

# 要旨

特別講演  
教育講演

## 特別講演

### 外来性化学物質(xenobiotics)により誘発される生体反応の分子機構解析と創薬加速

○菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所客員研究員  
東京理科大学薬学部客員教授  
筑波大学医学医療系客員教授

外来性化学物質(xenobiotics)により誘発される生体反応の分子機構の解析を、マウスの臓器の遺伝子発現を網羅的に観測することで進めている。投与量は、単回投与実験では24時間以内に細胞障害性が現れない最大量、反復実験では最終投与時に細胞障害性が現れない最大量を上限に設定している(ホルモン様物質の場合は、ED70~80相当量)。遺伝子発現の経時的情報を加味して、遺伝子発現ネットワークを網羅的に描出して、それらから生体反応を理解することを目指している。遺伝子ノックアウトマウスの解析にヒントを得て、「新型反復実験」を加えて実施し、反復毒性、延いては慢性毒性を予測する為の解析を、DNAメチル化(WGBS)及びヒストン修飾(H3K4me3, H3K27Ac, H3K27me3, 及び H3K9me3のChIP-Seq)を導入して展開中である。

創薬の観点からは、そもそも、PharmacogenomicsとToxicogenomicsは1つの薬の「薬効」と「毒性(副作用)」を指すのであれば、その薬を投与された個体の立場からは、一つの生体に起こる生体反応を便宜的に分けたに過ぎない。生体をコインに例えればPharmacogenomicsとToxicogenomicsはその「表と裏」の関係にあると言えよう。

ただし、薬の「薬効と副作用」と、一般的な化学物質の毒性試験の「毒性」の違いの一つに、用量(dose)の概念の違いが挙げられる。Paracelsusの言葉は有名であるが、もともとは、微量の水銀はてんかんに効くが、大量の水銀は当然ながら「毒」である、という話、とのことである。グラフに書くと分かりやすいが、用量Zeroから毒性量までの用量作用関係が不連続なのである。その意味では、「薬」の世界の用量作用関係にも不連続なところがある。用量Zeroから薬効量までの部分の概念、即ち、薬を100分の1錠摂取する、といった概念が存在しておらず、薬効量の範囲に急峻なシグモイド曲線があって、その上の用量から毒性が始まる。そういう意味で分子機構解析研究にとっては“Paracelsus is Not Enough”である。

他方、サリドマイドに代表される様に、薬効一つをとっても標的が複数あり、網羅的に解析すると広範な生体反応ネットワークを動員している。一般的には毒性も同じであり、複数のネットワークのどれをどの様に制御するかで、毒性の症状も経過も変えられるはずである。薬で病気を制御するのも、毒性を分析するのも、“Die another way”を探索するという共通性を持っている。

毒性の現れ方には、肝腫大など用量相関性をもってすべての個体に現れる場合と、発がん性に代表されるように、用量相関性をもって病変発生の確率が上昇する場合とがある。後者が、薬の上市後の副作用が発覚する事に相当する場合がある。周産期のシグナル毒性が成人期に高次機能系に異常を誘発する場合も、確率上昇が問題となる場合が多い様である。この“Quantum of Stochastics”は、Host側の問題がある場合があるので解析は一筋縄では行かないが、精緻な実験観測データとAIを駆使した既存情報のサーチの組み合わせが有効となると考えられる。

本講演では、上記の背景データ、及び、1つの化学物質の単回曝露及び新型反復曝露実験の遺伝子発現、WGBS、及びChIP-Seqのデータを俯瞰してわかってきた事を、解析は未完ではあるが、提示する。この様な解析がどの様に創薬の加速に貢献できるかを論議したいと思う。

# 教育講演

## 医薬品安全性評価における毒作用発現機序解明の役割とその意義

○堀井 郁夫

ファイザー

医薬品安全性評価の基本的命題は「医薬品の安全性を担保することではなく、誘発されうる毒作用を明確に提示し、ヒトでのリスク評価・管理する」ことにある。毒作用発現機序を明らかにする事は、ヒトへの外挿性検討やそのリスクの程度・容認性・回復性などについて重要な情報を与え、ヒトへの的確な適用や副作用誘発時の対処法提示などの基本的情報を提示する点で意義がある。

病気とは「遺伝学的因子と生活因子・環境因子の相互作用の結果が表現されたもの」である。それに対応した薬効とは「遺伝子発現から生理作用誘発蛋白産生までの過程を標的にした薬理学的作用の結果」であり、毒作用（副作用）とは「異物に対する生体防御反応の結果」であり、両者とも多様性科学に立脚した科学的思考の範疇にある。

毒作用発現機序解明の原点は、創薬のターゲットから捉えた MOA(mode of action)と毒作用発現状態を提示した AOP(adverse outcome pathway)の両面思考を合わせて考究していくことにある。毒作用発現機序を提示する事は、それに関わる指標（バイオマーカー）を設定する事に繋がり、ヒト適用時のリスク評価・管理の方向性の提示に重要な役割を果たす。また、創薬初期から承認申請に至る過程でのリード・開発候補化合物選定時の Decision-making への貢献度は高い。更に、開発の方向性の示唆・決定や開発途中での “Go” “No-Go” Decision、Clinical hold への対応に意義のある情報である。

創薬・医薬品開発研究段階における毒作用発現機序解明の役割のタイミングを以下に示す。本講演では、各段階における事例を提示しながら医薬品における毒作用発現機序の役割と意義について言及する。

- 創薬ターゲットと毒作用
- リード化合物選定・開発候補化合物選択
  - スクリーニング、High Throughput 試験(*in silico*、*in vitro*、*in vivo*)、探索毒性試験
- IND 申請：IND Regulatory Safety Assessment
- 臨床試験実施→承認申請
  - Regulatory Safety Assessment study
  - “Go or No-Go” Decision
  - Risk assessment and management
    - ヒトへの適用性・外挿性
    - Clinical hold に対する対応
- 承認申請：NDA Regulatory Science Assessment

将来展望として、Pure / Applied / Regulatory Science を融合した毒作用発現機序解明への糸口として AI (Artificial-intelligence) 思考からの Big Data を利用する Computational Toxicology への期待「Wet-science と Dry-science の融合」についても言及する。



# 要旨

## シンポジウム 企業シンポジウム

○佐山 絢子、藤本 和則、甲斐 清徳、森 和彦

第一三共株式会社 安全性研究所

【背景・目的】低分子抗がん剤である compound A のラット 4 日間反復経口投与試験において、薬効用量相当から全身性水腫及び肺水腫に関連すると考えられる死亡・瀕死がみられた。本シンポジウムでは、上記毒性の回避を目的として実施した、毒性発現機序の推定とそれに基づく毒性軽減に向けたアプローチを紹介する。

【毒性発現機序の推定】上記ラット 4 日間反復経口投与試験結果より、全身性水腫及び肺水腫は、低アルブミン血症による血漿膠質浸透圧低下、あるいは血管内皮障害による血管透過性亢進に起因する可能性が考えられた。このため、二つの検討を並行して実施し、毒性発現機序の推定を目指した。検討 1 では、低アルブミン血症に起因すると仮定して検査項目を設定したラット単回経口投与による複数化合物のスクリーニング評価、検討 2 では、compound A を単回あるいは 4 日間反復経口投与したラットの腎臓及び肺を用いた電子顕微鏡による超微細学的検索を行った。検討 1 では、compound A と異なり、低アルブミン血症を伴わず胸水及び腹水貯留を示す化合物が複数みられた。検討 2 では、腎糸球体において血管内皮細胞の変化が糸球体内皮細胞（ポドサイト）の変化より先行すること、並びに肺の血管内皮細胞においても腎糸球体血管内皮細胞と同様の変化がみられることが確認された。これらの結果より、全身性水腫及び肺水腫は、血管内皮障害による血管透過性亢進に起因する可能性が示唆された。

【毒性軽減のアプローチ】全身性水腫及び肺水腫が血管透過性亢進に起因すると考えられたことから、より少ない化合物量での評価が可能な *in vitro* 系として、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVEC) を用いた経内皮電気抵抗 (trans epithelial electrical resistance: TEER) 値の測定を用いて、複数化合物のスクリーニング評価を実施した。その結果、TEER 値低下と関連すると考えられる複数の部分構造が明らかとなり、これらの組み合わせにより、最終的に薬理活性を維持しつつ TEER 値を低下させない compound X を取得した。

【結果・考察】Compound X のラット 4 日間反復経口投与試験を実施したところ、薬効用量相当～約 3 倍の曝露条件下において、全身性水腫及び肺水腫、並びに肺水腫に関連する死亡・瀕死は認められなかった。さらに、compound X のラット 14 日間反復経口投与試験においても、全身性水腫及び肺水腫は認められなかったことから、推定された毒性発現機序、及びそれに基づく毒性軽減アプローチの妥当性が示された。この経験から、毒性発現機序の推定には詳細な病理組織学的検査による標的細胞の同定及び表現型の理解が有効な手段であり、この推定された毒性発現機序に基づく *in vitro* 評価系の適切な選択が、毒性回避・軽減アプローチの成否には重要であると考えられた。

## S1-2

## 遺伝毒性誘発メカニズムに基づくリスク評価

○武藤 重治

田辺三菱製薬株式会社 安全性研究所

遺伝毒性試験の陽性結果は医薬品の開発に大きな影響を及ぼす。一般的に、DNA に直接作用する化合物の作用には閾値が無いと考えられており、そのような作用機序を有する医薬品の開発は困難とされている。一方、DNA への直接的作用が無い場合には閾値があると考えられることから、薬効量との安全域次第では医薬品として開発可能となる。従って、メカニズム解析により化合物がDNA に直接作用しないことを証明できれば、医薬品開発の可能性が広がることに直結する。

弊社では、培養細胞を用いる遺伝毒性試験で陽性の場合などに、DNA への直接作用を評価する手法の一つとして LC-MS/MS を用いる網羅的 DNA 付加体検出法である DNA アダクトーム解析や、それ以外の作用を評価する手法として動原体染色法および小核関連キナーゼパネル評価などを実施している。

本発表ではこれら手法を用いた化合物評価事例を紹介するとともに、遺伝毒性誘発メカニズムが薬理作用の過大発現であることを説明した上で臨床入りした事例についても紹介する。

○伊佐治 優希<sup>1</sup>、金崎 聡一郎<sup>1</sup>、南 圭一<sup>2</sup>、川本 吏記<sup>1</sup>、吹田 直政<sup>2</sup>、片木 淳<sup>1</sup>、栗林 正伯<sup>1</sup>

<sup>1</sup>小野薬品工業株式会社 安全性研究部

<sup>2</sup>小野薬品工業株式会社 創薬基盤研究部

#### 【背景】

創薬初期段階において、化合物の毒性をプロファイリングし、発現した毒性の作用機序を明らかにすることは、化合物の合成展開過程に毒性作用機序に基づいた適切な評価系を組み込むことによって、毒性リスクを回避もしくは減弱した化合物の創製につながることから大きな意義がある。

胚・胎児発生毒性は重篤な毒性のうちの一つであり、適応疾患によっては、回避すべき毒性と考えている。本発表の事例では、医薬品開発における最適化段階で実施した化合物 X のラット胚・胎児発生に関する予備的な試験（pEFD 試験）において、有効量付近から顔面、指趾及び生殖器周囲に催奇形性を示唆する所見が認められた。化合物 X の目指す適応疾患を考慮すると有効量付近から認められた催奇形性は許容できないと判断し、催奇形性リスクを低減もしくは回避した代替化合物を見出すための機序研究を実施した。

#### 【方法・結果】

最初に、複数の化合物のラット pEFD 試験を実施した。その結果、化合物 X の類縁化合物においては、化合物 X と同様に、顔面、指趾及び生殖器周囲に催奇形性を示唆する所見が認められた。一方で、化合物 X とは骨格構造の異なるバックアップ化合物 Y においては、催奇形性所見は認められなかった。よって、化合物 X 及びその類縁化合物で認められた所見は、薬効標的に起因するオンターゲット毒性ではなく、化合物の構造に起因するオフターゲット毒性であると推察された。

そこで、化合物 X で認められた催奇形性所見のなかでも高頻度かつ特徴的な所見に着目した毒性標的の探索を行い、化合物 X 及びその類縁化合物と化合物 Y のプロファイルを比較することで作用機序の検証を行った。既報での遺伝子欠損マウスやヒト変異のフェノタイプ、既存薬の催奇形性所見等の類似性から毒性標的となりうる候補因子は多く存在したが、標的候補因子の中でも特にソニックヘッジホッグ (Shh) 経路に着目した。細胞系により Shh 経路の阻害活性を評価した結果、化合物 X 及びその類縁化合物において、既存の Shh 阻害剤と同程度の強力な抑制作用を示した。一方、催奇形性が認められなかった化合物 Y の Shh 経路の阻害活性は、化合物 X の活性と比較し 4000 倍程度弱いものであった。並行して、化合物 X の催奇形性所見の臨界期を同定した後、臨界期に化合物 X を妊娠雌ラットに投与し、胎児での網羅的な遺伝子発現解析を実施し、その作用を確認した。その結果、化合物 X によって Shh シグナル関連遺伝子群の抑制が認められた。一方で、その他の催奇形性関連遺伝子には変動は認められなかった。以上、*in vitro* 及び *in vivo* における検討結果から、化合物 X の催奇形性の作用機序として、Shh シグナルの抑制が考えられた。

本発表では、化合物 X における胚・胎児発生毒性に関する我々の機序研究の事例の詳細や新たな化合物を見出すための試みを紹介する。



## ○横井 毅

名古屋大学大学院医学系研究科

薬物性肝障害(drug-induced liver injury, DILI)、特に idiosyncratic DILI に分類される被験薬の動物モデル作成には、従来 LPS(lipopolysaccharide)前投与によるストレス/炎症刺激が必要とされ、多くの研究がなされてきた。この試験系は、LPS 刺激反応機序類似の被験薬のみに適用でき、被験薬自身に起因する機序解析が困難な場合が多いことが知られている。我々は、反応生代謝物の除去能を減弱するために、GSH レベルを低下させた系や、CYP 誘導を考慮した投与方法による DILI モデルを報告し、免疫/炎症因子の関与情報を蓄積してきた。Pathway の検証として、抗 IL-17 抗体や TLR4 拮抗薬等の多くを駆使しても、いずれの DILI も完全に抑制することはできない。一方で、ハロタン(HAL)やトログリタゾン(TRO) DILI モデルは、LPS や GSH の系では作出できないことが知られている。ヒト肝細胞キメラマウスでも、GSH 低下試験系は、肝障害の増悪ではなく抑制される結果となる。我々は、HAL や TRO のいずれにおいても、Ryr2 (Ryanodine receptor 2)が全く別の経路として関与していることを見出した。カルシウム動態に注目したさらなる解析が必要である。

*In vitro* cell-based DILI 予測試験系の開発は、2005 年頃から HCA(high content analysis)を駆使した結果、高い感度(sensitivity)と特異性(specificity)が得られると報告されてきた。しかし、その後も開発における DILI 発症の問題が改善されないことから、試験系のさらなる改良が必要であると認識されている。我々は、被験薬を暴露する細胞に、HepG2、HepaRG やへパトサイトを用い、暴露培養液上清を、HL-60 細胞やヒト PBMC(末梢血単核細胞)と co-culture し、それらの細胞中の免疫/炎症を中心とした mRNA の変動を指標とした検出系を検討し、高い感度と特異性を得た。被験薬の数や分類が異なるために、HCA との比較は難しいが、idiosyncratic DILI 予測を改善した系であると考えている。さらに、同検出系によるヒト PBMC mRNA の網羅的発現変動を解析すると、サイトカインやケモカイン等の免疫/炎症関連以外の複数の因子もバイオマーカー候補になったことから、さらなる予測向上と新規の機序探索を目指している。

Idiosyncratic DILI を予測できない限り、開発における不安は払拭できない。Idiosyncratic DILI 発症において、intrinsic と同様に、反応性代謝物生成が initiation 反応として重要であることは異論がないと考えられる。しかし、initiation 反応から肝障害の病態が成立するまでの pathway については、従来の DAMPs に加えて、免疫/炎症因子の知識は蓄積されたものの、さらなる考察と研究が必要である。例えば、DILI マウスモデル作成時に、起因薬を投与後の比較的早い時間にラジカルを除去すれば、いずれの DILI も完全に抑えられることは、あまり報告されていない。先人の知恵の民間(草木由来)薬には、強いラジカル消去作用があるものも珍しくない。DILI の発症機序を再考し、idiosyncratic という分類が不要になることを目指したい。

○齋藤 嘉朗、今任 拓也、塚越 絵里、荒川 憲昭、中村 亮介

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

医薬品の重篤副作用は、概して発生頻度が低いものの重症化することが多く、死に至る場合もある。特に重症薬疹は、医薬品の被害救済制度において、収載数が最も多く、問題となっている。また、薬剤性間質性肺炎は、他国・地域に比して、本邦で発生率が高い医薬品が複数知られている。従って、我が国における医薬品の適正使用上、重要な副作用である。しかし両副作用は「特異体質性」とされ、医薬品の用量非依存性で予測や回避が難しいとされてきた。

重症薬疹に関しては、2004年に台湾よりカルバマゼピンによるスティーヴンス・ジョンソン症候群（SJS）発症に *HLA-B\*15:02* アレルが非常に強く関連している事が報告されると、多くの遺伝学的な関連解析の結果が報告されるようになった。現在までに、我々の知見を含め、アロプリノール、アバカビル、フェニトイン、サルファ剤等の十種程度の医薬品で、関連する *HLA* 型が報告されており、免疫学的な機序の関与が示されている。またフェニトインでは、解毒代謝酵素 *CYP2C9* の活性低下型遺伝子多型との関連も報告されており、医薬品の血中濃度上昇との関連も示唆された。重症薬疹の初期発症機序としては、医薬品分子に関し、1) *HLA* 分子やその抗原ペプチド等への共有結合による提示（ハプテン仮説）、2) *HLA* 分子や T 細胞抗原受容体への非共有直接結合による提示（p-i concept）、3) *HLA* 分子への直接結合による、本来とは異なる抗原ペプチドの提示、に関する報告がある、またこの提示を認識する T 細胞受容体のタイプに関しても、複数の報告がある。さらに皮膚傷害を起こす分子として、細胞障害性 T 細胞が放出するグラニューライシン等が知られており、また表皮細胞が壊死する機構としては、表皮細胞の formyl peptide receptor 1（リガンドは Annexin A1）を介するプログラムされたネクロシスであるネクロプトーシスの関与が明らかになっている。

一方、薬剤性間質性肺炎に関しては、その発症機序は十分には解明されていない。一般的には、細胞障害作用（医薬品自体やその活性代謝物等）とアレルギーという二つの機序が考えられている。前者は、抗悪性腫瘍薬のような細胞障害性薬剤によって肺の細胞自体が傷害を受けて生じるもので、後者は、医薬品やその代謝物に対する免疫反応が原因と考えられるものである。ゲフィチニブによる間質性肺炎が社会問題となった際、その関連する遺伝子多型の探索がなされたが、明確に関連する多型は見いだされなかったとの報告がある。最近、我々は日本人において薬剤性間質性肺炎発症と関連する *HLA* 型の探索を行い、*HLA-DRB1\*04:05* アレルとの有意な関連を認めた（Imatoh et al., *Pharmacogenomics J.* 2020; 20: 823–830）。またこの関連は、本 *HLA* 型がリスク因子である関節リウマチ患者を除いた症例集団の解析でも認められると共に、化学薬品による薬剤性間質性肺炎発症において関連が見られ、タンパク質医薬品による症例では認められなかった。各国における頻度情報を検討した結果、日本における *HLA-DRB1\*04:05* アレルの頻度は、パプアニューギニアと共に、世界で最も高いこと（保有者頻度：0.253）が明らかとなった。従って、日本人における薬剤性間質性肺炎発症と、*HLA-DRB1\*04:05* アレルとの関連が示唆され、本 *HLA* 型の高い保有者頻度が、薬剤性間質性肺炎の日本人における高い発症率の説明因子の一つである可能性が考えられた。さらに産学官共同研究で、タンパク質バイオマーカーの探索も行っており、有意な関連性を認めている分子もあるが、その機序は不明である。

本シンポジウムでは、医薬品による重症薬疹、間質性肺炎の発症機序について、発表者らの知見に加え、国内外の最新の報告を含めて紹介したい。

○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

医薬品化合物の代謝反応は一般的に解毒反応であるが、ときに、不安定で生体高分子に結合する反応性代謝物を生成し、様々な毒性を引き起こすことがある。頭痛や関節炎等の治療に用いられているメフェナム酸は副作用として胃腸障害の他に肝障害も報告されており、反応性代謝物キノニンミン体の関与が示唆されている。キノニンミン体は一般的にグルタチオン(GSH)抱合反応を受けて解毒されるが、細胞内の GSH が枯渇すると生体高分子と結合して細胞機能を低下させる。キノニンミン体を解毒するメカニズムとして、GSH 抱合反応の他に NADPH-キノンオキシドレダクターゼ 1 (NQO1)による *p*-アミノヒドロキシ体への還元反応も知られているが、NQO1 はヒト肝臓にほとんど発現していないため、キノニンミン体が関与する肝障害に対して防御的に働いていないと考えられる。当研究室では他にどのような代謝メカニズムがキノニンミン体生成制御に関与するか、メフェナム酸をモデル化合物として解析した。

メフェナム酸のキノニンミン体生成に関与するシトクロム P450 の分子種 CYP1A2 および CYP2C9 の発現系を含む反応系にヒト肝臓サイトゾルを添加するとキノニンミン体の生成が減少したことから、サイトゾル中にキノニンミン体解毒酵素が発現していると考えられた。そのタンパク質をヒト肝臓サイトゾルから精製した結果、スーパーオキシドジスムターゼ 1(SOD1)が単離・同定された。実際、上記反応系に SOD1 を添加すると、メフェナム酸のキノニンミン体生成は抑制された。このような SOD1 のキノニンミン体生成抑制効果はメフェナム酸以外のフェナム酸系 NSAIDs、フルフェナム酸やトルフェナム酸でも認められたが、アセトアミノフェン、アモジアキン、ジクロフェナクおよびラパチニブでは認められなかった。よって、SOD1 は薬物選択的にキノニンミン体生成を抑制することが考えられた。SOD1 をノックダウンし CYP1A2 を過剰発現させた HepG2 細胞で対照群と比較してメフェナム酸の細胞毒性が有意に高く認められたことから SOD1 はメフェナム酸のキノニンミン体生成量を減少させることにより細胞毒性を減弱することが示された。

上記解析より、P450 により生成する *p*-アミノヒドロキシ体代謝物からキノニンミン体への変換がスーパーオキシドによって促進され、それを SOD1 が除去することによって、キノニンミン体の生成が抑制されるメカニズムが考えられた。薬物の酸化反応を触媒するシトクロム P450 もスーパーオキシドを産生するが、ヒト肝臓ではキサンチンオキシダーゼ(XO)が効率的にスーパーオキシドを生成することが知られている。そこで、XO 発現系を作製し、CYP1A2 発現系とともにメフェナム酸とインキュベートしたところ、キノニンミン体生成量の増加が認められた。以上より、SOD1 はスーパーオキシドを除去することによって反応性代謝物の生成を抑制することでも解毒機能を示すことが明らかになった。現在、フェナム酸系薬物においても *p*-アミノヒドロキシ体からキノニンミン体への変換にスーパーオキシドが関与する例はあるのか探索中である。

## ○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

肝臓は生体におけるエネルギーの中心を担うため、ほかの臓器に比べミトコンドリアが豊富に存在する。また、米国の添付文書中で黒枠警告を示す薬物の多くがミトコンドリア毒性を有することが報告されてから (Dykens et al., *Drug Discov Today*. 2007)、ミトコンドリアに由来する毒性にも着目が当てられている。それに伴い、ミトコンドリア機能を簡便に評価する方法も開発された。その中でも近年はヒト肝がん由来細胞の HepG2 細胞を用いた glucose/galactose assay が盛んに行われ、既存薬物のミトコンドリア毒性に関するデータが集まってきた (竹村、伊藤、日薬理誌 2020)。

アセトアミノフェンによる肝障害では CYP2E1 で代謝された NAPQI がミトコンドリア毒性を有することが示されている (Jaeschke et al., *J Clin Transl Hepatol*. 2014)。代謝物依存的な毒性評価を行う際は、凍結初代ヒト肝細胞を用いた評価がゴールドスタンダードであるが、これは凍結保存によりミトコンドリアが損傷するため (Stephenne et al., *Cell Transplant*. 2007) ミトコンドリア毒性に適応できない。一方で HepG2 細胞では多くの代謝酵素が欠落しているため本細胞を用いた評価法では毒性発現における代謝物の寄与は評価できない。

これを克服するために、我々は人工染色体を用いてヒト主要 4CYPs を発現させた HepG2 (TC-HepG2) に着目した (Sato et al., *PLoS One*. 2017)。本細胞を galactose 含有培地で培養した際に CYP 活性を保持したまま解糖系の最終産物である乳酸産生量の低下を確認した。CYP により代謝を受け、ミトコンドリア毒性を有するロテノンに曝露したところ、galactose 培養した TC-HepG2 では毒性が軽減された。一方で未変化体および代謝物がミトコンドリア毒性を有するフルタミドに曝露したところ galactose 培養した TC-HepG2 にて毒性感受性が増強した。また肝障害マーカーの異常値で開発中止に陥った化合物を本試験系にて評価したところ、複数の化合物において代謝物依存的にミトコンドリア毒性を有する化合物を見出すことができた。これら知見から本評価法にて安価で簡便に代謝物依存的なミトコンドリア毒性を検出することが可能になったと考えられる。

TC-HepG2 ではすべての代謝酵素活性を有していないため、初代ヒト肝細胞の利用が望まれる。その点について我々は非凍結のヒト肝細胞である PXB-cells (フェニックスバイオ社) を galactose 培養することでミトコンドリアでのエネルギー産生へシフトさせることが可能になり、それに伴いミトコンドリア毒性感受性が増強すること報告した (Ikeyama et al., *Toxicol In Vitro*. 2020)。このような点も踏まえた発表を通して皆様とご議論を深めたいと考えている。

○荒川 大、玉井 郁巳

金沢大学医薬保健研究域薬学系

【背景・目的】薬物誘発性腎毒性 (DIKI)の発症は、薬物投与計画に大きな影響を及ぼし、患者の予後に影響を与える可能性があることから、早期の評価が重要となる。その発症においては、薬物の腎細胞内蓄積量とそれに続く細胞応答が関わることとなる。多くの *in vitro* 培養細胞では薬物の蓄積に重要な薬物トランスポーターの発現量が低いこと、さらには酸素供給が不足し、嫌氣的呼吸に依存した ATP 合成がなされているため、*in vivo* で観察される好氣的な細胞応答を再現できる環境にない。この課題を解決する方法として、私たちはラット腎臓組織のスライスを利用した毒性試験に着目した。腎臓組織スライスは、生体から単離した新鮮腎臓切片のため、生体と同等の薬物トランスポーター発現量を持つ。そのため腎臓組織スライスは従来から近位尿細管上皮細胞の血液側膜トランスポーターの機能解析に利用されてきた。腎臓組織スライスにおいては培養細胞系での課題が解決できると予測し、DIKI 評価系としての有用性について検討を行った。

【結果・考察】薬物の近位尿細管上皮細胞への蓄積には、血液側のみならず、刷子縁膜側のトランスポーターが重要な役割を果たす。そこで、腎臓スライスを用いることで刷子縁膜側トランスポーターの評価が可能か検討を行なった。その結果、Na<sup>+</sup>依存性グルコーストランスポーター-SGLTs などの複数のトランスポーター活性評価が可能であることが示された<sup>1, 2)</sup>。また腎臓組織スライスは、β酸化経路を中心とした好氣的呼吸により ATP 供給がなされていることもわかった。このような特性を利用し、DIKI 評価への有用性を調べた。肝臓で生成すると考えられる水溶性代謝物として diclofenac の acylglucuronide 体を腎臓組織スライスへ曝露したところ、濃度依存的に組織内 ATP 量が減少し、その 50%減少濃度は、親化合物 diclofenac より低い結果が得られた。したがって、acylglucuronide 体の臨床血中濃度が親化合物と同程度であることを考慮すると、diclofenac の腎毒性には親化合物のみならず acylglucuronide 体が関わる可能性が示唆された。さらに、DIKI の評価には長期的な曝露が望ましいことから、ガス透過が可能な poly(dimethylsiloxane)に着目し、本素材から成る酸素透過プレートを用いた腎臓組織スライスの培養方法の構築を試みた。その結果、通常の CO<sub>2</sub>インキュベーターで数日の培養でも一定程度の ATP 量が維持されるため、長期培養が可能であることがわかった。さらに、トランスポーターの介在が関与する cisplatin による細胞毒性を調べたところ、時間依存的かつ濃度依存的な組織内 ATP 量の低下が観察された。さらに、有機カチオントランスポーター-OCT2 阻害薬 cimetidine により cisplatin による ATP 減少作用は緩和された。また、培養期間内において OCT2 タンパク質の発現量が維持されていることも確認された。以上の検討から、トランスポーター介在性の DIKI を評価できる簡便なモデルとしてラット腎臓組織スライスが挙げられた。今後、ヒト初代近位尿細管上皮細胞などとあわせて評価を行うことで、ヒトにおける DIKI の詳細な *in vitro* 評価が可能になると期待できる。

【参考文献】

- 1) Arakawa H. *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **20**:253-259 (2020).
- 2) Arakawa H. *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**:12814 (2020).

○志津 怜太、吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

生態外異物応答性の核内受容体 pregnane X receptor (PXR)及び constitutive androstane receptor (CAR)は、肝に高発現し、異物に対する生体応答を担う転写因子である。両受容体は、シトクロム P450 をはじめ種々の薬物代謝酵素遺伝子の発現調節を担うため、その活性化は化学物質による酵素誘導作用として広く認められている。また、両受容体は、多くの共通した標的遺伝子を有し、類似した機能を示すため、異物に対する生体防御において協調的に機能すると考えられている。他方、CAR の活性化は、齧歯動物において肝細胞増殖を引き起こし、肝発がんプロモーション作用を示す。したがって、医薬品や農薬などの化学物質開発時に実施される齧歯動物を用いた発がん性試験において、CAR 活性化はしばしば肝がんを伴う。一方で、化学物質による PXR の活性化が CAR と同様に肝細胞増殖や肝がんを誘導するか否かはほとんど明らかになっていない。PXR 活性化が肝発がんを誘導するか否かは、安全性試験における PXR 活性化作用の理解につながる重要な情報であるとの考えから、近年、当研究室では、マウス肝における PXR 活性化の肝細胞増殖、肝発がんへの影響について研究を進めてきた。

マウスに CAR 活性化薬であるフェノバルビタール (PB) 又は TCPOBOP、並びに PXR 活性化薬である PCN をそれぞれ投与したところ、単回腹腔内投与 48 時間あるいは 1 週間給餌投与のいずれにおいても CAR 依存的な肝細胞増殖は認められたものの、PCN 投与に伴う肝細胞増殖作用は認められなかった。さらにジエチルニトロサミン (DEN) によるイニシエーションを併用した肝発がんモデルを用い、PB 及び PCN の 35 週間の投与により、CAR 及び PXR 活性化の肝発がんへの影響を調べたところ、PB 投与群では明らかな肝がん所見が認められたが、PCN 投与群では肝がんは認められなかった。

さらに、両受容体活性化薬の複合的曝露の影響を調べるため、両受容体の活性化薬をマウスに併用投与したところ、興味深い結果が得られた。すなわち、PCN の併用投与は CAR 依存的な肝細胞増殖に対して増強作用を示し、CAR 依存的な肝細胞増殖の亢進と、投与 20 週後における肝がん前癌病変巣の増加を誘導したのに対して、35 週間投与により CAR 依存的に生じた肝がんに対しては、PCN の併用投与は病巣の数及びサイズを減少させ、PXR の活性化は肝がんの進行を抑制することが示唆された。

以上の結果とこれまでに当研究室で得られた知見から、PXR の活性化は、単独では、肝細胞増殖、肝発がんを誘導しないが、他の増殖シグナルに対する肝細胞の感受性を亢進させること、しかし、肝がんの進行に対して抑制的に働くことが明らかになった。本講演では、これらの PXR による調節機構の機序を紹介するとともに、核内受容体 PXR と肝がん研究の展望についても議論したい。

#### 【参考文献】

1. Shizu R, Ishimura M, Nobusawa S, Hosaka T, Sasaki T, Kakizaki S, Yoshinari K, Arch Toxicol., 2020.
2. Shizu R and Yoshinari K, Expert Opin Drug Metab Toxicol., 16, 343-351, 2020.
3. Abe T, Shizu R, Sasaki T, Shimizu Y, Hosaka T, Kodama S, Matsuzawa A, Yoshinari K, J Pharmacol Exp Ther, 371, 590-601, 2019
4. Yoshimaru S, Shizu R, Tsuruta S, Amaike Y, Kano M, Hosaka T, Sasaki T, Yoshinari K, J Toxicol Sci, 43, 443-450, 2018
5. Shizu R, Abe T, Benoki S, Takahashi M, Kodama S, Miyata M, Matsuzawa A, Yoshinari K, Biochem J, 473, 257-266, 2015.
6. Shizu R, Benoki S, Numakura Y, Kodama S, Miyata M, Yamazoe Y, Yoshinari K, PLoS One, 8, e6180, 2013.

○安藤 智広

Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社、統合トランスレーショナル研究

【背景・目的】 ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織は、病理所見に強く紐づけられた検体であり、その検体における網羅的タンパク質の発現量変動解析は、それら所見の発生機序または層別化解析に有用である。この発現量評価手法としては、抗体や核酸アプタマーを用いた多重リガンド結合アッセイ技術も考えられるが、評価タンパク質の網羅性から、特に、質量分析技術を用いたショットガンプロテオミクス解析に注目が集まっている。一方で、本解析技術の FFPE 組織への応用には、取得データ品質の低さという課題が存在する。FFPE 組織では、ホルマリン固定に起因する、検体中タンパク質の化学的修飾がランダムに生じる結果、タンパク質の酵素消化および、消化ペプチドのアミノ酸配列同定が妨害され、新鮮凍結組織検体に比べ、取得データのタンパク質網羅性および、発現量定量性の低さが懸念される。本演題では、その解決方法の一つとして、filter aided sample preparation (FASP)法<sup>1</sup>による消化不良ペプチドの除去、安定同位体標識ペプチド<sup>2</sup>によるアミノ酸配列同定の補助を解析へ応用し、その効果を検証した。

【方法】 FFPE ラット肝組織検体を、FASP 法で酵素消化、mTRAQ 標識の上、内部標準であるブール新鮮凍結ラット肝組織と混合し、LC/MS によるデータ依存性スキャンに供した。取得された MS データから mascot 検索によるペプチド同定、ピーク面積値による内部標準との相対評価を行い、従来法との比較を行った。さらに、構築した手法を用いて、phenobarbital 投与ラットにおける肝代謝酵素の発現量変動を、新鮮凍結および FFPE 肝組織間で比較した。

【結果・考察】 FASP および安定同位体標識法を組み込んだ結果、従来法に比べ、FFPE 肝組織からの同定タンパク質種数が 20%増加し、1 µg protein から約 2400 種が同定された。これは、同量の新鮮凍結肝組織からの同定タンパク質種数の 85%である。さらに、本法によるタンパク質発現量評価の妥当性検証を目的に、同一個体から調製されたラット新鮮凍結または、FFPE 肝組織検体間で、phenobarbital による代謝酵素発現量変動を比較した。その結果、全検体共通で 24 種の薬物代謝酵素の相対発現量情報を取得した。これらの相対発現量の新鮮凍結 - FFPE 肝組織検体間での相関係数は 0.936 と良好であった。

以上より、FFPE 組織検体を用いた質量分析技術によるプロテオミクス解析は、新鮮凍結組織検体と同様にタンパク質発現量変動評価が可能であり、タンパク質網羅性も迫る事が明らかとなった。本法を用いることで、病理所見が観察された FFPE 組織検体中で生じているタンパク質発現量変動を網羅的に評価する事が可能となり、所見自体または、その発生機序の理解に有用な情報を得る事ができる。

## 【参考文献】

1. Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **6**, 359–362 (2009).
2. Oppermann, F. S. *et al.* Comparison of SILAC and mTRAQ quantification for phosphoproteomics on a quadrupole orbitrap mass spectrometer. *J. Proteome Res.* **12**, 4089–4100 (2013).

○渡辺 健一、只野 純、吉沢 佑基、福田 幸祐、栃谷 智秋、山田 統一郎、高山 早代、  
中川 徹也、宮脇 出

大日本住友製薬株式会社 前臨床研究ユニット

創薬研究において、投与薬物および内因性代謝物の組織内分布の情報は薬効および毒性評価の観点で重要である。通常、組織内分布の評価は、組織全体をホモジネートし、LC/MS/MSにて定量する方法が一般的ではあるが、対象組織での空間的な情報が消失してしまうため、組織内分布として把握することが困難となる。また、組織を部位毎に採取し、各々をホモジネートする方法も報告されているが、多大な労力/時間を要することから、簡便にスクリーニング的に評価できる手法ではない。

そこで我々は、組織切片上の物質をイオン化することで組織内分布情報を確認できるイメージング質量分析 (IMS : Imaging Mass Spectrometry) 技術に着目し、組織切片上の物質をイオン化し、高い空間分解能で組織分布情報を確認できる Matrix Assist Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)を用いた組織切片の測定法に取り組み、創薬研究への活用を進めている。

近年のイメージング質量分析法の装置および測定技術の向上に伴い、測定可能な分子の幅は増大している。薬物だけでなく、神経伝達物質、アミノ酸、核酸塩基、エネルギー代謝物質、脂肪酸、リン脂質、糖脂質、中性脂肪、コレステロール、ペプチド、蛋白質、金属原子など、数多くの内因性由来の分子に関する測定が試みられている。これら分子は創薬研究上の意図決定の際に重要となるバイオマーカーの候補でもあり、我々も MALDI-IMS を用いて、これら分子の部位特異的な変動を指標とした薬理評価やバイオマーカー探索研究を実施している。また、毒性研究へのイメージング質量分析の活用事例も増加しており、ターゲット分子もしくはノンターゲット分子の組織内分布を評価する“Molecular Histology”の考えによる薬物の毒性評価や毒性機序の理解や毒性バイオマーカーの探索への活用も始まっている。

本シンポジウムでは、我々のデータや経験、世間動向を紹介し、IMSの毒性評価を含めた創薬活用について議論したい。



○前川 敏彦、鍛冶山 咲良、井上 愛優

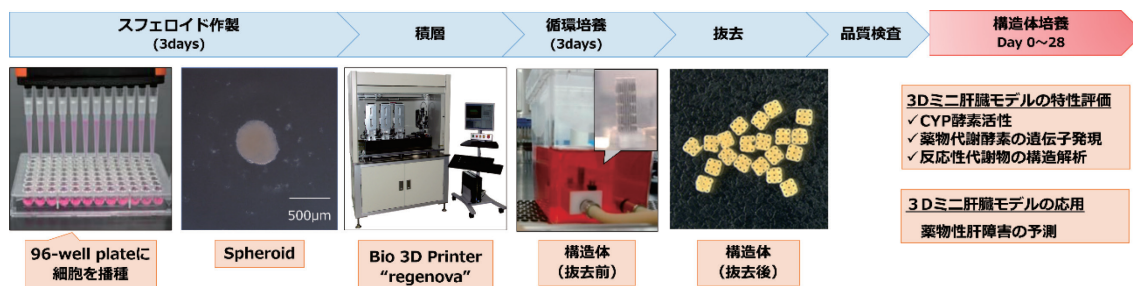
株式会社サイフューズ 研究開発部

## 【要旨】

薬物の肝毒性評価、薬物代謝機構解明、肝臓疾患のモデルなど、*in vitro* のヒト肝臓モデルの用途は広い。代表的な評価系として平面（2次元）培養のヒト初代培養肝臓細胞が使われてきているが、短期間で代謝活性が低下するなどの課題があり、培養培地の改良や3次元培養系の検討などが報告されてきた。我々は、自社で開発したバイオ 3D プリンタを用いて作製したヒト肝臓細胞のみからなる大きさ 1 mm 程度の三次元肝臓構造体（3D ミニ肝臓）のヒト肝臓モデルとしての有用性を評価してきた。本報告では、その特性の特徴について概説するとともに、薬物性肝障害（DILI）評価に応用した結果を報告する。

## 【3D ミニ肝臓の作製法】

ヒト凍結初代肝細胞とヒト肝星細胞からなる直径 500  $\mu\text{m}$  程度の細胞塊（スフェロイド）を作製した後、ニードルアレー（「剣山」）上に複数のスフェロイドを積層した。積層状態で培養を数日行い、スフェロイド同士が融合して1つの組織体になったことを確認後にニードルアレーから抜去して細胞のみからなる 3D ミニ肝臓を作製した。積層プロセスはバイオ 3D プリンタによってスフェロイドを正確に規定された位置に配置することが自動的に行われ、均質・大量の 3D ミニ肝臓を製造することが可能である。



## 【3D ミニ肝臓の特性評価】

主要な特徴として、1ヶ月の長期培養ができる、ヒト肝臓に類似した代謝機能を有する、肝臓の線維化に関与する肝星細胞を含有している、薬物暴露に応答して培地中にエクソソームを分泌する、が挙げられる。薬物代謝機能に関しては、第1相から第3相に関与する複数の遺伝子発現量が1ヶ月培養後も高い水準を維持されていた。また、non-CYP代謝酵素の遺伝子発現も持続する特徴を有していた。こうした特徴を活かし、培地上清を分析することで3Dミニ肝臓の培地に添加した薬物の3Dミニ肝臓内部での代謝反応を容易に解析することができた。また、培地上清からはエクソソームを回収でき、その内部のマイクロRNAを定量することも可能であった。以上から3Dミニ肝臓がヒト肝臓代謝機能を模倣した評価モデルとしての特性を有していることがわかった。

## 【3D ミニ肝臓の毒性評価への応用】

FDAが報告するDILI化合物を培地に添加し約2週間の評価を行った。肝細胞生存率の低下、アルブミン分泌量の低下に加えて、マイクロRNAの分泌量上昇が観測される薬物も見られた。特にマイクロRNAは、生存率やアルブミン分泌の変化が見られない化合物に対しても応答する可能性があることがわかった。高い確度の薬物毒性の検出や毒性の機序解明に有用と考えている。

○伊藤 晃成、青木 重樹

千葉大学大学院薬学研究院

ゲノムワイド相関解析から、特異体質毒性発症と HLA 多型の関連性が注目されている。HLA 多型保有者では非保有者に比べ、確かに毒性発症のオッズ比が高まるものの、陽性的中率は必ずしも高くなく、他の未知要因も無視できない。HLA が全身に発現するにも関わらず、皮膚などの特定組織に発症が集中する理由も不明である。これらの謎を解くためのツールとして、我々は HLA 遺伝子導入マウスモデルを用いた研究を進めている。

アバカビル過敏症は HLA-B\*57:01 多型保有者の約半数で発症し、特に皮膚での症状が特徴的である。B\*57:01 はアバカビルとの直接結合により搭載ペプチドレパートリーが変化し、CD8 陽性 T 細胞がこれを非自己と認識して活性化することが毒性の機序とされている。我々が作成した B\*57:01 多型導入マウスでは、アバカビル投与により免疫細胞学的な反応性は見られるものの、皮膚での所見はそれほど顕著ではなく、臨床症状の再現としては不十分であった。検討を重ねた結果、CD4 の中和抗体、ならびに免疫チェックポイント分子である PD1 欠損の条件を追加することで、より強い免疫細胞学的な反応、ならびに CD8 陽性 T 細胞の浸潤を伴う皮膚での毒性所見が再現できた。HLA 多型以外のリスク要因として、例えばこれら免疫抑制系の個人差が関与する可能性がある。

アバカビル過敏症が皮膚で好発する機序を解明する目的で、多型導入マウスより単離した初代ケラチノサイト (KC) を用いた解析も進めている。これまでに、初代 KC レベルでの多型依存的なアバカビルに対する急性の細胞応答と、その下流で樹状細胞が活性化される現象を見出している。一方、この現象は初代肝細胞では認められていない。抗原提示の段階で HLA 多型特異的、かつ細胞種特異的な応答が見られることは興味深く、毒性発現の組織指向性の機序を一部説明できる可能性がある。上記の急性応答には小胞体ストレスの関与を示唆する実験データを得ているほか、B\*57:01 多型は陰性対照で 2 アミノ酸のみが異なる B\*57:03 多型と比較して構造的に不安定であること、細胞表面での発現形態にも両者で違いが見られることも別の解析から確認している。小胞体内における B\*57:01 多型のフォールディング～成熟過程の特殊性が、アバカビルに対する KC の初期応答、ひいては CD8 陽性 T 細胞の浸潤を伴う皮膚での過敏症発症につながっている可能性があると考え、現在さらなる検討を進めている。

HLA 多型導入マウスは、B\*57:01 多型とアバカビルの組み合わせ以外にも適用可能である。HLA 多型以外の未知リスク要因探索に有用であるほか、時系列ならびに全身を網羅した比較解析が可能であり、“特異体質 (機序不明) “毒性の機序解明に少なからず貢献するものと期待している。

○小野田 淳人<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 <sup>2</sup>名古屋大学大学院 医学系研究科 小児科学

1959年、リチャード・ファインマンが提唱した仮説「原子を一つずつ扱う技術」に端を発するナノテクノロジーは、20世紀終盤におけるフラーレン、カーボンナノチューブなどのナノマテリアルの発見を経て、急速に発展を続ける科学技術である。ナノマテリアルの誕生は、その「小ささ」ゆえに発揮される独自の特性や機能により、従来の材料では不可能であった新製品や新技術の開発を可能にした。医薬・生命科学分野も例外ではなく、ナノマテリアルは薬物輸送の担体や生体応答の可視化技術への応用、ひいては新規治療法や早期診断技術の確立に貢献すると期待されている。その医療応用に向けて解決すべき課題が、未知なる物性を持つナノマテリアルの安全性である。本発表では、ナノマテリアルの毒性評価とその機序解明に向けた研究を通じて得られた知見と、ナノマテリアルの生体適合性の向上に成功した先行研究を紹介する。

我々は、これまでにナノマテリアルの生殖発生毒性や発達神経毒性を中心に解析を進めてきた。妊娠期間中に曝露されたナノマテリアルの一部は、生体に備わる各種関門を通過し、胎児の脳や肝臓等の器官に移行することが明らかにされている。特に、大気環境と労働衛生の観点から、ナノスケールの物質によって胎児や新生児に生じる脳発達異常が国際的に強く危惧され、2016年米国毒性学会では、ナノマテリアルにまつわる毒性研究の最優先事項の一つとして、児の発達神経毒性の調査が挙げられた。我々はその研究を通じて、胎仔期に曝露されたナノマテリアル（使用したものはカーボンブラックナノ粒子と二酸化チタンナノ粒子）は、①仔の脳実質組織に移行し、その粒子表面でタンパク質の構造変化を引き起こす ②構造変化したタンパク質は脳血管周辺に排出・集積され、小胞体ストレスを介した脳血管周辺異常を誘導する ③その脳血管周辺の異常は発達期の脆弱な介在神経を傷害し、最終的に脳機能や行動に異常をきたす といった、ナノマテリアルが脳発達に悪影響を及ぼす Adverse Outcome Pathways の一端を明らかにした。これは、ナノマテリアルの表面と生体分子の相互作用によって生成した異常物質が、細胞や組織の形態と機能に悪影響を及ぼす可能性を示した初めての報告である。

この研究は一例に過ぎないが、ナノマテリアルの表面は生体分子と相互作用が生じる場であり、表面相互作用は、そのナノマテリアルの毒性を左右する中心的な因子である。事実、ナノマテリアルの毒性を議論する際に考慮すべき物性は、粒径分布（一次粒径と二次粒径）、形状、構成元素、比表面積、可溶性など多岐にわたるものの、その中でも表面特性こそが、毒性発現を制御するうえで重要であると主張する研究は多い。特に、ナノマテリアルの表面特性はその表面に吸着する生体分子のプロファイル（バイオコロナ）に大きな影響を与える。興味深いことに、同じナノマテリアルであっても、吸着する分子のプロファイルが異なることで、異なる体内動態や細胞毒性を示すことが明らかになっている。また、毒性を理解する上では、粒子の分散性も考慮すべきであり、この分散性は粒子表面の性状に強い影響を受ける。こうした毒性学的知見と Safer by design の概念に基づき、表面特性を制御することで、より安全な新奇ナノマテリアルの開発が進められている。例えば、非イオン性界面活性剤である Pluronic F127 による表面コーティングは、カーボンナノチューブの単分散性を向上し、細胞取り込み、炎症反応、細胞毒性を減少させることが報告されている。このような表面特性の制御は、構成元素や形状などの物性と比較し、コーティング分子を用いた表面修飾や機能化によって柔軟にコントロールできることも利点であり、医療応用に向けたナノマテリアルの設計においても、効果的な手法の一つであると考えられる。

以上より、ナノマテリアルの毒性発現機序において、その表面と生体分子の相互作用が一つの鍵となることが示唆された。その表面の特性を制御することは、生体適合性の高い新奇ナノマテリアルの開発に繋がると期待される。

○原 崇人

東邦大学 薬学部 衛生化学教室

有機骨格構造に金属が導入された有機金属化合物および錯体分子（有機-無機ハイブリッド分子）は、それらを構成する有機化合物や無機金属とは異なる活性を発揮しうる。Grignard 試薬はその代表例であり、有機-無機ハイブリッド分子は化学において一つの領域を築き上げ、今や必要不可欠なものとなっている。しかしながら、反応試薬として注目されるあまり、有機-無機ハイブリッド分子の生物学への応用は遅れ、それに対する生体応答については長らく不明のままであった。我々は、有機-無機ハイブリッド分子を活用したバイオロジーをバイオオルガノメタリクスと呼び<sup>1)</sup>、主に培養細胞を用いてその解析を行っている。

ビスマスとアンチモンは共に 15 族に属する金属元素であり、無機ビスマスは次硝酸ビスマスとして医薬品で用いられる一方で、無機アンチモンは古くから毒性が認められてきた。我々は、複素八員環ビスマス化合物 *Bi-phenyl-N-methyl-5,6,7,12-tetrahydrodibenz[c,f][1,5]azabismocine* (PMTABi) が培養血管内皮細胞に対する極めて強い細胞傷害性を示すのに対し、その中心金属がアンチモンで構成される *Sb-phenyl-N-methyl-5,6,7,12-tetrahydrodibenz[c,f][1,5]azastibocine* (PMTAS) では細胞傷害性が消失することを見出した<sup>2)</sup>。このことは、有機-無機ハイブリッド分子の毒性は、それを構成する金属元素の毒性では単純に議論することができないことを示しており、有機-無機ハイブリッド分子の毒性学として新たに体系づけられる必要性を訴えるものである。

本発表では上述の PMTABi と PMTAS に加え、16 族に属する金属元素から有機セレン化合物 *diphenyldiselenide* および有機テルル化合物 *diphenylditelluride* の細胞傷害性についても取り上げる。これら有機-無機ハイブリッド分子の構造活性相関研究を通じて明らかとなった、各化合物への置換基の付加が細胞内蓄積量および細胞傷害性に及ぼす影響について紹介する。

1) Fujie *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, 41, SP81-SP88, 2016

2) Kohri *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, 40, 321-327, 2015

○高橋 祐次<sup>1</sup>、森田 紘一<sup>1</sup>、辻 昌貴<sup>1</sup>、菅 康佑<sup>1</sup>、相崎 健一<sup>1</sup>、大久保 佑亮<sup>1</sup>、種村 健太郎<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> 東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野

#### 【背景・目的】

現在、医薬品の安全性評価に際しては急性毒性試験の重要性は低下しており、致死性を評価指標とする試験は必要とされていない。一方、医薬品以外の化学物質において、急性毒性試験は依然として重要な位置をなしており、げっ歯類を用いた半数致死量(Lethal Dose, 50% : LD<sub>50</sub>)は、GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)における化合物の分類とラベリング、日本においては「毒物及び劇物取締法」の判定基準に利用されている。動物の「死亡」をエンドポイントとする急性毒性試験は、動物福祉の観点からも批判の強い毒性試験である。そのため、時代と共に簡便化され、信頼区間を絞った LD<sub>50</sub> を求める必要はなくなり使用動物数が削減されている。しかしながら、指標は動物の「死亡」のままであり、死因、標的臓器等その内容は一切考慮されていないため、ヒトの中毒治療に有用ではないとの批判がある<sup>1)</sup>。我々は、ヒトの安全性確保に主眼を置いた新規急性経口投与毒性試験方法の開発するため、急性毒性の指標を「死亡」からより精緻な「複数のバイタルサイン」に置き換え、化合物の毒性強度を「統計学」を背景とした「半数致死量」から「診断学」を基盤に「概略の致死量」へ転換を図ることを目的とした研究を進めている。

#### 【方法】

近年、人の医療において導入されているウェアラブル測定機器に着目し、これに新素材のセンサーを組み合わせ、バイタルサイン測定を基盤とした急性毒性試験の近代化に取り組んでいる。並行して、急性毒性発現時の生体影響を網羅的な遺伝子発現変動解析により、バイタルサインの妥当性を考察している。この試験方法を構築するためのモデル化合物として、テトロドトキシンをモデル化合物としてラット（投与用量：100, 300, 500 µg/kg）に投与しバイタルサインを測定した。マウス（投与用量：0, 30, 100, 300 µg/kg）Percellome法<sup>2)</sup>を用いた中枢（海馬）及び肝における網羅的遺伝子発現変動解析を行った。

#### 【結果・考察】

テトロドトキシン投与により、一過性の体温上昇、心拍数及び血圧低下がみられた。網羅的遺伝子発現変動解析においては、グルココルチコイド、糖新生に関する非常に多くの遺伝子を発現させており、標的がナトリウムチャンネル選択的と考え難い結果であった。急性毒性試験においても、多く情報を取得することにより、ヒトの中毒対策が可能になると考えられる。また、バイタルサインを含む一般状態観察は毒性試験の基本技術であるが、習得に多くの経験を要し伝授が難しい技術である。毒性試験の実践的経験が減少する昨今、熟練者が有する暗黙知を数値化して形式知に変換することにより、次世代の研究者にとっても有用な情報になり得る。

#### 【参考文献】

1. Chapman K, Creton S, Kupferschmidt H, et al. The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: a cross-discipline consensus. Regul Toxicol Pharmacol 2010;58:354-9.
2. Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays, BMC Genomics2006, 7:64

(厚生労働科学研究費補助金による)

## ○松下 幸平

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

腎臓は化学物質による毒性の主要な標的臓器であるが、中でも尿細管は最も傷害を受けやすい細胞である。尿細管は再生能力を有しており、尿細管障害による急性腎障害（AKI）が生じた際には、尿細管再生により腎臓の構造および機能は修復される。一方、この再生機構が破綻した場合には、尿細管は線維化促進能を獲得して慢性腎臓病（CKD）へ進展する。CKDは不可逆的な病態であるため、近年このAKI to CKDという概念が注目されている。病態の可逆性は化学物質の毒性を考慮する上でも重要な要素であるため、腎障害の慢性化メカニズムの解明および予後の予測指標の確立は、安全性評価の観点からも意義のあるものと考えられる。

再生過程にある尿細管は「再生尿細管」として毒性病理学分野ではよく知られており、一般毒性試験においてもしばしば遭遇する所見である。我々はこれまで、雌性F344ラットに腎虚血再灌流（I/R）処置を施して作製したAKIモデルラットにおいて、再生尿細管をレーザーマイクロダイセクション（LMD）により採取し、マイクロアレイを実施して遺伝子発現プロファイルを明らかにした（*Toxicol. Sci.*, 2018）。発現変動を示した遺伝子群のうち、尿細管の再生機構およびその破綻に関わると考えられる因子を抽出し、免疫染色にてそれらの発現を確認した。その結果、がん幹細胞マーカーとして知られるCD44が再生機構の破綻した拡張/萎縮尿細管に発現していることを示した（*J. Appl. Toxicol.*, 2020）。

引き続き、雄性SDラットにI/R処置を施してAKI to CKDモデルラットを作製し、免疫染色によりCD44の発現動態を詳細に検討した。その結果、CD44は再生機構の破綻した尿細管において特異的に発現しており、その発現は尿細管傷害の直後から線維化に至るまで持続することが明らかとなった。さらに再生機構の破綻した尿細管をLMDにて採取し、マイクロアレイおよびパルスウェイ解析を実施した結果、CD44は細胞外基質の産生に関わる複数の遺伝子発現を誘導していることが示唆された。以上より、CD44は線維化誘導因子としてCKDの病態形成に早期から関与していると考えられた。

今回の発表ではこれらの研究成果を紹介し、安全性評価への応用の可能性など今後の展望について議論したい。

## 企業シンポジウム 1

### Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社

#### 創薬初期ステージにおける遺伝毒性評価の重要性 ～最新の遺伝毒性スクリーニング試験のご紹介～

○吉田 唯真、松本 朱美、原田 裕美子、高砂 浄

Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社

統合トランスレーショナル研究 Discovery DMPK and Toxicology

##### 【紹介内容】

種々の安全性評価項目の中で、遺伝毒性は適応疾患領域に関わらず開発の Go/No go 判断に大きなインパクトを及ぼす毒性として知られています。そのため、製薬企業では創薬初期ステージから遺伝毒性ポテンシャルを種々のアッセイ系でスクリーニングしますが、採用されるアッセイ系は遺伝毒性ガイドライン試験と異なり各社様々で、試験方法・結果の解釈・最適なスクリーニング戦略等は企業のノウハウとして蓄積されるものの、公の場で議論される機会は少ない状況にあります。そこで本セミナーでは、Axcelead が提供する創薬初期ステージ向けの遺伝毒性スクリーニング戦略について、具体的な実用例を踏まえてご紹介します。

## 企業シンポジウム 2

Mimetas Japan 株式会社

### 組織培養チップ OrganoPlate®を使った疾患・毒性研究

○江尻 洋子

Mimetas Japan 株式会社

血管や複数の臓器を 1 つのチップ上に再現させる生体機能チップ (Organ-on-a-chip) の登場により、生体内の生理現象を *in vitro* でより高度に再現できるようになった。MIMETAS 社に代表されるような操作性・スループット性を持ち合わせた実用レベルの製品が開発され、創薬開発の現場で利用されるようになってきた。本講演では MIMETAS 社が開発した Organ-on-a-Chip、製品名: OrganoPlate®を利用した研究事例を紹介する。



## 企業シンポジウム 3

### 株式会社フェニックスバイオ

#### ヒト肝細胞キメラマウスを通じて考える-生命維持と毒性機序-

○加国 雅和<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>株式会社フェニックスバイオ

<sup>2</sup>KMT Hepatec, Inc.

ヒトの毒性を検討する目的で利用されている様々な試験系は、いずれもヒトと何らかの点において同一または類似する生物学的活動を行っている。「有害な生物学的影響を誘発する物質に固有の性質」と称されている「毒性」を検討することは、被験物質による生物学的活動の変化が「無害」か「有害」か判断するための情報を集める活動と言い換えることができ、この活動を成立させる前提は、毒性を検証する対象である試験系が生物学的活動を行っていること、すなわち生命を維持していることと言える。

生命維持という点において、当社が生産する **PXB** マウスはユニークな特徴を持っている。その特徴は、**PXB** マウスがマウス肝細胞の 70%以上をヒト肝細胞に置換された状態を維持して半年以上生存することが出来る点である。**PXB** マウスが生命維持できることは、ヒト肝細胞とその他のマウス組織・器官・細胞が協調関係を成立させていることを意味しており、それらの協調関係の詳細を知ることは、**PXB** マウスを毒性機序の解明目的に利用するための基礎となる。

今回のシンポジウムでは、**PXB** マウスを用いた過去の文献情報を整理し、ヒト肝細胞とその他のマウス組織・器官・細胞の協調関係について情報を提供する。



要旨

ポスター発表

P-1\*

## エタノールの発達期曝露によるラットの出生後の海馬歯状回における可逆的な神経新生障害と、成熟後における遅発影響としての新生顆粒細胞のシナプス可塑性の低下

○高橋 康徳<sup>1,2</sup>、山下 理紗子<sup>1</sup>、菊地 聡美<sup>1,2</sup>、岡野 拓<sup>1,2</sup>、高嶋 和巳<sup>1,2</sup>、尾城 椋太<sup>1,2</sup>、唐 倩<sup>1,2</sup>、吉田 敏則<sup>1,2</sup>、渋谷 淳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東京農工大・獣医病理学研究室

<sup>2</sup>東京農工大・院・共同獣医学専攻

【背景】我々は海馬神経新生が発達神経毒性の高感度エンドポイントであることを報告してきた。エタノール (EtOH) は妊婦のアルコール摂取によって生じる子供の中枢神経発達障害を含む胎児性アルコールスペクトラム症候群のリスクを高めることが知られている。げっ歯類モデルにおいても、発達期曝露により記憶・認知障害や脳の発達異常を起こすことが知られているが、病態出現の機序に関する詳細は明らかではない。本研究では、ラットに対して EtOH を OECD の試験ガイドライン No. 426 (発達神経毒性試験) に従い、着床後から授乳期を通じて発達期曝露し、児動物において海馬歯状回 (DG) で生後に始まる神経新生への影響を検討した。

【方法】妊娠 SD ラットに EtOH を 0, 10, 12.5% (v/v) の濃度で妊娠 6 日目から分娩後 21 日目 (PND 21) まで飲水投与した。離乳時となる PND 21 に母動物と雄児動物の半数を剖検し、脳採材および脳重量の測定を行った。残りの児動物について被験物質を含まない飲料水により飼育し、成熟後のタイミングである出生後 77 日目 (PND 77) に剖検を行った。PND 21、PND 77 とも雄児動物を対象として免疫組織化学解析用の個体には 4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液により灌流固定を実施し、遺伝子発現解析用の個体には脳重量を測定後、メタカーン固定を実施した。免疫組織化学的解析では、DG の顆粒細胞層下帯/顆粒細胞層 (SGZ/GCL) における顆粒細胞系譜の神経新生マーカー、シナプス可塑性関連遺伝子、及び歯状回門における各種の GABA 性介在ニューロンマーカー等の陽性細胞の分布について検索した。また、障害に関連する神経新生関連因子 (コリン作動性・グルタミン酸作動性入力、神経成長因子制御系、細胞増殖制御系、アポトーシス制御系など) に関して、q-RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。

【結果】PND 21、PND 77 どちらにおいても、母動物および児動物の絶対脳重量に変化は認められなかった。児動物の免疫組織化学的解析においては、PND 21 で SGZ/GCL において両用量群で SOX2 陽性細胞が増加し、高用量群で doublecortin 陽性細胞が減少したが、GFAP 陽性細胞 (type-1 神経幹細胞)、TBR2 陽性細胞、TUBB3 陽性細胞、NeuN 陽性細胞数は変動しなかった。また、SGZ において高用量群で細胞増殖マーカーの PCNA 陽性細胞が増加した。門部においては高用量群で GFAP 陽性アストロサイトが増加し、GABA 性介在ニューロンでは高用量群で somatostatin 及び calretinin 陽性細胞が増加し、reelin 陽性細胞が減少傾向を示した。PND 77 では、顆粒細胞系譜、GABA 性介在ニューロンの各細胞数には変動を認めなかったが、高用量群でシナプス可塑性に関連して GCL における c-FOS 陽性顆粒細胞が減少した。遺伝子発現解析においては、PND 21 で *Gfap* および AMPA 型グルタミン酸受容体遺伝子の発現が増加しており、PND 77 ではシナプス可塑性関連遺伝子および AMPA 型グルタミン酸受容体遺伝子の発現低下を認めた。

【考察】EtOH のラット発達期曝露は、高用量影響として曝露終了時に未成熟顆粒細胞への分化障害を認め、神経新生に機能する reelin シグナルの減少の関与が示唆された。また、代償性に type-2a 神経前駆細胞への増殖促進を認め、それには calretinin 陽性介在ニューロンシグナルによる somatostatin 陽性介在ニューロンシグナルの増強を介した神経新生増強の関与が示唆された。また、遅発影響として成熟後におけるシナプス可塑性の低下が示唆された。

○岡野 拓<sup>1,2</sup>、高嶋 和巳<sup>1,2</sup>、高橋 康德<sup>1,2</sup>、尾城 椋太<sup>1,2</sup>、唐 倩<sup>1,2</sup>、菊地 聡美<sup>1,2</sup>、  
小柳 美穂子<sup>3</sup>、吉田 敏則<sup>1,2</sup>、渋谷 淳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東京農工大・獣医病理

<sup>2</sup>東京農工大・院・共同獣医学専攻

<sup>3</sup>三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

【背景】周産期感染症は子供の脳発達障害を引き起こすことが知られ、lipopolysaccharide (LPS)のげっ歯類への発達期曝露は酸化ストレスの増加を伴う神経炎症を誘導し、種々の脳傷害を引き起す脳発達障害モデルとなっている。 $\alpha$ -Glycosyl isoquercitrin (AGIQ)は優れた水溶性及びバイオアベイラビリティを示し、抗酸化作用に加え抗炎症作用を示す。本研究では、新生ラットに LPS を単回投与することで誘発される神経炎症の海馬成体神経新生に与える影響と共に、AGIQ の持続投与による保護効果の有無を検討した。

【方法】妊娠ラットを対照群、LPS 群、LPS + 0.25% AGIQ 群、LPS + 0.5% AGIQ 群に分け、AGIQ を母動物に妊娠 18 日から分娩後 21 日まで、児動物に離乳時（生後 21 日：PND 21）から成熟時（PND 77）まで混餌投与し、LPS を PND 3 の児動物に 1 mg/kg の用量で単回、腹腔内投与した。PND 21 及び PND 77 に雄児動物の海馬歯状回の顆粒細胞層下帯（SGZ）／顆粒細胞層（GCL）における神経新生指標ならびに細胞増殖活性や、歯状回門における GABA 性介在ニューロン指標やグリア指標について免疫組織化学的に解析した。

【結果】PND 21 では、LPS 群で SGZ/GCL における NeuN<sup>+</sup>の未熟ないし成熟顆粒細胞のみが減数したが、LPS + 0.5% AGIQ 群で回復した。歯状回門では LPS 群で PVALB<sup>+</sup>介在ニューロンと GAD67<sup>+</sup>介在ニューロンが減数したが、LPS + AGIQ の両群では回復傾向を示した。PND 77 では、LPS 群で SGZ/GCL における DCX<sup>+</sup>顆粒細胞と TUBB3<sup>+</sup>顆粒細胞が減数、SGZ の PCNA<sup>+</sup>細胞と歯状回門の GAD67<sup>+</sup>介在ニューロンが増数したが、LPS + 0.5% AGIQ 群で DCX<sup>+</sup>顆粒細胞と TUBB3<sup>+</sup>顆粒細胞、PCNA<sup>+</sup>細胞数は回復ないし回復傾向を示した。歯状回門部のグリア指標について、PND 21 で Iba1<sup>+</sup>ミクログリア、CD68<sup>+</sup>M1 ミクログリア及び GFAP<sup>+</sup>アストロサイトが LPS 群で増数したが、AGIQ 群で回復ないし回復傾向を示した。CD163<sup>+</sup>M2 ミクログリアも LPS 群で増数したが、LPS + 0.5% AGIQ 群では更に高値傾向を示した。PND 77 の各グリア指標に有意な変化はみられなかった。

【考察】離乳時の LPS 群での NeuN<sup>+</sup>顆粒細胞の減数は、神経幹細胞及び神経前駆細胞数に変動を認めなかったことから、LPS の未熟ないし成熟顆粒細胞を標的とした傷害性が示唆された。また、ミクログリアやアストロサイトが増数したことから、上記の神経新生障害に対する神経炎症の関与が示唆された。成熟時にはミクログリアやアストロサイトの数が正常に復したため、神経炎症は終息した可能性があるが、今後の炎症性メディエーターや酸化ストレス指標の探索結果を待って判断する。離乳時の LPS 群での PVALB<sup>+</sup>介在ニューロン及び GAD67<sup>+</sup>介在ニューロンの減数は、成熟後の顆粒細胞系譜における DCX<sup>+</sup>細胞や TUBB3<sup>+</sup>細胞の減少の原因となった可能性が示唆された。AGIQ は介在ニューロンに対する保護作用を早期から発揮することで神経新生障害の改善に寄与した可能性が示唆された。その機序として、炎症時ミクログリアの M1（傷害型）から M2（保護型）への極性転換による抗炎症作用が示唆された。

## ラットに対するバルプロ酸の胎生期投与による海馬神経新生障害性の検討と、それに対する $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin の保護効果

○高嶋 和巳<sup>1,2</sup>、菊地 聡美<sup>1,2</sup>、岡野 拓<sup>1,2</sup>、高橋 康德<sup>1,2</sup>、尾城 椋太<sup>1,2</sup>、山下 理紗子<sup>1</sup>、唐 倩<sup>1,2</sup>、小柳 美穂子<sup>3</sup>、吉田 敏則<sup>1,2</sup>、渋谷 淳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>東京農工大・獣医病理学研究室

<sup>2</sup>東京農工大・院・共同獣医学専攻

<sup>3</sup>三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

【背景】発達神経障害の発症リスクを高める環境要因として母体の化学物質曝露があり、妊婦による抗てんかん薬バルプロ酸（VPA）の服用が自閉症の発症リスクを増大させることが疫学的に報告されている。実験動物においても、VPA の発達期曝露は、児動物の認知機能や情動行動に影響を及ぼし、自閉症様の行動異常を引き起こすことが報告されており、その病態への酸化ストレスの関与が示唆されている。一方、認知、学習及び記憶形成において重要な役割を果たしている海馬では、生後に形成される歯状回の顆粒細胞層下帯で神経新生が行われている。この成体神経新生は、神経細胞の発達過程の全てを網羅しているため、発達神経障害物質の標的となる可能性が高く、VPA の発達期曝露による発達神経障害の病態に関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では、海馬神経新生に着目し、ラット VPA 誘発自閉症モデルにおける神経新生障害及びその標的性について検討するとともに、抗酸化物質として優れた水溶性及びバイオアベイラビリティを示すイソクエルシトリン混合物である  $\alpha$ -glycosyl isoquercitrin (AGIQ) を用い、当該モデルに対する保護効果について検討した。

【方法】妊娠ラットを対照群、VPA 群、VPA+0.25% AGIQ 群及び VPA+0.5% AGIQ 群の 4 群に分け、妊娠 12 日に VPA 500 mg/kg 体重（対照群は生理食塩液）を単回、腹腔内投与した。AGIQ は、妊娠 13 日から分娩後 21 日まで母動物に、以降は児動物に混餌投与した。生後 21 日（PND 21）及び PND 63 に雄児動物の海馬歯状回の顆粒細胞層下帯（SGZ）／顆粒細胞層（GCL）における顆粒細胞系譜の神経新生指標とその増殖活性、及び歯状回門における GABA 性介在ニューロン指標の陽性細胞数を免疫組織化学的に解析した。

【結果】PND 21 では、VPA 群で対照群に比して、SGZ/GCL における SOX2 陽性細胞数及び doublecortin (DCX) 陽性細胞数が減少したが、GFAP 陽性細胞数、TBR2 陽性細胞数、TUBB3 陽性細胞数、NeuN 陽性細胞数及び増殖活性に変動は認められなかった。歯状回門では、VPA 群で対照群に比して somatostatin (SST) 陽性細胞数及び calretinin (CALB2) 陽性細胞数が増加したが、reelin 陽性細胞数、palvalbumin 陽性細胞数及び GAD67 陽性細胞数に VPA 投与による変動は認められなかった。一方、AGIQ 群では、SGZ/GCL における神経新生指標のうち DCX 陽性細胞数のみが両用量群で VPA 群に比して増加し、0.5% AGIQ 群ではさらに歯状回門における reelin 陽性細胞数が増加した。PND 63 では、VPA 投与の各群に神経新生指標の変動は認められなかった。

【考察】VPA の発達期単回投与は、幼若期に type-1 神経幹細胞から type-2a 神経前駆細胞への分化と type-2b から type-3 神経前駆細胞への分化を標的とした神経新生抑制を誘発した。SST 陽性細胞の増加は代償性の反応を示唆し、CALB2 陽性細胞は抑制性ニューロンの機能調節に機能することから、CALB2 陽性細胞の増加は SST 陽性細胞の増加に随伴した変化であると考えられた。一方、AGIQ は VPA による神経新生障害を軽減し、それには reelin シグナルの増加に起因する神経前駆細胞の増幅が関与することが示唆された。VPA の胎生期単回投与は、生後の動物の認知機能や情動行動に影響を及ぼすことが報告されているものの、海馬の神経新生自体への影響は可逆的であると判断された。

○岩崎 紘<sup>1</sup>、神尾 恭平<sup>1</sup>、桐畑 佑香<sup>1</sup>、西本 朋弘<sup>1</sup>、木下 幸之助<sup>1</sup>、中西 豊<sup>1</sup>、  
佐々木 稔<sup>2</sup>、若松 正樹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大正製薬株式会社 安全性・動態研究所

<sup>2</sup>大正製薬株式会社 シニアスペシャリスト室

【背景・目的】抗うつ薬として開発されていた TP0446131 のイヌ 13 週間反復経口投与毒性試験において、投与期間終了時の眼科学的検査で水晶体混濁が認められた。本検討では、TP0446131 による水晶体混濁について、眼科学的及び病理組織学的にキャラクタライゼーションを行うとともに、血液及び水晶体皮質の生化学的解析を行い、水晶体混濁の発現機序について検討した。

【方法】投与開始時 7~9 ヶ月齢の雄ビーグル犬に、TP0446131 の 30~100 mg/kg の用量を単回、2 週間又は 13 週間反復経口投与した。眼科学的検査及び血液生化学的検査を経時的に実施するとともに、水晶体混濁の発現時及び各投与期間の終了時に眼組織を採取し、病理組織学的検査、水晶体皮質の生化学的解析（糖質、抗酸化マーカー、LC-MS/MS を用いたコレステロール類縁物質の測定を含む）を実施した。一部の動物では、眼科学的に水晶体混濁が認められた時点で 18 週間の休薬期間を設け、その回復性について検討した。また、ラットについても投与開始時 6 週齢の雄 SD 及び有色（Long-Evans）ラットに、TP0446131 の 150 mg/kg を 2 週間反復経口投与し、イヌと同様に血液及び水晶体皮質の生化学的解析を実施した。

【結果・考察】イヌでは、眼科学的検査において投与 8 週以降に水晶体赤道部の混濁が認められた。水晶体の混濁域は投与 12~13 週までに水晶体全体に拡大し、眼科学的検査では眼底像が不明瞭な状態となった。投与 8~9 週の眼科学的検査で初期病変が認められた直後に休薬した動物でも水晶体混濁の進行が認められたが、極初期の段階で休薬した 1 例では、進行の程度が緩やかであった。病理組織学的検査では、水晶体混濁は皮質における水晶体線維の変性として観察された。投与 8~9 週に休薬し、18 週間の休薬期間を設定した動物では、水晶体上皮及び水晶体囊直下に正常な水晶体線維が認められたが、その内側の水晶体皮質領域に変性した水晶体線維が観察された。TP0446131 を投与したイヌの血清及び水晶体皮質中のコレステロール及びその前駆物質であるデスモステロールには明らかな変動は認められなかったが、血清及び水晶体皮質においてコレステロールの類縁物質と推定される 3 成分の増加が認められた。これらのことから、TP0446131 はコレステロール合成系に何らかの影響を与え、これが水晶体混濁の発現に関わっている可能性が考えられた。コレステロール類縁物質と推定される 3 成分は、水晶体混濁の発現に先行して血清で増加していたことから、TP0446131 により誘発される水晶体混濁の予測バイオマーカーとなる可能性が考えられた。なお、ラットでは 13 週間反復経口投与においても水晶体混濁は認められていないが、2 週間の反復経口投与によって血清及び水晶体皮質中のコレステロール類縁物質の増加が認められた。

○石井 雄二、中村 賢志、並木 萌香、高須 伸二、小川 久美子

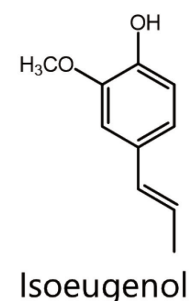
国立医薬品食品衛生研究所 病理部

【背景・目的】アルケニルベンゼン化合物は様々なハーブに含まれる香気成分で、その一部は香料として食品添加物や化粧品等に用いられている。我々はこれまでにアルケニルベンゼン化合物のうち齧歯類に肝発がん性を示すエストラゴール、メチルオイゲノール、サフロール及びエレミシンが *in vivo* において DNA 付加体を形成し、遺伝子突然変異を誘発することを明らかにしてきた。さらに、これらの遺伝毒性の発現にはプロペニル基の 2'、3'位に二重結合が必要であること、プロペニル基の *p* 位の水酸基は遺伝毒性を抑制することを見いだした。イソオイゲノールは、プロペニル基の 1'、2'に二重結合を有し、その *p* 位には水酸基を有することから（下図）、遺伝毒性を示さないと推察されるが、雄性マウスにおいて肝発がん性が報告されている。本研究ではイソオイゲノールの肝発がん性についてヒトへの外挿性の有無を明らかにするため、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* マウスを用いてその機序を検討した。

【方法】雌雄 6 週齢の B6C3F1 系 *gpt delta* マウスにイソオイゲノールを 150、300 または 600 mg/kg 体重の用量で 13 週間強制経口投与し、腹部大動脈から採血後、肝臓を採取した。血清生化学検査では肝毒性パラメーターの検索を行った。肝臓は重量を測定した後、一部を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン切片に HE 染色を施し病理組織学的検索を行った。残りの肝臓は液体窒素により凍結した後、-80°C で保存し、*gpt assay* および *Spi assay* による変異原性の検索、LC-MS/MS による網羅的 DNA 損傷解析、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析に供した。

【結果】雄性マウスでは高用量群において体重増加抑制が認められ、肝臓の実重量は中間用量群から、相対重量は低用量群から有意に増加した。血清生化学検査では ALP が低用量群から、ALT が高用量群において有意に上昇した。病理組織学的検索の結果、高用量群では軽度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。一方、雌マウスでは高用量群でのみ肝臓の相対重量の有意な増加が認められたものの、血清生化学検査、病理組織学的検索において投与に伴う変化は認められなかった。*gpt assay* および *Spi assay* の結果、雌雄ともに肝臓において変異頻度の変化は認められなかった。網羅的 DNA 損傷解析の結果、雌雄ともに DNA アダクトームマップ上においてイソオイゲノール投与に起因する特異的なスポットは検出されなかった。網羅的遺伝子発現解析において対照群に比べて 2 倍の発現変動が認められた遺伝子を抽出した結果、雄性マウスでは雌性マウスに比べ約 2 倍の遺伝子が発現上昇し、パスウェイ解析の結果から雄性マウスでは PPAR $\alpha$  および  $\gamma$  の活性化が示唆された。

【考察】肝臓において突然変異頻度の変化および DNA 付加体形成が認められなかったことから、イソオイゲノールの肝発がん性に遺伝毒性機序の関与は乏しいと考えられた。本結果は、我々がこれまでに明らかにした遺伝毒性を有するアルケニルベンゼン化合物の化学的特徴を支持するものであった。一方、雄性マウスの高用量群では軽度の肝細胞肥大と肝毒性示唆する変化が認められ、網羅的遺伝子発現解析では PPAR $\alpha$  および  $\gamma$  の活性化が示唆されたことから、イソオイゲノールの肝発がん性にはげっ歯類特異的な発がん機序で知られる PPAR 活性化が寄与する可能性が考えられた。





## びまん型胃がん及び腸型胃がんにおける上皮間葉転換に関連した細胞周期チェックポイント制御及びBRCA1の役割について

○田邊 思帆里<sup>1</sup>、Sabina Quader<sup>2</sup>、小野 竜一<sup>3</sup>、Horacio Cabral<sup>4</sup>、青柳 一彦<sup>5</sup>、  
広瀬 明彦<sup>1</sup>、横崎 宏<sup>6</sup>、佐々木 博己<sup>7</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> 公益財団法人 財川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター

<sup>3</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>4</sup> 東京大学大学院 工学系研究科

<sup>5</sup> 国立がん研究センター 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>6</sup> 神戸大学大学院 医学研究科

<sup>7</sup> 国立がん研究センター 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

【背景・目的】分子ネットワーク活性化状態は多様な疾患と生体状況により変化する。がん幹細胞においては、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) ネットワークが抗がん剤耐性及びがん転移の観点から重要な役割を果たしていることが知られている。上皮間葉転換とがん幹細胞における分子パスウェイネットワークを明らかとするため、胃がんの中でも上皮間葉転換様の性質を有するとされるびまん型胃がん、腸型胃がんの遺伝子発現プロファイルを比較解析した。

【方法】公開データベース cBioPortal for Cancer Genomics 上のびまん型胃がん及び腸型胃がんに関する RefSeq 公開データを用いて、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 及び Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 等による分子ネットワーク解析を実施した。

【結果・考察】びまん型胃がん、腸型胃がんにおいて有意差のある遺伝子群として同定された 2815 ID を用いた IPA による分子ネットワーク解析により、細胞周期や G<sub>1</sub>/S チェックポイント制御に関する経路がカノニカルパスウェイとして抽出された。IPA による活性化予測によると、びまん型胃がんにおいて Cell Cycle: G<sub>1</sub>/S Checkpoint Regulation パスウェイの活性化が予測され、腸型胃がんにおいて Cyclins and Cell Cycle Regulation パスウェイの活性化が予測された。Cell Cycle: G<sub>1</sub>/S Checkpoint Regulation パスウェイにおいては、DNA ダメージが p53 を誘導しており、びまん型胃がんにおける活性化が予測されていた。腸型胃がんにおいて、DNA ダメージ応答における BRCA1 の役割に関するカノニカルパスウェイが活性化しており、G<sub>1</sub>/S 移行に関連する BRCA1 が上昇していた。以上の結果から、びまん型胃がんにおける上皮間葉転換においては細胞周期制御の変化が生じている可能性が考えられる。

### 【参考文献】

1. Tanabe, S., Quader, S., Cabral, H., and Ono, R. (2020) Interplay of EMT and CSC in cancer and the potential therapeutic strategies. *Front. Pharmacol.* **11**:904. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00904>
2. The Cancer Genome Atlas Research Network., Analysis Working Group: Dana-Farber Cancer Institute., Bass, A. *et al.* Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**, 202–209 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13480>
3. Tanabe, S., Aoyagi, K., Yokozaki, H., and Sasaki, H. (2014). Gene expression signatures for identifying diffuse-type gastric cancer associated with epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. of Oncol.* **44**, 1955–1970. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2387>