

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19169

研究課題名(和文)メタボロミクス解析を用いた薬剤性間質性肺炎の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Metabolomics approach for understanding the underlying mechanism of drug induced lung injury

研究代表者

齊藤 公亮(Saito, Kosuke)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号：10650608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤性間質性肺炎は呼吸器における重篤な副作用であり、毎年1000件以上が薬事法の規定に基づき報告されている。そこで本研究では、薬剤性間質性肺炎のモデルマウスを用いて、メタボロミクス解析を行い、薬剤性間質性肺炎に特徴的な代謝物変動を明らかにした。肺及び肺胞洗浄液において大幅な脂質分子の変動が認められたことから、これらの分子が薬剤性間質性肺炎の発症に関与していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Drug induced lung injury is a severe adverse event in the respiratory tract, and more than 1000 cases are reported annually by the regulation of the Pharmaceutical Affairs Law. Therefore, in this study, metabolomics analysis was performed using mouse model of drug induced lung injury, and the characteristic of drug induced lung injury in metabolite alteration was clarified. Significant alterations of lipid molecules were observed in lung and bronchoalveolar lavage fluids, suggesting that these molecules are involved in the development of drug induced lung injury.

研究分野：Metabolomics

キーワード：Metabolomics lung injury

1. 研究開始当初の背景

薬剤性間質性肺炎は呼吸器における重篤な副作用であり、毎年 1000 件以上が薬事法の規定に基づき報告されている。また、予後不良であることも多く、発症頻度は 1 万～4 万例に 1 例と非常に低い。このため、臨床試験の段階で認識されることは稀である。さらに、ゲフィチニブ、イマチニブ、プレオマイシン等の多くの医薬品による間質性肺炎の発症頻度は欧米人とくらべ日本人で 100 倍近く高い(ゲフィチニブの場合、国内 3.98%に対し海外 0.3%)。これらの要因が重なり合い、我が国では 2000 年に上市されたゲフィチニブ(イレッサ)による間質性肺炎の多発が社会問題となった。したがって、薬剤性間質性肺炎は我が国にとって特に安全対策を施すべき重要な副作用であり、投薬時の事前予測及び早期診断、さらには創薬時のリスク評価系の構築が求められている。しかしながら、これらを達成するために有用な知見となる発症メカニズムは、1) 細胞障害及び 2) 免疫系によるアレルギー反応等、他の薬剤性副作用と共通する機構が考えられているものの、いまだに不明な点が多い。また、1) 先述したとおり薬剤性間質性肺炎は発症頻度が比較的少なく、臨床研究試料の収集は難しいこと、2) 多様な医薬品によって発症するにも関わらず、薬剤性間質性肺炎の動物モデルはプレオマイシンのみに限定していること等も発症メカニズムの解明の大きな障害となっている。

そこで、申請者らはこれまでに先行研究として、厚生労働省、医薬品医療機器総合機構、日本製薬団体連合会の協力の下、全国から薬剤性間質性肺炎を発症した患者のゲノム DNA 及び副作用情報等の臨床試料を収集するシステム(NIHS 症例集積システム)を独自に構築し、薬剤性間質性肺炎の発症と関連する遺伝子多型の探索研究を行っている。既に約 100 症例を収集済みであり、現在ゲノム網羅的に関連解析を進めている。しかしながら、ゲノム解析は 1) 臨床試料の収集が比較的容易であること、及び 2) 解析手法が一般化されていること、等の利点があるものの、偶然に相関が認められる多型が非常に多く認められ、別患者群を用いた検証が必須であり、解析に耐えうる症例数を確保するのは容易ではない。また、ゲフィチニブによる間質性肺炎の発症リスクは遺伝子多型では説明がつかないとの報告もある。

一方申請者らは、ゲノム網羅的解析系と並行して、代謝物を網羅的に測定するメタボロミクス解析系を立ち上げ、成果を挙げており、肝臓における副作用の一つである薬剤性リン脂質症に対して、モデル動物の血液を用いて診断バイオマーカー候補を同定してした。メタボロミクスは最も表現型に近い代謝物変動を明らかにするため、表現型との強い相関が期待され、薬剤性間質性肺炎の発症メカニズム解明において新規で有用なアプローチと期待される。

2. 研究の目的

薬剤性間質性肺炎は呼吸器における重篤な副作用であり、我が国にとって特に安全対策を施すべき重要な副作用である。この発症メカニズムは現在不明な点が多く、その解明は投薬時の事前予測及び早期診断、さらには創薬時のリスク評価系の構築等の安全対策に有用な知見となる。最近申請者らが行っているメタボロミクス解析は表現型との強い相関が期待でき、薬剤性間質性肺炎の発症メカニズムの解明を達成する新たなアプローチとなると考えられる。そこで本研究は、メタボロミクス解析を用いて薬剤性間質性肺炎の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。またその過程で副次的に、薬剤性間質性肺炎の早期診断バイオマーカー候補を同定すること、も目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞を用いた疎水性メタボロミクス(脂質)解析

細胞は NIH3T3 細胞を用いて、ゲフィチニブ、エルロチニブ、プレオマイシンを 24 時間暴露し、細胞を回収後、メタノールによる除タンパクを行い、網羅的な脂質解析を、逆相 LC/MS システムを用いて行った。データ抽出、脂質分子の同定後解析データを用いて多変量解析を行い、医薬品の非暴露細胞と医薬品暴露細胞を比較した。

2) 動物モデルの構築

マウスに対しプレオマイシン 3U/kg を肺胞内投与を行い、投与後 2 日、7 日、21 日のタイミングで、血漿、肺、肺胞洗浄液を採取した。血漿、肺、肺胞洗浄液を

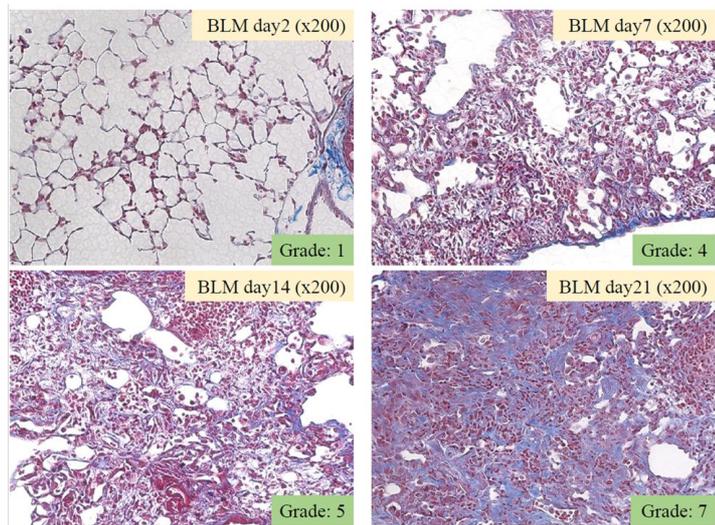


Fig. 1 Masson-Trichrome染色

疎水性メタボローム解析に供した。肺については、HE と Masson-Trichrome 染色を行った (Fig. 1)。

3) 動物モデルを用いた疎水性メタボロミクス (脂質) 解析

脂質抽出はマイクロラボ NINBUS を用いて自動化して行った。網羅的な脂質解析には血漿は 9 倍量のメタノール: イソプロパノール(1:1)による除タンパクを行い、肝組織はメタノールによる破碎 (40mg/ml) 後、等量のメタノール: イソプロパノール(1:1)を加えて、除タンパクプレートによって精製した。肺胞洗浄液は 100ul の BAL に対して、100ul のメタノール、300ul の 3%ギ酸水溶液を加え、C18 プレートによって精製した。オキシリピン解析には、肝組織はメタノールによる破碎 (70mg/ml) 2 倍量の 1.5%ギ酸メタノールを加え混和後、肺胞洗浄液は 100ul の BAL に対して、100ul のメタノール、400ul の 1.5%ギ酸メタノールを加え混和後、リン脂質除去プレートによって精製した。網羅的な脂質解析は、逆相 LC/MS システムを用いて行った。データ抽出、脂質分子の同定後解析データを用いて多変量解析を行った。また、多変量解析によって得られた特徴的な分子については、プレオマイシン投与による薬剤性間質性肺炎群をコントロールと比較した。オキシリピン解析は逆相 LC/MS システムを用いて行った。データ抽出を行い、プレオマイシン投与による薬剤性間質性肺炎群をコントロールと比較した。

4. 研究成果

1) 細胞を用いたメタボロミクス解析

間質性肺炎を引き起こす医薬品を暴露した細胞の疎水性メタボロミクス解析結果を用いて、多変量解析を行ったところ、コントロールと比べて明瞭な差異は認められなかった。

2) 動物モデルの構築

プレオマイシン投与後 2 日の時点で炎症性の浸潤が認められ、7 日の時点で炎症から線維化への移行、21 日の時点で大幅な線維化認められた。

3) 動物モデルを用いたリポミクス解析

上記に構築した動物モデルを用いて、血漿、肺、BAL の疎水性メタボローム解析を行い、その結果を用いて多変量解析 (PCA) を行った結果、血漿では明瞭な差異は認められなかったが、肺では、7 日、21 日において、肺胞洗浄液では、2 日、7 日、21 日全てにおいて、明瞭な差が

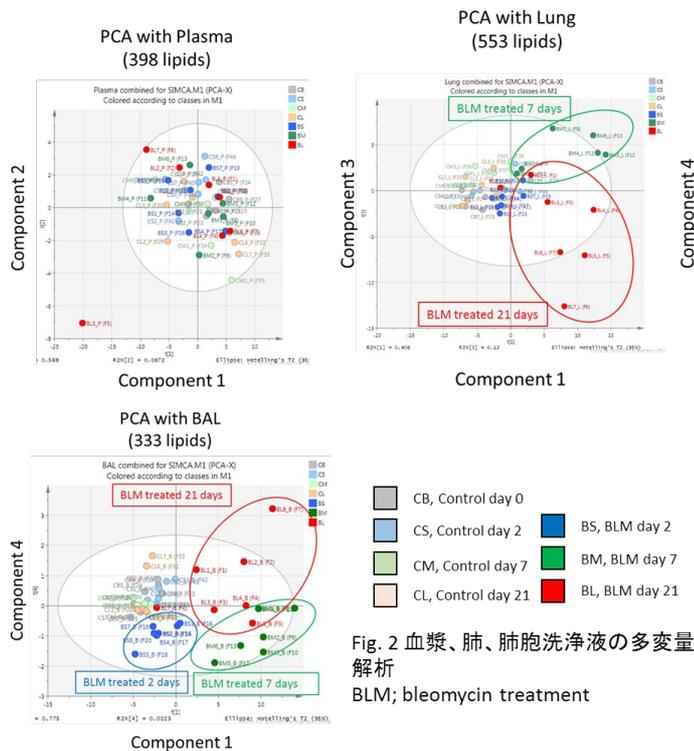


Fig. 2 血漿、肺、肺胞洗浄液の多変量解析
BLM; bleomycin treatment

Fig. 3 肺で変動した代表的な分子

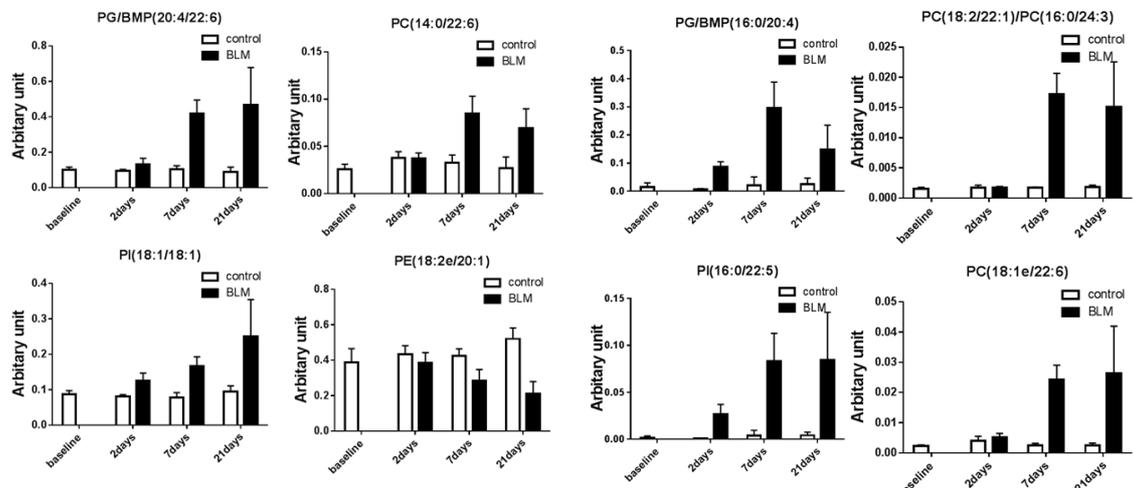
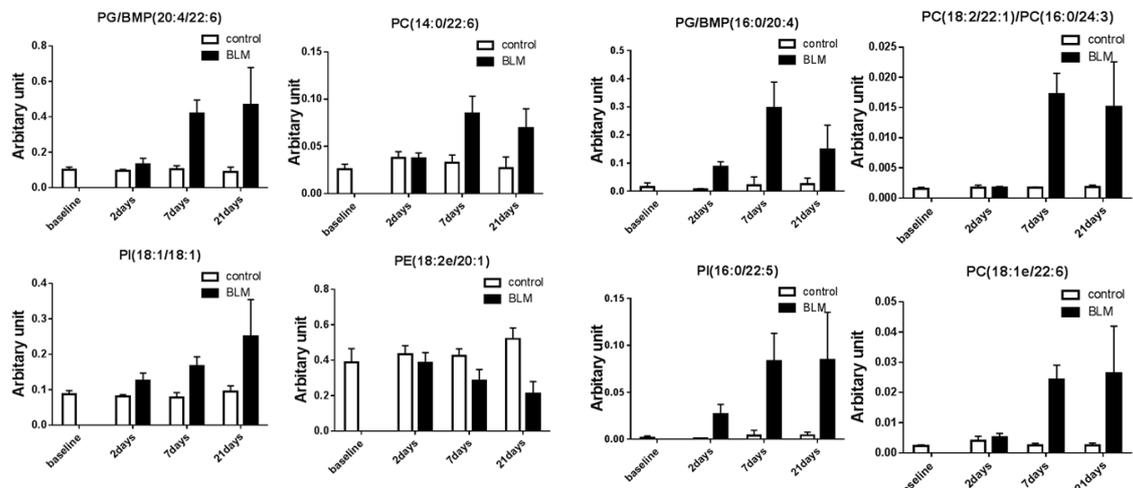


Fig. 4 肺胞洗浄液で変動した代表的な分子



認められた (Fig. 2)。そこで、どの分子がこれらの際に寄与するか探索した。肺においては、ピスモノホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルコリンが増加し、エーテル型のホスファチジルエタノールアミンが減少することを見出した (Fig. 3)。これらの分子については、7 日以降で増加が顕著になっており、肺の線維化関与している可能性が考えられた。また、肺胞洗浄液においては、多数の分子が増加することを見出した。代表的な分子としては、ピスモノホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルコリン、エーテル型ホスファチジルコリンが認められた (Fig. 4)。これらの分子についても、7 日以降で増加が顕著になっており、肺の線維化関与している可能性が考えられた。肺及び肺胞洗浄液に関しては、脂質分子の大幅な変動が認められたことから、オキシリピン分子も解析を行った。その結果、投与後 2 日において、肺中のプロスタグランジン類、アラキドン酸がプレオマイシンにより増加することを見出した (Fig. 5)。また、投与後 7 日において、肺胞洗浄液中の 12-リポキシゲナーゼ代謝物が増加することを見出した (Fig. 6)。したがって、プロスタグランジン類が肺における炎症に、肺胞洗浄液中の 12-リポキシゲナーゼ代謝物が炎症から線維化への移行に関与していることが考えられた。これらの結果から、薬物性間質性肺炎に関連する分子が明らかになり、メカニズムを解明する上で、重要な知見が得られた。

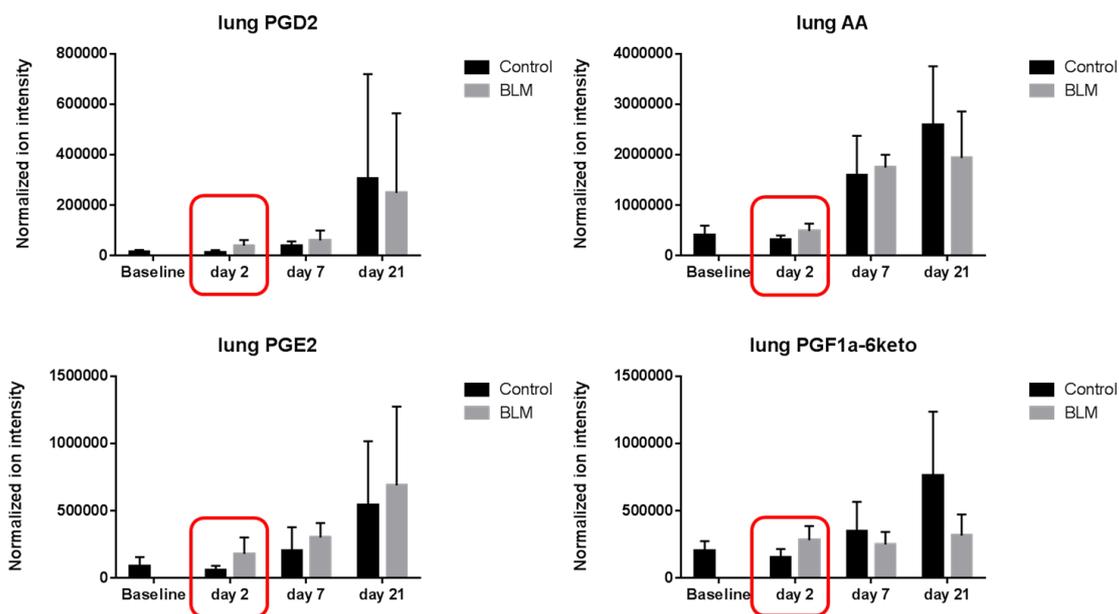


Fig. 5 肺で変動が認められたオキシリピン

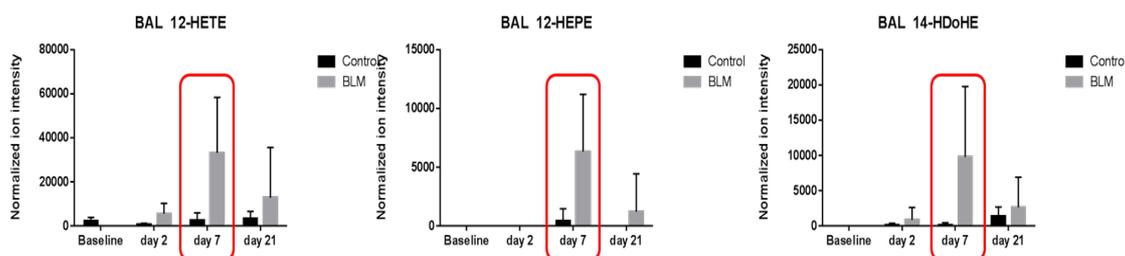


Fig. 6 肺胞洗浄液で変動が認められたオキシリピン

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. Kosuke Saito, Lipid profiling as a tool for understanding mechanisms of drug induced toxicity, 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (招待講演) 2018 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

齊藤 公亮（SAITO, Kosuke）

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号：10650608

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

該当無し