



Elucidation of Teratogenic Mechanisms of Immunosuppressant Leflunomide in Mice

Fukushima, Ryou

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2009-09-25

(Date of Publication)

2011-11-17

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4741

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004741>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	福島 亮
博士の専攻分野の名称	博士（農学）
学 位 記 番 号	博い第 4741 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Elucidation of teratogenic mechanisms of immunosuppressant Leflunomide in mice （マウスにおける免疫抑制剤 Leflunomide の催奇形性メカニズムの解明）

審 査 委 員

主 査	教 授	北川 浩
	教 授	河野 潤一
	教 授	星 信彦

別紙様式3（博士論文審査等内規第2条関係）

博士論文内容の要旨

氏 名 福島 亮

専攻・講座 資源生命科学 ・ 応用動物学

論文題目（外国語の場合は、その和訳を併記すること。）

Elucidation of teratogenic mechanisms of immunosuppressant

Leflunomide in mice

マウスにおける免疫抑制剤 Leflunomide の催奇形性メカニズム

の解明

指導教員 北川 浩

1950年から60年代にかけて発生したサリドマイド薬害以降、医薬品開発において催奇形性は重要な評価項目のひとつである。しかしながら、現在でも、催奇形性を有する医薬品を妊婦が誤って服用したことにより発生した奇形の症例が多数報告されてきている。そこで、催奇形性メカニズムを調べ、その活性を有しない化合物を選抜することで、より安全な医薬品を効率的に創製することが可能になると考えられる。しかしながら、サリドマイドを含め、その催奇形性メカニズムが解明された医薬品は未だに多くないのが現状である。

本研究では、免疫抑制剤である Leflunomide の催奇形性メカニズムの解明を試みた。Leflunomide は自己免疫作用及び破軟骨細胞の異常賦活化による関節破壊が原因である慢性リウマチの治療または症状の緩和に用いられる。Leflunomide の薬理作用として、ピリミジンヌクレオチドの生合成に必須な dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) 及び protein tyrosine kinase (PTK) の阻害作用が知られている。非臨床試験の結果、Leflunomide はラット及びウサギに対して催奇形性を示すことが報告されており、ヒトに対しては、FDA により pregnancy category X の医薬品に指定されている。Leflunomide の薬理作用の比較から、その催奇形性には DHODH 阻害作用が関与している可能性が推察されるものの、これまでに Leflunomide の催奇形性メカニズムについて検討した報告はない。そこで本研究では、マウスに対する催奇形性を詳細に調べ、メカニズム解析を実施した。

マウスにおける Leflunomide の催奇形性を検討する最初の実験として、胚の器官形成期（妊娠6～15日）の妊娠マウスに Leflunomide を10, 30 または 70 mg/kg/日 で反復経口投与し、母体への影響、胚・胎子の生存性、子宮内発育及び催奇形性について詳細に調べ、催奇形性が認められた 30 mg/kg/日 での妊娠マウスにおける血中濃度についても測定した。70 mg/kg 群では全母動物の全ての胚が死亡した。30 mg/kg 群においては顕著な胚致死性及び子宮内発育抑制が認められ、複合的な奇形が高頻度で認められた。生存胎子の外表の観察では、主に神経管閉鎖障害による外脳、口蓋裂及び尾部の形態異常、骨格では頸椎から仙椎、肋骨及び胸骨片の異常、内部器官では心室中隔壁性部欠損及び動脈管遺残が認められ、少数ではあるが四肢の異常も散見された。10 mg/kg 群では Leflunomide 起因性の異常は認められなかったが、ラットでは 10 mg/kg/日 投与により神経管閉鎖障害及び眼球の形態異常が報告されていることから、催奇形性を発現する投与量にはマウス及びラット間での種間差が存在することが明らかとなった。また、妊娠マウスにおける Leflunomide 血中濃度は、同用量に換算した非妊娠雌ラットに比して僅かに高いことも明らかになった。一方、マウスにおける DHODH 阻害作用はラットに比して 1/5 程度であることから、この奇形発現投与量におけるラットおよびマウス間での種間差は、血中濃度及び DHODH 阻害作用の差に起因する可能性が示唆された。本実験結果から、器官形成期に 30 mg/kg/日 で Leflunomide を反復投与することにより、マウスに対して胚致死性作用及び子宮内発育抑制作用を有し、また催奇形性、主に頭顔面部、軸骨格及び心血管系の異常を発現することが

明らかになった (Ryou Fukushima *et al.*, Reproductive Toxicology, 2007, 27: 310-316).

上記実験で見られた奇形の発現臨界期を検討するため、妊娠 6～11 日のマウスに 50 mg/kg の Leflunomide を単回経口投与し、催奇形性について調べた。外表の観察の結果、妊娠 7 日投与群では、少数例ではあるが、胚における神経管閉鎖障害に起因する頭顔面部の異常、妊娠 9 日投与群では口蓋裂、妊娠 10 日投与群では口蓋裂、四肢及び尾部の異常、妊娠 11 日では四肢の異常が主に認められた。骨格に関しては、妊娠 7～10 日にかけて頸椎から尾椎の異常が見られた。内部器官については、妊娠 7 日及び 9 日投与群において、心血管系の異常が認められた。これらの結果から、Leflunomide はほぼ全身の器官の形態形成に異常を引き起こし、様々な器官の正常発生を幅広く阻害することが明らかになるとともに、ほとんどの奇形の発現臨界期は各器官における形態形成期にあることが明らかになった (Ryou Fukushima *et al.*, Congenital Anomalies, 2009, 49: 20-26)。

Leflunomide の催奇形性メカニズムを検討するため、ピリミジンヌクレオチドの前駆物質である uridine を Leflunomide と併用投与し、胚組織中のヌクレオチド量の変化及び奇形発現への影響を調べて Leflunomide の DHODH 阻害作用と催奇形性との関連について検討した。70 mg/kg の Leflunomide を妊娠 10 日に単回投与した群、Leflunomide 投与の 0.5, 4, 9 及び 24 時間後または 0.5 及び 4 時間後に uridine 1000 mg/kg/回を腹腔内投与した Leflunomide と uridine の併用投与群、及び uridine のみを投与した群を比較した結果、Leflunomide 単回投与群では全ての胎子に全身性の複合異常が認められたが、Leflunomide と uridine の併用投与群では一部の指趾異常を除いてほとんどの奇形発現が顕著に抑制され、その抑制程度は uridine の併用回数に依存していた。また、胚組織中のピリミジンヌクレオチド濃度は Leflunomide のみの群では著しく減少したものの、Leflunomide と uridine の併用投与群では回復傾向が認められた。これらの結果から、DHODH 阻害作用が Leflunomide の催奇形性に関与していることが明らかとなったが、一部の指趾奇形の発現が uridine により抑制されなかったことから、他のメカニズム、即ち PTK 阻害が関与している可能性が想定された (Ryou Fukushima *et al.*, Toxicological Sciences, 2009, 108: 419-426)。

上記の実験から、DHODH 阻害作用以外のメカニズムが Leflunomide の催奇形性に関与している可能性が想定されたため、妊娠 10 日のマウスに 70 mg/kg の Leflunomide を単回経口投与して、投与後 4 及び 24 時間に胚の肢芽組織を採取し、肢芽における DNA microarray を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した。Leflunomide 投与によりコレステロール合成酵素をコードする遺伝子の発現低下が認められたものの、肢芽におけるコレステロール濃度に変化は認められず、これらの遺伝子発現変化は催奇形性には寄与しないと考えられた。また、転写因子または転写因子を制御する遺伝子の発現低下が認められたこと、及び PTK は細胞増殖因子、サイトカインなどのレセプターの活性化及びシグナル伝達を亢進する酵素であり、Leflunomide は線維芽細胞増殖因子、血小板増殖因子、上皮細胞増殖因子のレセプターの PTK 作用及びその下流のシグナル伝達を阻害することが知られて

いることから、Leflunomide 投与による転写関連遺伝子の発現低下は、Leflunomide の PTK 阻害が四肢における催奇形性に関与している可能性が示唆された。さらに、肢芽の組織観察の結果、肢芽間葉細胞の分裂細胞数が Leflunomide 曝露により顕著に減少していることが明らかになったことから、Leflunomide の DHODH 及び PTK 阻害作用が肢芽の間葉細胞の増殖抑制を介して四肢における奇形を引き起こしている可能性が示唆された (Ryou Fukushima *et al.*, Reproductive Toxicology, 2009, submitted)。

以上の結果から、免疫抑制剤である Leflunomide の催奇形性メカニズムを明らかにすることができた。Leflunomide の器官形成期の反復投与及び臨界期の単回投与により、全身に様々な異常が引き起こされることが明らかとなり、これらの異常は、Leflunomide の薬理作用である、DHODH 及び PTK 阻害作用に起因していることが示唆され、これらの作用が胚・胎子の発生に影響を及ぼし、催奇形性を惹起する原因のひとつであることが明らかとなった。今後、本研究が様々な化合物に幅広く適応され、多くの化合物による催奇形性メカニズムのデータベースへと発展することによって、より安全な医薬品の効率的な創製に貢献する端緒となることが期待される。

氏名	福 島 亮		
論文 題目	Elucidation of teratogenic mechanisms of immunosuppressant Leflunomide in mice マウスにおける免疫抑制剤 Leflunomide の催奇形性メカニズムの解明		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	北 川 浩
	副 査	教 授	河 野 潤 一
	副 査	教 授	星 信 彦
	副 査		
	副 査		
要 旨			
Leflunomide の薬理作用はピリミジンヌクレオチドの生合成に必須な dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) および protein tyrosine kinase (PTK) の阻害作用であり、本薬剤は自己免疫作用および破軟骨細胞の異常賦活化による関節破壊が原因である慢性リウマチの治療または症状の緩和に用いられている。しかしながら、非臨床試験の結果、Leflunomide はラットおよびウサギにおいて催奇形性を示すことが報告されており、ヒトではアメリカ食品医薬品局(FDA)により pregnancy category X の医薬品に指定されている。Leflunomide の薬理作用の比較から、催奇形性には DHODH 阻害作用が関与している可能性が推察されるものの、この点については明らかにされていない。そこで本論文では、免疫抑制剤である Leflunomide のマウスに対する催奇形性を詳細に調べ、そのメカニズムを解明している。 本論文は6章からなり、第1章では Leflunomide の薬理作用および催奇形性について述べられており、本研究における目的が記載されている。 第2章では、マウスにおける Leflunomide の催奇形性を検討するため、胚の器官形成期(妊娠6～15日)の妊娠マウスに Leflunomide を10, 30 または 70 mg/kg/日 で反復経口投与し、胚・胎子の生存性、子宮内発育および催奇形性について詳細に調べている。その結果、70 mg/kg 投与群では全ての胚が死亡し、30 mg/kg 投与群では顕著な胚致死性および子宮内発育抑制に加えて、複合的な奇形を高頻度でみとめている。すなわち、生存胎子の外表の観察では、主に神経管閉鎖障害による外脳、口蓋裂および尾部の形態異常、骨格では頸椎から仙椎、肋骨および胸骨片の異常をみとめ、内部器官では心室中隔膜性部欠損および動脈管遺残に加えて、四肢の異常を散見している。これらのことから、マウスの器官形成期に 30 mg/kg/日 の Leflunomide を反復投与することにより、胚致死性作用および子宮内発育抑制作用に加えて、主に頭顔面部、軸骨格および心血管系に奇形が出現することを明らかにしている。また、ラットで形態異常が報告されてきた 10 mg/kg 投与で、マウスでは Leflunomide 起因性の異常をみとめていないこと、妊娠マウスにおける Leflunomide の血中濃度が同用量に換算した非妊娠雌ラットに比べて高いこと、さらに、マウスにおける DHODH の阻害作用はラットに比べて 1/5 程度であることから、ラットおよびマウス間での催奇形性の種間差は、Leflunomide の血中濃度および DHODH 阻害作用の差に起因する可能性を考察している。(Ryou Fukushima <i>et al</i>, Reproductive Toxicology, 2007, 27:310-316)。 第3章では、第2章で明らかにした奇形の発現臨界期を検討するため、妊娠6～11日のマウスに 50 mg/kg の Leflunomide を単回経口投与し、催奇形性を調べている。その結果、妊娠7日投与群では胚における神経管閉鎖障害に起因する頭顔面部の異常をみとめ、さらに妊娠9日投与群では口蓋裂、妊娠10日投与群では口蓋裂、四肢および尾部の異常、妊娠11日では四肢の異常をみとめている。			

氏名	福 島 亮
----	-------

骨格に関しては、妊娠 7～10 日投与群で脊柱の異常をみとめ、内部器官では、妊娠日および 9 日投与群で心血管系の異常をみとめている。これらの結果から、Leflunomide はほぼ全身の器官の形態形成に異常を引き起こし、様々な器官の正常発生を幅広く阻害することを明らかにするとともに、ほとんどの奇形の発現臨界期は各器官における形態形成期であることを明らかにしている (Ryou Fukushima *et al*, Congenital Anomalies, 2009, 49:20-26)。

第 4 章では、Leflunomide の催奇形性メカニズムを検討するため、ピリミジンヌクレオチドの前駆物質である uridine を Leflunomide と併用投与し、胚組織中のヌクレオチド量の変化および奇形発現への影響を調べている。すなわち、70 mg/kg の Leflunomide を妊娠 10 日に単回投与した群、Leflunomide 投与の 0.5, 4, 9 および 24 時間後または 0.5 および 4 時間後に uridine 1000 mg/kg/回を腹腔内投与した Leflunomide と uridine の併用投与群、および uridine のみを投与した群を比較した結果、Leflunomide 単回投与群ではすべての胎子に全身性の複合異常をみとめたが、Leflunomide と uridine の併用投与群では一部の指趾異常を除いてほとんどの奇形発現が顕著に抑制され、その抑制程度は uridine の併用回数に依存することをみとめている。また、胚組織中のピリミジンヌクレオチド濃度は Leflunomide のみの群では著しく減少するが、Leflunomide と uridine の併用投与群では回復することをみとめている。これらの結果から、DHODH 阻害作用が Leflunomide の催奇形性に関与することを明らかにしているが、肢芽の奇形等の発現が uridine によって抑制されないことから、他のメカニズム、すなわち PTK 阻害の関与の可能性を考察している (Ryou Fukushima *et al*, Toxicological Sciences, 2009, 108:419-426)。

第 5 章では、第 4 章の実験結果から想定された DHODH 阻害作用以外の催奇形性のメカニズムについて明らかにするため、妊娠 10 日のマウスに 70 mg/kg の Leflunomide を単回経口投与して、投与後 4 および 24 時間で胚の肢芽組織を採取し、肢芽における DNA microarray を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施している。その結果、Leflunomide 投与によりコレステロール合成酵素をコードする遺伝子の発現低下をみとめたが、肢芽におけるコレステロール濃度に変化をみとめなかったことから、この遺伝子発現の変化は催奇形性には寄与しないことを考察している。一方、転写因子ないし転写因子を制御する遺伝子の発現低下をみとめたことや、PTK は細胞増殖因子、サイトカインなどのレセプターの活性化およびシグナル伝達を亢進する酵素で、Leflunomide は線維芽細胞増殖因子、血小板増殖因子や上皮細胞増殖因子の受容体の PTK 作用およびその下流のシグナル伝達を阻害することから、Leflunomide 投与による転写関連遺伝子の発現低下によって生じた PTK 阻害が四肢等における催奇形性に関与している可能性を考察している。また、肢芽の組織観察の結果、肢芽間葉細胞の分裂頻度が Leflunomide 曝露により顕著に減少したことから、Leflunomide の DHODH の阻害作用に加えて PTK 阻害作用が肢芽の間葉細胞の増殖抑制を介して四肢に奇形を引き起こしている可能性を考察している。(Ryou Fukushima *et al*, Reproductive Toxicology, 2009, submitted)

以上、本論文では、従来不明であった免疫抑制剤 Leflunomide の催奇形性メカニズムの詳細について明らかにしており、今後、本研究が様々な化合物による催奇形性メカニズムのデータベースの基礎となつて、より安全な医薬品の効率的な創製に貢献する端緒となることが期待される。

したがって、本論文は人や動物における薬剤開発や治療の分野に新たな基礎的知見を提供するとともに、畜産学、獣医学および医学の発展に大きく貢献するものと考えられ、価値ある研究成果の集積であるとみとめる。よって学位申請者の福島 亮氏は、博士 (農学) の学位を得る資格であると認める。