

博士論文（2018年3月）内容の要旨および審査結果の要旨

鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科

氏名 たてまつ ようへい
立松 洋平

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 博（薬）甲第2号

学位授与の日付 平成30年3月14日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目「薬剤性肝障害誘発因子の探索：
ミトコンドリア機能に及ぼす NSAIDs の影響」

論文審査委員 (主査) 教授 田口 博明 博士（薬学）
(副査) 教授 川西 正祐 薬学博士
教授 里見 佳子 博士（医学）
教授 藤川 隆彦 博士（医学）
准教授 米田 誠治 Ph.D.in Chemistry (オランダ)

論文要旨

氏名	立松 洋平
----	-------

論文の題名

薬剤性肝障害誘発因子の探索：ミトコンドリア機能に及ぼす NSAIDs の影響

論文の要旨

非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs) の副作用として消化管障害や腎障害、肝障害などが知られている。なかでも肝障害は重篤な結果をもたらすことが多く、その発生メカニズムの解明が進められてきた。本研究では NSAIDs が肝臓のミトコンドリア機能に与える影響を検証し、ミトコンドリア機能の修飾メカニズムや機能修飾に必須な構造要因を明らかにすることで、肝障害の発症制御および肝障害誘導リスクの低い薬物分子の設計に繋げることを目的の一つとした。また、ミトコンドリアが薬物分子を高感度に検知し、酸素消費という形で応答する特性を利用し、微粒子を含む様々な薬物担体に応用できる薬物放出評価系の構築を試みたので併せて報告する。

1. ミトコンドリア膨潤を誘導する NSAIDs のスクリーニング

ミトコンドリアの透過性遷移 (MPT) 誘導能を 540 nm における濁度変化を指標に観測し、セレコキシブ (CEL) とメフェナム酸 (MEF) に顕著な MPT 誘導をみとめた。CEL による MPT 誘導は Ca^{2+} 誘導性 MPT の阻害薬であるシクロスポリン A (CsA) により抑制されなかった。一方、MEF 誘導性の MPT は CsA による阻害が確認された。また、MPT の誘導に伴うアポトーシス誘導因子シトクロム C (CytC) の放出を検証したところ MEF では放出が確認されたが、CEL では確認されなかった。これらの結果から、2つの薬物は異なる機構でミトコンドリアの膜透過性を変化させていると考えられた。

特に CEL がミトコンドリア呼吸鎖機能に及ぼす影響を溶存酸素を指標に評価したところ、CEL は脱共役作用を有し、また、電子伝達系の阻害作用を併せ持つことが示唆された。CEL によってミトコンドリアから放出されるタンパク質の内訳を解析した結果、細胞死誘導因子が存在する膜間スペースのタンパク質には影響を与えず、マトリクスタンパク質を選択的に放出させる可能性が示唆された。単層膜リポソーム、赤血球を用いた膜透過性に及ぼす影響の解析から CEL による膜透過性の亢進が確認でき、ミトコンドリアへの作用濃度域と一致することから、ミトコンドリア毒性に膜作用の関与が考えられた。

2. *N*-Phenylanthranilic Acid を構造中に有する NSAIDs がミトコンドリア機能に及ぼす影響

MEF による Ca^{2+} 様の MPT 誘導機構解明のため MEF、トルフェナム酸 (TOL)、メクロフェナム酸 (MCL)、フルフェナム酸 (FLU)、ジクロフェナク (DIC)、フェナム酸 (NPA)、ジフェニルアミン (DPA) がミトコンドリア機能に及ぼす影響を比較検証した。 *N*-phenylanthranilic acid 骨格を持つ MEF、TOL、MCL、FLU、DIC、NPA は濃度依存的に MPT を誘導し、濃度反応曲線を見ると TOL、FLU、MEF の MPT 誘導がある濃度域を境に急激に起こるのに対し、MCL、DIC、NPA は低濃度域から徐々に MPT を誘導した。特に MCL の反応性は MPT 誘導因子である Ca^{2+} 様の濃度反応曲線を示した。カルボン酸を持たない DPA はミトコンドリアを濃度依存的に膨潤させたが、その膨潤誘導は CsA で阻害されず、NPA が Ca^{2+} 様 MPT 発現に必須な構造であると考えられた。また、分子力学 (MM) 解析から上記 NSAIDs は多配座を持つことが明らかとなり、得られた配座の立体疎水性度の指標である溶媒和エネルギー (dGW) から、動的構造変化により疎水性度が大きく変化することを確認した。膜作用性に富む脱共役剤 SF6847 は 127 個の配座を持つが、その dGW 値は -63 kJ/mol 付近の一定値をとる。MPT 誘導性が高い MCL は、SF6847 に近い dGW 値を持つ配座を多数有し (平均 -65.95 kJ/mol)、SF6847 の様に膜反応性に富む配座の存在確率が高く、肝毒性発症に寄与すると考えられた。

3. 薬物送達システムへの応用の試行

リポソームなどの微粒子製剤の薬物放出の制御は有効性、品質維持の観点から重要な要因であるが、確立された薬物放出の評価方法はない。そこで、ミトコンドリアの特性を利用した新規薬物放出評価系の構築を試みた。第一段階として SF6847 をはじめ脱共役作用を持つ NSAIDs を封入したアルギン酸ゲルビーズからの成分放出をミトコンドリアの酸素消費速度を指標に捉えることに成功した。この系では担体からの成分放出過程のみならず担体の状態を感度良く評価しうることも確認でき、様々な薬物送達体へ応用できると考えられた。脱共役作用を持たない薬物に対しては、成分の放出を水素原子や酸素原子または電子の動きに変換するプローブを用いる事で対応が可能であると考え、その設計を進めている。また、DDS ツール開発の一環として黄色ブドウ球菌由来ペプチド転移酵素 SrtA を利用した、リポソーム表面の修飾についても紹介する。

論文審査結果の要旨

【判定結果】

当委員会は、立松洋平氏による学位申請論文の審査および口述による諮問を行った結果、博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判断した。

【判定理由】

申請された論文は、NSAIDs による肝障害の発現にミトコンドリア透過性遷移 (mPT) などのミトコンドリアを介した細胞死の関与が示唆されていることから、NSAIDs によるミトコンドリア機能に与える影響を解析することにより、その詳細なメカニズムや機能修飾に必要な NSAIDs の構造的要因などの解明を試みた成果の報告である。

第二章では、13 種類の NSAIDs についてミトコンドリア膨潤活性を測定し、セレコキシブおよびメフェナム酸に強い膨潤活性があることを見出した。また、セレコキシブについてさらに詳細な解析を進めたところ、セレコキシブによるミトコンドリア膨潤活性がシクロスポリン A によって阻害されないことから、セレコキシブによる膨潤は、Ca²⁺が誘導する透過性遷移孔の開口とは異なるメカニズムで起こることが明らかになった。さらに、セレコキシブが濃度依存的にリン脂質二重膜の透過性を亢進させ、ミトコンドリア外膜を破壊することなく、多量のマトリクスタンパク質を放出することを確認した。これらの結果は、セレコキシブは膜透過性の亢進を伴う特殊な膜構造変化を惹起していることを示唆した。

三章では、メフェナム酸を含むフェナム酸系の NSAIDs についてミトコンドリア膨潤と NSAIDs の化学構造の関係について調べ、mPT を誘導する最小構造が *N*-フェニルアントラニル酸 (NPA) であることを明らかにした。また、ミトコンドリア膨潤メカニズムについて詳細な検討を行ない、NSAIDs の脱共役作用や電子伝達系の阻害により、ミトコンドリア機能を障害することが細胞毒性発現に重要であることを見出した。さらに、NPA 構造関連化合物の配座解析を行い、ミトコンドリアと高い反応性を示したメクロフェナム酸がミトコンドリア膜と相互作用を起こしやすいう疎水性度の配座を多数有していることを明らかにした。この結果から、生体膜と相互作用しやすいう配座を多く含む薬物は、毒性を示す可能性があることを見出した。

四章では、応用的研究として、ミトコンドリア機能を利用した新規なリアルタイム薬物放出評価系を構築した。開発した評価系を用いることにより、薬物担体の詳細な評価が可能となり、確立された評価系がない微粒子製剤の開発において非常に有用であることが予想される。

以上のような申請者の研究について審査委員会は慎重に審議し、次のような結論

を得た。申請者は薬学研究科において、生化学や計算機化学に関して十分な知識と技術を身につけ、そして鋭い観察力と展開力を持って、研究を遂行した。また申請者の研究より得られた知見は、NSAIDsによる肝障害発症機序の解明を大きく前進させ、さらに肝障害を回避できる薬物設計など医薬品開発への貢献は大なるものがあると考えられる。従って、審査委員会は、申請者を博士（薬学）の適格者と認める。