

称号及び氏名 博士（獣医学） 西村 陽子（森 陽子）

学位授与の日付 平成27年2月20日

論文名 **Studies on Establishment of Cardiotoxicity Biomarkers in Rats
Based on Toxicogenomic Technologies**

（トキシコゲノミクス手法を用いたラットにおける心筋毒性バイオ
マーカーの構築に関する研究）

論文審査委員 主査 山手 丈至
副査 久保 喜平
副査 竹内 正吉
副査 小森 雅之

論文要旨

【はじめに】

医薬品による有害事象の回避は製薬企業の使命であり、そのためには前臨床安全性試験において開発候補化合物の毒性プロファイルを把握し、より安全性の高い化合物を選抜する必要がある。また早期における毒性検出は開発に費やす費用及びタスクの削減に繋がるため、毒性を高感度かつ早期に検出できるバイオマーカーの必要性は高い。心筋毒性は生命維持に直結する臓器における毒性であるため、医薬品開発に与える影響は大きい。現在の前臨床安全性試験における心筋毒性評価は、通常病理組織学的検査及び血液マーカー測定（**aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, creatine kinase**）により行われるが、感度及び臓器特異性の点から十分とは言えない状況である。近年、従来の血液マーカーより優れた血液マーカーとして心筋トロポニンが用いられることがあるが、クリアランスが早いことから持続的に安定した変化を捉えにくい。

このような背景より、本研究ではラットにおける心筋毒性バイオマーカーをトキシコゲノミクス手法により探索した。

【第 1 章】化合物誘発性ラット心筋毒性マーカー遺伝子候補の選抜

毒性標的臓器における遺伝子の発現変動は明らかな毒性発現に先行して起こることが予想され、心筋組織を用いた **mRNA** マーカーは感度及び予測性に優れることが期待される。早期の前臨床試験においては様々な毒性メカニズムを有する化合物を扱うことから、第 1 章では汎用性の高い遺伝子マーカーの探索を目的に、3 つの心筋毒性陽性化合物 (**isoproterenol**, **doxorubicin**, **carbofuran**) を用いて、共通して発現変動を示す遺伝子の選抜を試みた。

ラットに **isoproterenol**, **doxorubicin** (低用量及び高用量群を設定)、または **carbofuran** を単回投与後、8 及び 24 時間に心臓を採材し、病理組織学的検査及びマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。**Isoproterenol** 及び **carbofuran** 投与群においては投与後 8 及び 24 時間において軽度な心筋の壊死および炎症細胞浸潤が見られた。一方、**doxorubicin** 投与群においては高用量群において間質の軽度な水腫が投与後 24 時間に見られたのみであり、低用量群に変化は見られなかった。マイクロアレイ解析の結果、3 化合物に共通して 2 倍以上発現上昇する 33 遺伝子 (36 プローブ) を選抜した。心臓に病理組織学的変化が見られなかった **doxorubicin** 低用量群においても多くの遺伝子が発現上昇を示したことから、これらの遺伝子は高感度なマーカーとして期待できると考えられた。

【第 2 章】化合物誘発性ラット心筋毒性遺伝子組み合わせマーカーの構築

前臨床試験において開発候補化合物を効率良くスクリーニングするためには、より少ない遺伝子セットの使用が望ましいことから、第 2 章では遺伝子組み合わせマーカーの構築を試みた。第 1 章において選抜した 33 遺伝子から、機能的に有望であると考えられる 8 遺伝子 (**Spp1**, **Fhl1**, **Timp1**, **Serpine1**, **Bcat1**, **Lmcd1**, **Rnd1**, **Tgfb2**) に注目した。信頼性の高いマーカーを構築するため、多くの心筋毒性陽性化合物 (8 化合物) または心筋毒性陰性化合物 (14 化合物) をラットに単回投与し、投与後 8 及び 24 時間における 8 遺伝子の心臓における発現を **real-time RT-PCR** で確認した。**Receiver Operating Characteristic analysis** (ROC 解析) により 8 遺伝子をその診断精度から順位付けし、高い診断精度を示した遺伝子を用い **Support Vector Machine** による最適な遺伝子組み合わせマーカー (**Spp1** 及び **Timp1** から成る) を構築した。**Spp1** 及び **Timp1** は、心筋毒性陽性化合物を投与後、心筋における病理組織学的変化を伴わないサンプルにおいても高い診断精度を示した。また遺伝子組み合わせモデルを既存の心筋毒性マーカーである心筋トロポニン I (**cTnI**) と比較したところ、遺伝子組み合わせマーカーの診断精度は **cTnI** に勝った。遺伝子組み合わせモデルの予測性を確認する目的で、ラットに **doxorubicin** を単回または 7 日間反復投与し、心筋組織における **Spp1** 及び **Timp1** の発現を **real-time RT-PCR** により確認し、構築した遺伝子組み合わせマーカーにあてはめた。その結果、単回投与時のデータは心筋毒性陰性と判定されたが、7 日間反復投与時のデータは心筋毒性陽性と判定された。一方、心臓の病理組織学的検査及び **cTnI** 測定では 7 日間反復投与後においても心筋毒性を捉えられなかった。

以上の結果から、構築した遺伝子組み合わせマーカーは、診断精度及び予測性において既存の検査法に勝るマーカーであると考えられた。

【第3章】化合物誘発性ラット心筋毒性血漿 miRNA マーカーの探索

医薬品開発においては、動物及びヒトに共通して使用可能なバイオマーカーを用い、前臨床試験、臨床試験、市販後を通じた医薬品の毒性のモニタリングは重要である。第3章ではヒトへの応用を考慮し、近年血漿マーカーとして注目されている miRNA マーカーの探索を行った。

心筋細胞において合成された miRNA は心筋障害時に細胞内から血液中に漏出すると考えられ、心筋特異的に高発現する miRNA は血漿マーカーとして有望である。まず、正常ラットにおける網羅的な器官・臓器における miRNA マイクロアレイデータを解析し、心筋特異的に高発現する miR-208、次点候補として心筋及び骨格筋特異的に高発現する miR-1, miR-133a, miR-133b を選抜した。さらに心筋毒性と骨格筋毒性の切り分けの観点から、骨格筋特異的に高発現する miR-206 を選抜した。

選抜した miRNA の有用性を確認するため、ラットに isoproterenol または doxorubicin を単回投与後、2, 4, 8, 24 時間に経時的に採血し、血漿中の miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208 を測定した。また同じ時点において血漿中の心筋トロポニン (cTnI, cTnT) 及び骨格筋トロポニン (sTnI) を測定した。投与後 24 時間の採血後に心臓及び骨格筋を採材し病理組織学的検査を行った。Isoproterenol 投与により心筋の壊死、炎症細胞浸潤、間質の水腫に加え、心筋トロポニンの上昇が主に投与後 2~8 時間に見られた。5 つの miRNA のうち、miR-208 は isoproterenol 投与後 2~24 時間において持続的な高い上昇を示した。他 4 つの miRNA については、miR-133b が投与後 8 時間に一過性的な上昇を示したのみであった。一方、doxorubicin 投与により miR-208 の上昇は見られなかったが、心臓における組織学的変化及び cTnI 及び cTnT の上昇も認められず、本試験条件下においては doxorubicin 投与により心筋障害は惹起されなかったと考えられた。さらに、慢性病変における miR-208 の有用性を確認するため、ラットに isoproterenol を 7 日間反復投与し、血漿中及び心筋組織における miR-208 の発現を確認した。血漿 miR-208 は投与後 1 日、3 日、7 日において持続的な上昇を示す一方で、心筋組織における miR-208 の発現は変動しなかった。これより血漿における持続的な上昇にはクリアランスが関連していると考えられた。

以上の結果から、miR-208 は持続的な変化を示す点で心筋トロポニンより優れたマーカーであると考えられた。ヒトの心筋障害における血中 miR-208 の上昇も報告されていることから、miR-208 は将来動物及びヒトに共通して使用可能なバイオマーカーになる可能性がある。

【まとめ】

本研究は、医薬品開発における前臨床試験で用いるラットの心筋毒性バイオマーカーの探索を目的に実施した。得られた成果は以下にまとめられる。

1. 3 つの心筋毒性陽性化合物 (isoproterenol, doxorubicin, carbofuran) に共通し、心筋組織において発現上昇する 33 遺伝子を選抜した。これらは汎用性の高い心筋毒性マーカー遺伝子候補として有望であることが示された。

2. 遺伝子の機能及び、多くの心筋毒性陽性及び陰性化合物を用いた検証から、**33** 遺伝子からさらに遺伝子を選抜し、*Spp1* 及び *Timp1* から成る遺伝子組み合わせモデルを構築した。ROC 解析の結果から、遺伝子組み合わせモデルは **cTnI** より高い診断精度を示した。
3. **doxorubicin** の反復投与条件下において、遺伝子組み合わせモデルは病理組織学的変化及び **cTnI** の上昇に先行して心筋毒性を捉え、予測性の高いマーカーであることが示された。
4. 血漿 **miR-208** は **isoproterenol** による心筋障害時に上昇し、その変化は **cTnI** 及び **cTnT** と比較し持続的であったことから、安定した検出が望める高感度なマーカーであると考えられた。また反復投与による慢性病変においても持続的な上昇を示した。

本研究成果は、前臨床安全性試験において有用なラット心筋毒性バイオマーカーを提示するものである。これらの新規マーカーの前臨床試験への導入は効率的な安全性評価に繋がる。また、血漿 **miR-208** はヒトの心筋障害時の上昇も報告されていることから、将来動物及びヒトに共通して使用可能なマーカーになり得る。

審査結果の要旨

医薬品による有害事象の回避は製薬企業の使命であり、そのためには前臨床安全性試験において、より安全性の高い化合物を選抜する必要がある。また早期における毒性検出は開発に費やす費用及びタスクの削減に繋がるため、毒性を高感度かつ早期に検出できるバイオマーカーの必要性は高い。心筋毒性は生命維持に直結する臓器における毒性であるため、医薬品開発に与える影響は大きい。現在の前臨床安全性試験における心筋毒性評価は、通常病理組織学的検査及び血液マーカー測定により行われるが、感度及び臓器特異性の点から十分とは言えない。このような背景より、本研究ではラットにおける心筋毒性バイオマーカーをトキシコゲノミクス手法により探索した。

第 1 章では、汎用性の高い遺伝子マーカーの探索を目的に、**3** つの心筋毒性陽性化合物 (**isoproterenol**, **doxorubicin**, **carbofuran**) を用い、共通して発現変動を示す遺伝子を選抜を試みた。ラットに **isoproterenol**, **doxorubicin** (低用量及び高用量群を設定)、または **carbofuran** を単回投与後 **8** 及び **24** 時間に心臓を採材し、病理組織学的検査及びマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイ解析の結果、**3** 化合物に共通して **2** 倍以上発現上昇を示す **33** 遺伝子 (**36** プローブ) を選抜した。心臓に病理組織学的変化が見られなかった **doxorubicin** 低用量投与時のサンプルにおいても多くの遺伝子が発現上昇を示したことから、これらの遺伝子は高感度なマーカーになり得ることを明らかにした。

第 2 章では、第 1 章において選抜した **33** 遺伝子から機能的に有望であると考えられる **8** 遺伝子 (*Spp1*, *Fhl1*, *Timp1*, *Serpine1*, *Bcat1*, *Lmcd1*, *Rnd1*, *Tgfb2*) を選抜し、遺伝子組み

合わせマーカーの構築を試みた。信頼性の高いマーカーを構築するため、多くの心筋毒性陽性化合物（8 化合物）または心筋毒性陰性化合物（14 化合物）をラットに単回投与し、投与後 8 及び 24 時間における 8 遺伝子の心臓における発現を **real-time RT-PCR** で確認した。**Receiver Operating Characteristic analysis (ROC 解析)** により 8 遺伝子の診断精度を順位付けし、高い診断精度を示した遺伝子を用い **Support Vector Machine** による遺伝子組み合わせマーカー (*Spp1* 及び *Timp1* から成る) を構築した。*Spp1* 及び *Timp1* は心筋における病理組織学的変化を伴わないサンプルにおいても高い診断精度を示した。またその診断精度を血漿心筋トロポニン (**cTnI**) と比較した結果、遺伝子組み合わせマーカーの診断精度は **cTnI** に勝った。さらに遺伝子組み合わせマーカーの予測性を **doxorubicin** 反復投与モデルにて確認した結果、病理検査及び **cTnI** 測定において心筋毒性が検出されない時点において、遺伝子組み合わせマーカーは心筋毒性陽性判定を示し、診断精度及び予測性において既存の検査法に勝るマーカーであることを示した。

第 3 章では、ヒトへの応用を考慮し血漿 **mi RNA** マーカーの探索を行った。正常ラットにおける網羅的 **mi RNA** マイクロアレイデータを解析し、心筋特異的に高発現する **mi R-208** を選抜した。**mi R-208** の有用性を確認するため、ラットに **isoproterenol** 単回投与後経時的に採血し、血漿中の **mi R-208** を測定した。さらに血漿心筋トロポニン (**cTnI**、**cTnT**) 測定及び心臓の病理組織学的検査を行った。**Isoproterenol** 投与により、心筋の病理組織学的変化に加え、**cTnI** 及び **cTnT** の上昇が主に投与後の早い時点で見られた。一方、**mi R-208** は **isoproterenol** 投与後 24 時間まで持続的な高い上昇を示し、安定した検出が望めるマーカーであることが示された。さらに **isoproterenol** 反復投与モデルを用い血漿及び心筋 **mi R-208** の推移を解析した結果、血漿 **mi R-208** は投与後 7 日まで持続的な上昇を示し、前臨床試験で用いられる反復投与条件下においても利用可能なマーカーであることが示された。血漿 **mi R-208** はヒトの心筋障害時の上昇も報告されていることから、動物及びヒトに共通して使用可能なマーカーになり得ることを示している。

本研究成果は、前臨床安全性試験において有用なラット心筋毒性バイオマーカーを提示するものである。これらの新規マーカーの前臨床試験への導入は効率的な安全性評価及び有害事象の回避に繋がると考えられる。この研究成果は、医学・獣医学の発展、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。