# 論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目　Study of the Usefulness of Transcriptomics in Research and Development of Drugs
(医薬品の研究開発におけるトランスクリプトーム解析の有用性に関する研究)

氏　名　田 村　幸 太 朗

ヒトゲノムの配列が 2003 年に解読され，疾患の予防と治療における新しい時代の到来が期待されたが，未だ実現していない。それどころか，新規に承認される医薬品は減少を続け，医薬品業界が直面する大きな課題となっている。ヒトゲノム解読研究と共に遺伝子発現の解析技術は飛躍的に進歩し，マイクロアレイなどの技術を用いることで数万におよぶ遺伝子の発現レベルが瞬時に測定可能となった。mRNA 総体の解析（トランスクリプトーム解析）が創薬のあらゆるステージに応用されるようになり，医薬品の研究開発の成功率改善が期待されている。トランスクリプトーム解析が有する潜在力を十分に活用できれば，医薬品研究開発の成功率は大幅に改善される。しかし，臓器の構造が均一でなく，遺伝子発現を含めた生理学的機能が乳頭，髄質および皮質等の領域間で大きく異なる腎の場合，トランスクリプトーム解析の手法には改善すべき点が多い。本研究では腎疾患治療薬の探索と安全性評価を念頭において，解析法が未発達な腎のトランスクリプトーム解析の開発と共にその有用性を評価した。

第一章では，臓器の構造が均質で先行知見の多い肝について，我が国の国家プロジェクトに参画して作成に貢献したトキシコゲノミクスデータベース（TG-GATEs）を用いて，慢性腎臓病の治療薬として有効である可能性が高いと考えられる高脂質血症治療薬の peroxisome proliferator-activated receptor（PPAR）αアゴニストを処置したラットの肝（*in vivo*）と初代培養肝細胞（*in vitro*）におけるトランスクリプトームデータを解析した。3 種類の PPARαアゴニスト（クロフィブラート，WY-14643 およびゲムフィブロジル）を処置すると脂肪酸β酸化に関連する acetyl-coenzyme A acyltransferase 等の多くの遺伝子が *in vivo* と *in vitro* で共に誘導された。これらの PPARαアゴニストで共通して変動した遺伝子に注目してデータベース中の 32 化合物について階層的クラスター解析を行った結果，*in vivo* ではベンズブロマロンおよびアスピリンが，*in vitro* ではベンズブロマロン，非ステロイド性抗炎症薬（non-steroidal anti-inflammatory drugs：NSAIDs；アスピリン，インドメタシンおよびジクロフェナク）およびバルプロ酸が PPARαアゴニストと同じクラスターに配置された。ベンズブロマロンとインドメタシンは PPARαアゴニストとしての作用を有することが報告されており，解析結果は PPARαアゴニスト作用の有無を反映した妥当なものであると考えられた。

第二章では，腎におけるトランスクリプトーム解析法の開発のための基盤として，乳頭，髄質，皮質およびこれら全てを含む腎スライス（whole slice）のトランスクリプトームデータの比較解析を行った。トランスクリプトームデータは Rat Genome 230 2.0（Affymetrix 社）を用いて取得し，マイクロアレイデータの一般的な補正法である global normalization（GN）法にて補正した。この補正法は RNA の総発現量はサンプル間で一致するという前提で全遺伝子発現レベルの平均値もしくは中央値をサンプル間でそろえるので臓器の構造が均質な場合は問題ないが，腎のように RNA の総量が領域間で異なる場合の比較には不適切であった。特に RNA 総量が相対的に少ない乳頭

と他の髄質，皮質および whole slice との比較解析では，従来用いられてきた補正方法では問題が発生した。GN 法による補正後に分散分析により領域間で発現量に差が有る遺伝子を抽出すると，乳頭で最も高く発現している遺伝子が過半数を占めるという結果になったが，これは元々相対的に低かった乳頭における遺伝子発現レベルが，過度に底上げされた結果であることがわかった。これを解決するためには percellome normalization 法が適切であることを明らかにした。これは細胞 1 つあたりの mRNA コピー数を得るための手法で，サンプル中の細胞数を代表するものとして DNA 量を測定し，それを基準にして外部標準 mRNA（スパイク RNA）をサンプルに添加した後，RNA 抽出およびマイクロアレイ実験（測定）を行う。スパイク RNA の測定値を基準に，サンプル中の各 mRNA の測定値を細胞 1 個当たりのコピー数に換算することで，領域間で発現量が異なる遺伝子を分散分析で効率良く抽出することが可能となった。その結果，領域間の発現量差が大きい遺伝子は，腎機能に特徴的なトランスポーターおよび代謝酵素などで占められていることが分かった。

第三と第四章では，遺伝性ネフローゼ症候群のモデル動物である ICR-derived glomerulonephritis（ICGN）マウスの病因解明に，腎のトランスクリプトーム解析が有効か否か調べた。ICGN マウスは ICR マウス突然変異体由来の腎疾患モデル動物で，加齢と共に腎炎病態が進行する。これまでに *tensin2* 遺伝子の変異が ICGN マウスにおけるネフローゼ症候群の原因の一つとして報告されているが，それ以外の要因の関与も示唆されている。腎における遺伝子発現レベルを ICGN マウスと ICR マウスで比較すると免疫関連のパスウェイに顕著な差が認められた。最大の相違はヒトにおいてループス腎炎との関連が報告されている complement component 1, s subcomponent（*C1s*）遺伝子の ICGN マウスにおける低発現（-45 倍）であった。更にループス腎炎の特徴である血中抗 dsDNA 抗体の高値および糸球体への免疫複合体の沈着も確認した。これらの結果から，*C1s* 遺伝子の低発現が ICGN マウスにおけるネフローゼ症候群の発症に関与すること，そして ICGN マウスがループス腎炎の実験モデルとして有用であることが示された。加えて病態の進行に伴って上昇する遺伝子群として collagen, MHC class I, CD marker を見出しており，これらが病態の進行を診断するバイオマーカーとなると考えられた。続いて ICGN マウスのホモおよびヘテロ接合型並びに健常対照としての ICR マウスの腎において腎疾患に伴う細胞表面糖鎖構造の変化を 24 種のレクチンをプローブとして組織学的に調べた。特異的にα-D-galactopyranosyl 基を検出する Bandeiraea simplicifolia lectin-I (BSL-I)の反応が ICGN マウスの腎にのみ特異的に検出され，ヘテロ接合型より病態が進行しているホモ接合型で高発現していた。BSL-I を用いたレクチンブロットの結果，ICGN マウスの腎に特異的な分子量 45，58 および 64 kD の糖蛋白が検出された。これらからレクチンによって検出される糖鎖構造の変化がネフローゼ症候群の診断や予後の予測に有効なバイオマーカーとなる可能性が示された。

本研究で得られた成果を活用することにより医薬品研究開発の成功率が大きく改善すると考えられる。創薬の標的探索ステージでは，標的分子の分布調査に第二章で示した percellome normalization 法を用いたトランスクリプトームデータの比較解析が活用できる。医薬品の副作用には標的分子を介したものとそれ以外のものがあるが，全身に広く分布する分子を標的とする薬剤では多くの臓器で副作用を引き起こすリスクがある。Percellome normalization 法を用いた臓器間や臓器内の領域間でのトランスクリプトームデータの比較解析により，標的分子の分布を正確に把握することが可能となる。治療対象の臓器や臓器内の特定領域に特異的に発現する分子を標的とした医薬品開発は，副作用リスクを早期に予測し，それを低減させることで，医薬品研究開発の成功率を向上させると考えられる。続く創薬の化合物選定ステージでは，望まれる薬理作用を有する

化合物の探索に第一章で示したトランスクリプトーム解析手法が有用である。近年既存薬や開発中止となった化合物の新しい薬理作用を見出し，新規な適応症で開発するアプローチ（drug repositioning）が注目されている。既存薬の場合は既に医薬品の承認申請に必要な安全性と体内動態が確認されているため開発成功率が高まると共に研究開発費の削減が可能となる。第一章では痛風治療薬（ベンズブロマロン），NSAIDs（アスピリン，インドメタシンおよびジクロフェナク）および抗てんかん薬（バルプロ酸）に PPARαアゴニスト作用があることを見出し，トランスクリプトーム解析が drug repositioning に有効であることを示した。創薬の非臨床ステージでは，第三章で示したトランスクリプトーム解析による疾患モデル動物のプロファイリングが有効である。疾患モデル動物の病態を正確にプロファイリングすることで，新薬の薬効評価や副作用予測のために適切な疾患モデル動物を選択することが可能となり，結果的にヒト臨床でも同様の薬効が確認される可能性が高まる。創薬の臨床ステージでは，非臨床ステージで同定された疾患関連遺伝子や第四章で評価したレクチンによる糖鎖構造変化の検出が，患者選択（テーラーメード医療）あるいは病態診断や予後予測のバイオマーカーとして活用できると考えられる。本研究により，腎におけるトランスクリプトーム解析の基盤技術が開発されると共に，医薬品研究開発におけるトランスクリプトーム解析の活用方法とその有用性が示された。