

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460629

研究課題名(和文)細胞内脂質輸送・代謝系を標的とした急性薬剤性肝傷害の画期的治療戦略

研究課題名(英文)Roles of NPC1 in development of drug-induced liver injury.

研究代表者

石塚 洋一 (Ishitsuka, Yoichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：70423655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な薬剤誘発性肝障害アセトアミノフェン(APAP)誘発肝障害の病態発症メカニズムにおけるNpc1遺伝子の役割について検討した。その結果、Npc1欠損マウスでは野生型マウスと比較して、APAP投与後に見られる肝障害が軽微であることが示された。また、CYP2E1の発現量および活性代謝物の産生は、Npc1欠損マウスと野生型マウスに顕著な差はなかった一方で、JNK経路の活性化、ニトロチロシン産生およびDNA断片化などの肝障害発症の重要な因子はNpc1欠損マウスで顕著に抑制されることを見出した。以上の結果から、Npc1はAPAP誘発肝障害の病態形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to evaluate the roles of Npc1 gene in the development of acetaminophen (APAP)-induced liver injury in mice. We observed that Npc1 null mice were protected from hepatotoxicity induced by APAP overdose compared with wild-type mice. Although significant difference was not observed in CYP2E1 expression and toxic metabolite production in liver, the key mediators in APAP hepatotoxicity, such as JNK phosphorylation, nitrotyrosine formation and DNA fragmentation were significantly attenuated in Npc1 null mice. These results suggest that Npc1, at least in part, play an important role in the development of APAP-induced liver injury.

研究分野：応用薬理学、医療薬学

キーワード：薬剤性肝障害 アセトアミノフェン NPC1 医薬品有害反応

1. 研究開始当初の背景

アセトアミノフェン(APAP)は一般用医薬品にも配合される解熱鎮痛薬として古くから世界中で汎用されている。ロキソプロフェンやジクロフェナクなどの非ステロイド性抗炎症薬と比較して胃腸障害やライ症候群発症など副作用の発現頻度は低いと、小児や高齢者、妊婦にも安全に使用できる。また、緩和医療においては、最近では本邦でも高用量 APAP が用いられている。このように基本的には安全性が高い APAP であるが、小児の誤飲や自殺企図などで過量服用された際にはほぼ確実に中毒性の肝傷害を誘発する。世界保健機構 WHO のデータでは重篤な薬剤性肝傷害の約 40% は APAP が原因と報告されており、薬剤性肝傷害の最も代表的な起因薬物として問題視され、現在も世界中で精力的な研究が行われている。

APAP 中毒に対する唯一の治療薬である N-アセチルシステイン(NAC)は、APAP の毒性代謝物 N-acetyl-p-benzoquinone imine を解毒・抱合するグルタチオンの補充作用や抗炎症・抗酸化作用により効果を示すが、NAC による十分な治療効果が得られないケースが多数存在することや催吐作用等により治療継続が困難な例も多い。したがって救命・救急医療の現場では、NAC に勝る新規治療薬の開発が切望されている。

申請者は、これまでの科研費補助金研究にて、アセトアミノフェン肝傷害モデルに対するオザグレリル塩酸塩の卓越した有効性(特開 2012-102029, *BMC Gastroenterol.* 13, 21, 2013)、肝傷害発症における小胞体ストレスの関与および小胞体ストレス抑制薬 4PBA の有効性(*Pharmacol Res.* 87, 26-41, 2014)、3次元培養法を用いた *in vitro* アセトアミノフェン肝傷害モデルの有用性(*J Pharmacol Sci.* 124, 218-229, 2014)を明らかにしてきた。これらの研究技術を基盤に、我々が保有するケミカルライブラリによる治療薬候補化合物の網羅的解析したところ、興味深いことに細胞内コレステロール輸送担体 Niemann-Pick type C1 の阻害物質 U18666A が肝細胞傷害抑制効果を発揮することを発見した。

Niemann-Pick type C1(NPC1)は細胞内小胞であるリソソーム(lysosome)に存在し、sterol-sensing domain を有する細胞内コレステロール輸送を担うタンパク質である。NPC1 と疾患の関わりは、脂質代謝異常を呈する劣性遺伝病 NPC 病が知られているが、薬剤性肝傷害の発症に関与することは理論的には考えにくい。しかし、近年、エボラ出血熱やマールブルグ出血熱の原因ウィルスの細胞質内放出に NPC1 タンパク質が必要であり、NPC1 遺伝子欠損マウスではウィルス感染率と死亡率が顕著に低下することが報告され(*Nature*, 477, 340, 2011)、NPC 病以外の疾患にも、脂質輸送等は異なる機序で NPC1 が病態形成に必須の役割を果たすことが示唆されている。これらの知見と示した NPC1 阻害物質 U18666A の結果と併せて勘案し、“脂質輸送担体の NPC1 が、アセトアミ

ノフェン誘発肝傷害の発症にも必須の因子では”と考えるに至った。

2. 研究の目的

リソソームに存在し細胞内コレステロール輸送を司るタンパク質である Niemann-Pick type C1(NPC1)が脂質輸送だけでなく“薬剤性肝傷害発症にも必須の因子である”との仮説を立て、本研究では、肝傷害発症における NPC1 の役割解明、Drug repositioning の観点から、NPC1 機能を制御する既存薬の肝傷害治療薬としての新たな可能性評価を行うことで、アセトアミノフェンをはじめとする重篤な急性薬剤性肝傷害に対する新規治療戦略としての NPC1 制御の可能性を検証する。

3. 研究の方法

試薬・実験動物

APAP は、Sigma 社(St.Louis, Missouri, USA)より購入したもので、マウスは *Npc1*^{-/-} マウス(BALB/cNctr-*Npc1*^{m1N})を用いた。コントロールとして野生型マウス BALB/cNctr を用いた。これらのマウスは、山陰労災病院の大野耕策博士、鳥取大学の檜垣克美博士より供与して頂いた。また、熊本大学、生命資源研究・支援センター、動物資源開発研究部門(CARD)協力のもと、体外受精により生産を行った。全ての動物実験は、熊本大学動物実験指針および倫理規定に則して行った。マウスは、12 時間の明暗サイクル下(明期: 8:00-20:00)で、不断給餌により飼育した。

2) APAP 肝障害モデルマウスの作製
APAP 肝障害マウスモデルは APAP (400 mg/kg)を PBS(phosphate buffered saline)に溶解(約 60)し、各種マウスに腹腔内投与することで作成した。

3) サンプルの採取

APAP 投与後、各時間経過後、マウスにジエチルエーテルによる吸入麻酔を施し、メスにて開腹して腹部大静脈よりテルモシリンジ 1 mL SS-01T ツベルクリン用およびテルモ注射針 26 G × 1/2 S・B(TERUMO corporation, Tokyo, Japan)にて採血を行った。血清サンプルは常温で 30-50 分間インキュベーションし、遠心分離(12000 g, 10 分, 4)後、上清を採取した。摘出した肝臓サンプルは 3 つの群に分け保存した。1 葉は 10 %中性緩衝ホルマリン溶液で組織固定を行い、残った部分より約 150 mg は 500 μ L の radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer(和光純薬工業株式会社製, Japan)を加えホモジナイズし、上清をタンパク抽出液とし Western blotting 用サンプルとして -80 で保存した。そしてその他の肝組織は全てまとめて -80 で保存した。

4) 血清 ALT 値の測定
血清サンプルをスポットケム TM GPT および SPOTCHEM™ EZ SP-4430 (アークレイ株式会社, Japan) を用い、手順に従い測定した。

5) H&E 染色、TUNEL assay、Nitrotyrosine 免疫染色
10 %中性緩衝ホルマリン溶液で組織固定を行った肝サンプルを用いて、病理組織標本を作成した。定法により固定組織をパラフィン包埋し、マイクロトームにより約 3 μm の薄切標本を作成した後、hematoxylin and eosin (H&E) 重染色、terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate nick-end labeling (TUNEL) assay、免疫染色 (nitrotyrosine 抗体) を行った。染色した肝臓切片は KEYENCE BIOREVO BZ-9000 (Keyence 株式会社, Osaka, Japan) を用いて撮影した。

6) APAP-protein adducts 測定
APAP の代謝物である NAPQI がタンパク質に共有結合 (APAP-protein adducts) することで毒性が発現すると言われている。NAPQI はタンパク質の主にシステイン残基に共有結合するため、APAP-protein adducts をプロテアーゼ処理することで APAP と cysteine が共有結合したもの (APAP-CYS) が得られる。HPLC-electrochemical detection (HPLC-ECD) を用いて APAP-CYS の定量を行った。肝臓組織に PBS (pH 7.4) 5 mL を加えてホモジナイズ後、遠心分離 (12000 g, 4, 20 分) を行い、上清を試料とした。調製した試料を NANOSEP® (Pall Corporation N, USA) を用いて洗浄・ろ過し、8 unit/mL protease (Sigma Chemical Co. MO, USA) を加えて 50 で 16 時間インキュベートして APAP-CYS を得た。HPLC は PU-980 (JASCO Corp/Tokyo, Japan)、ECD は Coulochem model 5200 detector (ESA Bedford, MA, USA) を用いて検出し、インジェクタは 851-AS (JASCO Corp.) を用いて 25 μL 注入した。移動相として pH 4.8 に調製した 50 mM sodium acetate 7% methanol を用いた。流速は 1.0 mL/min で逆相カラム COSMOSIL (Nacalai Tesque) を用いて、23 min 流動させた。検出限界は 1 μA に調整した。カラムの温度 40、検出器の電圧は 400 mV で行った。

7) Western blotting 法
Western blotting 用サンプルとして保存されたタンパク抽出液を用い、BCA protein assay kit (Thermo Scientific 社製) を用いタンパク質定量を行い濃度の補正を行った。その後 0.5 M/ 1.5 M Tris-HCL, 40%

acrylamide, 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) N.N.N',N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (Sigma 社製) 25% ammonium persulfate (APS) により作製したポリアクリルアミドゲルを用い、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて分離し、ニトロセルロース膜に転写した。0.1 % PBS-T (phosphate buffered saline + polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate) に 5 % skim milk を溶解したブロッキングバッファーにて膜を固定し、抗体反応を行った。一次抗体として CYP2E1、CYP1A2 (Abcam plc, Cambridge, UK)、JNK、p-JNK、 α -actin 抗体 (Cell Signaling Technology 社製) (すべて 1:1000) を一晩反応させ、二次抗体として anti-rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling Technology 社製) (1:3000) を

1 時間反応させた。抗体除去後、膜を PBS-T で洗浄した。抗体の検出には SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific 社製) を用いた化学発光法にて行い、発光シグナルは Image Quant LAS-4000 (FUJIFIRM 社製, Japan) を用いて可視化した。Band の定量化には Image J を用いた。

4. 研究成果

Npc1 遺伝子のホモ欠損、ヘテロ欠損マウスおよび野生型マウスにアセトアミノフェン (400 mg/kg) を投与したところ、ホモ欠損マウスでは、野生型と比較し、血液生化学パラメータ (AST および ALT) の上昇および肝細胞の小葉中心性壊死および TUNEL 染色で評価される DNA 断片化が顕著に抑制された。一方、ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスと比較して、顕著な変化が見られなかった。また、各種環状オリゴ糖で誘発される肝障害に対しても、野生型およびヘテロ欠損マウスと比較して、ホモ欠損マウスでは軽減された。以上の結果から、*Npc1* 欠損マウスは、薬剤誘発性肝障害に対し抵抗性を示すことが示唆された。

NPC1 阻害作用を有することが知られている薬物のうち、臨床でも使用される薬物であるアミトリプチリンを用い、アセトアミノフェン誘発肝障害におよぼす影響を調べたところ、アミトリプチリン投与による顕著な変化は見られなかった。

メカニズムを明らかにするため、アセトアミノフェン誘発肝障害の病態形成に重要な役割を果たす c-Jun N-terminal kinases (JNK) 経路の活性化におよぼす影響を調べたところ、野生型マウスと比較して、*Npc1* 欠損マウスでは JNK 経路活性化を示すリン酸化 JNK の発現が顕著に軽減されていた。また、*Npc1* 欠損マウスでは、APAP 肝障害においてみられる酸化ストレスの指標となるニトロチロシン化タンパク質量の増加も非常に軽度で

あった。Npc1 欠損マウスにおいて、APAP 代謝に主に関わるとされる CYP2E1 においてその発現量に野生型マウスとの有意な差は見られなかった。さらに APAP 投与後の APAP-protein adducts 量においても両マウス間で有意な差は見られなかった。これより、NPC モデルマウスにおいて少なくとも毒性が発現する量の NAPQI が生成していることが示された。

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 3 件)

石塚洋一、佐々木健太、近藤悠希、入江徹美、アセトアミノフェン誘発肝傷害モデルマウスにおけるミトコンドリア標的型抗酸化剤の有効性評価。第 90 回日本薬理学会年会(2017 年 03 月 15 日)、長崎市

柚木崎美織、石塚洋一、近藤悠希、竹尾透、中瀬直己、江良択実、東大志、本山敬一、有馬英俊、松尾宗明、檜垣克美、大野耕策、入江徹美、Niemann-Pick 病 C 型モデルマウスにおけるアセトアミノフェン肝障害リスクの検討。第 33 回日本薬学会九州支部大会(2016 年 12 月 03 日)、鹿児島市

佐々木健太、石塚洋一、近藤悠希、宮田敬士、尾池雄一、入江徹美、薬剤性肝障害発症における CCAAT/enhancer binding protein homologous protein(CHOP)の役割。第 9 回トランスポーター研究会九州部会(2016 年 10 月 01 日)、宮崎市

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石塚 洋一 (ISHITSUKA, Yoichi)
熊本大学・生命科学研究部・准教授
研究者番号：70423655

(2)研究分担者

江良 択実 (ERA, Takumi)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：00273706

竹尾 透 (TAKEO, Toru)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・講師

研究者番号：10517014

中瀬 直己 (NAKAGATA, Naomi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：30159058

(3)連携研究者

入江 徹美 (IRIE, Tetsumi)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：60150546

(4)研究協力者

()