

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21057

研究課題名(和文)薬物代謝および免疫因子を考慮した薬物性肝障害のin vitroリスク評価系の開発

研究課題名(英文) Establishment of a novel cell-based assay for detection of potential drug-induced liver injury by considering immune- and inflammatory-related factors

研究代表者

織田 進吾 (ODA, Shingo)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：10725534

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)：薬物性肝障害in vitro予測評価系として、薬物代謝反応を考慮し、免疫・炎症関連遺伝子発現量をマーカーとすることの有用性を検証した。薬物代謝酵素を発現するヒト肝癌由来HepaRG細胞または発現の低いHepG2細胞へ被験薬剤を処置し、培養上清をヒト白血病由来HL-60細胞に処置した。HepaRG培養上清を処置したHL-60におけるIL-8 mRNA発現量のROC-AUCは0.758であり、HepG2培養上清よりも高値であった。S100A9、IL-1beta及びIL-8の総和値によるROC-AUCは最も高値(0.819)であり、複数のパラメーターを考慮することでDILIの予測性が向上した。

研究成果の概要(英文)：This study sought to develop a novel cell-based assay for detecting potential drug-induced liver injury (DILI) by considering drug metabolism as well as immune- and inflammatory-related factors. Human hepatoma HepaRG or HepG2 cells were treated with drugs with different clinical DILI risks. The conditioned media were subsequently used to treat human promyelocytic leukemia HL-60 cells, and the mRNA expression levels were measured. ROC-AUC was calculated to evaluate the predictive performance of each gene mRNA as a marker to assess DILI risk. The expression of IL-8 in HL-60 cells treated with conditioned media from HepaRG cells (HL-60/HepaRG) exhibited the highest ROC-AUC value of 0.758. An integrated score calculated from the levels of S100A9, IL-1beta, and IL-8 more precisely determined the DILI risks than individual gene expression did. The developed cell-based assay using immune-related gene expression would be useful for the detection of potential DILI risks.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：薬物性肝障害 薬物代謝 in vitroアッセイ 免疫 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において安全性確保のために、実験動物を用いた毒性及び薬物動態試験が実施されることで、多くの毒性・副作用が検出される。しかし、頻度が稀な毒性反応・副作用については非臨床または臨床では見落とされることが多く、臨床開発後期または市販後に発現することが少なくない。特に、市販後の医薬品が市場から撤退する理由の約30%が薬物性肝障害 (DILI) であり、最も重要な問題である。

DILI発症メカニズムは完全には解明されていないものの、近年の研究から「反応性代謝物生成」、「投与量」、「免疫・炎症反応」がDILI発症と関係することが示唆されている。反応性代謝物生成を捉える目的として、「グルタチオントラッピングアッセイ」、「共有結合量」等の試験系が開発されてきた。さらにヒト肝癌由来細胞への薬物暴露後に「活性酸素種産生」や「ミトコンドリア膜電位」等を蛍光染色により分析するハイコンテンツスクリーニングも普及してきた。しかし、十分な予測性を得られていないことが問題である (Arch Toxicol 80:580-604, 2006)。

上述の試験系は肝細胞のみを用いた試験系であり、肝障害の発症メカニズムの一部を考慮したのみであることが予測性の低い原因であると考えた。そこで、「免疫・炎症反応」を試験系に取り入れる為に、肝障害を引き起こす種々の臨床使用薬を用いて肝障害発症モデルマウスを作製し、薬物性肝障害発症に共通するバイオマーカーの探索を試みた。その結果、DILI被疑薬投与マウス肝で共通にS100 calcium binding protein A8 (S100A8), S100A9, receptor for advanced glycation endproducts (RAGE), interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), macrophage inflammatory protein 2-alpha (MIP-2a, CXCL2) mRNAが発現上昇することを明らかにした (Toxicol Lett 228:13-24, 2014)。S100A8/A9 は肝実質またはKupffer細胞より放出されるダメージ

に関連分子パターン (DAMP) として知られ、RAGEはその受容体である。また、IL-1 $\beta$ は自然免疫を活性化させ、MIP-2aは肝への好中球浸潤に重要な役割を果たす。このようにDILI被疑薬において共通に自然免疫反応を中心とした遺伝子群が発現上昇することを明らかにした。本研究では、上述の知見を発展させ、第一にこれら遺伝子群を指標とした*in vitro*評価系の構築を目指した。

候補薬の肝障害 *in vitro* リスク評価にはヒト初代培養細胞及びヒト肝癌由来細胞株が多く報告されている。しかし、ヒト初代培養細胞は、供給量が限られており、スループット性に欠ける。齧歯類の肝細胞は大量に調製可能であるが、ヒトとの種差を考慮する必要がある。ヒト肝癌由来細胞株は肝機能の保持で問題があるが、安定供給が可能かつ品質が安定しており、簡便に使用することができる。しかし、癌細胞由来は細胞内グルタチオン量が初代培養肝細胞より高く、被験薬またはその反応性代謝物に起因する毒性の検出感度が低い一因と考えられている。本研究では、第二にヒト肝癌由来細胞株を用いた高感度DILIリスク *in vitro* 評価系の構築を目指した。

## 2. 研究の目的

### (1) 薬物代謝及び免疫・炎症関連因子を考慮したDILIRISク評価系の開発

代謝的活性化及び免疫・炎症関連因子を考慮した、DILIRISク*in vitro*評価系の構築を目的とした。肝癌由来HepG2細胞は薬物代謝酵素の発現が低く、分化HepaRG細胞はヒト初代肝細胞に匹敵する薬物代謝酵素が発現している。両細胞へ薬剤を処置することで、反応性代謝物の生成及びDAMPs分子の放出が予想される。この培養上清をヒト白血病由来HL-60細胞に処置することで、未変化体・代謝物及びDAMPsを含む細胞内容物が骨髓系細胞の免疫・炎症関連遺伝子発現量に与える影響を検討することを目的とした。

## (2) 薬物性肝障害リスク評価におけるグルタチオン枯渇肝癌由来細胞株の有用性検討

HepG2及び分化HepaRG細胞のグルタチオンをL-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO) により枯渇させることで、薬剤処置による細胞毒性への影響を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬物代謝及び免疫・炎症関連因子を考慮したDILIリスク評価系の開発

HepG2細胞及び分化HepaRG細胞に96種類の被験薬（市場撤退薬14種；ブラックボックス警告薬12種；警告薬45種；副作用薬16種；非ラベル薬9種）を100  $\mu$ Mを上限とし、細胞生存率70%を下回らない最大濃度で処置した。24時間後に培養上清を回収し、ヒト白血病由来HL-60細胞に処置した。さらに、24時間培養し、細胞中のRNAを回収した。RNAを用いて逆転写し、MCP-1 (CCL2), S100A9, IL-1 $\beta$ , IL-8 (CXCL8), TNF- $\alpha$  mRNAをreal-time PCR法により測定した。

薬剤の臨床DILIリスクはU.S. Food and Drug Administration (FDA) の Liver Toxicity Knowledge Base Benchmark Dataset (LTKB-BD) に従い、44種を臨床DILI陽性薬、35種を臨床DILI陰性薬とみなし（未分類の17種は除外）、receiver operating characteristic (ROC) 曲線により各mRNA発現量のDILI予測性を調べた。

#### (2) 薬物性肝障害リスク評価におけるグルタチオン枯渇肝癌由来細胞株の有用性検討

HepG2細胞及び分化HepaRG細胞にBSOまたは溶媒対照を3時間処置し、34種類の被験薬（市場撤退薬6種；ブラックボックス警告薬8種；警告薬4種；非ラベル薬16種）を臨床最高血中濃度の1.6, 6.4, 25, 100倍の濃度で処置した。24時間後に培養上清を用いてlactate dehydrogenase (LDH) 量を測定し、細胞を用いてカスパーゼ3/7活性を測定した。未処置および2% Triton X-100処置時のLDH量に基づき、

細胞生存率をそれぞれ100%及び0%とし、各薬剤処置時の細胞生存率を算出した。

市場撤退薬6種及びブラックボックス警告薬8種を臨床DILI陽性薬、非ラベル薬16種を臨床DILI陰性薬とみなし、ROC曲線により両アッセイのDILI予測性を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 薬物代謝及び免疫・炎症関連因子を考慮したDILIリスク評価系の開発

HepaRG培養上清を暴露させたHL-60 (HepaRG/HL-60) におけるIL-8発現量のROC-area under the curve (AUC) は高値(0.758)であり、次いでHepaRG/HL-60におけるIL-1 $\beta$  (ROC-AUC = 0.726) による予測性が良好であった。いずれの遺伝子においてもHepaRG培養上清を暴露させた方がHepG2よりもROC-AUCが高値傾向にあることから、薬物代謝を考慮することで予測性が向上することが示唆された。さらに、複数の因子を考慮することで予測性が向上するか検討した。S100A9, IL-1 $\beta$ 及びIL-8発現量において、各々カットオフ値以上を示す薬剤にはスコア (+1点) を与え、3遺伝子におけるスコアの総和値 (immune inducible score, IIS) を算出し、同様に評価した。HepG2及びHepaRG細胞のIISによるROC-AUCはそれぞれ0.763及び0.793であった。HepG2とHepaRGのIISの総和値によるROC-AUCは最も高値(0.819)であり、複数のパラメーターを考慮することでDILIの予測性が向上することが明らかとなった。

#### (2) 薬物性肝障害リスク評価におけるグルタチオン枯渇肝癌由来細胞株の有用性検討

HepG2細胞及びHepaRG細胞へのBSOの処置により、細胞内GSHがそれぞれ99%及び70%低下した。BSO単独処置は、細胞生存率及びカスパーゼ3/7活性に影響を及ぼさなかった。BSO未処置と比較し、BSO存在下薬剤を処置することで、DILI陽性薬剤の多くで細胞生存

率の低下およびカスパーゼ3/7活性の上昇が認められた。一方、DILI陰性薬剤においては一部を除いて、BSOの処置/未処置による、これらのパラメーターへの影響は認められなかった。HepG2細胞及びHepaRG細胞いずれにおいても、DILI予測性はカスパーゼ3/7活性より細胞生存率の方が良好であった。細胞生存率により算出したROC-AUC値は、HepG2細胞において0.821 (BSO未処置) 及び0.786 (BSO処置) であり、BSO処置で上昇しなかった。HepaRG細胞においては0.808 (BSO未処置) 及び0.813 (BSO処置) であった。感度 (sensitivity) 及び特異度 (specificity) を算出したところ、HepG2細胞においては、それぞれ43%と94% (BSO未処置) 及び50%と94% (BSO処置) とBSO処置により感度が上昇した。HepaRG細胞においては、それぞれ50%と100% (BSO未処置) 及び71%と100% (BSO処置) とBSO処置により感度の顕著な上昇が認められた。以上、ヒト肝癌由来細胞株のグルタチオンを枯渇することで、DILI予測性が向上することが示された。

#### 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4件)

Yuji Shirai, Shingo Oda, Sayaka Makino, Koichi Tsuneyama, Tsuyoshi Yokoi. Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of the pathogenesis. *Lab Invest*, in press. (査読有り)

Shingo Oda, Yuji Shirai, Sho Akai, Akira Nakajima, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Toxicological role of an acyl glucuronide metabolite in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *J Appl Toxicol*, 37(5):545-553, 2017. (査読有り)

Shingo Oda, Kentaro Matsuo, Akira Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A novel cell-based assay for the evaluation of immune- and inflammatory-related gene expression as biomarkers for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol Lett*, 241:60-70, 2016. (査読有り)

織田進吾, 横井 毅. いまさら聞けない薬物動態 Q&A: 薬剤師が知っておきたい抱合酵素とその基質について教えてください. *月刊薬事*, 58(4): 685-690, 2016. (査読無し)

##### [学会発表](計6件)

Jieyu Xu, Shingo Oda, Tsuyoshi Yokoi. Comparison of in vitro cytotoxicity assays using glutathione-depleted HepaRG and HepG2 cells for predicting drug-induced liver injury. Poster presentation, 56<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA.

Shingo Oda, Yuji Shirai, Sho Akai, Akira Nakajima, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Toxicological role of acylglucuronide metabolite in diclofenac-induced acute liver injury in mice. Poster presentation, The 11<sup>th</sup> International ISSX Meeting, June 12-16, 2016, BEXCO Convention Center, Busan, Republic of Korea.

許 潔玉, 織田進吾, 横井 毅. 薬剤性肝障害リスク評価におけるグルタチオン枯渇 HepaRG 細胞の有用性検討. ポスター発表, 2016年6月29日-7月1日, 第43回日本毒性学会学術年会, 愛知県産業労働センターウインクあいち, 愛知県名古屋市.

織田進吾, 横井 毅. Mechanisms of drug-induced liver injury (DILI) and establishment of a novel cell-based assay for DILI potential considering immune- and inflammatory-related factors. シンポジウム講演, 2015年11月11-13日, 第30回日本薬物動態学会年会, タワーホール船堀, 東京都江戸川区.

白井勇司, 織田進吾, 牧野早也香, 常山幸一, 横井 毅. Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of the pathogenesis. ポスター発表, 2015年11月11-13日, 第30回日本薬物動態学会年会, タワーホール船堀, 東京都江戸川区.

織田進吾, 松尾研太郎, 深見達基, 中島美紀, 横井 毅. HepaRG 細胞および免疫・炎症関連遺伝子マーカーを用いた薬剤性肝障害リスク評価系の構築. ポスター発表, 2015年6月29日-7月1日, 第42回日本毒性学会学術年会, 石川県立音楽堂, 石川県金沢市.

##### [その他]

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/toxicogenomics/>  
(名古屋大学・大学院医学系研究科・統合医薬学領域・トキシコゲノミクス)

6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

織田 進吾 (ODA, Shingo)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：10725534

( 2 ) 研究分担者

該当なし

( 3 ) 連携研究者

該当なし

( 4 ) 研究協力者

白井 勇司 (SHIRAI, Yuji)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院  
生  
許 潔玉 (XU, Jieyu)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院  
生