

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06767

研究課題名(和文) インフラマソーム反応に着目した特異体質性薬物性肝障害の機序解明と評価法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms of idiosyncratic drug induced liver injury focused on inflammasome reaction and development of the evaluation methods.

研究代表者

加藤 隆兎 (Kato, Ryuji)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30411482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回検討した薬物の中で、acetaminophen、amiodarone、amodiaquine、carbamazepine、entacapone、gefitinib、nevirapine、tolcapone、troglitazoneは、肝細胞内で反応性代謝物を生成し、damage-associated molecular patterns (DAMPs) が放出され、免疫細胞のインフラマソームを活性化させることで特異体質性薬物性肝障害を発症すると考えられた。また、DAMPsとして核酸やheat shock protein (HSP) 40、HSP60、HSP70、HSP90が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、特異体質性薬物性肝障害が、肝細胞から放出されたdamage-associated molecular patterns (DAMPs) により抗原提示細胞のインフラマソームを活性化することで発症するという発症機序、およびそれらDAMPsの具体的な種類について明らかにすることが出来た。このような詳細な検討は現在までに行われておらず、特異体質性薬物性肝障害の治療において、抗DAMPs抗体の投与など新たな治療戦略になりうると考えられる。さらに本研究で用いたin vitro評価系は利便性が高く、今後の医薬品開発および個別化医療の分野での応用が期待されるものである。

研究成果の概要(英文)：The reactive metabolite of acetaminophen, amiodarone, amodiaquine, carbamazepine, entacapone, gefitinib, nevirapine, tolcapone and troglitazone can cause the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) from hepatocytes which can activate inflammasomes. In this study, DAMPs which include DNA, RNA, heat shock protein (HSP) 40, HSP60, HSP70 and HSP90, were identified in the culture supernatant of a hepatocyte cell line. These results in the production of DAMPs that activate inflammasomes result in an immune response. Inflammasome activation may be an important step in the activation of the immune system, which in some patients, can cause immune-related adverse events. The method, which is developed in this study may provide a method to study the mechanism of idiosyncratic drug reactions and even predict which drug candidates are likely to cause such adverse reactions.

研究分野：臨床毒性学

キーワード：特異体質性薬物性肝障害 反応性代謝物 インフラマソーム DAMPs

### 1. 研究開始当初の背景

薬物副反応の発症機序として、投与量依存性の中毒性副反応と非依存性の特異体質性副反応が知られている。特異体質性薬物副反応については様々な発症機序が考えられているが、詳細な機序は未だ不明な点が多く、具体的な予測・予防・治療法が存在しない。2011年のデータでは、臨床試験の開発が中止された事例のうち約20%が副作用・毒性発現によるものであり、その中でも特に薬物性肝障害の発症が多いことが知られている。したがって、医薬品の効率的開発および安全性確保のため、特に創薬早期において利用可能な *in vitro* 予測技術の発展が強く望まれているが、特異体質性薬物性肝障害の発症機序が解明されていないことから、予測を行うための有効な方法が存在していなかった。

特異体質性薬物副反応の発症機序の1つとして、古くから hapten hypothesis が提唱されている。これは、薬物およびその反応性代謝物がハプテンとなり、たんぱく質と結合することで抗原化し、免疫反応を介して発症するという考え方である。実際に動物実験において薬物の反応性代謝物が臓器のタンパク質に共有結合し、抗原提示されることが確認されているものの、実際には副反応が認められない場合が多く、hapten hypotheses に加え、他の機序の存在が考えられていた。

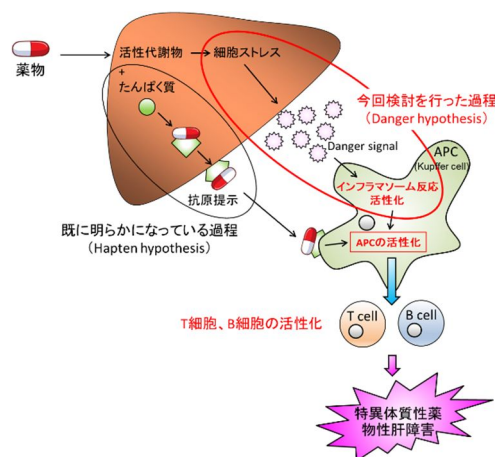


図1 特異体質性薬物反応において提唱されている hapten and danger hypotheses

その後、副反応の原因となる強い免疫反応が起こるためには、hapten hypotheses に加え、薬物の代謝物が細胞ストレスとなり danger signal が放出され、抗原提示細胞 (antigen presenting cell, APC) においてインフラマソームの活性化が起こり、APC の活性化が必要と考えられるようになった (danger hypothesis, 図1) (Chem Res Toxicol 2008;21:84-92)。

本研究開始当初、特異体質性薬物副反応発症に関与する仮説として、hapten and danger hypotheses が提唱されていたが、仮説の域を超えておらず、詳細な検討が必要であった。したがって、特異体質性薬物性肝障害に danger hypothesis の理論が当てはまれば、特異体質性薬物性肝障害の発症機序の理解に繋がり、予測・予防・治療に応用できるものと考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、インフラマソーム反応に着目した特異体質性薬物性肝障害の機序解明と評価法の開発である。すなわち、薬物の反応性代謝物がインフラマソーム反応を活性化させ、APC の caspase-1 を活性化、IL-1 $\beta$  の産生を増加させるかを検討する。反応性代謝物がインフラマソーム反応を活性化させることが明らかになれば、特異体質性薬物性肝障害の反応機序の解明に繋がり、またその評価系が創薬早期において利用可能な *in vitro* 予測技術となりうることから、極めて意義があると考えられる。

### 3. 研究の方法

本研究では、図1に示した薬物の反応性代謝物が原因となり、(1) APC においてインフラマソーム反応を活性化させること、(2) 肝実質細胞から放出される danger signal が何であるか、を明らかにするため、下記の検討を行った。なお、本研究においては、ヒト肝臓細胞として Functional

liver cell 4 (FLC-4) 細胞を用い、APC として THP-1 細胞を用いた。

#### (1) 薬物の反応性代謝物により、APC のインフラマソーム反応を活性化させるか否かの検討

FLC-4 細胞 ( $1.5 \times 10^4$  cells/mL) 100  $\mu$ L を Prime Surface 96U plate (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) に播種し、等量の薬剤を含有した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を加えて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 7 日間 3 次元オルガノイド培養を行った。なお、薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 阻害剤である 1-Aminobenzotriazole (ABT) を培養液中に添加し、反応性代謝物の関与についても検討を行った。THP-1 細胞については、24 well plate に  $4 \times 10^5/250 \mu$ L を播種し、phorbol myristate acetate (100 ng/mL) 含有培地 250  $\mu$ L を添加して、macrophage へ分化誘導した。3 日間培養後、PBS で洗浄し、DMEM 1 mL を添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 日間培養を行った後、FLC-4 細胞の培養上清を macrophage 化 THP-1 細胞に添加し、添加 24 時間後に THP-1 細胞から産生される IL-1 $\beta$  産生量および THP-1 細胞の caspase-1 活性を測定した。また、caspase-1 阻害剤である YVAD および caspase 阻害剤である ZVAD を添加することで、caspase-1 活性の阻害実験も行った。IL-1 $\beta$  産生量は培養上清中 IL-1 $\beta$  濃度として測定を行い、測定には ELISA kit (BioLegend, Inc.) を用いた。THP-1 細胞中の caspase-1 活性については、Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay (Promega Corporation) を用いて測定を行った。

#### (2) 肝実質細胞から放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs) の探索

(1) の方法により 3 次元オルガノイド培養を行った FLC-4 細胞の細胞上清を採取して、Western blot により培養液中に含まれる damage-associated molecular patterns (DAMPs) の探索を行った。本研究においては、high mobility group box 1 (HMGB1)、heat shock protein (HSP) 32、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90、S100 calcium-binding protein (S100) A8、S100A9、核酸 (DNA、RNA) について検討を行った。また、DAMPs として検出されたタンパクに対して、抗体を添加することで中和を行った FLC-4 細胞の細胞上清を macrophage 化 THP-1 細胞に添加することで、インフラマソーム反応の活性化が抑制化されるかについても検討を行った。

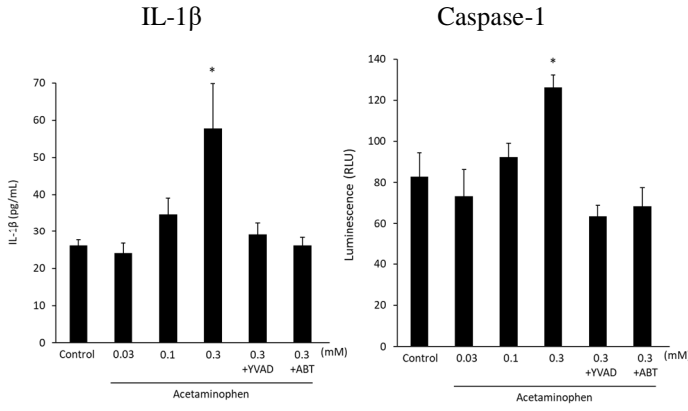
本研究において使用した薬物は、重篤副作用として肝障害の報告のある薬物および報告はないがそれら薬物と構造が類似しているもの (acetaminophen、amiodarone、amodiaquine、carbamazepine、dronedarone、entacapone、gefitinib、nevirapine、phenytoin、tolcapone、troglitazone、pioglitazone) を使用した。

## 4. 研究成果

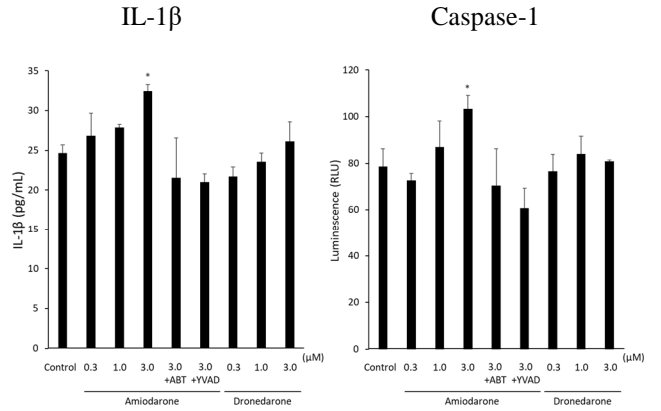
#### (1) 薬物の反応性代謝物により、APC のインフラマソーム反応を活性化させるか否かについて

Acetaminophen、amiodarone、amodiaquine、carbamazepine、entacapone、gefitinib、nevirapine、tolcapone、troglitazone において、FLC-4 細胞の薬剤含有培養上清を THP-1 細胞に添加したところ、THP-1 細胞から IL-1 $\beta$  の分泌が有意に上昇し、THP-1 細胞における caspase-1 活性上昇が認められた。Dronedarone、pioglitazone においては、THP-1 細胞からの IL-1 $\beta$  の分泌および Caspase-1 活性が、また phenytoin においては THP-1 細胞からの IL-1 $\beta$  の分泌に変化が認められず、THP-1 細胞のインフラマソーム反応に影響は認められなかった。以上の結果から、acetaminophen、amiodarone、amodiaquine、carbamazepine、entacapone、gefitinib、nevirapine、tolcapone、troglitazone においては、それら薬物の反応性代謝物が原因となり APC のインフラマソーム反応を活性化することが認められた (図 2)。

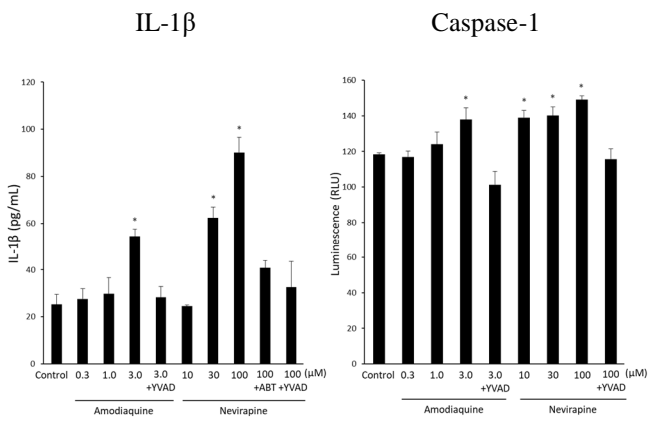
acetaminophen



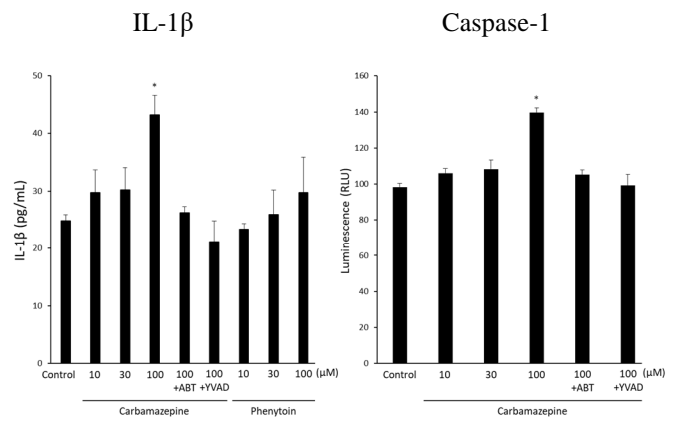
amiodarone、dronedaron



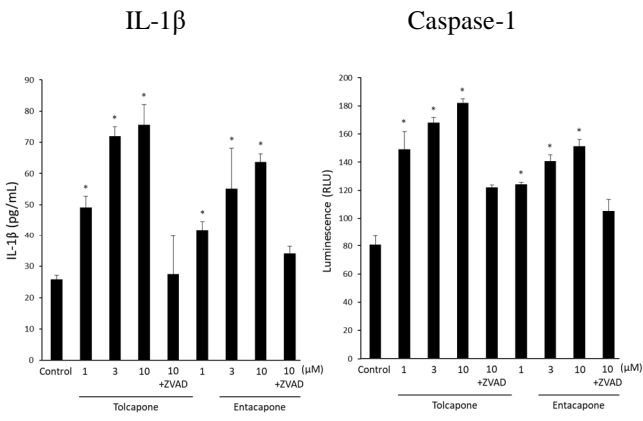
amodiaquine、nevirapine



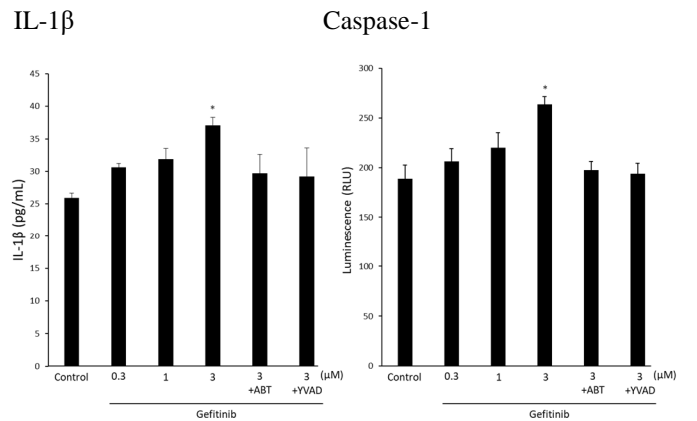
carbamazepine、phenytoin



entacapone、tolcapone



gefitinib



troglitazone、pioglitazone

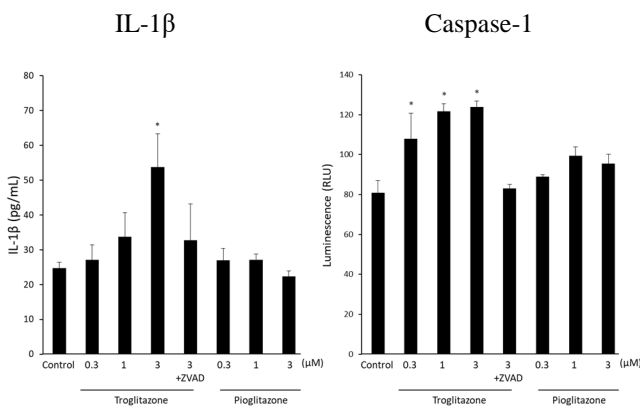


図2 FLC-4細胞の薬剤含有培養上清をTHP-1細胞に添加した際のTHP-1細胞培養上清中IL-1β濃度およびTHP-1細胞におけるcaspase-1活性

ABT, CYP阻害剤; YVAD, caspase-1阻害剤; ZVAD, caspase阻害剤

\*P<0.05, vs Control.

## (2) 肝実質細胞から放出される DAMPs の探索

(1)で反応性代謝物が APC のインフラマソーム活性化が認められた acetaminophen、amiodarone、amodiaquine、carbamazepine、entacapone、gefitinib、nevirapine、tolcapone、troglitazone において、FLC-4 細胞から放出される DAMPs の探索を行った。Amodiaquine においては、amodiaquine を THP-1 細胞に直接添加した際にインフラマソーム反応の活性化が認められた。一方、今回対象にしている他の薬物に関しては THP-1 細胞に対して直接インフラマソーム反応を活性化する作用は認められなかった。Amodiaquine は THP-1 細胞中のミエロペルオキシダーゼにより反応性代謝物が生成することが認められており (Chem Res Toxicol 2014,27,699-709) それによりインフラマソーム反応が活性化されたものと考えられた。本研究においては、直接インフラマソーム反応を活性化させた amodiaquine 以外の薬物について検討を行った。その結果、表 1 に示すように核酸 (DNA および RNA)、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 の有意な上昇が認められた。核酸および HSP は DAMPs として APC のインフラマソームを活性化することが認められている。また CYP 阻害剤である ABT 処理によりこれら DAMPs の発現低下が認められたことから、肝臓細胞中で代謝反応により反応性代謝物が生成し、それらが細胞ストレスとなって DAMPs が産生されたと考えられた。また、carbamazepine においては FLC-4 細胞の培養液上清に HSP60 の抗体を添加したのちに THP-1 細胞に加えたところ、インフラマソーム反応の抑制が認められた。したがって、今回 DAMPs が特定できた薬物に関しては、その中和抗体を投与することで治療につながる可能性が示唆された。また、本研究で使用した in vitro 実験系は、ヒト血中濃度範囲内で DAMPs およびインフラマソーム活性化に関する検出が十分可能であることが示された。本研究の特色の一つに、cell line を用いている事が挙げられる。そのため、初代培養細胞のようにロット間差がなく、安定した評価系となっている。さらに培養にかかるコストを最小限に抑えることが出来ており、経済的にも優れた実用的な実験系であると考えられた。

表 1 本研究で確認された肝細胞から放出された DAMPs

| 薬物名           | 核酸 | HSP40 | HSP60 | HSP70 | HSP90 |
|---------------|----|-------|-------|-------|-------|
| Acetaminophen | ○  |       |       |       |       |
| Amiodarone    |    | ○     |       |       |       |
| Carbamazepine |    |       | ○     |       |       |
| Entacapone    |    |       |       |       | ○     |
| Gefitinib     |    | ○     |       | ○     | ○     |
| Nevirapine    |    |       |       |       | ○     |
| Tolcapone     |    | ○     |       |       | ○     |
| Troglitazone  |    | ○     |       |       |       |

## (3) 得られた成果の国内外における位置づけと今後の展望

本研究では、特異体質性薬物性肝障害が肝細胞から放出された DAMPs が APC のインフラマソームを活性化することで発症するという発症機序およびそれら DAMPs の具体的な種類についても明らかとすることが出来た。このような詳細な検討は現在までに行われておらず、国際的にも非常に価値のある研究成果である。さらに本研究で用いた in vitro 評価系は利便性が高く、今後の医薬品開発および個別化医療の分野での応用が期待されるものである。今後はさらに多くの薬物について特異体質性薬物性肝障害発症機序の検討を行い、抗 DAMPs 抗体の投与など新たな治療法の開発に繋げていく予定である。

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 2件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kato Ryuji, Ijiri Yoshio, Hayashi Tetsuya, Utrecht Jack   | 4. 巻<br>47                |
| 2. 論文標題<br>The 2-Hydroxyiminostilbene Metabolite of Carbamazepine or the Supernatant from Incubation of Hepatocytes with Carbamazepine Activates Inflammasomes: Implications for Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Drug Metabolism and Disposition   | 6. 最初と最後の頁<br>1093 ~ 1096 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1124/dmd.119.087981   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する              |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kato Ryuji, Ijiri Yoshio, Hayashi Tetsuya, Utrecht Jack  | 4. 巻<br>45              |
| 2. 論文標題<br>Reactive metabolite of gefitinib activates inflammasomes: implications for gefitinib-induced idiosyncratic reaction | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Toxicological Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>673 ~ 680 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2131/jts.45.673  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する            |

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Kato Ryuji, Ijiri Yoshio, Hayashi Tetsuya   | 4. 巻<br>in press       |
| 2. 論文標題<br>Amiodarone, Unlike Dronedarone, Activates Inflammasomes via Its Reactive Metabolites: Implications for Amiodarone Adverse Reactions. | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>Chemical Research in Toxicology   | 6. 最初と最後の頁<br>in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-              |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kato R, Ijiri Y, Hirotsu Y, Tanaka K, Hayashi T, Utrecht J.   |
| 2. 発表標題<br>Amodiaquine and the reactive metabolite activate inflammasomes leading to amodiaquine-induced liver injury and agranulocytosis. |
| 3. 学会等名<br>16th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (国際学会)                                       |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小林岳広、山本菜、小柳津亨、西澤峻、林実花 加藤隆児、井尻好雄、Jack Utrecht、林哲也 |
| 2. 発表標題<br>Acetaminophen誘発肝障害発症機序とinflammasome反応との関連性       |
| 3. 学会等名<br>第35回日本TDM学会・学術大会                                 |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>加藤 隆児、井尻 好雄、Jack Utrecht、林 哲也                          |
| 2. 発表標題<br>ネビラピンの反応性代謝物はinflammasome反応を活性化させるか-ネビラピン誘発肝障害発症機序の検討- |
| 3. 学会等名<br>第一回医薬品毒性機序研究会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西澤峻、山本菜、小林岳広、小柳津亨、林実花、加藤隆児、山本浩二郎、大里恭章、井尻好雄、瓜生恭章、原田博雅、林哲也 |
| 2. 発表標題<br>血中Acetaminophen (APAP) -グルクロン酸体濃度/APAP比率モニタリングに関する臨床研究報告 |
| 3. 学会等名<br>第36回日本TDM学会・学術大会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>加藤隆児、井尻好雄、林哲也、Jack Utrecht          |
| 2. 発表標題<br>Acetaminophen誘発肝障害における免疫担当細胞のシグナル応答 |
| 3. 学会等名<br>第46回 日本毒性学会学術年会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>加藤隆児、井尻好雄、Jack Utrecht、林哲也       |
| 2. 発表標題<br>中毒性アセトアミノフェン誘発肝障害は臨床上免疫性に進行し増悪する |
| 3. 学会等名<br>第40回日本臨床薬理学会学術総会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kato R, Ijiri Y, Hayashi T, Utrecht J.   |
| 2. 発表標題<br>The 2-Hydroxyiminostilbene Metabolite of Carbamazepine or the Supernatant from Incubation of Hepatocytes with Carbamazepine Activates Inflammasomes. |
| 3. 学会等名<br>59th Annual Meeting and ToxExpo (Society of Toxicology) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 林 哲也<br><br>(Hayashi Tetsuya)<br><br>(30257852) | 大阪薬科大学・薬学部・教授<br><br><br>(34413)  |    |
| 研究分担者 | 井尻 好雄<br><br>(Ijiri Yoshio)<br><br>(50449823)   | 大阪薬科大学・薬学部・准教授<br><br><br>(34413) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関               |  |  |  |
|---------|-----------------------|--|--|--|
| カナダ     | University of Toronto |  |  |  |