

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15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 薬物動態研究所部長 二宮真一

平成16(2004)年3月31日

別添 3

目 次

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. 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

二宮真一

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

別添4

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

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、長期培養可能なプライマリーヒト肝・腎細胞を用いて毒性が懸念される薬剤の網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現解析のための最適なプロトコールの構築と薬剤の毒性発現に関わる遺伝子群の同定ならびに遺伝子発現のパターン化を行う。また、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響の解析を行い、より安全性の高い薬剤を設計するための基礎的知見を得る。さらに、ヒトでの安全性の高い薬剤の効率的な開発を可能にするために、実験動物から得られた遺伝子発現の解析データをヒトへ外挿するための基本的な手法の開発することを目的に研究を行っている。

具体的には、

- (1) プライマリーヒト肝・腎細胞を用いて薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現解析を行う際の最適なプロトコールを作成するとともに、プライマリーヒト細胞の有用性を評価する。また、遺伝子発現データの分子ネットワーク・パスウェイ解析を行い、変動した遺伝子系と毒性発現との相関を見出す。
- (2) 肝毒性や腎毒性が報告あるいは想定されている薬剤の構造修飾体を合成し、それらを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、毒性および薬効と遺伝子発現との相関に関する知見を得る。
- (3) プライマリーヒト肝・腎細胞で得られた遺伝子発現解析のデータと実験動物を用いた遺伝子発現解析のデータとの比較相関解析を行い、ヒトへの外挿を行うための基本手法の開発を行う。また、タンパク質の発現変動をハイスループットに解析する手法を確立する。

今年度は、昨年度に構築した長期培養可能なプライマリーヒト細胞試験系の最適化を行うとともに、肝毒性を有する薬剤処理による遺伝子発現の変動パターンを詳細に解析し、毒性マーカーの検索を行った。また、PPAR γ 作用薬について、プライマリーヒト細胞試験を用いる網羅的な遺伝子発現解析を行い、発現変動する遺伝子群の分子ネットワークの解析を行った。また、

構造を修飾した薬剤を用いて構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析する目的で、PPAR γ 作用薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、タモキシフェン関連化合物を合成するとともに、合成した化合物の薬効・毒性評価生物試験を行った。また、一部の化合物についてはすでに遺伝子発現解析試験を終え、発現が変化した遺伝子の解析を行っている。また、実験動物から得られる遺伝子発現解析データとプライマリーヒト細胞を用いた実験結果との相関性の解析を行うために、PPAR γ 作用薬についてマウス個体を用いた網羅的遺伝子発現実験を行い、プライマリーヒト細胞で得られた遺伝子発現解析のデータとの比較解析を行った。さらに、タンパク質の発現変動を解析する手法を確立する目的で、二次元電気泳動、タンデム MS 法、二次元液体クロマトグラフ法などを行った。

本年度までの研究により、プライマリーヒト細胞を用いた薬剤曝露・遺伝子発現研究の基礎的手法の確立をほぼ終了した。来年度は、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響の解析、および、動物実験結果をヒトへ外挿を目的としたプライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現データと動物データとの相関の解析を中心に研究を展開する。

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
二宮真一
第一化学薬品株式会社
薬物動態研究所部長

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
欒 洋
日本公定書協会流動研究員

A. 研究目的

長期培養可能なプライマリーヒト細胞およびヒト由来培養細胞を用いて、毒性を有する薬剤の網羅的遺伝子発現解析を行い、細胞で遺伝子発現解析を行う際の最適なプロトコルの検討、毒性発現に関わる遺伝子群の同定ならびに遺伝子発現パターンデータベース構築を行う。同時に、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす効果の解析を行い、より安全性の高い薬剤を設計するための知見を得る。また、ヒトでの安全性を評価するため、実験動物から得られた遺伝子発現解析のデータをヒトへ外挿するための基本手法の開発を行い、薬剤の副作用を回避あるいは軽減する評価法を確立する。

分担研究者二宮は、プライマリーヒト細胞を用いる網羅的遺伝子発現系を構築し、本法が薬剤の毒性評価に有用であることを実証する目的で研究を行っている。本年度は、肝毒性薬物および PPAR γ 作用薬について、昨年度に確立した遺伝子発現試験の至適プロトコルに基づき、プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現試験などを行い、発現する遺伝子のハイスループット解析を行うことを目的に研究を行った。

分担研究者宮田と奥田は、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析することを目的に研究を行っている。本年度は、昨年度に引き続き、PPAR γ 作用薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、タモキシフェン誘導体の合成法を確立し、合成した化合物の薬効・毒性を解析する目的で研究を行っている。また、合成した化合物は、構造修飾が遺伝子発現に及ぼ

す影響を解析するために、網羅的遺伝子発現解析実験に供する。

分担研究者鈴木は、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およびプロテオーム解析への応用を目指して研究を行っている。本年度は、PPAR γ 作用薬について、マウス個体を用いた肝臓における遺伝子発現解析、数種の遺伝子障害性物質を用いたヒトリンパ腫細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析などを行い、実験動物での遺伝子発現解析結果をヒトへ外挿するための知見を得ることを目的として実験を行った。また、遺伝子発現データを解釈するために重要となるタンパク質の発現変化を解析する方法を確立する目的で、本年度はタンデム型質量分析計を用いたタンパク質発現変化の解析を試みた。

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

長期培養可能なプライマリーヒト肝・腎細胞およびヒト由来培養細胞を用いて、毒性を有する薬剤の網羅的遺伝子発現解析を行い、細胞で遺伝子発現解析を行う際の最適なプロトコルの検討、毒性発現に関わる遺伝子群の同定ならびに遺伝子発現パターンデータベース構築を行っている。また、より安全性の高い薬剤を設計するための知見を得る目的で、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす効果の解析を行っている。本年度は、昨年度に確立した遺伝子発現試験の至適プロトコルに基づき、プライマリーヒト肝細

胞を用いた網羅的遺伝子発現試験を行い、発現する遺伝子のハイスループット解析を行った。

1-1 プライマリーヒト肝細胞に肝毒性薬剤を曝露したときの網羅的遺伝子発現解析

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プライマリーヒト肝細胞を用い、薬剤曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行い、代表的肝毒性薬剤曝露時の毒性マーカー検索を行った。薬剤はアセトアミノフェン、四塩化炭素、カルバマゼピン、イソニアジドを用いた。薬剤曝露後の細胞を回収し RNA を抽出して網羅的遺伝子発現解析を GeneChip U133A を用いて行った。その結果、カルバマゼピンは非常に発現変動遺伝子数が多く、細胞毒性が強く出ている結果が得られた。このことは細胞培養液を用いた生化学検査 (GPT, LDH) でも認められた。次に遺伝子発現変動パターンの類似性を、遺伝子発現変動の相関係数を指標として解析した。その結果、四塩化炭素 (4 時間) - イソニアジド (4 時間), 四塩化炭素 (24 時間) - イソニアジド (24 時間), 四塩化炭素 (72 時間) - イソニアジド (72 時間) などで遺伝子発現パターンの類似度が高いことが分かった。

次に、解析した遺伝子発現データを、(株)医薬分設設計研究所が開発した KeyMolnet を用いて分子ネットワーク解析した。共通に発現変動している分子ネットワーク、薬剤固有の分子ネットワークについて検討を行い、非常に多くのネットワークを捉えることが出来た (詳細

は分担研究報告書参照)。

1-2 プライマリーヒト肝細胞に PPAR γ 作用薬を曝露したときの網羅的遺伝子発現解析

実験には、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を、また、被験物質としてはトログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾンを用いた。薬剤曝露後の細胞を回収し RNA を抽出して網羅的遺伝子発現解析を GeneChip U133A を用いて行い、発現変動した遺伝子数を解析した。次に、トログリタゾン及びロシグリタゾンのデータを用いて KeyMolnet を用いた分子ネットワーク解析を行い、PPAR γ に関連するネットワーク上での遺伝子発現変化を調べた。その結果、関連するネットワーク上で発現変動する遺伝子が認められ、それらのなかには共通する遺伝子も認められた。また、すべての処理で共通して遺伝子の発現が減少する遺伝子クラスターを抜き出し、その遺伝子群についても KeyMolnet を用いて解析した。増加した遺伝子として、MMP (matrix metalloproteinase), FABP (fatty acid binding protein)、減少した遺伝子として MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) が見出された。

なお、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。

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

薬剤の構造修飾が毒性発現にかかわる遺伝子の発現に及ぼす影響を調べ、構造修飾と遺伝子発現との相関を解析することを目的として、PPAR γ 作用薬、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬、タモキシフェン誘導体を例にとり、構造修飾をした薬剤の合成、薬効・毒性解析、網羅的遺伝子発現解析を行う。

2-1. PPAR γ 作用薬

トログリタゾンやロシグリタゾンなどのTZD (thiazolidinedione) 薬は、インスリン抵抗性改善作用を有しており、II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 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、核内レセプターの種類であり、リガンド依存的な転写制御因子である。これまでに3種類のTZD 薬が臨床に用いられてきた。トログリタゾンは重篤な肝障害のために市販後中止になった薬剤である。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。また、チアゾリジン誘導体の共

通の副作用として貧血、浮腫、体重増加また肝機能障害や心不全がある。

このような問題点をふまえ、より優れた PPAR γ アゴニストの創製を目指し、新規 PPAR γ アゴニストを設計・合成し、活性(薬効・毒性)を評価すると共に遺伝子発現解析を行い、毒性と遺伝子発現の相関を解析することを目的として研究を行っている。

昨年度は、チアゾリジン骨格を有しない PPAR γ アゴニスト候補化合物として 3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propanoic acid を基本骨格とし、末端のアミノ基に種々の芳香族置換基、含窒素芳香族置換基、アルキル基などを導入した 24 種の誘導体を合成した。それらについて前駆脂肪細胞を用いた細胞分化誘導実験を行った結果、含窒素芳香族置換基とアルキル基を組み合わせると導入し、更にアルキル鎖の長さが長い誘導体がより強い分化誘導作用があることが分かった。PPAR γ 受容体は、リガンド結合部位に大きな疎水性空間があることが分かっている。そこで今年度は、3-[4-(2-aminoethoxy)-phenyl] propanoic acid を基本骨格とし、アミノ基の置換基の一つを含窒素芳香族置換基(ピリジル基)に固定し、アルキル鎖の長さをメチル基(C₁)からデシル基(C₁₀)まで変えた一連の化合物、ならびに、アミノ基を含窒素縮合芳香族複素環基にかえた化合物など、新たに15種の化合物を合成した。また、生物試験としては、昨年度に導入した前駆脂肪細胞を用いた分化誘導試験に加えて、今年度は新たに PPAR γ 受容体との結合試験(CoA-Bap System)を行った。PPAR γ 受

容体との結合試験は、昨年大阪大学の西川教授らが開発し発表した方法で、PPAR γ 受容体と薬物との結合性を直接評価することができる。さらに、昨年度と同様に、前駆脂肪細胞を用いた細胞毒性評価も行った。

アルキル基の長さの異なる一連の *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体の PPAR γ 受容体への結合能を調べた結果、アルキル鎖の長さが6から10の時に PPAR γ 受容体への結合能があることがわかり、最も強い結合能を示すアルキル鎖が9 (nonanyl 基) の化合物では化合物濃度 0.01 μ M でも結合性が見られた。これらの結果より、*N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体の PPAR γ への結合能は、アルキル鎖の長さ 9 が最適であることが明らかになった。*N,N*-diaryl 誘導体についても同様に PPAR γ 受容体への結合能を調べた結果、これらの化合物の PPAR γ 受容体への結合能は、*N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体より弱いものの、norharuman を結合させた誘導体は、上記のアルキル鎖の長さが 10 (decanyl 基) の化合物と同程度の結合性を有することがわかった。

次に、ラット前駆脂肪細胞を使用し、初代培養の腸管由来ラット前駆細胞を用いて細胞分化試験を行った。前駆脂肪細胞分化試験は、*in vivo* 系での血糖降下試験と相関性が高いことが知られている。化合物投与後 17 日間培養し、リピドス・リキッドを用いて脂肪滴中の中性脂肪を定量した。化合物濃度 10 μ M で活性を比較すると、アルキル基の長さの異なる一連の *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体では、アルキル鎖の長さが 5 (pentyl 基)

から 10 (decanyl 基) の化合物で陽性標品である 15d-PGJ₂ より高い脂肪細胞への分化誘導が見出され、PPAR γ 受容体への結合能試験の結果と同様な傾向が見られた。この結果は、これらの化合物の PPAR γ 受容体への結合がアゴニストとして作用していることを示す。また、*N,N*-diaryl 誘導体では、carbazole や norharman を結合させた化合物が比較的高い分化誘導能を示した。PPAR γ 受容体への結合試験で最も活性の高かった *N*-(2-pyridinyl)-*N*-nonanyl 誘導体について、前駆脂肪細胞の細胞分化誘導試験を低濃度領域まで調べた結果、2.5 μ M ではロシグリタゾンに匹敵する細胞分化誘導能を持つことがわかった。10 μ M では細胞毒性のために見かけ上の細胞分化誘導能が低下していたと考えられる。今後はさらなる構造修飾により、毒性と生物活性の分離を試みる必要がある。

2-2. ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ヒストンの脱アセチル化反応を行い、遺伝子の転写活性を制御していることが知られている。HDAC 阻害剤は、がん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、既存の抗がん剤とは異なる機構で作用する薬剤として注目を集めている。Tricostatin A (TSA) や Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) などのヒドロキサム酸系の化合物は、カルボニル基とヒドロキシル基の酸素が HDAC の活性中心

にある Zn^{2+} に配位して阻害活性をすると考えられている。しかし、ヒドロキサム酸構造に由来する毒性やバイオアビリティの低さから、ヒドロキサム酸構造を持たない HDAC 阻害剤の開発が望まれている。我々は新規の HDAC 阻害剤の開発を目的で合成研究に着手し、昨年度は、いくつかの非ヒドロキサム酸系化合物がすぐれた HDAC 阻害活性を有することを明らかにした。本年度は、SAHA の構造修飾により、HDAC に対してより親和性の高い化合物を見出す目的で、SAHA の cap 部分の構造およびリンカー部分の長さの異なる化合物 8 種類を合成した。HDAC 阻害活性の測定は、Deacetylase Fluorescent Activity Assay / Drug Discovery kit (BIOMOL®) を用いて行った。新規に合成した化合物の中では、SAHA の phenyl 基にオルト位に phenyl 基を導入した化合物が SAHA と同等の活性 ($IC_{50} = 0.2 \sim 0.3 \mu M$) を示した。また、リンカー部分の長さはメチレン鎖 5 および 6 が至適であり、6 の方がやや強い活性を示すことが明らかになった。現在、合成した一連の化合物について、プライマリーヒト肝細胞を用いて遺伝子発現解析実験を行い、毒性と遺伝子発現との相関の解析を行っている。

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抗エストロゲン剤としてタンパク質の転写を阻害し、また、成長抑制因子の生合成を促進するという乳がん細胞の成長に対する二重の阻害機構によって抗ガン作用を示す。しかし、長期投与によって子宮

内膜がんの発生頻度が有意に増加を示し、乳がん細胞が耐性を獲得して活性が著しく低下する。また、ラットに対して肝がんを誘発し、p53 の変異を高頻度で惹起することが報告されている。タモキシフェンの代謝物のうち、4-ヒドロキシ体（フェニル基の水酸化体）はタモキシフェンに較べて 100 倍以上強い抗エストロゲン作用を示すことから、タモキシフェンの抗エストロゲン作用の活性本体と考えられている。一方、エチル基の水酸化体はタモキシフェンの肝癌誘発性に関与していると考えられている。タモキシフェンとエストロゲン受容体との複合体の X 線構造解析の結果から、本レセプターは、タモキシフェンのエチル基が占める部位に空間的余裕があることが明らかになっている。この知見はタモキシフェンのエチル基の部分の構造展開しても、抗エストロゲン活性には影響を与えないことを示唆する。そこで、毒性に深く関与していると推定される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を合成し、構造と遺伝子発現パターンの変動を解析することによって、より安全性の高い薬剤の開発に資する基礎的データを得る目的で研究を開始した。

昨年度に開発したタモキシフェン誘導体の簡便な合成法を用いて、本年度は、タモキシフェンと 4-ヒドロキシタモキシフェンについて、エチル基を各種置換基に変換した誘導体を合成した（タモキシフェン誘導体 4 化合物、4-ヒドロキシタモキシフェンの誘導体 4 化合物）。

次に、タモキシフェンおよび 4-ヒド

ロキシタモキシフェンと合成した誘導体について pBR322DNA を用いて Fe³⁺ および Cu²⁺ 存在下での DNA 切断活性を調べた。その結果、タモキシフェン及び4-ヒドロキシタモキシフェンは金属として FeCl₃ または CuCl₂ の存在下 DNA を切断したが、その活性は非常に弱かった。しかし、合成した化合物には、有意な DNA 切断活性が認められるものがあり、特にエチル基を水素に置換したタモキシフェン誘導体は両金属イオン存在下、強力に DNA を切断した。

次に、BHK 細胞増殖阻害活性を調べた。その結果、タモキシフェン骨格は細胞増殖阻害活性が比較的高いことがわかった。またタモキシフェンのエチル基を他の置換基に変えても細胞増殖阻害効果は大きく変化しないことがわかった。

現在、合成した一連の化合物について、プライマリーヒト肝細胞を用いて遺伝子発現解析実験を行い、毒性と遺伝子発現との相関の解析を行っている。

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

3-1. マウス個体に PPAR γ 作用薬を投与したときの遺伝子発現変化の解析

プライマリー細胞は、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、しかし、in vitro の実験であるが故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、in vivo での動物を使ったデータを蓄積し、両者

を比較することが重要である。そこで、グリタゾン系糖尿病治療薬に関して、マウス個体を使って肝臓における遺伝子発現解析を行い、in vitro でのヒトプライマリー肝細胞を使った結果との比較を行った。トログリタゾン、ロシグリタゾン、ピオグリタゾンをマウス個体に単回腹腔内投与し、肝臓での遺伝子発現の解析を行った。マウスの肝臓から抽出した totalRNA を GeneChip 解析を行い、得られたデータを GeneSpring 解析ソフトを用いて、コントロール群に対する各遺伝子の発現比を求めた。得られた発現比の値を基に、シグナル強度に基づいて有意な変化として遺伝子を選択した。その結果、いずれかの薬物、いずれかのタイミングで有意となった遺伝子の総数は 1277 であり、いくつかの遺伝子に関して 2 種および 3 種の薬剤に共通した変化が認められた。次に、共通性の高かった 50 遺伝子の中で、PPAR γ 作用薬との関連が示唆される遺伝子も含まれている。たとえば、3 種の acyl-CoA thioesterase はペルオキシゾーム増殖剤にて誘導がかかることが知られている。Lipin 1 は脂質代謝やインシュリン耐性に関わり、正常な脂肪細胞の形成に必要な遺伝子である。Thyroid hormone responsive SPOT14 homolog は、ストレプトゾトシンにて誘発された糖尿病にて発現の変化する遺伝子として報告されている。Regulator of G-protein signaling 16 (RGS16) は mitogen にて誘導されることが知られており、MAP キナーゼシグナル系を活性化することが知られている。得られた各薬物、各サンプリングタイムにおける遺伝

子発現のパターンを利用して階層的クラスタリングを行った。その結果、ピオグリタゾンとロシグリタゾンは、1時間後、ロシグリタゾンとトログリタゾンは4時間後、ピオグリタゾンとトログリタゾンは24時間と72時間後に類似したパターンを示し、ピオグリタゾンの4時間後とロシグリタゾンの24時間後も類似したパターンを示し、時間経過が少しずつながら相互に類似した変化を示した。

3-2. ヒト培養細胞 TK6 に対する遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の解析

遺伝子傷害性物質に関しては、昨年度は、マウス個体を使って検討を行ったが、今年度は、*in vitro* の試験系として、ヒトリンパ腫細胞 TK6 を用いて遺伝子傷害性物質に関して網羅的に解析を行い、遺伝子傷害性に共通して起因する遺伝子発現変化を調べると共に、化合物ごとの作用機序に特徴的な遺伝子変化を検索した。6種の遺伝子傷害性物質を用いて実験を行い遺伝子発現の変化を調べた。遺伝子傷害性物質間での共通性は思ったよりも低く、上昇で3化合物、減少で5化合物であったが、これらの中には、ATF3, p21, Gadd45a など、遺伝子傷害に伴って発現が誘導されることが知られている遺伝子が含まれていた。一方、関連性の報告されていない遺伝子も多く含まれており、その作用が注目される。共通性が見られた遺伝子を使ってクラスタリング解析を行うと、アルキル化剤どうしは近傍にクラスターされ、中でも monofunctional なアルキル化剤 (EMS と MNNG) がもっと

も近い位置にあり、作用機序との良い相関性が認められた。共通性を持って変化した遺伝子のうち、上昇、減少それぞれ4遺伝子、計8遺伝子を選び、GeneChip 解析に用いた RNA サンプルを使って定量的 RT-PCR を行った。コントロールに対する発現比の値を算出し、GeneChip のデータと比較したところ比較的良い相関が得られ、GeneChip データの信頼性が裏付けられた。次にこれらの選択した遺伝子を指標として、さらに多くの遺伝子傷害性物質に関して RT-PCR 法にて遺伝子発現を調べたところ、これらの化合物に関しても比較的共通性を持って変化する遺伝子であることがわかった。

次に、GeneChip 解析実験として、新たに5種類の遺伝子傷害性物質と4種の非遺伝子傷害性物質を追加して検討を行った。化合物は、代謝拮抗剤として5FU, 6MP, AraC、活性酸素を産生させる薬剤としてBLM, KBrO₃、ニトロフルフリル化合物としてFZ、非遺伝子傷害性物質としてNaCl, PA, Chx, EtOH。これらの化合物をTK6細胞を処理し、この細胞より調製したRNAを使って定法に従いGeneChipによる解析を行った。先に行った6化合物のデータと一緒に再解析を行った。遺伝子の数は化合物ごとに大きく異なり、最も少ないPQで19、最も多いPAで537であった。変化の見られた遺伝子のうちで共通性の高いものを調べたが、全ての化合物に共通して変化する遺伝子は存在しなかったが、発現変化の共通性の高い遺伝子をリストアップし、遺伝子傷害性物質のみで共通して変化する13遺伝子を選択された。これらの遺伝子は、遺伝子傷害性の

予測に有用であることが期待される。また、それぞれ共通した作用機序の薬物間で共通性をもって動いた遺伝子の検索も行った。これらの中には、それぞれの作用機序と関連した遺伝子が含まれていると考えられる。以上、遺伝子傷害性に常に共通して変化する遺伝子は存在せず、比較的共通性は低かったが、遺伝毒性との関連性が報告されている遺伝子を含め、ある程度の共通性を持って変化する遺伝子が存在し、これらが遺伝毒性の指標として有効である可能性が示唆された。また、共通性を持って変化する遺伝子群を用いてクラスタリング解析を行うと、作用メカニズムとの関連した結果が得られ、その有効性が示された。また、RT-PCRの結果は GeneChip データとよく相関していた。

3-3. タンパク質発現変化の解析

遺伝子発現データの解釈の上で、生体機能性分子であるタンパク質の発現変化を直接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質発現解析法を確立することを目指して研究を行っている。今年度は、昨年度に行ったマウス肝臓のホモジネートより2次元電気泳動法により発現差の認められたタンパク質を分離し、MALDI-TOF/TOF 型タンデム質量分析計によりペプチドフラグメントの解析を行いタンパク質の同定を試みた。2次元電気泳動による検討ではスポットのタンパク量が質量分析機による解析に十分ではなかったため、今年度はアプライするタンパク量を増やし、染色はクマシーブルー染色にて行った。DEN 処理 28 日後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、コントロールと比較しスポットを検出した。これらを肉眼的に比較することにより、DEN 処理により明らかに発現量が減少したスポットとして3つのスポットを、移動度が酸性側にシフトした1つのスポットを確認した。スポットを切り出し、ゲル内にて還元アルキル化した後にトリプシン消化し生成したペプチドを回収し、マトリクス溶液として α -CHCA と混合したのち Zip チップにて脱塩、精製をした後、MALDI プレート上に滴下し結晶化した。タンデム型質量分析装置にて測定を行ったところ、ペプチドマスフィンガープリンティングにより、hsc70, heat shock protein, actin などを同定した。また、移動度が変化していたスポットは thioester S-methyltransferase と同定された。移動度の変化はリン酸化によることが予想される。

次に、2次元電気泳動を用いたタンパク質の分離能をさらに向上する目的で、

電気泳動の代わりに液体クロマトグラフィーを用いた2次元液体クロマトグラフィーシステムの構築をはかった。2次元LCとして、ギルソン社のProteome 2DLCシステムを基本として2次元クロマトグラフィーのシステムを構築した。1次元目の分離はクロマトフォーカシング法を用いて、タンパク質の等電点に基づいた分離をし、分画した各フラクションに対して2次元目の分離を逆相クロマトグラフィーにて疎水性に基づいた分離をし、多数のフラクションへと分画を行った。予試験として、HL-60細胞の細胞破碎液より得られたタンパク質混合液の分離を試みた。約5mgの総タンパク量からスタートし、1次元目のフラクションをさらに細かく分画することにより、かなり詳細な分離が可能となり、2次元電気泳動をこえる分離能が得られることが期待できる。今後さらに前処理や分離条件、および検出法の検討を行い、ハイスループットな解析システムの構築をめざす。

C. 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

最初に、肝毒性薬剤曝露時の遺伝子発現解析に関する考察する。今回の遺伝子発現解析では、それぞれの薬剤において細胞毒性が現れる程度の濃度によって細胞を処理した。そのため、細胞培養液を用いた生化学検査においては、アセトアミノフェンでは、若干のLDHの上昇が見られる程度であるが、他のイソニアジド、四塩化炭素、カルバマゼピンではGOT、GPT、

LDHの上昇が認められた。また、発現変動を示した遺伝子数は非常に多く、特にカルバマゼピン(1 mM)処理では多くの遺伝子の発現変動が認められた。また、発現変動した遺伝子数で特徴的であったのは、4時間後の時点でアセトアミノフェンでは発現減少した遺伝子が他の薬剤より多く、逆に発現増加した遺伝子が他の薬剤より少ない結果であった。これは薬剤性の毒性を反映したレスポンスの差と考えることができ、非常に興味深い。このように遺伝子発現解析を行う時点ごとに大きなレスポンスの違いが認められたり、遺伝子の中には連続する解析時点間で逆の変動を示すものもあり、解析時点が非常に重要であることが示唆される。本研究で用いた肝毒性薬剤を薬剤誘発性肝障害の組織学的形態により分類すると、アセトアミノフェン(直接毒性、肝壊死)、四塩化炭素(直接毒性、炎症)、イソニアジド(特異体質、炎症)のように分類できる。遺伝子発現解析のパターンを見てもと四塩化炭素とイソニアジドの処理によって変動する遺伝子発現パターンに相関が高いことが分かる。これは毒性発現のメカニズムから考えて炎症を起こすレスポンスに共通性が認められるからと考えられる。逆にアセトアミノフェンだけが肝壊死を起こす特徴があり、そのために遺伝子の発現パターンが異なっていると示唆される。このような解析は肝毒性をメカニズム別にカテゴライズするのに非常に有用な手法といえる。今後は薬剤による肝毒性をメカニズム別に考えて、様々な毒性タイプを表す薬剤を用いて、基本パターンとなる遺伝子発現デー

タの収集が必要と考える。このようなタイプ別の解析によって、タイプ固有の毒性マーカーの検索が可能となる。マーカーを厳密に抽出できることが可能になれば、今まで実験動物で見逃してしまっていたようなヒトで起こりうる毒性発現を、プライマリーヒト肝細胞を用いてハイスループットに検出できる試験系の開発が可能となる。肝毒性のタイプ別毒性マーカーを、プライマリーヒト肝細胞を用いて検索し、ヒトで起こりうる毒性を実験動物のデータと組み合わせて的確に捉えられることができれば、非常に有用なシステムになると言える。今後の課題としては、肝毒性タイプ別の毒性マーカーの検出を行いデータベース化することである。しかしそこには実験動物とは異なり非常に大きな問題が存在し、遺伝多型のような個人差があることを考慮しなければいけない。また、もっと大きな違いとして人種差にも考慮しなければならない。現在、使用可能なプライマリーヒト肝細胞としてモンゴリアンのプライマリー肝細胞があり、その利用により日本人に有用なデータベースの構築が可能であり、個人差・人種差を克服した有用なデータベースの構築が期待される。

KeyMolnet を用いて行った分子ネットワーク解析は、得られた遺伝子発現解析データを遺伝子の発現変動によって起こるタンパク分子のシグナリングをパターンとして捉えることができ、時点間で変動のある遺伝子発現をより効率的にプロファイルできる。この分子ネットワーク解析を用いてアセトアミノフェン、四塩化炭素、イソニアジドすべてに共通する

遺伝子発現変動を解析したが、発現増加、発現減少ともに細胞内の代謝系が捉えられた。これは毒性発現によるエネルギー代謝系の変化に伴うレスポンスであると捉えられ、毒性によって代謝が上手く働かなくなったものを違う代謝経路を働かせることによってリカバーする動きとも取れる。また遺伝子発現変動の相関性が高かった四塩化炭素とイソニアジドによる共通変動遺伝子群では、非常に多くのネットワークが捉えられた。これは肝毒性のメカニズムがともに炎症を起こすための結果であると考えられ、中でもβ-アミロイドなどの炎症関連タンパク質の発現増加が認められるネットワークが非常に大きなネットワークのつながりをもって抽出されたことは興味深い。肝毒性発現のメカニズムを詳細に追跡する目的では、この分子ネットワーク解析は有効であり、今後このネットワーク解析においてメカニズム別に毒性マーカーとなりうるネットワークを抽出することができれば、より確実に毒性を予測する試験系が開発できると考えられる。また、それを目指して実験計画を立て、展開する予定である。

次に、プライマリーヒト肝細胞を用いた PPAR γ 作用薬に関する考察であるが、実際の曝露実験においては、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・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見てみると、マウスでの実験とは異なり、発現増加する遺伝子が少なく、発現減少する遺伝子が多いことが分かる。これは、マウスの実験において薬剤に対する生体のレスポンスを1時間の時点で確認することができたが、プライマリーヒト肝細胞ではより直接的に薬剤が影響するため、処理後の非常に早い段階においてレスポンスした可能性が示唆される。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。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。薬剤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でも、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が異なり、そのレスポンスに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。

また、トログリタゾン 30 μ M 及びロシグリタゾン 30 μ M のデータを用いて KeyMolnet を用いた分子ネットワーク解

析により、PPAR γ に関連するネットワーク上での遺伝子発現変化を解析した結果、関連するネットワーク上で発現変動する遺伝子が認められた。中でも共通する変動を示した遺伝子は増加した遺伝子が、MMP (matrix metalloproteinase), FABP (fatty acid binding protein)、減少した遺伝子が MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) であった。MMP はコラーゲン、プロテオグリカン、ラミニンなど細胞外マトリックスを分解する一群の酵素であり、炎症性マーカーとして使用されている。ヒト MMP は 23 種あり、5 群に分けられる。この MMP-9 に関しては詳細な機能は不明であるが、癌の浸潤に関与するなど非常に興味深い遺伝子である。今回の実験では比較的薬剤処理の初期の段階で発現増加が認められており、PPAR γ の作用ではなく、薬剤の一部が他のレセプターに結合した結果を反映しているかもしれない。

また、FABP に関しては肝臓中の FABP の増加が PPAR リガンドによって上昇することが報告されており、今回の実験結果と合致している。FABP は脂肪細胞の分化時に発現増加するタンパク質であり、脂肪細胞分化誘導試験で PPAR γ 作用薬の評価をするときの一つのマーカーになっており、今回の実験で脂肪細胞分化試験と同じマーカーが変動していることは実験系として成立していることを意味する。

MCP-1 は動脈硬化に見られる血管内皮での細胞走化性タンパク質である。変動した遺伝子だけに注目して経時的な変化を見たが、共通変動した遺伝子の中にも違う時点で変動している遺伝子が見られ

た。これは薬剤による細胞のレスポンスに対する違いと考えられる。このように PPAR γ が遺伝子の発現を制御している分子だけを KeyMolnet を用いて解析することが簡単に行え、このような機能を用いることで遺伝子発現パターンを解析すれば経時的な変化を含めたパターン化を行うことができ、大変有用な解析手法となりえる。

また、すべての処理で共通して遺伝子の発現が減少する遺伝子クラスターを抜き出し、その遺伝子群に関して KeyMolnet を用いて解析分子ネットワーク解析を行った。すべての処理で発現減少した遺伝子クラスターは 3 つの分子ネットワークに参与していることが解析できた。FABP などの脂肪細胞分化に関わるネットワークや、JNK/p38 などのストレス応答性キナーゼ、FKBP/カルシニューリン系によるリンボカイン抑制、cyclinE などの細胞調節因子など非常に興味深い遺伝子のネットワークにおいて遺伝子の発現変動が見られた。現在、詳細な解析と確認試験を実施しており、マウスのデータとの相関解析を目指して、データ解析系の構築を進めている。

以上、代表的な肝毒性薬剤をプライマリーヒト肝細胞に曝露する実験において、肝毒性発現のメカニズムを詳細に追跡するのに分子ネットワーク解析大変有用であった。今後このネットワーク解析においてメカニズム別に毒性マーカーとなりうるネットワークを抽出することができれば、より確実に毒性を予測する試験系が開発できると考えられる。PPAR γ 作用薬をプライマリーヒト肝細胞に曝露

した実験では、経時的な分子ネットワーク解析手法の導入により、薬効発現・毒性発現に関与が示唆される遺伝子群を抽出することができた。プライマリーマウス肝細胞、マウスのデータを ortholog によるヒト遺伝子データへ変換する方法を既に確立しており、今後ヒトプライマリー肝細胞のデータとの相関性を検討し、ヒトでの毒性を予測するためのシステム構築を目指す。

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

トログリタゾンやロシグリタゾンなどの TZD (thiazolidinedione) 薬は、PPAR 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。これまでに 3 種類の TZD 薬が臨床に用いられてきたが、トログリタゾンは重篤な肝障害のために市販後中止になった。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。また、チアゾリジン誘導体の共通の副作用として貧血、浮腫、体重増加また肝機能障害や心不全がある。このような問題点をふまえ、より優れた PPAR γ アゴニストの創製を目指し、新規 PPAR γ アゴニストを設計・合成し、活性（薬効・毒性）を評価すると共に遺伝子発現解析を行い、毒性と遺伝子発現の相関を解析することを目的として研究を行った。今年度は、3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propanoic acid を基本骨格とし、アミノ基の置換基の一つを含窒素芳香族置換基（ピリジル基）に固定し、アルキル鎖の長さをメチ

ル基 (C₁) からデシル基 (C₁₀) まで変えた一連の化合物、ならびに、アミノ基を含む窒素縮合芳香族複素環基にかえた化合物など、新たに15種の化合物を合成した。また、生物試験として、前駆脂肪細胞を用いた分化誘導試験と PPAR γ 受容体との結合試験を行った。アルキル基の長さの異なる一連の *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体の PPAR γ 受容体への結合能を調べた結果、アルキル鎖の長さが9 (nonanyl 基) の化合物がもっとも強く PPAR γ 受容体に結合性することが明らかになった。*N,N*-diaryl 誘導体についても同様に PPAR γ 受容体への結合能を調べ、norharuman を結合させた誘導体が、上記のアルキル鎖の長さが10 (decanyl 基) の化合物と同程度の結合性を有することがわかった。次に、ラット前駆脂肪細胞を使用し細胞分化試験を行った。化合物濃度 10 μ M で活性を比較すると、アルキル基の長さの異なる一連の *N*-(2-pyridinyl)-*N*-alkyl 誘導体では、アルキル鎖の長さが5 (pentyl 基) から10 (decanyl 基) の化合物で高い脂肪細胞への分化誘導が見出された。この結果は、これらの化合物の PPAR γ 受容体への結合がアゴニストとして作用していることを示す。また、*N,N*-diaryl 誘導体では、carbazole や norharman を結合させた化合物が比較的高い分化誘導能を示した。PPAR γ 受容体への結合試験で最も活性の高かった *N*-(2-pyridinyl)-*N*-nonanyl 誘導体について、前駆脂肪細胞の細胞分化誘導試験を行った結果、2.5 μ M ではロシグリタゾンに匹敵する細胞分化誘導能を持つことがわかった。10 μ M では細胞毒

性のために見かけ上の細胞分化誘導能が低下していたと考えら、今後、さらなる構造修飾により、毒性と生物活性の分離を試みる必要がある。

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、遺伝子の転写活性を制御しており、HDAC 阻害剤は、がん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いる。しかし、ヒドロキサム酸構造に由来する毒性やバイオアビリティの低さから、ヒドロキサム酸構造を持たない HDAC 阻害剤の開発が望まれている。本年度は、SAHA の構造修飾により、HDAC に対してより親和性の高い化合物を見出す目的で、SAHA の cap 部分の構造およびリンカー部分の長さの異なる化合物8種類を合成した。HDAC 阻害活性を測定し、SAHA の phenyl 基にオルト位に phenyl 基を導入した化合物が SAHA と同等の活性を示すことがわかった。また、リンカー部分の長さはメチレン鎖5および6が至適であり、6の方がやや強い活性を示すことが明らかになった。

タモキシフェンは、非ステロイド系抗エストロゲン剤として抗ガン作用を示す。しかし、長期投与によって子宮内膜がんの発生頻度が有意に増加を示し、乳がん細胞が耐性を獲得して活性が著しく低下する。また、ラットに対して肝がんを誘発し、p53 の変異を高頻度で惹起する。そこで、一連のタモキシフェン誘導体を合成し、構造と遺伝子発現パターンの変動を解析することによって、より安全性の高い薬剤の開発に資する基礎的データを取得する目的で研究を行った。本年度

は、タモキシフェンと4-ヒドロキシタモキシフェンについて、エチル基を各種置換基に変換した誘導体を合成した（タモキシフェン誘導体4化合物、4-ヒドロキシタモキシフェンの誘導体4化合物）。合成した誘導体について Fe^{3+} および Cu^{2+} 存在下での DNA 切断活性を調べた結果、タモキシフェン及び4-ヒドロキシタモキシフェンは DNA 切断活性は非常に弱かった。しかし、合成した化合物には、有意な DNA 切断活性が認められるものがあり、特にエチル基を水素に置換した誘導体は両金属イオン存在下、強力に DNA を切断することが明らかになった。次に、BHK 細胞増殖阻害活性を調べた結果、タモキシフェン骨格は細胞増殖阻害活性が比較的高いことがわかった。またタモキシフェンのエチル基を他の置換基に変えても細胞増殖阻害効果は大きく変化しないことがわかった。

現在、合成した一連の化合物について、プライマリーヒト肝細胞を用いて遺伝子発現解析実験を行い、毒性と遺伝子発現との相関の解析を行っている。

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

最初に、マウス個体を用いた遺伝子発現変化の解析について結論と考察を述べる。GeneChip を用いた解析により、以前使用したガラスアレイに比べて、よりハイスループットに信頼度の高いデータが得られるようになった。これは、定量的 RT-PCR による検討結果との一致性により裏付けられた。GeneChip のデータ解析に

おいては、データの標準化、変化した遺伝子の選択法が重要であり、今年度までに、我々独自の手法をほぼ確立できた。弱い発現の遺伝子に対して単純な足切りをする代わりに、発現強度に応じて段階的に有意水準を変化させることにより、なるべく見落としのない選択を行うことにした。また、より信頼性の高いデータを得るためには、個体やチップに関する n 数を増やし統計的手法を導入することが一般に有効であるとされるが、今回比較的マウス個体間でのデータのばらつきが小さかったことと、チップが高価であることから、最小限のチップ数である程度信頼性をおけるデータを取得することが可能になった。この観点においては、遺伝毒性物質の検討のように、解析する化合物を増やすことにより、得られた結果の共通性を探る方向性も有用であると考えられる。

PPAR γ レセプター作用薬であるグリタゾン系化合物は、その作用を介してインシュリン低感受性の II 型糖尿病の治療薬となる。3種の構造の類似した化合物のうち、トログリタゾンは市販後重篤な肝毒性のため使用が中止された。この毒性発現のメカニズムを、構造活性相関の立場から予測することを目的として、本研究班では一連の新たに合成した類縁体の遺伝子発現に与える影響を検討することを目的としている。その際、従来の動物実験では肝毒性が十分予見できなかったため、ヒトでの毒性予測としてのヒト初代培養肝細胞で遺伝子発現の比較を行うことの有効性を検討している。本研究においては、この *in vitro* のヒト細胞

でデータとの比較を目的として、in vivoでのマウスのデータの取得を行った。マウスのフェノタイプとしては、トログリタゾンの毒性予測が十分できなかつたため、毒性発現において種差があると予想されるが、フェノタイプとして毒性が観察されなかつたが、遺伝子発現レベルでは何らかそれを補償するための変化が起きている可能性はあり、遺伝子発現変化を調べることにより予見が可能とも期待される。一方で、種差が根本的な問題であるなら、ヒトとマウスの間で遺伝子発現応答に関しても差があると予想され、その検証のためにヒト細胞で得られた結果とマウスでの結果とを比較検討することが重要となる。そこで、相互に得られた GeneChip データの比較手法を検討した。直接異なるチップ間での各プローブの比較ができないため、まず遺伝子ホモログの情報を活用するため、Unigeneのデータベースを検索して、マウスとヒトチップ間で対応する遺伝子を結びつけるためのホモロジーテーブルを作成した。これにより、個々の遺伝子に対して、Gene Spring ソフト上にて種間のデータをプローブレベルで比較することが可能となった。現在、全体を一括して比較することを目的として、ホモロジーテーブルを利用したデータ変換システムの構築に取り組んでいる。

次に、T6K 細胞を用いた遺伝子障害性物質による遺伝子発現変化の解析についてであるが、多くの遺伝子傷害性物質に関して検討を行った結果、共通性をもって変化する遺伝子は少なく、全てに共通して変化する遺伝子は存在しなかつた。

コントロールデータの安定性などを考慮すると、全般的に、in vivo での実験に比べて細胞を使った実験の方がばらつきが大きい傾向にあり、発現解析が難しいことも一因であるとも考えられるが。しかし、化合物によっては、作用発現の経時変化に差があることも十分予測されるため、今後は、より詳細に経時変化を検討することにより、化合物間の共通性が上がることが期待される。ただし、全てに関して GeneChip 解析を行うことは費用の面からも無理があるため、ある程度共通性が見られた遺伝子をピックアップし、定量的 RT-PCR 法を使って詳しい検討を行いたい。既に、化合物に関しては、初期の検討において共通性の高かつた 6 遺伝子を使って網羅的に解析を行った結果、他の遺伝子傷害性物質においても比較的共通性高く変化していることが観察できた。ただし、この数の遺伝子のみの変化からは作用機序による分類は難しく、化合物の作用機序ごとに特徴的な遺伝子を用いる必要があると考えられる。

最後に、タンパク質発現変化の解析手法の確立についてであるが、ゲルへのアプライ量を増やすことにより、2次元電気泳動で得られた差のあるスポットでのタンパク質の同定が可能になった。MALDI-TOF/TOF 型マスを使ったペプチドマスフィンガープリンティング法が有効であったが、感度の面からまだ発現の弱いスポットの同定は難しかった。これは、ゲルからの回収効率の低さやゲルへのアプライ量の制限からも、大幅な感度上昇が見込めないため、これらの問題を解決する上でも、ゲル電気泳動の代わりに液