

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 薬物性溶血性貧血および腎障害のトキシコゲノミクス解析に関する研究  |
| Author(s)    | 六嶋, 正知  |
| Citation     | 大阪大学, 2008, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49662">https://hdl.handle.net/11094/49662</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | ろくしままさとも<br>六嶋正知                                      |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学)  |
| 学位記番号      | 第 22371 号   |
| 学位授与年月日    | 平成20年5月30日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第2項該当  |
| 学位論文名      | 薬物性溶血性貧血および腎障害のトキシコゲノミクス解析に関する研究                      |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 山元 弘<br>(副査)<br>教授 松田 敏夫 教授 土井 健史 教授 高木 達也 |

### 論文内容の要旨

トキシコゲノミクスとは毒性学と網羅的遺伝子発現解析を融合した科学領域である。本手法は、従来からの毒性評価手法では困難であった「毒性予測」と「毒性メカニズムの解明」を可能にする新たなアプローチとして、近年、非常に注目されている。これまでに薬物起因性の肝障害や腎障害、遺伝毒性等の解析に積極的に活用され、新規マーカー候補遺伝子の発見や毒性メカニズムに関する知見の取得など、有用な成果が得られている。本研究では、従来からの評価方法である血液学的検査・血液生化学的検査では高感度な検出が困難な毒性として薬物起因性の溶血性貧血と腎障害に着目し、両毒性に対してトキシコゲノミクスを適用した。

まず、フェニルヒドラジンとフェナセチンを用いてハインツ小体形成性ラット溶血性貧血モデルを作製し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査および網羅的遺伝子発現解析を実施した。なお、溶血作用を有する薬物の傷害部位は赤血球であるが、成熟した赤血球は核を持たないため遺伝子発現プロファイル解析の対象とすることはできない。そこでまず、傷害された赤血球の処理臓器の一つである肝臓に着目し、同臓器における遺伝子発現変動と溶血性貧血との関連性を調べるとともに、貧血マーカー遺伝子の探索を行った。DNAマイクロアレイ解析を実施した結果、重篤な溶血性貧血が誘発された条件下で共通して発現変動する遺伝子として、35個の発現上昇遺伝子および10個の発現低下遺伝子を同定した。発現上昇遺伝子群の中にはヘモグロビン合成やヘム代謝、免疫応答等に関与する遺伝子が多く含まれており、それらの中には溶血性貧血の特徴病変である髄外造血や赤血球貪食等との密接な関連が推測されるものが多数存在した。次に、推測される溶血性貧血との関連性および発現変動の大きさを基に、発現上昇遺伝子の中から6遺伝子 (*Alas2*, *beta-glo*, *Eraf*, *Hmox1*, *Lgals3*, *Rhcd*) を貧血マーカー候補として選抜し、定量PCRによってその変動を確認した。また、当該6遺伝子の定量PCRによる発現変動パターンは、溶血性貧血の指標である血中の赤血球数および総ビリルビン値に対して高い相関を示すことが明らかとなった。このことから、本実験で見出したマーカー候補遺伝子群の肝における発現変化を指標として、薬物の溶血性貧血誘発作用が検出可能であることが示唆された。

次に、同じく薬物曝露により傷害された赤血球の破壊・処理を担う脾臓に着目し、溶血性貧血を検出する上で同臓器の遺伝子発現変動の有用性を検討した。上記のラット溶血性貧血モデルの脾臓についてDNAマイクロアレイ解析を実施し、肝臓の場合と同様に、重篤な溶血性貧血が惹起された条件下で共通した発現変化を示す遺伝子を抽出した。その結果、154個の発現亢進遺伝子と236個の発現低下遺伝子が見出され、溶血性貧血の際には肝臓よりも脾臓の方が大きな発現プロファイルの変化を伴うことが明らかとなった。また、発現亢進遺伝子群の中にはタンパク質分解や鉄代謝等の溶血性貧血に特徴的なプロセスに関わると考えられる遺伝子群が多数存在した。そこで、これらの中から脾臓における貧血マーカー候補として11遺伝子 (*Akr1b8*, *Ctsh*, *Ctsd*, *Fabp4*, *Fabp5*, *Fth1*, *Fil1*, *Hmox1*, *Lgals3*, *Slc11a1*, *Spin2c*) を選抜した。同遺伝子群の発現上昇を定量PCRにて検証するとともに、

その変動が従来項目である赤血球数や病理組織学的変化のグレードと強く相関することを確認した。また、定量PCRデータを用いた階層的クラスタリング解析から、マーカー候補遺伝子群の変動パターンは赤血球数の低下が観察されない程度の軽微な赤血球傷害をも反映し得ることが示唆された。選抜したマーカー候補遺伝子群の中では従来項目との相関性から *heme oxygenase 1 (Hmox1)* が最も有望であると考えられた。同分子については免疫組織染色によりその発現上昇をタンパクレベルでも確認した。以上の結果から、脾臓における遺伝子発現変化を調べることにより、赤血球数に比して鋭敏に化合物の貧血誘発作用が検出可能であると考えられた。

また、セファロsporin系抗生物質セファロリジンが誘発する急性尿細管障害について、毒性発現機序の検討とマーカー候補の探索・評価を目的としてトキシコゲノミクス解析を実施した。セファロリジンを低・中・高の3用量にてラットに単回静脈内投与し、24時間後に解剖を行った。血液生化学的検査および病理学的検査を実施したところ、高用量群においてのみ血漿中の尿素窒素およびクレアチニンの有意な増加、ならびに近位尿細管壊死が観察された。腎皮質についてDNAマイクロアレイ解析を行った結果、尿細管壊死が惹起された高用量群では数百の変動遺伝子が同定された。変動遺伝子群はその発現パターンに基づき、用量依存的に変動するものと、尿細管壊死が認められた高用量群で特異的に変動するものとに大別された。用量依存的な発現亢進を示すものの中には、異物代謝と酸化ストレス応答に関与する、転写因子Nrf2の標的として知られる遺伝子群が多く含まれており、従来の知見通り同抗生物質の腎毒性には酸化的ストレスが密接に関与することが示唆された。一方、尿細管壊死が誘発された高用量群で特異的に発現上昇する遺伝子の中には、細胞周期調節、特にDNA複製に関わる遺伝子群が多数存在し、これらの変動は傷害後の尿細管上皮再生に伴う細胞増殖を反映していると推察された。また、既報のマーカー遺伝子の中では *kidney injury molecule 1* が最も顕著な発現上昇を示したことから、セファロsporin腎障害の検出においても有望であると考えられた。

以上述べたように、本研究において溶血性貧血とセファロリジンによる急性尿細管障害に対して初めてトキシコゲノミクスを適用し、毒性発現に密接に関連すると推定される遺伝子発現変化を明らかにするとともに、両毒性の検出における有望なマーカー候補遺伝子を同定することに成功した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、薬物性溶血性貧血およびセファロsporin系抗生物質セファロリジンの腎毒性についてトキシコゲノミクス解析を実施し、その成果を纏めたものである。

薬物性溶血性貧血については、従来からの検査項目である血液中の赤血球数や総ビリルビン値では高感度な検出が困難であった。そこで著者は、フェニルヒドラジンとフェナセチンという二種類の薬物を用いてラット溶血性貧血モデルを作製し、DNAマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。なお、薬物の毒性標的である赤血球は核を有さず遺伝子発現解析の対象とできないため、傷害赤血球の異化を担う肝臓および脾臓に着目したことが本研究の独創的な点である。解析の結果、同毒性に特徴的と推察される肝臓および脾臓の遺伝子発現変化を明らかにするとともに、両臓器における溶血性貧血マーカー候補遺伝子を選定することに成功し、学術的に価値の高い知見を得ている。具体的には、肝臓については髄外造血等の溶血性貧血に特徴的な組織学的変化と密接に関連するものと推定される遺伝子群の発現上昇を同定した。一方、脾臓においてはタンパク質分解や鉄代謝等に関わる遺伝子群の発現亢進を見出し、*heme oxygenase 1* 遺伝子を有望なマーカー候補として同定した。また、脾臓におけるマーカー候補遺伝子は赤血球数等の血液検査項目に比して高感度に薬物の溶血性貧血誘発作用を検出できると考えられるため、本成果が製薬企業における医薬品候補化合物の安全性評価の効率化に繋がる可能性は十分にある。

セファロリジンは急性尿細管障害を誘発する代表的な薬物であり、古くから腎毒性の研究に頻用されている。著者は同薬物のラット急性尿細管障害モデルの腎皮質について網羅的遺伝子発現解析を実施することで、セファロsporin系抗生物質の腎毒性に対して初めてトキシコゲノミクス解析を適用した。解析の結果、解毒や酸化ストレス応答に関与する遺伝子群の用量依存的な発現亢進を同定し、同薬物の尿細管障害に酸化的ストレスが密接に関与することを遺伝子レベルで明らかにしている。また、尿細管壊死が惹起された条件下ではDNA複製に関わる多数の遺伝子が発現上昇することを見出し、傷害後の尿細管上皮の再生メカニズムに関する有用な知見を得てい

る。さらに、同薬物の急性尿細管障害に対して、*kidney injury molecule 1* が有用な遺伝子マーカーであることを明らかとしている。

溶血性貧血とセファロsporin系抗生物質セファロリジンの尿細管腎障害に対して初めてトキシコゲノミクスを適用し、両毒性検出における有望なマーカー候補遺伝子を同定した本研究は、その研究内容の新規性のみならず将来の医薬品候補化合物の安全性評価と効率化に対して重要な示唆を与えている。以上の理由から、六嶋正知氏の博士学位論文「薬物性溶血性貧血および腎障害のトキシコゲノミクス解析に関する研究」は大阪大学博士学位(薬学)に十分に値するものと判断した。