

20020792

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

医薬品等の毒性試験に用いるストレス遺伝子チップの開発に関する研究

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 水島 徹

平成15（2003）年 3月

## 目次

### I. 総括研究報告

医薬品等の毒性試験に用いるストレス遺伝子チップの開発に関する研究-----1

II. 研究成果に刊行に関する一覧表 -----7

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----9

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

医薬品等の毒性試験に用いるストレス遺伝子チップの開発に関する研究

主任研究者 水島 徹 岡山大学薬学部助教授

研究要旨

本年度我々は、大腸菌で12、酵母で15、ヒトで23の新しいストレス遺伝子を単離した。また、ある物質（医薬品の候補化合物など）に対して細胞を耐性化する遺伝子を同定することにより、その物質の細胞毒性の分子機構を解明するという方法で、NSAIDsの細胞毒性に与る新しい遺伝子、TP01を発見した。このように、当初の研究計画に従い、研究を順調に進んでいる。

## A. 研究目的

製薬企業を始め、新しい物質を合成しそれを商品化する企業にとって、毒性試験は必須である。現在、動物実験で毒性試験を行っているため、莫大な費用と時間がかかるという問題に加え、生死に関する（あるいは視覚的に判断できる）毒性しか分からないという問題もある。また動物保護の観点からも、動物実験以外の毒性試験法の確立が求められている。そこで動物実験に代わる方法として、新規物質を*in vitro*で細胞に作用させ、誘導される遺伝子を網羅的に解析することによって、その物質の毒性を予想する方法が考えられている（本プロジェクトの指定研究はこのようなプロジェクトであると我々は考えている）。そのためには、ストレス遺伝子（毒性のある物質など種々のストレスによって細胞が誘導する遺伝子）を数多く載せたDNAチップが大変有効である。本研究提案は、様々なストレス遺伝子を様々な生物種において同定してきたという我々の実績の基に（ヒトに関しては既にストレス遺伝子チップの試作品を開発している）、様々な生物種において様々な方法でストレス遺伝子を同定し、ストレス遺伝子チップを各生物種において作成することを目標としている。即ち本研究は、本プロジェクトの指定研究を支える研究と位置づけることができる。

一方本研究では、同じくストレス遺伝

子を利用した全く新しい毒性試験の確立も目指す。細胞は毒物などのストレスに対し、適切な遺伝子（ストレス遺伝子）を発現することによって、自らの生存を保っている。そこで、ある物質に対して細胞を耐性化する遺伝子を解析することによって、その物質の毒性を予想することが可能であると我々は考えている。その際、比較的短時間で遺伝子解析が出来る大腸菌、及び酵母を用いる。なぜなら、多くのストレス（アルコール、活性酸素、酸など）は大腸菌からヒト細胞まで同じ種類の遺伝子を誘導するので、大腸菌、酵母を用いてもヒト細胞への影響を予想出来るからである。実際我々は、抗精神病薬クロルプロマジンに対し大腸菌を耐性化する遺伝子が SoxR という酸素ストレスに関与する遺伝子であることを同定した。我々はこの薬物が実際に活性酸素を増加させることを見出し、パーキンソン病の発症に活性酸素が関与するという他のグループの研究と併せて、クロルプロマジンによるパーキンソン病誘発に、クロルプロマジンによる活性酸素増加が関与していることを報告した。そこで、他の医薬品に関しても同様の解析を行い、この方法の毒性試験法としての評価を本研究で行う。

## B. 研究方法

各生物種（ヒト、マウス、イネ、酵母、大腸菌）でなるべく多くのストレス遺伝

子を同定し、各生物種のストレス遺伝子チップを作成する。

ストレスとしては、アルコール、活性酸素、高塩濃度、膜傷害性物質、及びDNA合成阻害剤などを使用した。各生物種の細胞に各ストレスを与えた時に誘導される遺伝子を、既存のDNAチップ（ゲノム情報からランダムに遺伝子をチップ化したもの）を使って検索した。尚ヒトに関しては、我々が既に作成しているストレス遺伝子チップも用いた。一方未知の遺伝子の発見を目指して、ディファレンシャルディスプレイ法でも検索を行った。更に大腸菌、酵母に関しては、発現ライブラリーを用いて、細胞内で発現させた時、各ストレスに細胞を耐性化することを指標にした検索も行った。

### 耐性遺伝子を利用した、毒性試験法の確立を行う。

我々は、ある物質に対して細胞を耐性化する遺伝子を解析することによって、その物質の細胞毒性の分子機構を予想することが可能であると考えているので、そのような毒性試験法の評価を行った。使用する毒性物質は、インドメタシンなどの非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)である。NSAIDsは、リウマチなどの患者に大変有効な薬であるが、胃粘膜障害という副作用のためその使用を制限しなくてはいけない大きな問題がある。これまでNSAIDsによる胃粘膜障害は、胃粘膜防御

因子プロスタグランジンの低下によると考えられてきたが、我々を含む数グループの論文から、NSAIDsが直接細胞を障害する作用もこの副作用の原因になっていることが明らかになった。しかしその細胞障害機構は不明であった。そこで、酵母を用いて、多量発現によってインドメタシン耐性を導く遺伝子を検索した。

### C. 研究結果

以下の遺伝子を同定した。

エタノールによって誘導される遺伝子

大腸菌

ftsE

proA

flaR

damA

relA

recA

metG

酵母

PRP4

PDR3

Sec31

ARP3

PRP4

MET25

STE24

RadA

PGK

ICL

TopA

ヒト

nuclear interacting protein 1  
H2A histone family, member L  
transgelin 2  
transcription termination factor  
tumor necrosis factor (ligand) superfamily,  
member 12  
matrix metalloproteinase 23A  
eukaryotic translation initiation factor 3,  
subunit 2 (beta, 36kD)

DNA合成阻害によって誘導される遺伝子

大腸菌

dnaA  
dnaC  
recA  
thyA  
supE

酵母

Cdc45  
Hsp104  
Isa1  
Tpo1

ヒト

syntaxin 11  
nucleolar protein 4  
receptor-interacting serine-threonine  
kinase 2  
SWI/SNF related, matrix associated, actin  
dependent regulator of chromatin, subfamily  
a, member 5  
regulator of G-protein signalling 5

pre-mRNA splicing factor similar to *S.*  
*cerevisiae* Prp18

uridine monophosphate synthetase (orotate  
phosphoribosyl transferase and orotidine-5'-  
decarboxylase)

TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-  
binding protein-like 1

ES1 (zebrafish) protein, human homolog  
RNA guanylyltransferase and 5'-  
phosphatase

tumor necrosis factor (ligand) superfamily,  
member 13

RuvB (*E. coli* homolog)-like 1

vav 2 oncogene

tubulin, beta polypeptide

tryptase, alpha

small nuclear ribonucleoprotein  
polypeptides B and B1

また、多量発現した場合、酵母をインドメタシン (NSAIDs の一種) に耐性化する酵母の遺伝子として、TPO1 を発見した。TPO1 の多量発現は、他の NSAIDs (イブプロフェン、ジクロフェナク) に対しても、細胞を耐性化した。

TPO1 は、TPO1~5 からなる膜蛋白質からなるファミリーに一種で、様々な分子の排出に関与していると考えられている。我々は、TPO1~5 のそれぞれの変異株のインドメタシンに対する耐性を調べた。その結果、TPO1 変異株は野生株に比べ顕著にインドメタシンに対し感受

性を示したが、他の変異株は野生株と同程度であった。

さらに我々は、TPO1 のヒトホモログを同定し、それを胃粘膜由来培養細胞 (AGS 細胞) で多量発現させると細胞がインドメタシンに耐性化することを発見した。

#### D. 考察

上述のように、今年度我々は、多くのストレス遺伝子を同定した。これらのストレス遺伝子は、ストレス遺伝子チップを作成する研究に大きく役立つ。

一方 TPO1 に関する研究から、酵母では、TPO ファミリーの中で、TPO1 のみがインドメタシンの排出に関与していることが分かった。またそのヒトホモログもヒト胃粘膜細胞で、インドメタシンの排出に関与していることが分かった。この遺伝子はインドメタシンの排出に関与することが示された最初の遺伝子である。

#### E. 結論

上述のように、研究は順調に進んでおり、3年後には、研究目的 (医薬品等の毒性試験に用いるストレス遺伝子チップの開発) を達成できる見通しである。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Tsutsumi, S., Haruna, R., Tomisato, W., Takano, T., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* 47, 84-89.
2. Tsutsumi, S., Tomisato, W., Takano, T., Rokutan, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1589, 168-180.
3. Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Transforming growth factor-β1 is responsible for maturation-dependent spontaneous apoptosis of gastric pit cells in primary culture. *Exp. Biol. Med.* 227, 402-411.
4. Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced apoptosis. *Dig. Dis. Sci.* 47, 1546-1553.
5. Tomisato, W., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Maturation-associated increase in sensitivity of cultured guinea pig gastric pit cells to hydrogen peroxide. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2125-2133.

6. Hoshino, T., Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2002) Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on gastric irritant-induced apoptosis. *Dig. Dis. Sci.* 47, 2370-2379.
7. Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H-J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 24-27.
8. Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H-J., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2003) Prostaglandin E<sub>2</sub> protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptor activation. *J. Biol. Chem.* in press.
4. 水島徹 HSP 誘導による臓器保護メカニズム 日本ハイパーサーミア学会ランチョンセミナー (2002) (名古屋)
5. 水島徹 NSAIDs 潰瘍と GGA-HSP による保護作用 GGA・HSP 研究会 (2002) (東京)
6. 水島徹 NSAIDs 潰瘍発症の分子機構と HSP の保護効果 バイオロンジル会 (2002) (岡山)
7. 水島徹 NSAIDs 潰瘍克服への戦略 LIT 研究所での招待講演 (2002) (東京)
8. 水島徹 胃粘膜傷害副作用のない非ステロイド系抗炎症薬開発の戦略 日本薬学会中国四国支部例会 (2003) (徳島)
9. 水島徹 NSAIDs 潰瘍克服への戦略 聖マリアンナ医科大学での招待講演 (2003) (川崎)

学会発表 (招待講演のみ)

1. 水島徹 NSAIDs による胃粘膜障害と HSP による保護 シンポジウム (2002) (千葉) (本人主催)
2. 水島徹 ストレス蛋白質と疾患 熊本大学での招待講演 (2002) (熊本)
3. 水島徹 NSAIDs による胃潰瘍発症機構と HSP による保護 日本消化器外科学会ランチョ

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし



研究成果に刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsutsumi, S., Haruna, R., Tomisato, W., Takano, T., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Effects of prostaglandins on spontaneous apoptosis in gastric mucosal cells.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	84-89	2002
Tsutsumi, S., Tomisato, W., Takano, T., Rokutan, K., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture.	<i>Biochim. Biophys. Acta</i>	1589	168-180	2002
Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Transforming growth factor- $\beta$ 1 is responsible for maturation-dependent spontaneous apoptosis of gastric pit cells in primary culture.	<i>Exp. Biol. Med.</i>	227	402-411	2002
Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced apoptosis.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	1546-1553	2002
Tomisato, W., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Maturation-associated increase in sensitivity of cultured guinea pig gastric pit cells to hydrogen peroxide.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	2125-2133	2002
Hoshino, T., Takano, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Effects of prostaglandin $E_2$ on gastric irritant-induced apoptosis.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	47	2370-2379	2002
Hoshino, T., Takano, T., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hwang, H-J., Koura, Y., Nishimoto, K., Tsuchiya, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Effects of sucralfate on gastric irritant-induced necrosis and apoptosis in cultured guinea pig gastric mucosal cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	26	24-27	2002
Hoshino, T., Tsutsumi, S.,	Prostaglandin $E_2$ protects gastric	<i>J. Biol. Chem.</i>	in press.		2002

Tomisato, W., Hwang, H-J., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	mucosal cells from apoptosis via EP <sub>2</sub> and EP <sub>4</sub> receptor activation.				
--	--	--	--	--	--

20020792

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.7- P.8の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。