

氏名(生年月日)	岸田 知行 (1976年6月17日)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論博 第189号
学位授与の日付	2013年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	非臨床安全性評価における肝薬物代謝酵素及び特異体質性の薬物性肝障害に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 高田 寛治 (副査) 教授 安井 裕之 (副査) 教授 西口 工司

## 論文内容の要旨

Cytochrome P450 (CYP) はステロイドや脂肪酸などの内因性物質のみならず、薬物や農薬などの外来異物の酸化的代謝において中心的役割を担っている代謝酵素であり、特に肝臓のミクロゾーム分画に高濃度で存在している。体内に取り込まれたこれらの異物の多くは、CYP による代謝で解毒化され体外に排泄されるが、逆に活性化され、より毒性の高い代謝物(反応性代謝物)に変化し、様々な障害を誘発する異物も多く存在する。

医薬品開発において、特異体質性薬物毒性(idiosyncratic drug toxicity, IDT)と総称される副作用の発現は最も懸念される事項の一つである。IDTは、発症頻度が1/1,000~1/100,000と非常に稀にもかかわらず、薬物の薬理作用及び投与量とは無関係に肝毒性、心臓毒性、血液・骨髄毒性あるいはアレルギー反応などの重篤な障害を引き起こし、時として死に至らしめる。IDTの発現機序については、薬物の反応性代謝物及び免疫系の関与が示唆されているが、正常な実験動物ではIDTは再現されず、また適切な動物モデルが確立されていないことから、それらの仮説を裏付ける実験的証拠は不十分であり、詳細は明らかとなっていない。このようなIDTの特性から、非臨床安全性試験では評価が難しく、臨床試験後期又は市販後になってはじめて顕在化し、撤退を余儀なくされることも多い。従って、製薬企業にとってできるだけ開発初期にIDT回避のためのアプローチ及び評価法の確立が急務となっている。

本研究では、薬物の反応性代謝物生成に関与する肝臓中のCYPに着目し、非臨床安全性試験で用いられるSprague-Dawley (SD) 及びWistar (WI) ラットにおけるCYP発現量及び肝ミクロゾーム中の酵素活性並びにCYP誘導剤に対する各CYP分子種の反応性を検討した。また、SDラットをlipopolysaccharide (LPS) で前処置した免疫機能改変モデルをIDTモデルとして用い、免疫賦活化条件下における薬物の反応性代謝物の挙動を評価し、IDT回避のための評価法を模索した。

### Sprague-Dawley 及び Wistar ラットの肝薬物代謝酵素の系統差に関する検討

医薬品開発における非臨床安全性試験において、高頻度で使用されるSD及びWIラットについて、肝薬物代謝酵素CYPの発現量及びCYP誘導剤に対する反応性の系統差を検討した。CYP1A1, CYP1A2 及びCYP3A2 mRNA発現量はSDよりWIラットで高く、CYP誘導剤であるphenobarbital処置により、その差は

より明らかとなった。また、肝ミクロゾーム中の CYP1A 酵素活性及び総 P450 含量の増加並びに小葉中心性肝細胞における滑面小胞体の増加も WI ラットで顕著であった。CYP3A 誘導剤である dexamethasone を用いて SD 及び WI ラットを処置したとき、CYP3A1 及び CYP3A2 mRNA 発現量は SD よりも WI ラットでより強く誘導されたが、CYP1A 誘導剤である  $\beta$ -naphthoflavone の処置では両系統とも顕著な CYP1A の誘導が認められたにもかかわらず、誘導後の mRNA 発現量に系統差は認められなかった。また、これらの誘導に強く関与する各種核内受容体の mRNA 発現量は、phenobarbital あるいは dexamethasone を用いた処置で SD より WI ラットで有意に高かった。以上より、WI ラットは SD ラットよりも肝臓中の CYP1A 及び CYP3A の mRNA 発現量が有意に高く、その系統差の原因は、それらの分子種の誘導にかかわる核内受容体と関連していると考えられた。CYP1A 及び CYP3A が薬物動態学的及び毒性学的に重要な役割を担っていることを考慮すると、これらの酵素によって特異的に代謝されるような化合物の非臨床試験では、用いられるラット系統によって異なる試験結果が得られる可能性が考えられた。また、CYP 誘導剤に対する CYP mRNA 発現量の反応性においては、WI 及び SD ラット間で類似の反応性を示したことから、候補化合物の CYP 誘導評価はどちらのラット系統を用いても同様の結果が得られることが示唆された。

#### LPS 処置ラットを用いた特異体質性の薬物性肝毒性の検討

LPS はグラム陰性細菌の細胞外膜の主要構成成分であり、生体内に取り込まれると細胞膜に発現する Toll 様受容体 4 を介して、種々の炎症性サイトカインを産生させる。LPS で SD ラットを処置した肝ミクロゾームを用いて、*in vitro* 条件下における diclofenac (DCF) の水酸化活性及び DCF の反応性代謝物生成に及ぼす LPS の影響を検討した。LPS 処置ラットから採取した肝ミクロゾーム中では、総 P450 含量並びに testosterone の 6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -及び 16 $\beta$ -水酸化活性に顕著な低下が認められた。加えて、DCF の水酸化活性及び DCF の反応性代謝物生成量の減少も認められた。これらの結果は、LPS による CYP のダウンレギュレーションを示唆した。腹腔マクロファージを用いた細胞実験では、LPS の低濃度処理によっても炎症性サイトカインである interleukin-6 (IL-6) 及び tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の顕著な増加が認められ、ストレス応答蛋白である inducible NO synthase (iNOS) 及び heme oxygenase-1 (HO-1) の増加も認められた。HO-1 は、炎症反応によって生じるフリーラジカルや iNOS によって生成される NO などの酸化ストレスによって誘導されることから、LPS による CYP のダウンレギュレーションは LPS 刺激で惹起された酸化ストレスが一因であることが示唆された。

DCF が特異体質性肝障害を誘発することはよく知られている。LPS あるいは DCF 単独投与では肝障害を起こさない低用量でラットに LPS/DCF 併用投与したとき、肝逸脱酵素である ALT 及び AST 活性の増加とともに IDT 様の肝障害が病理組織学的に認められた。この肝臓を採取し、組織と反応性代謝物との付加体生成量を測定した結果、DCF 単独投与に比して、(アシルグルクロン酸抱合体由来の) DCF 及び 4'-水酸化代謝物の付加体生成量に変化は認められなかったが、5-水酸化代謝物 (5-OH-DCF) の付加体生成量は有意に増加した。また、反応性代謝物の解毒に重要な役割を担うグルタチオン (GSH) の肝臓中濃度を測定した結果、LPS/DCF の併用投与によって肝臓中の GSH 濃度の有意な低下が認められた。従って、5-OH-DCF の付加体生成量の増加は、肝臓中の GSH 濃度低下に依存した変化と考えられた。なお、*in vivo* 条件下では、LPS による CYP のダウンレギュレーションの影響は明らかではなかった。

薬物と蛋白との付加体の生成量は IDT 発現におけるリスクファクターであり、また 5-OH-DCF の付加体は免疫反応の抗原になり得ることから、その付加体生成量の増加は IDT 発現に重要な役割を果している可能性が示唆された。また、LPS 刺激によって発生する酸化ストレスや炎症性サイトカインなどは、危険シグナルとしてその免疫反応を惹起し、IDT 発現リスクを増強させるものと推察された。

以上、結論として、本論文では、非臨床安全性試験において高頻度で用いられる SD 及び WI ラットにおける CYP の発現量及び酵素活性並びに CYP 誘導剤に対する反応性の系統差を明らかにした。また、CYP による代謝活性化によって生成される反応性代謝物と組織蛋白との付加体の増加が IDT 発現において重要な役割を果す可能性を、SD ラットを用いて実験的に示した。

## 論文審査の結果の要旨

医薬品製剤は有効性と安全性とのバランスの上に成立している産業生産物である。安全性については、軽度の副作用から重度の障害に至るまで広範囲の表現系が対象となる。組織障害や臓器障害に関しては非臨床試験における毒性試験からある程度の精度でもって予測することができるまで医薬品開発の技術は進歩を遂げてきている。しかし、スチーブンソン症候群やギランバレー症候群などの劇症を伴う障害については発症頻度が極めて低いことから、2013 年時点においても発症の予測を行うことは困難である。著者はこのような特異体質性薬物毒性(idiosyncratic drug toxicity, IDT)と呼ばれる障害の発症を医薬品開発の初期段階において回避するための方法論の確立ならびに評価法の開発にチャレンジを試み、その研究成果を執筆している。本学位論文は2章から成っている。まず、薬物の反応性代謝物の生成に関与する肝薬物代謝酵素CYPの分子種について主要実験動物種であるSprague-Dawley(SD) ラットおよびWistar(WI)ラットにおける酵素誘導剤に対する反応性について記述した後、IDT モデルラットである lipopolysaccharide(LPS)前処置免疫機能改変ラットを用いて免疫賦活条件下における反応性代謝物の挙動について記述している。すなわち第一章においては、SD および WI ラットにおける CYP の系統差に関する研究として、CYP 分子種の mRNA 発現量について定量的に検索を行った。その結果、WI ラットは SD ラットよりも肝臓中の CYP1A および CYP3A の mRNA の発現量が高く、その差異は各々の分子種の誘導に関与する核内受容体と関連していることが示された。従って、これらの分子種の基質となる薬物の非臨床試験において用いるラットにより系統差が発現する可能性が示唆された。

第二章においては、LPS 前処置免疫機能改変ラットを用いた肝毒性に関する研究として、SD ラットの肝ミクロゾームを用いて *in vitro* で diclofenac(DCF)の反応性代謝物生成に関する検討を行い、LPS によるダウンレギュレーションの関与が示唆された。また、引き続いて行った腹腔マクロファージを用いた細胞実験では、LPS によるダウンレギュレーションはLPS 刺激で惹起された酸化的ストレスが一因であることが示された。そこでLPS と DCF 併用が肝代謝能に及ぼす影響について検討を行ったところ、肝内グルタチオン濃度の低下が認められるとともに、DCF の 5-水酸化体の付加体生成量が増加した。DCF の 5-水酸化体の付加体は免疫反応の抗原となり得ることから、付加体生成量の増大により IDT 発現が誘発された可能性が考えられた。以上、2章にわたる研究の成果は、医薬品開発の初期の段階において将来の承認・販売後に起こる IDT を予測して未然にその発症を防止するための基本となる情報を提供するものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。