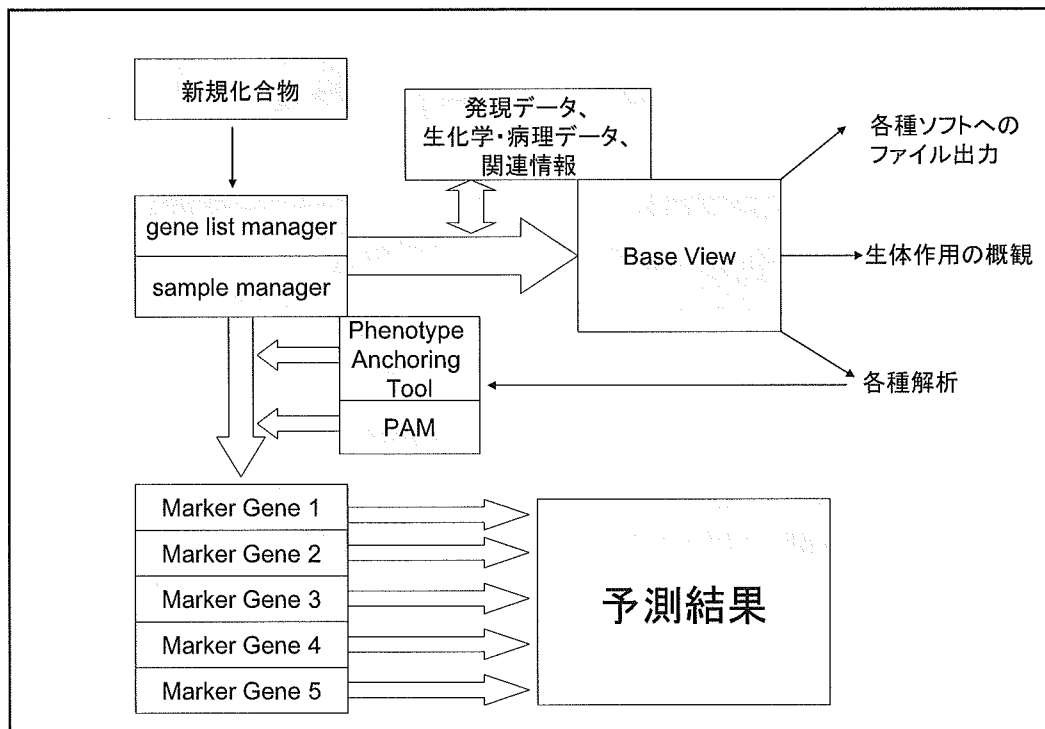
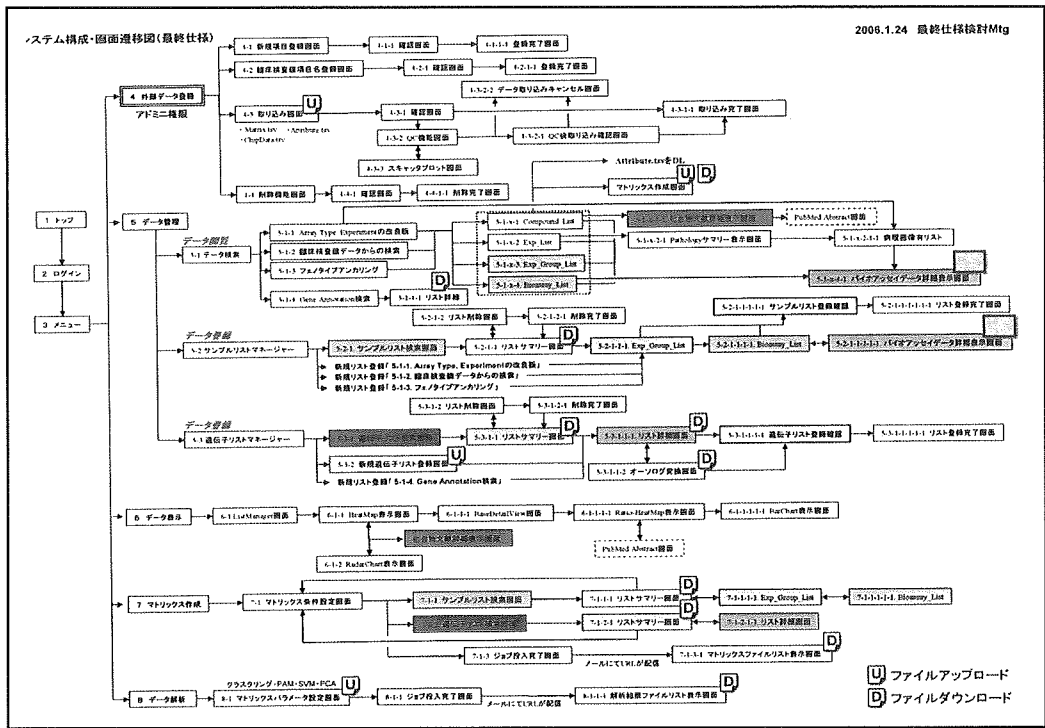


In vitro試験の問題点

- ヒト肝細胞の確保困難
- 予算との関係で時点・用量の削減？
4用量3時点
→ 3用量(middle, high) 2時点(8, 24 hr)
化合物数は減らさない(?)

インフォーマティクス

- 今期はTGPプロトコールに特化したデータ取り込み・検索・表示・解析・予測システム
- 最終形態は柔軟なプロトコールに対応(種・臓器・時点・用量水準・統計・評価係数・・・)
- 今期の予測はPrediction analysis of Microarray (PAM)による判別分析中心
- 最終形態にはSVM, PCAなどを追加



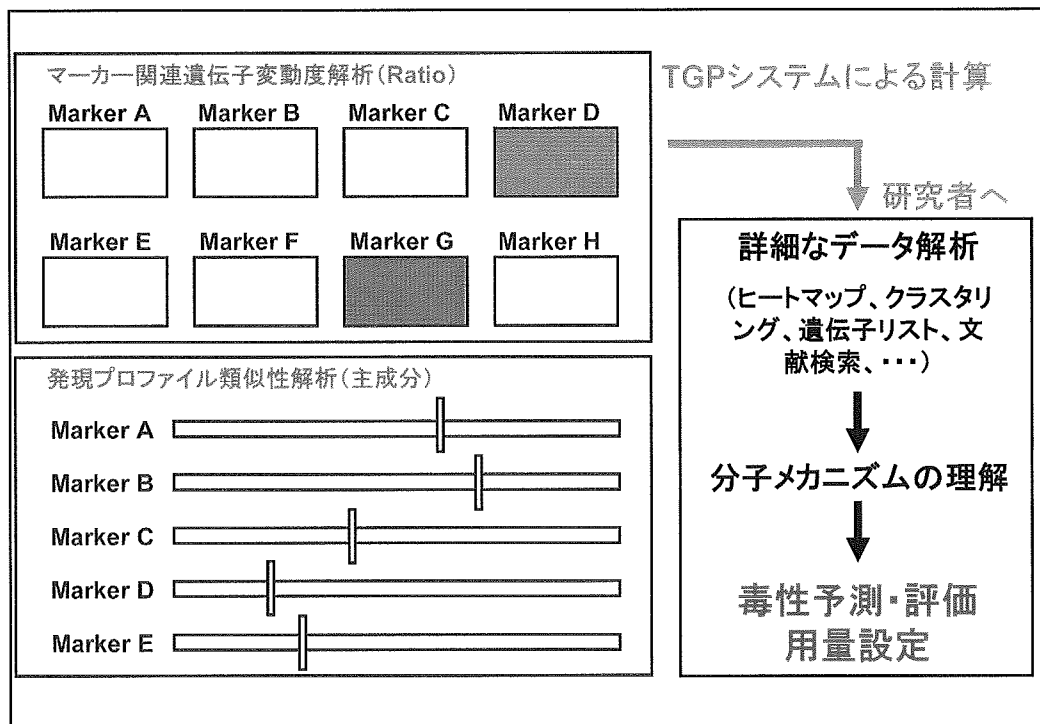
毒性予測のイメージ

- 特定の毒性カテゴリーに関するスコア化(遺伝子発現プロファイルの定量化)
- データベース中の相対位置を表示
- 各種毒性マーカー遺伝子リストに基づくスコアの一覧表示→総合判定

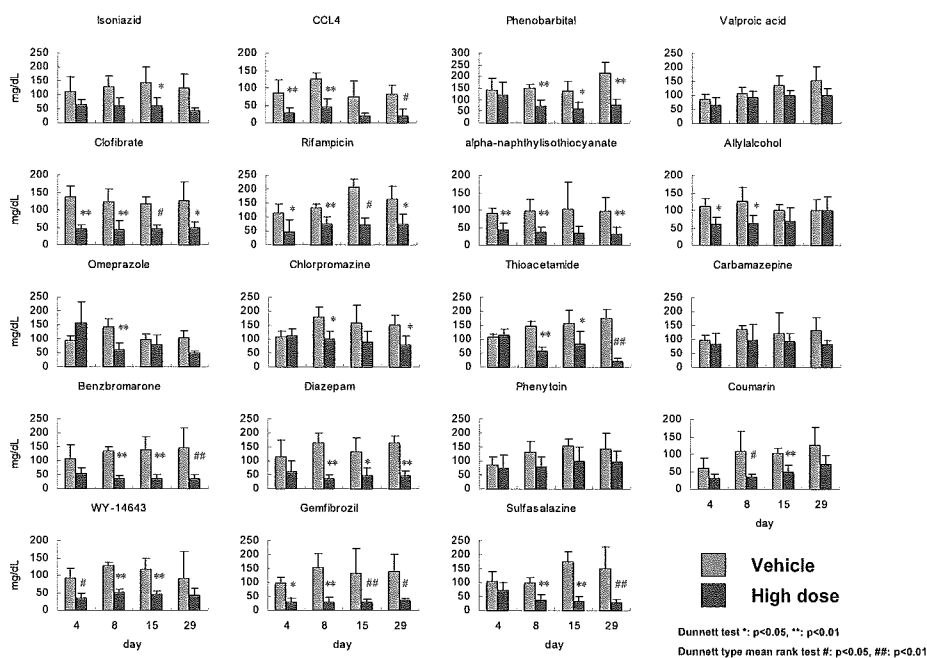
マーカー遺伝子リストの質に依存

データベース中の化合物の網羅性に依存

データ自身の質に依存



Phenotype Anchoring : Triglyceride



Selection of commonly changed gene in rat repeated dose

48 samples in each compound repeated dose study

↓
 Per chip normalization (normalized to median)

↓
 Genes with Affymetrix Present or Marginal Call in at least 1 of 48 samples

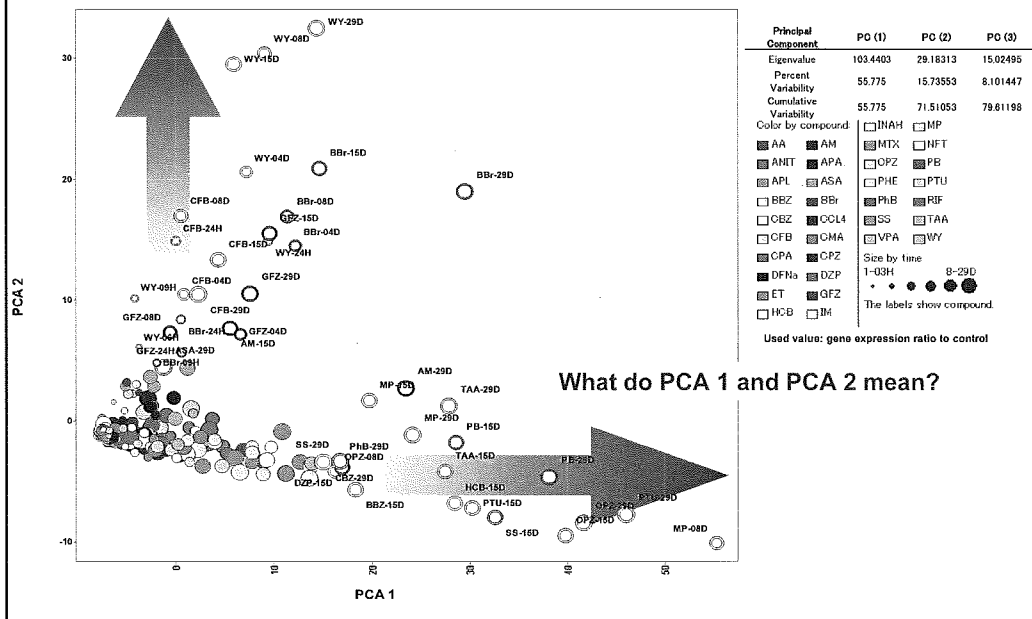
↓
 Statistically significant differences in dose level; Welch ANOVA, $p < 0.05$, multiple testing correction: Benjamini and Hochberg False Discovery Rate

Compound abbreviation	No. of probe sets extracted
INAH	1482 probe sets
CCL4	2262 probe sets
PB	547 probe sets
VPA	21 probe sets
CFB	1800 probes
RIF	56 probe sets
ANIT	1065 probe sets
AA	12 probe sets
OPZ	1424 probe sets
CPZ	87 probe sets
TAA	5665 probe sets
CBZ	480 probe sets
BBr	1722 probe sets
DZP	117 probe sets
PHE	88 probe sets
CMA	1006 probe sets
WY	4305 probe sets
GFZ	1944 probe sets
SS	859 probe sets

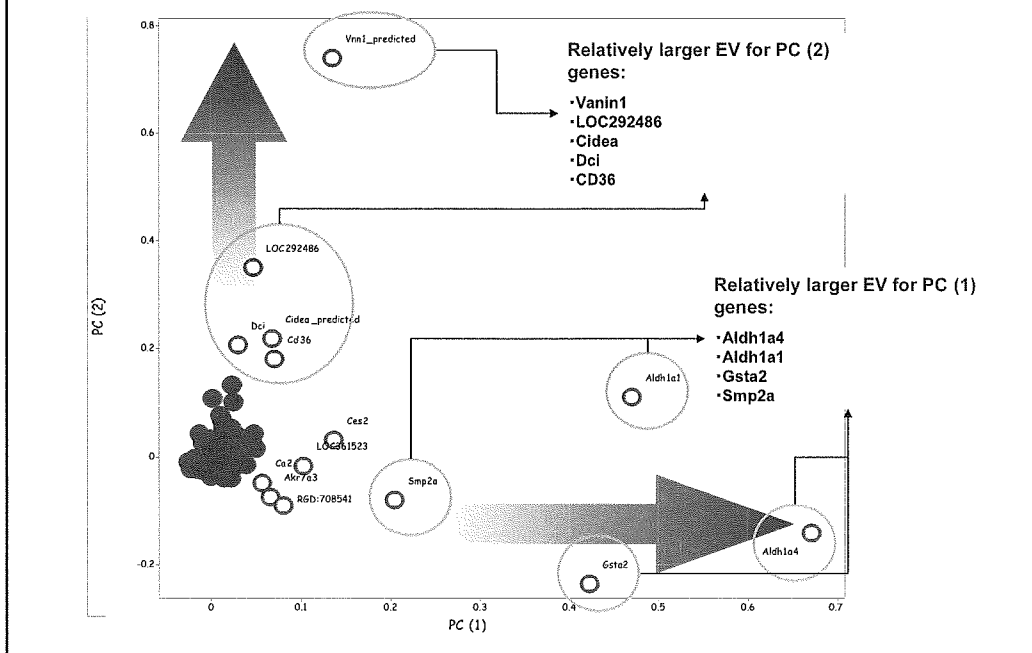
Select genes that were changed in more than 9 compounds

↓
 207 probe sets were selected.

Principal Component Analysis in TGP 34 compounds



Eigenvectors (EV) of each gene



Supposed Principal Component 1 meaning

- PB-like xenobiotics
- Caloric restrictions by reduction of food consumption

CAR (Constitutive Androstane Receptor) activation

Induction of xenobiotics/steroid
metabolizing enzymes

- CYP2B
- UDPGTR
- Carboxyesterase 2
- GSTa2

Metabolism of serum thyroid hormone

Decrease of serum thyroid hormone

Down-regulation of APOA5

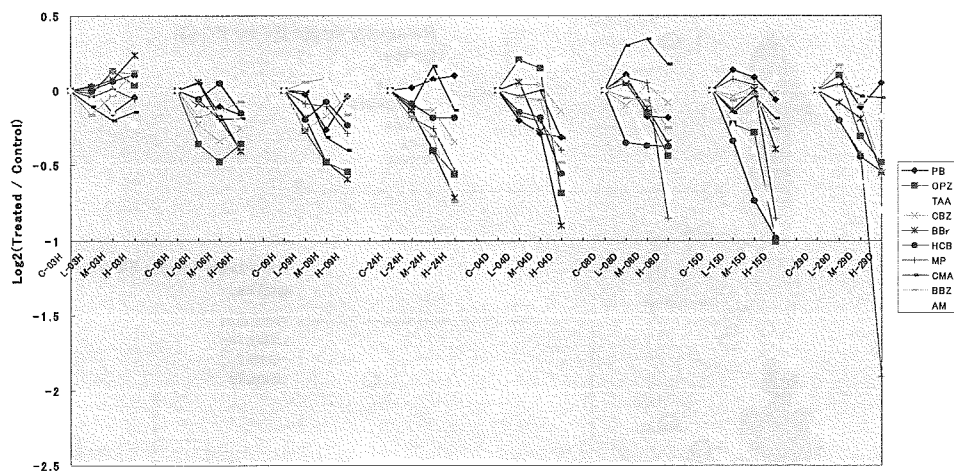
Decrease of plasma Triglyceride

Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5 shown to be a major determinant of plasma TG levels. (J Biol Chem. 2005, 280(30):27533-43)

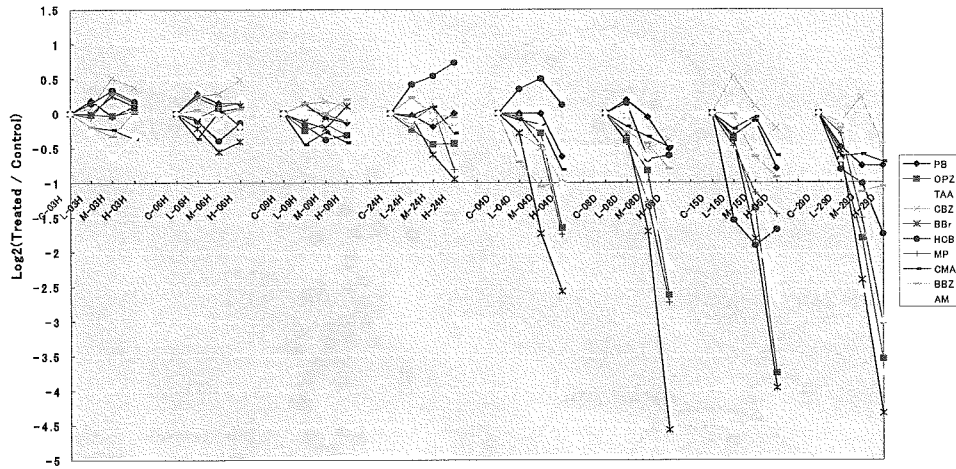
Thus, principal component 1 means ...

1. TG reduction via CAR activation by xenobiotics
2. TG reduction via CAR activation by caloric restriction (compensatory reaction)

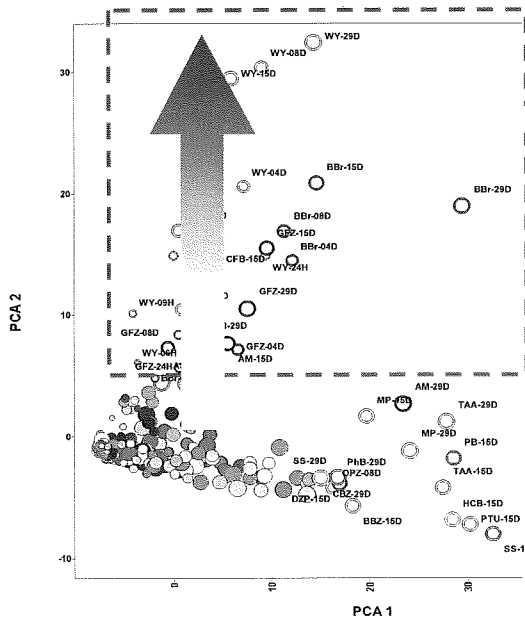
APOA5 expression in larger PC1 samples



APOA4 expression in larger PC1 samples



Principal Component Analysis (PC2)



Higher PC2 samples are ...

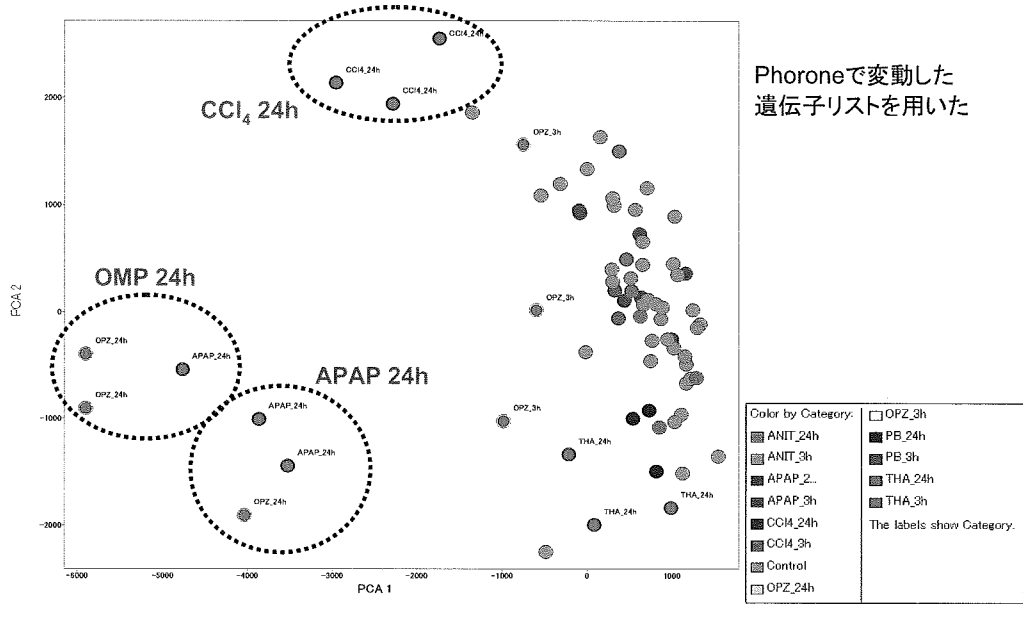
- WY-14643
- Clofibrate
- Gemfibrozil
- Benzbromarone

WY, CFB and GFB are well-known as a PPARalpha ligand.

BBr was reported to be a ligand of PPARalpha. (J Saitama Med School. 2003 (30): 187-194)

Principal component 2 means PPARalpha activation?

PCA 第一成分のみでスコア化→毒性学的機序が明確な場合には有用



Constantly up/down-regulated genes throughout the study periods in both MP and TAA→PAM

Fig. C1 Constantly up-regulated 276 genes

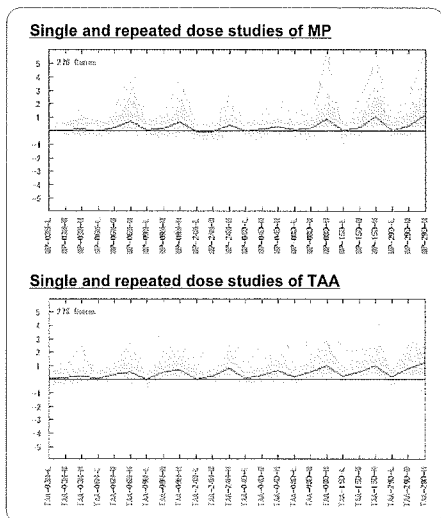
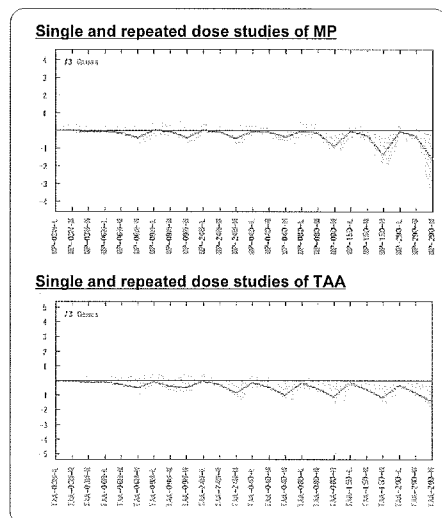
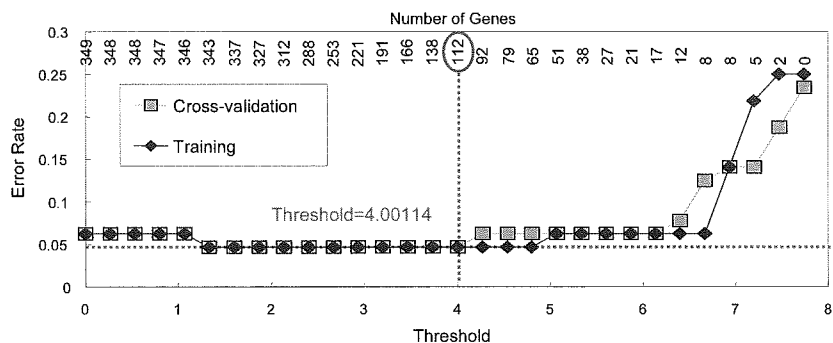


Fig. C2 Constantly down-regulated 73 genes



Training and cross-validation errors for different values of the shrinkage parameter



PAM classification results: classification error of the training sample

		Predicted			
		Positive	Negative	Class Error Rate	Overall Error Rate
Training	Positive	13	3	0.1875	0.046875
	Negative	0	48	0.0000	

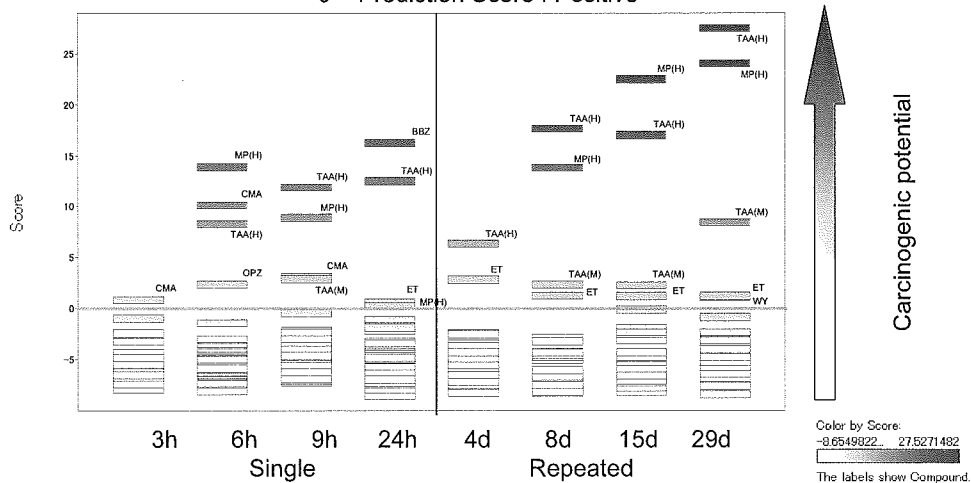
PAM classified 13 of 16 positive cases and all of 42 negative cases correctly for an overall success rate of 95.3%.

PAM Prediction Score

$$= \text{Log}_{10} [\text{class probability (positive)} / \text{class probability (negative)}]$$

Prediction Score < 0 : Negative

0 < Prediction Score : Positive

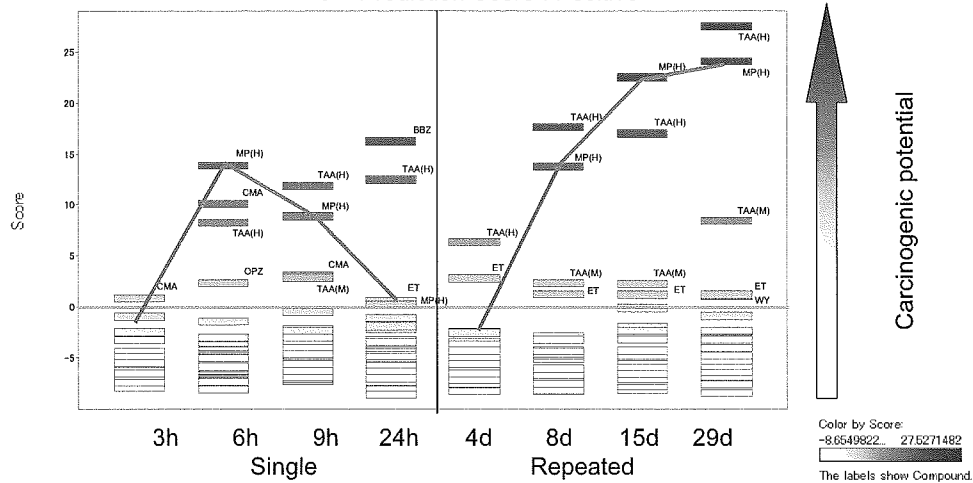


PAM Prediction Score

$$= \text{Log}_{10} [\text{class probability (positive)} / \text{class probability (negative)}]$$

Prediction Score < 0 : Negative

0 < Prediction Score : Positive



最大課題: in vitroの系を用いた種差のブリッジング

- 問題点

in vivoとin vitroの差は大きい

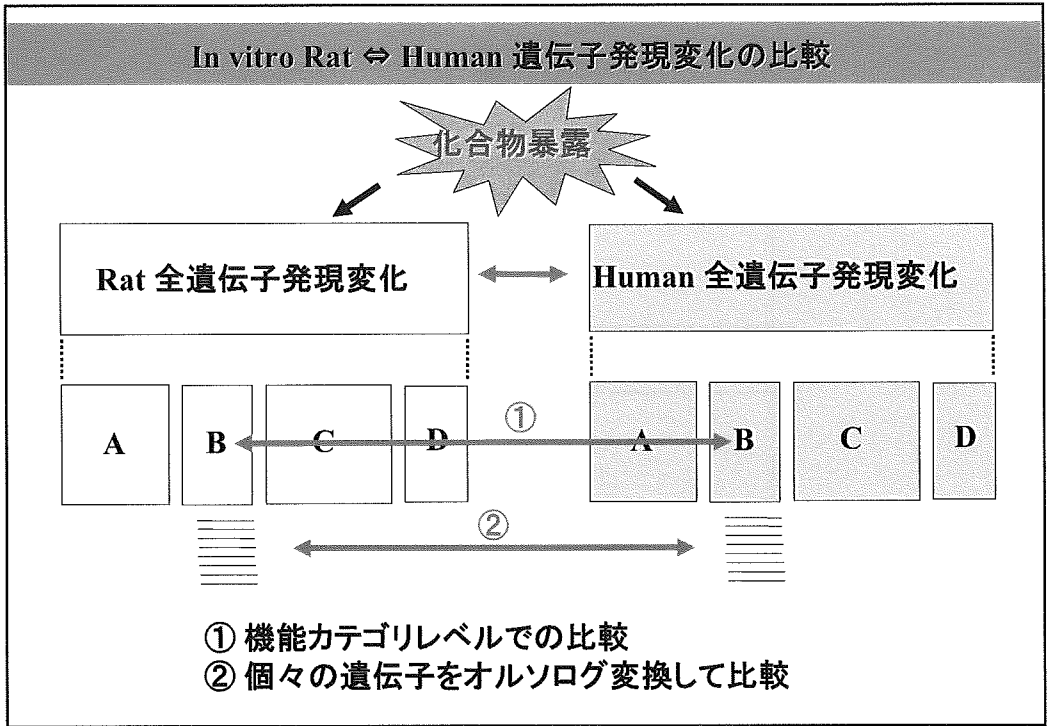
種差は大きい

- 戦略

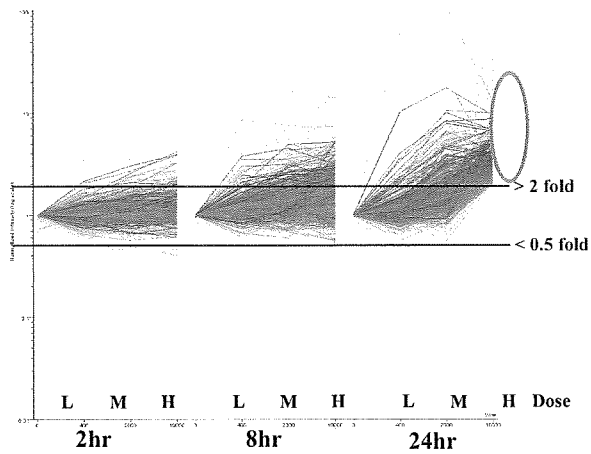
特定の薬理・毒性パスウェイに特化する

カテゴリ別のスコア化で評価する

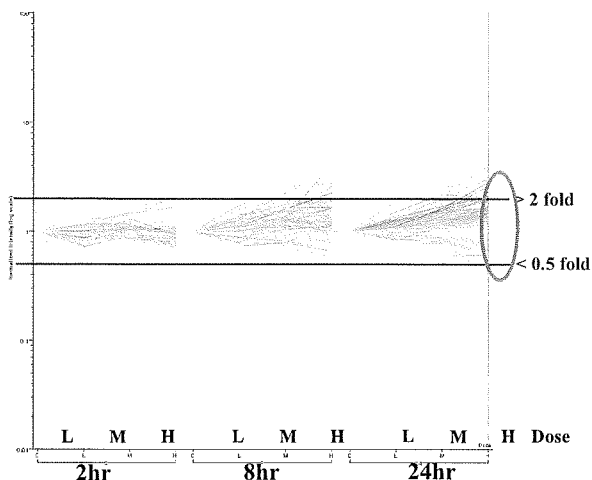
In vitro Rat ⇔ Human 遺伝子発現変化の比較



バルプロ酸 (VPA) 暴露時の遺伝子発現変化 (Rat in vitro, 1572 probes)

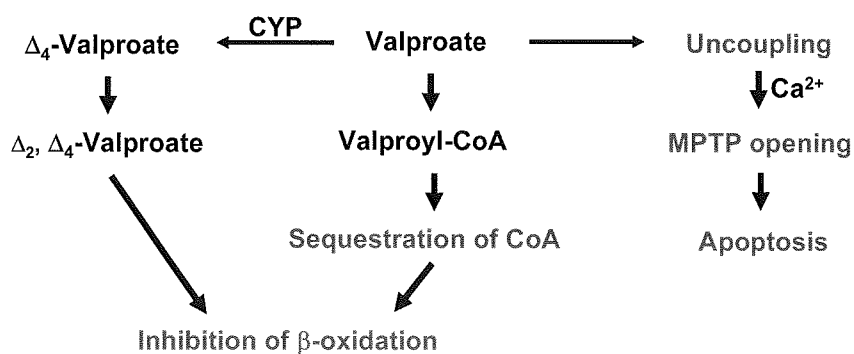


バルプロ酸(VPA)暴露時の遺伝子発現変化 (Human in vitro, 291 probes)



Rat 1572 probes を機械的にオルソログ変換した291 probesの
遺伝子発現変化→変動の傾向は一致していない。

VPAの毒性メカニズム



VPAはミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化の阻害および呼吸鎖不全を引き起こす。脂質代謝およびストレス応答遺伝子を含む酸化還元酵素のGOカテゴリに有意な変化が見られたことは上記のメカニズムと合致する。

VPA暴露時変動遺伝子の脂質関連GOカテゴリのP-value

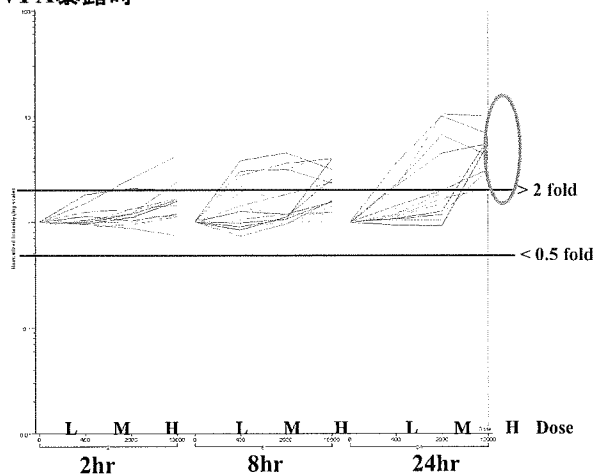
GO terms		Rat vivo	Rat vitro	Human
GO:0006631	fatty acid metabolism	0.0115	0.00180	0.000659
GO:0044255	cellular lipid metabolism	0.0115	0.00172	1.29E-07
GO:0006629	lipid metabolism	0.0244	0.0186	1.29E-07
GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	0.0512	0.0158	0.342
GO:0019395	fatty acid oxidation	0.0677	0.135	0.174

(P-value by Fisher's exact test)

機能カテゴリレベルでの比較では各実験系の間で比較的良好な対応関係が見られる。

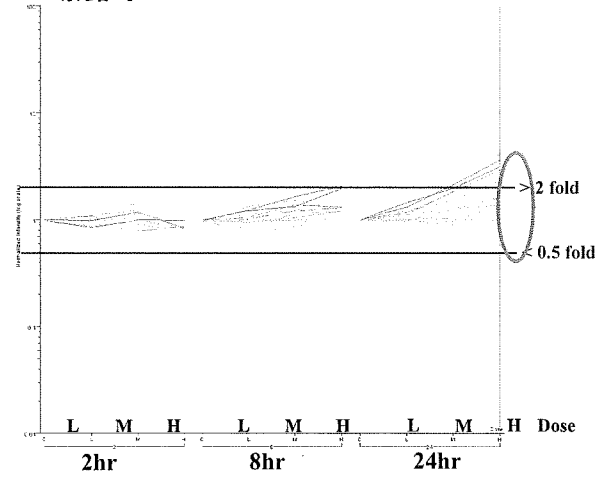
Rat における脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動

VPA暴露時



Humanにおけるオルソログ変換遺伝子の変動

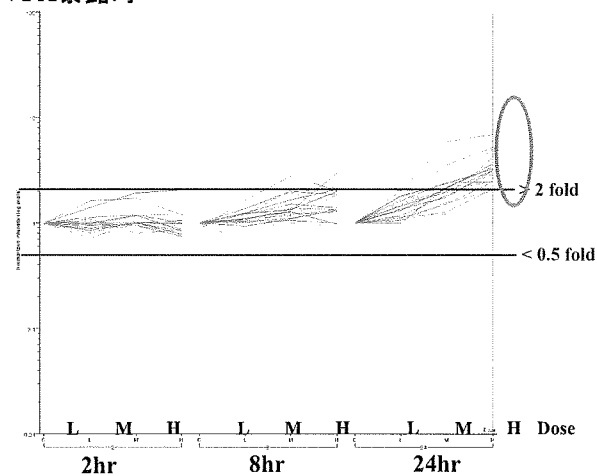
VPA暴露時



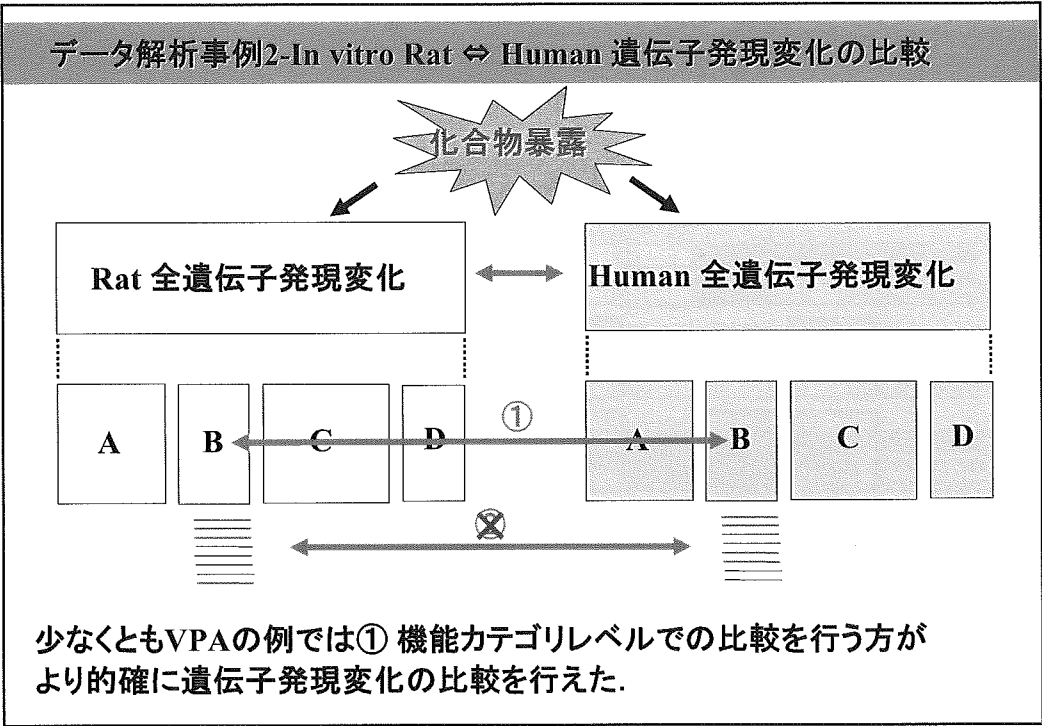
あるカテゴリに着目してオルソログ変換を行った場合でも変動の傾向は一致していない。

Humanにおける脂質代謝およびストレス応答の2カテゴリに属する遺伝子の変動

VPA暴露時



同一カテゴリ内でHuman独自に変動遺伝子を抽出した場合



スコア化の例(検討中)

Probe Set ID	Gene Title
1367577_at	heat shock 27kDa protein 1
1366247_at	heat shock 70kD protein 1 A / / / heat shock 70kD protein 1 B
1370812_at	heat shock 70kD protein 1 A
1587116_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
1372016_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (GADD45B)
1369590_a_at	DNA-damage-inducible transcript 3
1369268_at	activating transcription factor 3
1367741_at	homocysteine-inducible, ER stress-inducible, ubiquitin-like domain
1367795_at	interferon-related developmental regulator 1
1367969_at	chaperonin (C-X-C motif) ligand 10
1368844_at	stress 70 protein chaperone, microsomal-associated, 60kD, human
1367836_at	carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)
136946_at	carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)
1368020_at	mevalonate (diphospho) decarboxylase
1368283_at	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
1369150_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4 (PDK4)
1378074_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4 (PDK4)
1367667_at	faranyl diphosphate synthase
1367707_at	fatty acid synthase
1388210_at	mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1
1388211_s_at	cytosolic acyl-CoA thioesterase 1 / mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1
1367643_at	fibroblast growth factor 21 (FGF21)
1391534_at	Elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, y
1396521_at	STAR-related lipid transfer (START) domain containing 4 (predicted)
1379361_at	peroxisomal biogenesis factor 11A
1387740_at	peroxisomal biogenesis factor 11A
1396366_at	Peroxisomal biogenesis factor 12
1369203_at	Wnt inhibitory factor 1
1372966_at	hypothetical LOC296504 (predicted)
1376079_at	Smf1 (suppressor of lin-12) 1 homolog (C. elegans)
1386661_at	mitochondrial protein, 18kDa
1391269_at	PIM2
1396081_at	spine homolog 1 (Drosophila) (predicted)
1378497_at	---

ストレス応答遺伝子群

脂質代謝遺伝子群

VPA暴露時上記遺伝子群と変動の相関が高い遺伝子群

スコア化の例

	001 APAP	005 VPA	006 CFB	008 RIF	011 PhB	012 OPZ	014 ASA	015 IM	017 DFN	020 NFT
stress	0.01		0.01	0.06	0.21	0.00	0.19	0.55	2.63	1.03
lipid metabolism	0.06			0.08	0.11	0.01	3.30			0.06
unknown function	0.02		0.17	0.22	1.01	0.03	0.31	1.40		0.77

	021 BB	023 DZP	027 CMA	030 WY	034 SS	055 EE	080 TAG	081 MXS	070 AMT	071 HYZ
stress	0.01	3.16	1.42	0.01	0.00	0.00	0.55	1.33	0.00	2.98
lipid metabolism		0.29	0.05			0.35	0.88	0.13	0.16	1.18
unknown function	0.07	0.65	0.53	0.07	0.02	-0.08		0.06	0.05	1.22

	072 IBU	073 NPX	074 QND	079 FFB	083 EBU	083 TAN	100 SUL
stress		2.65	3.78	0.00	0.74		
lipid metabolism			2.90		1.14	-0.30	3.46
unknown function	3.21		1.65	-0.09	1.00	-0.43	

最終年度予測システムを充実させるための課題

- いかに納得性のある指標の定量化ができるか
- いかに毒性学的に意味のある遺伝子セットを揃えるか
- いかに毒性学的に検証可能な毒性パスウェイを提出できるか
- いかに毒性学的に意味のある種差ブリッジングマーカーを揃えるか

→ 基盤研究からのフィードバックが必須

別添 4

厚生労働省科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

薬物誘発ラット肝病変の発現機構と遺伝子発現プロファイルに関する研究

分担研究者 土井邦雄 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

研究要旨

本年度はまず、streptozotocin (SZ)による肝毒性の性状を *in vivo* と *in vitro* で比較・検討し、遺伝子発現プロファイルは両者で良く相関しているが、肝細胞の形態変化には相違がみられることを明らかにした。ついで、nitrofurazone (NF)による肝細胞 mitogen 作用の発現機構を明らかにした。さらに、本プロジェクトを補完する目的で、DNA 傷害物質 ethylnitrosourea (ENU) による胎児中枢神経の傷害期および修復期における遺伝子発現プロファイルを明らかにした。

A. 研究目的

化学物質による肝毒性の性状（遺伝子発現プロファイルと病変）に関し、*in vivo* と *in vitro* との相関を検討することは、本プロジェクトの重要課題の一つである。そこで、糖尿病モデルの誘発に汎用されている streptozotocin (SZ)を用いて、この点について検討する。併せて、SZの肝への直接作用を明らかにする。ついで、本プロジェクトでも取り上げられている nitrofurazone (NF) の肝細胞 mitogen 作用の発現機構を、フリーラジカルの関与との関連で、遺伝子発現プロファイルの面から明らかにする。さらに、本プロジェクトを補完する目的で、DNA 傷害物質である ethylnitrosourea (ENU) による胎児中枢神経毒性に関する遺伝子発現プロファ

イルを明らかにする。

B. 研究方法

(1) SZによる肝毒性の性状に関する *in vivo* と *in vitro* の比較

In vivo の実験については、Crj-CD-1 雄マウスに SZ (200mg/kg) を腹腔内投与し、6 から 48 時間後にかけて経時的に諸種の検索を行った (Kume et al.: *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55, 467-480, 2004; 56, 235-244, 2005)。

一方、*in vitro* の実験については、上記系統の雄マウスから調整した肝細胞初代培養系を用い、1-100mM の濃度の SZ に 6 ないし 24 時間暴露後に諸種の検索を行った (Kume et al.: *Exp. Toxicol. Pathol.*, 56, 245-253, 2005)。

(2) NFによる肝細胞 mitogen 作用の発現機構

雄の F344 ラットに 80mg/kg の NF を腹腔内投与し、24 時間後まで経時的に諸種の検索を行った。併せて、NF 投与の 0.5 時間前と 5 時間後に 50mg/kg の抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC) を腹腔内投与したラットについても同様に検索した。いずれの場合も、処分の 2 時間前に 50mg/kg の BrdU を腹腔内に投与した (Ito et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, in press)。

(3) ENU による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析

妊娠 13 日齢の雌ラットに 60mg/kg の ENU を腹腔内投与し、投与 3 から 48 時間後にかけて胎児終脳を採材して諸種の検索を行った。遺伝子発現プロファイルに関しては、傷害期 (6 時間後) および修復期 (24 時間後) について解析した (Katayama et al.: *Develop.Deprod.Toxicol.*, in press)。

C. 研究結果

(1) SZ による肝毒性の性状に関する in vivo と in vitro の比較

In vivo: SZ 投与 6 および 12 時間後には膵島ベータ細胞が急激に傷害を受け、血清インスリン値が一過性に上昇し、血糖値が減少すること、および、24 時間を境に血清インスリン値は正常値よりも低下し、血糖値が上昇することが確認された。また、投与 6 時間後には形態学的変化としてミトコンドリアの膨化が観察され、同時に TBARS やリン脂質過酸化物の増加がみられた。投与 24 および 48 時間後には PCNA 陽性肝細胞数および網

状赤血球数の明瞭な減少が観察された。

さらに、マイクロアレイ解析では、細胞周期停止関連遺伝子 (*GADD45, p21*)、アポトーシス促進関連遺伝子 (*BAX, Bcl2-like11, Apaf1, p53, perp, mdm2*)、免疫/炎症関連遺伝子およびストレス反応/異物代謝関連遺伝子の up-regulation、ならびに、糖、脂質およびタンパク質代謝関連遺伝子の down-regulation が観察された。アポトーシスに関しては、抑制関連遺伝子 (*bcl-xl, bag3*) の up-regulation も同時に観察された (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 55,467-480,2004; 56,235-244,2005)。

In vitro: 肝細胞の 50% 生存率 (IC50) は SZ 6 時間暴露では 62mM および 24 時間暴露では 7mM であった。また、3 および 10mM の 24 時間暴露では形態学的に肝細胞の核クロマチンのマージネーションが観察された。さらに、マイクロアレイ解析では、in vivo と同様、細胞周期停止関連遺伝子、アポトーシス促進関連遺伝子およびストレス反応/異物代謝関連遺伝子の up-regulation ならびに、糖、脂質およびタンパク質代謝関連遺伝子の down-regulation が観察された (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 56,245-253)。

(2) NF による肝細胞 mitogen 作用の発現機構

NF の血中濃度は投与後速やかに上昇し、1 時間後に最大となり、その後徐々に減少した。また、NF 投与により BrdU labelling index で示される肝細胞増殖活性は顕著に増加したが、肝細胞増殖に先立って生化学的にも組織学的にも肝細胞傷害は認められなかった。こうした NF 投与

による肝細胞増殖は、細胞内グルタチオン濃度を上げ、抗酸化剤としても作用する NAC の投与で、対照レベルにまで抑制された。さらに、NF 投与後の遺伝子発現プロファイル調べたところ、投与後 1、2 時間目に *c-jun*, *c-myc* が増加し、続いて *TNF- α* および *TGF- α* が投与後 8 時間目にかけて増加、*c-Ha-ras* が投与後 8-12 時間目、および *cyclin E* が 16 から 20 時間目にかけて増加した。こうした遺伝子の発現増加は NAC の投与で抑制された。なお、HF- κ B のサブユニットである p65 の肝細胞核内への移行は認められなかった (Ito et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, in press)。

(3) ENU による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析

Laser scanning cytometer による胎児終脳神経上皮細胞の細胞周期解析の結果、ENU 投与後早期に S 期細胞の集積 (6 時間後にピーク) とアポトーシス細胞の増加 (12 時間後にピーク) がみられたが、いずれも 48 時間後には対照群のレベルに戻った。また、マイクロアレイ解析では、発現増加が見られた遺伝子数は傷害期で 21 および修復期で 15、一方、発現減少が見られた遺伝子数は傷害期で 5 および修復期で 3 であった。傷害期に増加を示した遺伝子のなかにはアポトーシスや細胞周期停止に関与する p53 標的遺伝子が含まれており、また、修復期に増加を示した遺伝子には増殖促進関連遺伝子 (Id) および osteopontin 遺伝子が含まれていた。一方、傷害期に発現減少を示した遺伝子のなかにはコレステロール生合成関連遺伝子 (*liver steroyl-coenzyme*

Adesaturase, *cytosolic 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A synthase*, *squalene synthase*) およびコレステロール恒常性維持関連遺伝子 (*growth-response protein (CL-6)*) が含まれていた (Katayama et al.: *Develop.Reprod.Toxicol.*, in press)。

D. 考察

(1) SZ による肝毒性の性状に関する in vivo と in vitro の比較

今回の検査の結果、in vivo では、SZ 投与後血糖値が上昇する以前に、肝における TBARS および脂質過酸化物の増加といった酸化的ストレスの増加を示唆する所見と肝細胞のミトコンドリアの膨化が認められ、酸化的ストレスを介した SZ の肝細胞への直接傷害作用が示された。同時に、肝細胞増殖抑制が観察され、これはマイクロアレイ解析で認められた細胞周期停止関連遺伝子やアポトーシス促進関連遺伝子の up-regulation と関連しているものと考えられた。

一方、in vitro のマイクロアレイ解析では、免疫/アレルギー関連遺伝子を除き、in vivo のそれときわめて類似した結果が得られた。免疫/炎症関連遺伝子の発現に関する in vivo と in vitro の相違は、前者ではクッパー細胞や免疫応答細胞が含まれているのに後者ではそれが欠けていることによるものである。また、in vitro では肝細胞で形態学的にアポトーシスの初期像と考えられている核クロマチンのマージネーションが観察された。

このように、in vivo と in vitro で、遺伝子発現プロファイルには良い相関が認められたが、肝細胞の形態学的変化には相

違が見られた。その原因については今後の検討課題である (Kume et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, 55,467-480,2004; 56, 235-244, 245-253,2005)。

(2) NF による肝細胞 mitogen 作用の発現機構

今回の検索の結果、NF は肝細胞の傷害を伴わずに肝細胞増殖作用を示す mitogen としての作用を有し、その作用にフリーラジカルが関与していることが示された。また、NF の mitogen 作用は(a)フリーラジカル発生→(b)early response genes の発現増加による肝細胞の priming (G0→G1)→(c)TNF- α および TGF- α による増殖刺激→(d)c-Ha-ras および cyclin E の増加→(e)restriction point 通過と S 期移行→(f)肝細胞 DNA 合成、という経路を辿る可能性が示唆された。

NF により発現が増加した遺伝子セットは他の mitogen として知られている物質のそれと良く類似していた。また、肝毒性物質投与後や肝切除後にみられる compensatory proliferation と比べると、*c-jun*, *c-myc*, *TNF- α* 等の発現増加は共通していたが、compensatory proliferation でみられる *EGF* や *HGF* の発現増加は認められなかった。なお、フリーラジカル発生とその後の変化を結ぶ因子として最近注目されている NF- κ 活性化を調べたところ、そのサブユニットである p65 の核内への移行は認められなかった。

フリーラジカルおよびそれに伴う GSH を含む細胞の防御システムの変化は、細胞の酸化還元電位や環境に変化をもたらすが、この変化はタンパクキナーゼやフォスファターゼおよびその他の転写因子

等のシグナル伝達系に影響することが知られている。NF 投与に際し、これらの影響がどの程度であったかは不明であるが、フリーラジカル発生による細胞内の環境変化が、集合的に遺伝子発現の変化、さらには最終的に肝細胞増殖へと導いた可能性が考えられた (Ito et al.: *Exp.Toxicol.Pathol.*, in press)。

(3) ENU による胎児中枢神経毒性に関するマイクロアレイ解析

コレステロール代謝は神経細胞の発達に必要な役割を果たすことが知られている。ところで、今回の ENU による胎児中枢神経の傷害期においては、コレステロール生合成に必要な酵素関連遺伝子の発現減少に加え、コレステロールの恒常性維持に必要な CL-6 遺伝子の発現減少も観察されているところから、これらの遺伝子の発現減少が ENU 暴露後の胎児中枢神経系の発達異常に何らかの役割を果たしているものと推察された。傷害期にはまた、既に RT-PCR の結果を基に報告したアポトーシスや細胞周期停止に関与する遺伝子群の発現増加も認められた (Katayama et al.: *Neurobiol.Dis.*, 18,218-225,2005)。

ENU による胎児中枢神経の修復期には、2 種類の Id 遺伝子の発現が増加していた。Id タンパクは、多くの細胞系列で細胞分化を正の方向に制御している basic helix-loop-helix (bHLH) の主要な負のアンタゴニストとして作用しており、皮質形成期の細胞の運命を決定づける重要な役割を果たしている。こうしたことから、Id タンパクは、ENU による傷害によって失われた神経上皮細胞を回復するため、神