

分担研究課題名： CYP代謝に関する *in silico*アプローチの開発

研究分担者 安部 賀央里
名古屋市立大学 薬学研究科 講師

研究要旨

化学物質の毒性評価において、動物実験に依存しない新たな評価手法である New Approach Methodology (NAM) の開発、実用化が求められている。特に、既存の毒性情報や機械学習等を活用した *in silico* アプローチへの期待は大きく、化学構造情報を用いた定量的構造活性相関 (QSAR) やリードアクロス、グループ化等の評価方法が開発されている。現状では、これらの *in silico* 予測手法を人の健康影響評価の科学的な根拠として活用するための基盤整備が進められている。一方で、より複雑な毒性メカニズムを有する全身毒性に関しては、動態や代謝の観点からヒトと動物の種差を考慮した統合的な評価が必要とされるが、十分な予測は困難な状況にある。そこで、本分担研究ではヒトへの安全性外挿に関して、薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) の種差の違いに関する情報を効率的に提供できる *in silico* アプローチ開発を目的とした。ラットとヒトの CYP 分子種情報や反復投与毒性情報等を収集、整理し、CYP 阻害活性や代謝物を予測するモデルを組み合わせた *in silico* アプローチから、ラットとヒトの種差に関する情報提供が可能な場面を検討する。

A. 研究目的

化学物質の管理において、化審法等の生活関連物質の安全性評価は重要である。近年、ヒトへの健康影響評価において、3Rs の観点や、動物とヒトでの種差を考慮する中で毒性予測の精緻化を目指した取り組みが注目されており、化学物質の毒性評価において、動物実験に依存しない新たな評価手法である New Approach Methodology (NAM) の開発、実用化が求められている。特に、既存の毒性情報や機械学習等を活用した *in silico* アプローチへの期待は大きく、化学構造情報を用いた定量的構造活性相関 (QSAR) やリードアクロス、グループ化等の評価方法が開発されている。現状では、これらの *in silico* 予測手法を人の健康影響評価の科学的な根拠として活用するための基盤整備が進められている。一方で、より複雑な毒性メカニズムを有する全身毒性に関しては、動態や代謝の観点からヒト

と動物の種差を考慮した統合的な評価が必要とされるが、未だ十分な予測は困難な状況にある。そこで、本分担研究ではヒトへの安全性外挿に関して、薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) の種差の違いに関する情報を効率的に提供できる *in silico* アプローチ開発を目的とした。ラットとヒトの CYP 分子種情報や反復投与毒性情報等を収集、整理し、CYP 阻害活性や代謝物を予測するモデルを組み合わせた *in silico* アプローチから、ラットとヒトの種差に関する情報提供が可能な場面を検討する。

B. 研究方法

ラットとヒトの複数の CYP 分子種の阻害活性に関する *in vitro* 実験結果を基に作成された *in silico* 予測モデルや代謝テンプレートを整理した。これまでに開発したラット7種 (CYP1A1, 1A2, 2B1, 2C6, 2D1, 2E1, 3A2)、ヒト11種 (CYP1A1, 1A2, 1B1,

2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4) のCYP分子種の阻害活性を判別する*in silico*予測モデル

(Ambe et al., *Chem. Res. Toxicol.* 37(11) 1843-1850 (2024)) は、約300物質の*in vitro*実験結果を学習データとしている。また、化学物質のSMILESから分子記述子をmordredにより算出することで説明変数として使用し、各分子種の阻害活性の有無を判別することが可能である。このモデルをより簡便に使用するために、化学物質のSMILESを入手することで、半自動的にラット7種、ヒト11種のCYP分子種の阻害活性の有無 (1,0) と予測確率 (0-1) が得られるシステムを構築した (<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/dse/en/outline.html>)。

また、反復投与毒性に関するラットとヒトの公開情報を収集・整理した。ラットではAI-SHIPS ToxDBを活用し肝毒性に着目した。AI-SHIPS ToxDBの分類情報を基に、無影響量 (NOEL: Non Observed Effect Level) を使用して①NOEL ≤ 30 mg/kg/day、②30 mg/kg/day < NOEL ≤ 300 mg/kg/day、③ 300 mg/kg/day < NOELの3段階に化学物質を分類した。

(AI-SHIPS ToxDB: <https://riss.aist.go.jp/results-and-dissemin/2798/>)

ヒトの肝毒性についてはDILIrakを活用した。Most-DILI-concern、Less-DILI-concern、No-DILI-concern、Ambiguous-DILI-concernの4つの分類が使用されており、本研究でも化学物質の肝毒性の情報を4段階で分類した。(DILIrak: *Drug Discov Today*. 21(4) 648-653 (2016))

代謝テンプレートに関しては、山添らがこれまでに発表している、基質の3D構造とテンプレートシステムによる高精度のCYP代謝予測モデルの公表論文を中心に情報を整理した。代謝テンプレートは特定のコンピュータ環境 (MacOS 10.48等) で利用可能であり、化学物質の構造をMac版Chem3Dで作成した後、ChemDraw上で基質テンプレートへの「当てはめ」(化学物質の構造がテンプレート型の一部

の図形と一致した状態)を確認することが可能である。テンプレート当てはめの方法や規則については、プロトコールに従って実施することができる。

(倫理面の配慮)

本研究では動物を用いた実験は実施しない。

C. 研究結果

これまでに開発したCYP分子種の*in silico*予測モデルをシステム化し、本研究の予測対象物質に活用した。本システムは化学物質のSMILESが入手できれば、無料公開されている分子記述子計算ソフトウェア mordredにより記述子を計算することでラット7種、ヒト11種のCYP分子種の阻害活性の有無と予測確率を算出できる。また、肝毒性に関するラット (AI-SHIPS ToxDB) とヒト (DILIrak) の公開情報を収集・整理した。2つのデータベースからは、共通して87物質についてラットとヒトの両方で肝毒性の情報を有することが確認された。ヒトの肝毒性情報としては、Most-DILI-concernが44物質、Less-DILI-concernが36物質、No-DILI-concernが7物質であった。本研究ではAmbiguous-DILI-concernは情報の正確性が不足しているため使用しなかった。一方で、ラットの肝毒性情報としては、①NOEL ≤ 30 mg/kg/dayが23物質、②30 mg/kg/day < NOEL ≤ 300 mg/kg/dayが35物質、③300 mg/kg/day < NOELが29物質であった。本研究では、ヒトの肝毒性ありをMost-DILI-concernの44物質、肝毒性なしをLess-DILI-concernの36物質とNo-DILI-concernの7物質の計43物質とした。ラットの肝毒性は①NOEL ≤ 30 mg/kg/dayの23物質、肝毒性なしを③300 mg/kg/day < NOELが29物質とした。これらの定義に当てはまらない物質はその他 (others) とした。これら89物質に対してSMILESから分子記述子をmordredにより算出し、CYP阻害活性予測システムにてラット7種、

ヒト11種のCYP分子種の阻害活性の有無(1,0)と予測確率を出力した。

87物質についてCYP分子種の阻害活性の予測確率(0-1)を用いて、k-meansクラスタリングを実施した。最適なクラスタ数はElbow methodにて検討したところ、k=4またはk=5が本データにおける最適クラスタ数であったため、2つのクラスタを作成した。各化学物質について、ラット7種、ヒト11種の計18種のCYP阻害活性の予測確率(0-1)情報のみを使用して教師無し学習であるクラスタリングを実施した。クラスタにプロットされる各化学物質を、肝毒性に関するラット(AI-SHIPS ToxDB)とヒト(DILIrak)の公開情報から設定した肝毒性あり、肝毒性なし、その他(others)について色分けするとそれぞれのクラスタに種差がある可能性が高い物質、または種差を生じる可能性が低い物質がどのように分布しているかが確認できた。特に、クラスタ数を4つに設定した場合、クラスタ3ではラットとヒトの肝毒性に種差がある傾向がある物質が含まれないことが確認された(図1)。つまり、クラスタ3に分類されない物質は、種差を有する可能性が高いと推測することが可能である。以上の結果から、ラット7種、ヒト11種の計18種のCYP阻害活性の情報と肝毒性の関連が*in silico*手法から確認できる可能性が示唆された。

また、代謝テンプレートについては山添らの文献にて、CYP3A4、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C18に関するテンプレートが公表されており、CYP3A4については89物質の代謝情報が確認された。

(Yamazoe et al., Food Safety, 9, 10-21, 2021、Yamazoe et al., Food Safety, 8, 34-51, 2021、Yamazoe et al., Drug Metab Pharmacokinet., 35, 253-265, 2020、Yamazoe et al., Drug Metab Pharmacokinet., 34, 113-125, 2019、Goto et al., Drug Metab Pharmacokinet., 34, 351-364, 2019)

今後は、肝毒性に関するラット(AI-SHIPS ToxDB)

とヒト(DILIrak)の公開情報が得られる化学物質について、代謝テンプレートを活用した代謝物情報の取得を進める。

D. 考察

CYP分子種の阻害活性の予測結果を用いたクラスタリングの結果から、ラットとヒトの肝毒性に種差がある傾向が見られるクラスタが確認された。この結果から、CYPを介した化学物質の代謝の違いは、肝毒性の種差に関する情報を提供できる可能性が示唆された。また、化学物質のSMILESが入手できれば、ラット7種、ヒト11種のCYP分子種の阻害活性の有無が予測可能なシステムの構築は、代謝の種差情報を*in silico*にて簡便に得ることができ、動物試験の毒性情報からヒトへの外挿を行う際に有用な支援手段となると考えられる。今後は、代謝テンプレートを活用した代謝物情報を追加することで、全身毒性評価における*in silico*アプローチの有用性や利用場面における検討が期待できる。

E. 結論

これまでに開発したラットとヒトの複数のCYP分子種の阻害活性を化学構造情報のみから判別する*in silico*予測モデルをシステム化し、本研究の予測対象物質に活用可能とした。また、CYP分子種の阻害活性情報からラットとヒトの肝毒性に関する種差情報を*in silico*にて提供できる可能性を見出した。以上の結果をふまえて、CYP阻害活性や代謝物を予測するモデルを組み合わせた*in silico*アプローチから、ラットとヒトの種差に関する情報提供が可能な場面を検討する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名・頁・発行年等も記入)

1. Ambe K., Aoki Y, Murashima M, Wachino C, Deki Y, Ieda M, Kondo M, Hibi Y, Kimura K, Hamano T, Tohkin M. Prediction of cisplatin-induced acute kidney injury using an interpretable machine learning model and electronic medical record information. *Clinical and Translational Science*. 18(1) e70115 (2025).
2. Ambe K., Nakamori M., Tohno R., Suzuki K., Sasaki T., Tohkin M., Yoshinari K. Machine learning-based in silico prediction of the inhibitory activity of chemical substances against rat and human cytochrome P450s. *Chem. Res. Toxicol.* 37(11) 1843-1850 (2024).
3. Ashikaga T., Hatano K., Iwasa H., Kinoshita K., Nakamura N., Ambe K., Tohkin M. Next Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society*. 48(2), 73-77 (2024).
4. Watanabe T., Ambe K., Tohkin M. Streamlining Considerations for Safety Measures: A Predictive Model for Addition of Clinically Significant Adverse Reactions to Japanese Drug Package Inserts. *Biol Pharm Bull.* 47(3), 611-619 (2024).
5. Watanabe T., Ambe K., Tohkin M. Predicting the Addition of Information Regarding Clinically Significant Adverse Drug Reactions to Japanese Drug Package Inserts Using a Machine Learning Model. *Ther Innov Regul Sci.* 58(2), 357-367 (2024).

2. 学会発表

1. Kaori Ambe Prediction of skin sensitization using machine learning JSAAE & ASCCT-ESTIV Joint Webinar (2024.12)
2. 安部賀央里 皮膚感作性評価における機械学習モデルの活用 スポンサーシンポジウム 革新的創薬支援ツールとしての New Approach Methodologies (NAMs) 最前線 CBI 学会 2024 年大会 (2024.10)
3. 安部賀央里 機械学習を活用したレギュラトリーサイエンス研究 講演 データ解析を取り入れたレギュラトリーサイエンス研究の紹介 第10 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2024.9)
4. 安部賀央里 機械学習を用いた副作用予測に関

する研究 シンポジウム 100 歳を超える健康設計への挑戦 第 25 回応用薬理シンポジウム (2024.9)

5. 安部賀央里 New Approach Methodologies (NAMs) を活用した皮膚感作性強度予測に向けた機械学習モデルの開発 フォーラム II New Approach Methodologies (NAMs) による毒性の評価 フォーラム2024衛生薬学・環境トキシコロジー (2024.9)
6. Linfeng LIU, Kaori AMBE, Mayu ONISHI, Yuka YOSHII, Toshiaki MAKINO, Masahiro TOHKIN Comparison of Multiple Disease-Modifying Antirheumatic Drugs Combination Therapies with Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-Analysis of Efficacy and Safety The 9th Nagoya / Gifu / Shenyang / Nanjing Symposium of Pharmaceutical Sciences 2024 Nagoya (2024.9)
7. 安部賀央里 AI/機械学習 in 毒性学 ～化学物質の毒性予測モデル開発～ ワークショップ 2 ミライの毒性学 明日から役立つ最先端技術 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
8. 鈴木孝太郎、安部賀央里、有吉純平、神谷由紀子、頭金正博 ギャップマー型アンチセンスによるマウスでの血液中アラニンアミノトランスフェラーゼ上昇を予測するためのin silicoモデルの開発 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
9. 徳永朱莉、木下啓、安部賀央里、山田隆志、足利太可雄、頭金正博 機械学習を活用した皮膚感作性強度予測モデルの開発と解釈性向上に向けた検討 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
10. 安部賀央里 機械学習を活用した薬剤性腎障害の予測モデルの開発 ワークショップ7 ICT は急性期の腎臓診療に変革をもたらすか? 第67回日本腎臓学会学術総会 (2024.6)
11. 安部賀央里 データベースと機械学習を活用した副作用予測研究シンポジウム5 医療DX時代を先導する「薬学×データサイエンス」の取り組み 第26回医薬品情報学会総会・学術大会 (2024.6)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

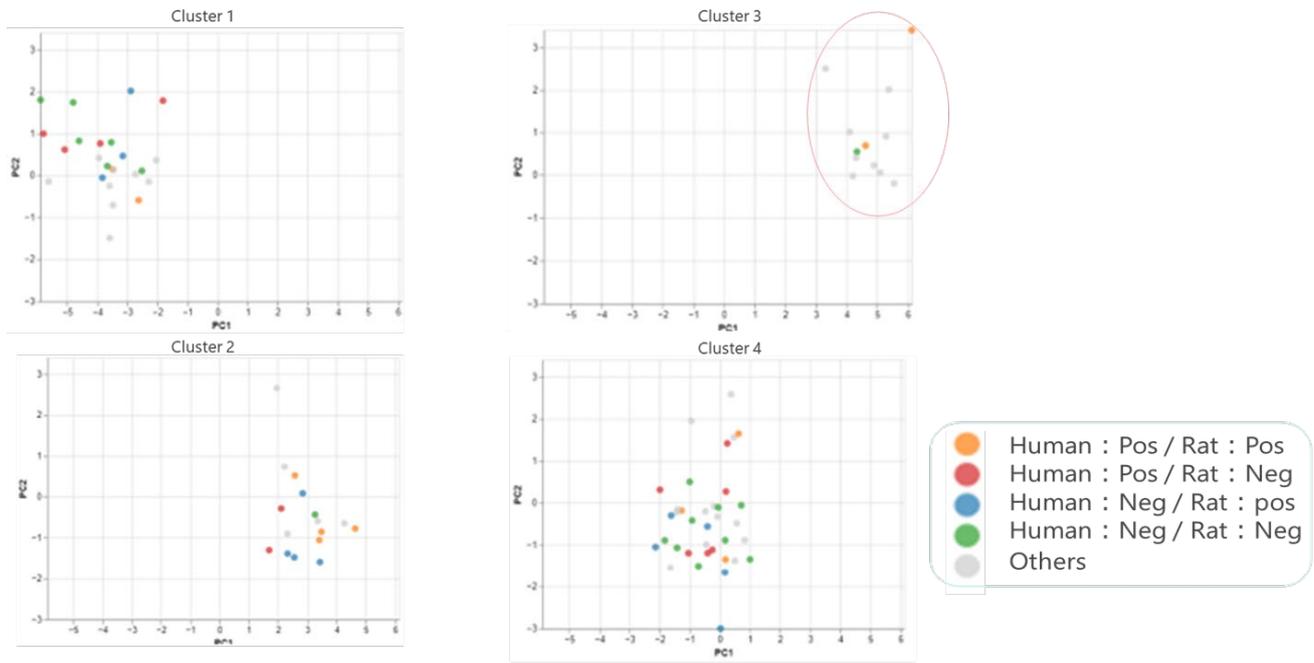


図1 k-means クラスタリング (k=4)によるヒトとラットのCYP阻害活性と肝毒性との関連