

要旨

特別講演
教育講演

特別講演

全身全細胞解析の実現にむけて

○上田 泰己^{1,2}

¹ 東京大学 大学院 医学系研究科

² 理化学研究所 生命機能科学研究センター

細胞から個体の階層におけるシステム科学的アプローチを実現するために、我々は成体組織を丸ごと透明化し1細胞解像度で観察できる技術の開発に取り組んだ。我々が開発したCUBIC法は、脂質や血液を豊富に含む組織をアミノアルコールによる脱脂除去・色素除去作用により透明化することで、マウス成体全身の透明化を世界で初めて実現した。さらに、1600個の水溶性化合物のプロファイリングにより組織透明化の各プロセスに重要な官能基を明らかにし、まさに「組織透明化の化学」を現在確立しつつある。組織透明化の基盤を確立するとともに生命科学・医科学への応用も進んでいる。具体的には、高解像度のライトシート顕微鏡の開発に取り組み、取得した10TBを超えるイメージをGPUで高速に処理し、臓器に含まれる約1億個もの細胞を全て解析する全細胞解析を世界で初めて実現した。全細胞解析で得られた標準臓器に、各条件でのデータをマップし、同一領域の細胞活動を直接比較する手法の開発にも成功している。講演では、脳や各種臓器を用いた全細胞解析が、解剖学・生理学・薬理学・病理学などの医学の各分野に対して今後なしうる貢献について議論したい。

参考文献

1. Susaki et al. *Cell*, 157(3):726–739 (2014).
2. Tainaka et al. *Cell*, 159(6):911–24 (2014).
3. Susaki et al. *Nature Protocols*, 10(11):1709–1727 (2015).
4. Susaki and Ueda. *Cell Chemical Biology*, 23(1):137–157 (2016).
5. Tatsuki et al. *Neuron*, 90(1):70–85 (2016).
6. Tainaka et al. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32:713–741 (2016).
7. Kubota et al. *Cell Rep.*, 20:236–250 (2017).
8. Nojima et al. *Scientific Reports*. 9269 (2017).
9. Murakami et al. *Nat. Neuroscience*, 21:625–637 (2018).
10. Tainaka et al. *Cell Report*, 24:2196–2210 (2018).
11. Mano T et al. *J. Neurosci.*, 38(44):9330–9337 (2018).
12. Matsumoto et al. *Nat. Protoc.*, 14:3506–3537 (2019).
13. Ueda et al. *Nat. Rev. Neurosci.*, 21(2):61–79 (2020)
14. Ueda et al. *Neuron*, 106(3):369–387 (2020).
15. Susaki et al. *Nat. Commun.*, 11(1):1982 (2020).

教育講演

エピジェネティクス入門 ―その分子基盤から臨床応用まで―

○仲野 徹

大阪大学大学院医学系研究科・病理学

ヒトゲノムが解読され、がんをはじめとする医学研究に大きな進歩をもたらしました。しかし、ゲノムだけですべてが決定されるわけではありません。というのは、ゲノム上の遺伝情報がいかにして読み出されるかが、さまざまな生命現象や疾患の発症においてきわめて重要だからです。そのために、ゲノムに上書きされた情報が存在しています。それがエピジェネティクスです。

いきなり重要といわれても「エピジェネティクス」などという言葉は聞いたことがない、とおっしゃる方が多いかもしれません。エピジェネティクスがその重要性の割に知られていないのには訳があります。エピジェネティクスの定義が「DNA の塩基配列の変化を伴わずに、染色体における変化によって生じる、安定的に受け継がれうる表現型である」と、すこしわかりにくいのです。

エピジェネティクスは、1950 年代に、発生や細胞分化という基礎生物学から考え出された概念です。しかし、いまでは、アサガオの縞模様といった植物の現象や、ストレス応答、ネズミの一夫一妻制といった社会行動においても重要な役割を果たすことがわかってきています。それだけではありません、がんや生活習慣病、精神疾患といったさまざまな病気の発症にも関与しています。さらに、エピジェネティクスを操作する薬剤も開発され、実際に臨床で用いられています。

これからの医学を理解するためには、エピジェネティクスは必須科目です。すこしとっつきが悪いかもかもしれませんが、この講演を通じて、ぜひエピジェネティクスを介した新しい生命像をのぞきみてください。

<参考図書>

仲野 徹 『エピジェネティクス 新しい生命像をえがく』(岩波新書 2014 年)

要旨

シンポジウム 企業シンポジウム

○瀬藤 光利^{1,2}

¹ 浜松医科大学 国際マスイメージングセンター

² 浜松医科大学 医学部 細胞分子解剖学講座

新薬の開発においては、レギュラトリーサイエンスの概念の元、長い期間と多大な費用をかけてその有効性、安全性を担保していくことになる。開発段階において候補化合物が薬効を示すには、標的臓器・器官・組織に適切な量が到達（分布）している必要があり、逆に必要量以上の化合物に当該臓器あるいは標的ではない臓器が曝露されると、毒性が発現してしまうことにもなりかねない。

現在、毒性・安全性試験では、医薬品等の被験物質を投与した動物の尿・血液採取さらには臓器等を摘出し、各種の検査を実施することにより、その毒性を評価している。尿・血液検査でも主要臓器における毒性評価は可能となっているが、最終判断に大きく寄与しているのは病理組織学的検査であろう。しかしながら、当該検査は、経験を積んだ鏡検者が標本観察する必要があり、さらに時間も相当かかることから新薬開発速度の向上に対してネックとなっている。

また、薬効・薬理試験においても、現状では血液等を用いて原末あるいは活性化体（代謝物）の血中濃度を解析したり、臓器等のホモジネート中濃度を LC/MS で測定したり、RI 標識化合物を用いた手法などから薬物分布・薬効や安全性を評価しているが、時間がかかるのみならず当該化合物の臓器等での分布をイメージとして捉えることはできていない。

新しい手法として、質量分析イメージング（Mass Spectrometry Imaging : MSI）技術が注目されてきており、ここ数年で大きく発展してきている。これは、標的臓器等の組織を薄切した組織切片上の分子をイオン化し、質量分析計でイオンのシグナル強度を測定するものである。その後、画像解析（二次元画像）を経て目的とする化合物の組織中での局在を可視化することができる。さらに本手法では放射性同位元素標識体の作製は不要であること、原末、代謝体、各種抱合体そして様々な生体成分も同時に測定が可能であることなど、大きな利点を持っている。これらの事から、毒性・安全性試験では毒性発現メカニズムの解明等の新たな手法として、また、薬効・薬理試験では PK（pharmacokinetics）及び PD（pharmacodynamics）の次世代解析ツールとして期待が高まっている。

このように MSI は大きな注目を集めているが、国際的な普及とレギュラトリーサイエンスへの応用には手法や処理、解析に関して共通性の高い規格の標準化が不可欠である。我々は ISO/TC201/WG4 に参画し、MSI をはじめとしたバイオ材料の表面分析に関する標準化に参画。これまでに、試料の取り扱いに関する企画として ISO20579 を成立させ、現在もサンプル輸送等の規格の標準化確立を目指している。

その、レギュラトリーサイエンスに関連した動きも国内外でオープンになってきている。国内では、国立がん研究センターの事業において「医薬品開発における質量分析イメージング技術利用に関するリフレクションペーパー」が取りまとめられた。また、海外では、米国 FDA で本年 5 月に開催された FDA Science Forum の中で、The National Center for Toxicological Research (NCTR) 所属の専任研究者が候補医薬品の毒性を理解するための有用なアプローチとして MALDI を用いた手法の確立に関する発表“MALDI Imaging Mass Spectrometry: A New Imaging Modality for Use in Toxicological Studies”がなされたところである。

本日は、MSI のメリット、デメリットさらには将来展望を含めてお話しする予定である。

○藤井 雄太、吉野 有香、千原 和弘、宮脇 出

大日本住友製薬株式会社 前臨床研究ユニット

医療の診断において、非侵襲的あるいは低侵襲的な検査方法として、生体組織を可視化する in vivo イメージング技術が広く利用されている。X 線（レントゲン）のほか、X 線-CT (X-ray computed tomography : CT)、ポジトロン断層法 (PET) や核磁気共鳴イメージング (MRI)、超音波 (Echo)、単一光子放射断層法 (SPECT) 等々、様々な技術が開発・活用されている。一方、動物を用いた評価では侵襲的な検査が可能であることから、病理検査が毒性の最終判断の多くを担っている。しかしながら、生体内で経時的な変化を経て顕在化する毒性を病理検査で評価していくことは難しい。この課題を解決しうる手法として、当社では生体イメージング技術の中でも磁気共鳴画像 (MRI) と磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) に着目している。MRI は生体内を非侵襲的に撮像できることから、個体別に病態の進展を経時的にモニターできる。さらに MRI の手法の一つである MRS は物質によって共鳴周波数に違いが生じることを利用して、MRI 画像にて特定した部位における組織中の微量物質を定量評価することができる。加えて、MRI/MRS は有用性とその応用範囲の広さから多くの医療現場で利用されているため、非臨床と臨床を繋ぐトランスレーショナルな検査手法となり得ることを期待している。

当社では、上記を期待し、薬剤性脂肪肝及び薬剤性血管炎に対する検討を行っている。これらの毒性はいずれも特異的で鋭敏なバイオマーカーが存在せず、臨床試験におけるモニタリングが困難であることから、医薬品開発での大きな問題となっている。

本講演では、主な生体イメージング技術の毒性評価への応用について概説するとともに、上記脂肪肝および血管炎の MRI/MRS を用いた検討結果についても紹介する。

○青木 重樹、伊藤 晃成

千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室

医薬品による副作用には、特定の遺伝子や環境が関係した特異体質薬物毒性が存在する。特異体質薬物毒性は発症頻度こそ低いものの、時として死亡するリスクもあることから、臨床上無理することができない重要な問題である。近年、特異体質薬物毒性の発症リスクとヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen; HLA) 多型との関連が多数報告されている。例えば、HLA*B-57:01 多型を有する患者では、アバカビルによる薬物過敏症やフルクロキサシリンによる肝障害、HLA-B*15:02 多型を有する患者では、カルバマゼピンによる SJS/TEN などの発症リスクが報告されている。しかし、その発症機序に関しては未解明な点が多く、我々は HLA 遺伝子導入マウスを用いて、HLA 多型と特異体質薬物毒性発症の因果関係の実証、およびそのメカニズムの解明に取り組んでいる。

ヒトで起こる HLA 依存的な反応をマウスで再現するために、導入する HLA の一部をヒトからマウスの遺伝子に置換し、HLA としての機能を保ちつつマウスの免疫細胞が認識可能なキメラ型 HLA としてマウスに導入した。ここでは、アバカビルによる薬物過敏症と関連する HLA-B*57:01 遺伝子導入マウス (B*57:01-Tg) について述べる。

B*57:01-Tg の耳介にアバカビルを塗布したところ、細胞傷害性を示す CD8⁺ T 細胞の BrdU 取り込みの亢進や IL-2、IFN- γ といった Th1 サイトカインの発現上昇が認められた。これらは、陰性対照の B*57:03-Tg (HLA-B*57:03 は B*57:01 と 2 アミノ酸のみ異なる) では認められなかったことから、HLA 多型特異的な薬物応答をマウスで再現できる可能性が示唆された。しかし、アバカビルを継続的に投与し続けても、免疫の活性化は観察されるもののヒトで認められるような顕著な毒性症状にまでは至らず、何かしら毒性発症を抑えている要因があるのではないかと考えられた。

そこで着目したのが抑制性の免疫に関与する寛容系である。実際に、アバカビルを投与し続けた B*57:01-Tg の CD8⁺ T 細胞上で PD-1 の発現量が有意に上昇することが確認され、免疫寛容系が毒性の惹起に対して抑制的にはたらく可能性が示唆された。そこで、B*57:01-Tg を PD-1 のノックアウトマウスと掛け合わせ (B*57:01-Tg/PD-1^{-/-})、さらに抑制性の免疫に関与すると考えられる CD4⁺ T 細胞を抗体を用いて除去し、アバカビルの投与を行った。その結果、CD8⁺ T 細胞の顕著な活性化 (細胞傷害顆粒に含まれる Perforin や Granzyme などの発現上昇) と皮膚の発赤などに代表される毒性症状が認められた。よって、HLA 依存的な薬物毒性には、免疫の活性化に加えてその抑制系もかかわっており、免疫のバランスが破綻することで毒性発症に至ると考えている。

本発表では、B*57:01-Tg 由来の細胞を用いた HLA と薬物との相互作用によって起こる自然免疫応答に関する最近の研究成果も説明し、それが毒性発症に与える影響についても議論する予定である。単に HLA と T 細胞受容体との相互作用のみではなく、リスクのある HLA が発現した細胞内で起こる特徴的なイベントも毒性惹起に重要な役割を担う可能性を見出しており、併せて紹介したい。

S1-4

染色体工学技術によるヒト化モデル動物・多機能細胞の作製と創薬研究への応用

○香月 康宏

鳥取大学 染色体工学研究センター

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

S2-1

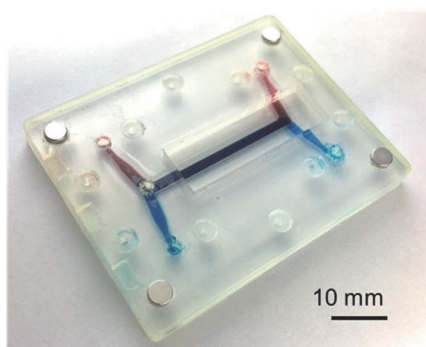
マイクロ工学を基盤技術とする生体模倣システム（MPS）とその応用

○木村 啓志

東海大学 工学部 機械工学科／マイクロ・ナノ研究開発センター

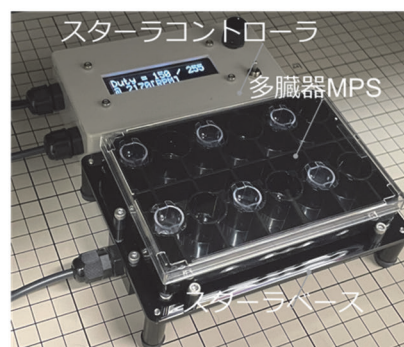
近年、マイクロ流体デバイス技術によって実現される Organ-on-a-chip をはじめとする生体模倣システム (Microphysiological System: MPS) を創薬現場で利用する試みが世界的に進められている⁽¹⁾。医薬品業界では実験動物とヒト間の種差を克服するために、動物実験に代わる新たな in vitro 試験系が望まれていたことがその背景にある。マイクロ流体デバイスを細胞培養に応用する場合、従来の細胞培養ウェアでは難しい機械的な刺激の付加や化学的な刺激の時空間制御などが可能となり、細胞機能の維持・向上を実現することができる。また、MPS と様々な検出系と組み合わせることによって、細胞アッセイの自動化・ハイスループット化なども期待できる。米国では 2012 年頃から多額の公的資金を投じて MPS 開発研究が進められ、最近ではメガファーマが積極的に MPS 技術を利用し始めている状況である。欧米諸国では多くの MPS 関連ベンチャー企業が立ち上がり、すでに複数の企業から実用的な製品が販売されている。我が国における MPS の実用化研究は欧米諸国の取り組みからやや出遅れていたが、2017 年に AMED（国立研究開発法人日本医療研究開発機構）で、MPS 開発研究事業が立ち上がり、産官学連携による MPS 製品化体制が整えられた。本事業の特徴は、MPS の製品化を目指して、アカデミアだけでなく製造企業や製薬企業から多くの研究者が参画するコンソーシアムが形成されているところである。この施策が奏功し、本事業の最終年度となる 2021 年度には、演者が開発中のものも含めて製品化が見込まれる MPS が複数存在している状況である。我々の研究グループは、図 1 に示す複数の MPS の事業化に携わっている。Fluid3D-X は多孔膜によって仕切られる上下層流路を有するマイクロ流体デバイスであり、多孔膜上で上皮細胞を培養することで膜型臓器モデルとして物質輸送を評価することができる。オンチップポンプ型多臓器 MPS は 2 つの 24 穴サイズの細胞培養ウェルがマイクロ流路で連結された多臓器培養ユニットを有しており、異なる臓器間の相互作用を評価できる細胞培養システムである。本講演では、MPS の概要と、演者らが開発中の MPS の評価として実施している薬効毒性試験についての内容を紹介する。

● Fluid3D-X (多孔膜上下灌流型チップ)



東京応化工業（株）との共同開発

● オンチップポンプ型多臓器MPS



住友ベークライト（株）との共同開発

図 1. AMED-MPS 事業内で製品化を目指して開発中の MPS

【参考文献】

1. Kimura H, Sakai Y, Fujii T (2018) Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. Drug Metabolism and Pharmacokinetics 33, 43-48.

○天野 雄斗

花王株式会社 安全性科学研究所

近年、化学物質の安全性評価における非動物系での評価戦略が盛んに議論されている。しかしながら、全身毒性は、作用機序が複雑であるため単一の非動物系での評価が困難であり、標準化された手法は確立していない。最近では、欧米を中心に、統合的評価アプローチ（IATA）に代表される複数の手法を組み合わせた非動物系が提唱されているものの、そもそも懸念される毒性を予測しにくい新規開発候補物質においては、どのような手法を組み合わせるべきかという評価戦略の構築は困難であり、評価初期の毒性機序推定の重要性が高まっている。従来の毒性予測手法としては、化学構造から毒性を予測する定量的構造活性相関（QSAR）が普及しているが、本手法は生物学的作用情報を使用しないため、毒性機序について十分な示唆を与えるものではない。また、機序に注目した予測手法として、毒性に関連する標的分子への作用を評価する手法もあるが、適用範囲が限定的であり毒性の見落としが懸念される。一方、化学物質の標的タンパク質や、*in vitro* 試験データ、毒性等に関する様々なデータは、年々蓄積されてきており、それらの活用によって、従来法の課題を解決する網羅性の高い作用機序ベースの毒性予測ができるのではないかと期待されている。

今回、我々は、毒性発現の起点となる化学物質と標的タンパク質との相互作用情報を活用した副作用予測モデルの構築を検討した。その結果、推定された未知の相互作用情報を予測に活用することによって、既存技術の予測精度を改善しうる可能性を見出した。さらに、各予測モデルにおいて予測結果への寄与の高いタンパク質を対象にエンリッチメント解析を行うと、それぞれの生理機能や副作用との関連が知られるタンパク質が多く含まれていることが確認された。従って、本モデルは、毒性の有無だけでなく、機序推定の推定にも活用でき、評価初期の戦略構築に有用であると考えられた。本発表では、非動物評価に関わる世の中の研究動向と我々の研究成果を紹介するとともに、毒性機序推定研究の活用方法について議論したい。

○篠澤 忠紘

武田薬品工業株式会社 Preclinical and Translational Sciences | Drug Safety Research & Evaluation

低分子化合物の開発に焦点を合わせたこれまでの医薬品開発において、動物を用いた安全性評価が極めて重要な位置を占め、事実、多くの薬剤開発に貢献してきた。一方、ヒトにおける薬剤安全性をより正確に評価することは常に望まれ、様々な外挿性検討も同時に進められてきた。In vitro における外挿性検討においてヒト由来材料の利用が必要となるが、入手や倫理的観点から制限があり、当初、多くの実験ではヒト株化細胞が用いられてきた。例えば、肝株化細胞である HepG2 やヒト子宮頸癌に由来する HeLa 細胞などは細胞障害性評価に利用され、細胞障害性の少ない化合物の選択に貢献してきた。一方、より高次の毒性機作を外挿するためには、ヒト初代培養細胞の利用が望まれ続けていた。ヒト由来細胞の中でも初代肝細胞については、比較的早期から利用可能であり、ドナー間またはロット間のばらつきがあるものの、代謝能や Transporter 阻害など肝障害の機序に基づいた解析に用いられることができた。また、最近では、ヒト肝キメラマウスに由来するヒト肝細胞を用いることができるようになり、同キメラマウスの in vivo 毒性情報を in vitro で再現することや、凍結保存を介さないより新鮮なヒト肝細胞を安全性評価系に応用できるようになってきた。実際に我々の研究室でも同肝細胞を用いて in vitro 系で毛細胆管を構築し、そこに流れ込む胆汁酸アナログをイメージングで取り込むことにより、薬剤の Transporter 機能への影響を評価することができた。また、肝障害を引き起こす大きな要因の一つとして位置づけられる反応性代謝物の発生を予測するために、複数種の培養細胞を用いて細胞内 Glutathione 量を測定し、より安全な化合物を効率よく選別する評価系を構築した。最終的にこのような in vitro 評価系を組み合わせることにより、ヒトで引き起こされる肝障害機作を回避するための戦略を構築した。だが、肝細胞以外のヒト組織・細胞については、近年まで利用が困難であり暫く研究が停滞していた。2007年、ヒト iPS 細胞が作製されて以来、その状況が一変した。特に薬剤開発中断の要因として代表的な心毒性の安全性懸念については、近年の評価系の発展は目覚ましく、ヒト iPS 細胞との因果関係は強い。これまで、ヒト心筋細胞を用いた心毒性の in vitro 評価系は細胞入手の困難から限定的であったが、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いることで、飛躍的に研究が活性化されたのである。例えば、自律拍動するヒト iPS 細胞由来心筋細胞の細胞外電位変化は、ヒトにおける QT 延長に外挿できることが報告されている。すなわち、薬剤の QT 延長リスクを in vitro で評価可能となり、現在ではその開発と標準化が国際的に進められている。また、心筋の収縮スピードを高感度カメラで測定することにより、薬剤の心筋収縮への影響を in vitro で評価することも可能となった。このような in vitro 評価系の進歩は、初期安全性評価戦略を発展させただけでなく、臨床において認められた有害事象のメカニズム検討にも応用される可能性が出てきた。今後、さらにヒト毒性機作を理解した評価系とそれを用いた創薬戦略を更新するために、まず着目すべき点は、ヒト個体差に関連する毒性であろう。例えば、臨床試験で認められる肝障害は、少数の患者集団または特定の個人で認められることが多い。いわゆる Idiosyncratic 肝障害である。従来 of in vitro 評価法は、投与量に依存する Intrinsic 肝障害の予測を主としたものであり、個人における薬剤感受性個体差には言及していない。また、抗体・核酸医薬品や細胞・遺伝子治療製品などの New modality 薬剤の安全性評価については、これまでとは異なる視点で in vitro 安全性評価を行う必要が出てきた。例えば核酸医薬品は、ヒトの遺伝子配列をもとに開発される薬剤であることから、ヒト試料を用いた検討が特に重要となっている。本発表では近年の in vitro 評価戦略の革新を実例とともに紹介するとともに、ヒトにおける毒性機序に立ち戻ったうえで、期待される未来の利用法と課題について議論したい。

○吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

ラット反復投与毒性試験は化学物質の安全性評価に重要な試験であるが、動物愛護や開発の効率化の観点から、その代替法の開発が求められている。2017年から5年間の時限プロジェクトとして開始された経済産業省委託事業である「省エネ型電子デバイス材料の評価技術の開発事業（機能性材料の社会実装を支える高速・高効率な安全性評価技術の開発・毒性関連ビッグデータを用いた人工知能による次世代型安全性予測手法の開発）」、通称 AI-SHIPS プロジェクトでは、化審法等で必要とされるラットの反復投与毒性試験の結果を、機序情報を踏まえて化学構造から予測するシステムの開発を進めている。なお、反復投与毒性のエンドポイントは多岐にわたるが、本プロジェクトでは、高頻度で認められる肝毒性、腎毒性及び血液毒性を対象とした。また、肝毒性に関しては、肝細胞傷害性、肥大、脂質代謝異常、胆管障害など複数のエンドポイントに分けて予測モデルを構築している。このプロジェクトにおけるインビボ毒性予測モデルの開発の特徴として、化学物質の物理学的特徴量である分子記述子に加えて、インビトロ試験結果を説明変数として活用することである。ただし、インビボ毒性試験がある全ての物質についてインビトロ試験を実施することは時間やコストの観点から非常に困難であるため、学習用セットとして選択した約320物質について試験を実施して、その結果を利用してインビトロ試験結果を予測するモデルを作成し、このモデルをインビボ毒性予測モデルの学習用物質に適用することで、各種インビトロ試験結果の予測値を算出し、この予測値をインビボ毒性予測モデルの説明変数として利用することとした。さらに、米国Tox21プロジェクトの各種インビトロ試験の結果も活用して同様に予測モデルの構築と予測値の算出を行い、説明変数として活用している。このような仕組みでインビボ毒性を予測することで、毒性発現機序と関連すると考えられるインビトロ試験結果の予測値も算出されることから、単にブラックボックスとしてインビボ毒性を予測するだけでなく、機序情報の提示も可能になると考えている。

本プロジェクトを進めるにあたり、私達の研究室では、化学物質の解毒や代謝活性化に関わる薬物代謝酵素との反応性評価、肝臓などの様々な生理作用調節に関わる核内受容体の活性化作用評価、肝細胞や腎由来細胞を用いた細胞傷害性試験、ハイコンテンツ解析（HCA）による細胞小器官影響や脂質蓄積の評価を、ラット反復投与毒性試験が明らかとなっている326物質について評価してきた。本講演では、これらのインビトロ試験結果とインビボ毒性との関連性解析の結果を紹介する。これらのインビトロ試験は、医薬品をはじめとする多くの化学物質の安全性評価試験としてよく実施されているものであり、インビボ毒性との体系的な関連性解析の結果は、機序を踏まえた安全性試験を選択・活用する上で有用な情報と思われる。

○今井 俊夫^{1,2}、石ヶ守 里加子²、中西 るり²、成瀬 美衣²

¹ 国立がん研究センター 研究所 がんモデル開発部門

² 国立がん研究センター 研究所 動物実験施設

【背景・目的】幹細胞と種々の分化細胞から成る腸管陰窩を長期間維持する方法として、2009年に Sato Tらにより、オルガノイド培養法が報告された¹⁾。その後、ヒトがん組織由来オルガノイドを用いる抗がん剤の評価や、マウス由来あるいはヒト iPS 細胞由来オルガノイドを用いる医薬品の毒性評価など、基礎研究のみならず開発研究にもオルガノイド培養法は積極的に応用され始めている。我々は、オルガノイド培養法により正常組織由来の細胞を長期間 *in vitro* で維持できる点、ならびに、ヒト検体を用いる基礎研究で明らかにされた発がん関連遺伝子の変異/発現変化をオルガノイドに導入し、ヌードマウス皮下に移植することで、発がん過程が再現できる点に着目した。即ち、実験動物に化学発がん物質を投与して腫瘍性病変を誘発する発がんモデルマウス/ラットと同様に、正常組織由来オルガノイドに対して *in vitro* にて化学物質暴露することで、腫瘍性病変の発生を再現できるかを確認する目的で研究を開始した。

【方法】各種純系マウスあるいはがん関連遺伝子改変マウスから正常組織を採取し、酵素処理した後、ラミニンを主成分とするマトリゲル上に単離細胞を播種し、上皮増殖因子 EGF や Wnt 伝達経路関連の R-spondin などを添加した培養液で培養した。我々は、化学物質暴露を確実に行うために、細胞播種翌日にマトリゲルを重層するマトリゲル重層オルガノイド培養 (MBOC) 法を採用している。オルガノイドの継代時には、培養開始時と同様に、細胞を単離し、新たにプレートに添加したマトリゲル上に播種するため、マトリゲルを重層する翌日まで、培養液に加えた被験物質 (+S9 mix) を細胞に直接暴露させることを可能にする。24 時間×3 回の被験物質暴露の後、オルガノイドをヌードマウス皮下に接種し、細胞が増殖して形成された結節状組織について、常法に従って病理組織学的に解析した。また、必要に応じて免疫組織学的解析、遺伝子変異解析を行った。

【結果・考察】肺あるいは肝臓 (胆管) 由来オルガノイドに対して遺伝毒性発がん物質であるジエチルニトロソアミンやメタンスルホン酸エチルを暴露することで、病理組織学的に上皮細胞の重層化や浸潤性など腫瘍性病変の特徴を示す結節の形成がみられた。病変部位ではリン酸化 ERK1/2 が陽性を示すなど、免疫組織学的にも腫瘍性病変の特徴を示した。また、乳腺由来オルガノイドに対して 7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン (DMBA) で処置すると造腫瘍性がみられた。現在のところ検討した化学物質は限られているが、被験物質の *in vitro* 暴露とヌードマウス皮下への接種を組み合わせることで、病理組織学的所見をエンドポイントとする化学物質の *ex vivo* 化学発がんモデルの作出が可能であることが示された²⁾。また、化学物質の発がん性のスクリーニングにも応用可能と考えられた。乳腺発がんについては、マウスに DMBA を経口投与することで誘発される腫瘍組織の病理組織学的特徴および遺伝子変異の特性と、オルガノイドに DMBA を暴露することでヌードマウス皮下に形成される組織のそれらとの比較解析を行った。その結果、誘発される遺伝子変異の特性に由来すると推察される病理組織学的特徴の違いが見出された。オルガノイドを用いる *ex vivo* 化学発がんモデルの位置づけについては、今後更に幅広い化学物質による影響解析を進めることで、従来の動物モデルとは異なる発がん機序を可視化できるモデルになり得ることが期待される。

【参考文献】

1) Sato T *et al.*, *Nature* 459, 262–265 (2009) doi: 10.1038/nature07935.

2) Naruse M *et al.*, *Carcinogenesis* 41, 1444–1453 (2020) doi: 10.1093/carcin/bgaa011.

○平田 暁大¹、田邊 健斗¹、入澤 祐太^{1,2}、今井 俊夫³、酒井 洋樹¹

¹ 岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 獣医病理学研究室

² あすか製薬株式会社 薬物動態・安全性研究部 安全性研究課

³ 国立がん研究センター 研究所 がんモデル開発部門

オルガノイドは、マトリゲルを用いる三次元培養法により *in vitro* にて樹立・維持される上皮細胞の集合体であり、幹細胞を含めた未分化細胞と分化細胞で構成され、臓器あるいは組織固有の特徴を保持している。オルガノイドは、通常の培養細胞よりも生体内に近い実験系として注目されており、基礎研究や再生医療研究などで幅広く応用されており、化学物質の毒性や発がん性評価への応用も期待されている。2020年には、肺、肝臓(胆管)、乳腺といったマウスの正常組織から樹立されたオルガノイドに *in vitro* で化学発がん性物質を繰り返し暴露した後、ヌードマウスに皮下移植すると腫瘍性結節が形成されることが示された(Naruse M et al., *Carcinogenesis*, 2020)。今井らにより確立されたこの評価法では、酵素処理によりオルガノイドを細胞単位に分離し、被験物質とS9mixを付加した培養液中で24時間培養することで化学物質への暴露が行なわれる。その後、被験物質を含む培養液を除去し、通常の培養液に切り替え、マトリゲル内で化学物質に暴露された細胞からオルガノイドを再構築する。この化学物質曝露-オルガノイド再構築の工程を3回行った後、継代と培養によりオルガノイドを増やし、化学物質に暴露されたオルガノイドをヌードマウスに皮下移植し、造腫瘍性を評価する。

我々は、この方法に則って化学物質を暴露した際、オルガノイドに形態学的な変化が生じているかを解析している。具体的には、マウスに肺腫瘍を誘発するアクリルアミド暴露によるマウス肺由来オルガノイドの形態変化を位相差観察および組織学的解析により評価している。これまでの解析から、アクリルアミド暴露後に再構築されたオルガノイドでは、用量依存性にそのサイズが小さくなり、さらに、通常は単層構造であるオルガノイドの壁に全周性あるいは局所性に多層化が観察されることがわかってきた。現在、アクリルアミド暴露を繰り返すことによって、オルガノイドのサイズ変化や多層化の程度や頻度が増強されるか解析しており、最適な暴露回数や観察ポイントの選定を進めている。また、アクリルアミド暴露後のオルガノイドの増殖活性や発がん関連分子の発現の免疫組織学的な評価も進めている。

昨今、3Rの原則に基づく動物実験の適正化が強く求められており、化学物質の毒性評価もその例外ではない。オルガノイドを用いた化学物質の評価系は動物実験代替法として期待されるが、ヌードマウスでの造腫瘍性評価に依らず、オルガノイド自体の形態学的および分子生物学的変化を指標に化学物質の発がん性を評価できれば、さらなる動物の削減につなげることができる。また、オルガノイドを用いた化学物質の発がん性評価試験法の中で、オルガノイドの形態解析は、ヌードマウスへ移植するオルガノイドの調製と並行して実施可能であり、ヌードマウスでの造腫瘍性の結果を補足するデータを提供できると考えられる。

オルガノイドの樹立には高度な技術や経験が必要であり、オルガノイドを用いた試験系を導入する上で障害となると予想される。我々は、樹立したオルガノイドを施設間で輸送して研究に用いており、その輸送方法や輸送がオルガノイドへ及ぼす影響についても紹介する。

(参考文献) Naruse M, Masui R, Ochiai M, Maru Y, Hippo Y, Imai T. An organoid-based carcinogenesis model induced by *in vitro* chemical treatment. *Carcinogenesis* 41(10):1444-1453, 2020

○美谷島 克宏¹、齋藤 由季^{2,3}、服部 一夫²

¹ 東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科

² 東京農業大学 応用生物科学部 栄養科学科

³ 新潟県立大学 人間生活学部 健康栄養学科

食品中の化合物の安全性の担保するため、これまで動物を用いた各種の毒性試験が実施され、そのデータを基に、1日許容摂取量が算出され、使用基準も定められてきた。昨今、動物福祉の観点から実験動物を取り巻く環境は厳しく、化粧品業界を中心に3R (Replacement, Reduction, Refinement) 原則に基づき、化学物質の安全性評価から動物実験を排除する傾向にある。一方、化合物の安全性を担保するため新規の動物実験代替法の開発・普及が世界的に求められている。

本研究では、消化管における安全性評価系を構築することを目的として、*in vivo* 実験系で得られた消化管の毒性学的変化と *in vitro* 実験系で観察された変化についての比較検討に取り組んだ。

オルガノイドは、複数細胞種からなる特定組織を *in vitro* にて3次元的に構築し、生体内の組織または臓器の特徴を保持する培養システムである。これにより幹細胞から分化した組織の機能が再現され、構成細胞間、細胞及びマトリックスとの相互作用を観察することが可能とされている。また、オルガノイドは平面培養モデルと異なり、生体組織と同様の生理学的特徴を有し、物理的、分子生物学的にも器官・組織を模倣したモデルとされている。

具体的には、マウス腸管由来のオルガノイド培養を用いて、カビ毒の一種であるデオキシニバレノール (DON) や粘膜障害作用を有するデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) などの化学物質が、粘膜防御機構や炎症並びに粘膜修復に及ぼす影響について、オルガノイドの形態及びその形成率、腸管幹細胞の性状、粘膜関連遺伝子の発現などに注目して解析した。さらに、マウスに DON 並びに DSS を投与し、腸管粘膜への影響について、上皮の細胞間接着、細胞増殖、粘液分泌、粘膜における炎症反応。アポトーシス検出並びに関連遺伝子の発現などを評価した。

正常マウスから作製した腸管オルガノイドを用いて陽性対照物質を評価した結果、マウスへの投与で見られた変化並びに関連因子の変動は、腸管オルガノイドにおいても DON 並びに DSS の曝露で誘発される種々の変化に共通するものとして観察された。このうち DON の曝露については、腸管の管腔側ないし基底膜側からの影響を比較する系として、培地中への添加並びにオルガノイド組織内へのマイクロインジェクション法により影響を比較した。その結果は、DON 投与によるマウスへの経口投与ないし腹腔内投与における病態誘発の差異を反映するものであった。

以上、腸管オルガノイド培養系から得られた結果と動物を用いた試験より得られた両実験系の結果を比較検討することにより、オルガノイド評価系の妥当性・有用性が明確となり、動物実験代替法としての発展や、新たな *in vitro* 腸管機能評価系の構築に寄与するものと考えられた。

【参考文献】

- 1) Hikaru Hanyu, et. al., Mycotoxin Deoxynivalenol Has Different Impacts on Intestinal Barrier and Stem Cells by Its Route of Exposure, *Toxins*, 2020, 12:610
- 2) Yuki Saito, et. al., Effect of short-time treatment with TNF- α on stem cell activity and barrier function in enteroids, *Cytotechnology*, 2021, 73:669–682

S3-4

三次元オルガノイド培養法を用いたオーダーメイド獣医療の開発と創薬への応用

○臼井 達哉

東京農工大学 農学部 獣医薬理学研究室

三次元培養法を用いた研究は主に人の医学領域で行われてきたが、我々はオルガノイド培養法をペットのがん治療に応用する研究を進めてきた。これまでの研究において、尿サンプルを用いて非侵襲的に犬の泌尿器がん(前立腺がんおよび膀胱がん)の画期的な三次元オルガノイド培養モデルを作製し、患者犬個々の抗がん剤感受性をチェックすることが可能であることを明らかにしてきた。またオルガノイドの培養液の組成を改良することで、ゲルフリーの環境下で3D膀胱がんオルガノイドの性質を維持する2.5D膀胱がんオルガノイドが作出可能であることを示した。

さらに、膀胱がんオルガノイドを用いて、抗がん剤感受性に関する前向き臨床研究を行い、オルガノイドにおける薬剤感受性が治療効果と相関することや、膀胱がんオルガノイドに対する分子標的薬トラメチニブの抗がんメカニズムを明らかにしてきた。本シンポジウムでは、これらの培養法を用いたオーダーメイド獣医療の開発と動物のがんオルガノイドを用いた創薬研究について解説する。

○井上 貴雄

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部

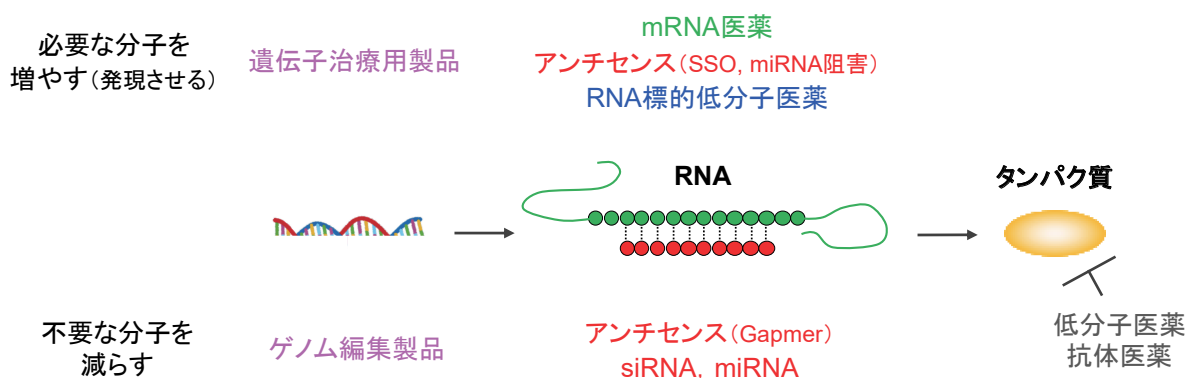
【背景】

近年、ゲノム編集治療や核酸医薬に関する技術開発が大きく進展しており、臨床開発が活発化している。これらの核酸・遺伝子医薬は、DNA あるいは RNA のレベルで生体を制御できる点が大きな特色であり、これまでのタンパク質を標的とする医薬品では難しかった「疾患の原因となる分子をなくす」あるいは「機能的な分子を発現させる」ことが可能である（下図）。特にアンメットメディカルニーズの高い遺伝性疾患や難治性疾患の領域での開発が先行しており、その多くが高い薬効を示すことから注目を集めている。これらの医療技術では、オリゴ核酸が標的 DNA あるいは標的 RNA と相補的に結合することで特異性を規定するが、その基質認識には揺らぎがあることから、いわゆる「オフターゲット効果」に起因する毒性発現を考慮する必要がある。また、TLR 等の核酸認識受容体を介した自然免疫活性化など相補結合に起因しない毒性にも注意が必要である。一方、これらのモダリティは基質認識機構に共通性があり、また、物理化学的性質についても「オリゴ核酸」という共通性の高い化合物で構成されるため、毒性評価や毒性回避の点から体系的な理解と研究戦略が可能と考える。

【取り組みの概要】

以上の背景のもと、当部では核酸・遺伝子医薬の毒性発現の予測・評価法の開発ならびに毒性低減法に関する研究を行っている。具体的には、先行する核酸医薬については、ヒト RNA データベースおよびヒト細胞を用いたオフターゲット毒性の予測・評価法（オフターゲット遺伝子を特定するの手順）やヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝毒性の予測・評価法など、“ヒト”を用いた各種評価系の開発・検証を行っている。また、修飾核酸の導入や配列設計の工夫による毒性低減技術を見出している。ゲノム編集治療については、*in vivo* ゲノム編集を対象に個体で生じうるオフターゲット変異を予測する評価法について、*in silico* 解析、*cell free* 解析（細胞から抽出したゲノムにゲノム編集ツールを作用させる手法）および *cell* 解析（細胞にゲノム編集ツールを作用させる手法）を用いて、変異導入の予測性や妥当性の検証を行っている。本研究では、核酸医薬（アンチセンス）とゲノム編集製品のオフターゲット毒性の予測・評価法を対比しながら考慮事項を議論したい。

DNA/RNAレベルで生体を制御するモダリティ



○佐藤 陽治

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部

【背景】再生・細胞医療に用いられる細胞加工製品は比較的新規のモダリティであり、その品質・安全性評価においては既存の医薬品の試験法がそのまま適用できるとは限らない。例えば、低分子医薬品の非臨床安全性試験では、ヒトへの外挿性を担保するための不確実係数を考慮した大量の検体を動物に投与してヒトでの安全性を推定するが、細胞加工製品で同様の試験を実施する場合、有効成分である細胞が通常の医薬品分子と比較して巨大なため、投与量は通常、ヒトでの臨床投与量以下となる。この場合、陽性の結果によりハザードの存在を示すことはできても、陰性の結果をヒトでの安全性推定の根拠とすることはできない。

製品中に含まれる細胞の造腫瘍性や体内動態といった、従来の医療製品にはない、細胞加工製品特有の品質・安全性上の懸念については、改めて試験法を開発しなければならない。例えば、ES/iPS細胞加工製品では、造腫瘍性を持つ未分化ES/iPS細胞の混入（残存）を高感度で検出する必要がある。また、悪性形質転換細胞の混入（発生）も造腫瘍性を惹起するハザードであり、高感度検出法が必要とされる。

【方法・結果】国立医薬品食品衛生研究所では、これら不純物としての造腫瘍性細胞を高感度で検出する試験法が数多く世界に先駆けて開発されており、その成果の多くは科学論文として公表されているだけでなく、試験実施の際の留意点とともにガイドラインとして厚生労働省から公表されている¹。さらには、細胞加工製品の造腫瘍性評価についての国際的なコンセンサス形成の必要性について、非競争的産官学プラットフォーム Health and Environmental Sciences Institute (HESI) において国際対話を展開し、ポジションペーパー²としてまとめるなど、試験の国際標準化・国際調和の素地形成を目指した活動も展開している。

なお、これまで国立医薬品食品衛生研究所と再生医療イノベーションフォーラム多能性幹細胞安全性評価委員会（FIRM-CoNCEPT）を中心とした官民共同プロジェクト（MEASURE）では、細胞加工製品の造腫瘍性関連試験法のバリデーションを目的に、多施設における試験法の性能比較・検証を実施している。また、さらに当該試験法の国際標準化を目指すことを目的として、現在、国内だけではなく海外の研究機関と共同した体制を新たに構築して、同一プロトコールによる試験法の性能評価を実施し、有用性および限界を確認・共有する活動を実施している。

【結論】以上のようなレギュラトリーサイエンス活動を通じ、細胞加工製品の造腫瘍性関連試験法の分析能と限界を明らかにし、ステークホルダー間で共有することにより、新規モダリティとしての細胞加工製品の開発や審査における試験結果の合理的な解釈および円滑な意思決定の促進が期待される。

【参考文献】

1. 「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点」（令和元年6月27日薬生機審発0627第1号厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知別添）
2. Sato Y, *et al.* Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider. *Cytotherapy*. 2019;21:1095-1111.

○問 哲生

第一三共株式会社 安全性研究所

抗体-薬物複合体 (antibody drug conjugate: ADC) は、モノクローナル抗体に細胞毒性を有するペイロードを結合させた創薬モダリティであり、その標的特異性から有効性と安全性に優れた抗腫瘍薬として期待されている。ADC の毒性は、それを構成する抗体またはペイロードが介在して引き起こされる。腫瘍以外の正常組織にも標的抗原が発現している場合は、ADC が正常細胞に取り込まれ毒性が発現することがある。また、ADC が Fc 受容体に結合することで毒性に関与する場合や、血漿中へ遊離したペイロードが正常組織を障害する可能性がある。毒性の回避や低減のため、これらの毒性機序を考慮した ADC の最適化やスクリーニング戦略が議論されている。ADC の非臨床毒性試験の実施においては ICH S6 (R1) 及び ICH S9 ガイドラインが適用されるが、ADC に関する記述は限られている。また、新規の低分子薬剤を ADC のペイロードに使用する場合は、ペイロード単独の毒性評価も必要とされ、通常のバイオ医薬品とは異なる留意点がある。

本演題では、規制ガイドライン及び ADC の毒性学的特性を踏まえ、臨床開発のために必要とされる非臨床毒性試験について要約する。また、ADC で報告されている臨床での安全性プロファイルと非臨床結果との関連性や評価上の課題について考察する。

○齋藤 嘉朗¹、出水 庸介²

¹国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

²国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部

天然型構造のみを有するペプチド医薬品は、古くから開発されてきたモダリティであるが、血中半減期が短い、経口投与ができない、などの欠点があった。近年、立体構造の安定化や細胞膜透過促進のための非天然型構造を有するペプチド医薬品が開発されており、多様な構造を短時間で化学合成可能な技術の発展と相まって、新規のモダリティとして大きな期待を集めている。近年、高額な医薬品の増加による国民皆保険制度への影響に関する議論がなされているが、非天然型構造を有するペプチド医薬品は、化学合成されるため、比較的安価であることも、その期待要因の一つである。一方で、中分子という性質から免疫原性や、天然型アミノ酸の変化等に基づく類縁構造を有する不純物の扱いなど、低分子化学薬品にはない特性に関し、検討が必要との意見もある。特に非臨床安全性評価は、低分子化学薬品とバイオテクノロジー応用医薬品で評価に対する考え方が大きく異なるため、中分子ペプチド医薬品について整理が必要と考えられた。

2018年度よりAMED医薬品等規制調和・評価研究事業「次世代型中分子ペプチド医薬品の品質・安全性確保のための規制案件に関する研究」班（研究代表者 出水庸介）が発足し、品質・製剤、及び非臨床安全性評価の点から、それぞれ産官のメンバーにより、留意点文書の作成に向けた論点のまとめと議論を行った。非臨床安全性評価に関しては、まず現在の非臨床安全性評価に関する各種ガイドラインにおけるペプチド医薬品の取り扱い、及びこれまでに承認された非天然型構造を有するペプチド医薬品の非臨床評価結果についてまとめた後、留意点文書に関する議論と文案の作成を行った。大枠として、天然構造のみを有するペプチド医薬品ではICH S6(R1)の考え方、また非天然型構造を有するペプチド医薬品ではICH M3(R2)の考え方に基づき、非臨床安全性試験を行ってはどうかと考えられた。また少数であるが、これまでに承認された非天然型構造を有するペプチド医薬品でも、化学薬品と比較的同様の評価がなされていた。さらに、非天然型構造を有するペプチド医薬品の定義、類縁構造を有する不純物評価の問題を中心に議論を行い、一定の合意を得た文書を作成した。2021年度より、同様にAMED医薬品等規制調和・評価研究事業「中分子ペプチド医薬品の品質及び安全性評価に関する研究（研究代表者 出水庸介）」が開始され、細胞内標的型のペプチドを対象に、特に遺伝毒性と薬物間相互作用の点から検討を継続している。

本講演では、研究班の議論及び研究内容等に基づく、非天然型構造を有するペプチド医薬品の非臨床安全性評価における留意点について、現状と今後の方向性を述べたい。

企業シンポジウム 1

株式会社ボゾリサーチセンター

4週間の反復投与毒性試験結果（肝臓小核試験および病理組織学的検査）から肝発がん性はどこまで予測できるか？

○濱田 修一

株式会社ボゾリサーチセンター

【背景・目的】

一般毒性試験への遺伝毒性指標の組み込みは使用動物数の削減による3Rsへの貢献だけでなく、病理組織学的検査や血液学的検査などの一般毒性指標と遺伝毒性指標を同一動物から得ることができ、より高度な安全性評価を可能にする。また、従来の骨髄小核試験で陰性となる肝発がん物質を検出するため、薬物代謝の中心である肝臓を標的臓器とし、組み込み試験にも適した反復投与肝臓小核試験法を開発した。本法の導入により4週間の反復投与毒性試験結果（肝臓小核試験および病理組織学的検査）から肝発がん性の予測を試みた。

【結果・考察・展望】

肝臓小核試験は、薬物代謝の主要臓器である肝臓において小核誘発性を評価可能な点で非常に優れた試験法である。特に不安定な代謝物が肝発がん性を示す物質は骨髄小核試験で検出出来ない場合が多く、肝臓小核試験による評価は極めて有用と考えられた。しかしながら、従来の肝臓小核試験は、小核評価に必要な細胞分裂を得るために、部分肝切除や幼若動物の使用が必要であった。部分肝切除は動物福祉の面から、幼若動物の使用は代謝系等の成熟動物との違いから推奨できず、いずれも一般毒性試験への組み込みは困難であった。我々は肝細胞のライフスパンが200日程度と長いことに着目し、骨髄小核試験では陰性となる肝発がん物質 2,4-Diaminotoluene および Diethylnitrosoamine を用いて、5日、14日、28日反復投与によって誘発される小核を有する肝細胞の蓄積効果を評価した。その結果、両化合物とも反復投与回数に比例して小核誘発率が上昇し、反復投与による肝臓小核試験の有用性（部分肝切除等を必要としない組み込み可能な試験系であること）が示唆された。本法の普遍性確認のため、日本環境変異原学会 MMS 研究会による共同研究をスタートさせ、発がん標的臓器や作用機序の異なる22化合物の評価を行った。その結果、本法が作用機序に関わらず、肝発がん物質に対する高い感受性と非肝発がん物質に対する高い特異性を有することが判明した。さらに肝発がん過程にみられる初期応答として5つの病理組織学的変化（Hypertrophy, Proliferation oval cell or bile duct, Tissue injuries, Regenerative change, Inflammatory）に着目し、肝臓小核試験の結果と同時評価することで、肝発がん物質を28日程度の反復投与試験結果から高精度に予測することに成功した。

また、その後開発したホルマリン固定法は、ホルマリン固定された肝臓から肝臓小核の評価を可能にするものであり、一般毒性試験への組み込みだけでなく、すでに完了した一般毒性試験のホルマリン固定臓器を用いたレトロスペクティブな遺伝毒性評価をも可能にする画期的な試験法である。今後もより高度な安全性評価を目指し、組み込みに適した遺伝毒性試験法の開発改良に努めると共に、国際的な普及も目指していきたい。

企業シンポジウム 2

株式会社 LSIM 安全科学研究所

がん創薬支援（PDX）及び再生医療への取り組み

○常住 真一郎、○大田 泰史、飯田 真志

LSIM安全科学研究所 熊本研究所

【PDX モデルに対する取り組み】

抗がん剤開発において、がん細胞株を移植したモデルは広く用いられているが、ヒトへの外挿性が低いことが問題となっている。ヒト腫瘍を免疫不全マウスに直接移植することによって作製する患者由来の異種移植片（PDX）モデルは、臨床腫瘍の多様性や不均一性、抗がん剤に対する反応性を保持しており、臨床予測性が高い革新的なツールとして注目されている。当社での PDX モデルに対する取り組みについて紹介する。

当社では、2018年～2020年において、日本医療研究開発機構（AMED）の支援の下、国立研究開発法人国立がん研究センター（NCC）、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所と協働して、日本人がん患者由来の PDX ライブラリー（J-PDX ライブラリー）の構築に取り組んできた。当社では NCC より入手した PDX 株について、現在 160 株程度をライブラリーとして保管している。これらの株について、マウスに移植してから腫瘍摘出までの経時的な腫瘍体積の推移に関するデータを取得するとともに、遺伝子の発現や変異等の情報を収集している。

これらの情報を整備することは、抗がん剤の開発に PDX モデルを使用する際の PDX の選択に役立ち、新たな抗がん剤の開発に貢献するものである。

【再生医療に対する取り組み】

近年、医薬品のモダリティが多様化しており、従来の低分子化合物に加え、タンパク質や、細胞、ウイルス、細菌など生物由来の、いわゆるバイオテクノロジー医薬品や再生医療等製品の開発が盛んに行われている。これらの医薬品の中にはバイオセーフティマネジメントや、遺伝子組換え生物の拡散防止措置が必要なものも含まれており、当社ではバイオセーフティレベル（BSL）2 対応および P2 レベルまでの拡散防止措置を要する試験を対象として、一般毒性試験、造腫瘍性試験、分布試験、薬効試験や先述の PDX マウスを用いた抗腫瘍性試験といったメニューを実施できるよう施設を整備してきた。最近では、遺伝子組換えウイルスやバイオテクノロジー技術を用いたワクチン製剤の開発が進み、ワクチンの安全性評価を行う上でも BSL 対応や拡散防止処置が必要となるケースが生じている。ワクチンの安全性評価では一般毒性試験等に加え、生殖発生毒性試験の実施も要求されることから、弊社では同施設における生殖発生毒性試験の受託準備を進めている。今回はその取り組みを紹介する。

企業シンポジウム 3

株式会社フェニックスバイオ

PXB マウスを用いた NASH 病態モデルの構築とヒト肝毒性マーカーに関して

○立野 知世

株式会社フェニックスバイオ 研究開発部

【紹介内容】

私達は、ヒト肝細胞で置換されたキメラマウス (PXB マウス®) を作製している。現在、PXB マウスは、新薬の安全性や薬物動態、肝炎ウイルスの薬効試験などに利用されている。

非アルコール性脂肪性肝疾患/肝炎 (NAFLD/NASH) は先進国で患者数が増加しており、肝硬変、肝癌へと進行することが知られている。現在、多くの製薬会社が NASH 治療薬を開発しているが、今のところ治療薬は見つかっていない。その原因として薬効試験に適した動物モデルが存在しないことが挙げられる。私達は PXB マウスにコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) を摂餌することによりヒト NASH モデルの作製に成功した。本モデルは、脂肪肝から線維化の病態を呈し、ヒト NASH 患者で見られる肝細胞のバルーニングやマロリーデング小体が観察された。本モデルに PPAR α / δ agonist の Elafibranor を投与したところ、治験と同様な結果が得られた。

PXB マウスは肝毒性試験にも利用されている。PXB マウスの肝臓は 70%以上がヒト肝細胞で置換されているが、残りの 30%以下はホストマウス肝細胞が存在する。一般的に肝障害の指標として血清中の alanine aminotransferase (ALT) 活性値が使われているが、PXB マウスの場合には血清中の ALT 活性値がヒト肝細胞由来かマウス肝細胞由来か判別できない。そこで、我々はヒト ALT1 特異的な ELISA キットを開発した。このキットを用いることにより、PXB マウスにおけるヒト肝細胞への毒性を特異的に検出することが可能となった。四塩化炭素あるいは Aflatoxin B1 を PXB マウスへ投与したところ、マウス血清中の hALT1 濃度上昇とヒト肝細胞障害に相関がみられた。

要旨

ポスター発表

急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する

○松下 幸平、豊田 武士、赤根 弘敏、森川 朋美、小川 久美子

国立医薬品食品衛生研究所 病理部

【背景・目的】

急性腎障害（AKI）はこれまで可逆的な病態であると考えられてきた。しかしながら近年、AKI後に不可逆的な慢性腎臓病（CKD）に移行する AKI to CKD という現象が明らかとなり、AKIの疾患概念が大きく見直されている。AKIの病変の主座である尿細管上皮は再生能力を有する細胞であるが、AKI後に尿細管が正常に再生されなかった場合には線維化が生じてCKDへ移行する。我々はこれまでに種々の腎障害モデルラットを用い、正常に再生されない尿細管は形態学的に拡張あるいは萎縮していること、さらにはがん幹細胞マーカーとして知られるCD44が特異的に発現することを見出した。

本研究ではシスプラチン（CDDP）誘発 AKI to CKD モデルラットの尿細管の特徴およびCD44の発現を経時的に観察し、さらに網羅的遺伝子発現解析により AKI to CKD におけるCD44の病態生理学的な役割について検討した。

【方法】

6週齢の雄性SDラットに0あるいは6 mg/kgのCDDPを単回腹腔内投与し、対照群は28日後、CDDP投与群は1、3、5、7、10、14および28日後に剖検した。各時点の腎臓を病理組織学的に解析し、投与28日後の腎臓における線維化病変内の拡張/萎縮尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取してマイクロアレイおよびパスウェイ解析を行った。

【結果】

CDDP投与群では毒性標的部位である髄質外帯外層において1から5日にかけて尿細管の変性/壊死が認められ、5日以降には拡張した尿細管が多く観察された。10日以降に間質の線維化が認められ、線維化病変内では拡張尿細管に加えて萎縮した尿細管も観察された。免疫染色の結果、CDDP投与群における5日以降の拡張/萎縮尿細管では上皮系マーカーであるサイトケラチンの発現が減弱しており、間葉系マーカーであるビメンチンが発現していた。CD44はこれらの尿細管において発現しており、パスウェイ解析では線維化に関連する遺伝子群の発現を誘導していることが示された。CD44の下流因子のうち細胞外基質の一種であるフィブロネクチンの産生に関わる*Fnl*について*in situ hybridization*および免疫染色を実施した。その結果、*Fnl*のmRNAは5日以降の拡張/萎縮尿細管の細胞質に発現していたことに対し、フィブロネクチンのタンパク発現はこれらの尿細管周囲の間質に認められた。

【考察】

線維化の進行したCKDの病態では、尿細管上皮は間葉系細胞の表現型を示すもの間質には遊走せず、基底膜に接着した状態で線維化促進能を獲得することが知られており、この現象は部分的上皮間葉転換（partial epithelial-mesenchymal transition: pEMT）といわれる。CDDP投与ラットでは5日以降の拡張/萎縮尿細管において上皮系マーカーの発現低下および間葉系マーカーの発現亢進がみられ、さらにこれらの尿細管はフィブロネクチンを産生・分泌していることが示唆された。よってCDDP誘発AKI to CKDモデルラットにおいては、pEMTが尿細管障害の直後から生じているものと考えられた。またCD44はpEMTの生じた尿細管の細胞外基質の産生能獲得に寄与し、AKIからCKDへの移行を促進しているものと考えられた。

○小川 文一郎^{1,2}、中西 豊¹、若松 正樹¹、高橋 康徳^{2,3}、渋谷 淳^{2,3}

¹ 大正製薬（株） 安全性研究室

² 東京農工大学 獣医病理学研究室

³ 東京農工大学 大学院・共同獣医学専攻

【背景・目的】アクリルアミド（ACR）は高温調理した食品中からの曝露が避けられない遺伝毒性発がん物質で、発がんと共に中枢及び末梢神経障害の誘発が懸念されている。我々の以前の研究で、ラットに妊娠・授乳を介して ACR を発達期曝露させた際に、海馬の神経新生部位である歯状回における type-3 前駆細胞から未熟顆粒細胞が減少することを報告した¹⁾。ACR はニューロンの軸索遠位端の維持機構を標的として軸索変性を誘発すると考えられている。神経新生においても、同じ分子機序が関与する神経突起伸展やシナプス形成が盛んな type-3 前駆細胞から未熟顆粒細胞が標的であると考えられたものの¹⁾、その詳細な毒性機序については不明なままである。また、ACR を成熟後のラットに曝露にした際の海馬神経新生への影響や標的に関するデータは乏しい。そこで本研究では、成熟後ラットの海馬神経新生における ACR の影響及びその毒性機序を検討した。

【方法】ACR の 0、5、10 及び 20 mg/kg を雄性 SD ラット（主群：n=10、サテライト群：n=6）に 28 日間反復経口投与し、一般状態観察（歩行異常スコアを含む）及び体重測定を行った。最終投与日の翌日に脳を採取し、免疫組織化学的染色法（主群）及び real-time RT-PCR 法（サテライト群）を用いて、海馬歯状回の神経新生関連マーカーの陽性細胞数及び mRNA の発現変動を検索した。

【結果・考察】10 及び 20 mg/kg 群で軽度から中等度の歩行異常が、20 mg/kg 群で体重の減少が認められた。免疫組織化学染色の結果、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯から顆粒細胞層にかけて type-3 前駆細胞から未熟顆粒細胞のマーカーである doublecortin 及び dihydropyrimidinase-like^{3,2,4)}陽性細胞数の減少が 20 mg/kg 群で認められた。その他の顆粒細胞系譜マーカー（GFAP、SOX2、TBR2、NeuN）や細胞増殖・アポトーシスマーカー（PCNA、TUNEL 染色）については陽性細胞数の変動が認められなかった。海馬歯状回の遺伝子発現解析では type-3 前駆細胞から未熟顆粒細胞のマーカーである *Dcx*、*Dpysl3* の発現低下が 10 及び 20 mg/kg 群で、神経突起伸展や軸索誘導、シナプス形成に関連するマーカーである *Ncam2*、*Mag*、*Mal* 及び *Nrep* の発現低下が 10 ないし 20 mg/kg 群で認められた。その他、介在ニューロンマーカーである *Reln*、*Calb1*、神経栄養因子関連マーカーである *Ntrk2*、グリア細胞関連マーカーの *Gfap*、*Cspg4*、*Pdgfra* の発現低下が認められた。以上から、発達期での曝露¹⁾と同様に、type-3 前駆細胞から未熟顆粒細胞が ACR の標的になっている可能性が考えられた。また、*Ncam2* 及び *Nrep* の発現低下に加えて、神経分化やニューロン移動に関連する指標、グリア指標の遺伝子発現の低下が認められたことから、その毒性機序として、神経突起伸展及びシナプス形成の障害及びそれに伴う神経新生障害と共にグリア新生の障害を生じている可能性が示唆された。

【参考文献】

¹⁾ Ogawa et al., Arch Toxicol. 2012; 86: 779-90.

²⁾ Hodge et al., J Neurosci. 2008; 28: 3707-17.

³⁾ Knoth et al., Plos One. 2010; 5: e8809.

⁴⁾ Kempermann et al., Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015; 7: a018812.

海馬における DNA メチル化制御の破綻に着目した神経伝達
関連発達神経毒性指標の探索

○高橋 康德^{1,2}、尾城 椋太^{1,2}、山下 理紗子¹、清水 沙織¹、前田 夏乃¹、岡野 拓^{1,2}、
高嶋 和巳^{1,2}、唐 倩^{1,2}、小澤 俊介^{1,2}、吉田 敏則^{1,2}、渋谷 淳^{1,2}

¹ 東京農工大学 獣医病理学研究室

² 東京農工大学 大学院・共同獣医学専攻

【背景と目的】

我々は先行研究において、神経毒性物質であるプロピルチオウラシル (PTU)、バルプロ酸 (VPA)、グリシドール (GLY) のラットへの発達期曝露により、生後における海馬神経新生の不可逆的な障害の誘発を見出している。また、発達神経毒性の不可逆影響指標を得る目的で、これらの物質の発達期曝露終了時での歯状回における網羅的解析により、プロモーター領域の過メチル化と mRNA 発現の下方制御を受ける遺伝子を多数見出した。本研究では、それらの遺伝子の中から神経伝達と神経新生に関連する遺伝子に焦点を当て、メチル化と遺伝子発現の検証解析に引き続き、候補遺伝子の翻訳産物について指標分子としての特性を検討した。

【方法】

神経伝達と神経新生に関連する指標候補遺伝子 (PTU : 26 遺伝子、VPA : 2 遺伝子、GLY : 12 遺伝子) について生後 21 日 (PND 21) と PND 77 における mRNA 発現を qRT-PCR 解析し、不可逆的に発現低下した遺伝子についてメチル化特異的高解像度融解曲線法 (MS-HRM) によりメチル化解析を行った。得られた遺伝子の翻訳産物について海馬歯状回での免疫染色による発現解析を実施し、神経障害物質曝露により陽性細胞数の変動がみられた分子について、ヒトで重要な発達神経毒性物質であるエタノール (EtOH)、塩化アルミニウム、酢酸鉛の発達期曝露及び 28 日間曝露例における発現挙動を解析した。

【結果】

qRT-PCR の結果、PTU で 3 遺伝子、GLY で 1 遺伝子が不可逆的に mRNA の発現低下を示した。これらの遺伝子の MS-HRM の結果、PND 21 で全ての遺伝子、PND 77 で PTU の 2 遺伝子の過メチル化が確認された。免疫染色による解析の結果、GLY で見出された neurogranin (NG) は、GLY 発達期曝露により海馬歯状回腹側の顆粒細胞での不可逆的な陽性細胞数の減少を示した。NG は PTU の発達期曝露でも PND 21 に強く陽性細胞数が減少し、ヒト重要発達神経毒性物質のうち、EtOH の発達期曝露例の PND 77 で陽性細胞数の減少、28 日間曝露例で減少傾向を認めた。二重染色の結果、NG は海馬歯状回の顆粒細胞層において未熟顆粒細胞および成熟顆粒細胞マーカーの NeuN と共局在を示したものの、未熟顆粒細胞マーカーである TUBB3 と共局在を示さなかった。

【考察】

NG は後シナプスでのカルシウム濃度調節に関与し、CaMKII 経路を介したシナプス可塑性の調節に寄与する。二重染色の結果から NG は成熟顆粒細胞に発現している。我々は既に PTU、GLY、EtOH の発達期曝露及び 28 日間曝露において、成熟顆粒細胞でのシナプス可塑性の低下を示唆する結果を報告しており、それは NG の発現抑制に起因することが示唆された。以上の結果から、神経毒性物質曝露に起因した海馬歯状回での NG の陽性細胞の減少の原因の一部に、本遺伝子のメチル化制御の破綻の関与が示唆され、NG はシナプス可塑性抑制の有効な評価指標であると考えられた。

海馬における神経突起伸展及びシナプス可塑性関連遺伝子の DNA メチル化制御破綻に着目した発達神経毒性指標の探索

○尾城 椋太^{1,2}、高橋 康德^{1,2}、山下 理紗子¹、清水 沙織¹、前田 夏乃¹、岡野 拓^{1,2}、高嶋 和巳^{1,2}、唐 倩^{1,2}、小澤 俊介^{1,2}、吉田 敏則^{1,2}、渋谷 淳^{1,2}

¹ 東京農工大学 獣医病理学研究室

² 東京農工大学 大学院・共同獣医学専攻

【背景と目的】

発達期の神経毒性は成熟後の不可逆影響が懸念されるため、化学物質リスク評価上の重要度が高い。しかしながら、化学物質の *in vivo* 発達神経毒性試験法は時間、コスト、評価の効率や有効性の面で課題があり、小規模スクリーニングに適う評価法が求められている。先行研究において、我々は不可逆的な発達神経毒性予測指標の同定を目的として、ラットへの発達期曝露により海馬神経新生の不可逆障害を示したプロピルチオウラシル (PTU)、バルプロ酸、グリシドールのそれぞれの発達期曝露例で、プロモーター領域の過メチル化と遺伝子発現の下方制御を示す多数の遺伝子を見出した。本研究では抗甲状腺剤である PTU を選択し、発達期甲状腺機能低下により過メチル化と発現の下方制御を示した神経突起伸展及びシナプス可塑性関連遺伝子に着目して指標分子を探索した。

【方法】

Methyl-Seq 及び RNA-Seq 解析により、抗甲状腺剤である PTU の発達期曝露終了時の生後 21 日 (PND21)において過メチル化と発現の下方制御を示した遺伝子の中から、神経突起伸展及びシナプス可塑性に関連する 18 遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 解析により PND 21 に引き続き PND 77 において mRNA 発現が不可逆的に低下した遺伝子を選抜した。選抜された遺伝子について、メチル化特異的高解像度融解曲線法 (MS-HRM)を用いて、プロモーター領域におけるメチル化の検証解析を行った。不可逆的な過メチル化と発現の下方制御が確認された候補遺伝子については、免疫組織化学染色により海馬歯状回における発現を解析した。

【結果】

リアルタイム RT-PCR では、PTU 発達期曝露例において PND 21 で 11 遺伝子、PND 77 で 6 遺伝子が mRNA の発現低下を示した。不可逆的に発現低下を示した 6 遺伝子のうち、MS-HRM により、PND 21 で 3 遺伝子、PND 77 で 1 遺伝子の過メチル化が確認された。免疫組織化学染色では、PTU 発達期曝露例の海馬歯状回顆粒細胞層において sodium voltage-gated channel beta subunit 1 (SCN1B) 陽性細胞の不可逆的な低下を認めた。

【考察】

SCN1B は電位依存性ナトリウムチャネルの構成蛋白であり、細胞興奮性の他、神経発達における神経突起伸展やシナプス可塑性などの多様なプロセスを調節する。本研究において、PTU 曝露による発達期甲状腺機能低下により、*Scn1b* の成熟後まで持続する過メチル化と共に、mRNA 発現と発現細胞数の不可逆的な低下が確認されたことから、SCN1B は発達神経毒性評価指標の有力な候補であると考えられた。今後はヒトで重要な発達神経毒性物質であるエタノール、アルミニウム、鉛の発達期曝露及び 28 日間曝露例における発現の解析と、免疫二重染色による陽性細胞の特性の検討を進めていく予定である。

○中島 峻汰、池山 佑豪、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・目的】

薬物性肝障害(DILI)は薬物自体の要因に加え、遺伝的・環境的要因の組み合わせにより発症するため、DILI リスクを創薬早期に予測することは非常に困難である。DILI 発症機序として様々提唱されているが、特にミトコンドリア膜透過性遷移(MPT)を誘導する薬物では DILI が重篤化するため、MPT を介した DILI 発症機序を詳細に解明することは重要である。以前より、炎症誘起物質であるリポ多糖(LPS)を前投与したマウス及びラットに DILI リスク薬物を投与することで、薬物単独では生じない肝障害を誘発できる、いわゆる LPS-DILI モデルが提唱されている。当研究室の先行研究において、ラットへの LPS 投与は MPT 感受性が亢進すること、ここに MPT 誘導能を有する DILI リスク薬物を併用すると肝障害が起こることを確認している^{a)}。さらに、抗凝固薬であるヘパリンでこの肝障害が軽減することも示している。この結果は、LPS による MPT 感受性亢進およびそれを介した肝障害発現に凝固系が関与することを示唆している。我々は今後、肝障害発現への MPT の関与、並びに MPT 感受性亢進に寄与する因子同定に向け、遺伝子改変マウスを用いた検討を予定している。そこで、これまでラットで見られた LPS 投与によって生じる MPT 感受性増強への凝固系の関与が、マウスにおいても確認できるかについて検討した。

【方法】

一晩絶食させた C57BL/6J マウスに LPS(1 mg/kg, i.p.)を投与してから 2 時間後にアセトアミノフェン(APAP, 200mg/kg, i.p.)及び MPT 阻害剤であるシクロスポリン A(CsA, 100mg/kg, i.p.)を投与し、APAP 投与から 24 時間後、肝障害の指標として ALT 値を測定した。また、LPS 及びヘパリン(3000 U/kg, i.v.)投与から 2 時間後、肝臓からミトコンドリアを遠心分離により単離し、MPT 感受性を swelling assay によって評価した。同時に肝切片を採取し、血小板(CD41)を免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

【結果・考察】

APAP 及び LPS 単独投与では肝障害を認めなかったが、共投与したマウスでは顕著な ALT 値の上昇を確認した。また、CsA の投与により ALT 値が有意に抑制されたことから、LPS 及び APAP 併用時の肝障害発現に MPT の関与が示唆された。次に、LPS 投与後のマウス肝ミトコンドリアにおいて、Ca²⁺に対する MPT 感受性がコントロール群に比べ上昇し、ヘパリン共投与によりこの上昇が抑制される傾向があることを確認した。また、LPS 投与後のマウス肝臓で血小板の蓄積が亢進していた。血小板は肝臓の傷害や修復の過程で重要な役割を果たすことが知られ^{b)}、LPS 前投与を施した APAP 肝障害マウスモデルにおいても、血小板が何らかの積極的な役割を担っていると推定される。

【まとめ】

LPS 投与により生じる MPT 感受性増強への凝固系の関与がマウスにおいても確認され、これが APAP による肝細胞での MPT 誘導と、その後の肝障害発現につながることを示唆された。今後は特に血小板と MPT の関連性に着目し、MPT 構成因子の欠損マウスを用いることで、MPT を介した肝障害発症機序の詳細解明につなげたいと考えている。

【参考文献】

- a) Arakawa K., et al., *J Toxicol Sci*, 44(12):833-843. 2019
b) Chauhan A., et al., *Hepatology*, 64(5):1774-1784. 2016

○竹村 晃典、佐藤 智之、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】

重篤な薬物性肝障害の機序としてミトコンドリア障害、その中でもミトコンドリア膜透過性遷移 (mitochondrial permeability transition: MPT) の関与が示唆されている^{a)}。近年、化合物によるミトコンドリア毒性評価も多くなされているが、これは主には呼吸鎖阻害を調べる目的であり、MPT 誘導能の有無はカバーされていない。この要因として、MPT 誘導に至るメカニズムの詳細が不明で直接的な作用標的が曖昧であるため、MPT 誘導に関する新規評価法構築を阻んでいることが考えられる。当研究室の先行研究で、既に肝障害が原因で市場撤退し MPT 誘導が既知の troglitazone を用いた解析から、MPT 誘導に脱共役が関わることを示した^{b)}。そこで本研究では脱共役と MPT 誘導の関連について化合物横断的評価を行い、一般性、ならびに MPT 誘導能を回避する戦略として化学構造的な特徴に注目した構造デザインやスクリーニングへの応用可能性について検証を行った。

【方法・結果・考察】^{c)}

脱共役と MPT 誘導の関連について化合物横断的評価

ミトコンドリア毒性の報告があるものを中心に 24 化合物を選定し、300 μ M を上限として単離ミトコンドリアにおける MPT 誘導能を評価した。試験した 24 化合物のうち、7 化合物が MPT 誘導能を示し、そのうち 6 化合物が脱共役の指標である酸素消費速度の比 (RCR: 呼吸調節能) を低下させた。一方で、MPT 誘導能を示さなかった 17 化合物のうち脱共役能を示したのはわずか 3 化合物だった。RCR 値から MPT 誘導能の有無を判断する ROC 解析を実施した結果、RCR=2.5 を閾値としたときに最も高い感度 0.86、特異度 0.82 を得た (図 1)。また、こ

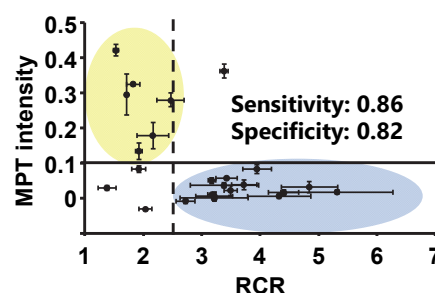


図1 MPT誘導能と脱共役能が相関する

こでみられた脱共役作用はすべて、MPT 阻害剤である cyclosporine A の併用による抑制を受けなかったことから、脱共役が MPT の下流の現象ではないことを確認した。

脱共役能の低減による MPT 誘導リスク回避の可能性

上記の結果を基に、構造の類似した化合物について、MPT 誘導能と脱共役能を比較しその相関関係を検討した。i) チアゾリジン系糖尿病治療薬、ii) サリチル酸系 NSAIDs、iii) フェナム酸系 NSAIDs について検討したところ、それぞれ脱共役を示す化合物は MPT 誘導能を有することを確認した。

【まとめ】

本研究では、医薬品化合物の MPT 誘導能は脱共役能と強い相関を示した。このことは、一般に細胞系では困難な MPT 誘導リスク評価を、より簡便な細胞系における脱共役能評価で代替できる可能性を示している。加えて、すでに構造や物性との相関について一定の知見が得られている脱共役能の観点から化合物をデザインすることで、構造との相関が不明であった MPT リスクを制御・回避できる可能性がある。本成果は、より安全性の高い医薬品の創製に役立つと期待している。

【参考文献】

- a) Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. *Fundam Clin Pharmacol*. 22(4):335-53. 2008
 b) Sato T, Segawa M, Sekine S, Ito K. *J Toxicol Sci*. 44(11):811-820. 2019
 c) Sato T, Takemura A, Ito K. *Toxicol Appl Pharmacol*. 427, 115659. 2021

○佐藤 拓海¹、志津 怜太^{1,2}、馬場 遼之介²、石村 麻衣²、保坂 卓臣^{1,2}、佐々木 崇光²、菅野 裕一郎^{1,2}、吉成 浩一^{1,2}

¹ 静岡県立大学 薬食生命科学総合学府 衛生分子毒性学講座

² 静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】

異物応答性核内受容体 CAR 及び PXR は肝臓に高発現し多種多様な化学物質の曝露により活性化して異物の代謝や排泄に関与する遺伝子の発現を制御する転写因子である。また、CAR 活性化物質は、齧歯動物において肝細胞増殖及び肝がんを引き起こす肝がんプロモーション作用を有することが知られている。一方、PXR の活性化は CAR とは異なり、単独では肝細胞増殖を引き起こさないが、CAR 活性化薬との併用により CAR による肝細胞増殖を増強することが当研究室により明らかにされた。さらに、マウスに diethylnitrosamine (DEN) と CAR 活性化薬である phenobarbital を併用投与した肝化学発がんモデルを用い、PXR 活性化の肝化学発がんへの影響について調べたところ、PXR 活性化は単独では肝がんを誘導しないが、phenobarbital によって生じた肝がんに対して、肝がん病巣の数や大きさを明らかに減少させることが明らかになった。これは、PXR が肝がんの進行に対する抑制因子としての新たな機能をもつ可能性を示している。そこで本研究では、動物実験サンプル及び肝がん由来細胞を利用して PXR による肝がん進行抑制の分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】

CAR 依存的な肝発がんに対する PXR 活性化の影響を調べるため、5 週齢の雄性 C3H マウスに DEN (90 mg/kg) を腹腔内投与し、2 週間後から CAR 活性化物質 phenobarbital (PB ; 混水、500 ppm) 及びマウス PXR 活性化物質 pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN ; 混餌、100 ppm) を 35 週間投与し、屠殺して肝臓を摘出した。これらの肝がん組織由来 RNA を用いて RNA シーケンシング解析を行い、各群間で 2 倍以上の変動がみられた遺伝子群を選択して遺伝子セットエンリッチメント解析を行った。肝がん細胞の上皮間葉転換 (EMT) における PXR の役割を明らかにするために、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に、間葉系細胞の分子マーカーである vimentin のプロモーター領域をルシフェラーゼ上流に組み込んだレポータープラスミド及びヒト PXR 発現プラスミドを導入し、TGF- β 処置依存的なレポーター活性の上昇に対する、PXR 活性化の影響を調べた。

【結果・考察】

PB 単独投与群と PB/PCN 併用投与群の遺伝子セットエンリッチメント解析の結果から、併用群では肝がんの進行において重要なイベントである EMT 関連遺伝子に変動が認められることが示唆された。さらに、KEGG パスウェイ解析の結果、PCN の併用により肝がんの EMT に重要な役割を担う TGF- β シグナルが抑制されることが示された。HepG2 細胞と vimentin プロモーターを用いたレポーターアッセイの結果、TGF- β 処置により認められたレポーター活性の増加は、ヒト PXR の発現とそのリガンドである rifampicin の処置により増強された。よって、培養肝がん細胞における PXR の活性化は EMT を促進する方向にはたらくと考えられた。一方、動物個体における肝がん細胞の EMT には、肝がん細胞の周囲に存在する肝星細胞やクッパー細胞等からのサイトカインシグナルが重要な役割を担うことが知られている。以上の結果及び知見から、PXR は肝がん周辺細胞からのサイトカインシグナルを抑制することで肝がん細胞の EMT に対して抑制的にはたらくのではないかと考えた。今後、PXR を活性化させた肝星細胞の培養上清を HepG2 細胞に処置し肝がん細胞の EMT に対する影響を調べていく予定である。

○牧田 夏希、志津 怜太、曾部 圭一郎、保坂 卓臣、菅野 裕一郎、佐々木 崇光、吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】

肝に高発現し、多種多様な化学物質の曝露により活性化される核内受容体 CAR は、異物代謝酵素の発現調節を担う一方で、その活性化は齧歯動物において肝細胞増殖とそれに伴う肝がんを惹起する。疫学的な研究から、この CAR 依存的な肝発がんには種差があり、ヒトでは起こらないとされているが、分子レベルでの理解がなされていない。最近、当研究室では、マウス肝において、CAR は細胞増殖促進因子である YAP と相互作用し、YAP の核移行を促進することで肝細胞増殖を誘導することを明らかにした。さらに、YAP は WW ドメインを介してマウス CAR と相互作用するが、ヒト CAR とは相互作用しないことを見出した。WW ドメインは、PPxY (x は任意アミノ酸) のアミノ酸配列 (PY モチーフ) と特異的に相互作用することが知られている。CAR タンパク質のアミノ酸配列と立体構造を調べた結果、マウス CAR はタンパク質構造の表面に PY モチーフ (PPAY) をもつのにに対し、ヒト CAR ではそれに対応する配列が PPAH となっていた。そこで本研究では、この PY モチーフの種差が CAR を介した肝発がんの種差の原因であるという仮説を立て、マウス CAR の PY モチーフをヒト型に変異 (PPAY→PPAH) させた遺伝子改変マウスを用いて、CAR の PY モチーフのヒト型変異が肝細胞増殖に与える影響を解析した。

【方法】

CAR 遺伝子にヒト型変異を導入したマウス (CAR-Y150H 変異型マウス) を作製し、CAR-Y150H 変異型および野生型の雄性マウスに CAR 活性化薬であるフェノバルビタール (PB : 100 mg/kg/日) 又は溶媒である生理食塩水を、3 日間連続で腹腔内投与し、最終投与の 24 時間後に屠殺し、肝を摘出した。細胞増殖マーカーである Ki-67 の免疫組織染色により肝細胞増殖の程度を調べた。肝核抽出液を用いたウエスタンブロット法により、核内の YAP レベルを調べた。肝 RNA を用いた定量的逆転写 PCR 法により、CAR 標的遺伝子、YAP 標的遺伝子及び細胞増殖関連遺伝子の mRNA レベルを測定した。

【結果・考察】

Ki-67 の免疫染色を行い、陽性細胞数を計測したところ、野生型マウスでは PB 投与により増加したが、CAR-Y150H 変異型マウスでは PB 投与に伴う増加は認められなかった。核内の YAP タンパク質レベルは、野生型マウスでは PB 投与により増加したが、CAR-Y150H 変異型マウスでは PB 投与により増加しなかった。CAR 標的遺伝子である *Cyp2b10* の mRNA レベルは、PB 投与により両マウスで増加し、その誘導倍率は同程度であった。一方、細胞増殖関連遺伝子である *Foxm1* や *Ccna2* 及び YAP 標的遺伝子である *Birc5* の mRNA レベルは、野生型マウスでは PB 投与により増加したが、変異型マウスでは増加しなかった。

以上の結果より、CAR-Y150H 変異型マウスでは、野生型マウスと異なり CAR 活性化に伴う肝細胞増殖が見られなかったことから、CAR 依存的な肝細胞増殖のヒトと齧歯動物間の種差は、PY モチーフの一アミノ酸の差異によって決まる可能性が示された。

○田代 紗莉依、志津 怜太、保坂 卓臣、菅野 裕一郎、吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) は、肝臓に高発現する異物応答性の転写因子である。CAR はフェノバルビタールをはじめとする多種多様な化学物質により活性化され、異物や内因性物質の代謝を担う酵素の発現を調節している。CAR の活性化により、甲状腺ホルモン代謝に関わる UDP-グルクロン酸転移酵素や硫酸転移酵素の発現が誘導されるため、血中甲状腺ホルモン代謝の亢進に伴う、甲状腺ホルモンレベルの低下が起こることが報告されている。一方で、甲状腺ホルモンは骨や肝臓に作用し、成長に促進的にはたらく内因性物質である。先天的に甲状腺機能が低下し甲状腺ホルモンが欠乏する疾患であるクレチン症では、その代表的な症状として、出生早期から幼児期にかけての体重増加率の低下や発達遅延が知られている。これらのことから、乳幼児期に化学物質曝露による CAR の活性化が起こると、甲状腺ホルモンレベルが低下し、それに伴う成長障害が引き起こされるのではないかと考えた。そこで本研究では、乳幼児期マウスに CAR 活性化薬を投与し、甲状腺ホルモン代謝と成長への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】(実験 1) 生後 15 日齢の雄性 C57BL/6N マウスに CAR 活性化物質である TCPOBOP (3 mg/kg) 又は溶媒 (コーン油) を 15 日間隔で 2 回腹腔内投与し、経時的に体重を測定した。初回投与の 30 日後である 45 日齢において屠殺し、肝と血液を採取した。肝から RNA を抽出し、定量的逆転写 PCR 法で肝の各種 mRNA レベルを測定した。また、血漿中の甲状腺刺激ホルモン (TSH) レベルを ELISA 法で測定した。(実験 2) 生後 15 日齢の雄性 C57BL/6N マウスに TCPOBOP (3 mg/kg) 又は溶媒 (コーン油) を単回腹腔内投与し、3 日後に肝と血液を採取し、実験 1 と同様に解析した。

【結果・考察】TCPOBOP 投与後の経時的な体重測定の結果、15 日齢から 30 日齢にかけての体重増加率が明らかに低下していた。投与 3 日後及び 30 日後の肝 mRNA レベルを測定したところ、代表的な CAR 標的遺伝子である *Cyp2b10* の mRNA レベルが両サンプルにおいて TCPOBOP 投与により増加したことから、CAR の活性化が確認された。甲状腺ホルモンの代謝に関わるグルクロン酸転移酵素のうち UGT1A1 及び UGT1A9 の mRNA レベルを測定したところ、両者はともに TCPOBOP 投与により増加していた。さらに、甲状腺ホルモンシグナルにより発現が亢進することが知られている成長因子 IGF1 及び Zn ファミリー転写因子 KLF9 の mRNA レベルを測定したところ、両遺伝子の mRNA レベルは TCPOBOP 投与 3 日後及び 30 日後のいずれにおいても低下していた。さらに、甲状腺ホルモンレベルの低下に伴うフィードバック機構により産生が上昇する TSH の血中レベルを測定したところ、予想通り TCPOBOP 投与 30 日後において増加が認められた。以上の結果から、乳幼児期における化学物質曝露による CAR の活性化は、甲状腺ホルモン代謝を促進し、甲状腺ホルモンシグナルの減弱とそれに伴う成長の遅延を引き起こす可能性が示された。

○岡野 拓^{1,2}、高嶋 和巳^{1,2}、高橋 康德^{1,2}、尾城 椋太^{1,2}、唐 倩^{1,2}、小澤 俊介^{1,2}、
小柳 美穂子³、吉田 敏則^{1,2}、渋谷 淳^{1,2}

¹ 東京農工大学 獣医病理学研究室

² 東京農工大学 大学院・共同獣医学専攻

³ 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

【背景・目的】 Lipopolysaccharide (LPS) の妊娠期曝露は、母体の免疫活性化に起因した脳発達障害モデルとなる。我々は、抗酸化物質である α -glycosyl isoquercitrin (AGIQ) の正常ラットに対する妊娠期からの持続投与によるシナプス可塑性亢進を介した恐怖消去学習の促進効果と、新生児期 LPS 曝露ラットに対する AGIQ の持続投与による抗炎症効果および脳発達障害の改善効果を報告している。本研究では、妊娠期 LPS 曝露後の児動物の行動ないし海馬神経新生への影響およびそれらに対する AGIQ 持続投与の影響を検討した。

【方法】 LPS は妊娠 15、16 日の母動物に 50 μ g/kg/day を腹腔内投与し、AGIQ は母動物に妊娠 10 日から分娩後 21 日まで、児動物に生後 21 日 (PND 21) から PND 77 まで 0.5% の濃度で混餌投与した。PND 10、春機発動期および成熟期に行動解析を実施し、PND 6、PND 21、PND 77 に海馬における炎症、酸化ストレス、神経新生、シナプス可塑性指標について生化学的解析、免疫組織化学的解析、遺伝子発現解析を実施した。

【結果】 PND 10 の ultrasonic vocalization test、春機発動期の open field test、social interaction test、contextual fear conditioning test、成熟期の social interaction test は LPS 単独群、LPS+AGIQ 群ともに変動はなかった。LPS 単独群で成熟期の open field test で自発運動の減少、contextual fear conditioning test で恐怖記憶獲得障害が認められ、LPS+AGIQ 群で改善した。PND 6 と PND 21 での炎症や炎症に起因する酸化ストレス関連指標は両群ともに変動しなかった。海馬顆粒細胞系譜は、LPS 単独群で PND 21 に TBR2⁺細胞、PND 77 に GFAP⁺細胞、SOX2⁺細胞が減少し、PND 21 に *Eomes*、PND 77 に *Nes*、*Sox2* の遺伝子発現が減少した。PND 21 では PCNA⁺細胞および *Pcna* の遺伝子発現が減少した。これらの神経新生指標に関する変化は LPS+AGIQ 群で回復ないし回復傾向を示した。歯状回門の GABA 性介在ニューロン指標は、LPS 単独群で PND 21 と PND 77 に GAD67⁺細胞が減少し、LPS+AGIQ 群で PND 77 に回復した。また、PND 77 では LPS 単独群で *Sst* の遺伝子発現が減少した。シナプス可塑性指標は、LPS 単独群で PND 21 に FOS⁺顆粒細胞と *Fos* 遺伝子の発現が減少し、LPS+AGIQ 群で回復した。PND 77 では LPS 単独群で FOS⁺顆粒細胞、*Fos*、*Mapk1*、*Mapk3* 遺伝子の発現が減少したが、LPS+AGIQ 群で FOS⁺顆粒細胞数と *Fos* 遺伝子の発現が回復した。神経栄養因子関連指標は、PND 77 に LPS 単独群で *Bdnf* と *Ntrk2* 遺伝子の発現が減少した。グルタミン酸受容体関連指標は、PND 77 に LPS 単独群で *Grin2a*、*Grin2b* 遺伝子の発現が減少した。

【考察】 胎生期の LPS 曝露は、児動物の離乳時での type-2b 神経前駆細胞、成熟期での type-1 神経幹細胞から type-2a 神経前駆細胞を標的とした進行性の海馬神経新生障害と成熟期での恐怖記憶獲得に関わる行動障害を誘発した。PND 6 の時点で炎症反応は消失しており、本研究での脳発達障害は LPS 曝露後早期での母体の一過性の免疫活性化が原因であると考えられた。成熟期の恐怖記憶獲得障害は、進行性の海馬神経新生障害と新生顆粒細胞におけるシナプス可塑性の低下が関与して生じ、それには GABA 性介在ニューロンシグナル、NMDA 受容体、BDNF シグナルの減少が関わっているものと考えられた。AGIQ の持続投与により LPS による行動障害や神経新生障害の殆どは改善しており、これは AGIQ が LPS 曝露後早期の免疫活性化を抑制した結果であると考えられた。

○高嶋 和巳^{1,2}、岡野 拓^{1,2}、唐 倩^{1,2}、高橋 康德^{1,2}、尾城 椋太^{1,2}、小澤 俊介^{1,2}、小柳 美穂子³、吉田 敏則^{1,2}、渋谷 淳^{1,2}

¹ 東京農工大学 獣医病理学研究室

² 東京農工大学 大学院・共同獣医学専攻

³ 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

【背景】 Polyinosinic-polycytidylic acid (poly (I:C)) のげっ歯類に対する妊娠期曝露は、ウイルス感染による母体免疫活性化に起因した発達神経障害モデルとして知られている。一方、認知、学習及び記憶形成において重要な役割を果たす海馬では、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、発達神経障害時の標的となる可能性が高く、母体免疫活性化による発達神経障害の病態にも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 poly(I:C)誘発母体免疫活性化モデルにおける児動物の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ケルセチン配糖体である α -glycosyl isoquercitrin (AGIQ) を用いて、当該モデルに対する保護効果について検討した。

【方法】 妊娠ラットを溶媒対照群、poly(I:C)単独群、poly(I:C)+0.25%AGIQ 群、poly(I:C)+0.5%AGIQ 群に分け、妊娠 15 日に poly(I:C) 4 mg/kg を単回、静脈内投与した。AGIQ は、妊娠 10 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 77 に雄児動物の海馬歯状回を対象に、顆粒細胞層下帯 (SGZ) / 顆粒細胞層 (GCL) における顆粒細胞系譜指標と歯状回門部における 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、関連遺伝子の発現を real-time RT-PCR 法により解析した。

【結果】 PND 21 では、溶媒対照群に比して、poly(I:C)単独群では SGZ における TBR2⁺細胞数が減少したが、他の顆粒細胞系譜指標 (GFAP、SOX2、DCX、TUBB3、NeuN) の陽性細胞数は変動しなかった。また、poly(I:C)単独群の SGZ では、細胞増殖指標の PCNA⁺細胞数が減少し、歯状回門部では reelin⁺介在ニューロン数が減少した。一方、0.5%AGIQ 群では、poly(I:C)単独群に比して SGZ における TBR2⁺細胞数及び PCNA⁺細胞数、並びに歯状回門部における reelin⁺介在ニューロン数が増加した。PND 77 では、poly(I:C)群及び AGIQ 群に神経新生指標の変動は認められなかったが、0.25%AGIQ 群の GCL において、シナプス可塑性指標の FOS⁺細胞数が増加した。遺伝子発現解析では、PND 21 に AGIQ 群で poly(I:C)群に比して reelin シグナル関連遺伝子 (*Reln*, *Vldlr*) 及び Wnt/ β -catenin シグナル関連遺伝子 (*Wnt5a*, *Lrp6*, *Gsk3b*, *Fzd1*, *Fzd3*) の発現が増加した。PND 77 には AGIQ 群で NMDA 型グルタミン酸受容体遺伝子 (*Grin2a*, *Grin2b*) の発現が増加した。

【考察】 Poly(I:C)の妊娠期単回投与は、幼若期に type-2b 神経前駆細胞を標的とした可逆的な神経新生抑制を誘発し、これには reelin シグナルの低下や神経前駆細胞の増殖抑制が関与することが示唆された。一方、AGIQ は、reelin シグナルや Wnt/ β -catenin シグナルの増加を介して神経前駆細胞を増幅することで poly (I:C)による神経新生障害を軽減することが示唆された。また、AGIQ は、NMDA 型受容体を介したグルタミン酸シグナルを増強することで成熟後のシナプス可塑性を亢進すること示唆された。

○小澤 俊介^{1,2}、渡邊 洋祐¹、齋藤 文代^{3,4}、赤堀 有美³、岡野 拓^{1,2}、高嶋 和巳^{1,2}、高橋 康徳^{1,2}、尾城 椋太^{1,2}、唐 倩^{1,2}、吉田 敏則^{1,2}、渋谷 淳^{1,2}

¹ 東京農工大学 獣医病理学研究室

² 東京農工大学 大学院・共同獣医学専攻

³ 化学物質評価研究機構

⁴ 岡山理科大学 毒性学研究室

【背景・目的】

アルキル化剤である *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) は、発達期のマウスへの曝露により前脳の広範な神経幹/前駆細胞の細胞死による小脳症を誘導する。我々は、ラットに MNU を 28 日間反復経口投与すると、海馬歯状回の神経新生部位で神経幹/前駆細胞の細胞死を誘導することを報告した。本研究では、アルキル化剤曝露による中枢神経に広く生じる影響を明らかにする目的で、この MNU 反復投与例において、複数の異なる脳領域に共通して発現変動する遺伝子を解析し、それらの発現特性を検討した。

【方法】

5 週齢の雄性 SD ラットに MNU を 0、5 及び 15 mg/kg 体重の用量で 28 日間強制経口投与し、4 つの脳領域 (海馬歯状回、脳梁、大脳皮質、小脳虫部) でマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。得られた候補遺伝子について、real-time RT-PCR による発現の検証解析を実施し、翻訳産物の免疫染色が可能な遺伝子を選択して、それらの分布解析を行った。更に発現細胞を同定する目的で、ニューロンやグリア指標との免疫二重染色を実施した。解析した分子がグリアとの共局在を示したため、GFAP、Iba1、CD68、CD163 の脳の各部位での発現細胞数の変動を解析した。

【結果】

網羅的遺伝子発現解析の結果、15 mg/kg 群で発現上昇 (1.5 倍以上) 又は発現低下 (0.67 倍以下) した遺伝子数は、海馬歯状回で 328、脳梁で 1144、大脳皮質で 317、小脳虫部で 1386 であった。その内、4 つの脳領域に共通して 27 遺伝子が発現上昇し、3 遺伝子が発現低下した。共通発現上昇遺伝子として、*Cd74*、*Ccl3*、*Lgals3*、*Fcgr2b*、*Fcgr3a*、*Serping1*、*Hcst*、*Kcnn4*、*Tyrobp*、*Cyba*、*Gpr18*、*Tnf* などの炎症・免疫応答関連遺伝子や、*Mt1*、*Mt2a* などの神経保護関連遺伝子が含まれた。一方、共通発現減少遺伝子は、細胞増殖、遊走、ヌクレオチド代謝に関連した *Bmp4*、*Vcan*、*Fhit* であった。mRNA 発現の検証解析後、*Lgals3*、*Mt1* 及び *Mt2a*、*Vcan* を選択し、その翻訳産物の発現細胞の分布を解析した結果、4 領域において metallothionein-I/II (*Mt1* 及び *Mt2a*) 及び galectin 3 (*Lgals3*) 陽性細胞数が増加し、いずれも GFAP 及び Iba1 と共局在したが、NeuN、OLIG2、NG2 とは共局在しなかった。グリア細胞の分布解析の結果、GFAP 陽性細胞は脳梁のみで増加し、Iba1 及び CD68 陽性細胞は 4 領域において増加したが、CD163 陽性細胞数の変動を認めなかった。

【考察】

本研究結果より、MNU の 28 日間反復経口投与によって、アストロサイト及びミクログリアでの metallothionein-I/II 及び galectin 3 の誘導が示唆された。Galectin 3 はミクログリアの活性化と増殖の調節を担うことが知られており、MNU 投与による広い脳領域での発現増加により、活性化した M1 ミクログリアの増加を伴った炎症・免疫応答の活性化が示唆された。また、グリアにおける metallothionein-I/II の誘導は、神経保護のための抗炎症反応への関与が示唆された。以上より、MNU の反復投与による脳内での神経炎症と共に抗炎症反応の誘導が示唆された。

○Hironori Izumi¹, Maina Demura¹, Ayako Imai¹, Tomoyuki Yoshida¹, Ryohei Ogawa², Hisashi Mori¹

¹ Department of Molecular Neuroscience, ² Department of Radiology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama 930-0194, Japan

【Background & Object】

Many types of pesticides including fungicide, insecticide and herbicide are widely used for improving the efficiency of agricultural yield and for enabling the prolonged storage of crops. They are typically expected to act on specific targets such as micro-organisms, insects, or plants. However, exposure to pesticides is potentially associated with human health risks, which is an increasing focus of public concern. Recent studies suggest the association of pesticides exposure with neurodevelopmental disorders including autism spectrum disorder¹. To obtain a better understanding of the neuronal substrates of behavioral changes related to exposure to pesticides, it is crucial to integrate the molecular/cellular events and behavioral outcomes. Previously, we have developed reporter transgenic mouse strains expressing the firefly luciferase gene under regulation of the Arc gene promoter and showed abnormal neuronal-activity-dependent Arc expression in mouse brain by the exposure with the herbicide glufosinate-ammonium (GLA)². Because Arc involves in synapse regulation, we examine the effects of GLA exposure on synapses formation and gene expression in this study.

【Materials & Methods】

C57BL/6N mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). The day observed a vaginal plug was designated gestation day 0.5 (GD 0.5) and GLA dissolved in saline was administered intranasally to pregnant females from GD 10.5 to GD 18.5. The GD 18.5 mouse embryos were used for primary culture of cerebral cortical neurons. For the synapse formation assay, the cultured neurons were incubated with post-synapse organizer coated beads and fixed with 4% PFA-PBS followed by immunostaining of presynaptic marker, Bassoon. For the transcriptome analysis, total RNA was isolated from the cultured neurons at different time points and synthesized cRNA were used for the microarray analysis (Clariom S Assay, Mouse, ABI). Obtained data were analyzed using Transcriptome Analysis Console 4.0.2 (ABI).

【Results & Discussion】

In the synapse formation assay, we found disturbance of presynaptic differentiation induced by the synapse organizer coated beads in cultured neurons from maternal exposure to GLA compared to saline-control group. Furthermore, we identified differentially expressed genes related to nervous system development including synapse components between GLA-treated and saline-control neurons from the transcriptome analysis of primary cultured cortical neurons. From our results, the synapse formation assay is valuable for the study of developmental neurotoxicology of pesticides. Our results will provide precious evidence to understand the mechanistic basis for the effect of GLA on the CNS.

【References】

1. von Ehrenstein et al., Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population based case-control study. *BMJ*, 364:1962, 2019.
2. Izumi et al., Bioluminescence imaging of Arc expression in mouse brain under acute and chronic exposure to pesticides. *Neurotoxicology*, 71:52-59, 2019.

○田邊 思帆里¹、Sabina Quader²、小野 竜一³、Horacio Cabral⁴、青柳 一彦⁵、
広瀬 明彦¹、横崎 宏⁶、佐々木 博己⁷

¹ 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

² (公財) 川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター

³ 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

⁴ 東京大学大学院 工学系研究科

⁵ 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

⁶ 神戸大学大学院 医学研究科

⁷ 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】 上皮間葉転換はがん幹細胞と共通の分子特性を有し、がん転移や治療抵抗性に関与している。上皮間葉転換の分子ネットワークを解析することは治療ターゲットを同定する上でも重要なことから、遺伝子発現関連公開データベース等のデータを用いてネットワーク解析し、その関連分子パスウェイの RNA 制御について検討した。

【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 公開データ及び Gene Expression Omnibus (GEO) 上の公開データを用いて、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 等による分子ネットワーク解析を実施した。

【結果・考察】 IPA を用いて”cancer stem cell” (がん幹細胞) の関連データを解析したところ、約9万を超えるデータから 58 データセット 46 解析が、がん幹細胞関連データとして同定された。46 解析のうち、”brain”に関連するデータは 22 解析であり、”bone marrow”に関連するデータは 6 解析であった。膠芽腫に関しては上皮間葉転換制御パスウェイが変化しており、let-7, mir-10, mir-218, mir-22, miR-489-5p (miRNAs w/seed GUCGUAU), mir-8, MIR100-LET7A2-MIR125B1, MIR99A-LET7C-MIR125B2, MIRLET7, SPRY4-IT1 が相互作用 RNA として同定された。白血病に関してはコロナウイルス病態パスウェイや活性酸素種産生パスウェイ等が変化していた。また、上皮間葉転換様の性質を有し、治療抵抗性を示すびまん型胃がんにおけるがん悪性化と治療応答性に関する分子ネットワークに関して IPA を用いて解析したところ、ERBB2, lenvatinib, pyrotinib, mir-196, HDAC1 が causal network のマスターレギュレーターとして同定された。HDAC1 の相互作用ネットワーク解析により、カノニカルパスウェイである growth factors pathway や coronavirus pathogenesis pathway、さらに vorinostat の関与が示唆された。びまん型胃がんの分子ネットワークへの RNA ウィルスネットワークの関与が示された。以上のことから、RNA ウィルスネットワークのがん悪性化への関与の可能性が示され、びまん型及び腸型胃がんにおける RNA 制御が明らかとなった。

【参考文献】

1. Tanabe, S., Quader, S., Ono, R., Cabral, H., Aoyagi, K., Hirose, A., Yokozaki, H., Sasaki, H. (2020). Molecular network profiling in intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Cancers* **12**:3833. doi:10.3390/cancers12123833
2. Tanabe, S., Quader, S., Cabral, H., Ono, R. (2020) Interplay of EMT and CSC in cancer and the potential therapeutic strategies. *Front. Pharmacol.* **11**:904. doi:10.3389/fphar.2020.00904
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. doi:10.3892/ijo.2014.2387

マウス受精卵の CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって オンターゲット部位に生じた多様な非意図的変異の次世代 伝達

○五十嵐 智女¹、安彦 行人^{1,2}、小野 竜一¹、高木 篤也¹、高橋 雄¹、栗形 麻樹子¹、
北嶋 聡¹

¹ 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

² 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 薬理部

【背景・目的】CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集は、配列特異的な DNA 二本鎖切断と修復機構を利用した技術であるが、従来法と比べて非常に高効率かつ簡便に目的とする遺伝子改変を実現し、多くの生物種への適用が可能である。このため、基礎研究の分野における遺伝子改変動物モデルの作製をはじめ、農作物の育種から新たな遺伝子治療法の開発まで、幅広い分野においてその活用が進められている。本技術の安全性に関わる潜在的なリスクとしては非意図的変異の挿入が挙げられ、これまで注目されてきたものは主にオフターゲット部位の変異である。一方、我々は本技術を用いたマウス受精卵のゲノム編集により、転写因子 *Myf5* の H1 enhancer Hox binding site (HBS) に一塩基置換を導入したノックインマウスを作製した際、「オンターゲット」部位において非常に多様な非意図的変異が高頻度に生じていることを見出した。本発表では、このようなオンターゲット部位の非意図的変異が次世代に伝達されることを報告する。

【方法】ノックイン型の受精卵ゲノム編集を行うために、Cas9 ヌクレアーゼ蛋白、HBS を挟む 2 か所で切断するよう設計した guide RNA、及びドナーの 1 本鎖 DNA を、エレクトロポレーションで 1 細胞期の受精卵に導入した (IDT 社 Alt-R®CRISPR/Cas9 system 及び BEX 社製エレクトロポレーターを使用)。117 個の受精卵を 2 細胞期で偽妊娠マウスの卵管に移植し 15 匹の出生児 (N0) を得た。N0 がモザイクであったため、野生型との交配により N1 を得た。尾の DNA を鋳型として PCR で増幅した HBS を含む 837 塩基の領域を TA クローニングし、DNA 配列を解析した。

【結果・考察】オンターゲット部位である HBS を含む 44 塩基の領域について詳しく検討したところ、N0 マウスの 6/15 匹 (40.0%) において目的とする変異のノックインを確認できた。一方、全ての N0 マウスで非意図的変異が検出され (合計 35 種類)、1 個体あたり最大 5 種類のアレルを有するモザイクとなっていた。次に、7 匹の N0 に由来する N1 マウスについて解析したところ、検出された変異型アレルは N0 の 1~5 種類に対し N1 は 1~4 種類とやや少なかった。しかし、N1 では目的変異のノックイン型だけでなく、大きな欠失型やタンDEMノックイン型のような非意図的変異を含む多くの変異が検出されたことから、ゲノム編集により生じた多くの変異が N0 の生殖系列に入り、排除されずに N1 世代に伝達されたと考えられる。本研究の条件下では、変異型アレル数が最大 5 種類であったことから 1 細胞期で導入した Cas9 蛋白のヌクレアーゼ活性が 8 細胞期まで残存し、N0 の体細胞及び生殖系列の細胞がモザイクとなったことが、多様な非意図的変異が生じた一因と考えられた。また、10 塩基のモチーフ CAGAGAGTTT を 3 回繰返す由来不詳の挿入配列が N0 及び N1 で検出され、この配列は *Salmo trutta* のゲノムと一致した。これは既報 (Ono et al. Commun. Biol., 2, 57, 2019) にあるような DNA 二本鎖切断の修復の際に起きた、異種ゲノムの水平伝播の可能性を示唆している。なお、5 系統については雌雄ともにホモ接合体の妊孕性を確認した。

【結論】以上のように、マウス受精卵のゲノム編集によってオンターゲット部位に生じた多様な非意図的変異は次世代に伝達され、ホモ接合体の雌雄は妊孕性を有することが明らかになった。このような本技術の潜在的特徴は、ゲノム編集を行った食品や医薬品の安全性担保においても適切な選別が必須であることを強く示唆している。

Fundam. Toxicol. Sci. Vol. 8, No. 5, 161–167, 2021.