

104(3):231-234, 2007

- 3) Hattori Y, Ohta S, Hamada K, Yamada-Okabe H, Kanemura Y, Matsuzaki Y, Okano H, Kawakami Y, Toda M: Identification of a neuron-specific human gene, KIAA1110, that is a guanine nucleotide exchange factor for ARF1. *Biochem Biophys Res Commun* 364(4):737-742, 2007
- 4) Kato M, Miya F, Kanemura Y, Tanaka T, Nakamura Y, Tsunoda T: Recombination rates of genes expressed in human tissues. *Hum Mol Genet* 17(4):577-586, 2008

2. 学会発表

- 1) 森 英樹, 正札智子, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の neurosphere 形成が及ぼす増殖促進効果. 第5回幹細胞シンポジウム, 2007年5月; 淡路
- 2) 金村米博, 正札智子, 山本篤世, 森 英樹, 岡野栄之, 山崎麻美: ヒト神経幹細胞/前駆細胞およびその分化細胞における遺伝子発現特性の検討. 第5回幹細胞シンポジウム, 2007年5月; 淡路
- 3) Kanemura Y, Shofuda T, Yamamoto A, Mori H, Okano H, Yamasaki M: Gene expression profiling of human neural stem/progenitor cells and analysis of genes involved in differentiation. 5th ISSCR Annual Meeting, June 2007; Cairns, Queensland, Australia
- 4) 森 英樹, 正札智子, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹細胞/前駆細胞の neurosphere 形成過程の解析. 第25回日本ヒト細胞学会学術集会, 2007年8月; 東京
- 5) 森 英樹, 紀ノ岡正博, 田谷正仁, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹細胞の分化率の評価. 第59回日本生物工学会大会, 2007年9月; 東広島
- 6) Miya F, Kawaguchi T, Tsunoda T: Searching optimal parameter values in tiling-array data normalization. 第30回日本分子生物学会、第80回日本生化学会大会 合同年会 (BMB2007), 2007年12月; 横浜

- 7) 森 英樹, 山崎麻美, 金村米博: ヒト神経幹/前駆細胞の密度がニューロン分化に及ぼす影響. 第7回日本再生医療学会総会, 2008年3月; 名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

マイクロアレイを用いた薬物応答性の薬効・毒性関連遺伝子の網羅的解析法の開発とその解析

分担研究者 角田 達彦

独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センター チームリーダー

宮 冬樹

独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センター 研究員

研究要旨

本研究グループ全体における主目的として薬剤安全性（毒性）評価システムの開発があり、その中で我々の研究室ではマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析と数理統計学的手法を駆使した評価システムの作製をおこなってきた。最終年度においては、これまで作製してきた発現解析およびパスイ解析のハイスループットスクリーニングシステムを実際に稼働させ、複数の細胞種における複数の薬剤応答反応データを収集した。特に本年度には株化細胞のデータのみでなく、当初よりの目標であった ES 細胞由来神経系細胞での薬剤応答性試験データの収集も完了させ、そのデータを含めた多量のトランスクリプトーム解析データよりなる薬剤応答遺伝子データベースを作製するに至った。このデータベースは近日公開予定である。ES 細胞由来の分化細胞は再生医療用のソースとしてのみならず、薬剤応答試験にも有用であると考えられる。すなわち、ES 細胞由来神経系細胞はより正常神経組織に近い薬剤応答を示すことが予想されるからである。また、ES 細胞から神経系以外でも各種組織に分化誘導することが可能となりつつあり、実際の各種正常組織での薬剤応答に近い反応を得られると考えられる。本研究においても株化細胞とは異なる ES 細胞由来正常細胞でのみ見られる薬剤応答が少なからず見られ、この蓄積情報を元に、より薬効作用が強いと予想される薬物を探索することや、毒性（副作用）が出ると予想される薬剤をスクリーニングの時点で除くなどのより効率的な薬剤スクリーニング方法に利用することなどの応用が可能となる。

A. 研究目的

本研究の目的は、細胞内での薬剤応答（毒性／薬効）遺伝子を網羅的に解析し、その中から各種細胞に共通しているもの、あるいは細胞により異なるもの、細胞種間での差異、等を捉えると同時に、そこで得られた情報をデータベース化し、新規の薬剤候補物質への応答反応と比較可能な薬剤評価システムを構築することである。薬剤スクリーニング試験にかかる時間や経費を削減することや、動物実験の犠牲や臨床試験での副作用発生リスクを少なくすることなどを目指すところである。

網羅的遺伝子発現解析の主要な方法として広く認知されているマイクロアレイ法は、ある細胞、あるいはある組織における各々の 50,000 を超えるゲノムからの転写産物を一度に捉えることを可能とした。変動の見られた遺伝子について、その後個々に検証していくというのがスタンダードな方法ではあるが、ある条件下における変動を包括的に理解するためには、個々の遺伝子という「点」だけではなく、機能群あるいはパスウェイ（遺伝子ネットワーク）という俯瞰的視点から「群」として応答を捉える必要性があると考えられる。そこで、本研究では昨年度までに遺伝子発

現データから変動の見られる機能群およびパスウェイ群を数理統計学的手法により抽出することを可能とするシステムの開発をおこなってきた。さらに今年度はこのシステムを使用しつつ、様々な細胞種における様々な薬剤の応答データを網羅的に収集することで、本データ同士あるいは今後の産出されるデータとも相互に比較可能な薬剤安全製評価システムとなるデータベースの構築をおこなう。薬剤応答対象細胞は薬剤応答試験に有用となることが考えられる ES 細胞由来の細胞も含めておこない、今後の薬剤応答試験への基盤を作製する。また、同様に薬剤応答と比較し副作用の予測や薬剤作用部位の予測が可能となると考えられるヒト各種組織の網羅的トランスクリプトーム解析も行い、同じくデータベースを構築する。

B. 研究方法

【本研究では ES 細胞由来の細胞を用いているが、使用に当たっては慎重に倫理面に配慮した実験をおこなうと共に、使用前には当、独立行政法人理化学研究所での倫理委員会に申請を行い実験実施の承認を受けている。】

本研究では、まず各種細胞における各薬剤への反応濃度域を網羅的に解析した。これは細胞種によって薬剤への応答が見られる濃度が大きく異なるためであり、薬剤応答試験において結果を大きく左右する重要な要因である。具体的には昨年度に構築した ATP assay (生存活性測定) と LDH assay (毒性度試験) を様々な薬剤濃度下において網羅的に調べる手法を利用し、ES 細胞由来の細胞等へ応用して用いた。

その結果をもとに、添加薬剤濃度を決定し、各種ヒト株化細胞 (HeLa, HepG2, SH-SY5Y, Netra2, U-251, Jurkat) および ES 細胞由来 NSC (神経幹細胞) の 7 種を用いて薬剤添加実験を行い、その RNA を回収後にマイクロアレイ実験を行った。また以前に解析済みのヒト胎児脳由来 NSC のデータとも比較した (最終的には 8 種の細胞種となる)。さらに、同じくヒト各種組織から抽出した

RNA サンプルを用いて網羅的にトランスクリプトーム解析実験をおこなった。

その後、産出されたデータに対し、昨年度までに構築してきた種々の数理統計学を用いて正規化を行い、遺伝子発現データを収集、データベースを構築した。

さらに、構築されたデータベース情報を元に、これまでに構築してきた手法を用いてクラスタリング解析による薬剤応答遺伝子の分類解析や、パスウェイ・機能などでの群としての変動を探索した。

C. 研究結果

昨年度までに構築してきた薬剤応答濃度探索手法を用いることで、各種の細胞での各薬剤への応答濃度を決定した。今回の研究で用いた ES 細胞由来細胞においても他種細胞とは異なる濃度域での応答パターンがあることが明らかとなった。例えば下表では Thioridazine の IC50 濃度を示すがこのように薬剤応答反応濃度が細胞によって異なっており、顕著な薬剤では数百倍の反応濃度差が見られた。

cell	Thioridazine
Ntera2	5.89uM
SH-SY5Y	7.70uM
HepG2	13.56uM
U251	14.48uM
Jurkat	14.47uM
HeLa	15.24uM
fetal_NSC	11.98uM
ES_NSC	15.43uM

この得られた結果を利用し、毒性濃度境界域にて種々の薬剤についてマイクロアレイ実験および統計解析をおこない、データベースを構築した(下図は公開予定のWEBデータベースの例)。同じくヒトの各種組織(25組織)についても網羅的にトランスクリプトーム解析を行い、薬剤応答試験と相互に比較可能なデータベースを構築した。(本ヒト組織トランスクリプトームデータは公共データベースであるNCBIのGEO(Gene Expression Omnibus)にて公開中である。GSE8124; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)

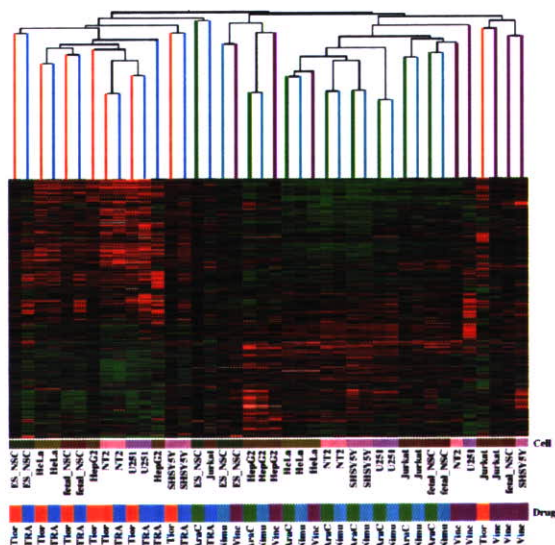


得られた各細胞種のデータについて、ES細胞由来のNSCとの相関を比較したところ、右上の表のようになった。これは解析した全転写産物(約5万)についてES細胞との相関係数(pearson's correlation coefficient)を算出したものであり、1に近いほどES細胞と遺伝子発現パターンが近いことを示す。この結果から、薬剤を添加する前のコントロールにおいても、薬剤に対する応答においてもES細胞由来NSCと遺伝子発現が近いのはヒト胎児脳由来NSCおよびNT2(奇形腫由来のヒト胎児性癌細胞で、分化能を有する神経系前駆細胞に類似の細胞)であり、次いでSHSY5Y(neuroblastoma由来)細胞、U251(glioma由来)細胞、そして遺伝子発現状態がES細胞から離れているものとしてHeLa(子宮頸部癌由来)細胞、Jurkat(白血病Tリンパ腫由来)細胞、HepG2(肝ガン由来)細胞となっており、細胞種の性質と遺伝子のパターンの類似性が薬剤応答においても

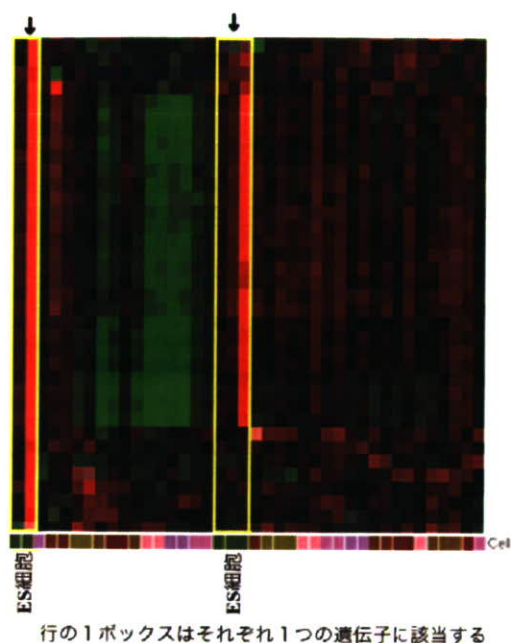
類似の関係となっていた。

cell	control sample	drug sample ave
	correl.	correl.
ES_NSC	1	1
fetal_NSC	0.927661775	0.936931756
NT2	0.903266772	0.940857629
SHSY5Y	0.892244261	0.910513286
U251	0.873711645	0.912880749
HeLa	0.866339529	0.889780361
Jurkat	0.86491206	0.866734399
HepG2	0.845328547	0.872859978

次にこれらのデータについて、同調して変動している群が存在しないかを解析したところ、薬剤によってある特定の遺伝子群が変動していることが確認され、薬剤の種類によってこのパターンはある程度細胞種を超えて分類可能であることが明らかとなり、それらの遺伝子群を抽出することができた。例えば、下図はクラスタリング解析の結果であるが、AraCおよびNimuの2種(Vincもややそれに近いことから合計3種とも言える)の抗ガン剤の変動パターンは類似しているものが多数検出され(図中の線分が短く近いほど類似していることを示す)、その他のTioridazine(向精神薬)およびATRA(レチノイン酸)は抗ガン剤とは発現パターンが大きく異なっている(赤色は高発現遺伝子、緑色は低発現遺伝子を示す)群が検出されると同時に、そのTioridazineとATRA同士は類似パターンが検出され得た。



同様の手法を用い、ES細胞由来の分化した正常細胞で、株化細胞とは異なり特に変動が大きい遺伝子群の抽出も可能であった（下図参照）。



最後に、薬剤により転写産物量に変動し応答を見せた遺伝子（controlに対して1つ以上の薬剤において4倍以上変動が見られた1938遺伝子）について、これらの薬剤応答遺伝子群に特定の機能群やパスウェイが含まれていないかどうかをこれまでに構築したパスウェイ・機能群解析プログラムを用いて統計解析した。その結果、特に細胞周期関連やアポトーシス関連の毒性関連機能群・パスウェイ群が多数検出された（右表参照。P-valueはbonferroniの多重検定補正後の値、 $p < 0.05$ のものを示した）。現在ES細胞特異的に変動している遺伝子群についても解析を継続している。

D. 考察

本研究により、基本的な薬剤応答データベースの構築が完成されたと言える。このデータをリファレンスとして今後の薬剤スクリーニング試験への応用が期待される。例えば、本結果において、抗ガン剤同士は似た薬剤応答パターンを示していたが、これと新たな新規薬剤候補の試験結果とを比較することで、もし抗ガン剤の応答遺伝子と

Title	Category	P-value
cell cycle	Biological process	1.20E-21
cell cycle process	Biological process	4.21E-17
mitotic cell cycle	Biological process	4.07E-15
M phase of mitotic cell cycle	Biological process	2.41E-14
mitosis	Biological process	5.08E-14
cell cycle phase	Biological process	7.53E-13
M phase	Biological process	9.63E-12
regulation of progression through cell cycle	Biological process	1.97E-10
regulation of cell cycle	Biological process	3.27E-10
cell division	Biological process	1.90E-09
nucleotide binding	Molecular function	1.30E-08
Cell cycle	Pathway	2.67E-08
response to DNA damage stimulus	Biological process	3.65E-06
purine nucleotide binding	Molecular function	9.41E-06
ATP binding	Molecular function	1.28E-05
intracellular transport	Biological process	1.82E-05
response to endogenous stimulus	Biological process	1.94E-05
adenyl nucleotide binding	Molecular function	3.73E-05
establishment of cellular localization	Biological process	0.000145568
chromosome segregation	Biological process	0.000435422
regulation of apoptosis	Biological process	0.000487806
DNA replication	Biological process	0.000537642
cellular localization	Biological process	0.000542529
RNA binding	Molecular function	0.000569389
cellular component organization and biogenesis	Biological process	0.000569789
regulation of programmed cell death	Biological process	0.000628609
regulation of mitosis	Biological process	0.000615945
RNA metabolic process	Biological process	0.000651385
spindle organization and biogenesis	Biological process	0.00161961
organelle organization and biogenesis	Biological process	0.002148483
cell cycle checkpoint	Biological process	0.002399187
apoptosis	Biological process	0.002614612
programmed cell death	Biological process	0.003924418
DNA metabolic process	Biological process	0.005146536
anti-apoptosis	Biological process	0.006818426
macromolecule localization	Biological process	0.007414578
DNA repair	Biological process	0.009432969
microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	Biological process	0.010652501
protein folding	Biological process	0.011904736
RNA processing	Biological process	0.011983465
cell death	Biological process	0.015798766
death	Biological process	0.015798766
protein serine/threonine kinase activity	Molecular function	0.019379406
negative regulation of cellular process	Biological process	0.021104708
cell development	Biological process	0.024491314
establishment of organelle localization	Biological process	0.026744028
regulation of cellular metabolic process	Biological process	0.028944132
negative regulation of biological process	Biological process	0.031576563
Glutamate metabolism	Pathway	0.042113083
response to unfolded protein	Biological process	0.045462942
response to protein stimulus	Biological process	0.045462942
negative regulation of apoptosis	Biological process	0.045513695

似ていれば抗がん作用を持つ薬剤である可能性が考えられるなど、統計手法と組み合わせることで作用・副作用の予測が立てられる。ヒト各種組織トランスクリプトームデータとも合わせることで、薬効や副作用の予想される組織も推定可能となる。今後の更なるデータベース情報の追加により、より強固なシステムへと進化していくこと

も期待できる。また、今回作製したシステムでは個々の遺伝子のみならず、群としても変動転写産物を同定できることから、より広範囲での薬剤応答（作用・副作用）予測やその確認、そして疾患や薬剤作用のメカニズム解明への一助にもなると考えられる。

ES 細胞由来 NSC の薬剤応答と他種の株化細胞を比較した結果、神経系細胞に細胞種に近いほど双方の薬剤応答も類似していたことから、ES 細胞由来 NSC は正常神経細胞に近い薬剤応答を示していることが予想される。また ES 細胞でのみ変動が見られた遺伝子群が存在していたことも興味深い。それらは今まで株化細胞等では探索不可能であった正常細胞のみで見られる重要な薬剤応答である可能性もあり、今後のさらなる解析が希望される。本研究では ES 細胞からの誘導細胞は神経系のみを扱ったが、他の臓器様の細胞へ分化誘導した ES 由来細胞も、それぞれの臓器をターゲットとした薬剤のスクリーニング試験に有用であろう。今後 iPS 細胞からの各種細胞への分化誘導技術が確立した際にもこのような ES 細胞で蓄積した手法を応用することで、同様の薬剤応答試験が可能となっていくことが期待され、本研究はその礎を作ることができたと考えられる。

E. 結論

- ・ 細胞に対する薬剤の毒性および生存活性をハイスループットで調べるシステムを完成させ、薬剤応答試験に用いる適正濃度を算出可能とした。
- ・ 細胞種や薬剤種により細胞応答が異なることを確認し、ES 細胞由来の分化細胞においても独自の薬剤への応答感受性濃度が存在することを明らかとした。
- ・ ES 細胞由来の細胞を含めた各種の細胞種における様々な薬剤への応答を網羅的に解析し、そのトランスクリプトームデータベースを構築した。
- ・ 同様にヒト各種組織での網羅的転写産物解析を行い、データベースを構築すると共に、そのデータを公共データベースにも公開した。
- ・ 抗ガン剤など薬剤の種類により一定の転写産

物反応パターンが存在すること、ES 細胞由来の正常細胞で株化細胞とは異なる応答遺伝子群が存在することなど、俯瞰的なトランスクリプトーム群を捉えることができるようになり、今後の薬剤応答試験への応用可能なシステム・手法を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato M, Miya F, Kanemura Y, Tanaka T, Nakamura Y, Tsunoda T: Recombination rates of genes expressed in human tissues. *Hum Mol Genet* 17(4):577-586, 2008

2. 学会発表

- 1) Miya F, Kawaguchi T, Tsunoda T: Searching optimal parameter values in tiling-array data normalization. 第 30 回日本分子生物学会、第 80 回日本生化学会大会 合同年会 (BMB2007), 2007 年 12 月 ; 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号：頁 出版年
Mori H, Fujitani T, <u>Kanemura Y</u> , Kino-oka M, Taya M.	Observational examination of aggregation and migration during early phase of neurosphere culture of mouse neural stem cells.	J Biosci Bioeng	104(3):231-234, 2007
Mori H, Ninomiya K, <u>Kanemura Y</u> , <u>Yamasaki M</u> , Kino-oka M, Taya M.	Image cytometry for analyzing regional distribution of the cells inside human neurospheres.	J Biosci Bioeng	103(4):384-387, 2007
Hattori Y, Ohta S, Hamada K, Yamada-Okabe H, <u>Kanemura Y</u> , Matsuzaki Y, <u>Okano H</u> , Kawakami Y, Toda M.	Identification of a neuron-specific human gene, KIAA1110, that is a guanine nucleotide exchange factor for ARF1.	Biochem Biophys Res Commun	364(4):737-742, 2007
Kato M, <u>Miya F</u> , <u>Kanemura Y</u> , Tanaka T, Nakamura Y, <u>Tsunoda T</u> .	Recombination rates of genes expressed in human tissues.	Hum Mol Genet	17(4):577-586, 2008
<u>Wada A</u> , Mizuguchi Y, Miyake H, Niihara M, Ito M, Nakagawa K, Okano T.	Preparation and Biological Activities of Heteroarotinoids.	Lett Drug Des Discov	4(6):442-445, 2007
Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, <u>Wada A</u> , Mori T, Murata K, Nishino R, Ukita T, Uenishi K, Tanaka K, Okano T.	Quantification of Fat-Soluble Vitamins in Human Breast Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry.	J Chromatogr B	859(2):192-200, 2007

Yamano Y, Fujita Y, Mizuguchi Y, Nakagawa K, Okano T, Ito M, Wada A.	Synthesis of γ -Hydroxybutenolides Applying Crossed Aldol Condensation in the Presence of a Bulky Lewis Acid and Their Anti-tumor Activity.	Chem Pharm Bull	55(9):1365-1370, 2007
Saeki M, Irie Y, Ni L, Itsuki Y, Terao Y, Kawabata S, Kamisaki Y.	Calcineurin potentiates the activation of procaspase-3 by accelerating its proteolytic maturation.	J Biol Chem	282(16):11786-11794, 2007
入江康至.	新規癌抑制蛋白質 Amida.	医薬品相互作用研究	31(1):1-7, 2007