

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立

所 属 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

研究者 井上 達

分担研究者

堀井郁夫 日本ロシュ 前臨床科学研究部

要旨

創薬過程での前臨床試験で予知困難にして特殊なアッセイ系でのみ検出可能であったような、造血器、特に造血幹細胞、或いは肝・腎などでの希少毒性を、cDNA マイクロアレイを用いて簡便に予知する方策について検討した。

1. 研究目的

本分担研究の目的は、創薬過程での前臨床試験で予知が困難で、特殊なアッセイ系のみではじめて予知可能であったような、造血器、特に造血幹細胞、或いは肝・腎などでの希少毒性を、cDNA マイクロアレイを用いて簡便に予知する方策を探ることにある。まず、造血細胞は、未分化な造血前駆細胞からさまざまな分化系列の細胞を含む。このため、従来の末梢血のモニターだけでは、潜在的な前駆細胞に局限した障害性を予知することが困難で、しばしば臨床試験に至って初めて認識されることが少なくなかった。また、肝細胞や腎臓の尿細管細胞の培養系を用いて毒性を予測する場合、従来の方法では特異酵素の逸脱やミトコンドリア活性を指標とした生存細胞数などをパラメータとしてきたが、この従来の方法では、1つまたは数種類のパラメータしか同時に評価できないので、そのメカニズムや標的に至る正確な細胞障害性の本質が見落とされがちであった。そこで、ここでは cDNA マイクロアレイを用いて考えられる障害性の可能な限り広範な対象を念頭に置いた網羅的な遺伝子発現を把握することによって、一見すると毒性指標とは思われないような遺伝子発現を若干上回る（下回る）ようなレベルの包括的な遺伝子発現影響を毒性発現スペクトラムとして把握し、これらを通じてメカニズムや標的の評価も視野に入れた、これまで見落とされがちであった多面的な毒性の評価を可能とする予知技術を確立する方策を探る。

造血毒性に関しては、国立衛研が中心となり、明らかな遺伝子毒性物質であるところのベンゼンの、野生型マウスにおけるエピジェネティックな発がん機構と、p53 欠失マウスでの遺伝子毒性発がん機構という、特異な白血病発症機構に着目し、ベンゼンの吸入暴露時の、造血前駆細胞の遺伝子発現変化を野生型マウスと p53 欠失マウスとで継時的に測定し、細胞動態関連分子を中心に関連遺伝子の検索を行う。本年度は、エピジェネティック発がんとしての白血病発症機構の背景にあると考えられる、ベンゼンの吸入暴露時の造血前駆細胞の細胞回転の停止と、暴露の中断による急速な細胞動態の亢進、並びに、野生型マウスにおける cDNA マイクロアレイ解析をすすめた。

肝・腎などでの希少毒性に関しては、日本ロシュが中心となって進めている。この研究の第1段階として、ラット実質肝細胞及び腎細胞の培養系において被験化合物に暴露し、遺伝子発現の変化を捉えることによって、肝毒性及び腎毒性の予測を行う場合に、培養による遺伝子発現の変化を把握しておくことは重要である。本年度は、ラット培養肝細胞の既知肝毒性物質による遺伝子発現変化を観察することを目的に、さしあたりラット肝から分離した実質肝細胞の培養条件及び培養期間による遺伝子発現の変化を調べた。すなわち、本実験では、最も簡単で広く行われているが肝臓に特異的な機能が低下するとされている I 型コラーゲンコートプレートでの単層培養、より肝臓での機能を保つと考えられる I 型コラーゲングル上での培養、立体的細胞構築が *in vivo* に近いスフェロイド培養について、遺伝子発現の違いを調べ、それぞれの培養に特異的な細胞の状態を把握することを目的に実験を行った。

2. 研究方法

A. 造血毒性

ベンゼン吸入暴露：

ベンゼン溶液（和光純薬）は 16℃ に加熱して、蒸気として、縦層流式吸入暴露チェンバー内の還流空気に混入させた。チェンバー内のベンゼンの濃度は、30 分ごとに、ガスクロマトグラフィー（GC-14A、島津）にてモニターした。

ベンゼンの暴露は、1 日 6 時間、週 5 日の、職業暴露を念頭に置いたスケジュールで暴露を行った。

チェンバー内は、温度 24±1℃、湿度 55±10%、1 日 12 時間毎の明暗周期を維持した。

被検マウスは、チェンバー内の金網ケージにて個別飼育し、水は紫外線滅菌したものを自由摂取させた。餌は、ベンゼン暴露中のみ絶食とした。即ち、ベンゼン暴露前に餌鉢を除き、暴露後に戻すことにより、餌へのベンゼン残留の可能性を排除した。

尚、対照群（擬似 sham 暴露群）は、ベンゼンを含まない還流空気による金網ケージ、縦層流暴露チェンバー内飼育をし、飲水、給餌などの条件は暴露群と全く同様とした。

個体内造血幹細胞動態解析法(BUUV 法)：

BUUV 法は、ブロムデオシキユリジン（Sigma, MO, USA）の浸透圧ミニポンプ（Alza, CA, USA）によるマウス個体への持続投与後、そのマウスの骨髓細胞を *ex vivo* で近紫外線を照射する事による細胞周期内細胞の淘汰と、その後のコロニーアッセイによる生残コロニーの比率によって周期内造血幹細胞比率を求める方法であり、造血幹細胞レベルでの細胞動態を正しく把握する従来にない解析手段である。

即ち、BrdUrd 溶液を充填した浸透圧ミニポンプを、マウスの背部皮下に移植して、細胞回転分画にある細胞を標識し、1～5 日後に大腿骨を採取する。この大腿骨を、27G 針を使って DMEM 溶液で洗浄し、中の骨髓細胞を単細胞浮遊液として回収する。4×10⁶ cells/mL の濃度に調整した細胞浮遊液を、平底の容器に 2 個に分注し、一方に近紫外線を照射し、他方はそのまま、培養性コロニーアッセイに供する。

培養性コロニーアッセイは、2×10⁴ cell/mL の細胞を、メチルセルロースを用いた半固形培地に、30% -FCS、1%-BSA、10⁻⁴ M-2ME、1ng/mL-GM-CSF を添加して、炭酸ガス培養装置（37℃、5%CO₂）で 6 日間孵置した後に、形成されたコロニーの数を、倒立顕微鏡下で計測する。紫外線照射の有無による生残コロニー数の比

率を計測し、周期内造血幹細胞比率とする。

ウエスタン解析：

被検マウスの骨髓細胞から、細胞溶解バッファー（20%SDS, 2mM-phenylmethanesulfonyl fluoride, 5mM-p-aminobenzamide, 2μM-leupeptin, 1.3μM-pepstatin）中で、超音波粉碎して粗蛋白溶液を抽出する。これを SDS-polyacrylamide gel で電気泳動し、Hybond polyvinylidene fluoride 膜（Amersham Life Science, UK）に転写し、細胞回転関連分子の特異抗体によって、泳動された蛋白中に含まれる当該蛋白量を測定した。

cDNA マイクロアレイ解析：

被検マウス骨髓細胞から、Trisol 溶液及びキアゲンのカラムを用いて、総 RNA を抽出した。曝露群から抽出した RNA には Cy5、sham 群から抽出した RNA には Cy3 でそれぞれ標識し、両者を混合して、Incite のマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせ、蛍光強度を計測し、曝露群の sham 群に対する遺伝子発現の相対変化としての結果を得た。検体は、経時的に、暴露開始 5 日後、暴露開始 12 日後、5 日×2 週間の暴露後休曝 3 日目に、それぞれ各群 3 匹、計 6 本の大腿骨から採取して解析した。

B. 肝腎毒性

肝細胞の分離：

雄 Sprague-Dawley ラット（6～8 週齢）をエーテル麻酔し、in situ perfusion 法により肝細胞を分離した。まず、門脈よりカニューレを挿入し、前還流液として 0.19 g/l の EGTA を含む Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Ca, Mg free で約 5 分還流後、0.5 g/l コラゲナーゼ、50 mg/l トリプシンインヒビターを含む HBSS で約 8 分還流した。肝臓を摘出後細胞を HBSS に浮遊させ、死細胞を除くために 35% percoll にて比重遠心を行い、沈降した細胞を実質肝細胞として用いた。細胞は Williams' E 培養液（10% FCS, 10^{-7} M インシュリン, 10^{-6} M デキサメサゾン含）に $1 - 6 \times 10^5$ cells/ml の濃度に浮遊させ、培養に用いた。分離した細胞は、均一な実質肝細胞の形態を示し、80%以上の viability を得た。

実質肝細胞の培養：

培養は、(1) I 型コラーゲンコートプレートでの単層培養、(2) I 型コラーゲングル上での単層培養、(3) 回転培養によるスフェロイド培養、の 3 種類を行った。(1) では、市販の I 型コラーゲンコートプレート (IWAKI) に実質肝細胞浮遊液 (2×10^5 cells/ml) を分注し、37°C, 5% CO₂, 湿潤条件下で培養した。(2) では、プレートの底に 2.6 mg/ml の I 型コラーゲングルを作製し、その上に実質肝細胞浮遊液 (6×10^5 cells/ml) を分注し、37°C, 5% CO₂, 湿潤条件下で培養した。コラーゲングルの作製には塩酸を含む低 pH のコラーゲン溶液に 10 倍濃度の minimum essential medium (MEM) を 1/10 容量加え、中性にした後で 37°C でインキュベートすることによりゲル化させた。(3) では、細胞接着を防ぐために poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA) コートしたプレートに実質肝細胞浮遊液を分注し、ロータリーシェーカー上に乗せ回転培養した。Poly-HEMA コートは、poly-HEMA を 20 mg/ml の濃度に 96% エタノール中に溶解し、6 穴プレートに 2.5 ml/well 分注後、クリーンベンチ内で静置することによって乾燥させた。Poly-HEMA コートプレートに実質肝細胞浮遊液 (1×10^5 cells/ml) を分注するし、37°C, 5% CO₂, 湿潤条件下で培養を行った。

RNA の分離：

各培養条件による遺伝子発現の違いを調べるために、分離直後の実質肝細胞、上記 3 種類の培養法で 1 日

から 3 日培養後の実質肝細胞について RNA の分離を行った。単層培養 (上記 1 および 2) では、培養液を除いた後に直接、分離直後およびスフェロイド (上記 3) では上清を除いた後に、セパゾール RNA I (ナカライテスク) を加え、ホモジナイズした。クロロホルムを加え、攪拌した後、水層 (上層) を採取し、イソプロパノールで沈降させ、75%エタノールで洗浄した。最後にペレットを RNase free 水に溶解し、電気泳動および吸光度により純度をチェックし、RNeasy column (QIAGEN) にてさらに精製した。

RNA から cDNA の合成 :

分離した RNA に、superscript II reverse transcriptase (GIBCO), primer, dNTP mix を加え、first-strand cDNA を合成した。更に、dNTP mix, E. coli DNA ligase, E. coli DNA polymerase I, RNase H, T4 DNA polymerase を加え、second-strand DNA を合成した。最後に、サンプルに PCI (phenol:chloroform:isoamylalcohol = 25:24:1) を加え攪拌した後に、Phase Lock Gel (light, Eppendorf) にて cDNA を精製した。

In vitro transcription labeling によるビオチンラベル cRNA の合成 :

合成した cDNA に biotin-label NTP mix, T7 enzyme mix (Ambion) を加え、in vitro transcriptin labeling を行った。その後、Chromaspin-100 DEPC column (Clontech) にて精製し、断片化を行った。

Gene chip への Hybridization および解析 :

Gene chip は、Affymetrix の Rat Toxicology U34 Array を用いた。断片化したビオチンラベル cRNA を含む hybridization mixture を gene chip に注入後に overnight で Hybridize した。gene chip を洗浄後、ストレプトアビジン R-phycoerythrin にて染色を行い、Affymetrix GCS/FS にて測定した。更に、ビオチン化抗ストレプトアビジン、ストレプトアビジン R-phycoerythrin 処理により増幅を行い、再び Affymetrix GCS/FS にて測定した。

3. 研究成果

A. 造血毒性

ベンゼン曝露による造血幹細胞の細胞動態の修飾 (BUUV 法による解析) :

まず、野生型マウスの造血幹細胞では、細胞動態を反映して、BrdUrd の標識率が経時的に増加し、培養性コロニーの場合は 6 日前後でプラトーに達した (図 1A)。これに対してベンゼンを曝露すると、標識率の増加は全く認められず細胞回転は停止に至ったものと考えられた (図 1B)。更に、ベンゼンの曝露を中止すると、急速に細胞回転は回復した (図 1C)。一方、p53 遺伝子欠失(KO)マウスでは、ベンゼン曝露による細胞回転の抑制は、殆どみられなかった (図 1D)。

ベンゼン曝露による細胞動態関連分子量の変化 (ウエスタン解析) :

細胞回転関連分子のうち p15、p16、p18、p19、p21、p27、CDK2、CDK4、CDK6 について、曝露開始 1 日から 12 日まで、それぞれの蛋白量を検討した結果、p19 が曝露直後に 2 倍程度に増加するものの曝露を続けると定常状態と差異が認められなくなること、p18 はむしろ曝露とともに濃度が低下するが、12 日後には回復してしまうこと、その他の分子は、p21 を除いては、あまり動いていないことがわかった。尚、p21 の発現については、ベンゼン曝露をはじめると、次第にその濃度が上昇し、12 日目には定常状態の約 15~20 倍に増加する (図 2A) が、曝露を休止すると急速に定常状態まで回復する (図 2B)。また、p53KO では、

この p21 の増加現象は観察されない (図 2B)。

ベンゼン曝露による発現遺伝子量の変化 (cDNA マイクロアレイ解析) :

ベンゼン曝露 5 日後、12 日後、及び、12 曝露終了後 3 日目の回復期において、それぞれ、sham 群に対する発現遺伝子変化を検討した。その結果、ベンゼン曝露中に発現が上がり、曝露終了後速やかに発現が低下するもの、逆に、曝露中は低下して曝露終了後速やかに上昇するもの、曝露期間中から上昇し曝露終了後も上がり続けるもの、などの種々のパタンとして認識される遺伝子の存在が観察された (図 3)。例えば、ベンゼン代謝物の骨髄での代謝を司る事が知られている *myeloperoxidase* は、曝露中は高く、曝露終了後速やかに低下した。他方、*cdk* 関連分子のホモログで、曝露中は低下して、曝露終了後速やかに上昇するものがみられた。

図 1

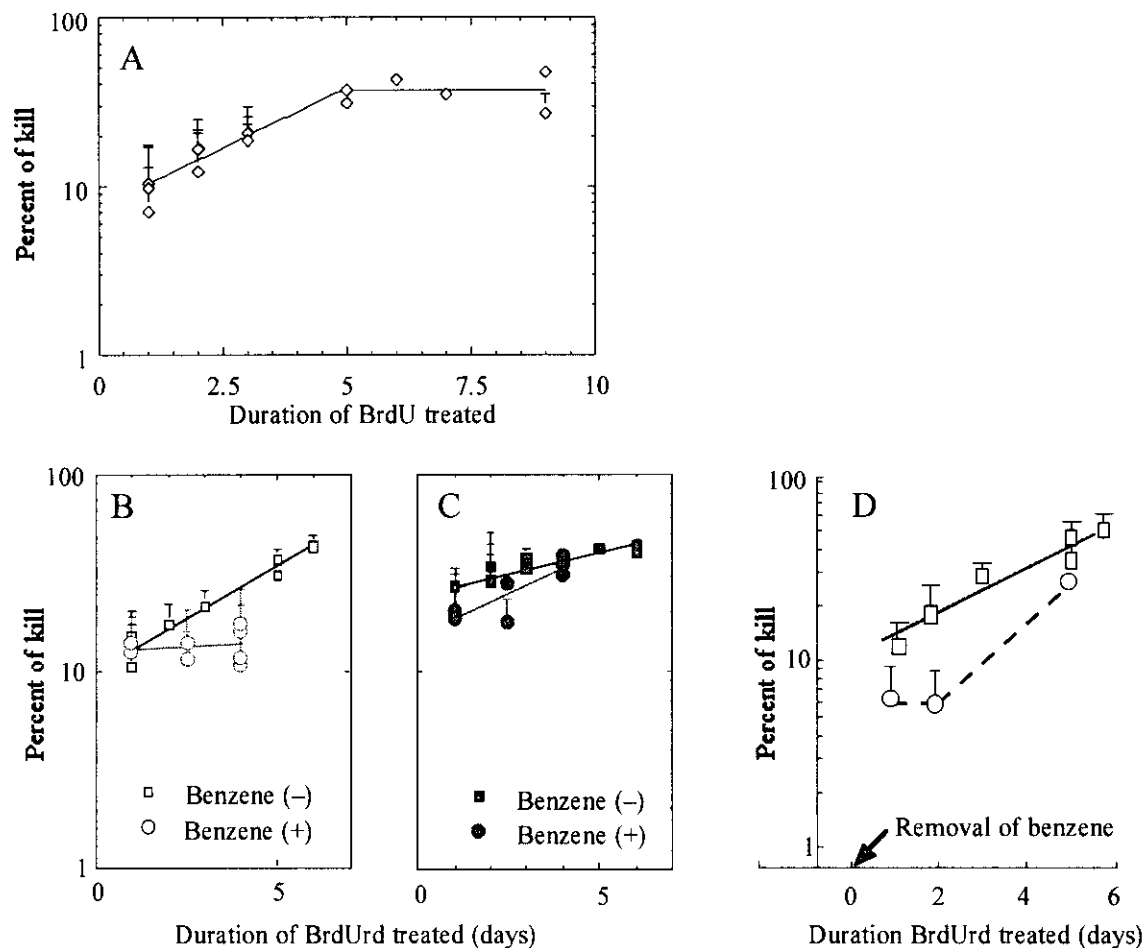


図 1 A: 野生型マウス由来 GM-CSF の細胞動態。 B: 野生型マウスでの、ベンゼン曝露中 (○) の GM-CSF の細胞動態。□は sham 曝露群の対照群。 C: p53 欠失マウスでの、ベンゼン曝露 (●) 中の GM-CSF の細胞動態。■は sham 曝露群の対照群。 D: 野生型マウスのベンゼン曝露終了後 (○) の GM-CSF の細胞動態。□は sham 曝露群の対照群。

図 2

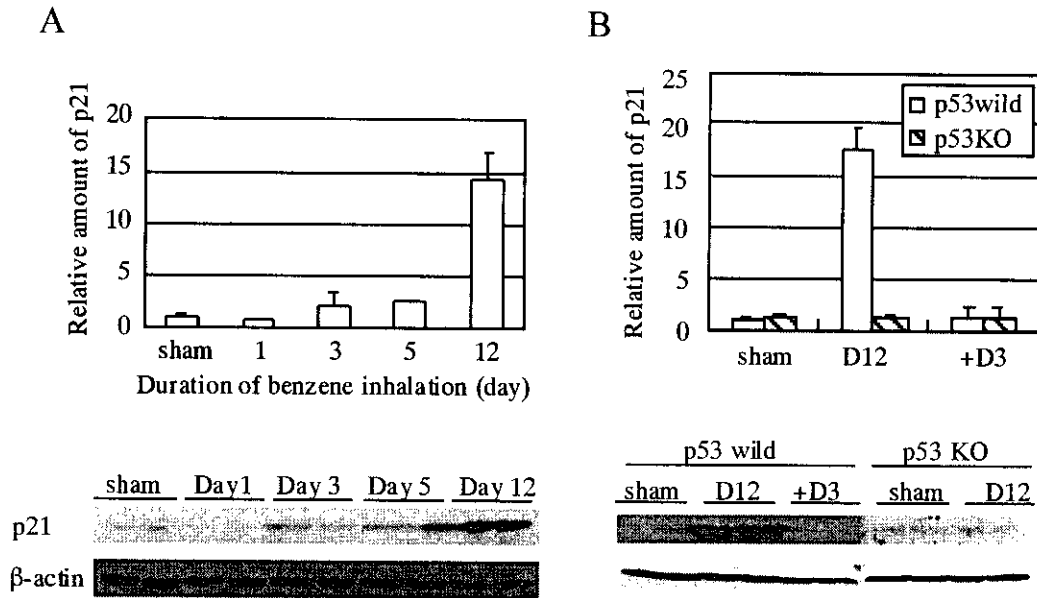


図 2 A : 野生型マウスの骨髓細胞のベンゼン曝露下での p21 蛋白量の経時的変化。B : 野生型マウスと、p53 欠失マウスのそれぞれの骨髓細胞の、ベンゼン曝露 12 日目の曝露直後(D12)と、曝露中止 3 日目(+D3)の p21 蛋白量。

図 3

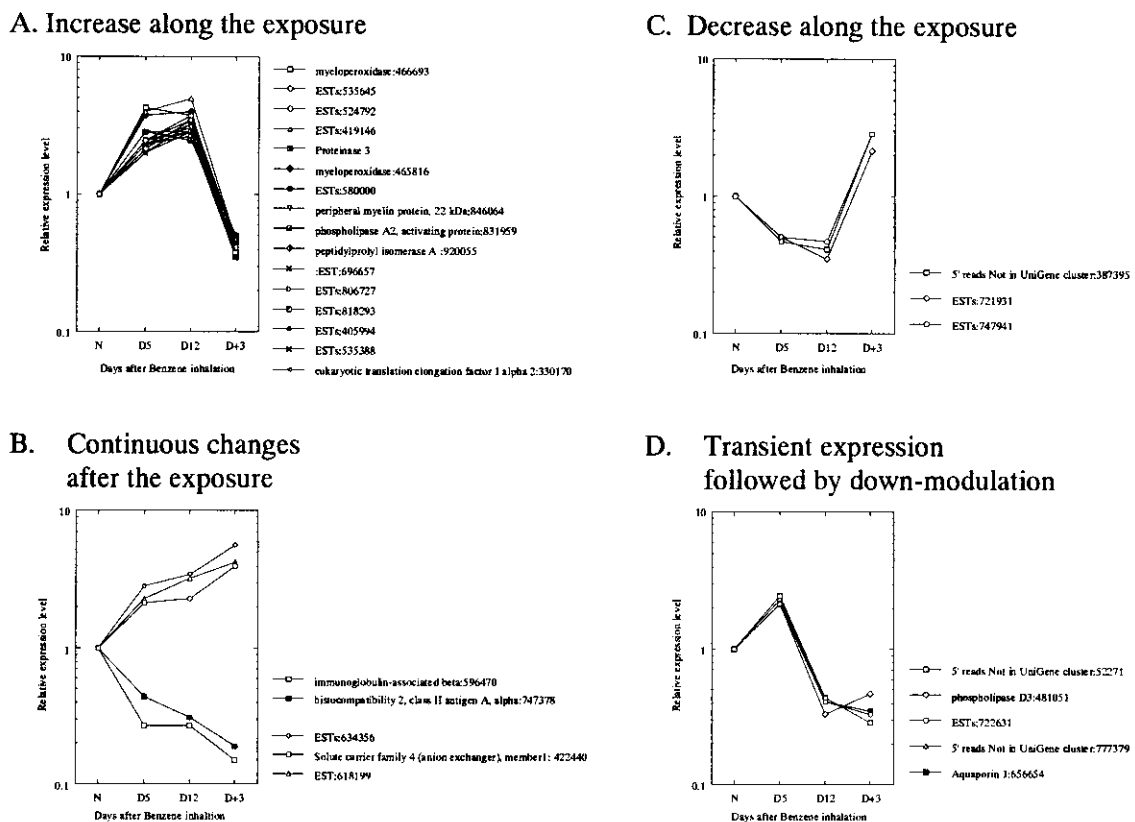


図 3 野生型マウスの骨髓細胞の、ベンゼン曝露 5 日後(D5)、12 日後(D12)及び、曝露中止 3 日目(+D3)に、遺伝子の発現量が変化した遺伝子群の例 (sham(N)群に対する相対比) A: 曝露期間中、発現が上昇し、曝露中止によって発現が低下する遺伝子群。B: 曝露期間中から曝露中止後 3 日まで、発現量が上昇ないしは低下し続ける遺伝子群。C: 曝露期間中、発現が低下し、曝露中止によって発現が上昇する遺伝子群。D: 曝露開始直後に一過性に発現上昇する遺伝子群。

B. 肝腎毒性

培養肝細胞の形態:

I 型コラーゲンコートプレートでの単層培養では、培養数時間後には、石垣状に細胞が接着し、単層の細胞層を形成した。細胞は薄く伸展しており、核、細胞内小器官等が観察できる状態であった。I 型コラーゲングル上での培養では、肝細胞はコラーゲングル上に単層に並んだが、コラーゲンコートプレートでの培養より細胞は伸展せず、細胞の丈の高さを保った状態で並んだ。また、培養数日後には、肝細胞間に毛細胆管様構造が発現し、肝臓における細胞構築に類似する構造が認められた。スフェロイド培養系では、分注する細胞数は多すぎると、形成されたスフェロイドが融合し大きくなるために、スフェロイド内部が栄養及び酸素不足になることが考えられたので、細胞数を 1×10^5 cells/ml まで下げ、培養を行った。

I 型コラーゲンコートプレートでの単層培養における遺伝子発現変化:

現在までの結果では、ストレプトアビジン R-phycoerythrin 1 回処理後の測定値と、更に増幅処理を行った後の測定値は、ほとんどパラレルに出ており、増幅による値の振り切れが無く、増幅の有無にかかわらずほぼ同様の結果を示すことが分かった。また、分離直後の実質肝細胞とコラーゲンコートプレートで 1 日単層培養後の実質肝細胞との比較では、1 日間の単層培養により発現が増加または減少する遺伝子が多く認められたが、異なるサンプル間での比較方法、増加または減少の判定方法等、更に検討する必要があると考えられた。

1 日間の単層培養により、予備的な解析結果の傾向としては以下の遺伝子発現変化が認められた。解糖系では低下が認められなかったものの、脂質代謝関連では、アシル-CoA デヒドロゲナーゼの発現低下、カルニチン オクタノイル トランスフェラーゼの発現低下が認められた。細胞骨格関連では、ビメンチンの発現増加が認められた。細胞周期関連では、サイクリン G の発現増加、PCNA の軽度発現増加が認められた。解毒関連では、グルタチオン シンセターゼの発現増加、サイトゾリック エポキサイド ハイドrolラーゼの発現低下、UDP グルクロノシル トランスフェラーゼ低下、リバー カタラーゼの発現低下、グルタチオン S-トランスフェラーゼの発現低下、L-システイン オキシゲン オキシドレダクターゼの発現低下が認められた。Cytochrome P450 関連では、CYP2B14P 低下、CYP2B15 低下、CYP2C11 低下、CYP2J3 (モノオキシゲナーゼ)低下、CYP2J3P2 低下、CYP4A1 低下、CYP4F1 低下、CYP4F4 低下、CYP4F6 低下、CYPC27 低下、が認められた。トランスポーター、胆汁排泄関連では、MDR の発現増加、cMOAT の発現増加、が認められた。ストレスタンパク質、分子シャペロン関連では、HSP70、HSP60、HSP90 の発現増加、カルネキシンの発現増加が認められた。培養液に添加したインシュリンまたはトランスフェリンの作用と考えられる細胞内シグナルとしては、ポリアミン合成に関わるオルニチン デカルボキシラーゼの発現増加、トランスフェリ

ン レセプターの発現増加が認められた。実質肝細胞以外の細胞に関連すると考えられるものには、細網内皮系細胞に関連するヘムオキシゲナーゼの発現増加が認められた。

4. 考察

A. 造血毒性

野生型マウスに見られたベンゼンによる骨髓造血幹細胞の細胞動態の抑制は、p53KO マウスで抑制が認められなかったこととあわせて、p53 による発現制御が知られている p21 の蛋白量が野生型で増加していたことから、p53 を介する p21 の増加によって引き起こされていたものと考えられる。但し、*in vitro* でのベンゼン曝露試験や、ここで観察された細胞回転の抑制に対して、p21 の増加の peak はむしろ遅い。これは、幹細胞動態停止に対して、p21 は全骨髓細胞で見ているため、個々の細胞、特に幹細胞でのそれを必ずしも反映していないことが考えられる。他方、何らかの別の機構によって、細胞回転が速やかに抑制される機構についても念頭に置いて、更に解析を進める。

併せてこのことは、Benzene もしくは、その代謝物が、p53 の checkpoint を発動する程度には、DNA damage を引き起こすことを示唆している。従来、分化型の細胞では細胞回転が抑制されても、幹細胞ではむしろ亢進していることが想定され、その結果白血病が誘発されることが仮説とされてきたが、ここで得られた結果はこれを否定するものであった。野生型におけるベンゼン白血病は、以上のようなベンゼンによる細胞周期の停止とアポトーティックな細胞死による細胞数と細胞キネティックスのオシレーションと関連していることがわかってきた。尚、文献上は、ベンゼン曝露により細胞周期は、亢進するとする見解と、今回見たような停止を重視する見解とが見られる。この背景を検討したところ、細胞周期の亢進を示す報告は、基本的には、曝露後の時間経過が比較的長期に及ぶものが目立ったので、制御後のオーバーシュートを反映しているものとする。

cDNA マイクロアレイについては Incite 社のマイクロアレイにハイブリダイズさせて、蛍光測光を行った。

B. 肝腎毒性

ラットから分離した実質肝細胞の 1 日間の単層培養により、種々の遺伝子発現に変化が認められ、細胞機能に変化していることが示唆された。特に実質肝細胞に特異的な CYP 関連の代謝機能、及びグルタチオン合成等の解毒機能が低下していた。これらのことから、実質肝細胞の長期培養では、肝臓に特異的な機能は失われる傾向にあり、*in vitro* の毒性評価系としてこの点に注意を払って評価に用いる必要があると考えられた。今後の解析により、I 型コラーゲンゲル上での培養、スフェロイド培養では、どの程度これらの機能が保たれているかどうかを確認し、それらの機能低下に違いがあれば、*in vitro* の毒性評価系に用いる場合に、それぞれの系の特徴を生かして用いる必要があると考えられる。

ストレスタンパク質の発現増加については、細胞分離処理、及び培養の過程自体により *in vivo* とは異なる刺激及び環境下に置かれるために、発現増加が認められた可能性が考えられる。これらの細胞の培養系に更に被験化合物を加えてその毒性を評価する場合、ストレスタンパク質の培養自体による発現増加のため、化合物によっては細胞傷害性の程度が *in vivo* とは異なってくる可能性も考えられる。更に今後の検討により、その影響を見極める必要があると考えられる。

細網内皮系の細胞での発現増加と考えられるヘムオキシゲナーゼの発現増加が認められているが、分離細胞中にわずかに混在していた実質肝細胞以外の細胞（クッパー細胞、毛細血管内皮細胞等）によるものと考え

えられる。しかしながら、実質肝細胞にもヘミン等の作用により誘導されることから、実質肝細胞でも発現増加が起こっていることも否定はできない。また、細胞分裂を示唆するサイクリン G、PCNA の発現増加も認められている。通常、実質肝細胞は、培養中に分裂増殖はせず、長期培養では細胞数が次第に減少する。一方、分離肝細胞中に含まれる上皮細胞、繊維芽細胞等は、培養中に分裂増殖が見られ、実質肝細胞の分画にもわずかに含まれるものと考えられ、これらの細胞の分裂による発現増加であると考えられる。このように実質肝細胞での遺伝子発現変化に加えて、わずかに混入している他の細胞種の遺伝子発現がかぶった状態で結果が得られるので、毒性の評価特に標的細胞を考えて評価する場合注意を要すると考えられた。

5. まとめ

創薬過程での前臨床試験で予知困難にして特殊なアッセイ系でのみ検出可能であったような、造血器、特に造血幹細胞、或いは肝・腎などでの希少毒性を、cDNA マイクロアレイを用いて簡便に予知する方策について検討した。

造血毒性については、ベンゼン曝露後の造血幹細胞の細胞周期を検討して、ベンゼンの細胞周期に与える影響が、その急速な停止とおそらくは apoptosis の惹起にあることを初めて明らかにした。さらに、その細胞周期の変化が、曝露休止期における細胞周期の亢進を引き起こし、エピジェネティック発がんとしての白血病誘発を引き起こす母地となることを明らかにした。これらの経過中の遺伝子発現を網羅的に観察し、細胞周期制御関連の遺伝子群や増殖分化に関連する遺伝子群の発現の消長を見だし、ベンゼン白血病における野生型マウスの白血病誘発の背景となる遺伝子変化として矛盾のないものであることを明らかにした。

肝腎毒性については、ラット肝から分離した実質肝細胞の種々の培養条件及び培養期間による遺伝子発現の変化を調べた。今回の実験では、最も簡単で広く行われているが肝臓に特異的な機能が低下すると言われている I 型コラーゲンコートプレートでの単層培養、より肝臓での機能を保つと考えられる I 型コラーゲンゲル上での培養、立体的細胞構築が *in vivo* に近いスフェロイド培養について、遺伝子発現の違いを調べ、それぞれの培養に特異的な細胞の状態を把握することを目的に実験を行った。現在までの予備的な解析の結果では、1 日間の単層培養により、以下の遺伝子発現変化が認められた。解糖系では低下が認められなかったものの、脂質代謝関連発現が低下した遺伝子が認められた。細胞周期関連では、細胞増殖を示唆する遺伝子発現増加が認められた。代謝・解毒関連では、Cytochrome P450 関連遺伝子発現低下、グルタチオン合成合成関連でも、発現の低下が認められた。トランスポーター、胆汁排泄関連では、遺伝子発現増加が認められた。ストレスタンパク質、分子シャペロン関連では、遺伝子発現増加が認められた。培養液に添加したインシュリンまたはトランスフェリンの作用と考えられる細胞内シグナルも、遺伝子発現増加が認められた。実質肝細胞以外の細胞に関連すると考えられる遺伝子の発現増加も認められた。

今後の方針としては、まず、造血毒性に関しては、以上のような背景に立って、より詳細な遺伝子発現の個々の意味を明らかにするとともに、細胞周期モジュレーターである、p53 欠失マウスにおける同様の変化を分析し、エピジェネティック白血病発症の機構を Key として、遺伝子発現マイクロアレイの果たす役割を明らかにしてゆきたい

肝腎毒性に関しては、以上の結果から、実質肝細胞の単層培養により、肝臓に特異的な機能は低下し、ストレスに対する防御機能も変化していることが示唆されたので、これらのことより、*in vitro* の系で化合物の毒性を評価する場合に、*in vivo* との細胞の状態の違いを把握する情報として有用であると考えられた。今後、更に解析を進めることによって、種々の培養条件の違いによる細胞の状態の違いを明らかにし、既知の毒性

物質による遺伝子発現の変化と毒性を関連付けていく予定である。

6. 研究発表

Hirabayashi Y, Matsuda M, Aizawa S, Kodama Y, Kanno J, Inoue T. Serial Transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth. *Experimental Biology and Medicine*, 2002, in press.

Yoshida K, Aizawa S, Watanabe K, Hirabayashi Y, Inoue T. Cell Leukemia: p53 Deficiency-mediated Suppression of the Leukemic Differentiation in C3H/He Myeloid Leukemia. *Leukemia Research*, 2002, in press.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Kim DY, Inoue T: Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM) *Experimental Hematology*, **29**, 278-285, 2001.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kodama Y, Kanno J, Yodoi J, Kim DY, Inoue T. Transgene expression of thioredoxin (Trx/ADF) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced hematotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **41**, 232-236, 2001.

Yoon BI, Hirabayashi Y, Ogawa Y, Kanno J, Inoue T, Kaneko T. Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. *Chemosphere*, **43**, 819-822, 2001.

Haraguchi S, Kitajima S, Takagi A, Takeda H, Inoue T, Saga Y. Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development. *Mech Dev*, **108**, 59-69, 2001.

Sai K, Kang KS, Hirose A, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T. Inhibition of apoptosis by pentachlorophenol in v-myc-transfected rat liver epithelial cells: relation to down-regulation of gap junctional intercellular communication. *Cancer Lett*, **173**, 163-74, 2001.

五十嵐 勝秀、井上 達: -Report-「トキシコゲノミクス国際フォーラム 2001」の開催と将来展望、MEDICHEM NEWS, 2002, in press.堀井郁夫, 創薬段階での非臨床評価, ハイスループット・トキシコロジー, 野村, 堀井, 吉田編, 非臨床マニュアル (エル・アイ・シー, 東京), p335-334, 2001.

堀井郁夫, 創薬段階での非臨床評価, トキシコゲノミクス・トキシコプロテオミクス, 野村, 堀井, 吉田編, 非臨床マニュアル (エル・アイ・シー, 東京), p348-357, 2001.

堀井郁夫, 創薬安全性評価におけるスフェロイド細胞培養系について, 第8回 HAB協議会学術年会発表 (May, 2001)

堀井郁夫, 医薬品の創薬: 開発研究における薬物安全性評価の新しい動向と展開, 日本実験動物科学技術大会 2001 発表 (May, 2001)

7. 知的所有権の取得状況

1) 取得特許

無し。

2) 実用新案登録

無し。

3) その他

無し。

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社