

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08419

研究課題名(和文)薬物の化学構造・生体反応性並びに個体因子の両者に着目した薬剤性肝障害評価手法開発

研究課題名(英文)Development of evaluation methods for drug-induced liver injury based on both chemical structure/biological reactivity of drugs and individual factors

研究代表者

佐々木 崇光 (Sasaki, Takamitsu)

静岡県立大学・薬学部・客員共同研究員

研究者番号：20382674

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)：本研究において、申請者は、DILI薬物及びno-DILI薬物の化学構造的特徴について分子記述子を利用して解析した。その結果、DILI薬物は、no-DILI薬物と比較して、AMWやMLOGPが高いことを明らかにした。また、分子記述子を用いた判別モデルを作成したところ、感度0.97でDILI薬物の判別が可能であった。さらに、DILI薬物及びno-DILI薬物のP450反応性などの生物学的反応性について評価を行ったところ、DILI薬物はCYP1A1及びCYP1B1反応性が高いことも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、DILIは、医薬品の開発及び販売中止の主要な要因の一つとなっている。しかし、DILI薬物の化学構造的特徴や生物学的特徴は明らかにされていない。本研究においては、DILI薬物及びno-DILI薬物のその両面からのアプローチにより、DILI薬物がno-DILI薬物と比較して、AMWが大きいこと、CYP1A1及びCYP1B1に対する反応性が高いことなど、これまでに報告例のない特徴を明らかにすることに成功した。これらの特徴は、簡便に評価できることから、医薬品開発研究においてDILI発症リスクの高いシード化合物のマーカーとしての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we analyzed the chemical structural features of DILI drugs and no-DILI drugs using molecular descriptors. The results showed that DILI drugs had higher AMW and MLOGP than no-DILI drugs. When discrimination models using molecular descriptors were constructed, it was possible to discriminate DILI drugs with a sensitivity of 0.97. In addition, when the biological reactivity of DILI and no-DILI drugs, such as P 450 reactivity, was evaluated, DILI drugs were found to be highly reactive to CYP1A1 and CYP1B1.

研究分野：薬物代謝、毒性学

キーワード：薬剤性肝障害 DILI インビトロ評価系 Cytochrome P450

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤性肝障害 (DILI) は、医薬品の開発及び販売中止の主要な要因の一つとなっている。そのため、多様な薬物を十分な精度で評価できるインビトロ試験系の開発が求められている。DILI 発症の代表的因子として、代謝的活性化による反応性中間体の生成、並びに単球細胞、T 細胞あるいは B 細胞の関与による炎症性ストレスが明らかにされている。申請者は、ヒト凍結肝細胞と同レベルの P450 代謝能を有するヒト肝薬物代謝模倣細胞 (5 分子種 P450 の同時発現 HepG2 細胞) や iPS 細胞由来肝様細胞を樹立し、単球系細胞株と共培養することで代謝及び炎症反応を考慮した共培養型インビトロ DILI 評価系を構築した。しかし、代謝依存的な ROS 生成や炎症関連遺伝子の発現上昇が認められる一方で、被験薬物の種類によっては十分な反応が認められないことも確認された。すなわち、多種多様な DILI 誘発性薬物 (DILI 薬物) を画一的なモデルのみで評価することは困難であると考えられた。

2. 研究の目的

現在、インビトロ DILI 評価系は、発症機序に基づく開発が進められている。この開発において、「DILI 薬物」は単一のグループとして扱われているが、それらにより誘発される DILI の臨床症状は様々であり、発症機序・発症要因は複数存在すると考えられる。そこで申請者は、何らかの手法により DILI 薬物の特徴によるクラス分けを行い、そのクラスごとに発症機序解明、評価系開発を行う必要があるという着想に至った。特に DILI 薬物の化学構造的特徴やその類似性を明らかにすることは、DILI 発症機序に関連する可能性があり、これを利用した DILI 薬物のクラス分けは、評価系開発等において重要な情報となると考えられる。一方、化学構造的特徴のみで生体の反応を正確に推測することは難しいことから、多種多様な化学物質を認識するタンパク質群である P450 の性質を利用し、P450 阻害活性を生物学的な反応性のクラス分けの指標として利用する。さらに、ストレス応答性因子等に与える影響についても、P450 と同様に指標とする。これらにより化学構造及び生物学的反応性に基づく DILI 薬物のクラス分けに加え、DILI 誘発性がない薬物 (no-DILI 薬物) との違いも明確にできると考えている。

そこで、本研究においては、化学構造及び生物学的反応性による DILI 薬物のクラス分けと no-DILI 薬物との差別化等を行い、新規 DILI 評価系の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) DILI 薬物及び no-DILI 薬物の調査及び選定: 米国 FDA の Liver Toxicity Knowledge Base とその文献情報¹⁾に基づき、DILI 薬物 (Most-DILI concern: 175 物質、Less-DILI concern: 257 物質) 432 物質と no-DILI 薬物 220 物質を選定した。

(2) DILI 薬物及び no-DILI 薬物の化学構造的特徴解析: 取得した 2 次元構造から分子記述子算出ソフト (Dragon 7) を用いて約 5000 種の記述子を計算し、算出不可能及び薬物間で値が等しい記述子を除いた後に、DILI と no-DILI 薬物間で差が大きい記述子を統計的手法により同定した。また、JMP Pro 14 や R のパッケージ (rpart、randomForest 等) を利用して決定木及びランダムフォレスト解析を行い、DILI 薬物の判別に有用な分子記述子を同定した。

(3) P450 反応性評価: (1) で選定した被験物質のうち、入手可能且つ 100 mM DMSO 溶液の調製が可能であった DILI 薬物 227 物質及び no-DILI 薬物 87 物質の合計 314 物質について、8 種のヒト P450 分子種 (CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4) に対する阻害作用を評価した。この評価においては、被験物質の濃度は 10 μ M とし、組換え酵素 Supersome (Corning) あるいはヒト肝ミクロソームを酵素源として用い、発光基質を用いたインビトロ酵素活性測定キットである P450-Glo Assay System (Promega) を利用した。溶媒対照群と比較して、阻害率が 20% 以上の薬物を阻害作用がありと判定した。

(4) ストレス応答性レポーター活性評価: (3) と同様の被験物質について、Nrf2 及び CREB の転写活性に与える影響を評価した。レポーター活性評価には、Nrf2 応答配列又は CREB 応答配列を含むレポータープラスミド (Oxidative Stress Luciferase Reporter Vector Set、Signosis) 及び HepG2 細胞 (Cell Bank) を用い、遺伝子導入には Lipofectamine 3000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific)、レポーター活性の測定には Dual-Luciferase Reporter System (Promega) 及び GloMax NAVIGATOR (Promega) を使用した。

(5) ハイコンテンツイメージングによる細胞小器官評価: (3) と同様の被験物質について、ミトコンドリア活性に与える影響を評価した。HepG2 細胞の細胞核、ミトコンドリア、細胞骨格を Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific)、MitoTracker Orange (Thermo Fisher Scientific) 及び Alexa Fluor 488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) を使用してそれぞれ染色し、CellInsight CX5 High-Content Screening (HCS) Platform (Thermo Fisher Scientific) での測定に付した。

(6) 個人差反映型細胞の作製: 申請者が樹立した 5 種の P450 分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4) の P450 発現アデノウイルス (Ad-P450) を HepG2 細胞に同時感染させ、ヒト凍結肝細胞と同レベルの活性パターンを有する Ad-P450 細胞²⁾ を利用し、CYP2D6 及び CYP3A4 の発現量を変動させた改良型 Ad-P450 細胞を作製した。発現量に依存した代謝活性の変化は、基質カクテルを用いて、LC-MS/MS (島津製作所) により測定した。

4. 研究成果

(1) DILI 薬物及び no-DILI 薬物の化学構造的特徴解析

DILI 薬物 432 物質と no-DILI 薬物 220 物質について、これらの 2 次元構造に基づき分子記述子を算出した結果、算出不可能及び薬物間で値が等しい記述子を除いた 2473 記述子の情報を得た。次に、DILI 薬物と no-DILI 薬物間の化学構造的特徴の違いを明らかにするため、Welch の t 検定により分散分析を行ったところ、2473 記述子中 838 種の記述子 (有意差記述子) において有意な差が認められた。有意差が認められた記述子には、AMW (平均分子量)、MLOGP (森口オクタノール-水分配係数)、nH (ハロゲン原子数)、H% (分子中に含まれる H 原子の割合)、Mp (分子分極率) などが含まれおり、これらの記述子においては、DILI 薬物の方が no-DILI 薬物より大きいことが明らかになった。過去の報告において、DILI 薬物は no-DILI 薬物より脂溶性が高いことが報告されており、脂溶性は薬物の DILI 誘発性の判別に有用な指標とされている。今回の解析において、脂溶性の指標の一つである MLOGP が DILI 薬物において有意に高いという結果は過去の結果を支持するものであり、本解析が DILI 薬物及び no-DILI 薬物の化学構造的特徴を捉えていることを示している。

(2) 分子記述子による DILI 薬物及び no-DILI 薬物の判別解析

次に、化学構造的特徴から DILI 薬物及び no-DILI 薬物の判別が可能であるか検討するため、2473 記述子を説明変数とした決定木判別モデルの作成を行った (図 1)。その結果、最初の分岐には有意差記述子としても同定された AMW が用いられた。その閾値は 7.409 で、この値をこえる被験物質は DILI 薬物と判別された。これに加えて、MLOGP 及び P_VSA_ppp_cyc (P_VSA-like on potential pharmacophore points, cyc-atoms belonging to cycles) の 3 種の記述子で、感度 0.970、特異度 0.218、一致率 0.716 の決定木が作成できた。また、ランダムフォレストを用いて判別モデルの作成を行った場合においても、AMW が判別重要度の高い記述子として同定された。本解析より、AMW は、DILI 薬物の判別に有用な新規指標となることが示された。化学構造から DILI 薬物を判別する指標はこれまでに明らかにされていないことから、本研究において有益な情報が得られたと考える。一方、本モデルにおいては、no-DILI 薬物の判別が難しいことが示唆された。

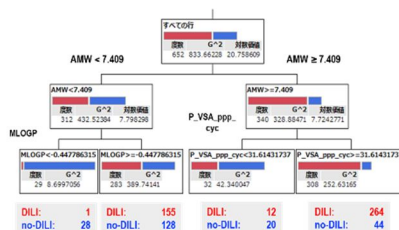


図 1 分子記述子による DILI 薬物及び no-DILI 薬物の判別解析

(3) 生物学的反応性による DILI 薬物及び no-DILI 薬物の判別

DILI 薬物 227 物質及び no-DILI 薬物 87 物質について、P450 阻害活性試験を利用した P450 反応性評価を実施した。8 種のヒト P450 分子種に対する阻害作用を評価したところ、CYP2D6 を除く 7 分子種において、DILI 薬物は no-DILI 薬物より阻害の程度が大きい傾向が認められた (図 2)。中でも、CYP1A1 及び CYP1B1 については、DILI 薬物と no-DILI 薬物間でその阻害率に有意な差が認められた。ROC 分析により CYP1A1 及び CYP1B1 の阻害率のカットオフ値を算出し判別を行ったところ、カットオフ値以上 (CYP1A1 阻害率 64%、CYP1B1 阻害率 40%) の阻害率を有する薬物 77 物質中 69 物質 (90%) が DILI 薬物であった (図 3)。一方、CYP1A1 又は CYP1B1 阻害率カットオフ値以上の no-DILI 薬物 8 物質については、皮下注射や貼付剤による投与、投与回数が少ない、消化管から吸収されないなど、臨床上的理由から DILI 発症リスクが非常に低い薬物が含まれていた。このことから、本研究において CYP1A1 及び CYP1B1 反応性は DILI 薬物の判別に有用であることを明らかにした。DILI 薬物が CYP1A1 及び CYP1B1 反応性が高い理由は今後更なる解析が必要であるが、P450 は分子種毎に基質特異性が異なることから、何らかの化学構造的特徴を捉えている可能性が示唆された。

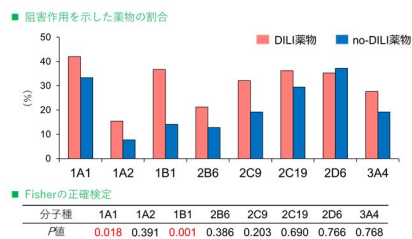


図 2 DILI 薬物及び no-DILI 薬物の P450 反応性評価

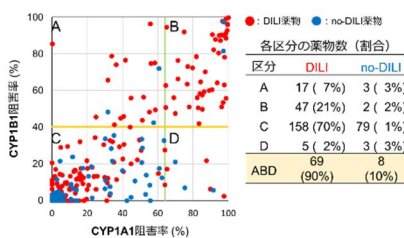


図 3 CYP1A1 及び CYP1B1 反応性による DILI 薬物の判別

次に、314 物質のストレス応答性レポーターアッセイ (Nrf2 及び CREB) 及びハイコンテントイメーシングを利用した細胞小器官影響評価 (細胞核、ミトコンドリア、細胞骨格) を実施した。その結果、no-DILI 薬物は DILI 薬物より Nrf2 レポーター活性を上昇させる傾向が認められた。しかし、両薬物間に明確な差は認められなかった。また、DILI 発症機序の一つとして報告されているミトコンドリア毒性についてもハイコンテントイメーシングによる評価を行ったが、ストレス応答性レポーターアッセイと同様に差は認められなかった。一方、CYP1A1 及び CYP1B1 阻害率カットオフ値未満の 237 物質について比較を行ったところ、DILI 薬物及び no-DILI 薬物間において Nrf2 及び CREB レポーター活性に差があることを見出した。このことから、ストレス応答性レポーターアッセイは P450 反応性評価を組み合わせることで、DILI 薬物と no-DILI 薬物の判別に有用な指標となることが示唆された。

(4) 個人差反映型細胞の作製

Ad-P450 細胞を基に CYP2D6 および CYP3A4 の活性バランスを変動させ、個人差を模倣した P450 細胞パネルの作製を行った。CYP2D6 及び CYP3A4 発現アデノウイルスの感染量を変化させることで、活性バランスを変化させたところ、他の 3 分子種の活性には影響を与えることなく、CYP2D6 および CYP3A4 活性を変動した個人差を模倣した P450 細胞パネルの作製ができた。しかしながら、生物学的反応性による DILI 薬物及び no-DILI 薬物の判別等に重点を置いて研究を遂行したため、本研究期間内にこの個人差反映型細胞を利用した DILI 発症機序に基づく評価を実施できなかった。今後、この細胞を更に発展させ、DILI 薬物の毒性学的評価を実施する予定である。

<引用文献>

- 1) Chen et al., DILIRank: the largest reference drug list ranked by the risk for developing drug-induced liver injury in humans. Drug Discovery Today, 21, 648-653, 2016.
- 2) Sasaki et al., Effect of health foods on cytochrome P450-mediated drug metabolism. J Pharm Health Care Sci, 3:14, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計42件（うち招待講演 6件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 米川恵理、山崎弘量、清水佑記、佐々木崇光、渡邊美智子、志津怜太、保坂卓臣、竹下潤一、吉成浩一
2. 発表標題 薬物のシトクロムP450反応性と肝障害誘発性の関連性解析
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会（徳島）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉成浩一
2. 発表標題 化学構造情報とインビトロ試験を利用した肝障害性薬物の判別
3. 学会等名 安全性評価研究会第28回夏の教育フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米川恵理、清水佑記、佐々木崇光、渡邊美智子、志津怜太、保坂卓臣、竹下潤一、吉成浩一
2. 発表標題 薬物のシトクロムP450反応性に着目した薬剤性肝障害評価
3. 学会等名 平成30年度内外環境応答・代謝酵素研究会（鳥取）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木崇光、渡邊美智子、川野拓歩、猿橋ひとみ、小倉瑠衣、志津怜太、保坂卓臣、吉成浩一
2. 発表標題 網羅的な化学物質のシトクロムP450阻害活性評価
3. 学会等名 平成30年度内外環境応答・代謝酵素研究会（鳥取）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米川恵理、清水佑記、佐々木崇光、渡邊美智子、志津怜太、保坂卓臣、竹下潤一、吉成浩一
2. 発表標題 シトクロムP450反応性を利用した肝障害誘発性薬物の判別
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会（大阪）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木崇光
2. 発表標題 シトクロムP450反応性評価の肝毒性予測への応用
3. 学会等名 日本薬物動態学会第32回年会（東京）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水佑記、佐々木崇光、渡邊美智子、保坂卓臣、竹下潤一、吉成浩一
2. 発表標題 肝障害誘発性薬物の化学構造的特徴の解析
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会（横浜）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木崇光、渡邊美智子、清水佑記、櫛田まどか、隠岐仁美、竹下潤一、保坂卓臣、吉成浩一
2. 発表標題 肝毒性予測を指向したシトクロムP450反応性評価による化学物質プロファイリング
3. 学会等名 第24回HAB研究機構学術年会（東京）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野
<https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/eisei/index.html>

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	吉成 浩一 (Yoshinari Kouichi) (60343399)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	
研究分担者	永田 清 (Nagata Kiyoshi) (80189133)	東北医科薬科大学・薬学部・教授 (31305)	
研究分担者	保坂 卓臣 (Takuomi Hosaka) (30611579)	静岡県立大学・薬学部・助教 (23803)	
研究分担者	志津 怜太 (Ryota Shizu) (50803912)	静岡県立大学・薬学部・助教 (23803)	
連携研究者	竹下 潤一 (Takeshita Jun-ichi) (60574390)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員 (82626)	