

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659073

研究課題名(和文) Drug hypersensitivity 動物モデルの確立と発症原因の解明

研究課題名(英文) Establishment of drug hypersensitivity animal model and investigation of the mechanism.

研究代表者

横井 毅 (Yokoi, Tsuyoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70135226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床使用薬において、極めて稀な頻度で重篤な皮膚障害であり、予測が不可能なスティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)や中毒性表皮壊死症(TEN)を発症する場合がある。代表薬であるカルバマゼピン(CBZ)やフェニトイン(DPH)で、通常のマウス系統を用いて、重篤な皮膚障害モデルが作成できたが、その頻度が低く、結果の再現性を確立することができなかった。しかし、CBZおよびDPHにおいて、初めて薬物誘導性肝障害のマウスモデルを再現性よく確立することができ、その発症機序として、薬物代謝酵素がその発症に、免疫/炎症関連因子が増悪に関与することを明確にした。

研究成果の概要(英文)：Stevens-Johnson syndrome (SJS) and toxic epidermal necrolysis (TEN) are major causes to attrition during clinical studies. Formation of reactive metabolites of drugs by drug-metabolizing enzymes has been focused. Considering the species differences and interindividual differences, studies for developing the prediction method of SJS/TEN in non-clinical drug development were conducted. However, SJS/TEN with very low incidence are hard to predict, because the immune- and inflammatory-related factors were not able to be considered. Recently, we have established animal models of drug-induced liver injury in 10 kinds of clinical drugs. However, the phenotypic consequence of SJS/TEN in mouse model showed very low reproducibility, even with many different experimental conditions. Thus, we clarified the mechanism of hepatic inflammation by carbamazepine and phenytoin (representative drugs for SJS/TEN) in mouse.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、医療系薬学

キーワード：医薬品副作用 薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において申請までに治験に関わる人数は、多くても数千名である。よって、0.1%以下の確率で発症する重篤な副作用発症を承認までに明確にすることは事実上不可能である。古くから dug hypersensitivity 反応として、重篤なステイブンジョンソン(SJS)症候群や中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis, TEN)の発症で知られるカルバマゼピン(CBZ)は、患者の全ゲノム配列の網羅的比較研究から、HLA-B*1502のみならず、HLA-B*1511, HLA-A*3101, HLA-DR1*1602やHLA-Cw*0801 遺伝子多型との相関が様々な人種において、矢継ぎ早に報告されている。肝細胞にはHLA-Aや-Bは呈示されるが、-DRなどのクラスIIは肝細胞に呈示されないために、原因となる臓器が肝臓のみであるかは不明である。また、同様な副作用はアロプリノールやフェニトイン(DPH)などの多くの薬で報告され、様々な人種において、様々な異なるHLA多型との高い相関が報告されていることから、HLAの多型と独立した他の基本的な機序による原因が存在すると申請者は考えた。すなわち、HLA型ではなく動態学/毒性学的アプローチによって、動物 *in vivo* 予測試験系を確立することができると考えた。申請者はCBZを正常マウスに1週間経口投与し、hypersensitivityを惹起することに成功した。同時にCBZ由来する重篤な肝障害が高頻度で発症することを見いだした。興味深いことに、肝障害発症するマウスは個体間で大きなバラツキが認められた。肝障害も肝臓の重篤な炎症であり、免疫因子の関与を明確にできれば、皮膚症状発症機序解明の糸口になると考えた。

2. 研究の目的

極めて稀な頻度で重篤な薬物誘導性SJSやTEN発症の相関因子であり、バイオマーカーとして脚光を浴びているのが、HLAの遺伝多型であるが、開発の段階で、こうした副作用の発症を予測する手段は無い。この副作用発症を前臨床開発の段階

で予測できれば、創薬における開発リスクも大幅に軽減され、患者の安全性の確保も出来ることが期待される。非臨床試験段階で、SJS/TENのリスクのより低い候補化合物の選択が可能になれば、安全な創薬が実現できることが期待できる。特に免疫/炎症因子が関与する為に、実験動物 *in vivo* を用いた試験系を確立することが必要である。SJS/TENを惹起する代表的な薬であるCBZやDPHなどの動物モデルを確立し、非臨床試験での予測試験系の構築を目的とした。

3. 研究の方法

【CBZの検討】CBZの構造類似体で、同効薬のoxcarbazepine (OXC)はCBZよりも薬物間相互作用や副作用が少ないとされている。CBZはチトクロームP450 (CYP) 3A4により、主代謝物であるCBZ 10,11-エポキシドに代謝される。CBZ連投により種々のCYPが誘導され、毒性を有する反応性代謝物を生成すると考えられている。これまでの *in vitro* における報告などから、反応性代謝物が肝臓のタンパク質と結合し、免疫反応およびネクローシスなどの細胞傷害が起きることでSJS/TENや肝障害が惹起されると考えられているが、実験動物でSJS/TENや肝障害の再現に成功した例はない。そこでOXCをネガティブコントロールとして、CBZ誘導性皮膚および肝臓障害マウスモデルを確立し、そのメカニズムを免疫・代謝の両面から検討した。様々な投与条件を検討後、以下の投与方法が重篤な肝障害の作成に最適であることが明らかになった。すなわち、10週齢の雄性BALB/cマウスにCBZまたはOXCを4日間400 mg/kgを、5日目に800 mg/kgを経口投与した。最終投与から0-72時間後に解剖し、血漿中ALTおよびAST値を測定するとともに肝臓の組織学的な変化を解析した。最終投与後のCBZとその代謝物の血中濃度をLC-MS/MSで測定した。また、Cyp3aの阻害剤であるketoconazole (KTZ)、troleandomycin (TAO)と併用投与した際の血中ALTおよびAST値とともに薬物の血中濃度を測定した。炎症性サイトカインなどの肝障害時の肝臓におけるmRNA発現変動をreal-time RT-PCR

で、血中タンパク質量を ELISA で測定した。toll-like receptor (TLR) 4 のアンタゴニストである eritoran、モノクローナル anti-receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) 抗体またはモノクローナル IL-17 抗体を併用投与した後に血漿中 ALT および AST 値を測定した。上記の検討過程において、肝障害発症条件での投与において、全身性の皮膚障害を発症するマウスが散見された。そこで、同じ系統のマウスで、何度も検討を行ったが、重篤な皮膚障害については、散見されるのみであり、投与条件を確立することが出来なかった。本章(研究の方法)の最後に、免疫/炎症反応に焦点を絞ったさらなる検討条件をまとめて示した。

【DPHの検討】抗てんかん薬フェニトイン (DPH) は、肝障害や薬物過敏性症候群を引き起こす事が報告されている。ヒトにおける DPH 誘導性肝障害では、肝組織に免疫細胞の浸潤が認められる事から免疫因子の関与が示唆されている。さらに、SJS/TE の発症も報告されている。しかし、これまでに DPH 誘導性 SJS/TEN や肝障害モデル動物の報告はなく、その発症メカニズムは不明な点が多い。本研究では、DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作出し、免疫や炎症反応及び薬物代謝酵素による代謝的活性化の視点から、肝障害発症メカニズムを解析した。雌性 C57BL/6 マウスに DPH と L-buthionine sulfoximine (BSO) を 5 日間併用投与する事で肝障害モデルを作製し、肝臓中の抗酸化物質、免疫及び炎症に関する因子を測定した。P450 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (ABT) を併用投与し、代謝的活性化の影響を検討した。上記の検討過程において、肝障害発症条件での投与において、全身性の皮膚障害を発症するマウスが C57BL/6 マウスで散見された。そこで、同じ系統のマウスで、何度も検討を行ったが、重篤な皮膚障害については、散見されるのみであり、投与条件を確立することが出来なかった。CBZ と同様に本章の最後に、免疫/炎症反応に焦点を絞ったさらなる検討条件をまとめて示した。

【投与条件の検討】肝障害は肝臓の炎症であり、これが皮膚に発症すれば SJS/TEN という phenotype になる。肝臓における重篤な肝障害は重度の炎症をともなっており、サイトカインやケモカインが高濃度に血中に遊離してくるが、これらは肝臓に存在する免疫/炎症関連因子によって主に引き起こされており、他の臓器の関与は低いとされている。そこで、肝臓で生成された反応性代謝物(反応性中間体)が、皮膚での炎症に結びつくための機序を推定して以下のような様々な in vivo 投与方法を検討した。(1) 肝障害に共通する機序として、Toll-like receptor 4 (TLR4) の活性化が知られている。これを活性化する因子として、Propionibacterium acnes が知られている。したがって、市販の P. acnes を前投与(1 microg/mouse)を3または4日間投与して、TLR4 を活性化状態にした状態で、CBZ または DPH を投与した。(2) Pregnane X receptor (PXR)は、多くの体内動態関連因子の発現変動に関わっている。よって、代表的な誘導薬として、rifampicin を3日間前投与し、酵素誘導の状態にした後に検討した。(3) 逆の発想で、薬物代謝酵素類、特に cytochromeP450 の活性を抑制して、代謝能を抑えた状態の場合に、解毒反応が進行しにくいと考えた。よって、ABT で前処理して、P450 の活性を抑制した状態で、CBZ または DPH を投与した。(4) DAMPs (damage associated molecular patterns)は、TLR2 および TLR4 を介して、IL-1 β を誘導し、ストレス状態を誘発し、炎症が発症しやすい状況に関係している。DAMPs を上昇させる手段として尿酸を投与し、血中尿酸値を 7 mg/dL 程度として、薬物を併用する検討を行った。(5) グルタチオン解毒能を低下させる状態での検討も行った。しかしながら、様々な仮説に基づいた投与方法も、肝障害以上に全身性の皮膚等に炎症を増悪することは出来なかった。これには、げっ歯類の高い解毒能や薬剤耐性機能が一因であるかもしれない。または、種差に起因する反応性の違いが一因かもしれない。さらに、ヒトにおいては未知の SNP などに関与しており、その状態をげっ歯類で再現できていないことなど、様々な原因が考えられた。いずれにしても、例えば DPH では約 5

%の発症頻度で全身性皮膚発赤と脱毛が認められるものの再現性が極めて乏しい結果となり、実験成果として樹立した動物モデルとして確立することは困難であった。さらに、全身性皮膚発赤と脱毛が認められた個体においても、特別な免疫/炎症的な血清学的な因子を見いだすことも出来なかった。従って、CBZ および DPH とともに肝障害のマウスモデルは、世界で最初の報告であるため、炎症発症におよぼす因子の詳しい解析を行った。

4. 研究成果

CBZ を 4 日間 400 mg/kg を、5 日目に 800 mg/kg を投与した群において血中 ALT と AST 値の有意な上昇が認められ、肝組織染色において、著しいネクロシスが認められた一方で、OXC 投与群では肝障害は惹起されなかった。以降、肝障害の惹起された条件におけるメカニズムの詳細な検討を行った。血中濃度は CBZ、CBZ-10,11-epoxide および Trans-10,11-diOH CBZ において最終投与 1.5 時間後に最大値を示し、3-OH CBZ は 3 時間後に最大値を示した。Cyp3a 阻害剤を併用投与した際、CBZ 単独投与群と比較して、血中 ALT および AST 値の上昇が認められ、CBZ と 3-OH CBZ の血中濃度が上昇したが、CBZ-10,11-epoxide の血中濃度は減少した。また、肝障害が起きなかった CBZ の単回投与時の血中濃度は、CBZ と CBZ-10,11-epoxide の血中濃度の上昇と 3-OH CBZ の減少が認められた。3-OH CBZ はさらに代謝を受けると反応性代謝物となることが報告されており、CBZ 誘導性肝障害の発症に 3-OH CBZ が関与する可能性が示された。

炎症を惹起するカルシウム結合性蛋白質である S100A8、S100A9 およびそれらのレセプターである TLR4 と RAGE の肝臓 mRNA の上昇が認められた。また、CBZ 誘導性肝障害の発症に TLR4 または RAGE の活性化が関与するか検討し、TLR4 アンタゴニストまたは RAGE 抗体により、CBZ 誘導性肝障害が減弱された。TLR4 や RAGE

の活性化は、炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されており、CBZ 誘導性肝障害において、それらの関与が示唆された。

炎症性サイトカインやケモカインの mRNA を網羅的に解析したところ、IL-6 や IL-23 の mRNA の上昇が認められた。IL-6 や IL-23 は IL-17 という強力な炎症性サイトカインを誘導することから、血中 IL-17 と IL-23 タンパク質量を測定したところ、CBZ 誘導性肝障害時に上昇が認められた。IL-17 が CBZ 誘導性肝障害の発症に関与するか検討するために、IL-17 抗体を CBZ と併用投与したところ、血中 ALT と AST 値の減少が認められ、肝組織染色では好中球およびマクロファージの浸潤の減少が認められた。以上より、IL-17 は免疫系細胞の浸潤を介して、CBZ 誘導性肝障害の発症に関与することが示された。

CBZ は肝障害だけでなく、SJS および TEN などの皮膚に関する副作用報告が多く、約 1000 ~ 10000 人に 1 人の可能性で起こるとされている。CBZ による薬疹は TEN まで重症化すると約 40%致死率であるが、皮膚での副作用の動物モデルがないため発症メカニズムがほとんど分かっていない。Hung ら (2006) は human leukocyte antigen alleles は CBZ による皮膚の副作用と強い関連がある一方、CYP2B6 の変異も hypersensitivity の発症と強くはないが相関関係にあることを報告した。CYP2B6 は 3-OH CBZ を産生する主要な代謝酵素であり、3-OH CBZ は MPO という好中球に主に発現する酵素により酸化的代謝を受け、反応性代謝物になるとされている。皮膚における副作用の場合、肝臓で 3-OH CBZ が産生され、血中に放出され、皮膚近傍で MPO により代謝を受け薬疹を起こす可能性が考えられている。3-OH CBZ が毒性発現に関与するという類似点など、本研究で得られたデータが CBZ の皮膚の副作用のメカニズム検討に適用できる部分はある可能性があるが、今回のモデルではマウスの毛などに異常は発症は極めて頻度が低く、再現性が認められなかった。今後、CBZ による薬疹のメカニズム検討できるさらなる新しいモデルが必要であると思われる。本研究で作製した肝障害毛

デルと肝障害メカニズムの情報は、臨床における薬物誘導性肝障害発症の回避に繋がる研究に役立つものと期待される。

DPHとBSOの5日間の併用投与により、DPH最終投与後24-48時間後にALT値が有意に上昇した。自然免疫因子においては、NACHT, LRR and PYD domains-containing protein (NALP) 3, interleukin (IL)-1 mRNAの有意な発現上昇が見られ、血漿中high-mobility group box (HMGB) 1タンパク質の上昇が認められた。獲得免疫系ではRetinoic acid-related orphan receptor (ROR)- γ , IL-6, IL-23 mRNAの有意な発現上昇及び、血漿中IL-17タンパク質の上昇が認められたことから、T helper (Th) 17細胞の関与が示唆された。ABTの投与によりALT値の有意な低下が認められた。以上、DPH誘導性肝障害モデルマウスを作出し、肝障害発症における代謝的活性化及び免疫因子の関与を明らかにした。さらに、DPH誘導性肝障害モデルを応用して、さらなる免疫学的反応が憎悪し、全身性の炎症反応が起きる様々な条件を検討したが、肝臓に限局した反応以上の結果は得られなかった。以上、DPH誘導性肝障害を初めて報告し、これまでに特異体質性肝障害と分類させていた事象の機序を明らかにすることができた。この結果は、さらなる検討を経て、非臨床における特異体質性の薬物副作用の予測へと進展することが期待される。

5. 主な発表論文等(研究代表者には下線) 〔雑誌論文〕(計7件)

- 1) Azusa Yano, Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Development of a cell-based assay system considering drug metabolism and immune- and inflammatory-related factors for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, in press (2014). DOI:10.1016/j.toxlet.2014.04.005.(査読あり)
- 2) Eita Sasaki, Kentaro Matsuo, Azumi Iida, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami,

Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. *Toxicol. Sci.*, 136: 250-263 (2013).

DOI:10.1093/toxsci/kft184. (査読あり)

- 3) Satonori Higuchi, Azusa Yano, Shohei Takai, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, 130: 4-16 (2012). DOI:10.1093/toxsci/kfs222. (査読あり)
- 4) 織田進吾, 横井 毅. 薬物性肝障害における免疫・炎症因子の関与. *日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌* 8: in press (2014). 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会出版(査読なし)
- 5) 横井 毅. 薬物代謝と免疫・炎症を考慮した薬物性肝障害の理解と展望. *日本薬理学雑誌* 143: in press. (2014) 日本薬理学会出版. (査読あり)
- 6) 横井 毅. 薬物代謝と肝障害. *月刊薬事* 56: 21-25. (2014) じほう出版. (査読なし)
- 7) 横井 毅. 体内動態と薬物相互作用の基礎と応用-食品成分への展開-. *食品加工技術* 33: 7-13 (2013). 日本食品機械研究会出版(査読なし)

〔学会発表〕(計12件)

- 1) 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. シンポジウム「特異体質性薬物毒性の研究最前線」日本薬学会第134年会(招待講演)、2014年3月30日 熊本市青年会館ホール、熊本.
- 2) Tsuyoshi Yokoi, Eita Sasaki, Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Toshiyuki Kume. Identification of a P450-mediated hepatotoxicity-associated glutathione-conjugate of phenytoin in phenytoin-induced liver injury in mice. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March

- 23-27, 2014. Phenix コンベンションセンター, Phoenix, USA.
- 3) Eita Sasaki, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March 23-27, 2014. Phenix コンベンションセンター, Phoenix, USA.
- 4) 横井 毅. 薬の副作用発現の個人差と創薬. 名古屋大学 予防早期医療創成センター第4回ワークショップ(招待講演) 2014年1月29日 名古屋大学野依記念学術交流館、名古屋.
- 5) 横井 毅. 薬物性肝障害における免疫学的因子の関与 シンポジウム「薬疹の理解に必要な免疫学」第43回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会(招待講演)2013年11月29-31日 ホテル日航金沢、金沢市.
- 6) 横井 毅. Biomarkers for Drug-induced Liver Injury. Symposium at 28th Japanese Society for the study of Xenobiotics (JSSX) (招待講演)2013年10月9-11日、船堀タワーホール、江戸川区、東京都.
- 7) Eita Sasaki, Atsushi Iwamura, Toshiyuki Kume, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A reactive metabolite formed by P450, which is readily subjected to glutathione conjugation, would be causal for phenytoin-induced liver injury. 日本薬物動態学会第28回年会, 2013.10.9-11, ポスター 船堀タワーホール、江戸川区、東京都.
- 8) 松尾研太郎、樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅 : アザチオプリン誘導性肝障害マウスにおける発症メカニズムの解析 第40回日本毒学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター, 幕張メッセ、千葉.
- 9) 佐々木永太、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅 : フェニトイン誘導性肝障害マウスの作出と発症メカニズムの解明 第40回日本毒学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター, 幕張メッセ、千葉.
- 10) 横井 毅、薬物誘導性肝障害に免疫学的機序が果たす役割、第155回日本獣医学会学術集会、(招待講演)2013年3月30日、東京大学農学部講堂、文京区、東京.
- 11) Tsuyoshi Yokoi, Satonori Higuchi, Azusa Yano, Shohei Takai, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. 18th North American Regional Meeting, 2012.10.14-18, Poster, Dallas, USA.
- 12) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅 : カルバマゼピン誘導性肝障害における代謝的活性化と炎症の関与 第39回日本毒学会学術年会 2012.7.17-19 ポスター 仙台国際センター、仙台.
- 〔図書〕(計1件)
- (4) 横井 毅. 薬物代謝反応・代謝酵素の多様性と薬物相互作用の予測 総ページ204頁(198-204). 「*In vitro* 毒性・動態評価の最前線」小島肇監修、(2013) シーエムシー出版.
- 〔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
- (1) 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
- (2) 研究分担者
 なし