

要旨

教育講演

教育講演

医薬品毒性機序研究の貢献と今後の展望

○横井 毅

名古屋大学大学院医学系研究科

医薬品開発におけるリード化合物の選択、治験における有用性や安全性の確保、臨床における個別薬物療法の実践等において、毒性情報は極めて重要である。近年の医薬品開発を取り巻く状況は、目覚ましい変化の渦中にある。薬物代謝や薬物動態研究の長足の進展は、創薬研究や臨床薬物療法に取り入れられ、今日まで約15年間に創薬の様々な段階において、開発中断の原因が解消されてきた。しかし、毒性研究はこれら代謝/動態の成果を取り込むことが十分ではなく、依然として毒性に起因する開発中断の割合は減少していない。本発表では、薬物動態研究の視点から毒性機序研究に関わる現状理解と研究の問題点や困難さ、そして今後の展望について述べる。

(1) 経口薬剤の消化管吸収の予測は難しい。塩基性薬物は胃内で易溶であり、胃内で溶解した薬剤がまとまって腸内へ移行し、腸内で過飽和や沈殿が生成される可能性がある。吸収の種差や、腸内の CYP 発現の著しい偏在の理解と解決が待たれる。今後は、*in silico* 吸収予測研究の進展も期待できる。(2) 近年の測定機器の性能進歩は顕著である。MALDI-TOF MS/MS は汎用機器となり、毒性代謝物の検索も簡便になった。今後、FT-ICR MS によって、ELISA レベルの感度による一斉分析が可能になり、動態と薬理と安全性を同時に考慮できる高い応用系が期待できる。(3) *In vitro* からヒト *in vivo* 動態予測における定量的外挿 (IVIVE, *in vitro-in vivo* extrapolation) は、動態研究の集大成の成果の一つである。IVIVE は non-CYP の代謝系や種差の考慮がまだ十分ではないが、体内動態が良好なリード化合物の選択が可能となった。この結果を毒性研究に拡大/応用した予測系が望まれている。(4) *In vitro* 試験系から予測された PK パラメーターは、薬理/動態や毒性発現の予測に用いられる。しかし近年、低クリアランス化合物が選択されることにより、特に non-CYP 代謝や種差の影響が出やすくなり、毒性予測を難しくしている。(5) 従来の CYP を中心とした試験系を強く補完する系として、non-CYP 及び肝外代謝の予測/評価の必要性が報告されている。特に、グルクロン酸転移酵素、アルデヒドオキシダーゼ、エステラーゼ等の関与が報告され、さらなる適切な予測試験系が開発されつつある。しかし、開発初期の非標識の候補化合物が、どの肝外臓器の酵素に影響を受けるかは難しい課題であり、毒性予測を難しくしている。(6) 近年様々なヒト型マウスモデル動物等が普及しつつある。なかでも、ヒト肝臓を有するマウスは動態/毒性/薬理研究に利用されている。肝臓以外の臓器はマウスであり、様々な点で種差が影響するものの、毒性研究の有力な手段である。(7) 医薬品毒性の多くは用量依存的に発現し、その予測・回避は可能である。しかし、Idiosyncratic (特異体質性) 毒性は、発症頻度が稀で、用量依存性を示さず予測は困難である。さらに近年、炎症・免疫因子の関与の研究が進展し、バイオマーカーの提案や、*in vitro* 予測試験系の開発が進められており、sensitivity 及び specificity の高い系の報告が散見される。(8) Idiosyncratic 毒性の起因薬には、反応性代謝物の関与が強く示されている。開発後期や市販後の毒性発現は、社会的損失が大きい。Idiosyncratic 毒性のバイオマーカーは未だ不十分であり、病態や病型バイオマーカーとしての確立が期待される。開発中止をもたらす毒性発現の理解には、薬物代謝・薬物動態の理解が必須であり、体内動態の包括的で定量的な理解が、近い将来の毒性研究に資するものと考えられる。

要旨

シンポジウム 企業シンポジウム

○今岡 尚子

第一三共株式会社 安全性研究所

細胞死の様式は様々であり、旧来から知られているネクロシス、アポトーシスに加えて、異なるメカニズムによる様々な細胞死が確立されてきている。しかしながら、毒性病理学的な視点からはこういった概念は評価に取り入れづらい。特に「化学物質や新薬候補化合物の毒性試験における病理評価」という視点から見た場合、形態学的な視点を基に診断を下している背景から、HE 標本で鑑別可能な細胞死の種類にのみ限定して所見名が規定されている場合が多い。また、ヒトへのリスクアセスメントという観点から見れば、細胞の死＝実質臓器の障害を示唆するか否か、その病変はヒトや実験動物にとって有害か否か、という点に焦点が絞られているため、厳密に細胞死の種類を規定する必要性が低いという背景もある。

一方で、近年では細胞死の種類を鑑別可能な特殊染色や免疫染色の知見も蓄積されている。病変の発現機序解析の際にこれらの鑑別ツールを活用すれば、形態学的診断を基本とする毒性病理学としても、より深く病態を知ることができると考えられる。本発表では、病理組織学・毒性病理学的な細胞死の診断の実際と細胞死の種類による形態の違い、最近検討されつつある各メカニズムに応じた病理学的な細胞死の鑑別方法について概説し、知見・経験の共有や今後の展望について議論したい。

○中野 裕康

東邦大学医学部生化学講座

最近の研究からアポトーシス以外にも制御された細胞死 (regulated cell death, RCD) が複数存在することが明らかになってきた。そのなかの1つであるネクロプトーシスは、ネクローシス様の細胞死形態をとり、早期に細胞膜が障害され danger-associated molecular patterns (DAMPs) が放出された結果、周囲に強い炎症などを引き起こすことが明らかにされている。ネクロプトーシスは TNF 投与などにより誘導される全身性炎症性症候群、虚血再灌流障害、神経変性疾患、ウイルス感染などの病態への関与が示されている。我々はこれまでに Fluorescence resonance energy transfer (FRET) の原理を応用してネクロプトーシス細胞をライブセルでイメージングできる SMART (a Sensor for MLKL Activation by RIPK3 based on FRET) と命名したバイオセンサーを開発した。また LCI-S (Live Cell Imaging for Secretion activity) という最新の技術を用いてネクロプトーシス細胞から放出される DAMPs の 1 細胞レベルでのイメージングに成功した。さらに最近 SMART を全身で発現するトランスジェニック (Tg) マウスを樹立し、DAMPs として有名な HMGB1 (High mobility Group Box 1) を mCherry との融合タンパク質として発現する Tg マウスを樹立した。本シンポジウムでは、我々が開発したネクロプトーシスのライブセルイメージング技術や SMART Tg マウスおよび HMGB1-mCherry Tg マウスを用いて得られた結果について紹介したい。

S1-3

重症薬疹における細胞死

○阿部 理一郎

新潟大学医歯学総合研究科皮膚科

重症薬疹 (Stevens-Johnson 症候群、中毒性表皮壊死症) は時に致死的となる重篤な薬疹である。臨床的特徴として、広範囲な皮膚及び粘膜のびらん・潰瘍形成であり、病理学的にも上皮細胞の細胞死が見られる。私たちは重症薬疹における上皮細胞死の機序の解明に取り組み、細胞死形態としてアポトーシスのみならず、ネクロプローシス (プログラムされたネクローシス) が起こり、その細胞死誘導には特異的な機序があることを報告してきた。

本講演では最近の知見を発表するとともに、研究成果に基づいた臨床への取り組みも紹介する。

○松沢 厚

東北大学 大学院薬学研究科 衛生化学分野

【背景・目的】 ゲフィチニブ(商品名:イレッサ)は、がん増殖に重要な上皮成長因子受容体(EGFR)を選択的に阻害する抗がん剤で、肺癌治療薬として世界に先駆けて日本で2002年7月に承認された。現在、世界約90カ国で、EGFR遺伝子変異陽性の手術不能または再発非小細胞肺癌に適応されている。ゲフィチニブのような特定の分子を狙い撃ちする分子標的治療薬は、治療効果と安全性の高さが期待されたが、上市直後から急性肺障害や間質性肺炎などの致死性副作用の報告が相次ぎ、我が国で大きな社会問題となった。しかし、ゲフィチニブによる急性肺障害や間質性肺炎の発症メカニズムはこれまで良く分かっていない。そこで我々は、ゲフィチニブ副作用発症の機序解明を目指して解析を進めた。

【結果・考察】 ゲフィチニブの副作用は、EGFRとは別の標的を介して惹起されると考えられる。急性肺障害や間質性肺炎はいずれも炎症性疾患であることから、ゲフィチニブが炎症誘導に関わる分子やシグナル経路を標的として炎症を惹起していると考え、その分子メカニズムを解析した。その結果、ゲフィチニブは免疫応答に重要なマクロファージに作用し、炎症性サイトカインIL-1 β と核内タンパク質HMGB1という2種類の起炎物質の細胞外分泌を促進して炎症惹起することが判明した。HMGB1にはIL-1 β 分泌促進作用があることから、ゲフィチニブによるHMGB1分泌は、IL-1 β 産生量を増強し、強い炎症誘導の引き金になっていると考えられる。そのメカニズムとしてゲフィチニブは、IL-1 β 分泌を促進して炎症誘導に働く細胞内分子複合体であるNLRP3インフラマソームを活性化すること、また、DNA障害などに応答する炎症誘導分子PARP-1の異常な活性化を介してHMGB1分泌を促進することが明らかとなった。従って、ゲフィチニブは「NLRP3インフラマソーム活性化」と「PARP-1の異常活性化」という異なるメカニズムを同時に動かし、相乗的に炎症を惹起することが判明した。さらに、IL-1 β 分泌を遮断したマウスでは、ゲフィチニブによる肺炎が起こらず、ゲフィチニブの肺障害や間質性肺炎の原因がIL-1 β の過剰分泌であることが示された。

我々は、ゲフィチニブ以外の薬剤についても副作用発症の機序解明を進めている。例えば、セフォタキシムのような一部のセフェム系抗菌薬は急性尿細管壊死を原因とする重篤な腎障害などを引き起こすが、その機序は不明である。検討の結果、セフォタキシムは、活性酸素種(ROS)の産生を惹起し、ROS依存的かつPARP-1異常活性化を伴う、液滴様タンパク質凝集体ALIS(aggregosome-like induced structures)の形成促進を介して、“パータナトス”と呼ばれる新たな細胞死を誘導することを見出した。パータナトスは神経変性疾患など様々な疾患との関連性が示され、最近注目を集めている。これらも含め、医薬品の副作用発症機序に関する我々の研究を紹介したい。

【参考文献】

1. Noguchi, T., Sekiguchi, Y., Kudoh, Y., Naganuma, R., Kagi, T., Nishidate, A., Maeda, K., Ishi, C., Toyama, T., Hirata, Y., Hwang, G. W., Matsuzawa, A. Gefitinib initiates sterile inflammation by promoting IL-1 β and HMGB1 release via two distinct mechanisms. *Cell Death & Disease*, 12, 49 (2021).
2. Kagi, T., Noguchi, T., Matsuzawa, A. Mechanisms of gefitinib-induced interstitial pneumonitis: why and how the TKI perturbs innate immune systems? *Oncotarget*, 12, 1321-1322 (2021).

○加藤 隆児

大阪医科薬科大学薬学部 循環病態治療学研究室

特異体質性薬物性肝障害の発症には、免疫細胞の関与が考えられている。通常、薬物性肝障害の検討を細胞実験系で行う場合、生体条件に近づけるために3次元培養などが行われているが、その多くは肝細胞単独での評価となっている。細胞実験での評価項目として生存率や細胞障害に関する逸脱酵素などが測定されているが、それらに変動が認められる薬物濃度は通常ヒトの臨床濃度（血液中濃度）よりかなり高い場合が多い。薬物は添加濃度が高くなれば、本来の薬理作用以外の作用を示していることが多く認められる。そのような条件下での検討では、本来臨床で起こっているものとは異なる機序で毒性を示している場合があり、研究結果が得られても実際の臨床には応用できない結果となってしまう。例えば、本来共有結合を起こさない薬物が、濃度が高いために共有結合を起こしているかのように見えてしまい、毒性機序を共有結合によるものとしてしまう場合がある。したがって、中毒性か特異体質性か、肝障害の発症機序を改めて考え、機序による濃度設定が必要と考えられる。

薬物性肝障害の中でも特異体質性薬物性肝障害は、その発症に免疫細胞が関与していると言われており、組織学的検討では免疫細胞の浸潤が認められている。そのため、免疫細胞により炎症が増悪され、その結果肝細胞障害が起こると考えられる。演者はこれまでに、薬物の反応性代謝物が細胞ストレスとなり、抗原提示細胞を活性化する何らかの物質を放出することで抗原提示細胞を活性化し、強い免疫反応が起こることで特異体質性の肝障害が起こることを検討してきた。現在実験を行っている条件での薬物濃度はヒトの臨床濃度域に設定して検討を行っているが、抗がん剤などを除けば、生存率や逸脱酵素の放出はあまり認められない条件である。ミトコンドリア膜電位やcaspase-9活性なども測定しているが、有意な変動も認められない場合が多い。一方、肝細胞と免疫細胞を共培養にて存在させ、免疫細胞の反応をしてみるとサイトカインの放出など何らかの反応が起こっているように観察される。このように、特異体質性薬物性肝障害では免疫細胞の関与が考えられるため、肝細胞での評価だけではなく、免疫細胞を共培養し、免疫細胞の反応を評価に組み込むことも有効と考えられる。

ヒトの生体を模倣した評価システム (Microphysiological System, MPS) は、その環境が生体に近いことから研究を行う上で重要である。薬物性肝障害の評価となると、肝細胞での反応を中心に考えることから、単独での培養を行う場合も多い。しかし、免疫細胞とのインタラクションが発症機序として必要な場合には、免疫細胞を評価系に組み込むことが必要と考えられる。本シンポジウムでは、演者がこれまで行って来た研究結果を提示しながら、特異体質性薬物性肝障害発症機序解明における免疫細胞の必要性について考えたい。

S2-2

免疫細胞—肝臓連結 MPS 開発の現状と課題及び DILI 発症における分子機構解明への取り組み

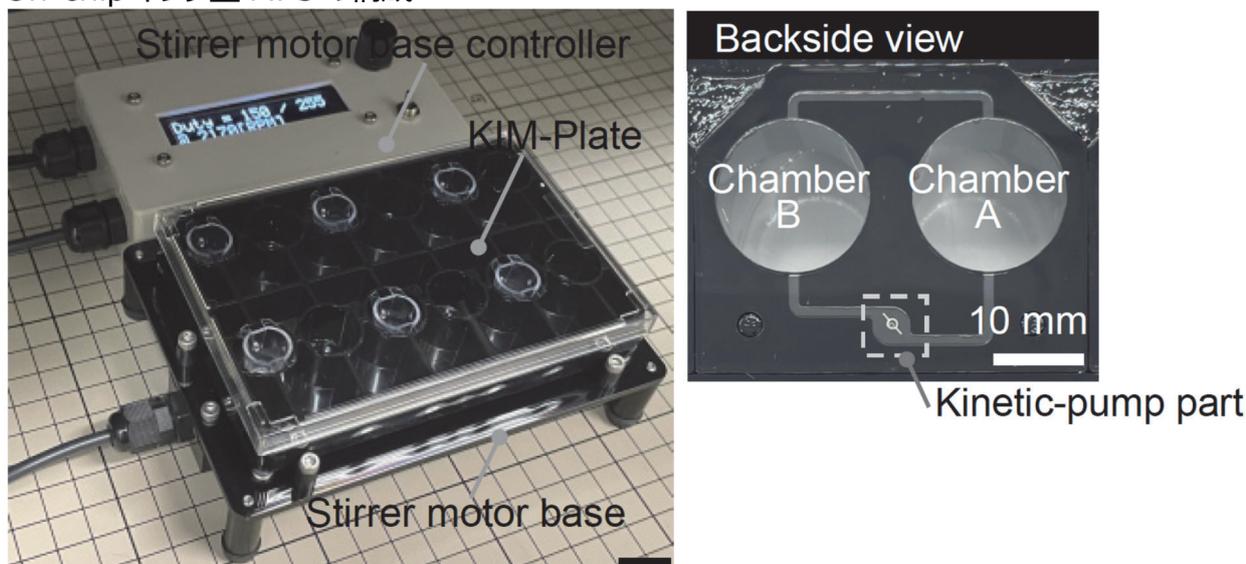
○柿木 基治, ○伴 涼太郎

エーザイ株式会社 グローバル薬物動態研究部

薬剤性肝障害 (DILI) を示す多くの化合物が化学的反応性の高い代謝物を生成することが知られている。これは反応性代謝物が肝細胞内の重要な機能を担っているタンパク質や核酸に共有結合するため細胞の機能障害、細胞ストレス及び細胞死を誘導する。引き続いて肝細胞死が誘導されると細胞外に内因性の DAMPs (damaging-associated molecular pattern: 障害関連分子パターン) である HMGB1、HSP90 及び ATP などが放出され、これらが TLR パターン認識受容体あるいはインフラマソームを介して炎症反応が拡大することにより肝障害が臓器全体に及ぶことが示唆されている。本発表では DILI 発症の細胞死及び DAMPs についてそれぞれ反応性代謝物のアダクト解析及びタンパク質の発現変動解析を目的とし、プロテオミクス手法を用いた解析結果を報告するとともに展望について言及する。

一方、次の目的として前述した免疫系関与の肝炎症発症機構に基づく DILI 予測系モデルの開発が重要な鍵となる。そこで肝細胞モデルに免疫システムを組み込んだ On-Chip ポンプ型 MPS モデルの可能性について検討した(下図)。

On-chip ポンプ型 MPS の構成¹⁾



本モデルは東海大学、木村啓志先生により開発された MPS モデルであり小腸—肝臓モデルを用いた薬物動態評価において報告されている¹⁾。そこで我々は本 MPS デバイスに肝細胞として HepaRG を免疫担当細胞は THP-1 細胞を用いて炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF α , etc) を指標に行った結果を報告するとともに免疫細胞を用いた共培養についての課題について議論したい。

1) K. Shinha, W. Nihei, H. Nakamura, T. Goto, T. Kawanishi, N. Ishida, N. Yamazaki, Y. Imakura, S. Mima, K. Inamura, H. Arakawa, M. Nishikawa, Y. Kato, Y. Sakai, H. Kimura, A Kinetic-Pump Integrated Microfluidic Plate (KIM-Plate) with High Usability for Cell Culture-based Multi-Organ Microphysiological Systems, *Micromach*, 2021, 12(9), 1007.

木村 真弥¹, 小森 久和¹, ○篠澤 忠紘¹

¹ 武田薬品工業株式会社 薬剤安全性研究所

近年、医薬品開発が困難を極める中、その成功確立向上に向けて、研究開発早期にその継続/非継続の意思決定を試みることは、極めて重要な課題となっている。中でも、前臨床段階における候補化合物の安全性評価結果、特に肝障害に関連した評価結果は、その後の開発の効率化に大きく影響するため、意思決定のための重要な要素になりうる。実際、臨床試験において肝障害による開発中止のケースは未だ多く、なにより患者さんの健康に大きな影響を与えうる。肝障害は Intrinsic Drug induced Liver Injury (DILI) と Idiosyncratic DILI に大別される。Intrinsic DILI は、予測しえる肝障害と報告され、前臨床モデルやヒトで用量依存性が確認できるものとされている。そのメカニズムとして、ミトコンドリア障害、酸化ストレスまたは胆汁合成・排泄のホメオスタシスに関連することが報告されており、研究開発早期における肝毒性評価には、細胞を用いた in vitro 評価系が大いに採用されてきた。これまで、同評価系には初代肝細胞、株化細胞または iPS 細胞由来肝細胞が採用されてきたが、細胞自体の成熟性・機能性の観点から、ヒト安全性予測における確度が保証しにくい状況であった。しかしながら、近年、3次元培養系により初代肝細胞を Spheroid 化し、肝障害予測の感度及び特異度を向上させる取り組みがいくつか示されており、薬物性肝障害発生の低減に貢献している。

一方、Idiosyncratic DILI については、現在の前臨床試験において、評価・予測することは未だ困難である。Idiosyncratic DILI は、そのケースは非常に稀で、10000 人の患者さんの中で 1 名の発生頻度とされている報告もある。特に、発症が初回投与からやや遅れて発現するものや用量依存性が認められないものが含まれ、その予測は困難を極める。Idiosyncratic DILI の主なメカニズムの一つとして、免疫システムの関与が考えられている。これは、肝細胞が薬剤に反応し何らかの抗原を産生することで抗原特異的なリンパ球が増殖・活性化し、自身の肝臓を攻撃するメカニズムである。多くの場合、薬剤により肝細胞にストレスがかかった場合にも、それに適応するためのシステムが早期に働く、または薬剤が Washout され、肝障害の重篤化を回避すること可能である。一方、何らかの原因によってこのような迅速な適応が機能しない場合、ストレス反応は、強力な免疫反応を誘発する「危険信号」の放出をもたらすことが示唆されている。そこで、この「危険信号」を探索し、それを前臨床評価に用いることによって、開発早期に Idiosyncratic DILI の原因の一つとされる免疫介在性肝障害を予測できないかと、評価系の構築が検討されている。

本発表では、前臨床における肝障害の評価・予測に関する実施例、特に、in vitro における免疫介在性肝障害 model 構築への試みを紹介するとともに、今後期待される展望と課題について議論したい。

○伊藤 俊輔¹¹ 中外製薬株式会社 トランスレーショナルリサーチ本部

【背景・目的】

可溶性抗原を標的分子とする抗体医薬品は、抗原と結合することにより、疾患の原因となるタンパク質の機能を阻害し、病態の改善に寄与する。一方、抗体-抗原から成る免疫複合体 (Immune Complex, IC) の形成と蓄積が生じうる。抗体を含む IC は、Fc 受容体 (FcR) を介して免疫細胞を刺激し、生体内で血管障害や血小板凝集等に繋がるポテンシャルを持つ。抗 CD40 リガンド (CD40L) を標的とした抗体医薬品 BG9588 の事例では、CD40L と IC を形成することが知られており、抗原の分解促進や複数の自己免疫疾患のマーカーの改善が臨床試験において認められたが、同時に、血栓症に起因した心筋梗塞の有害事象も報告されている¹⁾。IC の形成は抗体医薬品の代表的な作用機序に含まれるため、IC により起こり得る毒性の理解と予測は、抗体医薬品の開発にとって重要と考えられる。本発表では、抗体医薬品が IC を形成した際に引き起こす、血球及び血管内皮細胞への影響及び相互作用の研究を目的とした、ヒトの内皮細胞と末梢血単核球細胞 (PBMCs) の共培養モデルの応用事例について報告する。

【方法】

BG9588 の IgG1 型アナログ抗体 (BG9588 analog 抗体) と、BG9588 analog 抗体に対して FcγR への結合活性を減弱させる改変を加えた抗体 (BG9588 FcγR silent 抗体) をそれぞれ作製した。ヒトの PBMCs と臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) の共培養条件下、あるいは単独培養条件下に対して、各抗体を単独、又は可溶性 CD40L と IC を形成させた状態で加え、一定時間の培養後、細胞の表面マーカーやサイトカインなどの液性因子の分泌、TEER によるバリア機能等を測定した。

【結果・考察】

BG9588 analog 抗体を CD40L との IC 形成条件において、PBMCs と HUVECs の共培養条件下に添加すると、内皮細胞の活性化マーカー上昇、炎症性サイトカイン産生量の増加、及び TEER 値の低下が認められた。サイトカイン産生については、PBMCs の単独培養条件下でも、産生量増加が認められたが、HUVECs との共培養条件下の方が、増加量は大きかった。抗体単独で添加した条件では、いずれの測定項目も変化は認められなかった。BG9588 FcγR silent 抗体では、IC を形成させ添加した条件においても、各種細胞に変化は認められなかった。HUVECs のみを単独で培養させ、各抗体を添加した条件下では、IC 形成の有無に関わらず、いずれの抗体においても変化は認められなかった。これらの結果は、本共培養モデルにおいて、BG9588 が Fc 受容体を介して免疫細胞を活性化し、活性化された免疫細胞により内皮細胞が活性化されることで、サイトカイン産生の促進や血小板活性化因子の産生に繋がる現象を引き起こすことを示唆しており、BG9588 による心筋梗塞の機序理解に有用と考えられた。

【参考文献】

1) Dimitrios T Boumpas, Richard Furie, Susan Manzi, Gabor G Illei, et al., A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(3):719-27.

○田邊 思帆里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 安全性予測評価部

【背景・目的】現在、経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD）では健康影響等を評価するための有害性発現経路（Adverse Outcome Pathway; AOP）の開発が進んでいる。AOP の開発促進と OECD ガイダンスドキュメントへのコンプライアンス遵守を目的として、2019 年から OECD 分子スクリーニング及びトキシコゲノミクス拡大顧問委員会（the Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics; EAGMST）にてコーチングプログラムが導入されている。

【方法】AOP は、分子開始イベント（molecular initiating event; MIE）、派生する各レベルでのイベントである主要イベント（key event; KE）、最終的な有害影響である有害性発現（adverse outcome; AO）から構成される一連のパスウェイである。OECD EAGMST に各国等から提出された AOP にはコーチがアサインメントされる。現在、各国の専門家から構成される約 20 名のコーチが当該 AOP の OECD ガイダンスドキュメントやハンドブックへのコンプライアンスを確認している。コーチによるコーチ会議は年 2 回オンラインで開催され、コーチングの進め方に関して議論されている。

【結果・考察】2019 年以降、2022 年 11 月までに合計 7 回のコーチ会議を開催している。約 70 件超のコーチング AOP 及び AOP ネットワークが国際共同研究にて開発中であり、各 AOP について開発コーチング会議が開催されている。コーチング過程で頻出する事項に関して Q&A 形式でまとめたガイド文書をコーチ会議にて作成し、コーチングチェックリストを基にコーチングが進んでいる。OECD にて検討されたレギュラトリーアプリケーションに関するコメントも場合によって反映させるため AOP 開発がコーチングされている。OECD におけるコーチングプログラム等の取り組みにより、がんや新型コロナウイルス感染症等の疾患を含む様々な健康影響に関連する AOP 開発に関する国際共同研究が進んでいる。今後、健康や環境に関する安全性予測評価を含む科学的判断への AOP 活用が促進されると共に、医薬品等の有害性発現予測等に応用されることが期待される。

【参考文献】

1. Tanabe S, *et al.* (2022) Reactive Oxygen Species in the Adverse Outcome Pathway Framework: Toward Creation of Harmonized Consensus Key Events. *Front. Toxicol.* 4:887135. [doi:10.3389/ftox.2022.887135](https://doi.org/10.3389/ftox.2022.887135)
2. Tanabe S, *et al.* (2022) Report of the 1st and 2nd Mystery of Reactive Oxygen Species Conferences, *ALTEX*, 39(2), 336–338. [doi:10.14573/altex.2203011](https://doi.org/10.14573/altex.2203011).
3. Clerbaux L-A, *et al.* (2022) COVID-19 through adverse outcome pathways: Building networks to better understand the disease – 3rd CIAO AOP Design Workshop, *ALTEX*, 39(2), 322–335. [doi:10.14573/altex.2112161](https://doi.org/10.14573/altex.2112161).
4. Tanabe S, Hirose A, Yamada T. (2021) Adverse Outcome Pathway on histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy, *OECD Series on Adverse Outcome Pathways*, No. 17, OECD Publishing, Paris, [doi:10.1787/b9c4bdb2-en](https://doi.org/10.1787/b9c4bdb2-en).
5. 田邊 思帆里, 広瀬 明彦, Maurice Whelan, 山田 隆志 (2020) 「遺伝子ネットワーク解析による分子パスウェイ解明及び AOP 開発状況について」 *YAKUGAKU ZASSHI*, 140 巻, 4 号, p. 485-489, [doi:10.1248/yakushi.19-00190-2](https://doi.org/10.1248/yakushi.19-00190-2).
6. 田邊 思帆里, 山田 隆志 (2020) 「分子パスウェイ経路による有害性発現予測に関する OECD 等の取り組みについて」 *YAKUGAKU ZASSHI*, 140 巻, 4 号, p. 479-480, [doi:10.1248/yakushi.19-00190-E](https://doi.org/10.1248/yakushi.19-00190-E).

○小川 久美子¹, 長野 嘉介², 小島 肇³, 福島 昭治⁴, 西川 秋佳^{1,5}

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病理部

² 長野毒性病理コンサルティング

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安全性予測評価部

⁴ 一般社団法人化学物質安全性評価研究推進機構

⁵ 名古屋徳洲会総合病院 病理診断科

【背景・目的】経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）では、生体への有害影響の発現メカニズムが類似する化学物質をグループ化して理解し、規制に役立てる手掛かりとするため、機序に関する知見を毒性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）として取りまとめるプロジェクトを推進している。当初は環境毒性の発現経路を明確にするために開発されたが、広くヒト健康影響に関するメカニズム解析法の確立のために開発が推進されてきた。我々は、発がん機序に関する AOP のモデルとして、鼻腔発がんについて広く情報を収集し、腫瘍の発生部位、随伴病変等から発がんに至る経路及び病因について考察を試みた。

【方法】PubMed のほか、米国国家毒性プログラム（NTP: National Toxicology Program）、国際がん研究機関（IARC: International Agency for Research on Cancer）、及び日本バイオアッセイ研究センターのデータベースを用いて、ラット、マウスおよびハムスターに鼻腔腫瘍を誘発する化学物質を包括的に検索した。誘発鼻腔腫瘍については、動物種、投与経路、発生部位、病理組織型などのデータを抽出した。同時に誘発される非腫瘍性病変に関するデータも抽出した。病理用語については、年代等によって様々な用語が用いられることがあるため、国際毒性病理用語・診断基準（INHAND: International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria）に沿って分類する様に留意した。これらの情報を用いて、腫瘍の病因を評価するために、対応する部位の腫瘍タイプと非腫瘍性病変との関係を分析した。さらに、それぞれの化学物質の遺伝毒性データについても検索した。特に、ホルムアルデヒドについては、代謝や発がん過程の経時的変化に関する情報も収集し、詳細に検討した。

【結果・考察】検索によって、げっ歯類に鼻腔腫瘍を誘発する化合物として 72 の化合物が抽出された。40 物質が吸入試験、38 物質が非吸入試験（混餌、混水、強制経口）、6 物質が両方の経路からの暴露で誘発されていた。誘発腫瘍としては、扁平上皮癌、扁平上皮乳頭腫、腺癌、腺腫、腺扁平上皮癌、神経上皮腫瘍、及び間葉系腫瘍が認められた。扁平上皮癌は、投与経路に関係なく、げっ歯類で最も頻度の高い鼻腔腫瘍であり、その前駆病変は扁平上皮乳頭腫と同様に、呼吸上皮の扁平上皮化生及び/又は過形成であった。2 番目に多い腫瘍タイプである腺癌の前駆病変は、主に嗅上皮過形成であったが、腺腫の前駆病変は呼吸上皮病変であった。マウスとハムスターのデータは限られているものの、これらの経路は動物種間で一貫して認められた。検討結果からは、遺伝毒性の有無に依らず、責任病変は化学物質誘発性の細胞毒性と関連している可能性があること、分子起始イベントに続く経路は遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質の間でかなり重複している可能性があることが示唆された。これらの知見は、化学物質によって誘発される鼻腔腫瘍の病因に関する理解を深め、非遺伝毒性発がん物質の統合的評価手法（IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment）に繋がる細胞毒性に起因する発がん経路などの AOP を示すことになると考えられた。

○久田 茂

(元) 日本製薬工業協会医薬品評価委員会基礎研究部会

【はじめに】

本発表では、新たに発出された ICH S1B(R1)がん原性試験ガイドライン補遺で提唱された特定の証拠の重み付け (Weight of Evidence、WoE) に基づくがん原性評価における OECD の有害性帰結経路 (Adverse Outcome Pathway、AOP) の有用性について考える。

【ICH S1B がん原性試験法ガイドライン改定】

S1B ガイドラインの改定は 2011 年から進められ、2022 年 8 月 4 日に ICH 公式ウェブサイトにおいて S1B(R1) 補遺として公表された。本邦でも国内発出に向けての作業が進められている。

S1B(R1) で追加されたがん原性評価では、発がんに関連する生物学的、薬理的及び毒性学的知見をそれらの WoE に基づいて総合的に評価し、ラットがん原性試験を実施することなくヒトでの発がんリスク評価が可能かを判断する。

【OECD AOP プログラムと AOP の開発】

AOP は毒性発現の作用機序 (Mode of Action、MoA) に関する知見を AOP のフレームワークを用いて体系化したものであり、それぞれの AOP では、分子レベルでの初期イベント (Molecular Initiating Event、MIE) から有害影響 (Adverse Outcome、AO) の発生に至る経路が Key Events (KEs) 及び Key Event Relationships (KERs) を用いて記載される。OECD による AOP プログラムでは、総合的な毒性評価法 (Integrated Approach to Testing and Assessment、IATA) 開発の基盤とすることを目的の一つとして AOP の開発が進められており、これらが知識ベースとして AOP Wiki (<https://aopwiki.org/>) に蓄積されつつある。

【発がんに関する AOP】

6 月現在で AOP Wiki で閲覧可能な 398 件の AOP 及び AOP 案の内、48 件が発がんに関連する AOP である。ヒトにおける発がん及びげっ歯類特異的発がんを扱った AOP は、それぞれ 23 及び 25 件が登録され開発が継続されている。ヒト発がんの AOP では、肺及び乳癌発生に関して複数の AOP が提案され、MoA としては DNA 付加体形成を含む遺伝毒性機序、様々な要因による細胞障害に基づく発がんや悪性化、内分泌系の攪乱による発がんが含まれている。11 件で最終案またはそれに近い案が作成され、1 件を除く残りの 11 件でも主要な部分が作成されている。一方、げっ歯類特異的発がんの AOP には、我々が開発中のトリプシン阻害による膵発がんの他、既知の MoA による肝発がんやいくつかの生殖内分泌系腫瘍が含まれている。

【WoE に基づくがん原性評価への AOP 利用の可能性】

S1B(R1) に従い医薬品によりケースバイケースで実施される WoE に基づくがん原性評価では、発がん懸念のある、あるいは不確実な要素に関連する MIE や KEs を含む AOP から、発がんリスク予測、検討すべき医薬品特異的な指標及びこれらを用いた議論の構築に有用な情報が得られる可能性がある。このために、AOP Wiki における発がんに関する AOP のさらなる充実が望まれる。

○大石 巧^{1, 2}

¹ 日本免疫毒性学会 試験法委員会 AOP 検討小委員会

² 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

日本免疫毒性学会の試験法委員会では、AOP 検討小委員会を組織して免疫毒性に関する AOP (Adverse Outcome Pathway) の開発を進めていることを 2019 年の当研究会において紹介した。本発表では、その後の開発状況の進展などについて紹介したい。

AOP の開発は、厚生労働行政推進調査事業費補助金化学物質リスク研究事業のもとに研究班 (OECD プロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究) が組織されて複数の AOP の開発が進められている。その中の免疫毒性に関する AOP 開発を日本免疫毒性学会が担当し、開発を進めている。現在、免疫抑制に関する 3 つの AOP と免疫活性化に関する 2 つの AOP の開発を進めており、これらの免疫毒性に関する 5 つの AOP は、AOP の編集・閲覧サイトである AOP wiki において見ることができる (<https://aopwiki.org/aops/154>、<https://aopwiki.org/aops/277>、<https://aopwiki.org/aops/313>、<https://aopwiki.org/aops/314>、<https://aopwiki.org/aops/315>)。

5 つの AOP のうち、1 つの免疫抑制に関する AOP (Adverse Outcome Pathway on inhibition of calcineurin activity leading to impaired T-cell dependent antibody response) が 2021 年に発行に至っている。この AOP は OECD の AOP プログラムにおいて初めての免疫毒性に関する AOP として登録され、OECD の iLibrary にも収載されている (https://www.oecd-ilibrary.org/environment/adverse-outcome-pathway-on-inhibition-of-calcineurin-activity-leading-to-impaired-t-cell-dependent-antibody-response_3c988dde-en)。AOP は発行までにいくつかのレビュープロセスを経る必要があるが、他の 4 つの AOP も着実に進めていきたいと考えている。特に、免疫抑制に関する AOP については、AOP の構成要素である KE (Key Event) や AO (Adverse Outcome) とそれらをつなぐ KER (Key Event Relationship) を共有したりすることによって、3 つの AOP をつないで免疫毒性に関する AOP のネットワークを形成し、免疫毒性の IATA (integrated approaches to testing and assessment ; 複数の試験法を組み合わせる総合的に毒性を評価する手法) の構築に寄与していきたいと考えている。

S4-1

トランスクリプトームデータを用いた毒性発現メカニズムの推定

○夏目 やよい^{1,2}

¹ 医薬基盤・健康・栄養研究所 AI 健康・医薬研究センター

² 徳島大学 先端酵素学研究所

異種データの統合的な解析をどのように行うか。これは、機械学習技術を用いたデータ解析があらゆる分野で導入されている今日においても困難な課題の一つである。例えば、オミックス解析によって分子レベルの包括的な情報を得る一方で、同個体から毒性の有無や重症度などの情報を収集することは、毒性発現メカニズムを分子レベルで理解する上で有望なアプローチと考えられている。しかし、ゴールドスタンダードとなる解析手法は存在しない。本発表では、異種データを用いた統合解析のための新規機械学習手法と、本手法を用いた解析例を紹介する。

S4-2

ケミカルプロテオミクスによる毒性メカニズム解析

○小倉 裕次¹, 林 真由美¹, 笠原 亜希子¹, 勝野 紘士¹, 内藤 明日香¹, 舟橋 賢記¹,
清水 弘樹², 森 和彦¹

¹第一三共 RD ノバーレ トランスレーショナル研究部

²第一三共 RD ノバーレ 合成化学研究部

近年の創薬にとって薬物の標的を同定しその作用機序を解明することは、バイオマーカー探索や研究開発全体の効率化、臨床開発成功率向上のためにも必須となってきている。その標的同定へのアプローチの一つとしてケミカルプロテオミクスが挙げられる。ケミカルプロテオミクスは有機化学、生化学、分子生物学、プロテオーム解析技術など異なる領域にまたがる研究分野である。

Activity-Based Protein Profiling (ABPP)はケミカルプロテオミクスの手法の一つであり、酵素活性依存的なプローブ(Activity-Based Probe)とプロテオーム解析技術とを組み合わせることで、組織や細胞内の網羅的な酵素活性プロファイルを取得することが可能である。現在様々な酵素群に対するActivity-based probeが開発されており、実験や標的タンパク質の機能により使い分けが行なわれている。ABPPにはプロテオーム解析技術も大切な要素であり、網羅性・定量性を維持しつつスループットよく測定することが求められる。第一三共 RD ノバーレでは、activity-based probeをデザインし合成する技術、プロテオーム解析技術の両輪を回すことで創薬の過程で生じる様々な課題を解決することに成功している。

本講演ではABPPを用いた薬物代謝酵素同定、創薬標的候補同定の例を紹介し、最後にABPPの毒物メカニズム解析への応用について議論したい。

○緑川 淳¹, E. Gregori-Puigjané², R. Garcia-Serna², M. C. Carrascosa², M. Cases², N. Remez², J. Olivés², J. Quintana², J. Mestres²,

¹ 株式会社ワールドフュージョン

² Chemotargets SL.

医薬品の探索段階から、市販後の予期せぬ副作用まで医薬品の安全性は重要な問題であり、動物愛護の観点からも In Silico におけるアプローチが求められています。

Chemotargets 社は、**CLARITY** と **CLARITY_{PV}** という 2 つのテクノロジー プラットフォームを開発しました。これらは、安全性薬理学、前臨床毒性学、臨床安全性、および市販後のレポートから、医薬品の全ライフタイムをカバーする統合データを提供します。複数の独立した方法の複数の予測手法によるコンセンサス、アンサンブルにより、このプラットフォームは、低分子のオフターゲット薬理学 (**CLARITY**) および併用薬、生物製剤、ワクチンを含む医薬品の安全性トランスレーショナルリサーチに対する予測および分析ソリューション(**CLARITY_{PV}**)を提供します。

CLARITY には、6 つの独立した方法論を使用して、約 5,000 のターゲットとオフターゲットの 20,000 以上の予測モデルを搭載しています。各予測には、各ターゲットのすべてのモデルからのコンセンサス アプローチに基づく信頼度スコアと、予測につながる基礎となるデータを理解するためにダッシュボードが与えられます。既知の副作用に関連するタンパク質にはフラグが立てられます。また、すべてのタンパク質の臓器発現プロファイルは、オフターゲット相互作用と共通した臓器の副作用を関連付ける手段として提供されます。FDA および世界中の多くの製薬会社は、**CLARITY** を使用して内部データを処理しています。

CLARITY_{PV} は、前臨床毒性学、臨床安全性および/またはファーマコビジランスに携わる医薬品研究者および従事者に、医薬品ライフタイムの安全性の観点から追跡および分析する方法を提供します。これは、低分子、薬剤の組み合わせ、生物製剤、またはワクチンが対象です。ユーザーは、統合されたトランスレーショナル安全性データを検索および分析し、定期的に更新される安全性レポートの収集を容易にし、市販後の薬物有害事象シグナルを予測し、インタラクティブな視覚化ツールを使用してデータとシグナルを簡単にナビゲートできます。また、**CLARITY_{PV}** を使用すると、ユーザーは安全性イベントの層別分析を実行し、医薬品の安全性の進化を追跡し、医薬品と医薬品クラスの比較安全性分析を実行し、臨床段階または新しい段階に入る医薬品候補の最も可能性の高い安全性シグナルを予測することができます。AI ベースの予測方法と分析を使用して、市場に参入する医薬品。 **CLARITY_{PV}** に統合されたデータは、さまざまな公的および商業的なソースに加えて、専用のデータ抽出チームを使用して前臨床および臨床データを慎重にコンパイルする社内の取り組みから得られます。

○武田 一貴^{1,2,3}

¹北里大学 獣医学部 毒性学研究室

²東京工業大学 情報理工学院

³北海道大学 大学院獣医学研究院

【背景・目的】

化学物質の毒性発現機序の起点 (Molecular Initializing Event) の多くは生体内高分子 (タンパク質・核酸) への結合である。この評価手法に *in vitro* 発現系結合アッセイがあるが、目的タンパク質を培養細胞等に発現させる必要があり網羅性に欠ける。一方、この *in silico* 評価手法にタンパク質立体構造情報を用いた分子ドッキングがある。タンパク質立体構造は X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡で実験的に決定される。これに対しアミノ酸配列や既知構造からタンパク質立体構造を予測するホモロジーモデリング手法 (Swiss model 等) がこれまでに複数提案されアミノ酸配列のみで立体構造を予測できる簡便さが利点であったが高精度な予測には配列相同性の高い鋳型が必要な点が課題であった。しかしながら、2021 年に AlphaFold2 が公開され状況が一変した。

AlphaFold2 は深層学習ベースの高精度なタンパク質立体構造予測アルゴリズムである¹。タンパク質立体構造予測コンテスト CASP14 で実験的観察に比肩する高スコアを獲得し話題となり、Google Colaboratory を用い無料で利用可能になったため爆発的に利用が進んだ²。また、複数タンパク質ヘテロ複合体についても AlphaFold2 で良好な相対位置が得られる事が発見されてからタンパク質間相互作用の解析への応用も進んでいる³。一方で、AlphaFold2 自体は低分子リガンドの結合性等を評価していない事が公式から発表されている。本研究では環境化学物質の毒性評価に用いた事例の紹介と off-target 毒性評価の応用可能性について議論したい。

【方法・天然記念物オガサワラオオコウモリの殺鼠剤感受性評価】

小笠原諸島では外来ネズミ対策に抗血液凝固系殺鼠剤を散布している。一方で、これらは野生動物に中毒を生じる事があるため、小笠原諸島唯一の固有哺乳類オガサワラオオコウモリの感受性を AlphaFold2 で予測した殺鼠剤標的分子ビタミン K エポキシド還元酵素 (VKOR) 立体構造と殺鼠剤の分子ドッキングシミュレーション・分子動力学シミュレーションで非侵襲的に評価した⁴。

【結果・考察】

次世代シーケンス解析で同定したオガサワラオオコウモリ VKOR 遺伝子配列を基に AlphaFold2 で VKOR 立体構造を構築した。日本で用いられている 2 つの殺鼠剤 (ワルファリン・ダイファシノン) とオオコウモリ VKOR、ラット VKOR の結合能をシミュレーションで比較した結果、オオコウモリ VKOR はワルファリンに対しラットより低い結合性を示す一方で、ダイファシノンとは強固に結合すると予測された。この傾向はモデル動物としてエジプシャンルーセットオオコウモリで実施した *in vivo* PD/PK 解析と一致しており、標的タンパク質の構造種差による薬剤感受性の動物種差をシミュレーションベースで評価可能な事が示唆される結果となった。

【参考文献】

1. J. Jumper et al., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, V596, 583–589 (2021)
2. M. Mirdita et al., ColabFold: making protein folding accessible to all, *Nature Methods*, V19, 679–682 (2022)
3. R. Evans et al., Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer, *bioRxiv* (2022)
4. K. Takeda et al., Toxicokinetic analysis of the anticoagulant rodenticides warfarin & diphacinone in Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*) as a comparative sensitivity assessment for Bonin fruit bats (*Pteropus pselaphon*), *Ecotoxicology and Environmental Safety* V243, 113971 (2022)

企業シンポジウム: Metabolon Inc.

毒性学および薬理学におけるメタボロミクスの応用

○紙中 庄司, Heino Heyman

Metabolon Inc.

メタボロミクスは、細胞内の動的な生化学的挙動を反映するため、医薬品のみならず化学物質投与前後の生体系の機能的な状態をより正確に表します。その結果、他の多くのデータ（臨床検査、遺伝子関連検査など）と統合することにより、メタボロミクス・データがない場合よりも、深い臨床知見を得ることができます。表現型を記述する決定的な知見として、メタボロミクスはマルチオミクスの最後のピースであり、システム生物学研究における要といえます。

生体成分の生化学的変化のハイスループット・プロファイリングであるメタボロミクスにより、医薬品など化学物質の毒性と有効性だけでなく、疾患の発症および進行、治療における反応に関するユニークな知見が得られるため、遺伝学的情報および非遺伝学的情報をより有効に活用するための強力なツールとして現在認識されています。

毒性研究においては、メタボロミクスを駆使することで、危険な化学物質に対して感受性のある生体内ターゲットを特定したり、ターゲットとなる生体部位に関する重要な情報の収集を行うことが可能になります。今日、メタボロミクスは、化学物質の毒性や安全性、あるいは特定化合物の作用機序（MOA）を精査および理解するために、日常的かつ広範に使用されています¹。メタボロミクス技術の進歩により、腎臓および肝臓の毒性メカニズムを研究する上で新しい可能性が開かれ、新規あるいは、よりの確な毒性バイオマーカーが探索されています。

Metabolon Inc. は、ハイスループット・メタボローム解析におけるマーケット・リーダーとして、世界有数の研究機関や医療施設と共同して、人々の健康に関する世界的な取り組みに貢献しています。本シンポジウムでは、上記の概要について実際の応用例を含めてご紹介します。

要旨

ポスター発表

岩田 実咲¹、皆藤 駿之介¹、保坂 卓臣¹、志津 怜太¹、菅野 裕一郎¹、竹下 潤一^{1,2}、
○吉成 浩一¹

¹ 静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野

² 産業技術総合研究所安全性科学研究部門

【背景・目的】医薬品の開発中止及び市場撤退の理由の一つに、予測困難な副作用や毒性の発現がある。薬剤誘発性肝障害 (drug-induced liver injury: DILI) はその中でも多くの割合を占め、その発症は、反応性代謝物の生成とタンパク質への結合、ミトコンドリア機能障害、酸化ストレス等の複合的な発生とそれに続く細胞死によるものと考えられている。現在ではこれら発症機序を考慮したインビトロ試験が DILI 発症リスク評価のために行われている。一方、肝毒性以外の有害作用予測に寄与するとされる指標はほとんど明らかになっていない。当研究室では、DILI の発症に関与し、その評価に有用と考えられるインビトロ試験指標を明らかにしてきた。そこで本研究では、これらインビトロ試験結果や分子記述子が肝外組織の有害性評価にも有用な指標であるか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】医薬品の副作用を集約したデータベースである SIDER (Side Effect Resource) に収載されている薬物から 364 物質を被験物質として選択し、市販品を試験に利用した。各薬物の副作用情報を抽出し、医薬品開発で問題となりうる副作用として、ICH 国際医薬用語集 MedDRA を参考に 10 種類の毒性グループ (肝毒性、急性腎不全、慢性腎臓病、虚血性心疾患、心不全、血液造血、胃腸障害、横紋筋融解症、間質性肺炎、好酸球性肺炎) にまとめ、解析対象とした。HepG2 細胞を用いた細胞障害性試験 (LDH 漏出、細胞内 ATP 及び GSH レベル) 並びにハイコンテンツ解析 (HCA : 核、ミトコンドリア、F-アクチン、中性脂肪蓄積、リン脂質蓄積、活性酸素種産生、Ca²⁺濃度) を実施した。また 10 種のヒト P450 分子種及びヒト UDP-グルクロン酸転移酵素に対する阻害作用を、発光基質と組換え酵素またはヒト肝ミクロソームを用いて評価した。すべての実験において、被験薬物濃度は 10 μ M とした。分子記述子は alvaDesc を利用して計算し、化学構造との関連が分かりやすい 331 記述子を使用した。決定木は 5 分割交差検証により作成した。統計解析には JMP Pro 15 を使用した。

【結果・考察】10 種の毒性グループの有無を目的変数、実験データ及び分子記述子 (計 428 種) を説明変数として決定木を作成した。その際、被験物質を 10 グループに等分割し、そのうち 9 グループを学習用、残りの 1 グループを検証用とした解析を 10 回繰り返した。それぞれの決定木で得られた各説明変数の毒性判別への寄与率を合計し、毒性判別に有用な変数を調べた。その結果、肝障害で最大寄与を示した変数は、分子記述子 max_conj_path (互いに共役できる最大原子数)、次いで分子記述子 nHet (ヘテロ原子数) であった。max_conj_path は、急性腎不全で寄与率 3 位、好酸球性肺炎で 2 位と上位であった一方、心不全での寄与率は 0 であった。肝障害と肝障害以外の毒性グループの各変数の寄与率の関連性を調べるため、寄与率データを用いて各毒性グループ間の Spearman の相関係数を算出したところ、慢性腎臓病で肝障害と最も強い相関が認められたが、その相関は弱かった ($r=0.383$)。以上の結果から、肝毒性評価に有用な指標が必ずしも肝外組織の有害性評価に有用とは限らず、対象組織に応じた新たな指標が必要であることが示唆された。

○皆藤 駿之介¹、岩田 実咲¹、保坂 卓臣¹、志津 怜太¹、菅野 裕一郎¹、竹下 潤一^{1,2}、吉成 浩一¹

¹ 静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野

² 産業技術総合研究所安全性科学研究部門

【目的】薬物性肝障害 (drug-induced liver injury; DILI) は、肝臓に不可逆の障害を引き起こし、医薬品の開発及び販売中止の主要な要因となっている。発生機序は多岐に渡るが、多くの DILI の発症において、シトクロム P450 (P450) などによる活性代謝物の生成 (代謝活性化) が関与している。最近当研究室では、DILI 評価における P450 反応性試験の有用性を明らかにするために、DILI を引き起こす薬物 (DILI 薬物) と起こさない薬物 (no-DILI 薬物) のヒト P450 分子種に対する作用を評価し、CYP1A1 又は CYP1B1 を強く阻害する薬物のほとんどが DILI 薬物であることを見出した。そこで本研究では、DILI 薬物のスクリーニング評価に P450 反応性試験を含めることが有用か否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】米国 FDA のデータベースから DILI 薬物 266 種、no-DILI 薬物 92 種を被験物質として選択し、HepG2 細胞を用いた細胞障害性試験 (LDH 漏出、細胞内 ATP レベル、細胞内 GSH レベル) 並びにハイコンテント解析 (HCA: 核、ミトコンドリア、F-アクチン、中性脂肪蓄積、リン脂質蓄積、活性酸素種産生、Ca²⁺濃度) を実施した。また 10 種のヒト P450 分子種及びヒト UDP-グルクロン酸転移酵素に対する阻害作用を、発光基質と組換え酵素又はヒト肝ミクロソームを用いて評価した。すべての実験において、被験物質濃度は 10 μM とした。分子記述子は alvaDesc を利用して計算し、化学構造との関連が分かりやすい 332 記述子を使用した。決定木は JMP Pro を利用して 5 分割交差検証により、最小度数 10 の条件下で作成した。

【結果・考察】データセットを 10 分割し、その 1 つを検証用として決定木を作成した。その際、全パラメータを説明変数に用いた決定木と P450 試験データ以外のパラメータを説明変数に用いた決定木をそれぞれ作成し、精度を比較した。全パラメータを説明変数に用いた決定木では、P450 試験データが分岐に利用されていたにもかかわらず、P450 試験データ以外のパラメータを説明変数に用いた決定木との精度の差は見られなかった。これは、他のパラメータが P450 試験データを代替していたためと考えられた。そこで次に、P450 試験データ以外のパラメータを説明変数として決定木を作成し、この決定木で DILI 又は no-DILI と判別された薬物についてそれぞれ P450 試験データ (10 種) を説明変数とする決定木を作成し、2 段階の判別を行った。その結果、第一段階の決定木の感度、特異度及び一致率と比較して、P450 試験データによる判別を加えることで、いずれの精度指標も上昇した。毒性発現に対する代謝の寄与が大きい医薬品の判別精度が向上したと考えられる。対照として、P450 試験データ以外のパラメータから、あるいは P450 試験以外のインビトロ試験パラメータから無作為に 10 変数を抽出し、残りの全変数を第一段階、抽出した 10 変数を第二段階に用いて同様の解析を行った。変数選択は 5 回行い、それぞれ 5 つのモデルを作成した。その結果、無作為に抽出した変数を用いた場合には、P450 試験データを用いた場合に認められたような 2 段階判別による精度の向上は認められなかった。これらのことから、P450 試験データを利用した 2 段階判別の精度上昇は、方法論ではなく試験データ自体に依存すると考えられた。以上の結果から、薬物の解毒的代謝や代謝活性化に関与する P450 に関連するデータを利用した段階的な DILI 予測モデルの有用性が示唆された。

○片山 早紀¹, 安部 賀央里¹, 頭金 正博¹¹名古屋市立大学大学院薬学研究科 レギュラトリーサイエンス分野

【背景・目的】医薬品による特異体質性薬物性肝障害(idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury; iDILI)は、市販されている医薬品や新規の医薬品候補化合物の探索における安全性評価において重要な副作用の一つである。しかし、非臨床試験では iDILI を検出することは困難と言われており、機械学習等の *in silico* アプローチによる副作用予測が期待されている。そこで、本研究では機械学習を利用して、医薬品の化学構造から得られる物理的・化学的性質を表す分子記述子と肝障害に関連する *in vitro* 試験のデータを用いた iDILI の予測手法を開発することを目的とした。

【方法】アメリカ国立衛生研究所が医薬品による iDILI リスクについてまとめたデータベースである LiverTox®[1]に収録されている医薬品を用いて、iDILI リスクに関するデータセットを作成した。目的変数は iDILI リスク有り・iDILI リスク無しの二値とし、説明変数には医薬品の化学構造から得られる物理的・化学的性質を表す分子記述子と *in vitro* 試験データとして 5 種類のシトクロム P450(CYP)に対する阻害活性情報を用いた。分子記述子は AlvaDesc や MOE にて計算した。また、CYP の阻害活性情報は、PubChem に収録されている CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4、CYP1A2、CYP2D6 のアッセイ情報を活用した。機械学習のアルゴリズムは説明変数の重要度に関する情報が得られる勾配ブースティング決定木を用い、5 分割層化交差検証により性能評価を行った。モデルの評価指標には感度と特異度の平均値である Balanced Accuracy(BA)と ROC 曲線下面積(ROC-AUC)を用いた。

【結果・考察】はじめに Pubchem に収録されている約 1 万物質のデータを用いて CYP 阻害活性の有無を判別する予測モデルを構築した。次に LiverTox®から同定した iDILI リスク有り(306 化合物)および iDILI リスク無し(277 化合物)の医薬品について、CYP の阻害活性の有無を判別するモデルから得られる予測確率と分子記述子を説明変数として iDILI の予測モデルを構築した。その際、データ分布を確認し、学習用データセットは分子量が 50 以上 1000 未満、LogP 値の推定値である MLOGP 値が-4 以上の医薬品に限定した。はじめに作成した 5 種類の CYP 阻害活性の判別モデルは、いずれも ROC-AUC の平均値は 0.85 程度を示し、高性能であることを確認した。次に、CYP 阻害活性の予測確率の結果と分子記述子を説明変数として作成した iDILI のリスク有り・リスク無しを判別する二値分類モデルの性能としては、BA、ROC-AUC とともに平均値は 0.75 程度を示した。以上の結果から、説明変数として化学構造情報と CYP 阻害活性に関する *in vitro* の試験情報の両方を使用し iDILI を引き起こす可能性が高い化合物を判別する予測モデルを構築することができた。また、本モデルは、説明変数の重要度に関する情報を提示することが可能なことから、iDILI 発症への CYP の関与等の毒性機序の解明に繋がることを期待できる。

【参考文献】 [1] LiverTox®: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.)

○Eri Hamamura-Yasuno¹, Junya Matsushita¹, Seiji Sato², Takashi Shimada³, Yoshimi Tsuchiya¹, Kazunori Fujimoto¹, Kazuhiko Mori⁴

¹Medicinal Safety Research Laboratories, Daiichi Sankyo Co., Ltd.

²External Affairs Department, Daiichi Sankyo Co., Ltd.

³Organic & Biomolecular Chemistry Department, Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.

⁴Translational Research Department, Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.

【Background】 Mas-related G protein-coupled receptor X2 (MRGPRX2), expressed in human mast cells, is associated with drug-induced pseudo-allergic reactions. Dogs are highly sensitive to the anaphylactoid reactions induced by certain drugs including fluoroquinolones. Recently, dog MRGPRX2 was identified as a functional ortholog of human MRGPRX2, with dog MRGPRX2 being particularly sensitive to fluoroquinolones. The aim of this study was to determine key residues responsible for the enhanced activity of fluoroquinolone-induced histamine release associated with MRGPRX2. **【Materials and Methods】** A structure model of human and dog MRGPRX2 was built by homology modeling, and docking simulations with fluoroquinolones were conducted. From the docking model, we selected residues and constructed human MRGPRX2 mutants in which “dog-type” mutations were introduced. Then, intracellular calcium mobilisation assay with human MRGPRX2 mutants were conducted. **【Results】** Our docking model indicated that E164 and D184, conserved between human and dog, are essential for the binding to fluoroquinolones. In contrast, F78 (dog; Y) and M109 (dog; W) are unconserved residues, to which the species difference in fluoroquinolone sensitivity is attributable. Intracellular calcium mobilisation assay showed enhanced responses against fluoroquinolones in the human MRGPRX2 mutants M109W and F78Y/M109W (EC_{50} value *ca.* one-eighth that of the wild type). These results suggest that M109 and F78 of human MRGPRX2 are crucial residues for enhancing the fluoroquinolone-induced histamine release. In conclusion, these key residues have important clinical implications for revealing the mechanisms and predicting the risks of fluoroquinolone-mediated pseudo-allergic reactions in humans.

○市川 眞帆¹, 原田 直幹², 風岡 顯良¹, 青木 重樹¹, 伊藤 晃成¹

¹千葉大学大学院 薬学研究院

²大鵬薬品株式会社

【背景・目的】特異体質性薬物毒性は、特定の遺伝子や環境により発症する副作用である。発症頻度は低いものの、時として死に至る重篤な副作用であることから、予測やメカニズム解明は重要である。近年、特異体質性薬物毒性の発症リスクと HLA 多型との関連が報告されており、一例として HLA-A*31:01 はカルバマゼピン (CBZ) による過敏症のリスク多型である¹⁾。しかし、HLA-A*31:01 が CBZ に対する過敏性反応を引き起こす発症メカニズムについては、いまだ不明である。そこで我々は、CBZ 過敏症の基礎的メカニズムを理解することを目的に、HLA-A*31:01 が関与する CBZ 過敏症動物モデルの確立を試みた。本研究では、HLA-A*31:01 ノックインマウス (A31-KI) を使用し、CBZ による皮膚障害や免疫活性化といった過敏症の症状の再現を試みた。

【方法】A31-KI に CBZ を 1 週間の経口投与 (300 mg/kg/day) および耳介塗布 (25 mg/kg/day) を行い、野生型の同腹仔と比較検討した。H&E 染色や免疫組織化学染色によって耳介組織への炎症細胞の浸潤や CD8⁺T 細胞の浸潤を評価した。また、耳介リンパ節中の CD8⁺メモリーT 細胞 (CD8⁺CD44^{high}CD62L^{low}) の割合をフローサイトメトリーで測定することで免疫活性化を評価した。さらに、我々が行った、HLA-B*57:01 トランスジェニックマウスを用いたアバカビル過敏症誘発モデルにおいて、CD4⁺T 細胞や PD-1 といった免疫抑制システムの排除が強い免疫活性化を導くことが見出されている²⁾。よって、抗 CD4 抗体と抗 PD-1 抗体の投与による免疫抑制系の除去を組み込むことで鋭敏な反応の観察を試みた。また、抗 CD8 抗体の追加投与による皮膚障害の抑制作用について観察を試みた。

【結果および考察】A31-KI に CBZ を経口投与・耳介塗布したのみでは、皮膚障害や免疫活性化の顕著な変化が認められなかった。しかし、抗 CD4 抗体と抗 PD-1 抗体の投与を追加することで、耳介皮膚での発赤や耳介組織における炎症細胞の浸潤が確認され、その一部は CD8⁺T 細胞であることが観察された。また、そのマウスでは、耳介リンパ節中の CD8⁺メモリーT 細胞の割合の有意な増大が認められた。さらに、抗 CD8 抗体の追加投与により、耳介皮膚での発赤や耳介組織における炎症細胞の浸潤は減弱し、アトピー性皮膚炎の重症評価マーカーとして使用される血清 TARC 値も低下した。以上より、A31-KI マウスにおいて CBZ による皮膚障害や免疫活性化を再現できる可能性が示され、HLA-A*31:01 が CBZ による過敏症発症に関与すること、さらには CD8⁺T 細胞が皮膚症状の発現に関わることも確認された。また、免疫寛容系が CBZ による毒性発症の抑制に関与する可能性が示された。

【参考文献】 1) Mushiroda et al., *JAMA Neurol* 75:842-849, 2018 2) Susukida, Kuwahara et al., *Commun Biol* 4: 1137, 2021

○風岡 顯良¹, 熊谷 和善², 松下 隼也², 間 哲生², 桑原 佐季¹, 青木 重樹¹, 伊藤 晃成¹

¹千葉大学大学院薬学研究院

²第一三共株式会社 安全性研究所

【目的】薬疹は皮疹を主体とするが、全身炎症、皮膚以外の臓器での障害が生じる例が知られ、合併する臓器不全が臓器移植を伴う治療を要する例、予後不良の原因となる例も知られる。しかしながら、臓器障害の組合せのパターンは患者によって様々で、過敏症症状と見分けることが困難な場合もあり、軽度の場合は報告されない場合がある。よって、妥当な薬疹モデル動物を使用することで、多臓器に渡る過敏症の影響を明らかにし、臨床において生じる現象を予測することが期待される。

アバカビル過敏症は一部の HLA-B*57:01 保有者で生じ、斑状丘疹状の皮疹を主徴とし、発熱、全身倦怠感、消化器症状、リンパ節腫脹、その他、種々の臓器障害などの症状が知られている。我々の以前の研究より、キメラ型 HLA-B*57:01 遺伝子導入マウスに PD-1 を欠損させ (B*57:01-Tg/PD-1^{-/-}), さらに CD4 陽性 T 細胞の除去を行うことで、アバカビル経口投与時に耳介皮膚の発赤、耳介皮膚の真皮への CD8 陽性 T 細胞等の浸潤を認め、アバカビル過敏症における皮膚症状に類似した現象が観察され、特異体質性のアバカビル過敏症のモデルとして有用と考えられた (Susukida & Kuwahara *et al. Commun Biol*, 2021)。そこで本研究では、CD4 陽性 T 細胞を除去した B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} にアバカビルを経口投与し、これを病理学的に解析し、皮疹症状を含めて多臓器に渡る免疫応答を評価することとした。

【方法】B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} と PD-1^{-/-} (陰性対照) に 0.25 mg/mouse の抗 CD4 抗体を腹腔内投与 (Day -3 及び Day 1) し、Day 0 以降、20 mg/mouse/day のアバカビルを単回又は反復経口投与した。薬物投与の直前に体重および体温の測定を行った。Day 0, 1, 3, 5, 7 に病理解剖し、また、血清サイトカイン・ケモカイン濃度の測定も行った。

【結果】B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} はアバカビル投与開始後から体重が減少し、Day 5 以降、耳介の発赤が認められた。また、Day 7 までに死亡するマウスが現れ、Day 0-7 の累積生存率は 19% であった。一方、PD-1^{-/-} ではこれらの現象は認められなかった。B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} は Day 5 で一過性に体温が上昇し、PD-1^{-/-} と比べて Day 0 からの体温上昇幅が有意に大きかったが、Day 6 では顕著な体温低下が確認され、PD-1^{-/-} と比べて Day 0 からの体温低下幅が有意に大きかった。

B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} では、耳介において、Day 5 以降、真皮層にリンパ球および好中球の浸潤が認められ、肝臓、腎臓および肺の血管周囲でも確認された。また、B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} では、Day 5 以降の脾臓において、核の肥大を伴うリンパ球の増加および顆粒球造血亢進が認められ、Day 3 以降の胸腺皮質においてリンパ球壊死が確認された。これらの所見は PD-1^{-/-} では確認されなかった。B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} では Day 5 以降、血清 IFN- γ , TNF- α , IL-6, TARC, CXCL10 が上昇したが、PD-1^{-/-} ではそれらの変化は認められなかった。

【考察】CD4 陽性 T 細胞を除去した B*57:01-Tg/PD-1^{-/-} にアバカビルを経口投与し、各種臓器の病理検査を行うことで、皮膚に加えて肝臓・腎臓・肺等においても炎症細胞浸潤が確認された。アバカビル過敏症患者における病理生検はこれまで報告されてこなかったが、本マウスモデルの病理学的解析により、アバカビル過敏症においては皮膚以外の臓器においても炎症細胞浸潤が生じる可能性が考えられた。また、皮膚症状や多臓器への炎症性細胞浸潤が確認される以前に、体重減少や胸腺萎縮などの現象が確認された。本報告では炎症性細胞の臓器浸潤に先じて上昇する血清サイトカイン・ケモカインの発見には至らなかったが、本マウスモデルを用いることで、過敏症の発症予測に足るバイオマーカーを探索することが可能と考えられた。

P-7*

アセトアミノフェンを用いたヒト肝細胞中プロテオーム解析によるインフラマソームを介した自然免疫応答に起因する DAMPs の特定

○伴 涼太郎, 柿木 基治, 井上 和子

エーザイ株式会社 グローバル薬物動態研究部

【背景・目的】肝毒性を惹起することが知られているアセトアミノフェン (APAP) は、生体内において主に肝臓でグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け体外に排泄されるが、一部は CYP2E1 等によって代謝的活性化を受け、高い化学的反応性を有する N-アセチル-p-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) に変換される。NAPQI は生体内のスカベンジャー分子であるグルタチオン (GSH) による抱合を受け無毒化されるが、GSH による抱合代謝能を超えると生体内高分子と共有結合し、細胞の機能障害及び細胞ストレスを誘導し、毒性が発現することが知られている。肝細胞死が誘導されると細胞外に内因性の障害関連分子パターン (DAMPs: damaging-associated molecular pattern) が放出され、これらがインフラマソームを介して炎症反応を惹起させることが肝障害拡大のメカニズムの一つと考えられている。本発表では、上記の毒性メカニズムに基づいた肝障害リスク評価モデルとして構築した、HepaRG 細胞および免疫細胞を用いた *in vitro* 細胞評価系におけるプロテオーム解析を用いた毒性機序研究結果を報告する。近年の質量分析技術の進歩により、プロテオーム解析においては 1 度に数千タンパク質の変動解析が可能となっており、毒性機序研究に応用することで、薬剤の暴露に対するタンパク質応答の包括的な情報が得られると期待される。本研究では、APAP 暴露に対する細胞応答を DAMPs の同定および発現変動解析によって考察した。最後に NAPQI の標的タンパク質同定を企図した、NAPQI 修飾ペプチドの直接検出に関する取り組みについても紹介する。

【方法】HepaRG 細胞における反応性代謝物の生成を確認するために、APAP を暴露した HepaRG 細胞を有機溶媒で処理し、得られた上清を UHPLC-HRMS/MS で測定し、代謝物構造解析を行った。プロテオーム解析は、APAP を処理した HepaRG 細胞およびその培養上清を暴露させた免疫細胞からそれぞれ培養上清と細胞を分けて回収し、タンパク質を抽出後、トリプシン消化によって得られたペプチド混合液を nano-LC-HRMS/MS で測定した。DIA モードで取得したデータを用い比較定量プロテオミクスを実施した。

【結果・考察】まず、代謝物分析の結果から HepaRG 細胞において GSH 関連抱合体を検出することによって APAP が NAPQI へと代謝されていることが確認された。プロテオーム解析では APAP を処理した HepaRG 細胞の培養上清から、DAMPs である HMGB1, HSP90 が有意に上昇していることが確認され、反応性代謝物を介した毒性によって細胞内から DAMPs が放出したと推測された。一方で、検出された DAMPs によっては各 APAP 処理濃度において異なる挙動を示した。細胞内プロテオームの比較解析の結果からは、酸化ストレス応答タンパク質や抗原提示に関与する HLA 関連分子の発現増加が複数認められ、APAP から生成した反応性代謝物による毒性が惹起されていることを、毒性機序に関連するタンパク質の変動プロファイルによって明らかにした。さらに現在、NAPQI が標的とする細胞内タンパク質を同定するために、NAPQI が結合したペプチドを MS で検出し、直接的なエビデンスを得ることによる毒性機序解明に取り組んでいる。求電子性の NAPQI がタンパク質上の求核的アミノ酸残基であるシステインの SH 基に反応すると仮定して検索した結果、複数の NAPQI 修飾ペプチド候補が見いだされた。現在これらのペプチドへの NAPQI の結合性を検証するとともに、標的となるタンパク質と肝障害との関連を調査している。

今後は評価化合物を拡張し、同様のプロテオーム解析技術を応用することで、細胞内外の分子変動を包括的に解析し、反応性代謝物による肝毒性の毒性機序解明および開発化合物の毒性リスク評価に繋げたいと考えている。

○橋本 芳樹¹, 前田 和哉^{1, 2}, 下村 治³, 宮崎 貴寛³, 橋本 真治³, 森山 亜紀子⁴, 小田 竜也³, 楠原 洋之¹

¹ 東京大学大学院薬学系研究科 分子薬物動態学教室, ² 北里大学薬学部 薬剤学教室, ³ 筑波大学医学医療系 消化器外科, ⁴ 株式会社 新日本科学

【背景・目的】 上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) は主に非小細胞性肺がんに適応される分子標的薬であり、高頻度での下痢の発症が薬効とのバランスに基づく処方設計を困難としている。一方、創薬過程において消化器毒性の評価には適切な *in vitro* 実験系が存在しておらず、EGFR-TKIs をはじめとする薬剤誘導性の消化器毒性のリスクを早期に予測することは難しい。本研究は、より *in vivo* 消化管に近い性質を持つ細胞系としてヒト/サル crypt 由来消化管幹細胞培養系に着目し、新規 *in vitro* 毒性評価系としての有用性を EGFR-TKI 誘導性下痢のリスク評価をもとに検討した。

【結果・考察】

EGFR-TKIs では従来型の殺細胞性化学療法薬とは異なる毒性発現が観察された

消化管幹細胞から構成されるヒト/サル腸スフェロイドにおいて、シスプラチンをはじめ各種化学療法薬の暴露では ATP 量の低下と LDH 放出量の増加が濃度依存的に概ね逆相関し、殺細胞性の細胞傷害の発現が見られた。一方で EGFR-TKIs では、低濃度域で ATP 量の低下が LDH 放出量の上昇に先行して起こり、濃度上昇に伴い LDH 放出量の増加が遅れて追従したことから、低濃度域では代謝活性の低下・高濃度域では殺細胞性の細胞傷害に起因する毒性発現の二相性が示唆された。**未分化なスフェロイドにおいて、下痢の発症頻度に対応した EGFR-TKIs の細胞傷害が観察された**

第二世代の EGFR-TKI であるアフアチニブは、第一世代 (下痢発症頻度: 20-60%) に比べて下痢の発症がほぼ必発 (95.2%) に認められ、重篤化リスクも高いことが知られる。未分化なスフェロイドにおいてアフアチニブの暴露による ATP 量低下の IC₅₀ 値 (ATP IC₅₀) は、第一世代の EGFR-TKIs に比べて 10-100 倍程度低く、アフアチニブの高い毒性感受性が確認された。反対に第三世代のオシメルチニブは、野生型 EGFR への親和性を低下させることで、アフアチニブに比して低い下痢の発症リスク (40.1%) を実現しているが、本実験系においてもオシメルチニブ暴露による ATP IC₅₀ はアフアチニブに比べて 10-100 倍程度増加し、オシメルチニブの低い毒性リスクが示唆された。

EGFR に対する阻害モードの違いに対応したスフェロイド細胞傷害が観察された

可逆的な EGFR-TKIs では薬物の培地中からの除去に伴い細胞傷害からの回復が見られた一方で、不可逆的な EGFR-TKIs であるアフアチニブ (95.2%)・ポジオチニブ (96.2%) では、薬物を除去後においても ATP 量の低下が持続しており、持続的な細胞傷害性の発現が重篤な下痢の発症に寄与する可能性が示唆された。一方オシメルチニブでは、細胞傷害の持続性はアフアチニブやポジオチニブに比して弱く、同じ不可逆的阻害薬でありながらもアフアチニブやポジオチニブに比べて低い下痢の発症リスクを臨床で達成したことに起因する可能性が考えられた。

分化させた腸スフェロイドでは、未分化状態に比べて EGFR-TKIs の毒性感受性が大幅に低下した

幹細胞性の維持に必須な因子を培地中から除去することで、吸収上皮細胞への分化を促したスフェロイド由来分化細胞では、未分化なスフェロイドに比べて ATP 量の変化に基づく毒性感受性が大幅に低下した。特にアフアチニブやポジオチニブでは ATP IC₅₀ に 100-1000 倍程度の差異が見られ、EGFR-TKIs が未分化細胞に対して選択的に強い毒性を発揮する可能性が示唆された。

【まとめ】 ヒト/サル消化管幹細胞培養系を用いることにより、EGFR-TKIs による下痢の発症リスクを感受性良く捕捉可能になることが示唆された。また、EGFR-TKIs の毒性評価に未分化なスフェロイドを用いることの有用性が示唆され、今後は未分化・分化細胞に毒性感受性の差異を生じた分子論的な原因探索を行い、EGFR-TKIs による下痢発症の機序解析へと展開する予定である。

○小澤 俊介^{1,2}, 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}, 鄒
昕羽^{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

【背景及び目的】食品を汚染するカビ毒であるオクラトキシン A (OTA) は、ラットへの投与により腎臓髓質外層外帯 (OSOM) の尿細管上皮に巨大核を形成して腎細胞腫瘍を多発し、その発癌機序が不明なことから、ヒトへの発がんリスクが懸念されている。本研究では、OTA による腎発がん機序の解明を目的として、DNA メチル化制御破綻遺伝子に着目した解析を実施した。

【方法】ラットに OTA または巨大核を誘発しない腎発がん物質である 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD)、巨大核を誘発する遺伝毒性腎発がん物質である 1,2,3-trichloropropane (TCP) の腎発がん用量を 90 日間反復経口投与し、OSOM における RNA-Seq と DNA メチル化アレイ解析を組み合わせた網羅的解析を実施し、得られた候補遺伝子について、qRT-PCR およびプロモーター領域におけるメチル化特異的 PCR による検証解析を実施した。さらに、得られた遺伝子の翻訳産物について OSOM での免疫組織化学的な発現解析を実施した。

【結果】RNA-Seq の結果、OTA で有糸分裂関連のクラスターが多数見出されたが、3-MCPD で発現変動した遺伝子を差し引くとそれらは消失した。網羅的なメチル化変動遺伝子の探索の結果、OTA 特異的な過メチル化低発現遺伝子として *Gen1*、低メチル化高発現遺伝子として *Anxa3*、*Osm*、*Cdkn1a* (*p21^{Cip1/Waf1}*) がそれぞれ同定された。GEN1、ANXA3、*p21^{Cip1/Waf1}* についての免疫組織化学的な発現解析の結果、GEN1 と ANXA3 は OTA のみでそれぞれ陽性細胞数が減少、増加し、*p21^{Cip1/Waf1}* は OTA と TCP で陽性細胞数が増加した。3-MCPD で変動する分子はなかった。

【考察】RNA-Seq により OTA で見出された主要な遺伝子クラスターは、巨大核非誘発腎発がん物質である 3-MCPD で発現変動した遺伝子を差し引くと消失したことから、発がん物質に共通した特徴を指し示すものと考えられ、これらのクラスターから OTA 特異的な発がん機序を見出し得ないと判断された。プロモーター領域におけるメチル化の網羅的解析で見出された GEN1 は、ヌクレアーゼ活性を有し、DNA 二本鎖切断の修復中に形成されるホリデージャンクション中間体を解離する。相同組換え修復経路の下流に位置する GEN1 のメチル化を介した発現低下により、DNA 損傷修復が正常に完了せず、これが OTA による染色体不安定性や巨大核形成に寄与することが示唆された。また、ANXA3 と OSM は、それぞれ PI3K/Akt/NF- κ B 経路や JAK2/STAT3 経路を活性化することで細胞増殖を亢進させ、様々ながんで過剰発現することが知られており、それらの OTA による腎発がんへの寄与が示唆された。*p21^{Cip1/Waf1}* は細胞周期停止による細胞老化誘導に関与する癌抑制遺伝子であり、OTA で報告されている老化表現型に *p21^{Cip1/Waf1}* のメチル化を介した発現増加の関与が示唆された。以上より、巨大核誘発腎発がん物質 OTA のラット 90 日間反復投与例において、DNA 修復や細胞周期異常を介した染色体不安定性、細胞増殖亢進の誘導に関わる DNA メチル化制御破綻遺伝子が得られた。

Search for DNA Methylation-altered Genes in the Hippocampal Neurogenic Niche Linking to the Enhanced Neural Functions by Continuous Exposure to Curcumin from the Embryonic Age in Rats

○Qian Tang^{1,2}, Junta Nakahara¹, Kazumi Takashima^{1,2}, Yasunori Takahashi^{1,2}, Hiromu Okano^{1,2}, Ryota Ojiro^{1,2}, Shunsuke Ozawa^{1,2}, Xinyu Zou^{1,2}, Tomohiro Nakao³, Mihoko Koyanagi³, Toshinori Yoshida^{1,2}, Makoto Shibutani^{1,2}

¹ Laboratory of Veterinary Pathology, Tokyo University of Agriculture and Technology

² Cooperative Division of Veterinary Sciences, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

³ San-Ei Gen F.F.I., Inc.

[Background and Objectives] We previously reported that rat offspring exposed to curcumin (CUR) from embryonic stage revealed anxiolytic effects and enhancement of fear memory extinction and altered synaptic plasticity to strengthen neural circuits. Because DNA methylation status may alter expression of important genes that determine phenotypes, it may be of important to investigate the expression-altered genes engaged by DNA methylation. This study is aimed at searching for genes showing altered methylation status in the hippocampal neurogenic niche linked to enhancement of neural functions by CUR.

[Methods] Rats were treated with 0.5% CUR in diet from gestational day 6 to postnatal day (PND) 77. On PND 77, animals were sacrificed and brain tissue was collected. Methyl-Seq and RNA-Seq analyses were performed in the hippocampus dentate gyrus (DG). Then, candidate genes were validated by methylation-sensitive high resolution melting method, real-time RT-PCR, and immunohistochemistry. Finally, transcript levels of target molecule-related pathways involved in synaptic plasticity were examined.

[Results] Hypermethylation and downregulation by CUR were confirmed for *Pcdh8*, *Mmp23*, *Gpr150* and *Rprml*. Hypomethylation and upregulation by CUR were confirmed for *Opn3*, *Ppm1j* and *Fam222a*. Number of protocadherin 8 (PCDH8)⁺ granule cells and reprimin like (RPRML)⁺ hilar neurons were decreased, and OPN3⁺ hilar neurons were increased by CUR exposure. Among the pathways involving PCDH8-related, CUR increased the transcript level of *Cttnb1*, which encodes β -catenin. CUR also increased the transcript level of synaptophysin (*Syp*) in animals sacrificed 90 minutes after the last contextual fear conditioning test.

[Discussion] *Pcdh8*, *Opn3*, and *Fam222a* were reported to be expressed in the brain; however, gene function of the other genes was not known in the brain. PCDH8 mediates endocytosis of N-cadherin. N-cadherin and β -catenin are important transsynaptic adhesion complex that affect spine and synapse development.

Therefore, CUR-induced *Pcdh8* hypermethylation may result in increased synaptic plasticity through enhanced intercellular adhesion and increased synaptophysin expression in the DG. OPN3 is expressed in interneurons, and hypothetically playing important functional roles to regulate multiple motor and sensory circuitry systems. *Fam222a* encodes aggregatin expressed in astrocytes and minor population of neurons. RPRML is known to affect vascular development in zebrafish embryos. Obtained results suggest that functionally unrelated genes from different neural cell populations were found to show altered methylation and gene expression in the neurogenic niche in relation with enhancement of neural functions by CUR.

○松下 幸平¹, 豊田 武士¹, 赤根 弘敏¹, 森川 朋美¹, 小川 久美子¹

¹国立医薬品食品衛生研究所 病理部

【背景・目的】

薬剤性腎障害が生じた後、障害された尿細管が正常に修復されなかった場合、不可逆的な線維化が生じて病態は慢性化する。我々はこれまで、腎虚血再灌流障害モデルラットを用いて正常に修復されない尿細管には CD44 が発現することを見出した。本研究ではアロプリノール (APL) 誘発腎線維化モデルラットを用い、薬剤性腎障害の慢性化病態における CD44 陽性尿細管の病態生理学的な意義を検討した。

【方法】

6 週齢雄性 SD ラットに 0.5%メチルセルロースを媒体として APL を 0、100 及び 150 mg/kg の用量で 28 日間反復経口投与した。最終投与日に代謝ケージを用いて新鮮尿を採取し、その翌日に剖検を行い血液及び腎臓を採取した。腎臓について病理組織学的解析および免疫組織化学的解析を行った。また APL 150 mg/kg 投与群の線維化病変内の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を行い、Gene Ontology (GO) 解析および Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) を実施した。さらに血清および尿中の CD44 発現をそれぞれ ELISA 法およびウエスタンブロッティング法により解析した。

【結果】

APL 100 および 150 mg/kg 投与群の腎臓では線維化が認められ、線維化病変内には CD44 陽性を示す拡張あるいは萎縮した尿細管がみられた。

GO 解析では、拡張/萎縮尿細管において尿細管分化に関わる遺伝子群の発現低下および細胞外基質に関連する遺伝子群の発現上昇が示された。IPA では拡張/萎縮尿細管において細胞外基質であるフィブロネクチンをコードする *Fnl* を含む線維化に関連する遺伝子群の発現が上昇しており、それらの上流因子として CD44 が抽出された。

免疫組織化学的解析において、拡張/萎縮尿細管では尿細管分化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認められた。一方、基底膜マーカーの免疫染色によりこれらの尿細管は基底膜に接着していることが確認され、間質への遊走を示唆する所見は認められなかった。*Fnl* の *in situ hybridization* およびフィブロネクチンの免疫染色では、*Fnl* mRNA は拡張/萎縮尿細管の細胞質内において発現が亢進していたことに対し、フィブロネクチンタンパクはこれらの尿細管の周囲間質に認められた。

また APL 投与群では血清中の CD44 濃度が有意に上昇しており、尿中からも CD44 が検出された。

【考察】

尿細管上皮が間質には遊走せずに基底膜に接着した状態で間葉系細胞の形質を獲得する現象を部分的上皮間葉転換 (pEMT) という。APL 投与群の拡張/萎縮尿細管では分化マーカーの発現低下および間葉系マーカーの発現ならびに基底膜への接着が確認され、さらにフィブロネクチン分泌を示唆する所見がみられたことから、これらの尿細管では pEMT が生じていると考えられた。CD44 は pEMT の生じた尿細管において発現し、細胞外基質の分泌を誘導して線維化病変の形成に関与しているものと考えられた。また CD44 は腎線維化をモニターするバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

○尾城 椋太^{1,2}, 岡野 拓^{1,2}, 高嶋 和巳^{1,2}, 高橋 康德^{1,2}, 唐 倩^{1,2}, 小澤 俊介^{1,2}, 鄒 昕羽^{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】グリホサート (GlyP) は人体に安全な除草剤として世界的に広く使用されている。一方で、近年 GlyP 及びその代謝産物は環境中への残留による毒性懸念が高まっており、GlyP 系除草剤 (GBH) の発達神経毒性を示唆する報告も増えてきている。本研究では GlyP 及び GBH の神経発生毒性の病理学的なリスク評価を目的として、ラットを用いた発達期曝露実験を行い、海馬歯状回における神経新生と小脳における生後発達への影響を検討した。

【方法】妊娠ラットに妊娠 6 日目から離乳時 (生後 21 日目) まで、GlyP を 0、1.5%、3.0% の濃度で混餌投与、GBH を 1.0% (GlyP 濃度: 0.36%) の濃度で飲水投与した。生後 21 日目及び生後 77 日目に雄児動物を解剖し、海馬歯状回と小脳虫部第 X 葉を対象に免疫組織化学的解析及び遺伝子発現解析 (RNA-Seq、qRT-PCR) を実施した。また、海馬の malondialdehyde 測定を実施した。

【結果】生後 21 日目では、3.0% GlyP と GBH により児動物の体重が減少し、GBH では脳重量も減少した。生後 77 日目では、GBH によってのみ体重及び脳重量が減少した。

海馬：生後 21 日目では、免疫染色において 3.0% GlyP 及び GBH によって顆粒細胞層下帯の PCNA⁺細胞数の減少と、3.0% GlyP による TUBB3⁺未成熟顆粒細胞数の減少が誘発された。一方、両化合物により ARC⁺顆粒細胞数が増加した。qRT-PCR では、両化合物で *Cat* 及び *Sod2* の発現が低下した。生後 77 日では、免疫染色において GBH による COX2⁺顆粒細胞数の増加と顆粒細胞層下帯における TUNEL⁺細胞数の増加が誘発された。qRT-PCR では、両化合物によって *Arc*、*Casp9*、*Cat* の発現が増加した。また、両化合物は海馬の malondialdehyde 量の増加を誘発した。

小脳：生後 21 日目の分子層において、GBH による TBR2⁺細胞数の増加傾向と DCX⁺細胞数の増加が誘発された。内顆粒層においても GBH によって DCX⁺細胞数が増加した。また、GBH はプルキンエ細胞の配列不整を誘発した。一方、GlyP による細胞分布の変化は認められなかった。RNA-Seq 解析では、両化合物によって主に細胞運動関連遺伝子の発現が変動した。qRT-PCR では、両化合物によって *Nr4a3* の発現が増加し、GBH によって *Cdk5*、*Crmp1*、*Crmp2* の発現が低下した。

【考察】海馬歯状回では GlyP と GBH は共に、成熟期までに及び、代償性反応を伴う神経新生の抑制と酸化ストレスを誘発することが明らかになった。小脳虫部では、GBH によって分子層から内顆粒層への顆粒細胞の移動が障害された可能性が示唆され、この変化はプルキンエ細胞の位置決定にも影響した可能性が考えられた。海馬歯状回と小脳における免疫染色及び遺伝子発現解析結果を総合すると、GlyP と GBH による変化の質は概ね一致しており、両化合物は同様の毒性を有していると考えられた。一方、脳重量の減少や成体期の海馬神経新生及び小脳発達への影響は GBH でより顕著であり、GBH に含まれる界面活性剤が GlyP の神経毒性の増強に寄与した可能性が示唆された。

○小川 文一郎¹, 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 獣医病理学研究室

³東京農工大 院 共同獣医学専攻

【背景・目的】アクリルアミド(AA)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、発がん性と共に中枢及び末梢神経障害の誘発が懸念されている。AAの成体神経新生への影響については、我々の以前の研究で、胎生期・授乳期ないし若年期のラットにAAを曝露させた際に、海馬歯状回の神経新生部位でのtype-3前駆細胞から未熟顆粒細胞が減少し、移動や神経突起伸展、シナプス形成を行う分化段階後期の未熟ニューロンの障害性が示唆された^{1,2)}。嗅球-脳室下帯は、海馬歯状回と同様に神経新生が生後も継続する器官である^{3,4)}。嗅球-脳室下帯神経新生においても海馬と同様に、AAが神経新生の後半段階を障害する可能性が考えられるが、AAによる嗅球-脳室下帯神経新生への影響に関する報告は乏しい。そこで本研究では若年期のラットにAAを曝露した際の嗅球-脳室下帯神経新生に及ぼす影響及びその毒性機序について検討した。

【方法】7週齢の雄性SDラットに0、5、10及び20 mg/kgのAAを28日間経口投与し、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、嗅球及び脳室下帯(n=10)の各発達段階の神経細胞マーカーについて免疫組織化学的解析を実施した。また、0及び20 mg/kg群の嗅球(n=6)についてreal-time RT-PCRにより神経新生関連遺伝子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、嗅球の上衣層、顆粒層、糸球体層において、神経芽細胞マーカーであるPSA-NCAMまたはdoublecortin(DCX)陽性細胞数の減少が10及び20 mg/kg群で認められた。その他の神経細胞マーカー(嗅球:CALB2、NeuN、脳室下帯:GFAP、SOX2、TBR2、PSA-NCAM、DCX)については変動が認められなかった。嗅球のreal-time RT-PCRではシナプス関連マーカーのNcam2及び神経栄養因子のBdnfの発現の低下が認められた。脳室下帯のPSA-NCAM及びDCX陽性細胞数に変化がなく、嗅球上衣層のPSA-NCAM及びDCX陽性細胞数が減少していたことから、AAは脳室下帯から吻側移動流を経て嗅球に移動中の神経芽細胞を障害していると考えられ、その機序として、BDNFやNCAM2の発現低下による新生ニューロンの移動障害の可能性が示唆された。また、免疫組織化学染色の陽性細胞の変動は、過去に実施した海馬神経新生への影響検討²⁾よりも低い投与量から認められており、最終分裂後の移動距離が長い嗅球-脳室下帯神経新生のほうが海馬歯状回の神経新生よりもAAによる移動障害の感受性が高い可能性が示唆された。以上より、AAは嗅球-脳室下帯神経新生において、海馬歯状回と同様に、分化段階後期の未熟ニューロンを障害することが示唆された。

【参考文献】

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

²⁾ Ogawa et al., J Toxicol Sci. In press.

³⁾ Roybon et al., Eur J Neurosci. 2009; 29: 232-243.

⁴⁾ Ming and Song, Neuron. 2011; 70: 687-702.