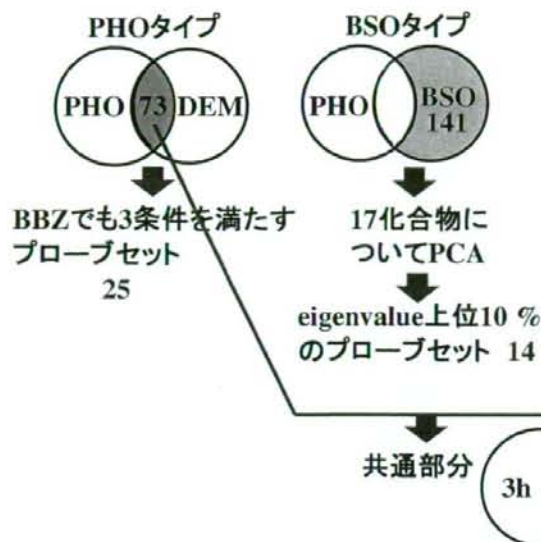
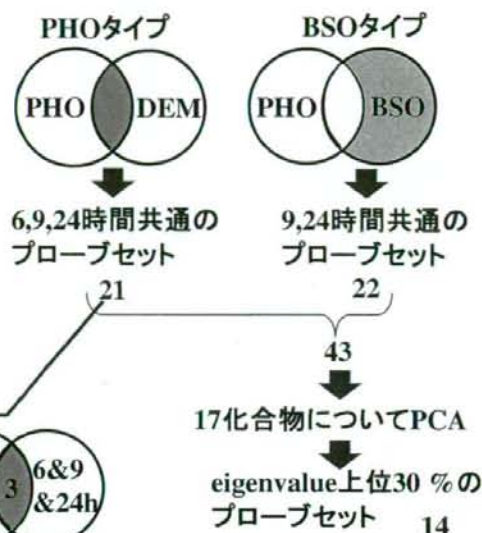


GSH枯渇時に変動する遺伝子



GSH枯渇後に変動する遺伝子



TGP2 Toxicogenomics Informatics Project in Japan

Biomarker gene sets responsive to PHO-type GSH-depletion when GSH was depleted

Table 3. The selected gene probe sets responsive to GSH-depletion induced by GSH conjugation (PHO-type)

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol
1368121_at	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)	Akr7a3
1369785_at	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	Ppat
1370694_at	tribbles homolog 3 (Drosophila)	Trib3
1370695_s_at	tribbles homolog 3 (Drosophila)	Trib3
1372510_at	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1
1373108_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	Ppp1r3c
1373282_at	similar to mitochondrial carrier protein MGC4399	LOC691431
1378173_at	Transcribed locus	---
1379793_at	similar to RIKEN cDNA 2110031B13	RGD1305356
1382500_at	similar to Sestrin 2 (H95) (predicted)	RGD1566319_p
1383315_at	hepatic protein E1H	E1h
1383793_at	hypothetical LOC312654 (predicted)	RGD1311909_p
1383939_at	Transcribed locus	---
1384331_at	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1
1386321_s_at	tribbles homolog 3 (Drosophila)	Trib3
1386662_at	similar to Sestrin 2 (H95) (predicted)	RGD1566319_p
1386937_at	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	Atp1b1
1387242_at	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent	Prkr
1387316_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1
1387598_at	thrombospondin	Thsp
1388742_at	---	---
1391607_at	similar to Sestrin 2 (H95) (predicted)	RGD1566319_p
1392580_at	Transcribed locus	---
1398482_at	similar to B-cell leukemia/lymphoma 3	LOC680611
1398620_at	Transcribed locus	---

Yellow colored: up-regulated (19 probe sets)
Blue colored: down-regulated (6 probe sets)

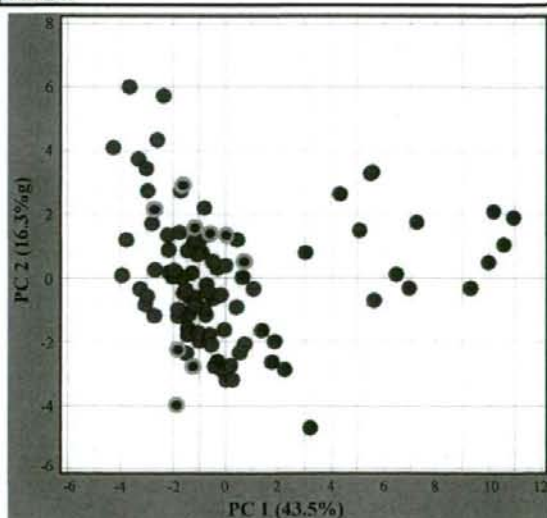


Fig. 2. Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 25 probe sets (see left) obtained from rat livers 3h after treatment of the 17 compounds. Each spot represents individual sample. The signal values were first normalized by log ratio in standard deviation units, and then by Z-score.

- PHO-like positive compounds
- BSO-like positive compounds
- Control and negative compounds

Biomarker gene sets responsive to BSO-type GSH-depletion when GSH was depleted

Table 4. The selected gene probe sets responsive to GSH-depletion induced by inhibition of GSH-synthesis (BSO-type)

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol
1370080_at	heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1
1372510_at	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1
1384331_at	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1
1373011_at	hypothetical protein LOC619558	LOC619558
1388953_at	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nuclear)	Gnl3
1390738_at	bone marrow stromal cell antigen 2	Bst2
1374326_at	peter pan homolog (Drosophila)	Ppan
1385345_at	Transcribed locus	—
1372676_at	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	Fahd1
1388710_at	ras responsive element binding protein 1 (predicted)	Rreb1_predicted
1385640_at	proprotein convertase subtilisin kexin type 9	Pcsk9
1367708_a_at	fatty acid synthase	Fasn
1376089_at	Transcribed locus	—
1370355_at	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1

Yellow colored: up-regulated (6 probe sets)
 Blue colored: down-regulated (8 probe sets)

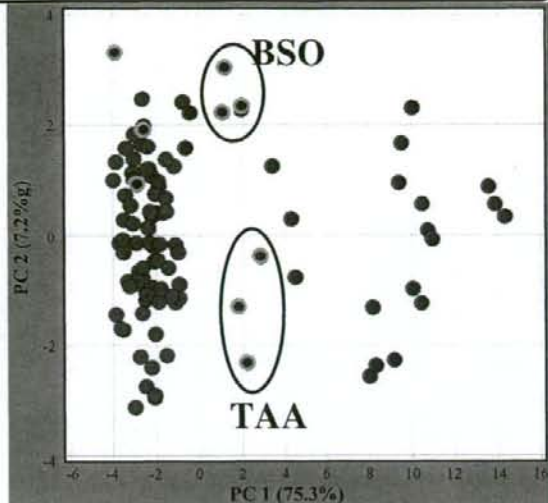
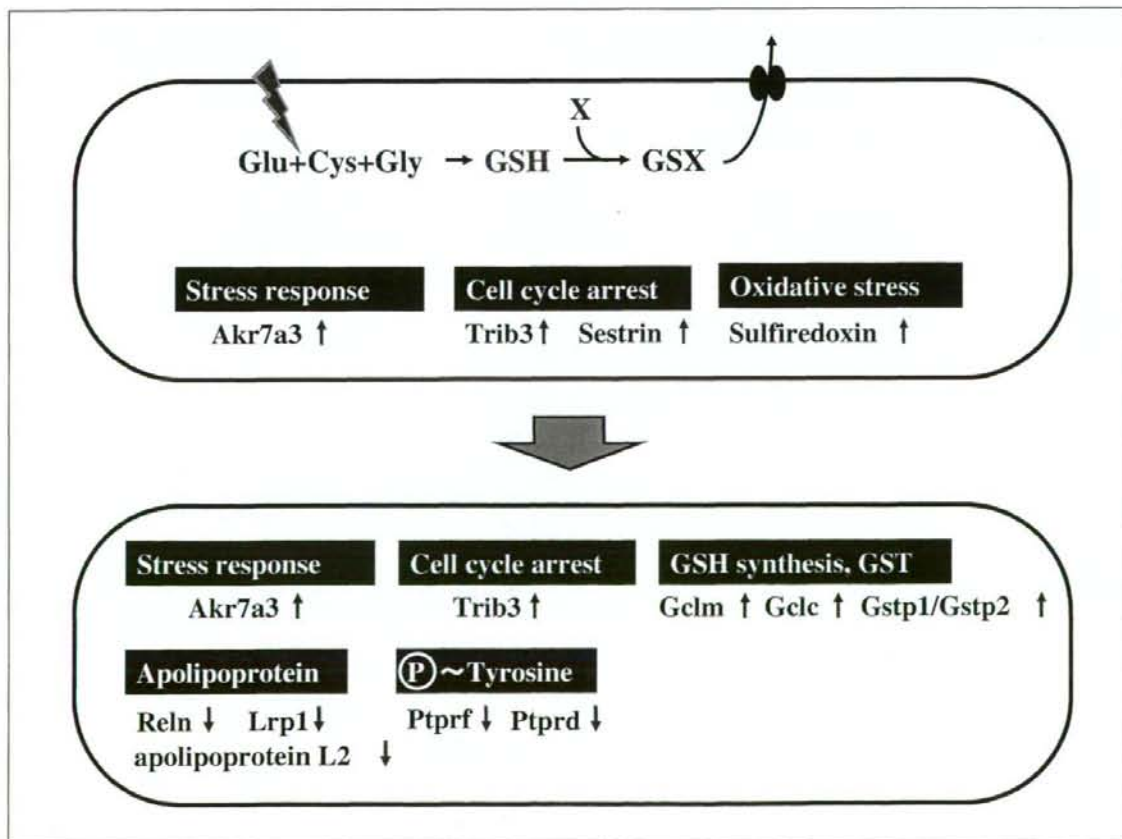
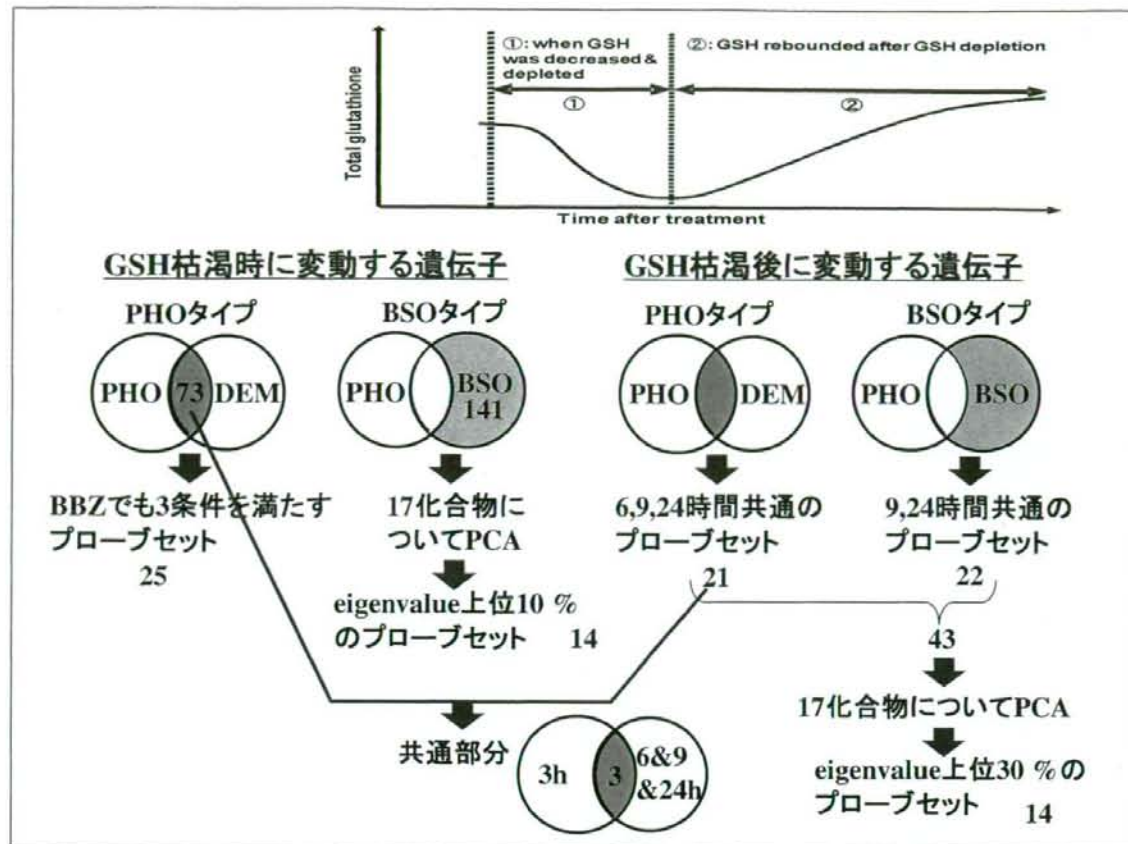


Fig. 3 Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 14 probe sets (see left) obtained from rat livers 6h after treatment of the 17 compounds. Each spot represents individual sample. The signal intensity values were normalized by log ratio in standard deviation units.

- PHO-like positive compounds
- BSO-like positive compounds
- Control and negative compounds





TGP2 Toxicogenomics Informatics Project in Japan

Biomarker gene sets for Hepatotoxicity induced by GSH-conjugation

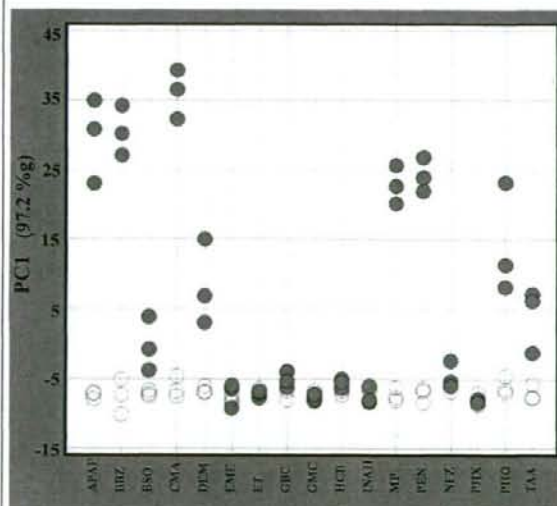


Fig. 6. Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 3 probe sets identified as differentially expressed in response to hepatotoxicity induced by GSH-depletion through GSH-conjugation. Each spot represents individual sample. The signal intensity values were normalized by log ratio in standard deviation units.

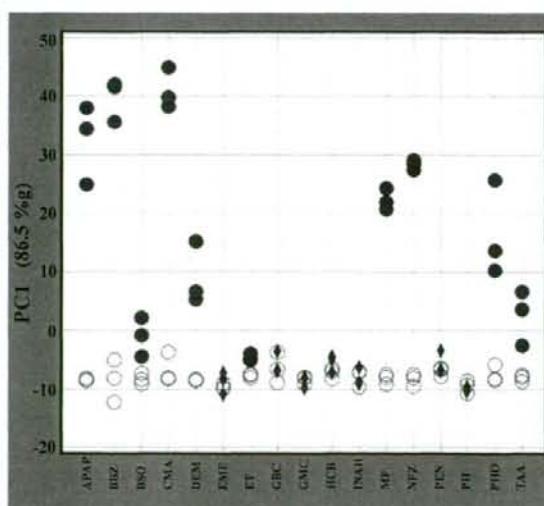


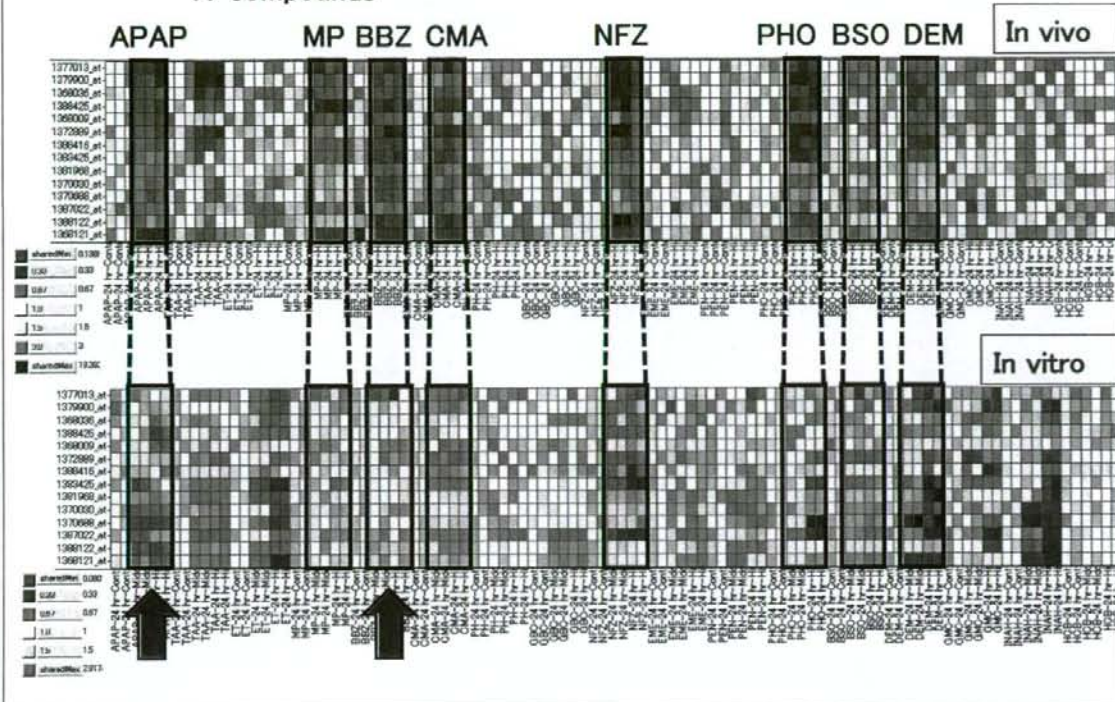
Fig. 7. Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 14 probe sets refined from 43 probe sets identified as differentially expressed in response to hepatotoxicity induced by GSH-depletion. Each spot represents individual sample. The signal intensity values were normalized by log ratio in standard deviation units.

○ control † negative compounds ● positive compounds

PHO-, BSO-type biomarkers after GSH depleted

24h H, 14 (30%) of 43 probe sets, union of PHO, BSO-type
17 compounds

Ratio



バイオマーカーⅣ～Ⅲのリスト(2008年12月時点)

第1期テーマ

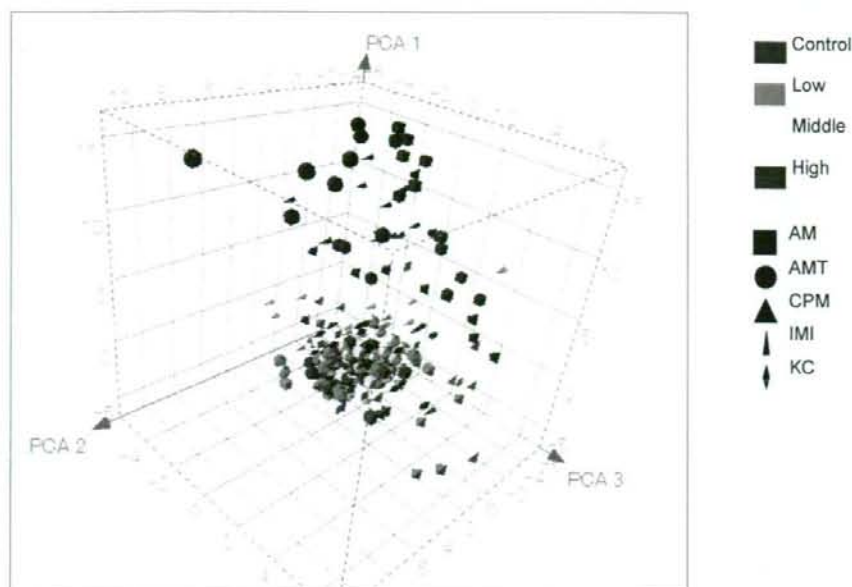
1. グルタチオン枯渇リスク x2
2. Phospholipidosis x2
3. 胆汁鬱滞 x2
4. くもり硝子変性
5. 好酸性顆粒状変性
6. 腎尿細管障害診断・・・Ⅲ
7. 腎尿細管障害予測・・・Ⅲ
8. 肝臓での貧血診断
9. 血液での貧血診断
10. 非遺伝子傷害性肝発ガン x2

14

検証中: 肝脂肪化、肝繊維化、Nrf2関与酸化ストレス、代謝酵素誘導

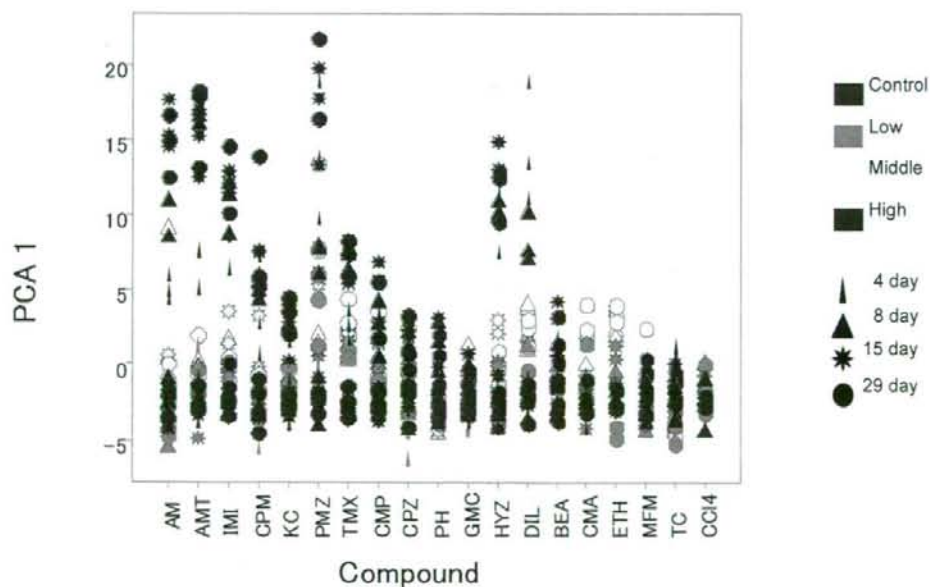
第2期テーマ進行中

解析例: phospholipidosis のリスク評価



Hirode et al., Toxicol Appl. Pharmacol. 229:290- 2008

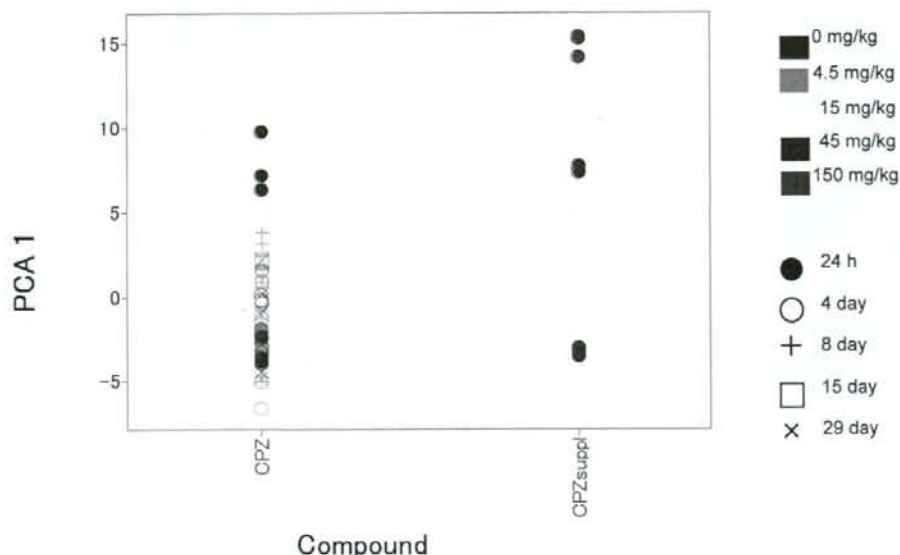
解析例: phospholipidosis のリスク評価



Hirode et al., Toxicol Appl. Pharmacol. 229:290- 2008

解析例: phospholipidosis のリスク評価

高用量を用いると、単回投与でも予測可能



Hirode et al., Toxicol Appl. Pharmacol. 229:290- 2008

バイオマーカーⅣ～Ⅲのリスト(2008年12月時点)

第1期テーマ

1. グルタチオン枯渇リスク x2
2. Phospholipidosis x2
3. 胆汁鬱滞 x2 LDA(39 probe sets), PCA(59 probe sets)
4. くもり硝子変性 SVM(24 probe sets)
5. 好酸性顆粒状変性 SVM (5 probe sets)
6. 腎尿細管障害診断・・・Ⅲ
7. 腎尿細管障害予測・・・Ⅲ
8. 肝臓での貧血診断
9. 血液での貧血診断
10. 非遺伝子傷害性肝発ガン x2

検証中: 肝脂肪化、肝繊維化、Nrf2関与酸化ストレス、代謝酵素誘導

第2期テーマ進行中

バイオマーカーⅣ～Ⅲのリスト(2008年12月時点)

第1期テーマ

1. グルタチオン枯渇リスク x2
2. Phospholipidosis x2
3. 胆汁鬱滞 x2
4. くもり硝子変性
5. 好酸性顆粒状変性
6. 腎尿細管障害診断・・・Ⅲ
7. 腎尿細管障害予測・・・Ⅲ
8. 肝臓での貧血診断
9. 血液での貧血診断
10. 非遺伝子傷害性肝発ガン x2

14

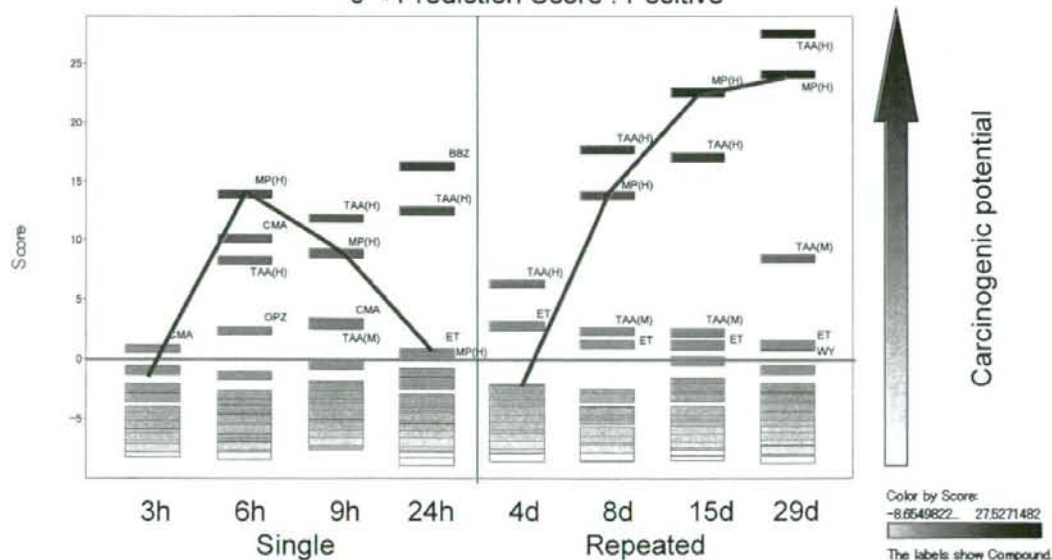
検証中: 肝脂肪化、肝繊維化、Nrf2関与酸化ストレス、代謝酵素誘導

第2期テーマ進行中

解析例: 非遺伝子傷害性発がん物質予測(PAM)

Prediction Score < 0 : Negative

0 < Prediction Score : Positive



トキシコゲノミクス・インフォマティクス プロジェクト(TGP2) H19~H23

- 1) TGP1の成果(TG-GATEs)を活用してバイオマーカー候補を創出する
- 2) トランスクリプトームで種差の壁に挑戦する
- 3) トキシコゲノミクス手法の施設間バリデーションを行い、レギュラトリーサイエンスへの応用の基盤を整備する

ヒト→ラット:種差のブリッジング戦略

1. Human Cell Line・・・TGP1でHepG2を検討したが却下
2. Primary Cultured Cellで比較・・・TGP1で採用
3. ヒト型遺伝子導入動物・・・分担研究(菅野)
4. ES, iPS細胞・・・機が熟していない(?)
5. Toxicological Pathwayで推定・・・知識の蓄積乏しい
6. 血球細胞を用いる・・・技術的に可能か?
7. 臨床研究・・・TGP内では困難→公募研究との連携

TGP2共同研究体制

- リーダー : 大野泰雄(国立医薬品食品衛生研究所副所長)
- サブリーダー : 漆谷徹郎(基盤研プロジェクトリーダー、同志社女子大)
- 基盤研サブプロジェクトリーダー : 山田弘(研究部門長・知的財産総務部門長)
- 基盤研顧問 : 奥野恭史(京都大学)
- 医薬基盤研究所: 中津則之、箕輪洋介、五十嵐芳暢、高衛華
- 国立医薬品食品衛生研究所: 菅野純(研究分担者)、小野敦
- 同志社女子大学薬学部: 水川裕美子(研究分担者)
- 製薬企業13社: アステラス、エーザイ、大塚、小野、キッセイ、三和化学、塩野義、住友化学、第一三共、大日本住友、武田、田辺三菱、中外
- バイオマーカーWG: 森下克美(リーダー・大塚)、住田佳代(サブリーダー・住友)、堀之内彰(サブリーダー・武田)、清水俊敦(サブリーダー・田辺三菱)
- 血液ゲノミクスWG: 神吉将之(リーダー・アステラス)
- TG-GATEsWG: 小野敦(リーダー・国立衛研)、新田浩之(リーダー・小野)
- 研究支援部門: 小野敦、矢本敬(第一三共)、新田浩之(小野)、廣出充洋(武田)、上原健城(塩野義)、宇波明(アステラス)、柿内太(エーザイ)

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業(創薬バイオマーカー探索研究事業))
分担研究報告書

創薬基盤としての分子毒性学研究

研究分担者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長

研究要旨

毒性予測に際して、実験動物(マウス)からヒトへの外挿の際に考察を要する因子のひとつに、外来性化学物質の代謝機能に関する種差が挙げられる。マウス PXR(ヒトのホモログは SXR)は薬剤代謝酵素の誘導に関わる重要な受容体であるが、そのリガンド選択性に種差が大きいことが知られている。本分担研究では、ヒト受容体 SXR のリガンド選択性を考慮した全身的な毒性検討が可能なマウスモデルを作出するために、遺伝子相同組み換え技術を用い、ヒト SXR のリガンド結合ドメイン(LBD)のみをマウス PXR の LBD と入れ替えたノックインマウス(hPXR-KI mouse)を作製した。これは hPXR の発現及び上・下流の制御は野生型マウスと同等で、リガンド特異性のみがヒト型化したモデルの作出を狙ったものである。この KI マウスと野生型マウスの毒性発現を比較し、ヒトへ外挿するモデル系としての基盤情報を得ることとした。

本年度は、作製した hPXR-KI mouse がヒト型のリガンド反応性を示すことを、マイクロアレイを用いた網羅的解析により検討した。PXR 標的遺伝子として報告されている複数の肝の反応性遺伝子について、リガンド選択性がヒト化していることを確認した。

A. 研究の目的

経口摂取された化学物質は消化管から吸収され、門脈を経由し肝で代謝を受けた後、或いは乳び管を経由して大循環に入る。小腸や肝には齧歯類では PXR、ヒトでは SXR と呼ばれる核内受容体が外来異物センサーとして存在し、化学物質を極性物質に代謝し体外への排出を促進する酵素 CYP3A 等の発現誘導を制御することが知られている。

CYP3A は複数の医薬品の代謝における相互干渉の問題において特に重要視されており、治療効果減少や、毒性増強に関わるとされている。この様な場合を含め、PXR と SXR のリガンド選択性に大きな種差があるこ

とから、この受容体系の反応が毒性を左右する物質については、齧歯類を用いた試験結果からヒトでの毒性の予測は行えない可能性が指摘されている。選択性の高いリガンドの実例はリファンピシム(RIF: Rifampicin)で、ヒト SXR 系は活性化するがマウス PXR は活性化しない。このタイプの物質の毒性評価はマウスを用いた試験からは困難であることになる。逆の事例に PCN (pregnenolone-16alpha-carbonitrile)等の物質が知られており、この場合はマウスからはヒトに対して偽陽性の結果を得ることになる。

ヒト型の反応を示すマウスの作成は、既に試みられている。初期のものに、ヒト SXR 遺

伝子をアルブミンプロモータ下に肝に強制発現させるトランスジェニックマウスがある。この場合、発現部位が肝に限定されることと、マウスの PXR が発現していることから、ヒト型の反応性の指標を得るに留まるものとなっている。

PXR と SXR を比較すると、DNA 結合ドメイン (DBD) のアミノ酸配列は 95% 保存されているのに対し、LBD は 77% 保存にとどまっている。ヒトとラットのキメラタンパク質を用いた解析により、LBD 内に種差を規定する領域が存在することが明らかにされており、ヒトの Leu308 とラットの Phe305 (マウスも同じ) が重要であることが示されている。ヒト PXR の結晶構造を元にした homology modeling により、これらのアミノ酸は located within or neighboring the flexible loop that forms part of the pore to the ligand-binding cavity であることが示唆されている。実際に、このアミノ酸を置換することで Rifampicin に対する種特異性が逆転する。これらの事から、マウス PXR の LBD をヒト SXR のものに変えることにより、ヒト型の活性化パターンを示すマウスが作製されることは想像に難くなく、実際に、幾つかのノックインマウスが報告されている。しかし、それらは、相同組換え体の設計の問題から、ヒト型 PXR の発現臓器が限定されている等の人工的な第二の要素が加わっており、マウスを用いての、全身を対象とした網羅性を重視する毒性評価に利用する為には十分な性能を有していないことが考えられた。

そこで、我々は LBD の部分のみをヒト型化し、DBD を含むそれ以外の部分はマウス型のままにするノックインマウスを作製することとした。これにより、マウスゲノム内に多数存在する cis-element への結合パターンに変化

が生じないこと、及び、転写開始点上流の配列が維持されることから、マウス PXR 本来の組織発現パターンとその誘導様態が保たれることを見込むものである。LBD のみをヒト型化したキメラタンパク質 (hPXR) をコードする cDNA をマウス PXR 遺伝子座の Exon3 に knock-in したマウスを作製し、そのマウスが実際にヒト SXR 特異的リガンドに対する反応を示したことを報告する。このマウスはヒト SXR を介した全身毒性の研究を行うための有用なツールとなると期待される。

B. 研究の方法

(1) hPXR-KI mouse

マウス LBD の代わりにヒト LBD を持つ hPXR chimeric protein を発現するノックインマウス (独自作製の詳細は昨年度報告書に詳述) を用いた。ES 相同組み換え体取得に利用したネオマイシン耐性遺伝子は CAG-Cre マウスとの交配により除去し、得られたマウスを C57BL/6 CrSic に少なくとも 6 回バッククロスし、ホモ体を得て以降の解析に供した。

(2) リガンド反応性検討

hPXR-KI mouse 及び野生型マウスの雄に対し、vehicle (corn oil)、RIF (10mg/kg/day) または PCN (40mg/kg/day) を 3 日間連日強制経口投与し、最終投与 24 時間後に肝、及び小腸 (粘膜部分) を採取した。また、野生型に対する PCN 投与による肝遺伝子発現の初期経時変化は PCN (7、20、70mg/kg) を単回強制経口投与し、2、4、8、24 時間の時点について解析した。肝は小片を 5mm 径の皮膚生検用トレパンにて打ち抜き、RNA later に浸漬した。小腸は粘膜領域のみを搔爬採

取し RNA later に浸漬した。

(3) Percollome 手法を適用した Total RNA の分離精製

組織は採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に 4℃ 一晚浸漬し、RNA 抽出操作までは -80℃ にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット (キアゲン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、あらかじめ臓器毎に設定した割合で GSC (Graded dosed spike cocktail; Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

(4) GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターにより付されたオリゴ dT 配列をもとに逆転写し cDNA を合成した。得られた cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ピオチン化 UTP、CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃ にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーにて発現データを得た。得られた発現デ

ータは、当方が開発した各種ソフトウェアを用いてコピー数に変換 (Percollome 法) し解析に供した。

(倫理面への配慮)

動物飼育、管理、動物実験に当たっては、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版) に則って行った。動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。

C. 研究結果

(1) ヒト型リガンド反応性の検討

hPXR-KI mouse がヒト型化反応を示すか否かを、ヒト特異的 agonist として RIF を、マウス特異的 agonist として PCN を用いて検討した。それぞれ 10mg/kg、40mg/kg を経口で 3 日間連日投与し、肝を採取し、CYP3A11 mRNA の発現量が典型的なヒト型反応を示すことを Percollome 定量 RT-PCR によって確認した。

そこで、CYP3A11 以外の遺伝子についてもヒト型反応を示すか、マイクロアレイを用いて検討した。その結果、PXR の標的遺伝子として報告されている CES6、CYP2B10、CYP2C55、CYP3A41、CYP3A44、GSTA1 を含む複数の遺伝子について、RIF で発現誘導されるが PCN では誘導されないという、典型的なヒト型反応を示すことが確認された (Figure 1)。また、CACNG2、GSTM2、GSTM3 など、PXR 標的遺伝子であることがまだ報告されていない遺伝子でヒト型反応を示すものが見出された。

(2)野生型マウスにおけるPCN投与による遺伝子発現経時変化

PXR 活性化による遺伝子発現の経時変化を調べるため、マウス特異的 agonist の PCN を野生型マウスに単回経口投与し、2、4、8、24 時間後に肝を採取して Percollome 法を適用した DNA マイクロアレイ解析を行った。PCN の投与量は、0、7、20、70mg/kg の 4 段階とした。

その結果、Figure 2 に示すように、投与後 24 時間に発現上昇のピークを有する遺伝子に加え、CYP2B10 のように 8 時間をピークに持つ遺伝子も見出された。

次に、それらの遺伝子の発現がヒト特異的 agonist である RIF によってどの程度発現変化するかを同様に DNA マイクロアレイにて調べたところ、Figure 3 に示すように、RIF 1、3、10mg/kg の範囲において発現変動は認められなかった。

さらに、PCN により野生型マウスで発現変動を示す遺伝子群に特有の機能カテゴリーが認められるかを Ingenuity Pathway Analysis (IPA) によって調べたところ、Figure 4 に示すように、PXR(NR1I2)を中心とするパスウェイが抽出され、そのパスウェイには実際に化学物質代謝系が含まれていた。

D. 考察

昨年度及び今年度の検討により、我々が作製した hPXR-KI mouse が実際にヒト型反応を示すことが確認された。代表的な PXR 標的遺伝子である CYP3A11 に加え、複数の標的遺伝子についてヒト型反応が認められた。

一方で、PXR 標的遺伝子とされているものでも ABCB1A のように、その誘導パターン

はヒト型傾向を示すが統計的に有意とはならなかったものもあった。今回ヒト型反応を調べた条件は、3日間連投後 24 時間であるが、CYP2B10 のように誘導ピークが 8 時間にあり 24 時間時には誘導が静まっているものは一見ヒト型反応を示さないように見える可能性がある。実際、ABCB1A の誘導ピークは 8 時間で、24 時間時には誘導はかなり静まっていることが既知である (Figure 5)。よって、化学物質の反応をある特定の時点のみで調べると、他の時点での反応を見落とす可能性があり、経時変化を念頭に置いた検討を加えることが重要である。

E. 結論

本年度の研究により、独自に作製したマウス PXR の LBD のみをヒト SXR の配列で置き換えた hPXR-KI mouse のリガンド反応性がヒト型化していることを複数の遺伝子について肝において確認した。今後、このマウスのヒト型反応性を経時的に確認し、本マウスの特性を詳細に把握すると共に、本マウスを活用してヒト型リガンドに対する反応と、マウス型リガンドに対する野生型マウスの反応との対比を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

荒瀬 栄樹、石井 健一郎、五十嵐 勝秀、相崎 健一、小倉 友二、今村 哲也、吉尾 裕子、有馬 公伸、菅野 純、杉村 芳樹、ビスフェノールA経胎盤投与によるマウス泌尿生殖洞でのSF1発現誘導、第96回日本泌尿器科学会総会、2008年4月25-27日、横浜

菅野 純、トキシコゲノミクス(Percellome Project)を基盤とした分子毒性学の展開の試み、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月26日、東京、口演

北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋聡、菅野 純、エストロゲン受容体(α 型)ノックダウンマウスの神経行動解析、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、ポスター

Kanno J, RISK MANAGEMENT FOR FOOD SAFETY AND INTRODUCTION TO THE SCIENCE AND TECHNOLOGY, Risk Management Seminar 2009, 2009年3月27日、東京、講演

G. 知的財産所有権の出願・登録状況(子
定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

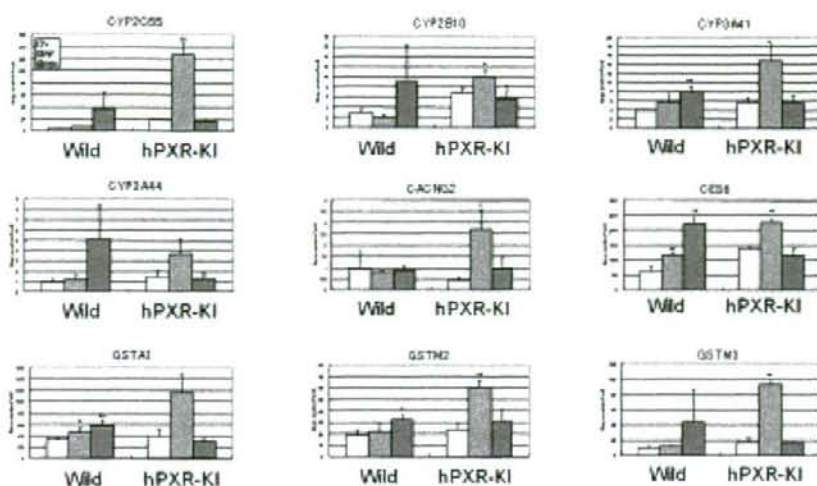


Figure 1 hPXR-KI mouseにおけるヒト型反応

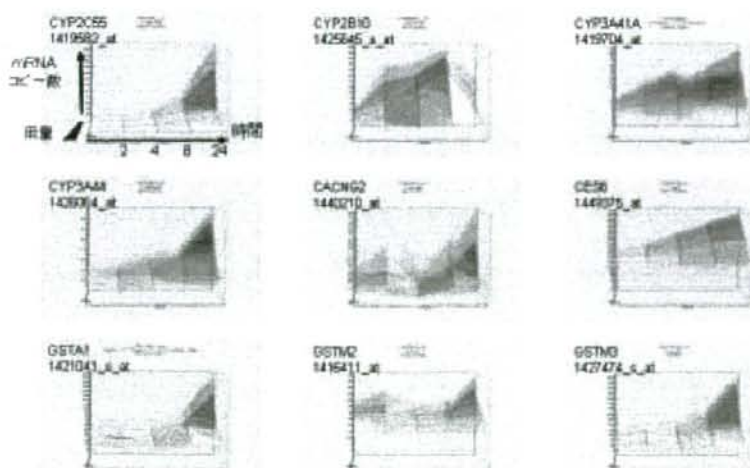


Figure 2 PXR活性化による野生型マウス反応の経時変化

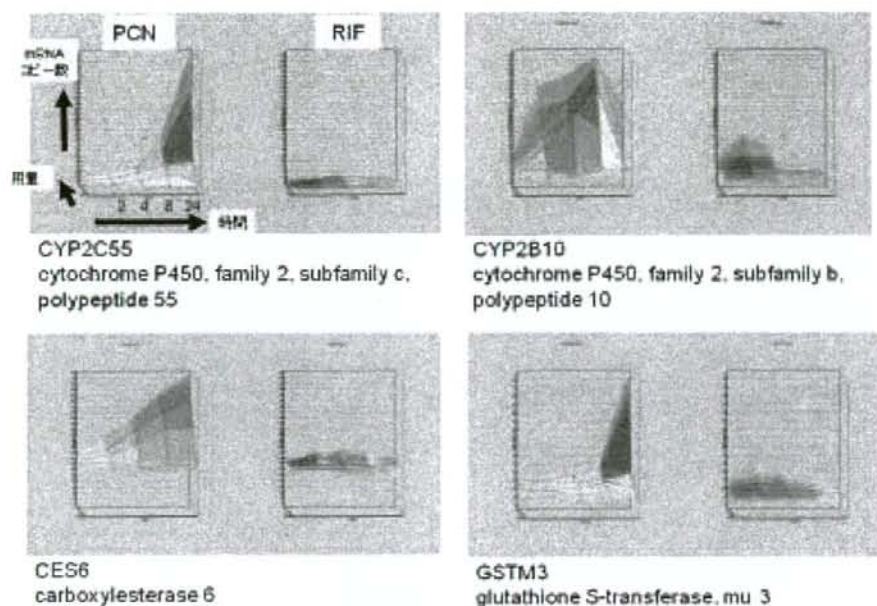


Figure 3 野生型マウスにおけるRIFによるPXR活性化の程度

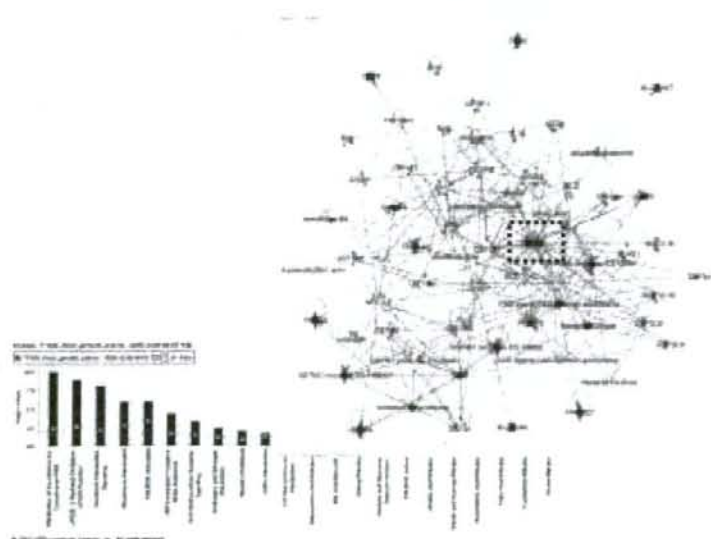


Figure 4 PXR活性化に伴う反応のパスウェイ解析

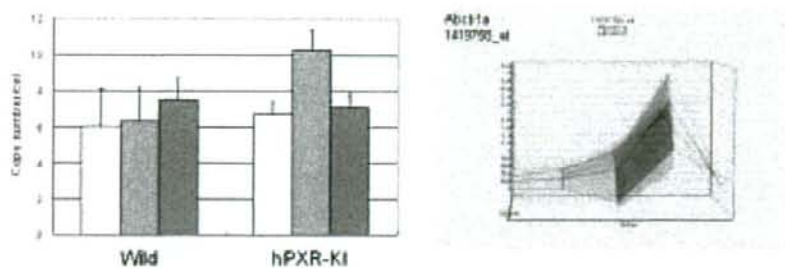


Figure 5 ABCB1Aの発現誘導パターン

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業：創薬バイオマーカー探索研究事業

分担研究報告書

バイオマーカー候補遺伝子の検証

研究分担者 水川裕美子 同志社女子大学薬学部 特別任用助教

研究要旨

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト(TGP2)ではバイオマーカーの創出を目指して大規模データベースの解析を行っているが、選出されたバイオマーカー候補遺伝子が真に創薬に役立つバイオマーカーとして利用可能になるためには各方面からの検証が必要である。そこで、本分担研究で *in vitro* を中心とした小規模実験を行い、毒性メカニズムの解析、裏付けの面から検証を行うこととした。

今年度はまずモデルケースとして薬剤誘発性肝障害の主な原因の一つであるグルタチオン(GSH)枯渇に注目し、大規模データベースよりメカニズムに基づくバイオマーカー候補遺伝子の抽出を行い、検証を試みた。その結果、GSH 枯渇時点がわからなくても *in vivo*, *in vitro* とも利用可能なマーカー候補として有望なものが得られた。

また、ラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築を行い、血球系細胞においても *in vitro* での解析が可能となる体制を整えた。

A. 研究目的

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト(TGP2)では平成 14～18 年度に行われたトキシコゲノミクスプロジェクト(TGP1)で構築した大規模データベース(TG-GATEs)を活用したバイオマーカーの創出を目指して解析を行っている。しかし選出されたバイオマーカー候補遺伝子が真に創薬に役立つバイオマーカーとして利用可能になるためには各方面からの検証が必要であり、医薬基盤研究所および TGP2 参加各企業において施設間でのデータバリデーションを行う一方、本研究では *in vitro* を中心とした小規模実験を行い、毒性メカ

ニズムの解析、裏付けの面から検証を行うこととした。

薬剤誘発性肝障害の主要なメカニズムの一つとしてグルタチオン(GSH)枯渇による酸化ストレスが挙げられ、アセトアミノフェン(APAP)やプロモベンゼン(BBZ)など多くの薬物による肝障害に GSH 枯渇が関わっていると考えられている。GSH 枯渇を起こすメカニズムはさらに二つに分けられ、化合物が GSH と共有結合することにより急速に GSH を消費し枯渇を起こす場合と GSH 合成に関わる酵素を化合物が阻害することにより GSH 枯渇を起こす場合がある。前者のメカニズムを持つ代表的な化合物は

ホロン(PHO)であり、以下 PHO タイプと称する。APAP などこのタイプである。後者のメカニズムを持つ代表的な化合物は L-ブチオニン-スルホキシミン(BSO)であり、以下 BSO タイプと称する。

これまで TGP1 の成果として GSH 枯渇マーカー候補遺伝子についての論文を二報報告している (Kiyosawa et al., *J. Toxicol. Sci.*, **31**, 433-448, 2006, Kiyosawa et al., *J. Toxicol. Sci.*, **32**, 469-486, 2007) もの、いずれの遺伝子セットも *in vitro* で無効、一過性に起こる GSH 量低下の最中の遺伝子発現変動をとらえなければならない、などいくつかの問題点があった。そこで今回まず新たにバイオマーカー候補遺伝子を抽出することから始めた。メカニズムを識別可能なバイオマーカーを得るため、PHO タイプ、BSO タイプそれぞれの化合物によりラット肝臓で GSH 枯渇時および枯渇後に発現変動する遺伝子を抽出した。その遺伝子セットについてデータベース中の *in vivo*, *in vitro* データでの化合物間比較および *in vitro* での化合物投与による GSH 量の測定を行った。

また、TGP2 ではヒトとラットのデータブリッジングの手段として血液サンプルを用いることが検討されており、検証実験に必要となると目される血球系細胞の初代培養系の構築も試みた。

B. 研究方法

1. ラット肝細胞 *in vitro* モデルを用いた GSH 枯渇マーカー候補遺伝子の検証使用データ

TG-GATES に格納されているデータのうち、PHO タイプ 7 化合物、BSO タイプ 3 化合物、GSH 枯渇を起こさないもの 7 化合物、

(表 1) 使用した化合物および用量。

(A): *in vivo*, (B): *in vitro*

(A) Chemicals and doses (*in vivo*)

Compounds	Abbreviation	Dose (mg/kg)			Administration route	Vehicle
		Low	Middle	High		
Positive						
Phenone	PHO	40	120	400	IP	Corn oil
Diethyl maleate	DEM	80	240	800	IP	Corn oil
Bromobenzene	BBZ	30	100	300	PO	Corn oil
Acetanilophen	APAP	300	600	1000	PO	5% MC
Cammarin	CMA	15	50	150	PO	Corn oil
Methapyrilene	MP	10	30	100	PO	5% MC
Nitrofurazone	NFZ	30	100	300	PO	5% MC
Buthionine sulfoximine	BSO	150	450	1500	IP	Saline
Ethionin	ET	25	80	250	PO	5% MC
Thioacetamide	TAA	4.5	15	45	PO	5% MC
Negative						
Erythromycin	EME	100	300	1000	PO	5% MC
Gentamicin	GMC	10	30	100	IV	Saline
Glibenclamide	GBC	100	300	1000	PO	Corn oil
Hexachlorobenzene	HCB	300	1000	2000	PO	Corn oil
Isoniazid	INH	200	600	2000	PO	5% MC
Penicillamine	PEN	100	300	1000	PO	5% MC
Perhexiline	PH	15	50	150	PO	5% MC

All were oral administrations unless indicated. MC: methylcellulose. PO: peroral, IP: intraperitoneal, IV: intravenous.

(B) Chemicals and doses (*in vitro*)

Compounds	Abbreviation	Dose (mM)			Vehicles
		Low	Middle	High	
Positive					
Phenone	PHO	0.02	0.1	0.5	medium
Diethyl maleate	DEM	0.06	0.3	1.5	medium
Bromobenzene	BBZ	0.008	0.04	0.2	DMSO
Acetanilophen	APAP	0.3	1	3	medium
Cammarin	CMA	0.012	0.06	0.3	medium
Methapyrilene	MP	0.0006	0.003	0.015	medium
Nitrofurazone	NFZ	0.012	0.06	0.3	DMSO
Buthionine sulfoximine	BSO	0.4	2	10	medium
Ethionin	ET	0.4	2	10	medium
Thioacetamide	TAA	0.4	2	10	medium
Negative					
Erythromycin	EME	0.003	0.015	0.075	DMSO
Gentamicin	GMC	1.2	6	30	medium
Glibenclamide	GBC	0.0024	0.012	0.06	DMSO
Hexachlorobenzene	HCB	0.0006	0.003	0.015	DMSO
Isoniazid	INH	0.4	2	10	medium
Penicillamine	PEN	0.4	2	10	medium
Perhexiline	PH	0.0004	0.002	0.01	DMSO

計 17 化合物 (表 1) の *in vivo* 肝臓データを用いてバイオマーカー候補遺伝子の抽出を行った。 *In vivo* 肝臓データは 6 週齢の雄性 Crl:CD(SD)ラットに化合物を単回投与し、3, 6, 9, 24 時間後に肝臓を摘出して GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix)を用いて得た 1 群 3 例、溶媒対照+3 用量の網羅的遺伝子発現データである。 GeneChip のデータ取得には MAS5.0 アルゴリズムを用い、各 Chip ごとの平均値でノーマライズした値を遺伝子発現シグナル値として用いている。その後抽出した遺伝子を *in vitro* データと比較した。 *In vitro* データは 6 週齢の雄性 Crl:CD(SD)ラットの肝臓から酵素的に単離・培養した肝細胞に化合物を曝露し 2, 8, 24 時間後に細胞を回収して GeneChip により得たものであり、1 群 2 例、溶媒対照+3 用量である。

バイオマーカー候補遺伝子の抽出

発現変動遺伝子の抽出は以下のように行った。PHOタイプについてはPHO, ジェチルマレイン酸(DEM) 各薬物によるGSH枯渇ピーク時点(3時間)での遺伝子発現データ, または枯渇後24時間までの遺伝子発現データを用い, 枯渇ピーク時点でのGSH量との相関係数を計算して無相関検定で $P < 0.05$ のプロープセットを抽出した。そのうちDetection callが12サンプル中3サンプル以上で P^* , 中用量または高用量で遺伝子発現シグナル値が対照群と比較して1.5倍以上変動, ウェルチのt検定で有意, の3条件を満たし, かつBBZでもこの3条件を満たすプロープセットを選択した。GSH枯渇後に関しては, 枯渇後24時間まで全時点に共通して選択されたプロープセットのみを選んだ。BSOタイプについてはBSOのデータ(GSH枯渇ピークは6時間)において同様に無相関検定で有意かつ3条件を満たすものを選択した。さらにPHOタイプ7, BSOタイプ3, GSH枯渇陰性7の合計17化合物のデータを用いて主成分分析を行い, 寄与度の高い遺伝子(GSH枯渇時の遺伝子に関しては10%, GSH枯渇後の遺伝子に関しては30%)を選択した。

肝細胞初代培養および肝GSH量測定

6週齢の雄性Crl:CD(SD)ラットの門脈より灌流し, コラゲナーゼで消化後, 肝臓を取り出し細切した。100 μ m ナイロンメッシュで濾過し, 3回洗浄後 1×10^6 cells/wellの濃度で6ウェルプレートに撒いた。培養開始20時間後にPHO(0, 0.1, 0.5 mM), APAP(0, 3, 10 mM), またはBBZ(0, 0.4, 2 mM)の曝露を開始し, 3時間後に細胞を回収してTotal GSH Quantification Kit (同仁化学)を用いて

GSH量を測定した。また24時間後に細胞を回収してGeneChip Rat Genome 230 2.0により網羅的遺伝子発現解析を行った。

2. 血球系 *in vitro* モデルとしてのラット末梢血単核細胞(PBMC)初代培養系の構築

12週齢の雄性Crl:CD(SD)ラットをエーテル麻酔し, 腹部大動脈よりヘパリン存在下で全血採取してPBSで3倍に希釈した。あらかじめLympholyte-Rat (CEDARLANE)を入れて遠心したLeucosepリンパ球分離チューブ(グライナー)にこれに加え, 1,600 \times gで10分遠心した。PBMCの集積している層を回収し, 3回洗浄後, 10 cmカルチャーディッシュに撒いた。1日後に細胞を回収し, RNeasy mini (QIAGEN)を使用してtotal RNAを抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は同志社女子大学動物実験委員会の承認を得て行っている。使用する動物の屠殺にあたっては, 麻酔薬の使用で苦痛の少ない方法を用いるといった本学の実験動物取扱規定に従った対応を行っている。

C. 研究結果

1. ラット肝細胞 *in vitro* モデルを用いたGSH枯渇マーカー候補遺伝子の検証

PHOタイプの化合物によってGSH枯渇時に応答する遺伝子が25プロープセット, GSH枯渇後に応答する遺伝子が21プロープセット得られた。またBSOタイプの化合物によってGSH枯渇時に応答する遺伝子が14プロープセット, GSH枯渇後に応答する遺伝子が22プロープセット得られた。主成分分析の結果, いずれの遺伝子セットを用いてもPHOタイプの化合物のデータ