

究では、HNF4a 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 HNF4a 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。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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

国内原著論文 0 件

海外原著論文 13 件

国内総説原著 1 件

海外総説原著 1 件

Yukitaka Yoshikawa, Mayu Morita, Hiroko Hosomi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Knockdown of superoxide dismutase-2 enhances acetaminophen-induced

hepatotoxicity in rat. *Toxicology*, **264**: 89-95 (2009).

Eisuke Kobayashi, Masanori Kobayashi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol. Sci.*, **111**: 302-310 (2009).

Sayaka Komagata, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Takuya Mohri and Tsuyoshi Yokoi. Human CYP24 catalyzing the inactivation of calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b. *Mol. Pharmacol.*, **76**: 702-709 (2009).

Yukitaka Yoshikawa, Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Establishment of knockdown of superoxide dismutase 2 and expression of CYP3A4 cell system to evaluate drug-induced cytotoxicity. *Toxicol. in Vitro*, **23**: 1179-1187 (2009).

Mayu Morita, Sho Akai, Hiroko Hosomi, Koichi Tsuneyama, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Drug-induced hepatotoxicity test using γ -glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol. Lett.*, **189**: 159-165 (2009).

Akinobu Watanabe, Tatsuki Fukami, Mikik Nakajima, Masataka Takamiya, Yasuhiro Aoki and Tsuyoshi Yokoi. Human arylacetamide deacetylase is a principle enzyme in flutamide hydrolysis. *Drug Metab. Dispos.*, **37**: 1513-1520 (2009).

Takuya Mohri, Miki Nakajima, Shingo Takagi and Tsuyoshi Yokoi; MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer*, **125**: 1328-1333 (2009).

Kenji Ishihara, Naruo Katsutani, Naoki Asai, Akira Inomata, Yuji Uemura, Akiyoshi Suganuma, Kohei Sawada, Tsuyoshi Yokoi, and Toyohiko Aoki: Identification of urinary biomarkers useful for distinguishing a difference in mechanism of toxicology in rat model of cholestasis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **105**: 156-166 (2009).

Katsuhiko Mizuno, Miki Katoh, Hirotohi Okumura, Nao Nakagawa, Toru Negishi, Takanori Hashizume, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation of benzodiazepine by CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.*, **37**: 345-351 (2009).

Taiga Maruichi, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Transcriptional regulation of human

carboxylesterase 1A1 by nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2). *Biochem. Pharmacol.*, **79**: 288-295 (2010).

Ryoichi Fujiwara, Miki Nakajima, Shingo Oda, Hiroyuki Yamanaka, Shin-ichi Ikushiro, Toshiyuki Sakaki, and Tsuyoshi Yokoi: Interactions between human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and UGT1A enzymes. *J. Pharm. Sci.*, **99**: 442-454 (2010).

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Katsuhiko Kida, Yu Yamaura, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi: MicroRNAs regulate human hepatocytes nuclear factor 4 α modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J. Biol. Chem.*, **285**: 4415-4422 (2010).

Hiroko Hosimi, Sho Akai, Keiichi Minami, Yukitaka Yoshikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. An in vivo drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and γ -glutamylcysteine synthetase knockdown cells. *Toxicol. in Vitro*, **24**: 1032-1038 (2010).

横井 毅

薬物動態と医薬品の薬効・副作用-代謝を

中心として - 治療学 43: 1262-1266
(2009).

Tsuyoshi Yokoi

Troglitazone

Handbook of Experimental Pharmacology
196: 419-435 (2010.)

2. 学会発表

国内学会発表 14 件

国際学会発表 5 件

吉川幸孝、細見浩子、森田麻友、常山
幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：
SOD2 ノックダウン試験系を用いた薬物誘
導性肝障害の評価、第 36 回日本トキシコ
ロジー学会学術年会 2009.7.6-8 口頭&
ポスター 盛岡

細見浩子、赤井 翔、吉川幸孝、南 圭
一、深見達基、中島美紀、横井 毅：
CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高
感度な薬物誘導性細胞障害試験系の構築、
第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会
2009.7.6-8 口頭&ポスター 盛岡

豊田泰之、深見達基、中島美紀、横井
毅：CYP1A2 および CYP2E1 発現アデノ
ウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評
価、第 36 回日本トキシコロジー学会学術
年会 2009.7.6-8 口頭&ポスター 盛岡

岩村 篤、深見達基、細見浩子、中島
美紀、横井 毅：CYP2C9 発現アデノウイ

ルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価、
第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会
2009.7.6-8 口頭&ポスター 盛岡

Katsuhiko Mizuno, Tatsuki Fukami, Miki
Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Terbinafine
stimulates inflammatory cytokines release in
human monocytic leukemia THP-1 cells. 第
24 回日本薬物動態学会年会
2009.11.27-29 口頭 京都

Eisuke Kobayashi, Masanori Kobayashi,
Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki
Eisuke Kobayashi, Masanori Kobayashi,
Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki
Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.

Interleukin-17 is involved in
halothane-induced liver injury. 第 24 回日本
薬物動態学会年会 2009.11.27-29 口頭
京都

Shin-ichi Yokota, Miki Nakajima, Eriko
Higashi, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi.
Human CYP2A6 is regulated by nuclear
factor-erythroid 2 related factor 2(Nrf2). 第
24 回日本薬物動態学会年会
2009.11.27-29 口頭 京都

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Katsuhiko
Kida, Yu Yamaura, Tatsuki Fukami, and
Tsuyoshi Yokoi. Human hepatocyte nuclear
factor 4 α is regulated by stress-induced
micro-RNAs. 第 24 回日本薬物動態学会年
会 2009.11.27-29 口頭 京都

Toshihisa Koga, Ryoichi Fujiwara, Tatsuki

Fukami, Miki Nakajima, Eiji Kashiyama, and Tsuyoshi Yokoi. Quantitative evaluation of cytotoxicities caused by acyl glucuronides. 第24回日本薬物動態学会年会 2009.11.27-29 口頭 京都

樋口悟法、小林雅典、吉川幸孝、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：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、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

山浦 優、中島美紀、高木信伍、深見達基、常山幸一、横井 毅：肝障害のバイオマーカーとなる血中microRNAの探索、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

水野克彦、深見達基、中島美紀、横井 毅：テルビナフィンによるERKシグナル伝達経路を介してヒト単球性THP-1細胞の炎症性サイトカイン産生を刺激する、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

吉川幸孝、豊田泰之、津久井通、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：薬物誘導性肝障害に対するTamoxifenによる肝保護作用、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

小林雅典、樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅： α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) 誘導性肝

障害へのinterleukin-17 (IL-17) の関与、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

Katsuhiko Mizuno, Miki Katoh, Hirotohi Okumura, Nao Nakagawa, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. 3rd Asia Pacific ISSX Meeting, 2009.5.10-12, Bangkok, Thailand.

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Katsuhiko Kida, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Human hepatocyte nuclear factor 4 α is regulated by miR-24. 3rd Asia Pacific ISSX Meeting, 2009.5.10-12, Bangkok, Thailand.

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Katsuhiko Kida, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. miR-24 regulates human HNF4 α expression. 16th International Conference on Cytochrome P450, 2009.6.24-25, Nago, Japan. Oral & Poster

Tsuyoshi Yokoi, Eisuke Kobayashi, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima. Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. 16th North American Regional ISSX Meeting, 2009. 10.18-22, Baltimore, USA.

Eisuke Kobayashi, Masanori Kobayashi, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of interleukin-17 in drug-induced liver injury in mice. SOT 49th Annual Meeting, 2010.3.7-11

Salt Lake City-USA. Poster&Oral

出願日：2010年3月19日

発明の名称：肝保護作用を有するタンパク質、肝障害予防・保護用化合物のスクリーニング方法

H. 知的財産権の出願・登録状況

1件。

発明人：横井 毅、吉川幸孝

特願 2010-065172

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 分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

分担研究者 中 島 美 紀

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）

分担研究報告書

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

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

研究要旨

近年、薬物性肝障害の発症機序のひとつとして、薬物と炎症反応の相互作用などの免疫学的機序が注目されている。しかしヒト *in vitro* において、免疫学的機序を考慮した薬物性肝障害の評価系はいまだに確立されていない。そこで、複数のヒト単球系細胞およびそのマクロファージ様細胞を用いて、肝障害性薬物による炎症反応の惹起を予測することとした。最初に、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。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。

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關与する

と言われている (Kaplowitz, 2001)。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 (Zimmerman, 1999)。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 (Utrecht, 1999)。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。

近年、そのメカニズムを説明する仮説のひとつとして、免疫反応に伴う炎症ストレスの重要性が提唱されている。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 (Ganey et al., 2004; Roth et al., 2003; Tafazoli et al., 2005)。肝臓における自然免疫には、肝臓へ浸潤している単球やマクロファージ、肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞などが関与する。これらの免疫細胞は、外来異物などにより活性化されると、多量の炎症性サイトカインやケモカインを産生する。主な炎症性サイトカインとしてTNF α 、ケモカインとしてIL-8が知られている。これらの炎症性サイトカインやケモカインはリンパ球や好中球を刺激し、炎症反応の引き金となる (Fig. 1)。

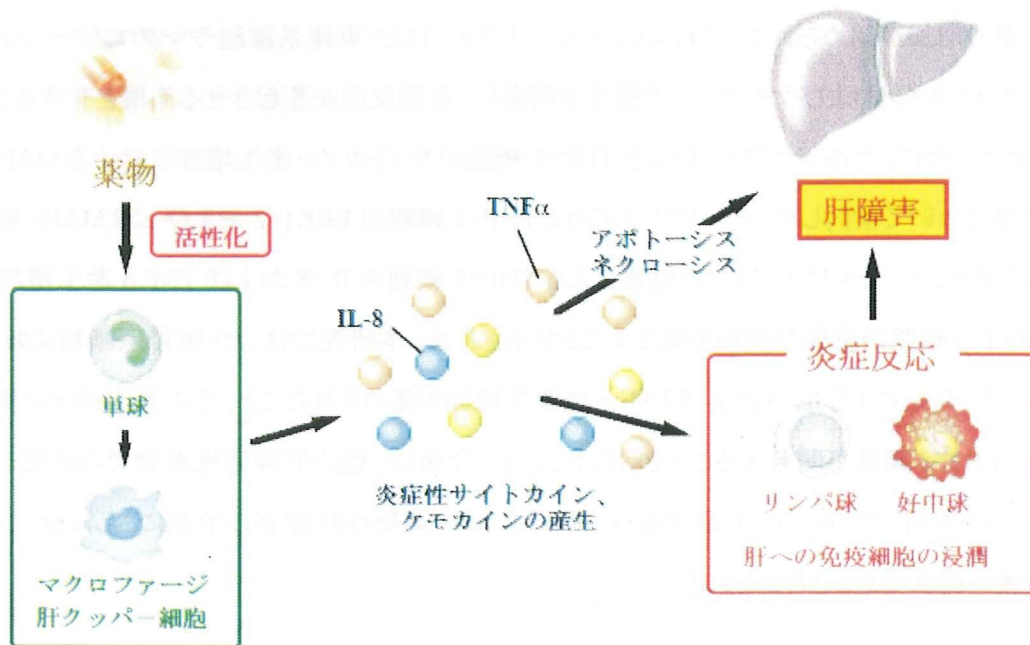


Fig. 1. Possible mechanisms of immune-mediated liver injury.

薬物性肝障害における免疫学的機序を説明するために、げっ歯類を用いた *in vivo*

の研究が盛んに行なわれている。一般には、マウスやラットに毒性用量の薬物を単回投

与し、その後の肝臓における組織学的変化や血清 AST 値、ALT 値を測定することにより、薬物の肝障害性を評価する。アセトアミノフェンや非ステロイド性抗炎症薬、抗菌薬などの投与によるげっ歯類肝障害モデルにおいて、炎症性サイトカイン TNF α の産生や好中球の浸潤は、肝障害の発症に重要な役割を果たすことが報告されている (Jaeschke, 2005; Deng et al., 2009)。また、げっ歯類でのパラセタモールまたは四塩化炭素投与による肝障害に、クッパー細胞の活性化が関与することも報告されている (Michael et al., 1999; Muriel and Escobar, 2003)。Tukov ら (2006) はラットから単離したクッパー細胞と肝実質細胞を共培養し、肝障害性薬物の評価を行なっている。しかし、げっ歯類を用いた研究では種差の問題があるため、必ずしもヒトにおける反応を予測できるとは限らない。このため、ヒト *in vitro* での免疫学的機序による肝障害の評価系の構築が望まれる。

薬物の肝細胞毒性を評価するヒト *in vitro* モデルでは、初代培養肝細胞や肝癌由来細胞株が頻用されているが、その感受性は低く、肝障害の予測にはあまり有用ではない (Dambach et al., 2005; Groneberg et al., 2002)。Cosgrove ら (2009) は、肝障害性薬物と炎症メディエーター (外毒素である LPS、炎症性サイトカインである TNF など) の同時曝露により、ヒトまたはラット初代培養肝細胞、ヒト肝癌由来

HepG2 細胞の細胞毒性を評価している。この評価系では、肝障害性薬物と炎症メディエーターの相乗効果について検討することが可能であるが、肝障害性薬物が直接的に免疫担当細胞を活性化しているか否かを判別することはできない。

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。Edling らの報告によると、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、ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 細胞の炎症性サイトカインやケモカインの産生は増加した (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009)。これより、キメラガトランおよびトログリタゾンの副作用には、炎症反応の活性化が関与する可能性が考えられる。しかし、他の肝障害性薬物に関する検討や、他のヒト単球系細胞株に関する検討は、まだなされていない。

テルビナフィン[®]は爪甲真菌症や皮膚糸状菌症の治療に用いられるアリルアミン系の抗真菌薬である (Gupta and Shear, 1997)。テルビナフィンの経口剤は日本や欧米で幅広く販売されているが、市販後調査によって、主な副作用として消化管障害、皮膚毒性、味覚障害が報告されている (Hall et al., 1997)。また、テルビナフィンの服用による肝障害も報告されており、その発症頻度は約 40,000 人に 1 人と非常に低いが、定期的な肝機能検査が義務付けられている (Garcia Rodriguez et al., 1999; ラミシールインタビューフォーム, 2007)。テルビナフィン誘導性肝障害は胆汁うっ滞性のものが多く、肝障害患者の血液学的検査において、AST 値、ALT 値、ビリルビン値など複数の血清マーカーの顕著な増加が認められる。肝生検では、門脈域への免疫細胞の浸潤が認められおり、浸潤した細胞の種類は単核球細胞、リンパ球、好中球、好塩基球など多岐にわたる (Mallet et al., 1997; Fernandes et al., 1998; Zepata Garrido et

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 (Koeffler and Golde, 1978; Gallagher et al., 1979; Tsuchiya et al., 1980)。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

al., 2003)。さらに、テルビナフィンを服用した患者において、全身性の過敏性症候群である発熱、発疹、リンパ肥大を併発した肝障害も報告されている (Gupta et al., 1997; Gupta and Porges, 1998)。また、テルビナフィンによる肝障害や過敏症症候群は、休薬により症状が改善するが多い。テルビナフィンによる肝障害の発症頻度は非常に低いと、テルビナフィン誘導性肝障害は特異体質性であると考えられている (van' t Wout et al., 1994)。しかし、免疫学的機序によるテルビナフィン誘導性肝障害の発症メカニズムはいまだに明らかとなっていない。

これらの知見より、テルビナフィン誘導性肝障害の発症において、炎症反応が重要な役割を果たす可能性があると考えられた。そこで本研究では、ヒト単球系細胞のサイトカイン産生能を炎症反応の指標とし、テルビナフィンがヒト単球系細胞による炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を増加させ、炎症反応を惹起させるかを評価した。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 (Fig. 2)。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 (Chang et al., 2007)。

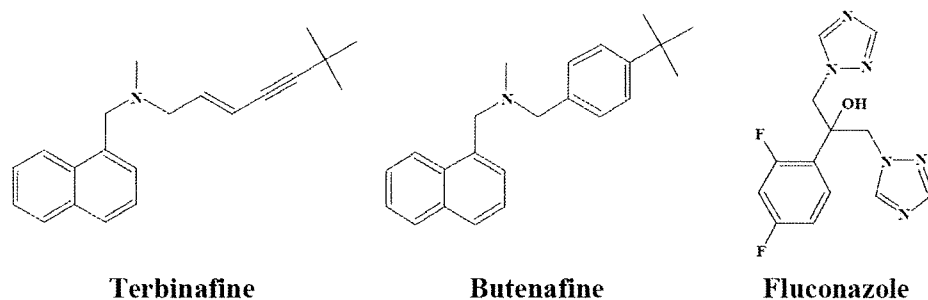


Fig. 2. Structures of antifungal drugs used in the present study.

B. 実験材料および実験方法

B-1 実験材料および使用機器

テルビナフィン塩酸塩、ブテナフィン塩酸塩、フルコナゾール、PMA は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞は、理研ジーンバンク (Tsukuba, Japan) より購入した。ヒト急性前骨髄性白血病由来 HL-60 細胞およびヒト急性骨髄性白血病由来 KG-1 細胞は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。RPMI 1640 は日水製薬 (Tokyo, Japan)、FBS は Invitrogen (Melbourne, Australia) より購入した。24 well plate および 96 well plate は Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ) より購入した。Human TNF α ELISA Ready-SET-GO!™ および TMB Substrate Reagent Set は eBioscience Inc (San Diego, CA) より、Human IL-8 ELISA

MAX™ は Biolegend (San Diego, CA) より購入した。イムノモジュール (ストリップ& フレーム) は Nalge Nunc International K. K. (Tokyo, Japan) より購入した。BSA は Sigma-Aldrich (St Louis, MO) より購入した。ReverTra Ace は 東洋紡 (Osaka, Japan) より、逆転写用 dNTPs は グライナー・ジャパン (Tokyo, Japan) より購入した。RNAiso、ランダムヘキサマー、SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) は タカラバイオ (Shiga, Japan) より購入した。プライマーは 北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。Reference Dye には Brilliant SYBR Green QPCR master mix (Stratagene, La Jolla, CA) 付属のものを使用した。分光光度計は NanoDrop (Wilmington, DE) の ND-1000 を使用した。ルミノメーターは Perkin-Elmer

(Wellesley, MA) の Wallac 1420 ARVOMX を使用した。U0126 および SB203580 は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より、SP600125 は Calbiochem (Los Angeles, CA) より購入した。LPS は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。ウサギ抗ヒト Thr202/Tyr204 リン酸化 ERK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト Thr180/Tyr182 リン酸化 p38 MAPK 抗体、ウサギ抗ヒト Thr183/Tyr185 リン酸化

JNK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト ERK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト p38 MAPK 抗体、ウサギ抗ヒト JNK1/2 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) より購入した。Alexa Fluor 680 ヤギ抗ウサギ IgG は Invitrogen より購入した。CellTiter-Blue Cell Viability Assay は Promega (Madison, WI) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または生化学用のものを用いた。

Table 1. Sequence of primers used in the present study.

Primer	Sequence
Human IL-8-S	5'-CAGCCTTCCTGATTTCTCTGCAG-3'
Human IL-8-AS	5'-AGACAGAGCTCTCTTCCATCAG-3'
Human TNF α -S	5'-CTTCTGCCTGCTGCACTTTGGAG-3'
Human TNF α -AS	5'-GGCTACAGGCTTGTCACCTCGG-3'
Human GAPDH-S	5'-CCATGAGAAGTATGACAACAGCC-3'
Human GAPDH-AS	5'-TGGGTGGCAGTGATGGCATGGA-3'

B-2 細胞培養および薬物処置
THP-1 細胞は 10% FBS、HL-60 および KG-1 細胞は 20% FBS を含む RPMI 1640 で 5% CO₂ 存在下、37° C で培養した。1 × 10⁶ cells/well の THP-1、HL-60 または KG-1 細胞を 24 well plate に 1 mL/well ずつ播種し、被験薬を含む RPMI 1640 で培養した。被験薬としてテルピナフィン塩酸塩、ブテナフィン塩酸塩、フルコナゾールを用いた。薬物処置後、24 well plate 上の細胞培養液をピペッティングにより懸濁し、1.5 mL

のチューブに移した。5,000 rpm、4° C にて 5 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、-70° C で凍結保存した。Total RNA を調製するために、沈殿した細胞は 1 × PBS で洗浄した後、500 μ L RNAiso を加えてピペッティングにより溶解した。そして、-70° C で凍結保存した。また、マクロファージ様 THP-1 細胞を用いる検討では、2 × 10⁵ cells/well の THP-1 細胞を 24 well plate に 1 mL/well ずつ播種し、100 ng/mL の PMA を含む RPMI 1640

で培養した。48 時間後に培養液を除き、1 × PBS で洗浄した後、被験薬を含む RPMI 1640 を処置した。薬物処置後、培養上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、-70° C で凍結保存した。Total RNA を調製するため、24 well plate 上の細胞は 1 × PBS で洗浄した後、500 μL RNAiso を加えて 5 分間静置した。ピペティングで懸濁した後、溶液を回収し、-70° C で凍結保存した。

B-3 ELISA による IL-8 および TNF α タンパク質の定量

B-2 で回収した細胞培養上清中の IL-8 および TNF α タンパク質濃度は Human IL-8 ELISA MAX™ および Human TNF α ELISA Redy-Set-Go!™ のマニュアルに修正を加えて以下の方法で測定した。96 well イムノモジュールに coating buffer に溶かした capture antibody を 100 μL ずつ添加し、4° C で 12 時間静置した。0.1% PBST で 5 回洗浄した後、1 × Assay Diluent を 100 μL ずつ添加し、室温で 1 時間静置した。0.1% PBST で 1 回洗浄した後、培養上清サンプルおよび 1 × Assay Diluent を用いて段階希釈を行った recombinant human IL-8 または recombinant human TNF α を 100 μL ずつ添加し、室温で 2 時間静置した。0.1% PBST で 5 回洗浄した後、1 × Assay Diluent に溶かした detection antibody を 100 μL ずつ添加し、室温で 1 時間静置した。0.1% PBST で 5 回洗浄した後、1 × Assay Diluent に

溶かした Avidin - HRP を 100 μL ずつ添加し、室温で 30 分間静置した。0.1% PBST で 7 回洗浄した後、TMB Substrate Reagent Set を用いて作製した 1 × TMB solution を 100 μL ずつ添加し、室温で 15 分間インキュベートし、1 M リン酸を 50 μL ずつ添加し、反応を停止させた。570 nm を対照とし、450 nm の吸光度を測定することにより定量した。

B-4 Total RNA の調製

B-2 で細胞を溶解させた 500 μL RNAiso に 100 μL のクロロホルムを加えて 15 秒間激しく攪拌し、室温で 5 分間静置した。その後 15,000 rpm、4° C にて 15 分間遠心分離した。水層を新しいチューブに移し、250 μL のイソプロパノールを加えて転倒攪拌し、室温で 5 分間静置した。15,000 rpm、10 分間、4° C で遠心分離し、沈殿を 500 μL の 70% エタノールで洗浄した。この沈殿を風乾し、DEPC 処理精製水に溶解した後 260 nm における吸光度を NanoDrop ND-1000 により測定した。

B-5 逆転写酵素による cDNA の合成

B-4 により得られた total RNA から以下の方法により cDNA を合成した。Total RNA 4 μg、ランダムヘキサマー (150 ng/μL) 1 μL に DEPC 処理精製水を加えて 23 μL とし、70° C 水浴中で 10 分間熱処理後、氷冷した。さらに 5 × 逆転写用バッファー 8 μL、2.5

mM dNTPs 8 μ L、逆転写酵素 ReverTra Ace 1 μ L を加えて全量を 40 μ L とし、以下の条件でサーマルサイクラーを用いて cDNA を合成した。(1) 30° C で 10 分、(2) 42° C で 60 分、(3) 98° C で 10 分。

B-6 Real-time RT-PCR による IL-8、TNF α および GAPDH mRNA の定量

Real-time RT-PCR には Mx3000P (Stratagene) を使用した。I-2-5 で得た cDNA サンプル 1 μ L、10 μ M のセンスプライマー 0.8 μ L (Table 1)、10 μ M のアンチセンスプライマー 0.8 μ L、SYBR Premix Ex Taq™ バッファー 10 μ L、5 μ M Reference Dye 0.3 μ L に滅菌精製水を加え、全量を 20 μ L とした。調製した反応液を専用のサンプルチューブに入れ、以下のプロトコールで反応を行った。ホールド反応を 95° C で 30 秒行った後、解離反応を 94° C で 20 秒、アニーリングと伸長反応を 64° C で 20 秒とし、45 サイクルを行った。アニーリングと伸長反応の際に、蛍光を real time で検出した。45 サイクルの反応終了後、60° C から 95° C まで 1 秒あたり 0.2° C 温度を上昇させ融解曲線の測定を行った。Real-time RT-PCR 反応終了後、2% アガロースゲルで電気泳動をして特異的に増幅されるバンドの確認を行った。

B-7 細胞生存率の測定

1 \times 10⁵ cells/well の THP-1 細胞を 96

well プレートに 100 μ L/well ずつ播種し、被験薬を含む RPMI 1640 で 6 または 24 時間培養した。被験薬としてテルビナフィン塩酸塩、ブテナフィン塩酸塩、フルコナゾールを用いた。DMSO の最終濃度は 0.1% とした。細胞生存率は CellTiter-Blue Cell viability Assay のマニュアルに従い、以下のように測定した。培養後の 96 well プレートに CellTiter-Blue Reagent 20 μ L を添加し、10 秒間振とう後、CO₂ インキュベーター内で 90 分間呈色反応を行なった。その後、Wallac 1420 ARVOMX で蛍光 (excitation: 338 nm, emission: 458 nm) を測定した。

B-8 全細胞溶解液の調製

細胞培養後、24 well plate 上の細胞をピペッティングにより懸濁し、1.5 mL のチューブに移した。10,000 rpm、4° C にて 5 分間遠心分離し、上清を除いた後、沈殿した細胞は 1 \times PBS で洗浄した後、20 - 100 μ L TGE buffer で懸濁した。細胞懸濁液を液体窒素と 37° C 温浴で凍結融解を 3 回繰り返す。ボルテックスミキサーでよく混和した。タンパク質濃度測定は Bradford 法 (Bradford, 1976) に従い、 γ -グロブリンを標準蛋白とし Bio-Rad (Hercules, CA) の Protein Assay kit を用いて行った。精製水で 5 倍希釈した Dye Reagent 200 μ L にタンパク質 4 μ L を加えて攪拌し、595 nm での吸光度を測定した。

B-9 SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング
調製した全細胞溶解液を用い、Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、SDS-PAGE を行った。厚さ 1 mm、7.5% ポリアクリルアミドゲルに 25 μ g のタンパク質をアプライした。SDS-PAGE 後、transfer cell を用いタンパク質をアクリルアミドゲルから Immobilon-P PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA) に、電氣的 (10 V, 30 分間) に転写した。この際、ろ紙、アクリルアミドゲル、PVDF 膜は 20% メタノール転写用緩衝液に浸して行った。転写後、PVDF 膜を PBS で 2 回洗浄した後、Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Cambridge, UK) に浸して 1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体を使用する際には、それぞれウサギ抗ヒト Thr202/Tyr204 リン酸化 ERK1/2 抗体は 2,000 倍、ウサギ抗ヒト ERK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト Thr180/Tyr182 リン酸化 p38 MAPK 抗体、ウサギ抗ヒト p38 MAPK 抗体は 1,000 倍、ウサギ抗ヒト Thr183/Tyr185 リン酸化 JNK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト JNK1/2 抗体は 200 倍となるように

C. 研究結果

C-1 抗真菌薬によるヒト単球系細胞の炎症性サイトカイン産生能の比較

ヒト単球系細胞の炎症性サイトカイン産生に対する抗真菌薬の影響を検討するため、

Odyssey Blocking Buffer + 0.1% Tween 20 で希釈したものをを用いた。2 次抗体には蛍光標識されたヤギ抗ウサギ IgG 抗体を Odyssey Blocking Buffer + 0.1% Tween 20 で 5,000 倍希釈したものをを用いた。ウサギ抗ヒト ERK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト p38 MAPK 抗体は 4 $^{\circ}$ C で 12 時間、その他の 1 次抗体は室温で 12 時間、2 次抗体は室温で 1 時間反応させた。1 次抗体反応後は 0.1% PBST で 5 分間ずつ 4 回、2 次抗体反応後は 0.1% PBST で 5 分間ずつ 3 回、さらに 0.1% PBST/0.01% SDS で 5 分間洗浄し、最後に PBS で 5 分間洗浄した。バンドの検出には Odyssey インフラレッドイメージングシステム (LI-COR Biosciences) を、定量は Odyssey software (ver. 1.2) を用いて行った。

B-10 統計解析

2 群間における統計学的評価は Student's *t*-test により、多群間における統計学的評価は ANOVA および Tukey または Dunnett 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

100 μ M の抗真菌薬をヒト単球系細胞に処置し、6 時間後の IL-8 および TNF α タンパク質産生量を ELISA にて定量した。その結果を Fig. 3 に示した。THP-1 細胞、HL-60

細胞におけるIL-8およびTNF α タンパク質産生量は、コントロール群と比較して100 μ Mテルビナフィンまたはブテナフィンの処置により有意に増加した。これより、テルビナフィンおよびブテナフィンはヒト単球系細胞による炎症性サイトカインおよびケモカイン産生を刺激し、炎症反応を惹起させる作用を有することが示唆された。ま

た、100 μ Mフルコナゾールの処置において、IL-8およびTNF α タンパク質産生量の有意な変動は認められなかった。一方、KG-1細胞による炎症性サイトカイン産生は3種の抗真菌薬により影響を受けなかった。以後の検討では、炎症性サイトカイン産生量の増加が最も顕著であったTHP-1細胞を用いることとした。

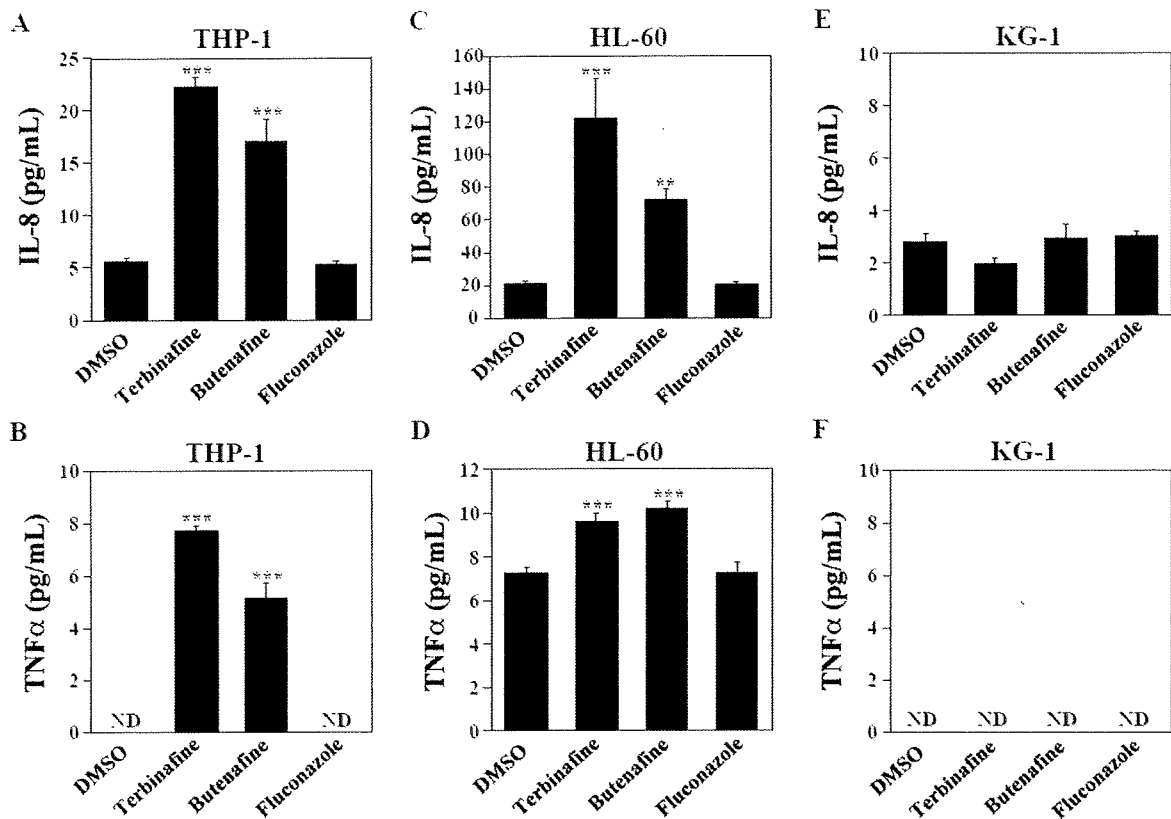


Fig. 3. Effects of antifungal drugs on the release of IL-8 and TNF α from human monocytic cell lines. Human monocytic cell lines including THP-1 (A and B), HL-60 (C and D), and KG-1 (E and F) were treated with 100 μ M antifungal drugs for 6 h. The release of IL-8 (A, C, and E) and TNF α (B, D, and F) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO). ND, not detectable.

C-2 テルビナフィンを処置した THP-1 細胞における炎症性サイトカイン産生の経時的変化

THP-1 細胞による炎症性サイトカイン産生の経時的変化を明らかにするため、処置時間を変化させて 100 μ M のテルビナフィンを処置し、IL-8 および TNF α の mRNA 発現量および IL-8 および TNF α のタンパク質産生量をそれぞれ real-time RT-PCR および ELISA にて定量した。結果として、THP-1 細胞の IL-8 および TNF α の mRNA 発現量は、コントロール群と比較して 100 μ M テルビ

ナフィンの処置により、1.5 時間後から 24 時間後まで有意に増加し、3 時間後において最大であった (Figs. 4A and 4B)。また、THP-1 細胞による IL-8 タンパク質産生量は、コントロール群と比較して 100 μ M テルビナフィンの処置 3 時間後により有意に増加した。IL-8 タンパク質産生量の増加は 6 時間後の約 7 倍が最大であった (Fig. 4C)。THP-1 細胞による TNF α タンパク質産生は 100 μ M テルビナフィンの処置 1.5 時間後より認められ、6 時間後で最大であった (Fig. 4D)。

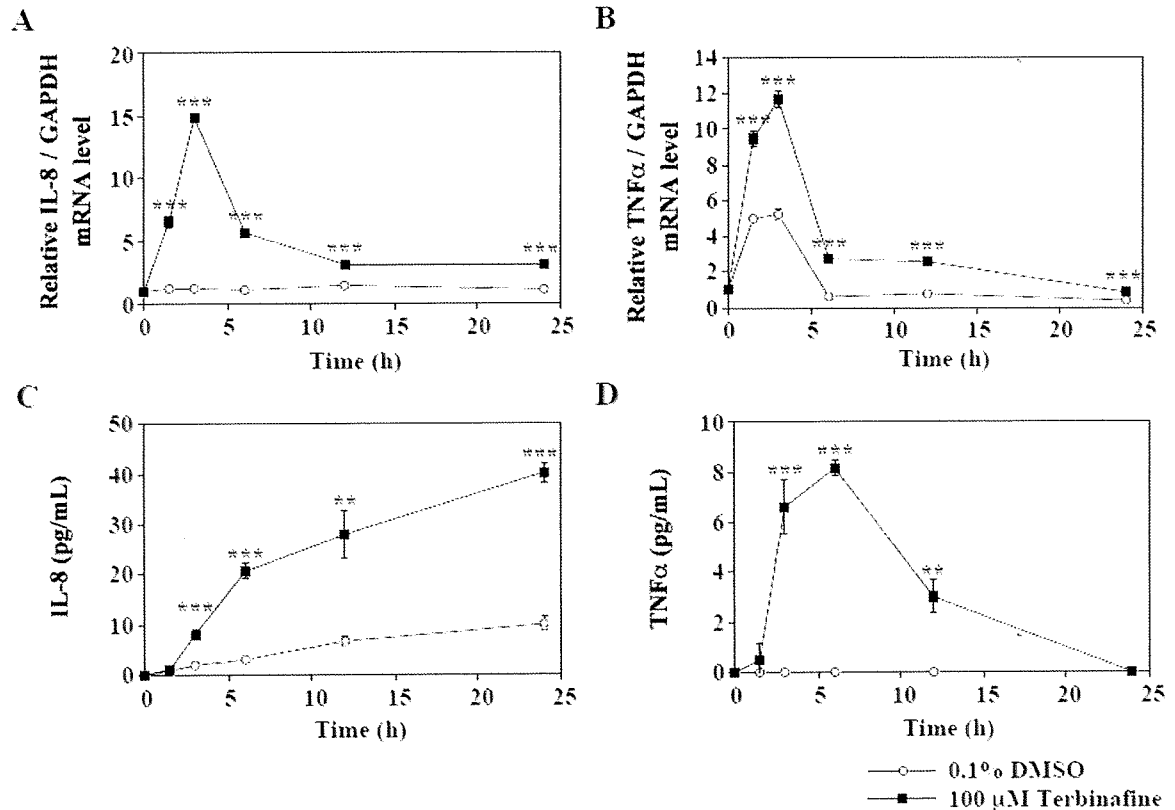


Fig. 4. Time-dependent changes in the mRNA expression levels and the release of IL-8 and TNF α in THP-1 cells treated with terbinafine. THP-1 cells were treated with 100 μ M terbinafine for various time points. The mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF α (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. The release of IL-8 (C) and TNF α (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO) of each time point.

C-3 抗真菌薬による THP-1 細胞に対する細胞毒性

3種の抗真菌薬の THP-1 細胞に対する細胞毒性を明らかにするため、THP-1 細胞の細胞生存率を測定した。薬物処置 6 時間後、すなわち THP-1 細胞における IL-8 および TNF α の産生増加が最も顕著であった時間において、100 μ M テルビナフィン、ブテナフィン、フルコナゾールによる細胞生存

率の有意な減少は認められなかった (Fig. 5A)。一方、薬物処置 24 時間後において、100 μ M テルビナフィンまたはブテナフィンによる有意な細胞生存率の減少が認められた (Fig. 5B)。以後の検討では、細胞毒性の影響を回避するために、mRNA 発現量およびタンパク質産生量は、それぞれ薬物処置 3 時間後および 6 時間後に測定することとした。

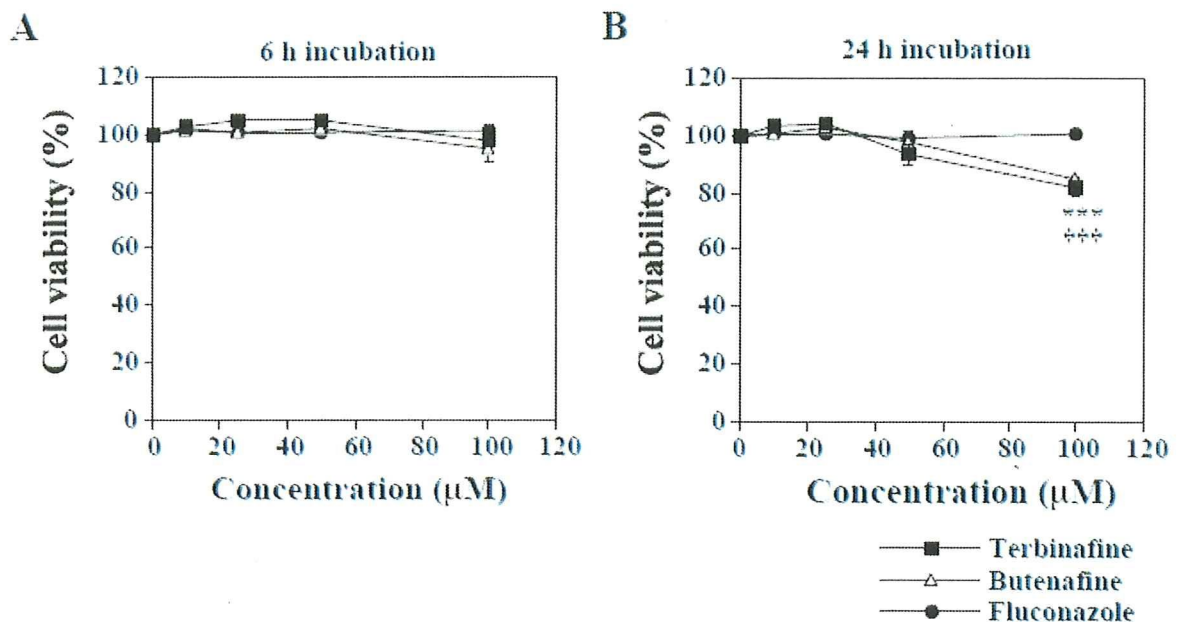


Fig. 5. Cytotoxicity in THP-1 cells treated with antifungal drugs. THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of antifungal drugs for 6 h (A) or 24 h (B). Cell viability in THP-1 cells was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO) and terbinafine. †††, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO) and butenafine.

C-4 抗真菌薬を処置した THP-1 細胞における炎症性サイトカイン産生の濃度依存的変化

抗真菌薬の処置濃度を下げても、THP-1

細胞の炎症性サイトカイン産生の増加が認められるかを検討するため、10 - 100 μ M の抗真菌薬を THP-1 細胞に処置し、3 時間後の炎症性サイトカイン mRNA 発現量およ

び6時間後の炎症性サイトカインタンパク質産生量を定量した。Fig. 6に示すように、テルビナフィンまたはブテナフィンの処置により、THP-1細胞のIL-8およびTNF α 産生は濃度依存的に増加した。IL-8 mRNA発現量およびタンパク質産生量の有意な増加には、少なくとも25 μ Mのテルビナフィン

が必要であった (Figs. 6A and 6C)。また、10 μ Mのテルビナフィン処置により、TNF α mRNA発現量は有意に増加したが、TNF α タンパク質産生量の有意な増加は50 μ M処置ではじめて認められた (Figs. 6B and 6D)。

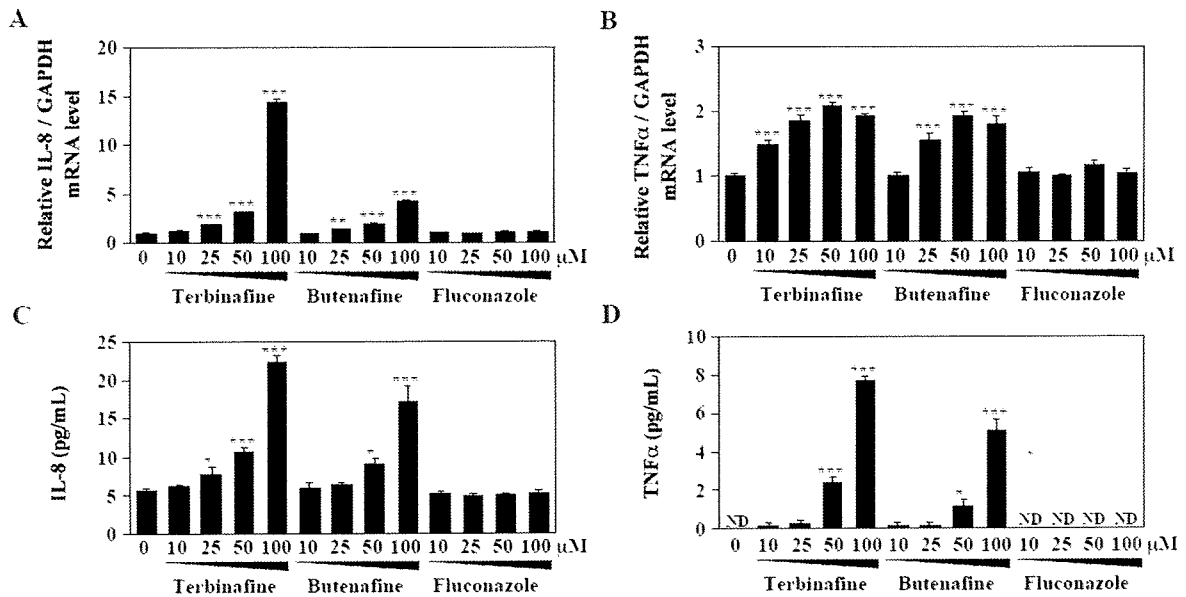


Fig. 6. Dose-dependent changes in the mRNA expression levels and the release of IL-8 and TNF α in THP-1 cells treated with antifungal drugs. THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of antifungal drugs. After incubation for 3 h, the mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF α (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. After incubation for 6 h, the release of IL-8 (C) and TNF α (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO). ND, not detectable.

C-5 テルビナフィンを処置したマクロファージ様 THP-1 細胞における炎症性サイトカイン産生の経時的変化

これまでの検討では、ヒト単球系細胞は未分化、すなわち単球細胞様のもを使用した。しかし、THP-1 細胞は PMA などの分化誘導薬を処置すると、マクロファージ様

に分化することが報告されている (Tsuchiya et al., 1982; Schwende et al., 1996)。そこで、PMA 処置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、テルビナフィンによる炎症性サイトカイン産生の増加が認められるかを検討した。マクロファージ様 THP-1 細胞における TNF α

タンパク質の産生量は、コントロール群と比較して 100 μ M テルビナフィンの処置により有意に増加し、24 時間後で最大値を示

した (Fig. 7)。一方、IL-8 タンパク質の産生量は 100 μ M テルビナフィンの処置により増加しなかった。

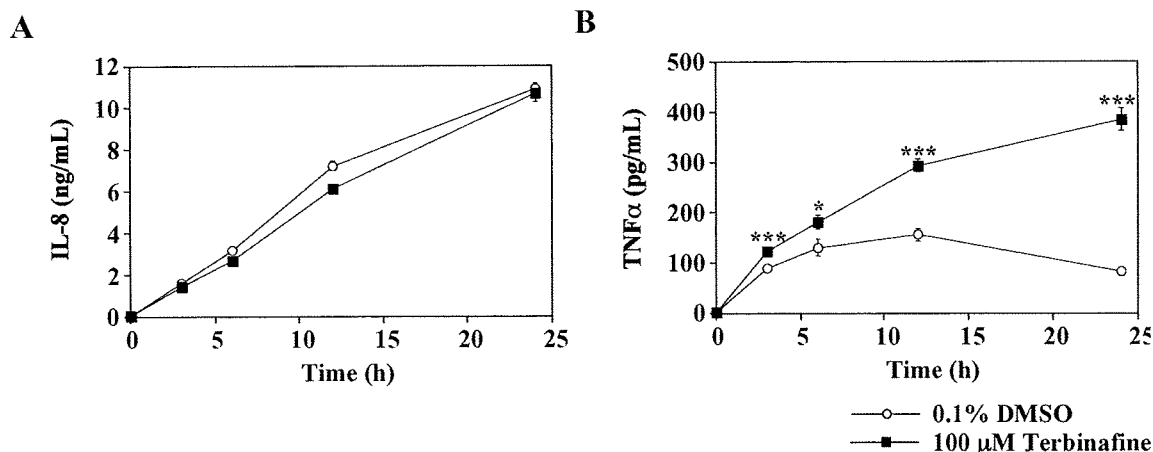


Fig. 7. Time-dependent changes in the release of IL-8 and TNF α in differentiated THP-1 cells treated with terbinafine. Before the treatment of 100 μ M terbinafine, THP-1 cells were pretreated with 100 ng/mL of PMA for 48 h and differentiated to a more macrophage-like phenotype. The release of IL-8 (A) and TNF α (B) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO) of each time point.

C-6 テルビナフィンによる THP-1 細胞の MAPK 活性化

テルビナフィンの処置により、THP-1 細胞の MAPK が活性化されるかを明らかにするため、THP-1 細胞内の ERK1/2、p38 MAPK および JNK1/2 のリン酸化をウェスタンブロットティングにより検討した。なお、2 μ g/mL LPS 処置群は MAPK リン酸化の陽性対照として用いた。その結果、THP-1 細胞の ERK1/2 および p38 MAPK リン酸化体は 100 μ M テルビナフィンの 1 時間処置により、コントロールと比較して有意に増加したが、JNK1/2 のリン酸化体は増加しなかった (Fig. 9)。これよりテルビナフィンは、THP-1 細胞の MAPK の中でも ERK1/2 および

p38 MAPK を活性化させることが明らかとなった。

さらに、MAPK 阻害薬による MAPK リン酸化の抑制効果を確認するため、THP-1 細胞に MAPK 阻害薬を 1 時間前処置したサンプルを用いて同様の検討を行なった。MAPK 阻害薬としては、MEK1/2 阻害薬で ERK1/2 経路を抑制する U0126、p38 MAPK 阻害薬である SB203580、JNK1/2 阻害薬である SP600125 を用いた。その結果、テルビナフィンの処置により認められた ERK1/2 および p38 MAPK のリン酸化は、それぞれ U0126 および SB203580 の前処置により有意に抑制された。