

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

2018 年

立松 洋平

**Exploring the hepatic disorder involved factors:
Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs
on the mitochondrial functions**

2018

Yohei Tatematsu

目次

第 1 章 序論

第 1 節 薬剤性肝障害の誘発とミトコンドリアの関与	2
第 2 節 ミトコンドリアの構造と機能	3
第 3 節 NSAIDs による肝障害の誘発とミトコンドリアへの影響	6
第 4 節 本研究の目的	7

第 2 章 非ステロイド性抗炎症薬セレコキシブがミトコンドリア機能に及ぼす影響

第 1 節 緒言	10
第 2 節 実験方法	11
第 3 節 結果	16
第 4 節 考察	21

第 3 章 *N*-Phenylanthranilic Acid 骨格を構造中に有する NSAIDs がミトコンドリア透過性遷移に及ぼす影響

第 1 節 緒言	26
第 2 節 実験方法	27
第 3 節 結果	29
第 4 節 考察	36

第 4 章 薬物送達システム開発への応用展開

第 1 節 緒言	40
第 2 節 実験方法	41
第 3 節 結果	42
第 4 節 考察	47

第 5 章 総括

第 1 節 NSAIDs によるミトコンドリア機能の修飾メカニズム	52
第 2 節 ミトコンドリアの特性を利用した薬物担体からの薬物放出の評価と DDS 開発への展開	54

引用文献	57
------	----

謝辞	69
----	----

英文要旨	71
------	----

本稿で用いた省略形

ANT: adenine nucleotide translocator

ADP: adenosine diphosphate

AK2: adenylate kinase 2

ATP: adenosine triphosphate

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

CK: creatine kinase

COX: cyclooxygenase

CsA: cyclosporin A

CypD: cyclophilin D

CytC: cytochrome c

DAMPs: damage-associated molecular patterns

DDS: drug delivery system

DIC: diclofenac

DILI: drug-induced liver injury

DMSO: dimethyl sulfoxide

DPA: diphenylamine

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

FLU: flufenamic acid

MCL: meclofenamic acid

MEF: mefenamic acid

HK: hexokinase

HMGCS2: hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 2

LUV: large unilamellar vesicles

mPT: mitochondrial permeability transition

mtDNA: mitochondrial DNA

MLV: multilamellar vesicles

NADH: reductive nicotinamide adenine dinucleotide

NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NCF: nitrocellulose membrane filter

NPA: *N*-phenylanthranilic acid

NSAIDs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs

PBR: peripheral benzodiazepine receptor

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

PTP: permeability transition pore

QOL: quality of life

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SrtA: sortase A

TCA: tricarboxylic acid

TOL: tolfenamic acid

RCI: respiratory control index

RR: ruthenium red

VDAC: voltage-dependent anion channel

第 1 章

序論

第 1 章 序論

第 1 節 薬剤性肝障害の誘発とミトコンドリアの関与

薬物治療に伴って引き起こされる副作用の管理は治療の有効性や安全性を向上させる上で重要な要因である。薬物の大多数は肝臓で代謝されるため、薬物が肝臓を障害することで惹起される薬剤性肝障害 (DILI) は多くの医薬品に共通してみられる副作用である。DILI は発生頻度こそ多くはないが、劇症化して死に至る場合もあり、その発症メカニズムや予防法について数多くの研究が行われてきた。また、DILI は医薬品開発においても重要な問題となりうる。DILI のように発生率が低い副作用は患者数が限定されている臨床試験段階では顕在化せず、市販後に明らかになるケースも少なくはない。本邦において DILI は医薬品副作用等報告の数が最も多く、また開発中止や市販後における販売中止の原因になることが多い副作用でもある (Sudo C. *et al.*, 2012)。現在、DILI はその発症機序から、「中毒性」と「特異体質性」の 2 つに分類されている。中毒性は薬物自体またはその代謝物が肝毒性を有するもので、用量依存的に毒性を示し、代表的な薬物としてアセトアミノフェンなどが挙げられる。「特異体質性」はさらに「アレルギー性」と「代謝性」に分類され、前者は免疫系の関与が、後者は代謝酵素活性の個人差の関与がそれぞれ示唆されている。近年、「特異体質性」肝障害薬に分類される薬物においても、そのほとんどが薬物代謝酵素による代謝を受け、反応性代謝物を生成することが知られている。薬物自体またはその反応性代謝物による肝細胞死の誘導は障害関連分子パターン (DAMPs) の遊離を促し、マクロファージやクッパー細胞からの炎症性のサイトカインやケモカインを遊離させ (図 1-1)、好中球などの浸潤を伴い肝障害を増悪させる。現在、この肝細胞死をトリガーとした一連の反応が「中毒性」と「特異体質性」の両者において共通したメカニズムであると考えられている (川西 正祐ら編集, 2017)。

近年、肝細胞死を引き起こすターゲットとしてミトコンドリアを介したメカニズムが注目されている。ミトコンドリアは細胞内のエネルギー産生において主要な役割を担うだけでなく、細胞死の調節機能を持つ多機能オルガネラである。DILI を誘発する薬物にはしばしばミトコンドリア機能に悪影響を及ぼすものが存在し、DILI の発症機序にミトコンドリアが関与していることが言及されてきた (Pessayre D. *et al.*, 2012; Vuda M. *et al.*, 2016)。ミトコンドリア機能の障害メカニズムは、エネルギー産生の阻害やミトコンドリア DNA (mtDNA) 及びミトコンドリアタンパク質合成への影響、ミトコンドリア膜構造の破壊など薬物による。薬物がミトコンドリアへ及ぼす影響を理解することは、より副作用の少ない医薬品を開発する上で非常に重要であると考えられる。

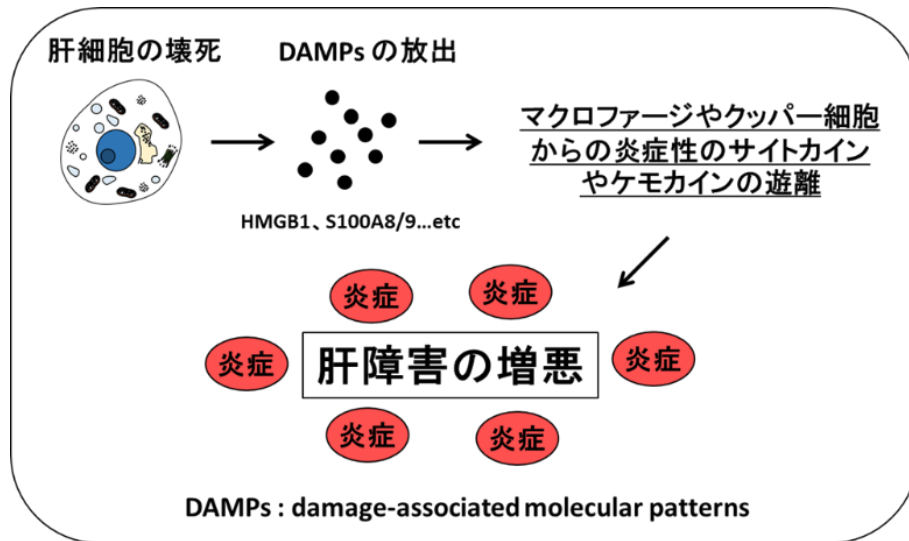


図 1-1 DAMPs の放出による DILI の発症機序

肝細胞死の誘導により DAMPs が放出され、炎症性サイトカインやケモカインの遊離を介して肝障害が増悪する。

第 2 節 ミトコンドリアの構造と機能

ミトコンドリアは酸化的リン酸化により生体内のエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸 (ATP) の産生を担うオルガネラである。ミトコンドリアの役割は ATP の産生のみならず、細胞内カルシウムの恒常性の維持やアポトーシスやネクローシスの誘導、種々の神経変性疾患への関与、近年では小胞体との接触などさまざまな生命現象に関わっていることが明らかになってきた。ミトコンドリアは外膜と内膜の 2 つの生体膜から成り、膜間スペース、マトリクスを含めた 4 つのコンパートメントとして捉えることができる (図 1-2)。外膜には電位依存性アニオンチャネル (VDAC) と呼ばれる膜タンパク質が大量に存在し、分子量 5000 以下の分子が自由に透過できるようになっている。一方、外膜と比較してミトコンドリア内膜の透過性は非常に厳密に制御されており、ほとんどの分子やイオンを通さない。内膜には電子伝達系と呼ばれるタンパク質複合体が存在しており、クエン酸回路 (TCA 回路) から得られた還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) やコハク酸由来の電子を伝達する過程で、マトリクス側に存在する H^+ を膜間腔側へ汲み出し、 H^+ の濃度勾配を形成している (Mitchell P., 1961 ; Kadenbach B. *et al.*, 2010)。ミトコンドリアはこの物理化学的なエネルギー勾配を利用して効率的な ATP の産生やマトリクスへの物質の輸送を行っており、内膜の不透性がこれらの機能を支えている。内膜に囲まれたマトリクス領域には TCA 回路や β 酸化など代謝機能に関わる酵素群を初めとする多数のタンパク質が含まれており、ミトコンドリア独自の遺伝子情報である mtDNA なども含

まれている。マトリクス中にはミトコンドリア全タンパク質の 6 - 7 割が存在しており、非常に高いタンパク質濃度が保たれている。外膜と内膜間にある膜間スペースにはシトクロム c (CytC) を初めとするアポトーシス誘導因子が存在しており (Yamada A. *et al.*, 2009)、ミトコンドリア膜の透過性は細胞死の調節に密接に関与している。例えば、細胞質に存在する Bcl-2 ファミリータンパク質である Bad、Bid、Bax および Bim は種々の細胞死シグナルによりミトコンドリアへと移動し、ミトコンドリアの膜電位や外膜の透過性を変化させることで CytC などの膜間スペースのタンパク質の放出を制御し、細胞死を調節している (Brenner D. *et al.*, 2009 ; Lindsay J. *et al.*, 2011 ; Nawaz M. *et al.*, 2011)。また、ミトコンドリアは細胞質の Ca^{2+} 濃度の上昇や酸化ストレスなどの異常を検知すると、膜の透過性を急激に変化させることでこれらのタンパク質を放出し、細胞死を誘導する。この自発的な膜透過性の変化を伴う細胞死誘導機構はミトコンドリア透過性遷移 (mPT) と呼ばれている (Gunter TE. *et al.*, 1990)。mPT は透過性遷移孔 (PTP) と呼ばれるタンパク複合体が形成されることで誘導されると考えられており、この複合体は外膜の VDAC やヘキソキナーゼ (HK)、末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (PBR)、膜間スペースのクレアチンキナーゼ (CK)、内膜に存在するアデニンヌクレオチド輸送担体 (ANT)、マトリクスタンパク質であるシクロフィリン D (CypD) などから構成されると考えられているが (図 1-3)、その詳細は未だ明らかになってはいない (Gross A. *et al.*, 1999 ; Kokoszka JE. *et al.*, 2004)。PTP を開口したミトコンドリアの内膜は約 1.5 kDa までの粒子やイオンを自由に透過させ (Bernardi P. *et al.*, 1998 ; Gunter TE. *et al.*, 1990 ; Zoratti M. *et al.*, 1995)、内膜の透過性亢進に伴い外部の水が侵入することで、外膜の破裂を伴う膨潤を引き起こす。膨潤したミトコンドリアは膜電位が消失し ATP の産生が停止するとともに、貯蔵されていた Ca^{2+} や CytC などを含む様々なタンパク質を放出する。この mPT に伴う ATP 産生機構の破綻や細胞死誘導因子の放出は、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死の引き金になることが明らかになっている (Brenner C. *et al.*, 2006 ; Tsujimoto Y. *et al.*, 2007)。いくつかの肝障害性薬物においてこの mPT の誘導活性が報告されており、mPT は DILI を惹起する代表的なメカニズムの一つとして注目されている (図 1-4)。

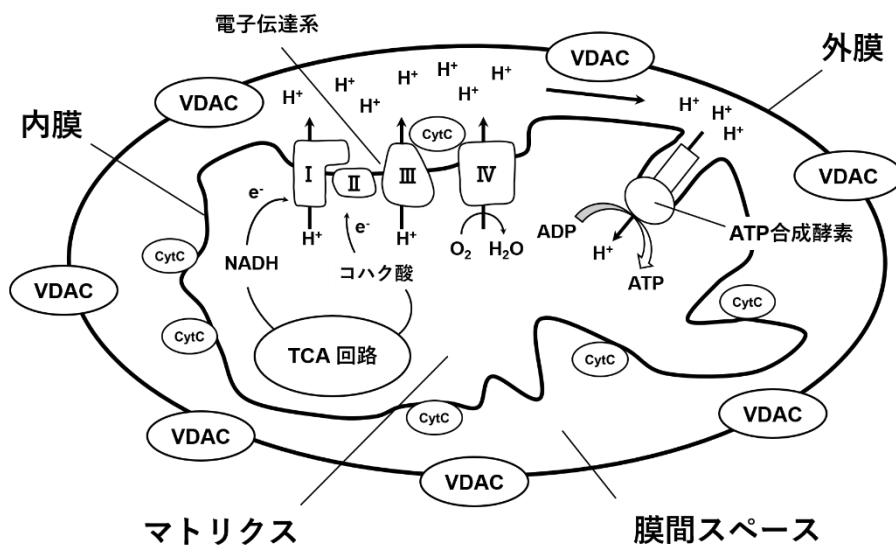


図 1-2 ミトコンドリアの構造と機能

ミトコンドリアは外膜、内膜、膜間スペース、マトリクスの 4 つのコンパートメントに区画化される。外膜には VDAC が大量に発現しており、分子量 5000 以下の分子が自由に透過できる。ミトコンドリア内膜には電子伝達系 (I - IV) が存在し、マトリクスにある TCA 回路から得られた NADH やコハク酸由来の電子を酸素に受け渡す過程で H^+ を膜間スペース側に汲み出し、 H^+ の濃度勾配を作り出している。内膜は不透性であるため、汲み出された H^+ は ATP 合成酵素を介してマトリクス側に戻り、この物理化学的なエネルギー勾配を利用してアデノシン三リン酸 (ATP) の合成が行われる。膜間スペースには CytC を初めとする細胞死誘導因子が存在しており、種々の細胞死誘導シグナルにより放出が制御されている。

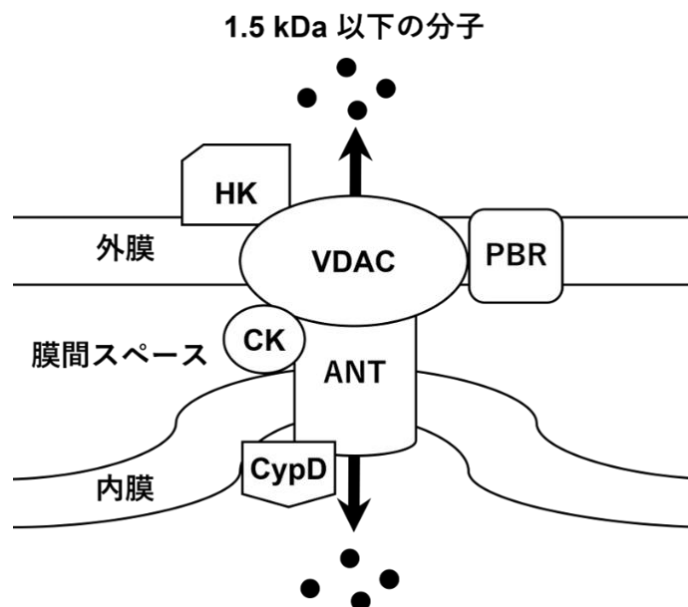


図 1-3 現在予想されている PTP の構造概略図

VDAC : 電位依存性アニオンチャネル、HK : ヘキソキナーゼ、PBR : 末梢性ベンゾジアゼピン受容体、CK : クレアチンキナーゼ、ANT : アデニンヌクレオチド輸送担体、CypD : シクロフィリン D を示した。

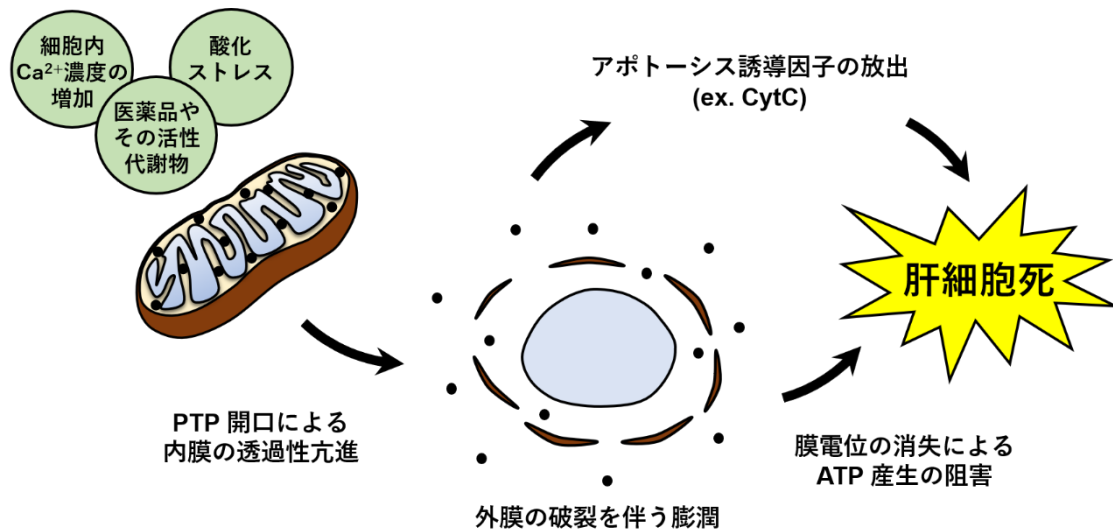


図 1-4 mPT による肝細胞死の誘導モデル

第 3 節 NSAIDs による肝障害の誘発とミトコンドリアへの影響

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は痛みや炎症を伴う疾患に汎用される解熱・鎮痛剤である。NSAIDs の主作用は、シクロオキシゲナーゼ (COX) への作用を介したプロスタグランジンやトロンボキサンなどのプロスタノイドの合成阻害によって発揮される。COX には COX-1 と COX-2 のアイソザイムが存在し、それぞれ独立して発現調節が行われていることが知られている (Steinmeyer J., 2000 ; Süleyman H. *et al.*, 2007)。COX-1 は構成型 COX と呼ばれ、全身組織の細胞に常時一定量存在しており、胃粘膜の血流の維持や粘液産生の増加、血小板凝集の抑制、腎血流量の増加など生理機能の維持に関与している。COX-2 は炎症性の刺激によって発現が誘導され、血管の拡張や透過性の亢進、発痛に関わるプロスタノイドを生成することから、炎症病態の形成に大きく寄与している。NSAIDs の代表的な副作用として消化管障害や腎障害、肝障害、心毒性などが知られており、COX 阻害活性とその副作用との関連が言及されてきた (Jones P. *et al.*, 2010 ; Souto EO. *et al.*, 2001)。1990 年代後半頃から副作用の軽減を目的に COX-2 を選択的に阻害する NSAIDs の開発が進み、1999 年に世界初となる COX-2 選択的阻害薬セレコキシブが米国にて上市され、本邦では 2007 年に承認されている (Baek SJ. *et al.*, 2006 ; Wang X. *et al.*, 2011 ; Watanabe T. *et al.*, 2011)。セレコキシブを初めとする COX-2 選択的阻害薬の使用により、従来の NSAIDs と比較して潰瘍や穿孔、出血などの消化管障害や腎障害を有意に低下させることが CLASS 試験 (Silverstein FE. *et al.*, 2000) や VIGOR 試験 (Bombardier C. *et al.*, 2000) などの大規模臨床試験の結果により示されており、NSAIDs による消化管障害や腎障害が COX-1 の阻害に起因するものであることが示唆された。一方、心毒性や肝障

害などの副作用は COX-2 選択的阻害薬においても依然として存在しており、これらの副作用は COX の阻害を介さないメカニズムによって誘発されている可能性がある (van Leeuwen. *et al.*, 2012)。近年、いくつかの NSAIDs がミトコンドリア機能に影響を与えることで細胞機能を欠損させることが報告されており、NSAIDs の肝毒性発現にミトコンドリアの関与が示唆されている (Berson A. *et al.*, 2006 ; Chakraborty H. *et al.*, 2007 ; Lal N. *et al.*, 2009 ; Masubuchi Y. *et al.*, 1999, 2000, 2002 ; Syed M. *et al.*, 2016)。

第 4 節 本研究の目的

第 3 節で述べたように、NSAIDs による肝障害の発現に 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。しかしながら、ミトコンドリア機能を障害する具体的なメカニズムや、どのような特徴を持つ NSAIDs がミトコンドリア機能の障害を惹起しやすいかなど、明らかになっていない部分も多い。そこで本研究では、ミトコンドリアの形態変化を指標に mPT を誘導する NSAIDs をスクリーニングし、その詳細なメカニズムや機能修飾に必須な構造的要因を明らかにすることで、医薬品の開発に有益な知見を得ることを目的とした。第 2 章では、セレコキシブやメフェナム酸の 2 つの NSAIDs に強力なミトコンドリア膨潤作用があることを示し、主にセレコキシブに着目してその詳細な検証を行った。セレコキシブがミトコンドリア内膜に存在する ATP 産生機構(電子伝達系、H⁺ 勾配) やミトコンドリアからのタンパク質の放出、赤血球やリポソームなどの生体膜に及ぼす影響を検証し、ミトコンドリアへの作用メカニズムについて考察した。第 3 章では、メフェナム酸を含むフェナム酸系 NSAIDs によるミトコンドリアの膨潤メカニズムを明らかにするために、7 種類の構造関連化合物を用いて検証を行った。これらの構造関連化合物について、ミトコンドリア形態や機能に及ぼす影響の違いを検証・比較することで、フェナム酸系 NSAIDs によって誘導されるミトコンドリア膨潤に必須な構造的要因を明らかにした。また、著者は医薬品による副作用の軽減を目的に、薬物送達システム (DDS) の開発にも着手している。第 4 章では、これまでの検証で明らかにしたミトコンドリア機能を DDS 開発ツールとして利用することを試みた。具体的には、NSAIDs などの薬物分子に感度良く反応して酸素を消費するミトコンドリアの特性を利用し、微粒子製剤など様々な薬物担体に応用可能な薬物放出のリアルタイム評価系の構築を行った。以上の結果をもとに、第 5 章ではセレコキシブやフェナム酸系の NSAIDs がミトコンドリア機能を障害するメカニズムや、ミトコンドリアを利用した薬物放出評価系を用いた DDS 開発の展望について総括する。

第 2 章

非ステロイド性抗炎症薬セレコキシブが
ミトコンドリア機能に及ぼす影響

第 2 章 非ステロイド性抗炎症薬セレコキシブが

ミトコンドリア機能に及ぼす影響

第 1 節 緒言

肝障害性の薬物には、ミトコンドリア機能に影響を及ぼすものが数多く存在する。これまでに多種多様な薬物やその代謝活性物においてミトコンドリア膜機能を修飾することが報告されており (Pessayre D. *et al.*, 2012)、mPT はその代表的なメカニズムの一つである。mPT 誘導能を持つ医薬品として報告されているものには序論で言及した NSAIDs の他に、抗生物質 (ニトロフラントイン)、高脂血症治療薬 (スタチン類)、抗精神病薬 (バルプロ酸ナトリウムやフェノチアジン類)、糖尿病治療薬 (トログリタゾン) などが報告されており (Carbonera D. *et al.*, 1988 ; Velho JA. *et al.*, 2006 ; Trost LC. *et al.*, 1996 ; de Faria PA. *et al.*, 2015 ; Okuda T. *et al.*, 2010)、いずれも肝障害が多い医薬品である (Björnsson ES., 2016)。特に、トログリタゾンは重篤な肝障害の発生により市場から撤退しており、この肝障害発現メカニズムにミトコンドリア機能への影響が関与している可能性がある。肝障害性薬物が mPT を誘導するメカニズムとしては、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP) トランスヒドロゲナーゼの活性阻害による過酸化水素 (H_2O_2) の解毒機構の障害や (Costantini P. *et al.*, 1996 ; Berson A. *et al.*, 2006)、カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 の活性化 (Okuda T. *et al.*, 2010)、ミトコンドリア内膜に存在するペルオキシダーゼ代謝によるカチオンラジカルの生成 (Cruz TS. *et al.*, 2010) などが報告されている。NSAIDs においては、アセトアミノフェンやその活性代謝物による酸化ストレスの増大 (Jiang J. *et al.*, 2015)、ニメスリドやジクロフェナクでは酸化リン酸化の脱共役に起因する NADP トランスヒドロゲナーゼの活性阻害 (Berson A. *et al.*, 2006 ; Masubuchi Y. *et al.*, 2002) が報告されている。

著者は、13 種の NSAIDs の中からミトコンドリアの形態変化を指標に mPT を誘導するものをスクリーニングした。その結果、COX-2 選択的阻薬に分類されるセレコキシブ、COX 非選択的阻薬に分類されるメフェナム酸において強いミトコンドリア膨潤作用をもつことを確認した。セレコキシブがミトコンドリア機能に及ぼす影響についてはこれまでも報告があり、セレコキシブによりミトコンドリアの膨潤や ATP 合成の障害が惹起されることが報告されているが (Lal N. *et al.*, 2009 ; Syed M. *et al.*, 2016)、そのメカニズムについてはほとんど明らかになっていない。そこで本章では、ウイスター系ラットの肝臓から単離したミトコンドリアを用いて、セレコキシブがミトコンドリアの ATP 産生やタンパク質の放出に及ぼす影響を検証した。また、ヒト赤血球や人工脂質二重膜小胞であるリポソームの膜物性に及ぼす影響についても併せて検証し、その作用メカニズムについて考

察した。メフェナム酸を初めとするフェナム酸系の NSAIDs がミトコンドリア機能に及ぼす影響については第 3 章で詳細に述べる。

第 2 節 実験方法

1. 材料

試薬：

セレコキシブは LC Laboratories (ウォーバーン、マサチューセッツ州、米国) から購入した。メフェナム酸とフェンブフェンはナカライテスク株式会社 (京都市、京都府、日本) から購入した。ナプロキセン、エトドラク、サリチル酸、ロキソプロフェン、アセチルサリチル酸、インドメタシン、イブプロフェン、ピロキシカム、メロキシカムは和光純薬工業株式会社 (大阪市、大阪府、日本) から購入した。セレコキシブ、ナプロキセン、エトドラク、サリチル酸、ロキソプロフェン、アセチルサリチル酸、インドメタシン、イブプロフェンはエタノールに溶解し、 -20°C で保存した。メフェナム酸、フェンブフェン、ピロキシカム、メロキシカムはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、 -20°C で保存した。SF6847 (sc-200569) は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (サンタクルーズ、カリフォルニア州、米国) から購入した。シクロスポリン A (CsA) はナカライテスク株式会社 (京都市、京都府、日本) から購入した。抗 - VDAC 抗体は CST ジャパン株式会社 (千代田区、東京都、日本) から購入した。抗 - CytC 抗体と抗 - アデニル酸キナーゼ 2 (AK2) 抗体は Signalway Antibody (ペアランド、テキサス州、米国) と Santa Cruz Biotechnology, Inc. (サンタクルーズ、カリフォルニア州、米国) からそれぞれ購入した。抗 - アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) 抗体は Abcam (ケンブリッジ、ケンブリッジシャー州、英国) から購入した。抗 - HMG-CoA 合成酵素 2 (HMGCS2) 抗体と抗 - ANT 抗体は篠原康雄教授 (徳島大学、徳島県、日本) から提供していただいた。ロバ抗ウサギ IgG (二次抗体) は GE ヘルスケア・ジャパン (日野市、東京都、日本) から購入した。1 - パルミトイル - 2 - オレオイルホスファチジルコリン (POPC) は和光純薬工業株式会社 (大阪市、大阪府、日本) から購入した。カルセインは東京化成工業株式会社 (中央区、東京都、日本) から購入した。

2. ラット肝臓ミトコンドリアの調製

単離液 ($-$ EDTA、 $+$ EDTA) の調製：

スクロース 85.58 g (終濃度 250 mM)、Tris 0.242 g (終濃度 2 mM) を 800 mL 程度の超純水で溶解し、室温で攪拌した。攪拌後、適当な濃度の HCl を滴下して pH を 7.4 に

調整し、超純水で 1000 mL にメスアップした。500 mL を精確に量り取り、ポリプロピレン製のメディウム瓶に分注し、使用するまで 4 °C で保存した (-EDTA 単離液)。残った 500 mL の -EDTA 単離液から 5 mL の溶液を引き抜き、100 mM EDTA-2Na (pH 7.4) を 5 mL (終濃度: 1mM) 加え転倒混和し、EDTA を含有した単離液を調製した (+EDTA 単離液)。+EDTA 単離液についても -EDTA 単離液と同様に、ポリプロピレン製のメディウム瓶に移し、4 °C で保存した。

呼吸調節率 (RCI) 測定メディウムの調製:

スクロース 34.23 g (終濃度 200 mM)、1 M MgCl₂ 1 mL (終濃度 2 mM)、100 mM EDTA-2Na (pH 7.4) 5mL (終濃度 1 mM)、1 M リン酸カリウム (K-Pi) 緩衝液 5 mL (終濃度 10 mM) を 400 mL 程度の超純水に加え、室温で攪拌した。攪拌後、適当な濃度の KOH を滴下して pH を 7.4 に調整し、500 mL にメスアップした。良く混和させた後、ポリプロピレン製のメディウム瓶に入れ、使用するまで 4 °C で保存した。

ウイスター系ラット肝臓からのミトコンドリア単離と懸濁液の調製:

ラット肝臓ミトコンドリアは以前に報告された方法に準じて、ウイスター系雄性ラットの肝臓から単離した (Yamada A. *et al.*, 2009; Kawashima S. *et al.*, 2011)。脱血死させたラットを解剖して肝臓を取り出した後、+EDTA 単離液で良く洗いこんだハサミを使用して細かく細断した。細断した肝臓片を 50 mL のポッター型ホモジナイザーに移し、ホモジナイズ (520 rpm) を行った。得られたホモジネートを 200 mL のメスシリンダーに移し液量が肝重量の 10 倍量になるまで +EDTA 単離液を加えメスアップした。このホモジネートを 3 つの遠心管に均等に分注し、遠心 (800 × g、5 分、4°C) した。遠心後の上清をデカントで別の遠沈管に移し、遠心 (6,800 × g、10 分、4°C) してミトコンドリア画分を得た。この画分を +EDTA 単離液で懸濁し 20 mL のポッター型ホモジナイザーに移して手動でホモジナイズした後、高速遠心 (17,400 × g、10 分、4°C) し、層分離したライトミトコンドリアを除去することでヘヴィミトコンドリアのみを精製した。得られたヘヴィミトコンドリアの沈殿を -EDTA 単離液で良く懸濁し、15 mL のポッター型ホモジナイザーを用いて手動でホモジナイズした後、再び高速遠心 (17,400 × g、10 分、4°C) を行った。得られた沈殿を 1 mL の -EDTA 単離液で再度懸濁し、5 mL のポッター型ホモジナイザーで手動でホモジナイズしたものをミトコンドリア懸濁液とした。懸濁液はウシ血清アルブミンを標準物質としたビウレット法を用いて定量し、実験に使用した。なお、操作中の遠心は全てマイクロ冷却遠心機 (Model 3700; 久保田商事株式会社、文京区、東京都、日本) 用いて行った。また、動物の取り扱いは、鈴鹿医療科学大学の動物実験指針 (承認番号: 第 19 号) に基づいて行った。

ミトコンドリア RCI の測定：

ミトコンドリアの状態を評価する指標である RCI は下記の式で定義されており、一般的に RCI 値が 5 ~ 8 のミトコンドリアは状態が良いとされている。本研究では、実験に用いるミトコンドリアの質を一定以上に保つために、単離したミトコンドリアの RCI 値を測定している。クラーク型酸素電極 (Yellow Spring 5331; Yellow Spring Instrument Co., Inc., イエロー・スプリングス、オハイオ州、米国) が付属したキュベット (容積 2.2 mL) に RCI 測定用のメディウムを 2.2 mL 充填し、電子伝達系複合体 I の阻害剤であるロテノンを 5.5 μ L (終濃度 1 μ g/ml)、複合体 II の呼吸基質であるコハク酸 (pH 7.4) を 44 μ L (終濃度 10 mM) 添加し、攪拌した。1 分後、ミトコンドリア懸濁液をタンパク質濃度として 0.7 mg/mL になるように添加し、さらに 1 分後、ADP (終濃度 250 μ M) を添加して、ATP の合成に伴う酸素消費速度 (state 3) を測定した。ADP が尽きるまで溶存酸素のモニタリングを継続し、ATP 合成を行っていないときの基礎的な酸素消費速度 (state 4) を測定した。得られた state 3、state 4 の酸素消費速度から RCI 値を算出した。本研究では RCI 値が 5.5 以上のミトコンドリアを用いて実験を行った。

$$RCI = (\text{state3 の酸素消費速度}) / (\text{state4 の酸素消費速度})$$

3. ミトコンドリア膨潤の観測

ミトコンドリア膨潤観測用無機リン酸メディウム (+Pi メディウム) の調製：

スクロース 34.23 g (終濃度 200 mM)、1 M K-Pi 緩衝液 5 mL (終濃度 10 mM) を 400 mL 程度の超純水に加え、室温で攪拌した。攪拌後、適当な濃度の KOH を滴下して pH を 7.4 に調整し、500 mL にメスアップした。良く混和させた後、ポリプロピレン製のメディウム瓶に入れ、使用するまで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

ミトコンドリア膨潤の観測：

25 $^{\circ}$ C におけるミトコンドリア懸濁液の 540 nm の吸光度の減少を UV - 1800 分光光度計 (株式会社島津製作所、京都市、京都府、日本) を用いた分光光度分析により検証した (Shinohara Y. *et al.*, 2002; Yamamoto T. *et al.*, 2008)。タンパク質濃度が 0.7 mg/ml になるようにミトコンドリアを 2.2 mL の +Pi メディウム中に懸濁し、呼吸基質としてコハク酸 (終濃度 10 mM) とロテノン (終濃度 1 μ g/ml) をそれぞれ添加した。NSAIDs もしくは Ca^{2+} をミトコンドリア懸濁液に添加し、540 nm における吸光度の経時的変化を測定した。

4. ミトコンドリア機能の解析

セレコキシブがミトコンドリア呼吸に与える影響の解析：

ミトコンドリアの ATP 合成や内膜に形成された H^+ 勾配の解消に応じて変化するミトコンドリアの酸素消費をクラーク型酸素電極を用いて測定した (Shinohara Y. *et al.*, 2002 ; Yamada A. *et al.*, 2009 ; Kawashima S. *et al.*, 2011)。基本的な操作はミトコンドリア RCI を測定する際と同様の方法で行ったが、ミトコンドリア懸濁液は +Pi メディウムで調製し、この懸濁液の溶存酸素の変化を指標に state4、state3、セレコキシブの脱共役作用などの検討を行った。

5. ミトコンドリアから放出されるタンパク質の解析

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)：

SDS-PAGE は 12.5 % または 15.0 % ゲルを用いて Laemmli の方法に従って行った (Laemmli UK., 1970)。ミトコンドリアを 200 μ M のセレコキシブ共存下でインキュベーション (10 分、25 $^{\circ}$ C) した後、反応液を遠心し (13200 rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分) 上清画分と沈殿画分を得た。得られたミトコンドリアタンパクを含む上清、沈殿サンプルを 1 % SDS、1 % ジチオトレイトール、10 % グリセロールを含む 25 mM Tris-HCl (pH 6.8) に溶解し、5 分煮沸した。ミトコンドリアタンパク可溶化液 (タンパク量として 10.5 μ g) を SDS-PAGE に供し、泳動後のゲルを 0.1% クマシーブリリアントブルー (CBB) R-250 を用いて染色した。

ウエスタンブロッティング：

ウエスタンブロッティングは Towbin らの方法に従って行った (Towbin H. *et al.*, 1979)。SDS-PAGE 後のゲル中のタンパク質をニトロセルロースメンブレンフィルター (NCF) にセミドライ式ブロッティング装置 (ホライズプロット 2 M、アトー株式会社、台東区、東京都、日本) を用いて転写した (20 V、144 mA、1 時間)。次に、転写後の NCF を 1% スキムミルク (ナカライテスク株式会社、京都市、京都府、日本) を含む Tween 溶液 (150 mM NaCl、0.05% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20)、20 mM Na-Pi (pH7.4)) 中で室温、1 時間インキュベーションし、膜上のタンパク質非吸着部分をブロッキングした。ブロッキング終了後、NCF をスキムミルク及びウサギ由来の一次抗体 (抗 -VDAC、- CytC、- AK2、- ALDH2、- HMGCS2、- ANT 抗体) を含む Tween 溶液に移し、室温で 1 時間インキュベーションした。NCF 膜を Tween 溶液にて 3 回洗浄後、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ IgG 抗体を含む Tween 溶液に移し、室温で 1 時間インキュベーションした。NCF を Tween 溶液にて 5 回洗浄した後、ECL 検出試薬 (GE ヘルスケア、日野市、東京都、日本) を添加し、ペルオキシダー

ゼ活性により生じた化学発光を ImageQuant LAS 4000 mini (富士フイルム株式会社、港区、東京都、日本) を用いて検出した。

6. セレコキシブがリン脂質膜へ及ぼす影響の解析

セレコキシブがヒト赤血球膜へ与える影響の解析：

ヒト赤血球は健常なボランティアの方から提供していただき、滅菌したアルセバー液に懸濁して使用するまで 4 °C で保存した。使用時血液を遠心 (3,000 rpm、3 分、4 °C) して上清と軟膜を除去し、赤血球をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS : 137 mM NaCl、1.47 mM KH_2PO_4 、8.10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、2.68 mM KCl、pH 7.4) で 3 回洗いこみを行った。洗浄した赤血球を 0.5 % (v/v) になるように、セレコキシブを溶解した PBS に添加した。100 % 溶血のコントロールとして脱イオン水をセレコキシブ溶液の代わりに用いた。薬物を混和した赤血球溶液を 37 °C で 90 分インキュベーションした後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分、4 °C) して得られた上清の 540 nm における吸光度を マイクロプレートリーダー Infinite M200 (TECAN、メンネドルフ、チューリッヒ州、スイス) を使用して測定した (Tabata A. *et al.*, 2014)。溶血率は常法に従って算出した (Nagamune H. *et al.*, 1996)。実験は、徳島大学大学院理工学研究科倫理審査委員会の承認を受けて行った (プロトコル番号 : 15002)。

セレコキシブがリポソームへ及ぼす影響の解析：

カルセインを封入した大型単層膜リポソーム (Cal-LUV) は常法に従って作製した (Yamamoto T. *et al.*, 2014)。全量 7.6 mg の POPC をクロロホルムに溶解し窒素ガスを用いて乾燥させた後、真空中で 2 時間静置し、残ったクロロホルムを完全に除去した。1 mL のカルセイン溶液 (60 mM カルセイン、200 mM スクロース、10 mM K/Pi 緩衝液、pH 7.4) を添加し 30 分間水和させることでリン脂質二重膜を形成させた。水和溶液をミキサーにて混和し、多重膜リポソーム (MLV) に形成した。作製した MLV を Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids、アラバスター、アラバマ州、米国) を使用して 80 °C 下で 100 nm ポリカーボネート膜に 11 回通し Cal-LUV を得た。余分なカルセインは Cal-LUV 懸濁液をセファデックス - G25 カラム (GE ヘルスケア、日野市、東京都、日本) に 2 回通すことで取り除いた。Cal-LUV の含有リン脂質量はラボアッセイリン脂質 (和光純薬工業株式会社、大阪市、大阪府、日本) を使用して定量した。セレコキシブなどの試験化合物を含む Cal-LUV を +Pi メディウムに懸濁し、25 °C、60 分でインキュベーションし、200 μL の懸濁液について Gemini XPS (Molecular Devices LLC.、サニーベール、カルフォルニア州、米国) を用いて蛍光強度を測定した (励起 : 490 nm、蛍光 : 520 nm)。

第 3 節 結果

1. ミトコンドリアの膨潤を誘導する NSAIDs のスクリーニング

種々の NSAIDs についてミトコンドリア膨潤誘導能を検証した (表 2-1)。セレコキシブ (200 μM) は Ca^{2+} と同様にミトコンドリア膨潤を誘導し、96.1 % (100 μM Ca^{2+} 添加時を 100% とした) の吸光度減少 (ΔAbs_{540}) が観察された。メフェナム酸 (200 μM) においても顕著な膨潤が観測され、 ΔAbs_{540} は 72.7 % であった。他の NSAIDs では弱いミトコンドリア膨潤誘導が観測されフェンブフェン (200 μM)、ジクロフェナク (200 μM)、ナプロキセン (200 μM) では各々、26.6 %、15.3 %、11.2 % のミトコンドリア膨潤が観測された。200 μM のエトドラク、サリチル酸、ロキソプロフェン、アセチルサリチル酸、インドメタシン、イブプロフェンにおいても弱いミトコンドリア膨潤誘導が観測された (5.1–9.1 %)。また、ピロキシカムとメロキシカムはミトコンドリアをほとんど膨潤させなかった。

表 2-1 NSAIDs によって誘導されるミトコンドリアの膨潤

	ΔAbs_{540} (%)
Ca^{2+}	100.0
セレコキシブ	96.1 \pm 7.7
メフェナム酸	72.7 \pm 20.1
フェンブフェン	26.6 \pm 16.3
ジクロフェナク	15.3 \pm 10.3
エトドラク	9.1 \pm 9.4
サリチル酸	8.7 \pm 4.8
ロキソプロフェン	5.1 \pm 5.7
ナプロキセン	11.2 \pm 4.8
アセチルサリチル酸	4.3 \pm 0.3
インドメタシン	6.7 \pm 1.3
イブプロフェン	6.4 \pm 4.2
ピロキシカム	0.1 \pm 5.0
メロキシカム	0.1 \pm 6.4

ミトコンドリアの膨潤は 540 nm の吸光度減少 (ΔAbs_{540}) を指標に検証した。 Ca^{2+} (100 μM) の添加により観測される 10 分間の ΔAbs_{540} を 100 % と示している。種々の NSAID (200 μM) をミトコンドリア懸濁液に添加し、10 分間の ΔAbs_{540} (% of Ca^{2+}) を検証した。なお、結果は独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 \pm 標準偏差 (SD) 値として示した。

2. セレコキシブがミトコンドリア膨潤へ及ぼす影響

無機リン酸(Pi)は Ca^{2+} による mPT の誘導において必須な因子である。 Ca^{2+} (100 μM) をミトコンドリア懸濁液に添加するとミトコンドリア膨潤を誘導し、540 nm の吸光度を減少させる (図 2-1 A、実線)。Pi 非存在下では、 Ca^{2+} の添加による著しい吸光度の変化は見られない (図 2-1 A、一点鎖線)。また、CsA (1 μM) は Ca^{2+} による吸光度変化を完全に抑制した (図 2-1 A、点線)。セレコキシブ (20–200 μM) は濃度依存的に 540 nm の吸光度を減少させた (図 2-1 B)。セレコキシブによって誘導された吸光度の減少は CsA (1 μM) の添加によって抑制されず (図 2-1 B、点線)、セレコキシブは Ca^{2+} とは異なるメカニズムでミトコンドリアを膨潤させていると考えられた。

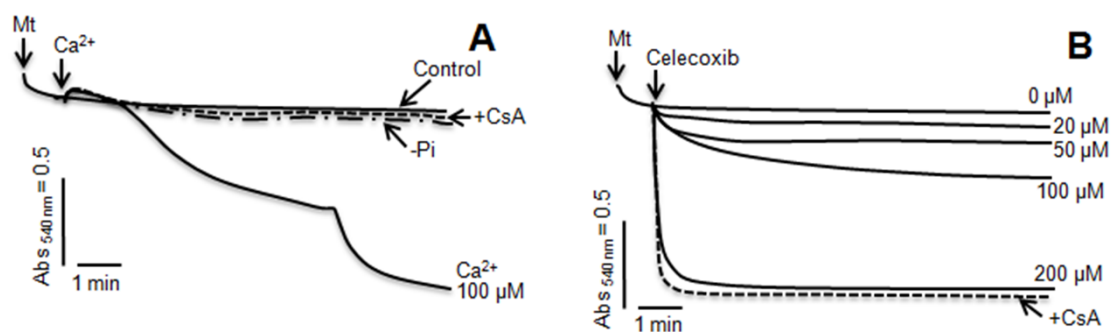


図 2-1 ミトコンドリア膨潤の特性

ミトコンドリア (Mt) を +Pi メディウムに懸濁し (タンパク質濃度として 0.7 mg / mL)、コハク酸 (10 mM) 及びロテノン (1 μg / mL) を呼吸基質として添加し、540 nm 吸光度変化をモニターした。Mt を添加後、100 μM Ca^{2+} (図 2-1 A、実線)、または、20–200 μM のセレコキシブ (図 2-1 B、実線) を添加した。Pi の影響を評価するために、Pi をメディウムから除いた条件 (図 2-1 A、一点鎖線)、CsA の影響を評価するために CsA をメディウムに添加した条件 (図 2-1 A、B、点線) で検証を行った。

3. セレコキシブがミトコンドリア機能に及ぼす影響

脱共役などのミトコンドリアの脱エネルギー化は mPT の誘導に関与することが示唆されていることから (Beatrice MC. *et al.*, 1980 ; Lal N. *et al.*, 2009 ; Petronilli V. *et al.*, 1993)、著者は Ca^{2+} とセレコキシブがミトコンドリア酸素消費に及ぼす影響を検証した。 Ca^{2+} (100 μM) は PTP を開口させて脱共役を誘導し、ミトコンドリアの酸素消費を著しく増加させた (図 2-2 A)。この Ca^{2+} が誘導する脱共役は CsA (1 μM) の添加により完全に抑制された (図 2-2 A)。PTP の開口による酸素消費の促進を抑制するために、ミトコンドリアを CsA (1 μM) で前処理した後、セレコキシブの脱共役活性を検証した。基礎酸素消費速度 (state 4) は 32.3 natomsO / mg / min (図 2-2 B、0 μM セレコキシブ) とな

り、SF6847 (100 nM、脱共役のポジティブコントロール) の添加により 151.6 natomsO/mg/min まで増加した (図 2-2 B)。セレコキシブは濃度依存的に酸素消費速度を増加させ (6.3–200 μ M) (図 2-2 B)、200 μ M セレコキシブによる酸素消費速度は 96.8 natomsO/mg/min となり、これは SF6847 による酸素消費速度促進の 54.0 % であった。さらに、セレコキシブは SF6847 が誘導する脱共役を 100 μ M で 34.2 %、200 μ M で 78.1 % とそれぞれ阻害した (図 2-2 C)。この結果は、セレコキシブが電子伝達系機能を阻害する可能性を示唆している。エネルギー産生はミトコンドリアの主要な機能であり、state 3 における酸素消費速度はミトコンドリア ATP 合成の指標となる。セレコキシブが state 3 の酸素消費速度に及ぼす影響を検証した結果、セレコキシブは濃度依存的に state 3 を阻害し (図 2-3)、200 μ M で 41.7 % の阻害が観測された。

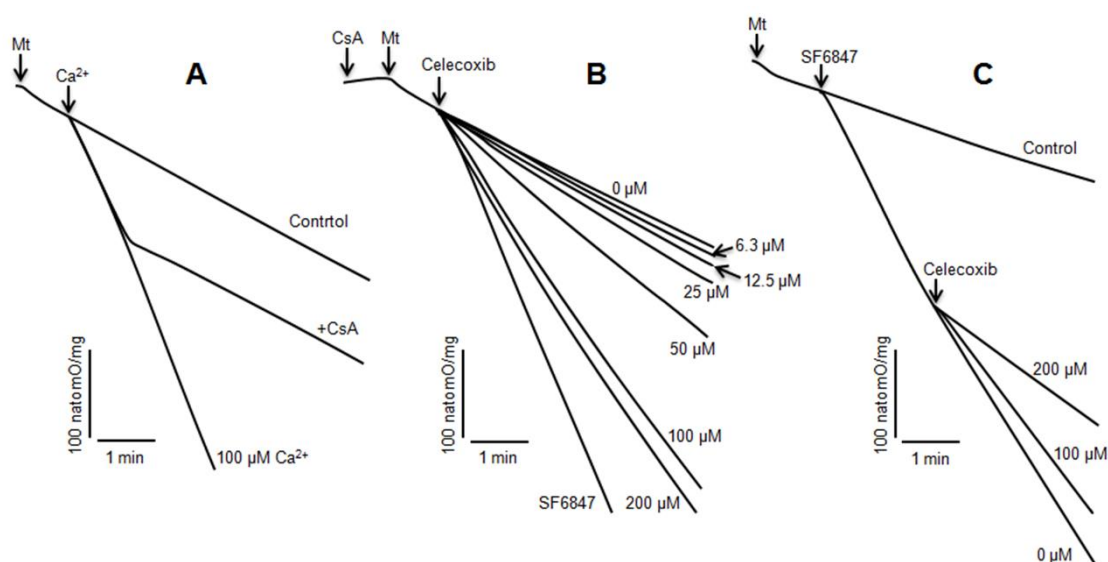


図 2-2 セレコキシブがミトコンドリア機能へ及ぼす影響

ミトコンドリア酸素消費速度を指標にセレコキシブの脱共役作用を検証した。図 2-1 と同様の条件でミトコンドリア懸濁液を調製し、 Ca^{2+} (100 μ M) がミトコンドリア酸素消費速度に与える影響を検証した (パネル A)。 Ca^{2+} による酸素消費は CsA (1 μ M) により完全に抑制された。コントロールの直線は state 4 酸素消費速度を示している。ミトコンドリアを CsA (1 μ M) で前処理し PTP の開口による酸素消費を抑制した後、セレコキシブ (6.3–200 μ M) の添加による酸素消費速度の変化を検証した (パネル B、実線)。SF6847 (100 nM) は脱共役作用のポジティブコントロールであり、パネル C は SF6847 の酸素消費速度にセレコキシブが与える影響を示している。

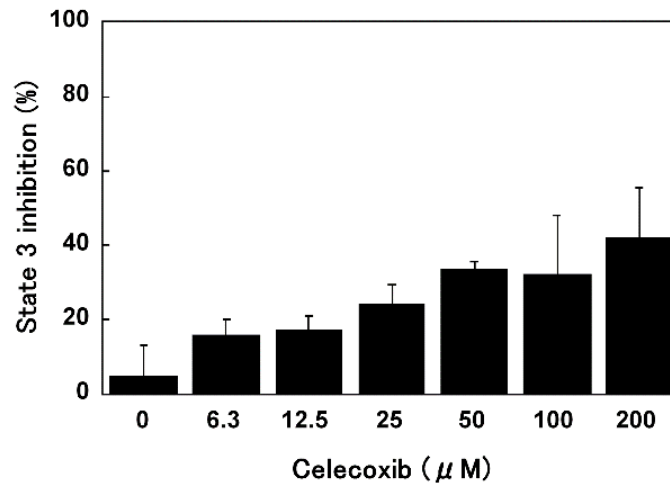


図 2-3 セレコキシブの state 3 酸素消費阻害作用の検証

ミトコンドリアを+Pi メディウムに懸濁し (タンパク質濃度 0.7 mg / mL)、コハク酸 (10 mM)、ロテノン (1 μg / mL) を呼吸基質として添加した。次いで、ADP (1 mM) を添加し、ATP 合成に伴う酸素消費速度 (state 3) を検証した。セレコキシブ (0 - 200 μM) を ADP を含むミトコンドリア懸濁液に添加し、セレコキシブが state 3 に及ぼす影響を検証した。state 3 の阻害作用 (%) を独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 ± SD 値として示した。

4. セレコキシブによるミトコンドリアからのタンパク質放出

SDS-PAGE による解析の結果 (図 2-4 A、B)、50 μM 以上のセレコキシブの添加により、上清サンプルにバンドが検出され (図 2-4 B、レーン 8 - 10)、ミトコンドリアの構成タンパク質がセレコキシブによる膨潤誘導によって放出されていることが示唆された。タンパク質の放出が最も顕著であった 200 μM のセレコキシブと反応させたミトコンドリアサンプルについてウエスタンブロッティング解析を行った結果、ミトコンドリア外膜マーカータンパク質である VDAC のバンドは上清に検出されず、沈殿中のみを検出された (図 2-4 C、4 D、レーン 3)。また、膜間スペースに存在するタンパク質である CytC と AK2 に関しても、上清中に検出されなかった (図 2-4 D、レーン 3)。一方、ALDH2 や HMGCS2 などのマトリクスタンパク質は上清中に検出された (図 2-4 D、レーン 3)。HMGCS2 は完全にマトリクスから放出され、沈殿にバンドは検出されなかった (図 2-4 C、レーン 3)。内膜に局在するタンパク質である ANT のバンドは沈殿中にのみ検出された (図 2-4 D、レーン 3)。内因性の mPT 誘導因子である Ca^{2+} は膜間タンパク質である CytC、AK2 及びマトリクスタンパク質 ALDH2、HMGCS2 を 100 μM 濃度で放出させ、これらのバンドは上清に検出された (図 2-4 D、レーン 2)。

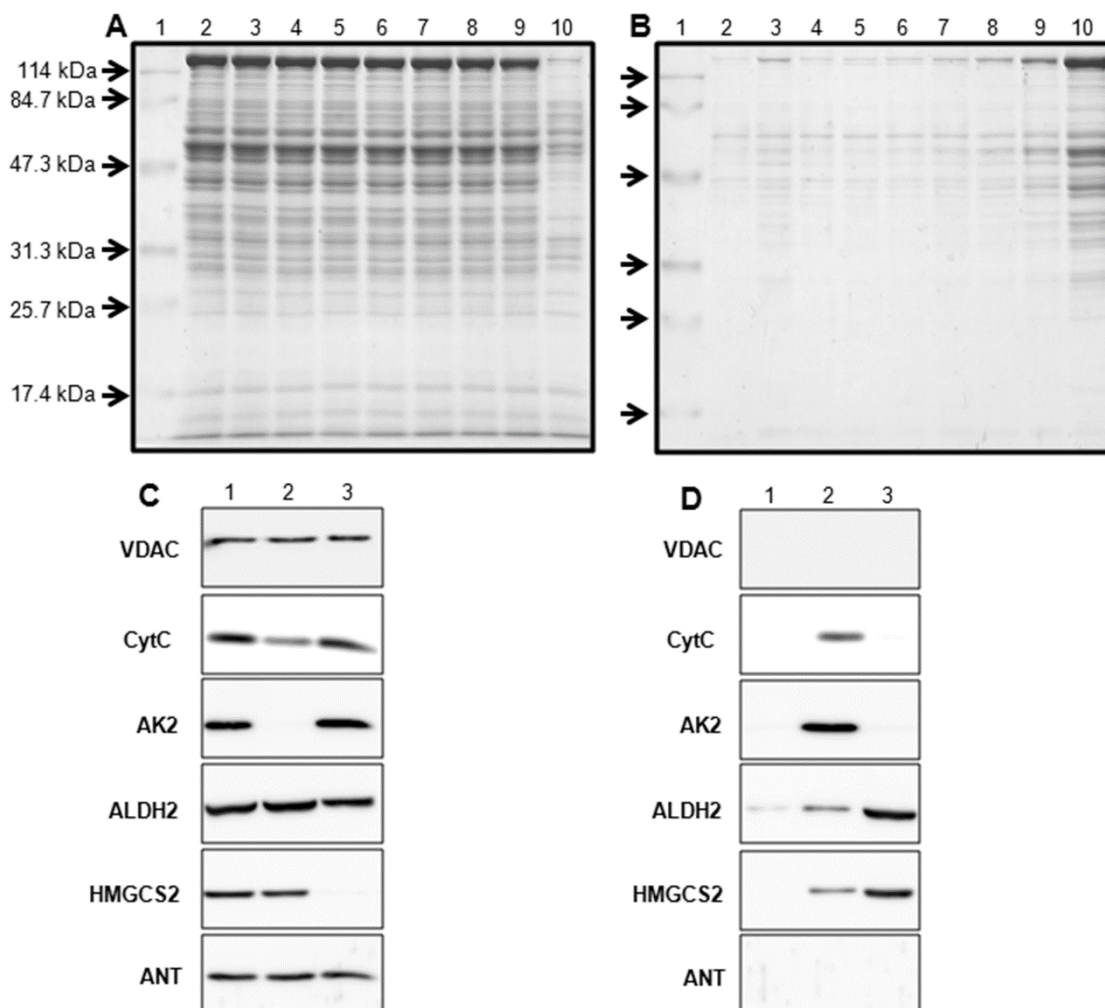


図 2-4 ミトコンドリアの各区画からのタンパク質放出特性

セレコキシブと反応させたミトコンドリアについて SDS-PAGE 及びウエスタンブロッティング解析を行った (沈殿: 図 2-4 A、4 C、上清: 図 2-4 B、4 D)。サンプルの調製は図 1 と同様の条件で行った。図 2-4 A 及び 4 B の各レーンは、分子量マーカータンパク質 (レーン 1)、未処理のミトコンドリア (レーン 2)、100 μM Ca^{2+} で処理したもの (レーン 3)、セレコキシブで処理したサンプル (3.1 μM : レーン 4、6.3 μM : レーン 5、12.5 μM : レーン 6、25 μM : レーン 7、50 μM : レーン 8、100 μM : レーン 9、200 μM : レーン 10) を示している。ミトコンドリアから放出されるタンパク質を抗 - VDAC、- CytC、- AK2、- ALDH2、- HMGCS2、- ANT 抗体を用いて検証した (図 4 C、4 D)。図 4 C、4 D の各レーンは未処理のミトコンドリア (レーン 1)、100 μM Ca^{2+} と反応させたもの (レーン 2)、200 μM セレコキシブと反応させたサンプル (レーン 3) を示している。

5. セレコキシブが生体膜へ及ぼす影響

リン脂質膜透過性へのセレコキシブの修飾効果をヒト赤血球の溶血率を指標に評価した。セレコキシブの添加により赤血球の溶血が確認され、溶血率は 4.0 % (50 μM)、55.8 % (100 μM)、93.6 % (200 μM) であった (表 2-2)。カルセインを封入した POPC リポソームを用いた検証では、カルセインの放出がセレコキシブの添加により観測された。カルセインの放出率は 23.7 % (50 μM)、79.3 % (100 μM)、90.1 % (200 μM) であった (表 2-2)。

表 2-2 セレコキシブがリン脂質膜へ及ぼす影響

セレコキシブ (μM)	赤血球 (%)	POPC-リポソーム (%)
0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
50	4.0 \pm 0.7	23.7 \pm 1.5
100	55.8 \pm 3.4	79.3 \pm 4.6
200	93.6 \pm 1.9	90.1 \pm 4.3

生体膜からの 100 % 溶出は赤血球では脱イオン水、POPC-リポソームでは 1 % triton X-100 で処理することで算出した。種々の濃度のセレコキシブ共存条件における、ヘモグロビン (赤血球) 及びカルセイン (POPC-リポソーム) の漏出率 (%) を示した。なお、結果は独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 \pm SD 値として示した。

第 4 節 考察

NSAIDs は抗炎症や抗鎮痛作用を期待して使用されているが、肝障害や消化管障害、腎障害、心毒性などいくつかの副作用を惹起すると考えられている (Bessone F., 2010 ; Graham DY. *et al.*, 2005 ; Harirforoosh S. *et al.*, 2013 ; Musu M. *et al.*, 2011 ; Unzueta A. *et al.*, 2013)。このうち肝障害は、肝ミトコンドリア機能の障害に起因する可能性が示唆されてきた (Pessayre D. *et al.*, 2012 ; Vuda M. *et al.*, 2016)。Ca²⁺ は PTP を開口させる因子として知られており、内膜の透過性の亢進に伴うミトコンドリア膨潤の誘導はその機能を障害する (Biasutto L. *et al.*, 2016 ; Nakagawa T. *et al.*, 2005 ; Tsujimoto Y. *et al.*, 2007)。本研究において、NSAIDs がミトコンドリア機能へ及ぼす影響を検証した結果、セレコキシブがミトコンドリアを顕著に膨潤させることを観測した (表 2-1)。ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系などの膜タンパク質は ATP の合成に関与しており、ミトコンドリアの膨潤によりその機能を維持できなくなることが肝機能障害の原因の一つであると考えられる。今回検証した種々の NSAIDs のうちピロキシカム、メロキシカムなどでは 200 μM の添加によってもミトコンドリア膨潤の誘導は観測されず (表 2-1)、セレコキシブによるミトコンドリア膨潤が浸透圧のような物理的な要因で誘導されていないと考えられた。

セレコキシブは 200 μM まで濃度依存的にミトコンドリアを膨潤させ、CsA によって膨潤は抑制されなかった (図 2-1)。この結果は、セレコキシブが Ca^{2+} (PTP の開口) とは異なる機構で、ミトコンドリア膨潤を誘導していることを示唆している。セレコキシブは脱共役剤 SF6847 と同じく濃度依存的にミトコンドリア酸素消費を促進させ (図 2-2 A、2-2 B)、この酸素消費の促進はミトコンドリア内膜の透過性亢進による H^+ 勾配の解消に起因していると考えられた。セレコキシブが誘導したミトコンドリアの酸素消費の促進は CsA によって阻害されず、この結果からもセレコキシブによるミトコンドリア膜透過性の変化が Ca^{2+} と異なる機構で誘導されていることが示唆されていた。また、データは示していないが SF6847 単独ではミトコンドリア膨潤を誘導しないことから、セレコキシブは SF6847 と異なる機構でミトコンドリア膜機能を修飾していると考えられた。さらに、セレコキシブは濃度依存的に SF6847 によるミトコンドリアの酸素消費を抑制した (図 2-2 C)。100 nM の SF6847 はミトコンドリア内膜でプロトンフォアとして働くことで H^+ 勾配を完全に消失させ、ミトコンドリア酸素消費を大きく増加させる。この酸素消費速度は電子伝達系による膜間腔側への H^+ の汲み出し速度に依存しているため、セレコキシブの添加による SF6847 の酸素消費速度の抑制は、セレコキシブが電子伝達系の機能を抑制していることを示唆している。また、セレコキシブが ATP 合成時に観測される酸素消費 state 3 を抑制したことからも (図 2-3)、電子伝達系機能を抑制していることが伺えた。これらの結果から、セレコキシブは 1) H^+ の膜透過性を変化させることで脱共役活性を示し、2) 電子伝達に関わる内膜タンパク質への作用により電子伝達系機能の異常を誘導していると考えられた。

セレコキシブによるミトコンドリアの各区画 (外膜、内膜、膜間スペース、マトリクス) を構成するタンパク質の放出についても検討したところ、マトリクスタンパク質である ALDH2 および HMGCS2 の遊離が確認された (図 2-4)。セレコキシブによるマトリクスタンパク質の放出量は、 Ca^{2+} による PTP 開口時のタンパク質放出量よりも多く、セレコキシブの添加によりミトコンドリアの性質 (形態、機能) が強く修飾されることが示唆された。外膜、内膜及び膜間の構成タンパク質の放出はセレコキシブの添加により観察されず、セレコキシブは Ca^{2+} が誘導する mPT とは異なる膜透過機構を示すと考えられた。セレコキシブの添加により CytC の放出は観測されず、セレコキシブがミトコンドリアを介して Ca^{2+} 様のアポトーシスを誘導しない可能性が示唆された。また、セレコキシブは濃度依存的に溶血活性を示し、200 μM のセレコキシブで 93.6 % の赤血球が溶血した (表 2-2)。また、セレコキシブは POPC-リポソームからのカルセイン放出を促進し、200 μM の添加で 90 % のカルセインが放出し、これらのことからセレコキシブはリン脂質などの一般的な膜構造因子を認識して膜特性を修飾すると考えられた。ミトコンドリア膜 (特に内膜) は電子伝達系や基質輸送に関わる多数のタンパク質を含んでおり、一般的な細胞膜とは物性が異なることから、薬物の膜作用に対する応答も通常の生体膜とは異なると考えられる。 Ca^{2+} による mPT の誘導時と同様に、セレコキシブが作用した後もミトコンドリアの構造

はある程度維持されており、マトリクスタンパク質は **mPT** と似たような膜孔機構を介して放出されている可能性があると考えられた。膜物性の変化に対するミトコンドリアの応答については十分に解明されていない領域であり、これらの応答機構の解明はミトコンドリア機能を理解する上で非常に重要な知見になると考えられる。

第 3 章

N-Phenylanthranilic Acid 骨格を構造中に有する
NSAIDs がミトコンドリア透過性遷移に及ぼす影響

第 3 章 *N*-Phenylanthranilic Acid 骨格を構造中に有する NSAIDs が ミトコンドリア透過性遷移に及ぼす影響

第 1 節 緒言

第 2 章では、セレコキシブと同様にメフェナム酸 (MEF) が強いミトコンドリア膨潤誘導能を持つことを示した。MEF はフェナム酸系に属する NSAIDs で、非選択性 COX 阻害剤に分類される。手術後や外傷時の炎症、関節の炎症性疾患や歯痛、上気道感染に伴う解熱など様々な病態に幅広く適応を持っており、他の NSAIDs と同様に一般的に安全性は高いと考えられているが、軽度及び重度の肝障害症例との関連が報告されており注意が必要である (NIH LiverTox Database Mefenamic Acid Last updated June 23, 2015.)。フェナム酸系の NSAIDs によるミトコンドリア機能の障害報告は、梶渕らの研究チームから詳細な報告があり (Masubuchi Y *et al.*, 1999, 2000, 2002)、ラット肝細胞毒性を示す NSAIDs に共通してジフェニルアミン (DPA) 骨格が含まれることが示されている。さらに、DPA が酸化的リン酸化を脱共役するだけでなくミトコンドリア膨潤を誘導することから、DPA をファーマコフォアとしたミトコンドリア障害メカニズムがフェナム酸系 NSAIDs の肝細胞毒性に寄与していることを示唆している。しかしながら、DPA がミトコンドリアの酸化的リン酸化の阻害や膨潤誘導に関与しないという報告もあり (Li Y. *et al.*, 2009)、詳細な mPT 誘導メカニズムについてはまだ明らかになっていない。

フェナム酸は芳香族アミノ酸の一つであり、*N*-フェニルアントラニル酸 (NPA) とも呼ばれる。NPA 骨格を有する NSAIDs としては MEF 以外にもメクロフェナム酸 (MCL)、トルフェナム酸 (TOL)、フルフェナム酸 (FLU) があり、構造が類似するものとしてアリアル酢酸系であるジクロフェナク (DIC) が挙げられる。本章では、構造中に NPA 骨格を有する NSAIDs やその構造関連化合物 (図 3-1) が、ミトコンドリア形態や機能に与える影響について精査し、ミトコンドリア機能へ及ぼす影響の違いから、MEF を初めとするフェナム酸系 NSAIDs がミトコンドリア機能の障害を惹起するメカニズムを探った。その結果、NPA 骨格を有する薬物と DPA が誘導するミトコンドリアの膨潤が異なる機構で誘導されていることを突き止め、PTP の開口による典型的な mPT 誘導において NPA 骨格が必須な構造であることを明らかにした。さらに、これらの構造関連化合物の細胞毒性についても併せて検証し、細胞毒性の発現における mPT の役割について考察する。また、これらの関連化合物のミトコンドリアへの活性は化合物毎に大きく異なる。そこで、この化合物間の活性の違いを決定する要因を明らかにするために、分子の持つ疎水性度に着目した。分子の動的な構造変化を考慮した疎水性度解析により、ミトコンドリア膜との反応に有利であると考えられる NSAIDs 分子の構造特性について考察する。

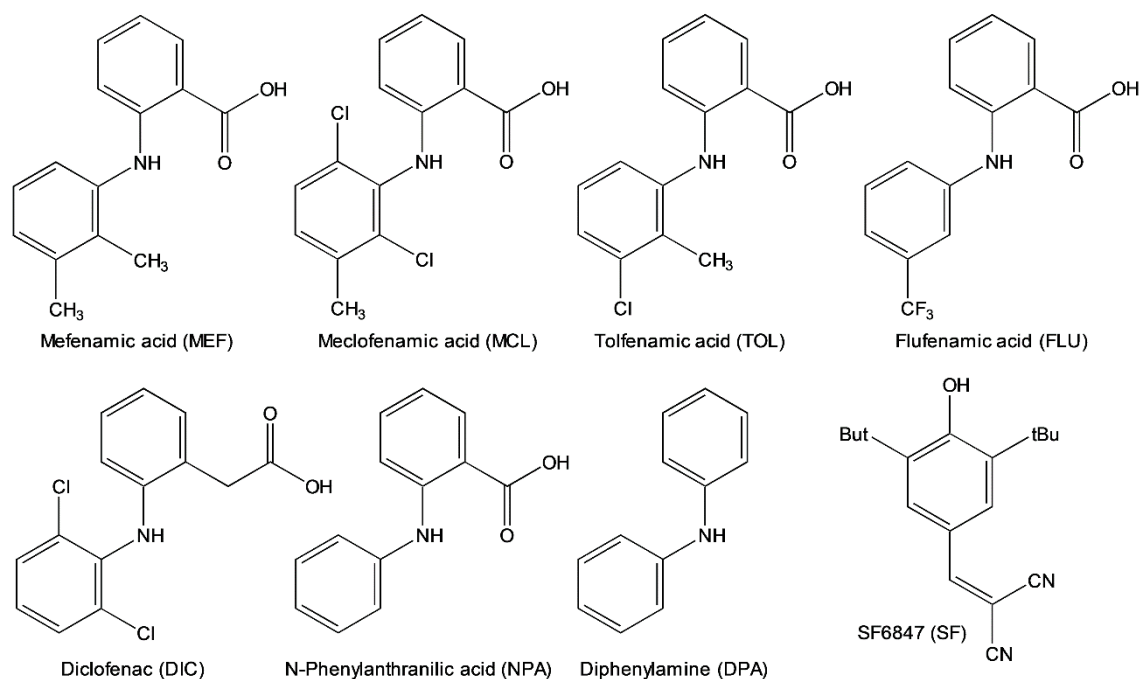


図 3-1 NPA 構造関連化合物及び脱共役剤 SF6847 の構造

第 2 節 実験方法

1. 材料

試薬：

MEF はコスモ・バイオ株式会社（江東区、東京都、日本）から購入した。MCL、TOL、FLU、DIC、NPA、DPA は和光純薬工業株式会社（大阪市、大阪府、日本）から購入した。MEF 及び構造関連化合物は DMSO に溶解し -20 °C で使用するまで保存した。CsA はナカライテスク株式会社（京都市、京都府、日本）から購入した。SF6847 (sc-200569) は Santa Cruz Biotechnology, Inc.（サンタクルーズ、カルフォルニア州、米国）から購入した。

2. ラット肝ミトコンドリアの調製

ミトコンドリア懸濁液は第 2 章と同様の方法を用いてウイスター系雄性ラットの肝臓から単離した。ミトコンドリア懸濁液のタンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準とし、ビウレット法により定量した。また、動物の取り扱い、鈴鹿医療科学大学の動物実験指

針（承認番号：第 19 号）に基づいて行った。

3. NPA 構造関連化合物がミトコンドリア形態に及ぼす影響の解析

第 2 章に記載した方法に従い、ミトコンドリア懸濁液の吸光度変化（540 nm）を指標にミトコンドリアの膨潤を観測した。+Pi メディウムにミトコンドリアを懸濁し（0.7 mg protein / ml）、ロテノン（終濃度 1 µg / ml）、コハク酸（終濃度 10 mM）を添加した際の吸光度（540 nm、25 °C）を UV - 1800 分光光度計（株式会社島津製作所、京都市、京都府、日本）で測定した。100 µM Ca²⁺及び種々の濃度の NPA 構造関連化合物を懸濁液に添加し、反応時間 10 分間における吸光度の変化を観測した。

4. NPA 構造関連化合物がミトコンドリア機能に及ぼす影響の解析

第 2 章に記載した方法に従い、ミトコンドリア懸濁液の溶存酸素を指標に NPA 構造関連化合物がミトコンドリア呼吸機能に及ぼす影響を検証した。ミトコンドリア懸濁液は +Pi メディウムを用いて調製し、懸濁液中の溶存酸素をクラーク型酸素電極を用いて測定した。

5. NPA 構造関連化合物の細胞毒性の評価

NPA 構造関連化合物がヒト培養細胞の生存に及ぼす影響を検証した。10 % ウシ胎仔血清及び抗生物質（ペニシリン G およびストレプトマイシン）を含むロズウェルパーク記念研究所 1640 培地（RPMI 1640 培地：日水製薬株式会社、台東区、東京都、日本）中で、ヒト血球・リンパ系細胞株（THP-1：国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク、茨木市、大阪府、日本）を 37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。培養した THP-1 細胞を血清を含んでいない RPMI 1640 培地で 6.0 × 10⁵ cells / well になるように懸濁し、96 well 細胞培養プレートに 50 µL ずつ播種した。THP-1 細胞に終濃度が 0 - 1000 µM になるように NPA 構造関連化合物を 50 µL 添加し、1 時間培養した。培養後、Cell Counting Kit-8（株式会社同仁化学研究所、上益城郡、熊本県、日本）を用いて細胞内の脱水素酵素活性を指標に細胞生存率（%）を評価した。また、細胞毒性の指標として半数致死量（LD₅₀）を細胞生存率 50% を挟む 2 点の濃度とそれに対応する生存率を下記の式に代入することで簡易的に算出した。

$$LD_{50} = 10^{\left(\frac{\log\left(\frac{A}{B}\right) \times (50 - C)}{D - C} + \log(B) \right)}$$

A：細胞生存率 50 % を挟む高い濃度

B：細胞生存率 50 % を挟む低い濃度

C：濃度 B における細胞生存率

D：濃度 A における細胞生存率

6. NPA 構造関連化合物の構造特性の解析

検証に用いた NPA 構造関連化合物 (MEF、MCL、TOL、FUL、DIC、NPA、DPA) 及び脱共役剤 SF6847 を CAChe (富士通株式会社、港区、東京都、日本) を用いてモデリングした。作製した分子モデルについて、MM2 力場下 CONFLEX プログラムを用いて配座探索を行った。得られた配座を MOPAC (富士通株式会社、港区、東京都、日本) のパラメトリック法 3 (PM3) ハミルトニアンを用いて解析した。立体疎水性度の指標である溶媒親和エネルギー (dGW) は MOPAC で得られたパラメーターを用いて、得られた全ての配座について計算した (Ohkura k. *et al.*, 1999, 2003, 2005)。

第 3 節 結果

1. NPA 構造関連化合物がミトコンドリア形態に及ぼす影響の解析

第 2 章でも述べたように、Pi は Ca^{2+} による mPT の誘導に重要なファクターである。100 μM Ca^{2+} の添加は 540 nm における吸光度を減少させるが (図 3-2A、3A)、Pi 非存在下では吸光度の減少は観測されない (図 3-2A、一点鎖線)。また、2.5 μM の CsA は Ca^{2+} によるミトコンドリア膨潤を完全に抑止した (図 3-2A、点線)。500 μM の MEF はミトコンドリアの膨潤を誘導し (図 3-2B、実線)、 Ca^{2+} による刺激と同様に Pi 非存在下ではミトコンドリアの膨潤は観測されず、Pi 存在下にて誘導された膨潤は CsA (2.5 μM) の添加で抑制された。データは示していないが、DPA を除く他の構造関連化合物についても同じく Pi 要求性及び CsA 感受性のミトコンドリア膨潤が誘導された。一方、500 μM の DPA は MEF と同様にミトコンドリアを膨潤させたが (図 3-2C、実線)、CsA によって抑制されなかった (図 3-2C、点線)。また、DPA によるミトコンドリアの膨潤は Pi 非存在下においても抑制されなかった (図 3-2C、一点鎖線)。次に、これらの NPA 構造関連化合物についてミトコンドリア膨潤の濃度依存性を検討した。Pi 存在下、反応時間 10 分の条件下で、MEF は 540 nm の吸光度を 100–200 μM の添加で著しく低下させた (図 3-3B)。MCL の膨潤反応は低濃度から観測され、100 μM 以上の濃度で吸光度の減少は頭打ちとなった (図 3-3C)。TOL は 20 μM までほとんどミトコンドリアを膨潤させなかったが、50 μM の添加で急激に吸光度を減少させた (図 3-3D)。FLU は TOL と似たような反応性を示し、100 μM の添加で急激な吸光度の減少が観測された (図 3-3E)。DIC や NPA では弱いミトコンドリア膨潤作用が 200 μM まで観測された (図 3-3F、G)。DPA は 100 μM まで吸光度を変化させず、200 μM の添加で穏やかに吸光度を減少させた (図 3-3H)。

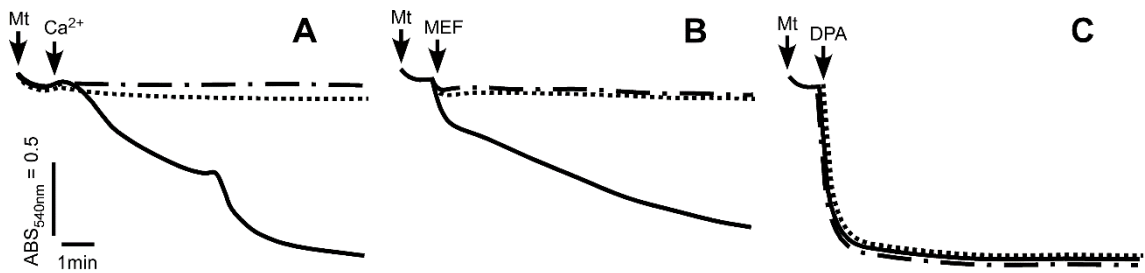


図 3-2 MEF 及び DPA のミトコンドリア膨潤特性

ミトコンドリア (Mt) をタンパク質濃度として 0.7 mg / ml になるように + Pi メディウムに懸濁し、コハク酸 (10 mM)、ロテノン (1 μ g / ml) を呼吸基質として添加した条件で 540 nm の吸光度変化を検証した。Mt 添加後、100 μ M Ca^{2+} (A: 実線)、500 μ M MEF (B: 実線)、500 μ M DPA (C: 実線) を添加した。Pi と CsA の影響を検証するために、Pi を除いた条件 (図 2A、2B、2C、一点鎖線)、CsA (2.5 μ M) をメディウムに添加した条件 (図 3-2 A、-2 B、-2 C、点線) で検証した。

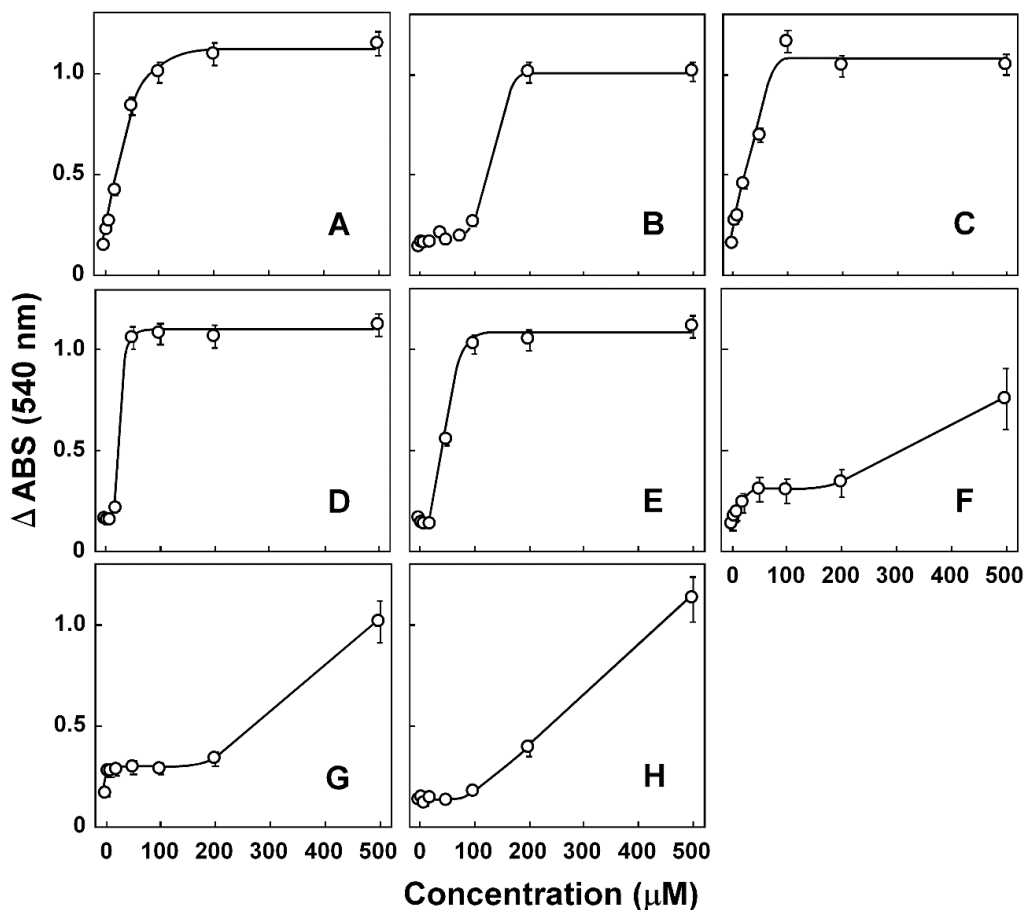


図 3-3 NPA 構造関連化合物のミトコンドリア膨潤の濃度依存性

種々の濃度の Ca^{2+} 若しくは NPA 構造関連化合物を添加し、10 分後の 540 nm における吸光度減少量 (ΔABS_{540nm}) を検証した。実験は、図 3-2 と同様の条件で行い、A: Ca^{2+} 、B: MEF、C: MCL、D: TOL、E: FLU、F: DIC、G: NPA、H: DPA として示した。なお、結果は独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 \pm 標準誤差 (SEM) 値として示した。

2. NPA 構造関連化合物がミトコンドリア機能に及ぼす影響の解析

NPA 構造関連化合物がミトコンドリアの呼吸機能に及ぼす影響を検証した。PTP の開口による酸素消費の促進を除外するため、ミトコンドリアを CsA (2.5 μM) で前処理して使用し、NPA 構造関連化合物の脱共役作用の有無を観測した。ミトコンドリアの基礎酸素消費速度(state 4)は 25.8 ± 1.6 natomsO / mg / min となり(図 3-4A、実線)、SF6847 (100 nM、脱共役剤のポジティブコントロール) の添加により 116.1 ± 4.8 natomsO / mg / min まで増加した(図 3-4A、点線)。MEF (200 μM) は 100 nM の SF6847 添加時と比較して 52.8% の酸素消費の促進を示した(図 3-4A、一点鎖線)。この酸素消費は 500 μM MEF では state 4 と同程度になり、高濃度においては酸素消費の促進は観測されなかった。同じく MCL、TOL、FLU の酸素消費の促進作用も濃度依存的に消失し(図 3-4B)、500 μM の添加で state 4 と同程度かそれよりも小さい速度になった(図 4B、黒色カラム)。DIC 及び NPA (200 μM) は MEF (200 μM) と同程度に酸素消費を促進させた。これらの結果から、MEF を初めとする NPA 骨格を構造中に有する化合物が濃度依存的にミトコンドリアの電子伝達系阻害作用を有していることを示唆している。一方、DPA の添加ではミトコンドリア酸素消費の増加は観測されなかった(図 3-4B)。

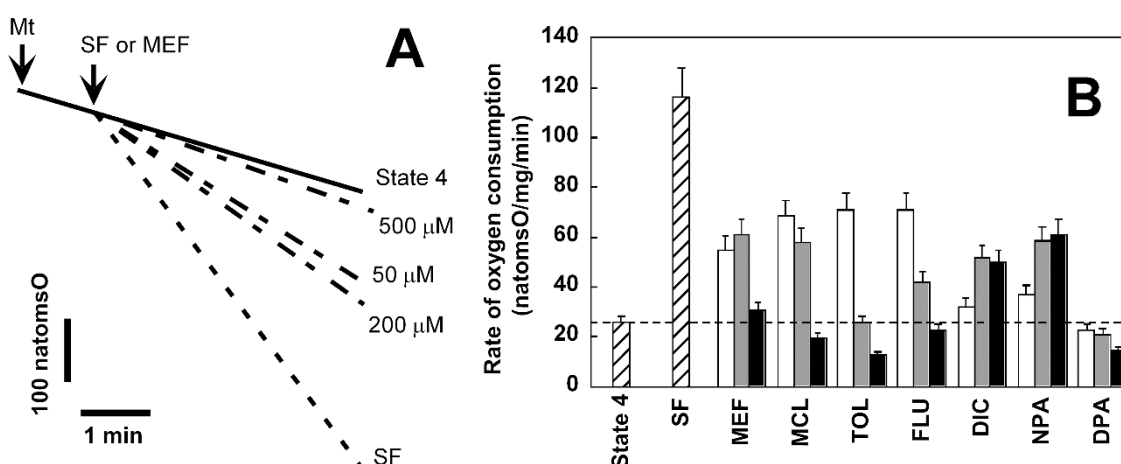


図 3-4 NPA 構造関連化合物の脱共役作用

NPA 構造関連化合物のプロトノフォアとしての作用を確認するために、ミトコンドリア酸素消費に及ぼす影響を検証した。パネル A はミトコンドリア懸濁液中(図 2 と同様の実験条件)の溶存酸素の変化を示しており、PTP の開口による酸素消費の加算を防止するため、CsA (2.5 μM) 存在下で実験を行った。実線は state 4 酸素消費速度を示しており、一点鎖線は MEF (50 - 500 μM) 添加時、点線は脱共役作用のポジティブコントロールである SF6847 (SF、100 nM) を添加した時の溶存酸素の変化を示している。パネル B は検証した NPA 構造関連化合物 (50 μM : 白色カラム、200 μM : 灰色カラム、500 μM : 黒色カラム) を添加した時の酸素消費速度を示している。コントロール (state 4) 及び SF6847 を添加した時の酸素消費速度は斜線のカラムとして示した。なお、結果は独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 \pm SEM 値として示した。

3. ミトコンドリア電子伝達系への NPA 構造関連化合物の影響の解析

電子伝達系への NPA 構造関連化合物の影響を検証するために、SF6847 (100 nM) で処理し完全に脱共役したミトコンドリアを+Pi メディウム中で呼吸基質とともにインキュベートし、酸素消費の促進を観測した (図 3-5A、実線)。MEF は濃度依存的に SF6847 で処理したミトコンドリアの酸素消費を阻害した (図 3-5A、50、200、500 μ M)。他の構造関連化合物も SF6847 で処理したミトコンドリアの呼吸活性を濃度依存的に阻害した (図 3-5B)。200 μ M の MEF、MCL、TOL、FLU、DIC、NPA、DPA は各々 SF6847 の酸素消費速度を 60.4、66.5、79.6、70.1、47.7、31.9、39.0 % 減少させた。この結果から、DPA 骨格を構造中に有する化合物は、電子伝達系を阻害することでミトコンドリアの呼吸に影響を及ぼすことが明らかとなった。

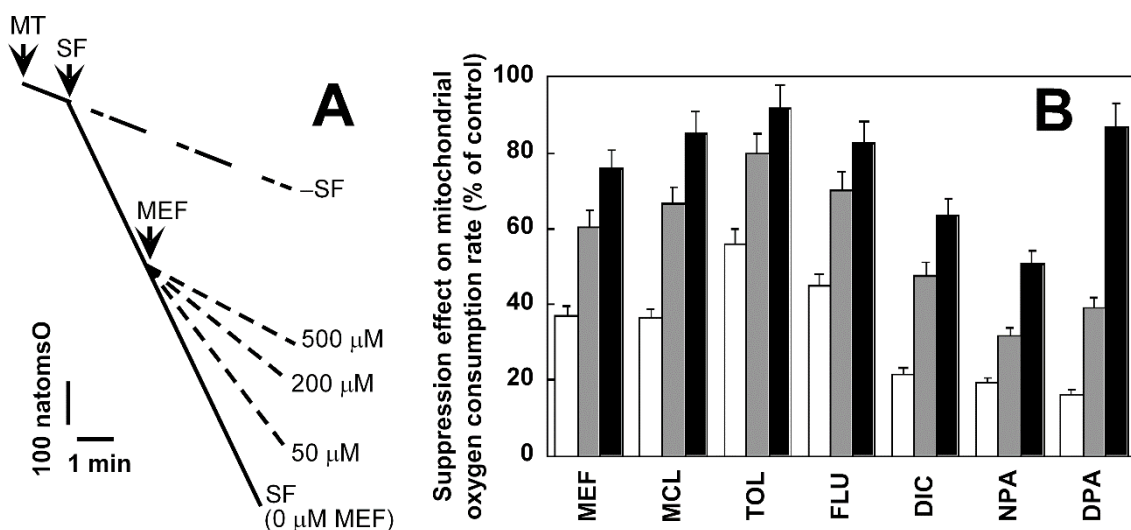


図 3-5 NPA 構造関連化合物によるミトコンドリア電子伝達系の阻害作用の評価

SF6847 (SF、100 nM) を添加し完全に脱共役させたミトコンドリアを解析に用いて電子伝達系へ及ぼす影響を検証した (パネル A、実線)。PTP の開口による酸素消費費の増加を抑制するため、実験は CsA (2.5 μ M) 存在下で行った。パネル A の点線は 50、200、500 μ M の MEF を添加した時の酸素消費速度を示している。一点鎖線は SF 非存在下 (-SF) におけるミトコンドリア基礎呼吸 (state 4) である。パネル B には NSAIDs のミトコンドリア酸素消費速度の阻害作用をまとめた (50 μ M : 白色カラム、200 μ M : 灰色カラム、500 μ M : 黒色カラム)。なお、結果は独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 \pm SEM 値として示した。

4. NPA 構造関連化合物の細胞毒性の評価

ミトコンドリア機能の障害性と細胞毒性との関連を検証するため、ヒト血球・単球系細胞株 THP-1 を用いて NPA 構造関連化合物 (0 - 1000 μM) の細胞毒性試験を行った。結果、NPA 骨格を有する NSAIDs において濃度依存的な細胞毒性が観察され(図 3-6)、 LD_{50} (μM) は MEF (354.6)、MCL (138.0)、TOL (104.4)、FLU (182.9)、DIC (654.6)、NPA (525.4) であった。一方、DPA は THP-1 細胞の生存率に影響を及ぼさなかった。次に、NPA 構造関連化合物が THP-1 細胞の形態に及ぼす影響を検証した。DPA を除いた構造関連化合物において、細胞形態の異常 (縮小化や内容物の漏出) が観察され、図 3-7 に代表例として変化が顕著であった TOL、MCL の顕微鏡像を示した。DPA を共存させた THP-1 細胞では、DPA 濃度が 1000 μM の条件下でも細胞形態に大きな変化は観察されなかった。

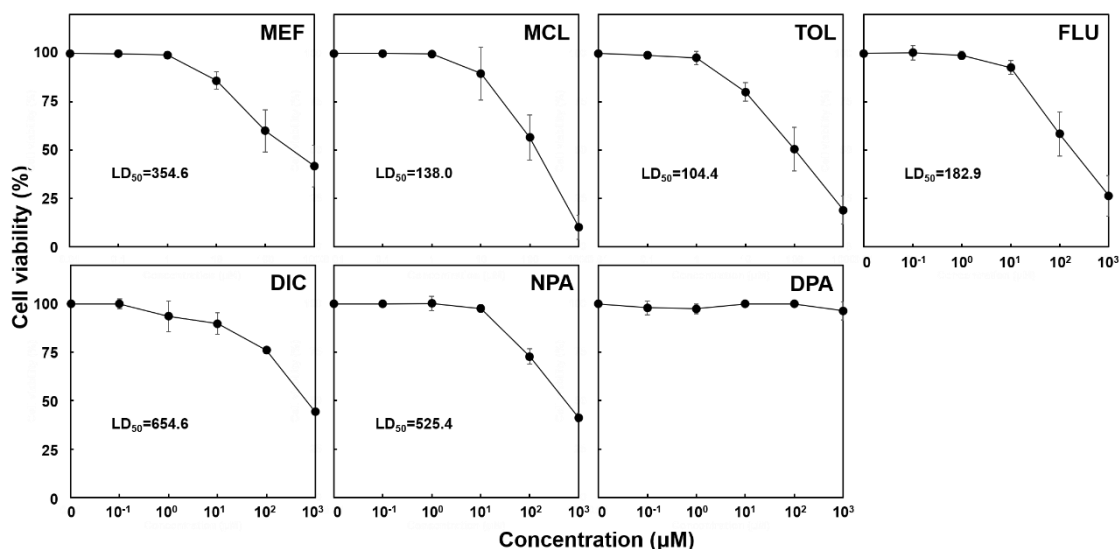


図 3-6 NPA 構造関連化合物が THP-1 細胞の生存に及ぼす影響

NPA 構造関連化合物の THP-1 細胞に対する毒性を検証した。 6.0×10^5 cells / well の THP-1 細胞を 0 - 1000 μM の薬物共存下で 1 時間培養した後、細胞内の脱水素酵素活性を指標に細胞の生存率を評価した。培養細胞に PBS のみ添加した条件を 100 % 生存、1 % SDS により完全に細胞を溶解させた条件を 0 % 生存の指標とし、各薬物濃度に対応する細胞の生存率の変化を図に示した。なお、結果は独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 \pm SD 値として示した。

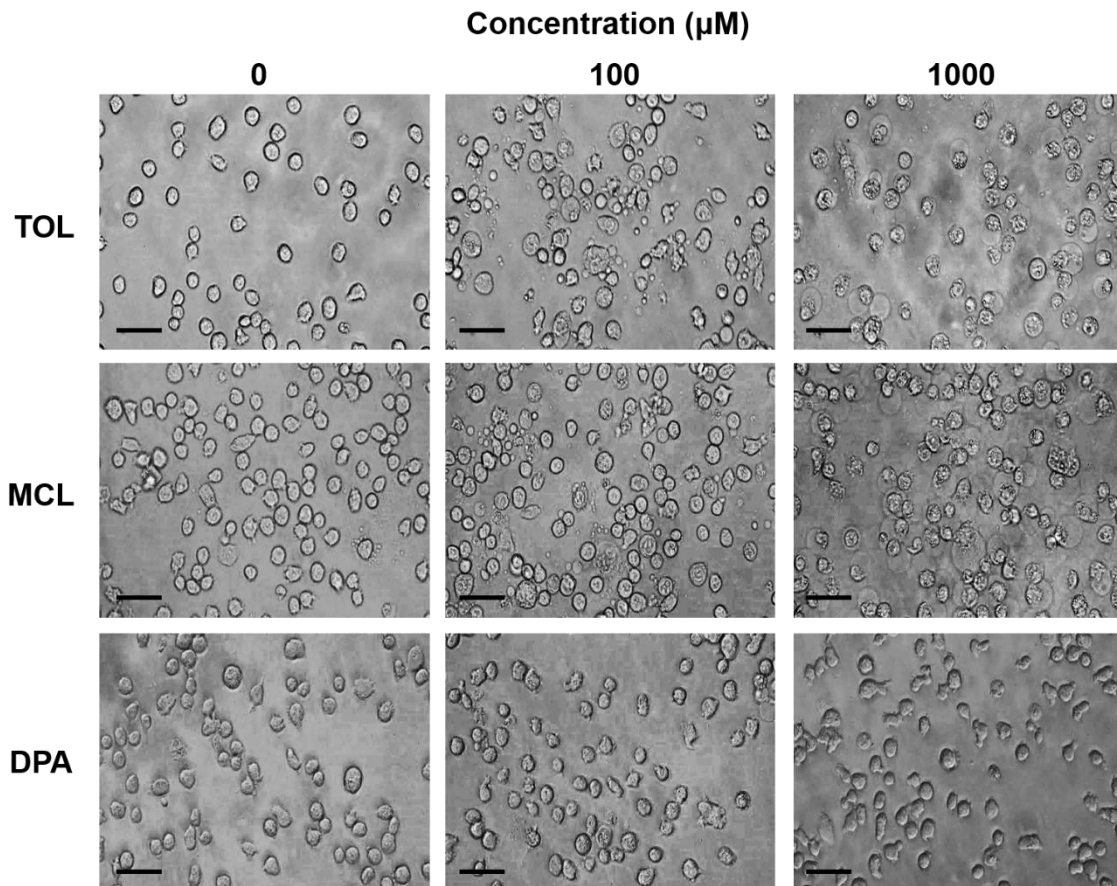


図 3-7 NPA 構造関連化合物が THP-1 細胞の形態に及ぼす影響

NPA 構造関連化合物を THP-1 細胞に添加して 4 時間培養した後、倒立顕微鏡 (CKX41 : オリンパス、新宿区、東京都、日本) を用いて細胞形態を観察した。代表的な例として TOL、MCL、DPA を 0 - 1000 μM で共存させた際の顕微鏡像を示した。0 μM はコントロールとして、0.5 % DMSO を添加したものを示している (スケールバーは 25 μm)。

5. NPA 構造関連化合物の分子特性の解析

NPA 構造関連化合物の配座解析は CONFLEX を用いて検証した (Ohkura K *et al.*, 2003, 2005)。MEF では 163 個の配座異性体が検出され、配座間のエネルギーレベルは $-6.39 \sim -1.89$ kcal/mol であった (図 3-8A)。他の構造関連化合物においても多数の配座が検出された (MCL (図 3-8C: 75 配座, $6.39 \sim 10.11$ kcal/mol)、TOL (図 3-8E: 114 配座, $-7.64 \sim 0.12$ kcal/mol)、FLU (図 3-8G: 配座, $-4.35 \sim 0.77$ kcal/mol)、DIC (図 3-8I: 65 配座, $1.86 \sim 8.88$ kcal/mol)、NPA (図 3-8K: 24 配座, $-9.75 \sim -4.39$ kcal/mol)、DPA (図 3-8M: 28 配座, $-3.875 \sim -0.538$ kcal/mol))。DIC の解析では急激な構造変化を伴うエネルギージャンプポイントが観測された (図 3-8I、矢印)。立体疎水性度の指標の 1 つである溶媒和自由エネルギー (dGW: より低い dGW 値は高い疎水性度を示している) を分子軌道計算を用いて算出したところ (Ohkura K *et al.*, 1999, 2007, 2009)、図 3-8B に示した MEF の dGW プロファイル ($-66.84 \sim -47.66$ kJ/mol) を得た。配座毎に様々な dGW 値が得られ、NPA 骨格を有する化合物はその立体構造の変化によって疎水性度を大きく変化させていることが明らかになった。dGW 解析において MCL ($-66.27 \sim -54.68$ kJ/mol)、FLU ($-78.06 \sim -58.35$ kJ/mol)、NPA ($-70.06 \sim -53.29$ kJ/mol) の解析値が得られ、dGW 値が極小値を示す配座群が得られた (図 3-8D、H、L、点線円)。TOL (図 3-8F、 $-75.54 \sim -50.30$ kJ/mol)、DIC (図 3-8J、 $-75.74 \sim -57.54$ kJ/mol) では dGW 値の極小群は得られず、dGW 値は様々な値をとった。DPA の dGW 解析では、配座による dGW 値の変動はごくわずかであった ($-27.14 \sim -24.02$ kJ/mol)。強力な脱共役剤である SF6847 では 127 個の配座が検出され、dGW 値は配座によらず一定の値を示した -62.92 kJ/mol (図 3-8P、平均値)。

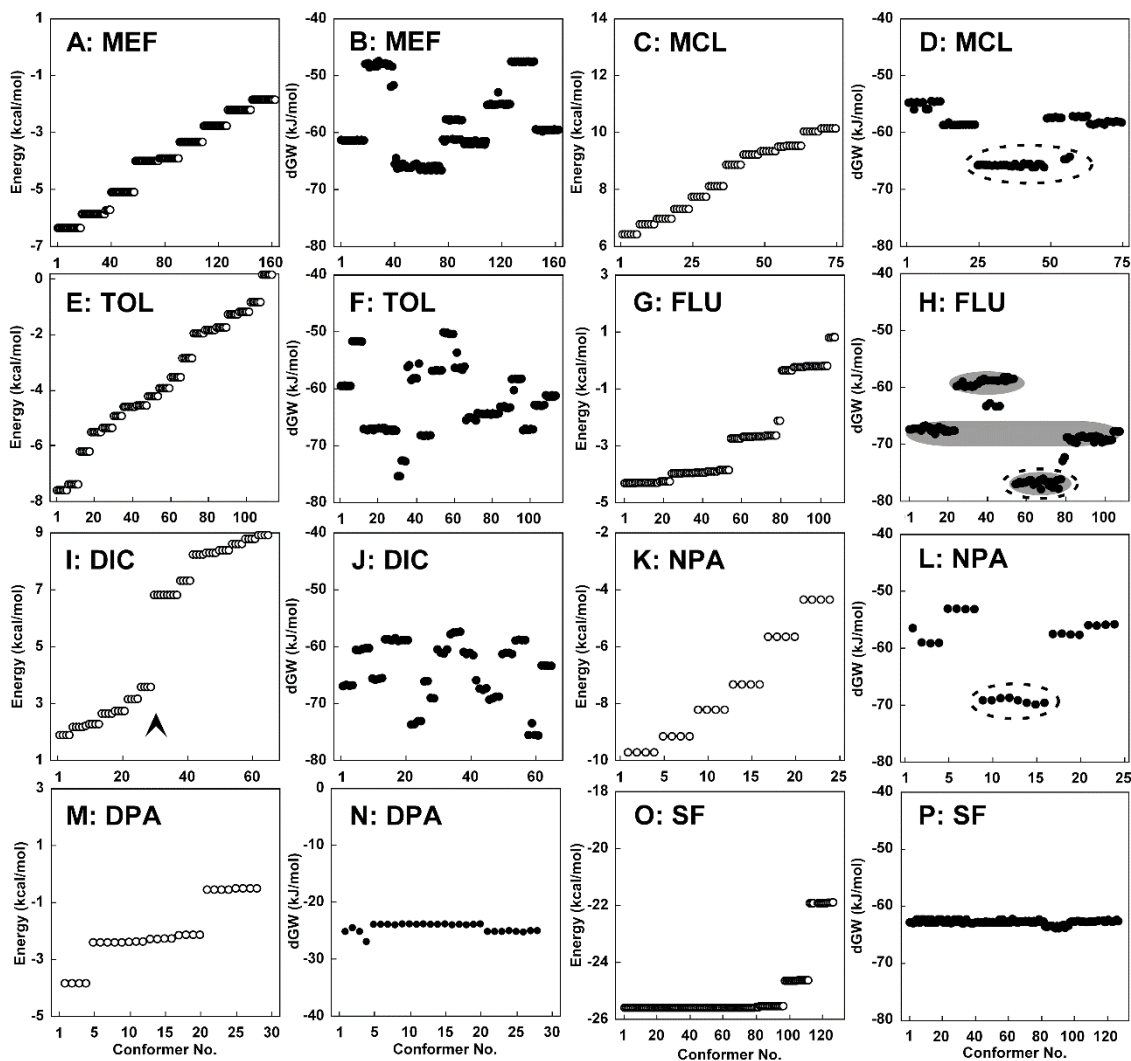


図 3-8 NPA 構造関連化合物の分子特性の解析

NPA 構造関連化合物の配座解析は CONFLEX を用いて行った。得られた配座をエネルギー順位に従って並べたパネルを A、C、E、G、I、K、M、O に示した。各構造関連化合物の溶媒和自由エネルギー (dGW) は MOPAC を使用して算出した。エネルギー順位に従って並べた配座に対応する dGW 値をパネル B、D、F、H、J、L、N、P に示した。

第 4 節 考察

MEF を初めとするフェナム酸系の NSIAD が持つ mPT 誘導能について、その詳細なメカニズムや誘導に必須な構造的要因を明らかにするために、NPA 骨格を構造中に有する関連化合物がラット肝臓のミトコンドリアに与える影響について検証した。第 2 章で述べたように Ca^{2+} 刺激により、内膜の透過性が亢進した結果、ミトコンドリアの形態変化が誘導される (図 3-2A)。MEF (200 μM)、MCL (100 μM)、TOL (50 μM)、FLU

(100 μM) の添加により、顕著な 540 nm の吸光度の減少が観測され、ミトコンドリアの膨潤が誘導された (図 3-3B-E)。また、DIC (200 μM)、NPA (200 μM)、DPA (200 μM) の添加では、より緩やかな膨潤が誘導された (図 3-3F-H)。これら NPA 構造関連化合物によるミトコンドリアの膨潤は DPA を除いてすべて CsA により抑制され (図 3-2B 対 C、点線)、この結果から DPA がミトコンドリア膜に他の関連化合物とは異なる影響を与えていると考えられた。さらに、Pi の存在は DPA を除く関連化合物による mPT の誘導に必須であることが明らかになり (図 3-2C、一点鎖線)、フェナム酸系の NSAIDs によるミトコンドリアの膨潤メカニズムが Ca^{2+} と同様 PTP を介したものである可能性が強く示唆され、PTP の開口に NPA 骨格が必須な構造要因であることが明らかとなった。

ミトコンドリア内膜の透過性はイオン輸送やエネルギー代謝の制御に密接に関係している。内膜の H^+ 輸送と協調している ATP 合成機構はミトコンドリア内膜の透過性亢進により機能が損なわれ、これは肝障害の発生機序の一つとして考えられている。MEF (200 μM) は SF6847 (100 nM) と比べて 52.8 % の脱共役活性を示した (図 3-4B)。MCL、TOL、FLU は 50 μM で MEF (200 μM) と同程度の作用を示し、濃度依存的に脱共役活性が低下した (50–500 μM)。この脱共役活性の低下は、これらの NSAIDs によって電子伝達系が阻害されている可能性を示唆しており、実際に電子伝達系機能を濃度依存的に阻害していた (図 3-5B)。これまでの結果から、NPA 骨格を有する NSAIDs はミトコンドリアに対して、脱共役活性 (図 3-4) と電子伝達系の阻害作用 (図 3-5) の 2 つの活性を持つことが明らかになった。一方、DPA はミトコンドリア膜に対して脱共役作用を示さず、電子伝達系の阻害作用のみを有していた。DPA と NPA 骨格を有する化合物で観測されたミトコンドリア膨潤メカニズムの違いは、この膜機能への影響の差異に起因しているのかもしれない。次に、NPA 構造関連化合物が細胞の生存率に及ぼす影響を検証したところ、DPA を除く化合物において細胞毒性が観察された (図 3-6)。また、細胞形態の観察においても NPA 骨格を有する化合物を添加した細胞では、細胞形態の縮小や内容物の漏出などの異常が観察されたが、DPA では変化は確認されなかった。これらの結果は、細胞毒性の発現においても NPA 骨格が必須であることを示しており、酸化リン酸化の脱共役や PTP の開口を介したミトコンドリア機能の障害メカニズムが細胞毒性の発現に重要である可能性を示唆していた。

疎水性度はミトコンドリア膜との反応性を規定する重要な因子の 1 つであり、分子の立体構造変化に伴う疎水性度変化は、ミトコンドリアの機能障害の活性に大きく影響を与えられと考えられる。SF6847 は 127 個の配座異性体を持ち、それらの dGW 値は配座によらず一定値 (平均: -62.92 kJ/mol) をとった (図 3-8P)。SF6847 は低濃度 (100 nM) で強力な脱共役作用を発揮することから、SF6847 が持つどの配座も十分にミトコンドリア膜と反応しうる疎水性度を持つと考えられた。今回、検証した NPA 構造関連化合物では多くの配座が検出されたが、そのなかで SF6847 と同程度の疎水性度をもつ配座はミ

トコンドリア膜と相互作用しやすいと考えられる。MEF の配座解析では様々な配座が検出され、dGW 値は配座間で大きく変化した (図 3-8B)。100 μM を超える濃度でないと MEF が反応を示さないことから、ミトコンドリア内膜と相互作用しやすい MEF の配座の存在確率は低いと考えられた (図 3-3B)。200 μM まで濃度を上昇させることで、膜と相互作用しやすい MEF 配座の比率が増加し、ミトコンドリアに強い膨潤が誘導されていると考えられた。MCL は多くの極小 dGW 値を示す配座を有し、この配座群の dGW 値の平均 (-65.95 kJ/mol 、図 3-8D の点線の円領域) は SF6847 の dGW 値と類似していた。MCL が低濃度からミトコンドリアの膨潤を引き起こすのは、ミトコンドリアなどの生体膜と相互作用 (図 3-3C) しやすい配座を多数持つことに起因している可能性が示唆された。また、TOL の dGW 値は多様で (図 3-8F)、ミトコンドリア内膜との相互作用に適切な疎水性度を有する配座の存在比が少ないことが伺えた。実際、TOL は 50 μM 未満の濃度まで膨潤を誘導しなかった (図 3-3D)。DIC の dGW 値も多様に変化し、ミトコンドリア膜との相互作用に有利な配座異性体は少ないと考えられ (図 3-8J)、200 μM の DIC の添加においても膨潤反応は弱いものであった (図 3-3F)。FLU は 3 つの疎水性度に分類できる dGW 群を有しており、疎水性度の値は最も高い群で平均 -76.99 kJ/mol 、中間の群で平均 -68.34 kJ/mol 、最も低い群で平均 -59.28 kJ/mol の値をとった (図 6H の灰色の円領域)。これらの 3 つのグループが、SF6847 の平均 dGW 値 (-62.92 kJ/mol) から大きく外れていることから、反応に適切な疎水性度を有する配座比率は少ないと考えられた。ミトコンドリアの膨潤は、20 μM の FLU を添加するまで観察されず (図 3-3E)、50 μM の FLU で弱い膨潤が観測された。NPA の極小 dGW 群は 8 つの配座で構成され、その平均 (-69.43 kJ/mol 、図 3-8L の点線の円領域) は SF6847 の平均とは異なり、200 μM の添加において緩やかな膨潤が観測された (図 3-3G)。DPA の dGW 値はほとんど変化せず (平均値: -24.63 kJ/mol 、図 3-8N)、他の NSAIDs の dGW と比べて高い値を示したことから、生体膜と相互作用しにくいと考えられた。DPA のミトコンドリア膨潤誘導能は弱く、100 μM DPA の添加ではミトコンドリアの形態にほとんど変化が見られなかった (図 3-3H)。これらの結果から、ミトコンドリア膜のような生体膜と活発に反応しうる疎水性度を有する配座の存在確率は、NSAIDs の肝毒性を発現させる要素の 1 つであると考えられた。薬物分子がとり得る配座の中から、生体膜と反応しやすい構造を選択し、その物性を解析することで、より正確な肝毒性リスクの予測が可能になると考えられる。

第 4 章

薬物送達システム開発への応用展開

第 4 章 薬物送達システム開発への応用展開

第 1 節 緒言

第 2 章及び第 3 章では肝障害性の NSAIDs がミトコンドリア機能へ及ぼす影響を検証し、そのメカニズムや障害を惹起しやすい分子特性について言及してきた。医薬品の副作用を軽減する方法としては、薬物分子そのものを改良する他にも、剤形や薬物を保持するデバイスへアプローチする方法もある。製剤化の工夫により、適切な量の医薬品を、適切な場所に、適切な時間で送り込むことが可能となり、この創薬技術は薬物送達システム (DDS) と呼称されている。DDS の基本的な概念は、放出制御、ターゲティング、吸収改善であり、薬物の有効性や安全性、患者の QOL を向上させる有効な手段として盛んに研究が進められてきた (米谷 芳枝編集, 2012)。近年、この DDS 分野で、マイクロスフェアおよびナノ粒子と呼ばれる微粒子が薬物担体として利用されている。マイクロスフェアは 1 ~ 数百 μm 、ナノ粒子は 10 ~ 1,000 nm のサイズを持つ粒子であり、粒子サイズや粒子表面の性質 (疎水性、電荷など) を調節することで体内の挙動を制御することがきる。また、これらの微粒子表面に特別な親和性を持つリガンドを結合させることで、標的に対し高い指向性を付加することも可能である。人工脂質二重膜小胞であるリポソームは微粒子型の薬物担体として最も頻繁に利用されている媒体であり (Langer R., 1990)、イムノリポソーム (Hatakeyama H. *et al.*, 2007 ; Nishikawa K. *et al.*, 2012) やアフィソーム (Puri A. *et al.*, 2008)、プロテオリポソーム (Hwang SY *et al.*, 2010)、ペプチドタグ結合リポソーム (Shahin M. *et al.*, 2013 ; Terada T. *et al.*, 2007 ; Wang Z. *et al.*, 2012 ; Yan Z. *et al.*, 2014)、レクチン修飾リポソーム (Bakowsky H., 2008) など様々な修飾が施されたリポソームが報告されている。

リポソームなどを初めとする微粒子担体を利用した DDS は、血中や細胞内において薬物を放出させることを目的としたものが多い。これらの微粒子は標的部位に到達するだけではその機能を十分に発揮できず、集積した部位で適切な薬物濃度が担保されなければならない。よって、標的指向性に加え厳密な薬物放出の制御が製剤の有効性や品質維持の観点から重要であると考えられるが、薬物放出の評価方法については確立されたものは存在しない。従って、微粒子担体から放出される微量な薬物分子を感度良く評価できる実験系を構築する必要がある。著者は DILI の研究を進める中で、ミトコンドリアが薬物分子を高感度に検知して酸素消費という形で応答することを明らかにしてきた (Tatematsu Y., 2016)。そこで、このミトコンドリアの特性を利用し、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。その第一歩として、マトリクス型の徐放性薬物担体アルギン酸ゲルビーズを作製し、ビーズから放出される脱共役剤 SF6847 や NSAIDs の放出挙動をミトコンドリア酸素消費を指標に評価した。

第 2 節 実験方法

1. 薬物担体モデル SF6847 封入アルギン酸ゲルビーズの作製

SF6847 封入アルギン酸ゲルビーズ (SF ビーズ) は、SF6847 を混和したアルギン酸ナトリウム水溶液を塩化カルシウム水溶液に滴下して、ゲル化させることで作製した。1% アルギン酸ナトリウム水溶液に終濃度 25% となるように DMSO を加え混和した後、SF6847 を終濃度 20 μM になるように添加し、十分に攪拌した。調製した 1 mL の SF6847 含有アルギン酸ナトリウム水溶液を、10 mL のゲル化溶液 (0.3 M CaCl_2 、25% DMSO) に 21 G の注射針を装着したシリンジを用いて滴下し、室温で保持 (5、10、30、60 分) してゲル化させ、SF ビーズを作製した。作製した SF ビーズは超純水で軽くすすいだ後、キムワイプで余分な水分を拭き取り、直ぐに実験に使用した。また、SF ビーズを乾燥させて使用する場合は、キムワイプで水分を拭き取った後、そのまま室温で 20 分間保持してから実験に使用した。

アルギン酸ゲルビーズの SF6847 封入効率は、ビーズ作製後のゲル化溶液の吸光度 (450 nm) を測定し、封入されなかった SF6847 量を算出することで評価した。具体的には、既知濃度の SF6847 をゲル化溶液に混和して希釈列を調製し、450 nm の吸光度を測定することで検量線を作成した。上記に従ってアルギン酸ゲルビーズを作製した後、ビーズを取り除いたゲル化溶液の 450 nm の吸光度を測定し、検量線からゲル化溶液の SF6847 濃度を得た。この SF6847 濃度からゲル化溶液中に存在する SF6847 分子のモル数を算出し、下記の式を用いて封入率 (%) を算出した。

封入率 (%) =

$$\frac{[\text{アルギン酸ナトリウム水溶液中の SF6847 (mol)} - \text{ゲル化溶液中の SF6847 (mol)}]}{\text{アルギン酸ナトリウム水溶液中の SF6847 (mol)}} \times 100$$

2. アルギン酸ゲルビーズから放出される SF6847 のリアルタイムモニタリング

ミトコンドリア酸素消費を指標に、アルギン酸ゲルビーズからの SF6847 放出をリアルタイムで観測した。ミトコンドリアの単離は第 2 章に記載した方法で行い、タンパク質濃度が 0.7 mg/ml になるように RCI メディウムに懸濁した。ミトコンドリア懸濁液に呼吸基質として 10 mM コハク酸と 1 $\mu\text{g/ml}$ ロテノン添加した後、アルギン酸ゲルビーズから漏出するカルシウムの影響を排除するため、カルシウムユニポーター阻害剤ルテニウムレッド (RR) を終濃度 2 μM になるように添加した。作製直後の SF ビーズ (1 個) をミトコンドリア懸濁液に添加して、懸濁液の溶存酸素の変化をクラーク型酸素電極で経

時的に観測した。また、観測された酸素消費速度を 1 分ごとに測定し、SF6847 濃度と酸素消費速度の関係図 (図 4-4B) から得られた下記の式を用いて、放出された SF6847 の濃度変化をプロットした。

$$\text{SF6847 濃度 (nM)} = \frac{\text{酸素消費速度 (\% of 100 nM SF6847)}}{6.0295} \quad (R^2 = 0.9964)$$

3. アルギン酸ゲルビーズから放出される NSAIDs のリアルタイムモニタリング

第 3 章で述べたように、フェナム酸系 NSAIDs は脱共役活性を持ち、濃度依存的にミトコンドリア酸素消費を増加させる。アルギン酸ゲルビーズに MEF あるいは DIC を封入し (NSAIDs ビーズ: MEF ビーズ、DIC ビーズ)、ミトコンドリア酸素消費を指標にビーズからの NSAIDs 放出を評価した。NSAIDs ビーズは SF ビーズと同様の方法で作製したが、滴下したアルギン酸ナトリウム水溶液は NSAIDs を混和したものを使用した (1 % アルギン酸ナトリウム、10 mM MEF あるいは DIC、5 % DMSO)。作製した NSAIDs ビーズ (8 個) をミトコンドリア懸濁液に添加し、懸濁液の溶存酸素の変化をクランク型酸素電極で経時的に観測した。また、SF6847 と同様に NSAIDs 濃度と酸素消費速度の関係図 (データは示さず) から得られた下記の式を用いて、放出された NSAIDs の濃度変化をプロットした。

$$\text{MEF 濃度 (\mu M)} = \frac{\text{酸素消費速度 (\% of 100 nM SF6847)}}{0.8333} \quad (R^2 = 0.9954)$$

$$\text{DIC 濃度 (\mu M)} = \frac{\text{酸素消費速度 (\% of 100 nM SF6847)}}{0.1182} \quad (R^2 = 0.9832)$$

第 3 節 結果

1. SF6847 を封入したアルギン酸ゲルビーズの作製

作製したアルギン酸ゲルビーズは直径がおよそ 1.5 mm 程度の球体となり、SF6847 の封入によるサイズ及び形状の変化は観察されなかった (図 4-1)。なお、室温で 20 分間保持して乾燥させたビーズにおいても、ビーズ表面からの水分喪失が見られたが、サイズや形態に大きな変化は及ぼさなかった (データ示さず)。次に、ゲル化時間を変更して SF ビーズを作製し、ビーズに封入された SF6847 量の変化を検討した。その結果、ゲル化時間の増加に伴いビーズ内の SF6847 量が減少し、封入率は 5 分で 51.1%、10 分で 39.8%、

30 分で 19.2 % であった (図 4-2)。また、30 分より長いゲル化時間では SF6847 の封入率に変化は見られなかった (図 4-2)。

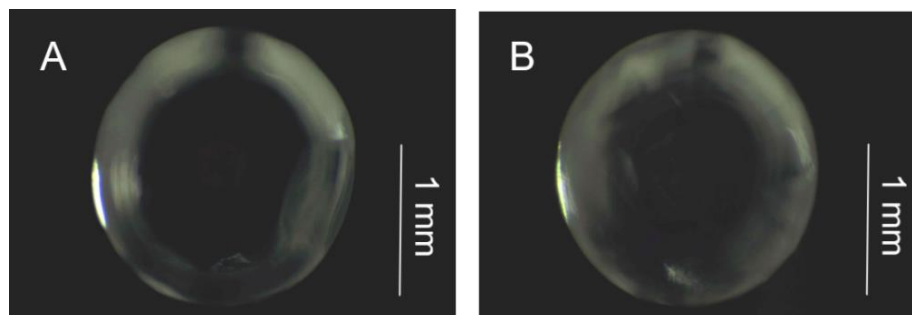


図 4-1 SF6847 を封入したアルギン酸ゲルビーズ

作製したアルギン酸ゲルビーズについて、倒立顕微鏡 (CKX41; オリンパス、新宿区、東京都、日本) を用いて観察した像を示す。SF6847 を混和せずに作製したビーズ (コントロールビーズ) をパネル A、SF 6847 を封入したビーズをパネル B に示した。

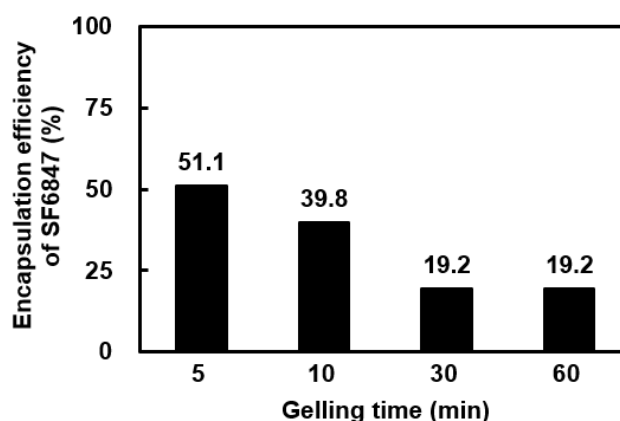


図 4-2 アルギン酸ゲルビーズ作製時のゲル化時間が SF6847 封入率へ及ぼす影響

アルギン酸ゲルビーズを作製する際のゲル化時間と SF6847 の封入率の関係について検証した。ゲル化時間を 5、10、30、60 分としてビーズを作製し、ゲル化溶液中に残存する SF6847 量から封入率 (%) を算出した。

2. アルギン酸ゲルビーズから放出される SF6847 のリアルタイムモニタリング

作製したアルギン酸ゲルビーズをミトコンドリア懸濁液に添加した結果、SF6847 を封入していないコントロールビーズで酸素消費の促進が観測された (図 4-3A)。これは、アルギン酸のゲル化に用いた Ca^{2+} がビーズから漏出し、mPT が誘導され酸素消費が促進している可能性が考えられた。そこで、ミトコンドリアの Ca^{2+} の取り込みに関与する Ca^{2+}

ユニポーターを、その阻害剤である RR で前処理することで阻害したところ、コントロールビーズによる酸素消費の促進は抑制された (図 4-3A、+ 2 μ M RR)。次に、RR で前処理したミトコンドリア懸濁液に SF ビーズを添加したところ、酸素消費の促進が観測された (図 4-3B)。ゲル化時間の異なるビーズ (5 分、10 分) を用いて検証した結果、ゲル化時間 10 分のビーズと比較して 5 分のビーズでより早い酸素の消費が観測された。さらに、20 分間室温で保持し乾燥させたビーズは、乾燥させていないビーズと比較して、ゲル化時間に関わらず酸素消費を低下させた。また、SF6847 (100 nM) を単独で添加すると、傾きが一定な直線型の酸素消費トレースが得られるが、SF ビーズを添加した場合には徐々に勾配がきつくなる曲線型のトレースが得られた。次に、SF6847 単独添加時の酸素消費速度 (トレースの傾き) と SF6847 濃度の関係について検討したところ、酸素消費速度と SF6847 濃度に良好な正の比例関係が得られた (図 4-4)。SF ビーズを添加して得られた曲線型のトレースについて酸素消費速度を 1 分ごとに測定し、図 4-4B のグラフから得られた式を用いて濃度を算出することで SF ビーズ の薬物放出曲線を作成した (図 4-5)。その結果、時間経過と共に懸濁液中の SF6847 濃度が上昇していることが確認され、SF6847 の放出挙動はビーズの作製条件 (ゲル化時間、乾燥処理の有無) で異なることが明らかになった。

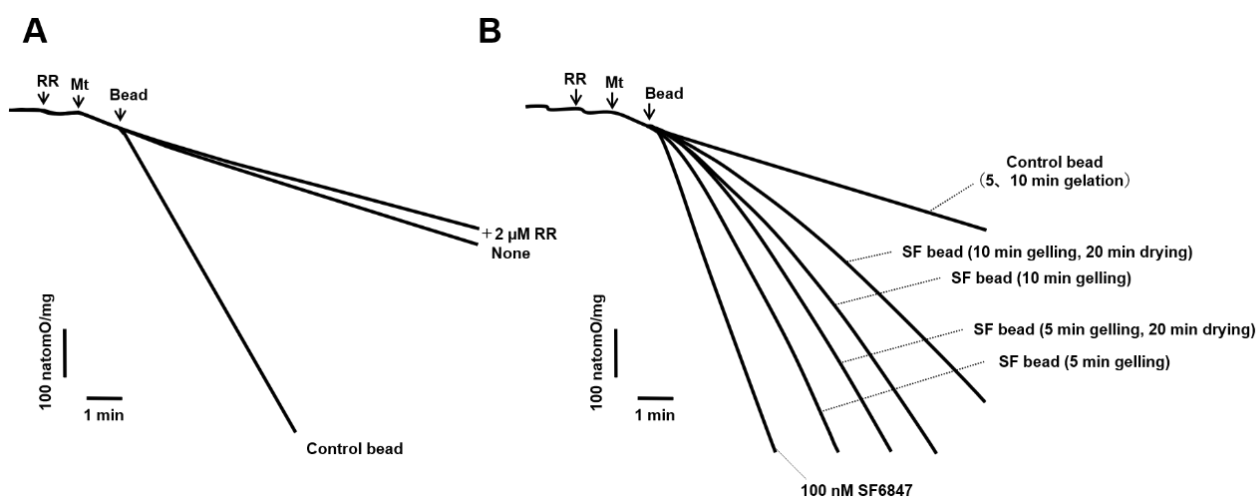


図 4-3 アルギン酸ゲルビーズから放出される SF6847 のリアルタイムモニタリング

SF ビーズをミトコンドリア懸濁液に添加した際の溶存酸素の変化についてリアルタイムモニタリングを行った。SF6847 を封入していないコントロールビーズを添加したところ、酸素消費の促進が観測された (パネル A)。このコントロールビーズの添加による酸素消費の促進は、RR での前処理により抑制された。パネル B では、RR で前処理したミトコンドリア懸濁液に作製条件の異なるコントロールビーズ若しくは SF ビーズ 1 個を添加した際の溶存酸素の変化を示した。

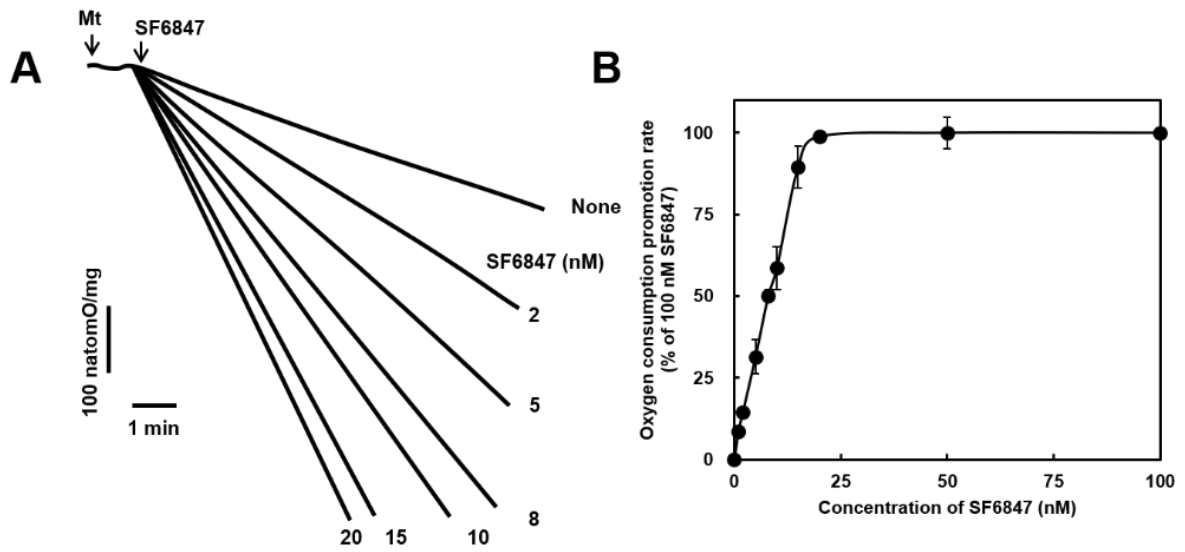


図 4-4 SF6847 添加時の酸素消費速度と SF6847 濃度の関係

SF6847 を単独で添加した際の酸素消費のトレースをパネル A に示した。パネル B には SF6847 濃度と酸素消費速度 (100 nM の SF を添加した際の酸素消費速度を 100 % とした) の関係を示した。なお、パネル B の結果は、独立した実験を 3 回試行して得られた平均値 ± SD 値として示した。

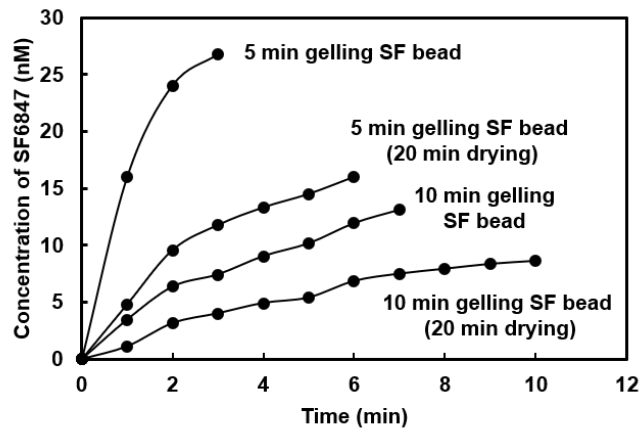


図 4-5 SF ビーズの薬物放出挙動

SF ビーズを添加した際の酸素消費速度を 1 分ごとに測定し、図 4-4B から得られた式を用いて SF6847 濃度を算出することで、時間経過と濃度の関係をプロットした。

3. アルギン酸ゲルビーズから放出される NSAIDs のリアルタイムモニタリング

NSAIDs ビーズをミトコンドリア懸濁液に添加した際の溶存酸素の変化を検討した (図 4-6)。コントロールビーズの添加では溶存酸素の変化は観測されなかったが、MEF ビーズあるいは DIC ビーズ の添加により経時的な溶存酸素の減少が観測された。なお、MEF 及び DIC も、SF6847 と同様に一定の濃度 (MEF : 0 - 30 μ M、DIC : 0 - 100 μ M) までは薬物濃度と酸素消費速度に正の比例関係があることを確認している (データは示さず)。SF ビーズと同様に、観測された酸素消費速度から MEF あるいは DIC の濃度を算出し、アルギン酸ゲルビーズからの薬物放出挙動を検証した (図 4-7)。その結果、MEF ビーズ (図 4-7 A) と DIC ビーズ (図 4-7 B) でそれぞれ特徴的な薬物放出曲線が得られ、MEF と DIC ではビーズからの放出挙動が異なることが示唆された。

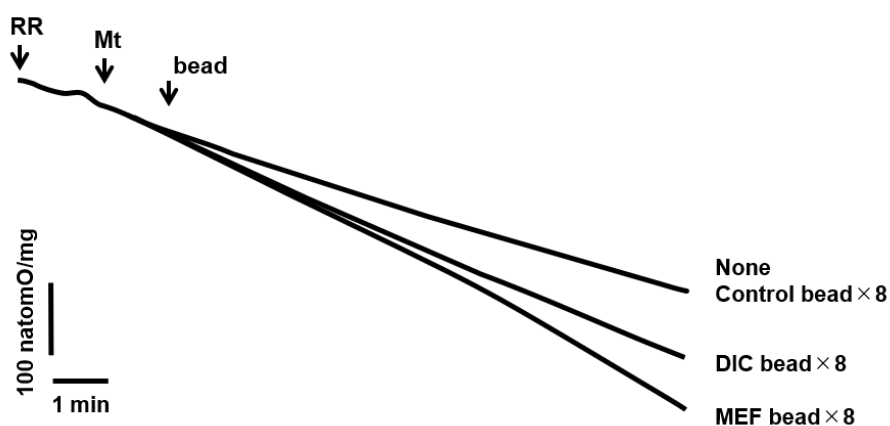


図 4-6 アルギン酸ゲルビーズから放出される NSAIDs のリアルタイムモニタリング

SF ビーズのモニタリングと同様に、RR で前処理したミトコンドリア懸濁液に、NSAIDs を封入していないコントロールビーズ、あるいは NSAIDs ビーズ (8 個) を添加し、経時的な溶存酸素の変化についてリアルタイムモニタリングを行った。

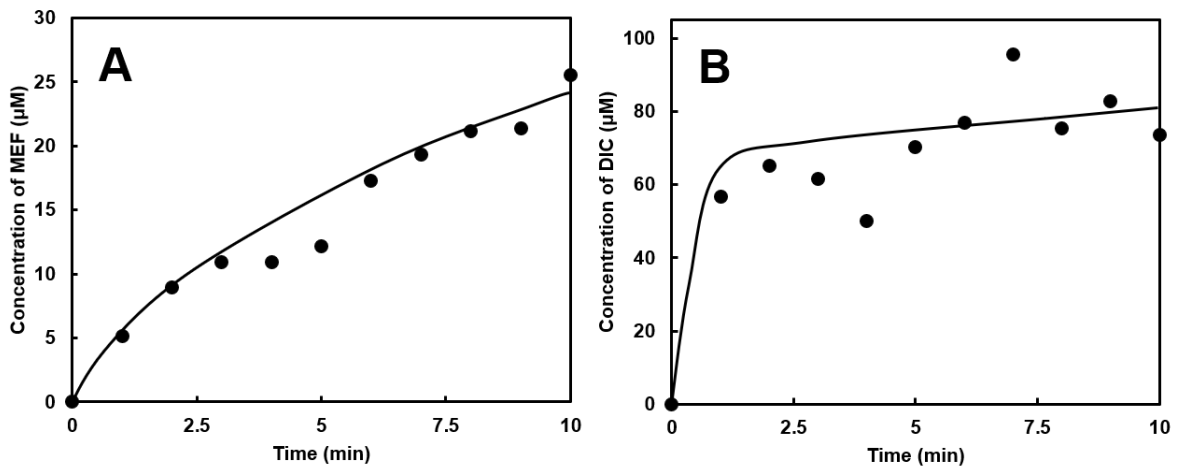


図 4-7 アルギン酸ゲルビーズから放出される NSAIDs の放出挙動

NSAIDs ビーズを添加して得られた酸素消費速度を 1 分毎に測定し、酸素消費速度 - 薬物濃度の関係式から薬物濃度を算出後、時間経過との関係をプロットした。MEF の放出曲線をパネル A に、DIC の放出曲線をパネル B に示した。

第 4 節 考察

製剤化技術の進歩により、リポソームの他にも生体適合性の高い素材で構成されたナノ粒子や高分子ミセルなどの微粒子製剤の研究が盛んに行われている。この微粒子からの薬物放出の制御は、製剤の有効性や品質を維持するのに重要なファクターであるが、その評価方法については確立されているものはない。本邦においては、現在リポソーム製剤のみガイドラインが策定されているが、「生理的条件を適切に反映した試験液中でリポソームからの有効成分の放出特性を測定する *in vitro* 放出試験法を確立すること」と記載されており、開発者が独自に評価系を設定する必要がある（厚生労働省. リポソーム製剤の開発に関するガイドライン. 2016, 24P.）。著者はミトコンドリアが環境中の薬物の存在を鋭敏に感知して酸素消費として反映させることに着目し、リポソームなどの微粒子を含む様々な製剤に応用可能な薬物放出評価系の構築を試みた。その試みの第一歩として、褐藻類などに含まれる多糖類であるアルギン酸をゲル化させることで作製できるアルギン酸ゲルビーズを薬物担体モデルとして採用し、脱共役剤 SF6847 を封入することで、ミトコンドリア酸素消費を指標にアルギン酸ゲルビーズからの SF6847 放出を観測した。アルギン酸は生体適合性や生分解性に優れた天然ポリマーであり、食品の増粘剤として使用される他、Ca²⁺ のような多価カチオンと反応させると瞬時にイオン架橋を起こすことからゲル化剤としても利用されている。また、ゲル化させたアルギン酸は内部に薬物を保持することが可能であり、徐放性の薬物担体としてその放出特性が詳細に研究されている（Elbadawy K., 2010 ; Lopes M. *et al.*, 2017）。著者は、内部に SF6847 を保持した SF ビーズを作製した。SF ビ

ーズは直径が約 1.5 mm 程の球体となり (図 4-1)、ゲル化時間によって内部に保有する SF6847 量の変化が確認された (図 4-2)。これは、封入されていた SF6847 が時間経過と共にビーズ内を拡散して徐々に外部溶液に漏出していることを示唆しており、アルギン酸ゲルビーズが徐放性を有する薬物担体として利用できることが確認された。また、作製したビーズをミトコンドリア懸濁液に添加したところ、SF6847 を封入していないコントロールビーズにおいて酸素消費の促進が観測された (図 4-3A)。この酸素消費の促進は、アルギン酸をゲル化させる際に使用した Ca^{2+} がビーズから漏出することが原因であると考えられ、ミトコンドリアカルシウムユニポーターの阻害剤 RR の添加により、この酸素消費は抑制された (図 4-3A、+2 μM RR)。この結果から、RR で前処理したミトコンドリア懸濁液を利用することで、アルギン酸ゲルビーズからの SF6847 放出を評価できると考えられた。次に、RR で前処理したミトコンドリア懸濁液に、異なる条件で作製した SF ビーズを添加して酸素消費をモニターした (図 4-3B)。その結果、SF ビーズの添加により徐々に変化する曲線型の酸素消費トレースが得られ、ゲル化時間や乾燥処理などのビーズ作製条件の違いで酸素消費は変化した。これまでに、アルギン酸ゲルビーズからの薬物放出の挙動は、封入されている薬物量やビーズ内部の水分量によって影響を受けることが報告されている (Elbadawy K., 2010)。従って、これらの結果は、SF ビーズに封入されている薬物量のわずかな差や、乾燥によるビーズの状態変化を感度良く反映させていると考えられる。次に、SF6847 を単独でミトコンドリア懸濁液に添加したところ、SF6847 濃度と酸素消費速度 (トレースの傾き) が正の比例関係にあることが明らかになった (図 4-4A, B)。SF ビーズ添加時の酸素消費速度から 1 分毎に濃度を算出し、SF ビーズの薬物放出曲線を得た (図 4-5)。その結果、作製条件の異なる SF ビーズで異なる放出挙動が得られ、特にゲル化時間 5 分の条件で作製した SF ビーズの初期放出が乾燥により顕著に抑制されている点は非常に興味深かった。これまでの検証では、主に SF6847 を薬物担体モデルに封入してその薬物放出特性を検証したが、フェナム酸系 NSAIDs のようにミトコンドリアの酸素消費を促進させる医薬品であれば、担体からの放出を直接評価できると考えられた。そこで、SF6847 と同様に NSAIDs を封入したアルギン酸ゲルビーズ (NSAIDs ビーズ) を作製し、ミトコンドリアの酸素消費を指標にその放出特性の解析を試みた。その結果、NSAIDs ビーズの添加によりミトコンドリアの酸素消費の促進が観測され (図 4-6)、ビーズからの NSAIDs 放出を反映していると考えられた。得られた酸素消費速度から NSAIDs 濃度を算出して薬物放出曲線を作成したところ、MEF と DIC のビーズからの放出挙動が異なることが明らかになり、アルギン酸ゲルビーズからの薬物放出は封入された薬物の種類によっても影響を受ける可能性が示唆された (図 4-7)。以上の結果から、ミトコンドリアの機能を利用した薬物放出の評価系を用いることで、薬物担体の特性を詳細に解析可能であると考えられた。SF6847 や NSAIDs のように直接ミトコンドリアの酸素消費に影響を及ぼす薬物以外でも、薬物に反応してミトコンドリアのプロトン勾配を変化させるようなプローブがあれば幅広い医薬品に対してこの測定系の利用が可能であると考

えられ、現在、そのプローブの探索と開発を視野に入れ研究を進めている。

薬物送達システム開発への応用展開に関して、本研究で検討した薬物担体への薬物の封入とその放出評価系の構築と並行して、薬物担体の標的部位への効率的な送達に関する検討についても、共同研究として展開した。その成果の一例として、グラム陽性細菌が産生するトランスペプチダーゼである *sortase A* (*SrtA*) のペプチド転移反応に着目し、リポソームの表面にペプチドタグ化した標的細胞リガンド分子を付加するシステムを構築した (Tabata A. *et al.*, 2015)。具体的には、*SrtA* のペプチド転移反応に不可欠な受容配列 (3 残基以上のオリゴグリシン) を有するリポペプチドを合成してリポソームに挿入し、*SrtA* のペプチド転移反応により転移配列 (LPETG) を有する肺癌細胞指向性ペプチドを転移させることによって肺癌細胞指向性のモデル DDS を作製し、*in vitro* においてヒト由来肺癌細胞株 A549 に選択的に送達されることを確認している。この表面修飾システムは、他の様々な標的分子 (例えば、一本鎖可変領域抗体を含むタンパク質やペプチドなど) を標的細胞に応じて自由に選択することで、より汎用性の高いシステムとして利用可能であると考えられる。このようにリポソームなどの薬物担体や微粒子製剤について、*SrtA* による表面リガンド付加反応により標的細胞への指向性を付加すると共に、本研究で構築・検討した薬物放出評価系を用いることでより厳密な薬物放出制御能を有す DDS 用の製剤開発が可能になると共に、高い有効性及び安全性を有する DDS の開発に繋がると考えている。

第 5 章

総括

第 5 章 総括

本研究は、NSAIDs がミトコンドリア機能に与える影響を解析することで、ミトコンドリア毒性を惹起する詳細なメカニズムや毒性の発現に必須な構造要因を明らかにすることを目的とし、ラットの肝臓から単離したミトコンドリアやリン脂質二重膜（ヒト赤血球及びリポソーム）、ヒト培養細胞、コンピューターシミュレーションを用いた解析を行った。また、解析によって得られたミトコンドリアの特性を利用し、DDS 開発への応用展開を試みた。本章では、本研究で得られた研究成果を総括する。

第 1 節 ミトコンドリアの機能修飾を介した NSAIDs 誘発性肝障害

非ステロイド性抗炎症薬セレコキシブがミトコンドリア機能に及ぼす影響の解析

第 2 章では、13 種の NSAIDs からミトコンドリア膨潤を誘導するものをスクリーニングし、コキシブ系 COX-2 選択的阻害薬であるセレコキシブ及びフェナム酸系 COX 非選択的阻害薬であるメフェナム酸に強いミトコンドリア膨潤活性があることを示した。この章ではセレコキシブについて解析を進め、セレコキシブによるミトコンドリアの膨潤が CsA によって阻害されないことから、Ca²⁺ が誘導する PTP の開口とは異なるメカニズムでミトコンドリアを膨潤させていることを明らかにした。さらに、ミトコンドリアの ATP 産生機構に及ぼす影響から、セレコキシブが酸化リン酸化の脱共役や電子伝達系の阻害作用を有することを示している。セレコキシブがミトコンドリアに及ぼす影響についてはこれまでも報告されているが (Lal N. *et al.*, 2009 ; Syed M. *et al.*, 2016)、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。著者らは、ヒト赤血球やリポソームを用いた解析により、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ることを明らかにした。これら生体膜に対する作用濃度域は、ミトコンドリアへ影響を及ぼす濃度域と一致することから、セレコキシブによってミトコンドリア内膜の性質（透過性や流動性など）が修飾されることで、H⁺ 勾配や電子伝達系機能に影響を及ぼしていると考えられた。また、セレコキシブによって膨潤したミトコンドリアから多量のマトリクスタンパク質が放出されていることを確認し、この放出タンパク質に CytC などの膜間スペースのタンパク質が含まれていないことを明らかにした。この結果は、セレコキシブの持つ膜作用により、PTP とは異なる、膜透過性の亢進を伴う特殊な膜構造変化が起こることを示唆しており、また、セレコキシブがミトコンドリアからの細胞死誘導因子の放出を介したアポトーシス誘導に関与しないことを示唆している。しかしながら、セレコキシブが生体膜に及ぼす影響はミトコンドリア膜に特異的な作用ではなく、細胞膜や小胞体膜に作用することで膜の透過性を亢進させ、細胞内の Ca²⁺ 濃度が上昇することで間接的にアポトーシス誘導性の mPT が惹起される可能性がある。また、セレコキシブはミトコンドリ

アの膨潤や赤血球などの生体膜の構造を破壊しない低濃度 (6.3–12.5 μM) から、脱共役作用や電子伝達系の阻害作用を示しており、ATP 産生機構の阻害が細胞死の誘導の主なメカニズムになりうる。よって、セレコキシブがミトコンドリアに起こす特殊な膜構造の変化や、肝障害の誘発にミトコンドリア機能の障害がどの程度寄与しているかという点について、今後更なる解析を行い、明らかにしていく必要がある。

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

第 3 章では、メフェナム酸をはじめとするフェナム酸系 NSAIDs が誘導するミトコンドリア膨潤メカニズムを明らかにするために、7 種類の構造関連化合物を用いて解析を行った。その結果、フェナム酸系の NSAIDs が Ca^{2+} と同様に PTP の開口を伴う mPT を誘導することを示し、mPT を誘導する最小構造として NPA 骨格が重要であることを明らかにした。構造中にカルボキシル基を有していない DPA ではミトコンドリアの膨潤は観測されたものの、Pi 非要求性、CsA 非感受性であったことから、NPA 骨格を有する化合物とは異なるメカニズムでミトコンドリアの膨潤が誘導されていると考えられる。また、ミトコンドリアの ATP 産生機構へ及ぼす影響の解析において、NPA を構造中に含む化合物が脱共役作用と電子伝達系阻害作用の 2 つの作用を持つのに対し、DPA が電子伝達系の阻害作用のみを有することから、この膜作用の違いが異なる性質のミトコンドリア膨潤の誘導に関与している可能性が示唆された。さらに、細胞の生存率に及ぼす影響において、NPA 骨格を有する化合物にのみ細胞毒性が認められたことから、酸化的リン酸化の脱共役や PTP の開口を介した mPT の誘導が細胞死を惹起する上で重要な因子であると考えられた。フェナム酸系 NSAIDs が Ca^{2+} 様の mPT を誘導するメカニズムとしては、酸化的リン酸化の脱共役による NADP トランスヒドロゲナーゼの活性阻害に起因する H_2O_2 除去能の低下が示唆されており (Masubuchi Y. *et al.*, 2002)、実際に本検証においても脱共役作用を有していない DPA は Ca^{2+} 様の mPT を誘導しなかった。しかしながら、フェナム酸系の NSAIDs と同様にプロトノフォア作用を持つ SF6847 によるミトコンドリアの完全な脱共役が、ミトコンドリアの膨潤を誘導しないことから (データは示さず)、mPT が前述のメカニズムだけで誘導されているとは考えにくい。以前の報告により、フェナム酸系 NSAIDs を含め、構造中にカルボキシル基を持つ薬物によって誘導される mPT が、カタラーゼの添加により阻害されることが示されており (Masubuchi Y. *et al.*, 2002 ; Velho JA. *et al.*, 2006)、mPT 誘導メカニズムに H_2O_2 が何らかの形で関与していると考えられる。近年、薬物がミトコンドリア内膜に存在するペルオキシダーゼによって代謝されることで生成したカチオンラジカルが、ミトコンドリア膜タンパク質を酸化することで mPT を誘導されるメカニズムが提案されている (Cruz TS. *et al.*, 2010)。また、フェナム酸系 NSAIDs は H_2O_2 存在下においてセイヨウワサビペルオキシダーゼなどの基質となり NSAIDs ラジカルを生成することが報告されている (Muraoka S. *et al.*, 2003 ; Zuurbier KW. *et al.*, 1990)。従って、NSAIDs の持つ脱共役作用や電子伝達系

の阻害作用によって発生した H_2O_2 がミトコンドリアへの酸化ストレスを増加させるだけでなく、内膜に存在するペルオキシダーゼと協調して NSAIDs ラジカルを生成している可能性が考えられる。また、 H_2O_2 の存在下において、ミトコンドリア内膜のカルジオリピンに結合している CytC の立体構造が変化し、ペルオキシダーゼ活性を示すことが報告されている (Belikova NA. *et al.*, 2006)。これらの知見から、フェナム系 NSAIDs とミトコンドリア膜に存在するペルオキシダーゼとの相互作用の解析を行うことで、mPT 誘導の詳細なメカニズムが明らかになる可能性が示唆される。

また第 3 章では、コンピューターシミュレーションを用いて NPA 構造関連化合物の構造特性の解析も行っている。解析の結果、ミトコンドリアに高い反応性を示した MCL が、その動的構造の中にミトコンドリア膜と反応しやすい疎水性度を持つ配座を多数有している可能性が示唆された。MCL は細胞毒性の検証においても強い毒性を示しており、生体膜と反応しやすい構造をとりやすい薬物は、肝障害を惹起しやすい可能性がある。今後、より精度の高い手法を用いて構造特性の解析を進めることで、肝毒性の予測や医薬品開発に有用な知見が得られることが期待される。

第 2 節 ミトコンドリアの特性を利用した薬物担体からの薬物放出の評価と DDS 開発への展開

第 4 章では、これまでに明らかにしてきたミトコンドリア機能を利用して、薬物担体からの成分放出をリアルタイムで評価できる実験系の構築を行った。脱共役剤 SF6847 を封入したアルギン酸ゲルビーズを薬物担体モデルとすることで、ビーズからの薬物放出をミトコンドリアの酸素消費を指標にリアルタイムで評価できることを示した。この評価系は作製時の条件によって変化するビーズ内の薬物量や水分量などの担体の状態を感度良く反映し、封入薬物として SF6847 を使用することで、ナノ粒子やマイクロスフェアなどの微粒子を含む様々な薬物担体に応用可能であると考えられる。また、脱共役作用のようにミトコンドリアの酸素消費を促進させ、濃度と酸素消費速度に良好な相関関係がある薬物であれば、担体からの薬物放出を直接評価することが可能である。著者はフェナム酸系 NSAIDs である MEF と DIC をアルギン酸ゲルビーズに封入することで、この 2 つの薬物のビーズからの放出挙動（初期放出や経時的な放出）が異なることを明らかにした。ナノ粒子やマイクロスフェアなどの微粒子製剤の開発においては、その粒子径の小ささから、薬物の初期放出の制御や薬物の封入効率が重要になってくる。本研究で構築した薬物放出の評価系を用いることで、薬物担体の詳細な検討が可能であると考えられ、確立された評価方法が存在しない微粒子製剤の開発において、この評価系は非常に有用であることが予想される。また、著者は共同研究として、グラム陽性細菌由来のペプチド転移酵素 SrtA 用いたリポソーム表面の修飾システム開発を行った (Tabata A *et al.*, 2015)。

SrtA が媒介するペプチド転移反応を利用することで、抗がん剤を封入したリポソーム表面へ肺癌指向性のペプチドを修飾した、モデル DDS を作製し、このモデル DDS がヒト由来肺癌細胞株 A549 に選択的に送達されることを示した。この SrtA を利用したリポソーム表面の修飾システムを応用して、リポソーム表面に様々な標的分子を結合することで、多様な標的への指向性の付加が可能であると考えられる。

現在、本邦において死因別死亡率の第 1 位は悪性新生物であり、1 年間に日本人の約 100 万人ががんに罹患し約 37 万人ががんで亡くなっている（厚生労働省. 我が国の人口動態—2015 年までの動向—. 2017, 55P.）。高齢化の進展に伴い、がん罹患数と死亡率は現在でも上昇し続けており、今後ますますがん薬物療法の位置づけは重要になると思われる。将来、本研究で構築したこれらのツールを利用し、高い標的指向性及び薬物放出制御能を有する DDS 製剤の開発を行い、がん薬物治療の効果をより高めるとともに、有害反応を軽減することで、がんによる死亡率を低下させるだけでなく、患者の QOL の向上につながることを期待される。

引用文献

引用文献

Baek SJ, Eling TE. Changes in gene expression contribution to cancer prevention by COX inhibitors. *Prog. Lipid Res.*, **45**, 1-16 (2006).

Bakowsky H, Richter T, Kneuer C, Hoekstra D, Rothe U, Bendas G, Ehrhardt C and Bakowsky U. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochim Biophys Acta.*, **1778**, 242-249 (2008).

Beatrice MC, Palmer JW, Pfeiffer DR. The relationship between mitochondrial membrane permeability, membrane potential, and the retention of Ca²⁺ by mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8663-8671 (1980).

Belikova NA, Vladimirov YA, Osipov AN, Kapralov AA, Tyurin VA, Potapovich MV, Basova LV, Peterson J, Kurnikov IV, Kagan VE. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry.*, **45(15)**, 4998-5009 (2006).

Bernardi P, Colonna R, Costantini P, Eriksson O, Fontaine E, Ichas F, Massari S, Nicolli A, Petronilli V, Scorrano L. The mitochondrial permeability transition. *Biofactors*, **8**, 273-281 (1998).

Berson A, Cazanave S, Descatoire V, Tinel M, Grodet A, Wolf C, Feldmann G, Pessayre D. The anti-inflammatory drug, nimesulide (4-nitro-2-phenoxy methane-sulfoanilide), uncouples mitochondria and induces mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells: protection by albumin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 444-454 (2006).

Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World J. Gastroenterol.*, **16**, 5651-5661 (2010).

Biasutto L, Azzolini M, Szabò I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 2515-2530 (2016).

Björnsson ES. Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents. *Int*

J Mol Sci., **17(2)**, 224 (2016).

Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ; VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med.*, **343(21)**, 1520-1528 (2000).

Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene*, **25**, 4744–4756 (2006).

Brenner D, Mak TW. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol.*, **21(6)**, 871-877 (2009).

Carbonera D, Angrilli A, Azzone GF. Mechanism of nitrofurantoin toxicity and oxidative stress in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.*, **936(1)**, 139-47 (1988).

Chakraborty H, Chakraborty PK, Raha S, Mandal PC, Sarkar M. Interaction of piroxicam with mitochondrial membrane and cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1138–1146 (2007).

Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem.*, **271(12)**, 6746-6751 (1996).

Cruz TS, Faria PA, Santana DP, Ferreira JC, Oliveira V, Nascimento OR, Cerchiaro G, Curti C, Nantes IL, Rodrigues T. On the mechanisms of phenothiazine-induced mitochondrial permeability transition: Thiol oxidation, strict Ca²⁺ dependence, and cytochrome c release. *Biochem Pharmacol.*, **80(8)**, 1284-1295 (2010).

de Faria PA, Bettanin F, Cunha RL, Paredes-Gamero EJ, Homem-de-Mello P, Nantes IL, Rodrigues T. Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: a structure-activity investigation. *Toxicology.*, **330**, 44-54 (2015).

Elbadawy Kamoun. Alginate Hydrogel as Drug Delivery System: Preparation of

Alginate Hydrogel and its Application as Drug Delivery System. VDM Verlag Dr. Müller, 2010, 84p., ISBN 978-3639304275.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **13(15)**,1899-1911 (1999).

Graham DY, Opekun AR, Willingham FF, Qureshi WA. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAIDs users. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 55-59 (2005).

Gunter TE, Pfeiffer DR. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.*, **258**, C755–C786 (1990).

Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **16**, 821-847 (2013).

Hatakeyama H, Akita H, Ishida E, Hashimoto K, Kobayashi H, Aoki T, Yasuda J, Obata K, Kikuchi H, Ishida T, Kiwada H and Harashima H. Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1MMP antibody-modified PEG liposomes. *Int J Pharm.*, **342**, 194-200 (2007).

Hwang SY, Cho do Y, Kim HK, Cho SH, Choo J, Yoon WJ and Lee EK. Preparation of targeting proteoliposome by postinsertion of a linker molecule conjugated with recombinant human epidermal growth factor. *Bioconjug Chem.*, **21**, 345-351 (2010).

Jiang J, Briedé JJ, Jennen DG, Van Summeren A, Saritas-Brauers K, Schaart G, Kleinjans JC, de Kok TM. Increased mitochondrial ROS formation by acetaminophen in human hepatic cells is associated with gene expression changes suggesting disruption of the mitochondrial electron transport chain. *Toxicol Lett.*, **234(2)**, 139-150 (2015).

Jones P, Lamdin R. Oral cyclo-oxygenase 2 inhibitors versus other oral analgesics for acute soft tissue injury: systematic review and meta-analysis. *Clin. Drug Investig.*, **30**, 419-437 (2010).

Kadenbach B, Ramzan R, Wen L, Vogt S. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1800**, 205-212 (2010).

川西 正祐, 小野 秀樹, 賀川 義之. 図解 薬害・副作用学 (第2版). 南山堂, 2017, 543p.,
みてわかる薬学シリーズ, ISBN 978-4-525-72072-8.

Kawashima S, Yamamoto T, Horiuchi Y, Fujiwara K, Gouda S, Yoshimura Y, Yamamoto A, Inotani Y, Yamashita K, Kitamura S, Terada H, Kanematsu M, Shishido K, Shinohara Y. S-15176 and its methylated derivative suppress the CsA-insensitive mitochondrial permeability transition and subsequent cytochrome c release induced by silver ion, and show weak protonophoric activity. *Mol. Cell Biochem.*, **358**, 45-51 (2011).

Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.*, **427(6973)**, 461-465 (2004).

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).

Lal N, Kumar J, Erdahl WE, Pfeiffer DR, Gadd ME, Graff G, Yanni JM. Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mitochondrial dysfunction during oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.*, **490**, 1-8 (2009).

Langer R. New methods of drug delivery. *Science.*, **249**, 1527-1533 (1990).

Li Y, Qi XM, Xue X, Wu XF, Wu YF, Chen M, Xing GZ, Luan Y, Ren J. The relationship between diphenylamine structure and NSAIDs-induced hepatocytes injury. *Toxicol Lett.*, **186(2)**, 111-114 (2009).

Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta.*, **1813(4)**, 532-539 (2011).

Lopes M, Abraham B, Veiga F, Seica R, Cabral LM, Arnaud P, Andrade JC, Ribeiro AJ. Preparation methods and applications behind alginate-based particles. *Expert Opin*

Drug Deliv., **14(6)**, 769-782 (2017).

Masubuchi Y, Yamada S, Horie T. Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 861-865 (1999).

Masubuchi Y, Yamada S, Horie T. Possible mechanism of hepatocyte injury induced by diphenylamine and its structurally related nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 982-987 (2000).

Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T. Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. *Hepatology*, **35**, 544-551 (2002).

米谷 芳枝. The Drug Delivery System－薬学が語る DDS の世界－. 京都廣川書店, 2012, 229P., ISBN 978-4-901789-94-3.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, **191**, 144-148 (1961).

Muraoka S, Miura T. Inactivation of creatine kinase during the interaction of mefenamic acid with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide: participation by the mefenamic acid radical. *Life Sci.*, **72(17)**, 1897-1907 (2003).

Musu M, Finco G, Antonucci R, Polati E, Sanna D, Evangelista M, Ribuffo D, Schweiger V, Fanos V. Acute nephrotoxicity of NSAIDs from the foetus to the adult. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **15**, 1461-1472 (2011).

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, **434**, 652-658 (2005).

Nagamune H, Ohnishi C, Katsuura A, Fushitani K, Whiley RA, Tsuji A, Matsuda Y. Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess. *Infect. Immun.*, **64**, 3093-3100 (1996).

Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Ola MS, Mol Cell Biochem.*, **351(1-2)**, 41-58 (2011).

Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N and Minamino T. Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. *J Control Release.*, **160**, 274-280 (2012).

Ohkura K, Hori H. Analysis of structure–permeability correlation of nitrophenol analogues in newborn rat abdominal skin using semiempirical molecular orbital calculation. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 309–314 (1999).

Ohkura K, Sukeno A, Yamamoto K, Nagamune H, Maeda T, Kourai H. Analysis of structural features of bis-quaternary ammonium antimicrobial agents 4,4'-(alpha,omega-polymethylenedithio)bis(1alkylpyridinium iodide)s using computational simulation. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 5035–5043 (2003).

Ohkura K, Sukeno A, Nagamune H, Kourai H. Bridgeliinked bis-quaternary ammonium anti-microbial agents: relationship between cytotoxicity and anti-bacterial activity of 5,5'-[2,2'-(tetramethylenedicarbonyldioxy)-diethyl]bis(3-alkyl-4-methylthiazonium iodide)s. *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 2579–2587 (2005).

Okuda T, Norioka M, Shitara Y, Horie T. Multiple mechanisms underlying troglitazone-induced mitochondrial permeability transition. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **248(3)**, 242-248 (2010).

Pessayre D, Fromenty B, Berson A, Robin MA, Lett eron P, Moreau R, Mansouri A. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev.*, **44(1)**, 34-87 (2012).

Petronilli V, Cola C, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca²⁺. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1011-1016 (1993).

Puri A, Kramer-Marek G, Campbell-Massa R, Yavlovich A, Tele SC, Lee SB, Clogston JD, Patri AK, Blumenthal R and Capala J. HER2-specific affibody-conjugated

thermosensitive liposomes (Affisomes) for improved delivery of anticancer agents. *J Liposome Res.*, **18**, 293-307, (2008).

Shahin M, Soudy R, El-Sikhry H, Seubert JM, Kaur K and Lavasanifar A. Engineered peptides for the development of actively tumor targeted liposomal carriers of doxorubicin. *Cancer Lett.*, **334**, 284-292 (2013).

Shinohara Y, Almofti MR, Yamamoto T, Ishida T, Kita F, Kanzaki H, Ohnishi M, Yamashita K, Shimizu S, Terada H. Permeability transition-independent release of mitochondrial cytochrome c induced by valinomycin. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 5224-5230 (2002).

Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA*. **284**(10), 1247-1255 (2000).

Singh BK, Tripathi M, Pandey PK, Kakkar P. Nimesulide aggravates redox imbalance and calcium dependent mitochondrial permeability transition leading to dysfunction *in vitro*. *Toxicology*, **275**, 1-9 (2010).

Souto EO, Miyoshi H, Dubois RN, Gores GJ. Kupffer cell-derived cyclooxygenase-2 regulates hepatocyte Bcl-2 expression in choledocho-venous fistula rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **280**, G805-811 (2001).

Steinmeyer J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res.*, **2**, 379-385 (2000).

Sudo C, Maekawa K, Segawa K, Hanatani T, Sai K, Saito Y. Trends in drug-induced liver injury based on reports of adverse reactions to PMDA in Japan. *Bull. Natl. Inst., Health Sci.*, **130**, 66-70 (2012).

Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.*, **59**, 247-258 (2007).

Syed M, Skonberg C, Hansen SH. Mitochondrial toxicity of selective COX-2 inhibitors via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria. *Toxicol. In Vitro*, **32**, 26-40 (2016).

Tabata A, Ohkubo Y, Sakakura E, Tomoyasu T, Ohkura K and Nagamune H. Investigation of a bacterial pore-forming chimera toxin for application as a novel drug-delivery system tool. *Anticancer Res.*, **32**, 2323-2329 (2012).

Tabata A, Ohkura K, Ohkubo Y, Tomoyasu T, Ohkuni H, Whiley RA, Nagamune H. The diversity of receptor recognition in cholesterol-dependent cytolysins. *Microbiol. Immunol.*, **58**, 155-171 (2014).

Tabata A, Ohkubo Y, Anyoji N, Hojo K, Tomoyasu T, Tatematsu Y, Ohkura K, Nagamune H. Development of a Sortase A-mediated Peptide-labeled Liposome Applicable to Drug-delivery Systems. *Anticancer Res.*, **35(8)**, 4411-4417 (2015).

Tatematsu Y, Hayashi H, Taguchi R, Fujita H, Yamamoto A, Ohkura K. Effect of N-Phenylanthranilic Acid Scaffold Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on the Mitochondrial Permeability Transition. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 278-284 (2016).

Terada T, Mizobata M, Kawakami S, Yamashita F and Hashida M: Optimization of tumor-selective targeting by basic fibroblast growth factor-binding peptide grafted PEGylated liposomes. *J Control Release.*, **119**, 262-270 (2007).

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350-4354 (1979).

Trost LC, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition: a new pathophysiological mechanism for Reye's syndrome and toxic liver injury. *J Pharmacol Exp Ther.*, **278(3)**, 1000-1005 (1996).

Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*, **12**, 835-840 (2007).

Unzueta A, Vargas HE. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity.

Clin. Liver Dis., **17**, 643-656, ix (2013).

van Leeuwen JS, Unlü B, Vermeulen NP, Vos JC. Differential involvement of mitochondrial dysfunction, cytochrome P450 activity, and active transport in the toxicity of structurally related NSAIDs. *Toxicol In Vitro.*, **26(2)**, 197-205 (2012).

Velho JA, Okanobo H, Degasperi GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, Oliveira HC, Vercesi AE. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology.*, **219(1-3)**, 124-132 (2006).

Vuda M, Kamath A. Drug induced mitochondrial dysfunction: Mechanisms and adverse clinical consequences. *Mitochondrion.*, **31**, 63-74 (2016).

Wang X, Baek SJ, Eling T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Rev.*, **30**, 641-657 (2011).

Wang Z, Yu Y, Dai W, Lu J, Cui J, Wu H, Yuan L, Zhang H, Wang X, Wang J, Zhang X and Zhang Q. The use of a tumor metastasis targeting peptide to deliver doxorubicin-containing liposomes to highly metastatic cancer. *Biomaterials.*, **33**, 8451-8460 (2012).

Watanabe T, Tanigawa T, Nadatani Y, Otani K, Machida H, Okazaki H, Yamagami K, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Mitochondrial disorders in NSAIDs-induced small bowel injury. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **48**, 117-121 (2011).

Yamada A, Yamamoto T, Yamazaki N, Yamashita K, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y. Differential permeabilization effects of Ca²⁺ and valinomycin on the inner and outer mitochondrial membranes as revealed by proteomics analysis of proteins released from mitochondria. *Mol. Cell Proteomics*, **8**, 1265-1277 (2009).

Yamamoto T, Yoshimura Y, Yamada A, Gouda S, Yamashita K, Yamazaki N, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y. Distinct behaviors of adenylate kinase and cytochrome c observed following induction of mitochondrial permeability transition by Ca²⁺ in the absence of respiratory substrate. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 619-623 (2008).

Yamamoto T, Ito M, Kageyama K, Kuwahara K, Yamashita K, Takiguchi Y, Kitamura S, Terada H, Shinohara Y. Mastoparan peptide causes mitochondrial permeability transition not by interacting with specific membrane proteins but by interacting with the phospholipid phase. *FEBS J.*, **281**, 3933-3944 (2014).

Yan Z, Yang Y, Wei X, Zhong J, Wei D, Liu L, Xie C, Wang F, Zhang L, Lu W and He D. Tumor-penetrating peptide mediation: an effective strategy for improving the transport of liposomes in tumor tissue. *Mol Pharm.*, **11**, 218-225, (2014).

Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139-176 (1995).

Zuurbier KW, Bakkenist AR, Fokkens RH, Nibbering NM, Wever R, Muijsers AO. Interaction of myeloperoxidase with diclofenac. Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by diclofenac and oxidation of diclofenac to dihydroxyazobenzene by myeloperoxidase. *Biochem Pharmacol.*, **40(8)**, 1801-1808 (1990).

謝辭

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、さらに終始ご指導、ご鞭撻を頂きました、鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 大倉 一人 教授に衷心より感謝の意を表します。

また、本論文の審査過程において、数々のご助言とご指導を賜りました、鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 田口 博明 教授、川西 正祐 教授、藤川 隆彦 教授、里見 佳子 教授、ならびに米田 誠治 准教授に深く感謝いたします。

さらに、本研究を行うにあたり、研究生生活について情熱を持ってご指導、ご討論して頂きました鈴鹿医療科学大学薬学部 山本 篤司 助手に心から感謝いたします。

また、本研究を遂行するにあたり、共同研究者として素晴らしい研究環境を提供していただき、良き理解者として暖かくご指導、ご討論して頂きました徳島大学生物資源産業学部 長宗 秀明 教授、ならびに田端 厚之 講師に深く感謝いたします。

また、4年間の研究生生活を通じて、終始暖かく見守り続け、ご協力して頂きました、鈴鹿医療科学大学薬学部の先生方、薬剤学研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、深い愛情と理解をもって応援し、支え続けてくれた家族に心から感謝いたします。

2018 年 3 月

立松 洋平

英語要旨

Exploring the hepatic disorder involved factors:
Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the mitochondrial functions

Yohei Tatematsu

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used to treat a number of disorders associated with pain and inflammation. NSAIDs are known to cause adverse effects such as gastric ulceration and injury to the liver and kidneys. Although rare, NSAIDs have been reported to induce fulminant hepatitis. Certain NSAIDs impair cellular function by acting on mitochondria, and the relationship between hepatic damage and mitochondrial dysfunction has been examined.

I investigated the effects of several NSAIDs on mitochondrial function, and observed celecoxib-induced mitochondrial swelling. Celecoxib dose-dependently induced mitochondria swelling, which was not suppressed by cyclosporine A (CsA). The oxygen consumption rate in mitochondria-suspended solution was facilitated by the addition of celecoxib, and its uncoupling activity was observed. Celecoxib also suppressed SF6847-induced uncoupling, and appeared to exert inhibitory effects on the electron transport chain. Celecoxib suppressed the state 3 oxygen consumption rate in the presence of ADP. Protein release from the mitochondrial matrix was detected following the addition of celecoxib, and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) and HMG-CoA synthase 2 (HMGCS2) bands were confirmed in a Western blot analysis. On the other hand, protein release of cytochrome C (CytC), which is an inducer of apoptosis, from the intermembrane space was not observed. Celecoxib enhanced the membrane permeability of human erythrocytes and synthesized liposomes dose-dependently. It then induced the membrane-involving mitochondrial swelling and suppressed mitochondrial function.

Effects of *N*-phenylanthranilic acid (NPA) scaffold NSAIDs on rat liver mitochondria were examined. Mefenamic acid (MEF) induced mitochondrial swelling, which was inorganic phosphate (Pi)-dependent and suppressed by CsA, similar to Ca²⁺-like mitochondrial swelling. The mitochondrial swelling was also observed following the addition of flufenamic acid (FLU), meclofenamic acid (MCL), and tolfenamic acid (TOL). Less swelling was observed with the addition of diclofenac (DIC) or NPA. Diphenylamine (DPA)-induced swelling occurred in a Pi-independent manner and was not sensitive to CsA. The mechanism by which DPA interacted with the mitochondrial inner membrane differed from those of the other NPA scaffold NSAIDs. Hydrophobicity is one of the factors regulating reactivity, and

stereo-structures have been shown to affect molecular hydrophobicity. NPA scaffold NSAIDs are known to have various dynamic structures, and the solvation free energies (dGWs: an index of stereo-hydrophobicity) of the conformers obtained were determined using a molecular orbital analysis. Potent uncoupler SF6847 has 127 conformers, and their dGW values were constant in the vicinity of -63 (average: -62.92) kJ/mol. Each conformer may exhibit interactive hydrophobicity with the mitochondrial membrane and exert uncoupling effects at a very low concentration (100 nM). MCL had a minimum dGW conformer group, and the average (-65.95 kJ/ mol) of this group was similar to the dGW level of SF6847. The stereo-hydrophobicity of MCL appears to be advantageous for interactions with biological membranes (*e.g.* liver mitochondrial membranes), and the existence probability of conformers with interactive hydrophobicity with biological membranes appears to be one of the key elements for NSAIDs-induced hepatotoxicity.

Moreover, I constructed a novel drug release evaluation system using mitochondrial functions. Mitochondria responded sensitively to the release of the compound, which has uncoupling activity, from alginate gel beads, and it possible to evaluate the details of drug release behavior in terms of oxygen consumption. This evaluation system is suitable for various drug carriers comprising a component drug that reacts sensitively to mitochondria and promotes oxygen consumption.