

学位論文の要旨

論文題目 サリドマイドの胚・胎児発生毒性研究における Kbl:JW ウサギの有用性

氏 名 河村佳徳

論文の要旨

ヒトの医薬品開発において実験動物を用いた毒性評価は、ヒトでの副作用の予測や機序の解析に重要であり、その一つの胚・胎児発生毒性試験は、開発候補化合物の胚・胎児発生への影響を調べるために実施されている。ウサギは、サリドマイドによって四肢奇形が誘発される動物であり、薬物の催奇形性の検討に使用されてきた。

胚・胎児発生毒性試験では主に胎児の奇形や変異を評価するが、一般的に、医薬品候補化合物により誘発される形態学的変化の発生頻度が顕著に増加する例は少なく、発生頻度のわずかな増加が投与の影響か否かを自然発生の頻度と比較して判断することが必要になる。そのため、自然発生の奇形や変異の種類および頻度に関するデータ(背景データ)を十分に把握し、その特性や被験物質への感受性が長期間安定していることを確認することが重要である。しかしながら、サリドマイドの胚・胎児発生への影響について日本白色種(JW : Japanese white)を用いて評価するにあたり、本系統のウサギ胎児における自然発生の奇形・変異のデータやサリドマイドによって誘発される奇形の報告は不十分であった。従って、本邦でよく使用される Kbl:JW ウサギ(生産者：北山ラベス株式会社)について、我々の研究所で 20 年以上にわたって蓄積された Kbl:JW ウサギの胚・胎児発生毒性試験の背景データを 5 または 6 年毎の 4 期間に分割して遡及的に解析し、各期間の生殖パラメーターならびに外表、内臓および骨格異常や変異などの形態学的変化の自然発生の頻度を比較した。また、1988 年、1995 年および 2007 年に実施したサリドマイドによる胚・胎児発生毒性試験について、胎児に誘発された奇形の種類や発生頻度を試験間で比較した。その結果、20 年以上にわたって母動物の生殖パラメーターならびに胎児の形態変化の種類や発生頻度に大きな変動がなかったことが示された。さらに、サリドマイドにより種々の奇形が高頻度に誘発され、奇形の種類は 3 試験で類似していた。従って、Kbl:JW 系統ウサギは医薬品候補化合物の効果を評価できる動物の一つであり、特に自然発生の形態変化と薬物誘発奇形が長期にわたって安定であるという観点から胚・胎児発生毒性試験に有用であると考えられる。

胚・胎児発生毒性試験に使用されているウサギの系統は、世界的にはニュージーランド白色種(NZW : New Zealand white)がほとんどである。本邦でも NZW が多く使用されているが、JW も比較的によく用いられている。医薬品開発のための毒性試験は世界的に行われており、他系統での試験結果を互いに参考にする必要性もあることから催奇形性物質への感受性は系統間で大差なく、比較可能であることが望ましい。サリドマイドの催奇形性評価にも NZW が最もよく使用されており、JW に関する報告は少なく、サリドマイドの Kbl:JW ウサギ胎児への影響に関する詳細な報告はなかった。一方、化学物質

によって誘発される奇形には系統差がみられることがある。ウサギについてはサリドマイドの催奇形性の系統差は、NZW、NZW 雑種、ダッチウサギの間で調べられており、また JW(生産者：セブン産業株式会社)と JW-NIBS ウサギ(生産者：日本生物科学研究所)の頭部奇形についても比較されていたが、NZW と JW についてウサギ胎児へのサリドマイドの影響を直接的に比較した報告はなかった。本研究ではサリドマイドにより誘発される奇形の系統差について生産者が同一の 2 系統(Kbl:JW および Kbl:NZW)を用いた胚・胎児発生試験(EFD 試験：Embryo-Fetal Development study)を行い、その結果を比較検討した。次にこれらの 2 系統でサリドマイドを妊娠 7-8 日、9-10 日および 11-12 日に分割して投与する感受期検討試験(SP 試験：Sensitive Period study)を実施し、それぞれの投与期間毎に誘発された奇形の種類を比較した。その結果、外表と骨格検査では、頭部、四肢、尾の奇形が、内臓検査では、水頭症、心血管系の奇形、肺中間葉欠損や肝臓分葉異常が EFD 試験および SP 試験ともに両系統で高頻度に発生し、いずれの系統でもサリドマイドの投与量の増加に伴って奇形発生頻度が上昇する傾向がみられた。多くの奇形や変異の種類と感受期に両系統で共通性が認められたことから、サリドマイドの催奇形性を評価する上で両系統の有用性は同等であると結論した。ただし、前肢の異常回転手、橈骨の欠損または短小、短尾などは Kbl:JW の方が Kbl:NZW よりも高頻度に発生するが、一方で後肢の異常回転手、脛骨の欠損または短小、肺中間葉欠損、横隔膜ヘルニアや胃小型化などは Kbl:NZW で多く認められた。従って、前肢奇形や短尾の奇形誘発メカニズムの解析には Kbl:JW ウサギの方が有用であると考えられた。

サリドマイドの催奇形性、特に四肢奇形の作用機序は、主にニワトリやゼブラフィッシュなどの実験動物で検証されてきたが、未だ不十分であり、ヒトへの外挿性の考察も十分とは言えなかった。ウサギにおいても、NZW 系統で行われた四肢奇形の形態学的解析や分子発生学的な観点からの報告は散見されるが、JW 系統では分子発生学的な解析は報告されていなかった。JW 系統における肢芽での遺伝子発現に及ぼすサリドマイドの影響を調べることは、本系統のウサギにおけるサリドマイド誘発性奇形の作用機序についての理解を深めるとともに、ヒトへの外挿性を考察する際に有用なデータになると考えられた。そのため、肢形成に重要な働きをもつ 3 種類の遺伝子(Fgf8、Bmp4、Hoxa11)のウサギ胚肢芽での発現へのサリドマイドの影響を whole mount in situ hybridization 法によって検討した。最近になって、サリドマイドが cereblon タンパク質に結合し、cereblon を構成要素とする E3 ユビキチンリガーゼ複合体の活性を阻害することが発見されている。この活性阻害を介してサリドマイドは発生の異常を最終的に引き起こすと考えられるようになってきている。詳細は不明だが、E3 ユビキチンリガーゼの基質となるタンパク質がユビキチン化されず、分解が阻害された結果として発生過程に重要な働きをする繊維芽細胞増殖因子、Fgf8 や Fgf10 等、の発現が低下すると思われる。つまり、サリドマイドによる四肢奇形誘発時には Fgf8 や Fgf10 の発現低下が起こることが考えられる。四肢形成は複雑な過程であり、Fgf8 は Fgf10 以外にも係る遺伝子が多数想定されるが、本研究では細胞分化誘導・増殖因子である Bmp4 および四肢の遠近軸形態パターン形成に係る Hoxa11 について解析した。その結果、サリドマイドにより妊娠 10 および 11 日で胚全体の成長が抑制され、肢芽の外胚葉性頂堤における Fgf8 の発現領域は、サリドマイド胚において縮小したが、Fgf8 発現領域の縮小と頭長には正の相関がみられたことから、この縮小は胚の成長抑制に伴う変化であり、サリドマイドの肢芽形成過程への特異的直接作用ではないと考えられた。なお、妊娠 12 日のサリドマイド胚では成長抑制

がみられず、Fgf8 の発現領域も対照胚の場合と差がなかった。Bmp4 の発現は妊娠 10、11 および 12 日のサリドマイド胚で観察されたが、対照胚と比べて違いがなかった。Hoxa11 は妊娠 11 および 12 日のサリドマイド胚の前肢および後肢で、対照胚と同様に肢芽の遠近軸に対して直角に帯状に発現した。妊娠 11 日のサリドマイド胚では対照胚との間に発現パターンの違いは認められなかったが、妊娠 12 日のサリドマイド胚の前肢芽では、後肢芽と異なり、前部側での発現領域が減少した。前部側はサリドマイドを投与したウサギ胎児で奇形がみられる橈骨の発生部位に相当すると考えられ、この Hoxa11 発現領域幅の前部側に特異的な減少はサリドマイドで誘発される四肢奇形の要因の一つと推察される。このことはサリドマイドの Hoxa11 の発現への影響がウサギ胎児でみられる橈骨の奇形に関与している可能性を初めて明らかにしたという点で大きな意義があると考えられる。

本研究では同一施設を使用し、ほぼ一定の基準で、背景データやサリドマイドへの反応性を解析することができたと考えられる。本研究で得られた、Kbl:JW ウサギの生殖や胎児の発生に関する長期安定性、サリドマイドに対する感受性の安定的維持、Kbl:NZW ウサギとの系統差についてのそれぞれの知見は、本系統ウサギを用いて胚・胎児発生毒性試験を行う上で重要な基盤となると考えられる。

Kbl:JW ウサギは日本の医薬品開発において胚・胎児発生毒性評価に頻用されている動物であり、本研究は本邦での医薬品開発に貢献するものと考えられる。また、Kbl:JW においてサリドマイド誘発性の橈骨奇形に関連すると推察される遺伝子発現の変化を初めて明らかにしたことは、分子発生的なアプローチによるメカニズム解明に本動物モデルを活用するための手がかりとなると考えられる。