

ミトコンドリア膜透過性遷移に起因する薬物性肝障害リスクの簡便な代替評価法の開発における血小板の利用

千葉大学大学院薬学研究院 竹村 晃典

薬物性肝障害 (Drug-induced liver injury: DILI) は稀に重篤化するため、臨床現場で回避すべき副作用の 1 つである。様々な機序を介して発症することが知られているが、その中でも代謝活性化・胆汁うっ滞・ミトコンドリア毒性を指標にすることである程度予測することは可能である。しかしながら、その予測精度は未だ改善の余地がある。これまでも様々な手法が考案されつつあるが、我々はその中でもミトコンドリア毒性の多様性に着目した。ミトコンドリア毒性には呼吸鎖阻害、 β 酸化阻害だけでなくミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) がある。MPT は、通常高い透過選択性を保っている内膜が膜上の MPT pore の開口によって非選択的に分子を通過させることで、ミトコンドリアの機能が失われ、最終的には細胞死に至る現象として知られている。MPT は重篤な肝障害を誘発する薬物 (アセトアミノフェン、トログリタゾン、ジクロフェナク) に共通した性質であるため、MPT 誘導能を評価することは新薬開発時に重要と考えられる。しかし、MPT の評価方法としてげっ歯類等の動物肝臓から単離直後のミトコンドリアを用いる手法に限られる。また、MPT の構成タンパクである cyclophilin D (CypD) は動物間で発現量に種差が報告されていることから、ヒト由来試料の利用が好まれるが入手のしやすさの点から多くの問題を含み、単離ミトコンドリアを使用しない代替評価法の開発が必要と考えた。そこで本研究では、MPT 誘発と血小板の活性化の間に存在する相関に着目し、げっ歯類血小板を用いた簡便な MPT 評価法の構築までを目的とした。

マウス肝臓から単離したミトコンドリアを用いて MPT 誘導能を評価した。既報 (ラット) で評価済みの薬物 9 種を選択し薬物曝露後の 570 nm 吸光度の低下で MPT を検出した。既報と同様に MPT 誘導能を持つ薬物 (troglitazone, diclofenac, amiodarone, ticlopidine, nimesulide, benzbromarone) はマウス肝ミトコンドリアでも MPT 誘導が見られた。そこで、次に MPT を介した血小板活性化能の評価をフローサイトメータにて測定した。評価方法は既報に基づきトロンビンと被験化合物を曝露後に CD41 (血小板マーカー) と Annexin V にて共染色し、共陽性群を MPT 依存的に活性化した血小板とした。ミトコンドリアでの評価と同一化合物で実施したところ troglitazone, diclofenac, amiodarone, ticlopidine, nimesulide, benzbromarone, sulindac は DMSO

群と比較して有意に活性化した血小板の割合が増加し、ミトコンドリアを用いて吸光度の低下を示した化合物の多くが血小板の活性化を示した。これら値を用いて相関係数を算出すると **0.35** を示した。十分な相関は見られなかったことから、i) 血小板を用いた評価について **CypD** 依存的な値を算出するためにトロンビン有無の値を差引いた値の利用、ii) 薬理作用が疑われる化合物の除外を行うことで相関係数は **0.635** を示し、単離ミトコンドリアを用いた評価と活性化血小板の値は相関することが示唆された。