

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：医薬品の非臨床安全性評価における既存試験法を活用したラットがん原性試験の WoE 要素の開発

Development of WoE factors in rat carcinogenicity tests utilizing existing methods for nonclinical safety evaluation of pharmaceutical drugs

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：豊田 武士
Takeshi Toyoda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター病理部・部長
Head, Division of Pathology, Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

【研究の背景と目的】

医薬品開発における非臨床のがん原性評価では、従来 2 種類の齧歯類を用いた長期試験が必要とされてきた。2022 年 8 月に、医薬品規制調和国際会議（ICH）において ICH S1B (R1) ガイドラインが成立し、ラット 2 年間がん原性試験を実施せず、様々なデータに基づく証拠の重み付け（Weight of Evidence ; WoE）によってラットがん原性の評価を行うアプローチが可能となった。この改定ガイドラインでは、主要な WoE 要素の他に、追加のアプローチとして過去の試験において採取した検体の分析（例：特殊組織化学染色、分子バイオマーカー等）に言及している。しかし、これら追加のアプローチに関する具体的な方法のコンセンサスは、いまだ存在しないのが現状である。ラット 2 年間がん原性試験を実施することなく WoE アプローチを用いてがん原性を適切に評価し、医薬品開発を推進するために、既存の毒性試験で得られたサンプルを活用したがん原性予測に関する新たな WoE 要素となる評価法が強く求められている。

ヒト臨床における病理診断および分子標的薬等の適用に関するコンパニオン診断には、病理組織検体を利用した免疫組織化学染色や遺伝子発現/変異解析が必須となっているが、非臨床試験におけるこのような手法の応用は限定的である。新規の動物試験を構築することなく、既存の試験サンプルを活用した評価法を確立することによって、がん原性評価における WoE アプローチを機能させ、がん原性評価の堅牢化および承認までの時間短縮に資すると期待される。

我々はこれまでに、鋭敏な DNA 損傷マーカーとして知られる γ -H2AX の免疫組織化学的解析により、化学物質のラット膀胱に対する発がん性を短期間（28 日間）の投与で検出できることを報告した（Toyoda & Ogawa, *J Toxicol Pathol*, 35: 283-98, 2022）。先行研究（H30～R2 創薬基盤推進研究事業「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 *in vivo* 遺伝毒性早期検出法に関する研究開発」）において、我々は本手法の肝発がん物質早期検出への応用を試みた。その結果、肝臓においては γ -H2AX に加えて EpCAM 等のマーカーを併用することで、検索した肝発がん物質 10 種すべてを検出できることが示された。

本研究の目的は、齧歯類の短期反復投与毒性試験から得られる組織サンプルを用いて解析可能な、がん原性評価のための WoE 要素として活用し得るバイオマーカーを確立することである。具体的には、ラット 28 日間反復経口投与試験から得られた肝臓を用いて、免疫組織化学的・分子生物学的解析による肝発がん性の短期検出法の開発を目指す。 γ -H2AX を含む種々のバイオマーカーを用いた免疫染色による短期肝発がん性評価について、これまでに評価した 10 物質に加えて新規の被験物質を追加評価し、本手法の感度・特異度を検証した。また、肝発がん機序は多岐にわたり、ヒトへの外挿性が乏しいと考えられるケースもあることから、分子生物学的解析を併用した発がんメカニズム推定法の確立を試みた。

【研究方法】

6 週齢、雄の F344 ラットに肝発がん物質、肝臓を標的としない発がん物質および非発がん物質を 28 日間反復経口投与し、投与終了時に解剖、肝臓を含む諸臓器を採材した。肝臓の病理組織標本を用いた免疫染色を実施し、各陽性細胞/領域の割合について定量/半定量解析を行い対照群と比較した。免疫染色では γ -H2AX に加え、細胞増殖マーカーとして汎用される Ki67 等、既知のバイオマーカーについて検証するとともに、新規マーカー候補の探索も並行して実施した。研究実施期間中に、肝発がん性検出または機序推定に利用可能な免疫組織化学的マーカーとして ALDH3A1、CYP1A および GPX2 等が新たに見出された。令和 5～7 年度にかけて、過去に実施した 28 日間反復経口投与試験から得られたサンプルを含め、肝発がん物質 46 種、非肝発がん物質 44 種の計 90 種の化合物を対象に検討を行った。

上記試験で得られたラット肝臓について、病理組織学的検索を併せて実施した。肝臓は異物代謝を司る主要臓器であり、化学物質への曝露により肝細胞の肥大・壊死・変性および胆管増生等、物質ごとに異なる特徴的

な病理所見を呈することが知られている。これらの病理組織学的所見は肝発がん性の有無およびその機序を予測する重要な WoE 要素となり得ることから、投与群ごとに詳細な検索を行い、免疫組織化学的・分子生物学的解析の結果と併せて考察を行った。また、肝臓の凍結サンプルまたはパラフィン包埋ブロックから RNA を抽出し、10 数遺伝子 (*Bax*, *Gdf15* 等) を対象とした遺伝子発現解析 (RT-PCR) を実施した。主成分分析による肝発がん性・発がん機序の分類を試みたものの、明確に関連した遺伝子発現パターンが認められなかったため、肝発がん物質投与ラットの肝臓組織標本を用いた空間トランスクリプトーム解析を追加で実施し、クラスター分類による遺伝子発現パターンの可視化および新規バイオマーカー候補の探索を行った。

【結果】

6 週齢・雄の F344 ラットを用いて、令和 5~7 年度にかけて計 24 種の新規被験物質による 28 日間反復経口投与試験を実施し、肝臓を含む諸臓器を採材した。また、以前に実施した試験から得たラット肝臓のホルマリン固定パラフィン包埋標本を加えて、計 46 種の肝発がん物質について評価を行った。免疫組織化学的解析として、先行研究で使用した γ -H2AX・EpCAM・CD13/APN に加え、本研究において新規バイオマーカー候補として見出された ALDH3A1 等を含め、計 36 種のマーカーを対象とした検討を実施した。その結果、 γ -H2AX・ALDH3A1・CYP1A・GPX2・GST-P を単独で用いた際の肝発がん物質検出感度は、それぞれ 45.7%・56.5%・54.3%・76.1%・84.8%であり、特異度は 95.5%・81.8%・81.8%・61.5%・43.2%であった。感度は GST-P、特異度は γ -H2AX が最も高かったものの、総合的な評価においては複数のマーカーを併用することが有用であると考えられた。そこで、上記の免疫染色結果に追加の変数として Ames 試験の結果 (陽性/陰性) を加え、決定木分析による肝発がん性予測アルゴリズムの構築を試みた。その結果、 γ -H2AX・ALDH3A1・CYP1A・GPX2 の 4 指標を用いた決定木が構築され、全体の感度は 71.7% (33/46)、特異度は 93.2% (41/44) となった。

令和 5~7 年度にかけて、上述の肝臓サンプルを用いた病理組織学的解析を実施した。免疫組織化学的解析における ALDH3A1 発現との関連を詳細に検討した結果、肝臓での ALDH3A1 発現は巣状~び慢性あるいは小管状など、物質によって異なるパターンを示すことが明らかとなった。小管状発現は、クロフィブラート等の PPAR 作動薬により特異的に誘発された。また、フラン等の胆管発がん物質では、肝細胞のみならず胆管上皮細胞においても ALDH3A1 発現が誘導されるなど、これらの発現パターンは発がん機序の違いを反映している可能性が考えられた。令和 5~7 年度に実施した新規被験物質 24 種の病理組織学的解析では、半数弱の 11 物質が小葉中心性肝細胞肥大を誘発し、うち 2 物質は脂肪変性またはクッパー細胞への色素沈着をそれぞれ伴っていた。他の 13 物質のうち 6 物質は、小葉辺縁性肝細胞肥大、肝細胞/クッパー細胞への色素沈着、肝細胞の単細胞壊死、または oval cell 過形成等の肝病変を誘発した。残る 7 物質では、肝臓に明らかな病理所見は認められなかった。

令和 6 年度に、本研究および以前に実施したラット 28 日間反復経口投与試験から得られた肝臓の凍結サンプルから RNA を抽出し、既報において選定された 16 遺伝子 (*Bax*, *Gdf15* 等) を対象とした遺伝子発現解析 (RT-PCR) を実施した。肝発がん物質 9 種について遺伝子発現のパターンを主成分分析により解析したものの、発現パターンと発がん機序との間に明らかな関連は見出されなかった。そこで、肝発がん物質 8 種について、肝障害や異物代謝および肝発がん関連因子を含む 140 遺伝子を対象に、肝臓のパラフィン包埋切片を用いた空間トランスクリプトーム解析 (MERSCOPE、VizGen) を実施した。得られた結果のクラスター解析により、肝発がん物質投与サンプルに共通して *Ahr*、*Nr1i3* 等の発現を特徴とする細胞クラスターが増加していることが明らかになった。同クラスターは小葉中心性の分布が認められ、肝発がん物質投与により誘導された肝細胞クラスターであると考えられた。さらに、高解像度解析により各肝発がん物質に特有の遺伝子発現パターンが見出された。これらの解析から得られた候補遺伝子について検討した結果、*Mrp3* が肝発がん物質検出モデルの感度改善に有用な新規バイオマーカーとして見出された。

【考察】

ラット 28 日間反復経口投与毒性試験から得られた肝臓サンプルを用いた免疫組織化学的解析により、 γ -H2AX・ALDH3A1 を含む複数のマーカーの免疫染色結果を組み合わせた肝発がん性予測アルゴリズムを構築し、投与物質のラット肝臓に対する発がん性を高い感度・特異度で予測可能であることが示された。 γ -H2AX はヒトや齧歯類を含む多くの動物種に共通するリン酸化ヒストンタンパク質であり、DNA 損傷の鋭敏なマーカーとして知られている。その形成は臓器や細胞種に依存せず、また直接的な DNA 損傷のみならず、細胞増殖亢進に伴う複製エラー等、非遺伝毒性機序による間接的な損傷によっても γ -H2AX 形成が生じることが知られている。一方で、本研究において示されたように、 γ -H2AX を肝発がん性検出のための単独の指標として用いた場合、特異度は 95.5% と非常に高い一方、感度は 45.7% にとどまった。他のマーカー候補も同様であり、これは肝臓における発がん機序が他の臓器と比較しても多様性が高く、単一の指標で評価することが困難であることが原因と考えられ、複数マーカーを併用することの必要性が示唆された。

肝臓の病理組織学的解析の結果、肝発がん物質によって誘発される病変としては小葉中心性肝細胞肥大が最も多く、その他には小葉辺縁性肝細胞肥大・oval cell 過形成等、多様な病変が認められた。重要なこととして、肝臓に明確な病理所見がみられなかった 7 種の肝発がん物質のうち、4 種は上記の肝発がん性予測アルゴリズムにおいて陽性と判定された。免疫組織化学的・病理組織学的解析の結果から、ALDH3A1 は発がん性の有無だけでなく、肝発がん機序の予測にも有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。また、CYP1A に陽性を示した物質にはアリル炭化水素受容体 (AhR)、GPX2 陽性物質には NRF2 の既知の活性化物質が複数含まれており、それぞれ対応する経路の活性化指標として有用である可能性が示唆された。今後決定木分析において、それぞれの病理学的所見を変数として加えた場合の判定フローを構築し、発がん性評価のさらなる精緻化および機序推定への応用を検討する必要がある。

【結論】

本研究により、28 日間反復経口投与毒性試験から得られた肝臓サンプルを用いた、 γ -H2AX・ALDH3A1 を含む複数のマーカーの免疫組織化学的解析結果を組み合わせることで、投与物質のラット肝臓に対する発がん性を高い感度・特異度で予測可能であることが示された。ホルマリン固定パラフィン包埋臓器を用いた免疫染色は、既存のガイドライン試験である 28 日間反復経口投与試験に容易に組み込みが可能であり、新規の試験を実施する必要がないという利点を有する。また、病理組織学的・免疫組織化学的解析等の併用による肝発がん機序の推定は、ヒトへの外挿性を判断する上で有力な根拠を提供する。本研究は 2 年間のラットがん原性試験を省略可能とする WoE アプローチの頑健化に寄与し、医薬品開発期間の短縮に繋がるとともに、ICH S1B ガイドラインの次回改定時に使用可能な WoE 要素として組み込まれることが期待される。さらに、DNA 損傷の鋭敏な指標である γ -H2AX、幹細胞マーカーと知られる ALDH3A1 等、本評価手法で用いたバイオマーカーは、他臓器のがん原性評価にも適用できる可能性がある。

[Background]

The ICH S1B (R1) guideline paved the way for assessing carcinogenicity through the weight of evidence (WoE) approach based on various data, without conducting a two-year rat carcinogenicity study. However, there is still no consensus on specific methods for additional approaches as WoE elements. To appropriately assess rat carcinogenicity, there is a strong need for the development of new evaluation methods utilizing samples obtained from existing toxicity studies. Here, we aimed to develop a novel method for the detection of rat hepatocarcinogens by combining immunohistochemistry for DNA damage marker γ -H2AX, AhR activation markers CYP1A and ALDH3A1, Nrf2 activation marker GPX2, and the marker of rat hepatic preneoplastic lesion GST-P.

[Methods]

A 28-day repeated oral dose toxicity study was conducted using 6-week-old male F344 rats to examine 90 chemical substances, including 46 hepatocarcinogens. Immunohistochemical analysis was performed and positive cell ratio of γ -H2AX, positive area ratio of CYP1A and GPX2, hepatocyte expression of ALDH3A1 and GST-P, and genotoxicity status were used as predictive variables for decision tree analysis. To elucidate the mechanisms underlying liver carcinogenesis and identify novel biomarkers, we also conducted gene expression analysis using liver samples and spatial transcriptomics analysis of liver tissue specimens.

[Results]

Immunohistochemical analysis of 36 markers, including γ -H2AX, EpCAM, CD13/APN, and several new candidates, showed variable individual performance. GST-P achieved the highest sensitivity, whereas γ -H2AX showed the highest specificity. To improve comprehensive evaluation, a decision tree prediction algorithm was constructed by combining the immunostaining data with Ames test results. The resulting model, utilizing four key indicators (γ -H2AX, ALDH3A1, CYP1A, and GPX2), achieved an overall sensitivity of 71.7% (33/46) and a specificity of 93.2% (41/44).

[Conclusion]

This study demonstrates that combining immunohistochemical analysis of markers, such as γ -H2AX and ALDH3A1, in 28-day rat liver samples can predict carcinogenicity with high sensitivity and specificity. Using formalin-fixed paraffin-embedded organs allows easy integration into standard toxicity studies, without extra animal experiments. Furthermore, elucidating carcinogenic mechanisms provides a robust rationale for human extrapolation. This approach strengthens the WoE strategy to waive two-year carcinogenicity studies, shortening drug development timelines. It is expected to serve as a valid WoE component for future ICH S1B guideline revisions. Additionally, these biomarkers may apply to carcinogenicity assessments in other organs.