

200708006B

厚生労働省科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト末梢血中リンパ球を用いたトキシコゲノミクス基盤研究

平成 17 年度—19 年度 総合研究報告書

主任研究者 藤村 昭夫

平成 20 年(2008)年4月

目 次

I. ヒト末梢血中リンパ球を用いたトキシコゲノミクス基盤研究	1
藤村昭夫	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
III. 研究成果の刊行物・別刷	添付
IV. (資料)別紙1	
別紙2	
別紙3	
別紙4	
別紙5	
別紙6	
別紙7	
別紙8	
別紙9	
別紙10	

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）
総括研究報告書

ヒト末梢血中リンパ球を用いたトキシコゲノミクス基盤研究

主任研究者 藤村昭夫 自治医科大学臨床薬理学 教授

研究要旨

本研究では、薬物治療中に問題になる薬物性腎障害の有無を、創薬時の早期に、簡便かつ高感度に予測する方法を確立するとともに、臨床試験時に末梢血リンパ球を用いてトキシコゲノミクス研究を推進する事を目標として、その取り扱い方法の検討を行った。まず、リンパ球系細胞を用いて薬物による腎障害の有無を見分ける事が出来るか否かを、日本人由来不死化 B 細胞を用いて検討した。次いで、臨床試験時の末梢血からサンプルを調整する際にリンパ球に影響を与える可能性のある因子を抽出し、実際に臨床検体を用いて発現データを取得する際の問題点について検討した。また、腎障害性薬物により発現誘導される遺伝子の機能解析を行い、薬物性腎障害の機序の一つを明らかにするとともに、治療への応用を検討した。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

大島康雄:自治医科大学 臨床薬理学 助教
津田英利:自治医科大学 臨床薬理学 ポスト・ドクター
草間幹夫:自治医科大学 歯科口腔外科 教授
篠原歩:東北大学大学院 システム情報学 教授
石野明:東北大学大学院 システム情報学 助教

A. 研究目的

創薬時には、前臨床試験によって安全とされる化合物が選ばれるが、臨床開発時には、さらにその安全性を確認する必要がある。各治療に用いる薬物は、前臨床試験において培養細胞や動物を用いてまず毒性に関するスクリーニングを詳細に行い、これをクリアした化合物を用いて、薬効や薬物動態に関する試験が行われる。その後、臨床試験でヒトを対象として薬効や有害反応を詳しく検討した後、治療薬として使用される事となる。

近年のマイクロアレー技術の進歩により、より簡便かつ高感度に遺伝子転写産物を網羅的に研究する事が可能となってきた。毒性学においても毒物や人体に有

害な化合物を対象とし、DNA マイクロアレーによる遺伝子転写産物を用いた網羅的研究が盛んに行われており、トキシコゲノミクスとして位置づけられている。

臨床試験中に前臨床試験で予測することの出来なかった有害反応が起こる事があるが、このような場合にトキシコゲノミクスは有力な研究手段となると考えられる。薬物によって腎臓や肝臓に障害が起こった時には、臨床検査データから推測する事は出来るが、血算や生化学データに変化が現れた時には既に障害が起こっていることになる。しかし、臨床検査データに異常が現れる前に転写産物に変化が認められるため、トキシコゲノミクスによって薬物に対する反応をより高感度にかつ早期にとらえる事が可能である。

しかし、その障害を検出する際に、患者から障害の起こった組織(例えば腎臓や肝臓)の一部の提供を受けることは、患者本人の負担が大きい。そこで、より負担の小さい方法で臨床検体を採取する必要がある。そのような検体として、ヒト末梢血中有核細胞、特にリンパ球が考えられる。そこで本研究では、薬物による腎障害をリンパ球を用いて評価することが可能か否か、を明らかとすることとした。まず、マイクロアレーの精度管理方法を開発した。次いで有害反応として腎不全等の腎障害が報告されている薬と報告の無い薬を 80 ずつリンパ球系細胞である日本人不死化 B 細胞に曝

露し、得られた発現データを用いて、両群間で発現量に有意差のある遺伝子を探索した。さらに、この有意な変化を示す遺伝子群が腎障害性を予測する上で有用か否かを評価した。またプライマリー腎細胞やリンパ球に薬物を曝露して得られた遺伝子発現情報を基にして、薬物による腎障害を防御することを目的とした基礎的検討を行った。

B.研究方法

1. 異なる組織間の発現比較・ブリッジングの検討

これまでの研究で確立した腎組織由来のプライマリー細胞と、日本人不死化 B 細胞由来リンパ球に同一の薬物を同一の時間曝露した。曝露した薬物は、シクロスポリン A(CisA)、タクロリムス(FK506)、グスベリムス(NKT-01)、アミカマイシン(AMK)、トブラマイシン(TOB)、ジベカシン(DKB)、ゲンタマイシン(GM)、硫酸イセパマイシン(ISP)であった。各薬物をプライマリー腎細胞とリンパ球由来細胞に同一の濃度で曝露し、曝露後24時間目にそれぞれより RNA を抽出した。ラベリング後、発現データを取得し、各データに対して normalization と noise reduction を行った。それぞれの細胞において、volcano plot により有意に発現の変動した遺伝子を分離し、その遺伝子の数と共通性を検討した。

2. 腎障害性薬物予測の検討

2.1 多サンプルのマイクロアレー精度管理法の開発

多サンプルの RNA 及びチップデータの質を客観的に評価し、一元的に管理する方法として、RNA に関しては、Agilent Bioanalyzer 2100 (以下 Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies)による 28S/18S を用いた評価法とその管理法を、電気泳動によって得られたレポートファイルから効率よく抜き出すスクリプトを作成し、評価した。

Chip のデータに関しては、GeneChip Operation System (以下 GCOS, Affymetrix)を用いて、スキャン終了後に作成される CHP ファイルからサンプルの状態を評価するために有用なパラメーターが得られる RPT(report)ファイルを、各発現データについて出力した。RNA が全領域に渡って合成されている事を示す cDNA の 3' 領域のシグナル強度と 5' 領域のシグナルを評価するため、housekeeping gene である β -アクチンと GAPDH の 3' /5' 比を効率よく抜き出すスクリプトを作成した。同時に発現量とハイブリダイゼーションの効率を評価するために全プローブに対する陽性率を

示す %Present の値もスクリプトにより抜き出し、評価した。いずれのスクリプトも一般的な表計算ソフトを用いて集計・管理出来るものとし、分布を検討することによって、解析から外すべきデータを決めた。

2.2 腎障害性薬物予測アルゴリズムの作成

薬物の添付文書情報を基に、重大な有害反応の項目に急性腎不全の記述のあるものを「腎障害あり」の薬物、記述の無いものを「腎障害なし」の薬物として分類した。それぞれ 80 種類、計 160 種類の薬物を選択し、日本人不死化 B リンパ球細胞である HEV0034 (RIKEN)に曝露した。曝露濃度としては、薬物使用時の最高血中薬物濃度を参考にし、3 つの曝露濃度グループに分類した。腎障害あり、なしの薬物を、それぞれ 40 ずつ前期、後期に分けてデータを取得した。曝露して得られたサンプルを用いて GeneChip により発現データを取得し、前期のサンプルデータを用いて腎障害あり、なしの 2 群間で有意に発現に差のある遺伝子を抽出した。その後、前期のデータを用いて cross validation test を行い、最も予測精度が高くなる様にパラメーターを設定した。得られたパラメーターを用いて、後期の薬物曝露データを腎障害の有無をブラインドにして、どの程度の精度で予測する事が出来るか検討した。

2.3 腎障害性薬物予測—多施設での検討

上記のアルゴリズムの有用性と、他施設で得られた発現データを解析する時の問題点を明らかにするために、国内の複数の施設に腎障害ありとなしの薬物を 5 ずつ、合計 10 薬物と培養細胞、チップ、およびそれに係る試薬を送付し、発現データを取得した。得られたデータを一度本研究室所有の GCOS に投入してチップ品質のチェック等を行い、クリアしたデータを GeneSpring によって normalization と noise reduction を行った。これらのデータを用いて、我々が構築した腎障害性薬物予測アルゴリズムにより、予測が出来るか否かを検討した。

3. 臨床検体としてリンパ球を用いるための基礎的検討

3.1 抗凝固剤の検討

採血時に用いる抗凝固剤が、リンパ球の遺伝子発現に影響するか否かを明らかにするために、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、EDTA-ナトリウム(EDTA-Na)及び EDTA-カリウム(EDTA-K)の 4 種類について培養細胞を用いて検討した。

3.2 RNA 抽出作業の検討

遺伝子発現実験に関する文献を調査して、血液細胞の RNA の純化に関するテクニックを比較し、純化・抽出過程における細胞に与える影響等の観点から、最適な方法を選択した。

3.3 臨床検体を扱う予備的検討

本学遺伝子解析倫理委員会に臨床試験の実施を申請し、許可を得た。患者を対象にして薬物の服用前と服用後に採血を行い、リンパ球から RNA を抽出して遺伝子発現解析を行った。対象者は本学歯科口腔外科外来に埋伏第三大臼歯(親不知)を抜歯するために来院した患者とし、抜歯の際に用いる塩酸セフカペンピボキシル(100 mg/回×3 回)の服用前と服用後に 2mL 採血した。その後、末梢血リンパ球から RNA を抽出し、その質と発現データの比較を行った。プロトコルを図 1 と別紙に示した。

4. 腎障害メカニズムの解析

4.1 三酸化ヒ素の毒性メカニズムの解析

急性白血病治療薬として使用されている三酸化ヒ素をプライマリー腎細胞に曝露し、得られたデータを用いて、通常の normalization および noise reduction を行なった。その後、k-means クラスタリングを行ったところ、5 つのクラスターに遺伝子が分類された。この中より遺伝子発現が経時的に上昇した HMOX-1 遺伝子を対象として、その発現を定量 PCR で確認した。さらにタンパク質レベルにおける発現誘導をウエスタンブロット法により確認した。また、HMOX-1 遺伝子を HEK293 細胞へ導入し、三酸化ヒ素による殺細胞活性を発現誘導していない細胞株と比較した。

最後に、HMOX-1 遺伝子は酸化ストレスと関連するため、三酸化ヒ素の細胞毒性と酸化ストレスの関連を検討した。

4.2 動物を用いた α -リポ酸の効果の検討

Wistar 系ラットを三酸化ヒ素 5mg/kg 群、三酸化ヒ素 5mg/kg + α -リポ酸 3.5mg/kg 群、三酸化ヒ素 5mg/kg + α -リポ酸 35mg/kg 群に分け、 α -リポ酸の効果を検討した。三酸化ヒ素として、現在治療に使用されているトリセノックスを週 5 回・8 週間腹腔内投与し、さらに α -リポ酸は三酸化ヒ素と同時に経口投与した。投与終了時に、血清クレアチニン、BUN、尿中 ALB、NAG、Cer を測定した。

4.3 Allograft inflammatory factor-1(AIF-1)のクローニングと機能解析

AIF-1(accession No. U49392)の配列を参考にプライマーを設計し、タンパク質コード領域を PCR 法により増幅した。増幅断片を pIRES2-EGFP(Clontech)にクローニングした。このプラスミドを pIRES-AIF1 とし、AIF-1 安定発現細胞株を作るためにヒト胚腎由来で T 抗原を持つ 293T 細胞へ遺伝子導入した。導入 24 時間後にネオマイシン入りの培地と交換し、プラスミド導入細胞を選抜した。293T 細胞に遺伝子導入し、ネオマイシンで 3 代選抜した細胞を 293T/AIF1 とした。コントロールとしてベクターのみを細胞へ導入し、293T/GFP とした。細胞増殖性は、トリパンブルー染色を行い、24 時間毎に生細胞をカウントする事により評価した。また、細胞活性は WST-1 試薬(TaKaRa)によって評価した。また日本人ヒト血球 B 細胞由来の培養細胞株である HEV0034 にも遺伝子を導入し、WST-1 試薬により細胞活性を評価した。

5. 肝障害性薬物予測の検討

薬物の添付文書情報により、重大な有害反応に肝障害あるいは劇症肝炎の表記のあるものを「肝障害あり」、表記のないものを「肝障害なし」と分類し、腎障害薬物予測の時と同様の方法で薬物を曝露して RNA を得た。得られた発現データも同様に処理し、training set として 34 薬物、test set として 51 薬物の曝露データを得た。GeneSpring により、normalization と noise reduction を行い、training set で有意に発現変動する遺伝子を分離し、肝障害予測遺伝子セットとした。腎障害性薬物予測の時と同様の手法を用いて、肝障害性薬物の予測が可能か否かを検討した。

C. 研究結果

1. 異なる組織間の発現比較・ブリッジングの検討

まず、両方の組織における薬物未曝露時の遺伝子発現を比較した。分布を観察したところ明らかに異なると思われる発現分布を示し、少なくとも global normalization によりこの両者を直接比較することは不相当と考えられた。そこで、house keeping gene による normalization を行うこととした。最終的なデータ解析においては、それぞれの組織における未曝露時の遺伝子発現と比較して、曝露後の遺伝子発現が 2 倍以上変化した遺伝子のリストを各組織・各薬物について作成し、そのリストの中から共通な遺伝子数を調べた。

今回調査した 8 種類の薬物では、プライマリー腎細胞とリンパ球細胞では、有意に発現変化する遺伝子数が著しく異なっていた(表1)。全ての薬物に関して、リンパ球に曝露した時の方が変化した遺伝子数が多く、最大 20 倍以上の違いがあった。共通して発現誘導が見られた遺伝子数は少なく、あっても 1-2 トランスクリプト程度であった。したがって、プライマリー腎細胞を用いた薬物曝露発現データとリンパ球を用いた薬物曝露発現データを直接比較することは困難だと思われた。

2. 腎障害性薬物予測の検討

2.1 多サンプルのマイクロアレイ精度管理法の開発

解析対象としたデータは、平成 17-18 年度に曝露した発現データ(再曝露を含む)、合計 216 である。Bioanalyzer 2100 によって、得られたデータファイルより 28S/18S 比を抽出した。これらの分布には 1.3-2.6 に主要なピークがあった。GeneChip により得られたデータから GAPDH、 β -アクチン、%Present の値を抽出し、チップのサンプルネームと相関させて Microsoft Excel で開く事の出来るファイルを作成した。分布を検討した結果、%Present は 30%未満、 β -アクチンおよび GAPDH は 100 以上と 1.0 以下がはずれ値と見なされた。以上の基準に基づいて、腎障害ありの薬物 80、なしの薬物 80 のデータを検討した結果、125 のデータが解析対象となった。

2.2 腎障害性薬物予測アルゴリズムの作成

添付文書情報を基に、腎障害ありの薬物、なしの薬物をそれぞれリストアップした。表2には前期実験(training set)、表3には後期実験(test set)のリストを示した。薬物曝露濃度を決定するために、各薬物の一日最大使用量と最高血中薬物濃度を調べた。各値をプロットした所、相関性を認めた(図 2)。以上の結果より、曝露濃度は、一日最大投与量が 10 mg までの薬物は 0.05 μ g/mL、10-400 mg の薬物は 1.0 μ g/mL、400 mg 以上の薬物は 20 μ g/mL とした。これらの濃度の薬物を細胞に 24 時間曝露後、RNA を抽出した。

RNA の品質管理基準に基づき、28S/18S=1.8 以下のサンプルについては cDNA の合成は行わなかった。その後、cDNA 合成の効率やチップへのハイブリダイゼーションの効率、ヒューマンエラー等による実験誤差を除くために、%Present 比(図 3)、 β -アクチンの 3'/5' 比(図 4)等により、品質不良サンプルを除いた。その結果、前期 49 サンプル、後期 76 サンプル、合

計 125 のサンプルが解析対象となった。前期 49 サンプルを用いて腎障害の有無により変動する遺伝子を検索し(図 5)、最終的には 32 遺伝子を抽出した(表 4)。この 32 遺伝子を用いて後期サンプルの予測を行った。条件は GeneSpring 内包のサポートベクターマシンに、training set として前期 49 サンプル、test set として後期 76 サンプルを用いた。パラメーターを腎障害あり、なしとし、Kernel Function を Radial Basis (Gaussian)、Diagonal Scaling Factor (Soft margin)を 32 とした時に、予測精度が最大の約 83%となった。予測の正確性を図 6 にまとめた。

2.3 腎障害性薬物予測—多施設での検討

各施設により得られたデータを解析した結果、一施設で cDNA 合成の効率の指標である house keeping gene の GAPDH と β -アクチンの 3'/5' 比が高値になり、%Present が低値になったが、全ての施設のデータは本研究で定めた基準をクリアしていた。各施設の発現データをブラインド化して、腎障害性薬物予測アルゴリズムにより検証した結果、一施設で 10 薬物中 6 薬物の正答、残りの施設では 5 薬物の正答しか得られなかった。そこで、各施設の発現データを全てまとめて、ボルケーノプロットにより腎障害ありとなしで発現が変動した遺伝子の分離を試みた。しかし腎障害予測に用いた 32 遺伝子は含まれておらず、また施設間で分離される遺伝子数が大きく異なることが明らかになった。

3. 臨床検体としてリンパ球を用いるための基礎的検討

3.1 抗凝固剤の検討

抗凝固剤として、クエン酸ナトリウム、ヘパリン、EDTA-Na、EDTA-K の 4 種類を選び、これらの HEV0034 に与える影響を、無処理細胞と比較した。その結果、クエン酸ナトリウム、EDTA-Na、EDTA-K では無処理と比べて発現が変化した遺伝子は検出されなかったが、ヘパリンでは 4 遺伝子の発現が抑制された。したがって、遺伝子発現に影響を与えるヘパリンを除いた 3 種類いずれかを使用することとした(図 7)。

3.2 RNA 抽出作業の検討

細胞分画・RNA 純化法として、Ficol 法、BD-CPT、PAXgene、QIAamp の 4 種類を検討した。得られた RNA 量の平均値は、全血 1mL 中 0.8-2.0 μ g と比較的均一であったが、Ficoll 法でばらつきが大であった。オペレーターによるばらつきが大きいものと思われる。

分離後の RNA を電気泳動法により比較すると、Ficoll, BD-CPT, QIAamp, PAXgene のいずれも良好な RNA が得られていた。しかし、ラベル後断片化前の cRNA を電気泳動したところ、PAXgene では 700b にドミナントなバンドが見られ、これは発現データなどを参考にすると globin mRNA が増幅されたものと考えられた。PAXgene では全血を RNA 純化に用いたため、赤血球由来の globin mRNA が大量に含まれ、一方 Ficoll や BD-CPT では globin mRNA がバンドとしては全く確認できないまでに赤血球が除かれていると考えられた。また QIAamp では、溶血が完全ではないためにわずかに赤血球由来の RNA が検出されたものと思われる。さらに、これらのサンプルを% Present の数値で比較すると、PAXgene は明らかに低値であった。これは、PAXgene では globin と思われるドミナントバンドが存在するために、globin を除いた RNA ターゲットのラベリングが相対的に低くなったものと思われる。

3.3 臨床検体を扱う予備的検討

同意の得られた被験者より、薬物投与前と投与後に 2mL ずつ採血し、QIAamp RNA prep mini kit (QIAGEN)を用いて赤血球を溶血後、リンパ球より RNA を抽出した(図 1)。その結果、培養細胞系に比べて、平均して約 1/10 程度の RNA 量が得られた。1mL あたりの細胞数は血液中の方が 1/10 程と考えられたが、今回得られた RNA 量は妥当な量であり、かつ発現実験を行うために必要な量の RNA が得られる事が明らかになった。また、RNA の電気泳動により質を確認した結果、投与前後合わせて 40 サンプル中 2 サンプルで 28S/18S が完全に分解されていることが明らかになった。その他、3被験者分 6 サンプルが解析に不向きであると判断され、残りの 34 サンプルが解析可能な品質を有していた。投与前採血と投与後採血を比較すると、GAPDH、 β -アクトチンの 3'/5' 比は投与前の方が値およびバラツキは大であった(図 8、9)。これは、RNA の分解や cDNA の合成効率が投与前の方が低いことを示しており、その原因として、採血後からサンプルを処理するまでの時間が長いためと考えられた。

4. 腎障害メカニズムの解析

4.1 三酸化ヒ素の毒性メカニズムの解析

遺伝子発現データを k-means クラスタ法により分類したところ、5つのクラスターに分類することができた(図 10)。さらに、遺伝子発現が経時的に上昇したクラスター-set2 に分類された遺伝子を定量 PCR によって

validation した結果、HMOX-1 が時間および濃度依存的に上昇していた(図 11)。

HMOX-1 が酸化ストレス時に発現誘導されると報告されているため、その点を細胞存在下で検討した。その結果、三酸化ヒ素添加により活性酸素産生の著明な上昇が示された(図 12)。この活性酸素により細胞が障害を受けると考えられたため、活性酸素による細胞障害を防ぐために、抗酸化剤の効果を検討した。その結果、 α -リポ酸が三酸化ヒ素存在下の活性酸素による細胞障害を有意に減少させることが明らかになった(図 13)。

4.2 動物を用いた α -リポ酸の効果の検討

投与終了後、各測定項目を比較した結果、三酸化ヒ素単独投与群では尿中 Cr は低値を示し、尿中アルブミンは高値を示したが、有意な差はなかった(図 14)。 α -リポ酸投与群では、いずれも回復傾向を示していたが、有意な差ではなかった。 α -リポ酸投与群ではいずれも死亡を抑制したが、有意な差ではなかった(図 15)。

4.3 Allograft inflammatory factor-1(AIF-1)のクローニングと機能解析

293T/GEP 及び 293T/AIF1 をシャーレに継代培養後 24 時間の細胞数を 1 として、その後、細胞数がどの様に変化していったのか 24 時間毎に計測した。その結果、継代培養後 48 時間まではほぼ同じであったが、72 時間、96 時間ではそれぞれ AIF-1 を過剰発現している細胞株の細胞数が有意に大であった(図 16)。

WST-1 活性測定の結果、リポフェクチン試薬による細胞毒性によって GFP のみを導入した細胞では活性が半分程度に落ちたが、AIF-1 が存在することにより有意に回復することが確認された(図 16, $p < 0.001$)。またこれはプラスミド量に依存しており、プラスミド量が倍になると、より回復度が高くなり未処理と同程度となった。HEV0034 に対して同様に遺伝子導入を行った結果、遺伝子導入効率は 293T 細胞と比較すると低く、差は大きくなかった。しかし、293T 細胞と同様、GFP のみでは活性が落ち、AIF-1 が存在することにより未処理の細胞とほぼ同じまで回復した。

5. 肝障害性薬物予測の試み

training set に 34 薬物、test set に 51 薬物をエントリーした。training set を所定の手順によりデータを整理した後に、肝障害ありとなしで $P=0.01$ で 2 倍以上の発現変動をした遺伝子を抽出したところ、53 遺伝子

を抽出した。この遺伝子セットを用いて予測を行った結果、51 薬物中 37 の薬物、すなわち 72.5%の精度で予測が可能であることが明らかとなった。また、53 遺伝子の中に腎障害と共通の遺伝子が 17 含まれていた。これを用いた場合、あるいは除いた場合で検討を行ったが、53 遺伝子全てを用いたときが最も予測精度が高かった。

D.考察

1. 異なる組織間の発現比較・ブリッジングの検討

様々な薬物曝露後の遺伝子発現の変動を指標にしたところ、プライマリー腎細胞とリンパ球由来細胞における共通性は、あってもごくわずかであった。両組織は基礎となる薬物曝露前の遺伝子発現も異なるため、発現変化の類似性も大きくなかった。しかし、リンパ球への薬物曝露・遺伝子発現研究により腎組織に対する薬物による臓器障害が予測できる可能性が否定されたわけではなく、今後さらに検討を行う必要がある。

2. 腎障害性薬物予測の検討

2.1 多サンプルのマイクロアレー精度管理法の開発

多検体の質を評価するための効率的な手順を開発するために、これまで手作業で行ってきた質の評価を再度行なった。半自動的に処理を行なうため、大量の演算を行う際の手作業によって起こる間違いが起りにくくなり、また、確認作業も容易になった。

2.2 腎障害性薬物予測アルゴリズムの作成

volcano plot 法により抽出した 32 遺伝子はサポートベクターマシン法において、効率良く腎障害性を予測する事が可能であることが明らかとなった。これらの遺伝子は新たな腎障害性予測のための DNA チップを作成する上で有用なものであると考えられる。

2.3 腎障害性薬物予測—多施設での検討

各施設で得られたデータは全て解析対象とする事が出来るデータであった。したがって、RNA の取り扱いを普段から行い、GeneChip の取り扱いにある程度慣れていれば、異なる cDNA 合成キットを使用しても問題は無いと考えられる。しかし得られた発現データでは腎障害性の予測を完全に行うことは出来なかった。これは volcano plot 法で分離された遺伝子の中に腎障害予測アルゴリズムに用いた 32 遺伝子が含まれておらず、また変動する遺伝子数も極端に少なかったためと考えられる。今回ほとんどの施設で、細胞を

凍結融解後、2-3 継代後に薬物を曝露しデータを取得していた。60%の正解が出た施設に関しては、これにくらべ 1-2 代長く継代した細胞を使用していた。以上より、細胞に薬物曝露する際、継代タイミングも規定する必要があると考えられる。

3. 臨床検体としてリンパ球を用いるための基礎的検討

3.1 抗凝固剤の検討

血液を採取する際、抗凝固剤の末梢血単核球に対する刺激が懸念されたが、ヘパリンを使用しない事によって影響を最小限にすることが出来た。

3.2 RNA 抽出作業の検討

今回の検討によって、PAXgene を用いると赤血球由来の globin mRNA の影響により、末梢血単核球中の遺伝子発現が正しく評価出来ないと判断された。Ficoll 法や BD-CPT では純度の高い RNA が抽出出来るが、操作の煩雑さ等により、使用される環境が制限されるものと思われた。したがって、QIAamp が最も操作性が良く、かつ赤血球由来 RNA の影響が最も少ないため、全血より RNA サンプルを得るためには最も適していると考えられる。

3.3 臨床検体を扱う予備的検討

全血を用いて質的に良好な RNA が得られ、かつ解析にも十分であることが明らかになった。RNA の純化条件として最も重要なポイントは、採血から RNA 抽出処理を行うまでの時間が 15 分以内であると考えられる。したがって、臨床研究を実施する場合、採血者と実験者の連携を上手く取ることにより、貴重な検体を無駄にすること無く、質の高い発現データを得ることが可能になると考えられる。

4. 腎障害メカニズムの解析

4.1 三酸化ヒ素の毒性メカニズムの解析

三酸化ヒ素の腎毒性メカニズムにアプローチし、酸化ストレスが関連していることが明らかになった。さらに、抗酸化剤を用いて毒性を軽減しても、薬効には影響がないことが明らかとなり、治療への応用が期待できる結果を得た。

4.2 動物を用いた α -リポ酸の効果の検討

今回行った実験では、三酸化ヒ素単独投与により悪化した腎機能を α -リポ酸を併用することにより、軽減することが出来たが、有意なものではなかった。これは

試験期間中に三酸化ヒ素単独群で死亡例が出て n 数が少なくなったために、統計的パワーが不足したためと考えられる。 α -リポ酸の臨床応用を進めるためにはさらに詳細に検討する必要がある。

4.3 Allograft inflammatory factor-1(AIF-1)のクローニングと機能解析

AIF-1 遺伝子の発現により、細胞活性が高まることが確認出来た。この遺伝子を効率よく誘導出来る方法や薬物が見つければ、薬物の腎障害を防ぐ一つの方法になるかもしれない。今後さらに詳細に検討して行く予定である。

5. 薬物性肝障害予測の試み

肝障害性薬物の予測が一定以上の精度で出来ることが明らかになったが、腎障害予測精度よりも低かった。今後、さらに曝露薬物数を増やして、training set の精度とパワーを増す必要がある。

E. 結論

リンパ球を用いてトキシコゲノミクス研究を行い、毒性予測に必要な様々な知識を蓄積した。さらに、蓄積したデータを基に毒性メカニズムにアプローチし、治療上有効性が示唆されるような応用モデルを見出した。また、将来的に臨床の場でトキシコゲノミクス研究を実施する場合の問題点を抽出するために基礎検討を行い、問題点を明らかにした。さらに、薬物の腎障害軽減の可能性を明らかにした。

F. 健康被害情報

なし

G. 研究発表

<論文>

[1] Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H, Harada M: Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein α in granulocyte colony-stimulation factor signaling pathway. J Biol Chem 280 (2005) 12621-12629.

[2] 大島康雄、藤村昭夫:日本人組織を用いたトキシコゲノミクス研究. 臨床薬理 36 (2005) 11-12.

[3] H. Ando, Y. Oshima, H. Yanagihara, Y Hayashi, T Takamura, S Kaneko, and A. Fujimura, Profile of rhythmic gene expression in the livers of obese diabetic KK-A(y) mice. Biochem Biophys Res Commun 346 (2006) 1297-1302

[4] A. Sasaki, Y. Oshima, S. Kishimoto and A. Fujimura, Individual Differences in Gene Expression in Primary Cultured Renal Cortex Cells Derived from Japanese Subjects. IPSJ Transactions on Bioinformatics 47 (2006) 67-72

[5] A. Sasaki, Y. Oshima, and A. Fujimura, An approach to elucidate potential mechanism of renal toxicity of arsenic trioxide. Experimental Hematology 35 (2007) 252-262

<学会>

[1] 臨床薬理学会 2006 年度、年会 シンポジウム S11「ゲノム解析による副作用の予測」(12 月 1 日(金曜日)15:00-17:10 第 1 会場(本館 5 階 コンコード A+B))、座長:藤村 昭夫(自治医科大学 臨床薬理学部門)、長尾 拓(内閣府食品安全委員会)

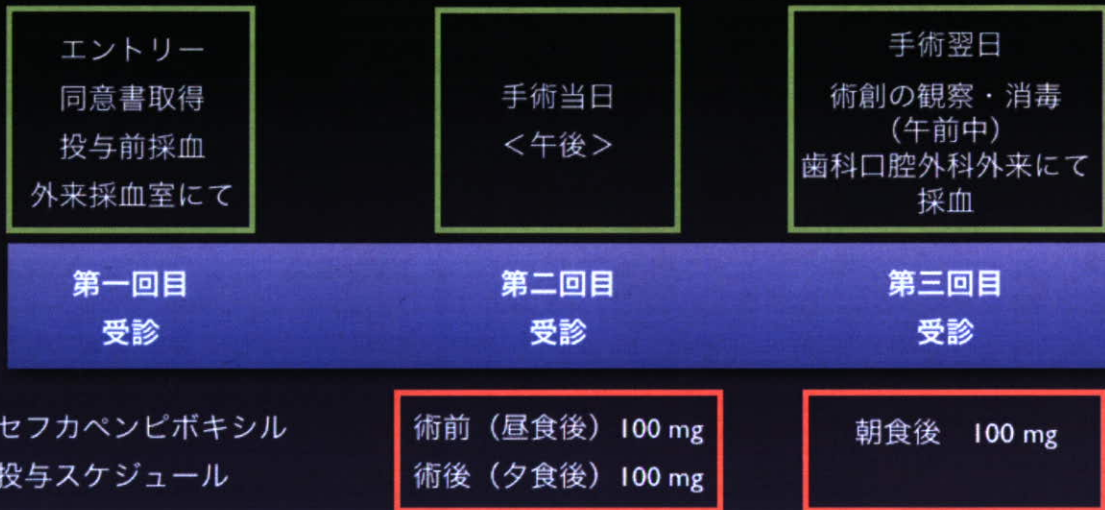
[2] BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)「遺伝子発現比較による薬物腎障害予測への応用<トキシコゲノミクスからのアプローチ>(12 月 14 日(金曜日)4P-1192 パシフィコ横浜 アネックスホール ポスター会場)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

[1] 出願番号:特願 2007-47053, 発明の名称:腫瘍治療における三酸化二ヒ素の副作用低減剤及び解毒剤

[2] 出願番号:特願 2007-72357, 発明の名称:遺伝子発現情報に基づく薬物有害反応の予測方法

薬物投与と採血プロトコール



塩酸セフカペンピボキシル
投与スケジュール

術前 (昼食後) 100 mg
術後 (夕食後) 100 mg

朝食後 100 mg

一回採血量：2 mL
RNA抽出までは室温

図1 臨床試験における薬物投与スケジュールと採血スケジュール

表 1 プライマリー腎細胞とリンパ球細胞で発現変化のあった遺伝子数の比較

Volcano Plotにて発現量変化あった遺伝子の数

薬物	プライマリー腎細胞	リンパ球	両組織に共通
CisA	6	126	0
FK506	9	99	0
NKT01	17	136	1
AMK	121	137	2
TOB	19	102	0
DKB	32	181	1
GM	15	149	1
ISP	15	150	1

両組織に共通して発現変化する遺伝子はほとんどない

それぞれの組織由来の細胞に同一薬物を同一時間曝露して、遺伝子発現データを得た。housekeeping gene による normalization を各データ毎に行い、volcano plot により、発現変化のあった遺伝子数を調べ、同一薬物について腎細胞とリンパ球細胞で共通の遺伝子があるか否か調べた。

一日（最大）使用量と添付文書におけるCmax値の相関

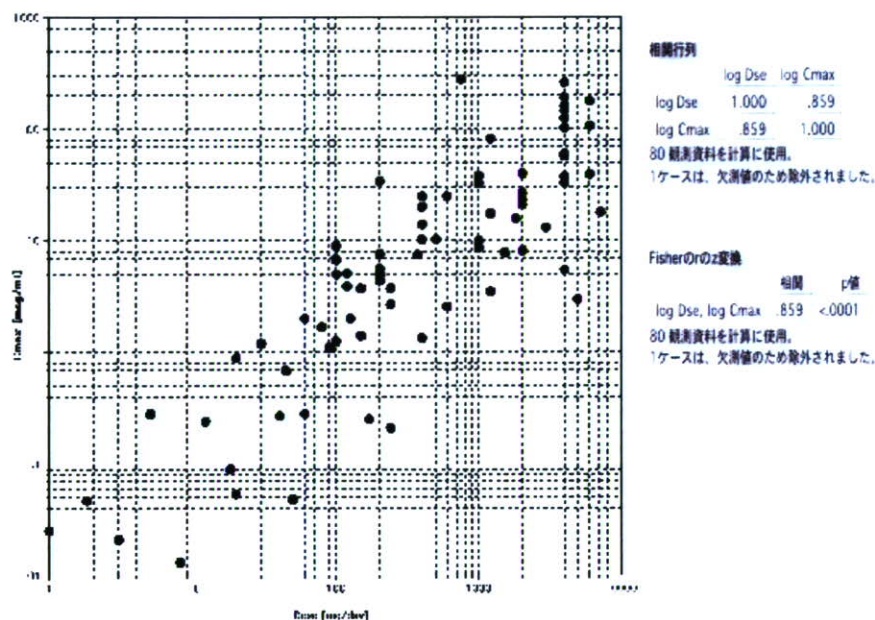


図2 薬物の一日最大使用量と添付文書における Cmax の相関図

横軸を薬物の一日最大使用量(mg)、縦軸を最高血中薬物濃度(Cmax, μ g/mL)とし、各薬物の値をプロットした。

表 2-1 腎障害あり training set

sample ID	一般名	通常一日使用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
#17-1	セフォジムナトリウム	4000	20
#17-2	塩酸セフォチアム	2000	20
#17-3	セフォペラゾンナトリウム	6000	20
#17-4	硫酸ゲンタマイシン	120	1
#17-5	セフトジム	4000	20
#17-6	アンピシリンナトリウム・スルバクタムナトリウム	6000	20
#17-7	トブラマイシン	120	1
#17-8	インドメタシンナトリウム	42	1
#17-9	硫酸ミクロノマイシン	240	1
#17-10	アンピシリン	4000	20
#17-11	アセタゾラミド	750	20
#17-12	ピアベネム	1200	20
#17-13	塩酸セフェピム	4000	20
#17-14	イノシン	400	20
#17-15	ケトプロフェン	100	1
#17-16	硫酸リボスタマイシン	1000	20
#17-17	アストレオナム	4000	20
#17-18	塩酸クロミブラミン	225	1
#17-19	硫酸ジベカシン	100	1
#17-20	スルベニシリンナトリウム	30000	20
#17-21	硫酸セフピロム	4000	20

#17-22	セフメタゾールナトリウム	4000	20
#17-23	シプロフロキサシン	600	20
#17-24	デカン酸ハロペリドール	150	1
#17-25	セフテゾールナトリウム	4000	20
#17-26	塩酸バンコマイシン	2000	20
#17-27	パミドロン酸二ナトリウム	45	1
#17-28	オザグレルナトリウム	80	1
#17-29	塩酸ミノサイクリン	200	1
#17-30	タゾバクタム・ピペラシリン水和物	5000	20
#17-31	スルピリン	1000	20
#17-32	硫酸ストレプトマイシン	2000	20
#17-33	フルコナゾール	400	20
#17-34	硫酸ペカナマイシン	600	20
#17-35	硫酸カナマイシン	2000	20
#17-36	オレイン酸モノエタノールアミン	250	1
#17-37	テオフィリン	576	20
#17-38	アレンドロン酸ナトリウム水和物	20	1
#17-39	アスポキシシリン	4000	20
#17-40	セファゾリンナトリウム	1000	20

表 2-2 腎障害なし training set

sample ID	一般名	通常一日使用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
#18-1	塩酸クロミブラミン	100	1
#18-2	エビネフリン	1	0.05

#18-3	フェニトイン	400	20
#18-4	塩酸エフェドリン	40	1
#18-5	メシル酸ブリジノール	2	0.05
#18-6	塩酸ニフェカラン	576	20
#18-7	ニコランジル	72	1
#18-8	塩酸ベラパミル	5	0.05
#18-9	臭化メチルアニソトロピン	30	1
#18-10	臭化チメジウム	7.5	0.05
#18-11	カンレノ酸カリウム	600	20
#18-12	塩酸ドブタミン	1728	20
#18-13	塩酸プレニルフィン	0.6	0.05
#18-14	ヒドロキシジシ	200	1
#18-15	酢酸フレカイニド	150	1
#18-16	塩酸プロカインアミド	1000	20
#18-17	塩酸コルホルシシダロバート	43.2	1
#18-18	塩酸リドカイン	200	1
#18-19	塩化ツボクラリン	21	1
#18-20	アムリノン	884	20
#18-21	塩化アセチルコリン	100	1
#18-22	ミルリノン	43.2	1
#18-23	ジアゼパム	4	0.05
#18-24	塩酸プロプラノロール	10	1
#18-25	トランス-バイオキソカンファー	80	1
#18-26	塩酸イソプロテレノール	1	0.05

#18-27	ノルエピネフリン	1	0.05
#18-28	二硝酸イソソルビド	240	1
#18-29	塩酸ジフェンヒドラミン・ジプロピリン	600	20
#18-30	ジピリダモール	30	1
#18-31	アモバルピタールナトリウム	500	20
#18-32	塩酸イソクスブリン	10	1
#18-33	チトクロムC	60	1
#18-34	塩酸ジフェンヒドラミン	30	1
#18-35	塩酸トラソリン	80	1
#18-36	臭化バンクロニウム	7.2	0.05
#18-37	マレイン酸クロルフェニラミン(d体)	5	0.05
#18-38	ニトログリセリン	432	20
#18-39	フェノバルピタール	400	20
#18-40	塩酸ピルジカイニド	90	1

表 3-1 腎障害あり test set

sample ID	一般名	通常一日使用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
#17-41	スルファメトキサゾール・トリメトプリム	1200	20
#17-42	ミダゾラム	18	1
#17-43	ラタモキシセフナトリウム	4000	20
#17-44	塩酸ヒドララジン	20	1
#17-45	セフミノックスナトリウム	6000	20
#17-46	セフロキシムナトリウム	6000	20

#17-47	プロクロルペラジン	5	0.05
#17-48	レボメプロマジン	25	1
#17-49	チミペロン	8	0.05
#17-50	硫酸イセパマイシン	400	20
#17-51	メロペネム三水合物	2000	20
#17-52	アムホテリシンB	60	1
#17-53	セファロチンナトリウム	6000	20
#17-54	セフスロジンナトリウム	4000	20
#17-55	アミノフィリン	500	20
#17-56	イミペネム・シラスタチンナトリウム	2000	20
#17-57	リン酸クリンダマイシン	2400	20
#17-58	テイコブラニン	200	1
#17-59	ピペラシリンナトリウム	4000	20
#17-60	セフオペラゾンナトリウム	4000	20
#17-61	パニペネム・ベタミプロン	2000	20
#17-62	アデニン	120	1
#17-63	硫酸セフォセリス	4000	20
#17-64	塩酸セフメノキシム	4000	20
#17-65	スルバクタムナトリウム・セフォペラゾンナトリウム	4000	20
#17-66	セファマンドールナトリウム	4000	20
#17-67	硫酸アミカシン	400	20
#17-68	ファモチジン	40	1
#17-69	セフピラミドナトリウム	4000	20

#17-70	ベルフェナジン	5	0.05
#17-71	ラクチビオン酸エリスロマイシン	1500	20
#17-72	セフチゾキシムナトリウム	7200	20
#17-73	硫酸シゾマイシン	150	1
#17-74	レボホリナートカルシウム	375	1
#17-75	アンピシリン・クロキサシリンナトリウム	3000	20
#17-76	硫酸アルベカシン	200	1
#17-77	インカドロン酸二ナトリウム	10	1
#17-78	塩酸セフォゾプラン	4000	20
#17-79	塩酸アミトリプチリン	150	1
#17-80	セフォタタンナトリウム	4000	20

表 3-2 腎障害なし test set

sample ID	一般名	通常一日用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
#18-41	臭化エチルピタナート	10	1
#18-42	ブメタニド	1	0.05
#18-43	酒石酸プロチレリン	2	0.05
#18-44	臭化ブチルスコプラミン	20	1
#18-45	ピレタニド	12	1
#18-46	リン酸ジソピラミド	100	1
#18-47	塩酸トラマドール	300	1
#18-48	塩酸ドパミン	1728	20
#18-49	塩酸トラゾリン	80	1
#18-50	ノルエピネフリン	1	0.05

#18-51	塩酸パバペリン	200	1
#18-52	プロキシフィリン	200	1
#18-53	塩酸プロメタジン	50	1
#18-54	カンシル酸トリメタファン	8640	20
#18-55	ブクラデシンナトリウム	17280	20
#18-56	シチコリン	1000	20
#18-57	レセルピン	2.5	0.05
#18-58	スルピリド	600	20
#18-59	マレイン酸メチルエルゴメリン	0.2	0.05
#18-60	マレイン酸クロルフェニラミン(d体)	20	1
#18-61	フマル酸ニゾフェノン	30	1
#18-62	アセチル酸ナトリウム	2000	20
#18-	塩酸ジフェニルピラリン	8	0.05
#18-64	ジゴキシン	1	0.05
#18-65	塩酸ニカルジピン	864	20
#18-66	フロセミド	20	1
#18-67	ネオステグミン	3	0.05
#18-68	金チオリンゴ酸ナトリウム	100	1
#18-69	臭化カルシウム	1200	20
#18-70	ピペリデン	10	1
#18-71	カルベリテド	8.64	0.05
#18-72	トリクロホスナトリウム	2000	20
#18-73	レボドパ	600	20

#18-74	コハク酸シベンゾリン	168	1
#18-75	セコバルビタールナトリウム	500	20
#18-76	メシル酸ジヒドロエルゴトキシン	0.3	0.05
#18-77	臭化プリフィニウム	7.5	0.05
#18-78	デスラノシド	1	0.05
#18-79	マレイン酸エルゴメリン	0.2	0.05
#18-80	塩酸メキシレチン	125	1

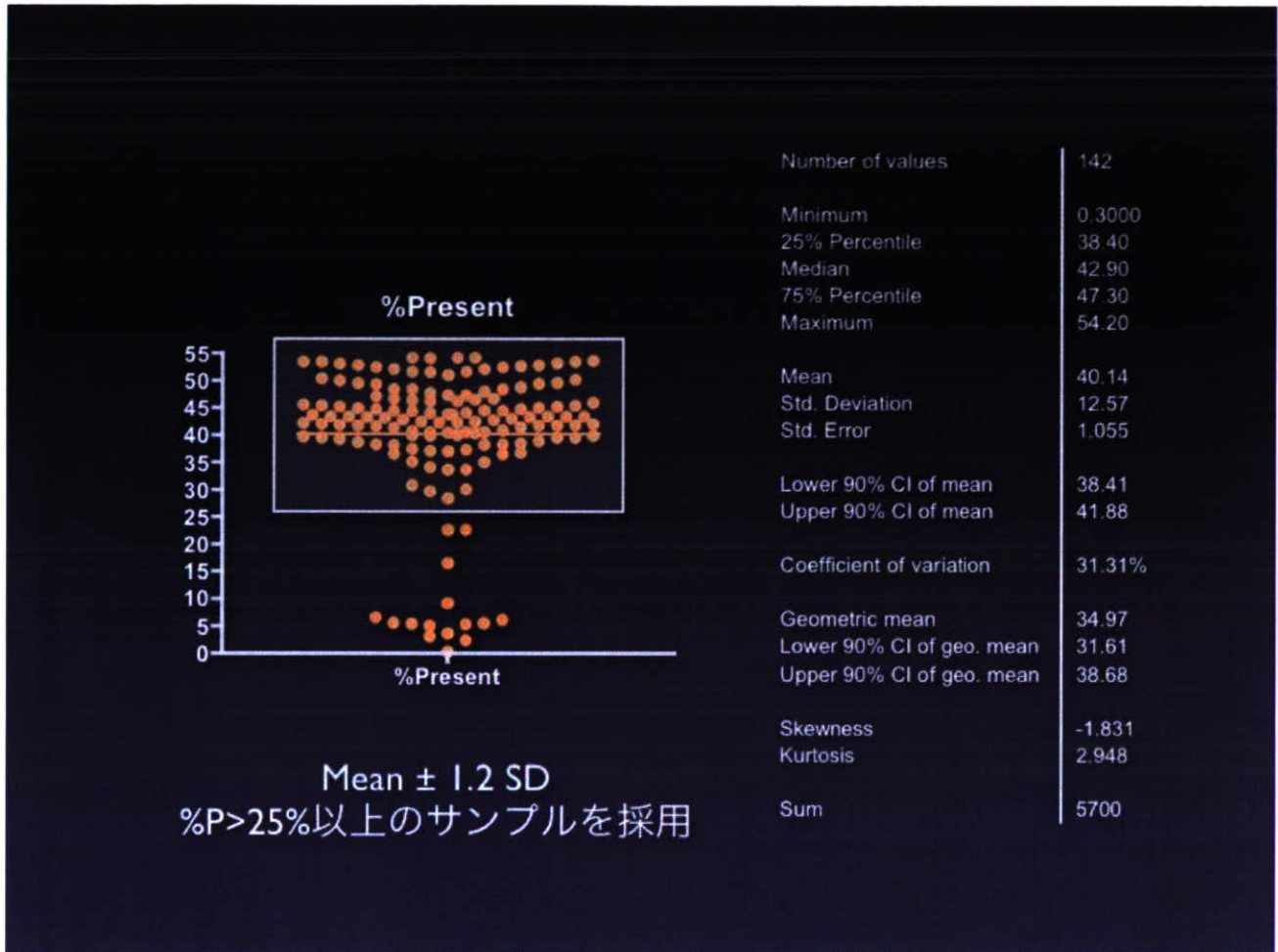


図3 %Present の分布図

チップより得られた発現陽性の遺伝子割合を抽出し、比較した。25%未満は不適切な状態のサンプル(または、ラベリング等のハンドリングが不適切であった)と考えられ、その後の解析から除いた。この条件で除かれたサンプルは #18-18, #17-24, #17-19, #17-26, #17-27, #17-21, #17-30, #17-22, #17-28, #17-29, #17-23, #17-17, #18-77, #17-6, #18-12 の 15 サンプルであった。

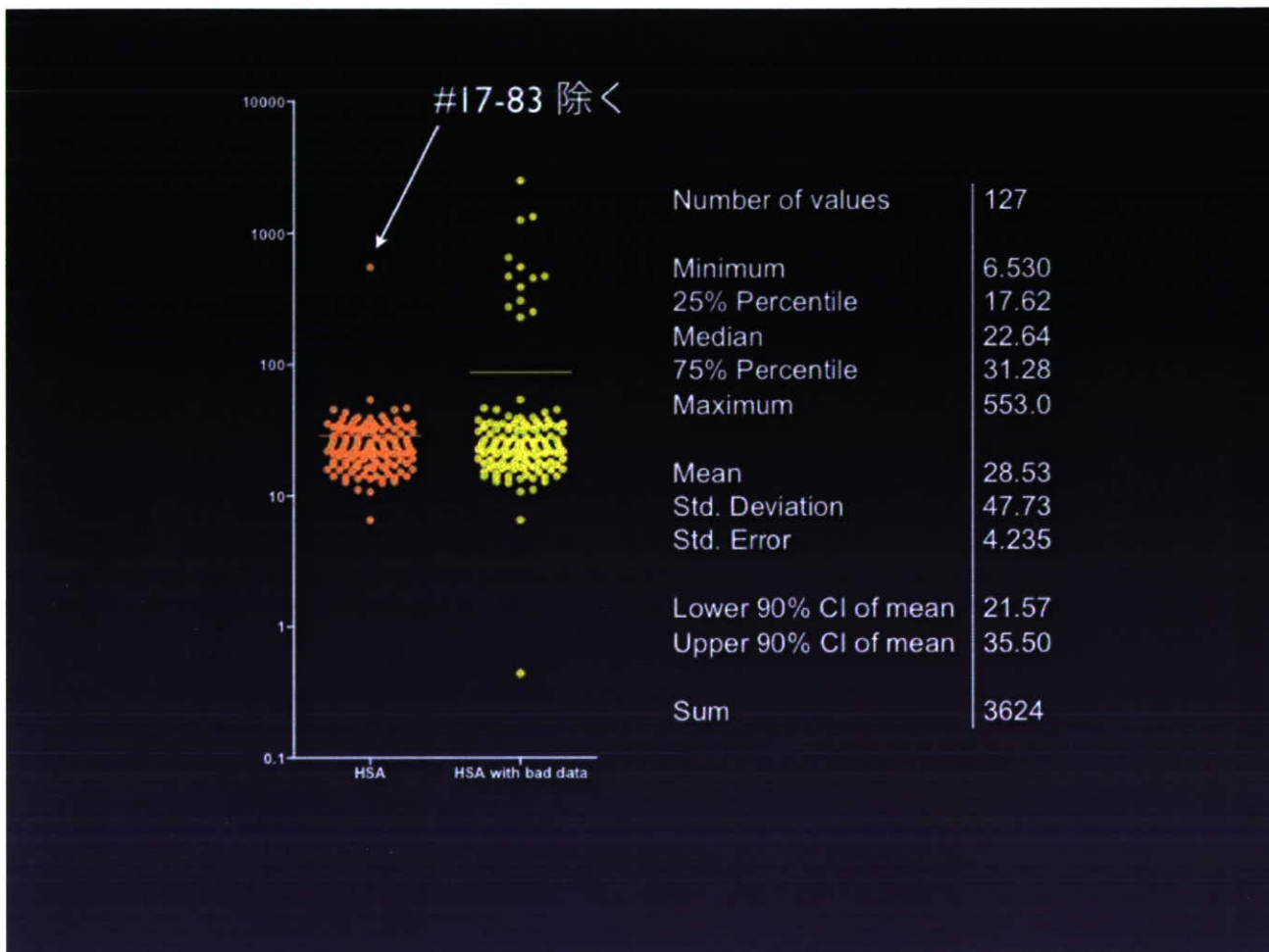


図4 Actin 3' /5' 比の分布図

左(オレンジ色)は%Present で除かれたサンプルを除いた場合。右(黄色)は%Present で除かれたサンプルも含む。ここで表現された情報から、はずれ値を示した#17-83 を除いて解析した。

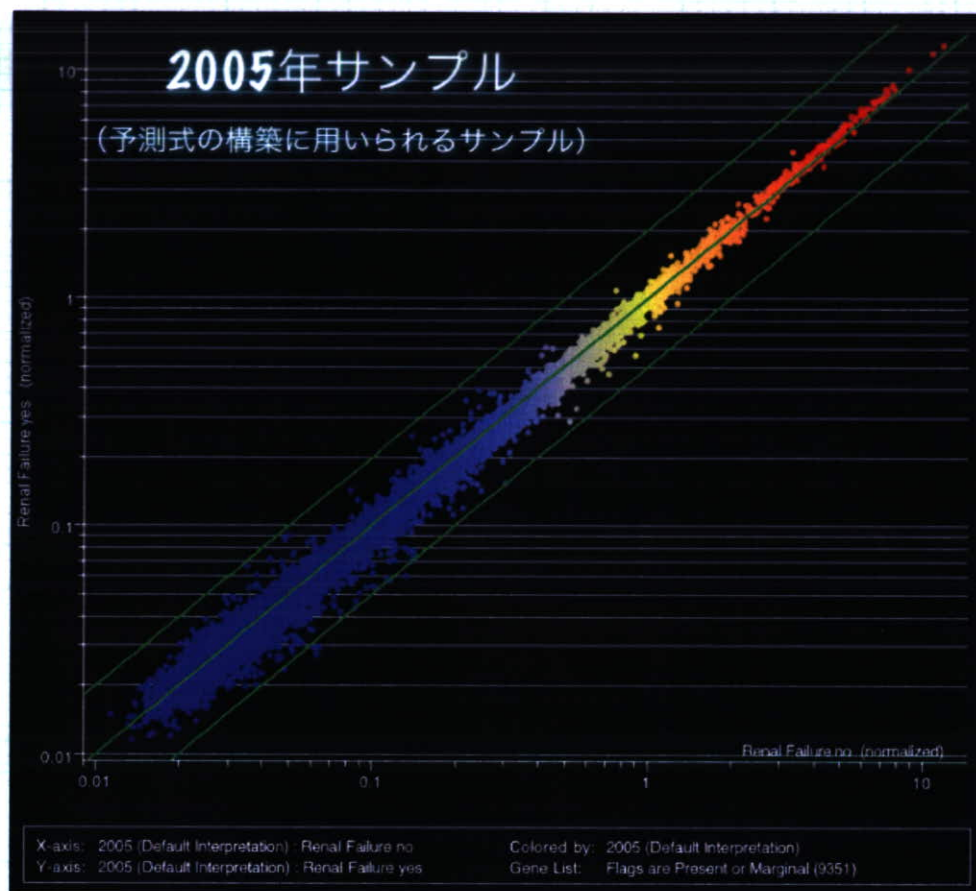


図5 前期実験における腎障害あり薬物曝露群と腎障害なし薬物曝露群の遺伝子発現量の比較

表 4 前期サンプルを用いて抽出した 32 遺伝子リスト

probe ID	gene symbol	gene common name			
218717_s_at	LEPREL1	Lepreacan-like 1	217771_at	GOLPH2	Golgi phosphoprotein 2
221731_x_at	CSPG2	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	218764_at	PRKCH	Homo sapiens protein kinase C, eta (PRKCH), mRNA.
215073_s_at	NR2F2	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	212698_s_at	SEPT10	Septin 10
204533_at	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	205933_at	SETBP1	SET binding protein 1
214036_at		CDNA: FLJ22256 fts, clone HRC02860	211367_s_at	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)
219777_at	GIMAP6	GTPase, IMAP family member 6	205590_at	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)
215118_s_at	IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	221584_s_at	KCNMA1	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1
210105_s_at	FYN	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	219410_at	TMEM45A	transmembrane protein 45A
220177_s_at	TMPRSS3	Transmembrane protease, serine 3	207111_at	EMR1	Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1
203430_at	HEBP2	Heme binding protein 2	209118_s_at	TUBA3	Tubulin, alpha 3
219938_s_at	PSTPIP2	Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	216557_x_at	A1VH3, IGHA1, IGHG3	Human rearranged immunoglobulin heavy chain (A1VH3) gene, partial cds.
202436_s_at	CYP1B1	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	203038_at	PTPRK	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
201131_s_at	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	205848_at	GAS2	Growth arrest-specific 2
215051_x_at	AIF1	Allograft inflammatory factor 1	210448_s_at	P2RX5	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5
209191_at	TUBB6	Tubulin beta 6	202552_s_at	CRIM1	Cysteine-rich motor neuron 1
209396_s_at	CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	218856_at	TNFRSF21	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (TNFRSF21), mRNA.