

200909001A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討
および予測評価試験系の開発研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横井 毅

平成22(2010)年5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討

および予測評価試験系の開発研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および予測評価試験系の
開発研究

横井 毅 ----- I

II. 分担研究報告

1. 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の *in vitro* 評価系の構築

横井 毅 ----- 1

2. ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与

横井 毅 ----- 29

3. 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序

横井 毅 ----- 55

4. グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討

中島 美紀 ----- 103

5. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究

横井 毅 ----- 115

6. ヒト hepatocyte nuclear factor 4 α の microRNA による制御は、
代謝酵素の発現や細胞周期を調節している

中島 美紀 ----- 141

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 167

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 171

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討

および予測評価試験系の開発研究

平成 21 年度 総括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

統括研究報告書

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および 予測評価試験系の開発研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

ヒトに初めて投与される開発候補薬や、市販後に多くの患者に投与されて初めて重篤な薬物誘導性臓器障害、特に肝障害が発現する場合が現在でも多く報告されており、創薬の大きな障害となっている。本研究では、薬物誘導性肝障害のメカニズムの解明と予測試験系の構築とその評価を目的とする。特にヒト肝における反応性代謝物の生成系を考慮した *in vitro* 細胞スクリーニング試験系と、ラット *in vivo* 試験系の作出と評価研究を行ってきた。主に以下の6項目について研究を行い当初の予定どおりの成果を挙げることが出来た。（1）免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の *in vitro* 評価系の構築： テルビナフィンまたはブテナフィン処置により、THP-1 細胞および HL-60 細胞の IL-8 および TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。さらに、PMA により分化させたマクロファージ様 THP-1 細胞においても、テルビナフィン処置により TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。これより、テルビナフィンはヒト単球系細胞やマクロファージによる炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を刺激し、炎症反応を惹起させる作用を有することが示唆された。テルビナフィンは THP-1 細胞の ERK1/2 および p38 MAPK 経路を活性化させること、テルビナフィンの処置による THP-1 細胞の IL-8 および TNF α 産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示された。今後、他の肝障害性薬物での研究や、テルビナフィンを用いた *in vivo* の研究を行なうことにより、薬物性肝障害の予測にさらに役立つ有用な情報が提供できると考えられる。（2）ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与： 本研究ではジクロキサシリン誘導性肝障害の発症には IL-4 などの Th2 因子の関与が示唆された。DK-PGD₂ 併用投与により肝障害の増悪が認められ、GATA-3 や MIP-2 mRNA の上昇が認められ、組織染色でもジクロキサシリン単独投与群では認められなかったネクロシスが認められた。本研究により、ジクロキサシリンによる肝障害の発症機序および、DK-PGD₂ 併用投与によって肝障害が増悪することを示した。本研究は薬物誘導性肝障害に IL-4 が関与することを示した最初の報告である。DK-PGD₂ 投与による肝障害の

増悪はいずれの薬物でも認められており、免疫系の関与する肝障害を高感度に検出する有用な方法になることが期待される。(3) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序： 本研究では、薬物誘導性肝障害に対する種々のエストロゲン関連化合物の肝保護作用を検討した。Ethinylestradiol (EE2)、Tamoxifen (TAM) および Raloxifene (RAL) の前投与により TA 誘導性肝障害の軽減が認められ、特に TAM で顕著であった。DNA マイクロアレイ解析の結果、monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2) の発現が TAM により顕著に誘導されたことに注目し詳細な検討を行った。Mmd2 の肝保護作用のメカニズムを明らかにするため、ER α を介して肝再生を担うことで知られる Amphiregulin (Areg) の mRNA を測定した。TAM 投与により Areg mRNA の上昇が認められ、ER α KO マウスにおいてはその上昇は認められなかった。また、siMmd2 投与により、肝臓における Areg mRNA の減少が認められ、Mmd2 との関連が示唆された。Mmd2 による肝保護作用メカニズムの一つとして、Areg を上昇させることによる肝再生促進が考えられた。以上より、TAM による肝保護作用は ER α を介した Mmd2 発現の上昇、およびそれに伴う Areg 発現の上昇が関与していることが示された。(4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討： 本研究では、GSH 合成酵素をノックダウンすることで GSH 減少モデルラットを構築した。このラットを用いて、トログリタゾン、ジクロフェナク、およびフルタミドの肝障害の発現について検討し、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出できることを明らかにした。GSH 減少モデルラットは急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出する有用な手段となり得ると考えられる。(5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究： 本研究において、ヒト肝細胞キメラマウスにおけるトログリタゾン投与実験を行った結果、GSH 減少モデルラットでは認められなかった肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、さらに、薬物動態関連因子や酸化ストレスの変動なども認められた。よって、キメラマウスがよりヒトに近い毒性プロファイルを持ち、トログリタゾン誘導性肝障害を明確に再現できる可能性を示唆した。前臨床試験におけるスクリーニングの段階で薬物誘導性肝障害を高感度に検出し、ヒトにおける副作用を未然に防ぐ有用な手段になることが期待できる。(6) ヒト hepatocyte nuclear factor 4 α の microRNA による制御は、代謝酵素の発現や細胞周期を調節している： 本研究では、HNF4 α の発現が miR-24 および miR-34a によりそれぞれ mRNA の分解と翻訳抑制によって負に制御されることを明らかにした。これらの microRNA による HNF4 α の低下は、CYP7A1 や CYP8B1 の発現減少や、細胞周期にも影響をおよぼすことが明らかになった。さらに、miR-24 および miR-34a はそれぞれ protein

kinase C/mitogen-activated protein kinase および reactive oxygen species 経路により制御されることが示された。本研究では、ヒト HNF4 α は miR-24 および miR-34a によって負に制御され、細胞ストレスや代謝酵素の発現など広範な影響を及ぼしていることを明らかにした。

以上、本年度は、薬物誘導性肝障害のヒトにおける *in vitro* 系の予測、免疫学的因子の関与についての新たなアプローチ、ラットを用いた高感度モデル作出、ヒト肝細胞モデルマウスの利用、そして microRNA による核内転写因子の制御について、より詳細な検討に成功し、一部はすでに論文発表を行った。今後はさらにヒトにおける薬物誘導性肝障害の予測試験系等について、動物モデルの作出、免疫学因子の関与、microRNA の可能性などについてさらに研究を進める予定である。

分担研究者：金沢大学大学院医学系研究科・准教授 中島美紀

A. 研究目的

薬物性肝障害は今日の医薬品開発および臨床における主要な問題の一つであり、米国における急性肝不全の約半数に関与すると言われている。また肝障害との関連が1件以上示唆されている薬物は約1000種類にのぼる。薬物性肝障害は中毒性と特異体質性の大きく2種類に分類される。中毒性肝障害は薬物の投与量依存的に、ほとんど個体差なく発症するため、非臨床試験による再現が可能であるとされている。一方、特異体質性肝障害は発症の個体差が大きく、発症頻度は100から10万人に1人程度と非常に低いため、医薬品の研究・開発段階で発見されにくい。薬物によっては、上市された後に特異体質性肝障害の発症が報告され、市場

から撤退する場合がある。しかし、特異体質性機序による副作用の発症メカニズムに関しては、未だに不明な点が多い。本研究では薬物誘導性肝障害の予測評価試験系の開発研究について、以下の6項目について研究を行った。(1) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の *in vitro* 評価系の構築 薬物の曝露により生体内の免疫機構が活性化されると、過剰な免疫反応に伴う炎症ストレスが特異体質性に発現し、肝障害の発症原因となると考えられている。薬物や化合物による免疫反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒトの末梢血から単離した単核球やT細胞、B細胞などを用いることが多い。しかし、ヒト末梢血から調製する試料の使用では、ロット間の個体差や、コストの問題が生じるため、*in vitro* の大規模スクリーニングには適さない。近年、このような問題を回避した *in vitro* 評価系

として、ヒト単球系細胞株の有用性が注目されている。ヒト単球系細胞株は、単球やマクロファージ、骨髄球などの免疫担当細胞における分化や活性化のメカニズム解明に頻用されている細胞株である。ヒト単球系細胞株には THP-1 細胞、HL-60 細胞、KG-1 細胞などが存在し、これらの細胞株は、単球やマクロファージ、骨髄球など免疫担当細胞における分化や活性化のメカニズム解明に頻用されている。そこで、上記のヒト単球系細胞による IL-8 および TNF α タンパク質産生能を炎症反応の指標とし、テルビナフィンおよびその類似薬がヒト単球細胞による炎症性サイトカイン、ケモカインのタンパク質産生量を増加させるかを検討した。なお、テルビナフィンの類似薬としてブテナフィン、フルコナゾールを用いた。ブテナフィンはテルビナフィンと類似した構造を有する抗真菌薬であるが、外用剤のみの販売であるため、肝障害の報告事例はない。フルコナゾールはテルビナフィンなど他の抗真菌薬と比較して、肝障害などの副作用に伴う休薬のリスクが低いと報告されている薬物である。MAPK は多くの細胞内シグナル伝達経路における重要な構成要素のひとつであり、主な MAPK として、ERK1/2、p38 MAPK および JNK1/2 が知られている (Fig. 8)。MAPK はリン酸化を受けて活性化体へ変換されることにより、シグナルカスケードおよび炎症反応の調節に関わる下流の因子を活性化する (DeFranco et al., 1998)。また、MAPK 経路に

は特異的な阻害薬が複数存在し (English and Cobb, 2002)、炎症性サイトカイン産生と MAPK 経路との関連性を解明することが可能である。そこで本章では、テルビナフィンによる THP-1 細胞の炎症性サイトカイン産生増加に対する MAPK 経路の寄与を明らかにすることを目的とした。

(2) ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与 ジクロキサシリンおよびフルタミド誘導性肝障害の発症機構に免疫学的な因子が関与をしていると考え検討を行った。最初にマウスにジクロキサシリンおよびフルタミドを投与し各々の肝サンプルを用いて、Th1、Th2 および Th17 に関与する免疫学的因子の測定を行った。抗菌薬であるジクロキサシリンは胆汁うっ滞を伴う肝障害を惹起することが知られている。処方後 1 週間以内に肝障害を引き起こす場合が多く、発熱や好酸球の増多などのアレルギー症状を伴う患者も多い。最初に、ジクロキサシリン投与後の血中肝障害マーカーを測定し、肝臓における炎症および免疫に関与する転写因子およびサイトカイン類の mRNA の定量を行った。前立腺癌治療薬であるフルタミドはごく稀に、細胞傷害型および胆汁うっ滞型の肝障害を引き起こすことが報告されているが、その機序は未だ十分には知られていない。本章では最初に、C57BL/6 マウス、Balb/c マウスの両方で、フルタミド投与後の血漿生

化学値を測定し、肝臓における炎症および免疫に関与する転写因子およびサイトカイン類の mRNA の定量、血中 IL-4 の測定を行った。また、rIL-4 または DK-PGD₂ 併用投与による影響を検討した。

(3) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序

Estrogen (E2) は Estrogen receptor (ER) に結合し、様々な生態反応に関与していることが知られており、ER には ER α 、ER β の 2 つの subtype が存在する。肝臓において、ER α は高く発現しているが、ER β はほとんど発現が認められないことが知られている。ER α agonist である Ethinylestradiol (EE2) の過量投与により、肝胆汁うっ滞が惹起されることが知られており、ER α は肝障害の発症に関与することが示唆されている。一方で、マウスにおいて薬理用量の E2 投与は様々な肝障害を抑制することも報告されている。肝虚血再灌流モデルを用いた検討や肝障害性化合物である diethylnitrosoamine を投与したマウスを用いた検討で、雄性に比べ雌性において肝障害性の程度が低く、また雄性への E2 投与により肝障害性が減少することが知られている。これらのことから肝障害の発症と ER α との間には関連があることが示唆されているが、薬物誘導性肝障害と ER α の関連を示した報告はない。SERM 投与による薬物誘導性肝障害への影響に関する報告もなく、また、E2 による肝保

護の詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では ER α アゴニストとして E2 に比べ安定性が優れる EE2、SERM として TAM と RAL、および ER α アンタゴニストとして ICI182.780 (ICI) を前投与することにより、薬物誘導性肝障害に及ぼす影響について検討した。

(4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討

GSH は、内因性物質や薬物より生じるフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護する役割を有している。グルタチオン S-転移酵素 (GST) は第 II 相酵素に分類され、薬物および反応性代謝物の解毒に深く関わっている。しかし、ヒトに比べげっ歯類で酵素活性が高いことが知られており、この代謝能の違いが前臨床試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。当研究室では、 γ -GCS の heavy chain に相補的な shRNA を発現するアデノウイルス (AdGCSh-shRNA) をすでに作製し、アデノウイルスが主に肝組織に感染することを利用して、ラット肝臓中の GSH 合成を抑制させた GSH 減少モデルラットを構築した。さらに、本モデルラットを用いて、GSH 減少によって毒性が増強される典型的肝障害化合物であるアセトアミノフェン (APAP) による肝障害を高感度に検出している。トログリタゾン、ジクロフェ

ナク、およびフルタミドは前臨床試験で肝障害発症のリスクは認められず、臨床で多くの患者に使用されることにより、一部の患者で重篤な肝障害が報告されている。そこで、GSH 減少モデルラットにこれらの薬物を投与することで急性、および亜急性の肝障害の発現について検討した。

(5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究 トログリタゾン¹はチアゾリジン系の糖尿病治療薬であり、その作用機序は、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ) に結合し、インスリン抵抗性を改善させるものと考えられている。画期的な糖尿病治療薬として上市されたが、稀に重篤な肝障害を惹起することが報告され、市場から撤退している。しかし前臨床試験では、サルを含む実験動物でいかなる肝障害も認められていない。トログリタゾンとともに培養したヒト肝細胞およびミクロソームからは GSH との複合体が検出されている。トログリタゾンはこれまで、動物モデルを用いた検討において、ヒトにおける肝障害をほとんど再現できていない。そこで、マウス肝の 70% 以上がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスにトログリタゾンを投与することで、トログリタゾンによるヒト特異的な薬物誘導性肝障害の発現とそのメカニズムについて検討した。

(6) ヒト hepatocyte nuclear factor 4 α の microRNA による制御は、代謝酵素の発現や細胞周期を調節している。 Cytochrome P450 (CYP) などの薬物代謝酵素は薬物、発癌物質および胆汁酸など様々な化合物の代謝および排泄に重要な役割を担っている。薬物代謝酵素の発現は主に核内受容体ファミリーに属する転写因子によって調節される。MicroRNA は標的 mRNA に結合し、翻訳抑制もしくは mRNA の分解を引き起こす小分子 non-coding RNA である。本研究では核内受容体の発現制御および代謝酵素の発現への microRNA の関与を解明することを目的とした。ヒト hepatocyte nuclear receptor (HNF) 4 α を中心に検討した。

B. 研究方法

Short hairpin RNA (shRNA) の発現手法、免疫学的因子の検討手法、および細胞への感染実験、ラットへの投与実験などは全て、昨年度までに確立した方法および常法に従って行ったが、免疫学的因子の検討については新たな考え方による検討方法も行った。その他、詳細は各分担報告書に記載をした。

(倫理面への配慮)

アデノウイルスを用いた全ての実験は、遺伝子組換え実験安全委員会による承認を受けて行った。本検討における動物実

験は、金沢大学動物実験指針に従って、承認を受けた後に行った。本研究で用いたヒト肝マイクロゾーム、ヒト肝 RNA などのヒト由来試料は、全て市販品として入手できるものを用いており、倫理委員会の申請対象とならないことを確認済である。

C. 研究結果

(1) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の in vitro 評価系の構築 テルビナフィンおよびその類似薬がヒト単球系細胞による炎症性サイトカイン、ケモカインのタンパク質産生に与える影響について検討した。テルビナフィンまたはブテナフィン処置により、THP-1 細胞および HL-60 細胞の IL-8 および TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。さらに、PMA により分化させたマクロファージ様 THP-1 細胞においても、テルビナフィン処置により TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。これより、テルビナフィンはヒト単球系細胞やマクロファージによる炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を刺激し、炎症反応を惹起させる作用を有することが示唆された。次に、テルビナフィンによる THP-1 細胞のサイトカイン産生増加に対する MAPK 経路の寄与について検討した。テルビナフィンは THP-1 細胞の ERK1/2 および p38 MAPK 経路を活性化させること、テルビナフィンの処置による

THP-1 細胞の IL-8 および TNF α 産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示された。

(2) ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与

ジクロキサシリン誘導性肝障害の発症には IL-4 などの Th2 因子の関与が示唆された。DK-PGD₂ 併用投与により肝障害の増悪が認められ、GATA-3 や MIP-2 mRNA の上昇が認められ、組織染色でもジクロキサシリン単独投与群では認められなかったネクロシスが認められた。さらに、フルタミド誘導性肝障害の発症メカニズムおよび DK-PGD₂ 投与による影響を検討した。Balb/c マウスにおいて Th2 因子の上昇が認められ、DK-PGD₂ 投与により肝障害の増悪も認められた。よって、ジクロキサシリンとフルタミドによる肝障害の発症機序および、DK-PGD₂ 併用投与によって肝障害が増悪することを示した。いずれの肝障害においても薬物投与 6 h 後において、ALT 値および IL-4 値の上昇が認められた。IL-4 は ConA 誘導性肝障害に関与することは報告されているが、薬物誘導性肝障害への関与の報告は未だに無く、薬物誘導性肝障害に IL-4 が関与することを示した最初の結果である。

(3) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序
薬物誘導性肝障害に対する種々のエストロゲン関連化合物の肝保護作用を検討し

た。Ethinylestradiol (EE2)、Tamoxifen (TAM) および Raloxifene (RAL) の前投与により TA 誘導性肝障害の軽減が認められ、特に TAM で顕著であった。ICI 182,780 (ICI) の前投与では軽減は認められなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2) の発現が TAM により顕著に誘導された。Mmd2 に対する siRNA (siMmd2) をマウス尾静脈内に投与することにより肝 Mmd2 mRNA の約 70% の減少が得られ、さらに TA 誘導性肝障害の増強および TAM による肝保護作用の減弱が認められた。また、ERα KO マウスにおいては TAM による Mmd2 mRNA の誘導は認められず、肝保護作用も認められなかった。また、Mmd2 の肝保護作用のメカニズムを明らかにするため、ERα を介して肝再生を担うことで知られる Amphiregulin (Areg) の mRNA を測定した。TAM 投与により Areg mRNA の上昇が認められ、ERα KO マウスにおいてはその上昇は認められなかった。また、siMmd2 投与により、肝臓における Areg mRNA の減少が認められ、Mmd2 との関連が示唆された。Mmd2 による肝保護作用メカニズムの一つとして、Areg を上昇させることによる肝再生促進が考えられた。

(4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討 ジクロフェナクについては、単回投与の検

討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 100 mg/kg の投与で肝障害が認められた。しかし、肝組織像での検討で変化は認められなかった。今回の検討では AST 値が特に上昇した。連続投与の検討においては、どの投与群においても肝障害が認められなかった。いずれにしても単回投与の検討結果から、GSH 減少モデルラットはジクロフェナクによる急性の肝障害を高感度に検出できることを示した。フルタミドについては、単回投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 1,000 および 1,500 mg/kg の投与で肝障害が認められた。500 mg/kg の投与では GSH 減少モデルラットおよび AdLuc-shRNA 投与ラットともに肝障害が認められなかった。連続投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 500 mg/kg の投与で肝障害が認められた。

(5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究 キメラマウスにおけるトログリタゾン投与実験を行った結果、GSH 減少モデルラットでは認められなかった肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、さらに、薬物動態関連因子や酸化ストレスの変動なども認められた。キメラマウスは肝実質細胞の 70% 以上がヒト肝細胞に置換されており、CYP や UGT などのヒト薬物代謝酵素が発現し、ドナーと同程度の酵素活性を示すこと、ヒトと類似した CYP の誘導や

阻害が認められること、薬物排泄経路がヒトと類似していることが当研究室で示されてきている。よって、キメラマウスがよりヒトに近い毒性プロファイルを持ち、トログリタゾン誘導性肝障害を明確に再現できる可能性を示唆した。

D. 考察

(1) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の in vitro 評価系の構築 本研究結果は、フルコナゾールはテルビナフィンなど他の抗真菌薬と比較して、肝障害などの副作用に伴う休薬のリスクが低いという報告を支持する (Chang et al., 2007)。これより、フルコナゾールはテルビナフィンの陰性対照として使用できることが示唆された。一方、KG-1 細胞による炎症性サイトカイン産生はテルビナフィン、ブテナフィン、フルコナゾールの抗真菌薬により影響を受けなかった。Teobaldら (2008) の検討では、LPS などの強力な免疫誘導剤の曝露でさえ、KG-1 細胞の炎症性サイトカインの産生量は増加しなかった。そのため、KG-1 細胞の炎症性サイトカイン産生量がテルビナフィンの処置により影響を受けなかったことは、KG-1 細胞の感受性の低さに起因しているのかもしれない。さらに、PMA により分化させたマクロファージ様 THP-1 細胞においても、テルビナフィン処置により、TNF α タンパク産生量の増加が認められ

た。これより、テルビナフィンは単球系細胞のみならず、マクロファージや肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞も活性化させることが示唆された。また、テルビナフィンを処置したマクロファージ様 THP-1 細胞および未分化の THP-1 細胞を比較すると、未分化の THP-1 細胞においてより炎症性サイトカインの産生量は顕著に増加した。これより、肝障害性薬物による炎症反応を予測する場合には、未分化のヒト単球系細胞を用いたほうが、炎症反応をより高感度に予測できると考えられる。

テルビナフィン以外の肝障害性薬物に関しては、特異体質性肝障害により市場から撤退した薬物であるキメラガトランまたはトログリタゾンの曝露により、THP-1 細胞の炎症性サイトカイン産生が増加したという報告がある (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009)。しかし、産生された炎症性サイトカインの種類、炎症性サイトカイン産生に要する薬物処置時間などはテルビナフィンの場合と異なるため、薬物ごとにヒト単球細胞活性化の機序が異なるのかもしれない。さらに、免疫学的機序による肝障害の発症が示唆される薬物であるアルベンダゾール、ヒドララジン、トログリタゾン、タモキシフェンなどの曝露によっても、THP-1 細胞の IL-8、TNF α タンパク質産生量は増加した (data not shown)。以上の

結果より、ヒト単球系細胞の炎症性サイトカイン産生能を評価することは、免疫学的機序による薬物性肝障害の予測に有用であると考えられる。本研究では、テルビナフィン[®]はヒト単球系細胞を活性化し、IL-8 および TNF α の産生を増加させることを明らかとした。単球やマクロファージによる炎症性サイトカインやケモカインの産生は、生体内における炎症反応を惹起するため、テルビナフィン[®]の投与により生じる炎症反応は、肝障害発症の原因のひとつであると考えられる。

(2) ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与 本研究ではジクロキサシリン誘導性肝障害の発症に IL-4 などの Th2 の因子が関与することを示し、DK-PGD₂ 投与がジクロキサシリン肝障害を増悪させることを見出した。本研究は薬物誘導性肝障害に IL-4 の関与を初めて示したものである。また、DK-PGD₂ が Th2 因子の関与する肝障害を増悪させることを示した最初の報告である。

ジクロキサシリンの投与により Th2 の因子である IL-5、STAT6 および Eotaxin-2 の有意な上昇が認められたことよりジクロキサシリン誘導性肝障害の発症に Th2 の因子が関与することが示唆された。

rIL-4 を投与する検討では、ジクロキサシリン単独投与群と比較して、rIL-4 とジクロキサシリンを併用投与することで ALT

値の上昇が認められた。rIL-4 は生体内での半減期が非常に短いことから、薬物投与 1 h 後に投与した。rIL-4 の投与量依存的に ALT 値が上昇した。IL-4 モノクローナル抗体を用いた検討では、IL-4 抗体投与により ALT 値の有意な減少が認められた。IL-4 抗体は同じ抗体を投与している報告を参考にし (Frendscho et al., 1992)、ジクロキサシリン投与の 1 h 後に投与した。上記の rIL-4 および IL-4 抗体を用いた検討からジクロキサシリンによる肝障害には IL-4 が関与することが示唆された。IL-4 はヒトおよびマウス間で働きが似ており、アレルギーの発症に関与するサイトカインである。IL-4 の放出を調節する転写因子の Minc は Single nucleotide polymorphism (SNP) が複数あることが報告されており (Okamoto et al., 2009)、その SNP により副作用の発現に個人差がある可能性が考えられる。

DK-PGD₂ は Th2 細胞などを活性化する CRTh2 に作用すること (Kostenis and Ulven, 2006) から、IL-4 が関与するジクロキサシリン誘導性肝障害を増悪させる可能性が考えられた。最初に、DK-PGD₂ 投与による肝障害への影響を検討した報告は未だにないため、投与量の検討から行った (Fig. 6)。DK-PGD₂ を併用投与した場合は GATA-3 の上昇が認められているこ

とから、肝臓での Th2 細胞数が上昇し、IL-4 を放出したことで血漿中の IL-4 濃度も上昇したと考えられる。DK-PGD₂ 投与によりジクロキサシリンによる肝障害が増悪したことから多数の免疫系細胞の浸潤が認められたこと、DK-PGD₂ 併用投与は免疫学的な因子が関与する薬物誘導性肝障害を *in vivo* で高感度に検出する方法の 1 つになり得るかもしれない。

(3) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序 本研究では薬物誘導性肝障害に対して EE2、TAM および RAL が肝保護的に働くことを見出し、その作用が ERα を介し、Mmd2 を上昇させることで起こることを示した。薬物誘導性肝障害と ERα との関連性を示した報告はなく、本研究が初めてである。TA 投与量依存的に Mmd2 mRNA は減少し (Fig. 8A)、また、APAP、DIC 投与においても減少が認められた (Fig. 10)。肝障害が惹起されることで Mmd2 発現量が減少することが示唆された。BB においては肝障害性が低かったために Mmd2 mRNA の減少が認められなかったと考えられる (Figs. 6 and 10)。詳細なメカニズムは不明であるが、Mmd2 が肝障害を感知し、肝保護作用を引き起こす可能性が考えられた。

Areg は肝再生に重要なタンパク質であり、Areg KO マウスでは血漿 ALT 値が 2 倍程度上昇することが知られている

(Berasain et al., 2005)。また、Areg は肝障害時に劇的に誘導されることおよび ERα を介して誘導されることが知られており (Berasain et al., 2007; Miceli et al., 2009)、本研究でもその再現が得られた (Fig. 21A)。TAM 投与により Areg mRNA が上昇したことから、肝再生能が上昇し、肝障害性が減少したと考えられた。また、siMmd2 投与マウスにおいて Areg mRNA の有意な減少が認められており、Areg と Mmd2 とが相互に作用していることが示唆された (Fig. 21B)。ERα を介して Mmd2 が上昇し、その結果 Areg が上昇したと考えられるが、さらなる解析が必要と思われる

ヒト肝臓組織においては MMD2 mRNA の発現量が低く、マウス肝臓に比べると 1/1000 程度であった (Fig. 22)。MMD2 の発現に非常に大きな種差が認められた。Mmd2 はマウス肝臓において保護的に働いていることが本研究で明らかとなったが、ヒトにおいては MMD2 が肝臓において常在的には発現していない。しかし、肝障害性の薬物投与時の発現変動についての検討は困難であるため、ヒトにおける解析は今後の課題である。

(4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討 トロジクロフェナク、およびフルタミドは前臨床試験において肝障害が認められていない。しかし、上市後の調査では頻度

は低いものの肝障害が報告されている。これらの薬物により惹起される肝障害を評価できる動物モデルは報告されていない。代謝的活性化によって生成した反応性代謝物の抱合反応による解毒は、最終的には GSH とそれを利用する酵素系が担うとされている。GSH を補酵素とする GST には基質特異性の異なる多数の分子種が存在するため、すべての発現を制御することは困難であるが、GSH の合成経路は一つのみであり、GSH 合成酵素を制御することで GSH による解毒能を調節できると考えられる。よって本研究では、GSH およびその合成酵素に注目し、一部のヒトにおいて重篤な肝障害が発現すると報告されている前述の薬物を、GSH 減少モデルラットに単回および連続投与した。本研究で使用した GSH 減少モデルラットでは、GSH 含量が最も低くなる AdGCSh-shRNA 投与後 2 週間から、投与後 4 週間までは同程度の GSH 含量を保てると報告されている (Akai et al., 2007)。そこで、ジクロフェナクおよびフルタミドの亜急性の肝障害の検討では、GSH 含量が低く保たれている期間において検討を行うために、薬物の投与期間を AdGCSh-shRNA を投与後 10 日間から 1 週間という短い期間に設定した。これは肝障害の発現を検討するためには、十分な期間であったと考えられる。

薬物誘導性肝障害は、用量依存的な肝障害がすべてのヒトに発現し、実験動物でも再現可能な中毒性、および用量依存性がなく実験動物で再現できない特異体質性に分類できる。本研究で用いた薬物の投与量は、臨床用量および最高血中濃度を考慮すると過剰であり、ヒトへの外挿は難しいため、今後はさらにヒトにおける毒性発現に近い実験系を確立する必要があると考えられる。しかし、特異体質性肝障害は実験動物で再現できないとされているにも関わらず、今回の GSH 減少モデルラットは、通常の実験動物で障害性が認められない用量で被験薬の障害性を検出可能であることを示した。本章において、GSH 減少モデルラットがジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害を高感度に検出できることを示し、これらの薬物の解毒に GSH が関与していることを明らかにした。今後、安全性研究において GSH 減少モデルラットを用いることで、急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出することに本モデルラットが貢献できると考えられる。

(5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究 前章では、GSH 減少モデルラットが薬物誘導性肝障害を高感度に検出する有用な手段となり得ることを明らかにした。しかし、トログリタゾン誘導性肝障害を検出する

には至っていない。本章では、キメラマウスを用いてトログリタゾン誘導性肝障害の発現とそのメカニズムについて検討した。BSO とトログリタゾンの同時投与では上昇傾向が認められなかった。BSO を投与したマウスおよびラットでは、薬物誘導性肝障害の増強が認められることが報告されている (Shimizu et al., 2009; Nishiya et al., 2008)。BSO 投与群では GST 酵素活性の変動は認められず、基質である GSH 含量の減少が認められたため、BSO 投与群では GSH による解毒能が低下していたと考えられる。よって、トログリタゾン誘導性肝障害における GSH の関与は小さい可能性がある。一方、酸化ストレスを減弱させる SOD2 の酵素活性は、BSO 投与群で有意な上昇が認められている (Fig. 6A)。GSH 含量低下による酸化ストレスの増大、あるいは BSO そのものを毒物と認識した結果 SOD2 が誘導され、BSO とトログリタゾン同時投与群では肝障害マーカーの上昇傾向が認められなくなった可能性が考えられる。また、トログリタゾンのみの投与によって GSH 含量の増加が認められた。トログリタゾン投与によって、GSH 合成律速酵素のサブユニットである GCSH の誘導は認められず (data not shown)、GST 酵素活性の低下も認められていない。したがって、GSH 増加のメカニズムを明らかにするには更なる検討が必要である。いずれにしても、キメラマ

ウスを用いることによってトログリタゾン投与による肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、キメラマウスがヒトと類似した毒性プロファイルを示すことが強く示唆された。トログリタゾンは、実験動物を用いた検討においてその障害性をほとんど再現できていない。本キメラマウスは最高で 95%の肝実質細胞をヒト肝細胞に置換可能である画期的なマウスである一方、肝実質細胞以外はマウス由来であり、種差を完全に克服することはできていない。しかし、トログリタゾン投与によっては ALT 値を含む肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、薬物動態関連因子や酸化ストレスの変動なども認められた。よって本研究は、ヒト特異的なトログリタゾン誘導性肝障害の発現メカニズムを解明し、医薬品開発に貢献できる情報を提供するものと考えられる。

(6) ヒト hepatocyte nuclear factor 4 α の microRNA による制御は、代謝酵素の発現や細胞周期を調節している。

HNF4 α は多くの核内転写因子や酵素類の発現調節に関与している。HNF4 α をノックアウトすると肝の形態も機能も大きく損傷を受ける。HNF4 α は組織の分化や極めて多くの代謝 pathway の恒常性を保ために重要であると言われている。本研究では、miRNAs による HNF4 α の発現の制御について検討を行った。その結果、miR-24 と miR-34a が HNF4 α を負に調節

していることを見いだした。本研究では、miR-24 が HNF4 α の翻訳領域から機能を発揮していることを見いだしたが、これは驚くことではなく、他のほ乳類ですでに報告がある。pre-miR-24-2 の発現レベルは、PKC/MAPK activator PMA と ROS generator H₂O₂ により上昇した。これは mature な miR-24 が、こうしたことに関与していることが推定された。また、fibrosis に関わる transforming growth factor である (TGF)- β は、miR-24 の発現を上昇させることが知られている(Huang et al., 2008). cholestasis, hepatic steatosis そして fibrosis の病態は、HNF4 α を down-regulate することが報告されている(Geier et al.,2005; Xie et al., 2009; Yue et al., 2008). 以前の報告で、miR-34 は p53 によって調節されていると報告された(Raver-Shapira et al., 2007; Chang et al.2007). 本研究では、過酸化水素処理によって pre-miR-34a のレベルが上がった。また、MAPK 阻害薬は pre-miR-34a の発現に影響せず、ROS は p53 を活性化することから、pre-miR-34a の上昇は、MAPK ではなく、p53 を介していると思われる。miR-24 と miR-34a によって細胞の形態が変化し、細胞のサイクルが影響を受けることは HNF4 α の低下が関与していると考えられる。しかし、この説明には、他の蛋白質やメカニズムなどが介在することを考えなくてはならない。実際 miR-34a は、cell

cycle-regulatory genes として知られている cyclin E2 や cyclin-dependent kinase 4 に影響を及ぼし、G1 期で細胞周期を止める (He et al., 2007). また、miR-24 は TGF- β で処理した HuH7 という肝癌由来細胞や A549 肺癌由来細胞などの増殖を促進させる(Huang et al., 2008, Cheng et al., 2005). 一方で、Cheng et al (2005) は、miR-24 は HeLa 細胞の増殖に影響することを報告している。よって、miR-24 は細胞の増殖などに色々な影響を及ぼすと考えられる。Hwang-Verslues et al.(2008)は、siHNF4 α をトランスフォーメーションすることにより p21 gene の発現を誘導することを報告している。こうした事象から、miR-24 と miR-34a は、多くのターゲット蛋白のグローバルネットワークにより細胞増殖を調節しているのであろう。

特にHNF4 α がmiR-24-とmiR-34a依存的にその下流遺伝子の発現を負に制御していることが特に興味深い。CYP7A1のデータから、miR-24とmiR-34aは胆汁酸の生合成に関わっていることが示された。さらに興味深いことに、これらのmicroRNAはPKC/MAPK activator や ROS generator で制御されていることが示されたことであり、これは胆汁酸生合成の新規の制御機構である。以上、本研究では、ヒトHNF4aはmiR-24およびmiR-34aによって負に制御され、細胞ストレスや代謝酵素の発現など広範な影響を及ぼしていることを明

らかにした。

E. 結論

(1) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の in vitro 評価系の構築 テルビナフィンまたはブテナフィン処置により、THP-1 細胞および HL-60 細胞の IL-8 および TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。さらに、PMA により分化させたマクロファージ様 THP-1 細胞においても、テルビナフィン処置により TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。これより、テルビナフィンはヒト単球系細胞やマクロファージによる炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を刺激し、炎症反応を惹起させる作用を有することが示唆された。テルビナフィンは THP-1 細胞の ERK1/2 および p38 MAPK 経路を活性化させること、テルビナフィンの処置による THP-1 細胞の IL-8 および TNF α 産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示された。以上、本研究では、ヒト単球系細胞において、テルビナフィンによる IL-8 および TNF α の産生増加が認められたこと、そのサイトカイン産生には主に ERK1/2 経路が関与することを明らかとした。今後は、他の肝障害性薬物での研究や、テルビナフィンを用いた *in vivo* の研究を行なうことにより、薬物性肝障害の予測にさらに役立つ有用な情報が提供できると考えられる。

(2) ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与 本研究ではジクロキサシリン誘導性肝障害の発症には IL-4 などの Th2 因子の関与が示唆された。DK-PGD₂ 併用投与により肝障害の増悪が認められ、GATA-3 や MIP-2 mRNA の上昇が認められ、組織染色でもジクロキサシリン単独投与群では認められなかったネクローシスが認められた。本研究により、ジクロキサシリンによる肝障害の発症機序および、DK-PGD₂ 併用投与によって肝障害が増悪することを示した。いずれの肝障害においても薬物投与 6 h 後において、ALT 値および IL-4 値の上昇が認められた。IL-4 は ConA 誘導性肝障害に関与することは報告されているが、薬物誘導性肝障害への関与の報告は未だに無く、本研究は薬物誘導性肝障害に IL-4 が関与することを示した最初の報告である。DK-PGD₂ 投与による肝障害の増悪はいずれの薬物でも認められており、免疫系の関与する肝障害を高感度に検出する有用な方法になることが期待される。

(3) 薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序 本研究では、薬物誘導性肝障害に対する種々のエストロゲン関連化合物の肝保護作用を検討した。Ethinylestradiol (EE2)、Tamoxifen (TAM) および Raloxifene (RAL)

の前投与により TA 誘導性肝障害の軽減が認められ、特に TAM で顕著であった。DNA マイクロアレイ解析の結果、monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2) の発現が TAM により顕著に誘導されたことに注目し詳細な検討を行った。Mmd2 の肝保護作用のメカニズムを明らかにするため、ERa を介して肝再生を担うことで知られる Amphiregulin (Areg) の mRNA を測定した。TAM 投与により Areg mRNA の上昇が認められ、ERa KO マウスにおいてはその上昇は認められなかった。また、siMmd2 投与により、肝臓における Areg mRNA の減少が認められ、Mmd2 との関連が示唆された。Mmd2 による肝保護作用メカニズムの一つとして、Areg を上昇させることによる肝再生促進が考えられた。以上より、TAM による肝保護作用は ERa を介した Mmd2 発現の上昇、およびそれに伴う Areg 発現の上昇が関与していることが示された。

(4) グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討 本研究では、GSH 合成酵素をノックダウンすることで GSH 減少モデルラットを構築した。このラットを用いて、トログリタゾン、ジクロフェナク、およびフルタミドの肝障害の発現について検討し、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出できることを明らかにした。GSH 減少モデルラットは急性

および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出する有用な手段となり得ると考えられる。

(5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究 本研究において、ヒト肝細胞キメラマウスにおけるトログリタゾン投与実験を行った結果、GSH 減少モデルラットでは認められなかった肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、さらに、薬物動態関連因子や酸化ストレスの変動なども認められた。キメラマウスは肝実質細胞の 70%以上がヒト肝細胞に置換されており、CYP や UGT などのヒト薬物代謝酵素が発現し、ドナーと同程度の酵素活性を示すこと、ヒトと類似した CYP の誘導や阻害が認められること、薬物排泄経路がヒトと類似していることが当研究室で示されてきている。よって、キメラマウスがよりヒトに近い毒性プロファイルを持ち、トログリタゾン誘導性肝障害を明確に再現できる可能性を示唆した。本研究で検討したモデル動物が医薬品開発の安全性研究で用いられ、前臨床試験におけるスクリーニングの段階で薬物誘導性肝障害を高感度に検出し、ヒトにおける副作用を未然に防ぐ有用な手段になることが期待できる。

(6) ヒト hepatocyte nuclear factor 4 α の microRNA による制御は、代謝酵素の発現や細胞周期を調節している。 本研