

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08432

研究課題名(和文) 特異体質性肝障害にアシルCoAチオエステル中間代謝物は関与しているか？

研究課題名(英文) Involvement of acyl-CoA thioester metabolite in drug-induced idiosyncratic liver injury

研究代表者

岩城 正宏 (Iwaki, Masahiro)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：30140346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)誘発性の特異体質性肝障害の発症原因の一つとして、肝臓内で生成されるアシルCoAチオエステル体(NSAID-CoA)に着目し、合成や化学的合成を試みたが、その生成は確認できなかった。一方で、NSAIDsは微弱ながらもアシルCoA合成酵素(ACS)に対する阻害活性を有していた。また、肝障害発症原因の一つであるアシルグルクロン酸抱合体(AG)についても検討し、酵素によるNSAID-AGの分解が特異体質性毒性と関連すること、マクロファージがAG生成を介したNSAIDsの肝細胞毒性発症に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者の体質に依存して発症する特異体質性肝毒性は発症予測が非常に困難であり、発症に反応性代謝物の生成が寄与することは明らかにされているが、詳細な発症機構については未だ不明であった。特に市場に出て幅広い背景を有する患者が服用して初めて特異体質性肝毒性が惹起される場合があり、医薬品開発においても臨床においても緊喫に解決すべき課題である。本研究は特異体質性毒性の発症メカニズムの一端として、薬物の代謝経路ごとの寄与や免疫担当細胞の寄与を明らかにしたことで、医薬品開発における候補化合物の選定や臨床における副作用回避に有益な情報を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We focused on the acyl-CoA thioester metabolites of NSAIDs (NSAID-CoAs) as one of the cause of NSAID-induced idiosyncratic liver injury. Although we attempted to obtain NSAID-CoAs to evaluate their chemical reactivity, we could not synthesized NSAID-CoAs successfully by performing both biological and chemical experiments. On the other hand, NSAIDs inhibited acyl-CoA synthase activity quite weakly. In addition to NSAID-CoA, we also investigated contribution of acyl glucuronide metabolite of NSAIDs (NSAID-AGs) to development of NSAID-induced idiosyncratic liver injury.

We clarified that the rate constant of enzymatic degradation of NSAID-AGs in rat liver microsomes well concern with the incidence of idiosyncratic toxicity of parent NSAIDs. Moreover, we demonstrated contribution of macrophage to NSAIDs-induced toxicity through AG generation in hepatocyte.

研究分野：薬物動態学

キーワード：特異体質性肝毒性 反応性代謝物 非ステロイド性抗炎症薬 免疫細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物による毒性発現の予測は、医薬品開発において重要な位置を占めており、毒性の発生機序の解明は安全な医薬品の開発に大きく貢献し、さらには適正な医薬品使用につながる。肝障害は、反応性代謝物が生体内高分子に共有結合することで肝障害を引き起こすことが一因と考えられている。反応性代謝物の一つとして、カルボキシ基含有薬物から生成するアシルグルクロン酸抱合体がタンパク共有結合体を生成し、毒性を起す可能性が以前より指摘されている。事実、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) のアシルグルクロン酸抱合体 (NSAID-AGs) の安定性がヒト血清アルブミンへの共有結合体形成と関連する。一方、別の反応性代謝物として、S-アシル CoA チオエステル (CoA 抱合体) がより反応性が高く、ヒトで認められる肝毒性に關与することを示唆する結果が報告されている。NSAIDs においては、立体異性体を有するプロピオン酸系 NSAIDs の体内での R 体から S 体へのキラル変換時に、NSAIDs の CoA 抱合体 (NSAID-CoAs) が生成する。しかし、NSAIDs 誘発性肝毒性の発症にこれらの反応性代謝物がどの程度寄与しているは未だ不明である。

これまでに肝ミクロソーム系を用いた反応性代謝物生成とタンパク共有結合体生成を検討することが、各代謝物の反応性の評価に有用であると報告されている。反応性代謝物は通常はグルタチオン (GSH) による捕捉により無毒化されると考えられる。さらに反応性代謝物生成を介した肝毒性の発症には免疫応答が關与することが報告されており、反応性代謝物ごとに免疫細胞に対する刺激性が異なる。したがって、肝ミクロソームでは毒性発現の評価ができず、反応性代謝物の解毒過程や免疫応答の誘導過程を評価することは困難であることから、その結果を細胞系や *in vivo* 系での肝毒性発現に外挿することに問題が残る。

以上の背景のもと、反応性代謝物の生成経路による毒性発現の差異を明らかにするとともに、防御機能としての細胞内 GSH レベルやグルタチオン抱合に關与するグルタチオン転移酵素 (GST) のこれら反応性代謝物を介する毒性発現への影響加えて、反応性代謝物を介した毒性発現における免疫細胞の役割を明らかにすることは肝毒性発現機構を理解するうえで有益と考えられる。

### 2. 研究の目的

反応性代謝物生成経路と細胞障害の關係について、市場から撤退した NSAID を含む種々カルボキシ基含有薬物を使用し、反応性代謝物生成経路とタンパク共有結合体生成および毒性発現の定量的關係、細胞内 GSH レベルおよび GST 誘導および阻害の毒性発現に対する影響、および反応性代謝物および毒性発現における免疫細胞の役割について細胞系で検討し、肝毒性発現に關する代謝経路および生体防御系としての GSH や免疫系の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

NSAID-CoAs の標品を得ることを目的に、ラット肝ミクロソーム代謝試験や市販のアシル CoA 合成酵素 (ACS) 活性測定キットを用いて複数の NSAIDs を基質として生合成を試みた。また、既報を参考にケトプロフェンの CoA 抱合体の有機化学的合成を試みた。ジクロフェナク (DIC) による肝細胞毒性における ACS の寄与を明らかにするために、ラットから初代培養肝細胞を単離培養し、200-800  $\mu$ M DIC を 24 時間曝露することによる肝細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 漏出に対する ACS 阻害薬 Triacsin C 共存の影響を検討した。また、ジクロフェナク肝細胞毒性に対する GSH や免疫応答の役割を明らかにする目的で、マウスから初代培養肝細胞および腹腔マクロファージを単離培養し、単培養および共培養時の DIC 細胞毒性に対する GSH 枯渴薬 L-buthionine sulfoximine (BSO) 処置の影響を検討した。DIC を含む NSAIDs や NSAID-CoAs、NSAID-AGs

の定量には HPLC および LC-MS/MS を用いた。

#### 4. 研究成果

NSAID-CoAs の反応性評価を行うことを目的に、NSAID-CoAs の標品の合成を試みた。既報に従い、ラット肝ミクロソームや市販のアシル CoA 合成酵素 (ACS)を用いて各種 NSAIDs から NSAID-CoAs の生合成を試みた。しかし、いずれの NSAIDs についても CoA 抱合体の生成を確認できなかった。この原因として、NSAID-CoAs 生成が少ないこと、生成した NSAID-CoAs が速やかに分解してしまうこと、反応液中タンパク質と速やかに結合する可能性が考えられた。そこで、既報を参考に化学合成も試みたが CoA 抱合体の生成を確認することはできなかった。以上より、NSAID-CoAs の標品の生化学的および化学的合成が叶わなかったことから、本研究では NSAIDs の ACS による基質認識性を間接的に評価することを目的に、脂肪酸アシル CoA 抱合体生成に対する NSAIDs の阻害活性を予備的に検討した結果、すべての NSAIDs で 50%阻害濃度が 1 mM 以上であり、非常に阻害活性が弱いことが示唆された。以上より、NSAIDs は ACS に対する親和性が低く、細胞内でほとんど生成しないことが考えられた。そこで NSAIDs 誘発性肝細胞毒性に対する肝細胞内 NSAID-CoAs 生成の寄与を示唆することを目的に、初代培養ラット肝細胞における DIC 毒性に対する ACS 阻害の影響を検討した。その結果、Triacsin C は DIC 曝露による初代培養ラット肝細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)漏出を抑制した。以上の検討から、NSAID-CoAs の肝細胞毒性発症における寄与の解明には至らなかったが、ACS が肝障害発症に関与することが示唆された。

DIC誘発性肝細胞毒性におけるGSHおよび免疫応答の重要性を明らかにすることを目的に、初代培養マウス肝細胞に対するDIC毒性を評価した。初代培養マウス肝細胞において、GSH合成酵素阻害薬L-buthionine sulfoximine (BSO)処置により細胞内GSHを枯渇させると、DIC処置による細胞内外のDICアシルグルクロン酸抱合体 (DIC-AG)量、細胞内のタンパク質との共有結合体量が増加した。さらに、DIC処置による細胞外へのLDH漏出もBSO処置により増加した。初代培養マウス肝細胞と初代培養腹腔マクロファージによる共培養を行い、DICによる肝細胞毒性の発症に対するマクロファージの役割を検討した。BSO非処置条件では腹腔マクロファージ共培養の影響は見られなかった一方、BSO処置条件において腹腔マクロファージ共培養はDICによるLDH漏出を増加させた。以上の結果より、DICによる肝細胞毒性の発症に対してGSHは抑制的に作用すること、マクロファージは特にGSH枯渇条件下でDIC誘発性肝細胞毒性を増悪することが示唆された。

NSAIDs は肝細胞内で NSAID-AG へ代謝されるが、生成した NSAID-AG は化学的不安定さにより非酵素的に加水分解するとともに  $\beta$ -グルクロナダーゼや一部のエステラーゼによって酵素的に加水分解することが知られている。本研究では、NSAIDs ごとの NSAID-AGs 生成および分解の程度と特異体質性毒性との関連性を明らかにすることを目的に、肝ミクロソーム中における NSAID-AGs の生成速度定数、非酵素的分解速度定数、酵素的分解速度定数を算出した。その結果として、重篤な特異体質性毒性によりすでに市場から撤退した NSAIDs において、現在も市販される NSAIDs と比較して NSAID-AGs の酵素的分解速度定数が大きいことが明らかになった。したがって、生成した NSAID-AGs が  $\beta$ -グルクロナダーゼやエステラーゼによって分解されやすい NSAIDs ほど特異体質性毒性を起こすことが示唆された。

以上、本研究により、NSAIDs 誘発性肝毒性に対して、ACS 活性が寄与すること、GSH が抑制的に寄与すること、マクロファージが増悪に寄与すること、酵素による分解特性による予測が有用である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawase Atsushi, Kaneto Ayaka, Ishibashi Mao, Kobayashi Akihiro, Shimada Hiroaki, Iwaki Masahiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Involvement of diclofenac acyl- $\beta$ -d-glucuronide in diclofenac-induced cytotoxicity in glutathione-depleted isolated murine hepatocytes co-cultured with peritoneal macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology Mechanisms and Methods	6. 最初と最後の頁 203 ~ 210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15376516.2018.1544384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 島田紘明、熊澤佳亮、野見真人、塩尻真弓、生田博之、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 肝ミクロソーム中におけるアシルグルクロン酸抱合体の生成・分解パラメータによる毒性評価の可能性
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下莉央、川瀬篤史、高島桜花、吉里翼、島田紘明、岩城正宏
2. 発表標題 肝細胞とマクロファージの共培養系を用いたジクロフェナク誘発性細胞傷害の評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水佑里子、島田紘明、藤原麻由、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 In situ肝還流法によるジクロフェナクの肝毒性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Shimada, Kento Hamaguchi, Yuriko Shimizu, Atsushi kawase, Masahiro Iwaki
2. 発表標題 Impact of Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup> depletion on glucuronidation of diclofenac
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22th MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田紘明, 瀧口健斗, 清水佑里子, 藤本和佳, 川瀬篤史, 岩城正宏
2. 発表標題 非ステロイド性抗炎症薬のアシルグルクロン酸抱合体生成に対するCa <sup>2+</sup> およびMg <sup>2+</sup> の影響
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水佑里子, 島田紘明, 瀧口健斗, 川瀬篤史, 岩城正宏
2. 発表標題 ジクロフェナクのグルクロン酸抱合に与えるCa <sup>2+</sup> およびMg <sup>2+</sup> の影響
3. 学会等名 未来創薬医療イノベーションシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊澤佳亮, 島田紘明, 野見真人, 塩尻真弓, 川瀬篤史, 岩城正宏
2. 発表標題 非ステロイド性抗炎症薬のアシルグルクロン酸抱合体の生成・分解パラメータによる毒性予測の可能性
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田紘明、清水佑里子、濱口健斗、藤本和佳、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 非ステロイド性抗炎症薬のアシルグルクロン酸抱合体生成に対するCa <sup>2+</sup> およびMg <sup>2+</sup> の促進作用
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川瀬 篤史 (Kawase Atsushi)  (80411578)	近畿大学・薬学部・准教授  (34419)	
研究分担者	島田 紘明 (Shimada Hiroaki)  (40783444)	近畿大学・薬学部・助教  (34419)	