

大きさは過去の報告と比較すると小さかったが、*in vivo* と *in vitro* の差が関係していると考えられる。しかし、細胞周期、サイトカイン、アポトーシス、P450、成長因子、シグナル伝達など、いろいろなカテゴリーに属する遺伝子が発現変動しており、これらの中に APAP の肝障害発症に関与する遺伝子の存在が示唆された。

ヒト非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトにおける発現変動を示す遺伝子は大部分が共通しており、両細胞に対する APAP 曝露の影響は類似していると考えられる。さらに非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト間で、発現変動に有意な差が認められた遺伝子は、APAP 曝露 6 時間または 24 時間でそれぞれ 6 個と 4 個であった。6 時間ではサイトカイン関連遺伝子である IRF4 と TNFRSF11B が凍結ヘパトサイトで発現が減少していた。IRF4 は IL-12 の産生を調節することによって間接的に T ヘルパー細胞の分化に影響を与えることが報告されている (Lohoff et al., 2002)。しかし、他の IRFs (IRF1、IRF3、IRF5、IRF6) は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト間では差が見られなかった。凍結ヘパトサイトではサイトカインの発現が変動すると考えられる。IGFBP1 と RAB33A はそれぞれ成長

因子とオンコジーンのカテゴリーに含まれる遺伝子であり、非凍結ヘパトサイトにおいて発現が減少していた。これらの遺伝子の発現変化も非凍結ヘパトサイトにおける APAP の毒性発現に対して何らかの影響を与えていることが示唆される。

HepG2 細胞を用いた APAP の毒性の検討について、APAP 20 mM を 24 時間まで曝露した時の遺伝子の発現変動について Gore ら (2000) により報告されている。1 時間から 24 時間までの 9 点のうち 3 点以上で 20 mM の APAP 曝露により発現が有意に増加した遺伝子の数は 5,000 個中 258 個であった。本章で検討した 5 mM の APAP 曝露の結果と比較すると非常に高い割合で遺伝子が変動している。これは、20 mM と 5 mM という濃度の差によると考えられる。また、大きく変動した個々の遺伝子についてしてみると、核内でアポトーシスのクロマチン凝縮の誘導体をコードする Acinus が発現増加したことを述べている。この遺伝子はアポトーシスを起こす caspase により活性化される蛋白をコードしている (Sahara et al., 1999)。また、ハムスターの細胞でアポトーシスを引き起こすと報告されている DAD1 (defender against cell death 1) は発現が減少した。トランスポーターに

関係する遺伝子では SEC13 と SEC23 という遺伝子の発現が減少したことを示している。本章の実験では HepG2 細胞においてアポトーシス関連遺伝子では CSE1L (Chromosome segregation 1 (yeast homolog)-like) が、トランスポーター関連遺伝子は APAP 曝露 24 時間で ABCC5 が有意な発現の増加を示した。これまでヒト *in vitro* において DNA チップを用いた研究がほとんどなされていない。ゆえに、本結果と Gore らの結果を参考にして今後の検討に役立てていくことが期待される。

核内受容体である CAR に注目すると、ラットにおける APAP 曝露による CAR の発現変動は、ラット *in vivo* ではほとんど認められず、*in vitro* では顕著に発現増加した。ヒト *in vitro* においてはラット *in vivo* と同様に発現変動はほとんど認められなかった。このことから、ヒトとラットでは APAP を曝露した際に CAR の発現変動が大きく異なることが示された。しかしこれは、ヒトヘパトサイトとラットの *in vivo*、スライスの違いによる差が現れている可能性がある。CAR の mRNA 発現は変化しないが、CAR 蛋白の発現や局在性に影響を与えている可能性もある。別の核内受容体である PXR は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト

において顕著に発現が減少した。PXR は CYP3A4 の発現を調節していることで知られている重要な因子であり、APAP 曝露により PXR の発現が減少したことによって CYP3A4 の発現も減少し、NAPQI の代謝生成を減少させて毒性を減らすメカニズムとして働くことが考えられる。APAP の肝障害発症時に CAR が毒性発現のマーカーとして適用出来るか否かはヒトにおいてはまだ不明であり、今後の更なる検討が必要である。

#### 5-E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスは医薬品の安全性試験への利用も期待されている。本年度は十分なマウスを確保できなかったために、その予備検討として、凍結および非凍結のヒトヘパトサイトを用いて、薬物動態関連遺伝子を主体とした網羅的な遺伝子発現解析を行った。肝毒性薬として APAP を用いた。この研究の結果、核内受容体とその関連遺伝子の動きが毒性に影響している可能性が示されたと共に、キメラマウスのヘパトサイトを用いた研究の準備も完了した。

F. 健康危険情報：なし

## G. 研究発表

論文発表：なし

学会発表： ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を用いた酵素誘導実験；日本薬学会第 123 年会、平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎

DNA チップを用いたヒトヘパトサイトにおけるアセトアミノフェンの影響の解析；第 17 回日本薬物動態学会年会、平成 14 年 11 月 20～22 日、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

5. 特許取得：なし
- 実用新案登録：なし
- その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）  
分担研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物動態関連遺伝子の発現解析

分担研究者 横井 毅 金沢大学薬学部 教授

研究要旨

広島県地域結集型共同研究事業（研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利）で開発されたヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測できる医薬品開発に有用な手段になり得ると予想される。創薬研究における薬物動態研究分野では、代謝酵素の誘導現象に起因する相互作用の予測の為に、ヒトヘパトサイトが多用されている。しかし、現在ヒトヘパトサイトは全て輸入に頼っており、さらに供給が不安定である。また一方で人種差の観点から、日本人由来の肝細胞の入手が強く期待されている。こうした問題をキメラマウス肝細胞で解決できるかの評価・検討を行った。さらに、創薬研究においてヒトに投与して初めて肝障害が発現し、開発を中断するケースは、近年も減少していない。とくに、安全性の予測については大きな種差が問題となっている。ヒト肝細胞キメラマウスを用いることにより、安全性研究への貢献も期待される。本分担研究ではヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトにおける薬物動態関連遺伝子 mRNA の発現プロファイルを検討し、さらにヒト肝チトクロム P450(CYP)の主要な分子種である CYP3A4、CYP1A1 および CYP1A2 の誘導について *in vitro* で検討した。また、安全性研究へのヒト肝細胞キメラマウスの利用を想定し、ヒトヘパトサイトを用いたアセトアミノフェン(APAP)の毒性について DNA チップを用いた研究の予備検討を終了した。本研究により、キメラマウスのヘパトサイトはヒトヘパトサイトとして酵素学的に活性および誘導能が機能していることが示された。さらに、安全性研究のための網羅的遺伝子発現検討の実験を立ち上げた。

## A. 研究目的

本研究では、吉里勝利教授（分担研究者）によって開発された「ヒト肝細胞キメラマウス」を用いて、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測するシステムの樹立を目的とする。ヒトと実験動物の間には、薬物動態関連酵素の機能に大きな種差が存在することが知られている。従って、医薬品開発における薬物動態および安全性の予測試験には、ヒト由来組織が必要とされる。中でも、医薬品の解毒や代謝的活性化に関わる酵素が多く存在する肝組織およびヘパトサイトが多用される。しかし、我が国では現在、ヒト肝組織およびヘパトサイトの使用には厳しい制限がある。よって、そのほとんどを欧米からの輸入に頼っている。ヒト肝細胞キメラマウスはこうした問題を解決できる画期的な研究手段になる可能性がある。

本研究では（１）ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトにおける薬物動態関連遺伝子の mRNA の発現プロファイルを検討し、さらにヒト肝チトクロム P450 (CYP) の主要な分子種である CYP3A4, CYP1A1 および CYP1A2 の誘導について *in vitro* で検討した。また、（２）安全性研究へのヒト肝細胞キメラマウス

の利用を想定し、ヒトヘパトサイトを用いたアセトアミノフェン (APAP) の毒性について DNA チップを用いた研究についての予備検討の２つの研究項目を実施した。

### 1 : ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトにおける薬物動態関連遺伝子の発現と誘導の検討

#### 1-B 研究方法

##### 1- 1. ヒト肝細胞キメラマウス由来ヘパトサイトの培養と薬物暴露

ヘパトサイト培養メディウム (CC-3198) および FBS は Bio Whittaker (Walkersville, MD) より購入した。ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトは、凍結保存されたものを解凍して使用した。解凍後すぐにヘパトサイト培養メディウムにて遠心分離洗浄した。トリパンブルーによる色素排出試験で、生細胞を計数し、細胞数  $1.0 \times 10^5$  cells/0.4 ml/24 well プレート蒔き、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。3 時間、24 時間、48 時間および 72 時間後に培地を交換した。各時間において経時的な mRNA の発現変化の検討試料を作成した。

キメラマウス作成に用いたヒト肝

細胞の使用は、広島大学倫理委員会の承諾「課題名；手術等で摘出されたヒト組織から分離したヒト肝細胞を用いた薬物代謝研究（遺伝子解析を含む）」（平成 14 年 6 月 10 日承認）にもとづいて行った。さらに、金沢大学の医学部等医の倫理委員会において（課題名；ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態及び安全性予測システムの構築）、平成 14 年 9 月 10 日に承認を受けている。ドナーは、12 歳の日本人男性であり、手術時の余剰肝切片からコラゲナーゼ法により採取した。対照とした凍結ヒトヘパトサイトは、In Vitro Technologies, Inc から購入した。74 歳白人の女性由来である。解凍時の viability は、それぞれ 60.1% と 89.0% であった。

ヘパトサイトへの薬物暴露による CYP 誘導実験については、下記のように行った。先の培養条件の 48 時間から 72 時間までの 24 時間に、1  $\mu$ M または 5  $\mu$ M  $\beta$ -ナフトフラボン、10  $\mu$ M または 50  $\mu$ M のリファンピシンを暴露し、暴露時間終了直後に RNA を調製した。

## 2. ヒト肝細胞キメラマウスヘパトサイトからの total RNA の調製

ヒト肝細胞キメラマウスヘパトサイトは、1 well につき 0.5 mL の

ISOGEN を加えて細胞を懸濁した後、エッペンに移して室温で 5 分間放置した。0.2 mL のクロロホルム溶液を加え、15 秒間激しく攪拌し、再度室温で 2~3 分間放置した。12,000 g、4°C にて 15 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、0.5 mL のイソプロパノールを加え、室温で 10 分間放置した。12,000 g、4°C にて 10 分間遠心分離し、沈殿を 75% エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、DEPC 処理精製水に溶解させ、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

## 3. Real-time PCR による遺伝子発現解析

TaqMan 法による Real-time PCR を行った。プライマーと TaqMan プロブは Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて設計した。Total RNA は酵母 tRNA を用いて 50  $\mu$ g/ml に希釈した。Total RNA 溶液を 6.4 から 100,000 pg、300 nM forward primer、900 nM reverse primer、200 nM TaqMan プロブを含む TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents を 50  $\mu$ L とした。ABI PRISM 7700 Sequence Detector system (Applied Biosystems) を用いて 48°C で 30 分を 1 サイクル、95°C で 10 分

を1サイクル行った後、全ての遺伝子について95°Cで15秒間、60°Cで1分間を50サイクル行った。β-アクトチンを内部標準として発現量を定量し、対照との比率を計算した。また、検量線用のヒト成人肝RNAはClontech, Incより購入したものを使用した。

今回検討した多くの項目のうち、代表的なCYP分子種であるCYP1A1、CYP1A2とCYP3A4のプライマー配列を以下に示す。

CYP1A1 (GenBank accession number NM-000499)

Forward primer

GTCATCTGTGCCATTTGCTTTG  
position 589-610

Reverse primer

CAACCACCTCCCCGAAATTATT  
position 685-664

Probe

CGCTATGACCACAACCACCAAGA  
ACT position 616-641

CYP1A2 (GenBank accession number AF182274)

Forward primer

TGTTCAAGCAAGAAGG position  
860-880

Reverse primer

TGCTCAAAGACGTCATTGAC  
position 951-931

Probe

CTAGAGCCAGCGGCAACTCATCC  
CA position 884-909

CYP3A4 (GenBank accession number AF182273)

Forward primer

GATTGACTCTCAGAATTCAAAAG  
AAACTGA position 825-854

Reverse primer

GGTGAGTGGCCAGTTCATACATAA  
TG position 973-948

Probe

AGGAGAGAACACTGCTCGTGGTT  
TCACAG position 946-918

## 1-C. 研果結果

1-C-1. ドナー肝とキメラ肝における薬物動態関連遺伝子の発現量

キメラマウス肝およびドナー肝からmRNAを調製し、薬物動態関連遺伝子の発現比を検討した。Table 1において、1.0以上は、キメラマウス肝がドナー肝よりも発現量が多かった遺伝子を、1.0以下は、キメラマウス肝が、ドナー肝よりも発現量が低い遺伝子名を示している。特にCYP8A1 (P450の8A1分子種)、SULT1B1 (硫酸抱合酵素の1B1分子種)、ALDH3 (アルデヒド脱水素

Table 1. Expression ratio of human hepatic mRNA in the chimeric mouse to that from donor.

(Chimeric mouse/ Human)	Total number of genes
4.0 CYP8A1, SULT1B1, ALDH3	3
2.0 CYP51, ADH7, UGT1, NAT2, ABCB4, ABCB6	6
1.0 CYP2E1, MGST1, CES1, GSTA2, EPHX1, CST, ABCA2, SLC22A3, TPST2	9
0.8 CYP1B1, CES2, SLC22A5, ADH1, PIG3, ADH2, HADH2, ABCF2, albumin ALDH2, CYP8B1, NMOR2, SLC22A1, ALDH4, transferrin, OATP2, CYP1A1 MAOB, CYP4F2, CYP27, ABCD1, ALDH1, CYP1A2, ABCB7, ABCB8 ALDH10, EPHX2, GAPDH, ABCB11, AADAC, ADH3, CYP26A1, ABCC9 UGT2B10, ABCB1, ADH4, CYP2D6, SULT2A1, ABCC6, ABCB9, NTE ABCD3, BAAT, UGT1A9, CYP2J2	45
0.5 AOX1, MGST2, UCHL3, COMT, ALDH5, GSTA4, ALDH9, ABCC3, ADH6 PNMT, GSTT1, NAT1, UGT2B17, MGST3, ABCE1, TPMT, ABCG2, CYP2C18 GSTM4, FMO3, GAMT, GSTM3, ABCB3, ABCA4, ESD, ABCC2, CYP39A1 GSTZ1, CYP4F3, ADH5, PEMT, XDH, ARD1, CYP2C9, ABCF1, MAOA, ASMT CYP46, DPYD, CYP3A5, CYP2C8, HNMT, CYP4A11, FMO4, ABCA8, CYP3A4 FMO5, ABCB2, LIPA, HEP27, CYP3A7	51
0.2 CYP7B1, $\beta$ -actin, ABCA1, UCHL1, GSTP1, TPST1, CYP2B6, ABCC5 ALDH6, CYP2C19, ABCG1, CHST4, NNMT, CYP5A1, PTGS2, CHST3 CYP2A6, PTGS1, CHST1, CHST2, UGT2B11, ABCC1	22
0.0	

酵素 3) は、キメラマウスにおいて高い発現が認められた。一報、FMO5 (フラビン含有モノオキシゲナーゼ 5)、ABCB2 (トランスポーターの分子種) や CYP3A7 (ヒト胎児発現方 CYP3A 分子種) などはドナーよりも 1/5 以下の発現量に留まった。しかし、全体的には殆どの遺伝子の発現量がドナーよりも少し低い程度であり、ヒトの肝の機能を十分に再現しているものと考えられた。

#### 1-C-2. ハウスキーピング遺伝子の

#### mRNA の経時変化

図 1 に  $\beta$  アクチンで補正した GAPDH の発現量の変化を示す。培養開始直後から 3 時間の間の発現量の減少は顕著であるが、その後 72 時間まで殆ど変化しなかった。この結果はキメラマウス由来ヘパトサイトでもヒトヘパトサイトでも同様であった。

#### 1-C-3. 代表的 CYP の mRNA の変化

図 2 と図 3 に CYP3A4、CYP1A1 と CYP1A2 の発現量の経時的変化を



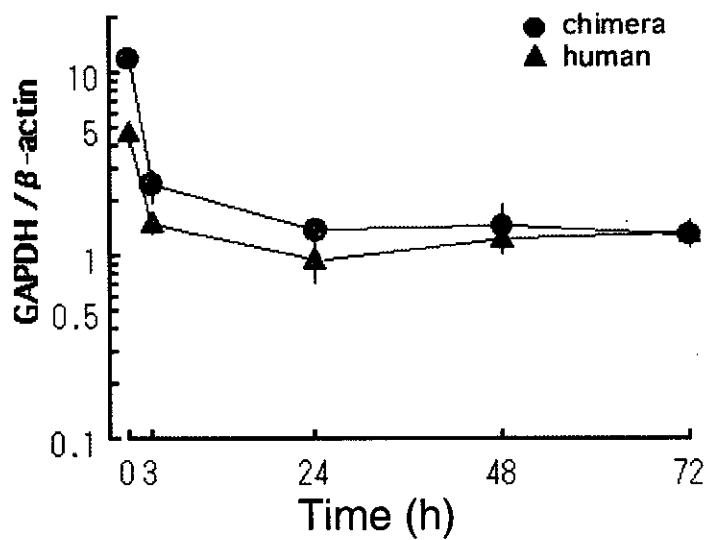


Fig.1. Time dependent changes of the GAPDH expression in chimera mouse and control human hepatocytes.

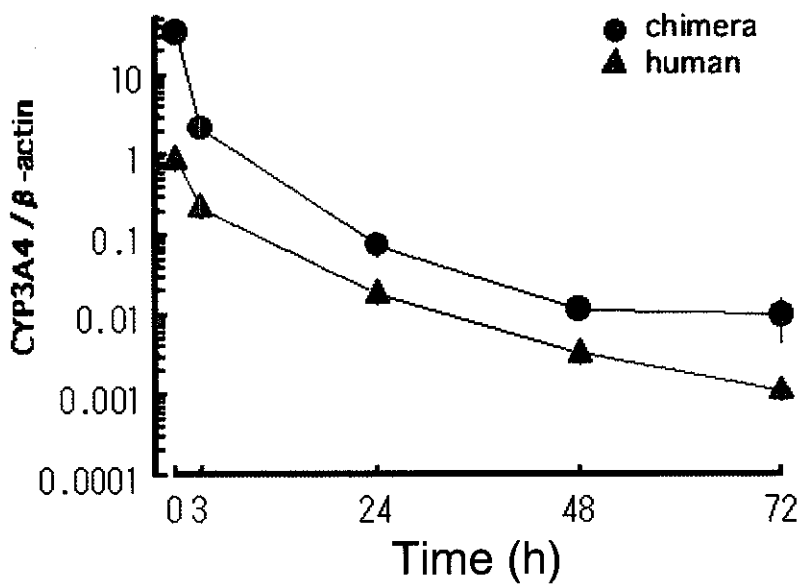


Fig.2. Time dependent changes of the CYP3A4 expression in chimera mouse and control human hepatocytes.

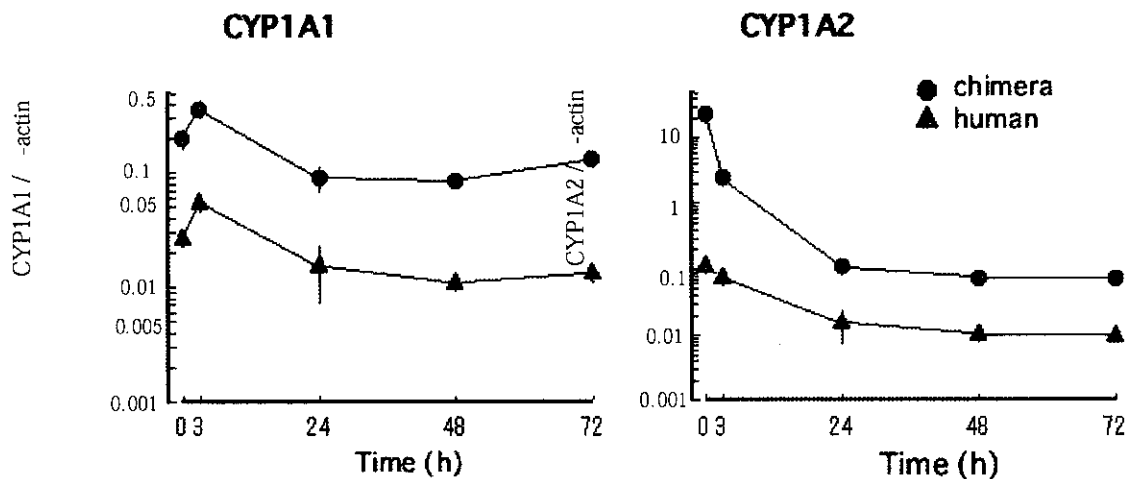


Fig.3. Time dependent changes of the CYP1A1 and CYP1A2 expression in chimera mouse and control human hepatocytes.

示す。CYP3A4 は最初の 3 時間で発現量が大きく減少したが、その後 72 時間まで緩やかな減少を示した。CYP1A1 は最初の 3 時間で発現量が少し上昇し、その後も 72 時間まで大きな変化は示さなかった。CYP1A2 は最初の 3 時間でキメラのヘパトサイトで減少が大きかったが、その後は、緩やかな減少にとどまった。以上のいずれの分子種の発現も対照群のヒトヘパトサイトよりも活性が高く、良好な結果を示した。

#### 1-C-4. $\beta$ -ナフトフラボン暴露による CYP1A の誘導

1  $\mu$ M または 5  $\mu$ M  $\beta$ -ナフトフラボン暴露により、CYP1A1 は、濃度依存的に発現量が増加した (Fig.4)。同様に CYP1A2 も誘導を示した (Fig.

5)。しかし、図 4 および図 5 の右に示すように、キメラマウスでは、ヒトヘパトサイトよりの誘導能が著しく低下していた。

#### 1-C-5. リファンピシン暴露による CYP3A4 の誘導

10  $\mu$ M または 50  $\mu$ M のリファンピシン暴露による CYP3A4 の誘導について図 6 に示す。濃度依存的な誘導が認められ、さらに対照群のヒトヘパトサイトとほぼ同様の値を示した。

#### 1-D. 考察

今回使用したヒト肝細胞キメラマウスは、マウスの肝細胞全体の約 80% がヒト肝細胞に置き換わったものである。ヘパトサイト調製時の生存率は 83.7% であったが、実験時の

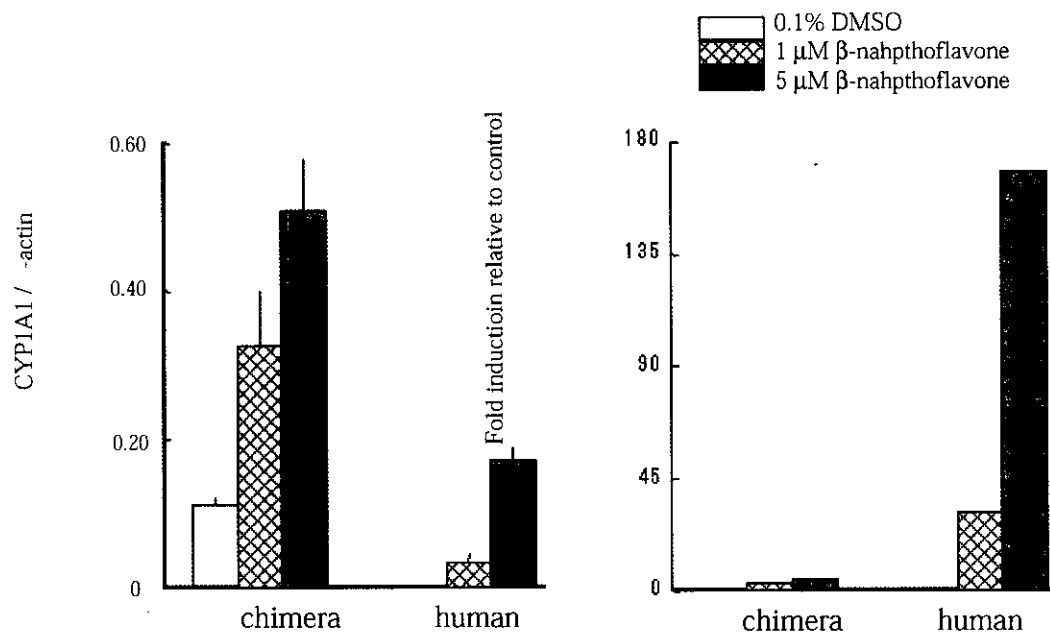


Fig.4. Induction of CYP1A1mRNA with exposure of β-naphthoflavone in chimera mouse liver.

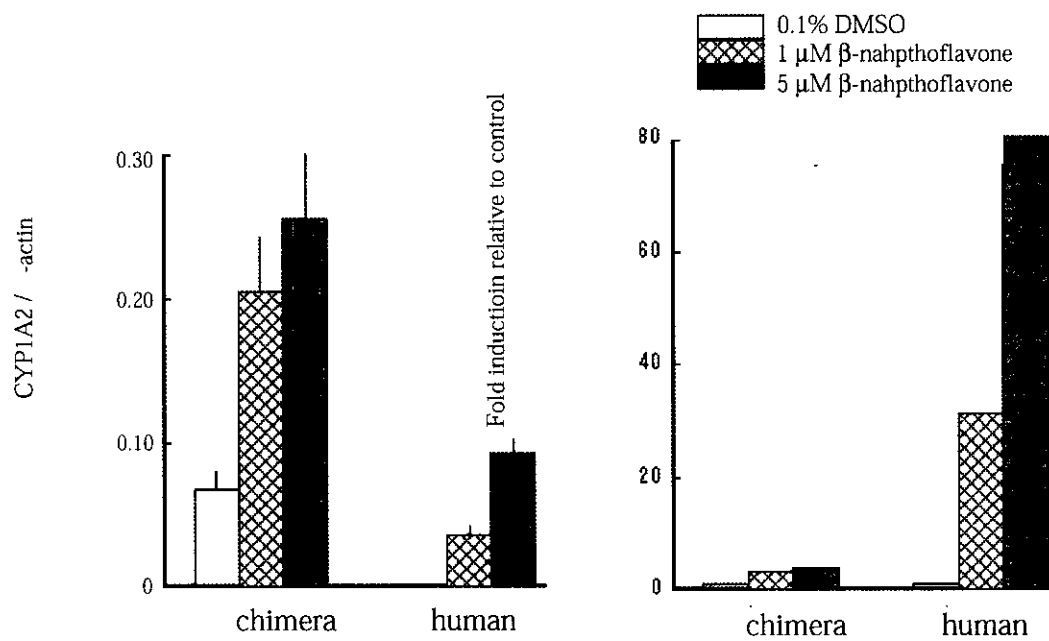


Fig.5. Induction of CYP1A2mRNA with exposure of β-naphthoflavone in chimera mouse liver.

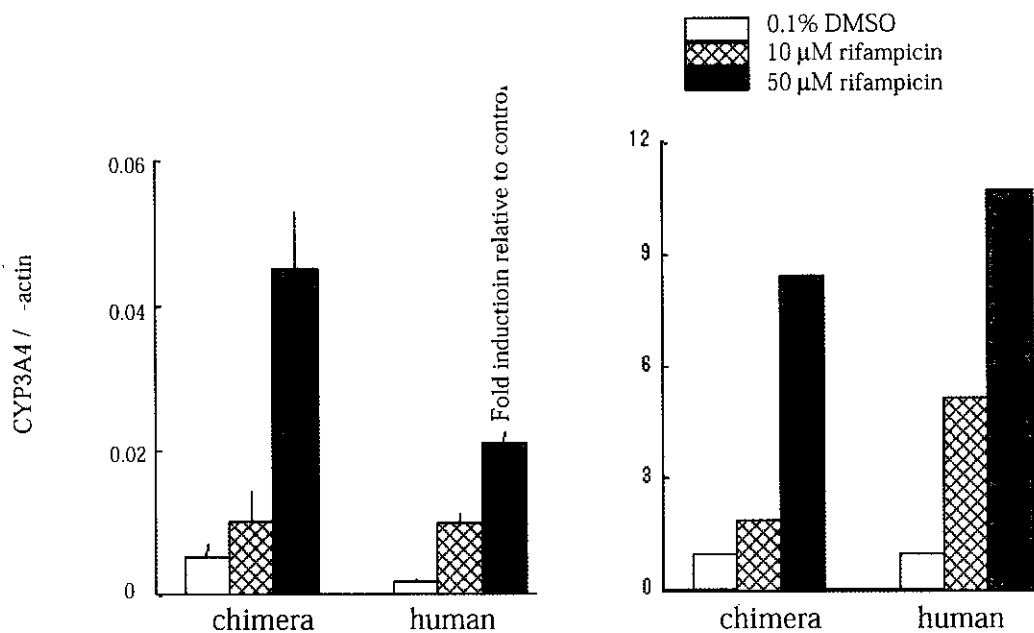


Fig.6. Induction of CYP3A4mRNA with exposure of rifampicin in chimera mouse liver.

解凍後には 60.1%であった。調製時の生存率が少々低いこと、さらに解凍時にもさらに生存率が低いことの直接の理由は不明であるが、今後、生存率の高い調製方法、および凍結手法を導入する必要がある。

ドナー肝の mRNA の発現量とキメラマウスの比較 (表 1) では、特定の酵素群が発現が低いという傾向は認められなかった。全体に 60% から 80% の発現量がキメラマウスに認められたことより、薬物動態や毒性について、ヒト特異的肝としての反応が充分期待できると考えられる。しかし、今後例数を追加し、同一ドナー由来ヘパトサイトを異なる

キメラマウスで作成する検討、さらに、異なるドナー由来肝の遺伝子の発現の普遍性の有無を詳細に検討する必要がある。

ハウスキーピング遺伝子は通常その発現量は変化しないと考えられている。しかし、解凍された肝細胞ではその直後から約 3 時間までは発現量が減少することが示された。しかし、その後は 72 時間まで一定の発現量を示すことより、対照群として用いることができることが示された。CYP3A4 は、72 時間まで発現が減少し続けた。これは対照群のヒトヘパトサイトでも同様の結果であるが、動態試験への使用時にはこの現象に

十分な注意が必要であると考えられる。一方、CYP1A1 と CYP1A2 は 24 時間まで減少を示すが、誘導試験を行う 48 時間から 72 時間ではその発現量が変化しなかった。これにより CYP1A 分子種の誘導については適切な評価が可能であると考えられた。

図 4 と図 5 に示す CYP1A1 と CYP1A2 の誘導はいずれも同様の傾向を示したが、対照群のヒトヘパトサイトに比べ、キメラヘパトサイトでは誘導能が著しく低下していた。この原因は不明であるが、凍結時および解凍後の生存率が比較的低いことが影響している可能性がある。今後さらに例数を増やして検討する必要がある。一方、リファンピシンによる CYP3A4 の誘導については、対照群と同様の誘導率を示したことより、CYP3A4 の誘導については、キメラヘパトサイトで十分に代用できる可能性が示されたと考えられる。今後、他の誘導剤を用いて詳細に検討する必要がある。

## 2 : ヒトヘパトサイトを用いた毒性化合物のスクリーニング手法の検討

### 2-B. 研究方法

#### 1. ヒトヘパトサイト培養

DMEM は日水製薬 (Tokyo, Japan) より購入した。FBS は Bio Whittaker (Walkersville, MD) より購入した。Cellmatrix は新田ゼラチン (Osaka, Japan) より購入した。Lanford medium は第一化学薬品 (Ibaraki, Japan) より御供与いただいた。ヒト非凍結ヘパトサイトは第一化学薬品より購入した。ヒト凍結ヘパトサイトは Charles River (Kanagawa, Japan) より購入した。ヒト非凍結ヘパトサイトは細胞数  $2.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> で、6 well プレートに Lanford medium で満たされた状態で供給され、到着日に培地を交換した。培地量は 2.4 mL/well とし、2 日間 5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。ヒト凍結ヘパトサイトはプレートへの接着を保つため、Cellmatrix を 1 mM HCl で 30 倍希釈し、6 well プレートに 2.4 mL/well で添加して室温で 1 時間静置することによりコラーゲンコートした。ヒト凍結ヘパトサイトのバイアルを 37°C 水浴で融解し、予め氷中で冷やしておいた 50 mL の遠心管に移した。10%FBS を含む Lanford medium 12 mL を 15 秒に 1 mL の割合で攪拌しながら添加した。2,000 g で 5 分間遠心分離後、上清を除き 14.4 mL の 10%FBS を含む Lanford medium を添加して細胞を懸濁した。コラーゲンコートした

プレートを滅菌 PBS で 2 回洗浄し、細胞を  $2.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種し、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。1 日培養後、10%FBS を含む Lanford medium を用いて培地を交換し、5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で 3 日間培養した。HepG2 細胞は 100 mm シャーレを用い、10%FBS を含む DMEM で 5%CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。

## 2. APAP の曝露

5 mM の APAP を含むそれぞれの培地に交換し、6 または 24 時間曝露させた後、total RNA を調製した。

## 3. ヒト非凍結および凍結ヘパトサイトおよび HepG2 細胞からの total RNA の調製

ヒト非凍結および凍結ヘパトサイトおよび HepG2 細胞から Chomczynski と Sacchi (1987) の報告により total RNA を調製した。ヒト非凍結および凍結ヘパトサイトは、1 well につき 0.5 mL の ISOGEN を、HepG2 細胞はシャーレ 1 枚につき 1 mL の ISOGEN を加えて細胞を懸濁した後、室温で 5 分間放置した。0.2 mL のクロロホルム溶液を加え、15 秒間激しく攪拌し、再度室温で 2~3 分間放置した。12,000 g、4°C にて 15 分間遠心分離した。上清を新しいチ

ューブに移し、0.5 mL のイソプロパノールを加え、室温で 10 分間放置した。12,000 g、4°C にて 10 分間遠心分離し、沈殿を 75%エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、DEPC 処理精製水に溶解させ、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

## 4. ヒト DNA チップによる遺伝子発現解析

ヒト DNA チップを用いての遺伝子発現解析は日立製作所・ライフサイエンス推進事業部に委託した。DNA チップに搭載した遺伝子の種類と数を Table 1 に示した。遺伝子発現のスキニングは ScanArray5000 (GSI Lumonics 社製) を用いて行った。画像データから数値データへの変換は専用ソフト QuantArray (GSI Lumonics 社製) を用いて行った。バックグラウンドには negative control の蛍光値を用い、各スポットの蛍光値から差し引いた。サンプル・コントロール間のノーマリゼーションは、グローバルノーマリゼーション法 (全体のスポットを用いて正規化する方法) を用いた。各遺伝子は二重でスポットしてあり、2 スポット間の平均値を算出して各遺伝子の発現量 (蛍光強度) を求めた。

Table 2. Classification of 1258 genes in human cDNA chip.

Category	Gene name	Number
Metabolism	P450, phase1, phase2 enzyme	171
Growth factor	EGF, PDGF, IGF, FGF, VEGF, HGF etc	58
Cytokine	CSF, IL, TNF, IFN, TGF $\beta$ , erythropoietin etc	144
Signal	insulin, MAPK, NF $\kappa$ B, NGF, Wnt etc	330
Cell cycle	cyclin, CDK, CKI etc	53
Apoptosis	caspase, etc	30
Transcription factor	STAT, ATE/CREB etc	35
Oncogene	oncogene, tumour suppression gene	97
Nuclear receptor	RXR, PPAR, AhR, LXR etc	32
DNArepair	topoisomerase, polymerase, DNArepair	85
Stress	heat shock protein etc	127
Membrane protein	receptor, ATPase, Gap-junction, selectin etc	87
Control	$\beta$ -actin, GAPDH etc	9
<b>Total</b>		<b>1258</b>

## 5. Real-time PCR による遺伝子発現解析

TaqMan 法による Real time PCR は、実験 1 と同じ手法で行った。

### 2-C. 研果結果

#### 2-C-1 Scatter-plot

ヒト凍結ヘパトサイトに APAP を曝露し、6 時間と 24 時間での遺伝子の発現変動の解析結果から scatter-plot を作成し、Fig. 7 に示した。各グラフの縦軸は APAP 未曝露のヒト凍結ヘパトサイトにおける遺伝子の発現変動値を、横軸は APAP

を曝露したヒト凍結ヘパトサイトにおける遺伝子の発現変動値をそれぞれ常用対数で表している。相関係数は APAP 曝露 6 時間で 0.9368、24 時間で 0.9091 と相関係数は共に高い値を示した。6 時間と 24 時間では 24 時間の相関係数が低いことからヒト *in vitro* においては APAP を長時間曝露することで遺伝子の発現が 6 時間と比べて大きく変動することが認められた。24 時間でスポットが直線から右下に移る傾向が認められ、これは APAP 曝露によって発現が増加した遺伝子が多いことを示している。

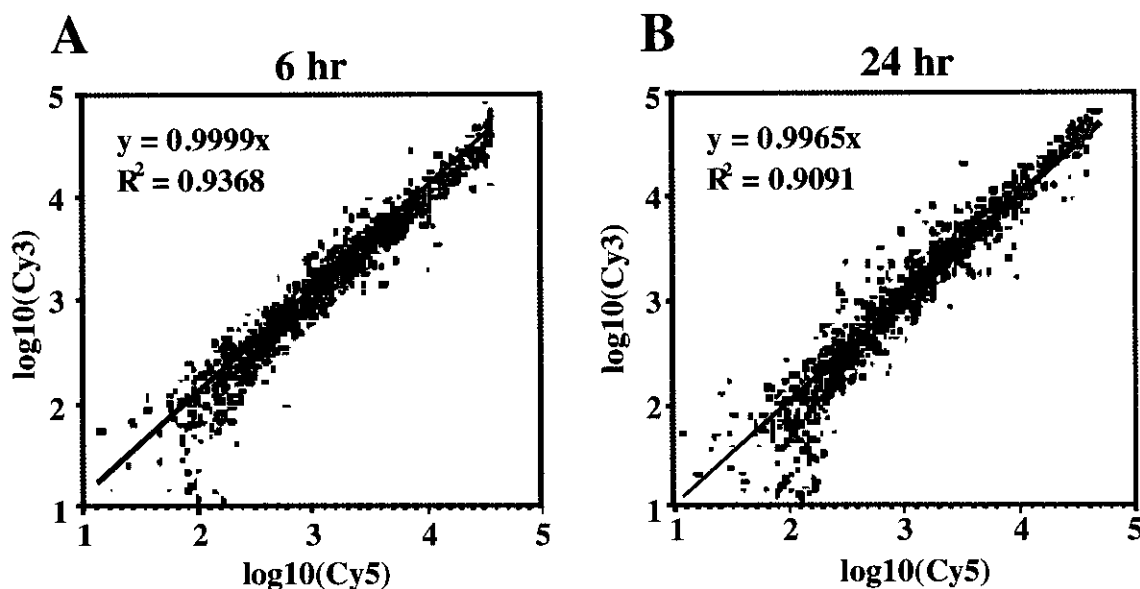


Fig. 7. Scatter-plot of 1258 genes expressed in APAP exposed cryopreserved human hepatocytes, comparison of the 6 hours exposure versus control (A) and of the 24 hours exposure versus control (B).

*Control RNA and RNA from APAP exposed sample were labeled with Cy3 or Cy5, respectively.*

## 2-C-2 遺伝子の発現変動のクラスター解析

ヒトヘパトサイトへの APAP 曝露濃度は、以前の検討結果から APAP の毒性発現が 5 mM から認められたことと、ラットにおける結果と比較するために 5 mM とした。曝露時間は APAP の毒性が認められないか、または軽微な毒性が予想される時間として 6 時間、確実な毒性が認められる時間として 24 時間の 2 点で検討した。実験はすべて  $n=3$  で行い、

カラーパターンによる発現表示は平均値を用いて表した。DNA チップに搭載した 1258 個の遺伝子についてクラスター解析を行った (Fig. 8)。縦軸は各遺伝子名を示していないが、1258 全ての遺伝子を、横軸はサンプルの種類と APAP の曝露時間を示す。図の赤い部分は APAP 曝露によって遺伝子の発現の増加を、緑の部分は発現の減少を、黒の部分は発現に変化が認められなかったことを示している。左側は総遺伝子の結果を、



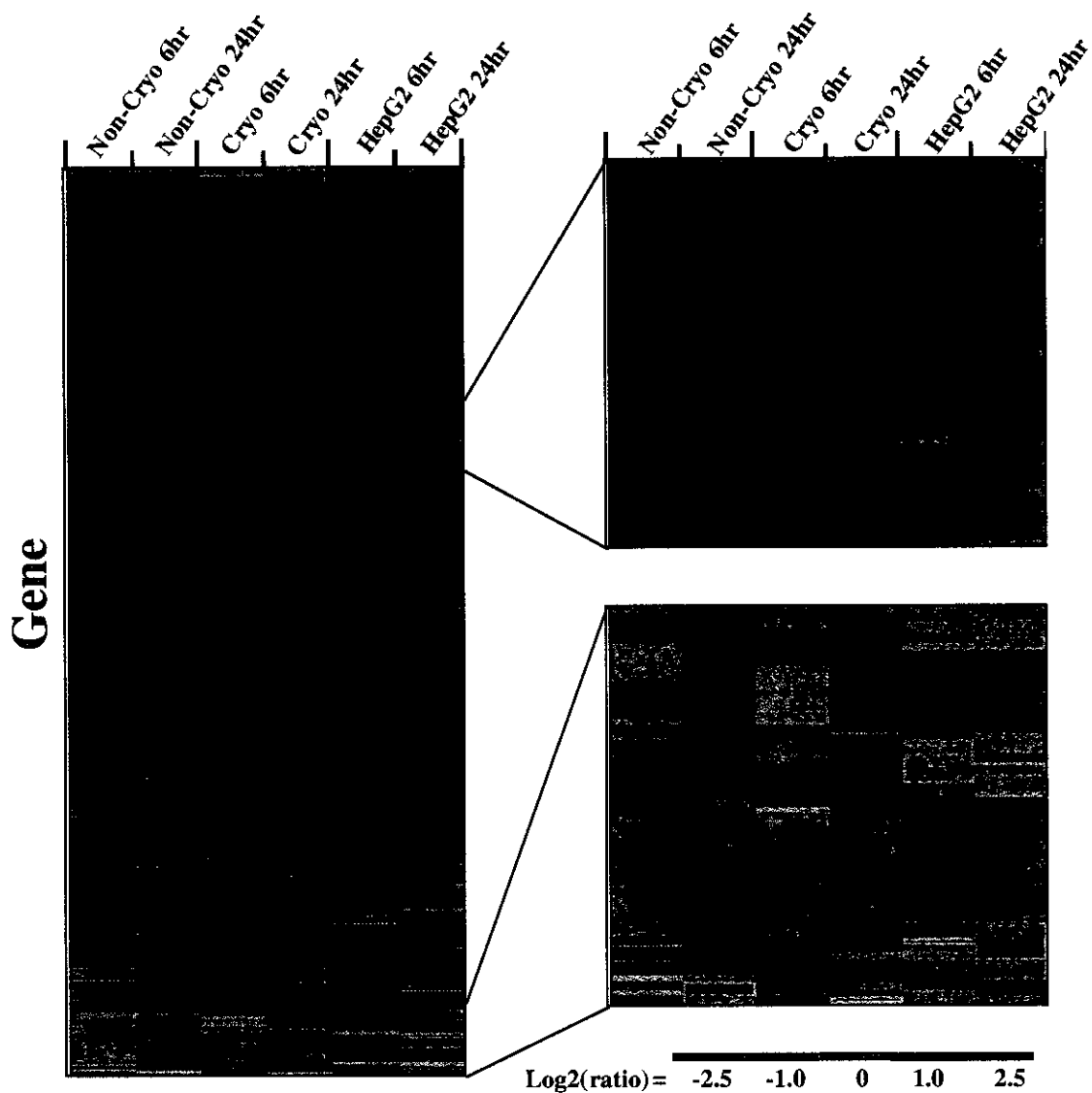


Fig. 8. Clustering of APAP-induced gene expression changes in non-cryopreserved and cryopreserved human hepatocytes and HepG2 cells.

*The color figures display expression data for each gene as a horizontal with the intensity of the color indicating the magnitude of up-regulation (red) or down-regulation (green).*

右側は左側の一部を拡大して示した。全体的に発現が変化しなかった遺伝子が多く、6時間および24時間で共に変化しなかった遺伝子について

はすべての細胞で類似の発現を示した。非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト間では6時間と24時間でそれぞれ遺伝子の発現変動パターン

がかなり類似していた。24 時間で発現増加した遺伝子が多く、これらの遺伝子のうち約半分が HepG2 細胞でも発現増加が認められた。6 時間のみまたは 6 時間および 24 時間で発現増加した遺伝子はほぼ同数であった。発現が減少した遺伝子は増加した遺伝子より少なく、6 時間のみ発現減少した遺伝子が非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで主に認められた。非凍結ヘパトサイトでのみ有意な発現変動を示した遺伝子はほとんど認められなかったが、凍結ヘパトサイトでのみ有意に発現変動した遺伝子は認められた。HepG2 細胞では両ヘパトサイトで有意に発現が増加した遺伝子で有意な発現変動がほとんど認められなかった。HepG2 細胞のみで有意に発現変動した遺伝子はほとんど認められなかった。

### 2-C-3 遺伝子の発現変動のカテゴリ分類

遺伝子の発現変動を遺伝子のカテゴリ別に分類して観察した。全ての遺伝子について、3 回の実験のうち 2 回以上で APAP 未曝露に対して APAP 曝露サンプルで 2 倍以上 (significant) の発現量が認められた遺伝子を up-regulated、半分以下の発現量を示した遺伝子を down-

regulated として集計した (Table 3)。APAP 曝露 6 時間後の significant 遺伝子の総数は非凍結ヘパトサイトで 45 個、凍結ヘパトサイトで 46 個、HepG2 細胞で 16 個であった。また同様に APAP 曝露 24 時間後では、非凍結ヘパトサイトで 42 個、凍結ヘパトサイトで 49 個、HepG2 細胞で 27 個であった。サイトカイン、シグナル関連遺伝子が多く変動していた。

代表的なカテゴリについて以下に示す。GST 関連遺伝子 (Fig. 9A) はすべての細胞で GSTZ1、GSTA4、GSTM3、GSTM4、GSTT2 が 24 時間で大きく発現が増加していた。GSTP1 は HepG2 細胞でのみ発現増加していた。HepG2 細胞では 6 時間での GST の発現変動はほとんど認められなかった。HSP 関連遺伝子 (Fig. 9A) は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトにおいて 6 時間と 24 時間共に発現が増加しており、特に HSPA1 類が強い発現増加を示していた。HepG2 細胞での HSP の発現変動は、6 時間では他の細胞と比べると発現増加が弱く、24 時間では類似の発現変動を示した。P450 関連遺伝子 (Fig. 9B) については、APAP の代謝に関与する CYP1A2 は非凍結ヘパトサイトの両時間で発現が減少し、凍結ヘパトサイトの 6 時

Table 3. Classification of genes those expression were significantly changed by 5 mM APAP exposure in non-cryopreserved and cryopreserved hepatocytes, and HepG2 cells.

6 hr Category	Non-Cryopreserved		Cryopreserved		HepG2	
	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
ADH	1					1
Ah receptor				1		
ALDH						
Apoptosis		3		4		
ATPase						
Cell Cycle	3		3		1	
Cytokine	3	5	4	9		2
Esterase	1					
GF	2	1	2	1	1	
GST					1	
Hsp	3		1			
Insulin	2	1				1
NR	1	1		1		1
Oncogene	2	3	1			2
P450		1		1		
Polymerase	1		1	1	1	
Signal	4	3	4	5	2	1
Sulfotransferase						1
UGT						
Others	3	1	3	4		1
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>27</b>	<b>6</b>	<b>10</b>

24 hr Category	Non-Cryopreserved		Cryopreserved		HepG2	
	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
ADH		1		1		1
Ah receptor						
ALDH	2		1			
Apoptosis				1	1	
ATPase		1	2		1	
Cell Cycle		2		1	3	
Cytokine	2	3	1	7	1	2
Esterase	1					
GF	1	3	4	1	1	
GST	2		1		1	1
Hsp	2		2			
Insulin						
NR						
Oncogene			1			1
P450	1	2	1	1		
Polymerase	1		2		1	
Signal	5	6	4	2	2	1
Sulfotransferase			1			2
UGT				2		
Others	2	5	6	7	5	3
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>16</b>	<b>11</b>

Others: ABC transporter, Angiotensin, ATF/CREB, Corticotropin, DNA-damage-inducible, DNArepair, Gap-junction, GH, Glucagone, Glucocorticoids, HMT, Mitochondria & stress, NQO, Stress, Supressor, TF, Topoisomerase, TPMT

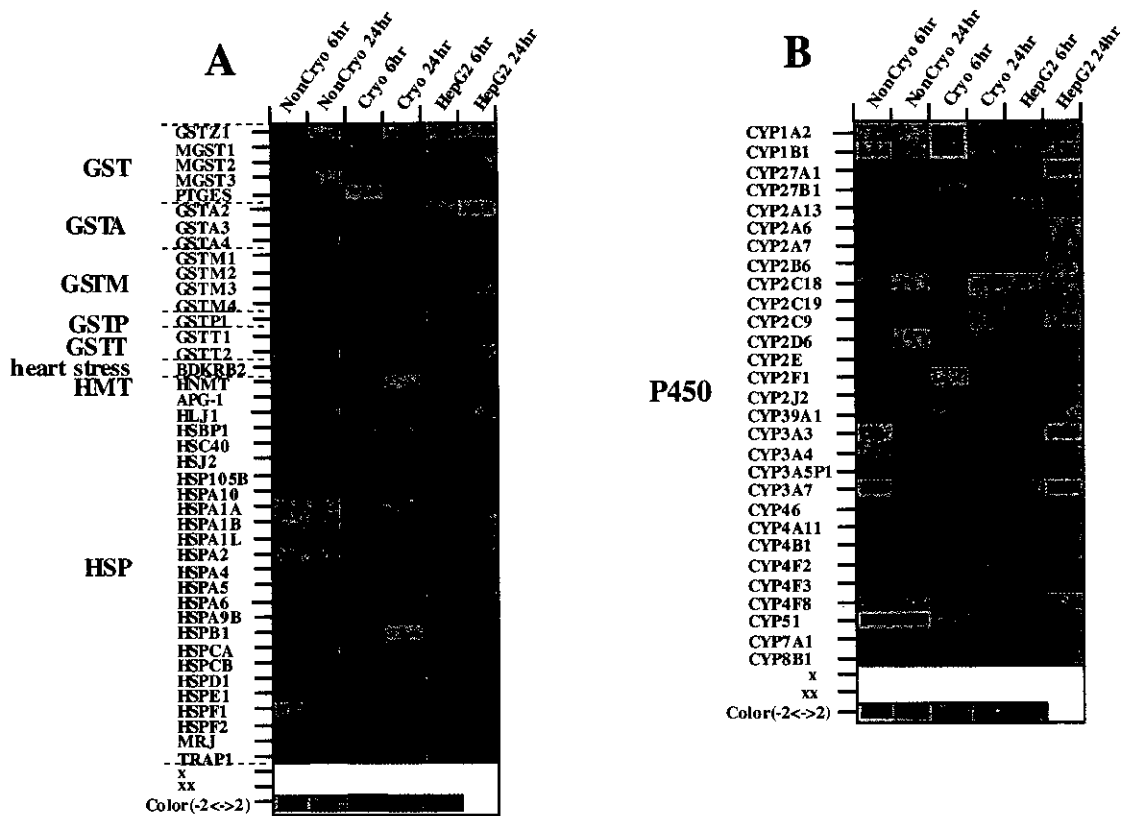


Fig. 9. Changes of expression level of GST, heat shock protein, and P450 by APAP exposure.

間で発現減少しており、HepG2 細胞では変動が認められなかった CYP2E1 はどの細胞のどの時間でも目立った変動は認められなかった。CYP3A4 は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトの 6 時間でわずかに発現が減少した。CYP2C は細胞間で共通して 24 時間で発現減少しており、CYP4 family は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで発現が増加していた。CYP1B1 は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで 6

時間では減少するが 24 時間では増加していた。

Sulfotransferase 関連遺伝子 (Fig. 10A) は非凍結ヘパトサイトでは 6、24 時間ともに大きな発現変動は見られなかった。凍結ヘパトサイトと HepG2 細胞で 6 時間と 24 時間で SULT (sulfotransferase) 類が発現の減少を示したが非凍結ヘパトサイトでは SULT1C1 と SULT2A1 は発現が増加していた。CHST1 (carbohydrate (N-acetylglucosamine-