HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	医薬品開発における臨床肝障害予測のための非臨床手法に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	合田, 圭佑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	乙第7077号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73843
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_GOUDA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（臨床薬学）　　氏 名　合 田 圭 佑

学 位 論 文 題 名

医薬品開発における臨床肝障害予測のための非臨床手法に関する研究

一般的に医薬品開発には 9~17 年もの長い年月と，500 億円を超える研究費が必要だとされている。医薬品開発に要する研究費は増加の一途を辿っており，臨床試験段階での開発中止は製薬企業にとって数百億円にも達する損失を意味する。そのため，医薬品開発の比較的初期に位置する非臨床試験の段階で，可能な限り成功確率を高めた医薬品候補化合物を創出することが製薬企業にとっては必要不可欠となる。1991 年において医薬品候補化合物の開発中止や医薬品の市場からの撤退の理由は薬物動態に関わるものが 40%，安全性に関わるものが 13%であった。しかしながら，近年，薬物動態学は急速に発展し，様々な新規技術が開発されてきたため，現在では *in vivo*，*in vitro* さらには *in silico* の新規技術を駆使することによって，非臨床試験の段階で臨床でのリスクを正確に予測できるようになった。その結果，臨床試験以降の開発中止事例に占める薬物動態に起因する事例は，2000 年，2011 年でそれぞれ 9%，1%と激減している。一方，安全性の問題に起因する開発中止事例は，2000 年，2011 年でそれぞれ 20%，19%と依然として多いことが報告されている。さらに安全性の問題で 1990～2011 年の間に市場から撤退した医薬品は 34 品あるが，そのうち 13 品（38%）は臨床での肝障害発現が原因であるとされている。以上のように，医薬品開発において臨床肝障害は大きなインパクトを持っているが，非臨床毒性試験から臨床肝障害のリスクを正確に予測することは困難であるのが現状である。そこで本研究では *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床毒性試験の両面から臨床肝障害を予測する新規評価手法を確立することを目指し，種々検討を行った。

第 1 章では，臨床肝障害の大半を占めるとされる特異体質性肝障害（idiosyncratic DILI）を予測する *in vitro* 非臨床毒性試験を新規に確立するために，凍結ヒト初代培養肝細胞を用いて，短時間曝露時のミトコンドリア呼吸能及び長時間曝露時の caspase-3/7 活性をエンドポイントとし検討を行った。Iidiosyncratic DILI を予測することが可能か否かは，既知の idiosyncratic DILI 誘発肝毒性物質及び idiosyncratic DILI 非誘発肝毒性物質を用いて検証した。その結果，*in vitro* 非臨床毒性試験ではヒト初代培養肝細胞を用い，短時間曝露時のミトコンドリア呼吸能及び長時間曝露時の caspase-3/7 活性に着目することにより，臨床肝障害，中でも非臨床毒性試験からの予測が困難だと言われている idiosyncratic DILI を予測可能であることが見出された。

第 1 章の結果から，ミトコンドリアが臨床肝障害予測に重要な役割を担っていることが明らかとなった。肝細胞におけるミトコンドリア呼吸能の低下は，脂肪酸代謝の低下につながり，ひいては脂肪肝につながると考えられる。以上の事から，*in vivo* 非臨床毒性試験で認められる脂肪肝が臨床肝障害の予測において非常に重要な所見である可能性が考えられた。そこで第 2 章では，ラットの *in vivo* 非臨床毒性試験で肝細胞の脂肪化が認められた自社化合物 X を用いて，メカニズム解析及び臨床肝障害リスクの推定を行った。その結果，ラットの *in vivo* 非臨床毒性試験で肝細胞の脂肪化を引き起こした自社化合物 X は，ミトコンドリア毒性により脂肪肝を引き起こしていたことが明らかとなった。この化合物を第 1 章で確立した *in vitro* の非臨床毒性評価系で評価すると，臨床肝障害のリスクが高いことが推察され，げっ歯類を用いた非臨床毒性試験において認められたミトコンドリア毒性による脂肪肝が，臨床肝障害のアラートとなることが見出された。続いて，非臨床毒性試験でミトコンドリア毒性に起因する脂肪肝を引き起こす代表的な化合物としてバルプロ酸を用い，*in vivo* 非臨床試験においてミトコンドリア毒性による脂肪肝を反映する新規血中バイオマーカーをリピドミクス解析により探索した。その結果，2 種類の血中エーテル型ホスファチジルコリン（PC [16:0e/22:4]及び PC [16:0e/22:6]）が，ミトコンドリア毒性による脂肪

肝のバイオマーカーとなることが示された。

第 3 章では，*in vivo* 非臨床毒性試験で認められたミトコンドリア毒性による脂肪肝が，何故臨床肝障害のアラートとなり得るのか，メカニズムの観点から考察を行った。

非臨床及び臨床において脂肪肝は同様に起きていると考えられるが，臨床における脂肪肝は自覚症状や肝機能パラメータの変動を伴わない不顕性の疾患である。この不顕性の脂肪肝が，nonalcoholic steatohepatitis（NASH）等に進展することにより，ようやく肝障害として顕在化する。この進展には脂肪肝の状態に second hit が必要だと考えられており，代表的な second hit として，酸化ストレス，炎症，腸管由来のエンドトキシン等に対する免疫反応が挙げられる。そこで我々は，ラットを始めとするげっ歯類で認められた脂肪肝が臨床肝障害のアラートとなるのは，ヒトでは second hit が起こりやすく，げっ歯類では起こりにくいことによるのではないかと考えた。また，臨床肝障害の大部分を占めるとされる idiosyncratic DILI は，2 つに分類されることが知られており，薬物の反応性代謝物が生体内タンパク質とアダクトを形成し，異常蓄積や細胞機能障害により，酸化ストレスや炎症を惹起するのが代謝性，同じように生成されたアダクトが，ハプテンとなることにより免疫反応を惹起するのがアレルギー性と呼ばれている。そこで，代表的な second hit であり，idiosyncratic DILI の発症にも関与する酸化ストレス，炎症及び免疫反応に対する生体の防御機構ついてげっ歯類及びヒトの間に種差が存在するか否か調査及び比較解析を行った。その結果，げっ歯類では GSH 及び PPARα を中心とした酸化ストレスあるいは炎症に対する防御機構が優れていること，またげっ歯類はヒトと比較し顕著な免疫寛容状態であることにより，げっ歯類では脂肪肝に引き続く second hit が起きず，脂肪肝で止まると考えられた。

本研究では臨床肝障害を予測可能な *in vitro* 非臨床毒性試験法を新規に確立した。また，げっ歯類の *in vivo* 非臨床毒性評価で認められるミトコンドリア毒性による脂肪肝は，ヒトでも同様に起きる臨床肝障害の first hit であり，臨床肝障害のアラートとなることを明らかにした。またミトコンドリア毒性による脂肪肝の新規バイオマーカー候補として血中 PC (16:0e/22:4) 及び PC (16:0e/22:6) を見出した。本研究で得られた知見は，予期せぬ臨床肝障害発現による医薬品開発中止のリスクを低減し，効率的な医薬品開発に貢献することが期待される。