

20030650

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 水島 徹

平成16（2004）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 -----8

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

昨年度我々は、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。本年度は、ヒトで40の新しいストレス遺伝子を単離すると共に、これまで我々が同定してきたヒトのストレス遺伝子120を含む、既知の全てのストレス遺伝子を網羅した改良型ストレス遺伝子チップを作成した。

一方昨年度我々は、NSAIDsの細胞毒性に与る新しい遺伝子、TPO1を発見した。またこの遺伝子のヒトホモロク（TETRAN）を同定し、それがヒト細胞をNSAIDsに耐性化することを見出した。本年度は、TETRANがヒト細胞をNSAIDsに耐性化するメカニズムとして、TETRANが細胞外へNSAIDsを排出していることを発見した。このようなNSAIDs排出システムが発見されたのは、これが初めてである。このように当初の研究計画に従い、研究は順調に進んでいる。

## 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、同しくストレス遺伝

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、抗精神薬クロルプロマシ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、クロルプロマシンによるパーキンソン病誘発に、クロルプロマシ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、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（ケ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。同定された遺伝子に関しては、ノーザンブロット法で確認するとともに、DNAチップに用いるための配列をコンピューターを使って検索した。

DNAチップの作成は民間会社に依頼した。

**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か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か、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シンの低下によると考えられてきたか、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、昨年度TPO1という遺伝子を同定した。さらにこの遺伝子のヒトホモログであるTETRANという遺伝子を発見し、細胞内でTETRANを発現することにより、ヒト胃粘膜細胞がNSAIDsに耐性化することを示した。本年度はこの耐性化機構を検討した。我々は、TETRANが既存の薬剤排出ポンプとホモロシーを持っていることから、TETRANがNSAIDsを排出している可能性を考え、TETRAN過剰発現細胞と野生型細胞から反転膜小胞を調製し、NSAIDs排出活性を比較した。

### C 研究結果

以下のヒト遺伝子を同定した。

NSAIDs（膜傷害性物質）によって誘導される遺伝子

Human chromosome 21 segment HS21C0

04 AL1632045 820879849

CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP),

beta W93514 4 761084522

Human low density lipoprotein receptor g

ene, exon 18	L00352	3 42883164	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 21kD	AI567477	2
3			390568889		
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 5			keratin 8	AI978932	2 372110171
M802443	002677003		immediate early response 3	AI022951	2
cytochrome c oxidase subunit VIII	J		357425546		
04823	2 89536847		ribosomal protein S21BE2214082	3392013	
Human urokinase-type plasminogen receptor, exon 7	U09937	2 80687624	79		
9			chromobox homolog 4 (Drosophila Pclass)	AF0139562	299988344
low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	NM_00052		keratin 8	X74929	2 290138748
7	2 748060893		dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	M76180	2 27058179
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	X52560	2 65794148	2		
epithelial protein lost in neoplasm beta	A		Human genomic DNA, chromosome 22q11.2, BCRL2 region, clone KB1440D3	AP000553	2 232044684
A594624	2 578110619		syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	D	
claudin 4	AK0266512	544981486	13292	2 221370746	
DNA合成阻害によって誘導される遺伝子			predicted using Genefinder, preliminary prediction	CAB60892	2
pim-1 oncogene	M24779	2 51813998	175940254		
9			S100 calcium-binding protein P	X	
procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase, thyroid hormone binding protein p55)	J02783	2 495785612	65614	2 155072182	
tissue factor pathway inhibitor 2	NM_0065		basigin	X64364	2 145768715
28	2 46381741		tumor necrosis factor alpha-induced protein 6	M31165	2 13628328
cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)			エタノールによって誘導される遺伝子		
M11233	2 397615848		ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit	AW163002	2
			134732705		

Incyte EST 02 108920122  
 interferon induced transmembrane protein  
 3 (1-8U)X573522 101902535  
 conserved hypothetical protein AAF96700  
 2 067803834  
 KIAA0316 gene product AB002314  
 2 062464711  
 Sequence 100 from Patent WO9951727 A  
 X015425 2 028429387  
 ribosomal protein S28 AW161288  
 2 027208876  
 zinedin AF2129402 010433205  
 glucosidase, beta, acid (includes glucosylce  
 ramidase) AF0232682 01010705  
 4  
 prostate differentiation factor AB000584  
 2 001359773

活性酸素によって誘導される遺伝子

Arginine-rich protein AA582041 2  
 0001823  
 transcription factor-like 1 AA705337  
 1 983229372  
 ectonucleoside triphosphate diphosphohydro  
 lase 6 (putative function) AF0399161  
 976892726  
 phosphatidylinositol transfer protein, memb  
 rane-associated AI805246 1 95629188  
 2  
 a disintegrin and metalloproteinase domain  
 15 (metargidin)U41767 1 95484954  
 2

calpain 4, small subunit (30K)AY007141  
 1 941214035  
 Rho GTPase activating protein 1 U  
 02570 1 940837133  
 Human melanoma growth stimulatory acti  
 vity beta (MGSA beta) gene, partial c,  
 ds U03019 1 931748436  
 U2 small nuclear ribonucleoprotein auxilia  
 ry factor (65kD)AA936430 1  
 931253285  
 alpha2,8-sialyltransferase U91641 1  
 919789645  
 Homo sapiens clone 23929 mRNA seque  
 nce AF0521221 918846265  
 tumor suppressing subtransferable candidate  
 3 AF0354441 91593511

以上40のヒトストレス遺伝子、昨年度  
 我々が同定した23のヒトストレス遺伝子  
 など、これまで我々が同定してきたヒト  
 ストレス遺伝子120を含む、既知の全て  
 のストレス遺伝子(920)を網羅した改  
 良型ストレス遺伝子チップを作成した。  
 そしてアルコールによるHSP誘導、NSA  
 IDsによるGRP78誘導など、これまでに  
 見出されているストレスによる遺伝子発  
 現変化をこのDNAチップを使って確認  
 することに成功した。

一方、NSAIDsによって誘導される遺  
 伝子の中で我々が注目したのか、claudin  
 4などのタイトジャンクション関連遺伝  
 子である。NSAIDsが抗癌作用を持つこ

とはよく知られているが、そのメカニズムはよく分かっていない。一方、タイトジャンクションの機能亢進は、癌細胞の浸潤を抑え、その転移を抑制する。実際に最近、claudin 4 の多量発現により、癌細胞の浸潤／転移が抑制されるという報告があった。そこで、NSAIDs による claudin 4 誘導は、NSAIDs の抗癌作用において重要な役割を果たしていると考え、その誘導機構の解析を行った。NSAIDs は、COX 阻害、MAP キナーゼ活性化、PPAR- $\gamma$  活性化、細胞内カルシウム上昇など様々な作用を示す。我々はこれらの作用の内どの作用が claudin 4 誘導に関与しているかを調べ、細胞内カルシウム上昇により claudin 4 が誘導されていることを初めて示した。

TETAN 過剰発現細胞と野生型細胞から反転膜小胞を調製し、NSAIDs 排出活性を比較したところ、TETAN 過剰発現細胞から調製した反転膜小胞の方が、3 倍以上高い排出活性を示した。この結果は、TETAN が NSAIDs 排出活性を有することを初めて示すものである。

#### D 考察

本研究事業の目的の一つである、ストレス遺伝子チップの開発に成功したと考えている。

また TETAN に関する研究は、これまで全く分かっていなかった NSAIDs の膜輸送系に関して、最初の重要な手がか

りになると考えられる。

#### E 結論

上述のように、研究は順調に進んでおり、1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。

#### F 健康危険情報

該当なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- 1 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
- 2 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.* 278, 12752-12758
- 3 Mizushima, T, Tsutsumi, S, Hoshino, T, and Tomisato, W (2003) Protection of gastric mucosal cells from apoptosis and

- necrosis by induction of HSP and PGE<sub>2</sub>  
*Jpn J. Hyperthermic Oncol* 19, 67-78
- 4 Tsutsumi, S, Mima, S, Tomisato, W, Hoshino, T, Tsuchiya, T and Mizushima, T (2003) Molecular mechanism of adaptive cytoprotection induced by ethanol in human gastric cells *Exp Biol Med* 228, 1089-1095
  - 5 Tomisato, W, Tsutsumi, S, Hoshino, T, Hwang, H-J, Mio, M, Tsuchiya, T and Mizushima, T (2003) Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem Pharmacol* in press
  - 6 Tanaka, K, Nishimoto, K, Tomisato, W, Tsutsumi, S, Hoshino, T, Tsuchiya, T and Mizushima, T Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs *Dig. Dis Sci* in press
  - 7 Tsutsumi, S, Gotoh, T, Mima, S, Tomisato, W, Hoshino, T, Hwang, H-J, Mori, M, Tsuchiya, T and Mizushima, T NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells *Cell Death Differ* in press
- 開発の戦略 日本薬学会中国四国支部例会 (2003) (徳島)
- 2 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)
  - 3 水島徹 HSP 誘導による胃粘膜保護と、HSP 誘導薬の将来 日本消化器外科学会ランチョンセミナー (2003) (東京)
  - 4 水島徹 GGA-HSP と PG による胃粘膜保護作用の比較 GGA・HSP 研究会 (2003)
  - 5 水島徹 直接細胞傷害作用に着目した新しい NSAIDs 開発への戦略 日本炎症・再生医学会 シンポジウム (2003)
- H 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

学会発表 (招待講演のみ)

- 1 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

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
Hoshino, T, Takano, T, Tomisato, W, Tsutsumi, S, Hwang, H J, Koura, Y, Nishimoto, K, Tsuchiya, T <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	2003
Hoshino, T, Tsutsumi, S, Tomisato, W, Hwang, H J, Tsuchiya, T <u>Mizushima, T.</u>	Prostaglandin E <sub>2</sub> protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP <sub>2</sub> and EP <sub>4</sub> receptor activation	<i>J Biol Chem</i>	278	12752-12758	2003
<u>Mizushima, T.</u> , Tsutsumi, S, Hoshino, T, Tomisato, W	Protection of gastric mucosal cells from apoptosis and necrosis by induction of HSP and PGE <sub>2</sub>	<i>Jpn J Hyperthermic Onco</i>	19	67-78	2003
Tsutsumi, S, Mima, S, Tomisato, W, Hoshino, T, Tsuchiya, T <u>Mizushima, T.</u>	Molecular mechanism of adaptive cytoprotection induced by ethanol in human gastric cells	<i>Exp Biol Med</i>	228	1089-1095	2003
Tomisato, W, Tsutsumi, S, Hoshino, T, Hwang, H-J, Mio, M, Tsuchiya, T <u>Mizushima, T.</u>	Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions	<i>Biochem Pharmacol</i>	in press		2004
Tanaka, K, Nishimoto, K, Tomisato, W, Tsutsumi, S, Hoshino, T, Tsuchiya, T <u>Mizushima, T.</u>	Adaptive cytoprotection induced by pre treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs	<i>Dig Dis Sci</i>	in press		2004
Tsutsumi, S, Gotoh, T, Mima, S, Tomisato, W, Hoshino, T, Hwang, H-J, Mori, M, Tsuchiya, T <u>Mizushima, T.</u>	NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells	<i>Cell Death Differ</i>	in press		2004

20030650

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