

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390020

研究課題名（和文） CYP による代謝活性化を伴う薬物有害反応の発現に関する研究

研究課題名（英文） Research on Drug-Induced Liver Injury Associated with Metabolic Activation by CYP

研究代表者

樋坂 章博 (HISAKA AKIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80420206

研究成果の概要（和文）：

これまでの臨床研究において、薬物性肝障害(DILI)の非遺伝的リスク因子として、グルタチオン量の低下、および血中の 4 種の炎症性サイトカイン濃度の上昇が同定されていた。そこで本研究では、ラット遊離肝細胞において 223 薬物の毒性発現をリスク因子の存在および非存在下で評価したところ、その比が実際のヒトの DILI 発症リスクと良く相関することを見いだした。この方法はこれまでの蛋白アダクト量に基づいた予測法より優れており、今後の新薬開発に有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In our previous study, the decrease of glutathione and the increase of four inflammatory cytokines in blood were identified as nongenetic risk factors of drug induced liver injury (DILI) in patients. In this study, cell toxicity was evaluated using rat primary isolated hepatocytes in the presence and the absence of these risk factors for 223 drugs, and it was revealed that the ratio correlated well with the observed risk of DILI in human. This method was superior to the standard method based on the amount of protein adducts, and would be useful for new drug development in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2012 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	8,100,000	2,430,000	10,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学

1. 研究開始当初の背景

薬物誘発性肝障害(DILI)および“Stevens-Johnson 症候群等の特異的に発現する薬物有害反応は、過去 50 年間にわたって医薬品の市場からの撤退の最大の原因となっており、現代の医療の課題の 1 つであるとともに、新薬開発にとっては重大なリスクである。し

たがって、これを創薬の初期段階で適切に予測し、適切に対処する方法が見いだされるならば、その価値は極めて高い。

DILI は最も頻繁に見られる副作用の一つであり、多岐に渡る薬物が DILI の起因薬となることが知られているが、発症が疑われた時点で速やかに被疑薬を休薬することで多

くのケースで深刻な事態には至らない。しかし、数千人から数万人に数例発症し劇症化する特異体質性 DILI の場合には、症状が深刻で肝移植が必要なケースがあり、致命的となる場合も少なくない。したがって、DILI 発症の危険性が高いと判断された薬物の投与中は、定期的な肝機能検査を実施する等の配慮が必要である。実際に、危険性が不明なまま長期間服用されたトログリタゾンの場合は、発見の遅れが多数の患者の重症化・劇症化を招き、最終的には市場撤退にまで至っている。そのため、被験者がまだ少ない医薬品開発の段階で薬物個々の DILI リスクを評価し、どのような患者の危険性が高いかを予測することには、創薬・臨床の両観点から極めて重大な意義がある。

特異的肝障害等は、薬物か 肝臓中の薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP)等により活性化され、これか CYP 自身を含む体内のタンパク質と共有結合し、最終的に修飾部位か 異物として免疫系に認識されるために有害反応が惹起されると考えられている。そこで本研究では、当初は肝障害等を生ずる薬物と CYP の結合箇所をフロンテオミクス技術により特定した上で、結合により修飾されたペプチド断片を鋭敏に検出することで、新薬候補品の肝障害発現のリスクを *in vitro* 実験で評価する計画であった。

しかし、LC-MS/MS を用いた機器分析により、CYP の修飾されたペプチドは比較的多数検出されるが、肝障害を引き起こす薬物が選択的に修飾ペプチドを生ずる傾向が確認できず、この方法で肝障害を引き起こす薬物を予測して選択することは困難と考えられた。そのため、最終的にはこの方法は断念することとなった。一方で、遊離肝細胞を特定のサイトカイン存在下で培養した場合に、肝障害を引き起こす薬物では細胞毒性が増強される傾向が新たに見いだされ、この性質を利用して新薬候補品の肝障害発現リスクを評価する方法を開発する方針とした。したがって、この報告書では後者の研究について述べる。

なお、これまでに *in vitro* 実験で DILI のリスクを評価する方法としては、CYP による代謝活性化に伴い、蛋白と共有結合してアダクトを生成する薬物が DILI のリスクが高いとの仮説の基に、放射性標識体を用いた結合実験が最も一般的であり、多くの企業で実際に採用されている。また、その結果を支持する論文も報告されているが、その識別性は必ずしも十分とは言えず、また、開発の初期に放射性標識体を準備しなければならない、との点が評価の足かせとなっていた。本研究はこれらの今までの問題点の解決を目指したものである。

2. 研究の目的

本研究に先立つ東大病院の患者を対象とした臨床研究において、DILI 発症以前から存在する肝臓中グルタチオン量の低下、及び血中の炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、IL-6) 濃度の上昇という複数の非遺伝的要因が DILI の危険因子として同定された。それらの相乗的な作用が肝細胞での薬物毒性を亢進させており、DILI 発症に不可欠な背景因子であることが示唆された。そこで本研究ではこれらの危険因子によって毒性の上昇する薬物が DILI を発症させやすいとの仮説の基に、入手が容易で代謝酵素の活性を保持しているラット初代培養遊離肝細胞を用いて、*in vitro* 実験による DILI 発症のリスク評価系を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット DILI モデル

Wistar ラット (8 週齢雄、175-200g) を日本 SLC (静岡) から購入し、12 時間の明暗サイクル下での 1 週間馴化後、24 時間絶食し各種実験を行った。動物の飼育・取り扱い、実験計画に関しては東京大学医学部の動物実験倫理委員会の承認の下で実施した。

薬物を投与する 2 時間前に各炎症性サイトカインの組換え蛋白質 (100 μ g/kg)、1 時間前に GSH 低下剤 (DEM: Diethyl maleate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 1 mmol/kg) を腹腔内投与し、モデル薬物としてジクロロフェナク (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan; 100 mg/kg) を静脈内投与した。薬物投与時点、あるいは投与 12 時間後に血漿・肝臓を採取し、種々の測定を行うまでは -80 $^{\circ}$ C もしくは液体窒素中に保存した。血漿中の肝障害マーカー ALT 値の測定は ALT-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries) を用いた。また、ホルマリン固定した肝臓切片をパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオシン染色した後に、全体の肝組織に占める傷害組織領域の割合を解析ソフト ImageJ 1.43u (National Institutes of Health, Bethesda, MD) で測定した。

(2) 炎症性サイトカインの作製

炎症性サイトカイン 4 種類 (TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、IL-6) の組換え蛋白質を、過去の方法に従い大腸菌で作製した。対象領域は以下の通り。ラット TNF α (GenBankTM accession number NM_012675: Leu80-Leu235)、ラット IL-1 β (NM_031512: Val117-Ser268)、ラット IFN γ (NM_138880: Glu23-Cys156)、ラット IL-6 (NM_012589: Phe25-Thr211)。各可溶性蛋白質を IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad Laboratories, San Diego, CA)、及び DEAE sepharose Fast Flow (GE Healthcare Bio-sciences, Little Chalfont, UK) を用いて精製し、夾雑蛋白質や大腸菌由

来のLPSが残存していないことを確認した。

(3) LPS 前投与ラット DILI モデル

薬物を投与する2時間前にLPS (Sigma-Aldrich) を1 mg/kg (3×10⁶ endotoxin units/kg) 腹腔内投与し、その後ジクロフェナク (100 mg/kg) を静脈内投与した。肝臓中のグルタチオン量を維持する場合は、還元型グルタチオンもしくは N-acetylcysteine (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan; 200 mg/kg) をLPSを投与する1時間前から1時間毎に4回 (ジクロフェナクを投与する-3, -2, -1, 0時間時点) 皮下投与した。また、炎症性サイトカインの作用を抑制する場合には、LPSを投与する1時間前に各中和剤を静脈投与した。TNF α 中和剤 (etanercept, Takeda Pharmaceutical Co., Osaka, Japan; 8 mg/kg)、抗 IL-1 β 抗体 (Abcam Inc., Cambridge, MA; 5 μ g/kg)、抗 IFN γ 抗体 (Abcam Inc.; 15 μ g/kg)、サイトカイン産生抑制剤 (pentoxifylline, Sigma-Aldrich; 50 mg/kg)。薬物投与時点、あるいは投与12時間後に血漿・肝臓を採取し、種々の測定を行った。

ラット肝細胞を用いてTC50を決定した薬物の内、5つの薬物 (ジクロフェナク、チクロピジン、ポリコナゾール、ラニチジン、クロルプロマジン) に関して、LPS (1 mg/kg) を前投与したラットに薬物を8時間毎に6回腹腔内に連投することで、血漿中濃度をTC50の1/2~1/10に維持した (いずれも遊離型濃度に補正)。投与量はシミュレーションソフト SAAM II (Epsilon Group, Charlottesville, VA) で決定し、以下の通り。ジクロフェナク (1回目: 15 mg/kg、2~6回目: 10 mg/kg)、チクロピジン (1回目: 80 mg/kg、2~6回目: 50 mg/kg)、ポリコナゾール (1回目: 50 mg/kg、2~6回目: 30 mg/kg)、ラニチジン (1回目: 250 mg/kg、2~6回目: 150 mg/kg)、クロルプロマジン (1回目: 50 mg/kg、2~6回目: 30 mg/kg)。経時的に採血し、血漿中薬物濃度を高速液体クロマトグラフィー質量分析で定量し、また各時間での肝障害マーカーALT値を測定した。

(4) ラット肝細胞毒性評価系

常法に従い、ラット肝細胞を単離した。コラーゲン処理した384wellプレートに細胞を播種 (3.5×10³ cells/well) し、4時間の前培養後に培地を交換した。同時に、DEM (100 μ M)、各炎症性サイトカインの組換え体 (100 ng/ml ずつ)、ジクロフェナクに曝露し、24時間培養した。培地交換から2時間後に肝細胞中グルタチオン量及び各炎症性サイトカインの下流遺伝子発現量を測定し、24時間後に細胞内のATP量を測定することで細胞生存率を評価した (CellTiter-Glo[®] Luminescent

Cell Viability Assay Kit, Promega, Madison, WI)。50%の肝細胞が死滅する濃度をToxic concentration 50 (TC50) と定義し、各条件下で比較した。

DEM (75 μ M) とGSH合成酵素阻害剤 (BSO: Buthionine sulfoximine, Wako Pure Chemical Industries; 25 μ M) を同時に曝露することで、GSH量をコントロール条件の約50%に維持した。炎症性サイトカインは、5時間まで高濃度 (TNF α 25 ng/ml, IL-1 β 25 ng/ml, IFN γ 25 ng/ml, IL-6 100 ng/ml) で刺激し、一度培地を除き5時間以降は低濃度 (それぞれ5, 5, 5, 20 ng/ml) で曝露した。以上の条件下で薬物を48時間曝露し、細胞生存率を評価した。

過去10年間でPMDAにDILI発症報告のある702薬物の内、入手可能な223薬物 (Appendixに記載) を対象としてラット肝細胞でのTC50を決定した。個々の薬物に関して、インタビューフォーム等から臨床上の平均血漿中濃度 (C_{ss}: Steady-state average plasma concentration)、血漿中非結合型分率 (fp) などの情報を収集し、TC50、C_{ss}ともに遊離型濃度に補正 (TC50はFBS 10%での補正) した上で比を取り、DILI発症率との関連性を検証した。

(5) ROC 曲線解析

受信者動作特性曲線 (ROC curve: Receiver operating characteristic curve) によって各方法間の信頼性を比較した。対象薬物の内、添付文書上に重大な警告がなされている、あるいはすでに市場から撤退している薬物を全て含み、かつ今回測定した全薬物のDILI発症率の中央値に当たる0.2%を閾値として、DILI発症率がそれ以上に高い薬物を低い薬物から分離することが可能か否か、統計解析ソフトSPSS statistics ver. 19 (IBM, Tokyo, Japan) を用いて解析した。対象となる事象、本解析では個々の薬物のDILI発症率が0.2%よりも高いか否か、を各指標の基準値を変化させながら判定し、各基準値での感度と特異度をプロットするため、曲線下面積 (AUC) の値がその判定法の信頼性を意味する。

(6) プロテインアダクト量の評価

過去の方法に修正を加え、ラット肝細胞中で形成されるジクロフェナクと蛋白質の共有結合体、プロテインアダクト量を測定した。単離したラット肝細胞をコラーゲン処理した60mmディッシュに播種 (1.2×10⁶ cells) し、ジクロフェナク ([¹⁴C]-標識体 (GE Healthcare Bio-sciences) 500 nCi + 非標識体 50 μ M)、DEM (100 μ M) に2時間曝露した。回収したラット肝細胞から、過去に報告のある通りにミトコンドリア分画、細胞質分画及び小胞体分画を調製し、各分画を以下

の溶媒で2回ずつ、計6回洗った：①80%メタノール、10%トリクロロ酢酸、②50%メタノール、50%ジエチルエーテル、③80%メタノール。沈殿した蛋白質を1規定の水酸化ナトリウム水溶液(500 μ l)で溶解し、液体シンチレーションカウンターを用いて[14C]のカウントを測定した。

ヒト肝臓ミクロソームを用いて、薬物が蛋白質と形成する共有結合体、蛋白質アダクト量を測定している複数の論文を収集した。論文間で共通する薬物の測定値から互いに補正し、一日最大服用量との積を取ることで、一日当りに形成される蛋白質アダクト量としてDILI発症率との関連性を検証した。

(7) 統計解析

全ての結果は、少なくともn=3以上のデータの平均と標準偏差から表示した。統計的検定は、対応する2群間の比較にStudent's t-testを、それ以上の多群間の比較にANOVA解析とStudent-Newman-Keuls testを行った。また、ROC曲線間の検定はJackknife法に従った。

4. 研究成果

(1) 肝細胞での毒性発現濃度でラット in vivo モデルでも肝障害が誘発される

以前の検討から、グルタチオン量の低下及び炎症性サイトカイン4種類の刺激条件下で見られる薬物依存的な肝細胞毒性は、薬物毎のDILIリスクを評価しうる指標となることが示唆された。そのため、まず、肝細胞レベルで評価した薬物の毒性発現が生体レベルでの肝障害を反映しうるのかどうか、薬物濃度を揃えることで比較検証した。

ラットDILIモデルとして検証した2つのモデル(グルタチオン低下剤DEM・炎症性サイトカイン前投与モデル、LPS前投与モデル)においては、いずれも炎症性サイトカインは初期のみ高濃度で肝臓に曝露され、その後の血中濃度は低下するため、ラット肝細胞でもこれを反映させた条件に修正した上で毒性を評価した。臨床でのDILI報告数が多い5種類の薬物(ジクロフェナク、チクロピジン、ポリコナゾール、ラニチジン、クロルプロマジン)に関して、肝細胞中グルタチオン量低下・炎症性サイトカイン刺激時のTC50を決定した。いずれの薬物においてもTC50の1/10程度の濃度から肝細胞死が起こることが確認されたため、次に、LPS前投与ラットにこれらの薬物の血漿中濃度がTC50の1/2~1/10程度に維持されるように連続投与し、肝障害が誘発されるか検証した。なお、いずれの濃度も遊離型濃度に補正した上で調節した。すると、いずれの薬物においても、LPSを前投与したラットにおいて有意なALT値の上昇が

認められた。このため、肝細胞での毒性評価が in vivo レベルでの肝障害を反映しうることが示唆されたため、ラット肝細胞を用いてより網羅的に薬物の毒性評価を行った。

(2) 臨床での平均血漿中濃度に近い濃度で毒性を発現する薬物ほどDILIを発症しやすい

評価対象薬物として、過去10年間にPMDAにDILI発症の報告があった702薬物の内、入手可能であった223薬物に関して解析を行った。なお、この中にはトログリタゾンのようにDILIが原因ですでに市場から撤退した薬物や、添付文書上に重大な警告が表示されている薬物15種類も含んでいる。ラット肝細胞において薬物の濃度依存的な肝細胞死が観察されている様に、臨床でのDILIリスクを評価するためには臨床での血漿中濃度を考慮する必要があると思われたため、各薬物で求めたTC50値と臨床での平均血漿中濃度Cssの比を取ってDILI発症率を評価した。その結果、肝細胞中グルタチオン量の低下・炎症性サイトカイン刺激存在下では、Css, u/TC50, uとDILI発症率との間に有意性を持った正の相関関係が認められた。このことは、リスク因子の条件が満たされた患者群においては、臨床での平均血漿中濃度に近い濃度で肝細胞死を誘発する薬物ほどDILIを発症しやすいことを示唆しており、個々の薬物のDILIリスクを評価しうる指標として有用な評価法であると思われた。これに対して、リスク因子を加えない条件下ではこのような傾向が消失したため、肝細胞中のグルタチオン量低下と炎症性サイトカイン4種類による刺激という複数の因子の重要性が改めて示された。そこで、リスク因子存在下で認められる肝細胞毒性の亢進の程度が、DILI発症率とどの程度関連性を持つのか検証した。リスク因子非存在下、すなわち薬物単独でのTC50値を、リスク因子存在下で決定したTC50値で除した値を以降TOXICS (Toxic ratio under oxidative and inflammatory conditions)と表記するが、このTOXICSの値が大きいほどリスク因子存在下で毒性が強亢進されることを意味する。このTOXICSの値とDILI発症率との相関関係を調べたところ、DILI発症率が高くなるにつれてばらつきが大きくなるものの、やはり有意性を持って正に相関することが分かった(図1)。なお、抗癌剤のように、細胞毒性が元々強い薬物がDILI発症率の高いグループには多く、そのことがばらつきの原因の一つであると思われた。

以上の解析から、リスク因子存在下に求められたTC50値とCss値の比、あるいはリスク因子存在下・非存在下でのTC50値の比であるTOXICSを評価することで、DILI発症率の高い薬物群を分離・予測出来ることが示

唆された。

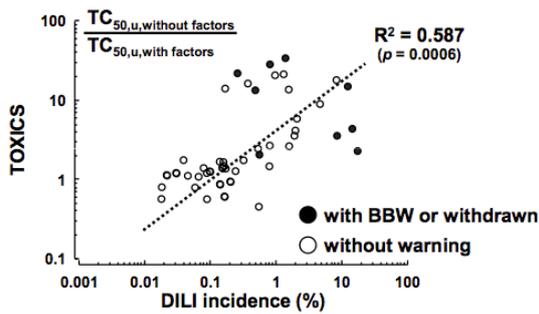


図 1. グルタチオン低下およびサイトカイン添加時の TC50 の減少比と DILI 発症率の関係

そこで、既に重大な警告が発せられている、あるいは市場から撤退した危険性の高い薬物を全て含み、かつ対象とした薬物の DILI 発症率の中央値に当たる 0.2% を閾値として、それより DILI 発症率が高い薬物をこれらの方法で分離することが可能か否か検証した。DILI 発症率の高低で薬物を 2 群に分割し、それぞれの指標のばらつきを確認したところ、薬物単独での TC50 を評価した場合でも DILI 発症率が高い薬物ほど臨床濃度に近い濃度で毒性を発現する傾向は認められたものの、リスク因子存在下での TC50 を評価した場合、さらにはそれらの比を取った TOXICS の値で評価した場合には、より精度良く分離出来ることが示唆された。そのため、このような複数の判定法の信頼性を比較する際に一般的に利用される ROC 曲線を用いて解析を行った。ROC 曲線は、対象となる事象、この場合は DILI 発症率が 0.2% よりも高いか否か、を各指標の基準値を変化させながら分離出来るか判定し、その感度と特異度をプロットするため、曲線下面積 (AUC) の値が 1 に近いほど良好な分離能を持つことを意味する。その結果、リスク因子存在下での TC50 を C_{ss} で補正したもの、更には TOXICS で評価した場合には DILI 発症率が高い薬物群を精度よく分離できることが示された。

(3) ラット肝細胞での毒性評価系を用いることでプロテインアダクト量での評価系よりも精度良く DILI リスクを予測出来る

FDA の企業向けガイダンスでも記載されている様に、薬物の反応性代謝物、あるいは代謝物が蛋白質と形成するプロテインアダクト量を測定することで薬物個々の DILI リスクを予測出来るとして、近年は一般に広く受け入れられてきた。しかし、これらの解析で評価されている DILI リスクは添付文書上の記載に基づいたあいまいなものであり、本研究で各薬物に関して算出した DILI 発症率のように実際の報告数を必ずしも反映した指標ではない。また、ラット肝細胞内でも代

謝依存的な反応性代謝物・プロテインアダクトの生成は起こるため、それらを包含した本評価法はより精度良く DILI 発症率を予測出来るものと思われた。そこで、過去に報告のある薬物に関してプロテインアダクト量を調査し、同一の薬物に関してラット肝細胞を用いた毒性評価系とどちらがより DILI 発症率を予測出来るか比較した。情報が得られた 49 薬物に関して、リスク因子存在下での $C_{ss,u}$ / TC50,u、TOXICS と DILI 発症率の間には有意な正の相関関係が認められた一方で(図 1)、過去の報告で行われている様にプロテインアダクト量に一日最大服用量を掛け合わせたもの、すなわち一日当りに形成されるプロテインアダクト量と DILI 発症率の間には有意性が認められなかった(図 2)。

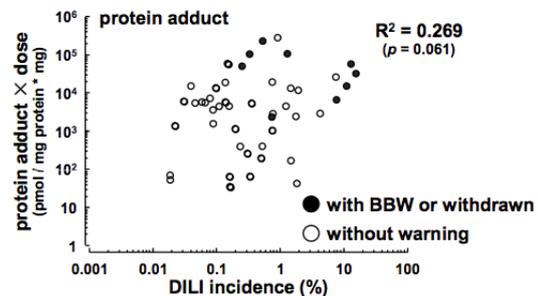


図 2. プロテインアダクト生成量と DILI 発症率の関係

また、DILI 発症率が 0.2% 以上の危険性が高い薬物を分離出来るか ROC 曲線を用いて解析した場合も、とりわけ TOXICS を評価することで非常に分離能よく危険性が高い薬物群を特定できたのに対して、プロテインアダクト量に基づいた解析では分離出来なかった。これらの結果から、現在広く受け入れられているプロテインアダクト量に基づいた DILI リスク予測法よりも精度良く、また簡便に、個々の薬物の危険性を評価出来る方法論を構築することが出来た。

(4) 結論

本研究から、ラット肝細胞中のグルタチオン量を低下させ、かつ炎症性サイトカイン 4 種類に曝露した条件下で肝細胞毒性を評価することにより、現在広く受け入れられているプロテインアダクト量に基づいた評価法よりも精度良く、個々の薬物の DILI リスクを予測出来ることが示された。この評価法に基づいて危険性が高いと判定された薬物に関しては、投与期間中は頻繁な肝機能検査を義務付けるようにしておけば、例え DILI を発症してしまった場合でも早期の発見・対応が容易であり、市販の中止に追い込まれるような大きな問題にはなりにくいのではない

かと思われる。実際に、ポリコナゾールのように予めDILIの発症リスクが高いことが分かっていた薬物に関しては定期的な肝機能検査が推奨されているため、軽度のDILI症例は数多く報告されているものの、それが放置された結果重篤化したケースはほとんど報告されていない。薬効に優れた薬物の開発・臨床使用を軽度のDILI発症のみで中止するのは創薬・臨床の両面から見て非常に大きな損失であり、そういったケースを避けるためにも、本解析で提唱できたDILIリスク評価法は大きな可能性を持っており、今後臨床応用も視野に入れた更なる解析を行う必要がある。

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 1 件)

Takaaki Ishida, Yuki Ikebuchi, Masashi Honma, Kousei Ito, Hiroshi Suzuki.
Predicting High-Risk Patients for the Onset of Drug-Induced Liver Injury. 日本薬物動態学会第27回年会, 2012年11月20日～22日(千葉). ベストポスター賞受賞

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(該当なし)

○取得状況(該当なし)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋坂 章博 (HISAKA AKIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 80420206

(2) 研究分担者

山本 武人 (YAMAMOTO TAKEHITO)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00376469

伊藤 晃成 (ITO KOUSEI)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30323405

山本 武人 (YAMAMOTO TAKEHITO)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00376469

(3) 連携研究者

本間 雅 (HONMA MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60401072

池淵 祐樹 (IKEBUCHI YUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20645725