反応性代謝物および免疫・炎症関連因子を考慮したフェニトイン誘導性肝障害発症機序に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42238

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

氏　　名	佐々木　永太
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	甲第8号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第４条第１項）
学位授与の題目	反応性代謝物および免疫・炎症関連因子を考慮したフェニトイン誘導性肝障害発症機序に関する研究
論文審査委員	主査　中島　美紀
	副査　加藤　将夫
	副査　松下　良
	副査　猪部　学
	副査　横井　毅

学位論文要旨

Drug-induced liver injury is an important issue for drug development and clinical drug therapy. Phenytoin (diphenylhydantoin, DPH) is an anticonvulsant drug that is widely used for the treatment of epilepsy. Some patients who are administered DPH may suffer from liver injury characterized by hepatic necrosis and neutrophil infiltration. The aim of this study was to establish a mouse model for DPH-induced liver injury and to analyze the mechanisms of liver injury focusing on metabolic activation, and immune- and inflammation-related factors. Female C57BL/6 mice were administered DPH for 5 days in combination with L-buthionine *S,R*-sulfoximine. After the last DPH administration, the plasma alanine aminotransferase (ALT) level was increased, hepatic lesion was observed during the histological evaluations, and the hepatic glutathione (GSH) level was significantly reduced. Hepatic mRNA levels of innate immune-related factors and plasma interleukin-17 protein levels were significantly increased. A novel GSH-conjugated DPH, which was a conjugate of putative electrophilic arene oxide intermediate with GSH, and was identified in bile from mice with DPH-induced liver injury. Cysteine- and *N*-acetylcysteine-conjugated DPH were identified in plasma, whose levels were correlated with the plasma ALT levels. In conclusion, the present study found that cytochrome P450-dependent metabolic activation followed by the stimulation of the innate immune responses is involved in DPH-induced liver injury.

薬物誘導性肝障害は、医薬品開発の中止理由の主要な原因であり、候補化合物の肝障害性を予測することは重要である。しかし、多くの薬物誘導性肝障害は正常動物で再現することが難しく、非臨床試験において候補化合物の肝障害性を予測することは困難である。その原因のひとつに肝障害発症機序が不明であることが挙げられ、薬物誘導性肝障害の発症機序を解明することは医薬品の開発研究において重要な課題である。抗てんかん薬フェニトイン (diphenylhydantoin, DPH) はごく稀に肝障害を発症することが報告されている。DPH の服用により肝障害を発症したヒトでは、肝組織に好酸球や好中球などの免疫細胞の浸潤や薬疹が認められる場合が多く、免疫因子の関与が示唆されている。DPH はシトクロム P450 (CYP) により毒性発現に関与する反応性代謝物へと代謝されることが推察されているが、そのような代謝物を実際に検出した報告や DPH の代謝と毒性発現の関係を検討した報告はない。そこで、本研究では DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作製し、肝障害発症機序を代謝と免疫の両面から検討することを目的とした。

1) DPH 誘導性肝障害モデルマウスの作製と肝障害発症における免疫および炎症関連因子の関与

はじめに、C57BL/6 マウスに DPH を 100 mg/kg で 5 日間経口投与したところ、肝障害マーカーである血漿中 ALT 値の上昇（1500 U/l 程度）が認められたが、DPH の薬理作用と推察される昏睡によりほぼ全ての個体が死亡した。そこで、DPH を 50 mg/kg で 2 日間腹腔内投与した後に 100 mg/kg で 3 日間経口投与する方法に変更することにより、致死率を 25%にまで低下させることができた。この時の血漿中 ALT 値はおよそ 200 U/l であった。さらに、グルタチオン（GSH）合成阻害剤である L-buthionine *S,R*-sulfoximine (BSO) を併用処置することで血漿中 ALT 値は高値を示した（700 U/l 程度)。一方で、200 mg/kg の DPH を BSO と共に単回投与した際には血漿中 ALT 値の上昇は認められず、DPH の反復投与が肝障害発症の鍵であることが示された。病理学的解析では、DPH/BSO 投与群において肝細胞のアポトーシスおよび変性が認められた。また、肝臓中には好中球の浸潤が認められ免疫因子が肝障害発症に関与していることが示唆された。BALB/c マウスを用いて同様に DPH および BSO を反復投与しても肝障害は発症せず、系統間で異なる何らかの因子が肝障害発症に重要と考えられた。DPH の反応性代謝物は CYP により生成され、GSH 抱合を受けることが示唆されている。肝臓中 GSH 含量は溶媒対照群と比較して DPH 投与群また

は BSO 単独投与群で低値を示した。DPH/BSO 投与群では DPH または BSO 単独投与群よりも低値を示した。したがって、DPH の反応性代謝物が肝臓中 GSH を消費し、BSO は肝臓中 GSH を低下させ反応性代謝物の GSH 抱合を不十分にさせることで、肝障害を増悪させるものと考えられた。次に、肝障害発症における免疫・炎症関連因子の関与を検討するため、肝臓中の自然免疫関連因子 mRNA 発現量を測定した。Kupffer 細胞などの自然免疫に関与する細胞は toll-like receptors (TLRs) を発現し、TLRs のリガンドとなる S100A8, S100A9 や high mobility group box 1 (HMGB1) などの damage- associated molecular pattern molecules (DAMPs) によって活性化される。DPH/BSO 投与群において、血漿中 HMGB1 タンパク質濃度および肝臓中 S100A8, S100A9 mRNA 発現量が DPH 最終投与 3 時間後において高値を示した。DAMPs と TLR4 を介した免疫活性化が肝障害発症に寄与しているか検討するため、TLR4 アンタゴニストであるエリトランを DPH 最終投与と同時に処置したところ、血漿中 ALT 値は溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。したがって、DAMPs と TLR4 を介して自然免疫が活性化されることが肝障害発症に繋がっていることが示唆された。薬物または化学物質による肝障害の発症および進行において、ヘルパーT (Th) 細胞を介した獲得免疫系が関与することが実験動物を用いた検討から示唆されている。DPH/BSO 投与群では、Th17 細胞の分化マーカーである RORγt mRNA 発現量が高値を示した。Th17 細胞はインターロイキン (IL)-17 を産生し、好中球を活性化することが知られている。DPH/BSO 投与群の血漿中 IL-17 タンパク質量は、肝障害発症に伴い高値を示した。さらに、抗 IL-17 抗体を DPH 最終投与 3 時間後に併用処置することで肝障害が緩和されたことから、IL-17 が肝障害発症に関与していることが示唆された。

2) DPH 誘導性肝障害モデルマウスにおけるチオール抱合体の検出と肝障害発症における CYP 代謝の関与

反応性代謝物の多くは抗原産生を介した免疫細胞活性化や細胞機能障害を引き起こすことで毒性発現を誘起すると考えられている。DPH 誘導性肝障害の発症において免疫活性化による炎症反応の誘起が関与していることを示したが、反応性代謝物が肝障害発症に関与しているかは不明である。DPH は反応性代謝物へと代謝されることが *in vitro* 実験から示唆されている。また、DPH 由来の反応性代謝物の肝ミクロソームタンパク質への共有結合量は、GSH やシステイン (Cys) を添加することにより減少することから、DPH の反応性代

謝物は GSH 抱合を受けると推察される。しかし、これまでに DPH のチオール抱合体代謝物を検出した報告はない。そこで、DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁および血漿中のチオール抱合体代謝物を LC-MS/MS にて定性分析したところ、DPH のベンゼン環に GSH、Cys または NAC (*N*-アセチルシステイン) が結合した代謝物 (チオール抱合体) が検出された。構造解析により、それらのチオール抱合体はアレンオキシド体から派生した代謝物と推察された。

DPH 誘導性肝障害モデルマウスにおける代謝プロファイルを解析するため、4'-HPPH、ジヒドロジオール体、グルクロン酸抱合体、NAC 抱合体および NAC 抱合体の血漿中濃度を LC-MS/MS にて定量分析したところ、反復投与 3 日目の肝障害未発症時点と比較して反復投与 5 日目の肝障害発症時点において、いずれも高値を示した。したがって、反復投与によって DPH の代謝が亢進しており、その現象が肝障害発症に関与していることが示唆された。

肝障害発症における Cyp 代謝の関与を検討するため、DPH 誘導性肝障害モデルマウスに Cyp 阻害剤 1-aminobenzotriazole (ABT) を DPH 最終投与から 1 時間前に併用処置したところ、血漿中 ALT 値は低値を示した。DPH の代謝亢進が Cyp 代謝の亢進に起因するか検討するため、DPH 最終投与後の血漿中 DPH および代謝物濃度を測定したところ、4'-HPPH、ジヒドロジオール体、Cys 抱合体および NAC 抱合体代謝物濃度が ABT 投与群で低値を示した。また、DPH 投与による肝臓中 GSH 含量の低下は ABT 併用処置で抑制された。したがって、DPH 誘導性肝障害の原因となる代謝物は CYP 代謝により生成され、かつ GSH 抱合を受けるアレンオキシド体であると推察した。

DPH 誘導性肝障害発症に関わる Cyp 分子種を検討するため、肝ミクロソームにおける Cyp タンパク質量をウェスタンブロッティング解析により、Cyp 酵素活性を HPLC により測定したところ、DPH 反復投与日数依存的な Cyp2c タンパク質量の増加と、Cyp2c 指標酵素活性の上昇が認められた。ヒトおよびラットのアレンオキシド体生成が、CYP2C によって触媒されることが示唆されている。したがって、DPH 誘導性肝障害モデルマウスでは Cyp2c の自己誘導が誘起されることで、アレンオキシド体の生成が増加しているものと推察した。Cyp を誘導することで DPH を反復投与することなく肝障害を誘発できる可能性を考え、Cyp 誘導剤フェノバルビタールを 4 日間処置したマウスに DPH および BSO を単回投与したところ、血漿中 ALT 値は、DPH 反復投与による肝障害モデルよりも低いものの高値

を示した（およそ 300 U/l)。したがって、Cyp 誘導動物は正常動物と比較して反応性代謝物による毒性を発現しやすいと考えられ、薬物連投により代謝亢進が予測される薬物の毒性評価に応用できるものと期待される。

3) 総括

本研究では DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作製し、肝障害発症機序を代謝と免疫の両面から解析した。これまでに DPH による毒性発現に対して GSH が保護的に作用することが推察されており、本研究では肝臓中 GSH 含量の低下が DPH 誘導性肝障害を増悪させることを、肝障害モデル動物を用いて直接的に示した。しかし、GSH 枯渇剤の BSO と共に DPH を高用量で単回投与しても肝障害は発症せず、DPH 反復投与が肝障害発症の鍵であることを示した。DPH を高用量での反復投与した場合、薬理作用によるものと推察される昏睡によって致死に至ったことから、投与量を増やして肝障害モデルを作製することは困難であったが、投与経路と投与用量を工夫することで致死率を低下させ、肝障害モデルを確立した。これまでに報告されている薬物誘導性肝障害モデル動物は、薬物単回投与により作製されていることが多い。DPH のように単回投与で肝障害を誘起できない薬物においては、GSH 枯渇剤の併用処置、反復投与や動物の系統を考慮することで肝障害モデル動物を作製することが可能になるかも知れない。薬物誘導性肝障害をはじめとする多くの肝障害の発症過程で、免疫因子が中心的な役割を担っていることが実験動物を用いた検討によって示されている。したがって肝障害発症機序を体系的に理解する上で肝臓中の免疫機構を解析することは重要である。本研究では肝障害発症初期から肝臓中の免疫関連遺伝子の発現量を経時的に解析し、TLR4 シグナルを介した自然免疫の活性化が肝障害発症に関与していることを示した。また、自然免疫の活性化に加えて獲得免疫に関わる Th17 細胞によって IL-17 が産生され、炎症反応が誘起されていることを示唆した。また、薬物代謝解析より DPH 反復投与によって反応性代謝物の生成が亢進し、肝障害が発症することが示唆された。ヒトにおける多くの薬物誘導性肝障害は、薬物の反復投与によって発症する。したがって、本研究で得た知見は薬物誘導性肝障害発症機序を理解する上で有用であると考えられ、非臨床試験をはじめとする医薬品開発研究に有益な情報を提供できたと考える。

審査結果の要旨

薬物誘導性肝障害（DILI）の多くは非臨床試験における動物実験で検出することが難しく、臨床ではじめて顕在化する場合がほとんどである。DILI モデル動物がほとんど存在しないこともあり、発症機序が解明されていないものが多い。本研究では DILI を引き起こすフェニトイン(DPH）に着目し、肝障害モデル動物を作出して肝障害発症機序を免疫と代謝の面から解明することをめざしたものである。C57BL/6 マウスにグルタチオン（GSH）合成阻害剤と DPH を工夫して反復投与することで、肝障害モデルの樹立に成功した。肝臓中 GSH 低下が肝障害発症の鍵となることから親電子性代謝物が肝障害発症に関与しており、Toll-like receptor による自然免疫の活性化が肝障害発症に重要であることを明らかにした。また、新規代謝物として尿中および胆汁中から DPH チオール抱合体を同定し、肝障害発症に関わる反応性代謝物として arene oixde 体が生成されていることが示唆された。Arene oixde 体生成を担うシトクロム P450 の誘導による DPH 代謝の変化が肝障害発症のリスクファクターとなっていることを明らかにした。以上、本研究ではこれまでに作製が困難であった DPH 誘導性肝障害モデル動物を作製し DILI 発症機序について新たな知見を与えた。これらの成果は非臨床試験における DILI 予測精度の向上や臨床における DILI 回避につながるものと期待され、博士（創薬科学）に値すると判定した。