

質量分析マルチオミクス解析を基盤とした薬物性肝障害の評価

九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野 高橋政友

背景・目的

薬物性肝障害 (drug-induced liver injury; DILI) は、医薬品の開発中止および市場撤退の主要な原因である。これまで、DILI の発症を早期に予測、回避することを目的として臨床試験の前段階で候補化合物の安全性を評価する *in vitro* の肝毒性スクリーニング法が開発されてきた。しかし、これまで頻用されてきた肝腫瘍細胞株 HepG2 は、正常な肝細胞と比べて薬物代謝酵素などの発現量が低く、肝臓での薬物代謝応答を正確に模倣できていない可能性が高い。さらに、反応性代謝物、ミトコンドリア機能障害や中性脂質蓄積などの従来の肝毒性指標だけでは、発症機序が不明な毒性や複合毒性を評価することは難しい。今後、DILI リスクの予測性能を向上させるためには、DILI に対する鋭敏なマルチバイオマーカーの発見と発症機序の解明につながる研究アプローチが必要である。申請者は、ヒト *in vivo* 肝組織に近い生理機能を有するヒト初代肝細胞 (PHH) を用いた質量分析マルチオミクス (薬物代謝, メタボローム, プロテオーム) 解析が上記の課題を解決する方法論になると考えた。一方、従来の汎用的な質量分析オミクス計測では、技術的限界から 1×10^6 個程度の肝細胞が必要であるため、継代培養のできない高価な PHH を用いたマルチオミクス解析の実施には至っていない。本研究では、96 well plate で培養した 1×10^4 個の PHH (従来の 100 分の 1) を用いた質量分析マルチオミクス解析システムを構築し、薬物ごとに異なる肝毒性発症を正確に評価・予測することのできるマルチバイオマーカーの発見と発症機序の解明を目指す。

方法および結果

課題 I: 内生代謝, 薬物代謝情報を単一分析で包括的に取得可能な分析条件の検討

これまでに我々が開発を進めてきた包括的なメタボローム分析手法である unified-HILIC/AEX/HRMS/MS を改良することで、内生代謝, および薬物とその代謝物を単一分析で包括的に分離・検出するための前処理・分析条件の最適化を行った。分析条件の最適化にあたっては、従来のスクリーニング法で頻用されてきた肝腫瘍細胞株 HepG2 を用いて実施した。その結果、代謝物抽出条件としては、イソプロパノールと水の混合溶液 (7:3 v/v) を用いることで、90%以上の除タンパク効率を維持しながら、代謝物 (内生代謝物, 薬物, およびその代謝物) の抽出を行うことができることを見出した。そして、最適化した HILIC/AEX/HRMS/MS 分析条件 (初期移動相組成, 注入量, グラジエント勾配など) を用いて 1×10^4 個程度の HepG2 細胞の抽出液を分析に供したところ、500 種を超える内生代謝物, 薬物, およびその代謝物を検出することができた。最適化条件を用いて、96 well plate で培養した 1×10^4 個程度の PHH を分析に供したところ、HepG2 細胞抽出液と同様、一度の分析で代謝物情報を網羅的に取得することに成功した。

課題 II: 外因性化学物質処理濃度の決定とマルチオミクスデータの取得と統合解析

DILI 発症の作用機序が確認されている外因性化学物質および、作用機序が不明もしくは複数の作用機序が関与していると考えられている外因性化学物質合計 5 種類 (acetaminophen, nilutamide, tilorone, clozapine, tamoxifen) に対して、マルチオミクスデータの取得および解析を目的とした。まず、各外因性化学物質の PHH への曝露濃度を過去の毒性評価の結果 (Gómez-Lechón, M. J. *et al.*, Toxicol. in vitro, 2010) を参考にして決定した。外因性化学物質を処理してから 24 時間培養後の PHH 細胞における 10%細胞増殖阻害濃度 (IC₁₀) および 50%細胞増殖阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。決定した IC₁₀, および IC₅₀ に基づいて各薬物を PHH に曝露し、24 時間培養後の PHH 細胞に対して課題 I で最適化した質量分析マルチオミクス解析システムを用いてデータ解析を実施した。Acetaminophen (APAP) を曝露した PHH において、これまでに知られている硫酸抱合体, グルクロン酸抱合体, グルタチオン抱合体などといった主に第 II 相薬物代謝反応で生成する薬物代謝物はいずれもコントロール群と比較して有意に増加していることが確認された。また、これら代謝物生成に関連する薬物代謝酵素も有意に増加していることが確認された。特に、硫酸酵素は約 180 倍, グルクロン酸代謝酵素は約 110 倍, グルタチオン代謝酵素は約 12 倍コントロール群と比較して増加していることが観測できており、これら薬物代謝酵素は APAP の無毒化を行うために誘導されたことが示唆された。また、ノンターゲットメタボローム解析結果において、全体で約 2000 種類の代謝物特性を検出することができ、有意に増加・減少した代謝物はそれぞれ 80, 200 種類程度確認された。特に酸化ストレスに関わる還元型グルタチオン (GSH) は APAP 曝露により有意に減少しており、過去の報告と一致していた。さらに得られた代謝物情報を用いてエンリッチメント解析を実施したところ、APAP 曝露群においては、グルタチオン代謝経路だけでなく、核酸代謝、一部のアミノ酸代謝経路など、APAP 刺激の応答に関与している可能性のある内生代謝の変動も観測できた。プロテオーム解析においては、約 5000 種類のタンパク質の検出に成功しており、いくつかのヒートショックプロテインファミリーは有意に増加しており、酸化ストレスによる影響を表していることが示唆された。APAP 以外の外因性化学物質においては、現在解析を進めているところであるが、APAP と同様に酸化ストレスによる影響が観測されていたものも存在した。一方で、APAP と全く異なった代謝変動パターンが見られたものもあった。以上の結果から、本システムは毒性発現経路に基づいた生化学的キーイベントを捉えることが可能なシステムであることが示唆された。



図 in vitro ヒト肝細胞を用いた質量分析マルチオミクス解析システムの概要