

称号及び氏名	博士（獣医学）	近藤 千晶
学位授与の日付	平成25年2月20日	
論文名	Studies on Toxicity Biomarker Research and Usability Validation Based on Toxicogenomic Technologies: Particular Reference to Drug-induced Nephrotoxicity and Myelosuppressive Anemia (トキシコゲノミクス手法を用いた毒性バイオマーカーの探索と有用性評価に関する研究：特に薬剤誘発性腎障害及び骨髄抑制性貧血について)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	松尾 三郎
	副査	小森 雅之
	副査	岡田 利也

論文要旨

序文

トキシコゲノミクスとは **toxicology** (毒性学) と **genomics** (ゲノム学) の合成語であり、薬剤が臓器・組織・細胞に及ぼす毒性や副作用を遺伝子レベルで解析する研究である。近年、トキシコゲノミクス手法を活用した毒性評価手法が著しく発展しており、迅速かつ効率的な毒性予測や毒性発現メカニズムの解明などの目的で広く活用されている。創薬の初期段階においては、こうしたトキシコゲノミクス手法を用いて得られる網羅的な情報の中から、毒性学的に意義のある情報を可能な限り多く抽出し、様々な毒性評価に活用することが重要である。

肝臓及び腎臓は、ほぼ全ての薬剤の代謝や排泄に関与する臓器であることから、医薬品による副作用の標的臓器となりやすい。そのため、新規の創薬において、薬剤誘発性の腎障害、肝障害を高感度に検出可能なバイオマーカーに対するニーズは非常に大きい。こうしたバイオマーカーを用いた効率的な医薬品候補化合物の毒性スクリーニング系を確立することは、より安全な化合物の創

出に繋がると期待される。

このような背景より、本研究では高感度に薬剤誘発性の障害を検出できる毒性バイオマーカーの探索及び、その有用性の研究を行った。まず第 1 章では、トキシコゲノミクス手法を用いて、ラット腎尿細管障害の診断や予測を可能とするバイオマーカー遺伝子の探索を行った。ラットの腎障害評価マーカーの報告は多数あるものの、いずれも特定の化合物や実験条件下での有用性が検証されているのみであり、様々な機序により起こる腎障害を広く検出できる汎用性の高いバイオマーカーは確立されていないのが現状であった。そこで、トキシコゲノミクスの大規模データベースを用い、種々の化合物によって誘発される腎障害を高感度に診断・予測できるマーカーを選抜した。第 2 章では、薬効評価動物として広く利用されているマウスの腎毒性を評価するマーカーの探索を行った。ファンギゾン投与により腎障害を誘発したマウス腎臓のマイクロアレイデータを取得し、マーカー候補遺伝子を選抜、複数の腎障害陽性・陰性化合物を用いて、選抜したマーカー候補遺伝子の妥当性の検証を行った。第 3 章では、ラットの肝臓において、骨髄抑制による貧血発症に関連して発現変動を示す貧血評価マーカー遺伝子を選抜を実施した。

第 1 章 ラットにおける薬剤誘発性腎障害の評価・予測マーカーの探索

第 1 節 薬剤誘発性腎尿細管障害の評価マーカーの探索

薬剤を反復投与したラットの腎臓の遺伝子発現データを用いて、病理組織学的検査や血液化学的検査といった既存の検査方法よりも高感度かつ鋭敏に腎臓の尿細管障害を診断可能な判別マーカーの探索を行った。マーカーの探索には反復投与時に尿細管に壊死、変性、再生のいずれかの病理組織学的変化が認められた 33 化合物と病理組織学的な変化が認められなかった 8 化合物のマイクロアレイデータを使用した。構築した尿細管障害の診断マーカーは、92 遺伝子の組み合わせにより、感度 90%、特異度 90%の高い予測性を示した。選抜した遺伝子には炎症、再生、細胞死に関連した機能を持つものが含まれており、病理組織学的な変化との関連性が示された。また、病理組織学的変化が現れるより早い時点でも尿細管障害陽性の判定が可能であること、文献情報では腎障害陽性であるものの本試験においては病理組織学的な変化が認められなかった化合物においても、10 化合物中 5 化合物で尿細管障害陽性の判定が可能であったことより、病理組織学的検査より高感度に腎障害を検出できることが示された。

第 2 節 薬剤誘発性腎尿細管障害の予測マーカーの探索

薬剤を単回投与したラットの腎臓の遺伝子発現データを用いて、反復投与時の尿細管障害の有無を予測可能とする判別マーカーの探索を行った。マーカーの探索には反復投与時に尿細管に壊死、変性、再生のいずれかの病理組織学的な変化が認められた 33 化合物と病理組織学的な変化が認められなかった 8 化合物の単回投与時のマイクロアレイデータを使用した。尿細管障害の予測マーカーは、19 遺伝子の組み合わせにより感度 93%、特異度 90%と高い予測性を示した。選抜した遺伝子には DNA 複製、細胞周期、アポトーシス、酸化ストレスなどに関連した機能を持つものが含まれており、これらは尿細管障害発生後、早期の生体応答遺伝子として生物学的にも妥当なものであった。既知の腎尿細管障害マーカーを用いて早期毒性予測を行った結果、いずれのマーカーも単体では予測精度が低く、今回構築した複数のマーカーを組み合わせたモデルが最も優れた予測精度を示したことから、トキシコゲノミクスアプローチによる判別の有用性が示された。

第 2 章 マウスにおける薬剤誘発性腎障害の評価マーカーの探索

創薬の初期段階においては、薬効評価モデルとしてマウスが用いられることが多いが、毒性のバイオマーカー遺伝子に関する情報はラットに関するものがほとんどであり、マウスに関して利用できる情報は限られている。そこで、本研究ではマウスにおける腎毒性マーカー候補遺伝子の探索を行い、その有用性を検証した。

マウスに腎障害を誘発することが知られている抗真菌薬であるファンギゾン（注射用アムホテリシン B）を 4 mg/kg で単回静脈内投与し、腎障害を発症させ、採取した腎臓の網羅的遺伝子発現解析を実施した。対照群との比較により、有意に発現変動を示す 14 遺伝子を選抜した。さらに、腎障害陽性及び陰性の計 9 化合物を用いて、リアルタイム RT-PCR により選抜したマーカーの有用性を検証した。その結果、**kidney injury molecule 1 (Kim1)**, **tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1)**, **lipocalin 2 (Lcn2)**, **secreted phosphoprotein 1 (Spp1)** の 4 遺伝子は評価した全ての腎障害陽性化合物に対して高い発現上昇を示した。血液化学的検査においてクレアチニン、尿素窒素の上昇が認められない場合にも遺伝子の発現上昇が認められ、より鋭敏に腎障害を検出可能であることが示された。更にこれらの遺伝子はファンギゾンの反復投与時にも高い発現上昇を示し、単回投与時の早期の腎障害から反復投与時の腎障害まで、幅

広く検出可能であることが示された。

第3章 ラットにおける骨髄抑制性貧血の評価マーカーの探索

様々な化合物を投与した際の遺伝子発現情報が蓄積されているラットの肝臓を用いて、骨髄抑制による貧血が評価可能かを検討した。まず種々の骨髄抑制物質に共通して、貧血発現時に **hemoglobin beta chain complex (*Hbb*)**, **aminolevulinic acid synthase 2 (*Alas2*)** 及び **cell division cycle 25 homolog B (*Cdc25b*)** の3遺伝子が肝臓で顕著に発現低下することを見出した。これらの遺伝子の発現は、肝臓を採取する前に肝臓中に含まれる血液を灌流することで顕著に低下したことから、肝臓中に含まれる血球成分に由来するものであることが判明した。また、*in vitro* で赤白血病細胞株の赤血球分化に伴い *Hbb* 及び *Alas2* 遺伝子の発現誘導が確認されたことから、肝臓において骨髄抑制時に認められたこれらの遺伝子の発現変動は、分化過程の赤血球に由来するものであると明らかになった。以上より、肝臓の網羅的遺伝子発現情報には、臓器中に含まれる血球成分由来の遺伝子発現変動も反映されることが明らかになり、これらの遺伝子の発現変動を毒性マーカーとして活用することで、骨髄抑制による貧血を評価できることが明らかになった。

結論

1. 腎障害陽性化合物 (33 化合物), 腎障害陰性・肝障害陽性化合物 (8 化合物) の反復投与試験のデータから, 92 遺伝子の組み合わせによる感度 90%, 特異度 90%となる高い感度を持つラットの尿細管障害診断の判別モデルが構築できた。
2. 腎障害陽性化合物 (33 化合物), 腎障害陰性・肝障害陽性化合物 (8 化合物) の単回投与試験のデータから, 19 遺伝子の組み合わせによる感度 93%, 特異度 90%となる優れたラットの腎尿細管障害の予測モデルが構築できた。
3. 構築した診断モデルには炎症, 再生, 細胞死に関連した遺伝子が含まれており, 病理所見との関連性が示された。一方, 予測モデルには DNA 複製, 細胞周期, アポトーシス, 酸化ストレスに関連した遺伝子が含まれており, 尿細管障害発生後の早期の生体応答遺伝子として生物学的に妥当であることが示された。
4. 既知の腎尿細管障害マーカーを用いた早期毒性予測を行った結果, いずれの

マーカーも単体では予測精度が低いことが分かり、複数のマーカーを組み合わせて構築したモデルの有用性が示された。

5. 構築したモデルは病理組織検査や血液化学的検査よりも高感度かつ鋭敏に腎臓の尿細管障害の有無を診断・予測可能であることが示された。
6. *Kim1*, *Lcn2*, *Timp1*, *Spp1* の 4 遺伝子はマウスにおける腎障害評価マーカーとして有用であり、単回投与の早い段階で生じる腎障害から回復した状態での腎障害まで、幅広く検出が可能であることが示された。
7. *Hbb*, *Alas2*, *Cdc25b* の 3 遺伝子は、種々の骨髄抑制物質に共通して、貧血発現時に有意に発現低下を示し、これらの遺伝子の発現変動を毒性マーカーとして活用することで、骨髄抑制による貧血を評価できることが明らかになった。
8. 選抜したマーカー遺伝子はいずれも有用性が高く、より効率的で正確な安全性評価が可能となることが示された。

審査結果の要旨

トキシコゲノミクスとは、薬剤が臓器・組織・細胞に及ぼす毒性や副作用を遺伝子レベルで網羅的に解析する研究である。近年、この手法を用いた毒性評価手法が劇的に発展しており、迅速かつ効率的な毒性予測や毒性発現メカニズムの解明などに活用され始めている。肝臓及び腎臓は、ほぼ全ての薬剤の代謝や排泄に関与する臓器であることから、医薬品による副作用の標的臓器となりやすい。そのため、新規の創薬において、薬剤誘発性の肝・腎障害を高感度に検出可能なマーカー遺伝子の探索は重要である。本研究では、このような臓器における薬剤誘発性の障害を高感度に検出できる毒性バイオマーカーの構築及び、その有用性を検証することを目的とした。

第1章第1節では、薬剤を反復投与したラットの腎臓での網羅的な遺伝子発現データを用いて、尿細管障害が診断可能な判別マーカーの探索を行った。その結果、感度 90%、特異度 90%の高い予測性を示す尿細管障害の診断モデルを得た。選抜した遺伝子には炎症、再生、細胞死に関連する機能を持つものが含まれており、病理組織学的な変化との関連性が示された。また、検証の結果、病理組織学的検査や血液

生化学的検査などの既存の検査方法よりも高感度かつ鋭敏に尿細管障害の程度を診断できる遺伝子マーカーであることを見出した。第2節では、薬剤を単回投与したラットの腎臓での遺伝子発現データを用いて、反復投与時の尿細管障害の有無を予測可能とする判別マーカー遺伝子の探索を行った。その結果、感度 93%、特異度 90% の高い予測性を示す腎尿細管障害の予測モデルを得た。選抜した遺伝子には DNA 複製、細胞周期、アポトーシス、酸化ストレスなどに関連した機能を持つものが含まれており、これらは尿細管障害後、早期の生体応答遺伝子として生物学的にも妥当なものと考えられた。既知の尿細管障害マーカーを用いて早期毒性予測を行った結果、いずれのマーカーも単体では予測精度が低く、今回構築した複数のマーカーを組み合わせた遺伝子モデルが最も優れた予測精度を示したことから、このモデルのトキシコゲノミクスアプローチによる判別の有用性が示された。

第2章では、マウスに腎障害を誘発することが知られている抗真菌薬であるファンギゾン[®]を単回静脈内投与し、腎臓での網羅的遺伝子発現を解析した。まず、第1章で見出した有意に発現変動を示す 14 遺伝子をマーカー候補として選抜し、腎障害陽性及び陰性の計 9 化合物を用いて選抜したマーカーの有用性を検証した。その結果、**kidney injury molecule 1 (Kim1)**, **tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1)**, **lipocalin 2 (Lcn2)**, **secreted phosphoprotein 1 (Spp1)** の 4 遺伝子が、評価した全ての腎障害陽性化合物に対して高い発現上昇を示した。この 4 つの遺伝子の組み合わせは、既存の腎障害マーカーであるクレアチニンや尿素窒素の上昇が認められない場合にも顕著な発現上昇を示し、既存のマーカーより鋭敏に腎障害を検出できるモデルであることが示された。

第3章では、第1章と2章と同様の解析法を用いて、種々の骨髄抑制物質をラットに投与し、肝臓における貧血関連遺伝子を解析した。その結果、**hemoglobin beta chain complex (Hbb)**, **aminolevulinic acid synthase 2 (Alas2)** 及び **cell division cycle 25 homolog B (Cdc25b)** の 3 遺伝子が顕著に発現低下することを見出した。これらの遺伝子発現は、肝臓中に含まれる血液を灌流することで低下したことから、肝臓中に含まれる血球成分に由来する変化であることが示された。また、*in vitro* で、赤白血病細胞株の赤血球分化に伴い **Hbb** 及び **Alas2** 遺伝子の発現誘導が確認されたことから、骨髄抑制時に肝臓において認められたこれらの遺伝子の発現変動は、分化過程の赤血球に由来することが分かった。これらはモデル遺伝子として、血液成分が含まれる肝臓において、骨髄抑制による貧血を評価できるマーカーとなることが示された。

以上のように本研究は、トキシコゲノミクス手法を用いて、肝臓や腎臓の薬剤誘発性の軽微な変化を迅速かつ効率的に検出する遺伝子モデルを構築する成果を提示し、かつそのようなマーカー遺伝子は、新規の創薬の安全性試験での有用性・応用性が

高く, よって, より安全な化合物の創出に繋がることが期待される. この研究成果は, 医学・獣医学・薬学の発展, とりわけ毒性学や毒性病理学の新たな展開に資すると判断する. よって, 本論文の審査並びに学力確認の結果と併せて, 博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める.