

117. 代謝物に着目した薬物性肝障害感受性マーカー探索

齊藤 公亮

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

Key words : リピドミクス解析, 肝障害, 感受性マーカー

緒 言

医薬品による有害作用は、医療事故や医薬品の開発中止・市場撤退の大きな原因の一つである。特に薬物性肝障害は代表的な有害作用の一つであり、重症化すると命に係わる肝不全に至る。したがって、医薬品による肝障害の適切な評価は非臨床・臨床どちらにおいても重要視されており、我々が提案した「官民共同による重篤副作用バイオマーカー開発」が日本医療研究開発機構委託研究費に採用され、薬物性肝障害を含めた重篤副作用の好感度かつ特異的な新規バイオマーカー探索・検証・臨床応用が始まっている。一方で、早期発見のみでの安全性の確保は非常に困難であることから、医薬品の安全性をさらに向上させるためには、並行して医薬品服用前に薬物性肝障害の感受性を予測することが必要であると考えられる。

これまでに薬物性肝障害の感受性予測においては、ゲノムを網羅的に探索することでリスクとなる遺伝子多型（ゲノムバイオマーカー）を同定するという手法が用いられてきたものの、ゲノムバイオマーカーはヒト個人に固有であり、生活習慣等による経年的な感受性の変化を予測することは不可能である。したがって、ゲノムバイオマーカーと相補的に運用することのできる薬物性肝障害の新規感受性予測バイオマーカーが必要であると考えられる。血中代謝物はゲノムと異なり、肝臓において生合成・代謝・排泄される分子が多く、血中代謝物レベルがその時点における肝臓の状態を反映していることが示唆される¹⁻³⁾。したがって、特定の血中代謝物が医薬品服用時点における薬物性肝障害に対する感受性を反映する可能性も十分に考えられる。そこで本研究では、アセトアミノフェン（APAP）単回投与誘導性肝障害マウスをモデルとして、メタボロミクス解析を用いて薬物性肝障害に対する感受性バイオマーカーを同定することを目的とした。

方 法

1. マウスへの APAP 投与

4系統のマウス（ICR、C57BL/6、C3H、BALB/c）は日本チャールズ・リバーより、5週齢時に購入し、馴化後、6週齢から実験に用いた。各系統のマウスは8匹、4匹、4匹の3群に分け、それぞれコントロール群、APAP低用量群、APAP高用量群とした。APAP低用量群は150 mg/kg、APAP高用量群は250 mg/kgの用量で16時間の絶食後単回腹腔内投与し、24時間後に採血を行った。血漿はEDTA-2Kチューブを用いて、血清は血清分離用チューブ（アズワン）を用いて調製し、それぞれ-80℃で保存した。

2. Alanine Transaminase (ALT) 測定

ALT測定はAlanine Transaminase Color Endpoint Assay Kit（コスモバイオ）と採取した血清（2.5 μl）を用いて発色反応を行い、マルチプレートリーダーを用いて測定した。

3. 抽出とリピドミクス解析

血漿（30 μl）から、内部標準物質（IS）存在下、メタノール・イソプロパノール混合液によって脂質を抽出した。フィルターろ過後、グリセロリン脂質（Glycerophospholipids, GPLs）及びスフィンゴ脂質（Sphingolipids, SPs）を、高速液体クロマトグラフ（UltiMate 3000, ThermoFisher Scientific）及びOrbitrap フーリエ変換質量分析計（Orbitrap

Fusion、ThermoFisher Scientific) を用いて、網羅的に測定した。得られたデータは、Compound Discoverer (ThermoFisher Scientific) による同定・定量化を行い、各マウス群間、肝障害への高感受性群と低感受性群で多変量解析 (PCA、OPLS-DA) を行い (SIMCA-P + 12)、S-plot によってバイオマーカー候補を同定した。

4. 倫理面への配慮

本研究は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(1973年10月1日 法律第105号、2013年改正) に従って実施される研究であり、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会により承認されている。

結 果

1. マウス系統間における肝障害感受性の差異

各マウス系統について、APAP 投与群における ALT レベルを測定したところ、低容量では ICR、C57BL/6、C3H においては有意ではない軽微な血清 ALT の増加が認められた (図 1)。

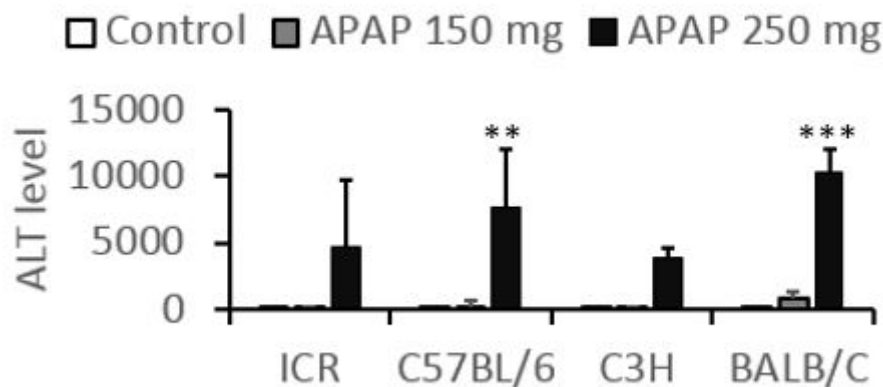


図 1. APAP 投与による血清 ALT レベルの増加の系統差

各系統に APAP を投与し、24 時間後に血清中 ALT レベルを測定した。統計解析は Two-way ANOVA によって行い、多重性を Dunnett's multiple comparisons test によって補正した。**及び***、C3H と比較して、多重性補正後に $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ 。

一方、BALB/c においては有意かつ 10 倍以上の増加が認められた。一方、高用量では、全ての系統において ALT の有意かつ大幅な増加が認められたが、ALT レベルを比較すると、BALB/c が最も高く、C57BL/6、ICR と続き、C3H で最も低かった。また、BALB/c と C3H の血清 ALT レベルには有意差が認められた。以上の結果から、APAP 単回投与による肝障害の感受性には系統差が存在すること、BALB/c は高感受性系統であること、C3H が低感受性 (耐性) 系統であることが示唆された。

2. マウス系統間における血中脂質プロファイルの差異

各マウス系統について、リピドミクスを用いて血中脂質プロファイルを解析したところ、297 分子の脂質を検出・測定した。測定した脂質分子レベルを用いて、多変量解析 (PCA) を行ったところ、各系統間で明確な分離が認められた (図 2)。

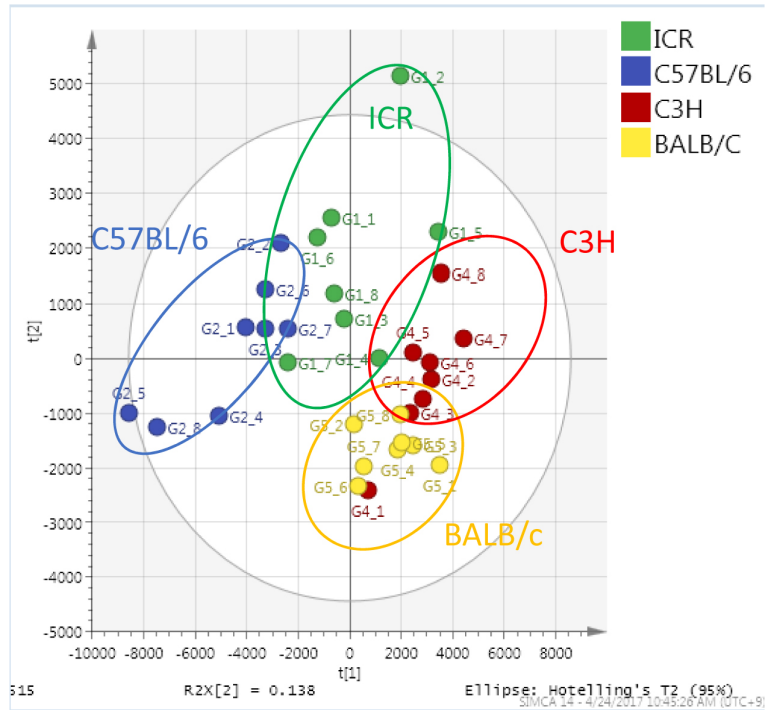


図2. 脂質プロファイルの系統差

得られた血中脂質プロファイルのデータを用いて、PCA をモデルとして多変量解析を行った。

したがって、血中脂質プロファイルに関しても肝障害への感受性と同様に系統差が存在することが示唆された。

3. 肝障害感受性と関連する血中脂質分子探索

APAP 投与時の ALT レベルが最も高い BALB/c を高感受性、最も低い C3H を低感受性、それ以外の ICR および C57BL/6 を中感受性として、OPLS 回帰を用いて、感受性と相関する脂質分子を S-plot (閾値 $p(\text{corr}) > 0.7$) によって探索した (図3)。

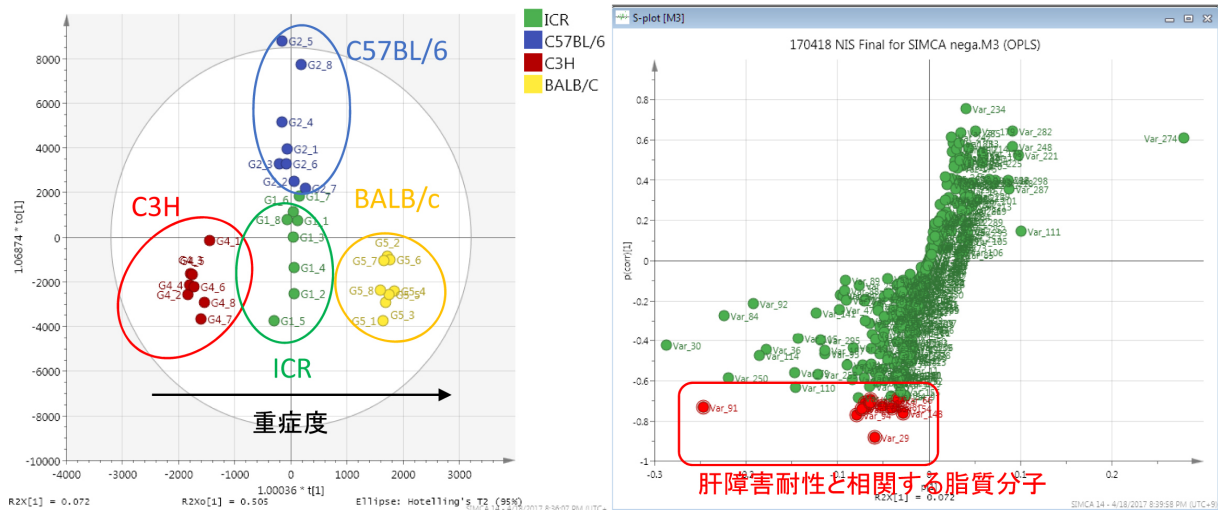


図 3. 肝障害感受性と関連する脂質分子探索

得られた脂質プロファイルを用いて、OPLS-DA をモデルとし、肝障害への感受性と関連する脂質分子を探索した。

その結果、10 分子がマーカー候補として同定され、うち 8 分子がリゾフォスファチジルコリン (LPC、LPC[14:0]、LPC[15:0]、LPC[22:5]) またはフォスファチジルコリン (PC、PC [16:0/22:5]、PC[16:0/24:6]、PC[18:2/24:1]、PC[39:5]、PC[42:6]) であった。これらの脂質分子のうち、代表的な分子を図 4 に示す。

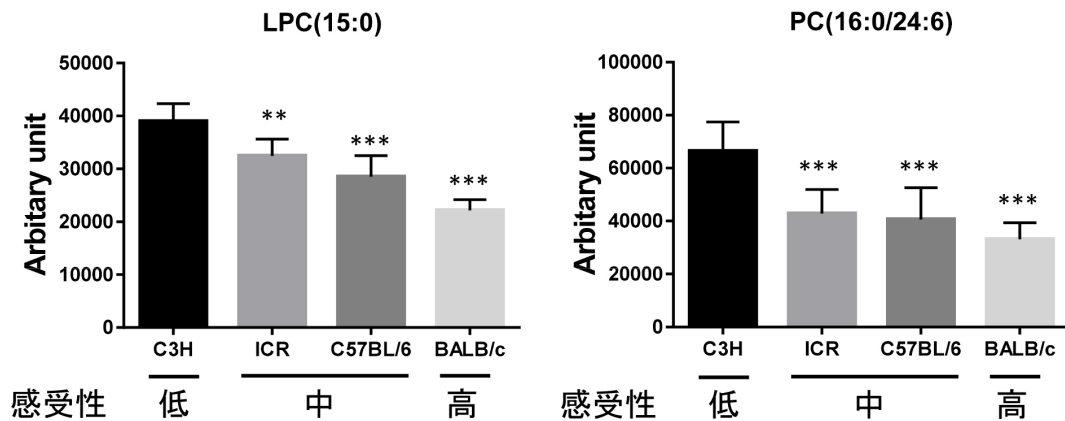


図 4. 肝障害感受性と関連する代表的脂質分子

各系統中の血中脂質レベル。統計処理は One-way ANOVA によって行い、多重性を Tukey's multiple comparison によって補正した。**及び***、C3H と比較し、多重性補正後に $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$ 。

LPC[15:0]及び PC[16:0/24:6] どちらも、いずれの系統に関しても C3H と比較し有意に低いレベルを示し、低感受性の C3H で最も高いレベル、中感受性の ICR、C57BL/6 で中程度、高感受性の BALB/c で最も低いレベルを示した。以上の結果から、一部の LPC 及び PC 分子の血中レベルが肝障害の感受性と相関していることが示唆された。

考 察

本研究結果から、肝障害の感受性及び血中脂質プロファイルに系統差が存在することが明らかになった。また、LPC[15:0]、PC[16:0/24:6]等、一部のLPC、PC分子種レベルが肝障害に対する耐性と相関していることが示唆された。血中の脂質分子の多くは肝臓で合成されることから、肝におけるLPC及びPCの合成が増加している可能性が考えられる。今後は肝を用いたリポミクス解析によるLPC及びPCの合成増加の検証、LPC及びPCの合成の増加と肝障害への耐性の関連性について分子メカニズム解析を行う予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、国立医薬品食品衛生研究所病理部の石井雄二である。また、本研究の協力者は国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部の豊島克子、佐藤優里子、小島舞である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kotronen A, Seppänen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepää AL, Yki-Järvinen H, Oresic M. 2010. Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum. *Obesity*. 18:937-44. DOI: 10.1038/oby.2009.326.
- 2) Drogan D, Dunn WB, Lin W, Buijsse B, Schulze MB, Langenberg C, Brown M, Floegel A, Dietrich S, Rolandsson O, Wedge DC, Goodacre R, Forouhi NG, Sharp SJ, Spranger J, Wareham NJ, Boeing H. 2015. Untargeted metabolic profiling identifies altered serum metabolites of type 2 diabetes mellitus in a prospective, nested case control study. *Clin Chem*. 61:487-97. DOI: 10.1373/clinchem.2014.228965.
- 3) Saito K, Goda K, Kobayashi A, Yamada N, Maekawa K, Saito Y, Sugai S. 2017. Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine characterized by consolidated plasma and liver lipidomics as an early onset marker for tamoxifen-induced hepatic phospholipidosis. *J Appl Toxicol*. *In press*.