

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	医薬品の非臨床試験における γ -H2AX の免疫組織化学染色を用いた <i>in vivo</i> 遺伝毒性早期検出法に関する研究開発
代表機関名	国立医薬品食品衛生研究所
職名	部長
研究開発代表者名	小川 久美子
全研究開発期間	平成 30 年度～令和 2 年度

1. 研究開発成果

【研究の背景と目的】

医薬品開発においては、数多くのシーズの中から、許容できない毒性を示すことのない有効な候補物質を早期に峻別し、臨床試験に繋げていくことが重要である。中でも、発がん性は十分な検討が求められる毒性の一つであり、長期間投与が適用となる低分子化合物については、げっ歯類を用いた 2 年間反復投与試験による検討が求められている。一方、研究開発代表者が参加している医薬品規制調和国際会議(ICH)S1 ガイドラインに関する専門家会合では、「特定の条件下では、ラット 2 年間がん原性試験を実施することなく、がん原性の評価が可能である」との仮説に基づいた改定が検討されているが、「発がん性の懸念がない」との根拠となる weight of evidence をより堅牢にする必要がある。そこで、効率的な発がん性評価及び開発期間の短縮化に資する、医薬品開発初期に実施される比較的短期間投与による非臨床試験に適用可能な、新規パラメーターを用いた評価手法の開発が必要と考えられた。

γ -H2AX は、多くの種間で共通しているリン酸化ヒストンタンパク質の一つであり、DNA 損傷の鋭敏なマーカーとしても知られている。研究開発代表者及び研究開発分担者のグループでは、膀胱を標的とした発がん性評価において、65 化合物の 28 日間反復投与毒性試験のラット膀胱粘膜を用いた γ -H2AX を指標とした免疫組織化学染色法による解析では、感度 82.9% (29/35)、特異度 100% (30/30)で膀胱発がん性を検出可能であることを示してきた。

本研究では、げっ歯類の化学発がんにおいて、約半数の発がん物質の標的臓器である肝臓及び、主要臓器の一つである腎臓をターゲットとして、 γ -H2AX 等の免疫組織化学染色によって発がん性及び遺伝毒性の検出を短期間で可能とする、新規 *in vivo* 遺伝毒性・発がん性評価法の開発を目的とした。

【研究方法と結果1:肝臓における検討】

初年度は、被験物質の肝臓に対する発がん性を評価するための最適な投与期間設定を目的とし、それぞれの臓器を発がん標的とした被験物質について、以下の検討を行った。6 週齢の雄 F344 ラット(5 匹/時点/群)に遺伝毒性機序による肝発がん物質(*N*-nitrosodiethylamine (DEN)、

3,3 -dimethylbenzidine (DMB)、4,4 -oxydianiline (ODA))、非遺伝毒性機序による肝発がん物質(di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、1,4-dioxane (DO))、肝臓を標的としない遺伝毒性発がん物質(*N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU))を発がん用量以上で経口投与し、投与期間 1 日、2 日、7 日及び 14 日の肝臓における γ -H2AX 陽性細胞率を免疫組織化学的に解析した。その結果、 γ -H2AX の陽性細胞率は、一部の肝発がん物質を投与した群においては増加が見られたが、増加が見られない場合もあり、より高値を示す至適投与期間にもばらつきがみられた。そこで他の試験への組み込みが可能であるという点も考慮して、投与期間は 28 日間が最適と判断したが、追加の被験物質についても検討が必要との結論に至った。

次年度は更に 5 種類の肝発がん物質 (2-nitropropane (2-NP)、*N*-bis(hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)、*N*-nitrosomorpholine (NMOR)、*p*-cresidine (*p*-Cre)、*o*-aminoazotoluene (AAT)) を 28 日間投与したラット肝臓標本 (5 匹/群) を用いて追加の検討を実施したところ、 γ -H2AX 陽性細胞率の有意な増加が見られたのは 5 物質中 3 物質 (60%) であった。以上の結果から、肝臓においては γ -H2AX 陽性率の増加のみを指標とした場合の発がん物質の検出感度は十分ではないことが示唆された。 γ -H2AX が強く誘導される DNA 二重鎖切断に至るためには多くの場合 DNA 複製を経る必要があることから、細胞増殖誘導状態を解析するため Ki-67 の陽性細胞率を検討したところ、肝臓における γ -H2AX 陽性細胞率と Ki-67 陽性細胞率の間には、正の相関が見られ、細胞増殖が誘導されない発がん物質は γ -H2AX が指標となりにくいことが示唆され、他のマーカーが必要と考えられた。

最終年度は、肝細胞増殖促進作用の低い肝発がん物質を投与したラット肝臓において γ -H2AX を補完するマーカーとなる因子の探索を行った。先行研究の膀胱においては、ケラチン 14、ALDH1A1、CD44 等の膀胱上皮の幹細胞マーカーが γ -H2AX を補完するマーカーとして有効であることが示されたため、肝細胞の幹細胞マーカーと考えられている CD13 (アミノペプチダーゼ N) および Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) について検討した。その結果、Ki-67 陽性肝細胞率の有意な低下が見られた AAT 群において、CD13 を細胞質に発現する肝細胞、および EpCAM を細胞膜に発現する肝細胞の増加が見られた。肝細胞の陽性率に基づくスコアリングを行ったところ、これらの因子を発現する肝細胞は DMB、2-NP、thioacetamide (TAA) および NMOR 群においても有意な増加を示し、EpCAM 発現肝細胞はそれらに加えて DHPN、*p*-Cre、DEHP 群でも有意な増加が見られた。一方、肝臓を標的としない発がん物質である 4-chloro-*o*-phenyldiamine (COP)、ENU 群では CD13 および EpCAM 陽性肝細胞ともに増加は見られず、さらに肝障害性非発がん物質であるアセトアミノフェン群でも CD13 および EpCAM 陽性肝細胞の増加は見られなかった。CD13 と EpCAM の結果を比較すると、EpCAM ではより多くの肝発がん物質で陽性となり、視野による偏りが少ないことから、マーカーとしてより適切であると考えられた。そこで判定規準を γ -H2AX または EpCAM のいずれかでの有意な増加が見られた物質を陽性と定義すると、今回検討した 10 種類の肝発がん物質の陽性率は 100% (10/10) であり、偽陽性となる非肝発がん物質は見られなかった (0/3)。

【研究方法と結果2:腎臓における検討】

初年度は、被験物質の腎臓に対する発がん性を評価するための最適な投与期間設定を目的とし、それぞれの臓器を発がん標的とした被験物質について、以下の検討を行った。6週齢の雄F344ラット(5匹/時点/群)に遺伝毒性機序による腎発がん物質(tris(2,3-dibromopropyl)phosphate (TBPP), *N*-nitrosomorpholine (NMOR), potassium bromate (KBrO₃), benzo[*a*]pyrene (BAP))及び非遺伝毒性機序による腎発がん物質(*d*-limonene (LIM))を発がん用量以上で経口投与し、投与期間1日、2日、7日及び14日の腎尿細管上皮細胞におけるγ-H2AX陽性細胞率を免疫組織化学的に解析した。定量解析の方法として、右腎横断面から皮質・髓質外帯外層の特定部位を4か所ずつx400倍にて撮影し、腎尿細管上皮細胞(合計1000個以上)中のγ-H2AX陽性細胞の割合を計測した。その結果、各投与群でのγ-H2AX陽性率(%±SD)は経時的に増加し、14日目にはLIM投与群を含めいずれの群においても有意な増加を示した。以上の結果から、γ-H2AXを指標とした評価は投与開始後14日以降が適切と考えられ、医薬品・化学物質の安全性評価において一般的に実施される28日間反復投与毒性試験への組み込みが妥当と判断された。

次年度は、γ-H2AX形成の用量相関性について検証を行った。6週齢、雄のF344ラット(5匹/群)に0, 0.015, 0.03, 0.06% TBPPを28日間混餌投与した結果、髓質外帯外層におけるγ-H2AX陽性率はそれぞれ0.8±1.0, 11.9±4.0, 37.5±11.4, 68.3±15.5であった。また、0, 300, 600, 1200 mg/kg体重/日LIMを28日間強制経口投与群とした結果、皮質におけるγ-H2AX陽性率はそれぞれ0.4±0.8, 6.2±2.9, 12.8±3.0, 20.5±6.8であった。以上の結果から、腎発がん物質によって誘導されるγ-H2AX形成は、明瞭な用量相関性を示すことが明らかとなった。

最終年度は、腎発がん物質4種(2-nitrofluorene (2-NF), chlorothalonil (CTN), aristolochic acid I (AAI), ochratoxin A (OTA))を追加の被験物質として、雄のF344ラット(5匹/群)に28日間経口投与し、γ-H2AXを指標とした腎発がん物質検出法の妥当性を検証した。その結果、CTNを除く3種の腎発がん物質は、γ-H2AX陽性細胞率の有意な増加を誘導した。これまでに検討した16物質の結果を総合すると、腎発がん物質9種中8物質がγ-H2AX形成の増加を誘導したのに対し(感度88.9%)、腎臓を標的としない発がん物質7種(2-Acetylaminofluorene (2-AAF), glycidol, *N*-nitrosodiethylamine (DEN), acrylamide, *p*-cresidine, chlorendic acid (CRA), clofibrate (CFB))を投与した群では、いずれも対照群と同じレベルにとどまった(特異度100%)。以上より、腎発がん物質早期検出指標として、γ-H2AX免疫染色が有用であることが示唆された。

【考察】

γ-H2AXは、多くの種間で共通しているリン酸化ヒストンタンパク質の一つであり、DNA損傷の鋭敏なマーカーとして知られている。これまでの報告からは、臓器や細胞種に依存せず、高度のDNA損傷時には形成される可能性が高いと考えられる。また、非遺伝毒性機序による傷害が原因であっても細胞増殖が著しく亢進し、リプリケーションエラーが誘導される場合にはγ-H2AXが形成される可能性がある。一方で、本研究において肝臓で認められた現象のように、細胞増殖が誘

導されにくい発がん物質に暴露された場合は γ -H2AX 形成が誘導されない可能性がある。発がん機序は多様であり、機序によらず発がん性を検出するには、単一のマーカーで評価することはむしろ現実的ではないと考えられる。先行研究の膀胱に続き、今回の肝臓の検討においても、 γ -H2AX の形成亢進に幹細胞マーカー発現亢進を補完的に組み合わせた解析によって、高感度に臓器特異的な発がん性を評価しうることが示唆された。今後、更に感度と共に特異度の検証を行い、本評価方法の有用性を示す事ができれば、短期間で発がん性の評価が可能な評価法として医薬品開発の迅速化に貢献できると期待される。

【結論】

腎尿細管上皮の発がん性検出法として、被験物質を 1 群 5 匹のラットに 28 日間反復投与した検体を用いた免疫組織化学染色による γ -H2AX 形成の増加を検討したところ、感度 88.9% (8/9)、特異度 100% (7/7) と高感度に腎発がん物質を検出することが可能であった。この γ -H2AX 形成は、被験物質投与量との用量相関性も観察された。また、肝臓では、 γ -H2AX 形成の増加のみを指標とした場合は十分な検出感度が得られなかったが、肝細胞の幹細胞マーカーとして知られる EpiCAM の発現亢進を指標として組み合わせることにより、100% (10/10) の感度で肝発がん物質を検出することが可能であった。以上の結果より、28 日間反復投与毒性試験の病理検体を用いて、 γ -H2AX 形成亢進と幹細胞マーカーを組み合わせた免疫組織化学染色による評価を加えることによって、肝臓及び腎臓の発がん性を短期間で高感度に検出できる可能性が示された。

In drug development, it is important to identify effective candidate substances that do not show unacceptable toxicity from a large number of seeds at an early stage and introduce them into clinical trials. Among all kinds of toxicity, carcinogenicity is one of the biggest concern and that require sufficient examination including 2 years rat carcinogenicity study.

It is considered necessary to develop an evaluation method using new parameters that can be applied to non-clinical studies of relatively short-term administration conducted in the early stage of drug development, which contributes to efficient carcinogenicity evaluation and shortening of development period.

γ -H2AX is one of the phosphorylated histone proteins common to many species and is also known as a sensitive marker of DNA damage. Our group has been evaluating that immunohistochemical staining using anti- γ -H2AX antibody as a possible index of carcinogenic potential on rat bladder mucosa in a 28-day repeated-dose study of 65 compounds. The outcomes have shown that bladder carcinogenicity can be detected with a sensitivity of 82.9% (29/35) and a specificity of 100% (30/30).

In this study, the liver, which is the target organ of about half of the rodent chemical carcinogens, and the kidney, which is one of the main organs, are targeted by immunohistochemical staining for γ -H2AX. The purpose was to develop a new *in vivo* evaluation method that enables detection of organ-specific carcinogenicity in a short period of time.

To evaluate the carcinogenicity of renal tubular epithelium, the ratio of the cell with γ -H2AX formation detected by immunohistochemical staining on a sample in which the test substance was repeatedly administered to 5 rats per group for 28 days was examined and the values were statistically analyzed. The outcome showed that renal carcinogens could be detected with high sensitivity of 88.9% (8/9) and specificity of 100% (7/7). This γ -H2AX formation was also observed to have a dose-response with the dose of the test substance. In the liver, sufficient detection sensitivity was not obtained when only the increase in γ -H2AX formation was used as an index, but sensitivity reached 100% (10/10) by combination with the increased expression of EpiCAM, which is known as a stemcell marker of hepatocytes.

Based on the above results, it was shown that the carcinogenicity of the liver and kidney could be detected with high sensitivity in a short period of time by using the histopathological specimen of the 28-day repeated-dose studies adding an evaluation of immunohistochemical staining for γ -H2AX formation and stem cell markers. Further analysis for specificity in the liver and application for other organs are expected.

2. 総合評価

良い

【評価コメント】

毒性試験における発がん性の指標として、腎臓では γ -H2AX により、肝臓では γ -H2AX に幹細胞マーカーを組み合わせることで、発がん性の指標となり得ることを明らかとし目標を達成した。これにより非臨床試験における肝発がん性の早期予測の可能性が高まったことは評価できる。

今後は、免疫組織化学染色の感度及び特異性の更なる改善に取り組み、がん原性の早期指標として完成度を高めるとともに、汎用性の高い試験方法、判定方法を公表し、医薬品のがん原性評価に広く取り入れられることを期待する。

以上