

別添2

厚生労働科学研究費補助金総括・分担研究報告書表紙

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

研究課題名(課題番号):トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測
システムの構築とその基盤に関する研究
(H14-トキシコ-001)

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長尾 拓

平成 15 (2003) 年 4 月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

- トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築と
その基盤に関する研究1
長尾 拓

II. 分担研究報告書

1. 薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究15
土井 邦雄
2. 化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究39
遠藤 仁
3. 大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究50
若林 敬二
4. 恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究56
菅野 純

III. 研究成果の刊行に関する一覧表65

IV. 研究成果の刊行物・別刷69

別添 4

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)

総括研究報告書

トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究

主任研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所・所長

研究要旨

本プロジェクトは、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術の構築により、創薬過程における安全性の予測システムを作成することを目的とする。具体的目標として、少数の小型実験動物あるいは培養細胞系における遺伝子発現の網羅的なプロファイル生成により、検体物質の安全性を、従来の毒性試験よりも、正確に、かつ、詳細に予測するシステムの開発を目指す。これは、企業参加を得て、国立衛研を核とした「産学官連携」の形態を取る大規模プロジェクト(プロジェクトリーダー:長尾)をなすものである。この目的の達成の為に、本プロジェクトに「発現解析データ生成部門」、「データベース・インフォマティクス部門」、「データ・システム精度管理部門」、「病理・毒性評価部門」、及び「知的財産・総務部門」を設け、遺伝子発現データの収集を開始した。これらの運営は、被検物質暴露実験及びデータベース・インフォマティクス部門開発等の委託を含め、主任研究者(長尾)を主体とする本研究班と参加企業との協調、協議の上で進められている。また、本プロジェクトの基盤を支える研究として、インフォマティクスの質的向上のために、基盤的分担研究(肝毒性、腎毒性、発がん性、及び恒常性維持機構を標的とした毒性)による当プロジェクトの強化を図った。

分担研究者

土井 邦雄 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授
遠藤 仁 杏林大学医学部・教授
若林 敬二 国立がんセンター研究所がん予防研究部・部長
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部・部長

A. 研究の目的

本研究では、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にした化学物質安全性データベースを構築することにより、インフォマティクス技術を活用した創薬過程における安全性の早期予測システムを構築することを目的とする。

従来、実験動物における毒性をヒトに外挿す

ることによって医薬品の安全性の予測を行ってきたが、それには科学的な限界があり、安全性が必ずしも確実なものでなかった。従ってより安全な近代的医薬品の開発には、従来の方法が持つ限界の克服が必要である。一方、今までの創薬の現場においては、その過程で得られた毒性データが体系立って蓄積されることは無か

ったが、その様なデータの蓄積と利用に対しては潜在的な要求が創薬の側からも、安全性確保の側からも存在していた。また、従来より形態学のレベルで解析されてきた安全性が、ゲノム創薬と同じ技術水準を応用する事により分子レベルの作用機序を基にして、より正確にあるいは早期に解析される事も望まれていた。更に、これと関係して、安全性の確保の面からは実験動物間及び、それらとヒトとの間の種差の問題に対する何らかの科学的な解決が模索されてきていた。これらの問題を包括的に解決する方策としては、化学物質投与に対する網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクスの構築が有効であることは内外の研究活動の方向性が示すところである。本研究の到達目標は、*in vivo*及び*in vitro*のモデル系において、化学物質により誘発される遺伝子発現の網羅的なプロファイルに基づいたデータベースの構築により、検体物質の安全性を、従来の毒性試験よりも正確かつ詳細に予測するシステムの開発にある。本研究の遂行によって、ヒトにおける副作用の早期予測、臨床における医薬品の予期せぬ副作用発現率の低下、及び、より安全性の高い医薬品の創製、またそれによる創薬の効率化（短期化、経済化）が期待される。インフォマティクスの基礎となる蓄積データで、最も注目され、有用性が高いと思われるものは、過去に「予期せぬ毒性、すなわち、開発段階では検出されなかった毒性がヒトに投与して初めて顕在化した」為に「開発中止、あるいは販売中止となった医薬品・医薬品候補物質」である。本研究では、このような事例の検討に基づいたインフォマティクスを構築する計画であり、これが本研究の成果を保証する要の一つとなっている。また、基盤研究との連携により分子メカニズムに裏打ちされた肝毒性、腎毒性、発がん、恒常性維持機構

に影響を与える毒性の予測性の向上も併せて期待される。

B. 研究方法

トキシコゲノミクスプロジェクト(長尾)

(1)遺伝子発現解析の研究室の立ち上げ

国立医薬品食品衛生研究所28号館3階に、トキシコゲノミクスプロジェクト研究室を設置し、RNA抽出装置、GeneChip遺伝子発現解析装置等の機器の配備、調整と整備を行い、さらに実験器具・備品・試薬を整備した。また、共同プロジェクトとしての「産」の参加メンバーと共に実験手技を確立、種々の標準作業書を作成し、遺伝子発現データのバリデーションを行った。発現解析の実験操作を行う技術員7名の教育を実施し、実働体制の整備を完了し、実際の実験データの収集を開始した。

(2)被験化合物選定

本プロジェクトの戦略として重要課題である被験化合物については、初期 5 化合物 (TGP-001～TGP-005)はトキシコゲノミクス準備委員会で決定し、また、第 6 化合物以降 (TGP-006～)は、トキシコゲノミクス準備委員会でリストアップした化合物を中心にラットとヒトとの毒性を考慮して研究内容 WG で選定し決定した。本年度は、6 週齢及び 12 週齢の肝機能の差異の検討を含め、アセトアミノフェンについては単回投与実験 (5 用量 5 時点、25 群、各群 3 匹) 実験と反復投与 (5 用量 4 時点、20 群、各群 3 匹) 実験、イソニアジド、及び四塩化炭素については単回投与実験実験を完了し、データの生成、解析中である。

(3)*in vivo*試験

実験手技、サンプルの送受方法及び*in vivo*試験情報のデータフォーマット等の確立及び統一を図り、HepG2細胞を用いた試験の予備試験を実施した。

(4)データベース・バイオインフォマティクス

共同プロジェクトとしての「産」の参加メンバーと「データベース・インフォマティクス部門」と

共に遺伝子発現実験管理システムの構築及び化合物情報、動物試験情報、遺伝子発現解析情報を蓄積する遺伝子発現統合データベースシステムのバージョン 1.0 を開発した。トキシコゲノミクス専用ネットワーク(28 号館遺伝子発現施設-トキシコゲノミクスプロジェクト間)を構築し、また、統合データベースシステムを運用するサーバーを導入してコンピュータの利用環境を整備した。また、遺伝子発現解析用ソフトウェア(GeneSpring, SpotFire)を導入し、それらの機能を検証した。

分担研究

(1) 薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究(土井)

1) 母体肝—胎盤—胎児肝における代謝系の変動について、Fusarium属真菌毒素でリンパ造血系組織にapoptosisを誘発することで知られているT-2 toxinを妊娠ラットに投与し、病変形成と代謝系を中心とする遺伝子発現プロファイルに関して、また、2) 胎児毒性、特に胎児中枢神経毒性に着目しその発現機構については、Ethylnitrosourea (ENU)と5-Azacytidine (5AzC)によるラット胎児中枢神経毒性に関して、それぞれ基礎検討を行った。1)は、妊娠13日齢(13DG)のSlc:WistarラットにT-2 toxinを経口投与し、24時間後に遺伝子発現プロファイルについて検討した。2)は、13DGのJcl:F344ラットにENUを、また、13DGのJcl:Wistarラットに5AzCをそれぞれ腹腔内投与し、48時間後まで経時的に殺処分して胎児中枢神経組織を採材し、代表的なapoptosisおよびcell cycle arrest 関連遺伝子の発現について検索した。

(2) 化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究(遠藤)

生体内での腎の機能保持遺伝子の同定と化学物質により強く影響を受ける遺伝子を明確にすることを目的として、平成14年度は、腎における、薬物及び毒性化合物の輸送を担

当する有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸等の細胞膜輸送体の分子同定、及びそれらを修飾した時に生じる遺伝子変化を網羅的に解析するための解析系の立ち上げを行った。1) トランスポーターの塩基配列を用いて、BLAST検索を行いBLAST hitを用いて全長cDNAを単離し、塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予想した。得られたcDNAをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、機能解析を行った。2) 遺伝子発現変動の解析:ヒト膀胱癌由来T24細胞(対数増殖期)の培地に20 mMのBCHを添加し、3時間後、及び12時間後にRNAを抽出し、DNA Chip(Affymetrix Human Genome U133A)を用いて遺伝子発現を測定した。

(3) 大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究(若林)

ヘテロサイクリックアミン(HCA)類を始めとした、環境変異原・がん原性物質はヒトのがんの原因物質である可能性が考えられる。本研究は、動物の発がんモデルを用いて、①遺伝子発現と遺伝子発現プロファイルの経時的変化、および、②その用量相関性、③発がん感受性の異なる動物系統における発現プロファイルの差異について包括的解析を行う。1) 大腸発がん過程の各種病変の遺伝子変異について解析した。また、F344及びACIラット系統間での病変の誘発感受性の違いについても検討した。2) 発現変動する遺伝子群の網羅的解析のために、PhIP含有基礎食を2週間、高脂肪食4週間投与を1クールとし、これを3クール繰り返した後、高脂肪食のみを投与する「短期間欠投与方法」により、ACF及び大腸腫瘍を誘発させた。高感受性を示すF344ラットと低感受性を示すACIラットの2系統を用い、網羅的遺伝子発現解析を行った。3) PhIP及びAOMによる発現遺伝子の特異性の検討を行った。AOM投与によって誘発したC57BL/6Jマウス及びF344ラットの大腸がん及び周辺の前がん部大腸粘膜サンプルより

RNAを抽出し、RT-PCR法によってPGE₂受容体EP_{1,4}の発現レベルを解析し、大腸発がんにおけるPGE₂受容体の発現変化について検討した。

(4)恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究(菅野)

恒常性維持機構が働く系に外界から化学物質等の影響が加わっても、そのフィードバック機構により形質が容易に得られないことが多い。このような場合に網羅的遺伝子発現解析を用いることで、少なくともフィードバック機構に関わる遺伝子群の発現変動という形で化学物質影響のモニターが可能であり、毒性予測の指標とすることが出来る。本研究では、恒常性に関わる核内受容体-転写因子系のうち、エストロゲン受容体 α (ER α)系とアリル炭化水素受容体(AhR)系を介する影響を網羅的遺伝子発現により解析した。また、恒常性維持機構が腫瘍の働きによって破綻したために起こる血管新生に関する検討を行った。1)核内受容体を介する生体作用のモデルとしてAhR受容体を対象とし、ダイオキシン類のうち2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)及び、2,3,7,8-tetrachloro-dibenzofuran(TCDF)を投与したヒトがん由来培養細胞株およびマウス肝における遺伝子発現変動の解析を行った。ヒトがん由来培養細胞株のうちTCDD非感受性TCDF感受性株、及びTCDD非感受性TCDF非感受性株における感受性の差の要因となっている遺伝子を検索する目的で包括的発現遺伝子解析を実施した。マウスにTCDD及びTCDFを皮下投与し、投与後24時間目の遺伝子発現の変化を溶媒対照群と比較した。またホモロジーテーブルを用いて、ヒト細胞株及びマウス肝で解析した遺伝子について種間の共通性を検討した。2)血管新生に関する検討については、細胞株(MCF-7、RERF-LC-KJ、T24等)の各々とHUVECs(正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)をTranswell cell culture chamber(Costar)を用いて共培養した。次いで作用機序の異なるいくつかの血管新生抑制物質

(troglitazone、pentoxifylline、rapamycin、1400W等)を作用させ、腫瘍細胞と内皮細胞間の相互作用への影響を検討し、血管新生を抑制する遺伝子クラスターを同定した。

(倫理面への配慮)

使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、各研究機関の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っており、特に国立衛研はそのモデル施設となっている。

C. 研究結果

本プロジェクトは、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォマティクス技術の構築により、創薬過程における安全性の予測システムを作成することを目的とする。具体的な目標として、少数の小型実験動物(ラット)あるいは培養細胞系における遺伝子発現の網羅的なプロファイル生成により、被検物質の安全性を、従来の毒性試験よりも、正確に、かつ、詳細に予測するシステムの開発を目指す。そのために、国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)は、公募の手続きを経て、製薬企業17社と共同研究契約を結び厚生労働科学研究「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究(課題番号:H14-トキシコ-001)」の一部として、平成14年度から5年計画の「トキシコゲノミクスプロジェクト」を開始した。これは、企業参加を得て、国立衛研を核とした、「産学官連携」の形態を取る大規模プロジェクト(プロジェクトリーダー:長尾)をなすものである。

プロジェクトは、約150化合物を対象にラット、ラット初代肝細胞及びヒト培養肝細胞を用いた暴露実験を行い、肝臓・腎臓を主標的にマイクロアレーを用いて遺伝子発現変化を網羅的に解析する。さらに蓄積された遺伝子情

報を基にデータベースを構築して、インフォマティクス技術を活用することにより、副作用発現分子メカニズムに基づいて、医薬品候補化合物の安全性を従来の毒性試験よりも早期に評価・予測するシステムを開発し、以て、創薬研究に役立てることを目的とする。この目的の達成の為に、本プロジェクトに「発現解析データ生成部門」、「データベース・インフォマティクス部門」、「データ・システム精度管理部門」、「病理・毒性評価部門」、及び「知的財産・総務部門」を設けた。これらの運営は、被検物質暴露実験及びデータベース・インフォマティクス部門開発等の委託を含め、主任研究者(長尾)を主体とする本研究班と参加企業との協調、協議の上で遂行されている。

平成14年度は国立医薬品食品衛生研究所28号館3階に、プロジェクト研究室を設置し、RNA抽出装置、GeneChip 遺伝子発現解析装置等の機器の配備、調整と整備を行い、実験手技を確立、種々の標準作業書を作成し、遺伝子発現データのバリデーションを行った。技術員7名の教育を実施し、実際のマイクロアレーデータの収集を開始した。被検化合物は、トキシコゲノミクス準備委員会を中心にラットとヒトとの毒性を考慮して選定し、研究内容WGで選定し決定した。本年度は、アセトアミノフェン、イソニアジド、及び四塩化炭素についてデータを生成し、現在解析中である。In vivo 試験については、実験手技、サンプルの送受方法及び in vivo 試験情報のデータフォーマット等の確立及び統一を図り、HepG2細胞を用いた試験の予備試験を実施した。遺伝子発現実験管理システムの構築及び化合物情報、動物試験情報、遺伝子発現解析情報を蓄積する遺伝子発現統合データベースシステムのバージョン1.0を開発した。また、統合データベースシステムを運用するサーバーを導入してコンピュータの利用環境を整備した。

これに加え、本プロジェクトの基盤を支える研究として下記の(1)～(4)をプロジェクトと連携して実施した。今年度は以下の結果を得た。

(1)薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究(土井)

新医薬品開発に重要であるにも拘わらず、その発現機構が明らかにされていない肝病変(明瞭な肝傷害を伴わない肝細胞増殖(発がん性なし)、同一薬物により誘発される2通りの肝細胞死(apoptosisとnecrosis)、非変異原性発癌物質投与初期の肝mitogenesisと生体反応)発現機構を解明し、病変型毎の発現遺伝子マップを作成する。さらに、母胎肝-胎盤-胎児肝軸における薬物代謝の変動および病変の発現機構に関与する遺伝子群の特定ならびに高脂血症個体で想定される薬物誘発肝病変の変動要因としての遺伝子の関与を明らかにする。平成14年度は、母体肝-胎盤-胎児肝軸における病変形成と遺伝子発現プロファイルとの関連を、T-2 toxin暴露妊娠ラットで検索した結果、酸化ストレスによるDNA傷害、ミトコンドリア機能阻害、脂質過酸化、脂質代謝阻害などが関与していることが示唆された。次いで胎児中枢神経毒性について、Ethylnitrosourea (ENU)(アルキル化剤)及び5-Azacytidine (5AzC)(DNAメチル化阻害剤)に暴露した妊娠ラット由来の胎児について検討を行った結果、いずれもp53依存性にapoptosisが誘発されたが、通説とは異なる非常に興味深い知見が得られた。

(2)化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究(遠藤)

生体内での腎の機能保持遺伝子の同定と化学物質により強く影響を受ける遺伝子を明確にする。その候補であるトランスポーター

(輸送体)は、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の輸送を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、或いは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子であり、その解析が疾患解析の中に組み込まれ、病態との関わりが包括的に把握されていくものと思われる。平成14年度は、腎における薬物及び毒性化合物の輸送を担当する有機陽イオン、陰イオン、アミノ酸等の細胞膜輸送体の分子同定を中心とした研究を行った。本年度の研究により、電位差駆動型の有機アニオントランスporter OATv1、アミノ酸型薬物、毒性化合物の輸送経路となる輸送系 L アミノ酸トランスporter LAT4、及び尿酸トランスporter URAT1 の3種の腎での薬物及び毒性化合物の細胞膜輸送を担当する新規輸送体が同定された。

(3)大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究(若林)

環境中に存在する種々の変異原・がん原物質により誘発される動物の腫瘍を用いて、遺伝子発現プロファイルの経時的変化、用量相関性、発がん感受性の異なる動物系統の発現プロファイル、及び化合物特異的な遺伝子発現の包括的な解析を行い、低用量被曝による発がん性の予測、早期段階での発がん予測の指標となる遺伝子を明らかにする。平成14年度は、PhIPによる遺伝子の発現誘導において、発がん高感受性を示すF344系統と低感受性を示すACI系統間で特異的なパターンを示す遺伝子が、80~100個前後認められた。一方、PhIP或いはAOM投与により発現変動する遺伝子を比較したところ、両者の共通性は低かった。又、AOM誘発マウス及びラットの大腸発がんに関与し、発がん過程により

発現が変化することを見出した。

(4)恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究(菅野)

恒常性維持機構が働く系に外界から化学物質等の影響が加わっても、そのフィードバック機構により形質が容易に得られないことが多い。このような場合に網羅的遺伝子発現解析を用いることにより、少なくともフィードバック機構に関わる遺伝子群の発現変動という形で化学物質影響のモニターが可能であり、毒性予測の指標とする事ができる。本研究では、恒常性維持機構の標的であると同時に解毒代謝に関わる恒常性維持の中核である肝臓、及び恒常性維持機構の上位中核である脳を対象とする。そして、恒常性に関わる核内受容体-転写因子系のうち、エストロゲン受容体 α (ER α)系とアリル炭化水素受容体(AhR)系を介する影響を網羅的遺伝子発現により解析する。平成14年度は、それらの検証に必要な生物学的基礎研究を開始した。まず、1) 形質の現れにくい低濃度で核内受容体に作用し、遺伝子発現に影響を現す化合物による遺伝子発現データを解析するためのモデルとしてTCDD、TCDFを投与した2種類のヒトがん由来培養細胞株及びマウスの肝臓における遺伝子発現変動の網羅的解析を行った。また2) 血管新生制御に関わる研究についても検討を進めた。

D. 考察

本研究は以下の4点を特色としている。第一に、毒性所見の有無に捕らわれず、網羅的に遺伝子発現のプロファイリングを行い、測定可能な遺伝子すべてをデータベース化する事である。第二に、そこで得られる未知の遺伝子発現プロファイルに対して、プロジェクト内にその検証に寄与すべく精度管理部門及び基盤研究(分担

研究)を置き、形質発現を予測する探索的解析研究を進め、その結果に基づいて随時インフォマティクスの精度向上を並行して進める事である。基盤的分担研究により肝毒性(土井)、腎毒性(遠藤)、発がん性(若林)、及び恒常性維持機構を標的とした毒性(菅野)に関する強化を図って、インフォマティクスの質的向上を目指している。第3点として網羅的な遺伝子発現プロファイリングを約150種類の化学物質について蓄積する際に「開発段階では検出されなかった毒性がヒトに投与して初めて顕在化した」為に「開発中止、あるいは販売中止となった医薬品・医薬品候補物質」、副作用情報が公示されている医薬品等(約40)を含めて検討する点が独創的である。また、第4点として、精度向上研究の一環として、強力な標準化戦略の実施が挙げられる。これは、従来の「発現比」に依らず、細胞当たりの絶対値測定を目指した「絶対化戦略」のための「標準スパイクRNAセットの供給」、異なるプラットフォーム間、あるいはマイクロアレイの新旧バージョン間のデータ互換性を確保するための「橋渡し戦略」のための「共通標準サンプルの供給」、及び基盤研究から得られる「Null発現系」情報などからなる。これらにより、遺伝子発現量の定量的解析が飛躍的に進み、データベースの著しい精度向上が期待される。プロジェクト本体としては、データ生成に必要な部門の立ち上げを完了し、初期予定3化合物(Acetoaminophen, Phenobarbital, Carbon tetrachloride)の暴露実験を実施し、GeneChipデータの集積を開始した。今後、「5年間150物質」のデータベース構築の目標達成に向けて、データ生成部門の安定運用の上にデータ解析、データベース作製の進展を図り、以て予測システムの実現を目指す。

分担研究については、以下の様に考察された。
(1)薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発

現プロファイルに関する研究(土井)

1) T-2 toxin 暴露による母体肝—胎盤—胎児肝における代謝系の変動

発現機構を遺伝子発現プロファイルの面から考察すると、T-2 toxin により酸化ストレスが生じ、その結果 DNA 傷害、ミトコンドリア機能障害及び脂質過酸化を引き起こし、最終的に細胞増殖抑制や apoptosis の誘導に至るものと考えられた。今後は早い時期での検索を行い、特に上記軸における apoptosis の発現機構ならびに従来我々が報告してきているリンパ造血系における apoptosis の発現機構と比較検討を行う予定である。

2) 胎児中枢神経毒性

ENU 及び 5AzC は共に、胎児中枢神経組織に p53 依存性の細胞周期停止と apoptosis を誘導した。しかし ENU の場合は、S 期に相当する DNA 量を有していながら BrdU を取り込んでいない細胞が多数観察された。これらの結果から、ENU は DNA 複製を開始後、DNA 複製を抑制し、G2 期に入る前に apoptosis を誘発するものと考えられた。一方、5AzC では異常分裂像と、BrdU を取り込んだ神経上皮細胞の停滞が観察された。さらに細胞移動の遅延が認められたこと等から、細胞を M 期で停滞させた後、分裂後の G1 期の細胞に apoptosis を誘発することが示唆された。

今後、神経系細胞の傷害後の修復/再生過程での遺伝子発現プロファイルを解析することで、ブラックボックスである胎児中枢神経毒性と出生児の中枢神経障害との関連に迫りたいと考えている。

(2)化学物質による腎臓発現遺伝子の制御と機能調節に関する研究(遠藤)

トランスポーター(輸送体)は、細胞膜あるいは細胞内膜系を介する物質の輸送を媒介する膜タンパク質であり、糖やアミノ酸等の栄養素

や、アニオン性、カチオン性薬物及び外来性異物、あるいは薬物、外来性異物の代謝物等の親水性化合物の経細胞膜輸送にとって必須の分子である。トランスポーターと思われるタンパク質をコードする遺伝子は予想以上に多く、5~10%の疾患がトランスポーター異常を原因とすると推定されている。トランスポーターと病態との関わりは、二つの観点からの研究が必要とされる。第一は、トランスポーターの遺伝子異常あるいは遺伝子多型自体が疾患の誘因となる点であり、第二は、トランスポーターの機能自体が病態形成に積極的に関わる場合である。平成14年度は、腎における細胞膜輸送体の分子同定を中心とした研究を行った。本年度は、機能発現クローニング及びゲノム情報のBLAST検索を行い、OATv1、LAT3、LAT4、URAT1の4種の新規トランスポーターを同定した。このうちOATv1、LAT4、及びURAT1の3種が、腎尿細管での薬物及び毒性化合物の輸送体として機能すると考えられる。

OATv1のクローニングにより、有機アニオントランスポーターの実体が解明された。LAT3及びLAT4は、既知LAT1及びLAT2とともに新たなトランスポーターファミリー(SLC41: solute carrier family 41)を確立することができた。悪性腫瘍では、トランスポーターが細胞増殖の律速段階の一つとなっていることから、新しい抗腫瘍薬の標的としての可能性を有している。本研究では、アミノ酸取り込み抑制薬BCHによる遺伝子発現変動を解析し、細胞増殖制御に関わる遺伝子群に変動が観察された。

(3)大腸の前がん病変及び腫瘍における遺伝子変化の解析に関する研究(若林)

PhIPによる大腸発がん性の異なるF344とACIの2系統のラットでは、発現遺伝子の系統特異性が認められた。今後の検討で、大腸発がん感受

性の予測に重要な遺伝子群(あるいは発現様式)を同定できる可能性がある。AOMとPhIPによる大腸発がんは、組織学的性状や遺伝子変異において類似した点が多い。しかしながらACFの誘発性や誘導遺伝子の違いを考慮すると、その発がんプロセスは大きく異なる可能性がある。遺伝子発現から、相違点を解明する手掛かりが得られると期待される。PGE₂受容体のノックアウトマウス及びアンタゴニストを用いた研究から、EP₁及びEP₄が大腸発がんの初期過程に関与することが分かっている。また、EP₂も腸ポリープ形成に関与していることが報告されている。今回、EP₁及びEP₂の発現がAOM誘発大腸がんの上昇していることがわかった。今後、その発現上昇メカニズムについて検討する必要がある。

(4)恒常性維持機構を標的とした毒性に関する研究(菅野)

1)ヒトがん由来培養細胞株及びマウスの肝臓における遺伝子発現変動の網羅的解析: 通常毒性試験では、形質の変化の捉えにくい恒常性維持機構等の、受容体を介したシグナル修飾による遺伝子発現の変化を網羅的に解析することにより、分子生物学的メカニズムに基づいた毒性評価のためのデータベースを構築することを目的として研究を進行していく。ヒトがん由来培養細胞株を用いた検討の結果、2,3,7,8-TCDD非感受性2,3,7,8-TCDF感受性細胞株が観察された。ダイオキシン類の毒性等価係数(TEF)は2,3,7,8-TCDDが1、2,3,7,8-TCDFが0.1とされており、このように2,3,7,8-TCDFの方が強い毒性を示したことは、評価法により毒性の現れ方が異なる事を示している。ダイオキシン類による遺伝子発現変動の観察が可能であり、ダイオキシン類の核内受容体であるaryl hydrocarbon receptor誘導も確認され、このような系を用いて、各種の化合物の濃度依存的・

時間依存的遺伝子発現変動をデータベース化し、安全性を評価する新手法の開発が期待され、今後、それを推進する。

2) 血管新生抑制物質の有効性や副作用を予測する *in vitro* システムの構築に関する研究：今年度は、血管新生の際に生じる腫瘍細胞と血管内皮細胞間の相互作用を *in vitro* で再構築することを目的として、表現型の異なる腫瘍細胞と HUVECs (正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) の共培養系の確立と細胞間相互作用の評価系の確立に関する実験条件の整備を図った。今後は、細胞間の相互作用に関連した遺伝子クラスターの同定を行い、恒常性維持メカニズムに立脚したモデルの開発を進め、データベースの精度向上への寄与の増大を目指す。

E. 結論

プロジェクト本体としては、データ生成に必要な部門の立ち上げを完了し、初期予定3化合物 (Acetoaminophen, Phenobarbital, Carbon tetrachloride) の暴露実験を実施し、GeneChip データの集積を開始した。今後、「5年間150物質」のデータベース構築の目標達成に向けて、データ生成部門の安定運用の上にデータ解析、データベース作製の進展を図り、以て予測システムの実現を目指す。また、インフォマティクスの質的向上のために、基盤的分担研究 (肝毒性 (土井)、腎毒性 (遠藤)、発がん性 (若林)、及び恒常性維持機構を標的とした毒性 (菅野)) による当プロジェクトの強化を図り、各々成果を得た。今後計画に従って研究を進め、網羅的な遺伝子発現プロファイリングを約150種類の化学物質について蓄積する際に「開発段階では検出されなかった毒性がヒトに投与して初めて顕在化した」ために「開発中止、あるいは販売中止となった医薬品・医薬

品候補物質」、副作用情報が公示されている医薬品等 (約40) を含めて検討することによって、創薬過程における安全性の早期予測システムの構築を目指す。尚、精度向上研究の一環として、強力な標準化戦略の実施が挙げられる。これは、従来の「発現比」に依らず、細胞当たりの絶対値測定を目指した「絶対化戦略」のための「標準スパイクRNAセットの供給」、異なるプラットフォーム間、あるいはマイクロアレーの新旧バージョン間のデータ互換性を確保するための「橋渡し戦略」のための「共通標準サンプルの供給」、及び基盤研究から得られる「Null発現系」情報などからなる。これらにより、遺伝子発現量の定量的解析が飛躍的に進み、データベースの著しい精度向上が期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Arai K, Maruyama Y, Nishida M, Tanabe S, Takagahara S, Turner J. H, Kozasa T, Mori Y, Nagao T, Kurose H, Differential requirement of $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_q$ and $G\beta\gamma$ for endothelin-1-induced JNK and ERK activation, *Mol. Pharmacol.*, 63: 478-488, 2003.

Mizukawa Y, Nishizawa T, Nagao T, Kitamura K Urushidani T, Cellular distribution of parrhorin, a chloride intracellular channel-related protein, in various tissues, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 282(4):C786-95, 2002.

Futagawa H, Takahashi H, Nagao T, Adachi-Akahane S, A carbamate-type cholinesterase inhibitor, 2-sec-butylphenyl N-methylcarbamate insecticide (BPMC) blocks L-type Ca^{2+} channel in guinea-pig ventricular myocytes, *Jpn. J. Pharmacol.*, 90: 12-20, 2002.

- Sakamoto K, Urushidani T, Nagao T, Translocation of HSP27 to sarcomere induced by ischemic preconditioning in isolated rat hearts, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 269(1), 137-42, 2000.
- Katayama K, Ueno M, Takai H, Ejiri N, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K, Ethylnitrosourea induces apoptosis and cell cycle arrest in the trophoblastic cells of the rat placenta, *Biol.Reprod.*, 67,431- 435, 2002.
- Ueno M, Katayama K, Nakayama H, Doi K, Mechanisms of 5-azacytidine (5-AzC)-induced toxicity in the rat foetal brain *Int.J.Exp.Pathol.*, 83,139-150, 2002.
- Ueno M, Nakayama H, Kajikawa S, Katayama K, Suzuki K, Doi K, Expression of ribosomal protein L4 (rpL4) during neurogenesis and 5-azacytidine (5AzC)-induced apoptotic process in the rat, *Histol.Histopathol.*, 17, 789-798, 2002.
- Katayama K, Ohtsuka R, Takai H, Nakayama H, Doi K, Expression of p53 and its transcriptional target genes mRNA in the ethylnitrosourea-induced apoptosis and cell cycle arrest in the fetal central nervous system, *Histol.Histopathol.*, 17,715-720,2002.
- Ejiri N, Katayama K, Yakayama H, Doi K, Expression of cytochrome P450 (CYP) isozymes in rat placenta through pregnancy, *Exp.Toxicol.Pathol.*, 53,387-391,2001.
- Katayama K, Uetsuka K, Ishigami N, Nakayama H, Doi K, Apoptotic cell death and cell proliferative activity in the rat fetal central nervous system from dams administered with ethylnitrosourea (ENU), *Histol.Histopathol.*, 16,79-85,2001.
- Ishigami N, Shinozuka J, Nakayama H, Doi K, Apoptosis in mouse fetuses from dams exposed to T-2 toxin at different days of gestation, *Exp.Toxicol.Pathol.*, 52, 493-501, 2001.
- Ichida K, Hosoyamada M, Kimura H, Takeda M, Utsunomiya Y, Hosoya T, Endou H, Urate transport via the human PAH transporter hOAT1 and its gene structure, *Kidney International* 63: 143-155, 2003.
- Kobayashi Y, Hirokawa N, Ohshiro N, Sekine T, Sasaki T, Tokuyama S, Endou H, Yamamoto T, Differential gene expression of organic anion transporters in mald and female fats, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 290: 482-487, 2002.
- Uchino H, Kanai Y, Kim D.K, Wenpe M.F, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders M.W, Endou H, Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): Insights into the mechanisms of substrate recognition, *Mol. Pharmacol.* 61:729-737, 2002.
- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Kobayashi Y, Yamamoto T, Cha S.H, Sekine T, Endou H, Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300(3): 918-924, 2002.
- Kimura H, Takeda M, Narikawa S, Enomoto A, Ichida K, Endou H, Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal transport of prostaglandins, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301(1):293-298, 2002.
- Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha S.M, Suzuki Y, Endou H, Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2 and OAT3 in rat kidney, *J Am Soc Nephrol.*, 13:848-857, 2002.
- Takeda M, Babau E, Narikawa S, Endou H, Interaction of human organic anion transporters with various cephaloporphin antibiotics. *Eur. J. Pharmacol.*, 438: 137-142, 2002.
- Hasegawa M, Kusuhara H, Sugiyama D, Ito K, Ueda S, Endou H, Sugiyama Y, Functional involvement of rat organic anion transporter 3 (rOAT3; slc 22a8) in the renal uptake of organic anions, *J. Phamacol. Exp Ther*, 300(3): 746-753, 2002.
- Nagata Y, Kusuhara H, Endou H, Sugiyama Y, Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (rOat3) in the choroid plexus, *Mol. Pharmacol.*, 51(5): 982-988, 2002.

- Enomoto A, Takeda M, Shimoa M, Narikawa S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Yamamoto T, Skine T, Cha SH, Niwa T, Endou H, Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Thera*, 301(3): 797-802, 2002.
- Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha S.H, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y. and Endou H, Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417(6887): 447-452, 2002.
- Hosoya K, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, Saeki S, Kanai Y, Endou H, Naito M, Tsuruo T. and Terasaki T, Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood-brain barrier by diethyl maleate treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(1): 225-231, 2002.
- Kobayashi Y, Ohshiro N, Shibusawa A, Sasaki T, Tokuyama S, Sekine T, Endou H, Yamamoto T, Isolation, characterization and differential gene expression of mutispecific organic anion transporter 2 in mice, *Mol. Pharmacol*, 62: 7-14, 2002.
- Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Shkthisekaran D, Endou H, Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A, *Biochim Biophys. Acta*. 1590: 64-75, 2002.
- Takeda M, Khamdang S, Narikawa S, Kimura H, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T. and Endou H, Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302(2): 666-671, 2002.
- Enomoto A, Takeda M, Tojo A, Sekine T, Cha SH, Khamdang S, Takayama F, Aoyama I, Nakamura S, Endou H, Niwa T, Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity, *J. Am Soc Nephrol*. 13: 1711-1720, 2002.
- Enomoto A, Michael F, Wempe, Tsuchida H, Shin HJ, Cha SH, Anzai N, Goto A, Sakamoto A, Niwa T, Kanai Y, Anders MW, Endou H, Molecular identification of a novel carnitine transporter specific of human testis, *J. Biol. Chem.* 277(39): 36262-36271, 2002.
- Khamdang S, Takeda M, Noshiro R, Narikawa S, Enomoto A, Anzai N, Piyachaturawat P, Endou H, Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. I, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303(2): 534-539, 2002.
- Mukobata S, Hibino T, Sugiyama A, Urano Y, Inatomi A, Kanai Y, Endou H, Tashio R, M6a acts as a nerve growth factor-gated Ca²⁺ channel in neuronal differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Comm* 297(4): 722-728, 2002.
- Matsuo H, Kanai Y, Kim J.Y, Chairoungdua A, Kim D.K, Inatomi J, Shigeta Y, Ishimine H, Chekuntode S, Tachampa K, Choi H.W, Babu E, Fukuda J, Endou H, Identification of novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains, *J. Biol. Chem.* 277(3): 21017-21026, 2002.
- Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M., Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K, Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP₄ in colon carcinogenesis, *Cancer Res.*, 62:28-32, 2002.
- Kitamura T, Kawamori T, Uchiya N, Itoh M, Noda T, Matsuura M, Sugimura T, Wakabayashi K, Inhibitory effects of mofezolac, a cyclooxygenase-1 selective inhibitor, on intestinal carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 23:1463-1466, 2002.
- Sasahara Y, Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Tanaka, N, Sugimura T, Wakabayashi K, Suppression of promoter-dependent transcriptional activity of inducible nitric oxide synthase by sodium butyrate in colon cancer cells *Cancer Lett.*, 177:155-161, 2002.
- Ohe T, Takata T, Maeda Y, Totsuka Y, Hada N,

Matsuoka A, Tanaka N, Wakabayashi K, Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured mammalian cells treated with aminophenylnorharman formed by norharman with aniline, *Mutat. Res.*, 515:181-188, 2002.

Nagao T, Yoshimura S, Totsuka Y, Wakabayashi K, Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline, *Human Exp. Toxicol.*, 21:147-151, 2002.

Totsuka Y, Takamura-Enya T, Kawahara N, Nishigaki R, Sugimura T, Wakabayashi K, Structure of DNA adduct formed with aminophenylnorharman, being responsible for the comutagenic action of norharman with aniline, *Chem. Res. Toxicol.*, 15:1288-1294, 2002

Matsunaga N, Kanno J, Yoshimura I, A statistical method for judging synergism: application to an endocrine disruptor animal experiment, *Environmetrics*, 14(2):213-222, 2003.

Utsuyama M, Kanno J, Inoue T, Hirokawa K, Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice, *Toxicol Lett.*, 135(1-2):145-53, 2002.

Kanno J, Kato H, Iwata T, Inoue T, Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies, *J Agri Food Chem.*, 50(13): 3883-5, 2002.

2. 学会発表

武田理夫, Suparat Khamdang, 成川新一, 遠藤 仁: ヒト有機アニオントランスポーター (hOAT) の cephalosphin 系抗生物質(CP)の尿中排泄と腎障害における役割. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

西堀由紀野¹, 楊 國昌¹, 佐藤一朗¹, 片岡佐依子¹, 清水マリ子¹, 東原英二², 細山田真³, 遠藤 仁³(¹杏林大学小児科, ²杏林大学泌尿器科, ³杏林大学薬理学): ヒトポドシンはネフリンの細胞内リガンドである. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

木村弘章¹, 武田理夫², 細山田真², 榎本篤², 市田公美¹, 大野岩男¹, 細谷龍男¹, 遠藤 仁²(¹東京慈恵会医科大学腎臓高血圧内科, ²杏林大学薬理学): ヒト有機アニオントランスポーター (hOAT)による xanthine (Xn), hypoxanthine (Hx)の腎輸送機構の解析. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

小野里マリステラリカ¹, 藤乗嗣泰¹, 武田理夫², 榎本 篤², 後藤淳郎¹, 藤田敏郎¹, 遠藤 仁²(¹東京大学腎臓内分泌内科, ²杏林大学薬理学): 糖尿病性腎症における有機アニオントランスポータ OAT1 の役割. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月25日.

中村桜子¹, 榎本 篤¹, 青山 功¹, 高山文夫¹, 遠藤 仁², 丹羽利充¹ (¹名古屋大学医学部附属病院予防医療部, ²杏林大学薬理学): ヒト腎における human OAT3 (hOAT3)とインドキシル硫酸(IS)の局在に関する検討. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月25日.

木村弘章¹, 武田理夫², 成川信一², 榎本篤², 市田公美¹, 大野岩男¹, 細谷龍男¹, 遠藤 仁²(¹東京慈恵会医科大学腎臓高血圧内科, ²杏林大学薬理学): ヒト有機アニオンとカチオントランスポータ (hOATとhOCT)によるプロスタグランジン (PG)腎排泄機構の解析. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

榎本 篤¹, 木村弘章², 茂田安弘³, Arthit Chairoungdua³, 車 碩鎬³, 細山田真³, 武田理夫³, 関根孝司⁴, 五十嵐 隆⁴, 松尾洋孝³, 菊池勇一⁵, 尾田高志⁶, 市田公美², 細谷龍男², 金井好克³, 丹羽利充¹, 遠藤 仁³(¹名古屋大学医学部附属病院予防医療部, ²東京慈恵会医科大学腎臓高血圧内科, ³杏林大学薬理学, ⁴東京大学小児科, ⁵防衛医科大学第二内科, ⁶自衛隊熊本病院): 血中尿酸値を調節する腎臓尿酸トランスポーター. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

細山田真, 遠藤 仁: Hela 細胞における尿酸取込みの薬理学的解析. 第45回日本腎臓学会学術総会, 大阪, 平成14年5月23日.

細山田真¹, 大久保正人², 柴崎敏昭², 遠藤 仁¹(¹杏林大学医学部薬理学, ²共立薬科大学薬物治療学講座): カドミウムトランスポ

ーターとしてのヒト Nramp2. 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成 14 年 6 月 18 日.

金井好克, 金 徒慶, 松尾洋孝, 遠藤 仁: メチル水銀の細胞毒性発現におけるアミノ酸トランスポーターの役割. 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成 14 年 6 月 18 日.

榎本 篤¹, 武田理夫¹, 丹羽利光², 遠藤 仁¹ (杏林大学医学部薬理学,²名古屋大学医学部予防医療部): インドキシル硫酸による腎障害における有機アニオントランスポーターの役割. 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成 14 年 6 月 18 日.

千葉正悦¹, 成川新一¹, 長濱 昇¹, 鈴木 晃¹, 黒岩幸雄¹, 遠藤 仁² (㈱富士バイオテックス,²杏林大学医学部薬理学教室): ヒト薬物トランスポーターを用いた薬物間相互作用の予測. 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 平成 14 年 6 月 18 日.

金井好克, Ho Jung Shin, 永森静志, 遠藤 仁: 硫酸抱合体を輸送する肝特異的新規有機アニオントランスポーターの同定. 第 9 回肝細胞研究会, 秋田, 平成 14 年 7 月 13 日.

Endou H.: Role of novel urate transporter, URAT1 in hyper- and hypo-uricemia and urinary stone formation. 第 5 回アジア太平洋生理科学会議. マレーシア. 平成 14 年 9 月 24 日

Endou H.: A novel urate transporter that regulates blood urate levels. Transporters 2002 'Session IV: Amino acid/osmolyte transporters. Sept 3, 2002

黒田琢磨¹, Chairoungdua Arthit¹, 小林ゆかり², 寺岡秀朗², 金井好克¹, 呉屋朝幸², 遠藤 仁¹: アミノ酸トランスポーター抑制薬及びアンチセンスオリゴ DNA の腫瘍増殖抑制効果の検討. 第 107 回日本薬理学会関東部会. 山梨. 平成 14 年 10 月 3 日.

Kanai Y, Endou H: Development of novel anti-cancer agents that selectively inhibit amino acid transporters upregulated in cancer cells. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Anzai N,

Kim JY, Shin HJ, Choi BK, Kim JK, Jung KY, Baik YH, Kim MK and Endou H: Identification and characterization of a novel epithelial aromatic amino acid transporter TAT1. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Shin HJ, Enomoto A, Anzai N, Kim Dk, Choi HW, Kanai Y and Endou H.: Identification of a novel liver specific organic anion transporter selective for conjugated rugs and steroid hormones. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Miyazaki H, Anzai N, Hosoyamada M, Enomoto A, Chairoungdua A, Noshiro R, Kanai Y and Endou H.: Molecular mechanism of renal urate transport. The 16th Japan-Korea Joint seminar on Pharmacology. Kyorin University, Oct 3-5, 2002.

Endou H.: Special Lecture "Role of renal drug transporters in the evaluation of human pharmacokinetics". Workshop; "Kidney Pharmacology Revised: Current technologies and future perspectives". Sorat Hotel Berlin, Oct 31 2002.

遠藤 仁: 学術講演「尿酸トランスポーターと腎性尿酸血症」第 32 回日本腎臓学会東部学術大会, 新宿, 平成 14 年 10 月 18 日.

野城理絵, 武田理夫, 遠藤 仁: ヒトペプチドトランスポーター 1(hPEPT1)及び hPEPT2 によるペプチド系薬物の基質認識. 第 17 回日本薬物動態学会年会, 江戸川, 平成 14 年 11 月 22 日

Endou H: Prenary lecture "Membrane transporters and new drug development". China-Japan Joint-congress on Toxicology and Pharmacology, Shenzhen, China, December 2, 2002.

Kanai Y, Kim DK, Endou H: Transport of methylmercury-cysteine conjugate by system L amino acid transporters and its transporter-mediated toxicity. China-Japan Joint-congress on Toxicology and Pharmacology, Shenzhen, China, December 2, 2002.

Endou H: Lecture "Molecular mechanisms of urate transport in the human kidney. The 9th Asian Pacific congress of Nephrology, Pattaya, February 19, 2003.

Asadi SA, Iribe Y, Kanai Y, Endou H: Investigation of effect of LAT1 inhibitors on gene expression profile in T24 cell. 第76回日本薬理学会年会, 福岡, 平成15年3月26日

Jutabha P, Kanai Y, Hosoyamada M, Chairoungdua A, Iribe Y, and Endou H. Molecular cloning and characterization of a novel apical organic anion transporter in pig kidney. 第76回日本薬理学会年会, 福岡, 平成15年3月26日

Ellappan Babu, Arthit Chairoungdua, Nesar Ahmed, Nobuaki Matsumoto, Takuma Kuroda, Yoshikatsu Kanai and Hitoshi Endou: Expression cloning of a novel branched-chain amino acid transporter. 第76回日本薬理学会年会, 福岡, 平成15年3月26日

Wakabayashi, K., Mutoh, M., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Maruyama, T., Narumiya, S., Sugimura, T. Enhancement of intestinal carcinogenesis through prostaglandin E receptor subtype EP4 in rodents. The 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 3321 (oral). San Francisco, CA, USA. March, 2002.

庄司 豊、武藤倫弘、渡部浩治、北村知宏、高橋真美、川森俊人、丸山隆幸、成宮周、杉村 隆、若林敬二。大腸発がんにおけるプロスタグランジン受容体の役割。第9回日本がん予防研究会(熊本)、O-16(口演)。2002年7月16日

若林敬二。動物を用いた大腸がんの化学予防研究。第61回日本癌学会、2002年10月1日

庄司 豊、武藤倫弘、渡部浩治、北村知宏、高橋真美、川森俊人、成宮 周、杉村 隆、若林敬二。プロスタグランジン E2 レセプターEP4の大腸発がんにおける役割。第61回日本癌学会総会(東京)、2596(口演)。2002年10月2日

Kanno J Toxicogenomics in Pharmacology/Physiology studies by functional genomics technology, The 76th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March 24-26, 2003, Fukuoka, Japan

Kanno J Reverse toxicology and data normalization/standardization Toxicogenomics International Forum 2002, Okazaki, 2002

菅野 純、内分泌攪乱化学物質とトキシコジェノミクス、第5回日本水環境学会シンポジウム、平成14年9月26日、東京

菅野 純、トキシコジェノミクスの展望、薬物動態談話会特別例会、平成14年10月4日、浜松

Kanno J Toxicogenomics の現状 ゲノム創薬フォーラム ゲノム創薬へのパラダイムシフト、平成14年11月13日、東京

菅野 純、創薬とトキシコジェノミクス研究戦略、第94回基礎研究部総会、平成15年2月27日、浜松

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究

分担研究者 土井邦雄 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

研究要旨

妊娠動物における毒性発現機構に関する基礎検討を行った。まず、母体肝—胎盤—胎児肝軸における病変形成と遺伝子発現プロファイルとの関連を、T-2 toxin 暴露妊娠ラットで検索した結果、組織学的には上記軸に共通して apoptosis が観察され、母体肝細胞では脂肪化も認められた。遺伝子発現検索結果から、T-2 toxin による上記軸における毒性の発現機構には、酸化ストレスによる DNA 傷害、ミトコンドリア機能障害、脂質過酸化、脂質代謝障害等が関与していることが示唆された。ついで、胎児中枢神経毒性について、Ethylnitrosourea (ENU) (アルキル化剤) および 5-Azacytidine (5AzC) (DNA メチル化阻害剤) に暴露した妊娠ラット由来の胎児について検討を行った結果、いずれも p53 依存性に apoptosis が誘発されたが、通説とは異なり、ENU は DNA 複製を重度に抑制あるいは停止させた後、G2 期に入る前に apoptosis を誘発し、また、5AzC は M 期で細胞周期を停滞させた後、分裂後の G1 期に apoptosis を誘発するという非常に興味深い知見が得られた。

A. 研究目的

妊娠動物は母体—胎盤—胎児からなる複雑な系で構成されており、妊娠動物における毒性発現機構に関しては多くの重要な課題が考えられる。そのなかで、(1) 母体肝—胎盤—胎児肝における代謝系の変動と、(2) 胎児毒性、特に胎児中枢神経毒性に着目しその発現機構をトキシコゲノミクス手法を活用して明らかにする。初年度に当たる今年度は、(1) については、Fusarium 属真菌毒素でリンパ造血系組織に apoptosis を誘発することで知られている T-2 toxin を妊娠ラットに投与し、母体肝—胎盤—胎児肝軸における病変形成と代謝系を中心とする遺伝子発現プロファイルに関して、また、(2)については、Ethylnitrosourea (ENU) (ア

ルキル化剤)と 5-Azacytidine (5AzC) (シチヂンのアナログで、DNA メチル化阻害剤)によるラット胎児中枢神経毒性に関して、それぞれ基礎検討を行う。

B. 研究方法

(1) T-2 toxin 暴露による母体肝—胎盤—胎児肝軸における代謝系の変動

妊娠 13 日齢 (13DG) の Slc:Wistar ラットに T-2 toxin (2mg/kg) を経口投与し、24 時間 (24h) 後に剖検して、母体肝—胎盤—胎児肝軸における病変形成と代謝系を中心とする遺伝子の発現プロファイル (GeneChip analysis; Affymetrix Rat Genome U34A) の関連について基礎検討を行った。

(2) 胎児中枢神経毒性

13DG の Jcl:F344 ラットに ENU (60mg/kg)を、また、13DG の Jcl:Wistar ラットに 5AzC (10mg/kg)を、それぞれ腹腔内投与し、48 時間 (48h)後まで経時的に殺処分して胎児中枢神経組織を採材し、組織学的検索、免疫組織化学的検索、細胞周期検索および RT-PCR 法による代表的な apoptosis および cell cycle arrest 関連遺伝子の発現の推移について検索した。発生初期の中枢神経組織には自己複製能および多分化能を有する神経上皮細胞(神経幹細胞)が ventricular zone と呼ばれる一層の多裂上皮を形成し、神経上皮細胞は ventricular zone で上下にエレベーター運動を繰り返して増殖している。この期間の上皮細胞は広範囲の化学物質に感受性を示すことから、ventricular zone に焦点を合わせて検索を行う。

上記の実験は全て、東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) T-2 toxin 暴露による母体肝—胎盤—胎児軸における代謝系の変動

全身諸臓器組織に関する病理学的検索では、従来報告されているリンパ系組織における変化に加え、母体肝においては肝細胞、胎盤においては栄養膜細胞および胎児肝においては肝細胞と造血細胞に共通して、single cell necrosis (apoptosis)が観察された。母体肝細胞では同時に脂肪化も認められた。GeneChip 解析の結果、母体肝と胎児肝では発現の増加した遺伝子数と減少した遺伝子数

がほぼ同数であったのに対し、胎盤では発現の減少を示す遺伝子数が大半であった。代謝関連遺伝子の発現に関しては、母体肝—胎盤—胎児肝軸にほぼ共通して、軒並みに発現が減少しており、母体肝ではミトコンドリア関連遺伝子の発現の減少も目立った。また、酸化ストレス関連遺伝子の発現増加とスクャベンジャー酵素関連遺伝子の発現減少も共通して認められ、さらに、apoptosis に関しては促進関連遺伝子の発現増加が、また、また、細胞周期に関しては、停止関連遺伝子の発現増加が、それぞれ優位であった。この他、母体肝では第 I、II 相、ならびに胎児肝および胎盤では第 II 相薬物代謝関連遺伝子、母体および胎児肝では血液凝固系関連遺伝子、母体肝および胎盤では Gap junction 関連遺伝子、ならびに胎盤では妊娠関連遺伝子の、それぞれ発現の減少が認められた。

(2) 胎児中枢神経毒性

ENU:apoptosis 細胞は細胞周期の S 期の細胞が存在する ventricular zone の外側部に集中して認められ、apoptotic index は ENU 投与 3h から増加しはじめ、12h にピークに達した後減少し、48h には対照群の値に復した。

また、BrdU 陽性細胞は 3h から減少し BrdU-labeling index は 6h に最低値を示した後増加に転じ、48h には対照群の値に復した。mitosis を示す細胞は 3h から減少しはじめ、mitotic index は 12h に最低値を示した後増加に転じ、48h には対照群の値よりもむしろ高い値を示した。続いて、胎児終脳より抽出した細胞の細胞周期を解析したところ、ENU 投与後 3h から S 期の細胞が増加しはじめ、その傾向は 6h で最も顕著になった。投与 12h には G2/M 期の細胞が最も減少し、apoptosis 細

胞はピークに達した。ENU 投与 6h に Flow Cytometry による BrdU-incorporation assay を行ったところ、S 期に相当する DNA を有していながら BrdU を取り込んでいない細胞が多数認められた。

ところで、p53 は細胞に DNA 損傷などのストレスが加えられるとその発現量が増加し、apoptosis や細胞周期停止、DNA 修復に係わる様々な遺伝子の転写を活性化することが知られている。そこで、p53 およびその標的遺伝子 (*p21*, *cyclin G1*, *bax*, *fas*, *gadd44*) の発現の推移を免疫組織化学および RT-PCR 法で検索したところ、p53 陽性細胞は投与後 3h に、また、p21 陽性細胞は 6h に、それぞれピークに達した後、急速に減少した。また、上記の p53 の標的遺伝子のうち *gadd44* を除く全ての遺伝子の発現の増加が ENU 投与後 6h をピークとして認められた。さらに、ENU に暴露した p53 ノックアウトマウス由来の胎児終脳から抽出した細胞の細胞周期解析 (ENU 投与後 6h) を行ったところ、p53 ノックアウトマウスでは apoptosis のみならず、細胞周期の変動も認められなかった。

5AzC:TUNEL 陽性で特徴的な電顕像を呈する apoptosis 細胞は 5AzC 投与後 9h に ventricular zone に出現し、その数は 12h にピークに達した。24h にはほとんどの apoptosis 細胞は marginal zone に認められた。また、6h には ventricular zone の脳室沿いに多数の mitosis を呈する細胞の集簇が認められ、電顕的に異常分裂像が観察された。mitotic index は 6h にピークを示した後、急速に減少した。免疫組織化学的検索では、p53 陽性細胞数は 9h および p21 陽性細胞数は 12h にピークに達した。TUNEL、p53 および p21 陽性細胞は同一部位で観察された。この p53 の標的遺

伝子の発現の推移を RT-PCR 法で検索したところ、9 から 24h にかけて *p21*、*bax*、*cyclin G1* および *fas* の発現が顕著に増加した。

ところで、5AzC と BrdU はともに DNA に取り込まれる性質を有するので、BrdU 陽性細胞を近似的に 5AzC 取込み細胞と看做することができる。このことを利用して、BrdU のみを投与した群と BrdU と 5AzC を同時投与した群とで ventricular zone 内での BrdU 陽性神経上皮細胞の移動を検索したところ、BrdU のみを投与した群では 12 時間周期の細胞周期で神経上皮細胞が上下にエレベーター運動していることが示された。一方、BrdU と 5AzC を同時投与した群では 6h に分裂期での遅滞および 9 から 12h には脳室側から外側部への移動の遅延が顕著に認められた。さらに胎児終脳から抽出した細胞についての Flow Cytometry による細胞周期解析を行った結果、5AzC 投与 6h に G2/M 期での細胞周期の停滞が起こり、12h に apoptosis 細胞の発現増加が認められた。

D. 考察

(1) T-2 toxin 暴露による母体肝—胎盤—胎児肝における代謝系の変動

母体肝—胎盤—胎児肝軸に共通して apoptosis の発現が観察され、遺伝子発現プロファイルの検索でも概ねそれを支持する結果が得られた。apoptosis を含め T-2 toxin によって誘発される毒性の発現機構を、母体肝を中心に遺伝子発現プロファイルの面から考察すると、T-2 toxin により酸化ストレスが生じ、その結果、DNA 傷害、ミトコンドリア機能障害および脂質過酸化を引き起こし、最終的に細胞増殖抑制や apoptosis の誘導に至るものと考えられた。また、上記軸では薬物代謝関連遺伝子 (母体肝では第 I、II 相ともに、胎児肝と胎盤

では第Ⅱ相)の発現が減少しており、胎児肝で特徴的にヘム合成関連遺伝子の発現の減少が認められた点が注目される。今後は T-2 toxin 暴露後より早い時期(T-2 toxin 投与後 0.5〜24 時間)での検索を行い、特に上記軸における apoptosis の発現機構ならびに従来我々が報告してきているリンパ造血系における apoptosis の発現機構と比較検討を行う予定である。

(2) 胎児中枢神経毒性

一般に p53 による細胞周期停止および apoptosis の発現機構については、p53 が cyclin-dependent kinase のインヒビターである p21 の発現を誘導して G1 期で細胞周期を停止させ、その間に DNA の損傷を修復し、それが間に合わない場合に apoptosis を誘発すると考えられている。今回の実験でも、ENU および 5AzC は共に胎児中枢神経組織に p53 依存性の細胞周期停止と apoptosis を誘導した。しかし、ENU の場合は、投与 6h には S 期の細胞が増加したが(細胞周期解析)、S 期に相当する DNA 量を有していながら BrdU を取り込んでいない細胞が多数観察された(BrdU-incorporation assay)。このことは、細胞周期解析で増加した S 期の細胞の大部分は実際には DNA 複製を行っていないことを示している。こうした結果と apoptosis の発現の推移に関する検索結果から、ENU は DNA 複製を開始した神経上皮細胞に作用し、DNA 複製を重度に抑制あるいは停止させた後、G2 期に入る前に apoptosis を誘発するものと考えられた。一方、5AzC では、6h 後に ventricular zone の脳室沿いに多数の分裂細胞の集簇が認められ、それらの多くで電顕的に異常分裂像が観察されたこと、当該部位では 6h に BrdU と

5AzC をともに取り込んだ神経上皮細胞の停滞が観察され、また、9〜12h にかけて脳室側から外側部への移動の遅延が認められたこと、細胞周期解析で 6h に G2/M 期(恐らく M 期)で細胞周期停止が起こり、12h で apoptosis の誘発が顕著になったことなどから、5AzC は ventricular zone の外側部にある DNA 複製中の神経上皮細胞に取り込まれ、取り込んだ細胞を M 期で停滞させた後、分裂後の G1 期の細胞に apoptosis を誘発することが示唆された。

今後、上述した細胞周期停止や apoptosis の発現機構をより詳細に検索するために、トキシコゲノミクス手法を応用する予定である。また、神経系細胞の傷害後の修復/再生過程での遺伝子発現プロファイルを解析することで、未だ不明な点の多い神経系細胞の修復/再生機構にアプローチするとともに、それを介して、ブラックボックスである胎児中枢神経毒性と出生児の中枢神経障害との関連に迫りたいと考えている。

E. 結論

T-2 toxin に暴露した妊娠ラットの母体肝—胎盤—胎児肝軸では組織学的に apoptosis が共通して観察された(その他、母体肝細胞では脂肪化も)。遺伝子発現プロファイルに関する検索結果から、T-2 toxin による上記軸における毒性の発現機構には、酸化ストレスによる DNA 傷害、ミトコンドリア機能阻害、脂質過酸化、脂質代謝阻害等が関与していることが示唆された。さらに、ENU および 5AzC 暴露妊娠ラット由来の胎児中枢神経毒性について基礎検討を行った結果、ENU と 5AzC はともに p53 依存性に細胞周期停止と apoptosis を誘導したが、通説とは異なり、ENU は DNA 複