

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	cfDNA およびエクソソーム RNA をバイオマーカーとした医薬品の次世代毒性評価法の開発
代表機関名	国立医薬品食品衛生研究所
職名	室長
研究開発代表者名	小野 竜一
全研究開発期間	平成 30 年度～令和 2 年度

1. 研究開発成果

血液中には、血球細胞の他に血流中を循環する cell free DNA (cfDNA) や分泌顆粒として知られるエクソソーム内に含まれる RNA が存在する。cfDNA は主に生体内で障害を受けた細胞から放出されるが、その DNA メチル化状態は、放出元臓器の DNA メチル化状態を反映することから、障害を受けた組織が同定され得る。エクソソームは、数十から百ナノメートル程度の脂質二重膜の小胞からなり、様々な細胞より体液中に分泌される。

この中に含まれる RNA には、細胞特異的なものが含まれることがわかってきた。例えば、腫瘍細胞特異的なエクソソームをバイオマーカーとして 90 %を超える診断精度が謳われていることや、マウスにアセトアミノフェンを投与により特異的なエクソソームが放出されることが明らかになるなど、これらの指標は、毒性評価の為の新規バイオマーカーとしての有用性が期待されている。

本研究では、薬剤投与後のマウスの血液中の cfDNA およびエクソソーム RNA を網羅的に解析することで、標的臓器を特定し、更に毒性発現機序の解明を目指す事で、医薬品毒性評価の迅速化、高度化、標準化に資する評価システムの開発を行うことを目的とする研究である。

cell free DNA (cfDNA) の DNA メチル化を指標とした毒性評価法の開発

cfDNA の DNA メチル化状態は、放出元臓器の DNA メチル化状態を反映することから、障害を受けた組織が同定され得る。そこで、臓器特異的 DNA メチル化部位を抽出し、cfDNA の DNA メチル化を指標として臓器障害の高感度な特定を行う系の開発を行なった。本研究では、肝臓特異的な DNA メチル化領域を同定することとした。それらの候補は全て、肝臓特異的 DNA メチル化領域となっていた。その中で、PCR の効率なども考慮し、肝臓特異的 DNA メチル化領域を肝臓障害のバイオマーカーを決定した。

また、追加交付(R2 年度のみ)を受けて、ヒト臨床サンプルにおいても cfDNA の DNA メチル化状態を指標とした肝臓障害を同定しうるのかの追加研究を開始したことに伴い、ヒトにおいて肝臓特異的な DNA メチル化領域のスクリーニングを、マウスと同様に行い、ヒト肝臓特異的に DNA メチル化を受ける領域を明らかにし、これをバイオマーカーとすることにした。

肝臓毒性を持つコントロール物質として、四塩化炭素の投与により肝臓障害を起こしたモデルマ

ウスにおいて、血液中の cfDNA 量は、100 倍以上に増加することも明らかにした。これは、障害を受けた肝臓細胞より血液中に cfDNA が大量に逸脱した結果である。

よって、血液中の cfDNA 量を定量することのみでも、臓器障害を特定しうることを明らかにした。

さらに、実際に我々の単離した肝臓特異的に DNA メチル化が非メチル化状態であるバイオマーカー領域の血液中の cfDNA の DNA メチル化状態は、完全にメチル化されている状態から、肝臓の DNA メチル化状態である非メチル化状態へと変化した。これにより、cfDNA をバイオマーカーとした肝臓細胞障害を明らかにすることに成功した。

次に、マウスにおいて、肝臓障害を、血液中の cfDNA のメチル化状態を明らかにすることで特定することに成功したことから、ヒト臨床サンプルにおいても同様な方法が応用可能かをの検討を行った。健康人血清(10検体)および、肝臓がん患者(10検体)から cfDNA の抽出を行ない、DNA 濃度の測定を行なったが、がん患者では、cfDNA の濃度が上昇していることはなかった。

よって、マウスの様に、臓器障害により cfDNA 濃度が大幅に上昇していることはない結論できた。

肝臓がん患者由来の cfDNA において、肝臓特異的 DNA メチル化の比率が高い傾向が示されたが、サンプルの状態により、cfDNA の検出ができなかったものもあることから、より症例数を増やして解析を行う必要がある。

エクソソーム RNA をバイオマーカーとした医薬品の次世代毒性評価法の開発

医薬品5品目(アセトアミノフェン、クロフィブレート、フェノバルビタール、バルプロ酸ナトリウム、アスピリン)の投与において、毒性指標となるエクソソーム RNA の単離を行ない、各種医薬品に非常に高感度な特異的なバイオマーカー候補を単離することに成功した。

これらのバイオマーカー候補は、各種医薬品、1種類に特異的なもの、2種類に共通するもの、3種類に共通するものなどが得られている。

本研究では、副作用のほぼ出ない用量で投与を行なっているので、肝臓障害により遺伝子発現が誘導されることが知られるマイクロ RNA である miR-122 や miR-192 の大幅な上昇が見られていないこと、また血液生化学検査を行った結果、肝臓障害のマーカーである逸脱酵素の ALT、AST の値に変化がないという結果を得ている。

また、本研究計画において投与実験を行う医薬品5種類の単回投与を行なった24時間後の肝臓の網羅的遺伝子発現データを収録しているトキシコゲノミクスデータを解析し、投与により活性化するシグナルパスウェイを明らかにした。ここで活性化したシグナルパスウェイは、各種医薬品、1種類に特異的なもの、2種類に共通するもの、3種類に共通するものなどが得られている。

これらの結果は、エクソソーム RNA が特定臓器における活性化したシグナルパスウェイのバイオマーカーとなっている可能性を示している。今後、血液中のエクソソーム RNA と特定臓器での遺伝子発現とのネットワークを解析することで、単に医薬品の副作用のなどの評価を迅速かつ高感度に行うことを可能とするバイオマーカーとなるだけでなく、医薬品の全身レベルでの毒性発現機序の解明に繋がれると考えている。

Outline of research

In addition to blood cells, there are cell free DNA (cfDNA) that circulates in the bloodstream and RNA contained in exosomes known as secretory granules. Although cfDNA is mainly released from damaged cells in vivo, the DNA methylation state reflects the DNA methylation state of the organ from which it was released, so that the damaged tissue can be identified. Exosomes consist of vesicles of lipid bilayer membranes of several tens to hundreds of nanometers, and are secreted into body fluids from various cells. It has been found that the RNA contained therein includes cell-specific ones. For example, it has been clarified that the diagnostic accuracy of tumor cell-specific exosomes as a biomarker exceeds 90%, and that administration of acetaminophen to mice releases specific exosomes. The index is expected to be useful as a new biomarker for toxicity evaluation. In this study, we will comprehensively analyze cfDNA and exosome RNA in the blood of mice after drug administration to identify target organs and further elucidate the mechanism of toxicity onset, thereby accelerating drug toxicity evaluation. This research aims to develop an evaluation system that contributes to sophistication and standardization.

(1) Development of toxicity evaluation method using DNA methylation of cell free DNA (cfDNA) as an index

Since the DNA methylation state of cfDNA reflects the DNA methylation state of the releasing organ, the damaged tissue can be identified. Therefore, we extracted organ-specific DNA methylation sites and developed a system for highly sensitive identification of organ damage using DNA methylation of cfDNA as an index. In this study, we decided to identify liver-specific DNA methylation regions. All of these candidates were in the liver-specific DNA methylation region. Among them, the biomarker for liver damage was determined for the liver-specific DNA methylation region in consideration of PCR efficiency and the like.

In addition, following the additional grant (R2 year only), we started additional research on whether liver disorders can be identified using the DNA methylation status of cfDNA as an index in human clinical samples, and as a result, we started liver-specific research in humans. The DNA methylation region was screened in the same manner as in mice to clarify the region that undergoes DNA methylation specifically in human liver, and this was used as a biomarker.

It was also revealed that the amount of cfDNA in blood increased 100-fold or more in model mice in which liver damage was caused by administration of carbon tetrachloride as a control substance having liver toxicity. This is a result of a large amount of cfDNA diverging from the damaged liver cells into the blood.

Therefore, it was clarified that organ damage can be identified only by quantifying the amount of cfDNA in blood.

Furthermore, the DNA methylation state of cfDNA in the blood of the biomarker region where DNA methylation is actually unmethylated in our isolated liver is from the fully methylated state to that of the liver. It changed to a non-methylated state, which is a DNA methylated state. As a result, we succeeded in clarifying liver cell damage using cfDNA as a biomarker. Next, since we succeeded in identifying liver damage in mice by clarifying the methylation state of cfDNA in blood, we investigated whether the same method could be applied to human clinical samples. It was. CfDNA was extracted from healthy human serum (10 samples) and liver cancer patients (10 samples), and the DNA concentration was measured. However, the cfDNA concentration did not increase in cancer patients. ..

Therefore, it was concluded that the cfDNA concentration did not increase significantly due to organ damage as in mice.

In cfDNA derived from liver cancer patients, the ratio of liver-specific DNA methylation tended to be high, but cfDNA could not be detected depending on the state of the sample, so the number of cases was increased. It is necessary to analyze.

(2) Development of next-generation toxicity evaluation method for drugs using exosome RNA as a biomarker

In the administration of 5 pharmaceutical products (acetaminophen, clofibrate, phenobarbital, sodium valproate, aspirin), exosome RNA, which is a toxicity index, was isolated, and a specific biomarker highly sensitive to various pharmaceutical products. We succeeded in isolating the candidate.

As these biomarker candidates, various drugs, ones specific to one type, ones common to two types, ones common to three types, and the like have been obtained.

In this study, since the dose was administered at a dose with almost no side effects, a significant increase in miR-122 and miR-192, which are microRNAs known to induce gene expression due to liver damage, was observed. As a result of blood biochemical tests, it was found that there was no change in the ALT and AST values of the deviant enzymes, which are markers of liver damage. In addition, we analyzed toxicogenomics data, which contains comprehensive gene expression data of the liver 24 hours after single administration of 5 types of drugs to be administered in this research plan, and signal activated by administration. Revealed the pathway. As the signal pathway activated here, various medicines, ones specific to one type, ones common to two types, ones common to three types, and the like have been obtained.

These results indicate that exosome RNA may be a biomarker of activated signal pathways in specific organs. In the future, by analyzing the network of exosome RNA in blood and gene expression in specific organs, it will not only become a biomarker that enables rapid and highly

sensitive evaluation of side effects of drugs. , We believe that it will lead to the elucidation of the mechanism of toxicity onset of drugs at the systemic level.

2. 総合評価

良い

【評価コメント】

医薬品により惹起される肝臓障害において、cfDNA の DNA メチル化状態及びエクソソーム RNA を特異的な肝毒性バイオマーカーとして検証を予定通り実施し、マウスにおいて高感度な評価系を開発したことは評価できる。

ただし、臨床サンプルを用いたヒトでの解析結果とマウスでの結果に乖離があると考えられるため、臨床サンプルの追加検証や毒性バイオマーカーと肝毒性発現の関連性検証など、更なる検討を進め、ヒトでの毒性発現予測に結びつく有用で汎用性の高い次世代毒性評価法を完成させることを望む。

以上