

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) DNA 損傷性を指標にした HTS による医薬品の発がん性評価システムの開発
(英語) Development of high-throughput screening system for assessment of drug-induced carcinogenic potential based on DNA damage evaluation

研究開発実施期間: 令和元年 7 月 1 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 砂田 成章
(英語) SUNADA Shigeaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子遺伝分野 助教 (非常勤講師 ※令和 4 年 1 月より)
(英語) Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文:

【研究開発の背景】

DNA 損傷の誘発に伴い、DNA 修復関連遺伝子の損傷・DNA 修復能の低下が起こると、細胞内の DNA 損傷が DNA 変異として固定化され、その結果、様々なゲノム異常(ゲノム不安定性)が引き起こされ、細胞増殖制御機構などに多段階の異常が蓄積し、発がんが誘発されると考えられる。DNA 損傷の中でも特に深刻な損傷であり、DNA 修復等の異常を引き起こしやすい DNA 二本鎖切断 (DSB) は、数多くの化学物質により誘発される。DSB は発がん誘導のイニシエーターであることが示唆されており (A.A.Goodarzi and P.A.Jeggio, *Adv Genetics* 2013)、有害性発現経路 (AOP) の観点から、DSB を DNA 損傷性の指標として発がん性を評価する種々の試験法の開発が進められてきた。一方で、化学物質は日々生み出されており、米国化学会の報告では 2015 年の時点でその種類は 1 億を超えることが発表されている。本邦で使用されている数万種にも及ぶ医療用医薬品に対しては、一部

で DNA 損傷性に伴う発がん性が認められているものの、未だ安全性が明確でない医薬品は多い。それらに対して速やかに DNA 損傷性を評価する必要があるが、多種化合物を対象にハイスループットに DNA 損傷性を評価するアッセイ系はほとんど開発されていない。

【研究開発の目標・ねらい】

研究開発の背景から、本研究では、化学物質により細胞内で誘発される DSB をハイスループットに定量できる *in vitro* スクリーニング試験系(HTS)を構築、多種多様な化学物質に対する DNA 損傷性を評価する。さらに、取得したデータをもとに *in silico* 解析を実施、DNA 損傷性を有すると予測される化学物質を探索する。

そこで、上記目標を達成するため、以下 2 つの研究開発項目を遂行した。それぞれの項目に対するマイルストーンも示す。

- 研究開発項目 1 : DSB 測定システムの構築と化学物質ライブラリを対象とした DNA 損傷性評価
 - マイルストーン 1 : 化学物質の準備
 - マイルストーン 2 : 化学物質による DSB 誘導性の評価
- 研究開発項目 2 : *in silico* 解析による DNA 損傷性を示す化学物質の予測システム構築
 - マイルストーン 3 : *in silico* 解析による DNA 損傷性を示す類似化合物の探索
 - マイルストーン 4 : 探索化学物質に対する DNA 損傷性の検証

【研究成果】

研究開発項目 1 : DSB 測定システムの構築と化学物質ライブラリを対象とした DNA 損傷性評価

はじめに、高精度かつハイスループットな DNA 損傷性評価アッセイ系の構築完了を進めた。これまでに報告したフローサイトメトリー法による高精度 DSB 測定法(S.Sunada et al, Radiat Res 2017)をベースに、ハイスループット化に向けて多検体対応の分注機、フローサイトメーターのサンプルローダーを組み合わせた。これにより、解析精度を維持したまま、一度の試験で多量の検体をスクリーニングするアッセイ系を構築した。

次に、当該アッセイ系により多種多様な化学物質の DNA 損傷性の評価を目的に以下のマイルストーンを設定、遂行した。

● マイルストーン 1 : 化学物質の準備

アッセイ系の精度検証にあたり、Selleck 社の FDA approved drug library (約 2,600 化合物)を準備した。さらに、日本医療研究開発機構(AMED)の「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」の支援のもと、東京大学・創薬機構の化合物ライブラリを利用し、機能未知等、構造多様性などを考慮された Core Library (9,600 化合物)の提供を依頼準備した。

● マイルストーン 2 : 化学物質による DSB 誘導性の評価

各化合物ライブラリを対象とした DSB 測定スクリーニングを実施した。FDA approved drug library (約 2,600 化合物)については、用量反応性として 0.1, 1, 10 μM の各化合物 3 つのデータポイントを取得、Core Library の 9,600 化合物については、各 10 μM のデータを取得した。合計で約 17,400 のデータを取得した。スクリーニング後に詳細な解析を進めるにあたり、ヒット化合物として抽出するための閾値を設定、DNA 損傷性化合物を抽出した。(発がん性の有無の評価は多角的かつ詳細な解析が必要であるため、本研究では、便宜的に DNA 損傷性と細胞致死性の関係性から閾値を設定した。)

FDA approved drug library のスクリーニング結果から、約 2,600 化合物中から 61 化合物を DNA 損傷性化合物

として抽出した。これらの化合物の機能を調べたところ、多くの化合物がアルキル化剤、Top1/2 阻害剤、PARP 阻害剤、DNA 複製阻害剤等の代表的な DNA 障害型抗がん剤であった。したがって、DNA 損傷性を評価するアッセイ系としては有用であることが示唆される。特に、ヒットした化合物の中では、未だ発がん性に関する詳細な評価がなされていない化合物も多いが、エトポシド、ドキソルビシン、ブレオマイシンをはじめ複数の化合物が、IARC 発がん性分類で発がん性が認められている、もしくは疑われている化合物である点で、DNA 損傷性と発がん性評価が密接な関係であることがうかがえる。さらに、これまでに DNA 損傷性について報告されていない化合物も検出されており、今後詳細な解析が待たれる。

Core Library の解析結果から、9600 化合物から 7 化合物を DNA 損傷性化合物として抽出した。7 化合物全てで小核形成試験を実施したところ、有意に細胞内で小核を形成することが認められた。さらに、DNA 損傷性が最も高い化合物 X の機能解析を実施したところ、新規のトポイソメラーゼ 2 (Top2) 阻害剤であることを見出した。上記のように IARC 発がん性分類でも、多くの Top2 阻害剤で発がん性を示すことが指摘されている。多種多様な化合物群から発がん性の関与が疑われる化合物を見出すという本研究の目標において、本アッセイ系の有効性が期待される。

研究開発項目 2 : in silico 解析による DNA 損傷性を示す化学物質の予測システム構築

化合物の機能と構造には関連性があることが予想される。そこで本項目では、開発項目 1 で実施したスクリーニングにより取得した DNA 損傷性化合物群のデータをクエリとして、DNA 損傷性を有すると予測される化学物質を探索、検証を試みた。そこで、以下のマイルストーンを設定、遂行した。

● マイルストーン 3 : in silico 解析による DNA 損傷性を示す類似化合物の探索

マイルストーン 2 の 9,600 化合物のスクリーニングにより同定した DNA 損傷性化合物について、DNA 損傷性が最も高い化合物として見出した化合物 X を対象に、構造類似性の高い化合物を収集した。2,000 万以上の化合物データベースから構造検索可能な、ナミキ商事株式会社のオンライン化合物検索システム ChemCupid® を利用、化合物 X の類似体を検索、類似性が高い順に、11 種の類似体を収集した。

● マイルストーン 4 : 探索化学物質に対する DNA 損傷性の検証

マイルストーン 3 により収集した化合物 X の類似体 11 種類に対して、0.1~100 μM の濃度範囲 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM) で DSB 測定を実施した。その結果、当該濃度帯において 4 つの化合物で DNA 損傷性を示した。そのうち 1 つは化合物 X よりも高い DNA 損傷性を示した。マイルストーン 2 (ランダムスクリーニング) で用いた化合物の処理濃度 (10 μ) と同条件下の DNA 損傷性化合物検出率は、類似体検索による探索が 1/11 (約 9%) に対し、ランダムスクリーニングによる探索が 7/9600 (約 0.07%) と、検出感度で 100 倍以上の差が見られた。したがって、予想通り、構造類似性に着目した DNA 損傷性化合物の予測は、ヒット検出率の向上に一定の効果が見込まれることを確認した。

【本研究の意義および将来展望】

医薬品をはじめ、一般生活で使用されている化学物質については、発がんリスク等が明確ではないものが多い。本研究は、化学物質の発がん誘導について、そのイニシエーターと考えられている DNA 損傷、特に DNA 二本鎖切断を高速かつ高精度に定量化し、発がん性評価に資するシステムの開発に向けた研究を遂行した。

本研究において、多種多様な化合物から複数の DNA 損傷性化合物を同定した。FDA 承認の化合物を対象としたスクリーニングにおいては、医薬品の再評価の促進につながる点で、機能未知化合物等を対象としたスクリーニングにおいては、医薬品開発段階での安全性評価が可能な点で意義が大きい。抗がん剤開発などへの波及効果

が見込まれる点でも意義が大きい。今後は、さらに高度な *in silico* 予測システムを導入することで、より迅速化された評価システムが構築され、当該研究分野が抱える諸課題の解決が期待される。

一方で、本アッセイ系は、膨大な数の化学物質等を対象に DNA 損傷性を評価する点では有用であるが、発がん性を正確に評価するためには、動物試験等の詳細な検証も必要となる。また、研究手法の限界として本アッセイでは検出が困難な化合物が存在する可能性も示唆される。以上から将来展望としては、本アッセイのハイスループット性を生かしたスクリーニングと他評価系を組み合わせた多角的評価を実施することで、高精度な発がん性評価に資するシステム開発の実現が期待される。

英文：

[Background] Many kinds of chemical substances induce DNA double-strand breaks (DSBs) in cells. DSB has been considered as an indicator of carcinogenesis, so that plenty of assays have been developed to evaluate the DNA damage from Adverse Outcome Pathway (AOP). There are about huge numbers of ethical pharmaceuticals in Japan and some are recognized as carcinogens. However, most chemicals' abilities of DNA damage induction as chemical genotoxicities have been still unclear. Therefore, screening systems should be established for a lot of compounds to assess their chemical genotoxicities.

[Objective] Our objective in this study is to establish a high-throughput DSB detection system to explore DNA damaging agents from chemicals *in vitro* and *in silico*.

[Research plan and achievements] To achieve the objective, we proceeded the research plans and acquired the achievements as follows.

1. To establish an *in vitro* high-throughput DSB detection system and assess chemical genotoxicity

Milestone 1: To collect chemical compounds

We collected FDA-approved drug library (2,600 compounds) from Selleck Chemicals and Core Library (9,600 compounds) including diverse compounds from Drug Discovery Initiative, The University of Tokyo supported by AMED BINDS.

Milestone 2: To assess inductive effect of DSBs by chemicals

We performed the DSB detection screening for the chemical libraries. From FDA-approved drug library, we selected 61 compounds as DNA damaging agents. Most of the compounds belong to alkylating agents, topoisomerase I or II inhibitors, PARP inhibitors and DNA synthesis inhibitors and several compounds are classified as factors that are carcinogenic hazards to humans by the IARC Monographs. Therefore, our assay system is possibly available for genotoxicity assessment. From Core Library, we selected 7 compounds as DNA damaging agents. One of the compounds, compound X, which induced the most severe DNA damage has been analyzed and identified as a topoisomerase II (Top2) inhibitor. IARC Monographs classified various Top2 inhibitors as carcinogenic agents, so that our screening system would be expected to detect those agents from diverse compounds.

2. To establish an *in silico* system to explore DNA damaging agents

Milestone 3: To explore structural analogs to the screened DNA damaging agents *in silico*

It is considered that the function of a compound would be related to structure of that. Therefore, we collected

11 compounds which are similar analogs to the compound X using chemical search system, ChemCupid® (Namiki Shoji Co., Ltd.).

Milestone 4: To validate genotoxicities of the explored compounds

We analyzed the genotoxicities of 11 analogs and identified 4 compounds as DNA damaging agents. Compared to the random screening for Core Library (9,600 compounds), the exploring system for DNA damaging agents based on the structural analogy is confirmed to improve the detection rate for hit-compounds.

[Significance of the study]

Our screening system has a higher advantage than the conventional methods because that can analyze genotoxicities for diverse compounds rapidly with high accuracy. This study would contribute to establishing one of the assessment system for drug-induced carcinogenic potential.