体クロマトグラフィーを使った分離を試みることにした。２次元液体クロマトウラフィーシステムを用いて、検出系として、蛍光の利用、同位体ラベルによる同時比較、マスによる直接検出、１次元SDS-PAGE との組み合わせなどによる感度の向上に関して検討を行う予定である。また、安定同位体ラベル法（ICAT）による、LC-MS/MS を使った解析系の検討も行う予定である。

以上、GeneChip を用いた解析により、各種薬剤処理により変動する遺伝子群を、ある程度信頼性をもって検出することができた。PPARγ作用薬での検討では、脂質代謝に関わる遺伝子等、PPARγ受容体との関連性の示唆される遺伝子が選択できた。今後より詳細に構造活性相関を検討することにより、肝毒性の発現に重要であると考えられる遺伝子の絞り込みを行いたい。また、同時に行っているヒトプライマリー肝細胞との比較についても、遺伝子ホモログの情報を用いて相互のデータを変化するシステムの構築を開始した。

タンパク質の発現解析については、２次元電気泳動を用いて、薬物処理により発現変化する数種のスポット検出し、質量分析機による分析によりタンパクを同定できたが、さらに高感度、ハイスループットな解析を可能とするため、２次元液体クロマトグラフィーによる分離法や安定同位体ラベル法の導入を開始した。

４．まとめ

本研究事業では、長期培養可能なプライマリーヒト肝・腎細胞を用いて、毒性を有す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こと、また同時に、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こと、さらに、ヒトでの安全性の高い薬剤の開発を可能にする目的で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を行う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、遺伝子発現データを効率的に分子ネットワーク・パスウェー解析し、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する。また、それらの化合物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を比較し、ヒトへの外挿を行うための基本手法の開発を行う。また、プロテオーム解析による安全性·有効性評価のための新たな診断マーカーを見つけ

る。

今年度は、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、PPARγ作用薬について、プライマリーヒト細胞試験を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、発現変動する遺伝子群、分子ネットワークの解析を行った。また、構造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、PPARγ作用薬（昨年度と合わせて総計３９化合物）、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬（昨年度と合わせて総計４０化合物）、タモキシフェン関連化合物（昨年度と合わせて総計１０化合物）を合成するとともに、合成化合物の薬効・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、PPARγ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予定である。

なお、遺伝子解析研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、研究機関等で定められた倫理規定を遵守している。

D. 健康危険情報

なし。

E. 研究発表

それぞれの分担研究報告書に記載した。

F. 参考資料

F-1. 研究班会議

本研究事業を遂行するに際して、本年度は、研究班会議（2003.4.17（東京）、2003.7.25（名古屋）、2004.12.12（東京））を三度開催した。また、2004.1.27 には、トキシコゲンミクス情報交換会にて研究成果を発表し情報交換を行った。

F－2. 外国人研究者の招へい

本研究にともなう「流動研究員活用事業（日本公定書協会）」により、平成１５年１０月１日～１６年３月３１日まで、欒 洋（Luan Yang; ラン ヨウ）博士(中国瀋陽薬科大学)を受け入れた。流動研究員研究経費を支給下さいました公定書協会に感謝いたします。

別添５

厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

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）
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解析系の構築・ハイスループット試験系の開発

分担研究者：二宮　真一
第一化学薬品株式会社　薬物動態研究所部長

研究要旨

マウスおよび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細胞を用いて、薬剤の暴露時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、薬剤曝露時の経時的な網羅的遺伝子発現データを、KeyMolnet（医薬分設計研究所開発）により分子ネットワーク解析した。その結果、薬剤曝露における遺伝子発現変動のパターン化に分子ネットワーク解析が大変有用であることが明らかとなった。また、核内レセプター欠損マウスを用いた肝障害関連遺伝子の同定を開始し、医薬品開発において重要な肝障害メカニズム別の毒性マーカー探索を行った。

研究目的

新規技術による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ールの検討、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の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。分担研究としてマウスおよびプライマリーヒト肝細胞を用いた遺伝子発現解析系の構築。分子ネットワーク手法を用いた遺伝子発現変動パターンの解析を行った。

研究方法

＜細胞培養に関して＞

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（コーカシアン）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㈱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。

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0.22μmm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 μg/mL
Glucagon	SIGMA	G6664	2 μg/mL
Bovine Serum Albumin	SIGMA	A7888	0.5 mg/mL
Linoleic acid	SIGMA	L1012	5 μg/mL
Hydrocortisone	SIGMA	H0888	1 μmol/L
Selenium	SIGMA	S5261	0.1 μmol/L
Cholera toxin	SIGMA	C3012	2 ng/mL
Liver growth factor	SIGMA	G1887	20 ng/mL
Transferrin	SIGMA	T8158	5 μg/mL
Ethanolamine	SIGMA	E0135	1 μmol/L
L-glutamine	Invitrogen	25030-0810	2 mmol/L
Prolactin	SIGMA	L6520	100 ng/mL
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen	15140-122	100 IU/mL・100 μg/mL
Fungizone	Invitrogen	15290-018	0.75 μg/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、研究を行うたびごとに解凍して使用した。細胞の解凍は37℃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℃, 45×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℃で1時間以上予温しておいたものを使用し、5×10^5cells/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 cm^2）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。

＜マウスを用いた薬剤曝露に関して＞

C57B/6 マウスを用いた実験

薬物：Troglitazone，Rosiglitazone，Pioglitazone, 投与量:200mg/kg, 20mg/kg（2 用量），溶媒：0.5%メチルセルロース水溶液, 動物:マウス（C57B/6　10W　雄），1 群：3 匹，時点：4（1hr，4hr，24hr，72hr），採取臓器：肝臓，腎臓，血液（血清），サンプル：肝臓は 2 ヶ所/Tube，腎臓は 1 ヶ所/Tube で 1 匹あたり 3 本ずつチューブを作成。サンプル合計：28 群×3 匹×2 臓器×3Tube＝504Tube を回収した。RNA 抽出は RNeasy 法を用い、GeneChip による網羅的遺伝子発現解析を行った。

FXR 欠損マウスを用いた実験

薬物：Lithochoric acid，投与：1%混餌投与，動物：マウス（FXR 野性型・欠損型マウス　10W　雌），1 群：3 匹，時点：1（9 日間混餌投与），採取臓器：肝臓，腎臓，回腸，結腸，サンプル：各臓器 1 ヶ所/Tube で 1 匹あたり 2 本ずつチューブを作成。サンプル合計：4 群×3 匹×4 臓器×2Tube＝96Tube を回収した。RNA 抽出は RNeasy 法を用い、GeneChip による網羅的遺伝子発現解析を行った。

＜生化学検査に関して＞

細胞培養液上清を用いた生化学検査

薬剤処理を行った細胞の培養液を用いて細胞障害等の毒性を評価することを目的として、GOT，GPT，ALP，γ-GTP，LDH 等の生化学検査を実施した。

マウス血清を用いた生化学検査

薬剤処理を行ったマウスの血清を用いて細胞障害等の毒性を評価することを目的として、GOT，GPT，ALP，γ-GTP，LDH，TG，Sugar 等の生化学検査を行った。

＜totalRNA 抽出に関して＞

TRIzol 法

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 $1.5x10^6$ ～ $6.0x10^6$ 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、ピペッ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は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℃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 μL 添加して 15 秒間激しく撹拌後、室温にて 3 分間静置した。静置後 12000 x g，15 min，4℃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 500μL 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 x g，10 min，4℃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 20μL の Rnase-free H_2O に溶解した。

RNeasy 法

被験物質処理した細胞を PBS(-)で洗浄後, RNeasy kit(キアゲン)の RLT Buffer（1% β-メルカプトエタノール含有）を 1well あたり 0.25 mL 加え，セルスクレイパー

を用いて細胞を培養容器より剥離した。得られた細胞溶解液を 20G の注射針をつけた 5 mL シリンジにて 10 回の吸排を繰り返しにて処理し，細胞溶解液を所定のバイアルに入れ液体窒素を用いて急速に凍結させた後-80℃にて保存した。RNA 抽出は保存しておいたサンプルを解凍し、細胞溶解液と同容量の 70%エタノール添加し、ピペットを用いてよく撹拌した。混合した後、RNeasy カラムに添加し、8000×g 以上の回転速度で遠心し、フロースルーを捨て、Buffer RW1 を同容量添加して、洗浄のため 8000×g 以上の回転速度で遠心し、フロースルーを捨てた。コレクションチューブを取り替え、Buffer RPE を添加し、8000×g 以上の回転速度で遠心し、フロースルーを捨てた。この操作を合計 2 回行い、最後に完全に水分を除去するために最高速度にて遠心を行い、最後に Rnase-free H_2O を添加して、カラム上の RNA をよく溶解し、遠心して回収した。

＜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 μg 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 1μL 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 あるいは SilicoCyte (CytoGenomics 社製) Ver.1.2 を用いてノーマライズ、クラスター解析等を行った。また、KeyMolnet (㈱医薬分子設計研究所) を用いて分子ネットワーク解析を行った。

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．プライマリーヒト肝細胞への肝毒性薬剤曝露時の GeneChip による遺伝子発現解析

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(2 mM)，四塩化炭素(0.5 mM),カルバマゼピン(1 mM),イソニアジド(1 mM)の4種の薬剤を用いた。薬剤曝露後 4,24,72 時間後の細胞を回収し 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、各処理によって変動した遺伝子数を表に示した（表１）。また、経時的な遺伝子の変動数を図に示した（図１・２）。これらの結果の中でカルバマゼピンだけ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と考えられる結果であった。このことは細胞培養液を用いた生化学検査においても明確であり、カルバマゼピン（1 mM）24 時間曝露では GPT, LDH の著しい上昇が認められた。カルバマゼピンの結果を含めて、遺伝子発現の結果をノーマライズすると、解析結果がカルバマゼピンの結果によって引きずられる可能性が高いためカルバマゼピンの結果を削除して解析を実施することとした。次に各処理時点の遺伝子発現変動パターンの類似性を検討した。遺伝子発現パターンの類似度は遺伝子発現変動の相関係数を指標として検討した。遺伝子発現変動相互について相関係数を算出して行列形式（相関行列）で整理した（表２－４,図３－５）。これらの結果より、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）で遺伝子発現パターンの類似度が高いことが分かった。この結果は四塩化炭素とイソニアジドの遺伝子発現を示した散布図（図６）でも確認できる。

解析した遺伝子発現データを用いて分子ネットワーク解析を行った。分子ネットワーク解析には㈱医薬分設計研究所が開発した KeyMolnet を用いた。これまでの解析によってイソニアジドと四塩化炭素の遺伝子発現パターンの共通性が認められるため、分子ネットワークで論理演算を行って、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った（図７－１０）。

２．PPARγ作用薬に関して（マウス）

Troglitazone や Rosiglitazone などの TZD（thiazolidinedione）系の薬剤は、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有用な経口糖尿病薬剤となっている。TZD 誘導体は PPARγ（peroxisome proliferator-activated receptor-γ）を活性化することによってインスリン抵抗性を改善することが明らかとなっている。PPAR は核内レセプターの一種であり、リガンド依存的な転写制御因子である。PPARγ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変化が PPARγアゴニストによるインスリン抵抗性改善のメカニズムの１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。

今回行った実験はC57B/6マウスに既に医薬品として開発されているTroglitazone，Rosiglitazone，Pioglitazoneを20，200 mg/kg強制経口投与し、投与後１，４，２４，７２時間後の肝臓での遺伝子発現解析をマウスのGeneChip（MOE430A）を用いて実施した。その結果、発現変動した遺伝子数（表５）ならびにそれを経時的にグラフにした（図１１）。この結果からTroglitazoneにおいては発現変動する遺伝子数が他の2薬剤よりも少ないことがわかる。また、各処理時点の遺伝子発現変動パターンの類似性を検討した。遺伝子発現パターンの類似度は遺伝子発現変動の相関係数を指標として検討した（図１２）。これにより3薬剤とも投与後1時間での発現変動遺伝子数が多く、遺伝子発現パターンには類似性が高いことがわかる。さらに、Pioglitazone 処理4時間後の変動遺伝子とRosiglitazone処理24時間後の変動遺伝子が非常に類似していることがわかる。一方でTroglitazone処理の発現変動遺伝子パターンは、1時間後以外は他の2薬剤と類似性が少なかった。このことは薬剤ごとに階層的クラスタリングを行うことによっても非常に明確に確認できる（図１３）。また、K-means クラスタリングによって経時的に3薬剤のクラスタリングを行ったところ非常に興味深いクラスタリングを行うことができ、3薬剤の発現変動遺伝子パターンによる区別が可能であることがわかった（図１４）。

３．PPARγ作用薬に関して（プライマリーヒト肝細胞）

研究には接着型凍結プライマリーヒト肝細胞であるLot59，100を用いて処理時間1,4,24,72時間で行った。被験物質としてはTroglitazone（30μM，3μM），Rosiglitazone（30μM，3μM），Pioglitazone（30μM，3μM）を用いた。薬剤曝露後1，4,24,72時間後の細胞を回収し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。発現変動した遺伝子数を示した（表６）。また、Troglitazone 30μM及びRosiglitazone 30μM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、PPARγ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（図１５）。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、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、その遺伝子群に関してKeyMolnetを用いて解析した（図１６）。

４．FXR（farnesoid X receptor）欠損マウスを用いた肝毒性メカニズム解析に関して

本研究は東北大学大学院薬学研究科薬物動態学分野の山添先生、宮田先生との共同研究である。

FXRは核内レセプターの一つであり胆汁酸センサーとして機能し、胆汁酸の生成を制御している。FXRは胆汁酸合成酵素のCYP7Aや胆汁酸の輸送担体であるBsep，Ntcp等の胆汁酸関連遺伝子の発現を調節することによって脂質特に胆汁酸の恒常性維持に重

要な役割を果たしており、FXR 欠損マウスは肝臓内や血清中の胆汁酸レベルが高くなっているが正常に発育する。ところが cholic acid (CA)の摂取により FXR 欠損マウスでのみ有意な体重の減少が認められ致死に至る。一方、二次胆汁酸である Lithochoric acid (LCA) を摂取させると CA と異なり雌性マウスではむしろ野性型マウスで FXR 欠損マウスに比べ LCA 誘発肝障害に対して高い感受性が認められた。FXR 欠損マウスにおいて肝内 LCA レベルが低い原因は、高い LCA 硫酸抱合活性のため、LCA が消化管から再吸収されにくい硫酸抱合体となって胆汁中に速やかに排出され、糞中に排泄されるためである可能性が示唆されている。

このような研究展開において網羅的遺伝子発現の手法を用いれば、FXR 欠損マウスと野性型マウスとの LCA に対するレスポンスの差を詳細に解析することが可能になり、胆汁うっ滞型肝障害に重要な役割を果たす遺伝子の同定につながると考えられる。

そこで雌性 FXR 欠損型マウスおよび野性型マウスに連続 9 日間、1%LCA を混餌投与し、9 日後に組織を回収し、肝臓より RNA 抽出を行い、遺伝子発現解析をマウスの GeneChip (MOE430A) を用いて実施した。解析は①野性型 1%LCA 投与群／野性型陰性対照群，②欠損型 1%LCA 投与群／欠損型陰性対照群，③欠損型陰性対照群／野性型陰性対照群，④欠損型 1%LCA 投与群／野性型 1%LCA 投与群の 4 解析を実施した。それぞれの解析において発現変動した遺伝子数を（表 7）に示した。また、発現変動した遺伝子の中で興味深い遺伝子群を（表 8）にまとめた。

ALP 値，GOT 値を測定したが、野性型の陰性対照群に比べ、野性型 LCA 投与群では ALP : 4.3 倍，GOT : 46.3 倍の上昇が認められた。一方 FXR 欠損型では野性型陰性対照群に比べ、ALP : 約 2 倍，GOT : 約 4 倍程度の上昇であり、FXR 欠損において肝障害の軽減が確認されている。

考察

肝毒性薬剤曝露時の遺伝子発現解析に関する考察

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。

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、その後に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。

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。

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（24時間曝露時）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。このときの細胞の形態を観察すると、毒性のために細胞の脱落や細胞の萎縮が認められた。他の薬剤処理においては72時間後まで観察を行ったが細胞の形態には大きな変化は認められなかった。そこで今回のデータ解析においてはカルバマゼピンのデータを一旦削除して解析を行うこととした。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。

あらためて薬剤性肝毒性のメカニズム分類を考えてみると、Lee, Willam M. は6つの肝毒性メカニズム分類を総説にまとめている（N. Engl. J. Med., Vol.349 (5), 474-485 (2003)。そこでは①膜傷害による毒性，②トランスポーターが関与する毒性，

③P450 が関与する毒性, ④免疫原性の毒性, ⑤TNFα receptor あるいは Fas が関与するアポトーシスによる毒性, ⑥ミトコンドリアが関与する酸化傷害による毒性とまとめられており、この他にも肝臓で DNA 損傷を起こすような毒性が考えられる。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行列相関で見てみる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であると考えられる。逆にアセトアミノフェンだけが肝壊死を起こすと言う特徴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であると考えられる。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、今まで実験動物で毒性を検索して見逃してしまっていた、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。

GeneLogic 社は既にトキシコゲノミクスデータベースを構築しており、その利点として「従来法では 100 程度のパラメータを追うのみであった毒性試験が、Toxicogenomics ではすべての遺伝子を見ることにより、従来法では見つけられないものを見つけることが可能になったり、毒性が出ない投与量で検出できる可能性、毒性が出る前の早期予測、毒性メカニズム解明が可能になる可能性がある」としている。GeneLogic 社が開発したトキシコゲノミクスデータベース ToxExpress はラットのデータ(90%)を主に集めており、これに付加して動物・ヒトの細胞のデータ(10%)を有する。これからの拡充が予定されているが、動物実験からヒトの毒性を予測する戦略である。またこれらのデータベース作成には単回投与 6 時間・24 時間後のデータを採用しており、選択された毒性マーカーとなる遺伝子の動きを捉え、短期・長期の両方の毒性を予測可能としている。肝毒性のデータベース構築に用いている薬剤に関しては Necrosis (acetaminophen), Steatosis (tetracycline), Chorestasis (estradiol), PeroxisomeProliferator (genfiblozil), Hepatitis (diclofenac), Human-Specific (tacrine), Non-genotoxic carcinogen (phenobarbitar), Genotoxic carcinogen (dimethylnitrosamine) であり、肝毒性の予測を非常に高い確率で予測可能とうたっている。このように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 で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クラスター解析によって他の処理時点の比較するあるいは興味のある遺伝子の抽出だけにとどめることなく、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おこすための結果であると考えられ、中でも非常に興味深いのは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である。

このように肝毒性発現のメカニズムを詳細に追跡するのに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。

PPARγ作用薬（マウス）に関しての考察

インスリン非依存型糖尿病(NIDDM)の経口治療薬として、従来、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PPARγ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PPARγに結合し、活性化することが報告された(*J Biol Chem* 270, 12953-12956, 1995)。さらにその後、PPARγ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 (15d -PGJ2)であることが分かった(*Cell* 83, 803-812 および813-819,1995)。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TNFα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（*J Clin Invest* 100, 2900-2908, 1997)。

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。

今回の実験ではC57B/6 マウスを用いて強制経口単回投与で実施したが、この他に糖尿病誘発マウスの使用によっても非常に有意義な解析が可能かもしれない。C57B/6 マウスにおいても薬剤投与後 24 時間後の血液を用いた血液生化学検査の結果から、Rosiglitazone，Pioglitazone では血液中の糖の減少が認められた。また他の生化学検査値にも若干のトリグリセリドの減少が認められている。このことから考えるとPPARγに作用して血糖値を下げる作用はC57B/6 マウスにおいても確認できることがわかった。

発現変動遺伝子数に関してはTroglitazoneで他の2薬剤よりも少ない発

現変動を示した。これは Troglitazone, Rosiglitazone, Pioglitazone で PPARγへの結合能力に違いがあることによるものとも捉えることができる。また、各処理時点の遺伝子発現変動数は 1 時間後で多くの遺伝子が発現増加していることがわかり、他の時点では発現増加する遺伝子が少ないこともわかる。このことより薬剤に対する生体のレスポンスが非常に早いことが示唆される。さらに、興味深いことは Pioglitazone 投与 4 時間後と Rosiglitazone 投与 24 時間後において発現減少する遺伝子が非常に多く、時点がずれてこのようなレスポンスが起こっている。この異なる時点での共通なレスポンスは、共通する遺伝子が約半分であり、これらの共通遺伝子の中に特徴的な遺伝子が見つけられることが期待され、現在解析を進行中である。

また、Troglitazone 処理の発現変動遺伝子パターンが、1 時間後以外は他の 2 薬剤と類似性が少なかったことや、前述の Pioglitazone 4 時間処理と Rosiglitazone 24 時間処理との共通性などから、これらの PPARγ作用薬 3 薬剤は発現変動遺伝子数の経時的パターンから予測可能であることが示唆される。このことは薬剤別の階層的クラスタリングを行うことによっても非常に明確に確認できる（図１３）。また、K-means クラスタリングによって経時的に 3 薬剤のクラスタリングを行ったところ非常に興味深いクラスタリングを行うことができ、3 薬剤の発現変動遺伝子パターンによる区別が可能であることがわかる。

このように経時的な発現変動遺伝子パターンの解析を実施することで、共通する薬効薬剤の構造変化に伴う遺伝子発現パターンの変化を捉えることができ、今後薬効発現に重要な遺伝子、毒性発現に重要な遺伝子が同定されれば、創薬過程における候補物質のスクリーニングに応用が可能であり、今までの試験に比べ網羅的遺伝子発現解析は、格段に多くの情報が得られるという意味では大変有用な技術になることが示唆される。

PPARγ作用薬（プライマリーヒト肝細胞）に関する考察

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。これらのことから、プライマリーヒト肝細胞を用いた実験系を、昨年度の研究成果として、本研究に採用している。

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を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。

また、Troglitazone 30μM 及び Rosiglitazone 30μM 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、PPARγ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（図１３）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（1.コラゲナーゼ群，2.ゼラチナーゼ/IV 群，3.ストロラムライシン群，4.細胞膜貫通型 MMP 群，5.その他）に分けられる。Marx N. *et al.*は Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23(2): 283-8 (2003) において Rosiglitazone によって MMP-9 の遺伝子発現を抑制することを報告しており、今回の結果はプライマリーヒト肝細胞を用いた実験系で逆の動きを示したことになる。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り、既に ELISA による発現量の測定法も開発されている。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、PPARγ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 Kaikaus RM. et al. Mol Cell Biochem. 123(1-2):93-100 (1993) によって報告されている。このことは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 PPARγ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。Kintscher U. et al.は Eur J Pharmacol. 401(3):259-70 (2000) において PPARγ作用により MCP-1 が抑制されることを報告しており、今回の実験結果と合致している。

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 PPARγ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（図１６）。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関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ポカイン抑制，cyclineE 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。

FXR（farnesoid X receptor）欠損マウスを用いた肝毒性メカニズム解析に関する考察

これまでの FXR 遺伝子に関わる研究において以下のことが明らかになっている。FXR は胆汁酸合成酵素の CYP7A や胆汁酸の輸送担体である Bsep, Ntcp 等の胆汁酸関連遺伝子の発現を調節することによって脂質特に胆汁酸の恒常性維持に重要な役割を果たしている。FXR 欠損マウスは肝臓内や血清中の胆汁酸レベルが高くなっているが正常に発育する。ところが cholic acid (CA) の摂取により FXR 欠損マウスでのみ有意な体重の減少が認められ致死に至る。一方二次胆汁酸である LCA を摂取させると CA と異なり雌性マウスではむしろ野性型マウスで FXR 欠損マウスに比べ LCA 誘発肝障害に対して高い感受性が認められた。野性型マウスで肝障害の指標である血清中 aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP)活性が FXR 欠損型マウスより高く、むしろ FXR 欠損型マウスが LCA 誘発肝障害に抵抗性を示した。これらの結果は、雌性 FXR 欠損マウスに特別な LCA 誘発肝障害の防御機構が存在することを示唆している。LCA を摂取させたマウスの肝内胆汁酸組成を解析したところ肝内 LCA 及び tauroLCA ともに FXR 欠損マウスで低く、FXR 欠損マウスにおいて肝内 LCA レベルを低下させ肝障害を軽減させる機序の存在が示唆された。これらの機序として胆汁酸代謝と胆汁酸輸送の亢進等が考えられた。胆汁酸輸送担体 mRNA の肝臓内発現レベルを RT—PCR 法で解析したが顕著な差異は野性型、FXR 欠損マウス間で認められなかった。一方胆汁酸代謝に関与する薬物代謝酵素として CYP3A や ST2A 等が考えら

れる。雌性マウスの肝ミクロゾーム，可溶性画分中のLCA 6 位水酸化活性とLCA 硫酸抱合活性を測定したところ、6b 位水酸化活性はむしろ FXR 欠損マウスで低く、6a 位水酸化活性は欠損マウスで高かったがそのレベルは 6b 位水酸化活性に比べて低く、CYP3A 分子種による LCA の水酸化が雌性 FXR 欠損マウスのLCA 誘発肝障害の軽減に関与している可能性は低いことが示唆された。一方LCA 硫酸抱合活性は欠損型マウス可溶性画分において野性型マウスに比べて 5.5 倍高かった。各個体で St2a タンパクの含量も LCA 硫酸抱合活性に相関し、FXR 欠損マウスで 5.8 倍高く FXR 欠損マウスにおいて St2a 含量が高いことが、LCA 硫酸抱合活性を増加させていることが示唆された。さらに各個体の St2a タンパク含量と血清中ALP 活性の間に逆相関の関係が認められ、FXR 欠損マウスにおいて肝内 LCA レベルが低い原因は高いLCA 硫酸抱合活性のため、LCA が消化管から再吸収されにくい硫酸抱合体となって胆汁中に速やかに排出され、糞中に排泄されるためである可能性が示唆されている。

今回の実験において、ALP 値，GOT 値の結果は、これまでに得られている知見と合致しており、野性型 1%LCA 投与により強度な肝障害が起こっていることが確認できる。これらのマウスより抽出した肝臓 RNA を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、発現変動した遺伝子数は肝障害の最も強い野性型 1%LCA 投与群で野性型陰性対照群に対して 1444 遺伝子が発現増加、944 遺伝子が発現減少していた。これは毒性発現に伴う遺伝子発現変動と捉えることができる。重要となるのはFXR 欠損によって毒性が軽減されていることであり、現在欠損型と野性型の 1%LCA 投与によって発現減少した遺伝子群の中で、特に FXR 欠損によって変動する遺伝子に着目して解析を行っており、大変興味深い遺伝子群が抽出されてきている。今後、これらをまとめ、他の胆汁うっ滞を誘発する薬剤での遺伝子発現変動を捉えることにより検証を行い、予測が非常に難しい胆汁うっ滞型肝毒性の毒性マーカーが抽出されることが期待される。げっ歯類の胆汁排泄はヒトのそれに比べて亢進しており、げっ歯類を用いて胆汁うっ滞型の肝毒性を予測することは非常に難しい。実際に臨床試験あるいは市販後にこのような遅延型の肝毒性の発生により中止される薬剤が多々見られる。胆汁うっ滞型の肝毒性を惹起する代表的な薬剤としては性ホルモン剤や蛋白同化ステロイド，テトラサイクリン，リファンピシン，クロールプロマジンなどが知られるが、これらの薬剤による毒性をあらかじめ予測することが可能となれば、創薬に非常に有用であると考えられる。

結論

マウスおよびプライマリーヒト肝細胞を用いた遺伝子発現解析系の構築。分子ネットワーク手法を用いた遺伝子発現変動パターンの解析を目的として行った。

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。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。

PPARγ作用薬をマウスに曝露した実験では、経時的な発現変動遺伝子パターンの解析を実施することで、共通する薬効薬剤の構造変化に伴う遺伝子発現パターンの変化を捉えることができ、今後薬効発現に重要な遺伝子、毒性発現に重要な遺伝子が同定されれば、創薬過程における候補物質のスクリーニングに応用が可能であり、今までの試験に比べ網羅的遺伝子発現解析は、格段に多くの情報が得られるという意味では大変有用な技術になることが示唆された。

PPARγ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。

FXR欠損型マウスを用いた肝障害のメカニズム解析では、げっ歯類で非常に難しい胆汁うっ滞型の肝毒性予測を可能にするべく、核内受容体である FXR を欠損させたマウスによる毒性マーカー遺伝子の探索を行った。今後、更なる検証が必要であるが医薬品開発過程における胆汁うっ滞型肝障害の予測が可能となれば非常に有用な毒性試験系として大変意義深いものとなると示唆される。

論文発表

Novel histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, enzyme inhibition, and binding mode study of SAHA-based non-hydroxamates. Suzuki T, Nagano Y, Matsuura A, Kohara A, Ninomiya S, Kohda K, Miyata N. Bioorg Med Chem Lett. 13 (24) 4321-6 (2003)

学会発表

実験動物・プライマリー細胞（ラット, ヒト)・ヒト由来株化細胞への薬剤曝露時の GeneChip による遺伝子発現解析
○小原有弘[1]，鈴木孝昌[2]，二宮真一[1]，須藤哲司[1]（[1]第一化学薬品，[2]国立衛研）
Affymetrix ユーザーミィーティング(2003年9月東京)

GeneChip®を用いた薬物応答遺伝子の解析とタンパク相互作用の予測　○田井中均[1]，小原有弘[2]，二宮真一[2]　([1]ディスカバリーバイオテクノロジーズ，[2]第一化学薬品)
第1回スポットファイアー日本ユーザー会(2003年11月豊橋)

GeneChip®を用いた薬剤曝露時の遺伝子発現解析　○二宮真一[1]，鈴木孝昌[2]，鈴木孝禎[3]，宮田直樹[3]，小原有弘[1]，須藤哲司[1]
([1]第一化学薬品，[2]国立衛研，[3]名市大・薬) 日本薬学会第124年会(2004年3月大阪)

チアゾリジンジオン誘導体曝露ヒトプライマリー肝細胞の GeneChip®遺伝子発現解析（KeyMolnet を用いた分子ネットワーク解析への展開）　○小原有弘[1]，鈴木孝昌[2]，小貫慶昭[3]，佐藤陽美[3]，板井昭子[3]，鈴木孝禎[4]，宮田直樹[4]，二宮真一[1]，須藤哲司[1]
([1]第一化学薬品，[2]国立衛研，[3]医薬分子設計研究所，[4]名市大・薬)
日本薬学会第 124 年会(2004 年 3 月大阪)