

B-4. DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、日立製作所ライフサイエンス事業部ゲノム技術開発センター (Saitama, Japan) に依頼した。使用したスライドは Rat Drug Response Chip (Hitachi) であり、その特徴として薬物動態関連遺伝子を中心に 1,097 種類の遺伝子を搭載している。また、特に APAP においては EST を含む 14,815 遺伝子を搭載した Agilent Rat cDNA microarray G4105A (Palo Alto, CA) でも解析を行った。遺伝子発現のスキャニングは ScanArray 5000 (GSI Lumonics, Watertown, MA) を用いて行った。画像データから数値データへの変換は、専用ソフト QuantArray (GSI Lumonics) を用いて行った。バックグラウンドにはネガティブコントロールの蛍光値を用い、各スポットの蛍光値から差し引いた。処置群と対照群の間のノーマライゼーションは、グローバルノーマライゼーション法 (全体のスポットを用いて正規化する方法) を用いた。各遺伝子は 2 ヶ所スポットしてあり、2 スポット間の平均値を算出して各遺伝子の発現量 (蛍光強度) を求めた。

B-5. DNA マイクロアレイによって得られたデータの解析

B-4 で得られた数値データに対する解析は、Agilent Technologies (Palo Alto, CA) の解析ソフトである GeneSpring を用いて

行った。データに対する総合的な補正として GeneSpring に含まれる LOWESS normalization を適用した。遺伝子誘導および抑制の評価は、2 倍以上または 1/2 以下の変動を基準とした。また、階層クラスタリングおよび QT クラスタリングにおいて、相関値は Standard correlation を使用した。

C. 研究結果

C-1. 5 種類の典型的肝毒性化合物投与群の血清試料の生化学検査

APAP の AST、ALT、LDH、ALP について 6、12、24、48 時間の各投与時間における 4 試料の平均値に標準誤差を付した結果を以下に示した (Fig. 1)。APAP 投与後 6 時間で AST の活性は対照群と比べ、有意な増加が認められたが、投与時間依存的な傾向は認められなかった。ALT は投与後 24 時間で 12 時間と比べ減少し、48 時間にまた上昇するという AST と同様な推移を示した。LDH の活性は投与時間依存的に増加し、24 時間で最大になる傾向が認められた。投与後 6 時間と 12 時間で ALP の活性に有意な減少が認められ、投与後 24 時間において活性値の低下が認められたが、対照群の活性値までには至らなかった。

BB 投与群の AST、ALT、LDH、ALP の結果を 6、12、24、48 時間の各投与時間について 4 試料の平均値に標準誤差を付した結果を以下に示した (Fig. 2)。BB 投与後 24 時間において、AST は対照群

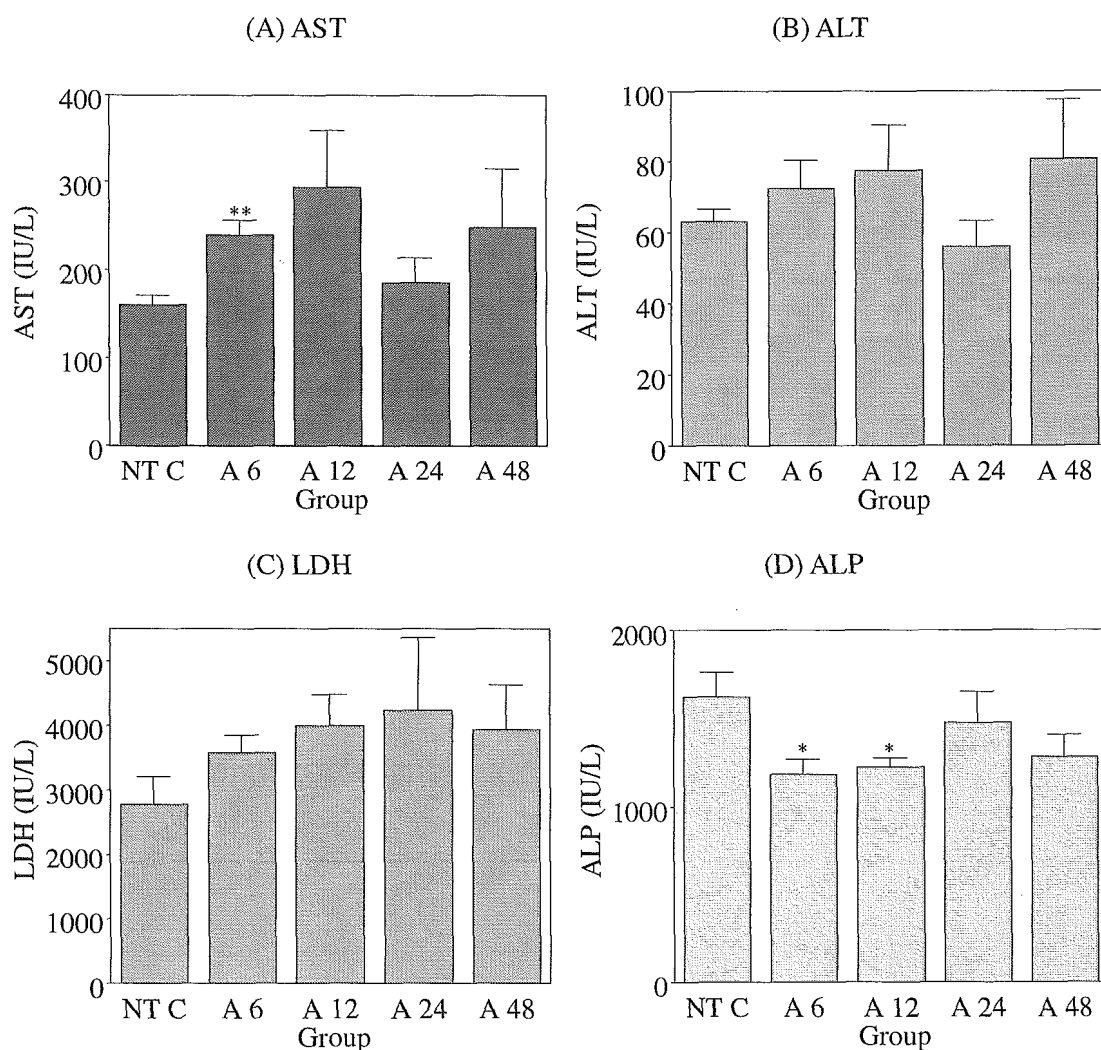


Fig. 1. Changes of various biochemical markers in APAP-administered rat serum.

Data are expressed as mean $\pm$ SE from four rats.

Significantly different from NT C group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

に比べて有意に上昇した。また、24、48時間で投与時間依存的に増加する傾向が認められた。ALTは投与後12時間までは有意な減少、それ以降は有意な増加が認められ、増加についてはASTと同じ傾向を示した。LDHは投与後どの時間でも対照群より高値であった。ALPは投与後12時間で有意な減少が認められた。CT投与群のAST、ALT、LDH、ALPの結果

を6、12、24、48時間の各投与時間について4試料の平均値に標準誤差を付した結果を以下に示した (Fig. 3)。CT投与後6時間でAST、ALTおよびLDHで対照群と比べて有意な上昇が認められた。ASTは投与後24時間までは対照群よりは高値ではあるものの6時間以後、減少する傾向が認められ、48時間では有意な上昇が認められた。ALTもASTとほぼ

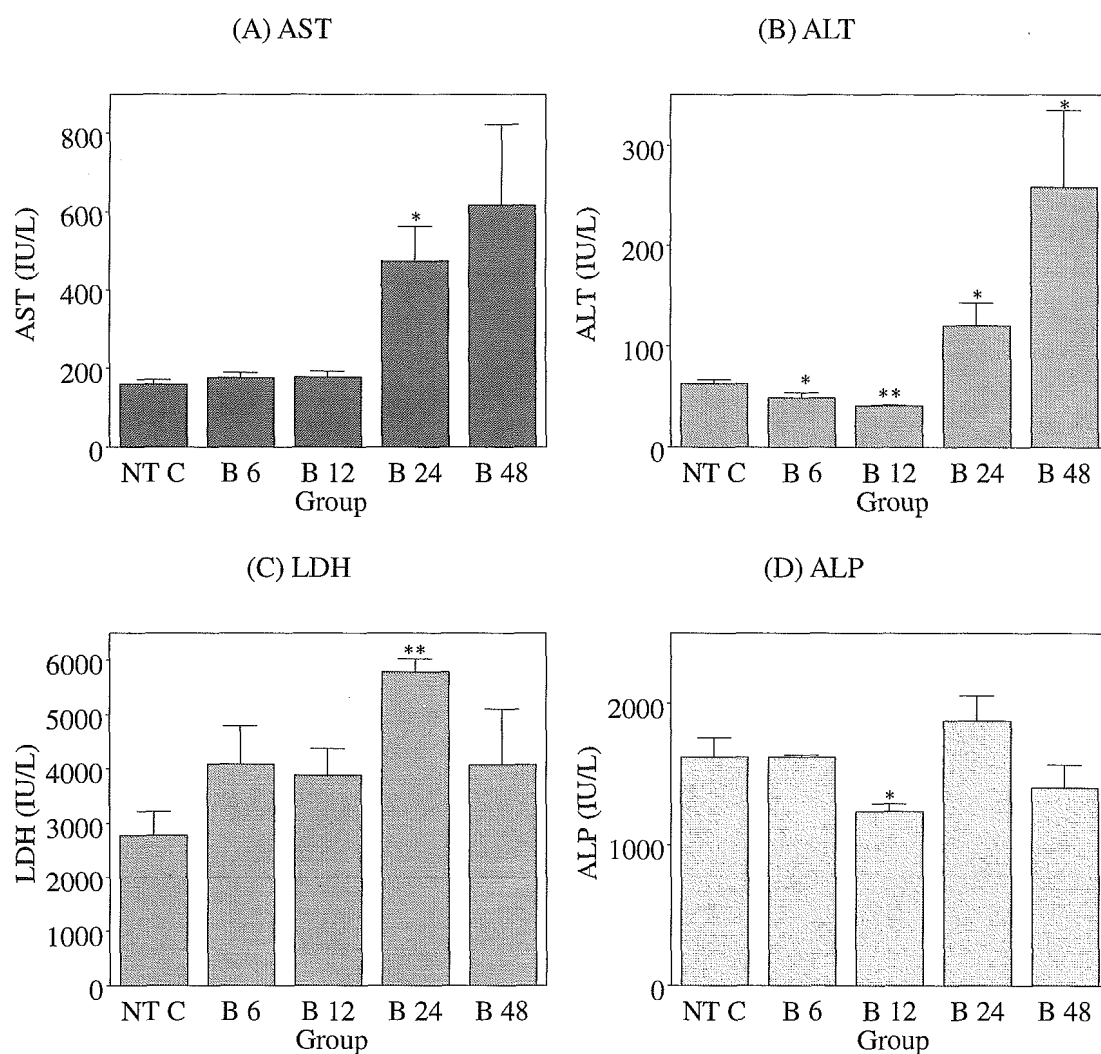


Fig. 2. Changes of various biochemical markers in BB-administered rat serum.

Data are expressed as mean $\pm$ SE from four rats.

Significantly different from NT C group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

同じ傾向を示した。LDH では、投与時間依存的に減少する傾向が認められた。ALP では投与後 6 時間での有意な上昇の後、12 時間から 24 時間で減少が認められ、48 時間には再度上昇を示した。

DMN 投与群の AST、ALT、LDH、ALP の結果を 6、12、24、48 時間の各投与時間について 4 試料の平均値に標準誤差を付した結果を以下に示した (Fig. 4)。

投与後 48 時間で、対照群と比べて AST、ALT では有意な活性の増加が、LDH、ALP では逆に有意な活性の減少が認められた。AST は、投与後 48 時間の上昇以外に有意な変化は認められなかった。ALT も AST とほぼ同じ傾向を示した。LDH は投与時間依存的に減少する傾向が認められた。ALP も投与時間依存的な変化は認められなかった。

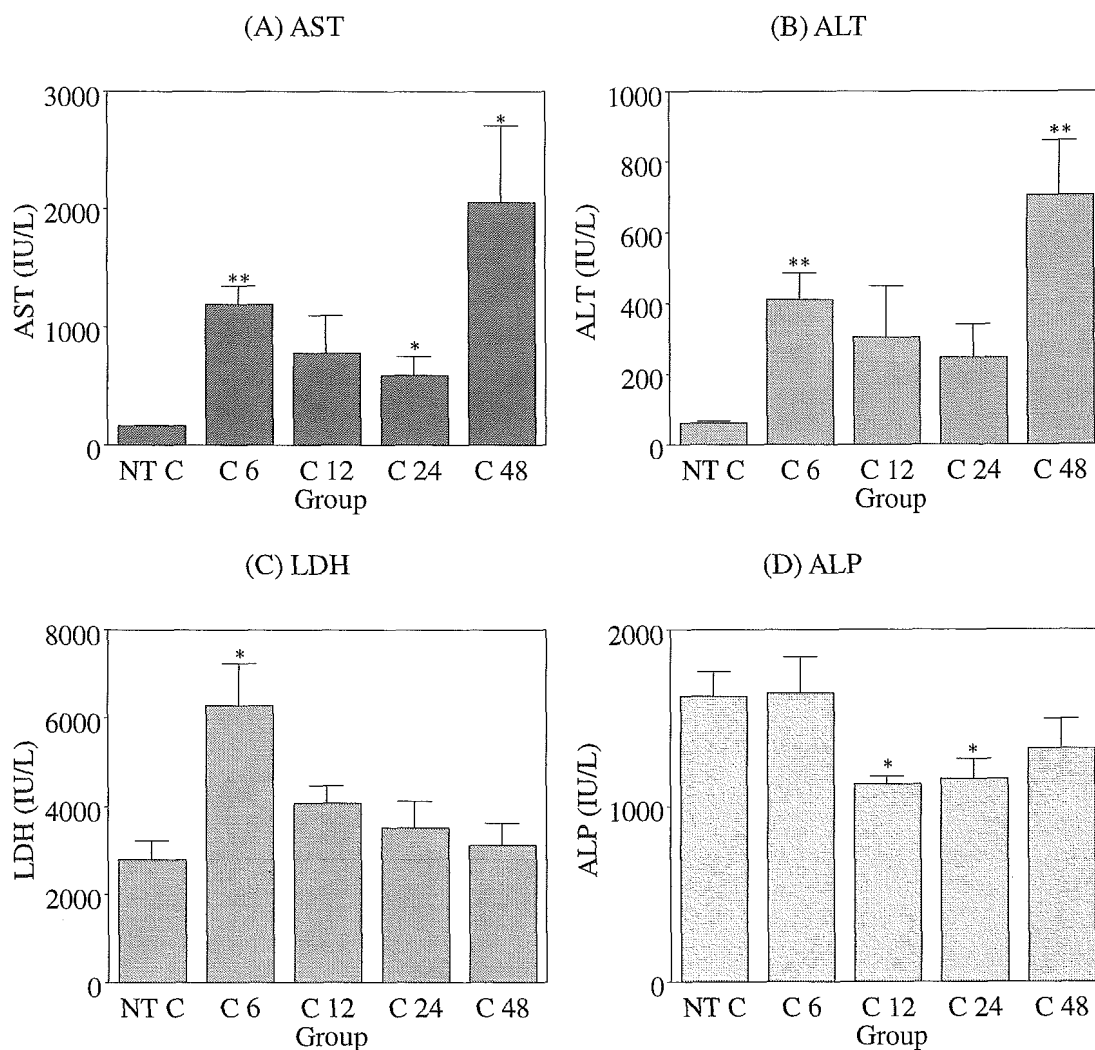


Fig. 3. Changes of various biochemical markers in CT-administered rat serum.

Data are expressed as mean $\pm$ SE from four rats.

Significantly different from NT C group (* p <0.05, ** p <0.01).

TA 投与群の AST、ALT、LDH、ALP の結果を 6、12、24、48 時間の各投与時間について 4 試料の平均値に標準誤差を付した結果を以下に示した (Fig. 5)。TA 投与後 24 時間で、対照群と比べて AST、ALT、LDH に著しい増加が認められた。AST において、投与後 24 時間以降対照群に対して有意な上昇が認められた。ALT にも AST と全く同じ傾向が認められた。

LDH においては投与後 24 時間の上昇以外は対照群との明確な差異は認められなかった。

以上の結果から、APAP、BB、CT、DMN および TA それぞれの毒性発現時間は 12 時間、24 時間、6 時間、48 時間および 24 時間と判断された。

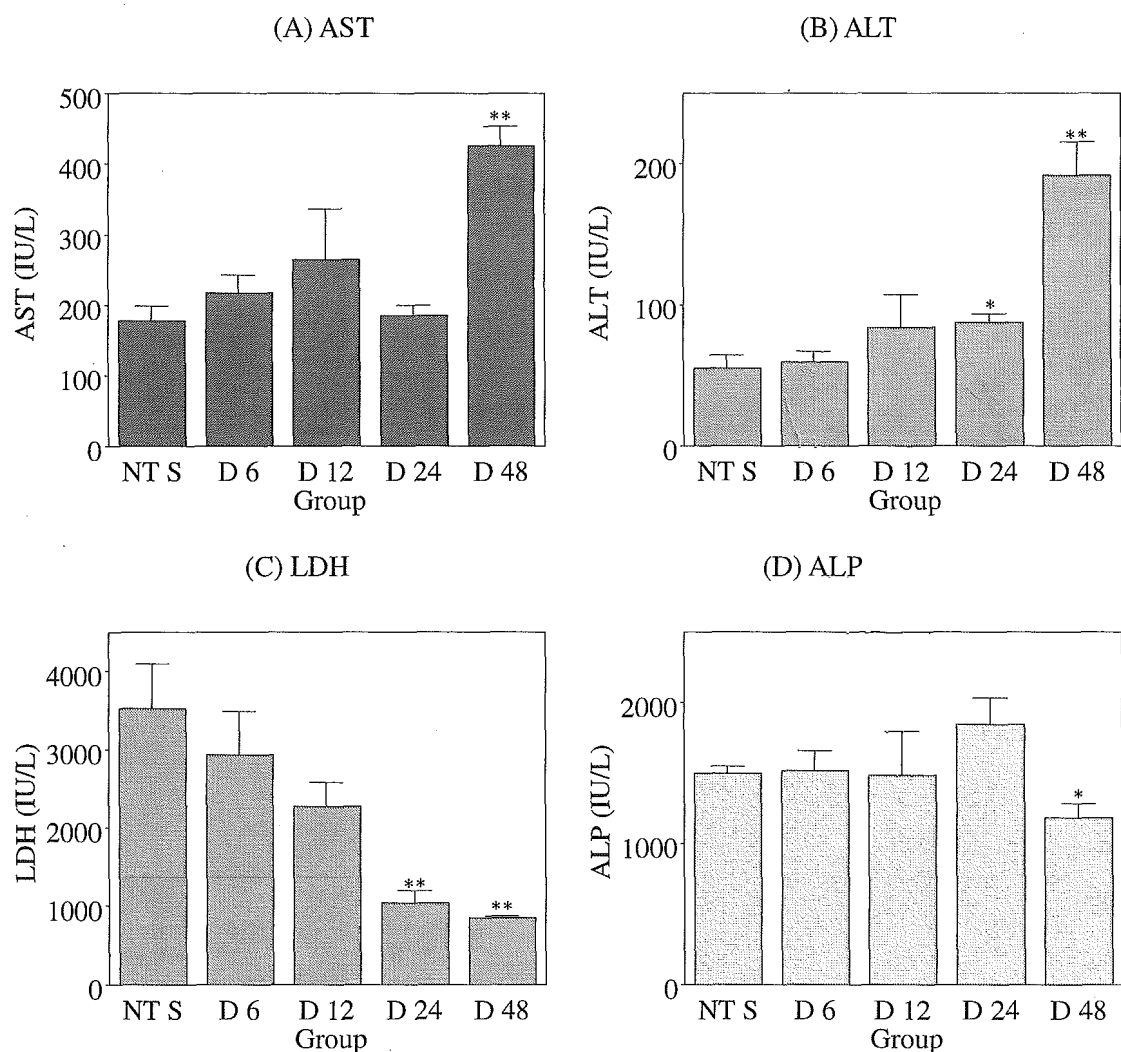


Fig. 4. Changes of various biochemical markers in DMN-administered rat serum.

Data are expressed as mean $\pm$ SE from four rats.

Significantly different from NT C group (*p<0.05, **p<0.01).

C-2. 複数の化合物で共通して変動が認められた遺伝子群

決定したそれぞれの化合物の毒性発現時間において、少なくとも 4 種類の化合物において 2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子は、DNA マイクロアレイに搭載された 1,097 遺伝子のうち 52 種類であった。そのうち、全ての化合物で変動が見られた遺伝子は 12 種類で、その内

訳は誘導されたものが 4 種類、抑制されたものが 8 種類であった。残りの 40 種類の遺伝子の内訳は誘導されたものが 21 種類、抑制されたものが 19 種類であった。また、変動が認められた遺伝子を以下に示した (Table 1)。

これらの誘導または抑制された遺伝子群を階層クラスタリングによって分類した結果を以下に示した (Fig. 6)。

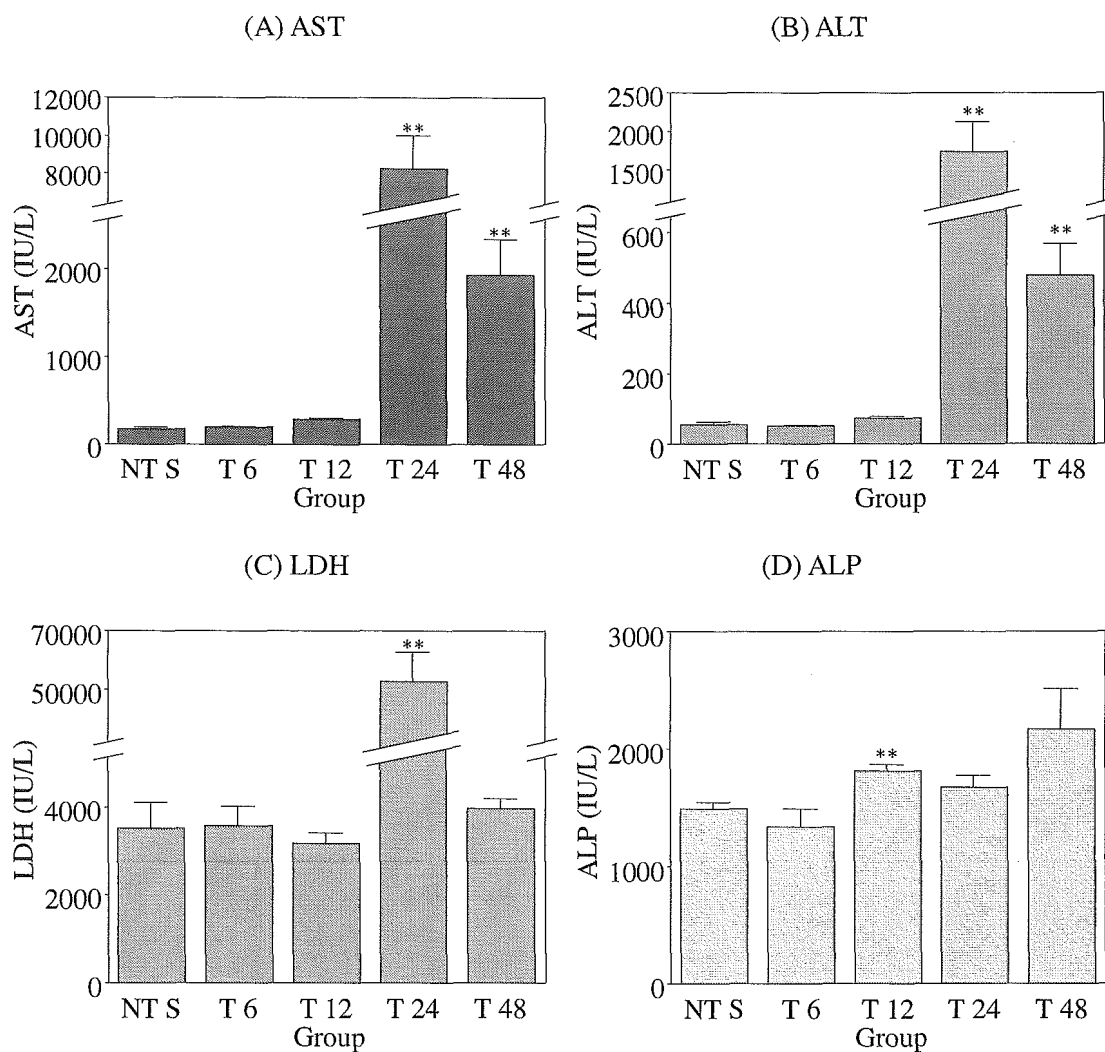


Fig. 5. Changes of various biochemical markers in TA-administered rat serum.

Data are expressed as mean $\pm$ SE from four rats.

Significantly different from NT C group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

誘導された遺伝子群では毒性が発現した時間において BB、CT、TA が比較的近い階層に配置された。DMN は 6 時間を除く全ての投与群が非常に近い階層に配置され、APAP は全体的に他の投与群とは離れた階層に配置された。抑制された遺伝子群においては、各化合物の毒性発現時間の群は CT と TA が非常に近く、BB

と CT はやや近くの階層に配置され、APAP は CT、TA 群を含む階層のやや近くに配置されていた。

Table 1. Genes significantly changed in at least 4 chemicals-administered rat livers.

Up regulation			
Gene name	Genbank ID	Common name	Pass number
Heme oxygenase	NM_012580	Hmox1	5
Diaphorase (NADH/NADPH)	J02679	Dia4	5
T-cell death associated gene	NM_017180	Tdag	5
P-glycoprotein/multidrug resistance 1	AF257746	Pgy1	5
Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)	U13396	Jak2	4
gro	NM_030845	Gro1	4
Heat shock cognate protein 70	NM_024351	Hsc70	4
RNA polymerase I (127 kDa subunit)	NM_031773	Rpo1-2	4
Small inducible gene JE	Scya2	Scya2	4
thioredoxin reductase 1	NM_031614	Txnrd1	4
Heat shock protein 70-1	Z75029	Hspa1a	4
Lysozyme	NM_012771	Lyz	4
Rat mRNA for alpha-2u globulin-related protein	X13295	Lcn2	4
Rattus norvegicus aldose-reductase-like protein MVDP/AKR1-B7 mRNA, complete cds	AF182168	Rn.32702	4
Rattus norvegicus interferon inducible protein 10 (IP-10) mRNA, complete cds	U22520	Rn.10584	4
Rattus norvegicus VESP11 mRNA for vascular endothelial cell specific protein 11, complete cds	AB027561	Rn.65187	4
Aldolase A, fructose-bisphosphate	NM_012495	Aldoa	4
Caspase 3, apoptosis related cysteine protease (ICE-like cysteine protease)	U49930	Casp3	4
potassium channel, subfamily K, member 3	U02316	Kcnk3	4
Cyclin G1	X70871	Cngl	4
DNA-damage-inducible transcript 1	NM_024127	Gadd45a	4
Glutathione synthetase gene	L38615	Gss	4
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	X55286	Hmgcr	4
Activating transcription factor 3	NM_012912	Atf3	4
Cathepsin L	Y00697	Ctsl	4
Down regulation			
Gene name	Genbank ID	Common name	Pass number
sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 2	NM_031732	Sult1a2	5
Rattus norvegicus NADPH oxidase 4 mRNA, complete cds	AY027527	Rn.14744	5
Gastrin	NM_012849	Gas	5
stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)	NM_139192	Scd1	5
Sulfonylurea receptor	NM_013039	Sur	5
Thyroid stimulating hormone receptor	NM_012888	Tshr	5
thyroid hormone receptor	X12744	Thra	5
Rattus norvegicus brain digoxin carrier protein mRNA, complete cds	U88036	Rn.5641	5
Neurotrophin 5 (neurotrophin 4/5)	NM_013184	Ntf5	4
ornithine aminotransferase	NM_022521	Oat	4
triadin 1	AJ243304	Trdn	4
Neuropeptide Y5 receptor	U66274	Npy5r	4
Transforming growth factor beta stimulated clone 22	NM_013043	Tgfbli4	4
Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	L07126	Rb1	4
R.norvegicus mRNA for V1a arginine vasopressin receptor	Z11690	Rn.32282	4
Rattus norvegicus cytochrome P450 2D18 mRNA, complete cds	U48220	Cyp2d18	4
Rattus norvegicus L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase precursor (HAD) mRNA, complete cds	AF095449	Rn.17172	4
ATPase inhibitor (rat mitochondrial IF1 protein)	AF368860	Atpi	4
Diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	M20268	Dbi	4
expressed in non-metastatic cells 3, protein (nucleoside diphosphate kinase)	AY017337	Nme3	4
Rat insulin-like growth factor-I mRNA, 3' end	X06108	Rn.6282	4
Estrogen sulfotransferase	NM_012883	Ste	4
galanin receptor 3	NM_019173	Galr3	4
Pim-1 oncogene	X63675	Pim1	4
carbonic anhydrase 2	X58294	Ca2	4
CL1BA protein	U72487	CL1BA	4
Epidermal growth factor	U04842	Egf	4

Genes those expression were judged as being present or altered by more than 2.0-fold in at least 4 chemicals at maximal toxic time point (APAP: 12h; BB: 24h; CT: 6h; DMN: 48h; TA: 24h).

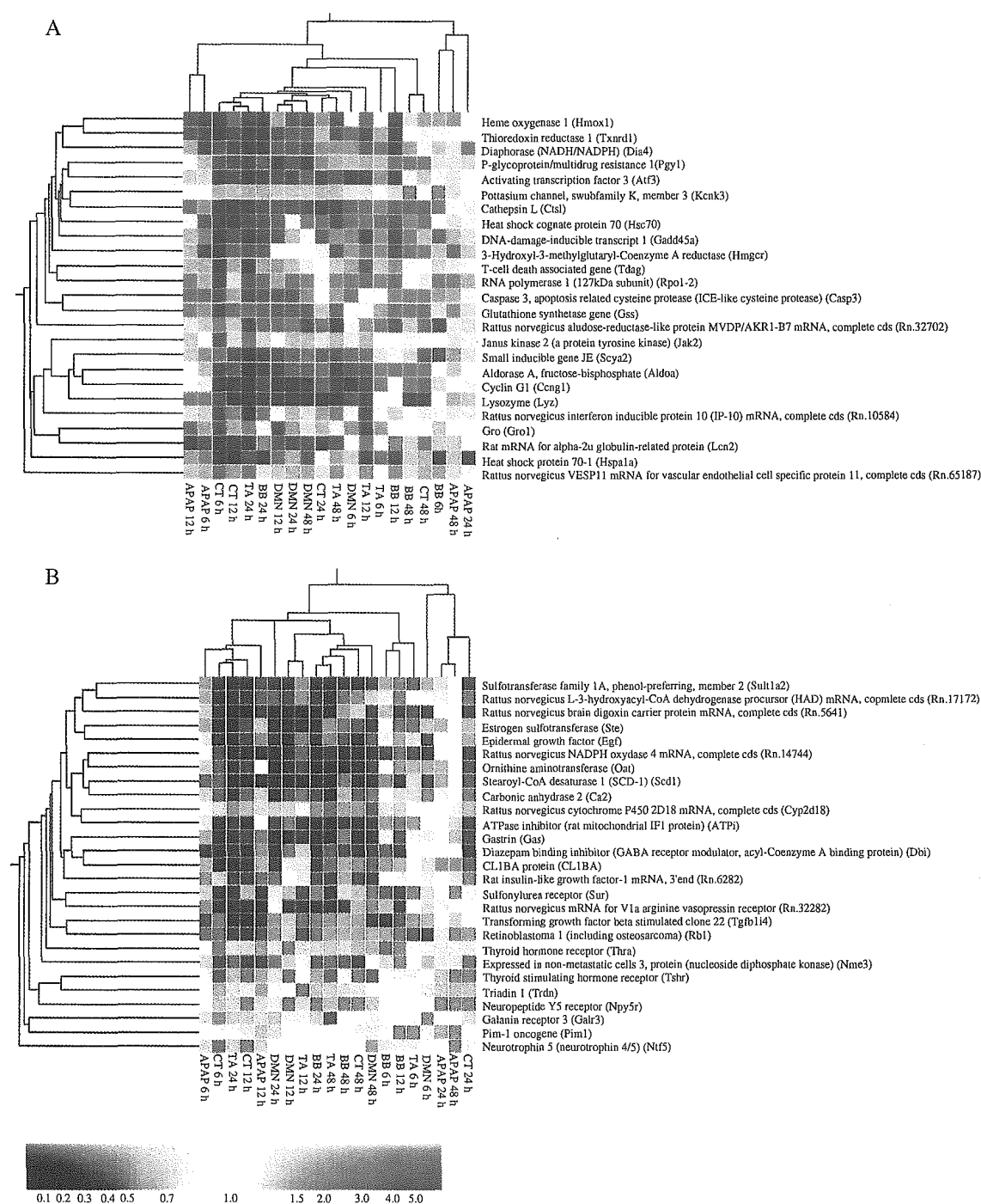


Fig. 6. Cluster images of expression profiles of the genes in Table 1.

Gene expression data expressed as fold of control values and range of change represented by colors at the bottom of the cluster images. Cluster image of (A) 25 induced genes and (B) 27 suppressed genes. The expression pattern of each gene was displayed here as a horizontal strip. The result of hierarchical cluster analysis was shown with dendrogram using the genes in Table 1.

C-3. 複数の化合物の毒性発現時間に大きく変動が認められた遺伝子群

C-2 で示した遺伝子群の中で、その発現変動のピークが少なくとも 2 つの化合物の毒性発現時間と重なる遺伝子群を、より多くの化合物に共通している遺伝子から順に 10 種類を集め、その発現変動と、個々の遺伝子プロファイルの平均をとったものについて示した (Fig. 7)。各投与群における遺伝子変動プロファイルは、本章で抽出した遺伝子群において相互で非常に似通っており、その平均値を示すグラフは毒性発現時間を反映したパ

ターンを示した。

C-4. QT クラスタリングによる主要な遺伝子発現変動パターンの検出

これまでの解析は血清の生化学検査値に基づく毒性発現時間と遺伝子発現変動について行ってきた。ここで用いる QT クラスタリングはある遺伝子の発現変動プロファイルに対して、設定した相関係数以上の遺伝子の個数が指定した個数を超える場合、一つのクラスターとしてカウントし、最終的にいくつかのクラスターを検出するというアルゴリズムであ

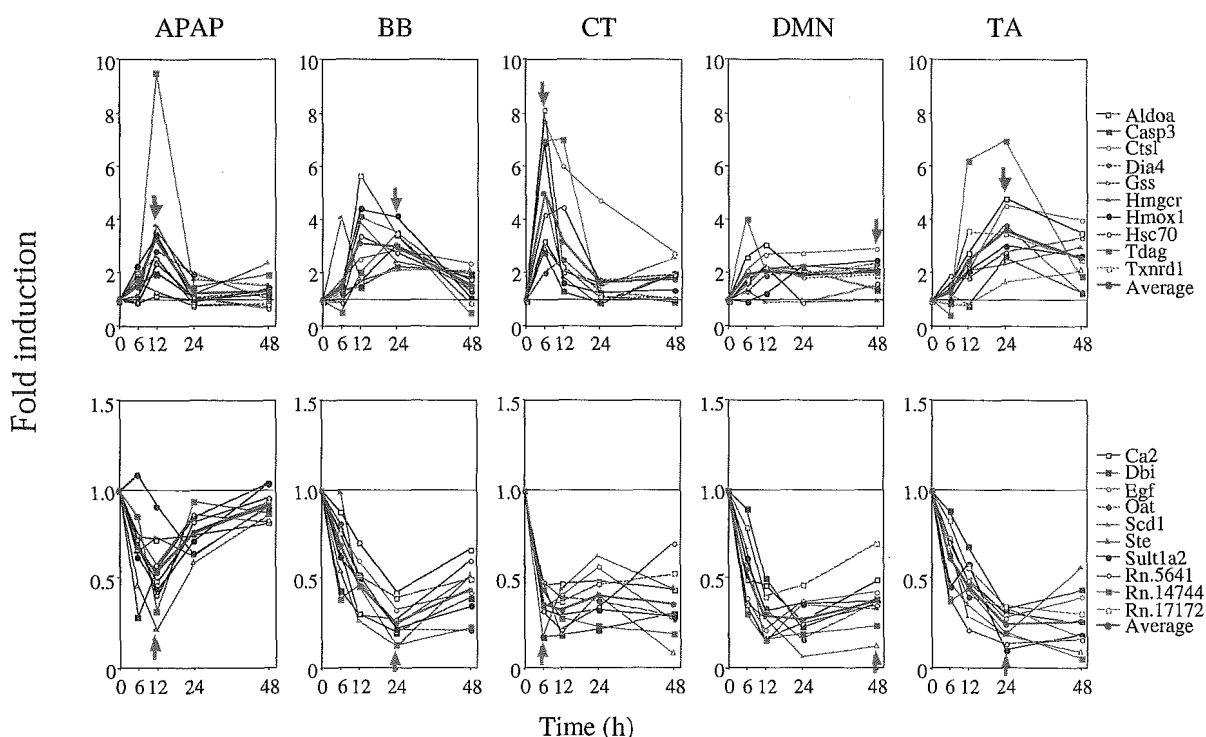


Fig. 7. Time dependent changes of expression in the 10 representative genes in Table 1.

Red arrow indicates the maximal toxic time in each chemical-administrated group estimated from the change of biochemical markers. Each data represent the expression profiles of each 10 genes. Red-bold-line represent expression profiles using the average values of individual in each group.

る。DNA マイクロアレイに搭載された 1,097 遺伝子のうち、全ての投与群において 0.01 以上の蛍光強度が得られた 759 遺伝子を用い、相関係数の閾値を 0.5、遺伝子数の閾値を 100 に設定し、それぞれの投与群において QT クラスタリングを行い、抽出された遺伝子群の平均値を以下に示した (Fig. 8)。この条件において得られたパターンは、誘導型と抑制型

の 2 種類であった。各投与群において抽出されたクラスターの大きさは、誘導型のクラスターで APAP、BB、CT、DMN および TA でそれぞれ 109、105、143、139、153 であり、抑制型のクラスターでは APAP、BB、CT、DMN および TA で 122、159、180、144、163 であった。また、I-3-3 において得られたパターンと同じく、毒性発現時間と重なる結果となった。

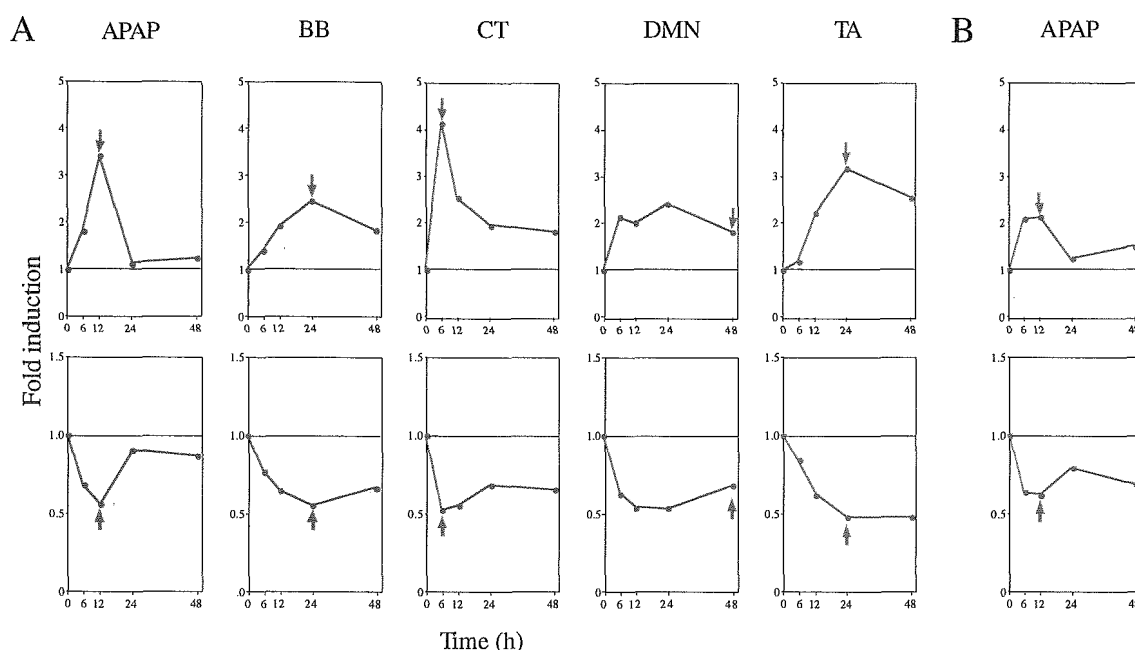


Fig. 8. QT clustering analysis of hepatic gene expression in 5 chemical-administrated rats. (A) Clustering settings were as follows: correlation value was 0.5 and contained more than 100 genes. The method for QT clustering analysis was mentioned in Materials and Methods. Each figure showed an expression profile using the mean value of clustered gene. Red arrow indicates the maximal toxic time in each chemical-administrated group estimated from the change of biochemical markers. In upper groups, APAP, BB, CT, DMN, and TA cluster contained 109, 105, 143, 139, and 153, respectively. In lower groups, APAP, BB, CT, DMN, and TA cluster contained 122, 159, 180, 144, and 163, respectively. (B) QT clustering analysis in APAP-administrated rats performed using Agilent oligonucleotide microarray. Clustering settings were as follows: correlation value was 0.68 and contained more than 1,000 genes. Upper cluster contained 1,058 genes and lower cluster contained 1,106 genes.

さらに、APAP 群のみで検討した Agilent 社の DNA マイクロアレイの解析では、相関係数の閾値を 0.68、遺伝子数の閾値を 1,000 に設定し、QT クラスタリングを行った。Rat Drug Response Chip と同様に、誘導型には 1,058 遺伝子を、抑制型には 1,108 遺伝子を含む 2 つのクラスターが検出でき、APAP の毒性発現時間と発現変動パターンが重なる結果となった。

C-5. QT クラスタリングで抽出される遺伝子と毒性発現時間に基づいて抽出した遺伝子との比較

C-4 において得られたそれぞれの投与群の誘導型および抑制型のクラスターから、少なくとも 4 つの化合物のクラスターに含まれる遺伝子を抽出したものを以下に示した (Fig. 9)。全ての投与群において共通して検出されたものは、誘導型では 3 遺伝子、抑制型では 17 遺伝子であった。抑制型については Fig. 9A に示しており、8 遺伝子が Fig. 7 に含まれていた。しかし、誘導型の 3 遺伝子については Fig. 7 に含まれている遺伝子が認められなかった。

少なくとも 4 投与群で検出された遺伝子のうち、誘導型で Fig. 8A のクラスターと共通したものは 37 遺伝子であり、抑制型では 60 遺伝子であった。この中で Fig. 7 に含まれるものは、誘導型は 7 遺伝子、抑制型は 10 遺伝子全てであった。ここでさらに少なくとも 4 投与群で認められた遺伝子群に対しさらに QT ク

ラスタリングを相関係数の閾値を 0.65、遺伝子数の閾値を 10 に設定して行った。その結果、誘導型は 22 遺伝子 (Fig. 9B)、抑制型は 44 遺伝子 (Fig. 9C) が抽出され、Fig. 7 に含まれる遺伝子は保存されていた。

D. 考察

本章で検討した肝毒性化合物は、比較的古くから知られている典型的な化合物であり、投与量の決定には多くの報告を参考にした。APAP の投与量は、いくつかの論文 (Hu et al., 1996; de Morais et al., 1989) を参考にして検討した。300 mg/kg 体重から 800 mg/kg 体重までのばらつきがあったが、確実な毒性発現が認められるという観点から、本研究では 500 mg/kg 体重とした。BB では 2.5 mmol/kg 体重 (Chakrabarti and Brodeur, 1986)、CT では 1 mL/kg 体重 (Theocharis et al., 2001)、DMN では 20 mg/kg 体重 (Asakura et al., 1998)、TA では 400 mg/kg 体重 (Wang et al., 2000; Zaragoza et al., 2000) とした。投与量を決定する際参考にした過去の報告 (Asakura et al., 1998; Chakrabarti and Brodeur, 1986; Theocharis et al., 2001; Wang et al., 2000; Zaragoza et al., 2000) において肝障害のマーカーとして検討されていたのはいずれの報告でも AST および ALT であり、LDH についてはほとんど検討されていない。本章では、LDH や ALP は特に胆道系の障害に応答する酵素であるため検討を行ったが、ALP は全ての投与

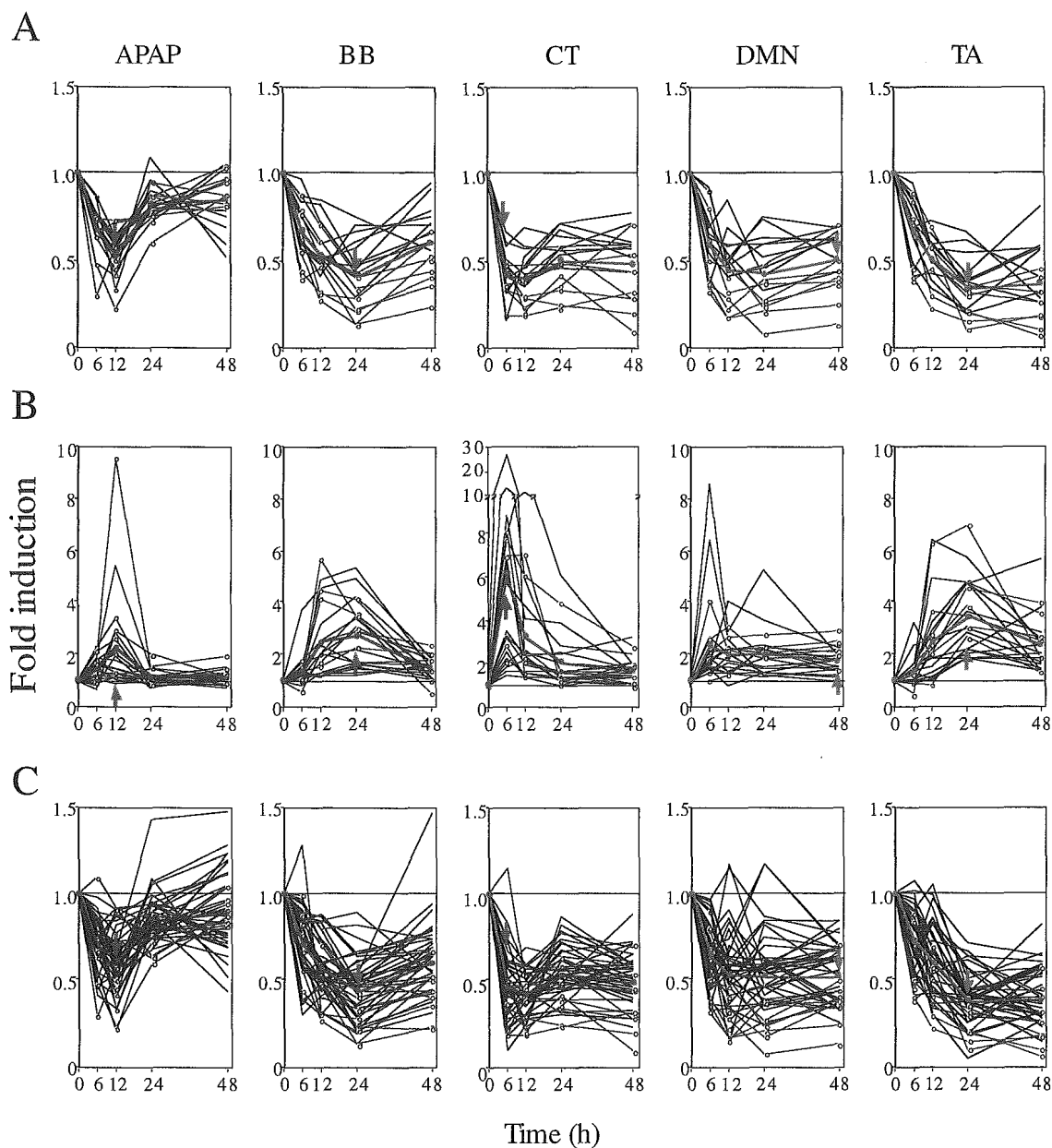


Fig. 9. Major gene expression profiles of 5 chemical-administrated rats. Blue lines showed gene expression profiles appeared in Fig.7. Other gene expression profiles are expressed by black lines. Red arrow indicates the maximal toxic time in each chemical-administrated group estimated from the change of biochemical markers. (A) Gene expression profiles which were down regulated in all chemical-administrated groups. (B) Gene expression profiles which were up regulated in 4 out of 5 chemical-administrated groups. (C) Gene expression profiles which were down regulated in 4 out of 5 chemical-administrated groups. Analysis settings were as follows: correlation value was 0.65 and contained more than 10 genes. Red line showed mean values of all clustered gene.

群で値の有意な上昇は認められなかった。

APAP 投与によって、投与後 6、12 時間において、AST、ALT では活性の上昇が認められ、LDH においては投与後 24 時間までは投与時間依存的な上昇が見られた。過去には 8 週齢の Wister 系雄性ラットに 750 mg/10 mL/kg 体重で i.p 投与後 24 時間で AST、ALT 活性の上昇が報告されている (Li et al., 2002)。しかし、この報告を含め、一般に APAP の投与に使用する溶媒は pH をアルカリ性 (pH 9.6 程度) に調整した生理食塩水が多く、本章では臨床で使用されない不自然な投与方法を避けてコーン油に懸濁させて投与を行っており、比較を行うことは難しい。さらに、12 時間における報告もされていない。本章の検討結果では APAP 投与後 12 時間には肝障害が起こっていると考えられた。

BB 投与については、これまでの報告では投与後 24 時間以降、48 時間まで検討されているものが多く、肝毒性についても投与後 24 時間から 48 時間における発現が主であり、週齢の記述はないものの本検討と同程度の体重の Sprague-Dawley 系雄性ラットに i.p 投与後 24、48 時間において 2.5 mmol/kg 体重投与群は対照群と比較して AST および ALT が上昇しているという報告がある (Chakrabarti and Brodeur, 1986)。また、本検討と同程度の体重の Wister 系雄性ラットにおいても 2 mmol/kg 体重の i.p 投与で、24、48 時間に AST および ALT 活性

が上昇し、ALP は影響されないという報告がある (Heijne et al., 2004)。本章での検討の結果、投与後 12 時間までは検討したすべての活性値において大きな変動は認められなかったが、投与後 24 時間においてすべての活性値で上昇が認められた。AST、ALT においては投与後 48 時間にも高い活性が認められた。また、投与後 48 時間の肝臓には、対照群と比較して赤い斑点状のうっ血が認められた (data not shown)。このことから、BB における肝毒性について、投与後 24 時間以降に発現することが示唆された。これは、前述の Chakrabarti ら (1986) の報告や Heijne ら (2004) の報告と一致していた。

CT 投与については、これまでの報告では 300 g 程度の Wister 系雄性ラットへの CT 0.5 mL/kg 体重で i.p 投与後、投与時間依存的に AST および ALT の上昇が認められ、48 時間をピークに活性が減少する傾向が認められていた (Noguchi et al., 2001)。しかし、他の報告では 300 g 程度の Wister 系雄性ラットに 1 mL/kg 体重で i.p 投与後、AST、ALT 活性は測定後 36 時間に活性のピークが認められ、それ以降は活性が減少するという報告もある (Theocharis et al., 2001)。本章での検討の結果、投与後 6 時間から対照群と比較して AST、ALT に有意な活性の上昇が認められ、投与後 24 時間までは投与時間依存的な活性の減少が認められた。しかし、AST および ALT において、投与後 48 時間において劇的な活性上昇が認

められた。また、CT 投与後 6 時間の肝臓にも対照群の肝臓と比較して顕著な灰白色の変色部位が認められ、投与後 48 時間の肝臓には脂肪組織の癒着が多く認められた (data not shown)。これらの結果から、CT 投与による肝毒性には、投与後 6 時間における超急性毒性および 48 時間における急性毒性が示唆された。この結果は前述の Nqguchi ら (2001) の報告にある、CT 0.5 mL/kg 体重での投与後 48 時間において AST および ALT の活性が最大になるという点で一致していた。しかし、同じ報告にある、投与後 12 時間、24 時間での AST および ALT 活性値の時間依存的な上昇という点で、また、Theocharis ら (2001) の 1 mL/kg 体重投与の報告とは、投与後 12 時間、24 時間での AST および ALT 活性値の時間依存的な上昇という点と、投与後 36 時間で活性が最大となる点で矛盾していた。Sprague-Dawley 系ラットと Wister 系ラットとの系統差の可能性があるが、その原因は不明である。

DMN 投与については、報告例が非常に少ないが、Fischer 系雄性ラットに p.o で 20 mg/kg 体重で投与後 48 時間における AST および ALT の活性の有意な上昇が認められていた (Asakura et al., 1998)。本章の検討の結果、AST、ALT 共に投与後 24 時間までは対照群とほぼ同じ活性を示しているが、投与後 48 時間において AST および ALT の有意な活性上昇が認められた。また、投与後 48 時間に採

取した肝臓には、BB 投与後 48 時間の時に認められた赤い斑点状のうっ血よりもさらに重度のうっ血が認められた (data not shown)。この結果から、DMN 投与後 24 時間までは毒性は発現しないが、投与後 48 時間において毒性が発現することが示唆された。この結果は AST および ALT について、投与経路の違いはあるものの、Fischer 系雄性ラットに p.o で 20 mg/kg 体重投与後 48 時間において活性が上昇するという過去の報告 (Asakura et al., 1998) と一致していた。また、i.p は p.o よりも早期に毒性が発現すると考えられるが、本章では検討していない 24 時間から 48 時間において毒性が発現していることも考えられるので、今回の結果だけでは過去の報告との厳密な比較を行うことはできない。

TA 投与については、これまでの報告では 8 週齢の Wister 系雄性ラットに 500 mg/kg 体重で i.p 投与後 12 時間まではゆっくりとした活性の上昇が、24 時間以降には活性の急激な上昇が認められていた (Zaragoza et al., 2000)。他の報告では 250 g 程度の Sprague-Dawley 系雄性ラットに 300 mg/kg 体重で i.p 投与を行い、24 時間における ALT 活性の上昇が報告されていた (Wang et al., 2000)。本章の検討の結果、AST および ALT において投与後 24 時間における急激な上昇と 48 時間における上昇が認められ、LDH においても投与後 24 時間において急激な上昇が認められた。また、TA 投与後 24 時間に採取した肝臓

では、対照群と比較して白色の斑点状の病変が確認された (data not shown)。この結果から、TA 投与後 24 時間において急激な肝障害の悪化が示唆された。この結果は、Zaragoza ら (2000) の Wister 系雄性ラットによる 500 mg/kg 体重における報告および Wang ら (2000) の Sprague-Dawley 系雄性ラットによる 300 mg/kg 体重における報告と投与後 24 時間で急激に肝障害が悪化するという点で一致していた。これらの血清の生化学検査結果によって、本章での投与量で概ね過去の報告と同じく肝障害が起こっていたことが確認された。

上述の血清の生化学検査値の検討から判断されたそれぞれの化合物の毒性発現時間において、少なくとも 4 つの化合物において 2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子について検討を行った。その結果 52 遺伝子 (誘導 25 種類、抑制 27 種類) が抽出された。遺伝子の機能で 52 遺伝子を分類した結果、薬物動態関連の遺伝子を多く搭載している性質上、Enzyme に分類される遺伝子が誘導で 10 種類、抑制で 9 種類確認されたが、その機能に共通点は認められなかった (data not shown)。

この 52 遺伝子について誘導、抑制別々に階層クラスタリングによって分類を行った結果、誘導された遺伝子群ではそれぞれの毒性が発現した時間において BB、CT、TA が比較的近い階層に配置された。APAP と DMN は全体的に他の投与群と

は離れた階層に配置された。抑制された遺伝子群においても BB、CT、TA は比較的近くの階層に配置され、APAP と DMN は少し離れた階層に配置された。このように、複数の肝毒性化合物に対して経時的に遺伝子発現変動を検討した報告はこれまでなされていない。本章での検討において、血清検査の結果から毒性が強く出ていた BB、CT、TA はその毒性発現時間において遺伝子発現変動が比較的顕著であり、まとまったクラスターを形成したと考えられる。一方、APAP、DMN は他の 3 化合物よりも毒性の発現が顕著ではなかったために遺伝子発現変動も穏やかになったと考えられる。

日立製作所ライフサイエンス事業部ゲノム技術開発センターから提供されたデータとして、投与化合物ごとで遺伝子変動の幅が大きい時間を 2 点抜き出したが、APAP が 6、12 時間、BB が 24、48 時間、CT が 6、48 時間、DMN が 24、48 時間、TA が 24、48 時間となり、それぞれの生化学検査値が増加した時間と一致していた。それらを階層クラスタリングにて分類した結果は、全投与群をまとめて階層クラスタリングした場合と同様の傾向を示した (data not shown)。

毒性発現時間の変動幅のみで遺伝子を選択した場合、毒性が発現していない時間における遺伝子変動を考慮することができないため、その遺伝子群の中から発現変動のピークが少なくとも 2 つの化合物の毒性発現時間と重なる遺伝子について

て検討を行った。過去の報告では、本章で使⽤した 5 化合物を同時に検討している報告はないが、個々の化合物において、本章で見出されたものと同じ遺伝子についていくつかの報告がなされている。

例えば、Aldorase A (Aldoa) は TA において誘導が報告されており (Bulera et al., 2001)、Glutathione synthetase (Gss) は CT において誘導が報告されている (Huang et al., 2000)。Cathepsin L (Ctsl) と Heme oxygenase 1 (Hmox1) は本章での検討において最多の 4 種の化合物において誘導のピークが毒性発現時間と重なった遺伝子である。Cathepsin L は TA および BB において誘導が報告されている (Bulera et al., 2001; Heijne et al., 2003) が、Heme oxygenase 1 では APAP (Chiu et al., 2002)、BB (Heijne et al., 2003)、CT (Montosi et al., 1998) および TA (Bulera et al., 2001) において誘導が報告されている。また、本章で使⽤した 5 つの化合物の代謝に大きく寄与している CYP2E1 (Jeong, 1999; Lauriault et al., 1992; Wang et al., 2000; Zimmerman, 1999) は、本章の検討においてほとんど変動が認められなかった (data not shown)。本章で検討した薬物動態関連 1,097 遺伝子から見出された、誘導もしくは抑制を受けたそれぞれ 10 種類の遺伝子は、前述の通り 4 種類の既報の遺伝子を含んでいる。このことから、本章で得られたデータは⾧分信頼できるものであり、これら遺伝子群のうちの何かが肝毒性化合物に対して共通のマーカ

ーとして利⽤できる可能性があるため、今後個々の遺伝子に対する詳細な検討を要する。

QT クラスタリングは本来無数にある遺伝子発現変動プロファイルから、ある遺伝子の発現変動プロファイルに対して設定した相関係数閾値を超える遺伝子数が指定した個数を超える場合に一つのクラスターとしてカウントし、最終的にいくつかの発現変動パターンを検出するというアルゴリズムである (Heyer et al., 1999)。しかし、本章ではこれまでの使⽤方法とは異なり、遺伝子数を大きく指定し、相関係数閾値を徐々に引き下げていった。これによって、その投与群における遺伝子発現変動から主要な遺伝子発現変動パターンを検出することができると考えられる。このような意図を持って行った QT クラスタリングの結果、⽣化学検査値から推定された毒性の大きさに関係なく、毒性発現と同じ時間にピークを持つ遺伝子発現変動パターンを 5 化合物全てにおいて検出することができた。さらにこの方法は遺伝子数が 10 倍以上搭載されている Agilent のマイクロアレイを⽤した検討においても、APAP のみの結果ではあるが同様の結果が得られた。このことから、どのような機能を持つ遺伝子群を網羅的に検討したとしても、そこから見出される主要な遺伝子発現変動パターンは肝毒性化合物によって一定であることが示唆される。さらに、全ての投与群の遺伝子発現変動からの QT クラ

スタリングによって得られた 2 つのクラスターには、毒性発現時間をもとに抽出された遺伝子のほとんどが含まれていた。

E. 結論

本章で主に使用した Rat Drug Response Chip は薬物動態関連遺伝子を中心に 1,097 種の遺伝子を搭載したマイクロアレイである。本章での検討の結果から、特定の遺伝子群を中心に少数の遺伝子を搭載したマイクロアレイだけでなく、Agilent 社の網羅的に遺伝子を含むマイクロアレイを使用した際にも、毒性発現時間と非常に相関した遺伝子発現変動パターンを、毒性化合物の種類に関わらず検出が可能であることがはじめて示唆された。また、血清生化学検査値をもとに検出した遺伝子群も主要な遺伝子発現変動パターンの検討で十分検出が可能であることから本章で用いた QT クラスタリングの変法は肝毒性化合物の検討に有効であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Minami, K., Saito, T., Narahara, M., Tomita, H., Kato, H., Sugiyama, H., Katoh, M., Nakajima, M., Yokoi, T., (2005) Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats. *Toxicol. Sci.*, **87**, 296-305.

G. 知的財産権の出願・登録

なし

H. 参考文献

Asakura S, Daimon H, Sawada S and Sagami F (1998) A short-term assessment of tumor-promotion activity in the livers of rats treated with two genotoxic methylating agents: dimethylnitrosamine and methylnitrosourea. *Toxicol Lett* **98**: 155-167.

Bulera SJ, Eddy SM, Ferguson E, Jatkoe TA, Reindel JF, Bleavins MR and De La Iglesia FA (2001) RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology* **33**: 1239-1258.

Chakrabarti S and Brodeur J (1986) Influence of mercuric chloride on the metabolism and hepatotoxicity of bromobenzene in rats. *Environ Res* **39**: 50-59.

Chiu H, Brittingham JA and Laskin DL (2002) Differential induction of heme oxygenase-1 in macrophages and hepatocytes during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat: effects of hemin and biliverdin. *Toxicol Appl Pharmacol* **181**: 106-115.

Heijne WH, Slitt AL, van Bladeren PJ, Groten JP, Klaassen CD, Stierum RH and van

- Ommen B (2004) Bromobenzene-induced hepatotoxicity at the transcriptome level. *Toxicol Sci* **79**: 411-422.
- Heijne WH, Stierum RH, Slijper M, van Bladeren PJ and van Ommen B (2003) Toxicogenomics of bromobenzene hepatotoxicity: a combined transcriptomics and proteomics approach. *Biochem Pharmacol* **65**: 857-875.
- Hu JJ, Yoo JS, Lin M, Wang EJ and Yang CS (1996) Protective effects of diallyl sulfide on acetaminophen-induced toxicities. *Food Chem Toxicol* **34**: 963-969.
- Huang ZA, Yang H, Chen C, Zeng Z and Lu SC (2000) Inducers of γ -glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression. *Biochim Biophys Acta* **1493**: 48-55.
- Jeong HG (1999) Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Toxicol Lett.* **105**: 215-222.
- Lauriault VV, Khan S, and O'Brien PJ (1992) Hepatocyte cytotoxicity induced by various hepatotoxins mediated by cytochrome P-450IIE1: protection with diethyldithiocarbamate administration. *Chem Biol Interact* **81**: 271-289.
- Li J, Kaneko T, Wang Y, Qin LQ, Wang PY, and Sato A (2002) Troglitazone enhances the hepatotoxicity of acetaminophen by inducing CYP3A in rats. *Toxicology* **17**: 91-100.
- Montosi G, Garuti C, Iannone A and Pietrangelo A (1998) Spatial and temporal dynamics of hepatic stellate cell activation during oxidant-stress-induced fibrogenesis. *Am J Pathol* **152**: 1319-1326.
- de Morais SM and Wells PG (1989) Enhanced acetaminophen toxicity in rats with bilirubin glucuronyl transferase deficiency. *Hepatology* **10**: 163-167.
- Noguchi T, Matsuyama S, Akao M, Hagiwara H, Uno S, Seki T and Ariga T (2001) Induction of hepatic tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator-inhibitor gene expressions and appearance of their translation products in the bile following acute liver injury in rats. *Thromb Res* **104**: 283-291.
- Theocharis SE, Margeli AP, Skaltsas SD, Spiliopoulou CA and Koutselinis AS (2001) Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study. *Toxicology* **161**: 129-138.

Wang T, Shankar K, Ronis MJ and Mehendale HM (2000) Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 473-479.

Zaragoza A, Andres D, Sarrion D and Cascales M (2000) Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital pretreatment in rats.

Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. *Chem Biol Interact* **124**: 87-101.

Zimmerman, HJ. (1999)

HEPATOTOXICITY –The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver- second edition. pp229-274, Lippincott Williams & Wilkins A Wolters Kluwer Company. Philadelphia.

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

肝毒性化合物の投与量と遺伝子発現の相関解析

分担研究者 中島美紀 金沢大学大学院医学系研究科

研究要旨

DNA マイクロアレイを遺伝子の網羅的な発現解析に用い、化合物の毒性のアセスメントに応用する為の検討を行った。本研究ではチオアセタミドを代表的な肝毒性化合物として用い、肝障害性のフェノタイプと特定の遺伝子の発現プロファイルの変化との相関を検討した。チオアセタミドは腹腔内に高用量（400 mg/kg）、中用量（150 mg/kg）、低用量（50 mg/kg）を各群4匹、投与後の時間を6, 12, 24, 36, 48時間で検討した。ALTとASTはチオアセタミドの投与量依存的に上昇し、24時間で最大を示した。進化樹的クラスタリングによって、6と12時間と、24, 36と48時間の2つの群に分けることが出来た。この初期段階のクラスターと後期のクラスターは、時間依存的にも、投与量依存的にも分けることができた。一方、主たる遺伝子のQuality-threshold (QT)クラスタリングでは、血清学的な値の最大値を、遺伝子変化のプロファイルから予測することができた。前章で特定した肝障害性への関与が考えられた遺伝子はいずれも再現良く検出することができた。このことは、肝障害に係わる遺伝子の発現プロファイルを知ることによって、肝障害を予測することができることを示している。本研究によって、QTクラスタリング手法は、肝障害性を予測する為の有用な解析であることを示した。