

アポトーシスに関わっている遺伝子が多いことに示されている。今後のさらなる検討により、それぞれの毒性メカニズムに対応する遺伝子発現変動が見出されると考えられた。カルバマゼピンの処理で最も多くの遺伝子発現変動が観察されたが、すべての時点で共通して発現変動した遺伝子が見出されている。Up-Regulateされている31遺伝子とDown-Regulateされている9遺伝子である。これらの遺伝子が他の処理で同様に変動しているかを調べたところ、他の処理でも同様の変化を示していることが多いということがわかった。これらの遺伝子は肝毒性物質に共通で、評価に有用な遺伝子群であることが示唆された。次にアセトアミノフェン処理に着目して他の薬剤処理との比較を行ったときには処理の初期段階ではアセトアミノフェン処理に固有の遺伝子発現変動が観察され、他の処理との共通性が見られなかった。このように薬剤処理の初期においては薬剤の特徴を表す遺伝子発現変動が観察されると考えられる。一方、24時間処理以降に着目してみると、他の処理で共通した遺伝子発現変動が良く見られるようになる。特に48時間処理では変動する遺伝子数も多いが、共通して変動する遺伝子数も多くなっていることがわかる。このことは薬剤で細胞が薬剤固有の特徴を示す遺伝子発現の変化を受け、その後細胞毒性として共通した遺伝子の変化が見られていることによる

と考えられる。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のリストからは酵素関連やトランスポーター関連の遺伝子の変動が共通して見られたが、これは薬剤による誘導効果によるものと考えられ、毒性代謝物を分解あるいは排泄する方向に遺伝子の変化が起こっているためであると考えられる。

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

最初に、PPAR γ 作用薬および構造修飾体を用いた遺伝子発現解析を考察する。インスリン非依存型糖尿病(NIDDM)の経口治療薬として、膵 β 細胞からのインスリン分泌を刺激するSU剤が用いられてきた。最近、これに加え新しい治療薬として、インスリン感受性を亢進させるチアゾリジン系薬剤(Thiazolidinediones)が発売もしくは治験段階で使用されている。日本人の推定糖尿病患者は500~600万人であり、その95%はII型糖尿病がしめると考えられている。現在、日本国内販売されている唯一の薬剤は、ピオグリタゾン(商品名、アクトス:武田薬品)である。最初に販売されたTroglitazoneは肝障害の副作用が稀に出現することで、販売を停止された。現在、治験段階にある薬剤は、JTT-501(日本たばこ)など数種類存在する。チアゾリジン系薬剤は、肥満のある糖尿病患者に高い有効率

を示すことが証明されている。しかし、BMI が高くても無効例がある反面、やせていても著効例があるなど、どのような糖尿病患者に最も有効であるかは、今後検討されていかなければならない課題である。現段階では、インスリン抵抗性があると推測される患者（空腹時血中インスリン高値で、食事療法、運動療法のみで十分な効果が得られない患者）や SU 剤で効果不十分な患者に使用するのが妥当だとされている。チアゾリジン系薬剤の直接の標的として脂肪細胞およびその分化過程に対する影響が注目されていた。そうした中、1988 年にはチアゾリジン系薬剤を前駆脂肪細胞に加えると脂肪細胞に分化させることができることが初めて見出された。脂肪細胞の分化に重要な転写因子は核内受容体である PPAR- γ であることが分かっていたが、1995 年にチアゾリジン系薬剤はこの PPAR- γ に結合し、活性化することが報告された。さらにその後、PPAR- γ には内因性のリガンドがあるはずだという検討が進み、それが 15-deoxy-12,14-プロスタグランジン J₂ であることが分かった。これにより、チアゾリジン系薬剤はプロスタグランジン J₂ 代謝産物と共通の核内受容体情報伝達系を介して、脂肪細胞分化に重要な転写イベントを開始することが判明している。なぜ脂肪細胞を分化させる薬剤が、インスリン抵抗性を改善するのか。これについては、現在明らかではない。脂肪細胞から

分泌される TNF α などのサイトカインが、筋肉や肝臓にインスリン抵抗性を引き起こし、チアゾリジン系薬剤はこれらの分泌量の変化をもたらすとの仮説が従来からあった。しかし、最近ではチアゾリジン系薬剤が直接筋肉や肝臓に作用してインスリン抵抗性を改善すると考えられるデータも示されている。例えば、脂肪細胞特異的な aP2 プロモーター下でジフテリア毒素 A を発現させ、脂肪細胞を壊死させたトランスジェニックマウス (aP2/DTA transgenic mice) を用いた検討が報告されている。aP2/DTA マウスは成長すると全く脂肪組織がなくなるが、高インスリン血症、高血糖、高中性脂肪血症、脂肪肝などを起こすことが知られている。ところがこのマウスに Troglitazone を投与すると、高血糖、高インスリン血症、高脂血症が劇的に改善される。そのためこの報告では、Troglitazone の効果は、脂肪細胞の存在とは独立に起こると結論している。最近の報告では、1) チアゾリジン系薬剤は TNF- α によるインスリン抵抗性を改善する。2) チアゾリジン系薬剤は、単球マクロファージの遺伝子発現や炎症性サイトカイン産生を強力に抑制する。3) 高血圧、血中脂質の上昇、血液凝固系の亢進等を是正する作用を介して動脈硬化を改善する。などの報告もなされている。今回このチアゾリジン系薬剤である Troglitazone と Rosiglitazone を用いて、Troglitazone のみで惹起される

肝毒性に関して、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことで比較検討した。解析に至った遺伝子数を経時的に見てみると 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も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。凍結型プライマリーヒト肝細胞を用いた細胞毒性試験を 37 ロット用いて行った結果をまとめた論文があるが、Rosiglitazone の方が若干細胞毒性が弱いが大差は認められない。今回用いた濃度は 30 μM を用いたが、文献を参照すると Troglitazone は平均 82.8 μM が IC_{50} 値となり今回の用量では毒性が低いことが示唆される。Rosiglitazone に関しても同様であり、平均 122.4 μM が IC_{50} 値であった。この 37 ロットを用いた研究においても毒性発現に差が見られるがこの差はロット間つまりは個人差を反映するものであり、この点からも 1 ロッ

トを用いた遺伝子発現解析では薬剤に応答したレスポンスを一般化できない危険性がある。これは肝毒性発現メカニズムに関しても同様であると考えられる。細胞が何らかの共通方向への変動を起こせば、遺伝子変動は共通してくると考えられるが、今回はそのような変化は見られなかった。また、処理時点間で共通変動する遺伝子数についても調べてみたが、ほとんど共通性は見られなかった。化学物質処理による遺伝子発現の変動は一過性のものであると考えられ、毒性兆候などが現れ、細胞が死ぬ方向へ動き出した時には非常に共通した遺伝子の変化が現れると考えられるが、それ以外のレスポンスを mRNA レベルで捉えるには解析する時点の最適化あるいは多数の時点の解析を行い出来るだけ特徴的な遺伝子発現変化を見逃さないようにする必要があると考えられる。また、同じメカニズムで毒性発現の起こす化学物質だとしても、薬剤がそのような変化を細胞に起こさせるために必要な時間は異なり、そのレスポンスには時間差があると考えられる。今後この問題を如何に克服するかが重要な問題となるが、より多くの薬剤で多くのデータを蓄積し解析する必要があると考えられる。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子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

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。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。

次に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に関する考察を行う。高等生物の核 DNA は 4 種類のコアヒストン (H2A, H2B, H3, H4) からなる 8 量体構造の周囲を約 2 回弱巻き付きながら数珠上につながったヌクレオソームと呼ばれる構造体として存在する。これはさらに高次構造を作り高度な制御を受ける。こうした DNA と蛋白質の複合体は一般にクロマチン構造と呼ばれ、遺伝情報の正しい発現に寄与していると考えられる。ヒストンのアセチル化は、リン酸化とともに最も古くから知られたヒストンの翻訳後修飾であり、そのレベルはアセチルトランスフェラーゼ (HAT) とデアセチラーゼ (HDAC) のバランスによって決まっている。近年、その実体について研究が進み、HAT は転写促進因子に導かれて DNA に近づき、近隣のヒストンをアセチル化することによって遺伝子発現を誘導する一方、HDAC は転写抑制因

子によって脱アセチル化することにより遺伝子発現のスイッチを OFF にすることがわかってきた。また、この HDAC が急性骨髄球性白血病などの癌に転写抑制などを引き起こし、癌の進展に深くかかわっていることがわかってきた。そこでこの HDAC を分子標的とした薬剤開発が進められており、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は新規抗がん剤として注目されている。そのコンセプトは癌細胞での遺伝子の異常発現 (特に転写因子に関わるキメラ蛋白の異常発現) の結果引き起こされた、転写の異常抑制状態に HDAC が深く関与しており、その酵素活性を阻害することで腫瘍細胞内に正常の転写状態を取り戻そうというものである。その作用の結果として細胞の分化誘導、アポトーシス誘導、細胞周期停止、血管新生抑制、免疫修飾作用等が報告されている。本研究に用いたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は Trichostatin A (TSA)、*N*-Hydroxy-*N*-phenyloctanediamide (SAHA) および新規に合成された Methyl 6-anilino-6-oxohexylcarbamate (P-Me) と 6-[(aminocarbonyl)amino]-*N*-phenyl-hexanamide (P-Urea) である。1 時間処理ではそれほど多くの発現変動は見受けられなかったが、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の発現変動が観察された。このことは本薬剤の特徴的な遺伝子発現変化を解析するには 1 時間の処理では短すぎたということを表している。

また、発現変動した遺伝子の中には、発現抑制される遺伝子が多かった。この事実は HDAC 阻害剤が遺伝子発現の抑制を OFF にする事実とは一見逆のように思える変動であったがその詳細を明らかにするには更なる解析が必要であると考えられる。ヒストン脱アセチル化酵素に対する TSA の阻害効果は IC_{50} 値 = 6~38 nM であるという報告があり、本研究に用いた用量では十分な効果が現れていると考えられる。しかし細胞の毒性は非常に弱いものであり、解析に十分な量の RNA が抽出できた。TSA 処理と SAHA 処理で共通した遺伝子が発現変動しているという事実はこれらの薬剤がヒストン脱アセチル化酵素を阻害するメカニズムは化学構造に基づいて異なるが、阻害効果によって起こる遺伝子発現変化が似ていることを示すものである。また、P-Me が TSA および SAHA 処理で発現変動する遺伝子とよく共通していた事実から考えるとこの化合物が新たなヒストン脱アセチル化酵素阻害剤となる可能性を示唆しており、今後の抗がん活性評価に興味を持たれる。また、これまでにこのように顕著に遺伝子発現を変化させた薬剤はなく大変興味を持たれた。今後の更なる解析によって遺伝子発現制御に関わる遺伝子の同定ならびに抗がん活性に関わる遺伝子が同定がなされることを期待している。

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

グラスマイクロアレイを使った実験では、比較的バックグラウンドのシグナルを押さえることが難しく、またムラも出来やすかった。きれいなシグナルを得るためには、ラベル化操作に関するある程度の熟練が必要と考えられる。一方、GeneChip を用いる解析においては、一連のプロトコールが既に標準化され、遺伝子数は多いが比較的安定したシグナルを得ることができた。今後、変化の見られた遺伝子に関して、定量的 RT-PCR 法による確認により、それぞれのアレイで得られたデータの信頼性を評価していく予定である。

今回、遺伝子傷害性物質により得られた変化として、薬物代謝酵素類が注目されたが、これらは代謝活性化に関与する一方、解毒的代謝にも関わっていると考えられる。今後、それぞれの代謝酵素と薬剤との相互作用に関してさらに詳しく検討を行う。また、ベンツピレンとキノリンでの共通した変化としてみられた、Bcl-associated death promoter, talin, wingless-related MMTV integration site 3, protein tyrosine phosphatase non-receptor type 13 に関しては、肝発がん性との関連が示唆され、今後定量的 RT-PCR による確認を経て、その役割に関して検討を加えていく必要がある。アリストロキア酸に関しては、同じ薬剤でも解析する臓器が異なる

ことにより動く遺伝子もかなり変わってきた。特に、遺伝子傷害性を含めた毒性のターゲットとなる腎臓において、非標的臓器である肝臓と比較してより多くの遺伝子変化が見られた点は注目でき、これらの遺伝子の発現変化が毒性予測の指標となる可能性が示された。この中には、例えば circadian clock protein など毒性とは関係なさそうな遺伝子も含まれており、これらがどのように関わっているのか興味を持たれる。アリストロキア酸はトランスジェニックマウスを用いた解析から、その標的臓器性がはっきりしていることが示されていることから、今後、他の標的臓器における遺伝子発現変化と比較し、共通して見られる変化を浮き彫りにしていく。なお、遺伝子が重複して検出されている例があるが、これは GeneChip 上に別々のプローブとして のっていたものが、たまたま同じ値として検出されたものであり、GeneChip データの再現性を示すと考察できる。

タンパク質の発現変化の同定については、2次元電気泳動にて変化の見られたスポットに関し、オンラインデータベースとして利用可能な、2次元電気泳動データベースのマウス肝臓サンプルの泳動像との比較を行ったが、スポットの位置情報のみからは、既存のタンパク質としての同定は難しく、質量分析による同定が必須であることがわかった。

今後1次元目に使用する PH 勾配ゲ

ルの PH 範囲を狭くすることにより、アプライするタンパク量を増やし、目的となるスポットのタンパク量を増やすとともに、インゲル消化およびゲルからのペプチド回収の効率をあげることにより、目的のスポットの質量分析による同定を試みる予定である。一方、2次元電気泳動は、一般に脂溶性のタンパク質や塩基性のタンパク質の解析が難しいという欠点もあるため、より普遍性があり、高感度検出が可能な、LC-MS/MS を用いた方法に関する検討を行う必要がある。さらに、質量分析計における定量性の問題を克服する目的で、安定同位体ラベル化 (ICAT: Isotope Coded Affinity Tag) 法の導入を試み、より定量的なプロテオーム解析をめざす。

4. まとめ

プライマリーヒト細胞を用いた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目的として研究を行った。細胞の種類は、非凍結型プライマリーヒト肝細胞2種、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞2種、ヒト株化細胞(肝がん由来)2種の合計6種を用いた。薬剤は、肝毒性を有するアセトアミノフェン、カルバマゼピン、イソニアジド、四塩化炭素および研究班で新規合成された一連の構造類似化合物を用いて薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、それぞれの薬剤

による遺伝子発現変化を比較する際には、定常状態で発現している遺伝子が大きく違うことや薬剤処理に対する遺伝子発現変化がプライマリーヒト肝細胞と大きく異なることから株化細胞では評価が困難であることがわかった。また、プライマリーヒト肝細胞を用いた場合でも、薬剤処理に用いるプライマリーヒト肝細胞に由来するロット間差（個人差）が非常に大きく、薬剤による遺伝子発現変化を見落とす可能性がある。このロット間差を含まないように同一ロットで実験が行える接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を使用する実験系の有用性が示された。また、薬物処理の条件や RNA 抽出のことを考慮すると接着型の細胞の利用が有用であると考えられた。接着型凍結プライマリーヒト肝細胞の培養は非常に困難とされてきたが、今回の検討から容易に培養できる方法を獲得した。また、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞から GeneChip による解析に十分な量の RNA を確保するための培養条件も本研究において確立できた。

薬剤の処理時間に関しては、その毒性発現メカニズムと密接に関わっており、今回の結果からは比較的初期の処理で化学物質固有の遺伝子発現変動が観察され 48 時間程度の処理によって、細胞毒性に基づく毒性物質に比較的共通した遺伝子発現変動が捉えられることがわかった。今後は薬剤固有の遺伝子発現変化と細胞

毒性に基づく遺伝子発現変化をともに捉え薬剤が細胞に及ぼす毒性を予測するシステムを構築するため、比較的処理の初期の遺伝子発現変化と 48 時間程度以上の処理を行った時の遺伝子発現変化を捉えるようにした実験系で研究を行うことに決定した。本実験系によって様々な薬剤を用いた場合に薬剤固有ならびに毒性発現メカニズム固有に特徴ある遺伝子発現変化を捉えることが出来るようになり有用な遺伝子発現変化パターンの蓄積構築が出来るものと考えられる。

今回研究に使用した細胞は、コーカシアン由来のものが多く、遺伝子発現解析において人種差による評価が異なることが予測される。現在、日本人にも遺伝的に近いと考えられるモンゴリアン由来のプライマリーヒト肝細胞を用いた実験系の構築を行っており、人種差についての遺伝子発現解析情報を蓄積し、薬剤の毒性発現予測における人種差を明らかにしていきたいと考えている。

本研究に新規合成された一連の構造類似化合物を用いて構造活性相関の概念を導入したが、薬剤の開発において実験動物を用いた研究では予測できないヒトでの毒性予測試験系さらには活性評価にも、今後はプライマリーヒト細胞を用いた実験系の構築が有用であることが示唆された。現在、本実験系にロボットを導入したハイスループット試験系の確立を行っており、本研究成果がヒトでの

毒性を予測できるハイスループット試験系として確立できることが期待される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

それぞれの分担研究報告書に記載した。

G. 参考資料

G-1. 研究班会議

本研究事業を遂行するに際して、二度の研究班会議（2002.11.11、2003.3.6）を開催した。

G-2. 特別講演会

本研究事業が主催し、外国人招へい研究者、および、本研究分野で顕著な業績を有する研究者の先生を招き、トキシコゲノミクス研究に関する講演ならびに意見交換を行った。参加者 47 名。日時：2003 年 3 月 6 日 午後 3 時から午後 5 時 30 分。場所：国立医薬品食品衛生研究所。講演会の開催案内書を添付した。

演題および内容

1. 「Use of Human Primary Hepatocytes for Research on Liver Diseases <artificial liver dialysis for patients with liver dysfunction>」

Dr. Zhuohan Hu (Research Institute for Liver Diseases, China)

中国では B 型肝炎ウイルスに感染している人が 1 億人以上と見積もられており、ウイルス性の肝がん発症率が非常に高く、国家プロジェクトでの肝臓疾患の研究が進められている。その一部である Research Institute for Liver Diseases での研究内容に関して発表された。中国では整備されている法律の元、本人意思でのドナーカードの携帯が行われており、死後の献体に関しては本人の同意（ドナーカードの携帯）と家族の同意により献体が行われている。実際に Research Institute for Liver Diseases で献体された臓器を用いて肝臓疾患に関する研究を行っている。研究の内容は献体された臓器より肝細胞を調製し、1. 抗ウイルス薬の開発ならびに新薬の開発スクリーニングに利用できる肝細胞の利用、2. 薬物-薬物間相互作用における酵素誘導に関する研究、3. 人工肝臓の調製に関する研究を行っており、他の実験動物ではなく、ヒトの細胞である有用性を発表された。

2. 「Prediction of Human Drug Toxicity: Past Mistakes, Present Limitations, Promising Technologies」

Dr. Albert P. Li (Phase-1 Molecular Toxicology, U.S.A)

現在、薬剤の毒性予測するための毒性試験には実験動物、組織あるいは細菌や哺乳動物由来の株化細胞などを用いて様々な毒性予測を行っている。しかしヒトでの毒性を

完全に予測することは不可能である。そこでヒトでの毒性を予測するための最適な材料としてヒト由来のプライマリー細胞を用いた毒性予測システムの構築がある。ただ単にそれらの細胞に対する細胞毒性試験を行うだけでなく、その細胞を用いた網羅的な遺伝子発現解析により、限界はあるものの様々な毒性を予測し得るシステムの構築が可能であると考えられる。実際に肝毒性を有する薬剤をヒト由来のプライマリー肝細胞を用いて遺伝子発現解析を行い、毒性マーカーと考えられる遺伝子の変動を確認し、その有用性を発表された。

3. 「臓器選択的な代謝活性化とその解析：末梢標的と肝」

山添 康 先生 (東北大学薬学研究科医療薬科学専攻薬物動態分野教授)

発表内容は「Extrahepatic activation of DMBA」と「Bile acid-induced liver toxicity and the metabolism and transport」であった。DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) の発癌標的性は皮膚、胃、乳腺および骨髄である。また毒性も広範な臓器に及ぶ。これは肝臓で代謝活性化された活性体が脾臓での毒性を引き起こしているのではなく、臓器特異的に発現している P450 分子種が関与して毒性を発現する臓器で特定の代謝活性化体を生成するためにこれだけ広範な臓器での毒性を引き起こしていると考えられる。これは NNK に関しても同様のことが言える。

市販後肝毒性が問題となった薬物は「トログリタゾン」「セリバスタチン」「ベンズプロマロン」「フルタミド」などがあり、医薬品開発において現在問題となっている肝毒性の多くはその原因が特定できず、実験動物では再現が困難であることが多い。その原因の一つは種差に基づく薬物動態の違いが挙げられる。胆汁酸排泄の種差に着目してみるとげっ歯類では P450 による酸化代謝の寄与が大きく、タウリン抱合が多い (ヒトはグリシン抱合が多い)。さらに脂溶性胆汁酸はグルクロニドとサルフェートに変換されるが、グルクロニドが多い (ヒトはサルフェートが多い)。また、複数の排泄に関与するトランスポーターに種差が認められ、胆汁酸排泄される分子の分子量にも差が見られる。そこでこの胆汁酸排泄の制御に関与している核内レセプターである FXR ノックアウトマウスを用いて研究を行うことでヒトにより近い実験系の確立を行った。FXR からのシグナルは胆汁酸排泄に関与するトランスポーター Bsep, Mrp2 の発現を誘導し、コレステロールからの胆汁酸の生成ならびに胆汁酸の再吸収に対して抑制的に働く。この FXR ノックアウトマウスに対して Lithocholic acid (LCA), Cholic acid (CA) を投与した時、野生型では見られない St2a (硫酸転移酵素) の発現誘導が見られていることが確認された。この実験動物モデルはよりヒト型に近く (グルクロニドよりもサルフェートが多

い)、胆汁酸排泄が毒性発現に関与する薬剤におけるヒトでの毒性を予測する新たな実験系として有用であると言える。

G-3.外国人研究者の招へい

本研究にともなう「外国研究者招へい事業（日本公定書協会）」により、平成15年2月22日～3月8日まで、Dr. Zhuohan Hu (Research Institute for Liver Diseases, China)を招聘し、技術指導ならびに意見交換を行った。「招へい承諾通知」および「外国人研究者招へい事業（萌芽的先端医療技術推進研究事業）研究実績報告書」を添付した。

[外国人研究者招へい事業]
(萌芽的先端医療技術推進研究事業)
研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者
所属・職名 (和文)：瑞徳肝肚疾病研究所 代表取締役社長
(英文)：Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. LTD.
CEO
氏 名 (和文)：ゾーハン フー
(英文)：Zhuohan Hu
2. 招へい申請者
所属・職名：名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授
氏 名：宮田 直樹
3. 受入研究者
所属・職名：第一化学薬品株式会社薬物動態研究所所長
氏 名：須藤 哲司
4. 招へい期間：平成15年2月22日～平成15年3月8日（15日間）
5. 研究課題：プライマリーヒト細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現解析手法の確立
6. 研究活動の概要
2月23日から2月28日までの間は、第一化学薬品株式会社薬物動態研究所および国立医薬品食品衛生研究所においてプライマリーヒト肝細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現解析に関する研究メンバーおよび大野泰雄薬理部長と細胞培養法、評価系について意見交換およびバリデーション研究に従事した。
3月3日から3月7日までの間は、第一化学薬品株式会社においてトキシコゲノミクスに関する研究に、卓越した知識・技術を有する Phase-1 Molecular Toxicology 社 CEO Dr.A.Li および東京大学大学院薬学研究科杉山雄一教授（公募研究「薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析および副作用発現との

連鎖解析)と情報交換、意見交換を行った。

3月6日国立医薬品食品衛生研究所において講演会を開催した。(参加者 47名)

7. 研究課題の成果

萌芽的先端医療技術推進研究事業トキシコゲノミクスプロジェクト研究課題「プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現解析に関する研究」を推進するに当たり、プライマリー肝細胞および株化細胞を用いて、その特性評価を行ってきたが、材料の良し悪しが研究成果の成否を決める上で最も重要な要素の1つである。

我々は、第一化学薬品株式会社薬物動態研究所およびフランスの Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM 研究所)が構築した長期培養法、輸送方法をこの研究課題に反映させるために検討を行った。初めに、この技術を移管した米国 BDGENTEST 社において臓器提供者(白人種)から得られた臓器不適合の材料を使って、試験評価系を構築した。しかし、現在使用されている試験材料の多くは白人種から得られたものであり、日本人のための医薬品開発を効果的に行うためには、この人種差を考慮し、克服することが課題である。現在、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業「ヒト組織を用いた薬物代謝に関する研究、ヒト肝細胞を試験系のバリデーション研究」(大野班)において、試験材料として日本人の手術残余組織での評価が進んでいるが、その材料は極めて限られている。今回、人種差の問題を解決するため、Research Institute for Liver Diseases (上海)でモンゴリアンから得られたヒト非凍結および凍結肝細胞の培養方法、輸送状態の最適化(バリデーション)を検討した。

このうち外国人研究者を招聘することによって得られた成果は、インフォームドコンセントが得られている臓器提供者(モンゴリアン)の肝臓より肝灌流法を用いて研究材料用の非凍結肝細胞を分離調製し、組織培養用のプレートに接着させ、上海から第一化学薬品株式会社薬物動態研究所へ空輸した。その結果は、輸送中の温度管理、薬物代謝活性とも良好であったことから、研究材料としてモンゴリアンを用いた研究の推進が可能となった。また、この分野の多くの研究者との意見交換が行うことができ、臓器提供者から得られた臓器に関するインフォームドコンセントのあり方についても、国立医薬品食品衛生研究所大野泰雄薬理部長、細胞バンク増井博士との有益な意見交換が行えた。本招聘の成果はトキシコゲノミクスプロジェクト推進への寄与とトキシコゲノミクスによる医薬品開発への効果および関連研究への波及効果が期待できるものである。

トキシコゲノミクス 特別講演会

日時：2003年3月6日(木) 15:00～17:00

場所：第一会議室（28号館3階）

演題

15:00-15:30

「Use of Human Primary Hepatocytes for Research on Liver Diseases <artificial liver dialysis for patients with liver dysfunction>」

Dr. Zhuohan Hu (Research Institute for Liver Diseases, China)

15:40-16:10

「Prediction of Human Drug Toxicity: Past Mistakes, Present Limitations, Promising Technologies」

Dr. Albert P. Li (Phase-1 Molecular Toxicology, U.S.A)

16:20-16:50

「臓器選択的な代謝活性化とその解析：末梢標的と肝」

山添 康 先生 (東北大学薬学研究科医療薬科学専攻薬物動態分野教授)

厚生労働科学研究費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暴露、遺伝子発現に関する研究 宮田班

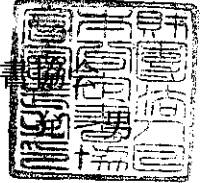
世話人：鈴木 孝昌 (遺伝子細胞医薬部, e-mail : suzuki@nihs.go.jp)



日公協発第211号
平成14年11月19日

名古屋市立大学 大学院薬学研究科
教授 宮田 直樹 殿

財団法人 日本公定書
会長 寺尾



平成14年度萌芽的先端医療技術推進研究推進事業（トキシコゲノミクス分野）
に係る「外国人研究者招へい事業」の公募申請結果について（通知）

今般、貴殿より応募申請のあった外国人研究者の招へいについては、審査の結果、
下記のとおり採択されましたので、ご通知申し上げます。

記

1 招へいする外国人研究者

- (1) 氏名： ゴーハン・フー
(2) 所属機関： 中国／瑞徳肝脈疾病研究所
(3) 職名： 代表取締役社長

2 共同で行う研究課題： プライマリーヒト細胞を用いた薬剤暴露、
遺伝子発現解析手法の確立

3 受入先

(1) 受入先機関

- ① 名称： 第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所
② 所在地： 茨城県那珂郡東海村村松2117

(2) 受入研究者

- ① 氏名： 須藤 哲司
② 職名： 所長

4 招へい期間： 平成15年2月22日～平成15年3月8日（15日間）

5 その他

- (1) 招へい期間の変更をする必要が生じた場合は、（様式7）「招へい期間変更申請書」及び「来日旅行行程調書」を至急提出して下さい。
(2) それ以外の事務手続きについては、送付しました手引書により行って下さい。

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）
分担研究報告書

分担研究課題：プ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

分担研究者：須藤 哲司
第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所所長

研究要旨

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時ににおける網羅的な遺伝子発現解析を行い、薬剤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、非凍結型、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞各 2 ロットおよび株化ヒト肝細胞 2 種を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、比較検討することによって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行った。

研究目的

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時に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、分担研究として遺伝子発現解析系の構築。ハイスループット試験系の開発を行った。

より購入し、購入直後に細胞を増殖させ、5% (v/v) DMSO 添加培地を用いてストックを調製し、試験に用いた。通常の継代培養は 2 週間に 1 度行い、週に 2 度培地交換を行った。継代には 0.25 % (w/v) Trypsin-0.03 % (w/v) EDTA を用いて行った。試験に用いる細胞はストックより調製し、2~4 継代目の細胞を用い、継代後 2 日目の接着した細胞を研究に用いた。被験物質処理は、6 well plate (IWAKI コラーゲンタイプ 1 コート Cat. No. 4810-010、1 well 当り約 9.4 cm²) を用いて行った。

研究方法

<細胞培養に関して>

HepG2

HepG2 は American Type Culture Collection (ATCC) (Catalog No. HB-8065)

使用培地：Dulbecco's Modified Eagle Medium (基本培地) に、以下の濃度となるように Co-factor を添加して調製し、

使用に際しては 0.22 μm のフィルターを用い、滅菌ろ過を行った。

培養液は調製後 1 ヶ月以内に使用した。

試薬・溶液名	供給元	Catalog No.	最終濃度
Fetal Bovine Serum	Invitrogen	16000-044	10% (v/v)
L-Glutamine 200 mM (100x)	Invitrogen	25030-081	2 mM

LI90

LI90(資源番号 JCRB0160)は(財)ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクより分譲を受け、分譲直後に細胞を増殖させ、5% (v/v) DMSO 添加培地を用いてストックを調製し、試験に用いた。継代培

試薬・溶液名	供給元	Catalog No.	最終濃度
Fetal Bovine Serum	Invitrogen	16000-044	10% (v/v)
L-Glutamine 200 mM (100x)	Invitrogen	25030-081	2 mM

非凍結型プライマリーヒト肝細胞

非凍結型ヒト培養肝細胞は BD GENTEST 社より、各 plate に培養液を入れた状態で輸送され、第一化学薬品(株)において、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。

養は 2 週間に 1 度行い、週に 2 度培地交換を行った。継代には 0.25% (w/v) Trypsin-0.03% (w/v) EDTA を用いて行った。試験に用いる細胞はストックより調製し、2~4

継代目の細胞を用い、継代後 2 日目の接着した細胞を研究に用いた。被験物質処理は、6 well plate (IWAKI コラーゲンタイプ I コート Cat. No. 4810-010、1 well 当り約 9.4 cm^2) を用いて行った。

使用培地 : Dulbecco's Modified Eagle Medium (基本培地) に、以下の濃度となるように Co-factor を添加して調製し、使用に際しては 0.22 μm のフィルターを用い、滅菌ろ過を行った。

培養液は調製後 1 ヶ月以内に使用した。

使用培地 : Williams E medium (基本培地; SIGMA、Cat. No. W1878) に、以下の濃度となるように Co-factor を添加して調製し、使用に際しては 0.22 μm のフィルターを用い、ろ過滅菌を行った。

培養液は調製後 1 ヶ月以内に使用した。

試薬・溶液名	供給元	Catalog No.	最終濃度
EGF	SIGMA	E4127	50 ng/mL
Insulin	SIGMA	D5500	10 μ g/mL
Glucagon	SIGMA	G6664	2 μ g/mL
Bovine Serum Albumin	SIGMA	A7888	0.5 mg/mL
Linoleic acid	SIGMA	L1012	5 μ g/mL
Hydrocortisone	SIGMA	H0888	1 μ mol/L
Selenium	SIGMA	S5261	0.1 μ mol/L
Cholera toxin	SIGMA	C3012	2 ng/mL
Liver growth factor	SIGMA	G1887	20 ng/mL
Transferrin	SIGMA	T8158	5 μ g/mL
Ethanolamine	SIGMA	E0135	1 μ mol/L
L-glutamine	Invitrogen	25030-0810	2 mmol/L
Prolactin	SIGMA	L6520	100 ng/mL
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen	15140-122	100 IU/mL \cdot 100 μ g/mL
Fungizone	Invitrogen	15290-018	0.75 μ g/mL

接着型凍結プライマリーヒト肝細胞

接着型凍結プライマリーヒト肝細胞は In Vitro Technologies, Inc. (代理店：日本チャールス リバー(株)) より購入し、液体窒素中に保存し、研究を行うたびにごとく解凍して使用した。細胞の解凍は 37°C の温水中ですばやく細胞の解凍を行い、氷冷した培養液で希釈を行う。希釈後、遠心分離 (4°C, 45 \times g, 3min) を行い、デカンテーションにより培地 (上清) を捨て、さらに培地 6mL (氷冷) をゆっくりと滴下した。細胞を血球計算版にて計数し、 2.5×10^5 cells/mL に調製した。プレートは予め培養液を入れて 37°C で 1 時間以上予温しておいたものを使用し、 5×10^5 cells/2.0mL/well で、6 well plate (IWAKI コラーゲンタイプ I コート Cat. No. 4810-010, 1 well 当り約 9.4 cm²) に

播種した。細胞播種 4 時間後に培地交換を行い、接着していない細胞を除く作業を行った。被験物質処理は、細胞播種 24 時間後より開始した。

使用培地：Bio Whittaker, Inc. 社製 (代理店：旭テクノグラス(株)) ヒト肝細胞培養用無血清培地を使用した。

<被験物質処理に関して>

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無い) を行ったサンプルを調製した。

<totalRNA 抽出に関して>

被験物質処理の終了した細胞を一度 PBS(-)にて洗浄した後、6 well plate の 3 well(細胞数 $1.5 \times 10^6 \sim 6.0 \times 10^6$ cells) に対して 1 mL の TRIzol 試薬 (Invitrogen Cat. No. 15596-026) を添加し、セルスクレーパーを用いて細胞をプレートより完全に剥離し、ピペティングを行って均一な溶液とした。得られた細胞溶解液を液体窒素を用いて急速に冷凍し、RNA 抽出作業に入るまで -80°C で保存した。RNA 抽出は保存しておいたサンプルを解凍し、クロロホルムを $200 \mu\text{L}$ 添加して 15 秒間激しく攪拌後、室温にて 3 分間静置した。静置後 $12000 \times \text{g}$, 15 min, 4°C にて遠心を行い、上層(水層)を別の容器に移した。分取した上層に 2-propanol を $500 \mu\text{L}$ 添加し、均一な溶液になるまでゆっくりと転倒混和し、室温で 10 分間静置した。 $12000 \times \text{g}$, 10 min, 4°C にて遠心を行い、上清をすべて除いた。沈殿物を 1 mL の 75% EtOH で洗浄し、最終的に $20 \mu\text{L}$ の RNase-free H_2O に溶解した。

<GeneChip による遺伝子発現解析に関して>

GeneChip による遺伝子発現解析には、各被験物質処理を行った細胞より調製した totalRNA $5 \mu\text{g}$ を使用した。

- ・ 使用した RNA の濃度測定には NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies 社製) を用いてサンプル $1 \mu\text{L}$ を用いて測定した。
- ・ 純度・品質の検定には Agilent 2100 バイオアナライザシステム (Agilent 社製) 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。

<データ解析に関して>

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。

倫理面への配慮に関して

遺伝子解析にかかる研究については「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。

結果

1. 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（表1, 2）を用い、無処理時の網羅的遺伝子発現解析をGeneChip UI33A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、表3に示すように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（同一遺伝子の違う配列のスポットも含めて）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（表4）。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（表3）。

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、横軸に無処

理のLot41の遺伝子発現量、縦軸に無処理のLot42の遺伝子発現量をプロットした。すべての遺伝子の発現量がロット間で差が無ければ対角線上にプロットされるはずである。しかし、ロット間差のために大きく対角線から外れることがわかった（図1）。このことはLot41とLot100、Lot42とLot100でも同様であった（図2, 3）。しかしながらLot42を用いて、縦軸に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、横軸に無処理のLot42の遺伝子発現量をプロットした場合、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（図4）。

2. 細胞処理における経時変化に関する検討

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における遺伝子発現変動を経時的に解析した。処理時間は4, 24, 48, 72時間とした。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ところ表5のようになった。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（表6）。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。

3. 代表的肝毒性物質に対する検討

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明らかにすることを目的として研究を行った。研究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。その結果、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表7に示した。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つい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（表8）。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は表5に示したが、その中で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。表9に示すように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無く、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のリストを表10に示した。リスト内の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。