

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	概日リズムに着目した肝毒性評価試験構築に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	守矢恒司
Author(English)	Koji Moriya
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11545号, 授与年月日:2020年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田川 陽一,生駒 俊之,糸 昭苑,秦 猛志,藤枝 俊宣
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11545号, Conferred date:2020/5/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論 文 要 旨 (和文2000字程度)

Dissertation Summary (approx. 2000 characters in Japanese)

報告番号 For administrative use only	乙 第 号	氏 名 Name	守矢 恒司
---	-------	-------------	-------

【諸言】

地球上に存在する生物は地球の自転による昼夜の環境変化に応じて、生理機能が約24時間周期、概日リズムを示す。生体内では太陽光を網膜が光シグナルとして受容し、視床下部に存在する視交叉上核へと伝達される。視交叉上核はそれに応じて、液性因子や神経伝達を介して全身の末梢組織の概日リズムを同調させる。肝臓も概日リズムの制御を受けるため、肝機能も変動していることから薬物応答性は投与時刻で異なる。このような個体の応答性を反映する細胞培養系を用いた毒性試験の確立に、概日リズムを再現することは毒性を精確に評価するうえで必須であると考えられる。

【論文の構成と各章の要旨】

第1章 序論

本論文の背景および目的を述べた。概日リズムの生理的意義および分子メカニズムについて概説し、肝臓の機能および薬物代謝過程における概日リズムの重要性を述べた。新薬や化合物の一般的な肝毒性試験では概日リズムによる肝機能変動は考慮されていない現状を述べた。本論文では肝毒性誘発物質として過剰摂取により肝障害を誘発する解熱鎮痛剤アセトアミノフェンを用い、マウス個体のアセトアミノフェン肝毒性に対する応答性を指標に、細胞培養系においても個体同様アセトアミノフェン肝毒性に対する応答性が概日リズムの制御を受けるかどうかを検証することを目的とした。

第2章 アセトアミノフェンの解熱作用と肝障害誘発における概日リズムの影響

概日リズムを持ち、アセトアミノフェンの解熱効果の影響を受ける体温に着目した。マウスの体温周期を経時的に測定し、最低温もしくは最高温付近の時刻において、アセトアミノフェンを投与し、肝障害を誘導した。最低温付近で投与したところ、顕著な体温低下を示し、生化学的解析および肝臓の病理解析からも顕著な肝障害の誘導がみられた。正常のマウス肝臓における時計遺伝子およびアセトアミノフェンの代謝酵素の発現量を経時的に定量解析したところ、時計遺伝子および代謝酵素の変動が確認でき、顕著に誘導された時刻付近で代謝酵素の発現量が高いことが分かった。マウス個体において、投与時刻により肝毒性や生理機能への影響が異なることを示し、肝毒性応答性における概日リズムの必要性について考察した。

第3章 マウス初代培養肝細胞の調製時刻におけるアセトアミノフェン誘導肝毒性に対する感受性評価

概日リズムを制御する日照周期に着目し、朝または夜時刻に肝障害を誘発したマウスにおける肝毒性評価を行ない、同時刻にアセトアミノフェンを暴露できるように、初代培養肝細胞を調製し、同様に肝毒

性試験を行なった。マウス個体で、夜時刻に投与した群で顕著に肝障害を誘導された。初代培養肝細胞においても、個体同様、夜時刻に調製された群で顕著に肝細胞死が誘導された。時計遺伝子の発現量を比較したところ、マウス肝臓で見られた発現量の違いが初代培養肝細胞でも同様にみられた。また薬物代謝酵素遺伝子発現量においても、夜時刻のマウス肝臓および、初代培養肝細胞で、第I相反応に関与する代謝酵素が高い発現を示した。また解毒能力の指標である細胞内グルタチオン濃度は朝時刻の群で高いことが分かった。調製された初代培養肝細胞は、単離直前の概日リズムを保持し、個体同様の肝毒性が誘発したものと考える。つまり、細胞培養系においても概日リズムの影響を受ける可能性を示した。

第4章 概日リズムを同調させた細胞培養系における肝毒性評価

調製された初代培養肝細胞は、日照周期により概日リズムが同調した肝臓が基準となっているため、細胞集団として概日リズムの周期性がある一定方向に定まっていると考える。しかし通常の細胞株では、同調因子がなく、個々の細胞は乱れた周期性を持ち、系全体として見かけ上、概日リズムが消失している。そこで、マウス肝癌細胞株Hepa8F5を用い、Forskolinによる概日リズムの同調を行なった。時計遺伝子および薬物代謝酵素遺伝子の発現量解析から、約24時間の周期性を生み出すことができた。またアセトアミノフェン肝毒性は薬物代謝酵素の発現量に変動と一致したことから、細胞培養系で概日リズムを再現することの重要性を示した。

第5章 総括および今後の展望

総括として、本論文の意義をまとめるとともに、今後の展望を記した。アセトアミノフェン肝毒性に対する応答性評価を通し、細胞培養系においても概日リズムの制御を受けることを明らかにし、肝毒性評価における概日リズムの重要性を見出した。本研究により得られた知見は、より精確な肝毒性試験系構築に貢献できるものであり、精度の高い化合物の安全性試験が実施できるものと期待される。

【発表論文】

- ・博士論文に関する原著論文

Moriya K, Tamai M, Koga T, Tanaka T and Tagawa YI.

Acetaminophen-induced hepatotoxicity of cultured hepatocytes depends on timing of isolation from light-cycle controlled mice. *Genes to Cells. in press.* doi:10.1111/gtc.12755

- ・その他の論文

Imada T, Moriya K, Uchiyama M, Inukai N, Hitotsuyanagi M, Masuda A1, Suzuki T, Ayukawa S, Tagawa YI, Dohmae N, Kohara M, Yamamura M, Kiga D. A Highly Bioactive Lys-Deficient IFN Leads to a Site-Specific Di-PEGylated IFN with Equivalent Bioactivity to That of Unmodified IFN- α 2b. *ACS Synth Biol.* 2018. 7. 2537-2546

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.

(論文博士)
(Dissertation Doctorate)

論 文 要 旨 (英 文) (300語程度)

Dissertation Summary (approx. 300 words in English)

報告番号 For administrative use only	乙 第	号	氏 名 Name	守矢 恒司
---	-----	---	-------------	-------

Most physiological changes follow a daily cycle in animals because their circadian rhythm is adjusted by and synchronized to sunlight. In particular, the circadian rhythm affects liver functions, including pharmacokinetics and metabolism. Circadian rhythm has not been considered significant in hepatotoxicity assays used in drug discovery and development. In this study, to demonstrate the circadian effect on the hepatotoxicity testing, the response towards acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol: APAP)-induced hepatotoxicity was examined in animal and cell culture model.

First, mice were more significantly induced hypothermia and liver injury by APAP at night than those during the day. The clock of APAP administration was consistent of the expression levels of APAP-metabolizing enzyme. These results suggested that APAP-induced liver injury depended on timing of APAP administration clock.

Second, it was examined whether APAP-induced hepatotoxicity depends on the retention of circadian rhythm after primary cultured hepatocytes which are isolated from the liver of mouse maintained under a 12 h light cycle. The circadian rhythm was retained and mainly affected the expression levels of phase I APAP-metabolizing enzymes and the levels of intracellular glutathione in primary hepatocytes after their isolation from the liver. These results indicated that circadian rhythm affected the cell culture model.

Finally, it was assessed whether the circadian rhythm of Hepa8F5, murine hepatoma cell line, was synchronized by forskolin stimulation. The expression levels of circadian gene and APAP-metabolizing gene showed the circadian rhythm after forskolin. After synchronization, APAP hepatotoxicity was dependent on the circadian rhythm of APAP-metabolizing enzyme in Hepa8F5. These results indicated that the reproduction of circadian rhythm in cell culture system is important for the hepatic assay model of cell culture.

In summary, the circadian rhythm affected the hepatic metabolic function of cultured cells through the response against APAP-induced hepatotoxicity. This study demonstrates that it is necessary to consider the exact construction of the hepatic assay model in relation to circadian rhythm when performing drug screens.

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Dissertation summaries must be written in either of the following formats: (A) both in Japanese (approx. 2000 characters) and in English (approx. 300 words), or (B) in English (approx. 800 words).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Important: Dissertation summaries will be published online on the Tokyo Tech Research Repository (T2R2). Do not include information treated as confidential under certain circumstances.