

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32511

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670084

研究課題名(和文)疾患モデル動物ミトコンドリアを活用した特異体質性薬物毒性の機序解明と評価系の構築

研究課題名(英文) Analysis of idiosyncratic drug toxicity using mitochondria isolated from an animal model of metabolic syndrome

研究代表者

堀江 利治 (HORIE, Toshiharu)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：90120154

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)：特異体質性薬物性肝障害(DILI)の非遺伝的リスク因子として様々な背景疾患が指摘されているが、機序はほとんど明らかとなっていない。本研究では2型糖尿病時の脂肪肝ではDILIリスクが高いことを薬物誘発性ミトコンドリア膜透過性遷移が正常時に比べてより強く生じるという肝臓ミトコンドリア薬物感受性の高さから明らかとした。同時に感受性が正常時とは異なる2型糖尿病肝臓ミトコンドリアは、未知のDILI機序およびリスクを見出す有用なツールとなりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：Although it has been suggested that underlying disease could be a nongenetic risk factor for idiosyncratic drug-induced liver injury (DILI), little is known about the mechanisms that determine the increased sensitivity to DILI. In addition to patient risk factors, drug related risk factors including mitochondrial toxicity have also been proposed to explain the complex mechanisms of DILI. The objective of this study was to determine whether the fatty liver in type 2 diabetes (T2D) is more susceptible to mitochondrial permeability transition (MPT), characterized by swelling and membrane depolarization that are associated with DILI. Our result showed that T2D enhanced susceptibility to drug-induced MPT. We also demonstrated that the liver mitochondria isolated from T2D mice had increased oxygen consumption stimulated by an uncoupler compared to normal liver mitochondria (NLM). It might be a useful tool to predict DILI in T2D patients, because its sensitivity to drug is different from NLM.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝障害 生活習慣病 ミトコンドリア毒性 医薬品 毒性予測

## 1. 研究開始当初の背景

特異体質性薬物毒性 (IDT: idiosyncratic drug toxicity) は動物実験で再現、予測できず多数の患者に使用して初めて見出される。特に肝臓で発症する重篤な IDT は、開発や製造販売中止に直結する。反応性代謝物、ミトコンドリア毒性、輸送担体阻害など薬物リスク因子、ならびに HLA、CYP、UGT の遺伝子多型および年齢、背景疾患など非遺伝的要因に大別される患者リスク因子が相互作用し、ある毒性の閾値もしくは病態到達時に急激に、また時に不可逆的に発症する機序が想定されているが、背景疾患と IDT リスクとの関連性は必ずしも明らかではない。

我々はミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT: mitochondrial permeability transition) と呼ばれる 1500Da 程度以下の分子のミトコンドリア内膜透過性が亢進する現象に着目し、Diclofenac や Acetaminophen の肝障害の機序を示してきた (Hepatology, 2002, 35; J. Hepatol, 2005, 42)。特に、特異体質性薬物性肝障害 (DILI: idiosyncratic drug-induced liver injury) が原因で製造販売中止に至った PPAR α agonist Troglitazone については、Pioglitazone や Rosiglitazone など他のチアゾリジン系糖尿病治療薬に比べて MPT 誘発能が強いことが DILI 発症頻度の高さに関係することを示した (Toxicology, 2006, 222)。さらにはミトコンドリアに局在する CyclophilinD、有機カチオン輸送担体 OCTN1 の発現量の差が MPT およびミトコンドリア呼吸鎖障害の感受性を変えることをノックアウトマウス、ラット、サルなど様々な動物種および培養細胞による解析から示し (Biochem Pharmacol, 2013, 86; Toxicol Sci, 2013, 132)、薬物が有するミトコンドリア障害能のみならずミトコンドリアの性質もまた IDT の重要なリスク因子となりうるとの着想に至った。したがって、肝臓ミトコンドリアの薬物感受性が高いヒトでは DILI 発症リスクが高いと考えられた。

近年、癌、C 型肝炎、神経変性、加齢、心疾患など実に多くの病態発症、進展にミトコンドリア障害が寄与することが着目され、糖尿病についてはミトコンドリア呼吸鎖障害に伴う活性酸素産生が病態発症の原因となりうることを mtDNA 変異マウスで示されている (Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109)。一方、IDT を惹起する薬物によっても呼吸機能障害、活性酸素生成など様々な病態下と共通したミトコンドリア障害がしばしば誘発される。そこで我々は、病態下の肝臓ミトコンドリアでは薬物感受性が高いと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれらの知見に基づき、病態下のミトコンドリア薬物感受性を明らかにすると共に病態下のミトコンドリアを活用した毒性評価が、ヒト DILI の発症機序および未知のリスク解析を行う上で有用なツール

となり得るか明らかにすることを目的とした。特に本研究では様々な疾患の背景にある生活習慣病の肝臓ミトコンドリアに焦点を当て、正常時の肝臓ミトコンドリアとの薬物感受性の違いについて DILI を誘発する代表的な薬物を用いて解析した。

背景疾患が DILI リスクを上昇させると指摘されながら、どういった病態下でどの薬物について成り立つのかこれを詳細に説明できる機序はほとんど明らかとなっておらず、本研究は生活習慣病時の肝臓ミトコンドリア薬物感受性に着目して、この一端を明らかにすることも同時に目的としている。ミトコンドリア薬物障害感受性の違いという新たな視点から DILI の機序および未知リスクの解明を目指したものである。

## 3. 研究の方法

### 1) 疾患モデル動物の選定

薬物誘発性 MPT の感受性が高いヒトでは DILI リスクが上昇すると我々は考えている。そこで DILI の機序解析に用いる実験動物、すなわち肝臓ミトコンドリアの MPT 感受性が高い疾患モデル動物を見出すことを目的とした。様々な生活習慣病モデル動物 (ラット、マウス) の肝臓から遠心分離法によりミトコンドリア画分を調製し、DILI を惹起するモデル薬物 Troglitazone によって誘発される MPT を薬物障害感受性の指標として、正常動物の肝臓から単離したミトコンドリアで誘発される MPT と比較した。

### 2) MPT 高感受性の機序解析

解析した生活習慣病モデル動物のうち、肝臓ミトコンドリアでの Troglitazone 誘発性 MPT 感受性が正常時の肝臓ミトコンドリアに比べて高い疾患モデル動物を用いて、MPT 感受性の違いを生み出す機序を解析した。本研究ではミトコンドリア呼吸機能との関連性に着目した。クラーク型酸素電極を用いて溶解酸素の減少量から肝臓単離ミトコンドリアの呼吸機能に対する Troglitazone の効果を正常動物および疾患モデル動物間で比較した。呼吸基質には Glutamate/Malate もしくは Succinate/Rotenone を用いた。また PTP 開口阻害剤すなわち MPT の典型的阻害剤 Cyclosporin A (CsA) を用いて、Troglitazone によって誘発される MPT と呼吸機能障害との関連性を解析し、生活習慣病肝臓ミトコンドリアでは正常時の肝臓ミトコンドリアに比べて MPT が強く生じる機序を評価した。さらにミトコンドリア呼吸鎖に直接作用しないプロトノフォア FCCP を用いて生活習慣病肝臓ミトコンドリアの性質の違いについて解析し、MPT との関連性を評価した。

## 4. 研究成果

幾つかの生活習慣病モデル動物の肝臓より単離したミトコンドリアに対して、DILI 誘発代表的薬物を作用させて MPT 感受性を評価

した。レプチン受容体欠損肥満2型糖尿病モデル db/db マウス肝臓より単離したミトコンドリアでは、正常時の肝臓ミトコンドリアに比べてカルシウム存在下 Troglitazone 誘発性 MPT が有意に強く生じることが明らかとなった。そこで db/db マウスを DILI 機序解析に用いるモデル動物とし、この肝臓単離ミトコンドリアが MPT 高感受性である機序をミトコンドリア呼吸機能に着目して解析した。

呼吸基質 Glutamate/Malate もしくは、Succinate/Rotenone を用いて溶存酸素の減少量から呼吸機能の評価したところ、いずれの基質においても db/db マウス肝臓ミトコンドリアでは正常マウス肝臓ミトコンドリアに比べ、ADP 添加後の酸素消費すなわち電子伝達系と共役した酸化リン酸化に伴う酸素消費(State3)が亢進していた。そこで、この系を用いて Troglitazone による影響を評価した。db/db マウス肝臓ミトコンドリアおよび正常マウス肝臓ミトコンドリアいずれにおいても Troglitazone による State3 の阻害が見られたが、この程度は両群間に明らかな差は見られなかった。また Troglitazone は濃度依存的に ADP 非添加時の酸素消費速度を両群いずれにおいても亢進させ、この効果は db/db マウス肝臓ミトコンドリアで有意に強く見られた。さらに PTP 阻害剤 CsA を用いて MPT と呼吸機能の関連性を検討したところ、CsA は db/db マウス、正常マウスいずれの肝臓ミトコンドリアにおいても Troglitazone 誘発性 MPT をほぼ完全に抑制し、両群共に CsA 感受性の MPT であることが明らかとなった。また同様に CsA は、Troglitazone による ADP 非存在下の酸素消費速度亢進を抑制したものの、State3 阻害に対する抑制効果は見られなく、この現象は両群共通するものだった。これより ATP 合成とは無関係な酸素消費速度の亢進しやすさが MPT 感受性に関与する可能性が考えられた。そこで、電子伝達系に直接作用せず内膜電位差を解消する脱共役剤 FCCP を用いて、ミトコンドリア酸素消費速度および MPT への影響を評価した。db/db マウス肝臓ミトコンドリアおよび正常マウス肝臓ミトコンドリアいずれにおいても FCCP は単独で MPT を誘発したが、この程度は両群間に明らかな差は見られなかった。一方、ミトコンドリア酸素消費に関しては、db/db マウス肝臓ミトコンドリアでは正常マウス肝臓ミトコンドリアに比べ、FCCP による酸素消費速度亢進の感受性が高いことが明らかとなった。

本研究により、2 型糖尿病時には一部の薬物では DILI リスクが高いことが明らかとなった。また 2 型糖尿病が DILI リスク因子である機序として、肝臓ミトコンドリアの MPT 感受性の高さが示された。ミトコンドリアを障害する強さは DILI 発症の重要なリスク因子であり、世界中で爆発的に患者数が増加している 2 型糖尿病時の肝臓ミトコンドリアで MPT 感受性が高まるという本研究成果は DILI

リスク予測を行う上で重要な知見と言える。本研究により疾患時に薬物感受性が変わる肝臓ミトコンドリアは、DILI の未知リスクおよび機序を見出す有用なツールとなりうる可能性を示した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Susukida T, Sekine S, Nozaki M, Tokizono M, Oizumi K, Horie T, Ito K. Establishment of a Drug-Induced, Bile Acid-Dependent Hepatotoxicity Model Using HepaRG Cells. *J Pharm Sci.*2016; 105(4):1550-60. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.xphs.2016.01.013.
2. Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions: Insight into Mechanisms and Consequences. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2016;41(2):93-108. (査読あり)  
doi: 10.1007/s13318-015-0296-z.
3. Shirakawa M, Sekine S, Tanaka A, Horie T, Ito K. Metabolic activation of hepatotoxic drug (benzbromarone) induced mitochondrial membrane permeability transition. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;288(1):12-8. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.taap.2015.06.018.
4. Susukida T, Sekine S, Ogimura E, Aoki S, Oizumi K, Horie T, Ito K. Basal efflux of bile acids contributes to drug-induced bile acid-dependent hepatocyte toxicity in rat sandwich-cultured hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(7):1454-63. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.tiv.2015.06.004.
5. Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;282(3):237-43. (査読あり)  
doi: 10.1016/j.taap.2014.12.004.

〔学会発表〕(計5件)

1. 濱田和真、桜田啓広、齋藤希衣、中埜貴文、堀江利治  
2 型糖尿病時の肝臓ミトコンドリアにおける薬物障害性の解析  
日本薬学会第 136 年会(パシフィコ横浜・

神奈川・横浜) 2016年3月

2. 中埜貴文、濱田和真、森屋恭爾、  
小池和彦、堀江利治  
HCV コア蛋白質が惹起する細胞内ポルフィリン代謝異常に関する検討  
日本薬学会第136年会(パシフィコ横浜・神奈川・横浜) 2016年3月
3. 中埜貴文、濱田和真、森屋恭爾、  
小池和彦、堀江利治  
C型肝炎ウイルスが惹起する細胞内ポルフィリン代謝異常についての検討  
日本薬物動態学会第30回年会  
(タワーホール船堀・東京)2015年11月
4. 濱田和真、中埜貴文、堀江利治  
生活習慣病モデル動物を用いたミトコンドリア薬物感受性の解析  
日本薬学会第135年会(神戸サンボーホール・兵庫・神戸) 2015年3月
5. 中埜貴文、濱田和真、森屋恭爾、  
小池和彦、堀江利治  
C型肝炎とポルフィリン症の関連性についての解析  
日本薬学会第135年会(神戸サンボーホール・兵庫・神戸) 2015年3月

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀江 利治 (HORIE, Toshiharu)  
帝京平成大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90120154

### (2)研究分担者

濱田 和真 (HAMADA, Kazuma)  
帝京平成大学・薬学部・講師  
研究者番号: 90596884

中埜 貴文 (NAKANO, Takafumi)  
帝京平成大学・薬学部・助教  
研究者番号: 40720793