

2004-06222B

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14年度～16年度 総合研究報告書

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

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14年度～16年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告(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

(資料1) プライマリーヒト細胞を用いた薬剤曝露、遺伝子発現に関する研究の図表

(資料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に関する研究の図表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表(別添4)

III. 研究成果の刊行物・別刷

別添3

1. 総合研究報告

平成14年度～16年度

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)

総合研究報告書

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、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ールの構築と、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った。

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、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求めた。

また、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を行った。

具体的には、

- (1) プライマリーヒト肝および腎細胞を用いて、薬剤曝露時の網羅的遺伝子発現解析を行い、最適なプロトコー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した。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した。
- (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に供し、毒性及び薬効と遺伝子発現との相関を検討した。
- (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手法の開発を行った。

三年間の本研究事業により、プライマリーヒト細胞を用いる遺伝子発現解析系の構築した。構築した遺伝子発現解析系を用いて、代表的な8種類の肝毒性化合物、PPAR- γ 作用薬 (troglitazone、rosiglitazone および pioglitazone) およびその構造修飾化合物4種、HDAC 阻害剤 (SAHA) およびその構造修飾化合物4種、抗エストロゲン作用薬 (tamoxifen) とその誘導体2種類を用い、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明らかになった。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は、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された。

薬剤の構造修飾体を用いた網羅的遺伝子発現解析が、毒性を軽減した薬物を開発するために有用な手法であることを示す基礎的知見を得ることができた。

実験動物を用いて得られた遺伝子発現解析データをヒトへ外挿する研究では、10種以上の遺伝子傷害性物質、3種の PPAR- γ 作用薬、3種の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、ヒト細胞を用いた結果とを直接比較する方法を確立した。

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

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

福原 潔

国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部室長

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

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

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

欒 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

協力研究者

中川秀彦

名古屋市立大学大学院

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

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ールを構築することを目的とした。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化を行いデー

データベースを構築することを目的とした。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ことを目的とした。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を試みた。

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

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、肝・腎毒性を有する薬剤の曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行い、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遺伝子発現解析系の構築、および、ハイスループット試験系の開発を行った。

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のプライマリーヒト肝細胞(非凍結型、凍結型)について、薬剤曝露時における網羅的な遺伝子発現解析を行い、由来個体による発現の差異、非凍結・凍結による差異、ヒト由来株化肝細胞との比較を行い、毒性評価に妥当な実験系の構築の検討を行った。プライマリーヒト肝細胞(非凍結型、凍結型)、ヒト由来株化肝細胞を用い、無処理時の網羅的遺伝子発現解析を GeneChip を用いて行い、特に薬物代

謝酵素関連の遺伝子発現を比較した。その結果、無処理の細胞で定常的に発現しており GeneChip で検出できた遺伝子の総数は 22283 遺伝子部分の解析中 37%~44%程度であった。肝細胞の機能の指標となる薬物代謝酵素関連(第 I 相および第 II 相あわせて 209)の発現遺伝子数は非凍結型、凍結型、株化細胞の順に少なくなった。この結果は、薬物代謝関連酵素活性が維持されているプライマリーヒト細胞を用いた遺伝子発現解析が、株化細胞を用いた遺伝子発現解析よりも有用であることを示す。本研究では、操作性の観点から、凍結型のプライマリーヒト細胞を用いることとした。次に、プライマリーヒト肝細胞のロット間の差、すなわち個人差(由来個体差)に着目し、薬剤無処理における遺伝子発現量を比較した、その結果、ロット間差があることがわかった。アセトアミノフェン処理した時の遺伝子発現量と、薬剤無処理の遺伝子発現量を比較した場合、個体差に基づくロット間変動のほうが大きい。本研究では、ロット間差(個体差)の影響を減少させるために、3ロット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 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
(blank)

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 γ 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、経時的に細胞を回収し、GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現データのうち、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。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 1way-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。

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とから、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 γ 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

一解析を行った。この結果から、PPAR γ 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 γ 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 γ 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 γ 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。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。

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- γ 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 γ 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 γ アゴニストの創製を目指し、新規PPAR γ 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。具体的には、毒性軽減を目指して、ロシグリタゾンの構造を参考に、チアゾリジンジオン骨格を生物学的等価体であるカルボン酸基に変換し、さらに、PPAR- γ の内因性リガンドであるプロスタグランジンの構造因子を加味した一連の新規化合物(約50の新規化合物)を合成した。これらについて、PPAR- γ 結

合活性および前駆脂肪細胞の分化誘導試験を行い、ロシグリタゾンの活性に匹敵する活性化合物を見いだした。

また、遺伝子発現解析試験については、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(約 70 の新規化合物)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、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

乳がん治療薬タモキシフェンは、非ステロイド系抗エストロゲン剤として抗がん作用を示す。しかし、長期投与によって子宮内膜がんの頻度が有意に増加する、また、ラットに対しては肝がんを誘発することが知られている。より安全なタモキシフェン誘導体を得る目的で、タモキシフェンの代謝活性化体を含む数種の化合物を合成した。

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。さらに、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5種誘導体の合成を行った。

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、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目指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、候補遺伝子を選んで行った。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 steptozotocin 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 γ 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 α 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(ΔC_2H_5)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、 ΔC_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。遺伝子傷害性と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と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

ブしたが、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、 ΔC_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 ΔC_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 ΔC_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 ΔC_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てのみ変化をみたところ、 ΔC_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 ΔC_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。

(倫理面への配慮)

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各研究機関の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

する必要がある、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)、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 γ 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- γ 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