

201107001B

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19年度～23年度 総合研究報告書

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19年度～23年度 総合研究報告書

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

平成19年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 漆谷 徹郎

平成24(2012)年 4月

目 次

| | | |
|---|-------|-----|
| I. 総合研究報告 | | |
| 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 | | |
| （資料）プロジェクト成果概略説明 | | |
| （資料）プロジェクトで得られたバイオマーカー概略説明 | | |
| （資料）バイオマーカー検証例（分担研究） | | |
| 創薬基盤としての分子毒性学研究（分担研究） | ----- | 174 |
| 菅野純 | | |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 199 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 208 |

別添 3

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

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、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った。この 5 年間に於いて、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、創薬研究の初期段階に有効利用可能なバイオマーカー 36 種以上を得、うち 2 種は臨床適用可能なものであった。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、mRNA、メタボロームによるバイオマーカーを開発した。また種差のブリッジングに関しては、国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基盤形成をおこなった。データ公開に関しては、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を刊行した。

研究分担者

大野 泰雄 国立医薬品食品衛生研究所・所長
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（平成 20 年度より）
三森 国敏 東京農工大学・教授（平成 21・22 年度のみ）

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った。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つの柱を置いた。

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た。この種差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。本研究計画立案当時、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た。[\(http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/\)](http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/)。したがって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であつ

た。

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た。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意図もあった。

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あった。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。すなわち、本プ

プロジェクトの3年目以降にデータベース公開が可能となり、その方策も策定する必要があった。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ーリングなどの場合、担当者が該当部分を個々に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、3年目および4年目（平成21～22年度）に限り、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った。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された。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した。また、医薬品審査への適用を視野に入れ、厚生労働省・総合機構との連絡を保った。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った。

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、数値目標として30個を置く、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、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。

平成19年度

初年度はまず、組織の構成を行った。基本的にはTGPの組織を継承したが、細かい変更を行った。今回のプロジェクトがTGPと最も異なる点は、研究員の問題である。TGPでは、実際の研究に携わる研究員は、プロジェクト参加企業から順番に派遣され、4～6名が常駐していたが、今回はそれがない。したがって、参加企業の意味を研究内容に反映させ、かつ研究を効果的に進めるために、以下のような組織を編成した。

まず、最高議決機関として「運営委員会」を設け、その下に基盤研を中心とした「トキシコゲノミクス・インフォマティクス研究部門」を設けた。さらに、企業との共同研究を効果的に推進するために「研究連絡委員会」と「ゲノミクス」「インフォマティクス」「バリデーション」「TG-GATEs」の各ワーキンググループを設け、それぞれの問題に関して討議した。また、研究とは

別に、企画・契約ワーキンググループと、知的財産・総務部門を設けた。さらに、企業からの研究員が基盤研に派遣されないという部分を補うため、参加企業有志および国衛研のメンバーによる「研究支援部門」を設け、実際の研究の進め方およびデータ解析の支援を得る体制を整えた。

バイオマーカー探索の戦略

FDAによるCritical Path Initiativeの発表以来、医薬品開発の領域においてバイオマーカーの重要性の認識が特に高まった。しかしながら、バイオマーカーの定義に関しては、注目する領域によってさまざまであり、混乱が生じていた。そこでまず、研究を開始するにあたって本プロジェクトで探索すべきバイオマーカーの定義を明確化し、この5年間のプロジェクトでどのようなバイオマーカーをどれだけ得るのかという目標を設定した。研究支援部門、およびゲノミクス・インフォマティクスワーキンググループで議論した結果、以下のような結論を得た。

まず、バイオマーカーを以下の4つのグレードに分類した。

レベルⅣ：TG-GATEsの内部データの範囲内において、ラットの毒性に関する診断・予測に有効であることが実証された遺伝子リスト。

レベルⅢ：プロジェクト内部以外のプラットフォームでラットの診断・予測に有効であることが実証された遺伝子リスト。

レベルⅡ：臨床での毒性に関する診

断・予測に有効であることが示唆された複数の遺伝子リストとそれに付随したアルゴリズム。

レベルⅠ：臨床での毒性に関する診断・予測に有効であることが示唆された単一ないしごく少数の遺伝子

臨床研究を含まない現在のプロジェクトでは、レベルⅠのバイオマーカーを得ることは原則不可能である。そこで、プロジェクトではレベルⅢのバイオマーカーを多く得ることを目指し、これにより非臨床試験の大幅な効率化を図ることとし、これをレベルⅡにあげる戦略については別項目とした。レベルⅢのバイオマーカーとしては、5年間で30種を目標とした。このうち1～2種をレベルⅡにあげることができれば、大成功であると考えた。

種差のブリッジング

非臨床試験の結果を臨床に適用するには大きな種差の壁がある。特に、本プロジェクトでは摘出組織の遺伝子発現データをもとに安全性評価を行っているため、その結果を臨床に持つていくには困難が多い。これを克服するには、次に示す多くの可能性が考えられた。①ヒト由来の株化細胞を用いたin vitro試験を利用する②ヒト由来の一次培養細胞を用いたin vitro試験を利用する③ヒト由来のES細胞あるいはiPS細胞を用いたin vitro試験を利用する④ヒト型組織や遺伝子を持った動物を用いたin vivo試験を利用する⑤動物試験の毒性発現機序を解析し、ヒトとの共通性を見出す⑥臨床で採取可能な

サンプルでの測定を行う⑦患者からバイオプシーによって直接サンプルを得る。

以上のうち、7は問題外であるが、残りの6つも、それぞれ多くの問題が指摘された。1、2の*in vitro*試験は、もっともありふれた戦略であるが、株化細胞は元の組織の性質をほとんど保持しておらず、応用性は低い。TGPでは、ヒト凍結肝細胞の暴露実験を行い、ラット一次培養細胞の暴露実験をラットの*in vivo*実験とのブリッジングに利用するという戦略を採用した。しかしながら、データ解析を進めてみると、ヒトとラットの種差も大きい、*in vivo*と*in vitro*の差もそれに匹敵するほど大きいものであることが明らかとなってきた。すなわち、たとえ*in vitro*で種差のブリッジングができたとしても、それを*in vivo*に翻訳することが困難なのである。3は、将来はともかく現在の技術レベルでは臨床とのギャップが大きく、実用には耐えない。4については、少なくとも毒性のある一面を評価するには有用な方法と考えられる。そこで、プロジェクトの一員である国衛研毒性部菅野部長を班員とし、ヒト型遺伝子ノックインマウスを開発してこれを安全性研究に応用しようと企図した（後述）。

現在、最も可能性の高いのが5と6であろう。5は毒性学の進歩に寄与するとともに、最も着実な方法であるが、非常に時間がかかり、また臨床における検証が困難である。一方、6が可能となればこれは有力な武器になる。現在、

遺伝子発現が測定可能な侵襲性の低い臨床サンプルとしては、血液中のリンパ球が唯一のものといってよい（皮膚や口腔内粘膜の細胞は、肝臓や腎臓の毒性学的変化を反映するとは期待できない）。そこで、もしリンパ球の遺伝子発現変化が投与された医薬品の薬理作用・毒作用を反映するとすれば、これをラットの*in vivo*のデータと比較することによって、ブリッジングが可能となることが期待された。

プロジェクトの計画段階では、血液サンプルでの遺伝子解析は、その実用性が未知であるため慎重に行うこととし、多くの化合物の実験を行う前に、予測性がどの程度かを種々検討する予定であった。ところが、米国でかなり先行した研究が行われていることが判明したため、早期に本格的な検討に着手することとした。

バリデーション試験

本プロジェクトで確立を目指しているバイオマーカーは、その性格から遺伝子発現データである。いくらTG-GATEs内のデータの組み合わせで毒性の診断・予測アルゴリズムを得たとしても、遺伝子発現データが他の施設で再現できなかつたら、創薬に役立てることはできない。従って、少なくとも参加企業内ではデータの互換性・再現性があることが担保されていなければならない。また、将来的に遺伝子発現データを申請データなど、レギュラトリーサイエンスへの応用を考えた場合、ことなる施設、プラットフォーム、プロト

コールなどがデータに与える影響を検討することは必須である。米国におけるMAQCなどの活動によって最近では考え方も改まってきたが、マイクロアレイデータそのものに信頼性や再現性が乏しいという意見も根強くあり、バリデーション試験は必須と考えられる。

今回は、施設間変動と施設内変動の両者を評価するために、次のようなプロトコルを採用した。

サンプル：CROにおいて、溶媒（メチルセルロース）、アセトアミノフェン

300mg/kg (sub-tox dose), または 1000mg/kg (tox dose) をSDラット (N=5) に経口投与し、24時間後に肝臓を摘出してRNA-Laterで処理した。これを基盤研においてホモジナイズし、そのホモジネートをバリデーション試験に参画した10社に送付した。各社においては、それぞれのSOPに従ってRNA抽出とGeneChip解析を行った。測定は、各群5例のうち、1番の動物に関しては同一サンプルをtriplicateで測定し、施設内誤差を見積もった。GeneChipデータはAffymetrix Microarray Suite 5.0で解析し、normalizationはGlobal meanを採用した。また、基盤研で行った測定のうち1セットはPercellome法で行い、外因性に与えた多段階希釈標準RNAが測定に与える影響について検討した。

インフォマティクス研究

膨大なデータに関する標準化手法比較などの基礎的な計算を行うため、新たに計算サーバーを導入し、全データを扱える環境を整えた。これを用いて、

次のような一斉計算をともなうテーマを設定した。

- ・TG-GATEsに登録された24000枚以上のGeneChipの全データに対する標準化手法の比較検討
- ・TG-GATEsに登録された血液学・血液化学の全データに対する標準化の検討
- ・腎毒性誘発化合物の早期毒性予測と毒性マーカーの抽出
- ・PPAR α アゴニストに特徴的な毒性予測のモデル化の検討

平成20年度

ラット末梢血における遺伝子発現解析プロトコルの検討を続けた。採血後リンパ球を密度勾配遠心で純化する操作を加えると、遺伝子発現に影響することが考えられ、全血をそのまま使用するか、特殊なフィルター上にリンパ球をトラップして直後に固定し、RNA抽出を行うかの二者択一であった。前者には、大量に存在する赤血球由来のグロビンRNAを除く操作が必要になり、これによる発現解析への影響が懸念されたが、初年度の検討で、これは十分に克服できること、更に後者の方法は、将来臨床の場に応用することを考えると、煩雑で採血室レベルでは対応が困難なことから、基本的には全血を用いた方法で行うこととした。本年度は、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、すなわち、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することとした。

遺伝子発現実験の施設間バリデーションを目的とし、標準サンプルを参加企業10社に配布した。前年度、GeneChipを用いたバリデーションを行い良好な結果を得たのを受けて、当該年度はAgilentのChipを用い、他のプラットフォームでも施設間で安定した解析が可能かどうか検討した。

バイオマーカー創出に関しては、前年度に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た。これにはプロジェクトメンバーの全企業が参加し、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。

平成21年度

バイオマーカー創出に関しては、作業の効率化を企図して、前年度に組織したバイオマーカーワーキンググループを次の4つに再編成した。

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。とくに本年度は、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することを主目的とする。

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。本年度は特に、メタボロミクス(慶応大学・曾我教授の研究室に委託)、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)などの方法が、肝毒性マーカー創出に有用かどうかを検討した。

以上の4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た。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、基本的には全血を用いた方法で行うこととし、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、ブロモベンゼン)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。

遺伝子発現実験の施設間バリデーションを継続した。初年度、GeneChipを用いたバリデーションを行い良好な結果を得たが、次年度はAgilentのChipを用い、他のプラットフォームでも施設間で安定した解析が可能かどうか検討し、当該年度はそのデータを解析し、これをどのように実用的な情報に落とし込むかの検討に入った。

平成22年度

基本的には前年度までの研究体制を継続したが、バイオマーカーワーキングのサブグループとしてA~Dチームに加えてグループEを追加した。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。それ以外は前年度と同様のチーム編成・戦略を継続した。

平成23年度

基本的には前年度までの戦略を継承した。ただし、チームB（メカニズムに基づく遺伝子リストの取得）に対して主体的に動き、レベルⅢのマーカー創成に尽力するよう要請した。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促した。また、その他の戦略を担当するチームDの活動も強化した。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。

これらワーキング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、発がんとの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、病理学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。

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

のみを起す条件の6試験を行った。

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、投稿する。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める。

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。

平成20年度

19年度にグルタチオン枯渇を評価する機序・時間依存性マーカーをレベルIVとした。この有用性を検証するため、この遺伝子セットが培養肝細胞の系でも利用可能かどうかを検討した。また、その検証のために、実際にグルタチオン量を測定した。

もう1つの課題として、血液ゲノミクスの支援を行った。プロジェクト本体ではラット全血を用いたトランスクリ

プトミクスを行っているが、その検証にはいずれ白血球における遺伝子発現に対する各薬物の直接作用を検討する必要があることが予想される。その準備として、ラットの白血球を分離・精製して短期間培養し、その遺伝子発現変化を測定する系を立ち上げた。

平成21年度

当該年度は、(1)ラット肝細胞in vitroモデルを用いたGSH枯渇マーカー候補遺伝子の検証のため、肝細胞初代培養を用いた遺伝子発現解析とGSH量測定の継続 (2)血球系in vitroモデルとしてのラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築の継続 (3)ラット肝細胞初代培養系におけるリン脂質症検出系の構築、の3点が行われた。この3番目のテーマを主に行い、フェノタイプの乏しいin vitroの系でのフェノタイプアンカーリング、およびin vivo とin vitroをブリッジングに挑戦した。

平成22年度

当該年度は、前年度までに抽出されたレベルIVマーカーをレベルIIIにアップさせることに傾注した。前年度までに得られていたマーカーのうち、(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、(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うこととした。

平成23年度

最終年度であるため、前年度までに抽出されたレベルIVマーカーのレベルIIIへのアップのみに傾注した。対象としたのは以下のレベルIVマーカーである：(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 α 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。本研究では、柱の一つである種差の克服に資するべく、ヒト型受容体導入マウスを用いた毒性研究の可能性を探るものである。

平成19年度

薬物代謝において、齧歯類ではPXR、ヒトではSXRと呼ばれる核内受容体が外来異物センサーとして存在し、CYP3A等の発現誘導を制御する。CYP3Aは医薬品の代謝においてもっとも重要性が高いが、PXRとSXRはリガンド結合領域（LBD）の種差が大きく、齧歯類を用いた試験でのヒトへの外挿を阻んでいる。マウスPXRのLBDをヒトSXRのものに変えればヒト型の活性化パターンを示すマウスが作製されることは容易に期待することができ、すでに、いくつかモデルマウスが作られているが、毒性評価に利用する為には問題があった。そこで、LBDの部分のみをヒト型化し、DBDを含むそれ以外の部分はマウス型のままとするノックインマウスを作製することとした。具体的には、LBDのみをヒト型化したキメラタンパク質（mhSXR）をコードするcDNAをマウスPXR遺伝子座のExon3にknock-inした。

平成20年度

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（hSXRki mouse）の作成が有望である。本マウスでは、マウスゲノム内に多数存在するcis-elementへの結合パターンに変化が生じないことに加え、転写開始点上流の配列が維持されることによりマウスPXR本来の発現組織分布がhSXRkiにおいても保たれることが見込まれる。これにより、hSXRkiの発現及び上流、下流の制御は野生型と同等で、リガンド特異性のみがヒト型化したマウスモデルが得られることが期待された。

平成21年度

前年度までに得られたknock-inマウスを用いた毒性評価系として、肝マイクロソフェア培養法を採用した。コラゲナーゼ灌流法によって肝細胞を回収し、マイクロソフェアアレイ（ステムバイオメソッド社）中で培養し、肝スフェロイドを形成させた。また、付着培養の場合は、コラーゲンをコートした24well容器に肝細胞を播いた。

全体の解析手法はBMC genomics 2006, 7, 64の方法に従った、percellome法により絶対値を求めるPCRにより遺伝子発現を定量した。

平成22年度

前年度までに作成したノックインマウス（hSXRkimouse）を用い、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。

平成23年度

前年度までと同様にノックインマウス (hSXRkimouse) を用い、トランスクリプトーム解析を行った。それに加え、In situ hybridization解析も行い、臓器内での発現細胞種の同定も行った。また、一部リガンドの実験は、本マウスを米国カリフォルニア大学アーバイン校のBruce Blumbergに供与し、先方で実施した。

分担研究（三森）

プロジェクトの運営委員会において、平成22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、これを三森が担当した。限定的なテーマであるため、研究班への参加は平成21・22の2年とした。

平成21年度

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。また、研究成果報告書に記載された所見について、同じ病変について同一用語を用いて診断しているかについても調査した。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。

平成22年度

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)

平成19年度

バイオマーカー探索

初年度は、レベルⅣのバイオマーカー、すなわちプロジェクト内部でのバイオマーカー候補遺伝子リストとして、次の4種類を提出した。

(1) グルタチオン枯渇マーカー：グルタチオン枯渇剤phoroneを投与したラット肝臓において、経時的にグルタチオン量と遺伝子発現変化を同時測定し、グルタチオンの低下に相関して上昇する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、グルタチオン枯渇リスクを持つと思われる薬物群が第Ⅰ主成分方向に分離された。

(2) 脂質低下マーカー：各種薬物のうち、連続投与において血清中の脂質が低下していた薬物に共通して肝臓で変動する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、PPAR α に関連すると思われる化合物群と、CARに関連すると思われる化合物群に分離できた。すなわち、脂質低下という同じフェノタイプを示す化合物でも、その作用機序を区別することができた。

(3) フォスホオリピドーシスマーカー：データベース中に存在する化合物のうち、連投によりフォスホオリピドーシスを発生させた化合物に共通する遺伝子を抽出した。これらの遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、その第

一主成分値は、フォスホオリピドーシスとよく相関した。特に、病理組織上紛らわしい所見を出す化合物も主成分分析により区別でき、また、連続投与でフォスホオリピドーシスを発生させる化合物も、用量を増加させればまだ病変の出ない単回投与24時間後の遺伝子変化を主成分分析することにより病変発生を予測できた。

(4) PPAR α アゴニスト判別マーカー：代表的な3種類のPPAR α アゴニストに共通して肝臓で変動する遺伝子群を抽出した。この遺伝子群を用いて主成分分析を行うと、代表的なPPAR α 以外にも数種の化合物が分離されたが、これらは文献的にPPAR α アゴニスト作用が報告されたものであった。すなわち、このマーカー遺伝子群は、未知の化合物のPPAR α 活性を検出できる可能性がある。また、これら遺伝子群を用いると、ラット一次培養肝細胞においてもPPAR α 活性を検出することができた。すなわち、培養細胞系を用いた種差のブリッジングができる可能性を示した。

以上4種類のマーカー候補に関しては、改良以前の状態で論文として報告した。

種差のブリッジング

種差のブリッジングの一つの方策として、リンパ球における遺伝子発現解析の可能性を探ることとし、まず、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た。ラット末梢血のマイクロアレイ解析法として3つの方法（密度勾配遠心により分離し、得

られたリンパ球分画からmRNAを抽出するもの、特殊なフィルター上にリンパ球をトラップしてRNA抽出を行うもの、全血からそのままRNA抽出を行うもの）を検討した結果、全血を用いた方法が最も適していると結論された。

データベースコンテンツの充実

ラットのデータに基づく安全性評価の精度を向上させ、go/no goの納得性を与えるため、毒性学的メカニズムの裏づけが必須である。TG-GATE sのコンテンツは、医薬品が中心であるため、医薬品の開発のリファレンスとしては有用であるが、それぞれについての毒性メカニズムが明らかになっているものは多くない。従って、毒性学的メカニズム解析を行うためには、メカニズムの明らかな化合物の暴露実験を行い、これをリファレンスとして用いることが重要である。そこで、初年度はそのような化合物として、rosiglitazone (PPAR γ 受容体刺激)、rotenone (ミトコンドリア呼吸阻害)、dexamethazone (ステロイド受容体刺激)、lipopolysaccharide (感染・炎症のモデル) を行った。

また、TGPにおいては、150すべての化合物投与実験において肝臓だけでなく、腎臓のサンプルも保存しておいた。予算の関係上、TGPでは25化合物分のGeneChip解析しか行えず、腎毒性診断・予測モデルにはほとんど手をつけることができなかった。肝臓の解析結果から、30種以上の化合物パネルがそろった状態で急激に有用な情報が得ら

れるという感触が得られていた。そこで、本プロジェクトにおいて、前プロジェクトの貴重な遺産である腎臓サンプルについて点も解析を行うこととした。

初年度は、腎臓に病理変化の現れた以下の8化合物を選択し、順次GeneChip解析を行った: triamterene, enalapril, captopril, caffeine, acetaminophen, hexachlorobenzene, allopurinol, acetazolamide。

施設間バリデーション

遺伝子発現実験の施設間バリデーションを目的とし、標準サンプルを参加企業10社に配布し、データを集積した。プロジェクトの参加企業内では GeneChip を用いた遺伝子発現実験の再現性は非常に高く、プロジェクトで抽出されたバイオマーカー遺伝子リストに関しては、少なくともプロジェクト参加企業内では再現性を持つものとして薬物開発において有用であろうことが期待された。

すべてのサンプルを対象にした遺伝子発現値の施設間の相関性は、全遺伝子を用いた場合、悪くても 0.91 以上であったが、Affymetrix の PMA call の presence に絞って相関性を評価した場合（すなわち、肝臓で発現が確認できたプローブセットに限った場合）、相関係数は悪くても 0.98 以上と非常に改良された。

次に、薬物効果・毒性の検出にどのような施設間変動が起こりうるかのシミュレーションを行った。まず全遺伝子を用いた階層クラスタリングでは、毒性量のアセトアミノフェン投与群は明瞭に区別できたが、低用量群の分離は悪く、適当

なフィルタリングによる遺伝子選別、すなわちマーカー遺伝子の抽出が必須であった。この問題を解決するために、各データを対照群に対する \log_2 (比率) に変換し、施設間相関をみたところ、施設間でほぼ完全に一致するデータが得られた。このことは、対照群に対する変化を正規化してやれば、遺伝子発現データは十分に施設間で互換性が取れることを意味する。すなわち、管理された状況下においては、優れたプローブセットに関して、厳密に施設間の再現性のあるデータが取得できることが証明された。また、再現性のあるバイオマーカーを得るためには、遺伝子抽出手法とともに、施設間再現性のあるプローブセットの選択も重要な点であることが判明した。

遺伝子発現データのバリデーションは将来の申請データとしての使用を視野にしている。この意味から、医薬品機構との関係は重要である。初期の方針決定の段階から連携が必須と考え、同機構のゲノクスグループと定期的にミーティングをもった。

インフォマティクス研究

GeneChip データを扱うとき、最も基本的な問題として、画像値を発現値に変換する方式の選択がある。TGP では基本的に MAS5 を採用してきたが、他の標準化方式との比較は行っておらず、以前からの課題であった。他の方式とは、RMA と GCRMA であるが、TG-GATE s のデータ規模であると、通常のマシンスペックでは取り扱えないほどのデータ量となる。そこで新たに計算サーバーを導入したが、入

札等の手続きに時間がかかり、次年度の課題とした。

また、バイオマーカー候補（レベルⅣ）をレベルⅢにアップさせる戦略についても検討した。レベルⅢとは、少なくともプロジェクト参加企業内で再現性がある診断・予測マーカーである。今回行ったバリデーション試験で、発現量の低いプローブセットや、発現量は高くても再現性の劣るプローブセットが認められることから、バイオマーカーリストからこれらを除く必要がある。また、一つの機能をもつリストに含まれるバイオマーカー遺伝子の数は、多いほうが結果に頑強性がもたらされるが、実用的には1桁、最大でも2桁にとどめることが望ましいと考えられた。

平成20年度

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、当該年度までに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、年度最初には次の4種類のレベルⅣマーカーが得られていた：グルタチオン枯渇マーカー、非遺伝子傷害性肝発がん物質判定マーカー、血中脂質低下マーカー、PPAR α アゴニスト、である。これらに加えて、本年度は新たに25種以上のテーマを設定して研究を行ったところ、次の19種のレベルⅣマーカーを得、累積数としては23種類となった。なお、これらの一部には、多施設での再現性が確認できたもの、すなわちレベルⅢとの判定

が可能なものも含まれていたが、当該年度は、バイオマーカーワーキンググループにおいてレベルⅢとしてオーソライズする作業を行っていないことから、成果としてレベルⅢマーカーを挙げることはしていない。本年度新たにテーマ設定をして得られたマーカーは以下の通りである。

(1) 肝グルタチオン枯渇予測マーカーⅠ

前年度抽出したマーカーは、遺伝子数も141と多く、毒性学的機序も不明確であった。今回のマーカーは、わずか二つのプローブセットを用いてグルタチオンと共有結合を形成することによって肝細胞でグルタチオン枯渇を起こす化合物を判定できるものである。

(2) 肝グルタチオン枯渇予測マーカーⅡ

このマーカーは14プローブセットからなり、肝細胞中のグルタチオン枯渇が生じるならば単回投与24時間以内のいずれの時点においても主成分分析で分離できるというものである。更に、このマーカーは、*in vivo*のみでなく*in vitro*でも有効である可能性が示唆された。なお、以上2つのマーカー開発・検証は研究分担者である水川によって行われた（後述）。

(3) 胆汁鬱滞マーカーⅠ

このマーカーは、39プローブセットからなり、反復投与によるデータを用いると、線形判別分析によって予測精度94%で薬剤誘起性胆汁鬱滞を検出できるというものである。

(4) 胆汁鬱滞マーカーⅡ

連続投与により血中ビリルビン値が上昇した化合物に共通する遺伝子を抽出す