

図1 肝毒性薬剤暴露時の経時的発現変動遺伝子数 (Threshold 3.0)

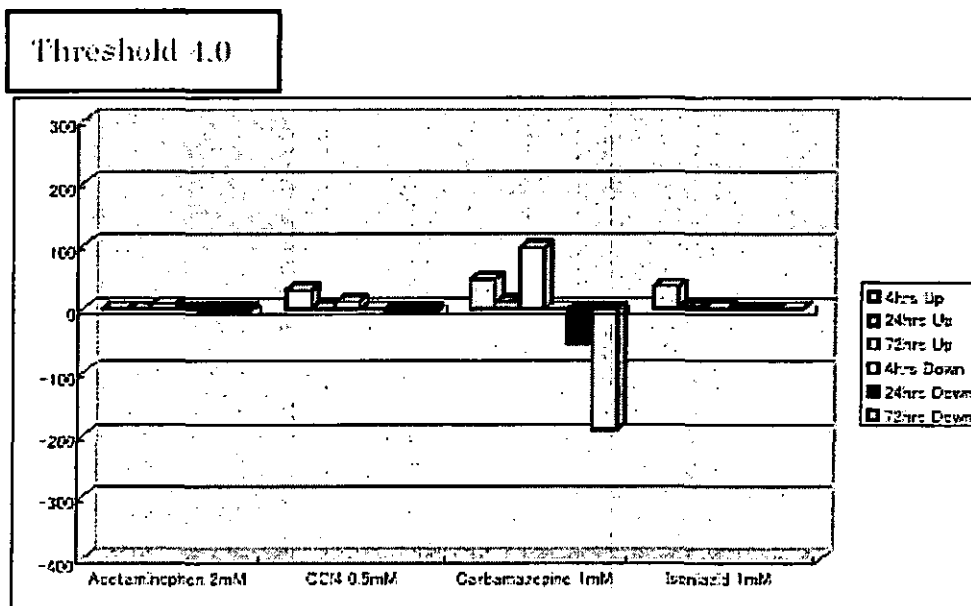


図2 肝毒性薬剤暴露時の経時的発現変動遺伝子数 (Threshold 4.0)

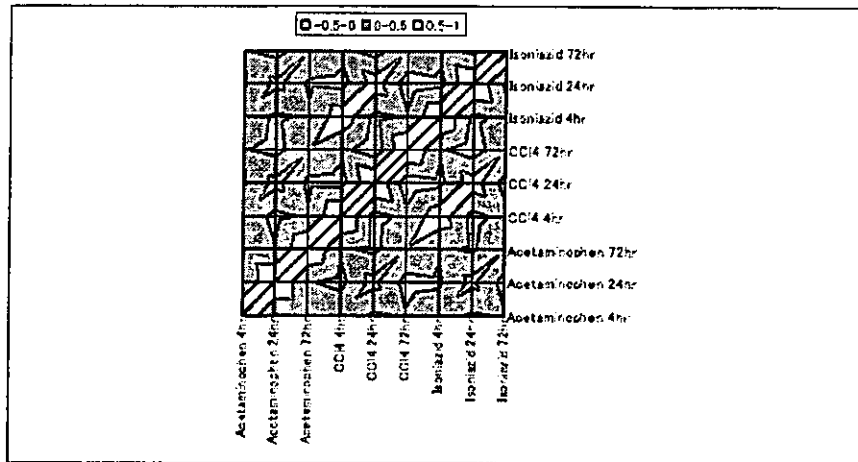


図3 遺伝子発現パターンの行列相関図 (すべてのデータを使用)

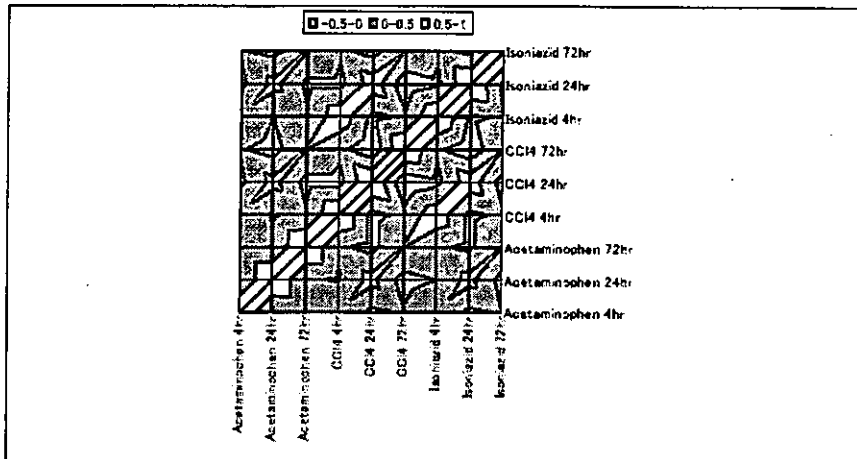


図4 遺伝子発現パターンの行列相関図 (Threshold 2.0 以上)

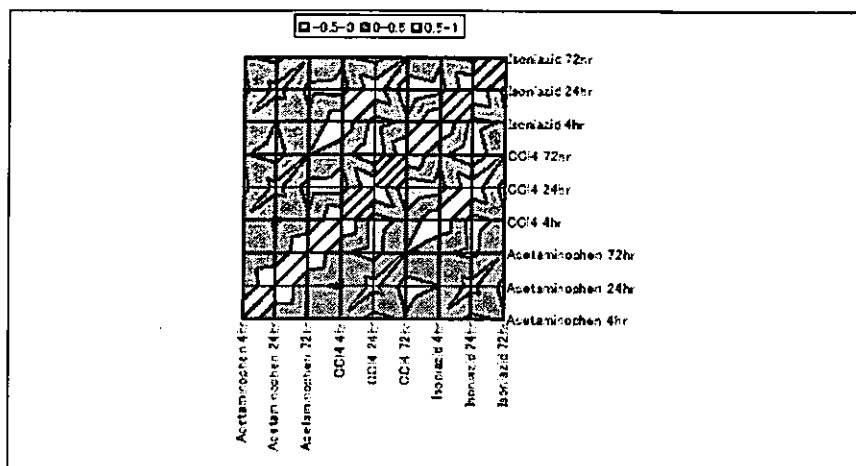


図5 遺伝子発現パターンの行列相関図 (Threshold 3.0 以上)

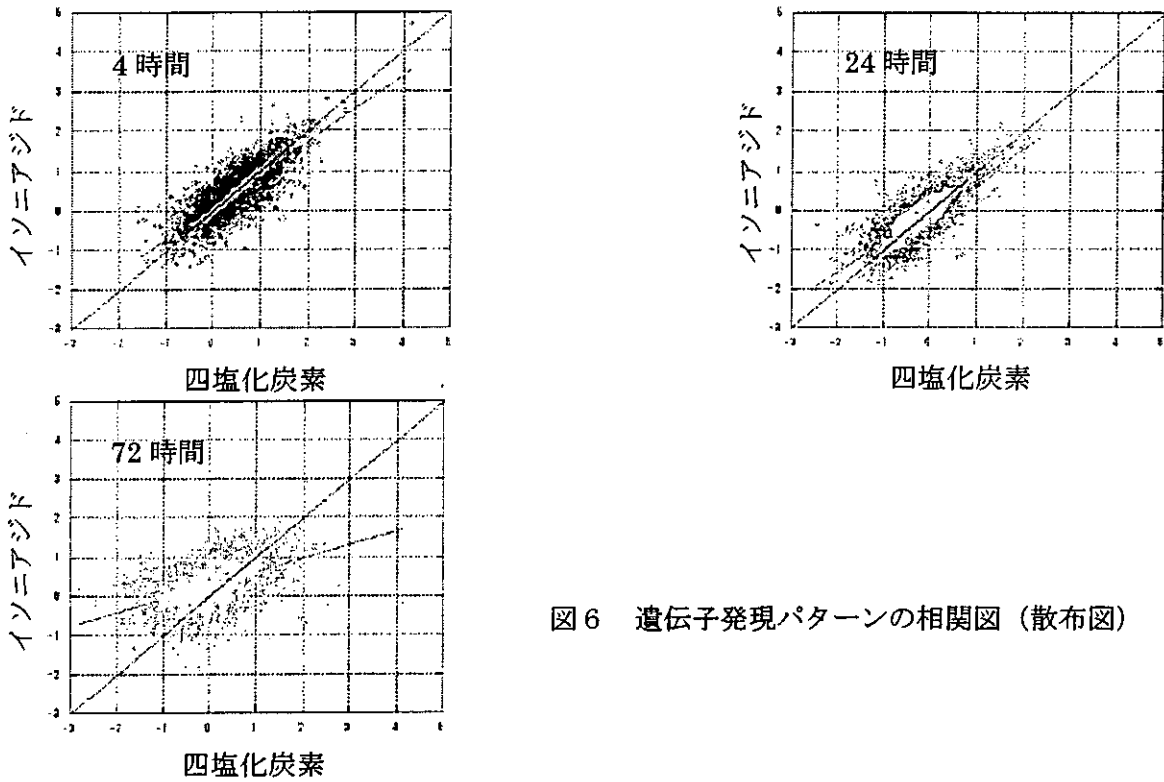
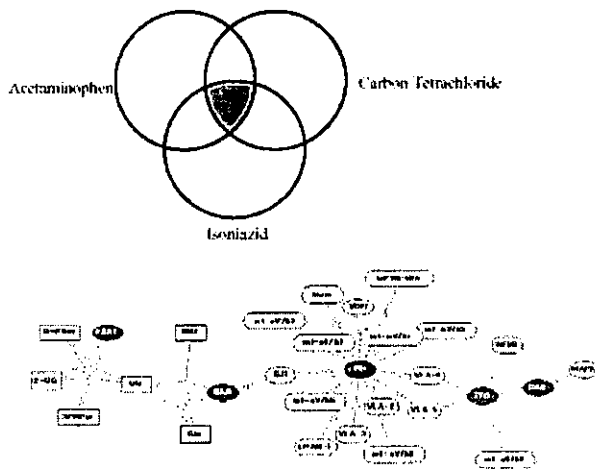
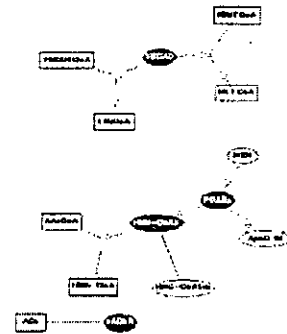


図6 遺伝子発現パターンの相関図 (散布図)

### Threshold 2.0 Up-regulation



FN: Fibronectin  
 tTG: tissue transglutaminase  
 RAR: retinoic acid receptor  
 GLS: Glutaminase アミノ基代謝、+アミノ酸代謝  
 PSAT: Phosphoserine aminotransferase、グリシン代謝、セリン代謝、トレオニン代謝



SBCAD: Acyl-CoA dehydrogenase short-branched chain specific、イソロイシン異化経路、バリン異化経路  
 PPARα: Peroxisome proliferator activated receptor alpha  
 HMG-CoAS: Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase  
 ステロール同化経路  
 nAChR: nicotinic acetylcholine receptor

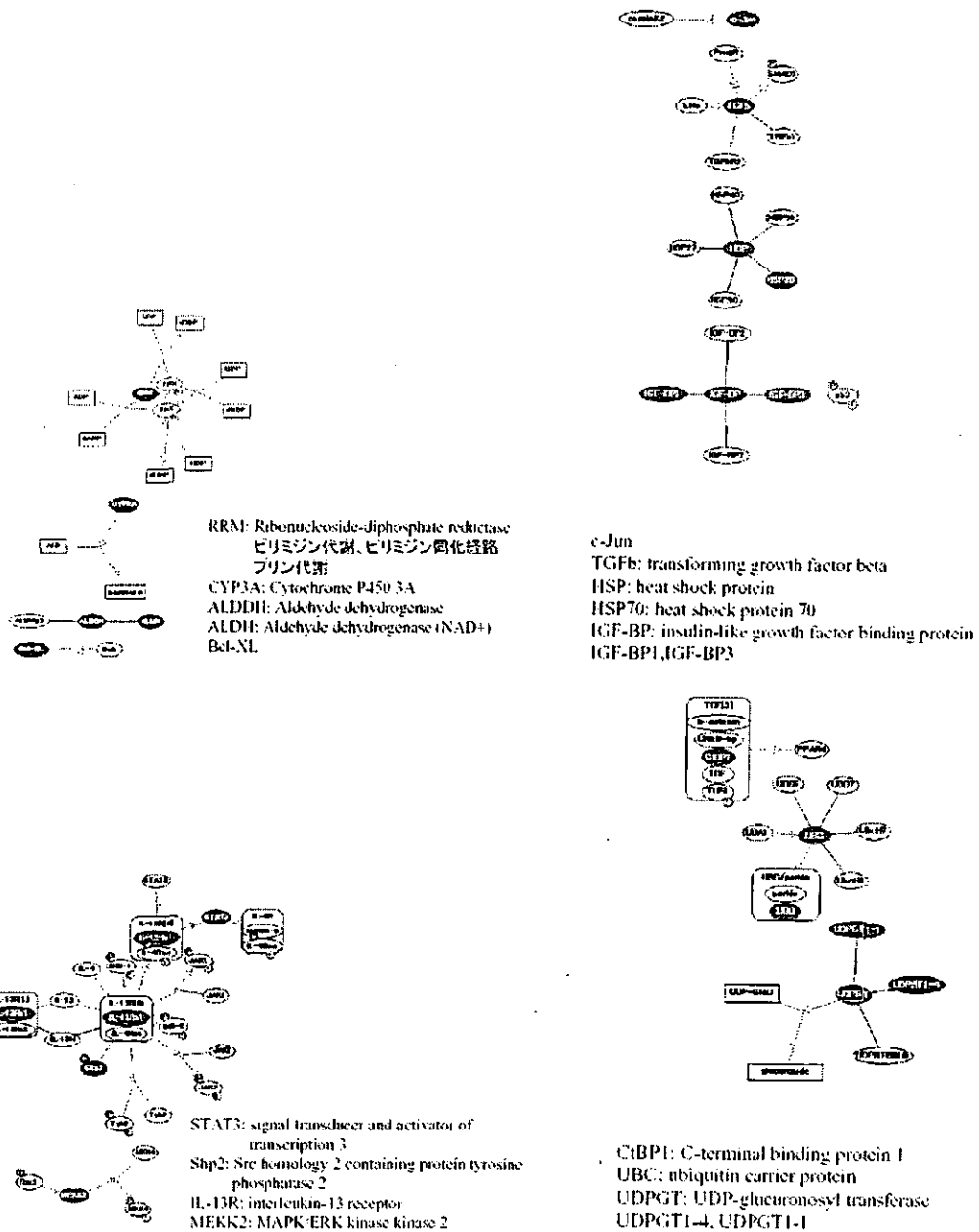


図7 アセトアミノフェン，四塩化炭素，イソニアジドで共通に発現増加した分子ネットワーク

## Threshold 2.0 Down-regulation

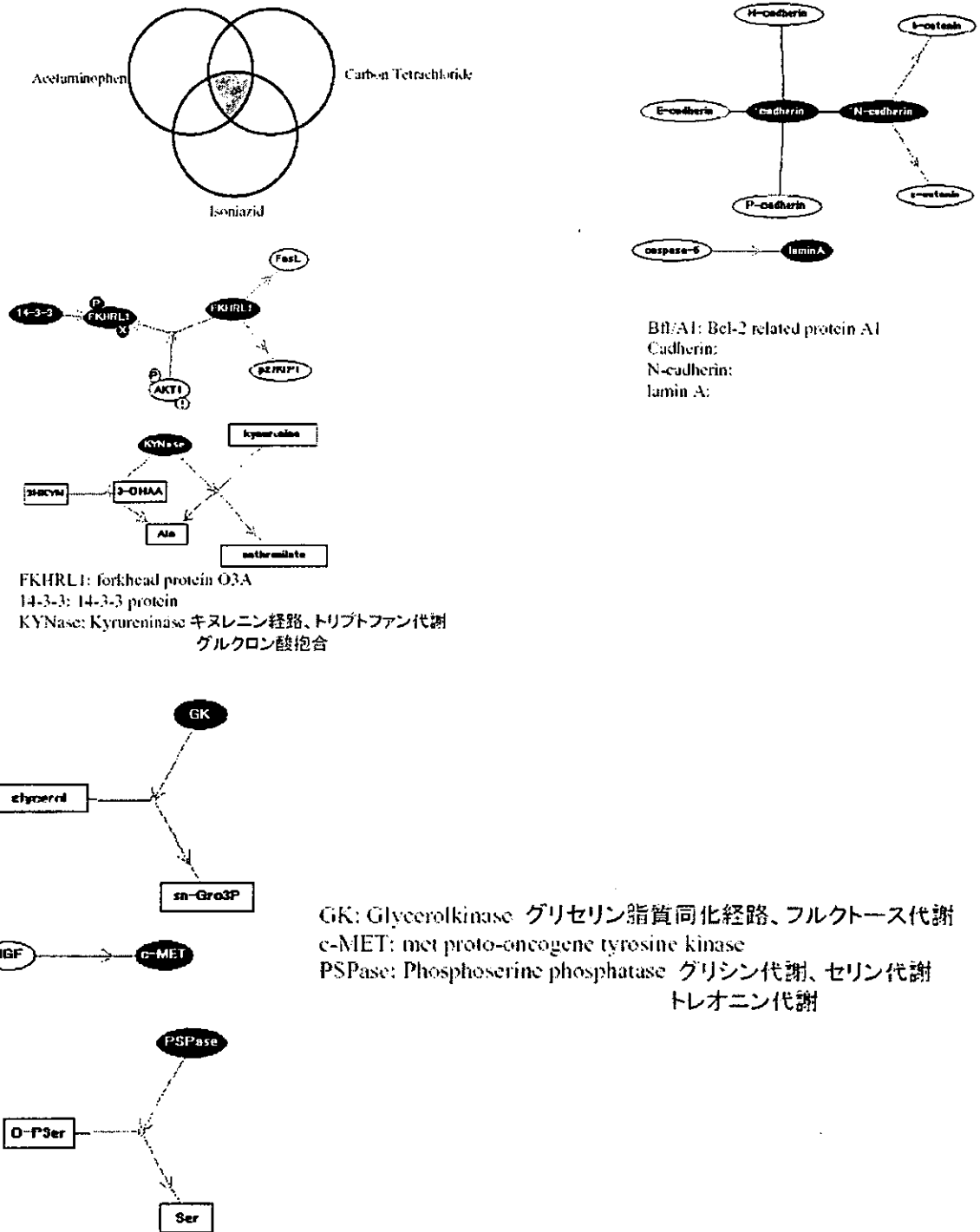
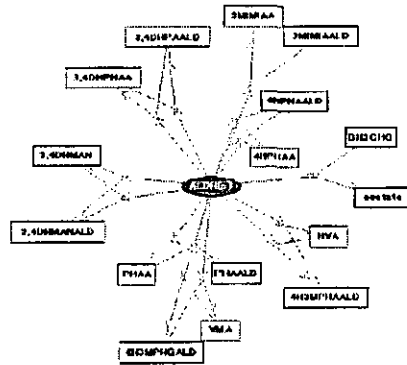
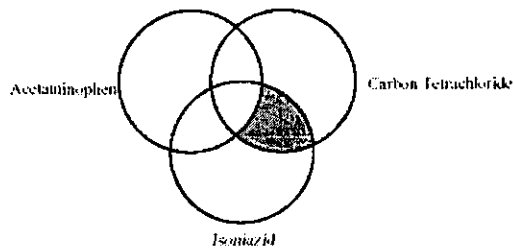
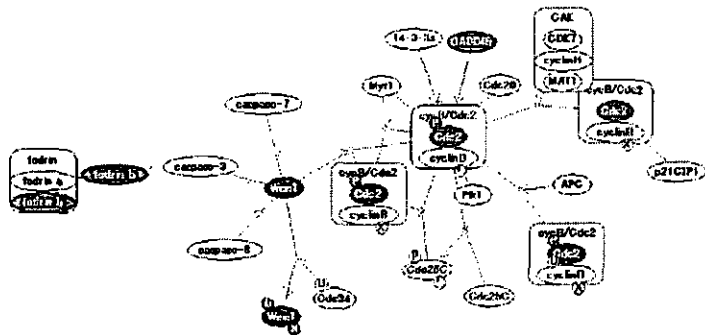


図8 アセトアミノフェン，四塩化炭素，イソニアジドで共通に発現減少した分子ネットワーク

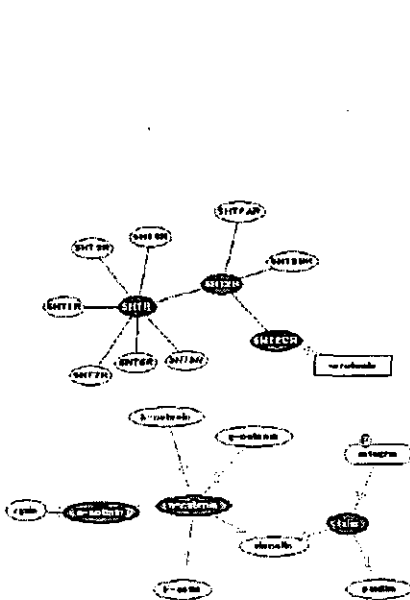
# Threshold 2.0 Up-regulation



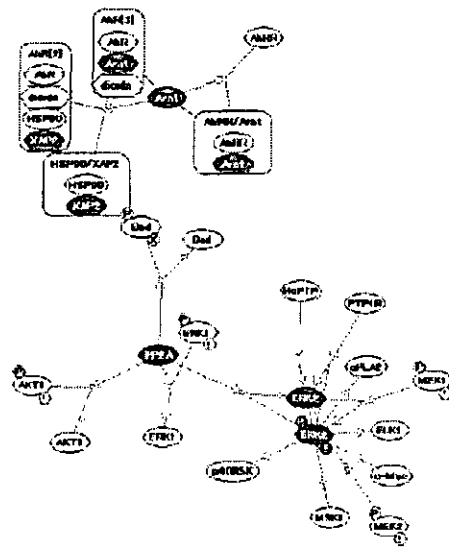
ALDH1p: Aldehyde dehydrogenase (NAD(p)+)  
 カテコールアミン代謝、グリシン代謝  
 セリン代謝、チロシン代謝、  
 トレオニン代謝、ヒスタミン代謝、  
 ヒスチジン代謝、フェニルアラニン代謝



cdc2: cell division cycle 2  
 GADD: growth arrest and DNA damage inducible protein  
 Wee1: Wee1-like protein kinase  
 Fodrinb: fodrin beta chain

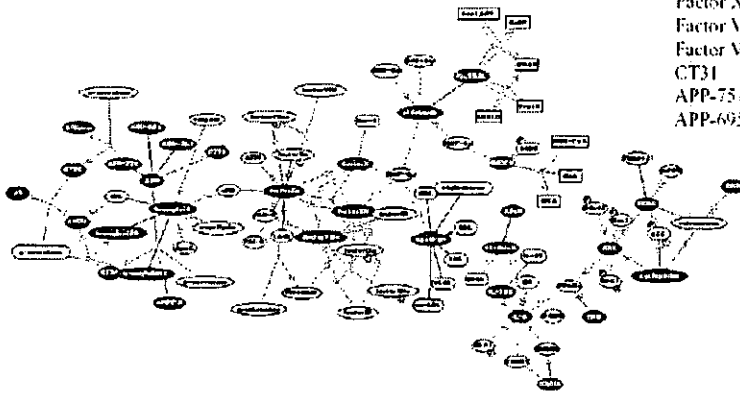


5HT1R: 5-hydroxytryptamine receptor  
 5HT2R: 5-hydroxytryptamine 2 receptor  
 5HT2CR: 5-hydroxytryptamine 2C receptor  
 a-catenin: alpha-catenin  
 a-actinin: alpha-actinin

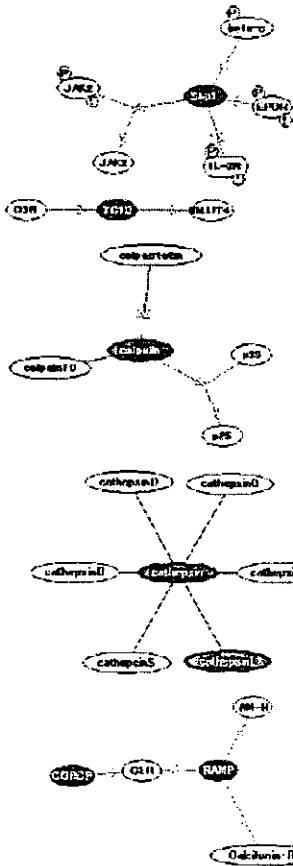


Arnt: AhR nuclear translocator  
 XAP2: X associated protein 2  
 Erk2: extracellular signal regulated kinase 2  
 PP2A: serine/threonine protein phosphatase 2A

CHP: calcium-binding protein CHP  
 FKBP: FK-506 binding protein  
 Cyclophilin  
 JNK: c-Jun N-terminal kinase  
 ERK: extracellular signal regulated kinase  
 IL-8: interleukin-8  
 IL-12B: interleukin-12 beta chain  
 A1-AdoR: A1 adenosine receptor  
 AdoR: Adenosine receptor  
 HMGCR: hydroxymethylglutaryl-CoA reductase(NADPH)  
 ApoC-III: apolipoprotein C-III  
 FruBPAL: Fructose-bisphosphate aldolase  
 Aldolase B: Fructose-bisphosphate aldolase B  
 Factor X: blood coagulation factor X  
 Factor Xa: blood coagulation factor X activated  
 Factor VII: blood coagulation factor VII  
 Factor VIIa: blood coagulation factor VII activated  
 CT31  
 APP-751: Amyloid beta A4 protein-751  
 APP-695: Amyloid beta A4 protein-695



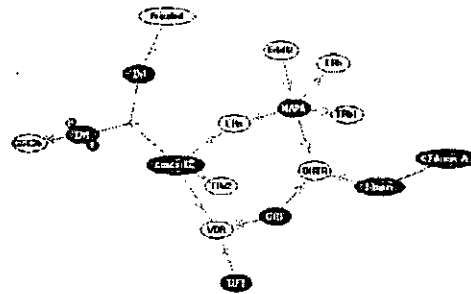
APP: Amyloid beta A4 protein  
 APP-770:  
 b-amyloid42: amyloid beta protein 42  
 APPS-b: Soluble APP-beta  
 b-amyloid40: amyloid beta protein 40  
 CT99  
 AICD: APP intracellular domain  
 APPS-a: Soluble APP-alpha  
 CT-83  
 p3



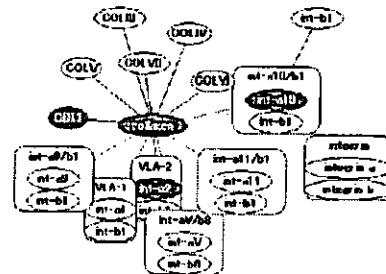
Shp1:  
 TC10:  
 Calpain:

Cathepsin:  
 Cathepsin L

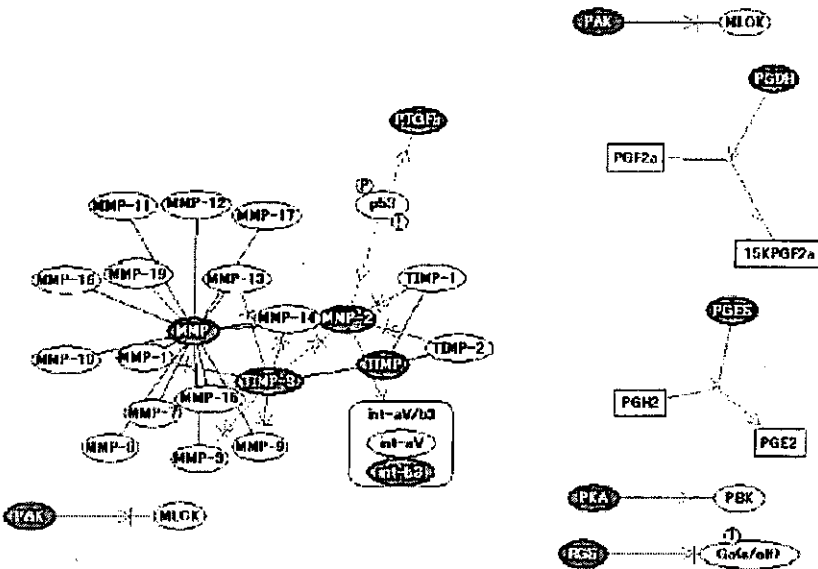
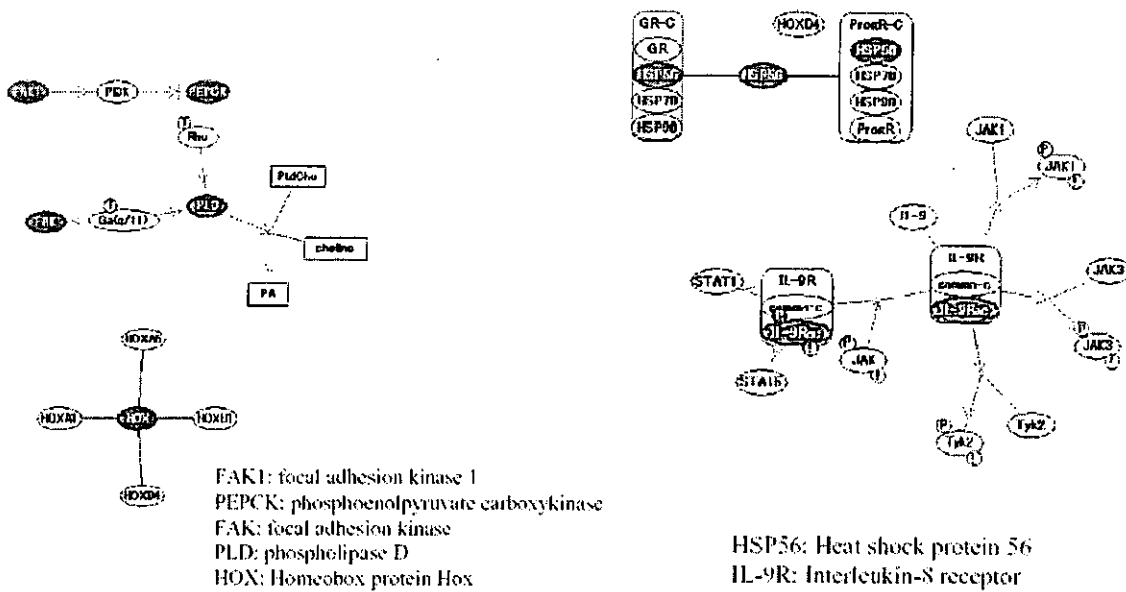
CGRCP: Calcitonin gene-related peptide-receptor component protein  
 RAMP: Receptor activity-modifying protein



Dvl: segment polarity protein dishevelled homology  
 casinK2: casein kinase 2  
 MAPK: MAP kinase  
 CRT: calreticulin  
 TIF1: transcription intermediary factor 1  
 Filamin  
 Filamin A

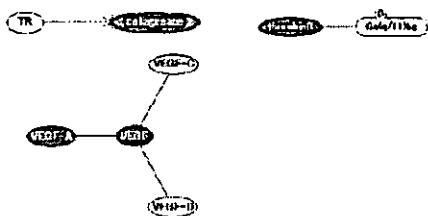


Collagen  
 COL1: collagen type 1  
 Int-a2: integrin alpha-2  
 Int-a10/b1: integrin alpha-10/beta-1



MMP: matrix metalloproteinase  
 TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase  
 TIMP-3  
 Int-6: integrin beta-3  
 PAK: serine/threonine protein kinase PAK

PGDH: prostaglandin 15-hydroxydehydrogenase  
 PGES: prostaglandin-E synthase  
 PKA: cAMP-dependent protein kinase  
 RGS: Regulator of G-protein signaling



Collagenase  
 Thrombin R: thrombin receptor  
 VEGF: vascular endothelial growth factor  
 VEGF-A: vascular endothelial growth factor A

図9 四塩化炭素, イソニアジドで共通に発現増加した分子ネットワーク



## Threshold 2.0 Down-regulation

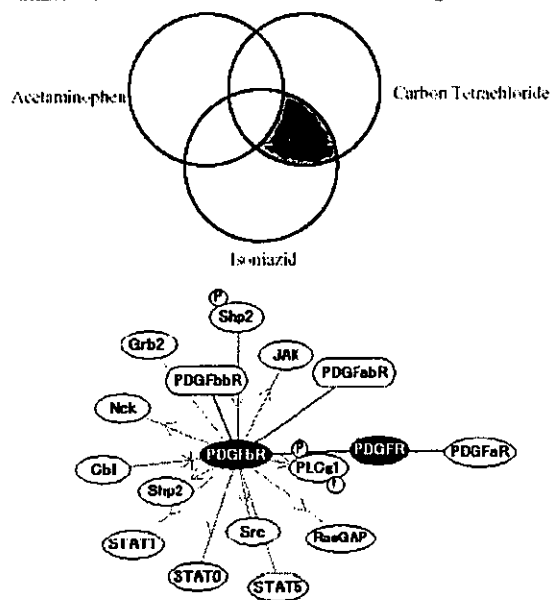


図 1 0 四塩化炭素, イソニアジドで共通に発現減少した分子ネットワーク

PDGFR: platelet derived growth factor receptor  
 PDGFRβ: platelet derived growth factor beta receptor

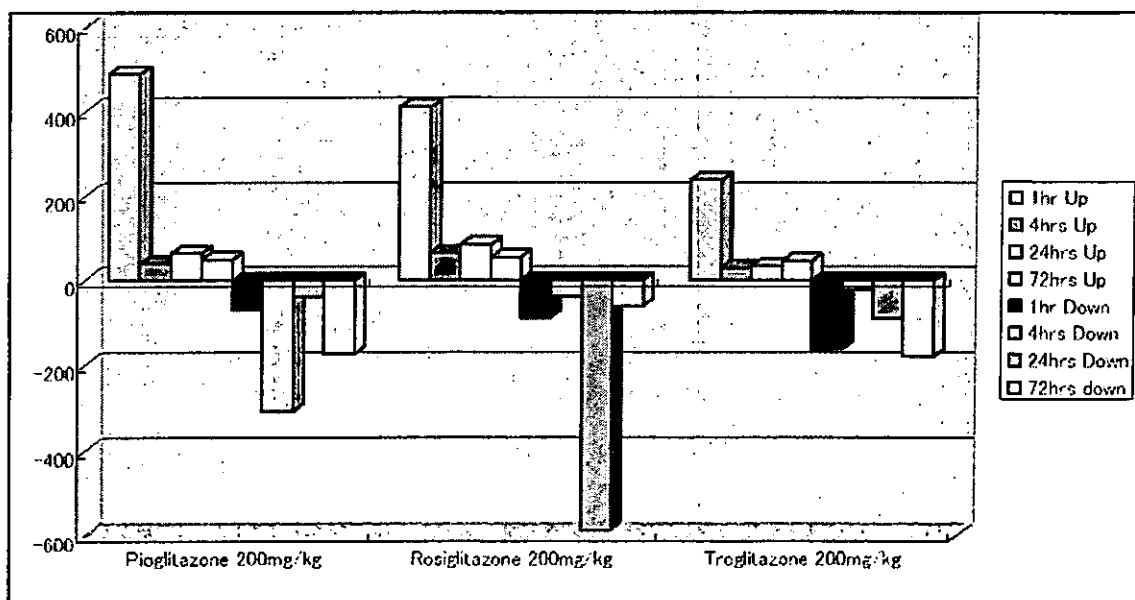
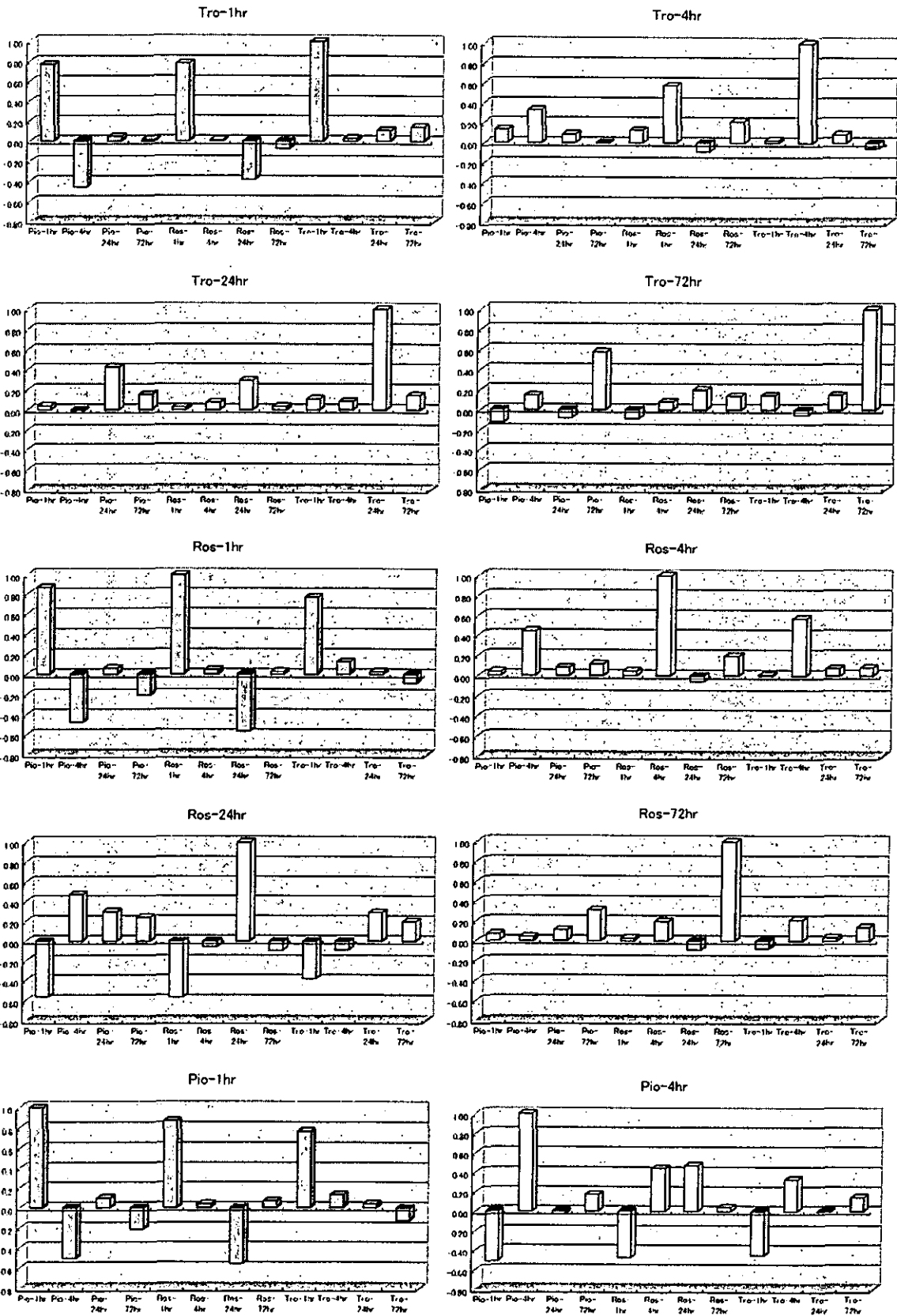


図 1 1 PPAR $\gamma$  作用薬暴露時の経時的発現変動遺伝子数 (Threshold 2.0)



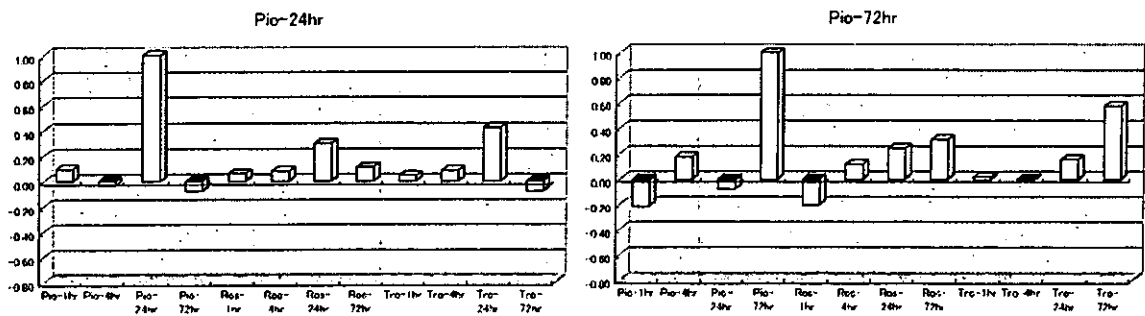


図 1 2 遺伝子発現パターンの経時的相関 (すべてのデータを使用)

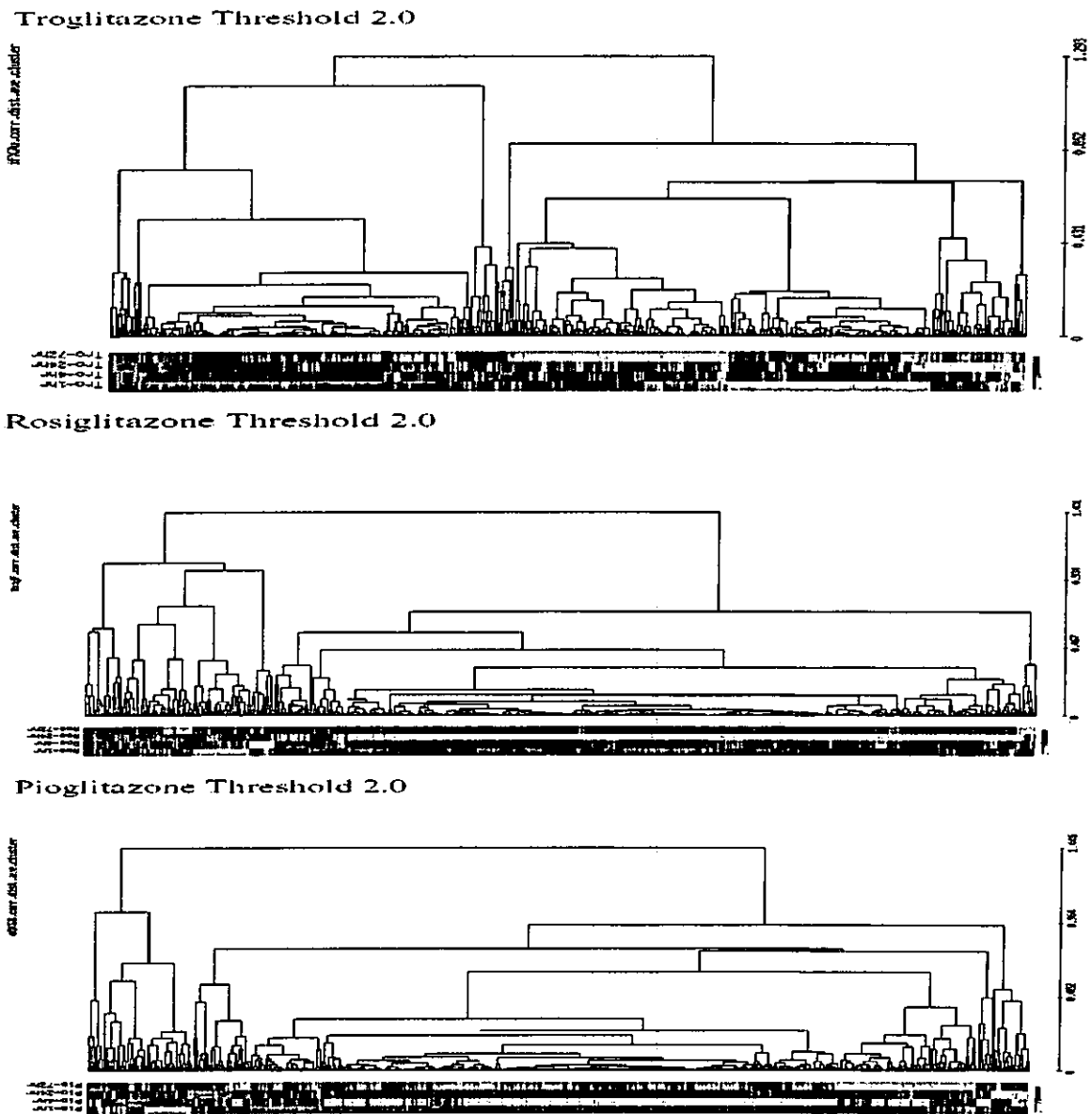
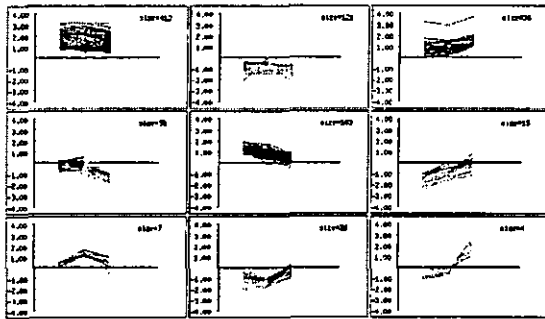


図 1 3 薬剤別階層的クラスタリング (Threshold 2.0)

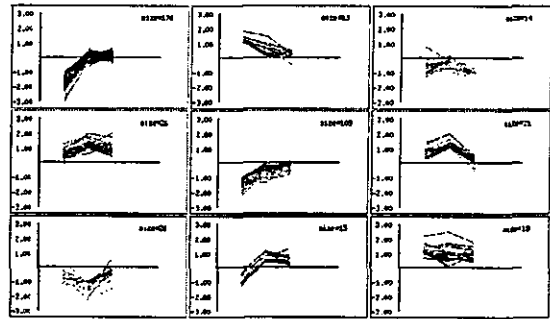
Time Course : 1hr

k-means clustering



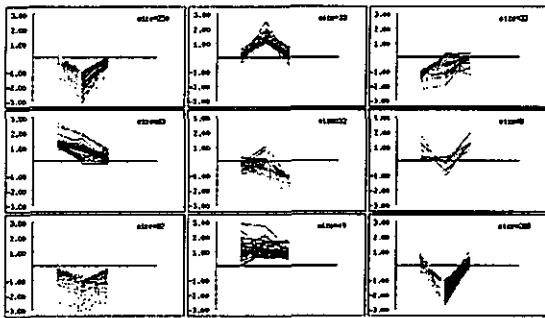
Time Course : 4hr

k-means clustering



Time Course : 24hr

k-means clustering



Time Course : 72hr

k-means clustering

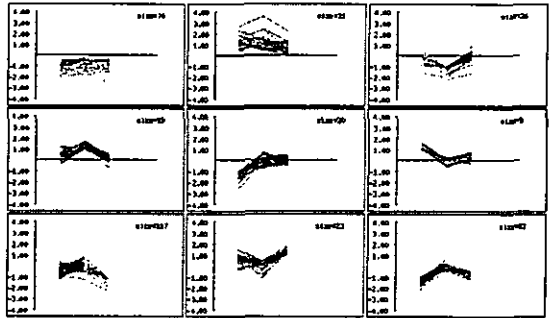


図 1 4 3 薬剤の経時的な K-means クラスタリング (K=9)

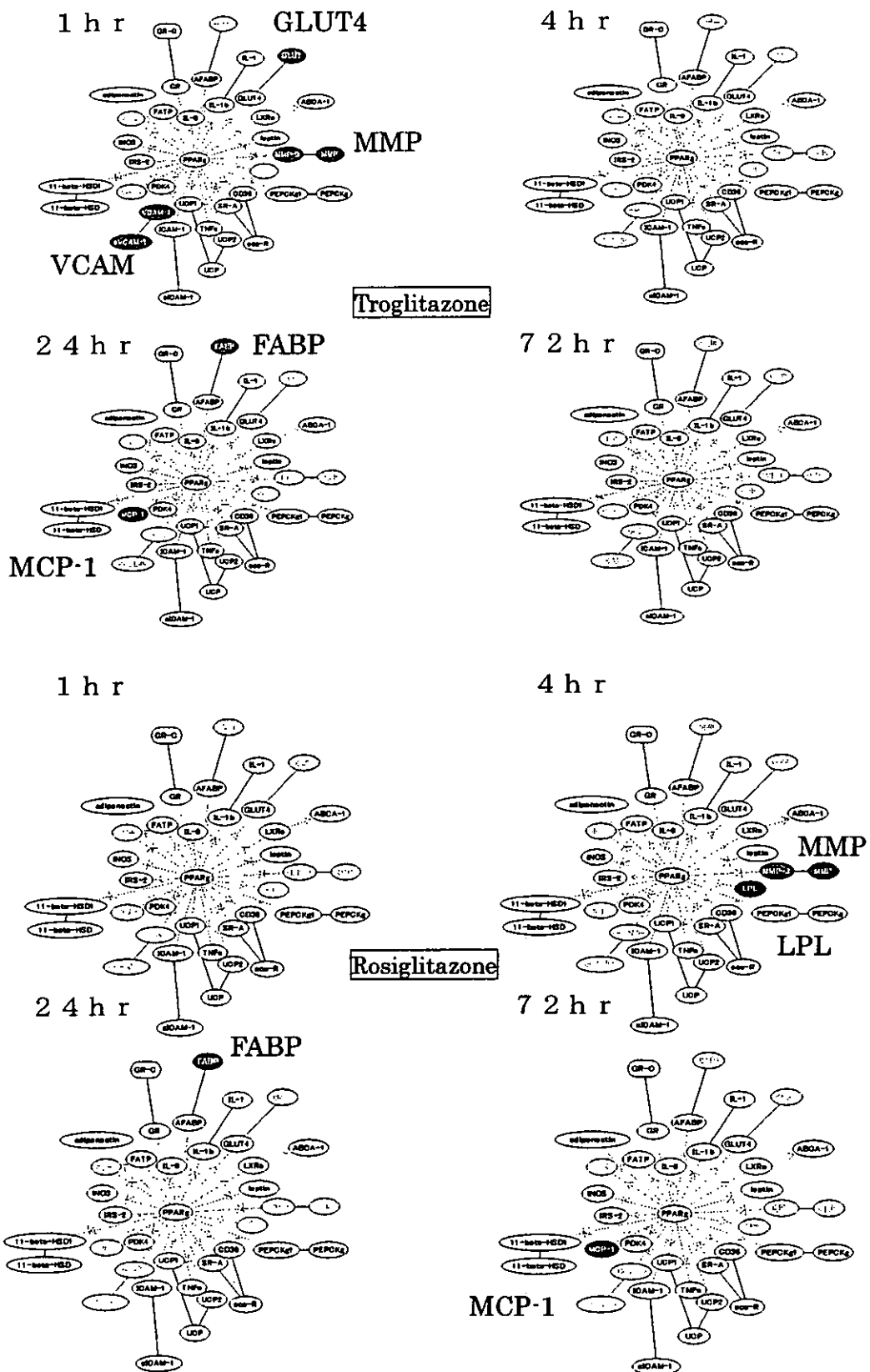


図 15 PPAR $\gamma$ に関連するネットワーク上での遺伝子発現変化

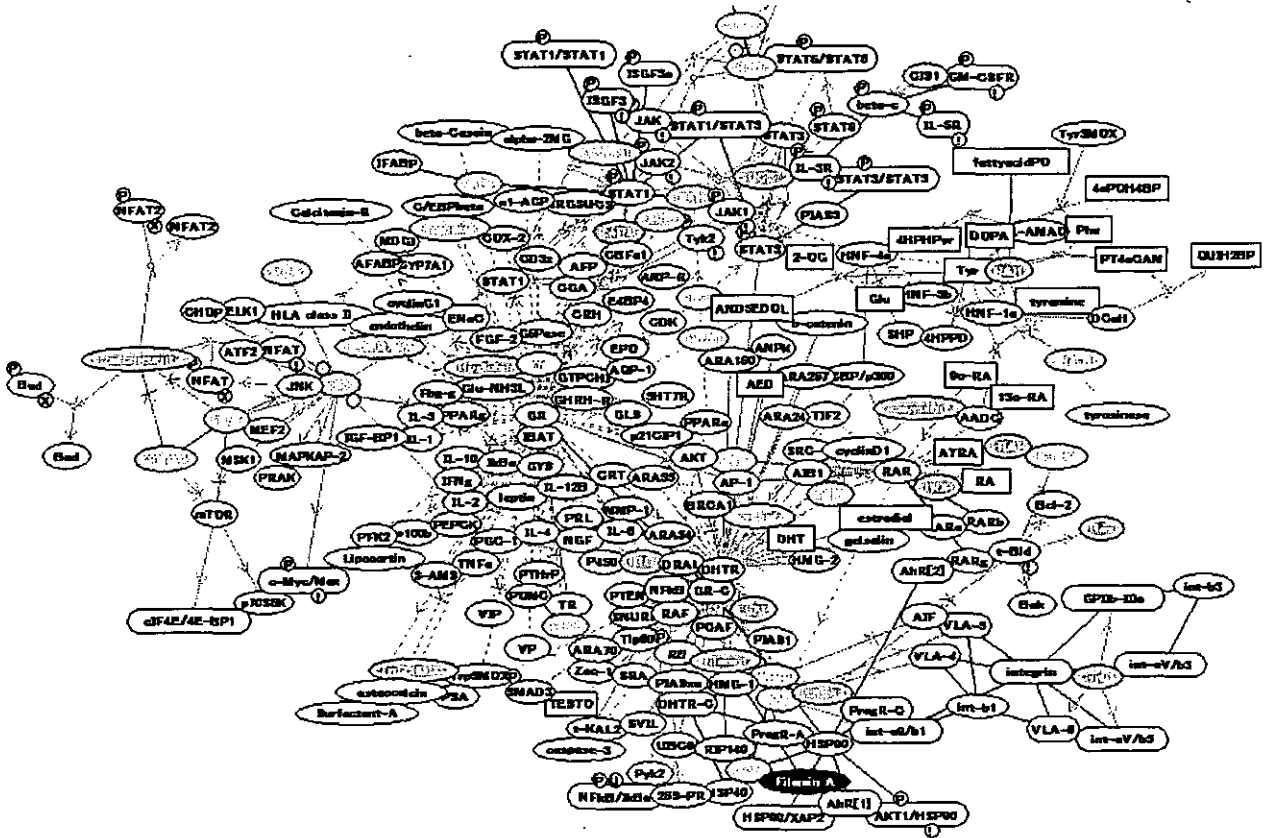
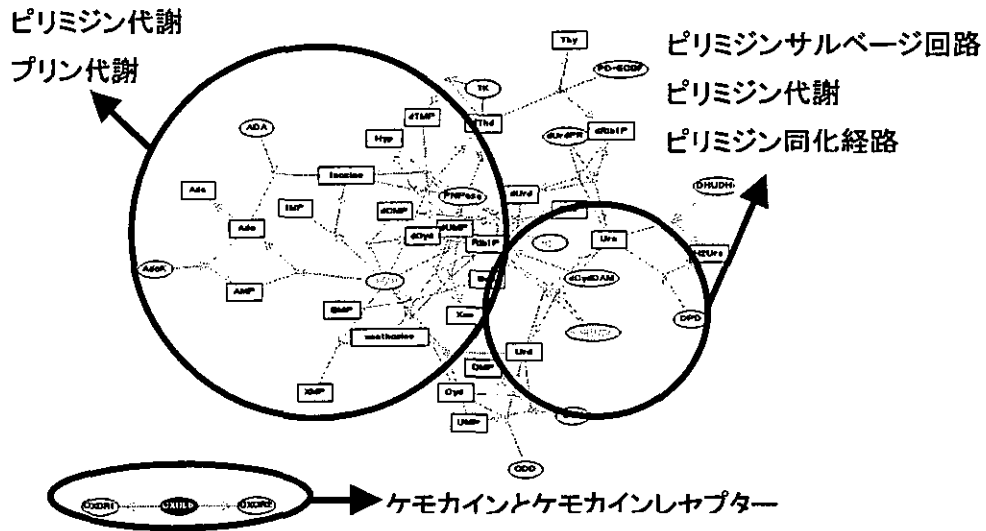


図16 共通して遺伝子発現減少した遺伝子クラスターの分子ネットワーク

表 1 肝毒性薬剤暴露時の発現変動遺伝子数

	>2	<-2	>3	<-3	>4	<-4	>5	<-5	>10	<-10
Acetaminophen	311	530	33	56	7	10	2	3	0	0
CCl4	877	465	155	61	44	13	14	7	2	0
Carbamazepine	1450	1233	364	443	147	233	73	154	10	33
Isoniazid	1001	250	148	19	41	1	11	6	1	0

表 2 各処理時点での遺伝子発現パターンの相関係数 (すべてのデータを使用)

遺伝子発現変動データ全てを使用									
	Acetaminophen 4hr	Acetaminophen 24hr	Acetaminophen 72hr	CCl4 4hr	CCl4 24hr	CCl4 72hr	Isoniazid 4hr	Isoniazid 24hr	Isoniazid 72hr
Acetaminophen 4hr	1	0.017	0.103	0.351	-0.067	0.042	0.347	-0.061	0.042
Acetaminophen 24hr	0.017	1	0.039	-0.129	0.644	-0.162	-0.088	0.619	-0.186
Acetaminophen 72hr	0.103	0.039	1	0.079	-0.102	0.452	0.079	-0.070	0.467
CCl4 4hr	0.351	-0.129	0.079	1	-0.163	0.110	0.793	-0.140	0.131
CCl4 24hr	-0.067	0.644	-0.102	-0.163	1	-0.281	-0.138	0.744	-0.175
CCl4 72hr	0.042	-0.162	0.452	0.110	-0.281	1	0.063	-0.263	0.434
Isoniazid 4hr	0.347	-0.088	0.079	0.793	-0.138	0.063	1	-0.108	0.121
Isoniazid 24hr	-0.061	0.619	-0.070	-0.140	0.744	-0.263	-0.108	1	-0.092
Isoniazid 72hr	0.042	-0.186	0.467	0.131	-0.175	0.434	0.121	-0.092	1

表 3 各処理時点での遺伝子発現パターンの相関係数 (Threshold 2.0 以上)

Threshold 2.0 以上のデータを使用									
	Acetaminophen 4hr	Acetaminophen 24hr	Acetaminophen 72hr	CCl4 4hr	CCl4 24hr	CCl4 72hr	Isoniazid 4hr	Isoniazid 24hr	Isoniazid 72hr
Acetaminophen 4hr	1	0.028	0.054	0.411	-0.092	0.046	0.413	-0.094	0.033
Acetaminophen 24hr	0.028	1	0.054	-0.031	0.651	-0.186	0.006	0.640	-0.151
Acetaminophen 72hr	0.054	0.054	1	0.060	-0.148	0.502	0.069	-0.108	0.506
CCl4 4hr	0.411	-0.031	0.060	1	-0.139	0.121	0.815	-0.113	0.085
CCl4 24hr	-0.092	0.651	-0.148	-0.139	1	-0.351	-0.117	0.781	-0.181
CCl4 72hr	0.046	-0.186	0.502	0.121	-0.351	1	0.069	-0.332	0.474
Isoniazid 4hr	0.413	0.006	0.069	0.815	-0.117	0.069	1	-0.086	0.062
Isoniazid 24hr	-0.094	0.640	-0.108	-0.113	0.781	-0.332	-0.086	1	-0.105
Isoniazid 72hr	0.033	-0.151	0.506	0.085	-0.181	0.474	0.062	-0.105	1

表 4 各処理時点での遺伝子発現パターンの相関係数 (Threshold 3.0 以上)

Threshold 3.0 以上のデータを使用									
	Acetaminophen 4hr	Acetaminophen 24hr	Acetaminophen 72hr	CCl4 4hr	CCl4 24hr	CCl4 72hr	Isoniazid 4hr	Isoniazid 24hr	Isoniazid 72hr
Acetaminophen 4hr	1	0.038	0.059	0.450	-0.154	0.053	0.439	-0.125	0.061
Acetaminophen 24hr	0.038	1	0.100	-0.055	0.650	-0.211	-0.013	0.636	-0.136
Acetaminophen 72hr	0.059	0.100	1	0.088	-0.194	0.508	0.088	-0.135	0.470
CCl4 4hr	0.450	-0.055	0.088	1	-0.233	0.163	0.855	-0.181	0.103
CCl4 24hr	-0.154	0.650	-0.194	-0.233	1	-0.444	-0.194	0.839	-0.209
CCl4 72hr	0.053	-0.211	0.508	0.163	-0.444	1	0.113	-0.403	0.492
Isoniazid 4hr	0.439	-0.013	0.088	0.855	-0.194	0.113	1	-0.157	0.050
Isoniazid 24hr	-0.125	0.636	-0.135	-0.181	0.839	-0.403	-0.157	1	-0.123
Isoniazid 72hr	0.061	-0.136	0.470	0.103	-0.209	0.492	0.050	-0.123	1

表5 PPAR $\gamma$ 作用薬暴露時の発現変動遺伝子数 (マウス)

Threshold 2.0

	1hr Up	4hrs Up	24hrs Up	72hrs Up	1hr Down	4hrs Down	24hrs Down	72hrs down
Pioglitazone 200mg/kg	489	39	- 64	50	-69	-307	-39	-174
Rosiglitazone 200mg/kg	411	63	86	54	-99	-38	-585	-61
Troglitazone 200mg/kg	238	29	34	45	-162	-22	-89	-178

Threshold 3.0

	1hr Up	4hrs Up	24hrs Up	72hrs Up	1hr Down	4hrs Down	24hrs Down	72hrs down
Pioglitazone 200mg/kg	108	4	8	5	-7	-62	-4	-21
Rosiglitazone 200mg/kg	89	8	18	8	-10	-5	-135	-8
Troglitazone 200mg/kg	60	4	5	4	-11	0	-11	-10

表6 PPAR $\gamma$ 作用薬暴露時の発現変動遺伝子数 (プライマリーヒト肝細胞)

		Troglitazone 30 $\mu$ M	Troglitazone 3 $\mu$ M	Rosiglitazone 30 $\mu$ M	Rosiglitazone 3 $\mu$ M
1hr	解析遺伝子数	6628	8004	7473	8003
	発現増加	570	75	140	50
	発現減少	98	32	64	33
4hr	解析遺伝子数	7060	6638	6736	7318
	発現増加	52	38	62	30
	発現減少	106	61	70	77
24hr	解析遺伝子数	9305	8533	8801	8411
	発現増加	103	132	87	134
	発現減少	87	69	84	96
72hr	解析遺伝子数	7376	8731	8403	8555
	発現増加	519	52	139	83
	発現減少	105	46	65	51

表7 FXR 欠損型マウス 1%LCA 投与実験における発現変動遺伝子数 (Threshold 2.0)

	野生型1%LCA投与 /野生型陰性対照群	欠損型1%LCA投与 /欠損型陰性対照群	欠損型陰性対照群 /野生型陰性対照群	欠損型1%LCA投与 /野生型1%LCA投与
発現増加	1444	293	423	991
発現減少	944	110	1812	2080



表 8 FXR 欠損型マウスの実験において興味をもたれた遺伝子群

---

Energy and cell component transport:

Abca1 (Cholesterol efflux to HDL), Abca3 (Peptide transport), Abca11 (Bsep), Slc16a1 (Lactic acid uptake), Slc35a5 (UDP-GlucNAc), Atp7a (Mit. Cu<sup>++</sup> transporting ATPase), Atp6vs

Sinusoid:

Nidogen 1 (TGFb-activated), Occludin (Bile duct tight junction)

Dyling or regenerating:

Calpain, Glucosaminyl transferase, Adam 9, 10, 17, Tcf4, Metaloproteinase, Ubiquitin associated 26S proteins (Proteasome)

Hypoxia:

Von Hippel-Lindau protein, HIF1a, Hypoxia-induced gene 1

Growth factor & Cytokine:

Epidermal growth factor receptor interacting protein, FGFR inducible 14, NS-1 associated, IGF binding protein 7, Platelet-derived growth factor receptor, TGFbR, Activin A, TGFb-induced, TNFa-induced protein 1& 2, RIP, Cofilin

---

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：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

分担研究者：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** 肝毒性や腎毒性が報告あるいは想定されている薬剤（医薬品および医薬品候補化合物）を中心にその類縁体の合成を行い、それら一連の化合物について遺伝子発現の解析を行い、毒性と遺伝子発現との相関に関する知見、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を担当した。本年度は、2型糖尿病治療薬として有用な経口糖尿病治療薬となっているグリタゾン類（PPAR $\gamma$ 作用薬）、遺伝子発現を制御し新しいタイプの制がん剤として期待されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDAC阻害剤）について、構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析するため、新規誘導体（PPAR $\gamma$ アゴニスト候補化合物15種、HDAC阻害候補化合物8種）を合成した。また、生物活性試験（PPAR $\gamma$ アゴニスト候補化合物についてはPPAR $\gamma$ 受容体への結合試験と脂肪細胞への分化誘導試験ならびに細胞毒性評価、HDAC阻害候補化合物についてはHDAC活性阻害試験）などを行った。これらの化合物の遺伝子発現の解析実験（プライマリーヒト肝・腎細胞および株化ヒト培養細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析）は、初年度に合成した化合物について分担研究者二宮が予備的解析を行った。現在、一連の化合物について構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析中である。

**A. 研究目的**

本研究事業では、新規技術による長期培養可能なプライマリーヒト肝・腎細胞を用いて、薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行い、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。

分担研究者宮田は、肝毒性や腎毒性が報告あるいは想定されている薬剤（医薬品および医薬品候補化合物）を中心に、その類縁体の合成を行う。薬剤としては、核内受容体結合性薬剤、遺伝子発現制御薬剤、活性酸素産生薬剤などを取り上げる。さらに、一連の化合物について遺伝

子発現の解析を行い、毒性と遺伝子発現との相関に関する知見、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を行う。

本研究では、II型糖尿病治療薬として有用なグリタゾン類(PPAR $\gamma$ 作用薬)と、遺伝子発現を制御し新しいタイプの制がん剤として期待されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、さらに、脳梗塞急性期の治療薬であるが急性腎不全が問題になっているエダラボンの類縁体を対掌化合物とした。これらの化合物について構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響を解析するため、新規誘導体を合成し、毒性・薬効解析、遺伝子発現の解析実験を行っている。

本研究を遂行することにより、ゲノム創薬の根幹となる薬剤の毒性発現に係わるヒトでの遺伝子発現情報が収集できる。その結果、医薬品候補化合物等について迅速・効率的にヒトでの安全性の予測が可能になり、安全性が高い薬剤を開発するためのトキシコゲノミックスの基盤技術開発に資すると考える。

## B. 研究方法と結果

本研究では、プライマリーヒト肝・腎培養細胞を用いて遺伝子発現を検討する。本年度は、名古屋市立大学大学院薬学研究科にて誘導体の化学合成を行うとともに、毒性・薬効の解析実験を行った。また、合成化合物のプライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現の解析は、分担研究者である二宮が行った。

### 1. PPAR $\gamma$ 作用薬

チアゾリジン誘導体に代表される PPAR $\gamma$ アゴニストは、II型糖尿病におけるインスリン抵抗性改善作用を示すことが明らかとなっており、近年 rosiglitazone や pioglitazone が臨床の場で用いられている。しかし、これらのチアゾリジン骨格を有する化合物は、副作用(肝毒性など)があり、より優れた化合物の開発が求められている。

PPAR $\gamma$ は核内受容体型転写因子であり、N末端のA/B領域にリガンド非依存性の活性化領域(AF-1)、C末端のEF領域にリガンド結合部位(LBD)とリガンド依存性の活性化領域(AF-2)をもち、その間のC領域にDNA結合領域が存在する構造をとっている。PPAR $\gamma$ は、同じ核内受容体型転写因子RXR $\alpha$ とヘテロ二量体を形成して、PPRE(PPAR responsive element)に結合し、転写共役因子であるコアアクチベーターと結合することで標的遺伝子の転写を促進する。

脂肪細胞のライフサイクルは、①中胚葉系多機能肝細胞が前駆脂肪細胞へ決定される過程、②前駆脂肪細胞の増殖と成熟脂肪細胞へと分化する過程、③機能を終えた脂肪細胞の死と生体から排除される過程に分けて考えられる。PPAR $\gamma$ は、脂肪細胞において②の中の終末分化期に誘導され、脂肪細胞特異的遺伝子のプロモーター領域に存在するPPREに結合しその発現をPPAR $\gamma$ リガンド依存的に誘導することが分かっている。他にもPPAR $\gamma$ は、同時期に誘導されるロイシンジッパー型の転写因子であるC/EBP $\alpha$ と協調して、終末分化の遺伝子発現を制御するとも考えられている。このように、PPAR $\gamma$ はC/EBP

$\alpha$  や SREBP1 とともに脂肪細胞分化のマスターレギュレーションとなることが明らかとなっており、このことが PPAR $\gamma$  アゴニストのインスリン抵抗性改善作用のメカニズムを考える上で重要となる。

前駆脂肪細胞から分化した脂肪細胞（小型脂肪細胞）は、インスリン感受性ホルモン（アディポネクチン、レプチン）を産出・分泌している。しかし肥満状態では、小型脂肪細胞は肥大化した状態になっており（肥大脂肪細胞）、肥大脂肪細胞からインスリン抵抗性惹起因子（TNF $\alpha$ 、FFA、Resistin）が過剰生産されることで、インスリン抵抗性を起こしている。

PPAR $\gamma$  アゴニストは、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進して新しく小型脂肪細胞を増加させ、小型脂肪細胞由来のインスリン感受性ホルモン（アディポネクチン、レプチン）を増加させるとともに、インスリン抵抗性惹起因子（TNF $\alpha$ 、FFA、Resistin）を過剰生産する肥大脂肪細胞をアポトーシスにより減少させ、インスリン抵抗性を改善させると考えられている。また、PPRE 配列を有し組織への中性脂肪の取り込みに重要な役割を果たす LPL、CD36 などの発現を脂肪組織では増加させ、また脂肪酸の脂肪組織への流入を推進することにより骨格筋や肝への脂肪酸の流入を相対的に減少させ、骨格筋や肝におけるインスリン抵抗性を改善させるというメカニズムも考えられている。

近年、インスリン抵抗性改善の分子メカニズムが明らかにされ、その有用性が認められてきたことで、インスリン抵抗性改善薬として、PPAR $\gamma$  アゴニストであ

るチアゾリジン誘導体が臨床の場で用いられるようになった。しかし、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に注意が必要であるが、特に肝機能障害に関しては、troglitazone で重篤な肝障害がみられ発売が中止されるにいたった。toroglitzazone の肝障害では PXR（pregnane X receptor）との関与も指摘されており、チアゾリジン薬の副作用の原因が PPAR $\gamma$  のアゴニスト作用のみに起因しているのかは明らかではない。

このような問題点をふまえ、より優れた PPAR $\gamma$  アゴニストの創製を目指し、新規 PPAR $\gamma$  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開始した。

アゴニストの分子設計にあたり、まず X 線構造解析で明らかになっているチアゾリジン骨格と PPAR $\gamma$  LBD の水素結合形成に注目した。チアゾリジン骨格のカルボニル基と NH 基が LBD アミノ酸残基と水素結合を形成すると解析されているが、これと同じ役割をカルボキシル基のカルボニル基およびヒドロキシル基が果たすと考えた。すなわち、チアゾリジン骨格の生物学的等価体としてカルボキシル基が機能する可能性があると考え、分子設計を行った。基本構造としては、チアゾリジン薬の中で最も高い活性をもつ rosiglitazone を参考にして、チアゾリジン骨格をカルボキシ基に置換した、3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]-propionic acid を基本骨格として、そのアミノ窒