

の発症に関与することが示唆されている (Yamamoto et al., 2006)。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 (Harada et al., 2001; Naugler et al., 2007)。これらのことから肝障害の発症と ERa 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 ERa の関連を示した報告はない。

ER の研究に ERa および ERb ノックアウト (KO) マウスが頻用されている。ERa KO マウスは成獣になるまで通常通り成長するが、雌雄ともに不妊である (Lubahn et al., 1993)。また、雌性マウスにおいて、子宮は重度の形成不全を示し、卵巣には卵泡があり黄体は認められない。一方、ERb KO マウスでは成獣になるまで通常通り成長し、雌雄ともに繁殖能力を有するが、産仔数が少なく、生まれた仔は Wild

type よりも体重が少ないことが報告されている (Krege et al., 1998)。ERa および ERb double KO マウスにおいては ERa KO マウスの特徴に加え、卵巣の卵胞顆粒膜細胞が精巣で認められるセルトリ細胞に転分化することが知られている (Couse et al., 1999; Dupont et al., 2000)。以上のように ER KO マウスを用いた報告が多くなされているが、肝臓における ER の研究は未だ十分に行われていないのが現状である。

Tamoxifen (TAM) は selective estrogen receptor modulator (SERM) の一種であり、今日、aromatase 阻害薬に代わり乳癌の治療薬として頻用されている (Howell et al., 2005)。SERM は ER に対して agonist および antagonist の両方の作用をもち、その作用は臓器により異なる (Behjati and Frank, 2009)。TAM は乳腺では ER に対する antagonist として作用するが、子宮および骨組織では agonist として作用する (Osborne and Fuqua, 1994)。TAM と同様の SERM に属する Raloxifene (RAL) は、乳腺では TAM 同様 antagonist として作用し、骨組織におい

て agonist として作用するが、子宮においてはどちらの作用も示さないことが知られている (Mitlak and Cohen, 1997; Cosman and Lindsay, 1999)。肝臓においては TAM および RAL とともに E2 様作用、つまり agonist 作用を示すことが報告され

ている (Mitlak and Cohen, 1997; Cosman and Lindsay, 1999)。

肝障害を惹起する薬物および化合物として様々なものが知られているが、本研究では下記に示す APAP、Bromo

benzene (BB)、DIC および Thioacetamide (TA) の 4 種類の化合物を選択した (Fig. 1)。

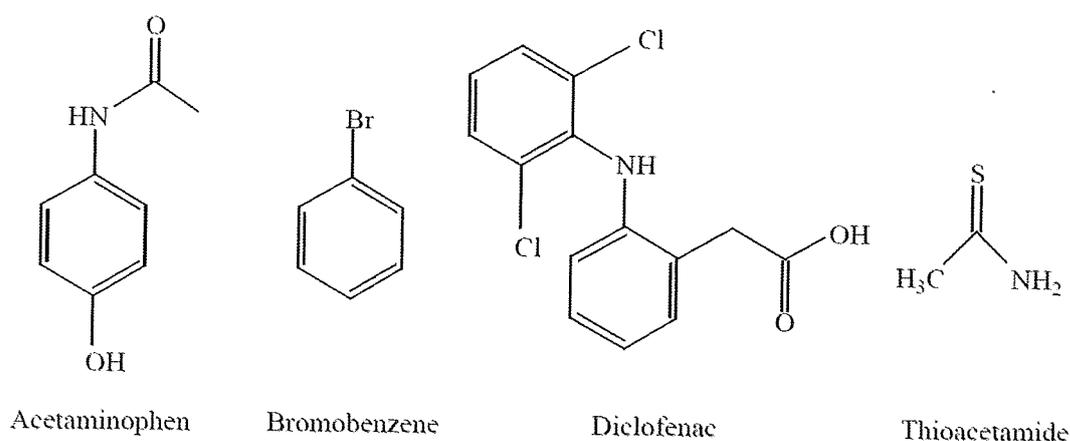


Fig. 1 Chemical structures of APAP, BB, DIC, and TA.

APAP は広く一般に用いられている解熱鎮痛薬であり、前述のように薬物誘導性肝障害において最も研究されている薬物である。DIC は非ステロイド性消炎鎮痛薬の一種であり、その作用機序は主としてアラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼの活性を阻害することにより、炎症、疼痛等に関与するプロスタグランジンの合成を阻害するものと考えられて

いる。しかし、一部の患者に重篤な肝障害を引き起こすことが報告され、げっ歯類を用いた検討においても肝障害を引き起こすことが知られている (Purcell et al., 1991; Walker, 1997; Morita et al., 2009)。

BB は 2, 3-epoxide と 3, 4-epoxide に代謝されることが知られており (Heijne et al., 2004)、2, 3-epoxide は無毒性である。

一方、3,4-epoxide は肝グルタチオンと結合することで解毒されるが、細胞中タンパク質とも結合し、肝障害性を引き起こすことが知られている (Jollow et al., 1974; Koen et al., 2000)。エタノールを3週間投与した雄性SDラットにBBを投与することで肝障害が増悪したことから、CYP2E1による代謝的活性化も示唆されている (Hétu et al., 1983)。

TAはCytochrome P450 (CYP) 2E1およびフラビンモノオキシゲナーゼによりTA sulfineおよびTA sulfeneに代謝されることが知られており (Porter and Neal, 1978; Porter et al., 1979)、これら代謝物が細胞中のタンパク質に結合することで肝障害性を示すと報告されている (Hunter et al., 1977; Wang et al., 2000; Dyroff and Neal, 1981)。また、雄性SDラットを用いた検討で、絶食下においてTA誘導性の肝障害が増悪することから、CYP2E1による代謝的活性化が肝障害に大きく関与することが示唆されている (Ramaiah et al., 2001)。

これまでにE2、SERM投与による薬物誘導性肝障害への影響に関する報告はなく、

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ERα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ERα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。

B. 実験材料および実験方法

B-1. 実験材料および試薬

ヒト肝16サンプルはHuman and Animal Bridging Research Organization (Chiba, Japan)より購入し、9サンプルは岩手医科大学 (Morioka, Japan)より御供与いただいた。ドナー情報はTable1にまとめた。ヒト肝癌由来HuH-7細胞、HLE細胞およびヒト胎児腎由来HEK293細胞は、大日本住友製薬 (Osaka, Japan)から購入した。ヒト肝癌由来HepG2細胞はRiken Gene Bank (Tsukuba, Japan)より購入した。ヒト肝由来Fa2N4細胞およびMFE™ Plating Medium Fは日本農産工業 (Yokohama, Japan)より購入した。ヒト乳腺由来MCF-7細胞、マウス線維芽由来NIH/3T3細胞およびマウス副腎皮質由

来 Y-1 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。マウス肝癌由来 Hepa1-6 細胞および MM45LTi 細胞は金沢大学医学部第一内科より御供与頂いた。マウスマクロファージ由来 J774A.1 細胞は金沢大学薬学部生体防御応答学研究室より御供与頂いた。マウスマクロファージ由来 RAW-264.7 細胞は金沢大学病院薬剤部研究室より御供与頂いた。DMEM 培地は日水製薬 (Tokyo, Japan) より、ウシ胎児血清 (FBS)、リポフェクタミン RNAi MAX およびアガロースはインビトロジェン (Melbourne, Australia) より、ReverTra Ace は東洋紡 (Osaka, Japan) より購入した。DIC は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、Cell Counting Kit-8 は同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) より、SYBR[®]Premix Ex Taq[™]、RNA iso とランダムヘキサマーは宝酒造 (Kyoto, 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、siRNA は B-Bridge (Mountain view, CA) に合成を依頼した。APAP、BB、TA、TAM、EE2 は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。ICI182,780 (ICI) は TOCRIS bioscience (Ellisville, MO) より、RAL

は Toronto Research Chemicals (North York, CA) より購入した。電気泳動は BIO CRAFT (Tokyo, Japan) の BE-560 型泳動槽と PA-055 型泳動槽を用いた。10 cm プレート、96 ウェルプレートは Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ) より、6 ウェルプレートは Nunclon Δ [™] Surface (Roskilde, Denmark) より購入した。セルスクレイパーはイワキ (Tokyo, Japan) より購入した。AteloGene[™] Systemic Use は高研 (Tokyo, Japan) 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。

B-2 EE2、TAM、RAL および ICI 前投与 ICR マウスへの TA 投与

ICR マウス (雄性および雌性、6 週齢 20 ~25 g; 日本 SLC) に EE2 (100 μ g/kg in saline, *i. p.*)、TAM (1 mg/kg in saline, *i. p.*)、RAL (3 mg/kg in saline, *i. p.*) または ICI (1 mg/kg in saline, *i. p.*) を 5 日間連続投与し、最終投与 12 時間後に TA (200 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与した。各群 3~5 匹のマウスを使用した。TA 投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

Table 1 Characteristics of 25 donors in the present study.

No	Sex	Age (yr)	Ethnic	Cause of death
1	M	33	Caucasian	Head trauma
2	F	47	Caucasian	Cerebrovascular accident
3	M	49	Hispanic	Head trauma
4	F	32	Hispanic	Subarachnoid hemorrhage
5	F	33	Hispanic	Cerebrovascular accident
6	F	41	Caucasian	Cerebrovascular accident
7	M	38	Caucasian	Head trauma
8	M	56	Caucasian	Intracerebral hematoma
9	F	34	Black	Cerebrovascular accident
10	F	35	Hispanic	Intracerebral hematoma
11	M	36	Caucasian	Intracerebral hematoma
12	M	46	Caucasian	Anoxia
13	M	68	Caucasian	Cerebrovascular accident
14	M	57	Asian	Intracerebral hematoma
15	F	33	Caucasian	Primary brain tumor
16	M	60	Caucasian	Aneurysm rupture
17	M	79	Japanese	Death from cold
18	F	82	Japanese	Hemorrhagic shock
19	F	23	Japanese	Drug abuse
20	M	33	Japanese	Hemorrhagic shock
21	F	68	Japanese	Death from cold
22	F	39	Japanese	Intracranial injury
23	F	72	Japanese	Asphyxia
24	F	70	Japanese	Hemorrhagic shock
25	M	24	Japanese	Sudden death

B-3 TAM 前投与 ICR マウスへの化合物投与
 mg/kg in 80% 1, 2-propanediol with 0.15% KCl, *i. p.*), BB (2.5mmol/kg in corn oil, *i. p.*), DIC (200 mg/kg in saline, *i. p.*)
 ICR マウス (雌性、6 週齢 20~25 g; 日本 SLC) に TAM (1 mg/kg in saline, *i. p.*) または TA (200 mg/kg in saline, *i. p.*)
 を 5 日間連続投与し、その後 APAP (400

を投与した。各群 3 匹のマウスを使用した。APAP および DIC は投与 6 時間後に、BB および TA は投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-4 AST、ALT およびトータルビリルビン (T-Bil) 値の測定

マウス下行大静脈より血液を採取し、7,000 rpm (3,000 g)、4° C で 15 分間遠心分離した後、血清約 400 μ L をサンプルチューブに採取した。AST、ALT および T-Bil 値は、血清 10 μ L を富士ドライケム SD スライドに点着させ、富士フィルム (Tokyo, Japan) の DRI-CHEM 4000V を用いて測定した。

B-5 マウスおよびヒト肝組織からの total RNA の調製

ヒト肝サンプルを用いる検討は金沢大学および岩手医科大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得た上で行った。マウスまたはヒト肝 50 mg に対して RNA iso 1 mL を加えた。氷冷下、ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、1.5 mL チューブに分注後、室温で 5 分間

放置した。0.2 mL のクロロホルム溶液を加えて 15 秒間激しく攪拌し、再度室温で 5 分間放置した。15,000 rpm (12,000 g)、4° C にて 15 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、0.5 mL のイソプロパノールを加え、室温で 10 分間放置した。15,000 rpm (12,000 g)、4° C にて 10 分間遠心分離し、沈殿を 70%エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、DEPC 処理精製水に溶解させ、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

B-6 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に依頼した。使用したアジレントアレイは Whole Mouse Genome Oligo であり、マウス全遺伝子を解析した。遺伝子発現は Agilent Technologies Microarray Scanner を用いて 5 μ m の解像度でスキャンした。スキャンの結果得られた数値化データを、GeneSpring にインポートし、ノーマライゼーションを行い、各シグナル値やフラグ情報を集めた

解析用データを作成した。

B-7 ICR マウスにおける TA 投与量依存 的な検討

ICR マウス (雌性、6 週齢 20~25 g; 日本 SLC) に TA (0, 50, 200 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与した。各群 3 匹のマウスを使用した。TA 投与後 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-8 ICR マウスにおける TA 投与時間依 存的な検討

ICR マウス (雌性、6 週齢 20~25 g; 日本 SLC) に TA (200 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与した。各群 3 匹のマウスを使用した。TA 投与後 0, 3, 6, 12, 24 および 48 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-9 Real-time RT-PCR による種々の遺 伝子の発現量解析

2-4 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

10 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全量を 23 µL とした。70° C 水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。さらに、5 × 逆転写反応用緩衝液 8 µL、2.5 M dNTP 8 µL、ReverTraAce (100 units/µL) 1 µL を加えて全量を 40 µL とし、30° C で 10 分間、42° C で 1 時間、98° C で 10 分間、サーマルサイクラーを用いて反応させた。得られた cDNA から以下の方法により PCR を行った。cDNA 溶液を 1 µL、2 × SGI 溶液を 10 µL、10 µM forward primer および reverse primer を 0.8 µL、ROX 溶液を 0.3 µL、滅菌水 7.1 µL を加えて全量を 20 µL とした。Stratagene (La Jolla, CA) の Mx3000P™ を用いて、95° C で 3 分間、94° C で 4 秒間、64° C で 20 秒間を 45 サイクルで反応を行った。45 サイクル終了後、60° C から 95° C まで、1° C /min を上昇させて融解曲線の測定を行った。PCR に用いたプライマーの配列を Table 2 に示す。

Table 2. Sequences of primers for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
Areg	5'-AGG CTT CGA CAA GAA AAC GGG-3'	5'-TCT GGA ACC ATC CGA AAG CTC-3'
Arg2	5'-TGC ATT TGA CCC TAA ACT GGC-3'	5'-CAA TGT GTC CTC CTT CTC TTG-3'
eNOS	5'-TGC AAA CCG TGC AGA GAA TTC-3'	5'-TGT CGC TCC TGC AAA GAA AAG-3'
Gapdh	5'-TCA CCA GGG CTG CCA TTT G-3'	5'-CTC ACC CCA TTT GAT GTT AGT-3'
Gdf9	5'-CAG AAG TCA CCT CTA CAA TAC-3'	5'-GAT TTG AGC AAG TGT TCC ATG-3'
Hemt1	5'-CTC TAT CAA CAA TAC CAG TGC-3'	5'-TAG CAC TTA TGG CAT GTA AGC-3'
Mmd2	5'-TGC TAT GTG GTG ATG GGT TTC-3'	5'-CTC TTA AAG AAC ACC ATG CCC-3'
Mmp9	5'-TAA GGA GTT CTC TGG TGT GCC-3'	5'-TGG AAA CTC ACA CGC CAG AAG-3'
Pign	5'-TGG CAG CTG GCT TGA TAT TGG-3'	5'-ATG CTG ACT GAT GGC TTC ACC-3'
hGAPDH	5'-CCA GGG CTT TTA ACT C-3'	5'-GCT CCC CCC TGC CCA AAT GA-3'
hMMD2	5'-ACC AGC CCA CAG AGT ATG AAC-3'	5'-TCC GAC AGG AAG TAG AGG TTG-3'

Areg; Amphiregulin, Arg2; Arginase 2, eNOS; epidermal NO synthetase, Gapdh; mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Gdf9, Growth differentiation factor 9, Hemt1; Hematopoietic cell transcript 1, Mmd2; mouse monocyte to macrophage differentiation-associated 2, Mmp9; Matrix metalloproteinase 9, Pign; Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class N, hGAPDH; human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hMMD2; human monocyte to macrophage differentiation-associated 2

B-10 TAM 前投与 ERα KO マウスへの TA
投与

ERα KO マウス (雌性、6 週齢 30~35 g、
系統 C57BL/6N) に TAM を 5 日間連続投与

(1 mg/kg in saline, *i. p.*) し、最終投与 12 時間後に TA (200 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与した。各群 3 匹のマウスを使用した。TA 投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-11 細胞培養

HuH-7 細胞、HLE 細胞、HepG2 細胞、HEK293 細胞、MCF-7 細胞、Hepal-6 細胞、J774A.1 細胞、MM45LTi 細胞、NIH/3T3 細胞、RAW-264.7 細胞および Y-1 細胞は 10% FBS を含む DMEM を用いて 10 cm シャーレで培養した。継代時、培地をアスピレーター除去した後 1 × PBS 溶液 4 mL をシャーレに加え、培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のチューブにシャーレより剥離した細胞を移し、4,000 rpm (1,000 g)、4° C で 5 分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してシャーレに播種し、5 % CO₂ 存在下 37° C で培養した。

Fa2N4 細胞は 10% FBS を含む MFE™ Plating Medium F を用いて 10 cm シャーレで培養した。継代時、培地をアスピレーター除去した後 1 × PBS 溶液 4 mL をシャーレに加え、培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のチューブにシャーレより剥離し

た細胞を移し、4,000 rpm (1,000 g)、4° C で 5 分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してシャーレに播種し、5 % CO₂ 存在下 37° C で培養した。

B-12 TA 誘導性細胞障害の検討

HuH-7 細胞、HLE 細胞、HepG2 細胞、Fa2N4 細胞、HEK293 細胞、MCF-7 細胞および Hepal-6 細胞を 96 ウェルプレートに各ウェル 20,000 cells となるよう播種し、5 % CO₂ 存在下 37° C で 24 時間培養した。その後、TA 濃度が 0, 1, 10, 100 μM, 1, 10 mM になるよう加え、24 時間処置した。

B-13 MTT アッセイ

同仁化学研究所の Cell counting kit-8 を用い、以下の方法で MTT アッセイを行った。TA 溶液を 24 時間処理した種々の細胞株に、CCK-8 溶液を各ウェル 10 μL ずつ加えた。溶液添加 1 時間後における 450 nm の吸光度を Biotrak II Plate reader を用いて測定した。

B-14 J774A.1 および Y-1 細胞への siMmd2 処置

1 ウェルあたり Lipofectamine RNAiMAX

2.5 μ L、20 μ M Mmd2 Stealth™ RNAi または 20 μ M rSOD2 Stealth™ RNAi 1.5 μ L に無血清培地を加え全量を 4 mL とし、6 ウェルプレートにアプライした。20 分間静置させた後に、J774A.1 細胞 (6×10^5 cells/well) または Y-1 細胞 (4×10^5 cells/well) を播種した。siMmd2 の配列は #1 CAGAAAACCAAAUAUGCAA, #2 CCACACAGUCUCAUGGAAA, #3 GCUAUGUGGUGAUGGGUUU, #4 GAUCAAAGCAACAUGGGAA, #5 GCAGGGAGACCAAGGCAUA を用いた。

B-15 肝癌由来細胞からの total RNA の調製

RNA iso を用いて total RNA を調製した。6 ウェルプレートで培養したそれぞれの細胞株に RNA iso 500 μ L を加えてピペッティングにより懸濁した後、室温で 5 分間放置した。100 μ L のクロロホルム溶液を加え、15 秒間激しく攪拌し、再度室温で 5 分間放置した。15,000 rpm (12,000 g)、4° C にて 15 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、250 μ L のイソプロパノールを加え、室温で 5 分間放置した。15,000 rpm (12,000 g)、4° C にて 10 分

間遠心分離し、沈殿を 75%エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、15,000 rpm (12,000 g)、4° C にて 10 分間遠心分離し、DEPC 処理精製水に溶解させた。60° C の水浴で 10 分間インキュベートした後、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

B-16 アテロコラーゲンを用いたマウスへの siRNA 送達

siRNA のマウス *in vivo* への導入は AteloGene™ を用いて行った。AteloGene™ 600 μ L に等量の 40 μ M に調製した siRNA 溶液を加え、4 rpm、4° C で 20 分間回転混和した。その後、10,000 rpm (7,000 g)、4° C にて 1 分間遠心分離することで脱泡処理した。AteloGene™/siRNA 複合体を尾静脈より投与 (200 μ L/body) し、投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓、脾臓および腎臓を採取した。

B-17 TAM 前投与における Mmd2 ノックダウンによる Mmd2 mRNA への影響

ICR マウス (雌性、6 週齢 20~25 g; 日

本 SLC) に TAM を 4 日間連続投与 (1 mg/kg in saline, *i. p.*) し、投与 12 時間後に AteloGene™/siRNA 複合体を静脈内投与した。投与 12 時間後に TAM (1 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与した。各群 3 匹のマウスを使用した。TAM 投与 12 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-18 TAM 前投与における Mmd2 ノックダウンによる TA 投与の影響

ICR マウス (雌性、6 週齢 20~25 g; 日本 SLC) に TAM を 4 日間連続投与 (1 mg/kg in saline, *i. p.*) し、投与 12 時間後に AteloGene™/siRNA 複合体を静脈内投与した。投与 12 時間後に TAM (1 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与し、さらにその 12 時間後に TA (200 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与した。各群 6 匹のマウスを使用した。TA 投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-19 TAM 未投与における Mmd2 ノックダウンによる TA 投与の影響

ICR マウス (雌性、6 週齢 20~25 g; 日

本 SLC) に AteloGene™/siRNA 複合体を静脈内投与した。投与 24 時間後に TA (100 mg/kg in saline, *i. p.*) を投与した。各群 5 匹のマウスを使用した。TA 投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

C. 研究結果

C-1 EE2、TAM、RAL および ICI 前投与による TA 誘導性肝障害への影響

2-2 の方法によって EE2、TAM、RAL および ICI 前投与による TA 誘導性肝障害への影響を 6 週齢雌性 ICR マウスを用いて検討した。TA 投与により None treatment (NT) と比べて血漿 ALT および AST 値の有意な上昇が認められた。EE2、TAM、RAL 前投与により TA 単独投与群と比べて、血漿 ALT および AST 値の有意な減少が認められた (Fig. 2A and 2B)。ICI 前投与では TA 単独投与群と比べて、血漿 ALT および AST 値の有意な減少は認められなかった。Total bilirubin (T-Bil) についてはいずれの群においても変動は認められなかった (Fig. 2C)。TAM 投与により最も

肝障害性の軽減が認められた。また、EE2 前投与の TA 投与群では血漿が黄色を示し、肝胆汁うっ滞の関与が考えられた。肝組織染色の検討においても TA 誘導性の肝障害が認められ、TAM 前投与により TA 誘導性の肝障害の軽減が認められた (Fig. 3)。TAM 投与のみでは血漿パラメータ (Figs. 2A, B and C) の上昇は認められず、肝組織染色 (Fig. 3) においても肝障害は認められなかった。

性の肝障害が軽減したことから、雄性 ICR マウスにおいては TAM 前投与による TA 投与の検討を行った。雄性マウスにおいても TA 投与により血漿 ALT および AST 値の顕著な上昇が認められた (Figs. 4A and 4B)。しかし、雌性マウスとは対照的に、TAM 前投与において TA 投与単独投与と比べて、血漿 ALT および AST 値の減少は認められなかった (Figs. 4A and 4B)。肝組織染色の検討においても、TA 誘導性の

雌性において TAM 前投与で最も TA 誘導

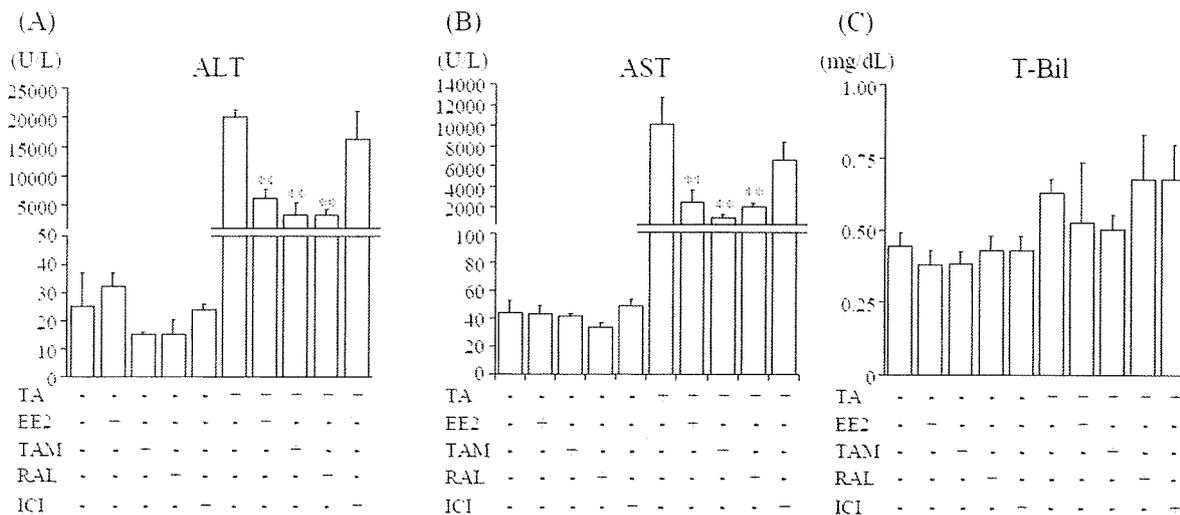


Fig. 2 Effects of estrogen-like drugs on TA-induced hepatotoxicity in female mice. Mice (female, 6-week old) were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days EE2 (100 µg/kg, i.p.), TAM (1 mg/kg, i.p.), RAL (3 mg/kg, i.p.), or ICI (1 mg/kg, i.p.) administration. ALT (A), AST (B), and T-Bil (C) were measured 24 h after TA administration. The data are mean ± SD of 3 mice. ***P* < 0.01, compared with only TA-administrated mice.

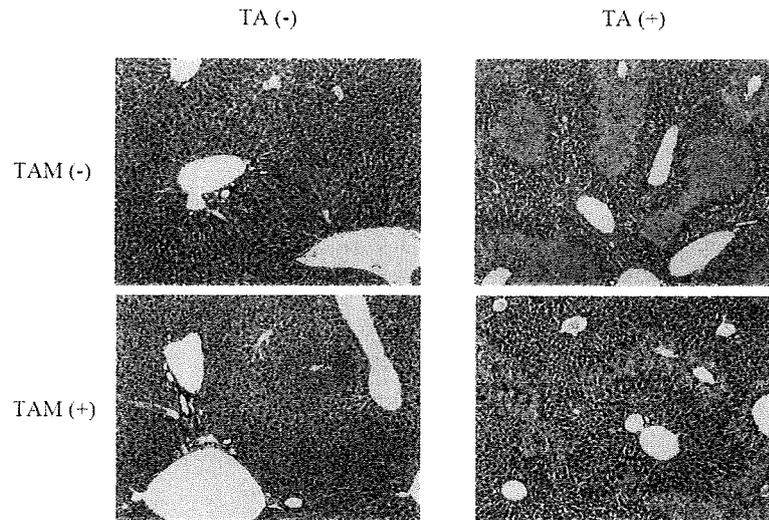


Fig. 3 Hepatoprotective effect of TAM on TA-induced hepatotoxicity in female mice. Mice were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). Hematoxylin-eosin staining was performed in sections of mouse liver.

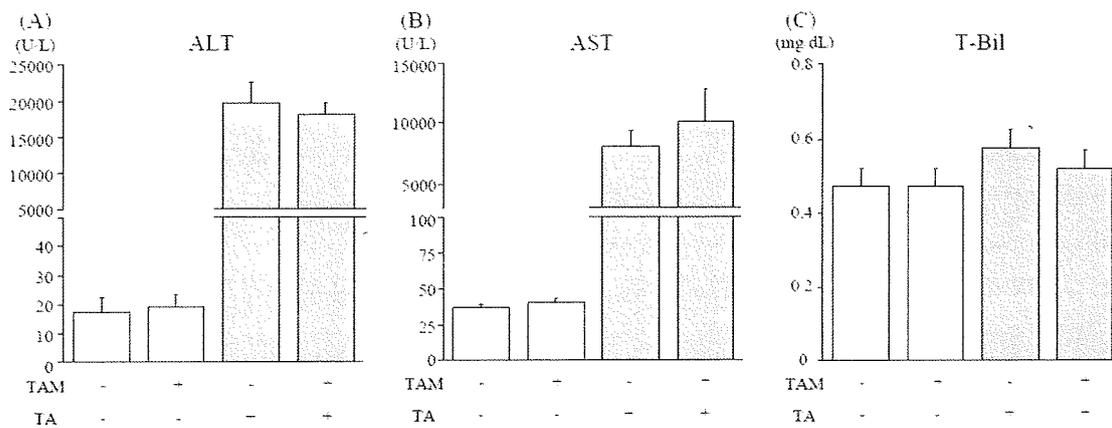


Fig. 4 Effects of TAM on TA-induced hepatotoxicity in male mice. Mice (male, 6-week old) were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). ALT (A), AST (B), and T-Bil (C) were measured 24 h after TA administration. The data are mean \pm SD of 3 mice.

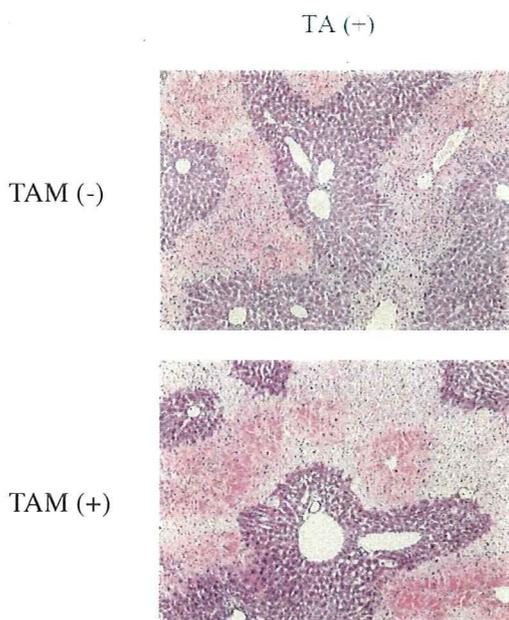


Fig. 5 Hepatoprotective effect of TAM on TA-induced hepatotoxicity in male mice. Mice (male, 6-week old) were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). Hematoxylin-eosin staining was performed in sections of mouse liver.

肝障害が雌性マウス同様に認められたが、TAMによるTA誘導性肝障害の軽減は認められなかった (Fig. 5)。TAMによるTA誘導性肝障害の軽減は雌においてのみ認められたため、以後の検討は雌のマウスを用いることとした。続いてTA以外の肝障害誘導化合物投与時におけるTAMの肝障害への影響を検討した。

C-2. TAM前投与による化合物誘導性肝障害への影響

TA以外の化合物でも同様にTAMによる肝保護作用が認められるか検討するため、TAM前投与によるAPAP、BB、DICおよびTA誘導性肝障害への影響について2-3に

述べた方法で検討した (Fig. 6)。APAP投与において、TAM前投与により血漿ALTおよびAST値の有意な減少が認められた。また、血漿AST値がALT値よりも高値を示した。BB投与において、TAM前投与により血漿ALTおよびAST値の有意な減少が認められた。DIC投与では、TAM前投与により血漿ALTの有意な減少が認められた。血漿AST値がALT値よりも高値を示し、AST値のTAM前投与による減少は認められなかった。TA投与ではFig. 2と同様にTAM前投与により血漿ALTおよびAST値の有意な減少が認められた。全ての化合物において対照群と比べて、TAM前投与群において肝障害の軽減が認められた。

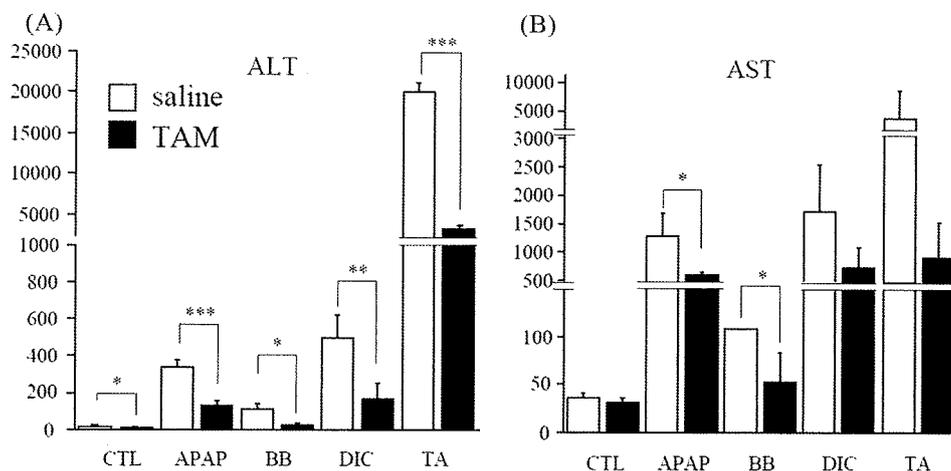


Fig. 6 Effects of TAM on various compounds-induced hepatotoxicity in female mice. Mice (female, 6-week old) were administrated APAP (400 mg/kg, i.p.), BB (2.5 mmol/kg, i.p.), DIC (200 mg/kg, i.p.) or TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). ALT (A) and AST (B) were measured 6 h (APAP and DIC) or 24 h (BB and TA) after administration. The data are mean \pm SD of 3 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, compared with TAM-untreated mice.

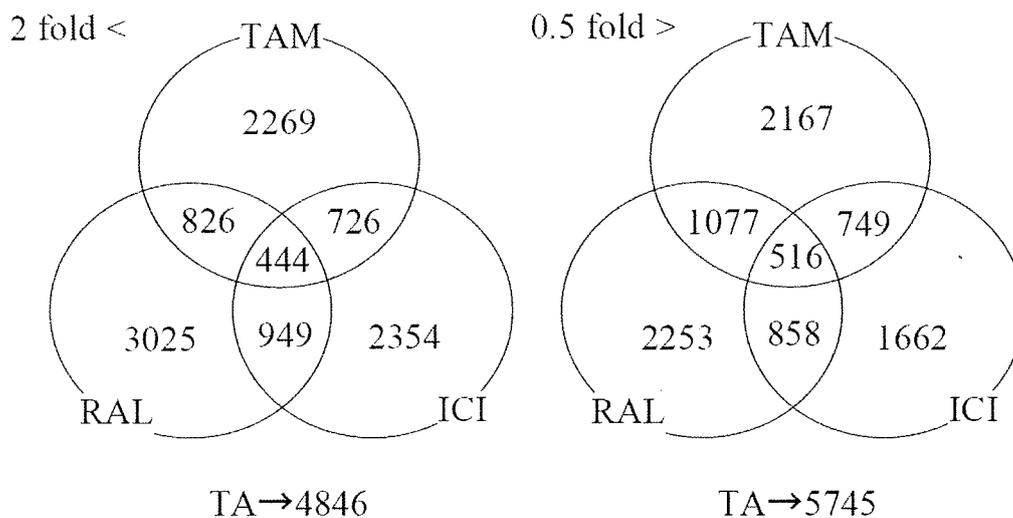
TAMによる肝障害性の軽減はTA特異的ではなく、APAPやDICなどの薬物およびBBなど毒物においても認められた。

C-3. DNAマイクロアレイによる解析

薬物誘導性肝障害に対するTAMによる肝保護作用の原因因子を解明するために、2-6に述べた方法に従いDNAマイクロアレイによる解析を行った。DNAマイクロアレイはNT、TAM単独投与、ICI単独投与、RAL単独投与、TA単独投与、TA+TAM投与、TA+ICI投与およびTA+RAL投与群のサンプルを用いて解析

を行った。3-1で述べたように、EE2投与群のサンプルは血漿の色が黄色を示したため、TAMおよびRALとは別の因子が関わると考え、DNAマイクロアレイ解析は行わなかった。TA単独投与では4846、TAM前投与群では2,269、ICI前投与群では2,354およびRAL前投与群では3,025の遺伝子がNTと比べて2倍以上上昇した(Fig. 7)。また、TA単独投与群を対照とした場合、TAM前投与群では3,732、ICI前投与群では2,783およびRAL前投与群では4,731遺伝子が2倍以上上昇した。TAMおよびRAL前投与群においてTA誘導性

CTL:Non treatment



CTL:TA

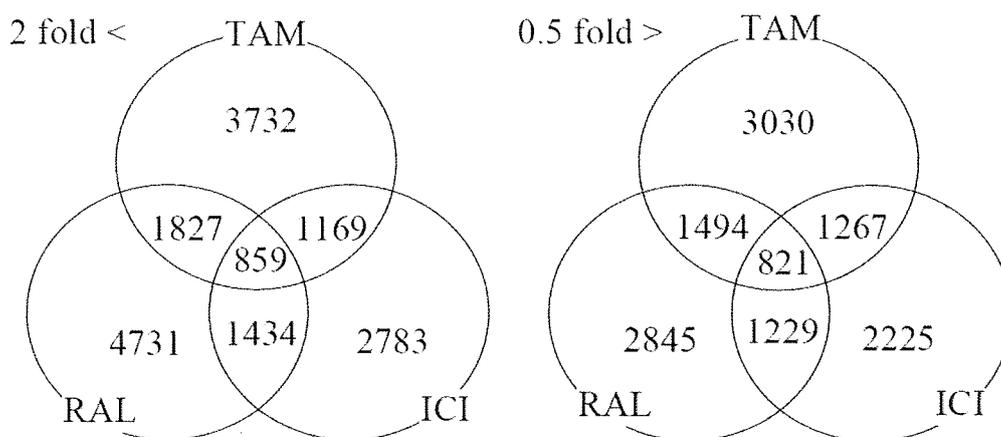


Fig. 7 Venn diagram depiction of probe set regulation of TAM-, ICI-, and RAL-administrated mice relative to NT- or TA-administrated mice. Mice (female, 6-week old) were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM (1 mg/kg, i.p.), RAL (3 mg/kg, i.p.), or ICI (1 mg/kg, i.p.) administration.

の肝障害性が軽減し、ICI 前投与群では軽減が認められなかったことから、TAM および RAL 前投与群のみで上昇した遺伝子を選択した。TAM 単独投与および RAL 単独投与で 2 倍以上上昇し、ICI では 0.5~2 倍の変動幅の遺伝子は 380 個であった。その中でも TAM および RAL 単独投与いずれか、もしくはともに 5 倍以上上昇した遺伝子として Growth differentiation factor 9 (Gdf9)、Monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2)、Matrix metalloproteinase 9 (Mmp9) および Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class N が候補に挙げられた。

(Table 3)。また、TAM 単独投与および RAL 単独投与とともに 2.5 倍以上上昇し、ICI でほとんど変動が認められない (変動幅 0.90~1.10 倍) 遺伝子として上記に挙げた Mmp9 および Pign 以外に Arginase 2 (Arg2) および Hematopoietic cell transcript 1 (Hemt1) の 2 つが挙げられた (Table 3)。TA 単独投与を対照とした場合、TAM 投与および RAL 投与で 2 倍以上上昇し、ICI では 0.5~2 倍の変動幅の遺伝子として 907 遺伝子あったが、Table 3 で挙げた遺伝子と共通するものとして唯一 Mmd2 が挙げられた。

Table 3 DNA array analysis

Gene name	Genbank ID	Common name	TAM*	ICI*	RAL*
Arginase 2	NM_009705	Arg2	2.67	1.08	4.74
Growth differentiation factor 9	NM_008110	Gdf9	2.02	1.09	7.38
Hematopoietic cell transcript 1	NM_010416	Hemt1	3.28	1.09	2.72
Monocyte to macrophage differentiation-associated 2	NM_175217	Mmd2	7.57	1.86	8.21
Matrix metalloproteinase 9	NM_013599	Mmp9	3.30	1.10	6.49
Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class N	NM_013784	Pign	5.50	1.10	3.41

*fold change compared with NT

また、NT と比べて 0.5 倍以下に減少した遺伝子数は TA 単独投与では 5745、TAM 前投与群では 2,167、ICI 前投与群では 1,662 および RAL 前投与群では 2,253 個であった。また、TA 単独投与群を対照とした場合、TAM 前投与群では 3,030、ICI 前投与群では 2,225 および RAL 前投与群では 2,845 遺伝子が 0.5 倍以下に減少した。本研究では TAM による肝保護遺伝子の特定を目的としているため肝保護遺伝子と相互作用し、抑制に働く遺伝子などは TAM および RAL 投与により減少すると考えられる。しかしながら、肝保護作用の直接的な原因とは考えにくいいため、今回は減少した遺伝子群は候補から外すこととし、Table 3 に挙げた計 6 種を肝保護遺伝子の候補とした。

C-4. 候補遺伝子の TA 投与量依存的な発現変動

Arginase 2 (Arg2)、Growth differentiation factor 9 (Gdf9)、Hematopoietic cell transcript 1 (Hemt1)、Mmd2、Matrix metalloproteinase 9 (Mmp9) および phosphatidylinositol

glycan anchor biosynthesis class N (Pign) における TA 投与量依存的な血漿 ALT 値および mRNA 発現量変動を 2-7 および 2-9 の方法に述べた方法で検討した。6 週齢 ICR 雌性マウスにおいて、TA 投与量依存的な血漿 ALT 値の上昇が認められた (Fig. 8A)。Arg2 mRNA および Gdf9 mRNA において、TA 投与量依存的な上昇が認められ、Mmd2 mRNA においては TA 投与量依存的な減少が認められた (Fig. 8B)。Hemt1 mRNA において TA 投与 10 mg/kg では変動が認められなかったが、50 および 200 mg/kg 投与では顕著な上昇が認められた。しかし、TA 投与量依存性は認められなかった。Mmp9 mRNA では TA 投与 10 および 50 mg/kg では変動は認められなかったが、200 mg/kg 投与では顕著に上昇した。しかし、TA 投与量依存性は認められなかった。Pign mRNA においては TA 投与 10 および 50 mg/kg では変動は認められなかったが、200 mg/kg 投与では僅かに減少した。しかし、TA 投与量依存性は認められなかった。

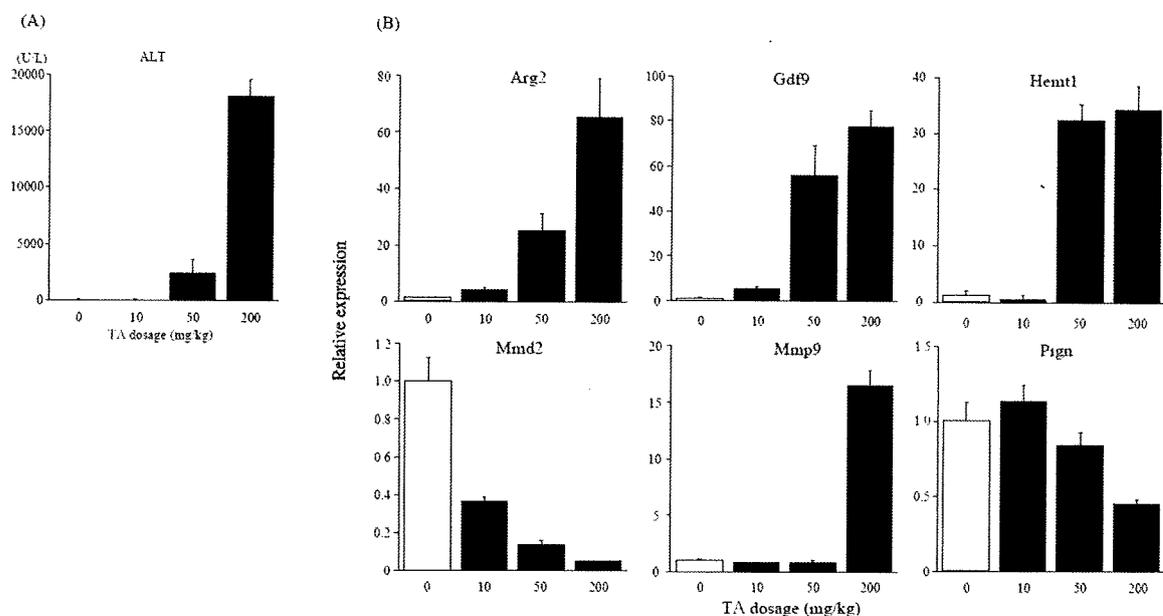


Fig. 8 Dose-dependent effects of TA administration on plasma ALT (A) and candidate genes for hepatoprotection of TAM (B). Mice (female, 6-week old) were administrated TA (0, 10, 50, or 200 mg/kg, i.p.). Plasma and liver samples were collected 24 h after TA administration. The data are mean \pm SD of 3 mice.

C-5. 候補遺伝子のTA投与時間依存的な発現変動

Arg2、Gdf9、Hemt1、Mmd2、Mmp9およびPignにおけるTA投与時間依存的な血漿ALT値およびmRNA発現量変動を2-8および2-9に述べた方法に従って検討した。TA投与時間依存的な血漿ALT値の上昇が認められ、投与後24時間で最大となり、48時間では減少した。TA投与0, 3, 6, 12および24時間後において、TA単独投与群に比べて、TA+TAM群でALT値の有意な減

少が認められた (Fig. 9A)。TA投与48時間後では有意ではないものの減少傾向が認められた。Arg2 mRNAにおいて、TA単独投与ではTA投与24時間後で最大となり、48時間後で減少した。TA+TAM群ではTA投与48時間後まで上昇し続けた。Gdf9 mRNAにおいて、TA単独投与ではTA投与3時間後で上昇し、24時間後まで同程度であり、48時間後で減少した。TA+TAM群ではTA投与24時間後で最大となり、48時間後で減少した。

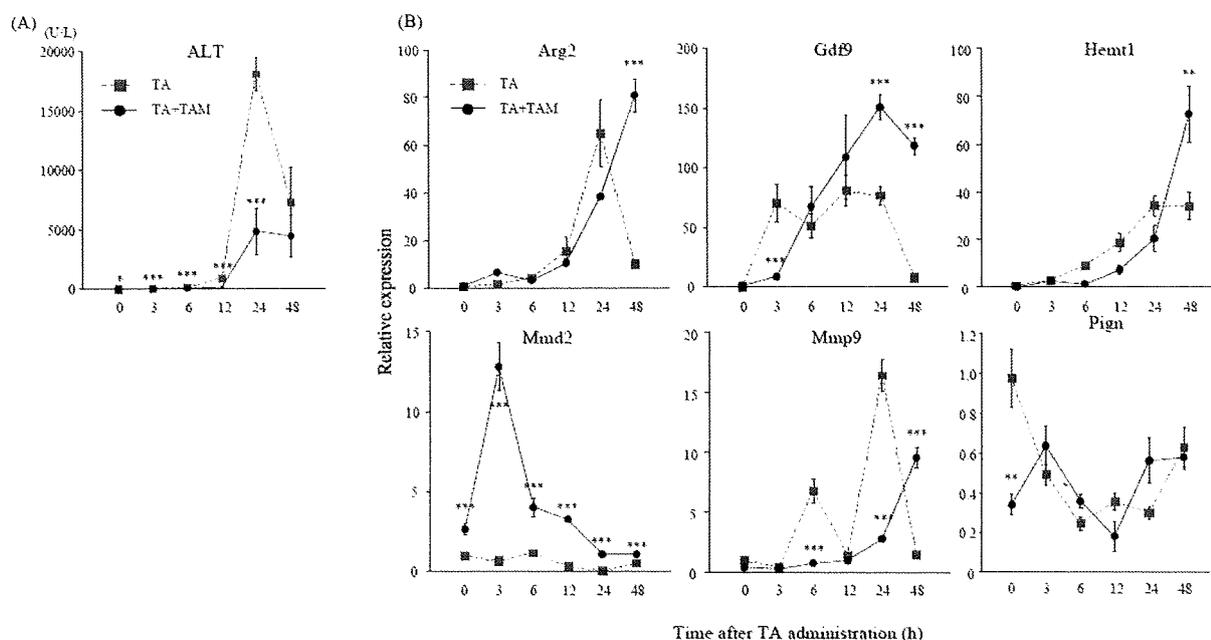


Fig. 9 Time-dependent effects of TA administration on plasma ALT (A) and candidate genes for hepatoprotection of TAM (B). Mice (female, 6-week old) were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). Plasma and liver samples were collected 0, 3, 6, 12, 24 or 48 h after TA administration. The data are mean \pm SD of 3 mice. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, compared with only TA administrated mice.

Hemt1 mRNA において、TA 単独投与では TA 投与 24 時間後まで上昇し続け、48 時間後ではわずかに減少した。TA+TAM 群では TA 投与 48 時間後まで上昇し続けた。Mmd2 mRNA において、TA 単独投与では時間依存的な減少が認められた。TA+TAM 群では TA 投与 3 時間後で最大となり、その後減少した。Mmp9 mRNA において、TA 単独投与群では、TA 投与 6 時間および 24 時間でピークとなった。TA+TAM 群では TA 投与 12

時間後までは変動が認められなかったが、24 時間後で上昇し、48 時間後ではさらに上昇した。Pign mRNA において、TA 単独投与では TA 投与後 24 時間まで減少し、48 時間後では上昇した。TA 単独投与群と比べて、TA+TAM 群で全ての時間において発現上昇が認められたのは Mmd2 のみであった。

C-6. 4 種の化合物投与における候補遺