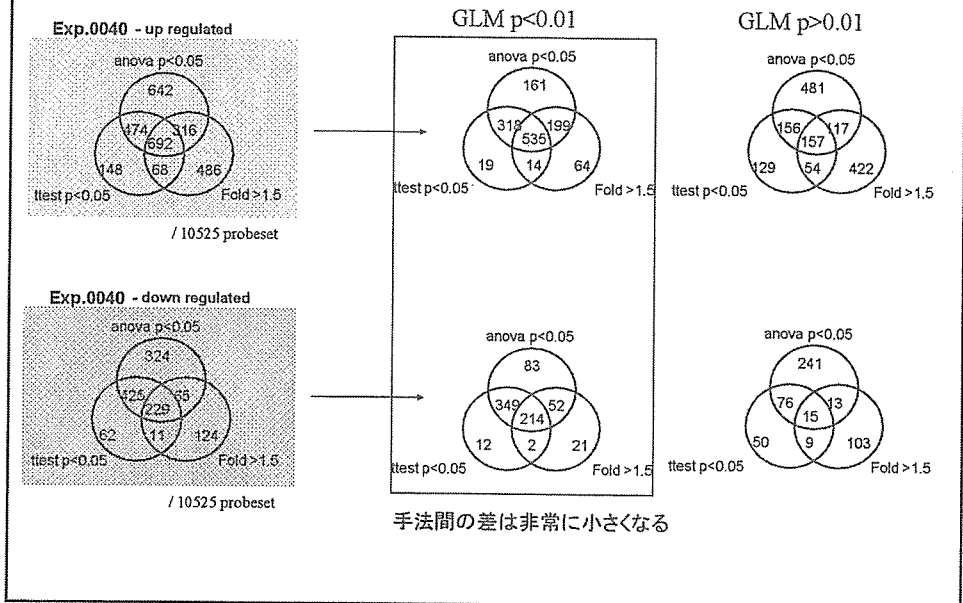
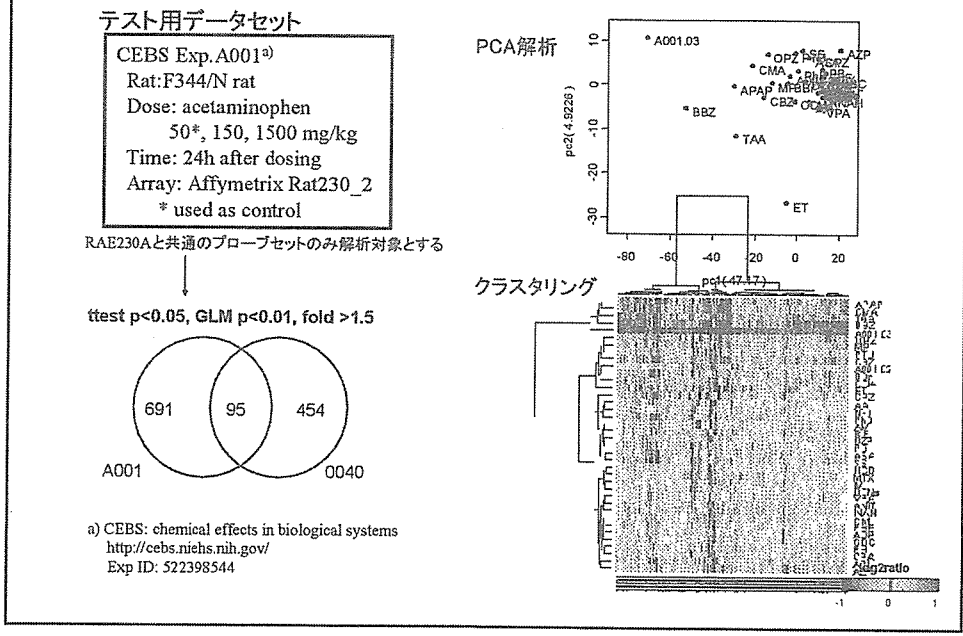


投与量依存性による絞込み



化合物類似性の評価は出来るのか？



遺伝子抽出を必要としないアノテーション解析

TGP1scoreによる遺伝子セット全体の
変動をスコア化

- 統計検定などの遺伝子抽出を
必要としない
- スコアは定量的

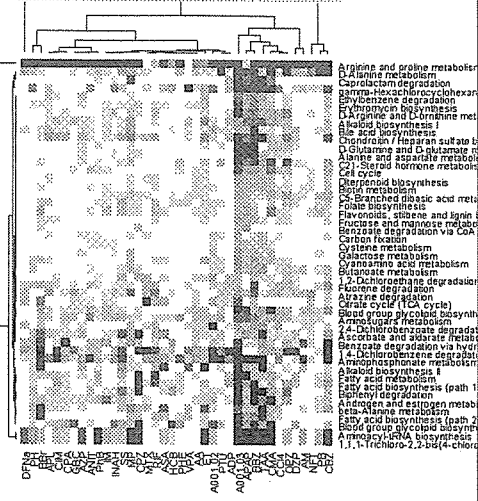
$$\text{TGP score 1} = (\text{Index 1}) \times (\text{Index 2})$$

Index 1 = $\frac{\sum (\text{log}_2(\text{fold change})^2)}{\text{Number of probesets}}$

Index 2 = $\frac{\sum (\text{log}_2(\text{fold change})^2)}{\text{Number of probesets}}$

Kiyosawa N, et al.
J Toxicol Sci. 2006 Dec;31(5):433-48

TGP1score for KEGG pathway

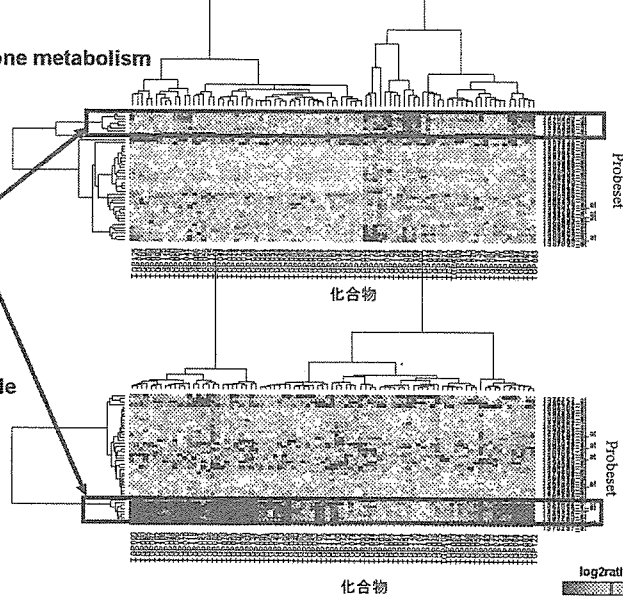


既存のpathway情報はバイオマーカーとして使えるか？

KEGG: Glutathione metabolism

バイオマーカーとして
使えそうだが、
生体における変化
との関連は？

KEGG: Cell cycle



遺伝子についての情報

Probeset on RAT230_2.0 genechip

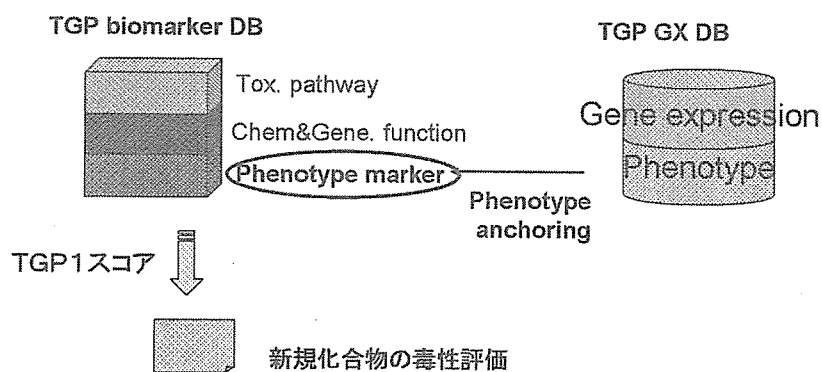
	+	-
Total No. of probeset on RAT230_2	31054	-
Gene name	21944	9110
unique UNIGENE ID	19015	3268
LocusLink ID	13687	9359
RGD ID	13314	9877
Annotations		
GO annotation	15672	
KEGG annotation	764	
GENE MAPP	1616	
probeset with no knowledge		15368

The GO, Kegg etc. is constructed to be a universal categorization of genes and gene products across species and states. Unique cellular functions and processes associated with the toxic response is not included.



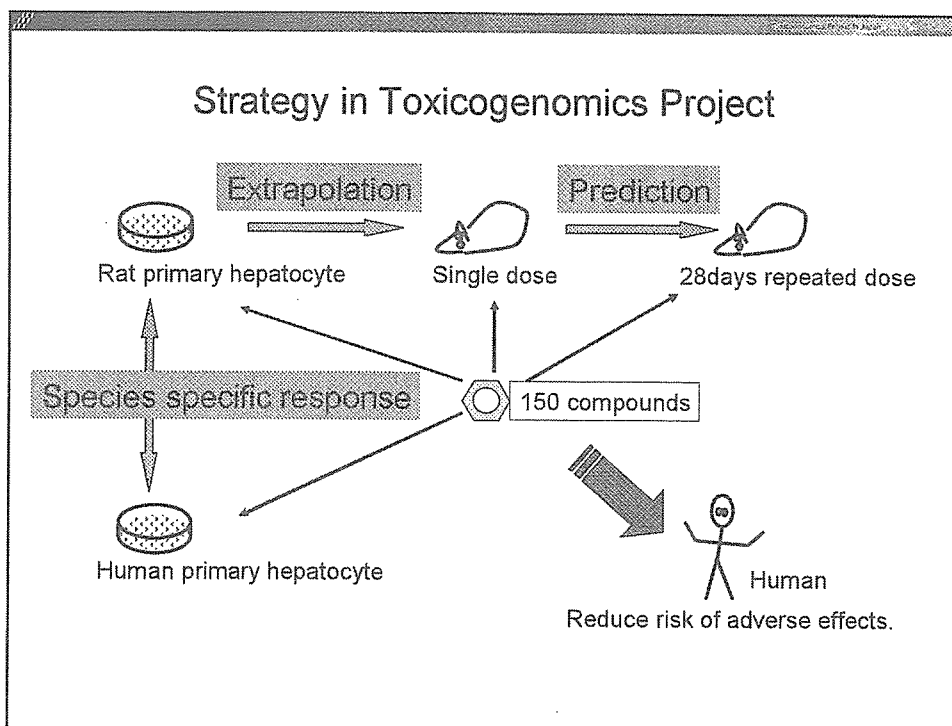
毒性変化との関連については、ほとんど不明

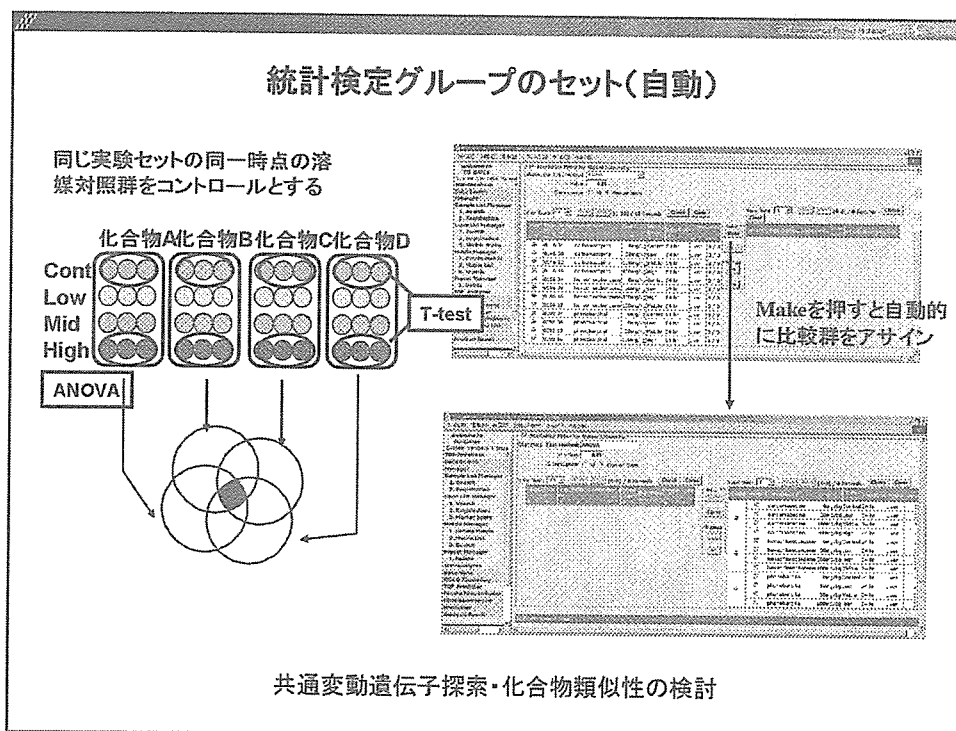
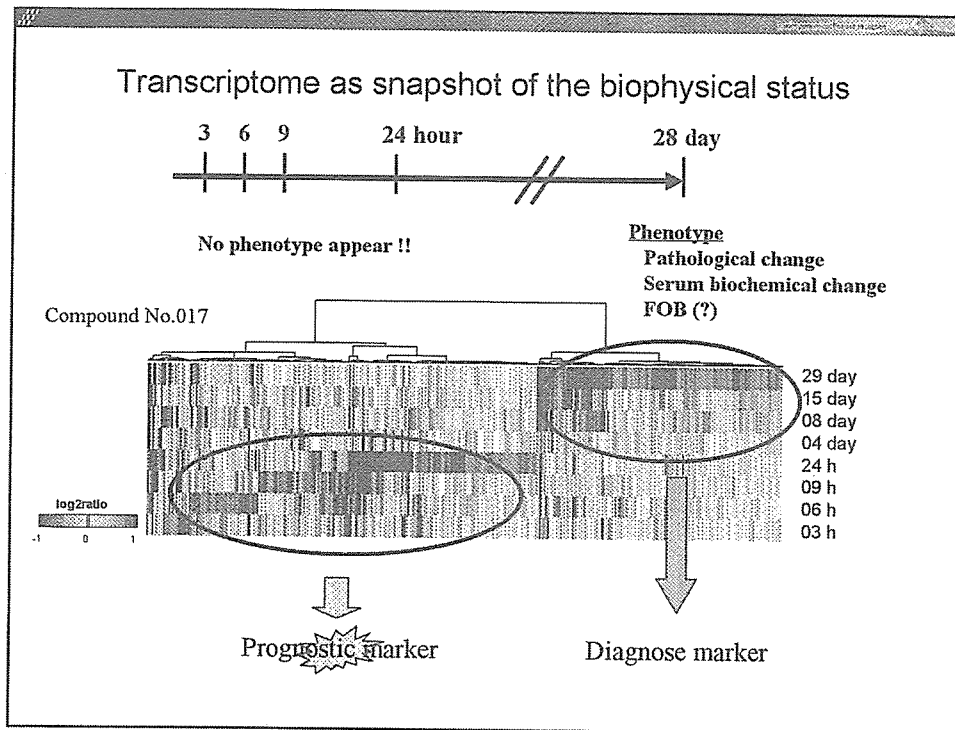
毒性バイオマーカーの必要性



TGxによる毒性予測・評価の精度・感度が向上には、フェノタイプを判別できる種々の毒性バイオマーカーの蓄積が必要

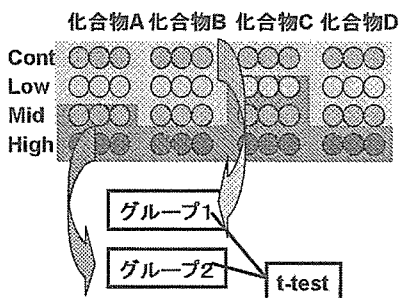
TG-GATEによるバイオマーカーの抽出 共通変動遺伝子の抽出





統計検定グループのセット(手動)

特定のフェノタイプの有無により化合物横断的にアサイン



グループ1のアサイン

グループ2のアサイン

フェノタイプに関連するバイオマーカー探索

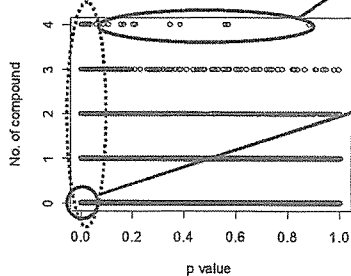
重要な変化の見落とし

例

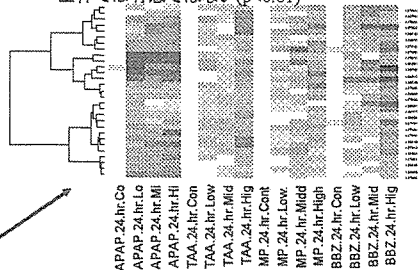
酸化ストレス性肝障害物質
acetaminophen
thioacetamide
methapyrilene
bromobenzene

単回投与後24時間

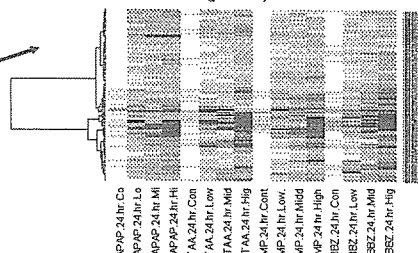
化合物別にANOVA $p < 0.05$ の化合物数と全体でt検定を行った場合のp値の比較



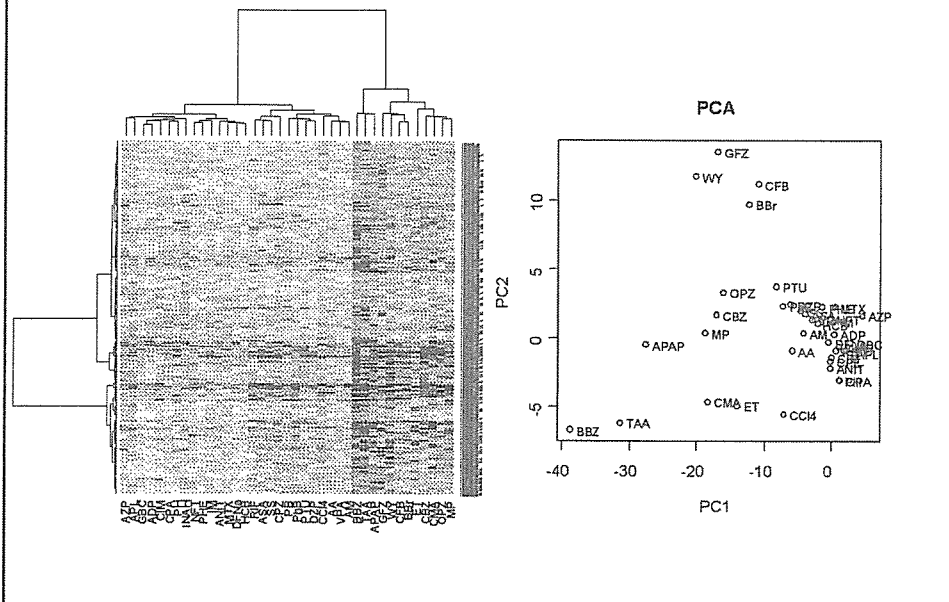
個別解析では4化合物で有意になるが、全体では有意ではない($p < 0.01$)



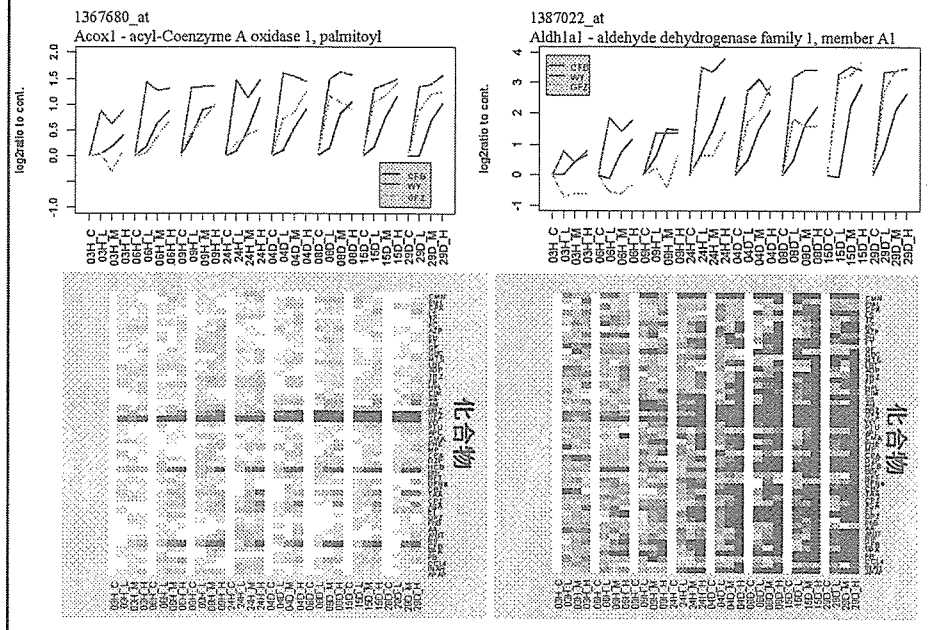
個別解析で1化合物も有意にならないが、全体では有意($p < 0.01$)



共通変動遺伝子を用いた化合物評価

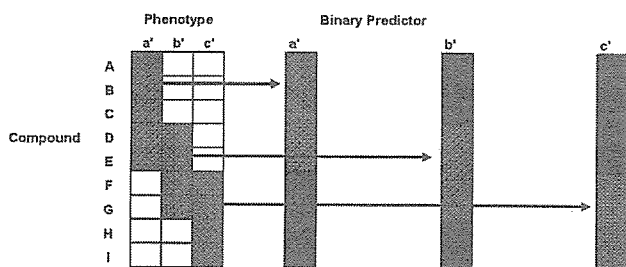
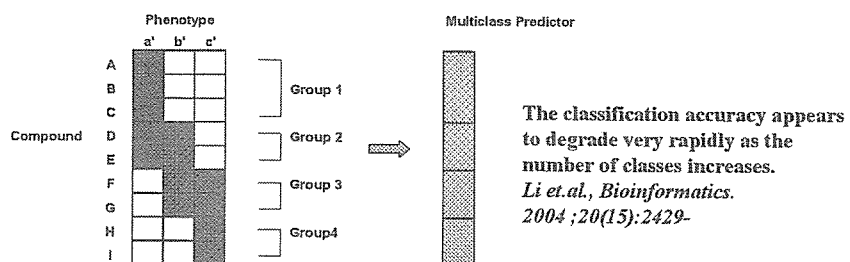


共通変動遺伝子と特異的変動遺伝子



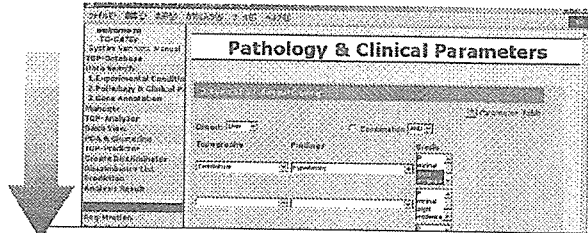
特異的変動遺伝子の選択と予測モデルの構築

判別分析の進め方



特異的遺伝子の抽出と判別モデルの構築

フェノタイプによるサンプル抽出



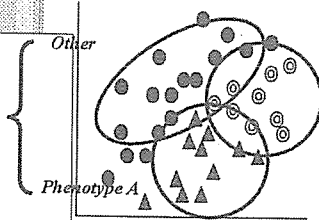
Phenotype A群とOtherで発現の異なる遺伝子を抽出

Correlation based gene selection
t-stat base (unmodified or FDR correction)

判別に有用な遺伝子の絞り込み

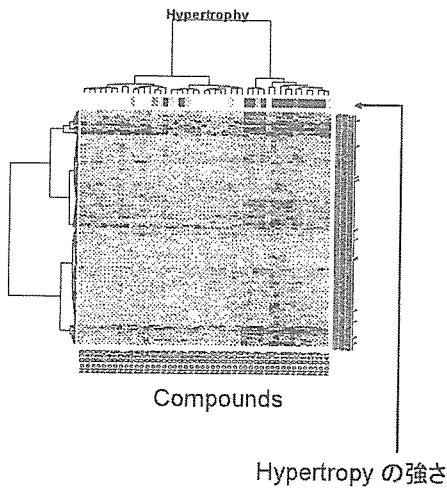
Nearest Shrunken Centroids (NSC)

判別機の作成

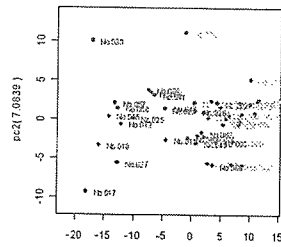


反復投与により Hypertrophy を惹起するサンプルの 単回24時間時点での特異的遺伝子抽出

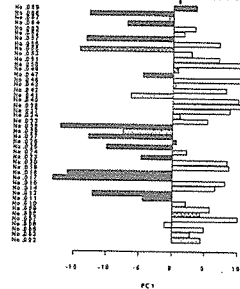
Gene expression at 24h high dose



PCA

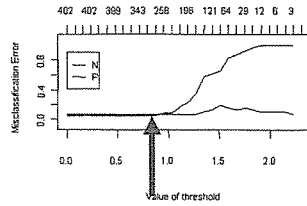


PC1 score of compounds



Nearest Shrunken Centroids (NSC) による遺伝子の絞込み

遺伝子絞込みによるPAM判別エラーの推移



最大の判別率になる遺伝子数に絞込み

判別機の作成

SVM : Support vector machine

PAM : Prediction analysis of microarrays

LDA: linear discriminant analysis

MLDA : Maximum likelihood discriminant analysis

DQDA : diagonal quadratic discriminant analysis

DLDA : diagonal linear discriminant analysis

KNN : K-nearest neighbor

クロスバリデーションによる検証

判別機のトレーニングとテスト

トレーニング (55化合物)

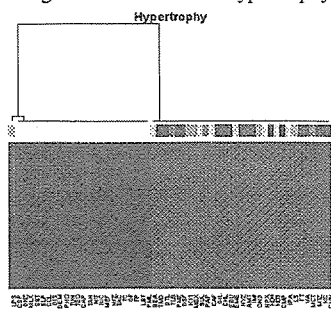
Rat230_2.0

24h high dose データによるhypertrophy判別モデル

テスト (21化合物)

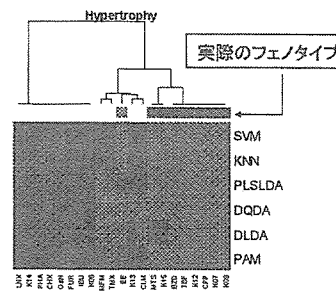
Rat230_2.0

24h high dose データによるテスト



55化合物

別のサンプル
によるテスト



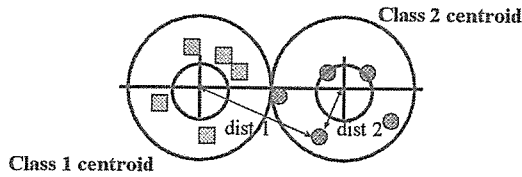
21化合物

■ Positive
■ Negative

	Cross Validation	Training	Test	Total
SVM	0.020	0.000	0.000	0.000
KNN	0.143	0.000	0.000	0.000
PLSLDA	-	0.000	0.143	0.066
DQDA	-	0.018	0.190	0.079
DLDA	-	0.018	0.238	0.092
PAM	0.055	0.018	0.095	0.053

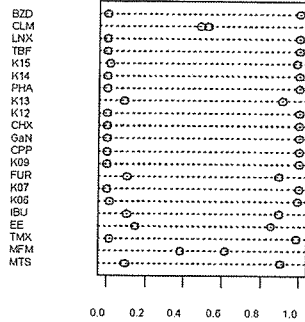
2クラス分類におけるPAMIによる定量的判定

Nearest Centroid model

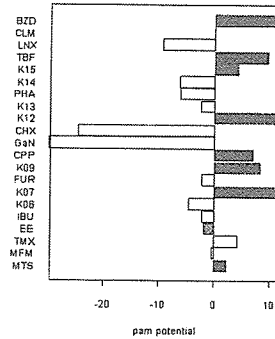


各クラスの中心からの距離を各クラスへの所属確率(class probability)として得る

Class probability

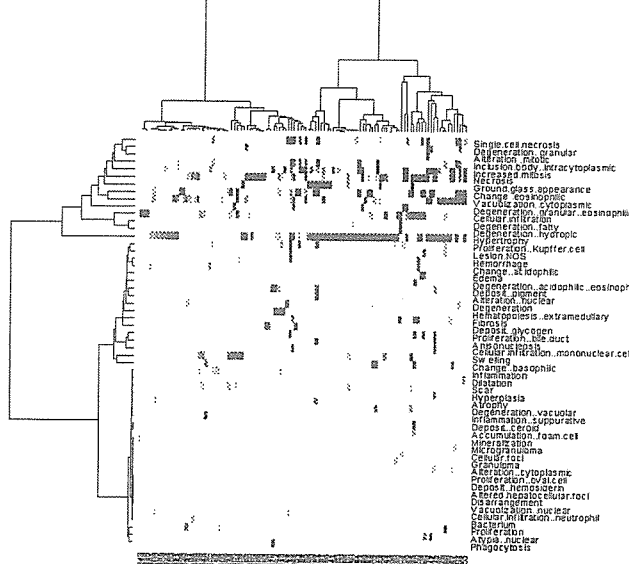


Prediction score Hypertrophy



$$\text{Prediction score} = \log \left(\frac{\text{positive probability}}{\text{negative probability}} \right)_{10}$$

病理変化の発現状況 (75化合物)



メジャーなフェノタイプは限られている

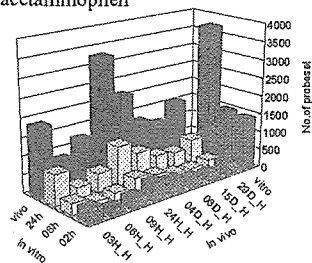


病理変化との関連だけでは、抽出できるバイオマーカーも限られる
↓
いかに化合物を分類するかが重要

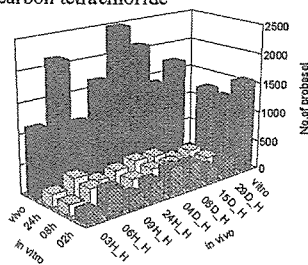
in vitro データの利用

Probeset > 1.5 fold up regulated *in vivo* & *in vitro*

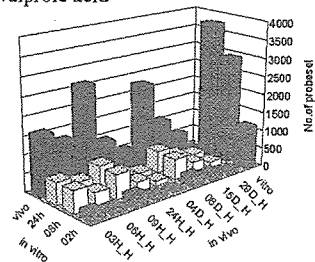
acetaminophen



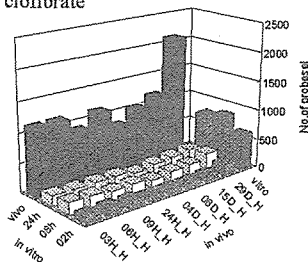
carbon tetrachloride



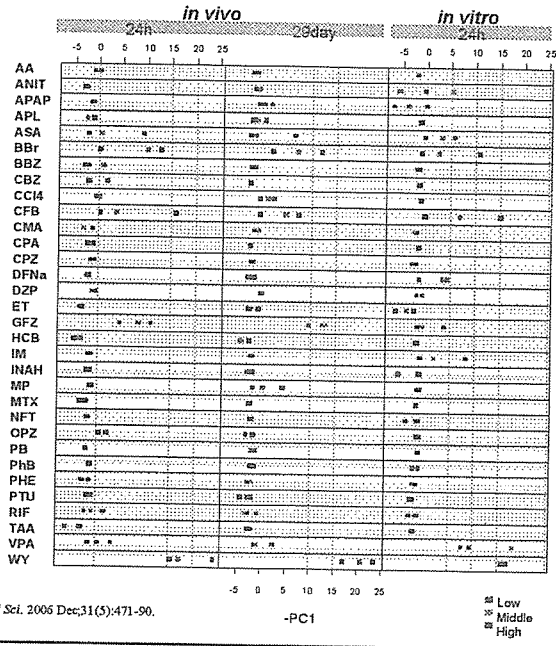
valproic acid



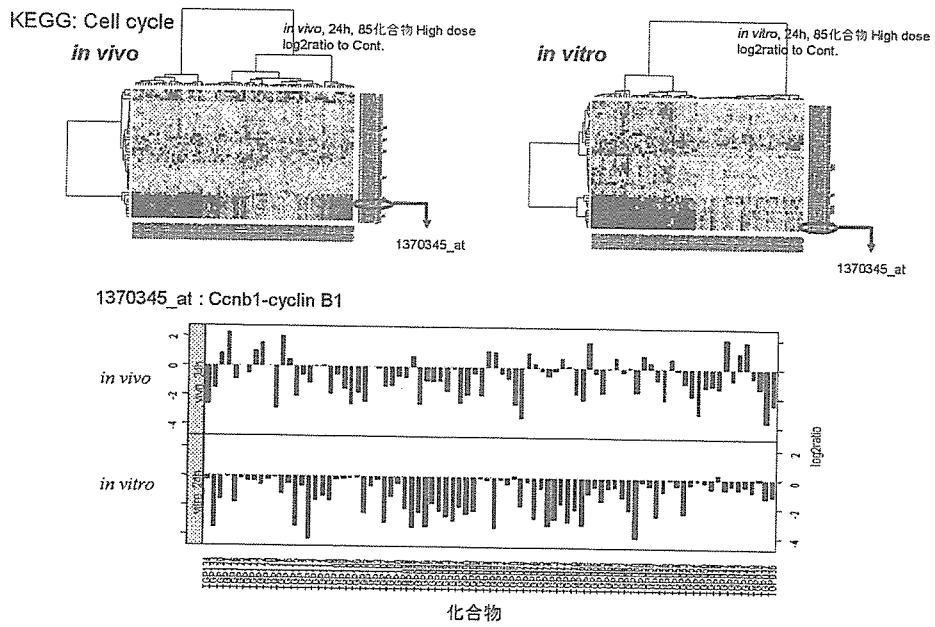
clofibrate

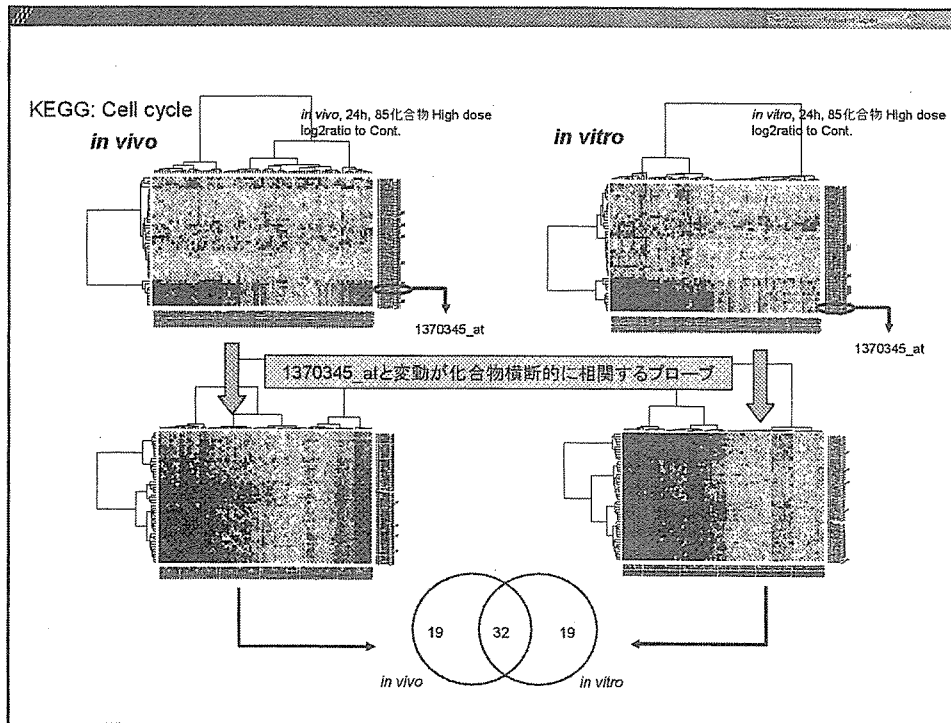


Prediction of PPARalpha action from *in vitro* to *in vivo*

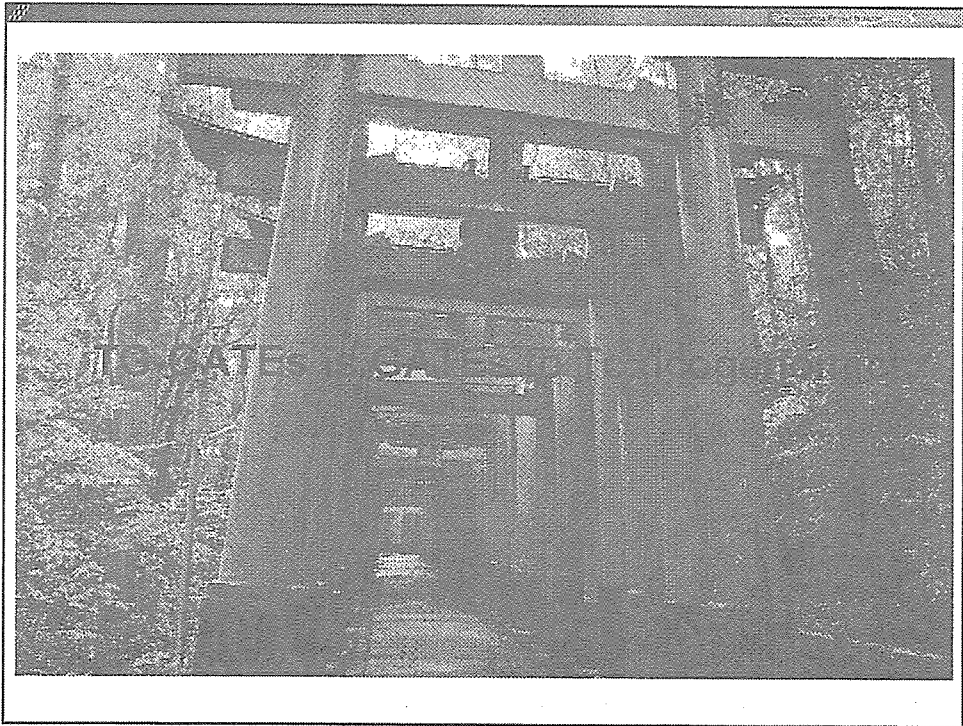
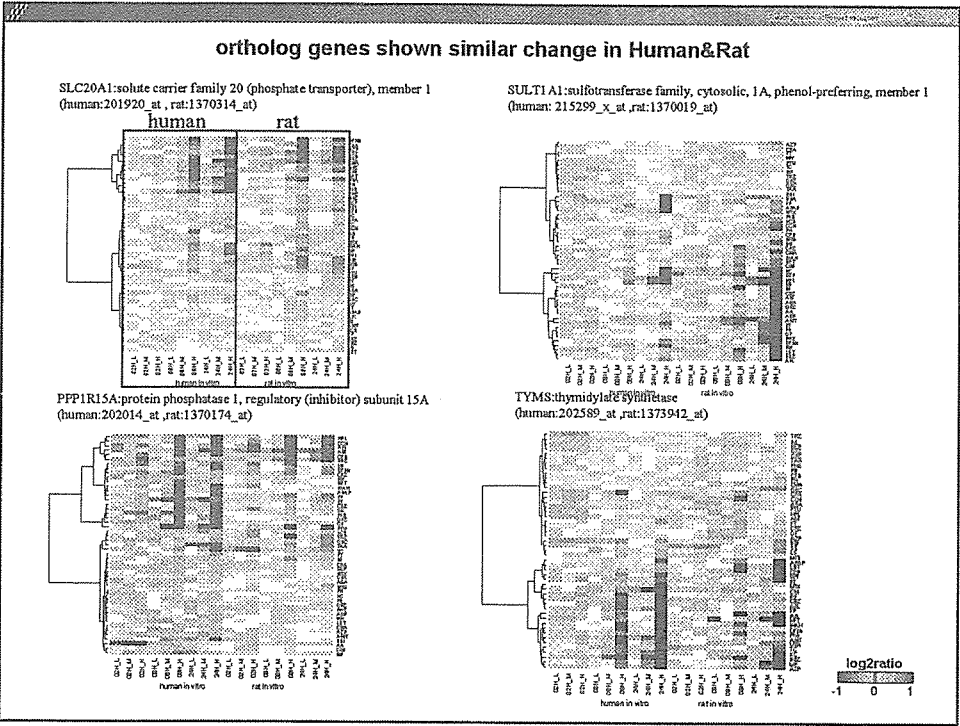


Tamura K et al. *J Toxicol Sci.* 2006 Dec;31(5):471-90.





in vitro ヒト-ラット間の比較



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

平成 18 年度：中山裕之 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

平成 14～17 年度：土井邦雄 前・東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

研究要旨

薬物誘発性のげっ歯類肝病変について、その発現機構を肝病変と遺伝子発現プロファイルとの時間的・空間的対応関係に即して解析した。その結果、

(1) 妊娠および授乳時のラット肝臓における薬物代謝酵素 (CYP など) の動態が明らかになった。(2) ラットの胎盤、母体肝臓および胎児肝臓では CYP3A1 が妊娠期間を通じて発現し、胎盤ではとくに栄養膜巨細胞に常在していた。(3) 妊娠ラットに T-2 toxin を投与すると、母体肝臓、胎盤および胎児肝臓にアポトーシスが生じ、これらの組織に共通して、酸化ストレス関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、脂質代謝および薬物代謝関連遺伝子の発現が変化した。(4) 高用量ニトロフラゾン (NF) はフリーラジカルの関与による肝細胞壊死を惹起し、低用量 NF は肝細胞 mitogen としての作用した。この際、c-jun、c-myc、TNF- α の発現の増加がみられた。

(5) プ血清投与ラットでは肝線維化が認められ、MHC class II 関連遺伝子、炎症関連遺伝子、ストレス/細胞傷害関連遺伝子、分泌産物および増殖反応タンパク関連遺伝子の発現増加が認められた。(6) ストレプトゾトシン

(SZ) 投与マウスの肝では肝細胞のミトコンドリアと核、および胆管上皮が傷害され、脂質過酸化、細胞分裂抑制および apoptosis 関連遺伝子の発現増加が観察された。

A. 研究目的

本研究の目的は以下の通りである。すなわち、毒性病理学的観点からみて極めて重要な薬物誘発性肝病変について、その発現機構を肝病変と遺伝子発現プロファイルとの時間的・空間的対応関係に即して解明する。次いで、広範な薬物誘発

肝病変をその性状によっていくつかの型に分類し、それぞれの型について病変と遺伝子発現プロファイルおよび誘発薬物との関連性を調べる。さらに、薬物の次世代への影響を評価する上で重要な妊娠時の母体肝-胎盤-胎児肝軸における薬物代謝の動態と病変の発現機構、および修

飾機構を遺伝子プロファイルの面から明らかにする。

B. 研究方法／C. 研究結果／D. 考察

1. 妊娠期および泌乳期ラットの肝臓における遺伝子発現プロファイルの変化

正常な妊娠および授乳が肝臓の CYP 含有量および薬物代謝酵素活性の減少に関係することはよく知られているが、妊娠および哺乳時の各々の CYP アイソザイム発現の詳細についてはごく少数報告があるのみである。そこで、本研究では妊娠期および泌乳期のラット肝臓における遺伝子発現プロファイルの変化を調べた。

Western blot 解析および免疫組織学的検索を用いて、ラットの妊娠中期、妊娠末期および泌乳期における肝臓 CYP 蛋白の発現変化を探索した。解析には CYP の各アイソザイムに対する九つの抗体 (CYP1A1、CYP2B1/2、CYP2C6、CYP2C12、CYP2D1、CYP2D4、CYP2E1、CYP3A1 および CYP4A1) を用いた。同週齢、未妊娠の F344 ラットと比較して、妊娠中期 (GD 13) における CYP2B2、CYP2C6 と CYP4A1 の発現量および妊娠末期 (GD 19) における、CYP2B2、CYP2C6、CYP4A1、CYP1A1、CYP2B1、CYP2E1 の発現量の著しい減少が見られたが、分娩後の 28 日目 (PPD 28) に、control との同じレベルに戻った。妊娠および泌乳期における CYP2C12、CYP2D1 および CYP3A1 の発現変化は認められなかった。すべての肝臓サンプルにおいて CYP2D4 は検出さ

れなかった。免疫組織学的検索では、CYP1A1 が類洞及び静脈内皮細胞で陽性と示した。一方、他の CYP は主に小葉中心の肝細胞で発現が見られた。

次に、cDNA マイクロアレイ分析を用いて妊娠におけるラット肝臓中の遺伝子発現プロファイルの変化を探索したところ、およそ 16,000 の遺伝子のうち、妊娠中期における 394 (257 up、137 down) および妊娠末期における 1092 (513 up and 579 down) 遺伝子の発現の著しい変化が確認された。これらの変化はリアルタイム PCR の結果とも一致した。

妊娠におけるラット肝臓中の遺伝子発現プロファイルは胎児と母親に対する化学物質の毒性発現機序を明らかにする基盤となると考えられる。

以上の研究により薬物投与ラットの肝臓における組織病変と遺伝子発現プロファイルの変化との関係が明らかになった。すなわち、妊娠後期および泌乳期において Phase I と Phase II の薬物代謝酵素遺伝子の一部、および核内受容体遺伝子の発現が未経産ラットに比べて減少した。これらの結果は real-time PCR 法によって確認された。妊娠におけるラット肝臓中の遺伝子発現プロファイルは胎児と母親に対する化学物質の毒性発現機序を明らかにする基盤となると考えられる。

2. 薬物代謝酵素誘導剤投与による妊娠ラットの肝、胎盤、胎児肝における CYP

の発現動態

Cytochrome P450 (CYP) は生体内において第 I 相代謝にきわめて重要な役割を果たす酵素群であり、主として CYP1、2、3 family と CYP4 family の一部が毒性物質や薬物の代謝に関与している。CYP は主に肝に存在するが、肝以外に、腎、副腎、肺、小腸、脳、皮膚、胎盤などにも分布することが知られている。ラットは胚毒性や胎児毒性の研究に繁用されているが、胎児と母体をつなぐ重要な器官で、内分泌機能や代謝機能を備えている胎盤における CYP の発現に関する報告はごく少ない。また、妊娠中の母体、胎盤および胎児のそれぞれの間での薬物代謝の流れを理解するためには、母体肝、胎盤および胎児肝での CYP の発現状況を明らかにすることが必要である。本研究では、まず、正常妊娠ラット胎盤における CYP タンパクの発現について妊娠全期間を通じて経時的に検索し、さらに CYP 誘導剤を用いた母体肝、胎盤および胎児肝における CYP タンパクの発現誘導実験を行った。そして、母体肝、胎盤および胎児肝における第 I 相薬物代謝酵素関連遺伝子 (CYP)、第 II 相薬物代謝酵素関連遺伝子 (GST および UDPGT) の発現プロファイルについても検索した。

得られた結果は下記の通りである。

(1) 正常妊娠ラット胎盤について、抗 CYP 抗体 (CYP1A1、CYP2B1、CYP2C6、CYP2C12、

CYP2D1、CYP2D4、CYP2E1、CYP3A1 および CYP4A1) を用いて Western blot 解析および免疫組織化学的検索を行った。その結果、CYP3A1 タンパクのみが妊娠の全期間を通じて胎盤栄養膜細胞層巨細胞の細胞質に存在することが示された。

(2) 胎盤に常在することが示された CYP3A1 タンパクを誘導する薬剤、dexamethasone (DEX) および pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) を 1 (16DG) ないし 4 日間 (13-16DG)、妊娠ラットに投与し、母体肝、胎盤および胎児肝を対象に、CYP3A1 抗体を用いて Western blot 解析および免疫組織化学的検索を行った。母体肝および胎児肝で CYP3A1 タンパクの著しい誘導が認められたが、母体肝より胎児肝での誘導が顕著であった。胎盤では、PCN の 4 回投与群でのみ対照群と比べて有意な CYP3A1 タンパクの誘導が認められた。免疫組織化学的には、母体肝および胎児肝で、対照群に比べ、CYP3A1 陽性肝細胞領域が著しく拡大したが、胎盤では CYP3A1 陽性領域および発現部位に変化は認められなかった。

(3) 広範な薬物代謝酵素誘導剤として知られる Phenobarbital (PB) を妊娠ラットに 4 日間 (13-16DG) 投与し、母体肝、胎盤および胎児肝について 9 種類の CYP 抗体を用いた Western blot 解析および免疫組織化学的検索を行った。母体肝では PB 投与により CYP3A1 タンパクの発現が増加した。CYP2B1 タンパクは対照群では

発現がみられなかったが、PB 投与群では著しい発現が認められた。CYP2D1 タンパクについては発現が減少した。他の CYP 種には有意な変化は認められなかった。胎盤では、CYP3A1 タンパクの発現のみが観察されたが、PB による有意な誘導は認められなかった。胎児肝では、Western blot 解析でのみ CYP3A1 および CYP2C6 タンパクの有意な誘導が観察されたが、その発現は弱かった。免疫組織化学的検索では、母体肝では、CYP3A1 陽性肝細胞領域の拡大が観察され、CYP2B1 陽性肝細胞も認められるようになった。CYP2D1 は免疫組織化学的にも染色性の減弱が認められた。他の CYP 種についても、Western blot 解析と一致する結果が得られた。胎盤では Western blot 解析の結果と同様、CYP3A1 タンパクのみが認められ、また、発現部位に変化はなく、栄養膜細胞層の巨細胞に陽性像が認められた。胎児肝では、Western blot 解析で陽性を示した CYP3A1 および CYP2C6 について免疫組織化学的検索では明瞭な陽性像は観察されなかった。

(4) PCN あるいは PB を 4 日間 (13~16DG) 投与した妊娠ラットの母体肝、胎盤および胎児肝を対象に、40 種類の CYP 遺伝子、16 種類の GST 遺伝子、11 種類の UDPGT 遺伝子および 2 種類の CYP 誘導遺伝子 (orphan nuclear receptor 遺伝子) の発現について、DNA マイクロアレイ法を用いて検索を行った。40 種類の CYP 遺伝子の

うち、母体肝では CYP3A subfamily および CYP2B subfamily に属する遺伝子を中心に、PCN 群では 12 種類および PB 群では 9 種類の遺伝子発現の有意な増加が認められた。胎盤では、有意な変化を示す遺伝子はほとんど認められず、PB 群で Cyp3A1 遺伝子のみが有意な増加を示した。また、PCN 群では、Cyp3A1 遺伝子は増加する傾向にはあったが、有意な変化は認められなかった。胎児肝では CYP3A subfamily および CYP2B subfamily に属する遺伝子を中心に、PCN 群で 4 種類および PB 群で 4 種類の遺伝子発現の有意な増加が認められた。第 II 相代謝系の GST 酵素遺伝子および UDPGT 酵素遺伝子では、母体肝と胎児肝で誘導される遺伝子の種類が多く異なっており、母体肝と胎児肝の薬物誘導能の違いが示唆された。胎盤では有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、胎盤では CYP3A1 が栄養膜細胞層の巨細胞の細胞質に常在していることが明らかとなり、CYP3A1 が妊娠期間を通じて CYP による薬物代謝システムの主要な構成要素であると考えられた。胎盤で発現する CYP3A1 は、誘導剤の投与により若干の誘導を受けるが、母体肝および胎児肝で認められる程明らかではなかった。また、広範な薬物代謝酵素誘導剤である PB の投与によっても、胎盤では CYP3A1 以外の CYP は発現しないことが分かった。また、母体肝と胎児肝については、その薬物代謝能に、第 I 相および第

II 相ともに大きな差があることが明らかとなった。さらに、妊娠ラットにおける母体肝、胎盤および胎児肝における薬物代謝酵素関連遺伝子の発現プロファイルが明らかとなった。

3. 妊娠ラットにおける T-2 トキシンの毒性に関する研究

T-2 toxin は *Fusarium* 属の真菌により産生されるマイコトキシンである。T-2 toxin を種々の動物に投与すると、胸腺をはじめとするリンパ系臓器、造血器、消化管、肝臓等にアポトーシスが生じることが知られている。また、T-2 toxin は遺伝毒性に加え胎児毒性も有し、胎児死亡および奇形が認められることが報告されている。本研究では、T-2 toxin を妊娠ラットに投与して、肝臓、胎盤、胎児肝臓を対象に、病理組織学的変化と遺伝子発現の変化を検索した。

T-2 toxin のより詳細な毒性発現メカニズムを検索するため、経時的な形態学的変化とその際の遺伝子発現プロファイルの解析を実施した。妊娠 Wistar ラットに T-2 toxin (2 mg/kg) を単回経口投与し、投与 1, 3, 6, 9, 12 および 24 時間後に解剖し、肝臓、胎盤および胎児肝臓を採材した。病理組織学的検査では、TUNEL 陽性アポトーシス細胞数が投与後から増加し、母体肝臓では投与 6 時間後および胎盤では投与 12 時間後にそれぞれピーク

に達し、胎児肝臓では投与 9 時間後にプラトーに達した。

この結果を基に、各組織で投与 3 時間後、アポトーシス細胞数がピークを示す投与 6 あるいは 12 時間後および投与 24 時間後の 3 ポイントを選択して、マイクロアレイ解析を実施した。チップは Affymetrix Rat Genome U34A チップを用いた。データは標準化後、 ± 1.5 倍の発現量を示し、かつ、統計検定で有意差を示した遺伝子プローブを選択した。その結果、酸化ストレス関連遺伝子 (heat shock protein 70, heme oxygenase, metallothionein-1 and -2 等)、アポトーシス関連遺伝子、脂質代謝および薬物代謝関連遺伝子 (P450, GST 等) の発現の変化が、これら 3 つの組織に共通して認められた。また、アポトーシス関連遺伝子としては、p53, GADD45, p21, cyclin D1, cyclin G, NF-kappa B, Bax-alpha, BOD-L, mdm2, c-jun, MEKK1, p38 MAPK および ERK3 の発現の増加が認められた。これら遺伝子のなかには、細胞周期を抑制し、growth arrest に関わる遺伝子や、細胞の生存に関わる遺伝子も多く、T-2 toxin の投与により、アポトーシスのみならず、細胞の修復・生存反応も同時に生じていることを示唆している。マイクロアレイで認められた変化を確認するため、酸化ストレス関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子および薬物代謝酵素遺伝子を選択して半定量的 RT-PCR あるいは real-time RT-PCR