

令和 2 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

反復投与毒性の AOP キーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究

研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	部長
研究協力者	山田 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	室長
研究協力者	重田 善之	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	村田 康允	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	Susanne Stalford	ラーサ研究所		
	Adrian Fowkes	ラーサ研究所		
	Alun Myden	ラーサ研究所		
	Emma Hill	ラーサ研究所		

研究要旨

令和 2 年度は、昨年度に生殖発生毒性に関するリードアクロスの精度向上を目指して行われた毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして特定された標的に対して、ゴナドトロピン放出ホルモン受容体 (GnRHR) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に関連した AOP (毒性発現経路) の開発を検討した。その結果、GnRHR 結合阻害による妊娠損失と、HDAC 阻害による発生毒性の AOP を開発することができた。GnRHR リガンドを用いた生殖発生毒性試験では、生殖能の低下および胚・胎児毒性の可能性が示されており、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) システムが着床および胎盤機能に関与すること考えられた。その結果、GnRH に関連した AOP として GnRHR 結合から妊娠損失の増加に至る 2 系統の AOP を開発した。一方、HDAC 阻害剤として分類されるいくつかの化合物は、実験動物に催奇形性反応として心欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などを引き起こす。発生毒性に関する文献調査の結果、HDAC 阻害から中軸骨格欠損に至る 3 系統の AOP を開発することができた。本研究では、生殖毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして特定された標的に対して、より詳細な文献調査を行えば生殖毒性を引き起こす AOP を開発できることが明らかとなった。これらの AOP の開発は、リードアクロスに対する知識を拡大できる可能性があることに加え、これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立てるなどして、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できるという可能性も拓けると考えられた。

A. 研究目的

近年の化学物質の規制に関わる国際的な関心は、化学物質の安全性評価において動物実験を用いた試験だけに頼ることなく、化学物質曝露による有害作用を同定し評価するための評価ストラテジーを確立することであり、その中において構造活性相関(QSAR)やカテゴリーアプローチなどの *in silico* 手法を用いたコンピュータトキシコロジーは重要な位置づけでもあり、発展の望まれる研究分野である。そこで、反復投与毒性の毒性予測モデル開発の一環として、令和2年度は、昨年度より取りかかった生殖発生毒性に関するリードアクロスモデルの構築を目指して行われた毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規のAOPを開発するという手法を基づき、更に2つのAOPの開発を検討した。

B. 研究方法

昨年度は、毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性のあるデータセットに含まれる標的から、GnRHRと生殖毒性の間のシグナルについてのAOPの作成を試みたが、その中に多く含まれるニトロベンゼン類の調査では、本来の受容体を介する影響ではなく、グルタチオンの枯渇を伴う酸化ストレスによる精巣毒性のAOPを作成することとなった。今年度はGnRHRによる本来の生物学的影響の蓋然性にに基づき、様々なDARTエンドポイント(雌の受胎率、催奇形性および発生毒性等)とGnRHR変調の間の因果関係を明らかにするため、さらなる文献調査を実施し、GnRHR阻害によるAOPの作成を試みた。また、昨年度のデータセットとToxCast試験結果との相関マイニングによって、発生生殖毒性傾向が潜在すると特定

されたタンパク質標的の一つとして、HDACの阻害と生殖毒性の間の弱いシグナルも特定されており、さらなる文献検索の結果に基づき、発生毒性と関連したHDACの阻害によるAOPを作成した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C.1. GnRHR 阻害 AOP の作成

標的の役割

GnRHは、GnRHRの活性化を通じて生殖を調節する、デカペプチドである(Flanagan, 2017)。GnRHとGnRHRはいずれも視床下部-下垂体-性腺(HPG)軸の主要な構成要素であり、男性および女性の生殖能の維持に不可欠である(Oyola, 2017)。HPG軸では、視床下部から分泌されたGnRHがGnRHRに結合し活性化する。下垂体でこの受容体が活性化されることにより、下垂体における黄体形成ホルモン(LH)および卵胞刺激ホルモン(FSH)の両方の放出が調節される(Desaulniers, 2017; Flanagan, 2017)。続いて、LHおよびFSHは、配偶子形成、性腺細胞の増殖および性腺におけるステロイド産生など、生殖能の鍵となるプロセスを調節する(Flanagan, 2017)。

哺乳類では、2種のGnRHデカペプチドと2種のGnRHRアイソフォームが同定されており(Desaulniers, 2017; Lee, 2010; Maggi, 2016)、各GnRHは特定の受容体に作用すると考えられている。しかし、GnRH IIおよびGnRHR IIは、すべての哺乳類種で検出または発現されておらず、例えばラットにはGnRH IIの遺伝子が含まれていない。さら

に、ヒトは GnRHR II 遺伝子を保有しているが、完全長タンパク質を産生することはできない。そのため、GnRH II および GnRHR II の役割はまだ完全に解明されていない。

また、GnRH および GnRHR は、生殖能以外の生物学的過程を調節し、HPG 軸から独立していると考えられている。例えば、GnRH およびその受容体は、視床下部および下垂体以外の器官（胎盤、腎臓、卵巣、精巣など）で発現することが明らかになっている(Lee, 2010; Rama, 2001)。雌の生殖器および胎盤に発現する GnRH および GnRHR は、着床や胎盤形成などの過程で重要な役割を果たすと考えられているため(Chou, 2004; Lee, 2010)、妊娠維持に GnRH が重要である可能性がある。ヒトでは、胎盤性 GnRH がヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)

(胎盤形成や胎盤の脈管形成など、いくつかの重要な過程を調節するホルモン)の発現を調節することが明らかになっている(Cole, 2010; Keay, 2004)。

AOP 概要

GnRH 系が生殖能、着床および胎盤形成において重要な役割を果たすことを考慮すると、GnRH シグナル伝達障害が生殖能および妊娠転帰の異常につながり得ることは、生物学的に妥当である。この AOP は、GnRHR の結合阻害が、特に着床と胎盤の発生および機能の妨害を通して妊娠損失の増加を引き起こす可能性があるという裏付けのエビデンスを示している。この経路を裏付けるエビデンスには以下が含まれる。

- ・ GnRH アゴニストおよびアンタゴニストの両方を用いた前臨床 *in vivo* 毒性試験では、これらのタイプの化合物の投与により胚・胎児毒性が生じる可能性がある

ことが示されている。妊娠中のラットおよびウサギに GnRH 受容体アンタゴニスト（および1種類のアゴニスト）を投与した試験では、胎仔生存率の低下が認められた。妊娠中のヒヒに受容体アンタゴニストおよびアゴニストを投与したところ、死産仔および胎盤重量の減少が認められた。

- ・ GnRH により調節されるシグナル伝達分子の遺伝子 (ERK1 および ERK2) を胎盤で選択的にノックアウト (KO) したマウスの試験では、妊娠期間延長、胎盤構造の異常、産仔数減少および新生児死亡率増加が認められた(Brown, 2019)。

この経路は、以下の関連試験によりヒトへの適用可能性も裏付けられている。

- ・ ヒト胎盤細胞（栄養膜細胞および脱落膜間質細胞）を用いた *in vitro* 試験で、GnRH デカペプチドと GnRHR-I はともに胎盤で発現するだけでなく、hCG の発現を調節することが示されている(Chou, 2004; Lee, 2010)。hCG は、妊娠初期における黄体の維持など、妊娠を支援する重要な生物学的過程を調節する(Cole, 2010; Keay, 2004)。さらに、hCG は胎盤に十分な血液を供給するために子宮の脈管形成を調節していると考えられている(Cole, 2010)。したがって、GnRH 受容体の拮抗作用を介した GnRH の胎盤機能への影響は、上記のような調節過程を乱し、流産を増加させる可能性があると考えられる。
- ・ GnRH は哺乳類において着床を調節する重要な因子として特定されている(Desaulniers, 2017; Maggi, 2016)。ヒトにおける GnRHR の不活性化が着床障害につ

ながら得るといのは生物学的に妥当である。この主張を裏付ける実験に基づくエビデンスは限られており、現在のところ結論は出ていない。

- 体外受精(*In Vitro* Fertilization: IVF)治療計画において、GnRH アゴニストおよびアンタゴニストは、FSH および LH 分泌を抑制するために使用される(Depalo, 2012; Santos, 2010)。しかし、IVF で GnRH アンタゴニストを使用すると着床率が減少し、早期妊娠損失が増加するという懸念が複数の文献で提起されている(Blumenfeld, 2001; Hernandez, 2000; Kol, 2000)。
- IVF における GnRHR 調節因子の使用が着床に及ぼす影響を検討した複数のコホート研究が発表されている。これらの研究の結果はまちまちであり、例えば入手可能なメタデータのレビューから、GnRH アンタゴニストおよびアゴニストに基づく IVF が着床成功率の低下を引き起こす可能性があることが示唆された(Santos, 2010)。しかし、別の研究では、IVF 治療計画において GnRH 調節因子を使用した場合、GnRH 調節因子を使用しなかった場合と比較して、IVF 治療計画を通じて妊娠率が改善することが示された(Depalo, 2012)。

GnRHR 調節と着床障害の関連性を直接に裏付ける実験的データはないが、GnRHR 系の既知の役割と生物学的妥当性に基づいて、この AOP に含めた。

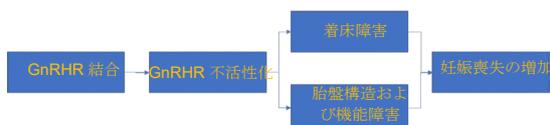


図 1. GnRHR 結合の AOP による妊娠損失の増加

GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化

GnRH は、GnRHR に結合することで下垂体からの FSH および LH の放出を調節する視床下部デカペプチドであることが最大の特徴である(Desaulniers, 2017; Flanagan, 2017)。哺乳類では、2 種の GnRH (GnRH I と GnRH II) および 2 種の GnRHR (GnRHR I と GnRHR II) が特定されている(Desaulniers, 2017)。GnRH がその受容体に結合すると、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) カスケードが活性化され、遺伝子転写が変化する。GnRHR I と II はともに MAPK ERK1 と 2 を活性化することが知られているが、GnRHR I は MAPK p38 MAPK およびビッグ MAPK も活性化させることが実証されている(Desaulniers, 2017; Liu, 2009)。

GnRH およびその受容体は、胎盤、卵巣、子宮内膜など、その他の多くの器官および組織に認められている(Cheng, 2000; Desaulniers, 2017; Terashima, 2016; Maggi, 2016)。GnRH 受容体にアンタゴニストが結合すると、受容体が不活性化される。GnRH アンタゴニストは競合的に受容体に結合し、GnRH アンタゴニストへの長期曝露により、受容体の発現が低下する可能性がある(Hernandez, 2000)。したがって、GnRH 受容体アンタゴニストの結合が、受容体の不活性化および関連する遺伝子発現の減少につながる可能性がある。GnRHR アンタゴニストの例としては、アバレリックス、ガニレリックス、セトロレリックスがある(FDA, 2003; EMA, 2004)。

GnRHR アゴニストへの長期曝露により GnRHR 発現が減少するため、受容体の活性が低下することも示されている(Kol, 2000;

Hernandez, 2000)。ゴセレリンは、長時間の投与により GnRHR 活性が低下する GnRHR アゴニストの一例である(Zeneca, 1998)。

GnRHR 不活性化 => 着床障害

GnRH および GnRHR は、特定の子宮内膜細胞(上皮細胞および間質細胞)で発現することが分かっている(Maggi, 2016)。これらの細胞における GnRH および GnRHR の発現は月経周期の黄体期に増加し、着床のための子宮内膜の準備に働くと考えられている。このことから、GnRHR アンタゴニストまたは強力なアゴニストの投与により着床障害が起こる可能性があることは生物学的に妥当である。

GnRH 調節因子が着床を阻害することを示す実験データは限られている。ゴセレリンは、長期使用により GnRHR 活性を低下させる作用を有する GnRHR アゴニストであり、投与された雌動物群において生殖能の障害を引き起こした(Zeneca, 1998)。投与終了後、交尾成立は回復したが、排卵率および着床率は低下したままであった。

この生物学的妥当性および動物での限られたエビデンスにも関わらず、GnRHR 調節因子は IVF 治療計画で使用されている(Depalo, 2012; Santos, 2010)。IVF 治療における GnRHR 調節因子の使用に伴う着床へのリスクに関する懸念は、いくつかのグループによって検討されている(Blumenfeld, 2001; Hernandez, 2000; Kol, 2000)。公表された試験の結果は、例えば以下のように様々である。

- 入手可能なメタデータのレビューから、GnRH アンタゴニストおよびアゴニストに基づく IVF が着床成功率の低下を引き起こす可能性があることが示唆された

(Santos, 2010)。

- IVF での GnRHR アゴニストの使用は、GnRHR アンタゴニストを使用する IVF に比べて、子宮内膜厚が増し、妊娠率を高めることが観察されている(Maggi, 2016)。
- Tug らにより、ガニレリクスを着床期の初期に4日間連日投与する治療計画が着床率に影響しないことが観察された(Tug, 2011)。

IVF 治療計画において GnRH 調節因子を使用した場合、GnRH 調節因子を使用しなかった場合と比較して、IVF 治療計画を通じて妊娠率が改善することが示された(Depalo, 2012)。この KER (Key Event Relationship) を裏付ける上述のエビデンスは、ばらつきのある限られた実験的エビデンスと共に、主に生物学的妥当性に基づいている。この KER を裏付けるエビデンスは限られているが、IVF 治療における着床率低下への関与の可能性から、これを本 AOP に含めることは妥当といえる。

着床障害 => 妊娠損失の増加

着床の成功は妊娠に不可欠である(Schoenwolf, 2014)。ヒトでは、着床後の栄養膜細胞から hCG が分泌され、これが妊娠初期に胎盤が十分に発育するまで黄体を補助する。着床の過程が乱されると、妊娠損失が増加する可能性がある。着床しなければ直ちに妊娠損失が生じる一方、着床に障害が生じた場合には黄体の補助が不十分になることがある。妊娠第 1 三半期の妊娠損失の主要な原因に関する研究から、着床障害から生じる可能性がある黄体の維持の失敗が、早期妊娠損失の一般的な原因であることが明らかになった(Baird, 2009)。

GnRHR 不活性化 => 胎盤の構造および機能障害

GnRH は、GnRHR との結合を通して胎盤機能を調節することが実証されている (Desaulniers, 2017; Maggi, 2016)。したがって、GnRHR の不活性化が胎盤機能障害をもたらす可能性があることは生物学的に妥当である。

GnRHR の不活性化が胎盤の構造および機能の障害をもたらす可能性があることが示す、動物モデルを用いた試験には、以下のものがある。

- ・ マウスを用いた組織選択的 KO 試験から、妊娠中の胎盤 GnRHR 活性の重要性が裏付けられている (Brown, 2019)。これらの試験では、胎盤 GnRHR により活性化されるシグナル伝達分子 ERKI および ERKII を KO した。その結果、妊娠期間の延長、胎盤構造の異常、産仔数の減少、新生仔死亡率の増加が認められた。
- ・ 妊娠中に GnRH アンタゴニストを投与した 3 匹のヒヒのうち、1 匹は低出生体重仔を出産し、2 匹は死産した (Siler-Khodr, 1984)。死産の 1 匹から摘出した胎盤は正常胎盤の半分の大きさであった。ヒヒは CG (絨毛性ゴナドトロピン: GnRH により調節されるホルモンで、黄体機能の維持およびプロゲステロンの発現を通じて妊娠を補助することが知られている) を発現する。しかし、CG と GnRH アンタゴニスト投与との間に相関は認められなかった。妊娠した雌に対し、CG のピーク後 (これ以降 CG の濃度が低下すると予測される) に GnRH アンタゴニストを投与した。したがって、著者らは、化合物投与が CG 濃度に及ぼす影響を明

らかにすることができなかった。投与された動物では、プロゲステロン、エストロゲンおよびエストラジオールの減少が認められた。

- ・ また、長時間作用型 GnRH アゴニストであるゴセレリンを投与した妊娠したヒヒでは、胎盤機能障害が認められた (Kang, 1989)。これらの試験では、対照群と比較して CG およびプロゲステロンの平均濃度がいずれも低下した。長時間または高用量の GnRHR アゴニストを投与すると、GnRHR が下方制御され、受容体が不活性化されるため (Kol, 2000; Hernandez, 2000)、ゴセレリンが GnRHR を不活性化する可能性がある。
- ・ GnRHR アンタゴニストであるオルガノン-30276 を投与したヒヒでは、平均 CG 濃度の低下とプロゲステロン濃度の不安定化が認められた (Kang, 1989)。投与された 5 匹のヒヒのうち 3 匹では、対照濃度よりもはるかに高いプロゲステロン濃度が示された。これらの異常に高いプロゲステロン濃度は、胎盤のフィードバック制御の結果であるとの見解が提案された。ヒヒ CG に対する用量依存性の影響が観察され、50 mg 投与群の 3 匹のヒヒは正常なヒヒ CG 濃度を示したが、100 mg 投与群の 2 匹は対照群に比べてピーク CG が低かった。
- ・ GnRHR アンタゴニストであるセトロレリクスをラットに子宮内投与した試験では、胎盤発生が抑制された (Tug, 2011)。一方、ヒトに適用可能な KER のエビデンスとしては、GnRH が GnRHR を介して作用し、hCG の発現を用量依存的に調節することが示されている (Lin, 1995)。GnRH-I、

GnRH-II、GnRHR-I mRNA およびタンパク質は、妊娠満期に分離されたヒト胎盤細胞（栄養膜細胞、脱落膜間質細胞、不死化細胞株）で発現することが明らかになっている（Lee, 2010）。これに加えて、GnRH-I または GnRH-II で処理した栄養膜（および栄養膜由来）細胞では用量依存性の hCG 産生の増加が認められた。上記の用量反応試験の一環として、他のサイトカイン（インターロイキン 8、血管内皮増殖因子など）の調節を評価したところ、GnRH-I または-II には反応しないことが明らかになった。これは、栄養膜細胞では、GnRH とその受容体が主として hCG の発現を調節することを示している。妊娠満期および妊娠第 1、2 三半期での治療的流産における GnRH 投与とヒト胎盤の hCG 産生との間にも、同様の関係が認められた（Lin, 1995）。9 週で終了した妊娠において胎盤を摘出したところ、beta-hCG の増加が最も大きかった。GnRH アンタゴニスト（Nal-Glu）の併用投与により、beta-hCG の発現増強が抑制された。これらの胎盤組織での GnRH 受容体 mRNA の試験では、妊娠第 1 三半期の胎盤外植片では GnRH 受容体が高濃度で存在し、9 週の外植片では発現量が最大であることが示された。この GnRH 受容体の発現パターンは、妊娠中の hCG 濃度パターンと一致する。

これらの試験は、胎盤 GnRH 受容体の活性低下が hCG 濃度の低下につながる可能性があることを示している。さらに、子宮内膜細胞は GnRH および GnRHR を発現することが示されており、胚-子宮内膜付着後にこの系がパラクライン作用で hCG の発現をサポートするとの見解が提案されている（Maggi, 2016）。

胎盤の構造および機能障害 => 妊娠損失の増加

胎盤は、母体から発育中の胚/胎児へ栄養を供給するとともに、主要なホルモン [CG (ヒトおよび高等霊長類)、プロゲステロン、およびエストロゲン] の調節および産生を通じて妊娠を補助している（Schoenwolf, 2014）。胎盤の正常構造および生物学的機能を損なうことにより妊娠の補助が低下し、結果として妊娠損失が増加する可能性がある。GnRHR の不活性化によって誘発される胎盤の構造および機能の障害と妊娠損失増加との関連性を裏付ける哺乳動物に適用可能な KER のエビデンスエビデンスを以下に示す。主に、妊娠中の動物（サル、ラット、ウサギ）への GnRHR アンタゴニスト投与および KO マウスモデルにより、生仔出生数の減少と胎盤構造障害との間に関連性があることが示されている。

- ・胎盤 GnRHR 活性を選択的に KO したマウスの KO 試験では、胎盤発生障害とそれに伴う産仔数の減少および新生仔死亡率の上昇が認められた（Brown, 2019）。
- ・GnRHR アンタゴニストを投与した妊娠中のサル 3 匹のうち、2 匹は死産、1 匹は出生時低体重であった（Siler-Khodr, 1984）。このうち 1 匹の胎盤を観察したところ、正常な胎盤の大きさの半分であった。さらに、CG、エストロゲン、プロゲステロンの産生が損なわれていた。
- ・GnRHR アゴニストであるゴセレリンを妊娠 14~21 日目から投与したヒヒでは、妊娠損失が増加した（Kang, 1989）。ゴセレリンを投与した 6 匹のヒヒのうち、3 匹が死産に至り、2 匹が流産し、1 匹が低出生体重で出生した。プロゲステロンおよ

びCGの濃度はいずれもゴセレリンの投与により損なわれていた。著者らは、観察された妊娠損失の増加は胎盤の障害による可能性があることを示唆している。

- ・ **GnRHR** アンタゴニストであるオルガノン-30276 を妊娠中に投与したヒヒでは、妊娠損失が増加した(Kang, 1989)。オルガノン-30276 を投与した 5 匹のヒヒのうち、1 匹は死産 (50 mg 投与群)、2 匹は流産 (100 mg 投与群)、2 匹は生仔出産 (50 mg 投与群) した。この試験では、投与を行った全ヒヒの平均CG濃度は対照群よりも低かったが、出産した2匹および死産の1匹のヒヒのプロゲステロン濃度は対照群よりもはるかに高かった。著者らは、この正常よりも高いプロゲステロン産生が、胎盤のフィードバック制御の結果である可能性を示唆している。一方、ヒトに適用可能なKERのエビデンスとしては、hCGの発現が黄体細胞におけるプロゲステロン合成の促進、着床、脈管形成、栄養膜細胞の合胞体細胞への分化、および胎児の成長に応じた子宮の成長など、いくつかの重要な過程の制御を通じて妊娠を促進することが知られている(Cole, 2010)。GnRH受容体の不活性化による胎盤でのhCG産生の減少は、hCGの機能に影響を及ぼし、胚・胎児死亡に至る可能性が知られている。
- ・ hCGは、子宮脈管構造における血管新生および脈管形成を促進することが示されている(Cole, 2010)。子宮脈管構造は、胎盤浸潤に不可欠な血液を供給し、胎児に栄養を供給する。
- ・ hCGは、早期の妊娠の維持に重要な黄体

とプロゲステロンおよびレラキシンの合成を維持する(Keay, 2004)。

- ・ hCGは免疫抑制を調節し、胎盤浸潤を補助していることが、多くの研究で示されている(Cole, 2010)。

AOPと関連する医薬品の例

市販されているいくつかの医薬品(アゴニストおよびアンタゴニストの両方)がGnRHRを標的とするよう開発されている(Tarlatzis, 2007)。アンタゴニストは受容体に競合的に結合するため、GnRHが介在する作用(LSおよびFSHの放出など)を阻害する。一方、アゴニストは受容体と結合して活性化する(LHおよびFSHの急激な放出など)。しかし、アゴニストによって受容体が長時間刺激されると、受容体が下方制御されてGnRHに対して脱感作が起こるため、下垂体ホルモンの放出が減少する。したがって、GnRHアゴニストおよびアンタゴニストはいずれもGnRHRを不活性化する可能性がある。

アンタゴニスト:

動物モデルに投与した場合、いくつかのGnRHアンタゴニストで同様の有害性発現(雌雄の生殖能に対する可逆的な障害、胎仔吸収の増加、催奇形性の欠如)が誘発された。

● アバレリックス

雌ラットに0.3~10 mg/kgの用量でGnRHRアンタゴニストであるアバレリックスを皮下投与したところ、生殖能に対する用量依存性の影響が認められた(FDA, 2003)。

● ガニレリクス

ガニレリクス(GnRHRアンタゴニスト)をそれぞれ0.1 ug/kg/日および0.5 ug/kg/日

を超える用量でラットに投与したところ、雄および雌の生殖障害が観察された(EMA, 2004)。妊娠中（器官形成期）にガニレリクスを投与したラットおよびウサギでは、胎仔吸収率が増加したが（ラットで 10 ug/kg/日、ウサギで 30~50 ug/kg/日）、催奇形性は認められなかった。別の生殖毒性試験でも、雌雄ラットが高用量（100 ug/kg/日以上）で不妊となり、この作用は投与終了時に回復することが示された(Merck, 2019)。

- セトロレリクス

雌雄ラットにセトロレリクスを投与したところ、用量依存性の生殖毒性が認められた(EMA, Cetrotide Scientific Discussion, 2004)。雌ラットでは生殖能の低下も認められ、いずれの影響も可逆的であった。異常または催奇形性は認められなかった。

- オルガノン-30276

5匹の妊娠したヒヒに、GnRH アンタゴニストであるオルガノン-30276 を 50 または 100 mg の用量で妊娠第 14~21 日から継続投与した(Kang, 1989)。低用量群の 3 匹では、対照群と比較して 3 匹とも正常なヒヒ CG (bCG) 濃度であった。1 匹は死産となり、他の 2 匹は正常な妊娠転帰となった。しかし、19 日目に 1 匹の新生仔が死亡した。高用量群の 2 匹では、いずれの妊娠も流産し、低濃度の bCG が観察された。プロゲステロン濃度は、妊娠初期に流産しなかった投薬動物の方が高かった。この所見は、GnRH シグナル伝達系の乱れによる胎盤の正常な恒常性の破綻に起因すると考えられている。

アゴニスト：

GnRHR アゴニストは生殖能を（可逆的に）低下させ、胚・胎児毒性を引き起こす可能性がある。

- ゴセレリン

ヒトの推奨用量（500~1000 ug/kg/日）の 30~60 倍のゴセレリンを投与した雄ラットでは、精巣、精巣上体、精嚢および前立腺の重量減に加え、萎縮性の組織学的変化が認められ、精子形成が完全に抑制された(FDA, 1998)。同様の用量を投与した雌ラットでは卵巣機能が抑制され、卵巣の大きさおよび重量の減少、卵胞発達の停止、黄体の大きさおよび数の減少が引き起こされた。これらの所見の大部分は投与終了後に回復可能であったが、生殖能は低下し、着床数および成功した妊娠における生存胎仔数は減少した。妊娠したヒヒ 6 匹に対して、妊娠第 14 日にゴセレリンを低用量（3.6 mg）または高用量（7.2 mg）投与した(Kang, 1989)。低用量を投与した 2 匹の妊娠のうち、1 匹は bCG が緩やかに増加して流産に至り、もう 1 匹は対照群と同程度の bCG 濃度であったが死産に至った。高用量群では、2 匹が流産し（いずれも対照群よりも著しく低い bCG 濃度であった）、1 匹は低出生体重仔が生まれて新生仔死亡に至ったが、もう 1 匹は正常妊娠であった。このことは、GnRH アゴニストを妊娠初期に投与すると、妊娠期間を通して黄体機能と胎盤機能に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。

- レウプロレリン

成人を対象とした臨床試験では、レウプロレリンを 24 週間にわたり投与した結果、生殖能が抑制されたが、投与中止後に回復した(FDA, 2012)。妊娠したウサギを用いた毒性試験では、用量依存性の胎仔異常の増加が認められ、高用量群では胎仔体重の減少が認められた。ラットを用いた同様の試験では異常は認められなかったが、高用量

群で胎仔死亡の増加および胎仔体重の減少が認められた。

C.2. 発生毒性を引き起こす HDAC 阻害 AOP の作成

標的の役割

HDAC は、ヒストン尾部での特定のアセチル化リジン残基の脱アセチル化を促進する酵素のファミリーである (Seto, 2014)。HDAC とヒストンアセチルトランスフェラーゼのいずれも、クロマチン/ヌクレオソームの構造を変えることによって遺伝子発現を制御する働きをする。ヒストン尾部の脱アセチル化によってヒストンの正電荷が増加し、同様に負に帯電した DNA に対する親和性が増加する (Bradley, 2011)。このヒストンと DNA の親和性の増加によってクロマチン/ヌクレオソーム構造のコンパクションおよび、究極的には遺伝子発現の抑制が生じる (Bradley, 2011; Haberland, 2009)。HDAC がクロマチン構造の調節で演じる重要な役割に加え、HDAC は転写因子に存在するタンパク質を含むヒストン以外のタンパク質を脱アセチル化することが可能であり、その結果 HDAC が遺伝子発現の調節に関与する別の機序を提供することも研究で明らかにされている (Bradley, 2011)。HDAC にはそのイースト HDAC 相同性によって定義される 4 つの異なるクラスに分類される多数のイソフォームがある (Seto, 2014)。クラス I、II、および IV の HDAC は亜鉛依存性酵素であり、一方、クラス III の HDAC は NAD⁺依存性である。HDAC は核および細胞質内で触媒機能を果たす (Haberland, 2009)。例えば、HDAC6 (クラス IIb の HDAC) は、細胞骨格タンパク質 (例えば、 α -チュー

ブリン) および膜貫通タンパク質 (例えば、IFN α R) を脱アセチル化する主要な細胞質内デアセチラーゼであるが、クラス I の HDAC は主として核に局在している。

発生毒性に関する推測

HDAC は遺伝子発現の調節に関与し、そこで HDAC によって促進されるヒストンの脱アセチル化によって遺伝子発現の抑制が生じる (Haberland, 2009)。正常な胎芽・胎児発生のためには、遺伝子発現の慎重な調節が必要であり、不規則な遺伝子発現による HDAC 機能障害は心奇形や骨発生障害などの多くの発生異常を示す (Haberland, 2009)。バルプロ酸 (VPA) は HDAC 阻害薬であり、神経管、中軸骨格および心欠損に加え、胎芽・胎児死亡率の増加と関連する既知のヒト催奇形性物質である (Shepard, 2007)。培養されたラット胎芽およびマウスとヒトの肝細胞に VPA を投与すると、全般的遺伝子発現のパターンに変化が生じた (Li, 2016)。遺伝子発現への HDAC 阻害の幅広い影響 (VPA によって実証されたような) は多数の毒性機序を許容し、その結果、毒性機序の描写が困難である可能性がある。アポトーシス経路の攪乱、DNA メチル化の攪乱、レチノイン酸 (RA) の不均衡または Runt 関連転写因子 2 (Runx2) シグナル伝達の攪乱など、HDAC 阻害に起因するいくつかの催奇形性機序が文献で提案されている (Giavini, 2014; Paradis, 2013)。また、HDAC 阻害の観察された毒性を生じる機序は時間依存性である可能性がある (Paradis, 2013)。例えば、HDAC 阻害薬は発生時の中軸骨格欠損を引き起こすことが明らかにされているが、この毒性を介する機序がいくつか文献で提案されており、それぞれの機序は胎芽・胎児発

生の様々な段階(原腸形成、軟骨形成および骨形成)で起きる(Li, 2016; Paradis, 2013)。HDAC 阻害は、不規則な RA 媒介遺伝子転写の結果として、原腸形成時の不規則な軸パターンと関連している(Li, 2016)。軟骨内骨化は、軟骨組織が骨形成時に骨と置き換えられる軟骨形成時の鋳型を形成する(Paradis, 2013)。HDAC 機能障害は、それぞれ Sox9 シグナル伝達障害または Runx2 シグナル伝達障害のいずれかを介し、これらのプロセスの両方に悪影響を与えることが明らかにされている(Haberland, 2009; Paradis, 2013)。骨格奇形は HDAC 阻害薬を用いると認められることが多く、これらの奇形は上記の妥当な機序の結果である可能性がある。

AOP の根拠

AOP の根拠は、多数のマウス HDAC KO モデル、および *in vivo* と *in vitro* の両方の齧歯類モデルにおける用量反応試験から得られた。単一および多数の両方の HDAC アイソフォームを標的とするマウス KO モデルから、様々な HDAC のクラス/アイソフォームの役割と冗長性に関する実質的な根拠

が得られている(Haberland, 2009)。特定の HDAC を標的とする KO モデルによって、2、3 例を挙げると、原腸形成(HDAC3)、心臓/血管発生(HDAC1、HDAC2、HDAC5 および HDAC9)、および骨発生(HDAC4)に關与することが明らかにされている(Haberland, 2009)。VPA、エンチノスタット、サーチノール、トリコスタチン A などの HDAC 阻害薬として記載されたいくつかの化合物は、動物モデルにおける骨および心臓の発生を害する能力が明らかにされている(Giavini, 2014; Paradis, 2015; Shepard, 2007)。VPA は、二分脊椎、心臓および骨の欠損を含むヒトにおける欠損を伴う既知のヒト催奇形性物質である(Ornoy, 2009)。KO 法または低分子阻害薬の使用のいずれかによる *in vivo* での HDAC の阻害は、骨発生障害、心臓発生障害および胎芽・胎児の死亡をもたらす可能性がある。以上の試験によって、HDAC が発生毒性の影響を媒介する可能性が明らかになった。この文書は、HDAC の阻害が骨格奇形を生じ得る機序を裏付ける根拠に焦点を置いている。

HDAC 阻害 AOP の概要

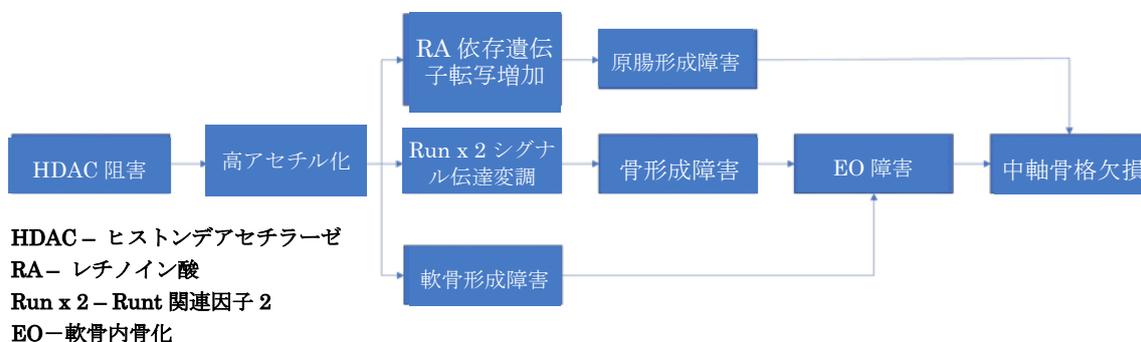


図 2 HDAC 阻害から中軸骨格欠損に至る重要な事象

HDAC 阻害 => 過剰アセチル化

HDAC は、ヒストン尾部の特定のアミノ酸からアセチル基を除去する働きをする酵素のファミリーである(Seto, 2014)。HDAC は、アセチル基の除去によって、DNA により強固に接続し遺伝子転写を減らす正電荷のヒストン尾部を生じる時、重要な後成的役割を演じる。HDAC の活性を阻害する化合物は、ヒストンからのアセチル基の除去を妨げる可能性がある。これにより、過剰アセチル化とその後のヒストン複合体の弛緩が引き起こされ、遺伝子転写因子に DNA が曝露される可能性がある。

HDAC は、Runx2 や他の転写因子などのヒストン以外のタンパク質のリジン残基を脱アセチル化し、それらの遺伝子発現プログラムを改変する(Bradley, 2011)。同様に、HDAC を阻害する化合物も、ヒストン以外のタンパク質の過剰アセチル化を生じ得る。VPA、トリコスタチン A、アピシジン、エンチノスタット、酪酸ナトリウム、ボロン酸およびサリチル酸などのいくつかの化合物は、HDAC を阻害し、過剰アセチル化を引き起こすことが知られている(Giavini, 2014)。例えば、VPA で処理されたマウス胎仔の肢は、ヒストン-4-アセチル化のレベルで測定したように過剰アセチル化が生じる(Bradley, 2011)。急速なヒストン-4 の過剰アセチル化が VPA 投与後 1 時間で認められ、6 時間検出可能であった。VPA 誘導体であるバルプロミドは、催奇形性が限られており、HDAC を阻害しないと考えられ、マウス胎仔の肢に投与した場合にヒストン-4-アセチル化の濃度の増加を生じなかった。

過剰アセチル化 => RA 依存性遺伝子転写の増加

VPA は、原腸形成の *in vitro* モデルにおける様々な RA 依存性遺伝子の転写を促進する(Li, 2016)。この試験で、RA 依存性遺伝子転写の増加は RA の濃度の増加と相関しないことが強調された。ヒストン複合体の過剰アセチル化は RA 依存性遺伝子へのアクセスの増加とその後の転写の増加をもたらすことが提案された。RA 依存性遺伝子は、Cdx1 および Hox1a などであった。*in vitro* モデルにおける RA 受容体拮抗薬を同時投与すると、VPA によって促進された Cdx-1 および Hox1a の発現の増加が消失した。用いた VPA の用量はヒトの医薬品の用量に相当した。

RA 依存性遺伝子転写の増加 => 原腸形成障害

VPA で処理された *in vitro* の胚様体モデルによって、RA 依存性遺伝子転写(例えば、Cdx1 および Hox1a) の増加、並びにパターン形成障害や軸方向伸長などの形態発生異常が実証された(Li, 2016)。これらの奇形は、RA 受容体拮抗剤の同時投与によって部分的に回復した。この所見は、VPA 処理モデルで認められた RA 依存性遺伝子転写の増加の逆転と共に認められた。著者らは、観察された原腸形成障害は少なくとも部分的には RA 依存性遺伝子転写への VPA の影響から生じたものであると結論した。同様の原腸形成障害が、胚様体モデルを HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A で処理した場合においても認められた。

VPA が誘発する RA 依存性遺伝子転写は HDAC 阻害によって起きると考えられる。マウス胚性幹細胞 HDAC1、2 および 3 は、RA 依存性遺伝子である Hox1 遺伝子の RA 応答配列のエンハンサー領域に結合するこ

とが知られている(Li, 2016; Urvalek, 2014)。上記の HDAC 阻害薬のそれぞれのノックダウンは、Hoxa1 転写の増加をもたらした(Li, 2016; Urvalek, 2014)。HDAC3 KO マウスは、原腸形成障害の結果、胎生期 9.5 日前に死亡した(Haberland, 2009)。

原腸形成障害 => 中軸骨格欠損

原腸形成障害は中軸骨格欠損をもたらす可能性がある (Li, 2016)。VPA は、原腸形成を障害し、中軸骨格欠損を引き起こすことも立証されている(Li, 2016)。

過剰アセチル化 => 軟骨形成障害

軟骨形成は骨のための軟骨テンプレートの形成であり、軟骨内骨化の最初の部分である(Paradis, 2013)。いくつかの研究で、ヒストン脱アセチラーゼ (HDAC) の阻害または KO のいずれかの結果、過剰アセチル化と軟骨形成障害の関連が特定されている。この KER を裏付ける根拠は以下の通りである：

- ・ HDAC 阻害薬の VPA で処理された胎仔マウスの肢芽は、Sox9 およびその下流標的 (Sox5 および Sox6) 並びにコラーゲン 2a1 (col2a1) を含む過剰アセチル化および軟骨形成を調節する遺伝子の発現の用量依存的減少を生じた(Paradis, 2013)。これらの結果は、他の HDAC 阻害薬に関わる所見と一致した。トリコスタチン A とベリノスタットは、Wnt5a により介在される効果であるウサギ関節軟骨におけるコラーゲン 2 の発現を低下させると報告されている(Paradis, 2013)。

- ・ クラス I の HDAC 阻害薬であるエンチノスタットは、軟骨形成を攪乱することが報告されている(Paradis, 2015)。また、エンチノスタットは、子宮内で処理された

マウスの胎仔に過剰アセチル化を引き起こすことも明らかになっている(Di Renzo, 2007)。

- ・ VPA で処理された培養ラットの成長軟骨板は、軟骨発生障害を示した(Wu, 2004)。

- ・ HDAC1 は、軟骨内骨化時に軟骨形成を調節する Nkx3.2 と関連することが知られている(Bradley, 2011)。したがって、HDAC1 阻害の結果としての過剰アセチル化は骨形成障害を引き起こす可能性がある。また、HDAC4 と HDAC5 は Smad シグナル伝達を調節することも知られており、その結果軟骨形成において役割を果たす可能性があると考えられている。

軟骨形成障害 => 軟骨内骨化障害

軟骨内骨化は、軟骨が最初にテンプレートを形成し、次いで軟骨形成のプロセス時に骨化することができる骨形成のプロセスである(Paradis, 2013)。そのため、軟骨形成の攪乱は軟骨内骨化の障害をもたらすことがあり得る。

軟骨内骨化 => 中軸骨格欠損

軟骨内骨化は、長骨や椎骨を含む骨格中のほとんどの骨の形成につながるプロセスである(Bradley, 2011)。軟骨内骨化の障害は中軸骨格欠損をもたらす可能性がある。ヒストン脱アセチラーゼ (HDAC) 阻害薬は、マウス並びにヒトにおいて中軸骨格欠損を引き起こすことが明らかにされている(Di Renzo, 2007; Shepard, 2007)。HDAC 阻害薬または HDAC KO モデルを用いた機構研究から導かれた根拠から、軟骨形成障害または骨形成障害のいずれかの結果としての軟骨内骨化障害がこれらの骨格欠損を引き起

こす可能性があることが示唆される (Haberland, 2009; Paradis, 2013)。例えば、以下の HDAC 阻害薬、すなわちトリコスタチン A、ホウ酸、VPA、アピシジン、エンチノスタットおよび酪酸で処理された齧歯類では高い比率で中軸骨格欠損が認められた (Di Renzo, 2007; Shepard, 2007)。

過剰アセチル化 => Runx2 シグナル伝達変調

HDAC 阻害または HDAC KO モデルのいずれかの結果としての過剰アセチル化は、Runx2 のシグナル伝達の増加もしくは減少をもたらすことがあり得る (Haberland, 2009; Paradis, 2013)。例えば：

- ・ HDAC4 KO マウスモデルは、Runx2 シグナル伝達の増加をもたらした (Haberland, 2009)。
- ・ HDAC4 および 5 によるリジンの脱アセチル化は、Runx2 活性を負に調節することが知られている (Paino, 2014)。
- ・ VPA 処理されたマウス胎仔肢芽は、Runx2 発現の用量依存的減少を示した (Paradis, 2013)。VPA は HDAC 阻害薬であり、過剰アセチル化を引き起こすことが明らかにされている。HDAC 阻害特性が無い VPA の類似物であるバルプロミドで処理されたマウス胎仔肢芽は、最も高い試験用量でも Runx2 発現の有意な減少を示さなかった。
- ・ マウス胎仔肢芽は、クラス I の HDAC 阻害薬であるエンチノスタットで処理されると、コラーゲン 10a1 (col10a1) 発現の減少を示した (Paradis, 2015)。この Col10a1 発現の変化は、Runx2 シグナル伝達の変調に起因した。

- ・ HDAC 阻害薬はさらに、間葉系肝細胞および頭蓋冠由来の初代骨芽細胞における Runx2 発現を増加させると報告されている (Paradis, 2013)。上記の試験における Runx2 の発現の差は、組織特異かつ発生段階の反応の結果であると推定されている。

Runx2 シグナル伝達変調 => 骨形成障害

骨形成は、骨の石化が起きるプロセスである (Paradis, 2013)。Runx2 は、骨の石化を促進するコラーゲン 10a1 の転写を調節する。いくつかの研究によって、HDAC 阻害薬の阻害が、軟骨の過剰石化の促進または軟骨の石化の抑制のいずれかが明らかにされている Runx2 の発現の減少または増加のいずれかに関連付けられている。 (Haberland, 2009; Paradis, 2013)。例えば：

- ・ マウス胎仔肢芽を HDAC 阻害薬である VPA で処理した試験によって、Runx2 転写および Col10a1 の減少が実証された (Paradis, 2013)。これらの所見は、骨形成の障害をもたらすと結論された。
- ・ HDAC4 KO マウスモデルは、軟骨内軟骨の異所性骨化と一体となった過剰な Runx2 シグナル伝達をもたらすことが明らかになっている (Haberland, 2009)。
- ・ マウス胎仔肢芽は、クラス I の HDAC 阻害薬であるエンチノスタットで処理されると、コラーゲン 10a1 (Col10a1) 発現の減少および骨形成の障害を示した (Paradis, 2015)。著者らは、骨形成障害は Runx2 シグナル伝達の攪乱の結果であると推測した。

骨形成障害 => 軟骨内骨化障害

軟骨内骨化は、軟骨が最初にテンプレートを形成し、次いで軟骨形成のプロセスにおいて、骨形成時に骨化することができる骨形成のプロセスである(Paradis, 2013)。軟骨形成の攪乱は、軟骨内骨化の障害をもたらすことがあり得る。

AOP と関連する HDAC 阻害化合物の例

HDAC 阻害薬に分類されるいくつかの化合物は、実験動物に同様な催奇形性反応を示している(Giavini, 2014)。HDAC 阻害薬と関連する催奇形性には、心欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などがある(Giavini, 2014; Shepard, 2007)。神経管欠陥は、ヒトとマウスのモデルのみで認められた (Giavini, 2014)。同様な催奇形性転帰にかかわらず、これらの化合物は、短鎖脂肪酸、ベンズアミドおよび環状テトラペプチドなどの多様な構造的特徴を示す(Giavini, 2014)。いくつかの HDAC 阻害薬の発生毒性研究の要約を以下に述べる。検証した HDAC 阻害薬のうち、1つ(ポリノスタット)を除いた全てが動物モデルにおいて催奇形性を示した。

• アピシジン

アピシジンに子宮内曝露されたマウスでは、対照より有意に高い比率で骨格異常が認められた(Di Renzo, 2007)。妊娠したマウスにアピシジン 10 mg/kg を性交後 8 日目に腹腔内注射した。認められた欠陥の種類は、いずれも融合(椎骨、肋骨および胸骨分節)およびセグメントのホメオティックな再特異化(形態変化、頸肋)であった。認められた全ての異常は中軸骨格に限定され、他の HDAC 阻害薬(例えば、VPA およびトリコスタチン A)で見られた異常と同等であった。アピシジンに曝露された胎子の妊娠中

に明らかな過剰アセチル化が認められ、著者らはこれが催奇形性を引き起こす機序であると示唆している。

• ホウ酸

子宮内においてホウ酸で処理されたラットは、水頭症および骨格異常を示した(Shepard, 2007)。マウスでは異常の増加は見られなかったが、ウサギでは心血管異常の増加が認められた。高熱症と併せてホウ酸に曝露されたラットも、椎骨や肋骨などの骨格異常の増加を示した。神経管欠陥などいくつかの主要な形成異常がヒトにおける試験で認められているが、データはヒトでの発生または生殖毒性について結論するには不十分である。

• 酪酸

酪酸に子宮内曝露されたマウスでは、対照より有意に高い比率で骨格異常が認められた(Di Renzo, 2007)。妊娠したマウスに酪酸 2000 mg/kg を性交後 8 日目に腹腔内注射した。見られた欠陥の種類は、セグメントのホメオティック再特異化(形態変化、頸肋)で、肋骨の融合は生じたが有意なレベルではなかった。認められた全ての異常は中軸骨格に限定され、他の HDAC 阻害薬(例えば、VPA およびトリコスタチン A)で見られた異常と同等であった。酪酸に曝露された胎子の妊娠中に明らかな過剰アセチル化が認められ、著者らはこれが催奇形性を引き起こす機序であると示唆している。

• エンチノスタット

エンチノスタットに子宮内曝露されたマウスでは、対照より有意に高い比率で骨格異常が認められた(Di Renzo, 2007)。妊娠したマウスにエンチノスタット 25 mg/kg 体重を性交後 8 日目に腹腔内注射した。認めら

れた欠陥の種類は、いずれも融合（椎骨、肋骨および胸骨分節）およびセグメントのホメオティックな再特異化（形態変化、頸肋）であった。認められた全ての異常は中軸骨格に限定され、他の HDAC 阻害薬（例えば、VPA およびトリコスタチン A）で見られた異常と同等であった。エンチノスタットに曝露された胎仔の妊娠中に明らかな過剰アセチル化が認められ、著者らはこれが催奇形性を引き起こす機序であると示唆している。

- トリコスタチン A

トリコスタチン A に曝露された場合、マウス胎仔において神経管および体節の尾末端で過剰アセチル化が誘発され、さらに肋骨および椎骨の融合が認められた (Shepard, 2007)。中軸骨格の重複やホメオティック再特異化など、VPA に関連する奇形と同様の奇形が認められた。著者らは、催奇形性機序はヒストン脱アセチル化の阻害であると結論した。

- VPA

妊娠時に摂取した VPA の影響に関するヒトについての試験が多数行われている (Shepard, 2007)。神経管欠損、二分脊椎、頭囲縮小、心臓欠損および四肢欠損などの奇形のかなりの発生が認められた。いくつかの試験で、VPA を他の薬剤と同時投与していない場合、欠陥のリスクが高いことが見出された。胎児性 VPA 症候群は、顔の小奇形、指の大奇形および発達遅延を特徴とする。妊娠初期の毒物に関する種間の検証から、ヒトは他の種より VPA の影響に敏感であることが示唆された。マウス、ラット、ウサギおよびサルにおける VPA の催奇形性を評価した試験は多数存在する (Shepard,

2007)。誘発される奇形には、神経管欠損、四肢欠損、骨格異常、心奇形、二分脊椎および頭蓋顔面欠陥などがある。ある試験で、VPA はマウス胎仔の尾側神経管における過剰アセチル化を誘発することが見出され、VPA によって誘発される催奇形性機序はヒストン脱アセチル化の阻害であると結論された。

追加試験で、HDAC を阻害しない VPA 類似物は催奇形性ではないことが実証された (Giavini, 2014)。

- ポリノスタット

ラットとウサギを用いた発生毒性試験において、妊娠している動物にポリノスタット（それぞれ、妊娠 6～20 日に 0、5、15 または 50 mg/kg/day、妊娠 7～20 日に 0、20、50 または 150 mg/kg/day）を毎日投与した (Wise, 2007)。母体毒性は認められず、胎仔の生存に対する影響は見られなかったが、両種とも最高用量で胎仔の体重の低下が認められた。ラットの場合、全ての用量で外面、内臓または骨格の異常の発生はなかったが、最高用量で骨格変異が生じた。これらの変異には、四肢、椎骨、胸骨分節または頭蓋骨の不完全な骨化、および脊椎骨数、頸肋および過剰肋骨の変異などがある。ウサギでは、最高用量群で骨格奇形は認められなかったが、多少の骨格変異、短い第 13 肋骨および中手骨の不完全な骨化が生じた。ポリノスタットが VPA より強い HDAC 阻害薬で同じ催奇形性転帰が認められなかったことから、著者らは VPA の発生毒性機序は HDAC 阻害によるものではないと示唆した。特に、この試験におけるポリノスタットの母体中濃度は、VPA を用いたそれ以前の試験よりはるかに高かった。

D. 考察

昨年度の毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性、データセットに含まれる物質の数から、GnRHR と生殖毒性の間のシグナルについての AOP の作成を試み、そのデータセットに多く含まれるニトロベンゼン類を対象として調査では、結果的にグルタチオンの枯渇による酸化ストレスが引き起こす精巢毒性という初期の想定とは異なる AOP が見いだされることとなった、今年度は GnRHR による生物学的影響の蓋然性に基づき、さらなる文献調査を実施した結果、裏付けとなるエビデンスのレビューおよびこれを整理することにより、標的に関連した発生毒性の原因が存在し、有害性発現に至る妥当な機序が説明可能であると考えられたため、GnRHR 結合を介した妊娠損失の増加に関する AOP を構築することができた。しかし、不確実性として、複数の動物種から得られたエビデンスは、妊娠維持における GnRHR の重要性を裏付けているものの、hCG を介した系はヒトおよび一部の高等霊長類でしか観察されていない(Cole, 2010)こと、GnRHI および II は、hCG の胎盤発現に関与すると考えられる(Lee, 2010)が、受容体の正確な分子シグナル伝達メカニズムは完全には解明されておらず (Desaulniers, 2017)、この AOP で定義した各イベントは、特定のアイソフォームではなく、より広範な GnRH シグナル伝達系を指すこと、さらに、GnRH 類似体は下垂体 GnRHR のアゴニストまたはアンタゴニストに割り当てられることが多く(Kang, 1989)、これらの類似体が非下垂体 GnRHR に与える影響は、下垂体 GnRHR に与える影響とは異なる可能性があるなどの課題がある。

一方、HDAC 阻害 AOP については、HDAC の阻害から生じ得るいくつかの有害転帰を記述している。個々の HDAC アイソフォームの固有の機能はマウスの遺伝子 KO 試験によって解明されているが、機能の冗長性は全てのアイソフォームに存在し(Haberland, 2009)、HDAC 阻害薬が多数のアイソフォームをターゲットにする可能性があるため(Ververis, 2013)、特定の有害転帰が特定のアイソフォームの攪乱に起因する確実性は低いこと、HDAC は Sox9 転写因子などのヒストン以外のタンパク質を脱アセチル化し、これらの脱アセチル化の阻害は、観察された HDAC 阻害薬の毒性および KO モデルにおいて影響力のある役割を果たす(Bradley, 2011; Di Renzo, 2007; Murko, 2010)こと、および多数の HDAC 阻害薬は動物モデルで催奇形性であり、有害転帰の中でもとりわけ中軸骨格欠損を生じることが明らかにされているが、妊娠したラットとウサギの両方をポリノスタットで処理した場合、クラス I および II の HDAC 阻害薬は骨格変異を生じたが、奇形や催奇形性の転帰は生じなかった(Wise, 2007)ことから、VPA および他の HDAC 阻害薬の毒性はそれらの HDAC に対する影響に起因する可能性はないことも示唆されていることなどの、不確実性が残っている。

本研究では、生殖毒性を引き起こす GnRHR 結合や HDAC 阻害についての AOP が合成できる可能性があることが明らかとなった。これらの経路の開発は、Lhasa の AOP DART ネットワークにおける既存の知識(エストロゲンシグナル伝達知識と重複)を活用し、データベースにおける経路の知識を拡大する可能性がある。提示した事例

研究では、単一の AOP の観点からデータを評価することに焦点を当てた。これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立て、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できる可能性も広がると考えられた。

E. 結論

昨年度に行った毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規の AOP を開発するという手法に基づき、特定された標的のうち、GnRHR と HDAC に関連した AOP の開発を検討した。その結果、GnRHR 結合阻害による妊娠損失と、HDAC 阻害による発生毒性の AOP を開発した。

GnRHR リガンドを用いた生殖発生毒性試験では、生殖能の低下および胚・胎児毒性の可能性が示されている。観察された主要な胚・胎児毒性は、胚吸収、死産および産仔数減少の形をとるが、催奇形性は限られた例でしか観察されていない。GnRH システムは、生殖能の鍵となる HPG 軸の一部であり、妊娠維持における GnRH の役割や妊娠に及ぼす影響について、文献では十分に説明されていないものの、本調査では、GnRH が着床および胎盤機能に関与することが明らかになった。したがって、[GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 着床障害 => 妊娠損失の増加] 及び [GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 胎盤の構造および機能障害 => 妊娠損失の増加] という 2 系統の AOP が開発できた。

HDAC 阻害薬に分類されるいくつかの化合物は、実験動物に催奇形性反応を示し、心

欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などがある。神経管欠損は、ヒトとマウスのモデルのみで認められた。HDAC は遺伝子発現の調節に関与し、HDAC によって促進されるヒストンの脱アセチル化によって遺伝子発現の抑制が生じる。正常な胎芽・胎児発生のためには遺伝子発現の慎重な調節が必要であり、不規則な遺伝子発現による HDAC 機能障害は心奇形や骨発生障害などの多くの発生異常を示す。文献調査の結果、阻害から中軸骨格欠損に至る 3 系統の AOP

(HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => RA 依存性遺伝子転写の増加=>原腸形成障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => Runx2 シグナル伝達変調 => 骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => 軟骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損) を開発した。

本研究では、生殖毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして、特定された標的に対して、より詳細な文献調査を行えば、生殖毒性を引き起こす AOP を開発できることが明らかとなった。これらの AOP の開発は、リードアクロスに対する知識を拡大できる可能性があることに加え、これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立てるなどして、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できるという可能性も広がると考えられた。

F. 参考文献

Baird DD. The gestational timing of pregnancy loss: adaptive strategy? *American Journal*

- of *Human Biology*. 2009, 21, 725-727
- Blumenfeld Z. Gonadotropin-releasing hormone antagonists instead of agonists: a change for the better? *Fertility and Sterility*. 2001, 76, 443-444.
- Bradley EW, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2011, 21, 101-113.
- Brown JL, Sones JL, Angulo CN, Abbott K, Miller AD, Boehm U, Roberson MS. Conditional loss of ERK1 and ERK2 results in abnormal placentation and delayed parturition in the mouse. *Scientific Reports*. 2019, 9, 9641.
- Cheng KW, Nathwani PS, Leung PC. Regulation of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in placental cells. *Endocrinology*. 2000, 141, 2340-2349.
- Chou CS, Beristain AG, MacCalman CD, Leung PC. Cellular localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II in first-trimester human placenta and decidua. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004, 89, 1459-1466.
- Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010, 24, 1-14.
- Depalo R, Jayakrishan K, Garruti G, Totaro I, Panzarino M, Giorgino F, Selvaggi LE. GnRH agonist versus GnRH antagonist in *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012, 10, 1-8.
- Desaulniers AT, Cederberg RA, Lents CA, White BR. Expression and Role of Gonadotropin-Releasing Hormone 2 and Its Receptor in Mammals. *Frontiers in Endocrinology*. 2017, 8, 269.
- Di Renzo F, Broccia ML, Giavini E, Menegola E. Relationship between embryonic histonic hyperacetylation and axial skeletal defects in mouse exposed to the three HDAC inhibitors apicidin, MS-275, and sodium butyrate. *Toxicological Sciences*. 2007, 98, 582-588.
- EMA, Cetrotide Scientific Discussion, 2004
- EMA, Orgalutran Scientific Discussion, 2004.
- FDA, Zoladex Professional Information Brochure, 1998.
- FDA, Plenaxis Pharmacology Review Part 2, 2003.
- FDA, LUPRON DEPOT® safety sheet, 2012.
- Flanagan CA, Manilall A. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Frontiers in Endocrinology*. 2017, 8, 274.
- Giavini E, Menegola E. Teratogenic activity of HDAC inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20, 5438-5442.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2009, 10, 32-42.
- Hernandez ER. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation:

- the Rubicon for GnRH antagonists. *Human Reproduction*. 2000, 15, 1211-1216.
- Kang IS, Kuehl TJ, Siler-Khodr TM. Effect of treatment with gonadotropin-releasing hormone analogues on pregnancy outcome in the baboon. *Fertility and Sterility*. 1989, 52, 846-853.
- Keay SD, Vatish M, Karteris E, Hillhouse EW, Randeve HS. The role of hCG in reproductive medicine. *BJOG*. 2004, 111, 1218-1228.
- Kol S. Embryo implantation and GnRH antagonists: GnRH antagonists in ART: lower embryo implantation? *Human Reproduction*. 2000, 15, 1881-1883.
- Lee HJ, Snegovskikh VV, Park JS, Foyouzi N, Han KT, Hodgson EJ, Guller S, Norwitz ER. Role of GnRH-GnRH receptor signaling at the maternal-fetal interface. *Fertility and Sterility*. 2010, 94, 2680-2687.
- Li AS, Marikawa Y. Adverse effect of valproic acid on an *in vitro* gastrulation model entails activation of retinoic acid signaling. *Reproductive Toxicology*. 2016, 66, 68-83.
- Lin LS, Roberts VJ, Yen SS. Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1995, 80, 580-585.
- Liu J, Maccalman CD, Wang YL, Leung PC. Promotion of human trophoblasts invasion by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II via distinct signaling pathways. *Molecular Endocrinology*. 2009, 23, 1014-1021.
- Maggi R, Cariboni AM, Marelli MM, Moretti RM, Andrè V, Marzagalli M, Limonta P. GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human Reproduction Update*. 2016, 22, 358-381.
- Merck, Orgalutran Product Monograph, 2019.
- Murko C, Lagger S, Steiner M, Seiser C, Schoefer C, Pusch O. Expression of class I histone deacetylases during chick and mouse development. *The international Journal of Developmental Biology*. 2010, 54, 1527-1537.
- Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017, 20, 476-494.
- Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive Toxicology*. 2009, 1, 1-10.
- Paino F, La Noce M, Tirino V, Naddeo P, Desiderio V, Pirozzi G, De Rosa A, Laino L, Altucci L, Papaccio G. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells*. 2014, 32, 279-289.
- Paradis FH, Hales BF. Exposure to valproic

- acid inhibits chondrogenesis and osteogenesis in mid-organogenesis mouse limbs. *Toxicological Sciences*. 2013, 131, 234-241.
- Paradis FH, Hales BF. The Effects of Class-Specific Histone Deacetylase Inhibitors on the Development of Limbs During Organogenesis. *Toxicological Sciences*. 2015, 148, 220-228.
- Rama S, Rao AJ. Embryo implantation and GnRH antagonists: the search for the human placental GnRH receptor. *Human Reproduction*. 2001, 16, 201-205.
- Santos MA, Kuijk EW, Macklon NS. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction*. 2010, 139, 23-34.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human Embryology*. 2014.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014, 6, a018713.
- Shepard TH, Lemire RJ. *Catalog of Teratogenic Agents*. 2007, 12th edition.
- Siler-Khodr TM, Kuehl TJ, Vickery BH. Effects of a gonadotropin-releasing hormone antagonist on hormonal levels in the pregnant baboon and on fetal outcome. *Fertility and Sterility*. 1984, 41, 448-454.
- Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH agonists vs antagonists. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2007, 21, 57-65.
- Terashima R, Laoharatchathanin T, Kurusu S, Kawaminami M. Augmentation of gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the post-lactational mammary tissues of rats. *The Journal of Reproduction and Development*. 2016, 62, 495-499.
- Tug N, Uslu U, Cumbul A, Eyuboglu S, Cam C, Karateke A, Yilmaz B. Effects of the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix in the early postimplantation period on rat pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011, 155, 166-170.
- Urvalek AM, Gudas LJ. Retinoic acid and histone deacetylases regulate epigenetic changes in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289, 19519-19530.
- Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi PV. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics: Targets & Therapy*. 2013, 7, 47-60.
- Wise LD, Turner KJ, Kerr JS. Assessment of developmental toxicity of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in Sprague-Dawley rats and Dutch Belted rabbits. *Birth Defects Research Part B: Developmental and reproductive toxicology*. 2007, 80, 57-68.
- Wu S, Legido A, De Luca F. Effects of valproic acid on longitudinal bone growth. *Journal of Child Neurology*. 2004, 19, 26-30.
- Zeneca, *Professional Information Brochure*. 1998.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Igarashi T, Suzuki H, Ushida K, Matsumoto M, Inoue K, Kanno T, Miwa Y, Ishii T, Nagase T, Katsumata Y, Hirose A. Initial hazard assessment of 1,4-dichlorobutane: Genotoxicity tests, 28-day repeated-dose toxicity test, and reproductive/developmental toxicity screening test in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020 Apr; 112:104610. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104610. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32032664.
- 2) Kawashima A, Inoue K, Yoshizaki Y, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Takano M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Yamada T, Hirose A. Combined repeated-dose and reproductive/developmental oral toxicity of 3-methylpentane, isooctane, and isononane in rats. *Fundamental Toxicological Sciences*. 2020, 7, 259-279.
- 3) Shigeta Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VI). *Bull. Natl Inst. Health Sci*. 2020, **138**, 33-39.

2. 学会発表

- 1) Development of initial environmental risk assessment methods for pharmaceuticals by using Eco-QSAR system. Hirose A, Kobayashi N, Kurimoto M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Yamada T. SETAC Europe 30th Annual Meeting (May 2020, Online)
- 2) OECD における Wnt/beta-catenin シグナルがん悪性化に関連する Adverse Outcome Pathway (AOP)の開発, 田邊 思

- 帆里, 青柳 一彦, Sabina QUADER, Horacio CABRAL, 小野 竜一, 広瀬 明彦, 横崎 宏, 佐々木 博己, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 3) 化学物質の生殖発生毒性の新しいデータベースの開発とその特徴解析, 三浦 稔, 栗本 雅之, 川村 智子, 牛田 和夫, 井上 薫, 山田 隆志, 栗形 麻樹子, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 4) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用ー構造類似物質候補の収集・選択法の確立, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 5) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用ーノナンー1ーオール(C₉H₂₀O)の人健康影響評価, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 吉崎 芳郎, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 6) 食品用器具・容器包装のポジティブリストに記載されているナノ物質も含む無機化学物の遺伝毒性評価, 磯 貴子, 松本 真理子, 鈴木 洋, 杉山 圭一, 本間 正充, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 7) 短期的緊急時における人の健康を守るための水道水中汚染物質濃度の提案, 松本 真理子, 重田善之, 川村 智子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 日本毒性学会 (2020 年 6 月 Web 開催)

- 8) Derivation of Subacute Guidance Values of Inorganic Metal Contaminants Controlled by the Drinking Water Quality Standards in Japan. Matsumoto M, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Iso T, Hirose A. 2021 SOT Annual Meeting and ToxExpo (March. 2021, Online)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし