

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390037

研究課題名(和文) MHC発現量を考慮した薬剤性肝障害の増悪・劇症化予測のための基盤研究

研究課題名(英文) Basis study for the prediction of fatal DILI risk based on MHC expression in the liver

研究代表者

伊藤 晃成 (Ito, Kousei)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30323405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品はごく稀に特定の患者で致死的な肝障害を引き起こす。原因は免疫系の個人差によると考えられている。個人差を含め動物で肝障害を再現することは困難だが、本研究ではこれを再現しうる動物の作出に成功した。将来的にこのマウスを使って事前にそのリスクが評価できる可能性がある。また、将来的にこのマウスにより鋭敏に毒性リスクを判定するための条件を決めるとともに背景機序についても明らかにすることができた。さらに、動物を用いることなく毒性評価が可能となる新たな実験系も構築した。

研究成果の概要(英文)：The pharmaceutical products extremely rarely cause a fatal liver damage in some patients. It is owing to the individual difference of the immune system. It was difficult to reproduce a liver damage in animals including individual difference. We have succeeded in construction of new model mice possibly overcoming such problem. We will be able to evaluate the risk of DILI aggravation with such mice in the future. In addition, we found a better condition to evaluate a drug toxicity with this mice model and also clarified its background mechanism. Furthermore, we built an in vitro experimental system that enabled us to evaluate aggravation of DILI without using an animal.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：特異体質毒性 薬物性肝障害 HLA 増悪

1. 研究開始当初の背景

薬剤性肝障害 (DILI) は、稀だがほぼ全ての薬物で生じること、劇症化後の致死率が高いことから、前臨床・臨床それぞれの場面で、劇症化する可能性のある薬物のスクリーニング、患者の判別が特に重要であるが、その方法は確立されていない。

(1) 近年、薬剤による特異体質毒性の発症と免疫系因子であるヒト白血球抗原 (HLA) 多型との関連性がゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果から数多く報告されている。例えば、HLA-B*57:01 多型とアバカビル服用による薬剤性過敏症あるいはフルクロキサシリンによる肝障害、HLA-B*15:02 多型とカルバマゼピン服用によるスティープンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症の発症などで相関が認められている。

(2) DILI を実験動物で再現するのは一般に困難である。実際に多くの薬物を単独で動物に大量に投与しても肝障害は生じにくい。これに対し、少量の LPS を前投与したラットに DILI 誘発薬物を投与すると血清 ALT 値の上昇を伴う DILI 様の症状が再現できることが報告されている。この LPS との併用条件が上記で作製した HLA-Tg マウスでの肝障害発症・増悪試験に応用できる可能性がある。

(3) 肝臓は薬物などの異物に高濃度曝されるため、障害に対して高い修復能を有する。DILI は多くの場合、服用中止により回復するが、ごく稀に増悪し劇症化することもあるため臨床で大きな問題となっている。ここで、薬物による修復過程の阻害が肝障害増悪に関わると考え、特にこの修復過程で肝細胞間に形成される毛細胆管構造に着目することとした。毛細胆管構造は胆汁排泄や解毒機能に必須な構造であり、形成不全は胆汁うっ滞の長期化、ひいては肝障害増悪につながると考えられる。

(4) DILI は、ALT/AST 上昇が優位な肝細胞障害型、ALP 上昇が優位な胆汁うっ滞型、両者の混合型に大別され、報告によって差はあるものの、概ね臨床ではそれぞれ約 6 割、2 割、2 割を占める。胆汁うっ滞型 DILI は胆汁の流れが滞り、胆汁成分が肝細胞内や血中に逆流するために起こると考えられている。胆汁の主要成分である胆汁酸は、肝細胞胆管側に発現する Bile salt export pump (BSEP) により濃縮的に胆汁に排泄される。BSEP 機能を阻害する薬剤は胆汁うっ滞型 DILI 発症に繋がるとの理屈から、BSEP 輸送機能評価系 (膜ベシクル法) を用いた薬剤スクリーニング系が提唱されている。しかし、BSEP 以外の要因、例えば血管側に発現する胆汁酸排泄輸送体などは考慮されておらず、現に偽陰性を生じる薬剤が多いなど精度面で改良の

余地があると思われる。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、薬剤性肝障害の増悪・劇症化を予測するためのツール・方法論の構築である。そこでまず、1) DILI が発症・増悪する過程で、近年報告が増えつつあるヒトリンパ球抗原 HLA (動物一般には主要組織適合抗原 MHC) に着目し、適切な HLA 分子種を動物肝臓に十分量発現させることで、免疫系を介した DILI 増悪過程を再現する動物モデルの作出を試みた。HLA のみを発現させて医薬品を投与するだけでは肝障害の発症に至らない可能性がある。細胞傷害性 T 細胞の活性化には自然免疫系の活性化の必要も考えられるため、並行して、2) 炎症性物質のリポ多糖 (LPS) と薬物の併用による肝障害の発症条件の探索を行い、LPS 併用時に肝細胞がどのようなメカニズムで DILI 感受性が増強するのかのメカニズム解明を試みた。一方で、DILI 増悪は“肝細胞の分化再生不全”という文脈での解釈も可能である。そこで、この観点から、DILI 増悪リスクを評価するための新規 *in vitro* 系の構築を行い、臨床での DILI リスクとの対応を調べた。具体的には 3) 毛細胆管伸長阻害の観点からの系構築と、4) 胆汁酸依存性肝細胞傷害の観点からの系構築を試みた。

3. 研究の方法

(1) HLA 発現トランスジェニックマウスの作製

マウス肝臓における MHC 発現量解析：MHC 発現量の定量：マウス各臓器 (肝臓、腎臓、脾臓、小腸) から mRNA を調製した。MHC 分子種のうち、H-2K(b) について半定量 PCR 法により臓器発現量を相対比較した。発現量はアクチンで補正した。

HLA-B*5701(03) トランスジェニックマウスの作製：HLA-B*5701 の 3 ドメインをマウス型に置き換えたキメラ型 HLA-B*5701 を設計した。これとヒト 2m をピコルナウイルス由来のポリシストロン配列 (2A peptide 配列) で繋いだ。これら遺伝子を CAG ベクターにサブクローニングし、ヒト HLA を高発現する遺伝子導入マウス (キメラ型 HLA-Tg) の作出を試みた。陰性対照として HLA-B*57:01 と 2 塩基のみ異なる HLA-B*57:03 遺伝子の導入マウスを同様に作出した。

(2) LPS による DILI 感受性増大メカニズムの解明

Wistar 系ラットを用いた LPS 処置による影響の検討：ラットに LPS (1 mg/kg, *i.p.*) 及びヘパリン (3000 units/kg, *s.c.*) を処置し、2 時間後に DIC (100 mg/kg, *i.p.*) を投与し、さらに 12 時間後の血清 ALT を測定することで肝障害の有無を評価した。ラットに LPS 及びヘパリンを処置した 2 時間後に肝臓及び肝ミトコンドリアを単離し、呼吸機能、酸化ストレ

スを評価した。また、単離したミトコンドリアに DIC を添加し、その後のミトコンドリア膨潤 (swelling) を調べることでミトコンドリア毒性を評価した。ラット初代培養肝細胞を用いた検討：細胞を O₂ 濃度 1% で 4 時間インキュベートし、その後 O₂ 濃度 20% に戻すことで一過性の低酸素ストレスを *in vitro* で再現した。このときの細胞内 Ca²⁺ 濃度や薬物に対する毒性感受性への影響を評価した。

(3) 毛細胆管伸長阻害を指標とする肝障害増悪評価系の構築

ラットサンドイッチ培養肝細胞 (SCRH) 培養 2 日目に各種薬物を曝露し 24 時間後に回収した。毛細胆管の指標として毛細胆管に発現するトランスポーターである Mrp2 と細胞骨格である f-actin を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて画像を取得した。Mrp2 と f-actin の共染色部位を毛細胆管と見なし、複数視野内における毛細胆管長の合計を細胞数で除することで毛細胆管伸長を評価した。

(4) 胆汁酸に依存した肝細胞毒性評価系の構築

臨床における DILI リスクの調査：医薬品医療機器総合機構 (PMDA) 医薬品副作用データベース、医薬品インタビューフォーム (IF) をもとに臨床における医薬品の DILI リスクを調査した。胆汁うっ滞型 DILI リスクの大小を鑑みて 44 薬剤を抽出し、引き続き IF から ALP 上昇頻度、GT 上昇頻度情報の収集を行った。最終的に ALP 上昇頻度については 31 薬剤 (0.006%–5.6%: 中央値 0.22%)、GT については 28 薬剤 (0.004%–16.4%: 中央値 0.45%) の情報を得た。

SCH での毒性評価：上記 44 薬剤に対し、ラット SCH (rSCH) の系で曝露濃度 50 μM、24 時間曝露の一律条件下で胆汁酸依存性毒性を評価した。添加した胆汁酸はヒト血清中に存在するもののうち一般的な 12 分子種の混合物とし、正常時の 100–150 倍程度の濃度とした。

データ解析：ALP 上昇頻度と GT 上昇頻度の中央値をそれぞれ閾値として、この値以上をリスク有と設定した。*in vitro* 毒性データからの肝障害マーカー上昇リスク識別性について ROC 解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス肝臓における MHC 発現量の半定量比較を行ったところ、予想に反して肝臓における MHC 発現量は他臓器に比べてほぼ変わらなかった (腎臓、小腸と同程度、脾臓の半分程度)。すなわち動物において DILI が起こりにくい理由として、肝臓における MHC 発現量が低いという仮説は必ずしも正しくなく、むしろ薬物と相互作用する特異的な MHC 分子種を動物が持っていないことが大きな理由と考えられた。そこで、フルクロキサシリン

による DILI 発症との関連が過去に報告されている HLA-B*5701 分子種をマウス肝臓に強制発現させることを試みた。HLA がマウス T 細胞によって認識される必要があるため、一部のドメインをマウス型に置換したキメラ型 HLA-B*57:01 遺伝子を構築し、さらに HLA 複合体を沈降するために FLAG タグを C 末に付加した。また、導入した HLA の細胞表面上での安定性を向上させるため 2m 遺伝子と等モル導入されるようなコンストラクトとした。キメラ型 HLA-B*57:01 およびヒト 2m 遺伝子の共導入は、マウスの出生過程には大きな影響を及ぼさず、成長過程における外見上の違いも認められなかった。また、キメラ型 HLA-Tg およびそのリッターメイトの野生型より各種臓器を回収し、HLA の mRNA およびタンパク質の発現レベルを検討したところ、mRNA は検討したすべての臓器に、タンパク質は皮膚や肝臓などの複数臓器に確認できた。また、複数の Tg ラインのマウス全血から末梢血単核球 (PBMC) を単離し、フローサイトメトリーを用いて細胞表面上の HLA 発現量を野生型と比較したところ、導入した HLA の十分な発現を認めるラインを確認した。肝細胞を単離してフローサイトメータにより HLA の細胞表面発現を調べたところ、リッターメイトコントロールに比較して有意なシグナル増強を認め、目的とする肝細胞に HLA 蛋白質が機能的に発現しているものと考えられた。

(2) LPS 前処置により DIC 単独投与では見られない血清 ALT 値の上昇が見られ、ヘパリン併用により LPS-DIC 併用による肝毒性発現が抑制された。また、LPS を投与したラット肝臓から単離したミトコンドリアでは、酸化ストレスによりカルジオリピン (MPT pore の安定化などミトコンドリア諸機能に関わるリン脂質) の酸化体比率が上昇していた。過去にカルジオリピンの酸化が、ミトコンドリアの MPT を引き起こしやすくするとの報告があったため 3)、ミトコンドリアに DIC を曝露して MPT を評価したところ、実際に LPS 処置群から単離した肝ミトコンドリアにおいて DIC による MPT の増強が確認された。これら LPS による一連の影響は、ヘパリン併用により全て抑制されたことから MPT 感受性亢進に虚血の関与が示唆された。一方、ラット肝細胞を用いた実験では低酸素により、DIC の毒性が有意に上昇した。このとき、MPT 感受性亢進の原因となる細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が観察され、さらに小胞体 (ER) からの Ca²⁺ 放出を増加させる Thapsigargin (TG) 処置によっても同様に DIC による毒性増強が見られた。これらの結果から低酸素ストレスによる MPT 感受性が DIC による毒性増強に関わっていると考えられた。

以上より、LPS 投与後の肝臓では、一過性虚血による酸化ストレスの発生、ならびに細胞内 Ca²⁺ 上昇によってミトコンドリアの MPT 感受性が高まり、その結果低酸素ストレスに

よる DILI を発症しやすくなっていると考えられた。

(3) 過去に劇症型肝障害が原因で市場撤退したトログリタゾン、小葉間胆管消失による急性胆汁うっ滞とこれに引き続く長期の胆汁うっ滞が報告されているイミプラミン、クロルプロマジンなどで著しい毛細胆管伸長抑制を確認した。これら抑制は LDH 漏出、細胞内 ATP 減少を伴わないことから、細胞死による二次的影響ではないと考えられる。様々な解析法を試みた結果、毛細胆管伸長に対する阻害能 (IC50) と臨床投与量との比を算出することで、臨床における重篤な DILI リスクが最も高い薬物群 (黒枠警告・市販後撤退) とその他の比較的安全な薬物群を分離できることが示唆された。本 in vitro 評価系は前臨床段階で DILI の増悪・劇症化予測に有用な系となる可能性がある。

(4) ALP については in vitro での胆汁酸依存性毒性の境界値を 12.2%とした場合に最も良好な識別結果を与え(感度 75%/特異度 78%)、また GT についても in vitro の胆汁酸依存性毒性の境界を 8.6%とした場合に最も良好な識別結果を与えた(感度 92%/特異度 92%)。さらにヒト SCH (hSCH) についても同薬剤セットについて in vitro 毒性データを取得した。その結果、一部の薬剤では in vitro 毒性値が rSCH と hSCH の間で 1:1 の相関ラインから外れたものの、全体としては正の相関を認めた ($r=0.651$, $p<0.001$)。hSCH の結果を元に、rSCH での解析と同様の手法で ALP、GT 上昇頻度を識別可能か検証した。その結果、hSCH でも rSCH と同程度に肝障害マーカー上昇リスクの識別が可能であった。従来法との比較のため、BSEP 発現膜ペシクルで報告されている IC50 値を用いた ROC 解析も行ったところ、ALP、GT のいずれも感度 50%前後、特異度 70%程度であり、rSCH/hSCH 系からの識別精度に比べて低かった。

本研究の最終目的は、DILI の増悪・劇症化を予測するためのツール・方法論の構築である。ヒトにはあって動物には絶対に欠けている HLA を導入したモデルマウスの作出に成功した。将来的にこのマウスに薬物を連投して DILI 増悪を再現する予定だが、その際にも薬物に対する毒性感受性を可能な限り高めておく必要がある。LPS は自然免疫活性化を介して薬物に対する肝細胞死感受性を高めることが知られ、また同時に獲得免疫の活性化、すなわち先の HLA 導入マウスにおいて薬物の免疫感作を成立させるためにも有効と期待される。これに関連して本研究では、LPS による薬物感受性の増強メカニズムの詳細を明らかにすることができた。DILI 増悪の背景には HLA を中心とする免疫学的な側面のほかに、傷害によって失われた肝細胞の補充、すなわち肝前駆細胞あるいは肝幹細胞から

の増殖・分化の過程も重要と考えられる。この観点から、毛細胆管伸長に対する阻害を指標とした新たな DILI 増悪リスク評価系の構築に成功した。また、胆汁酸蓄積による肝毒性は数ある肝障害リスク要因の中でも特に重要なものの一つとされていることから、最後に述べた胆汁酸依存性肝毒性評価系も DILI 増悪リスクを評価する上で有効と考えられる。

本研究を通じて得られた HLA-Tg マウス、ならびに周辺の知見や評価系は、これまで困難とされた HLA (MHC) の関わる特異体質性 DILI の発症～増悪～劇症化のメカニズム解明と予測法構築に向けた重要な基盤になると期待される。

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 5 件、いずれも査読有)

T. Susukida, S. Sekine, M. Nozaki, M. Tokizono, K. Oizumi, T. Horie, K. Ito, Establishment of a Drug-Induced, Bile Acid-Dependent Hepatotoxicity Model Using HepaRG Cells, J Pharm Sci, 105 (2016) 1550-1560.

T. Susukida, S. Sekine, E. Ogimura, S. Aoki, K. Oizumi, T. Horie, K. Ito, Basal efflux of bile acids contributes to drug-induced bile acid-dependent hepatocyte toxicity in rat sandwich-cultured hepatocytes, Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA, 29 (2015) 1454-1463.

T. Susukida, S. Sekine, M. Nozaki, M. Tokizono, K. Ito, Prediction of the Clinical Risk of Drug-Induced Cholestatic Liver Injury Using an In Vitro Sandwich Cultured Hepatocyte Assay, Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 43 (2015) 1760-1768.

M. Shirakawa, S. Sekine, A. Tanaka, T. Horie, K. Ito, Metabolic activation of hepatotoxic drug (benzbromarone) induced mitochondrial membrane permeability transition, Toxicology and applied pharmacology, 288 (2015) 12-18.

K. Kosaka, T. Watanabe, T. Susukida, S. Aoki, S. Sekine, T. Kume, K. Ito, Key determinants of the circulatory exposure of organic anions: differences in hepatic uptake between multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2)-deficient rats and wild-type rats, Xenobiotica, 45 (2015) 556-562.

[学会発表](計 36 件)

A. Takemura, A. Izaki, S. Sekine, K. Ito, Troglitazone-sulfate strongly inhibits bile canalicular network formation in vitro 日本薬物動態学会第 30 年会, 東京 (2015 年 11 月 10 日 ~ 12 日).

T. Susukida, S. Sekine, M. Nozaki, M. Tokizono, K. Ito, SANDWICH CULTURED HUMAN HEPATOCYTE ASSAY FOR PREDICTION OF THE CLINICAL RISK OF CHOLESTATIC DRUG-INDUCED LIVER INJURY, 日本薬物動態学会第 30 年会, 東京 (2015 年 11 月 10 日 ~ 12 日).

C. Liu, S. Aoki, K. Kogo, S. Fujimori, S. Sekine, K. Ito, CHIMERIC HLA-B*57:01 TRANSGENIC MICE ENABLE THE COMPREHENSION OF IMMUNE-MEDIATED DRUG HYPERSENSITIVITY REACTIONS 日本薬物動態学会第 30 年会, 東京 (2015 年 11 月 10 日 ~ 12 日).

荒川公一, 関根秀一, 佐藤智之, 伊藤晃成, LPS 前投与ラットにおける薬剤性肝障害感受性増強のメカニズム研究, 第 42 回日本毒性学会学術年会, 金沢 (2015 年 6 月 28 日 ~ 7 月 1 日).
(他 3 2 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yakuzai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 晃成 (ITO, Kousei)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号 : 30323405

(2) 研究分担者

関根 秀一 (SEKINE, Shuichi)
千葉大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号 : 70401007

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :