

論文の内容の要旨

論文題目 ハイコンテントアナリシスによる化合物の遺伝毒性誘発
機序解明系の構築

氏名 安 藤 雅 光

【背景】

医薬品を研究開発する過程で、遺伝毒性の評価はヒトのがん原性及び生殖発生毒性を予測するためにも重要である。遺伝毒性 (genotoxicity) とは、DNA 損傷、染色体異常や突然変異などの DNA を中心とした遺伝物質に対する毒性を意味する。日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) のガイドライン (ICH S2(R1)) では、医薬品候補化合物を *in vitro* で遺伝毒性を評価し、遺伝毒性を示した場合は、作用機序を明らかにするための追加の *in vitro* 遺伝毒性試験を行うか、*in vivo* 遺伝毒性試験を行うことが推奨されている。

従来から行われている *in vitro* 遺伝毒性試験には、細菌を用いた Ames 試験、培養細胞を用いた *in vitro* 小核試験や染色体異常試験がある。また、作用機序を明らかにするための *in vitro* 遺伝毒性試験として、動原体染色試験や DNA adductome 試験などがある。しかしこれらの従来型の試験には、時間がかかり、多くの化合物を一度に処理することができない。一方、医薬品開発においては、日々多くの化合物の評価が必要とされており、ハイスループットに遺伝毒性や遺伝毒性機序を解明できる系が求められている。

【目的】

Histone H2AX は、DNA が損傷されると迅速にリン酸化され、 γ -H2AX と呼ばれるリン酸化タンパク質となるため、DNA 鎖切断のマーカーとして注目されている。一方、多くの遺伝毒性物質は、DNA 複製時や有糸分裂時にその作用機序に基づいて作用するため、細胞

周期停止を引き起こす。そのため、化合物による細胞周期停止は、遺伝毒性の有用なマーカーとなると考えた。私は、この γ -H2AX と細胞周期停止を High-content screening (HCS) 法を用いて同時に検出することで、遺伝毒性の検出と遺伝毒性メカニズムの推定をハイスループットに検出する系の構築をすることを目的として、以下の試験を行った。

【方法】

384-well プレートに HepG2 細胞を播種し、24 時間 CO₂ インキュベーターで前培養を行った。公比 2 で 10 濃度に希釈した化合物を暴露し、1 時間及び 24 時間 CO₂ インキュベーターで培養した。このシステムでは、一度に 16 化合物の処理が可能である。1 時間及び 24 時間培養したプレートを、Hoechst33342 及び抗 γ -H2AX 抗体を用いて染色した。一方、24 時間培養したプレートは、Hoechst33342、抗 phospho-histone H3 抗体及び抗 Tubulin 抗体で染色した。染色したプレートは、ArrayScan VTI HCS reader を用いて蛍光顕微鏡画像を取得し、核内の γ -H2AX 平均蛍光強度および細胞周期を観察するために染色体の 2N/4N 比、核内の抗 phospho-histone H3 平均蛍光強度及び核内の抗 Tubulin 平均蛍光強度を算出した。算出した値は、独自に開発したシステムを用いてグラフ化し、最少反応濃度 (MEC) の算出を行った。19 種の様々なメカニズムを持つ遺伝毒性物質と 7 種の非遺伝毒性物質を暴露し、その γ -H2AX と細胞周期の変化を捉えることで、この系が遺伝毒性の検出及び遺伝毒性メカニズムの推定に役立つかを検証した。

【結果】

系の構築及び解析システムの構築

HCS 系は、Apredica 社 (旧 Cellumen 社) が開発した肝毒性予測システムを用いた。3 回実験を行い、陽性対照の反応及び溶媒対照のバラつきに関する Apredica 社のクライテリアを満たしていたため、系の移管に成功したと結論した。また、Apredica 社の解析システムに使用しづらい点があったため、新しい解析システムを NTT 数理システムに委託して開発した。

γ -H2AX 検出に関して

26 種の化合物のうち、そのメカニズムより DNA 鎖切断を生じると考えられた化合物は 10 化合物であった。1 時間曝露の結果、 γ -H2AX の検出感度は 80% (8 化合物/10 化合物) であり、特異度は 87.5% (14 化合物/16 化合物) であった。一方、24 時間曝露の結果、 γ -H2AX の検出感度は 100% (10 化合物/10 化合物) であったが、特異度は 50% (8 化合物/16 化合物) であった。24 時間曝露の特異度が低かった要因としては、化合物の細胞毒性によるアポトーシスの結果生じた DNA 断片化によって γ -H2AX が増加したためと考えられた。そのため、 γ -H2AX を用いた遺伝毒性の検出には、1 時間曝露が最適であると考えられた。

細胞周期停止に関して

2N/4N 比の増減を用いて G1 期停止（増加）と S、G2 及び M 期停止（減少）を識別した。また M 期特異的に histone H3 がリン酸化されることを利用して、抗 phospho-histone H3 の蛍光強度の増減を観察することで、S-G2 期（変化なしもしくは減少）と M 期（増加）の識別を行った。その結果、DNA 鎖切断を生じると考えられた遺伝毒性物質では、S-G2 期での細胞周期停止が観察され、Paclitaxel などの Tubulin に作用する遺伝毒性物質では M 期での細胞周期停止が観察された。一方、高濃度の Sodium saccharin などでは、G1 期での細胞周期停止が観察された。よって、遺伝毒性物質は、そのメカニズムに基づいて、各細胞周期において細胞周期停止反応を示すことが明らかになった。以上のことから、細胞周期停止が、遺伝毒性メカニズム推定の有用なマーカーとなりうることが示された。

【結論】

HCS 法を用いて γ -H2AX 及び細胞周期の状態を観察することで、従来法と比較してハイスループットに DNA 鎖切断を誘発する化合物のスクリーニングを行うことが可能になり、また、細胞周期の状態から遺伝毒性メカニズムの推定を行うことが可能になった。このシステムを創薬の初期のスクリーニングに使用することで、次のステージに進める化合物の優先順位づけなどに有用に用いることができると考えられた。