

## 「化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究」

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター毒性部長  
菅野 純



では、我々が実施しております、トキシコゲノミクスに関しまして、簡単に説明させていただきます。(資料:1)

これが、厚労省の化学物質リスク評価管理技術の高度化に関するスキームでございます。迅速、効率的なスクリーニングの開発という中にマイクロアレイ等を用いたトランスクリプトーム対象のものがございます。この様に対象物質はバラエティーに富んでおります。(資料:2)

化学物質イニシヤティブに登録させていただいている 2003 年度から始めましたものは、トキシコゲノミクスデータベースに基づくインフォマティクスを活用して、化学物質の安全性評価のためのより迅速、正確かつ安価な評価システムを構築することを目的としています。具体的な数値目標がございまして、核となるデータベースを 90 ないし 100 の既知化合物を対象にして、3 年以内に作成するというものでございます。

まず、代表的な物質を選び、マウスを用いて 1 化合物につき、時間経過、用量依存性、基本的には 4 タイミング、4 ドーズの 16 群、1 群 3 匹、合計 48 匹による非常に小型の実験を実施しております。(資料:3)

我々が開発しました、細胞 1 個当たりの平均コピー数でマイクロアレイデータを得る方法を用いております。現在使用中のマイクロアレイでは、1 化合物から 4 万 5,000 枚の用量時間曲面が得られます。これを基にしたデータベースを作ります。この曲面の形はバイオリジストにとって分かり易いデータでありまして、これをもって包括的なリスクアセスメントの糧にするということでありまして、選択する化合物は、医薬品、食品、添加物を始め多種多様でございます。今は肝臓を主に観察しておりますが、行く行くはその他の臓器に拡大し、また、いわゆる「死ぬ毒性」から得られる MTD や、LD<sub>50</sub> だけでなく、「死なない毒性」、あるいは今までは別の試験を実施していた、催奇形性や生殖毒性、内分泌かく乱化学物質問題の中心である受容体原性毒性に関わる様な事までを包括的に扱えるようになる事が目標でございます。このためには、従来型の有害性評価の限界を打破する必要に迫られました。それは、従来どおりにフェノタイプに縛られてしまうと、トランスクリプトームデータの解析が行き詰る場合があるということでありまして、そのために形質非依存的なアプローチをとる事にしたわけです。(資料:4)、(資料:5)

繰り返しのなってしまうますが、毒性所見の有無にかかわらず、網羅的に遺伝子データを採取し、データベース化するというのが今までと異なっております。

こうしますと、従来の毒性エンドポイントに加えて、分子レベルで見られないエンドポイントもデータベース化できるということでもあります。勿論、本研究班ではデータベース作成以外に、分担研究の形で違った切り口から情報を入れていただきまして、データベースの強化を図ります。個々の分担研究者にお願いしたテーマでございますが、発生、生殖、ストレス、肝細胞障害、免疫、その他代替法に関わるもの、変異原などです。(資料：6)、(資料：7)

基本的には我々が開発しました Percellome 手法を用いるという特徴がございます。(資料：8) この手法は、ホモジネートサンプルの中の核から来る DNA 情報をマイクロアレイに持ち込んで per cell の平均コピー数として計算できるようにするというものです。用量作用関係がきちんと取れるマイクロアレイを探したときに、こういう Liver-Brain Mix という5種類の、脳と肝臓のサンプルをお互いに薄め合ったサンプルを用意して、系の直線性を検定しました。(資料：9)、(資料：10)

Percellome 手法の特徴は、子宮肥大反応の様な場合に顕著に現れます。卵巣を摘出すると子宮が萎縮しエストロゲン投与により元に戻るという劇的な変化をするとき、無処置対照群をコントロールにした、いわゆるグローバル・ノーマライゼーションを実施しますと、統計処理をするものですから、変動しないものや減って見えるものが出ることになります。しかし、実際に細胞1個当たりで見ますと、殆ど全ての遺伝子のコピー数が増えている、こういうデータが取れるというものです。(資料：11)、(資料：12)

この Percellome 手法を用いて、遺伝子のカスケードの描出を今まで以上の精度で、倍率表示ではなく絶対値表示で、ゼロから幾つ増えたかと計算しデータベースを得ることができます。(資料：13)

概念的には、今までの毒性学が生体というブラックボックスを扱う際に、インプットの化合物とアウトプットの症状とを統計学的な回帰モデルで結んでいたのに対し、ここでは、ブラックボックスの中身を実際に遺伝子カスケードとして見たいということです。(資料：14)

今までに、VIP、いわゆる重要な遺伝子、これらは症状とリンクする重要な遺伝子で、これらのカスケード研究はあるのですが、ここでは、すべての遺伝子を見たいと考えています。その場合は、すべての遺伝子カスケードがフェノタイプを伴うわけもないので、フェノタイプは一度忘れましょうということでもあります。これを助ける要素としてノックアウトマウスを使う理由がありまして、ラットではなく、あえてマウスを採用しました。(資料：15)

標準プロトコルは、用量を4段階ないし5段階、時間を振ってコピー数との関係を調べています。この場合は48枚の GeneChip からのデータの表示例になります。(資料：16)

今、使っているマウスのマイクロアレイは、一度に4万5,000種類の遺伝子プローブセ

ットを測定しますので、この様な曲面が4万5,000枚描けます。そういうデータを取り扱うということになります。3年計画の半年が過ぎた段階で、大体45から50化合物が終わっており、3年計画で90ないしは100に到達するペースで計画どおりに進んでおります。

(資料:17)

どういうデータがどのように見えるかということで、ダイオキシンをマウスに投与したときの肝臓の遺伝子初期変化をお見せします。(資料:18)

表示法は、縦軸がコピー数、こちらが用量、こちらが時間、格子点が3匹の平均です。(資料:19)

これは有名なCYP1A1ですが、同じデータをどちらが見やすいかお選びいただくということで、二通りで表示してあります。(資料:20)

この様なデータ形式で検索を行うと、例えば、2時間目にしか変動しない遺伝子をあつという間に抽出できます。実際、4万5,000のうちから拾うと、実は十数個しかないということがすぐわかります。

こうすることで、データベースができ始めまして、将来に向けてコンソーシアムを考えた場合に、データの互換性を確保したいということで、いろいろ試してまいりました。鍵は、ここに示す用量相関性など基本性能が満たされれば、どんな系でも絶対量化できるということでありまして。(資料:21) CodeLinkチップやAgilent社の単色マイクロアレイについて評価中です。

2つの異なったプラットフォームで前述のLiver-Brain-Mixを1回測定すると、 $y=f(y)$ という関数が取れます。ですから、直線性が良く、両方にて測定されるプローブセットに関しては、個別に換算関数が得られるという直接的な形での互換性が取れるということですので。(資料:22)

同じ原理で、バージョンアップ前後間、1回増幅と2回増幅の系の間でも直接換算ができる遺伝子が見つかるようになります。これを拡張しまして、定量PCRに持っていくこともできまして、PCRの原理とチップの原理が全く異なる原理であるにも拘らず驚くほどそっくりのデータが取れました。(資料:23)

繰り返しになりますが、「一度フェノタイプを忘れなさい」と提案する理由は、例え話していうようになります。ウイルス性肝炎がA型とB型とnon-A、non-Bしかなかった時代は患者さんを3種類に分類していたのですけれども、ある日突然C型が出てくると、同じデータなのにそれを4種類に再分類することになる。マイクロアレイデータで考えると、先に既知のフェノタイプで遺伝子のクラスターを固めてしまうと、背後に隠れている未知の情報を埋もれさせてしまう危険があるということでありまして。(資料:24)

トランスクリプトームのクラスターを何らかの方法で、それだけの情報から先につくっておいて、それを現在知られているフェノタイプなどの情報とどういう関係にあるかを、後でオーバーラップさせる。そうすると新しい発見があると。これが私どもが提唱するフェノタイプを一度忘れてクラスタリングすることでありまして。

それには、曲面データである Millefeuille データが非常に我々にとっては、理解し易く、人の顔のモンタージュ写真で、似た人を集める感覚であります。(資料:25) こういうサーバーを立ち上げてうまくいっております。(資料:26)

ブラックボックスをいろいろな化合物で多方面から串刺しにしたときに、交点になっているクラスターが見つければ、そのクラスターは常に一緒に動く遺伝子のかたまりであるということで、あるカスケードの常連さんであるということがわかる、といったストラテジーで解析を進めております。(資料:27)、(資料:28)

今、成熟マウスのプロジェクトが動き出しておりますが、今後、吸入毒性、あるいは胎児毒性などに拡張して行く予定であります。(資料:29)、(資料:30)、(資料:31)、(資料:32)

EcoToxicogenomics の立場からも Percellome の展開が考えられます。(資料:33)

今後、恐らくエクソンアレイが出てきますと、スプライシングバリエーションも含めて定量化ができるだろうということになると思います。タイリングアレイは、ちょっと時間がかかると思います。(資料:34)

以上、お陰様でプロジェクトが順調に動き始めました。アフィメトリクス独占ではなくて、異なったプラットフォームのマイクロアレイ、定量PCRも含めて、細胞1個当たりのコピー数で比較できる状況がつくられつつあり、今後、コンソーシアム等々を構築するに当たり、Percellome 手法を使っただけならありがたい、という状況にあります。(資料:35)



資料 : 7

**探索的基盤の研究:**

【基礎研究- 機能的経路解析】

1. 発癌毒性に関わる遺伝子発現変動解析
2. 生殖毒性に関わる毒性発現メカニズム
3. 急性臓器毒性としてストレスシグナルに関わる毒性発現メカニズム
4. 幹細胞障害としての造血毒性の発現メカニズムに関する研究
5. 免疫毒性の一環としての胸腺毒性に関わる分子メカニズム
6. ヒト培養細胞アレイによる毒性インフォマティクス研究及び作用メカニズム研究
7. 代替法研究の一環としてのマウス等由来培養細胞による毒性メカニズム

【基礎研究- 遺伝毒性メカニズム解析】

8. 変異原性毒性の生体防御反応として検出の検討

尚、肝毒性については、網羅的発現解析の際に検討

2005-01-18 日本薬学会薬理学分会 同僚学講演会 化学物質の毒性メカニズムの予測, 60国立薬理研究所 大山記念ホール 11

資料 : 8

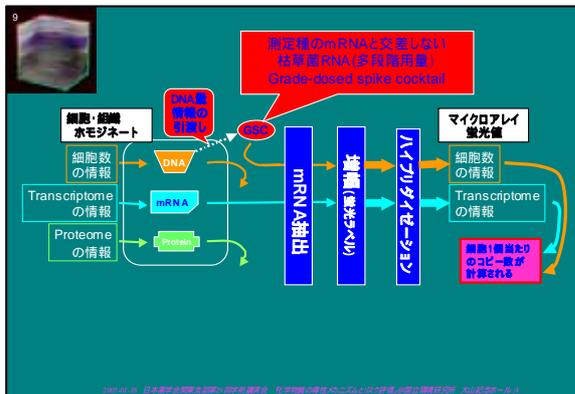
**Percollome 手法**

mRNA quantity data in a "per one cell" basis  
細胞1個当たりのコピー数としての  
遺伝子発現量

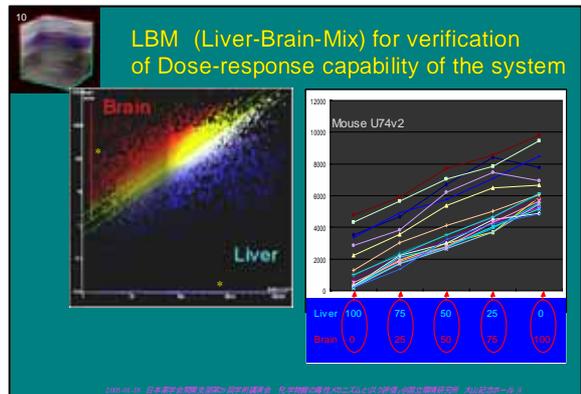
Normalization to cell number (genomic DNA)  
細胞数 (ゲノミックDNA) に対する標準化

2005-01-18 日本薬学会薬理学分会 同僚学講演会 化学物質の毒性メカニズムの予測, 60国立薬理研究所 大山記念ホール 11

資料 : 9



資料 : 10



資料 : 11

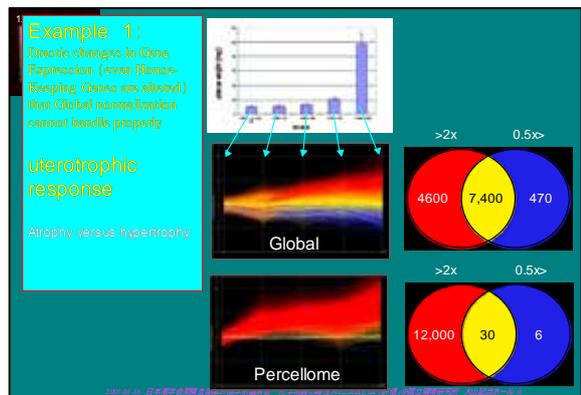
**Advantage of the Percollome Strategy**

Ovariectomy

Chemical (estrogenic) effect

2005-01-18 日本薬学会薬理学分会 同僚学講演会 化学物質の毒性メカニズムの予測, 60国立薬理研究所 大山記念ホール 11

資料 : 12



資料 : 13

13

- Percellome の目的
  - 遺伝子発現カスケードの描出・解析
    - 今までの倍率表示データの限界の克服
    - “Phenotypic Anchoring”の限界の克服

2005.01.18 日本薬学会関東支部の遺伝子発現学会 化学物質の毒性やリスクとリスク評価、毒理立証研究 大山記念ホール

資料 : 14

14

input Chemicals → Organism BLACK BOX Linkage by Regression Model → output Symptoms

Mechanism-based modernization

input Chemicals → Organism → output Symptoms

Cascade Database by All genes (not only “VIP” genes)

**Not all cascade accompanies phenotype**

2005.01.18 日本薬学会関東支部の遺伝子発現学会 化学物質の毒性やリスクとリスク評価、毒理立証研究 大山記念ホール

資料 : 15

16

### Gene Knock out organism

Cascade analysis:  
Gene Knock Out Mouse:  
→ null cascade:  
A very sharp “cut surface” of the “Black Box”  
A very Subjective “cut surface” of cascade meshwork

2005.01.18 日本薬学会関東支部の遺伝子発現学会 化学物質の毒性やリスクとリスク評価、毒理立証研究 大山記念ホール

資料 : 16

18

単回暴露実験プロトコール  
Single exposure protocol

- Dose: 0, 1, 2, 3
- Time: 2, 4, 8, 24 hr
- Exposure: single gavage
- Target: Liver (kidney, etc)
- n=3, separately applied to GeneChip

Acquisition: Percellome  
Display & Analysis: Millefeuille Software

1	0	2hr	3hr	3hr	3hr	3hr	3hr	3hr	3hr
2	1	2hr	4hr	8hr	24hr	2hr	4hr	8hr	24hr
3	2	2hr	4hr	8hr	24hr	2hr	4hr	8hr	24hr
4	3	2hr	4hr	8hr	24hr	2hr	4hr	8hr	24hr

2005.01.18 日本薬学会関東支部の遺伝子発現学会 化学物質の毒性やリスクとリスク評価、毒理立証研究 大山記念ホール

資料 : 17

19

### “Millefeuille” data by “Percellome”

- ひとつのprobesetに一枚の曲面  
One isoborogram for one gene (probesets)
- MOE430v2 GeneChip  
約 45,000 probesets / Chip
- 1化合物 = 45,000曲面  
共通の目盛りにプロット可能  
One chemical data = ~45,000 isoborograms plotted in a single 3-D graph

“ミルフィーユ (millefeuille)” data

2005.01.18 日本薬学会関東支部の遺伝子発現学会 化学物質の毒性やリスクとリスク評価、毒理立証研究 大山記念ホール

資料 : 18

### A Few Examples Example 1: TCDD full scale experiment

TCDD (TCDF) in corn oil  
0, 1, 3, 10, & 30 microgram/kg  
Oral gavage  
C57BL/6 CrSlc male, 12 wo  
3 mice per group  
Sampling timing:  
2hr, 4hr, 8hr, & 24hr

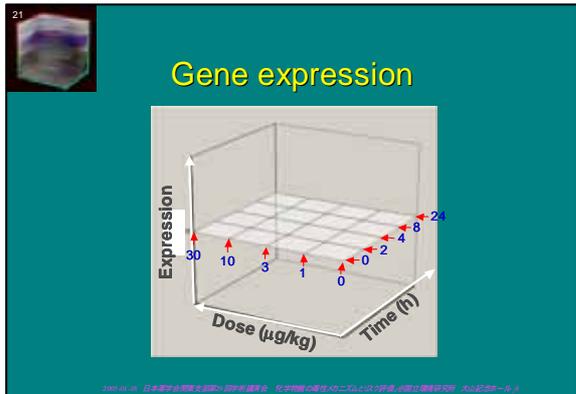
Total 20 groups, 60 mice

Organs:  
Liver  
Kidney  
Thymus  
Bone marrow (femoral)

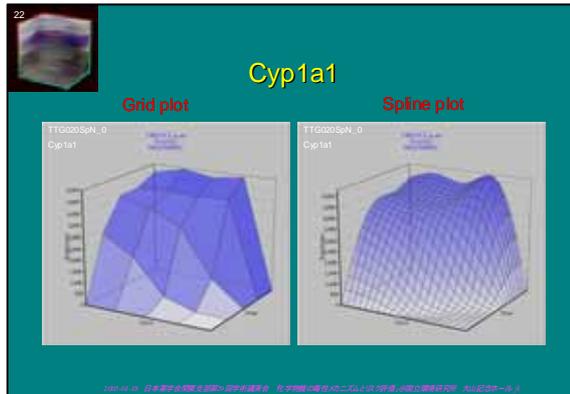
GeneChip analysis (MOE430v2)  
Liver

2005.01.18 日本薬学会関東支部の遺伝子発現学会 化学物質の毒性やリスクとリスク評価、毒理立証研究 大山記念ホール

資料 : 19



資料 : 20

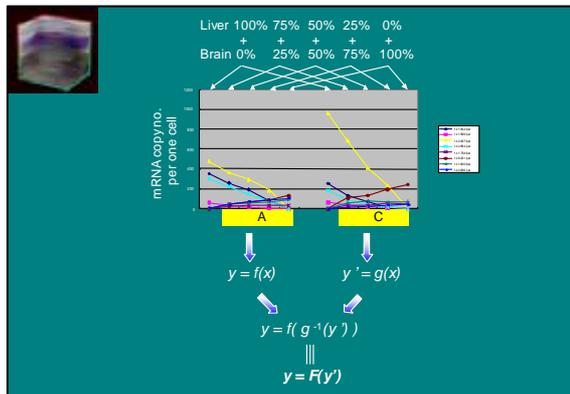


資料 : 21

### 大型データベース・コンソーシアム構築のための Percellomeによるデータ互換の促進

- Percellomeによるデータ互換が可能となるマイクロアレイ・PCRの条件
  - GSCを受け入れる
  - 直線性の良い用量相関性があること
  - 用量相関性が広いレンジで見られること
- LBM データを基に変換関数が求まる
  - 再計算が容易
- 現状
  - CodeLink マイクロアレイ
  - Agilent 単色マイクロアレイ
  - GeneChip の新旧バージョン間
  - IVTの1回増幅と2回増幅の間
  - Quantitative PCR (SYBRGreen)

資料 : 22



資料 : 23

### Percellome Q(RT)-PCR protocol

- DNase treatment
  - Enzyme: DNaseI (amplification grade, Invitrogen)
  - Reaction: 15min (room temperature)
- RT
  - Enzyme: SuperScript II (Invitrogen)
  - Reaction: 50min (42°C)
- real time PCR
  - Apparatus: 7900HT (ABI)
  - Chemistry: SYBR Green
  - Enzyme: SYBR Premix Ex Taq (ROX, Takara)
  - Reaction:
 

10 sec (95°C)	} 40 cycles
5 sec (60°C)	
60 sec (95°C)	

資料 : 24

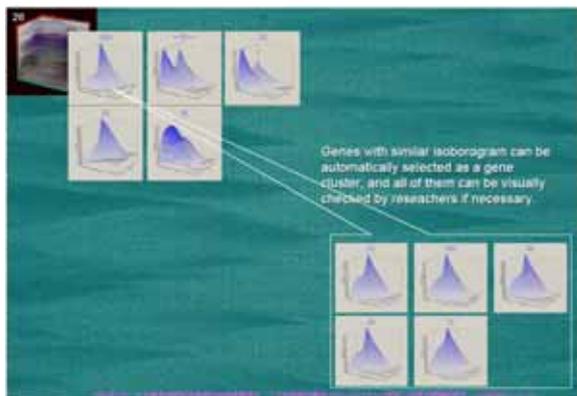
### Phenotype情報を用いない方法の必要性

たとえば: ウイルス肝炎

- ひと昔前: A型, B型, non-A non-B型
  - データを3通りに分類してきた
- 少し前: C型の出現
  - データを4通りに分類し直し

遺伝子発現情報は、未認識の「分類」を含んでいる。  
 一既知情報で分類してしまう弊害: 新分類の発見を阻害する

資料 : 25



資料 : 26

### MF Server

Windows2000 Server x 4  
Linux Grid (4Node) x 1  
RAID1 System x 3 (2.5TB)

with NTTComware and Teradata

資料 : 27

### 進捗、及び段階的貢献(情報還元)計画

- 進捗
  - 約50化合物データ取得済み(2004.12現在)
  - データストレージシステム構築(2.5TB: Teradata)
  - 完全教師なしクラスティングプログラム(共同研究開発: NTTComware)
  - Millefeuille Software System
- 段階的貢献
  - フィンガープリントの照合
    - 遺伝子発現のパターンの一致性から既知の化合物の毒性との照合: フェノール/ハルビタール型, など
    - 幾つかの典型的毒性パターンとの照合: 胆汁鬱滞パターン, など
  - メカニズムに基礎を置く(毒性評価)
    - カスケード抽出
      - 毒性毒性との理論的関連付け
        - 経断
        - 副作用問題(用量作用関係)
        - 種差
          - Mode of action
          - Mechanism of action

資料 : 28

### リスクアセスメント・規制決定への適応

- データの互換性
- 精度・安定性
- 共有(公共性)
- Percellome
  - データ互換
  - 再現性・比較性
- 国際的動向
  - WHO / IPCS WORKSHOP ON TOXICOGENOMICS AND THE RISK ASSESSMENT OF CHEMICALS FOR THE PROTECTION OF HUMAN HEALTH
  - OECD WORKSHOP ON TOXICOGENOMICS

資料 : 29

### Percellome Projects @

Division of Cellular and Molecular Toxicology,  
National Institute of Health Sciences

- Grant-in-aid of MHLW

資料 : 30

### Percellome Project

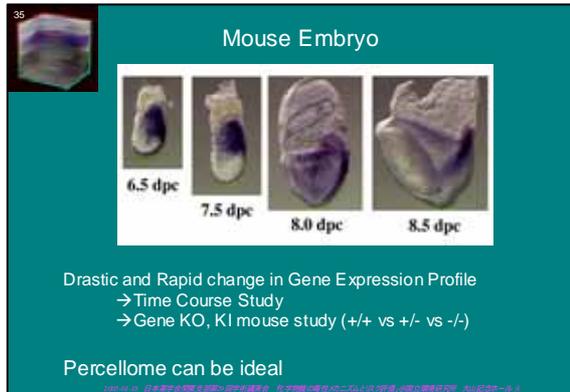
@ NIH/ BSR/ Division of Cellular and Molecular Toxicology

- TTG: Adult mouse, liver: Oral route
  - Single administration (2003-, 90-100 chem database by 2005)
  - Repeated administration (planned)
  - Gene knockout mouse
- ITG: Adult mouse, Lung & Liver
  - 2hr exposure (2004-)
- FTG: Fetus mouse
  - Basic data accumulation (Gene KO mouse embryo)(2004-)
    - Double IVT
      - Various developmental stages
      - Gene knockout mouse embryo
- Data Consortium:
  - Data Disclosure to Consortium Members (2004-)
  - Start of New Collaborations (2004-) incl. xenopus studies

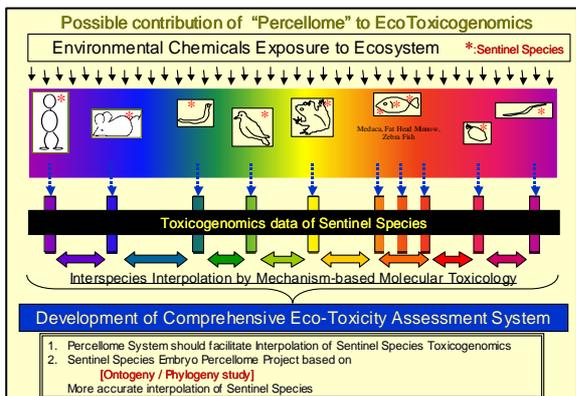
資料 : 31



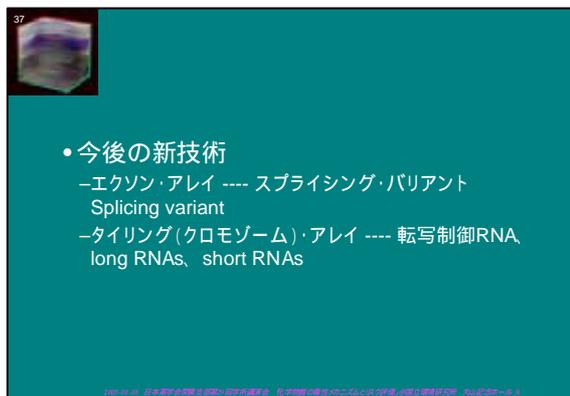
資料 : 32



資料 : 33



資料 : 34



資料 : 35

**Percollome 手法開発 (2001-)**

五十嵐 勝秀  
相崎 健一  
小野 敦  
安東朋子  
森山紀子  
近藤優子  
中村祐子  
安部麻紀

**Millefeuille Software**  
相崎 健一

**IT 共同研究**  
NTTcomware (Perdata)

**NIHS 創業支援 TG startup group (-2002)**

広瀬 明彦 (総合評価研究/BSRC/NIHS)  
鈴木 孝昌 (変異原/BSRC/NIHS)  
渋谷 淳 (癌毒/BSRC/NIHS)  
五十嵐 勝秀 (毒物/BSRC/NIHS)  
小野 敦 (毒物/BSRC/NIHS)  
相崎 健一 (毒物/BSRC/NIHS)

**化学物質トキシカミタス (Percollome) (2003-)**

相崎 健一  
五十嵐 勝秀  
中津 則之  
小野 敦  
児玉 幸夫  
小川 幸男 (ITG)  
北嶋 聡 (FTG)  
安東朋子  
森山紀子  
近藤優子  
中村祐子  
安部麻紀  
吉本健太  
松田稔恵  
青柳千百合  
森田純二  
今井あや子