

2015 年度日本臨床薬理学会海外研修員報告：

研修完了報告書

加藤 隆児

研修先：Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Toronto, Canada（指導者：Professor Jack Uetrecht)

研修内容：Evaluation of inflammasome reaction using FLC-4 and THP-1 cells

研修期間：2016 年 2 月 6 日～2017 年 3 月 23 日

現所属：大阪薬科大学循環病態治療学研究室

著者連絡先： 大阪薬科大学循環病態治療学研究室
〒569-1094 大阪府高槻市奈佐原 4-20-1

電話番号： 072-690-1045

Fax 番号： 072-690-1045

E-mail アドレス：rkato@gly.oups.ac.jp

1. はじめに

私は 2016 年 2 月から 2017 年 3 月までの 1 年 2 か月の間、カナダの University of Totonto 薬学部 Jack Uetrecht 教授の指導の下、研修を行う機会をいただきました。本研修先である University of Totonto と研修先で行った研究内容を報告いたします。

2. 研修先について

University of Totonto は、オンタリオ州にある州立大学で、創立は 1827 年と古く、構内には非常に古い建物が多く残っています。研究も非常に盛んであり、インスリンの発見などノーベル賞受賞者も多数輩出しています。また、幹細胞研究発祥の地としても知られ、国および州からの援助を受け、盛んに研究が行われています。留学生は世界 165 か国から集まってきており、最も留学生が多い国は中国でおよそ 9,000 人もの学生が在籍しています。大学院生の活動も非常に活発であり、学部ごとに学生団体が組織されており、学生主体で様々なイベントを行っています。また、薬学部では毎年 6 月に大学院生の研究成果を発表する graduate research in progress symposium (GRIP) が開催され、学部内での研究交流が行われています。University of Totonto のキャンパスはトロント市のダウンタウンにあるセントジョージキャンパス、隣のミシサガ市にあるミシサガキャンパス、トロント市の東部にあるスカボロキャンパスの 3 つがあり、学生数はおよそ 86,000 人とカナダでは最大規模の大学です。私は最も大きいセントジョージキャンパスにある薬学部で研究を行いました。

3. 研究について

研究室を主宰されている Jack Uetrecht 教授は、特異体質性薬物反応について研究を続けられ、薬疹や肝障害などを中心にその発症機序の解明を行っています。研究室のメンバーは博士課程の学生が中心であり、私が在籍していた時期は 6 名の学生が動物や細胞実験を中心に各自のテーマを研究していました (Figure 1)。Jack 教授は、常に薬物を化学的な面と生物学的な面の両方から捉えながら研究をされています。特異体質性薬物反応の発症機序の一つとして、haptens and danger hypotheses が提唱されています。この仮説は、薬物あるいはその反応性代謝物がタンパク質などに結合し hapten となるだけではなく、反応性代謝物が細胞ストレスとなることで danger signal が放出され、antigen presenting cell (APC) においてインフラマソーム活性化などが起こり、その結果免疫反応が起こるというものです (Figure 2) ¹⁾。インフラマソームが活性化されると caspase が活性化され pro-IL-1 β 、pro-IL-18 が IL-1 β や IL-18 に変換され細胞外に放出されます ²⁾。そこで、反応性代謝物がインフラマソーム反応を活性化しているか否かを検討するため、薬剤を肝細胞に添加し代謝反応を起こした後、その培養液をマクロファージに分化させた THP-1 細胞に添加し、THP-1 細胞から培養液中に放出されてくる IL-1 β 濃度の測定を行いました。研修期間中に COMT 阻害剤であるトルカポン、エンタカポン、チアゾリジン系糖尿病薬であるトログリタゾン、ピオグリタゾン、マラリア治療薬であるアモジアキン、HIV-1 感染症治療薬であるネビラピンを

用いて検討を行いました。今回用いた薬剤は、主に重篤副作用として肝障害が報告されているものを選択し、エンタカポンおよびピオグリタゾンについてはネガティブコントロールとして用いました。



Figure 1 Jack 研究室のメンバー（前列一番左が Jack Utrecht 教授、左から 3 番目が著者）

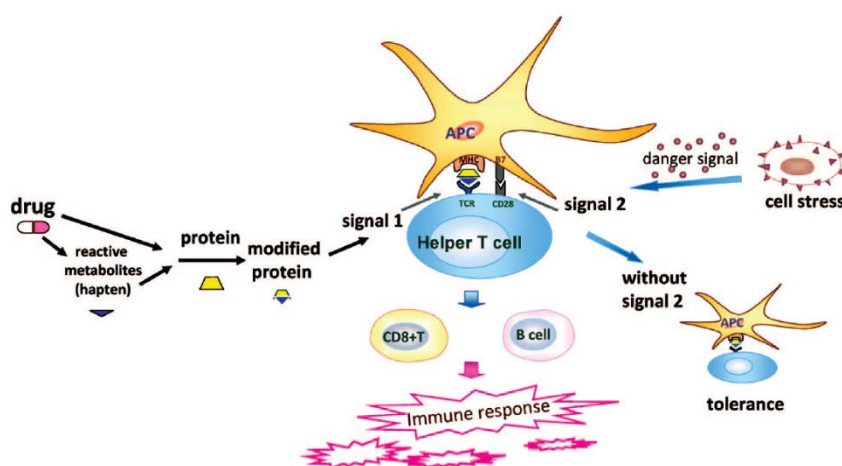


Figure 2. 特異体質性薬物反応において提唱されている haptens and danger hypotheses¹⁾

3-1. トルカポン、エンタカポン

トルカポンは重篤な肝障害のため日本では 1998 年に市場から撤退した薬剤です。エンタカポンは現在も市販されていますが、トルカポンと類似構造を持つ化合物です。トルカポン、エンタカポン共に直接 THP-1 細胞に添加した場合は培養液中 IL-1 β 濃度に変化は認められませんでした。肝細胞に添加し代謝反応を起こした後の培養液を THP-1 細胞に添加すると培養液中 IL-1 β 濃度の有意な上昇が認められ、その産生量はトルカポンに比べエンタカポンのほうが少ないという結果になりました。caspase-1 活性についても IL-1 β と同様の結果となり、トルカポン、エンタカポンの反応性代謝物がインフラマソーム反応を活性化することが確認されました。研究を行う前には、トルカポンの反応性代謝物のみインフラ

マソーム反応を活性化するのではないかと予想していましたが、エンタカポンの反応性代謝物も同様に活性化する結果となりました。トルカポンよりもエンタカポンのほうが肝障害の起こりにくい理由としては、両薬剤の血液中濃度を比較した場合、エンタカポンはトルカポンの 1/3 程度であり、エンタカポンの血中濃度が低いためではないかと考えられました。

3-2. トログリタゾン、ピオグリタゾン

トログリタゾンは重篤な肝障害のため日本では 2000 年に市場から撤退した薬剤です。ピオグリタゾンは現在も市販されていますが、トログリタゾンと類似構造を持つ化合物です。トログリタゾン、ピオグリタゾン共に直接 THP-1 細胞に添加した場合は培養液中 IL-1 β 濃度に変化は認められませんでした。肝細胞に添加し代謝反応を起こした後の培養液を THP-1 細胞に添加するとトログリタゾンのみ培養液中 IL-1 β 濃度の有意な上昇が認められました。caspase-1 活性についても IL-1 β と同様の結果となり、トログリタゾンの反応性代謝物がインフラマソーム反応を活性化することがわかりました。ピオグリタゾンについてはインフラマソーム反応の活性化が認められなかったことから、トログリタゾン誘発肝障害の発症機序に反応性代謝物のインフラマソーム反応活性化が関与していることが考えられました。

3-3. アモジアキン、ネビラピン

アモジアキン、ネビラピンともに現在も市販されている薬剤ですが、重篤副作用に肝障害があります。アモジアキンは薬物代謝酵素 cytochromeP450 (CYP) のほか、好中球やマクロファージに存在する myeloperoxidase で代謝され、反応性代謝物が産生されることが知られています。アモジアキンの場合は、アモジアキンを直接 THP-1 細胞に添加した際および肝細胞に添加した後の培養液を添加した際に培養液中 IL-1 β 濃度の有意な上昇が認められました。caspase-1 活性についても IL-1 β と同様の結果となり、アモジアキン自身およびアモジアキンの反応性代謝物がインフラマソーム反応を活性化することがわかりました。また、アモジアキン添加後の THP-1 および肝細胞をホモジナイズし、Western blot でアモジアキンが共有結合しているかを確認したところ、THP-1 および肝細胞のたんぱく質とアモジアキンが共有結合していることが認められました。

ネビラピンについては、直接 THP-1 細胞に添加した場合は培養液中 IL-1 β 濃度に変化は認められませんでした。肝細胞に添加し代謝反応を起こした後の培養液を THP-1 細胞に添加すると、培養液中 IL-1 β 濃度の有意な上昇が認められました。caspase-1 活性についても IL-1 β と同様の結果となりました。また、ネビラピン添加後の肝細胞からたんぱく質を抽出し Western blot で確認したところ、共有結合が認められました。さらに、CYP の非特異的阻害薬である 1-aminobenzotriazole を添加して CYP の酵素反応を阻害したところ、インフラマソームの活性化は抑制され、肝細胞への共有結合も認められませんでした。このこと

から、ネビラピンは CYP により産生された反応性代謝物が原因となり、インフラマソーム反応が起こったと考えられ、ネビラピン誘発肝障害の発症機序に関与していると考えられました。

以上の結果から、トルカボン、エンタカボン、トログリタゾンおよびネビラピンについては、反応性代謝物が原因となりインフラマソーム反応が起こることが認められました。アモジアキンについては、薬物自身あるいは反応性代謝物の両者がインフラマソーム反応を活性化することが確認されました。

本研究から上記薬剤に起因する肝障害発症機序として、反応性代謝物のインフラマソーム活性化が関与することが考えられ、今後新規薬剤開発時の安全性試験において、反応性代謝物がインフラマソームを活性化するか否かを評価することにより、重篤副作用としての肝障害発症のスクリーニング法につながると期待されます。また、インフラマソーム反応の抑制が重篤副作用発症時の治療法に応用できる可能性が考えられました。本 *in vitro* 実験系は、薬物およびその代謝物がインフラマソーム反応を起こすか否かの評価に応用できる簡便な方法であると考えられます。

4. 終わりに

日本臨床薬理学会海外研修員として研修の機会をいただき、大変貴重で有意義な1年を過ごすことができました。今後は留学で得たことを生かし、臨床薬理学会の発展に貢献できるよう尽力したいと思っております。最後になりましたが、このような貴重な海外研修をご支援いただきました日本臨床薬理学会の先生方、日本製薬工業協会の皆様方に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Uetrecht J. Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21: 84-92.
- 2) Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015; 21: 677-87.