

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15326

研究課題名（和文）特異体質性毒性発症にエイコサノイド体内動態の個体差が影響するか？

研究課題名（英文）Impact of the individual variance of eicosanoid disposition on the development of idiosyncratic liver injury

研究代表者

島田 紘明（Shimada, Hiroaki）

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：40783444

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：特異体質性薬物毒性の発症原因として、内因性エイコサノイドの体内動態の個人差を挙げ、肝臓におけるエイコサノイドの動態調節機構の解明を目的とした。ラット肝では主に12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸（12-HETE）が産生され、その産生はリポキシゲナーゼ経路でなくチトクロームP450（CYP）2Cが寄与すること、プロスタグランジンE2（PGE2）はほぼ産生されないが消失活性が高いこと、その消失に有機アニオントランスポーターOATP2A1が寄与することが示唆された。したがって、CYP2CやOATP2A1、PGE2消失に関わる酵素の活性変動は肝臓におけるエイコサノイド量の個人差の原因になり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特異体質性薬物性肝障害の原因として肝臓におけるエイコサノイド動態に着目したのは初めての試みである。またミクロソームなどを用いて肝組織におけるエイコサノイド産生を評価した例はあるが、肝臓の組織構造を保持したまま生体に近い条件下で肝エイコサノイド動態を評価した例は今回が初めてである。本研究成果により、肝臓におけるエイコサノイドの生成・消失に関わる分子が明らかになったことは、肝臓におけるエイコサノイド動態を変動させる因子の評価やエイコサノイド動態の変動が実際に肝障害の程度に与える影響について理解する上で意義がある。

研究成果の概要（英文）：We focused to the inter-individual variance of the disposition of eicosanoids, endogenous bioactive substances, as a cause of drug toxicity that occurred with idiosyncratic manner. In this study, we aimed to clarify the regulatory mechanisms of eicosanoids disposition in the liver. We found that 12-hydroxyeicosatetraenic acid (12-HETE) is a major productive eicosanoid in rat liver and its production seems to be catalyzed by cytochrome P450 (CYP) 2C, not by lipoxygenase. Although the activity of prostaglandin E2 (PGE2) production was quite low, PGE2 was immediately disappeared in rat liver. Moreover, organic anion transporting-polypeptide (OATP) 2A1 seems to contribute to PGE2 disappearance. These results indicated that the activities of CYP2C, OATP2A1, and enzyme related to PGE2 disappearance are key factors to regulate eicosanoids disposition in liver.

研究分野：薬物動態学

キーワード：エイコサノイド 12-HETE PGE2 OATP2A1 P450 肝臓

1. 研究開始当初の背景

患者の体質に依存して惹起される重篤な肝毒性や心毒性、アレルギー反応など薬物による予測困難な副作用を特異体質性薬物毒性 (IDT)と総称する。多くの場合、その原因は薬物が生体内で反応性に富む代謝物 (反応性代謝物)を生成することと考えられている。したがって、生体内で反応性代謝物の生成・分解に関わる酵素や、分布・排出に関わるトランスポーター (以下、輸送体)の発現量や活性の個体差は、IDT 発症において重要である。しかし、IDT 発症には食事や喫煙、飲酒、疾患の有無等の様々な環境要因や患者背景が複雑に關与するため、薬物の代謝酵素および輸送体の発現や活性の個体差だけでは IDT 発症の個体差が説明できない。

一方で、エイコサノイドは必須脂肪酸であるアラキドン酸から合成され、プロスタグランジン (PGs)、ロイコトリエン (LTs)、エポキシエイコサトリエン酸 (EETs)やヒドロキシエイコサテトラエン酸 (HETE)s)などがある。エイコサノイドは全身で炎症反応や免疫応答の調節、血管拡張、細胞増殖による組織修復など様々な作用を有するため、様々な疾患の発症や重症度に関連する。したがって、エイコサノイドの作用は IDT の症状である肝毒性や心毒性、アレルギー反応などと非常に密接な関係があるが、その具体的な関連性は明らかにされていない。エイコサノイドはさまざまな刺激によって、産生や分解に関わる酵素や、膜透過に関わるトランスポーターの発現や活性が変動するため、組織におけるエイコサノイドの動態は個人差が大きいことが想定される。

IDT 発症には薬物の代謝反応が密接に關与することから、従来の IDT 研究では肝臓における反応性代謝物の生成や除去に関わる酵素やトランスポーターの活性変動が重要な検討項目と認識されてきた。一方で、エイコサノイドの肝臓内動態についてはほぼ不明である。

2. 研究の目的

生体恒常性維持に重要なエイコサノイドの体内動態の個人差が、特異体質性薬物毒性の原因となるか明らかにすることが研究の最終目標だが、エイコサノイドの体内動態の調節機構の大部分は不明である。そこで本研究では、肝臓内におけるエイコサノイドの動態制御因子を明らかにすることを目的とし、肝組織内で生成されるエイコサノイドの探索、エイコサノイドの産生酵素や代謝酵素、トランスポーターの阻害が肝臓内エイコサノイド量に与える影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) ラット肝臓 S9 画分におけるエイコサノイド産生の評価

健常な SD ラット (8 週齢, 雄性)の肝臓を採取し、S9 画分を調製した。調製したラット肝臓 S9 画分中にアラキドン酸や NADPH 生成系を添加し、所定時間インキュベーションすることで賛成されるエイコサノイドを酢酸エチルにより反応液中から抽出し、LC-MS/MS により定量した。また、ラット肝臓で EETs や HETE)s の生成に關与することが示唆されているシトクロム P450 (CYP)2C 阻害薬としてテルミサルタンやクロミプラミンを反応液中に添加して、CYP2C 阻害によるエイコサノイド生成に対する影響を評価した。

(2) In situ ラット肝還流法による肝組織におけるエイコサノイド動態評価

健康な SD ラット (8 週齢, 雄性) の門脈および肝静脈にカニューレーションし、脱血後に Krebs 緩衝液を流速 8 mL/min で門脈から肝静脈後に還流した。所定時間還流後に、肝臓から緩衝液中に分泌されるエイコサノイドを酢酸エチルにより抽出し、LC-MS/MS により定量した。また、還流開始時に PGE₂ の重水素標識体を緩衝液中に添加し、OATP2A1 阻害薬スラミンの非共存下、もしくは共存下で還流し、肝臓における PGE₂ 消失に対する OATP2A1 の寄与を検討した。

4. 研究成果

健康ラットの肝 S9 画分におけるエイコサノイド産生の経時変化および各種エイコサノイドの産生量比較を行った結果、特に CYP により産生される EETs および 20-HETE の他、CYP と LOX の両経路で産生される 5-HETE、12-HETE、15-HETE が、COX 経路により産生される PG 類よりも顕著に多く産生されることが示された。そこで、特に産生量の多かった CYP 経路を阻害することにより、LOX および COX 経路によるエイコサノイド産生への影響を、CYP 阻害薬を用いて評価した。ヒト肝ミクロソームにおいて CYP2C8 および 2C9 による EET 産生を抑制することが知られるテルミサルタン (TEL) を添加したが、ラット肝 S9 画分における EET 産生は抑制されなかった。したがって、ヒトとラットでは CYP 分子種の基質認識性が異なる可能性がある。そこで、CYP2C11 阻害活性を有するクロミプラミン (CLO) を添加して、同様に検討した。CLO はラット肝 S9 画分における epoxyeicosatrienoic acids (EETs) および hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) の産生を顕著に阻害した。ただし、EETs と HETEs の産生阻害条件下においても、シクロオキシゲナーゼ (COX) 経路により産生されるプロスタグランジン (PGs) 類の産生量は変化しなかった。したがって、肝臓において主なエイコサノイド産生経路であるシトクロム P450 (CYP) 経路が阻害されても、量的なエイコサノイドインバランスが惹起されないことが明らかになった。また、肝臓において HETE の産生には主に LOX が寄与すると考えられていたが、健康状態では CYP の寄与が大きいことが明らかになった。また、CLO による各種エイコサノイド産生に対する 50% 阻害濃度を算出したところ、臨床で使用される CLO が臨床肝臓中濃度に非常に近い濃度で EETs や HETEs の産生を阻害することが明らかになった。

生理的な組織構造を保持した肝臓におけるエイコサノイド産生が CLO によって阻害されるかを、ラット in situ 肝還流法により検討した。緩衝液中ではエイコサノイドのうち 12-HETE のみが検出され、経時的に緩衝液中濃度が増大した。ラット肝臓 S9 画分と異なり、組織構造を保持した肝臓から還流液中へのエイコサノイド分泌には、産生酵素の細胞局在や、細胞内における内因性基質の存在、分泌過程の存在などにより、緩衝液中には 12-HETE のみが検出された可能性がある。さらに還流時に CLO を共存させると、緩衝液中の 12-HETE 濃度は著しく低下した。また、その他のエイコサノイドについては CLO 添加条件でも検出されなかった。したがって、健康な肝臓から分泌されるエイコサノイドは主に CYP により産生される 12-HETE であることが明らかになった。

肝臓において PGE₂ 産生活性が非常に低いことが明らかになったが、肝臓は PGE₂ の主要な代謝臓器として知られている。そこで PGE₂ の肝臓への取込みにおける OATP2A1 の寄与を評価するため、緩衝液中に PGE₂ の重水素体 (PGE₂-d₄) を添加し、OATP2A1 阻害活性を有するスラミン共存の影響を評価した。PGE₂-d₄ は肝還流開始とともに速やかに消失したが、スラミンの添加によってその消失は顕著に阻害された。したがって、肝 PGE₂ 取込みに

は OATP2A1 が寄与することが明らかになった。

以上より、肝臓において主に産生されるエイコサノイドは 12-HETE であり、CYP による 12-HETE の産生が阻害されても、エイコサノイドのバランス破綻は起こらないことが示唆された。また、肝臓における PGE2 の消失には OATP2A1 が寄与し、阻害により PGE2 消失が低下することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oba Ken-ichi, Shimada Hiroaki, Hashimoto Ryota, Kawase Atsushi, Nakanishi Takeo, Iwaki Masahiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Assessment of hepatic prostaglandin E ₂ level in carbamazepine induced liver injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Regulations	6. 最初と最後の頁 22 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2478/enr-2022-0003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikuta Hiroyuki, Shimada Hiroaki, Sakamoto Kenjiro, Nakamura Rena, Kawase Atsushi, Iwaki Masahiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Species differences in liver microsomal hydrolysis of acyl glucuronide in humans and rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Xenobiotica	6. 最初と最後の頁 653 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00498254.2022.2131484	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Kawase Atsushi, Irie Kota, Matsuda Naoya, Takai Yuzuki, Shimada Hiroaki, Iwaki Masahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Distinct roles of HMGB1 in the regulation of P?glycoprotein expression in the liver and kidney of mice with lipopolysaccharide?induced inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2022.12858	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Shimada Hiroaki, Ikuta Hiroyuki, Kumazawa Keisuke, Nomi Manato, Shiojiri Mayumi, Kawase Atsushi, Iwaki Masahiro	4. 巻 174
2. 論文標題 Relationship between the risk of idiosyncratic drug toxicity and formation and degradation profiles of acyl-glucuronide metabolites of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rat liver microsomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 106193 ~ 106193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejps.2022.106193	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 島田紘明、竹田祐佳、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 肝S9画分において産生されたエイコサノイドの同時定量
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横飛暉斗、島田紘明、吉川幸伽、山本望乃花、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 アセトアミノフェン誘発性肝障害における肝プロスタグランジンE2量調節機構およびプロスタグランジンE2による血管内皮細胞保護作用
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田紘明、横飛暉斗、高田真桜、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 アセトアミノフェン誘発性肝障害に対するPGE2不活化酵素15-PGDH阻害の影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田紘明、横飛暉斗、山田爽、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 四塩化炭素およびアセトアミノフェン誘発性肝障害における肝プロスタグランジンE2量調節機構
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横飛暉斗、島田紘明、吉川幸伽、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 Acetaminophen誘発性肝障害におけるprostaglandin E2量調節機構とその役割
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横飛暉斗、島田紘明、吉川幸伽、山本望乃花、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 Acetaminophen誘発性肝障害に対する15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase阻害の影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Shimada, Yuka Takeda, Atsushi Kawase
2. 発表標題 The interaction between cytochrome P450 inhibitors and eicosanoid production in rat liver
3. 学会等名 日本薬物動態学会第38年会/第23回シトクロムP450国際会議 国際合同大会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田紘明、横飛暉斗、山本望乃花、高田万桜、川瀬篤史、岩城正宏
2. 発表標題 アセトアミノフェン誘発性肝障害に対するプロスタグランジン不活性化酵素15-PGDH阻害の影響
3. 学会等名 第65回日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田紘明、藪内優介、川瀬篤史
2. 発表標題 肝臓におけるプロスタグランジン動態に対するOATP2A1の寄与
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------