

(別紙2)

審査の結果の要旨

申請者氏名

廣出 充洋

論文題目： **Toxicogenomics approach to investigate drug-induced rat hepatotoxicity**
(トキシコゲノミクス技術を用いた薬物誘発性ラット肝毒性解析)

安全性試験 (GLP) は臨床試験開始時の安全性担保に必須である。しかし、実験動物の試験で安全性が確保されても臨床試験以降で副作用が見出され、開発中止や市販後の市場から回収される医薬品は少なくない。ハイスループットスクリーニングなどの創薬技術の進歩と医薬品の安全性への要求が増加し、GLP 効率化への必要性が高まった。一度に数万の遺伝子の発現レベルを検出する DNA チップを用いたトキシコゲノミクスは毒性発現の早期予測・機序解明への手掛りが得られる技術として期待されている。産官学の共同研究で 2002 年開始されたトキシコゲノミクスプロジェクトでは、肝・腎毒性を有する 150 の化合物を暴露したラットの肝、腎、ラット肝細胞、ヒト肝細胞に関する網羅的遺伝子発現情報を収集し、臨床検査や病理組織学的検査等、従来の毒性データと併せたデータベースを構築した。本研究ではデータベースを用い古典的な毒性学的指標に関連して発現変動を示す遺伝子群をバイオマーカー候補として選抜し、その候補遺伝子群を用いた毒性予測及び毒性評価を試みている。

第 1 章では血液凝固異常を引き起こした 8 化合物を陽性化合物とし、反復投与した肝臓サンプルを分析対象とした。肝毒性起因でなく薬理作用として直接、血液凝固異常を引き起こすアスピリンを陰性対照化合物とした。統計学的手法を用いて 8 化合物に共通する 344 遺伝子セットを抽出した。この遺伝子セットを用いた主成分分析の結果、大部分の陽性化合物投薬群のサンプルが溶媒投与対照群のサンプルから用量依存的かつ経時的に判別された。抽出された遺伝子は脂質代謝あるいは細胞障害に関連したものであった。また、血液凝固に関連する遺伝子の大部分は陽性化合物投与群で発現が低下していた。血液凝固に関連する因子の大部分は肝臓で産生され、肝機能障害と血液凝固不全の関連性が報告されている。陽性化合物投与群では肝機能障害によりこれらの血液凝固に関連する遺伝子の産生が低下したと推察される。一方、陰性化合物であるアスピリンでは、これらの遺伝子の発現変動は少なかったことから、今回抽出された遺伝子セットを用いることにより、薬理作用に基づく直接的な血液凝固不全と肝障害に起因した血液凝固不全を判別出来ると考えられた。

第 2 章では血液中の総ビリルビン及び直接型ビリルビンの高値を示した 7 化合物を陽性化合物とし、反復投与した肝臓サンプルから統計学的手法で共通する 59 遺伝子セットを抽出した。主成分分析の結果、大部分の陽性化合物投薬群のサンプルが溶媒投与対照群から用量依存的・経

時的に判別された。文献的に高ビリルビン血症が報告されている 18 化合物をテスト化合物として同様に 59 遺伝子セットを用いて主成分分析をした。その結果、それらの内 12 化合物は陽性化合物と同様に陽性と判別された。数種の医薬品はビリルビン高値が認められていない単回投与 24 時間後の肝臓サンプルでも遺伝子セットで判別可能であり、高ビリルビン血症を予測出来る可能性が示された。

第 3 章では肝臓の病理組織学的検査でリン脂質症が認められた 5 化合物を陽性化合物とし、反復投与した肝臓サンプルから統計学的手法で共通する 78 遺伝子セットを抽出した。主成分分析で大部分の陽性化合物投薬群が溶媒投与対照群から用量依存的・経時的に判別された。文献的にリン脂質症の報告があるものの今回の実験では肝臓の病理組織学的検査ではリン脂質症が確認出来なかった 6 化合物についても陽性化合物と同様に陽性と判別された。一方、病理組織学的にリン脂質症と類似した空胞を示した 8 化合物は、主成分分析によりリン脂質症陽性化合物とは異なる変動を示した。反復投与でリン脂質症を示したいくつかの化合物において、リン脂質症が病理組織学的には認められない単回投与 24 時間後の肝臓サンプルにおいても主成分分析によりリン脂質症を予測出来る可能性が示された。

以上の結果から、各毒性指標についてバイオマーカー候補となる遺伝子群が統計学的手法により選抜された。それらの遺伝子群は古典的な毒性学的指標に随伴しており、用量相関的及び経時的に遺伝子の発現が変動し、肝毒性が陽性の化合物及び陰性の化合物を判別することが出来た。さらに古典的な毒性評価法で毒性フェノタイプを検出できない単回投与 24 時間後の肝臓サンプルの遺伝子変動解析においても毒性が早期に予測出来る可能性が見出された。

以上のように、本研究ではトキシコゲノミクスという新しい手法を用いて、医薬品の毒性評価、毒性予測、作用機序の推測を可能にしたものである。今回の研究によりトキシコゲノミクスによる肝毒性の予測・評価の可能性と今後のトキシコゲノミクス研究の展望が示された。よって審査委員一同は本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値があるものと認めた。