

ることにより、59プローブセットからなるマーカーを得た。これを用いたPCAをおこなうと、そのPC1によって、胆汁鬱滞リスクを定量的に評価することができた。更に、高用量単回投与のデータを用いることにより、連続投与で発症する胆汁鬱滞を、24時間以内で予測できる可能性を示した。

(5) くもり硝子変性マーカー

肝臓にくもり硝子変性を共通に認める化合物で、変動している遺伝子を統計フィルターによって選別した。病理学へのアンカーリングをチューニングすることにより、24プローブセットを得た。この遺伝子セットを用い、線形判別分析法によりマーカー遺伝子セットをバリデートした。これと、80プローブセットからなる陰性化合物判別マーカーを組み合わせることによって、肝重量増加が生じたときのメカニズムをくもりガラス変性（酵素誘導型）と判定することが可能となる。

(6) 好酸性顆粒状変性マーカー

肝臓に好酸性顆粒状変性を共通に認める化合物で、変動している遺伝子を統計フィルターによって選別した。この遺伝子セットを用い、線形判別分析法によりマーカー遺伝子セットをバリデートした。これと、80プローブセットからなる陰性化合物判別マーカーを組み合わせることによって、肝重量増加が生じたときのメカニズムを好酸性顆粒状変性（PPARアゴニスト型）と判定することが可能となる。以後、肝重量増加を呈しながら5、6のどちらにも属さない化合物の判定について検討する必要がある。

(7) 腎尿細管障害診断マーカー

薬剤誘起性腎障害のうち、腎尿細管障害を起こした化合物に共通して変動する遺伝子群をフィルター法により抽出し、線形判別分析器を構築した。検出力は90%であり、障害が発生するより低用量から陽性と判別でき、病理診断より感度の高いものであった。

(8) 腎尿細管障害予測マーカー

薬剤誘起性腎障害のうち、腎尿細管障害を起こした化合物において、早期から共通して変動する遺伝子群をフィルター法により抽出し、線形判別分析器を構築した。こうして選別した72個のマーカーによれば、腎尿細管障害が発生するはるか以前から陽性と判別でき、障害予測マーカーとして使用できる可能性が見出された。

(9) 肝臓での貧血診断マーカー

ラットでは成熟後も肝臓において髄外造血が見られるため、貧血が生じると、肝臓においても当然変化が生じる。薬剤性の貧血が生じ、網状赤血球数が上昇した化合物に関して、網状赤血球と関連して変動する肝臓の遺伝子を抽出し、マーカーとした。

(10) 血液での貧血診断マーカー

薬物による各種障害に伴って、貧血が見られることがある。これは網状赤血球の増加を伴い、血液を用いたトランスクリプトミクスにより判定できる可能性があった。後述の血液ゲノミクスのテーマにおいて得られたデータを用い、網状赤血球と関連のある遺伝子を抽出した。予測マーカーとしては困難が予想されるが、診断マーカーとしては使用可能であると判断された。

(1 1) リン脂質症マーカー I

これは 78 プロブセットからなり、現在臨床において適当なバイオマーカーが存在していない肝臓リン脂質症リスクをもつ化合物を、PCA の PC1 値によって分別するものである。このマーカーの特長は、空胞化を生じても、リン脂質症でないフェノタイプを区別できることがある。更に、通常リン脂質症は長期に連続投与して初めて発現する病変であるが、化合物によっては、単回高用量投与を受けたラット肝臓の 24 時間後の発現データを用いても判定できるという利点がある。

(1 2) リン脂質症マーカー II

これは、25 プロブセットからなり、前者と異なって、遺伝的アルゴリズムによって抽出されたものである。これらは、単回投与のデータから 4 週間後の肝臓におけるリン脂質症誘発能を高精度で予測することができる。なお、このプロブセットには上記マーカーと共通なものはほとんど含まれず、異なる機序に基づくマーカーと考えられる。

(1 3) リン脂質症マーカー III

これは、上 2 者と異なり、SVM を用いて、リン脂質症誘発リスクを判別するモデルを構築しようとしたものである。結果として、この判別器によってリン脂質症の線形判別は可能であったが、未だノイズが残っており、改良の余地がある。

(1 4) 肝脂肪化マーカー I

肝細胞に脂肪蓄積が見られた 6 種の化合物を陽性対照として抽出したプロブセットであり、TG-GATE s に標準装備されている PAM をもちい、高い精度で脂肪蓄積を判別する判別器が得られた。また、

一部は脂肪蓄積より 2 週間前の時点でも陽性判定でき、予測マーカーとして使用できる可能性が見出された。

(1 5) 肝脂肪化マーカー II

肝脂肪化を指標として学習セットを設定し、線形判別分析法を適用した。5 fold cross validation による判別性能評価の結果、感度 97%、特異性 90%を得た。この判別器によりデータベース内全 150 化合物を検討すると、脂肪化について病理では不明瞭とされた化合物の一部が陽性と判定されたため、性能を評価する上で、これらの検証が必要である。

(1 6) 肝繊維化マーカー

データベース中、肝繊維化を生じた 6 種の化合物の発現データから、決定木手法を用いてマーカーを探索した。その結果、CC12, Lbp, Gstm4 の 3 つの遺伝子を用いることにより、良好な診断結果が得られた。また、一部の化合物については、繊維化発症以前に陽性判定され、予測マーカーとしても有望であった。

(1 7) 非遺伝毒性化合物の肝発ガンマーカー

Ames 試験陰性でありながら肝発癌性を示す化合物において有意に変動する遺伝子群を抽出し、これらを用いて判別分析 (SVM) を行った。これにより、10~30 程度のプロブセット、予測精度 74%程度の判別期が得られた。今後これを改良していく。

(1 8) 転写因子関連マーカー

本マーカーは、他のマーカーと異なる戦略で抽出した。すなわち、酸化ストレス応答で重要な役割を果たすと考えられている Nrf2 を中心に、文献情報を基にし

てその制御下にある遺伝子をリスト化した。こうして得た 93 プローブセットを用いてデータベース内の化合物群を解析したところ、酸化ストレスによる肝障害惹起物質を分類することができた。

(19) 肝細胞壊死

反復投与の肝臓遺伝子発現データを用いて、肝細胞壊死の判別モデル (LDA 法) を構築し、112 プローブセットを得た。テスト化合物における陽性判定率 60% を達成するためには、擬陽性が 10% 生じる。以後、最適な閾値を設定することによりこれを改良することとした。

血液ゲノミクス

チオアセタミド、メタピリレン、クマリン、プロモベンゼンをラットにそれぞれ単回および反復経口投与し、単回投与後 3、6、9、24 時間および 3、7、14、28 日間反復投与後に剖検を実施したところ、AST、ALT 値の増加および肝細胞の壊死が単回投与 6 時間後および 3 日間反復投与後から認められ、特に高用量群においてより明確な変化が認められた。全血を用いた遺伝子発現解析の結果、4 薬剤共通で変動を示す遺伝子が単回投与後で約 30 遺伝子、反復投与後で約 880 遺伝子が抽出され、これらの中には肝細胞壊死や炎症反応との関連が報告されている遺伝子が複数含まれていた。本検討により抽出された変動遺伝子セットは、肝細胞壊死を非侵襲的に検出あるいはモニターできる可能性があり、以降肝細胞壊死のマーカー遺伝子としての妥当性を確認することとした。

施設間バリデーション

前年度、アセトアミノフェンを投与されたラット肝臓標本を用いて、Affymetrix 社の GeneChip による遺伝子解析結果を参加企業間で比較検討した。参加企業はほぼ全社がこのシステムを導入しているが、トキシコゲノミクス技術をレギュラトリーサイエンスの基礎技術として定着させるためには、異なるプラットフォームの検討も必要である。今年度は、Agilent 社のマイクロアレイを用い、前年度と同じプールされたサンプルを測定にかけた。膨大なデータのため、当該年度は解析中であり、まとめは次年度までずれこんだ。

公募研究との連携

本指定研究は、「創薬バイオマーカー探索研究」に属する公募研究と連携をとって成果を上げることが当初計画に盛り込んでいる。公募研究の採択は本研究開始 2 年後の本年度から行われた。指定研究との連携を前提に採択された公募研究としては、自治医大・藤村教授、京都大学病院・増田講師および熊本大・水島教授による 3 件である。本年度の夏から秋にかけて、それぞれの研究代表者をバイオマーカーワーキングの会議に招聘し、データに基づいた意見交換を行い、また 2008 年 12 月には、合同の研究発表会を開催した (東京・渋谷、薬学会館)。これを機会として、藤村教授、増田講師、水島教授、参加企業運営委員、研究代表者らからなる研究推進委員会を組織し、これを 2009 年 4 月初旬に開催した。

その他

種差のブリッジングを克服する戦略として、血液ゲノミクスとヒト型遺伝子導入動物のみで完全であるとは思われない。特に、レベルⅡ（臨床に直接応用可能性のある）のバイオマーカーを考えたとき、他のテクノロジーの適用可能性を検討する必要がある。そこで、慶応大学の曽我教授に委託し、プロジェクトに保存してある、薬物を投与したラットから採取した血清サンプルのメタボロミクス解析を行った。当該年度中に解析は終了しなかったが、次年度に有用なマーカーが見いだされた。

当該年度は、前プロジェクトで導入したコンピューターシステムの耐用年限が経過したため、システムリプレースメントを行った。システムの効率化のため、サーバーを整理し、開発環境と使用環境を分離した。TG-GATE s のシステム上の不具合や、使い勝手にかかわる問題点などを、TG-GATE s ワーキンググループで検討し、仕様にまとめる作業に入った。

平成21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ためには、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、当該年度当初には23種類のレベルⅣマーカーが得られていたが、年度末までには累計36種のレベル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、レベル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、10個がレベルⅢマーカーとして認定された。

(1) 腎尿細管障害診断マーカー

統計選別した遺伝子により構築された線形判別器である。5-fold cross validationによる判別精度検証を実施した結果、偽陽性率が約10%のとき、検出力は90%となった。障害が発生するより低用量から陽性と判別でき、病理診断より感度の高いものであった。前年度レベル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、レベルⅢと認定された。

(2) 腎尿細管障害予測マーカー

統計選別した遺伝子により構築された線形判別器である。腎障害が発生する用量より低用量で、かつ障害発生より前の時点で判別可能な、予測マーカーとして利用可能である。また、KIM-1などの、報告されているマーカーと比較しても感度や特異度が優れていた。前年度レベル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、レベルⅢと認定された。

(3) 肝臓での造血抑制に起因した貧血診断マーカー

ラットに貧血が生じているときに、それが肝臓での髄外造血の障害であるのか否かを診断する遺伝子群である。これ単独での使用意義はそれほど高くないが、GeneChip解析をする場合は、すべての遺伝子が測定されるので、その中から毒性的に意味のあるマーカーリストは多いほどよいと考えられる。

(4) リン脂質症マーカー

これは、25プローブセットからなり、遺伝的アルゴリズムによって抽出されたものである。これらは、単回投与のデータから4週間後のリン脂質症誘発能を高精度で予測することができる。前年度レベルⅣとして認定されていたが、検証用化合物の追加実験によって再現性が証明され、レベルⅢが認定された。

(5) グルタチオン枯渇マーカー I

このマーカーは、わずか三つのプローブセットを用いることによって、グルタチオンと共有結合を形成し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。更に、単回投与でグルタチオン枯渇が生じる場合は、一旦低下したのちにリバウンドで増加する場合が多く、適当な測定時点を決定することが難しい。このマーカーの場合は、一旦グルタチオンが低下したエピソードがあれば、低下期間中ばかりでなく、リバウンドが生じている24時間後でも陽性判定可能である。これは前年度レベルⅣと認定されていたが、公共データベースのデータを用いて再現性が確認できたため、レベルⅢと認定された。

(6) グルタチオン枯渇マーカー II

このマーカーは14プローブセットから成り、いかなる機序によるものであってもグルタチオン枯渇をおこす化合物を陽性判定できる。時点も問わないというメリットをもつ。これも前年度レベルⅣと認定されていたが、公共データベースのデータを用いて再現性が確認できたため、レベルⅢと認定された。

(7) ERストレスマーカー

これは、それまでのフェノタイプアンカーリングとは異なる戦略で得られたものである。すなわち、ERストレスに関係があるとする文献情報のある遺伝子のリストを作成し、これを用いてデータベース内の化合物をスコア化したところ、ERストレスを惹起すると考えられる化合物群を弁別することができた。メカニズムと判別結果の両方に文献的裏付けがあることから、レベルⅢと認定された。

(8) 胆管増生マーカー

このマーカーは 95 遺伝子からなる判別器であり、8日連投以降では特異度97%以上の判別精度で胆管増生が判定できるものである。マーカーには細胞増殖関連にマップされるもの、また胆管のマーカーであるkeratin19が含まれており、毒性メカニズムの裏付けがとれている。また4種の化合物を用いた追加実験により正しい判定結果が得られたため、再現性有りとし、レベルⅢとして認定された。

残りの2つのマーカーは、メタボロミクス・血液ゲノミクス関連で見出されたレベルⅡまたはⅠのものであり、次項で述べる。

メタボロミクス・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(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ていた。しかしながら、全血における遺伝子発現変化は、網状赤血球の影響を受けることが分かっており、かつ、薬物によって網状赤血球の割合が変化することもわかっている。遺伝子発現変化が、肝障害に起因するものか、貧血の結果によるものなのかを区別することが難しい場合も出てくる。そこで、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方法の検討を行った。

(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。これを有効利用するため、臓器特異的蛋白質の測定系を立ち上げるグループを編成した。

(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、予備試験において、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、抗凝血剤を変更した暴露実験を行い、測定を開始した。

(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。

当初の目的は、曾我教授がマウスを用いて報告したアセトアミノフェン型グルタチオン枯渇マーカーであるオフトアルミン酸が、ラットでもマーカーたりうるか、という点の検証であった。

解析の結果、オフトアルミン酸は、ラットにおいても十分にグルタチオン枯渇マーカーとなりうる事が確認された。更にその解析の過程で、肝臓における遺伝子発現解析結果と、血漿メタボロームをつき合わせる事によって、新たな 2 つのバイオマーカー候補を見出した。これらはその性質上、レベル II あるいはレベル I のマーカーとして十分であると考えられた。現在、これらについては特許申請した。

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

依託した。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、レベルⅡの可能性のあるバイオマーカーを見出した。

バリデーション

前年度、TG-GATEs 内の遺伝子発現データ取得に用いた GeneChip を用いる限りにおいては、参加企業間で品質の保証されたデータが取得できることが示されていた。しかしながら、遺伝子発現解析をレギュラトリーサイエンス領域で活用するためには、異なるプラットフォームも利用可能でなければならない。前年度末に、同一サンプル（対照およびアセトアミノフェン投与群）を Agilent 社のチップを用い、2 箇所の異なる場所で測定・解析した。

Agilent 社チップと GeneChip 間にはプローブ設計に大きな差があるため、直接比較できる遺伝子は 6864 であった。従って、両者の比較はこの遺伝子に絞って行った。その結果、2 箇所間の Agilent チップ間の一致性は高かったが、当然のことながら、GeneChip との一致は低いものであった。しかしながら、データを「対照群に対する比」に変換すると、両者の相関は Agilent 社間と遜色ない程度まで改善した。

アセトアミノフェンにより変動が報告されている遺伝子群を両チップ間で個々に比較してみたところ、発現の絶対値には大きな差があったが、データを「対照群に対する比」に変換すると、類似した値になる場合が多く見られた。しかし中には、プローブ設計が悪いと考えられる

遺伝子、プローブが飽和していると考えられる遺伝子が散見され、実際の解析には注意が必要と考えられた。

この 2 つの異なるプラットフォームにおける遺伝子発現解析結果が生物学的に同等の解釈を与えるか否かを検討するため、まず、前年度行った GeneChip 14 サイト、Agilent 2 サイト、計 16 サイトでの変動遺伝子を IPA Canonical Pathway 解析し、結果を $-\log P$ 値に変換して順位変動グラフを作成した。すると、上位 21 位までにランクされた Pathway については、その 20 Pathway が全サイトで選択された。すなわち、薬剤応答性遺伝子に関しては、発現比を用いると異なるプラットフォーム間の比較も可能であると結論付けられた。

以上の解析は、それぞれのプラットフォームにおいて厳密なプロトコールの統一と実施が必須である。そのノウハウを創薬に携わる者が共有することは重要であると考え、前プロトコールを手順書として公刊することとし、バリデーションワーキンググループによって編集作業に入った。

平成 22 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、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、年度当初には 37 種類のレベルⅣマーカーが得られており、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。

追加実験や外部データを参照することにより、レベル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種がレベルⅢマーカーとして認定された。以下に、本年度新しくレベル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。前年度レベル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、レベル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。前年度レベル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、レベルⅢと認定された。

(3) リン脂質症マーカー

前年度までレベル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、レベル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子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、レベル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 p 53 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、レベル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、レベルⅢと認定された。

メタボロミクス・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、当該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た(ワーキンググループによる結果の評価は次年度)。

(2) 末梢血中 mRNA を指標とした臓器障害バイオマーカー

前年度開始したテーマであったが、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(A1b, 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遺伝子での評価を検討した（ワーキンググループによる結果の評価は次年度）。

（3）末梢血 miRNA を指標とした臓器障害バイオマーカー

前年度開始したテーマであったが、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、新たに抗凝固剤を変更した暴露実験を行った。ブロムベンゼン、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ったため、各組織の miRNA を網羅的に定量する実験を計画し、次年度に結果を解析することとした。

（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プタルミン酸が、ラットでも有用であることの確認と、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。

メタボロミクスが有用な技術であること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、レベル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。

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。ただし、これまで各方面と検討を重ねてきたが、我が国や欧米のトレンドとしては、トランスクリプトミクスデータそのものをレギュレーションに用いるという方針は薄れ、あくまでもバイオマーカーという形で使用するという使い方が主であるとの印象が強い。したがって、トランスクリプトームとしてのデータの質保証という点の意義は以前より薄れ、むしろ、しっかりした裏付けのあるバイオマーカーを提示すべき時代になったと思われた。したがって、本プロジェクトの3本の柱のうち、3本目（レギュラトリーサイエンスの基盤形成）は1本目（バイオマーカー創出）に包含されるべきものと考えられた。したがって、バリデーションワーキンググループにおいてバリデーション結果と、標準的プロトコールを英文論文としてまとめ、公開することで目的を達成するものとした。

データベース公開

当該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、最終年度に公刊することとした。

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-GATE s のクローンが保存されるが、公共データベースとして、TG-GATE s 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、当時構想中であつた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、医薬基盤研のホームページに掲載した (<http://toxico.nibio.go.jp>)

平成23年度

安全性バイオマーカーの開発

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つたため、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つて、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リ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 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 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（その他のカテゴリー）

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

メタボロミクス・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ー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。

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。

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-GATE s 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）

4年間を通してバイオマーカーの検証を行い、その内容は年度をまたがっているため、検証したバイオマーカーごとに記述する。

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

プロジェクト初期においてグルタチオン枯渇剤 Phorone 投与ラット肝臓のグルタチオン含量と逆相関する遺伝子を抽出し、PCA によりリスク化合物を分離できたためこれをレベルIVとした。以後、これをさらに改良した。改良点は GSH 枯渇剤として、DEM, BSO、BBZ を加えたこと、GSH 含量と相関して増加する遺伝子のみでなく、低下するものも抽出したこと、GSH 枯渇と遺伝子発現変化の時間的ずれを考慮したこと、評価は発現値をスコア化（TGP1 スコア）して定量化したことである。これにより、外部データ（GSE8858 データセット）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。内容的には、マーカーA（単回投与 24 時間以内であれば肝臓におけるグルタチオン枯渇時あるいは枯渇後での判定が可能。ただし、枯渇は共有結合型に限る。プローブセット数が 3 と少ないので、明瞭だが擬陽性が出やすい）とマーカーB（単回投与 24 時間以内であれば肝臓でのグルタチオン枯渇エピソードの有無枯渇メカ

ニズムによらず判定可能。薬物動態を考慮する必要なし）の 2 種類があり、当初マーカーB は in vitro にも適用できる可能性があったため別のマーカーとしていたが、検証の結果、それが困難であることが判明した。結果的に、この 2 種のマーカーの組み合わせで判定するというこ

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

プロジェクト初期において、典型的 PPAR α 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 α 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 α アゴニストか否か不明な化合物や、NSAID はすべて PPAR α アゴニストなのか、という問題が生じ、cell free の PPAR α 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。

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

PPAR α 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 α 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 α 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。本マーカーは種差の解明、真の臨床ターゲットの特定に有用であると考えられた。

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

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マーカーとされていたものである。これを精査し、最終的に 14 プロブセット (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。

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

前項のマーカーをラット 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ブセットが得られ、レベルⅢマーカーと認定した。

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

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マーカーとしていた。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、このマーカー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。

7. 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ー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ー、血中ビリルビン値上昇を診断するマーカーなどであるが、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。これらは論文として公開されているので、広く一般による検証を待ちたい。

分担研究（菅野）

（1）hSXR-KI mouse の作出

マウス LBD の代わりにヒト LBD を持つ hSXR mRNA を発現するノックインマウス作製用ターゲティングベクターを構築するために、マウス PXR の exon 3 にヒト SXR の cDNA を連結した。ターゲティングベクターには、ES 相同組み換え体選択用の Neomycin 耐性遺伝子を Cre enzyme による除去を可能とするために LoxP 配列で挟んだ形で共存させ、相同組み換え用 long arm として exon 3 に対し 5' 側の intron 2 の 7kbp を、short arm として 3' 側の exon8 から intron8 に対応する 1.3kb を用いた。

このベクターを C57BL/6 と CBA の F1 由来の ES 細胞クローンである TT2 に導入し、サザンブロッティングによって相同組み換えが確認された 2 クローン（#4, #25）をキメラマウス作製に用いた。得られたキメラマウスを ICR 系マウスと交配し、2 クローンとも生殖系列に移行することが確認された。

そこで、#4 クローンを Cre を CAG promoter 制御下に恒常的に発現するマウスと交配し、Neor を失ったマウスを選別した。このマウスを C57BL/6 CrSlc に少なくとも 4 回バッククロスし、ホモ体を得て以降の解析に供した。

（2）hSXR の組織発現パターンの検討

mhSXR の組織発現パターンを定量 RT-PCR によって検討した。定量 RT-PCR は細胞当たりのコピー数に変換可能な手法である Percellome method を用いて実施した。脳、胸腺、心、肺、肝、胃、脾、腎、小腸及び精巣の 10 臓器について検討したところ、発現パターンは野生型と一致し、肺、肝、胃、腎、小腸で 2 コピー以上の発現が認められた。また、1 コピー以上の発現が精巣において認められた。各臓器における発現量は総じて mhSXR の方が高く、野生型に対し肺で 1.8 倍、肝で 2.4 倍、胃で 1.8 倍、腎で 1.7 倍、小腸で 1.2 倍、精巣で 3.0 倍であった。

（3）ヒト型化リガンド反応性の検討

このマウスがヒト型化反応を示すか否かを、ヒト特異的 agonist として RIF を、マウス特異的 agonist として PCN を用いて検討した。それぞれ 10mg/kg, 40mg/kg を経口で 3 日間連日投与し、肝、小腸粘膜を採取し、CYP3A11 mRNA の発現量を Percellome 定量 RT-PCR によって検討した。その結果、肝、小腸粘膜ともに RIF で発現誘導されるが PCN では誘導されないという、典型的なヒト型反応を示すことが確認された。一方で野生型では PCN による誘導が確認された。次に、肝での発現誘導を組織学的に検討するため、CYP3A11 mRNA に対する in situ hybridization を行った。その結果、野生型での PCN による発現誘導と同様の、肝小葉中心静脈周囲を起点とする発現上昇が、ヒト型マウスで RIF 投与によって認められた。尚、コントロール群の CYP3A11 発現量は mhSXR マウスの方が特

に肝で高く、野生型の 2 倍程度に上昇していた。これは、肝での mhSXR の発現量が野生型での PXR に比べて 2 倍程度高いことに対応するものと考えられた。

次に、CYP3A11 以外の遺伝子についてもヒト型反応を示すか、マイクロアレイを用いて検討した。その結果、PXR の標的遺伝子として報告されている CES6、CYP2B10、CYP2C55、CYP3A41、CYP3A44、GSTA1 を含む複数の遺伝子について、RIF で発現誘導されるが PCN では誘導されないという、典型的なヒト型反応を示すことが確認された。また、CACNG2、GSTM2、GSTM3 など、PXR 標的遺伝子であることがまだ報告されていない遺伝子でヒト型反応を示すものが見出された。

マウス特異的 agonist の PCN により野生型マウスで発現変動を示す遺伝子群に特有の機能カテゴリーが認められるかを Ingenuity Pathway Analysis (IPA) によって調べたところ、PXR (NR1I2) を中心とするパスウェイが抽出され、そのパスウェイには実際に化学物質代謝系が含まれていた。

マウスの PXR (mPXR) を活性化し、ヒトの PXR (hPXR) を活性化しない PCN について、研究分担者が既に構築しているデータベースを参照することにより、PCN によって発現が上昇する遺伝子として、よく知られた Cyp3a11 に加え、Cyp2b10、Ces6、Gstm3 が見出された。これらを mPXR 活性化のマーカー遺伝子として、PCN 同様の発現上昇を示す化学物質を検索したところ、Phenytoin、Thalidomide、Phenobarbital が抽出された。

(4) 肝スフェロイドの検討

以上の結果に基づき、Phenytoin、Thalidomide、Phenobarbital を肝スフェロイドに暴露し、Cyp3a11、Ces6、Cyp2b10、Gstm3 を定量 RT-PCR (Percellome PCR) にて測定したところ、Phenytoin は野生型で CYP3A11、CES6、CYP2B10、GSTM3 の誘導作用を示す一方、hPXRki では作用を示さなかった。Thalidomide は野生型で CYP3A11、CES6、CYP2B10、GSTM3 の誘導作用を示す一方、hPXRki には作用を示さなかった。Phenobarbital は、hPXRki の方でより低い濃度から誘導作用が認められた。以上のように、検討した 3 種の化学物質は mPXR と hPXR に対し、異なる作用を示した。

(5) 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、PXR 応答遺伝子の一つである CES6 の定量 RT-PCR 解析 (Percellome 法) を行い、肝、小腸における PXR 応答を検討した。PCN または RIF を単回強制経口投与し、投与後 8 時間時に臓器を採取した。その結果、mPXR リガンドである PCN は野生型のみ、hPXR リガンドである RIF は hPXRki のみで用量依存的発現上昇を示した。従って 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。

(6) 全身臓器のトランスクリプトーム解析

定量 RT-PCR 結果を受け、各臓器のトランスクリプトーム解析を、PCN、RIF につ

いて Affymetrix 社の GeneChip (Mouse Genome 430 2.0) を用いた Percellome 法を用いて実施した。

各臓器において PXR 活性化により発現の変動を示す遺伝子を抽出する為に、野生型で PCN、hPXRki で RIF によって同方向への変化を示す遺伝子を「PXR 依存型発現変動」遺伝子と捉え、統計解析による絞り込みを行った。その結果、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。臓器間における候補プローブセットの重なりを、肝を基準に検討した結果、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。

(7) 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。例えば、GSTM family のうち、GSTM1, 3, 4, 6 が小腸のみで PXR 依存型発現変動を示しているが、それらのプロモーター配列の共通性を検討したところ、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 (Figure 4A)。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 (Homeodomain transcription factors) , CART

(cartilage homeoprotein 1) 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

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