

機関番号：17401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009 ～ 2010
 課題番号：21790524
 研究課題名(和文) 薬剤性肝傷害に著効を示すオザグレルの作用機序解明および新規治療戦略への展開
 研究課題名(英文) Protection afforded by a selective thromboxane A2 (TXA2) synthase inhibitor, ozagrel, against 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・助教
 研究者番号：70423655

研究成果の概要(和文)：

TXA2 合成酵素阻害薬オザグレルのアセトアミノフェン(APAP)誘発肝傷害の新規治療薬としての可能性評価を行った。APAP 肝傷害マウスモデルで見られる血清 ALT 値の上昇、小葉中心性壊死および DNA 断片化に対し、オザグレルは著効を示し、現行の治療薬より優れていた。この機序として、TXA2 合成阻害以外の他の作用の可能性が示唆された。研究成果より、薬剤性肝傷害の新規治療薬としてのオザグレルの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

This study was conducted to evaluate the effects of ozagrel, a selective thromboxane A2 synthase inhibitor, against acetaminophen-induced hepatic injury in mouse. Ozagrel effectively attenuated the acetaminophen-induced hepatic damage as indicated by the serum ALT, and oncotic necrosis and nuclear DNA fragmentation in liver in dose- and time-dependent manner. In addition, delayed administration of the ozagrel was more effective than N-acetylcysteine after the acetaminophen liver injury. The results suggest that ozagrel is a promising drug candidate for preventing acetaminophen-induced hepatic injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：オザグレル、トロンボキサン A2、アセトアミノフェン、肝傷害、有害事象

1. 研究開始当初の背景

解熱鎮痛薬アセトアミノフェン(N-acetyl-p-aminophenol: APAP)は非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)に比べ胃腸障害、心血管障害、腎障害、およびライ症候群発症の危険性が低いことから、小児・高齢

者・妊婦に至るまで使用されている。医療用のみならず一般用医薬品にも数多く配合されており(本邦においては800品目以上)、安全な薬として広く用いられている。

しかし、一方ではアセトアミノフェンは薬剤肝傷害を引き起こす薬物として世界中で

問題視されている。世界保健機関 (WHO) によると、1963 年—2003 年における 13 カ国を対象とした薬剤性肝傷害の報告数の第一位は APAP であり、特に 1990 年以降の薬剤性肝傷害の約 9 割は APAP によるものと報告されており、APAP 誘発肝傷害の発症頻度は年々増加傾向にある。日本中毒情報センターによると、一般用医薬品が原因となった中毒に関する問い合わせ件数では 1999 年—2009 年にかけて APAP に関するものが最も多く、本邦においても問題となっている。APAP 誘発肝傷害の主な原因として自殺目的や誤飲による過量服用が報告されており、その他にも、エタノールや cytochrome (CYP) 2E1 誘導薬との併用、代謝酵素の遺伝子多型による APAP 常用量における肝傷害誘発例も多数報告されている。通常、APAP はグルクロン酸抱合 (40-67%) や硫酸抱合 (20-46%) 等により代謝・排泄されるが、5-15% は主に CYP2E1, CYP1A2, および CYP3A4 により求電子性が高く反応性に富んだ毒性代謝物である N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) に変換される。

APAP を常用量の範囲で使用した際に生成する NAPQI は、グルタチオン (GSH) により速やかに抱合・解毒されるため、肝傷害は起こらない。しかし APAP 過量服用等で NAPQI が大量に生成した場合は GSH の枯渇が起こり、除去しきれなくなった NAPQI が素早く高分子タンパク質に共有結合することが肝細胞毒性の誘因と考えられている。NAPQI は直接的または Mitogen activated protein (MAP) 経路の c-jun N-terminal kinase (JNK) 経路の活性化等によりミトコンドリア膜透過性遷移現象 (mitochondrial membrane permeability transition : MPT) を引き起こし、膜電位崩壊による ATP 合成能の低下、ミトコンドリア内からの endonuclease G の放出・核移行が起ることによってクロマチンの凝集・DNA の断片化が引き起こされる。また、貪食細胞である好中球の侵潤による炎症反応の惹起および MPT による活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) や peroxynitrite (ONOO⁻) の産生などにより肝実質細胞死が誘発される。しかし、未だにそのメカニズムは完全には解明されておらず、様々な因子が絡み合い、致死的な肝傷害が誘発していると考えられている。

APAP 誘発肝傷害の唯一の治療薬として本邦でも保険適応されている N-acetyl cysteine (NAC) は主に GSH の前駆体として働き、NAPQI の抱合・解毒作用により肝傷害を抑制する。つまり、NAC は APAP 誘発肝傷害発症機構でも比較的上流を止めるものであり、APAP 過量服用後に可能な限り速やかな投与が望まれている。実際、大規模臨床試験の結果において、APAP 摂取から 16

時間以上経過した場合は NAC の有効性が減弱することが報告されている。また、NAC による治療は、初回投与量 140 mg/kg、次いで 4 時間後から 70 mg/kg を 4 時間毎に 17 回、経口投与することや催吐等の副作用による患者への負担がしばしば治療を困難にしている。このような NAC の問題点から、救命救急の現場では新規治療薬の開発が切望され、現在も世界中で精力的な研究が行われている。

当研究室ではこれまでに APAP 誘発肝傷害新規治療薬候補物質を *in vitro* NAPQI 誘発細胞傷害系やマウスを用いた *in vivo* APAP 誘発肝傷害を用い検討を行ってきた。新規治療薬候補物質の中でも、気管支喘息治療薬として臨床応用されており、これまでに当研究室の検討で急性肺障害モデルにおいて卓越した抑制効果を示すことを報告してきた選択的 thromboxane (TX) 合成酵素阻害薬オザグレル塩酸塩 (E)-3-[p-(1H-imidazol-1-ylmethyl) phenyl]-2-propenoic acid hydrochloride monohydrate が APAP 誘発肝傷害モデルに対し顕著な有効性を示すことを見出した。

TXA2 はアラキドン酸カスケードに由来する生理活性物質の一つで、血小板凝集促進作用、血管収縮作用、血管透過性亢進作用、および気道抵抗増加作用を持ち、エンドトキシンショックや急性肺傷害など様々な急性炎症性疾患の増悪因子として働くことが報告されている。また、lipopolysaccharide (LPS)、四塩化炭素、虚血—再灌流等による種々の実験的肝傷害の病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかしながら、APAP 誘発肝傷害における TXA2 の役割はほとんど明らかになっていない。TXA2 受容体の活性化は、近年 APAP 誘発肝傷害の増悪因子として注目されている JNK 系路の活性化に関与するという報告もあることから、TXA2 が過剰に産生され病態悪化に関わっているという可能性は十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究では APAP 誘発肝傷害マウスモデルに対するオザグレル塩酸塩の有効性評価、および作用機序の解明、ならびに本モデルにおける TXA2 の役割の解明を目的として検討を行った。

3. 研究の方法

APAP 肝傷害モデルの作成

肝傷害を十分誘発しうる投与量として APAP (550 mg/kg) を腹腔内投与した。

サンプルの採取

各薬剤投与後、各時間経過後、マウスに吸入麻酔を施し、メスにて開腹して腹部大静脈よ

リテルモシリンジ 1 mL SS-01T ツベルクリン用およびテルモ注射針 26G×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、最後のサンプルがそろいまでの間は 4°C の冷蔵庫で保存。サンプルがそろい次第、遠心分離 (5000 g, 10 分, 4°C), 上清を採取し測定まで -20°C で保存した。摘出した肝臓サンプルは組織重量 1 g あたり 5 ml の 5% metaphosphoric acid 水溶液を加え、氷で冷却しながら Polytron PT 1600 (EKINEMATICA Inc.) でホモジナイズし遠心分離 (5000 g, 10 分, 4°C) 上清は測定まで -80°C で保存。

アラニントランスアミナーゼ (ALT) 活性の測定
肝傷害の指標として ALT 活性の測定を行った。測定にはトランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社, Osaka, chuo-ku, Japan) を用い、手順に従い測定した。吸光度の測定は分光光度計 (V-530, JASCO Corporation, Hachioji-shi, Tokyo, Japan) にて行った。

総グルタチオン (GSH) 量の測定
サンプル採取の項で得たサンプルを BIOXYTECH GSH/GSSG-412 (OXIS International inc. California, Beverly Hills, USA) を用い、手順に従い測定した。吸光度の測定は分光光度計 (V-530, JASCO Corporation, Hachioji-shi, Tokyo, Japan) にて行った。

組織学的検討
各薬剤投与後、各時間経過後、マウスにエーテル麻酔をかけ開腹し肝臓を摘出後、直ちに 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で組織固定を行い、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 μ m の薄切標本を作成した後、Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色または TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay を行った。

TUNEL 組織の定量化
HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (キエンス株式会社, Osaka, Japan) を用いて染色したマウスの肝組織切片の全体像から無作為に選んだ 10 視野の写真を撮った。ImageJ version 1.44b (Wayne Rasband) を用いて TUNEL 陽性率 (TUNEL 陽性細胞の面積/全面積) をそれぞれ算出し、平均値をそのサンプルの TUNEL 陽性率とした。なお、中心静脈等の空洞部分の面積は除いて計算を行った。

2, 3-dinor thromboxane B2 濃度の測定

血漿サンプルはマイクロティナ微量採血管 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, United States) に最終濃度 10 μ M になるように indomethacin (0.1M Na2CO3 溶液にて溶解) を添加したものに採取した。サンプル中の TX 濃度は Thromboxane B2, 2, 3-Dinor-, EIA Kit (Cayman chemical) を用い、手順に従って測定を行った。吸光度の測定はマイクロプレートリーダー (Immuno mini NJ-2300, Nalge Nunc International K.K, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan) にて測定した。

グルタチオン枯渇モデルの作成
APAP 投与の 2 時間前に L-buthionine-sulfoximine (BSO) 1000 mg/kg を腹腔内投与した。

Cytochrome P450 活性測定
マウス肝ミクロソーム画分の抽出は, Omura, Tらの方法 44 に従った。Alice JW らの方法 45 に準じて CYP2E1 に特異性の高い基質である 0.1 mM の p-nitrophenol (PNP) から p-nitrocatechol (PNC) の生成量を求めることにより CYP2E1 活性を評価した。PNP および PNC の濃度は Sigma-Aldrich より購入した標準品を基準に、吸光度を Ultrospec 3300 (GE Healthcare UK Ltd.) を用いて測定した。ヒト CYP2E1 とウサギ NADPH-P450 レダクターゼを発現する昆虫細胞から調製されたマイクロソームで構成される Vivid® CYP2E1 Blue Screening Kit (Invitrogen) を用いた。

real time PCR
リアルタイム PCR システムは StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Inc. Foster City, California, United States) を用い、SYBR®Green PCR assay のプロトコルに従い PCR 産物の検出を行った。初期変性はサイクル数 1, 95°C で 30 秒, PCR 反応はサイクル数 40, 95°C で 5 秒, 60°C で 30 秒 で行った。なお、反応後は融解曲線分析を行い PCR 産物の特異性を確認した。定量方法は PCR の反応効率が一定であることを確認し, comparative CT 法 ($\Delta\Delta$ CT 法) を用いた。用いた器具はすべて乾熱滅菌, オートクレーブおよび DEPC (RNase free water) で処理したものを用了。

DNA マイクロアレイ
株式会社セルイノベーター (Fukuoka, Japan) に委託した。使用したマイクロアレイ: Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ (4×44K) v2 (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, California Oswego, Illinois, U.S.) RNA の濃度測定: Invitrogen 社推奨のプロトコルで Trizol か

ら total RNA を抽出し濃度測定を行った。
ラベリング：各 50ng の totalRNA を用いて Agilent Low-Input QuickAmp labeling kit, one color によりラベリング反応を行った。
ハイブリダイゼーション：Agilent 社推奨の プロトコルで、ハイブリダイゼーション、 wash, scan を行った。マイクロアレイ解析：Agilent 社 Feature Extraction ソフトウェアによるデータの数値化を行った。統計処理ソフト R を用いて正規化を行った。正規化には、quantile 法を用いた。

(15) 統計学的分析

実験結果は平均値±標準誤差で示した。統計処理は GraphPad Prism ver. 3.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。2 群間の比較は、F 検定により母集団の等分散性の検定を行い、等分散のときは、Student's t 検定を行い、不等分散のときは、Welch's t 検定を行った。3 群以上の群間比較は、多重群間比較検定により行った。すなわち、Bartlett 検定により分散の均一性を検定し、分散が均一であった場合には一元配置分散分析を行い、不均一であった場合には Kruskal-Wallis 検定を行い、これらで有意差が認められた場合に限り、Tukey's Multiple Comparison Test, Dunnett's Multiple Comparison Test, または Dunn's Multiple Comparison Test により各群間の有意差検定を行った。以上の検定により、危険率が 5% 未満のときに有意であると判定した。

4. 研究成果

アセトアミノフェン誘発肝傷害に対するオザグレルの有効性評価

C57BL/6N マウスを用いて APAP 誘発肝傷害モデルを作成し、オザグレルの有効性評価を行った。本モデルに対しオザグレルは用量依存的に肝傷害抑制効果を示し、8-24 時間後に起こる血清 ALT 活性の上昇を完全に抑制し、肝組織中総 GSH 濃度の減少に対しても抑制効果を示した。また、病理組織学的検討においてもオザグレル投与群は H&E 染織において肝細胞壊死を抑制し、TUNEL assay においては TUNEL 陽性細胞の割合を減少させた。よって、オザグレルは本モデルに対して強力な保護効果を示すことが示された。

APAP の投与に対し、NAC は投与時間が遅れると有効性の低下が見られたが、オザグレルは 2 時間後投与までは有効性の低下は見られなかった。よって、既存の治療薬 NAC では有効性が低下する時間帯においてもオザグレルは有効性を示す可能性が示唆された。

アセトアミノフェン誘発肝傷害における TXA2 の関与

本モデルにおいて、血漿中 2,3-dinor TXB2 濃度の上昇が見られたのは APAP 投与から 4-8 時間後であり、血清 ALT 活性が上昇する時間帯であった。よって、TX 濃度の上昇は肝傷害発症と並行して起こっている可能性が考えられ、主な肝傷害誘発因子では無く、肝傷害を増幅させる働きをしている可能性が示唆された。また、オザグレル投与群では TX 濃度の上昇は見られなかった。TXA2 受容体拮抗薬の投与は血清 ALT 活性による評価において本モデルに有効性を示さなかったが、投与量に関しては再検討が必要かもしれない。TX 合成酵素阻害剤は用量依存的な TX 濃度の減少を示したが、血清 ALT 活性においては高用量のみで抑制効果が見られた。よって、TX が肝傷害に及ぼす影響には域値が存在する可能性や、別の薬理作用が関係している可能性が考えられる。

アセトアミノフェン誘発肝傷害に対するオザグレルの作用機序の解明

オザグレル単独投与は肝組織中総 GSH 濃度に影響を与えなかった。また、オザグレルを APAP の 30 分前に投与した群は 30 分後に投与した群に比べ有意に高い肝組織中総 GSH 濃度を示した。さらに、BSO 前投与による GSH 合成阻害条件下においてもオザグレルは APAP 投与後の血清 ALT 活性の上昇を強力に抑制した。よって、オザグレルは GSH 濃度に影響を与えることなく、NAPQI 生成量を減少させている可能性が考えられる。

In vitro ヒト CYP 発現系及びマウス肝ミクロソームにおける検討で、オザグレルは 1 mg/mL の高濃度においても CYP2E1 阻害作用を示さなかった。また、In vivo における検討において、オザグレル投与群は APAP 投与群と比べ mRNA 発現量および活性に対して極端な阻害作用を示さなかった。よって、本モデルにおいて顕著な肝傷害抑制効果を示すオザグレルの作用機序として、CYP 阻害の寄与はほとんどないものと考えられる。

本モデルにおいて APAP 投与後 2 時間から 4 時間の肝組織中において複数のアポトーシス関連遺伝子の増加が確認された。これらは、APAP 誘発肝傷害の新規治療ターゲットとなる可能性があり、今後検討していく必要がある。

本研究で得られた結果は、オザグレルは APAP 誘発肝傷害に対し強力な保護効果を持ち、既存の治療薬 NAC のように治療開始の遅れに伴う有効性の減弱を起こさない、APAP 誘発肝傷害に対する画期的な治療薬となる可能性を示した重要な基礎資料になると思われる。また、オザグレルは既に臨床応用されている薬であるため、APAP 誘発肝傷害の新規治療薬としての導入も比較的容易であると

考えられる。オザグレルの効果の少なくとも一部は TX 合成酵素阻害によるものであると考えられるが、未だ明らかではない。今後必要なデータを収集し、臨床応用を目指したいと考えている。また、本研究で得られた成果は APAP 誘発肝傷害の新規治療戦略の開発および肝傷害予防につながる重要な基礎的データであり、将来的には APAP 誘発肝傷害の撲滅につながるものと考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. 富島喜朗, 石塚洋一, 松永直哉, 永留美菜子, 入倉充, 大戸茂弘, 入江徹美, 薬剤性肝傷害に著効を示すオザグレル塩酸塩の有用性評価, 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (2010 年 12 月 11 日-12 日) 長崎市, 長崎大学
2. 竹浦宏幸, 田添光二, 石塚洋一, 入倉充, 上田賢太郎, 岩田一史, 下石和樹, 陣上祥子, 吉田稔, 入江徹美, 福永栄子, 非ステロイド性消炎鎮痛薬の使用が困難な成人患者への小児用アセトアミノフェン坐剤の使用およびその有効性と安全性に関する検討, 第 20 回日本医療薬学会年会 (2010 年 11 月 13 日-14 日) 千葉市, 幕張メッセ
3. 田添光二, 竹浦宏幸, 野田寛子, 石塚洋二, 入倉充, 入江徹美, 吉田稔, 定永明子, 永田浩泰, 陣上祥子, 福永栄子, 高用量アセトアミノフェン坐剤の製剤特性及び有効性に関する検討, 第 20 回日本医療薬学会年会 (2010 年 11 月 13 日-14 日) 千葉市, 幕張メッセ
4. 石塚洋一, 富島喜朗, 永留美菜子, 近藤悠希, 入倉充, 入江徹美, アセトアミノフェン誘発肝障害に対する抗酸化薬の効果, 日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28 日-30 日) 岡山市, 岡山コンベンションセンター, 岡山県桃太郎アリーナ

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: アセトアミノフェン肝傷害治療剤
発明者: 石塚 洋一、富島 喜朗、入倉 充、

入江 徹美
権利者: 熊本大学、キッセイ薬品工業
種類: 特許
番号: 特願 2010-250367
出願年月日: 2010 年 11 月 9 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/dcci/>

6. 研究組織

(1) 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・助教
研究者番号: 70423655

(3) 研究協力者

富島 喜朗 (TOMISHIMA YOSHIRO)
熊本大学・薬学教育部・大学院生

松永 直哉 (MATSUNAGA NAOYA)
九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

竹浦 宏幸 (TAKEURA HIROYUKI)
熊本赤十字病院・薬剤部・薬剤師

大戸 茂弘 (OHDO SHIGEHIRO)
九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

入江 徹美 (IRIE TETSUMI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授