



核内受容体の肝毒性発現への寄与と 毒性予測への応用

吉成 浩一
静岡県立大学薬学部
衛生分子毒性学分野



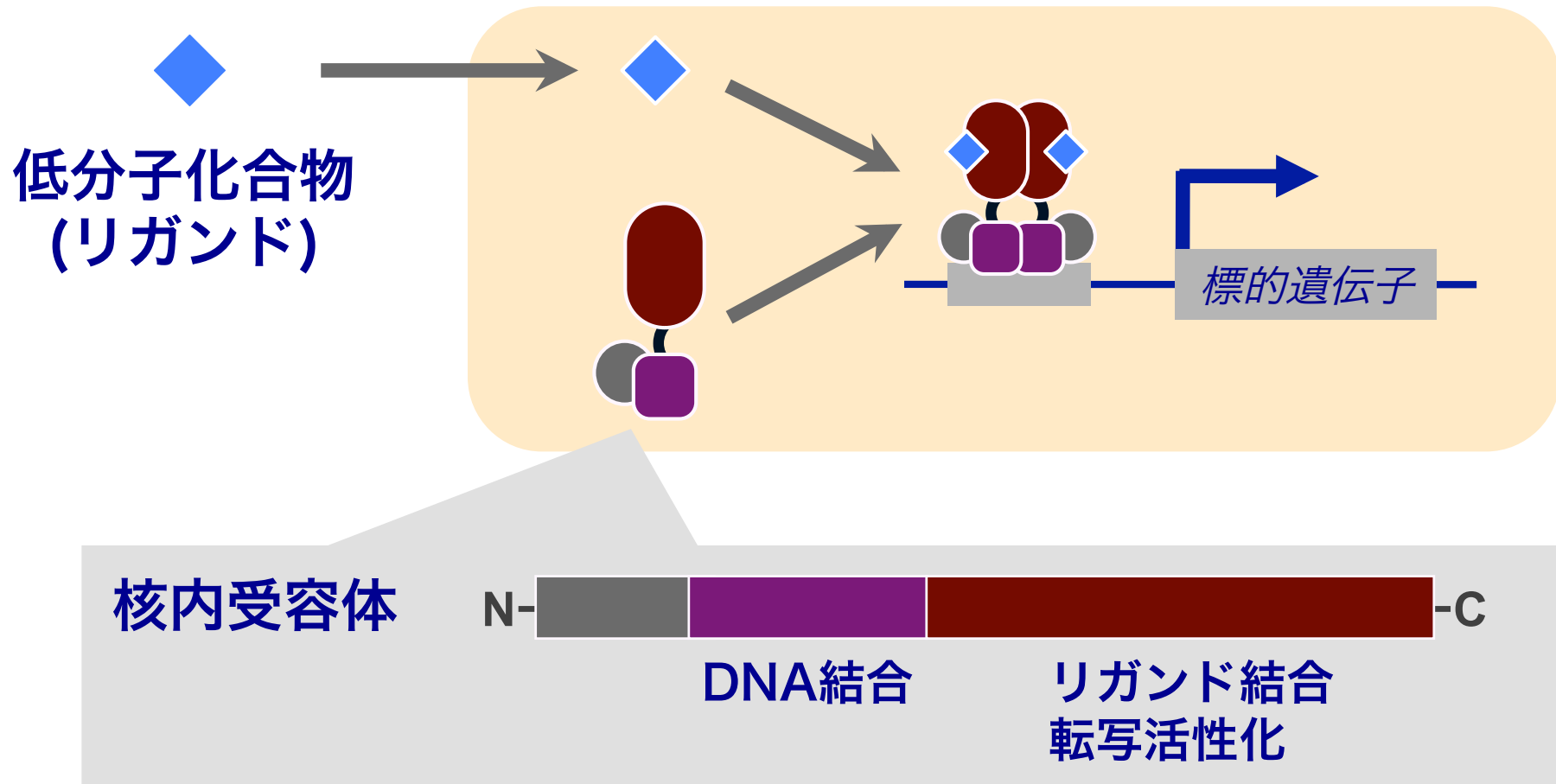


- ✓ イントロダクション：核内受容体とは？
- ✓ 肝発がんと核内受容体：分子機序の考察
- ✓ 肝毒性の予測に向けた取り組み：
 - ・インビボ毒性試験データベースと核内受容体アッセイを利用した試み



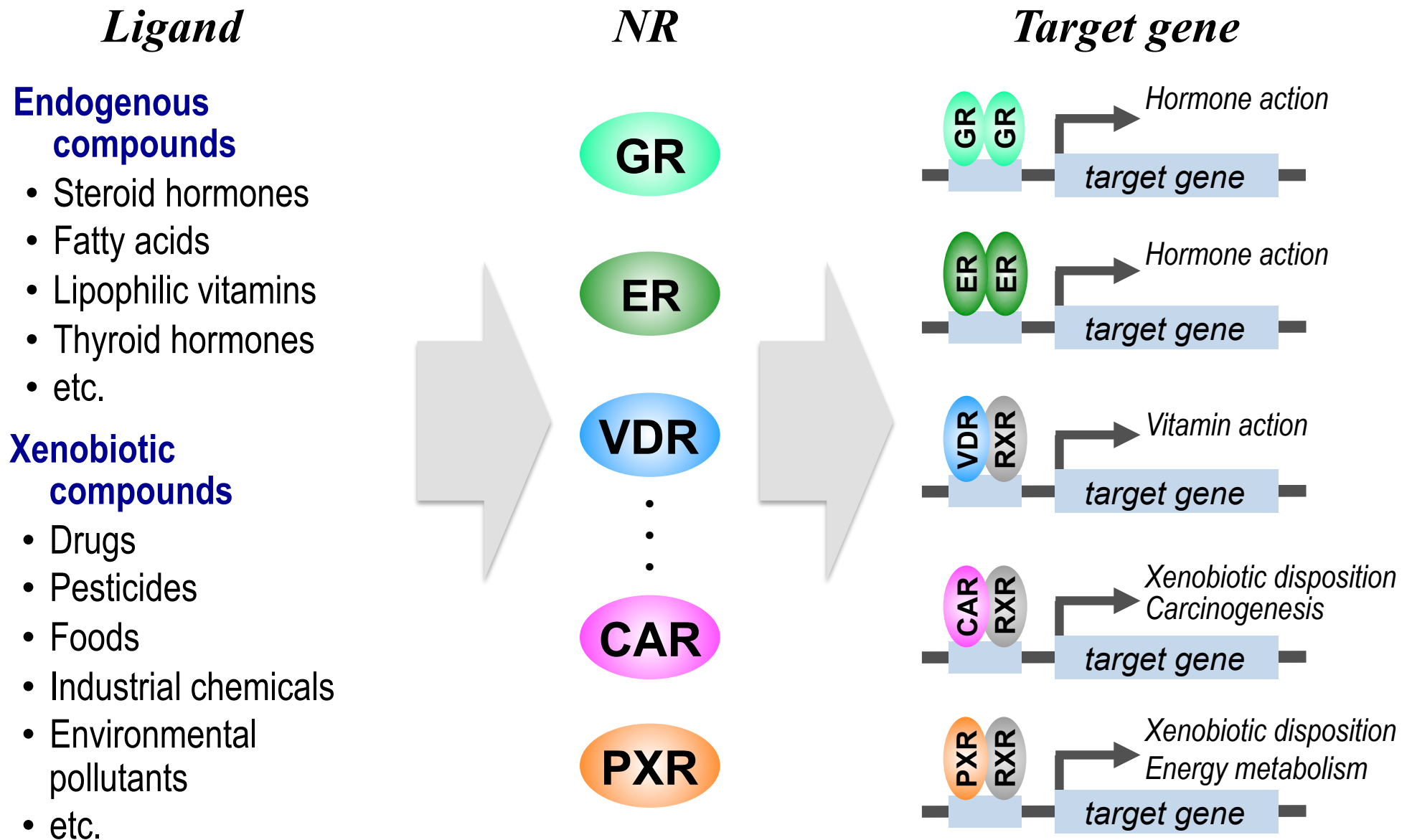
- ✓ イントロダクション：核内受容体とは？
- ✓ 肝発がんと核内受容体：分子機序の考察
- ✓ 肝毒性の予測に向けた取り組み：
 - ・インビボ毒性試験データベースと核内受容体アッセイを利用した試み

核内受容体 *nuclear receptor* (NR) の構造と作用機序



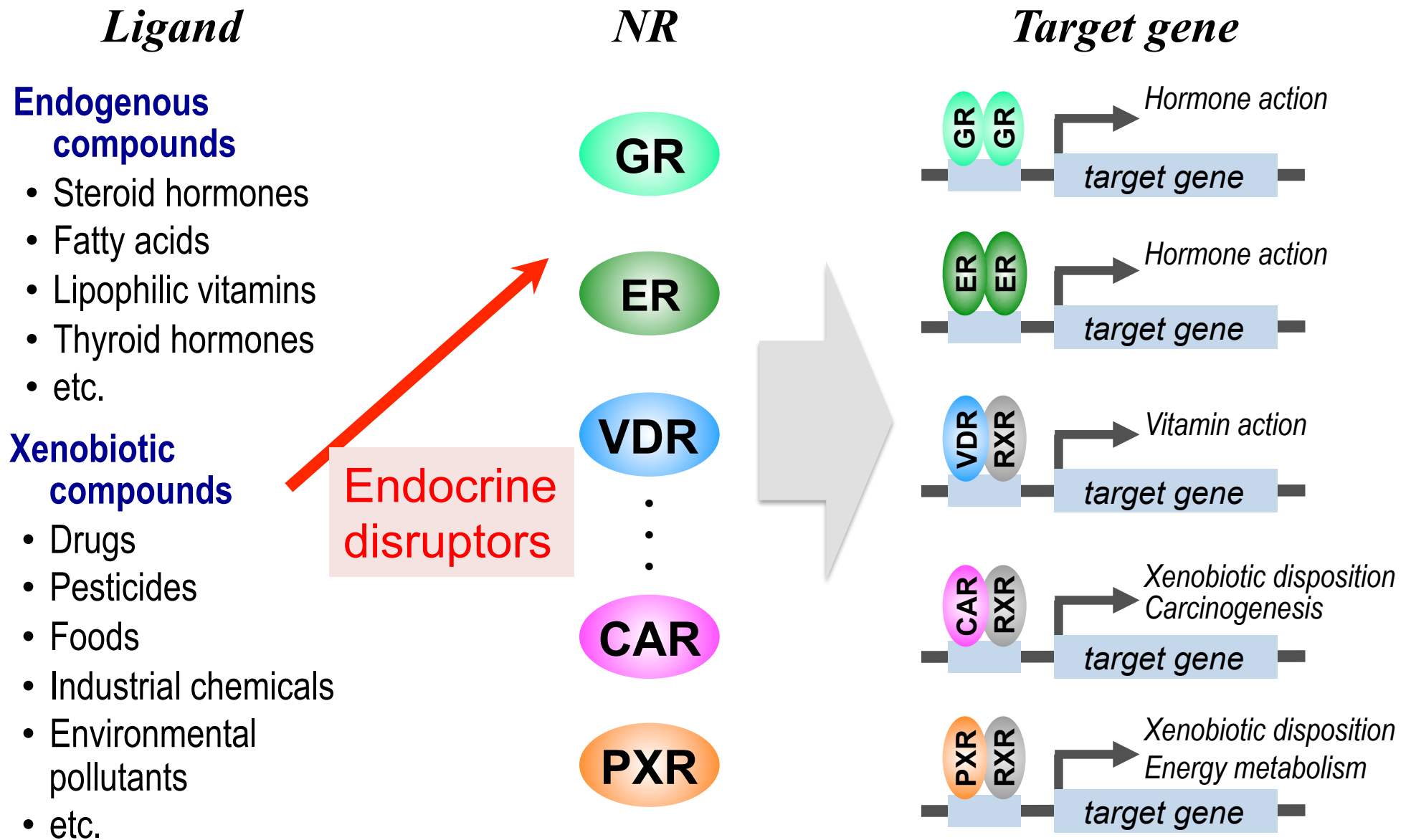
核内受容体は、低分子化合物に応答して種々遺伝子の発現を変化させることで細胞機能を制御している。

NRs: members and functions

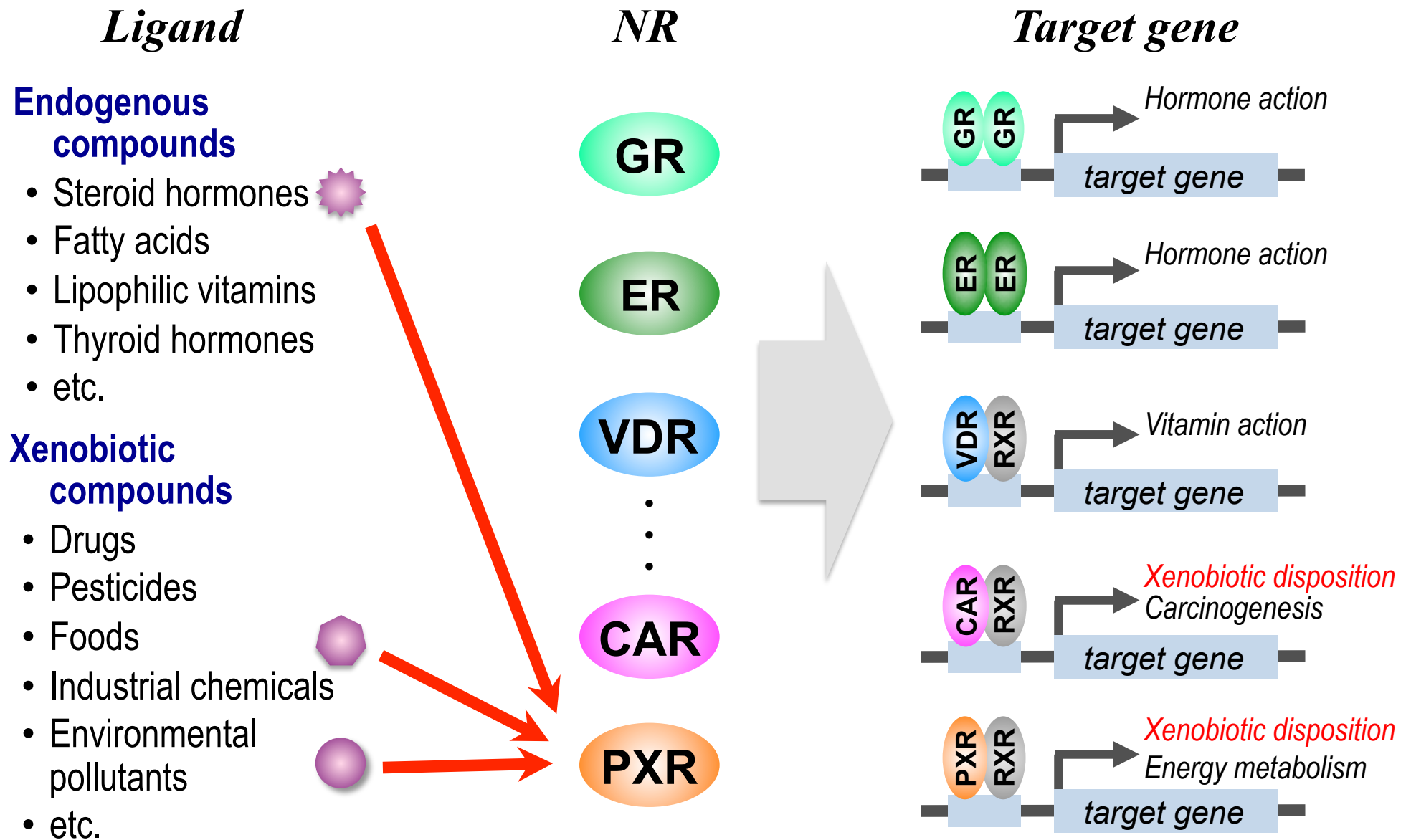


There are 48 members identified in human NR superfamily.

Chemical activation of nuclear receptors

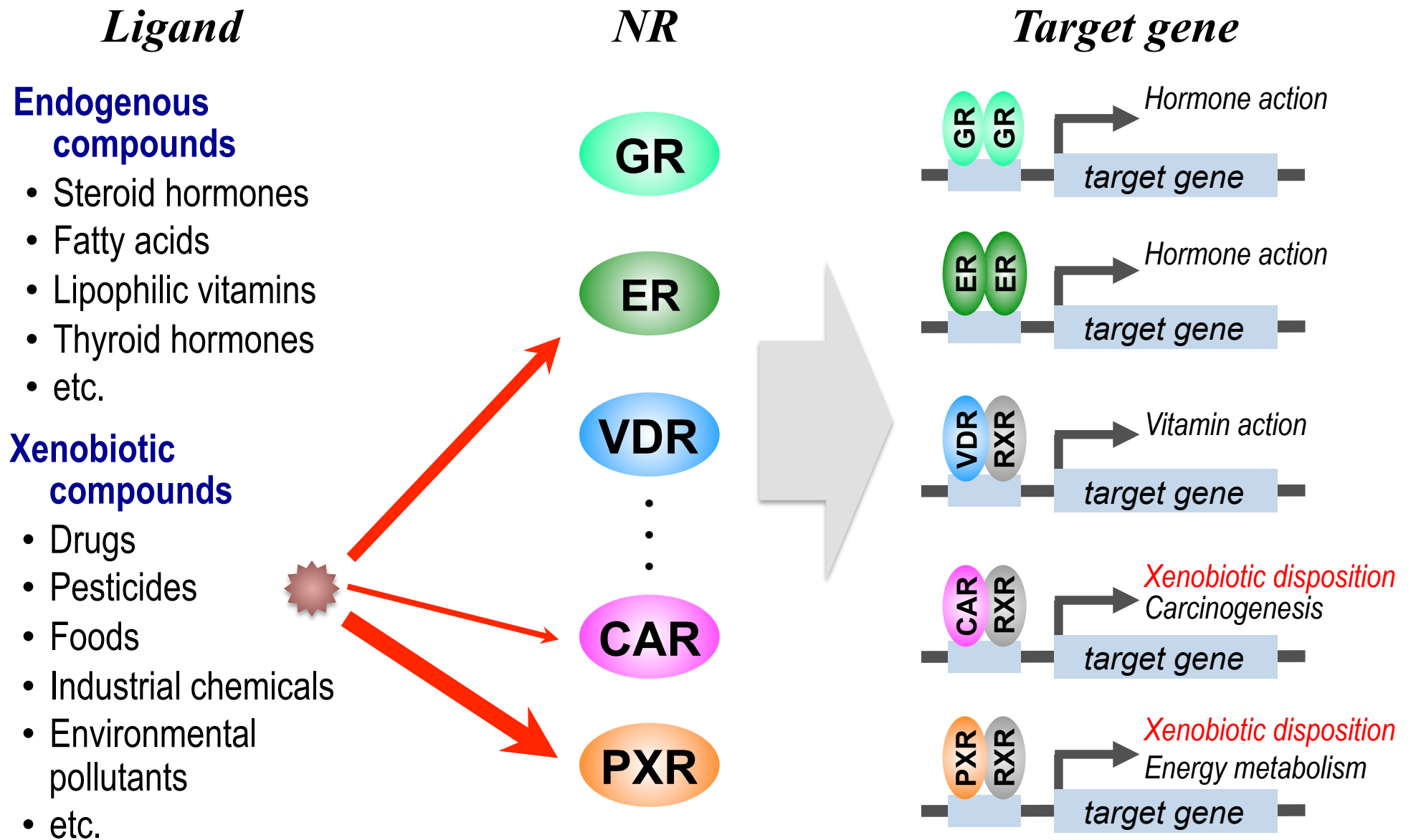


Chemical activation of nuclear receptors



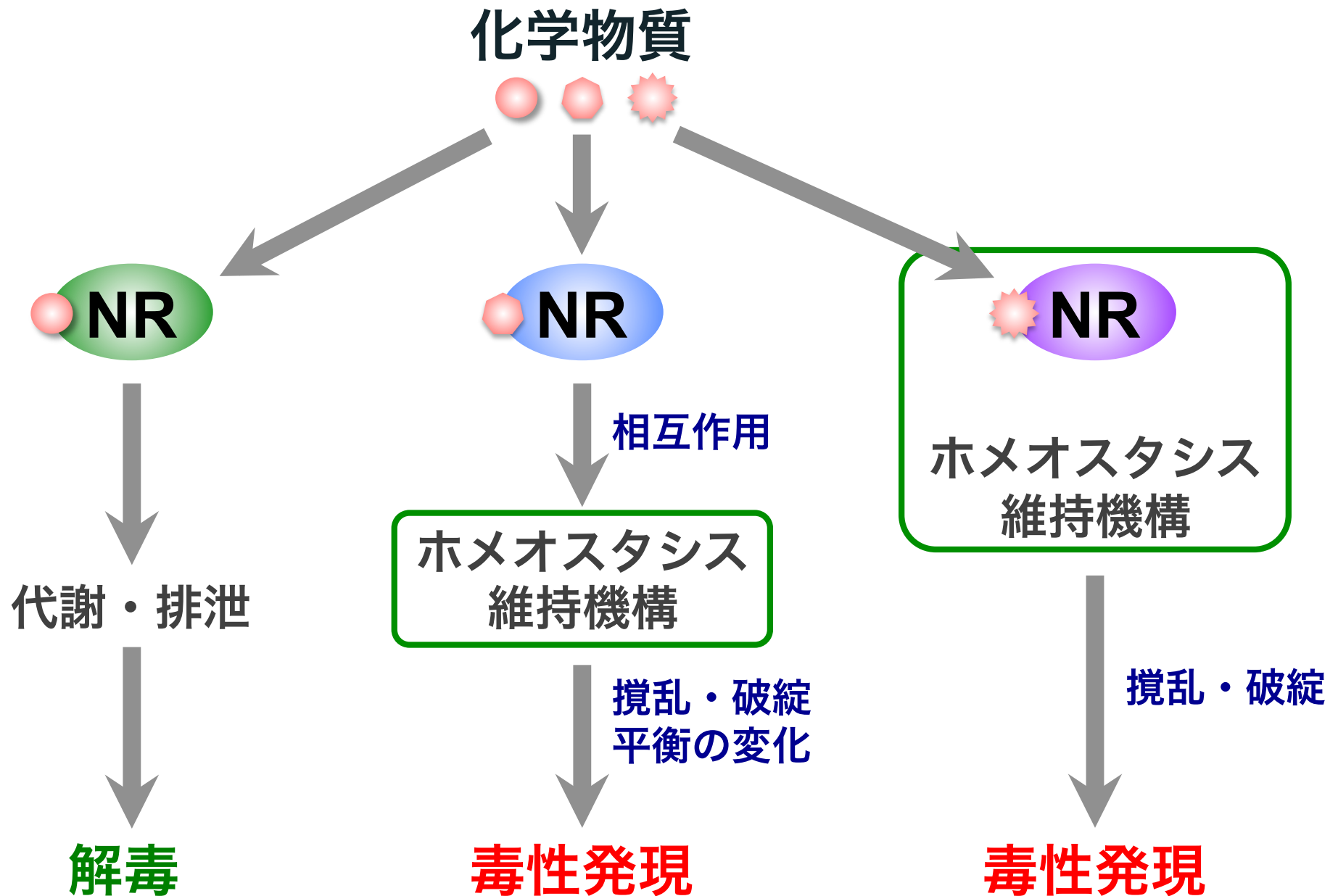
NRs have broad, overlapping but distinct ligand specificity.

Chemical activation of nuclear receptors



NRs have broad, overlapping but distinct ligand specificity.

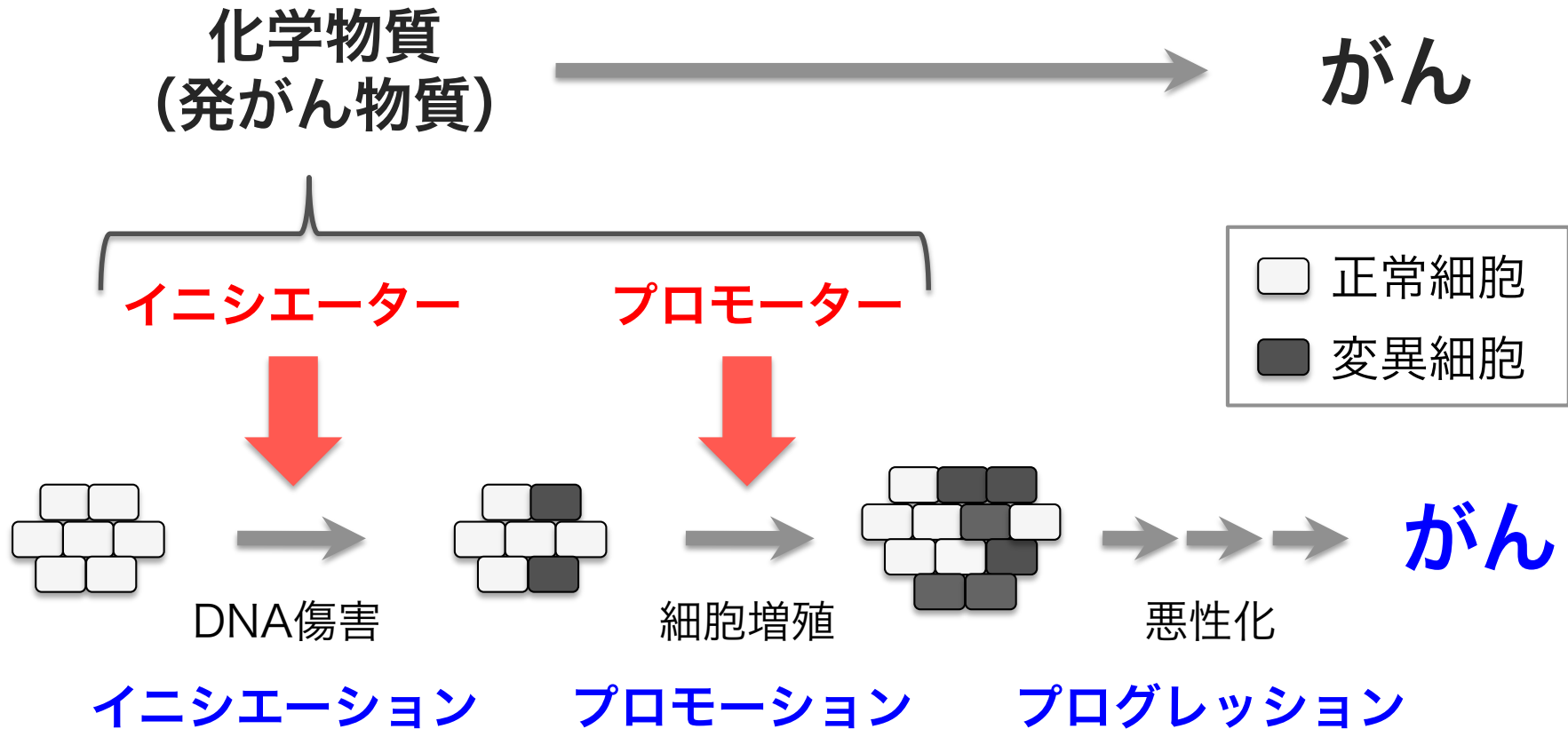
化学物質の毒性発現に対する核内受容体の寄与





- ✓ イントロダクション：核内受容体とは？
- ✓ 肝発がんと核内受容体：分子機序の考察
- ✓ 肝毒性の予測に向けた取り組み：
 - ・インビボ毒性試験データベースと核内受容体アッセイを利用した試み

化学物質による発がん



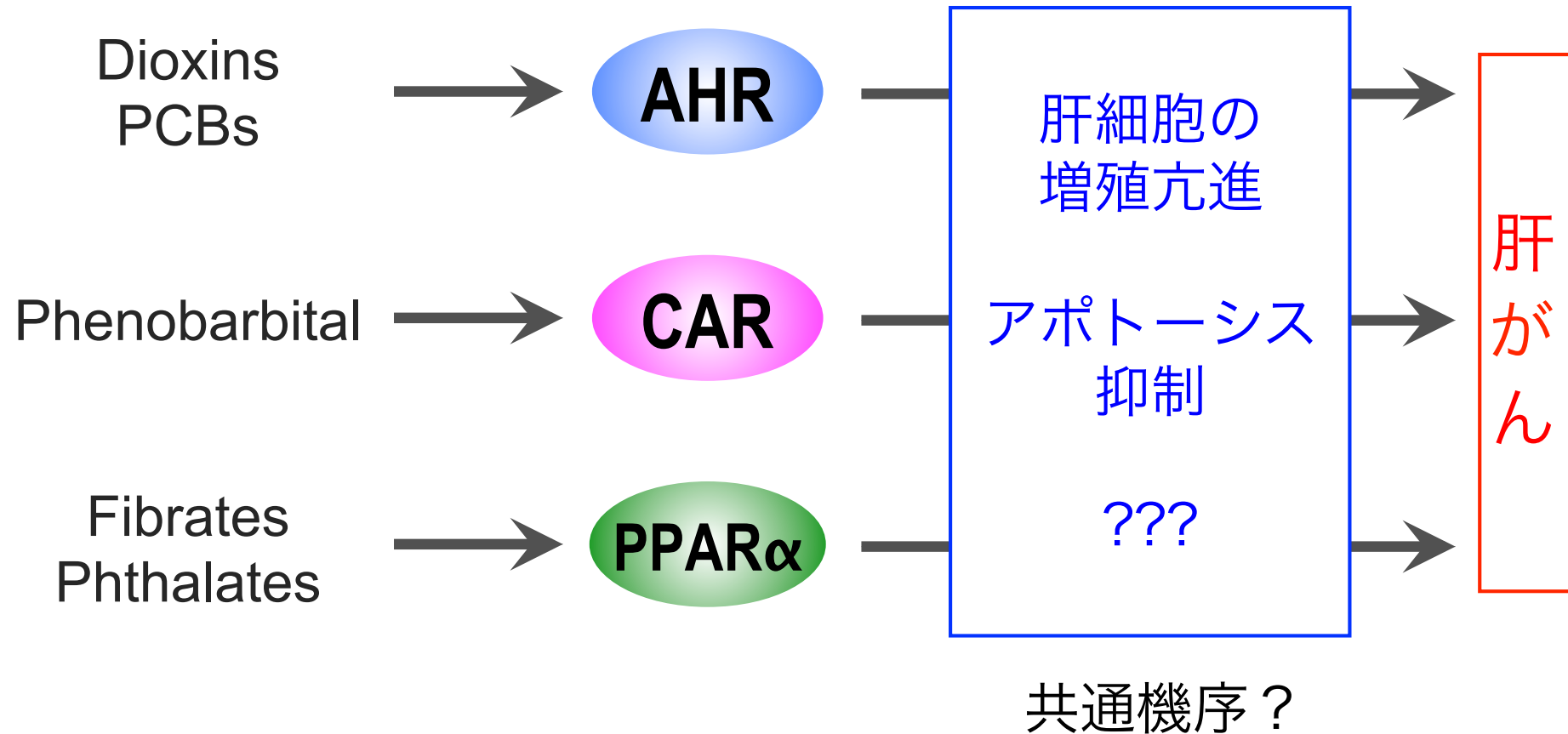
発がん性試験

• 長期発がん試験 (ラット、マウス)

• Ames試験
• 小核試験
• コメットアッセイ
• 染色体異常試験

• 二段階発がん試験

核内受容体と肝化学発がん



- ✓ 肝がんプロモータによる発がんには、核内受容体の活性化が関与することが知られている。
- ✓ しかし、その詳細な分子機序は明確になっていない。

発がん予測モデル



非発がん物質

発がん物質



短期間曝露



学習用化学物質の選択に、機序が考慮されていない。

ラット・マウス（肝）の網羅的遺伝子発現解析

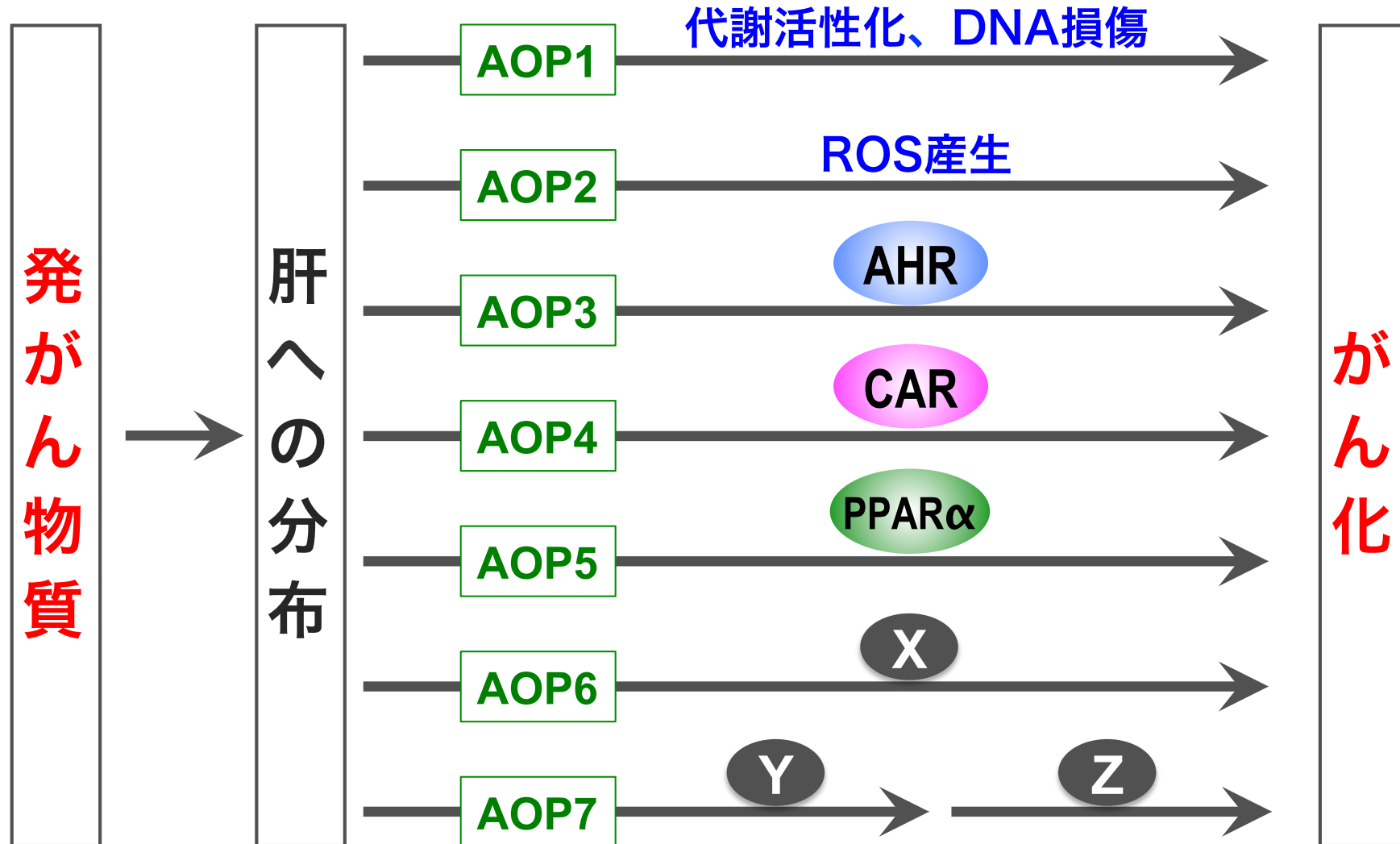
発がん物質曝露に伴い特異的に発現変動する遺伝子群の同定

分子機序の考察などによる選別

機械学習モデルの構築（SVMなど）

発がん予測モデル

機序を考慮した発がん性予測

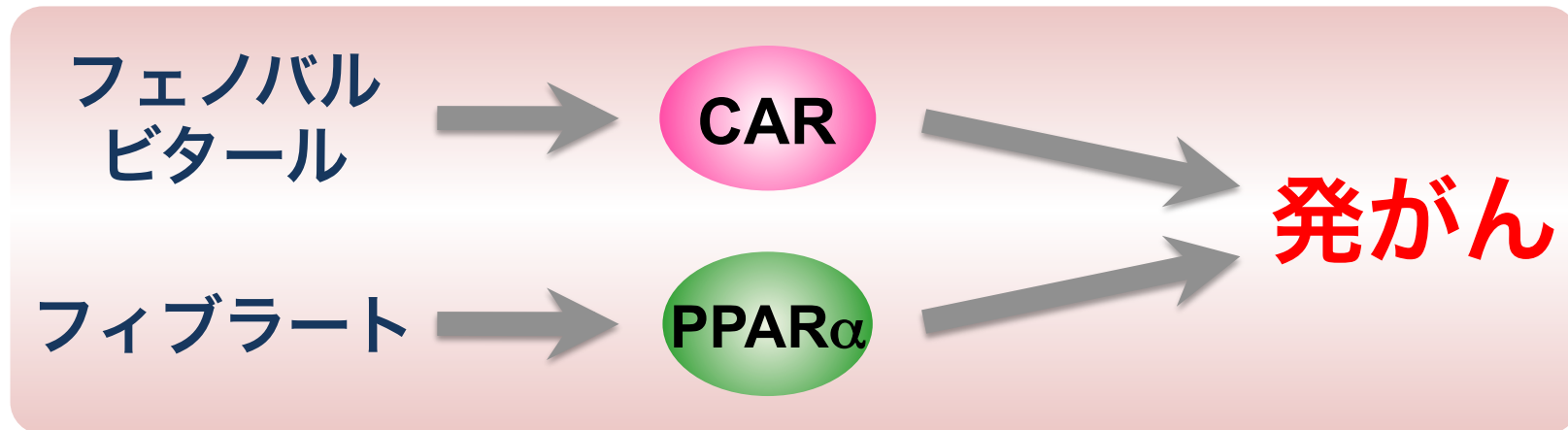


AOPの同定は、精度の高い（動物を用いた）発がん予測モデルおよびインビトロインシリコ発がん予測モデルの構築、ヒト外挿性評価に必須である。

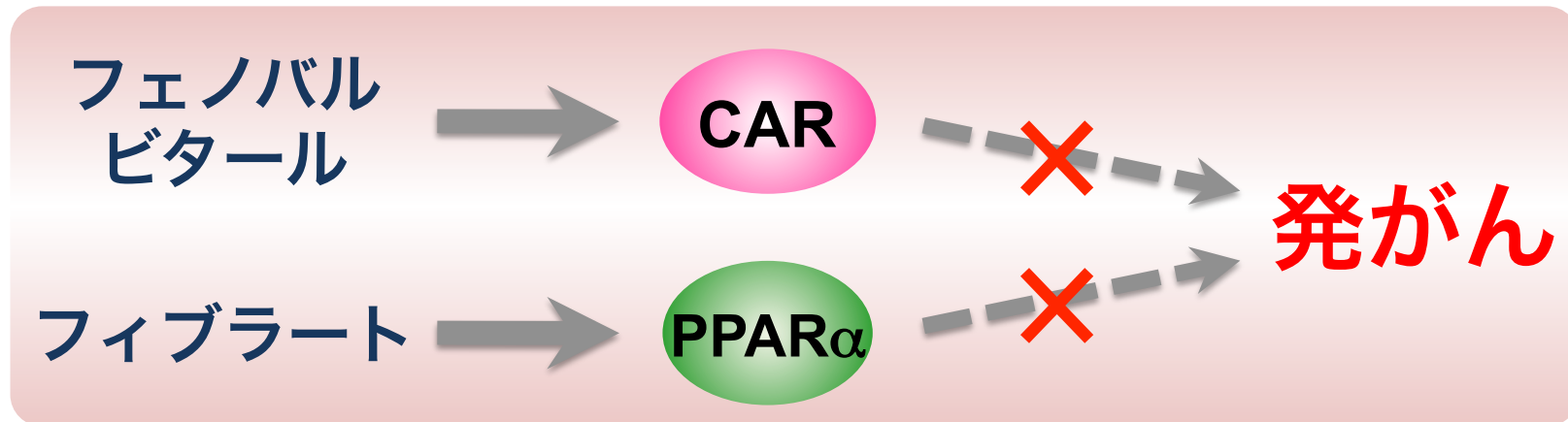
核内受容体を介した肝化学発がんの種差



げっ歯
動物
肝臓

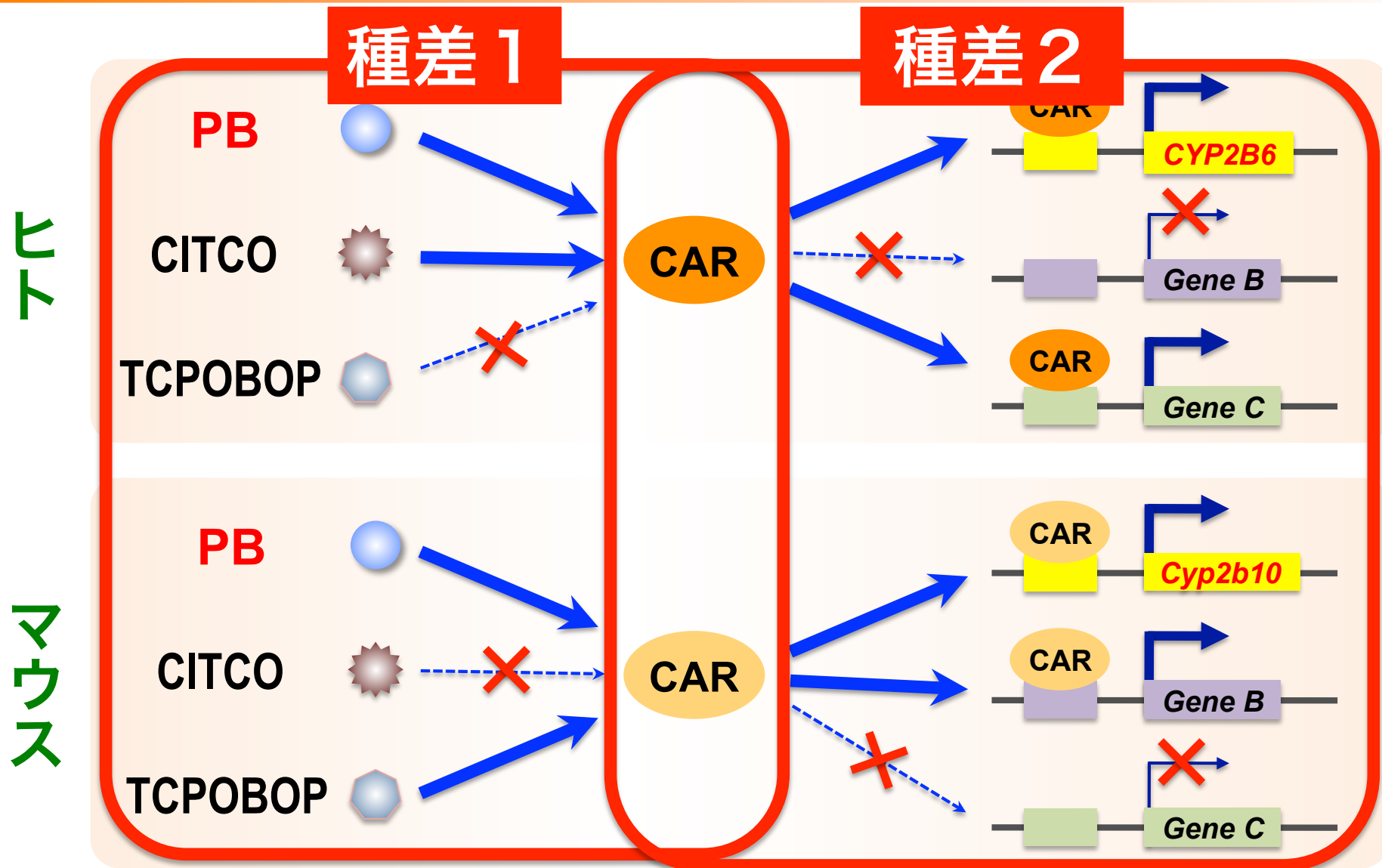


ヒト
肝臓



- ✓ フェノバルビタールやフィブラートによるげっ歯動物の肝発がんには、核内受容体CARとPPAR α が必要である。
- ✓ これら化学物質は、ヒトとげっ歯動物のCARとPPAR α を共に活性化するが、ヒトでは肝がんを引き起こさないと考えられている。

CAR機能の種差を生じる2つの要因： 活性化物質の種類と機能発現機構



ヒト・マウスに共通のCAR活性化物質であるフェノバルビタールを投与した際にマウスで認められるCAR依存的な転写は、必ずしもヒトで認められるとは限らない。

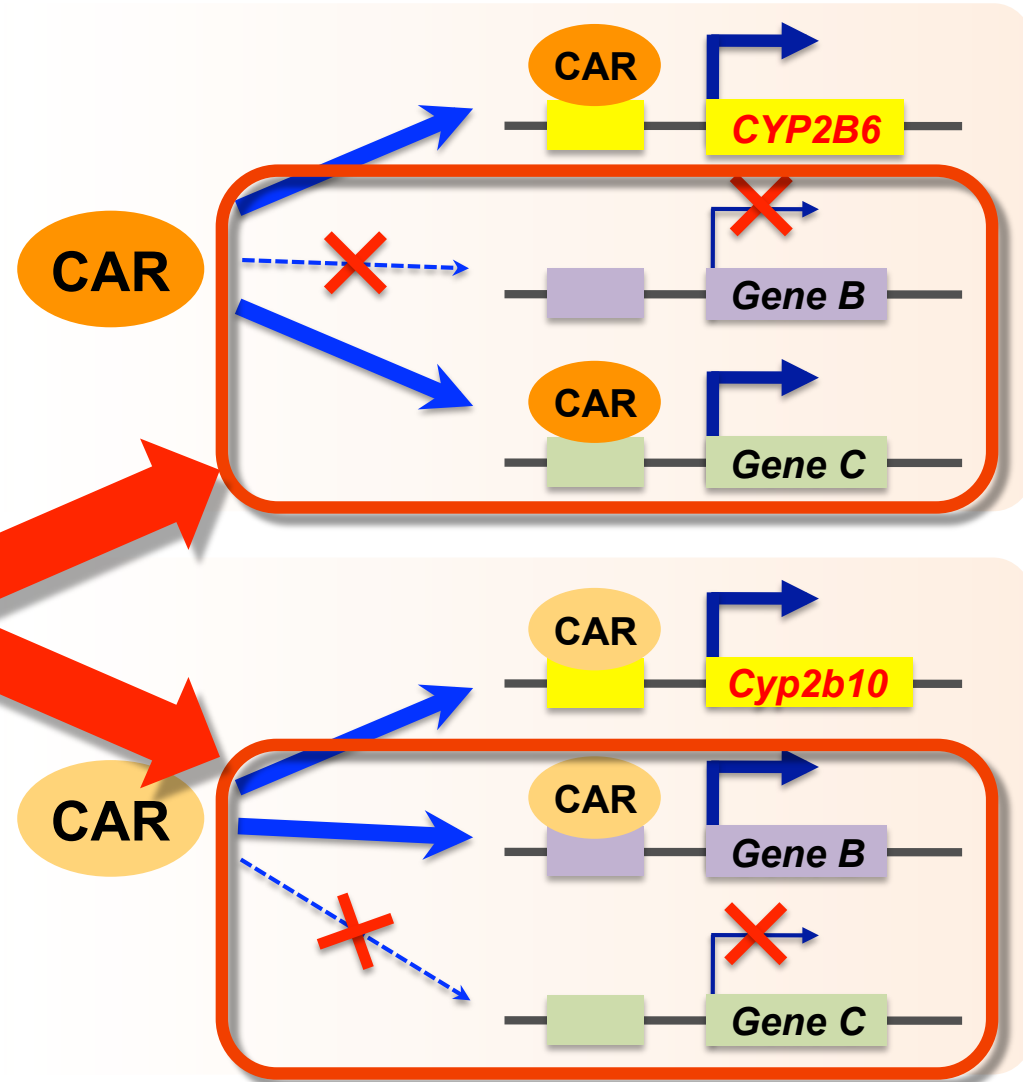
CAR機能の種差の原因は？



ヒト

マウス

この差が
発がん性の
種差の原因？



ヒト・マウスに共通のCAR活性化物質であるフェノバルビタールを投与した際にマウスで認められるCAR依存的な転写は、必ずしもヒトで認められるとは限らない。



- ✓ イントロダクション：核内受容体とは？
- ✓ 肝発がんと核内受容体：分子機序の考察
- ✓ 肝毒性の予測に向けた取り組み：
 - ・ インビボ毒性試験データベースと核内受容体アッセイを利用した試み

Use of *in vitro* assays for the biological/toxicological characterization of chemical compounds



(Q)SAR approach

- Defines **physicochemical properties** (e.g. descriptors), based on the whole and/or partial **chemical structure (2D/3D)**.
- Tries to find out the association between **physicochemical properties and toxicity**.

Our working hypothesis

- The **biological property** (ability to interact with cellular macromolecules) may not be defined comprehensively only by chemical structures.
- The biological (toxicological) property of chemicals may be defined by ***in vitro* assay using cells and/or biomolecules**.

What kind of assays are good for such a strategy?

How much *in vitro* information do we need?



- ✓ **Big data** (by a large set of assays) will give us valuable information on chemicals' biological/toxicological characteristics that we cannot obtain *in silico* analysis (descriptors, (Q)SAR).
- ✓ Japan is far behind USA in terms of *in vitro* big data collection (e.g. ToxCast by USEPA)

Our hypothesis and project:

- There are Japan-made good database available (e.g. HESS, TG-GATEs) .
- We may be able to predict *in vivo* toxicity with ***small data*** by selected/targeted assays in combination with such database.
- ***Nuclear receptor/P450 assays*** seem good as “***startup/first choice***” assays for a such strategy in the evaluation and prediction of chemical toxicity.

Why nuclear receptors?



- ✓ Nuclear receptors (NRs) are activated by a wide variety of chemical compounds, acting as “**xeno-sensors**” and “**toxicity targets**” in the body.
- ✓ NRs show **broad, overlapping, but distinct, ligand specificity**.
- ✓ NR-activating ability of chemical compounds is easily determined by **easy-to-handle, high-throughput in vitro assays**.
- ✓ NR assays show “**high-positive rate**”.
- ✓ P450s are major drug metabolizing enzymes showing broad substrate specificities and work as “**xeno-sensors**”. (e.g. human CYP3A4 metabolizes ~50% of clinically used drugs)

NR/P450 assays may be used as in vitro chemical profilers.

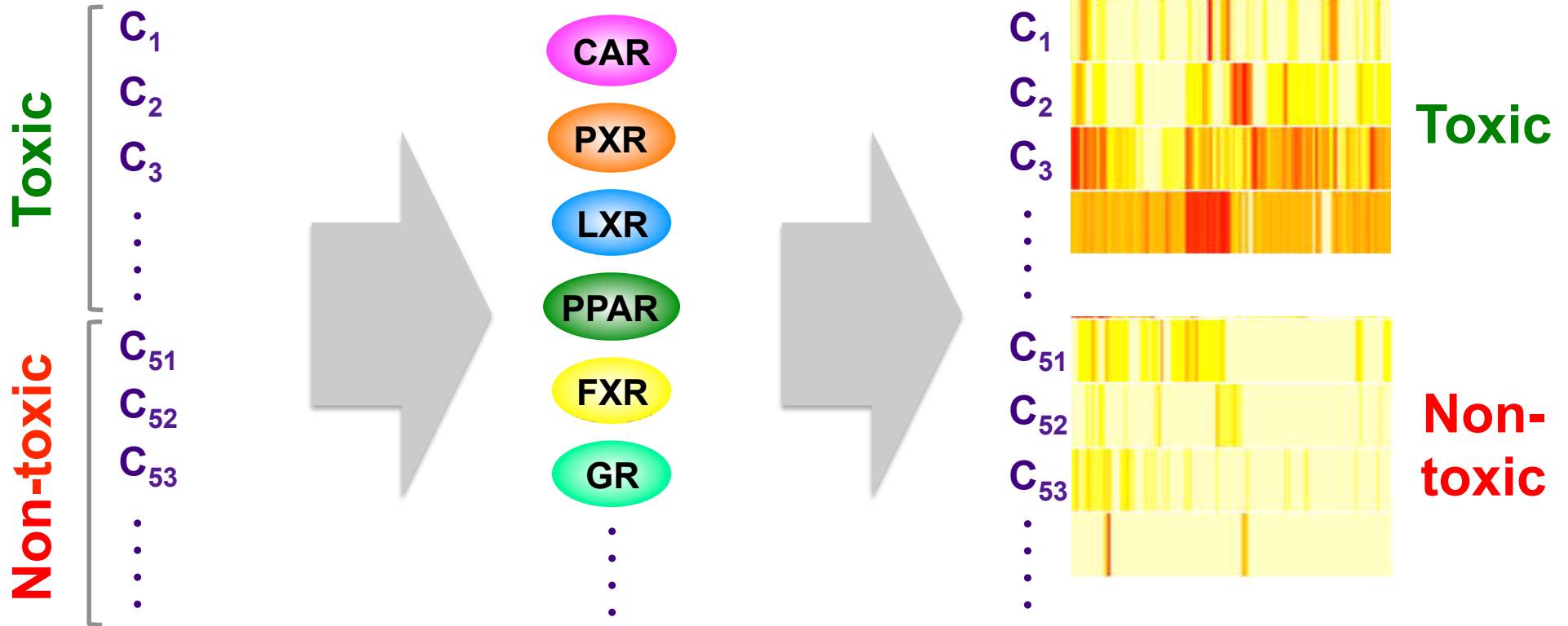
Toxicity prediction using NR-activating profiles and in vivo toxicity database: on-going LRI project



Compounds
from DB

NR assays
(+P450s)

NR-activating profile
(with chemical properties)



Toxicity prediction using NR-activating profiles and in vivo toxicity database: on-going LRI project



Compounds from DB

NR assays (+P450s)

Prediction:
 C_x exhibits C_3 -like toxicity.

Toxic

C_1
 C_2
 C_3
...

Non-toxic

C_{51}
 C_{52}
 C_{53}
...

CAR

PXR

LXR

PPAR

FXR

GR

C_1
 C_2
 C_3
...

C_{51}
 C_{52}
 C_{53}
...

Toxic

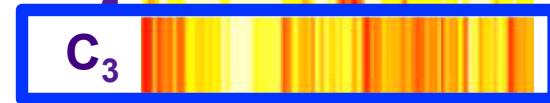
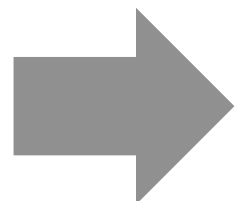
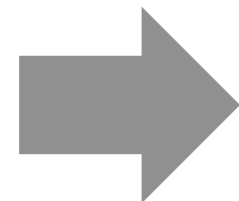
Non-toxic

Comparison

C_x
New compound

Performing assays

C_x





- 核内受容体は、生体内「異物センサー」として機能しており、化学物質による毒性発現の作用点となりうる。
- 作用機序（AOP/MOA）の把握は、毒性予測モデルの構築、種差の理解に重要である。
- 化学物質応答性核内受容体のリガンド選択性は低く、その活性化作用評価試験は、陽性率の高いインビトロ試験である。このため、化学物質の生物学的・毒性学的特徴付け（プロファイリング）に利用可能である。
- これら試験と、インビボ毒性試験データベース及びインシリコ解析（記述子計算）の統合により、複雑な毒性の予測に有用な試験系を構築できる可能性がある。
- 代謝（体内動態）情報の利用が、インビボ毒性とインビトロ試験をつなぐために重要と思われる。

謝辞



静岡県立大学薬学部

中山 知恵

増田 茜

増田 雅美

東北大学大学院薬学研究科

中島 宏之

野表 知世

飯塚 薫

杉本 雄一

山添 康

製品評価技術基盤機構(NITE)

山田 隆志

櫻谷 祐企

山田 隼

北海道立衛生研究所

小島 弘幸

産業技術総合研究所

竹下 潤一

Funding

日本化学工業協会 (LRI)

内閣府食品安全委員会

経済産業省

マンダム・動物実験代替法学会



Thank you for your kind attention.