

安全性評価のための肝毒性知識の体系化

—オントロジー工学に基づく機序解釈支援に向けて—

Ontology-based Knowledge Systemization for Interpreting the Mechanism of Liver Toxicity

山縣 友紀*1

Yuki Yamagata

五十嵐 芳暢*1

Yoshinobu Igarashi

中津 則之*1

Noriyuki Nakatsu

堀本 勝久*2

Katsuhisa Horimoto

福井 一彦*2

Kazuhiko Fukui

植沢 芳広*3

Yoshihiro Uesawa

山田 弘*1

Hiroshi Yamada

*1 医薬基盤・健康・栄養研究所

Toxicogenomics Informatics Project,
National Institutes of Biomedical
Innovation, Health and Nutrition
(NIBIOHN)

*2 産業技術総合研究所

Molecular Profiling Research Center for
Drug Discovery, National Institute of
Advanced Industrial Science and
Technology (AIST)

*3 明治薬科大学

Department of Medical Molecular
Informatics, Meiji Pharmaceutical
University

To understand the mechanisms of drug-induced liver injury, we have developed an ontological model for the liver toxicity. In this paper, we focus on safety assessment and propose an application system based on the ontology and the semantic web technology.

1. はじめに

医薬品開発では開発中止および市場撤退の主な原因として薬剤性肝障害があり、開発早期段階での安全性評価技術が要請される。毒性学とは化学物質などが引き起こす生体影響(毒作用)を科学的に明らかにする学問であり[日本トキシコロジー学会教育委員会 09]、近年 *in silico* 解析による毒性予測が期待され、機械学習を用いたバイオマーカーの候補の探索など、データ駆動型研究によるアプローチが進められている。これをさらにすすめる適切な安全性評価を行うには、機械学習等で得られた結果の根拠として機序との関係性を明らかにする事が必要となる。そのためには毒性の発現機序(メカニズム)そのものを把握する必要があるが、肝毒性の発現機序は複雑であり、様々な因子が関与することから全体像の把握が困難となっている。毒作用へ対処し適切な安全管理を行うためには、機序の本質を把握し、一貫性のある視点に基づき必要な知識を体系化していく必要がある。

このような背景から、本研究では肝毒性に関わる多種多様な知識を組織化し、肝毒性の知識基盤の構築を目指してオントロジー構築に取り組むとともに、機序を適切に表現する記述枠組みのモデル化を行っている。本稿では、これまでの取り組みについて報告する。さらに、応用研究としてデータ駆動型研究との連携による安全性評価と管理への適用について考察し、機序解釈支援のための知識システムを提案する。

2. 肝毒性知識の体系化

2.1 オントロジー構築の概要

薬剤は生体にとっては異物(Xenobiotics)であることから、体内で有害反応を引き起こすというリスクが存在する。一方、生体においては、細胞小器官、細胞、器官など様々な構造物や分子がホメオスタシス維持のための役割を担っている。肝毒性機序を把握するためには、これらの多様な生体構成要素の薬剤

に対する防御反応からホメオスタシス破綻における毒性発現プロセスまで一貫性をもって概念化できる手段が必要となる。そこで、注目した技術がオントロジーである。オントロジーとは対象世界に存在する概念を切り出し、それらの関係を記述するための基盤概念の理論であり、知識背景を明示し、対象の捉え方を規定することで知識の体系化のための共通基盤構築に貢献する。図1に現在構築を進めている肝毒性オントロジーの全体像を示す。最上位は持続物(Continuant)(図1左)と生起物(Occurrent)(図1右)に大別でき、持続物は3次元空間の存在物、いわゆる「モノ」を指し、生起物は時空間上の存在物である「コト」を示す。これら分野独立の一般概念は、哲学的思考に基づいて構築された上位オントロジー-BFO [Arp 15] と YAMATO [Mizoguchi10] を参照することで客観性を確保している。オントロジーでは一般・特殊関係(is-a 関係)に基づいて下位概念を定義していくことで共通性や相違点を明らかにしながら知識を積み上げて体系化を図る。持続物の下位概念には、分子や化合物、細胞小器官や細胞、器官などの生体構造物、ヒトやラットの生物種等がある。これらは生命科学領域では汎用的な概念であり、バイオコミュニティでの知識共有と標準化を目指して開発されている既存のデータベースおよびオントロジー^{1,2,3,4}の定義の再利用を基本とした。生起物の下位概念にはプロセスが定義されている。本研究ではプロセスの下位を Primitive プロセスと複数のプロセスから構成されるプロセス系列に分け、プロセス系列の下位に毒性機序を定義することとした。さらに、持続物/生起物と別の分類軸として何かに従属することでしか存在できない従属的実在物があり、コンテキストに依存して変化するロールや、属性、特性などの性質に関する概念を定義している。ロールの下位概念には毒性機序の発現の過程で分子の果たす様々な役割を中心に概念化を行っている。オントロジーの構築は文献や教科書をもとにマニュアルアノテーションにより情報を抽出し、Protégé⁵を用いて記述を行っている。2018年2月1日時点でオントロジーには約6000の概念が定義されている。

¹ UBERON, <http://uberon.org>² ChEBI, <http://www.ebi.ac.uk/chebi>³ Gene Ontology, <http://www.geneontology.org>⁴ NCBI Taxonomy DB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>⁵ Protégé, <http://protege.stanford.edu/>

連絡先: 山縣友紀, 医薬基盤・健康・栄養研究所, 〒567-0047
大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8, Tel: 072-641-9826,
Fax: 06-6879-2123, E-mail: y-yamagata@nibiohn.go.jp



図1 オントロジーの全体像

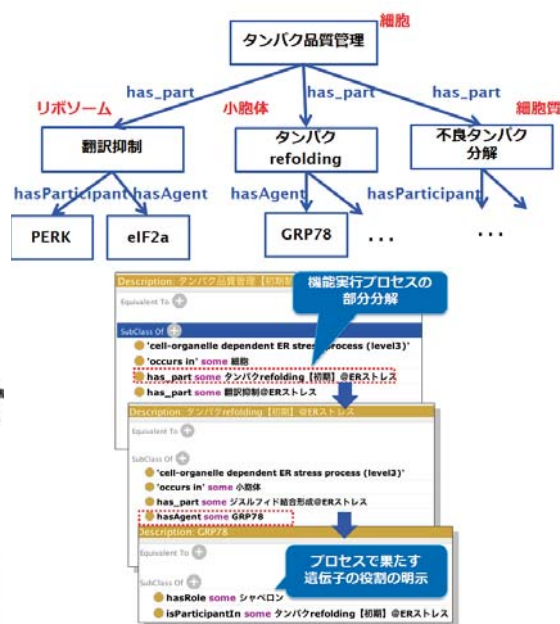


図2 細胞機能実行プロセスと部分分解例

2.2 作用機序と構成プロセスの概念定義の詳細

本節では毒性発現機序とそれを構成するプロセスの概念定義についての詳細を説明する。肝毒性発現機序は一般的な過程では、薬剤が標的部へ配送されターゲットに作用し、生体側では生体防御反応や適応を試みるが、細胞障害が起きることから毒性が発現するとされている[日本トキシコロジー学会教育委員会 09]。したがって、機序は複数のプロセスが組み合わせられた一連の流れとして捉えることができることから、本研究では毒性発現機序について「毒性発現に至るまでに引き起こされる生体プロセスの間の因果関係の組み合わせ (因果連鎖)」として定義する。オントロジー階層では、プロセス系列の下位概念として毒性発現機序の概念化を行い、さらに、その下位に小胞体ストレス (ER ストレス)、グルタチオン枯渇、ミトコンドリア障害、リン脂質症等、機序テーマの詳細を定義することとした (図 1 右下)。

次に毒性機序を構成するプロセスについて説明する。機序の把握には、生体の構造と機能に対応付けたいうえでプロセスを客観的かつ一貫性をもって概念化する必要がある。そこで、本研究では機能概念オントロジー[来村 02]を参考に生体の機能発揮プロセスについて定義することとした。機能概念オントロジーでは、機能語彙体系の定義および機能的知識のモデル化を進めており、機能の発揮主体を「装置」(device)と呼ぶ。装置は全体-部分関係を持ち、ある装置はより小さな装置の組み合わせから構成され (システムと呼ぶ)、複数の部分機能発揮によってシステムの機能が達成される。そして、装置と装置に入出力された対象物の状態変化 (対象物のもつ属性の値の変化) から装置の機能を捉える。本研究では、細胞をシステムとして捉え、複数の装置 (部品) として細胞小器官から構成されるという全体-部分関係 (has_part 関係) をもとに、粒度毎の生体構造物の機能発揮プロセスを明らかにすることを基本方針とした。図 2 は、方針に従い細胞システムがどのように機能を達成するかについて記述した例である。ER ストレスでは薬剤が小胞体に蓄積し、その結果小胞体内でタンパクが折りたたまれずに不良タンパクが生成されることが知られている。それに対し、細胞システムでは「タンパク品質管理」機能を実行する。ここで、細胞の部品である細胞小器官に注目すると、小胞体では「不良タンパク refolding

(再折りたたみ)」、細胞質では「不良タンパク分解」という2つの部分機能発揮プロセスが起こり、これらの部分プロセスによって細胞システムとして品質管理が達成されることがわかる。また、不良タンパクに反応する間、リボソームでは新たなタンパクの生成を抑制する「翻訳抑制」の部分プロセスも行われているが、これは機能オントロジーでは品質管理のためのメタ機能「補助貢献」に対応する。

2.3 プロセスに参加する分子とプロセスで果たすロール

分子は生体内では一般に生体内で複数の役割を担っていることが知られている。そこで、本研究では毒性機序を構成するプロセスに参加する分子を同定するとともに、その分子がプロセス内で果たす役割をロール概念として概念化することとした。例えば、タンパク refolding プロセスでは GRP78 が Agent として参加し、タンパクの再折りたたみを補助する「シャペロン」ロールを担う (図 2 下部)。

機能分解については、分子も装置とみなして分子の粒度まで部分分解するという手法も考えられる。しかし分子レベルではあまりに多くのプロセスが機序に関与することから機序の全体像の把握をかえって困難にする恐れがある。また、細胞構造から考えても細胞小器官以上を基本部品とするのが本質であると考えられる。そこで、部分分解については必要とされる場合のみ分子レベルのプロセスを詳細化することとした。

3. 作用機序の統一的表現記述枠組み

生体機序の理解を支援するには、知識の体系化に加えどのように知識を表現するかということも重要である。進行の過程の全体を適切に表現し、視覚化できれば、機序の理解を促進することが期待される。これまでに生命科学分野では既に KEGG⁶ や Wikipathways⁷, Reactome⁸ 等パズウェイデータベースが公開されているが、分子間相互作用の記述が中心となっており、細胞レベルの記述は少ない。また、いずれも毒性の観点で構築さ

⁶ KEGG <http://www.genome.jp/kegg>

⁷ Wikipathways <https://wikipathways.org>

⁸ Reactome <https://reactome.org>

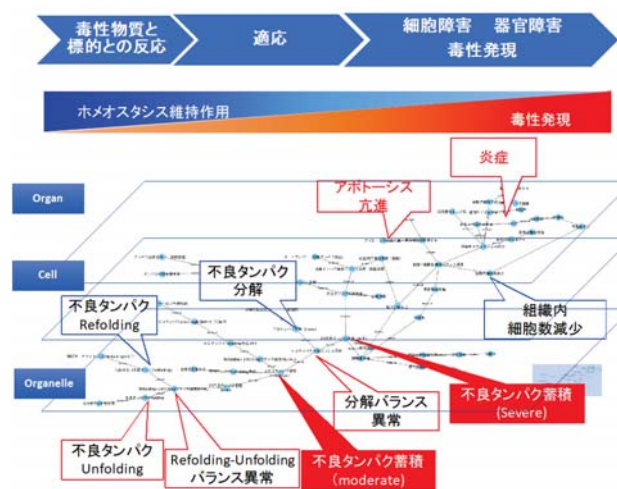


図3 作用機序マップ

れたものではないため肝毒性機序の過程を把握するには不十分である。そこで、本研究では作用機序を適切に表現するための記述枠組みとして「肝毒性作用機序マップ」を開発することとした。本マップはオントロジーで構築した概念をもとに、1つの肝毒性作用機序テーマに対し、毒性発現に至る過程において生体で起こりうるプロセスをノードとし、因果関係をエッジで表現することで、機序の全体像をグラフ形式としてモデル化する。さらに毒性発現の過程について、本研究ではバランス異常の考え方を導入し[Mizoguchi 11]、毒性の進行過程において、1) 毒作用としての機能要求プロセスと、2) ホメオスタシス維持のための機能発揮プロセス、そして 3) それらのバランス異常から 4)アウトカムとして生体構造物の機能障害が起こる各々のプロセスを可視化して表現することを基本方針とした。これまでグラフ表示ツール Cytoscape⁹を用いて 6 種の機序テーマのマップ記述を進めており。その一例として、ER ストレスのマップ表現を図 3 に示す。ER ストレスでは、不良タンパク Unfolding とタンパク Refolding のバランス異常の結果、不良タンパクが蓄積することがわかる。さらに、不良タンパクを分解しようと機能発揮するが、結局重度の不良タンパクが蓄積する。そして、その対処として、不良タンパクの蓄積した細胞を除去するために細胞レベルではアポトーシスが起こるが、アポトーシスも亢進しすぎると組織内の細胞数を減少させる毒作用として捉えられる。また、生存のための防御反応といえる炎症が、器官レベルでは肝の器質的変化として肝線維化を引き起こす可能性があることがマップによって把握可能である(図 3)。

このように、機序マップでは細胞や細胞小器官自体の適応のための機能発揮プロセスも、一段粒度の大きいレベルからみると毒作用となるということが理解できる。従来のパスウェイデータベースでは分子間相互作用の可視化が主であったが、本研究ではオントロジーで定義された概念に基づいて統一された記述枠組みで細胞や細胞小器官レベルのプロセスを表現することで、毒性発現までの過程が粒度毎に把握しやすく、機序の理解のサポートに大きく貢献する。

4. 応用研究

オントロジーを用いれば知識を適切に計算機処理できることから、基盤技術として様々な応用が期待できる。本節ではデータ駆動型研究の結果に対するオントロジーの適用例をもとに、

安全性評価および安全性管理に貢献できるか考察し、今後の機序解釈支援型知識システムの実現に向けた検討を行う。

4.1 データ駆動型研究との連携による安全性評価

安全性評価において、適切なバイオマーカーの設定は重要課題となっている。特に、生体内 (*in vivo*)と細胞/組織培養系 (*in vitro*)の間での毒性発現の違いや生物種の違いが問題となっており、これらの差異を反映できるマーカーや、さらには生物種や実験系に依存しないマーカーを開発すれば創薬に大きく貢献すると考えられる。これまで我々はラットを用いた *in vivo* 実験モデル系とヒト初代培養細胞系 (*in vitro*)の各実験系を用いて化合物投与実験を行い、マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現プロファイルに基づき、機械学習により肝毒性マーカーとなりうる複数の候補遺伝子を選定してきた。今回、機械学習で得られたマーカー候補遺伝子について文献をもとに機序への関連性をアノテートし、意味内容をオントロジーで定義付けた後、マップへの表現記述を試み、本研究が安全性評価に貢献しうる記述能力を有するか、検証を行った。

In vitro マーカー候補遺伝子の検証

図 4 の赤い丸は ER ストレスについて、*in vitro* における機械学習で得られたマーカー候補遺伝子がどのようなプロセスに関わるか、マップ上で表示した結果を示したものである。培養細胞は、通常生体の変化の一部しか反映されないとも考えられているが、候補遺伝子は ER ストレスの毒性発現機序において、タンパク品質管理から下流の重度の肝障害のプロセスまで関与していることが明示され、それらの中には複数のプロセスに関わる遺伝子もあることが確認された。

In vivo と *in vitro* のマップ比較におけるマーカー候補遺伝子の識別性と共通性に関する検証

次に、ラット生体 (*in vivo*) への化合物投与実験についても、同様に機械学習で予測された遺伝子についてマップに反映し、*in vivo* と *in vitro* の間で比較を行った。その結果、両実験条件下で共通して予測される遺伝子があることがわかり、例えば、タンパク refolding プロセスに関与するシャペロンロールを果たす遺伝子群に共通性が見られた(図 4 左下)。また、*in vitro* 特異的に予測されたシャペロン遺伝子のうち、ある遺伝子はアポトーシス抑制因子としても働き、下流では腫瘍生成に関与するということが把握できる(図 4 中央から右上の点線枠)。このように、機械学習で予測された遺伝子について、マップを利用することで共通性や差異を可視化できることから、実験条件等を考慮した適切な評価やさらには両者のブリッジングへ貢献すると期待される。また、遺伝子についてオントロジーでは関与するプロセスやその役割、さらに進行過程を把握できることから、機械学習で得られた情報について生物学的根拠を示すことが可能となる。



図4 マップを利用した *in vivo*/*in vitro* 比較

⁹ Cytoscape <http://www.cytoscape.org>

我々は別のデータ駆動型研究として、数理解析によるパスウェイの順位相関等からの毒性予測も行っている。解析では化合物投与後の生理学的計測条件下、数理解析によって有意に出現するパスウェイを抽出し、順位相関解析を行っている。しかし、薬剤には本来の目的としての薬効作用もあるため、解析結果には毒性に関わるパスウェイ (Off-target) の他、薬効の延長上 (On-target) のパスウェイも含まれる場合がある。そこで、オントロジーに蓄積された毒性機序プロセスに関与するパスウェイとこれら数理解析で予測されたパスウェイとを比較することで、毒性機序に特異的なパスウェイと薬効上のパスウェイを識別できれば、安全性評価の精度の向上に貢献すると考えられ、今後検討していきたい。

ここで、オントロジーとデータ駆動型の連携は、オントロジーによる知識の体系化にも利点をもたらす。オントロジー内の各概念は教科書や文献からマニュアルでアノテーションを行っているため、質の高さは確保されるが、あくまでも人間のこれまで得た知識の集積である。そのため、未だ人間が認識していない情報をデータ駆動型研究が発見する可能性があると考えられる。データ駆動型研究で得られる特徴量などの情報について、一般化/特殊化、あるいは概念間の関係性をたどりながらその性質を検証し、新たな概念や属性として知識化することも安全性の評価という点において重要であると思われる。

4.2 機序解釈支援型知識システムの開発に向けて

オントロジーを基盤知識としてデータベース化することで、客観的かつ頑健な理論に支えられた知識の積み上げや知識管理が期待される。これに加え、実用面ではユーザーが肝毒性機序の把握するための関連情報を容易に活用できることが望ましい。そこで、オントロジーデータベースとセマンティックウェブ技術を用いた Web アプリケーションによる機序解釈支援のための知識システムを目指す。前節で考察した安全性評価に向け、システムではオントロジーをもとにした機序に関する説明文生成機能や機序可視化機能を基本仕様として備える。さらに、Linked Data 技術 [ヒース 13] を用いることで外部リソースの副作用情報や文献情報などを利活用し、創薬に必要な様々な知識を統合していきたいと考えている。加えて、システムでは機序解釈支援のための知識探索・推論機能を持たせたい。推論には SPARQL 検索に加え、OWL 推論機構を用いる予定である。機序については、原因プロセスの複数機序テーマ横断探索や、機序の後期段階で起こりうる毒性発現プロセスの推論、二点間の作用機序経路探索等を予定している。上位-下位概念や兄弟概念、全体-部分関係などオントロジーで定義された概念とその関係性に基づく共通性や違いからの説明や、多様な視点から機序解釈を支援することで、ユーザーが知見を深めることができるようなシステムとしていきたい。

5. まとめと今後の展望

本研究では、肝毒性発現機序の本質を理解するために肝毒性知識の体系化を目指したオントロジーの構築および機序を表現するための記述枠組みの開発について述べた。さらに、応用として安全性評価への貢献について議論した。

臨床では病理所見や血液学的検査の測定値である AST, ALT 等の変動等観測データから肝障害を判断している。本研究では顕性化前の早期段階から機序をたどることができることから、安全性管理においても有用な知見が得られることが期待される。図 5 は ER ストレスの機序の進行過程を示したものであり、ストレス応答プロセスが進行していく中でホメオスタシス維持プロセスに関する遺伝子発現の変化をモニタリングし、毒性発

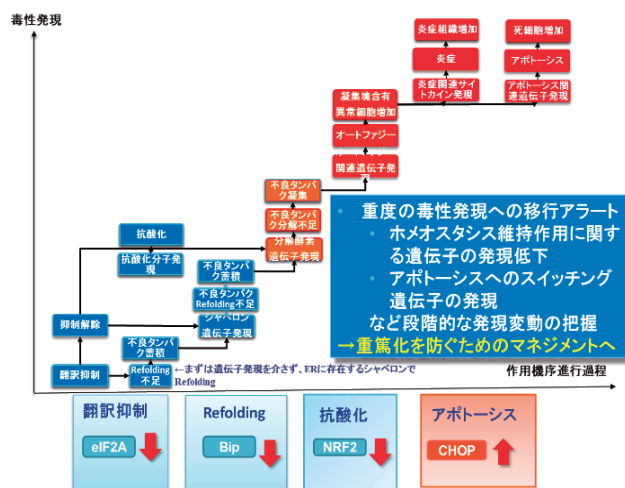


図 5 マップを利用した進行過程把握による安全性管理

現の指標としてアポトーシスへのスイッチング遺伝子の発現などをとらえていけば、ターニングポイントの把握が可能となる。さらに、発現プロセスの段階に応じた重篤化を防ぐための治療計画、あるいは新たな分子標的薬開発など毒作用への対処にも適用できると考えている。今後知識システムの実装をすすめ、創薬支援に役立てていきたい。

本研究は創薬分野の安全性評価の問題として扱っているが、その内容を汎化技術として拡張すれば環境等他の分野における安全性評価・管理にも有用であると考えている。本稿では、データに囲まれた社会において対象とする問題にどのように向き合い、内容を同定していくかという基礎的な考察から応用への実現に向けて議論した。データ駆動型研究の結果に対し、オントロジーが核となり俯瞰的な視野でデータの意味解釈を処理することで、データから高次知識へ変換し知識空間における位置づけを知ることができれば、新たな技術開発につながり AI 研究の進展に貢献すると考えている。

謝辞

本研究は、本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の創薬支援推進事業 (JP17nk0101103) の支援によって行われた。

参考文献

- [Arp 15] Arp R. et al., Building Ontologies with Basic Formal Ontology, MIT Press, (2015).
- [日本トキシコロジー学会教育委員会 09] 日本トキシコロジー学会 教育委員会編集, トキシコロジー, 朝倉書店, (2009)
- [來村 02] 來村他 : オントロジー工学に基づく機能的知識体系化の枠組み. 人工知能学会誌. Vol 17, No.1. pp.61-72 (2002).
- [Mizoguchi 10] Mizoguchi R: YAMATO: Yet Another MoreAdvanced Top-level Ontology, In Pro. of the Sixth Australasian Ontology Workshop, pp.1-16, (2010)
- [Mizoguchi 11] Mizoguchi R. et al.: River Flow Model of Diseases, In Proc. of 2nd International Conference on Biomedical Ontology (ICBO2011), pp.63-70 July 28-30, 2011, Buffalo, NY, USA, (2011).
- [ヒース 13] トム ヒース (著), クリスチャン バイツァー (著), 武田 英明 (監訳): Linked Data: Web をグローバルなデータ空間にする仕組み, 近代科学社 (2013)