

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

プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究

(H14-トキシコ-008)

平成14年度総括・分担研究報告書

主任研究者

名古屋市立大学大学院 薬学研究科教授 宮田直樹

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長 奥田晴宏

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部室長 鈴木孝昌

第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所長 須藤哲司

平成15（2003）年3月31日

別添 3

目 次

・総括研究報告書概要版（別添 1）

I. 総括研究報告書（別添 4）

プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究

宮田直樹

II. 分担研究報告書（別添 5）

1. ライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現系の構築・ハイスループット試験系の開発

須藤哲司

2. 構造修飾した薬剤の合成・薬剤の構造修飾が遺伝子発現パターンに及ぼす影響の解析

宮田直樹

3. 構造修飾した薬剤の合成・薬剤の構造と遺伝子発現パターンの相関の解析

奥田晴宏

4. 実験動物データのヒトへの外挿を目指した基本手法の確立・プロテオーム解析への応用

鈴木孝昌

III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 6）

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究

主任研究者：宮田直樹
名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授

研究要旨

本研究では、薬物代謝酵素等の活性が維持されているプライマリーヒト細胞を用いて薬剤の曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行いデータベースを構築するとともに、薬剤および多様な構造修飾体を用いて遺伝子発現変化を解析する事により化学物質の構造修飾に伴う遺伝子発現パターンの変化を明らかにし、安全性の高い医薬品の創製につながる構造修飾法の確立を目指している。また、ヒト細胞での遺伝子発現のデータと実験動物を用いたデータを比較解析することにより、動物実験結果をヒトの安全性予測へ外挿するための基礎的知見を得る事を目的とする。

本年度は、

プライマリーヒト肝細胞（非凍結型：2 ロット、凍結型：2 ロット）、ヒト由来株化肝細胞（HepG2, LI90）の計 6 種の細胞を用い、無処理時の網羅的遺伝子発現解析を GeneChip U133A を用いて行い、特に薬物代謝酵素関連の遺伝子発現を比較し、最適材料の選択検討を行った。その結果、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた遺伝子発現解析系が様々な薬剤の網羅的遺伝子解析を行い比較する試験系として最適であることがわかった。また、経時的な遺伝子発現解析によって、効率よく薬剤の毒性評価系を構築するための薬剤処理時間の最適化を達成した。

2 型糖尿病治療薬として有用なグリタゾン類（PPAR- γ 作用薬）と、遺伝子発現を制御し新しいタイプの制ガン剤として期待されているヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤について、構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析するための新規誘導体を合成し（PPAR- γ 作用薬として 24 種の誘導体、HDAC 阻害剤として 32 種の化合物）、生物活性試験（脂肪細胞への分化誘導試験、HDAC 酵素活性阻害試験）を行うと共に、遺伝子発現の解析に関する予備的知見を得た。

非ステロイド系抗エストロゲン剤タモキシフェンは、乳ガンに対する化学療法的第一選択薬であるが、本剤の長期投与により子宮体癌の発生頻度が

増大しラットに対して肝癌を誘発することが知られている。そこで、タモキシフェン誘導体によるヒト肝培養細胞曝露時の遺伝子発現パターンの変動を検討することによりタモキシフェンの構造と毒性発現の関係を明らかにすることを目標とし、タモキシフェン誘導体の簡易合成法の開発を行い、市販の化合物を出発原料とし4工程でタモキシフェンを合成した。構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析するための一連の新規誘導体の合成を達成したので、今後は生物活性試験ならびに薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行うことにより構造と毒性との相関を明らかにする予定である。

実験データのヒトへの外挿を目指し、種々の薬剤をマウスに投与したときの肝臓および腎臓における遺伝子発現とヒトでの遺伝子発現との相関を明らかにする目的で、市販のガラスマイクロアレイおよび GeneChip を用いて、マウスに遺伝子傷害性物質を処理した際の、遺伝子発現変化を調べた。ガラスマイクロアレイを使った実験では、肝発がん物質であるベンツピレン、およびキノリンを用いて解析を行ったところ、両者に共通して発現の上昇する遺伝子として Bcl-associated death promotor など数種見つかり、これらが肝発がん性予測のための指標となる可能性が示唆された。また、GeneChip を用いた実験では、腎障害を起こし、遺伝子傷害性の示された天然物由来の成分であるアリストロキア酸を用い、標的臓器となるマウス腎臓での遺伝子発現変化を非標的臓器である肝臓と比較した結果、腎臓では薬物代謝酵素を中心として多くの遺伝子の発現が変化していることがわかった。しかし肝臓では、変化する遺伝子はごくわずかであった。

タンパク質発現の変化という観点から、遺伝子発現データとの比較を行うため、ジエチルニトロソアミン処理した肝臓でのタンパク質発現変化を2次元電気泳動を用いて解析を行った。その結果、発現の上昇または減少する5つのスポットが確認できた。現在、MALDI-TOF/TOF 型質量分析計を用いて、該当するタンパク質の同定を試みている。これら in vivo の実験で得られたデータは、今後 in vitro と in vivo のデータを比較し、ヒトでの安全性予測を行うための橋渡しデータとする予定である。

主任研究者

宮田直樹

名古屋市立大学大学院

薬学研究科教授

分担研究者

奥田晴宏

国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部長

鈴木孝昌

国立医薬品食品衛生研究所

遺伝子細胞医薬部室長

須藤哲司
第一化学薬品株式会社
薬物動態研究所長

協力研究者

幸田光復
名古屋市立大学大学院
薬学研究科助教授
鈴木孝禎
名古屋市立大学大学院
薬学研究科助手
小原有弘
第一化学薬品株式会社
薬物動態研究所研究員
名古屋市立大学大学院
薬学研究科研究員

福原 潔
国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部室長

石黒正路
サントリー生物有機科学研究所
部長研究員

Zhuohan Hu
Research Institute for Liver Diseases
China

A. 研究目的

本研究事業では、薬物代謝酵素等の活性が維持されているプライマリーヒト細胞を用いて、薬剤の曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行い、データベースを構築することを第一の目的とする。さらに、薬剤および多様な構造修飾体を用いて遺伝子発現変化を解析する事により、

化学物質の構造修飾に伴う遺伝子発現パターンの変化を明らかにし、安全性の高い医薬品の創製につながる構造修飾法の確立を目指す。さらにヒト細胞での遺伝子発現のデータと実験動物を用いたデータを比較解析することにより、動物実験結果をヒトの安全性予測へ外挿するための基礎的知見を得る。

本年度は、

- ① 須藤（第一化学薬品）が、薬物代謝酵素等の活性が維持されているプライマリーヒト肝・腎細胞および株化ヒト培養細胞を用いて、薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行うための遺伝子発現解析系を構築し、ハイスループット試験系を開発する、
- ② 宮田（名古屋市立大学大学院薬学研究科）が、2型糖尿病治療薬として有用な経口糖尿病治療薬となっているグリタゾン類（PPAR- γ 作用薬）、および、遺伝子発現を制御し新しいタイプの制がん剤として期待されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤について、構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析するため新規誘導体を合成し遺伝子発現を解析する、
- ③ 奥田（国立医薬品食品衛生研究所）が、肝毒性を有することが知られている非ステロイド系エストロジェン剤タモキシフェンの構造と毒性との相関を、網羅的遺伝子発現解析により明らかにする目的で、タモキシフェン誘導体の合成手法を確立する、

④ 鈴木（国立医薬品食品衛生研究所）が、実験データのヒトへの外挿を目指し、薬剤をマウスに投与したときの肝臓および腎臓における遺伝子発現の解析、および、生体機能性分子であるタンパク質の発現変化解析手法の確立する、ことを目的に研究を行った。

本研究を遂行することにより、ゲノム創薬の根幹となる薬剤の毒性発現に係わるヒトでの遺伝子発現情報が収集できる。その結果、医薬品候補化合物等について迅速・効率的にヒトでの安全性の予測が可能になり、安全性が高い薬剤の開発するためのトキシコゲノミックスの基盤技術開発に資することができる考える。

B. 研究方法と結果

1. プライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現系の構築とハイスループット試験系の開発

薬物代謝酵素等の活性が維持されているプライマリーヒト細胞を用いて、肝・腎毒性を有する薬剤の曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行い、安全性予測システムや早期毒性予測システムを構築することを目的とし遺伝子発現解析系の構築、および、ハイスループット試験系の開発を行った。

非凍結型プライマリーヒト肝細胞は、BD GENTEST 社より各 plate に培

養液を入れた状態で輸送され、入手後直ちに新しい培養液と交換し、継続培養した。細胞の使用は細胞播種後 10 日目から 1 ヶ月以内とした。

接着型凍結プライマリーヒト肝細胞は In Vitro Technologies, Inc.より購入し、液体窒素中に保存し、研究を行うたびごとに解凍して使用した。

被験物質処理は、培地に溶解できるものはすべて培地に溶解し、培地に溶解できないものは DMSO 最終濃度 0.1%となるように DMSO に溶解後、培地で希釈して用いた。処理時間は今回の試験においては 1, 4, 24, 48, 72 処理（すべての処理に共通ではない）を行ったサンプルを調製した。

totalRNA 抽出に関しては、分担研究報告書に記した。

GeneChip による遺伝子発現解析は、各被験物質処理を行った細胞より調製した totalRNA を使用した。純度・品質の検定には Agilent 2100 バイオアナライザシステムを用い RNA の断片化が起こっていないことを確認した上で研究に使用した。GeneChip 測定に用いるサンプルの調製は Affymetrix 社のマニュアルに基づいて行い、作成したサンプルを用いて GeneChip HG-U133A Array を用いてハイブリ、ウォッシュ、測定を行った。

GeneChip を用いて測定した遺伝子発現データは GeneSpring(Silicon Genetics 社製) Ver.5.0.3 にて解析を行った。

遺伝子解析にかかる研究についての倫理面への配慮に関しては、「ヒト

ゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年3月文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示)に従って行い、研究機関の実験動物取扱指針に従って行った。本研究に関わる倫理審査は第一化学薬品株式会社研究開発倫理委員会において審査され、承認を受け、倫理規定を遵守して実施した。研究に使用したプライマリーヒト肝細胞は、アメリカよりインフォームドコンセントが得られた移植不適合臓器を細胞に調製された状態で入手した。

使用細胞の検討：本研究ではヒトにおける毒性発現をより忠実に再現し得る材料としてのプライマリーヒト肝細胞（非凍結型、凍結型）について、薬剤曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行い、由来個体による発現の差異、非凍結・凍結による差異、ヒト由来株化肝細胞（HepG2, LI90）との比較を行い、毒性評価に妥当な実験系の構築の検討を行った。プライマリーヒト肝細胞（非凍結型：2ロット、凍結型：2ロット）、ヒト由来株化肝細胞（HepG2, LI90）の計6種の細胞を用い、無処理時の網羅的遺伝子発現解析をGeneChip U133Aを用いて行い、特に薬物代謝酵素関連の遺伝子発現を比較した。その結果、無処理の細胞で定常的に発現しておりGeneChipで検出できた遺伝子の総数は22283遺伝子部分の解析中8222～9872遺伝子部分となり37%～44%程度であった。その中でも6種すべての細胞の遺伝子発現を

用いて標準化する方法を用いた場合に、それぞれの細胞種において6種の平均より2倍以上発現変化してくる遺伝子を抽出したところ、LI90, HepG2の遺伝子発現変化は凍結型、非凍結型と異なり非常に多くの遺伝子が発現変動を示した。さらにLI90とHepG2で共通に発現変動した遺伝子も多く、その大部分が分子機能を制御する遺伝子であり、中でも酵素機能を制御する遺伝子の発現変動が大きくなっていた。また、肝細胞の機能の指標となる薬物代謝酵素関連（第I相および第II相あわせて209）の発現遺伝子数は非凍結型（Lot41:136, Lot42:137）、凍結型（Lot100:143, LotNOG:122）、株化細胞（LI90:81, HepG2:105）の順に少なくなった。

非凍結型および凍結型プライマリーヒト肝細胞のロット間の差、すなわち個人差（由来個体差）に着目し、無処理のLot41とLot42の遺伝子発現量を比較すると、ロット間差があることがわかった。この結果はLot41とLot100、Lot42とLot100でも同様であった。また、Lot42を用いて、2mMの濃度でアセトアミノフェン処理（4時間処理）した時の遺伝子発現量と、無処理のLot42の遺伝子発現量を比較した場合、ロット間の差よりも小さな遺伝子発現変動を示すことがわかり、個体差に基づくロット間変動は非常に大きいことが確認された。

次に、細胞処理における経時変化に関する検討を行った。非凍結型プライマリーヒト肝細胞（Lot42）を用

いてアセトアミノフェン処理時（処理時間は 4, 24, 48, 72 時間）における遺伝子発現変動を経時的に解析した。各処理時点で無処理の細胞と比較して 1/2 倍以下あるいは 2 倍以上に発現変動した遺伝子数を調べた。処理 4 時間では発現変動してくる遺伝子数は少なく、24 時間処理以降に発現変動する遺伝子数が多くなることがわかった。特に 48 時間処理では 4 時間処理の 4~5 倍程度の遺伝子が発現変動していた。さらに詳細に解析した結果 48 時間処理、72 時間処理で共通に遺伝子発現が抑制される遺伝子が非常に多かった。その内訳を見ると細胞の増殖や維持に関わる遺伝子の抑制であった。処理時間を 4 時間として 6 種の細胞種（凍結型 2 種、非凍結型 2 種、株化細胞 2 種）を用いてアセトアミノフェン処理を行ったときの遺伝子発現変動を解析したところ、2 mM という高濃度の処理にもかかわらず発現変動した遺伝子数は非常に少なかった。また細胞種の中での共通変動する遺伝子を調べたが、凍結型および非凍結型プライマリーヒト肝細胞を用いた場合にはそれぞれの中で若干の共通性が見出せたが、凍結型と非凍結型の間での共通性はわずか 1 遺伝子のみとなった。株化細胞に関しては他の細胞種とほとんど共通性が見られないことや、発現変動する遺伝子数が少ないことが特徴であった。

次に、代表的肝毒性物質に対する検討を行った。アセトアミノフェン

以外の代表的な肝毒性物質としてカルバマゼピン(1 mM)、イソニアジド(1 mM)、四塩化炭素(0.5 mM)を用いて遺伝子発現変動における共通性ならびに毒性メカニズムに基づく遺伝子発現変化を調べた。実験には、非凍結型プライマリーヒト肝細胞 Lot42 を用いて処理時間 4,24,48,72 時間で遺伝子発現解析を行った。各処理時点でコントロールに対して 2 倍以上あるいは 1/2 倍以下に遺伝子発現が変化した遺伝子数を解析した。その結果、これらの薬剤を処理した場合には 48 時間処理の時点で多くの遺伝子発現が変化していることがわかった。また、連続する処理時点間で共通に変化する遺伝子数に関しても解析を行ったが、その結果は処理の初期には共通する遺伝子変化は少ないものの、処理時間が長くなるにつれて共通する遺伝子変化が多く見られるようになった。また、最も多くの遺伝子が発現変動した薬剤処理はカルバマゼピン処理であった。カルバマゼピン処理では、すべての時点で共通して動く遺伝子が見出され、その遺伝子の機能を調べてみると、その多くが細胞の増殖あるいは維持に関わる遺伝子であることがわかった。また、共通して動く遺伝子の中には比較的初期の処理時点よりアポトーシスに関わる遺伝子の変化が見られた。

次にアセトアミノフェンに着目して他の薬剤処理との比較を行った。これら 4 薬剤はすべて肝毒性を有する薬剤であるが、それぞれ毒性発現

メカニズムが異なる。アセトアミノフェンの処理時間に伴う遺伝子発現変動の解析では、他の薬剤処理と共通な遺伝子変化または逆の遺伝子発現変動はないかを中心に解析を行った。その結果、アセトアミノフェンのみで遺伝子発現変動している遺伝子が約30～40%程度あるが、処理時間4時間の時のみ60%を超えていた。また、逆にすべての処理に共通した遺伝子数を解析すると4時間処理のときはすべての処理に共通する遺伝子はなく、さらには他の処理で逆の方向への遺伝子発現変動を示した遺伝子も多かった。各時点ですべての処理に対して共通して変動する遺伝子を調べると酵素関連の遺伝子やトランスポーター関連の遺伝子が多く見受けられた。

2. 構造修飾した薬剤の合成、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響の解析

2-1. PPAR- γ 作用薬

Troglitazone や Rosiglitazone などの TZD (thiazolidinedione) 薬は、インスリン抵抗性改善作用を有しており、2型糖尿病治療薬として期待されている。近年の研究から、TZD 誘導体は PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) を活性化することによりインスリン抵抗性を改善することが明らかになっている。PPAR は、核内レセプターの一つであり、リガンド依存的な転写制御因子であ

る。PPAR- γ は、脂肪組織に多く発現して脂肪細胞分化に深く関与しており、分化促進による脂肪細胞の質的变化が PPAR- γ アゴニストによるインスリン抵抗性メカニズムの一つと考えられている。これまでに3種類の TZD 薬が臨床に用いられてきた。Troglitazone は副作用である重篤な肝障害のために市販後中止になった薬剤として有名である。副作用の原因については不明な点も多いが、他の核内レセプターにも作用することが原因である可能性が指摘されている。

今回、肝毒性が問題になった Troglitazone、毒性が発現しない Rosiglitazone、Pioglitazone の構造を参考に、一連のチアゾリジン骨格を持たない PPAR- γ アゴニストの合成を行った。Troglitazone、Rosiglitazone、Pioglitazone、および、これらの新規合成化合物について遺伝子発現を解析し相関を明らかにすることにより、より毒性の少ない PPAR- γ アゴニストの開発に有用な知見が得られることが期待できる。

X 線結晶構造解析の結果から、rosiglitazone の TZD 骨格中のカルボニル基およびアミノ基が PPAR- γ のリガンド結合部位 (LBD) と水素結合ネットワークを形成し、これが LBD、特に AF-2 (activating function-2) の活性構造に重要であることが明らかになっている。また、TZD 誘導体以外の PPAR- γ のアゴニストでは、長鎖脂肪酸やプロスタグランジンなどカルボキシル基が LBD と作用している

ことが知られている。そこで、今年度は、TZD 誘導体の一種である rosiglitazone の構造で、その TZD 基カルボキシル基で置換した 3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propionic acid 誘導体を設計・合成した。分子中のアミノ基窒素には、種々のヘテロ環やアルキル基を組み合わせ導入し、24 の化合物（内、新規化合物 23）を合成した。

次に、合成した化合物の生物活性試験を行った。脂肪細胞には PPAR- γ 2 が特異的に発現しており、脂肪細胞の分化には PPAR- γ が深く関わっていることがこれまでの研究から明らかとなっている。脂肪細胞の分化は、形態学的には段階的な細胞内での脂肪滴の蓄積として観察されるが、その過程では aP2（脂肪酸結合タンパク質）などの特異的遺伝子群の発現がみられる。PPAR- γ は、ロイシンジッパー型転写因子である C/EBP（CCAAT/enhancer binding protein）などとネットワークを形成しながら、これらの分化遺伝子の発現調節マスターレギュレーターとして機能していることが明らかとなっている。そのため、脂肪細胞の分化は PPAR- γ アゴニストによって促進され、これによる脂肪細胞の質的変化がインスリン抵抗性改善機構の 1 つである。このことを利用したスクリーニング法が、脂肪細胞分化試験であり、脂肪細胞分化試験の利点として、in vivo 系での血糖降下試験との相関性の高さが挙げられる。アッセイ系は、東

洋紡のラット前駆脂肪細胞 Total Kit を用いた。実験の手順は、基本的にはラット前駆脂肪細胞 Total Kit のプロトコールに従った。Total Kit では分化促進剤（PPAR- γ アゴニスト）として 50 μ M indomethacin が使われているが、本研究では、indomethacin の代わりに TZD 薬である rosiglitazone maleate、troglitazone、および合成化合物を使用し、薬物共存下で約 2 週間培養した。Oil red O 染色による形態学的な観察によって、ポジティブコントロール（indomethacin を用いて Total Kit のプロトコール通りに行ったもの）と分化の程度を比較した。薬物濃度は、rosiglitazone・troglitazone では 0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、500 μ M に、合成化合物では 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM に設定した。その結果、合成した化合物の中に、脂肪細胞の分化誘導能を有するものを見出した。分化の度合いを定量的に検討するには、中性脂肪測定試薬「リピドス・リキッド」（小野薬品工業）を用いて細胞内の中性脂肪量を定量することも可能であり、現在、その他の合成化合物を含めて脂肪細胞分化の定量的評価と構造活性相関の解析を行っている。

次に、Gene Chip を用いた網羅的遺伝子発現解析（予備実験）を行った。接着型凍結プライマリーヒト肝細胞である Lot100 を用いた網羅的遺伝子発現解析実験は、被験物質として、Troglitazone (30 μ M, 3 μ M),

Rosiglitazone (30 μ M, 3 μ M), YH-1 (10 μ M, 1 μ M) (新規合成化学物質)、YH-16 (10 μ M, 1 μ M) (新規合成化学物質) を用いて行った。解析は、各処理時点で発現変動した遺伝子数を、高濃度処理と低濃度処理で共通した変動を示した遺伝子数、YH-1 と YH-16 のそれぞれの両濃度で共通に変動する遺伝子数、Troglitazone と Rosiglitazone のそれぞれの両濃度で共通に変動する遺伝子数などについて行った。さらに YH-1 および YH-16 によって発現変動する遺伝子が Troglitazone と Rosiglitazone で同じ方向に変動する遺伝子のどちらにより近いかの共通性の解析も行った。解析に至った遺伝子数を経時的に解析すると、1 時間処理と 4 時間処理では 24 時間・72 時間処理に比べて 1000~2500 遺伝子程度の差が見られることがわかる。このことは処理の比較的初期に強い遺伝子抑制が現れてしまい、発現解析に至らない検出限界以下の遺伝子が多いのではないかと考えられる。発現変動する遺伝子数を、経時的に解析したがそれほど大きな変化は見られなかった。また、濃度が異なっても共通変動した遺伝子数を比較してみたが、それほど大きな特徴は見られなかった。今回研究に用いた用量ではこれらの化学物質はそれほど強い細胞毒性を惹起しないために共通変動が見られていないと思われる。今回新規合成された YH-1 および YH-16 はチアゾジン骨格を持たない薬剤であるが網羅的遺伝発現

解析を行うことで、PPAR γ アゴニスト活性を有するかどうかと、さらには Troglitazone あるいは Rosiglitazone のどちらの薬剤に似た遺伝子発現変化を起こすかが興味をもたれるところであった。そこで YH-1 および YH-16 で誘導される遺伝子発現変動が Troglitazone あるいは Rosiglitazone で誘導される遺伝子発現変動のどちらと共通しているかを解析した。その結果は共通する遺伝子の総数では YH-1、YH-16 とともに Troglitazone の遺伝子発現変動に近いことがわかる。ただしそれほど大きな違いは観察されておらず、今後の更なる解析が必要と考えられる。

2-2. ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬

Histone deacetylase (HDAC) はヒストンの脱アセチル化の反応に関与して遺伝子の転写活性を制御している。この HDAC の阻害剤は癌細胞に対して細胞周期の停止、分化誘導、腫瘍細胞の形態正常化、アポトーシスなどの生物活性を示すことがわかっており、毒性が少なく既存の抗癌剤とは異なる機構で作用する薬剤として注目されている。また、既存の HDAC 阻害剤とは異なる構造を有する化合物を見出すことは、同様の活性を示す薬剤でも用途の幅が広がる可能性が考えられ、また、有機化学的にも生物学的にも新規の薬剤が見出されることは大変興味深いと考えられる。そこで新規の HDAC 阻害剤の開発に

向けて研究に着手した。研究は、酵素阻害活性の解析とともに、ヒトのプライマリー細胞を用いて作用・副作用に関する遺伝子発現解析を行うこととした。

HDAC 阻害剤のデザインは、以下のように行った。Histone deacetylase (HDAC) の活性部位は細長いポケットのような構造をしており、その入り口付近は疎水性を帯びている。活性中心には亜鉛が存在し、チロシン、ヒスチジン、アスパラギン酸が亜鉛に配位する形で存在している。既存の HDAC 阻害剤の多くは、本来の基質であるアセチルリシン残基と似たような構造を持っている。化合物は単純化すると cap、linker、metal-binding functional group などの biasing element を持つパーツの3つの部分から構成される。cap 部分は疎水性が高い芳香環の他に、立体的に大きな構造にあたる。そして、ヒドロキサム酸などの metal-binding functional group との間をアセチルリシンと同程度の鎖長を持つ linker で繋ぐ格好になっている。そこで、TSA よりもより構造が単純化されている SAHA をもとにして cap 構造には手を加えず、biasing element として既存の HDAC 阻害剤とは異なる構造を持つ化合物を設計した。まず、既存の阻害剤の多くは biasing element がカルボン酸から誘導されているため、カルボン酸からの誘導化合物だけではなく、よりアセチルリシンに近い構造を持つように linker 末端をアミン

に変換した。そして、metal-binding functional group にあたる官能基をアミド結合で繋げた。この時、官能基を選択する際には脱アセチル化の反応機構を考慮したうえで (1) アセチルリシンアナログとなりうるもの (2) 金属に配位しやすいと考えうるもの (3) 酵素を不可逆的に阻害するもの、などを想定して合成を行なった。この他に、linker 部分についても炭素鎖の長さが異なる三種類のものを合成した。また、SAHA と HDAC アナログである HDLP との結晶構造解析結果を検討し、ポケット底部にある亜鉛よりもさらに奥の部分に空間があることから、金属に配位しやすい構造を用いて鎖長を伸ばした化合物も合成した。新規合成化合物数は、32 である。詳細は、分担研究報告書に記載した。

次に、HDAC 阻害活性を調べた。Histone deacetylase (HDAC) の阻害活性の評価には、Histone Deacetylase Fluorescent Activity Assay / Drug Discovery Kit (BIOMOL) を用いた。

ポジティブコントロールとして用いる Trychostatin A (TSA) と Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) の HDAC 阻害活性を、キットを用いて評価したところ、IC₅₀ は TSA が 30 nM、SAHA が 300 nM であり、TSA と SAHA では HDAC 阻害濃度は一桁異なることがわかった。合成した化合物について、サンプル濃度を 100 μ M となるように調製してスクリーニングを行なった結果、

ヒドラジン末端を有する化合物とプロモアセチル末端を有する化合物は、1 μ M の SAHA と同程度の HDAC 阻害活性を有することが明らかになった。現在、IC50 値などを明らかにするための実験を行っている。

次に、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞である Lot100 を用いて網羅的遺伝子発現解析実験を行った。被験物質としては、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Trichostatin A (TSA)、*N*-Hydroxy-*N*-phenyloctanediarnide (SAHA) (10 μ M)、および、新規に合成した Methyl 6-anilino-6-oxohexylcarbamate (P-Me)と 6-[(amino-carbonyl)amino]-*N*-phenyl-hexanamide (P-Urea)を用いた。解析の結果、処理1時間では発現変動する遺伝子数は少ないが、4時間処理では TSA、SAHA および P-Me において非常に多くの遺伝子が発現変動していることがわかった。また、2濃度共通して発現変動した遺伝子も TSA、SAHA および P-Me で多かった。また、TSA と SAHA で共通して発現変動した遺伝子も多いことがわかった。P-Me および P-Urea によって発現変動する遺伝子と TSA と SAHA 処理時に変動する遺伝子との共通性を比較したところ、P-Me に関しては多くの遺伝子で共通変動が認められたが、P-Urea では共通性が低かった。現在、詳細な解析を実施中である。

2-3. タモキシフェン関連化合物

タモキシフェンは非ステロイド系

の抗エストロゲン剤であり、乳がんに対する化学療法の第一選択薬として世界中で広く使用されている。また、乳がんに対してハイリスクを有する女性に投与することにより乳がん発生率を減少させることが報告されている。一方、本剤の長期投与により子宮体癌の発生頻度が増大することが報告されている。また、ラットに対して肝癌を誘発し、p53 遺伝子の変異を高頻度で惹起する。タモキシフェンの発癌性は、とくに本剤を健常な女性に対して乳がんの予防投与する上での重大な障害となる。タモキシフェンの肝癌誘発性には薬物代謝酵素による活性化とそれに引き続いて生じる DNA 損傷が関与していると考えられている。即ち、CYP3A4 により α -ヒドロキシタモキシフェンが生成し、さらにスルホトランスフェラーゼにより究極代謝活性体である硫酸抱合体が生成する。この硫酸抱合体は硫酸基の脱離を伴い、グアニン塩基の環外アミノ基と共有結合することが報告されている。 α -ヒドロキシ体以外に 4-ヒドロキシ体、*N*-脱メチル体、*N*-オキシド体、及びそのエポキシド誘導体等が代謝物として知られ、活性と構造との関係が調べられている。興味深いことに (Z)-4-ヒドロキシ体はタモキシフェンに比べて 100 倍以上強い抗エストロゲン作用を示すが、(E)-4-ヒドロキシ体の抗エストロゲン作用は極めて弱い。オレフィンに結合したエチル基が発がん性に深

く関与していると推定されていることから、エチル基を各種の置換基に変換した一連のタモキシフェン誘導体の構造と遺伝子発現パターンの変動には興味を持たれる。本研究では、これら誘導体の簡便な合成法を開発することを目的とし、タモキシフェン合成に関する検討を行った。その結果、市販品であるベンジル-4-ヒドロキシフェニルケトンを出発原料とし、4工程でタモキシフェンを Z,E の混合物として合成することに成功した。また、代謝物による遺伝子発現パターンを検索するため、タモキシフェン N-オキシド及びそのエポキシド誘導体を合成した。Z,E 異性体は分離可能であり、必要に応じて精製し、生物活性の測定に供する。次年度計画で合成予定のタモキシフェン誘導体についてもその 4-ヒドロキシ化は可能と考えており、これら誘導体も次年度研究において合成し、遺伝子発現に及ぼす効果を検討する予定である。

3. 実験動物データのヒトへの外挿を目指した基本手法の確立・プロテオーム解析への応用

3-1. 遺伝子発現変化の解析

遺伝子発現解析手法を用いて毒性の予測を行うトキシコジェノミクスは、従来のクラシカルな毒性試験では予測できなかった臨床試験等における実際のヒトでの毒性の予測に大きく貢献することが期待されている。

本研究班では、ヒトでの毒性を予測する系として、よりヒトに近い実験材料としてプライマリーヒト肝・腎細胞を用いて、in vitro における曝露による発現の変化を調べる事になっている。プライマリー細胞においては、ある程度の代謝酵素活性を維持するなど、通常の株化細胞に比べるとより生体内に近い状況で試験をすることが可能であるが、in vitro の実験であるがゆえの限界も有ると予想される。In vitro と in vivo における作用の違いを検討する上でも、in vivo での動物を使ったデータを蓄積し、両者を比較することは重要である。そこで、比較的作用機序の良く知られた各種遺伝子傷害性物質をマウスに投与し、肝臓および腎臓における遺伝子発現の解析を行った。発現の解析には、市販のマイクロアレイとして、clontech 社の Atlas ガラスマイクロアレイおよび Affymetrix 社 GeneChip を使用した。

一群3匹の7週令の雄 C57BL6 マウスに対し、肝発がん物質ベンツピレン (BP)、キノリン (Q) を単回腹腔内投与し、4時間後および24時間後にマウスより肝臓を回収した。TRIzol 試薬中にてホモジネートし、totalRNA サンプルを得た。得られた totalRNA サンプルより oligo dT-30 カラムを用いて mRNA を単離した後、RT-PCR により cDNA を調整し、無処理対照細胞より調整した。cDNA には Cy-5 で、処理サンプルを Cy-3 にて蛍光ラベルしてプローブとした。

なお、プローブの調製には、Atlas Fluorescent Labeling Kit (Clontech)を使用し、そのプロトコールに従って蛍光ラベル化を行った。

マイクロアレイへのハイブリダイゼーションには、Clontech 社製 Atlas™ Glass mouse 1.0 Array (1081 遺伝子)を用いた。専用のチャンバー中にて処理、無処理ラベル化 cDNA サンプルを 50 度にて一晩競合的にハイブリダイゼーションさせた。洗浄後、得られた Cy3 および Cy5 のシグナル強度を GenePix 4000 マイクロアレイスキャナーにて定量した。データ解析にはシグナル強度の S/N 比が少なくとも片側の波長で 2 を越えるスポットを用い、グローバルノーマライゼーションを行った後、発現量の比を算出し、処理により発現の変化する遺伝子を特定した。ベンツピレン(BP)、キノリン (Q) を投与し 4 時間後の遺伝子発現変化について解析をした結果、発現の上昇する遺伝子、減少する遺伝子が検出できた。このうち動きが大きかった 10 遺伝子を抽出した。BP と Q による変化は、比較的類似しており、肝発がん物質に共通した遺伝子変化である可能性が示唆された。BP においては誘導が予想された p450 1A1 遺伝子の発現量が増加しており、この試験系の信頼性が確認された。BP のみで発現の上昇した遺伝子として、CYP 1A1 と linker for activation of T cells があり、Q 特異的に発現の上昇した遺伝子として EGF receptor pathway substrate 8、calcium binding

protein A11 (calgizzarin)が見つかった。BP と Q での共通した変化として、Bcl-associated death promoter, talin, wingless-related MMTV integration site 3, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 13 などの遺伝子の発現が上昇した。また、myelin transcription factor が共通して減少していた。

Affymetrix 社 GeneChip を使った遺伝子発現を解析は、以下のようにして行った。7 週令の雄 C57BL/6 マウスに対し、植物由来の遺伝子傷害性物質であるアリストロキア酸を単回強制経口投与し、24 時間後にマウスより臓器を回収した。個体ごとに RNA later 溶液(Qiagen)中にてホモジナイズし、RNeasy mini キット(Qiagen)を用いて情報に従い、totalRNA を単離した。totalRNA(5µg/ml)より、reverse transcriptase により cDNA を合成した。この際、プライマーとして、T7 プロモーターを結合させた poly dT を用いることにより、引き続き T7RNA polymerase による転写を行い、増幅された cRNA を合成した。cRNA 合成時にビオチンラベル化 dNTP を用いて標識した。これを断片化したのち、50 度にて 16 時間 GeneChip にハイブリさせた。ハイブリ溶液を除いた後、Affymetrix 社の GeneChip 用フルイディックステーションにて洗浄および、ストレプトアビジン-フィコエリスリンによる蛍光ラベル化を行った後、GeneChip 専用スキャナーにてスキャンを行い、チップの蛍光イメージを取得した。チップイメージ

を GeneChip 用データ解析ソフト Microarray Suite にて解析し、数値化するとともに、パーフェクトマッチおよびミスマッチプローブ間の蛍光強度比から Presense/Marginal/Absence の判定を行った。その後、GeneSpring ソフトウェアにデータを取り込み、標準化を行った後、コントロール群と処理群の発現比を算出した。この際、どちらかの処理群において、少なくとも 2 匹のマウスにおいて Presence の判定がある遺伝子のみを信頼性のあるデータとして採用した。アリストロキア酸(AA)処理 24 時間後の腎臓および肝臓における遺伝子発現変化を GeneChip を用いて解析を行った結果、発現の変化する遺伝子群が検出された。2 倍以上発現が上昇、または減少する遺伝子は、腎臓ではそれぞれ、40、および 6 遺伝子、肝臓では 6、および 5 遺伝子と、前者で多かった。変化のみられた遺伝子のうちで既知の遺伝子に関してリストアップした。共通して発現上昇する遺伝子として、amino levulinate synthase, MHC class III region RD 遺伝子が同定された。また、腎臓特異的な変化としては、GST や P450 などをはじめとする、PhaseI/II の薬物代謝酵素類が多く認められた。さらに、遺伝子傷害性との関連性が示唆される遺伝子としては、heat shock protein 70kD, cyclin G, FBJ osteosarcoma oncogene が含まれていた。

一方、遺伝子発現データの解釈の上で、直接の生体機能性分子である

タンパク質の発現変化をとらえることは、非常に重要である。遺伝子発現に関しては、既に各種のマイクロアレイを使った網羅的かつ簡便な解析法が確立されているが、タンパク質の発現に関しては、まだそれらと同等な解析技術は確立されていない。遺伝子発現データの解釈をさらに進める上でも、タンパク質の発現に関するデータを有る程度網羅的に解析する手法を確立することが急務とされている。そこで、本研究では、2 次元電気泳動や液体クロマトグラフィーと質量分析法を組み合わせた試験法さらには多次元 LC とタンデム型質量分析計を組み合わせた手法の開発により、ハイスループットなタンパク発現解析をめざした。今年度は、まずマウス肝臓のホモジネートを用い、比較的普及した手法である 2 次元電気泳動法によるタンパク質の分離により発現の変化するタンパク質の同定を試みた。MutaMouse、雄 7 週令に、肝発がん物質である DEN を週一回 25 mg/kg にて腹腔内投与し、最終投与 7 日後にマウスを解剖し臓器を回収した。未処置群、および DEN 処理群 3 匹のマウスより得られた少量の肝臓組織を混合して、タンパク質抽出用細胞破碎液（urea/thiourea/ CHAPS/dithiothreitol/spermine）中にて、ホモジネートした。得られた溶液のタンパク質含量を測定後、タンパク量として 50μg に相当する量を、固定化 PH 勾配 (PH3-10)イモビランドライストリッ

プゲルによる一次元目となる等電点電気泳動を行い、続いて SDS-ポリアクリルアミドゲルによる分子量に基づく二次元目の電気泳動を行った。得られたゲルを、銀染色法により染色し、スポットを検出した。2次元電気泳動ゲル上の、発現が変化していると思われるスポットを切り出し、トリプシンにてゲル内消化し、ZipChip (Qiagen)にて脱塩後、マトリックスとして α CHCA と混合して、MALDI 測定用ターゲット上へスポットした。MALDI-TOF/TOF 型質量分析装置である AB4700 にて、目的とするペプチド混合物の MS および MS/MS 解析を行った。未処置群と DEN 処理群の肝臓ホモジネートの可溶性タンパクを2次元電気泳動により分離した結果、いくつかのスポットを検出できた。これらを肉眼的に比較することにより、明らかに発現量が変化したスポットとして、DENにより発現の増加する変化するスポット3つと減少するスポット2つが検出された。一方、2次元電気泳動により得られたスポットを MALDI-TOF/TOF 質量分析計にて同定するための基礎検討を行った結果、クマシーブルー染色で確認できる程度のスポットについては検出が可能である事がわかった。しかし、今回得られたスポットについては、銀染色レベルでの検出であるため、その同定は難しく、今後さらに感度を上げる必要があると考えられた。

D. 結論と考察

1. プライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現系の構築とハイスループット試験系の開発

本研究ではヒトにおける毒性発現をより忠実に再現し得る材料としてのプライマリーヒト肝細胞（非凍結型、凍結型）について、薬剤曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行い、由来個体による発現の差異、非凍結・凍結による差異、ヒト由来株化肝細胞（HepG2, LI90）との比較を行い、毒性評価に妥当な実験系の構築の検討を行った。

最初に、細胞の性質に関する考察を行う。LI90 および HepG2 細胞はそれぞれ 55 歳の日本人女性、15 歳のコーカシア人男性由来の肝がん細胞株であり、その染色体数は近二倍体程度であるが、がん細胞として細胞の増殖は増大している。さらに肝細胞としての機能は低下しており、特に細胞内の酵素機能は著しく低下していることが考えられる。しかし HepG2 においては薬物代謝酵素誘導剤で処理することにより CYP1A 分子種ならびに CYP3A 分子種に関しては誘導が確認されており、その活性は細胞に存在することがわかっている。実際に遺伝子発現解析結果からは酵素機能の変動つまり機能低下が観察された。このことから考えると、通常のヒトでの遺伝子発現と非常に異なるこれらの細胞を用いて毒性評価の実

験系を確立することは危険因子を多く含むと考えられる。今後の検討結果によって毒性評価に有用な遺伝子群が抽出され、その遺伝子発現レベルがこれら株化細胞と比べて大きく通常のヒト細胞と異なることと、薬剤に対する遺伝子発現のレスポンスが同様であることが確認できれば、増殖する細胞であるこれら株化細胞は生命倫理上でも有用性が高いといえる。

薬物代謝酵素の発現遺伝子数が非凍結型、凍結型、株化細胞の順に少なくなったことは材料の有用性を評価する上で重要な知見といえる。薬剤は体内に吸収されると主に肝臓で代謝を受ける。もともと薬剤に毒性がある場合もあるが、肝臓で代謝されて初めて毒性を示す薬剤も数多く存在する。また、ヒト体内での薬剤の動態を考えた場合には代謝酵素によって代謝を受けた代謝産物が非常に重要であるといえる。遺伝子発現をヒト体内での毒性評価に用いる場合においては薬剤の未変化体およびその代謝産物の影響を考慮する必要があるが、そのためには薬物代謝酵素の活性を有する細胞を用いるのが適していると考えられ、またその薬物代謝活性が生体をよく反映している方が望ましい。そのような観点から考えると、非凍結型および凍結型のプライマリーヒト肝細胞を用いることが最適であると示唆された。

無処理の細胞同士の遺伝子発現を比較することによって、非凍結型、凍結型のロット間差すなわち個人差

(由来個体差)が非常に大きいことが明らかとなり、薬剤処理を行ったときよりも遺伝子発現に差が生じていることがわかった。このような結果から、様々な薬剤による影響をプライマリーヒト細胞で評価する場合には、出来る限りロットを揃えなければ薬剤による遺伝子発現の違いは検出できず、ロット間差の変動の中に混ざってしまうことが考えられた。そのような観点から考えると凍結型のプライマリーヒト肝細胞が最適であると考えられた。薬物代謝酵素等の発現遺伝子数も非凍結型とそれほど差異は無く、凍結保存してある細胞を薬剤処理前に細胞を起こして準備し使用するのが望ましいと考えられた。もちろん考えられるのはロット間で共通性が見出されるのかということであり、凍結型プライマリー細胞を数ロット用いて標準化する方法が良いと考えられた。

次に、処理時間に関する考察を行った。非麻薬性鎮痛薬であるアセトアミノフェンの過剰使用による急性中毒は劇症肝炎の重要な原因となっている。成人で10~15g以上または1日4g以上を数日間投与することにより肝のグルタチオンが減少する。このグルタチオンは危険性の高い毒素の中間代謝産物と結合することによって、通常は薬物の解毒を行う働きをもつ。この機能が飽和状態に至ると、遊離した代謝産物は肝の巨大分子と結合し、主に小葉における壊死を起こす。微小血管障害は重要な損

傷の早期機序のようである。肝障害はしばしばアセトアミノフェン摂取の2～5日後まで明らかにならず、その後急性肝細胞壊死の臨床的または生化学的な証拠が明らかとなる。致死率はこの薬を25g以上摂取した場合増加する。非凍結型プライマリー肝細胞（Lot42）を用いてアセトアミノフェン処理時における遺伝子発現変動を経時的に解析した結果から、処理の初期では遺伝子発現変動が少ないが、24時間処理後より発現変動してくる遺伝子の数が増大する。また48時間後で変動する遺伝子数が最高となる。48時間処理、72時間処理と共通した遺伝子が多く見られるようになった。このことはアセトアミノフェンの毒性は弱く、その代謝産物が毒性を有しており処理の初期においてはその毒性は比較的弱く観察され、その後経時的に細胞毒性が出てくると考えられる。それとともに遺伝子発現変動も大きくなり、48時間処理の時点で最高となった。48時間処理と72時間処理において共通して遺伝子の発現が抑制される遺伝子の内訳を見てみると細胞の増殖や維持に関連している遺伝子が多く含まれており、細胞毒性が出てその機能の維持が不能になってきていることが推察される。処理時間を4時間として6種の細胞種（凍結型2種、非凍結型2種、株化細胞2種）を用いてアセトアミノフェン処理を行ったときの遺伝子発現変動を解析したときには、同じ薬剤処理を行っている

にもかかわらず、共通した発現変動を示す遺伝子は少なかった。これは2mMという高濃度の処理にもかかわらずアセトアミノフェンの毒性が低く、細胞に共通の変化が見られていないことが考えられる。アセトアミノフェンは代謝されて初めて毒性を示す薬剤であり、4時間処理という時間では毒性効果が細胞にはっきりとした形であらわれていない結果であると考えられる。同様の処理を48時間行った場合には共通した発現変動を示す遺伝子が多くみられると考えられる。このようにどの時点で遺伝子発現変動を解析を行うのかということで、同じ処理を行っても細胞を変えるだけ、特に同じ凍結型あるいは非凍結型のプライマリーヒト肝細胞で細胞を変えるだけでも薬剤による特徴ある遺伝子発現変化を見逃す恐れがある。処理時間に関しては非常に短いものから72時間程度までの処理を行い、その中で数点の時点で評価するのが望ましいと考えられた。しかし、遺伝子発現解析には多くのコストを要するため、如何に少ない時点で遺伝子発現解析を行い、その毒性に基づく特徴ある遺伝子発現変動を捉えられるかが非常に重要であると考えられる。

次に、代表的肝毒性物質処理に関する考察を行った。まず、今回研究に用いた薬剤の毒性機序について文献を参考に記載する。カルバマゼピンは抗てんかん薬であり重篤な肝障害（胆汁うっ滞性、肝細胞性、また

は混合型、肉芽腫性)を起こす可能性がある薬剤である。またこの薬剤は間質性腎炎等の重篤な腎障害を起こすこともある薬剤である。イソニアジドは抗結核薬であり、約 20%の患者で通常一過性のわずかなトランスアミナーゼの上昇を認める。明らかな肝炎が 1~2%にみられ、ときに死に至る。35 歳以上の患者および同時にリファンピンを投与されている患者では、より肝障害を起こしやすい。肝毒性の発症率はアセチル化が遅い人の方が大きい。服用後 2~3 週間に発症するほとんどの薬物関連肝炎と異なり、イソニアジドによる損傷は 1 年近くまで遅れて発症することもあり、その時点では関連性が見過ごされる。薬物を中止しない限り進行性慢性肝炎および肝硬変に移行しうる。この反応が過敏性メカニズムによるのか肝毒性の代謝産物に起因するものなのかはよくわかっていないが、多くの証拠では後者の可能性が高い。四塩化炭素は肝障害のモデル物質として動物実験に繁用されてきた。四塩化炭素による肝障害は、四塩化炭素そのものによって引き起こされるのではなく、体内(肝臓)で生成した反応性に富む中間代謝物(ラジカル)によって引き起こされる。この活性代謝物は肝細胞内の滑面小胞体に局在する CYP によって生成する。一晩、ラットを絶食状態におくと、CYP2E1 の活性が著しく亢進する。四塩化炭素は CYP2E1 によって代謝されるので、一晩絶食したラ

ットに四塩化炭素を与えると極めて強い肝障害が起こる。前の晩に普通に餌を食べたラットでは血清 GPT (肝障害の指標)は数百で、肝臓も軽度の脂肪変性を示すのみで肝細胞の壊死はみられない。ところが、一晩絶食のラットでは、血清 GPT は数千となり、肝中心葉に広範な細胞壊死が認められる。これらの 3 薬剤を用いて文献値を参照に、十分に細胞毒性が現れるような濃度(カルバマゼピン:1 mM, イソニアジド:1 mM, 四塩化炭素:0.5 mM)で細胞処理を行った。網羅的遺伝子発現解析の結果から、それぞれの薬剤処理によって発現変動する遺伝子が導き出されたが、4 時間程度の短時間の薬剤処理では比較的発現変動する遺伝子が少なかった。このことは薬剤の毒性発現メカニズムと深く関わっており、そのメカニズムが用いた薬剤による直接毒性によるものであれば比較的処理の初期に大きく遺伝子発現が変化してくると考えられるが、今回用いた薬剤はその代謝産物が主に毒性を示すために 48 時間処理の時点で大きく遺伝子発現変動を示した。このことは初期の遺伝子発現変動が薬剤の特徴を示すような遺伝子発現となり、その後起こる細胞毒性に対する遺伝子発現変動が経時的に現れてくるものと考えられる。そのことは連続する時点間で共通する遺伝子発現変動が処理時間を長くすることで多くなることや、その共通して変動する遺伝子が細胞の増殖や維持、さらには