

# 特別講演・シンポジウム要旨

# SL-1 革新的イメージング技術を駆使した多階層医薬品毒性機序解析技術の創出

○今村 健志<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>愛媛大学大学院 医学系研究科 分子病態医学講座

<sup>2</sup>愛媛大学 医学部附属病院 先端医療創生センター

医薬品毒性機序の研究においては、培養細胞を用いた*in vitro*解析のみならず実験動物を用いた*in vivo*解析が必須である。これまでの実験動物を用いた医薬品毒性評価においては、動物を安楽死させて臓器・組織を取り出し、組織病理学または分子生物学の手法を駆使した解析が中心であった。これらの解析では、全身の臓器・組織・細胞を空間的に観察・評価することができる。一方、動物を安楽死させるかぎり同一個体で継続的に観察・評価することができず、さらに、生体内の不均一な分子・細胞の時空間的動態を正確に、定量的に明らかにすることが難しい。よって、今後は、スナップショットではなく、生きている細胞や個体においてライブで分子・オルガネラ・細胞の時空間的動態を解析するバイオフォトニクスを駆使した革新的蛍光ライブイメージングの医薬品毒性機序研究への応用が必要である。

本講演では、マイクロからマクロまで多階層の医薬品毒性機序の解析を実現させるための革新的イメージング技術を紹介する。具体的には、超解像顕微鏡によるオルガネラの高解像リアルタイムイメージングからメダカやマウスの全身マクロイメージング、さらに2光子励起蛍光顕微鏡を用いた高解像生体深部イメージングまで、様々な最先端機器、蛍光タンパク質や蛍光色素を駆使して、生体で細胞動態、細胞機能や細胞環境を画像化して解析する手法を紹介する。まず、超解像顕微鏡を用いた、特殊な色素によるミトコンドリアの高解像リアルタイムイメージングを紹介する。この手法では、これまで電子顕微鏡でしか観察できなかったミトコンドリアのクリステ構造のライブイメージングが可能である。次にヒトがんを移植した免疫不全マウスのがん微小環境リアルタイムイメージングおよびマルチカラーイメージングを紹介する。この手法では、血管新生、リンパ血管新生およびプロテアーゼ活性などのリアルタイムマクロイメージングおよび3色同時イメージングが可能である。さらに、2光子励起蛍光顕微鏡を用いた大脳新皮質から海馬の高解像3Dイメージングを紹介する。2光子顕微鏡法は、深部組織における細胞の挙動および機能を調べる強力な技術であり、我々が開発・応用した、1040nm以上の励起波長を用いた赤外（IR）-2光子励起顕微鏡および補償光学系についても紹介する。IR-2光子励起顕微鏡は、赤色蛍光タンパク質/色素の適用を可能にし、従来の多光子顕微鏡と比較してより深いイメージングを可能にする。次世代の医薬品毒性機序研究において、バイオフォトニクス技術を駆使し、医薬品により惹起される病態とその分子メカニズムを解明することは有用であろう。

## SL-2 病理標本のデジタル化と機械学習の活用法

### ○高松 学

公益財団法人がん研究会 がん研究所 病理部

医療における人工知能（AI）の活用は近年飛躍的に発展している。病理診断においても、数年前からデジタル化組織画像における研究が活発化しており、医学ジャーナルで取り上げられる機会も増えてきている。その主旨の多くは、組織画像のデジタル化と AI を用いた画像解析により病変の検出や既知の組織分類を行うもので、近い将来病理診断の補助的な役割を担うことが期待されている。一方で、癌を始めとする悪性疾患の予後や、遺伝子変異情報、分子標的治療への反応性など、直接治療法選択に結びつく分野との融合的な研究については、本格的な研究がはじめられたばかりである。

日常の病理診断においては、組織画像のデジタル化は必須ではなく、顕微鏡据え付けのカメラで都度撮影するか、あるいはデジタルスライドスキャナでスライドガラス全体をスキャンするかのどちらかのステップを経て、初めてデジタル化される。2000年代にデジタルスライドスキャナは全国的に普及し、遠隔診断やコンサルテーションを主な目的として活用されているが、AIによる組織画像の解析に用いるためには、臨床情報（予後・治療）との組み合わせが重要になる。がん研究会では2019年7月よりすべての生検検体の組織画像をデジタル化しており、今後臨床情報も併せたデータベースを構築する予定である。

病理組織画像の解析において、ネックとなるのが、その情報量の膨大さである。1スライドあたり数ギガバイトになることもある組織画像を、いかにして診療に役立つ形に加工し解析するかという点が非常に重要となる。多くの場合、病理組織画像をタイル状に分割し、それぞれの画像を解析（分類・判定）することで、機械による解釈を引き出すのであるが、その根拠となる教師データは多量かつ安定的である必要があるため、効率よく正解データを収集する（画像にラベル付けを行う）ことが求められる。

本講演では、がん研病理部における病理組織標本デジタル化の取り組みと、組織画像を用いた機械学習の実際の手法の紹介に加え、現在病理診断が抱える問題点を AI でどのように解決してゆくか、という点に焦点をあてて述べる。

# S1-1 質量分析イメージングによる組織内局所代謝解析の最新動向

○杉山栄二, 水野初, 豊岡利正, 轟木堅一郎

静岡県立大学薬学部生体機能分子分析学分野

【目的】質量分析イメージング (Mass Spectrometry Imaging: MSI) は、平面試料から位置情報とマススペクトルを取得し、そのデータを用いて標的分子の分布を描出する手法である<sup>1)</sup>。この手法は特にオートラジオグラフィや免疫組織化学で困難な低分子化合物の組織学的解析に有用であり、定量的解析も可能となりつつある。また近年、誘導体化や多段階質量分析の適用に加えて質量分析計の性能が向上した結果、標的可能な分子種が大幅に拡大した。演者はこれまで関連技術の開発と応用に携わり、例えば夾雑成分の影響を軽減する手法を考案して極性代謝物のイメージングに応用した<sup>2)</sup>。また、区画培養法を導入し、神経細胞が軸索末端で細胞外遊離脂肪酸を取り込みリン脂質に変換した状態を可視化した<sup>3)</sup>。病態モデルマウスやヒト病理組織の解析では、病変部位の脂質組成変化や治療薬の薬効評価等を通じて新知見を得た<sup>4)</sup>。最近では、内標準法や安定同位体標識体を利用した脳内モノアミン代謝の定量的解析を進めている<sup>5), 6)</sup>。本シンポジウムでは、脳内モノアミン代謝の解析例を中心に、MSIに関わる最新技術の動向について紹介したい。

【目的】脳内モノアミンの代謝経路は気分障害治療薬の主要な標的となっているにも関わらず、各治療薬が「どこ」で「どれだけ」モノアミン量の変化を及ぼしているのかは未だ不明である。種々の病態や薬物治療が及ぼす局所モノアミン量の変化を調べることにより、病態や薬効に寄与する神経核の同定や有効性の高い治療法の開発に寄与することが期待される。そこで我々はまず、マウス脳全体のモノアミン量分布を明らかとすることを目的に、MSIを用いた解析を行った。続いて acute tryptophan depletion (ATD)<sup>7)</sup>に着目し、脳内セロトニン代謝の変動に基づく神経核の分類を試みた。

【方法】8-12週齢の雄マウスより作成した新鮮凍結脳切片にデータ補正用の安定同位体標識体を塗布後、誘導体化試薬とイオン化促進剤を塗布して測定に供した。ATDモデルは先行研究<sup>8)</sup>に従い準備し解析した。併せて、安定同位体標識した前駆体を経口投与し、脳内で合成されるセロトニンの動態を解析した。

## 【結果・考察】

マウス脳内モノアミンマッピングの結果、既知の部位に加えて意外な部位にモノアミンが集積することが明らかとなった。また、血中トリプトファン濃度に応じたセロトニンの局所量変化を定量的に解析することで、セロトニン神経系の主要な投射部位を分類することに成功した。特に、セロトニン神経系およびノルアドレナリン神経系における主要な神経核として視床室傍核 (the paraventricular nucleus of the thalamus: PVT) を同定した。近年PVTと気分障害等の関わりが着目されている一方、PVTにおけるモノアミンの役割はほとんど調べられていなかった。今後、PVTにおけるモノアミン代謝が果たす機能の解明が進むことが期待される。

## 【参考文献】

- 1) Norris and Caprioli, *Chem Rev.*, **113**, 2309-2342 (2013)
- 2) Sugiyama *et al.*, *Anal Chem.*, **87**, 11176-11181 (2015)
- 3) Sugiyama *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, **495**, 1048-1054 (2018)
- 4) Kitakaze *et al.*, *J Clin Invest.*, **126**, 1691-1703 (2016)
- 5) Sugiyama *et al.*, *iScience*, **20**, 359-372 (2019).
- 6) Sugiyama *et al.*, *Neurochem Int.*, **129**, 104494 (2019)
- 7) Schweighofer *et al.*, *J Neurosci.*, **28**, 4528-4532 (2008)
- 8) Biskup *et al.*, *PLoS One*, **7**, e35916 (2012)

## S1-2 内外環境因子が肝再生や代謝能に与える影響

### ○佐能 正剛

広島大学大学院医系科学研究科生体機能分子動態学研究室

肝臓の再生能に期待して、肝臓がんの外科的治療として肝切除が施されることがある。しかし、肝切除後は肝機能が低下していることから、肝再生が完了するまでの間の薬物治療には注意を要するが、この期間における薬物代謝能の変化やそのメカニズムは十分に分かっていない。また、薬物治療が肝再生機能に影響を与えることも想定される。

2/3 肝切除肝再生モデルマウスは、肝切除後おおむね 1 週間で肝再生が完了することが知られている。肝臓および小腸に発現するシトクロム P450 (CYP) 分子種の肝切除後の発現変化を調べたところ、いくつかの CYP 分子種の mRNA 発現が一時的に増加することが明らかとなった。一方、マウスの飼育飼料を通常飼料から精製飼料 (AIG-93G) に変更したところ、肝再生速度の有意な遅延が観察された。また、精製飼料で飼育時の 2/3 肝切除肝再生モデルマウスの方が、発現が増加する CYP 分子種は多くなった。このことから、これら CYP 発現の増加は、肝切除による肝機能低下に応答した代償誘導が、肝臓と小腸の臓器間連動として機能したのではないかと考えられた。

我々は、この臓器間連動に関与する内在性物質として腸肝循環の体内動態を示す胆汁酸に着目した。精製飼料で飼育した 2/3 肝切除肝再生モデルマウスに、胆汁酸のひとつコール酸を投与したところ、細胞増殖の指標である cyclinD1 の発現量は増加し、cyp3a11 の発現も増加する傾向が観察された。以上から肝再生や CYP 発現変動に、一部胆汁酸が関与していることが示唆された (*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2019)。また、胆汁うっ滞を惹起することが知られるリファンピシンを 2/3 肝切除肝再生モデルマウスに投与したところ、肝再生が促進されことから、胆汁酸濃度の増加が肝再生に影響を与えているものと考えられた。

免疫不全と肝障害の性質を有する uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植し、マウスの肝臓がヒトの肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスは、ヒト肝臓における薬物動態や毒性を評価できるモデル動物として期待されている。我々は、ヒト肝細胞キメラマウス (PXB mouse, 株式会社フェニックスバイオ) にリファンピシンを投与したところ、胆汁酸濃度が増加することが分かった (*Biol. Pharm. Bull.*, 2019)。また、ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞置換率が増加するにつれて、胆汁酸濃度が高くなることも分かった (*BPB Reports*, 2019)。これらの知見をふまえると、ヒトにおいても胆汁酸を変化させる因子は肝再生に影響を与える可能性が示唆された。

一方で、精製飼料で飼育した 2/3 肝切除肝再生モデルマウスでは、トリグリセリドの濃度が減少していたこと、リファンピシン投与でトリグリセリド濃度が上昇した知見もあり、胆汁酸だけでなく、脂質を変動させる因子も肝再生や CYP の発現変化に影響を与えている可能性がある。今後、肝再生や薬物代謝能に影響を与える内在性物質を絞り込んだ上で、ヒトにおける可能性をさらに精査する必要はあるものの、食事療法や薬物治療によって胆汁酸などの内在性物質が変動し、肝再生や薬物代謝に影響を与える可能性があることが示唆された。

## S1-3 シトクロム P450 阻害作用にもとづく化学物質プロファイリングの毒性予測研究への応用

○吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

医薬品等の化学物質の安全性評価は主に動物実験データを基に行われているが、化粧品や工業化学品の領域では動物実験代替法の開発が強く求められ、皮膚感作性などでは adverse outcome pathway (AOP) が確立され、それらに基づいたインビトロ試験が開発されている。一方、安全性評価において重要な反復投与毒性に関しては、その多様性、複雑さなどの理由から AOP の確立や代替法の開発は進んでいない。毒性発現機序が複雑な医薬品の肝毒性についても、様々な評価系が確立されているにも関わらず、非臨床段階で肝毒性を確実に評価することはできていない。

インシリコ手法を利用した毒性評価において、化学物質の物理化学的特徴と毒性との関連性を明らかにし、それに基づいて毒性を予測する構造活性相関手法がしばしば用いられる。これら手法では化学物質の特徴量として分子記述子やフィンガープリントが用いられるが、反復投与毒性をはじめとする多くの毒性ではこれら特徴量だけでは精度の高い予測が困難である。このような背景のもと演者らは、主要な薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (P450) との反応性を新たな特徴量として利用した、反復投与毒性や医薬品肝毒性の予測に取り組んでいる。

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) からラット 28 日間反復投与毒性試験結果がある約 150 物質を選択し、18 分子種の P450 に対する阻害作用を測定して P450 阻害プロファイルを取得した。主成分分析の結果、P450 阻害プロファイルは既存の分子記述子 (Dragon 記述子) は異なる新たな分子記述子となりうることを示唆された。また P450 阻害プロファイルと特定の反復投与毒性エンドポイントとの間に有意な関連性があることを見出した。

他方、医薬品の肝毒性評価への P450 反応性データの有用性を解析するため、薬剤誘発性肝障害 (drug-induced liver injury: DILI) 誘発作用がある薬物と DILI 誘発作用がない薬物を米国 FDA の Liver Toxicity Knowledge Base (LTKB) から選択し、8 分子種のヒト P450 に対する阻害作用を評価した結果、DILI 誘発性薬物は非誘発性薬物に比べて CYP1A1 および CYP1B1 を阻害しやすいことが明らかとなり、CYP1A1 や CYP1B1 の阻害作用が、新たな DILI アラートとして有用な可能性が示された。

本講演ではこれらの研究成果を紹介し、その意義、活用方法を議論したい。

### 【参考文献】

1. 吉成浩一, 佐々木崇光, 渡邊美智子, 橘内陽子, 竹下潤一: 化学物質の反復投与毒性予測手法開発の現状と課題. *日本化学会情報化学部会誌*, 36: 47-50, 2018.
2. Watanabe M, Sasaki T, Takeshita J, Kushida M, Shimizu Y, Oki H, Kitsunai Y, Nakayama H, Saruhashi H, Ogura R, Shizu R, Hosaka T, Yoshinari K: Application of cytochrome P450 reactivity on the characterization of chemical compounds and its association with repeated-dose toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019 in press. doi: 10.1016/j.taap.2019.114854.
3. 米川恵理, 山崎弘量, 清水佑記, 佐々木崇光, 渡邊美智子, 志津怜太, 保坂卓臣, 竹下潤一, 吉成浩一: 薬物のシトクロム P450 反応性と肝障害誘発性の関連性解析. 第 46 回日本毒性学会学術年会要旨集, 2019. doi: 10.14869/toxpt.46.1.0\_P-85S

# S1-4 質量分析イメージングを用いた核医学診断剤の代謝機序探索

○志水 陽一

京都大学 医学部附属病院 放射線部

放射性同位元素を標識した核医学診断剤を用いた陽電子放射断層撮像法 (Positron Emission Tomography, PET) などの核医学診断法は、投与した薬剤の体内動態を体外より高感度かつ定量的に画像化する手法であり、臨床画像診断や創薬研究などに応用されている。核医学診断剤は主に標的受容体とリガンドの特異的結合を利用した“受容体結合型核医学診断剤”，標的酵素による代謝を利用して標的組織に集積する“代謝補足型核医学診断剤”に分類される。ところで、核医学診断法では核医学診断剤に標識している放射性同位元素に由来する放射能の空間的分布を評価する手法であるため、得られた画像から核医学診断剤の化学形態を区別することが出来ず、代謝補足型核医学診断剤が生体内でどのような化学形態で存在するかについて解析するのは困難である。

近年、質量分析技術により二次元空間上に存在する分子の分布を直接可視化できる質量イメージング法が開発された。質量分析イメージング法は、従来の核医学診断法では困難であった組織切片中における薬剤およびその代謝物の分布を区別して可視化できる特徴を有している。そこで演者は、がんの低酸素領域を標的とする代謝補足型核医学診断剤である“<sup>18</sup>F-FMISO”に着目し、質量分析イメージング法と核医学診断法を融合することにより、本診断剤の腫瘍組織内の低酸素領域における化学形態および分布を評価し、代謝集積機序を明らかにすることを試みた。その結果、FMISOは低酸素環境下の細胞内にて還元代謝を受けたのち、従来想定されてきた細胞内タンパク質等の高分子に共有結合するのみならず、グルタチオン抱合反応を受けることにより細胞内に集積していることを明らかにした (Fig. 2) (Sci Rep., 2015)。また、低酸素環境下細胞における<sup>18</sup>F-FMISOの集積量は酸素濃度のみならず、細胞のグルタチオン抱合関連因子 (Glutathione-S Transferase や Multidrug Resistant Protein-1, MRP-1) の発現・活性度により変化することを見出した (Ann Nucl Med., 2017)。さらに、本知見を基に MRP-1 阻害能を有する薬剤を前投与した担がんマウスに<sup>18</sup>F-FMISOを投与し、PET/CT撮像を行ったところ、<sup>18</sup>F-FMISOの腫瘍集積量はMRP-1阻害剤未投与群と比べて有意に高くなることを示し、<sup>18</sup>F-FMISOを用いたPET診断において、MRP-1阻害能を有する薬剤を併用すると腫瘍組織内の低酸素領域を過剰に描出する可能性を見出した。

本シンポジウムでは上記の研究成果を基に、質量分析イメージング法を用いた核医学診断剤の代謝機序の探索研究への応用の可能性について紹介する。

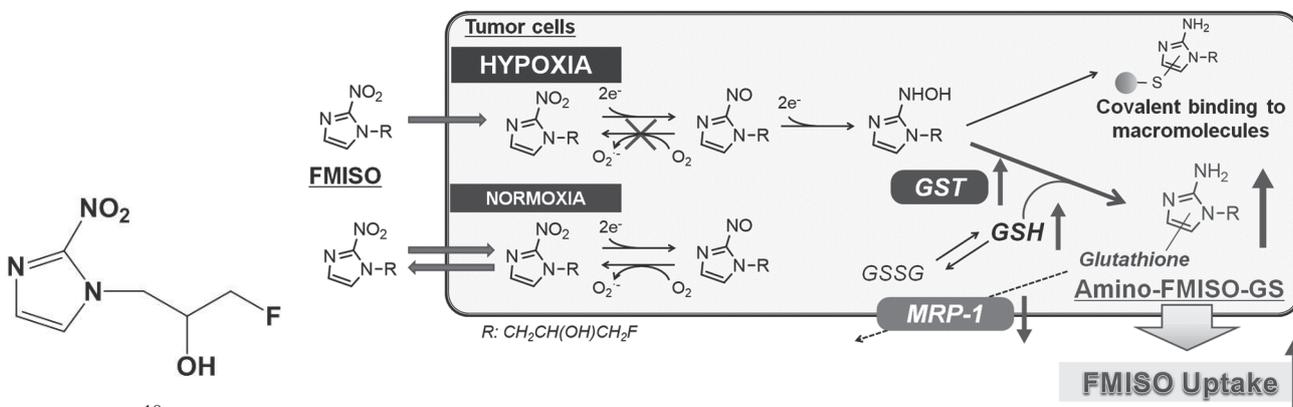


Figure 1. <sup>18</sup>F-FMISOの化学構造式.

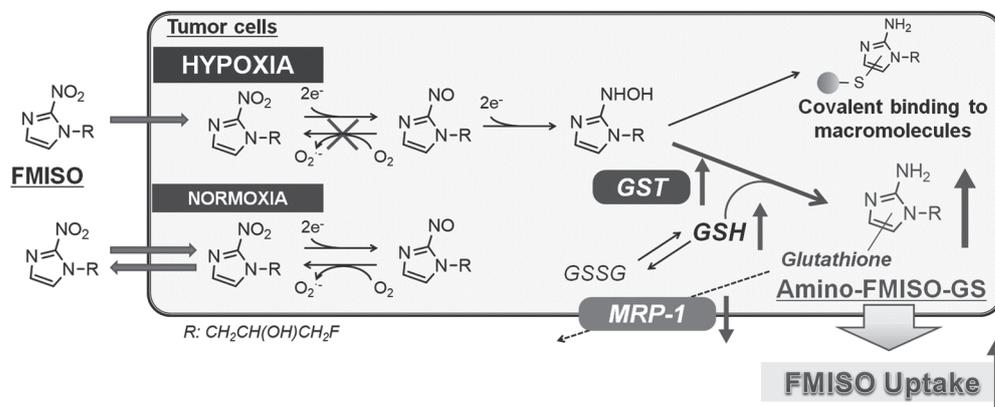


Figure 2. 本研究結果より推測される<sup>18</sup>F-FMISOの低酸素環境下細胞内への集積機序.

## S2-1 コンパニオン診断薬をめぐる規制と開発の動向

○鈴木 孝昌

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部

個別化医療の実現に向けて、コンパニオン診断薬は欠かせない存在となっている。がんの分子標的薬に代表されるように、特定の分子やその変異といった治療ターゲットの有無により、薬剤への感受性の個人差が大きく変化するケースが増えてきており、こうした場合には、事前に対象となるバイオマーカーを診断することにより治療効果を予測するコンパニオン診断が重要となる。このようなコンパニオン診断薬の存在が、新規医薬品の開発においては必須となるケースが増えており、我が国においても米国 FDA の方針に追随して、コンパニオン診断薬とその対象となる新規医薬品に関し、同時申請、同時承認が原則となった。これにより、開発側とともに規制側においても全く新しいスキームでの承認申請への対応を迫られることとなった。国内の医薬品メーカーにおいては、診断薬部門を自社内に持たないケースが多いため、外部診断薬メーカーと協調して医薬品との同時開発を進めるという、新たなビジネスモデルの構築を迫られることとなった、また、審査側においても、医薬品の審査とコンパニオン診断薬の審査を協調して進める体制を構築する必要性に迫られ、PMDA においては、コンパニオン診断薬 WG を立ち上げ、必要なガイドライン等の作成にあたっている。平成 25 年の関連通知の発出以降、本邦において承認されたコンパニオン診断薬等は 20 種類近くになっており、すでに一定の地位を確立しているが、次世代シーケンサーの診断応用や、同一バイオマーカーを対象とする異なるコンパニオン診断薬の取り扱いなど複雑な課題も生じている。プロファイリング検査として承認されたがん遺伝子パネル検査の一部は、コンパニオン診断薬としても承認されているが、保険点数はむしろ低く設定されていることや、従来診断薬としては承認されなかった海外の特定機関での検査が、ソフトウェア等の医療機器のカテゴリーでコンパニオン診断薬“等”として承認されるなど、規制をとりまく状況も混迷を極めて

いる。  
本講演では、こうしたコンパニオン診断薬をめぐる最近の動向を概説するとともに、その分析的妥当性の評価に向けた我々の取り組みについて紹介する。また、従来は安全性の問題により開発を断念した医薬品に関して、コンパニオン診断薬の利用により承認を可能とするスキームに関しても提案を行う。

## S2-2 メタボロミクス解析による安全性バイオマーカー探索とコンパニオン診断への可能性

○齊藤公亮, 斎藤嘉朗

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

現在（令和元年 9 月 18 日現在）コンパニオン診断薬は、オンコパネルによるがんの網羅的な遺伝子変異の検出を除き、医薬品の有効な患者群の層別化に用いられているが、医薬品には有害作用が必ず随伴し、有効な患者群の層別化だけでなく、有害作用を回避しうる患者群の層別化も医薬品の適正使用という観点では必要不可欠である。実際に、コンパニオン診断薬として承認はされていないものの、グルクロン酸転移酵素の遺伝子多型によりイリノテカンの解毒代謝遅延が生じ、有害作用の発現率が上昇するため、その遺伝子多型検査は保険適用されている。また、近年では、医薬品ごとに重篤な有害事象の一つであるスティーヴンス・ジョンソン症候群の発現率が増加するヒト白血球抗原（HLA）型が報告されており、HLA 型を調べることで、有害作用を回避しうる患者群の層別化が実用化されつつある。従って、ゲノム解析によって有害作用に関連すると同定された遺伝子多型は、安全性バイオマーカーとしてコンパニオン診断薬化も期待される。

一方、遺伝要因が同一であっても、食事・睡眠等の生活習慣に代表される環境要因によって、生体内の状況は変化しており、今後より有効かつ安全に医薬品を利用していくためには、環境要因を含めた医薬品有害作用の発現リスクを層別化する技術開発が課題であると考えられる。血中を循環する代謝物、タンパク質、マイクロ RNA の各臓器からの合成・放出とその体内分布は、環境要因によって変動することが分かっており、これらの分子は環境要因を反映する因子となりうる。メタボロミクス解析は生体中を循環する代謝物を対象とした網羅的解析であり、表現型に直結すると考えられているため、血液や尿等、リキッドバイオプシーによって評価できるバイオマーカーの探索へ応用されている。そこで本発表では、我々が独自に開発したメタボローム解析系を用いて、抗がん剤投薬前の患者血液試料中から、抗がん剤投薬後の奏功性や副作用の発症と相関する分子を見出した例を中心に成果をご紹介し、コンパニオン診断への可能性についてもお話ししたい。

## S2-3 コンパニオン診断薬に関わる病理診断

○高橋 智<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院 医学研究科 実験病態病理学

<sup>2</sup>名古屋市立大学 病理診断部

遺伝子解析技術の飛躍的な進歩によってがん細胞が有する全ゲノムにおける遺伝子変異の全貌が明らかにされている。これらのゲノム情報に基づいて個人レベルにおける最適な治療方法を選択するプレジジョンメディスンががん治療の主流となっており、がん細胞に特有の遺伝子変異を標的とした分子標的治療薬の使用が急速に増加している。その際、コンパニオン診断薬を用いて効果がより期待される患者を選別し、無駄な治療を回避するための検査が実施されている。コンパニオン診断薬の多くは遺伝子変異を検出するものであるが、いくつかの診断薬では免疫組織染色によるタンパク発現を評価することで患者の選別を行なっている。

がん治療に関連したコンパニオン診断薬における病理組織診断として、HER2 および PD-L1 免疫組織染色が知られており、HER2 は乳癌、胃癌、PD-L1 は非小細胞肺癌を中心に実施されている。HER2 における陽性の判定基準は乳癌、胃癌ではいくつかの点で差異があり、PD-L1 においては使用する抗体によって判定基準が異なっている。今回の発表では、それぞれのガイドラインに沿った判定基準およびその基づいて選択された症例に対する治療効果について、名古屋市立大学関連施設における実臨床データを紹介する。

## S2-4 法令・制度面からみたがんゲノム医療 － 企業の立場での課題 －

○田澤義明

中外製薬株式会社

がん関連遺伝子を網羅的に測定・解析し、がん患者ごとに最も効果が期待できる抗がん剤治療を選択するためのがん遺伝子パネル検査として、「OncoGuide®NCC パネル」と「FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル」が薬事承認され保険医療として実装されるに至った。がん遺伝子パネル検査では解析速度が速く低コストを実現した次世代シーケンサーを用いて数百のがん関連遺伝子の様々な変異を分析するだけでなく、選択可能な有効薬剤を特定するためには、蓄積されたゲノムデータベースの活用と各測定方法に応じた解析アルゴリズムの開発が必要であり、従来の臨床検査や特定の薬剤のコンパニオン診断薬と比べて技術的に極めて複雑な検査法である。特に解析に必要なゲノム情報や治療法は日々進化しており、最新の医学的なエビデンスに基づいた遺伝子変異の意義付けと検査時での最適な薬剤を選択することが求められることから、従来の測定試薬や装置と言う「製品」ではなく、変化する種々のデータに基づいた解析結果を「情報」として取り扱うことが特徴である。

従って、こうした新しい概念の医療技術を適切に評価する薬事承認審査の基準・要件だけでなく必要となるコストの償還の適正化が重要な課題である。また、パネル検査では遺伝性／家族性腫瘍を疑う遺伝子変異が見つかるため、患者及び血縁者へのカウンセリングや確定診断のための検査の開発から臨床運用、更には遺伝子検査結果の取扱いに伴う遺伝的保因者への社会的不利益を防止する法令の整備など様々なレギュラトリー上の対応課題が指摘されている。特に本邦では、がんゲノム医療が先行している米国と比較すると、これら最新の医療技術を安全かつ公平に患者に届ける上での仕組みや法令の整備は脆弱であり、今後、医療産業として発展させて行くためにも必要となる法令の整備や仕組みの適正化と、個人医療保険等の運用などを踏まえ高額化する医療技術に対する保険償還システムの多様性が強く望まれる。

## S3-1 核酸医薬品における毒性評価の現状 ～国際協調ガイドライン策定への道のり～

○平林 容子<sup>1,2</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

<sup>2</sup> ICH S6 対応研究班<sup>1</sup>

オリゴヌクレオチド製剤（以下、核酸医薬品）に特化したガイドラインは存在しないため、このものの安全性評価については、バイオ医薬品のガイドライン（ICH S6(R1)）をはじめ、諸種の非臨床に関する既存のガイドラインを参照しながら、ケースバイケースで対応せざるを得ないのが実情である。一方、核酸医薬品は通常、種々の化学修飾が付加されることや、このものの薬理作用が、細胞内で発現する事を前提としつつ、核酸の配列に依存するため結果的に種特異性が高いことなど、従来の非臨床安全性試験だけでは、十分ではない懸念がある。他方、近年の核酸医薬品開発はめざましく、実例に基づく知見が蓄積し始めた中で、ガイドライン化に向けた調査研究が、国内外で現在進行中である。

ICH S6 対応研究班でも、国際協調ガイドライン策定に向けて、Oligo Safety Working Group (OSWG) の構成員との情報交換を行いつつ、論点を整理し、それらに対する見解を発信してきた。更に、革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業の一環として進められてきた「核酸医薬の臨床有効性、安全性の評価方法に関する研究」の非臨床安全性評価に関する課題を引き継ぐ形で、最新情報をもとに見解を更新し、「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン(案)」(以下、本ガイドライン案)を取りまとめた。本ガイドライン案は厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管課より公開され、2019年2月21日から5月21日までの間、パブリックコメントが募集された。

本講演では、当該ガイドライン案とりまとめの背景を説明するとともに、ICH S6 対応研究班における国際協調ガイドライン策定に向けた取り組みについて、これまでの経緯とともに、今後の展望についても紹介したい。

---

<sup>1</sup> 「バイオ／核酸医薬品の安全性に関する研究」班；日本医療研究開発推進事業費補助金〔医薬品等規制調和・評価研究事業〕「医薬品の安全性および品質確保のための医薬品規制に係る国際調和の推進に関する研究」班の補助課題

## S3-2 核酸医薬品における毒性評価の課題 ～パブリックコメントより～

○木下 潔<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会

<sup>2</sup> MSD 株式会社

核酸医薬品により生じる可能性のある毒性には、過剰な薬理作用であるオンターゲット毒性や、核酸分子特有の構造や物理化学的特性により生じる毒性（ハイブリダイゼーションによらないオフターゲット毒性：クラスエフェクトなど）に加え、標的とする RNA 配列と同一もしくは類似した他の配列にハイブリダイズすることによる毒性（ハイブリダイゼーションによるオフターゲット毒性）が考えられる。しかし、低分子化合物やバイオ医薬品を対象とした既存の非臨床安全性評価ガイドラインには、これらの毒性を評価するために参考となる記載がない場合があった。このため、核酸医薬品の安全性評価に対する全般的な考え方の指針を示すものとして、厚労省「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン（案）」が作成・公開され、2019年2月より3か月間にわたりパブリックコメントが募集された。

パブリックコメントの集中したポイントと、そこから読み取れた主な疑問は以下の通りであった。

- ハイブリダイゼーションによるオフターゲット毒性の評価方法
  - in silico 解析や in vitro 解析の具体的な方法や留意点は何か？
  - オフターゲット候補遺伝子の絞り込み時に着目すべき点は何か？
- オンターゲット毒性の評価方法
  - 薬理作用を示す種がヒトのみである場合、試験動物で薬理作用を示すサロゲートを用いた評価が考えられるが、試験実施時や結果を解釈する際の留意点は何か？
  - 薬理作用を示す種がヒト及び非ヒト霊長類（NHP）のみである場合、毒性評価には NHP とげっ歯類のサロゲートとのどちらを優先するのが適切か？
- 試験の要否または試験デザインに関連したもの
  - hERG 試験を実施すべきか？
  - in vitro 遺伝毒性試験を実施すべきか？
  - 一般毒性試験での高用量設定時の留意点は何か？ など。

本講演では、これらパブリックコメントの寄せられた背景を説明するとともに、当該ガイドライン最終化に向けて、国際動向を踏まえた対応について紹介する。

## S3-3 ペプチド医薬品の非臨床安全性評価の考え方

○真木一茂、直田みさき

医薬品医療機器総合機構 毒性領域

1980年代に化学合成医薬品に代わって登場したバイオテクノロジー応用医薬品（以下、「バイオ医薬品」）は、現在に至るまで数多くの革新的な医薬品を生み出しているが、近年、その標的となる細胞外分子は枯渇しつつあること、さらに製造コストの観点から、化学合成医薬品とバイオ医薬品の長所を併せ持つペプチド医薬品が注目されている。特にペプチド医薬品の中でも環状ペプチドなどの中分子ペプチドについては、バイオ医薬品と同様に高い特異性やタンパク質間相互作用阻害活性を持つ一方で、バイオ医薬品では期待することが難しい経口投与や細胞内分子を標的することが可能であることから、新たなモダリティーとして注目されている。

しかしながら、現時点でペプチド医薬品に特化した非臨床安全性評価に係るガイドラインは存在しない。FDAでは40アミノ酸残基以下のペプチドは化学合成医薬品と同等の規制を行っているが、PMDAでは、バイオ医薬品に関するICH S6(R1)ガイドラインに「本ガイドラインに示される原則は、…（中略）…化学合成ペプチドにも適用されうる」との記載があることから、その基本理念である「ケースバイケース」の原則を、ペプチド医薬品の非臨床安全性評価に適用している。したがって、本邦でのペプチド医薬品の非臨床安全性評価においては、ペプチド医薬品を構成するアミノ酸の種類（天然型/非天然型）に加え、ペプチド医薬品の立体構造（鎖状/環状）、修飾（脂肪酸、PEG、抗体等による修飾）等の物理化学的特性や生物活性を十分理解し、「ケースバイケース」で適切に評価する必要があると考える。

本講演では、様々なペプチド医薬品に共通する非臨床安全性評価について、既存医薬品とペプチド医薬品との違いや、既存ガイドラインでの安全性評価の考え方を参考にした上で、我々の基本的な考え方を紹介したい。

## S3-4 ペプチド医薬品安全性試験の課題

### ○三島 雅之

中外製薬株式会社 トランスレーショナルリサーチ本部

ICH S6 ガイドラインでは、バイオ医薬品についての考え方はペプチド医薬品にも適用できる旨が記載されている。この考え方は、例えばペプチドホルモンなどの生体内物質を医薬品として開発しようとする場合は適切であろう。しかしながら、特殊環状ペプチドであるシクロスポリンに ICH S6 の考え方を適用できるとは思えない。医薬品の新規モダリティとして近年注目されているのは、分子量 600~2,500 程度の中分子ペプチドで、特殊環状ペプチドは特に注目されている分子である。こうした医薬品の安全性については世の中に蓄積が少なく、現時点で適切な非臨床安全性評価のコンセンサスがない。こうした状況は、バイオ医薬品の黎明期に似ている。当時は、バイオ医薬品でも、交叉反応性のないラットを用いた毒性試験や、Ames 試験を実施した。低分子の経験が当てはまらない新しい分子種であることは理解しながらも、既存のガイドラインに適合することを重視したためである。我々は、同じ轍を踏んではならない。新規モダリティの開発は、その物質の性質に基づいて、ケースバイケースで適切に対応すべきである。

低分子医薬品は酵素等のターゲット分子の深く狭いポケットにきっちりとはまり込んで、その作用を発揮する。経口吸収性に有利と言われる分子量 500 以下のものが多い。一方で、多くのバイオ医薬品は分子量が 10,000 を超えるタンパク質である。バイオ医薬品は構造に柔軟性があり、ターゲット分子との相互作用により、浅く広い作用面で結合する複合体を形成して薬理作用を発揮する。薬効ターゲットとの結合様式が異なるため、低分子医薬品とバイオ医薬品では同じターゲットを対象にしたとしても特異性や感受性の種差などの生物学的性質が大きく異なり、安全性評価の考え方を変えざるを得ない部分がある。

新規モダリティのペプチド医薬品は、低分子医薬品とバイオ医薬品の両方の長所を併せ持つことが期待されている。バイオ医薬品と同じようにタンパク質相互作用を持ち、低分子医薬品のように細胞内に移行する。こうした分子について、ヒトにおけるどのような毒性懸念に対応する非臨床評価が必要かは、現在のところ一般化できない。低分子とバイオ医薬品の双方の性質を併せ持つことから、低分子医薬品およびバイオ医薬品を念頭に置いた既存ガイドラインの、何が適用できるのか、何が適用できないのかを明らかにし、実際に安全性試験を実施する場合にどんな課題があり、それにどう対応できるのか、原薬に混入する不純物への対策も含めて論じる。

## S4-1 がんの病理組織検体を用いたエピゲノム解析：個別化医療開発への展開

○金井 弥栄

慶應義塾大学医学部病理学教室

ゲノム等オミックス解析研究手法の発達した今日では、がん等の疾患の本態解明・バイオマーカー開発・治療標的の同定を行うために、多数の臨床試料を用いたデータ駆動型研究の成果が強く求められている。手術標本のうちの病理診断に支障をきたさない適切な部位から研究のために採取された病理凍結組織検体等は、データ駆動型研究のためのオミックス解析の重要な対象となる。病院病理部等に保管されている病理アーカイブ中のホルマリン固定パラフィン包埋標本からも、広汎なオミックス解析が可能になった。病理組織標本を顕微鏡的に観察し、マイクロダイセクション等を行った上でオミックス解析を実施すれば、形態学的な heterogeneity に対応する分子情報を獲得することができる。詳細で正確な臨床病理情報との相関こそ、数字の羅列である莫大なオミックスデータの中から、がんの発生・進展に寄与し臨床のブレイクスルーに結びつく分子情報を抽出する根拠になる。演者らは病理専門医であるがん研究者で、自ら病理診断し臨床病理学的な検討を詳細に行った病理組織検体を用いてオミックス解析を行うことが、重要であり強みにもなると考えてきた。

他方で、病理組織検体の品質管理は、ゲノム等オミックス解析の成否を握る鍵となる。そこで、日本病理学会においては『ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程』を策定した。この規程は、病理組織検体を実際にいろいろな条件や方法で採取・保管・標本作成したのちに、実証的に解析したデータをもとに編集している。演者は日本病理学会ゲノム病理組織取扱い規約委員会委員長として実証解析を主導したので、本講演では、実証解析データを供覧しながら、ゲノム等オミックス解析研究に適した病理組織標本の取扱い方について述べる。

さらに演者は、多様な分子病理解析の中でも特に、世界的な研究の動向に先駆けて発がんエピゲノム機構に注目してきた。諸臓器の病理組織検体のゲノム網羅的 DNA メチル化解析で、DNA メチル化異常が、諸臓器における多段階発がん過程に、喫煙・慢性炎症・ウイルスの持続感染等を伴う前がん段階から寄与することを示した。前がん段階で一旦起こった DNA メチル化異常は、維持メチル化機構で DNA 2 重鎖上に比較的安定に保存され、がん組織そのものに継承されてがんの臨床病理学的悪性度や症例の予後を規定すると考えられる。我々は我が国の代表研究チームとして「ヒトエピゲノムコンソーシアム」の国際的データベース作成に参画し、また近年は、急増している非アルコール性脂肪性肝炎由来肝細胞がんや悪性度の高い CpG アイランドメチル化形質陽性腎細胞がん等の治療標的を、病理組織検体のエピゲノム解析をもとに同定している。

このようなデータ駆動型研究の成果は、病理組織検体を用いたクリニカルシーケンシングを基盤とするがんゲノム医療として、急速に社会実装に向かっている。クリニカルシーケンシングに供した病理組織検体の残余をバンキングする、診療機関併設型のバイオバンクががんゲノム医療中核拠点病院等で一層発達すると期待される。バンキングされた病理組織検体を用いた分子病理学的研究の成果が、次代の個別化医療を創出することが望まれる。

## S4-2 毒性評価における Magnetic Resonance Imaging (MRI)及び組織透明化技術の活用に向けて

○武田 賢和

エーザイ株式会社 バイオフィーマシューティカル・アセスメント機能ユニット グローバル安全性研究部

Magnetic Resonance Imaging (MRI) は、非侵襲的かつ高感度に生体内の構造や病巣を 3 次元的に捉えるイメージング技術として、臨床での病態診断や病態モデル動物での薬効評価等に幅広く用いられている。MRI は、Computed Tomography (CT) や Positron Emission Tomography (PET) と比較して放射線被曝がなく、骨や空気の影響を受けず、高い分解能で任意の断面を撮像できる特長を有する。また、MRI は磁場と電磁波を利用し、生体の水や脂肪に豊富に存在するプロトンの、組織内の密度や磁力による励起後の緩和（元の平衡状態に戻る過程）の違いを画像化することで病変を検出できるため、脳をはじめとする水分や脂肪の多い臓器の解析に適していると言われている。

このような病変の分布・局在および経時的変化の把握が可能なライブイメージング技術に加えて、近年、3 次元での詳細な組織構造解析や免疫組織化学等の分子標識技術と組み合わせた解析を可能とするために、組織透明化技術が注目されている。組織透明化は、光の散乱の原因となる因子を除去するとともに、組織内の屈折率を均一にすることで、可視光線が通常透過できない組織サンプルの光学的性質を変化させ、組織深部の構造観察を可能にする技術である。現在までに、有機溶媒や水溶性化合物を用いる方法、強固な固定による脱脂方法など、多様な透明化技術が開発されている。

これらの技術は、非臨床安全性研究における毒性評価でも応用可能であり、個体内で毒性発現部位や病変部位を検出し、その経時的変化や回復性の評価への活用が期待される。また、臓器内における病変の有無や局在・分布、組織構造変化を 3 次元的に捉えて解析することで、最適な病理標本作製部位の抽出や、病変の病理組織的特徴とその臓器内分布との関連性の比較・考察が可能となり、毒性機序解明に有効な技術になり得る。本演題では、MRI 及び組織透明化技術を活用した毒性評価の可能性と展望について、弊社における検討事例を、文献情報を交えて紹介する。

## S4-3 病理学的手法による膀胱発がん性の早期検出および機序解明

○豊田 武士<sup>1</sup>, 山田 貴宣<sup>1,2</sup>, 松下 幸平<sup>1</sup>, 小川 久美子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 病理部

<sup>2</sup>東京農工大学 獣医病理学研究室

齧歯類を用いた長期がん原性試験の代替法が求められる中で、我々は鋭敏な DNA 損傷マーカーとして知られる  $\gamma$ -H2AX の免疫染色による、膀胱発がん物質の早期検出法開発を目指している。これまでに膀胱発がん物質 35 種、非膀胱発がん物質 30 種の計 65 物質について、ラットへの 28 日間経口投与後の膀胱粘膜を用いて解析した結果、 $\gamma$ -H2AX 陽性細胞率を指標とした膀胱発がん性の検出感度は 82.9% (29/35)、特異度は 100% (30/30) であった。膀胱発がん物質により誘導される  $\gamma$ -H2AX 形成は用量相関性を示し、過形成等の病理学的所見や細胞増殖マーカーである Ki67 発現よりも鋭敏な指標であることが確認されている。本手法は化学物質の安全性評価において広く実施されている、既存の 28 日間反復経口投与毒性試験への組み込みが容易であり、化学物質の効率的かつ迅速なリスク評価法になり得る。

$\gamma$ -H2AX はリン酸化ヒストンタンパク質の一種であり、DNA に二本鎖切断 (DSB) が生じた際に形成されることから、化学物質の遺伝毒性試験への応用が期待されてきた。興味深いことに、膀胱における  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞は遺伝毒性膀胱発がん物質だけでなく、非遺伝毒性膀胱発がん物質の投与時にも増加することが示されている。この結果は、DNA 損傷は付加体形成等の直接的な傷害のみならず、細胞増殖活性の亢進に伴う複製ストレス等、間接的な傷害の結果としても生じる事実を反映していると考えられる。多重免疫蛍光染色による解析において、非遺伝毒性膀胱発がん物質であるメラミンを投与したラットでは、 $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の大半が Ki67 との共発現を示した一方、遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN の投与群では  $\gamma$ -H2AX 単独陽性細胞がより多く認められた。 $\gamma$ -H2AX 形成と細胞増殖活性の関連を調べることで、膀胱発がん過程における遺伝毒性機序の関与を判別できる可能性がある。

近年、膀胱粘膜の基底層に存在する幹細胞が、傷害時の再生や発がん過程に深く関与することが明らかにされている。膀胱粘膜幹細胞に特徴的に発現する因子 (KRT14, ALDH1A1, CD44 等) も、 $\gamma$ -H2AX を補完する指標として利用できる可能性がある。実際、我々の BBN 誘発ラット膀胱発がんモデルを用いた検討において、 $\gamma$ -H2AX、ALDH1A1 および CD44 陽性細胞率は、BBN 投与終了後の観察期間中にも一貫して対照群よりも有意な高値を維持していた。この結果は、これらのバイオマーカーの発現が化学物質曝露に対する一過性の反応ではなく、膀胱腫瘍の発生過程と密接に関連していることを示唆している。また、膀胱粘膜幹細胞マーカー陽性細胞の一部が、粘膜上にパッチ状に集簇する像が観察されており、膀胱発がん過程において変異細胞がクローン性拡大により粘膜を置換してゆく「Field change」に該当する所見とみなせるかもしれない。

本シンポジウムでは、膀胱発がん性早期検出指標としての  $\gamma$ -H2AX に関するこれまでの検討結果を報告するとともに、膀胱発がん機序解明への応用について議論したい。

## S4-4 画像解析ソフトウェアによる病理所見の定量解析の検討

○洞井 康<sup>1</sup>, 水川 真緒<sup>1</sup>, 仁科 嘉修<sup>1</sup>, 西川 智美<sup>1</sup>, 大野 裕子<sup>1</sup>, 柿本 哲宏<sup>1</sup>,  
田中 雅治<sup>1,2</sup>, 馬場 伸之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 田辺三菱製薬株式会社 創薬本部

<sup>2</sup> 一般財団法人バイオインダストリー協会

【背景・目的】病理組織の評価は一般的には、パソロジストによる各所見のグレーディングや確定診断によるものであった。近年のデジタルパソロジーの普及や IT, AI 技術の発展に伴い、これらを利用した病理組織変化の認識および定量化が可能になってきている。これまで我々は、病理評価の客観性・正確性・効率性の向上を目的に、既存の画像解析ソフトウェアを用いて、様々な病理所見の形態変化の定量化が可能かどうかを検討してきた。最近では、AI を利用した画像解析ソフトを用いることによって、より複雑な形態変化の認識が可能となってきており、本発表ではその一例を紹介する。

【方法】マウス、ラットあるいはヒトの Hematoxylin eosin (HE) 染色標本および Azan 染色標本をデジタルスライドスキャナーAperio で撮影し、画像解析ソフト HALO を用いて、次の所見の定量化を実施した。①腎尿細管好塩基性変化②肝細胞変性/壊死③肝臓における胆管増生④胸腺皮質萎縮⑤肺線維化⑥脾臓マージナルゾーン萎縮、髄外造血減少⑦耳下腺腺房細胞萎縮

【結果・考察】①～⑤では、HALO の random forest classifier module (RF) により、各(病態)部位の形態的特徴を認識させ、その領域の面積を定量化した。定量解析した結果は、パソロジストによる評価とほぼ同等であった。①ラット腎臓の HE 標本を用いて、尿細管の好塩基性部位、硝子様円柱およびその他の部位を認識させて、各領域の面積を算出した。②ラット肝臓の HE 標本を用いて、肝細胞の変性/壊死およびその他の部位を認識させて、各領域の面積を算出した。③ヒト肝臓の HE 標本を用いて、胆管増生、細胞浸潤およびその他の部位を認識させて、各領域の面積を算出した。④ラット胸腺の HE 標本を用いて、皮質、髄質および被膜部位などを認識させて、各領域の面積を算出した。⑤マウス肺の Azan 染色標本を用いて、線維化部位、泡沫マクロファージ、正常な肺胞壁などを認識させて、各領域の面積を算出した。⑥ラット脾臓の HE 標本を用いて、赤脾髄、白脾髄およびマージナルゾーンを RF により認識させて、各領域の面積を算出した。さらに、認識させた赤脾髄領域に限定して、cytonuclear module を用いて、赤芽球と赤血球の核の形態的特徴(色・サイズ)を区別して抽出し、各細胞質領域をシミュレートすることによって、その細胞面積を算出し、髄外造血の程度を定量化した。⑦ラット耳下腺の HE 標本を用いて、腺房細胞およびその他の領域(導管、間質結合組織および被膜)を RF により認識させた。さらに、認識させた腺房細胞領域に限定して、vacuole module を用いて、各腺房細胞の大きさを解析し、サイズごとの総面積を算出した。

この様に、所見に基づく様々な病理組織変化を認識、定量化することが可能になってきており、今後もこの様な技術や評価方法が浸透し、発展していくことを期待する。

### 【参考文献】

- Horai Y, et al (2019) Quantification of histopathological findings using a novel image analysis platform. J Toxicol Pathol. 32(4): 319-327.
- Horai Y, et al (2017) Quantitative analysis of histopathological findings using image processing software. J Toxicol Pathol. 30: 351-358.

# ポスター要旨

# P-1\* 微小管重合阻害薬の心毒性発現機序に関する研究

○柄内 亮太<sup>1,2</sup>, 角 将一<sup>1</sup>, 水流 功春<sup>3</sup>, 桑原 正貴<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (株) ヤクルト本社 中央研究所 安全性研究所

<sup>2</sup> 東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医衛生学教室

<sup>3</sup> プライムテック (株) ライフサイエンス研究室

【背景・目的】微小管重合阻害薬は炎症性疾患や悪性腫瘍の治療薬として応用されているが、心毒性が存在する（参考文献）。特に、微小管上の colchicine バインディングサイトに結合する combretastatin A4 disodiumphosphate (CA4DP) では顕著な心毒性が確認されており、がん化学療法における大きなリスク要因となっている。しかしながら、心毒性の発現機序に関する研究報告はほとんどなく、詳細は不明である。そこで本研究では、CA4DP および colchicine を用いて病態生理学的ならびに病理組織学的に微小管重合阻害薬の心毒性発現機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】①colchicine および CA4DP がヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPS-CM) のインピーダンス、細胞生存性 (WST-8 アッセイ) および ATP 産生に与える影響を評価した。②ラットに CA4DP を投与して心電図、心エコーおよび血圧変化の誘発を試み、その結果からラットを用いた試験のヒトへの外挿性と毒性機序を評価した。③colchicine および CA4DP をラットに投与して病理組織学的解析を行った。さらに、心臓病変が虚血と関連している可能性が示唆されたため、低酸素マーカー (pimonidazole) を用いて組織低酸素領域の検出を試みた。④自律神経機能の変化が心筋障害に関与している可能性についても検討するために、ラットに colchicine および CA4DP を投与し、心拍変動パワースペクトル解析を実施した。

【結果・考察】①colchicine および CA4DP は hiPS-CM のインピーダンスを低下させること、および拍動を亢進させることが明らかとなった。一方、細胞生存性および ATP 産生には変化が認められなかった。これらのことから、微小管重合阻害薬によって誘発される心筋細胞の細胞死は、心筋細胞に対する直接的な細胞毒性が原因ではなく、虚血あるいは自律神経系の異常などに起因した二次的な作用によって誘発されることが示唆された。②CA4DP 投与ラットの心電図において、T 波の電位の低下、ST segment の明瞭化、および QT 間隔の延長といった ST-T 部分の異常が認められた。心エコー検査では心拍数、左室駆出分画および心拍出量の低下が認められた。これらの変化はヒトにおける所見と共通しており、ラットの試験成績はヒトへの外挿性を有すると考えられた。また、CA4DP 投与後に拡張期血圧の上昇が認められ、末梢血管に異常が生じたと考えられた。③colchicine 投与ラットの心臓において、心室中隔および左心室壁内層に好発する心筋細胞の空胞化および多巢性の壊死が認められた。電子顕微鏡検査学的検査では心筋細胞におけるミトコンドリアの腫大が認められ、微小管重合阻害薬が骨格筋に誘発する二次ライソゾームの蓄積からなる空胞化とは異なる病態であることが明らかとなった。また、心筋細胞の変性・壊死領域と一致して pimonidazole が検出された。さらに、心臓の血管内皮細胞においてアポトーシスが認められた。CA4DP 投与ラットの心臓においても colchicine 投与ラットと共通した心筋細胞の変性・壊死ならびに血管内皮細胞のアポトーシスが認められた。④colchicine および CA4DP の投与によって副交感神経系の活動が亢進した個体が認められたが、心筋傷害に直接的に繋がるような交感神経系の明らかな活動亢進は検出されなかった。

【結論】微小管重合阻害薬によって誘発される心筋障害は、冠循環の低下および毛細血管内皮細胞の障害による微小循環の低下に起因した虚血が原因となって生じるものと考えられた。

【参考文献】 Subbiah IM, et al. Cardiovascular toxicity profile of vascular-disrupting agents. *Oncologist*. 16: 1120-1130. 2011.

# P-2\* Internet of Things in Toxicology (IoTT)の実現を目指した ウェアラブルバイタルサイン計測機器の開発 ～覚醒下非拘束ラットの心拍・血中酸素濃度・呼吸数計測～

○大久保 佑亮<sup>1</sup>, 嘉本 海大<sup>2</sup>, 高橋 祐次<sup>1</sup>, 北嶋 聡<sup>1</sup>, 太田 裕貴<sup>3</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 毒性部

<sup>2</sup>横浜国立大学 大学院理工学府

<sup>3</sup>横浜国立大学 大学院工学研究院



## 【背景】

現行の毒性試験は、人的・経済的な制約から化学物質投与後の一般状態観察を試験実施者の経験を基にした定性・定量的な評価に頼っている。そのため、夜間を含む投与後の連続した毒性情報は取得が困難である。また、膨大な毒性情報が積み重ねられてきているにもかかわらず定性データ故にデータサイエンスとの親和性は低く、データの有効な利用が難しい。加えて、実務的な面からは、実施者の習熟に時間を要するなど多くの課題が存在する。一方で、医師による人の診断では、手術を必要としないウェアラブル医療機器を開発・導入することで客観的な定量データを基に診断の妥当性を向上させており、経験の浅い医師においても熟練の医師に準じた診断が可能となりつつある。また、Internet of Things (IoT)技術の発達によりWi-FiやBluetoothを備えた医療機器が開発され、ネットワークを介して得られたビックデータを解析することで新しい治療方法や医学的知見を得る“Internet of Medical Things (IoMT)”の概念も浸透しつつある。

我々はラットに代表される小型哺乳類を用いた毒性試験においても、ヒトのような医療機器を導入し客観的な定量データの取得が可能となれば、供与動物数や経費の削減のみならず、これまで親和性が低かった毒性試験情報とデータサイエンスを繋ぐ新たな毒性分野“Internet of Things in Toxicology (IoTT)”の創出が可能であると考えている。しかしながら、小型哺乳類はヒトに比べ非常に小さいため機器の開発が困難であること、覚醒下非拘束では体動の制御が不可能であるためにデータの信頼性に課題があることなどから、これまではウェアラブルバイタルサイン計測機器の毒性試験への適用は現実的ではなかった。近年、バッテリーの進歩や柔軟デバイス材料の開発、電子機器の小型化、スマートフォンの普及など科学技術や社会インフラが飛躍的に発達しており、これら課題の解決策が見えてきた。

## 【目的】

本研究では、バイタルサインの構成要素である心拍・血中酸素濃度(SpO<sub>2</sub>)・呼吸数を覚醒下非拘束ラットから計測可能な機器を開発する。また、機器に小型バッテリーやBluetoothモジュールを実装することで、ネットワークを介して化学物質投与による連続・定量化された毒性情報を集約し、IoTTの基盤創出を目指す。

## 【結果・考察】

本研究ではSD雌ラットを用い実験を行った。まず、既存のヒト用パルスオキシメータを小型化し麻酔下のラットからの脈波取得を試みたが、うまくいかなかった。LEDの光度や受光シグナルの増幅率、LEDと受光機の距離・数、取得部位、サンプリングレート、ノイズの除去などラット用に多くの検討を行い、麻酔下ラットから心拍・SpO<sub>2</sub>・呼吸数を取得できる有線機器の開発に成功した。さらに、機器の小型化・Bluetoothによる無線化にも成功した。また、ラットの体動による機器のずれを防ぐために、全身をホルマリン固定したSDラットを3Dスキャンし、3Dプリンタで樹脂製のラット模型を作製し、それを基にラット用のジャケットを作製した。最後に、開発した無線化機器の位置を麻酔下において定めジャケットで保定した後に覚醒させ、心拍・SpO<sub>2</sub>・呼吸数の取得を試みた。その結果、複数のラット・無線化機器において、安定的に覚醒下非拘束ラットの心拍・SpO<sub>2</sub>・呼吸数を連続して取得できた。また、最長79分の連続取得に成功した。これらの結果は、IoTT分野の創出が可能であることを示唆しており、今後は心電など他のバイタルサイン計測機器の開発を進めると共に、複数のラットからデータを同時取得可能な機器及び解析ソフトの開発を進める。

## P-3\* 肝細胞肥大を誘発する薬物の核内受容体活性化能の解析

○大橋真帆、志津怜太、保坂卓臣、佐々木崇光、吉成浩一

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 衛生分子毒性学講座

### 【背景・目的】

肝細胞肥大は化学物質の曝露による肝臓への影響として最も一般的に認められる変化の1つである。その発現には薬物代謝酵素誘導が関与すると言われているが、分子レベルでの発現機序は不明である。また、肝細胞肥大が化学物質の有害影響であるか否かも明確にはなっておらず、この判断は化学物質の曝露基準の設定にも影響を与えうる。これらのことから、化学物質の安全性評価において肝細胞肥大の毒性学的特徴の解明が必要とされている。肝細胞肥大を引き起こす化学物質は多種多様であり、限られた実験で上記課題を解決することは困難である。そこで、本研究では、多くの化学物質の毒性試験結果が公開されていることに着目し、農薬のラット反復投与毒性試験において小葉中心性肝細胞肥大を誘発する化合物を選択し、これら被験物質について、薬物代謝酵素誘導に関わる核内受容体 AHR、PPAR $\alpha$ 、PXR および CAR の活性化作用を評価し、肝細胞肥大と核内受容体活性化作用との関連性を解析した。

### 【方法】

内閣府食品安全委員会で公開されている農薬(349 種)のラット 90 日間反復投与毒性試験並びにラット 2 年間慢性毒性試験及び発がん性試験結果を取得し、小葉中心性肝細胞肥大が認められた農薬 63 種類を被験物質として選定した。ラット PPAR $\alpha$ 、ラット PXR の活性化は、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた哺乳動物ワンハイブリッドアッセイにより評価した。また、ラット AHR の活性化は、ラット肝がん由来 H4IIE 細胞を用い、AHR の DNA 結合領域用いたレポーターアッセイにより評価を行なった。被験物質の濃度はいずれも 10  $\mu$ M とした。得られたデータを用いて、関連性の高い所見 7 種(血中 ALT 増加、血小板数増加、血中アルブミン増加、血糖減少、血中総コレステロール増加、血中 TG 増加、血中リン脂質増加)と各核内受容体の活性相関を調べた。

### 【結果・考察】

被験物質として選定した農薬 63 種類のうち、2 種が PPAR $\alpha$  活性化作用を、23 種が PXR 活性化作用を、9 種が AHR 活性化作用を示した。そのうち、AHR、PPAR $\alpha$  および PXR の全てを活性化したものが 1 種、AHR と PXR を活性化したものは 5 種、AHR 活性化作用のみを示したものが 3 種、PXR 活性化作用のみを示したものが 17 種となった。以上の結果より、農薬によるラット小葉中心性肝細胞肥大の発現には、PPAR $\alpha$  活性化の寄与は極めて小さいことが示唆された。細胞毒性が発現した農薬を除外した農薬 60 種のうち、12 種は 2 年間ラット慢性毒性試験及び発がん性試験において肝発がんを誘発したが、このうち 2 種は AHR および PXR 活性化作用を示し、4 種は PXR 活性化作用のみを示した。他にも、血中アルブミンレベル上昇を誘発した農薬 22 種のうち 7 種が PXR 活性化作用を示した。また、血中総コレステロールレベル上昇を誘発した農薬 49 種のうち、19 種は PXR 活性化作用を、4 種は AHR 活性化作用を示し、そのうち 2 種は AHR および PXR を、1 種は AHR、PPAR $\alpha$  および PXR の全てを活性化した。これらの結果より、ラット PXR 活性化と血中アルブミンレベル上昇および血中総コレステロールレベル上昇との関連性が示唆された。現在、ラット CAR 活性化作用の評価を進めている。今後、これら 4 種の核内受容体活性化と肝細胞肥大以外の肝毒性所見との関連性を解析することで、様々な肝毒性を引き起こす農薬の特徴や、その分子機序の解明が期待される。

## P-4 アンドロゲン受容体によるヒト肝薬物動態支配因子遺伝子発現への影響

○菅野 裕一郎<sup>1</sup>, 齋藤 菜緒<sup>1</sup>, 出川 雅邦<sup>1,2</sup>, 根本 清光<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室

<sup>2</sup>静岡県立大学 薬学部

### 【背景・目的】

外来性化合物（医薬品や環境化学物質など）に対する感受性（薬効・毒性発現）には、しばしばヒト個人差、動物種差、性差などが発現する。これらの差の要因として、外来性化合物の体内動態（吸収・分布・代謝・排泄）を支配する薬物代謝酵素やトランスポーターの質的・量的相違が考えられる。ヒトに対する外来性化合物の薬効や安全性評価を推定するのに有用であるとされるブタを用いた研究により、肝臓での種々薬物代謝酵素分子種の遺伝子発現量の種差、性差の要因として血中テストステロン量の差が挙げられている<sup>1)</sup>。しかし、ヒトにおける薬物代謝酵素遺伝子発現に対する性ホルモンの影響は不明確である。本研究では、種々薬物代謝酵素の肝臓での発現調節にアンドロゲン受容体（AR）が関与しているかを、AR を安定発現するヒト肝がん由来細胞を樹立し評価することとした。

### 【方法】

AR の発現の認められないヒト肝がん由来 HepG2 細胞に、染色体に組み込まれないエピソーマル発現ベクターを用いて安定的に AR を発現する細胞株（HepAR 細胞）を樹立した。HepAR 細胞をテストステロン存在下あるいは非存在下で、活性炭処理 5% FBS 含有 DMEM 培地にて培養後、total RNA を抽出し、各種薬物代謝酵素遺伝子（CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, SULT1A1, SULT1E1, UGT1A1 など） mRNA 発現量を RT-qPCR 法により定量した。

### 【結果・考察】

まず、HepAR 細胞を樹立後、その細胞株における AR の発現をウエスタンブロット法で確認した。テストステロン処理の HepAR 細胞における薬物代謝酵素発現への影響を評価するため、テストステロン存在下（1~1000 nM）で5日間培養した後、各種薬物代謝酵素の mRNA 発現量を測定した。その結果、いくつかの薬物代謝酵素の発現に変動が認められた。現在、薬物代謝酵素の発現を調節する転写因子の発現などについても検討中である。

### 【参考文献】

1) Kojima M. *et al.*, *Drug Metab Pharmacokinet*, 31, 185-192 (2016)

# P-5\* 核内受容体 CAR による薬物代謝酵素誘導に対する HDAC 阻害剤の影響

○島田 朋佳, 齋藤 菜緒, 伊藤 美友, 小泉 佳穂, 菅野 裕一郎, 根本 清光

東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室

## 【背景・目的】

核内受容体 constitutive active/androstane receptor (CAR) は、CYP2B6、CYP3A4 などの異物/薬物代謝酵素の転写活性化に関わる受容体型転写因子である。生体外異物により活性化した CAR は標的遺伝子エンハンサー上に存在する応答配列に結合し、様々な転写共役因子を呼び込むことで転写を促進する。転写共役因子群にはヒストンのアセチル化、メチル化に関与するヒストン修飾酵素が含まれており、これら酵素による周辺のヒストンの修飾が転写調節に重要であると考えられている。現在我々は、CAR を介した薬物代謝酵素の誘導メカニズムを理解するために、CAR と転写共役因子の相互作用に着目しており CAR の転写活性化に関わる転写共役因子を同定してきた。しかし、CAR による標的遺伝子発現調節におけるヒストン修飾酵素の役割は明らかとなっていない。

そこで、本研究では tetracycline (tet) 誘導性 CAR 発現調節 HepG2 細胞株 (HepTR/hCAR) における CAR 標的遺伝子の発現誘導に対するヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) の関与を検討することにした。

## 【方法】

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞及び tet 誘導性 CAR 発現調節 HepG2 細胞株 (HepTR/hCAR) を用いて検討した。HepTR/hCAR 細胞を 24 well プレートに播種し、翌日、tet 及び CAR のインバーサアゴニストである CINPA1 (1  $\mu$ M) を添加した。48 時間後、選択的 HDAC アイソフォーム阻害剤を添加し前処理を行い、1 時間後に CAR アゴニストである CITCO (1  $\mu$ M) をさらに添加した。6 時間後に total RNA を回収し、CAR の標的遺伝子である CYP2B6、CYP3A4、UGT1A1 の mRNA 発現量を RT-qPCR 法により定量した。また、HDAC10 においては HDAC10 特異的 siRNA によるノックダウンにより評価を行った。

## 【結果・考察】

はじめに、CAR による標的遺伝子転写活性化に対するヒストン脱アセチル化酵素の影響を明らかにするために、様々な選択的 HDAC 阻害剤 (Trichostatin A (TSA)、MI-192、MS-275、TMP269、Tubastatin A) を用いて検討した。その結果、HepTR/hCAR 細胞は CITCO 処理により標的遺伝子である CYP2B6、CYP3A4 mRNA 発現の誘導が認められたが、TSA の前処理により CAR による CYP3A4 mRNA の発現誘導が抑制された。しかしながら、CYP2B6 mRNA 発現誘導には影響がみられなかった。また、他の選択的 HDAC 阻害剤では CAR による標的遺伝子発現誘導に対する影響がみられなかったことから、選択的な阻害剤のない HDAC10 が関与している可能性が考えられた。そこで、siRNA を用いたノックダウン法により CAR による標的遺伝子転写活性化に対する HDAC10 の影響を検討することにした。その結果、HDAC10 のノックダウンにより CAR による CYP3A4 mRNA 発現誘導の抑制が認められた。一方で、CYP2B6 mRNA 発現誘導には影響が認められなかった。以上のことより、HDAC10 は CAR による CYP3A4 の誘導に関与しており、CAR を介した転写活性化に対して遺伝子特異的に影響していると考えられる。

## 【参考文献】

- Kanno Y. *et al.*, *Mol Pharmacol*, 95, 120-126 (2019)
- Kanno Y. *et al.*, *Drug Metab Dispos*, 46, 46-52 (2018)
- Kanno Y. *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 459, 143-147 (2015)

## P-6\* 核内受容体 CAR による薬物代謝酵素誘導に対する BET ブロモドメイン阻害剤の影響

○伊藤 美友, 齋藤 菜緒, 島田 朋佳, 小泉 佳穂, 菅野 裕一郎, 根本 清光

東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室

### 【背景・目的】

BET (bromodomain and extra-terminal) ドメインタンパク質ファミリーは、アセチル化修飾を受けたヒストンが特異的に結合するブロモドメインを持つタンパク質ファミリーであり、転写の開始から完了までの様々なステップにおいて多角的に機能していることが明らかとなってきた。近年 BET ドメインタンパク質ファミリーは、抗がん剤あるいはさまざまな治療薬の標的として注目されている。中でも BET 阻害剤である JQ-1 は、がんエピゲノムを標的とした新規抗がん剤として非常に期待されている。しかしながら、このようなエピゲノム調節を標的とした医薬品は、遺伝子発現調節を介した毒性発現にかかわる可能性が考えられるが、ほとんど評価されていない。

核内受容体 constitutive active/androstane receptor (CAR) は薬物代謝酵素の発現誘導に関与する。したがって、CAR による標的遺伝子の転写活性化は薬物相互作用を考える上で非常に重要である。そこで本研究では、エピゲノム調節を標的とした医薬品による薬物相互作用の可能性を検証するため、CAR の転写活性化に対する BET 阻害剤の影響を評価した。

### 【方法】

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞および tetracycline (tet) 誘導性 CAR 発現 HepG2 細胞株 (HepTR/hCAR) を用いた。HepTR/hCAR 細胞を 24 well プレートに播種し、翌日、tet 及び CAR のインバーサアゴニストである CINPA1 (1  $\mu$ M) を添加した。48 時間後、BET 阻害剤を添加し、その 1 時間後に CAR アゴニストである CITCO (1  $\mu$ M) をさらに添加した。6 時間後に total RNA を回収し、CAR の標的遺伝子である CYP2B6、CYP3A4、UGT1A1 の mRNA 発現量を RT-qPCR 法により定量した。

### 【結果・考察】

はじめに CAR による薬物代謝酵素誘導に対する BET 阻害剤の影響を明らかとするために、BET 阻害剤の 1 つである JQ-1 を用いて検討を行った。その結果、JQ-1 は CAR による CYP2B6、CYP3A4、UGT1A1 の mRNA 発現誘導を抑制した。さらに、同じく BET 阻害剤である PFI-1 を用いて評価したところ、JQ-1 と同様に CYP2B6、CYP3A4、UGT1A1 の mRNA 発現誘導を抑制した。以上のことから、BET 阻害剤は CAR を介した薬物代謝酵素発現誘導を抑制することが明らかとなった。

## P-7\* 培養細胞株での核内受容体 CAR の自発的核移行機構の解明 —スプライシングバリエーション産物を用いた検討—

○小泉 佳穂, 齋藤 菜緒, 島田 朋佳, 伊藤 美友, 菅野 裕一郎, 根本 清光

東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室

### 【背景・目的】

生体内には、生体外異物を認識し、異物/薬物代謝酵素などを誘導することで、生体外異物の排泄を促進する防御機構がある。この1つとして、核内受容体 constitutive active/androstane receptor (CAR) による異物応答が知られている。CAR はホモダイマーを形成し細胞質に存在しているが、アクチベーターによる活性化あるいはリガンドの結合によって CAR は核内に移行する。核内で CAR は retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子プロモーター上に存在する応答配列 (DR4 モチーフ) に結合することで転写を促進する。したがって CAR の細胞質から核への移行は、CAR による異物代謝酵素誘導において重要であると考えられる。しかしながら、継代培養細胞株を用いて CAR の細胞質から核への移行を観察すると、継代培養細胞株に発現させた CAR は細胞質に局在化することができず、自発的に核内へ移行してしまう。CAR 遺伝子からは選択的スプライシングによりいくつかのスプライシングバリエーション (SV) が生成されることが報告されている。なかでも Exon 7 と Exon 8 の間にインフレームの 15bp 挿入を含む SV2 は、CAR (WT, SV0) とほとんど同じ量生成される。興味深いことに CAR の SV 産物である SV2 は、SV0 と異なり継代培養株において核移行が認められないことから、その原因の追究が CAR の自発的核移行機構の解明の糸口となると考えている。これまでに、CAR の核内移行に核内輸送タンパク質 importin 13 (IPO13) が関与することを報告している。そこで、CAR の細胞内局在調節機構を明らかとするため、SV2 の IPO13 との結合および SV2 と CAR SV0 とのヘテロダイマー化について、本研究で検討することにした。

### 【方法】

HEK293 細胞及び HepG2 細胞に、それぞれ N 末端にタグをつけた CAR SV0、IPO13、CAR SV2 発現プラスミドをトランスフェクションした。48 時間後、細胞を細胞溶解液により溶解し、遠心後上清を回収した。タンパク質相互作用は、免疫共沈降法により評価した。

### 【結果・考察】

培養細胞において CAR SV2 が自発的な核移行を示さない要因の一つとして、核輸送タンパク質との相互作用が関与しているかどうかを確認するために、CAR SV0 または SV2 と IPO13 の相互作用について免疫共沈降法により検討した結果、CAR SV0 と同様に SV2 も IPO13 と相互作用することが確認できた。次に、CAR の細胞質局在にはホモダイマー化が関与していることが示唆されていることから、SV2/SV2 のホモダイマー化および SV2/SV0 のヘテロダイマー化を評価したが、それらの形成が確認された。

以上の結果より、継代培養細胞株における CAR SV2 の自発的核移行能の欠落は、核輸送タンパク質 IPO13 との相互作用の変化や二量化の変化によるものではないことが明らかとなった。

# P-8\* ラットにおける胆汁うっ滞性肝障害のバイオマーカーとしての miR-218a-5p の有用性及びその機能解析

○平吹 有香, 織田 進吾, 武内 太輝, 香川 匠, 横井 毅

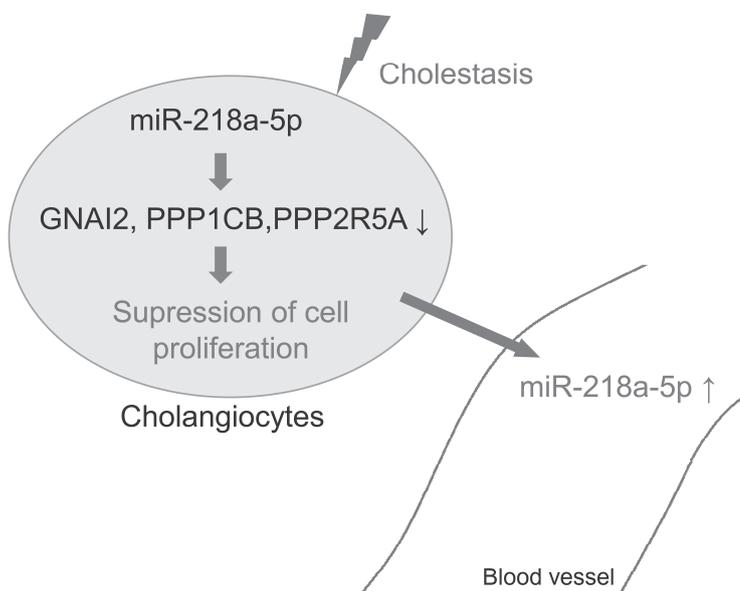
名古屋大学大学院 医学系研究科 トキシコゲノミクス研究室

【背景・目的】近年 microRNA (miRNA) は薬剤性肝障害のバイオマーカー候補として注目されている。我々は以前 rno-miR-143-3p および rno-miR-218a-5p が重度な胆汁うっ滞性障害を呈するラット血漿中で早期段階より増加することを報告したが<sup>1)</sup>、これらの miRNA が障害の重症度に依存して増加するか明らかにされていない。本研究では、これら miRNA が胆汁うっ滞性障害特異的に障害重度依存的な増加を示すか検討するとともに、胆汁うっ滞特異的 miRNA の病態生理学的な役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】重症度の異なる障害モデルラットの作製には SD ラット (雄性、6 週齢) を用いた。胆汁うっ滞性障害モデルには 4, 4'-メチレンジアニリン (250, 125, 62.5 mg/kg) および  $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート (150, 75, 37.5 mg/kg)、肝細胞障害モデルにはアセトアミノフェン (1500, 1000, 500 mg/kg) およびチオアセトアミド (180, 90, 45 mg/kg) をそれぞれ経口投与した。経時的に血液を採取し、剖検時に肝組織を採取した。血漿および肝組織から RNA を抽出し、qPCR により miRNA 発現量を測定した。ヒト不死化胆管由来細胞株 MMNK-1 細胞に miR-218-5p を過剰発現させ、細胞生存率を測定した。さらに miR-218-5p の標的遺伝子を *in silico* 解析により予測し、miR-218-5p の発現過剰時の標的遺伝子の mRNA 発現量を測定した。

【結果・考察】胆汁うっ滞性障害モデルラットにおいて、血漿 ALT, T-Bil, GGT 値は 48 時間後に有意に増加した。組織学的所見では、胆管上皮の変性・破壊およびリンパ球浸潤等の胆管損傷がみられ、薬物投与量に依存した障害の増悪が認められた。ラット血漿中 rno-miR-143-3p および rno-miR-218a-5p は胆汁うっ滞障害特異的かつ投与量依存的に増加した。hsa-miR-218-5p の過剰発現により MMNK-1 細胞の細胞生存率が低下し、標的として予測された GNAI2, PPP1CB, PPP2R5A mRNA 発現量は、hsa-miR-218-5p 発現上昇によって有意に低下した。これらは細胞増殖の促進に関与する遺伝子であることから、miR-218a-5p は胆管細胞において細胞増殖関連遺伝子の発現を抑制することが示唆された。以上、miR-218a-5p は胆管細胞死を誘導することで胆汁うっ滞性肝障害に寄与し、障害を受けた胆管細胞から重篤度依存的に血漿に逸脱することを明らかにした。

【参考文献】<sup>1)</sup> Kagawa et al., *Toxicol Sci*, 166:228-239, 2018



# P-9\* 雄性 hL-FABP Tg マウスを用いた食餌誘発性 NASH 様病態と背景メカニズムの解析

○龍 完次朗<sup>1</sup>、美谷島 克宏<sup>1 2 3</sup>、山口 彩音<sup>1</sup>、日高 佳穂<sup>3</sup>、岩本 健志郎<sup>3</sup>、佐野 孝太<sup>3</sup>、大畑敬一<sup>4</sup>、宇野 絹子<sup>2</sup>、煙山 紀子<sup>1 3</sup>、小川 秀治<sup>2</sup>、渡邊 厚<sup>2</sup>、中江 大<sup>1 2 3</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学大学院 農学研究科 食品安全健康学専攻、

<sup>2</sup>東京農業大学大学院 農学研究科 食品栄養学専攻、

<sup>3</sup>東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科

<sup>4</sup>シミックホールディングス (株) L-FABP 事業部

【目的】血液中の肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP) は、ヒト薬剤性肝障害や NAFLD/NASH の疾患マーカーとなり得ること、また、ヒト肝疾患患者において、早期の慢性肝炎から肝細胞癌まで一貫して予後を評価できるバイオマーカーであることが報告されている。しかし、それらの疾患に対する L-FABP の機能は明らかにされていない。本研究では、雄性のヒト L-FABP 遺伝子導入マウス (hL-FABP Tg マウス) を用いて、食餌誘発性 NASH 様病態進行における L-FABP の影響を観察した。

【材料及び方法】7 週齢雄性 hL-FABP Tg マウスおよび対照の野生型 C57BL/6 マウスに、基礎飼料 (CE-2) とコリン欠乏メチオニン低減高脂肪アミノ酸食 (CDAA-HF) を自由摂取させた。給餌期間は 2、13 及び 26 週間とし、各期間終了時に採血及び肝臓を採取し、血液生化学的検査と病理組織学的解析及び遺伝子発現解析を実施した。

【結果】血清中 hL-FABP 値は、CDAA-HF 給餌 Tg マウスにおいて、2 週間給餌から増加した。また、血清中内在性マウス L-FABP (mL-FABP) 値も、CDAA-HF 給餌の Tg 及び野生型マウスにおいて、2 週間給餌から増加した。血清中 AST 及び ALT 活性は、CDAA-HF 給餌の Tg 及び野生型マウスにおいて、2 週間給餌から上昇したが、この変化は Tg マウスの方が弱かった。病理組織学的解析により、CDAA-HF 給餌の Tg 及び野生型マウスにおいて、2 週間給餌から顕著な脂肪化、軽度の肝細胞肥大、炎症、線維化が観察され、13 及び 26 週間給餌ではその程度が増悪した。さらに、CDAA-HF を 26 週間給餌した Tg マウスの 5 例中 1 例では再生性過形成が観察され、同個体の血清中 hL-FABP は明らかな高値を示した。hL-FABP 免疫組織化学染色では、CE-2 または CDAA-HF を給餌した Tg マウスにおいて、2 週間給餌から hL-FABP の陽性像が観察された。この変化は、CDAA-HF 給餌マウスの方が弱く、また、他のいずれの給餌期間においても同様の傾向を示した。遺伝子発現解析では、CDAA-HF を給餌した Tg 及び対照マウスにおいて、線維化関連遺伝子である *collagen type 1a*、*TGF-β* と、酸化ストレス関連遺伝子である *p67phox* の発現上昇が確認された。この変化は、CDAA-HF 2 週間給餌マウスにおいて、Tg マウスの方が弱かった。

【結論】以上の結果から、hL-FABP Tg マウスにおいて、L-FABP は食餌性 NASH 様病態進行に対して抑制的に機能することが示唆された。このことは、NASH 病態進行の把握や治療法の基礎的検討につながる情報である。

# P-10\* トログリタゾンによる胆汁酸依存性肝細胞死におけるミトコンドリア障害の関与

○竹村 晃典<sup>1,2</sup>, 七尾 佳樹<sup>1</sup>, 中島 峻汰<sup>1</sup>, 伊藤 晃成<sup>1</sup>

<sup>1</sup>千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室

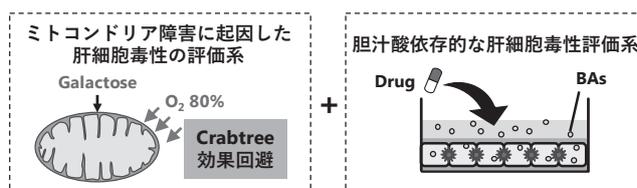
<sup>2</sup>千葉大学大学院 薬学研究院 国際創薬学研究室

## 【背景・目的】

薬物性肝障害 (DILI) は医薬品の市場撤退の主たる要因となる有害事象である。DILI 発症には様々な機序が報告されているが、特にミトコンドリアの障害と BSEP 阻害の両方を示す薬物は DILI リスクが高いことが知られている<sup>a)</sup>。薬物の BSEP 阻害により蓄積した胆汁酸による毒性機序の1つにミトコンドリア障害がある。しかし、通常培養条件では Crabtree 効果によりこの毒性を過小評価している可能性がある。そこで本研究ではミトコンドリア障害を加味した胆汁酸依存毒性評価系の構築を目的とし、BSEP 阻害とミトコンドリア障害を有するトログリタゾンを用いて Crabtree 効果回避が胆汁酸依存毒性の感受性に与える影響について評価した。

## 【方法・結果】

当研究室において構築した、i) Crabtree 効果回避条件によるミトコンドリア障害に起因した肝細胞毒性評価系<sup>b)</sup>、ii) 胆汁酸併用条件における胆汁酸依存的な肝細胞毒性評価系<sup>c)</sup>を組み合わせ評価した (図1)。具体的には、通常条件及び Crabtree 効果回避条件にて培養したラット・マウス肝細胞にヒト血清中の主要胆汁酸組成を基に調整した 12 種の胆汁酸混合物と薬物を共曝露し、24 時間後の細胞毒性を培養液中に漏出した LDH にて評価した。



## 【結果・考察】

### 1. ラット初代肝細胞における細胞毒性評価

通常条件においてトログリタゾンと胆汁酸共曝露で毒性を示し、Crabtree 効果回避条件ではその毒性が通常条件に比べて増強することを確認した。

### 2. Cyclophilin D (CypD) KO マウスを用いた細胞毒性評価

トログリタゾンおよび一部の胆汁酸はミトコンドリア膜透過性遷移 (mMPT) を介したミトコンドリア障害を引き起こすことが知られている。そこでラット肝細胞を用いて見られた毒性感受性の増強が mMPT を介しているか調べるために、mMPT の調節因子である CypD KO マウスから単離した肝細胞を用いて同様の検討を行った。その結果、トログリタゾンと胆汁酸を共曝露した際に見られた毒性感受性の増強が、CypD KO マウス由来の肝細胞において抑制することを確認した。

## 【結論】

Crabtree 効果回避条件を胆汁酸依存毒性試験に組み込むことで、トログリタゾンによる胆汁酸依存毒性が増強し、その増強分に mMPT が関与することを明らかとした。

## 【参考文献】

- Aleo MD. et al., *Hepatology*, 60 (3), 1015-22 (2014)
- Liu C. et al., *Toxicol Appl Pharmacol*, 302:23-30, (2016)
- Ogimura E. et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 416 (3-4):313-7, (2011)

## P-11\* フルクロキサシリンによる血中胆汁酸組成変化に着目した 抗菌薬の肝障害リスクに関する検討

○早崎 洸太郎, 宋 彬彬, 竹村 晃典, 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】抗菌薬は他の薬物に比べ肝障害リスクが高いことが医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の副作用報告などから示唆されているが、その理由は未だ明らかになっていない。抗菌薬は胆汁酸の代謝を行う腸内細菌叢に影響し、胆汁酸組成を変化させ得ることが知られている。また、特定の胆汁酸が肝細胞特異的に好中球遊走ケモカインである Cxcl2 を誘導し、免疫細胞による肝障害を惹起することも示唆されている (S Cai et al., JCI Insight, 2017)。そこで我々は、抗菌薬と、抗菌薬による胆汁酸組成変化の組み合わせが免疫細胞の活性化を介した抗菌薬の肝障害リスクになり得るとの仮説を立て、フルクロキサシリン (FLUX) をモデル薬物に用いてマウスでの検証を行った。また、ここで見られた肝障害発症メカニズムの詳細についても解明を試みた。

【方法】① マウス (C57BL6/J 雌 9 週齢) に vehicle あるいは FLUX (2 mg/mouse/day) を経口投与し、5 日目の血漿中胆汁酸組成を調べた。② マウスから肝細胞を単離し、タウロコール酸 (TCA) またはコール酸 (CA) と FLUX を、単独あるいは併用により 12 時間曝露した。Cxcl2 mRNA 発現量を RT-qPCR を用いて定量した。③ 胆汁酸と FLUX による肝障害を評価するために、マウスを 4 群 [ i) vehicle, ii) 0.5 % CA in diet, iii) FLUX, iv) CA + FLUX ] に分け、7 日間投与した。最終日に血液を採取し、血漿 ALT 値と血漿中胆汁酸を測定した。また、肝臓を採取し、mRNA 発現量、ならびに好中球浸潤を評価した。④ Cyclophilin D (CypD) KO マウスから肝細胞を単離し、TCA と FLUX を 12 時間曝露後、Cxcl2 mRNA 発現量を定量した。

【結果】① vehicle 群では主要な胆汁酸が CA であったのに対し、FLUX 群では TCA が主要な胆汁酸であった。② TCA 群、CA 群、FLUX 群において Cxcl2 発現増加は認められなかった一方で、TCA+FLUX 併用群で有意な増加が認められた。また、CA+FLUX 併用群では有意な増加は認められなかった。③ 0.5 % CA 群、FLUX 群では血中 ALT 値の上昇は認められなかった一方で、0.5 % CA+FLUX 併用群では顕著な ALT 上昇と好中球浸潤が認められた。また、0.5 % CA 群での主要な血漿中胆汁酸は CA であったのに対し、0.5 % CA+FLUX 併用群では TCA であった。④ CypD KO マウスの肝細胞では、TCA+FLUX 併用群で見られた Cxcl2 の増加がキャンセルされた。

【考察】FLUX は TCA とともに肝細胞へ作用することで Cxcl2 を相乗的に誘導することが示された。CA と FLUX の併用時にはこのような相乗効果は認められず、FLUX の投与により主要胆汁酸が TCA に変化することが Cxcl2 の誘導に重要と考えられた。実際に CA を混餌投与して胆汁酸プールを増加させた条件においては FLUX 投与により好中球浸潤を伴う肝障害が再現された。また、ミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) の正の制御因子である CypD をノックアウトした CypD KO マウスの肝細胞で、FLUX と TCA による Cxcl2 の誘導がキャンセルされたことから、Cxcl2 の誘導に MPT の関与が示唆された。MPT に伴いミトコンドリア DNA が細胞質に漏出すること、ミトコンドリア DNA が TLR9 のリガンドとなることが過去に報告されていることから、今回観察された現象においても MPT に続く TLR9 の活性化が Cxcl2 誘導に関与する可能性が考えられた。

【結論】抗菌薬と、抗菌薬による胆汁酸組成変化の組み合わせが MPT を介したケモカイン誘導、免疫細胞の活性化を経て肝障害を誘発する可能性が示された。

## P-12\* ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 における芳香族炭化水素受容体 (AhR) ノックアウト細胞株の樹立と応用

○山下 直哉<sup>1,2</sup>, 菅野 裕一郎<sup>2</sup>, 眞田 法子<sup>1</sup>, 根本 清光<sup>2</sup>, 木津 良一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>同志社女子大学 薬学部 衛生化学研究室

<sup>2</sup>東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室

【背景・目的】芳香族炭化水素受容体 (AhR) は、ダイオキシン類や多環芳香族炭化水素等の環境毒性化学物質をリガンドとする受容体型転写因子である。一般的に、AhR は、リガンドを認識すると細胞質から核内に移行し、DNA 上に存在する AhR の応答配列に結合することで薬物・異物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) 1A1 や CYP1A2 を誘導する。タバコに含まれる多環芳香族炭化水素類によって活性化された AhR が CYP1A2 等を誘導することから、喫煙者と非喫煙者とは、薬物の体内動態が変化していることがこれまでに知られている。以上のことから、AhR は薬物の代謝を考える上で非常に重要な因子である。しかしながら、AhR の活性化による薬物代謝酵素の発現制御については、未だ不明な点が数多く残されている。

本研究では、AhR による薬物代謝への影響を明らかにする一環として、最初に、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 における AhR 遺伝子破壊細胞株 (AhR KO) を樹立した。さらに、野生型 (WT) および AhR KO 細胞に AhR のリガンドを処理し、主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 および CYP3A5 の遺伝子発現量を評価した。

【方法】CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集により、AhR KO 細胞を樹立した。mRNA、タンパク質発現量はそれぞれリアルタイム PCR、ウエスタンブロット法により評価した。

【結果・考察】初めに、AhR KO 細胞では、AhR のタンパク質発現が認められないことウエスタンブロット法により確認した。さらに、AhR のリガンドである 3-methylcholanthrene (3MC) 処理における CYP1A1 mRNA の発現誘導が認められないことも併せて確認した。次に、WT および AhR KO 細胞に 3MC、indirubin をそれぞれ 24 時間処理し、CYP1A1、CYP3A4 および CYP3A5 の mRNA 発現量を評価した。その結果、WT 細胞において、CYP1A1 mRNA の発現誘導は 3MC および indirubin 処理群で認められ、CYP3A4 および CYP3A5 mRNA の発現誘導は 3MC 処理群のみで認められた。一方で、AhR KO 細胞では、CYP1A1、CYP3A4 および CYP3A5 mRNA 発現の誘導が 3MC および indirubin 処理群のどちらにおいても認められなかった。

以上のことから、3MC は AhR 依存的に CYP3A4 および CYP3A5 mRNA の発現を誘導することが示唆された。また、indirubin 処理において、CYP3A4 および CYP3A5 の発現誘導が認められなかったことから、AhR の活性化による遺伝子発現誘導機構には、リガンドによる相違があることが考えられた。現在、上記事象がゲノム編集によるオフターゲット作用ではないことを証明するために、AhR KO 細胞に再び AhR を発現させた細胞株を樹立し、検討を進めている。

## P-13\* 慢性腎臓病における再生機構の破綻した尿細管による線維化促進メカニズムの解明

○松下 幸平<sup>1</sup>, 豊田 武士<sup>1</sup>, 山田 貴宣<sup>1,2</sup>, 森川 朋美<sup>1</sup>, 小川 久美子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 病理部

<sup>2</sup>東京農工大学 獣医病理学研究室

### 【背景及び目的】

これまで急性腎障害 (Acute kidney injury; AKI) は可逆的な病態と考えられてきたが、近年の疫学研究により AKI 発症後に約 15-20%の症例で不可逆的な慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD) に進展することが明らかとなり、AKI to CKD という概念が注目されるようになった。AKI が生じた後、尿細管の再生により腎組織は修復されるが、その再生機構が破綻した尿細管は線維化促進能を獲得し、CKD への進展に寄与するとされている。本研究では再生機構の破綻した尿細管による線維化促進メカニズムの解明を目的とし、AKI to CKD モデルラット腎臓における尿細管の経時変化を病理組織学的に解析するとともに、再生機構の破綻した尿細管を採取して網羅的遺伝子発現解析を行った。

### 【材料及び方法】

各群 5 匹の 6 週齢雄性 SD ラットの左腎臓に 60 分間の虚血再灌流 (I/R) 処置を施し、1、3、5、7、14 及び 28 日後に解剖して病理組織学的解析を実施した。対照群には Sham 処置を施し、1 及び 28 日後に解剖した。I/R 群・28 日目の線維化病変における尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより回収し、cDNA マイクロアレイ及び Ingenuity Pathway Analysis (IPA)によるパスウェイ解析を実施した。

### 【結果】

I/R 群において、処置後 1 日目には尿細管壊死が認められ、3~7 日にかけては拡張した尿細管が多数観察された。14 日目以降には間質の線維化が生じ、線維化病変内の尿細管は拡張もしくは萎縮していた。免疫染色では 3 日目の拡張尿細管が細胞周期停止に関わる p21 に陽性を示し、7 日以降の尿細管は老化関連因子である  $\beta$ -galactosidase 染色に陽性を示した。マイクロアレイの結果、線維化病変内の拡張/萎縮尿細管では、正常尿細管に比して 836 遺伝子の発現が上昇しており、1295 遺伝子の発現が減少していた。発現上昇を示した遺伝子群には細胞外基質の産生に関わる *Coll1a1* 及び *Fnl* が含まれており、それらの発現を誘導する上流因子を同定するため Upstream Regulator Analysis を実施した結果、5 遺伝子が候補因子として抽出された。その中で最も大きい発現上昇 (約 100 倍) を示した CD44 に着目し、免疫染色により発現動態を検討した。その結果、対照群での発現は認められなかった一方、I/R 処置後 3~7 日の拡張尿細管及び 14 日以降の線維化病変内の拡張/萎縮尿細管に明らかな発現増加が認められた。

### 【考察】

再生機構の破綻した尿細管は障害直後から拡張し、一過性に p21 を発現した後に細胞老化に至ることが示された。尿細管障害から線維化に至る過程において、CD44 は再生機構の破綻した尿細管に持続的に発現し、細胞外基質の産生を促進して CKD の病態形成に寄与することが示唆された。また、CD44 は線維化に先行して発現することから、AKI から CKD への進展を早期に予測する評価分子としても応用が期待される。

## P-14\* 非晶質ナノシリカによる生殖毒性とその誘導機序の解明に関する研究

○東阪和馬<sup>1,2</sup>、辻野博文<sup>1</sup>、長野一也<sup>1</sup>、堤 康央<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>大阪大学大学院 薬学研究科 毒性学分野

<sup>2</sup>大阪大学大学院 医学系研究科 法医学教室

<sup>3</sup>大阪大学国際医工情報センター

【背景・目的】組織浸透性や薬剤保持・徐放性などに優れたナノマテリアルを、主剤あるいは基剤として医薬品に活用したナノ医薬品は、近年、急速に研究開発とその実用化が進んでいる。一方で、サイズの微小化により実現した革新的機能が、有用性のみならず生体に負の影響をおよぼすことが懸念されており、ナノマテリアルの安全性情報の収集が喫緊の課題とされている。本観点から我々は、有用かつ安全なナノマテリアルの開発と実用化支援に資する基礎情報の収集を目指して、物性・動態・生体影響の連関解析に基づくナノ安全科学研究と、それら知見をもとに、より安全なナノマテリアルを開発するためのナノ最適デザイン設想を推進してきた。これら研究を通じ、これまでに、ワクチンや遺伝子といった、次世代医薬に関する細胞内への薬物送達キャリアとして期待されると共に、医薬品添加剤などに既に汎用されている非晶質ナノシリカを用い、過剰量投与によるハザード同定ではあるものの、非晶質ナノシリカが、その物性によっては、胎仔発育不全や流早産といった、妊娠合併症を惹起し得ることを明らかとしてきた。一般的に、妊娠障害の誘発には、全身性の炎症応答の関与が示唆されているが、非晶質ナノシリカ投与による妊娠障害について、その詳細な機序は殆ど明らかとされていない。そこで本研究では、妊娠維持が破綻する際の一目として、様々な炎症応答への関与が認められている好中球の関与に着目し、非晶質ナノシリカ投与による妊娠合併症の発現機序の解明を試みた。

【方法・結果・考察】まず、粒子径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) 投与後の妊娠マウスにおける末梢血好中球画分の割合を解析したところ、妊娠 16 日目の母体マウスに nSP70 を単回静脈内投与することで、末梢血中の好中球画分の割合が有意に増加することが示された。そこで、末梢血好中球の増加が、nSP70 投与による妊娠障害の誘発におよぼす影響を解析する目的で、妊娠 15 日目の母体マウスに好中球特異的な中和抗体である抗 Ly-6G 抗体を前処置した後、妊娠 16 日目に nSP70 を尾静脈内より単回投与した。その結果、抗 Ly-6G 抗体を前処置した nSP70 投与群では、nSP70 単独投与群と比較し、母体体重の低下、および子宮中に含まれる胎仔数の減少が亢進することが示された。また、nSP70 が胎盤の栄養膜層への傷害により胎盤構造の崩壊を誘導し得ることから、好中球が妊娠維持における胎盤機能におよぼす影響を評価した。HE 染色による病理組織学的解析を実施し、胎盤構造への影響を解析したところ、抗 Ly-6G 抗体を前処置した nSP70 投与群の胎盤において、顕著な辺縁部のうっ血が確認され、好中球存在下で nSP70 を投与した群、および、Isotype を前処置した nSP70 投与群と比較し、その程度が亢進することが示された。さらに、好中球非存在下で nSP70 を投与した群において、栄養膜層における nSP70 投与による傷害性が増大すると共に、nSP70 による胎盤障害、胎盤血管障害、およびアポトーシス細胞死が顕著に悪化することを明らかとした。従って、nSP70 投与による母体への影響、特に、妊娠維持の破綻に対し、好中球が抑制的に働く可能性が示された。本知見を発端に、ナノマテリアル投与により誘発される生殖毒性の発現機序の解明につながることを祈念している。

【参考文献】 Higashisaka K., et al. Neutrophil depletion exacerbates pregnancy complications, including placental damage, induced by silica nanoparticles in mice, *Front. Immunol.*, 9, 1850, 2019.

## P-15\* ラット精巣障害における血清エクソソーム中 small RNA バイオマーカー探索

○川田 玲央<sup>1,2</sup>, 香川 匠<sup>1</sup>, 織田 進吾<sup>1</sup>, 横井 毅<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科 トキシコゲノミクス

<sup>2</sup>大塚製薬(株) 探索安全性研究部

【背景・目的】医薬品開発時みられる組織障害の一つとして、精巣障害があげられる。精巣障害の低侵襲性バイオマーカーとして、血中ホルモンや尿中クレアチン等が用いられているが、いずれも感度が低いとされる。このため、精巣障害のモニタリングは困難であり、医薬品前臨床試験における精巣毒性発現は、臨床開発を進める上で大きな障害となりうる。近年、体液エクソソーム中分子が癌等の疾患バイオマーカーとして注目を集めている。これらエクソソームに包含された分子は体液中で高い安定性を保つことができ、このためエクソソーム中分子の低侵襲性バイオマーカーとしての応用が検討されてきている。本研究では、医薬品前臨床試験で主に用いられるラットにおける精巣障害時の低侵襲性バイオマーカー同定を目的とし、精巣障害モデルラットの血清エクソソーム中 small RNA を解析した。

【方法】雄性 SD ラットに ethylene glycol monomethyl ether (EGME) 2000 mg/kg あるいは carbendazim (CBZ) 400 mg/kg を各単回経口投与し、精巣障害モデルを作製した。これらモデルラットの血清エクソソーム中 small RNA-seq 解析を行い、バイオマーカー候補を選定した。また、1,3-dinitrobenzene (1,3-DNB) 60 mg/kg あるいは nitrofurazone (NF) 500 mg/kg 各単回経口投与により精巣障害モデルを作製し、EGME, CBZ モデルと共に血清エクソソーム中候補マーカーの qPCR バリデーションを実施した。

【結果・考察】EGME, 1,3-DNB, NF 投与ラットの精巣組織において、精母細胞変性及びセルトリ細胞空胞化がみられた。また、CBZ 投与ラットにおいて、精母細胞脱落、減少がみられた。これらモデルラットにおいて、既存汎用バイオマーカーである血清中テストステロン値は精巣組織障害に相関した変動を示さなかった。EGME, CBZ モデルの血清エクソソーム small RNA-seq 解析により、両モデルで共通して有意に変動する small RNAs を同定し、これらの内、miR-423-5p 及び miR-128-3p を精巣障害バイオマーカー候補とした。EGME, CBZ, 1,3-DNB, NF モデルにおいて、これら候補マーカーの血清エクソソーム中 level を qPCR により解析したところ、1,3-DNB モデルを除く全モデルで有意な変動がみられた。これら候補マーカーは血清 RNA qPCR 解析では有意な変動がみられなかった。

【結論】本研究において、ラットの血清エクソソーム中で精巣障害により変動する small RNAs マーカー (miR-423-5p 及び miR-128-3p) を同定した。これらエクソソーム中マーカーは既存障害マーカーと比較して障害検出感度がすぐれており、新規ラット精巣障害バイオマーカーとして、医薬品開発上有用となる可能性がある。

## P-16\* ビタミンE 欠乏給餌によるマウス雄性生殖器および精子への影響

○齊藤 洋克<sup>1</sup>, 小林 記緒<sup>3</sup>, 白形 芳樹<sup>2</sup>, 井上 弘貴<sup>2</sup>, 岡江 寛明<sup>3</sup>, 樋浦 仁<sup>3</sup>, 原 健士朗<sup>2</sup>, 北嶋 聡<sup>1</sup>, 有馬 隆博<sup>3</sup>, 種村 健太郎<sup>2</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 毒性部

<sup>2</sup> 東北大学大学院農学研究科動物生殖科学分野

<sup>3</sup> 東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野

### 【背景・目的】

ビタミンEは4種のトコフェロールと4種のトコトリエノールの合計8種類の化合物の総称であり、生体において抗酸化作用を担うことが知られている。そのため、ビタミンEの欠乏(以下VED)は、老化の進行にも関与する酸化ストレスの蓄積を増加させ、認知機能、免疫機能の低下といった、様々な機能障害を誘発することが報告されている。しかし、VEDが哺乳類の雄性生殖機能に与える影響については十分明らかにされていない。本研究では、VEDが雄性生殖機能に与える影響を探るため、雄マウスへVED給餌を行い、その雄性生殖器(精巣・精巣上体)および精子に与える影響について解析した。

### 【方法】

C57BL/6N雄マウスを2群に分け、離乳後の4週齢から、ビタミンE含有飼料(コントロール)もしくはVED飼料を継続的に給餌し、飼育した。両群それぞれについて、12および24週間後に精巣、精巣上体を摘出し、それぞれメタカン固定液、4%パラホルムアルデヒド固定液で固定、組織切片を作製してHE染色、TUNEL法および免疫組織化学による解析を行った。また、精巣上体より精子を採取し、塗抹標本を作製後、パパニコロウ染色による精子の形態解析を行った。さらに、24週間VED給餌群に関しては、採取した精巣上体精子よりDNAメチローム解析を行った。

### 【結果・考察】

HE染色により、VED給餌マウスの精巣組織切片において、ほとんどの精細管横断面でコントロール群と同様に精子形成が認められたものの、一部の精細管に多数の剥脱が観察された。観察した全ての精細管横断面のうち、剥脱が観察された精細管横断面の割合は、12および24週間のいずれの給餌期間においても、コントロール群に対し、VED給餌群において有意に高かった。また、24週間VED給餌群の精巣上体組織切片のHE染色像から、精子数の減少および管腔内での多数の異常細胞の出現が観察された。TUNEL法および免疫組織化学の結果から、これら異常細胞は、TUNEL陽性かつVASA(生殖細胞マーカー)陽性であり、アポトーシスを起こした生殖細胞であることが示唆された。パパニコロウ染色の結果から、精子頭部の形態異常率は、12および24週間のいずれの給餌期間においても、コントロール群に対し、VED給餌群において有意に高かった。以上の結果から、VED給餌によって生じる精巣、精巣上体および精子への特徴的な影響は、高齢マウスで観察される特徴の一側面と高い類似性を示すものであるとともに、VEDによって精子形成不全が誘発されることが明らかとなった。

一方で、VED給餌群においても精巣上体から運動性を持つ精子の採取は可能であり、精子の産生能は完全には失われていないが、精子のDNAメチローム解析の結果、VED給餌によって精子エピゲノム様式に変化が生じることが示された。パスウェイ解析の結果、特に免疫系に関する変化が大きいことが判明した。今回みられたマウス雄性生殖器および精子への影響は、VED給餌によって生体内の抗酸化作用が低下した結果生じたものであると考えられる。今後、その生物学的意義を含めさらなる解析を進める必要があるとともに、本研究では、医薬品がビタミンEの吸収や代謝経路を阻害することによる、雄性生殖機能への影響についても議論したい。

# P-17 三次元動物用マイクロX線コンピュータ断層撮影装置を用いたラット骨格の生後観察

○栗形麻樹子<sup>1</sup>, 熊谷文明<sup>2</sup>, 瀬沼美華<sup>2</sup>, 等々力舞<sup>2</sup>, 北嶋 聡<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 毒性部

<sup>2</sup>一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 安全性事業部

【背景・目的】生殖発生毒性試験における出生児の骨格観察は、剖検時に軟X線撮影により行われている。近年、げっ歯類に対応した小型動物用の三次元マイクロX線コンピュータ断層(Computedtomography:CT)撮影装置が開発され、生きたまま非侵襲的に動物の骨格を評価することが可能となり、試験への応用が期待されている。今回、代表的な骨格変異である過剰肋骨<sup>1)</sup>の生後推移を、CT撮影(CosmoScan GXII, RIGAKU, Japan)により経時的に観察し、出生前後の児の骨格形態比較、骨格変化の可逆性、さらに異常と変異の区別の判断に有用か否かを検討した。

【方法】過剰肋骨動物モデルとして、既報<sup>2)</sup>に基づき、抗真菌剤である5-flucytosine(5-FC)をSD系ラット妊娠9日に単回経口投与(0, 35, 75 mg/kg)し、自然分娩させて出生児を得た。生後4日から生後9週まで個体ごとに胸椎・腰椎境界部のCT撮影を行い、3D画像を用いて形態学的観察を、MIP(maximum intensity projection)画像から、第13肋骨および第14肋骨(過剰肋骨)の長さを計測し、その割合(第13肋骨長に対する過剰肋骨長の割合)を算出して、同一個体における過剰肋骨の生後推移を観察した。性成熟による成長を加味したポイントを選択し、雄では6回、雌では5回、CT撮影した。CT撮影はイソフルランと酸素の混合麻酔下にて行った。過剰肋骨の型は、痕跡型、短小型(第13肋骨長の半分以下の長さ)及び完全型(第13肋骨長の半分以上の長さ)に分けて評価した。また、最終撮影後に血液学検査を実施し、X線曝露による造血系への影響を確認した。

【結果・考察】いずれの母動物も正常に分娩し、出生児の生存率にも5-FC投与による影響はなかった。対照群を含む各投与群に過剰肋骨が観察され、5-FC投与群では用量依存的に過剰肋骨の発現頻度は増加した。経時的な同一個体におけるCT撮影結果から、初回撮影時である生後4日の過剰肋骨の型は、生後9週まで変化しなかった。MIP画像解析から、児の成長に伴って第13肋骨および過剰肋骨は伸長したが、その割合は観察期間を通して一定であり、性成熟による影響もなかった。また、対照群を含む各投与群の痕跡型過剰肋骨の約3割は生後2週以降、椎骨と癒合したが、それ以外は9週まで癒合しなかった。血液学検査の結果、X線曝露による造血系への影響は認められなかった。

以上の結果から、CT撮影による生後の骨格観察は可能であった。過剰肋骨は生後の個体の成長とともに伸長するが、逸脱した伸長はしないことが明らかになった。痕跡型の過剰肋骨は、生後、消失すると思われていたが、軟X線の検出感度による差と考えられた。また、胎生末期の骨格観察結果と同様であったことから、催奇形性試験の胎児骨格観察から、生後の骨格変化を評価できると考えられた。

## 【参考文献】

- 1) Kuwagata et al., Historical control data on developmental toxicity studies in rats. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2019, 59(4):125-131.
- 2) Kuwagata et al., Induction of a thoracolumbar supernumerary rib in rat developmental toxicity studies: A short discussion on the critical window. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2019 Nov;59(6):190-192.

## P-18\* ラットを用いた海馬神経新生障害時の DNA 過メチル化に着目した発達神経毒性標的遺伝子の網羅的探索

○菊地 聡美<sup>1,2</sup>, 高橋 康德<sup>1,2</sup>, 山下 理紗子<sup>1</sup>, 岡野 拓<sup>1,2</sup>, 高嶋 和巳<sup>1,2</sup>, 余 沁蔓<sup>1</sup>,  
吉田 敏則<sup>1,2</sup>, 渋谷 淳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東京農工大学 獣医病理学研究室

<sup>2</sup>東京農工大学 大学院共同獣医学専攻

【背景及び目的】我々は、ラットまたはマウスでいくつかの神経障害物質の発達期曝露により成熟後に及ぶ海馬歯状回での神経新生の不可逆影響を見出している。本研究では、その中で抗甲状腺剤のプロピルチオウラシル (PTU)、HDAC 阻害剤のバルプロ酸 (VPA)、軸索末端傷害物質のグリシドール (GLY)のラット発達期曝露例で、不可逆影響を及ぼす可能性のある DNA 過メチル化に着目して、神経新生部位において過メチル化及び下方制御を示す遺伝子を網羅的に探索した。

【方法】妊娠ラットに PTU、VPA、GLY を妊娠 6 日目から出産後 21 日目まで飲水投与し、生後 21 日目 (PND21)に児動物の海馬について、Methyl-Seq 及び RNA-Seq 解析を実施した。さらに PND21、77 の児動物の海馬の Real-time RT-PCR で mRNA の発現低下を検証した。

【結果及び考察】対照群と比較して、転写開始点から 2 kb 以内の CpG でメチル化率が 20%以上増加し、mRNA 発現量が 50%以下に減少した遺伝子を同定した。そのうち、PTU、VPA、GLY でそれぞれ 247、81、181 遺伝子、3 物質に共通で 24 遺伝子が神経関連であり、多くは神経分化に関連するものであった。Real-time RT-PCR 解析では、PTU、VPA、GLY で、PND21 に 39、7、25 遺伝子の下方制御が確認された。うち 12、3、16 遺伝子の下方制御が PND77 まで持続していた。PTU では *Hes5*、*Fzd9*、VPA では *Sox2*、GLY では *Afdn* が神経幹・前駆細胞関連遺伝子として同定され、顆粒細胞系譜の永続的な分化障害が示唆された。PTU では、*Fzd9*、*Creb1* が同定され、既に PTU で報告しているアポトーシスの増加、type-2a~未熟顆粒細胞の減少への関与が示唆された<sup>1)</sup>。VPA では、樹状突起の発達に関与する *Dpysl4* が同定され、既に VPA で報告している *Reln*、*Grid1* の発現増加は代償反応である可能性が示唆された<sup>2)</sup>。GLY では、樹状突起発達 (*Acs14*、*Baiap2*、*Kalrn*)、神経移動 (*Afdn*、*Arx*)、GABA 受容体 (*Gabrb1*)に関する遺伝子も同定され、既に GLY で報告している一過性の未熟顆粒細胞の減少、持続性の GABA 性介在ニューロンの増加への関与が示唆された<sup>3)</sup>。PTU、GLY に共通して神経可塑性に関わる *Arc*、海馬の電気生理学的調整に関わる *Mas1*、ニューロン移動、軸索の形態の調整に関わる *Fgf13* 遺伝子が同定された。これらは神経新生障害により影響を受けやすい遺伝子であると考えられた。今回の試験で見出された過メチル化遺伝子は、不可逆的な発達神経毒性のバイオマーカーとなりうる。

【参考文献】1) Shiraki A et al. 2016. Toxicol Lett. 261: 59-71. 2) Watanabe Y et al. 2017. Neurotox Res. 31: 46-62. 3) Akane H et al., 2013. Toxicol Sci. 134(1): 140-154

## P-19 The Wnt/beta-catenin signaling pathway and its relation to cancer and stem cells

○Shihori Tanabe<sup>1</sup>, Sabina Quader<sup>2</sup>, Ryuichi Ono<sup>3</sup>, Kazuhiko Aoyagi<sup>4</sup>, Akihiko Hirose<sup>1</sup>, Hiroshi Yokozaki<sup>5</sup>, Hiroki Sasaki<sup>6</sup>

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

<sup>2</sup>Innovation Centre of NanoMedicine (iCONM), Kawasaki Institute of Industrial Promotion

<sup>3</sup>Division of Cellular and Molecular Toxicology, Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences

<sup>4</sup>Department of Clinical Genomics, National Cancer Center Research Institute

<sup>5</sup>Department of Pathology, Kobe University of Graduate School of Medicine

<sup>6</sup>Department of Translational Oncology, National Cancer Center Research Institute

[Background] Molecular network pathways interact with each other and regulate cellular phenotypes. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the acquisition of cancer stem cell (CSC) feature and drug resistance, which are main hallmarks of cancer malignancy. Although previous findings have shown that Wnt/beta-catenin signaling pathway is activated in the cancer progression, the precise mechanism of Wnt/beta-catenin signaling in EMT and CSC are not fully understood.

[Methods] To reveal the network pathways in EMT, gene expression in mesenchymal stem cells (MSCs) and diffuse-type gastric cancer (GC) as well as intestinal-type GC have been analyzed and compared. Microarray analysis was performed using total RNA purified from MSCs and GC. The network pathways in MSCs and GC were analyzed with Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

[Results and Discussion] The gene expression profiling demonstrated that gene expression of cadherin 1 (*CDH1*), Wnt family member 9A (*WNT9A*) and catenin beta 1 (*CTNNB1*) were up-regulated in diffuse-type GC compared to MSCs. The gene expression of growth factor receptor bound protein 7 (*GRB7*) and erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (*ERBB2*) were up-regulated in intestinal-type GC compared to diffuse-type GC. Wnt/beta-catenin signaling, as well as ERBB signaling networks, involved in EMT, CSCs and drug resistance, have been investigated and profiled in bioinformatics. In conclusion, the Wnt/beta-catenin signaling pathway was included in EMT-related molecular network pathways in MSCs and GC, which may contribute into the elucidation of mechanism in the drug resistance of CSC population. Adverse outcome pathway for Wnt signaling is currently under development.

## P-20\* 芳香族炭化水素受容体 (AhR) リガンドによる乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用

○齋藤 菜緒<sup>1</sup>, 山下 直哉<sup>1,2</sup>, 菅野 裕一郎<sup>1</sup>, 出川 雅邦<sup>1,3</sup>, 根本 清光<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東邦大学 薬学部 公衆衛生学教室

<sup>2</sup> 現・同志社女子大 薬学部 衛生化学研究室

<sup>3</sup> 静岡県立大学 薬学部

【背景・目的】芳香族炭化水素受容体 (aryl-hydrocarbon receptor, AhR) は、環境化学物質であるダイオキシン類や芳香族炭化水素などの生体外異物をリガンドとする転写因子である。AhR は通常、細胞質に局在しており、リガンドの結合により AhR nuclear translocator (Arnt) とヘテロダイマーを形成して核内へ移行する。AhR/Arnt 複合体は、標的遺伝子エンハンサー上に存在する異物応答配列へ結合し、様々な転写共役因子を DNA 上へ呼び込むことにより、標的遺伝子の転写を活性化する。環境化学物質などの毒性発現を担う受容体型転写因子として発見された AhR であるが、近年、免疫系における炎症応答や器官形成、腫瘍抑制など生体の恒常性維持における多様な機能に重要な役割を果たしていることが報告されている。当教室の菅野らはこれまでに、AhR リガンドの一つである  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) による AhR の活性化が、乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成を抑制することを明らかにしており<sup>1,2</sup>、AhR リガンドの中にはがん治療に有効なものが存在するものと考えている。AhR リガンドには、 $\beta$ NF や多環芳香族炭化水素である 3-methylcholanthrene、benzo[a]pyrene などの外来性リガンドだけではなく、トリプトファン代謝物である kynurenine や 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)、アブラナ科由来成分 indole-3-carbinol (I3C)、マメ科植物由来の天然色素 indirubin といった内在性リガンド、ナチュラルリガンドなど多数報告されている。本研究では、AhR による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用に着目し、様々な既知 AhR リガンドを用いてその作用を評価・比較することにした。

【方法】ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 (WT 細胞) を親株として、CRISPR/Cas9 法により AhR knockout 細胞株 (KO 細胞) を作製した。 $\beta$ NF を含む 10 種類の AhR 既知リガンド存在下において、WT 細胞と KO 細胞を非接着条件下で培養し、5 日目に腫瘍様塊を観察・撮影した (mammosphere formation assay)。

【結果・考察】まず、WT 細胞、KO 細胞の 2 種細胞を用いて、 $\beta$ NF 処理による乳がん幹細胞由来の腫瘍様塊形成抑制作用を検討した。WT 細胞では腫瘍様塊形成の顕著な抑制が認められたが、KO 細胞では形成抑制は認められなかったことから、 $\beta$ NF の腫瘍様塊形成抑制作用は、AhR 依存的であると結論づけられた。さらに、様々な AhR リガンドの作用を 2 種細胞を用いて評価した。 $\beta$ NF 以外のリガンドにおいても AhR 依存的な形成抑制作用が認められたが、その作用には次のような差異が認められた。外来性リガンドである 3-methylcholanthrene や benzo[a]pyrene は、 $\beta$ NF と同様に腫瘍様塊形成を顕著に抑制し、その作用は AhR 依存的であった。一方、内因性リガンドである FICZ や indirubin は、AhR 依存的な弱い形成抑制作用を認めたが、処理濃度を増加させても外来性リガンドのような顕著な抑制作用は認められなかった。以上の結果より、AhR リガンドによって腫瘍様塊形成抑制作用に相違が存在する可能性が示された。現在、この相違について着目し、その要因の解析を進めている。

### 【参考文献】

Zhao S. *et al.*, *Cancer Letters*, 317, 192–198 (2012)

Zhao S. *et al.*, *Cancer Letters*, 330, 41–48 (2013)

## P-21 GPG モデルを用いた furan 類化合物の *in vivo* 変異原性および発がん性の検討

○高須 伸二<sup>1</sup>, 土屋 卓磨<sup>1</sup>, 石井 雄二<sup>1</sup>, 木島 綾希<sup>1</sup>, 小川 久美子<sup>1</sup>, 梅村 隆志<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 病理部

<sup>2</sup>ヤマザキ動物看護大学 動物看護学部

【背景・目的】食品香料として広く用いられている furan 類香料の基本骨格である furan は、げっ歯類に対して肝発がん性を有することが知られている。これまでに我々は、furan の肝発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する目的で、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットに発がん用量の furan を投与した結果、肝臓のレポーター遺伝子変異頻度に有意な変化は認められないことを報告した。しかしながら、furan 類香料の DNA 親和性には furan 骨格の側鎖の違いが関係すると考えられている。一方、我々は肝臓における遺伝毒性および発がん性を同時に評価することが可能な肝短期遺伝毒性・発がん性試験法 (GPG モデル) を開発してきた。本研究では、furan 類香料のうち側鎖にアルキル基を有する 2-pentylfuran、アルデヒド基を有する 3-(2-furyl)acrolein、ケトン体である 2-furyl methyl ketone およびエステル構造を有する ethyl 3-(2-furyl)propanoate を GPG モデルに適用し、furan 類香料の *in vivo* における変異原性および発がん性を明らかにするとともに、側鎖の違いがそれらに及ぼす影響を検討した。

【方法】雄性 6 週齢の F344 系 *gpt delta* ラット 90 匹を対照群、各被験物質投与群および陽性対照群の計 6 群に配した。被験物質の投与量は予備試験の結果から得られた最大耐量とし、コーン油に混じた 2-pentylfuran (100 mg/kg 体重)、3-(2-furyl)acrolein (400 mg/kg 体重)、2-furyl methyl ketone (25 mg/kg 体重)、ethyl 3-(2-furyl)propanoate (1000 mg/kg 体重) および陽性対照群として estragole (150 mg/kg 体重) を強制経口投与した。対照群にはコーン油を投与した。GPG モデル標準プロトコールに従い、被験物質を 4 週間反復強制経口投与し、2 週間の休薬を行った。投与開始 6 週目に diethylnitrosamine を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、その 18 時間前に 2/3 部分肝切除を施した。7 週目から被験物質の投与を再開し、13 週目まで投与を継続した。投与終了後、切除肝を用いた *gpt* assay および *Spi* assay ならびに残存肝を用いた GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を行った。

【結果・考察】*In vivo* 変異原性試験の結果、何れの furan 類香料投与群とも *gpt* および *Spi* 変異体頻度に有意な変化は認められなかった。GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果、2-pentylfuran および 2-furyl methyl ketone 投与群の GST-P 陽性細胞巢の数および面積は有意に増加または増加する傾向が認められた。一方、3-(2-furyl)acrolein および ethyl 3-(2-furyl)propanoate 投与群では変化は認められなかった。以上の結果から、何れの furan 類香料も肝臓への遺伝毒性を示さなかった一方、2-pentylfuran および 2-furyl methyl ketone は発がんプロモーション作用を有することが示唆された。従って、furan 骨格側鎖の違いは発がんプロモーション作用発現に影響する可能性が考えられた。

## P-22 レポーター遺伝子導入動物を用いた *in vivo* 変異原性試験と網羅的 DNA 付加体解析によるアルケニルベンゼン化合物の発がん機序の探索

○石井 雄二<sup>1</sup>, 高須 伸二<sup>1</sup>, 中村 賢志<sup>1</sup>, 木島 綾希<sup>1</sup>, 小川 久美子<sup>1</sup>, 梅村 隆志<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 病理部

<sup>2</sup>ヤマザキ動物看護大学

【背景・目的】LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 付加体解析はデオキシリボースの開裂に起因する 116 の質量差を生じる分子を検出することで、化学物質によって生じる DNA 中の損傷塩基を網羅的に検索する方法である。一方、レポーター遺伝子導入動物を用いた *in vivo* 変異原性試験は、化学物質の分布・吸収・代謝・排泄を考慮した発がん標的臓器における突然変異誘発性を評価できる試験法である。本研究では、これらの方法を組み合わせてハーブ等に含まれる香気成分であるアルケニルベンゼン化合物の DNA 障害性と遺伝毒性の評価を行い、発がん過程への遺伝毒性機序の関与とその化学構造特異性について検討した。

【方法】被験物質には、アルケニルベンゼン化合物のうちげっ歯類において肝発がん性を有するエストラゴール (ES)、メチルオイゲノール (MEG)、サフロール (SA)、非発がん性のオイゲノール (EG) および発がん性に関する報告がないエレミシン (EL) を用いた。実験 1 雄性 6 週令の F344 系 *gpt* delta ラットに ES、MEG または EG を 300、100 または 300 mg/kg 体重/日の用量で 4 週間強制経口投与した。実験 2 雄性 6 週令の F344 系 *gpt* delta ラットに SA は 5000 ppm の濃度で 4 週間混餌投与した。実験 3 雄性 6 週令の F344 系 *gpt* delta ラットに EL を 400 mg/kg 体重/日の用量で 13 週間強制経口投与した。投与後、肝臓を採取し、網羅的 DNA 付加体解析、*gpt* assay 及び Spi<sup>-</sup> assay に供した。

【結果】網羅的 DNA 付加体解析の結果、ES、MEG、SA および EL 投与群の DNA アダクトームマップ上には付加体を示す複数のスポットが検出されたのに対し、EG 投与群で該当するスポットは検出されなかった。MS スペクトラム解析の結果、これらのスポットはデオキシグアノシン、デオキシアデノシンおよびデオキシシチジンと ES、MEG、SA または EL の付加体であることが示唆された。*gpt* assay および Spi<sup>-</sup> assay の結果、ES、MEG、SA および EL 投与群では *gpt* 変異体頻度の有意な上昇と Spi<sup>-</sup>変異体頻度の上昇傾向が認められた。*gpt* 変異体の変異スペクトラム解析の結果、これらの投与群では A:T-G:C transition の変異が共通して増加した。

【考察】肝発がん性を有する ES、MEG および SA では DNA 付加体形成と共に突然変異誘発性が認められ、これらのアルケニルベンゼン化合物が遺伝毒性肝発がん物質であることが示された。また、発がん性の報告がない EL においても DNA 付加体形成および突然変異誘発性が確認されたことから、EL はラット肝発がん性を有する可能性が高いと考えられた。さらに、これらの群で共通して認められた A:T-G:C transition 変異の増加はアルケニルベンゼン化合物が引き起こす突然変異の特徴と考えられた。一方、EG では DNA 付加体形成及び突然変異誘発も認められなかったことから、フェノール性水酸基はアルケニルベンゼン化合物の DNA 親和性に抑制的に働いていると考えられた。

# P-23\* 重症薬疹発症と関連する HLA マーカー研究の進捗と添付文書比較

○塚越 絵里<sup>1</sup>, 中村 亮介<sup>1</sup>, JSAR Research Group<sup>2</sup>, 齋藤 嘉朗<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

<sup>2</sup>JSAR Research Group

## 【背景・目的】

Stevens-Johnson 症候群 (SJS) や中毒性表皮壊死融解症 (TEN) 等の重症薬疹発症と関連するゲノムバイオマーカー探索を目的として、国立衛研を中心とする JSAR Research Group が発足して 10 余年が経過した。この間、厚労省、PMDA、日薬連の協力の下、140 社以上の製薬会社から、自発報告が 2,000 件以上寄せられた。さらに共同研究機関及び SJS 患者会からの登録症例を加え、約 320 件の SJS/TEN 症例を集積した。本発表では、これまでの成果を総括すると共に、日米欧での関連ゲノム情報の添付文書の記載を比較した。

## 【方法】

医薬品医療機器等法第 68 条の 10 に基づき PMDA に寄せられた SJS/TEN 症例の報告企業等へ、当該症例の国立衛研への報告を依頼し、さらに担当医への研究協力依頼を行った。研究倫理委員会の承認の下、患者全血からのゲノム DNA 採取、ケースカードの収集を行い、HLA 型及びゲノム網羅的遺伝子多型解析を行った。

## 【結果・考察】

これまでに、日本人 SJS/TEN 症例に関し、アロプリノールと *HLA-B\*58:01*、カルバマゼピンと *HLA-B\*15:11* 及び *A\*31:01*、ゾニサミドと *HLA-A\*02:07*、フェノバルビタールと *HLA-B\*51:01*、フェニトインと *CYP2C9\*3* 及び *HLA-B\*51:01*、重症眼障害を伴う風邪薬誘発性 SJS/TEN と *HLA-A\*02:06* 及び *B\*44:03* など、種々のマーカー候補を同定した。一方で、上記の医薬品と同程度の症例数を収集してもゲノムバイオマーカーが見つからない例があり、ゲノム以外のマーカーの同定が今後重要と思われた。また添付文書比較に関しては、カルバマゼピンにおいて、欧米の添付文書では禁忌欄にゲノム情報が記載されていたが、日本では副作用欄に記載されており、国別にゲノム情報の扱い方に違いがあることが示唆された。

## 【参考文献】

*Epilepsia*. 51:2461-2465 (2010)

*Drug Metab Pharmacokinet*. 27:447-450 (2012)

*Pharmacogenomics J*. 13: 60-69 (2013)

*Pharmacogenomics*. 14:1821-1831 (2013)

*Ther. Adv. Drug Saf*. August 1, 2042098613499791 (2013)

*JAMA*. 312:525-534 (2014)

## P-24\* アバカビルによる HLA-B\*57:01 多型依存的な毒性発現に与える免疫の抑制的制御機構の影響

○青木 重樹<sup>1</sup>, 桑原 佐季<sup>1</sup>, 薄田 健史<sup>1,2</sup>, 伊藤 晃成<sup>1</sup>

<sup>1</sup>千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室

<sup>2</sup>アルバータ大学 薬学部

### 【背景・目的】

近年、特異体質薬物毒性 (idiosyncratic drug toxicity, IDT) 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。そこで我々は、抗 HIV 薬であるアバカビルが関与した IDT の皮疹発症に焦点を当て、キメラ型 HLA-B\*57:01 遺伝子導入マウス (B\*57:01-Tg) を作出し、毒性の再現を試みている。

これまでに、作出したマウスモデルを用いることで、アバカビルの耳介局所曝露によって免疫反応が惹起可能であることを報告してきた (Susukida et al. *Arch Toxicol.* 2018)。しかし、アバカビルを継続的に経口投与しても、臨床で報告されているような顕著な皮膚傷害にまで発展することはないかと考えた。

本研究では、IDT 発現に与える免疫の抑制的制御機構の影響を検討するために、免疫寛容系の代表分子である PD-1 を欠損させた B\*57:01-Tg (B\*57:01-Tg/PD-1<sup>-/-</sup>) を樹立し、このマウスに免疫抑制性の制御性 T 細胞を含む CD4 陽性 T 細胞の除去も組み合わせることで、アバカビルによる HLA 多型依存的な毒性が惹起できないか検討を行った。

### 【方法】

抗 CD4 抗体を、B\*57:01-Tg およびその同腹子 (LM)、B\*57:01-Tg/PD-1<sup>-/-</sup> およびその同腹子 (PD-1<sup>-/-</sup>) に投与し、CD4 陽性 T 細胞の除去を行った。これらのマウスにアバカビルの混餌 (1% (w/w)) を一週間与えた際の皮膚傷害を観察し、また各検体のリンパ節に含まれる CD8 陽性メモリー T 細胞 (CD8<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup>) の割合と CD8 陽性メモリー T 細胞における PD-1 発現量をフローサイトメトリーによって測定した。

### 【結果・考察】

B\*57:01-Tg において、CD4 陽性 T 細胞の除去を行うことで、アバカビルの経口投与時に LM と比較してリンパ節中の CD8 陽性メモリー T 細胞の割合が増加し、さらに CD8 陽性メモリー T 細胞での PD-1 発現量の増加も確認された。また、CD4 陽性 T 細胞を除去した B\*57:01-Tg/PD-1<sup>-/-</sup> では、B\*57:01-Tg と比較して、アバカビルの投与によって顕著な CD8 陽性メモリー T 細胞の増加が確認され、B\*57:01-Tg では認められていなかったような皮膚の発赤も観察された。PD-1<sup>-/-</sup> のみでは、アバカビルの投与による変化は認められなかった。

以上の結果から、アバカビルによる IDT の発症抑制には、PD-1 や CD4 陽性 T 細胞が関与していることが示唆された。HLA を導入したマウスモデルを用いて IDT を鋭敏に再現・評価するためには、免疫反応を抑制的に制御する PD-1 や制御性 T 細胞を含む CD4 陽性 T 細胞の排除が必要であると考えている。

## P-25\* アバカビルによる HLA-B\*57:01 を介した 特異体質性副作用 *in vitro* 評価系の構築

○半田 有紀<sup>1</sup>, 平石 千紘<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】

重篤な特異体質性副作用であるスティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死融解症(TEN)の発症について、近年、ヒト白血球抗原(HLA)の特定のタイプとの関連が、様々な医薬品で報告されており、発症機序に免疫系の関与が示唆されているものの、正確な機序は不明の点が多い。そこで、本研究では、HLA-B\*57:01の保有患者でSJS/TEN発症のリスクが高くなることが明らかにされている抗HIV薬Abacavir(ABC)に注目し、ABC添加により、HLA-B\*57:01特異的に細胞傷害性T細胞(CTL)を活性化する*in vitro*系を構築し、SJS/TENの発症機構の検討を行った。

### 【方法】

HLA-B\*57:01(+)<sup>1</sup>のヒト末梢血単核球(PBMC)と抗原提示細胞、ABC、HLA-B\*57:01結合ペプチド(pepV: HSITYLLPV)を、CTL誘導条件下で2週間培養した。HLA-B\*57:01(+)<sup>1</sup>のPBMCから誘導した樹状細胞を抗原提示細胞とした。フローサイトメーターを用いて培養上清中のCD8陽性T細胞の割合、分泌タンパク質(Granzyme B, TNF)濃度を測定し、CTLの活性を解析した。HLA-B\*57:01の特異性を検証するために、ペプチドが結合しないことが*in silico*で示唆されているHLA-B\*44:03(+)<sup>1</sup>のPBMCを用いて同様の操作を行った。

### 【結果・考察】

HLA-B\*57:01(+)<sup>1</sup>のPBMCおよび抗原提示細胞を pepV 存在下で共培養し CTL を誘導したところ、CD8 陽性 T 細胞の誘導が確認された。HLA-B\*57:01(+)<sup>1</sup>の PBMC では pepV 存在下で、いずれのサイトカイン類も ABC 添加により増加した。一方、対照群とした HLA-B\*44:03(+)<sup>1</sup>の PBMC では、pepV 存在下においても顕著なサイトカイン類の分泌は見られなかった。以上の結果から、ABC の濃度依存的に HLA 結合性が上昇すると報告されている pepV が<sup>(\*)</sup>、ABC の有無により HLA-B\*57:01 への結合性に影響を与えたと考えられる。また、HLA-B\*57:01 に特異的に結合するペプチド添加によってサイトカイン類の分泌が増加したことから、HLA 結合ペプチドは ABC による CTL の活性化に必要であることが考えられた。さらに、HLA クラス I は一般的に細胞内に取り込んだタンパク質を抗原ペプチドとして提示するが、内在性ではなく細胞外の培地に加えることでも CTL の活性化を評価できることが示唆された。以上の結果から、ABC による特異的な CTL の活性化には、HLA-B\*57:01 と HLA 結合ペプチドの存在が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、この *in vitro* 実験系は、HLA が関連する特異体質性副作用の評価系への応用が可能と考えられた。

### 【参考文献】

\*<sup>1</sup> Ostrov, David A., *et al.* "Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.25 (2012): 9959-9964.

## P-26\* HLA 遺伝子導入マウス由来ケラチノサイトを用いた HLA 多型特異的な皮膚障害発症メカニズムに関する研究

○山田 悠士郎, 藤森 惣大, 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】近年、ゲノムワイド解析により薬物過敏症や SJS/TEN、薬物性肝障害などの特異体質薬物毒性の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。これらの毒性は関連 HLA 多型による薬物抗原の提示が引き起こす細胞傷害性 T 細胞の活性化に伴う免疫応答が原因であると考えられているが、毒性が組織特異的に発症するメカニズムは未だ不明である。我々はこれまでに HLA-B\*57:01 遺伝子導入マウス(B\*57:01-Tg)を作出し、このマウスモデルを用いて、HLA-B\*57:01 多型保有者で過敏症発症との関連がある抗 HIV 薬アバカビルによる免疫応答の再現に成功している(参考文献 1)。本研究では、アバカビル過敏症を含めて HLA の関与する薬物毒性が皮膚で好発することに注目し、HLA-B\*57:01 とアバカビルの組み合わせを例に、B\*57:01-Tg 由来のケラチノサイトを用いて皮膚毒性発症メカニズムを究明することを目的に検討を行った。

【方法】B\*57:01-Tg およびその同腹子(LM)、陰性対照である B\*57:03-Tg 由来のケラチノサイトを単離して培養し、アバカビルを曝露したときの IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  といった炎症性サイトカインの発現量変動をリアルタイム PCR を用いて測定した。また、免疫プロテアソームサブユニット( $\beta$ 1i、 $\beta$ 2i、 $\beta$ 5i)の mRNA 発現量も同様に測定した。さらに、B\*57:01-Tg の両耳にアバカビルを皮内投与し、耳組織の全タンパクを回収し、免疫プロテアソームサブユニットのタンパク質レベルの発現をウエスタンブロットによって評価した。

【結果・考察】アバカビルを曝露した B\*57:01-Tg 由来のケラチノサイトにおいて、炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  の mRNA 発現の有意な上昇が認められた。さらに、主として IFN- $\gamma$  によって誘導される免疫プロテアソームサブユニットの mRNA 発現の有意な上昇も認められた。これらの現象は、LM マウスまたは B\*57:03-Tg 由来のケラチノサイトを用いた検討からは確認されなかった。また、IFN- $\gamma$  の主要なシグナル伝達経路である JAK/STAT1 シグナルを STAT1 阻害剤フルダラビンを用いて阻害したところ、アバカビルの曝露に伴った免疫プロテアソームサブユニットの mRNA 発現上昇が抑制された。また、アバカビルを B\*57:01-Tg の耳に皮内投与した際に免疫プロテアソームサブユニットのタンパク発現量の上昇が認められた。この現象は、野生型マウスを用いた検討からは確認されなかった。以上の結果から、B\*57:01 由来のケラチノサイトにおいて、アバカビル曝露により HLA 多型特異的に炎症性サイトカインの発現が亢進し、それらがケラチノサイトに作用することで免疫プロテアソームの発現が誘導されるのではないかと考えている。今後、免疫プロテアソームを介した抗原ペプチドの産生が HLA の関与する薬物性の皮膚毒性発症に関与するのかについて、より詳細な検討を行う予定である。

### 【参考文献】

- 1 Susukida T, Aoki S, Kogo K, Fujimori S, Song B, Liu C, Sekine S, Ito K. Evaluation of immune-mediated idiosyncratic drug toxicity using chimeric HLA transgenic mice. *Arch Toxicol.* 2018, 92(3):1177-1188.