

III 章 PGE₁ 投与がハロタン誘導性肝障害に与える影響の検討

III-A. 緒言

PGE₁ は肝障害モデル動物における様々なサイトカインの発現に影響を与えることで障害を軽減することが知られている。また PGE₁ は好中球の遊走、免疫複合体の貪食およびリソソームの放出を抑制すると言われている。そこでハロタン誘導性肝障害モデルマウスに PGE₁ を投与することで Th1、Th2 サイトカインの発現や好中球の浸潤が変化し、肝障害の程度に影響が現れるかについて検討した。

III-B. 研究方法

III-B-1 実験材料および実験試薬

PGE₁ のアピスタンディン注射用 500 μg は日本ケミファ (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬は I-B-1 準じた。

III-B-2 マウスへの PGE₁ およびハロタンの投与

I-2-2 の方法に従って BALB/c マウス (雌性、6 週齢; 日本 SLC) にハロタンを投与した。PGE₁ 投与群にはハロタンの投与から 6、9 および 12 時間後に 2.5

mg/kg body weight を単回腹腔内投与した。対照群には生理食塩水を 500 μL/kg body weight で投与した。ハロタンの投与から 24 時間後に下行大静脈より採血を行い III-B-3 で使用した。同時に肝臓を採取し、1.15%塩化カリウム溶液で洗浄後、III-B-4 で使用した。

III-B-3 血漿中 AST および ALT 値の測定

III-B-2 で得られた全血を用いて血漿中の AST および ALT 値を I-B-3 の方法に従って測定した。

III-B-4 Total RNA の調製

I-B-2 で得られた肝臓から total RNA を I-2-5 の方法に従って調製した。

III-B-5 RT 反応

III-B-4 で得られた total RNA を用い、I-B-6 の方法に従って RT 反応を行った。

III-B-6 Real-time RT-PCR

III-B-5 で得られた cDNA 試料を用い、I-B-7 の方法に従って mRNA の定量を行った。

III-C. 研究結果

III-C-1 ハロタン投与マウスの血漿試料の生化学検査

BALB/c マウスのハロタンおよび

PGE₁ 投与後の血漿試料中の AST および ALT の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig.13)。

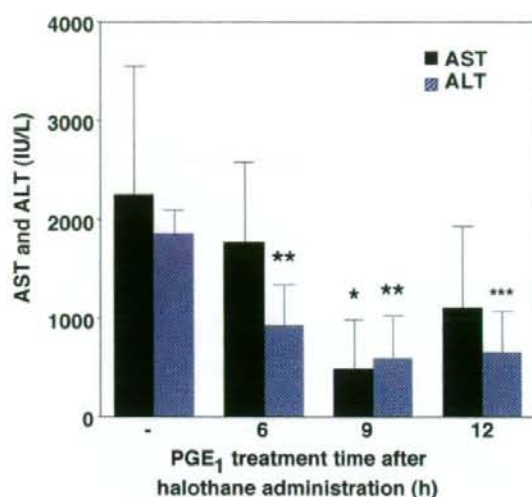


Fig. 13. Effects of PGE₁ treatment on plasma AST and ALT levels in halothane-treated BALB/c mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Mice were treated with prostaglandin E₁ (2.5 mg/kg, i.p.) 6, 9 and 12 h after the halothane administration. Plasma for the AST and ALT assay were collected 24 h after the halothane administration. The data are means \pm S.D. of three to four mice. Significantly different from prostaglandin E₁-non-treated group (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

BALB/c マウスはハロタン投与後 24 時間で高い AST 値を示すが、AST の上昇はハロタンの投与から 9 時間後に PGE₁ を投与することによって有意に減少した。またハロタンの投与から 6 および 12 時間後に PGE₁ を投与することによって AST は減少する傾向にあった。BALB/c マウスはハロタン投与後 24 時間で高い ALT 値を示すが、ALT の上昇はハロタンの投与から 6、9 および 12 時

間後に PGE₁ を投与することによって有意に減少した。

III-C-2 ハロタン投与マウス肝における炎症・免疫に関与する遺伝子の mRNA の変動解析

ハロタン投与後 24 時間のマウス肝における炎症・免疫に関与する遺伝子の mRNA の発現変動を、real-time RT-PCR を用いて検討した。各サンプルについて

T-bet、GATA-3、IFN γ 、IL-10、TNF α 、MIP-2 および β -actin の mRNA の量を測定し、T-bet 量には GATA-3 量を、IFN γ 量には IL-10 量を、TNF α および MIP-2 量には β -actin 量を補正に用いて対照群

に対する T-bet/GATA-3 比、IFN γ /IL-10 比 (Fig. 14)、TNF α / β -actin 比および MIP-2/ β -actin 比 (Fig. 15) の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した。

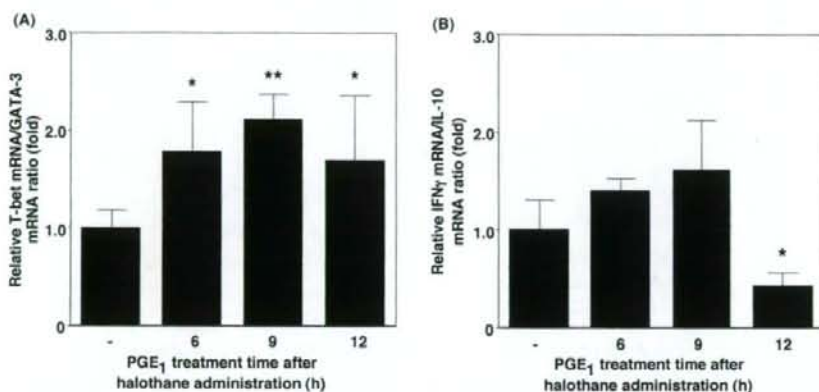


Fig. 14. Effects of PGE₁ treatment on hepatic mRNA expression levels in halothane-treated BALB/c mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Mice were treated with prostaglandin E₁ (2.5 mg/kg, i.p.) 6, 9 and 12 h after the halothane administration. Twenty four hours after halothane administration, mice were sacrificed and livers were removed for mRNA extraction. Relative mRNA expression was measured for T-bet and GATA-3 (A), IFN γ and IL-10 (B) by real-time RT-PCR. The data are means \pm S.D. of three to four mice. Significantly different from prostaglandin E₁-non-treated group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

ハロタンの投与後 24 時間で対照群と比べて有意に減少していた肝臓の T-bet/GATA-3 の mRNA の比は、ハロタンの投与から 6、9 および 12 時間後に PGE₁ を投与することで有意に増加した。ハロタンの投与後 24 時間で対照群と比べて減少していた肝臓の IFN γ /IL-10 の mRNA の比はハロタンの投与から 6 および 9 時間後に PGE₁ を投与することで

増加する傾向にあった。しかしハロタンの投与から 12 時間後に PGE₁ を投与した場合には有意な減少が認められた。ハロタンの投与後 24 時間で対照群と比べて増加傾向にあった肝臓の TNF α / β -actin の mRNA の比はハロタンの投与から 6、9 および 12 時間後に PGE₁ を投与することで減少する傾向にあった。ハロタンの投与後 24 時間で対照群と比べて有意に

増加していた肝臓の MIP-2/ β -actin の mRNA の比はハロタンの投与から 6 および 9 時間後に PGE₁ を投与することで

有意に減少するした。またハロタンの投与から 12 時間後に PGE₁ を投与することで減少する傾向にあった。

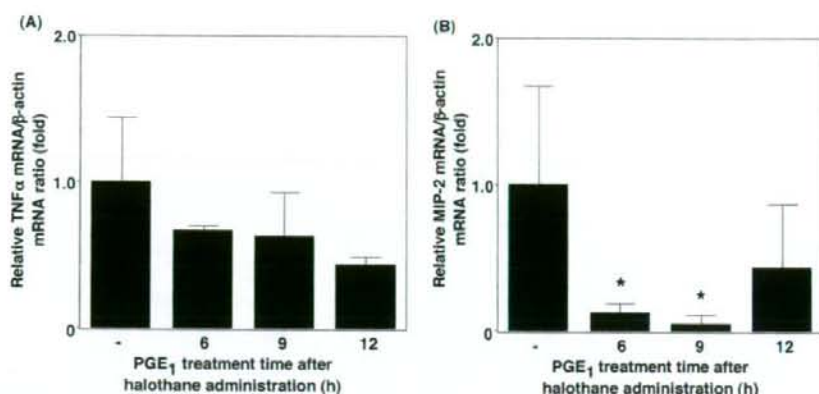


Fig. 15. Effects of PGE₁ treatment on hepatic mRNA expression levels in halothane-treated BALB/c mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Mice were treated with prostaglandin E₁ (2.5 mg/kg, i.p.) 6, 9 and 12 h after the halothane administration. Twenty four hours after halothane administration, mice were sacrificed and livers were removed for mRNA extraction. Relative mRNA expression was measured for TNF α / β -actin (A) MIP-2/ β -actin (B) by real-time RT-PCR. The data are means \pm S.D. of three to four mice. Significantly different from prostaglandin E₁-non-treated group (* p < 0.05).

III-D. 考察

本章において用いた PGE₁ 製剤は PGE₁ を α -シクロデキストリンで包接し、安定化したものであり、血小板凝集抑制作用および末梢血管拡張作用を有することから様々な末梢循環障害の治療に用いられている。

プロスタグランジンの細胞に対する保護作用に関しては古くから研究がなされており (Robert et al., 1979)、PGE₁ は四塩化炭素の投与によって誘導した劇症肝炎を軽減すること (Akamatsu et

al., 2001)、LPS によって誘導される肝障害を軽減し、血清中の IL-12 の減少、IL-10 の増加および肝臓のリンパ球の IL-4 の産生能を増加させることが報告されている (Mokuno et al., 1999)。また PGE₁ はクッパー細胞の活性化を抑制すること (Kayano et al., 1995)、好中球の細胞への接着を抑制すること (Lindemann et al., 2003)、ヒト好中球における ROS の産生を抑制すること (Talpain et al., 1995) が報告されており、様々なサイトカインや好中球などを介した炎症およ

び免疫反応との関連について研究がなされている。さらに PGE₁ は血行の改善作用を有しており、肝臓の虚血再灌流障害に対し保護的に働くことが報告されている (Hossain et al., 2003)。

本章では PGE₁ がハロタン誘導性肝障害にどのような影響を与えるかを検討した。PGE₁ の投与方法については臨床における用法と同様に点滴静注を採用した報告が多数存在するが、Mokuno ら (1999) の報告を参考に投与方法はより簡便な腹腔内単回投与とし、投与量もこの報告を参考に決定した。

I 章では BALB/c マウスにおいてハロタン投与後 24 時間で血漿中の AST および ALT が顕著に上昇することを示した。本章において PGE₁ の投与がハロタンによる肝障害にどのように影響を与えるかを検討したところ、PGE₁ の投与によって血漿中の AST および ALT が有意に減少することが明らかとなった。

また I 章ではハロタンを投与された BALB/c マウスにおいて中心静脈周囲の肝細胞の脱落および多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められ、好中球の肝臓への浸潤の増加が見られることを示した。本章において PGE₁ の投与の影響を検討したところ中心静脈周囲の肝細胞の脱落が認められたのに対し、MPO 陽性細胞

の浸潤は減少しており、PGE₁ の投与は好中球が肝臓へ浸潤するのを抑制することを明らかにした (data not shown)。また好中球の遊走に関連するケモカインである MIP-2 の mRNA の発現量が BALB/c マウスに対するハロタンの投与によって顕著に増加することを I 章において示したが、本章において PGE₁ の投与が MIP-2 の誘導を有意に抑制することを明らかにした。I 章において TNF α がハロタンの投与によって増加する傾向にあることを示したが、本章において PGE₁ の投与が TNF α の誘導を抑制する傾向にあることが明らかとなった。

さらに I 章において T-bet/GATA-3 および IFN γ /IL-10 の mRNA の発現量の比が BALB/c マウスに対するハロタンの投与によって有意に低下することを示したが、本章において PGE₁ の投与がこれらの比の減少を抑制することを明らかにした。しかしハロタンの投与から 12 時間後に PGE₁ を投与した場合には IFN γ /IL-10 の mRNA の発現量の比はハロタンのみを投与した群よりも有意に減少していた。6 時間および 9 時間後に投与した場合は異なった変化であったが、LPS 誘導性肝障害時において PGE₁ の投与が血清中の IL-10 濃度を増加させることが報告されており (Mokuno et al.,

1999)、IL-10 が誘導されやすい条件なのかも知れない。実際、ハロタン投与の12 時間後に PGE₁ を投与した場合には6 時間および 9 時間後に投与した場合と比べ、肝臓における IL-10/b-actin の mRNA の比が 4 倍程度高い値を示していた (data not shown)。

Th1 と Th2 のバランスを変動させることで様々な疾患が軽減または増悪されるという事象については多くの研究がなされており (Daniel et al., 2008; Kremer et al., 2006)、肝障害についても Th1 と Th2 のバランスの関与が報告されている (Masubuchi et al., 2008; Mokuno et al., 1999)。また TNF α 、IL-1 β 、MIP-2、KC、CINC-1 など様々なサイトカインやケモカインが好中球の肝臓への浸潤に関与することが報告されており (Ramaiah and Jaeschke, 2007; Jaeschke and Hasegawa, 2006)、1 章および本章の結果からハロタンによる肝障害についても Th1 と Th2 のバランスや MIP-2 の変動との関連があることが示唆された。

本検討においてはマウスにおけるハロタンの体内動態や代謝物の生成の系統差および PGE₁ の投与による影響を評価していないが、ハロタンの投与後 12 時間における BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスの肝臓中のトリフルオ

ロアセチル化タンパク質の生成に系統差がないことが Youら (2006) によって報告されており、本検討においてハロタンの投与後12時間の時点でPGE₁を投与した場合にも肝障害の軽減および遺伝子の発現の変動が見られたことから、トリフルオロアセチル化タンパク質の生成以降の炎症および免疫反応の違いがハロタンによる肝障害の系統差の原因であると考えられる。

本章における検討はハロタンによる肝障害は PGE₁ の投与によって軽減されることを明らかにした。また本章において検討した炎症・免疫に関連する遺伝子がハロタンによる肝障害の発症に関与する可能性が示唆された。マウスに Con A を投与すると TNF α が放出され、TNF α が MIP-2 を誘導することで肝臓への好中球の浸潤が増加すると言われており (Nakamura et al., 2001)、本検討においてもハロタンによる肝障害時には TNF α および MIP-2 が誘導され、PGE₁ によって障害を軽減した場合には誘導の抑制が認められた。ハロタンの投与によって T-bet/GATA-3 比や IFN γ /IL-10 比が減少し、Th1 と Th2 のバランスが Th2 側へと傾いていることが示唆されるにも関わらず、Th1 が産生すると言われてい (Afzali et al., 2007) TNF α の発現量

は本検討においてハロタンの投与によって増加傾向にあった。このことから $\text{TNF}\alpha$ が Th1 以外の細胞において誘導されている可能性および MIP-2 の誘導には $\text{TNF}\alpha$ 以外の因子が関与すること

が示唆された。そこで IV 章では Th1 とは別の $\text{TNF}\alpha$ を産生する T 細胞であり、MIP-2 の誘導に関与している Th17 についてハロタンによる肝障害との関与を検討した。

IV章 IL-17がハロタン誘導性肝障害に与える影響の検討

IV-A. 緒言

近年新たに発見されたTh1およびTh2とは異なるThサブセットであるTh17はIL-17を産生することで様々な炎症反応と関連することが報告されている。Th17はTh1やTh2と互いに抑制し合う関係にあると言われており、ハロタンの投与によるTh1サイトカインやTh2サイトカインの変動によって何らかの影響を受けているまたはTh17サイトカインがTh1やTh2を変動させている可能性がある。またTh17はTNF α を産生すること、IL-17はMIP-2を誘導することが報告されている。Th17とハロタン誘導性肝障害との関連を明らかにするために、本章ではTh17によって主に産生されるIL-17を抗IL-17モノクローナル抗体によって中和し、ハロタン誘導性肝障害に与える影響についての検討を行った。

IV-B. 研究方法

IV-B-1 実験材料および実験試薬

Ready-SET-GO! Mouse Interleukin-17A (IL-17A) はeBioscience, Incより購入し

た。抗マウスIL-17モノクローナル抗体500 μ gおよびラットIgG2aアイソタイプコントロールはR&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)より購入した。B

IV-2-2 ELISAによる血漿中のIL-17タンパク質量の変動解析

I-2-2およびIII-2-2で得られた全血からI-2-3の方法に従って血漿を調製し、Ready-SET-GO! Mouse Interleukin-17A (IL-17A)を用いてI-2-4の方法に従って血漿中のIL-17濃度の測定を行った。

IV-B-3 マウスへの抗IL-17抗体およびハロタンの投与

I-B-2の方法に従ってBALB/cマウス(雌性、6週齢;日本SLC)にハロタンを投与した。抗IL-17抗体投与群およびIgG2a投与群にはハロタンの投与の9時間後に100 μ g/mouseを単回腹腔内投与した。ハロタンの投与から24時間後に下行大静脈より採血を行いIV-B-4で使用した。同時に肝臓を採取し、1.15%塩化カリウム溶液で洗浄後、IV-B-5で使用した。

IV-B-4 血漿中ASTおよびALT値の測定

IV-B-3で得られた血漿中のASTおよ

びALT値をI-B-3の方法に従って測定した。

IV-B-5 Total RNA の調製

IV-B-3 で得られた肝臓から total RNA を I-2-5 の方法に従って調製した。

IV-B-6 RT 反応

IV-B-5 で得られた total RNA を用い、I-B-6 の方法に従って RT 反応を行った。

IV-B-7 Real-time PCR

IV-B-6 で得られた cDNA 試料を用い、I-B-7 の方法に従って mRNA の定量を行った。

IV-C. 研究結果

IV-C-1 ELISA による血漿中の IL-17 の定量

ハロタンの投与後 24 時間のマウス血漿中の IL-17 タンパク質量の変動を ELISA を用いて検討した。血漿中 IL-17 濃度の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 16)。

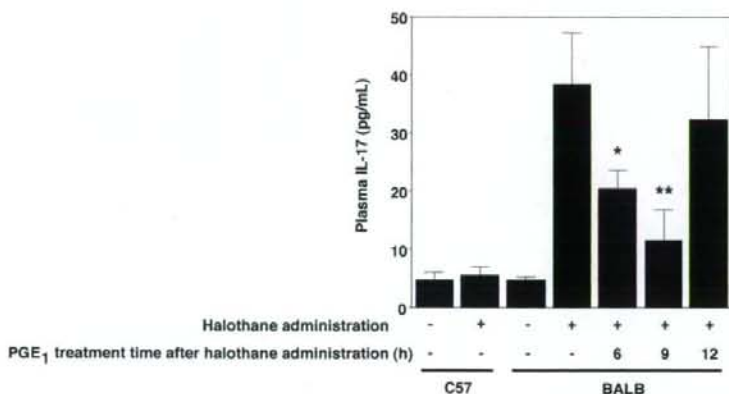


Fig. 16. Changes of plasma IL-17 levels in halothane-treated BALB/c and C57BL/6 mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Some BALB/c mice were treated with prostaglandin E₁ (2.5 mg/kg, i.p.) 6, 9, and 12 h after the halothane administration. Plasma were collected 24 h after the halothane administration and IL-17 concentration was measured using ELISA. The data are means \pm S.D. of three to ten mice. Significantly different from halothane-treated and prostaglandin E₁-non-treated group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

BALB/c マウスはハロタン投与後 24 時間において対照群と比べ、血漿中の

IL-17 濃度の顕著な増加が認められた。一方 C57BL/6 マウスにおいてはハロタ

ンの投与後 24 時間において対照群との間に有意な違いは認められなかった。

BALB/c マウスにおけるハロタン投与後 24 時間の血漿中の IL-17 濃度の上昇はハロタンの投与から 6 時間および 9 時間後に PGE₁ を投与することで有意に減少した。またハロタンの投与から 12 時間後に PGE₁ を投与した場合には有意ではないが血漿中の IL-17 濃度は減少する傾向

にあった。

IV-C-2 ハロタン投与マウスの血漿試料の生化学検査

BALB/c マウスのハロタンおよび抗 IL-17 抗体投与後の血漿試料中の AST および ALT の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 17)。

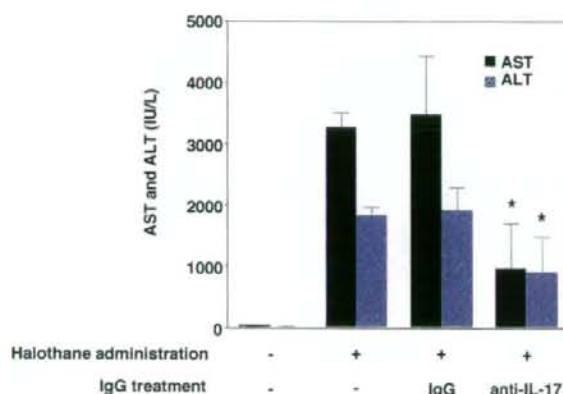


Fig. 17. Effects of anti-IL-17 antibody treatment on plasma AST and ALT levels in halothane-treated BALB/c mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Some mice were treated with anti-IL-17 antibody (100 μ g/mouse, i.p.) 9 after the halothane administration. Plasma for the AST and ALT assay were collected 24 h after the halothane administration. The data are means \pm S.D. of three to four mice. Significantly different from halothane-treated and IgG-treated group (* $p < 0.05$).

BALB/c マウスにおいてハロタン投与後 24 時間で顕著な AST 値の増加が認められるが、ハロタンの投与から 9 時間後に抗 IL-17 抗体を投与することによって AST 値は有意に減少した。一方 IgG2a の投与では AST 値に有意な変化は見ら

れなかった。また BALB/c マウスにおいてハロタン投与後 24 時間で顕著な ALT 値の増加が認められるが、ハロタンの投与から 9 時間後に抗 IL-17 抗体を投与することによって ALT 値は有意に減少した。一方 IgG2a の投与では ALT 値に有

意な変化は見られなかった。

IV-C-3 ハロタン投与マウス肝における炎症・免疫に関する遺伝子の mRNA の変動解析

ハロタン投与後 24 時間のマウス肝における炎症・免疫に関する遺伝子の mRNA の発現変動を、real-time RT-PCR を用いて検討した。各サンプルについて T-bet、GATA-3、IFN γ 、IL-10、TNF α 、MIP-2 および β -actin の mRNA の量を測定し、T-bet 量には GATA-3 量を、IFN γ 量には IL-10 量を、TNF α および MIP-2 量には β -actin 量を補正に用いて対照群

に対する T-bet/GATA-3 比、IFN γ /IL-10 比 (Fig. 18)、TNF α / β -actin 比および MIP-2/ β -actin 比 (Fig. 19) の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した。

対照群に比べ、ハロタン投与群、IgG2a 投与群において肝臓の T-bet/GATA-3 の mRNA の比の有意な減少が認められた。また抗 IL-17 抗体投与群においても有意ではないが T-bet/GATA-3 の mRNA の比の減少が認められた。しかしハロタン投与群と IgG2a 投与群および抗 IL-17 抗体投与群との間に T-bet/GATA-3 の mRNA の比の有意な差は見られなかった。

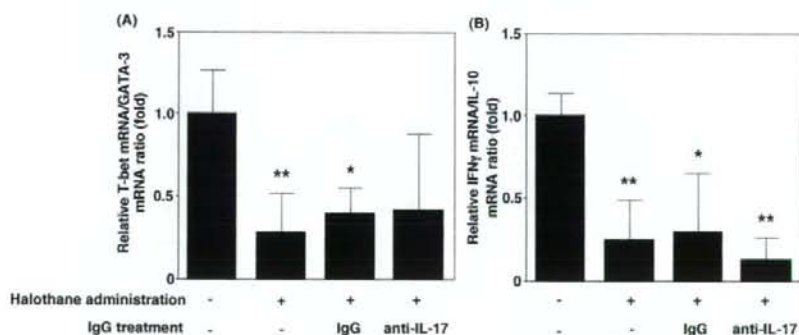


Fig. 18. Effects of anti-IL-17 antibody treatment on mRNA expression levels in halothane-treated BALB/c mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Some mice were treated with anti-IL-17 antibody (100 μ g/mouse, i.p.) 9 after the halothane administration. Twenty four hours after halothane administration, mice were sacrificed and livers were removed for mRNA extraction. Relative mRNA expression was measured for T-bet and GATA-3 (A), IFN γ and IL-10 (B) by real-time RT-PCR. The data are means \pm S.D. of three to five mice. Significantly different from halothane-non-treated group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

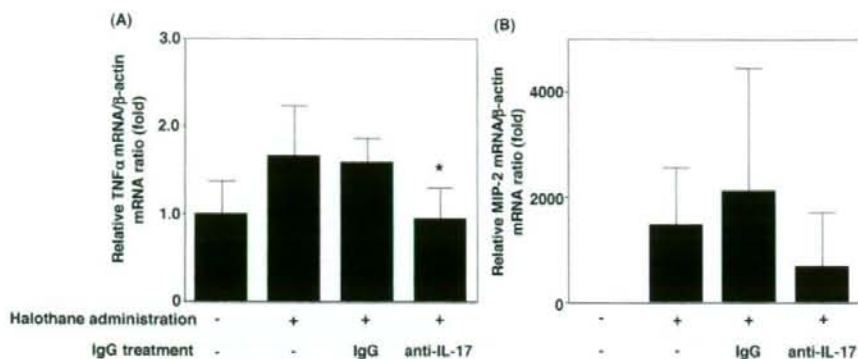


Fig. 19. Effects of anti-IL-17 antibody treatment on hepatic mRNA expression levels in halothane-treated BALB/c mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Some mice were treated with anti-IL-17 antibody (100 μ g/mouse, i.p.) 9 after the halothane administration. Twenty four hours after halothane administration, mice were sacrificed and livers were removed for mRNA extraction. Relative mRNA expression was measured for TNF α and β -actin (A), MIP-2 and β -actin (B) by real-time RT-PCR. The data are means \pm S.D. of three to five mice. Significantly different from halothane-treated and IgG-treated group (* $p < 0.05$).

対照群に比べ、ハロタン投与群、IgG2a投与群および抗IL-17抗体投与群において肝臓のIFN γ /IL-10のmRNAの比の有意な減少が認められた。しかしハロタン投与群とIgG2a投与群および抗IL-17抗体投与群との間にIFN γ /IL-10のmRNAの比の有意な差は見られなかった。

対照群に比べ、ハロタン投与群およびIgG2a投与群においてTNF α / β -actinのmRNAの比は増加する傾向にあった。IgG2a投与群に比べ、抗IL-17抗体投与群においてTNF α / β -actinのmRNAの比の有意な減少が認められ、対照群と同程度となった。

対照群に比べ、ハロタン投与群におい

てMIP-2/ β -actinのmRNAの比は増加する傾向にあった。抗IL-17抗体投与群においてMIP-2/ β -actinのmRNAの比はハロタン投与群に比べ、減少する傾向にあったが、IgG2a投与群ではそのような減少傾向は認められなかった。

IV-D. 考察

IL-17にはIL-17AからIL-17Fまでの6つのファミリー分子が存在することが知られている (Moseley et al., 2003)。IL-17 (IL-17A) についてはこれまで様々な研究がなされており、IL-17は感染性微生物から宿主を守る役割を果たすが (Kelly et al., 2005; Ye et al., 2001;

Huang et al., 2004)、一方で IL-17 の誘導はリウマチ性関節炎、結腸炎および多発性硬化症などの自己免疫性疾患との関連が示唆されている (Langrish et al., 2005; Kotake et al., 1999)。IL-17 は KC (CXCL1)、MIP-2 (CXCL2) および LIX (CXCL5) などのケモカインを強く誘導すること (Prause et al., 2003; Ruddy et al., 2004; Shen et al., 2005; Witowski et al., 2000) および好中球の浸潤を促進させ様々な組織の炎症に関与することが報告されている (Caldwell et al., 2005; Miyamoto et al., 2003)。IL-17F が様々な細胞から産生されるのに対し、IL-17A の主な産生細胞は Th17 であると言われている。Th1 および Th2 とは異なるサブセットとして近年発見された Th17 は自己免疫性疾患、アレルギー疾患および細胞外増殖性細菌に対する応答などにおいて中心的な役割を果たしていることが明らかとなっており (Ishigame et al., 2009)、またこれまで Th1 病であると考えられてきたリウマチ性関節炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患および乾癬が実際は Th17 に関連していることが報告されている (Weaver et al., 2007)。IFN γ や IL-4 は Th17 が IL-17 を産生するのを抑制しており (Park et al., 2005b)、IL-17 も Th1 および Th2 サイトカインを抑制する

ことから Th1、Th2 および Th17 は互いに制御し合う関係にあることが示唆されている (Schnyder-Candrian et al., 2006; Yi et al., 2008)。本検討に用いた C57BL/6 マウスと BALB/c マウスとでは Th1 と Th2 の応答性に系統差があり、微生物の感染に対する抵抗性が異なること古くから知られているが (Heinzel et al., 1989)、Th17 の応答に関する系統差については明らかになっていない。しかし BALB/c マウスと C57BL/6 マウスとではリウマチ性関節炎 (Nandakumar and Holmdahl, 2006) および多発性硬化症 (Kigerl et al., 2006) などの免疫性疾患の実験動物モデルの病態が異なることが報告されており、Th17 の性質に違いがある可能性は十分に考えられる。また両マウスにおいて Th1 と Th2 の性質が異なることが、間接的に Th17 の制御に異なる影響を与えているかも知れない。

III 章までに BALB/c マウスと C57BL/c マウスとではハロタン誘導性肝障害の発症に系統差があり、感受性を示す BALB/c マウスにおいて特に Th1 と Th2 の応答性が Th2 にシフトしている可能性があることを示してきた。しかし Th2 の応答が優位であるにも関わらず、Th1 によって産生すると言われている TNF α の肝臓における mRNA の発現はハロ

タンを投与したBALB/cマウスにおいて誘導される傾向にあり、Th1以外の細胞によるTNF α の発現が誘導されていることが示唆された。TNF α がMIP-2の誘導に関与することが報告されており(Nakamura et al., 2001)、本研究においてTNF α の下流の因子については検討を行っていないが、ハロタンを投与することで見られたTNF α の誘導はBALB/cマウスとC57BL/6マウスにおいて同程度であり、MIP-2の顕著な誘導はTNF α のみでは説明することはできないと考えられた。そこで本章ではTNF α を発現し、IL-17を介してMIP-2を含む様々なケモカインの誘導に関与するTh17について検討を行った。

最初に肝臓にTh17が浸潤している可能性を考え、肝臓におけるIL-17およびIL-17FのmRNAの発現量の変化について検討を行ったがIL-17は測定条件を確立することができず、IL-17Fについてはハロタンの投与によって顕著な変化はみられなかった(data not shown)。ROR γ tはTh17のマスター遺伝子であると言われており(Ivanov et al., 2006)、Th17への分化において中心的な役割を果たしているが胸腺以外の組織には発現しておらず、肝臓においてもROR γ tのmRNAの発現は確認されていない(He

et al., 1998)。本検討ではハロタンの投与によって肝障害を誘導した場合には肝臓においてIL-17のmRNAの発現を確認できることを期待したが、それに反した結果となり、様々な細胞によって産生されるIL-17Fの発現のみ確認された。IL-17FはIL-17ファミリーの中では最もIL-17と相同性が高いと言われているが、Th17関連疾患に対する寄与は低いと考えられており(Ishigame et al., 2009)、肝臓におけるIL-17およびIL-17FのmRNAに関する検討は保留とした。

次にELISAによる肝臓中および血漿中のIL-17タンパク質の検出を行い、BALB/cマウスおよびC57BL/6マウスに対してハロタンを投与することによる変動を検討した。肝臓のライゼートを調製し、ELISAを行ったところ全てのサンプルにおいて定量限界である500 pg/mLを超えてしまい、測定することができなかった(data not shown)。組織中のサイトカインをELISAによって測定することは難しく、報告が非常に限られているが、それは組織からの抽出に用いる界面活性剤の選択によって非常に影響を受けやすいためだと言われている(Matalka et al., 2005)。しかし本検討においては抽出に界面活性剤は用いていないため、抽出効率は悪くなったことが予

想されるが抗体の反応性に影響は与えていないと考えられる。肝臓において IL-17 タンパク質が非常に高濃度に存在している、または肝臓中に ELISA による測定に影響を与える物質があるのかも知れない。一方、血漿中の IL-17 タンパク質については、BALB/c マウスにおいてハロタン投与後 24 時間で有意な増加が認められ、C57BL/6 マウスにおいてはハロタンの投与による変動は認められなかった。血漿中の IL-17 タンパク質は BALB/c マウスにおいてのみ変動が見られ、ハロタンによる肝障害の発症または増悪に寄与している可能性が示唆された。

IL-17 が MIP-2 を誘導することで肝臓に好中球が浸潤し、ハロタン誘導性肝障害が発症または増悪するという仮説を検証するために抗マウス IL-17 モノクローナル抗体を BALB/c マウスに投与した。LPS によって誘導した肺の炎症や虚血再灌流による肝障害において、抗 IL-17 抗体は MIP-2 などのケモカインの誘導や好中球の浸潤を抑制することが報告されている (Ferretti et al., 2003; Caldwell et al., 2005)。その他いくつかの報告を参考に抗 IL-17 抗体の投与方法を決定した (Miyamoto et al., 2003; Park et al., 2005b)。

本章においてハロタン誘導性肝障害

を発症する BALB/c マウスに抗 IL-17 抗体を投与することによって血漿中の AST および ALT が有意に減少することを明らかにした。一方、IgG2a の投与では AST および ALT の有意な減少は見られなかった。よってハロタン誘導性肝障害の軽減は抗 IL-17 抗体に特異的な事象であり、IL-17 はハロタンによる肝障害の誘導に関与することが示された。本検討においてハロタンの投与後に抗 IL-17 抗体を投与することで肝臓の T-bet/GATA-3 の mRNA の比や IFN γ /IL-10 の mRNA の比に有意な変化は認められなかった。第 1 章において、これらの比がハロタンの投与後 3 時間から減少することが示されており、抗 IL-17 抗体を投与しても変動が見られないのは抗体の投与が遅かったためかも知れない。しかし血漿中の IL-17 タンパク質はハロタンの投与後 3、6 および 12 時間では変動が見られなかったことから (data not shown)、Th1 と Th2 の変動は IL-17 以外の経路によって誘導されたため、抗体による影響が現れなかったとも考えられる。一方、抗 IL-17 抗体の投与によって肝臓の TNF α / β -actin の mRNA の比は IgG2a 投与に比べ有意に減少しており、ハロタンの投与による TNF α の発現の変動は Th1 ではなく

Th17 に由来することが示唆された。また肝臓の MIP-2/ β -actin の mRNA の比も抗 IL-17 抗体の投与によって減少傾向にあり、IL-17 によって誘導された MIP-2 がハロタンによる肝障害に関与することが示唆された。抗 IL-17 抗体を投与したマウスについて肝障害の程度と MIP-2 の mRNA の発現量を個体ごとに評価すると、MIP-2 の mRNA の誘導が強く抑制されたマウスほど AST および ALT が低値を示しており (data not shown)、MIP-2 が肝障害の発症または増悪に寄与するという仮説を支持していた。IL-17 によって誘導される他のケモカインについても MIP-2 と同様に変動し、肝障害に寄与している可能性がある。今回、抗 IL-17 抗体の投与時間の詳細な検討を行っていないため、適切な時間に投与することでハロタンによる肝障害を、より軽減できると考えられる。

血漿中の IL-17 タンパク質、肝臓中の TNF α および MIP-2 の mRNA は、第 1 章で見られた Th1 と Th2 の変動の後で誘導されており、ハロタンによる IL-17、TNF α および MIP-2 の誘導は Th1 と Th2 の影響を受けている可能性が示唆された。また抗 IL-17 抗体を用いた検討によってハロタンによる肝障害の誘導に対して IL-17 が寄与することが明らかとな

った。IL-17 を主に産生する Th17 の系統差の存在は明らかとはされていないが、BALB/c マウスと C57BL/6 マウスのハロタンに対する感受性の違いは Th17 の応答性に系統差があることを示唆している。野生型のマウスにおいては BALB/c マウスがハロタンによって肝障害を発症し、C57BL/6 マウスが耐性を示すが C57BL/6 マウスの IL-10 をノックアウトすることで肝障害が発症するようになり、また遺伝子組み換え IL-10 タンパク質を野生型の BALB/c マウスに投与すると肝障害が軽減されることが報告されている (Feng et al., 2009)。また IL-10 は Th17 サイトカインの産生を抑制すると言われており (Gu et al., 2008)、これらの報告は本研究において明らかとなったハロタン誘導性肝障害に対する IL-17 の関与を支持していると考えられる。

虚血再灌流による肝障害、アルコール性肝炎、 α ナフチルイソチオシアネートおよびアセトアミノフェンによる肝障害などが好中球の浸潤によって引き起こされる、または悪化することが報告されており (Ramaiah and Jaeschke, 2007)、さらにラニチジン投与によってヒトで発症する個体特異的な肝障害の実験モデルラットにおいても好中球の浸潤が認められている (Luyendyk et al., 2003)。

虚血再灌流による肝障害については IL-17 が関与することを示唆した研究がなされており (Caldwell et al., 2005)、ヒトにおける個体特異的な肝障害と IL-17 が関与する可能性が示唆される。また血清中の IL-17 がヒトにおける急性肝障害の有用なマーカーとなり得ること (Yasumi et al., 2007) が報告されており、肝障害に対する IL-17 の重要性を支持している。

しかし Th17 の分化についてヒトとマウスとでは完全に異なっていると言われており (Acosta-Rodriguez et al., 2007)、この他にも Th17 の性質については様々な種差の存在が報告されている (Romagnani, 2008)。よって実験動物で得られた結果をヒトへ外挿する場合にはこのような種差に関して考慮しなければならないと考えられる。

ヒトおよびマウスにおいてハロタンによる肝障害時に様々な自己抗体が生成されるが、血清から自己抗体が検出されるのは肝障害の発症後であり、ハロタンによる肝障害は自己抗体の生成とは異なるメカニズムによって誘導されることが示唆されている (Njoku et al., 2005)。ハロタンによる肝障害の発症は複数回曝露の例が多いことから、自己抗体は肝障害の発症ではなく増悪に寄与

しているのかも知れない。本研究ではハロタンによる急性肝障害動物モデルにおいて IL-17 を介したメカニズムの存在を明らかにしており、肝障害の発症に対する Th17 の寄与が考えられる。

IL-17 の上流には stat-3 や ROR γ t などの転写因子や核内受容体があり (Nishihara et al., 2007; Ivanov et al., 2006)、下流には p38 MAPK、ERK、C/EBP、NF- κ B および AP-1 など様々な経路が存在しており、遺伝子の発現を調節している (Cortez et al., 2007)。また p38 MAPK と NF- κ B は IL-10 ノックアウトマウスにハロタンを投与することで活性化されることがわかっている (Feng et al., 2009)。p38 MAPK および NF- κ B が MIP-2 の誘導に関与することが報告されており (Hung et al., 2006; Galloway et al., 2008)、これらの経路のハロタンによる肝障害への寄与が考えられる。IL-17 に関連する様々な因子について検討することで様々な肝障害のメカニズムが明らかになるのではないかと考えられる。

E. 結論

本研究によってハロタン誘導性肝障害の発症には Th1 と Th2 のバランスの変動および IL-17 を介した MIP-2 の誘導に

よる好中球の肝臓への浸潤が関与しており、これらの変動は PGE₁ の投与によって抑制されることを明らかにした。本研究は薬物誘導性肝障害のメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

G. 研究発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願；1件

特願 2009-075280 出願日：2009年3月25日

発明の名称：哺乳動物の薬物誘導性肝障害の抑制薬

参考文献

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, and Sallusto F (2007) Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* **8**: 942-949.

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, and Lord GM (2007) The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* **148**: 32-46.

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, and Frucht DM (2003)

Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* **23**: 147-161.

Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y, and Hashida M (2001) Synthesis and pharmacological activity of a novel water-soluble hepatocyte-specific polymeric prodrug of prostaglandin E₁ using lactosylated poly(L-glutamic hydrazide) as a carrier. *Biochem Pharmacol* **62**: 1531-1536.

Bajt ML, Knight TR, Lemasters JJ, and Jaeschke H (2004) Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine. *Toxicol Sci* **80**: 343-349.

Bourdi M, Chen W, Peter RM, Martin JL, Buters JT, Nelson SD, and Pohl LR (1996) Human cytochrome P450 2E1 is a major autoantigen associated with halothane hepatitis. *Chem Res Toxicol* **9**: 1159-1166.

Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, and Lentsch AB (2005) Divergent functions of CD4+ T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G969-976.

Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, and Scott FW (2003) T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods* **278**: 157-169.

Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente

- AJ, Steffensen B, Vincenti M, Barnes JL, and Chandrasekar B (2007) IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP- β , NF- κ B, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H3356-3365.
- Cousins MJ, Plummer JL, and Hall PD (1989) Risk factors for halothane hepatitis. *Aust N Z J Surg* **59**: 5-14.
- Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, and Stein JM (2008) Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* **324**: 23-33.
- Feng D, Wang Y, Xu Y, Luo Q, Lan B, and Xu L (2009) Interleukin 10 deficiency exacerbates halothane induced liver injury by increasing interleukin 8 expression and neutrophil infiltration. *Biochem Pharmacol* **77**: 277-284.
- Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, and Trifilieff A (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* **170**: 2106-2112.
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, and Glimcher LH (2002) Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* **295**: 336-338.
- Fukunaga J, Abe M, Murai A, Akitake Y, Hosokawa M, and Takahashi M (2007) Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. *Int Immunopharmacol* **7**: 1852-1861.
- Furst SM, Luedke D, and Gandolfi AJ (1997) Kupffer cells from halothane-exposed guinea pigs carry trifluoroacetylated protein adducts. *Toxicology* **120**: 119-132.
- Galloway E, Shin T, Huber N, Eismann T, Kuboki S, Schuster R, Blanchard J, Wong HR, and Lentsch AB (2008) Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**: C514-520.
- Gu Y, Yang J, Ouyang X, Liu W, Li H, Yang J, Bromberg J, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC, and Xiong H (2008) Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol* **38**: 1807-1813.
- Hallquist N, Hakki A, Wecker L, Friedman H, and Pross S (2000) Differential effects of nicotine and aging on splenocyte proliferation and the production of Th1- versus Th2-type cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med* **224**: 141-146.
- Hamra JG and Yaksh TL (1996) Halothane inhibits T cell proliferation and interleukin-2 receptor expression in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **18**: 323-336.
- Hatano M, Sasaki S, Ohata S, Shiratsuchi Y,

- Yamazaki T, Nagata K, and Kobayashi Y (2008) Effects of Kupffer cell-depletion on Concanavalin A-induced hepatitis. *Cell Immunol* **251**: 25-30.
- He YW, Deftos ML, Ojala EW, and Bevan MJ (1998) ROR γ t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* **9**: 797-806.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, and Locksley RM (1989) Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* **169**: 59-72.
- Hoet P, Buchet JP, Sempoux C, Haufroid V, Rahier J, and Lison D (2002) Potentiation of 2,2-dichloro-1,1,1-trifluoroethane (HCFC-123)-induced liver toxicity by ethanol in guinea-pigs. *Arch Toxicol* **76**: 707-714.
- Hong JY, F Sato E, Hiramoto K, Nishikawa M, and Inoue M (2007) Mechanism of Liver Injury during Obstructive Jaundice: Role of Nitric Oxide, Splenic Cytokines, and Intestinal Flora. *J Clin Biochem Nutr* **40**: 184-193.
- Hossain MA, Izuishi K, and Maeta H (2003) Effect of short-term administration of prostaglandin E₁ on viability after ischemia/reperfusion injury with extended hepatectomy in cirrhotic rat liver. *World J Surg* **27**: 1155-1160.
- Huang W, Na L, Fidel PL, and Schwarzenberger P (2004) Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* **190**: 624-631.
- Hung CC, Chang CT, Tian YC, Wu MS, Yu CC, Pan MJ, Vandewalle A, and Yang CW (2006) Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory chemokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. *Nephrol Dial Transplant* **21**: 898-910.
- Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, and Iwakura Y (2009) Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* **30**: 108-119.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, and Littman DR (2006) The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**: 1121-1133.
- Jaeschke H and Hasegawa T (2006) Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* **26**: 912-919.
- Jenkins RE, Kitteringham NR, Goldring CE, Dowdall SM, Hamlett J, Lane CS, Boerma JS, Vermeulen NP, and Park BK (2008) Glutathione-S-transferase pi as a model protein