

201107001A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成24(2012)年4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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成24(2012)年4月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成24(2012)年 4月

## 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

## 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	-----	79
水川裕美子		
2. 創薬基盤としての分子毒性学研究	-----	120
菅野純		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	130
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	133

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 と命名した。本研究は TG-GATEs を最大限に活用し、5 年間で①安全性予測の向上・安全性バイオマーカーを 30 種以上開発、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った。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、最終的にレベルⅢ以上のバイオマーカー 36 種を得た。うち 2 種は臨床適用可能なレベルⅠおよびⅡのマーカーであり、この面では目標を上回ることができた、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肝細胞壊死のマーカーを 1 種提案し、メタボロミクスとゲノミクスを融合させた手法により 3 種のマーカーを提案するなど、臨床応用可能なマーカーによる種差のブリッジングの可能性を提示した。また、ヒト肝細胞におけるバイオマーカーも 2 種類得た。更に、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、プロトコール集を編纂し、大規模施設間バリデーション試験の詳細を論文として投稿した。データベースの中身については、前プロジェクトの内容を昨年度 Open TG-GATEs という形で Web 上に公開したが、本プロジェクトで得られたデータも今年度追加公開した。また書籍の形態としての毒性データ集を完成し、全国の医薬獣医系大学と毒性病理学会員に配布した。

## 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

### 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。

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(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。

## 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、血液で得られるでき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点を目標とした。

## 1. バイオマーカー探索

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（後述）、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た。これにはプロジェクトメンバーの全企業が参加し、それぞれのテーマについて、基盤研究者が担当者となり、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、次の5つのワーキンググループを編成した。

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

基本的には前年度までの戦略を継承した。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した。

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った。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した。

チームC：培養細胞

培養細胞を担当。これまでのデータを見直し、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。

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した。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)、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-GATE s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。

これら5グループの研究中に、種々の検証実験や新規測定項目の提案がなされた。それらは、以下のようなテーマが含まれる。

①ラット肝二段階発がんモデルを用いた肝発がんの分子毒性学的研究

これは、チームAで得られた肝発がんバイオマーカーの検証のために行われた。

②肝発がん物質のイニシエーション活性の検索

同上の目的で行われた。

③グルタチオン抱合不全ラット原因究明

検証のために行われたアセトアミノフェン投与実験において、異常に重篤な肝障害を発症したラットが見いだされた。おそらくグルタチオン抱合不全と思われるので、その機序を追究した。

これは、Idiosyncrasyのモデルになりうると考えられた。

④DNAメチル化の網羅的解析

次世代シーケンサーによりDNAメチル化を網羅的に解析することが可能となりつつある。オミクス技術の中ではエピジェネティクスの解析が遅れていたが、この技術の毒性学への応用可能性を検討することとした。肝発がんバイオマーカーの検証として行った2段階発がん試験のサンプルを対象として、発がんメチル化の関係を探ろうと試みた。

⑤糖鎖プロファイル

翻訳後修飾も重要な生理応答であり、特に発がんとの関連が注目されている糖鎖の変化であるが、レクチンを用いた網羅的解析が可能となっている。この技術の毒性学への応用可能性を検討することとした。これも、前項と同様のサンプルを対象として検討した。

⑥サイトカインを指標としたバイオマーカー探索

炎症性サイトカインは臓器病変において重要な役割を果たしている。トランスクリプトミクスの対象臓器である肝臓と腎臓において、サイトカイン遺伝子およびサイトカイン応答遺伝子の発現変化はしばしば観測されるが、病理的フェノタイプとの関係性、あるいは他の指標との関係性は、医薬品や化学物質の場合、複雑すぎて解析が困難である。そこで、血中サイトカインの量を網羅的に測定することにより、フェノタイプと、トランスクリプトミクスの間をつなごうと試みた。



## 2. 血液ゲノミクス

以上の5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から、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。これを検証するため、腎障害のみを起こす条件の6試験を行った。

## 3. レギュラトリーサイエンスの基盤形成

前年度までに完了したバリデーション試験に関して、データ解析を完了し、英文論文としてまとめ、投稿した。これには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ールも含まれている。

これらにおいて、最も重要なのがバイオマーカー30以上という数値目標である。ただし、このバイオマーカーの定義が曖昧であると、この数値目標自体に意味がなくなる。そこで、まずバイオマーカーの定義をはっきりさせた。TGP2の開始時、データベースは完成しており、トランスクリプトームデータは各種毒性データと紐づけされた形で格納されていた。そこで、各種インフォマティクス手法を用いてこれらに関係づければ何かしらの答えが引き出せる。たとえば150の化合物中、化合物Xのある用量・時点で特異的に発現変動する遺伝子があったとする (GeneChip

上には32000プローブセットも存在するため、確率的には十分あり得る)。この遺伝子を化合物Xのバイオマーカーと呼ぶことは可能であったとしても、これはいくつもの問題がある。まず、この現象の再現性が保障されていない。通常ゲノミクスデータは実験例数に比べ測定対象数が桁外れに大きいため、いくら危険率を小さくしても、偶然の差が認められてしまう。次に、これが最大の問題であるが、この情報が毒性研究や医薬品開発にほとんど寄与しないという点である。ここで求められているのは、医薬品開発の初期段階で有用かつ再現性のあるマーカーである。そこで、マーカーのレベルを次の4段階とした。

レベルIV : TG-GATE s 内の発現データと毒性学的情報を関係づける遺伝子セットとアルゴリズムの組み合わせ

レベルIII : 少なくとも同一のプラットフォームでは再現性が保障され、かつ化合物の毒性学的機序の理解に寄与する遺伝子セットとアルゴリズムの組み合わせ

レベルII : 臨床応用可能性が示された生物学的指標またはその組み合わせ

レベルI : 臨床での利用が保証された単一の生物学的指標

本プロジェクトはその構成上、臨床研究を行うことができない。そこで、レベルII以上のマーカー創成を直接の目標とはせず、これは1つ以上のものが得られればよしとした。主目的はレベルIIIのマーカーである。これは少なくともプラットフォームやプロトコール

を共有している参加企業内では再現性が保証され、かつ毒性学的機序解析に有用であることが確認されているので、新薬創成時の初期段階において安全性面からみた至適化合物の選択に活用するバイオマーカーの開発という、本プロジェクトの中心課題である。これをプロジェクト終了までに30種以上を得るという数値目標をおいた。

これを達成するため、当初は各企業からテーマ（毒性学的フェノタイプ）を募り、これと関係づける遺伝子群とそのアルゴリズムをTG-GATEs内から抽出する作業を続けた（フェノタイプアンカーリング型と呼ぶ）。これはレベルⅣのマーカーであるが、初期はレベルⅣの蓄積に主眼を置いた。次に、このレベルⅣをⅢやⅡにレベルアップするわけであるが、ここに明確な判定基準を置くべきであることは明白である。そこで、次の3基準を置いた。

1. TG-GATEs外のデータで再現性が取れること。これは、追加実験、参加企業内部データ、公共データベースのいずれかで検証すべきであるとされ、原則的には、TG-GATEs内のデータを一部除外してモデルを作成したうえで、その除外したデータを検証に用いるという手法は、やむを得ない場合を除き、推奨されていない。

2. インフォマティクス上の問題点が解消されていること。変数の多いゲノミクスデータの場合、いわゆるオーバーフィッティングの問題が生じやすい。これには、モデル形成や解析法によって検証方法が異なるが、特徴遺伝子の

プロファイルが正例特異的であることの確認、判別分析のクロスバリデーションにおいて、特徴遺伝子が常に上位で選択される、などの手法がとられた。

3. マーカー遺伝子の生物学的・毒性学的解釈が可能なこと。ここで目標としているレベルⅢのマーカーは、単なる研究目的ではなく、創薬の早期段階の非臨床試験において、化合物選択や開発の可否を判断する場合の重要な判断基準を得るための実用的なものである。純粋なインフォマティクスの立場から言えば、前2項で十分なのであるが、このような目的である限り、生物学的・毒性学的な裏付けは必須である。また、研究的には、判断を下すのみでなく、毒性学的メカニズム解析にも資するべきものである。このため、必然的に最終的なバイオマーカーはプローブセットの数を減らす方向にあった。インフォマティクスのには、プローブセットの数を減ざると頑強性が犠牲になることが多い。しかしながら現状では、機能既知の遺伝子は少ない（機能が推定されていても、その毒性学的意義が未解明であることがほとんどである）ため、プローブセット数が多いと、毒性学的な説明がどんどん困難になっていくからである。

一方、プロジェクトの後半には、別の方向性のバイオマーカー創成の試みがなされた。それは、既知情報からのものである。すなわち、毒性シグナルパスウェイ上の機能既知遺伝子群を用い、TG-GATEs中のデータに適用し、毒性学的に有意義な化合物分類ができる

かどうかを検討することである（シグナルパスウェイ型と呼ぶ）。これが成功した場合、既知情報を用いているということは、再現性はすでに保証されているとみなせる。従って、インフォマティクス上の問題がなければ、上記3つのクライテリアはすべて満たすこととなり、レベルⅢに認定できるとした。

以上は、WGで決定された事項であるが、実際の検証作業において最も重視された点がある。それは、そのマーカー候補の「毒性学的有用性」である。実際のレベルアップの作業においては、この項目が最重要視された。すなわち、いくら再現性良く、インフォマティクスの的に完全で、生物学的な裏付けがとれていたとしても、そのマーカーから得られる情報が、創薬時の安全性研究に有用でなければマーカーに値しない、企業の毒性研究者が「本当に必要としているマーカー」であることが要求されたのである。

前年度までに、バイオマーカーレベルⅣを46種得、そのうち16がレベルⅢ以上と認定されていた。本年度は新規レベルⅣの創成を行わず、フェノタイプアンカーリング型レベルⅣマーカーのレベルアップと、シグナルパスウェイ型レベルⅢマーカーの創成に力を入れた。また、肝臓や腎臓のトランスクリプトームデータのみでなく、メタボロミクス等の他の指標も取り入れたマーカー探索を行った

#### 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的実験が必須である。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枯渇を評価するマーカーのチューニング（2）in vivo, in vitroのリン脂質症マーカーの検証とチューニング（3）PPAR $\alpha$ 活性化マーカーについて、ラットおよびヒトに適用可能なマーカーのチューニングと公共データベースを用いた検証（4）血液凝固異常を判定するマーカーのチューニングと検証（5）ビリルビン値の上昇を判定するマーカーについてチューニングと検証を行った。

#### 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-16alpha-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。

(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種以上のレベル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種以上のレベル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種類のレベルⅣマーカーが得られていた。結局今年度末までには、累計46種のレベルⅣマーカーが得られた。

本年度は最終年度であったため、レベルⅣマーカーの創成よりも、レベルⅣマーカーのレベルアップ、あるいはシグナルパスウェイ型のマーカー創成に力を入れた。その結果、最終的にレベルⅢ以上のマーカーとして、フェノタイプアンカーリング型20種、シグナルパスウェイ型12種、その他手法によるもの4種の、計36種を得、目標を上回る成果が得られた。なお、その他マーカーには、レベルⅠとⅡが一つずつ含まれ、このカテゴリーにおいても目標を達成した。

以下に、最終的なマーカーのリストを示す。最初の番号は、各カテゴリーにおける番号で、次の ( ) 内は通し番号である。それぞれの内容の詳細は別添資料に譲るが、シグナルパスウェイ

イ型マーカーの10番目として、iCompassというものがある。これは狭義のバイオマーカーといえないかもしれないが、その有用性は大きく、数値目標が過達であることでもあり、ワーキンググループにおいて、全員一致でレベルⅢマーカーと認定した。内容は、機能既知で、毒性学的に重要なパスウェイに属する遺伝子であって、かつデータベース中の化合物いずれかで変動を検出・評価するプローブセットをまとめ上げ、変動の方向性をそろえたうえで、これをスコア化したものをレーダーチャート表示するものである。これは特定のフェノタイプを判定するものではなく、ある化合物に関して、その毒性学的プロファイルを一目で判定できるように可視化する、非常に有用なツール（マーカー）と考えられた。

#### トランスクリプトミクスマーカー（フェノタイプアンカーリング型）

- 1 (1) ラット単回投与試験で肝臓のグルタチオン枯渇をスコアにより定量評価する診断マーカー
- 2 (2) ラット単回投与試験およびラット肝細胞で肝臓のPPAR $\alpha$ アゴニスト活性を評価する判別マーカー
- 3 (3) ヒト肝細胞で肝臓のPPAR $\alpha$ アゴニスト活性を評価する判別マーカー
- 4 (4) ラット反復投与試験で肝臓のリン脂質症を評価するスコアリングマーカー
- 5 (5) ラット肝細胞で肝臓のリン脂質症を評価する判別マーカー
- 6 (6) ラット反復投与試験で肝臓のデ

ータから血液凝固不全を診断する判別マーカー

7 (7) ヒトおよびラット肝細胞(24時間曝露)で肝臓の小胞体ストレスを予測するための判別マーカー

8 (8) ラット単回及び反復投与試験で肝臓における遺伝毒性発がん作用を予測する判別マーカー

9 (9) ラット単回および反復投与試験で肝臓の壊死を予測する判別マーカー

10 (10) ラット反復投与試験で肝臓の脂肪化を予測・診断する判別マーカー

11 (11) ラット単回投与試験で腎臓の尿細管障害を予測する判別マーカー

12 (12) ラット反復投与試験で腎臓の尿細管障害を診断・予測する判別マーカー

13 (13) ラット単回及び反復投与試験の肝臓で骨髓抑制性貧血を診断するスコアリングマーカー

14 (14) ラット反復投与試験で肝臓における細胞障害型遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん作用を予測する判別マーカー

15 (15) ラット単回投与試験で肝臓における細胞障害型遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん作用を予測する判別マーカー

16 (16) ラット単回及び反復投与試験で腎臓の乳頭障害を予測・診断する判別マーカー

17 (17) ラット反復投与試験（15あるいは29日目）で肝臓の発がん性を予測する判別マーカー

18 (18) ラット単回投与試験（24時間目）で肝臓のリン脂質症を予測する判

別マーカー

19(19) ラット反復投与試験（8日目以降）で肝臓の胆管増生を診断・予測する判別マーカー

20(20) ラット単回および反復投与試験の全血で肝臓の壊死を診断するためのスコアリング用途マーカー

トランスクリプトミクスマーカー（シグナルパスウェイ型）

1(21) ラット単回および反復投与試験で肝臓の壊死を評価するためのp53, TNF $\alpha$ メカニズムに基づいたスコアリング用途マーカー

2(22) ラット単回(24時間目)および反復投与試験で肝臓の好酸性顆粒状変性を予測・診断する判別マーカー

3(23) ラット反復投与試験で肝臓の酵素誘導型小胞体増生を診断する判別マーカー

4(24) ラット反復投与試験で肝臓の線維化（炎症背景）を評価するためのスコアリング用途マーカー

5(25) ラット反復投与試験で肝臓の線維化（線維形成背景）を評価するためのスコアリング用途マーカー

6(26) ラット単回および反復投与試験で肝臓の糖代謝活性低下を評価するためのスコアリング用途マーカー

7(27) ラット単回および反復投与試験で肝臓の脂肪酸生合成能を評価するためのスコアリング用途マーカー

8(28) ラット単回および反復投与試験で肝臓の細胞増殖活性を評価するためのスコアリング用途マーカー

9(29) ラット単回および反復投与試

験で肝臓の脂質代謝活性亢進の分子メカニズムを評価するための診断マーカー

10(30) i-Compass

11(31) ラット単回投与試験で肝臓の小胞体ストレスを評価するためのスコアリング用途マーカー

12(32) ラット単回投与試験で肝臓の酸化ストレスを評価するためのスコアリング用途マーカー

レベルⅠ～Ⅲマーカー（その他のカテゴリ）

1(33) ラット単回および反復投与試験の血漿で腎臓の障害を診断するメタボノミクスマーカー

2(34) ラット単回投与試験で肝臓のグルタチオン枯渇に起因する肝障害を診断する臨床適用可能なメタボノミクスマーカー（レベルⅡ）

3(35) ラット単回投与試験で肝臓の障害を予測する臨床適用可能なメタボノミクスマーカー（レベルⅠ）

4(36) ラット単回投与試験で肝臓の壊死を診断する血漿中肝臓特異的mRNAバイオマーカー

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レベル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、レベルⅣの肝細胞壊死マーカーが得られた。このマーカーの再現性・妥当性を検討するため、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。これにより検証を行った結果、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可能となり、レベルⅢと認定された（前項 20 番）

#### （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。4 遺伝子 (Alb, Ambp, Apoh, Gc) を指標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、Alb mRNA をレベルⅢバイオマーカーとして認定した（前項 36 番）。

#### （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した。各種 miRNA

を検討した結果、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 を網羅的に定量した。これにより、miRNA を臓器特異的障害の検出に利用する場合の基礎データが得られたが、これをレベルⅢのマーカーとするためには、クライテリアが決定できず、バイオマーカーには参入しなかった。

#### （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

前年度までに、メタボロミクスとトランスクリプトミクスを組み合わせた戦略が、特にレベルⅡ以上のマーカーを得るためには非常に有効であることが明らかとなっていた。前年度までに 2 つのレベルⅡあるいはレベルⅠのマーカーを抽出したが、これを障害物質処理動物の血漿メタボロームを行った。その結果、ヒスチジン代謝物に有用性が見いだされ、レベルⅢと認定された。これにレベルⅡまたはⅠの可能性が考えられたため検討したが、ラットとヒトの種差が大きく、臨床への適用は断念した。

### 3. バリデーション

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を詳細に記したバリデーション結果を英文論文として投稿した。

### 4. データベース公開

昨年度、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

のを編集した。本年度はこれを2冊一組の冊子（毒性データ編 544 ページ、病理画像編、フルカラー296 ページ）として完成させ、コンソーシアムメンバーのみでなく、全国の医・歯・薬・獣医学部のある大学および日本毒性学会評議員および日本毒性病理学会員全員に無料配布することとした。これに関連して、150以上の化合物の病理組織標本をすべて日本毒性病理学会に寄付し、認定試験の資料として活用してもらうこととした。これにより、学会よりプロジェクトに対し感謝状を頂いた。

次に、遺伝子発現データの公開である。TGP1時代の150化合物のデータに関しては、昨年度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、医薬基盤研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。また、省庁横断的データベース構想 (DBCLS) にも参画し、ここに遺伝子発現データと毒性データをアーカイブした。更に、2012年1月には、TGP2で得られた実験データもTG-GATEsに追加した。本データベースは、世界各国からアクセスされ、その内容の評価も高いときいている。

#### 分担研究 (水川)

##### 1. ラット単回投与試験およびラット肝細胞で肝臓のPPAR $\alpha$ アゴニスト活性を評価する判別マーカー

プロジェクト初期において、典型的PPAR $\alpha$ アゴニストによる遺伝子発現変化のうち、in vivoとin vitroで共通して

変動する遺伝子を抽出し、PCAによりPPAR $\alpha$ アゴニストとNSAIDがよく分離することからレベルIVマーカーと認定した。その後、典型的なPPAR $\alpha$ アゴニストか否か不明な化合物や、NSAIDはすべてPPAR $\alpha$ アゴニストなのか、という問題が生じ、cell freeのPPAR $\alpha$ アゴニスト活性をアッセイすることによりこの問題に切り込んだ。また、PCAによる定性的な評価ではなく、レベルIVマーカー遺伝子を出発点としてSVMによる判別分析を行い、陽性確率で定量評価できるようにした。計算科学的に至適遺伝子を絞り込むとin vivoとin vitroで異なる遺伝子が選ばれたので、これらの組み合わせで1つのレベルIIIバイオマーカーとした。外部データを含めた多数の化合物の判定結果は良好であった。

##### 2. ヒト肝細胞で肝臓のPPAR $\alpha$ アゴニスト活性を評価する判別マーカー

PPAR $\alpha$ アゴニストはラットで肝臓がんに至る強い肝細胞増殖活性を示すが、臨床では全く見られないことが知られている。PPAR $\alpha$ は転写制御因子であり下流の遺伝子群はラットとヒトでほぼ共通しているといわれており、この大きな種差の原因は解明されておらず、脂質異常症治療薬としての真のターゲットも確定していない。そこでまず前項のマーカー (in vitroで有効) をヒト肝細胞に適用してみたところ、発現パターンは多少の共通性が見られるものの、かなり異なったものであり、判別分析の正答率も低いものであった。そこで、cell freeのPPAR $\alpha$ アゴニストアッセイ結果に基づいてSVMを行い、ヒト特異的マーカーを抽出した。



外部データを含めた検証結果も良好であり、レベルⅢと認定された。本マーカ―は種差の解明、真の臨床ターゲットの特定に有用であると考えられた。

### 3. ラット反復投与試験で肝臓のリン脂質症を評価するスコアリングマーカ―

これは、リン脂質症を生じた化合物に共通して発現変動する 78 遺伝子を抽出し、検証化合物に適用したところ、主成分分析の PC1 方向の固有値によりリン脂質症を診断・評価できるということでレベルⅣマーカ―とされていたものである。これを精査し、最終的に 14 プローブセット (13 遺伝子) に絞り込んでも、同様の結果が得られ、更に外部データも正しく判定されたためレベルⅢと認定した。なお、ここで得られた 13 遺伝子のうち 9 遺伝子は、市販の PCR Array (Quiagen) と共通であり、汎用性は保証されている。

### 4. ラット肝細胞で肝臓のリン脂質症を評価する判別マーカ―

前項のマーカ―をラット *in vitro* に適用しても全く使い物にならず、*in vivo* と *in vitro* ではかなり異なることが判明した。そこで、*in vitro* のリン脂質症アッセイ系を用い、*in vitro* でのフェノタイプアンカーリングを行った。*in vitro* で陽性反応を示した化合物を正例として判別分析 (SVM) を行った。幾たびかのチューニングののち、感度・特異度とも満足のいくプローブセットが得られ、レベルⅢマーカ―と認定した。

### 5. ラット反復投与試験で肝臓のデータから血液凝固不全を診断する判別マーカ―

プロジェクト初期にラットに連続投与

して血液凝固異常を呈した化合物に共通して変動する遺伝子を抽出したところ、これら化合物が PCA で分離できたため、これをレベルⅣマーカ―としていた。これを検証したところ、PCA 上、血液凝固時間が延長する群と、血液凝固時間がほとんど変化せずフィブリノーゲン量が減少する群の、2つのカテゴリーに分かれ、このマーカ―では判別分析がうまくいかなかった。そこで正例からフィブリノーゲン低下化合物を除き、判別器を作り直したところ、感度・特異度ともおおむね満足すべきものが得られ、外部データでの検証もできたことからレベルⅢと認定された。

### 6. その他の検討

プロジェクト初期にレベルⅣと認定されたマーカ―は他にも多く存在し、そのいくつかについて再現性の検証やブラッシュアップを試みた。血中脂質低下を診断するマーカ―、血中ビリルビン値上昇を診断するマーカ―などであるが、当該年度中にはレベルⅢの基準を満たすことはできなかった。

### 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。

## 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は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、今年度は、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。その結果、レベルⅢ以上のバイオマーカー36種という、当初目指していた30を大きく上回ることができた。

今回の研究成果で問題があるとすれば、種差のブリッジングを企図して導入したヒト凍結肝細胞の系からのバイオマーカー創成が乏しかったことがある。36種のバイオマーカーのうち、ヒト細胞に適用可能なものは2種に過ぎなかった。これは、レベルⅢの条件として再現性の保証を要求していたため、検証が困難であったことが主な理由である。しかし、もともとヒト肝細胞を対象としたレベルⅣマーカーもほとんど創出できなかったことも事実である。その理由として、*in vivo*と *in vitro*の壁が、予想よりはるかに高かったことにある。プロジェクトの経験上、種差の壁よりも *in vivo*と *in vitro*の壁の方が高いのではないかという印象を持った。実際、ラットにおいて、*in vivo*と *in vitro*に共通して適用可能なバイオマーカーは2番の1つのみであった。たとえばリン脂質症に関しては、4番 (*in vivo*、連続投与結果に基づく診断マーカー)、5番 (*in vitro*データに基づく予測マーカー)、18番 (*in vivo*単回投与結果に基づく予測マーカー)の3種類が得られたが、遺伝子の内容はほとんど共通性はない。ただし、*in vivo*のマーカーどうしを比較すると、生物学的機能はほとんど共通しているため、毒性学的パスウェイは共通しているが、関与する遺伝子に時間差が

あると解釈できる。ところが *in vivo*と *in vitro*のマーカー遺伝子に関しては、その毒性学的パスウェイに全く共通性がない。リン脂質症に関しては、ラット *in vivo*の病理データ、ラット *in vitro*のリン脂質症アッセイデータが得られているため、フェノタイプアンカーリングにより特徴遺伝子の抽出が可能であったが、ラットにおいて *in vivo*と *in vitro*がこれほど異なるという前提のもとに、フェノタイプが得られないヒト肝細胞の遺伝子発現データからマーカーを抽出することはほぼ不可能に近い。唯一ラットとヒトに共通に用いることのできるマーカー(7番)は、小胞体ストレスという、フェノタイプではなく、毒性学的パスウェイそのものをターゲットとしたものであった。すなわちあらかじめヒトとラットで共通な毒性パスウェイが解明している場合、に限られている。このことは、いかにトランスクリプトームという新しいテクノロジーを用いようが、このような戦略をとる限り、毒性メカニズム解析を進めることが先決であることになる。したがって、この分野で画期的成果を上げるためには、前述のメタボロミクスとの融合など、別の戦略が必要であり、次項もその一環である。

## 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、現実的には困難な課題であった。今年度までの研究により、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。その意味で、血中サイトカインの網羅的測定も行った。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 の定量を行い、広範なターゲットを設定した。この領域から得られたバイオマーカーは 2 種であったが、今回のバイオマーカーのカテゴリにはなじまない種々の知見が得られたことから、これを公表し、以後の検討に期待したい。

### 3. バリデーション

TGP1 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、バリデーション試験の結果と併せて英文論文として投稿した。

### 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 (<http://toxico.nibio.go.jp>)、統合データベース DBCLS への登録も完了した。また TGP2 で得られたデータのデータベースへの登録もほぼ完了し、印刷版の毒性データ集も配布された。これによって、全世界の毒性研究者にとって、非常に貴重な情報、特に次世代の毒性研究者に対する教育研究の資料として多大な貢献ができたと自負している。プロジェクトで得られたバイオマーカーの活用により創薬研究が加速することはもとより、毒性研究が近代化され、トランスクリプトミクスの面から毒性発現メカニズムの解明がすすむことが期待される。

### 分担研究 (水川)

GSH 枯渇マーカー候補および PPAR $\alpha$  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