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

大村 功, 松田 喬, 木上 大輔, 田村 幸太朗, 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. ラットにおける肝細胞壊死に関連した遺伝子マーカー探索と判別モデル構築. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

住田 佳代, 五十嵐 芳暢, 鳥塚 尚樹, 松下 智哉, 阿部 香織, 青木 幹雄, 山田 弘, 漆谷 徹郎, 大野 泰雄. DMSO がヒト凍結肝細胞の遺伝子発現に与える影響. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

松下 智哉, 武藤 裕紀, 芦原 基起, 三島 雅之, 山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹郎. トキシコゲノミクスデータベースを用いた薬剤誘発性胆管増生マーカー遺伝子の探索. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

中津 則之, 神吉 将之, 山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹郎. 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 37 回日本トキシコロジー学会学術年会

半田 千彰, 武藤 信一, 中津 則之, 赤羽 敏, 山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹郎. ラ