

Prediction Ratio : 82.61

Model\_b :

$$Y = 0.721847 + 0.520018X_1 + 0.166623X_2 + 0.425152X_3$$

X<sub>1</sub>…221964\_at (AI591305 NCBI)

X<sub>2</sub>…221988\_at (AA463853 NCBI)

X<sub>3</sub>…222118\_at (AK023669 NCBI)

Prediction Ratio : 86.95

Model\_c :

$$Y = 0.528268 - 0.172258 X_1 + 0.831421 X_2$$

X<sub>1</sub>…222352\_at (BE465371 NCBI)

X<sub>2</sub>…46256\_at (AA522670 NCBI)

Prediction Ratio : 95.65

Model\_d :

$$Y = 0.558062 - 0.102747 X_1 + 0.303256 X_2 + 0.765536 X_3$$

X<sub>1</sub>…219398\_at (NM\_022094 NCBI)

X<sub>2</sub>…221788\_at (AV727934 NCBI)

X<sub>3</sub>…51200\_at (AI744084 NCBI)

Prediction Ratio : 86.96

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

本研究では、Human renal cortical cell(HRCC) (In Vitro Technologies, Inc.) 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。

培養は In Vitro GRO RC medium (In Vitro Technologies, Inc.) 中 75cm<sup>2</sup> のカルチャーラスコを用いて培養した。10% コンフルエントにあたる細胞 (図 5) を播種

した後、7 日目に 0.25% トリプシンで継代し、HRCC を維持した。

トランスポーター活性を測定するために、5×10<sup>4</sup> cell/well の細胞密度で 24well プレートに播種し、2 日後に実験を行った。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 (4℃) に対し、時間依存的な取り込み活性が確認された。(図 6)

#### D. 考察

新規の医薬品候補化合物を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ている。よって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。そこで本研究では、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も重要であると考えられたが、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といえる。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。

さらに今年度の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と考えたからである。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と考えられる。そこで今回は複数の個体（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に影響されない遺伝子のみを抽出することができると仮定し、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述べる。化合物は、構築するデータベースの目的を考慮して選択した。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)、phenobarbitar (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) といった 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、げっ歯類への長期投与により、肝癌を誘発するとの報告はあるが、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。

#### 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非常に不可解な結果であった。しかし、これに関しては以下のような理由が考えられた。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大きく影響していると考えられた。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 時間になると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と思われる。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は、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 解析の結果からも明らかのように、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くなる。つまり曝露開始後 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。

#### 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が、以下に、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結果を記す。（なお、ここで用いた参考文献は本

分担研究報告書の末尾に記した。)

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[1]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[2]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[2]と Coen[3]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[4]、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[5]。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 $\gamma$  アントゴニストである 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。[6]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的ストレスの原因となるが[7]、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 があった。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。以下に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記す。

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[8]、Lake らによれば CYP1A2, 2B1/2, 2E and 4A がラットの肝臓で誘導されことを報告しており[9]、また、Longueville も CYP3A1 の誘導を報告している。[10]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[11]、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。[12] 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[13]、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[14]、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。[15]

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。

#### 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。

モデル作成には富士通九州システムエンジニアリング社の「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。

作成したモデルは4種類である。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大きな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言える。それであれば、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、今回の研究で使用した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定量のみで肝毒性を予測できることが可能となるかもしれない。さらにその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は、モデルに用いられるパラメーターの抽出方法が挙げられる。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ためにはその少ない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てしまうため、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十分な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もあると考えられた。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、パラメーターの数がもう少し多くなるようにModelBuilderの条件を検討するなど考えられる。これらについては今後一つずつ検討していく予定である。

#### 細胞培養・薬剤暴露のハイスループット試験系の開発についての考察

本研究においては、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ている。このような問題をクリアし、*in vitro*での毒性スクリーニングのHTS化を実現するため、テカン社のアッセイ用ロボット Workstation Genesisを用いて上記の作業の自動化を検討し、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今後の検討で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、将来、肝毒性の発現メカニズムが多くの化合物で解明され、マーカーとなる遺伝子を得ることができれば、このような 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。本プロジェクトの中では、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。

#### 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、今回検討した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ものと言える。しかしその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、今後より詳細な検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

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・薬剤曝露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、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結果を得ることができた。

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。

以上

横川 伸也

第一化学薬品株式会社  
薬物動態研究所研究員

Declan Mulhern

第一化学薬品株式会社  
薬物動態研究所研究員

小貫 慶昭

株式会社医薬分子設計研究所  
臨床開発部長

佐藤 陽美

株式会社医薬分子設計研究所  
生物情報部長

北島 正人

株式会社富士通九州システムエンジニア

リング ライフサイエンス部

Jose Martin Ciloy

株式会社富士通九州システムエンジニア  
リング ライフサイエンス部

## F. 健康危険情報

なし

## 研究発表

論文発表

Thiol-based SAHA analogues as potent histone deacetylase inhibitors.

Suzuki T, Kouketsu A, Matsuura A, Kohara A, Ninomiya S, Kohda K, Miyata N.

Bioorg Med Chem Lett. 2004 Jun 21; 14(12):3313-7.

学会発表

チアゾリ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、鈴木孝昌、小貫慶昭、佐藤陽美、板井昭子、鈴木孝禎、宮田直樹、二宮真一、須藤哲司 (第一化学薬品、国立衛研、医薬分子設計研、名市大院薬) 第 124 年会、日本薬学会 (大阪 2004.3)

GeneChip を用いた薬剤曝露時の遺伝子発現解析 (Toxicogenomics への応用を目指して)

二宮真一、鈴木孝昌、鈴木孝禎、宮田直樹、小原有弘、須藤哲司 (第一化学薬品、国立衛研、名市大院薬) 第 124 年会、日本薬学会 (大阪 2004.3)

新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の合成と作用機序の解析

松浦梓、長野有紀、鈴木孝禎、小原有弘、二宮真一、幸田光復、宮田直樹（名市大院薬、第一化学薬品）第124年会、日本薬学会（大阪2004.3）

非ヒドロキサム酸系ヒストン脱アセチル酵素阻害剤の設計、合成と酵素阻害活性評価  
鈴木孝禎、瀬瀬章泰、松浦梓、小原有弘、二宮真一、幸田光復、宮田直樹（名市大院薬、第一化学薬品）第124年会、日本薬学会（大阪2004.3）

PPAR $\gamma$ アゴニスト作用をもつ  
3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]propionic acid 誘導体の合成  
江藤一摩、服部義史、小原有弘、二宮真一、幸田光復、宮田直樹（名市大院薬、第一化学薬品）第124年会、日本薬学会（大阪2004.3）

Tissue mRNA Expression of Monkey MDR1 and Functional Analysis of Monkey MDR1/P-Glycoprotein  
Yasuhisa Adachi, Declan Mulhern, Shin-ichi Ninomiya and Tetsuji Sudo  
(7<sup>th</sup> Interanational ISSX meeting, 2004, Canada)

7. Ultimate Predictability for Human Drug Disposition Using Chimera Mice  
Tae Inoue, Yasuhisa Adachi, Shin-ichi Ninomiya, Yoshinori Soeno, Chise Tateno, Horie Toru, Tetsuji Sudo and Katsutoshi

Yoshizato (7<sup>th</sup> Interanational ISSX meeting, 2004, Canada)

The Use of Chimeric Mice (Humanized Mice) in Drug Discovery and Development

Toru Horie, Chise Tateno, Tae Inoue, Yasuhisa Adachi, Hiroki Ebine, Yoshihiro Ohzone, Shin-ichi Ninomiya, and Katsutoshi Yoshizato (19<sup>th</sup> Annual Meeting of ISSX, 2004 Kanazawa)

Utilization of Human Chimeric Mice for Predicting Human Metabolism of Drugs (I)

Yoshihiro Ohzone, Yasuhisa Adachi, Hiroki Ebine, Atsuhiko Inaba, Yoshinori Soeno, Tae Inoue, Shin-ichi Ninomiya, Tetsuji Sudo, Katsutoshi Yoshizato and Tohiro Horie  
(19<sup>th</sup> Annual Meeting of ISSX, 2004 Kanazawa)

Utilization of Human Chimeric Mice for Predicting Human Metabolism of Drugs (II)

Yoshinori Soeno, Yoshihiro Ohzone, Yasuhisa Adachi, Hiroki Ebine, Yoshihiro Ohzone, Tae Inoue, Yoji Hakamata, Shin-ichi Ninomiya, Eiji Kobayashi, Katsutoshi Yoshizato and Tohiro Horie (19<sup>th</sup> Annual Meeting of ISSX, 2004 Kanazawa)

網羅的遺伝子発現解析データを用いた肝毒性予測モデルの構築

横川伸也, Declan Mulhern, 清水和, 小

原有弘, 北島正人, Jose Martin Ciloy, 鈴木孝昌, 奥田晴宏, 宮田直樹, 二宮真一, 須藤哲司 (第一化学薬品, 国立医薬品食品衛生研究所, 富士通九州システムエンジニアリング, 名古屋市立大学) 第 32 回 日本トキシコロジー学会学術年会 (東京 2005.6)

Gene expression profiles of hepatotoxin-treated human hepatocytes can be used to cluster unknown compounds according to their mode of action.

Declan Mulhern, Shinya Yokokawa, Hitoshi Shimizu, Arihiro Kohara, Takayoshi Suzuki, Haruhiko Okuda, Naoki Miyata, Shin-ichi Ninomiya and Tetsuji Sudo (32<sup>th</sup> Annual Meeting of JSOT, 2005 Tokyo)

#### 参考文献

- [1] Harris AJ, Dial SL, Casciano DA, (2004) Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells, *Mut Res*, 549, 79-99
- [2] Reilly TP, Bourdi M, Brady JN, Pise-Masison CA, Radonovich MF, George JW, Pohl LR, (2001) Expression Profiling of Acetaminophen Liver Toxicity in Mice Using Microarray Technology, *Biochem Biophys Res Comm*, 282, 321-328
- [3] Coen M, Ruepp SU, Lindon JC, Nicholson JK, Pognan F, Lenz EM,

Wilson ID (2004), Integrated application of transcriptomics and metabonomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse, *J Pharm Biomed Anal*, 35, 93-105

- [4] Tateishi T, Kumai T, Watanabe M, Tanaka M, Kobayashi S (1999), A comparison of the effect of five phenothiazines on hepatic CYP isoenzymes in rats, *Pharm Toxicol*, 85, 252-256
- [5] Wojcikowski J, Pichard-Garcia L, Maurel P, Daniel WA, (2003), Contribution of human cytochrome P-450 isoforms to the metabolism of the simplest phenothiazine neuroleptic promazine, *British Journal Of Pharmacology* 138 (8): 1465-1474 APR 2003
- [6] Boelsterli UA, (2003), Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity, *Tox App Pharmacol* 192, 307-322
- [7] Cantoni L, Valaperta R, Ponsoda X, Castell JV, Barelli D, Rizzardini M, Mangolini A, Hauri L, Villa P, (2003), Induction of hepatic heme oxygenase-1 by diclofenac in rodents: role of oxidative stress and cytochrome P-450 activity, *J Hepatol*, 38, 776-783
- [8] Wortelboer HM, Dekruif CA, Vaniersel AAJ, Falke HE, Noordhoek J, Blaauboer BJ (1991), Comparison of cytochrome p450 isoenzyme profiles in rat-liver and hepatocyte cultures - the effects of model inducers on apoproteins and biotransformation

- activities, *Biochem Pharmacol*, 42, 381-390
- [9] Lake BG, Renwick AB, Cunninghame ME, Price RJ, Surry D, Evans DC (1998), Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver, *Toxicology*, 131, 9-20
- [10] de Longueville F, Atienzar FA, Marcq L, Dufrane S, Evrard S, Wouters L, Leroux F, Bertholet V, Gerin B, Whomsley R, Arnould T, Remacle J, Canning M (2003), Use of a low-density microarray for studying gene expression patterns induced by hepatotoxicants on primary cultures of rat hepatocytes, *Tox Sci* 75, 378-392
- [11] Nishimura Y, Kurata N, Sakurai E, Yasuhara H, (2004), Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities, *J Pharmacol Sci* 96, 293-300
- [12] Madan A, Graham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, Krueger LA, Downey AD, Czerwinski M, Forster J, Ribadeneira MD, Gan LS, Lecluyse EL, Zech K, Robertson P, Koch P, Antonian L, Wagner G, Yu L, Parkinson A, (2003), Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes, *Drug Met Dis*, 31, 421-431
- [13] Frei E, Kuchenmeister F, Gliniorz R, Breuer A, Schmezer P (2001), N-nitroso-dimethylamine is activated in microsomes from hepatocytes to reactive metabolites which damage DNA of non-parenchymal cells in rat liver, *Tox Lett* 123, 227-234
- [14] Moroy T, Geisen C, (2004), Cyclin E, *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 1424-1439
- [15] Usui T, Saitoh Y, Komada F, (2003), Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs - Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor, *Bio Pharm Bull*, 26, 510-517

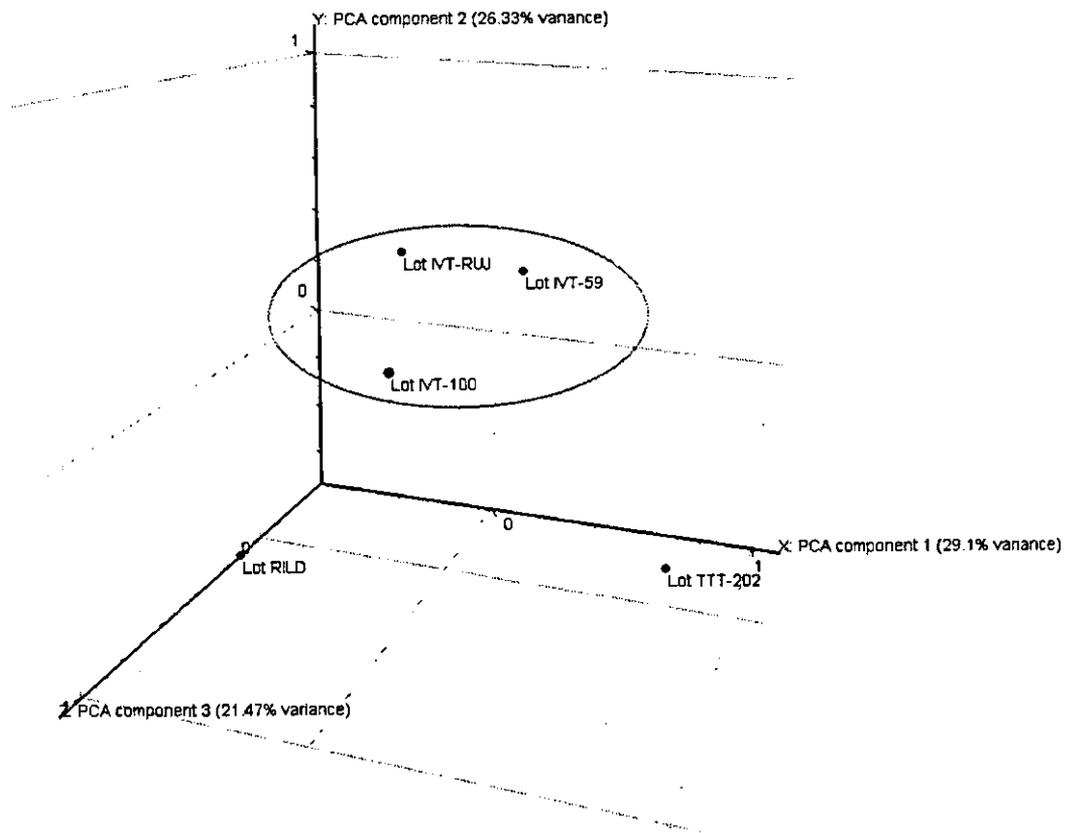


図 1. 主成分分析による各ロットの遺伝子発現プロファイルの比較

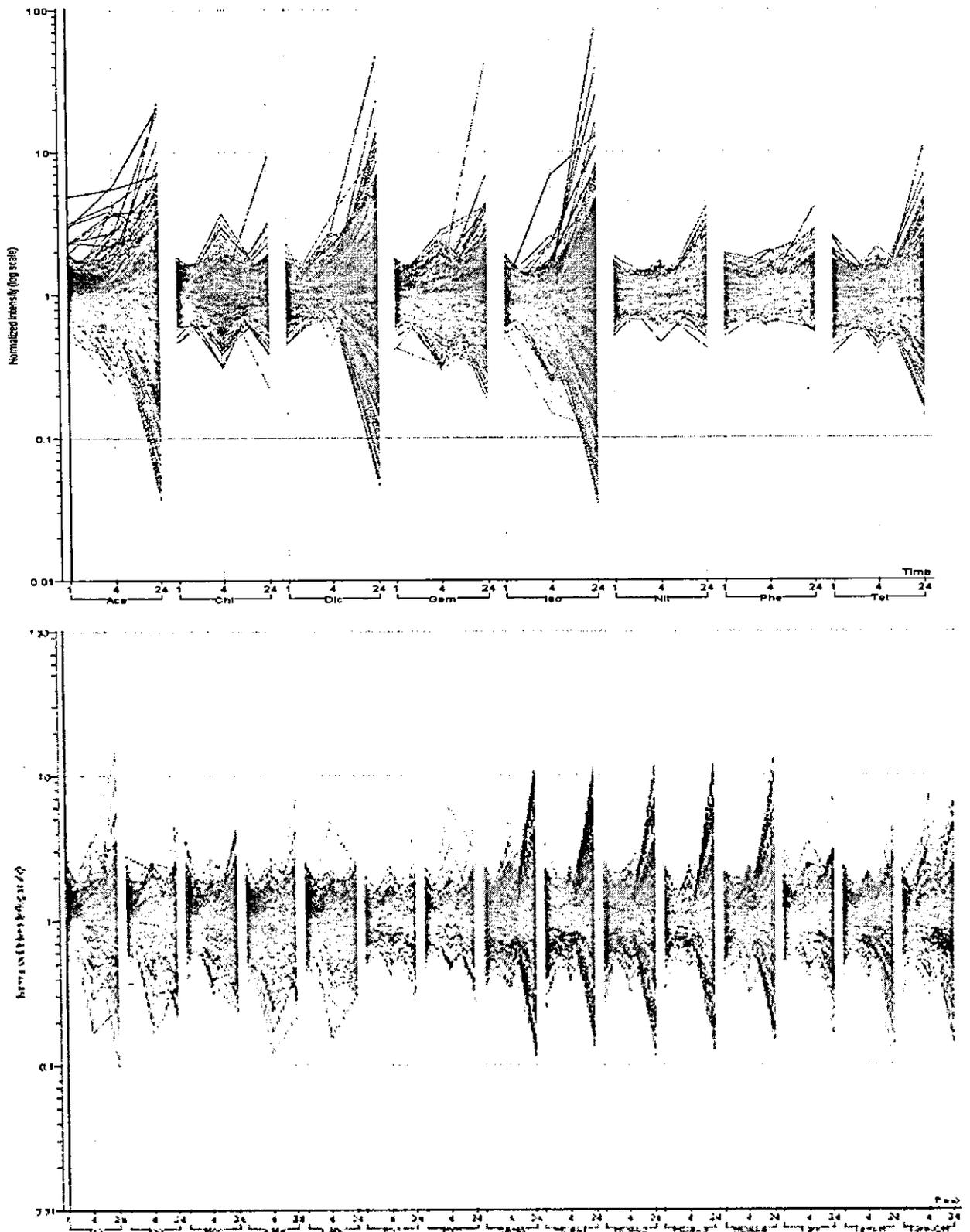


図2. 薬剤曝露による遺伝子発現の経時的変化

上図：肝毒性薬剤 8 剤    下図：データベース検証用化合物（15 化合物）

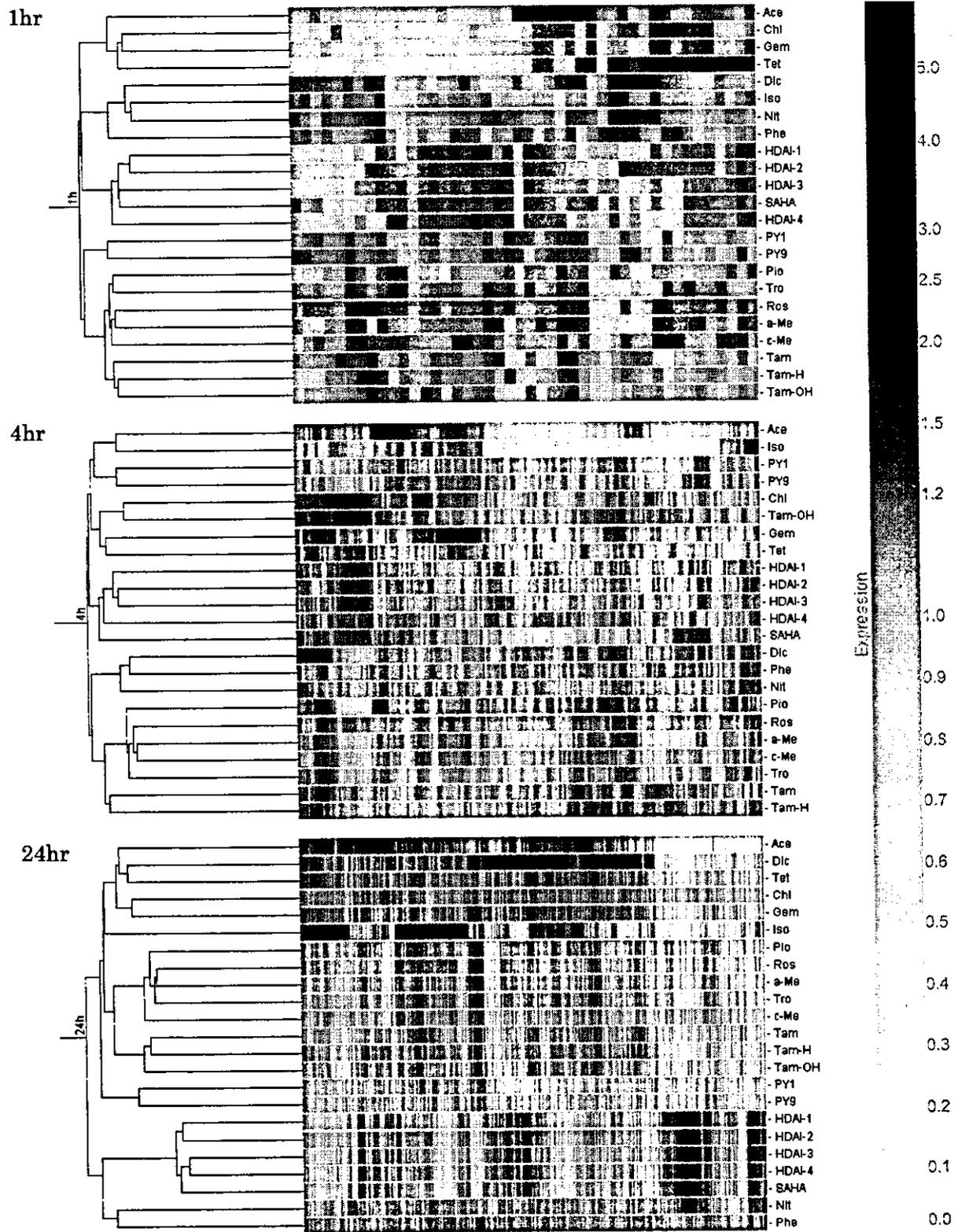
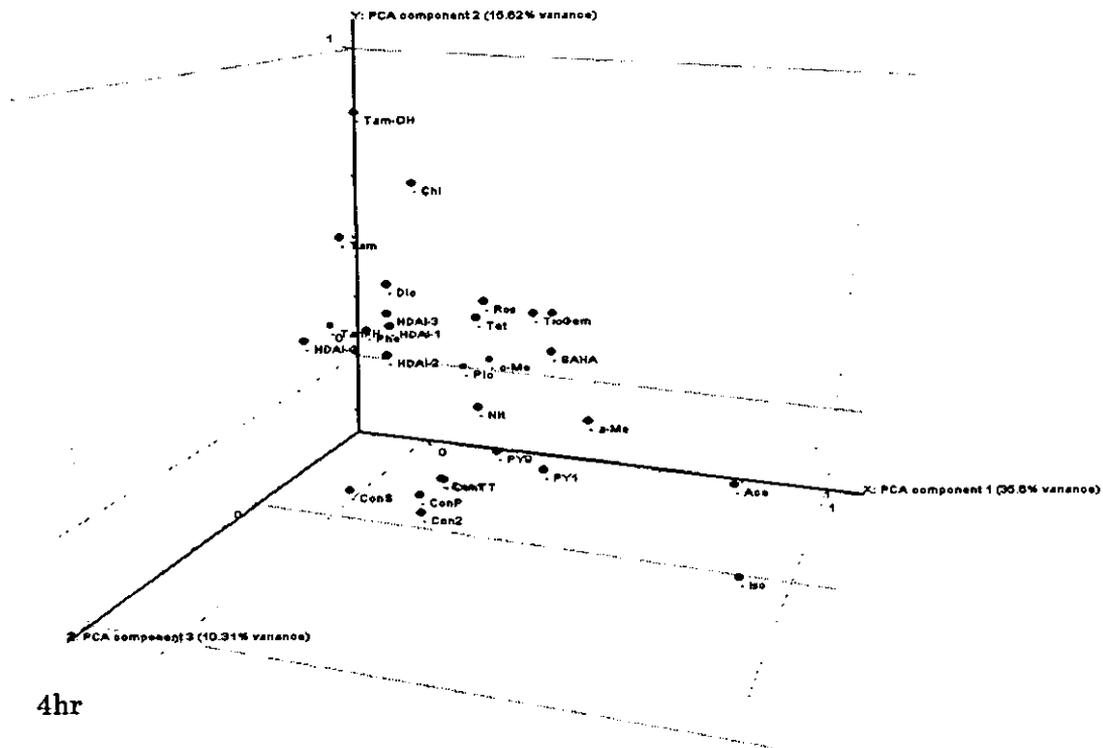
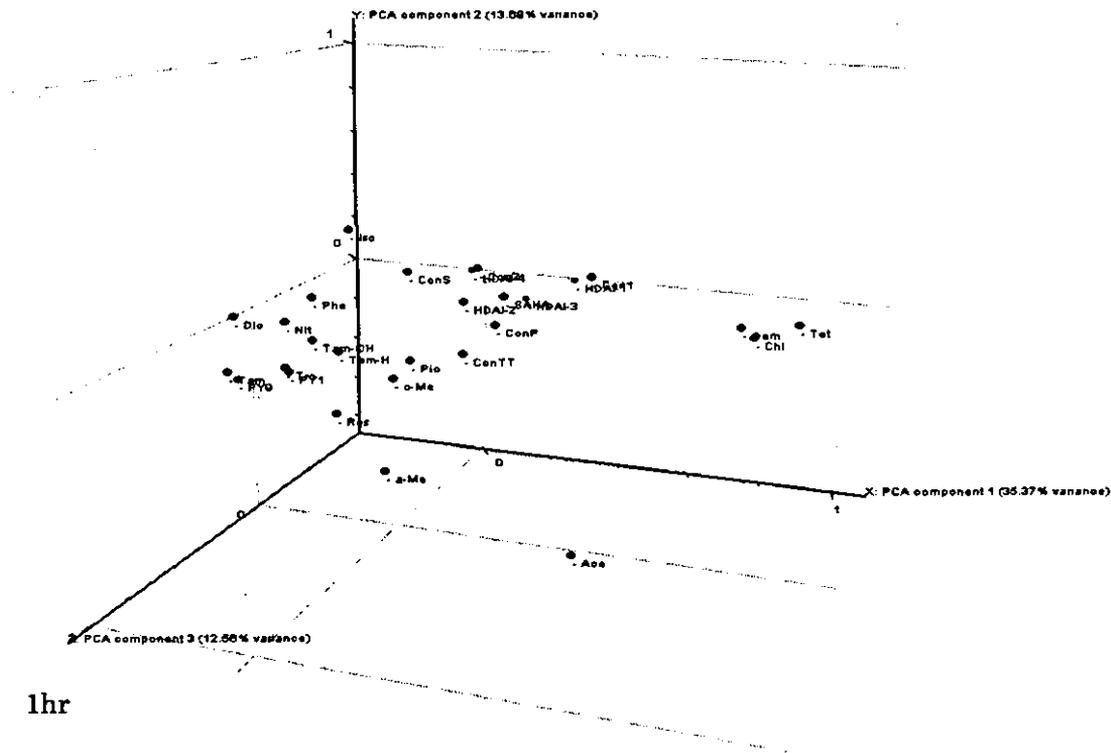


図 3. クラスター解析による遺伝子発現のパターン分類の結果



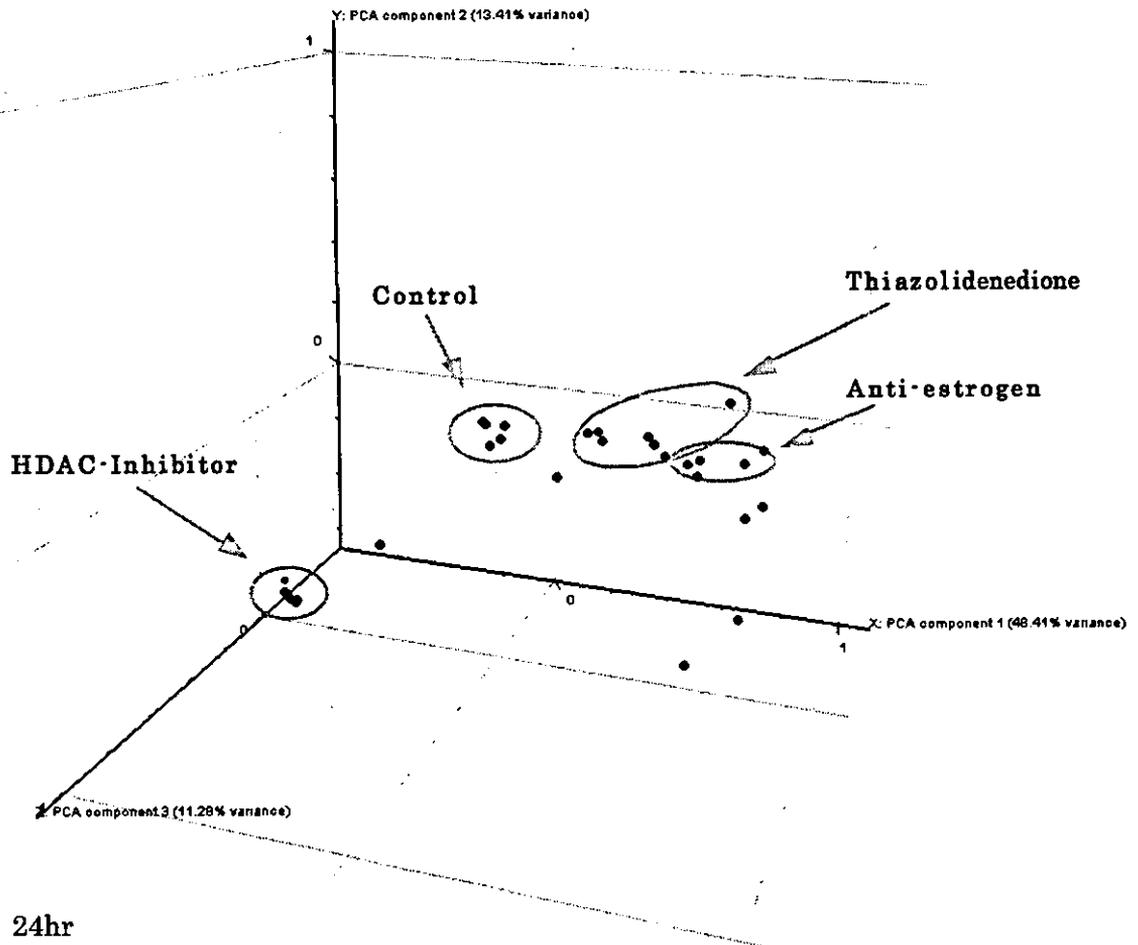


図 4. 主成分分析による遺伝子発現パターンの解析結果

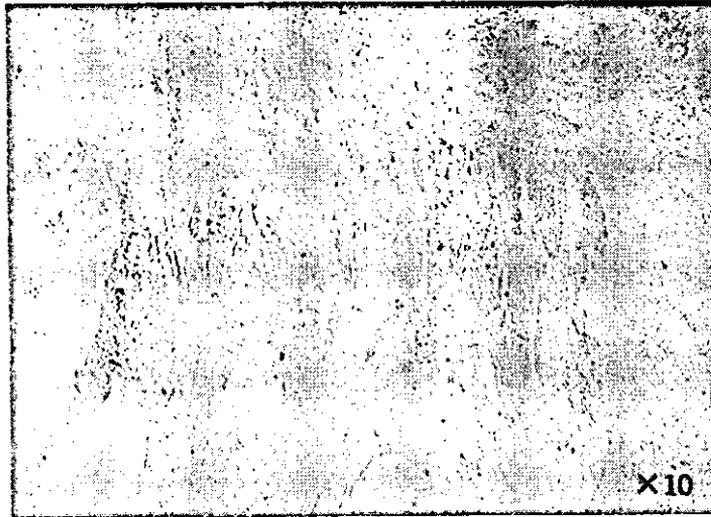


図 5. Human renal cortical cell (10%コンフルエント)

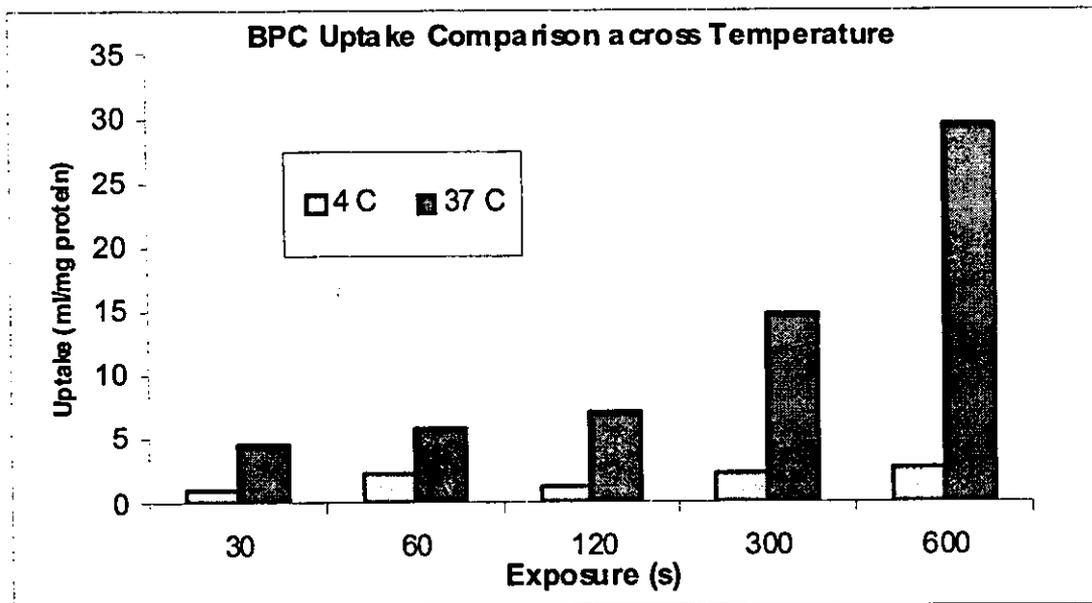
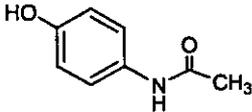
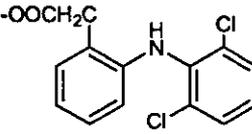
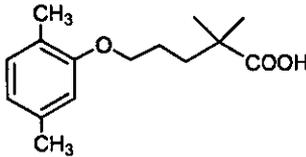
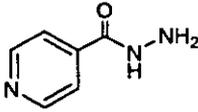
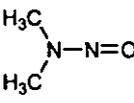
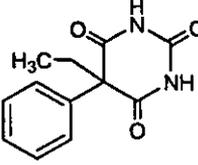
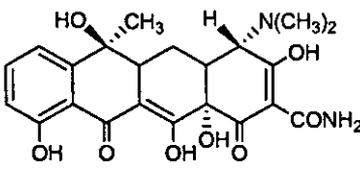


図 6. トランスポーターの取り込み活性試験の結果

表 1. プライマリーヒト肝細胞への曝露実験で使用した化合物の構造および曝露濃度

Chemical	Structure	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Reference
Acetaminophen		5000	[a,b]
Chlorpromazine		5	[c]
Diclofenac		200	[d,e,f]
Gemfibrozil		250	[g]
Isoniazid		50	[h,i]
Nitrosodimethylamine		100	[j,k]
Phenobarbital		500	[l,m]
Tetracycline		300	[n,o]