

氏 名 (本籍) 清 澤 直 樹

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 9 2 号

学位授与年月日 平成 17 年 1 月 19 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 ゲノミクス手法を用いたラット肝臓の
薬物起因性遺伝子発現変動に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 山 添 康

教 授 永 沼 章

助教授 永 田 清

論文内容要旨

製薬企業の創薬に要する費用は、1987年の2億3000万ドルから現在では8億ドルにまで上昇している。その一方で、FDAに対する新薬の販売許可申請はピーク時の1996年に131であったのに対して、2000年には78にまで減少している。前臨床試験以降での薬物開発中止が創薬の費用を引き上げており、そのうち前臨床試験における薬物開発障害の44%は薬物の有害事象によると報告されている。臨床試験実施以前に薬物の開発障害の予測精度を10%改善できれば、創薬に要する費用を1薬物あたり1億ドルの節減できるとの見込みもある。

公共遺伝子配列データベースの充実化は、数千から数万もの遺伝子のmRNAレベルを網羅的に測定可能なマイクロアレイ技術の発展をもたらした。マイクロアレイ解析の薬物の毒性メカニズム解析への応用は、トキシコゲノミクスと呼ばれて現在盛んに研究されている。トキシコゲノミクス研究によって毒性の分子メカニズム解明を進めることにより、創薬の早期段階での化合物の安全性評価を可能にするバイオマーカーの発見、およびヒトにおける薬物の安全性評価の精度と効率の向上につながる事が期待されている。

現在公共マイクロアレイデータベースは急速に質的、量的な充実化が進んでいる。その一方で、膨大なマイクロアレイデータベースから生物学的に、特に毒性学的に有用な情報を抽出するためには、データベースの充実化と共に、その効率的な活用のための知識ベースの充実化が必須である。しかし薬物の安全性評価に活用可能なバイオマーカーの同定および活用法といった知識ベースの公知化は、まだ乏しいのが現状である。こうした背景のもとで、本研究はAffymetrix社のGeneChip®を用いた肝臓のマイクロアレイデータベースの構築とその解析を通し、トキシコゲノミクス研究の創薬、特に薬物の安全性評価に貢献するための知識ベースを構築することを目的として行われた。

まず第2章では、phenobarbital (PB)、clofibrate (CLO)、3-methylcholanthrene、あるいはbutylated hydroxyanisole (BHA) を投与した雄性F344ラット肝臓におけるI相系およびII相系薬物代謝酵素 (DME) 遺伝子のmRNAレベルを、Affymetrix社のRG U34A Arrayにより測定した。市販のマイクロアレイシステムでは、DME遺伝子に関して必ずしも体系的な名称付けを行っていないため、各プローブに対応するDME遺伝子を特定することが難しいことがある。この問題点を解決するため、プローブ設計の基となったDNA配列の相同性を指標に分子系統樹を作成し、各プローブに対応するDME遺伝子ファミリーにクラスター化した。またmRNAレベルのデータ (Average Difference) に関して作成したヒートマップを、データのシグナル・ノイズ比の情報 (Absolute Call) に関して作成したヒートマップと併記することにより、マイクロアレイデータの定量性および質の両方に関する情報を視覚的に把握可能にした。最後に分子系統樹とヒートマップを組み合わせ、DME遺伝子の網羅的なmRNAレベル測定結果を表した。GeneChip®プローブ設計の基になった配列には、mRNA配列以外にゲノム配列を含むものがあり、このような配列は分子系統樹上で本来対応すべきDME遺伝子ファミリーに分類されなかった。また一部には、同一遺伝子ファミリーに属するにも関わらずデータに不一致が認められるプローブ群も存在し、これらはプローブ設計が適切でないものと考えられた。しかしほとんどのDME遺伝子のプローブは対応する遺伝子ファミリーに

分類されたことから、本手法が各DMEプローブに対応する遺伝子の効率的な同定、およびmRNAレベル測定に適したプローブの同定に有効であることが示された。さらにマイクロアレイのデータとDME活性データには良好な相関が認められたことから、薬物投与後のラット肝臓DME活性をモニターするために、この解析手法が有用であることが示された。

続いて第3章では、PBの反復投与がラットの血清総コレステロール (T.CHO) 濃度を上昇させる分子メカニズムの解析を目的として、100 mg/kgのPBを14日間反復投与したラット肝臓に関して、RG U34A Arrayによるマイクロアレイ解析を行った。また、血清T.CHO、血清非エステル体脂肪酸 (NEFA)、総ケトン体 (TKB) およびトリグリセリド (TG) の各濃度をそれぞれ測定した。血清T.CHO濃度は4日反復投与以降14日間反復投与後まで、対照と比較して有意な増加が観察された。血清NEFA濃度は反復投与7日目を除いて、単回投与後から14日間反復投与の間で有意な減少が観察された。血清TKB濃度は反復投与7日目で有意な増加が、また血清TG濃度は14日間反復投与後に有意な低下がそれぞれ観察された。解糖系関連遺伝子群のmRNAレベルはPB投与により減少したのに対し、脂質代謝に関わる lipoprotein lipase のmRNAレベルはPB反復投与により連続的な増加を示したことから、PBの反復投与はラット肝臓において解糖系の抑制と脂質代謝の活性化をもたらすことが示唆された。この仮説を既報のFlux-balance解析に対応させて検証した結果、PB反復投与による malic enzyme のmRNAレベル増加は、この仮説を支持していた。この仮説は同時に、PB反復投与がラット肝臓において解糖系からの代謝産物の欠乏、および acetyl-CoA の含量増加をもたらすことを示唆した。同様の状況をもたらす絶食下ではケトン体合成の亢進が認められるのに対し、本試験におけるPB反復投与後のラットにおいてはわずかな血清TKB濃度増加が観察されたのみであった。これはPB投与による肝臓HMG-CoA synthaseのmRNAレベル減少が一因であると推察された。この結果はacetyl-CoAのケトン体生合成による異化の抑制、およびその結果としてのコレステロール生合成経路への基質流入の可能性を示唆する。また、複数のコレステロール生合成関連遺伝子のmRNAレベルがPB投与により増加した。以上の結果から、血清生化学値およびマイクロアレイ解析の結果は、PB反復投与がラット肝臓においてコレステロール生合成を亢進させ、血清T.CHO濃度上昇をもたらす可能性を示唆するものと考えられた。

次に第4章では、肝臓において血清T.CHO濃度プロファイルに相関してmRNAレベルが変動する遺伝子を、PBあるいはCLOを投与したラット肝臓マイクロアレイデータベースから Spearman の相関係数を用いて選抜した。その結果、UDP-glucuronosyltransferase-21、apolipoprotein A-IあるいはATP-binding cassette, sub-family C, member 2を始め、多数のコレステロールあるいは胆汁酸の代謝関連遺伝子群が選抜された。アミロイド前駆タンパク質 (APP) 遺伝子はAffymetrix社のRat Genome U34 Arrayに含まれる8,799個のプローブのうち、5番目に高い相関を示した。次に、高コレステロール (1%) を含む餌をラットに33日間摂取させ、血清T.CHO濃度の増加と肝臓APPのmRNA増加が観察されるか否かを検討した。その結果、血清T.CHO濃度は対照の4.6倍に上昇し、肝臓におけるAPP遺伝子のmRNAレベルは対照の1.9倍に増加した。以上の結果は、ラット肝臓におけるAPP遺伝子のmRNAレベルが血清のT.CHOにより影響を受けること、およびAPPが肝臓でコレステロール恒常性に関与している可能性を示唆するものである。この結

果はまた、APP遺伝子が肝臓コレステロール代謝恒常性の変動を検出するためのバイオマーカーに成り得る可能性を示す。

最後に第5章では、雄性F344ラットに対して4日間、20 mMのL-buthionine (S,R)-sulfoximine (BSO)を飲水投与した後、肝臓グルタチオン含量の測定、および肝臓に関してRG U34A arrayを用いたマイクロアレイ解析を行った。グルタチオン含量およびマイクロアレイデータに関してSpearmanおよびPearsonの相関係数を計算した。このうちSpearmanの相関係数が統計学的に有意であり ($P<0.05$)、かつPearsonの相関係数が-0.8以下のものを選抜した結果、69プローブがグルタチオン欠乏評価プローブとして選抜された。II相系薬物代謝酵素誘導剤であるBHAを投与したラット肝臓マイクロアレイデータと比較した結果、14プローブがBSO特異的なmRNAレベル増加を示し、これらはグルタチオン欠乏の良い指標になると考えられた。Acetaminophen、PBおよびCLOを投与したラット肝臓マイクロアレイデータについて、グルタチオン欠乏関連プローブを用いた主成分解析を行った結果、それぞれの化合物投与による肝臓グルタチオン含量変動を反映すると考えられるmRNAレベルプロファイルを示した。本試験で同定されたプローブは、肝臓におけるグルタチオン欠乏をマイクロアレイデータより評価するために有用なマーカーであると考えられた。

以上の成果により、ラット肝臓に関して取得したマイクロアレイデータを用いたDME遺伝子のmRNAレベル把握のための効率的な解析法を確立し (第2章)、またPB反復投与時の肝臓エネルギー代謝プロファイル変動をモニターするための、糖代謝、脂質代謝およびケトン体生合成パスウェイに関するプローブの同定と活用例 (第3章)、肝臓コレステロール代謝恒常性の変動をモニターするバイオマーカーとしてのAPP遺伝子 (第4章)、肝臓グルタチオン恒常性変動をモニターするバイオマーカーとしての遺伝子群とその活用法 (第5章)を、それぞれ確立した。このような知識ベースを蓄積、公知化していくことで、充実化が進む公共トキシコゲノミクスデータベースの、薬物安全性評価への利用価値がますます高まることが期待される。

審査結果の要旨

マイクロアレイデータベースから有用な情報を抽出するためには、データベースの充実化と、その効率的な活用のための知識ベースの充実化が必須である。しかし薬物の安全性評価に活用可能なバイオマーカーの同定および活用法といった知識ベースの公知化は、まだ乏しい。こうした背景のもとで、本研究は、トキシコゲノミクスの創薬、特に薬物の安全性評価のための知識ベース構築を目的として行われた。phenobarbital (PB)、clofibrate (CLO)、3-methylcholanthrene、あるいはbutylated hydroxyanisole (BHA) を投与したラット肝臓における薬物代謝酵素 (DME) の mRNA レベルを測定した。DNA 配列の相同性を指標に、DME 遺伝子ファミリーにクラスター化して、mRNA レベルのデータから作成したヒートマップとデータのシグナル・ノイズ比の情報から作成したヒートマップを組み合わせ、マイクロアレイデータの定量性および質の両方に関する情報を視覚的に把握可能にした。得られたマイクロアレイのデータと DME 活性データには良好な相関が認められ、薬物投与後の DME 活性のモニター手法として有用であることが示された。PB の反復投与がラットの血清総コレステロール (T.CHO) 濃度を上昇させる機序を知るためマイクロアレイ解析を行ったところ、PB は解糖系の抑制と脂質代謝の活性化をもたらすことが示唆された。PB 反復投与による malic enzyme の mRNA レベル増加はこの仮説を支持し、解糖系からの代謝産物の欠乏、および acetyl-CoA の含量増加を示唆した。この結果はケトン体生合成による異化の抑制とその結果としてのコレステロール生合成経路への基質流入の可能性を示唆した。また相関遺伝子として UDP-glucuronosyltransferase-21、apolipoprotein A-I あるいは ATP-binding cassette、sub-family C、member 2 を始め、多数のコレステロールあるいは胆汁酸の代謝関連遺伝子群が選抜された。アミロイド前駆タンパク質 (APP) 遺伝子は APP 遺伝子が肝臓コレステロール代謝恒常性の変動を検出するためのバイオマーカーに成り得る可能性を示した。さらにラットに L-buthionine (S,R)-sulfoximine (BSO) を飲水投与して、グルタチオン欠乏評価プローブを選抜した。

以上の実験は、ラット肝臓に関して取得したマイクロアレイデータを用いた DME 遺伝子の mRNA レベル把握のための効率的な解析法を確立しトキシコゲノミクスデータベースの、薬物安全性評価への利用価値方法についての手法を開発したものであり、したがって本研究は博士論文に十分に値すると判断した。