

脂質分子の細胞内局在・機能を解明するための研究

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・主任研究官

内田 安則

【はじめに】

脂質は細胞や細胞内小器官を外界から区切る「膜」を形成する生体分子であり、栄養源やシグナル伝達分子としての機能も持つ。ヒト細胞においては1000種類を超える脂質分子が存在するが、遺伝子にコードされるタンパク質と異なり、脂質の遺伝学的な取り扱いや局在の可視化は難しい。このため、脂質分子の機能の解明は遅れているのが現状である。

私は国立衛研に本年4月に着任するまで、生化学・分子生物学的な手法や、細胞内イメージングを駆使し、脂質分子の細胞内機能の一端を明らかにしてきた。本発表ではこれらの研究の概要をお話するとともに、開発を進めてきた脂質可視化プローブについても紹介させていただきたい。

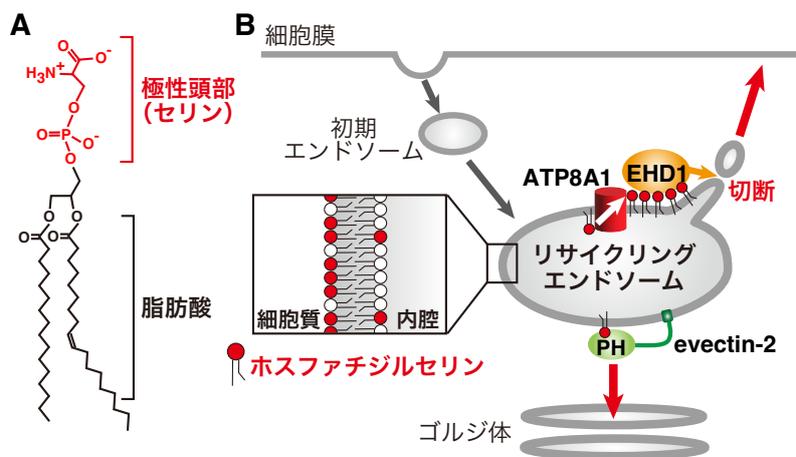
【脂質分子による細胞内膜輸送の制御】

ホスファチジルセリンは、真核細胞の主要な脂質分子の一つであり、極性頭部としてアミノ酸の一種であるセリンを持ち、生理的pHでは負電荷を1つ有する(図1A)。ホスファチジルセリンは細胞膜においてシグナル伝達に関与することが知られていたが、細胞内小器官における機能は不明であった。

この状況下、まず細胞内でホスファチジルセリンが存在する場所を明らかにするため、局在可視化プローブを用いた解析を行った。ここでは、ゴルジ体、エンドソーム、リソソームが明確に分離しており、これらの小器官の観察に適した細胞株であるCOS-1細胞を用いた。その結果、エンドソームのサブクラスの一つであるリサイクリングエンドソームの細胞質側に、ホスファチジルセリンが豊富に存在することを見出した(図1B)。

リサイクリングエンドソームは細胞膜から取り込まれた受容体の細胞膜への再輸送(リサイクル)や、細胞に侵入してきた毒素のゴルジ体への輸送などに関わる小器官である。そこで膜輸送に着目した解析を行った結果、ホスファチジルセリンが *evectin-2* と呼ばれるタンパク質をリサイクリングエンドソームに局在化させることで、リサイクリングエンドソームからゴルジ体へのコレラ毒素の輸送を制御することを発見した¹。

次に、リサイクリングエンドソームの細胞質側にホスファチジルセリンが濃縮される分子機構について解析した。その結果、ATP8A1 と呼ばれるリン脂質反転酵素がホスファチジルセリンをリサイクリングエンドソームの内腔側から細胞質側に移動させることで、細胞質側にホスファチジルセリンを濃縮していることを見出した。また、濃縮されたホスファチジルセリンが EHD1 タンパク質をリサイクリングエンドソームに局在化させること、EHD1 がリサイクリングエンドソームの膜を切断して細胞膜へ輸送される小胞を形成すること、を示した²。これら一連の研究から、リサイクリングエンドソームにおける膜輸送の制御、というホスファチジルセリンの新たな機能が判明した。

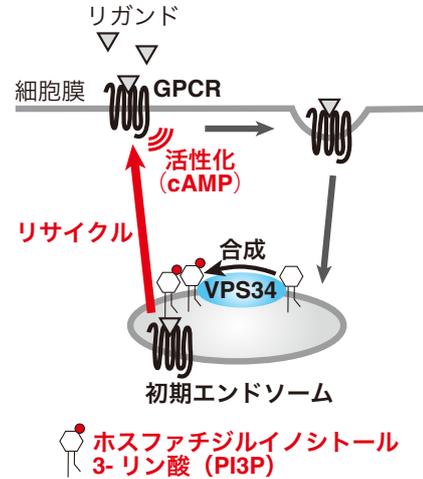


【図1】(A) ホスファチジルセリンの分子構造。(B) ホスファチジルセリンによるリサイクリングエンドソームを介した膜輸送の制御機構。

【脂質分子による薬物受容体の制御】

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) はヒトにおける最大の受容体ファミリーであり、低分子医薬品やペプチド医薬品の標的として知られている。多くの GPCR は細胞膜でリガンドと結合して活性化した後、エンドサイトーシスされて初期エンドソームに輸送される。その後、細胞膜へと再輸送 (リサイクル) され、活性化・エンドサイトーシスのサイクルが繰り返される (図 2)。細胞膜における GPCR の輸送・シグナル伝達機構の理解が進む一方で、初期エンドソームにおける機構には不明な点が多かった。

この状況下、初期エンドソームに選択的に存在する脂質ホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P)、及びその産生酵素 VPS34 に着目した解析を行った。その結果、PI3P 及び VPS34 が、典型的な GPCR (β2 アドレナリン受容体) の初期エンドソームから細胞膜へのリサイクル輸送に必要であることを見出した。さらに、VPS34 が β2 アドレナリン受容体の活性化により引き起こされるサイクリック AMP (cAMP) 産生を促進することを示した³⁾ (図 2)。以上の結果から、PI3P/VPS34 が GPCR の輸送・シグナル伝達を初期エンドソームで制御することが明らかになった。

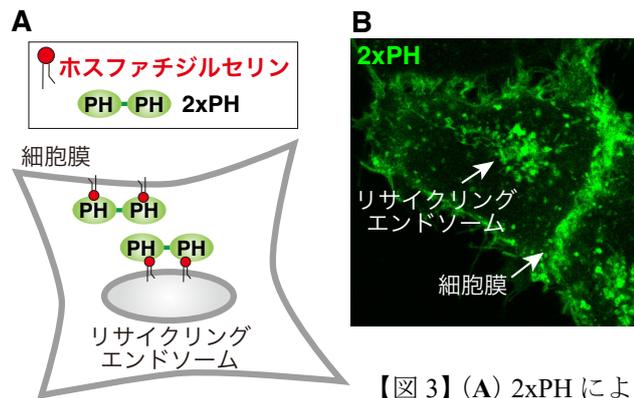


【図 2】 PI3P/VPS34 による GPCR のリサイクル輸送・シグナル伝達の活性化。

【脂質可視化プローブの開発と、プローブを利用した脂質関連タンパク質の同定】

前述したホスファチジルセリンについての研究を進める過程で、evectin-2 に存在する pleckstrin homology (PH) ドメインがホスファチジルセリンに特異的に結合することが分かった (図 1B)。しかし、その親和性はそれほど高いものではなかった。そこで、この PH ドメインを 2 つ連結したもの (2xPH) を作成し、ホスファチジルセリンに特異的かつ高親和性で結合すること、ホスファチジルセリンの細胞内局在を可視化するプローブとして使用できることを示した^{1,2)} (図 3A, B)。2xPH は既知のプローブと比較してホスファチジルセリンに対する特異性が高く、可視化プローブとして世界中で広く認知されている⁴⁾。

2xPH はホスファチジルセリンの可視化のみならず、ホスファチジルセリン近傍に存在するタンパク質の同定にも利用されている。具体的には、2xPH に BirA* (約 10 nm 以内に存在するタンパク質を非特異的にビオチン化する酵素) を連結することで、ホスファチジルセリン近傍に存在するタンパク質をタグ付けし、質量分析によって同定するという研究が行われている (図 3C)⁵⁾。最近、この研究で同定したタンパク質脱リン酸化酵素 PPP1R12A が、ホスファチジルセリン依存的に膜に局在化し、YAP と呼ばれる転写調節タンパク質を活性化することを見出した。さらに、この一連の反応が乳がん細胞の増殖を促進することを明らかにしている (論文査読中)。



【図 3】 (A) 2xPH による細胞内 PS 局在の可視化 (模式図)。 (B) 蛍光タンパク質を付加した 2xPH の顕微鏡画像 (HeLa 細胞)。 (C) BirA*-2xPH タンパク質によるホスファチジルセリン近傍タンパク質のビオチン化。

また、スフィンゴミエリンという細胞膜に多く含まれる脂質分子に対するプローブも開発した⁶⁾。これはイソギンチャク (*A. equina*) から単離された毒素 Equinatoxin-II をベースとしたものである。Equinatoxin-II は膜上でスフィンゴミエリンに結合した後に、膜に孔を開けて細胞毒性を示すため、生細胞で可視化プローブとして利用するのは不可能だった。そこで、膜の開孔に関与するアミノ酸に複数変異を導入し、スフィンゴミエリン結合能を維持しながら無毒化することに成功した。この Equinatoxin-II 変異体を用いることで、生細胞でスフィンゴミエリンを含む膜を可視化することが可能となった。

【まとめ】

核酸医薬や mRNA 医薬は細胞外から取り込まれたのち、エンドソームから細胞質・核へと移行し薬効を発揮する。また、取り込まれた核酸はエンドソーム内腔や細胞質に存在する核酸受容体を活性化し、副反応の一因となる自然免疫・炎症応答を惹起する。これまでに得てきた細胞生物学の知見や技術を活かすことで、ヒト細胞を用いた安全性評価手法の開発など、核酸系医薬品モダリティの安全性確保に資する研究を推進していきたい。

【参考文献】

- 1) Uchida Y*, Hasegawa J*, Chinnapen D, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108, 15846-15851. (2011).
- 2) Lee S*, Uchida Y*, Wang J, et al., *EMBO J.* 34, 669-688 (2015).
- 3) Uchida Y, Rutaganira FU, Jullié D, et al., *Mol. Pharmacol.* 91, 65-73 (2017).
- 4) Hasegawa J*, Uchida Y*, Mukai K*, et al., *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 783857. (2021).
- 5) Matsudaira T, Mukai K, Noguchi T, et al., *Nat Commun* 8, 1246 (2017).
- 6) Yachi R, Uchida Y, Balakrishna B, et al., *Genes to Cells.* 17, 720-727. (2012).

*共同筆頭著者

宿主細胞由来タンパク質試験法に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・第三室長
日向 昌司

【はじめに】

宿主細胞由来タンパク質（HCP）は、バイオ医薬品の製造工程由来不純物のひとつで、多種類のタンパク質の混合物である。HCPは、それ自身が抗原として免疫反応を引き起こすだけでなく、抗薬物抗体を誘導するアジュバント様作用を持つ可能性があること、酵素活性を持つHCPが、目的物質や製剤の成分を分解することなどが懸念される。したがって、バイオ医薬品の製法開発や製造管理において、HCPが恒常的に除去できていることの検証、工程内試験の設定、あるいは、原薬の純度試験を設定することにより、適切にHCP量を管理しなければならない。

標準的なHCP試験法としては、HCP全体を抗原とした抗HCPポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA（HCP-ELISA）が用いられている。通常、ELISAは、単一のタンパク質を抗原とした抗体を用いて測定するが、HCP-ELISAでは複数のHCPを同時に測定する特殊な測定系であるため、特有の要件や留意点を考慮する必要がある。

本発表では、HCP測定法として汎用されているELISAに用いる抗HCP抗体の適格性評価法に関する研究に焦点を絞り、我々の取り組みを交えて紹介する。

【従来の抗HCP抗体の適格性評価法と技術的な課題】

HCP-ELISAに用いる抗HCP抗体は、多種多様なHCPを網羅的に検出しうることが理想的であるが、HCP種によって抗原性は大きく異なるため、抗原として用いた一部のHCP種に対する抗体しか調製されていない可能性に留意が必要である。したがって、HCP-ELISAに用いる抗HCP抗体が適格であるか、抗原として用いたHCP種の検出率（抗原カバー率）を評価しておくことが要件となっている。

抗原カバー率は、HCPを二次元電気泳動法で分離し、ゲルの総タンパク質染色と抗HCP抗体を用いたウェスタンブロットを行い、総タンパク質染色のスポット数に対するウェスタンブロットで検出されたスポット数で算出する方法（2D-WB法、図1）が、日本薬局方・参考情報「HCP試験法」に標準的な評価方法として提示されている。一方、その評価方法では、変性状態のHCPに対する抗HCP抗体の反応性を観察しているため、HCP-ELISAにおける抗体の反応性を適切に反映していない可能性があることが指摘されており、より適切な評価手法の開発が課題となっている。

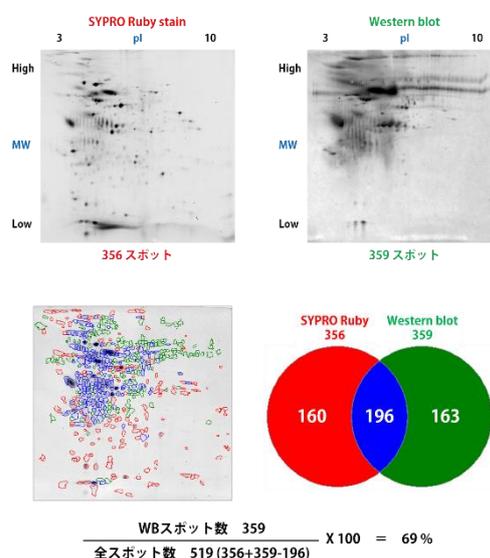


図1 2D-WB法による抗原カバー率の評価

【LC/MSを用いた抗HCP抗体の適格性評価法の検討】

2D-WB法の課題を克服する新たな手法として、抗HCP抗体結合性HCPを解析対象とした様々な手法が提案され、その有用性や課題について議論が進められている。

我々は、HCP-ELISAプレート結合性HCPをLC/MSを用いて解析する手法に注目し、抗HCP抗体の適格性評価法の技術的指針の提示を目標とした研究を進めている。

LC/MS を用いた抗 HCP 抗体の評価は、市販の HCP-ELISA キットを活用し、モデル試料としてモック CHO 細胞の培養上清濃縮物 (CHOP) を用いた。内部標準物質としてウシ炭酸脱水酵素 2 (CA2) をスパイクしたものをトリプシン消化し、LC/MS を用いてデータ依存的取得法 (DDA) でペプチドを同定、データ非依存的取得法である SWATH 測定でペプチド相対量を求め、TOP3 法で各 HCP の相対量を算出した。全 HCP 消化物解析による各 HCP の相対量から、CA2 含量を基準として各 HCP の含量を求めた結果、1 ppm 以上含有する HCP が 580 種同定され、これらの HCP 種を評価対象とした。

市販 HCP-ELISA キットのプレートに対し、抗原抗体反応の飽和濃度で添加し、反応させ洗浄した後、トリプシン消化し、また、抗 HCP 抗体を固相化せず、ブロッキング処理を行ったプレートについても同様に反応させ、トリプシン消化した。それぞれのプレート結合性 HCP 相対量を求め、各 HCP 種の相対量が 2 倍以上となったものを抗 HCP 抗体反応性とした抗原カバー率は、約 70% と算出された。

抗原性の高さが指摘されており、比較的 CHOP 中の含量が多いホスホリパーゼ B 様タンパク質 (PLBL2) に着目し、組換え PLBL2 を用いて (吸光度) を評価した結果、100 ng/mL でほぼ最大レスポンスとなるシグモイド型の反応が観察され、CHOP を標準物質とした検量線で 5.4 ng/mL に相当することが明らかとなった (図 2)。

PLBL2 のレスポンスと HCP-ELISA プレートへの結合量を基準とし、各 HCP 種の結合量からレスポンスを推定した結果、10 ng/mL 以上のレスポンスが期待された HCP が 19 種 (3.3%)、1 ng/mL 以上が 226 種 (38.9%) と評価され、多くの HCP は、高含量でも個々 HCP 種のレスポンスは僅かなレベルに留まっていることが予想された (図 3)。

本研究で提案した評価手法を用いることで、HCP-ELISA における個々の HCP 種の測定能力を踏まえた抗原カバー率の評価が可能となり、ロット間の同等性評価等への応用が期待される。今後、各 HCP の ELISA での測定値の検証が必要である。また、抗 HCP 抗体の適格性を判定基準の妥当性については、議論が必要である。

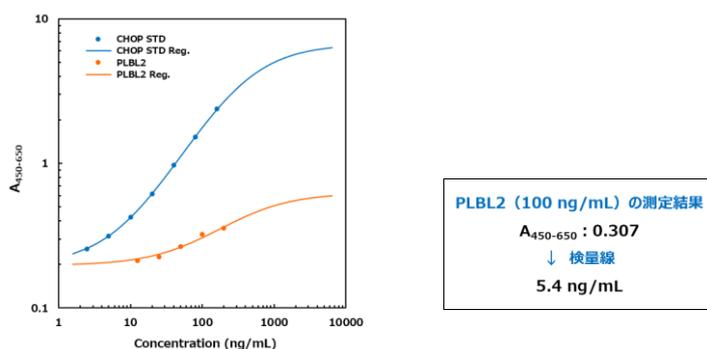


図2 HCP-ELISAにおけるPLBL2のレスポンス

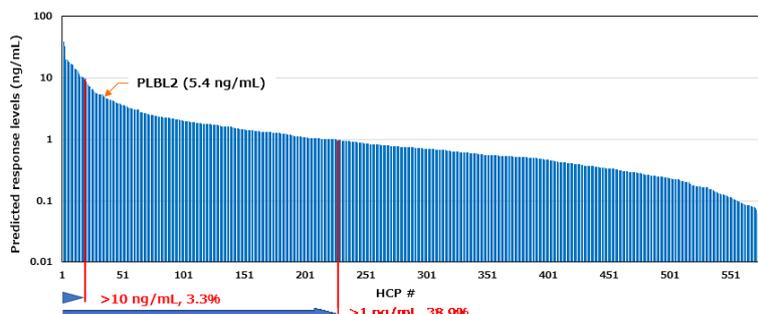


図3 予想されるレスポンスに基づいた測定能力の評価

有機シアン化合物の劇物包括指定の見直しに資する研究

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部・第3室長
松本真理子

【はじめに】

私は2019年9月に安全性予測評価部第3室の主任研究官に採用され、2023年4月より第3室長として勤務している。それ以前は（旧）総合評価研究室・（現）安全性予測評価部第1室の非常勤職員又は派遣社員として10年以上勤務していた。主業務はOECDのHPV点検プログラムにおける化学物質の評価、化審法のスクリーニング評価や優先評価化学物質の評価であった。最近では器具・容器包装のポジティブリストの評価のために尽力している。過去を振り返ってみると、前部長の広瀬先生が引き受けてきた研究課題や行政支援の無理難題解決のために、ひたすらに働いてきたと思う。その内容は多岐に渡り、何でもやってきたが故に、これが自分の研究テーマだと言える仕事が何かと考えると答えを出すのは難しい。しかし、私は仕事を効率的に進めるために、評価対象物質の全体像を把握することを目的として、様々な*in silico*のツールを長年使っている。仕事の成果として表に出るのは、最終的な評価結果や評価手法（方針）であり、その目的を達成するための過程で、私が日常的にどのようにツールを活用しているかを発表する機会はなかったように思う。そこで、第3室の所掌業務である毒劇の評価を題材に*in silico*ツールの活用例について発表を行うこととした。また、この先、安全性予測評価部に求められる方向性の一つとなるであろう「機械学習」による有機シアン化合物の急性経口毒性の予測を試行したので、その内容を発表する。

【有機シアン化合物の包括指定の背景】

「有機シアン化合物」は、毒物及び劇物指定令が現在の形となった昭和40年から包括的に劇物に指定されている（少なくとも昭和22年に毒物指定されていた）。厚生労働省としては「シアン基があればシアンが遊離する可能性がある」「指定根拠は当時の科学的判断」として、包括指定の正当性を主張してきた。制定当時は除外が2品目だったが、現時点までに187の除外項目が規定されている。劇物からの除外は、事業者からの申請ベースであり、事業者が実施する調査・試験などの結果を受けて除外の可否を審議会で判断するものである。特に、既存の毒性データがない場合は動物実験等、1物質につきおおよそ500～1000万程度の費用がかかり、また試験～指定令改正まで1年以上の期間がかかるなど、事業者に重い負担を強いている。これまで幾度も有機シアン化合物の包括指定について、過剰規制であるとして見直し提言がなされてきたが、見直しに至ってはいない。本研究では、劇物に指定すべき「有機シアン化合物」の定義を示し、化学構造や物性等の共通点から、包括的な除外項目が設定できないか等について調査し、過剰規制とならない、かつ公衆衛生上必要な規制となるよう包括指定の範囲の見直しを、令和5年度から3年間を目途に検討するものである（令和5年度化学物質安全対策室支出委任：毒劇物指定に関する化学物質の情報の収集）。

【有機シアン化合物のデータベース作成】

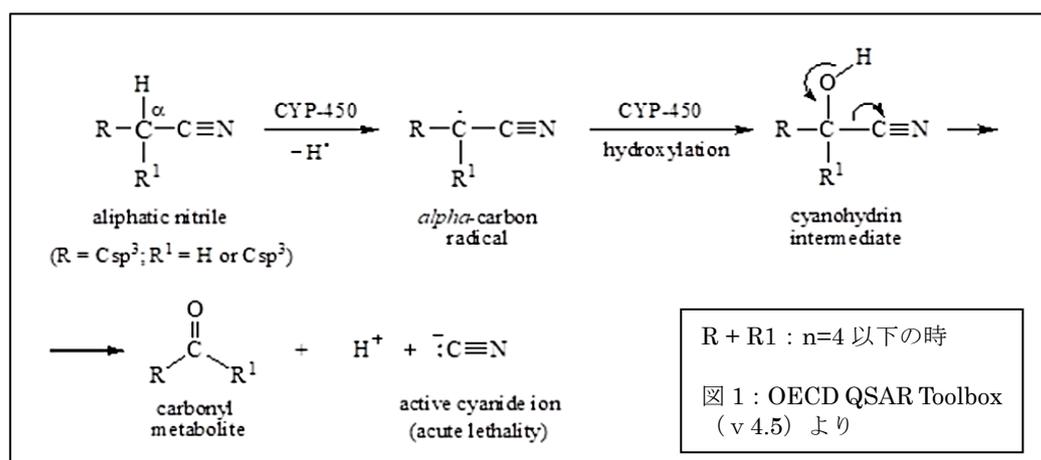
毒劇法における有機シアンの定義については、かつては“有機物であるシアン化合物”が全て該当していたものと考えられるが、平成8年ごろに「シアン基が炭素原子に結合しているもの」のみ該当するとして、行政内部で整理をし、平成25年にはホームページでその解釈を対外的に示した。本研究ではまず初めに、NITE・CHRIP掲載の「国内法規制情報：毒物及び劇物取り扱い法」のリスト（政令第2条第1項第32号）から「有機シアン化合物（608物質）」及び「政令第2条第1項第32号で規定する「有機シアン化合物及びこれを含有する製剤」から除かれるもの（216物質：CAS単位）」を入手し、母集団として整理し

た。しかし、有機シアン化合物の定義である「シアン基が炭素原子に結合しているもの」という条件を満たしていない物質がリストに入っていること、または条件を満たしているにも関わらずリストに入っていない物質があることが分かった。そこで、独自に有機シアン化合物を NITE・CHIP から収集・整理することにした。検索条件は smiles による構造検索でシアン基を示す「C#N」or「N#C」を用いた。上記定義に合致する物質を再整理した結果、1777 物質（CAS 単位）が毒劇法における有機シアン化合物と定義された。

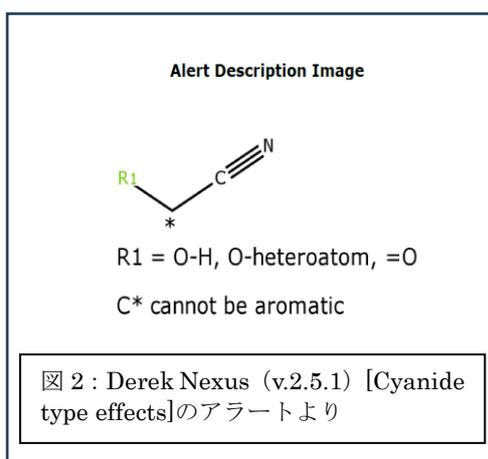
次に毒劇物指定に必要となる「急性毒性」「皮膚腐食性・刺激性」「眼腐食性・刺激性」の毒性情報を日本政府による GHS 分類から収集した（参考：急性経口毒性 GHS 区分 1 及び 2 が毒物相当、GHS 区分 3 が劇物相当、皮膚及び眼腐食性・刺激性 GHS 区分 1 が劇物相当）。GHS 分類が存在する物質は全体の約 5%程度であり、除外項目についても、その明確な毒性根拠が部会資料から見つけられた物質は数十物質であった。予備的な情報検索により、GHS 分類はされていないものの関連毒性情報が存在しそうな物質数は 200~300 であり、それらの毒性情報の収集整理・データベース化の必要性が確認された。また、毒性情報が存在していない物質が数多く存在することから、包括的な除外項目設定のためにはリードアクロスの妥当性など毒性予測についての考察も必要となると考えられた。なお、眼又は皮膚腐食性・刺激性が劇物相当である既知物質が 5 物質しかなかったため、まずは急性経口毒性に焦点を当てて調査をすることとした。

【有機シアン化合物の *in silico* 予測解析】

劇物から除外された約 200 物質（NITE・CHIP 上の整理に基づく）の化学構造の特徴を捉えることを目的として、OECD QSAR_toolbox4.5 を用いて「Organic Functional Group」に基づくクラスタリング解析を行った。クラスタリング解析に用いた 1777 物質の化学構造は CAS 番号を基に SciFinder から入手した。クラスタリング解析の結果、劇物から除外された物質は 108 通りにグループ化された。次にシアンに関連する毒性メカニズムを確認するため、OECD QSAR_toolbox4.5 の「Oral acute toxicity」のプロファイル検索を行った。シアンが遊離するメカニズムの条件にシアン基が結合する炭素が代謝を受けるか否かがかかわっており、炭素数の長短などが関連することが分かった（図 1）。グループ毎に劇物指定/除外の状況を調べていくと、ベンゼン環にシアン基が結合しているグループのいくつかは既に包括的に除外指定されていた。一方、現在包括的に除外指定されていない物質でも、類似物質をグループとして包括除外できる可能性が示唆された。



次に、有機シアン化合物 1777 物質について Derek Nexus (v.2.5.1)による QSAR 解析「High Acute toxicity」及び「Cyanide type effects」を実行した結果、それぞれ 1 物質及び 611 物質が「PLAUSIBLE」と予測された。急性毒性に関するアラートはヒドラジン構造についてであり、シアン化合物の急性毒性影響に対しては、「Cyanide type effects」の解析



が有効であると考えられた。「Cyanide type effects」アラートの除外構造として、シアン基が結合する炭素が芳香族でないことが示されており(図2)、前述のクラスタリング解析の結果として整理した内容をサポートするものであった。この611物質を対象に急性経口毒性のGHS区分の分布を確認すると、アラートがない物質であってもGHS区分2(LD50:50 mg/kg未満相当)の高い急性毒性を示す物質がある一方、QSAR結果が「PLAUSIBLE」であってもGHS区分5(LD50:2000 mg/kg-5000 mg/kg相当)の物質があった。「Cyanide type effects」に対するアラートがないにも関わらず急性毒性の強い物質を個別に確認すると、1物質は有機リン系の農薬であり、シアン基とは異なる部位による急性毒性影響であることが確認された。本QSAR解析結果を有機シアン化合物の急性毒性予測として活用するためには課題があることが分かった。

【有機シアン化合物の機械学習による急性経口毒性予測】

Pythonの機械学習ライブラリ「Scikit-learn 1.3.0」を用いてランダムフォレスト回帰モデルを構築し、機械学習による有機シアン化合物の急性経口毒性の予測を試みた。毒性既知265物質の8割を機械学習に用い、2割を検証用のテストデータとした。化学構造はRDKitでsmilesからモーガンフィンガープリントへの変換を行った。学習データはそれぞれのモーガンフィンガープリントに対するGHS区分とした。学習データを用いた予測精度はR²(誤差指標)が0.88と良好であった。しかし、学習内容を基に2割のテストデータで検証を行った結果、R²は-0.004となり、未学習構造の予測は全く出来ない事が示された。学習精度向上のために、諸条件を変えて解析を行ってみた。ランダムフォレスト分類(劇物か否かの2値予測)による結果では、14物質中8物質について正しく予測された。残りの6物質の予測は、フォールスネガティブ1物質、フォールスポジティブ5物質であった。データ数が少なく結果の解釈に限界はあるが、シアン化合物に限定した学習では、他の構造による毒性予測が出来ないため、精度が低い可能性が示された。予測精度向上のためには、やるべき事が沢山あることが分かった。

【まとめ】

本発表では、安全性予測評価部第3室の所掌業務である毒劇の評価を例に、*in silico*ツール活用事例の紹介を行った。様々なツールを用いることによって、シアンが遊離しやすい(しにくい)化学構造の特徴の一端をつかむことが出来たと考える。一方、シアン基ではない構造由来の毒性影響も考慮する必要があり、毒性を予測する際に複合的な視点で検討する必要があることが示された。毒性予測ツールの開発のためにはデータサイエンティストの能力が必要だが、毒性のメカニズムを理解する人間がいなければ、モデル精度を向上させることはできない。また、学習データの信頼性が低ければ予測精度は上がらない。したがって、データの収集・整理、一定の質の毒性情報データベース化が大切になると考える。毒性予測ツール構築のためには、様々なスキルを持つ人の協力が必要だと思う。

