

# シンポジウム要旨

# S1-1 ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 医薬品毒性予測システム： 消化管と血液毒性

○松永 民秀

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野

## 【背景・目的】

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、増殖性に富み、生体の様々な細胞に分化する能力を有する。その為、再生医療のみならず薬物動態試験や安全性評価等の創薬研究支援材料としての利用が期待されている。

医薬品による消化管障害には、下痢、便秘、消化性潰瘍、麻痺性イレウスなどがあり、これらを引き起こす医薬品は数多く知られている。このような消化管障害は、場合によっては致死性となりうることもあることから、治験時や市販後に医療現場で安全に医薬品を用いるためにも、より早期の段階で毒性の評価を行うことが極めて重要である。消化管における薬物動態や毒性の評価には、ヒト結腸ガン由来の Caco-2 細胞やマイクロソーム、実験動物などが用いられている。しかしながら、Caco-2 細胞の薬物トランスポーターの遺伝子発現パターンはヒト正常小腸とは異なる上に、薬物代謝酵素が顕著に低いことが問題である。また、腸管は様々な細胞から構成されているが、単一細胞系である Caco-2 細胞は安全性評価には適さない。さらに、実験動物とヒトの間には種差が存在するため、*in vitro* 試験にはヒトの初代腸管上皮細胞や組織の利用が望ましいが、入手は極めて困難である。

また、薬物誘発性の代表的な血液毒性として、赤血球減少 (貧血)、白血球減少、血小板減少がある。その主な機序として、造血器における造血系細胞の分化増殖過程への障害と末梢における成熟細胞の破壊が考えられている。医薬品の研究開発では、実験動物を用いた一般毒性試験の中で、末梢血を用いた血液学的検査により血液毒性が評価されている。しかし、この方法は手間や時間がかかるだけでなく種差や個体間差が大きい。例えば、薬物による血小板減少症は、巨核球系細胞の産生低下と末梢での破壊亢進が考えられており、さらに、血管内皮への障害や血小板凝集による場合も知られている。しかし、その毒性予測の研究のために骨髓穿刺にて巨核球を得ることは侵襲性が高く、倫理的に問題である。

本シンポジウムでは、ヒト iPS 細胞を用いた消化管障害と血小板減少症の毒性予測システムへの利用について、我々の研究を中心として紹介する予定である。

## S1-2 ヒト初代培養肝細胞との差別化を目指した ヒト iPS 細胞由来肝細胞の開発と毒性評価系への応用

○水口裕之<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院薬学研究科

<sup>2</sup>大阪大学国際医工情報センター

<sup>3</sup>国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所

初代培養ヒト肝細胞（PHH）を用いた肝毒性評価は、これまで非臨床試験においてゴールドスタンダードとして行われてきた。PHH は、言うまでも無く『ヒト由来の本物の肝細胞』であり、単離直後や最適な培養条件下では、機能面において PHH に勝る細胞系は存在しない。一方で、PHH は *in vitro* では増殖能を一切有さず、培養後急速に肝機能が減弱すること、入手に限りがあること等、試験系としての種々の問題・課題を抱えている。

ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、再生医療への応用だけでなく、毒性試験や薬物動態試験等の創薬研究のための新規細胞ソースとして期待されている。近年、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術は目覚ましい発展を遂げ、高機能なヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製が可能になってきたが、機能面において PHH と完全に匹敵する細胞系の開発は未だ困難である。このような現状を鑑みると、むしろ、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の毒性評価系への応用をはじめとする創薬応用には、PHH で実施されている試験系の置き換えを目指すよりも、ヒト iPS 細胞の特性を生かし、PHH で実施困難な試験系の開発を目指すことが有用ではなかろうか？

我々は上記の考えのもと、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の開発研究を進めている。本講演では、ゲノム編集技術を駆使し、任意の薬物代謝酵素遺伝子等を欠損したヒト iPS 細胞由来肝細胞を作製することで、*poor metabolizer* に相当する個人にも対応可能な”キメの細かい”毒性評価系の開発の試みについて紹介する。iPS 細胞技術とゲノム編集技術を利用することで、特異な薬物代謝酵素の遺伝子座を有した個人由来の肝細胞の安定供給が可能になり、PHH を用いた従来技術では解析が困難であった毒性試験も可能になる道が開けてきたと言える。併せて、関連するヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の開発とその応用についても簡単に紹介する。

## S1-3 ヒト iPS 細胞由来細胞を用いた *In vitro* 評価系の応用性と今後の展望

○篠澤 忠紘

武田薬品工業 リサーチ 薬剤安全性研究所/ 再生医療ユニット (兼務)

医薬品開発の成功確立向上に向けて、開発戦略の中で継続/非継続の意思決定をできるだけ早期に試みることは、以降の開発戦略において極めて効果的な戦略と考えられる。特に、前臨床段階における候補化合物の安全性評価結果は、その後の開発の効率化に大きく影響するため、意思決定のための重要な要素になりうる。これまで、開発早期における安全性評価には、多くの場合、*in vitro* 評価系が採用されてきた。しかしながら、同評価系に利用される初代細胞や株化細胞は、細胞種が限定的であることや細胞自体の成熟性・機能性の問題から、ヒト安全性予測における確度が保障しにくい状況であった。ヒト iPS 細胞は、多分化能および自己増殖能を保持しているため、これまで入手が困難であった機能的なヒト細胞を供給することができ、同細胞を用いた新たな評価系が複数生まれてきた。例えば iPS 細胞由来心筋細胞は、既に多くのベンダーにて広く販売されており、製薬企業でその応用性を評価し利用が試みられている。昨今の同細胞を用いた各種応用法の発展は目覚しく、不整脈予測や収縮異常、形態学的な異常を予測する *in vitro* 系の構築と標準化研究が活性化している。さらに、iPS 細胞技術の発展が牽引し、新たな細胞・組織モデルも生まれつつある。オルガノイド技術はそのうちの一つである。オルガノイドは、従来の 2 次元培養系や 3 次元の Spheroid 培養系に比べ、より生体組織に近い細胞系として再生医療分野で注目されているが、安全性研究分野においても新たな洞察を生み出す研究材料として期待されている。一方、臨床開発における安全性の担保に着目したトランスレーショナル研究も重要度を増している。最近、iPS 細胞が持つドナーの Phenotype を再現するという特性を生かして、ヒト薬剤反応性個体差を評価できる *Clinical trial on dish* という概念が提唱された。これは、臨床段階で少数の被験者のみで認められる有害事象を前臨床段階で予測・評価しておくという戦略に利用可能であり、安全性評価における新たな視点として注目されている。得られた情報はバイオマーカー研究や被験者層別化に貢献できる可能性がある。本発表では iPS 細胞由来機能的細胞を用いた各種安全性評価系の進捗と展望を実際のデータを用いて紹介するとともに、トランスレーショナル研究を含めた新たな展開について議論したい。

## S2-1 ヒト肝臓キメラマウスを用いた抗体医薬品の肝毒性機序解析

○仁平 開人

協和発酵キリン株式会社 安全性研究所

【背景・目的】薬剤誘発性肝障害（DILI）は開発中止や市販後の警告・販売中止に至る主要な有害事象であり、医薬品開発においては DILI のポテンシャルやリスクの早期見極めが求められている。そのための新たな肝毒性評価モデルの一つとして、ヒト肝臓キメラマウスが近年注目されている。このマウスは 70%以上の肝細胞がヒトに置換されたマウスであり、これまでにアセトアミノフェンやトログリタゾンなど低分子化合物の肝障害作用に関する検討が報告されている一方、抗体医薬品の肝毒性を評価した報告は少ない。抗体医薬品の非臨床安全性評価にはサルが汎用されているが、抗体の組織交差性や標的抗原に対するアフィニティの種差により従来の非臨床試験の結果から臨床での有害事象を予見することは難しくなっているのが実情である。

臨床における抗体医薬品の肝毒性の報告事例の一つとして TRAIL-R2 活性化抗体が挙げられる。Death receptor ファミリーの一つとして知られる Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand 2 (TRAIL-R2) の活性化は、癌細胞にアポトーシスを誘導しうる有望な抗癌薬標的と考えられている。しかしながら、TRAIL-R2 の活性化を標的とした複数の医薬品の臨床試験において肝毒性が報告されており、肝毒性の発現機序や TRAIL-R2 活性化の寄与は明らかでない。そこで、我々は自社にて創製した、強力な活性を持つ TRAIL-R2 アゴニスト抗体 (KMTR2) の肝細胞傷害作用について、ヒト肝臓キメラマウスを用いて検討した。

【方法】フェニックスバイオ社において生産されたヒト肝臓キメラマウス (PXB マウス<sup>®</sup>) に KMTR2 (1 or 10 mg/kg) を単回あるいは反復静脈内投与し、血液生化学検査、病理組織学検査及びヒト/マウス遺伝子を区別した次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を実施した。

【結果・考察】血液生化学検査では、PXB マウス<sup>®</sup>への KMTR2 の投与による血中 AST/ALT 活性の上昇及びヒト特異的 ALT1 濃度の増加が認められた。肝臓の病理組織学検査では、肝細胞死及び肝細胞変性がヒト肝細胞特異的に認められた。更に、KMTR2 投与によって TUNEL 陽性のヒト肝細胞及び血清中の cleaved cytokeratin 18 濃度が増加し、ヒト肝細胞特異的なアポトーシスの誘導が示された。RNA-seq 解析では、生物学的機能に紐づいた遺伝子群の発現変動にヒトとマウスで違いが認められた。また、ヒトにおいてのみ TRAIL-R2 シグナルの活性化を示唆する遺伝子発現変動が認められた。以上より、KMTR2 による TRAIL-R2 の活性化は、PXB マウス<sup>®</sup>のヒト肝細胞特異的にアポトーシスを誘導し、肝細胞傷害を誘発したと考えられた。臨床で認められた TRAIL-R2 活性化抗体による肝毒性を再現できたと考えられることから、抗体医薬品の肝毒性リスクを *in vivo* において評価するツールとしてヒト肝臓キメラマウスの利用が期待される。

本発表では上記検討で得られた結果や、肝毒性評価へのヒト肝臓キメラマウスの使用法・解析方法について紹介する。

## S2-2 ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス<sup>®</sup>)、およびキメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells<sup>®</sup>) の肝毒性予測系としての利用

○立野 知世<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>株式会社フェニックスバイオ

<sup>2</sup>広島大学肝臓・消化器研究拠点

2004年に発表したヒト肝細胞を持つキメラマウス (PXB マウス<sup>®</sup>) は、ホストマウスとして urokinase-type plasminogen activator transgenic/severe combined immunodeficiency (uPA/SCID) マウスを使用しており、体重が低く置換率の低下や脆弱さ故、長期試験には向かなかった。これらの短所を克服するために2014年に新たなホストマウスである cDNA-uPA/SCID マウスを開発し、ホストマウスとして使用開始以来、PXB マウス<sup>®</sup>の体重やヒト肝細胞の置換率は長期に渡って安定的に保たれるようになり、最近では、40週令を超える長期試験も行われている。PXB マウス<sup>®</sup>は開発当初よりB型・C型肝炎ウイルスに感染することから、新規抗ウイルス薬の薬効試験に広く使われてきた。また、PXB マウス肝臓はヒト薬物代謝酵素、トランスポーターをヒト肝臓と同様に有しており、PXB マウスを用いた医薬品の代謝物プロファイル、PKパラメーターや血中濃度推移の予測に使われている。

私たちは、以前よりPXBマウス<sup>®</sup>がヒト肝毒性を予測する系として利用できないか検討してきた。通常、肝毒性予測には血清中の alanine aminotransferase (ALT) 活性がよく使われる。PXB マウス<sup>®</sup>の肝臓にはマウス肝細胞が30%以下の割合で含まれているため、ある化合物をPXB マウス<sup>®</sup>に投与してALT活性が上昇したとしても、マウス肝細胞あるいはヒト肝細胞のどちらが傷害を受けたのかは判別できない。そこで、私たちは、ヒト特異的ALT1を測定できるELISAキットを開発した。このELISAキットを用いたPXBマウス<sup>®</sup>におけるヒト肝細胞に対する肝毒性の検証例について紹介する。PPAR $\alpha$ やCARをターゲットとした化合物は、齧歯類の肝細胞の増殖・肝発癌を誘導することが知られている。PXBマウス<sup>®</sup>肝臓は、核内レセプターがヒト肝臓と同様に発現しており、これらの化合物をPXBマウス<sup>®</sup>に投与することにより、齧歯類で知られている肝細胞増殖に関連する反応はヒト肝細胞においては起こらないということも証明された。さらに、遺伝毒性分野においても、PXBマウス<sup>®</sup>の利用が可能かどうかの検討も行っている。

PXBマウス<sup>®</sup>は、新鮮ヒト肝細胞の供給源としての利用価値も注目されている。私たちは約5年、同じドナー肝細胞のPXBマウス<sup>®</sup>を生産していることから、長期間同一ドナーの新鮮肝細胞を必要な時にコラゲナーゼ灌流法により分離して供給することができる。PXB-cells<sup>®</sup>は高密度での2次元培養が可能なることから、3週間以上、第I相、第II相薬物代謝酵素、トランスポーターの発現や活性を維持することができる。PXB-cells<sup>®</sup>を用いた薬物代謝酵素誘導試験、ミトコンドリア毒性試験などのPXB-cells<sup>®</sup>の利用例を紹介したい。

本シンポジウムでは、PXBマウス<sup>®</sup>、およびPXB-cells<sup>®</sup>の特徴を紹介し、これらを用いたこれまでの毒性試験の実例を示しながら、PXBマウス<sup>®</sup>、およびPXB-cells<sup>®</sup>の医薬品開発における安全性評価系としての有効性や今後改良しなければならない点に関して議論したい。



## S2-3 人工染色体技術を用いた創薬研究への応用

○香月康宏<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>鳥取大学大学院医学系研究科

<sup>2</sup>鳥取大学染色体工学研究センター

哺乳類細胞や動物に外来遺伝子を発現させるためのベクターの開発は遺伝子機能を解析するためのツールであるばかりでなく、産業や医療への応用面でも重要な役割を果たしてきた。従来のトランスジェニック技術では、導入可能な DNA は通常数百 kb が限界であり、1Mb を超える大きさを持つ遺伝子や遺伝子クラスターの導入は不可能であった。これらの問題を解決するために、巨大なヒト遺伝子、複数のヒト遺伝子を比較的安定な形で導入可能であるヒト人工染色体 (HAC) およびマウス人工染色体 (MAC) の開発を染色体工学技術を用いて行ってきた。本発表では、これまで開発してきた HAC/MAC 技術による創薬支援ツール (ヒト薬物代謝モデル動物や代謝酵素発現細胞など) と、現在も発展し続ける染色体工学技術の最新技術などを紹介し、染色体工学技術の限りない可能性について、紹介する。

## S3-1 毒性データベースを用いた *in silico* 安全性予測

○安部 賀央里, 頭金 正博

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 医薬品安全性評価学分野

近年、人工知能技術の発展に伴い大規模情報を活用した新たな予測技術が幅広い分野で開発されており、医薬品等を含む様々な化学物質の安全性評価においても、大規模データベースを用いる *in silico* による毒性予測手法が注目を集めている。医薬品開発においては、発現機序が解明されていない毒性の場合、*in vitro* や *in vivo* のスクリーニング系での毒性評価は困難な事が多い。また、微量の不純物や代謝物について全て実験動物を用いた毒性試験を行うことは費用や時間、動物愛護の観点からも現実的ではない。これらの背景から、副作用や毒性発現の既知情報に基づいて、新規化学物質の安全性を予測する *in silico* 手法への期待が拡大している。

*In silico* での安全性予測手法の開発に使用される機械学習は、既存のデータをコンピュータが学習し、導き出したルールに基づいて未知データを予測する手法である。機械学習において未知データの予測には主として「教師あり学習」が使用される。教師あり学習ではラベル付けされた学習データを学んで予測を行うため、モデル構築には目的とする予測対象のラベル情報の入手が必須となる。さらに、予測モデルの性能を向上させるためには質の高い大量のデータ確保がポイントとなる。従って、化学物質の副作用や毒性を予測するモデルを構築する際は、毒性に関する大規模かつ高精度のデータベースを用いることが重要である。現在、市販後の副作用情報として、大規模な有害事象自発報告データベースが各国で整備され、開発段階では見出されなかった未知の有害事象の検出等に用いられている。これらのデータベースは副作用の予測研究への活用が可能だと考えられる。また、非臨床試験の情報源の一つとして、国内で開発された有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) の反復投与毒性試験データベースは、化審法の既存点検物質を中心に信頼性の高い *in vivo* の試験情報が蓄積されており、定期的に情報の追加が行われている。

本講演では、我々の取り組みとして既存の毒性データベースを使用し、機械学習により化学物質の構造情報からその安全性を予測する *in silico* 手法を紹介する。副作用や毒性発現では、メカニズムが不明なものや複雑な要因が含まれている事が多く、化学物質の構造も多種多様であるため、確実に入手可能な物質特有の構造情報と既知の副作用や毒性情報の関係をコンピュータに学ばせ、機械学習により構築した予測モデルは安全性予測を支援する有用な手段となり得る。HESS の反復投与毒性試験データベースを用いた例では、無毒性量 (NOAEL) の設定に影響を及ぼすことが多いラットの肝細胞肥大の有無を判別するモデルを構築し、Support Vector Machine により感度が 0.91、受信者操作特性の曲線下面積 (ROC-AUC) が 0.81 の予測結果が得られた。また、PMDA が公開している医薬品副作用データベース (JADER) を利用し、スティーヴンス・ジョンソン症候群・中毒性表皮壊死症 (SJS/TEN) などの重症皮膚副作用を対象とし、医薬品の構造情報を用いてヒトの副作用予測モデルの開発にも取り組んでいる。

### 【参考文献】

Ambe K., et al. *In silico* prediction of chemical-induced hepatocellular hypertrophy using molecular descriptors. *Toxicological Sciences*, **162** (2), 667-675 (2018).



## S3-2 薬物動態・毒性予測のための統合解析プラットフォーム An integrated analysis platform for toxicity and pharmacokinetic modelling

○水口 賢司<sup>1,2</sup>, 大橋 力也<sup>1,3</sup>, 江崎 剛史<sup>1</sup>, 渡邊 怜子<sup>1</sup>, 川島 和<sup>1</sup>,  
長尾 知生子<sup>1,2</sup>, 夏目 やよい<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト

<sup>2</sup> 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センター インシリコ創薬支援プロジェクト

<sup>3</sup> 田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 創薬基盤研究所

### 【背景・目的】

創薬初期における薬物動態と毒性評価は、アカデミアにおける創薬シーズの実用化に非常に重要である。これらの分野のモデリング研究においては、関連する実験結果は公共のデータソースからある程度入手可能だが、実験条件が統一されていない、化合物の記述が不正確などの理由により、高精度の予測モデルの作成が進んでこなかった。AMEDの支援を受けた「創薬支援インフォマティクスシステム構築プロジェクト」では、薬物動態及び毒性予測を簡便かつ少ない負担で行える環境の提供を目的として、データベースとデータ解析機能を搭載したインシリコ統合解析プラットフォームの構築を行っている<sup>[1]</sup>。本プロジェクトは薬物動態・心毒性・肝毒性の3つの研究課題から構成され、発表者らが携わる薬物動態部分では、化合物の構造情報から物性・薬物動態パラメータを予測し、最終的には血漿中及び組織中の薬物濃度推移を予測することを目的として研究を行っている。

### 【成果】

公共データベースから収集した薬物動態に関するデータを精査して均一の条件で取得されたデータのみを抽出し、8000以上の化合物を含む薬物動態統合データベースを構築した。溶解度や脂溶性などの物性値、肝ミクロソームを用いた代謝安定性、血漿蛋白結合性、脳ホモジネート結合性、血液血漿濃度比などの *in vitro* 試験値及び、薬物をラットに経口もしくは静脈内投与した時の薬物の血漿や組織中濃度推移など、創薬段階で重要視される項目を網羅的に収録した。また、上述の試験項目において、統一した条件下で実施した新規実験データも収集している。

次に、構築したデータベースに収録されたデータを用いて、開発段階で検討される基本的な物性及び薬物動態パラメータ（溶解性、代謝安定性<sup>[2]</sup>）、血漿蛋白結合性<sup>[3]</sup>、脳ホモジネート結合性、血液血漿濃度比などのインシリコ予測モデルの構築を進めている。さらに薬物動態および心毒性データベースの拡充を目指して製薬企業7社との企業連携を確立し、スクリーニングデータなどの共有を開始した。

### 【将来像】

今後は統合的な解析に必要な環境整備に加え、創薬イノベーションを実現するための有力な手段として、アカデミアと企業もしくは企業間の連携を加速し、人工知能を含む多様な技術を組み合わせることで、より幅広いデータの取得と新たな付加価値の創出が期待される。

### 【参考文献】

[1] 江崎剛史, 渡邊怜子, 川島和, 夏目やよい, 水口賢司 薬剤学, 77 (4), 211-215 (2017)

[2] Esaki, T., et al., Data curation can improve the prediction accuracy of metabolic intrinsic clearance. Mol. Inf., 2018. 37: p. 1800086.

[3] Watanabe, R., et al., Predicting fraction unbound in human plasma from chemical structure: Improved accuracy in the low value ranges. Mol. Pharmaceutics 2018, 15, 11, 5302-5311

## S3-3 シミュレーションと AI を組み合わせた ADMET 予測と構造提案への展開

○本間 光貴

理化学研究所 生命機能科学研究センター

近年の創薬において、シミュレーションや AI を含むインフォマティクスを利用したインシリコスクリーニングや最適化設計は無くてはならないものとなっている。すでに、多くの医薬品において、それらを包含したいわゆる「インシリコ創薬」手法が創薬の過程において用いられ、医薬品の創出に貢献している。

しかし、インシリコ創薬は、創薬初期のヒット探索では、ドッキング等の手法によってある程度の成功を収めているが、リード最適化以降における ADMET の予測においては、十分に堅牢な予測を提供することが難しかった。これには、いくつかの原因があるが、最も大きな要因は、創薬後期では、多くの種類（10 種類以上）の ADMET プロファイルをすべて解決する必要があり、そのような「同時最適化問題」の難しさがインシリコの貢献を限定的にしている。また、ADMET に関連するタンパク質の構造が一部しか解明されていないことや、コストの高い試験であるため、公知の試験結果データが非常に少なく AI 構築に困難であることも影響している。

このような背景から、日本において 2 つの産官学の取り組みが始まっている。一つは、日本医療研究開発機構（AMED）における「創薬支援インフォマティクス構築」であり、2015 年から 5 年計画で ADMET 予測を目的とした統合データベースと予測プラットフォームの構築を目指している。一方、奥野らが立ち上げたライフインテリジェンスコンソーシアム（LINC）においても創薬 AI 開発の中の一つの課題として、2017 年から ADMET 予測のプロジェクトが立ち上がっている。理研の本間研究室では、両方の取り組みにおける基盤構築や AI 開発を手伝っており、「創薬支援インフォマティクス構築」では、心毒性（hERG）予測・回避のための構造提案システム開発、LINC では、合成経路 AI、構造発生 AI、新規記述子開発、ADMET 予測 AI の開発を連携して進めている。

心毒性回避のための構造提案など、一部実用レベルに達しているものもあるが、まだまだ暗中模索の課題もあり、当日は、それらの最近の進捗について紹介して、皆さんと今後の展望を議論したい。

## S4-1 リアルタイム発光測定による細胞機能解析と毒性評価への応用

○中島 芳浩

産業技術総合研究所 健康工学研究部門 細胞光シグナル研究グループ

各種の発光生物から単離された発光レポーター（ルシフェラーゼ）を用いたレポーターアッセイは、日本が先導する独創的な技術であり、生体情報を様々な角度から解析できるユニークな技術である。発光レポーターから発する光は、発光基質であるルシフェリン（発光基質の総称）ルシフェラーゼ（発光タンパク質の総称）が酸化、ルシフェリンが励起状態から基底状態に遷移する際に光エネルギーを放出することにより生じる。このルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を、解析の対象とする細胞や個体で再構成させることにより、遺伝子発現、タンパク質-タンパク質相互作用などの種々の細胞内イベントを簡便且つ定量的にモニターすることが可能となる。近年では、新規発光レポーターの単離・改良、発光測定装置開発、さらには発光基質の改良等の進展に伴い、ハイスループット測定が可能なエンドポイントアッセイ、数日～数週間の長期間の遺伝子発現を検出するリアルタイムモニター、個体におけるガン細胞の増殖等を検出する *in vivo* イメージング、1細胞における細胞内情報を可視化するシングルセルイメージングシステムなど、バラエティーに富んだ発光測定が可能となっている。

我々はこれまで多色発光レポーター遺伝子等、新規発光生物から独自に単離・改良した発光レポーター遺伝子群を開発してきた<sup>(1)</sup>。また、解析に用いる発光レポーター導入細胞或いはマウスの樹立期間の短縮化と、宿主ゲノムにレポーター遺伝子を導入した際に生じる位置効果の問題を解決するため、人工染色体ベクターにレポーター遺伝子群を導入する方法を取り入れてきた<sup>(2,3)</sup>。近年ではこれらの基盤技術を活用し、細胞を破碎することなく定量的に細胞の状態をモニターできるという発光レポーターの最大の利点を活かし、種々の発光測定法の毒性評価への応用を試みている。具体的には、発光レポーター導入トランスクロモソミックマウスの初代肝細胞を3次元培養に供し、同一のスフェロイドに対する細胞毒性を約1ヶ月間測定する非破碎発光測定<sup>(4)</sup>、既存の代表的な2種の比色測定法（MTTおよびLDH法）による細胞毒性評価に代わり、分泌・非分泌発光レポーターを併用し非破碎的に毒性をモニターする方法<sup>(5)</sup>等を開発してきた。また近年では、メカニズムに基づく毒性評価法開発に向け、各種の細胞ストレス応答の動的变化をモニターするリアルタイム発光測定を実施している。

本研究会では、これらの発光測定による医薬品毒性研究への可能性について議論したい。

(1) Nakajima Y. and Ohmiya Y., *Expert Opin. Drug Discov.*, 5, 835-849 (2010).

(2) Wakuri et al., *Anal Biochem* 522, 18-29 (2017).

(3) Satoh D. et al., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 33, 17-30 (2018)

(4) Yasunaga et al., *BMC Biotechnol.*, 17, 54 (2017)

(5) Uno K. et al., *Luminescence*, 33, 616-624 (2018).

## S4-2 *In vitro* 系を用いたヒトへの外挿性検討と毒性メカニズム解析の事例紹介とその課題

○藤本 和則<sup>1</sup>, 井口 拓馬<sup>1</sup>, 岸野 寛之<sup>1</sup>, 荒川 真悟<sup>2</sup>, 渡邊 稔之<sup>1</sup>, 森 和彦<sup>1</sup>

第一三共株式会社<sup>1</sup>安全性研究所、<sup>2</sup>オンコロジーラボラトリー

非臨床安全性研究者は、様々な非臨床安全性評価から医薬品のヒトに対するリスクアセスメントを行っている。この中でも、非臨床安全性試験でしばしば直面する種差を伴う毒性表現型からヒトのリスクを適切に予測することは、非常に大きなチャレンジであり、そこに答えを出すことが求められている。この毒性種差に対するアプローチのひとつとして、ヒト由来の培養細胞を用いた *in vitro* 評価の活用がある。つまり、特定の実験動物種でみられた毒性表現型の発現もしくはバイオマーカーの変化を、その実験動物種由来の培養細胞を用いた *in vitro* 評価系に落とし込み、その変化がヒト由来の培養細胞においても同様に認められるか否かを明らかにすることによってヒトでの毒性を予測する、というものである（下図参照）。ただし、個人差が大きいヒト集団の毒性を少数のドナー由来のヒト培養細胞から精度高く予測するためには、毒性種差に関与する毒性メカニズムを明らかにすることがより重要になってくる。

今回、弊社で経験したラット3ヶ月反復経口投与毒性試験でみられた雄ラット特異的な肝細胞脂肪化に関して、ヒト及びラット由来の培養細胞を用いた *in vitro* 系から毒性メカニズム解析を進め、ヒトへの外挿性を検討した事例を紹介する。第一に、長期反復投与でみられた毒性表現系（すなわち雄ラット特異的な肝細胞脂肪化）について、初代培養ラット肝細胞を用いた *in vitro* 系で再現した。次に、この毒性メカニズム解析を目的として、*in vivo* 及び *in vitro* の両方から、オミクス解析（ゲノミクス及びメタボロミクス解析）並びにモデル動物を用いた種々の検討を進め、*in vivo* の毒性表現系が肝臓からの脂質分泌の阻害と脂質合成の亢進に起因している可能性を見出した。一方、*in vitro* においては、*in vivo* をそのまま反映した結果は得られず、*in vitro* の毒性表現系に関与する毒性メカニズムを *in vivo* に外挿するためには、さらなる検討が必要と考えられた。この事例を教訓に、我々非臨床安全性研究者がヒトでの毒性・副作用を予測するために取り組まなくてはならない課題を考えてみたい。

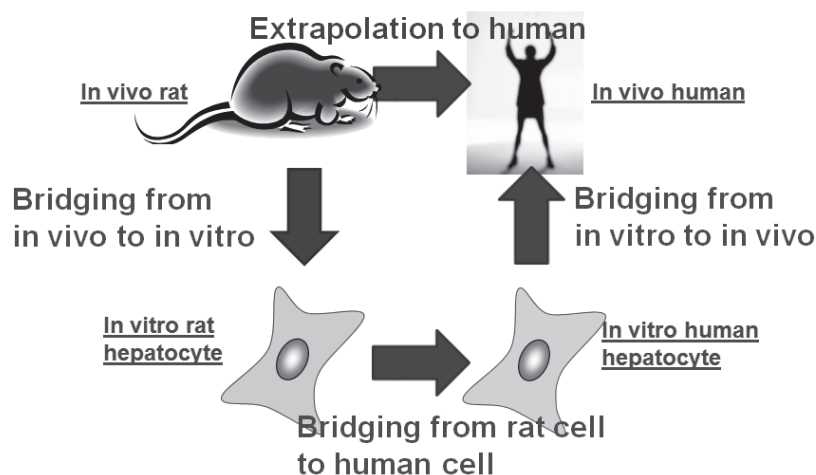


図. *In vitro* 系を用いたヒトへの外挿性検討の1例



## S4-3 クリニカルホールドを受ける前に前臨床試験すべきこと： ヒトへの外挿性を検討した事例紹介

○福井 英夫

Axcelead Drug Discovery Partners, Inc. 非臨床安全性研究

医薬品候補化合物の毒性試験で毒性所見がみられた場合でも、無毒性量と臨床用量との間に十分な安全域があれば開発は可能である。たとえ毒性試験で十分な安全域が得られない場合でも、臨床で毒性マーカーをモニターし、副作用を事前に予見できる場合には臨床試験が実施可能である。また、毒性機作研究の結果から、ヒトへの外挿性が否定できる場合には安全域が確保できなくても開発が可能となる場合がある。一般に、糖尿病、高血圧症、ホルモン依存性がんあるいは消化器関連疾患などの治療薬には十分な安全域が求められる。一方、中枢関連疾患、心不全、慢性閉塞性肺疾患、がんあるいは肥満症などの治療薬では有効性と安全性とのバランスが考慮されるため、それらの安全域についてはケースバイケースで議論される。薬理作用により病気の治癒や症状緩和といった利益が大きい場合には、安全性の懸念はある程度許容されることがある。許容されるリスクの大きさは毒性の性質や重篤度だけでは無く、治療対象となる疾患の重篤度や代替治療法の有無などとの比較が重要であり、疾患そのものに対する知識と理解が必要である。

候補化合物が選別された後、IND までに実施される GLP 毒性試験でみられた毒性の事例として、LH-RH 作動薬などの前立腺がん治療薬でみられたげっ歯類の精巣壊死、及びペプチド性抗肥満薬 GLP-1/GIP 作動薬の小核誘発作用を紹介する。いずれも非臨床試験でみられた毒性変化のヒトへの外挿性を否定できない場合あるいは臨床でモニター可能なバイオマーカーが提示できない場合にはクリニカルホールドを受け、臨床試験が開始できなかった可能性のある事例である。

臨床試験が順調に進み、承認申請の約 1 年前にがん原性試験の結果が明らかになる場合が多い。その際のがん原性試験で設定した低あるいは中用量投与群から腫瘍が発生するケースがある。臨床用量での血中濃度と比較して、十分な安全域が確保できない場合には進行中の臨床試験が中断、あるいは候補化合物の開発自体が中止になるケースもある。今回は、腫瘍の発現メカニズムを説明し、臨床でのバイオマーカーを提示することで、ヒトでのリスク評価が可能であることを示した結果、新薬として承認された事例を紹介する。抗肥満薬 GLP-1 作動薬でみられたげっ歯類の甲状腺 c 細胞の過形成・腺腫、プロトンポンプ阻害薬などの酸分泌抑制薬によりげっ歯類でみられた胃カルチノイド腫瘍及び精巣間細胞腫、あるいは抗糖尿病薬  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬の腎細胞腫瘍を紹介する。前臨床試験でみられた毒性所見の安全性評価を、当局に対して十分に説明できない場合にはクリニカルホールドを受ける。しかし、各種領域の治療薬での安全域の考え方及び毒性発現機作と種差に基づくヒトへの外挿性評価を十分に説明することができれば、開発が中断することはない。本シンポジウムではクリニカルホールドを受ける前に前臨床試験で準備すべきことについて議論したい。

## S5-1 医薬品毒性に対する non-P450 代謝の寄与

### ○深見達基<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>金沢大学 医薬保健研究域薬学系 薬物代謝安全性学研究室

<sup>2</sup>金沢大学 ナノ生命科学研究所

医薬品の多くは薬物代謝酵素により解毒または活性化されるばかりでなく、毒性の原因となる反応性代謝物に変換されることもある。薬物代謝酵素の中でもシトクロム P450 が多くの医薬品の代謝に関与しているが、近年では、シトクロム P450 以外の酵素、non-P450 酵素により代謝される例が増えてきており、non-P450 酵素の情報が求められている。

臨床で使用されている医薬品の約 10%は加水分解反応を受けることが知られており、本反応を利用して薬理活性体へと変換されるプロドラッグの代謝を中心に研究されてきた。最も研究が進んでいる加水分解酵素はカルボキシエステラーゼ (CES) であり、ヒトにおいて CES1 と CES2 の 2 つの分子種が医薬品代謝に関与する。CES による加水分解反応は、反応性代謝物を生成することで毒性を引き起こすこともあり、例えば、β遮断薬アセプトロールや解熱鎮痛薬フルピルチンは CES による加水分解によって抗核抗体産生や肝障害の原因代謝物が生成する。CES のみならず、アリリアセタミドデアセチラーゼ(AADAC)も抗がん薬フルタミド、解熱鎮痛薬フェナセチンおよび真菌症治療薬ケトコナゾールなどによる有害事象に関与していることを明らかにしてきた<sup>1</sup>。

還元反応も医薬品の副作用に関与することがある。ニトロ基を有する医薬品は副作用として肝障害が報告されているものが多い。催眠薬ニトラゼパムや筋弛緩薬ダントロレンのニトロ基の還元は、アルデヒドオキシダーゼ(AOX)が触媒していることを明らかにした<sup>2,3</sup>。すなわち、AOX は酸化反応を担う酵素として認知されてきたが、還元反応をも触媒する多機能性酵素であった。AOX によるニトロ体からアミノ体への還元反応は 2 電子還元反応であるため、毒性アラート構造として知られるヒドロキシルアミン体が中間体として生成する。また、代謝物であるアミノ体からも、シトクロム P450 により酸化されることで同一のヒドロキシルアミン体が生成する。よって、ニトロ基が還元を受けるかどうかは毒性発症の鍵となると考えられる。ニトロ基含有医薬品でも、ニメスリドやニルタミドのような肝障害が副作用として報告されている医薬品は AOX により還元されるものの、ニフェジピンやメトロニダゾールなどの毒性の報告が少ない医薬品は還元されないことも明らかにし<sup>4</sup>、したがって AOX により還元されるニトロ基含有医薬品は毒性発現リスクが高いことが示唆された。

本シンポジウムでは non-P450 酵素による代謝反応が医薬品の副作用発現に関与する事例について最新の知見を発表する。

1) Fukami et al., *Biochem Pharmacol* 116: 153-161, 2016.

2) Konishi et al., *Biochem Pharmacol* 140: 150-160, 2017.

3) Amano et al., *Biochem Pharmacol* 151: 69-78, 2018.

4) Ogiso et al., *Arch Biochem Biophys* 659: 85-92, 2018.



## S5-2 薬物性肝障害の発症とミトコンドリア毒性：機序の理解とスクリーニング系構築への応用

○伊藤晃成

千葉大学大学院薬学研究院 生物薬剤学研究室

臨床において重篤な薬物性肝障害 (DILI) が問題となった薬物の多くで、何らかのミトコンドリア毒性が共通の性質として認められる。よって、非臨床開発の早期に化合物のミトコンドリア毒性ポテンシャル有無を知ることができれば、開発優先順位を定める上で有用な判断材料の一つになると期待される。ミトコンドリア毒性には主に酸化リン酸化 (OXPHOS) 阻害、膜透過性遷移 (MPT) 誘導など複数あるが、スクリーニング効率の観点からは *in vitro* 評価が望ましく、一定程度の感度も求められる。しかし、培養細胞を用いた通常の *in vitro* 評価系ではミトコンドリア毒性が検出されにくいことが経験的に知られ、克服すべき課題となっている。課題の克服に当たっては、ミトコンドリア毒性に絡む周辺機序の理解が必要である。実際に我々は、DILI のモデル動物から単離したミトコンドリアの状態や機能の変化、あるいは、ミトコンドリア毒性感受性を亢進させる因子について探索を進めており、そこで得られた種々の知見を元に試行錯誤しながら *in vitro* 評価系の改良を進めている。

OXPHOS 阻害は主に ATP 産生と関連する呼吸鎖複合体が標的であり、複合体 IV による酸素消費に影響が現れる。そのため、単離ミトコンドリアや培養細胞の酸素消費を特殊な機器でモニタすることで評価可能である。一方、ATP 量の極端な低下は細胞死につながるため、原理的には細胞死をモニタすることで簡便な評価ができるはずである。しかしながら先述のように、*in vitro* では OXPHOS 阻害剤で処理しても細胞死が期待するほど起こらない。生体内では血液からの酸素供給が豊富なため細胞はミトコンドリアで大部分の ATP が生成されるのに対し、培養細胞では気相からの酸素供給のみでは細胞の酸素要求を満たせず、結果的に酸素不足に陥っているためと考えられている。酸素不足下の細胞では ATP の産生がミトコンドリアから解糖系依存にシフトしており (クラブツリー効果)、OXPHOS 阻害が ATP 低下につながりにくい。つまり、OXPHOS 阻害薬のスクリーニング評価を細胞死で行うにはクラブツリー効果の回避が重要となる。これを踏まえ我々は、ラット初代培養肝細胞において培地糖源をガラクトースに置換し (解糖系での正味 ATP 産生がゼロとなる)、さらに培養庫内の酸素濃度を高める処置をすることでクラブツリー効果を効率的に回避し、OXPHOS 阻害薬の細胞死感受性を著しく高めることに成功している。

MPT 誘導はミトコンドリアの外膜と内膜を貫通するポアの開口を指し、これによりマトリクス内容物が細胞質に放出されてプログラム細胞死につながる。MPT 誘導能評価についても *in vitro* 培養細胞での評価が望まれるが、先のクラブツリー効果回避措置のみでは感受性が改善しないことが問題であった。我々は、DILI モデル動物等での検討から、ミトコンドリア内の酸化ストレスが MPT 誘導感受性を高めている可能性を見だし、これを *in vitro* での MPT 誘導評価に応用することを着想した。具体的には、クラブツリー効果を回避した上でさらに一過性の低酸素ストレスを負荷するというプロトコルである。実際に、マウス初代培養肝細胞にプロトコルを適用することでミトコンドリア内の酸化ストレス発生、典型的な MPT 誘導薬物群による特異的な細胞死の検出に成功している。

発表では上記内容を中心にしながら、ミトコンドリア毒性の背景機序、ならびに毒性スクリーニングを指向した実用研究の両面からの成果を紹介したい。

## S5-3 CAR 依存的肝発がんの種差における分子基盤

○吉成 浩一, 志津 怜太

静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

核内受容体 CAR は、PXR などとともに薬物代謝酵素誘導に重要な受容体型転写因子である。CAR はフェノバルビタールをはじめとする多くの薬物により活性化され、CYP2B 遺伝子などの標的遺伝子の転写を亢進する。医薬品の薬効や有害作用、相互作用について CAR の関与を考える際、2 つの種差に注意する必要がある。

1 つは活性化物質の種差である。TCPOBOP や CITCO などの合成リガンドは CAR のリガンド結合領域に結合するため、これらによる CAR の活性化にはリガンド結合領域のアミノ酸配列の差に基づく種差が認められ、TCPOBOP 及び CITCO はそれぞれマウス及びヒト CAR を選択的に活性化する。一方、フェノバルビタールは直接 CAR とは結合せず、EGF 受容体などの細胞膜受容体及び細胞内リン酸化・脱リン酸化シグナルを介して CAR を活性化する。この非リガンド型薬物による CAR の活性化には種差が認められず、フェノバルビタールは齧歯動物及びヒトの CAR をともに活性化する。

もう 1 つの種差は作用の種差である。CAR は薬物代謝に加えて肝細胞増殖や肝発がんにも関与することが明らかになっているが、フェノバルビタールはマウスやラットでは肝発がんプロモーション作用を示すが、ヒトでは肝がんを誘発しないとされ、CAR の肝発がん作用は齧歯動物特異的とされている。この CAR を介した肝発がんの種差の分子機序は不明である。

肝発がんの種差の理解には CAR 依存的な肝細胞増殖の分子機序の解明が重要であるが、その機序もほとんど明らかとなっていない。その原因の 1 つとして齧歯動物の肝細胞増殖をインビトロで観察できないことが挙げられる。また、初代培養マウス肝細胞の CAR 発現レベルは培養に伴い急速に著しく低下することも知られている。これらのことから我々は、アデノウイルスを用いて初代培養及び不死化マウス肝細胞に CAR を高発現させたところ、CAR 依存的な細胞増殖を観察することができた。そこでこの実験系を用いて CAR 依存的な肝細胞増殖の機序解析を進めた結果、CAR 依存的な肝細胞増殖には、臓器サイズを規定する Hippo パスウェイのエフェクター分子である転写共役因子 YAP が重要な役割を果たすことを明らかにした。YAP は通常細胞質に存在し、活性化すると核へ移行して TEAD などの転写因子による細胞増殖関連遺伝子の発現を亢進することで細胞増殖促進作用を示すが、マウスに CAR 活性化物質を投与すると肝での YAP の核移行や YAP/TEAD 標的遺伝子の発現増加が認められ、CAR 活性化に伴い YAP が活性化することが示唆された。さらに、培養細胞を用いたレポーターアッセイにおいて CAR は YAP/TEAD 依存的な転写を亢進したこと、ならびにインビトロでのタンパク質間相互作用解析において、マウス CAR はマウス YAP と結合するが、ヒト CAR はヒト YAP と結合しないことを示唆する結果が得られた。以上の結果から、マウス肝臓において、活性化した CAR は YAP と相互作用することで肝細胞増殖を引き起こし、CAR と YAP の分子間相互作用が CAR 依存的な肝細胞増殖、さらにはおそらく肝発がんの種差の原因となっていると考えられた。

本講演では当研究室での研究成果ならびに過去の知見を基に、CAR を介した肝発がんの種差の分子基盤について議論したい。

参考文献：T Abe, Y Amaike, R Shizu, M Takahashi, M Kano, T Hosaka, T Sasaki, S Kodama, A Matsuzawa, K Yoshinari: Role of YAP activation in nuclear receptor CAR-mediated proliferation of mouse hepatocytes. *Toxicol Sci*, 165, 408-419, 2018.

## S6-1 HLA ノックインマウスの作製と医薬品毒性評価への応用の可能性

○原田 直幹

大鵬薬品工業（株） 研究本部

腫瘍組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex; MHC) クラス I 分子は、様々な抗原ペプチドを細胞膜表面に提示することにより細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を活性化し、ウイルスや癌などの異物の排除および自己/非自己の認識において重要な役割を果たすことが知られている。MHC class I 遺伝子はマウス (H-2 class I) とヒト (HLA class I) とで異なるため、ワクチンなどの *in vivo* 評価モデルとして使用するために、これまで種々の HLA を発現するトランスジェニック (Tg) マウスが作製されてきた。

我々は HLA-A0201, HLA-A0301, HLA-A2402, または HLA-A3101 の  $\alpha 1/\alpha 2$  ドメインとマウス H-2Db の  $\alpha 3$  ドメインを、15 アミノ酸のリンカーを用いてヒト  $\beta 2$  ミクログロブリン ( $\beta 2m$ ) と連結したキメラ HLA class I 分子を、マウス  $\beta 2m$  遺伝子座にノックイン (KI) したマウスを作製した。ヘテロ接合体およびホモ接合体 KI マウスでは、ヒト末梢血単核細胞と同様に、遺伝子コピー数に依存した HLA の発現が認められた。種々のウイルス抗原エピトープで HLA-KI マウスを免疫したところ、HLA 拘束性でエピトープ特異的な CTL 反応が誘導された。これらの結果から、本 HLA class I KI マウスモデルは、前臨床におけるワクチン評価に有用な研究ツールとなることが示された。

近年、過敏症や重症薬疹などの医薬品副作用が特定の HLA 型と相関することが報告されており、毒性発現を評価するモデルとして HLA-Tg マウスが使用されているが、HLA-Tg マウス作製には遺伝子コピー数や発現量を指標としたファウンダーの選別が必要である。HLA KI マウスでは系統選別の労力が不要であることから HLA-Tg よりも汎用性の高い評価モデルとなることが期待される。また、CRISPR/Cas9 の登場によりゲノム編集技術が飛躍的に進歩し、マウス受精卵に Cas9 と guide RNA をエレクトロポレーションすることにより個体レベルで特定の遺伝子を KO することが可能となり、同時に相同組換修復に必要な鋳型 DNA を導入することによって特定の遺伝子配列を KI することも可能になりつつある。HLA-KI マウスは、HLA 遺伝子を 1 または 2 コピーのみ保有することから、受精卵を用いて直接 HLA 遺伝子の編集を行うことが可能であり、種々の HLA 型の KI マウスを短時間で効率良く作製できる可能性についても言及する。

## S6-2 HLA トランスジェニックマウスを用いた薬物過敏症のメカニズム研究

○青木 重樹, 伊藤 晃成

千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室

医薬品による副作用には、特定の遺伝子や環境が関係した特異体質薬物毒性が存在する。特異体質薬物毒性は、発症頻度こそ低いものの、時として死亡するリスクもあることから、臨床上無理することができず、その予測・回避が重要な課題である。近年、特異体質薬物毒性の発症リスクとヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen; HLA) 多型との関連が多数報告されている。例えば、HLA-B\*57:01 多型を有する患者では、アバカビルによる薬物過敏症やフルクロキサシリンによる肝障害、HLA-B\*15:02 多型を有する患者では、カルバマゼピンによる SJS/TEN などの発症リスクが報告されている。しかし、その発症機序に関しては未解明な点が多く、我々は HLA トランスジェニックマウスを作出し、HLA 多型と特異体質薬物毒性発症の因果関係の実証、およびそのメカニズムの解明に取り組んでいる。ここでは特に、アバカビルによる薬物過敏症に焦点を当て、HLA-B\*57:01 トランスジェニックマウス (B\*57:01-Tg) を用いた解析から得られた結果について発表する。

まず、B\*57:01-Tg および陰性対照の B\*57:03-Tg (HLA-B\*57:01 と 2 アミノ酸異なる HLA 多型のトランスジェニックマウス) の耳介にアバカビルを 3 日間連続で塗布し、耳介リンパ節中の CD4 または CD8 陽性 T 細胞における BrdU 取り込み、および IL-2、IFN- $\gamma$  陽性細胞の割合を測定した。その結果、アバカビルを曝露した B\*57:01-Tg では、CD8 陽性 T 細胞における上記いずれの増加も確認された一方で、B\*57:03-Tg では顕著な変化は認められなかった。CD4 陽性 T 細胞については、どちらのマウスにおいても有意な変化を認めなかった。次に、アバカビル塗布後の凍結耳介組織切片を作製し、H&E 染色により所見を観察した。すると、アバカビルを曝露した B\*57:01-Tg の耳介でのみ、真皮組織中への炎症性リンパ球の浸潤が認められた。これらの結果から、作出した B\*57:01-Tg を用いて、アバカビルによる薬物過敏症を再現することが可能ではないかと考えられた。

アバカビル過敏症を含めて、HLA の関与する薬物毒性は皮膚で好発する。そこで、B\*57:01-Tg 由来の表皮細胞 (ケラチノサイト) を用いて、HLA 多型特異的な免疫応答、およびそれに続く獲得免疫系への作用が認められるか検討した。まず、アバカビル曝露時の細胞内応答を DNA マイクロアレイを用いて評価したところ、カルシウムシグナリングや MAPK 経路などに関連する mRNA の発現上昇が認められた。次に、アバカビル曝露時の細胞内応答を詳細に検討したところ、MAPK 経路の中でも特にストレス応答性の JNK 経路の亢進が観察された。さらに、アバカビルを曝露した B\*57:01-Tg 由来のケラチノサイトの培養上清を骨髄細胞より分化誘導させた樹状細胞に添加したところ、その樹状細胞の活性化が認められた。つまり、アバカビル曝露に伴って、HLA-B\*57:01 を発現するケラチノサイト内で免疫応答が惹起され、それが樹状細胞の活性化・獲得免疫系の亢進に関与していることが示唆された。B\*57:01-Tg においても、アバカビルを皮内投与することで、ケラチノサイトにおける Hsp70 の発現上昇、樹状細胞の所属リンパ節への遊走が認められており、ケラチノサイトにおける HLA 多型特異的な応答が、過敏症の発症に関与していると想定している。

以上の結果から、HLA の関与するアバカビル過敏症の発症に関して、HLA 多型特異的なケラチノサイトにおける免疫応答、およびそれに続く CD8 陽性 T 細胞の活性化 (獲得免疫系の亢進) が、皮膚を特徴とした傷害発現に寄与していると考えている。



## S6-3 重症薬疹の発症と関連する HLA 型とその発症機序における役割

○中村 亮介

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

Stevens-Johnson 症候群 (SJS) や中毒性表皮壊死症 (TEN) に代表される重症薬疹は、非常にまれではあるものの、医薬品副作用被害救済制度の救済例では毎年最も頻度の高い、極めて深刻な副作用である。SJS と TEN は同一の臨床スペクトラムに属しており、基本的に同一の疾患と考えられている。多くの被疑薬による SJS/TEN の発症例が知られているが、カルバマゼピンやフェニトイン等の芳香族抗てんかん薬、アロプリノール、感染症治療薬などの報告が多い。CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞が関与する IV 型過敏症の一種である。

カルバマゼピンに関しては、台湾の漢民族を対象とした研究により、HLA-B\*15:02 というヒト白血球抗原 (HLA) 型が SJS/TEN の発症と有意に関連していることが明らかになり、その後、東南アジアを中心に多くの民族でその関連が再確認された。同 HLA は、オクスカルバゼピンやフェニトインといった、他の芳香族抗てんかん薬に関しても、SJS/TEN との関連が報告されている。また、アロプリノールによる SJS/TEN では HLA-B\*58:01 が、アバカビル過敏症では HLA-B\*57:01 が、ダブソンによる過敏症や SJS/TEN では HLA-B\*13:01 が関連することが知られている。

我々は、厚生労働省・PMDA・日本製薬団体連合会の協力の下、全国で散発的に発生する SJS/TEN の症例を 10 年以上収集している。その結果、日本人症例におけるアロプリノールと HLA-B\*58:01 の関連の他、抗てんかん薬や風邪薬等における SJS/TEN の発症と関連する HLA 型を見出してきた。

HLA 依存的な薬物特異的免疫反応が誘導される機序として、現在のところ大きく 3 種の仮説が提唱されている。まずは、ペニシリン等によく知られる古典的な「ハプテン-プロハプテン仮説」である。次に、薬物が直接 HLA または T 細胞抗原受容体 (TCR) と結合することによって抗原として認識される「p-i (pharmacological interaction with immune receptors) 仮説」が挙げられる。カルバマゼピンやオキシプリノールの応答様式が p-i モデルで説明されている。最後に、アバカビル過敏症等における、薬物が HLA のペプチド結合溝に結合することにより提示されるペプチドのレパトアが変化する「レパトア改変仮説」である。

本講演では、これらの機序を紹介するとともに、我々が現在行なっている *in vitro* の解析系において見出された結果について議論したい。最後に、HLA が重症薬疹の発症において果たす役割を考察し、より安全な医薬品の使用・開発等への貢献の可能性を考えたい。

## S6-4 OECD AOP プログラム及び免疫毒性 AOP 開発の現状と将来

○大石巧<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 日本免疫毒性学会試験法委員会 AOP 検討小委員会

<sup>2</sup> 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

Adverse Outcome Pathway (AOP) とは、化学物質によって生じる複数の有害事象の中から、一つの標的分子への作用 (Molecular Initiating Event, MIE) と一つの有害事象 (Adverse Outcome, AO) に着目して、生体の各レベル (分子レベル、細胞レベル、組織/器官レベル、個体レベル、集団レベル) において定量が可能な重要な事象 (Key Event, KE) を抽出して MIE から AO に至る一連の経路とし、各 KE 間の関係 (Key Event Relationship, KER) の確かさを示したものである。生体に発生する有害事象は、複数の AOP の集合として理解することができ、それらの複数の AOP が KE や KER を共有することにより、AOP ネットワークを構築することが可能になる。集積された AOP による Knowledge Base から得られる AOP ネットワークが、試験法の選定やガイドラインの策定、更には、試験法を組み合わせる総合的に毒性を評価する手法である IATA (integrated approaches to testing and assessment) の作成の基盤となることが期待されている。

OECD では、Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics (EAGMST) のメンバーを中心に AOP Development Programme が進められている。開発中の AOP は OECD の専用サイトである AOP Wiki に登録されて公開され、OECD の EAGMST による内部レビュー、さらにその後外部レビューを受けた後、発行される。我が国では、日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) が OECD AOP Development Programme に参加し、免疫毒性を含む AOP の作成を進めている。

免疫毒性に関する AOP については、その作成が JaCVAM から日本免疫毒性学会に依頼され、同学会の試験法委員会内に AOP 検討小委員会を組織して作成が進められている。その第一段階として、カルシニューリン阻害を MIE とする免疫抑制の AOP 事例 (Inhibition of Calcineurin Activity Leading to Impaired T-Cell Dependent Antibody Response) の作成を進め、EAGMST による内部レビューまで終了し、外部レビューの段階に進んだところである。更に、AOP 検討小委員会では、Janus kinase 阻害、Toll-like receptor の活性化及び Estrogen receptor の活性化を MIE とする免疫毒性の AOP 作成を OECD に申請した。今後は、この3つの AOP の作成も併せて進めることにより、免疫毒性の AOP ネットワークの構築、更には、免疫毒性の IATA 作成にも貢献してゆきたいと考えている。

実際の AOP の作成では、膨大な文献情報の中から必要な情報を集め、MIE、各 KE と AO、さらにこれらの関係の妥当性を示す KER を作成し、これらの要約と総合的評価をまとめた AOP Overview を作成して、これら全てを AOP Wiki に入力することになる。AOP の作成上留意すべきこととして、各 KE や KER は他の AOP でも利用される可能性を考慮すること、さらに、KER では前後の KE 間の用量反応関係や時間関係を明らかにする必要がある。このような AOP の特性を考慮すると、文献知見には AOP に利用しやすい情報と AOP に利用しにくい情報があることが推察される。したがって、将来、新知見に関する AOP 作成を考慮するのであれば、AOP 作成に必要な情報が得られる実験を計画する必要があるだろう。



# ポスター要旨

# P-1\* リードアクロスによるラット反復投与毒性のインシリコ予測手法の提案

○竹下 潤一<sup>1,2</sup>, 橋内 陽子<sup>2</sup>, 佐々木 崇光<sup>2</sup> 吉成 浩一<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (国研) 産業技術総合研究所 安全科学研究部門

<sup>2</sup> 静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】化学物質、農薬、食品添加物等の安全性評価は、実験動物を用いた毒性試験に基づいて実施されている。しかし、動物実験にかかる費用・期間や動物愛護の観点から、世界的に動物実験代替法（インビトロ試験等）を用いた毒性判別方法や計算科学的なアプローチによる毒性予測手法（インシリコ手法）の開発が着目されている。インシリコ毒性予測手法には大きく分け2つ枠組みが提案されている。QSAR（構造活性相関）手法[1]とリードアクロス手法[2]である。そして遺伝毒性などエンドポイントが1つである毒性についてはQSARの枠組みによる予測手法が整備されつつある[3]。一方で、一般毒性を評価する反復投与毒性については、リードアクロス手法を用いたケーススタディがいくつかあるものの、計算科学的なアプローチによる先行研究はほとんどないと言える。そこで、本研究ではリードアクロスの枠組みによるラット反復投与毒性のインシリコ予測手法の提案を目指し、基礎検討を行った。

【方法】(1) (独) 製品評価技術基盤機構が公開している HESS[4]より、雄性ラットの28日間反復投与毒性試験及び、42日間反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験データを抽出し、460物質と肝毒性、腎毒性、血液毒性に関連する84所見を解析対象とした。(2) 毒性学的観点から、6つの肝毒性、1つの腎毒性、1つの血液毒性の所見グループ(EPG)を作成し、これら8個のEPGを予測対象のエンドポイントとした。(3) 各化合物の各EPGについて、LOELが1,000 mg/kg 体重/day未満である場合を「陽性」と、それ以外の場合を「陰性」と定義した。(4) 各化合物をアトムペア[5]で表現することとし、化合物間の距離（非類似度）をアトムペアの有無を表す0-1ベクトル間のコサイン距離で表現することとした。(4)  $k$ -近傍法[6]によりリードアクロス手法を提案することとした。

【結果・考察】 $k$ -近傍法のアルゴリズムで、予測対象化合物の17近傍を考え、近傍化合物の30%以上が「陽性」を示しているEPGを「陽性」と予測する場合は内部検証による精度が良かった。このときの内部検証の精度は、感度0.729、特異度0.545、精度0.599であり、外部検証の精度は感度0.602、特異度0.679、精度0.657となった。本研究では、毒性予測の枠組みの1つであるリードアクロスについて、計算科学的な手法で実現化することを試みた。その結果、最初の試みとしては比較的良い予測精度を持つ手法を提案することができたと考えられる。今後、化合物の表現方法、化合物間の非類似度、予測アルゴリズムなどをさらに検討していき、精度の向上を目指したい。

## 【参考文献】

- [1] OECD, *Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationships [(Q)SAR] models*, 2007.
- [2] OECD, *Guidance on grouping of chemicals*, 2014.
- [3] M. Hayashi, E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita, and M. Ema, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2 (2005) 129–135.
- [4] NITE, Hazard Evaluation Support System Integrated Platform (HESS), <http://www.nite.go.jp/en/chem/qsar/hess-e.html> (accessed November \*\*, 2018).
- [5] R.E. Carhart, D.H. Smith, and R. Venkataraghavan, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **13** (1985) 8–11.
- [6] B.V. Dasarathy, *Nearest Neighbor (NN) Norms: NN Pattern Classification Techniques*, IEEE Computer Society Press, 1991.

## P-2\* 機械学習法を利用した化学物質誘発性腎毒性の予測

○落部 達也, 安部 賀央里, 頭金 正博

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 医薬品安全性評価学分野

### 【背景・目的】

近年、人工知能に関するコンピュータ技術の発展に伴い、実験動物を用いた毒性試験の代替法の一つとして、*in silico* による毒性予測手法が注目されている。*In silico* 毒性予測手法の開発において、予測モデル構築のためには、質の高い十分な量の学習データと適切な予測手法が必要不可欠である。独立行政法人製品評価技術基盤機構から公開されている有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) には化学物質審査規制法で実施された既存化学物質等の反復投与毒性試験情報が収載されており、その毒性試験は Good Laboratory Practice に準拠しているため、試験情報の信頼性が担保されている。本研究では、反復投与毒性において重要な腎毒性に着目し、HESS を用いて、機械学習法により化学物質の構造情報から腎毒性を予測する *in silico* モデルの開発を目的とした。

### 【方法】

HESS に搭載されている腎毒性に関する所見及び報告物質数を調査し、最も報告数が多かった腎重量増加に着目した。雄性ラットの 28 日間反復投与毒性試験情報と 42 日間反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験情報を抽出し、Lowest Observed Effect Level (LOEL) と No Observed Effect Level (NOEL) を用いて、腎重量増加の有無により陽性と陰性を定義した。化学物質の構造データを用いて、Dragon7 による分子記述子の計算を行った。予測モデルは Support Vector Machine (SVM) 及び Random Forest (RF) を用いた。モデル性能の評価指標には予測精度、感度、特異度、曲線下面積 (AUC)、及びマッシュューズ相関係数 (MCC) を使用し、5-分割交差検証法により評価した。MCC は正例と負例が不均衡な場合であっても予測性能を評価することが可能である。MCC は -1 ~ 1 の値を取り、1 に近づくほど性能の良いモデルであるといえる。上記の腎重量増加の予測モデル(モデル 1; 陽性 159 物質、陰性 132 物質)を構築した後に、腎重量増加に加えて腎臓の病理学的所見誘発の有無を予測するモデル(モデル 2; 陽性 105 物質、陰性 118 物質)と腎重量増加に加えて血清クレアチニン (Cre) 値の上昇又は尿素窒素 (BUN) の上昇の有無を予測するモデル (モデル 3; 陽性 23 物質、陰性 131 物質)を構築した。

### 【結果・考察】

HESS には腎毒性に関連する多様な毒性所見が評価されており、所見ごとに収集できる学習データ数は異なっていた。腎臓重量増加や腎臓の病理学的所見に関しては多くの化学物質が収集可能であったが、Cre 値の上昇や BUN の上昇等のバイオマーカーに関しての報告は少なかった。特に Cre は腎機能の鋭敏な指標ではなく、重度の腎障害を誘発する化学物質のみが報告されていると考えられる。モデル 1 を構築した結果、SVM, RF の両モデルにおいて MCC は 0.40 ~ 0.50 であった。モデル 2 では、SVM, RF の両モデルにおいて MCC は 0.55 を上回っていた。モデル 1 と比較してモデル 2 の予測性能の方が優れていたという結果から、腎重量増加のみでなく、腎臓の病理学的所見の条件を加えることで、陽性と陰性の区別がより明確になったと考えられた。また、モデル 3 では SVM, RF の両モデルにおいて MCC は 0.30 未満であった。モデル 3 では陽性物質数が少なく、大部分を陰性に予測していたため、予測性能が低くなったと考えられる。本研究では HESS を用いて化学物質誘発性腎毒性予測モデルの構築を行った。また、本研究の結果から *in silico* 毒性予測において、目的とするエンドポイントの設定や、確保できるデータ数の検討が重要であることが示唆された。

## P-3 OECD AOP プロジェクト

### ○小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部

#### 【背景・目的】

経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）では、EAGMST（Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics）というプロジェクトにおいて、毒性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）の開発を進めている。AOPは全身毒性や環境毒性の発現経路を明確にするために、US EPA（United States Environmental Protection Agency）で開発され、以後OECDにて採用され、この情報をもとに*in silico*や*in vitro*試験の開発を促すためにその概念が発展してきた。本発表の目的は、EAGMSTの活動を紹介し、AOPへの理解を深めて頂くことである。

#### 【現状】

このプロジェクトが設置されてから5年がたつが、US EPAとEU JRC(Joint Research Centre)を中心にガイダンスや入力フォームAOP wikiやEffectopedia等の開発、AOPの普及・教育が行われてきた。これまでに成立したAOPはまだ10に満たず、現在、100以上のAOPが開発されている。OECDのAOPとは、毒性発現までの過程をなるべくシンプルに、枝分かれ少なく記載しようというものであり、MIE（Molecular Initiation Event）から始まり、KE (Key Event)とKER（Key Event relationship）からなり、AOに至る。それにより、WoE（Weight of Evidence）が明確になっていくことが期待される。開発者はEAGMSTに申請した後、入力フォームにそれぞれのAOP案を入力し、EAGMSTによる内部評価を受けた後、外部第三者評価を受けて公定化される。

#### 【考察】

日本でも10本程のAOP開発をEAGMSTに提案している。当初は、AOPの開発をもっと軽く考えていた。これは最初に開発された皮膚感作性のAOPに起因する。現在でも、このAOPをもとにOECDの試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）は作られていることからよく引用される。しかし、現在の求められるAOPは皮膚感作性のAOPを超越し、進化し続けている。Living documentであり、特定の物質のAOではなく、一般的でなければならない。KEやKERは定量的でなければならない、それをもとにWoEが明確になっていくなど、我々が最初に免疫毒性のAOP開発を提案した際にはなかったルールである。それが、AOPの開発が進む中で徐々に精査されてきた。

さて、このAOPは本当に*in silico*や*in vitro*試験の開発のため、バイオマーカーと提案する情報として有用なのであろうか。日本人はEAGMSTの枠組みの中でAOPを開発する意義をどこに見つければいいのか。OECDの枠組みの中で、AOPの開発と利用が問われていると考えている。

【参考文献】 Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics, Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>

## P-4\* 肝発がん物質のラット反復投与による遺伝毒性の有無での肝臓における細胞老化関連代謝分子の発現反応の違い

○伊藤 優子<sup>1,2</sup>, 中島 康太<sup>1,2</sup>, 増淵 康哲<sup>1,2</sup>, 菊地 聡美<sup>1</sup>, 齋藤 文代<sup>3</sup>, 赤堀 有美<sup>3</sup>, 吉田 敏則<sup>1</sup>, 渋谷 淳<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学 獣医病理学研究室

<sup>2</sup>岐阜大学大学院 連合獣医学研究科

<sup>3</sup>化学物質評価研究機構

**【背景及び目的】** 不可逆的な細胞周期停止 (G1 期停止) を表現型とする細胞老化は化学物質投与による不可逆的毒性と考えられる。我々は、肝発がん物質のラットへの投与時に、肝臓での発がん性に関連した細胞周期分子の反応性が発がん物質の遺伝毒性の有無により異なることを見出している。本研究では、ジエチルニトロソアミン (DEN)、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を遺伝毒性及び非遺伝毒性肝発がん物質の例としてラットに投与した際の、肝臓における細胞老化関連代謝分子の発現と発がん過程への関与の相違を比較・検討した。

**【材料及び方法】** ラットに DEN ないし CCl<sub>4</sub> の発がん用量を 28 日間ないし 84 日間反復経口投与し、肝臓における代謝及び細胞老化関連分子の遺伝子発現と免疫組織学的分布を検討した。

**【結果及び考察】** 解糖系関連遺伝子は、DEN 群では 84 日目で発現増加したが、CCl<sub>4</sub> 群では 28 日目より減少した。酸化リン酸化関連遺伝子は、CCl<sub>4</sub> 群のみで 28 日目から発現減少した。老化関連細胞周期制御遺伝子 *Cdkn1a* 及び *Cdkn2a* の発現は DEN 群で顕著に増加したが、CCl<sub>4</sub> 群では 28 日目のみで *Cdkn2a* が増加し 84 日目では逆に低下した。84 日目の免疫組織学的解析により、DEN 群のみで前がん病変である GST-P<sup>+</sup> 巣に一致して、glucose transporter 1 (GLUT1) の発現が増加しており、解糖系の亢進が示唆された。一方、ミトコンドリア ATP 合成酵素である ATP synthase subunit beta (ATPB) の発現は両群で減少し、酸化リン酸化の抑制が共通機序として示唆された。細胞老化関連細胞周期制御分子 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> の発現は、CCl<sub>4</sub> 群では GST-P<sup>+</sup> 巣に一致して陽性を示したが、DEN 群では GST-P<sup>+</sup> 巣を含めた肝臓全域で陽性を示した。以上より、遺伝毒性肝発がん物質では細胞老化が亢進しながら発がんのスイッチが入り、前がん病変内では、Warburg 効果として知られる酸化リン酸化から解糖系への代謝シフトが生じるのに対して、非遺伝毒性肝発がん物質では投与期間の延長に伴う細胞老化の破綻と、前がん病変での解糖系の不応答が示唆された。



## P-5 Wnt signaling and epithelial-mesenchymal transition pathway network in mesenchymal stem cells and gastric cancer

○田邊 思帆里<sup>1</sup>, 青柳 一彦<sup>2</sup>, Sabina Quader<sup>3</sup>, 横崎 宏<sup>4</sup>, 佐々木 博己<sup>5</sup>, 広瀬 明彦<sup>1</sup>  
○Shihori Tanabe<sup>1</sup>, Kazuhiko Aoyagi<sup>2</sup>, Sabina Quader<sup>3</sup>, Hiroshi Yokozaki<sup>4</sup>, Hiroki Sasaki<sup>5</sup>,  
Akihiko Hirose<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部

<sup>2</sup> 国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター 臨床ゲノム解析部門

<sup>3</sup> 公益財団法人 川崎市産業振興財団 医療イノベーションセンター

<sup>4</sup> 神戸大学大学院医学研究科 病理学講座・病理学分野

<sup>5</sup> 国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター 創薬標的・シーズ探索部門

<sup>1</sup> Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences

<sup>2</sup> Department of Clinical Genomics, National Cancer Center Research Institute

<sup>3</sup> Innovation Centre of NanoMedicine (iCONM)

<sup>4</sup> Department of Pathology, Kobe University of Graduate School of Medicine

<sup>5</sup> Department of Translational Oncology, National Cancer Center Research Institute

### 【Background and Objective】

Several signaling pathways with gene expression alteration are regulated in cancer and stem cells. Cells exhibiting EMT (epithelial-mesenchymal transition), the important cellular phenotype alteration, exist in population of cancer stem cells (CSCs). In this study, detailed mechanism of EMT with molecular signature alteration was investigated.

### 【Methods】

Gene expression was profiled in bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and diffuse-type gastric cancer (GC) using GeneChip Human Genome U133Plus 2.0 Array, followed by cluster analysis and real-time RT-PCR technique. Molecular network was analyzed using databases such as cBioPortal for Cancer Genomics, Ingenuity Pathway Analysis, KEGG and Reactome.

### 【Results and Discussion】

Gene expression in CDH1 and ERBB3 in diffuse-type GC were up-regulated compared to MSCs, whereas gene expression in CDH2 was down-regulated. The EMT networks analyzed included WNT/beta-catenin signaling. The ERBB network was activated in diffuse-type GC compared to MSCs. The gene expression of CDH1 was up-regulated in intestinal GC compared to diffuse-type GC. The EMT-related pathway networks and molecular signatures in MSCs and GC were revealed in this study. It is very important to further know EMT-related signatures to reveal the mechanism in CSCs.

### 【References】

1. Shihori Tanabe (2018). “Molecular network and cancer” *Research Journal of Oncology*, 2, 1: 3
2. Shihori Tanabe, Kazuhiko Aoyagi, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki (2018). “Molecular pathway network of EFNA1 in cancer and mesenchymal stem cells” *AIMS Cell and Tissue Engineering*, 2, 58-77
3. Shihori Tanabe (2017). “Networking the signaling pathways in stem cells and cancer” *Journal of Clinical Epigenetics*, 3, 28
4. Shihori Tanabe, Takeshi Kawabata, Kazuhiko Aoyagi, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki (2016). “Gene expression and pathway analysis of CTNBN1 in cancer and stem cells” *World Journal of Stem Cells*, 8, 384-395



## P-6\* 核内受容体 CAR 活性化による肝発がんプロモーションの分子機序解析

○志津 怜太, 曾部 圭一郎, 阿部 太紀, 石村 麻衣, 保坂 卓臣, 佐々木 崇光,  
吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】核内受容体 CAR は、肝臓に高発現する異物応答性の転写因子である。CAR は、フェノバルビタールをはじめとする多種多様な化学物質によって活性化され、薬物代謝酵素等の発現調節を介して異物除去を担っている。一方で、CAR の活性化は齧歯動物において肝細胞増殖や肝がんを引き起こすことが知られている。CAR 依存的な肝発がんには種差が認められ、CAR はヒトでは肝がんを引き起こさないとされている。しかし、CAR 依存的肝細胞増殖の分子機序が明らかとなっていないため、実際にヒトにおいて肝がんが起るか否かは不明である。以上のことから我々は、CAR 依存的な肝発がん機序の解明を目指して研究を進め、最近、臓器サイズを規定する Hippo 経路のエフェクター分子であり、肝細胞増殖促進因子である YAP が CAR 依存的肝細胞増殖に関与する可能性を見出した。本研究では、CAR による肝細胞増殖における YAP の役割に注目し、齧歯動物における肝発がんの分子機序を明らかにすることで、種差を明確にすることを目的とした。

【方法】CAR 活性化物質である TCPOBOP をマウスに 3 日間連続腹腔内投与 (3 mg/kg/day) し、最終投与 24 時間後の肝の YAP の活性化について、YAP の核移行を免疫組織化学法および核抽出液を用いたウェスタンブロット法で、YAP 標的遺伝子発現レベルを定量的逆転写 PCR 法で調べた。

CAR と YAP の相互作用を明らかにするため、His タグを付与したマウスおよびヒト CAR の組換えタンパク質を大腸菌から精製し、それぞれのマウスおよびヒト YAP のインビトロ翻訳タンパク質との結合を Ni-NTA カラムを用いたインビトロプルダウンアッセイにより解析した。さらに、CAR と YAP の相互作用部位の特定のため、それぞれのドメインを部分的に欠損させた変異体を用いて相互作用を同様に解析した。種差の原因を明らかにするため、特定された相互作用部位のヒト齧歯動物間のアミノ酸配列およびタンパク質立体構造を比較した。

【結果・考察】TCPOBOP を投与したマウスの肝において、YAP の明らかな核移行が認められ、YAP 標的遺伝子である *Birc5*、*Ankrd1* および *Myc* mRNA レベルは増加していた。よって、CAR 活性化により YAP が活性化することが示唆された。インビトロプルダウンアッセイの結果、マウス CAR とマウス YAP は相互作用したが、ヒト CAR とヒト YAP は相互作用しなかった。ドメインを部分的に欠損させた変異体を用いて相互作用部位の探索を行ったところ、マウス YAP は WW ドメインと呼ばれるドメインを介してマウス CAR と相互作用していることが示唆された。YAP の WW ドメインは、PPxY (x はいずれかのアミノ酸) のアミノ酸配列 (PY モチーフ) と選択的に相互作用することが知られている。そこで、マウス、ラット及びヒト CAR のタンパク質アミノ酸配列中の PY モチーフを探索したところ、マウスおよびラット CAR は PY モチーフ (PPAY) を有するが、ヒト CAR ではこの配列が PPAH に変異していた。したがって、この PY モチーフの違いが CAR と YAP の相互作用の種差、ひいてはヒトと齧歯動物における CAR を介した肝発がんの種差の原因となる可能性が考えられた。

【参考文献】 T Abe, Y Amaike, R Shizu, M Takahashi, M Kano, T Hosaka, T Sasaki, S Kodama, A Matsuzawa, K Yoshinari: Role of YAP activation in nuclear receptor CAR-mediated proliferation of mouse hepatocytes. *Toxicol Sci*, **165**, 408-419, 2018.

## P-7\*

# 一過性低酸素は薬物によるミトコンドリア透過性遷移を介した細胞死を惹起する

○池山 佑豪, 佐藤 智之, 関根秀一, 荒川公一, 伊藤晃成

千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室

【背景・目的】近年、ミトコンドリア (Mt) 障害は薬剤性肝障害 (DILI) の主たる要因の一つと考えられている。DILI は臨床試験の中止や市販後の撤退につながり得るため、前臨床において Mt 障害に起因する肝細胞死を評価することは重要である。Mt 障害には呼吸鎖複合体阻害 (RCI)、Mt 透過性遷移 (MPT) の惹起が含まれる。このうち、呼吸鎖複合体阻害については単離 Mt を用いた評価系や、培地中の糖源をガラクトースに置換した細胞の評価系が存在するが、MPT については主に単離 Mt での評価に留まっている。単離 Mt の系では、薬物自身の影響を直接的に評価できる利点がある一方、薬物代謝の影響を含まないことや細胞死との対応が必ずしも明確でないなどの問題が残るため、細胞を用いた評価系の構築が必要である。過去に我々は、ある種の DILI 誘発薬物の毒性発現の閾値を低下させる LPS-DILI モデルラットを用いた先行研究において、一過性虚血により産生される活性酸素種 (ROS) が MPT の感受性増強とそれに引き続く肝障害発症に関与することを見出している。そこで本研究では、これら LPS-DILI モデルでの知見を踏まえ、一過性低酸素 (H/R) を *in vitro* で再現することで MPT を介した肝細胞死の評価を可能とする系の構築を目的とした。

【方法】Mt 機能を *in vitro* で評価する際、その機能を *in vivo* に近づけることが重要と考えられる。そこで、(1) 肝細胞の上下を細胞外マトリックスで挟むサンドイッチ培養、(2) 糖源をグルコース (Gluc 条件) からガラクトース (Gala 条件) に置換した培養、の二点に着目し、マウス肝細胞に対して (1) (2) を組み合わせた培養法を検討した。薬物曝露時、マルチガスインキュベーターを用いて 1%O<sub>2</sub> で 4 時間、その後 40%O<sub>2</sub> 条件で 20 時間培養を行った。細胞死は乳酸脱水素酵素の漏出で評価した。

【結果・考察】H/R 処理による ROS の発生を評価するため、1%O<sub>2</sub> 条件 4 時間後 40%O<sub>2</sub> 条件下に戻し 2 時間培養した群 (H/R 6hr)、およびコントロール群 (N) における MtROS を評価した。その結果、Gala 条件でのみ H/R 6hr で N と比較して ROS 増強が認められた。この系を用いて薬物による細胞死への影響を評価した結果、MPT を引き起こすことが既知の四薬物 (ジクロフェナク、フルタミド、ベンズプロマロン、トログリタゾン) のうちジクロフェナク以外の三薬物において、Gala 条件でかつ H/R 処置を行った群でのみ顕著な細胞死を認めた。これら三薬物で認められた細胞死が MPT によるものかを確認するため、MPT の構成因子の一つである Cyclophilin D を欠損させたマウスにて同様の検討を行った結果、いずれも細胞死は有意に減弱し、MPT の関与が示された。一方、RCI による細胞死が既知の薬物 (ロテノンなど四薬物) については、Gluc 条件に比べ、Gala 条件での毒性増強は認められたものの、H/R 処置による細胞死増強は確認されず、また、ROS 生成による細胞死が既知の薬物 (イミプラミンなど三薬物) では、Gluc 条件、Gala 条件ともに H/R 処置での細胞死増強を認めた。

【結論】サンドイッチ培養、Gala 条件と H/R 処置を組み合わせることで、MPT を介した肝細胞死評価が可能となった。本手法は、培地中の糖源置換により RCI を介した肝細胞死を鋭敏に検出する既存の手法に加え、これまで検出困難だった MtROS 生成や MPT を背景機序とする Mt 障害に起因した肝細胞死の評価を補完しうる点で有用と考えられる。

# P-8\* イメージング質量分析を用いた ヒト肝細胞キメラマウスにおける薬剤性胆汁うっ滞の評価

○田村 優香<sup>1</sup>, 佐能 正剛<sup>1</sup>, 菅原 豪<sup>2</sup>, 吉実 康美<sup>2</sup>, 柳 愛美<sup>2</sup>, 石田 雄二<sup>2,3</sup>,  
立野 知世<sup>2,3</sup>, 太田 茂<sup>1,4</sup>, 古武 弥一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学研究室

<sup>2</sup>株式会社フェニックスバイオ

<sup>3</sup>広島大学 肝臓プロジェクト研究センター

<sup>4</sup>和歌山県立医科大学

【背景・目的】医薬品創薬の中で、肝毒性を原因として開発中止や市場撤退となる場合は多く存在する。ヒト毒性を予測する評価系の構築が求められているが、現状の *in vivo* 毒性評価はマウスなどの実験動物を用いて行われ、ヒトとの種差が懸念されている。また、肝毒性のメカニズムやバイオマーカーも明らかにしていく必要がある。

ヒト肝細胞キメラマウス肝臓中にはヒト型の薬物代謝酵素・トランスポーターが発現し、薬物動態予測モデルなどに用いられている。当研究室ではこれを用いて薬剤性リン脂質症を評価し、肝毒性評価のモデル動物としての可能性も見出した<sup>1)</sup>。

本研究では胆汁うっ滞型肝障害に着目し、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた毒性評価を検討した。発症機序のひとつに胆汁排泄トランスポーターBSEP、MRP2 の障害が挙げられ、BSEP 障害には種差があると報告されている<sup>3)</sup>。そこでイメージング質量分析装置を取り入れ (Fig. 1)、ヒト肝細胞キメラマウス肝臓中の物質局在を考慮した胆汁うっ滞評価系の構築を目指した。

【方法】ヒト肝細胞キメラマウスはPXB マウス((株)フェニックスバイオ)を用いた。ヒト型 MRP2、BSEP 障害の報告があるリファンピシン<sup>4)</sup>、ケトコナゾール<sup>5)</sup>を評価化合物とし、200 mg/kg でPXB マウスに単回経口投与し、6 時間後に肝臓・血液を採取した。肝臓並びに血漿中の胆汁酸濃度を液体クロマトグラフ質量分析で、肝臓切片中の胆汁酸分布をイメージング質量分析で評価した。

【結果・考察】肝臓・血漿中の胆汁酸 13 分子種を定量的に測定し、対照群と比較した結果、リファンピシン投与ではタウロコール酸 (TCA)、ケトコナゾール投与ではタウロデオキシコール酸といったタウリン抱合型胆汁酸が上昇することが明らかになった。イメージング質量分析では、リファンピシン投与群の肝臓中に TCA が多く存在することが示された (Fig. 2)。

今回の結果から、医薬品に起因する胆汁うっ滞型肝障害を評価する上で、ヒト肝細胞キメラマウスが有用となる可能性を見出した。このような胆汁うっ滞評価を更に進めることで、肝毒性のヒト特異的なバイオマーカー発見につながることを期待される。

## 【参考文献】

- 1) Sanoh et al., *J. Toxicol. Sci.* 2017; 42:589-596. 2) Padma et al., *Hepatology* 2011; 53:1377-1387
- 3) Kis et al., *Drug Metab. Dispos.* 2009; 37:1878-1886. 4) Pedersen et al., *J. Med. Chem.* 2008; 51:3275-3287
- 5) Morgan et al., *Toxicol. Sci.* 2010; 118(2):485-500

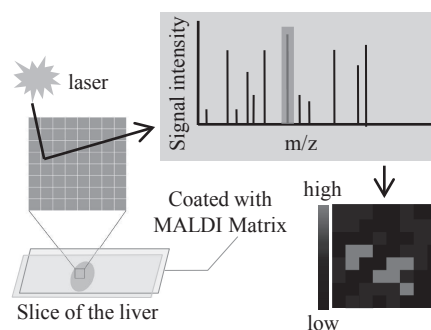


Fig. 1 Concept of imaging mass spectrometry.

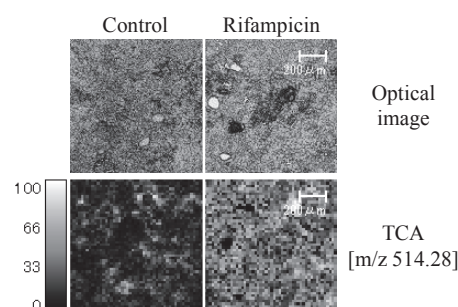


Fig. 2 Visualization of taurocholic acid on the liver slice after administration of rifampicin in chimeric mice.

## P-9 ラットへの胆汁酸塩の経口投与による 薬剤性肝障害の評価

楊 馥華, ○織田 進吾, 横井 毅

名古屋大学大学院 医学系研究科 トキシコゲノミクス研究室

【背景・目的】薬剤性肝障害 (drug-induced liver injury, DILI) は医薬品の市場撤退、開発中止の原因となり得る重要な問題である。薬剤性肝障害の発症機序として提唱されるものの一つに、薬剤による胆汁酸トランスポーター bile salt export pump (BSEP, *ABCB11*) の阻害がある。実際に、多くの臨床 DILI 陽性薬剤が *in vitro* で BSEP 阻害能を有することが示されている。しかし、胆汁酸ホメオスタシスにおけるヒトとの種差のため、齧歯類において BSEP 阻害薬剤による肝障害を検出した報告は殆ど存在しない。本研究では、胆汁酸塩の投与により薬剤性肝障害の感度を上昇させることが可能か検討した。

【方法】5 週齢の雌性 Sprague-Dawley ラットにケノデオキシコール酸ナトリウム (CDCA) を 200 mg/kg/day で 3 日間経口投与し、30 分後にケトコナゾール (KTZ) またはミコナゾール (MZ) を 150 mg/kg/day で 3 日間経口投与した。3 日目の投与 6 時間後に剖検し、血漿および肝臓を採取した。肝臓より胆汁酸を抽出し、LC-MS/MS を用いて、20 種類の胆汁酸を定量測定した。

【結果・考察】CDCA のみを 100, 200, 300 および 400 mg/kg/day でラットに 4 日間経口投与したところ、300 mg/kg/day 以上では血漿 ALT・AST 値の上昇および肝細胞壊死が認められた。一方で、200 mg/kg/day では ALT・AST 値に変化が認められなかったため、最大無毒性量として以降の実験に使用した。*In vitro* で BSEP を阻害し、かつ臨床肝障害陽性薬剤である KTZ をラットに投与したところ、単独投与では肝障害を認めず、CDCA と KTZ の併用で血漿 ALT・AST 上昇および肝細胞壊死が認められた。一方で、BSEP 阻害と臨床肝障害の報告がない MZ は、CDCA 併用の有無に関わらず、ラットにおいて肝障害を惹起しなかった。CDCA と KTZ の併用群において肝臓中胆汁酸濃度を測定したところ、一次胆汁酸である CDCA、 $\alpha$ -ミユリコール酸 ( $\alpha$ -MCA)、 $\beta$ -MCA、グリコデオキシコール酸 (GDCA)、タウロデオキシコール酸 (TDCA)、タウロケノデオキシコール酸 (TCDCA)、二次胆汁酸であるウルソデオキシコール酸 (UDCA)、リトコール酸 (LCA) が溶媒群と比べ高値を示した。また、CDCA と KTZ の併用群 ( $n=9$ ) において、血漿 ALT 値と肝臓 CDCA 濃度の有意な相関が認められた ( $r=0.73, p=0.02$ )。ヒトと比べ、ラットにおいては全胆汁酸に占める非抱合型胆汁酸の割合が極めて少ないことが知られる。本研究では、CDCA の投与によって胆汁酸プールがより疎水性高くなり、さらに KTZ を投与することで肝臓中に胆汁酸が蓄積し、肝障害に至ったと考えられた。薬剤例数が少ないため、更なる検討が必要であるが、本手法は BSEP 阻害薬剤の肝毒性を *in vivo* で捉える有効な手段となることが期待される。



## P-10\* キメラ型 HLA 遺伝子導入マウスを用いた高感度な特異体質薬物皮膚毒性評価モデル

○薄田 健史, 青木 重樹, 伊藤 晃成

千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室

【背景・目的】医薬品による副作用にはある特定の体質(遺伝子)・環境により現れる個人差が存在し、それらは特異体質薬物毒性(IDT)と定義されている。IDTは臨床上無視できない有害事象として知られており、中には死亡例も報告されているものの、その発症頻度は極めて低く、現在の非臨床試験ではリスク予測が困難であることが問題となっている。近年、IDT発症リスクとヒト白血球抗原(HLA)多型との関連が多数報告されている。我々はこれまでに、抗 HIV 薬アバカビル(ABC)が関与する皮膚特異的な IDT に焦点を当て、ABC の耳介局所刺激(LLNA 試験)により IDT が評価可能なキメラ型 HLA-B\*57:01 遺伝子導入マウス(B\*57:01-Tg)を作出した<sup>1</sup>。しかしながら、経口投与条時の B\*57:01-Tg においては臨床で報告されている皮膚傷害が観察されず、原因として免疫寛容に働く細胞(制御性 T 細胞など)が毒性惹起の障壁となっていることが予想された。本研究では、制御性 T 細胞を含む CD4 陽性 T 細胞を除去した B\*57:01-Tg を用いて、ABC による皮膚 IDT が再現可能か評価した。

【方法】CD4 陽性 T 細胞除去マウスは、抗マウス CD4 抗体を B\*57:01-Tg、B\*57:03-Tg(陰性対照)、及び各同腹子(LM)に腹腔内投与することにより作製した。1% ABC 混餌を 3 週間与え、かつ 3 日毎に ABC を右耳に塗布した各マウスより頭頸部リンパ節を単離し、CD8 陽性メモリー T 細胞(CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>)の割合を測定した。さらに、耳介の凍結組織切片を作製し、H&E 染色および CD8 の蛍光免疫染色により皮膚傷害を観察した。肝障害の有無も併せて評価し、血清 ALT 値の測定および凍結組織切片画像の観察を耳介と同様に実施した。

【結果・考察】ABC を経口投与した B\*57:01-Tg では CD8 陽性メモリー T 細胞の割合の有意な増加が LM と比較して認められ、CD4 陽性 T 細胞除去条件ではさらに増加した。加えて、CD4 陽性 T 細胞除去 B\*57:01-Tg では両耳において顕著な発赤が観察され、真皮組織中への炎症性リンパ球の浸潤(H&E 染色)や CD8 陽性 T 細胞の集積(蛍光免疫染色)が認められた。一方で、血清 ALT 値は正常であり、肝臓の組織学的所見も異常を認めなかった。以上より、B\*57:01-Tg の CD4 陽性 T 細胞を除去することで皮膚特異的な IDT の再現が可能となることが示唆された。一方で、皮膚感作を実施しなかった ABC 経口投与 CD4 陽性 T 細胞除去 B\*57:01-Tg については、CD8 陽性メモリー T 細胞の増加を同程度認めたものの、皮膚傷害の程度は劣っていた。したがって、CD8 陽性 T 細胞の活性化から皮膚傷害に至るまでの過程に、皮膚細胞(ケラチノサイト)への直接的な ABC 曝露刺激も重要な要因となっていることが示唆された。

【参考文献】<sup>1</sup>Susukida T et al., *Arch Toxicol.* 92(3): 1177-1188, (2018)

# P-11\* HLA-B\*58:01 を介したオキシプリノールによる特異体質性副作用 *in vitro* 評価系の構築

○榎野 隆太<sup>1</sup>, 長部 誠<sup>2</sup>, 頭金 正博<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院 薬学研究科 医薬品安全性評価学分野

<sup>2</sup>日本薬科大学 薬学科 衛生薬学分野

【背景・目的】医薬品による重篤な副作用として、スティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)や中毒性表皮壊死融解症(TEN)、薬剤性過敏症症候群(DIHS)といった皮膚障害が発症することがある。これらの詳しい発症機序は未だ不明であるが、ヒト白血球抗原(HLA)の特定のタイプとの関連が明らかになってきている。HLA-B\*58:01 はアロプリノール(ALP)及びその活性代謝物であるオキシプリノール(OXP)による SJS/TEN、DIHS の発症との強い関連が報告されている。また、ALP による重篤な皮膚障害の発症時に、ヒトヘルペスウイルス 6 型(HHV-6)の再活性化が起こることも報告されている\*<sup>1,2</sup>。我々はこれまでに *in vitro* での細胞傷害活性評価系を用いることにより、HHV-6 由来の抗原ペプチドの中に ALP/OXP 添加時に HLA-B\*58:01 に結合し細胞傷害性 T 細胞(CTL)を活性化させるペプチドが存在する可能性を見出した。しかし、これまでの *in vitro* 評価系においては抗原となるペプチドは外部から培地中に添加しており、細胞内で抗原ペプチドと HLA 分子が結合するという本来の HLA クラス I の抗原提示とは異なるプロセスを経ている。そこで本研究では、HLA クラス I の抗原提示プロセスに沿った条件で同定することのできる HLA 結合ペプチドの探索法の構築及び OXP 添加時に HLA-B\*58:01 に結合し CTL を活性化させるペプチドの候補となる抗原タンパク質の同定を目的とした。

【方法】ヒト胎児腎細胞(HEK293 細胞)に HLA-B\*58:01 と補助刺激分子 CD80 を共発現させた安定発現細胞株を作製し、抗原タンパク質発現プラスミドをエレクトロポレーション法により細胞内に導入し一過性発現させることで抗原提示細胞を作製した。この抗原提示細胞とヒト末梢血単核球(PBMC)を OXP の存在下で共培養し、複数のサイトカイン類による刺激を加えることによって PBMC から CTL の誘導を行った。CTL の誘導は CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の細胞をフローサイトメトリーで測定することで確認した。さらに、培養上清中のサイトカイン量をフローサイトメトリーで定量解析し、T 細胞中の CTL が放出したサイトカイン量を算出することで、OXP 添加または抗原タンパク質を細胞内に導入し発現させた影響による CTL の活性化を評価した。抗原タンパク質としては HHV-6BU54 抗原を用い、また HLA-B\*58:01 の特異性を検証するために HLA-B\*44:03 発現細胞を用いて同様の操作を行った。

【結果・考察】HLA-B\*58:01(+)の PBMC から CTL を誘導した結果、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の誘導を確認できた。T 細胞中の CTL が産生したサイトカイン量を測定したところ、対照群とした HLA-B\*44:03 発現細胞に比べ HLA-B\*58:01 発現細胞において IFN- $\gamma$  の産生量が有意に増加した。また、HLA-B\*58:01 発現細胞において、OXP の添加と HHV-6BU54 抗原を抗原提示細胞に導入した条件下でのみ IFN- $\gamma$  の有意な上昇が認められた。以上の結果から、HLA クラス I 分子の抗原提示プロセスを反映した評価系の構築をすることができた。またこの評価系により OXP によって HLA-B\*58:01 分子との結合性が増加し、CTL を活性化させることで重篤な皮膚障害をもたらすペプチドが HHV-6BU54 抗原の中に存在する可能性が示唆された。

## 【参考文献】

\*<sup>1</sup> 橋本公二. "薬剤性過敏症症候群とヒトヘルペスウイルス 6."モダンメディア 56.12 (2010): 305-310

\*<sup>2</sup> 藤山幹子, 橋本公二. "薬剤性過敏症症候群と HHV-6 の再活性化について."ウイルス 59.1 (2009): 23-30.



## P-12\* 日本人 1070 人の全ゲノム解析で同定された 21 種の Dihydropyrimidine dehydrogenase レアバリエント活性変化

○菱沼 英史<sup>1, 2, 3</sup>, 成田 瑤子<sup>1</sup>, 齋藤 さかえ<sup>2</sup>, 前川 正充<sup>4</sup>, 赤井 文香<sup>1</sup>, 中西 悠悦<sup>1</sup>,  
安田 純<sup>2</sup>, 長崎 正朗<sup>2</sup>, 山本 雅之<sup>2, 3</sup>, 山口 浩明<sup>4</sup>, 眞野 成康<sup>4</sup>, 平澤 典保<sup>1, 3</sup>,  
平塚 真弘<sup>1, 2, 3, 4</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院 薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野

<sup>2</sup>東北大学東北メディカル・メガバンク機構

<sup>3</sup>東北大学未来型医療創成センター

<sup>4</sup>東北大学病院薬剤部

【背景・目的】5-Fluorouracil (5-FU) を活性本体とするフッ化ピリミジン系抗がん剤 (FP 剤) は、投与患者の 10-30% に重篤な副作用が生じる。投与された 5-FU の 80% 以上は主に肝臓の Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) による分解を受け排泄されるため、DPD の酵素機能が低下している患者では FP 剤投与により、5-FU の血中濃度が上昇して副作用が発現すると考えられている。DPD は *DPYD* 遺伝子にコードされており、白人種においては数種の *DPYD* 遺伝子多型が副作用予測マーカーとして用いられている。しかし、日本人集団における副作用予測に有用な遺伝子多型マーカーは未だ報告がない。近年、東北大学東北メディカル・メガバンク機構が実施した日本人 1070 人の全ゲノム解析により、21 種のアミノ酸置換を伴う *DPYD* 遺伝子多型が同定された。しかし、これらの多型に由来するバリエント酵素の機能変化や副作用との関連については未だ明らかでないものが多く、日本人集団において FP 剤による副作用発現の原因になり得る多型が存在する可能性が高い。本研究では日本人集団から同定された 21 種の *DPYD* バリエントについて *in vitro* 酵素機能解析を行い、各アミノ酸置換が DPD 酵素機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】*DPYD* の cDNA に各遺伝子多型を導入した発現ベクターを構築し、ヒト胎児腎臓由来 293FT 細胞にトランスフェクション後、DPD の補因子である FAD、FMN、鉄及び硫黄の存在下で各 DPD バリエント酵素を発現させた。細胞を破碎及び遠心分離後に DPD タンパク質を含む可溶性画分を回収し、DPD タンパク質の発現量を SDS-PAGE 後のイムノブロットにより定量した。次に、基質として様々な濃度の 5-FU を発現タンパク質と反応させ、代謝物の生成量を LC-MS/MS により定量し、酵素反応速度論的パラメータを算出した。また、Blue native-PAGE 後のイムノブロットによる多量体形成変化解析及び 3D シミュレーションモデル解析による酵素活性低下の分子メカニズム解析を行った。

【結果・考察】G926V DPD バリエントでは高基質濃度においても代謝物の生成が認められず、活性が完全に消失した。その他 20 種の DPD バリエントについては、典型的なミカエリスメンテンカーブが得られた。T298M、V313L、V335M、A380V、V434L、V515I、R592W、T768K、H807R 及び V826M の 10 種の DPD バリエントにおいて、野生型と比較して有意に固有クリアランスが低下することが明らかとなった。また、Blue native-PAGE 後のイムノブロットの結果より、酵素活性の低下及び消失が認められたバリエントでは二量体相当のバンド強度が低下しており、酵素活性が発揮される上で二量体形成が極めて重要なプロセスであることを明らかにした。さらに、これらのバリエントでは 3D シミュレーションモデル解析においても、アミノ酸置換が DPD の基質結合ドメインや二量体相互作用部位の立体的配置が著しく変化し、酵素活性に影響を及ぼしていることが示唆された。

本研究により、日本人集団における FP 剤による副作用発現予測を行うための有益な遺伝子多型情報が得られた。今回解析対象とした *DPYD* バリエントの存在頻度は低いですが、日本人集団における FP 剤投与に伴う重篤な副作用発現に寄与している可能性が考えられる。今後は、*in vivo* データとの関連性を調査することで、FP 剤の個別化薬物療法への応用へと展開して行きたい。

## P-13\* レゴラフェニブ誘発性肝障害に関連する CYP2D6 遺伝子の同定

○福永航也<sup>1</sup>、加藤健<sup>2</sup>、奥坂拓志<sup>3</sup>、吉田輝彦<sup>4</sup>、前佛均<sup>5</sup>、蒔田泰誠<sup>1</sup>

<sup>1</sup>理化学研究所生命医科学研究センター ファーマコゲノミクス研究チーム

<sup>2</sup>国立がん研究センター中央病院 消化器内科

<sup>3</sup>国立がん研究センター中央病院 肝胆膵内科

<sup>4</sup>国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター

<sup>5</sup>がん研究会 がんプレジジョン医療研究センター リキッドバイオプシー診断開発プロジェクト

【背景・目的】レゴラフェニブ (REG) は結腸・直腸癌などに用いられているが、肝障害を含む肝機能異常が有害事象として問題になっている。本報告では REG 誘発性肝障害の発症リスク予測システムの構築のために、薬物動態関連 100 遺伝子の翻訳領域を対象としたアンプリコンシークエンズパネル (PKSeq) を用いて、肝障害リスクと関連するゲノムバイオマーカーを探索した。

【方法】REG 誘発性肝障害患者 12 例と非発症患者 71 例について、PKSeq を用いてシークエンシングを行った。同定された全てのバリエーションを用いてケース-コントロール関連解析を行った。TaqMan Copy Number Assays を用いて CYP2D6 遺伝子の 5' 上流とエクソン 9 のコピー数を測定した。CYP2D6\*1、\*2 及び\*10 の大腸菌発現系を用いて、REG から *N*-desmethyl *N*-hydroxymethyl regorafenib (M-3) への代謝活性を測定した。HepG2 細胞株を用いて REG 及び M-3 の細胞毒性試験を行った。293T 細胞株に 9 つの CYP2D6 アリルを一過性に発現させ REG から M-3 への代謝活性を測定した。CYP2D6 活性に基づいて、正常な活性を有する extensive metabolizer (EM)、活性が著しく低い poor metabolizer (PM) 及び EM と PM の中間の代謝活性を有する intermediate metabolizer (IM) に分類し、関連解析を行った。

【結果・考察】PKSeq により、薬物動態関連 100 遺伝子の翻訳領域上に 547 バリエーション (535 SNVs 及び 12 INDELS) が同定された。これらのバリエーションを用いて関連解析を行ったところ CYP2D6 遺伝子上の SNV (T486S) が最も小さい P 値を示した ( $P = 0.0022$ )。CYP2D6 遺伝子上のバリエーションとコピー数に基づいて\*1、\*2、\*5、\*10 及び\*36 アリルを判定し全ての患者を EM/IM/PM に分類したところ、肝障害患者群及び非発症患者群における EM の頻度はそれぞれ 66.7%及び 23.9%であり CYP2D6 の EM が肝障害発症リスクに有意な関連を示した ( $P = 0.0055$ ,  $OR = 6.4$ )。これまで REG の代謝に CYP2D6 が関与するという報告は存在しなかったため、大腸菌発現系 CYP2D6 を用いて代謝試験を施行したところ、M-3 の生成が認められた。また\*2 及び\*10 の M-3 生成活性における  $V_{max}/K_m$  は、\*1 のそれぞれ 40.5%及び 9.9%を示した。さらに細胞毒性試験によって M-3 が REG よりも細胞障害性が高いことを明らかにした。CYP2D6 遺伝子上の全てのバリエーションを精査したところ新規アリルを含む 5 つのレアなアリルが検出された (\*35、\*41、\*51、\*2 + R414C 及び\*2 + P430L)。これらの 9 つの CYP2D6 アリル発現 293T 細胞株を作製し REG の M-3 への代謝試験を行い、\*1 の活性と比較することで EM/IM/PM を再分類し、再度、関連解析を行ったところ、肝障害患者群及び非発症患者群における EM の頻度はそれぞれ 66.7%および 18.3%であり、EM と肝障害との関連における P 値は低下した ( $P = 0.0013$ ,  $OR = 8.9$ )。

以上の結果より CYP2D6 遺伝子の EM 患者における M-3 の高曝露が、肝障害誘発の一因であることが示唆された。すなわち、CYP2D6 アリルは、REG 誘発性肝障害の発症リスク予測におけるゲノムバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

# P-14\* Lapatinib による T 細胞分化誘導機構の解析

○宮路 康平<sup>1</sup>, 岡本 秀人<sup>1</sup>, 榎野 隆太<sup>1</sup>, 長部 誠<sup>2</sup>, 頭金 正博<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院 薬学研究科 医薬品安全性評価学分野

<sup>2</sup>日本薬科大学 薬学科 衛生薬学分野

## 【背景・目的】

近年、特定のヒト白血球抗原 (HLA) のタイプが医薬品による重篤な特異体質性副作用と関連する例が明らかとなっている。分子標的薬である抗がん剤 Lapatinib は、HLA クラス II に属する HLA-DRB1\*07:01 を保有する患者において、重篤な肝障害の発症リスクが上昇すると報告されているが、その発症機序に関しては明らかにされていない。我々はこれまでに Lapatinib 添加により、HLA-DRB1\*07:01 及び HLA-DRB1\*07:01 結合ペプチド特異的に、ヘルパー T 細胞である Th2 が優位となる現象を見だし、Th1/Th2 のバランスの変化が肝障害の発症に関わる可能性を報告してきた。そこで、本研究では Lapatinib による肝障害の発症機序の更なる解明のために、T 細胞分化に関わる転写因子への影響とその誘導機構について解析を進めた。

## 【方法】

ヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562 細胞) に 12 時間 Lapatinib を暴露し、qPCR を用いて Th2 分化に関わる転写因子 GATA-3 並びにその他の T 細胞分化にかかわる各種転写因子の mRNA 発現量を解析した。次に、GATA-3 の転写活性化シグナルの機序を明らかにするために、GATA-3 の誘導に重要な働きをする TCR-p38-NF-κB 経路及び IL-4-STAT6 経路に対する阻害剤を添加し、Lapatinib による GATA-3 の mRNA 発現量への影響を解析した。また、Lapatinib による NF-κB 及び p38 の活性化を調べるために、Lapatinib 添加 24 時間後の K562 細胞を回収し、Western blot 法を用いて各シグナル分子のリン酸化状態を解析した。さらに、Lapatinib による GATA-3 の活性化が NF-κB を介する経路であることを裏付けるために、NF-κB 発現プラスミドおよび Lapatinib を用いて Luciferase promoter assay を行い、GATA-3 の転写調節領域を同定した。

## 【結果・考察】

K562 細胞に Lapatinib を添加したところ、GATA-3 の mRNA 発現量が有意に上昇した。また、GATA-3 の誘導に重要な働きをする TCR-p38-NF-κB 経路及び IL-4-STAT6 経路に対する阻害剤を添加した結果、p38 MAPK 及び NF-κB の阻害剤によって Lapatinib による GATA-3 の mRNA 発現量の誘導が有意に抑制されたが、STAT1, STAT6 の阻害剤では GATA-3 の mRNA 発現量は減少しなかった。加えて、Lapatinib を添加することによって、核分画の NF-κB のリン酸化量及び GATA-3 のタンパク量が增加していた。また、細胞質分画では p38 のリン酸化量が增加していた。さらに、Luciferase reporter assay においても Lapatinib によって GATA-3 プロモーター領域の転写活性化が認められた。また、GATA-3 プロモーター領域において NF-κB の応答配列と予測される部位を欠失させたところ、Lapatinib による転写活性化が抑制された。以上の結果より、Lapatinib は p38 のリン酸化に直接影響を与え、NF-κB を活性化し、GATA-3 の上流部分に存在する NF-κB の応答部位を介して GATA-3 の転写が活性化され、Th2 を分化誘導することが明らかになった。これまでに Lapatinib は HLA-DRB1\*07:01 特異的に HLA 分子とペプチドの結合を増強することが報告されている<sup>\*1</sup> ことから、今回の研究結果を合わせると、Lapatinib がペプチド刺激を増強し、T 細胞受容体 (TCR) からの TCR-p38-NF-κB のシグナル伝達経路を活性化させていると考えられた。したがって、Lapatinib は HLA-DRB1\*07:01 特異的なペプチドの結合増強作用と p38 の活性化作用の 2 つの作用を介して GATA-3 の発現を誘導し、Th2 への分化を誘導することで Th1/Th2 のバランスを崩すことが示唆された。

## 【参考文献】

<sup>\*1</sup> Hirasawa M, Hagihara K, Okudaira N, Izumi T *PLoS ONE* (2015) 10(6): e0130928



## P-15\* 腎スライス法を用いた Diclofenac、Diclofenac Acyl Glucuronide の腎蓄積、及び代謝・毒性評価

○根立 志帆, 荒川 大, 久保 光, 中西 猛夫, 玉井 郁巳

金沢大学 医薬保健研究域・薬学系 薬物動態学研究室

【背景・目的】非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) は、臨床において腎毒性の副作用を持つ。そのメカニズムとして、血管内皮細胞のプロスタグランジン合成阻害による腎血管の狭窄が示唆されている一方、細胞毒性も観察される。しかし、細胞毒性発現のメカニズムは十分に明らかにされていない。そこで本検討では、ジクロフェナク (DF) 及びそのアシルグルクロン酸抱合体 (DF-AG) をラット腎スライスに曝露し、腎組織中 ATP 量及び蓄積した化合物量を定量し、両化合物の腎毒性における関与について調べた。

【方法】Wistar rats (雄性、7週齢) から腎スライス (厚さ 0.3 mm) をマイクロライサーを用いて調製した。腎スライスを DF または DF-AG を含む pH 6.0 の薬液に入れ、37°C でインキュベーションした。所定時間後、腎スライス内の DF 及び DF-AG 蓄積量を LC-MS/MS を用いて定量した。また、腎スライス中 ATP 量はルシフェラーゼ法を用い、その発光強度を測定することで定量した。

【結果・考察】DF 及び DF-AG をそれぞれインキュベーションした時、腎スライス内の各化合物量は時間依存的に増加した。また、DF インキュベーション時のスライス内 DF-AG はわずかであった。一方、DF-AG インキュベーション時には腎スライス内で DF が検出され、腎臓中に存在するエステラーゼにより DF-AG が DF へ代謝されることが示唆された。また、腎スライスに 100  $\mu$ M の DF または DF-AG を曝露したところ、非曝露群 (control) と比較し、2 時間内に腎スライス中 ATP 量が 50% 程度にまで減少した。また DF 及び DF-AG の濃度上昇に伴い、腎スライス中 ATP 量が減少し、その細胞外濃度基準の  $IC_{50}$  値は DF 曝露時と比較し、DF-AG 曝露時では 3 分の 1 程度の値となった。一方、それぞれの細胞内 DF 蓄積量基準の  $IC_{50}$  値は DF 曝露時と比較し、DF-AG 曝露時では 4 分の 1 程度の値となった。したがって、DF-AG 曝露時における ATP 量の減少効果は、腎スライス内で生成された DF のみでは説明できず、その毒性発現に DF-AG 蓄積が関与することが示唆された。さらに、エステラーゼ阻害剤 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 100  $\mu$ M を添加したところ、DF-AG 単独条件と比較し、PMSF 添加では、腎スライス内 ATP 量のさらなる減少が観察された。この際、PMSF は腎スライス内 ATP 量に影響しないことが確認された。以上の結果より、DF および DF-AG の腎蓄積量増加により毒性が誘発されることが示唆された。

【結論】本研究では、腎スライスを用いた DF の代謝及び毒性発現について評価した。その結果、DF-AG は腎臓内へ取り込まれ、直接的にあるいは DF へ代謝されることで ATP 合成阻害を介して腎毒性を引き起こすことが示唆された。ヒト血漿中において、DF-AG は DF と同等の濃度で存在することが報告されており、臨床においても DF-AG は DF による腎毒性発現に関与している可能性がある。一方、本検討は ATP 量の変化のみを観察したため、今後活性酸素種量や逸脱 LDH 量を測定し、その毒性をさらに特徴付ける必要がある。



# P-16\* シトクロム P450 と UDP-グルクロン酸転移酵素の相互作用による双方向の機能制御：in vivo における評価とその毒性学的意義

○宮内 優<sup>1,2</sup>, 永里 萌<sup>2</sup>, 田中嘉孝<sup>1</sup>, 永田 清<sup>3</sup>, 山添 康<sup>4</sup>, Mackenzie Peter<sup>5</sup>, 石井祐次<sup>2</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院 薬学研究院 細胞生物薬学分野

<sup>2</sup>九州大学大学院 薬学研究院 分子衛生薬学分野

<sup>3</sup>東北医科薬科大学 薬学部 環境衛生学教室

<sup>4</sup>東北大学大学院薬学研究科

<sup>5</sup>フリンダース大学 医学部

【背景・目的】シトクロム P450 (P450, CYP) および UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) は薬物代謝反応の第一相、第二相で中心的な役割を担う。長い間、これらの酵素は独立して機能すると信じられてきたが、我々は P450 と UGT が複合体を形成することを見出した [1]。また、主要 P450 分子種である CYP3A4 がこの相互作用を介して多くの UGT 分子種の活性を変動させることも報告した [2, 3]。さらに直近では、UGT2B7 が CYP3A4 の酵素機能を抑制するという、逆向きの影響も明らかにしている [4]。このように P450-UGT 相互作用は単なる物理的な結合だけではなく、それらの酵素活性を制御する機能的なものであることが明らかになりつつある。本研究では UGT1A9 が CYP3A4 活性に与える影響および、in vivo における P450-UGT 相互作用の評価を中心に検討を行った。

【方法】Bac-to-Bac Baculovirus Expression System を用いて CYP3A4、P450 還元酵素、UGT1A9 および UGT2B7 の組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞 Sf9 に発現させた。Sf9 からマイクロゾームを調製し、P450 および還元酵素を定量した。UGT を共発現させたマイクロゾームとさせていないもので CYP3A4 活性を比較し、UGT1A9 および 2B7 が CYP3A4 活性に与える影響を検討した。in vivo における P450-UGT 相互作用の評価では、5 週齢の Wistar 雄性ラットにグルココルチコイドの一種である dexamethasone を投与し、肝臓における P450 および UGT を誘導させた。摘出した肝臓からマイクロゾームを調製し、CYP3A および UGT1A の誘導率をイムノプロットで確認したのち、CYP3A 活性を比較した。CYP3A4 活性測定には P450-Glo CYP3A4 Assay kit を用いた。

【結果・考察】UGT1A9 は UGT2B7 同様に CYP3A4 活性を抑制したものの、CYP3A4 の酵素反応速度論的パラメーターに与える影響には大きな違いが認められた。すなわち UGT1A9 が  $S_{50}$  を上昇、Hill 係数を低下させたのに対し、UGT2B7 は  $V_{max}$  のみを有意に低下させた。この結果から、UGT による CYP3A4 活性抑制の分子機構は、UGT 分子種により異なることが示唆された。Dexamethasone の投与によりラット肝臓中の CYP3A および UGT1A はそれぞれ約 10 倍、4 倍と異なる割合で増加した。また、単位 CYP3A あたりの酵素活性は、dexamethasone 処理により 2 倍程度増加した。これらの結果は、dexamethasone 処理後のラット肝臓中では CYP3A と UGT1A の割合が変化し、UGT1A により抑制を受けない CYP3A が増えたことを示唆している。演者らは、さらに、CYP2C9 と UGT2B7 に機能的相互作用があることも見出している。このことから、クロピドグレルやゲムフィブロジルのグルクロン酸抱合を介した P450 の mechanism-based 阻害とも密接に関係する可能性がある。今後は P450-UGT 相互作用の毒性学的意義についても検討していきたい。

## 【参考文献】

[1] Taura K I et al, Biochem Biophys Res Commun, 273: 1048-1052 (2000)

[2] Takeda S et al, Mol Pharmacol, 67: 665-672 (2005)

[3] Ishii Y et al, Drug Metab Dispos, 42: 229-238 (2014)

[4] Miyauchi Y et al, Mol Pharmacol, 88: 800-812 (2015)

## P-17\* 薬物代謝酵素発現酵母を用いた医薬品および食品成分の代謝予測と代謝物調製法の確立

○西川 美宇<sup>1</sup>, 増山 優香<sup>2</sup>, 安田 佳織<sup>1</sup>, 濱田 昌弘<sup>1</sup>, 中島 範行<sup>1</sup>, 榎 利之<sup>1</sup>, 生城 真一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>富山県立大学 工学部 医薬品工学科

<sup>2</sup>富山県立大学 工学部 生物工学科

### 【背景・目的】

医薬品開発の初期段階における代謝予測および代謝物の安全性評価は、開発中止の回避に重要である。また近年、機能性食品の利用増加に伴う医薬品-食品相互作用防止の観点から食品成分代謝予測の重要性も高まっている。従来の代謝予測ツールとしては、肝細胞、組織および酵素発現系画分などが使用されるが、既存の酵素発現系は入手可能な分子種に制限がある。また、一定量以上の代謝物が必要となった場合、*in vitro* 酵素を用いた合成法での対応は困難であり全合成などの検討が必要となる。本研究では、医薬品及び食品成分代謝スクリーニングから代謝物調製まで応用可能な基盤技術として、酵母を用いた薬物代謝酵素の異種細胞発現系を構築した。

### 【方法】

出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* AH22 株を宿主として、UDP-グルコース脱水素酵素と UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の同時発現系を構築した。本発現酵母株の静止菌体を用いて抱合化基質とインキュベートすることで、補酵素非添加系におけるグルクロン酸抱合体合成を実現した。アシルグルクロン酸抱合体の生成が想定される NSAIDs および、抱合代謝を受けやすいポリフェノール類について、ヒト UGT14 分子種、マウス UGT6 分子種、およびラット UGT9 分子種発現酵母株による代謝スクリーニングを実施した。また、diclofenac および quercetin のグルクロン酸抱合体については最適分子種を用いた抱合代謝物のスケールアップ製造を実施し、NMR スペクトル測定による構造解析を行った。

### 【結果・考察】

NSAIDs である diclofenac, mefenamic acid, flufenamic acid について、ヒト UGT 発現酵母による代謝スクリーニングは既存のヒト UGT 発現系と同様の活性分子種パターンを示した。ヒト分子種以外ではラット UGT2B1 はこれらの基質に対して高い抱合能を示した。ポリフェノールである quercetin および resveratrol については、ヒト肝発現 UGT については 1A1 および 1A9 が比較的高い代謝活性を示した。ヒト血中では quercetin-3-glucuronide が主要な代謝物として知られるが、3位の抱合活性は UGT1A9 で高かった。これらの結果より、本薬物代謝酵素発現酵母株が簡易な代謝予測システムとして有用である可能性が示された。また、代謝スクリーニングによる選定された最適分子種を用いることで、補酵素非添加系で数十 mg 以上の diclofenac および quercetin グルクロン酸抱合体を合成した。ラット UGT2B1 を用いて合成した diclofenac-acyl-glucuronide について、MNR 構造解析によりグルクロン酸 C1 への  $\beta$  結合を確認した。またヒト UGT1A1 を用いて取得した 4 種の quercetin-glucuronide が、それぞれ 7,3,3' および 4' 位水酸基のグルクロン酸抱合体であることを確認した。また UGT に加えて CYP や SULT, non-CYP 代謝酵素である FMO についても発現系構築に成功している。これらの薬物代謝酵素発現酵母株は、医薬品開発初期の代謝予測から代謝物安全性評価まで一貫して代謝研究をサポートできるプラットフォームとして利用可能であると考えられる。

### 【参考文献】

Ikushiro *et al.*, Biosynthesis of Drug Glucuronide Metabolites in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharm.* **13**:2274-2282 (2016)

Nishikawa *et al.*, Whole-cell-dependent biosynthesis of sulfo-conjugate using human sulfotransferase expressing budding yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* **102**:723-732 (2018)

## P-18\* Phytochemical 及びその抽出物を対象とした in vitro 新規肝臓毒性評価の開発

○前田美里, 田中康浩, 堀妃佐子, 古久保進

サントリー-MONOZUKURI エキスパート株式会社

### 【背景・目的】

ヒトにおける毒性影響を適正かつ簡便に評価可能な試験手法の必要性が高まっている。そこで我々は、in vivo (毒性試験及び臨床報告) との相関性の高い新規 in vitro 評価手法の導入および開発を進めている。

ヒトへの全身影響を評価するにあたり、重要な臓器の一つとして、毒性がよく見られる臓器である肝臓が挙げられる。肝臓での毒性を予測するためには、代謝を考慮した評価が必要である。また、Phytochemical (植物化学物質) は、第 I 相のみでなく第 II 相酵素によって代謝されることが報告されている。そのため、植物化学物質及び抽出物の毒性を適正に評価する事を目的に、第 I 相及び第 II 相の代謝反応を付与した新規 in vitro 試験系を開発した。今回は植物化学物質及び抽出物 17 種を用いた in vivo との相関性の検証結果について報告する。

### 【方法】

ヒト肝臓細胞 (HepG2) を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に sample を添加する。sample は未変化体 sample と第 I 相代謝酵素 (ラット S9) 及び第 II 相代謝酵素補因子 (PAPS, UDPGA) により代謝させた代謝物含有 sample を準備した。sample は 24 時間細胞に暴露した。その後、培地交換を行い 24 時間培養後に核・ROS・MMP・GSH を標識する蛍光基質を用いて 45 分間染色した。染色した細胞を Cellinsight CX-5 High Content Analysis にて測定・解析した。

毒性指標には細胞生存率を用い、70%以下の生存率の場合に陽性と判断した。

### 【結果・考察】

sample 17 種の毒性について、代謝酵素付与の影響を評価した結果、未変化では 17 種中 9 種、代謝物 (第 I 相+第 II 相) の形成により 17 種中 16 種が in vivo の報告と一致した。従って、既存の in vitro 試験系に第 I 相及び第 II 相の代謝酵素を付与することで既知の肝臓毒性情報との相関性が高まることが明らかとなった。また、純物質の評価に加え混合物の状態である抽出物を用いた評価も可能であることを確認した。更に、代謝酵素による種差の影響も評価できることを確認した。これらの結果より、本試験系の植物化学物質及び抽出物の肝臓毒性スクリーニング試験としての有用性が示唆された。

## P-19 ネビラピンの反応性代謝物は inflammasome 反応を活性化させるか-ネビラピン誘発肝障害発症機序の検討-

○加藤 隆児<sup>1</sup>, 井尻 好雄<sup>1</sup>, Jack Uetrecht<sup>2</sup>, 林 哲也<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪薬科大学 循環病態治療学研究室

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, University of Toronto

### 【背景・目的】

HIV 治療薬である非核酸系逆転写酵素阻害剤ネビラピンの添付文書には、重篤で致死的な皮膚粘膜眼症候群、中毒性表皮壊死症、過敏症候群、薬物性肝障害を発現することがあるとの警告が記載されている。しかし、それらの発症機序は不明である。

一方、薬物性肝障害は中毒性と特異体質性に分類され、特異体質性のものは免疫反応が関与することが報告されている。近年、薬物の反応性代謝物が肝細胞から damage-associated molecular patterns (DAMPs) を放出させ、DAMPs により抗原提示細胞の inflammasome 反応が活性化されることで、特異体質性薬物肝障害が発症するとの仮説があるが、不明な点が多い。

そこで、ネビラピン誘発薬物性肝障害の被疑物質について検討することを目的として、ヒト肝がん細胞 (FLC-4 細胞) 3 次元培養および macrophage 化ヒト単球性白血病細胞 (THP-1 細胞) を用い、ネビラピン及びその反応性代謝物の inflammasome 反応に対する影響について検討を行った。

### 【方法】

FLC-4 細胞にネビラピンを添加して 7 日間 3 次元培養を行った。その後、macrophage 様細胞に分化誘導を行った THP-1 細胞に培養液上清を添加し、添加 24 時間後に THP-1 細胞から産生される IL-1 $\beta$  産生量、THP-1 細胞の caspase-1 活性を測定した。また、薬物代謝酵素非特異的 cytochrome P450 (CYP) 阻害剤である 1-aminobenzotriazole を添加して同様の検討を行った。ネビラピン添加後の FLC-4 細胞培養液中に放出された DAMPs を探索するために、培養液 20  $\mu$ L を採取し、Western blot にて high mobility group box 1 (HMGB1)、heat shock protein (HSP) 32、40、60、90 のタンパク発現量の測定を行った。

### 【結果・考察】

FLC-4 細胞の培養上清を THP-1 細胞に添加することで、ネビラピン添加群における IL-1 $\beta$  産生量および THP-1 細胞の caspase-1 活性は、control 群と比較して有意な上昇が認められた。また、これら反応はネビラピンを直接 THP-1 細胞に添加しても認められなかったことから、ネビラピンが FLC-4 細胞で代謝され、その代謝物が inflammasome 反応活性化に関与していることが示唆された。また、非特異的 CYP 阻害剤添加により、これら反応が抑制されたことから、CYP の代謝物が inflammasome 反応活性化に関与していると考えられた。一方、FLC-4 細胞培養液中には、HMGB1 は検出されなかったが、HSP90 発現量の有意な増加が認められた。さらに、CYP 阻害剤添加によりその発現量は control 群と同程度であったことから、HSP90 が DAMPs の一つであると考えられた。

### 【結論】

ネビラピンの CYP による反応性代謝物が inflammasome 反応を活性化すること、またその原因となる DAMPs として HSP90 が関与していることが明らかになった。本機序が、ネビラピン誘発肝障害の発症に関与している可能性が考えられた。

### 【参考文献】

- Chem Res Toxicol 30, 1327-1332 (2017)
- Xenobiotica 48, 60-72 (2018)



## P-20\* Establishment of a novel mouse model of troglitazone-induced liver injury and analysis of its hepatotoxic mechanism

○Ru Jia<sup>1</sup>, Shingo Oda<sup>1</sup>, Koichi Tsuneyama<sup>2</sup>, Yuya Urano<sup>1</sup>, Tsuyoshi Yokoi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Drug Safety Sciences, Division of Clinical Pharmacology, Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>2</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

[Purpose] Drug-induced liver injury (DILI) is a major problem in drug development and clinical drug therapy. Troglitazone (TGZ), a thiazolidinedione antidiabetic drug for the treatment of type II diabetes, was found to induce rare idiosyncratic severe liver injury in patients, which led to its withdrawal in 2000. In experimental animals *in vivo*, however, TGZ has never induced liver injury. Our study aimed to establish a normal mouse model of TGZ-induced liver injury and analyze the hepatotoxic mechanism.

[Methods] Six-week-old female BALB/c mice were treated with or without L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO, 700 mg/kg, *i.p.*) 1 h prior to TGZ or rosiglitazone (RGZ) (300 mg/kg, *i.p.*) treatment. Plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were determined to assess liver damage and liver samples were collected 6 h after TGZ or RGZ treatment and subjected to glutathione, microarray, real-time RT-PCR and immunoblot analyses.

[Results and Discussion] TGZ alone treatment significantly increased ALT and AST levels 6h after the treatment. BSO unexpectedly restrained the TGZ-dependent increase of ALT and AST. The ratio of oxidative stress marker glutathione/disulfide glutathione was significantly decreased in TGZ and BSO+TGZ groups, and increased hepatic mRNA levels of inflammation- and oxidative stress-related factors in liver were observed. The Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) signaling pathway was activated in TGZ-induced liver injury with microarray analysis. Moreover, the activation of JAK/STAT pathway promoted phosphorylation of STAT3 in TGZ and BSO+TGZ groups and STAT3 upregulation increased mRNA levels of its downstream genes.

[Conclusions] We successfully established a mouse model of TGZ-induced liver injury with BALB/c mouse for assessing DILI in drug development and the activation of JAK/STAT signaling pathway might be as an important role involved in hepatotoxic mechanisms of TGZ.

# P-21\* 肝細胞障害、胆汁うっ滞および脂肪肝を病型別に早期発見が可能な血漿 miRNA バイオマーカー探索研究

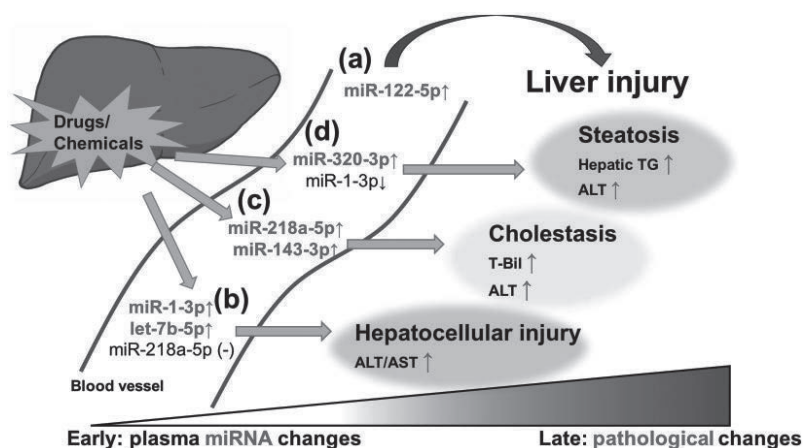
○香川匠, 白井勇司, 織田進吾, 横井毅

名古屋大学大学院 医学系研究科 統合医薬学領域 トキシコゲノミクス

[背景・目的] 近年、薬や化合物に起因する肝障害の新規バイオマーカー候補として血中 microRNA (miRNA) が注目されている。中でも肝細胞特異的に存在する miR-122 の肝障害予測バイオマーカーとしての有用性が期待されているが、病型判断には不十分である。本研究では肝細胞障害、胆汁うっ滞および脂肪肝について、早期に病型判断可能な miRNA の探索と評価を目的とした。

[方法] 肝障害モデル作成には 6 週齢の雄性 SD ラットを用いた。肝細胞障害モデル作成にはアセトアミノフェン (1500 mg/kg) とチオアセトアミド (100 mg/kg)、胆汁うっ滞モデルには  $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート (150 mg/kg) と 4,4'-メチレンジアニリン (250 mg/kg)、脂肪肝モデルには四塩化炭素 (300 mg/kg) とデキサメタゾン (15 mg/kg) をそれぞれラットに経口投与した。経時的に血液を採取し、血漿から RNA を抽出後、次世代シーケンサーを用いて血漿中 miRNA を網羅的に解析した。ピーク時点や障害の程度が異なる病型間での miRNA 発現を比較するために、時系列的 miRNA プロファイルのクラスターパターンから肝障害の初期、中期、後期を定義し、各時点において増加または減少した miRNA を、ベン図を用いて病型別、または網羅的に解析した。

[結果・考察] 病型別肝障害モデルにおいて、ALT や AST などの生化学値や、組織学的に変化の認められない障害初期の段階から変動する miRNA を複数同定することができた。その中から全病型に共通して上昇する miR-122 および、病型特異的 miRNA に着目し、RT-PCR による検証実験を行った。その結果、肝細胞障害からは miR-1-3p と let-7b-5p、胆汁うっ滞からは miR-143-3p と miR-218a-5p、脂肪肝からは miR-320-3p が病型初期に上昇し、全病型における miR-122 の経時的増加も確認された。本研究結果から肝障害の病型別、早期予測における miRNA の有用性が示された。



[参考文献] Takumi Kagawa, Yuji Shirai, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi. Identification of specific microRNA biomarkers in early stages of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis in rats. *Toxicol. Sci.*, 166:228-239 (2018)

## P-22 バイオ 3D プリンタで作製したヒト肝臓モデルの構築：ヒト凍結初代肝細胞を用いた構造体とスフェロイドの毒性評価比較

○長尾映里、鍛冶山咲良、溝口奈津美、島村満、井出いずみ

株式会社サイフューズ

### 【背景】

薬物性肝障害(DILI)は医薬品の開発中止や市販後における販売中止に至る原因となることが多い重篤な副作用であり、創薬研究の初期段階において化合物の肝毒性を予想することの意義は大きい。近年、毒性評価のためのヒト 3D 肝臓モデルが構築されつつあるが、DILI と完全に相関の取れる *in vitro* 評価系は未だ存在しない。そのため、重度な DILI を引き起こす薬剤を早期に見分けるアプローチが必要とされている。

### 【目的】

我々はこれまでに、ヒト凍結初代肝細胞(PHH)にマウス線維芽細胞を加えて作製したヒト肝臓構造体について報告してきた。今回は、DILI と相関する精度の高い評価系を構築するために、マウス細胞を完全に排除した完全ヒト化 3D 肝臓構造体を作製した。また、本構造体による化合物の肝毒性の検出力を評価するために長期暴露試験を行い、スフェロイドを用いた既存の *in vitro* 評価系と比較した。

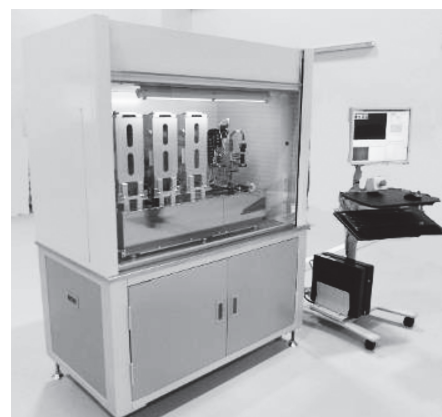


図1 バイオ 3D プリンタ regenova

### 【方法】

市販の非接着性 96-well plate を用いてヒト肝星細胞 (HSC) と PHH を含むスフェロイドを作製した後、バイオ 3D プリンタ (regenova®) (図 1) を用いてスフェロイドを積層し、融合してできた肝臓構造体について、①主要な薬物代謝関連遺伝子群の発現解析、②Rifampicin による CYP3A4 の誘導試験、③DILI Category 1~3 且つ平面培養や既存のヒト 3D 肝臓モデルで毒性が検出されない化合物の長期暴露試験を行い、アルブミン、ATP、尿素の産生量測定と病理染色を行った。

### 【結果と考察】

本構造体の主要な薬物代謝関連遺伝子群は初期値を大きく下回ることなく発現量を維持しており、Rifampicin による CYP3A4 の誘導も確認された。本構造体の長期暴露試験においては、アルブミン、ATP、尿素のいずれかの産生量低下が見られ、構造体の病理組織像は DMSO 群と比較して広領域に渡り死細胞が観察され、スフェロイドでは毒性検出できなかった毒性を検出することができた。

ヒト由来細胞のみで作製された 3D 肝臓構造体は、臨床段階で起こりうる肝毒性と類似した傾向を示しており、既存のモデルでは検出されない毒性を *in vitro* で予測できるヒト肝臓モデルになると期待される。

## P-23\* バイオ 3D プリンタで作製したヒト肝臓モデルの構築： 新鮮ヒト肝細胞（キメラマウス由来ヒト肝細胞）を用いた 肝臓構造体の毒性評価

○鍛冶山咲良、長尾映里、溝口奈津美、島村満、岸井保人、井出いずみ

株式会社サイフューズ

【目的】薬物性肝障害 (DILI) は医薬品の開発中止や市場からの撤退となる主な原因の一つで、創薬において早期から潜在的な肝障害リスクを予測できるツールが求められている。近年、*in vitro* 培養系で肝細胞 3 次元 (3D) 毒性評価モデルが構築されつつあるが、それらの多くはマウス由来のフィーダー細胞やコラーゲン繊維等の足場材が使用されており、ヒト肝毒性検出感度への影響が懸念されている。また、肝細胞の平面培養ではトランスポーター関連遺伝子の発現量が低く、肝毒性評価の正確性が乏しいことから化合物の長期暴露試験において臨床結果を反映した毒性評価が十分なされていない。そこで我々は、自社のバイオ 3D プリンタを使用して完全ヒト化した 3D 肝臓構造体モデルを作製し、その機能評価および化合物による毒性評価を行うことで毒性評価ツールとしての有用性や DILI の臨床結果との相関性について確認した。

【方法】マウス肝臓がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス<sup>®</sup>) から分離した細胞 (PXB-cells<sup>®</sup>) (置換率 90%以上) を非接着性 96-well plate に播種し、直径約 500 $\mu$ m のスフェロイドを作製した。数日後、バイオ 3D プリンタを用いて剣山上にスフェロイドを積層し、循環培養を行った。スフェロイド同士が融合した後、肝臓構造体を剣山から抜去し、培地及び各化合物を添加した培地を入れた容器中で更に培養を継続したものを評価に用いた。評価は機能評価と毒性評価を行い、機能評価については構造体の ATP 量、CYP 酵素活性、代謝関連遺伝子の発現量測定を行い、毒性評価については構造体に臨床で毒性を示す 4 化合物を添加し、ATP 量、Albumin 産生量、Urea 産生量及び病理によって評価を行った。

【結果】使用した PXB-cells<sup>®</sup>には 10%程度マウス由来の細胞が存在しているが、本構造体では培養過程でマウス由来細胞が消滅し、最終的に 100%ヒト肝細胞へ置換することに成功した。機能評価については、生存率を表す ATP 量や肝細胞主要遺伝子の発現量は 3 週間以上高い値を示し、Rifampicin による CYP3A4 の活性誘導も認められた。特に長期培養で初期値の 1/10 以下に低下すると知られている OATP1B1 の遺伝子発現量だが、本構造体では 3 週間後も初期値と同等レベルの発現量を確認することができた。毒性評価については、ATP 量、Albumin 産生量、Urea 産生量について各項目共に 4 化合物中 3 化合物以上で毒性を検出することができた。また、病理評価においては control と比較し、全化合物添加群で多数の死細胞が確認でき、毒性を検出することに成功した。今回我々は、自社技術を用いて作製したヒト肝臓構造体によって、既存のツールでは検出できなかった化合物においても臨床結果と相関した結果が得られたことから、本肝臓構造体のヒト肝毒性評価ツールとしての有用性が示唆された。