

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06416

研究課題名(和文) ヒトの代謝酵素を発現する新規 in vivo毒性スクリーニング系の作出

研究課題名(英文) Novel screening system expressing human metabolic enzymes in vivo

研究代表者

寺岡 宏樹 (Teraoka, Hiroki)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50222146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シトクロームP450(CYP)を中心に代謝酵素は化学物質の解毒だけでなく、毒性を顕著に増強する例がよく知られている。この毒性の代謝的活性化は、げっ歯類には無効だが、ヒト、サル、ウサギでのみ短肢症を示すサリドマイドや、肝毒性を示すアセトアミノフェン(APAP)の毒性発現に特異的なCYPサブタイプが関与することが報告されている。本研究では、 α -アクチンプロモーター下にヒトシトクロームP450 3As(hCYP3As)やラットCYP2E1をゼブラフィッシュ全身に発現させることで、見かけ上の発生過程にはほぼ影響を与えずに、サリドマイドによる胸ビレの低形成やAPAPによる肝毒性が増強することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、2億種近くの化学物質がCASに登録されている。これらの大半の毒性情報は乏しいが、げっ歯類を使用した in vivo毒性試験は動物福祉の問題からますます実施困難になっている。代替法としてゼブラフィッシュが注目されているが、種差が問題である。種差の主因の1つは代謝の種差にあると信じられている。本研究では、ヒトを含めた哺乳動物のシトクロームP450をゼブラフィッシュに発現させることで、顕著な種差を示すサリドマイド奇形を含めた、哺乳動物で認められるのと類似の毒性を再現することができた。今後、動物福祉の問題だけでなくコストパフォーマンスにも優れた試験系としてさらに検討する価値がある。

研究成果の概要(英文)：It is well-known that metabolic enzymes, such as cytochrome P450 (CYP), are not only detoxify chemicals but also markedly enhance their toxicity. This metabolic activation of toxicity has been reported to involve CYP subtypes specific for the expression of toxicity of thalidomide, which is not active in rodents, but only in humans, monkeys, and rabbits, which exhibit short limb syndrome (Phocomelia Syndrome), and acetaminophen (APAP), which causes liver toxicity. In the present study, whole body expression of human cytochrome P450 3As (hCYP3As) and rat CYP2E1 in zebrafish under the α -actin promoter potentiated thalidomide-induced hypoplasia of pectoral fins and APAP-induced liver toxicity with little apparent effect on developmental processes without affecting zebrafish development.

研究分野：実験動物代替法

キーワード：ゼブラフィッシュ 発生毒性 代謝的活性化 サリドマイド アセトアミノフェン in vivo トランスジェニック動物

1. 研究開始当初の背景

動物福祉の問題から、以前のようにげっ歯類を大量に使用する毒性試験は実施できない。そのため、効果的なスクリーニング系が重要である。げっ歯類を用いた *in vivo* 試験と比べた時に、培養細胞を用いた試験結の精度は充分でなく、下等動物を用いた *in vivo* スクリーニング試験を併用する二段階スクリーニングが提唱されている。下等動物のなかでも、小型熱帯魚であるゼブラフィッシュ(ゼブラ)が最も注目されている。動物福祉の規制が厳しい EU においてさえ、採餌能を得るまでの初期ゼブラ胚仔魚を用いた試験系は動物試験の規制の対象を外れている。ゼブラは直径 1 mm に満たない透明な胚を多数周年産出し、受精後 3-4 日で臓器の基本構造が完成し、通常の顕微鏡で全身の変化を網羅的に観察できる。つまり、*in vivo* 試験を培養細胞の手軽さで、しかも安価に実施できる(マウスの 1/100 以下)。哺乳動物への外挿性が問題であるが、げっ歯類と比較した多くの研究は 80%以上の相関性を示している。

毒性や薬理作用における種差の主な要因の 1 つは化合物代謝の種差にあると考えられているが、ゼブラにおける吸収や代謝など化合物動態に関する情報は極めて乏しい。一方、多くの化合物が生体で代謝されてはじめて毒性を示す、いわゆる代謝的活性化が知られている。最も重要な異物代謝酵素であるシトクローム P450(CYP)は毒性代謝産物産生でも中心的な役割を果たす。また近年、サリドマイドがゼブラ胸ヒレの低形成を起こすことが報告され、ウサギに代わる発生毒性試験系としてのゼブラ胚の価値を強く印象付けた(Ito et al., 2000, Science)。しかし、ゼブラ胚仔魚におけるサリドマイド毒性は再現性に難があるとも言われている(Mikami et al. 2019, Congenit Anom)。他方、ヒト CYP 分子種(hCYP3A4/7、2C19 等)はげっ歯類と異なる代謝産物(5-OH-サリドマイド)を産生すること、人工染色体を用いてヒト CYP3As を発現させたマウス胎児が肢芽形成不全を起こすことなどが報告されている(Chowdhury et al., 2014, Chem Res Toxicol.; Kazuki et al., 2016, SciRep)。このほか、アセトアミノフェンなど、CYP 代謝産物が毒性を示す物質がゼブラで発生毒性を起こすことが報告されている。すなわち、ゼブラは毒性試験全般の *in vivo* スクリーニングモデルであるとともに、発生毒性モデルとしての二面性を持っている。

2. 研究の目的

本研究は、種差を克服するため、ヒト(一部、ラット)の CYP 分子種を発現させたゼブラ胚仔魚を作成することにより、高精度の *in vivo* スクリーニング系を開発することを目的とした。そのため、まず、発生期ゼブラ固有の主要 CYP 分子種の発現および代謝活性を明らかにした。ヒト胎児肝臓に発現する主要な CYP を中心に、ヒト CYP 分子種(hCYP)の一過性発現モデルを作出して、毒性の代謝的活性化に関与する CYP 分子種を明らかにした。さらに、ヒト CYP 分子種を発現させたトランスジェニックゼブラ(hCYP-TG ゼブラ)を作出し、ゼブラフィッシュに、ヒトのシトクローム P450 分子種(hCYPs)を発現させることにより、化学物質毒性が増強することを確認した。今回開発したゼブラモデルについて、毒性および創薬スクリーニングとしての可能性を検討した。

3. 研究の方法

1) CYP 分子種発現の検出

各発生ステージのゼブラ胚仔の cDNA を作成し、SYBR Green 法に基づく qPCR 法を用いて CYP 分子種発現の時間経過を検討した。また、アンチセンス RNA プローブを用いて、whole-mount *in situ* hybridization (WISH) を行い、発現分布を確認した。

2) 薬物代謝活性

CYP の薬物代謝活性測定には LC/MS/MS を用いた。ゼブラ胚仔魚に発現させた hCYP1A についてはエトキシレゾルフィン蛍光で代謝活性を確認した。

3) ヒト CYP 分子種の強制発現

成人および胎児肝で発現する主要なヒト CYP 分子種(hCYP1A1、3A4、3A7)とともに enhanced green fluorescent protein (EGFP) のコード領域全長を組み込んだ tol2 遺伝子発現ベクターをトランスポゼースとともに 1 細胞期に微量注入することにより、hCYP 蛋白質を強制発現させた。この胚仔魚を F0 と呼んだ。今回、鑄型とした cDNA で作成する限り、hCYP2E1 については組替体作成時に発現させると大腸菌が発育しなかったため、ラットの CYP2E1 (hCYP2E1)を発現させた。

F0 胚仔魚を成熟させて野生型と交配することで全身に EGFP 蛍光を発する TG ゼブラ(F1)を得た。さらに EGFP 蛍光陽性の F1 の成魚同志を交配させて(インクロス)エタ EGFP 蛍光

の強い F2 胚仔魚を実験に供した。また、一部の実験では、F1 を野生型と交配して、さらに続く世代を作成し、インクロスさせて得た蛍光の強い胚仔魚も実験に供した。

4) 水溶液を満した 3.5 cm プラスチックシャーレ中で、hCYP 分子種を発現したゼブラ胚仔魚 (F0) に、CYP による代謝的活性化代謝産の毒性影響が報告されるサリドマイド、ベンツピレン、およびアセトアミノフェンを加えて暴露し、主に実体顕微鏡を用いて発生毒性を検討した。

4. 研究成果

1) 発生に伴い、各 CYP 分子種は異なる発現パターンを示した。多くの CYP 分子種は肝臓形成の進行する受精後 96 hr (hpf) ごろから大きく増加したが、いくつかの CYP1 分子種 (1B1, 1C1, 1C2, 1D1) と CYP2R1 の発現量は肝臓形成完了前の 48、72 hpf でピークに達した。CYP の誘導剤として知られるリファンピシンやフェノバルビタール、ダイオキシン (TCDD) を暴露した 55 hr ゼブラ胚仔魚を用いた *in situ* hybridization では、CYP2R1 が肝臓、2N13 が鰾、2Y3、3A65 が肝臓と腸管と思われる各原基に発現が認められた。ジクロフェナクおよびカフェインを処置した時、カフェインは 50、120hr で、ジクロフェナクは 24-120 hr で水酸化物が測定された。特にジクロフェナクの 4'水酸化活性は肝臓がほぼ完成する 120 hr より 48、72 hr の方が顕著に高かった。したがって、発生期ゼブラには肝臓形成前にも関わらず、基質によっては顕著な CYP 活性を示すことがわかった。

2) hCYP1A1、3A4、3A7 を発現する F0 胚仔魚は全身にモザイク状の EGFP 蛍光を発現し、実体顕微鏡でみるかぎり正常に発生した。野生型あるいは hCYP1A1 仔魚にサリドマイドを水性暴露しても全く影響しなかったが、hCYP3A4、3A7 を発現させた F0 胚仔魚は胸ビレの欠損や短縮、耳石の異常、浮腫、眼の縮小など、ヒトで報告されているサリドマイド奇形を示した。hCYP1A1 発現胚仔魚では、hCYP3As 発現胚仔魚と同様に心臓周囲浮腫などのベンツピレン毒性が顕著に増強した。また、サリドマイド処置は肢芽形成に必要と言われている、胸ビレにおける線維芽細胞成長因子 8 (fgf-8) 発現を野生型では影響せずに、hCYP3A7-F0 胚仔魚でのみ抑制した。以上より、サリドマイド毒性の発現には hCYP3As による代謝が必要であることが示唆される。

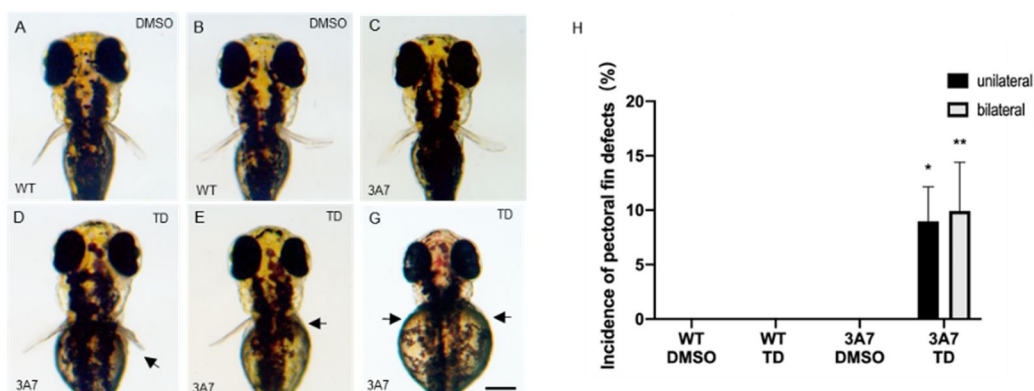


図 1. ヒト CYP3A7 発現ゼブラフィッシュ胚仔魚の胸ビレ形成に対するサリドマイドの効果

野生型 (WT) (A, B) とヒト CYP3A7 発現ゼブラフィッシュ胚仔魚 (3A7) (C-G) に 200 μ M サリドマイド (TD) か 0.02% DMSO (溶媒) を受精後 17 時間 (17 hpf) から 72 時間まで暴露した。D-G の矢印は胸ビレの異常を示す。F の白矢頭は出血を、F と G の黒矢頭は目の縮小ないしは欠損を示す。Scale bar = 200 μ m。H は観察された胸ビレの異常の発生率を棒グラフで示したもの (n=6, それぞれ 8-26 匹のゼブラフィッシュ胚仔魚を用いた)。黒いバーは片側性、グレーのバーは両側性の異常。*p<0.05。

3) hCYP3A7-TG 胚仔魚はサリドマイドにより胸ビレの低形成を示す傾向があったが、弱かった。また、この影響は F2 でもっとも顕著で、F5 ではほとんど確認されなかった。F5 胚仔魚の EGFP 蛍光、hCYP3A7 発現とも、hCYP3A7-F0 胚仔魚にくらべて非常に低かったことが原因と思われた。

3) 代表的解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン (APAP) は、過剰摂取では CYP2E1 代謝産物が肝毒性を生じさせる。ゼブラでは CYP2E1 に相同な CYP 分子種が存在も含めてわかっていない。そこで hCYP2E1 を発現するゼブラモデルの作成を試みたが、入手した hCYP2E1 の多型の問題が組換えに必要な大腸菌の発育が認められなかった。毒性試験で最も使用されるのは

ラットなので、本研究では、ラットの CYP2E1 (rCYP2E1) を強制発現したゼブラ (F0) を作製し、さらに、F0 を継代して rCYP2E1 を全身に発現するトランスジェニックフィッシュ (TG) を作製し、APAP 曝露の影響を検討した。rCYP2E1-TG ゼブラは CYP2E1 特異的な 4-Nitrophenol 代謝活性を認めた。APAP を 24 hpf から曝露したところ、浮腫と体表色素の低下のほか、野生型、TG ゼブラとも網膜径の縮小が認められた。網膜径の縮小は野生型に比べて F0 で発生率、重症度とも増加し、TG ゼブラではさらに顕著であった。実体顕微鏡で観察する限り、その他の影響は確認されなかった。24 hpf から暴露すると顕著な浮腫が起きる場合があったので、APAP を 48 hpf から曝露したところ、TG では 72、96 hpf で肝臓が野生型より低濃度で有意に縮小した。同様に、*in situ* hybridization で観察した肝細胞マーカー (liver-type fatty acid-binding protein 10a, lfabp10a) 発現も同様に縮小が認められた。APAP の解毒薬として臨床現場で使用されている N-アセチルシステインは APAP の作用を抑制した。これらの成績は CYP2E1 が APAP 毒性を介在することを改めて示唆した。

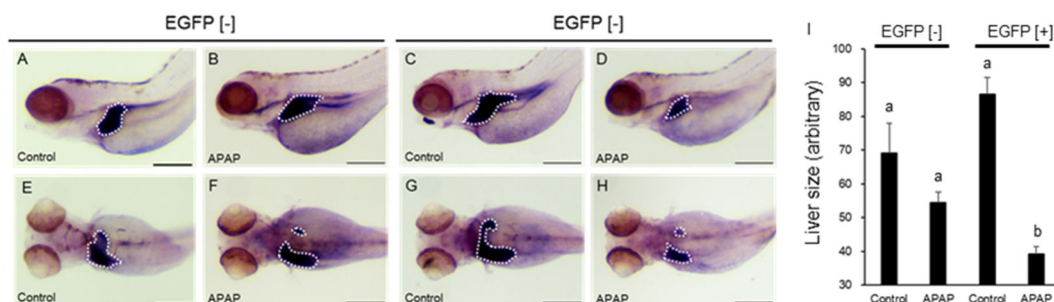


図2. ラット CYP2E1-トランスジェニックフィッシュ胚仔魚におけるアセトアミノフェン誘発性の肝臓縮小

EGFP 蛍光陰性 (EGFP [-]) あるいは陽性 (EGFP [+]) ラット CYP2E1-トランスジェニックフィッシュ (F2) に 2.5 mM アセトアミノフェン (APAP) を 48 から 96 hpf まで暴露した。96 hpf で仔魚を固定してホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) に供した。プローブは肝細胞マーカーである lfabp10a を用いた。WISH シグナルの周囲の白い破線は面積を測定した部位を示している。A, B, E, F: EGFP [-] 仔魚。C, D, G, H: EGFP [+] 仔魚。E, F, G および H はそれぞれ、A, B, C および D (側面図) の背面図。(I) はそれぞれの処置仔魚で計測した面積の平均値 ± 標準誤差 (N=10 or 12) Scale bar = 200 μm。棒の上方の異なる小文字アルファベット間で有意差があることを示す。

以上をまとめて、ヒトあるいはラットの CYP 分子種を発現させることで、ゼブラの性状発達に大きな影響を与えることなく、導入 CYP 分子種の代謝活性が発現すること、さらに今回用いた化学物質のゼブラ胚仔魚毒性が増強することが確認できた。しかし、 β -アクチンプロモーターを用いて CYP 分子種を発現させようとすると、TG ゼブラの発現は F0 より弱く、また継代によって発現がさらに低下する可能性が認められた。これを打開するために、臓器あるいは組織特異的に発現する TG ゼブラの開発に着手している。

引用文献

- 1) Ito et al. 2010. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, 327: 1345-1350. doi: 10.1126/science.1177319.
- 2) Mikami et al. 2019. Zebrafish yolk sac microinjection of thalidomide for assessment of developmental toxicology. *Congenit Anom*. 60: 71-72. doi: 10.1111/cga.12335.
- 3) Chowdhury et al. 2014. Human cytochrome P450 oxidation of 5-hydroxythalidomide and pomalidomide, an amino analogue of thalidomide. *Chem Res Toxicol*. 27: 147-156. doi: 10.1021/tx4004215.
- 4) Kazuki et al. 2016. Thalidomide-induced limb abnormalities in a humanized CYP3A mouse model. *Sci Rep*. 6: 21419. doi: 10.1038/srep21419.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 TANAKA Katsuki, ADACHI Hikaru, AKASAKA Hironobu, TAMAOKI Junya, FUSE Yuji, KOBAYASHI Makoto, KITAZAWA Takio, TERAOKA Hiroki	4. 巻 283
2. 論文標題 Oxidative stress inducers potentiate 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated pre-cardiac edema in larval zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1050-1058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nawaji Tasuku, Yamashita Natsumi, Umeda Haruka, Zhang Shuangyi, Mizoguchi Naohiro, Seki Masanori, Kitazawa Takio, Teraoka Hiroki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cytochrome P450 Expression and Chemical Metabolic Activity before Full Liver Development in Zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 456 ~ 456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph13120456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yoshinori, Dong Wenjing, Nakamura Tatsuro, Mizoguchi Naohiro, Nawaji Tasuku, Nishikawa Miyu, Onaga Takenori, Ikushiro Shinichi, Kobayashi Makoto, Teraoka Hiroki	4. 巻 24
2. 論文標題 Transgenic Zebrafish Expressing Rat Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): Augmentation of Acetaminophen-Induced Toxicity in the Liver and Retina	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4013 ~ 4013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24044013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dong Wenjing, Akasaka Ippo, Komiyama Akifumi, Nakamura Tatsuro, Mizoguchi Naohiro, Nawaji Tasuku, Ikushiro Shinichi, Kobayashi Makoto, Teraoka Hiroki	4. 巻 16
2. 論文標題 Augmentation of Pectoral Fin Teratogenicity by Thalidomide in Human Cytochrome P450 3A-Expressing Zebrafish	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 368 ~ 368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph16030368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Dong Wenjing, Yin Xiaoyu, Yang Jing, Pei De-Sheng, Teraoka Hiroki, Dong Wu
2. 発表標題 シトクロームP450 1A発現トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた渤海湾底泥におけるダイオキシン様物質の評価
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田 春佳, 縄司 奨, 山下 夏未, Shuangy Zhang, Dong Wenjing, 溝口 直洋, 関 雅範, 北澤 多喜雄, 寺岡 宏樹
2. 発表標題 肝臓形成前ゼブラフィッシュにおけるシトクローム P450発現と薬物代謝活性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田 結衣, Dong Wenjing, 赤坂 洪暢, 勝見 齊充, 生城 真一, 小林 麻己人, 北澤 多喜雄, 寺岡 宏樹
2. 発表標題 ヒトシトクローム P450 3As発現ゼブラフィッシュにおけるサリドマイドの催奇形性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dong Wenjing, 久保田結衣, 赤坂洪暢, 縄司 奨, 関 雅範, 生城真一, 小林麻己人, 寺岡宏樹
2. 発表標題 ヒトシトクロームP450 3As発現 ゼブラフィッシュにおけるサリドマイド奇形
3. 学会等名 第7回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会 2021年12月3日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 縄司 奨、村上佳穂、久樂喬、松浦武、関雅範、寺岡宏樹
2. 発表標題 ICH S5対照物質を用いたゼブラフィッシュ胚発生毒性試験 胚中濃度測定による偽陰性判定の原因調査
3. 学会等名 第47回日本毒性学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺岡 宏樹, Wenjing DONG, 久保田 結衣, 赤坂 洪暢, 縄司 奨, 関 雅範, 生城 真一, 小林 麻己人
2. 発表標題 ヒトシトクロームP450 3As 発現ゼブラフィッシュにおけるサリドマイド奇形
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 縄司 奨, 関 雅範, 生城 真一, 小林 麻己人, Wenjing DONG, 寺岡 宏樹
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける薬物動態の特性: 安全性評価の精度を高めるために
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤慶典, Dong Wenjing, 中村達朗, 溝口直洋, 縄司 奨, 生城真一, 小林麻己人, 寺岡宏樹
2. 発表標題 ラットシトクロームP450 2E1発現ゼブラフィッシュの作製
3. 学会等名 第8回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺岡宏樹
2. 発表標題 ラットシトクロームP450 2E1発現ゼブラフィッシュに対するアセトアミノフェンの影響
3. 学会等名 第 6 回環境化学討論会 北海道東北地区部会・中国四国地区部会 合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	生城 真一 (Ikushiro Shinichi) (50244679)	富山県立大学・工学部・教授 (23201)	代謝酵素発現系構築、代謝実験
研究分担者	小林 麻己人 (Kobayashi Makoto) (50254941)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	トランスジェニックフィッシュの作成

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------