

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15001

研究課題名(和文)薬物性肝障害発症の個体差の決定因子の探索

研究課題名(英文)Factors of individual variability in onset of drug-induced liver injury

研究代表者

横井 毅 (Yokoi, Tsuyoshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70135226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な薬物性肝障害が開発医薬品や市販薬で報告されているが、その発症には大きな個体差がある。その原因を明らかにすることを目的とした基礎的研究を行った。申請者はこれまで10種類の臨床使用薬による肝障害マウスモデルを報告した。最初に抗てんかん薬カルバマゼピン誘導性肝障害ラットモデルについて、血中マイクロRNAの変動を経時的網羅的に解析を行い、個体差に関わるマイクロRNAの候補を見出し、関連するpathway候補を見出した。これらマイクロRNAのターゲットが肝障害発症の個体差を予測できるかを検証している。今後、マイクロRNAターゲットの種差を考慮し、ヒトへの外挿性を検討する。

研究成果の概要(英文)：Severe drug-induced liver injury has been reported in the drug development process and some marketing drugs, but its occurrence has large individual variability. I conducted fundamental research aimed at clarifying the cause. Our research group has reported drug-induced mouse models in ten different types of clinical drugs. For the antiepileptic drug carbamazepine-induced liver injury mouse model, time-dependent changes of the expression of plasma microRNA were investigated, then, found candidate microRNAs related to individual variability of liver injury and then found related signaling pathway candidates. The potential of microRNA targets to predict individual variability in onset of liver injury is being investigating. In the future, extrapolation to humans will be examined considering the species difference of microRNA target.

研究分野：毒性学、医薬品安全性学

キーワード：薬物性肝障害、 個体差 バイオマーカー マイクロRNA 抗てんかん薬 薬剤性肝障害 代謝多型

1. 研究開始当初の背景

新薬が市販後に稀な頻度ではあるが重篤な肝障害を発症することは珍しく無く、場合によっては市場から撤退することは、製薬企業のみならず社会にとっても大きな損失となる。すでに臨床で使用されている薬においても、その3割以上に肝障害発症に対する注意喚起が添付文書に記載されている。こうした薬物性肝障害 (drug-induced liver injury, DILI) の発症には大きな個体差が存在することは古くから知られているが、特に重篤な肝障害発症は頻度が低く、予測が困難である。我々は、近年カルバマゼピン、フェニトイン、ジクロフェナク、フルタミドなど 10 種類の特異体質性肝障害を惹起することが注意喚起されている代表的な臨床薬について、肝障害発症モデルを正常マウスを用いて確立し、その発症機序に T helper(Th)2 細胞や Th17 細胞を介した免疫関連因子が肝障害の発症及び増悪に関与することを論文報告してきた。この研究過程において、遺伝的背景が均一な動物実験 (マウスおよびラット) においても、その発症頻度に大きな個体差が認められた。そこで、肝障害発症後のマウス肝臓や血漿を用いて、ストレスや免疫/炎症関連因子を解析したが原因の同定には至らなかった。すなわち、最終的に重篤な副作用が発症する個体が否かについて、ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)などの変動で示される肝障害惹起時間よりも早い時期に予測でき、肝障害が発症重篤化する個体を早い時間に知り得るバイオマーカーの開発が望まれている。

2. 研究の目的

研究代表者のグループは、これまでノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA の生化学/動態学的研究を継続しており、ハロタン誘導性肝障害マウスの血漿から、ALT 上昇に先んじて発現変動するマイクロ RNA が、その後のハロタン誘導性肝障害の機序を予測できること発表した (*Toxicology* 319:75-84, 2014)。さらに、メチマゾール誘導性の肝障害マウスモデルにおいても、ALT の上昇が認められない早期の血漿中のマイクロ RNA が予測バイオマーカーになる可能性について発表した (*Toxicol Appl Pharmacol* 307:1-9, 2016)。こうした研究結果に基づ

き、血漿中のマイクロ RNA の早期の発現変動が、肝障害の個体差の解明にも適用できると考えた。これまでの 10 種類の DILI モデルマウスの確立の過程において、最も大きな発症個体差を示した抗てんかん薬カルバマゼピン (CBZ) について検討することとした。すなわち、薬物摂取後に発症するかもしれない DILI について、発症前に予測可能なバイオマーカーを同定することが目的であるため、非侵襲的な材料のみが採取可能であり、最終段階で DILI に対して、responder か non-responder かを *in vivo* で確認して初めて研究材料を得ることができる。従って、極めて低侵襲性の方法として、経時的に血漿を採取し、血漿中のマイクロ RNA profile の網羅的解析から着手し、個体差に関係すると考えられる特定のマイクロ RNA を同定後、*in silico* の pathway 予測から、経時的な protein 及び phenotype の解析を step by step で行い、検討を進める。さらに、特定の pathway が他の DILI 関連薬にも関与しているか検討する。さらに、マイクロ RNA は種差が少ないことが特徴であるため、ヒトへの外挿性の視点から研究を発展させることを目指す。最終的には、ヒトにおける肝障害の発症の著しい個体差の因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗てんかん薬カルバマゼピン (CBZ) による肝障害マウスモデルを作成した。雄性 Balb/c マウス 8 週齢に 400 mg/kg の CBZ を 4 日間、5 日目に 800 mg/kg を連続経口投与した。最終投与 1.5, 3, 6, 12, 24 時間後に血漿を頸静脈から採取した。マウスが CBZ-DILI responder または non-responder かは最終投与 24 時間後の血漿及び肝組織から判定した。

(2) CBZ 最終投与から経時的な採血を行い、CBZ 及び複数の代謝物の体内動態パラメーターを測定した。

(3) CBZ 誘導性肝障害の responder 及び non-responder の肝臓における免疫炎症関連因子の mRNA を網羅的に定量測定した。

(4) CBZ 誘導性肝障害の responder 及び non-responder の経時的採取血漿について、網羅的マイクロ RNA の発現解析を行った。その結果を解析し、個体差に起因すると考えられる pathway を *in silico* で解析した。

(5) 個体差に関連する pathway における様々な因子を protein 及び mRNA レベルで検討した。併せて、網羅的発現解析の結果を、個々の target 及び個々のマウスにおいて確認した。

4. 研究成果

(1) CBZ 誘導性肝障害マウスモデルにおける個体差は、High-responder ではいずれも ALT 値が 1 万～3 万程度であり、non-responder と比べて著しい差異が認められた。Non-responder では ALT 値は上昇しなかった。相対肝重量も high-responder で有意に高く、non-responder では低値を示した。これは、肝臓の炎症反応に起因する差異であると考えられた。組織学的検討において、non-responder は CBZ を投与後も肝組織の目立った変化はなく、ALT 値と相関が認められた。

(2) CBZ および代謝物の体内動態の変化について検討した。high responder において未変化体の C_{max} は、non-responder と有意差は認められなかった。しかし、3 位水酸化代謝物のみ high-responder で有意に高値を示したが、ALT の極端な差異を説明出来る変化ではないと考えられた。血中の未変化体量の 5% 程度の代謝物量であった。しかし、10,11-エポキシド代謝物の量は、未変化体量の 2 倍程度あったが、responder 間で差異はなかった。Trans 10,11-水酸化代謝物量にも両 responder 間で差は認められなかった。よって、被験薬の体内動態の個体差によって、被験薬の肝障害性の大きな差異は説明が困難であると判断できた。

(3) CBZ による肝障害の high-responder と non-responder 間における肝障害時の肝臓中の炎症免疫因子の mRNA 発現変動について検討した。その結果、Th17 関連因子である、IL-6, TNF と TGF- β 2 の mRNA が high-responder の肝臓で有意に高値を示した。IL-23 には変化がなかった。TLR4 関連因子である IRAK2 は、有意に高値を示したが、TLR4 と IRAK4 は有意な変化は認められなかった。

(4) 経時的に採取した血漿を用いて、マイクロ RNA の網羅的な発現解析を行った。CBZ による肝障害には、Th17 細胞とそれに関係する因子の関与を我々は報告しているが、今回

のマイクロ RNA アレイ分析の結果、Th17 関連因子に直接関係すると報告されている一連のマイクロ RNA の発現 profile と、responder 間の差異は見出せなかった。すなわち、Th17 関連因子は DILI 発症ではなく、増悪因子であると考えてきたことを裏付けていると考えられる。早い時間に発現が high responder 特有に発現上昇が認められた miR-30e, miR-140, miR-196c, miR186, miR1306 などに着目した。

(5) マイクロ RNA の profile 解析から、TNF pathway の関与が示唆され、個々のマウスモデルの肝試料について詳細に検討した。特に miR-19a の関与が示唆されたが、responder 間の差異を明確に説明することはできなかった。しかし、miR-19a は TSLP(thymic stromal lymphopoietin)の制御に関与していることが示唆されているため、関連 pathway についても検討を行っている。さらに、IL-6 や TGF- β 2 についても、検討を行ったが、個々の responder の差異を説明することができなかった。TNF は、non-responder では低値で、high-responder で高値の傾向を示した。MAPK pathway について検討した結果、この pathway の寄与が示唆された。さらに、詳細な *in silico* 解析を行い、リン酸化酵素が関与する pathway を検討中である。

(6) さらに詳細な検討を目指して、mRNA の網羅的アレイ解析を行った。その結果、IL-6, TGF- β 2 のケモカイン類に加えて、多くの MAP kinase およびその inhibitor 類の発現が変動しており、詳細に検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件、全て査読あり)

Yuji Shirai, Shingo Oda, Sayaka Makino, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of a pathogenesis. *Lab. Invest.*, in press (2017). doi: 10.1038/labinvest.2017. 22. PMID: 28263289

Yasuaki Uematsu, Sho Akai, Tomoaki Tochitani, Yumi Tateishi, Shingo Oda, Izumi Tsumoto, Toru Yamada, and

Tsuyoshi Yokoi. Micro RNA-mediated Th2 bias in the pathogenesis of methimazole-induced acute liver injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **307**: 1-9 (2016). doi:

10.1016/j.taap.2016.07.008.

Atsushi Iwamura, Katsuhito Watanabe, Sho Akai, Tsubasa Hishinosono, Koichi Tsuneyama, Shingo Oda, Toshiyuki Kume, and Tsuyoshi Yokoi. Zomepirac acyl glucuronide is responsible for zomepirac-induced acute kidney injury in mice. *Drug Metab. Dispos.*, **44**(7): **888-896** (2016).

doi:10.1124/dmd.116.069575.

Sho Akai, Yasuaki Uematsu, Koichi Tsuneyama, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi. Kupffer cell-mediated exacerbation of methimazole-induced acute liver injury in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **36**(5): **702-715** (2016). doi: 10.1002/jat.3202.

Eita Sasaki, Azumi Iida, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.

Pathogenetic analyses of carbamazepine-induced liver injury in F344 rats focused on morphology and immune- and inflammation-related factors. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **68**(1): **27-38** (2016). doi:

10.1016/j.etp.2015.09.004.

Shohei Takai, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.

Establishment of a mouse model for amiodarone-induced liver injury and analyses of its hepatotoxic mechanism. *J. Appl. Toxicol.*, **36**(1): **35-37** (2016). doi: 10.1002/jat.3141.

Azumi Iida, Eita Sasaki, Shingo Oda, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Carbamazepine-induced liver injury required CYP3A-mediated metabolism and glutathione depletion in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **43**(7):

958-968 (2015). doi:

10.1124/dmd.115.063370.

Shohei Takai, Satonori Higuchi, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.

Involvement of immune- and inflammatory-related factors in flucloxacillin-induced liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, **35**(2): **142-151** (2015). doi: 10.1002/jat.3002.

Eita Sasaki, Atsushi Iwamura, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Toshiyuki Kume and Tsuyoshi Yokoi. Role of P450-mediated metabolism and identification of novel thiol-conjugated metabolites in mice with phenytoin-induced liver injury.

Toxicol. Lett., **232**(1): **79-88** (2015). doi: 10.1016/j.toxlet.2014.10.012.

[学会発表](計9件)

白井勇司、織田進吾、牧野早也香、常山幸一、横井 毅. エナラプリル誘発性肝障害マウスモデルの作出と病態の解明. ポスター発表、2017年7月10日～7月12日、第44回日本毒性学会学術年会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

山下頌平、織田進吾、岩村篤、横井 毅. ゾメピラク誘導性腎障害マウスにおける毒性発現メカニズムの解析. ポスター発表、2017年7月10日～7月12日、第44回日本毒性学会学術年会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

赤井 翔、織田進吾、横井 毅. ラモトリギン誘導性肝障害発症メカニズムのC57BL/6J マウスを用いた解析. ポスター発表、2016年6月29日～7月1日、第43回日本毒性学会学術年会、愛知県産業労働センターウインクあいち、愛知県名古屋市

上松泰明、赤井 翔、織田進吾、山田 徹、横井 毅. メチマゾール誘導性マウス肝障害においてT helper 2型免疫応答に関与するmiRNA. ポスター発表、2016年6月29日～7月1日、第43回日本毒性学会学術年会、愛知県産業労働センターウインクあいち、愛知県名古屋市

織田進吾、白井勇司、赤井翔、常山幸

一、中島晶、横井 毅 . ジクロフェナク誘導性肝障害モデルマウスにおけるアシルグルクロン酸代謝物の毒性学的役割の検討 ポスター発表、2016年5月26-27日、第23回HAB研究機構学術大会、つくば産業総合技術研究所共用講堂、茨城県つくば市

岩村 篤、伊藤雅仁、三井英晃、長谷川洵、小坂圭吾、木野一郎、津田実、中島美紀、横井 毅、久米利行 . Toxicological evaluation of acyl glucuronides utilizing half-lives, peptide adducts, and immunostimulation assays. ポスター発表、2015年11月11-13日、第30回日本薬物動態学会年会、タワーホール船堀、東京都江戸川区

白井勇司、織田進吾、牧野早也香、常山幸一、横井 毅 . Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of the pathogenesis. ポスター発表、2015年11月11-13日、第30回日本薬物動態学会年会、タワーホール船堀、東京都江戸川区
渡辺克仁、岩村 篤、赤井 翔、西之園翼、常山幸一、織田進吾、横井 毅 . Acyl glucuronide involved in zomepirac-induced nephrotoxicity. ポスター発表、2015年11月11-13日、第30回日本薬物動態学会年会、タワーホール船堀、東京都江戸川区

赤井 翔、上松泰明、常山幸一、織田進吾、横井 毅 . メチマゾール誘導性肝障害ラットモデルの作成及び肝障害発症メカニズムの解析 . ポスター発表、2015年6月29～7月1日、第42回日本毒性学会学術年会、石川県立音楽堂、石川県金沢市

〔図書〕(計1件)

1. 織田進吾、横井 毅 . 薬物性肝障害の動物モデルの作出と発症メカニズムの解析. *YAKUGAKU ZASSHI* 135: 1407(579-588) 2015.

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP 研究概要

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/toxicogenomics/Research.html>

研究室 HP 業績リスト

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/toxicogenomics/Publish.html>

6 . 研究組織

研究代表者

横井 毅 (YOKOI, Tsuyoshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 70135226