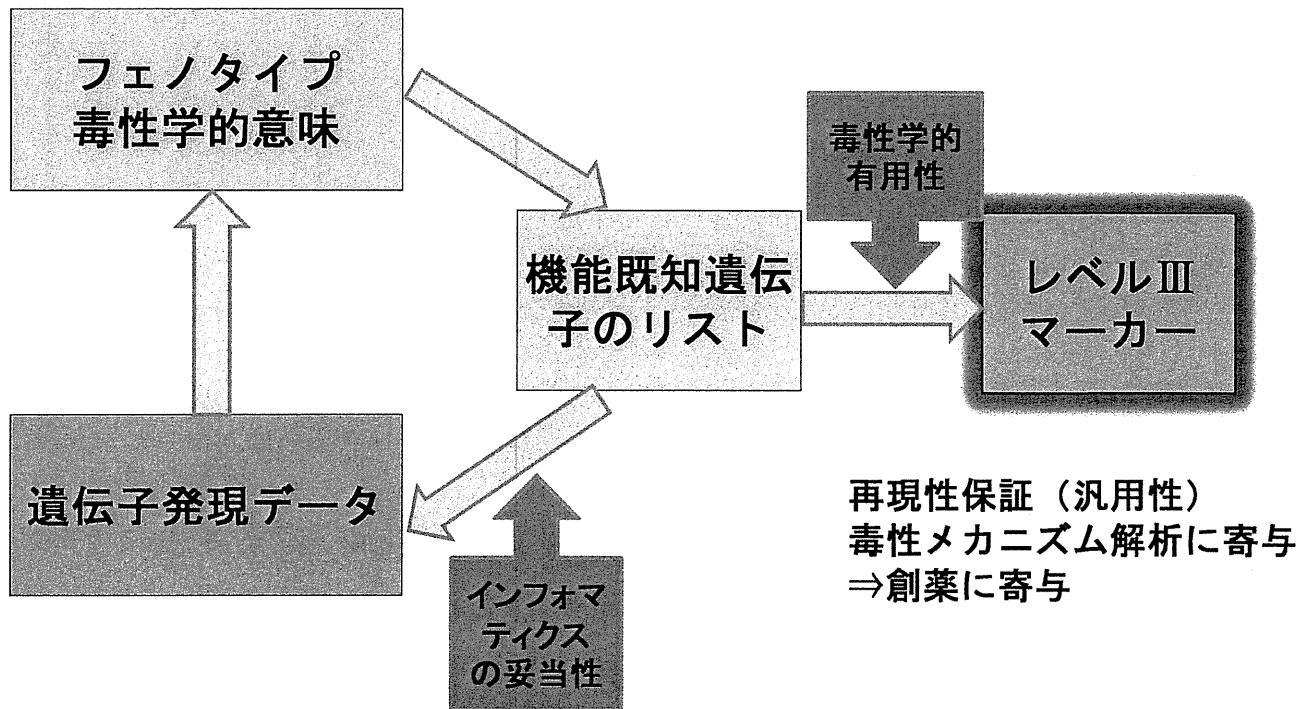


バイオマーカー抽出のストラテジー (シグナルパスウェイ型: チームB)



レベルIII 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 α 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 α 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予測する判別マーカー
- 5 (5) ラット肝細胞で肝臓のリン脂質症を評価するスコアリングマーカー
- 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髄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

レベルⅢ 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 α 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)

- 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

バイオマーカー探索に関連した諸研究

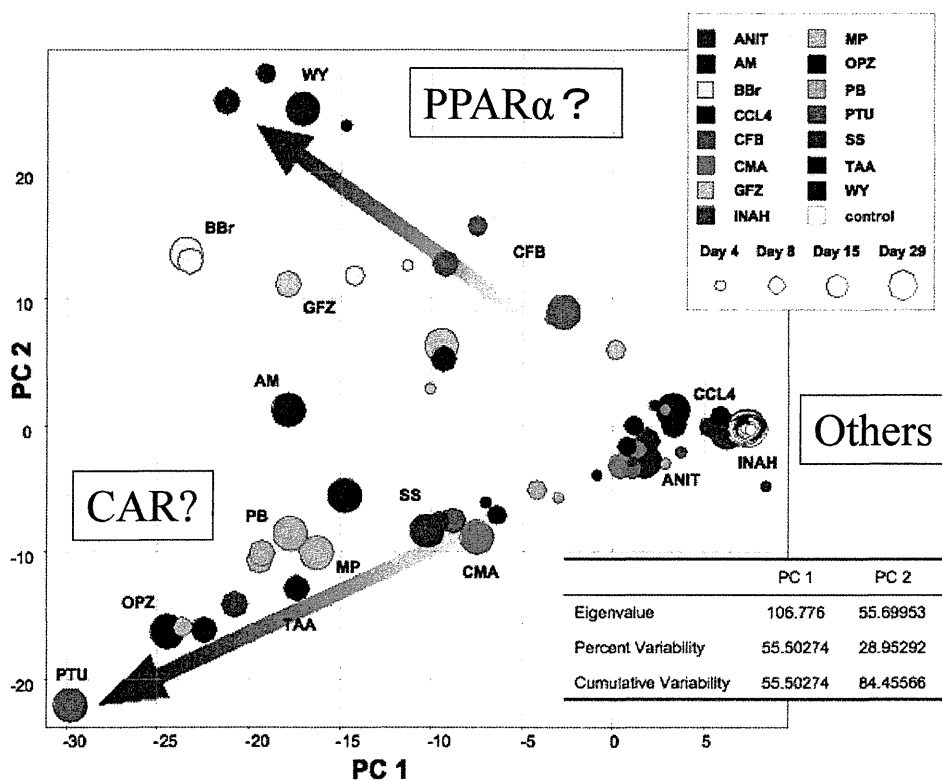
- ラット肝二段階発がんモデルを用いた肝発がんの分子毒性学的研究
- 肝発がん物質のイニシエーション活性の検索
- グルタチオン抱合不全ラット原因究明
- 血中miRNAのバイオマーカーとしての可能性検討
- DNAメチル化の網羅的解析
- 糖鎖プロファイル
- メタボロミクス (慶応大学・曾我先生へ委託)
- サイトカインを指標としたバイオマーカー探索
- In vitro試験における溶媒の影響

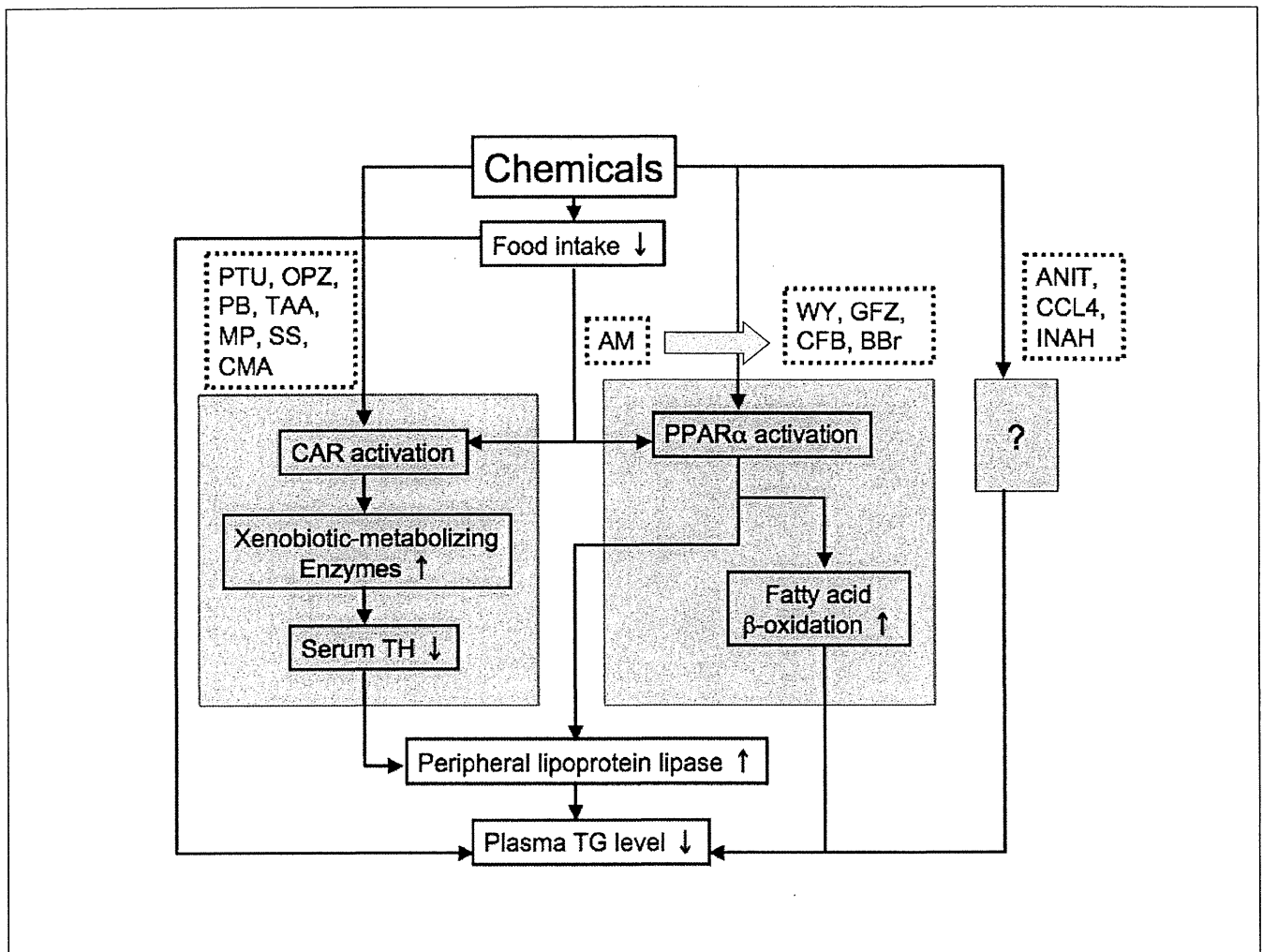
レベルⅣに留まり、Ⅲに至らなかった例

ラット連続投与において血中中性脂肪低下機序を判定するマーカー

K. Omura, N. Kiyosawa, T. Uehara, M. Hirode, T. Shimizu, T. Miyagishima, A. Ono, T. Nagao, T. Urushidani. Gene expression profiling of rat liver treated with serum triglyceride-decreasing compounds. J. Toxicol. Sci. 32: 387-399, 2007.

- 連続投与により血中中性脂肪が低下した15化合物に関して、連続投与4時点、全用量のデータを用い、Welch's ANOVA/t-testにより遺伝子を選択し、15化合物のうち少なくとも10化合物で変化した218プローブセットに絞り込んだ
- これによってPCAを行うと、2次元上で、2方向に分離し、3つのクラスター（PPAR α 活性化、CARの活性化、その他）に分かれた。
- CARの活性化による中性脂肪低下の機序として、CARで誘導される酵素群による甲状腺ホルモンの分解が考えられた。





グレードⅢを目指した検討

- 血中の甲状腺ホルモンレベルを測定したが、CAR仮説を裏付けるようなデータはえられなかった。
- データはAチップを用いたものであり、ver.2.0チップのデータで再現性を確認したところ、全く同じようなPCAが得られた。
- 218プローブセットの中にはPPARα活性化を表わすものが含まれていることは確実なので、CARによる分離を際立たせる目的で、PC2の固有値の絶対値が0.01以上の38プローブセットに絞り、これによってPCAを行ったところ、4方向に分離した。

解釈

38プローブセットのヒートマップにおいて

- 負の固有値を持つものはPPAR α 群で強く誘導され、TAA/MP群では抑制され、その他群では不変か抑制気味である。
- 正の固有値を持つものはCAR群で強く誘導され、TAA/MP群で抑制と誘導が半々、PPAR α 群では抑制され、その他群では不変か抑制気味である。
- 15化合物中10化合物で変動した遺伝子を抽出したため、全く変動しない化合物群(INAH,ANIT,CCL4)が出てしまった。
- 当時、AMは機序不明としていたが、PPAR α のマーカー探索の結果、in vivoでは代謝されてPPAR α アゴニストとなることが推定されたので、今回のPCAでも、ヒートマップでもPPAR α 群に分類されるのは妥当である。

結論

- 以上は仮説を裏付ける有望な結果であり、研究的には興味深い出発点ではあるものの、この戦略ではグレードⅢバイオマーカーを得るのに困難が予想された
- 想定されるゴールは、それぞれのメカニズムを区別する判別器を複数組み合わせることで脂質低下メカニズムを判定することになるだろうが、PPAR α 以外のメカニズムは不明か裏付け不十分な状態であり、プロジェクトの残り時間を考えると不可能である
- フェノタイプは同一でも、明らかに複数の機序で生ずるものはバイオマーカーに落とし込むのは極めて困難である
- バイオマーカー抽出というミッションから離れて、今後検討する価値のあるテーマかもしれない

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

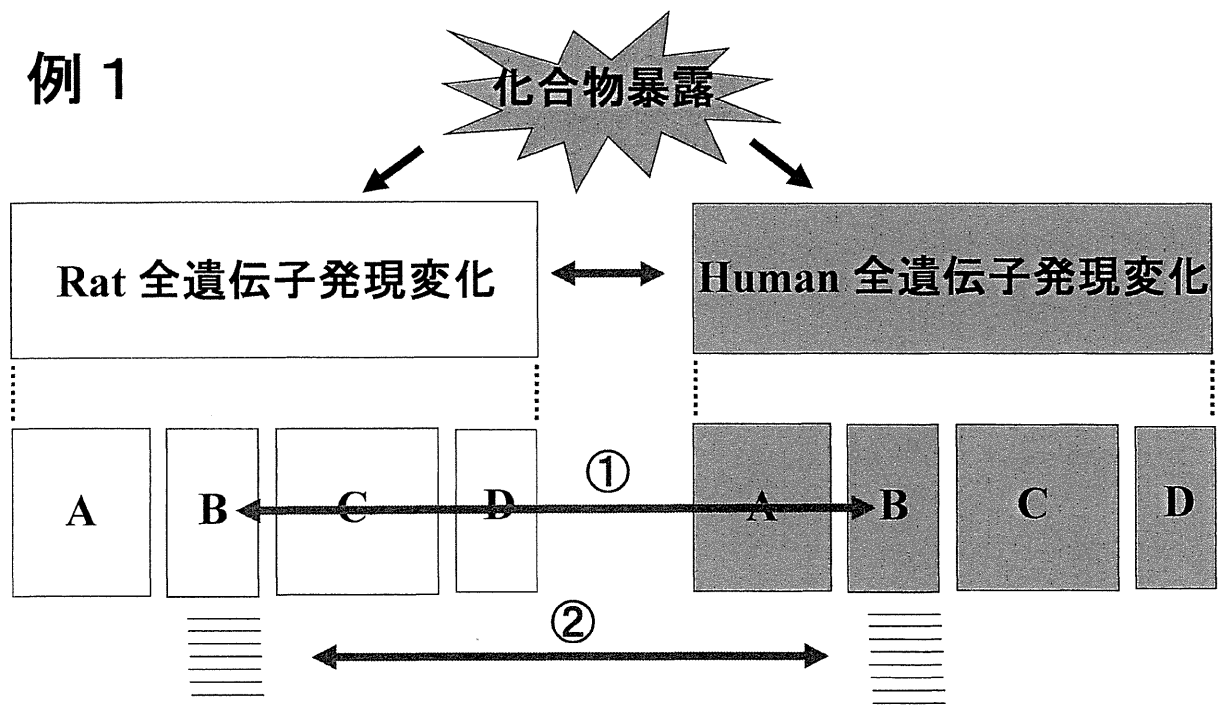
ヒト→ラット:種差のブリッジング戦略

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. 他のオミクス技術の併用・・・有望か?
8. 臨床研究・・・TGP内では困難→公募研究との連携

ヒト→ラット:種差のブリッジング戦略

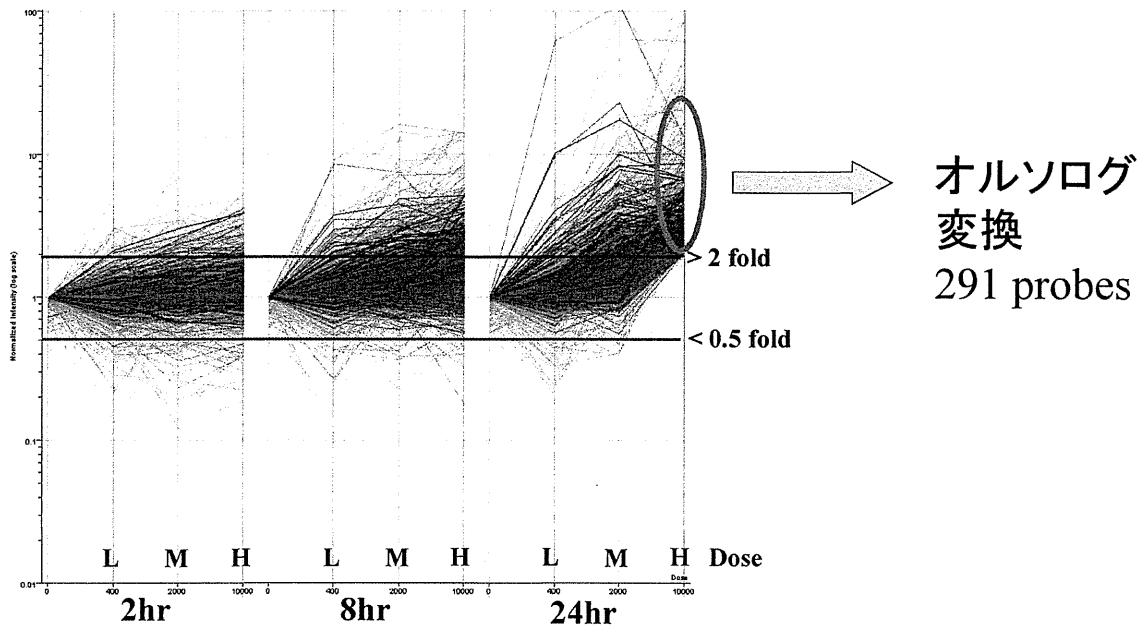
1. Human Cell Line・・・TGP1でHepG2を検討したが却下
2. Primary Cultured Cellで比較・・・TGP1・2で採用
3. ES, iPS細胞・・・機が熟していない(?)→スーパー特区
4. ヒト型遺伝子導入動物・・・分担研究(菅野)
5. Toxicological Pathwayで推定・・・知識の蓄積これから
6. 血球細胞を用いる・・・技術的に可能か?
7. 他のオミクス技術の併用・・・有望か?
8. 臨床研究・・・TGP内では困難→公募研究との連携

例 1

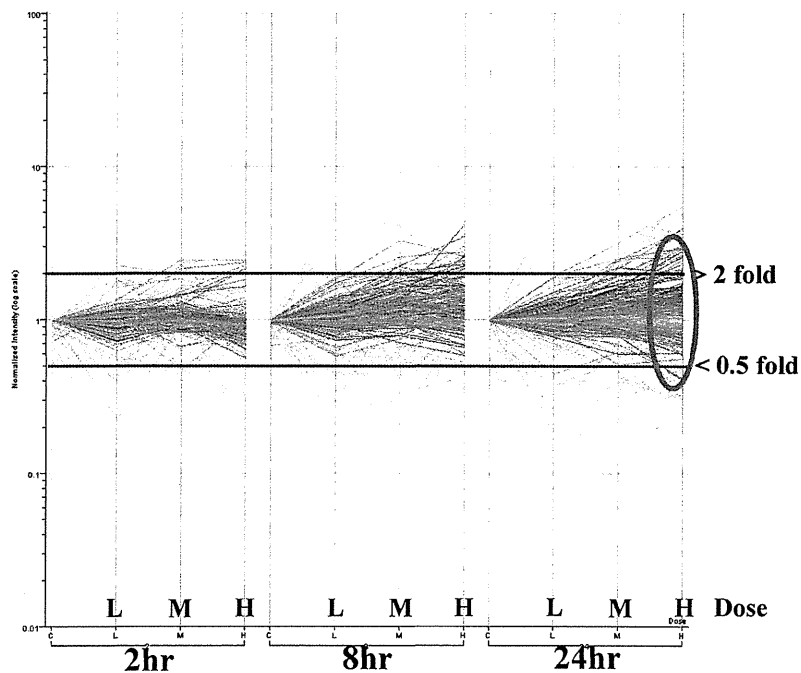


- ① 機能カテゴリレベルでの比較
- ② 個々の遺伝子をオルソログ変換して比較

バルプロ酸(VPA)暴露時の遺伝子発現変化 (Rat in vitro, 1572 probes)



バルプロ酸(VPA)暴露時の遺伝子発現変化 (Human in vitro, 291 probes)



Rat 1572 probes を機械的にオルソログ変換した291 probesの
遺伝子発現変化→変動の傾向は一致していない。

VPA暴露時発現量増加遺伝子(24 hrs)のGOカテゴリ分類

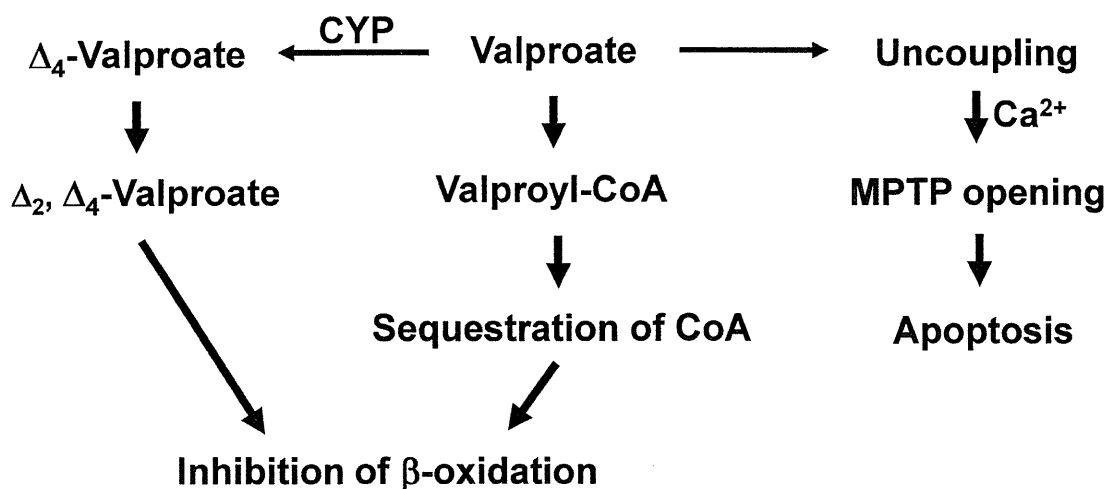
GO terms		P-value
GO:0016491	oxidoreductase activity	0.000394
GO:0006629	lipid metabolism	0.00229
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.00624
GO:0019752	carboxylic acid metabolism	0.00624
GO:0006082	organic acid metabolism	0.00624
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.00838
GO:0004497	monooxygenase activity	0.00838
GO:0006118	electron transport	0.00874
GO:0042598	vesicular fraction	0.0123
GO:0005792	microsome	0.0245

○:CYPを含む、酸化還元反応に関与する遺伝子群

(Fisher's exact test)

■:代謝関連の遺伝子群(主として脂質代謝系)

VPAの毒性メカニズム



VPAはミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化の阻害および呼吸鎖不全を引き起こす。脂質代謝およびストレス応答遺伝子を含む酸化還元酵素のGOカテゴリに有意な変化が見られたことは上記のメカニズムと合致する。

VPAにはPPARαアゴニスト活性があり、脂質代謝応答遺伝子の一部は種共通

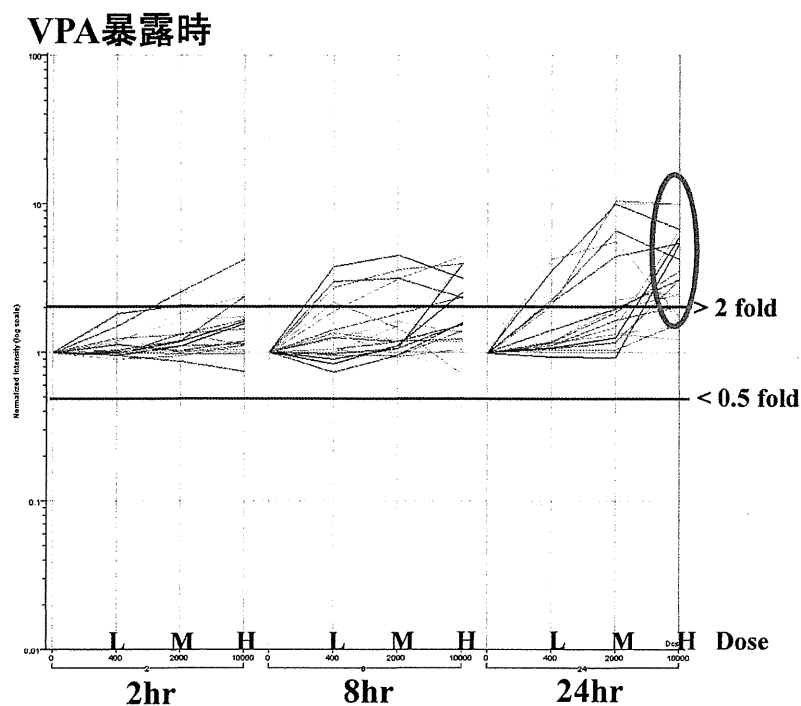
VPA暴露時変動遺伝子の脂質関連GOカテゴリのP-value

GO terms		Rat vivo	Rat vitro	Human
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.0115	0.00180	0.000659
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.0115	0.00172	1.29E-07
GO:0006629	lipid metabolism	0.0244	0.0186	1.29E-07
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	0.0512	0.0158	0.342
GO:0019395	fatty acid oxidation	0.0677	0.135	0.174

(P-value by Fisher's exact test)

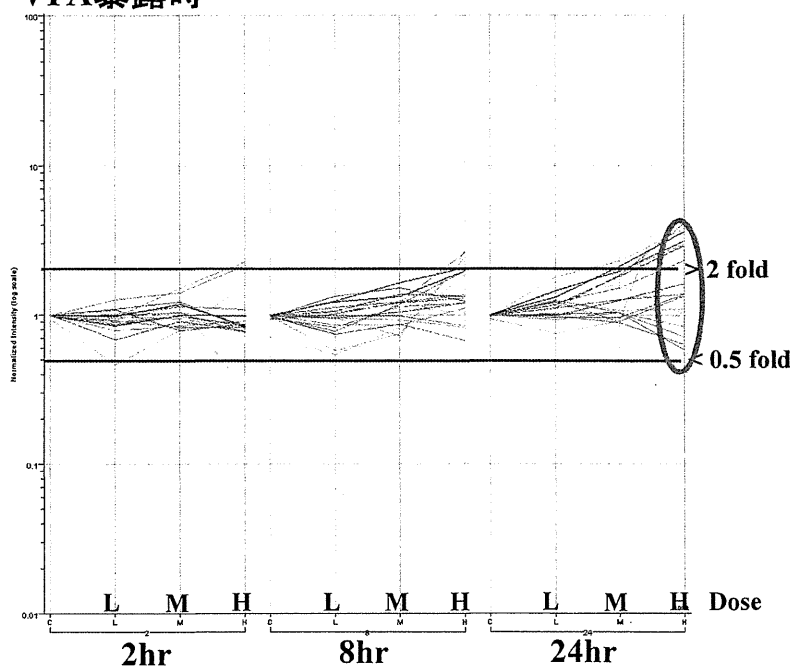
機能力ゴリレベルでの比較では各実験系の間で比較的良い対応関係が見られる。

Rat における脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動



Human におけるオルソログ変換遺伝子の変動

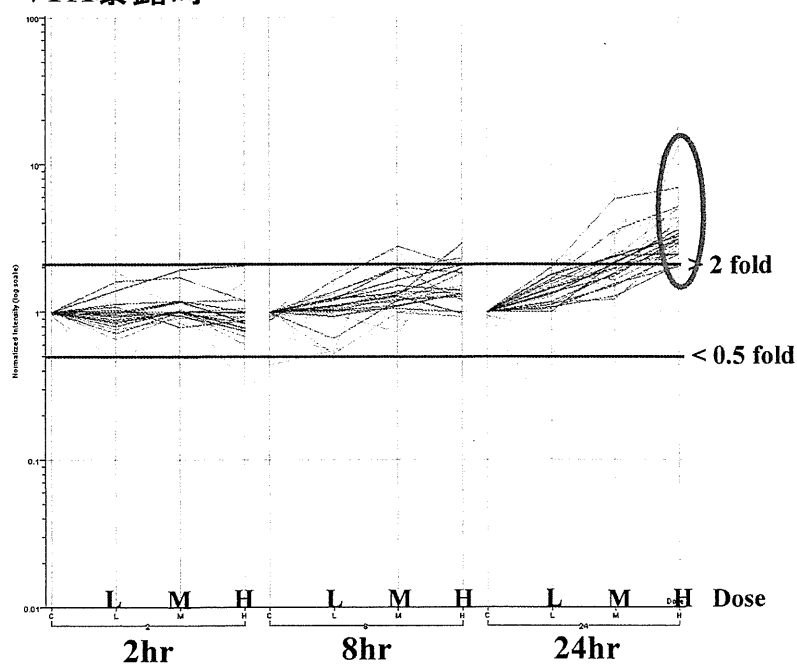
VPA 暴露時



あるカテゴリに着目してオルソログ変換を行った場合でも変動の傾向は一致していない。

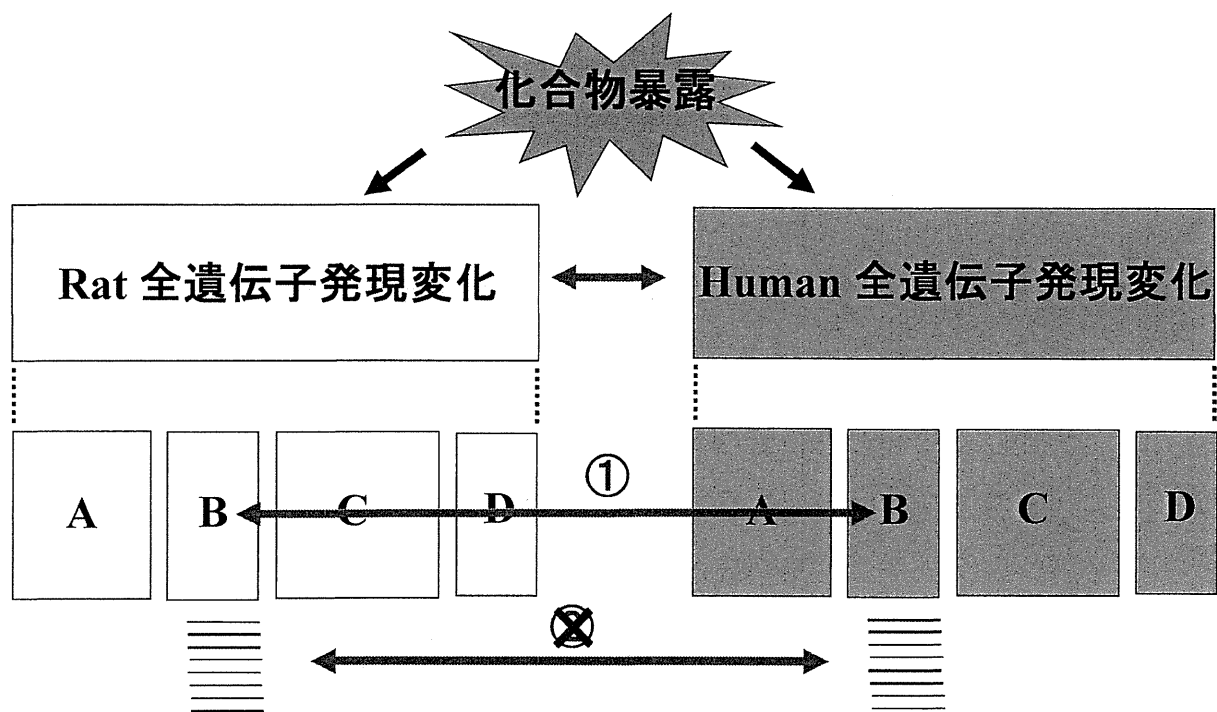
Human における脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動

VPA 暴露時



同一カテゴリ内でHuman独自に変動遺伝子を抽出した場合

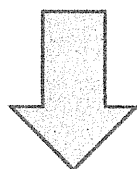
In vitro Rat \leftrightarrow Human 遺伝子発現変化の比較



メカニズム解析による種差のブリッジングならば可能か？

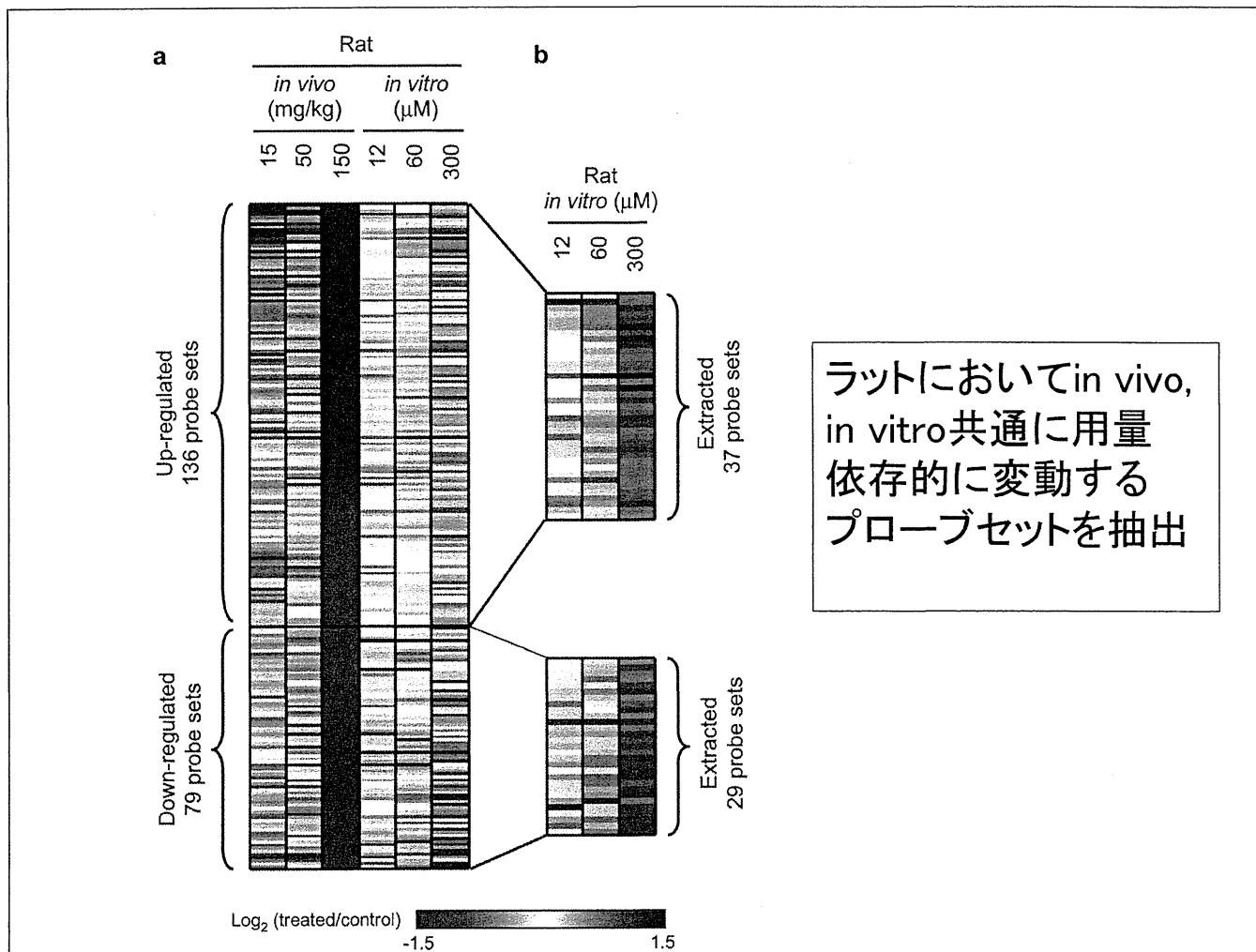
例2: クマリン

クマリンはヒトよりラットに対して肝毒性が高いことが知られている



種差を反映した肝障害マーカーを抽出

Uehara et al., Hum. Exp. Toxicol. 27:23- 2008



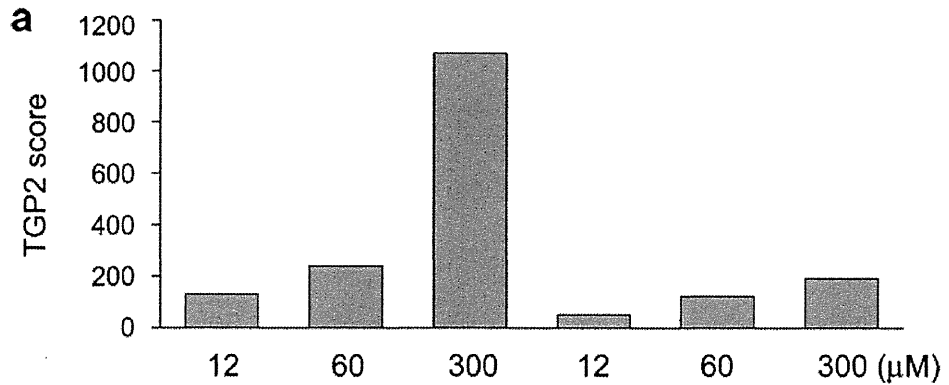
ラット⇄ヒト オルソログ変換

Rat		Human		Affymetrix probe ID		Gene description (RAE230 2.0)	Gene symbol
12	60	300	12	60	300 (μM)		
				RAE230 2.0	HG-U133 2.0	flavin containing monooxygenase 1	Fmo1
				1387053_at	205666_at	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	Cyp1a2
				1387243_at	207608_x_at	carbonic anhydrase 3	Ca3
				1367896_at	204865_at	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	Hao2
				1387139_at	231156_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12
				1388583_at	203666_at	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit	Igfals
				1387816_at	215712_s_at	thyroid hormone responsive protein	Thrsp
				1387852_at	229477_at	betaine-homocysteine methyltransferase	Bhmt
				1387665_at	206119_at	mannose-binding lectin 2, protein C	Mbl2
				1387528_at	207256_at	phosphodiesterase 4B	Pde4b
				1369044_a_at	211302_s_at	fatty acid desaturase 1	Fads1
				1367857_at	208962_s_at	protein kinase inhibitor p58	Dnajc3
				1370073_at	208499_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	Dnajb11
				1389308_at	223054_at	Na/Pi cotransporter 4	Slc17a3
				1390591_at	207298_at	hypoxia up-regulated 1	Hyou1
				1370665_at	200825_s_at	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)	Akr7a3
				1368121_at	206469_x_at	crystallin, lamda 1	Cryl1
				1376051_at	220753_s_at	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Gclc
				1370688_at	202922_at	ischemia/reperfusion inducible protein	Yrdc
				1389578_at	218647_s_at	glutathione reductase	Gsr
				1369061_at	225609_at	phospholipase A2, group X1IA (predicted)	Pla2g12a
				1373810_at	223373_s_at	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Nqo1
				1387599_a_at	201468_s_at	aldo-keto reductase family 1, member B8	Akr1b8
				1370902_at	206561_s_at	DNA-damage-inducible transcript 4-like	Ddit4l
				1368013_at	228057_at	heat shock 70kD protein 1A/1B	Hspa1a/1b
				1368247_at	200800_s_at		

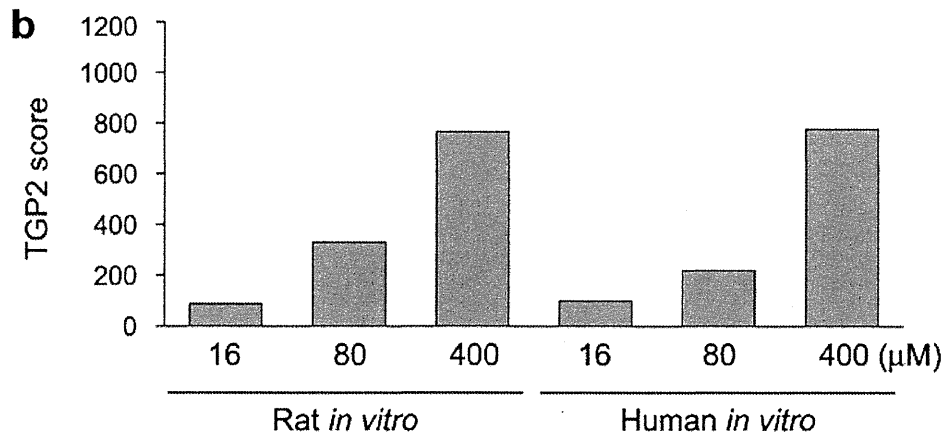
Log₂ (treated/control) -1.5 1.5

TGP2スコアを用いてスコア化

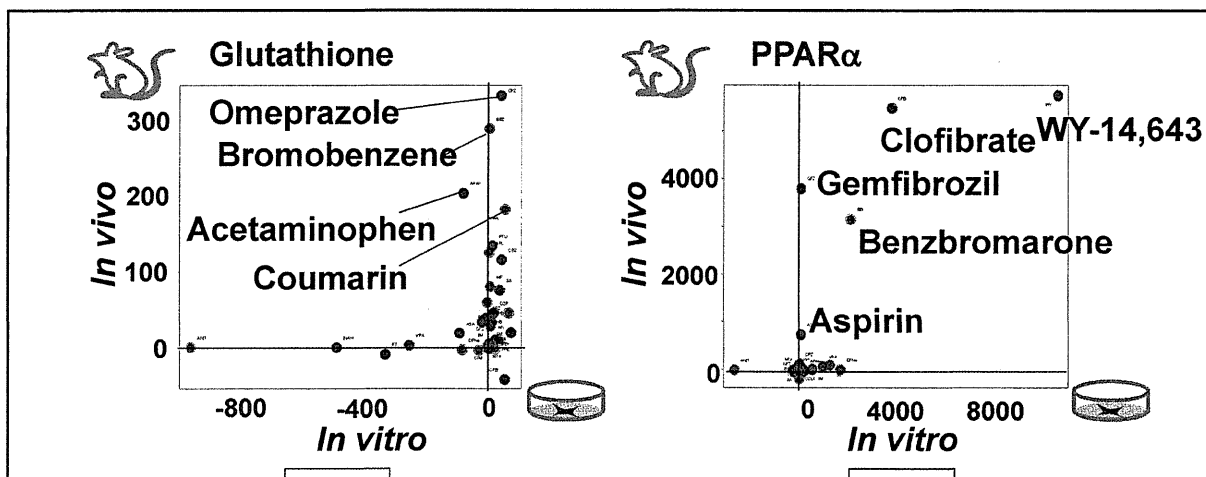
Coumarin



Diclofenac



マーカー遺伝子のin vivo – in vitro相関性



グルタチオン欠乏評価マーカー:
*in vivo*と*in vitro*の相関低

PPAR α 制御下遺伝子セット:
*in vivo*と*in vitro*の相関高

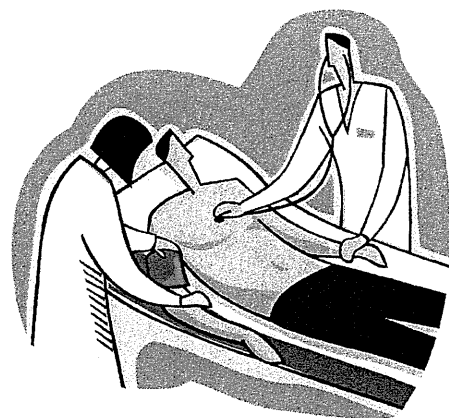
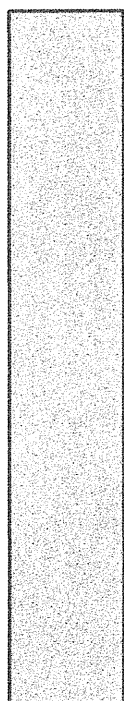
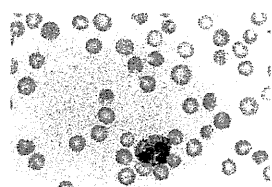
Kiyosawa et al., J. Toxicol. Sci. 31: 433-, 2006.

バイオマーカーレベルⅢの例

- 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

反復投与と単回投与間では、遺伝子カテゴリーは共通だが
遺伝子は全く一致していない
一次培養細胞では遺伝子カテゴリーでさえ全く異なる

種差の壁



レベルⅢ 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 α 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 α 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予測する判別マーカー
- 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髄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

レベルⅢ 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 α 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）

- 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

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. 他のオミクス技術の併用・・・有望か？
8. 臨床研究・・・TGP内では困難→公募研究との連携

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

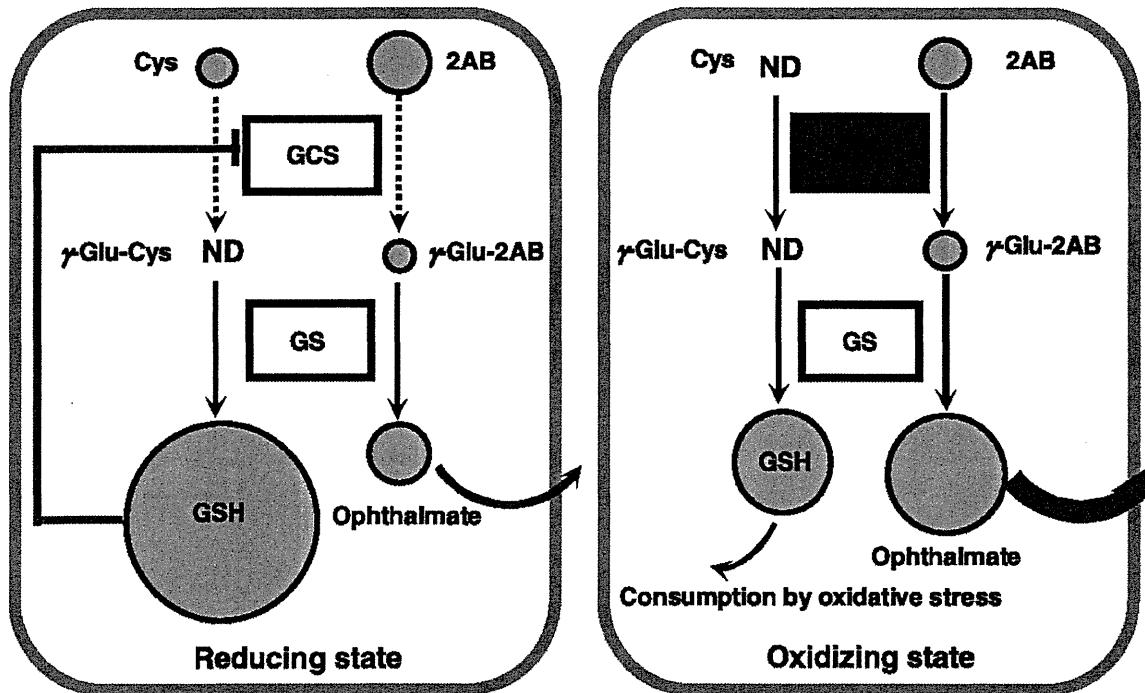
○南 圭一¹, 五十嵐 芳暢², 神吉 将之³, 太田 聖子², 堀之内 彰⁴, 小野 敦⁵, 山田 弘², 漆谷 徹郎^{2,6}, 大野 泰雄^{2,7}

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コゲノミクス・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.



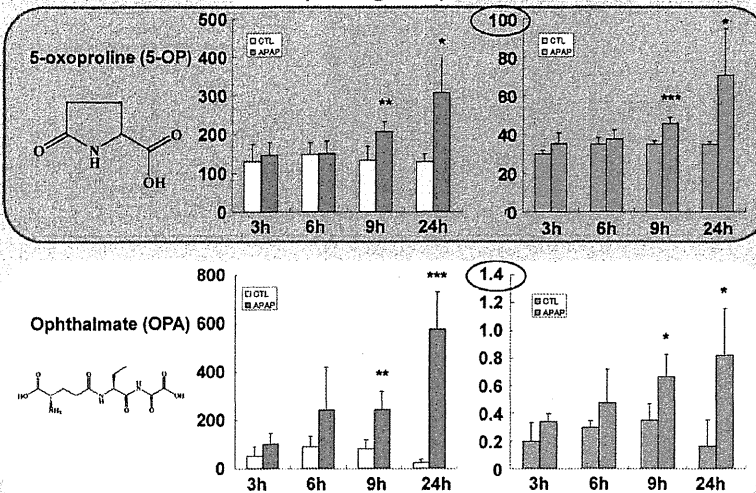
Soga T et al. J. Biol. Chem. 2006;281:16768-16776

©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)

Liver (nmol/g liver) Plasma (μ M)



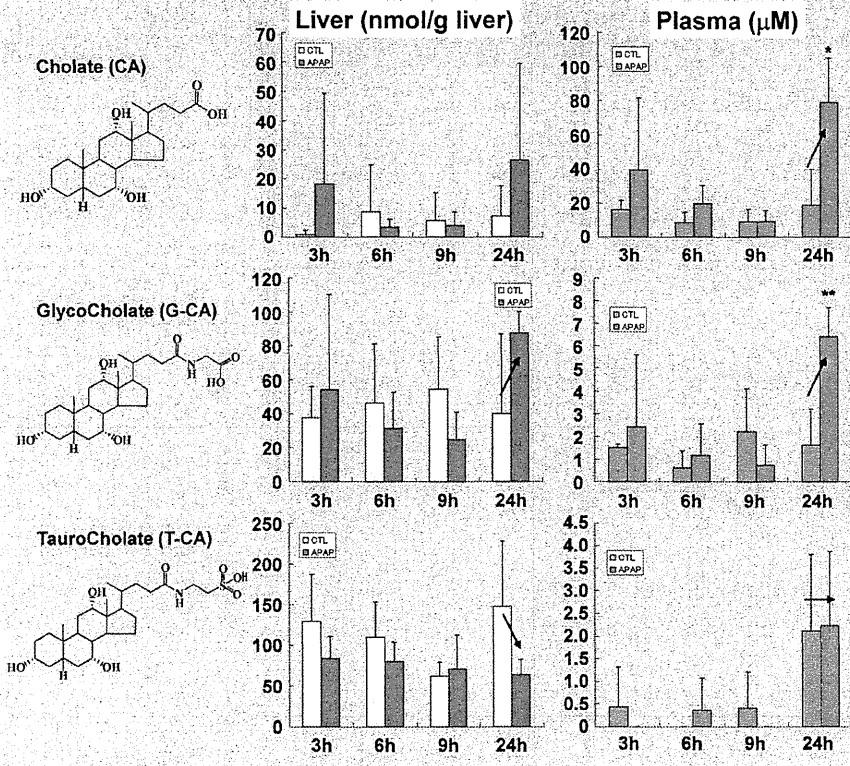
5-OPの方が血漿中での濃度が高い。(約70x)
5-OPの方がBaselineが安定しており、変化をとらえやすい。

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。

ゲノクスデータとの統合 (APAP投与後24h)

