

要旨

特別講演
教育講演

特別講演

「既知から未知を発見する AI」の毒性機序解明への応用

○豊柴 博義¹

¹株式会社 FRONTEO 取締役/CTO

成功確率の低下や研究開発コストの増加により、新薬の開発は困難になってきている。解決手段の一つとして人工知能 (AI) の活用が注目され、化合物の設計や最適化などでは活用が進んでおり、既に AI がデザインした薬が臨床試験に進んでいるケースも存在する。しかし、創薬研究の競争優位を生む開発初期の標的検討・評価や毒性分野などにおいては未だ活用が進んでいない。

創薬の開発初期段階において文献情報は非常に重要なソースであり、文献情報探索の核となる自然言語処理 (人が日常的に使う言語をコンピュータで処理する技術) は、最も重要な技術の一つと考えられる。ところが多くの研究者は、過去の研究結果を調査することをベースにした文献検索では、未報告で新規性の高い情報の発見は非常に困難であると考えている。

創薬に関連する文献情報の探索は、古くから行われているが、その手法のほとんどが、事象を連続的に繋げて導く、連続的な発見に頼ったものである。具体的には、「A は B と関連している」、「B は C と関連している」という 2 つの事象が文献に記載されていた場合に、A と C が関連しているのではないかと考える方法である。この例は、2 ステップの例で誰もが想起できるものであるが、ステップ数が多くなると、一般には想起するのは難しくなる。現在の多くの自然言語処理を使った AI は、大規模言語モデルを含めてこの形である。一方で、連続的な事象のつながりでは決して見つけることができない関連性も存在しており、記載されていない関連性を見つけ出すことを、非連続的な発見と呼ぶ (Figure 1)。FRONTEO の自然言語処理をベースにした AI 「KIBIT (キビット)」は、非連続的な発見をもたらすことが出来る。つまり KIBIT は、未報告の関連性であっても、見つけ出すことが可能であり、これまでの自然言語処理では未だ見出されていない隠れた標的分子と疾患や、毒性と遺伝子の関連性などを発見することが可能である。

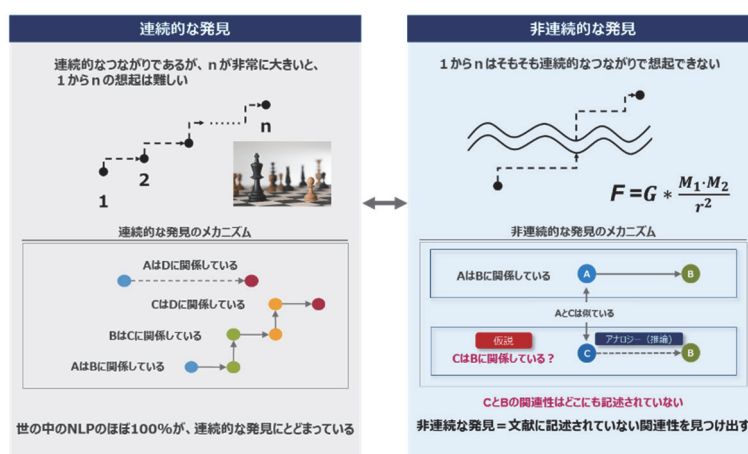


Figure 1. 連続的な発見と非連続的な発見

AI と創薬に精通した当社のバイオロジストが既知の情報から未知の関連性を見つけ出す KIBIT をベースに独自の解析手法を駆使し、仮説生成を中心に創薬における様々な課題を解決する当社のサービスが「Drug Discovery AI Factory」である。本セミナーでは、当社の CTO でアルゴリズム開発者が KIBIT の特性を活かした、他では得られないアウトプットの一端を、毒性の機序解析など安全性に関わる課題における活用事例を交えて紹介する。

教育講演

慢性肝疾患における臓器線維化と発がんの分子機構

○河田 則文¹

¹大阪公立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科学

国立がん研究センターがん情報サービスの統計によると本邦の 2020 年度の肝がん死亡者数は 24,839 人でがん死亡全体の第 5 位である。世界では GLOBOCAN2020 のデータベースに基づく肝がんによる死亡者数は 830,200 人、世界 46 カ国では肝がんはがん死亡の第 3 位以内で、このまま推移すると 2040 年までに 55%以上の増加が見込まれる。特に近年、アルコールに加えて、肥満や 2 型糖尿病など代謝機能障害関連脂肪肝疾患に由来する肝がんが増加傾向で、その発生機序の解明とそれに立脚した治療法・予防法開発は重要である。

病因に関わらず肝がんは、慢性炎症とそれに引き続く線維化が進行した背景肝、特に肝硬変を母地として発生する。長期に亘るウイルス感染や肥満・生活習慣に伴う酸化ストレス、炎症局所で産生される TNF α などのサイトカインや成長因子等に暴露された肝細胞では MEK-ERK パスウェイなどの増殖シグナルが持続的に活性化し、p16^{INK4} 不活化、p53 変異等の遺伝子変異が蓄積して細胞異形・がん化が生じる。更に炎症・線維化に伴う血管新生や cancer-associated fibroblasts (CAF) の関与、免疫応答の破綻の末にがん組織は形成される。

演者らは特に肝星細胞 (HSCs) について詳細に解析してきた。HSCs は肝類洞の Disse 腔、即ち、肝細胞 (HEPs) と類洞内皮細胞 (LSECs) の間隙に存在するビタミン A 貯蔵細胞であり、障害 HEPs、LSECs などの近隣細胞や局所浸潤したマクロファージ (MACs) 等から分泌される活性酸素やサイトカイン、ケモカインなどにより“活性化”を受け、I 型コラーゲン (COL1) を主とする細胞外マトリックス物質や TGF β などの線維化促進因子を分泌し、 α 平滑筋アクチン (α SMA) 陽性の活性化 (ac)HSCs へと形質変化する。一方、HSCs に発現する 21 kDa のサイトグロビン (cytoglobin, CYGB) はミオグロビンなどの他のグロビン同様、酸素 (O₂)、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) などガス分子と結合し、ペルオキシダーゼ活性や nitric oxide dioxygenase (NOD) 活性を持つ。acHSCs では TGF β を介して CYGB 発現低下が生じ、NO 過剰産生と NOD 活性の低下により隣接する HEPs への NO 供給が過剰となる。その結果、HEPs のミトコンドリア機能障害が生じて ROS が産生され、DNA 損傷のトリガーになり得る可能性を見出した。即ち、肝臓で HSCs のみに発現する CYGB の欠損が HSCs の活性化形質を誘導するのみでなく、HEPs の機能不全や酸化的 DNA 損傷に加担してがん化に関与する可能性があり、CYGB 発現の多寡は肝病態に大きく関与すると想定される。

本講演では、肝臓局所の細胞間相互作用の肝発がん機構への関与について演者らの研究成果を基に議論してみたい。

要旨

シンポジウム

○大槻 博礼^{1,2}, 上森 健至¹, 稲井 洋平¹, 鈴木 唯¹, 荒木 徹朗¹, 南谷 賢一郎¹, 吉成 浩一²

¹協和キリン株式会社 安全性研究所

²静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野

Hippo 経路は、細胞や器官の成長、発生及び再生において重要なシグナル伝達経路である。Hippo 経路の下流の転写共役因子である Yes-associated protein (YAP) や transcriptional coactivator PDZ-binding motif (TAZ) は、転写因子 transcriptional enhanced associate domain (TEAD) と複合体を形成し、遺伝子の転写活性化を介して細胞増殖や胚・器官発生に寄与している。一方、YAP/TAZ-TEAD の過剰な活性化は悪性胸膜中皮腫 (MPM) などの発がんへの関与が報告されており、TEAD 阻害薬は MPM 治療薬としての開発が期待される。K-975 は新規 TEAD 阻害薬であり、K-975 は培養細胞及びマウス異種移植モデルの両方で MPM に対する抗腫瘍活性を示す。加えて、マウス異種移植モデルにおいて標準療法と K-975 の併用療法は標準療法単独よりも長い延命効果が報告されているため、K-975 は単独療法のみならず、標準療法との併用療法としても期待される。一方で、K-975 の毒性プロファイルは不明であり、TEAD 阻害による毒性懸念も複数報告されている。Yap、Taz 又は Tead の遺伝子改変マウスでは胎生致死や腎臓、肝臓、心臓及び肺等、複数の主要臓器における影響が報告されている。これらの報告は、TEAD 阻害薬を抗がん剤として開発する上で、TEAD 阻害による多臓器に対する影響が毒性懸念となりうることを示唆している。しかし、YAP/TAZ 及び TEAD 阻害によって生体でどのような毒性が生じるのかは現時点で不明である。以上を踏まえて本研究では、K-975 を含む TEAD 阻害薬を抗がん剤として開発するために、K-975 の腎毒性を含む毒性プロファイル及び毒性バイオマーカー探索をラットで評価した。

K-975 を 0.5%メチルセルロース 400 (0.5% MC) に懸濁し、雄性 Crl:CD(SD)ラット (各群 8 又は 10 例) に、1 週間、1 日 1 回、0 (0.5% MC 単独)、30、100 又は 300 mg/kg の用量で K-975 を反復経口投与した。一般状態観察、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、病理学的検査、toxicokinetic 解析及び遺伝子発現解析により K-975 の毒性プロファイルを評価した。また、一部の動物は最終投与後 2 週間の休薬期間を設け、K-975 による変化の回復性も確認した。更に、1 週間の投与及び 2 週間の休薬のサイクルを 3 サイクル繰り返した試験も実施した。

K-975 の 1 週間経口投与により、腎糸球体ポドサイトの足突起消失を伴う蛋白尿がみられたが、2 週間の回復期間を経て完全に回復した。尿検査により、尿中アルブミン指数 (尿中アルブミン/尿中クレアチニン) が K-975 による腎毒性の最も感度の高いマーカーであることが示唆された。次いで、1 週間投与及び 2 週間回復を 3 サイクル繰り返した長期の評価においても、概ね腎毒性は可逆的であったが、毒性に個体差が認められ、重度の蛋白尿を伴うラットでは不完全な回復性が観察された。以上のことから、K-975 の経口投与により、ラットでは糸球体ポドサイト足突起消失を伴う重篤な蛋白尿を引き起こすが、これは可逆的であり、尿中アルブミン指数によりモニター可能であることが明らかになった。本発表では TEAD 阻害による可逆的な腎毒性について、その機序を考察し、Hippo 経路を標的とした抗がん薬開発について議論したい。

【参考文献】 Otsuki, H. et al. Reversible and monitorable nephrotoxicity in rats by the novel potent transcriptional enhanced associate domain (TEAD) inhibitor, K-975. J Toxicol Sci. 49(4):175-191 (2024).

○依田 智美¹, 栃谷 智秋¹, 河内 眞美¹, 臼井 亨¹, 保坂 卓臣², 宮脇 出¹, 吉成 浩一²

¹住友ファーマ株式会社 前臨床研究ユニット

²静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】

肝毒性は医薬品候補化合物の非臨床安全性試験で頻発する毒性の一つであり、ヒト外挿性の評価にはその発現機序の理解が重要である。本研究は、ラットの反復経口投与毒性試験において小葉中心性の肝細胞肥大や脂肪滴蓄積等を伴う肝毒性が認められた自社化合物 (DSP-0640) について、その発現機序の解明を試みた。

【方法・結果・考察】

DSP-0640 を 4 週間反復経口投与したラットの肝臓を用いて遺伝子発現を解析したところ、*Cyp1a1* を含む芳香族炭化水素受容体 (AHR) 応答遺伝子の発現上昇が認められた。一方、レポーターアッセイではラット及びヒト AHR 活性化作用は限定的であった。そこで、CYP1 阻害作用が内因性 AHR アゴニストの代謝消失を抑制することで、AHR 活性化作用を増強させるとの報告 (Wincent et al., 2009) を基に (図 1)、DSP-0640 が同様の機序で AHR を活性化させる可能性を検証した。その結果、DSP-0640 は *in vitro* においてラット及びヒト CYP1A1 に対する阻害作用を示し、さらにレポーターアッセイにおいて低濃度の内因性 AHR アゴニストによるラット及びヒト AHR 活性化作用を増強させた。以上より、DSP-0640 による肝毒性誘発には CYP1A1 阻害を介した AHR 活性増強が関与していることが示唆された。

次に CYP1A1 阻害を介した AHR 活性増強の肝障害への関与についてさらに検証するため、臨床において高頻度で肝障害を発症する薬物である *albendazole* 及び *tacrine* について、本機序の関与を検討した。その結果、*albendazole* はラット及びヒトの両種において CYP1A1 阻害及び AHR 活性増強作用を示した。また、*tacrine* はラットと比較しヒトで肝障害が顕著に発現する化合物であるが、CYP1A1 阻害及び AHR 活性増強作用はラットよりもヒトで強く認められた。これらの結果から、両薬物によるヒトでの肝障害に CYP1A1 阻害を介した AHR の活性増強が関与していることが示唆され、この機序が DSP-0640 以外の薬剤による肝障害においても生じている可能性が示された。

以上より、本機序は CYP1A1 阻害作用を有する医薬品による肝障害発現の一因になり得ると考えられ、本知見は医薬品候補化合物の肝毒性の発現機序の理解やヒト外挿性の考察に有用と考えられた。

【参考文献】

Wincent, E., Amini, N., Luecke, S., Glatt, H., Bergman, J., Crescenzi, C., Rannug, A. & Rannug, U. *J Biol Chem* 284, 2690-2696 (2009).

Yoda, T., Tochtani, T., Usui, T., Kouchi, M., Inada, H., Hosaka, T., Kanno, Y., Miyawaki, I. & Yoshinari, K. *J Toxicol Sci* 47, 359-373 (2022).

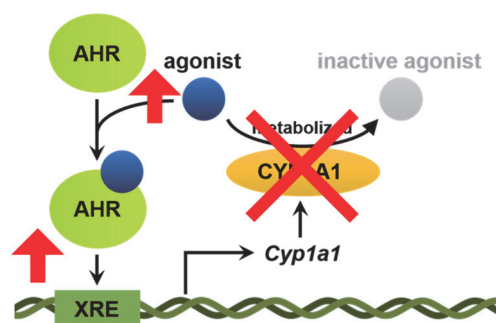


図 1 : CYP1 阻害による AHR 活性増強

○高野 美里¹, 中島 康太¹, 石田 知己², 太田 恵津子¹, 森山 智之¹, 朝倉 省二¹

¹エーザイ株式会社 グローバル安全性研究部

²エーザイ株式会社 グローバル薬物動態研究部

手足症候群（HFS）は抗がん剤治療時にみられる、手掌や足底などの四肢末端に発現する皮膚関連有害事象の総称である。原因薬剤として殺細胞性抗がん剤であるフッ化ピリミジン系抗がん剤、ドキシル[®]、ドセタキセルなどがあり、これらは高頻度でHFSを引き起こす。HFSの副作用報告は1980年代からあるにもかかわらず、その正確な発症メカニズムには不明点が多い。現在の臨床現場では効果的な予防及び対症療法は確立されておらず、一般的な予防方法は、刺激からの保護と保湿とされている。悪化した場合には抗がん剤治療が中断されることもあり、抗がん剤治療完遂のためにも効果的な予防法や治療法確立が待ち望まれている。この中でも我々は、フッ化ピリミジン系抗がん剤の1つであるテガフルによるHFSについて検討を進めてきた。

フッ化ピリミジン系化合物は抗がん剤として広く使用される薬剤であり、HFSの副作用報告頻度の高い薬剤である。そのHFS発症には抗がん剤投与開始から数週間から数カ月を要する。症状の初期から感覚異常や疼痛を訴える報告が多く、その後色素沈着や顕著な落屑、ひび割れが起き、疼痛の重症度が増し、ものを掴みづらい・歩行が困難になるなど、生活へ支障をきたし、患者様のQOLを著しく低下させる。患部の病理組織学的評価では主に表皮層で影響がみられ、基底細胞の変性や角化異常などが報告されているが、正確な発症メカニズムは現在も不明である。動物モデルも限られていることから、まずはフッ化ピリミジン系抗がん剤の1つであるテガフルを用いて動物モデルを確立し、その特徴を精査するとともに発症メカニズムについて検討を進めている。

動物モデルは、我々が確立した170 mg/kgのテガフルを雄性SDラットに5週間反復経口投与することで四肢にヒトに類似のHFS様皮膚症状を発症させたものを用いた。一般状態観察及び病理組織学的評価、並びに、モデルの特性解析として、圧痛刺激に対する疼痛閾値評価及び活動量測定を行い、その発症過程や特徴のヒトHFSとの類似性を検討した。その結果、投与後約3週間頃から肢底に皮膚症状が観察され、徐々に顕著な落屑や皮膚の硬化、ひび割れが起き、投与期間終了時の病理組織学的検査では顕著な落屑や表皮層の肥厚、角化異常などがみられた。また、肢底皮膚に明らかな変化がみられる前から圧刺激への感受性が高くなり、症状の悪化に伴って活動量は低下した。これらの、一般状態観察時の皮膚症状の進行過程、病理組織学的特徴、圧刺激への感受性、及び活動量の観点から、フッ化ピリミジン系抗がん剤によるHFSの臨床症状と類似性の高い動物モデルであることが確認できた。

さらに我々はHFSの治療・予防法の一助とするために、本HFSモデルを用いた発症メカニズムを解析した。まず、肢底皮膚での薬剤貯留の関与の可能性について、検討を行った。その結果、活性本体である5-FUが腹部皮膚（比較対照部位）と比べて、肢底皮膚で高濃度に検出され、肢底皮膚の基底層ではアポトーシスの頻度も増加した。

本シンポジウムにおいては、テガフルを用いたHFSモデル動物確立及びそれに続く発症メカニズム検討で得られたデータを紹介するとともに、薬剤を用いた発症抑制・発症遅延についての検討結果も併せて報告する。

参考文献：Takano-Mochizuki, M., Nakajima, K., Ishida, T., Ohta, E., Moriyama, T., Asakura, S. 2024. A novel animal model of tegafur-induced hand-foot syndrome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 487. 116977.

○大谷 尚子¹, 奈良岡 準¹

¹アステラス製薬株式会社 非臨床バイオメディカルサイエンス

医薬品開発において、消化管毒性は非臨床試験及び臨床試験で最もよく認められる毒性、有害事象の一つである。また臨床試験において重篤な消化管症状が発現した場合は、用量制限毒性 (DLT) として用量の調整を余儀なくされる場合がある。消化管毒性のメカニズムを解明することは、このようリスクの回避や、臨床での適切な予防策および対処法の策定に寄与するため、結果として臨床試験の成功率の向上に繋がると考えられる。

消化管毒性の発現メカニズムは複数の要因から成り立っていることが知られている。一方、一般毒性試験で行われる種々の検査からは、消化管の機能的および器質的変化の一部しか評価できていない。より詳細な情報を必要とする場合、消化管毒性の各メカニズムに対応した評価が求められる。しかし従来のアプローチは主に *in vivo* や *ex vivo* 試験が多く、これには高いコストや時間の負担がかかる上、ヒトへの外挿性には種差の課題がある。また、これまで消化管の機能や特性を再現した汎用的な *in vitro* 評価系はほとんどなかったことから、消化管毒性を *in vitro* で評価することは難しい状況だった。しかし近年、スフェロイドやオルガノイドなどの3次元培養や、生体の構造や機能を模倣した生体模倣システム (MPS: microphysiological systems) などの複雑な *in vitro* モデル (CIVM: complex *in vitro* model) の実用化が進んできている。FDA 近代化法 2.0 の成立など規制当局の動きが追い風となり、これらの技術を応用したヒトにおける毒性予測への関心が更に高まっている。消化管毒性評価においてもこれらの新規技術を活用した評価系の可能性が期待されている。

本発表では、薬剤性の消化管毒性の中でも特に下痢に焦点を当て、下痢評価系における弊社の新たな取り組みについて紹介する。下痢の発生メカニズムは主に浸透圧性、分泌性、滲出性、腸管運動異常の4つに分類されるが、通常、複数要因が組み合わさって生じている。全ての要因を網羅して評価できる単一の試験系はないが、複数の試験を組み合わせることでデータを補完することで、メカニズムの考察を深めることができる。弊社では、従来の *in vivo/ex vivo* のアプローチに加えて、ヒト細胞株やヒト iPS 細胞を用いた *organ-on-chip* やオルガノイドなどの CIVM の評価系の検討も開始している。従来の評価系と新規評価系を組み合わせたアプローチにより、従来の評価系では得られなかった新たな視点からのデータ取得が期待され、より詳細なメカニズム解明につながる可能性がある。本発表では、弊社のこのような取り組みを紹介するとともに、この取り組みにおいて複数の CIVM の中からモデルを選択した際のポイント [COU (Context of Use) の明確化、細胞の選択、それぞれの課題] についても取り上げる。

○荻谷 嘉顕^{1,2,3}

¹ 東京大学大学院薬学系研究科 医療薬学教育センター

² 東京大学大学院薬学系研究科 医薬品評価科学教室

³ 東京大学医学部附属病院 薬剤部

【背景】昨今の薬物開発では、分子生物学的に妥当と想定される標的に対して、一定程度の選択性を有する薬物が開発されるため、疾患治療に寄与する薬物作用のメカニズムの多くは明らかになっている。一方で、当該薬物の使用に際して発生する意図しない作用である副作用や毒性の発生メカニズムは、不明な場合が多い。そのため、臨床現場において発生する副作用についても、事前にその発生を予測することが困難であり、薬物使用の中止以外の副作用回避方法は限定的になりがちである。また、薬物開発段階においても、事前に副作用や毒性を予測し、候補物質を選別することは難易度が高い。そこで演者らは、(1) 臨床で副作用が問題となる薬剤の一例として、分子標的薬抗がん剤であるスニチニブに関する副作用メカニズムの解明を試みることにした。また、(2) 新規薬物開発過程における毒性評価に資する情報として、毒性が起こりうるメカニズムを可能な限り包括的に探索・抽出する手法の開発も試みている。さらに、(3) 注目すべきメカニズム(分子生物学的イベント)の振る舞いを、限られた情報から半定量的に評価するための方法論の開発にも取り組んでいる。

【方法】(1) スニチニブの副作用発現に関わるメカニズム解析には、キナーゼ阻害薬というスニチニブの特性を考慮し、キノーム全体に対するスニチニブの親和性を調べ、同効薬との対比から副作用発現に関わりうるキナーゼを探索した。さらに、当該キナーゼを阻害することで生じる事象を、システム生物学モデルのシミュレーションによる定量的評価を行い、毒性との関連が想定される機序を探索した。(2) 毒性発現に関わる分子細胞生物学的メカニズムを抽出するため、薬物による様々な細胞への細胞死誘導に関するデータが豊富に取得できるデータベースを対象に、機械学習により細胞死に関連する細胞内の遺伝子発現パターンを網羅的に抽出する方法を開発している。(3) 注目する分子生物学的イベントが設定され、周辺の分子機構が既知かつ関連分子の速度論的な情報が入手困難な場合に、そのシステム全体が生物学的に安定な挙動をするという制約のもとで生じる挙動を網羅的に探索する手法を開発した。

【結果】(1) スニチニブは、Phosphorylase kinase gamma subunit をオフターゲット阻害することが見出され、その阻害に伴い、酸化ストレスが惹起され、副作用発現に寄与することが見出された。

(2) 細胞死を予測する機械学習モデルの感受性解析により、既知の様々な毒性メカニズムが抽出され、機械学習がメカニズム解析に有用である可能性が示唆された。(3) アラキドン酸経路を対象に常微分方程式ベースの速度論モデルを記述し、そこに生物学的安定性の制約を与えることで得られるパラメータ値の組み合わせを用いたところ、NSAIDsの毒性予測につながりうる半定量的なシミュレーション結果の取得が可能であった。

【まとめ】これらの手法は、毒性の理解や予測に部分的に寄与することが期待される。今後、これらを組み合わせることで、より統合的な毒性予測技術の開発を目指したい。

【参考文献】

• Amemiya T *et al.* Elucidation of the molecular mechanisms underlying adverse reactions associated with a kinase inhibitor using systems toxicology. *NPJ Syst Biol Appl.* 2015 Sep 28;1:15005.

• Kariya Y *et al.* Utility of constraints reflecting system stability on analyses for biological models. *PLoS Comput Biol.* 2022 Sep 9;18(9):e1010441.

○浅谷 公威¹

¹ 東京大学 工学系研究科

【背景・目的】

科学的知見が政策立案に活用される過程では、特定の科学者や国際機関が重要な役割を果たしている[1,2]。特に Covid-19 関連分野では、論文の被引用回数が政策引用との関係性を持つことが指摘されているが[3]、政策への影響力が特定の科学者に集中するメカニズムについては依然として解明されていない。本研究の目的は、科学論文と国際政府間組織（IGO）の政策文書における引用関係を分析し、科学的証拠が政策へ反映されるとき科学者の役割について明らかにすることである。

【方法】

Scopus および Overton データベースを使用し、IGO 政策文書から引用された 2015 年以降に発表された 23 万件的学術論文を解析した。まず、国別の政策影響力を評価した後、著者の過去の政策被引用数などの各種要因との関係性を解析した。また、共著ネットワーク解析によってリッチクラブ（政策引用数の上位に位置する科学者の共著ネットワークの最大接続成分）を抽出し、その科学者集団が発表した論文の特徴についても解析を行った。

【結果・考察】

科学論文の政策引用には国別で大きな差異が認められたが、出版ジャーナル、引用ネットワーク、および著者の過去の政策引用回数がこの差異をおおむね説明できることが分かった。多くの分野において、政策被引用回数が多い科学者同士の共著関係は密であり、一部の科学者が大きな影響力を持つことが明らかになった。この傾向は分野別に異なり、気候変動分野では政策引用が集中する科学者が共著でつながったリッチクラブを形成するのに対し、AI 分野では各科学者の政策への影響が分散している。また、環境毒性分野でもリッチクラブは存在するものの、その規模は気候変動分野より小さい。さらに、リッチクラブの科学者は国際共著率が高く、これは IPCC などの機関が主導する国際協力が有効に機能していることを示唆する。論文発表から政策引用に至るまでのタイムラグは平均 2 年であるが、リッチクラブの科学者に関してはより迅速に政策に取り入れられる傾向が確認された。一方で、リッチクラブは迅速かつ国際的な政策意思決定に貢献する反面、特定のトピックに議論が集中し、科学者の多様な視点の政策反映が制約される可能性も指摘された。

【参考文献】

- [1]Reillon, V. (2016). Scientific advice for policy-makers in the European Union.
- [2]Zastrow, M. (2020). Open science takes on the coronavirus pandemic. *Nature*, 581, 109–111.
- [3]Yin, Y., Gao, J., Jones, B. F., Wang, D. (2021). Coevolution of policy and science during the pandemic. 371, 128–130.

○武田 一貴¹

¹北里大学 獣医学部獣医学科 毒性学研究室

【背景・目的】

生体内高分子と化学物質の結合に対する構造解析は医薬品研究の効率化に大きく寄与している。特に、構造に基づく薬物設計は SBDD (Structure-Based Drug Design) と呼ばれ既に広く用いられる手法である。SBDD の基盤技術となるのが分子ドッキング・分子動力学シミュレーションである。分子ドッキングではターゲットとなるタンパク質及びそれに結合し得る候補化学物質の立体構造を用い、タンパク質内の薬剤結合ポケットの検出及び、そこに最適に結合する化学物質の構造を計算しその結合親和性を予測する。分子ドッキングシミュレーションは簡便な反面タンパク質の可動性を考慮し辛い系であるため、近年は GPU 計算を用いた分子動力学シミュレーションも併用される事がある。

これまでタンパク質の立体構造は X 線結晶構造解析、NMR (核磁気共鳴)、またはクライオ電子顕微鏡を用いて実験的に決定され、高価な測定機器を必要とするものであった。これに対し、近年 AlphaFold2 に代表される生体内高分子構造の高精度構造予測手法が爆発的に普及した事で、分子ドッキングにおけるタンパク質構造の利用性が格段に向上した。これにより医薬品毒性発現に係るオフターゲット標的分子の同定や実験的評価が困難な非モデル生物/野生動物における毒性感受性種差の評価といった *in silico* 毒性予測が可能となりつつある。

【方法・結果】

当研究室ではこれまで環境汚染物質を用いた毒性評価例として生息数 100 頭程度の絶滅危惧種であるオガサワラオオコウモリの殺鼠剤散布に対する非侵襲的リスク評価として RNA シークエンスで得た殺鼠剤標的タンパク質 VKORC1 と国内で用いられている VKORC1 阻害剤 2 薬 (ワルファリン・ダイファシノン) の結合親和性を評価した。その結果オオコウモリ VKORC1 はワルファリンに対してはラットと比較し低感受性だがダイファシノンに対してはラットより高感受性を示し同じ標的タンパク質に対しても異なる感受性を示すことが明らかとなった。近縁種であるエジプシヤンルーセットオオコウモリを用いた *in vivo* 試験でも同様の傾向が得られており、分子シミュレーションに基づく薬剤感受性動物種差の評価も可能な事が示唆された。

医薬品毒性機序の評価法としては AlphaFold 予測構造プロテオームに対する網羅的結合性評価が有効となる事が期待される。現在タンパク質データベースである Uniprot に収載されているほぼ全てのタンパク質に対し AlphaFold による構造予測が実施されデータベース化されている。当研究室では各生物種の全プロテオームに対する網羅的分子ドッキングとエンリッチメント解析を実施する事で化合物が生体内で結合し得るタンパク質候補を検出するいわば構造プロテオミクス解析を実施している。

○水野 忠快¹¹ 東京大学大学院薬学系研究科

【背景】

ドラッグリポジショニングの成功や、予期せぬ有害事象による市場撤退の事例が示すように、医薬品には開発者にさえ認識されていない未知側面が存在する。我々は、そのような医薬品の「認識されていない側面」の理解に向け、医薬品を恣意性なく①数値化した後、②パターン認識に供する研究を展開している。パターン認識により、医薬品の性質はヒトが認知可能な範疇で可視化(レーダーチャート等)できるようになり、既知・未知問わず医薬品の性質を俯瞰・認識可能となる。このように、可能な限り人の認識に依存しない体系でパターンを揃え、既存知見と照合することで、新規側面の発見や、既存知見の網羅性理解につながると期待される。

上記スキームの第一段階、可能な限り恣意性を排して医薬品を記述する方法論には、大きく2つのアプローチがある。一つはオミクス解析など、網羅性の活用である。ある層に属する変数を網羅的に取得することで、着目した層について解析対象を恣意性なく数値化可能である。医薬品の作用は、処理に対する生体応答と解釈できるため、解析対象を処理した生体(培養細胞や動物)を試料としたオミクスデータが頻用されている。もう一つは、画像データなど、感覚器に近いデータの活用である。取得に際し、ヒトの認識が介在しないデータを対象とすることで、低い恣意性を担保することができる。しかしながらこれらのデータは、一般に高次元であり、ヒトはその違いを認識できない。そこで大量のデータからパターンを抽出し、ヒトが認識・理解可能な次元にて俯瞰・照合を行うのが第二段階である。本発表では、このような信条の元に進めている我々の研究より、特に言語モデルを用いた免疫細胞トラフィッキングの研究、及び化合物構造の研究について紹介したい。

【方法・結果・考察】

免疫細胞トラフィッキングは、薬剤誘導性肝障害の進展など、様々な臓器の障害において重要な役割を果たしている。一方、免疫細胞トラフィッキングに関する多様なデータが存在しないため、どのようなパターンが存在するかに関する俯瞰的な知見は存在しない。そこで言語モデルの一つである潜在的ディクレ配分法をベースに、バルクの組織トランスクリプトームデータより準網羅的に細胞比率を推定する手法を開発した。同手法を蓄積されたトランスクリプトームデータベースに適用することで、パターン認識に資する多様な免疫細胞トラフィッキングの数値情報が得られ、引き続きネットワーク解析によりパターンの抽出に成功した。

化合物構造の数値化は、ケモインフォマティクスでの主要な研究対象である。近年、表現力の高い連続量にて数値化する方法論として、SMILES など化合物構造の文字列表現を言語モデルに入力して扱う化学言語モデルが頻用されている。化学言語モデルの強みの一つとして、補助的データなしに化合物の構造情報を学習可能な点が挙げられる。しかし、多様な構造をどのように学習するのかについては不明であった。そこで化学言語モデルの精度と学習の進捗を比較することで、部分的な構造の学習は瞬時に完了する一方、全体の学習には時間を要することを見出した。興味深いことに、ChatGPT などでも用いられる Transformer をベースとしたモデルでは、特にキラリティなどの立体構造を誤認識しやすいことを見出した。

【参考文献】

1. Azuma I, Mizuno T*, Kusahara H. GLDADec: marker-gene guided LDA modeling for bulk gene expression deconvolution. *Brief Bioinform.* 2024 May 23;25(4):bbac315.
2. Yoshikai Y, Mizuno T*, Nemoto S, Kusahara H. Difficulty in chirality recognition for Transformer architectures learning chemical structures from string representations. *Nat Commun.* 2024 Feb 16;15(1):1197.

○小宮 ひろみ¹

¹国立成育医療研究センター 女性の健康総合センター

【初めに】2024年10月国立成育医療研究センター内に女性の健康総合センターが開設された。近年の女性の健康課題には、ライフステージ毎の心身の状況及び社会的立場の変化があげられる。また、働く女性の増加に伴いライフスタイルが変化し、妊娠・出産に関しても出産年齢の上昇やハイリスク妊産婦が増加している状況である。さらに、これまでの日本の医学・医療において男女とも罹患する疾患・病態における生物学的性（セックス）と社会・文化的性（ジェンダー）両者について性差が十分に考慮されてこなかった。本センターは、基礎・臨床研究、イノベーション、診療についてライフコースと性差を考慮した女性の健康促進をめざす。

【概要と取組】本センターでは、女性の健康や疾患について、心身における性差とライフステージに着目し、多面的・包括的分析を行い、病態の解明や治療および予防に向けた研究及び臨床を推進するため、以下5本の柱をたてた。1) 女性の健康に関するデータセンターの構築 2) 女性のライフコースを踏まえた基礎研究・臨床研究の積極的な推進（外部のアイデアやリソースを活用して技術革新を推進するオープンイノベーションセンター設置を含む） 3) 情報収集・発信、人材育成、政策提言 4) 女性の体とこころのケアなどの支援等 5) 女性に特化した診療機能の拡充 本講演では、これらの取組について紹介する。

【展望】第1に女性特有の疾患・病態の解明や治療法の開発だけでなく、男女とも罹患する疾患や病態において性差を意識して、エビデンスの創出と政策提言、社会実装に繋げる。第2に女性の健康にかかわる多職種の人材育成・ネットワーク構築を図る。第3に、診療機能に関して、女性総合診療の在り方を探求し、エビデンスの構築を目指す。

【最後に】女性特有の疾患や病態に関する研究、男女ともに罹患する疾患や病態における性差研究、社会・環境的要因が女性の健康に及ぼす影響についての研究を包括的に推進することが健康寿命延伸に繋がる可能性があるのではないかと考える。本センターが女性の健康を推進し、女性の人生100年時代を支える医学・医療の発展に貢献できるように尽力したい。

○友藤 嘉彦^{1,2,3,4}¹ハーバード大学医学部 ブリガム・アンド・ウィメンズ病院²東京大学大学院 医学系研究科³大阪大学大学院 医学系研究科⁴理化学研究所 生命医科学研究センター

ヒトにおいて、男性は1つのX染色体を、女性は2つのX染色体を持っている。このX染色体の数の性差を解消するために、女性において、2本のX染色体のうちランダムに選ばれた1本は不活性化されている。しかしながら、X染色体の不活化はしばしば完全でなく、一部の遺伝子はX染色体の不活化から「逃避」することが知られている。X染色体不活化からの逃避は、男女間での遺伝子発現の差につながるため、ヒトの性差に関する重要な現象であると考えられてきた。しかしながら、生理的な条件下でX染色体不活化からの逃避を直接定量する技術がないために、X染色体不活化からの逃避の影響がどの細胞の遺伝子発現プロファイルにどれほどの影響を与えているのか、という点については解明されてこなかった。そこで我々はシングルセルオミクスデータセットを入力としてX染色体不活化からの逃避を定量する汎用ソフトウェア、scLinaX(single-cell Level inactivated X chromosome mapping)を開発した。scLinaXを複数の大規模シングルセルRNA-seqデータセットに適用することで、様々な細胞種におけるX染色体不活化からの逃避を定量することに成功し、特にリンパ球においてX染色体不活化からの逃避が強く起きていることを明らかにした。本研究で開発したscLinaXは既にRパッケージとして公開されており(<https://github.com/ytomofuji/scLinaX>)、今後、様々なデータセットに適用することが可能である。

【参考文献】

Tomofuji Y, et al. (2024) Quantification of escape from X chromosome inactivation with single-cell omics data reveals heterogeneity across cell types and tissues. *Cell Genom.* Aug 14;4(8)

scLinaX R package
([Github](#))

○坂本 多穂¹, 黒川 洵子¹

¹ 静岡県立大学薬学部 生体情報分子解析学分野

骨格筋は、運動器として機能するだけでなく、数多くの物質の貯蔵と代謝に関わり、さらには内分泌器官としての側面も有している。全身の容積の約4割、心拍出量の2~8割を占める巨大な組織であり、その貯蔵・代謝・内分泌機能は全身機能に大きく影響を及ぼす。特筆すべきは、骨格筋の機能と形態が、性別によって明確に変化するという点である。本講演では、我々の研究を踏まえ、副作用も含めた疾患における性差において、骨格筋が果たす役割について紹介する。

敗血症は、感染症を引き金として全身に炎症が広がり、多臓器不全を引き起こす重篤な疾患である。この疾患の生存率は男女間で異なり、女性の方が高い。敗血症性差への骨格筋炎症反応の関与が示唆される報告があることから¹、我々は、この性差のメカニズムを解明するため、性転換マウスを用いた解析を行った。骨格筋においてメスマウスで特異的に発現する遺伝子 *Prg4* が、敗血症に対する抵抗性に関わっている可能性が示唆された。さらに、エストロゲン受容体や転写因子 FOXO1 が *Prg4* の発現を制御し、メスにおける高い生存率に貢献する可能性がある。これらの結果は、敗血症の治療に新たな視点をもたらし、より効果的な治療法開発につながることを期待される。

次に副作用研究を紹介する。HMG-CoA 還元酵素阻害薬(スタチン)は筋毒性が副作用として知られている²。特に、親水性と脂溶性のスタチンでは、臨床と細胞実験の結果に矛盾が見られる。臨床では両方のスタチンが筋毒性を示す一方、細胞実験では脂溶性スタチンのみが筋毒性を示すという現象が報告されている。我々はラット骨格筋線維をもちいた解析によりスタチン輸送体である *Oatp1a4* と *Oatp2b1* の関与を見出した。これら輸送体により、親水性スタチンが骨格筋線維に取り込まれやすくなり、筋毒性を引き起こすと考えている³。一方、がん治療においては、個人差・性差を考慮した治療法の開発が求められている。最近の研究では、スタチンと同じく *Oatp* で輸送されるタキサン系抗がん薬の毒性性差に、除脂肪筋肉量が、密接に関連していることが示唆されていることから⁴、薬物動態への骨格筋の関与を解析することは重要であると考えられる。

骨格筋における性差研究は、疾患・副作用の両面において重要な意義を持つ。新たな治療法の開発や、個別化治療の実現に繋がる可能性を示唆しており、臨床医学への貢献が期待される。

【参考文献】

1. Laitano O, Robinson GP, Murray KO, et al. Skeletal muscle fibers play a functional role in host defense during sepsis in mice. *Sci Rep*. 2021;11(1):7316.
2. Sakamoto K, Kimura J. Mechanism of Statin-Induced Rhabdomyolysis. *J Pharmacol Sci*. 2013;123(4):289-294.
3. Sakamoto K, Mikami H, Kimura J. Involvement of organic anion transporting polypeptides in the toxicity of hydrophilic pravastatin and lipophilic fluvastatin in rat skeletal myofibres. *Br J Pharmacol*. 2008;154(7):1482-1490.
4. Shachar SS, Deal AM, Weinberg M, et al. Skeletal muscle measures as predictors of toxicity, hospitalization, and survival in patients with metastatic breast cancer receiving taxane-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2017;23(3):658-665.

○黒川 洵子¹, 清水 聡史¹, 児玉 昌美¹, 砂川 陽一², 諫田 泰成³, 森本 達也², 坂本 多穂¹

¹ 静岡県立大学薬学部 生体情報分子解析学分野

² 静岡県立大学薬学部 分子病態学分野

³ 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

【背景・目的】内服薬が心臓に異常をもたらす心毒性は、上市後の市場撤退の約3割を占める。代表的な心毒性であるQT延長をともなう心室性不整脈(TdP; torsade de pointes)の発症リスク評価項目として、心筋hERG阻害やQT延長のコアバッテリーに加えて、ヒトiPS細胞やインシリコの利用がICH S7B Q&Aに記載されたことは記憶に新しい。今後は、非常にまれであるTdP発症について、個人差を考慮した試験法の開発が予測精度を向上させると期待できる。これまで、当分野では、TdP発症率が男性に比べ女性の方で高い臨床データに着目し、動物実験の結果を基に、性ホルモンが関与する分子機構を提唱してきた。ヒトiPS技術を用いて、性別を考慮した心毒性評価系を構築し、個人差の概念を非臨床安全性試験に導入することを目指している。具体的には、遺伝子背景が近い二卵性双生児男女からiPS細胞を樹立し(双子男女iPS)、その分化心筋を性別ごとの心毒性評価に利用することを計画している。

【方法】双子男女iPS細胞から抽出した全RNAを標本としたNGS解析によって得られた性差遺伝子の疾患エンリッチメント解析を実施した。市販の男女iPS細胞を比較対象群とし、性差分析への使用可能性を評価した。次に、双子女性iPS細胞由来分化心筋細胞を作製し、その拍動動画から算出した動きベクトル波形の収縮—弛緩持続時間(CRD)を経時的に計測し、hERG阻害薬E-4031によるCRD延長作用を解析した。成人女性の卵胞後期でTdP発症率が高いことが示されているので、平均血中女性ホルモン濃度を模倣した培地で24時間培養し、その影響を検討した。

【結果・考察】NGS解析の結果から、双子男女iPS細胞は、市販男女iPS細胞に比べて、性染色体由来遺伝子病との関連がより高感度に検出でき、遺伝的な性別を反映できる細胞であることが強く示唆された。女性由来iPS細胞では、男性由来株に比べて、X染色体不活性化機構のマスター遺伝子であるXISTの発現が有意に高いことが示された。これまで女性由来iPS細胞を継代することによりXISTの発現が低下することが報告されているが、我々が樹立した女性株は最長26回継代しても、このようなXIST発現の異常は見られなかった。理由は不明であるが、染色体由来の性差をより精確に反映することが示唆された。次に、双子女性由来分化心筋を用いた機能解析では、女性ホルモン添加の有無にかかわらず、既報どおり、E-4031の濃度依存的にCRDが延長した。女性ホルモンの添加によって、その濃度依存性は低濃度側にシフトし、CRD延長作用を増強する効果があることが示された。この結果は、卵胞期後期でQT延長薬の作用が増強されるという過去の報告と一致した。

以上より、本双子男女由来iPS細胞は、性差を反映した細胞モデルとして心毒性評価に用いることができる。今後は、薬剤によるTdP発症リスクの予測に性別を考慮するための科学的根拠を提示することを目指し、本細胞を用いて、成人男性および女性性周期における性ホルモン状態を再現し、心毒性が報告されている薬剤における性差機構について、機能解析、発現解析等により検討していく予定である。

○志津 怜太¹, 吉成 浩一¹

¹ 静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野

異物応答性核内受容体である constitutive androstane receptor (CAR)は、肝に高発現し、多種多様な化学物質によって活性化され薬物代謝酵素の転写活性化を介して肝における異物除去に働く受容体型転写因子である。他方、CAR の活性化は、齧歯動物において肝細胞増殖および肝発がんを誘導することが知られており、代表的な齧歯動物における肝発がんプロモーターであるフェノバルビタールをはじめ、齧歯動物における肝化学発がんの多くは、CAR 活性化に伴う肝細胞増殖誘導による肝発がんプロモーション作用により起こると考えられる。実際に当研究室において、ラットで非遺伝毒性の非遺伝毒性の肝がんを誘発することが報告されている数十種類の農薬をラット肝細胞に処置し、核内受容体活性化作用を評価したところ、約 8 割の化合物が CAR 活性化作用を示した。一方で、フェノバルビタールを投与された患者の疫学研究、あるいはヒト肝細胞キメラマウスやヒト CAR ノックインマウスを用いた研究から、CAR 依存的な肝発がんプロモーション作用には種差が存在し、ヒトでは起こらないと考えられている。しかしながら、齧歯動物における肝発がん機序は明確にはなっておらず、CAR を介した肝発がんプロモーション作用の種差は、齧歯動物における発現機序を基にして論理的に説明することはできない。

近年我々は、齧歯動物における CAR 依存的肝発がんプロモーション作用の機序及び種差の解明に向け研究を行ってきた。CAR の機能発現には、CAR の標的遺伝子エンハンサーへの結合を介した標的遺伝子の転写活性化による機序と、他の転写因子等との相互作用を介した他転写因子の活性化/不活性化による機序がある。ヒト-齧歯動物における CAR タンパク質の 1 次構造を比較すると、DNA 結合ドメイン (DBD) の相同性は 90%、リガンド結合ドメイン (LBD) の相同性は 70% 程度である。すなわち、DBD の DNA 応答配列への結合にはヒト-齧歯動物間でほとんど種差はなく、LBD を介した他タンパク質との相互作用には種差が認められる可能性が高いと考えられる。CAR 依存的な肝発がんプロモーション作用にはヒト-齧歯動物間で種差が認められることから、CAR は何らかのタンパク質との相互作用を介して、肝発がんプロモーションを誘導すると考えられる。近年我々は、臓器サイズ制御に関わる細胞内シグナルである Hippo 経路のエフェクター分子であり、肝細胞増殖・肝発がんの促進因子である yes-associated protein (YAP)が、CAR 依存的な肝細胞増殖において重要な役割を担うことを見出した。さらに、CAR はその LBD を介して YAP と相互作用し、YAP の核局在化 (活性化) を誘導すること、この YAP との相互作用は齧歯動物特異的で、ヒト CAR では認められないことも見出した。さらに我々は、マウス CAR と YAP との相互作用部位を同定し、肝発がんの種差の原因と考えられる CAR タンパク質の一次構造上のヒト・齧歯動物間の差異を明らかにした。

本講演では、CAR を介した肝発がんの機序及び種差の理解に向けた、我々の最近の研究結果を紹介する。

○紙谷 聡英¹

¹東海大学・医学部医学科・基礎医学系分子生命科学領域

【背景・目的】 肝臓は薬物・脂質代謝の中心臓器であり、薬物分解の中心を担うのが、加水分解酵素 Cytochrome P450 ファミリー (CYP) である。ヒトとマウスでは発現する CYP ファミリーが異なり、薬物代謝の種差の原因となる。さらに肝臓の機能には性差があり、CYP を含む薬物代謝や脂質代謝関連遺伝子には男性優位や女性優位の発現を示すものが存在する。また、胆汁酸は食物由来の脂質の分解を補助する胆汁の主要成分であり、脂質代謝経路の一部としてコレステロールから合成される。ヒト肝臓で合成される胆汁酸は、その疎水性・界面活性作用から強い細胞毒性を持ち、胆汁のうっ滞は強い肝傷害につながる。一方で、マウス肝臓は独自の胆汁酸代謝酵素 (Cyp2a12, Cyp2c70) を発現しており、その胆汁酸組成は親水性で毒性が低い。従って、胆汁うっ滞傷害の動物モデルの作製において、胆汁酸組成の種差が問題となる。本研究では、このような薬物代謝や脂質代謝の性差や種差に着目した解析のための新規 in vivo モデル系の構築を行った。

【方法】 薬物・脂質代謝関連遺伝子の欠損マウスを作製するために、アデノ随伴ウイルス (AAV) により gRNA を導入する in vivo ゲノム編集法を用いた。Cas9 ノックイン (KI) マウスに Bcl6 下流遺伝子群の gRNA を AAV で導入し、遺伝子欠損を誘導した。また、胆汁うっ滞性の肝傷害を解析するために、ヒト胆汁酸モデルマウス (Cyp2a12, Cyp2c70 二重欠損, CYPDKO マウス) に SaCas9 および Abcb4 の gRNA を導入して遺伝子欠損を誘導した。それぞれのマウスで AAV 感染 1 か月後に、肝臓や血清、小腸、胆のうなどを回収し解析した。

【結果・考察】 我々は転写調節因子 Bcl6 の肝臓特異的欠損 (Bcl6LKO) マウスの解析から、CYP や脂質代謝酵素の発現をオス型に維持するために、肝臓での Bcl6 が必要なことを見出している。Bcl6 は転写抑制因子であり、下流にあたる様々な転写因子の発現を制御している。そこで、オス・メス Bcl6LKO マウス肝臓の遺伝子発現を網羅的に解析した結果から、Bcl6 下流の性差制御転写因子の候補を複数同定した。これらの遺伝子群はメス野生型肝臓や Bcl6 欠損肝臓で遺伝子発現が高い一方で、オス野生型肝臓では発現が抑制されていた。そこで、メス Cas9KI マウスで AAV を用いてこれらの遺伝子欠損を誘導した。その結果、それぞれの単独欠損では一部の薬物・脂質代謝関連性差遺伝子の発現が変化する一方で、三種類の Bcl6 下流転写因子を同時に欠損させたマウス (3 重欠損マウス) では多くの性差遺伝子の発現がオス型に変化した。次に、病態との関連について解析した。長期の食事負荷による脂肪肝炎誘導下で、オス野生型マウスでは多数の腫瘍が生じるのに対し、メス野生型マウスや Bcl6LKO マウスではほとんど見られず、肝臓における性差制御と肝腫瘍形成との関連が明らかとなった。そこでメス野生型マウスとメス 3 重欠損マウスで同様の比較を行った結果、これらの遺伝子欠損によってメスマウスでも腫瘍が形成されたことから、メスマウス特異的な Bcl6 下流転写調節因子群が肝腫瘍形成を阻害する可能性を明らかにした。

また、胆汁うっ滞症におけるヒト・マウスの種差を解析する目的で、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) の原因遺伝子の一つである Abcb4 の欠損マウスを AAV を用いて作製し、病態比較を行った。野生型マウスで Abcb4 を欠損させた場合と比較して CYPDKO/Abcb4 欠損マウスではより強い肝傷害が誘導され、肝線維化の促進や偽胆管増生、血液細胞浸潤などが観察された。このことから、薬物性胆汁うっ滞など胆汁によって生じる他の肝傷害・毒性においても、マウスとヒトの種差は重要と考えられる。本研究で示した in vitro ゲノム編集系やヒト胆汁酸モデルマウスを用いることで、種差や性差を介した肝臓における薬物動態評価の新しい解析につながる可能性を見出した。

○合田 亘人¹¹早稲田大学理工学術院

アディポカインの発見以降、古典的な内分泌器官以外の脂肪組織や骨格筋などの臓器から、エネルギー代謝の恒常性維持にかかわるホルモン様の生理活性物質が分泌されていることが明らかになってきた。近年、肝臓においても、2型糖尿病の病態進展にかかわるセレノプロテインP、フェチュインAやFGF21などの生理活性物質（肝臓から分泌されるものは「ヘパトカイン」と総称される）が相次いで同定され、ヘパトカインを介した新しい代謝制御システムの理解が急速に深まりつつある。

2型糖尿病発症過程においてインスリン抵抗性が生じると、生体は膵β細胞数を増やしインスリン分泌量を増強することで血糖値を維持しようとする。この応答は代償性膵島肥大として知られており、ヘパトカインが重要な役割を果たしている。我々はこの代償応答にかかわる新規ヘパトカインとしてニューレグリン1を新たに同定した。高糖質高脂質食投与により誘導した2型糖尿病モデルマウスを用いて、肝臓でのニューレグリン1発現が高糖質高脂質食投与によって誘導されること、肝臓ニューレグリン1遺伝子発現および血中ニューレグリン1濃度と膵島サイズに正の相関があることを見いだした。また、2型糖尿病を発症させた肝臓特異的ニューレグリン1遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、膵島サイズの増大およびインスリン追加分泌量の増強の抑制が認められ、その結果耐糖能が増悪することが明らかにした。さらに、遺伝的肥満マウス ob/ob に対するリコンビナントニューレグリン1タンパク質の投与や食餌誘導性2型糖尿病モデルマウスの肝臓でニューレグリン1遺伝子を過剰発現させることにより、膵島サイズのさらなる増大とインスリン追加分泌量のさらなる増強を伴った耐糖能の改善を認めた。一方、膵β細胞特異的にニューレグリン1の受容体 *ErbB3* 遺伝子欠損マウスを用いた解析結果から、ニューレグリン1が ERBB3 受容体の活性化を介して代償性膵島肥大を誘導することを見いだした。また、マウス膵β細胞株マウス初代培養膵島細胞を用いた解析より、ニューレグリン1は ERBB3 と ERBB2 の2量体に結合し、MEK-ERK 経路を活性化することで膵β細胞増殖を誘導することが明らかにした。ヒトの解析から、血中ニューレグリン1濃度が肥満度の上昇に伴い増加する一方、2型糖尿病を発症した患者では血中濃度が低下する結果を得た。これらの結果は、ニューレグリン1が生体防御機構としての代償性膵島肥大にかかわる因子であることを強く示唆している。本講演では、我々が解析を進めてきたニューレグリン1の役割について最新のデータを提示し、血糖調節におけるヘパトカインを介した新たな臓器間相互作用について議論をしたい。

○松原 勤^{1,2}, 湯浅 秀人¹, 宇留島 隼人¹, 松原 三佐子^{3,4}, 河田 則文⁵, 池田 一雄¹

¹大阪公立大学大学院医学研究科 機能細胞形態学

²大阪公立大学 LAC-SYS 研究所

³大阪公立大学大学院獣医学研究科 細胞分子生物学

⁴大阪公立大学大学院医学研究科 合成生物学

⁵大阪公立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科学

【背景・目的】

患者数が40～50万人で年間1～2万人亡くなっている肝硬変は、背景疾患に問わず慢性肝炎の終末像で治療薬がないアンメッド・メディカル・ニーズであり、革新的治療法の開発が急務とされる。肝硬変は、肝障害により静止型から活性型へ形質転換した(活性化した)肝星細胞がI型コラーゲン(COL1A)を持続的に産生し過剰な蓄積を生じさせることが主要因とされている。肝星細胞の活性化は、肝細胞障害等により肝細胞との接着結合が破綻し(活性化初期)、炎症細胞からの刺激により形質転換が促進され(活性化中期)、さらに肝星細胞自身でサイトカインや細胞外基質等を放出して(活性化末期)、肝星細胞がCOL1A産生を促進する肝類洞環境を形成する。しかし、現在の医療技術は、このような肝類洞環境を改善できず、肝星細胞を制御できていない。我々は、肝星細胞を中心とした肝硬変の分子病態の解明、肝硬変治療薬の開発を目的とした。

【方法・結果】

活性化初期に起こる肝星細胞-肝細胞間接着結合の破綻について解析し、接着結合に構成するE-CadherinがTAZシグナルを阻害することで肝星細胞活性化を抑制する事[文献1]、肝星細胞-肝細胞間接着結合に必要な突起(スパイン)の形成にCell division cycle 42(CDC42)活性が重要である事、CDC42活性の阻害が障害肝からの修復を遅延させる事を明らかにした。肝臓において肝星細胞特異的に発現しているCytoglobin(CYGB)について機能解析し、CYGBが肝星細胞の活性酸素レベルを低下させる事[文献2]、一酸化窒素レベルを低下させて薬物代謝やミトコンドリア代謝の活性維持に務めている事を明らかにし[文献3]、CYGBは肝臓のガスバイオロジーにおいて重要な因子であると推定された。また、肝硬変患者で観察される老化肝星細胞は、ERK1/2シグナルの亢進により、Interleukin-8、Angiopoietin-like 4、Platelet factor 4 variant 1の分泌が亢進していると推定された[文献4]。一方、肝硬変治療薬の開発研究において、増殖因子Fibrosis growth factor 2[文献5、特許1]、低分子化合物Lawsone[特許2]、菌類抽出液AHCC[文献6]が肝星細胞のCYGBを誘導し、肝星細胞活性化・肝線維化を抑制することを見出した。

【考察・結語】

肝星細胞は、活性化すると細胞外基質やサイトカインを産生するだけでなく、肝臓のガスバイオロジーに影響し、肝細胞等の代謝能を変化させると推定された。また、肝硬変治療には、活性化中期や末期への対策のみならず、活性化初期で認められる肝星細胞と肝細胞の接着結合の再構築も考慮する必要があると考えられた。

【文献・特許】

文献1: Am J Pathol. 2021;191(3):438.

文献2: J Hepatol. 2020;73(4):882.

文献3: Antioxid Redox Signal. 2023;38(7-9):463.

文献4: Mol Cell Biochem. 2019;455(1-2):7

文献5: J Biol Chem. 2017;292(46):18961.

文献6: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2024;327(6):G741-G753.

特許1: 特許第6675150号

特許2: 特許第7142886号

要旨

ポスター発表

○田邊 思帆里¹, Sabina Quader², 小野 竜一³, Horacio Cabral⁴, 佐々木 博己⁵, Edward Perkins⁶

¹ 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部

² ナノ医療イノベーションセンター (iCONM)

³ 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

⁴ 東京大学大学院 工学系研究科

⁵ 国立がん研究センター研究所 基盤的臨床開発研究コアセンター 薬効試験部門

⁶ US Army Engineer R&D Center, USA

【背景・目的】ヒト胃がんの治療抵抗性には活性酸素等による炎症の関与が知られている。本研究では、慢性的な活性酸素種の上昇から Wnt/beta-catenin シグナリング及び上皮間葉転換 (EMT) を介してヒト治療抵抗性胃がんに至る有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway; AOP) の解明を目的とし、AOP298 「Increases in cellular reactive oxygen species (ROS) and chronic ROS leading to human treatment-resistant gastric cancer (GC)」を開発することとした。

【方法】AOP データベースである AOP-Wiki (<https://aopwiki.org>) を用いて、AOP298 を開発した。また、分子ネットワークパスウェイ解析ツールである Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて、活性酸素種産生カノニカルパスウェイ及び上皮間葉転換の分子関連性ネットワークを解析した。

【結果・考察】AOP298 の構成要素として、分子開始イベント (Molecular Initiating Event; MIE) である MIE1940 「Increases in cellular ROS」及び MIE1753 「Chronic ROS」、並びに主要イベント (Key Event; KE) である KE1754 「Porcupine-induced Wnt secretion and Wnt signaling activation」、KE1755 「beta-catenin activation」、KE1457 「Epithelial mesenchymal transition」、さらに有害性発現 (Adverse Outcome; AO) として KE1651 「Treatment-resistant gastric cancer」を AOP-Wiki 内 (<https://aopwiki.org/aops/298>) にて開発した。AOP298 は OECD に登録してコーチングプロセスを終了し、現在、科学レビューのエディターをアサイン中であり、今後、OECD でのエンドースに向けて議論が進められる。

【参考文献】

1. [Tanabe S, Quader S, Cabral H, Perkins EJ, Yokozaki H, Sasaki H \(2024\). Master regulators of causal networks in intestinal- and diffuse-type gastric cancer and the relation to the RNA virus infection pathway. *Int J Mol Sci* **25**\(16\):8821 doi:10.3390/ijms25168821](#)
2. [Tanabe S, Boonstra E, Hong T, Quader S, Ono R, Cabral H, Aoyagi K, Yokozaki H, Perkins EJ, Sasaki H \(2023\). Molecular Networks of Platinum Drugs and Their Interaction with microRNAs in Cancer. *Genes* **14**\(11\):2073 doi:10.3390/genes14112073](#)
3. [Tanabe S, et al. \(2023\). Report of the 3rd and 4th Mystery of Reactive Oxygen Species Conference. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* **40**\(4\):689-693 doi:10.14573/altex.2307041](#)
4. [Tanabe S, Quader S, Ono R, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Perkins EJ, Yokozaki H, Sasaki H \(2023\). Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction. *Onco* **3**\(1\):13-25 doi:10.3390/onco3010002](#)
5. [Tanabe S, et al. \(2022\). Report of the 1st and 2nd Mystery of Reactive Oxygen Species Conferences. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* **39**\(2\):336-338 doi:10.14573/altex.2203011](#)
6. [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](#)

○竹村 晃典¹, 池山 佑豪¹, 藤田 敦哉¹, 伊藤 晃成¹

¹千葉大学大学院薬学研究院 生物薬剤学研究室

【背景・目的】

近年、ミトコンドリア障害は薬物性肝障害 (DILI) の主たる要因と考えられている。しかし、未だに医薬品開発段階における DILI リスク薬物の排除は実現できていない。その原因の一つとしてミトコンドリア障害のうち、ミトコンドリア透過性遷移 (MPT) を想定している。MPT は重篤な DILI を発症した薬物の多くで共通する性質として知られているが、MPT に起因した肝障害発症の機序は詳細に解明されていないことが問題と考えられる。当研究室の先行研究から、一過的に発生する血液凝固系の変化が肝臓でのミトコンドリアにおける MPT 感受性を増大させる可能性を示した¹⁾。このうち、特に血液凝固の因子である血小板はアセトアミノフェン (APAP) 誘導性の肝障害や様々な肝障害発症に関わる因子として報告されている²⁾。さらに、MPT は血小板においても重要なイベントであり、MPT 依存的に血小板が活性化し通常と異なる表現型を示す³⁾。そこで、APAP 肝障害モデルを用いて MPT を介して活性化した血小板が肝障害にどのように寄与するか検証した。

【方法・結果・考察】

MPT 依存的に活性化した血小板が APAP 肝障害に及ぼす影響の解析

In vivo にて肝臓と血小板の MPT を分離して検証するために、血小板を含む骨髓細胞 (BM) において特異的に cyclophilin D (CypD ; MPT の構成因子) を欠損させたマウス (BM-CypD LM/KO) を X 線照射ならびに BM 移植することで作製した。このマウスに APAP を腹腔内投与すると、6 時間後に BM-CypD LM マウスで見られた肝障害は、BM-CypD KO において有意に抑制された。この結果から血小板を含む骨髓細胞で起こる MPT が肝障害に関わることが示唆された。次に肝臓内における時間依存的な血小板の集積を評価したところ、ALT が血中に漏出する前の APAP 投与 1 時間後より BM-CypD LM では血小板の集積が認められ、BM-CypD KO では軽減することを確認した。

共培養した血小板の活性化を介した肝細胞でのケモカイン誘導

先の検討より、in vivo にて ALT が上昇するに伴って好中球の浸潤を認めており、ケモカインの発現誘導に着目して in vitro の解析を実施した。マウスより肝細胞と血小板を単離し、共培養下で APAP を曝露したところ、CypD LM 由来の血小板を用いることで好中球遊走の促進にかかわる *Cxcl2* mRNA 発現を亢進させた。

【総括】

肝障害の発症には血小板などを含む骨髓由来細胞での MPT が関わることを示し、好中球の遊走など炎症反応の惹起に大きく影響を及ぼすことが示された。今後は血小板を MPT 依存的に活性化させる因子の探索や、活性化した血小板による肝細胞でのケモカイン誘導機序の解析を実施し MPT を介した障害発症機序の解明につなげていきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Arakawa K. et al., *J Toxicol Sci*, 44, 833-843. 2019
- 2) Miyakawa K. et al., *Blood*, 126(15):1835-43. 2015
- 3) Jobe SM. Et al., *Blood*, 111(3):1257-65. 2008

○渡邊 輝彦¹, 福田 翼¹, 白木 伸明², 糸 昭苑²

¹関東化学株式会社 技術・開発本部 生命科学研究所

²東京科学大学 生命理工学院

【背景・目的】

医薬品候補化合物の開発中止要因の一つとして、胆汁酸が肝臓内に蓄積して起こる胆汁うっ滞型の薬物性肝障害が挙げられる。非臨床研究における胆汁うっ滞評価は、ラットなどの実験動物を用いて行われている。しかし、種差や動物福祉の問題が存在するため、ヒト予測性の高い *in vitro* 評価系が求められている。その評価系に必須の毛細胆管を形成する方法としては、初代ヒト肝細胞 (PHH) の上にマトリゲルを重層するサンドイッチ培養法が主流であるが、マトリゲルのロット間差の影響やマトリゲルへの薬剤吸着により、試験データの信頼性の低下が懸念されている。また、急激に活性が低下するとされる PHH については、毛細胆管としての機能を長期間維持することも課題であると考えられる。そこで我々は、マトリゲルを用いずに毛細胆管形成が可能な培地 BCEM (Bile Canaliculi-Extending Medium) 1st、および BCEM 1st で形成させた毛細胆管を長期維持する培地 BCEM 2nd を開発した。本発表では、これら BCEM の性能評価を目的とし、マトリゲルサンドイッチ培養を行わずに構築した毛細胆管における排泄機能およびその排泄機能が維持される期間を調査した。

【方法】

接着型 PHH を BCEM1st に懸濁し、 1×10^5 cells/well で 96well コラーゲン I プレートに播種し、播種 4 時間後、1 日後、2 日後に BCEM 1st で培地交換を行った。培養 3 日目以降に BCEM 2nd を使用して培地交換を行い、マトリゲルを使用せずに 21 日目まで培養した (BCEM 条件)。また、対照として、市販培地を用いたマトリゲルサンドイッチ培養法 (培養 1 日目、8 日目、15 日目にマトリゲル重層) により 21 日目まで培養した条件も用意した (従来条件)。培養 7 日目、14 日目、21 日目に MRP2 の蛍光基質 (CDFDA) および BSEP の蛍光基質 (Tauro-nor-THCA-24-DBD) を曝露し、胆汁酸排泄トランスポーターを介して蛍光基質が毛細胆管へ排泄されるかどうかを条件間で比較した。

【結果・考察】

BCEM 条件では、培養 7 日目、14 日目、21 日目の全てのアッセイ日において、各蛍光基質が細胞-細胞間に集積している様子が蛍光顕微鏡観察により認められた。一方、従来条件では、各日ともにそのような蛍光基質の集積は十分には認められなかった。このことから、BCEM 条件では、従来条件よりも伸長した毛細胆管が形成されており、MRP2 および BSEP を介した排泄機能が少なくとも 14 日間は高水準で維持されていることが示唆された。胆汁うっ滞試験においては、毛細胆管腔のキャパシティーや薬剤の長期曝露が重要になることから、排泄機能を備えかつ伸長した毛細胆管を形成・長期維持可能な BCEM が、胆汁排泄型の医薬品候補化合物の非臨床研究に貢献することを期待している。

○高岡 尚輝¹, 森田 萌々夏¹, 高橋 淳², 江刺家 勝弘², 太田 茂¹, 佐能 正剛¹

¹和歌山県立医科大学薬学部 衛生薬学研究室

²三井化学株式会社 合成化学品研究所

【背景・目的】薬剤誘発性肝障害 (Drug-induced liver injury, DILI)は、医薬品開発中止や市場撤退の要因となる頻度の高い副作用である。これまでにヒト由来肝細胞を用いた *in vitro* 評価系が構築されてきたが、その DILI 予測性は十分ではない。特に、薬物代謝は肝毒性を考える上で重要な肝機能の一つであるが、肝臓における薬物代謝酵素の発現や活性を十分に反映した *in vitro* 評価系の構築には課題がある。近年、スフェロイドなどの三次元培養技術の進歩により、薬物代謝を含めた肝細胞機能の向上が期待されているが、これらの三次元培養モデルには、スフェロイド内部での酸素や栄養素の不足による細胞機能の低下という特有の課題が存在する。そこで本研究では、培養底面からの酸素透過性を高めた培養プレートである「InnoCell[®]」(三井化学株式会社)を用いて、肝細胞のスフェロイド培養を行い、肝細胞機能をより向上させた三次元培養モデルの構築を試みた。

【方法】HepaRG 細胞を 2000~20000 cells/well の範囲で、底面素材が polymethylpentene である InnoCell[®]プレートまたは底面素材が polystyrene である他社対照製品に播種し、スフェロイド培養を実施した。低酸素プローブ Image-iT Green-Hypoxia Reagent を曝露し、蛍光顕微鏡 (キーエンス, BZ-X810) を用いてスフェロイド内部の蛍光観察を行った。Q-PCR およびウエスタンブロットにより、CYP3A4 の mRNA およびタンパク発現量を評価した。市販のキットを用いて細胞内 ATP およびグルタチオン量を測定した。クロザピン曝露後の未変化体および代謝物生成を LC-MS/MS により評価した。

【結果・考察】2000~20000 cells/well の細胞数のスフェロイドに対して、蛍光プローブを用いて低酸素状態の観察を行ったところ、コントロールプレートでは細胞数に依存して蛍光強度が増加したが、InnoCell[®]プレートでは細胞数依存的な蛍光カウントの増加が顕著に抑制された。この結果から、InnoCell[®]プレートによる培養は、スフェロイド内部の低酸素状態を改善することが示唆された。次に、この酸素条件の改善がスフェロイドの細胞機能に与える影響を評価したところ、InnoCell[®]プレートでは、細胞内 ATP 量やグルタチオン量はコントロールプレートと同等であった一方で、CYP3A4 mRNA やタンパク発現はコントロールプレートと比べて増加しており、薬物代謝能の向上が示唆された。さらに、毒性発現に薬物代謝が関与することが知られているクロザピンを用いた代謝および肝細胞毒性を評価したところ、InnoCell[®]プレートでは、コントロールプレートと比較して未変化体の消失が増加し、*N*-desmethyl 体および *N*-oxide 体の生成比率が変化した。また、クロザピン曝露による細胞内グルタチオンの減少が認められ、反応性代謝物の生成が示唆された。

【結論】InnoCell[®]プレートでの HepaRG スフェロイド培養は、スフェロイド内部の低酸素条件を改善することで、より高い肝細胞機能を維持できる可能性が示唆された。今後、複数のエンドポイントで本培養系の DILI 予測性を検討する必要があるが、InnoCell[®]プレートを用いた肝細胞スフェロイド培養系は、肝毒性評価における New Approach Methodology として提案できることが期待される。

○内嶋 聖允¹, 深見 達基^{1,2}, 篠原 颯志¹, 中島 美紀^{1,2}¹金沢大院薬 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】抗マラリア薬アモジアキン (AQ) は、シトクロム P450 (CYP, P450) 2D6 によって反応性代謝物であるキノニンミン体に代謝され、肝障害を引き起こすと考えられているが、キノニンミン体による肝障害誘発メカニズムは不明である。近年、AQ と化学構造が類似するアセトアミノフェンによる肝障害の発症に、鉄依存性の細胞死であるフェロトーシスが関与することが報告された。また近年、当研究室では、薬物加水分解酵素アリルアセタミドデアセチラーゼ (AADAC) が非酵素的に肝臓内の Fe²⁺ レベルを低下させ、フェロトーシスに対して保護的に働くことを明らかにしている。本研究では、AQ 誘発性肝障害 (AILI) の発症にフェロトーシスが関与するか、また AADAC による鉄ホメオスタシスの制御が AILI 感受性に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】8-10 週齢の雌性 C57BL/6J 野生型 (WT) と *Aadac* KO マウスに、AQ (150 mg/kg, *p.o.*) とともにグルタチオン合成阻害剤 L-ブチオニン-(*S,R*)-スルホキシミン (BSO: 700 mg/kg, *i.p.*)、P450 阻害剤 1-アミノベンゾトリアゾール (1-ABT: 100 mg/kg, *i.p.*) またはフェロトーシス阻害剤デフェロキサミン (DFO: 100 mg/kg, *i.p.*) を投与し、血漿中 ALT および AST 値、肝臓中の脂質過酸化の指標マロンジアルデヒド (MDA) および Fe²⁺ レベルを測定した。CYP2D6 を過剰発現させたヒト肝がん由来 Huh-7 細胞に 50 μM AQ とともに 200 μM BSO および 10 μM フェロトーシス阻害剤 Fer-1 を処置し、LDH assay により細胞傷害を評価した。Fe²⁺ と反応する FerroOrange を処置し、細胞内 Fe²⁺ レベルを蛍光顕微鏡により評価した。

【結果・考察】AQ と BSO を共投与した WT マウスでは、血漿中 ALT および AST 値に大きな個体差が認められ (ALT 値: 25-38,100 U/L)、ALT 値が 1,000 U/L 以上の high responders は全体の 42% (n = 5/12) であった。一方、1-ABT を前処置すると high responders が認められなくなったことから、AILI の発症に P450 代謝が関与することが示された。また、未処置群と比較して high responders では有意に高い肝臓中 MDA および Fe²⁺ レベルが認められたが、DFO の前投与により、肝臓中 MDA レベルの低下とともに ALT および AST 値の有意な低下も認められたことから、AILI にフェロトーシスが関与することが示唆された。*Aadac* KO マウスにおける high responders は 59% (n = 10/17) と WT マウスより高値を示し、血漿中 ALT および AST 値、肝臓中 MDA および Fe²⁺ レベルも WT マウスより有意に高値を示したことから、*Aadac* は AILI に対して保護的に働いていると考えられた。CYP2D6 過剰発現 Huh-7 細胞において、AQ 処置により細胞内 Fe²⁺ レベルの増加と細胞毒性が認められ、Fer-1 の前処置により抑制された。ヒト AADAC を過剰発現させると AQ による細胞内 Fe²⁺ レベルの増加や細胞毒性が抑制されたことから、ヒト AADAC も AQ 誘発性フェロトーシスを抑制することが示された。以上より、AILI にはフェロトーシスが関与しており、AADAC がフェロトーシスを抑制させることで AILI に対して保護的に働くことを *in vivo* および *in vitro* の検討より明らかにした。

○中川 朋香¹, 水野 忠快¹, 岩坂 拓海¹, 中島 恵理¹, 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

【背景・目的】

医薬品安全性評価において、病理組織学的解析による休薬時の回復性は、国際的ガイドラインでも求められている重要な評価項目である。例えば薬剤誘導性肝障害時には、病理組織学的変化として壊死性領域が認められ、その回復過程には単球由来マクロファージ(MoMF)や自然抗体(NAb)の集積等、免疫因子の関与が示されている。^{1,2}一方、これまでに我々は、化合物の飲水投与を用いたマウス肝障害モデルの経時観察時に、投与に伴い生成された壊死性領域が継続投与下でも消失することを見出した。飲水投与による継続的な肝障害誘導下において、どのように壊死性領域から回復するのだろうか？この問いに答えるべく、本研究では免疫因子の挙動に着目した以下の検討を行った。

【方法】

我々はこれまでに、C57BL/6 マウスに対するメチレンジアニリン(MDA)の飲水投与により、胆汁うっ滞性肝障害モデルを構築している。³同モデルと頻用されるチオアセトアミド(TAA)による飲水肝障害モデルの2つのモデルを用いた。最大28日間飲水投与を継続し、7日ごとに肝臓を採取して、免疫蛍光染色によりMoMF、およびNAbの経時変化を評価した。さらに免疫細胞の挙動について俯瞰的な知見を得るべく、データ駆動型の解析を実施した。具体的には、組織のBulk RNA-seqデータより免疫細胞比率を推定するDeconvolution法⁴を用い、2つのモデルの飲水投与開始初期でのRNA-seqデータを解析し、得られた出力をネットワーク解析により可視化した。

【結果・考察】

MDAの飲水投与により、肝機能障害マーカーであるALTは7日をピークに14日、28日と次第に減少していく様子が観察され、TAAに比して14日時点でのALT値が有意に高いことが明らかとなった。免疫染色を実施したところ、両モデルともに7日からNAbの蓄積が認められた。一方、TAAでは14日以降にNAb蓄積が消失したものの、MDAでは7日に臃気だった当該領域の輪郭が14日にはっきりし、28日にかけて緩やかに縮小する様子が認められた。以上の経過は以前に取得したヘマトキシリンエオジン染色での壊死性領域の経時変化と同様であり、サイズや形状も考慮すると、壊死性領域にNAbが蓄積していると推定される。壊死性領域周辺にマクロファージマーカー(Iba-1)のシグナルの集積が認められ、MoMFが壊死性領域周辺に集積していることを示唆する。2つのモデルを比較すると、TAAでは7日に壊死性領域を覆うように、MDAでは7、および14日に壊死性領域辺縁、21、および28日では内部に浸潤するように集積する様子が観察された。免疫細胞の挙動についてはデータ駆動型の解析においても違いが認められた。具体的には、樹状細胞やKupffer細胞などの免疫細胞のネットワークの中心性が2つのモデルで異なっていた。

壊死性領域へのNAb、およびMoMFの集積は、単回投与時の既報の事象と合致しており、継続的な肝障害誘導下においても、壊死性領域のクリアランスにこれらが関与していることが示唆された。^{1,2}また同じ継続的な肝障害誘導下でも、用いる薬物によって、免疫因子の挙動が異なることが明らかとなった。

【参考文献】

- 1: Feng D et al. *J Clin Invest*. 2023 Aug 1;133(15):e166954 DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI166954>
- 2: Mattos SM et al. *JHEP Rep*. 2024 Jan 24;6(4):101013. DOI: [10.1016/j.jhepr.2024.101013](https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101013)
- 3: Iwasaka T et al. *bioRxiv*. 2024 DOI: <https://doi.org/10.1101/2024.01.25.577198>
- 4: Azuma I et al. *Brief Bioinform*. 2024 May 23;25(4):bbae315. DOI: [10.1093/bib/bbae315](https://doi.org/10.1093/bib/bbae315)

○堀田 英音¹, 月星 陽介¹, 横田 理², 緒方 謙一^{1,3}, 小縣 綾¹, 吉岡 弘毅¹

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（CL/P）は本邦では500人に1人の割合で発症する先天性疾患であり、遺伝要因と環境要因で発症すると考えられている。我々は喫煙、飲酒および医薬品服用などの環境要因によって発症する影響に焦点を当てて研究を実施してきた。マイクロRNA（miRNA）は発生や細胞増殖などで重要な役割を担っており、複数の遺伝子を負に制御する。我々は口唇口蓋裂に関与する遺伝子からその上流を制御するmiRNAを同定するとともに医薬品によって減少する間葉系細胞の増殖抑制に複数のmiRNAが関与することを報告してきたが、不明な点は多く残されている。ミコフェノール酸モフェチル（MPM）は免疫抑制剤として用いられる医薬品であり、従来の医薬品よりも副作用が少ないが口唇口蓋裂などの頭部奇形を引き起こす。MPMによる口唇口蓋裂にMDM2、RPL5、TP53などのタンパク質が関与することは報告されているが、miRNAに関する報告はなされていない。また、予防の観点からも口唇口蓋裂の発症を低下させる物質の探索も求められる。そこで本研究では、ヒト口蓋間葉系細胞であるHEPM細胞を用いて、miRNAを介したMPMによる細胞増殖抑制作用を検討するとともにクマザサ抽出液（SE）による防御作用を評価した。

【方法】

HEPM細胞に対して、MPM（0.01-10 μM）を24-48時間処理し、細胞生存率を評価した。MPM（1 μM）を48時間処理した際のアポトーシスや細胞周期に伴うタンパク質の発現をウェスタンブロッティング法、免疫染色法により評価した。また、ヒト口蓋裂に関わるmiRNAの発現量を測定した。次にmiR-4680-3pまたはlet-7c-5p阻害薬を前処理した際にMPMによる細胞数減少が軽減されるか検討した。さらにMPMとSEを共処理し、細胞増殖への影響を評価した。

【結果・考察】

MPMをHEPM細胞に処理すると時間・濃度依存的に細胞数が減少した。また、MPM処理によって、G1期に関連するタンパク質発現が減少した。MPMはmiR-4680-3pおよびlet-7c-5pの発現量が増加するとともにその下流遺伝子の発現量が減少した。また、miRNA阻害薬の単独処理によって部分的な改善作用を示すとともに、両miRNA阻害薬を処理すると細胞増殖抑制作用を完全に防御した。さらにSEを共処理すると、MPMによる細胞数減少は減弱した。以上の結果から、MPMによる間葉系細胞増殖抑制にmiR-4680-3pとlet-7c-5pが関与することを初めて明らかにした。これらのmiRNAの下流遺伝子の発現減少によってCCND1/CDK6とCCNE/CDK2に起因するG1 arrestによって細胞増殖を抑制すると考えられた。また、我々はレチノイン酸による細胞増殖抑制作用に対し、SEがmiR-4680-3pの発現抑制を介した防御作用を報告している。本検討においても、SEはmiR-4680-3p発現減少を介してMPMによる細胞増殖抑制に対して防御的な作用を示すと考えられた。

○佐藤 里菜¹, 岩下 賢士郎¹, 藤井 萌功¹, 清水 聡史¹, 児玉 昌美¹, 坂本 多穂¹,
黒川 洵子¹

¹静岡県立大学 薬学部 生体情報分子解析学分野

【背景・目的】

臨床現場において抗がん剤による心抑制（心毒性）が問題視されており、その予防・治療法の開発が望まれている。当研究室では、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPSC-CM) シートの拍動動画から動きベクトルを算出するという、非侵襲的な心筋収縮機能の評価法を用いて、nobiletin が doxorubicin 誘導性心毒性に対して保護作用があることを見出したが、その作用機序は不明である。Nobiletin には PDE 阻害作用が報告されていることから、本研究では、アントラサイクリン系抗がん剤である doxorubicin 誘発性心不全に対する治療もしくは予防薬の候補として、細胞内環状ヌクレオチドを代謝するホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬に着目した。PDE は、21 種の遺伝子でコードされ、特徴的な細胞局在を示す 11 種のファミリー、100 以上のバリエーションがある多様性に富んだ分子群であり、ヒトと実験動物では機能特性に違いがあることが報告されている。したがって、作用機序を考える上でヒト心筋の実験データは重要だと考えられるので、ヒト心筋細胞として hiPSC-CM を用いることとした。そこで、本研究では、doxorubicin 誘発性心毒性に対する保護効果を持つ PDE サブタイプの同定を目的とし、以下の薬理的解析を実施した。

【方法】

標本として、市販ヒト iPS 細胞由来心筋細胞である iCell-cardiomyocyte2 (FujiFilm CDI) を用いて、96 ウェルプレートに均一に播種して形成した心筋シートを用いた。倒立顕微鏡 (IX-73, エビデン) 下にて、ステージトップインキュベーター (STX, 東海ヒット) により温度 37°C・湿度 100%・5%CO₂ を正確に管理し、心筋シートの拍動動画 (150 fps、1024 x 1024 pixels, 10 秒間) を撮影した (KP-F400WCL, 日立工機)。得られた拍動動画から SI8000 Cell Motion Imaging System (ソニー株式会社) を用いて動きベクトルを算出し、各種パラメーターが安定していることを確認した後、薬剤の添加を開始した。培養液は毎日半量交換し、8 日間の慢性投与を行った。なお、動画撮影は毎日定刻に実施し、動きベクトルの変化を経時的に解析した。

【結果・考察】

PDE による保護作用について調べるために、非選択的 PDE 阻害薬である IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) を doxorubicin と共投与したところ、IBMX は濃度依存的に心抑制を軽減した。IBMX は PDE8 と PDE9 以外の PDE に対して広汎な阻害活性を有すること、またヒト心臓には PDE1-5, 8-10 が発現していることから、PDE2 阻害薬 (EHNA)、PDE3 阻害薬 (milrinone)、PDE4 阻害薬 (rolipram) の保護効果について、doxorubicin との共投与により検討した。いずれの阻害薬も K_d 値の 30-100 倍の濃度とした。その結果、milrinone および rolipram では心保護作用が見られなかったが、EHNA 存在下では doxorubicin 誘発性心毒性が有意に抑制された。EHNA は、PDE2 阻害以外にアデノシンデアミナーゼ (ADA) 阻害作用もあることから、PDE2 選択的阻害薬 PF-05085727 と、ADA 選択的阻害剤 pentostatin の共投与による検討を実施した。その結果、PF-05085727 および pentostatin による心保護作用はみられなかった。この結果は、EHNA が PDE2A1 に対するサブタイプ特異性があることや ADA 阻害が影響することが関与する可能性があるが、今回は解明できなかった。今後は、心機能解析と並行して、doxorubicin 誘発性心リモデリングへの影響も解析することで、今回提示できた 2 つの可能性を検討することを予定している。

○深松 美咲¹, 岡村 佳奈², 小倉 千春², 長岡 慧³, 影近 弘之⁴, 棚谷 綾², 武田 一貴¹

¹北里大学 獣医学部獣医学科 毒性学研究室

²お茶の水女子大学 理学部化学科

³大丸合成薬品株式会社

⁴東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所

【背景・目的】

殺鼠剤とは読んで字の如く鼠類を駆除する毒餌であるが、これが存外医薬品との関連性が深い。現在の殺鼠剤世界市場の主流は抗血液凝固殺鼠剤でありシェアの7割を占めるが、その原薬は抗血栓薬として著名なワルファリンである。ワルファリンは元々1920年代に腐敗したスイートクローバーを喫食した牛の中毒死成分として同定されたジクマロールを基に合成され、当初は殺鼠剤として利用された。これのヒトでの（農薬としての）安全域の広さが確認された事から医薬品に転用されたという謂わば **Rodenticide-Drug Repositioning** という一風変わった歴史を持つ。

一方で、ワルファリン等抗血液凝固系殺鼠剤に対し抵抗性を有する齧歯類が日本を含む世界各地に出現し、その駆除は困難である。また、抵抗性齧歯類対策に開発された高蓄積性のワルファリン誘導体であるプロジファクム等の第二世代抗血液凝固系殺鼠剤は猛禽類の大量死を生じており深刻な環境問題を生じている。このため抗血液凝固系殺鼠剤とは異なる作用機序を有する殺鼠剤の開発が求められてきた。

当研究グループではお茶の水大学で創出されたリトコール酸骨格を持つ新規ビタミン D 受容体アゴニストである Dcha-20 (特開 2023-111289) が齧歯類に対し顕著な致死効果を有する事から殺鼠剤としての有効性及びその作用機序の検証を実施した (特願 2024-11448)。

【方法】

Dcha-20 の殺鼠活性を調べる為に、7週齢(系統 Slc:Wistar)の雄性/雌性ラットそれぞれにコーンオイルに溶解した Dcha-20 各種濃度を用い、絶食時単回経口投与を行い致死効果を検証した。これに続き Dcha-20 3 mg/kg の単回経口投与後及び静脈内投与後の薬物動態試験を実施した。薬物動態試験終了後のラットはイソフルラン過剰吸入で安楽死処置を実施し、腎臓の病理組織学的検索及び血漿生化学的バイオマーカー測定、RNA シークエンス解析による発現量変動を評価した。

【結果・考察】

Dcha-20 は齧歯類に対し顕著な致死効果を発揮し、雄性/雌性ラットそれぞれに対し数 mg/kg オーダーでの LD50 を示した。これら齧歯類から採取した血漿サンプルでは腎バイオマーカーの上昇が認められた事から Dcha-20 の致死効果の一因が腎障害を介する可能性が示唆された。薬物動態試験では経口投与、静脈内投与後それぞれで良好なコンパートメントモデルへのフィッティングを示した。薬物動態試験後の腎臓は肉眼所見・組織学的所見ともに顕著な病理学的変化を認めなかったが、腎尿管での初期的な変化も一部観察された。RNA シークエンス解析ではビタミン D3 アゴニスト活性及びその他のパスウェイの有意な上昇を認め、Dcha-20 がリトコール酸骨格を基礎としながらもビタミン D 受容体を介する生理活性を有する事が示唆された。本研究知見を基に殺鼠剤としての実用性の更なる検証が求められる。

○元勝 琴菜¹, 志津 怜太¹, 菅原 彩加¹, 大岡 央¹, 保坂 卓臣¹, 吉成 浩一¹

¹ 静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】核内受容体 PXR は医薬品、農薬、食物などの様々な化学物質により活性化し、シトクロム P450 などの薬物代謝酵素の遺伝子の発現を調節することにより生体防御を担う転写因子である。PXR による標的遺伝子の発現調節機構を明確にすることは、化学物質に対する生体応答を理解する上で重要である。最近当研究室では、PXR による標的遺伝子の転写において、リガンドあるいは標的遺伝子依存的に転写に寄与するコアクチベーター (CoA) が異なることを示唆する結果を得た。本研究では、PXR による遺伝子発現調節機構の解明を最終目的として、標的遺伝子プロモーターの PXR 結合領域 (PXRE) に依存する転写共役因子選択性の分子機序解明を目指した。

【方法】PXR 標的遺伝子である *CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP3A4* の PXRE は、いずれも 4 塩基を隔てて核内受容体結合領域が直列に並んだ DR4 型の応答配列である。*CYP2C9*、*CYP2C19*、*CYP3A4* の DR4 およびその前後 6 塩基 (それぞれ 2C9_DR4、2C19_DR4、eNR3A4) をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド、ならびに CoA (PGC1 α 、SRC1、SRC2、SRC3 または ASC2) 発現プラスミドを COS-1 細胞に導入し、PXR リガンドを処置してレポーター活性を測定することで、PXRE の違いが CoA による PXR の転写活性化に影響するか否かを調べた。また、2C9_DR4 の一部の塩基を 2C19_DR4 または eNR3A4 の塩基に変異させたレポータープラスミドを作製し、レポーターアッセイによって PXRE のどの塩基の違いが CoA の選択性に影響するのかを調べた。Protein Data Bank (PDB) の登録情報を利用して、RXR α とのヘテロ二量体として DNA に結合する種々の核内受容体の DNA 結合型の立体構造を調べた。

【結果・考察】レポーターアッセイにおいて、2C19_DR4 では rifaximin 処置時に ASC2 発現依存的にレポーター活性値がわずかに上昇したが、eNR3A4 では活性値の変化はなく、2C19_DR4 では活性値が有意に減少した。eNR3A4 では rifampicin 処置時に PGC1 α 発現依存的にレポーター活性値が大きく上昇したが、2C9_DR4 および 2C19_DR4 では、レポーター活性の上昇はわずかであった。2C9_DR4 の一部の塩基を 2C19_DR4 または eNR3A4 の塩基に変異させたレポータープラスミドを作製し、レポーターアッセイを行ったところ、2C9_DR4 の DR4 直前の 2 塩基を 2C19_DR4 の対応する塩基に変異させることで、2C19_DR4 同様に rifaximin 処置時において ASC2 発現によりレポーター活性値が上昇した。したがって、2C9_DR4 と 2C19_DR4 による CoA の選択性の違いには、この 2 塩基が寄与することが示唆された。2C9_DR4 の DR4 直前の 6 塩基または 3'側のハーフサイトを eNR3A4 の塩基に変異させたところ、rifampicin 処置時に PGC1 α 依存的にレポーター活性値が上昇したことから、2C9_DR4 と eNR3A4 による CoA の選択性の違いにはこれらの領域が寄与していることが示唆された。報告されているタンパク質・DNA 立体構造の解析では、核内受容体-RXR α ヘテロ二量体は、スペーサー塩基数が少ない DR1 や DR3 では RXR α が 3'側のハーフサイトに結合し、塩基数が多い DR4 や DR5 では RXR α が 5'側のハーフサイトに結合していたことから、PXR-RXR α ヘテロ二量体が DR4 に結合する際には、RXR α が 5'側に、PXR が 3'側に結合することが示唆された。

【結語】本研究において、標的遺伝子の PXRE の塩基配列、特に DR4 直前の塩基が CoA 選択性を決定していることが示唆された。本領域は PXR ではなく RXR α と相互作用し、DR4 に結合した RXR α の構造情報から、一つ目の Zn フィンガー中の H146、Y147 および G148 が DR4 直前の塩基との相互作用に重要であると考えられた。今後は、CoA 選択性におけるこれらアミノ酸の役割について解析を行う予定である。

○吉岡 弘毅¹, 小縣 綾¹, 横田 理², 杉本 昌弘³, 三浦 伸彦⁴, 前田 徹⁵

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慶應義塾大学 政策・メディア研究科

⁴横浜薬科大学薬学部 環境科学研究室

⁵金城学院大学薬学部 医療薬学分野

【背景・目的】

シスプラチン (CDDP) は白金を含有する抗悪性腫瘍剤であり、多くのがん化学療法プロトコルにおいて中心的な役割を担っている。その一方で副作用として急性腎障害を引き起こす。CDDP が惹起する急性腎障害の非侵襲的バイオマーカーとしては様々な探索が行われているが、特異的かつ鋭敏なバイオマーカーは見つかっていない。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」として展開しており、7種類の金属は曝露時刻の違いで毒性差があることを示した (Yoshioka et al, J Toxicol Sci, 2018)。CDDP も金属を含有することから、同様に感受性時刻差を示し、実際にマウスを用いた検討で腎障害の程度が曝露時刻によって異なる報告はあるが相反するものも存在する (Cao et al, Biochem Biophys Res Commn, 2019 & Zha et al, Cell Death Dis, 2020)。本研究では、より腎障害が強く認められる高感受性の時刻に CDDP を投与したマウスにおいて、経時的に採取した尿サンプルによるメタボローム解析を行い、CDDP 腎障害に対する特異的バイオマーカーおよび毒性防御因子の探索を目的とした。

【方法】

7週齢の ICR 系雄性マウスに、8時 (明期) と 20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。メタボローム解析は 20 時投与群の実験群を用いて解析を行った。投与前、投与 24 時間、48 時間、72 時間後に尿を 40 μ L 採取し、ノンターゲット法によってキャピラリー電気泳動・質量分析装置でメタボローム解析を行った。得られた結果は MetaboAnalyst によって各種解析を行った。

【結果・考察】

CDDP の投与によって、8時の投与では若干の腎障害が認められた。それに対して、20時の投与群では、血漿中クレアチニン値、尿素窒素値および MDA 値 (酸化ストレス指標) が有意に増加した。また、炎症関連遺伝子 (*Cox2*・*Il-6*・*Tnf α*)、壊死関連マーカー (RIP1) や、糸球体や近位尿細管の傷害 (H&E 染色、KIM-1 の免疫染色) なども観察された。尿中メタボローム解析での結果では、約 120 種類の物質が検出され、経時的に減少した物質が 13 種類、経時的に増加する物質が 3 種類得られた。以上の結果から、本実験では、8時と 20時の 2時刻の結果から 20時曝露の方が腎障害の程度が大きい結果となった。その条件下でも投与 48 時間までは血漿中クレアチニン値および尿素窒素値は有意な増加は認められなかった。その一方で、24 時間で既に尿中物質が複数変化していることからより有用なマーカーが得られる可能性が考えられる。本結果で変動があった 5-アミノレブリン酸は CDDP の腎障害を軽減する報告があり (Terada et al, PLoS One, 2013)、我々が実施した解析の有用性を示唆するものである。今後同定した物質の有効性を *in vitro* および *in vivo* で解析していき、バイオマーカーおよび毒性防御因子になり得るか検証を行う予定である。

○清水聡史^{1,2}、Pornparn Kongpracha²、水野葵¹、宮坂 政紀²、Pattama Wiriyasermkul²、坂本多穂¹、児玉昌美¹、中井雄治³、永森收志²、黒川洵子¹

¹静岡県立大学薬学部 生体情報分子解析学分野

²東京慈恵会医科大学 医学部 SI 医学応用研究センター

³弘前大学 地域戦略研究所 食料科学研究部門

【背景・目的】

腎臓は薬物の排泄に関わっており、近位尿細管では特徴的な薬物の分泌・再吸収が行われているが、尿細管細胞内では薬物濃度が上昇しやすく、毒性を発現しやすい。シスプラチンによる腎毒性やピオグリタゾンによる浮腫には性差の存在が知られているがその詳細な形成機構は不明である。多くの薬剤はトランスポーターにより、分泌・再吸収されるが、トランスポーターなどの膜タンパク質は取り扱いが難しく、タンパク質発現量を網羅的に測定することは困難である。そこで共同研究者が確立した膜タンパク質に特化した膜プロテオミクスと、腎臓全体のトランスクリプトミクスを組み合わせることで、腎臓における薬物副作用の性差形成機構の解明を目指した。

【方法・結果】

性差は性染色体・性ホルモンの影響を受けることから、これらの影響を区別できる性決定遺伝子 *Sry* を改変したマウスから生まれる 4 種の Four Core Genotypes (FCGs) マウスを用いた。FCGs マウスの腎臓から近位尿細管刷子縁膜小胞を精製し、尿素処理を行なった後、nano LC-MS/MS (Q-Exactive) を用いて膜プロテオミクスし、合計で約 5,000 種類のタンパク質プロファイルを取得した。また、RNA 抽出を行い、マイクロアレイ測定をすることで遺伝子の転写プロファイルを取得し、両プロファイルから性ホルモン、性染色体由来の性差形成分子を同定した。

同定した性差形成分子を METASCAPE や QIAGEN IPA を用いてエンリッチメント解析をおこなったところ、膜プロテオミクス・マイクロアレイそれぞれ、特徴的な性差に関わる分子群が同定された。性差のあった SLC トランスポーター、ABC トランスポーターを中心に薬物輸送との関係を調べたところ、シスプラチンの輸送に関わる性差のあったトランスポーターを 2 つ発見した。そこで、膜プロテオミクスデータを刷子縁膜上のタンパク質、マイクロアレイデータを細胞内・基底膜側のタンパク質として、既存のシスプラチンの代謝機構に関わる分子を調べたところ、複数の性差分子が見つかった。これらの性差分子には性染色体由来・性ホルモン由来の性差がそれぞれ存在し、シスプラチンによる腎毒性の死亡率が男性で高く・高齢になると死亡率が逆転する臨床結果を説明することが可能であった。

【考察】

本発表ではシスプラチンの腎毒性に着目したが、その他の薬物性腎毒性の性差形成メカニズムについてもみつけている。このように、本研究結果は正常な男女の腎臓の機能差、その他の薬物性腎毒性の性差形成メカニズムを説明できる基本的なデータとなりうる可能性を秘めており、早期のデータ公開を考えている。今後、本データが性差医療の学術的根拠にもなりうることを期待される。

○芝田 南美¹, 保坂 卓臣¹, 志津 怜太¹, 吉成 浩一¹

¹静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野

【目的】肝障害は、医薬品の開発・販売中止の主要な要因であり、その機序解明や評価系の開発が求められている。最近、我々の研究室では、CYP1A1 を強く阻害する医薬品のほとんどが肝障害誘発性薬物であること¹⁾、また医薬品によるラット個体での CYP1A1 阻害は、芳香族炭化水素受容体 AHR の間接的な活性化を介して肝障害を引き起こす可能性があること²⁾を報告した。そこで本研究では、医薬品以外の化合物における同様の関連性の有無、そして CYP1A1 以外のシトクロム P450 (P450) 阻害と肝毒性所見の関連性の有無を明らかにするため、農薬のラット P450 阻害とラット反復投与毒性 (repeated-dose toxicity : RDT) 試験における肝毒性所見の関連性を解析した。

【方法】食品安全委員会が公表している農薬評価書から、126 農薬のラット 2 年間 RDT 試験結果を入手した。各肝毒性所見について、いずれかの投与量で LOAEL が報告されていた場合、当該所見を陽性とした。類似の肝毒性所見をグループ化して 6 つのグループエンドポイント (gEP) を定義し、gEP 内のいずれかの所見が陽性であれば、該当 gEP を陽性とした。P450-Glo assay (Promega) 及び組換え酵素 (Gentest) を用いてラット CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2C6、CYP2D1 及び CYP3A2 に対する各農薬の阻害作用を評価し、溶媒対照群の残存活性 (100%) から被験物質の残存活性を引くことで阻害活性 (%) を算出した。阻害活性が 15% 以上の場合阻害陽性と判定した。統計解析には JMP Pro 17 (SAS Institute) を用いた。

【結果】P450 阻害試験の結果、CYP1A1、CYP2C6 及び CYP3A2 は、他の分子種に比べて多くの農薬により強く阻害された。また、分子種間での基質特異性の重複を調べるため、Pearson の相関分析を実施したところ、CYP1A1 と CYP1A2、CYP2B1 と CYP2C6、CYP2C6 と CYP3A2 の組み合わせで阻害活性に強い相関が認められた。次に、肝毒性所見と P450 阻害活性の関連性を調べるため、Fisher の正確確率検定を実施した結果、肝肥大及び脂質代謝異常に関する gEP、並びにそれらに含まれる所見と CYP1A1 及び CYP2C6 阻害との間に関連性が認められた。また、関連が認められた所見は CYP1A1 と CYP2C6 の阻害でほぼ同一であった。Wilcoxon の順位和検定の結果、肝肥大及び脂質代謝異常に関する gEP、並びにそれら gEP に含まれる所見と CYP1A1 及び CYP2C6 の阻害との間に有意な関連性が認められた。最後に、内因性 AHR アゴニストである 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) の CYP1A1 及び CYP2C6 阻害作用を調べたところ、FICZ は、CYP1A1 を濃度依存的に阻害したが、CYP2C6 に対しては阻害活性を示さなかった。

【考察】CYP1A1 阻害と関連性が認められた肝毒性所見は、医薬品を用いた先行研究におけるラットでの CYP1A1 阻害により認められた所見と一致していた。したがって、CYP1A1 阻害に伴うこれら肝毒性は、化学物質で一般的に認められる現象であることが示唆された。CYP1A1 と CYP2C6 は、阻害を示す農薬及び阻害と関連性を示す所見の観点で強い類似性を示した。そのため、CYP2C6 阻害が CYP1A1 阻害と同様に間接的に AHR を活性化する可能性が考えられたが、FICZ の阻害試験の結果から、CYP2C6 は FICZ の代謝には関与しない可能性が高いと考えられた。したがって、CYP2C6 阻害は、CYP1A1 阻害とは異なる機序を介して肝障害を引き起こす可能性、CYP1A1 阻害のサロゲートマーカーとして機能している可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Shimizu et al, *J Toxicol Sci*, 46:167-176, 2021.
- 2) Yoda et al., *J Toxicol Sci*, 47:359-373, 2022.

○佐藤 清美¹, 皆藤 駿之介¹, 岩田 実咲¹, 保坂 卓臣¹, 志津 怜太¹, 佐々木 崇光¹, 吉成 浩一¹

¹静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野

【背景・目的】現在、予測困難な臓器毒性の発現は医薬品の開発及び臨床使用における深刻な問題となっており、開発早期段階で使用可能な確度の高い毒性予測系の開発が求められている。当研究室では、ヒト CYP1A1 又は CYP1B1 の強い阻害作用と薬剤性肝障害 (DILI) との間に有意な関連があり、これら P450 分子種の阻害作用が DILI 予測の有用な指標になること¹⁾、CYP1A1 阻害は間接的に芳香族炭化水素受容体 (AHR) を活性化して脂肪蓄積などの肝毒性を示すこと²⁾を報告した。これらの背景から本研究では、シトクロム P450 (P450) 阻害試験データが DILI 以外の臓器毒性予測に対して有用か否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】医薬品副作用情報データベースである SIDER (Side Effect Resource) から、複数臓器に対する副作用情報を有する 364 物質を被験物質として選択した。その後、国際的医学用語集 MedDRA を用いて、抽出した副作用情報を医薬品開発で問題となり得る 10 種の臓器毒性グループに分類し、解析対象とした。各被験物質について、P450-Glo Assay system (Promega) と組換え P450 (Gentest) を用いた評価系により 10 種のヒト P450 分子種に対する阻害作用を測定した。統計解析には Microsoft Excel と JMP Pro15 を用いた。

【結果】各種薬剤誘発性臓器毒性と P450 阻害試験データの関連性を調べるため、Wilcoxon の順位和検定を行ったところ、心不全と CYP1A1、CYP1B1、CYP3A4 の阻害との間に非常に強い関連が見られた (それぞれ $p=0.0001$, 0.0014 , 0.0005)。一方、肝障害では CYP1A1 及び CYP1B1 阻害との関連は認められたが、CYP3A4 阻害との関連は認められなかった。また、心不全陽性薬物は、陰性薬物に比べてこれらの P450 分子種を強く阻害する傾向が認められた。そこで、閾値を 10% ごとに設定して被験物質をそれぞれの閾値で阻害陽性・陰性の 2 群に分類し、心不全と P450 阻害の関連を Fisher の正確確率検定により調べたところ、CYP1A1、CYP1B1、CYP3A4 阻害では、それぞれ 70%、40%、20% の閾値で分類したときに最も小さい p 値が得られたことから、これらの値を阻害活性陽性・陰性を判別する閾値とした。次に、2 つの P450 分子種の阻害活性値に基づいて被験物質を二次元にプロットし、決定した閾値に基づいて被験物質を 4 群に分類して心不全陽性率を比較したところ、いずれの組み合わせにおいても、1 つ以上の P450 分子種阻害が陽性である群で高かった。さらに、各被験物質について、上記 3 分子種のうちの阻害陽性の分子種数をスコア化し、各スコアの心不全陽性率を調べたところ、スコアが 2 点又は 3 点である物質のほとんどは心不全陽性であった (77 物質中 68 物質)。

【考察】以上の結果から、P450 阻害試験データは DILI だけでなく薬剤誘発性心不全の予測においても有用であることが示唆された。CYP1A1、CYP1B1、CYP3A4 阻害と心不全の関連性の理由は明確になっていないが、CYP1A1 や CYP1B1 の阻害による AHR シグナルの増強が心毒性に関与している可能性や、CYP3A4 阻害が、CYP3A4 と類似した基質特異性を示し、心臓に高発現する CYP2J2 阻害のサロゲートマーカーとして機能した可能性などが考えられる。

【参考文献】

- 1) Shimizu et al, *J Toxicol Sci*, 46:167-176, 2021.
- 2) Yoda et al., *J Toxicol Sci*, 47:359-373, 2022.

○菅原 琳¹, 羽山哲平¹, 鎌田亮¹, 武田 一貴¹

¹北里大学 獣医学部獣医学科 毒性学研究室

【背景・目的】

新薬創出は一つの新薬に 9~17 年/約 500 億円を要するとされる困難な過程である。その一因として期待する薬効以外の毒性影響（副作用）の発現が挙げられる。薬効と異なり副作用はどの臓器・分子に発現するか不明なため化合物探索段階での毒性の予測は困難である。この評価には動物実験による毒性試験が不可欠だが、実験動物とヒトの種差が問題となるうえ、毒性試験で得られた表現型からその標的分子を同定する事には更なる分子生物学実験が必要となる事が多い。このため候補化合物の毒性影響を事前予測する手法が求められる。

毒性発現メカニズムの多くは標的タンパク質との結合が起点となる（Molecular Initializing Event: MIE）。そこで化学物質のタンパク質結合による MIE を事前に評価できれば副作用を予測できると着想した。これに対し、近年 AlphaFold2 に代表される深層学習を用いた高精度タンパク質立体構造予測法が発展したため、動物種を問わず網羅的なタンパク質構造取得が可能となった。これと化学物質-タンパク質の結合力予測シミュレーション手法である分子ドッキング計算を組み合わせ、各生物種の全タンパク質立体構造に対し網羅的に分子ドッキング計算を行い、入力した化学物質が生体内でどのタンパク質に結合し、その結果生じうる生理学的変化を評価する in silico Binding-Proteomics パイプラインを作出した。

【方法】

パイプラインは、解析対象の生物種と目的となるリガンド(化学物質構造)の情報を入力することで、タンパク質およびリガンドの前処理からドッキング、エンリッチメント解析までを自動で実行できるようにした。まず、対象の生物種におけるプロテオームのタンパク質立体構造データである PDB ファイル群を AlphaFold Protein Structure Database からダウンロード、リガンドの 3D 構造データである sdf ファイルを PubChem からダウンロードし、これらのデータに対し水素付加、電荷付加、ファイル形式変換といった前処理を施した。次いで、各タンパク質のリガンド結合ポケットを Fpocket により検出、ポケットの中心座標をドッキングの中心座標とし、Vina-GPU により各タンパク質に対してリガンドのドッキングを行って、結合親和性をドッキングスコアとして記録した。

【結果・考察】

ドッキングの結果は、ペルメトリンでスコアの平均が 4.9、中央値は 5.5、最高値は 11.5、最低値は -55 であり、スコア 8 以上のタンパク質の数は 1747 個(全体の 8.0%)であった。プベルル酸はスコアの平均が 5.1、中央値は 5.2、最高値は 9.0、最低値は -24.8 であり、スコア 8 以上のタンパク質の数は 63 個(全体の 0.3%)であった。ワルファリンはスコアの平均が 5.5、中央値は 5.8、最高値は 11.1、最低値 -56.1 はであり、スコア 8 以上のタンパク質の数は 1611 個(全体の 7.5%)であった。ワルファリンの本来のターゲットである VKORC1 のスコアは全タンパク質中 6 位の 10.4 であり、今回のドッキング手法の妥当性を裏付ける結果の一つといえた。

○内田 奈那¹, 芝田 南美¹, 原川 ゆう¹, 大岡 央¹, 保坂 卓臣¹, 志津 怜太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 安全科学研究部門

【背景・目的】現在、動物実験の代替法の開発が世界的に求められているが、反復投与毒性については毒性の多様さや複雑さなどの理由から代替法の開発は進んでいない。また、被験物質と構造が類似する物質の毒性を参考に、その毒性を類推する‘リードアクロス’に期待が寄せられているが、構造情報だけでは毒性の類推が正しくできない場合も多い。本研究では、構造情報のみに基づくリードアクロスでは毒性を評価できないような構造類似物質の毒性を類推する手法の開発を最終的な目的とし、RNA シーケンス解析により得られた発現変動遺伝子情報を用いた構造類似物質の毒性学的分類を試みた。

【方法】製品評価技術基盤機構で公開されている有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) のラット反復投与毒性試験データが入手可能な化合物群からアニリンまたはフェノール構造を有する 11 種の構造類似物質を被験物質として選択した。これらを初代培養ラット肝細胞に 100 μM で 24 時間処置して RNA シーケンス解析を行い、各被験物質処置に伴う遺伝子発現変動プロファイルを取得した。また、反復投与毒性情報として、HESS に登録されている約 481 所見の最小影響量 (LOEL) を使用した。解析には Python 3.12.3 を使用し、NumPy (1.26.4)、Pandas (2.2.2)、Seaborn (0.13.2)、Matplotlib (3.9.2) ライブラリを用いた。

【結果・考察】各物質の各反復投与毒性試験所見の LOEL 値を 4 つの毒性クラス (①30 mg/kg/day 以下、②30~300 mg/kg/day、③300 mg/kg/day 以上、④LOEL なし) に分け、11 物質すべてでクラス ④になる所見を除いた 83 所見を解析に用いた。物質のペアごとに 83 所見の LOEL クラスの相関係数を算出し、これらに基づいた 11×11 の相関行列を作成して階層的クラスタ解析を行った。その結果、比較的毒性が強い 2 物質が独自のクラスタを形成することが分かった。次に、発現変動の閾値を 1.5~32 倍の 6 段階に設定し、いずれかの物質で検出された全 17442 遺伝子の中から、いずれかの物質で閾値以上の発現変動を示した遺伝子を選択して階層的クラスタ解析を行った。その結果、いずれの閾値を用いた場合にも明確なクラスタは形成されず、その dendrogram は毒性プロファイルから得られた dendrogram とは大きく異なっていた。そこで、すべての物質のペアについて、全 17442 遺伝子の発現変動倍率を変数としたスピアマンの相関係数を計算して相関行列を作成し、階層的クラスタ解析を実施したところ、得られた dendrogram は毒性プロファイルに基づいた dendrogram と部分的に一致しており、上述の毒性が強い 2 物質のクラスタが再現された。次に、全 17442 遺伝子からいずれかの物質で閾値以上の発現変動を示した遺伝子を選択して同様の解析を行ったところ、化学物質の毒性学的な分類精度は向上せず、むしろ選択せずにより多くの発現変動遺伝子を用いた場合により毒性プロファイルに基づくクラスタと類似することが明らかになった。

以上の結果より、構造類似物質において、発現変動遺伝子プロファイルに基づく相関行列データを利用して階層的クラスタ解析を行うことで、毒性プロファイルと似た物質のグルーピングができる可能性があると考えられた。

○中村 友香¹, 羽山 哲平¹, 菅原 琳¹, 鎌田 亮¹, 武田 一貴¹

¹北里大学 獣医学部獣医学科 毒性学研究室

【背景・目的】

芳香族炭化水素受容体 (AhR) は、ダイオキシンなど種々の環境汚染物質に反応し、様々な生理機能を制御する毒性学上重要な受容体である。代謝、免疫応答、発生、癌化に至る広範な分野での役割を担い、医療や環境科学の研究においても非常に重要なターゲットとして認識されている。

AhR は生物種横断的に保有している核内受容体であるが、外来化学物質に対する応答性には動物種差があり、例えばダイオキシンに対する致死量はモルモットとハムスターとでは 1000 倍以上異なる。その原因として AhR のアミノ酸配列やそれに伴う立体構造の動物種差による化学物質への応答の多様性が起因する。AhR 作動性の化合物に対する毒性予測はヒト医療においては普及しつつあるが、野生動物を含む非モデル動物種における感受性予測、特に動物種差の評価は進んでいないのが現状である。

本研究では立体構造を用いた多生物種 AhR リガンド結合能予測の検討として既知バイオアッセイ値と分子シミュレーション間の相関性を検証した。

【方法】

タンパク質-リガンド結合の実測値データベースである BindingDB と ChEMBL より実測値掲載動物種 (ヒト・ウサギ・ラット・マウス・ゼブラフィッシュ) AhR をターゲットとするリガンドのバイオアッセイ値として K_i 値、 IC_{50} 値、 K_d 値及びそのバイオアッセイ条件を取得した。続いて、AlphaFold database より取得した各動物種 AhR の予測立体構造と、Pubchem より取得した各リガンドの立体構造を用い、これらの結合性を Autodock vina を用いた分子ドッキングシミュレーションで予測した。シミュレーションを経て算出した結合親和性値ドッキングスコアと各バイオアッセイ値の相関性を比較した。

【結果・考察】

各バイオアッセイ値とドッキングスコアの単純線形相関解析では IC_{50} -ドッキングスコアにおける R^2 値は 0.02 とほぼ相関性を示さず、 $K_{i/d}$ -ドッキングスコアにおいては R^2 値 0.2 と弱い相関性を示した。以上から高精度な予測の実現に際し実測値自体も相対値である IC_{50} より $K_{i/d}$ 値を用いる事が重要だと示唆された。

○水野 航介¹, 竹下 潤一^{1,2}, 原川 ゆう¹, 保坂 卓臣¹, 志津 怜太¹, 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 国立研究開発法人産業技術総合研究所 (AIST) 安全科学研究部門

【背景・目的】ラットの発がん性を評価するための代替法の開発は依然として困難である。本研究では、化学構造などの物理化学的特徴を表す分子記述子ならびに腫瘍形成に関与する毒性メカニズムと関連する *in vitro* 試験データを用いた非遺伝毒性発がん性を予測するためのリードアクロス手法の確立を目的として、農薬の細胞傷害に関連する鼻腔、胃、膀胱/尿道腫瘍の予測を試みた。

【方法】食品安全委員会が公表している農薬評価書の2年間ラット発がん性試験または発がん性・慢性毒性併合試験の結果から、がんの発症頻度が高い9臓器（肝臓、甲状腺、精巣、子宮、卵巣、乳腺、鼻腔、胃、膀胱/尿道）のいずれかで良性又は悪性腫瘍を起こす80農薬、並びに発がん関連所見を認めない46農薬を選出した。本研究では、上皮細胞傷害に関連する3種類の腫瘍（鼻腔、胃、膀胱/尿道の腫瘍）に焦点を当てた。これら126物質について、HepG2細胞を用いた細胞傷害性試験（LDH放出、細胞内ATPレベル、細胞内GSHレベル）を実施した。全126物質で計算可能な2297種のalvaDesc(alvascience社)分子記述子を利用して物質間のユークリッド距離を計算し、各被験物質について一定距離内に含まれる近傍物質から被験物質の発がん性を予測した。場合によっては *in vitro* 試験結果の一致に基づく近傍物質の絞り込みを行った。また、数理的¹⁾及び毒性学的観点から、各腫瘍（鼻腔、胃、膀胱/尿道）について、Wilcoxonの順位和検定で関連性の高い記述子を被験物質と同数の126種選択して物質間の相対距離を計算し、距離及び *in vitro* 試験結果に基づいて発がん性を予測した。

【結果・考察】分子記述子のみに基づいて選択した近傍物質から発がん性を予測した場合、精度は低く (balanced accuracy: 0.294-0.582)、構造類似性だけで発がん性を予測することは困難であることが明らかとなった。しかし、*in vitro* 試験結果を利用して近傍物質を絞り込むことで精度が向上した (balanced accuracy: 0.639-0.835)。また、統計学的な発がん性との関連により選択した分子記述子と *in vitro* 試験結果を組み合わせることで、さらに精度が向上した (balanced accuracy: 0.752-0.821)。これらの結果は、発がん性との関連で選択された分子記述子と発がん機序関連する *in vitro* 試験データの併用が、ラットの細胞傷害関連腫瘍のリードアクロス予測に有用であることを示唆している。非遺伝毒性発がんのadverse outcome pathway (AOP)は多数構築され、AOP-wikiを通じて公開されていることから²⁾、分子開始イベントと主要イベントを特定するための適切な *in vitro* 試験を同定・確立できれば、本アプローチは他の種類の腫瘍に適用可能であると考えられた。

【参考文献】

- 1) France, S. L., Douglas Carroll, J., & Xiong, H. (2012). Distance metrics 467 for high dimensional nearest neighborhood recovery: Compression and normalization. *Inf Sci*, 184: 92-110. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2011.07.048>
- 2) Martens, M., Evelo, C. T., & Willighagen, E. L. (2022). Providing Adverse Outcome Pathways from the AOP-Wiki in a Semantic Web Format to Increase Usability and Accessibility of the Content. *Appl In Vitro Toxicol*, 8: 2-13. <https://doi.org/10.1089/aivt.2021.0010>

○李 澤昇¹, 水野 忠快¹, 根本 駿平¹, 楠原 洋之¹¹ 東京大学薬学系研究科 分子薬物動態学教室

【背景】

創薬の更なる効率化と低コスト化が求められている昨今、機械学習による毒性予測に期待が高まっている。特に近年、分子構造グラフや文字列表現を入力とするニューラルネットワークを用いた深層学習が加速的に発展しており、情報学領域を中心に化合物を対象とした機械学習モデルの研究開発が盛んに行われている。しかし、医学薬学領域における深層学習を利用した毒性予測モデルに目を向けると、モデル構造の体系化など、情報が整備されていない。そこで本研究では、深層学習による毒性予測に焦点を当てて包括的なサーベイを行い、研究領域の現状と課題を明らかにした。

【方法】

まず医学論文データベース PubMed とプレプリントサーバーarXiv から下記の検索クエリで 2015 年以降の論文を取得した。

Query: (drug / chemical) & (toxicity) & (neural network / deep learning) & (graph / SMILES / strings)

次にタイトルと要旨から、「研究論文であり、グラフ、または文字列表現由来の記述子を利用した深層学習モデルを用いて、人間に関係する毒性、並びに毒性関連アッセイ結果の予測を行っている」ものに絞り込んだ。候補論文を対象に内容、特にモデルへの入力形式やモデルの種類、予測対象や評価指標等を確認し、収集した。

【結果・考察】

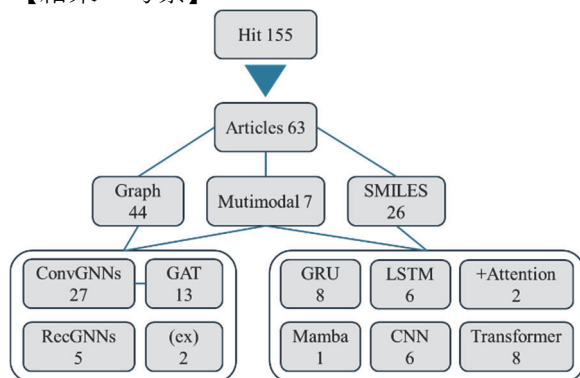


図 1 入力形式とモデル構造

Year	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Hit	4	2	4	4	10	7	15	17
Graph	3	2	2	1	7	5	12	12
SMILES	1	0	2	3	4	2	7	7

表 1 発表年ごとの論文数

155 件の論文がヒットし、うち 63 件がグラフと文字列表現を入力とする深層学習モデルを使用していた。入力形式とモデルの種類は図 1 の通りであり、グラフを用いるモデルは、例外 2 件を除き、全て Message-Passing のアルゴリズムを利用していた。文字列表現を用いるモデルは全て SMILES を入力としており、モデル構成は、事前学習を行った Encoder による潜在表現抽出からの転移学習形式、もしくは End-to-End 形式に大別された。予測対象は臨床で認められる毒性ではなく前臨床段階での毒性関連アッセイ結果が多数を占めたが、これはデータセットの充実度による差であると推定される。また発表年ごとの論文数(表 1)は年々増加していた。ChatGPT など大規模言語モデル公開の翌年である 2023 年以降に急激な増加が確認されることから、近年の深層学習

の普及が毒性予測モデル開発にも反映されていることが確認された。

一方、不均衡データに対する AUROC のみによる予測性能評価など、論文内での統計学上不適切な評価指標の利用や誤表記が目立った。

【総括】

本研究では深層学習を用いた毒性予測という研究領域の現状を論文サーベイから明らかにした。トレンドは比較的想定通りであった一方、現時点では信頼性の面で課題が見られ、深層学習モデルの適切なモデル開発、および性能評価に向けたリテラシー向上が肝要と考えられる。

○原川 ゆう¹，竹下 潤一^{1,2}，大岡 央¹，保坂 卓臣¹，志津 怜太¹，吉成 浩一¹

¹ 静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府 衛生分子毒性学講座

² 産業技術総合研究所 安全科学研究部門

【背景・目的】反復投与毒性 (repeated-dose toxicity, RDT) 試験は化学物質の安全性評価に重要である。近年、動物を用いない RDT 評価手法として、未評価物質の毒性を、物理化学的、生物学的、そして毒性学的に類似した物質の毒性情報から推定するリードアクロスに期待が寄せられている。しかし、RDT のような多様で複雑な毒性のリードアクロスにおいては、どのような生物学的、毒性学的データが予測に有用であるかが不明である。そこで、当研究室が保有する約 30 種のインビトロ試験データを用いて、RDT 評価におけるインビトロ試験の有用性を明らかにすること、また、RDT 予測に有用なインビトロ試験の種類を特定することを本研究の目的とした。

【方法】有害性評価支援システム統合プラットフォーム (製品評価技術基盤機構) から 326 物質の雄性ラット 28~42 日間 RDT 試験データを入手した。RDT 試験で認められた所見のうち、類似の所見をグループ化して肝毒性と関連する 6 種および血液毒性と関連する 2 種のグループエンドポイント (gEP) を定義した。グループ内のいずれかの所見で LOEL が報告されていた場合に該当 gEP を陽性として、各物質の各 gEP の有無を定義した。326 物質に対して、ラット薬物代謝酵素およびトランスポーター阻害試験、HepG2 細胞を用いた細胞毒性試験、ラット核内受容体活性化試験、ならびにラット薬物代謝酵素誘導試験を実施した。さらに、ハイコンテント解析によって細胞小器官や脂肪蓄積に関するデータを取得した。これら試験結果は陽性・陰性の 2 値に分類した。また、326 物質から、フェノール、第一級及び第二級芳香族アミン、芳香族エーテル、ニトロベンゼン、芳香族カルボン酸、多環芳香族炭化水素に該当する物質を選択し、7 種の構造類似物質グループ (サブグループ) を作成した。各物質について、インビトロ試験結果が陽性の場合、gEP 陽性と予測し、326 物質および各サブグループの感度、特異度および balanced accuracy (BA) を算出した。

【結果・考察】326 物質を用いた解析の結果、BA はいずれの gEP においても、どのインビトロ試験を用いた場合も 0.5~0.6 程度であった。すなわち、単一のインビトロ試験によって gEP の有無を高精度に評価するのは困難であった。この理由として、ある毒性エンドポイントについては、構造類似物質は類似の機序で毒性を発現すると考えられるが、解析に用いた 326 物質は構造的に多様であり、単一のエンドポイントでも多様な毒性機序によることが考えられた。そこで次に、構造が類似した物質群において、インビトロ試験によって gEP の有無を評価できるかを調べた。その結果、解析した 1624 の条件 (サブグループ-gEP-インビトロ試験の組み合わせ) のうち、54 種で 0.8 以上の高い BA が得られた。これらの条件には、ニトロベンゼン-肝肥大-CYP2B1 誘導、多環芳香族炭化水素-肝機能亢進-CYP1A2 阻害、芳香族エーテル-肝機能低下-細胞毒性、芳香族エーテル-血液凝固異常-PPAR α 活性化などが含まれ、これらの条件については、gEP とインビトロ試験の間に毒性学的な関連性が考えられた。以上の結果より、特定の部分構造を有する物質群の RDT エンドポイントの評価にインビトロ試験結果が有用であることが示唆された。本研究成果は、化学構造やインビトロ試験結果に基づくリードアクロスによる毒性予測への応用とともに、RDT の機序解明に寄与すると考えられる。