

200809004A

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の臨床への展開

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤村 昭夫

平成21(2009)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- トキシコゲノミクス研究の臨床への展開 ----- 1
藤村昭夫

II. 分担研究報告

1. 患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究 ----- 6
安藤 仁
箕田清次
鈴木光明
森田辰男
草間幹夫
2. Flutamideを用いたin vitroおよび動物におけるトキシコゲノミクス研究 ----- 9
安藤 仁
森田辰男
津田英利
3. プシラミンの腎障害性のin vitroにおける検討 ----- 13
牛島健太郎
津田英利
4. 薬剤性肝障害を早期に検出するための安全性バイオマーカーの開発 ----- 18
興水崇鏡

資料（総括・分担研究報告共通） ----- 21

- 資料1 自治医科大学生命倫理委員会設置規程
資料2 ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程
資料3 遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規程
資料4 研究課題名「末梢血遺伝子発現解析を用いた薬物安全性バイオマーカーの
検索」
遺伝子解析研究許可申請書・遺伝子解析研究審査結果について・
遺伝子解析研究許可申請書（再）・遺伝子解析研究許可決定通知書・
遺伝子解析研究変更許可申請書・遺伝子解析研究許可決定通知書・
遺伝子解析研究計画書（第1版）・遺伝子解析研究計画書（第2版）・
遺伝子発現解析研究への協力についての同意書（第1・2版共通）・
遺伝子解析研究への協力の同意撤回文書（第1・2版共通）・
同意説明文書（第1・2版共通）〔関節リウマチ患者用・切迫流産患者用・
前立腺癌患者用・口腔咽頭真菌症患者用〕
資料5 研究課題名「末梢血遺伝子発現解析による薬物有害反応の機序解明」
遺伝子解析研究許可申請書・遺伝子解析研究許可決定通知書・
遺伝子解析研究計画書・遺伝子発現解析研究への協力についての同意書・
遺伝子解析研究への協力の同意撤回文書・同意説明文書
資料6 自治医科大学動物実験規程

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 132

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 133

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

トキシコゲノミクス研究の臨床への展開

研究代表者 藤村昭夫 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 教授

研究要旨

薬物療法の安全性を向上させることを目的として、これまでに得られたトキシコゲノミクス研究の成果を利用して臨床研究を開始した。重篤な有害反応をきたすことが知られている 9 種類の薬物を選択し、倫理面に十分配慮した上で、いずれかの薬物を使用する患者よりその使用前で末梢血をサンプリングした。また、臨床検体における遺伝子発現情報を適切に解析するために、培養細胞および動物の遺伝子発現におよぼす 9 薬物の影響も精査しており、逐次、データを集積中である。

研究分担者

安藤 仁 自治医科大学薬理学講座
臨床薬理学部門 准教授
奥水 崇鏡 自治医科大学薬理学講座
分子薬理学部門 准教授
牛島健太郎 自治医科大学薬理学講座
臨床薬理学部門 助教
森田 辰男 自治医科大学泌尿器科学
教授
養田 清次 自治医科大学アレルギー
膠原病学 教授
鈴木 光明 自治医科大学産婦人科学
教授
草間 幹夫 自治医科大学歯科口腔
外科学 教授

労働省、萌芽の先端医療技術推進研究事業）にプライマリーヒト細胞を用いたトキシコゲノミクス研究を行い、研究基盤を整備し、次いで、平成 17-19 年度（厚生労働省、創薬基盤推進研究事業）にヒト末梢血リンパ球を用いたトキシコゲノミクス研究手法を確立した。そこで本研究では、これまでの研究成果を生かしてトキシコゲノミクス研究を臨床に展開し、薬物療法の安全性バイオマーカーを見出すこと、さらに、これらを基にして薬物の安全性を従来の毒性試験よりも正確かつ詳細に予測するシステムを開発することを目的とする。

B. 研究方法

①患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究

自治医科大学附属病院の 4 診療科を受診し、重篤な有害反応をきたすことが知られている以下の薬物を新たに使用することになった成人患者のうち、文書で研究への参加の同意が得られた者を対象に、薬物投与前で末梢血を採取した（括弧内は重篤な有害反応の種類）。

メトトレキサート（肝障害・腎障害・

A. 研究目的

多くの薬物の中には、臨床開発時あるいは一般臨床で使用時に重篤な有害反応を来とし、開発や使用が中止されるものがある。このような薬物を早期に見出し、より高い安全性を確保するための方策の 1 つとしてトキシコゲノミクスが注目されている。これまでわれわれは、平成 14-16 年度（厚生

間質性肺炎)
ブシラミン (肝障害・腎障害・間質性肺炎)
エタネルセプト (間質性肺炎)
レフルノミド (肝障害・間質性肺炎)
リトドリン (肝障害)
リュープロレリン (肝障害・間質性肺炎)
フルタミド (肝障害・間質性肺炎)
ピカルタミド (肝障害・間質性肺炎)
イトラコナゾール (肝障害)

また、薬物や有害反応の種類は限定せず、実際に有害反応をきたした患者より、有害反応出現時、有害反応軽減時の両方または一方で末梢血を採取した。

②培養細胞および動物を用いたトキシコゲノミクス研究

臨床研究で得られたデータを解析する上で、培養細胞や動物を用いたデータを利用することは有用と考えられる。そこで、①で対象とした薬物のうち、本年度はフルタミド、ブシラミン、リトドリンについて、*in vitro* または動物におけるトキシコゲノミクス情報を収集した。各薬物に対して使用した実験系は以下のとおりである。

フルタミド
HepG2 肝細胞 (24 時間曝露)
雄性 Wistar ラット (7 日間反復投与)
ブシラミン
HEK293 腎細胞 (24 時間曝露)
リトドリン
雌性 C57BL/6J マウス (14 日間反復投与)

これらの臨床研究および *in vitro* 実験、動物実験で得られた検体より RNA を抽出し、Affymetrix 社 GeneChip を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究は、ヘルシンキ宣言 (2000 年エ

ジンバラ総会で修正) の趣旨に則り、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成 16 年厚生労働省告示第 459 号) および自治医科大学の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程 (資料 1) を遵守し実施した。各臨床研究の計画は、自治医科大学生命倫理委員会設置規定 (資料 2) および遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規定 (資料 3) の定める遺伝子解析研究倫理審査委員会の審議および審査を経て、自治医科大学学長の承認を得ており (資料 4、5)、承認後に試験を開始した。

同意の取得は、倫理審査委員会および学長の承認を得た同意説明文書 (資料 4、5) を用いて行い、研究への参加に同意が得られた場合には、同意書 (資料 4、5) に説明を行った医師名を記載し、試料等提供者に同意年月日、住所の記載と、氏名の自署または記名押印をしていただいた。また、同意書の写しとともに、同意の撤回が容易にできるように同意撤回文書 (資料 4、5) を手渡した。

動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭 48 年法律第 105 号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年文部科学省告示第 71 号)、日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」および自治医科大学動物実験規程 (資料 6) に基づき、動物実験委員会の承認を得て実施した。動物愛護の観点から、実験は動物の苦痛をできる限り軽減するように努め、臓器の採取は十分な麻酔下で行った。

C. 研究結果

①患者検体を用いたトキシコゲノミクス研

究

平成 20 年 8 月 22 日より検体採取を開始し、平成 21 年 3 月 20 日現在までに計 147 サンプルを収集した。

②培養細胞および動物を用いたトキシコゲノミクス研究

《フルタミド》

HepG2 肝細胞にフルタミド 1 $\mu\text{g/ml}$ を 24 時間曝露したところ、有意な発現変動を示した遺伝子数は、発現比 1.5 倍以上、 $p < 0.05$ の条件では 71 であった (表 1)。また、Wistar ラットにフルタミド 7.5 または 75 mg/kg/day を 7 日間反復投与したところ、有意な発現変動を示した遺伝子数は、発現比 1.5 倍以上、 $p < 0.05$ の条件では、低用量群の肝で 22、血液細胞で 31、高用量群の肝で 501、血液細胞で 548 であった。

【表 1】フルタミドにより発現が変動した遺伝子数

	rat liver		rat blood		HepG2
	7.5	75	7.5	75	
Fold change 1.5, $p < 0.05$	22	501	31	548	71
Fold change 2.0, $p < 0.05$	2	159	8	237	3

《ブシラミン》

293 細胞にブシラミン (SA96) と 2 種類の代謝物 SA981、SA679 をそれぞれ 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間曝露した。発現比 2 倍以上、 $p < 0.05$ の条件では、SA96 により 2 遺伝子、SA981 により 598 遺伝子、SA679 により 612 遺伝子の発現が有意に変動した (表 2)。

《リトドリン》

C57BL マウスにリトドリン 100 または 200 mg/kg/day を 14 日間反復投与し、肝で

【表 2】薬物曝露により発現が変動した遺伝子数

SA96	$p < 0.05$	$p < 0.02$	$p < 0.01$
	FC > 1.1	943	494
FC > 1.5	24	17	14
FC > 2.0	2	2	1
FC > 3.0	0	0	0
SA981	$p < 0.05$	$p < 0.02$	$p < 0.01$
	FC > 1.1	4,293	2,811
FC > 1.5	2,010	1,699	1,263
FC > 2.0	598	529	454
FC > 3.0	83	68	63
SA679	$p < 0.05$	$p < 0.02$	$p < 0.01$
	FC > 1.1	3,491	1,164
FC > 1.5	1,843	806	282
FC > 2.0	612	288	133
FC > 3.0	185	55	29

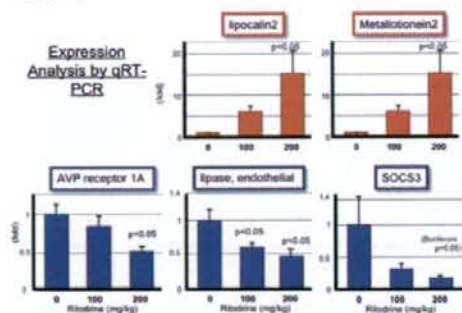
FC, fold change.

発現が有意に変化する遺伝子を調べた。その結果、発現が増加したものには Mt2 メタロチオネイン 2、lcn2 リポカリン 2、CD36 抗原等が含まれ、一方、発現が低下したものには AVPR1a バゾプレッシン受容体、SOCS3 ソックス 3 転写因子、lipg 内皮性リパーゼが含まれていた。これらの遺伝子は半定量的 RT-PCR でも発現の増減が確認された (図 1)。

D. 考察

フルタミドの遺伝子発現に対する影響を、培養肝細胞、ラット肝臓、ラット血液細胞において観察したところ、興味深いことに

【図 1】リトドリンにより発現が変動した遺伝子



発現が変動した遺伝子はそれぞれで異なっていた。培養細胞においてブシラミンにより発現が上昇した遺伝子には、Fas、HSP90AB1 などアポトーシスやストレス応答に関連する遺伝子群が含まれていた。リトドリンは、ラット肝臓の *lcn2*、*Mt2*、*AVPR1a* 等の mRNA 発現量を有意に変動させることが判明した。今後は患者検体から得られたデータと比較し、これらの同定した遺伝子群が臨床における安全性マーカーとなるか否かを明らかにしていく。

E. 結論

重篤な有害反応をきたすことが知られている 9 種類の薬物を選択し、患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究を開始した。倫理面に十分配慮した上で、いずれかの薬物を使用する患者よりその使用前後における末梢血サンプリングを実施している。また、患者検体より得られたデータを適切に解析するために、9 薬物に対するトキシコゲノミクス研究を培養細胞と動物を用いた実験系でも開始しており、本年度は 3 薬物に関するデータベースを構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Araki N, Tsuruoka S, Wang N, Hasegawa G, Yanagihara H, Ando H, Omasa T, Enosawa S, Nagai H, Fujimura A. Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: in vitro screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity. *Xenobiotica* 38(11):1355-64, 2008
- [2] Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, Shiramoto M, Tsuru T, Irie S, Fujimura A, Kaneko S. Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 52(2):329-35, 2009
- [3] Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Nakamura S, Kumazaki M, Kurita S, Misu H, Togawa N, Fukushima T, Fujimura A, Kaneko S. The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 380(3):684-8, 2009
- [4] Koshimizu T, Tsujimoto G. New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: vasopressin and pain perception. *J Pharmacol Sci* 109(1):33-7, 2009
- [5] Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Koshimizu T, Itsubo C, Sadakane K, Awaji T, Tsujimoto G. Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1: free fatty acid receptor 1).

Mol Pharmacol 75(1):85-91, 2009

[6] Tanaka T, Yano T, Adachi T, Koshimizu T, Hirasawa A, Tsujimoto G. Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377(4-6):515-22, 2008

[7] Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu T, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377(4-6):523-7, 2008

[8] Hirasawa A, Itsubo C, Sadakane K, Hara T, Shinagawa S, Koga H, Nose H, Koshimizu T, Tsujimoto G. Production and characterization of a monoclonal antibody against GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1). *Biochem Biophys Res Commun* 365(1):22-8, 2008

2. 学会発表

[1] 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究の臨床への展開. 「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 2008年12月, 東京.

[2] 津田英利, 藤村昭夫. トキシコゲノミクス手法を用いた薬物肝毒性予測の試み. 第35回日本トキシコロジー学会 2008年6月, 東京.

[3] 津田英利, 佐々木晃, 安藤仁, 奥水崇鏡, 水川裕美子, 漆谷徹郎, 藤村昭夫. 薬物の腎障害性予測における in vitro 遺伝子発現解析の施設間バリデーション. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会) 2008年12月, 神戸.

[4] 土屋裕義, 津田英利, 藤村昭夫, 奥水崇鏡. 網羅的遺伝子発現解析を用いた Ritodrine による肝毒性誘導因子の探索. 第82回日本薬理学会年会 2009年3月, 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許申請準備 1件

学内審査; 名称 新規創薬バイオマーカーの発見. 発明者; 奥水崇鏡, 土屋裕義, 山田俊幸, 藤村昭夫

患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究

研究分担者	安藤 仁	自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門	准教授
研究分担者	簗田清次	自治医科大学アレルギー膠原病学	教授
研究分担者	鈴木光明	自治医科大学産婦人科学	教授
研究分担者	森田辰男	自治医科大学泌尿器科学	教授
研究分担者	草間幹夫	自治医科大学歯科口腔外科学	教授

研究要旨

薬物の有害反応の予測法の開発および毒性機序の解明を目的に、患者の末梢血を用いたトキシコゲノミクス研究を開始した。重篤な有害反応をきたすことのある9種類の薬物を選択し、それらを投与する前後での遺伝子発現プロファイルの変化を解析中である。また、実際に有害反応を生じた患者も対象として検体を収集している。

A. 研究目的

臨床で使用されている薬物には重篤な有害反応をきたすものが少なくなく、個々の患者の治療を行う上で重大な問題となっている。また、薬物の開発には莫大な費用や手間を要するが、有害反応の出現により販売が中止された薬物も少なくない。したがって、有害反応の予測・予防法の確立や有害反応のない薬物の開発が切に望まれている。そこで本研究は、これまでにならぬ確立してきたトキシコゲノミクス研究手法を用いて、有害反応をきたすことの知られている薬物が患者の遺伝子発現におよぼす影響を網羅的に解析し、薬物の安全性バイオマーカーの同定および毒性発現機序の解明を行うことを目的とした。

B. 研究方法

①有害反応をきたすことの知られている薬物を投与後の遺伝子発現変化の解析

自治医科大学附属病院の4診療科を受診し、重篤な有害反応をきたすことが知られ

ている以下の薬物を新たに使用することになった成人患者を対象とした（括弧内は重篤な有害反応の種類）。

- メトトレキサート（肝障害・腎障害・間質性肺炎）
- ブシラミン（肝障害・腎障害・間質性肺炎）
- エタネルセプト（間質性肺炎）
- レフルノミド（肝障害・間質性肺炎）
- リトドリン（肝障害）
- リュープロレリン（肝障害・間質性肺炎）
- フルタミド（肝障害・間質性肺炎）
- ビカルタミド（肝障害・間質性肺炎）
- イトラコナゾール（肝障害）

培養細胞や実験動物と異なり、患者ではその背景因子が多様であることから、使用頻度が比較的高い薬物を選択した。

対象者より文書にて同意を取得後、試験薬の投与前（投与開始1ヵ月以内）と投与後に静脈血を採取した。試験薬投与後の採血は2回行い、外来患者の場合は、通常、試験薬投与開始後の次回再診日と次々回再診日とした（ただし、リトドリン、リュープロレリンの場合のみ、最終採取日をそれ

ぞれ試験薬終了時、試験薬投与後6ヵ月～1年後とした)。採取した全血は、直ちにバクスジーンRNA採血管に注入し、RNAを安定化させた上で-80℃に保存した。また、全血の一部より血清を分離し、-80℃に保存した。

現在、バクスジーンRNA採血管に採取した検体より、RNAの単離、cDNA合成、ラベリングを行い、Affymetrix社GeneChipを用いた遺伝子発現解析を逐次行っている。

②有害反応が出現した患者の遺伝子発現解析

①とともに、実際に有害反応をきたした患者を対象としたサンプリングも開始した。4診療科で治療中の患者のうち、現在または以前に何らかの薬物で有害反応をきたした患者を対象に、有害反応出現時、有害反応軽減時の両方または一方で静脈血を採取し、①と同様に保存、解析を行っている。

(倫理面への配慮)

これらの臨床研究は、ヘルシンキ宣言(2000年エジンバラ総会で修正)の趣旨に則り、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、臨床研究に関する倫理指針(平成16年厚生労働省告示第459号)および自治医科大学の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程(資料1)を遵守し実施している。各臨床研究の計画は、自治医科大学生命倫理委員会設置規定(資料2)および遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規定(資料3)の定める遺伝子解析研究倫理審査委員会の審議および審査を経て、自治医科大学学長の承認を得ており(資料4、5)、承認後に試験を開始した。

試料等提供者の不利益や危険性をできる限り排除するため、対象は本研究への参加

の同意が文書で得られる成人患者のみとし、高度の貧血がある者や医師により不適当と判断された者は除外した。また、研究用の採血は保険診療用の採血時に合わせてなるべく行い、保険診療で一般血液検査を行わない場合には本研究費よりその費用を支出することにより、試料等提供者の精神的、肉体的、経済的負担を生じさせないようにした。

同意の取得は、倫理審査委員会および学長の承認を得た同意説明文書(資料4、5)を用いて行い、研究への参加に同意が得られた場合には、同意書(資料4、5)に説明を行った医師名を記載し、試料等提供者に同意年月日、住所の記載と、氏名の自署または記名押印をしていただいた。また、同意書の写しとともに、同意の撤回が容易にできるように同意撤回文書(資料4、5)を手渡した。

個人情報の保護のため、研究者は提供者のエントリー後に直ちに識別コードを付し、試料、臨床データ等の匿名化を行った。なお、個人情報の電子化は行わず、匿名化の対応表は手書きのノートのみに記載し、施設した場所に厳重に管理している。

C. 研究結果

平成20年8月22日より検体採取を開始し、平成21年3月20日現在までに計147サンプルを収集した。

D. 考察

現在、解析を開始したところであり、考察できる結果はまだ得られていない。

E. 結論

倫理面に十分に配慮した上で、患者の血液検体のサンプリングを開始し、解析可能な検体数を順調に増やしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究の臨床への展開. 「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, 平成 20 年 12 月, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

Flutamideを用いたin vitroおよび動物におけるトキシコゲノミクス研究

研究分担者 安藤 仁 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 准教授
研究分担者 森田辰男 自治医科大学泌尿器科学 教授
研究協力者 津田英利 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 研究員

研究要旨

患者検体を用いて得られた遺伝子発現情報が in vitro 実験や動物実験でも得られるか否かを明らかにするため、HepG2 肝細胞とラットに flutamide を曝露した際の遺伝子発現情報を収集した。その結果、HepG2、ラット肝臓、ラット血液細胞では flutamide により発現が変化する遺伝子が異なっていることが明らかになった。今後、患者検体の解析結果との比較を行う予定である。

A. 研究目的

薬物有害反応の発現予測や機序解明が、in vitro 実験や動物実験を用いて可能になれば理想的である。そこで、本分担研究では、「患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究」で得られた flutamide に関するデータが in vitro 実験および動物実験でも得られるか否かを明らかにする目的で、flutamide を培養細胞および動物に曝露した際の遺伝子発現データを収集した。

B. 研究方法

①in vitro 実験系の確立

Flutamide の肝毒性は、代謝物である 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (Flu-1) が CYP3A4 により酸化された Flu-1-N-OH によりもたらされることが報告されている。そこで、HepG2 細胞と CYP3A4（およびグルタミン合成酵素）を強制発現させた HepG2-GS-3A4 細胞に、flutamide と Flu-1 をそれぞれ 0、0.01、0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間曝露し、ATP アッセイを用いて細胞生存

率を調べることによって、肝障害の有無を判別することのできる in vitro 実験系を確立した。

②in vitro における遺伝子発現解析

HepG2 に flutamide 1 $\mu\text{g/ml}$ または vehicle (DMSO) を 24 時間曝露し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。Bioanalyzer2100 (Agilent)により RNA のクオリティをチェック後に Ovation RNA Amplification System V2 (NuGEN)を用いて cDNA の合成・増幅を行い、FL-Ovation V2 を用いて cDNA ラベリング・断片化を行った。これを GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)へ Hybridization した。洗浄・染色後、スキャナーでスキャンし、蛍光イメージを取得した。遺伝子発現解析は GeneSpring GX10 (Agilent)を用いて行った。

③動物における遺伝子発現解析

雄性 Wistar ラットを 10 週齢で購入し、2 週間馴化後に 3 群に分け、薬物を 7 日間反復投与した：(1)対照群 (n=4) vehicle

(0.5% carboxymethylcellulose sodium)、(2)低用量群(n=3) 7.5 mg/kg/day (ヒトの臨床用量に相当)、(3)高用量群(n=3) 75 mg/kg/day(ヒトの臨床用量の10倍に相当)。薬物最終投与 24 時間後に肝臓と血液を採取し、それぞれ RNAlater、PAXgene 採血管を用いて RNA を安定化させた後に-80℃で保存した。また、全血の一部より血清を分離し、血液生化学検査を行った。

肝臓および全血からの RNA 抽出は、それぞれ RNeasy Mini Kit、PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN)を用いて行い、全血 RNA は GLOBINclear Kit (Applied Biosystems)により globin mRNA を除去した。その後、in vitro 実験と同様に、cDNA 合成、ラベリング、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)による遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

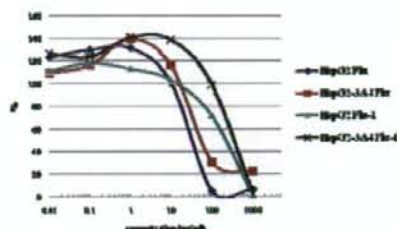
動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭 48 年法律第 105 号)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)、日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」および自治医科大学動物実験規程(資料 6)に基づき、動物実験委員会の承認を得て実施した。動物愛護の観点から、実験は動物の苦痛をできる限り軽減するように努め、血液および肝臓の採取はネブタールを用いた十分な麻酔下で行った。

C. 研究結果

細胞生存率は Flutamide 曝露群、Flu-1 曝露群の両群とも 10 μ g/ml より低下し、濃度依存的に細胞障害性を示すことが確認された。また、予想に反し、100 μ g/ml で

は flutamide 曝露群の方が Flu-1 曝露群に比べ強い細胞障害性を示した(図 1)。

【図 1】 Flutamide および Flu-1 曝露後の細胞生存率

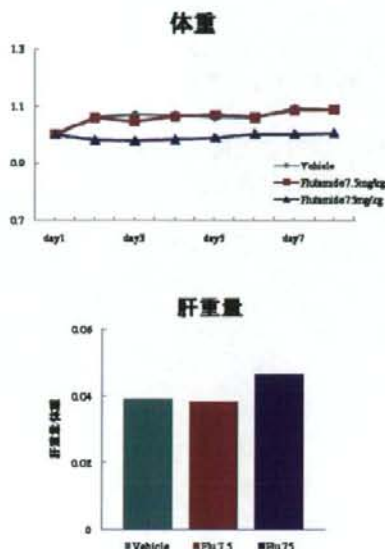


これらのことから、本研究で用いる in vitro 実験系として、最も強い細胞障害性を示す HepG2 と flutamide の組み合わせを選択した。また、flutamide とその活性代謝物である OH-flutamide を合わせた血中濃度が約 1 μ g/ml であること、10 μ g/ml 以上では実際に細胞障害が出現するために薬物による直接の影響が判別しにくくなる可能性があることから、用いる薬物濃度は 1 μ g/ml とした。

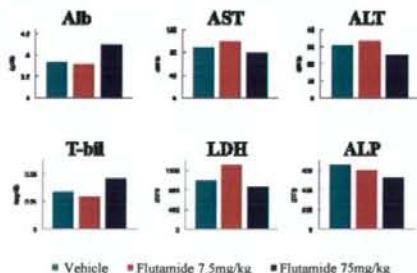
これらの条件下で実験を行い、細胞より抽出した RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、有意な発現変動を示した遺伝子数は、発現比 1.5 倍以上、 $p < 0.05$ の条件では 71、発現比 2 倍以上、 $p < 0.05$ の条件では 3 であった(表 1)。

次に、ラットにおける flutamide の影響を検討した。図 2 に示すように、体重は対照群と低用量群では増加したが高用量群では増加しなかった。また、高用量群では軽度の肝腫大を認めた(図 2)。肝機能値に関しては、高用量群においても明らかな異常は認められなかった(図 3)。有意な発現変動を示した遺伝子数は、発現比 1.5 倍以上、 $p < 0.05$ の条件では、低用量群の肝で 22、血液細胞で 31、高用量群の肝で 501、血液細胞で 548 であった(表 1)。

【図 2】 ラットの体重と肝重量におよぼす Flutamide の影響



【図 3】 ラットの肝機能値におよぼす Flutamide の影響



【表 1】 Flutamide により発現が変動した遺伝子数

	rat liver		rat blood		HepG2
	7.5	75	7.5	75	
Fold change 1.5, p<0.05	22	501	31	548	71
Fold change 2.0, p<0.05	2	159	8	237	3

D. 考察

HepG2 やヒトの臨床用量を投与したラットでは、flutamide により発現量が影響を受けた遺伝子は比較的少なかった。一方、臨床用量の 10 倍量を投与したラットでは、変動した遺伝子数は著明に増加した。現在、これらの有意な変動を示した遺伝子について比較解析を進めている。興味深いことに、HepG2 とラット肝臓、ラット肝臓とラット血液細胞、低用量群と高用量群のいずれの組み合わせにおいても、重複する遺伝子はほとんどなかった。今後は、患者から収集した検体の解析結果と比較し、肝障害の機序やその予測に関連する遺伝子を明らかにする予定である。

E. 結論

培養肝細胞およびラット生体内（肝、血液細胞）の遺伝子発現におよぼす flutamide の影響をデータベース化した。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Araki N, Tsuruoka S, Wang N, Hasegawa G, Yanagihara H, Ando H, Omasa T, Enosawa S, Nagai H, Fujimura A. Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: in vitro screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity. *Xenobiotica* 38(11):1355-64, 2008

[2] Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, Shiramoto M, Tsuru T, Irie S, Fujimura A, Kaneko S. Clock gene expression in peripheral leucocytes of

patients with type 2 diabetes.
Diabetologia 52(2):329-35, 2009

[3] Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Nakamura S, Kumazaki M, Kurita S, Misu H, Togawa N, Fukushima T, Fujimura A, Kaneko S. The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 380(3):684-8, 2009

2. 学会発表

[1] 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究の臨床への展開. 「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. 平成 20 年 12 月, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

ブシラミンの腎障害性の in vitro における検討

研究分担者 牛島健太郎 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 助教
研究協力者 津田英利 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 研究員

研究要旨

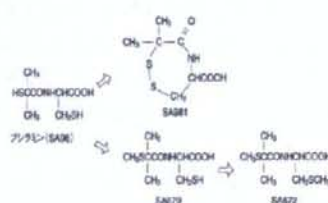
抗リウマチ薬であるブシラミンを投与した患者検体から得られたデータを解析する上で、培養細胞や動物を用いた毒性学的な基礎データを利用することは有用と考えられる。そこで本研究では、まず、ブシラミンおよび代謝物の培養細胞に対する細胞障害性を明らかにした。さらに、臨床用量に相当する濃度のブシラミンあるいは代謝物を 293 細胞に曝露し、発現量が影響される遺伝子群を抽出した。

A. 研究目的

ブシラミンは長く使われている抗リウマチ薬であり、その腎障害も良く知られているが、まだそのメカニズムは不明であり、より適切な投薬方法や、腎障害を予期出来るバイオマーカーは明らかになっていない。それらを解明するための一つのアプローチとして現在臨床試験においてブシラミンが投与された患者の全血サンプルを集め、血球の遺伝子発現プロファイルの取得を試みている。今後基礎的データの蓄積を行い、臨床データと比較することは意義が高いと思われる。そこでまず基礎検討として、培養細胞にブシラミンを曝露し、その遺伝子発現プロファイルを取得し、ブシラミンによりどの様な遺伝子の発現が変動しているのか検討することとした。

ブシラミン(SA96)は活性体であるが、投与後ヒト血中に 3 種類の代謝物が確認されている(図 1)。SA672 を除く 2 種類の代謝物は、親化合物である SA96 と同等の血中濃度を示し、かつ同程度かそれ以上の活性を持つことが知られている。培養細胞の様な単一で単純な系では代謝産物がヒト体内と同様に産生されることは望めない。そ

こで活性も血中濃度も低い SA672 を除く 2 種類の代謝物、SA981 と SA679 をそれぞれ培養細胞へ曝露し、SA96 と同様に遺伝子発現プロファイルの取得を試みた。



【図 1 ブシラミンの推定代謝経路と代謝産物】

B. 研究方法

1) 薬物の細胞増殖に対する影響の確認

SA96、SA981 および SA679 の標準的な曝露量は臨床用量による血中濃度を参考にした。当研究室で開発した一日最大投用量から算出する方法により、各薬物の標準曝露濃度を $1\mu\text{g/mL}$ とした。この用量は無毒性量であると考えられるため、この用量を基に、0, 0.1, 1, 10, $100\mu\text{g/mL}$ を選択し、細胞活性に対する影響を細胞内ミトコンドリアにおける ATP 量を測定することにより

評価した。96well plateに 5×10^3 cells/wellになる様に播種したヒト胎児腎由来である293細胞に対して、各濃度に希釈した化合物を総量100 μ Lになる様に曝露した。曝露24時間後に、「細胞のATP試薬」(東洋インク)を等量加え、ATP量をルシフェリンの発光量に換算して測定した。0 μ g/mLを曝露した時の細胞活性を100%とし、各化合物、各濃度での細胞活性を相対的に評価した。

2) 各化合物の遺伝子発現プロファイルの解析

臨床サンプルとの比較を行うことを前提としているため、培養細胞へのSA69およびSA981とSA679の曝露の濃度は前述にもあるように1 μ g/mLとした。曝露対象は293細胞とした。293細胞を6well plateに 5×10^5 cells/mLで各薬物n=3となる様に播種し、24時間後にPBS(-)にて1度洗浄後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。vehicle群には薬物の溶媒であるDMSOを薬物曝露群と同量になる様に加えた。抽出したRNAはNanoDropにて濃度を測定後、BioAnalyzerにて電気泳動を行いRNAの品質チェックを行った。全てのサンプルがRNA Integrity Number (RIN)が8以上あることを確認した後に、OVATION RNA Amplification System V2 (NuGen)を用いてcDNAを合成し、FL-OVATION cDNA Biotin Module V2 (NuGen)にてcDNAのビオチンラベルおよび断片化を行った。得られたビオチンラベル化cDNAはGeneChip Human Genome U133 plus 2.0 (HG-U133 plus 2.0, Affymetrix)を用いて遺伝子発現プロファイルを取得した。得られたデータはGeneSpring 10.0 (Agilent)を用いてMAS5形式にてnormalizationを行った後、各filtrationを行い、vehicle群と各薬物群で比較を行った。

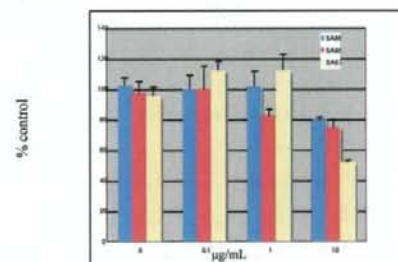
(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトの検体や動物を用いておらず、遺伝子改変等の操作も行っていないため、倫理面は特に問題はなかった。

C. 研究結果

1) 細胞増殖に対する影響

各化合物を293細胞に曝露し、24時間後にATP活性を測定したところ、0.1及び1 μ g/mLではSA981でATP活性が落ち、10 μ g/mLでは全ての化合物でATP活性が0 μ g/mLと比較して80%以下に落ちることが分かった(図2)。

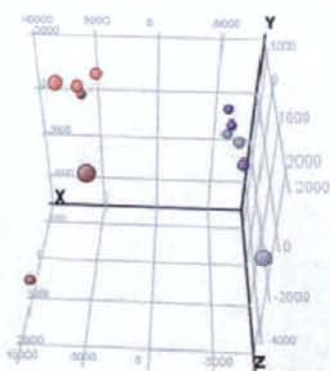


【図2 293細胞へ各薬物を曝露した時の細胞ATP活性】

2) 遺伝子発現プロファイルの解析

得られたRNAのRINを調べた結果、全ての検体はマイクロアレイで解析して良いグレードであった。GeneSpringへはCELファイルのままデータをインポートし、vehicle、SA96、SA981、SA679各n=3合計12のデータを一つにまとめ、ノイズリダクションを行った。ハウスキーピングジーンにおけるQCを主成分分析にて行った結果、各薬物曝露群はほぼ一塊になっており、特に大きく外れた値を示したデータは見られなかった(図3)。このことから、今回得られたデータを全て採用し、解析に用いることとした。

MAS5アルゴリズムによりつけられた各遺伝子のpresent or absence callにより、



- SA981 ● SA679
- SA96 ● vehicle

【図 3 マイクロアレイデータの house keeping gene によるデータ QC を目的と下主成分分析】

12 サンプル中 6 サンプルで present、すなわち発現ありと判断された遺伝子数は 54,675 中 32,259 遺伝子であった。またこれを群間の信頼度によるフィルターをかけると 10,986 の遺伝子が候補として残った。この 10,986 遺伝子を用い、vehicle 群と各化合物曝露群との比較を行い、2 倍以上の発現変動(FC)を示し、 $p < 0.05$ 以上の信頼度をもつ遺伝子を求めたところ、SA96 では 2 遺伝子、SA981 では 598 遺伝子、SA679 では 612 遺伝子が絞りこまれた(表 1)。SA96 に関しては FC を 1.5 にまで下げると 24 遺伝子が絞り込まれた。ここで絞り込まれた SA96 の 2 遺伝子は全て SA981 および SA679 に含まれており、また SA679 の絞り込み遺伝子も多くが SA981 と重なっていたため、SA981 の結果を基にさらに解析した。

SA981 により絞り込まれた遺伝子リストを GeneSpring 10.0 に内包されているパスウェイ解析を用いて解析したところ、酸化還元に関連する酵素や、ストレス応答遺伝

【表 1 薬物曝露によって vehicle 群と比較して変動した遺伝子数】

SA96			
	$p < 0.05$	$p < 0.02$	$p < 0.01$
FC > 1.1	943	494	282
FC > 1.5	24	17	14
FC > 2.0	2	2	1
FC > 3.0	0	0	0

SA981			
	$p < 0.05$	$p < 0.02$	$p < 0.01$
FC > 1.1	4,293	2,811	1,746
FC > 1.5	2,010	1,699	1,263
FC > 2.0	598	529	454
FC > 3.0	83	68	63

SA679			
	$p < 0.05$	$p < 0.02$	$p < 0.01$
FC > 1.1	3,491	1,164	333
FC > 1.5	1,843	808	282
FC > 2.0	612	288	133
FC > 3.0	185	55	29

子、またアポトーシスに関連する遺伝子やそれに相互作用する遺伝子が多く含まれていた。そこで抽出された遺伝子を化合物の曝露により発現が上昇した遺伝子と減少した遺伝子に分け、それぞれ一部分を抜粋したものを表 2 に示した。

D. 考察

親化合物である SA96 および代謝物であり活性も持つ SA981 と SA679 の細胞に対する障害性を評価したところ $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ までの濃度ではほとんど影響が無く、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上になると各化合物で細胞障害性

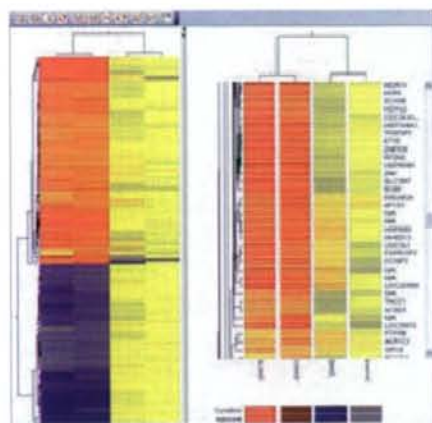
【表2 SA981において絞り込まれた遺伝子のうちアポトーシスおよび酸化還元に関連する遺伝子のリスト】

SA981で発現上昇した遺伝子抜粋

Probe Set ID	Vehicle	SA981	Gene	Gene Symbol	
21483A_at	3.00E-05	2.249E-02	0.00096280	0.0170714	0.0140267 HSP90AB1
21484A_at	2.21E-05	1.338E-06	0.249003	1.893038	0.00897142 HSP90B1
21571A_at	5.01E-06	1.31842E	0.14997788	1.041925	0.00700238 Fas
20128A_at	1.23E-05	1.17370E	0.10902079	1.154934	0.00402087 G2E2
20897A_at	6.83E-05	1.21873E	0.10208284	1.231919	0.00619461 HNF1A
20996A_at	1.03E-04	1.03847E	0.00378754	1.2794334	0.00440388 GLRX3
20919A_at	0.00090938	0.0037787	0.4497793	1.163205	0.1989158 AKR1C3
21813A_at	0.00209109	1.02670E	0.0504883	1.074965	0.0105418 HES1A7
20171A_at	0.01260783	1.00730E	0.00504487	1.190982	0.00101514 PYZ2
20189A_at	0.00123857	1.04423E	0.00463653	1.019987	0.1048126 LTRAC1
20146A_at	1.54E-04	1.26251E	0.00208888	1.320479	0.0114902 GCM3
20194A_at	3.90E-05	0.84642E	0.04816488	1.1008912	0.0174233 APOE
20995A_at	0.00747238	0.282567E	0.4548002	0.8488288	0.00523382 DCL3L1

SA981で発現減少した遺伝子抜粋

Probe Set ID	Vehicle	SA981	Gene	Gene Symbol	
20816A_at	1.24E-05	-1.02481E	-0.1801717	-1.254887	-0.00020275 BAD
20170A_at	1.42E-04	-1.70157E	-0.00700806	-1.031903	0.00000004 DACT1
21273A_at	0.12E-05	-1.34848E	-0.1045041	-1.152771	0.01088218 FASN
22279A_at	0.20E-05	-1.00789E	0.00002819	-1.214267	0.01098158 SREBF4
22521A_at	2.88E-05	-1.30684E	0.00308473	-1.237864	0.00706826 SCD
22547A_at	0.04E-04	-1.30894E	-0.04897888	-1.301138	0.00168578 RXR13
22817A_at	6.02E-04	-0.29283E	-0.02941040	-1.007715	0.017908 DPPK13
22014A_at	4.24E-05	-1.03827E	-0.1737027	-1.044881	0.00488299 DUS15
20145A_at	0.00441216	-1.08103E	0.00055471	-0.846284	0.18184791 LEO
20418A_at	1.25E-04	-1.00974E	0.13287838	-1.191905	0.000491478 BAPC1H
21421A_at	1.03E-04	-1.78812E	0.00010181	-1.254482	0.02057006 FTH1
21486A_at	1.70E-04	-0.98084E	-0.0138205	-0.842828	0.00500517 SOD
20498A_at	0.00189473	-1.04942E	-0.10588485	-1.000183	0.0104687 SVA1
20471A_at	6.84E-04	-0.88702E	0.0340771	-0.8174704	0.00480434 YW1



【図4 SA981で絞り込まれた変動遺伝子の階層化クラスタリングとヒートマップ】

が見られた。中でもSA981は1 μ g/mLでも若干細胞障害が見られ、既存の報告と同様、3つの化合物の中で最も活性が強いと考えられた。また、in vitroの研究で臨床濃度として用いた1 μ g/mLは、細胞に対しては無毒性量だと思われ、細胞への影響をより早期に発見するという目的のためには妥当であると考えられた。

細胞へ各化合物を曝露したときの遺伝子発現プロファイルをvehicleと比較し、最終的にvolcano plotによる絞り込みを行った結果、2倍以上の発現変動(FC > 2.0)を来とし、信頼度 p < 0.05のcut off値を設定したところ、SA96では2遺伝子、SA981では598遺伝子、SA679では612遺伝子が絞り込まれた。SA69で絞り込み遺伝子が少なかった理由は不明ではあるが、SA981を基に階層化クラスタリングを行った結果、SA981とSA679の間では強い相関が見られ(図4)、SA96においても弱いながらSA981およびSA679に対して相関が見られたため、薬物曝露の影響はマイクロアレイにて検出することが出来ているものと考えられた。

SA981の曝露において発現上昇が見られた遺伝子の中には、Fasという遺伝子があ

った。これは最も一般的なアポトーシスの上流にある遺伝子であり、Fas-Lの刺激によりアポトーシスを誘導する。また、HSP90AB1やHSP90B1はストレス応答、特に酸化ストレスに応答して発現が上昇することが知られている遺伝子であり、細胞内に何らかの酸化ストレスがかかり、さらにFASの発現により、293細胞がアポトーシスに感受性が高くなっている可能性がある。SA981の曝露により発現が減少した遺伝子の中ではアンチアポトーシスに働くBADや脂肪酸を合成し、かつ酸素を消費し細胞内の酸化を下げるFASN等の酸化還元系にアポトーシスや酸化還元に関連する遺伝子が多く含まれていた。細胞に対する酸化ストレスは一般的な細胞障害因子の一つであり、シスプラチンの腎障害の原因もシスプラチンによる酸化ストレスの結果であるとされている。また一方ではFAS誘導性アポトーシスを活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオンが阻害するという報告もある。従って、いずれが細胞障害性の増悪因子になりうるのか明らかではなく、今後Real Time-PCR法を用いて各遺伝子の発現の増減とChipデータとの相関を検討

し、どの遺伝子が鍵となりうるのか明らかにする予定である。

E. 結論

in vitro において、ブシラミンおよびその代謝物の細胞障害性を確認し、細胞障害をきたさない濃度でも発現量に変化する遺伝子群を抽出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

津田英利・藤村昭夫 (2008) トキシコゲノミクス手法を用いた薬物肝毒性予測の試み
第 35 回日本トキシコロジー学会 東京
国立オリンピック記念青少年総合センター

津田英利・佐々木晃・安藤仁・奥水崇鏡・水川裕美子・漆谷徹郎・藤村昭夫 (2008)
薬物の腎障害性予測における in vitro 遺伝子発現解析の施設間バリデーション
BMB2008 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 神戸国際会議場他

藤村昭夫 (2008) トキシコゲノミクス研究の臨床への展開 「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 東京 日本薬学会長井記念館

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

薬剤性肝障害を早期に検出するための安全性バイオマーカーの開発

研究分担者 興水崇鏡 自治医科大学医学部分子薬理学分門 准教授

研究要旨

医薬品の有害反応を最小限にとどめ、患者の体質に最適化された安全な薬物療法が望まれている。特に薬剤性肝障害は患者保護、保健行政、創薬効率化など多方面に影響が及ぶ重大な医療上並びに経済上の問題として、発症の早期検出と原因特定、効果的治療方法の開発が望まれる。申請者らは動物実験により薬剤性肝障害の早期バイオマーカーとなる可能性の高い物質の同定と、その測定系の開発に成功した。この研究成果をヒトに応用するためには、比較的少数例の探索的臨床研究が有効と考えられる。

A. 研究目的

薬剤性肝障害は、薬剤に対するアレルギーによって生じる場合と薬剤の直接作用によって生じる場合とがある。薬剤に対するアレルギーによって生じる薬剤性肝障害では、初期にしばしば一過性の好酸球増多が認められる。アレルギーによって生じる薬剤性肝障害の診断基準には、薬物の服用開始後に肝機能障害の出現を認め、症状として発熱、発疹、皮膚掻痒、黄疸などを認め、末梢血液像に好酸球増加や白血球増加を認めることが記載されている。検査値異常では GOT、GPT が上昇する細胞障害型や、ALP が上昇する胆汁うっ滞型と混合型がある。しかし、GOT や GPT の上昇は既に肝細胞が障害を受け破壊されたことを意味している。すなわち、実際に組織の障害が起こるより以前に薬剤の肝臓への障害性を予測する方法の確立が求められている。

本研究では、臨床上問題となる重篤な肝障害の発症があり得ることが知られる子宮収縮抑制薬リトドリンについて、早期より利用可能な安全性バイオマーカーを開発することを目的とする。

B. 研究方法

8-10 週雌性 C57/BL6J マウスを 1 週間順化飼育後、100 mg/kg、200 mg/kg のリトドリン、または生理食塩水を連日 1 4 日間腹

腔内投与し、経過中の体重、食餌量、飲水量をモニターした。最終投与 2 4 時間後に肝組織、脂肪組織と血清を採取し組織学的解析、トランスクリプトーム解析、生化学検査を行なった。空腹時血糖を測定する場合は 1 8 時間絶食とした。DNA マイクロアレイで得られた結果は Real time PCR にて確認した。Real time PCR 法は、Total RNA を定法により逆転写した後、希釈し、PCR に使用した。PCR 反応は 40 サイクルで行った。PCR プライマーはデータベース上に報告されている配列を元に作成した。β-actin 遺伝子を発現量変化のないコントロール遺伝子として利用した。

（倫理面への配慮）

本研究は学内の動物実験委員会の承認を得て実施し、動物愛護の観点から苦痛を最小限に止める様配慮した。ヒトからの臨床検体や試料は取り扱わなかった。

C. 研究結果

1) リトドリン 2 週間投与において最終日に血清中の GOT、GPT、ALP、LDH は正常範囲内であり組織像にも炎症細胞の浸潤や胆汁うっ滞、肝細胞破壊像を認めなかった。よってこのモデルは肝機能障害が出現する以前の薬剤の肝への影響が検索可能であると考えられた。

2) 肝臓トランスクリプトーム解析