The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Novel miRNA biomarkers for genotoxicity screening in mouse
Author(s)	岡, 宏之
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72167
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　岡 宏之

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	山下 徹
	副　査	大阪大学教授	河原 行郎
	副　査	大阪大学教授	高島 成二

論文審査の結果の要旨

遺伝毒性の評価は医薬品の開発過程において重要なプロセスの一つである．DNA損傷性を簡便かつ迅速に検出できるコメットアッセイは医薬品開発過程で汎用されている試験の一つであるが，偽陽性の多さが問題となっている．本論文では，microRNA（miRNA）に着目し，新規遺伝毒性マーカーのスクリーニングを実施した．その結果，miR-22-3p，miR-409-3p及びmiR-543-3pの3種類が遺伝毒性物質の投与によって肝臓で有意に発現減少することを見出だした．これらmiRNAの発現変化に基づいて構築した判別モデルは，検証に用いた遺伝毒性物質及び非遺伝毒性物質5種類ずつ全て正しく判別した．次にこれらmiRNAのマウス血漿中における発現解析もまた，遺伝毒性の予測に有用である可能性を見出した．さらに，肝臓と血漿中の発現変化を組み合わせることで，判別の精度が向上することが示唆された．本研究で見出されたバイオマーカーは，化合物の遺伝毒性ポテンシャルを高い確度で判断することを可能とし，医薬品開発に貢献することが期待される．以上より，本論文は学位の授与に値すると考えられる．

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	岡 宏之
論文題名 Title	Novel miRNA biomarkers for genotoxicity screening in mouse (遺伝毒性スクリーニングのための新規マウスmiRNAバイオマーカー)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

医薬品開発において，化合物の毒性評価を適切に実施することが必要である．特に，DNA等の遺伝物質に障害が生じる遺伝毒性はがんをはじめ様々な疾患を惹起しうるため，その評価は極めて重要である．現在，*in vivo*遺伝毒性評価法の一つとして，DNA損傷性を簡便かつ迅速に検出できるコメットアッセイが汎用されているが，評価組織における細胞障害などに起因する偽陽性が問題となっている．本研究では，組織中や血液中に安定に存在し，比較的簡便に測定することが可能な分子としてmicroRNA（miRNA）に着目し，化合物の遺伝毒性を検出できる新規バイオマーカーの同定を目的とした．

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

遺伝毒性物質4化合物または非遺伝毒性物質2化合物をそれぞれマウス（ICR，雄，7週齢）に3日間投与し，最終投与の3時間後に肝臓を採取して750種類のmiRNAの発現スクリーニングを実施した．その結果，遺伝毒性物質投与時にのみ肝臓中で発現レベルが上昇するmiRNAは認められなかったが，発現レベルが低下するmiRNAは84種類認められた．この84種類のmiRNAの中から，DNA損傷修復パスウェイに関与することが示唆されている13種のmiRNAを遺伝毒性バイオマーカー候補として選抜した．次に遺伝毒性物質4化合物または非遺伝毒性物質4化合物をそれぞれマウスに投与し，肝臓におけるマーカー候補miRNAの発現レベルをRT-qPCRにより解析した．ΔΔCt値を用いて主成分分析を実施した結果，遺伝毒性物質と非遺伝毒性物質は第2主成分で最も分離され，miR-22-3p，miR-409-3p及びmiR-543-3pの3種類が第2主成分の構成に特に高い負荷量を示したことからこの3種類のmiRNAを遺伝毒性バイオマーカーとし，ロジスティック回帰分析によって判別モデルを構築した．構築した判別モデルの有用性を検証する目的で，遺伝毒性物質5化合物または非遺伝毒性物質5化合物をマウスに投与し，肝臓中のmiR-22-3p，miR-409-3p及びmiR-543-3p発現レベルをRT-qPCRによって測定した．得られたΔΔCt値を構築した判別モデルに用いた結果，非遺伝毒性物質であるDEHPの1化合物を除く全ての化合物で過去の分類と一致する判別結果が得られた．DEHPはリパーゼによって遺伝毒性物質のMEHPに加水分解されることが報告されていることから，DEHP投与マウス肝臓で認められた遺伝毒性結果はマウス生体内で生じたMEHPによる作用であると考えられた．そこでDEHPをリパーゼ阻害剤と共にマウスに投与した結果，肝臓中のmiR-22-3p，miR-409-3p及びmiR-543-3pの発現レベルは非遺伝毒性物質投与時と同等の値を示した．

次に，今回見出したバイオマーカーの血漿中における発現解析が遺伝毒性の検出に有用であるかを検証するために，遺伝毒性物質4化合物または非遺伝毒性物質4化合物をマウスに投与し，血漿中miR-22-3p，miR-409-3p及びmiR-543-3p発現レベルをRT-qPCRにより解析した．その結果，これらmiRNAの血漿中における発現は遺伝毒性物質の投与によって有意に上昇した．主成分分析の結果，肝臓中及び血漿中におけるmiRNAの発現値を組み合わせて用いることで，肝臓中または血漿中の発現値をそれぞれ単独で用いるよりも遺伝毒性と非遺伝毒性がより大きく分離された．

〔総　括(Conclusion)〕

本研究では，遺伝毒性の新規検出法としてマウス肝臓中及び血漿中のmiR-22-3p，miR-409-3p及びmiR-543-3pの発現解析が有用であることが示唆された．本研究で見出したバイオマーカーを測定することで化合物の遺伝毒性ポテンシャルを高い確度で判断することが可能であり，医薬品開発に貢献することが期待される．しかしながら，遺伝毒性物質によってこれらmiRNAが発現変動を示すメカニズム及びその生理的意義は不明であり，解明のためにはさらなる研究が必要である．