

伝子の発現変動

Arg2、Gdf9、Hent1、Mmd2、Mmp9 および Pign における 4 種の肝障害誘導化合物投与による mRNA 発現量変動を検討した (Fig. 10)。Arg2 mRNA において、TAM および RAL 前投与において発現の有意な上昇が認められ、ICI 前投与では発現の上昇

が認められなかった。また、APAP+TAM および TA+TAM 群では対照群と比べて発現の変動は認められなかったが、BB+TAM 群では発現の有意な減少が認められ、DIC+TAM 群では発現の有意な上昇が認められた。Gdf9 mRNA において、RAL 前投与において発現の有意な上昇が認められ、TAM および

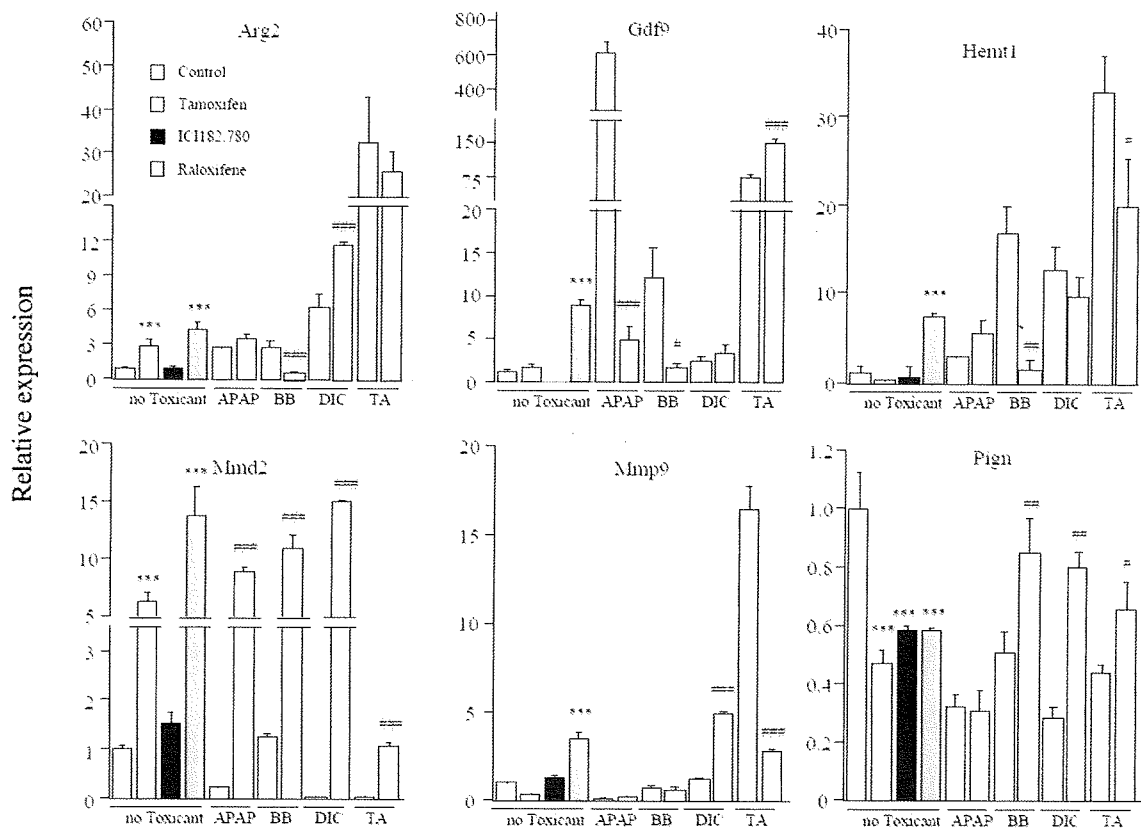


Fig. 10 Effects of various compounds administration on the experimental of candidate genes for hepatoprotection of TAM. Mice (female, 6-week old) were administrated APAP (400 mg/kg, i.p.), BB (2.5 mmol/kg, i.p.), DIC (200 mg/kg, i.p.) or TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). The data are mean  $\pm$  SD of 3 mice. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001, compared with none-treated mice. # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01, and ### $P$  < 0.001, compared with TAM-untreated mice.

ICI 前投与では発現の上昇が認められなかった。また、APAP+TAM および BB+TAM 群では対照群と比べて発現の有意な減少が認められたが、DIC+TAM 群では発現の変動は認められず、TA+TAM 群では発現の有意な上昇が認められた。Hemt1 mRNA において、RAL 前投与において発現の上昇が認められたが、TAM および ICI 前投与で発現の上昇が認められなかった。また、APAP+TAM および DIC+TAM 群では対照群と比べて発現の変動が認められなかったが、BB+TAM および TA+TAM 群では発現の有意な減少が認められた。Mmd2 mRNA において、TAM および RAL 前投与において顕著な発現の上昇が認められた。ICI 前投与では発現の上昇は認められなかった。また、APAP+TAM、BB+TAM、DIC+TAM および TA+TAM 群において発現の有意な上昇が認められた。Mmp9 mRNA において、RAL 前投与において発現の上昇が認められたが、TAM および ICI 前投与では発現の変動が認められなかった。また、APAP+TAM および BB+TAM 群では発現変動は認められず、DIC+TAM 群では対照群と比べて発現の有意な上昇が認められ、TA+TAM 群では発現の有意な

減少が認められた。Pign mRNA において、TAM および RAL 前投与において発現の上昇が認められなかった。ICI 前投与でも発現の上昇が認められなかった。また、APAP+TAM 投与では対照群と比べて発現変動が認められず、BB+TAM、DIC+TAM および TA+TAM 群では発現の有意な上昇が認められた。DNA マイクロアレイ解析の結果より、TAM および RAL 単独投与において全てに遺伝子で上昇が認められると考えられたが、Gdf9、Hemt1、Mmp9 および Pign mRNA では上昇が認められず、再現が得られなかった。Arg2 および Mmd2 mRNA においては上昇が認められ、再現が得られた (Fig. 10)。

#### C-7. ERα KO マウスにおける TAM 前投与による TA 誘導性肝障害への影響

ERα KO マウスにおける TAM 前投与による TA 誘導性肝障害への影響を 2-10 に述べた方法に従い検討した (Fig. 11)。Wild-type マウスにおいて、ICR マウスと同様に TA 投与により顕著な ALT 値の上昇が認められた。また、TAM 前投与により、TA 単独投与群と比べて血漿 ALT 値の有意

な減少が認められた (Fig. 11)。一方、ERα KO マウスにおいては TAM による肝保護作用は認められなかった。また、ERα KO マウスにおいて Wild type に比べて血漿

ALT および AST 値が有意に高かった。これより TAM による TA 誘導性肝障害の軽減は ERα を介することが示唆された。

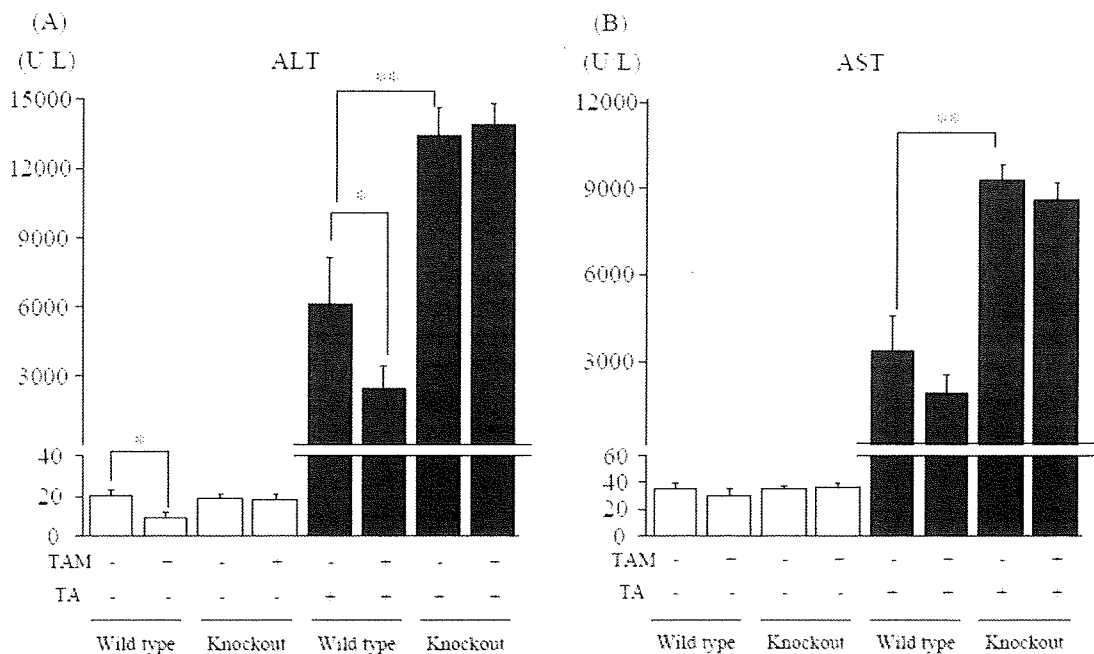


Fig. 11 Effects of TAM on TA-induced hepatotoxicity in ERα KO mice. Mice (female, 6-week old) were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 5 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). ALT (A) and AST (B) were measured 24 h after TA administration. The data are mean ± SD of 3 mice. \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01.

#### C-8. ERα ノックアウトマウスにおける注目遺伝子の発現変動

TAM は ERα を介して様々な生態反応に関与していることが知られているため、Arg2、Gdf9、Hemt1、Mmd2、Mmp9 および Pign mRNA の ERα KO マウスにおける変動

を検討した (Fig. 12)。Arg2 mRNA において、TAM 前投与により有意な上昇が認められ、ERα KO マウスにおいて上昇は認められなかった。Gdf9 mRNA において、TAM 前投与により有意な上昇が認められ、ERα KO マウスにおいても有意な上昇が認められ

た。Hemt1 mRNA においてはいずれの群においても検出されなかった。Mmd2 mRNA において、TAM 前投与により有意な上昇が認められ、ERa KO マウスにおいては上昇

が認められなかった。また、ERa KO マウスにおいて Mmd2 mRNA の発現量が Wild type に比べて 1/10 程度であった。

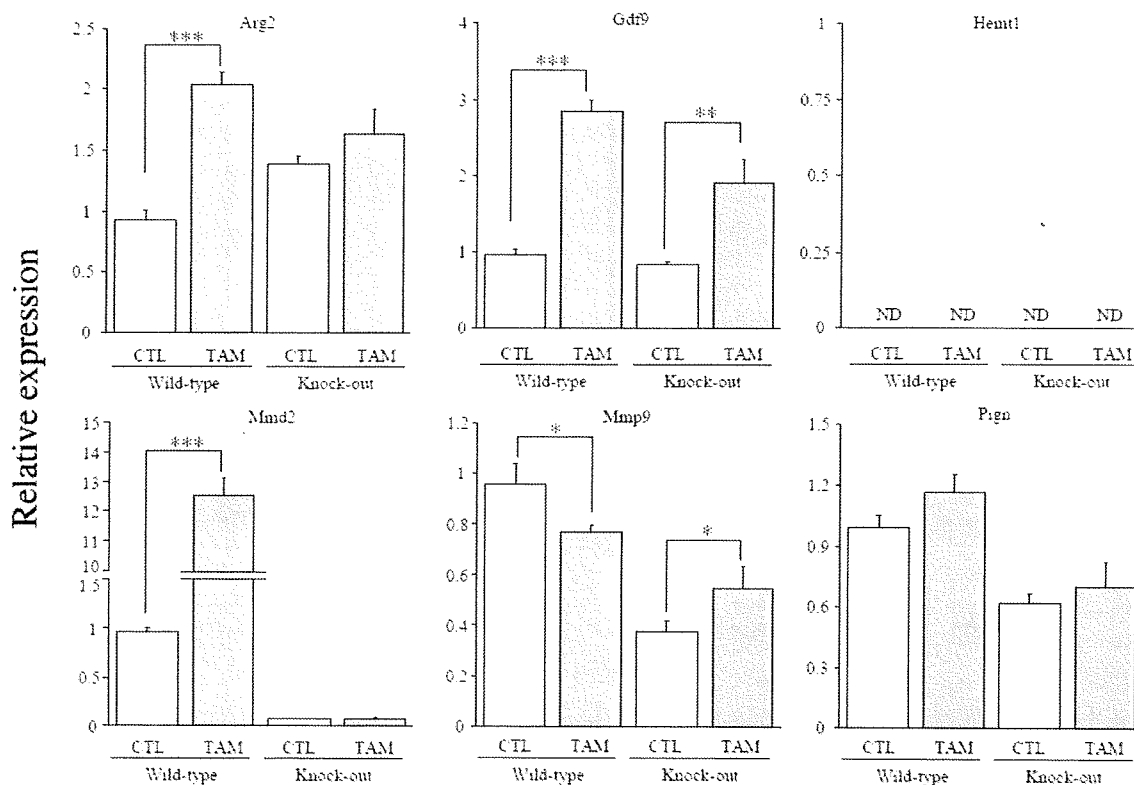


Fig. 12 Effects of TAM administration on candidate genes for hepatoprotection of TAM in ER $\alpha$  KO mice. Mice (female, 6-week old) were administrated TAM for 5 days (1 mg/kg, i.p.). The data are mean  $\pm$  SD of 3 mice. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001. ND; Not detectable.

Mmp9 mRNA において、TAM 前投与により上昇は認められず、ERa KO マウスにおいて有意な上昇が認められた。Pign mRNA においてはいずれの群においても変動は認められなかった。これより、Arg2 および Mmd2

が ERa を介して上昇されることが示唆された。3-4、3-5、3-6、3-7 および 3-8 の結果より、Mmd2 を肝保護遺伝子の第一候補とし、詳細な検討を行っていくこととした。

#### C-9. TA 誘導性細胞障害の検討

Mmd2 が TAM による肝保護に関与しているか検討を行うにあたり、*in vitro* での系を構築することとした。*In vitro* 系でこれまでの *in vivo* 系と同様に TA 誘導性の肝障害が TAM により軽減されれば、遺伝子発現調節による解析が容易であると考えた。最初に、2-12 および 2-13 の方法に従い HuH-7、HLE、CYP2E1 発現アデノウイルス感染 HepG2 (HepG2/AdCYP2E1)、Fa2N4、CYP2E1 安定発現 HEK293 (HEK293/CYP2E1 stable)、MCF-7 および Hepa1-6 細胞株を用いて、TA の細胞障害性を MTT アッセイを用いて検討した。いずれの細胞株においても TA 処置による細胞生存率の減少は認められなかった (Fig. 13)。TA 処置濃度をより高濃度で行い細胞障害を惹起させ検討を進めていくことは困難と考え、*in vitro* 系の検討は保留とし、*in vivo* で検討を進めていくこととした。

#### C-10. マウス細胞株における Mmd2 mRNA の発現

*In vivo* で Mmd2 の肝保護の関与を検討するために、Mmd2 に対する siRNA (siMmd2) をマウスに投与することとした。*In vivo* でのノックダウンを検討するにあたり、*in vitro* でノックダウン効率のよい siMmd2 を選択することとした。最初に、Mmd2 mRNA が発現している細胞株を選択するために、J774A.1、RAW264.7、NIH/3T3、MM45LTi、Hepa1-6 および Y-1 細胞株の 6 種のマウス由来細胞株を用いた。J774A.1 および Y-1 細胞において Mmd2 mRNA の発現が認められた (Fig. 14)。RAW264.7、NIH/3T3、MM45LTi および Hepa1-6 細胞においては Mmd2 mRNA の発現は認められなかった。J774A.1 および Y-1 細胞ともに Mmd2 mRNA 発現量は検出限界値であったことから、1 種の細胞株を用いてノックダウン効率の良い siMmd2 を選択することは信憑性に欠けると考え、両細胞株を用いることとした。

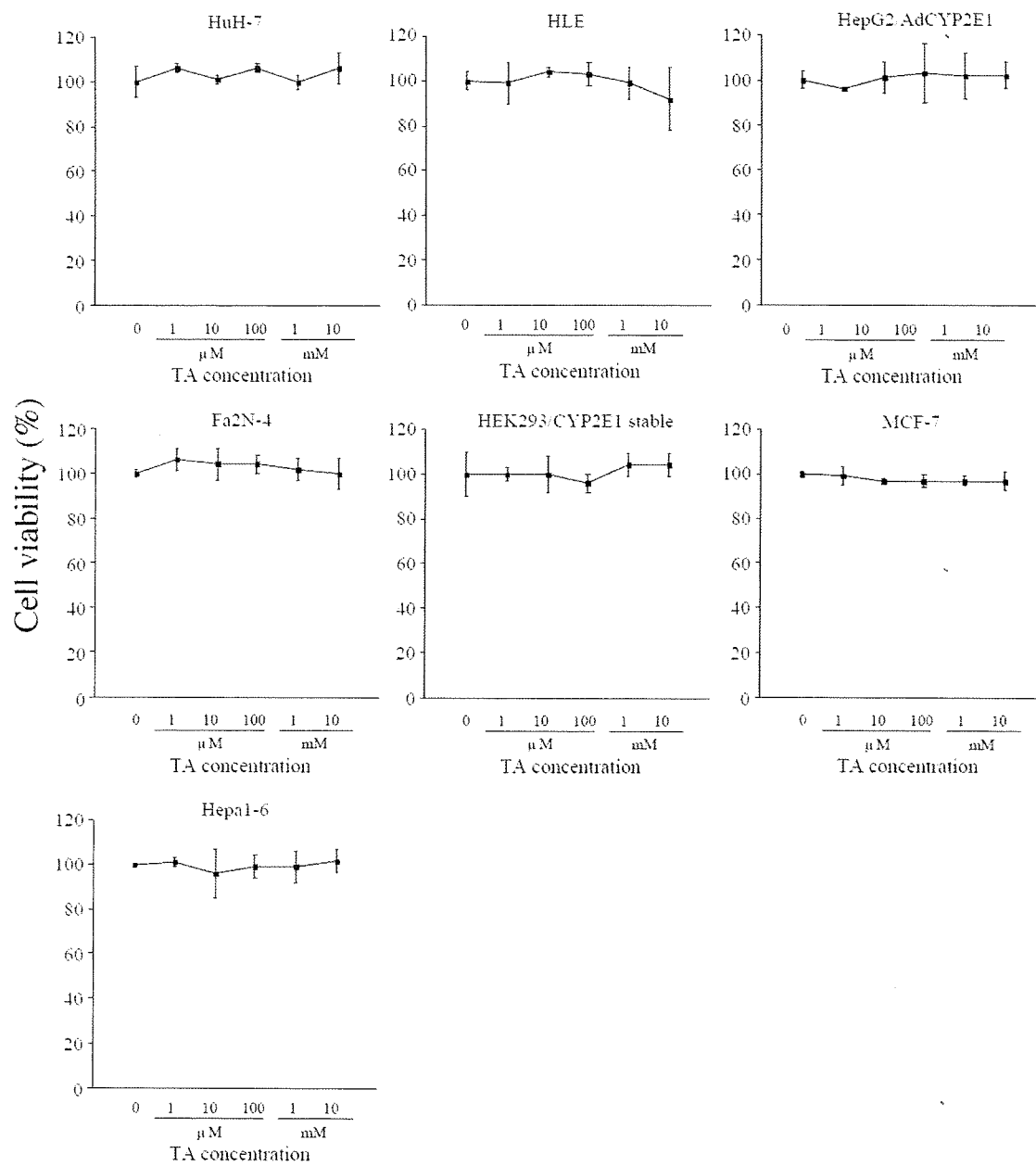


Fig. 13 MTT assay in various cell lines after 24 h exposure of TA. Cell viability is expressed as percentage of solvent-treated cells. The data are mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments.

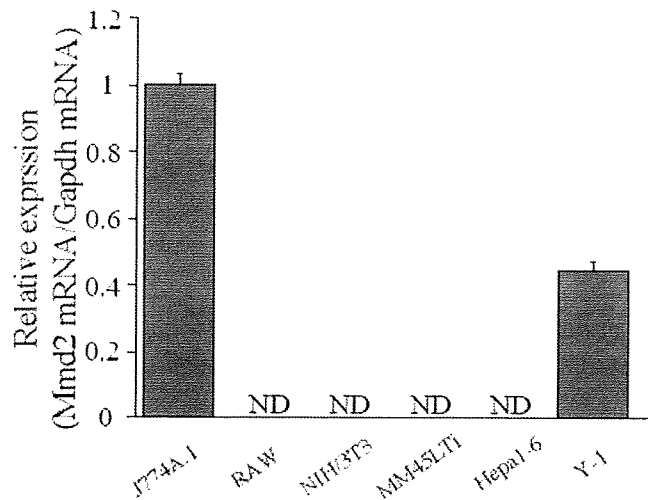


Fig. 14 Mmd2 mRNA levels in various mouse cell lines. The expression levels of Mmd2 mRNA were determined by realtime RT-PCR analysis. The data are mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. ND; Not detectable.

C-11. *In vitro*における siMmd2 処置による Mmd2 mRNA への影響

J774A.1 および Y-1 細胞に 5 種類の siMmd2 (#1~#5) を 2-14 に述べた方法に従い処置した。J774A.1 細胞において、#5siMmd2 処置によってのみ Mmd2 mRNA の濃度依存的かつ有意な減少が認められた (Fig. 15A)。Y-1 細胞においては#1siMmd2 および#5siMmd2 処置により Mmd2 mRNA の濃度依存的かつ有意な減少が認められた (Fig. 15B)。両細胞株において、lipofectamine (lipo) 単独処置および siScramble (siScr) 処置において、Mmd2 mRNA の変動は認められなかった。

#5siMmd2 処置において両細胞株でノックダウンが認められたことから、*in vivo* では#5siMmd2 (以下 siMmd2) を投与することとした。また、siMmd2 の対照として siScr を用いることとした。

C-12 アテロコラーゲンを用いた *in vivo* における siMmd2 処置による Mmd2 mRNA への影響

siRNA を未修飾で投与を行った場合、ヌクレアーゼにより速やかに分解されることが知られている。そこで 2-16 に述べた方法に従って、siRNA 輸送媒体として知られるアテロコラーゲンを用いた検討を行っ

た。マウスは6週齢雌性 ICR を用いた。

NT と比べて siMmd2 投与マウスにおいて、

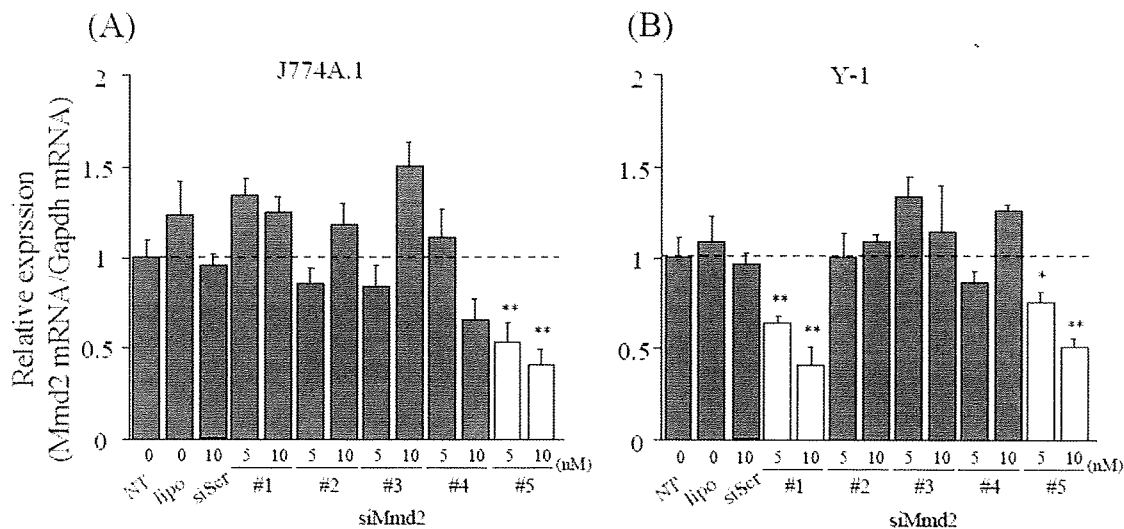


Fig. 15 Relative expression levels of Mmd2 mRNA in J774A.1 cells (A) and Y-1 cells (B) transfected various siRNA. Mmd2 mRNA in J774A.1 cells (A) and Y-1 cells (B) 48 h after the transfection of siRNA were determined by real time RT-PCR analysis. The data are mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared with siScr treated groups.

肝 Mmd2 mRNA の約 70%の減少が認められた (Fig. 16A)。アテロコラーゲン単独投与群 (Atelo) および siScr 投与群においては肝 Mmd2 mRNA の変動は認められなかった。siMmd2 投与群において、若干ではあるが血漿 ALT 値の有意な上昇が認められ、血漿 AST および T-Bil 値の変動は認められなかった (Fig. 16B)。腎臓および脾臓においては Mmd2 mRNA 発現が認められず、ノックダウンを確認することはできなかった (data not shown)。

C-13 TAM 前投与における Mmd2 ノックダウンによる Mmd2 mRNA への影響

TAM 前投与における Mmd2 ノックダウンによる Mmd2 mRNA への変動について 2-17 に述べた方法に従って検討した。マウスは 6 週齢雌性 ICR を用いた。NT と比べて TAM+siScr 投与マウスにおいて、Mmd2 mRNA の約 20 倍の上昇が認められた (Fig. 17A)。また、血漿 ALT および AST 値は有意な減少が認められ、血漿 T-Bil 値の変動は認められなかった (Fig. 17B)。

TAM+siMmd2 投与マウスにおいては



TAM+siScr 投与マウスと比べて約 70%の Mmd2 mRNA の減少が認められた。

ALT および AST 値の減少は TAM+siMmd2 投与マウスでは認められなかった。

TAM+siScr 投与マウスで認められた血漿

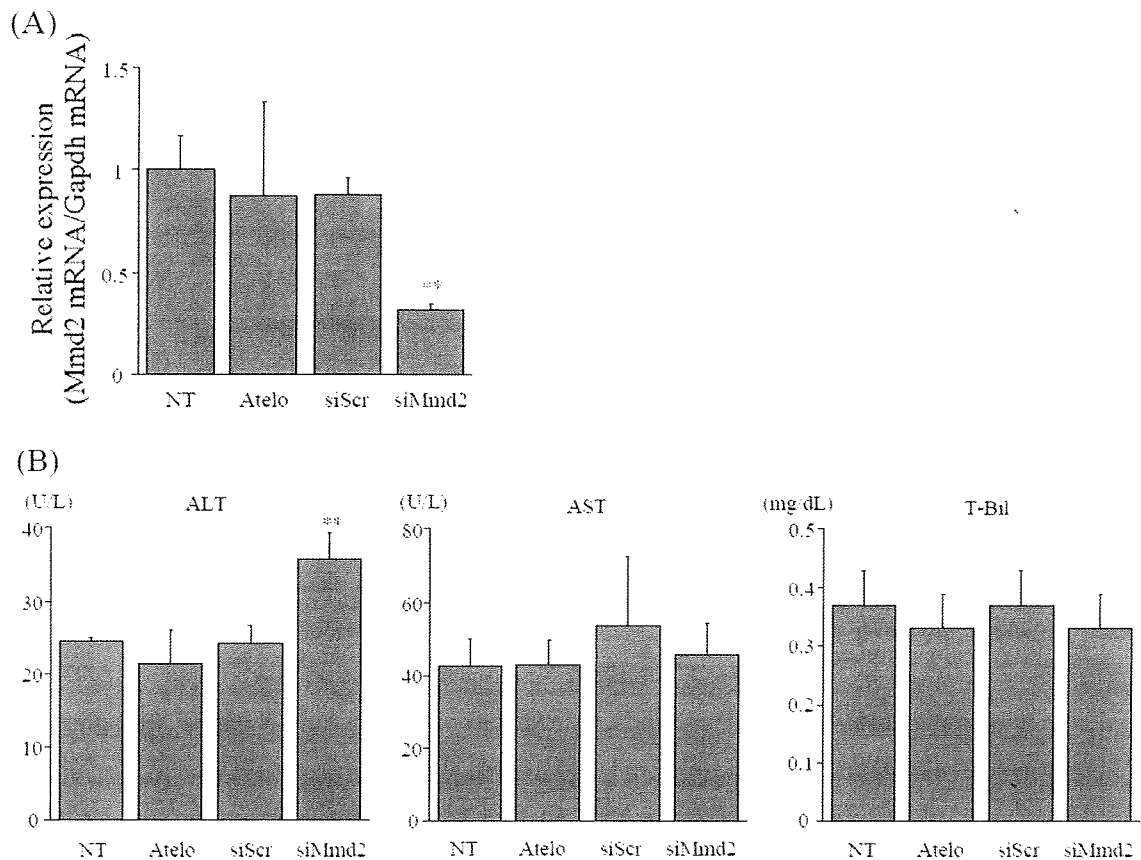


Fig. 16 Relative expression levels of Mmd2 mRNA (A) and plasma ALT, AST, and T-Bil (B) in female mice administrated siMmd2. Atelocollagen only, atelocollagen/siScr, and atelocollagen/siMmd2 (5 nmol/head, i.v.) in a 200  $\mu$ L volume were injected into the mouse tail vein. Plasma and liver samples were collected after 24 h injection of atelocollagen. The data are mean  $\pm$  SD of 3 mice. \*\* $P < 0.01$ , compared with siScr injected mice.

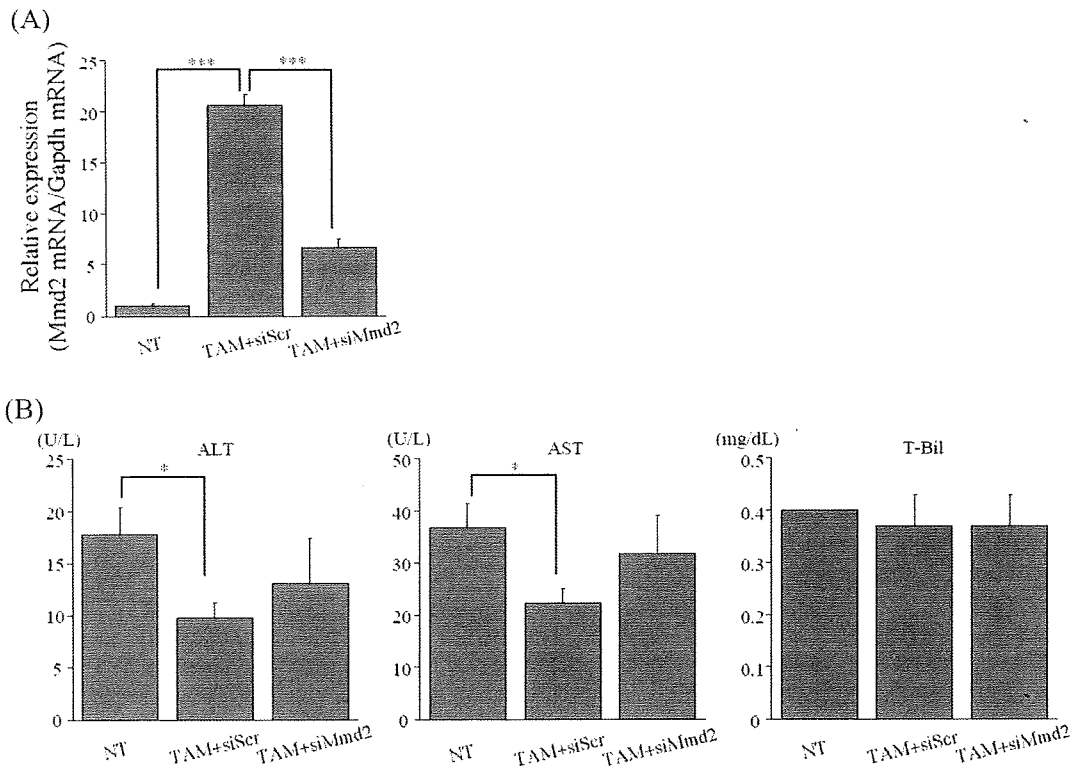


Fig. 17 Relative expression levels of Mmd2 mRNA (A) and plasma ALT, AST, and T-Bil (B) in female mice administrated siMmd2 after 5 days TAM administration. Atelocollagen/siScr, and atelocollagen/siMmd2 (5 nmol/head, i.v.) in a 200  $\mu$ L volume were injected into the mouse tail vein after 4 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). The last TAM administrations (1 mg/kg, i.p.) were performed 12 h after atelocollagen injection. Plasma and liver samples were collected after 24 h injection of atelocollagen. The data are mean  $\pm$  SD of 3 mice. \* $P$  < 0.05 and \*\*\* $P$  < 0.001.

C-14. TAM 前投与における Mmd2 ノック  
 ダウンによる TA 投与の影響  
 TAM 前投与における Mmd2 ノックダウン  
 による TA 投与の影響を 2-18 に述べた方  
 法に従って検討した。マウスは 6 週齢雌  
 性 ICR を用いた。TA+TAM+siMmd2 投与マウ

スにおいて、TA+TAM+siScr 投与マウスに  
 比べて血漿 ALT および AST 値の有意な上  
 昇が認められた (Fig. 18B)。血漿 T-Bil  
 値に変動は認められなかった。また、  
 TA+TAM+siMmd2 投与群において、  
 TA+TAM+siScr 投与マウスに比べて Mmd2

mRNA の有意な減少が認められた (Fig. 18A)。siMmd2 投与により、TAM による肝保護作用の抑制が認められた。

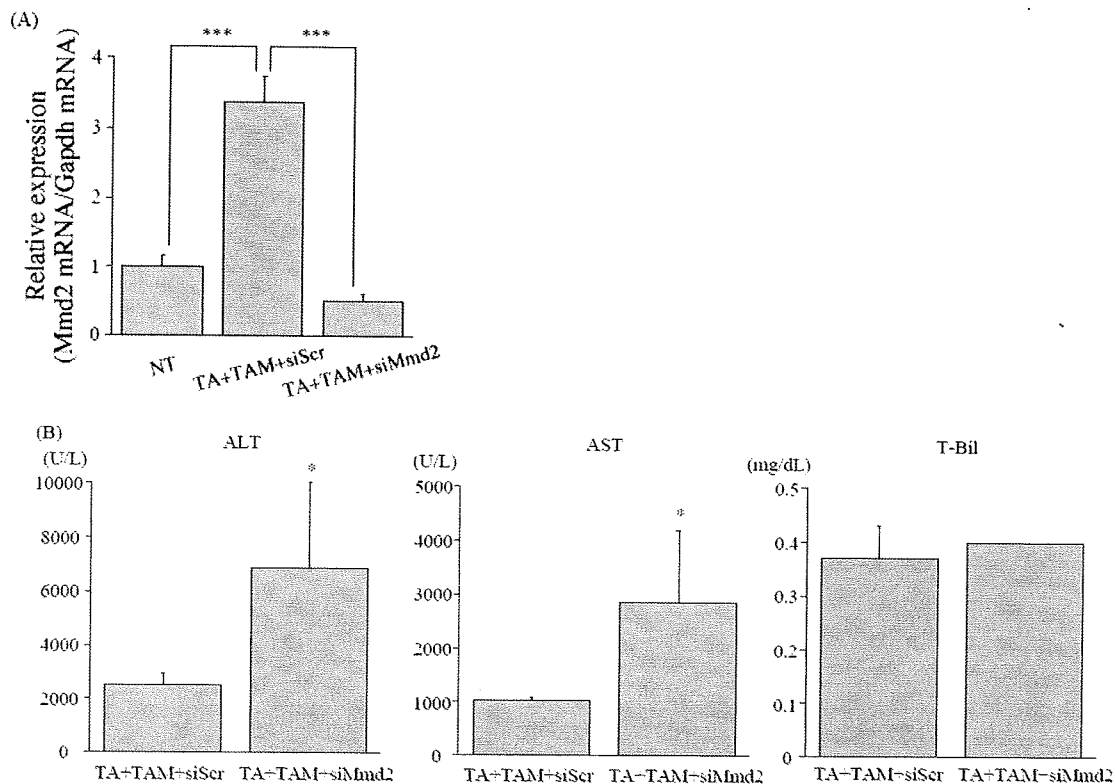


Fig. 18 Relative expression levels of Mmd2 mRNA (A) and plasma ALT, AST, and T-Bil (B) in female mice administrated TA and siMmd2 after 5days TAM administration. Atelocollagen/siScr, and atelocollagen/siMmd2 (5 nmol/head, i.v.) in a 200  $\mu$ L volume were injected into the mouse tail vein after 4 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). The last TAM administrations (1 mg/kg, i.p.) were performed 12 h after atelocollagen injection. Mice were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 24 h injection of atelocollagen. Plasma and liver samples were collected after 24 h injection of TA. The data are mean  $\pm$  SD of 6 mice. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

C-15. TAM 未投与における Mmd2 ノック  
ダウンによる TA 投与の影響

TAM 未投与における Mmd2 ノックダウン  
による TA 投与の影響を 2-19 に述べた方

法に従って検討した。マウスは 6 週齢雌  
性 ICR を用いた。TA+siMmd2 投与マウスに  
おいて、TA+siScr 投与マウスに比べて血  
漿 ALT および AST 値の有意な上昇が認め

られた (Fig. 19B)。血漿 T-Bil 値に変動は認められなかった。siMmd2 投与により、TA 誘導性肝障害の増大が認められた。また、TA+siMmd2 投与群において、TA+siScr 投与マウスに比べて Mmd2 mRNA の有意な減少が認められた (Fig. 19A)。NT と比べ

て TA+siScr 投与群で Mmd2 mRNA の有意な減少が認められたが、Fig. 8、Fig. 9 および Fig. 10 と同様の結果であり、再現が得られた。3-14 および 3-15 の結果より、Mmd2 が肝保護遺伝子であることが示唆された。

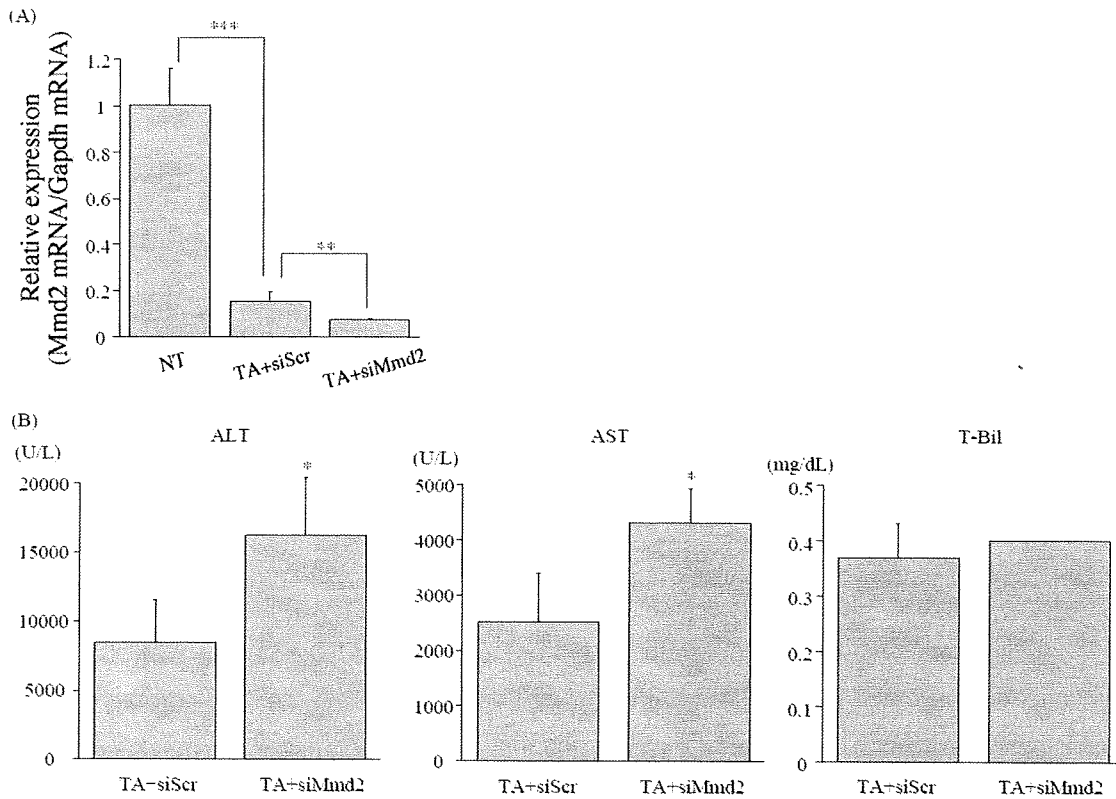


Fig. 19 Relative expression levels of Mmd2 mRNA (A) and plasma ALT, AST, and T-Bil (B) in female mice administrated TA and siMmd2. Atelocollagen/siScr, and atelocollagen/siMmd2 (5 nmol/head, i.v.) in a 200  $\mu$ L volume were injected into the mouse tail vein. Mice were administrated TA (100 mg/kg, i.p.) after 24 h injection of atelocollagen. Plasma and liver samples were collected after 24 h injection of TA. The data are mean  $\pm$  SD of 5 mice. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

C-16. eNOS および Amphiregulin (Areg) mRNA 測定

続いて、Mmd2 による肝保護作用がどのような機序で起こっているか検討した。

Mmd2 が ERα を介して誘導されることが Fig. 12 で示されたことから、ERα を介し、かつ肝保護遺伝子として報告のある eNOS および Areg の mRNA 発現量を測定した。Wild type マウスにおいて、TAM 前投与により eNOS mRNA は NT と比べて有意に減少した (Fig. 20A)。ERα KO マウスでは減少は認められなかった。また siMmd2 投与により eNOS mRNA の変動は認められなかつ

た (Fig. 20B)。これより、eNOS mRNA の減少が ERα を介することが示唆されたが、eNOS が減少したことから TAM による肝保護に eNOS が関与しているとは考えにくい。また、siMmd2 投与により変動が認められないことから、Mmd2 が eNOS に関与する可能性は低いと考えられた。よって TAM による肝保護作用に eNOS は関与しない可能性が示唆された。

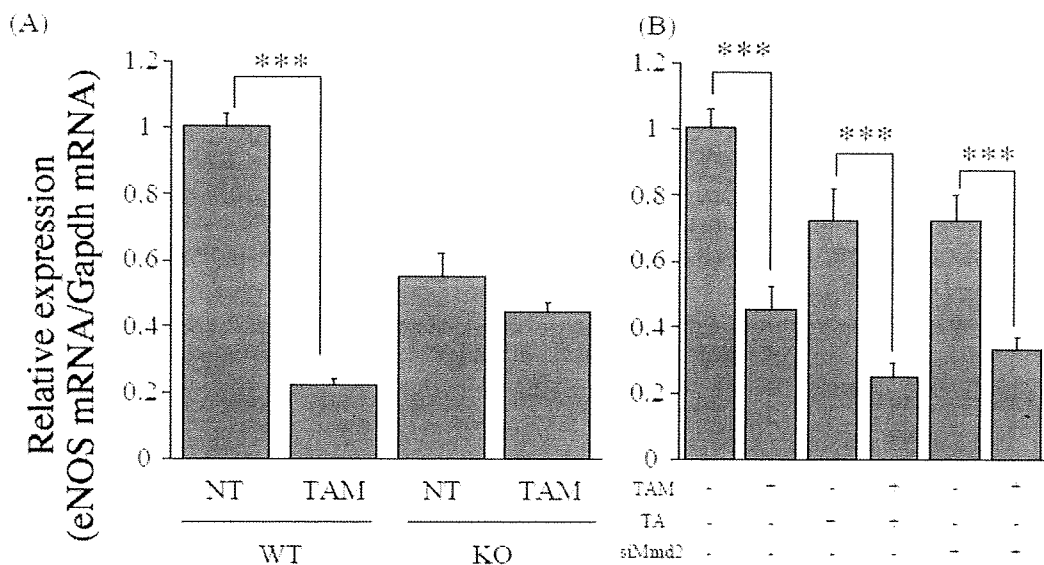


Fig. 20 Relative expression levels of eNOS mRNA in ERα KO mice (A) and mice administrated siMmd2 (B). A; Mice (female, 6-week old) were administrated TAM for 5 days (1 mg/kg, i.p.). The data are mean ± SD of 3 mice. B; Atelocollagen/siScr, and atelocollagen/siMmd2 (5 nmol/head, i.v.) in a 200 μL volume were injected into the mouse tail vein after 4 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). The last TAM administrations (1 mg/kg, i.p.) were performed 12 h after atelocollagen injection. Mice were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 24 h injection of atelocollagen. Plasma and liver samples were collected after 24 h injection of TA. The data are mean ± SD of 3 mice. \*\*\* $P < 0.001$ .

Wild type マウスにおいて、TAM 前投与により Areg mRNA は NT と比べて約 90 倍に上昇した (Fig. 21A)。ERa KO マウスでは Wild type に比べるとその上昇は低く、有意でなかった。ICR 雌性マウスにおいても TAM 投与により Areg mRNA は NT に対して有意に上昇した (Fig. 21B)。また siMmd2 投与により Areg mRNA の有意な減少が認められた (Fig. 21B)。TA 投与時間依存的な変動においては TA 単独投与では TA 投与 24 時間後において最大となり、投与 48 時間後では減少した。TA+TAM 群においては TA 投与 48 時間後においても Areg mRNA の上昇が認められたことから、肝再生が TA 単独投与に比べて持続していることが考えられた (Fig. 21C)。これより、Areg mRNA の上昇が ERa を介すること、および Mmd2 との関与が考えられ、Mmd2 によ

る肝保護の一因が、Areg mRNA の上昇による肝再生能の向上であることが示唆された。

#### C-17 ヒトにおける MMD2 mRNA 測定

25 種のヒト肝臓サンプルを用いて、ヒトにおける肝臓中の MMD2 mRNA 発現量を 2-9 に述べた方法に従って検討した。ヒト肝臓においても MMD2 mRNA の発現が認められたが (Fig. 22)、その発現量は非常に少なく検出限界に近い値であった。また、MMD2 mRNA の最も低い検体を 1 としたとき、ヒト 25 検体の平均値は約 24 であり、マウス 3 匹の平均値は約 23,000 であった。マウス肝臓に比べて 1/1000 程度であり、ヒト肝臓中の MMD2 mRNA には約 188 倍の個体差が認められた。

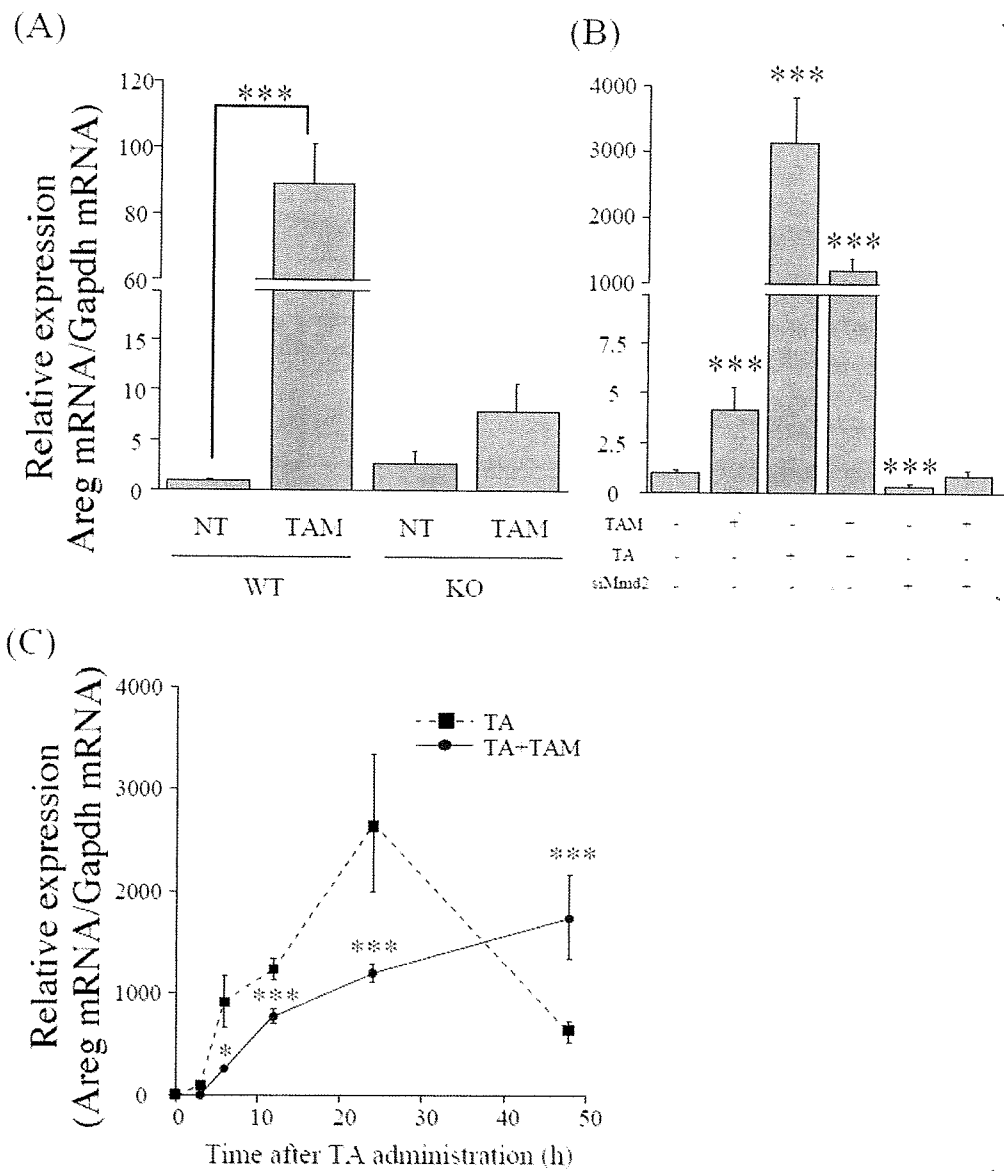


Fig. 21 Relative expression levels of Areg mRNA in ER $\alpha$  KO mice (A), mice administrated siMmd2 (B), and time-dependent effects of TA administration on Areg mRNA in ICR mice (C). A; Mice (female, 6-week old) were administrated TAM for 5 days (1 mg/kg, i.p.). The data are mean  $\pm$  SD of 3 mice. B; Atelocollagen/siScr, and atelocollagen/siMmd2 (5 nmol/head, i.v.) in a 200  $\mu$ L volume were injected into the mouse tail vein after 4 days TAM administration (1 mg/kg, i.p.). The last TAM administrations (1 mg/kg, i.p.) were performed 12 h after atelocollagen injection. Mice were administrated TA (200 mg/kg, i.p.) after 24 h injection of atelocollagen. Plasma and liver samples were collected after 24 h injection of TA. C; 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.

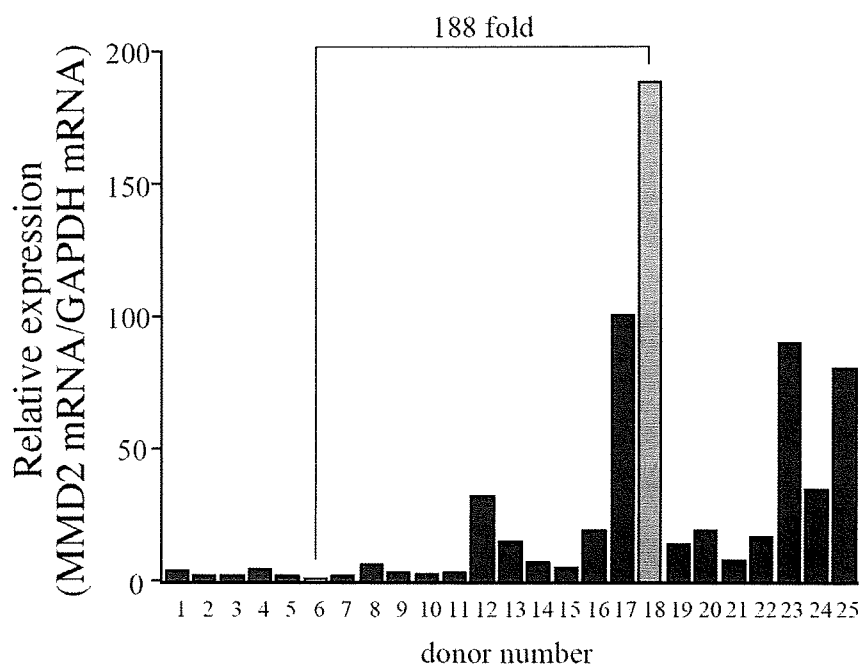


Fig. 22 Interindividual variability of MMD2 mRNA expressions in 25 human livers. Data are mean of two independent experiments.

#### D. 考察

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。Mmd2 は種間で良く保存されており、アミノ酸レベルでヒトとマウスで 94% の相同性があるが、その機能は全く解明されていない。本研究では初めて Mmd2 の機能を見出した。

EE2、TAM および RAL 前投与により TA

誘導性肝障害の軽減が認められた (Figs. 2 and 3)。TAM および RAL 前投与における TA 投与では血漿の色は正常 (透明) であったが、EE2 前投与における TA 投与では血漿の色が若干黄色を示した。EE2 は過剰投与により胆汁うっ滞を示すことが知られているが (Yamamoto et al., 2006)、今回用いた投与量は薬理用量である。TA 投与により T-Bil 値が上昇しないことから胆汁うっ滞を示さないことが考えられるが、EE2 と同時投与することにより胆汁うっ滞が惹起されたのかもしれない。TAM および RAL とともにマウス肝臓では ERα ア



ゴニストとして作用するが (Mitlak and Cohen, 1997; Cosman and Lindsay, 1999)、EE2 とは作用が異なることが示唆された。TAM 前投与において TA 誘導性肝障害に対し最も肝保護効果が強く、血漿の色も正常であることから TAM を用いて検討を行った。

APAP は薬物誘導性肝障害の分野において最も研究されている薬物である。JNK2 ノックダウンや PAI-1 ノックアウトにより APAP 誘導性肝障害が軽減する報告があるが、他の化合物での報告はなく、これら遺伝子は APAP 特異的に保護作用を有することが考えられた (Gunawan et al., 2006; Bajt et al., 2008; Ganey et al., 2007)。TAM による肝保護が TA 特異的に認められるのか、または APAP、BB および DIC など他の化合物でも認められるか検討した。その結果、TA 以外の化合物でも TAM による肝保護作用が認められ、TA 特異的ではないことが示された (Fig. 6)。TAM による肝保護メカニズムの解明をすることで、薬物誘導性肝障害の原因の根本解明に近づけると考えられた。APAP および DIC 投与において、TAM 前投与により AST

値の減少が認められず、ALT 値よりも AST 値で高値を示した。APAP および DIC は肝障害以外にも消化管障害を惹起することが知られているため、AST 値の上昇は肝障害以外の原因が考えられる。AST 値における減少が認められなかったことから、TAM による保護作用が肝臓特異的であることが示唆された。

TAM および RAL 投与で上昇が認められ、ICI 投与では変動が認められなかった遺伝子は NT 基準で 382 種であった (Fig. 7)。TA 投与による遺伝子発現変動の可能性を排除するため、NT を基準として遺伝子を選択した。382 種の遺伝子のうち特に上昇率が大きかった Arg2、Gdf9、Hemt1、Mmd2、Mmp9 および Pign に注目した。Mmd2 においては TA 投与しても上昇が認められていた。

DNA マイクロアレイの結果の再現を得るために real time RT-PCR を行ったが、Hemt1、Mmp9 および Pign mRNA では再現が得られなかった (Fig. 10)。DNA マイクロアレイはバリデーションが取れないこともあるため、複数の DNA マイクロアレイを用いて、同様なサンプル解析を行うこ

とでより信頼性の高いデータが得られる。しかし、コストがかかるため、DNA マイクロアレイによる再試は行わなかった。

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。TA 投与時間依存的な検討においては、TA 投与 3 時間後で最も Mmd2 mRNA が上昇した (Fig. 9)。TAM 投与時、TA 曝露の早い段階で上昇が認められたことから、Mmd2 の肝障害に対する反応性は高いことが示唆された。

ERa KO マウスにおいては TAM による TA 誘導性肝障害の軽減が認められなかった (Fig. 11)。肝虚血再灌流モデルを用いた検討において、ERa KO マウスでは Wild type に比べて血漿 ALT 値が高値を示しており、その原因として肝保護遺伝子であ

る eNOS が ERa KO マウスにおいて低値であることが報告されている (Harada et al., 2001; Harada et al., 2004)。本研究でも Wild type に比べ ERa KO で eNOS mRNA が低く、その再現が得られた (Fig. 20A)。しかしながら、TAM 投与により eNOS mRNA は減少し、ERa KO マウスではその減少が認められなかった。また、siMmd2 投与により eNOS mRNA に変動が認められなかったことから、eNOS に Mmd2 が関与する可能性は低いと考えられた (Fig. 20B)。これより eNOS mRNA の減少が ERa を介して起こることが示唆されたが、TAM による肝保護作用に eNOS は関与しないと考えられた。

本研究において ERa KO マウスでは Wild type のマウスと比べて Mmd2 mRNA 発現量が低値を示した (Fig. 12)。Wild type に比べ ERa KO において肝障害性が増強したこと (Fig. 11)、および、Mmd2 ノックダウンにおける TA 誘導性肝障害の増大 (Figs. 18 and 19) はともに Mmd2 の常発現量が低いことによることが示唆された。

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 ERa 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)。ERa 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。TA との同時投与では TAM 投与で Areg mRNA の発現量が低くなったが (Fig. 21B)、これは TA 単独投与群と比べ、TA+TAM 群で肝障害性が低いことによると示唆される。

培養細胞を用いて TA 誘導性細胞障害の検討を試みたが、いずれの細胞株においても細胞生存率の減少は認められなかった (Fig. 13)。これは TA の水溶性が非常

に高く、細胞内に輸送されなかったことが考えられた。TA は CYP2E1 により代謝的活性化を起こすことが知られているが (Hunter et al., 1977; Wang et al., 2000; Dyroff and Neal, 1981)、細胞内に輸送されないことから、その影響が認められなかったと考えられる。TA を輸送するトランスポーターを発現させる、または、細胞内に TA を輸送する媒体を用いれば細胞生存率を減少させることが可能かもしれない。また、Mmd2 mRNA 発現が J774A.1 細胞および Y-1 細胞で認められたが (Fig. 14)、その発現量はほぼ検出限界に近い値である。*In vivo* でのメカニズム解明は非常に困難であるため、Mmd2 安定発現系などを作製することで Mmd2 のより詳細な機能を解明していく必要がある。

アテロコラーゲンは免疫原性が極めて低く、生態適合性が高いバイオマテリアルである (Takeshita et al., 2005)。生理的条件において、アテロコラーゲンは正電荷、siRNA は負電荷を帯びているため両者は静電的に複合体を形成する。一般に siRNA は投与されても血中のヌクレアーゼにより速やかに分解されてしまう。

しかし、アテロコラーゲンと複合体を形成することにより、ヌクレアーゼによる分解を免れ、組織に効率よく輸送される (Ochiya et al., 1999; Minakuchi et al., 2004)。アテロコラーゲンを用いた siRNA 輸送は肝臓特異的ではなく、腎臓や脾臓にも輸送される (Takeshita et al., 2005)。Mmd2 mRNA が腎臓および脾臓で発現が認められず (data not shown)、ノックダウンを確認することができなかったが、siRNA 投与を行ったマウスにおいて、脾臓の Gapdh mRNA が約 1/100 程度に減少していた。これまでに siRNA 輸送による Gapdh mRNA の変動の報告はなく、siRNA を *in vivo* で投与を行うことで脾臓に何らかの損傷を及ぼしている可能性が考えられた。今後、より最適な投与条件を検討していく必要がある。

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。薬物誘導性肝障害が既存の動物モデルでは再現できず、臨床において問題になることがある。この一因としてマウス肝臓において Mmd2 が発現していることにより、外挿を困難にしているのかもしれない。cre/loxP システム等を用いて Mmd2 を肝臓特異的にノックアウトすることで、薬物誘導性肝障害を初めとする、様々な肝障害に対して高感度検出系として用いることができるかもしれない。

今回、Mmd2 が薬物誘導性肝障害に対して保護的に機能することを明らかにした。本研究は Mmd2 の肝保護作用を初めて示し、薬物誘導性肝障害発症メカニズムの根本解明に繋がると期待される。

## E. 結論

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