

以外の化合物については、構造が似ており、その作用も比較的類似すると予想されることから、それぞれがクラスターを形成することは予想できたが、作用や構造の大きく異なる肝毒性薬剤同士がクラスターを形成したことは注目すべき結果であった。これに関しては以下の理由を考えた。本研究では作業量を考慮し、肝毒性薬剤 8 剤を用いた曝露実験および GeneChip 解析を 4 薬剤ずつ 2 回に分けて実施し、さらにその他の化合物についても薬剤の種類ごとに 3 回に分けて曝露実験と GeneChip 解析を行ったが、この組み合わせがこの 1 時間後の遺伝子発現データによって形成されるクラスターと一致していた。この原因としては、薬剤曝露 1 時間後の遺伝子発現量とコントロールサンプルの遺伝子発現量に違いが少ないため、結果としてコントロールサンプルの遺伝子発現量の実験間差がデータの正規化の段階で影響している可能性が考えられた。これは曝露後 4 時間そして 24 時間と時間の経過に伴ってクラスターの構成に変化が確認されたことから示唆された。曝露開始後 24 時間では、クラスターはさらに明確になった。PPAR- $\gamma$  作用薬の誘導体である PY1 および PY9 が他の troglitazone、pioglitazone、rosiglitazone およびそれらの誘導体とは別のクラスターを形成したことは非常に興味深く、薬効等のデータも含めた検証が必要である。さらにもう一点興味深い現象として、dimethylnitrosamine と phenobarbital という異なる 2 つの発癌性の化合物が明確なクラスターを形成した点が挙げられる。この 2 つの化合物は共

に肝臓における発癌性が報告されているが、それぞれ遺伝子障害性と非遺伝子障害性ということで毒性発現のメカニズムは異なる。このような 2 つの化合物の間で確認された遺伝子発現パターンの共通性については、今後詳細な解析が必要となると考えられる。また、gemfibrozil は、げっ歯類に対する長期投与によって肝癌を誘発することが知られているが、ヒトでの肝癌の誘発は確認されていない。その gemfibrozil が dimethylnitrosamine および phenobarbital とクラスターを形成しなかった点は、肝癌の発現における種差に関するメカニズムを考えるうえで有用なデータになるものと考えられた。

1 時間あるいは 4 時間といった短時間の曝露で、薬剤の細胞に対する直接的な作用を遺伝子発現のレベルで捉えることができると考えたが、PCA 解析の結果から明らかなように、コントロールサンプルにおける遺伝子発現パターンとの違いを明確に区別することが出来なかった。従って 1 時間あるいは 4 時間の細胞内で進む化合物の細胞に対する直接的な作用を遺伝子発現のレベルで評価することは、今回のデータからは困難であると考えられた。ラットやマウスを用いた in vivo の実験に比べ、in vitro の実験では、実験者間の微妙な手技の違いや実験間のわずかな条件の違いが実験の結果に影響をおよぼすと考えられ、化合物による遺伝子の発現誘導あるいは抑制が起こるような生育環境の変化が与えられないコントロールサンプル(溶媒コントロール)では特にデータのバラツキが目

立つ結果となってしまう可能性が高い。すなわち、曝露開始後 1 時間あるいは 4 時間といった、発現している遺伝子の少ない条件では、コントロールサンプルの遺伝子発現のバラツキが解析結果に大きく影響してしまうと予想される。よって、*in vitro* の遺伝子発現解析で化合物に対する直接的な応答をモニタリングするには、コントロールサンプルにおける遺伝子発現の再現性を高めるための検討が必要になると考えられた。また、化合物の用量設定について十分に検討し、曝露開始後により多くの遺伝子発現が変動する条件で解析をするなどといった対策が必要になると考えられた。

## 1-2. 構築した肝毒性予測データベースについての考察

同じエンドポイント(例えば壊死、胆汁うっ滞 *etc.*)を引き起こす薬剤は様々あるが、その毒性は異なるメカニズムで誘発され、したがってその毒性発現に至るまでの遺伝子の発現もそれぞれ異なる。類似した条件で実施された別々の実験において、同じ遺伝子でも実験間で異なる発現変化が見られることがあり、過去の文献におけるデータとの比較は慎重に行わなければならない。そこで、本研究で得られたデータベースと過去の文献での報告を比較した。APAP は通常グルクロン酸抱合や硫酸抱合で代謝され、その薬効濃度においては基本的に無毒である。しかし用量が高くなると上記の経路が飽和してしまい、CYP(主に CYP3A4)で代謝される割合が増し、活性代謝物である NAPQ (N-水酸化体)が産生される。

この活性代謝物もグルタチオン抱合で容易に無毒化されるが、APAP の過剰摂取によりグルタチオンが枯渇すると生成量が解毒量を上回り、細胞内において重要な働きをするタンパクと結合し毒性(壊死)を誘発する。Harris らによれば、プライマリー肝細胞への APAP の曝露によって ID1 (Inhibitor of DNA binding 1)の発現が 3 倍になることを報告しているが、今回の我々の実験ではそれは確認されなかった。それに対し、我々のデータによれば、ID2 (Inhibitor of DNA binding 2)の発現が 2 倍になることが確認された。GADD45B (growth arrest and DNA damage inducible mRNA)の発現がコントロールに比べて 3.4 倍以上に亢進していた点は Reilly らがマウスを用いて行った実験の報告と一致した。また、APAP の過剰投与によりグルタチオンが枯渇すると oxidative stress reactant heme oxygenase-1 遺伝子の発現が誘導されるとされているが、我々のデータにおいても 2.1 倍の発現誘導が見られた点で一致した。APAP 以外では tetracycline がこの遺伝子を誘導したが(2.8 倍)、gemfibrozil においては発現抑制が確認され(0.4 倍)、それ以外の化合物では変動は見られなかった。Reilly と Coen は癌関連遺伝子である *c-fos* の発現が APAP によって誘導されることを報告しているが、*c-fos* には変化は確認されず、同じく癌関連遺伝子である *v-fos* のホモログが APAP により 16 倍、isoniazid により約 78 倍まで発現が亢進していた。その他、APAP と isoniazid の両方で発現が誘導される癌関連遺伝子としては *L-myc-1* が確認さ

れたが、Longuevilleらの報告では c-myc の誘導が報告されている。

Dimethylnitrosamine を除く他の化合物では、薬剤曝露による CYP の発現誘導が見られた。Chlorpromazine はラットの CYP2B と CYP3A を誘導することが知られているが、ヒト肝における promazine 類の代謝に最も関与するのは CYP1A1 であると Wojcikowski らによって報告されている。そして、我々の解析において Chlorpromazine の曝露によって最も強く誘導された CYP は CYP1A1 であった。PPAR $\gamma$  アンタゴニストである diclofenac と PPAR $\alpha$  のアゴニストである gemfibrozil は CYP の発現パターンが非常に類似していた。Diclofenac は主に CYP2C9 により代謝され 4' 位の水酸化を受けるが、一部 CYP3A4 により代謝され、5' 位が水酸化されることも明らかとなっている。我々の結果においても CYP2C9 の発現量は 11.8 倍まで亢進しており、また、CYP3A4 も 3.4 倍まで発現が亢進していることが示された。Diclofenac は他の非ステロイド性消炎鎮痛剤と同様に酸化ストレスの原因となるが、ストレス応答タンパクである heme oxygenase 1(HMOX1)の発現誘導は 1.9 倍とわずかであった。Diclofenac と APAP のみに共通して誘導が確認された応答性遺伝子としては転写活性化因子である ATF3 があつた。なお、ATF3 は DNA 損傷によって活性化されることが知られている。

一方で遺伝子それぞれの発現変動の予測が困難であることは、過去の文献によって報告された遺伝子発現の傾向が一致しないことが少なからず確認される

ことから明らかである。文献によって発現の誘導あるいは抑制についての報告が異なった遺伝子、または我々の本研究におけるデータとは反対の傾向を示した遺伝子について検討した。

Wortelboer らはラットを用いて isoniazid 投与時の遺伝子発現を解析し、CYP の発現に変化は見られないと報告しているが、Lake らによれば CYP1A2, 2B1/2, 2E and 4A がラットの肝臓で誘導されたと報告しており、また、Longueville も CYP3A1 の誘導を報告している。さらに同じく isoniazid を用いた実験であるが、Nishimura らはヒトにおいて CYP1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2E1 and 3A の発現が抑制されると報告しているが、Madan らによれば、CYP2E1 に関しては発現が誘導されると報告している。なお、我々の解析では CYP2A6, 2B6, 2C8, 3A4, 3A7, 4F2, 4F3 の誘導が見られたが、発現が抑制される遺伝子の中に CYP3A5 が含まれていることは、過去の報告で CYP3A が誘導されていることと相反するものでもあり、興味深い結果であった。また、GADD153 が 5.8 倍に発現誘導されており、用いた種は異なるものの de Longueville らの報告にある 3.2 倍の誘導と傾向が一致する。Dimethylnitrosamine の曝露による遺伝子についてはあまり変動は見られなかったが、発現変動が確認できた遺伝子に BUB1 と cyclin E2 という細胞周期の制御に深く関与している 2 つの遺伝子が含まれていた。特に cyclin E2 の高発現はヒトにおける癌の発生または進行に深く関連していることが知られているが、我々の

データでは dimethylnitrosamine だけが cyclin E2 の誘導を示し、他の化合物では誘導が見られなかったという点で興味深い。

我々が phenobarbital をヒトヘパトサイトに曝露した結果では CYP3A4, 3A5, 3A7 の誘導が確認されたが、この結果は Usui らが HepG2 cell を用いて解析した結果と一致した。

以上から、遺伝子発現データの解析にあたっては、単に一つの遺伝子の発現量に注目し、薬物に対する細胞の応答を予想することは極めて危険であり、慎重なデータの取扱いと深い考察が必要とされると言える。また、データベースの信頼性をより高めるために、サンプル数（実験の繰り返し回数）やサンプルの調製、さらにデータの正規化やフィルターによる解析対象遺伝子の絞り込みなどについても、今後更なる検討が必要と考えられた。

### 1-3. 肝毒性予測モデルの検討について

データベース化された遺伝子発現データを利用し未知化合物の毒性や薬効を予測するには、メカニズムレベルでの検証が非常に重要であると考えられるが、医薬品開発時に化合物ライブラリーの毒性をスクリーニングする場合にはより効率の良い方法が求められる。本研究では、毒性や薬効などが類似する化合物群と類似しない化合物を遺伝子発現レベルで効率良く予測するための手法として、遺伝子発現データを用いたモデル作成を検討した。

モデル作成には ADMEWORKS / ModelBuilder を使用した。本ソフトウェアは化学性に基づいた化合物群の解析と予測モデルを構築するための化学データ解析支援／予測モデル作成システムであり、本来は化合物の構造情報からディスクリプターを発生させ予測モデルを作成するソフトウェアである。今回は GeneChip 解析で得られた 23 化合物の遺伝子発現データ(24 時間後)をサンプルとして用い、パラメーターにはクラスター解析および主成分分析に用いた遺伝子を使用した。

4種類のモデルを作成した。1 つ目のモデル(model\_a)は肝毒性を誘発するとされている化合物を「1」と設定し、そうではない化合物を「2」としている。ただし gemfibrozil はヒトにおける肝癌の誘導は報告されていないため、肝毒性化合物とはしなかった。また、重篤な肝障害を誘発することが報告され、医薬品としての販売が中止となった troglitazone は肝毒性薬剤とした。また、pioglitazone、rosiglitazone や SAHA、tamoxifen の誘導体については肝毒性が無いと仮定してモデルを作成した。その結果、Cross validation error が 4 つ検出され、prediction ratio も約 83%と低く、この原因については、使用したパラメーターの中にこの 2 つの「クラス」、即ち肝毒性の発現とそうではないことを十分に説明することのできる遺伝子発現データのセットが無いことが原因であると思われた。化合物による毒性の発現機序やあるいは毒性の発現を回避する機序に関与する肝細胞の遺伝子レベルでの応答は、処理

される薬剤や発現する毒性の種類によってそれぞれ異なることは言うまでもなく、本研究における階層型クラスター解析や主成分分析の結果からもそれは明らかである。つまり「model\_a」の結果は、肝毒性の発現という現象と発現しないという現象を、少なくとも遺伝子発現レベルでは明確に分けることが困難であることを示す結果であると。肝毒性をタイプ別に予測するためには、各毒性につき複数の化合物を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施し、予めタイプ別のクラスターが作られることを確認した上で実際にモデル作成とその検証を行わなければならない。しかし、今回の実験では各毒性につき1化合物の設定であり、その検証は実施不可能であった。そこでその代わりに、それぞれの誘導体と明確なクラスターを形成した SAHA、troglitazone 類および tamoxifen について、それぞれのクラスターを他と区別するモデルの作成を行い、その精度を確認した(model\_b~d)。その結果、何れも model\_a に比べて cross validation error が少ない結果が得られた。特に主成分分析において明確なクラスターを形成した SAHA とその誘導体はエラーがわずか1つであり prediction ratio も 95.7%と良好な結果が得られた。これはあくまでも、今回の研究で使った 23 種類の化合物の中で、SAHA とその誘導体 4 種の計 5 化合物とその他の 18 化合物とを遺伝子発現データを基に分類するためのモデルであり、肝毒性を予測するものではない。しかしこれらの結果は、今後の実験及び解析方法の検討によっては遺伝子発現解析データを基

に精度の高い肝毒性予測モデルを構築することができる可能性を示唆するものと言える。先述のとおり、このような予測モデル作成には今後より多くの肝毒性薬剤、あるいは肝毒性陰性の薬剤を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現レベルでの毒性を分類する必要がある。そのためには非常に多くの遺伝子発現データが必要となるが、それを実現できれば、その分類に必要な最小限の遺伝子を Modelbuilder によって抽出し、そのパラメーター遺伝子の発現量のみで肝毒性を予測することが可能となる。さらにパラメーターのみの定量であれば、TaqMan RT-PCR などの定量 PCR 技術を用いることで、多検体の同時測定が可能となり、毒性スクリーニングの HTS 化の実現を期待できる。

課題としては、マイクロアレイのデータベースを構築する際のデータ信頼性の向上が挙げられる。マイクロアレイによる遺伝子発現定量解析は、ハードおよびソフト共に著しい進歩により精度の向上が続いているものの、決して十分なものとは言えない。よってサンプル数、データの解析方法も含めた実験条件の最適化について今後さらに検討を重ねなければならない。

さらにもう一つの課題として、モデルに用いるパラメーターの抽出方法がある。今回の得られた 4 つのモデルでは予測因子として残るパラメーターが 2 個あるいは 3 個と非常に少ない。これは遺伝子解析のデータをもとに 2 つの現象を説明するにはこれだけのパラメーターで必要十分であるということで、理論上は正しい結

果である。しかし、特に *in vitro* 試験においては培養の条件の微妙な違い、細胞のコンディションの違いが遺伝子発現に影響を与えるため、今回の方法で Modelbuilder より得られたモデルを用いて毒性を予測することは精度および信頼性の点でまだ不十分であると考えられる。よって、今後は実験間誤差の影響をある程度緩衝できるようなモデル作成法を検討する必要があると考える。例えばモデル作成の過程では correlation test と呼ばれる検定を行い、各実験間における遺伝子発現の相関の高い複数の遺伝子群の中から自動的に一つの遺伝子のみを残して他の全てを除外している。このようなパラメーターを利用して複数のモデルを評価に用いることや、パラメーターの数ももう少し多くなるように ModelBuilder の条件を検討するなどが考えられる。これらについては今後検討が必要である。

#### 1-4. 細胞培養・薬剤曝露のハイスループット試験系の開発についての考察

本研究では、医薬品開発時における毒性試験の HTS (high-throughput screening) 化の検討も実施した。In vitro での毒性スクリーニングを行う際には、播種した細胞の培地交換、薬剤の曝露および細胞溶解液やアッセイ用試薬の添加といった作業を伴うが、これらの作業に必要な労力は非常に大きく、スクリーニングの効率を大幅に低下させる。この問題をクリアし、*in vitro* での毒性スクリーニングの HTS 化を実現するため、アッセイ用ロボット Workstation Genesis を用いて作業の自動化を行い、本研究にお

ける遺伝子発現解析のための細胞培養において大きな成果をあげた。また、細胞からの核酸サンプルの抽出および精製も迅速に対応可能な状況にある。MTT アッセイのような一般的な細胞毒性試験の HTS 化が可能であるだけでなく、肝毒性の発現メカニズムが化合物で解明され、マーカーとなる遺伝子を得ることができれば、HTS 系により遺伝子発現解析を高効率で行い、遺伝子レベルでの毒性予測スクリーニングを効率よく行うことができると思う。本プロジェクトでは、このような HTS のためのハードの整備という面においても成果を得ることができた。

#### 1-5. 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の考察

肝毒性と同様に薬剤の投与による副作用が問題となっている腎毒性のメカニズム解析および毒性予測も非常に重要な課題である。腎は化学物質の主要な排泄器官の 1 つであることから、薬剤の影響を受ける機会が多く、また、その発達した代謝機能により活性代謝物の障害を受ける機会も多い。また、浸透圧や酸塩基平衡といった生理機能の維持に重要な働きをしていることから、これらの機能の障害は生体の機能に大きな影響を与える。このように腎臓は肝臓と並んで薬剤による毒性が発現しやすい臓器と言え、薬剤による毒性発現の早期予測が求められている。

本プロジェクトにおいてはヒトプライマリー腎細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析のための培養系の検討を行い、薬剤

(benzyl penicillin)に対する時間依存的なトランスポーター取り込み活性を観察することができた。この結果は、プライマリーヒト腎細胞とその培養系がヒトの腎臓における薬剤に対する応答反応の解析に非常に有用であることを示すと共に、プライマリーヒト肝細胞と同様に、トキシコゲノミクス的手法を用いることによって、薬剤による腎毒性発現メカニズムを遺伝子発現レベルで解析することができる可能性を示唆する。しかし膨大な遺伝子発現データを用いて腎毒性の早期予測を実現するには、今回のプライマリーヒト肝細胞を用いた解析と同様に、培養条件や薬剤の用量および薬剤処理時間等の設定について、より詳細な検討が必要である。

## 2. 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

### 2-1. 遺伝子発現変化の解析手法

GeneChip を用いた解析では、一般に個体別データや再現性を見るために複数のチップを用いてデータを取得することにより、発現変化を示した遺伝子を統計的な手法を用いて選択可能になり、データの信頼性も増す。しかし、チップ自体が高価なこともあり、データポイントに対して複数枚のチップを使うことにより、用量やサンプリングタイムの選択が限られることになる。これまでの我々の検討、および他の GeneChip を用いた解析により、RT-PCR データとの相関性の高さからチップデータの信頼性が高いこと、また、マウス個体間でのばらつきが比較的

小さいことがわかっている。一方で、用量、サンプリングタイムを変化させた場合に結果が大きく変化する傾向にあり、各データポイントでの信頼性を増すよりも、より広く用量、サンプリングタイムを設定する方が有益な情報が得られると考えられている。本研究では、各データポイントに対して一枚のチップのみを用いたことにより、発現変化した遺伝子の選択にあたっては、統計的な手法を用いる事ができず、発現比の値からの判断が必要となった。一般に用いられている方法では、単純に一定の比の値にて判定されるが、この場合、発現の弱い領域でのノイズの問題と、発現の高い領域での選択漏れの危険性が生じる。そこで、単純に発現比のみではなく、シグナル強度を考慮して段階的に有意水準を変化させる手法を開発した。最終的に回帰曲線を用いることにより、発現強度に応じて連続的に有意水準を変化させ、遺伝子を選択する方法を確立した。これにより、発現変化ありと選択された遺伝子に関する信頼性を増すことができた。また、こうして選択した遺伝子に関し、共通する作用を持つ化合物間での共通性を調べることにより、再現性を持たせることができる。

### 2-2. TK6細胞での遺伝子傷害性物質に関する検討

これまでに多くの遺伝子傷害性物質に関して検討を行ってきたが、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った。しかし、遺伝子傷害性物質のみに比較的共通性を持って変化する遺伝子群を

指標遺伝子として選択できた。本年度は、これら遺伝子の有用性を検討するため、まず RT-PCR 法によりチップデータの再現性を確認したところ、良い相関が得られ、GeneChip データの信頼性が確認できた。一方で、発現変化の見られなかった化合物に関してはやはり変化がないことが確認された。この理由として、解析に単一の用量とサンプリングタイムのみしか用いていない点が考えられたため、RT-PCR法を用いてより広い濃度範囲およびサンプリングタイムに関して検討を行ったところ、高用量および遅いサンプリングタイムにて陽性を示す例が観察できた。この結果より、遺伝子発現解析においては、より広い用量およびサンプリングタイムに関して検討を行う重要性が示唆された。しかし、一般にチップが高価であるため、詳細な検討を行うことが難しいため、今回のように、ある程度の解析から対象とある遺伝子を絞り込み、RT-PCR の手法を使ってより広範な解析を加えていくことは、有用であると考えられる。

### 2-3. グリタゾン系糖尿病治療薬による遺伝子発現解析による肝毒性の検討

PPAR $\gamma$  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。本研究ではこの毒性発現のメカニズムを、遺伝子発現解析を用いて検討する事を目的とした。トログリタゾンは従来の動物実験では肝毒性が予見できず、フェノタイプと

して毒性は見られなくても、遺伝子発現レベルでは何らかの変化が起きている可能性があり、発現解析により毒性のメカニズム解析に迫れる可能性があると期待される。一方、トログリタゾン以外のグリタゾン系化合物についても、ヒトでの肝毒性を持つ可能性も示唆されており、共通のメカニズムおよびトログリタゾン特異的なメカニズムでの肝毒性の解析を行った。その結果、共通した変化として脂肪酸合成に関わる遺伝子の変化がクローズアップされた。もともとPPAR $\gamma$ 作用薬は脂肪細胞での脂肪合成を活性化するが、肝臓においても脂肪酸の合成を促進すると考えられる。一般に糖尿病患者では、脂肪肝を伴う場合が多く、さらに脂肪酸合成が促進される事により、脂肪肝の症状が悪化すると考えられる。事実、ピオグリタゾンは肥満モデルマウスを使った検討で肝毒性を示すことが報告されており、グリタゾン系薬剤共通のメカニズムとして、脂肪肝の悪化による毒性発現のメカニズムが考えられる。正常のマウスおよび健常人では、肝臓における脂肪の蓄積が少ないため、これら薬剤による脂肪合成の亢進が重篤な毒性としては現れず、調節可能であるためフェノタイプとしての毒性が予測できなかったとも考えられる。

一方、トログリタゾンに特異的に変化する遺伝子を解析した結果、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、酸化的傷害応答遺伝子、炎症関連遺伝子などが特徴として見つかった。これらから類推されるメカニズムとして、活性酸素を介したミトコンドリアの酸化的

傷害によりアポトーシスが引き起こされ、肝細胞の傷害が起きるとともに、局所での炎症反応が引き起こされることが考えられる。実際に、トログリタゾンだけが、他の薬物と異なりキノンタイプの活性代謝物が生成するため、そこから活性酸素が発生して肝細胞に傷害を与えたと説明することができる。生体側の防御機構によりこの作用単独ではそれほど重篤な肝毒性は起こらないにしても、脂肪肝の悪化との相乗作用により、若しくは関連した防御機構に障害のある個人において重篤な肝毒性へと結びつくことが考えられる。今後、この仮説を元にヒトにおける重篤な肝毒性メカニズムの解明にアプローチできることが期待される。

以上の結果より、正常な個体ではフェノタイプとしては現れない毒性も、遺伝子発現レベルでは何らかの変化が起きており、発現解析から従来は困難であった毒性の予測が可能になることが示唆され、遺伝子発現解析を用いたトキシコゲノミクス研究の有用性が示された。

#### 2-4. 乳癌治療薬タモキシフェン誘導体による遺伝子発現解析

タモキシフェンはエストロゲンリセプター (ER) に対するアンタゴニストとして作用することによりホルモン依存的な乳癌細胞の増殖を抑える。しかし、子宮においては逆にアゴニストとして作用し副作用を引き起こす事が知られており、同じ薬物でも作用する組織により効果が異なる。これは、化合物自身の構造による ER との相互作用、主に働く ER のサブタイプおよびコアクチベーター、コリプレッサー

などとの相互作用によりもたらされ、薬物の微妙な構造変化により各種組織に対する作用が異なることが予測される。一方、タモキシフェンはラットに対して肝発現性を示すという事実から DNA との反応性も調べられており、 $\alpha$  位の水酸化が代謝活性化のメカニズムと考えられている。そこで、この水酸化が起こりにくい構造修飾を行った化合物を用いて、遺伝子傷害性の変化を遺伝子発現の変化から検討したが、肝臓においては明確な差異は認められなかった。マウスでは肝癌ができず、遺伝子傷害性も弱いという事実もあり、今回の処理条件ではそれを検出できるだけの変化が見られなかった可能性もある。

一方、合成化合物である  $\Delta C_{2}H_{5}$  体のみ特徴的な変化として、代謝酵素である CYP2b 類の誘導が見られた。一般に、タモキシフェン誘導体はヒトでは CYP3A4 で代謝されるが、そのマウスホモログは発現に変化が見られなかった。これは、おそらくこれらの代謝酵素の定常レベルでの発現量が多いためであると考えられる。これに対しマウスで誘導がかかった CYP2b10, 20 のヒトホモログは CYP2b6 であり、フェノバルビタールで誘導がかかる事が知られているが、定常レベルでの発現が低いため誘導がかかりやすいと考えられる。一般に酵素誘導がかかる場合には、他の薬物の代謝が影響を受けるため望ましくない作用と考えられるが、酵素誘導に関する構造活性相関にも興味を持たれる。

子宮においては、Tam, 4OH に関して顕著な子宮肥大作用がみられ、アゴニス

トとして働いてエストロゲン様作用を示したと考えられる。事実、ER 関連遺伝子に関しても動きが見られていたが、作用の弱かった Tre,  $\Delta C_2H_5$ との間に明確な区別はみられなかった。Tre,  $\Delta C_2H_5$  に関しては子宮に対する副作用が低いことが期待されるが、ER を介した作用調節のメカニズムは複雑であるため、フェノタイプを遺伝子発現から予測するため有効なマーカーの選択には、さらに検討が必要である。現時点においては、子宮肥大という肉眼的所見の方が、遺伝子発現よりも明確な解答を与えている。

## 2-5. ヒトとマウスの遺伝子発現情報の直接比較

マウスとヒト遺伝子のホモログの情報から、両者のデータを結びつけ、比較することが可能となった。今回は、グリタゾン系薬物とタモキシフェン誘導体に関して、マウスを用いた *in vivo* での検討とヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* での検討を平行して行い、得られたデータから両者の直接比較を行った。その結果、両者の相関性は非常に低いことがわかった。種の違いおよび *vivo* と *vitro* の違いという二つのファクターがあるため一概には言えないが、両者を結びつけることの難しさが浮き彫りとなった。トキシコゲノミクス研究では、遺伝子発現を手がかりに最終的にヒトの *vivo* での毒性を予測することを目的としているが、そのためにはまだ今後乗り越えなければならない課題も多い。ヒトでの予測を行うためには、可能であれば直接ヒトでの試料を使った解析が有効であると考えられ、そのためには今

後非侵襲的な試料を使った解析の重要性が高まったと言える。肝臓での毒性を予測するために肝臓組織を採取することは難しいため、血液や尿中にて有効となる変化を追う必要性がある。その意味では、遺伝子発現という指標ではなく、タンパク、代謝産物を対象としなければならず、プロテオミクス、メタボノミクス解析という方向性が重要であると考えられる。

## D. 結論

プライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現解析では、昨年度までに構築したプライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現解析系を用い、肝毒性発現予測のための遺伝子発現データベースを作成した。この際、細胞培養・薬剤暴露用ロボットにより細胞培養の HTS 化について検討を行い、実験作業の高効率化を実現することができた。今回使用したロボットは周辺機器の拡張によって RNA 抽出および標識 cRNA 調製への対応が可能であり、今後より多くの化合物を用いた遺伝子発現データベースの構築に大きく貢献することができる。

構築したデータベースについては、PPAR $\gamma$  作用薬、HDAC 阻害剤、抗エストロゲン作用薬とそれらの誘導体を用いて検証を行った結果、構造の類似した化合物間でそれぞれ遺伝子発現プロファイルが近似しており、本データベースを構築した際のデータ解析方法が有効であったことが示された。

また、モデル作成ソフト (ModelBuilder) を利用し、肝毒性予測モデル構築とその実用化の可能性について検討を行った。

この結果は、データベースに用いる精度の向上や解析手法の最適化の検討を続けることで、遺伝子発現レベルでの毒性予測システムの高精度化とマーカー遺伝子を利用した毒性試験の HTS 化が可能であることを示唆する。

さらに、プライマリーヒト腎細胞を用いた薬剤暴露と遺伝子発現解析系についても検討を行った。網羅的遺伝子発現解析によって腎毒性発現メカニズムを解析するための基礎検討として培養系の検討を行った。その後、benzyl penicillin を用いてトランスポーターの取り込み活性を測定した結果、時間依存的な取り込み活性を確認することができ、今後の網羅的遺伝子発現解析を用いた毒性発現メカニズム解析に有用であることを示唆するデータを得ることができた。

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については、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、遺伝子発現強度に応じた有意水準にて選択することにより、ある程度信頼性をもった解析手法を確立することができた。1万を超える遺伝子群から、有意な変化を示す遺伝子を網羅的に検出できる手法は非常に有益であり、直接メカニズムの解明にはつながらなくても、データベースとして蓄積された各種薬剤による発現変化の情報は、トキシコゲノミクスプロジェクト等で構築される大規模な外部データベースとともに、今後の毒性研究にとって有益な情報となることが期待される。

我々の検討においては、まず遺伝子傷

害性物質については、in vitro のヒト培養細胞を用いた系においてスクリーニングを行う際に有効となる指標遺伝子を選ぶことができた。今後はさらに多くの薬剤についてその有効性を検討することで、マーカーとしての有効性が検証されることを期待する。なお、この際には網羅的なチップを使用する必要はなく、より簡便迅速で安価な定量的 RT-PCR を用いた方法が有効である。

次に、グリタゾン系化合物の肝毒性の解析に関しては、マウスにおいてはフェノタイプの変化としては現れないものの、遺伝子発現は変化していることがわかり、毒性予測における有効性が示された。グリタゾン系化合物共通にして、脂肪酸合成関連遺伝子の変化が認められ、糖尿病患者での脂肪肝を悪化させることが共通した肝毒性のメカニズムとして考えられた。一方、トログリタゾン特異的な肝毒性に関しては、この薬物のみから生成するキノンタイプの代謝物の関与が考えられ、特徴的に変化した遺伝子の機能より、活性酸素を介したミトコンドリアの酸化的傷害により、アポトーシスを引き起こし、肝細胞の傷害が起きると予想した。脂肪肝との相乗作用によりトログリタゾンに特異的な重篤な肝障害へとつながったと考えられる。

## E. 健康危険情報

なし。

## F. 研究発表

それぞれの分担研究報告書に記載した。

別添 4

II. 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 薬物動態研究所研究開発部長

### 研究要旨

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・腎細胞を用いて「薬剤曝露時における網羅的な遺伝子発現解析」を実施し、さらにその細胞培養・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、チアゾリジンジオン系 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。

### A. 研究目的

本研究では、細胞培養ロボットと薬剤曝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た。さらに今年度は、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を行った。

### B. 研究方法

#### <概要>

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た。その後、細胞から total RNA を抽出し、GeneChip 解析に用いるビオチン標識 cRNA サンプルを合成した。ビオチン標識 cRNA サンプルは薬剤および時点毎に各細胞由来のサンプルを等量ずつ混

合し、GeneChip HG-U133A array を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。なお、より精度の高い解析を行うために、肝毒性薬剤 8 剤を用いた実験については 2 回繰り返した。スキャン後に得られた遺伝子発現データは GeneSpring を用いて RMA 法によって正規化した。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。以下にその詳細を示す。

#### <肝細胞の培養に関して>

・接着型凍結プライマリーヒト肝細胞

使用細胞：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))、Tissue Transformation Technologies, Inc. (代理店：(株)ケー・エー・シー)、Research Institute Liver Disease Co.,LTD (RILD) (代理店：第一化学薬品(株)) より購入し、予備検討後、3 ロット (Lot.59、100、RUJ、何れも In Vitro Technologies, Inc.) を選択し、使用した。細胞は液体窒素中に保存し、研究を行うたびに解凍して使用した。

使用培地：Hepatocyte basal medium (Cambrex, CC-3199) に SingleQuots (Cambrex, CC-4182) を添加し、Hepatocyte culture medium (HCM) を調製した。本培地は調製後 4℃にて保存し、1 ヶ月以内に使用した。

細胞培養用プレート：コラーゲン type-I プレート (住友ベークライト, MS-0024L) を使用した。プレートは細胞播種の 1 時間

以上前に使用培地を入れて 37℃、5% CO<sub>2</sub> でプレインキュベートしたものをを用いた。

#### <披験物質>

以下の化合物を使用した。各化合物の構造式および曝露濃度は表 1 に示した。

・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

Phenobarbital

Tetracycline

※gemfibrozil は陰性コントロールとして用いた。

・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

a-Me

c-Me

PY-1

PY-9

上記 4 化合物は分担研究者宮田からの供与化合物

HDAC (histone deacetylase) 阻害剤

SAHA

HDAI-1

HDAI-2

HDAI-3

HDAI-4

上記 4 化合物は分担研究者宮田から

の供与化合物  
抗エストロゲン作用薬

Tamoxifen

Tamoxifen-H (Tam-H)

Tamoxifen-OH (Tam-OH)

上記2化合物は分担研究者奥田から  
の供与化合物

#### <披験物質処理に関して>

Isoniazid を除く全ての化合物は DMSO の最終濃度が 0.1%になるように DMSO に溶解後、培地で希釈して細胞に曝露した。Isoniazid に関しては培地に溶解した後、最終濃度が 0.1%になるように DMSO を添加して用いた。薬剤処理は 1, 4, 24 時間行った。

#### 細胞培養：

細胞の解凍は 37℃の温水中ですばやく行い、氷冷した培養液に穏やかに滴下し、懸濁した。その後、遠心分離(4℃, 500 rpm, 3 min) を行い、培地上清を捨て、さらに培地 6mL (氷冷) をゆっくりと滴下し、再懸濁した。生細胞数を血球計算版にて計数し、氷冷された HCM を用いて  $2.0 \times 10^5$  cells/mL に調製した。この後の培地交換、薬剤曝露、細胞の溶解、細胞溶解液の回収までの操作は細胞培養・薬剤暴露用ロボット (TECAN WORKSTATION GENESIS : テカン社製) を用いて作業の迅速化と標準化を図った。ロボットによるこれらの作業を自動化するために、上記の各ステップに対応する script を設定し、一連の作業をコンピューターで制御した。調製した細胞懸濁液は  $4 \times 10^5$  cells/2.0mL/well で、6well プレートに播種した。この際のプレートレ

アウトは下図のとおりである。プレートは 5% CO<sub>2</sub>、37℃ で静置した。その後、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去した。被験物質処理は、細胞播種 24 時間後にプレートの各ウェルから培地を除去し、被験物質を添加した培地を添加することで開始した。

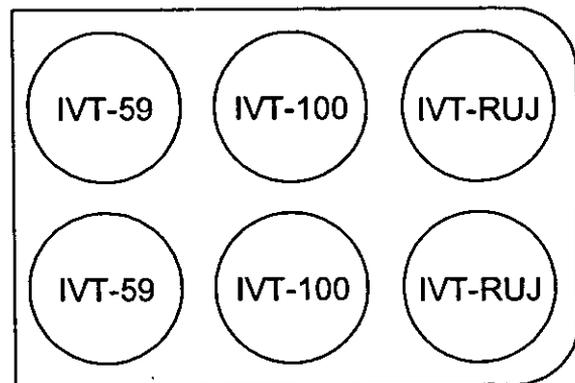


Plate layout for one chemical at one time point.

#### <Total RNA の抽出>

披験物質を規定時間処理した後、同じロットの細胞を培養した 2well に対して合わせて 1000  $\mu$ L の TRIzol 試薬 (Invitrogen, 15596-026) を添加し、ピペッティングによって細胞を完全に剥離、均一な溶液とした後、2 well 分の溶解液を合一し、細胞溶解液とした。得られた細胞溶解液はドライアイスを用いて冷凍し、total RNA 抽出作業に入るまで -80℃ で保存した。total RNA 抽出にあたっては、まず凍結保存したサンプルを解凍後、200  $\mu$ l の CHCl<sub>3</sub> (Cica, 07278-00) を添加しボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌した。室温で 5 分間静置した後、15 分間遠心分離し (16,000 g, 4℃)、上層 (水層) を別のバイ

アルに分取した。次にこのバイアルに 50% EtOH を 600  $\mu$ l 添加し、ピペッティングによって素早く混合した。この EtOH/細胞溶解液から RNeasy Mini Kit protocol (Qiagen, 7416)を用いて total RNA を単離した。EtOH/lysate をキット添付のカラムに添加し、遠心分離によりフロースルーを除去した。カラムに Buffer RW1 を 700  $\mu$ l 添加して、洗浄のため 8000 $\times$ 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 500  $\mu$ l 添加し、8000 $\times$ g 以上の回転速度で遠心し、フロースルーを捨てた後、この操作をもう一度繰り返した。次に、残存している EtOH を完全に除去するために、カラムを新しいコレクションチューブに移し、2 分間遠心した。カラムのメンブラン上に RNase-free H<sub>2</sub>O を 30  $\mu$ l 滴下し、1 分間静置した後、遠心分離によって回収し、total RNA の単離を完了した。単離した total RNA は、-80 $^{\circ}$ C にて保存した。なお、total RNA 濃度 (A<sub>260</sub>) は NanoDrop ND-1000 を用いて測定し、この際、A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> の値が 1.9 以上であることが確認されたサンプルのみ、これ以降の操作に用いた。

#### <標識 cRNA の調製と遺伝子発現データの取得>

GeneChip 測定に用いるビオチン標識 cRNA サンプルの調製と遺伝子発現データの取得は Affymetrix 社のマニュアルに基づいて行った。異なる 3 ロットの細胞から調製したサンプルは曝露した化合物および時点ごとに等量 (5  $\mu$ g) となるように混合し、GeneChip HG-U133A Array を用い

てハイブリ、ウォッシュ、測定を行った。

#### <細胞培養・薬剤曝露用ロボットの利用 (HTS 化に向けた検討)>

本研究の細胞培養および薬剤曝露においてはアッセイ (細胞培養・薬剤曝露) 用ロボットを利用した。トキシコゲノミクスでは、生体が毒性物質に晒されることにより鋭敏に反応するマーカーとして遺伝子発現量を捕えるが、それ故に細胞培養における実験者間および実験間の手技の違いが解析データに与える影響も大きいと考えられる。また、実験に必要なとされる多大な労力は解析のスループットにもマイナスの影響を与える。よってこれらの作業を可能な限り標準化し、網羅的遺伝子発現解析データの信頼性を高めるとともに、解析効率を大幅に向上させることを目的として、細胞培養・薬剤曝露用ロボットを用いることで細胞培養時の細胞の播種、培地交換、薬剤曝露、細胞溶解液の調製を自動化した。

#### <遺伝子発現データの解析>

スキャン後に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 Ver.7.2 (Silicon Genetics 社製) 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 ver.1.0 (富士通九州システムエンジニアリング社製) を用いた。

(※) *Biostatistics*, 4(2): 249-264. Irizarry,

RA et al. (2002)

*Bioinformatics*, 19, 185–193. Bolstad

BM et al. (2003)

＜プライマリーヒト腎細胞を用いた薬剤曝露による網羅的遺伝子発現解析系の検討＞

この方法については「結果」の項に併記した。

＜倫理面の配慮に関して＞

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および腎細胞は、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。

## C. 結果

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。そして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遺伝子発現データベースの構築を行った。

プライマリーヒト肝細胞は、よりヒトに近い材料として極めて有用であるが、個体間差が存在するため、個体間差に埋もれてヒトに共通する薬剤のレスポンスを検出することが難しい場合がある。それを避けるためには、特定の個体から得られたプライマリーヒト肝細胞によって全てのデータ取

得を継続的に行うことであるが、細胞の量に限りがあるため、現実的ではない。また、複数の個体由来の細胞を用いて、それぞれ網羅的遺伝子発現解析を行い、より一般化されたデータベースを構築することも考えられるが、GeneChip 解析に必要となる 15  $\mu\text{g}$  の標識 cRNA を調製するためには、同一個体由来のプライマリーヒト肝細胞を大量に確保しなければならず、サンプルの量的にも GeneChip も含めた全体的なコスト面においても大きな問題となるため、これも現実的ではない。よって本研究ではこれらの点を考慮し、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 調製後にそれぞれ 5  $\mu\text{g}$  ずつ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。

3 ロットの細胞を選択するにあたっては、入手可能な 8 ロットの接着型凍結ヒトヘパトサイトを用いて検討を行った（表 2）。まず、本研究においては生細胞数が非常に重要であることから、viability の低い Gen-44 (72%)、IVT-FEP (74%) さらに比較的細胞数そのものが少ない TTT-185 を選択肢から除外した。次に、残った 5 ロットの細胞を用い、培養開始 24 時間後の遺伝子発現を GeneChip HG-U133A Array を用いて測定した。そのデータを主成分分析法によって解析した結果、HH-011 と TTT-202 の遺伝子発現パターンが他の 3 種類に比べて大きく異なることが分かった。（図 1）この結果より、極端に大きな個体間差がデータに与える影響を考慮し、遺伝子発現パターンが比較的類似した IVT-59、IVT-100、

IVT-RUJ を本研究で使用することとした。

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。また、細胞に対する曝露濃度はそれぞれ過去の文献を参考にした。(表 1)

代表的な肝毒性とその原因となる薬剤

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：

phenobarbital

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、チアゾリジンジオン系 PPAR $\gamma$  作用薬の 3 薬剤と宮田らが合成した誘導体を 4 種類、HDAC (histone deacetylase) 阻害剤である SAHA と宮田らが合成した誘導体を 4 種類、抗エストロゲン作用薬である tamoxifen と奥田らが合成した誘導体を 2 種類それぞれ用い、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、total RNA の抽出、cDNA 合成、ビオチン標識 cRNA を合成した後、化合物および時点毎に各細胞由来のサンプルを等量ずつ混合し、GeneChip HG-U133A array 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、8 薬剤すべ

てで発現量の変動が少なかった (コントロールの 0.67 倍から 1.5 倍) 遺伝子については解析の対象から除外した。さらに、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

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。

(図 2) 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 dimethyl nitrosamine、phenobarbital 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。発現変動の程度が低かったものについても、発現変異の程度が大きくなるまで (細胞の機能破壊やアポトーシス、壊死に達するまで) その変動を検証する必要があると考え、発現変動の小さい被験薬物については、濃度の最適化が十分でなかった、あるいは設定時間が 24 時間では十分ではないことが原因と考えられた。しかしながら、現時点において毒性検出系に必要な遺伝子発現量がどの程度必要かということは明確ではなく、大きな発現変動が見られることが必ず

しも毒性検出系として良好であるとは考えられなかった。また、この設定を今回の試験で実施することは、3時点、被験薬物1濃度という限定されたスケールを考えると不可能であった。適切な設定を実施するためには、より多くの薬物、時点、濃度について検討する必要があると考えられた。しかしながら、今回得られたデータは、今後、どのような方向性を持って、解析系について検討を行い、データベースを構築すべきか、という点で多くのヒントを提供するものと考えられた。従って、今回得られたデータについて、さらに詳細に分析を進めることとした。なお、検証用に肝毒性未知の化合物として解析した化合物においても同様の結果が得られた。(図2)

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1way-ANOVAによって解析した。(表3) 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phenobarbitar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。

遺伝子リストおよび肝毒性関連遺伝子発現

## データベースの作成

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。この知見から、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ることとした。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(GeneSpringに登録されているGene Ontologyのサブクラス「GO SLIMS」を利用)、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。(表4)

## 階層型クラスター解析の結果

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。(図3)

この結果からはまず、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は、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。今回の実験は、作業上の都合から被験薬物を幾つかのグループに分けて実施しているが、このクラスターは実験実施時グループ分けに一致した結果であった。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主成分分析によって、より明らかにすることができた。

### 主成分分析の結果

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 (図 4)。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。また 0.1%DMSO を含む溶媒コントロールもそれぞればらばらに位置していた。しかし、24 時間後になるといくつかの傾向が見られた。その傾向とは第一に、コントロールサンプルが原点 (0,0,0) 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とである。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。次に、それらコントロールサンプルに加え、SAHA とその誘導体、PPAR $\gamma$ 作用薬(thiazolidendion)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ことである。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。

### データベースを用いた肝毒性予測の検討

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。モデルの作成方法であるが、2 クラス分割法、つまり 2 つの異なる現象を予測するためのモデル作成法を用いた。例えば、a と b それぞれ 2 つの現象 (b は a ではない現象) を予測するのであれば、a という現象を起こすことが分かっているサンプルは「クラス 1」とし、a ではない現象を起こすことが分かっているサンプルは「クラス 2」と予め設定することで、それを説明することのできるモデルを算出する。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 (correlation test)。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。

今回は表 5 に示すように 2 つのクラスを仮定し、以下の 4 つのモデルを得た。

Model\_a :

$$Y = 0.19837 + 0.730031X_1 + 0.168914X_2 + 0.631801X_3$$

X<sub>1</sub>…203252\_at (NM\_005851 NCBI)

X<sub>2</sub>…214008\_at (N25562 NCBI)

X<sub>3</sub>…218387\_s\_at (NM\_012088 NCBI)