

要旨

特別講演

特別講演

AI 技術の先に見るイノベーションのあり方

○矢倉 大夢

筑波大学大学院 システム情報工学研究群

人工知能（AI）の進化は、現代社会において多方面での変革をもたらしている。例えば、最近特に注目を集めている技術として ChatGPT が挙げられるが、日常的な会話から専門的な文書、また創造的な物語まで多岐にわたる文章生成が可能となっており、すでに業務で用いているという事例も増えつつある。本講演では、こうした技術が我々の生活やこれからの技術開発にどういった影響を与えるのかという点について議論する。

講演の前半では、まず最新の AI 技術がどこまでを可能としているのかについて、具体的な事例とともに紹介する。もちろんその領域は ChatGPT のような文章生成 AI に限られてはおらず、画像生成や動画生成、また発表者自身も研究に取り組む、音楽生成 AI なども含まれる。こうした AI 技術がいかにか驚異的な進化を遂げているのかについて、その分野に身を置くものとしての視点も紹介できればと考えている。

講演の後半では、そうした技術革新が社会に及ぼす影響について、また、その中でどういったことが求められていくかについて議論する。そのヒントとなるのは、過去の技術革命を振り返りながら、人類がどのように技術の進化とそれに伴う社会の変化に向き合っていたかという点である。人類と技術の関係性は常に変遷を続けてきたが、新しい技術がもたらす「脅威」が結果的には人類の可能性や価値を広げ、新たな視点やアプローチを促進するという側面もあるのではないだろうか。

本講演の 1 つのキーワードは「AI が世界をのみ込む」というフレーズである。10 年前に「ソフトウェアが世界をのみ込む」という言葉が流行ったが、それと同じような変化が今後の社会に起こるのではないかと考えている。もちろん、新しい技術や産業の台頭は、既存のものが全て消失することを意味しない。ただし同時に、価値の基準が更新され、新たな「イノベーション」が求められることは確かだろう。

そうした時代において、人間の本質的な価値を再評価し、新しい技術のうまく取り入れていくにはどうしたらよいか。そうした観点を本講演で提起できれば幸いである。

要旨

特別シンポジウム
シンポジウム

特-1

非天然型構造を有する化学合成ペプチド医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン案について

○齋藤 嘉朗, 出水 庸介

国立医薬品食品衛生研究所

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評価の必要性や遺伝毒性評価法の選択、さらには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があった。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研究班（研究代表者 出水庸介）が発足し、2期に渡って品質・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、ガイドライン案の作成に向けた議論を行ってきた。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、主な論点に関する議論とガイドライン案の作成を行ってきた。概要は以下の通りである。

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うことが妥当と考えられる。論点となった不純物評価のうち、ペプチド関連不純物については、ICH Q3A及びQ3Bに定められている安全性確認の必要な閾値以下に管理することが考えられるものの、非天然型ペプチドの製造技術は現時点では成熟していないことから、本閾値による管理が難しいと思われる場合も多いと考えられ、現実的な製造技術の限界も考慮する必要があるかもしれない。その場合には、毒性試験に用いる被験物質の不純物プロファイルを明らかにした上で、当該被験物質を用いて毒性試験を実施し、その結果を不純物含量の規格設定の際に参照することが考えられる。また、設定する規格値以上の不純物を含有した原薬等を用いて毒性試験を実施し、その曝露量と毒性プロファイルの結果を、不純物含量の規格値設定の参考とすることも可能と考える。

また天然にはない構造を有することから、一般に低分子化学薬品で必要とされる各種毒性評価試験を実施することが考えられ、省略する場合は、その科学的根拠を含めて提示する必要があると思われる。遺伝毒性評価に関しては、分子量の関係から被験物質がグラム陰性菌の外膜を通過せず、Ames試験では変異原性を評価できない可能性があるため、哺乳類細胞を用いたin vitro遺伝子突然変異試験（チミジンキナーゼ試験やヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ試験）を追加すべきと考えている。

本講演では、研究班としてまとめたガイドライン案の概要と主な論点について紹介する。

特-2

非天然型化学合成ペプチド医薬品の遺伝毒性評価について

○杉山 圭一¹

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 変異遺伝部

中分子ペプチド医薬品は、一般的に低分子医薬品よりも副作用が生じる懸念が少なく、製造コストは高分子医薬品よりも低いことが見込めるなど、それぞれの医薬品が持つ問題点を回避できる可能性を有することから、近年その開発に注目が集まっている。特に、非天然型構造を有するペプチド医薬品は、L型アミノ酸では困難であった代謝安定性や細胞膜透過性の亢進などが期待できることから注目度は高い。一方で、非天然型構造を含むことで、従来天然ペプチドでは想定されなかった毒性作用を示すことへの懸念が生じているのも事実である。その背景の一つとして、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ついて、グローバルレベルで統一的な見解が定まってはいることが挙げられる。同医薬品の遺伝毒性評価については、「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」(ICH S2 (R1))が参考になるが、非天然型ペプチド医薬品の合成過程や物理化学的特性を考慮した評価法を新たに提案することは、科学的により妥当な遺伝毒性評価を担保することに繋がると予想される。その際、中分子ペプチド医薬品を代表的な遺伝毒性試験である「細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験)」で評価する妥当性を膜透過性の観点から慎重に検討することは、特に重要と考えられる。また、非天然型ペプチド医薬品合成時の不純物に対する遺伝毒性評価においても、必然的に Ames 試験の有効性を含め検証すべき課題が考えられ、複眼的な視点は当該医薬品の遺伝毒性を適切にかつ不純物を含め包括的に評価を行なっていく上で必要であろう。

本講演では、非天然型構造を有する化学合成ペプチド医薬品の遺伝毒性を評価するにあたって、考慮すべき点を整理・考察したい。

特-3

企業視点からみた非天然型化学合成ペプチド医薬品の非臨床安全性評価について

○福井 英夫

Axcelead Drug Discovery Partners, Inc., Applied Regulatory Science

バイオ医薬品（ニューモダリティー医薬品）の承認品目数増加に伴い、それらの売上高は米国を始めとして日本でも増加している。バイオ医薬品の開発が拡大するとともにモダリティーの多様化が加速している。ニューモダリティー医薬品の開発は、アカデミアあるいは創薬ベンチャー企業により牽引されるケースが増えてきた。ニューモダリティー医薬品とはペプチド医薬品、抗体医薬、核酸医薬、遺伝子治療用製品、細胞治療あるいはエクソソーム製剤等、多岐に渡っている。

ペプチド医薬品はこれまで天然型あるいは非天然型アミノ酸から構成されるペプチドに分類されていた。しかし、現在では化学修飾された天然型あるいは非天然型アミノ酸から構成されるペプチド医薬品、抗体と結合させ複合化したペプチド医薬品など多様化が加速している。

このようにモダリティーが急速に拡大し、多様化しているにも関わらず、ICH ガイドラインが整備されておらず、各国がローカルルールに従って判断している。特に、規制当局はケースバイケースで判断されることが多いため、開発戦略を考える製薬会社にも混乱が生じている。ペプチド医薬品開発に関するガイドラインも存在しないことから、ICHM3 ガイダンスあるいは ICHS6 ガイダンスを始めとする各種ガイダンスを参考にして、各種非臨床試験の必要性がケースバイケースで判断されている。

AMED の支援を受けて、非天然型ペプチド医薬品（次世代型中分子ペプチド医薬品）の非臨床試験に関する各項目について、2019 年から研究班で議論されてきた。今回、ガイダンス（案）の概要が発出される段階まで到達したことから、近日中に公開される予定である。本講演では非天然型アミノ酸から構成されるペプチド医薬品の非臨床安全性試験ガイダンスについて解説したい。

特に、製薬企業が混乱する点、例えば、開発者は天然型ペプチド医薬品だと判断し、ICHS6 に準じて IND enabling study package を組んでいたが、規制当局には非天然型ペプチド医薬品に分類され、ICHM3 ガイダンスに記載されている非臨床安全性試験が要求されることがある。このケースでは、試験種、投与期間、最高用量の設定根拠などが異なってくることから、追加試験を実施することがないように細心の注意を払うべきである。その他、製薬企業が混乱する点として、動物種選択、免疫原性、不純物&代謝物評価、光毒性評価、ガイダンスがグローバルに通用するか否か等について内容を説明したい。

特-4

規制からみた非天然型化学合成ペプチド医薬品の非臨床安全性評価の考え方

○真木 一茂

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

1980年代に化学合成医薬品（以下、「化成品」）に代わって登場したバイオテクノロジー応用医薬品（以下、「バイオ医薬品」）は、現在に至るまで数多くの革新的な医薬品を生み出している。しかしながら、近年では、その標的となる細胞外分子が枯渇しつつあること、さらに製造コストの観点から、化成品とバイオ医薬品の長所を併せ持つ中分子医薬品が新たなフロンティアとして注目され、その1つとして非天然型化学合成ペプチドの開発が活発になってきている。非天然型化学合成ペプチドの特徴としては、特に環状ペプチドなどの中分子ペプチドについては、バイオ医薬品と同様に高い特異性やタンパク質間相互作用阻害活性を持つ一方で、バイオ医薬品では実現が難しい経口投与や細胞内分子を標的とすることが可能であることから、新たなモダリティとして期待されている。

このような中分子ペプチド医薬品の開発及び需要の急速な高まりを踏まえ、産官学で非臨床安全性評価の方法論や規制についての議論が始められる中、我々規制当局としても、安全かつ効果的な医薬品を一日でも早く患者に提供するための適切な評価基準の確立に向けた取り組みを進めている。中分子ペプチドの非臨床安全性を評価する上では、特化した国際ガイドライン（ICHガイドライン等）は存在しないものの、バイオ医薬品に関するICH S6(R1)ガイドラインにある「本ガイドラインに示される原則は、... (中略) ...化学合成ペプチド、オリゴヌクレオチド製剤にも適用されうる」と記載されていることから、現在、PMDAでは、当該ガイドラインの基本理念である「ケースバイケース」の原則を、非天然型化学合成ペプチド医薬品の評価の参考としてきた。一方、非天然型化学合成ペプチドの特性に注目した評価の必要性について、日本医療研究開発機構（AMED）では、医薬品等規制調和研究事業において、「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」班が立ち上げられ、産官学のメンバーによる議論の結果、「非天然型構造を有する化学合成ペプチド医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン（案）」が作成され、近日中にパブリックコメントの募集が行われる予定となっている。

本講演では、当該ガイドライン（案）、中分子ペプチド医薬品の非臨床安全性評価（総論及び各論）に関する骨子を概説したい。その上で、我々PMDAがこれまでに実施した治験相談、承認申請などでの事例を踏まえて、現時点での中分子ペプチド医薬品の非臨床安全性評価に関する考え方を紹介することにより、当該ガイドラインの最終化に向けて、中分子ペプチド医薬品の非臨床安全性評価について参加者との相互理解を深め、世界初のよりよいガイドライン発出に向けた機会としたい。

○永井 健治

大阪大学産業科学研究所、大阪大学先導的学際研究機構

従来の科学的アプローチは、観察対象を構成する主要成分に着眼し、測定された値の中で他のデータとかけ離れている外れ値を解析対象から除外するのが一般的であった。それ故、外れ値的特徴量を有する希少成分に関する知見はほとんど蓄積されてこなかった。一方、近年、細胞集団の中に存在する稀にしか見出されない細胞が生命システムに大きな影響を及ぼすことが知られるようになってきた。このような外れ値的特性を有する希少細胞をターゲットとして研究するためには、非常に多くの細胞を同時に観察し、個々の細胞が多細胞システムの中でどのように振舞うかを観察することが必要となる。しかしながら、従来の生物顕微鏡やFACSなどの計測装置では、レンズのサイズや観察用カメラの画素数、或いは細胞を組織から取り出して1細胞ずつ計測しなければならないなどの制約があり、上記の解析は困難であった。従って、これまでの常識に縛られない、新しいイメージング法が必要となる。

そこで我々は、生物顕微鏡用のレンズとカメラの縛りを取り払って、工場のラインで製品検査に利用されるマシンビジョン用のカメラとレンズを用いることを着想し、1.2億画素CMOSイメージセンサーと倍率2倍のテレセントリックマクロレンズを組合わせた蛍光イメージング装置を開発した。これにより、1.46x1.01cm²の視野の中で、個々の細胞を識別できる空間分解能を実現した。センチメートルからマイクロメートルまで、4桁の空間スケール階層を跨いで細胞を観察できることから、マイクロコップでもマクロコップでもないこのイメージング装置の一般名称を「トランススケールスコープ」と称し、特に今回開発した装置を「遍く照らし出す」という意味を込めてAMATERASと命名した。従来の生物顕微鏡ではなし得なかった、10万から100万にもものぼる数の細胞を一つの視野の中で同時に撮像し、全ての細胞の動態（変位、機能発現、状態変化など）を観察できるようになった。これにより100万個の多細胞の中で、0.01%以下しか存在しないユニークな細胞や生命現象の検出に成功した。さらに、このAMATERASにロボットアームと試料ローダー、恒温培養インキュベータなどを設置することで、細胞やオルガノイドなどの自動培養・自動イメージングを可能にした。大規模データをハイスループットに取得可能な自動化トランススケールスコープは、基礎生物学のみならず創薬、医療用途まで、幅広い応用が期待される。本研究では、トランススケールスコープの装置概要と観察・解析例を紹介し、生命科学研究における新たな科学的思考基盤並びに創薬への応用可能性を概説する。

○横田 理（Satoshi Yokota）

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
(Division of Cellular & Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences)

In the drug discovery process, a pipeline compound that can affect the size and weight of the testes points to a sign of serious testicular toxicity. Therefore, testicular toxicity must be adequately evaluated before the first clinical trial on humans. In testing male reproductive toxicity, using experimental animals is preferable to detect similar changes occurring in humans exposed to the same chemicals. Among all adverse findings, histopathology and the weight of a male reproductive organ are the best non-clinical endpoints to detect reproductive toxicity. However, it is difficult to determine testicular size from the body surface. Furthermore, these data can only be collected by euthanizing a large number of animals, but reducing the number of animals used in toxicological research is required from the perspective of animal welfare. In addition, histological findings are generally not available in humans. To address these concerns, it is important to develop a non-invasive method to evaluate testicular toxicity *in vivo*.

The present study demonstrated the suitability of a new, ready-to-use compact MRI platform using a high-field permanent magnet to assist with the evaluation of testicular toxicity. To validate the utility of the MRI platform, male mice were treated with busulfan (40 mg/kg, intraperitoneal injection). Twenty-eight days after treatment, both testes in busulfan-treated and control mice ($n = 6/\text{group}$) were non-invasively scanned *in situ* by MRI at 1 tesla.

On a T1-weighted 3D gradient-echo MRI sequences (voxel size: $0.23 \times 0.23 \times 0.50$ mm), the total testicular volume in busulfan-treated mice was significantly smaller than in controls. On T1-weighted images, the signal intensity of the testes was significantly higher in busulfan-treated mice than in controls. The mice were sacrificed, and the testes were isolated for histopathological analysis. The weight of the testes in busulfan-treated mice significantly decreased, similar to the results of the non-invasive analysis. The validity of the testis volume obtained by MRI was confirmed by 3D reconstruction of serially section of the whole testes. Additionally, periodic acid-Schiff stain-positive effusions were observed in the interstitium of the busulfan-treated mouse testes, potentially explaining T1 shortening due to a high concentration of glycoproteinaceous content. The present data demonstrated a rapid evaluation of testicular toxicity *in vivo* by compact MRI.

In conclusion, the present study demonstrated that small animal imaging *in vivo* can detect morphological and anatomical changes in the testes, using an infertility mouse model to better understand non-clinical testicular toxicity.

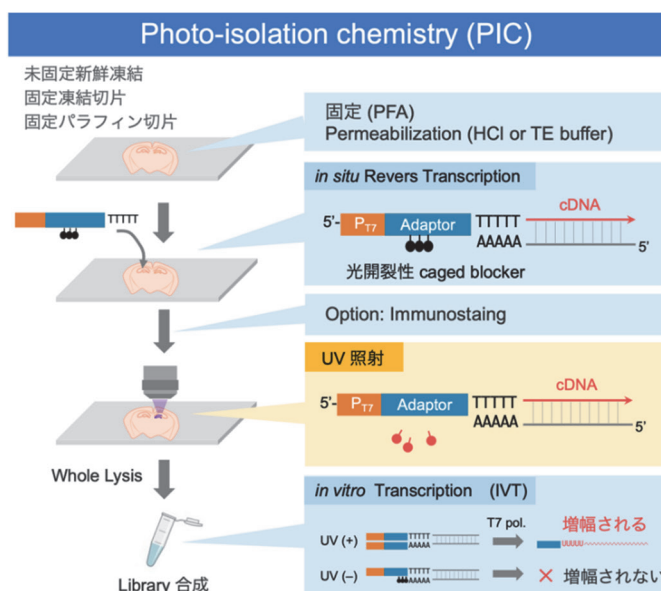
S1-3

ミクロ組織を踏まえた高解像度かつ高深度空間トランスクリプトーム技術

○本田 瑞季¹

¹ 京都大学大学院医学研究科

組織や臓器は時空間的に定められた遺伝子発現により厳密に制御されている。そのため、そのしくみを正確に理解するには空間情報と遺伝子発現情報を紐付けた解析が必要である。そこで、我々は組織切片上の光照射した領域だけの遺伝子発現情報を網羅的に解析できる新たな空間トランスクリプトーム法、Photo-Isolation Chemistry (PIC)を開発した(Honda et al., 2021; Honda et al., 2022)。PICはマウス胚や成体マウス海馬などのマクロ領域から細胞内構造体などの1 μ m以下のミクロ領域と大小さまざまな領域を高感度に解析できる。さらに、未固定や固定凍結切片に加えパラフィン切片にも適応できるため、生物学的研究から病理診断などの臨床研究にまで幅広く応用されることが期待できる。ここでは、PICの原理からPICを用いた様々な解析事例を紹介しつつ、他技術との比較やPICの今後の技術展開についても議論したい。



○Miyu Nakayama

COE for drug metabolism, pharmacokinetics and modeling, Takeda Pharmaceutical Company Limited

【Purpose】 A direct administration into the cerebrospinal fluid (CSF) is conventionally employed in antisense oligonucleotides (ASOs) therapy for central nervous system diseases. However, the intra-brain behavior of ASOs after intrathecal (IT)/ intracerebroventricular (ICV) injection and its species differences have not been fully clarified. Recent advances in light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) and tissue clearing technique have demonstrated the feasibility of whole-brain imaging at single-cell resolution, which would be promising as a practical solution to the above issues. In this study, we aimed to newly develop the whole-brain imaging platform and figure out the brain distribution behavior of ASOs in mice, rats, and marmosets.

【Methods】 The whole-brain samples were collected at 5 min, 1, 4, and 24 h after intrathecal (IT)/ intracerebroventricular (ICV) injection of Alexa647-labeled ASOs to mice and rats. After treatment with tissue-clearing reagents, the cerebrovascular networks, stained with anti-CD31 (endothelial marker) and alpha-smooth muscle actin (artery marker) antibodies, and ASOs were visualized using LSFM.

【Results】 The imaging analysis of the vascular networks and spatial distribution of ASOs in the whole brain of mice and rats revealed that ASOs were firstly distributed around the circle of Willis (artery circle) at 5 min after ICV injection. After that, ASOs were transported to the brain parenchyma along the large arteries and penetrating arteries over time. The similar distribution pattern and process were observed after IT injection. These results suggested that ASOs would be delivered to the brain parenchyma via CSF flow along perivascular space architected by the glymphatic system. In addition, the distribution pattern in rats and marmosets was similar to that in mice.

【Conclusions】 We successfully developed the whole-brain imaging platform and suggested the brain distribution mechanism of ASOs after IT/ICV injection into mice and rats. The developed platform would enable the detailed analysis of drug distribution at single-cell resolution. In this presentation, the future perspective for the toxicological evaluation will be discussed.

○足利 太可雄¹

¹ 国立医薬品食品衛生研究所 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）において有害性発現経路（adverse outcome pathway: AOP）の開発が進められており、そうした AOP は特定の毒性エンドポイントについて試験の結果や情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する、試験の実施と評価のための戦略的統合方式（integrated approaches to testing and assessment: IATA）の理論的基盤になることが期待されている。また、医薬品の非臨床試験に必ずしも動物実験を求めないという法案「FDA Modernization Act 2.0」が昨年末米国にて成立し、従来の動物を用いる毒性試験が New Approach Methodologies (NAMs) と呼ばれる *in vitro* または *in silico* 試験への置き換えが加速することが想定される。こうした国際的な動きの中で日本は積極的に免疫毒性に関する AOP およびそれに基づく *in vitro* 試験法の開発を進めている。そこで本講演では、AOP の基本的概念について概説した後、日本において開発が行われている免疫毒性に関する AOP の開発状況について紹介する。次に、毒性機序研究と NAMs 開発の接点の実例として、いずれも日本において行われた、IL-2 発現抑制を主要イベント（key event: KE）とする世界初の免疫毒性に関する AOP である AOP154 の開発と、IL-2 発現を指標とする世界初の免疫毒性に関する OECD テストガイドライン (TG) である IL-2 Luc assay の開発について紹介する。

【方法・結果】日本免疫毒性学会 AOP 検討小委員会において、化学物質によるカルシニューリン (CN) 阻害により IL-2 および IL-4 の産生抑制が生じ、最終的に T 細胞依存性抗体反応（T-cell dependent antibody response: TDAR）の抑制となる AOP154 が開発され、2021 年 10 月に OECD において承認された。シクロスポリンやタクロリムスのような CN inhibitor (CNI) は、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD)、乾癬、アトピー性皮膚炎などの自己免疫疾患やアレルギー性疾患の治療効果を発揮する一方で、感染の頻度や重症度の増加など、免疫抑制に由来する副作用を誘発することも知られている。したがって、IL-2 や IL-4 の産生阻害を指標とする試験法により、化学物質による免疫毒性の評価が可能になると考えられた。一方相場節也（東北大学医学部名誉教授）らにより、3 色発光細胞の技術を応用し Jurkat 細胞における IL-2 および G3PDH プロモーター活性を定量できる多色発光細胞が樹立され、化学物質の IL-2 のプロモーター活性に及ぼす影響を検出できる *in vitro* 免疫毒性評価システム (IL-2 Luc assay) が開発された。IL-2 Luc assay は、免疫抑制剤であるデキサメサゾン、シクロスポリン、タクロリムスなどの免疫抑制作用を正確に評価できることが明らかとなった。本試験法を OECD TG 化するために、JaCVAM 主導により validation study および peer review が国内外の様々な専門家や研究施設の協力により行われた。その結果、2023 年 7 月に本試験法は化学物質の免疫毒性を評価する OECD TG444A として承認された。

【まとめ・考察】AOP 開発の目的の一つは、AOP から KE を測定可能なバイオマーカーとして抽出し、それを用いて IATA を構成する試験法を開発することである。AOP154 の KE の一つは IL-2 産生抑制であり、本 AOP 成立は IL-2 の産生を指標とする OECD TG IL-2 Luc assay 成立の理論的基盤と考えられた。免疫毒性のような複雑な毒性を NAMs で評価するためには、免疫毒性に関する複数の AOPs からなるネットワーク、およびそれに裏付けられた IATA の構築が必要である。IL-2 に関する AOP 開発と *in vitro* 試験法開発は、毒性機序研究と NAMs 開発の接点の実例であり、今後の NAMs による免疫毒性評価の方向性を示していると考えられる。

○角谷 友美¹, 福田 千春¹, 宮脇 出¹

¹住友ファーマ株式会社 リサーチディビジョン前臨床研究ユニット

【背景・目的】

近年脚光を浴びている新規モダリティのひとつとして、核酸医薬品が挙げられる。2023年10月現在、日米欧の3局で計18剤、アンチセンス核酸としては10剤が上市されている。しかしながら、中枢神経疾患標的の核酸医薬品は長らく Nusinersen (2016, 米国) のみであり、今年に入ってからようやく Tofersen が米国で承認されたという状況から、中枢神経系標的の核酸医薬品開発は未だハードルが高いと言える。毒性面から考えると、核酸医薬品のクラスエフェクトとして、主に肝毒性・腎毒性・免疫毒性・オフターゲットがよく知られている。これらに加えて、中枢神経系投与時には急性中枢神経毒性が大きな懸念となる。例として、マウスへの脳室内投与後1時間以内に痙攣、鎮静などの中枢神経系所見が認められることがある。急性中枢神経毒性は標的遺伝子非特異的であり、また用量依存的であることが明らかになりつつある。血液ほどダイナミックな流動のない脳脊髄中への投与において、高用量投与が困難であることは大きな課題であろう。アンチセンス核酸のスクリーニング段階で、より安全な候補配列を取得しておくことの重要性は非常に大きい。

さて、ゼブラフィッシュは特に発生学分野の研究で多用されてきたモデル動物である。ヒトとの遺伝子相同性及び臓器類似性の高さ、ライフサイクルの短さ、並びに運用コストの低さから、最近では医薬品開発にも取り入れられ、特に欧米では申請資料に用いられつつある。3Rの高まりによって、今後も重要性が増すと考えられる。

本研究では、急性中枢神経毒性を回避した安全な核酸医薬品を取得するため、ゼブラフィッシュを用いたスクリーニング系を確立することを目的とした。これによって、動物数の削減による3Rへの貢献、高額な核酸医薬品合成費の抑制、Lead optimisation 期間の短縮を見込むことができる。

【方法・結果・考察】

マウスに核酸医薬品の脳室内投与を行い、投与後の一般状態観察によって急性中枢神経毒性をスコア化した。マウスで見出した毒性陽性及び陰性の核酸配列を用いてゼブラフィッシュの成魚に脳内投与を行い、投与後の一般状態観察を実施したところ、中枢神経毒性陽性及び陰性の核酸配列は、ゼブラフィッシュ成魚においても同様の傾向を示し、陽性配列投与群では明確な一般状態の異常が認められた。続いてゼブラフィッシュ稚魚に脳内投与後、遊泳をトラッキングし、総移動距離を評価した。陽性配列投与群では投与後約1h時点での行動量が著しく減少した。24h後には陽性配列投与群の行動量は媒体群と同程度まで回復していた。これらの結果から、急性中枢神経毒性は種差の少ない毒性であり、ゼブラフィッシュでも毒性ポテンシャルを評価可能であることが明らかとなった。

加えて、UAS-GCaMP 系統及び GAL4 系統を交配させたカルシウムセンサー組換え系統を用いて、ゼブラフィッシュ稚魚の脳におけるカルシウムイメージングを行った。3Dプリンターで開発した保定台を用いることで、効率的な測定を可能とした。測定回ごとの変動幅が大きいものの、陽性配列投与群では蛍光量の最大値が減少する傾向が認められ、イメージングに利用可能な配列として3系統を見出した。更に、tSNE 解析の結果から、1系統では各投与群の分布を明確に分離が可能であり、機械学習を用いた毒性予測システムを構築できる可能性が示唆された。

【展望】

急性中枢神経毒性は、推測される機序から種差が少ないと考えられるにも関わらず、高い相関性のある *in vitro* 系は確立されていない。本研究では、ゼブラフィッシュを用いた *in vitro* 系及び *in silico* 予測への道筋を見出した。更なる改善を試み、新規モダリティ分野において重要な、創薬プラットフォーム化に貢献したい。

○出口 清香¹, 高山 和雄¹

¹ 京都大学 iPS 細胞研究所

【背景・目的】胎児期の小腸組織は、腸管の側底側に接続した血管から染み出す体液が形成する間質流に晒されている。そのため、発生を模倣しながらヒト iPS 細胞から小腸組織を構築するためには、増殖因子や細胞外基質に加えて、間質流も考慮した培養系が望ましいと考えられる。しかし、現在までに開発されているヒト iPS 細胞の小腸分化誘導法の多くは、様々な増殖因子を組み合わせることや、ゲル中で三次元培養を行うなどのアプローチに限定されており、発生過程で晒される間質流のような体液の流れを再現できていない。本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて間質流を再現した条件で、ヒト iPS 細胞から構造的かつ機能的な小腸組織（小腸組織チップ）を構築できるか試みた。

【方法】ここでは、上下二つの流路が多孔質膜で仕切られたマイクロ流体デバイスを使用した。上側流路にヒト iPS 細胞を播種し、小腸細胞へ分化誘導を行った。その際、下側流路の培地を低速灌流することで、腸管の側底側から頂端側に流れる間質流を再現した。

【結果・考察】数値シミュレーションにより、下側流路の培地を低速還流することで、培地が多孔質膜の微細孔を通過して下側から上側流路に向かって染み出し、間質流に類似した液体の流れを形成できることを確認した。シングルセル RNA-seq 解析の結果、小腸組織チップは、小腸の主要な機能を担う上皮細胞だけでなく、上皮細胞をサポートする間葉系細胞も含むことが分かった。形態学的解析により、小腸組織チップの小腸上皮細胞は、間質流に晒されることで発達した柔毛様の隆起構造を構築することが判明した。また、小腸組織チップにおいて、間質流暴露により、線維芽細胞は上皮細胞層の側底側に局在した。線維芽細胞が分泌する細胞外基質であるコラーゲン線維も、上皮細胞層の側底側に局在して形成された。以上のことから、間質流を再現することで、生体に近い構造を持つ小腸組織チップの開発に成功した。

小腸で発現する薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現量および代謝活性は、間質流暴露により上昇したことから、小腸組織チップは薬物代謝・動態研究に利用可能であることが示唆された。また、ヒトコロナウイルスである HCoV-229E の感染受容体である ANPEP は、間質流に暴露することで上皮細胞層の頂端側に局在し、生体と類似した発現を示した。感染受容体 ANPEP の局在と同様に、小腸組織チップの頂端側から HCoV-229E 作用するとウイルスは効率的に感染したが、側底側からウイルスを作用しても感染しなかった。このことから、本モデルは生体を再現したウイルス応答を示すことが示唆された。本研究では、マイクロ流体デバイス内で間質流を生み出し、胎児期の小腸組織の力学条件を再現することで、構造的かつ機能的な小腸組織チップをヒト iPS 細胞から創成し、薬物代謝・動態研究や感染症研究に応用できることを示した。今後、小腸組織チップを用いた評価系が普及することで、より臨床外挿性の高い創薬研究が実現することを期待する。

○年本 広太¹¹ アステラス製薬株式会社 開発研究 非臨床バイオメディカルサイエンス システムズ薬理研究室

【背景・目的】 Quantitative systems pharmacology (QSP)モデルは生物学的システム、疾患プロセス、薬物動態を数学的な表現を用いて設計されたモデルである。QSP モデルは、動物薬理試験結果の定量的解釈からヒトにおける臨床予測、薬物応答のバイオマーカーの推定、最適な他剤との併用戦略の立案といったことに活用することができる。これらの多くは、主薬効に関する研究が中心である一方で QSP モデルを用いた毒性機序研究もなされている。本発表では、QSP モデルを用いた一般的な研究事例から、毒性研究に応用した事例まで複数の事例を紹介し、毒性機序研究における QSP モデルの活用の現状と展望について議論する。

【事例紹介】 1. 担癌マウスモデルの *in vivo* QSP モデル¹。放射線治療および抗 PD-1 抗体治療後の腫瘍体積データを使用し、CT26 モデルマウスの QSP モデルが発表されている。このモデルは、ごく少数の連立微分方程式から成る小規模な QSP モデルでありながら、放射線および抗 PD-1 抗体治療の様々な組み合わせにおける腫瘍体積データを良好に再現することに成功した。このモデルを用いて、放射線と薬物療法の様々な組み合わせ、投与タイミングにおけるシミュレーションを行うことで、最適な組み合わせとなるレジメの提案を行った。2. 血液凝固カスケード QSP モデル²。抗凝固剤の投与は出血のリスクがあるため、活性化部分トロンボプラスチン時間(aTT)およびプロトロンビン時間の国際標準比(INR)といった指標がモニタリングされる。そこで、血液凝固カスケード QSP モデルを用いることで、これら指標を予測する研究が実施された。結果として、長期ワルファリン治療を受けている患者の観察された INR、および 長期リバーロキサバン療法を受けている患者の aPTT 測定値を予測することに成功した。さらに、CYP2C9 および VKORC1 の遺伝子多型が INR 測定に及ぼす影響も予測することができた。3. DILIsym による肝毒性評価³。Entolimod が投与された phase I 単回投与臨床試験において、一部の被験者で ALT の顕著な上昇が観察された。そこでヒトおよび前臨床種における薬物性肝障害を定量的に理解および予測するための数理モデルソフトウェアである DILIsym を用い、観測された事象から重大な肝障害が発生しうるかの予測を行った。その結果、肝細胞数の減少は 5%未満と限定的であることが示唆され、これは実際の肝機能障害を引き起こすのに必要な肝細胞減少量よりも低いことが示唆され、重大な肝障害を引き起こす可能性は低いと考えられた。

【考察】 オンターゲット毒性および毒性所見の情報が得られている場合において、それらに関連するシステムの QSP モデルを用いることで、毒性発生の可能性やその重大性について定量的な解析を行うことが可能である。しかし、QSP モデルの思想が目的とするシステムを数学的記述することであるため、記述されたシステム外の毒性、例えばオフターゲット毒性に関して QSP モデルを用いた検討は難しいと考えられる。

【参考文献】

1. Kosinsky Y. et al. Radiation and PD-(L)1 treatment combinations: immune response and dose optimization via a predictive systems model. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):17.
2. Hartmann S. et al. Quantitative Systems Pharmacology Model-Based Predictions of Clinical Endpoints to Optimize Warfarin and Rivaroxaban Anti-Thrombosis Therapy. *Front Pharmacol*. 2020;11:1041.
3. Howell BA. et al. A mechanistic model of drug-induced liver injury AIDS the interpretation of elevated liver transaminase levels in a phase I clinical trial. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014;3(2):e98.

アントラサイクリン系抗がん剤心毒性におけるフェロトーシス～フェロトーシスに関する病態生理、誘導機序、予防戦略と臨床開発～

○池田 昌隆¹, 井手 友美¹¹九州大学病院循環器内科

ドキシソルビシンは 1967 年にイタリアの Farmitalia 研究所の F. Arcamone らにより、*Streptomyces Peucetius* var. *Caesius* の培養濾液中から発見された抗腫瘍性抗生物質（アントラサイクリン系抗がん剤）である。アントラサイクリン系抗がん剤は、その高い抗腫瘍効果に基づき、幅広い悪性腫瘍の治療に用いられたが、1974 年には心毒性を生じることが報告 (Rinehart et al., *Ann Intern Med*, 1974) された。アントラサイクリン系抗がん剤は、現在でも悪性リンパ腫、白血病、乳がん、卵巣癌、骨肉腫など幅広い悪性腫瘍に対する第一選択薬に位置づけられているが、用量依存性に生じる心毒性のために厳格に総投与量が制限されている。このため、悪性腫瘍に対するアントラサイクリン系抗がん剤を用いた治療は十分に行えていない現状にある。さらに心筋症（ドキシソルビシン心筋症）の発症に至った場合には、その予後は極めて不良であり (Felker et al., *N Engl J Med*, 2000)、長らく心毒性の分子機序解明とその克服が目指されてきた。

我々は、2012 年に米国の Stockwell らにより提唱された新規細胞死“フェロトーシス (ferroptosis)” (Dixon et al., *Cell*, 2012) に着目し、アントラサイクリン系心毒性の分子機序の解明とその克服に取り組んできた。フェロトーシスは、鉄依存性に生じる脂質過酸化に基づく regulated cell death であり、鉄のキレート剤、脂質親和性抗酸化剤、内因性過酸化脂質特異的抗酸化酵素 Glutathione peroxidase 4 (GPX4) により抑制される細胞死と定義される。我々は、GPX4 の遺伝子改変動物および単離培養心筋細胞を用いた実験により、フェロトーシスがドキシソルビシン心毒性において重要な分子機序となっており、ミトコンドリアを契機として生じていることを明らかにした (Tadokoro and Ikeda et al., *JCI Insight*, 2020)。さらに、心筋細胞のミトコンドリアを契機としてフェロトーシスが生じる原理を探索する過程で、mtDNA にインターカレーションすることで集積するドキシソルビシンと、アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) の発現低下に基づきヘム合成が障害されることで生じた鉄の利用障害による鉄の蓄積が協調してフェロトーシス、ひいては心毒性を引き起こしていることを明らかにした。これらの病態機序の解明に基づき、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) によりヘム合成を促進することで、ミトコンドリア内の鉄、およびフェロトーシスを抑制し得ることを見出した (Abe and Ikeda et al., *Science Signaling*, 2022)。

アントラサイクリン系抗がん剤による心毒性が報告されて以来、約 50 年にわたり、細胞増殖を抑制するはずの抗がん剤が、細胞増殖をしない心筋細胞に毒性を示す分子機序は、多くの研究にも関わらず、大いなる謎であった。フェロトーシスの誘導分子機序に取り組むことで、心筋細胞の豊富な mtDNA が DOX を心筋細胞のミトコンドリアにアントラサイクリン系抗がん剤を呼び込む原理となり、アントラサイクリン系抗がん剤のフェロトーシスに基づく毒性が心筋細胞優位に生じていることが見えてきた。

現在、我々は 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) の臨床開発を通じ、フェロトーシスに基づいた心毒性を克服することで、アントラサイクリン系抗がん剤によるがん治療を完成形に昇華させることを目指している。本講演においては、我々がこれまでに明らかにしてきた「アントラサイクリン系抗がん剤心毒性におけるフェロトーシスに関する病態生理、誘導分子機序」と、現在取り組んでいる「5-アミノレブリン酸を用いた心毒性の予防戦略と臨床開発」の現状と今後の展望について紹介したい。

○早乙女 俊樹¹, 遠山 由貴¹, 安田 好美¹, 島田 直樹¹, 澤田 光平^{1,2}

¹日本毛織株式会社 研究開発センター

²一般社団法人日本薬理評価機構

【背景・目的】

心筋細胞において、アクチンフィラメント (F-アクチン) は、サルコメア部と非サルコメア部に存在し、サルコメア部では心筋収縮力の発生、非サルコメア部では、細胞骨格として収縮の伝達、細胞小器官の支持、細胞の形状変化と運動に寄与している。F-アクチンの形態が心筋細胞の収縮性に大きく影響すると考えられるが、抗がん剤の心収縮障害と F-アクチンの形態の関係性は十分に理解されていない。ゼラチンハイドロゲル不織布 (GHFN) は、柔軟なゼラチンの繊維で形成された細胞評価基材であり、GHFN 上でヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPSC-CM) を培養すると、hiPSC-CM の収縮により GHFN が大きく変形することで心収縮性を容易に検出でき、また GHFN を構成するゼラチン繊維に沿って F-アクチンが配向するため、F-アクチンの形態変化が観察可能である。この GHFN の特性を活用し、GHFN 上で培養した hiPSC-CM に種々の抗がん剤を暴露し、hiPSC-CM の F-アクチンの形態変化と心収縮障害の関係性の評価を行った。

【方法】

iCell cardiomyocytes² (富士フイルム和光純薬社) を 3,500 cells/mm² となるように GHFN 上に播種し、14 日間培養後、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬 (Panobinostat, Tubasutatin-A, Entinostat) をはじめとした様々な抗がん剤を 72 時間暴露した。明視野タイムラプス像を共焦点イメージングシステム (横河電機社、CellVoyager CQ1) で観察し、MUSCLEMOTION 解析を行うことで収縮力変化を評価した。抗がん剤暴露後の標本を 4 %パラホルムアルデヒドで固定し、F-アクチンおよび細胞核をファロイジンおよび Hoechst で染色し、蛍光観察像を画像解析ソフトウェア (横河電機社、CellPath1Finder) で解析することで、F-アクチンの面積および蛍光強度、細胞核の直径および配向性を評価した。

【結果・考察】

Panobinostat 30 nM (HDAC 1-12 inhibitor, IC₅₀: 1-31 nM) は収縮力、50 %ピーク幅ともに低下させ、Tubasutatin-A 1 μM (HDAC 6 inhibitor, IC₅₀: 11 nM) は収縮力を低下させず、50 %ピーク幅のみを低下させた。Entinostat 3 μM (HDAC 1, 3 inhibitor, IC₅₀: 0.5-1.7 μM) は収縮を停止させた。これらの標本の F-アクチンを観察すると、DMSO では広範囲に広がった F-アクチンが見られるのに対し、Panobinostat 30 nM、Entinostat 3 μM は、F-アクチンの範囲が顕著に狭く、HDAC 阻害薬は F-アクチンを崩壊させて断片化する挙動が観察された。さらに、断片化した F-アクチンの範囲と、収縮力変化には高い相関がみられた。F-アクチンの崩壊の定量は、心毒性評価の主要なパラメーターとして利用できる可能性がある。一方で、HDAC6 は F-アクチンの重合を Cortactin を介して制御するため、HDAC6 阻害薬 (Tubastatin-A) による収縮力低下と F-アクチンの崩壊の検出を試みた。収縮力低下、F-アクチンの崩壊とも見られず、HDAC 6 以外の毒性機序による F-アクチンの崩壊が示唆される。発表では、他の抗がん剤の結果を紹介し、毒性機序について議論する。

○井手 聡一郎、池田 和隆

公益財団法人 東京都医学総合研究所 依存性物質プロジェクト

アディクションは、薬物やアルコール、タバコ・電子タバコなどを対象とした依存である物質依存に加えて、ギャンブルやゲームなど特定の行動に対するのめり込みである行動嗜癖も含めた概念であり、世界的に大きな社会問題となっている。アディクションを理解し、克服していくためには、そのメカニズムを解明することが非常に重要であり、数多くの研究がなされている。しかしながら現時点では、未解明な点が多く残されており、その一因として適切なモデルが得られていない点が挙げられる。物質依存性のリスク評価に関しては、依存性物質の急速な多様化が近年進んでいることもあり、より精度が高く、短期間で評価可能な実験系の確立が求められている。しかしながら、少なくとも現時点では、細胞等を用いた *in vitro* 実験系ではアディクションの実体を再現できておらず、“動物個体”を用いた検討が必須であると考えられる。また、行動嗜癖に関しては、モデル動物の開発は難航しており、汎用性の高い指標は未だ提唱されていない。アディクションの動物モデルの開発は、今後ますます必要性が高まっていくと考えられる。

オールズとミルナーが頭蓋内自己刺激 (ICSS) 行動を発見してから 60 年以上が経過し、ICSS 法は報酬系の神経回路網を解明する有力な手段になっている。近年、物質依存の評価法として、齧歯類やサルなどにおける自己投与試験や条件付場所嗜好試験が広く用いられているが、ICSS 法も同様に物質依存評価法として有用であることが示されている。さらに中脳ドーパミン系の内側前脳束 (視床下部外側領域) を電気的に刺激する ICSS 法は、依存性物質を投与すること無く報酬獲得行動を持続する点において、アディクションの評価において異なる知見をもたらす有用なツールになり得ると考えられる。本発表では、我々の ICSS を用いた研究成果を紹介しつつ、アディクションの評価系に関して議論したい。

また我々は、アディクションの評価において、より原始的な生物である線虫 (*Caenorhabditis elegans*: *C. elegans*) を用いた実験系構築に取り組んでおり、本発表においてその成果を紹介したい。線虫は、経験に基づいて獲得された学習行動を行い、餌がある環境と共に経験した周辺環境の塩 (NaCl) 濃度を好み、逆に餌が無い環境 (飢餓) を経験した周辺環境の塩濃度を避けるよう行動する塩走化性が知られている。これらの「嗜好・嫌悪」の学習行動を利用し、これまでに、線虫がコカインやメタンフェタミンに曝露された際に、ドーパミン神経伝達に依存して条件付けされたイオンを好むようになることが報告されている。我々は、中枢刺激薬とは異なる作用機序を持つモルヒネに着目して検討を行ったところ、線虫がモルヒネへの用量依存的な嗜好性を示すことを見出した。さらに、卵孵化から 4 日齢幼虫 (L4 stage) になるまでモルヒネを曝露した線虫では、オピオイド受容体拮抗薬ナロキソンに対して嫌悪性を示すようになり、身体依存 (禁断) 様の行動が見られることを明らかにした。これらのデータは、モルヒネが線虫において齧歯類やヒトと同様にオピオイドシステムを介して精神依存性および身体依存性を有することを示唆している。

○佐藤 慎司¹, 足立 善昭², 川端 茂徳³

¹株式会社リコー メディカルイメージング事業センター

²金沢工業大学 先端電子技術応用研究所

³東京医科歯科大学大学院 先端技術医療応用学講座

【背景】

近年の医療分野ではMRIなどの画像診断装置の発展により、腫瘍や神経の圧迫など形態の診断が可能となっている。しかし、形態的な異常がない場合でも神経機能に異常がある例や、逆に神経が圧迫されていても神経機能が正常な例も多く、神経機能を加味して評価することが必要である。神経機能を評価する方法としては、神経の走行上の体表面に電極を貼り付け、刺激に誘発された神経活動電位を計測する電気生理学的検査が広く適用されている。しかし電位計測では骨や軟部組織といった神経周囲の組織の導電率の影響を受けるため、体表から深く骨組織に囲まれている脊髄などでは詳細な障害部位診断が難しい。

一方、神経の電気活動により発生する磁界を体表面上で検出する神経磁界計測法は、生体組織の影響を受けないため、体内深部における神経機能を高い空間分解能で評価が可能となる革新的な検査法である。そのため、治療前の障害部位診断のみならず、病態の解明や治療効果の評価、薬効評価など、神経疾患医療に幅広く貢献することが期待されている。

【装置開発と臨床応用】

神経磁界計測装置では超高感度磁気センサである超伝導量子干渉計 (superconducting quantum interference device, SQUID)を用いて、地磁気の10億分の1程度の微弱な生体磁界を計測する。同様の技術を用いてこれまで脳の分野では脳磁計として既に臨床応用されているが、脊髄を含む神経軸索の活動は脳の活動より高速で伝搬することや信号の強度がより微弱であることなどから臨床応用が困難であった。そこで我々は神経磁界計測の実現に向けてハードウェアや解析方法など様々な改良をおこなってきた⁽¹⁾。

近年の装置開発と臨床研究により、ヒトの頸椎から腰椎までの全脊椎⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾の神経電気活動の可視化に成功し、神経機能の評価を可能としてきた。また、末梢神経における神経電気活動の可視化にも成功しており、神経磁界計測法の応用範囲の拡大と神経機能評価手法の確立に向けても検討を進めている。

本講演では、システムに用いられている技術の一端を紹介するとともに、神経機能の評価法に関する基本的な知識から、神経磁界計測の臨床応用事例を交え、臨床研究成果を紹介する。

【参考文献】

- (1) Adachi Y, Kawabata S, Hashimoto J, Okada Y, Naijo Y, Watanabe T, et al. Multichannel SQUID Magnetoneurograph System for Functional Imaging of Spinal Cords and Peripheral Nerves, in IEEE Transactions on Applied Superconductivity, vol. 31, no. 5, pp. 1-5, Aug. 2021
- (2) Sumiya S, Kawabata S, Hoshino Y, Adachi Y, Sekihara K, Tomizawa S, et al. Magnetospinography visualizes electrophysiological activity in the cervical spinal cord. Sci Rep 2017;7:2192–203.
- (3) Ushio S, Hoshino Y, Kawabata S, Adachi Y, Sekihara K, Sumiya S, et al. Visualization of the electrical activity of the cauda equina using a magnetospinography system in healthy subjects. Clin Neurophysiol 2019;130:1–11.
- (4) Hashimoto J, Kawabata S, Sasaki T, Hoshino Y, Sekihara K, Adachi Y, et al. Assessment of thoracic spinal cord electrophysiology activity through magnetoneurography. Clin Neurophysiol 2022;133:39–47.

要旨

ポスター発表

○篠原 颯志¹, 深見 達基^{1,2}, 内嶋 聖允¹, 廣澤 啓也¹, 長岡 茉唯¹, 中野 正隆^{1,2}, 中島 美紀^{1,2}

¹金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 薬物代謝安全性学研究室

²金沢大学ナノ生命科学研究所

【背景・目的】アリルアセタミドデアセチラーゼ (AADAC) は医薬品の加水分解酵素として働き、時には肝障害を引き起こす原因代謝物を生成することを当研究室で明らかにしてきた。近年、AADAC はがん抑制遺伝子として働くこと、およびがん悪性化に関与する活性酸素種 (ROS) を抑制することが示唆されている。ROS は薬物誘導性肝障害 (DILI) の悪化の鍵要因でもあり、AADAC が ROS の抑制を介して肝障害緩和に働く可能性が考えられる。本研究では ROS 産生により肝障害を惹起することが知られている四塩化炭素 (CCl₄) を用いて野生型 (WT) と *Aadac* ノックアウト (KO) マウスにおける肝障害感受性を比較することで AADAC が DILI に対して保護的に働く可能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】各種化合物を投与した WT と KO マウスにおける血漿中 ALT および AST 値、肝臓中グルタチオンおよびマロンジアルデヒドレベルを測定した。ヒト肝臓ミクロソームと抗 AADAC 抗体を用いた免疫沈降とプロテオミクスを行った。AADAC 野生型および変異型 (S189N) を過剰発現させたヒト肝がん由来 Huh-7 細胞に CCl₄ を処置し、LDH assay により細胞傷害を評価した。細胞内の鉄量は Fe²⁺ と選択的に反応し蛍光を発する FerroOrange を処置し、蛍光顕微鏡により評価した。

【結果・考察】肝障害マーカーの血漿中 ALT と AST 値は、CCl₄ 投与によって上昇し、その上昇は WT マウスより KO マウスで顕著であった。抗酸化物質の肝臓中グルタチオン量は WT マウスより KO マウスで有意に低値を、脂質過酸化マーカーのマロンジアルデヒド量は有意に高値を示した。CCl₄ による毒性に加水分解反応は関わらないため、AADAC は加水分解非依存的なメカニズムを介して酸化ストレスを抑制すると考えられた。そこで AADAC がなんらかのタンパク質と相互作用することで酸化ストレス抑制に関わっている可能性を考え、AADAC 抗体を用いた免疫沈降とプロテオミクスを行ったところ、Fe²⁺ 依存的な細胞死であるフェロトーシスに対して保護的に働く Fe²⁺ 酸化酵素セルロプラスミン (Cp) が同定された。興味深いことに肝臓中 Cp 活性は WT マウスより KO マウスで有意に低値を示し、かつ Fe²⁺ 濃度が約 3 倍高かったことから、*Aadac* 欠損は Cp 発現量を低下させることでフェロトーシスを増悪させると考えられた。加えて、KO マウスにおける CCl₄ による重度な肝障害は、フェロトーシス阻害剤デフェロキサミンやフェロスタチン-1 の前投与により抑制された。また、Huh-7 細胞にヒト AADAC を過剰発現させると細胞内 Fe²⁺ 濃度が減少し、CCl₄ による毒性が抑制されたことから、ヒト AADAC もフェロトーシスに対して保護的に働き、酵素活性のない AADAC 変異型でも同じ結果が得られたことから、その保護効果は酵素活性非依存的なものと示された。さらに、フェロトーシスの関与が報告されているアセトアミノフェン誘導性肝障害も WT マウスより KO マウスで重度であったため、*Aadac* は CCl₄ に限らずフェロトーシスをメカニズムとする DILI を抑制する役割を持つことが示された。以上、本研究では AADAC が肝臓内鉄濃度を抑制し、薬物誘導性フェロトーシスに対して保護的に働く機能を有していることを解明した。

○平井 智也¹, 住江 翔太郎¹, 竹村 晃典³, 早崎 洸太郎², 伊藤 晃成³

¹千葉大学薬学部 生物薬剤学研究室

²千葉大学大学院医学薬学府 生物薬剤学研究室

³千葉大学大学院薬学研究院 生物薬剤学研究室

【背景・目的】

薬物性肝障害は稀に重篤化し致死的転帰に至るため、その発症メカニズムを同定することは非常に重要である。中でも抗菌薬は薬物性肝障害の報告例が多く、副作用自発報告データベースの解析から副作用に占める肝障害の割合が非抗菌薬に比べて抗菌薬で多いことも確認されている。しかし、抗菌薬で肝障害が起こりやすい理由は十分に解明されていない。この点について我々は、抗菌薬に共通する薬理作用により腸内細菌叢が変化し、これが体内の胆汁酸組成を変化させることに起因すると仮説をたてた。胆汁酸は肝細胞内でアミノ酸抱合を受け、胆汁排泄される。その後、腸管に分泌された胆汁酸は腸内細菌により脱抱合を受け、大部分は回腸付近で再吸収され再び肝臓に取り込まれる。胆汁酸は腸肝循環する中で組成が一定に維持されている。そこで、抗菌薬による腸内細菌叢の減少が胆汁酸組成を変化させることで肝障害発症に影響を及ぼすか、非吸収性抗菌薬のバンコマイシン (VCM) とコール酸 (CA) を共に経口投与することで検討した。

【方法・結果】

C57BL/6J マウス (メス、9 週齢) を i) Vehicle, ii) VCM (100 mg/kg), iii) CA (450 mg/kg), iv) VCM+CA の 4 群に分類し 1 日 1 回、14 日間強制経口投与した。Vehicle, VCM 群では ALT の上昇は認めず、CA 群では投与 7 日目に一過的な ALT の上昇を認めしたが、その後は低値を示した。VCM+CA 群では、他の群と異なり 14 日目まで持続的な ALT 値の上昇を認め (Fig. 1)、糞便中の腸内細菌 DNA 量は VCM、VCM+CA 群で顕著に減少し、14 日目まで減少を維持した。

14 日目の血中胆汁酸濃度を LC-MS/MS で測定した結果、抱合型胆汁酸であるタウロコール酸 (TCA) は Vehicle で定量限界以下、VCM 群で $57 \pm 59 \mu\text{M}$ 、CA 群で $26 \pm 16 \mu\text{M}$ 、VCM+CA 群で $630 \pm 204 \mu\text{M}$ であり、VCM+CA 併用群で増加していた。さらに他の抗菌薬 (フルクロキサシリン) で検討したところ同様の結果を認め、抗菌薬と CA 併用群を含めた各群の ALT 値と血中 TCA 濃度には正の相関が確認された。

【まとめ】

本結果から、抗菌薬による腸内細菌の減少が抱合型胆汁酸、特に TCA の血中濃度上昇を引き起こし、これが肝障害発症に寄与することが示唆された。

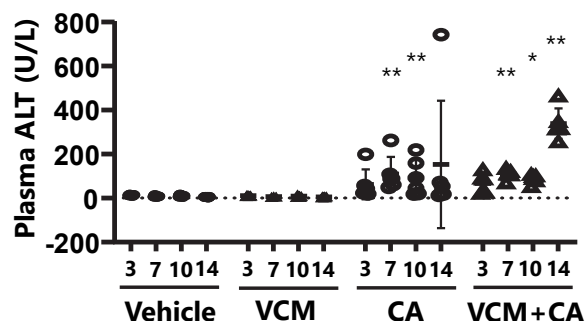


Fig.1 Analysis of plasma ALT level.

Data are means \pm SD (n=3-6)

*p<0.05 **p<0.01 vs vehicle group at the same time point.

佐藤 怜¹, 下村 和也¹, ○深見 達基^{1,2}, 中野 正隆^{1,2}, 樋口 裕一郎³, 上原 正太郎³, 米田 直央³, 末水 洋志³, 中島 美紀^{1,2}

¹金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科 薬物代謝安全性学研究室

²金沢大学ナノ生命科学研究所

³公益財団法人実験動物中央研究所

【背景・目的】アルコール基を有する化合物がカルボン酸体へと酸化される過程で生成されるアルデヒド中間体は、細胞内のタンパク質と結合することで、毒性発現につながることを示唆されている。アルコール体からアルデヒド体への酸化反応がアルコール代謝の律速段階と考えられており、アルデヒド体を生成する酵素の発現量や活性の個人差は医薬品の副作用感受性を左右する可能性がある。一般的に、サイトゾルに局在する NAD⁺要求性のアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) がアルデヒドの生成反応を触媒すると考えられているが、不安定なアルデヒド体の生成を直接評価することにより触媒酵素を精査した研究は少ない。本研究は、アルデヒド体を検出することにより、ヒト肝臓におけるアルコール体の酸化を担う酵素を解明することを目的とした。

【方法】アルコール基を有する 10 種の化合物を対象に、補酵素 (NAD⁺, NADP⁺ および NADPH) およびトラップ試薬を反応系に添加し、生成したアルデヒド体を安定な抱合体として LC-MS/MS により検出した。ヒト肝臓に発現する ADH 分子種 (ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4 および ADH5) およびアルドケトレダクターゼ 1A1 (AKR1A1) の発現系を作製し、市販のシトクロム P450 発現系とともに酵素源として使用した。ヒト肝キメラマウスより単離した細胞 (HepaSH 細胞) に ADH やシトクロム P450 の阻害薬もしくは発現誘導薬を処置し、アルデヒド体の生成を評価した。15 検体のヒト肝臓サイトゾル (HLC) を用いたプロテオミクス情報を基に、アルデヒド体の生成活性と有意な相関を示す NADP⁺要求性酵素を探索した。

【結果・考察】ADH 分子種発現系を用いてアルデヒド体の生成活性を測定した結果、ADH1C と ADH4 がそれぞれ 6 および 8 種類の医薬品の酸化反応を触媒した。興味深いことに、ADH4 の基質となった化合物の化学構造的な特徴から、ADH4 はベンゼンやピリジンなどの 6 員環に結合したメチロール基 (-CH₂OH) の酸化反応を触媒する傾向が認められた。次に、ヒト肝臓画分と各種補酵素を用いて、アルデヒド体の生成反応を触媒する酵素を精査した結果、アバカビルの酸化反応に NADPH 要求性のミクロソーム酵素の関与が示唆され、発現系や阻害剤を用いた解析より、CYP1A2 が触媒することを明らかにした。また、速度論的解析や細胞を用いた検討より、CYP1A2 は ADH よりもアバカビルのアルデヒド体の生成反応を効率的に触媒することが示された。他にも、ヒドロキシトルブタミドの酸化反応では、NADP⁺を添加した HLC において、NAD⁺添加時 (ADH 活性) と同等の酵素活性が認められ、NADP⁺要求性酵素の関与が考えられた。HLC を用いたプロテオミクス解析により、還元酵素と認知されていた AKR1A1 が当該 NADP⁺要求性酵素の候補として挙げられ、実際に AKR1A1 発現系は顕著なアルデヒド体生成活性を示した。

【結論】本研究では、各 ADH 分子種が異なる基質特異性によりアルコール化合物の酸化反応を触媒すること、および ADH により特異的に触媒されると考えられてきた化合物の酸化反応に P450 や AKR が関与することを明らかにした。本検討結果は、アルコール体の代謝反応に関与する酵素を明らかにする上で、サイトゾルだけでなくミクロソーム画分および補酵素を用いた詳細な解析が必要であることを示唆している。

○吉岡弘毅¹, 月星陽介¹, 堀田英音¹, 横田 理², 三上友理恵³, 緒方謙一^{1,3}

¹岐阜医療科学大学薬学部 薬理学分野

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毒性部

³九州大学病院

【背景・目的】

口唇口蓋裂は2番目に多い先天性疾患であり、本邦では500人に1人程度の割合で出現する。生後半年から複数回の外科的手術が必要であるとともに、言語障害など様々な障害が起こることから、早期の治療や手術以外の治療法が望まれている。口唇口蓋裂は遺伝因子と環境因子によって引き起こされる多因子しきい説で発症すると考えられる。環境要因としては、医薬品曝露、喫煙および飲酒などが含まれる。近年、環境因子によってマイクロ RNA (miRNA) の発現変動が報告されている。miRNA は20塩基程度の1本鎖 RNA で発生や細胞増殖などで重要な役割を担っている。また、医薬品曝露における薬効や毒性との関連性も報告されつつある。口唇口蓋裂と miRNA の報告は近年少しずつ報告されているものの、その全貌は明らかになっていない。本研究では、口唇口蓋裂に関与する miRNA の同定を目的とするとともに、医薬品曝露によって発症する口唇口蓋裂に対する miRNA の関与を評価した。本研究では、急性前骨髄性白血病に用いられるレチノイン酸を用いた。

【方法】

(1) Medline, Pubmed, Embase, および MGI によるデータサーチを行い、マウスの口蓋裂に関連する論文を検索し、その中から口蓋裂に関連する遺伝子を抽出しリストの作成を行った(システムティックレビュー)。

(2) 作成したリストを用いて、関連性の高い miRNA をバイオインフォマティクス手法(PITA, miRanda, miRTarBase, TargetScan)を用いて推察した。

(3) 関連性の高かった上位10種類の miRNA の mimic を E13.5 のマウスから得た初代培養口蓋間葉系細胞(MEPM 細胞)に過剰発現させ、細胞増殖に変化が認められるか評価した。細胞増殖に変化が認められた miRNA については、処理24時間後に定量 PCR を行い、バイオインフォマティクスによって予測した遺伝子が制御されるか評価した。また、inhibitor においても同様に検討した。

(4) MEPM 細胞および E11.5 のマウスに対して、レチノイン酸を処理または投与し、前述の miRNA が変化するか評価した。miR-124-3p inhibitor を共処理または投与した際に、レチノイン酸の毒性が軽減されるか検討した。

【結果・考察】

(1) システムティックレビューの結果、195個の遺伝子が口蓋裂に関与することを明らかにした。

(2) バイオインフォマティクスの結果、18個の miRNA が口蓋裂発症に関与する可能性が示唆された ($P < 0.01$)

(3) 10種類の miRNA のうち、3種類(miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-124-3p)を過剰発現させると細胞増殖抑制が確認された。定量 PCR の結果から、miR-27a-3p は22個、miR-27a-3p は10個、miR-124-3p は16個の遺伝子が制御されることを示した。

(4) レチノイン酸は MEPM 細胞およびマウス口蓋において、miR-124-3p 発現量が増加した。

また、阻害薬を処理することで、細胞増殖抑制および口蓋裂発症の程度が改善された。

本研究の結果から、システムティックレビュー・バイオインフォマティクス・細胞増殖試験を組み合わせることで、miRNA を同定することに成功した。また、レチノイン酸による口蓋裂発症にも miRNA が関与するとともに、miRNA 阻害薬が口唇口蓋裂の治療薬になる可能性が示唆された。

○吉岡弘毅¹, 富永サラ², 横田 理³, 前田 徹², 三浦伸彦⁴

¹岐阜医療科学大学薬学部 薬理学分野

²金城学院大学薬学部

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横浜薬科大学薬学部 健康薬学科環境科学研究室

【背景・目的】

これまでに我々は生体リズムを考慮した毒性学を「時間毒性学」として展開してきた。その結果、カドミウムの毒性が曝露時刻によって顕著に異なることを明らかにした (Miura et al, J Toxicol Sci, 2017)。また、カドミウム以外の 7 種類の金属においても曝露時刻によって感受性時刻差があることを示した (Yoshioka et al, J Toxicol Sci, 2018)。我々の周りには金属医薬品も存在する。そのため、金属医薬品においても、投与時刻により副作用の強さに差が出るのが予想される。

シスプラチン (CDDP) は白金製剤の抗悪性腫瘍剤であり、多くのがん化学療法プロトコールにおいて中心的な役割を担っている。しかし、約 3 割の患者に急性腎障害が認められる。しかしその発現頻度の時刻依存性や障害の程度は十分に解明されていない。そこで、今回は CDDP の曝露時刻が急性腎障害に及ぼす影響を検討するとともに感受性時刻差を示す因子の探索を行った。

【方法】

7 週齢の ICR 系雄性マウスに、CDDP (20 mg/kg) を 10 時 (ZT2) から 4 時間ずつ時刻をずらして単回腹腔内投与を行い (6 群)、投与 14 日後までの生存数および平均生存日数を算出した。次に、10 時 (明期) と 22 時 (暗期) 2 つの時刻に対して、CDDP (20 mg/kg) を単回腹腔内投与し、投与 72 時間後に解剖した。解剖時に血液および腎臓を採取して、各種腎障害パラメーターの測定、H&E 染色および免疫染色による組織学的検討を行った。さらに、マウス腎近位尿細管細胞株 MuRTE61 を用いて、CDDP (2.5-40 μ M) で 24 時間処理した際の細胞生存率を AlamarBlue によって評価し、10 μ M CDDP で処理した際の時計遺伝子の発現レベルを測定するとともに、変動した時計遺伝子を過剰発現させた条件下で CDDP の毒性が変化するかどうか評価した。

【結果・考察】

生存数および平均生存日数から、2 時・14 時・18 時・22 時では毒性感受性が高く、6 時・10 時では毒性感受性が低かった。CDDP 投与による血中尿素窒素値および MDA 値 (酸化ストレス指標) は 22 時で有意な増加が認められた。また 22 時の CDDP 投与群では、炎症関連遺伝子 (*Cox2*・*Il-6*・*Tnfa*) の mRNA 発現量および、壊死関連マーカー (RIP1) のタンパク質の顕著な増加が観察されたが、10 時投与ではそれらの傾向は認められなかった。CDDP 投与群では、糸球体や近位尿細管の傷害 (H&E 染色、KIM-1 の免疫染色) や DNA 損傷 (γ H2AX の免疫染色) が、10 時に比べて 22 時の方に多く観察された。細胞株 MuRTE61 での検討では、濃度依存的に細胞増殖抑制が認められた。CDDP 濃度において *Bmall* および *Cry2* などの特定の時計遺伝子の発現レベルの変化がみられた。さらにこれらの時計遺伝子を過剰発現させることで、CDDP の細胞増殖に変化を示した。

CDDP 投与による毒性発現も過去の金属曝露と同じく時間依存性が確認され、さらに時計遺伝子発現が関与することが示された。CDDP の添付文書には投与時刻が明記されていないため、ヒトにおいても投与時刻の違いが CDDP の急性腎障害の発現強度を変化させる可能性がある。安全に CDDP を使用するうえで投与時刻を注視する必要があるかもしれない。

ラット近位尿細管上皮細胞におけるオクラトキシン A 曝露に関連した *in vitro* および *in vivo* 小核形成の誘導と染色体不安定性関連遺伝子の発現プロファイリング

○小澤 俊介^{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・目的】カビ毒であるオクラトキシン A (OTA) は、ラットへの反復投与により、腎臓髄質外層外帯 (OSOM) の近位尿細管上皮細胞に、増殖性病変を誘導する前に巨大核を形成する。また、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 遺伝毒性試験において、OTA は欠失変異を誘導することが知られているが、DNA への直接的作用を示す証拠はなく、その発がん機序は依然不明のままである。本研究では OTA 誘発腎発がんにおける小核形成の関与の可能性を探るため、発がん標的細胞での小核形成の有無と、小核形成との関連が示唆できる遺伝子を網羅的に探索した。

【方法】OTA を最長 21 日間処置したラット腎 NRK-52E 細胞株を用いた *in vitro* 小核アッセイおよび、巨大核誘発腎発がん物質 [OTA、モノロン (MON)、1,2,3-トリクロロプロパン (TCP)] または巨大核非誘発腎発がん物質 [3-クロロプロパン-1,2-ジオール (3-MCPD)、リン酸トリクロロエチル、臭素酸カリウム]、巨大核誘発非発がん物質 (*p*-ニトロ安息香酸)、巨大核非誘発非発がん物質 (アセトアミノフェン) を 4 または 13 週間投与したラットの OSOM を用いた *in vivo* 小核アッセイを実施した。さらに、OTA または 3-MCPD を 13 週間投与したラットの OSOM を用いた RNA シークエンシング解析を実施し、OTA 特異的な発現変動遺伝子を対象に遺伝子オントロジー (GO) term に基づくエンリッチメント解析及び qRT-PCR による検証解析を実施した。

【結果】*In vitro* 小核アッセイでは、OTA 処置 24 時間後の NRK-52E 細胞において、細胞生存率低下を示さない用量から小核出現頻度が増加した。さらに、OTA 処置 21 日間後においても、24 時間後と同程度の小核出現頻度の増加が認められた。*In vivo* 小核アッセイでは、DNA 二本鎖切断マーカーである γ H2AX に陽性となる小核を有する OSOM の近位尿細管上皮細胞数が、OTA、MON、TCP 投与群で投与期間依存的に増加した。また、OTA、MON、TCP 投与群では、PCNA 陽性細胞数の増加も認められた。エンリッチメント解析では紡錘体形成や微小管等の染色体不安定性 (CIN) に関連する GO term が見出された。qRT-PCR 検証解析では、微小管-動原体結合 (*Nuf2, Skat2*)、キネシンスーパーファミリー (*Kif11, Kif15, Kif18a, Kif20a, Kif26b*)、中心体アセンブリ (*Lgals3*)、DNA 二本鎖切断修復 (*Rad51, Rad51ap1*)、細胞周期制御 (*Myc, Cdkn1a*) に関連する遺伝子の発現が OTA 特異的に増加することが明らかとなった。

【考察】*In vivo* 小核アッセイにおいて、巨大核誘発腎発がん物質に共通して、近位尿細管上皮細胞に小核形成が認められた。さらに、小核形成が認められたいずれの投与群でも細胞増殖活性が亢進していたことから、OTA 投与に起因する有糸分裂制御の破綻によって引き起こされる小核形成が細胞増殖促進により加速されることで、巨大核形成と関連した CIN を増大させることが示唆された。一方、*in vitro* 小核アッセイでは、長期間曝露後も *in vivo* と同様に小核形成の誘導が認められたが、曝露期間依存的な出現頻度の増加は認められなかった。これは、*in vitro* 試験では OTA により細胞周期停止を反映した細胞生存率の低下が認められたことを反映して、小核の形成と、小核保有細胞のアポトーシス等による排除が均衡した可能性が示唆された。更に、小核はクロモソリプシスを介して主核の染色体欠失を引き起こす可能性があることから、OTA による小核の形成は欠失変異の誘導に関与する可能性が示唆され、それが OTA 誘発腎発がんに寄与することが考えられた。以上より、OTA 投与に起因する近位尿細管上皮細胞における小核の形成は、増殖性病変形成前の巨大核形成と関連した CIN の増大に関与していることが示唆された。

○Xinyu ZOU^{1,2}, Qian TANG^{1,2}, Ryota OJIRO^{1,2}, Shunsuke OZAWA^{1,2}, Momoka SHOBUDANI¹, Yuri SAKAMAKI¹, Yuri EBIZUKA¹, 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

[Background and Objectives] Imidacloprid (IMI) is a widely used neonicotinoid insecticide; however, its neurotoxic potential in the mammalian brain remains unknown. Because adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus (DG) entirely recapitulates the developmental process of neuron production during the embryonic stage, the monitoring of the adult neurogenic niche in experimental animals may provide a valuable tool for detecting developmental neurotoxicity. The present study investigated the developmental exposure effect of IMI on adult neurogenesis in the hippocampal DG of rat offspring.

[Methods] Dams were exposed to IMI (83, 250, and 750 ppm in diet) from gestation day (GD) 6 until day 21 post-delivery (PND) on weaning, and offspring were maintained without IMI exposure until adulthood on PND 77. Exposed offspring were subjected to open field, Y-Maze, and contextual fear conditioning tests.

[Results] On weaning, 750 ppm IMI decreased the numbers of DCX⁺ cells, TUBB3⁺ cells and PCNA⁺ proliferating cells in the subgranular zone (SGZ) and granule cell layer (GCL), c-FOS⁺ or p-ERK1/2⁺ granule cells, and RELN⁺ interneurons in the DG hilus, suggesting suppressed proliferation of late-stage neural progenitor cells (NPCs) and postmitotic immature granule cells and decreased synaptic plasticity of newborn granule cells through suppressing reelin signaling. In adulthood, IMI decreased the number of GFAP⁺ type-1 neural stem cells (NSCs) and NeuN⁺ postmitotic granule cells in the SGZ/GCL from 250 ppm, accompanied by downregulation of *Pcna* and *Bcl2l1* in the DG and increased number of TUNEL⁺ cells in the SGZ at 750 ppm, suggesting a progressive disruption of neurogenesis. Moreover, 750 ppm IMI revealed a sustained decrease in acetylcholinesterase activity level in the hippocampus and *Chrn2* downregulation in the DG. The results suggest that developmental IMI exposure persistently affected hippocampal nicotinic receptor signaling. With regard to neuroinflammation and oxidative stress-related parameters, 750-ppm IMI increased the numbers of GFAP⁺ astrocytes, CD68⁺ M1-type microglia, and Iba1⁺ microglia in the DG hilus and upregulated oxidative stress-related and inflammation-related genes on weaning. In adulthood, 750 ppm IMI increased hippocampal malondialdehyde (MDA) level and the number of CD68⁺ M1-type microglia, accompanied by downregulation of oxidative stress-related *Nrf2*, *Hmox1*, and *Gpx1* and inflammation-related *Il6* and *Tgfb1*, suggesting a shift from induction of both neuroinflammation and oxidative stress on weaning to a state of increased sensitivity to oxidative stress in adulthood. Behavioral tests revealed that 750 ppm IMI caused hyperactivity in open field test but unaltered values in Y-maze and fear conditioning tests in adulthood.

[Discussion] Developmental IMI exposure decreased late-stage NPCs and immature granule cells by suppressing NPC proliferation and reduced synaptic plasticity of newborn granule cells at weaning. Induction of neuroinflammation and disruption of cholinergic signaling and reelin signaling might be responsible for disrupted neurogenesis and synaptic plasticity. In adulthood, developmental IMI exposure decreased the number of NSCs due to their suppressed proliferation and increased apoptosis and also decreased the number of mature granule cells due to suppressed differentiation of NPCs into postmitotic granule cells as effects of increased sensitivity to oxidative stress, causing abnormal behaviors.

○光山 菜々美¹, 中村 良太¹, 柴田 侑裕¹, 頭金 正博¹

¹名古屋市立大学院 薬学研究科 医薬品安全性評価学分野

【背景・目的】重篤な特異体質性副作用であるスティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)及び中毒性表皮壊死融解症(TEN)の発症について、ヒト白血球抗原(HLA)の特定のタイプとの関連が数種の医薬品で報告されているが、発症機序は不明な点が多い。アロプリノール(ALP)及びその活性代謝物であるオキシプリノール(OXP)による皮膚障害には、HLA-B*58:01 との関連が報告されている*¹。また、ALP による重篤な皮膚障害の発症時に、ヒトヘルペスウイルス 6 型(HHV-6)の再活性化が起こることが報告されている*²。我々はこれまでに *in vitro* での細胞傷害活性評価系を用いることにより、HHV-6B U54 由来の抗原ペプチド全長を抗原提示細胞に導入した際、ALP/OXP 添加時に HLA-B*58:01 に結合し細胞傷害性 T 細胞(CTL)を活性化させる可能性を見出した。さらに、HHV-6B U54 由来の抗原ペプチドの全長 1380 bp を 3 分割(1-480 bp, 451-930 bp, 901-1380 bp)して導入した際、451-930 bp の領域に ALP/OXP 添加時に HLA-B*58:01 に結合し細胞傷害性 T 細胞(CTL)を活性化させるペプチドが存在する可能性を見出した。そこで、本研究では、451-930 bp の領域をさらに 3 分割(451-630 bp, 601-780 bp, 751-930 bp)し、目的のペプチドが存在する領域の絞り込みを行うことを目的とした。

【方法】ヒト胎児腎細胞(HEK293 細胞)に HLA-B*58:01 と補助刺激分子 CD80 及び β 2-mg を共発現させた安定発現細胞株を作製し、HHV-6B U54 抗原由来のタンパク質発現プラスミドをエレクトロポレーション法により細胞内に導入し一過性発現させることで抗原提示細胞を作製した。この細胞とヒト末梢血単核球細胞(PBMC)を OXP の存在下で共培養し、サイトカインによる刺激を加えることで PBMC から CTL の誘導を行った。CTL の誘導は CD3⁺CD8⁺の細胞をフローサイトメトリーで測定することで確認した。CTL の誘導後、培地中のサイトカイン量(IFN- γ , Granzyme B)をフローサイトメトリーで定量解析し、T 細胞中の CTL が放出したサイトカイン量を算出することで、OXP 添加または HHV-6B U54 抗原由来のタンパク質を細胞内に導入し発現させた影響による CTL の活性化を評価した。また HLA-B*58:01 の特異性を検証するために HLA-B*44:03 発現細胞を対照群として同様の操作を行った。

【結果・考察】HLA-B*58:01 発現細胞に HHV-6B U54 をコードする遺伝子の 451-630 bp、601-780 bp、751-930 bp 領域のいずれかを導入し OXP と反応させたところ、601-780 bp 部分を導入した細胞でのみ OXP 非存在下と比較して OXP 存在下では IFN- γ の分泌量が 1.3 倍に有意に増加し、Granzyme B の分泌量が 1.4 倍に有意に増加した。これは HHV-6 U54 をコードする遺伝子を全長導入した細胞と同等の反応であった。一方、HLA-B*58:01 発現細胞に 451-630 bp 領域もしくは 751-930 bp 領域をコードする遺伝子を導入した場合、サイトカインの分泌量に変化は見られなかった。また、HLA-B*44:03 発現細胞ではいずれの条件においてもサイトカインの分泌量に変化は見られなかった。この結果から OXP 存在下で HLA-B*58:01 と結合し、CTL を活性化させることで重篤な皮膚障害をもたらすペプチドが HHV-6U54 タンパク質の 601-780bp 中に存在する可能性が示唆された。

【参考文献】

*¹Shuen-lu Hung *et al.* HLA-B*5801 allele as a genetic marker for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:4134-4139(2005)

*²MASAKI, T. *et al.* Human Herpes Virus 6 Encephalitis in Allopurinol-induced Hypersensitivity Syndrome. *Acta Derm-venereol* 83, 128-131 (2003)

○川崎 秀吉¹, 佐々木 大祐¹, 松村 匠悟¹, 上総 勝之¹

¹アステラス製薬株式会社 開発研究部門 非臨床バイオメディカルサイエンス

アデノ随伴ウイルス (AAV; Adeno-Associated Virus) は医学生物学領域において遺伝子治療への応用が進められているウイルスの1つであるが、投与によって生体内に補体活性化を惹起する可能性が知られている。免疫機能において重要な役割を担う補体は、その活性化により炎症惹起だけでなく、赤血球、血小板、血管内皮細胞等の細胞にも損傷を与えることが知られているため、補体活性化は重篤な副作用に繋がる可能性がある。実際の臨床試験においても、補体活性化の関与が疑われる有害事象が報告されている。一方、補体活性化に主に関与する経路には種差があることが示唆されている。

そのため、補体活性化メカニズムには種差があることを念頭に置きながら、ヒトにおけるリスクを評価する系を拡充しておくことが臨床における重篤な副作用回避において重要であり、AAV を使用した遺伝子治療製品の最適化および臨床でのアセスメントの一助となると考えられる。

そこで、AAV を使用した遺伝子治療製品の安全性評価系の一環として、*in vitro* の補体活性化評価系の構築、AAV による補体活性化メカニズムの解明、更にはその種差の有無について検討を進めた。本検討では AAV セロタイプとして AAV9 を使用した。ヒト血清に所定量の AAV9 を添加し、一定時間反応後に補体活性化の指標として補体 C3a を測定した。種差検討にはカニクイザル血清を使用し、AAV9 により惹起される補体活性化の程度を比較した他、補体活性化に関連する因子として血清中の抗 AAV9 抗体を測定し、補体活性化との相関を確認した。

本発表ではそれらの結果と、本検討において明らかとなった課題について報告する。

○石橋 勇人¹, 永福 菜美¹, 鈴木 郁郎¹¹東北工業大学 工学部 電気電子工学科**【背景・目的】**

神経毒性における化学物質の *in vivo* 評価には、かなりの時間と費用が必要であること、げっ歯類からヒトへの外挿が必要であること、毒性メカニズムに関する情報が限られていることから、一定の制限がある。このような現状から、神経毒性における化学物質の *in vivo* 評価には限界があり、従来の *in vivo* 試験より効率的かつ予測性の高い New Approach Methodologies (NAM) を利用した *in vitro* 試験法を開発する戦略が期待されている。神経毒性評価の *in vitro* 試験法の開発は、神経系の複雑な性質と多様な機能のため困難であり、現状では *in vivo* における神経毒性評価を代替する *in vitro* 試験法は確立されていない。最近では、OECD で化学物質試験の TG として発達神経毒性の *in vitro* 試験に関するガイダンスが議論されており、複数の *in vitro* 試験を組み合わせる *in vitro* testing battery の考え方が導入されている。本研究では、化学物質の神経毒性評価における動物実験を代替する *in vitro* 試験法の 1 つとして、平面微小電極アレイ (MEA) システムによるヒト iPS ニューロンを用いた神経毒性評価法の構築を目的とした。

【方法】

MEA システムは、電極上に神経細胞を培養することで神経の電気的な活動を計測することができ、化学物質暴露による神経ネットワークの活動変化を評価できる。ただし、化学物質の評価基準に関する議論は未だ不十分である。この研究では、MEA システムを用いてヒト iPS 細胞由来ニューロンの活動を計測することで、神経活動に対する痙攣化合物および殺虫剤の影響を評価した。MEA 計測で得られた電気生理学的パラメータについて主成分分析を行い、化学物質暴露による過剰な神経活動への影響を、溶媒添加時の神経活動の標準偏差を用いて定義した。MEA 計測における神経毒性の陽性対照として既知の痙攣化合物を使用し、ヒトでの神経毒性の検証が不十分な殺虫剤を評価することにより、これらの殺虫剤のヒトへの神経毒性を検証した。

【結果・考察】

既知の痙攣化合物を MEA における神経毒性の陽性対照として、ヒトへの神経毒性の検証が不十分である殺虫剤関連物質のヒトへの神経毒性を検証することで、殺虫剤関連物質でヒトへの神経毒性が認められることを示した。さらに MEA 計測における、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤、GABAA 受容体阻害剤、Na チャネル opener として作用する殺虫剤の特徴的な応答を明らかにすることで、化学物質の作用機序推定が可能であることを示した。

【まとめ】

本研究で実施した MEA システムによるヒト iPS ニューロンにおける神経毒性評価法はヒト神経に対する化学物質の毒性を評価する方法として有効であり、動物実験を代替する化学物質の *in vitro* 神経毒性試験法の 1 つとして期待される。

○浅野 雄哉¹, 小黒 裕嗣², 安田 秋太², 岩井 祥人², 濱中 さえこ¹, 長瀬 孝彦¹, 古屋 優里子², 山本 恵司²

¹株式会社日本バイオリサーチセンター

²オリエンタル酵母工業株式会社 長浜生物科学研究所

【背景・目的】近年の処方データやビックデータ解析により聴覚に副作用を示す薬物が報告されつつある¹⁾。聴覚毒性の検出には *in vivo* での機能観察総合評価法や聴性脳幹反応測定が用いられてきた。聴覚毒性を示す薬物は多岐にわたるため、よりスループット性が高く、作用機序も検討が可能な *in vitro* の評価系が求められている。我々は、マウス内耳由来不死化細胞株 (HEI-OC1 細胞) のオリジナル細胞株を入手した。HEI-OC1 細胞の特徴には様々な報告がなされており、発現しているマーカーも報告により異なる^{2) 3)}。まずはオリジナル細胞株の特徴を調べるため、既報の培養条件での増殖性と遺伝子発現を調べた。さらに、聴覚毒性を示す代表的な薬物であるシスプラチンを用いて聴覚毒性アッセイ系の構築を検討した。

【方法】① HEI-OC1 細胞を 33°C/10% CO₂ 条件 (Permissive 条件) で培養した際の増殖性を細胞数計数で確認した。② Permissive 条件で培養した HEI-OC1 細胞における内耳関連遺伝子 (有毛細胞マーカー、支持細胞マーカーおよびラセン神経節細胞マーカー) の発現を qPCR で確認した。③ シスプラチンを Permissive 条件で培養している HEI-OC1 細胞に 24 時間曝露し、総細胞数、細胞生存能、細胞死およびカスパーゼ 3/7 活性に及ぼす影響をそれぞれ Hoechst アッセイ、WST-8 アッセイ、CellTox™ Green Cytotoxicity Assay および Caspase-Glo® 3/7 Assay System で検討した。

【結果】① HEI-OC1 細胞の総細胞数は、Permissive 条件において経時的に増加した。② HEI-OC1 細胞は、*Myosin6* (有毛細胞マーカー)、*Gjb2* (支持細胞マーカー)、*Ntrk3* (ラセン神経節細胞マーカー) の発現を確認した。③ シスプラチンは、HEI-OC1 細胞において 1 から 30 μmol/L の薬剤濃度で濃度依存的な総細胞数および細胞生存能の低下を示し、また、10 および 30 μmol/L で濃度依存的な細胞死およびアポトーシス活性の増加を示した。

【考察】本細胞は、既報の Permissive 条件で株化細胞のように増殖する細胞であることを確認した。また、有毛細胞マーカー、支持細胞マーカーおよびラセン神経節細胞マーカーが発現していることから、内耳における複数の細胞の特徴をもつことが示唆された。さらに、シスプラチン 30 μmol/L の曝露によりアポトーシスが誘導され、細胞死を示すことを確認した。なお、シスプラチンのヒトにおける治療用量域での C_{max} は 10 から 20 μmol/L であり、本試験で毒性がみられた濃度範囲と同等であったことから、本試験系は薬剤性難聴のスクリーニングに有用であることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Tanaka M, Hasegawa S, Nakao S, Shimada K, Mukai R, Matsumoto K, Nakamura M. Analysis of drug-induced hearing loss by using a spontaneous reporting system database. *PLoS One*. 2019 Oct 8;14(10):e0217951. doi: 10.1371/journal.pone.0217951. eCollection 2019.
- 2) Gilda M. Kalinec, Paul Webster, David J.Lim, Federico Kalinec. A cochlear cell line as an *in vitro* system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurootol*. 2003 Jul-Aug;8(4):177-89. doi: 10.1159/000071059.
- 3) Rianne Beach, Julia M. Abitbol, Brian L. Allman, Jessica L. Esseitine, Qing Shao, Dale W. Laird. GJB2b mutations linked to hearing loss exhibit differential trafficking and functional defects as revealed in cochlear-relevant cells. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 215. Published online 2020 Apr 2. doi: 10.3389/fcell.2020.00215

○小黒 裕嗣¹, 浅野 雄哉², 安田 秋太¹, 岩井 祥人¹, 濱中 さえこ², 長瀬 孝彦², 古屋 優里子¹, 山本 恵司¹

¹オリエンタル酵母工業株式会社 長浜生物科学研究所

²株式会社日本バイオリサーチセンター

【背景・目的】 抗がん剤であるシスプラチンは、薬剤性難聴を引き起こす薬剤（聴覚毒性薬）として内耳分野の研究に広く用いられてきた。これまで、シスプラチンの内耳における毒性機序としてアポトーシスの誘導による細胞死が知られていたが、その他の毒性機序に関する報告は乏しい。そこで我々は、細胞の恒常性維持に関わるオートファジー・リソソーム経路および内耳機能関連タンパク質であるコネキシン 26 に着目し、内耳由来不死化細胞株 (HEI-OC1 細胞) を用いて、シスプラチンが聴覚毒性を引き起こす機序を検討した。

【方法】 33°C/10% CO₂ 条件 (Permissive 条件) で培養している HEI-OC1 細胞にシスプラチンを 24 時間曝露し、① 細胞死およびカスパーゼ 3/7 活性に及ぼす影響を CellTox™ Green Cytotoxicity Assay および Caspase-Glo® 3/7 Assay System で、② オートファジー・リソソーム経路に及ぼす影響を LC3B-II のウエスタンブロットおよび DQ™ Green BSA Assay で、③ *Gjb2* (コネキシン 26 をコードする遺伝子) の発現量に及ぼす影響を qPCR で、それぞれ検討した。なお、シスプラチンの適用濃度は、ヒトにおける治療用量域での C_{max} (10 - 20 μmol/L) を含む濃度範囲とした。

【結果】 シスプラチンは、HEI-OC1 細胞において ① 10 および 30 μmol/L で濃度依存的な細胞死およびアポトーシス活性の増加を示した。② 10 および 30 μmol/L で濃度依存的な LC3B-II 蓄積量の増加およびリソソーム活性の低下を示した。③ 1 - 30 μmol/L で濃度依存的な *Gjb2* 発現量の減少を惹起した。

【考察】 本研究によりシスプラチンは内耳細胞においてリソソーム障害に起因するオートファジー障害や内耳機能に重要な役割を果たしているコネキシン 26 の発現量低下を介して聴覚毒性を引き起こしている可能性が示唆された。

野口 誉之¹, 加納 ふみ², ○米谷 信彦³, 岩本 智沙子³, 山崎 聖子⁴, 大坪 洋介⁴, 中津 大貴², 國重 莉奈^{1,2}, 村田 昌之^{1,2,*}

¹ 東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

² 東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター

³ 株式会社ニコン ヘルスケア事業部

⁴ 株式会社ニコン 先進技術開発本部

【背景・目的】

新薬のターゲット探索や作用機序解明には、薬剤添加によるシグナル伝達系の変化を正確にとらえることが不可欠である。シグナル伝達系は、細胞膜脂質ラフトや核などの特定の場所を介して制御されており、加えて近年では、液-液相分離により形成されるタンパク質の集合体（ドロプレット）が、シグナルの増減や分岐に関与しているという報告もある。しかし、一般的な生化学分析ではタンパク質局在を解析することが困難であり、これが薬剤の作用機序や毒性機序の解明が難しいという創薬課題の一因になっている。

これに対して、顕微鏡画像からは、タンパク質局在の時空間的な挙動を詳細に定量化することが可能である。この顕微鏡の特性を利用して、薬剤添加により活性化／不活性化するシグナル伝達系を、顕微鏡画像のみに基づいて推定する技術「PLOM-CON 解析法」を開発した。

【方法】

顕微鏡画像から細胞内区画（細胞質、核、オルガネラ、足場タンパク質など）を検出し、細胞内区画ごとに数十種類のタンパク質の蛍光強度およびタンパク質集合体の形態を、薬剤による細胞刺激後から経時的に測定する。タンパク質は、疾患メカニズム、薬剤の作用機序及び毒性機序に関連することが予測されるシグナル伝達系から選択する。

次に細胞内区画が介在するタンパク質同士の相関性を分析し、その結果をネットワーク図（共変動ネットワークと呼称する）として表現する。共変動ネットワーク上ではタンパク質同士が細胞内のどの場所を介して相関しているのかが可視化されている。このネットワークを見ることで、以下の予測が可能になる。

- ・ 活性化／不活性化されているシグナル伝達系
- ・ 薬剤のターゲットとなるタンパク質
- ・ 特定の細胞内区画に局在するタンパク質群により制御されるシグナル伝達系

【結果・考察】

PLOM-CON 解析法をインスリン応答研究に適用した。ラット肝がん由来の培養細胞 H4IIEC3 では、インスリン刺激により一過性に Actin 集合体が形成され、そこに様々なシグナル分子が集まることが知られていた。しかし Actin 集合体を生化学的に精製することは困難であり、その細胞内機能は未解明であった。一方、顕微鏡画像からは Actin 集合体を正確に定量化することが可能であるため、顕微鏡画像を基に PLOM-CON 解析を実施した。

その結果、グリコーゲン合成の経路が Actin 集合体で生起していることが確認された。

Actin 集合体は、液-液相分離で一過性に形成される高次タンパク質複合体であることが示唆されている。このように、本解析法を使用することで、高次タンパク質複合体やドロプレットに局在するタンパク質により制御されるシグナル伝達系を捉えることが可能である。本解析法は薬剤の作用機序、毒性機序や疾患メカニズムの解明等にも応用可能なため、創薬、医療、生命科学の分野で研究効率の向上に貢献することが期待できる。

【参考文献】 Noguchi et al., *iScience* 24,102724, 2021

○Naoki Matsuda¹, Nami Nagafuku¹, Han Xiaobo¹, Yuto Ishibashi¹, Ikuro Suzuki¹

¹Department of Electronics, Graduate School of Engineering, Tohoku Institute of Technology

【Introduction】

The technology for measuring the electrical activity of the nervous system is essential for understanding higher functions and neurological diseases, drug discovery development, and toxicity evaluation of compounds. In the recent years, microelectrode array (MEA) technology has been largely developed for electrical measurement of neural activities. Especially MEAs with large amounts of electrodes at a high density provides a high spatio-temporal resolution at the single-cell level, and noninvasive measurements of large areas which increase insights on underlying neuronal function.

【Methods】

In the present study, we used a complementary metal-oxide semiconductor (CMOS)-microelectrode array (MEA) that uses 236,880 electrodes each with an electrode size of $11.22 \times 11.22 \mu\text{m}$ and 236,880 covering a wide area of $5.5 \times 5.7 \text{ mm}$ in presenting a detailed and single-cell-level neural activity analysis platform. This live field potential imaging method was applied for measurements of brain slices, human iPSC cell-derived cortical networks, peripheral neurons, and human brain organoids.

【Results and Discussion】

In brain slices, we observed detailed propagation paths and frequency characteristics of propagation waveforms in the hippocampus, entorhinal cortex, and perirhinal cortex. In human iPSC-derived cortical neurons, we identified differences in the effects of PTX and 4-AP on synaptic connection strength through rigorous single-cell spike detection and time-series pattern analysis. In DRG neurons, the effects of Vincristine on peripheral nerves were assessed using axonal conduction distance and conduction velocity as indicators. In the brain organoid, by measuring the electrical activity of each neuron, we succeeded in capturing the propagation pattern inside the organoid and observed an increase in the frequency of activity caused by 4-AP. These results provide new understanding of the basic mechanisms of brain circuits in vitro and ex vivo on human neurological diseases, and show the possibility of the current field potential imaging technology utilization for drug discovery, and compound toxicity assessment.

Advancement of AI Drug Review Process and Required Manufacturer and CRO Responses

○Takayuki Anzai^{1,2}, Reto Aerni², Kenshi Nakagawa¹, Hijiri Iwata³, Dai NAKAE^{4,5}

¹ Showa University School of Medicine 昭和大学医学部

² Instem

³ LunaPath Laboratory of Toxicologic Pathology ルナパス毒性病理研究所

⁴ Global SEND Alliance (G-SEND)

⁵ Teikyo Heisei University 帝京平成大学

【背景】

FDA 近代化法案が通過した。新薬開発における実験動物使用の義務付けを撤廃するこの法案の実効性は今のところ乏しいが、今後の米国をはじめとする諸外国における医薬品申請の形を変えてゆく大きな流れを象徴する出来事である。一方、製薬企業においては患者への安全性を最優先に考える製品安全の観点から、全面的に動物試験をなくす大きな動きはない。しかしながら動物試験を取り巻く社会環境は厳しくなりつつあり、使用動物数の削減、試験数の削減などは当然の動きとして出てくるであろう。これら一連の動きはいずれ新薬承認申請の形を変えてゆくことになり、医薬品の作用機序解明のための動物試験も例外ではない。この発表においては、動物試験の数が減る、あるいは試験に用いられる動物数の減少することを前提とし、医薬品の作用機序解明のためのオープンサイエンス、更に削減される情報の代替として、バイオインフォーマティクス、新しい技術などを取り上げ、未来の新薬承認申請の予想される姿を示す。

【方法】

以下の項目について調査及び FDA をはじめとする当事者へ直接調査した。

1. 動物試験を取り巻く環境
 - 1) 法規制と国際協調
 - 2) 経済性の悪化
 - 3) 経済安全保障
2. インフォーマティクスあるいは TSA の発展
3. オープンサイエンスとコンソーシアムの動き
4. 高度化する動物試験

【結果・考察】

FDA が導入計画している AI 審査に対応するための方法を検討した。



○Shihori Tanabe ¹

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

The interconnected function of reactive oxygen species (ROS) in the adverse outcome pathway (AOP) framework is being discussed in an international consortium, the Mystery of ROS (MoR). At the MoR I and II conferences in 2021, the consortium created harmonized key events (KEs) on ROS (Tanabe et al., 2022a, b). Continuing discussions are focused on refining the description of ROS-related KEs in the AOP framework, terminologies, the mechanistic understanding of ROS production by endogenous and exogenous stimuli, and the stress responses associated with ROS. MoR (III and IV) were held on May 10, 2022, and May 11, 2023, respectively. An AOP begins with a molecular initiating event (MIE), leading through sequenced key events (KEs), which are linked with key event relationships (KERs), to an adverse outcome (AO). The AOPs containing ROS-context have been developed in the AOP Knowledge-Base as part of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) projects¹ and the AOP-Wiki², where harmonization of the KE nodes to create grouped and representative KEs is in great demand. AOP379 “Binding to ACE2 leading to thrombosis and disseminated intravascular coagulation” has been developed in an international consortium for creating AOPs related to COVID-19. AOP379 includes KE1869 “Diminished protective oxidative stress response” as an intermediate KE to link MIE “Binding to ACE2” and AO “Thrombosis and disseminated intravascular coagulation.”

[Reference]

Tanabe, S., Beaton, D., Chauhan, V. et al. (2022a). Report of the 1st and 2nd mystery of reactive oxygen species conferences. *ALTEX* 39, 336-338. [doi:10.14573/altex.2203011](https://doi.org/10.14573/altex.2203011)

Tanabe, S., O’Brien, J., Tollefsen, K. E. et al., (2022b). 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)

¹ <https://aopkb.oecd.org/>

² <https://aopwiki.org/>