

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年10月16日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）中川晋作
（英語）Shinsaku Nakagawa

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人大阪大学・大学院薬学研究科・教授
（英語）Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

II 補助事業の概要

（1）支援

薬物動態試験と安全性試験支援を実施した。薬物動態試験支援では、アカデミアで創製された被検化合物を大阪大学薬学研究科動物実験施設において実験動物に投与し、採血した。また質量分析計により被検化合物の血中濃度測定法を構築し、採血した血液を用いて血中濃度の変動を経時的に定量した。その結果に基づき薬物動態（pharmacokinetics ; PK）パラメーターの算出を行い、支援依頼者に結果の報告をした。また安全性試験では、被検化合物を投与した実験動物の主要各臓器を摘出後ホルマリン固定し、病理組織標本を作製した後、毒性病理学専門の獣医師により評価した。また被検化合物投与後の血液を用いて、血液学的検査並びに血液生化学検査を実施し、安全性に関するパラメーターの解析も支援した。具体的な支援件数として5年間における薬物動態試験支援件数は、53件であり、その内東京大学構造展開領域と連携した支援を21件実施した。一方、安全性試験支援件数は、19件であり、その内東京大学構造展開領域と連携した支援が4件であった。令和2年度導入したイメージング質量顕微鏡による支援では、使用技術の確立の完了に伴い、令和3年度2件の支援を行った。

（2）高度化研究

課題1：M1/M2 マクロファージ分極化に基づく新規肝毒性発現機序の解明と評価手法の構築

傷害部位に出現する肝マクロファージは多種多彩であり、その特性はM1/M2分極化により評価できることが知られている。また、細胞内傷害因子やオートファジーがその分極化に関与することも知られている。そこでまず6種類の抗原に対する抗体を用いてラットの肝マクロファージの特性が免疫組織化学

的に評価できることを提示した。さらに、ラットの肝細胞傷害と線維化の形成モデルにおける肝マクロファージの特性を評価し、M1 型と M2 型の特有サイトカインとマーカータンパク質の病理組織学的特徴を見出した。また肝マクロファージは化学物質による肝細胞傷害を修飾すると考えられる。そこでデキサメサゾン処置したところ、CD163 発現 M2 クッパー細胞の出現が減少し、その状態で肝毒性物質であるチオアセトアミド TAA を投与したところ肝線維化が軽減した。一方、マクロファージの反応を抑制するクロドロネートを事前処置し、その後 TAA を投与すると、M1/M2 マクロファージによる傷害組織の貪食・排除機能が不十分となり、肝細胞の凝固壊死が維持され、異栄養性石灰沈着が生じ、修復が不完全となることが分かった。さらに「M1/M2 肝マクロファージの枯渇・活性化実験に基づいた肝毒性の発現機序の解析」に関して、解熱鎮痛剤であるアセトアミノフェン投与によるラットでの肝毒性の発生機序をマクロファージの M1/M2 分極化に基づいて評価した。その結果、肝細胞の傷害と同時に CD68 発現 M1 マクロファージが、それに続く修復性線維化において CD163 発現 M2 マクロファージが出現することが分かった。また、M1 マクロファージの反応に先立ち傷害因子である HMGB1 とその受容体である TLR-9/RAGE の発現上昇とオートファジーがすでに誘導されていることが示された。傷害因子により誘導されるマクロファージの M1/M2 分極化により肝細胞傷害が促進あるいは修復されることが分かった。続いて「DAMPs -オートファジー-マクロファージの相互関連」を基軸とした肝毒性発現機序の解明を試みた結果、肝小葉の傷害部位の違いにより M1 と M2 マクロファージの出現様式が異なることを突き止めた。さらに DAMPs の一種である HMGB1 は傷害肝細胞において核から細胞質に移行し、細胞外に放出されることでマクロファージなどの炎症細胞の反応を誘導することを見出した。低用量 LPS はクッパー細胞を介しオートファジーを亢進することで、肝細胞内での DAMPs を効果的に処理し、その結果マクロファージ反応が軽減し、肝障害が改善されることが分かった。低用量 LPS で刺激されたクッパー細胞には、抗炎症作用や肝細胞保護機能があることが分かった。以上、「DAMPs-オートファジー-肝マクロファージ」を軸にした生体反応は肝毒性のメカニズムの解明において重要である事を明らかにした。

課題 2：エピトランスクリプトーム解析による安全性評価基盤の構築

RNA の後天的修飾であるエピトランスクリプトーム解析では、まず質量分析計を用いた検出基盤技術によりマウス週齢に伴う変動解析を実施した。その結果、加齢に伴い発現変動する特徴的な RNA 塩基修飾体を脳や肝臓、腎臓などで認めた。またこの修飾体はヒト iPS 細胞由来肝細胞でも認められたことから、エピトランスクリプトームは臓器機能を鋭敏に反映する可能性が示唆された。これらの成果は、エピトランスクリプトーム解析により化合物の毒性発現評価に新たな知見をもたらすことを示唆するものである。そこでエピトランスクリプトーム解析による安全性評価基盤を構築すべく、マウス肝炎モデルを用いて基盤技術である RNA 修飾塩基の定量的評価を行った。その結果、2 種類の RNA 塩基修飾が肝炎誘発により肝臓内で低下を認めた。またヒトの肝臓とともに腎臓や心臓由来の RNA、さらに血中から抽出した RNA においてもこれらの修飾体を有する RNA 塩基修飾体を検出できた。RNA 塩基修飾体の検出は、同じ基盤技術でマウス等実験動物とヒトとで評価できることが示され、安全性試験において有用となる可能性が示唆された。

課題 3：構造活性相関 (QSAR) による変異原性予測モデルの開発

本高度化研究では、労働安全衛生法に基づき実施された Ames 試験の結果に基づく 12, 140 物質より成るデータベースに、詳細な試験情報 (試験菌株ごとの陽性・陰性結果、被験物質純度、媒体) を追加入力し、さらに、試験結果の判定に疑義があった 60 物質の結果を変更し、付加価値と信頼性が高いデータベースを再構築した。また 6, 149 物質の Ames 試験陰性結果の試験報告書を再評価した。内、33 物質については、陽性と再評価され既存試験結果のデータベースにアーカイブされた。また独自のアルゴリ

ズムを用いた QSAR モデルの開発も進めることができた。次に StarDrop™ Auto-Modeller™を用い、主として香料等の低分子化合物（主として分子量 200 以下）に特化した QSAR モデルを開発した。StarDrop NIHS 834_67 と命名した本モデルは、94.6%の精度で低分子化合物の変異原性を予測できた。この新しく開発された QSAR ツールは他の商業ベースの QSAR よりも予測精度が高く、今後、低分子医薬品候補物質や不純物の変異原性の評価に有用であると考えられる。

課題 4：行動学的解析による脳機能への安全性評価基盤の構築

本高度化研究では、マウスを用いて行動学的評価により協調運動機能の解析、短期記憶能の解析、感覚情報制御機能の解析を行った。各試験において、複数の系統の行動を評価し、薬物の単回投与による急性的な鎮静作用や筋弛緩作用、短期記憶障害を検出できる適切なマウス系統と実験条件を確立した。また複数の行動学的手法を用いて、マウスの自発的運動、そして物体認知・連合学習・記憶といった異なる認知機能を評価できる系の構築について検討した。マウスの系統によって、適切に学習・記憶させるためのトレーニング方法等を最適化し、実験条件を確立した。

(1) Support

We have supported Pharmacokinetic studies and safety study . In support of pharmacokinetic studies, the test compound created by academia was administered to experimental animals at the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, and blood was collected. In addition, a measuring the blood concentration of the test compound was measured by a mass spectrometer, and fluctuations in the blood concentration were quantified over time using the collected blood. Based on the results, pharmacokinetics (PK) parameters were calculated and the results were reported to the support requester. In the safety test, each major organ of the experimental animal to which the test compound was administered was excised, and then a histopathological specimen was prepared. The histopathological specimen was observed by a veterinarian specializing in toxic pathology. In addition, hematological tests and blood biochemical tests were performed using blood after administration of the test compound, and the analysis of safety-related parameters was also supported. The number of pharmacokinetic study support cases in 5 years was 53, of which 21 cases were provided in collaboration with the Drug Discovery Initiative, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo. On the other hand, the number of safety test support cases was 19, of which 4 were supported in collaboration with the Drug Discovery Initiative, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo. With the completion of the establishment of the technology for the use of the imaging mass microscope introduced in 2020, we provided support for two projects in 2021.

(2) Advanced research

The following five themes were tackled as advanced research.

Theme 1: Elucidation of new hepatotoxicity onset mechanism based on M1 / M2 macrophage polarization and construction of evaluation method

In this advanced study, it was clarified that biological reactions centered on "DAMPs-autophagy-liver macrophages" are important in elucidating the mechanism of hepatotoxicity.

Theme 2: Establishment of safety evaluation platform by epitranscriptome analysis

We have established a basic technology for analyzing the epitranscriptome, an acquired modification of RNA, and demonstrated the possibility of safety evaluation by analyzing RNA modifiers common to both mice and humans.

Theme 3: Development of mutagenicity prediction model by structure-activity relationship (QSAR)

In this advanced study, we reconstructed a database consisting of 12,140 substances based on the results of the Ames test conducted under the Industrial Safety and Health Act, with high added value and reliability.

Theme 4: Construction of a safety evaluation platform for brain function by behavioral analysis

In this advanced study, we established experimental conditions for analyzing coordinated motor function, short-term memory ability, and sensory information control function by behavioral evaluation using mice.