

200708011B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(トキシコゲノミクス研究)

トキシコゲノミクスのための遺伝子ネットワーク解析法の開発

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 奥野 恭史

平成20 (2008) 年 4月

## 目 次

### I. 総合研究報告

トキシコゲノミクスのための遺伝子ネットワーク解析法の開発 ----- 1

奥野恭史

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 23

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総合研究報告書

トキシコゲノミクスのための遺伝子ネットワーク解析法の開発

主任研究者 奥野 恭史 京都大学薬学研究科 准教授

研究要旨

本研究は、化合物による生体系への影響を、薬物作用遺伝子群や毒性関連遺伝子群の遺伝子発現ネットワーク（分子ネットワーク）の変動として解析する高精度な薬物安全評価アルゴリズムの開発と実用化を目的としている。すなわち、化合物を作用させた各種細胞のDNA マイクロアレイ実験による網羅的遺伝子発現データから、バイオインフォマティクス手法によって薬物毒性特有の遺伝子発現ネットワークを構築し、薬物毒性を反映する遺伝子ネットワークのパターンとして薬物安全性を評価するトキシコゲノミクス計算法の確立を目指す。一般に遺伝子発現ネットワーク解析手法は、生命現象と分子メカニズムを繋げる有力なバイオインフォマティクス手法であり、本手法をトキシコゲノミクスへ適用することにより毒性と遺伝子発現パターンの相関を鮮明にし、予測精度の向上と毒性分子メカニズムの解明という成果をもたらすものと予想される。近年、マイクロアレイ解析のトキシコゲノミクスや薬理ゲノミクスへの適用に対する期待が国内外を問わず高まって来ているが、トキシコゲノミクスや薬理ゲノミクスへのネットワーク解析手法の適用・成功事例は今のところ世界的に皆無である。従って、本研究は、ネットワーク解析法のトキシコゲノミクスへの応用という試み自身の独創性を有しており、薬物の毒性評価とその毒性発現の分子メカニズムに関する知見をも同時に提供する強い特色を有している。研究実施内容としては、初年度（平成17年度）にはアルゴリズム開発のための実験データを収集し、2年次（平成18年度）にはアルゴリズムの実質的開発と追加マイクロアレイ実験を行い、最終年度となる平成19年度には、先の2年間で開発検討行ってきたネットワーク解析手法の有効性の評価とそれによる毒性メカニズムの解明を試み、最終的には、マイクロアレイデータを入力とした時に、薬理作用遺伝子ネットワーク、毒性作用遺伝子ネットワークを自動抽出するシステムを開発に成功した。本研究によって開発される高精度な毒性予測手法は、医薬品開発における早期毒性予測による医薬品開発期間・コストの軽減化と、国民における医薬品使用の安全性の向上を実現するものと期待できる。

## A. 研究目的

ポストゲノム時代の今日、生命科学研究の関心は遺伝子・蛋白質の単一の機能解明にとどまらず、これらを統合した生命システム全体の機能解明へと移行しつつある。医薬の観点においても、化合物と直接作用する単一のタンパク（遺伝子）の機能変化からその薬理活性の全てを語り尽くそうとする従来の考え方では不十分であり、化合物と特定のタンパク質との直接的な作用が周辺や下流の遺伝子たちにどのような影響を及ぼすのかという化合物と生体系との作用を多種多様な生命システムの変動とみなす新しい概念の導入および解析法の開発が必須である。そこで、本研究は、薬物標的分子や毒性原因遺伝子などの単一遺伝子（タンパク質）を対象にした従来の解析手法から逸脱し、化合物による生体系への影響を薬物作用遺伝子群や毒性関連遺伝子群の遺伝子発現ネットワークの変動として解析する高精度な薬物安全評価アルゴリズムの開発と実用化を目的としている。すなわち、薬物曝露におけるマイクロアレイ実験による網羅的遺伝子発現データから、バイオインフォマティクス手法によって薬物毒性特有の遺伝子発現ネットワークを構築し、薬物毒性を反映する遺伝子ネットワークのパターンとして薬物安全性を評価するトキシコゲノミクス計算法の確立を目指す。一般に遺伝子発現ネットワーク解析手法は、生命現象と分子メカニズムを繋げる有力なバイオインフォマティクス手法であり、本手法をトキシコゲノミクスへ適用することにより毒性と遺伝子発現パターンの相関を鮮明にし、予測精度の向上と毒性分子メカニズムの解明という成果をもたらすものと予想される。研究計画としては、初年度（平成17年度）にはアルゴリズム開発のた

めの実験データを収集し、2年次（平成18年度）にはアルゴリズムの実質的开发と追加マイクロアレイ実験を行い、最終年度となる平成19年度には、先の2年間で開発検討行ってきたネットワーク解析手法の有効性の評価とそれによる毒性メカニズムの解明を目指す。最終的には、マイクロアレイデータを入力とした時に、薬理作用遺伝子ネットワーク、毒性作用遺伝子ネットワークを自動抽出し、その薬理効果・毒性作用を予測するシステムとする。本研究によって開発される高精度な毒性予測手法は、医薬品開発における早期毒性予測による医薬品開発期間・コストの軽減化と、国民における医薬品使用の安全性の向上を実現するものと期待できる。

## B. 研究方法

### 1. 基準細胞と基準薬物の選択

基準薬物の選定のための基盤データベースとして、薬物と標的タンパク質の相互作用データを集積したGLIDAデータベースを構築した。トキシコゲノミクスのインフォマティクス展開には、薬物の作用基点となる遺伝子との相互作用様式を情報学的に処理する基盤技術の整備は必須であり、本データベース構築によりその基盤は確立された。GLIDAは、GPCRのバイオ情報、リガンドのケミカル情報、およびGPCRとリガンドの相互作用情報の3種類の情報より構成される。GPCRのエントリはヒト、ラット、マウスに限定し、バイオ情報はGPCRDBから取得した。また、GPCRと結合するリガンドのエントリとそのケミカルデータ（化学名、構造式、分子量、MDL Molファイルなど）はIUPHAR Receptor Database, PubMed, PubChemおよびMDL ISIS/Base 2.5などの公共または商用のデータベースから取得した。

GLIDAはLAMP(Linux, Apache, MySQL & PHP)プラットフォームで制作され、現在Web公開を行っている。

(<http://gdds.pharm.kyoto-u.ac.jp/services/glida>)。

## 2. 肝毒性評価系の構築およびマイクロアレイ実験データの収集[細胞培養] : 10%

(v/v) fetal bovine serum (GIBCO)、100 U/mL penicillin (GIBCO) および 100 µg/mL streptomycin (GIBCO) を含有する Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) を用い、コラーゲンコートディッシュにて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で細胞培養を行った。

[WST-1細胞増殖測定] : WST-1を基質とした NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) 還元酵素の活性を指標に、細胞増殖を測定した。HepG2細胞 1x10<sup>4</sup> cells を vehicle (1% dimethylsulfoxide) 及び各濃度 (3 µM, 100 µM) のトログリタゾンもしくはピオグリタゾンで刺激し、各 0, 2, 6, 12, 24 時間後に飽和 WST-1 溶液 (Roche) を加えた。37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間反応させた後、還元型 WST-1 (Formazan) の増加量を測定するため、マイクロプレートリーダーで 460nm の吸光度を測定した。さらに、バックグラウンドシグナルとして 650nm の吸光度を測定した。

[マイクロアレイ解析] : vehicle 及び各濃度 (3 µM, 100 µM) のトログリタゾンもしくはピオグリタゾンで刺激した HepG2 細胞を、刺激後 0, 2, 6, 12, 24 時間後にそれぞれ回収し、acid

guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform 法ならびに Rneasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出・精製した。これに T7-dT<sub>24</sub> プライマーをアニールさせ、1st strand DNA

を合成し、引き続いて 2nd strand DNA を合成した。この二本鎖 DNA を鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼによりビオチン標識 dNTP を用いてビオチン標識 antisense RNA を合成した。この antisense RNA を 200 塩基以下に断片化し、Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリダイゼーションした。16 時間後、ストレプトアビジン-フィコエリスリンにて蛍光ラベル化を行い、Genome U133 Plus 2.0 Array の蛍光イメージを取得した。

## 3. チアゾリジン系薬物作用遺伝子ネットワークの構築

トログリタゾンとピオグリタゾンのマイクロアレイデータから、各濃度の時系列遺伝子発現プロファイルにおいて発現量が 3 倍以上変動した遺伝子を抽出した。全濃度での時系列における発現変動パターンに基づいてクラスタリングした後に濃度毎に分割する事により、各薬剤及び各濃度の遺伝子ネットワークと薬剤及び濃度間での遺伝子ネットワークの構築を行った。具体的には、遺伝子の経時的な発現パターンが薬物刺激によってどの様な変動を受けるのかを分類する為、3 倍以上変動している遺伝子群の発現変動プロファイルについて k-means 法で 120 種類のクラスターに分類した。次に、各クラスター内の代表的な遺伝子変動パターンを得るため、各クラスターのベクトル重心

$$V_{CL=n} = (v_{t=0h}^{C=0}, v_{t=2h}^{C=0}, \dots, v_{t=24h}^{C=0}, v_{t=2h}^{C=3}, \dots, v_{t=24h}^{C=3}, v_{t=2h}^{C=100}, \dots, v_{t=24h}^{C=100})$$
 を計算し、濃度 C = (vehicle; 0 µM, 3 µM, 100 µM) 毎のベクトル  $V_{CL=n}^{C=m}$ ,

( $n = 1, \dots, 120, m = 0, 3, 100$ ) に分割した。このとき、クラスター重心は薬物毎に計算した。さ

らに、クラスターを固定し、各濃度間 (C=0 vs C=3, C=0 vs C=100, C=3 vs C=100) での相関

$$\text{係数 } CC_{CL=n}^{C=(m_i, m_j)} = \text{Cov}(V_{CL=n}^{C=m_i}, V_{CL=n}^{C=m_j}),$$

( $i \neq j$ ) を計算し、次に、濃度を固定し各クラスター重心の相関係数

$$CC_{CL=(n_k, n_l)}^{C=(m_i, m_j)} = \text{Cov}(V_{CL=n_k}^{C=m_i}, V_{CL=n_l}^{C=m_j}), (k \neq l) \text{ を計}$$

算した。続いて、各クラスターの代表発現パターンに基づいて、「120クラスター」×「3濃度」のクラスター間の相対距離を主座標分析法により座標化し、遺伝子ネットワーク及び変動パターンの変化を図示した。

#### 4. チアゾリジン系薬物作用遺伝子ネットワーク解析による毒性評価

上記、3倍以上変動した遺伝子の全てのペアについて相関係数(ピアソンの積率相関係数)を算出した。ここで、閾値以上 ( $p > 0.97$ ) の相関係数をもつ遺伝子ペアについて、リンクを繋げることにより各薬物、各濃度における relevant network を構築した。それぞれの遺伝子ネットワークの構造特徴を比較することによって毒性評価ができるかどうかの検討を行った。

#### 5. 毒性特異的遺伝子ネットワーククラスターの実験検証

[細胞培養]: 10% (v/v) fetal bovine serum (GIBCO)、100 U/mL penicillin (GIBCO) および 100 µg/mL streptomycin (GIBCO) を含有する Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO) を用い、コラーゲンコートディッシュにて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件で細胞培養を行った。

[WST-1細胞増殖測定]: WST-1を基質とした脱水素酵素の活性を指標に、細胞増殖を測定した。

HepG2 細胞 1x10<sup>4</sup> cells を vehicle (1%

dimethylsulfoxide) 及び各濃度 (3 µM, 100 µM) のトログリタゾンもしくはピオグリタゾンで刺激し、各 0, 2, 6, 12, 24 時間後に飽和 WST-1 溶液 (Roche) を加えた。37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間反応させた後、還元型 WST-1 (Formazan) の増加量を測定するため、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定した。さらに、バックグラウンドシグナルとして 650nm の吸光度を測定した。

[遺伝子過剰発現]: トログリタゾンの薬物細胞毒性に特異的な遺伝子ネットワーククラスターに含まれている遺伝子を発現ベクター (pCMV-sport6) に組み込み、それらのベクターを単独もしくは複数を組み合わせて HepG2 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間と 48 時間後に導入遺伝子 (群) の細胞増殖における効果を調べるため、WST-1 法を用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は計算機アルゴリズムの開発と培養細胞を用いたインビトロ実験のみであり、倫理面に関する問題は一切無い。

### C. 研究結果

#### 1. 基準細胞と基準薬物の選択

本研究で開発した薬物と標的タンパク質の相互作用データベースである GLIDA は、<http://gdds.pharm.kyoto-u.ac.jp/services/gilda> より公開している。各エントリの検索は、GPCR (又はリガンド) のキーワード検索およびクラス分類テーブルから行うことが可能である。ここで、GPCR 分類は、GPCRDB に定義されている進化系統樹由来の分類に従った。またリガンド分類は、KEGG で定義されている原子タイプの原子数/結合数に基づいた頻度プロファイルから

距離行列を計算し、階層型クラスタリングを行ったGLIDA独自の分類木を作成した。検索された各GPCR（又はリガンド）のページには、バイオ情報（又はケミカル情報）、及びそれらに結合するリガンド（又はGPCR）のリストが同時に表示される。さらに、GLIDAのGPCR（又はリガンド）のページはGPCR-リガンド相互作用の解析機能を有している。すなわち、検索されたGPCR（又はリガンド）と最も高い類似性を持つ25個のGPCR（又はリガンド）リストを表示するとともに、これら25個のエントリと結合するリガンド（又はGPCR）との相互作用様式を2次元マップ表示する。このマップの2軸に並ぶGPCRとリガンドの順番は、各々GPCRとリガンドのクラスタリング結果を反映している。したがって、GPCR、リガンドの類似性情報と相互作用情報を同時に視覚化し、このパターンを分析してGPCRとリガンドの相互作用予測を実現し、薬物と作用基点の相互作用に関する情報を得ることができる。

## 2. 肝毒性評価系の構築およびマイクロアレイ実験データの収集

本研究では、まず肝臓における薬物毒性発現の分子メカニズムを明らかにするため、肝毒性を有する薬物として劇症肝炎などの肝障害を引き起こしたため臨床での使用が中止されたトログリタゾン、肝毒性の予測を目的としたモデルとしてヒト肝癌由来細胞株HepG2を用いて解析を行った。また、肝毒性のネガティブコントロールとして、トログリタゾンと同じくperoxisome-proliferator activated receptor gamma (PPAR $\cdot$ )のリガンドであり、チアゾリジン骨格を有するインスリン抵抗性改善薬であるが、肝毒性が少ないとされているピオグリタゾンを用いた。

トログリタゾンのHepG2細胞に対する毒性用

量を確認するため、WST-1法を用いてトログリタゾンとピオグリタゾンがHepG2細胞の増殖に及ぼす影響を調べた (Figure 1)。その結果、vehicleと比較してトログリタゾン100  $\mu$ M刺激群において、刺激後6時間から有意な増殖の抑制が検出され、刺激後24時間において最も顕著な増殖抑制効果が検出された。一方、トログリタゾン3  $\mu$ Mやピオグリタゾン刺激群では増殖抑制作用は検出されず、むしろピオグリタゾン刺激後24時間においては増殖の亢進が検出された。ピオグリタゾンによるHepG2細胞の増殖促進作用に関して、3  $\mu$ Mと100  $\mu$ Mの濃度における差は検出されなかった。以上のこととPPAR $\cdot$ に対するトログリタゾンとピオグリタゾンのEC50から、HepG2細胞に対するトログリタゾンの毒性用量としては100  $\mu$ M、薬効(非毒性)用量としては3  $\mu$ Mと定義し、以後の解析を行った。

vehicle及び各濃度 (3  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) のトログリタゾンもしくはピオグリタゾンで刺激したHepG2細胞の0, 2, 6, 12, 24時間後における経時的なマイクロアレイデータの収集を行った。各薬物刺激0時間と24時間後における全遺伝子のシグナル値を比較したところ、他に比べ、毒性用量であるトログリタゾン100  $\mu$ Mにおいて発現変動の度合いが大きいことが示唆された (Figure 2)。また、トログリタゾンとピオグリタゾンのマイクロアレイデータにおいて、各濃度の時系列において発現量が3倍以上変動した遺伝子を抽出したところ、Figure 2の結果と同様に、トログリタゾン100  $\mu$ Mにおいて発現変動している遺伝子の数が顕著に多いことが明らかとなった (Figure 3)。

## 3. チアゾリジン系薬物作用遺伝子ネット

## ワークの構築

Figure 3において抽出された合計1,428個の遺伝子において遺伝子ネットワークの構築を行い、薬物及び薬物濃度間における遺伝子ネットワークの変動を解析した(Figure 4)。「120クラスター」×「3濃度」のクラスター間相関を距離として主座標分析法により座標を決定し、遺伝子ネットワーク及び変動パターンの変化を図示した。各層でのxy平面内での距離は、クラスター間相関を反映しているため、近接しているクラスター同士は類似した変動パターンを持っており、各層間での移動が大きいクラスターは、濃度間での発現変動量が大きい事を示している。各薬剤において特異的な遺伝子のみを含むクラスターから薬剤特異的なネットワークを、遺伝子が両薬剤で発現するクラスターから共通ネットワークを構成した結果、トログリタゾンもしくはピオグリタゾンに特異的な変動を示すクラスター群と、トログリタゾンとピオグリタゾンで共通した変動を示すクラスター群が同定された(Figure 4)。

これらのクラスターからトログリタゾンによる細胞毒性に大きく寄与するクラスターを選定するため、前記の1,428個の遺伝子に対する主成分分析を行い(Figure 5)、その結果をクラスターに反映させた(Table 1)。トログリタゾンおよびピオグリタゾンの全濃度の経時的発現変動に対して主成分分析を行い、3変数に情報を集約したところ、第二主成分においてトログリタゾン毒性濃度である100 $\mu$ Mで刺激した際のベクトルとそれ以外の濃度で刺激した際のベクトルが逆の方向性を示した。従って、第二主成分はトログリタゾンによる毒性を示していると判断された(Figure 5)。次に、第二主成分スコアの上位および下位それぞれ

100位以内に含まれる遺伝子を多く含むクラスターを選別した(Table 1)。その結果からトログリタゾンの毒性発現に寄与すると予測された遺伝子を多く含み、トログリタゾンの毒性発現に特異的な発現変動パターンを提示するクラスターとして、クラスター20(CL20)及び12(CL12)などが選定された。トログリタゾン特異的なCL20及びCL12はvehicle及び3 $\mu$ Mでは殆ど変動が見られないが、100 $\mu$ Mにおいてネットワーク上での位置が大きく変動していた(Figure 6)。

## 4. チアゾリジン系薬物作用遺伝子ネットワーク解析による毒性評価

チアゾリジン系薬物作用ネットワークにおいて、Vehicleでは $\gamma \approx 1.61$ でのスケールフリー性が確認されたのに対し、薬物投与時ではネットワークのランダム性が増大し( $\gamma$ が減少し)、ネットワーク全体の特性が変化を受けていることが明らかとなった。特に、トログリタゾン毒性濃度においては、高いエッジ数を持つノードが増大し、ランダムネットワーク性が増大することが確認された。また、トログリタゾン特異的な遺伝子ネットワーククラスターがネットワークパラメータ変動の原因となっていること示された。これにより本研究で開発したネットワーク解析手法が、薬物毒性による遺伝子ネットワーク攪乱の指標となることが示唆された。(Figure 7)

## 5. 毒性特異的遺伝子ネットワーククラスターの実験検証

毒性発現と共に遺伝子発現が増大するCL20(Figure 8)に属する遺伝子群が、細胞増殖の抑制に寄与しているかどうかを明らかにするために、これらの遺伝子を過剰発現させた際の細胞



増殖に対する影響を観測した (Figure 9a)。CL20 に含まれているMAFF (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F)、DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3)、IFRD1 (Interferon-related developmental regulator 1)、CG018 (Hypothetical gene CG018)の4遺伝子の発現ベクターを単独もしくは同時にHepG2細胞に遺伝子導入した際の細胞増殖への影響をWST-1法により解析した結果、4種類の遺伝子の発現ベクターを同時にHepG2細胞に遺伝子導入した際に最も強い細胞増殖の抑制が遺伝子導入後24時間と48時間のいずれにおいても検出された。MAFF、IFRD1、CG018単独の過剰発現ではコントロールのMockと比較してHepG2細胞の増殖に有意な差は検出されなかったが、DDIT3単独の過剰発現においては遺伝子導入後24時間においてのみHepG2細胞の増殖が有意に抑制された。以上のことから、今回、トログリタゾンによる肝毒性特異的な遺伝子ネットワーククラスターとして選定されたCL20 (MAFF, DDIT3, IFRD1, CG018の4遺伝子)に含まれている遺伝子群が、本検証実験系においても協調的に細胞増殖を抑制していることが示唆された。また、トログリタゾン100  $\mu$ Mで発現抑制されるCL25 (Figure 8) から CDKN2C (cyclin-dependent kinase inhibitor 2C), SHCBP1 (SHC SH2-domain binding protein 1), KBTBD7 (Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7), DTL (denticleless homolog), SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2), FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1), RFC5 (replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa)の7つの遺伝子を選別した。トログリタゾン毒性によるこれらの遺伝子の発現抑制の細胞増殖への関与を明らかにするため、これ

らの遺伝子をHepG2細胞において強制的に発現させた状態でトログリタゾン 100  $\mu$ Mによる刺激を行い、WST-1による細胞増殖を観測した。その結果、48時間後において、SHCBP1 またはSKP2導入細胞での有意な細胞増殖が確認された ( $p < 0.01$ )。 (Figure 9b) さらに、特筆すべき点として、7遺伝子全てを導入した細胞において、24時間後および48時間後にトログリタゾン毒性に抵抗してWST-1 Assay の増大が確認された。また、対照実験として、Plasmid のみの導入を行った条件下で、SKP2ないしRFC5導入細胞が細胞増殖の傾向を示す事が発見された ( $p < 0.01$ ) (Figure 9c)。以上のことから、トログリタゾンによる肝毒性特異的な遺伝子ネットワーククラスターとして選定されたCL25に含まれている遺伝子群 (CDKN2C, DTL, FEN1, KBTBD7, SHCBP1, SKP2, RFC5)の7遺伝子)が、本検証実験系においても協調的に細胞増殖を制御し、トログリタゾン毒性により阻害されていることが示唆された。

#### D. 考察

HepG2細胞とトログリタゾン及びピオグリタゾンを用いた遺伝子ネットワーク解析を行い、主成分分析結果を反映させた結果、トログリタゾンの薬物細胞毒性に特異的なクラスターが同定された。主成分分析のみでは、高変動を示す遺伝子のみが選別され、それ以外の重要な働きを持つ遺伝子群は見落とされる傾向にあるが、本手法では、毒性特異的な主成分の上位/下位の遺伝子を多く含む薬物特異的変動クラスターを選別することにより、薬物毒性特異的に変動したクラスター (遺伝子群) として同定することが可能となった。これらのクラスターにはアポトーシスの感受性に関わる遺伝子や細胞周期に関わる遺伝子に加えて、細胞毒性とは関連がまったく報告されていない酵素類や細胞外マトリ

ックス因子も含まれており、大変興味深い。主成分分析第二主成分における遺伝子順位や遺伝子発現変動の度合いから、CL20及びCL25に注目し。CL20およびCL25に含まれる遺伝子群がシステムとして薬物毒性に寄与しているかどうかを、遺伝子群の過剰発現による実験により検証を行った。

CL20 に属する4遺伝子に対するWST-1アッセイの結果から、DDIT3はトログリタゾン毒性と関連して、細胞増殖を阻害する事が示された。さらに、DDIT3単独ではなく、4つの遺伝子を同時に強制発現させたところ、細胞増殖はより強く阻害された。DDIT3はGADD153 としても知られており、PPAR- $\gamma$ 転写パスウェイが誘導するNSCLC細胞の増殖抑制の候補要因である。これまでに、DDTT3とMAFF, IFRD1, CG018が協調的に作用するという知見は報告されていない。すなわち、これら3つ遺伝子がトログリタゾンの毒性に関連する新規関連遺伝子であることが示唆された。また、CL25に属する遺伝子においては、FEN1, RFC5, DTL1 は Cell Cycle プロセスへの関与と、PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) との関連性が報告されている。本手法により得られたクラスターにおいて、PCNAは主成分分析第二主成分においてCL25と同様の傾向を示すCL12 に属していることは興味深い事実である。FEN1は、複製や修復時に生成するDNAの分岐に重要な役割を果たしている。また、FEN1はインビトロでPCNAにより活性化されることが知られている。DLT 1はDNA合成、細胞周期、細胞分裂、増殖、分化などにおいて重要な役割を担うと共に、PCNAと共に、DNA損傷後のCDT1分解に関与することが報告されている。RFC5は replication factor C complexのサブユニットであり、出芽酵母ではDNA複製および有糸分裂 (mitosis) と共役することが報告されている。

すなわち、これら複数の遺伝子群が、トログリタゾン毒性による薬物毒性にシステムとして関与している事が示唆された。今回同定した毒性特異的遺伝子ネットワーククラスターの作用機序をFigure 10にまとめる。

## E. 結論

糖尿病治療薬トログリタゾン、ピオグリタゾンの肝毒性評価系を用いて、トキシコゲノミクスのための遺伝子発現ネットワーク解析法を開発することに成功した。本研究において開発した遺伝子ネットワーク解析法は、GEM-TRENDシステムとして次のURLよりWeb公開も行っている。  
<http://cgs.pharm.kyoto-u.ac.jp/services/network/>

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Niijima, S. and Okuno, Y. “Laplacian Linear Discriminant Analysis Approach to Unsupervised Feature Selection.” *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, in press
2. Okuno, Y., Tamon, A., Yabuuchi, H., Niijima, S., Minowa, Y., Tonomura, K., Kunimoto, R. and Feng, C. “GLIDA: GPCR-Ligand Database for Chemical Genomics Drug Discovery - Database and Tools Update.” *Nucleic Acids Research*, 36, D907-12, 2008
3. Kitajima, M., Minowa, Y., Matsuda, H. and Okuno, Y. “Compound-Transporter Interaction Studies using Canonical Correlation Analysis.” *Chem-Bio Informatics J.*, 7, 24-34, 2007
4. Yamamoto, H., Takematsu, H., Fujinawa, R., Naito, Y., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Suzuki, A. and Kozutsumi, Y. “Correlation index-based

- responsible-enzyme gene screening (CIRES), a novel DNA microarray-based method for glycan biosynthesis enzyme gene.” *PLoS ONE*, 2, e1232, 2007
5. Ikeda, A., Miyazaki, T., Kakizawa, S., Okuno, Y., Tsuchiya, S., Myomoto, A., Saito, SY., Yamamoto, T., Yamazaki, T., Iino, M., Tsujimoto, G., Watanabe, M. and Takeshima, H. “Abnormal features in mutant cerebellar Purkinje cells lacking junctophilins.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363, 835-9, 2007
  6. Yamazaki, T., Sasaki, N., Nishi, M., Yamazaki, D., Ikeda, A., Okuno, Y., Komazaki, S., and Takeshima, H. “Augmentation of drug-induced cell death by ER protein BRI3BP.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362, 971-5, 2007
  7. Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itohara, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., and Kozutsumi, Y. “Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B cell activation.” *Mol. Cell Biol.*, 27, 3008-22, 2007
  8. Zhu, S., Okuno, Y., Tsujimoto, G., and Mamitsuka, H. “Application of a new probabilistic model for mining implicit associated cancer genes from OMIM and Medline” *Cancer Informatics*, 2, 361-71, 2006
  9. Osada, S., Naganawa, A., Misonou, M., Tsuchiya, S., Tamba, S., Okuno, Y., Nishikawa, J., Satoh, K., Imagawa, I., Tsujimoto, G., Sugimoto, Y., and Nishihara, T. “Altered gene expression of transcriptional regulatory factors in tumor marker-positive cells during chemically induced hepatocarcinogenesis.” *Toxicology Letters*, 167, 106-13, 2006
  10. Tsuchiya, S., Okuno, Y., and Tsujimoto, G. “MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer.” *J. Pharmacol. Sci.*, 101, 267-70, 2006
  11. Okuno, Y., Yang, J., Taneishi, K., Yabuuchi, H., and Tsujimoto, G, “GLIDA: GPCR-Ligand database for Chemical Genomic Drug Discovery” *Nucleic Acids Research.*, 34, D673-7, 2006
  12. Okuno, Y., “Chemical-genomic network for integrating bioinformatics and chemoinformatics” *Journal of Pharmacological Sciences.*, 97, 29p-29p Suppl.1, 2005
  13. Zhu, S., Okuno, Y., Tsujimoto, G., and Mamitsuka, H., “A probabilistic model for mining implicit ‘chemical compound-gene’ relations from literature” *Bioinformatics*, 21, ii245-51, 2005
  14. Sugimoto, Y., Fukada, Y., Mori, D., Tanaka, S., Yamane, H., Okuno, Y., Deai, K., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A., “Prostaglandin E2 Stimulates Granulocyte Colony-Stimulating Factor Production via the Prostanoid EP2 Receptor in Mouse Peritoneal Neutrophils” *J. Immunol.*, 175, 2606-12, 2005
  15. Adachi, T., Okuno, Y., Takenaka, S., Matsuda, K., Ohta, N., Takashima, K., Yamazaki, K., Nishimura, D., Miyatake, K., Mori, C., and Tsujimoto, G. “Comprehensive analysis of the effect of phytoestrogen, daidzein, on a testicular cell line, using mRNA and protein expression profile.” *Food Chem. Toxicol.*, 43, 529-35, 2005

16. Yamada, M., Katsuma, S., Adachi, T., Hirasawa, A., Shiojima, S., Kadowaki, T., Okuno, Y., Koshimizu, T.A., Fujii, S., Sekiya, Y., Miyamoto, Y., Tamura, M., Yumura, Y., Nihei, H., Kobayashi, M., and Tsujimoto, G. "Inhibition of protein kinase CK2 prevents the progression of glomerulonephritis." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 736-41, 2005
2. 学会発表
1. 日本薬学会 128 年会 日本薬学会奨励賞受賞講演「バイオ空間とケミカル空間の包括的相関解析とそのインシリコ創薬への研究展開」 (2008. 3. 28)
  2. 日本薬学会 128 年会 日本薬学会・日本学術会議薬学委員会共催シンポジウム「バイオインフォマティクスの薬学研究・薬学教育への応用と展開」 Bio-Informatics for Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Education 「バイオ空間とケミカル空間の包括的相関解析とそのインシリコ創薬への研究展開」 (2008. 3. 26)
  3. 第 3 回三重ゲノム創薬フォーラム「薬学研究におけるアレイインフォマティクス」 (2008. 2. 15)
  4. 平成 19 年度 第 2 回産業情報交流会「ケミカルゲノミクスに基づくインシリコ化合物探索他」 (2007. 10. 22)
  5. 新産業を創る先端科学技術フォーラム 2007「ポストゲノム創薬のための新技術」セッション「ケミカルゲノミクスに基づく創薬インフォマティクス」 (2007. 10. 18)
  6. 第 66 回日本癌学会学術総会 International Session 「Chemical Genomics for Cancer Research」 「Knowledge Discovery and Data Mining in Chemical Genomics」 (2007. 10. 3)
  7. 日本ケミカルバイオロジー研究会 第 2 回年会「ケミカルゲノミクス情報を利用した GPCR の in silico リガンド探索手法の開発」 (2007. 5. 10)
  8. 産業クラスター計画 関西バイオクラスタープロジェクト「第 2 回 フォローアップ勉強会」 (2006. 12. 4)
  9. 日本薬物動態学会 第 21 回年会「ケミカルゲノミクスからの創薬インフォマティクス」 (2006. 12. 1)
  10. 第 32 回 情報処理技術検討交換会「ケミカルゲノミクス情報のデータマイニング」 (2006. 11. 30)
  11. モレキュラーライブラリー研究会「ケミカルゲノミクス情報を用いた化合物ライブラリーの合理的設計」 (2006. 11. 16)
  12. 第 34 回 構造活性相関シンポジウム 奨励講演「ケミカルゲノミクス情報に基づく化合物探索」 (2006. 11. 14)
  13. 第 269 回 C B I 学会「ケミカルゲノム情報に基づく GPCR 創薬」 (2006. 11. 1)
  14. 第 21 回 21 世紀の薬学を語る京都シンポジウム - 薬学教育フロンティア - 「インフォマティクスと創薬」 (2006. 10. 14)

15. 産業クラスター計画 関西バイオクラスタープロジェクト「第1回 フォローアップ勉強会」(2006.10.4)
16. 第2回 バイオメディカル研究会 基調講演 「ケミカルゲノミクスのための創薬インフォマティクス」(2006.09.12)
17. 第4回先端医療セミナー「ケミカルゲノミクスからの In silico 創薬」(2006.8.25)
18. 第45回 バイオグリッドビジネスサロン 「創薬におけるバイオインフォマティクスの可能性」(2006.8.18)
19. 第16回 近畿バイオインダストリー振興会議 技術シーズ公開会「創薬リード化合物自動合成装置の研究開発」(2006.7.28)
20. コンピュータ化学部会 平成18年度例会 「ケミカルゲノム情報に基づく In silico 創薬」(2006.6.13)
21. バイオグリッド研究会 -IT プログラム成果報告と今後の展開- 「化合物空間を利用した化合物検索」(2006.5.27)
22. (財)サントリー生物有機科学研究所 コロキウム「ケミカルゲノミクスのためのインフォマティクス」(2006.2.21)
23. The 2005 AAPS Annual Meeting, Cutting-Edge Bioinformatics from Nanotechnology to Toxicogenomics, Nashville, USA "Bioinformatics for Chemical Genomics" (2005.11.7)
24. 第78回日本薬理学会年会 シンポジウム -ケミゲノミクスの新しい展開とゲノム創薬科学- 「バイオインフォマティクスとケモインフォマティクスの融合に向けたケミカルゲノムネットワークの構築」(2005.3)
- G. 知的財産権の取得状況
1. 特許取得
1. 公開番号WO2007/004479 A1 (特開2007-11752)、「データ処理装置、データ処理プログラム、それを格納したコンピュータ読み取り可能な記録媒体、およびデータ処理方法」、(国際)2006年6月28日;2007年1月11日公開(国内)2005年6月30日出願;2007年1月18日公開、出願人 京都大学、発明者 奥野恭史、辻本豪三、梁智允、種石慶
2. 公開番号WO2007/139037 A1; PCT/JP2007/060736 (特願2006-147433)、「ケミカルゲノム情報に基づく、タンパク質-化合物相互作用の予測と化合物ライブラリーの合理的設計」、(国際)2007年5月25日出願;2007年12月6日公開、(国内)2006年5月26日出願、出願人 京都大学、発明者 奥野恭史、種石慶、辻本豪三
2. 実用新案登録  
無し
3. その他

無し

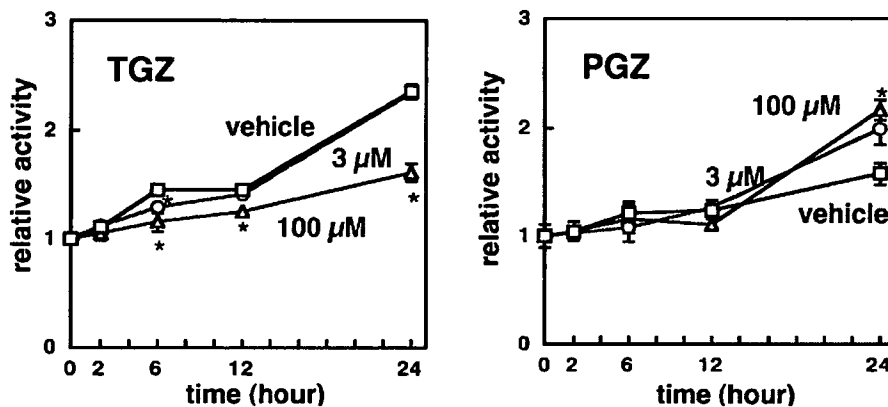


Figure 1. The effect of TGZ and PGZ on cell growth of HepG2 cells. HepG2 cells were stimulated with vehicle (black,  $\square$ ; 0.1% dimethylsulfoxide), 3  $\mu\text{M}$  (blue,  $\circ$ ), or 100  $\mu\text{M}$  (red,  $\triangle$ ) TGZ or PGZ for the indicated times. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ), (\*,  $p < 0.05$  for TGZ or PGZ vs vehicle).

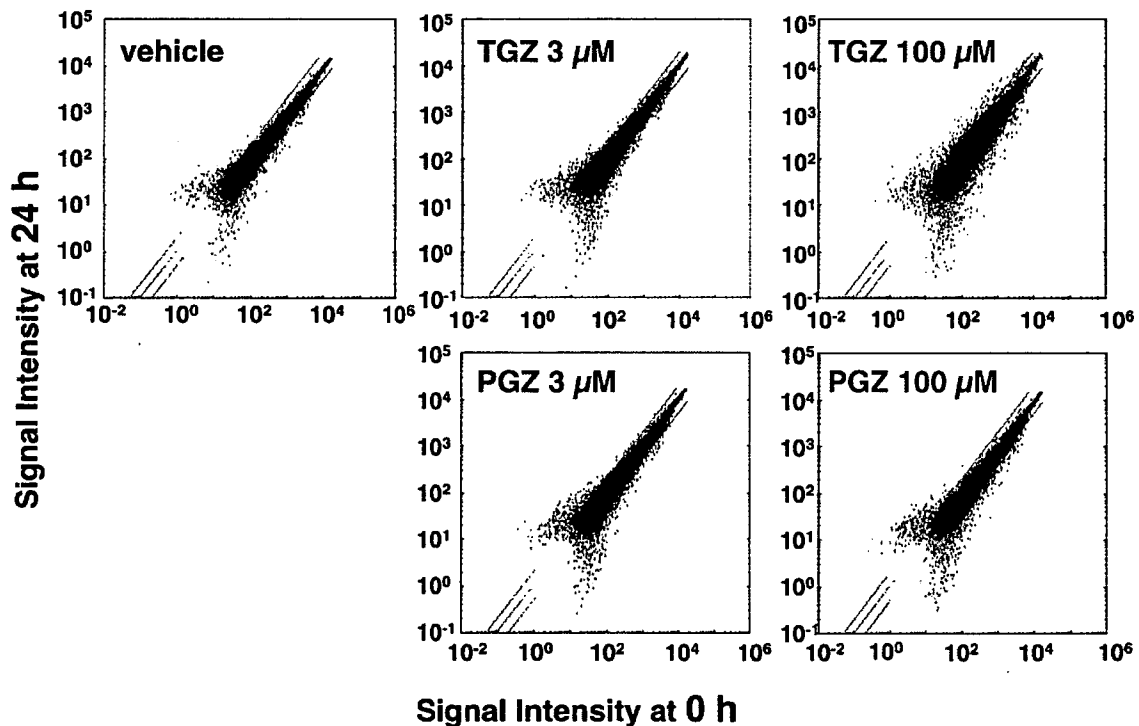


Figure 2. Scatter correlation graph representing the expression levels of genes at 0 h and 24 h in TGZ- or PGZ-treated HepG2 cells. For each gene, the expression level at 0 h is given on the X axis, and the expression level for the same gene at 24 h is plotted on the Y axis. Red dots show genes judged as “Presence”, and yellow dots represent genes judged as “Absence” by GeneChip Operating Software (GCOS) of Affymetrix in both microarray analyses. Blue dots show genes judged as “Presence” only in either microarray analysis. The same and two-fold induction and suppression thresholds were indicated as diagonal lines.

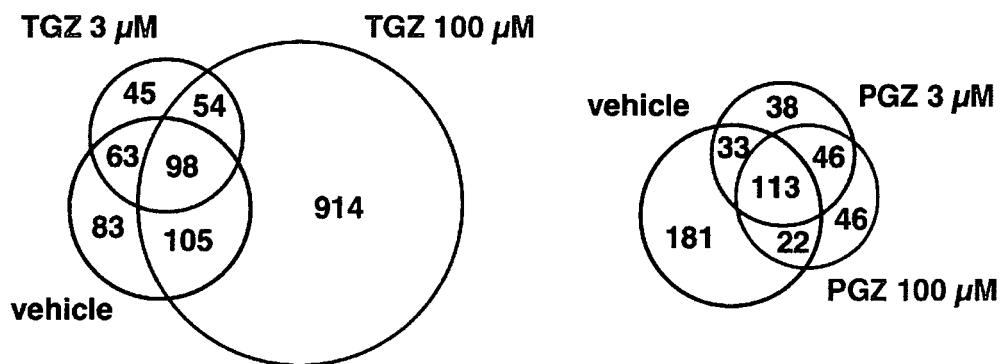


Figure 3. Overlapping sets of genes differently expressed in each concentration of TGZ or PGZ. Numbers in the overlapping region of the Venn diagram represent shared genes. Genes were selected if the ratio of the relative expression level in time course was larger or smaller than 3.0.



Figure 4. Genes networks by the stimulation of TGZ and PGZ in HepG2 cells. The TGZ-specific network (left panel), PGZ-specific network (right panel) and the network common between TGZ and PGZ (middle panel) were displayed.

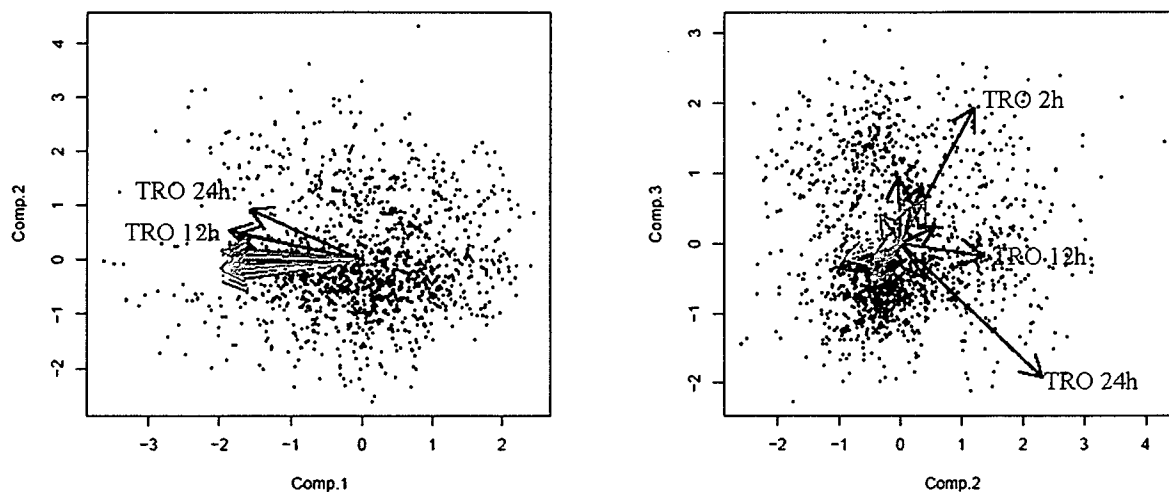


Figure 5. Principal component analysis of gene expression profiles in TGZ- or PGZ-stimulated HepG2 cells. Genes were selected if the ratio of the relative expression level in time course was larger or smaller than 3.0. The axes correspond to principal component (Comp.) 1, Comp. 2 and Comp. 3. Red arrows represent vectors of 100  $\mu$ M TGZ-stimulated samples, and other color arrows represent samples except for TGZ 100  $\mu$ M.

Table 1. Relation between the principal component analysis and each cluster of genes network.

Cluster Number	Number of genes		
	PCA (Comp. 2)	TGZ	PGZ
<i>Upper 100 genes of Comp. 2</i>			
39	18	29	1
82	17	3	31
20	11	18	0
59	10	19	0
51	10	11	0
<i>Lower 100 genes of Comp. 2</i>			
12	30	36	0
50	14	1	33
21	13	10	26
25	12	15	0
49	10	11	0
11	10	0	25



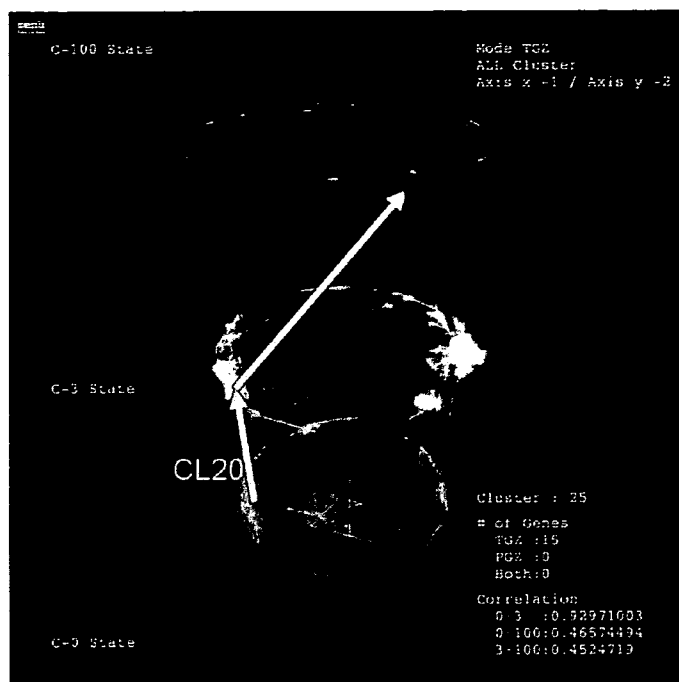
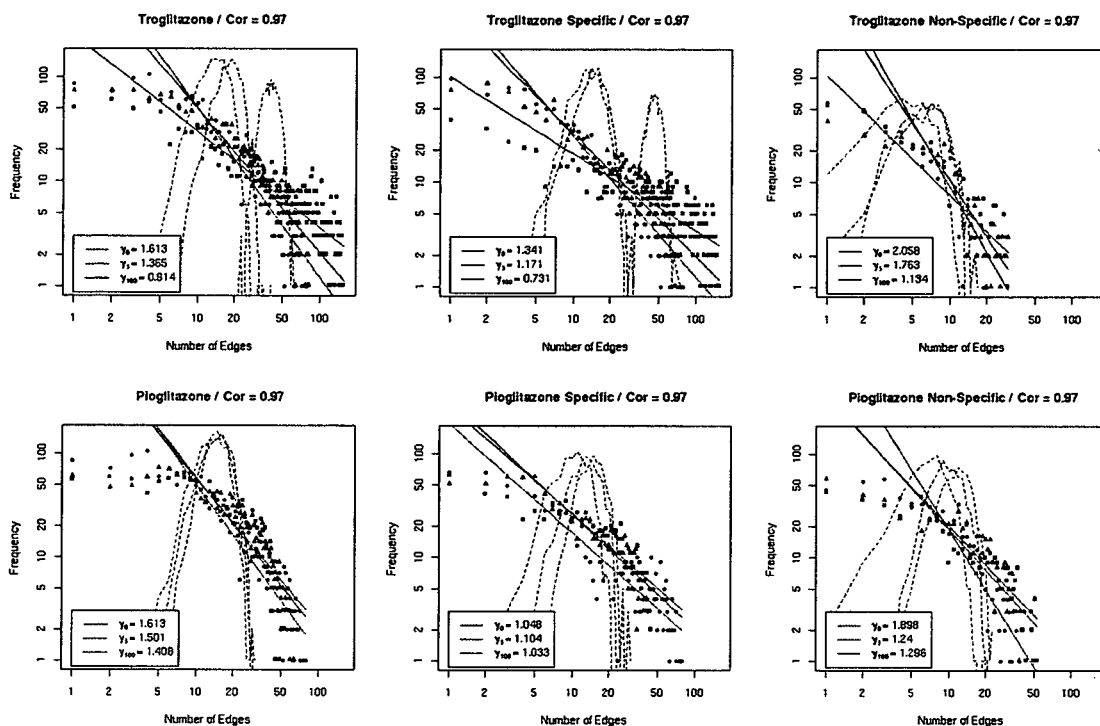


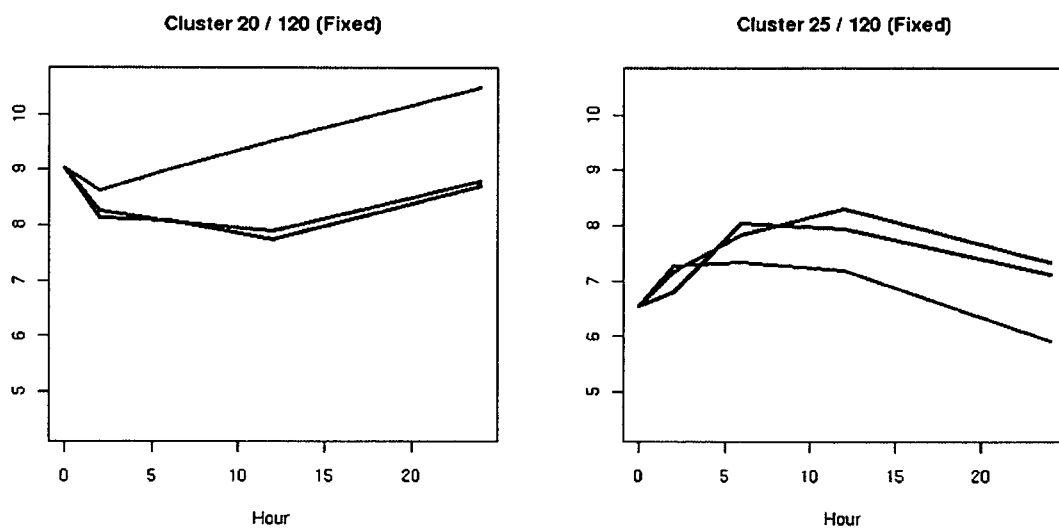
Figure 6. CL20 and CL25 in the genes network of TGZ-stimulated HepG2 cells.

Table 2.

	# of cluster	# of genes		
		TGZ	PGZ	TGZ $\cap$ PGZ
Drug Specific Cluster				
TGZ Specific	52 clusters	1070	107(*)	0
PGZ Specific	29 clusters	58(*)	827	0
Non-specific Cluster	45 clusters	358	601	209



**Figure 7.** Distribution of the number of links for TGZ and PGZ networks. (x axis, log10 scale) compared with number of links (y axis, log10 scale) in the vehicle network (green round), 3  $\mu\text{M}$  stimulated networks (blue triangle) and 100  $\mu\text{M}$  stimulated (red square). Each color line depicts the least squares fit of the data to a linear line in the log-log plot. Each dashed line depicts the distribution of random networks.



**Figure 8.** The gene expression patterns of CL20 and CL25. Black line: Vehicle, blue line: 3  $\mu\text{M}$ , Red line: 100  $\mu\text{M}$

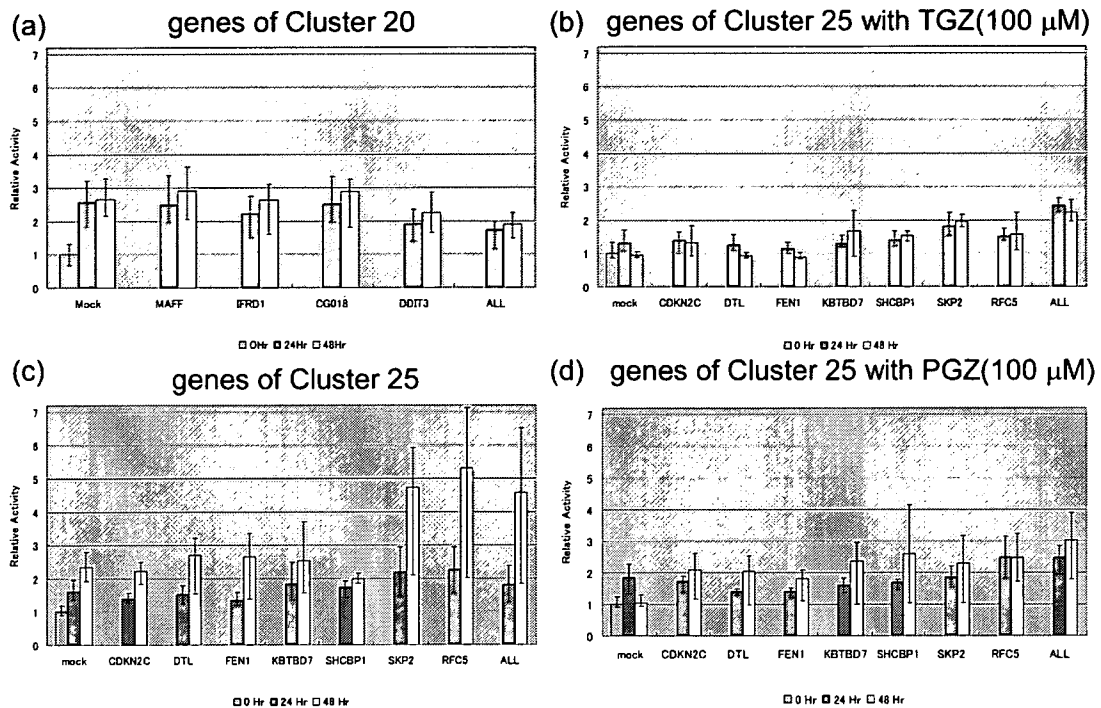


Figure 9. WST-1 assay of CL20 and CL25.

(a) HepG2 cells were transfected with the expression vector(s) for mock, MAFF, DDIT3, IFRD1, CG018, or four genes and assayed at the indicated times. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Data are represented as fold of the value at 0 h, (\*,  $p < 0.05$  for DDIT3 at 24 h and for four genes at 24 and 48 h vs mock).

(b,c,d) HepG2 cells were transfected with the expression vector(s) for mock, CDKN2C, DTL, FEN1, KBTBD7, SHCBP1, SKP2, RFC5 or seven genes and assayed at the indicated times. (b) Troglitazone stimulated HepG2 cell, (c) control(Plusmid only) (d) Pioglitazone stimulated HepG2 cell. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM (n = 8). Data are represented as fold of the value at 0 h, (b:  $p < 0.01$  for SHCBP1 or SKP2 at 48 h and seven genes at 24 and 48 h vs mock. c:  $p < 0.01$  for SKP2 or RFC5 at 48 h).

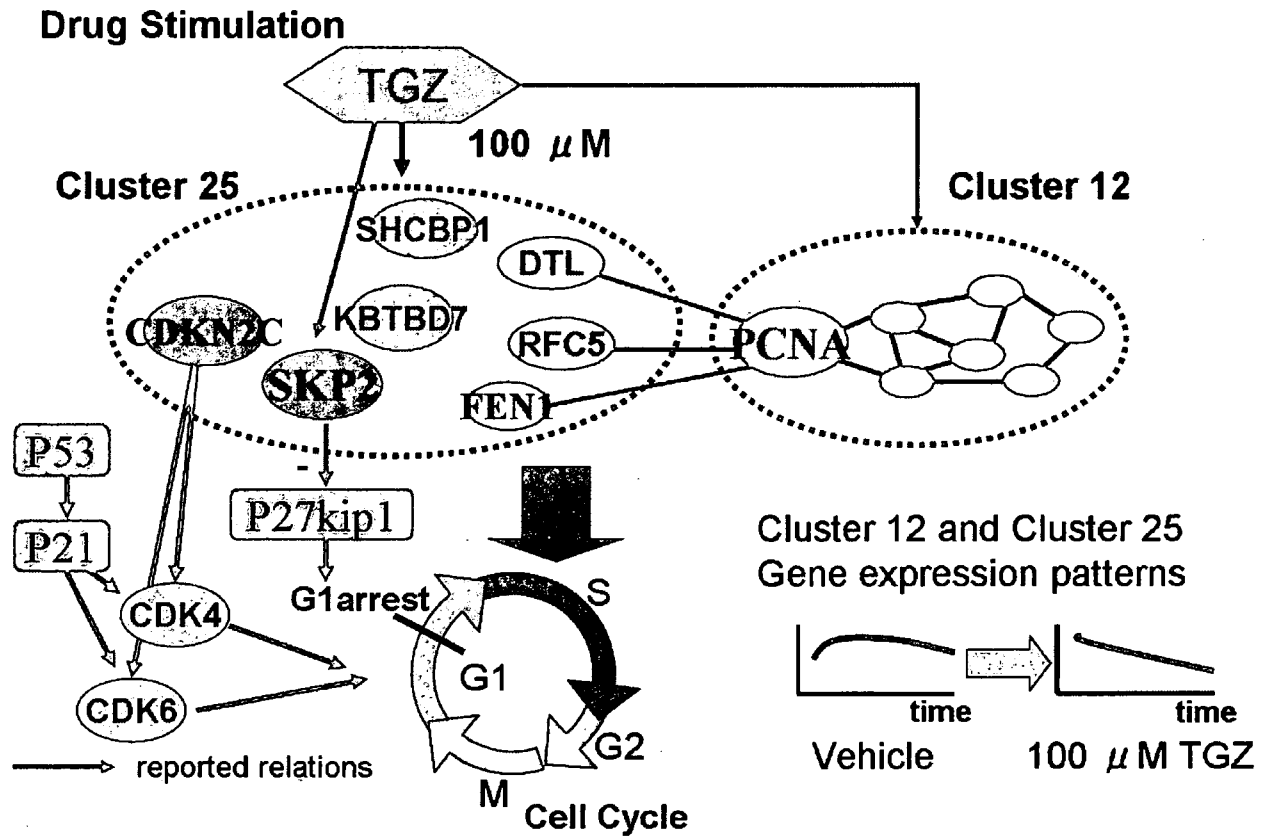


Figure 10. Troglitazone toxicities and cell cycle arrest mechanism.