



## 判別モデルの学習セット

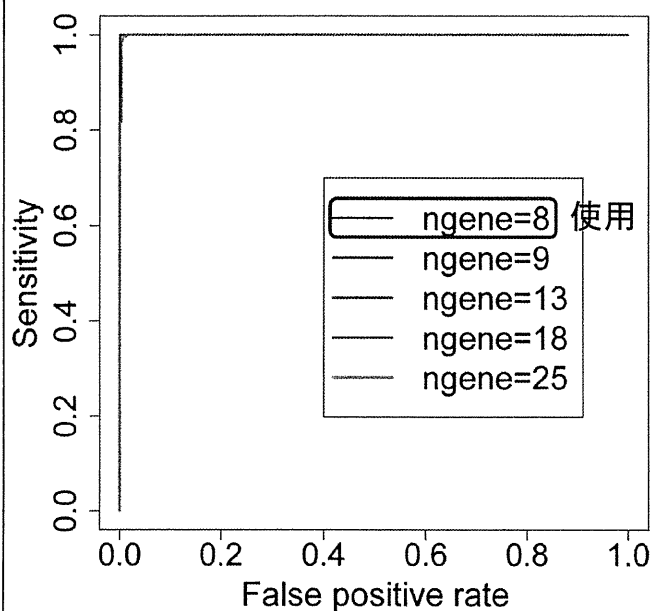
化合物番号	化合物略称	化合物名	H-24H
00006	CFB	clofibrate	Y
00014	ASA	aspirin	Y
00021	BBr	benzbromarone	Y
00030	WY	WY-14643	Y
00031	GFZ	gemfibrozil	Y
00001	APAP	acetaminophen	N
00002	INAH	isoniazid	N
00003	CCL4	carbon tetrachloride	N
00004	PB	phenobarbital	N
00007	MTX	methotrexate	N
00008	RIF	rifampicin	N
00009	ANIT	naphthyl isothiocyanate	N
00010	AA	allyl alcohol	N
00012	OPZ	omeprazole	N
00013	ET	ethionine	N
00016	CPZ	chlorpromazine	N
00017	TAA	thioacetamide	N
00018	CBZ	carbamazepine	N
00020	NFT	nitrofurantoin	N
00022	HCB	hexachlorobenzene	N
00023	DZP	diazepam	N
00024	CPA	cyclophosphamide	N
00025	MP	methapyrilene	N
00026	PHE	phenytoin	N
00027	CMA	coumarin	N
00028	APL	allopurinol	N
00029	PTU	propylthiouracil	N

陽性 (5化合物)と  
陰性 (22化合物)  
の24h高用量デー  
タで学習させた。

## 判別モデルのROCカーブ

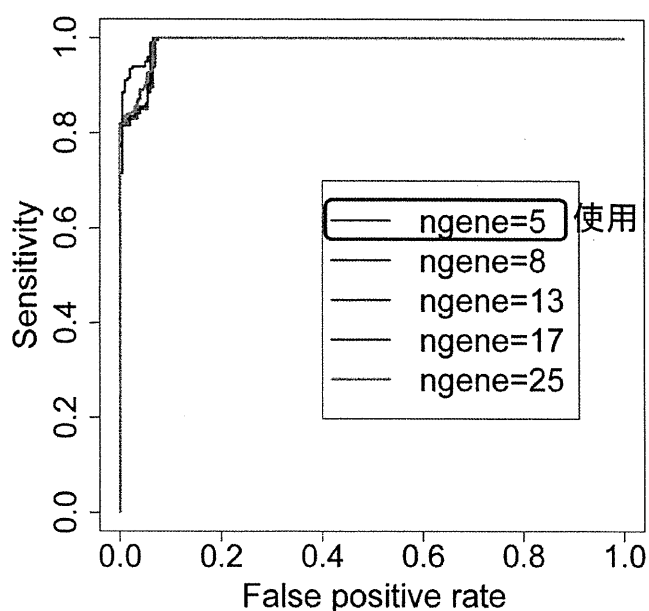
### *In vivo* モデル

SVM+Mann-Whitney U-test



### *In vitro* モデル

SVM+Mann-Whitney U-test



いずれも非常に良い判別結果を示した。

# 抽出されたマーカー遺伝子

*In vivo*用: 8プローブセット

*In vitro*用: 5プローブセット

- ★★ 1388211\_s\_at Acot1 /// Acot2
- ★★ 1368283\_at Ehhadh
- 1389253\_at Vnn1
- 1377037\_at Acot4
- ★★ 1368934\_at Cyp4a1 /// Cyp4a10
- ★ 1367659\_s\_at Dci
- 1370818\_at Decr2
- ★ 1386880\_at Acaa2

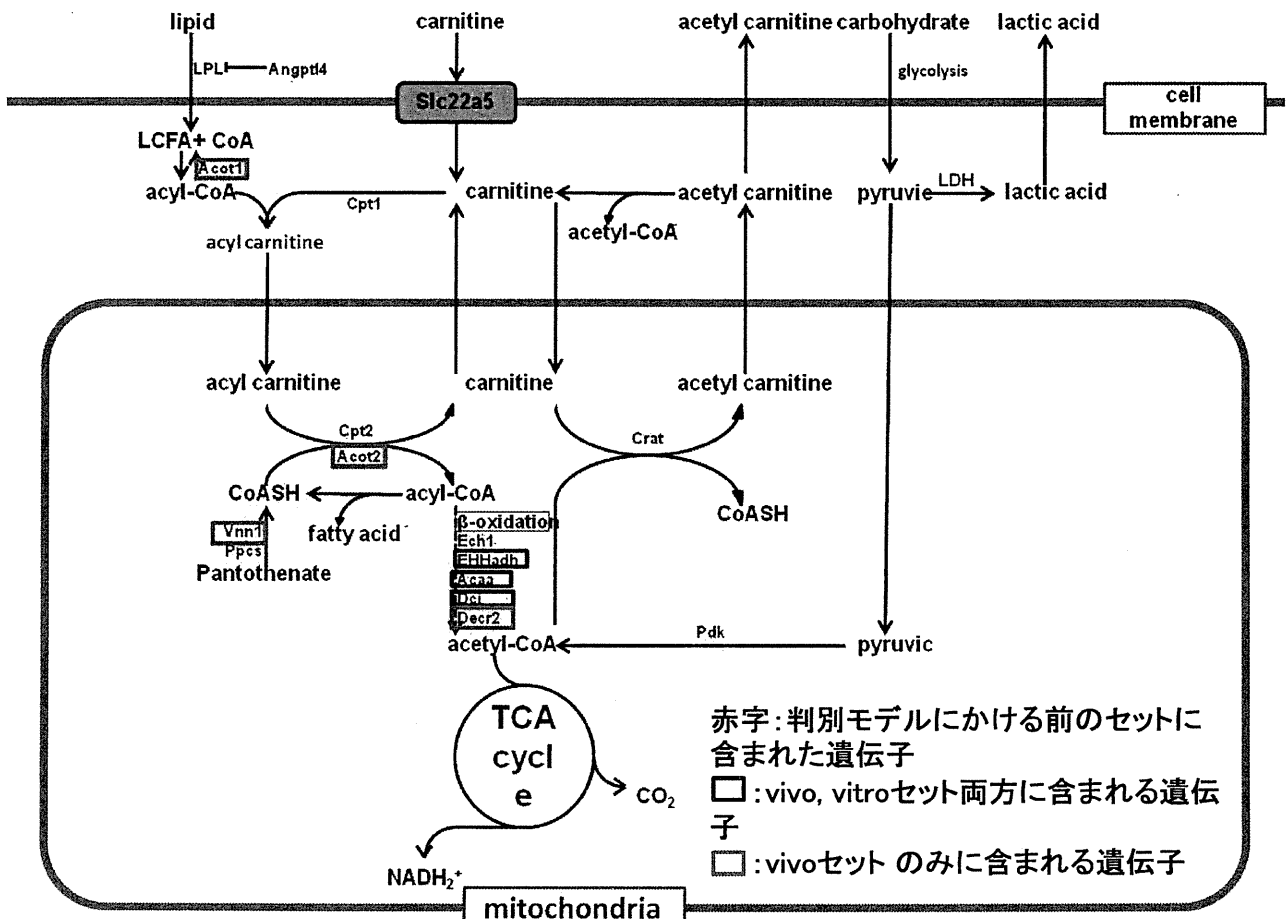
- ★★ 1368283\_at Ehhadh
- ★★ 1370397\_at Cyp4a3
- ★★ 1387783\_a\_at Acaa1 /// RGD1562373
- ★ 1367659\_s\_at Dci
- 1367777\_at Decr1

Acot: acyl-CoA thioesterase, Ehhadh: enoyl-Coenzyme A hydratase, Vnn: vanin, Cyp: cytochrome P450, Dci: dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase, Decr: 2,4-dienoyl CoA reductase, Acaa: acetyl-Coenzyme A acyltransferase

- ★: KEGGのPPAR signaling pathwayに含まれる
- ★: KEGGのfatty acid metabolism pathwayに含まれる

*In vivo*用, *in vitro*用で共通の遺伝子が複数ある。  
PPARとの関連の知られた遺伝子が多い。

## マーカー遺伝子の生物学的役割



# TG-GATEs in vivoデータの判別結果-1

学習セット	化合物番号	化合物名	low												middle												high											
			3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d												
00006	CFB	clofibrate	0.008	0.017	0.066	0.021	0.048	0.062	0.052	0.049	0.049	0.272	0.356	0.011	0.429	0.011	0.023	0.067	0.006	0.008	0.008	0.008	0.004	0.010	0.016	0.023	0.017											
00014	ASA	aspirin	0.020	0.029	0.096	0.000	0.012	0.006	0.017	0.006	0.012	0.027	0.035	0.031	0.022	0.032	0.022	0.011	0.023	0.067	0.006	0.008	0.008	0.008	0.004	0.010	0.016	0.023	0.017									
00021	BBr	benzbromarone	0.026	0.054	0.101	0.053	0.065	0.069	0.141	0.107	0.041						0.066			0.006	0.008	0.008	0.008	0.004	0.010	0.016	0.023	0.017										
00030	WY	WY-14643	0.419								0.311						0.458			0.006	0.008	0.008	0.008	0.004	0.010	0.016	0.023	0.017										
00031	GFZ	gemfibrozil	0.006	0.006	0.013	0.160					0.020	0.063	0.104				0.056	0.138		0.006	0.008	0.008	0.008	0.004	0.010	0.016	0.023	0.017										
00001	APAP	acetaminophen	0.006	0.010	0.006	0.007	0.007	0.004	0.006	0.009	0.009	0.008	0.003	0.005	0.009	0.018	0.007	0.027	0.006	0.008	0.008	0.008	0.004	0.010	0.016	0.023	0.017											
00002	INH	isoniazid	0.007	0.006	0.004	0.007	0.006	0.003	0.007	0.012	0.006	0.005	0.008	0.012	0.004	0.005	0.008	0.005	0.006	0.010	0.004	0.031	0.003	0.006	0.004	0.008												
00003	COL4	carbon tetrachloride	0.004	0.006	0.005	0.008	0.009	0.016	0.010	0.019	0.007	0.005	0.003	0.008	0.017	0.016	0.013	0.068	0.004	0.004	0.003	0.009	0.013	0.045	0.089	0.102												
00004	PE	phenobarbital	0.005	0.003	0.002	0.004	0.004	0.009	0.009	0.006	0.005	0.003	0.002	0.005	0.006	0.006	0.006	0.010	0.004	0.007	0.003	0.098	0.005	0.004	0.006	0.006												
00007	MTX	methotrexate	0.009	0.004	0.009	0.003	0.009	0.005	0.004	0.005	0.008	0.005	0.006	0.003	0.006	0.007	0.003	0.004	0.006	0.008	0.007	0.003	0.006	0.005	0.002	0.016												
00008	RIF	rifampicin	0.009	0.006	0.004	0.005	0.004	0.004	0.009	0.003	0.010	0.007	0.008	0.011	0.007	0.006	0.012	0.004	0.006	0.010	0.021	0.040	0.030	0.016	0.036	0.016												
00009	ANIT	naphthyl isothiocyanate	0.003	0.008	0.009	0.007	0.008	0.008	0.009	0.006	0.005	0.005	0.015	0.006	0.009	0.013	0.006	0.012	0.006	0.004	0.008	0.010	0.008	0.010	0.017	0.015												
00010	AA	allyl alcohol	0.014	0.013	0.023	0.007	0.006	0.006	0.003	0.006	0.011	0.010	0.012	0.006	0.011	0.009	0.003	0.005	0.005	0.016	0.005	0.003	0.025	0.013	0.005	0.009												
00012	OPZ	omeprazole	0.004	0.006	0.003	0.015	0.009	0.007	0.007	0.006	0.005	0.010	0.010	0.012	0.010	0.012	0.014	0.009	0.006	0.007	0.003	0.015	0.017	0.006	0.005	0.005												
00013	ET	ethionine	0.004	0.008	0.006	0.002	0.007	0.010	0.008	0.006	0.005	0.006	0.004	0.001	0.013	0.016	0.006	0.007	0.003	0.004	0.004	0.001	0.032	0.029	0.043	0.022												
00016	CPZ	chlorpromazine	0.009	0.027	0.016	0.018	0.005	0.004	0.005	0.005	0.004	0.031	0.023	0.167	0.003	0.008	0.007	0.005	NA	NA	NA	NA	0.005	0.004	0.007	0.005												
00017	TAA	thioacetamide	0.005	0.004	0.004	0.005	0.008	0.005	0.003	0.008	0.003	0.003	0.002	0.003	0.006	0.005	0.005	0.010	0.006	0.003	0.002	0.000	0.011	0.005	0.007	0.027												
00019	CBZ	carbamazepine	0.003	0.008	0.006	0.004	0.008	0.003	0.002	0.003	0.002	0.008	0.007	0.004	0.005	0.008	0.003	0.004	0.003	0.006	0.010	0.013	0.026	0.004	0.004	0.004												
00020	NFT	nitrofurantoin	0.014	0.008	0.007	0.015	0.007	0.006	0.011	0.006	0.024	0.013	0.008	0.027	0.008	0.004	0.005	0.004	0.008	0.022	0.016	0.062	0.005	0.005	0.008	0.008												
00022	HCB	hexachlorobenzene	0.004	0.007	0.007	0.003	0.003	0.004	0.006	0.007	0.006	0.012	0.013	0.002	0.008	0.002	0.003	0.004	0.004	0.009	0.010	0.022	0.002	0.003	0.002	0.005												
00023	DZP	diazepam	0.006	0.016	0.003	0.009	0.006	0.004	0.012	0.010	0.012	0.006	0.002	0.008	0.010	0.010	0.008	0.016	0.006	0.005	0.002	0.008	0.029	0.032	0.018	0.010												
00024	CPA	cyclophosphamide	0.003	0.008	0.003	0.008	0.005	0.007	0.003	0.005	0.005	0.009	0.004	0.017	0.009	0.004	0.003	0.007	0.004	0.006	0.004	0.022	0.011	0.006	0.003	0.004												
00025	MP	methapyridine	0.009	0.004	0.004	0.007	0.005	0.012	0.005	0.013	0.007	0.005	0.007	0.006	0.009	0.017	0.003	0.008	0.008	0.005	0.005	0.009	0.017	0.001	0.001	0.001												
00026	PHE	phenytoin	0.006	0.006	0.006	0.011	0.009	0.003	0.003	0.004	0.005	0.006	0.005	0.014	0.006	0.006	0.009	0.002	0.005	0.004	0.008	0.047	0.009	0.004	0.005	0.002												
00027	CMA	coumestrol	0.010	0.003	0.006	0.005	0.010	0.003	0.003	0.008	0.006	0.005	0.010	0.009	0.022	0.012	0.004	0.012	0.006	0.003	0.003	0.007	0.027	0.022	0.009	0.010												
00028	APL	allopurinol	0.005	0.009	0.008	0.012	0.006	0.010	0.010	0.006	0.003	0.003	0.008	0.006	0.007	0.007	0.005	0.009	0.002	0.007	0.003	0.003	0.006	0.009	0.004	0.020												
00029	PTU	propylthiouracil	0.009	0.004	0.008	0.007	0.004	0.003	0.005	0.005	0.011	0.003	0.009	0.009	0.007	0.005	0.006	0.010	0.005	0.003	0.007	0.005	0.003	0.005	0.008	0.015												
00005	VPA	valproic acid	0.005	0.005	0.013	0.008	0.009	0.015	0.007	0.007	0.009	0.016	0.047	0.026	0.011	0.010	0.011	0.013	0.020	0.056	0.228	0.223	0.028	0.078	0.063	0.131												
00011	PhB	phenylbutazone	0.004	0.005	0.008	0.005	0.004	0.006	0.005	0.006	0.009	0.004	0.013	0.006	0.006	0.005	0.003	0.007	0.005	0.008	0.006	0.004	0.012	0.005	0.003	0.008												
00015	IM	indomethacin	0.005	0.004	0.005	0.004	0.003	0.007	0.004	0.005	0.003	0.009	0.005	0.000	0.005	0.006	0.003	0.008	0.003	0.005	0.008	0.000	0.000	0.001	0.001	NA												
00019	DFNa	difenflufenacil	0.005	0.003	0.014	0.004	0.008	0.004	0.004	0.006	0.004	0.003	0.008	0.002	0.007	0.005	0.006	0.008	0.006	0.003	0.004	0.000	0.004	0.005	0.003	0.003												
00032	BBZ	bromobenzene	0.005	0.007	0.005	0.007	0.010	0.011	0.008	0.005	0.009	0.008	0.011	0.018	0.015	0.014	0.014	0.008	0.006	0.008	0.028	0.022	0.015	0.019	0.016	0.008												
00033	AM	amidone	0.007	0.010	0.010	0.050	0.011	0.005	0.006	0.007	0.007	0.005	0.017	0.054	0.010	0.016	0.015	0.014	0.005	0.017	0.013	0.123	0.189			0.038												
00034	SS	sulfasalazine	0.003	0.003	0.006	0.014	0.008	0.006	0.007	0.010	0.007	0.004	0.007	0.014	0.008	0.005	0.011	0.016	0.004	0.006	0.016	0.063	0.019	0.028	0.038	0.035												
00035	CJM	cimetidine	0.005	0.006	0.005	0.009	0.007	0.004	0.007	0.010	0.005	0.010	0.003	0.003	0.006	0.004	0.007	0.007	0.004	0.012	0.004	0.004	0.003	0.004	0.006	0.006												
00036	HPL	haloperidol	0.008	0.005	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.002	0.014	0.010	0.008	0.008	0.006	0.004	0.004	0.015	0.012	0.044	0.009	0.008	0.007	0.019												
00037	FP	fluphenazine	0.007	0.006	0.009	0.005	0.005	0.005	0.005	0.007	0.005	0.006	0.020	0.011	0.008	0.009	0.005	0.004	0.004	0.015	0.012	0.044	0.009	0.008	0.007	0.019												
00038	TRZ	thioridazine	0.011	0.009	0.010	0.011	0.005	0.005	0.009	0.007	0.010	0.009	0.010	0.016	0.004	0.010	0.006	0.010	0.015	0.026	0.014	0.011	0.009	0.013	0.008	0.013												
00039	ADP	adapin	0.003	0.012	0.009	0.006	0.003	0.005	0.005	0.006	0.004	0.015	0.011	0.034	0.002	0.010	0.004	0.006	0.013	NA	NA	NA	0.006	0.007	0.005	0.010												
00040	LBT	labetalol	0.007	0.004	0.011	0.005	0.007	0.008	0.004	0.008	0.012	0.003	0.017	0.006	0.007	0.006	0.006	0.007	0.013	0.005	0.014	0.014	0.013	0.011	0.011	0.011												
00041	MTS	methyltestosterone	0.005	0.005	0.006	0.009	0.005	0.004	0.007	0.005	0.003	0.003	0.002	0.014	0.007	0.004	0.005	0.005	0.003	0.006	0.003	0.008	0.008	0.004	0.009	0.011												
00042	GBC	glibenclamide	0.004	0.002	0.002	0.012	0.009	0.006	0.005	0.007	0.004	0.003	0.002	0.007	0.012	0.010	0.006	0.009	0.002	0.002	0.003	0.010	0.007	0.015	0.006	0.002												
00043	GF	griseofulvin	0.009	0.004	0.003	0.007	0.005	0.004	0.011	0.003	0.007	0.004	0.006	0.006	0.007	0.006	0.008	0.002	0.007	0.002	0.004	0.007	0.009	0.006	0.005	0.002												
00044	FT	flutamide	0.011	0.010	0.010	0.003	0.005	0.006	0.006	0.007	0.008	0.008	0.007	0.009	0.009	0.006	0.008	0.003	0.																			

# TG-GATEs in vivoデータの判別結果-3

ID	Drug	Class	low								middle								high							
			3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d	3h	6h	9h	24h	4d	8d	15d	29d
			00102	DIS	disopyramide	0.006	0.004	0.004	0.006	0.004	0.004	0.008	0.005	0.004	0.003	0.004	0.007	0.005	0.003	0.006	0.012	0.009	0.003	0.005	0.013	0.025
00153	DEX	dexamethasone	0.003	0.002	0.003	0.004	NA	NA	NA	NA	0.003	0.002	0.001	0.001	NA	NA	NA	NA	0.006	0.003	0.001	0.001	NA	NA	NA	NA

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5), 赤字: vitroでも陽性

# TG-GATEs in vitroデータの判別結果-1

化合物番号	化合物略称	化合物名	low			middle			high		
			L-2H	L-8H	L-24H	M-2H	M-8H	M-24H	H-2H	H-8H	H-24H
00006	CFB	clofibrate	0.038	0.052	0.123	0.062			0.080		
00014	ASA	aspirin	0.054	0.061	0.103	0.054	0.143	0.500	0.043	0.426	
00021	BBr	benzbromarone	0.041	0.062	0.055	0.041	0.262	0.486	0.061		
00030	WY	WY-14643	0.076			0.081			0.057		
00031	GFZ	gemfibrozil	0.040	0.036	0.054	0.032	0.073	0.110	0.055		
00001	APAP	acetaminophen	0.004	0.016	0.406	0.019	0.008	0.053	0.008	0.091	0.303
00002	INAH	isoniazid	0.107	0.037	0.068	0.135	0.048	0.073	0.102	0.019	0.004
00003	CCL4	carbon tetrachloride	0.025	0.041	0.063	0.035	0.045	0.047	NA	0.025	NA
00004	PB	phenobarbital	0.079	0.428	0.091	0.021	0.038	0.160	0.194	0.003	0.041
00007	MTX	methotrexate	0.048	0.059	0.063	0.046	0.069	0.061	0.054	0.065	0.049
00008	RIF	rifampicin	0.045	0.050	0.048	0.039	0.044	0.036	0.038	0.024	0.013
00009	ANIT	naphthyl isothiocyanate	0.043	0.083	0.125	0.061			0.083	0.182	0.018
00010	AA	allyl alcohol	0.063	0.032	0.040	0.059	0.045	0.043	0.064	0.040	0.042
00012	OPZ	omeprazole	0.041	0.057	0.050	0.045	0.052	0.045	0.037	0.039	0.049
00013	ET	ethionine	0.060	0.024	0.010	0.060	0.013	0.001	0.099	0.020	0.000
00016	GPZ	chlorpromazine	0.044	0.042	0.061	0.061	0.057	0.041	0.046	0.042	0.033
00017	TAA	thioacetamide	0.049	0.044	0.027	0.038	0.042	0.018	0.043	0.046	0.035
00018	CBZ	carbamazepine	0.055	0.061	0.054	0.048	0.048	0.054	0.050	0.036	0.039
00020	NFT	nitrofurantoin	0.043	0.046	0.050	0.040	0.039	0.028	0.043	0.021	0.003
00022	HCB	hexachlorobenzene	0.057	0.061	0.044	0.062	0.060	0.043	0.061	0.064	0.036
00023	DZP	diazepam	0.048	0.062	0.048	0.048	0.054	0.061	0.052	0.042	0.027
00024	GPA	cyclophosphamide	0.048	0.048	0.048	0.039	0.036	0.036	0.038	0.023	0.024
00025	MP	methapyrilene	0.042	0.048	0.052	0.057	0.052	0.040	0.050	0.046	0.031
00026	PHE	phenytoin	0.053	0.039	0.047	0.059	0.039	0.049	0.061	0.043	0.044
00027	CMA	coumarin	0.042	0.067	0.039	0.054	0.062	0.036	0.042	0.042	0.033
00028	APL	allopurinol	0.050	0.038	0.044	0.038	0.042	0.063	0.042	0.039	0.063
00029	PTU	propylthiouracil	0.041	0.043	0.035	0.062	0.057	0.030	0.085	0.041	0.016
00005	VPA	valproic acid	0.051			0.050			0.051	0.100	
00011	PhB	phenylbutazone	0.052	0.044	0.055	0.044	0.042	0.040	0.060	0.015	0.019
00015	IM	indomethacin	0.087	0.082	0.064	0.084	0.156	0.427	0.069	0.260	
00019	DFNa	diclofenac	0.036	0.056	0.064	0.057	0.255		0.058	0.075	0.450
00032	BBZ	bromobenzene	0.034	0.050	0.055	0.029	0.040	0.060	0.032	0.050	0.050
00033	AM	amidarone	0.037	0.049	0.045	0.036	0.050	0.033	0.039	0.065	0.076
00034	SS	sulfasalazine	0.060	0.316	0.421	0.082			0.077		
00035	CIM	cimetidine	0.040	0.041	0.061	0.035	0.051	0.046	0.043	0.047	0.057
00036	HPL	haloperidol	0.039	0.035	0.047	0.032	0.045	0.037	0.035	0.029	0.026
00037	FP	fluphenazine	0.044	0.058	0.043	0.037	0.060	0.035	0.035	0.044	0.049

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5)

## TG-GATEs *in vitro*データの判別結果-2

			low			middle			high			hr
			2	8	24	2	8	24	2	8	24	
			00038	TRZ	thioridazine	0.054	0.047	0.047	0.040	0.056	0.040	
00039	ADP	adapin	0.043	0.042	0.047	0.046	0.046	0.060	0.043	0.029	0.016	
00040	LBT	labetalol	0.041	0.047	0.039	0.056	0.034	0.035	0.045	0.021	0.010	
00041	MTS	methyltestosterone	0.043	0.048	0.045	0.054	0.050	0.043	0.061	0.041	0.026	
00042	GBC	glibenclamide	0.050	0.044	0.045	0.054	0.051	0.048	0.070	0.045	0.131	
00043	GF	griseofulvin	0.064	0.046	0.046	0.070	0.046	0.048	0.062	0.039	0.032	
00044	FT	flutamide	0.048	0.075	0.042	0.052	0.068	0.041	0.035	0.062	0.035	
00045	PH	perhexiline	0.060	0.045	0.040	0.054	0.035	0.038	0.069	0.028	0.028	
00046	AZP	azathioprine	0.040	0.066	0.054	0.040	0.064	0.035	0.041	0.060	0.020	
00047	KC	ketoconazole	0.060	0.060	0.049	0.062	0.057	0.039	0.049	0.023	0.004	
00048	TC	tetracycline	0.037	0.038	0.047	0.056	0.063	0.043	0.054	0.053	0.055	
00049	LS	lomustine	0.047	0.035	0.038	0.057	0.049	0.045	0.048	0.030	0.077	
00050	CPX	ciprofloxacin	0.044	0.038	0.045	0.053	0.051	0.046	0.053	0.051	0.050	
00051	PML	pemoline	0.038	0.068	0.059	0.036	0.083	0.046	0.066	0.068	0.048	
00052	CMN	chlormezanone	0.039	0.066	0.042	0.045	0.101	0.058	0.047	0.082	0.068	
00053	MFM	metformin	0.049	0.031	0.041	0.044	0.036	0.049	0.044	0.029	0.012	
00054	TMX	tamoxifen	0.053	0.042	0.057	0.039	0.048	0.052	0.040	0.044	0.047	
00055	EE	ethinylestradiol	0.054	0.056	0.034	0.055	0.086	0.061	0.066			
00056	MDP	methyl dopa	0.053	0.036	0.035	0.049	0.056	0.044	0.043	0.049	0.061	
00057	MTZ	methimazole	0.035	0.052	0.055	0.048	0.023	0.038	0.046	0.032	0.051	
00058	MCT	monocrotaline	0.063	0.040	0.055	0.042	0.038	0.033	0.039	0.024	0.023	
00059	VA	vitamin A	0.040	0.050	0.048	0.031	0.071	0.043	0.041	0.095	0.076	
00060	TAC	tacrine	0.054	0.035	0.049	0.047	0.029	0.045	0.066	0.014	0.012	
00061	MXS	moxisylyte	0.053	0.052	0.038	0.051	0.051	0.027	0.061	0.023	0.017	
00062	IPA	iproniazid	0.067	0.037	0.065	0.051	0.028	0.156	0.055	0.030	0.135	
00063	K01	K01	0.056	0.062	0.061	0.032	0.055	0.042	0.034	0.049	0.061	
00064	CMP	chloramphenicol	0.037	0.067	0.042	0.063	0.047	0.032	0.043	0.035	0.021	
00065	NFZ	nitrofurazone	0.048	0.041	0.051	0.029	0.045	0.023	0.038	0.031	0.008	
00066	K02	K02	0.035	0.066	0.026	0.025	0.051	0.035	0.041	0.072	0.060	
00067	K03	K03	0.033	0.072	0.068	0.034	0.060	0.056	0.029	0.038	0.016	
00068	K04	K04	0.043	0.056	0.044	0.053	0.082	0.045	0.041	0.030	0.019	
00069	IMI	imipramine	0.050	0.052	0.058	0.045	0.055	0.034	0.042	0.018	0.006	
00070	AMT	amitriptyline	0.054	0.052	0.062	0.053	0.028	0.055	0.055	0.013	0.021	
00071	HYZ	hydroxyzine	0.044	0.061	0.054	0.034	0.046	0.023	0.041	0.018	0.002	
00072	IBU	ibuprofen	0.061	0.072	0.033	0.062	0.003	0.000	0.072	0.466	0.425	
00073	NPX	naproxen	0.057	0.110	0.234	0.072	0.007	0.000	0.066	0.000	0.000	
00074	QND	quinidine	0.053	0.060	0.054	0.043	0.052	0.035	0.062	0.028	0.001	
00075	K05	K05	0.049	0.057	0.060	0.046	0.068	0.059	0.031	0.060	0.044	

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5)

*In vivo*  
でも陽性  
 NSAID

## TG-GATEs *in vitro*データの判別結果-3

			low			middle			high			hr
			2	8	24	2	8	24	2	8	24	
			00076	K06	K06	0.050	0.042	0.047	0.043	0.050	0.029	
00077	K07	K07	0.041	0.045	0.044	0.055	0.063	0.060	0.048	0.057	0.061	
00078	FUR	furosemide	0.050	0.049	0.051	0.067	0.084	0.122	0.083	0.098	0.207	
00079	FFB	fenofibrate	0.062	0.142	0.175	0.072	0.022	0.015	0.097	0.016	0.000	
00080	CPP	chlorpropamide	0.061	0.037	0.025	0.078	0.052	0.031	0.068	0.043	0.040	
00081	NIC	nicotinic acid	0.054	0.044	0.042	0.064	0.053	0.060	0.064	0.098	0.304	
00082	EME	erythromycin ethylsuccinate	0.069	0.044	0.056	0.061	0.051	0.056	0.060	0.056	0.054	
00083	EBU	ethambutol	0.039	0.049	0.053	0.033	0.043	0.035	0.022	0.020	0.007	
00084	MEF	mefenamic acid	0.052	0.061	0.054	0.043	0.071	0.054	0.058	0.415	0.022	
00085	FAM	famotidine	0.054	0.044	0.046	0.036	0.053	0.049	0.043	0.047	0.051	
00086	RAN	ranitidine	0.035	0.048	0.034	0.062	0.056	0.024	0.095	0.039	0.001	
00087	K08	K08	0.048	0.123	0.403	0.039	0.055	0.055	0.042	0.000	0.000	
00088	K09	K09	0.052	0.041	0.036	0.069	0.055	0.031	0.069	0.039	0.014	
00089	K10	K10	0.034	0.045	0.024	0.039	0.048	0.019	0.041	0.038	0.022	
00090	CHL	chlorpheniramine	0.035	0.027	0.039	0.036	0.027	0.017	0.030	0.020	0.003	
00091	NIF	nifedipine	0.043	0.027	0.044	0.060	0.021	0.031	0.100	0.017	0.045	
00092	DIL	diltiazem	0.050	0.035	0.044	0.048	0.054	0.031	0.039	0.018	0.002	
00093	TAN	tannic acid	0.037	0.037	0.067	0.037	0.043	0.041	0.036	0.021	0.003	
00094	CAP	captopril	0.055	0.069	0.070	0.050	0.097	0.195	0.068	0.353	0.015	
00095	ENA	enalapril	0.042	0.048	0.056	0.039	0.066	0.052	0.048	0.083	0.007	
00096	TEO	theophylline	0.044	0.062	0.062	0.043	0.135	0.172	0.065	0.071	0.356	
00097	CAF	caffeine	0.053	0.052	0.108	0.056	0.096	0.354	0.048	0.145	0.029	
00098	PAP	papaverine	0.050	0.044	0.032	0.055	0.042	0.034	0.057	0.071	0.005	
00099	PEN	penicillamine	0.050	0.050	0.057	0.047	0.059	0.064	0.067	0.075	0.070	
00100	SUL	sulindac	0.061	0.051	0.021	0.059	0.078	0.055	0.068	0.234	0.004	
00101	TRI	triamterene	0.053	0.063	0.048	0.058	0.077	0.060	0.042	0.061	0.049	
00102	DIS	disopyramide	0.059	0.037	0.033	0.042	0.027	0.012	0.045	0.011	0.001	
00103	MEX	mexiletine	0.050	0.045	0.036	0.053	0.055	0.045	0.033	0.057	0.035	
00104	TXO	tiopronin	0.053	0.046	0.054	0.049	0.051	0.059	0.059	0.052	0.061	
00105	K11	K11	0.061	0.049	0.043	0.062	0.043	0.032	0.053	0.021	0.003	
00106	K12	K12	0.036	0.041	0.040	0.042	0.050	0.030	0.038	0.061	0.032	
00107	K13	K13	0.042	0.079	0.037	0.048	0.073	0.042	0.045	0.071	0.015	
00108	ACZ	acetazolamide	0.047	0.054	0.044	0.049	0.063	0.053	0.046	0.069	0.047	
00109	DSF	disulfiram	0.041	0.039	0.040	0.053	0.055	0.046	0.073	0.028	0.019	
00110	PMZ	promethazine	0.051	0.042	0.046	0.052	0.057	0.042	0.050	0.025	0.016	
00111	K14	K14	0.065	0.056	0.054	0.050	0.047	0.045	0.062	0.034	0.038	
00112	K15	K15	0.038	0.066	0.070	0.053	0.192	0.241	0.065	0.020	0.456	
00113	COL	colchicine	0.070	0.030	0.010	0.065	0.039	0.011	0.049	0.045	0.001	

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5)

*In vivo*  
でも陽性  
 NSAID

# TG-GATEs *in vitro* データの判別結果-4

			low			middle			high			hr	
			2	8	24	2	8	24	2	8	24		
			SST	→	00114	TLB	tolbutamide	0.067	0.057	0.032	0.066		0.046
		00115	SLP	sulpiride	0.053	0.036	0.056	0.061	0.030	0.044	0.060	0.009	0.003
		00116	ACA	acarbose	0.042	0.051	0.059	0.043	0.045	0.050	0.045	0.081	0.043
		00117	SST	simvastatin	0.041	0.061	0.142	0.043	0.293	0.050	0.037	0.000	0.000
		00118	AJM	ajmaline	0.040	0.052	0.038	0.030	0.059	0.021	0.032	0.029	0.005
		00119	DTL	dantrolene	0.049	0.062	0.036	0.040	0.061	0.033	0.038	0.062	0.023
		00120	TZM	triazolam	0.047	0.078	0.048	0.061	0.070	0.049	0.053	0.061	0.049
		00121	CPM	clomipramine	0.038	0.045	0.067	0.041	0.032	0.047	0.072	0.015	0.007
		00122	TMD	trimethadione	0.038	0.043	0.030	0.035	0.044	0.032	0.043	0.049	0.025
		00123	TBF	terbinafine	0.028	0.049	0.056	0.028	0.059	0.041	0.036	0.075	0.090
		00124	MLX	meloxicam	0.048	0.052	0.053	0.046	0.073	0.045	0.041	0.071	0.053
		00125	LNK	lornoxicam	0.056	0.036	0.054	0.044	0.059	0.038	0.038	0.048	0.025
		00126	CLM	chlormadinone	0.050	0.037	0.071	0.053	0.042	0.031	0.046	0.012	0.012
		00127	DNZ	danazol	0.039	0.064	0.039	0.029	0.047	0.048	0.023	0.018	0.027
		00128	K16	K16	0.064	0.077	0.075	0.071	0.332	0.454	0.092	0.114	0.000
		00129	RDZ	bendazac	0.060	0.047	0.039	0.064	0.059	0.036	0.069	0.117	0.000
BZD	→	00130	BZD	benziodarone	0.029	0.038	0.036	0.054	0.167	0.028	0.068	0.024	0.000
		00131	ETP	etoposide	0.043	0.062	0.039	0.053	0.066	0.035	0.068	0.077	0.058
		00132	GSP	cisplatin	0.049	0.058	0.031	0.047	0.055	0.014	0.045	0.127	0.088
		00133	CBP	carboplatin	0.064	0.036	0.018	0.071	0.037	0.009	0.046	0.054	0.007
		00134	BEA	bromoethanamine	0.063	0.037	0.048	0.064	0.050	0.058	0.070	0.022	0.034
		00135	ETH	ethionamide	0.045	0.054	0.039	0.056	0.060	0.041	0.042	0.044	0.037
		00136	NIM	nimesulide	0.040	0.044	0.066	0.030	0.062	0.055	0.027	0.042	0.051
		00137	ETN	ethanol	0.047	0.052	0.037	0.046	0.051	0.050	0.040	0.050	0.107
		00138	PCT	phenacetin	0.051	0.065	0.115	0.058	0.084	0.038	0.062	0.122	0.044
		00139	BCT	bucetin	0.049	0.044	0.047	0.043	0.058	0.048	0.049	0.049	0.043
		00140	NPAA	phenylanthranilic acid	0.056	0.054	0.043	0.065	0.081	0.060	0.054	0.359	0.670
		00141	CLT	cephalothin	0.050	0.054	0.034	0.051	0.060	0.054	0.047	0.051	0.002
		00142	CSA	cyclosporine A	0.043	0.027	0.022	0.050	0.034	0.024	0.066	0.022	0.010
		00143	PAN	puromycin aminonucleoside	0.050	0.064	0.018	0.036	0.066	0.020	0.056	0.137	0.055
		00144	AAF	acetamidofluorene	0.057	0.095	0.316	0.066	0.183	0.050	0.043	0.213	0.000
		00145	DEN	nitrosodiethylamine	0.049	0.068	0.034	0.042	0.063	0.028	0.042	0.034	0.018
		00146	TGP	ticlopidine	0.062	0.066	0.062	0.049	0.097	0.055	0.059	0.110	0.232
		00147	GMC	gentamicin	0.050	0.063	0.037	0.052	0.076	0.026	0.069	0.135	0.005
		00148	VMC	vancomycin	0.064	0.062	0.039	0.052	0.071	0.050	0.045	0.062	0.060
		00149	DOX	doxorubicin	0.079	0.055	0.037	0.074	0.051	0.045	0.070	0.074	0.052
		00150	K17	K17	0.053	0.064	0.058	0.056	0.029	0.043	0.052	0.024	0.001

数字はprobability, ピンク: ポジティブ判定(probability>0.5)

*In vivo*  
でも陽性

NSAID

## 陽性と判別されたNSAIDなどの非フィブラート化合物

いわゆるPPAR $\alpha$ アゴニスト(フィブラート系化合物)の他, *in vivo* ではamiodarone (AM), terbinafineなど, *in vitro* ではvalproic acid (VPA), NSAIDsなどが陽性と判定された. simvastatin (SST) とbenziodarone (BZD)は*in vivo*, *in vitro*両方で陽性だった. NSAIDなどは、PPAR $\alpha$ アゴニスト活性ありとの報告がある.

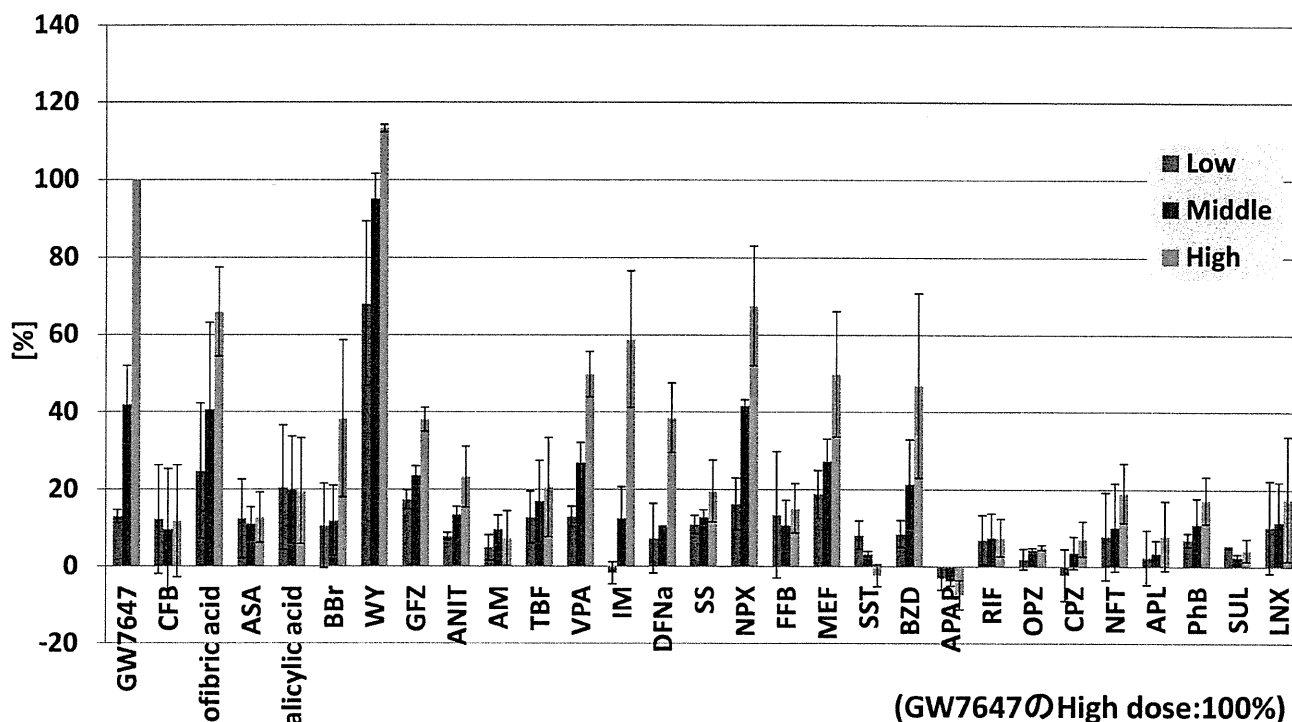
Lehmann *et al.*, "Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs."

*J. Biol. Chem.*, 272, 3406-3410, 1997.



これらの結果をもとに、学習に用いた陽性セットの化合物, 陰性化合物, *in vivo*と*in vitro*で一致しないもの, NSAIDsなどについて、セルフリーのPPAR $\alpha$ 活性化アッセイを行った。(EnBio RCAS for PPAR $\alpha$ ; 藤倉化成)

# 化合物のPPAR $\alpha$ に対するリガンド作用の検証



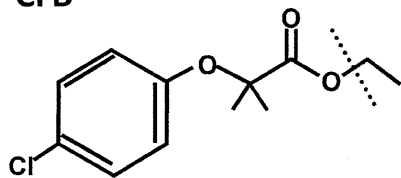
EnBio RCAS for PPAR $\alpha$  (藤倉化成)を用いたセルフリーアッセイでPPAR $\alpha$ 活性化のフェノタイプを検証した。HumanのPPAR $\alpha$ を用いたキット。

abbv.	compound name	vivo H:24h	vitro H:24h	Assay
CFB	clofibrate	○	○	×
ASA	aspirin	○	○	×
BBr	benzbromarone	○	○	○
WY	WY-14643	○	○	○
GFZ	gemfibrozil	○	○	○
ANIT	naphtyl isothiocyanate	×	M:8,24h	○
AM	amiodarone	H:8,15,29D	×	×
TBF	terbinafine	○	×	×
VPA	valproic acid	×	○	○
IM	indometacin	×	○	○
DFNa	diclofenac	×	M:24h	○
SS	sulfasalazine	×	○	×
NPX	naproxen	×	○	○
FFB	fenofibrate	○	○	×
MEF	mefenamic acid	×	○	○
SST	simvastatin	○	○	×
BZD	benziodarone	○	○	○
APAP	acetaminophen	×	×	×
RIF	rifampicin	×	×	×
OPZ	omeprazol	×	×	×
CPZ	chlorpromazine	×	×	×
NFT	nitrofurantoin	×	×	×
APL	allopurinol	×	×	×
PhB	phenylbutazone	×	×	×
SUL	sulindac	×	×	×
LNX	lornoxicam	×	×	×
	clofibric acid			○
	salicylic acid			×

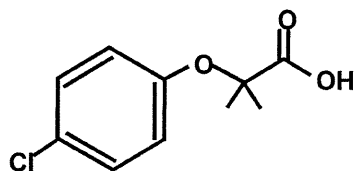
← 代謝物がアゴニスト活性を持つと考えられる ←



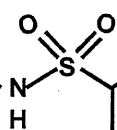
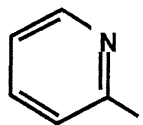
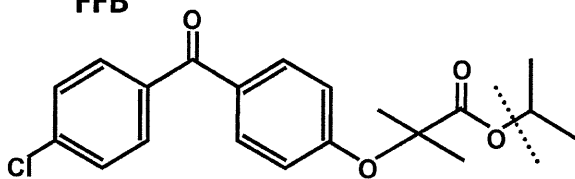
CFB



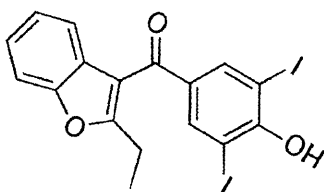
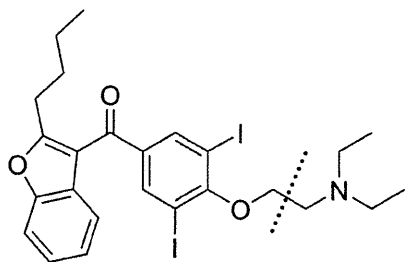
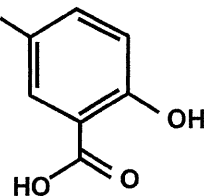
clofibrlic acid



FFB



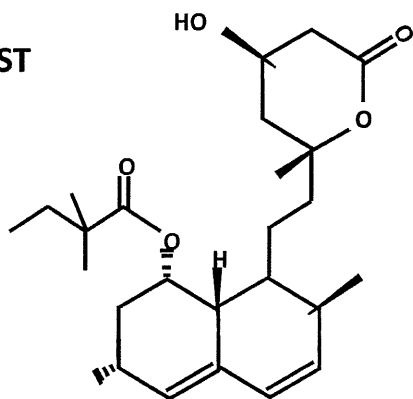
Sulfasalazine



amiodarone (negative in vitro)

benziodarone (positive in vitro)

SST

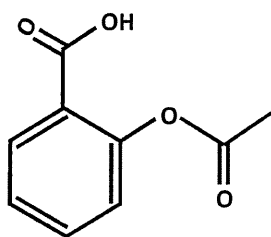


Pravastatin activates PPARalpha/PPARgamma expression in the liver and gallbladder epithelium of hamsters. Dong SH et al., Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2011 10(2):185-90.

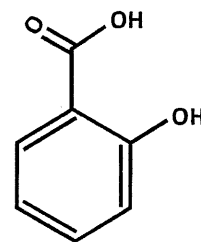
HMG-CoA reductase inhibitors (statins) activate expression of PPARalpha/PPARgamma and ABCA1 in cultured gallbladder epithelial cells. Lee J, et al., Dig Dis Sci. 2010 55(2):292-9.

内因性リガンド生成か？  
その他の作用か？

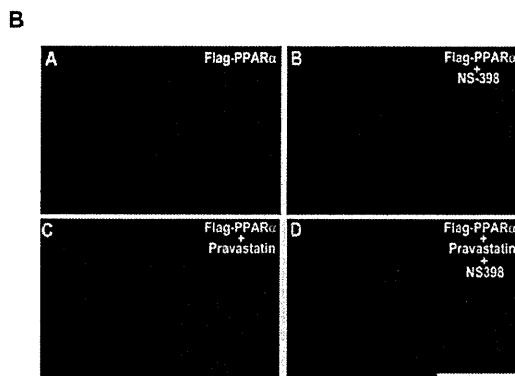
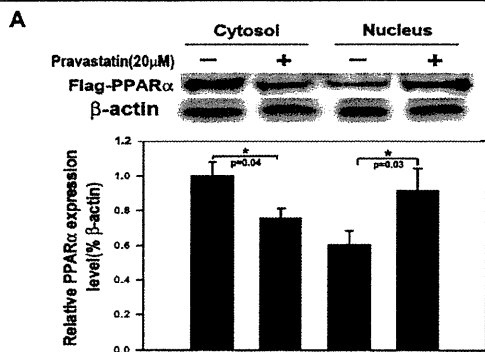
ASA



salicylic acid



Aspirin inhibits MMP-2 and MMP-9 expressions and activities through upregulation of PPARalpha/gamma and TIMP gene expressions in ox-LDL-stimulated macrophages derived from human monocytes. Hua Y,et al.. Pharmacology. 2009;83(1):18-25.



FLAG-PPARαがプラバスタチン曝露により核移行する  
(*Mol. Pharmacol.* 78: 36-45, 2010)

Fig. 5. Enhanced nuclear translocation of PPARα in response to pravastatin via a PPARα-PGL<sub>2</sub>-dependent pathway. A, translocation of PPARα in response to pravastatin treatment. Plasmid containing FLAG-PPARα was transfected into NRK-52E cells, and cell lysates were separated into nuclear and cytosolic fractions and probed with specific antibody against FLAG. Representative results from two independent experiments are shown. Scanning densitometry was used for semiquantitative analysis to compare against β-actin. \*,  $p < 0.05$  compared with sham treatment. B, subcellular localization of FLAG-PPARα in pravastatin-treated NRK-52E cells. B, parts A and B, in control cells without pravastatin treatment, most of the FLAG-PPARα was located in the cytosol. B, part C, after pravastatin treatment, PPARα was translocated from the cytosol to the nucleus. B, part D, nuclear translocation was decreased by pretreatment with the COX-2 inhibitor NS-398. Scale bar, 200 μm.

## 外部データの判別結果

GEO Accession	化合物	用量	時点	Positive Probability		判定
				<i>vitro</i> モデル	<i>vivo</i> モデル	
GSE14712	WY	60mg/kg	1d	-	0.990	P
	WY	60mg/kg	3d	-	0.986	P
	WY	60mg/kg	7d	-	0.995	P
GSE24363	BBZ	25mg/kg	24hr	-	0.038	N
	BBZ	75mg/kg	24hr	-	0.015	N
	BBZ	250mg/kg	24hr	-	0.000	N
	MCT	10mg/kg	24hr	-	0.008	N
	MCT	50mg/kg	24hr	-	0.005	N
	MCT	300mg/kg	24hr	-	0.000	N
	TAA	15mg/kg	24hr	-	0.006	N
	TAA	50mg/kg	24hr	-	0.000	N
	TAA	150mg/kg	24hr	-	0.000	N
GSE8302	WY	10μM	24hr	0.994	-	P

*in vivo*

*in vitro*

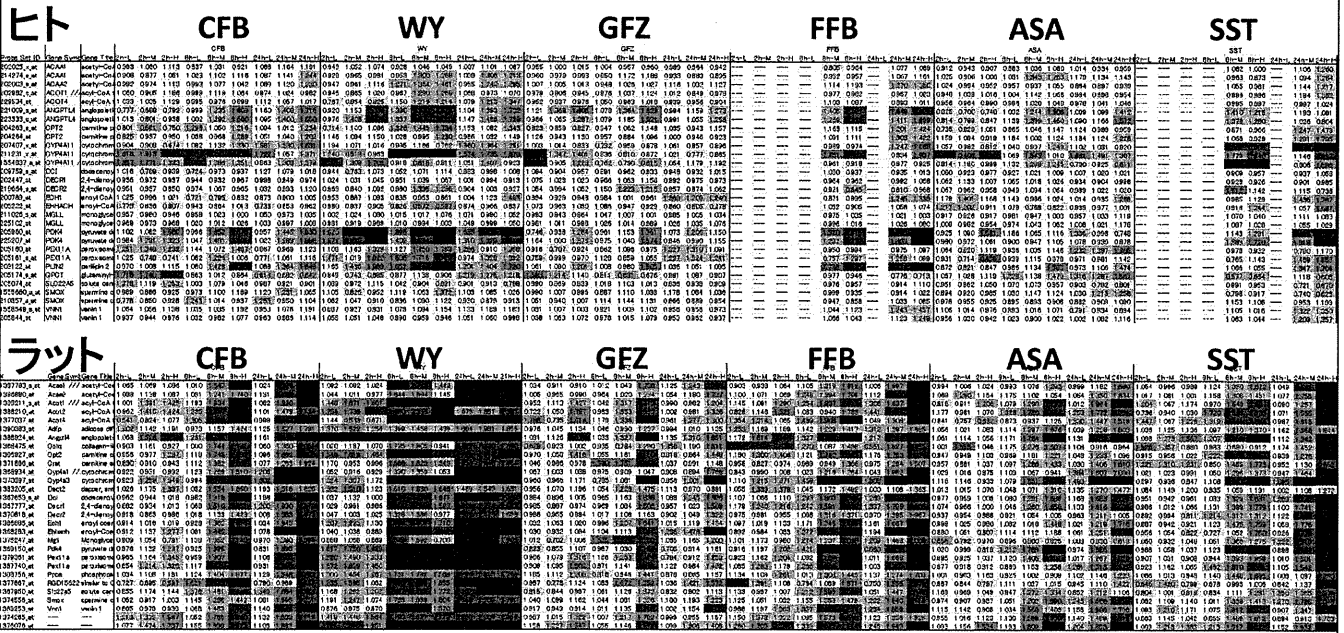
NCBI GEOから各データセットのCELファイルをダウンロードし、TG-GATEsのデータと同様にデータ処理後、判別モデルにかけた。ピンク:陽性化合物, 水色:陰性化合物

*In vivo, in vitro*モデル共に外部データにも適用可能.

# ヒト肝細胞におけるマーカーの検討

ラットの29プローブセットのオアソログ:

39プローブセット→信頼性の低そうなものを除いて30プローブセット  
シグナル値の対照群に対するratioで表し、ヒートマップにした。



いくつかの遺伝子はヒト肝細胞でも反応するが、ラットに比べて小さい

## ヒト肝細胞用マーカー抽出の方法

ヒト初代培養肝細胞の遺伝子発現データにおいて、PPARα agonistで共通に変動する遺伝子を抽出

使用化合物: clofibrate (CFB), WY-14643 (WY), gemfibrozil (GFZ), fenofibrate (FFB), valproic acid (VPA), benzbromarone (BBR), naproxen (NPX), mefenamic acid (MEF), diclofenac (DFNa), indomethacin (IM)

化合物処置: 8, 24h曝露, 対照群 + 中・高用量

データ取得: Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0, MAS 5.0を使用.

データ処理: 全プローブセットのmeanを1とする(global (mean)補正).

max intensity < 0.01, all Absent, 対照群のCV 30%以上のプローブセットをそれぞれ除外.

対照群 vs 各用量でrank productを算出,  $p < 0.05$ のプローブセットを抽出.

10化合物中7化合物以上で同方向に共通変動した遺伝子を選択.

## SVMを用いた判別モデル構築

上記10化合物を陽性, 22化合物を陰性として学習. 抽出した遺伝子の  $\log_2$  ratio 値 (vs 対照群) を用いてSVMによる判別モデルに適用し, 変動倍率, U検定のp値, SVM Marginを統合したランキングに従いROCカーブのAUC最大となる遺伝子数に絞った.

UP:  
106  
DOWN:  
93

# ヒト肝細胞用マーカー検証の方法

TG-GATEsのデータに適用して判別し, 検証



PPARα活性化アッセイキット(EnBio RCAS for PPARα; 藤倉化成)の結果, ラットの結果, および文献情報と比較.

外部データに適用して判別し, 検証

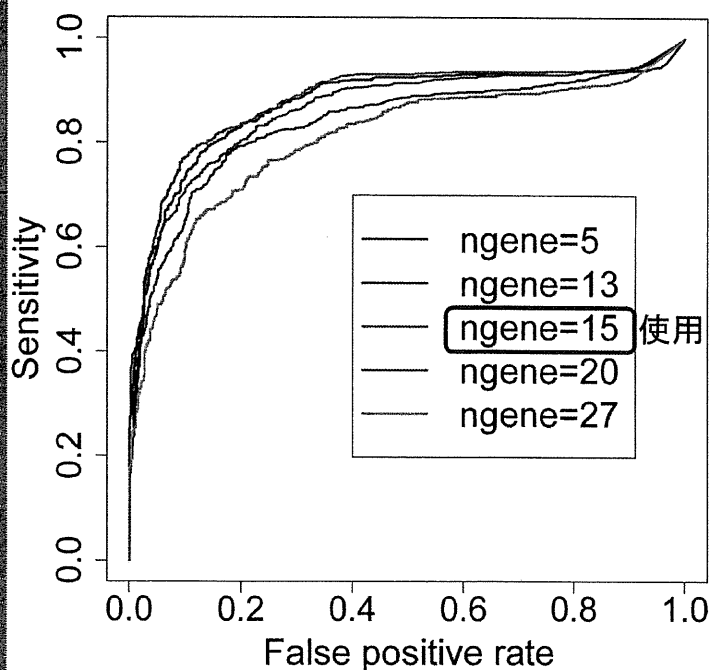
NCBI GEOのデータのうち, Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 arrayで取得された, 陽性化合物曝露後のヒト初代培養肝細胞の遺伝子発現データを用いた.

CELファイルをダウンロードし, TG-GATEsのデータと同様にデータ処理後, 判別モデルにかけた.

## 判別モデルの学習セットとROCカーブ

Compound_No	Abbr.	Compound_Name	Middle:24h	High:24h
00030	WY	WY-14643	P	P
00031	GFZ	gemfibrozil	P	P
00006	CFB	clofibrate	P	P
00021	BBr	benzbromarone	P	P
00005	VPA	valproic acid	P	P
00079	FFB	fenofibrate	P	P
00015	IM	indomethacin	P	P
00019	DFNa	diclofenac	P	P
00073	NPX	naproxen	P	P
00084	MEF	mefenamic acid	P	P
00001	APAP	acetaminophen	N	N
00028	APL	allopurinol	N	N
00010	AA	allyl alcohol	N	N
00018	CBZ	carbamazepine	N	N
00003	CCL4	carbon tetrachloride	N	N
00016	CPZ	chlorpromazine	N	N
00027	CMA	coumarin	N	N
00024	GPA	cyclophosphamide	N	N
00023	DZP	diazepam	N	N
00013	ET	ethionine	N	N
00022	HCB	hexachlorobenzene	N	N
00002	INAH	isoniazid	N	N
00025	MP	methapyrilene	N	N
00007	MTX	methotrexate	N	N
00012	OPZ	omeprazole	N	N
00004	PB	phenobarbital	N	N
00026	PHE	phenytoin	N	N
00029	PTU	propylthiouracil	N	N
00071	HYZ	hydroxyzine	N	N
00083	EBU	ethambutol	N	N
00008	RIF	rifampicin	N	N
00017	TAA	thioacetamide	N	N

SVM+Mann-Whitney U-test



陽性 (10化合物) と陰性 (22化合物) の中, 高用量24hデータで学習させた.

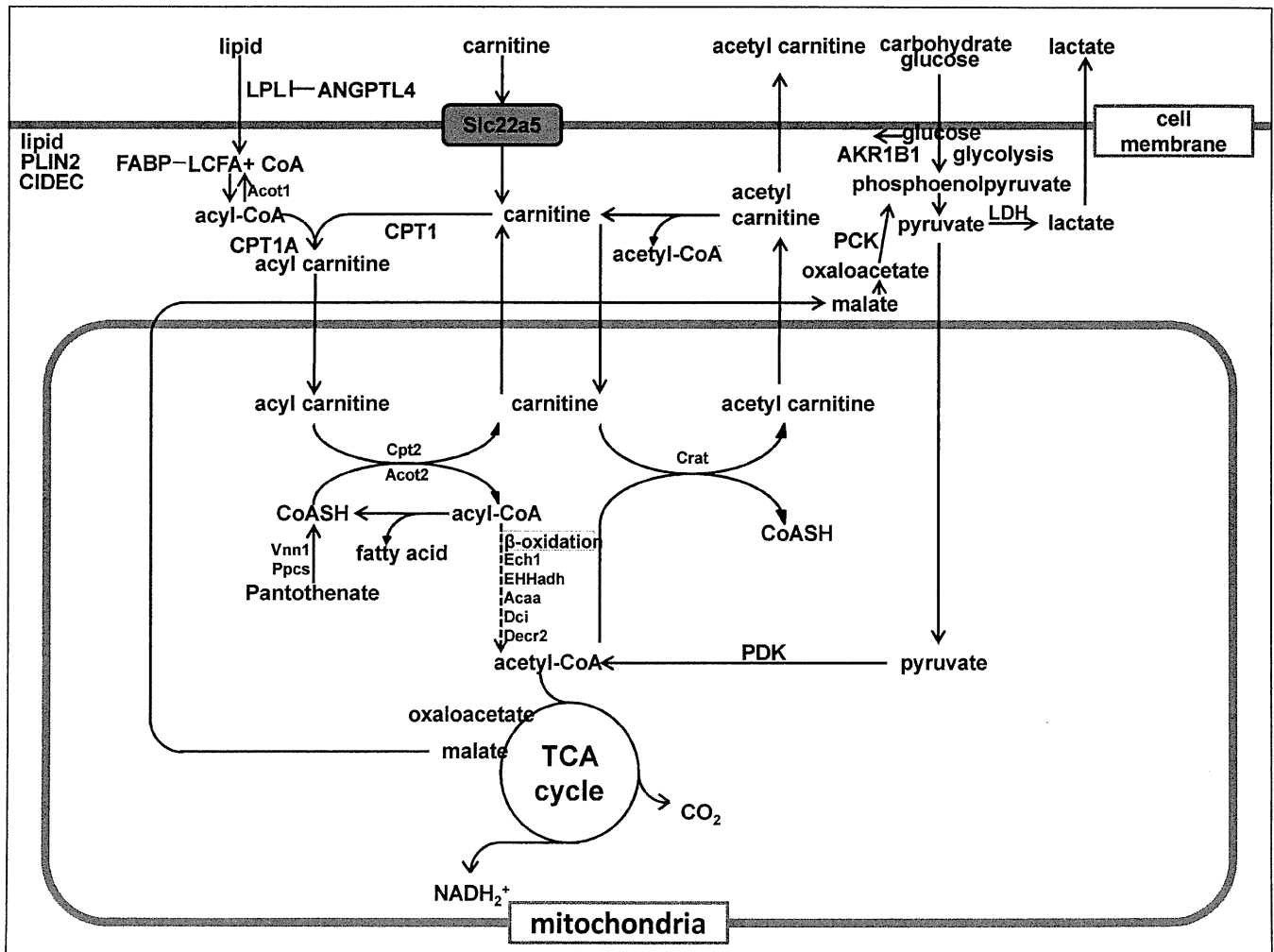
# 抽出されたマーカー遺伝子

以下の15プローブセット

ピンク:ラット29プローブセットに含まれる遺伝子

208383_s_at	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)
205892_s_at	FABP1	fatty acid binding protein 1, liver
225207_at	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
219398_at	CIDEc	cell death-inducing DFFA-like effector c
201272_at	AKR1B1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)
238982_at	DENR	density-regulated protein
221009_s_at	ANGPTL4	angiopoietin-like 4
221059_s_at	COTL1	coactosin-like 1 (Dictyostelium)
203633_at	CPT1A	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)
201010_s_at	TXNIP	thioredoxin interacting protein
207256_at	MBL2	mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)
209122_at	PLIN2	perilipin 2
225354_s_at	SH3BGRL2	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2
206292_s_at	SULT2A1	sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1
1553181_at	DDX31	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 31

脂質関連遺伝子が多く含まれる。ラット29プローブセットと共通のものもあるが、ラットの最終的なマーカーとは共通遺伝子なし。



# TG-GATEsデータの判別結果-1

化合物番号	化合物略称	化合物名	low			middle			high			hr
			2	8	24	2	8	24	2	8	24	
00030	WY	WY-14643	0.160	0.065	0.373	0.163	0.022	0.246	0.130	0.000	0.000	
00031	GFZ	gemfibrozil	0.144	0.126	0.217	0.112	0.247	0.302	0.112	0.000	0.000	
00006	CFB	clofibrate	0.078	0.171	0.352	0.117	0.485	0.000	0.135	0.000	0.000	
00021	BBr	benzbromarone	0.146	0.181	0.284	0.144	0.396	0.000	0.220	0.003	0.013	
00005	VPA	valproic acid	0.095	0.205	0.366	0.222	0.273	0.000	0.213	0.463	0.000	
00079	FFB	fenofibrate	NA	NA	NA	NA	0.226	0.000	NA	0.000	0.000	
00015	IM	indomethacin	0.160	0.430	0.340	0.155	0.000	0.000	0.280	0.000	0.000	
00019	DFNa	diclofenac	0.100	0.124	0.147	0.116	0.372	0.486	0.160	0.153	0.000	
00073	NPX	naproxen	NA	NA	NA	NA	0.000	0.000	NA	0.000	0.000	
00084	MEF	metenamic acid	NA	NA	NA	NA	0.137	0.303	NA	0.046	0.024	
00001	APAP	acetaminophen	0.087	0.132	0.098	0.037	0.021	0.090	0.049	0.001	0.041	
00028	APL	allopurinol	0.086	0.143	0.107	0.080	0.208	0.114	0.043	0.116	0.073	
00010	AA	allyl alcohol	0.323	0.112	0.098	0.071	0.240	0.118	0.080	0.018	0.002	
00018	CBZ	carbamazepine	0.127	0.125	0.122	0.160	0.123	0.093	0.095	0.021	0.018	
00003	CCL4	carbon tetrachloride	0.121	0.056	0.090	0.216	0.085	0.125	0.108	0.095	0.077	
00016	CPZ	chlorpromazine	0.292	0.265	0.333	0.092	0.118	0.127	0.295	0.088	0.058	
00027	CMA	coumarin	0.083	0.158	0.290	0.112	0.237	0.230	0.063	0.115	0.251	
00024	GPA	cyclophosphamide	0.087	0.222	0.064	0.123	0.175	0.114	0.070	0.069	0.139	
00023	DZP	diazepam	0.216	0.079	0.061	0.139	0.023	0.038	0.158	0.002	0.002	
00013	ET	ethionine	0.076	0.036	0.008	0.046	0.022	0.077	0.063	0.005	0.093	
00022	HCB	hexachlorobenzene	0.185	0.073	0.131	0.098	0.143	0.091	0.077	0.109	0.177	
00002	INAH	isoniazid	0.202	0.192	0.072	0.150	0.095	0.035	0.097	0.024	0.004	
00025	MP	methapyrilene	0.118	0.238	0.196	0.113	0.100	0.115	0.136	0.010	0.012	
00007	MTX	methotrexate	0.100	0.094	0.112	0.161	0.146	0.092	0.065	0.108	0.220	
00012	OPZ	omeprazole	0.111	0.076	0.052	0.100	0.065	0.064	0.066	0.003	0.000	
00004	PB	phenobarbital	0.213	0.080	0.099	0.262	0.079	0.017	0.214	0.003	0.000	
00026	PHE	phenytoin	0.222	0.128	0.142	0.116	0.110	0.216	0.231	0.033	0.094	
00029	PTU	propylthiouracil	0.178	0.196	0.142	0.155	0.052	0.372	0.264	0.006	0.002	
00071	HYZ	hydroxyzine	NA	NA	NA	NA	0.153	0.376	NA	0.125	0.132	
00083	EBU	ethambutol	NA	NA	NA	NA	0.083	0.227	NA	0.037	0.075	
00008	RIF	rifampicin	0.109	0.197	0.126	0.127	0.115	0.157	0.153	0.149	0.189	
00017	TAA	thioacetamide	0.117	0.062	0.250	0.208	0.070	0.220	0.174	0.085	0.250	

学習セット  
陽性

学習セット  
陰性

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5)

# TG-GATEsデータの判別結果-2

化合物番号	化合物略称	化合物名	low			middle			high			hr
			2	8	24	2	8	24	2	8	24	
00009	ANIT	naphthyl isothiocyanate	0.068	0.195	0.077	0.055	0.320	0.069	0.067	0.055	0.050	
00011	PhB	phenylbutazone	0.110	0.201	0.293	0.118	0.310	0.180	0.119	0.441	0.160	
00014	ASA	aspirin	0.055	0.158	0.063	0.079	0.280	0.079	0.057	0.000	0.389	
00020	NFT	nitrofurantoin	0.061	0.092	0.159	0.094	0.120	0.043	0.091	0.027	0.006	
00032	BBZ	bromobenzene	0.092	0.109	0.188	0.075	0.397	0.176	0.151	0.383	0.113	
00033	AM	amiodarone	0.154	0.088	0.156	0.173	0.124	0.200	0.177	0.171	0.094	
00034	SS	sulfasalazine	0.030	0.130	0.184	0.049	0.279	0.387	0.105	0.370	0.000	
00035	CIM	cimetidine	0.108	0.088	0.139	0.072	0.163	0.146	0.109	0.123	0.058	
00036	HPL	haloperidol	0.241	0.067	0.194	0.252	0.190	0.265	0.185	0.038	0.160	
00037	FP	fluphenazine	0.084	0.099	0.106	0.064	0.140	0.211	0.067	0.058	0.190	
00038	TRZ	thioridazine	0.133	0.139	0.138	0.136	0.207	0.151	0.090	0.072	0.035	
00039	ADP	adapin	0.135	0.126	0.126	0.061	0.211	0.146	0.042	0.037	0.050	
00040	LBT	labetalol	0.152	0.125	0.201	0.118	0.137	0.254	0.075	0.007	0.065	
00041	MTS	methyltestosterone	0.147	0.062	0.084	0.178	0.065	0.160	0.129	0.043	0.130	
00042	GBC	glibenclamide	0.104	0.080	0.127	0.132	0.152	0.397	0.179	0.487	0.000	
00043	GF	griseofulvin	0.140	0.317	0.153	0.140	0.205	0.072	0.235	0.207	0.042	
00044	FT	flutamide	0.097	0.251	0.050	0.087	0.107	0.030	0.046	0.004	0.001	
00045	PH	perhexiline	0.179	0.152	0.116	0.173	0.167	0.123	0.095	0.029	0.005	
00046	AZP	azathioprine	0.122	0.060	0.335	0.100	0.048	0.000	0.095	0.049	0.000	
00047	KC	ketoconazole	0.165	0.156	0.170	0.241	0.092	0.088	0.245	0.003	0.056	
00048	TC	tetracycline	0.216	0.109	0.234	0.060	0.113	0.166	0.083	0.089	0.111	
00049	LS	lomustine	0.080	0.084	0.091	0.130	0.074	0.066	0.204	0.093	0.095	
00050	CPX	ciprofloxacin	NA	NA	NA	NA	0.062	0.139	NA	0.080	0.158	
00051	PML	pemoline	NA	NA	NA	NA	0.065	0.107	NA	0.039	0.086	
00052	CMN	chlorzemanone	NA	NA	NA	NA	0.234	0.223	NA	0.193	0.417	
00053	MFM	metformin	NA	NA	NA	NA	0.080	0.167	NA	0.020	0.006	
00054	TMX	tamoxifen	NA	NA	NA	NA	0.153	0.304	NA	0.098	0.345	
00055	EE	ethinylestradiol	NA	NA	NA	NA	0.200	0.225	NA	0.171	0.183	
00056	MDP	methylropa	NA	NA	NA	NA	0.064	0.077	NA	0.064	0.105	
00057	MTZ	methimazole	NA	NA	NA	NA	0.054	0.094	NA	0.008	0.018	

ラット  
in vitro  
でも陽性

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5)

## TG-GATEsデータの判別結果-3

			low			middle			high			hr
			2	8	24	2	8	24	2	8	24	
			00058	MCT	monocrotaline	NA	NA	NA	NA	0.134	0.123	
00059	VA	vitamin A	NA	NA	NA	NA	0.189	0.202	NA	0.357	0.224	
00060	TAC	tacrine	NA	NA	NA	NA	0.072	0.230	NA	0.057	0.228	
00061	MXS	moxisylyte	NA	NA	NA	NA	0.127	0.185	NA	0.080	0.313	
00062	IPA	iproniazid	NA	NA	NA	NA	0.098	0.300	NA	0.017	0.102	
00064	CMP	chloramphenicol	NA	NA	NA	NA	0.022	0.035	NA	0.009	0.022	
00065	NFZ	nitrofurazone	NA	NA	NA	NA	0.166	0.081	NA	0.091	0.167	
00069	IMI	imipramine	NA	NA	NA	NA	0.106	0.105	NA	0.172	0.170	
00070	AMT	amitriptyline	NA	NA	NA	NA	0.100	0.162	NA	0.045	0.081	
00072	IBU	ibuprofen	NA	NA	NA	NA	0.252	0.236	NA	0.050	0.079	
00074	QND	quinidine	NA	NA	NA	NA	0.077	0.256	NA	0.026	0.355	
00078	FUR	furosemide	NA	NA	NA	NA	0.090	0.334	NA	0.009	0.255	
00080	CPP	chlorpropamide	NA	NA	NA	NA	0.093	0.166	NA	0.139	0.485	
00081	NIC	nicotinic acid	NA	NA	NA	NA	0.061	0.237	NA	0.016	0.236	
00082	EME	erythromycin ethylsuccinate	NA	NA	NA	NA	0.026	0.226	NA	0.049	0.074	
00085	FAM	famotidine	NA	NA	NA	NA	0.062	0.146	NA	0.039	0.127	
00086	RAN	ranitidine	NA	NA	NA	NA	0.178	0.074	NA	0.021	0.063	
00090	CHL	chlorpheniramine	NA	NA	NA	NA	0.092	0.220	NA	0.074	0.332	
00091	NIF	nifedipine	NA	NA	NA	NA	0.110	0.148	NA	0.020	0.046	
00092	DIL	diltiazem	NA	NA	NA	NA	0.236	0.084	NA	0.017	0.019	
00093	TAN	tannic acid	NA	NA	NA	NA	0.088	0.191	NA	0.029	0.129	
00094	CAP	captopril	NA	NA	NA	NA	0.077	0.282	NA	0.026	0.440	
00095	ENA	enalapril	NA	NA	NA	NA	0.072	0.190	NA	0.117	0.143	
00096	TEO	theophylline	NA	NA	NA	NA	0.012	0.002	NA	0.001	0.001	
00097	CAF	caffeine	NA	NA	NA	NA	0.129	0.080	NA	0.019	0.245	
00098	PAP	papaverine	NA	NA	NA	NA	0.013	0.062	NA	0.008	0.001	
00099	PEN	penicillamine	NA	NA	NA	NA	0.169	0.423	NA	0.028	0.222	
00100	SUL	sulindac	NA	NA	NA	NA	0.060	0.605	NA	0.003	0.000	
00102	DIS	disopyramide	NA	NA	NA	NA	0.044	0.590	NA	0.008	0.157	
00103	MEX	mexiletine	NA	NA	NA	NA	0.117	0.236	NA	0.047	0.170	

□ NSAID

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5)

## TG-GATEsデータの判別結果-4

			low			middle			high			hr
			2	8	24	2	8	24	2	8	24	
			00104	TIO	tiopronin	NA	NA	NA	NA	0.093	0.136	
00108	ACZ	acetazolamide	NA	NA	NA	NA	0.154	0.262	NA	0.171	0.206	
00109	DSF	disulfiram	NA	NA	NA	NA	0.147	0.090	NA	0.024	0.202	
00110	PMZ	promethazine	NA	NA	NA	NA	0.061	0.061	NA	0.019	0.207	
00113	COL	colchicine	NA	NA	NA	NA	0.009	0.001	NA	0.007	0.000	
00114	TLB	tolbutamide	NA	NA	NA	NA	0.367	0.313	NA	0.448	0.963	
00115	SLP	sulpiride	NA	NA	NA	NA	0.213	0.275	NA	0.034	0.261	
00116	ACA	acarbose	NA	NA	NA	NA	0.095	0.112	NA	0.127	0.182	
00117	SST	simvastatin	NA	NA	NA	NA	0.206	0.291	NA	0.167	0.656	
00118	AJM	ajmaline	NA	NA	NA	NA	0.215	0.195	NA	0.064	0.205	
00119	DTL	dantrolene	NA	NA	NA	NA	0.122	0.112	NA	0.160	0.151	
00121	CPM	clomipramine	NA	NA	NA	NA	0.033	0.134	NA	0.039	0.086	
00123	TBF	terbinafine	NA	NA	NA	NA	0.099	0.085	NA	0.048	0.047	
00124	MLX	meloxicam	NA	NA	NA	NA	0.084	0.110	NA	0.126	0.336	
00125	LNX	lornoxican	NA	NA	NA	NA	0.158	0.120	NA	0.205	0.241	
00126	CLM	chlormadinone	NA	NA	NA	NA	0.048	0.078	NA	0.034	0.006	
00127	DNZ	danazol	NA	NA	NA	NA	0.104	0.111	NA	0.003	0.000	
00130	BZD	benziodarone	NA	NA	NA	NA	0.072	0.081	NA	0.222	0.952	
00131	ETP	etoposide	NA	NA	NA	NA	0.110	0.196	NA	0.019	0.154	
00135	ETH	ethionamide	NA	NA	NA	NA	0.106	0.347	NA	0.025	0.119	
00136	NIM	nimesulide	NA	NA	NA	NA	0.317	0.247	NA	0.012	0.001	
00137	ETN	ethanol	NA	NA	NA	NA	0.030	0.072	NA	0.127	0.054	
00138	PCT	phenacetin	NA	NA	NA	NA	0.073	0.121	NA	0.044	0.119	
00139	BCT	bucetin	NA	NA	NA	NA	0.067	0.096	NA	0.194	0.161	
00140	NPAA	phenylanthranilic acid	NA	NA	NA	NA	0.233	0.144	NA	0.091	0.966	
00144	AAF	acetamidofluorene	NA	NA	NA	NA	0.061	0.168	NA	0.014	0.154	
00145	DEN	nitrosodiethylamine	NA	NA	NA	NA	0.108	0.142	NA	0.020	0.157	
00146	TCP	ticlopidine	NA	NA	NA	NA	0.121	0.128	NA	0.069	0.221	

□ ラット  
in vitro  
でも陽性  
□ NSAID

数字はprobability, ピンク:ポジティブ判定(probability>0.5)

## 外部データの判別結果

化合物名	用量 ( $\mu$ M)	時点 (hr)	Probability	判定 結果	GEO ID	TGP用量 ( $\mu$ M)	TG-GATEsデータで 陽性判定
WY-14643	50	6	0.876	P	GSE17251	6, 30, 150	2hr-H, 8hr-L&M&H, 24hr-M&H
WY-14643	50	24	0.992	P	GSE17251		
Atorvastatin	10	24	0.247	N	GSE24187	simvastatin: 6, 30	simvastatin: 24hr-H
Rosuvastatin	10	24	0.240	N	GSE24187		
Rifampicin	5	24	0.122	N	GSE24187	2.8, 14, 70	なし

NCBI GEOから各データセットのCELファイルをダウンロードし、TG-GATEsのデータと同様にデータ処理後、判別モデルにかけた。

ピンク:陽性化合物, 水色:陰性化合物, クリーム色:典型的PPAR $\alpha$ アゴニストではないが陽性が期待された化合物

スタチンでの陽性判定は出なかったが、用量不足の可能性も。  
WYとRIFは正しく判別された。



外部データにも適用可能。

## 小括

●ラット肝臓の*in vivo*, *in vitro*共通に利用可能なグレードIVのPPAR $\alpha$ アゴニストマーカーについて検証を行った。その過程で、PCAによる評価からSVMによる判別を用いた方法に変更し、*in vivo*, *in vitro*それぞれについて判別モデルを作成した。

●ヒト肝細胞についても発現変動遺伝子抽出後判別モデルを作成し、マーカーを選抜した。

●判別結果はラットについては*in vivo*, *in vitro*ともに非常に良好だった。ヒトはラットほどではないが、十分利用可能なレベルであった。いずれも外部データについても利用可能であった。

●マーカー遺伝子にはラットとヒトで共通のものはないが、いずれもPPARとの関連が既知の脂質関連遺伝子が多く含まれた。また遺伝子発現変動としては一部は共通している。



## まとめ

---

本分担研究で検証を行った各種マーカーはプラットフォームやデータ処理法を合わせる必要がある場合が多いものの、ほとんどが外部データについても有効であった。

これらのマーカーを組み合わせると一度の実験で多くのフェノタイプについて推定でき、新規化合物の毒性プロファイリングなどに有用と考えられる。

また未だ毒性メカニズムが明らかではない化合物のメカニズム解析にも役立つと考えられる。

分担研究総合報告書

創薬基盤としての分子毒性学研究

研究分担者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

実験動物のデータをヒトへ外挿し毒性予測をする際、外来化学物質代謝機能の種差が問題となる。SXR(マウスでは PXR)は代謝酵素の誘導を制御し、代謝機能調節に関わる重要な受容体であるが、そのリガンド選択性に種差が大きいことが知られている。

本分担研究では、ヒト受容体 SXR 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且つ、その受容体の発現調節機構が生理的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、ヒト SXR(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)を作製した。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 SXR(mSXR)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。

本マウスの SXRリガンドに対する反応のヒト型化程度を評価し、本マウスが今後毒性研究において有用なツールとして活用可能である事を検証した。マウス SXR に対する選択性が高いリガンドとして Pregnenolone-16alpha-carbonitrile(PCN)、及びヒト SXR に対する選択性が高いリガンドとして Rifampicin(RIF)を用い、SXR が機能していることがよく知られている肝、小腸について検討した。その結果、肝、小腸において既知の SXR 標的遺伝子である Cyp3a11 及び Ces6 の発現誘導パターンがヒト型化していることを確認し、本マウスが毒性研究における有用なツールであることを示した。

次に、本マウスの利用について、肝初代培養系(肝スフェロイド培養系)の適用性を確認するとともに、マウス個体の全身を対象とする毒性研究の性能の確認として多種臓器(肝、小腸、脳(海馬)、胸腺、肺、腎、精巣の合計 7 臓器)における Percellome 法を適用したトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、肝初代培養系においても PCN と RIF のヒト型化パターンが再現されることが確認できた一方、Phenytoin と Thalidomide は野生型、hSXRki ともに応答が弱く、Phenobarbital は野生型の方に強く作用する可能性がある結果であった。多種臓器のトランスクリプトーム解析においては、肝、小腸以外の臓器においては、SXR 活性化パターンを示す遺伝子はごく少ないという結果であった。しかし、SXR の発現が肝、小腸に限られるわけでは無いことを踏まえると、他の臓器における機能が予想されたため、米国カリフォルニア大アーバイン校と共同研究を行い、脾等での白血球細胞における SXR を介した生体作用を見出した。

以上、hSXRki を全身に生理的発現する本マウスは、ヒト SXR に対するリガンド特異性を反映するマウスとして、今後毒性研究における有用なツールとしての活用が期待される。

A. 研究の目的

経口摂取された化学物質は消化管から吸収され、門脈を経由し肝で代謝を受けた後、

或いは乳び管を経由して大循環に入る。小腸や肝には齧歯類では pregnane X receptor (PXR)、ヒトでは Steroid X Receptor (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、化学物質を極性物質に代謝し体外への排出を促進する酵素 CYP3A 等の発現誘導を制御することが知られている。

CYP3A は複数の医薬品の代謝における相互干渉の問題において特に重要視されており、治療効果減少や、毒性増強に関わるとされている。このような場合を含め、ヒト SXR(hSXR)とマウス SXR(mSXR)のリガンド選択性に大きな種差があることから、この受容体系の反応が毒性を左右する物質については、齧歯類を用いた試験結果からヒトでの毒性の予測は行えない可能性が指摘されている。選択性の高いリガンドの実例は Rifampicin (RIF) で、hSXR 系は活性化するが mSXR は活性化しない。このタイプの物質の毒性評価は通常のマウスを用いた試験からは困難であることになる。逆の事例に Pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN) が知られている。

ヒト型の反応を示すマウスの作製は、既に試みられている。初期のものに、hSXR 遺伝子をアルブミンプロモータ下に肝に強制発現させるトランスジェニックマウスがある。この場合、発現部位が肝に限定されることと、mSXR も発現していることから、ヒト型の反応性の有無を得るに留まるものとなっている。

mSXR と hSXR を比較すると、DNA 結合ドメイン (DBD) のアミノ酸配列は 95% 保存されているのに対し、LBD は 77% にとどまっている。ヒトとラットのキメラタンパク質を用いた解析により、LBD 内に種差を規定する領域が存在することが明らかにされており、ヒトの Leu308 とラット/マウスの Phe305 が重要であることが示されている。hSXR の結晶構造を元にした homology modeling により、これらのアミノ酸

は located within or neighboring the flexible loop that forms part of the pore to the ligand-binding cavity、即ち、リガンド結合ポケットの陥凹部分の一つで可動性のあるアミノ酸ループの中或いはその近傍のアミノ酸であることが示唆されている。実際に、このアミノ酸を置換することで RIF に対する種特異性が逆転する。これらの事から、mSXR の LBD を hSXR のものに変えることにより、ヒト型の活性化を示すマウスが作製されることは想像に難くなく、実際に、幾つかのノックインマウスが報告されている。しかし、それらは、相同組換え体の設計の問題から、hSXR の発現臓器が限定されている等の人工的な要素が加わっており、マウスを用いての、全身を対象とした網羅性を重視する毒性評価に利用する為には十分な特性を有していないことが考えられた。

そこで、我々は LBD の部分のみをヒト型化し、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。これにより、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、及び、転写開始点上流の配列が維持されることから、マウス本来の組織発現パターンとその誘導様態が保たれることを見込むものである。LBD のみをヒト型化したキメラタンパク質 (hSXR) をコードする cDNA を mSXR 遺伝子座の Exon3 に knock-in したマウスを作製し、そのマウスが実際に hSXR 特異的リガンドに対する反応を全身性に示したことを報告する。このマウスは hSXR を介した全身毒性の研究を行うための有用なツールとなると期待される。

## B. 研究の方法

### (1)hSXRki mouse の作出

マウス LBD の代わりにヒト LBD を持つ mhSXR chimeric protein 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作製するために、マウス SXR の intron2 から exon 3 領域の DNA をマウス BAC clone (BAC clone No. RP23-351P21) を鋳型に PCR (primer: BAC39486FW:CCATGGGTACCACGAA TAACAA,mSXR462RV:CATGCCACTCT CCAGGCA) にて増幅し、別途 PCR 増幅したヒト SXR の cDNA (primer: hSXR904FW: AAGAAGGAGATGATCATGTCCG, hSXR1887RVEcoRI: CCGAATTCTCATCATCAGCTACCTGT GATACCGAACA) と連結し、終始コドンより 3' 側に BGH (bovine growth hormone) 3' UTR を付加した。配列を確認した後、この cDNA を Cre enzyme による除去が可能な LoxP 配列で挟まれた Neomycin 耐性遺伝子を含むベクターに挿入し、相同組み換え用 long arm として exon 3 に対し 5' 側の intron 2 の KpnI 断片 7kbp を、short arm として 3' 側の exon8 から intron8 の PstI-EcoRI 断片 1.3kb を用い、ターゲティングベクターを構築した。制限酵素 SacII により直鎖化し、C57BL/6 と CBA の F1 由来の ES 細胞クローンである TT2 ES cells にエレクトロポレーションにて導入し、ネオマイシン耐性クローンを選択した。144 クローンを選択し、PCR によって相同組み換え体の選別を行って得た 10 クローン中の 6 クローンをサザンブロットングによって検討し、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。これら 2 クローンは ICR マウス卵を

用い、キメラマウスを作製し、生殖系列への移行を確認した。次に、#4 クローンについて、ネオマイシン耐性遺伝子を CAG-Cre マウスとの交配により除去し、得られたマウスを C57BL/6 CrSlc に少なくとも 6 回バッククロスし、ホモ体を得て以降の解析に供した。

### (2)リガンド反応性検討

Vehicle として corn oil+0.1%DMSO を用い、PCN は 20、70、200mg/kg、RIF は 10、30、100mg/kg を hSXRki マウス及び野生型マウスの雄に単回強制経口投与し、投与 8 時間後に脳(海馬)、胸腺、肺、肝、腎、小腸、精巣の 7 臓器を採取した。肝は小片を 5mm 径の皮膚生検用トレパンにて打ち抜き、RNA later に浸漬した。小腸は粘膜上皮のみを搔爬採取し RNA later に浸漬した。なお、臓器採取は十分に手順の効率化を図り複数人のチームにより実施することで時間を 2 分半～3 分/匹程度に維持し、mRNA 発現量の日内変動及び変性の影響を排除するよう努めた。

PCB 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。

### (3)Percellome 手法を適用した Total RNA の分離精製

組織は採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4℃ 一晩浸漬し、RNA 抽出操作までは -80℃ にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 $\mu$ l を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量