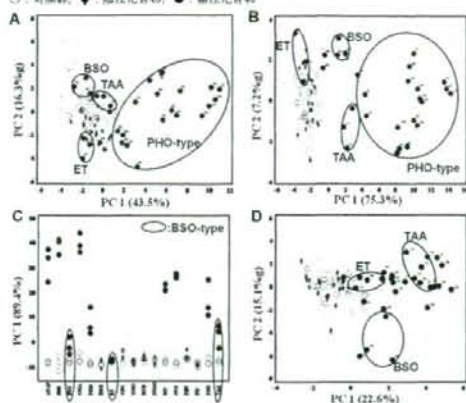


(図1) GSH枯渇メカニズム別に選択した応答遺伝子による主成分分析
 A: PHOタイプ化合物でGSH枯渇時に変動する15プローブセット, B: BSOタイプ化合物でGSH枯渇時に変動する22プローブセット, C: PHOタイプ化合物でGSH枯渇後に変動する14プローブセット, D: BSOタイプ化合物でGSH枯渇後に変動する21プローブセットによる主成分分析のプロットを示した。1点41サンプルを示す。
 ○: 対照群, ◆: 陰性化合物, ●: 陽性化合物



が対照群および GSH 枯渇陰性化合物のデータと明確に峻別された (図 1A). BSO タイプの化合物のデータは, PHO タイプで GSH 枯渇時に応答する 25 プローブセットを用いた時は対照群および陰性化合物と区別されなかったが, PHO タイプで GSH 枯渇後に応答する 14 プローブセットあるいは BSO タイプで GSH 枯渇時に応答する 21 プローブセットを用いると対照群および陰性化合物とはわずかながら峻別された (図 1B, C). BSO タイプで GSH 枯渇後に応答する 22 プローブセットを用いた場合, BSO タイプの化合物のデータは対照群および陰性化合物とは峻別されたが PHO タイプの化合物とは全く区別されなかった (図 1D). 次に両タイプ共通に反応する遺伝子セット, あるいは GSH 枯渇時・枯渇後共通に反応する遺伝子セットを抽出したところ, PHO タイプでは GSH 枯渇時・枯渇後共通に変動する遺伝子が 3 プローブセット得られた (データ非掲載). BSO タイプではそのような遺伝子は得られなかった. また GSH 枯渇後に両タイプに反応する遺伝子セットとして 14 プローブセットが得られた (表 2). この遺

(表2) GSH枯渇バイオマーカー候補14プローブセット

PHOタイプとBSOタイプでGSH枯渇後に発現変動する遺伝子を統合した45プローブセットから主成分分析で寄与度上位30%の遺伝子に絞り込んで得た。

Probe set ID	Gene name	Gene symbol
136095_at	glucosyltransferase, receptor type F	Glrf
136094_at	protein-protein phosphatase, receptor type F	Prpf2
136822_at	alkaline phosphatase family 1, member A3 (alkaline phosphatase)	Alka*3
157968_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157969_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157970_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157971_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157972_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157973_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157974_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157975_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157976_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157977_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157978_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157979_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157980_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157981_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157982_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157983_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157984_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157985_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157986_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157987_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157988_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157989_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157990_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157991_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157992_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157993_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157994_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157995_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157996_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157997_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157998_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
157999_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm
158000_at	glucosyl transferase, membrane bound	Glrfm

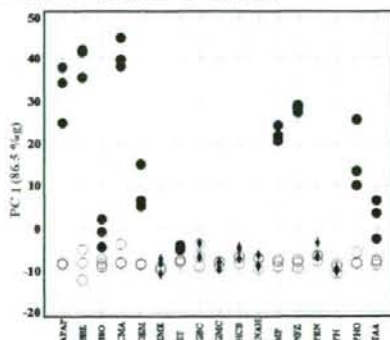
The up-regulated probe sets are in bold, and the down-regulated are in italic.

伝子セットには PHO タイプで GSH 枯渇時・枯渇後共通に変動する 3 プローブセットのうちの 2 つが含まれていた. この遺伝子セットは GSH 枯渇後 24 時間まで全時点において PHO タイプもしくは BSO タイプの化合物により発現変動する, という性質を持つことから, GSH 枯渇の起こる時点や枯渇のメカニズムがわからなくとも例えば投与 24 時間後に遺伝子発現解析を行えばその化合物が GSH 枯渇を引き起こすかどうか判断できる, というメリットがある. この 14 プローブセットを用いて主成分分析を行ったところ, PHO タイプの化合物が対照群および陰性化合物と明確に峻別され, BSO タイプの化合物についても弱いながら対照群および陰性化合物と峻別された (図 2). 従ってこの 14 プローブセットは GSH

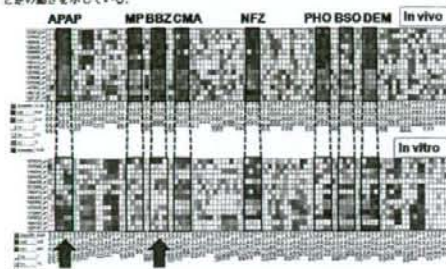
(図2) GSH枯渇バイオマーカー候補遺伝子セットによる主成分分析の二次元プロット

PHOタイプとBSOタイプでGSH枯渇後に発現変動する遺伝子を統合、絞り込みして得た14プローブセットを用いて主成分分析を行った。

○: 対照群, ◆: 陰性化合物, ●: 陽性化合物



(図3) GSH枯渇バイオマーカー候補遺伝子の*in vivo*, *in vitro*比較
 毒性化合物によりGSH枯渇に誘導する遺伝子14プローブセットについて、対照群との比較を色分けしヒートマップで示した。黄色系で発現低下、藍色系で発現上昇を示している。最上段が14プローブセットを、縦1列が1サンプルを表す。上段が*in vivo*、下段が*in vitro*であり、遺伝子の並び順は同じである。上段では高用量3例ずつ、下段では対照群、中用量、高用量各2例ずつ並んでおり、化合物の並び順は同じである。典型的なGSH枯渇陽性化合物を両方で選んでおり、その多くは*in vitro*でも*in vivo*と似た傾向を示しているが、矢印で示したAPAPとBBZは*in vitro*で遺伝子発現変動がほとんどみられない、むしろ*in vivo*と逆の動きを示している。

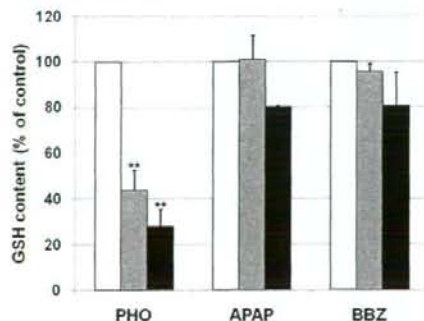


枯渇に関するバイオマーカー候補として有用であると考えられた。

そこで次にこの14プローブセットに関して*in vitro*データと比較したところ、典型的なGSH枯渇陽性化合物の殆どが*in vitro*においても*in vivo*と同様にこの遺伝子セットに反応する傾向がみられたが、例外的にAPAPとBBZが陰性を示した(図3)。そこで、APAP, BBZの曝露によりGSH枯渇が本当に起こっているかどうか検証することを試みた。ラット肝細胞を単離・培養し、PHO(0, 0.1, 0.5 mM), APAP(0, 3, 10 mM), またはBBZ(0, 0.4, 2 mM)を曝露した。この用量は、TG-GATEs 内データにおける用量と比較してPHOとAPAPは同じ、BBZは10倍である。曝露開始3時間後のGSH量を測

(図4) ラット肝細胞中の総GSH量に対する化合物の影響
 各化合物の対照群の平均値を100%として平均値+標準偏差の形で表した。□: 対照群, ■: 中用量群, ▨: 高用量群

**p < 0.01 by Tukey's test

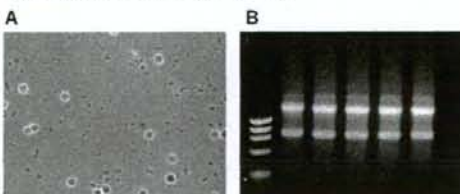


定したところ、PHOでは大幅に減少していたのに対し、APAPとBBZでは僅かな減少がみられた(図4)。曝露開始24時間後の遺伝子発現解析では、APAPは他の陽性化合物と同様にマーカー候補14プローブセットが反応したが、BBZにはほとんど反応しなかった(データ非掲載)。APAPやBBZではGSH枯渇のピークが3時間よりも遅い時点であると考えられるので、今後タイムコースをとってそれぞれピーク時のGSH枯渇がどの程度であるか検討する必要があるといえる。

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

血球系細胞においても*in vitro*での毒性メカニズム解析を可能にするため、PBMC初代培養系の構築を試みた。ラット全血よりficollを含む血球分離用試薬を用いて密度勾配遠心を行い、PBMCを多く含む層を採取して洗浄した(図5A)。今回の方法により、12週齢の雄性SDラット1匹より $4-8 \times 10^7$ 個程度のPBMCが得られた。

(図5) 分離したPBMCと培養後に抽出したtotal RNA
 A: ラット血液からPBMCとして分離した細胞。細かい点は試薬中に含まれる結晶である。B: 1日培養後に抽出したtotal RNA。1%アガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイド染色した。



抽出可能なRNA量を検討するため、この細胞を 1×10^7 cells/dishまたは 5×10^7 cells/dishの濃度で10cmディッシュに撒き、培養して1日後に細胞を回収し、total RNAを抽出した。 1×10^7 個の細胞からは3μg、 5×10^7 個の細胞からは9μgのtotal RNAが得られ、マイクロアレイ実験に必要な量が確

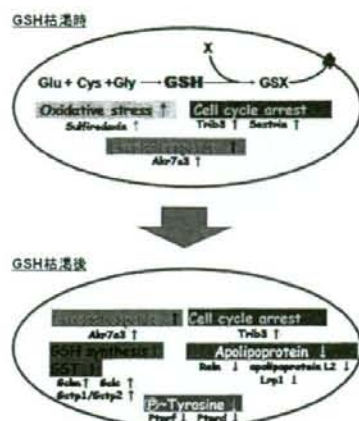
保できることがわかった。また品質も 18S, 28S の rRNA のバンドがはっきり確認でき、問題ないと考えられた (図 5B)。次に培養 1 日後に代表的な肝毒性物質であるチオアセタミド(TAA)を曝露し、24 時間後に回収したところ、total RNA は殆ど得られなかったため、以降の実験に進めることができなかった。今後検討が必要である。

D. 考察

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

当初 PHO タイプ, BSO タイプのメカニズム別にバイオマーカー候補遺伝子を得ようとしたが、両方の化合物に応答する遺伝子セットが得られ、特に BSO タイプ特異的な遺伝子セットは全く得ることができなかった。これは、枯渇メカニズム特異的に変動する遺伝子が殆ど存在しないということの意味すると考えられた。すなわち、PHO タイプと BSO タイプの化合物に応答して発現変動する遺伝子に殆ど違いはなく、応答の大きさは PHO タイプの方が大きいと考えられた。この差は急速に GSH を消費してしまう PHO タイプと GSH の合成が止まり既存の GSH が徐々に減少する BSO タイプでは組織に対するストレスが異なるためではないかと推測された。得られた発現変動遺伝子の内容からは、GSH 枯渇時 (特に PHO タイプ) にはストレス関連遺伝子の発現が誘導され、その後脂質代謝関連遺伝子や GSH 代謝関連遺伝子の発現上昇およびチロシンリン酸化関連遺伝子の発現低下がみられていた (図 6)。特に GSH 枯渇後の GSH 代謝関連遺伝子誘導はフィードバックと考えられ、枯渇後の GSH 量回復に関わってい

(図6) GSH枯渇 (PHOタイプ) による遺伝子発現変動の模式図



ることが推測された。

また抽出したバイオマーカー候補遺伝子セットについて *in vivo*, *in vitro* 間で比較したところ、APAP と BBZ で *in vitro* での応答が *in vivo* と一致しなかったが、新たに実験を行ったところ、APAP では *in vivo* と一致した結果が出た。これは TG-GATEs 中の *in vitro* データの方に何らかの不具合があったものと考えている。一方 BBZ には TG-GATEs 中のデータと同様、遺伝子発現応答が殆どみられなかった。BBZ は DMSO に溶解して培地中に分散しているが、非常に水溶性が低い細胞への曝露が殆どなされていない可能性が考えられる。曝露 3 時間後の GSH 量低下がごく僅かであることはそれを支持するものといえるが、さらに今後 GSH 量の低下がピーク時にどの程度起こっているかを測定する必要があると考えられる。

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 週齢のラット 1 匹からマイクロアレイ実験可能な量の total RNA が得られた。しかし TAA を投与した PBMC では RNA が殆ど

得られなかった。理由としては1日余分に培養している間に細胞中のRNA量が減少した、TAAの毒性で細胞が死んでしまった、などが考えられる。まず前者の可能性を検討するため、今後2日培養後のRNAも測定する予定である。その後、後者の可能性について、用量の検討なども考えていきたい。

E. 結論

今年度の研究により、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。今後検討を重ね、バイオマーカーとして使用に耐えるよう検証していきたい。

また、ラット肝細胞およびPBMCの初代培養系を立ち上げた。今後これらを用いて阻害薬投与や遺伝子導入・ノックダウンなどを利用したアプローチにより各種バイオマーカー候補遺伝子の検証を行い、バイオマーカーの確立に貢献していきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takeki Uehara, Mitsuhiro Hirode, Atsushi Ono, Naoki Kiyosawa, Ko Omura, Toshinobu Shimizu, Yumiko Mizukawa, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani, "A toxicogenomics approach for early assessment of potential non-genotoxic hepatocarcinogenicity of chemicals in rats.", *Toxicology* **250**(1): 15-26, 2008.

2. 学会発表

Weihua Gao, Yumiko Mizukama, Hiroshi Yamada, Noriyuki Nakatsu, Yosuke Minowa, Yasuo Ohno, and Tetsuro Urushidani, "Mechanism-based biomarker gene sets for

glutathione-depletion related hepatotoxicity in rat liver.", The 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2009年3月, Baltimore, MD, USA.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

平成20年度厚生労働科学研究費補助金

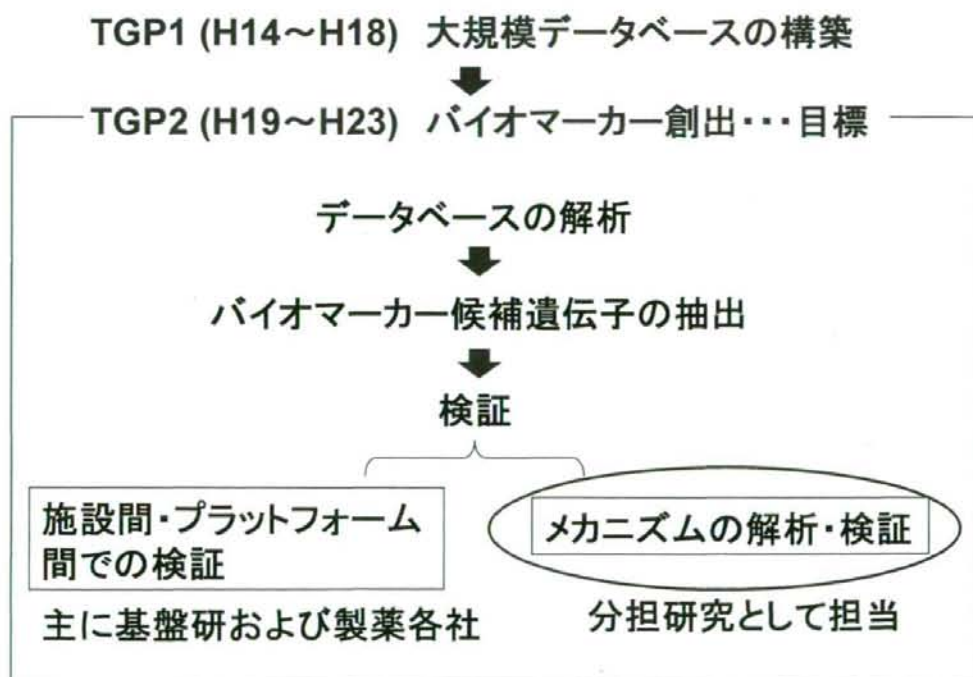
創薬基盤推進研究事業：創薬バイオマーカー探索研究事業

「トキシコゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく
医薬品安全性評価に関する研究」発表会

バイオマーカー候補遺伝子の検証

同志社女子大学薬学部 病態生理学研究室

水川 裕美子



分担研究: バイオマーカー候補遺伝子の検証

平成20年度は検証のためのin vitro実験系構築を中心に行った

1. ラット肝細胞in vitroモデルを用いたグルタチオン(GSH)枯渇マーカー候補遺伝子の検証

2. 血球系細胞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

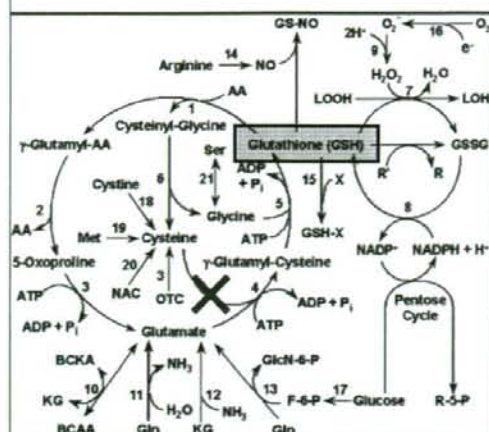
分担研究: バイオマーカー候補遺伝子の検証

平成20年度は検証のためのin vitro実験系構築を中心に行った

1. ラット肝細胞in vitroモデルを用いたグルタチオン(GSH)枯渇マーカー候補遺伝子の検証

2. 血球系細胞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

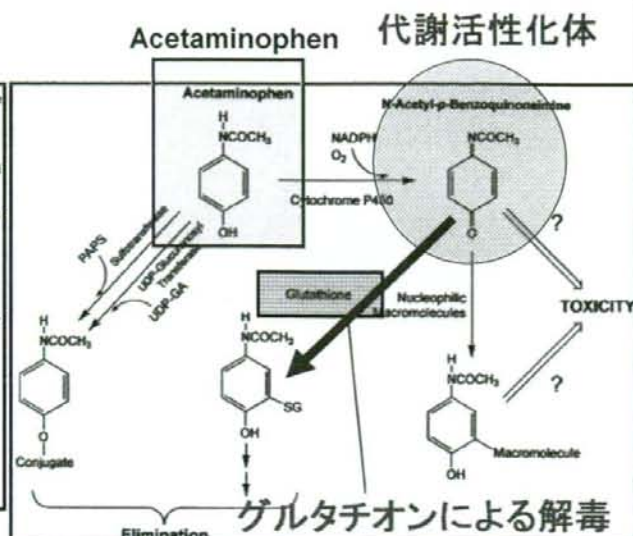
グルタチオン(GSH)と薬剤誘発性肝障害



グルタチオン生合成経路

J Nutr. 2004, 134(3):489-92

(X : BSOの阻害反応部位)



グルタチオン抱合による

代謝活性化体の解毒

Drug Metab Dispos. 2003, 31(12):1499-506

TGP1のGSH枯渇マーカー候補遺伝子に関する報告

◆Kiyosawa et al., J. Toxicol. Sci., 31, 433-448, 2006

文献中のマーカー候補遺伝子セット

(ラット in vivo 肝臓;

L-ブチオニン-スルホキシミン(BSO)投与でGSH量
変化と逆相関する遺伝子を抽出)

45プローブセット

◆Kiyosawa et al., J. Toxicol. Sci., 32, 469-486, 2007

ラット in vivo 肝臓

ホロン(PHO)投与でGSH量変化と逆相関する遺伝子
を抽出

161プローブセット

$$\text{Signal log ratio } (i) = \log_2 \left\{ \frac{\text{Average Signal } i \text{ (treated)}}{\text{Average Signal } i \text{ (control)}} \right\}$$

$$\text{Index 1} = \frac{\sum_{i=1}^N \text{Signal log ratio } (i)}{\text{Number of probe sets}}$$

$$\text{Index 2} = \frac{\sum_{i=1}^N \{ \text{Signal log ratio } (i) \}^2}{\text{Number of probe sets}}$$

$$\text{TGP1 score} = (\text{Index 1}) \times (\text{Index 2})$$

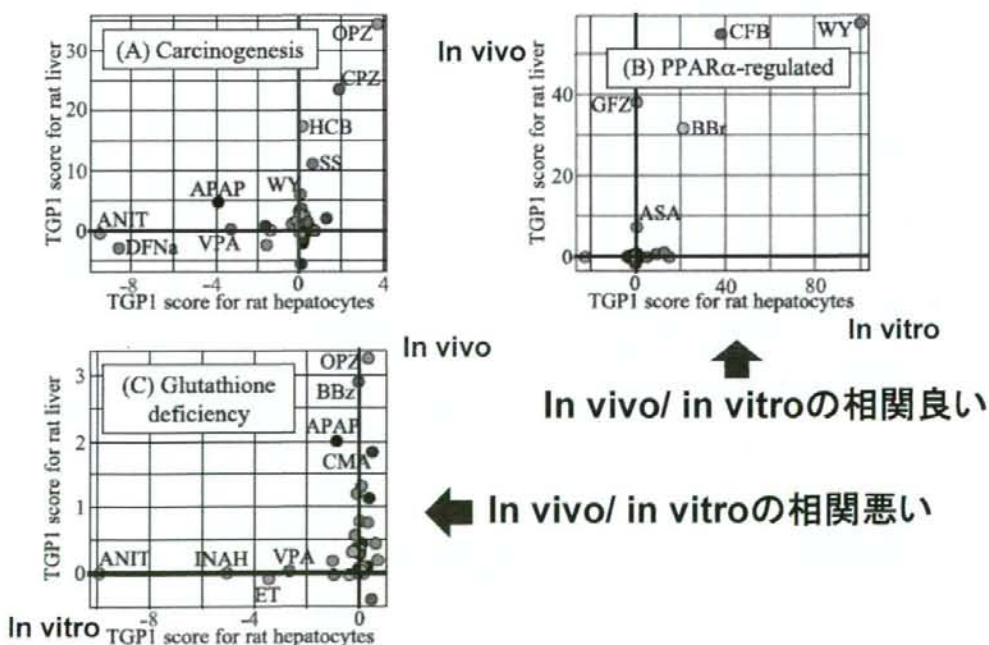


Fig. 4. Comparison of TGP1 scores between rat liver and rat hepatocytes.

Scatter plots of TGP1 scores for rat liver and rat hepatocytes are presented using (A) carcinogenesis-related genes, (B) PPAR α -regulated genes and (C) glutathione deficiency-related genes.

問題点:

いずれの遺伝子セットもin vitroでは無効
信頼性の低いプローブセットも含まれている
理論上GSH量減少の起こる時点でしか検出できない

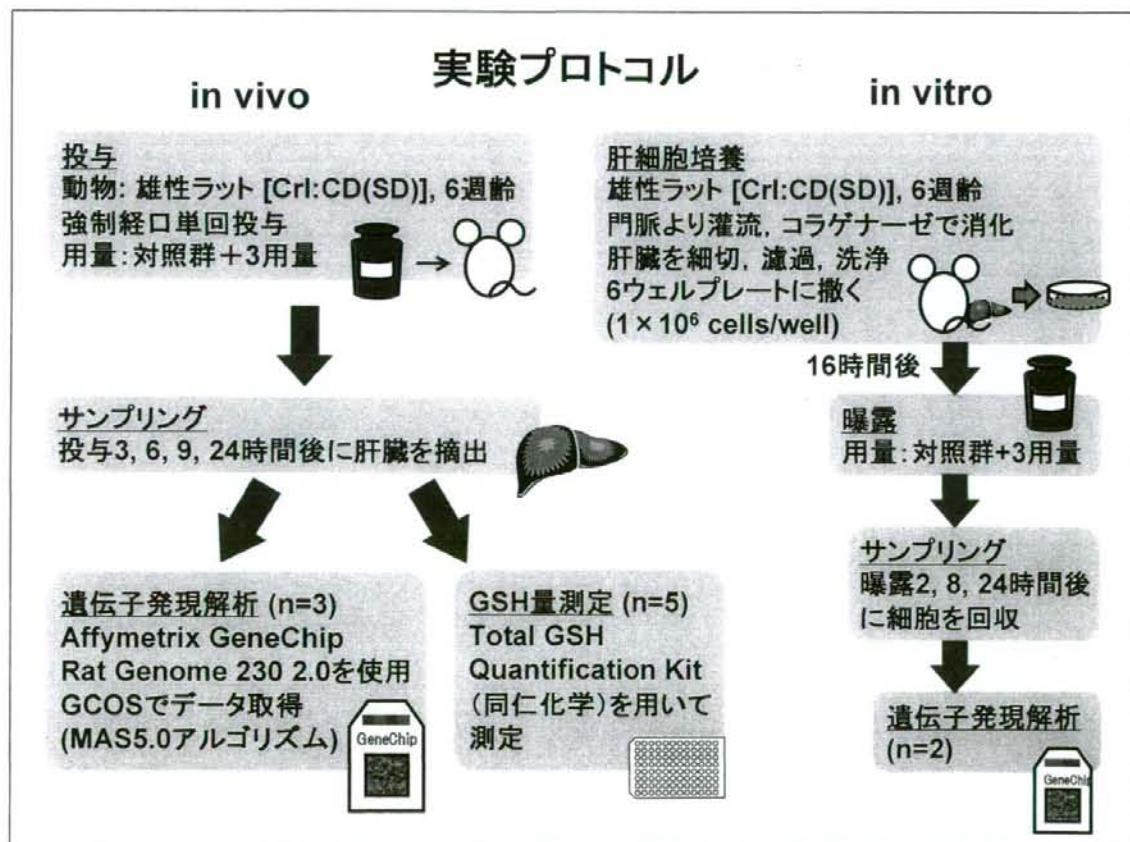
➡ 候補遺伝子を新たに探索

GSH枯渇を引き起こす化合物

PHOタイプ・・・GSHと複合体を形成することによりGSH消費
PHO, ジエチルマレイン酸(DEM),
プロモベンゼン(BBZ)など

BSOタイプ・・・GSH合成に必要な酵素を阻害
BSOなど

➡ 各タイプごとにラット肝臓でGSH量減少と同時, 及びGSH量減少後に有意に発現変動した遺伝子を抽出



Chemicals and doses (in vivo)

Compounds	Abbreviation	Dose (mg/kg)			Administration route	Vehicles
		Low	Middle	High		
Positive						
Phorone	PHO	40	120	400	IP	Corn oil
Diethyl maleate	DEM	80	240	800	IP	Corn oil
Bromobenzene	BBZ	30	100	300	PO	Corn oil
Acetaminophen	APAP	300	600	1000	PO	5% MC
Coumarin	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
Ethionine	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	INAH	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: methyl cellulose.
PO: peroral; IP: intraperitoneal; IV: intravenous

Chemicals and doses (in vitro)

Compounds	Abbreviation	Dose (mM)			Vehicles
		Low	Middle	High	
Positive					
Phorone	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
Acetaminophen	APAP	0.3	1	3	medium
Coumarin	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
Ethionine	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	INAH	0.4	2	10	medium
Penicillamine	PEN	0.4	2	10	medium
Perhexiline	PH	0.0004	0.002	0.01	DMSO

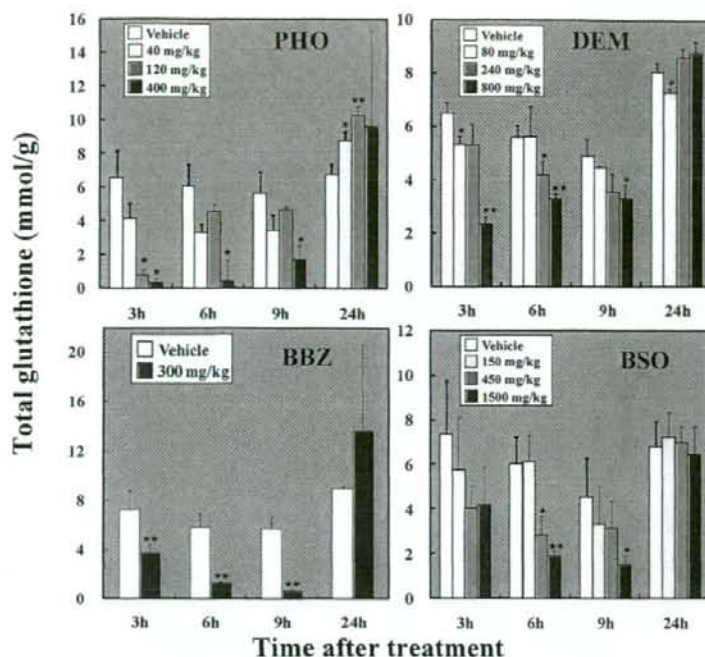


Fig. 1. Hepatic GSH content after treatment

Hepatic total GSH content data are presented as mean \pm S.D.
 ** and *, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ by Welch's *t*-test, respectively.

データ解析

In vivoデータ



GSH枯渇時に変動する遺伝子

GSH枯渇時
 (PHO, DEMでは3時間, BSO
 では6時間)のサンプル

GSH枯渇後に変動する遺伝子

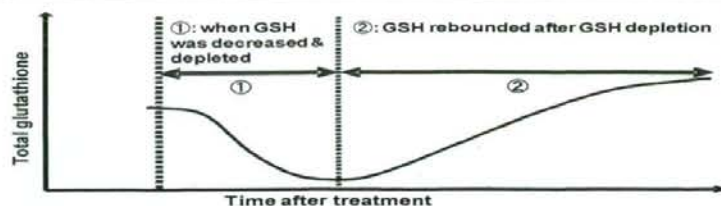
GSH枯渇後
 (PHO, DEMでは6, 9, 24時間,
 BSOでは9, 24時間)のサンプル

GSH量
 遺伝子発現シグナル値 } → スピアマンまたはピアソンの相関係数

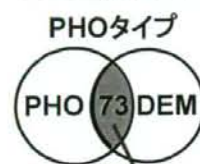
無相関検定で $p < 0.05$ のプロブセットを抽出

以下の3条件を満たすものを選択

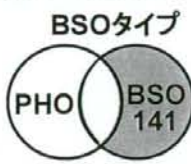
- Detection callが12サンプル中3サンプル以上で"P"
- 中用量または高用量で
 遺伝子発現シグナル値が対照群と比較して1.5倍以上変動
- ウェルチのt検定で有意



GSH枯渇時に変動する遺伝子

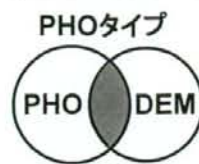


BBZでも3条件を満たす
プローブセット
25

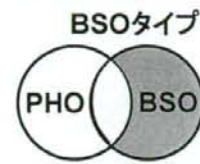


17化合物についてPCA
eigenvalue上位10%
のプローブセット 14

GSH枯渇後に変動する遺伝子



6,9,24時間共通の
プローブセット
21



9,24時間共通の
プローブセット
22



共通部分

43
↓
17化合物についてPCA
eigenvalue上位30%
のプローブセット 14

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 3110031B13	RGD1305356
1382500_at	similar to Sestrin 2 (H95) (predicted)	RGD1566319_predicted
1383315_at	hepatic protein E1H1	E1h1
1383793_at	hypothetical LOC312654 (predicted)	RGD1311909_predicted
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_predicted
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	thrombopoietin	Thpo
1388742_at	—	—
1391607_at	similar to Sestrin 2 (H95) (predicted)	RGD1566319_predicted
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)

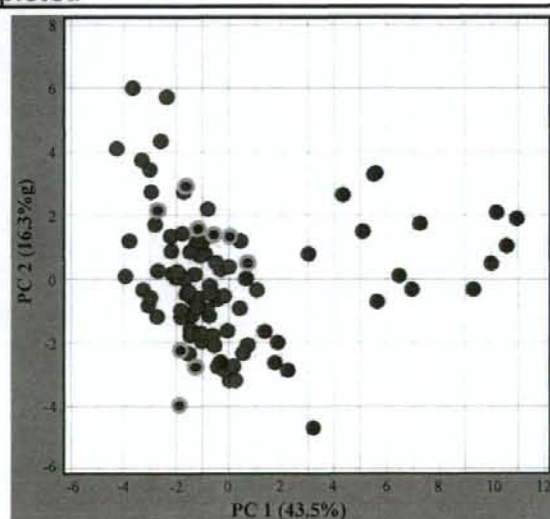
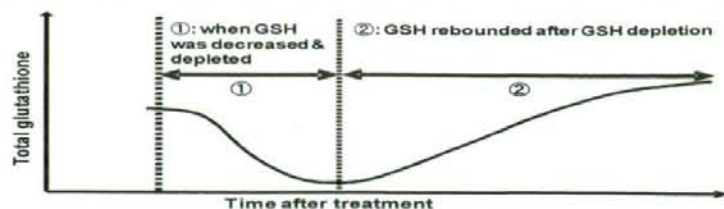
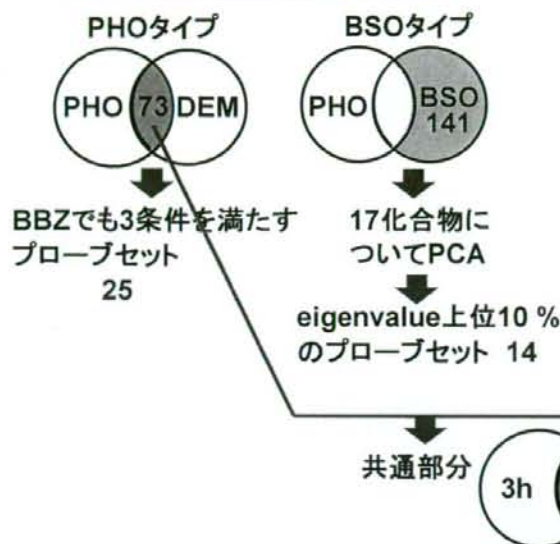


Fig. 2. Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 25 probe sets (see left) obtained from rat livers 3h after treatment of the 17 compounds. Each spot represents individual sample. The signal values were first normalized by log ratio in standard deviation units, and then by Z-score.

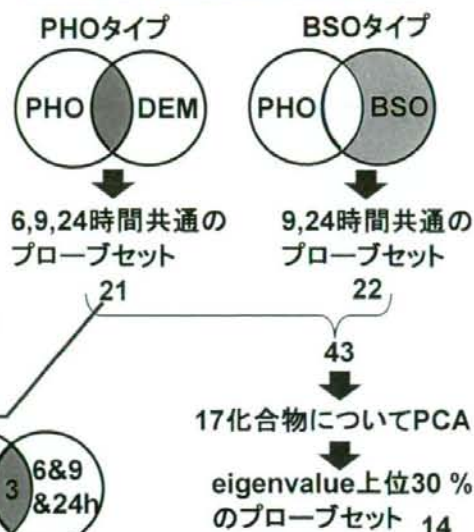
- PHO-like positive compounds
- BSO-like positive compounds
- Control and negative compounds



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 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 (nucleolar)	Gal3
1390738_at	bone marrow stromal cell antigen 2	Bot2
1374326_at	peter pan homolog (Drosophila)	Ppan
1383348_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	Psk9
1367708_at	fatty acid synthase	Fasa
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)

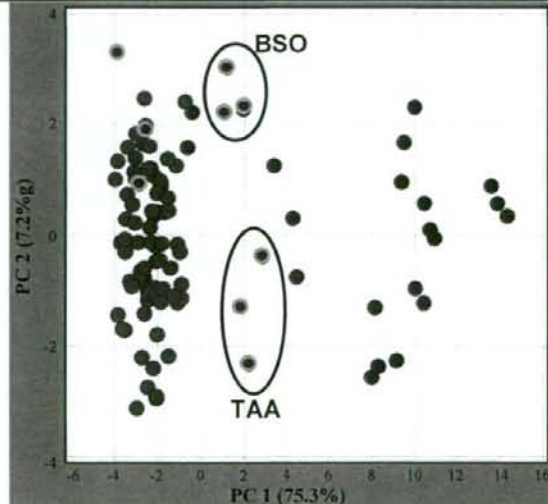
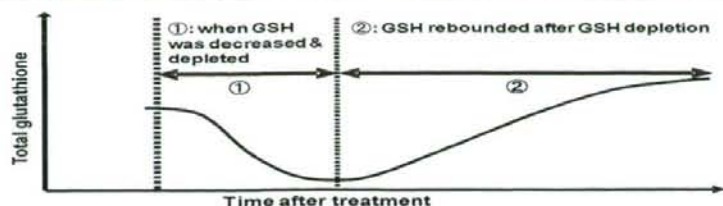


Fig. 3 Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 14 probe sets (see left) obtained from rat livers 6h after treatment of the 17 compounds. Each spot represents individual sample. The signal intensity values were normalized by log ratio in standard deviation units.

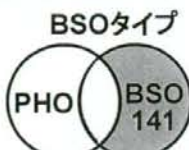
- PHO-like positive compounds
- BSO-like positive compounds
- Control and negative compounds



GSH枯渇時に変動する遺伝子



BBZでも3条件を満たす
プローブセット
25

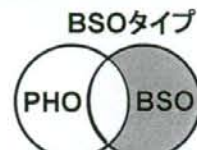


17化合物についてPCA
eigenvalue上位10%
のプローブセット 14

GSH枯渇後に変動する遺伝子

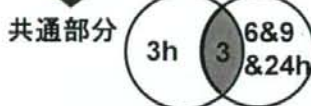


6,9,24時間共通の
プローブセット
21



9,24時間共通の
プローブセット
22

43
17化合物についてPCA
eigenvalue上位30%
のプローブセット 14



TGP2 Toxicogenomics Informatics Project in Japan

Biomarker gene sets for Hepatotoxicity after GSH-depletion induced by GSH-conjugation (PHO-type)

Table 5. The selected gene probe sets for hepatotoxicity after PHO-type GSH-depletion

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol
1368099_at	glucosamine	Gnc
1368036_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	Ptpnf
1368121_at	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)	Akr7a3
1369093_at	retin	Rctn
1370030_at	glutamate cysteine ligase, modifier subunit	Gclm
1370599_a_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	Ptpnd
1370688_at	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Gclc
1372604_at	similar to apolipoprotein L2; apolipoprotein L-II (predicted)	LOC66810
1372889_at	Transcribed locus	---
1376990_at	Transcribed locus	---
1377013_at	---	---
1379900_at	Transcribed locus	---
1381968_at	cellular repressor of E1A-stimulated genes (predicted)	Creg_predicted
1382544_at	Transcribed locus	---
1383425_at	complement component 5	C5
1386321_s_at	tribbles homolog 3 (Drosophila)	Trib3
1388122_at	glutathione-S-transferase, pi 1 // glutathione S-transferase, pi 2	Gstp1 // Gstp2
1388416_at	low density lipoprotein receptor-related protein 1	Lrp1
1388425_at	similar to RIKEN cDNA D13003B021	RGDI305890
1388911_at	DNA primase, p58 subunit	Prim2
1390692_at	cytidine 5'-triphosphate synthase (predicted)	Ctps_predicted

Yellow colored: up-regulated (9 probe sets)
Blue colored: down-regulated (12 probe sets)

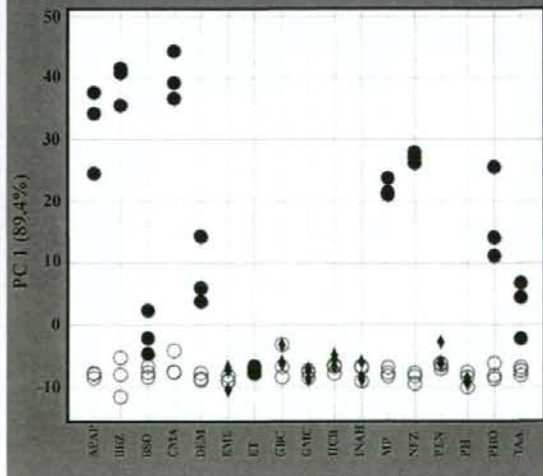
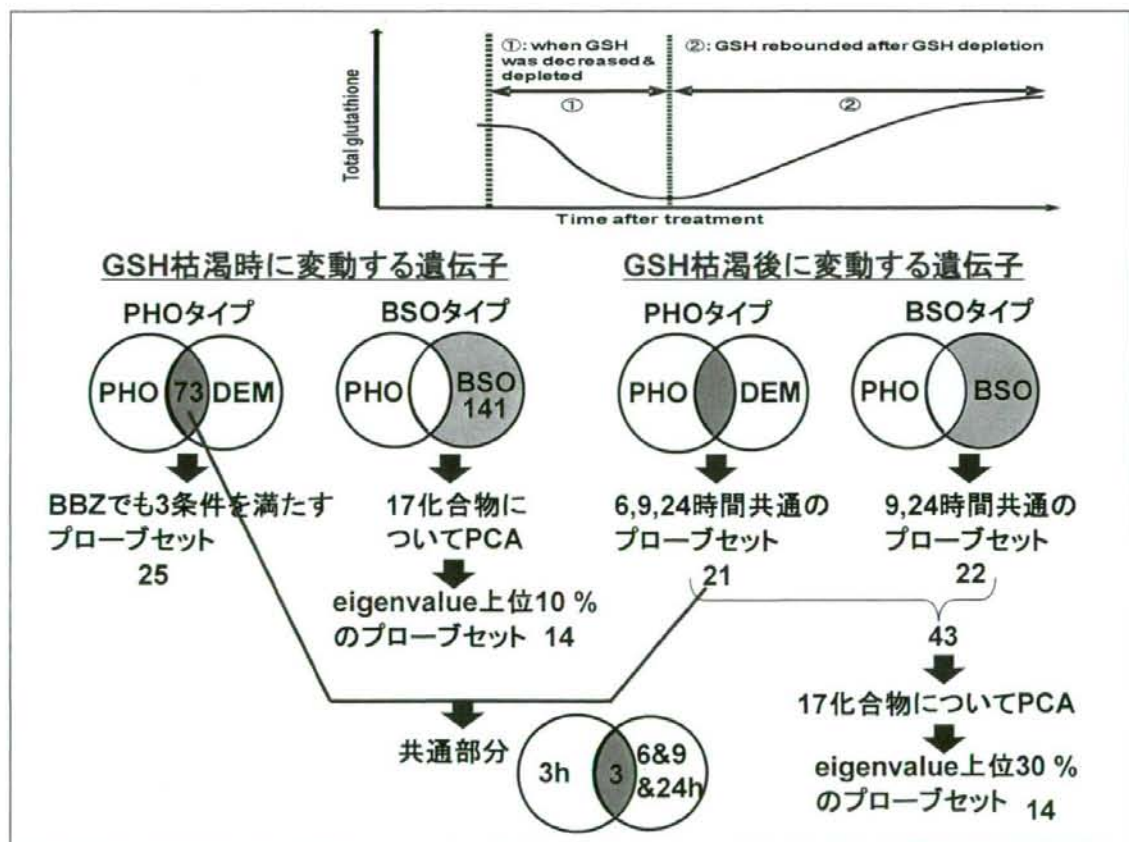
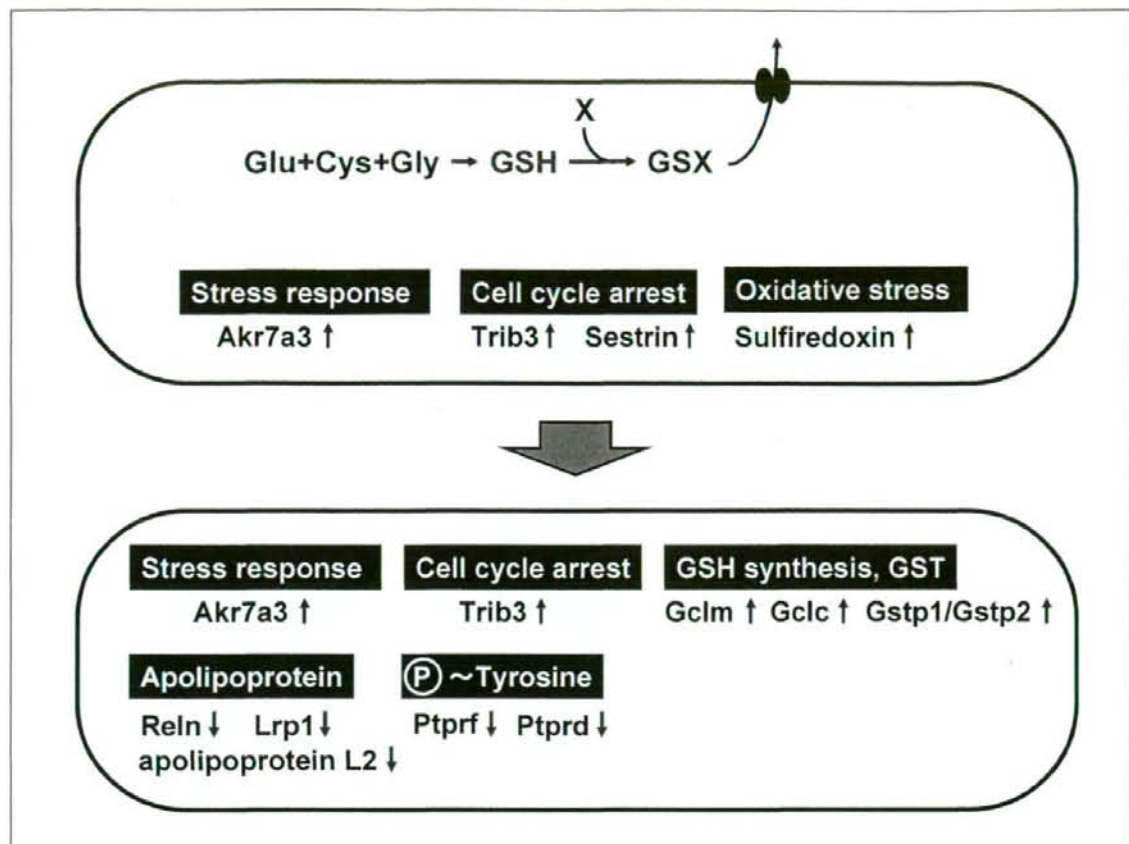


Fig. 4. Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 21 probe sets (see left) obtained from rat livers 24h after treatment of the 17 compounds. Each spot represents individual sample. PCA was performed using signal intensity values.

○ control ♦ negative compounds ● positive compounds



Biomarker gene sets for Hepatotoxicity after GSH-depletion induced by inhibition of GSH-synthesis (BSO-type)

Table 6. The selected gene probe sets for hepatotoxicity after BSO-type GSH-depletion

Probe-Set ID	Gene Title	Gene Symbol
1369840_at	integral membrane transport protein UST4r	UST4r
1372613_at	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2 (predicted)	Bdh2_predicted
1373043_at	stromal cell-derived factor 2-like 1 (predicted)	LOC683036
1377472_at	exostosin (multiple)-like 1 (predicted)	Exll1_predicted
1378131_at	similar to solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 9 (predicted)	RGD1560736_predicted
1379967_at	zinc finger protein 367	Zfp367
1379989_at	similar to Autr2 protein	LOC305633
1380262_at	Transcribed locus	---
1383401_at	similar to Testis derived transcript	LOC500040
1384312_at	Iroquois related homeobox 1 (Drosophila) (predicted) (Homeodomain protein IRXA1)	Irx1_predicted
1384380_at	Transcribed locus	---
1385398_at	zinc finger and BTB domain containing 7B (predicted)	Zbtb7b_predicted
1386261_x_at	caveolin 2	Cav2
1387022_at	aldehyde dehydrogenase family 1, member A1	Aldh1a1
1389581_at	similar to RIKEN cDNA 9230117N10	RGD1311155
1390507_at	interferon stimulated exonuclease 20	Isg20
1391848_at	---	---
1393857_at	Transcribed locus	---
1394488_at	Transcribed locus	---
1394570_at	Transcribed locus	---
1395547_at	Transcribed locus	---
1396419_at	---	---

Yellow colored: up-regulated (14 probe sets)
 Blue colored: down-regulated (8 probe sets)

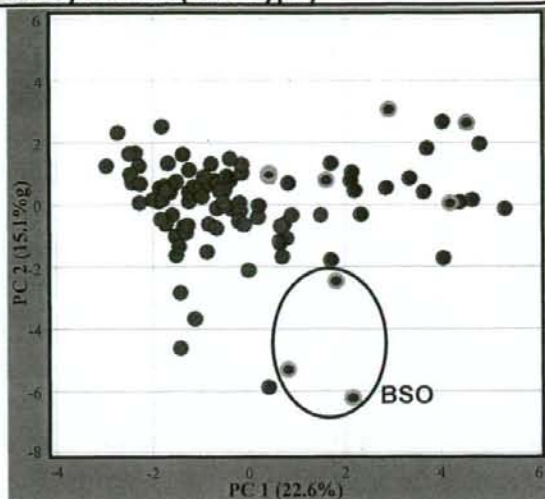
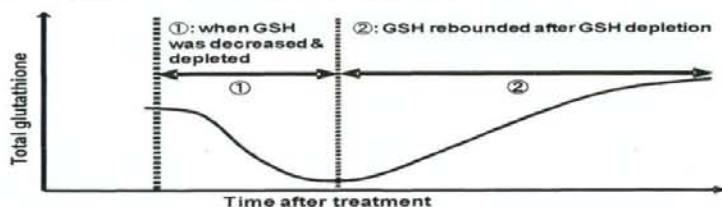
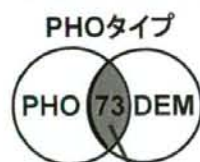


Fig. 5 Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 22 probe sets (see left) obtained from rat livers 24h after treatment of the 17 compounds. Each spot represents individual sample. The signal intensity values were normalized by log ratio in standard deviation units.

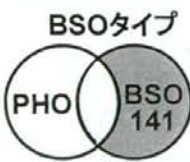
- PHO-like positive compounds
- BSO-like positive compounds
- Control and negative compounds



GSH枯渇時に変動する遺伝子

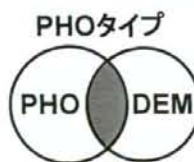


BBZでも3条件を満たす
 プロブセット
 25

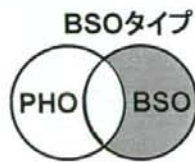


17化合物に
 ついてPCA
 eigenvalue 上位10%
 のプロブセット 14

GSH枯渇後に変動する遺伝子

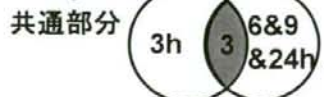


6,9,24時間共通の
 プロブセット
 21



9,24時間共通の
 プロブセット
 22

43
 ↓
 17化合物についてPCA
 eigenvalue 上位30%
 のプロブセット 14



Biomarker gene sets for Hepatotoxicity induced by GSH-conjugation

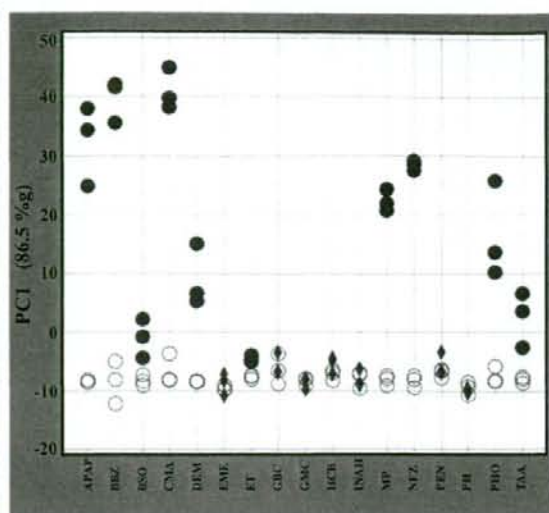
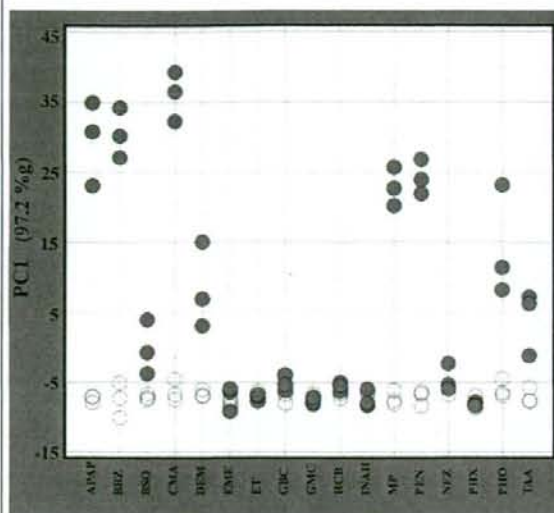


Fig. 6. Scatter plot of PCA on gene expression data sets of 3 probe sets identified as differentially expressed in response to hepatotoxicity induced by GSH-depletion through GSH-conjugation. Each spot represents individual sample. The signal intensity values were normalized by log ratio in standard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

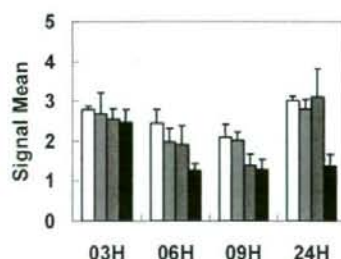
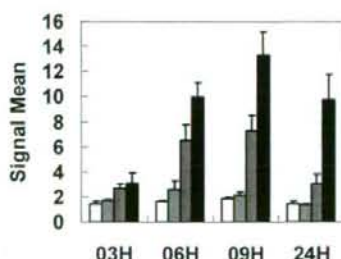
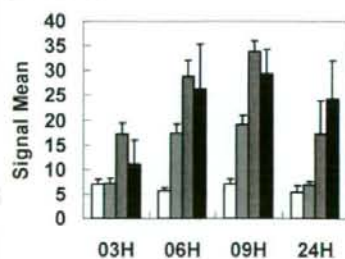
PHO-, BSO-type biomarkers after GSH depleted

PHO

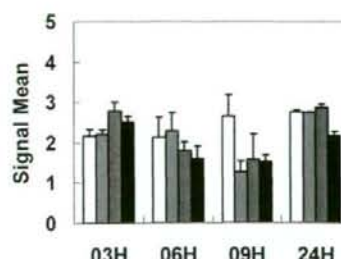
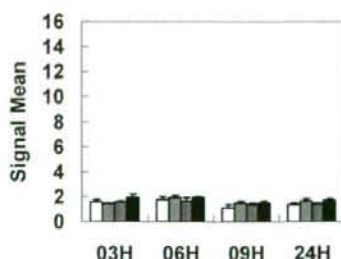
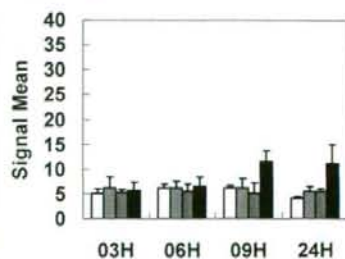
Akr7a3

Gstp1 /// Gstp2

Ptpfr



BSO

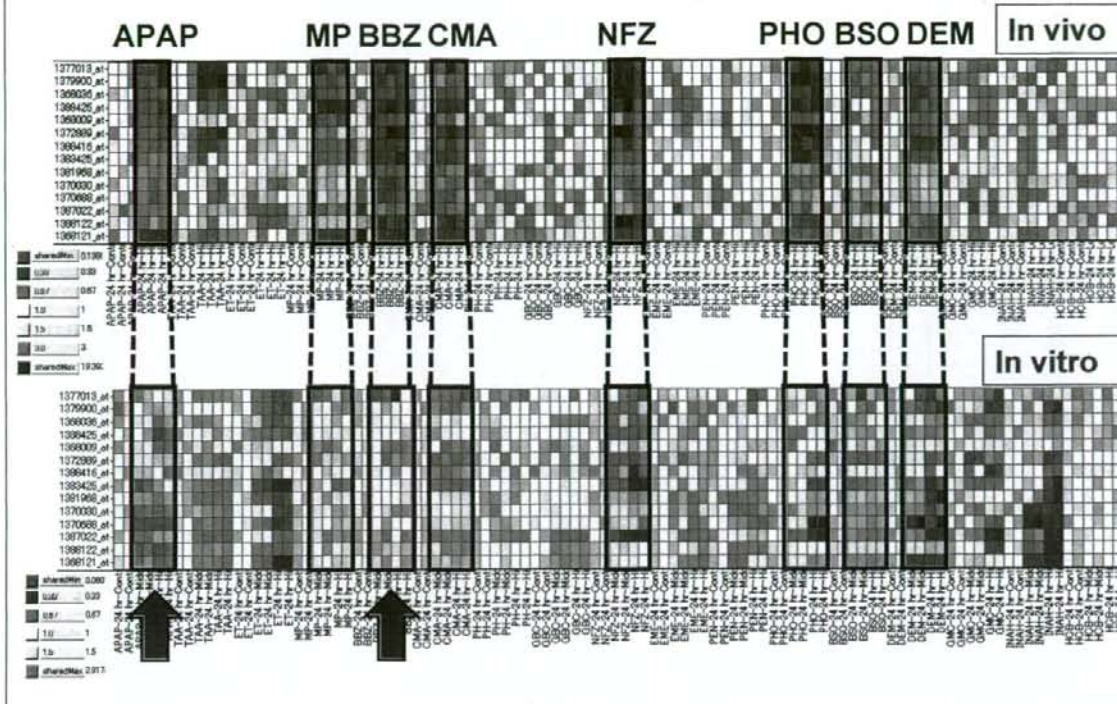


□ control ▨ low ▩ middle ■ high

PHO-, BSO-type biomarkers after GSH depleted

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

17 compounds



肝細胞初代培養

雄性ラット [Cri:CD(SD)], 6週齢
 門脈より灌流, コラゲナーゼで消化
 肝臓を取り出し細切,
 100 μ mナイロンメッシュで濾過
 3回洗浄

6ウェルプレートに撒く
 (1×10^6 cells/well)



20時間後

曝露開始

PHO(0, 0.1, 0.5 mM), APAP(0, 3, 10 mM), BBZ(0, 0.4, 2 mM)



3時間後

GSH量測定
 Total GSH
 Quantification Kit
 (同仁化学)を用いて
 測定

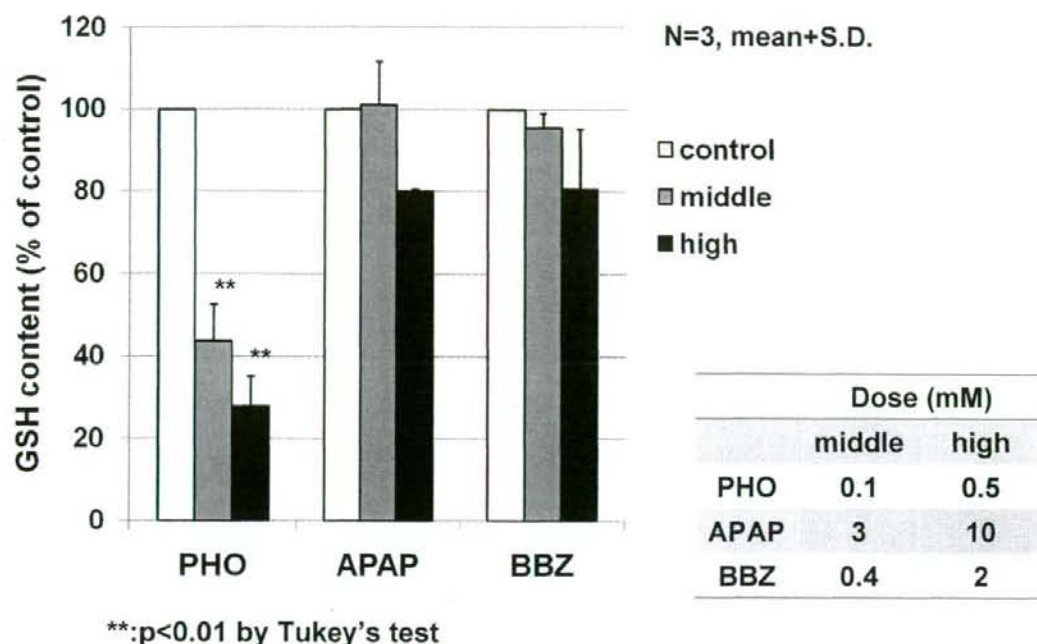


24時間後

遺伝子発現解析



ラット肝細胞中の総GSH量に対する化合物の影響



小括

◆メカニズムに基づくGSH枯渇バイオマーカーを得るため、PHOタイプ、BSOタイプに分けてGSH枯渇時および枯渇後に変動する遺伝子を抽出した (in vivo).

◆PHOタイプ→GSH枯渇時、枯渇後とも変動する遺伝子
3プローブセット

PHOタイプまたはBSOタイプ→GSH枯渇後に変動する遺伝子
14プローブセット

これらはin vitroでも有効である可能性(例外; APAP, BBZ)

◆in vitroでAPAP, BBZによるGSH量減少をとらえることができた. この用量での遺伝子発現を検討する必要がある.

➡ GSH枯渇のメカニズムや時点に依らず利用でき、かつin vitroでも有用なGSH低下リスクバイオマーカーの可能性

分担研究: バイオマーカー候補遺伝子の検証

平成20年度は検証のためのin vitro実験系構築を中心に行った

1. ラット肝細胞in vitroモデルを用いたグルタチオン(GSH)枯渇マーカー候補遺伝子の検証

2. 血球系細胞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

方法

雄性ラット[Cri:CD(SD)], 12週齢

エーテル麻酔下、腹部大動脈よりヘパリン存在下採血
PBSで3倍に希釈



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)に加える

1,600 × gで10分遠心

PBMCの集積している層を回収

細胞を3回洗浄

10 cmディッシュに撒く

↓ 1日後

細胞回収, total RNA抽出(RNeasy mini (QIAGEN)を使用)

