

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16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17(2005)年4月1日

別添1

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16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17(2005)年4月1日

## 別添2

### 目 次

#### I. 総括研究報告(別添3)

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(別添4)

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5)

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

別添3

I. 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

本研究事業は、(1)長期培養可能なプライマリーヒト細胞を用いて毒性が懸念される薬剤の網羅的な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、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、(2)薬剤の構造修飾体を合成し、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。また、(3)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を開発することを目的とする。

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ルを作成するとともに、プライマリーヒト細胞を使った遺伝子発現解析実験の有用性を実証する。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との相関を検討する。
- (2) 肝毒性や腎毒性が報告あるいは予期される薬剤の構造修飾体を合成し、それらの網羅的遺伝子発現解析を行い、毒性及び薬効と遺伝子発現との相関を検討する。
- (3) プライマリーヒト細胞を用いて得られた遺伝子発現解析データと、実験動物を用いて得られた遺伝子発現解析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的な手法の開発を行う。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。

本年度は、昨年度までに構築し最適化したプライマリーヒト細胞を用いる遺伝子発現系を用いて、代表的な肝毒性化合物を含む被験化合物曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を実施するとともに、細胞培養・薬剤曝露のハイスループット (high-throughput screening: HTS) 化について検討を行った。薬剤には肝壊死、肝炎、胆汁うっ滞、脂肪変性、胃癌という代表的な肝障害の原因となる化合物 8 種類と、PPAR- $\gamma$  作用薬 (troglitazone、rosiglitazone、pioglitazone)、HDAC 阻害剤

(SAHA)、抗エストロゲン作用薬(tamoxifen)とそれらの誘導体 15 種類を用いた。これら化合物の曝露による遺伝子発現変動を解析するとともに、肝毒性関連遺伝子発現データベースの構築と検証を行った。この結果、今回構築したデータベースが薬剤に対する細胞の応答反応の解析に有効であることが示唆された。また、プライマリーヒト腎細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析系について検討を行った。その結果、検討に用いた腎細胞およびその培養系が、薬剤による腎毒性発現メカニズムの遺伝子発現レベルでの解析に有用であることが示唆された。

また、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響の解析に関する研究では、本年度も引き続き、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)、遺伝子発現を制御し新しいタイプの分子標的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)、乳がん治療薬タモキシフェン誘導体を取りあげ、新規誘導体の合成を行うとともに生物作用の評価を行った。その結果、新規な構造を有するPPAR- $\gamma$ 作用薬およびHDAC阻害剤を見いだした。このうち4種のPPAR- $\gamma$ 作用薬、4種のHDAC阻害剤、2種のタモキシフェン誘導体について、網羅的遺伝子発現解析を行った。

ヒトへの外挿に関する研究では、遺伝子傷害性物質にてヒト培養細胞を処理した場合、および、PPAR- $\gamma$ 作用薬又はタモキシフェン誘導体にてマウスを処理した際の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。遺伝子傷害性物質に関する検討では、定量的RT-PCR法にてGeneChipデータとの再現性の確認を行い、GeneChip解析では変化が見られなかった薬剤も異なる用量またはタイミングにおいて変化を示す例が見られ、用量、経時変化を広く検討する重要性が示された。PPAR- $\gamma$ 作用薬に関する検討では、昨年度に加え、さらに低用量における作用を追加解析した結果、3種のPPAR- $\gamma$ 作用薬に共通して変化する遺伝子およびトログリタゾンのみに特徴的に変化する遺伝子を選びだした。前者には既知の変化を含め脂肪酸代謝に関わる遺伝子群が多く含まれ、後者にはミトコンドリアの機能関連遺伝子および酸化的傷害、アポトーシス関連遺伝子に変化が見られた。この結果より、PPAR- $\gamma$ 作用薬に共通して起こりうる副作用として、脂肪酸代謝の亢進による脂肪肝の悪化が考えられ、さらにトログリタゾンにおいては、ミトコンドリアの酸化的傷害に起因する肝細胞のアポトーシスが誘発されることにより重篤な肝障害が起こったと予想される。タモキシフェン誘導体に関する検討では、合成誘導体を含めて肝臓および子宮における遺伝子発現変化を検討した。その結果、合成誘導体では子宮肥大作用が弱く、遺伝子傷害に関する遺伝子の変化も少ない傾向がみられたが、肝臓における特徴的な代謝酵素の誘導も認められた。エストロゲンレセプター(ER)誘導性遺伝子の多くに変化が見られたが、その内容は誘導体間でバリエーションが見られた。以上の結果は、タモキシフェン誘導体の微妙な構造に差異により、ERおよびコファクターとの相互作用が変化し、異なる生体作用をもたらす事を示しており、その予測に遺伝子発

現変化が指標となることが示唆された。PPAR- $\gamma$  作用薬およびタモキシフェン誘導体に関しては、同じ化合物を *in vitro* でヒト培養肝細胞に処理して同様の検討を行っており、マウスのデータと比較をするためのデータ解析法を樹立し、両者の直接比較を可能とした。その結果、全体として両者の相関性はあまり良くなく、共通して変化を示す遺伝子は少なかった。ヒトとマウスという種差に加え、*in vitro* と *in vivo* という環境の違いが大きく影響していると考えられる。発現データはすべてデータ解析ソフト GeneSpring を用いてデータベース化を行い、任意の実験間の比較が可能な状態として提供可能となった。

以上を総括すると、プライマリーヒト細胞を用い、薬剤曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行うための最適なプロトコルを構築した。また、代表的な薬物(毒物)を用いて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化を行った。毒性を軽減した薬物を開発する目的で、薬剤の構造修飾体の網羅的遺伝子発現解析については、有用性を示す基礎的知見を得ることができたが、現在、さらに詳細に検討中である。ヒトでの安全性を予測する目的で、実験動物から得られた遺伝子発現解析データをヒトへ外挿するための手法の開発を行い、両者を直接比較する手法を確立した。

#### 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

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

#### 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

国立医薬品食品衛生研究所  
変異遺伝部研究官  
名古屋市立大学大学院  
薬学研究科研究員

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

福原 潔  
国立医薬品食品衛生研究所  
有機化学部室長

二宮真一  
第一化学薬品株式会社  
薬物動態研究所部長

押澤 正  
国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部主任研究官

#### 協力研究者

中川秀彦  
名古屋市立大学大学院

櫛 洋  
国立医薬品食品衛生研究所  
遺伝子細胞医薬部流動研究員

## A. 研究目的

本研究事業では、長期培養可能で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細胞を用いて、薬剤の曝露時における網羅的な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ルを構築する。また、代表的な薬物(毒物)を用いて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化を行う(二宮)。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、毒性を軽減した薬物を開発するために網羅的遺伝子発現解析の果たす役割を明らかにする(宮田、奥田)。さらに、ヒトでの安全性を予測する目的で、実験動物から得られた遺伝子発現解析データをヒトへ外挿するための手法の開発を行い、薬物の副作用を回避あるいは軽減するための評価法の確立に資する(鈴木)。

## 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

細胞培養ロボットと薬剤暴露ロボットを利用したハイスループット試験系を利用し、昨年度までに構築したプライマリーヒト肝細胞の長期培養系を用いて、肝毒性を有する薬剤の網羅的遺伝子発現解析による肝毒性予測データベースの構築とその検証を行うと共に、さらにそのデータを用いた肝毒性予測モデルの構築とその検証を目的として実験を行った。さらに、プライマリーヒト腎細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析系についての検

討も行った。

3種類の接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を培養し、薬剤曝露後、1,4,24 時間後の細胞を回収し、GeneChip HG-U133A array を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。披験物質として、以下の化合物を使用した。代表的な肝毒性の原因となる薬剤 8 種類：Acetaminophen (APAP)、Chlorpromazine、Diclofenac、Gemfibrozil、Isoniazid、Dimethylnitrosamine、Phenobarbitar、Tetracycline、(gemfibrozil は陰性コントロール)。データベースを検証するための薬剤 3 種類とこれらの誘導体：チアゾリジンジオン系 PPAR  $\gamma$  作用薬 ( Troglitazone、Rosiglitazone、Pioglitazone、 $\alpha$ -Me、 $\gamma$ -Me、PY-1、PY-9)、HDAC (histone deacetylase) 阻害剤 ( SAHA、HDAI-1、HDAI-2、HDAI-3、HDAI-4、抗エストロゲン作用薬 (Tamoxifen、Tamoxifen-H (Tam-H)、Tamoxifen-OH (Tam-OH))。

HTS 化に向け、細胞培養および薬剤曝露においてはアッセイ(細胞培養・薬剤暴露)用ロボットを利用した。

得られた遺伝子発現データは RMA 法を用いて正規化し、さらにコントロールサンプルに対する発現変動を比較するために、各実験のコントロールサンプルによる Per Gene Normalization を行い、それ以降の解析に用いた。正規化には GeneSpring を使用した。また、肝毒性予測のためのモデル作成の検討においては、ADMEWORKS / ModelBuilder を用いた。

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た。しかし、プライマリーヒト肝細胞は、個体間差が存在する。本研究では、3種類のプライマリー凍結ヒト肝細胞を用いて薬剤曝露実験を行い、標識 cRNA 調製後に混合したサンプルを用いて GeneChip 解析を実施することで、個体間差の影響が少ない遺伝子発現データベースの構築を目指すこととした。

曝露する被験物質には肝毒性の原因となる薬剤の中から、代表的な毒性を示すものとして以下の8化合物(gemfibrozilは陰性コントロールとして用いた)を使用した。

①肝壊死:acetaminophen (APAP)

②胆汁うっ滞:chlorpromazine

③肝炎:diclofenac

④肝炎:isoniazid

⑤脂肪変性:tetracycline

⑥遺伝子傷害性発癌物質:

dimethylnitrosamine

⑦非遺伝子傷害性発癌物:

phenobarbitar

⑧ペルオキシソーム増殖:gemfibrozil

さらにこれらに加えて、データベースの検証と薬剤の構造が遺伝子の発現に与える影響を解析する目的で、チアゾリジン系 PPAR $\gamma$  作用薬の3薬剤とその新規誘導体を4種類、HDAC (histone deacetylase) 阻害剤である SAHA とその新規誘導体を4種類、抗エストロゲン作用薬である tamoxifen と新規誘導体を2種類用い、同様に遺伝子発現解析を行った。

薬剤曝露後、1,4,24 時間後の細胞を

回収し、GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。スキャン後に得られた遺伝子発現データを RMA 法によって正規化した後、発現の再現性 ( $\sigma \leq 2$ ) と有意差 ( $P \leq 0.05$ ) が見られた遺伝子のみを抽出した。

薬剤曝露による遺伝子発現の経時的変化については、作成した遺伝子リストを用い、各被験物質の曝露による遺伝子発現の経時的な変動について GeneSpring を用いて解析した。この結果から、曝露開始後 24 時間で多くの遺伝子の発現が誘導、もしくは抑制されていることがわかった。この傾向は APAP や diclofenac、isoniazid、tetracycline で顕著だったが、chlorpromazine や dimethylnitrosamine、phenobarbitar といった化合物では、前群ほど大きな発現変動は見られなかった。この様に多くの遺伝子についてその発現、抑制が見られたことは細胞の機能が破壊されている可能性やアポトーシスあるいは壊死へと細胞が向かっている可能性を示唆するものと考えられた。また、薬物によって発現変動の程度が異なる点については、被験薬物の作用機序の違いを反映するものと考えられた。次に各肝毒性薬剤と各時点の遺伝子発現変動との相関を lway-ANOVA によって解析した。この結果、曝露時間の経過にしたがって各化合物の間で発現に有意差がある遺伝子の数が増加する傾向が明確になった。特に APAP など、発現変動を示すグラフで 24 時間後に大きな変動を示した化合物では発現に有意差のある遺伝子が多い傾向にあり、化合物が与える肝細胞の病理的な変化を

遺伝子の発現レベルで分類できることが示唆された。しかし、これらの中にはこのような傾向が見られず、遺伝子の発現に有意差が少ない化合物も確認された。特に、chlorpromazine と gemfibrozil、dimethylnitrosamine と phenobarbital の間の有意差は非常に少なく、化合物に対する肝細胞のレスポンスがそれぞれで似ている可能性が示唆された。

経時的な遺伝子発現変動の解析結果より、曝露開始 24 時間後の遺伝子発現の変化が非常に大きく、また化合物間でも異なる遺伝子の変動が多く見られた。Quality Control により残った遺伝子の中から 24 時間後の遺伝子発現データに含まれる遺伝子のみを用いて遺伝子リスト (4461 遺伝子) を作成し、これ以降の解析に用いた。また、この遺伝子発現リスト内の各遺伝子を Gene Ontology の biological process で分類し、遺伝子発現データと併せ肝毒性関連遺伝子発現データベースとした。肝毒性薬剤の遺伝子発現データに PPAR $\gamma$  作用薬、SAHA、tamoxifen とその誘導体も含め、1, 4, 24 時間後のそれぞれのサンプルを用いて階層型クラスター解析を行った。この結果から、PPAR $\gamma$  作用薬、SAHA および tamoxifen は各時点ともそれぞれの誘導体とクラスターを形成していることが明確となった。また、化合物曝露 1 時間後のデータを用いたクラスター解析で、肝毒性薬剤 8 剤が 4 種類ずつ 2 つのクラスターを形成し、さらに PPAR $\gamma$  作用薬、SAHA、tamoxifen がそれぞれの誘導体と共にクラスターを形成していた。4 時間後については Tam-OH と chlorpromazine

によるクラスターの形成や、他の PPAR $\gamma$  作用薬と離れた PY1 と PY9 のクラスターの形成などは見られたものの、1 時間後の結果と同様に実験のグループ分けに影響を受けている傾向が見られた。しかし、この傾向は 24 時間後には見られなくなった。この時間依存的なクラスター形成については次の主成分分析によって、より明らかにすることができた。

GeneChip を用いて得られた全データを用いて主成分分析を行った。この結果、階層型クラスター解析の結果と同様に、化合物曝露 1 時間後および 4 時間後には目立った傾向が見られなかった。しかし、24 時間後になるといくつかの傾向が見られ、コントロールサンプルが原点近傍にクラスターを作っているのに対して他の化合物は原点から離れた位置にプロットされた。これは化合物を曝露した後、時間の経過とともに化合物処理群とコントロール群との間で遺伝子の発現変動に明確な違いが生じていることを意味する。また、SAHA とその誘導体、PPAR $\gamma$  作用薬(thiazolidinedione)とその誘導体もそれぞれクラスターを形成したのに対し、肝毒性薬剤 8 剤はクラスターを形成しなかった。肝毒性薬剤に関しては選択する際に、毒性の種類やその薬理的な作用の異なるものを選択しており、それが遺伝子発現にも反映されていると言える。一方、クラスターを形成した各化合物については、それぞれの誘導体ということで生体に対する作用が比較的類似していると考えられ、それが遺伝子発現の傾向にも現れていると考えられた。

肝毒性関連遺伝子発現データベース

を利用して肝毒性を予測するための試みとして、多変量解析によるモデル作成を検討した。モデル作成には ADMEWORKS / ModelBuilder を用いた。パラメーターには上記クラスター解析および主成分分析で用いた遺伝子リストの中で 24 時間後のリストのみを使用した。モデルの作成には、2 クラス分割法を用いた。解析にあたっては各サンプルにおける遺伝子発現量の相関が 0.9 以上になるパラメーターを予め取り除いた。また、作成されたモデルに対しては cross validation を実施することで検証を行った。今回は2つのクラスを仮定し、4つのモデルを得た(詳細は分担研究報告書)。

プライマリーヒト腎細胞を用いた薬剤曝露および遺伝子発現解析系の検討については、Human renal cortical cell(HRCC)の培養系について、腎毒性を誘発することが報告されている benzyl penicillin のトランスポーター取り込み活性を測定した。benzyl penicillin を用い、トランスポーターの取り込み活性を測定した結果、コントロール群に対し、時間依存的な取り込み活性が確認された。

## 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

### 2-1. PPAR- $\gamma$ 作用薬

トリ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 型糖尿病薬として期待されている。近年の研究から TZD 誘導体は PPAR $\gamma$  受容体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種の TZD 薬が臨床に用いられてきたが、そのうちトログリタゾンは重篤な肝障害のために販売が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が多いが、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示唆されている。また、TZD 誘導体の共通の副作用として貧血、浮腫、体重増加、肝機能障害や心不全がある。

このような問題をふまえ、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行った。

昨年度までに、TZD 骨格を有さない PPAR $\gamma$  アゴニスト候補化合物として、3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propanoic acid を基本骨格として、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39種の誘導体を合成した。これらについて、PPAR- $\gamma$  との結合試験ならびに前駆脂肪細胞を用いた細胞分化誘導実験を行い、導入するアルキル基の長いものほど強い生理作用を有することを見いだした。

本年度は、より高活性な PPAR- $\gamma$  作用薬の創生を目的として、ベンゼン環上の置換基の位置をパラ位からメタ位にすることで、PPAR- $\gamma$  の内因性リガンドである 15d-PGJ<sub>2</sub> と構造が類似し、より高活性な

PPAR- $\gamma$  アゴニストの創生ができると考え、新たに三種の誘導体を合成した。これらの化合物については、昨年度報告したのと同様に、CoA-BAP システムを用いて、PPAR- $\gamma$  受容体との結合試験、ならびに、ラット前駆脂肪細胞を用いた細胞分化誘導試験を行っている。

また、遺伝子発現解析試験については、昨年度までに合成し顕著な生物作用を示した化合物(a-Me、c-Me、PY1、PY9 (Compound 9))について、プライマリーヒト細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、Troglitazone、Rosiglitazone、Pioglitazone でのデータとの相関を解析した。

## 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、ヒストンのアセチル化されたリシン残基からアセチル基を除去する反応を触媒し、遺伝子発現を調節する重要な酵素である。HDAC を阻害すると相対的にヒストンアセチル化酵素 (HAT) の働きが強くなり、ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる。このヒストンハイパーアセチレーションにより、多くの遺伝子の転写活性化が起こる。HDAC 阻害により転写活性化される遺伝子の中で最も注目されているのが癌抑制に関わる p21 遺伝子である。p21 は、cyclin-dependent kinase-2 を阻害し、癌の細胞周期を停止する。このような癌抑制に関わる遺伝子の発現を制御する HDAC 阻害薬は、新たな癌の分子標的治療薬となり得る。これまでに報告された HDAC 阻害薬のほとんどはトリコ

スタチン A (TSA) やスベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA) に代表されるようなヒドロキサム酸系化合物であり、ヒドロキサム酸が酵素活性中心にある亜鉛に配位し、基質であるアセチル化されたリシンに拮抗して阻害活性を示すと考えられている。しかしながら、一般にヒドロキサム酸を zinc-binding group (ZBG) として持つ化合物は体内動態が悪く、毒性の懸念も多い。それ故に、より体内動態の改善した抗癌剤、より副作用の少ない抗癌剤になり得る非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の開発が望まれている。

我々は、本研究班において、毒性の少ない新たな癌の分子標的治療薬の開発を目的とし、非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の創製研究を行ってきた。HDAC 阻害剤は、以下の 5 つの概念により設計した。

- 1) 酵素の三次元構造を基にした設計
- 2) 亜鉛の硫黄親和性を利用した設計
- 3) 遷移状態構造に基づく設計
- 4) 酵素の触媒機構を基にした設計
- 5) 不可逆的阻害を意図した設計

合成した非ヒドロキサム酸系化合物の HDAC 阻害活性評価は、HDAC Activity Assay/Drug discovery Kit を用いて行った。その結果、酵素の三次元構造を基に設計した化合物の中では、ヒドロキシウレア誘導体とセミカルバジド誘導体に HDAC 阻害活性が見られが、SAHA には及ばなかった。亜鉛の硫黄親和性を利用して設計したチオール誘導体は、HDAC に対しては予想以上の強い阻害活性を示し、 $IC_{50} = 0.21 \mu M$  と既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬の活性を

上回り、SAHA と同等以上であった。遷移状態アナログとしてHDACを阻害することを期待したスルホン誘導体では、活性はSAHA や既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬には及ばなかった。酵素の触媒メカニズムを基に設計したアセタミド誘導体では、メルカプトアセタミド誘導体に強い活性が見られ、その活性は、SAHA に匹敵した。不可逆的阻害を意図して設計した化合物の中では、プロモアセタミド誘導体が HDAC 阻害活性を示した。しかし、活性は SAHA には及ばなかった。

以上、非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬として、チオール誘導体及びメルカプトアセタミド誘導体がヒドロキサム酸に匹敵する活性を持つことが分かった。これら両官能基は、非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬として、ヒドロキサム酸と同等の活性を示した初めての化合物である。

プライマリーヒト細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析は、接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いて行った。被験物質としては、SAHA、および、チオール系活性化合物(HDAI-1)と(HDAI-2)、プロドラッグ化した化合物(HDAI-3)と(HDAI-4)を用い、SAHA と比較した遺伝子発現解析を行った。

### 2-3. タモキシフェン関連化合物

平成14年度および15年度は乳がんに対する化学療法の第1選択薬として用いられているタモキシフェンをとりあげ、毒性と遺伝子発現との構造活性相関の検討に資するデータベースを構築する為にタモキシフェン誘導体の合成を行った。

さらに合成したタモキシフェン誘導体については酸化的 DNA 損傷能およびBHK 細胞増殖阻害活性を検討した結果、誘導体の毒性はタモキシフェンおよび、その活性本体(4-ヒドロキシタモキシフェン)とほぼ同程度であることがわかった。今年度は、タモキシフェンと同様のスチルベン骨格を有する天然抗酸化剤として、生活習慣病の予防および細胞寿命の延命効果等で話題となっているレスベラトロールをとりあげ、毒性と遺伝子発現との構造活性相関の検討に資する誘導体の合成を行った。レスベラトロールは多彩な薬理活性(脂質過酸化の抑制、制癌作用、抗炎症作用、エストロゲン活性等)が報告されており、特にがん発症の三段階(イニシエーション、プロモーション、プログレッション)のいずれの過程にも作用することからがん予防物質として注目を集めている。また、NAD<sup>+</sup>依存性蛋白質脱アセチル化酵素である Sir2 を刺激することで DNA の安定性を増大させ、細胞寿命を 70%延長させることが報告された。一方、レスベラトロールは従来のフラボノイド系ポリフェノールやビタミン E と同様に水酸基からの水素移動反応によって活性酸素や脂質ペルオキシラジカルを消去する。生活習慣病の発症や進行の予防にはこの抗酸化機構も大きく関与していることも明らかとなっている。

レスベラトロールの毒性について、我々はすでに、in vitro で染色体異常、小核および姉妹染色分体交換を濃度依存的に誘発することを見出し、側鎖水酸基に関する構造活性相関を調べた結果、

4'位の水酸基がレスベラトロールの遺伝毒性に必須であること、また、その分子作用機構は、すべての生物に必須でDNAの合成および修復において中心的役割を果たす酵素 ribonucleotide reductase を阻害することであることをみいだしている。

本研究では毒性の軽減とラジカル消去活性の増強を目的とした誘導体として水酸基のオルト位にメチル基が導入された誘導体の合成を行った。すなわち、レスベラトロールにメチル基が導入されると酵素や様々なシグナル伝達に関わる生体高分子との結合がメチル基の立体障害によって阻害され、毒性が軽減されることが推定される。また、ビタミンEと類似の構造を有するレスベラトロールのメチル誘導体は、メチル基の超共役作用によってラジカル消去能が増強されることも予測される。

レスベラトロールの誘導体5種を合成した。合成したレスベラトロールのメチル誘導体およびレスベラトロールの活性酸素に対するラジカル消去能の解析を行った。その結果、レスベラトロールの水酸基のオルト位(3'位)にメチル基を導入することによりラジカル消去能が顕著に増強されることがわかった。また、レスベラトロールの3位と5位の水酸基の間のメチル基も抗酸化活性を増強させることがわかった。さらに、水酸基のオルト位へのメチル基の数が増える程、抗酸化活性が増強することがわかった。

プライマリーヒト細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析は、タモキシフェンおよび、昨年度合成した2種のタモキシフェ

ン誘導体について接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いて行った。

### 3. 実験動物データのヒトへの外挿を旨とした基本手法の確立・プロテオーム解析への応用

遺伝子発現解析手法を用いて毒性の予測を行うトキシコジェノミクスは、従来のクラシカルな毒性試験にて予測できなかった臨床試験等における実際のヒトでの毒性の予測に大きく貢献することが期待されている。本研究班では、ヒトでの毒性を予測する系として、よりヒトに近い実験材料であるプライマリーヒト肝・腎細胞を用い、in vitroにおける曝露による発現の変化を検討している。プライマリー細胞においては、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が、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も、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は重要である。そこで、グリタゾン系糖尿病治療薬および乳癌治療薬タモキシフェン誘導体に関して、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ない、ヒトとマウスの種差およびin vitroとin vivoの比較に関して考察を加えた。また、遺伝子傷害性物質に関しては、ヒトリンパ腫細胞 TK6を用いた in vitro の試験系により得られた遺伝子傷害性に起因して変化する遺伝子を用いて、定量的RT-PCRによる詳

細な検討を行い、その有用性に関して検討した。最後に、今回の検討で得られた発現データは膨大な量に上るが、データ解析ソフトの力を借りてこれらを効率的に解析するため、すべてのデータをデータベース化するとともに、異なる種間のデータのブリッジングを行うための解析システムの構築を試みた。

### 3-1. 遺伝子発現変化の解析

ヒトリンパ腫由来の細胞株である TK6 細胞を用い、対数増殖期に各種遺伝子傷害性物質にて処理し、培養を続けた後、Total RNA を細胞より抽出した。得られた Total RNA を用いて定量的 RT-PCR 解析を行い、遺伝子発現量を比較した。

遺伝子傷害性物質による遺伝子発現変化の解析は、前年度までの実験に基づいて候補遺伝子を選んだ。これらの遺伝子に対し特異的に設計された TaqMan PCR 用試薬を用いて、定量的リアルタイム PCR 法を行い、発現比を GeneChip で得られたデータと比較した。GeneChip のデータと RT-PCR のデータの相関性は良く、GeneChip データの信頼性が裏付けられた。今回選んだ遺伝子のうち、PLAB, p21, ATF3, LTA, GPR43, CCL2 は比較的多くの化合物で変化が見られたが、EIF5A, PSMD1, CDC, SLC は、特に RT-PCR 法での変化が少なかった。

GeneChip の解析においては、一般に発現比がコントロールに対して2倍変化した場合に有意として選択する方法が簡便な手法として用いられているが、得られた Raw intensity のデータをプロットす

ると低発現量でばらつきの大きい分布を示すため、低用量でより多くの遺伝子が検出され、逆に高用量では検出される遺伝子は少なくなる。広い領域に対して、均一に変化した遺伝子を選択するため、昨年度までに、発現強度に応じて有意水準を変化させる、いわゆる Step-wise selection 法を開発して、遺伝子の選択に用いてきた。今年度はさらにこの方法を進化させ、回帰曲線を書かせることにより段階的ではなく連続的に有意水準を変化させて遺伝子の選択を行う方法を開発した。この手法により、得られたチップデータを標準化後、回帰曲線に基づいて発現強度依存的に発現の変化した遺伝子を選択した。

### 3-2. グリタゾン系薬物による遺伝子発現

マウス肝臓におけるグリタゾン系化合物の処理による遺伝子発現変化について、トログリタゾン(T)、ロジグリタゾン(R)、ピオグリタゾン(P)処理によるマウス肝臓での遺伝子発現の解析を、今年度は低用量である 20 mg/kg に対して行い、昨年度のデータと併せて再解析をした。全体として発現上昇した遺伝子が約 1500 発現低下した遺伝子が約 1000 個選択された。3 つの薬物に共通して選ばれた遺伝子数は上昇 684、低下 128 と、特に上昇した遺伝子で共通性が高かった。一方、化合物間ではロジグリタゾンでの変化が最も数が多く、ロジグリタゾンとピオグリタゾンとの共通性が高かった。

3つの薬物に共通性高く変化した遺伝子のうち thyroid hormone responsive

SPOT14 homolog 遺伝子は、肝臓や脂肪細胞においてホルモンや栄養による発現調節を受けている遺伝子で、脂肪生成に関与する。さらに、この遺伝子の発現が streptozotocin で誘発した糖尿病で変化する点で、関連性が注目される。Lipin1 遺伝子も脂肪酸代謝に関わる遺伝子であり、この遺伝子の変異はヒトで lipodystrophy を起こす。この病気は体脂肪の減少、脂肪肝、hyperglyceridemia、インシュリン抵抗性などを起こすという特徴を持つ点で、今回の PPAR $\gamma$  作用薬との関連性が示唆される。さらに、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。

共通性が見られた遺伝子を、機能別に分類し、いずれの時点においても共通に見られた変化として、脂肪酸代謝に関わる遺伝子が特徴的であった。

次に、トログリタゾンに特異的な肝毒性のメカニズムを考える意味で、トログリタゾンに特徴的に変化する遺伝子の解析を行った。トログリタゾン特異的に発現の上昇した遺伝子としては、chemokine (C-X-C motif) ligand 1、orosomucoid 2、serum amyloid A2、lipocalin 2 などが含まれ、発現低下する遺伝子としては、Down syndrome critical region homolog 5、heat shock protein 1B、などが含まれていた。これらの遺伝子は、トログリタゾン特異的な肝毒性発現に何らかの関連性を持つことが期待される。

これらの遺伝子に関して、各時点ごとに遺伝子の機能別に分類した結果、特

徴的な遺伝子群としては、ミトコンドリアの機能関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、酸化ストレス応答遺伝子、炎症関連遺伝子などが見いだされた。

### 3-3. タモキシフェン誘導体による遺伝子発現

乳癌治療薬として使われているタモキシフェン (Tam) は、エストロゲン受容体 (ER) の発現が更新している乳癌に対して、抗エストロゲン様作用を示すことにより、癌細胞の増殖を抑える。一方、子宮に対しては逆にエストロゲン様作用を示し、子宮肥大や、子宮癌などの副作用を示すことが知られている。また、Tam およびその活性代謝物である 4-hydroxyTam (4OH) はラットに対して肝発癌性を示す事が知られ、オレフィン部位に結合したエチル基の水酸化による  $\alpha$  ヒドロキシタモキシフェンを介した代謝活性化による DNA へのアダクト生成が関与していると考えられている。Tam のエチル基が Cl 化された構造を持つトレミフェン (Tre) は、これらの副作用が少ないことが知られている。また、共同研究者の奥田らが合成した Tam の脱エチル体 ( $\Delta$  C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) はアダクト形成の代謝活性化が起こりにくいと考えられ、副作用の少ない薬として期待される。そこで、マウスを用いてこれらの薬剤のエストロゲン様作用および遺伝子傷害に関する副作用を遺伝子発現の面から考察するため、GeneChip を使った解析を行った。

マウスに薬物を投与し、4時間後および24時間後に肝臓および子宮を回収したが、この際肉眼的な変化として子宮の

肥大作用が観察された。Tam、4OH ではすでに4時間後より子宮の肥大傾向が見られたのに対し、Tre、 $\Delta C_2H_5$  ではその作用は小さかった。

肝臓および子宮において発現変化した遺伝子を、回帰曲線を用いた手法によりした選択した結果、肝臓においては、上昇、低下ともに約 1000 個の遺伝子が変化し、子宮においてはそれぞれ 2000 個を超える遺伝子が変化を示した。重複を除いたのべの遺伝子は、肝臓 1158、子宮 2807 であった。肝臓において変化した遺伝子のうち誘導体間で共通性の高かったものをリストアップすると、発現上昇、低下ともに化合物間での共通性は高く、特に Tam と 4OH でのパターンはよく似ていた。遺伝子傷害性に関連する遺伝子の変化を検討するため、遺伝子機能として遺伝子傷害に関連する遺伝子のうち変化が見られたものをリストアップしたが、これからは、化合物間に明らかな差は見られなかった。肝臓における CYP 遺伝子群の発現変化に着目した場合、全体として多くの CYP 遺伝子の発現低下が認められたが、 $\Delta C_2H_5$  体のみ特異的に CYP2b 群の代謝酵素遺伝子の発現誘導が認められた。CYP2b 群の酵素はフェノバルビタールにより誘導される遺伝子であり、肝毒性との関連が懸念される。次に、各化合物ごとに変化した遺伝子群の特徴を調べた。ステロール合成およびテルペノイド合成、アセテート合成に関与する遺伝子が共通の変化として検出されたが、Tre に特徴的な変化として nitric oxide 合成遺伝子、および  $\Delta C_2H_5$  体の特徴として MAP キナーゼの活

性化に関わる遺伝子群が注目された。

子宮での遺伝子発現変化の解析では、すべての薬物に関して共通性を持って発現上昇した遺伝子をリストアップした。子宮では多くの遺伝子の発現が変化していたこともあり、化合物間の共通性も高かった。ただし、Tre の 4 時間後および  $\Delta C_2H_5$  体の 24 時間後のデータは変化が小さく、他とは違う傾向を示した。これは、これらの化合物では子宮肥大の作用が弱かったことと関連している可能性がある。共通性の有りがつ変化の激しかった遺伝子として、kallikrein 遺伝子の多くのホモログが同時に検出された点が注目され、エストロゲン作用との関連に興味を持たれる。この他変化の大きかった遺伝子としては、IL-1 receptor type II、S100 calcium binding protein A14、stratifin、TNF receptor superfamily member 12a などが挙げられる。一方、共通して発現が低下した遺伝子についても、同様に共通性が高く、Tre の 4 時間後および  $\Delta C_2H_5$  体の 24 時間後のデータが他と違う傾向を示した。子宮では子宮肥大というフェノタイプの変化が見られたことから、エストロゲン様作用が疑われる。そこで、エストロゲンレセプター関連遺伝子に関してその動きを抜き出したが、化合物ごとの特徴は見られず、いくつかの遺伝子に関して共通して変化が見られる事がわかった。一方、肝臓と同様に遺伝子傷害関連遺伝子に関して変化を解析したところ、やはり化合物間で明らかな差は見られなかったが、我々が他の検討により選択した遺伝子傷害性スクリーニングのための指標遺伝子に関し

でのみ変化をみたところ、 $\Delta C_2H_5$  体のみ変化が小さく、この化合物が子宮では遺伝子傷害性が低い可能性が示唆された。次に、化合物ごとの特徴を明らかにするため、肝臓の場合と同様 Gene ontology tree による解析を行った。いずれの化合物においてもステロイド関連遺伝子、および細胞周期 (mitosis) 関連の遺伝子群の動きが見られた。化合物に特徴的な遺伝子は 4OH に多く、IGF レセプター関連遺伝子、ヒートショック応答遺伝子などがあり、4OH と  $\Delta C_2H_5$  体に共通した特徴として抗アポトーシス関連遺伝子、Tam における骨ミネラル化遺伝子、Tre の免疫応答遺伝子群などが挙げられる。

### 3-4. 遺伝子発現データベースの構築とマウスおよびヒト GeneChip データの直接比較解析法の開発

GeneChip 解析より得られたデータは、スケールリング後の生データとしてすべて GeneSpring 解析ソフトで読み込み、実験およびプロジェクトごとに、チップの種類別にデータベース化し、全チップデータを統合したデータベースを構築した。データベースは、一枚のチップごとの Raw データが集積されており、同一種のチップデータであれば任意の実験を比較可能になっている。GeneSpring の Homology Table 作成機能を利用し、ホモログの情報をチップデータに追加し、Excel 上にて異種チップのデータを直接横並びに結合して表示させた。これにより、ホモログが存在する遺伝子に関して、ヒト細胞とマウスのデータを直接比較し、発現比に関する散布図を書かせることが

できた。タモキシフェン処理をしたヒト初代培養肝細胞でのデータと、マウス肝臓でのデータの比較を行ったが、両者の相関性はあまり良くなかった。最も良い相関を示した遺伝子は、bone morphogenetic protein receptor, type 1A であり、いずれの場合にも5倍以上の発現上昇が見られた。同様の検討をグリタゾン化合物処理に関しても行ったが、やはり、両者での動きに共通性は低く、特に vitro で発現低下した遺伝子は、vivo において全く変化が見られなかった。一方、発現上昇した遺伝子のうち vivo と vitro で共通性が見られた遺伝子としては、cathepsin Z、P450 oxidoreductase があつた。vivo と vitro でのデータを処理群ごとに散布図を作成して比較し、相関係数を計算した結果、vivo どちらのデータ、ついで vitro どちらのデータは相関が良いのに比べ、両者の間の比較ではいずれも相関が低いことがわかつた。以上の結果より、マウス肝臓での結果と、ヒト初代培養肝細胞でのデータは相関性が低いことが示唆された。これは、種の差のみならず vitro と vivo のデータの直接比較の難しさを反映した結果であると考えられる。

## 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・ハイスループット試験系の開発

新規の医薬品候補化合物は、ヒトに投与する前に、遺伝毒性試験、一般毒性試験、生殖毒性試験、安全性薬理試験等によって幾重にも安全性のチェックが

行われている。しかし、臨床試験段階や市販後に予期せぬ副作用が発生し、開発もしくは販売を中止せざるを得ない例も少なくない。従って、医薬品開発過程において、重篤な副作用(毒性)を引き起こす可能性を予見することが可能であれば、薬剤を投与される患者の安全を確保することが可能となる。また、臨床試験開始後あるいは販売承認後の医薬品あるいはその候補化合物の撤退は、製薬企業に対して非常に大きな経済的ダメージを与える。それゆえ、実験で顕在化した毒性の性格付けを通してヒトへの外挿を行っている現在の非臨床試験に加え、化合物を動物や細胞に暴露して遺伝子発現解析を実施することにより、顕在する毒性の発現メカニズムに関する理解を深めるとともに、予測精度の飛躍的な向上を目指すトキシコゲノミクスによるアプローチの実用化が非常に期待されている。本研究では、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、トキシコゲノミクスの手法を用いた薬剤曝露時における網羅的な遺伝子発現解析とそこで得られる肝毒性関連遺伝子の発現データベースの構築を行った。

この肝毒性予測データベースの構築にあたり材料として用いる細胞の選択が重要であるが、次の理由からプライマリーヒト肝細胞の使用を決めた。体内に吸収された薬剤は主に肝臓で代謝を受ける。もともと薬剤そのものに毒性がある場合もあるが、その一方で、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、代謝酵素によって生じた代謝産物が非常に重要である。以上から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、薬剤の未変化体とその代謝産物の両方の影響を考慮する必要があり、そのためには薬物代謝酵素の活性を維持している細胞を用いることが望ましいと考えられる。また細胞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、本研究におけるデータベース構築において採用した。

さらにデータベース作成においては、予め検討を行った上で選択したロットの異なる3種類のプライマリーヒト肝細胞を用いて薬剤曝露実験を実施し、GeneChipにハイブリダイゼーションする直前に、3種類の細胞由来のサンプルを等量ずつ混合して用いた。これは、肝毒性関連遺伝子の発現データベースを構築するにあたって、細胞の由来の違い、即ちヒトの個人差を考慮する必要があるからである。遺伝子多型や人種差、年齢、性別、飲酒、喫煙、薬剤の服用等、薬剤に対する応答に個人差を生じさせる要素は非常に多く存在し、これらはデータベースの作成において大きな課題になる。複数の個体(ロット)由来のサンプルを同時に解析することによって、上記のような個人差の影響を少なくできると考え、3種類の異なるロット由来のサンプルを混合して得られたデータを用いた。

次に使用する化合物の選択については、構築するデータベースの目的を考慮した。網羅的遺伝子発現解析データ

を利用した毒性予測データベースの構築には Chemical Database と Pathology Database の 2 つの方法が考えられる。前者は、構造や化学的な性質の類似した化合物は、ヒト細胞において同じタイプの毒性を引き起こすであろうという予想に基づいており、構造の特徴が異なる様々な種類の化合物を用いて遺伝子発現データベースを構築し、それを用いて未知化合物を評価するものである。一方後者は、薬剤によって引き起こされる壊死や肝炎、肝硬変といった毒性が引き起こされると、その際の遺伝子発現プロファイルがそれぞれ毒性によって異なる傾向を示すということを前提にデータベースを構築し、未知化合物の評価を行うものである。本研究ではこの 2 種類から、Pathology Database を構築することとし、肝毒性の病理学的な分類に基づいた化合物の選択を行った。選択した化合物は Acetaminophen (肝壊死)、chlorpromazine (胆汁うっ滞)、diclofenac (肝炎)、isoniazid (肝炎)、dimethylnitrosamine (遺伝子傷害性発癌物質)、phenobarbital (非遺伝子傷害性発癌物質)、tetracycline (脂肪変性)、gemfibrozil (ペルオキシソーム増殖) という 8 種類の代表的な肝毒性薬剤であり、これらを用いてプライマリーヒト肝細胞における網羅的遺伝子発現解析を行い、肝毒性関連遺伝子データベースを構築した。ただし、gemfibrozil は、ヒトでの肝毒性は無いとされていることから、陰性コントロールとして採用した。

### 1-1. 肝毒性薬剤曝露時の遺伝子発現解析に関する考察

化合物曝露による経時的な遺伝子発現変動を解析した結果、細胞死あるいはアポトーシスが示唆される著しい発現誘導あるいは抑制が見られた化合物があった一方で、大きな発現変動が見られない化合物もあった。化合物に対する細胞の応答はその種類によって様々であれば、濃度や時間の影響もまた様々と考えられ、このような遺伝子発現レベルの変動の違いは当然であるとも言える。しかし、細胞が化合物に対して直接的な応答をしているコンディションであるのか、あるいは毒性が発現する過程や既に発現してしまった毒性に対して応答しているコンディションであるのかを判断できなければ、遺伝子発現データについて詳細な解析をすることは困難となる。特に本研究のように薬効や毒性の異なる化合物に対する細胞内での応答反応を遺伝子発現レベルで比較解析する場合には、前記コンディションを十分に把握した試験条件の設定が必要であり、結果としては今回の試験では不十分であった。この点については今後の研究において十分に検討すべき課題であり、時点や濃度だけでなく、LDH 漏出や細胞内 DNA などを指標とした細胞毒性の評価も必要であると考えられた。

階層型クラスター解析では化合物曝露 1 時間後のデータを用いた解析の結果、肝毒性薬剤 8 剤が 4 種類ずつ 2 つのクラスターを形成し、さらに PPAR $\gamma$  作用薬、SAHA、tamoxifen がそれぞれの誘導体と共にクラスターを形成した。肝毒性薬剤