

ットにおける薬剤誘発性肝線維化を予測する遺伝子マーカーの探索と評価. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会

甲斐 敏裕, 弓立 恭寛, 青木 幹雄, 山田 徹, 木村 徹, 漆谷 徹郎, 山田 弘, 大野 泰雄. 反応性代謝物生成に関連した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

鳥塚 尚樹, 中津 則之, 小野 敦, 山田 弘, 大野 泰雄, 漆谷 徹郎. TGP 大規模データベースにおけるラット肝の小胞体ストレス関連遺伝子の発現解析. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会

南 圭一, 五十嵐 芳暢, 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. クロスオミクスによるグルタチオン枯渇型肝障害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

菅野 純

菅野 純、インフォマティクス局面にある Percellome トキシコゲノミクスの食品・食品添加物への適用、第37回日本トキシコロジー学会 学術年会 (2010. 6. 16) (沖縄)、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome トキシコゲノミクスの抗がん剤研究への応用、第69回日本癌学会学術総会 (2010. 9. 24) (大阪) 口演

Natalia Polouliakh, Jun Kanno, Yukiko

Matsuoka, Ken-Ichi Aisaki, Richard Nock, Frank Nielsen, Keigo Oka, Satoshi Kitajima and Hiroaki Kitano, Discovery of Gene Network Regulated by the Toxicity Equivalent Factor of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) and 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzofuran (TCDF) chemicals. the 11th International Conference on System Biology (2010. 10. 11) (Edinburgh, UK), Poster Presentation

Jun Kanno, Percellome Toxicogenomics Project and its application to studies on anticancer agents., the 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2011. 3. 8, Washington D. C., USA, Poster Presentation

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

2011.2.28

トキシコゲノミクス Toxicogenomics

医薬品安全性研究のパラダイムシフト

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: 毒性試験に代わりうるか?

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

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

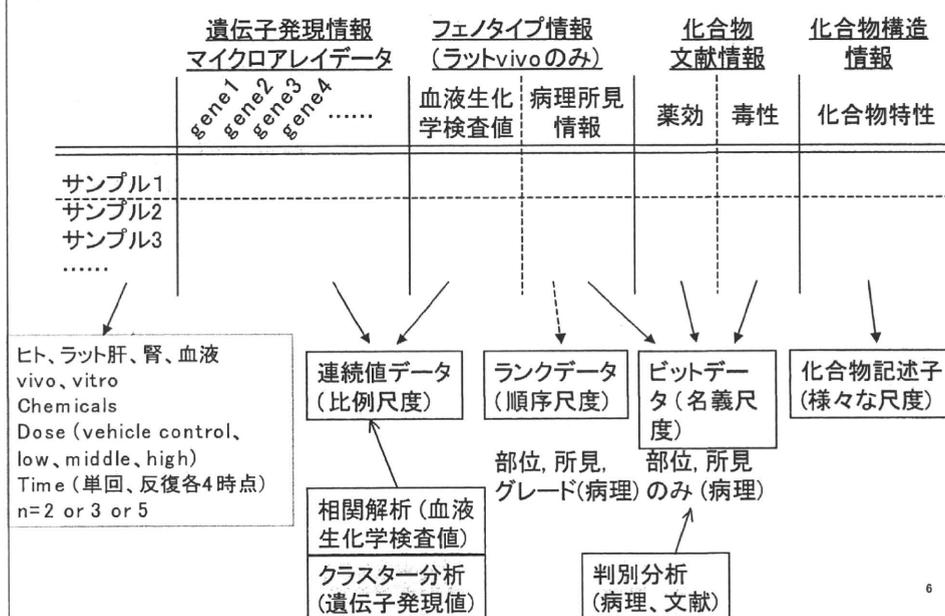
GeneChip数: 24, 000

測定遺伝子数: 約800, 000, 000

測定検査値: 2, 880, 000項目

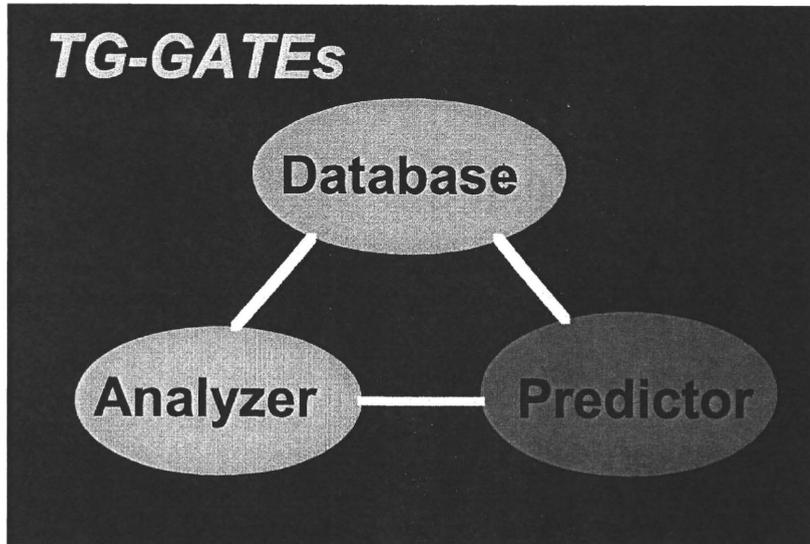
病理組織標本: 48, 000

TGPデータのデータ構造・尺度



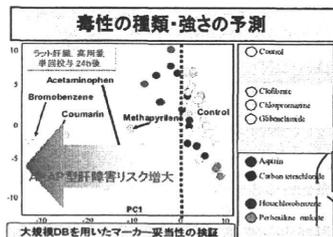
Genomics-Assisted Toxicity Evaluation System
created by Toxicogenomics Project Japan

TG-GATEs



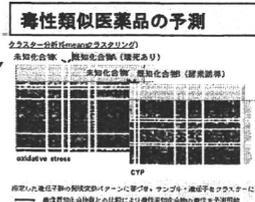
TGP Analyzer · Predictor

主成分分析



毒性未知化合物 X

クラスター分析

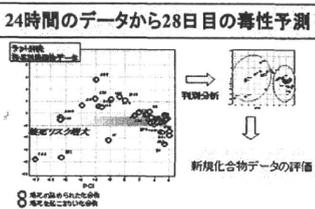


Analyzer · Predictor

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

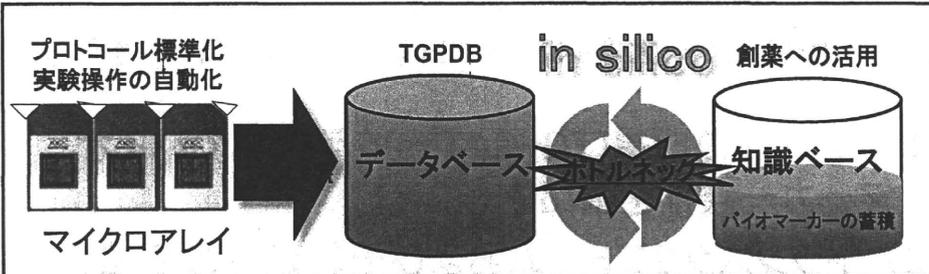


大規模データビューワ



遺伝子発現変動マーカーを網羅的に表示

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

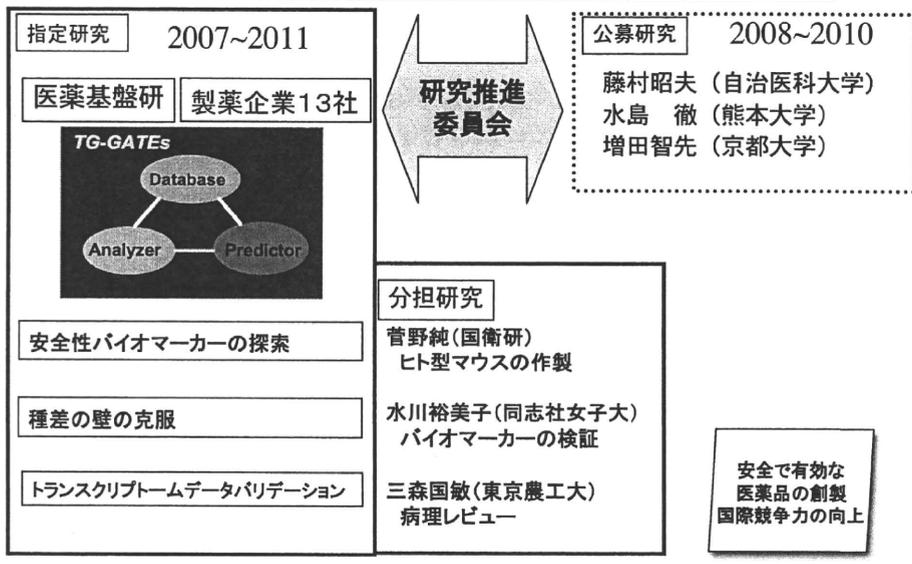
トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト(TGP2)H19~H23

プロジェクトリーダー:大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所副所長

- 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およびそれ以外の手法を用いて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

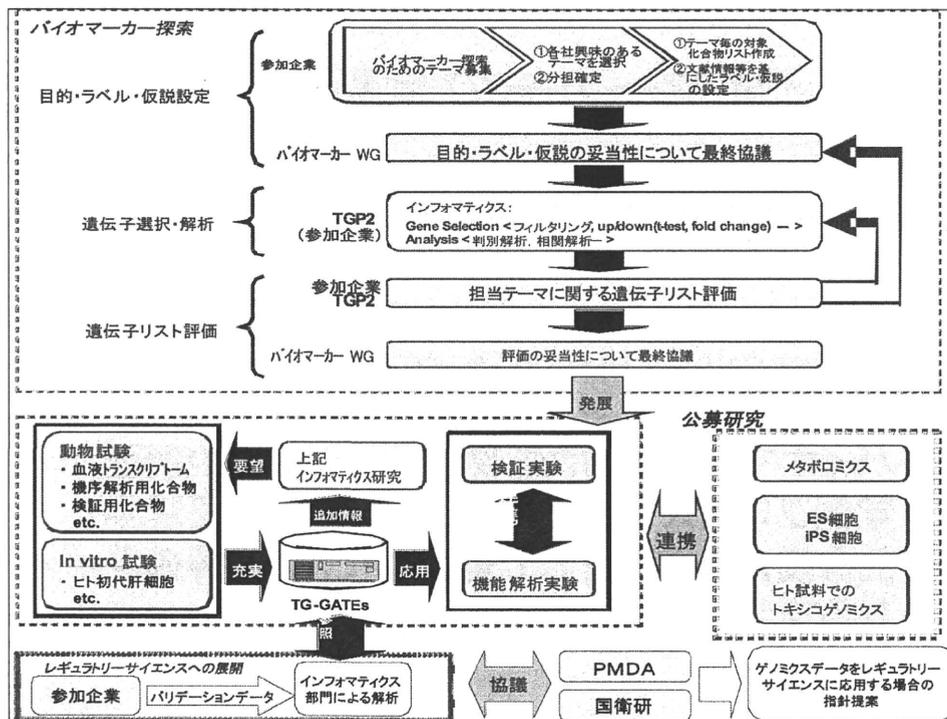
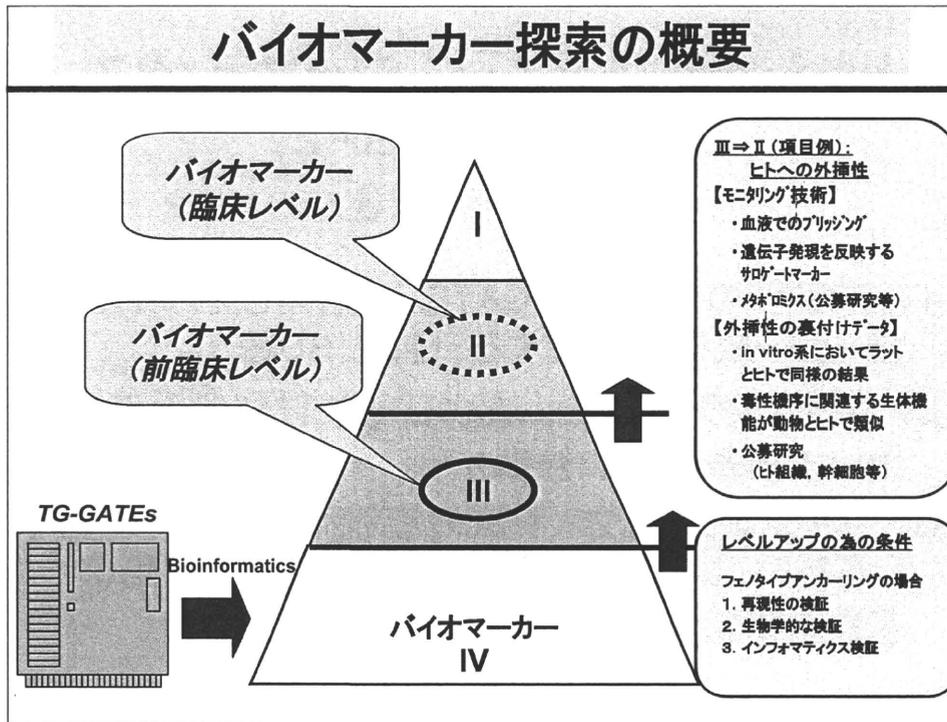
- 1) TGP1の成果(TG-GATEs)を活用してバイオマーカー候補を創出する:目標 30種
- 2) トランスクリプトームおよびそれ以外の手法を用いて種差の壁に挑戦する
- 3) トキシコゲノミクス手法の施設間バリデーションを行い、レギュラトリーサイエンスへの応用の基盤を整備する

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



例2: メタボロミクスとトランスクリプトミクスの融合

2010年 トキシコロジー学会学術年会 (沖縄)



クロスオミクスによるグルタチオン枯渇型 肝障害バイオマーカーの探索

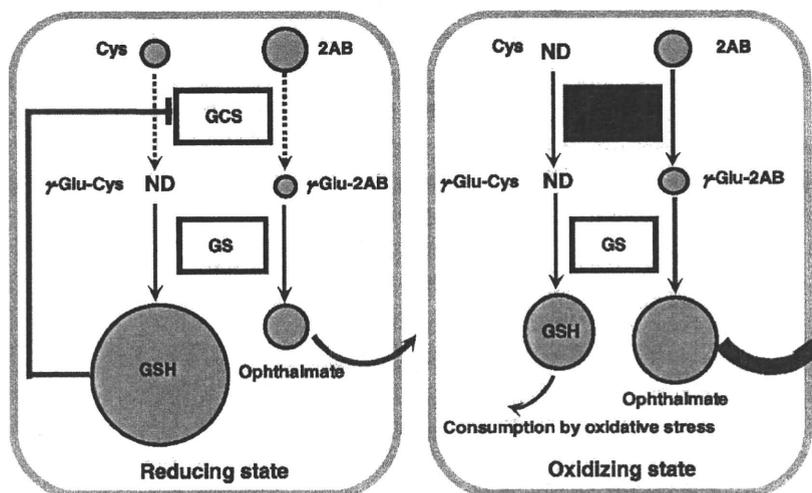
○南 圭一¹, 五十嵐 芳暢², 神吉 将之³, 太田 聖子², 堀之内 彰⁴, 小野 敦⁵, 山田 弘², 漆谷 徹郎^{2,6}, 大野 泰雄^{2,7}

¹小野薬品工業株式会社 福井研究所 安全性研究部, ²独立行政法人 医薬基盤研究所 トキシゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト, ³アステラス製薬株式会社 安全性研究所, ⁴武田薬品工業株式会社 開発研究センター, ⁵国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室, ⁶同志社女子大学 薬学部, ⁷国立医薬品食品衛生研究所

メタボロミクス委託先: 慶応大学先端生命科学研究所 曾我朋義教授

1. (Ophthalmate) 曾我研のマウスデータをラットで確認
2. 5-Oxoproline : グルタチオン枯渇型、血漿中
3. Cholate, Taurocholate, Glycocholate 肝障害、血漿中

Mechanism of ophthalmate biosynthesis in hepatocytes.

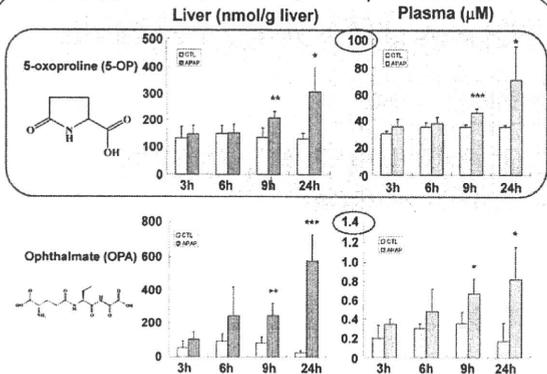


Soga T et al. J. Biol. Chem. 2006;281:16768-16776

©2006 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology

jbc

今回発見したバイオマーカー① 5-oxoproline (5-OP)



5-OPの方が血漿中での濃度が高い。(約70x)
5-OPの方がBaselineが安定しており、変化をとらえやすい。

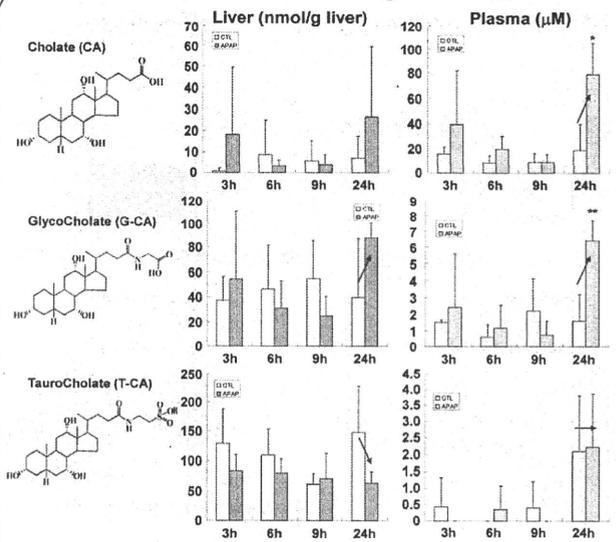
APAP投与と5-oxoprolineの増加

血中5-OP増加の主な原因はグルタチオン合成系(γ-glutamyl cycle)の不全である。先天的なグルタチオン合成酵素の欠損のほか、5-oxoprolinaseの阻害によっても5-OPは増加する。

APAPを投与された患者において、血中及び尿中の5-OPの増加とそれに伴う重篤な代謝性アシドーシスが発症する例が報告されている。また、アシドーシスに至らない例においても、APAP投与によって血中5-OPの増加が報告されている。→ヒトにも外挿できる変化であることが示唆される。

Journal of medical toxicology Vol. 3 119-124 (2007)

今回発見したバイオマーカー② Cholate類

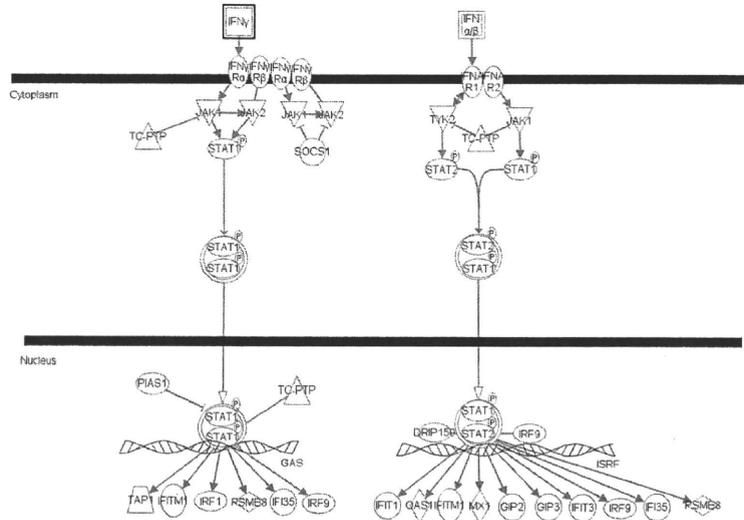


- 血漿中に未抱合のCAが増加している
- 胆汁中にトランスポーター(MRP3)を介して輸送されるG-CAが血漿中に漏出している
- 肝臓中での含量が減少しているT-CAの血中濃度が変化していない。
→間接的に漏出を裏付ける結果と考えられる。

Interferon Signaling

→ いかにして毒性学的解釈につなげるか

Interferon Signaling



© 2000-2003 Incepta Systems, Inc. All rights reserved.

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

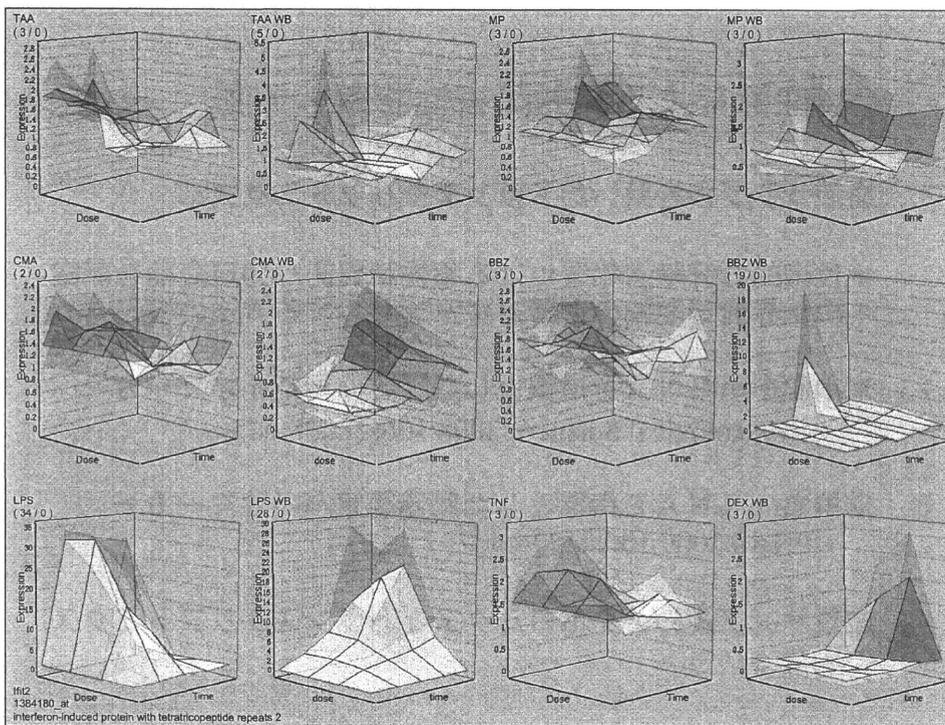
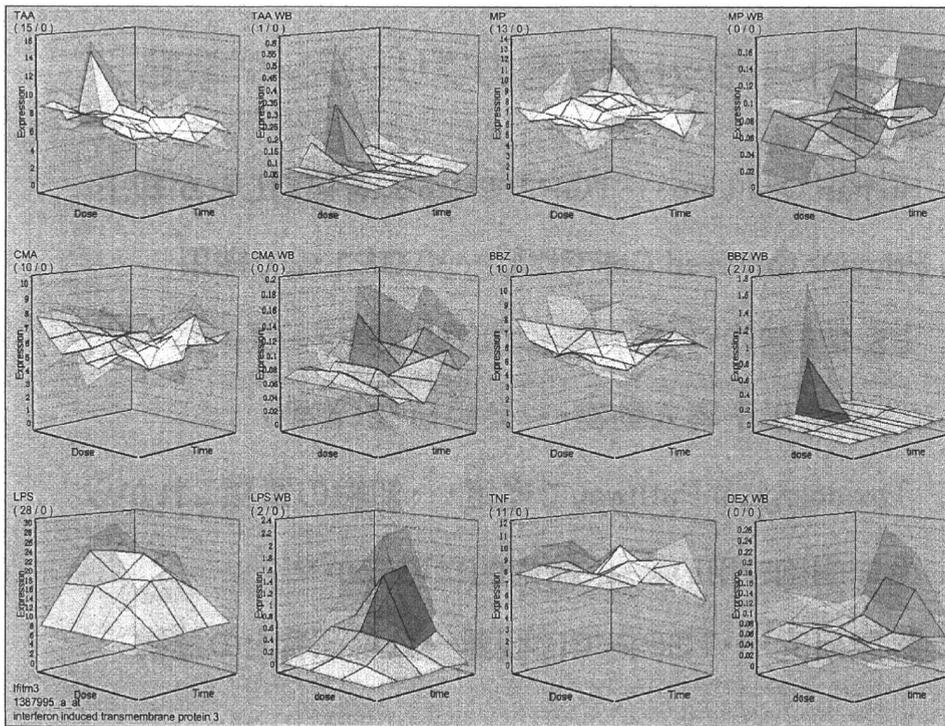
- 1) TGP1の成果(TG-GATEs)を活用してバイオマーカー候補を創出する
- 2) トランスクリプトームおよびそれ以外の手法を用いて種差の壁に挑戦する
- 3) トキシコゲノミクス手法の施設間バリデーションを行い、レギュラトリーサイエンスへの応用の基盤を整備する

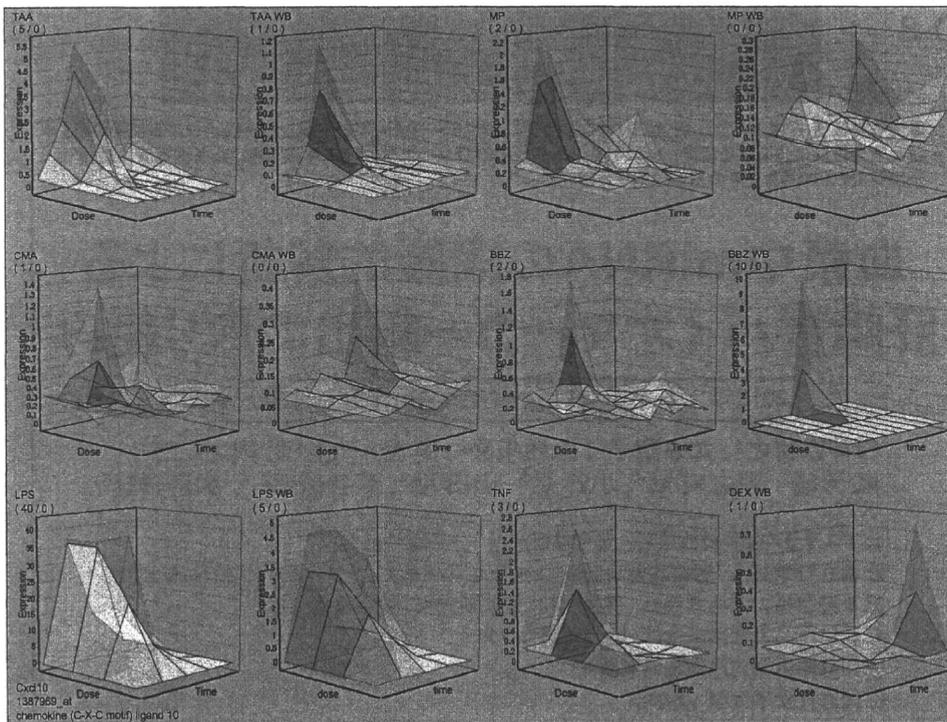
ヒト→ラット:種差のブリッジング戦略

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





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



厚労省科研費(H19-トキシコ-指定-001「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」、H14-トキシコ-指定-001「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究」)

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

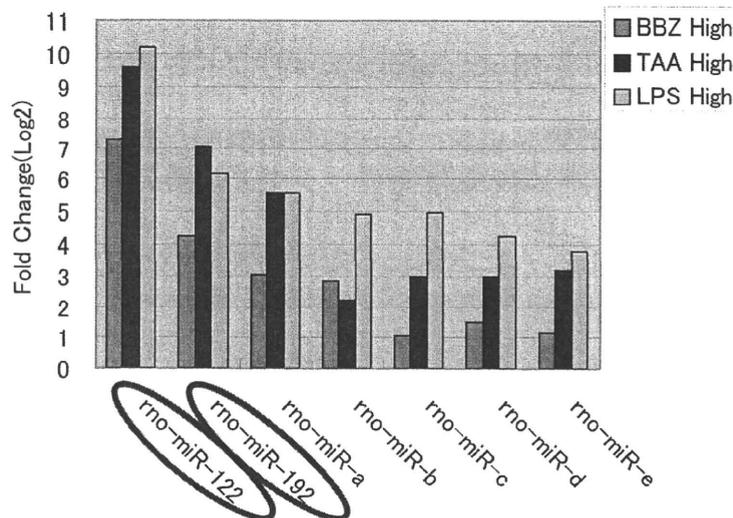
2010年 トキシコロジー学会学術年会（沖縄）

○神吉将之¹、太田聖子²、上西千晶²、南 圭一³、中津 則之²、五十嵐 芳暢²、堀之内 彰⁴、小野 敦⁵、山田 弘²、漆谷徹郎^{2,6}、大野泰雄⁵

- 1: アステラス製薬株式会社 安全性研究所 分子毒性研究室
- 2: 独立行政法人 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
- 3: 小野薬品工業株式会社 研究本部 福井研究所 安全性研究部
- 4: 武田薬品工業株式会社 開発研究センター
- 5: 国立医薬品食品衛生研究所
- 6: 同志社女子大学 薬学部

◆薬剤誘発性肝障害血漿中microRNAマーカー候補

BBZとTAAの両化合物で共通して2倍以上の増加が確認されたmiRNA: 計7miRNAs



➤miR-122, 192についてReal Time PCRによる検証を実施した。

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

