

京都大学	博士（薬科学）	氏名	張 綺悦
論文題目	Identification of cAMP/CREB signaling pathway as a potential biomarker and therapeutic target for drug-induced liver injury （薬剤性肝障害に対するバイオマーカーおよび治療標的としてのcAMP/CREBシグナル経路の同定）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>Drug-induced liver injury (DILI), a commonly recognized cause of acute liver injury, is one of the main reasons for drug failure in the development phase and the withdrawal of drugs from the market. Despite efforts for DILI prediction, it remains a worrisome and tough issue because at least 6 mechanisms are involved in DILI, including cell injury/death, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and accumulation of fatty acids, most of which are specific, unpredictable, and dose-independent according to the pharmacological effects of drugs. Conventional animal studies for the assessment of human hepatotoxicity have obstacles such as cross-species extrapolation, resulting in low concordance and poor prediction of human hepatotoxicity. Therefore, there is a pressing need for finding reliable biomarkers and targets to improve the accuracy of <i>in vitro</i> methods for DILI prediction and clinical therapy efficacy, thereby reducing the cost of preclinical drug development and improving the safety of clinical medication. In this study, CREB was identified as a potential marker for DILI, and its prediction robustness and treatment utility were further validated. The research content will be discussed across three chapters.</p> <p>Chapter 1. Toxicogenomic analysis for identification of transcription factors associated with drug-induced liver injury</p> <p>Toxicogenomics (TGx), aimed at applying comprehensive technologies to investigate the adverse effects of environmental and pharmaceutical chemicals on human health, provides an unprecedented opportunity for the clarification of toxicity mechanisms and biomarker discovery in drug risk assessment. However, transcriptome assays, key TGx approaches, are not ideal for the screening of large numbers of exploratory compounds in early drug discovery. Since changes in gene expression are primarily related to the activity of transcription factors (TFs), this study aimed to identify the DILI-relevant TFs from the TGx data in the Open TG-GATEs dataset by using the gene set enrichment analysis (GSEA). It focuses on gene sets, which are defined as groups of genes that share common biological functions or regulations based on prior biological knowledge. Results showed that the R-value of each gene for each of the four treatment conditions was not strongly suggestive of an association with DILI. While GSEA of preranked gene lists based on R values highlighted four DILI-relevant TFs, including CREB, NRF2, ELK-1, and E2F.</p> <p>Chapter 2. Assessment of transcription factors for DILI prediction markers in reporter gene assay</p> <p>The usefulness of the TFs identified in Chapter 1 as a DILI prediction marker was experimentally validated in the reporter gene assay which is most commonly used for monitoring the dynamics of gene expression and regulation. The assay provides high sensitivity, robustness, wide linearity, and the ability to rapidly screen a large number of samples on multi-well plates. Using ten drugs with already assigned DILI risks, reporter gene assays were conducted in HepG2 cells in the presence of the S9 mix. Weak correlations were observed between NRF2 activity and DILI risk, whereas strong correlations were noted between CREB activity and DILI risk. Moreover, CREB activation associated with three Withdrawn/Black box Warning drugs was reversed by pretreatment with a PKA inhibitor. In addition, a stable cell line with a CREB reporter was developed for efficient screening. Further validation using three top-ranking drugs detected by RUCAM-based DILI assay</p>			

(ritonavir, atorvastatin, and diclofenac) showed strong responses in CREB activation. Therefore, the developed stable cell line exhibited a stable and robust response, characterized by elevated CREB activity, to extracellular toxic stimuli.

Chapter 3. Suppression of atorvastatin-induced hepatotoxicity by activating cAMP/CREB signaling pathway

Atorvastatin (ATO) is a commonly prescribed and widely used 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor for treating hypercholesterolemia. It is also one of the most frequently indicated statins, known to carry a higher risk of drug-induced liver injury. However, the underlying mechanisms of atorvastatin-induced liver injury are complex, poorly understood, resulting in limited options for treatment. The present study used a CYPs-UGT1A1 KI-HepG2 cell line for the atorvastatin-induced liver injury research. Compared with the wild-type HepG2 cells, it has been proven more sensitive to DILI in *in vitro* research. Atorvastatin caused lower cell viability in the CYPs-UHT1A1 KI-HepG2 cells compare with the wild-type. It also strongly increased caspase-3 activity. Subsequent investigation showed that an adenylyl cyclase activator, forskolin partially reversed the cytotoxicity induced by atorvastatin, being in good agreement with the fact that elevation of cAMP protects hepatocytes against various harmful stimuli.

Collectively, CREB might be a sensitive biomarker for DILI prediction, and its response to stress induced by high DILI-risk drugs might be primarily regulated by the PKA/CREB signaling pathway. The utility of the stable cell line with a CREB reporter was also validated to be a promising tool for rapid screening in the pre-clinical drug development phase. Atorvastatin induces cytotoxicity in the HepG2 cells with introduced major drug metabolizing enzymes while activation of adenylyl cyclase protects against atorvastatin-induced liver injury.

(論文審査の結果の要旨)

薬剤誘発性肝障害 (DILI) は医薬品の開発での失敗や市場からの撤退の主要因の一つとなっている。細胞の損傷/死、酸化ストレス、ミトコンドリアの機能不全、脂肪酸の蓄積などが DILI に関与すると知られているが、特異体質性で依然として発症予測が困難とされている。したがって、信頼性の高いバイオマーカーと障害回避のための標的発見が急務となっている。本研究では、CREB が DILI の潜在的なマーカーであることを同定し、その予測の堅牢性と治療の有用性の検証がなされた。

第 1 章では、トキシコゲノミクス (TGx) 解析によって DILI に関連する転写因子の同定が試みられた。TGx 解析は、網羅的な遺伝子発現解析を通じて、薬物毒性に対するメカニズム解明やバイオマーカー検出に貢献してきた。しかし、TGx に代表的なトランスクリプトーム解析は、創薬初期における大量の探索化合物をスクリーニングする目的には適さない。そこで、申請者は、遺伝子発現が転写因子によって制御される点に着目し、まず、DILI に関連する転写因子の同定を行った。TGx データベースの Open TG-GATEs からヒト肝細胞への薬剤暴露実験データを抽出し、相関解析を行ったところ、個々の遺伝子レベルでは薬剤の肝障害性と発現変動との間に強い相関は認められなかった。しかし、相関係数でランク付けし、遺伝子セット濃縮解析を行った結果、CREB、NRF2、ELK-1、および E2F が有意な DILI 関連転写因子として抽出された。

第 2 章では、第 1 章で特定された転写因子が DILI 予測マーカーとなり得るかをレポーター遺伝子アッセイにより確認した。DILI リスクがラベルされている 10 種の既知薬剤を使用し、HepG2 細胞において S9 ミクロソーム存在下レポーター遺伝子アッセイを実施したところ、CREB 活性と DILI リスクとの間に強い相関が認められた。さらに、市場撤退あるいは FDA 黒枠警告の薬物について解析したところ、CREB 活性化には Protein kinase A が関与することが示された。また、CREB レポーターの安定細胞株を開発し、より効率的な DILI スクリーニングモデルとしての可能性を提示した。

第 3 章では、cAMP/CREB シグナル経路の活性化によりアトルバスタチン誘発性肝毒性を軽減できないかを評価した。アトルバスタチン (ATO) は、高コレステロール血症治療薬であるが、薬剤誘発性肝障害のリスクが高いことも知られている。薬物代謝酵素を導入した CYPs-UGT1A1 KI-HepG2 細胞株に対してアトルバスタチンを作用させたところ、野生型の HepG2 細胞に比べて細胞生存率が低下し、caspase-3 活性を強く増強することを明らかにした。さらに、アデニル酸シクラーゼ活性化剤フォルスコリンが、アトルバスタチン誘発細胞毒性を部分的に抑制することを証明した。

以上、申請者は、CREB が DILI 予測のための鋭敏なバイオマーカーであり、その上流のアデニル酸シクラーゼの活性化によって薬剤誘発性肝障害に対して保護できる可能性を示した。

よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 5 年 2 月 16 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、(令和 9 年 3 月 25 日までの間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降