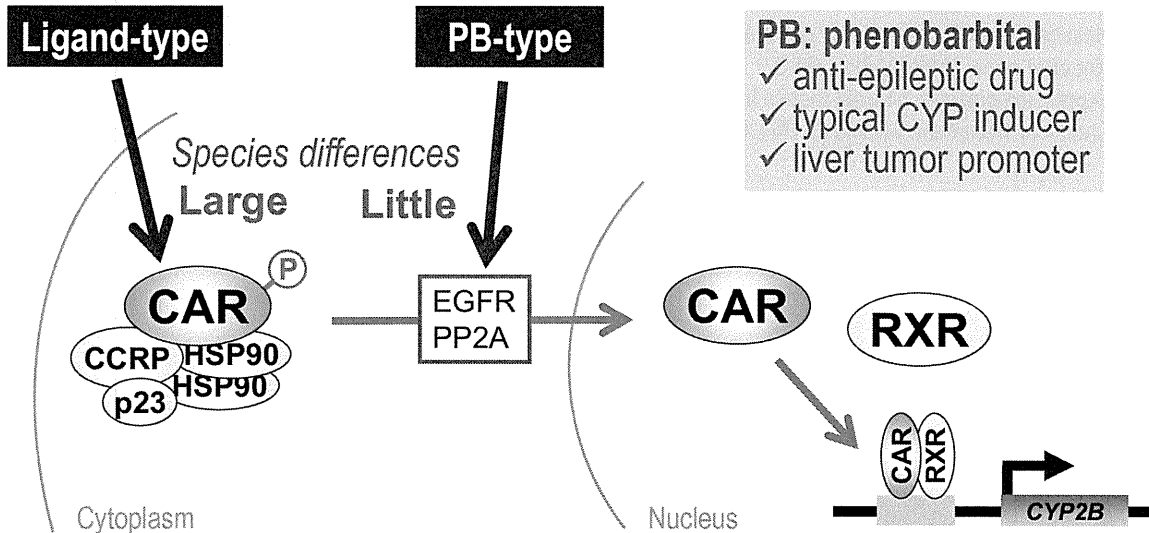


## CARの活性化機構と活性化物質の種類



- ✓ CAR is constitutively active transcription factor, and its activity is regulated by cellular localization (nuclear translocation by xenobiotics).
- ✓ Nuclear translocation is regulated de-phosphorylation and phosphorylation by PP2A, PKC and EGFR signals.
- ✓ PB does not bind to CAR, but indirectly activates CAR.

## CAR活性化能評価系の問題点



- ヒト肝細胞でのCAR発現量にはロット差が大きい。発現量も低い。
- CARを構成的に発現する培養細胞はない。
- CARは恒常的に転写活性を有しており、その活性は、肝細胞では細胞質から核への移行によって制御されている。
- 培養細胞にCARを強制発現すると、リガンド非存在下でも核に移行し、転写を活性化してしまう。

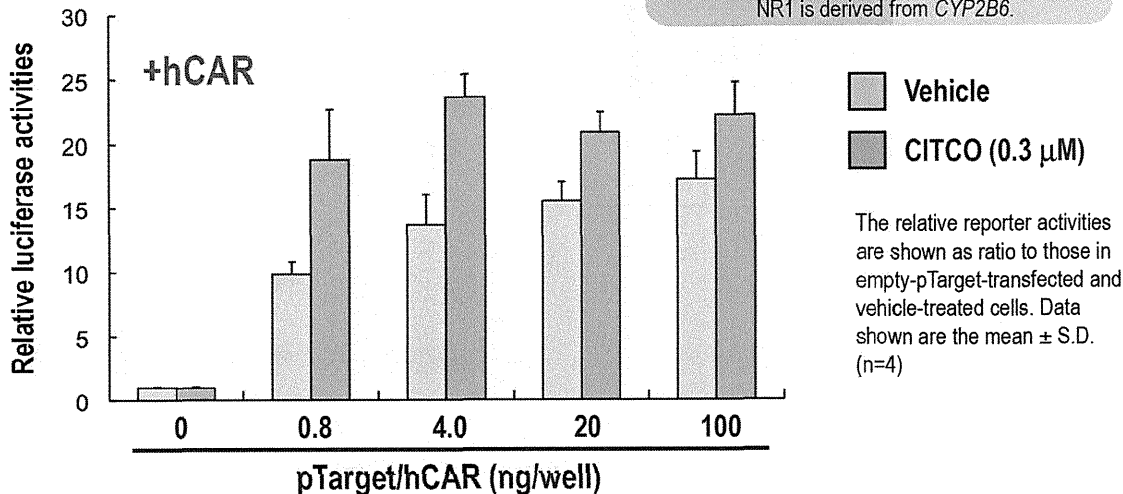
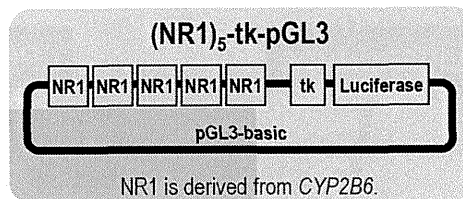
ヒト肝細胞以外では、CAR活性化能を評価可能なシステムはほとんどない。

# ヒトCAR発現プラスミドを用いたレポーターアッセイ



## Experimental protocol

- ✓ Host cell: HepG2 cells (4 x10<sup>4</sup> cell/well, 48-well)
- ✓ Reporter gene: (NR1)<sub>5</sub>-tk-pGL3
- ✓ Expression plasmid: pTarget (native hCAR)
- ✓ Chemical Treatment: vehicle (0.1% DMSO) or CITCO, 24 hr



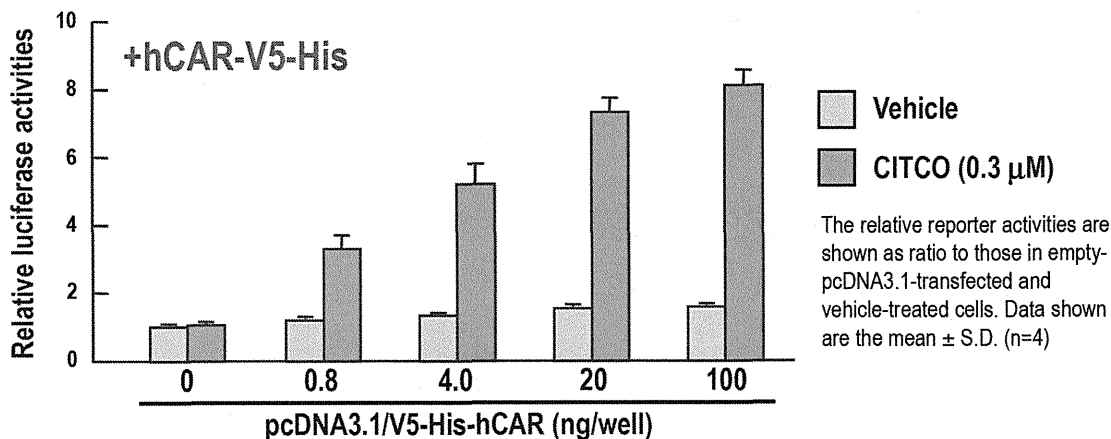
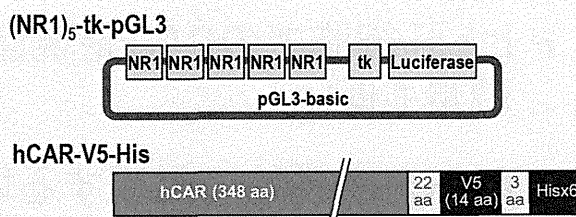
CARを発現させただけでレポーター活性が上昇し、リガンドによる活性化の程度(誘導倍率)が小さい⇒CAR活性化能の評価系としては不十分

# C末端タグ付加ヒトCAR発現プラスミドを用いたレポーターアッセイ



## Experimental protocol

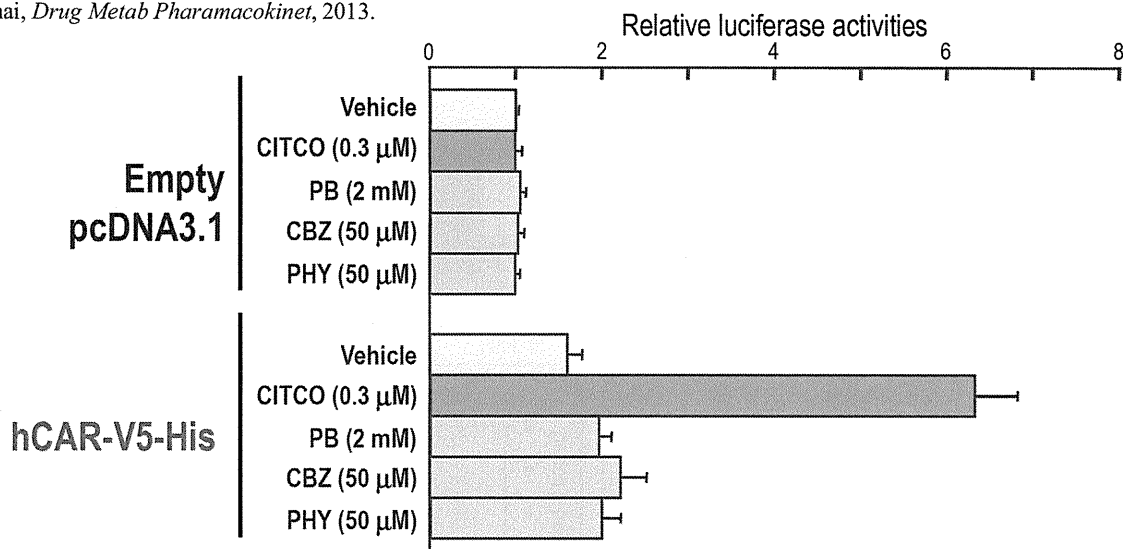
- ✓ Host cell: HepG2 cells (4 x10<sup>4</sup> cell/well, 48-well)
- ✓ Reporter gene: (NR1)<sub>5</sub>-tk-pGL3
- ✓ Expression plasmid: pcDNA3.1/V5-His  
Expressing hCAR tagged with V5 and His<sub>6</sub> tags
- ✓ Chemical Treatment: vehicle (0.1% DMSO) or CITCO, 24 hr



# ヒトCAR活性化物質に対するhCAR-V5-Hisの応答性



Imai, *Drug Metab Pharmacokin*, 2013.



### Experimental protocol

- ✓ Host cell: HepG2 cells (4 x 10<sup>4</sup> cell/well, 48-well)
- ✓ Reporter gene: (NR1)<sub>5</sub>-tk-pGL3
- ✓ Expression plasmid: pcDNA3.1/V5-His
- ✓ Chemical Treatment: 24 hr

The relative reporter activities are shown as ratio to those in pcDNA3.1-transfected and vehicle-treated cells. Data are the mean ± S.D. (n=4).  
CBZ, carbamazepine; PHY, phenytoin; FLV, fluvastatin.

PBタイプの活性化物質に対する応答性は弱い、リガンド応答性は維持されている。

## インビボ薬物代謝を反映するレポーターアッセイの構築

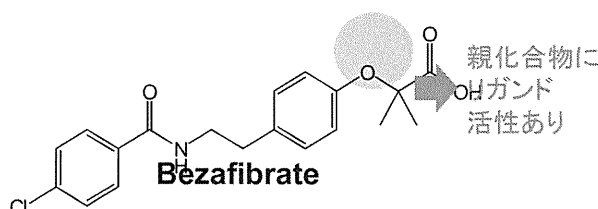
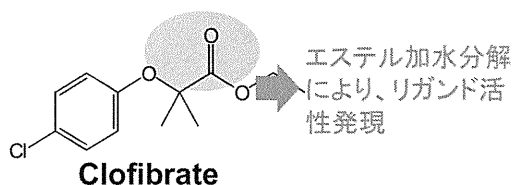
### 【レポーターアッセイの問題点】

- ✓ 培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイは、被験物質の遺伝子発現に対する影響や転写因子への作用を評価する試験系として有用である。
- ✓ しかし、培養細胞の薬物代謝酵素活性は極めて低く、被験物質の代謝を考慮した評価(代謝物の影響など)ができない。

### ➡ インビボ薬物代謝を反映するレポーター遺伝子アッセイの開発

### 【方法】

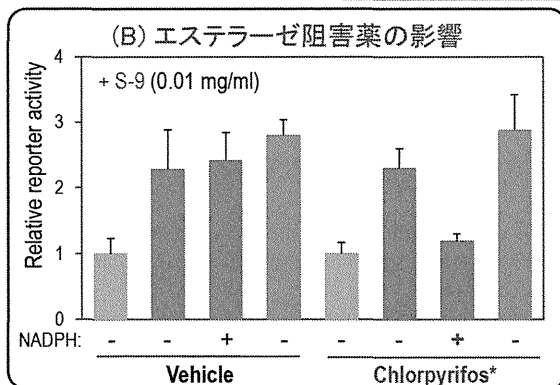
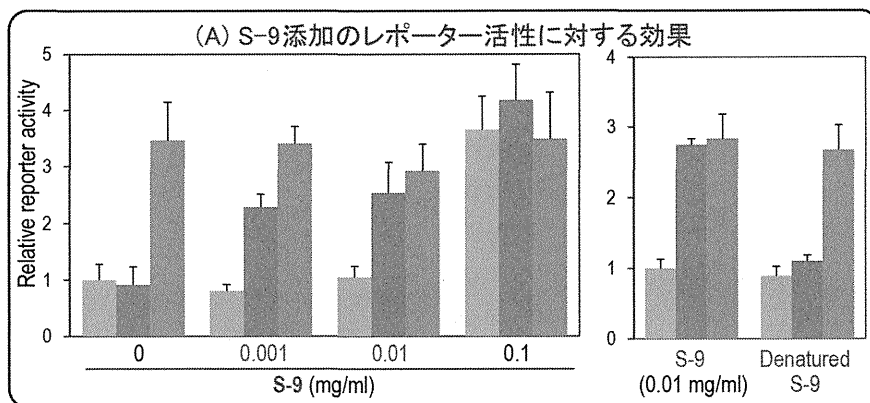
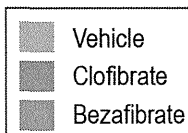
- ✓ 細胞: COS-1細胞
- ✓ プラスミドDNA: ラットPPARα発現プラスミド、ラットAox1-PPRE\*レポーター遺伝子
- ✓ PPARα活性化薬: clofibrate(エステル体)、bezafibrate(カルボン酸体)
- ✓ ラット肝S-9の添加の効果を検証



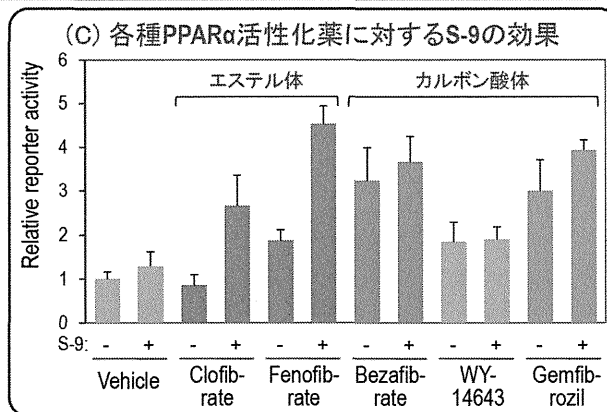
\*PPRE: PPARα応答配列

## インビボ薬物代謝を反映するレポーターアッセイの構築

加水分解後にPPAR $\alpha$ 活性化作用を示すfibrate類は、ラット肝S-9のesterase活性依存的に転写活性化作用を示した。



\*Chlorpyrifos: a P450-dependent esterase inhibitor.



## 本日の内容



- ✓ 核内受容体と解毒・毒性発現
- ✓ 核内受容体と肝発がん・肝細胞増殖
- ✓ 核内受容体の活性化作用評価系
- ✓ 核内受容体評価系の応用
  - 肝細胞肥大研究
  - 新規毒性予測システムの開発に向けて

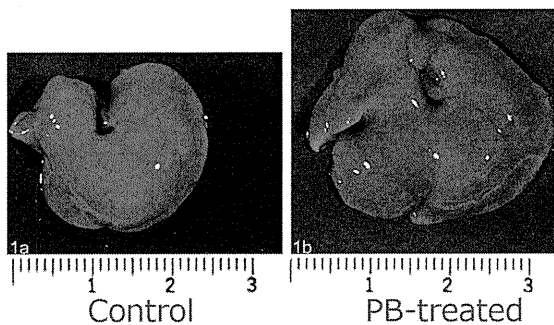
## 肝肥大と肝細胞肥大

- ✓ 化学物質の曝露により、しばしば肝(細胞)が肥大する。
- ✓ この肝細胞肥大・肝肥大の生理学的・毒性学的意義ならびに発現機序は不明である。
- ✓ 肝細胞肥大を起こす化学物質の種類は非常に多く、それらの化学構造も多種多様である。化学物質誘発性の肝細胞肥大が、全て同一の機序で起こるとは考えにくい。
- ✓ 薬物による肝細胞肥大の多くは可逆的で、酵素誘導に伴う適応反応と考えられており、毒性学的に重要な指標とはされていない。
- ✓ 肝肥大と肝発がんとの関連性が指摘されている。
- ✓ NOAEL/ADIの設定根拠となることもある。

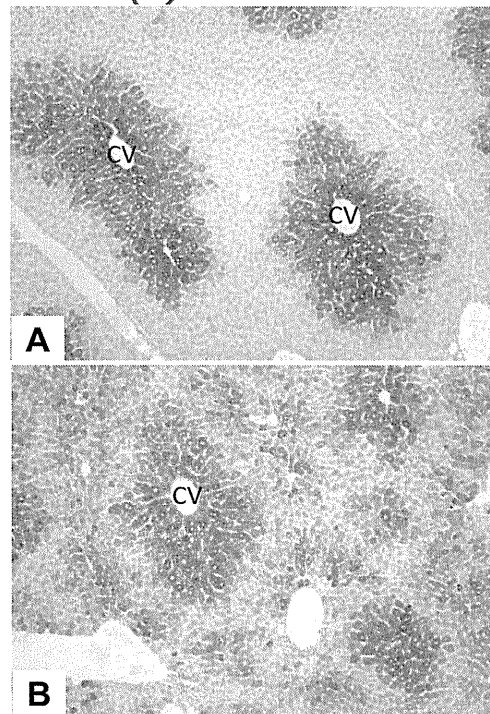
化学物質の安全性評価において、肝細胞肥大・肝肥大の毒性学的理解が必要とされている。

## Liver hypertrophy and hepatocyte hypertrophy

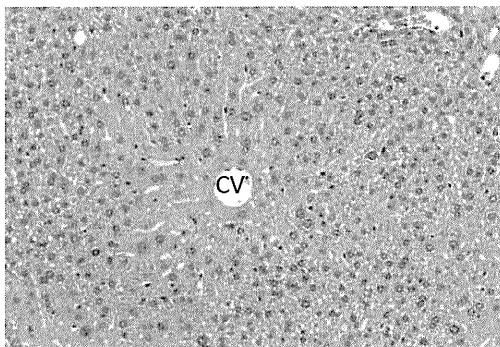
### *Liver hypertrophy (mouse)*



### *Immunohistochemical analyses of CYP1A (A) and CYP3A (B) in untreated*



### *Hepatocyte hypertrophy, centrilobular*



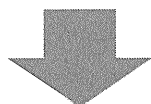
*Toxicol Pathol* 2012 40: 971.

CV, central vein

## 化学物質の分類と作用機序の推定：決定木の利用

### 作業仮説・疑問

- ✓肝肥大誘発性の化学物質を、酵素誘導と関連する核内受容体に対する作用の違いに基づき分類できないか？
- ✓分類条件から発現機序を推定できないか？



### 決定木を利用した化学物質の分類・作用機序の推定

#### 決定木

- ✓機械学習予測モデルの1つ
- ✓説明変数で繰り返し質問し、目的変数を分類する方法
- ✓作成した決定木から分類条件を判別可能

## データ収集概要

---

### 1. 試験化合物の選択

- ✓ラット毒性試験結果データベースHESS-DB\*から選出。
- ✓小葉中心性肝細胞肥大陽性化合物：81物質
- ✓小葉中心性肝細胞肥大陰性化合物：89物質

### 2. 評価系

- ✓ラット核内受容体(CAR、PXR、PPAR $\alpha$ 、AhR)レポーターアッセイ
- ✓ラットPPAR $\alpha$ ワンハイブリッドアッセイ(リガンド活性)
  - 対照群との有意差検定：有意差なし→活性「0」
  - 陽性対照の活性化率に対する比(%)で評価(数値化)
- ✓ヒトCYP2E1代謝予測
  - 基質→1、非基質→0

\*HESS-DB : Hazard Evaluation Support System Integrated Platform-Data Base  
化審法既存点検物質を中心に、約500物質のラット反復投与毒性試験(28日～90日)の詳細な試験成績が搭載されている。

# データ収集: DB情報とアッセイ結果

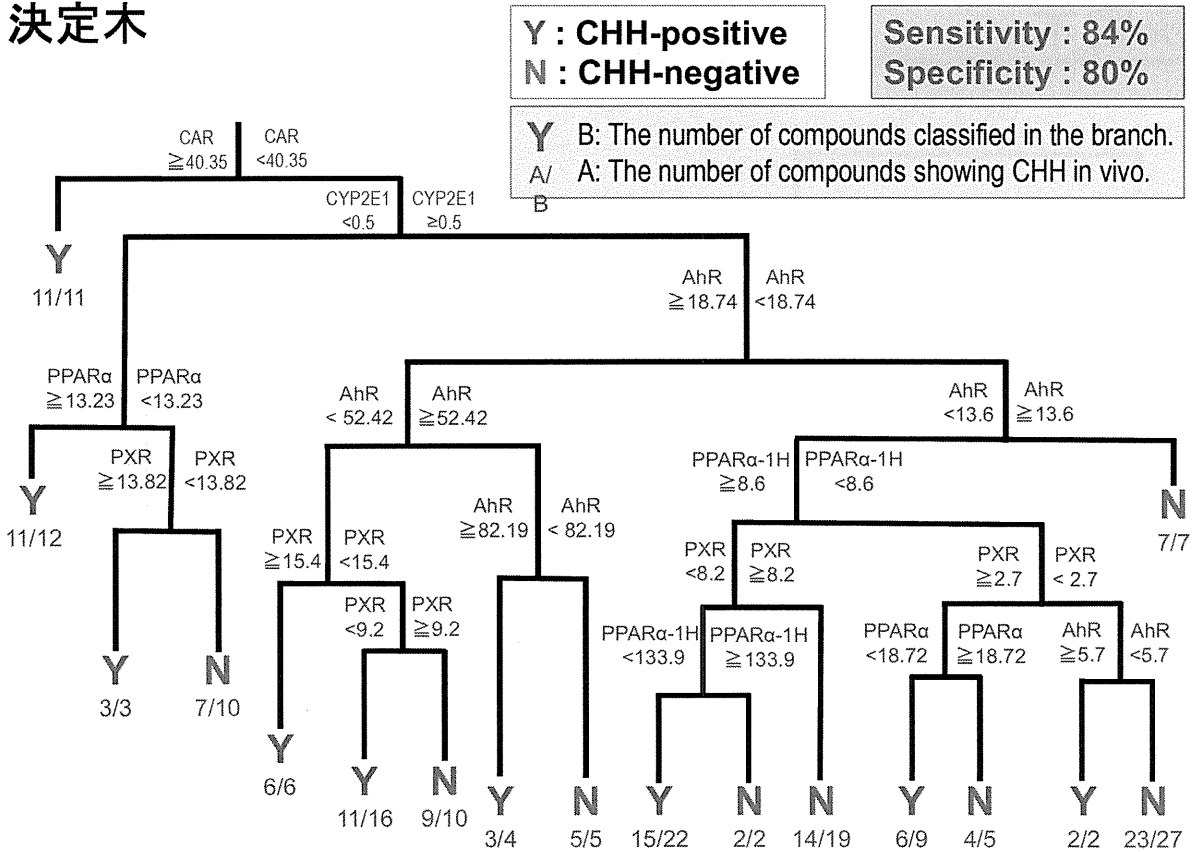
HESS-DBから入手		インビトロ・インシリコ解析から獲得					
No	肝細胞肥大	PPAR $\alpha$ -1H	PPAR $\alpha$	CAR	AhR	PXR	hCYP2E1
1	N	29.5	0	0	0	0	1
2	N	22.2	0	0	0	0	1
3	N	21.8	10.8	0	76.7	27.7	1
4	N	36.3	61.2	0	29.0	12.0	1
5	N	23.8	7.3	0	44.4	0	1
6	N	30.6	46.7	0	0	46.3	1
...	...	...	...	...	...	...	...
164	Y	0	0	0	19.2	0	1
165	Y	0	0	44.8	0	33.3	1
166	Y	18.3	12.7	77.8	0	11.4	0
167	Y	19.6	23.9	0	0	0	1
168	Y	50.6	70.8	36.2	82.9	18.9	1
169	Y	29.3	11.9	0	0	7.5	1
170	Y	30.8	43.6	0	22.1	54.4	1

目的変数  
(従属変数)

説明変数(独立変数)

レポーターアッセイの結果(説明変数)で肝細胞肥大の有無(目的変数)を説明する。

## 決定木



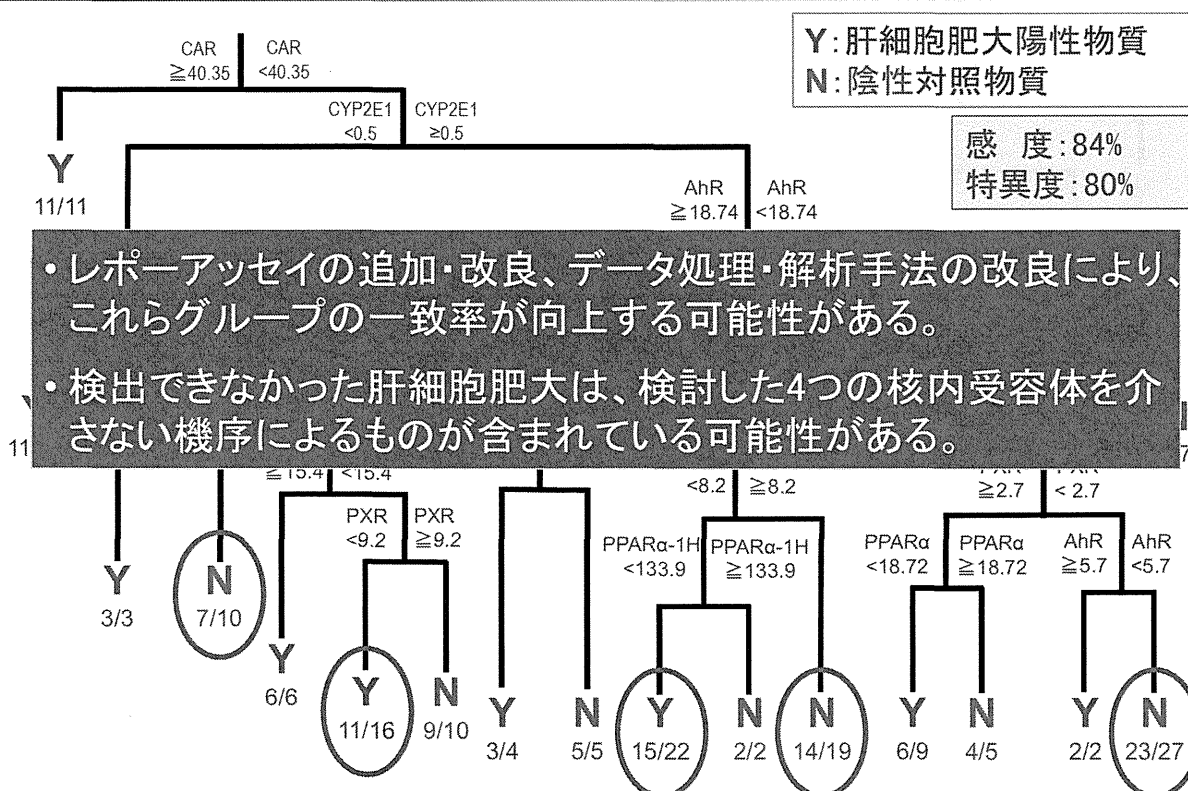
The mvpart package on R was used to build a tree.

## 肝細胞肥大性化学物質の特徴

グループ	#	CAR	PPAR $\alpha$	PXR	AhR	CYP2E1
1	11/11	強	-	-	-	-
2	11/12	<弱	>中	-	-	非基質
3	3/3	<弱	無	>中	-	非基質
4	6/6	<弱	-	>中	中	基質
5	11/16	<弱	-	無	中	基質
6	3/4	<弱	-	-	強	基質
7	15/22	<弱	中~強	無	無	基質
8	6/9	<弱	弱~無	>弱	無	基質
9	2/2	<弱	無	無	弱	基質

- 必ずしも全てのアッセイは必要なく、1つのアッセイで説明可能な場合もある。
- ある特定の受容体に対する「作用がない」ことも重要かもしれない。

## 決定木





- ✓ 核内受容体と解毒・毒性発現
- ✓ 核内受容体と肝発がん・肝細胞増殖
- ✓ 核内受容体の活性化作用評価系
- ✓ 核内受容体評価系の応用
  - 肝細胞肥大研究
  - 新規毒性予測システムの開発に向けて

### 化学物質の生物学的・毒性学的特性の評価における核内受容体評価系の利用

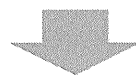


#### ***Current (Q)SAR approach for toxicity prediction***

- ✓ Chemical and physicochemical properties are extracted and defined based on the 2D/3D chemical structure.
- ✓ The biological property (e.g. ability to interact with cellular macro-molecules) may not be defined appropriately in that way.

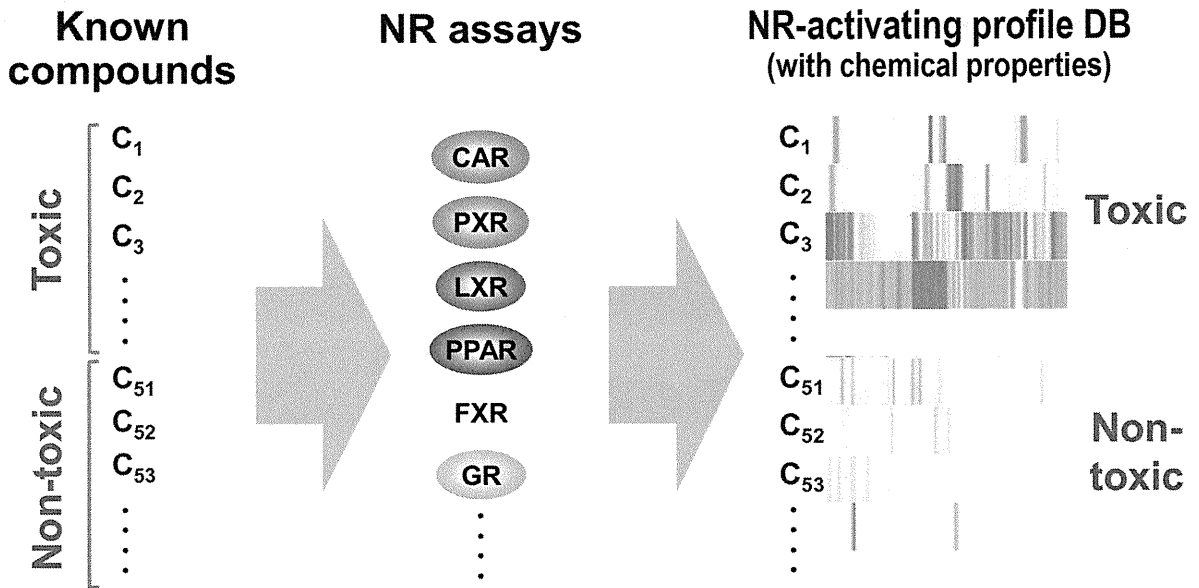
#### ***Characteristics of NRs***

- ✓ NRs are activated by a wide variety of chemical compounds, acting as “xeno-sensors”
- ✓ NR-activating ability of chemical compounds is easily determined in easy-to-handle, high throughput in vitro assays.

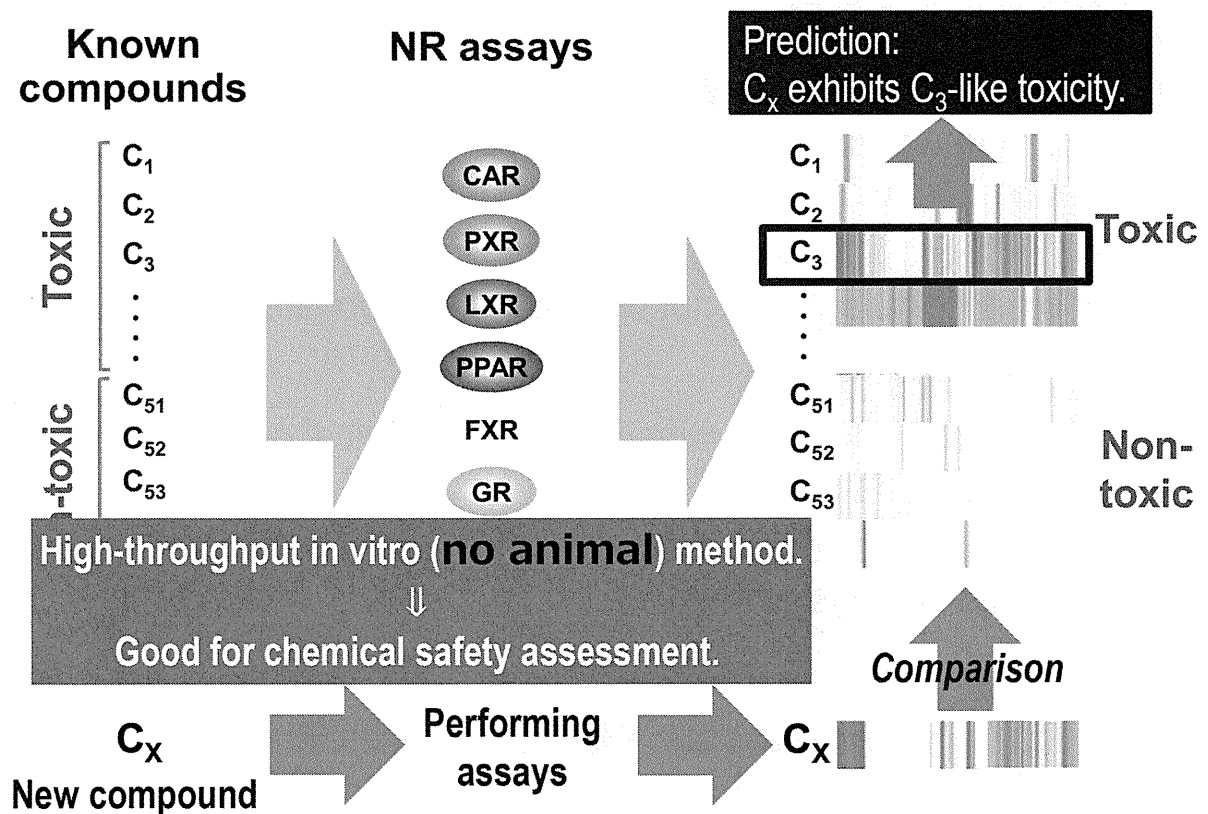


- In vitro reporter assays for NRs may be useful to describe the biological/toxicological properties of chemical compounds.

# Toxicity prediction using NR-activating profile and toxicity DB

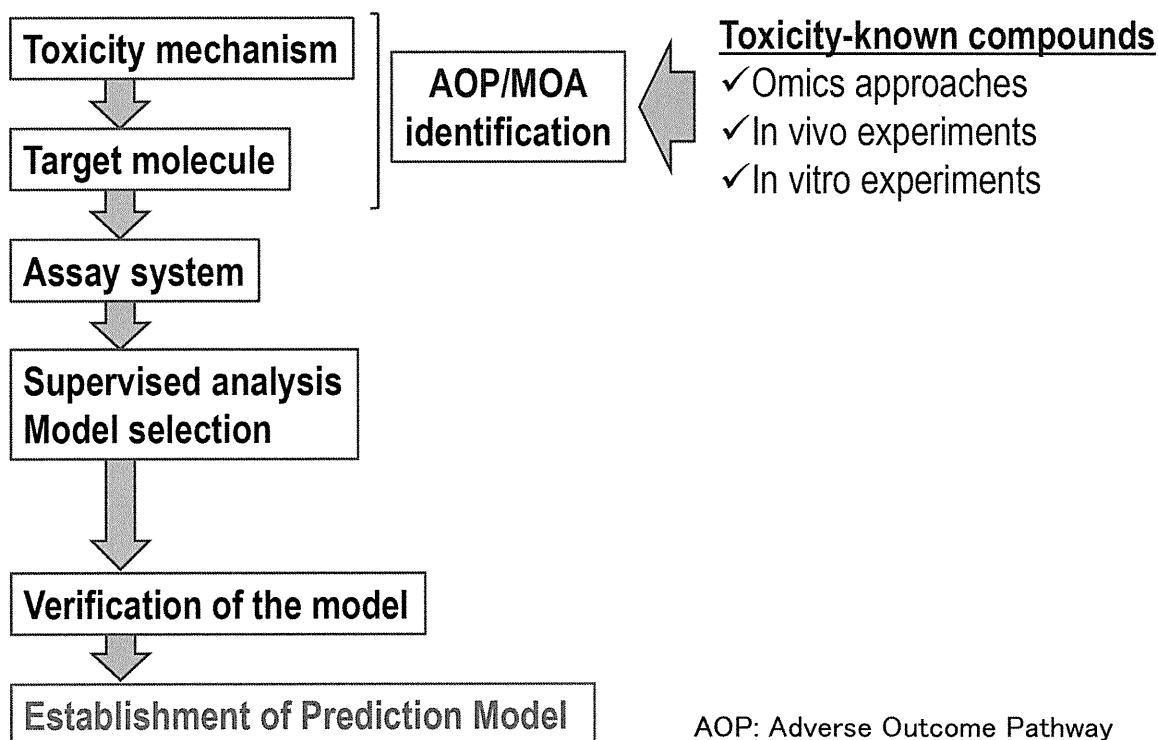


# Toxicity prediction using NR-activating profile and toxicity DB

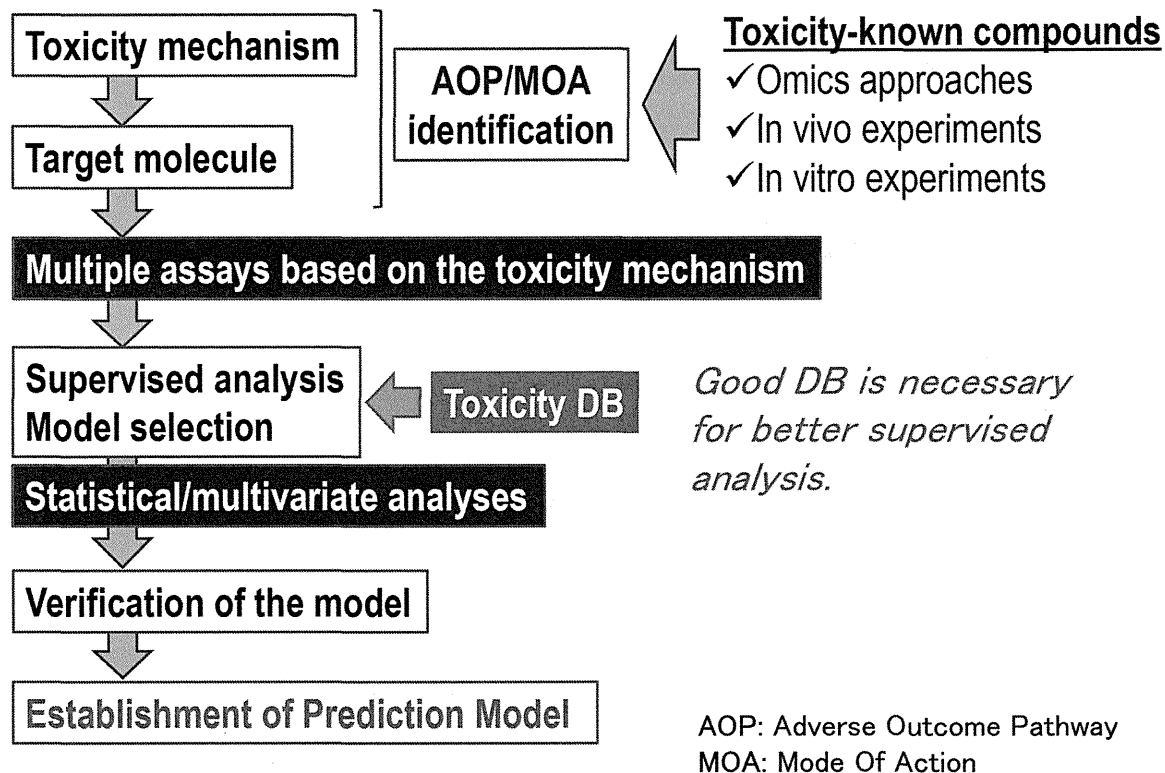


- ✓ To take this approach,  
we need a list of toxic and non-toxic compounds.
- ✓ To obtain this list,  
we need a well-organized database for in vivo toxicity.
- ✓ To build such a toxicity database,  
we should avoid performing new animal experiments.
- ✓ We also need human toxicity database and in vitro  
assay systems reflecting toxicity in humans in vivo.

## Classical approach for the establishment of toxicity prediction system



## In vitro/in silico integrated approach using toxicity database (DB) for the establishment of toxicity prediction system



### まとめ



- 核内受容体は、異物センサーとして機能し、解毒と毒性発現の両者に寄与している。
- 化学物質の核内受容体に対する作用は、インビトロアッセイにより評価可能である。
- 核内受容体活性化プロファイルを、化学物質の生物学的反応特性指標として利用可能かもしれない。
- 毒性データベース・インシリコ解析・インビトロ試験の統合は、より良い予測モデルの構築に有効かもしれない。
- 化学物質の複雑な毒性(発がん性・反復投与毒性等)の毒性試験の動物実験代替法の開発への貢献が期待される。

# 謝辞



東北大学大学院薬学研究科

山添康(現内閣府食品安全委員会)、永田清(現東北薬科大学)、児玉進、宮田昌明  
発現調節: 依田典明、荒木希久子、鳥谷部貴祥、渡邊圭祐、橘修子、近田翼  
肝毒性: 大野仁、新宮究、大塚祐多、石井千鶴  
肝細胞増殖: 志津怜太、辺野喜智、沼倉裕希、高橋未来、阿部太紀  
活性評価系: 今井純、中島宏之、野表知世  
肝肥大: 杉本雄一、伊藤和実、飯塚薫

NIEHS/NIH 根岸雅彦

University of Kansas J. Staudinger

北海道立衛生試験所 小島弘幸

日本薬科大学薬学部 北村繁幸、浦丸直人、藤野智恵美

関西学院大学 岡田孝

製品技術評価基盤機構 山田隆志、櫻谷祐企、山田準

国立医薬品食品研究所 石田誠一 医薬基盤研究所 水口賢司

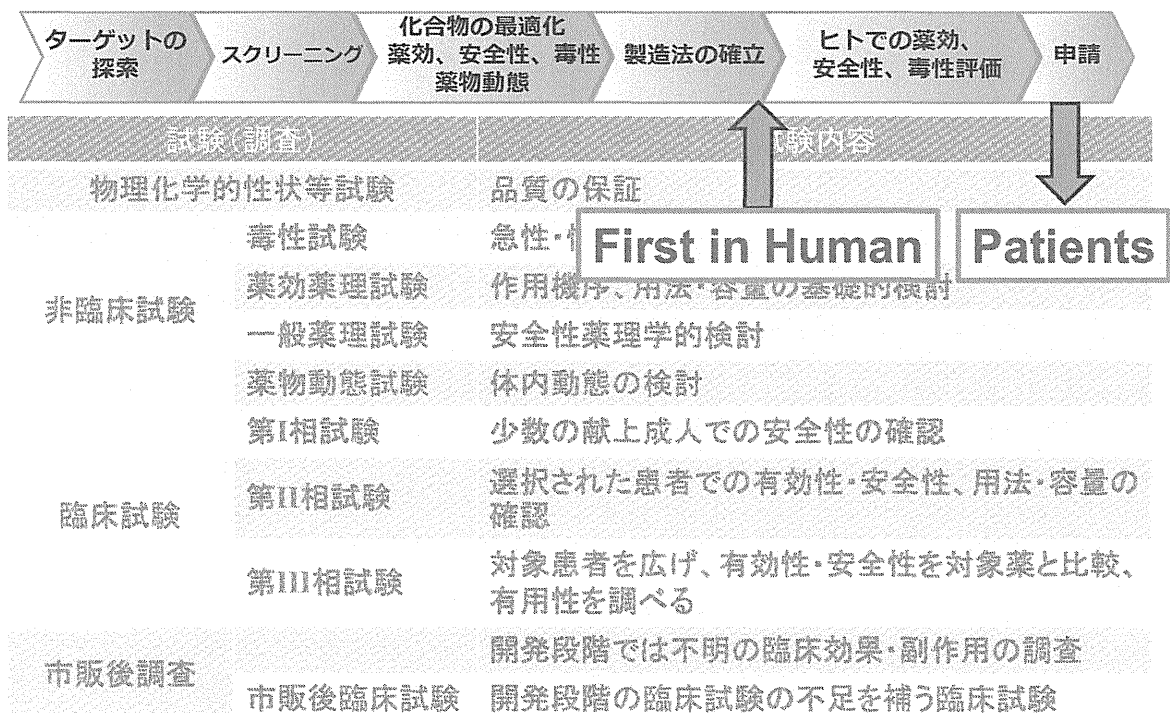
文部科学省、厚生労働省、経済産業省、NEDO、内閣府食品安全委員会、  
日本化学工業協会(LRI)、臨床薬理研究振興財団、持田記念医学薬学振興財団、  
武田科学振興財団、他

CBI学会2013年大会-生命医薬情報学連合大会-スポンサードセッション  
 日本動物実験代替法学会 (JSAAE) 協賛シンポジウム

# in vitro試験と代替法をつなぐ 計算毒性学の立ち上げ

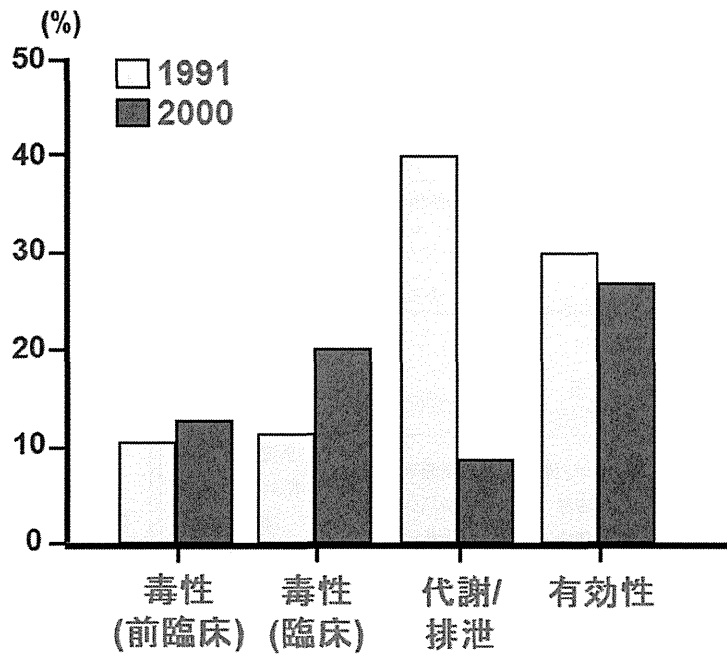
国立医薬品食品衛生研究所  
 石田 誠一

## 創薬クリティカルパス と非臨床・臨床試験

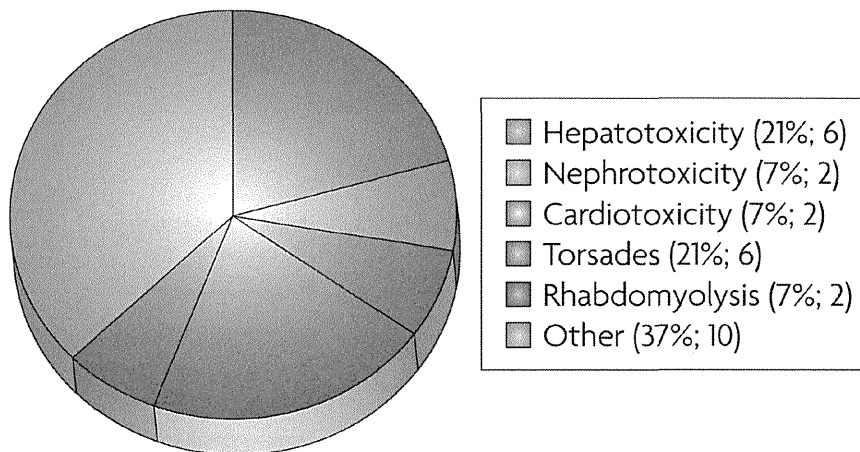


## 創薬プロセスにおける開発中止理由

(Nature Rev. Drug Discov. (2004)より改変)

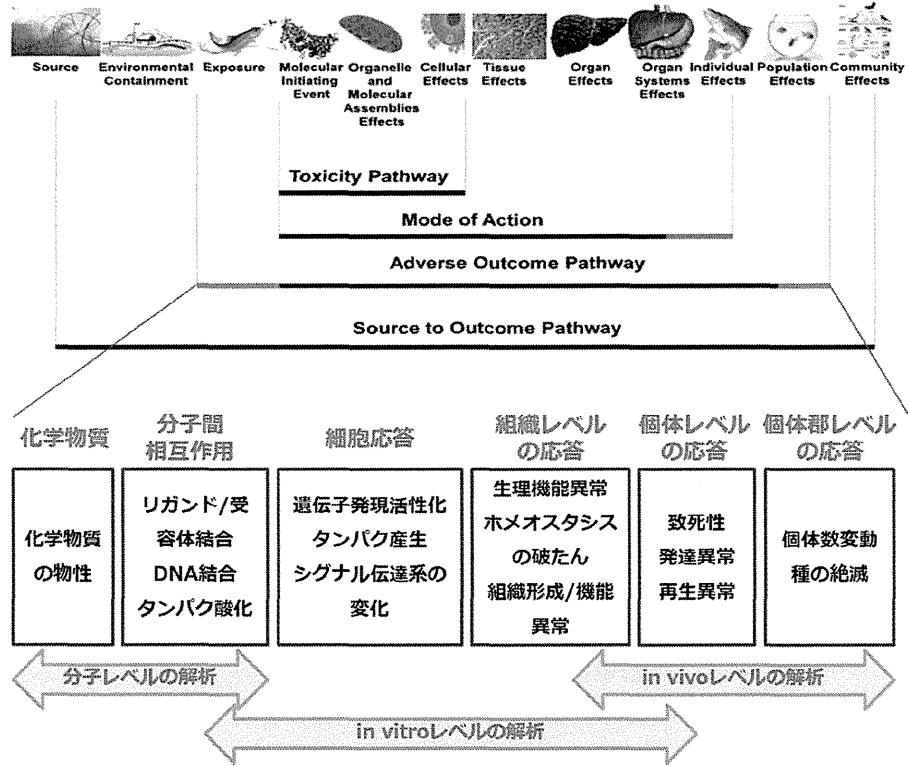


## 米国市場において、撤退を余儀なくされた薬物毒性の原因

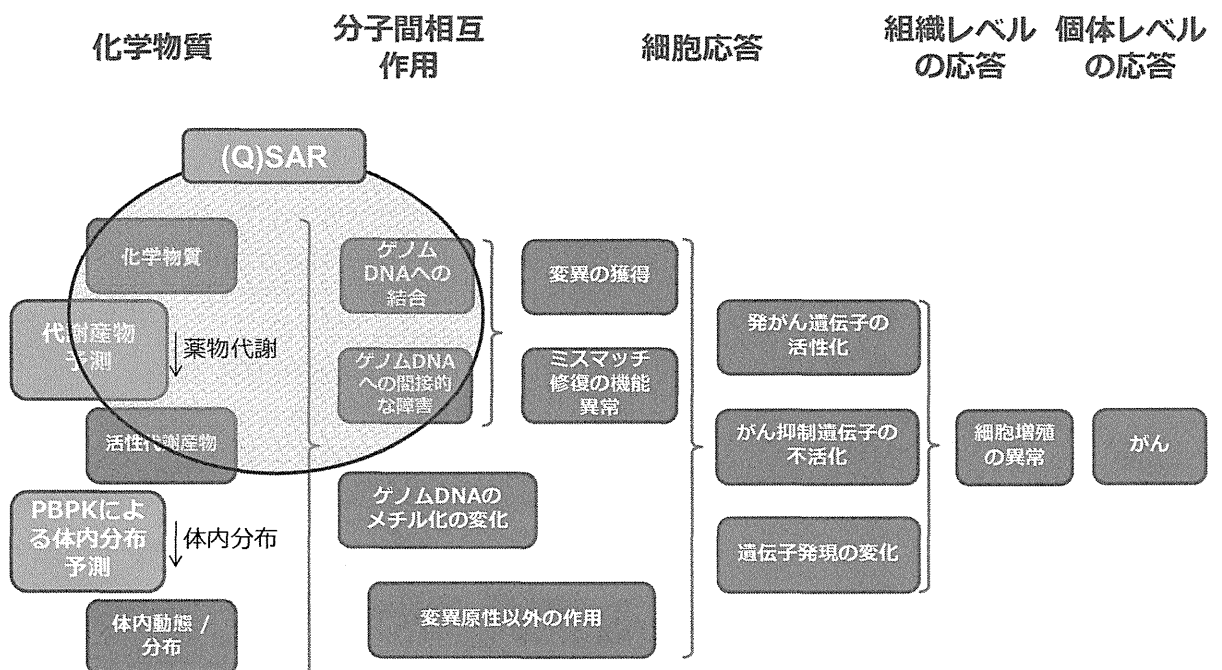


Nat Rev Drug Discov. 2007, 6, 904

# 新しい毒性評価手法: Adverse Outcome Pathway : AOP

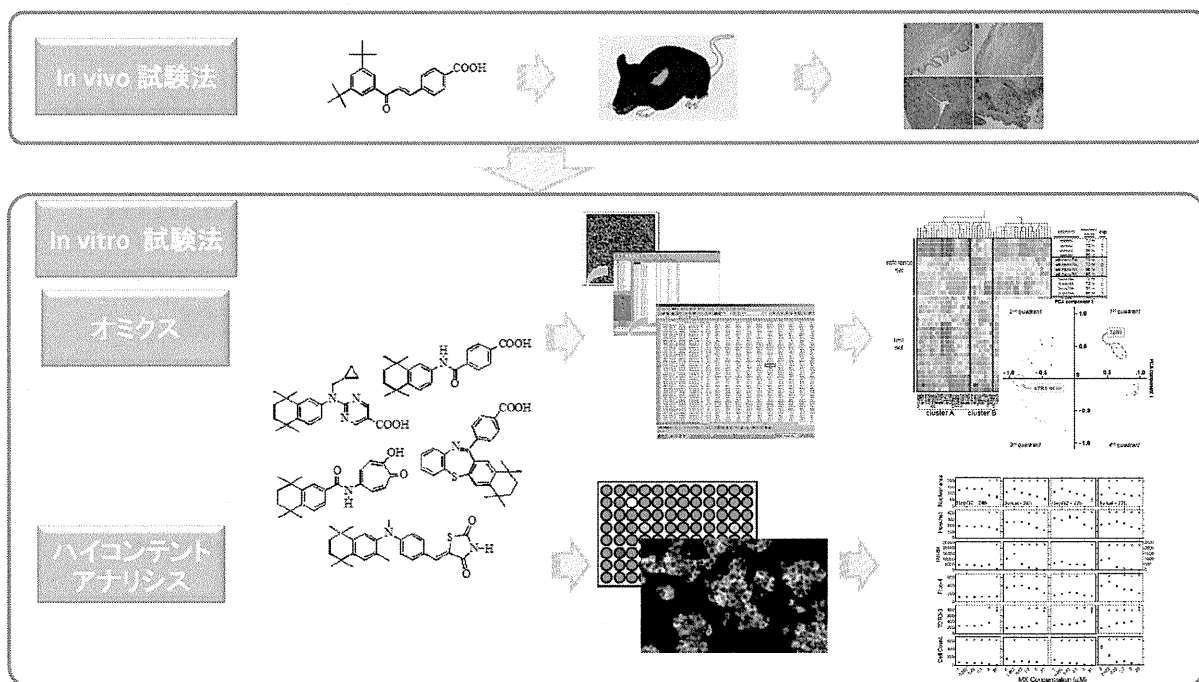


## AOPの例: 化学発癌

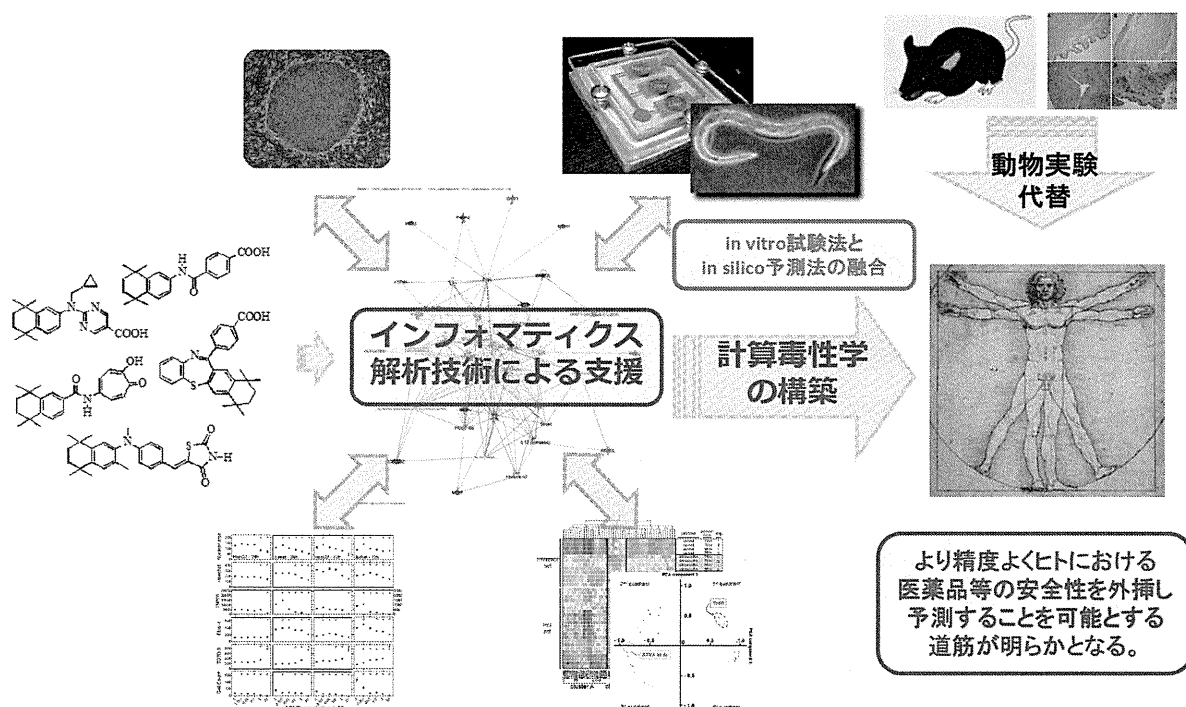




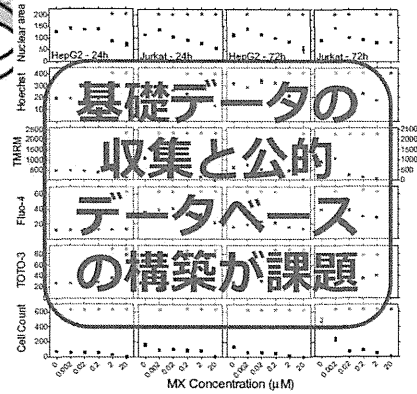
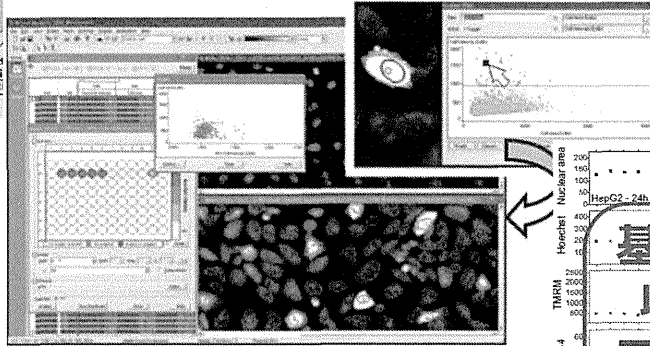
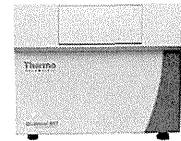
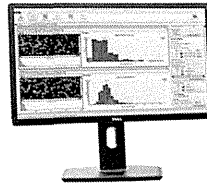
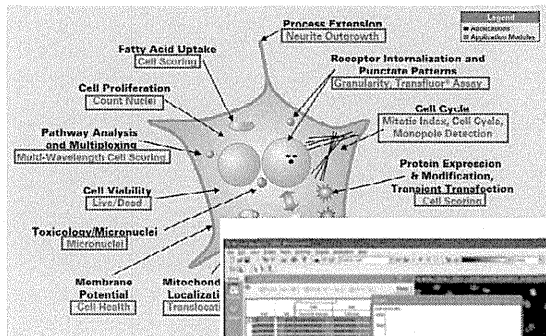
# 多変数の評価指標を含む試験法の安全性評価への応用



## インフォマティクスによる解析技術を活用した安全性評価の構築



# 課題：ハイコンテンツアナリシスのデータベースの拡充



基礎データの  
収集と公的  
データベース  
の構築が課題

