

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06643

研究課題名（和文）腸内細菌応答による薬物性肝障害の予測とその治療展開

研究課題名（英文）Prediction of drug-induced liver injury by gut microbiota response and its therapeutic development

研究代表者

佐能 正剛（Sanoh, Seigo）

和歌山県立医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00552267

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）：本研究では、腸内細菌叢をかく乱させることが確認された医薬品成分をマウスに投与したところ、肝機能関連遺伝子の発現を変化させることが示唆された。一方、腸内細菌代謝物の中で、肝機能に影響を与える可能性がある内在性物質の絞り込みができた。今後、ヒト化マウス等を用いることで、マウスとヒトの種差も考慮した評価を行う必要はあるものの、腸管（腸内細菌）-肝臓の連関による肝毒性発現メカニズムを説明できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、薬物投与による腸内細菌環境の変化、それに伴う腸内細菌代謝物の変化が、腸管-肝臓の臓器連動のかく乱につながり、肝機能に影響を与える可能性が示唆された。今後の検討によって、動物モデルやヒトにおいて、薬物性肝障害に関わる特徴的な腸内細菌叢カタログを決定、さらにはカギとなる腸内細菌代謝産物を同定することにより、精度の高い薬物性肝障害の臨床診断指標の構築や新規治療薬の開発に貢献できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the pharmaceutical that were confirmed to disrupt the gut microbiota were administered to mice, suggesting that it alters the expression of genes related to liver function. On the other hand, we could find the endogenous substances among the intestinal bacterial metabolites that may affect liver function. In the future, we may be able to explain the mechanism of hepatotoxicity by the intestinal tract (intestinal bacteria)-liver interaction although it is necessary to take into account the species difference between mice and humans using humanized mice.

研究分野：衛生薬学

キーワード：腸内細菌 薬物性肝障害

1. 研究開始当初の背景

医薬品候補化合物の予期せぬ開発中止や上市された医薬品の市場撤退の要因として最も多いものが「薬物性肝障害」である。薬物性肝障害には、「中毒性」と「特異体質毒性」に分類され、特に後者は、実験動物で観察されにくいため、ヒトでの発症予測が難しく、また感受性の高い人と低い人の間に顕著な個人差が観察される。この感受性を決める「特異体質」のひとつとして、薬物または代謝中間体がハプテンとなり抗原性を獲得するアレルギー機序に基づく炎症・免疫応答性の個人差などが提唱されているものの、すべてのケースにおいて統合的に解明されておらず、特異体質毒性を回避した安全性の高い医薬品を創出するための予測評価系もまだ十分に構築されていない。

薬物性肝障害の臨床診断基準として「DDW-J2004薬物性肝障害ワークショップのスコアリング」が広く採用されている。しかし、偽陽性や偽陰性の診断結果となってしまう場合もあり、さらに精度の高い診断基準が必要となる。一方、肝障害の治療においては、グリチルリチンなどが使用されるものの、そのエビデンスは十分ではなく最適な治療薬がないことも課題となっていた。

当研究では、特異体質のひとつとして腸内細菌叢環境に着目した。腸内細菌には、*Blautia* 属、*Bacteroides* 属などが存在するが、その組成比は疾病、薬物治療、薬剤耐性などによって変化する。その変化に依存して、腸内細菌叢が有する薬物代謝活性にも個体差が見られることが報告された (Zimmermann *et al.*, *Nature*, 2019; Javdan *et al.*, *Cell*, 2020)。以前、我々は、抗生物質リファンピシンがマウス肝再生能を低下させる可能性を見出した。腸内細菌の代謝産物である二次胆汁酸が減少しており、腸内細菌叢に対する毒性影響によるものと考えられた。一方、非アルコール性脂肪性肝炎の発症には腸内細菌から産生する代謝産物が影響していることが示唆されているが、腸内細菌の代謝産物は腸肝循環の動態をとることからも、肝臓はその影響を受けやすいと考えられた。最近、医薬品の約 25%が腸内細菌の増殖を阻害することが報告され (Maier *et al.*, *Nature*, 2018)、抗生物質以外の医薬品も腸内細菌叢に影響を与えることも明らかとなり、これらも肝機能に影響を与える可能性があると考えた。

2. 研究の目的

様々な環境因子による腸内細菌叢の変化が、肝障害の感受性の要因となっている可能性がある。また、抗生物質をはじめ、抗ウイルス剤、抗がん剤、解熱鎮痛剤などで肝障害の頻度が高いことが知られているが、腸内細菌叢の変化に伴う代謝産物の変動による肝機能低下が肝障害に関与している可能性もある。腸内細菌叢プロファイル (菌種構成や菌数) から「特異体質」となる「肝障害の感受性、重症度、回復度の指標」を探索する。その中で、薬物性肝障害を特徴づける腸内細菌叢プロファイル「腸内細菌叢のカタログ化」を確立する。また、肝機能に影響を与える腸内細菌の代謝産物を同定することで、「腸管-肝臓の臓器連動」による新しい毒性発現メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 16S rRNA細菌叢解析

C57BL/6J雄マウスに抗菌剤リファンピシンおよびリファキシミンを200mg/kg (投与溶媒: 0.5%メチルセルロース) の投与量で経口投与後の糞便を採取し、糞便からDNAを抽出し、16Sプライマーを用いて16S rDNAの2つの可変領域 (V3とV4) を増幅し、ハイスループットシーケンス、データ解析を行った。

(2) 肝再生モデルマウスを用いた評価

肝再生研究で汎用される2/3肝切除モデルマウス (C57BL/6J雄マウス) を作成した。肝切除後、肝再生される間の3日間、リファキシミンを経口投与した。回収した肝臓からRNA抽出と逆転写を行い、リアルタイムPCRを行った。

(3) 肝細胞培養系を用いた内在性物質の評価

Huh7細胞に腸内細菌代謝物として報告されるトリプトファン代謝物標品を添加し、24時間後のシトクロム P450 3A4 (CYP3A4) 活性を Luciferin-IPA (Promega) を用いて測定した。

(4) ヒト肝キメラマウス (PXB-mice®, 株式会社フェニックスバイオ) より単離した肝細胞PXB-cells®を用いた評価

20%酸素条件 (5% CO₂, 95% atmosphere) あるいは40%酸素条件 (5% CO₂, 55% N₂) 下で10日間培養した。各酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞における脂質をOil Red O染色およびコレステロール (積水メディカル株式会社) により経時的に評価した。FAO活性を蛍光で評価することのできるFAOBlue (フナコシ株式会社) を用いて、各酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞におけるFAO活性を経時的に評価した。

4. 研究成果

(1) リファンピシン、リファキシミンがマウス腸内細菌に与える影響

リファンピシン、リファキシミンをそれぞれマウスに経口から3日間投与(200mg/kg)したところ、投与溶媒0.5%メチルセルロース投与群(MC)との比較において、マウス糞便中の腸内細菌のうち、*Lachnospiraceae*属の存在比が減少し、*Bacteroides*属の存在比が増加するなど腸内細菌環境が大きく変化することが確認された(図1)。

リファンピシンは肝毒性を示すことが知られ、肝臓中の胆汁酸濃度の増加や(Sano *et al.*, *Biol Pharm Bull*, 2019)脂質の蓄積をマウスの肝臓がヒト化されたヒト肝キメラマウスにおいて観察された化合物である。また、部分肝切除肝再生モデルマウスにおいて、肝再生能を低下させることが示唆されていた。この知見は、腸内細菌環境の変化によるものなのか調べるため、リファンピシンと構造が類似し、同じように腸内細菌環境を変化させたリファキシミンを検証化合物として用いることにした。リファキシミンは、経口吸収性がほとんどない化合物であることから、リファキシミンによる肝臓への直接的な影響を除外できる化合物として考えることができる。

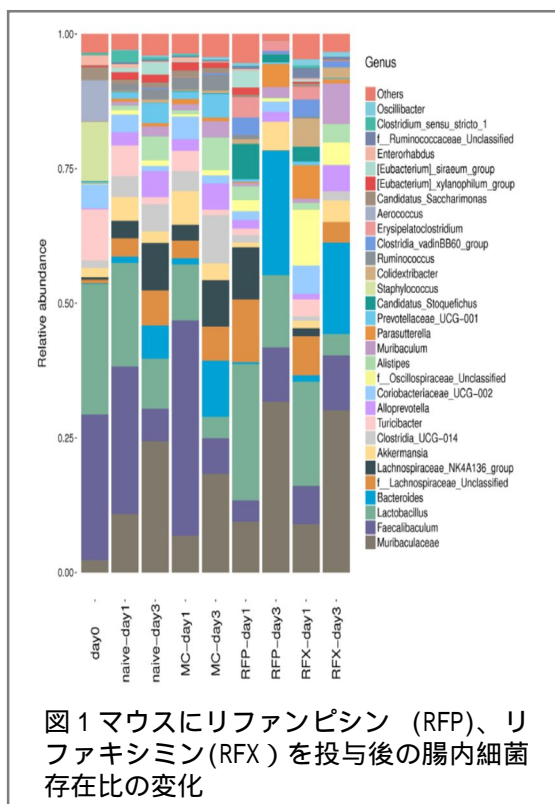


図1 マウスにリファンピシン(RFP)、リファキシミン(RFX)を投与後の腸内細菌存在比の変化

(2) リファキシミンによる肝再生に与える影響

部分肝切除肝再生モデルマウスにおいて、リファキシミンを投与したところ、再生される肝臓重量には影響をほとんど与えなかった(図2)。一方、肝再生関連遺伝子(*Ccnb1*, *Ccnd1*)は、有意ではないものの変化させることが分かった(図3)。その見極めにはさらなる検討が必要であるものの、腸内細菌による影響も考えられた。

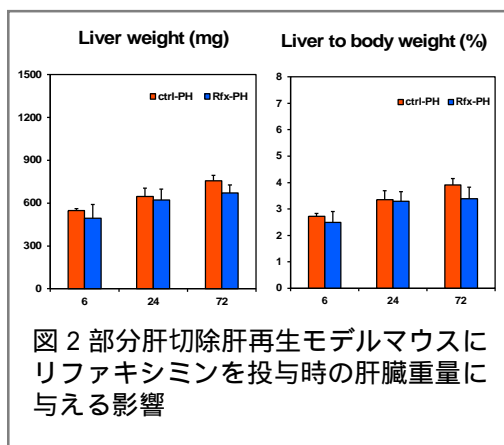
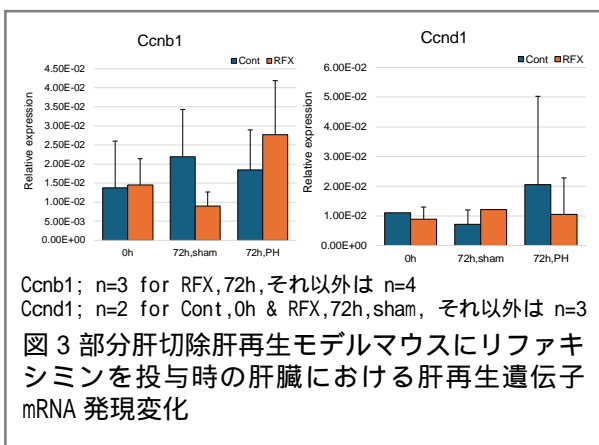


図2 部分肝切除肝再生モデルマウスにリファキシミンを投与時の肝臓重量に与える影響



Ccnb1; n=3 for RFX,72h,それ以外は n=4

Ccnd1; n=2 for Cont,0h & RFX,72h,sham, それ以外は n=3

図3 部分肝切除肝再生モデルマウスにリファキシミンを投与時の肝臓における肝再生遺伝子mRNA発現変化

(3) 腸内細菌代謝物による肝細胞機能(薬物代謝能)に与える影響

我々は、腸内細菌代謝物としてトリプトファン代謝物に着目した(Agus *et al.*, *Cell Host Microbe*, 2018)。その中で、Huh-7細胞にインドール-3-ピルビン酸(IPYA)を48時間曝露したところ、CYP3A4活性が増加することが分かった(図4)。細胞の培養条件の検討も含め、そのメカニズム解明は今後の課題であるが、トリプトファン代謝物にはAhRを活性化するものも知られていることから、CYP3A4だけでなくCYP1A2への関与もある可能性がある。今後、*in vivo*実験においても検証が必要であるものの、腸内細菌代謝物が肝臓機能に影響を与える可能性が示唆された。

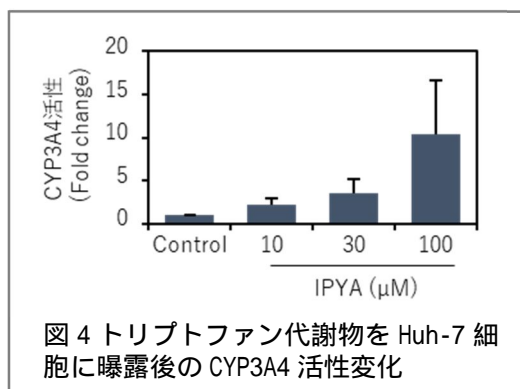


図4 トリプトファン代謝物をHuh-7細胞に曝露後のCYP3A4活性変化

(4) 肝細胞を用いた評価系の検討

マウスとヒトの肝機能や肝毒性の種差を鑑みると、ヒト化モデル動物が有用となる。その中で、マウス肝臓がヒト化されたヒト肝細胞キメラマウス (PXB mice) さらにはその肝臓から単離した肝細胞 (PXB cells) に着目した。これらを用いることで、ヒトにおける肝毒性を *in vitro* と *in vivo* 両面から見積もることができる。しかしながら、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓は脂質が蓄積している問題点を有しており、脂肪肝といった薬剤による肝毒性評価において課題となっていた (佐能正剛, 毒性質問箱, 2023 年)。

我々は肝細胞培養における酸素濃度に着目した。肝細胞を通常の 20%酸素に加え、40%酸素濃度で培養したところ、細胞内に蓄積していた脂質が減少することが分かった。これには、40%酸素濃度培養下において、脂肪酸の代謝に関わる酸化が活性化されることが要因の一つと考えられた (図 4, 5)。高酸素濃度培養によって脂質除去した肝細胞を用いれば、前述の(3)のような実験のヒトにおける可能性を見積もることができると考えており、今後検討していく。

一方で、*in vivo*におけるヒト肝細胞キメラマウスの肝臓における脂肪肝については、ヒト成長ホルモンを定速投与することで脂質の蓄積が改善することも分かってきており、これらのアプローチを適用することで、*in vitro*、*in vivo*両面からのヒト予測評価が可能となる。

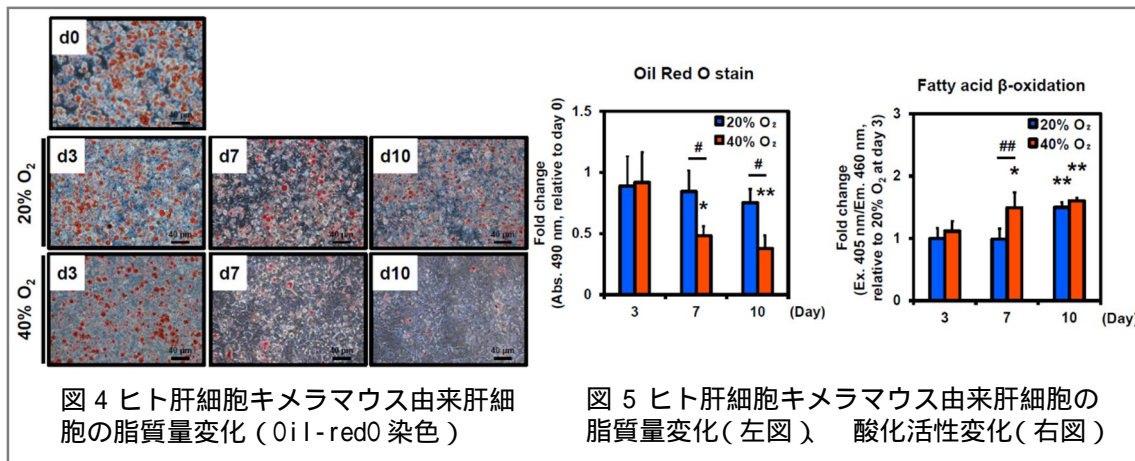


図 4 ヒト肝細胞キメラマウス由来肝細胞の脂質量変化 (Oil-redO 染色)

図 5 ヒト肝細胞キメラマウス由来肝細胞の脂質量変化 (左図)、酸化活性変化 (右図)

(5) 今後の展望

*In vivo*評価において、ヒト肝細胞キメラマウスとその無菌キメラマウス、さらにはヒト肝細胞キメラマウスの無菌マウスにヒトの糞便を移植したマウスを用いたリファンピシンの肝毒性評価を検討している。将来的には、薬剤性肝障害患者の糞便も移植したヒト肝細胞キメラマウスも構築したいと考えている。その中で、ヒトの腸内細菌と肝臓の臓器連関が関与する肝毒性評価を行っていきたい。

検証化合物をさらに増やして評価できれば、肝障害に関わる腸内細菌叢カタログを決定し、カギとなる腸内細菌叢の代謝産物を同定することにより、精度の高い予測や臨床診断指標の構築につながるだけでなく、新規治療薬の開発にも貢献できると期待される。

<引用文献>

- ・ Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018;23(6):716-724.
- ・ Javdan B, Lopez JG, Chankhamjon P, Lee YJ, Hull R, Wu Q, Wang X, Chatterjee S, Donia MS. Personalized Mapping of Drug Metabolism by the Human Gut Microbiome. *Cell*. 2020;181(7):1661-1679.e22.
- ・ Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, Brochado AR, Fernandez KC, Dose H, Mori H, Patil KR, Bork P, Typas A. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature*. 2018;555(7698):623-628.
- ・ Sanoh S, Tamura Y, Fujino C, Sugahara G, Yoshizane Y, Yanagi A, Kisoh K, Ishida Y, Tateno C, Ohta S, Kotake Y. Changes in Bile Acid Concentrations after Administration of Ketoconazole or Rifampicin to Chimeric Mice with Humanized Liver. *Biol Pharm Bull*. 2019;42(8):1366-1375.
- ・ Zimmermann M, Zimmermann-Kogadeeva M, Wegmann R, Goodman AL. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature*. 2019;570(7762):462-467.
- ・ 佐能 正剛, ヒト肝細胞キメラマウスを用いてヒトにおける薬物性肝障害をどこまで予測できるのか? ~さらなる予測性向上を目指して~, 谷本学校 毒性質問箱, 2023;25

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 1件）

1. 著者名 Ohtsuki Yuya, Sanoh Seigo, Yamao Mikaru, Kojima Yuha, Kotake Yaichiro, Tateno Chise	4. 巻 48
2. 論文標題 Establishment of hyperoxic cell culture system for predicting drug-induced liver injury: reducing accumulated lipids in hepatocytes derived from chimeric mice with humanized liver	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 99 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.48.99	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 5件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 InnoCellプレートを用いた2D、3D肝細胞培養における薬物代謝
3. 学会等名 第2回 New Cell Based Assay Working Group研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 InnoCellプレートを用いた肝細胞培養における薬物代謝評価の検討
3. 学会等名 第1回 New Cell Based Assay Working Group研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森岡 晶, 佐能 正剛, 石田 雄二, 古武 弥一郎, 立野 知世
2. 発表標題 ヒト成長ホルモン投与によるPXBマウスの脂肪肝改善と薬剤性脂肪肝評価の検討
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大月 佑也, 佐能 正剛, 山尾 美香留, 小島 夕葉, 古武 弥一郎, 立野 知世
2. 発表標題 ヒト肝キメラマウス由来肝細胞を用いた薬剤誘発性脂肪肝評価のための高酸素培養系の構築
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大月 佑也, 佐能 正剛, 山尾 美香留, 小島 夕葉, 山崎 ちひろ, 古武 弥一郎, 立野 知世
2. 発表標題 高酸素培養が肝細胞に蓄積した脂質におよぼす影響とその調節機構の検討
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐能 正剛, 大月 佑也, 掛田 雄基, 高岡 尚輝, 太田 茂, 山尾 美香留, 森岡 晶, 立野 知世, 古武 弥一郎
2. 発表標題 薬剤による脂肪肝発症予測のためのヒト肝細胞キメラマウスを用いた in vitro・in vivo 短期毒性評価系の構築
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大月 佑也, 佐能 正剛, 掛田 雄基, 高岡 尚輝, 太田 茂, 山尾 美香留, 森岡 晶, 立野 知世, 古武 弥一郎
2. 発表標題 ト肝細胞キメラマウス由来肝細胞を用いた薬剤誘発性脂肪肝の評価検討
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたin vitro・in vivo薬物動態および肝毒性評価
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた非臨床薬物動態および肝毒性評価法
3. 学会等名 安全性評価研究会第27回冬のセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森岡 晶, 佐能 正剛, 掛田 雄基, 立野 知世, 古武 弥一郎
2. 発表標題 薬剤性脂肪肝の評価モデル構築のための、ヒト成長ホルモン正常化ヒト肝細胞キメラマウスの開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 掛田 雄基, 佐能 正剛, 森岡 晶, 山尾 美香留, 立野 知世, 高岡 尚輝, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたアミオダロン、リファンピシンによる薬剤誘発性脂肪肝のin vitro・in vivo 評価
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森岡 晶, 浜村 理子, 油野 陽香, 佐能 正剛, 茶山 一彰, 石田 雄二, 立野 知世
2. 発表標題 無菌ヒト肝細胞キメラマウスへのヒトフローラ移植
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたin vitro/in vivo体内動態予測とその展望
3. 学会等名 第1回Cell-Based Assayワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

和歌山県立医科大学薬学部・衛生薬学研究室ホームページ https://www.wakayama-med.ac.jp/pharm/ohtalab/

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	古武 弥一郎 (Kotake Yaichiro) (20335649)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	太田 茂 (Ohta Shigeru) (60160503)	和歌山県立医科大学・薬学部・教授 (24701)	

	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
研究協力者	高岡 尚輝 (Takaoka Naoki) (40909587)	和歌山県立医科大学・薬学部・助教 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関