

Google translation/ AETC trial

J. Toxicol. Sci., 2021; 46(2):

The Journal of Toxicological Sciences Vol. 46 (2021) No. 2 February

Review

[Development challenges associated with rAAV-based gene therapies](#)

Michael W. Bolt, Joseph T. Brady, Lawrence O. Whiteley, K. Nasir Khan

2021 年 46 卷 2 号 p. 57-68

Original	Google translation
<p>The number of gene therapies in development continues to increase, as they represent a novel method to treat, and potentially cure, many diseases. Gene therapies can be conducted with an <i>in vivo</i> or <i>ex vivo</i> approach, to cause gene augmentation, gene suppression, or genomic editing. Adeno-associated viruses are commonly used to deliver gene therapies, but their use is associated with several manufacturing, nonclinical and clinical challenges. As these challenges emerge, regulatory agency expectations continue to evolve. Following administration of rAAV-based gene therapies, nonclinical toxicities may occur, which includes immunogenicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, and the potential risks for insertional mutagenesis and subsequent tumorigenicity. The mechanism for these findings and translation into the clinical setting are unclear at this time but have influenced the nonclinical studies that regulatory agencies are increasingly requesting to support clinical trials and marketing authorizations. These evolving</p>	<p>開発中の遺伝子治療の数は、多くの病気を治療し、潜在的に治療するための新しい方法であるため、増え続けています。遺伝子治療は、遺伝子増強、遺伝子抑制、またはゲノム編集を引き起こすために、インビボまたはエクスピボアプローチで実施することができます。アデノ随伴ウイルスは、遺伝子治療を提供するために一般的に使用されますが、それらの使用は、いくつかの製造、非臨床および臨床の課題に関連しています。これらの課題が発生するにつれて、規制当局の期待は進化し続けます。rAAV ベースの遺伝子治療の投与後、免疫原性、肝毒性、神経毒性、および挿入型遺伝子変異とその後の腫瘍形成の潜在的なリスクを含む非臨床毒性が発生する可能性があります。これらの発見と臨床設定への変換のメカニズムは現時点では不明ですが、規制当局が臨床試験と販売承認をサポートすることをますます要求している非臨床研究に影響を与えています。これらの進化する規制上の期待と毒性、および将来の非臨床的考慮事項について、ここで説明します。</p>

Google translation/ AETC trial

regulatory expectations and toxicities, as well as future nonclinical considerations, are discussed herein.

Original Article

[Silencing TRPV4 partially reverses the neurotoxic effects caused by excess Ketamine](#)

Chunson Yang, Mengqing Si, Jing Zhou

2021 年 46 卷 2 号 p. 69-81

Original	Google translation
<p>Excessive use of Ketamine (KET) has a neurotoxic effect on the brain. This study explored the effect of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) on KET-induced neurotoxicity in the hippocampus. We extracted and identified rat hippocampal neuronal cells. The hippocampal neurons were treated with different concentrations (0, 0.1, 1, 10, 100, 300 and 1000 μ mol/L) of KET (6, 12 and 24 hr). Cell viability was detected by cell counting Kit-8 (CCK-8), and TRPV4 expression was detected by quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) and western blot. After silencing TRPV4, we tested cell viability and apoptosis. The contents of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT) were detected by colorimetry, and the contents of TNF-α, IL-1β, IL-6 and reactive oxygen species (ROS) were detected by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Finally,</p>	<p>ケタミン (KET) の過剰使用は、脳に神経毒性を及ぼします。この研究では、海馬における KET 誘発神経毒性に対する一過性受容器電位バニロイド 4 (TRPV4) の効果を調査しました。ラット海馬神経細胞を抽出して同定しました。海馬ニューロンは、さまざまな濃度 (0, 0.1, 1, 10, 100, 300, および 1000 μ mol/ L) の KET (6, 12, および 24 時間) で処理されました。細胞生存率は、細胞計数キット-8 (CCK-8) によって検出され、TRPV4 発現は、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) およびウエスタンブロットによって検出されました。TRPV4 をサイレンシングした後、細胞の生存率とアポトーシスをテストしました。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、グルタチオン (GSH)、マロンジアルデヒド (MDA)、カタラーゼ (CAT) の含有量を比色分析で検出し、TNF-α、IL-1β、IL-6、活性酸素種 (ROS) の含有量を検出しました。) 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって検出されました。最後に、アポトーシス関連タンパク質 Bcl-2、Bax および Cleaved caspase-3、およびリン酸化-p65 (p-65)、p65、リン酸化-IκBα (p-</p>

Google translation/ AETC trial

<p>the expression levels of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax and Cleaved caspase-3, and phosphorylated-p65 (p-65), p65, phosphorylated-IκBα (p-IκBα) and IκBα were detected by qRT-PCR and western blot. KET inhibited the viability of hippocampal neurons in a dose-dependent manner, and up-regulated TRPV4 expression. SiTRPV4 inhibits KET-induced decrease in cell viability and promotes apoptosis. SiTRPV4 reduced MDA and ROS content, increased SOD, GSH and CAT levels. The release of proinflammatory factors TNF-α, IL-1β and IL-6 was also inhibited by siTRPV4. In addition, siTRPV4 up-regulated KET-induced Bcl-2 expression in hippocampal neurons, down-regulated Bax and Cleaved caspase-3, and inhibited the activation of the inflammatory pathway. Silencing TRPV4 partially reverses the neurotoxic effects induced by KET through regulating apoptosis-related proteins and p65/IκBα pathway.</p>	<p>IκBα) および IκBα の発現レベルが qRT-PCR によって検出されました。ウエスタンブロット。KET は、海馬ニューロンの生存率を用量依存的に阻害し、TRPV4 の発現をアップレギュレートしました。SiTRPV4 は、KET による細胞生存率の低下を抑制し、アポトーシスを促進します。SiTRPV4 は、MDA と ROS の含有量を減らし、SOD、GSH、CAT のレベルを上げました。炎症誘発性因子 TNF-α、IL-1β および IL-6 の放出も siTRPV4 によって阻害されました。さらに、siTRPV4 は海馬ニューロンにおける KET 誘導性の Bcl-2 発現をアップレギュレートし、Bax および Cleaved caspase-3 をダウンレギュレートし、炎症経路の活性化を阻害しました。TRPV4 をサイレンシングすると、アポトーシス関連タンパク質と p65 /IκBα 経路を調節することにより、KET によって誘発される神経毒性作用が部分的に逆転します。</p>
--	--

Original Article

[Development of a new *in vitro* assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation](#)

Maky Ideta-Otsuka, Misato Miyai, Naoki Yamamoto, Ayaka Tsuchimoto, Hid ...

2021 年 46 巻 2 号 p. 83-90

Original	Google translation
Epigenetic toxicity, a phenomenon in which chemicals exert epigenetic effects and produce toxicity, has been attracting	化学物質がエピジェネティックな効果を発揮して毒性を生み出す現象であるエピジェネティックな毒性は、ライフサイエンスの

Google translation/ AETC trial

attention in recent years due to advances in toxicology accompanying the development of life sciences. However, it has been difficult to identify epigenetic toxicants due to the lack of a simple experimental system to evaluate epigenetic toxicity. In this study, we developed a prototype of an *in vitro* reporter assay system for assessing the effects of chemicals on DNA methylation using two promoters showing different degrees of DNA methylation, Agouti IAP and Daz1 promoters, and a luciferase reporter. The system successfully detected DNA demethylating activity using 5-azacytidine, a chemical having DNA demethylation activity, as a positive control chemical, and demethylation of cytosine of CpG in the promoter was confirmed by pyrosequencing analysis. Next, in order to improve the detection sensitivity of the DNA demethylating activity of this system, we tried to increase the basal level of methylation of the Daz1 promoter by pre-methylase treatment of the reporter vectors. As a result, the detection sensitivity of the system was successfully improved in cells where the basal level of methylation was indeed increased by methylase treatment. Thus, the developed assay system here is effective for the simple evaluation of chemicals that affect DNA methylation.

発展に伴う毒物学の進歩により、近年注目を集めています。しかし、エピジェネティックな毒性を評価するための簡単な実験システムがないため、エピジェネティックな毒物を特定することは困難でした。この研究では、異なる程度の DNA メチル化を示す 2 つのプロモーター、Agouti IAP および Daz1 プロモーター、およびルシフェラーゼレポーターを使用して、DNA メチル化に対する化学物質の影響を評価するための *in vitro* レポーターアッセイシステムのプロトタイプを開発しました。このシステムは、DNA 脱メチル化活性を有する化学物質である 5-アザシチジンを陽性対照化学物質として使用して DNA 脱メチル化活性を検出することに成功し、プロモーター中の CpG のシトシンの脱メチル化がパイロシーケンス分析によって確認されました。次に、このシステムの DNA 脱メチル化活性の検出感度を向上させるために、レポーターベクターのプレメチラーゼ処理によって Daz1 プロモーターのメチル化の基礎レベルを上げることを試みました。その結果、メチル化の基礎レベルがメチラーゼ処理によって実際に増加した細胞では、システムの検出感度が正常に改善されました。したがって、ここで開発されたアッセイシステムは、DNA メチル化に影響を与える化学物質の簡単な評価に効果的です。

Google translation/ AEC trial

Letter

[Adverse effects of methylmercury on gut bacteria and accelerated accumulation of mercury in organs due to disruption of gut microbiota](#)

Natsumi Seki, Masahiro Akiyama, Hiroto Yamakawa, Koji Hase, Yoshito Ku ...

2021 年 46 卷 2 号 p. 91-97

Original	Google translation
<p>Methylmercury (MeHg), an environmental electrophile, binds covalently to the cysteine residues of proteins in organs, altering protein function and causing cytotoxicity. MeHg has also been shown to alter the composition of gut microbes. The gut microbiota is a complex community, the disturbance of which has been linked to the development of certain diseases. However, the relationship between MeHg and gut bacteria remains poorly understood. In this study, we showed that MeHg binds covalently to gut bacterial proteins via cysteine residues. We examined the effects of MeHg on the growth of selected <i>Lactobacillus</i> species, namely, <i>L. reuteri</i>, <i>L. gasseri</i>, <i>L. casei</i>, and <i>L. acidophilus</i>, that are frequently either positively or negatively correlated with human diseases. The results revealed that MeHg inhibits the growth of <i>Lactobacillus</i> to varying degrees depending on the species. Furthermore, the growth of <i>L. reuteri</i>, which was inhibited by MeHg exposure, was restored by Na₂S₂ treatment. By comparing mice with and without gut microbiota colonization, we found that</p>	<p>環境求電子試薬であるメチル水銀 (MeHg) は、臓器内のタンパク質のシステイン残基に共有結合し、タンパク質の機能を変化させ、細胞毒性を引き起こします。MeHg は腸内微生物の組成を変えることも示されています。腸内細菌叢は複雑なコミュニティであり、その障害は特定の病気の発症に関連しています。ただし、MeHg と腸内細菌の関係はよくわかっていないままです。この研究では、MeHg がシステイン残基を介して腸内細菌タンパク質に共有結合することを示しました。選択されたラクトバチルス種、すなわち、<i>L. ロイテリ</i>、<i>L. ガセリ</i>、<i>L. カゼイ</i>、および <i>L. アシドフィルス</i> の増殖に対する MeHg の影響を調べました。これらは、人間の病気と正または負の相関関係があることがよくあります。その結果、MeHg は種によってさまざまな程度で乳酸桿菌の増殖を阻害することが明らかになりました。さらに、MeHg 曝露によって阻害された <i>L. reuteri</i> の増殖は、Na₂S₂ 処理によって回復しました。腸内細菌叢のコロニー形成がある場合とない場合のマウスを比較することにより、腸内細菌が腸内の硫化水素や過硫化水素などの反応性硫黄種の生成に寄与することを発見しました。また、腸内細菌の除去により、MeHg 曝露後のマウスの小脳、肝臓、肺への水銀の蓄積が促進されることも発見しました。したがって、</p>

Google translation/ AEC trial

gut bacteria contribute to the production of reactive sulfur species such as hydrogen sulfide and hydrogen persulfide in the gut. We also discovered that the removal of gut bacteria accelerated accumulation of mercury in the cerebellum, liver, and lungs of mice subsequent to MeHg exposure. These results accordingly indicate that MeHg is captured and inactivated by the hydrogen sulfide and hydrogen persulfide produced by intestinal microbes, thereby providing evidence for the role played by gut microbiota in reducing MeHg toxicity.

これらの結果は、MeHg が腸内微生物によって生成された硫化水素および過硫化水素によって捕捉および不活性化されることを示し、それによって MeHg 毒性の低減において腸内細菌が果たす役割の証拠を提供します。