

る CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示唆された。mature miR-378 と CYP2E1 mRNA の相関について検討した結果から両者の間に逆相関が認められなかった ($r = 0.31, p = 0.13$) ことから、miR-378 の CYP2E1 mRNA の分解への影響ばかりでなく、CYP2E1 の転写活性への影響の可能性も低いと考えられる。このことより、miR-378 は主に翻訳抑制に寄与していることが示唆された。

D. 考察

(D-1) ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の影響；これまでに、臨床報告からジクロフェナク誘導性肝障害の発症機序には、免疫学的因子の関与が疑われていたが、詳細な検討はされていなかった。本研究は、ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について詳細に検討した初めての報告である。発症に免疫が関与すると考えられているアセトアミノフェンおよびハロタン誘導性肝障害モデルマウスにおいても肝細胞壊死や、肝組織への好中球浸潤が認められている。組織染色の結果、肝細胞の損傷および好中球の浸潤が認められたことから、ジクロフェナクにより肝障害が引き起こされていること、および好中球による炎症反応が関与していることが示された。IL-1 β などの炎症性サイトカインや MCP-1、MIP-2 および CXCL1 などの好中球の浸潤に関与するケモカインの mRNA 発現上昇が認められた。IL-1 β は、内皮細胞、単球およびマクロファージなどから放出される炎症性サイトカインであり、自然および獲得系の免疫

応答に関与し、様々な自己免疫疾患の発症の一因であると考えられている。また、MCP-1、MIP-2 および CXCL1 はクッパー細胞、好中球、単球および内皮細胞などから放出され、炎症部位への免疫細胞の浸潤に関与することが知られている。中でも MIP-2 は好中球の遊走作用が強く、ハロタン誘導性肝障害においても顕著な上昇が認められている。これら MIP-2 などのケモカインの上昇により、ジクロフェナク投与後の肝組織において好中球の浸潤が認められた可能性が考えられる。ジクロフェナクにより重篤な肝障害を引き起こした患者の約 77% が骨関節炎を発症していることが報告されており (Banks et al., 1995)、骨関節炎の病態では局所において IL-17 を始めとする様々な炎症性サイトカインの濃度が上昇している (Kapoor et al., 2011)。骨関節炎を発症した患者がジクロフェナク誘導性肝障害を発症する場合は多い一因として、関節炎などの病態により生体内の IL-17 などの炎症性サイトカイン量が比較的に高い状態にある場合、肝障害に伴う炎症反応が強く惹起され、重篤な肝障害発症に至る可能性が考えられた。

さらに、免疫学的因子の SNP がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与していることも genome-wide association study (GWAS) での検討により明らかにされており、主に Regulatory T cell (Treg) から産生される抗炎症性サイトカインである IL-10 の転写活性が低下しているヒトでは、変異を持たないヒトと比較してジクロフェナク誘導性肝障害を 3 倍程度引き起こしやすいことが報告されている。

このことから、免疫応答における個体差がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与してくること、また、IL-17だけでなくIL-10などを含めた複数のサイトカインによりジクロフェナクによる炎症反応が制御されていることが考えられる。

IL-17を始めとする炎症性因子はNK、NKT細胞、樹状細胞および単球などの複数の免疫細胞から産生される。肝臓内の免疫応答のネットワークは非常に複雑なものでありIL-17だけでなくIL-6およびIL-1 β などの炎症性サイトカインやケモカインのmRNAの発現量の増加も認められていることから、様々な免疫学的因子がジクロフェナク誘導性肝障害を発症する一因になることが考えられる。

(D-2) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価；AMDによる肝障害では、免疫学的な小葉中心壊死、門脈域の炎症 (Lewis et al., 1990)、好中球の浸潤、非アルコール性脂肪肝炎、マロリー小体を伴う慢性肝障害 (Kang et al., 2007) および肝硬変などさまざまな病態を示す。AMDによる肝障害の詳細な機序は不明であるが、AMDおよびその代謝物であるDEAおよびDiDEAの組織内蓄積によるミトコンドリア機能障害のため、毒性が発現することが示唆されている。また、CYP3A4の誘導によりAMDがヒトへパトサイトに及ぼす細胞障害性が増強したことが示され、AMDの細胞毒性にCYP3A4がリスクファクターとなることが示唆されている。以上のように、AMDによる肝障害において、肝細胞に対する直接的な細胞障害性に関しては様々な研究がなされているが、AMDお

よびその代謝物について代謝的活性化を介した免疫学的因子と肝障害との関連性を示した報告はない今回の検討では、AMD濃度20 μ MおよびDEA濃度10 μ Mから炎症性サイトカイン産生量の有意な増加が認められた (Figs. 6 and 7)。ヒト *in vitro* 試験系を用いて薬物の作用や副作用を評価する場合、試験系の薬物処置濃度と、臨床における薬物の暴露量との関連性を考慮する必要がある。AMDを服用していた患者の部検試料における血漿中AMD濃度は0.9-3.6 μ M、DEA濃度は0.6-5.7 μ Mであり、肝臓中AMD濃度は7.1-1379.2 μ M、DEA濃度は15.4-10530.2 μ Mであると報告されている。このように、肝臓におけるAMDとDEAの濃度は血漿より2桁から3桁ほど高く、非常に高い蓄積性を示している。しかし、ヒト肝臓におけるアミオダロン濃度を予測することは困難であり、*in vitro* の結果を単純に *in vivo* へ外挿することは出来ない。アミオダロンが *in vivo* においても炎症反応を惹起させるかを明らかにするためには、さらなる研究が必要であると考えられる。

また、DEAはさらに脱エチル化しDiDEAを生成することが明らかとなり、ヒトにおけるDiDEA血中濃度は約0.057 μ Mと、アミオダロンの30分の1以下であった (Ha et al., 2005)。このことは、今回の検討による、DiDEA生成量がAMDの約1%程度であったことと一致した結果となった。DiDEAの生成量が、AMDおよびDEAの存在量と比較して少ない理由として、DEAはCYP3A4酵素活性を強く阻害すること、つまりAMDの代謝によりMBIが生じることが報告されているた

め、DiDEA への代謝が DEA により阻害されていることが考えられた。したがって、今回の検討より CYP3A4 存在下での AMD および DEA 処置による CD54 発現量および炎症性サイトカイン産生量の増加が DiDEA によることが考えられるが、上述のように生成量は微量であり、DiDEA のヒト組織中濃度はこれまでに報告されていないが、イヌにおいて心筋細胞には DiDEA の血中濃度の 80 から 190 倍以上もの高濃度に存在することが知られている。このため、この代謝物が与える免疫因子への影響にはより詳細な検討が必要であると考えられる。

以上より、アミオダロン誘導性肝障害における免疫学的機序の重要性を裏付ける結果が示されたと考えられる。また、CYP3A4 は臨床で使用されている薬物によって誘導される分子種でもあり、また酵素活性には個体差が認められている。従って、高用量で長期間服用する可能性がある AMD については、CYP3A4 による代謝的活性化が肝障害の原因として重要かもしれない。

(D-3) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響: 一般的に女性は男性に比べ重篤な肝障害を引き起こしやすいことが報告されている。また、性周期や妊娠時において、自己免疫疾患などの免疫が関連した病態に影響を及ぼすことが報告されている。本研究では初めに E2 と Prog の影響を検討するために、HAL 単独による肝障害性があまり認められない 15 mmol/kg の投与を検討した結果、E2 前投与では変化はほとんど認められず、Prog 前投与では有意な ALT 値の上昇が認

められた。したがって、E2 前投与時の投与量は HAL 単独で顕著な ALT 値の増加が認められる 30 mmol/kg、Prog 前投与時は 15 mmol/kg で投与した。その結果、E2 投与は HAL 誘導性肝障害を減弱し、Prog 投与は肝障害を悪化させる結果が得られ、さらにレセプターアンタゴニストを用いた検討からこれらの影響にはそれぞれのレセプターを介することが示唆された。肝組織像の評価においても血漿トランスアミナーゼ値と同様に E2 による肝障害減弱作用および Prog による肝障害悪化作用が示され、これらの女性ホルモンの作用は好中球浸潤を介し肝障害の程度に影響を及ぼすことが示唆された。現在、臨床で広く使用され、HAL より肝障害性の低い Iso 投与では血漿トランスアミナーゼ値の上昇は認められなかった (Fig. 4)。さらに、Prog 投与でも肝障害悪化が認められなかったことから、Prog 前投与は肝障害性を示す薬物のみで悪化作用を示すこと、および Prog は肝障害発症よりも悪化の段階に寄与していることが示唆された。ヒトでは吸収された HAL の 20%が TFA に代謝されるのに対し、Iso は HAL 同様に TFA に代謝されるが、その割合は HAL の 0.2%であることが報告されており、この TFA の生成量の差が今回 Iso で肝障害が認められなかった原因のひとつとして考えられる。

薬物誘導性肝障害では免疫システムの活性化が重要な因子の一つであることが示唆されており、HAL によってリジン残基を修飾されたタンパク質がクッパー細胞に取り込まれ、免疫細胞に抗原として提示されることでアレルギー反応によ

る肝細胞壊死が起こり肝障害が誘導されると考えられている。本検討においても炎症性サイトカインである TNF α 、IL-1 β および IL-6、好中球遊走に関わる CXCL1 および CXCL2、ICAM-1 mRNA の発現と肝障害の程度が相関する結果が得られた。また本検討と同様の HAL 投与において TNF α 、IL-1 β 、IL-6 や好中球の遊走に関わるケモカインである CXCL1 の mRNA の発現量が BALB/c マウスの肝臓において有意に増加することが報告され、好中球が HAL 誘導性肝障害に重要な役割を有することが報告されている。本検討における MPO 陽性細胞の浸潤も肝細胞傷害の程度を決定するのに寄与していると考えられる。

(D-4) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について

薬物誘導性肝障害は、医薬品開発や疾病治療において安全性上重大な問題のひとつである。臨床において女性は男性に比べ、重篤な肝障害を引き起こす確率が高いことが報告されており、DILI のリスクファクターの一つに挙げられている。しかし、この詳細な原因およびメカニズムについての研究はなされていない。そこで、本研究では女性で認められる性周期で変動する代表的な女性ホルモン E2 および Prog に着目し、薬物誘導性肝障害に与える影響について検討した。

本研究では、Prog が肝障害悪化作用を有することが示唆されたことから、そのメカニズムを解明することを目的として検討を行った。HAL だけでなく他の肝障害性化合物においても Prog 投与による肝障害悪化作用が認められ、これらは

CXCL1 を初めとする免疫因子の活性化を介していることを見出した。さらに、これらの免疫因子の活性化には ERK 経路の活性化や、クッパー細胞が関与し、Prog による肝障害悪化に寄与していることが示された。また、PR のアンタゴニストである RU を肝障害惹起後に投与した際にも、HAL 誘導性肝障害を減弱させることを示した。さらに、本研究では、女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の程度に影響を与えることを示した。また、Prog が ERK 経路やクッパー細胞を介して薬物誘導性肝障害の悪化に寄与することを初めて明らかにし、これらの女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の性差メカニズムの一因になりうる可能性を示した。さらに、肝障害惹起後の RU 投与により肝障害減弱が認められたことから、薬物誘導性肝障害に対する新たな治療手段になりうるものが期待される。

(D-5) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の microRNA による発現制御: PPAR α の 3'-UTR (8376 塩基) に相補的な miRNA をコンピューター解析により探索した結果、いくつかの miRNA が挙げられた。本研究では肝臓に豊富に発現している 6 種の miRNA に注目して検討した。HuH7 細胞に 6 種の pre-miRNA を導入した時、pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により有意な PPAR α タンパク質の低下が認められた。このことから miR-21 および miR-27b が PPAR α の発現制御に関与していることが示唆された。しかし PPAR α mRNA は変動しなかったことより、miR-21 および miR-27b は翻訳抑制により

PPAR α の発現を制御していることが示唆された。さらに、HepG2 細胞においても HuH7 細胞と同様の結果が得られたことから、miR-21 および miR-27b による PPAR α の発現制御は細胞株の種類によらないことが示された。骨関節軟骨細胞において、miR-22 の過剰発現により PPAR α タンパク質が減少することが報告されている。しかし今回 HuH7 細胞を用いた実験では miR-22 による PPAR α タンパク質発現量の低下は認められなかった。この矛盾には、用いる細胞株の違いにより、組織特異的な因子が miR-22 による PPAR α の発現制御を妨害していることが考えられる。miR-21 と miR-27b は PPAR α の下流遺伝子の発現にも影響を及ぼすことが示されたこと等より、miR-21 および miR-27b が PPAR α の発現を翻訳抑制により負に制御しており、それが PPAR α の下流遺伝子の発現に影響を及ぼすことを明らかにした。

PPAR α の翻訳領域や 5'-UTR に機能的な MRE27b が存在するか検討したが、機能的な MRE27b を同定することはできなかった。本研究で明らかとなった機能的な MRE21_1 は配列全体の相同性が miR-21 とかなり高い。一方で、今回候補となった 3'-UTR 内の MRE27b の中で、標的 mRNA の認識に重要である seed sequence との相同性が高い MRE27b_5 は周辺の配列はそれほど相同性が高くないために機能的ではなかったのかもしれない。PPAR α の発現制御に MRE21_1 が機能的に働いていることを明らかにした。また MRE27b は同定に至らなかったが、細胞株における検討を考慮すると、miR-27b

は PPAR α の発現制御に関与していると考えられる。以上、本研究では PPAR α およびその下流遺伝子の発現制御という脂質代謝や異物代謝での miR-21 および miR-27b の新たな機能を明らかにした。

(D-6) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御 : CYP2E1 の 3'-UTR に相補的な miRNA をコンピュータ解析により探索した結果、いくつかの miRNA が挙げられた。本研究では CYP2E1 mRNA と最も高い相同性を示し、また肝臓で発現している miR-378 に注目して検討した。ヒト CYP2E1 mRNA の 3'-UTR の長さは 152 塩基対であるが、終始コドンから 44 塩基離れた位置に miR-378 の結合領域 (MRE378) が存在していた。HEK293/2E1+UTR 細胞および HEK293/2E1 細胞を用いて pre-miR-378 の CYP2E1 タンパク質発現量への影響を検討した結果、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 発現抑制に役割を果たしていることが示された。miR-378 が CYP2E1 mRNA の翻訳を抑制しているか、mRNA の分解を亢進しているかを調べるため、CYP2E1 mRNA の発現量に及ぼす pre-miR-378 の影響を検討した。どちらの細胞においても CYP2E1 mRNA 発現量の有意な低下が認められ、pre-miR-378 は CYP2E1 mRNA に対して 3'-UTR 非依存的に影響を及ぼすことが明らかになった。HEK293/CYP2A6、HEK293/UGT1A3、HEK293/UGT1A4 細胞の 3 種類を用いた検討を行なったが、miR-378 導入による mRNA の低下は認められなかった。従って、miR-378 は pTARGET ベクターの転写活性に影響し

ている訳ではないことが示された。

CYP2E1 mRNA 低下の原因については更なる解析が必要である。しかし、3'-UTR を含まない HEK293/CYP2E1 細胞では、miR-378 過剰発現による CYP2E1 タンパク質発現量に影響を示さなかったことから、翻訳を阻害することが miR-378 の主要なメカニズムと考えられる。

miR-378 による CYP2E1 発現調節が実際にヒト肝臓中でも起きている事象であるか、25 検体のヒト個人肝における CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性、mature miR-378 発現量の相関関係を調べることで評価した。CYP2E1 mRNA 発現量とタンパク質発現量との間には正の相関関係が認められず、これは過去の報告 (Sumida et al., 1999) と一致するものであり、転写後調節の関与が支持された。また、miR-378 発現量と CYP2E1 タンパク質発現量および CYP2E1 翻訳効率との間に有意な逆相関が認められたことから、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示唆された。miR-378 は癌抑制遺伝子 Sufu (suppressor of fused) と Fus-1 の発現を抑制し、腫瘍細胞の生存、増殖および血管新生を促進することが報告されている (Lee et al., 2007)。また、miR-378 は vascular endothelial growth factor (VEGF) の 3'-UTR に結合する miR-125a などの miRNA に対して競合することにより、VEGF の発現を促進することが報告されている (Hua et al., 2006)。このように miR-378 は、癌遺伝子として機能することが示されてきたが、本研究では薬物動態分野における miR-378 の新しい機能を明らかにした。

E. 結論

(1) ジクロフェナク (DIF) 誘導性肝障害における免疫学的因子の影響; DIC 誘導性肝障害において様々な免疫学的因子が発現変動すること、その中でも IL-17 を初めとする Th17 因子の関与が示唆された。発症機序解明にはさらなる検討が必要であると考えられるが、今回明らかにした結果は、今後のジクロフェナク誘導性肝障害に関する検討や、その他の薬物誘導性肝障害の発症メカニズム解明の手がかりになると考えられる。

(2) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価; AMD などの肝障害性薬物について、CYP3A4 による代謝的活性化を介した免疫反応の活性化が示唆されたことより、本試験系は *in vitro* において代謝的活性化による免疫反応の関与を評価し得る手段となると考えられる。

(3) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響: 本章での検討では、E2 および Prog 処置により HAL 誘導性肝障害の程度および炎症関連因子の mRNA 発現に関連性が認められ、さらにいずれもレセプターアンタゴニスト投与により、その作用が認められなくなることを示した。これまでに、マウス腹腔マクロファージやヒト末梢血単球に E2 や Prog を処置し、酸化ストレスを与えた際にも炎症性サイトカインやケモカイン産生に影響を与えることが報告されており、本章の結果と同様に E2 処置時には炎症性サイトカインの産生減少、Prog 処置時には炎症性サイトカイン産生増加が認められている。さらに、今回の検討と同様にこれ

らの効果がレセプターアンタゴニスト処置により認められなくなっている。以上のことより E2 および Prog は ER および PR を介して免疫反応を調節し、肝障害の程度を変化させることが示唆された。

(4) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について

て：本研究では女性で認められる性周期で変動する代表的な女性ホルモン E2 および Prog に着目し、薬物誘導性肝障害に与える影響について検討した。前章において、Prog が肝障害悪化作用を有することが示唆されたことから、そのメカニズムを解明することを目的として検討を行った。HAL だけでなく他の肝障害性化合物においても Prog 投与による肝障害悪化作用が認められ、これらは CXCL1 を初めとする免疫因子の活性化を介していることを見出した。さらに、これらの免疫因子の活性化には ERK 経路の活性化や、クッパー細胞が関与し、Prog による肝障害悪化に寄与していることが示された。また、PR のアンタゴニストである RU を肝障害惹起後に投与した際にも、HAL 誘導性肝障害を減弱させることを示した。本研究では、女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の程度に影響を与えることを示した。また、Prog が ERK 経路やクッパー細胞を介して薬物誘導性肝障害の悪化に寄与することを初めて明らかにし、これらの女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の性差メカニズムの一因になりうる可能性を示した。さらに、肝障害惹起後の RU 投与により肝障害減弱が認められたことから、薬物誘導性肝障害に対する新たな治療手段になりうることを期待される。

(5) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の microRNA による発現制御：本研究により、ヒト肝臓における常在的な PPAR α 発現調節機構に対して、miRNA による翻訳抑制機構を新たに提唱することが出来た。miR-21 および miR-27b による PPAR α の発現制御は、ヒト肝臓における脂質代謝や異物代謝を変動させる因子であることを明らかにした。

(6) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御：ヒト CYP2E1 は薬理学的および毒性学的に極めて重要な P450 分子種の 1 つである。本研究では、ヒト CYP2E1 の発現調節に miRNA が関与するか検討した。CYP2E1 mRNA の 3'-UTR に miR-378 が結合する領域 (MRE378) を見出し、MRE378 に対して miR-378 が機能的に作用するかを検討した。Pre-miR-378 の導入により、MRE378 を含むプラスミドにおいてルシフェラーゼ活性の低下が認められたことから、MRE378 が miR-378 により認識され、発現制御に機能的に働いていることが示唆された。また、3'-UTR を含むまたは含まない CYP2E1 安定発現 HEK293 細胞を構築することで、CYP2E1 タンパク質発現量への miR-378 の影響を検討した。3'-UTR を含む CYP2E1 安定発現細胞株においてのみ、pre-miR-378 導入による CYP2E1 タンパク質発現量の低下が認められた。このことから、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 の発現抑制に重要な役割を果たしていることが示された。次に、miR-378 による CYP2E1 発現調節が実際にヒト肝

臓中でも起きている事象であるか、25 検体のヒト個人肝における CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性、mature miR-378 発現量の相関関係を調べることで評価した。CYP2E1 mRNA 発現量とタンパク質発現量との間には正の相関関係が認められず、また、miR-378 発現量と CYP2E1 タンパク質発現量および CYP2E1 翻訳効率との間に有意な逆相関が認められたことから、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示唆された。未解明であった CYP2E1 の転写後調節機構に対して、miRNA による翻訳抑制機構を新たに提唱することが出来た。miR-378 による CYP2E1 の発現制御は、ヒト肝における CYP2E1 発現量の個人差を引き起こす要因の 1 つとして考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表など

国内原著論文	0 件
国内著書（分担）	1 件
国内和文総説	2 件
海外著書（分担）	1 件
海外総説原著	13 件

1) 横井 毅. 薬物動態関連遺伝子の多型と薬物相互作用, *臨床検査*, **54**: 1107-1113 (2010).

2) 横井 毅. 第 II 相代謝の評価と創薬

「医薬品開発に必要なストラテジー上」
日本薬理学会編, 224-231 (2011).

3) 横井 毅. 薬物代謝に関与する酵素とその反応機構, 薬物代謝と毒性発現
「薬物代謝学 医療薬学・医薬品開発の基礎として 第 3 版」加藤隆一・山添康・横井 毅編, 東京化学同人, p43-68, 182-192, 2010

4) Tsuyoshi Yokoi. Troglitazone. Adverse Drug Reactions. In *Handbook of Experimental Pharmacology* vol.196. Ed. J. Uetrecht, pp 419-435, Springer-Verlag, 2010.

5) Takuya Mohri, Miki Nakajima, Tatsuki Fukami, Masataka Takamiya, Yasuhiro Aoki, and Tsuyoshi Yokoi. Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem. Pharmacol.*, **79**: 1045-1052 (2010).

6) Masanori Kobayashi, Satonori Higuchi, Katsuhiko Mizuno, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Interleukin-17 is involved in α -naphthylisothiocyanate-induced liver injury in mice. *Toxicology*, **275**: 50-57 (2010).

7) Katsuhiko Mizuno, Tatsuki Fukami, Yasuyuki Toyoda, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Terbinafine stimulates the pro-inflammatory responses in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Life. Sci.*, **87**: 537-544

(2010).

8) 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).

9) 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).

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

11) Katsuhiko Mizuno, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.*, **85**: 199-207 (2011).

12) Shin-ichi Yokota, Eriko Higashi, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Human CYP2A6 is regulated by nuclear

factor-erythroid 2 related factor 2. *Biochem. Pharmacol.*, **81**: 289-294 (2011).

13) Toshihisa Koga, Ryoichi Fujiwara, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.

Toxicological evaluation of acyl glucuronides of NSAIDs using HEK293 cells stably expressing human UGT and human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 54-60 (2011).

14) Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Yukitaka Yoshikawa, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.*, **200**: 139-145 (2011).

15) Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Hiroko Hosomi, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. CYP2C9-mediated metabolic activation of losartan detected by a highly sensitive cell-based screening assay. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 838-846 (2011).

16) Yasuyuki Toyoda, Taishi Miyashita, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Estradiol and progesterone modulate halothane-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.*, in press.

17) Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Atsushi Iwamura, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for

CYP3A4-mediated metabolic activation.

Drug Metab. Dispos., in press.

2. 学会発表

国内学会発表 26 件

国際学会発表 7 件

【国内学会発表 26 件】

1. 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

2. 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 ポスター 沖縄

3. 水野克彦、深見達基、中島美紀、横井
毅：テルビナフィン[®]は 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

4. 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

5. 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

6. 古賀利久、藤原亮一、深見達基、中島
美紀、横井 毅：アシルグルクロニドの
細胞毒性および遺伝毒性に関する検討、
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

7. 横井 毅：代謝物を考慮した薬物誘導
性肝障害の予測試験系の検討、第 37 回日
本トキシコロジー学会学術年会
2010. 6. 16-18 シンポジウム 沖縄

8. Theerada Taesotikul, Vichien
Navinpipatana, Wichitra
Tassaneeyakul, Miki Nakajima, and
Tsuyoshi Yokoi. Inhibitory effects of
Thai medicinal plants on human
cytochrome P450 and
UDP-glucuronosyltransferase
activities. 第 25 回日本薬物動態学会年
会 2010. 10. 7-9 ポスター 東京

9. Katsuhiko Mizuno, Tatsuki Fukami,
Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. In
vitro study of the mechanisms of
terbinafine associated hepatic injury.
第 25 回日本薬物動態学会年会
2010. 10. 7-9 ポスター 東京

10. Tatsuki Fukami, Akinobu Watanabe,

Shiori Takahashi, Yuki Kobayashi, Nao Nakagawa, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Difference in phenacetin and acetaminophen toxicities is due to substrate specificity of human arylacetamide deacetylase. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 ポスター 東京

11. Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Yukitaka Yoshikawa, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Th2 immune response mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 ポスター 東京

12. Masanori Kobayashi, Satonori Higuchi, Mika Ide, Satomi Nishikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Th2 cell mediated immune response was involved in methimazole-induced liver injury mice. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 ポスター 東京

13. Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Human alpha/beta hydrolase domain containing 10 (ABHD10) is a responsible enzyme for hydrolysis of mycophenolic acid acyl glucuronide. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京

14. Yuki Kobayashi, Tatsuki Fukami, Akinori Nakajima, Akinobu Watanabe, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Species differences in localization and activities of arylacetamide deacetylase in mouse, rat, and human. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京

15. Akinori Nakajima, Tatsuki Fukami, Akinobu Watanabe, Yuki Kobayashi, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Human arylacetamide deacetylase is the enzyme responsible for the hydrolysis of rifamycins: rifampicin, rifabutin, and rifapentine. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京

16. Shingo Oda, Miki Nakajima, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. PGRMC1 modulates activities of human drug-metabolizing cytochrome P450s in an isoform-dependent manner. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京

17. Yuki Oda, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Role of miR-24 in regulation of human ARNT and its downstream genes. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京

18. Katsuhiko Kida, Miki Nakajima,

- Takuya Mohri, Yuki Oda, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. MiR-21 is a negative regulator of human PPAR α . 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京
19. Tomomi Hioki, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Characterization of simvastatin hydrolases in human and rat. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京
20. Yu Yamaura, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Tatsuki Fukami, Koichi Tsuneyama, Kazuto Tajiri, Masami Minemura and Tsuyoshi Yokoi. Circulating micro-RNAs as a biomarker of liver injury. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 口頭 東京
21. Tsuyoshi Yokoi. Approaches to predict idiosyncratic and immune-mediated drug-induced liver injury. 第25回日本薬物動態学会年会 2010.10.7-9 ラウンドテーブル 東京
22. 細見浩子、深見達基、岩村 篤、中島美紀、横井 毅：CYP3A4による代謝的活性化を考慮した薬物誘導性肝障害の高感度試験系 日本動物実験代替法学会第23回大会 2010.12-3-5 口頭&ポスター 東京
23. 岩村 篤、深見達基、細見浩子、中島美紀、横井 毅：アデノウイルスベクターを用いたCYP2C9による代謝的活性化の高感度評価系の構築 日本動物実験代替法学会第23回大会 2010.12-3-5 口頭&ポスター 東京
24. 横田真一、中島美紀、高橋 圭、深見達基、横井 毅：喫煙は血中microRNAの発現プロファイルを変化させる 日本薬学会第131年会 2011.3.29-31 ポスター 静岡
25. 山浦 優、中島美紀、高木信伍、深見達基、常山幸一、田尻和人、峯村正実、横井 毅：肝障害バイオマーカーとしての血中microRNAの有用性 日本薬学会第131年会 2011.3.29-31 シンポジウム 静岡
26. 横井 毅：薬物性肝障害の予測試験系とバイオマーカー 日本薬学会第131年会 2011.3.29-31 シンポジウム 静岡
- 【国際学会発表 7件】
1. Miki Nakajima, Toshihisa Koga, Haruko Sakai, Hiroyuki Yamanaka, Ryoichi Fujiwara, and Tsuyoshi Yokoi N-Glycosylation plays a role in protein folding of human UGT1A9. 18th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2010, 5.16-20 Beijing-China
2. Katsuhiko Kida, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Yuki Oda, Shingo Tagagi, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Human PPAR α is regulated by miR-21. 9th

International ISSX Meeting. 2010.9.4-8
Istanbul-Tukey

3. Akinobu Watanabe, Tatuki Fukami,
Shiori Takahashi, Yuki Kobayashi, Nao
Nakagawa, Miki Nakajima, and Tsuyoshi
Yokoi. Arylacetamide deacetylase is a
determinant enzyme for the difference
in hydrolyase activities of phenacetin
and acetaminophen. 9th International
ISSX Meeting. 2010.9.4-8
Istanbul-Tukey

4. Yukitaka Yoshikawa, Yasuyuki Toyoda,
Satoriori Higuchi, Tohru Tsuku, Koichi
Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki
Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.
Mechanism of hepatoprotective effect
of tamoxifen against drug-induced
liver injury. 9th International ISSX
Meeting. 2010.9.4-8 Istanbul-Tukey

5. Tsuyoshi Yokoi, Yukitaka Yoshikawa,
Yasuyuki Toyoda, Satoriori Higuchi,
Tohru Tsukui, Koichi Tsuneyama,
Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima.

Monocyte to macrophase
differentiation-associated 2 (MMD2) is
a new candidate gene for
hepatoprotective effect of tamoxifen
against drug-induced liver injury. SOT
50th Annual Meeting, 2011.3.6-11
Washington D.C.-USA. Poster

6. Masakazu Kakuni, Mayu Morita,
Yumiko Katoh, Miki Nakajima, Chise
Tateno, Tsuyoshi Yokoi.
Troglitazone-induced liver injury in
chimeric mice with humanized liver. SOT
50th Annual Meeting, 2011.3.6-11
Washington D.C.-USA. Poster

7. Kornphimol Kulthong, Yuki Kobayashi,
Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and
Rawiwan Maniratanachote. SOT 50th
Annual Meeting, 2011.3.6-11 Washington
D.C.-USA. Poster

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

該当なし。

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 22 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 23 (2011) 年 5 月

ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の影響

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）であるジクロフェナク（DIC）は解熱鎮痛薬として臨床で頻用されているが、稀に重篤な肝障害を惹起することが知られている。DIC 誘導性肝障害には、臨床報告から免疫学的因子の関与が疑われているが、発症機序は不明である。本研究では、DIC 誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について明らかにすることを目的とした。雌性 BALB/c マウスに DIC（80 mg/kg in corn oil）を単回腹腔内投与し、肝障害モデルマウスを作製した。経時的な血漿パラメータ値の測定および肝臓中の組織学的評価を行い、薬物投与後のヘルパーT（Th）細胞の分化に関与する転写因子や炎症性因子の肝臓中 mRNA 発現変動や、血漿中 interleukin（IL）-17 タンパク質量を測定した。結果として、DIC 投与により血漿中 ALT 値および AST 値の上昇が認められ、薬物投与 24 時間に最も高値を示した。また、肝細胞壊死および肝組織への好中球の浸潤が認められた。肝臓中における免疫学的因子の mRNA 発現変動を解析した結果、IL-1b、IL-6、macrophage inflammatory protein（MIP）-2 および monocyte chemoattractant protein（MCP）-1 などの様々な炎症性サイトカインおよびケモカインの発現上昇が認められた。また、Th17 への分化に関与する転写因子である retinoid-related orphan receptor（ROR）-gt の発現上昇および、Th1 分化に関与する転写因子である T box expressed in T cells（T-bet）の発現低下が認められた。さらに、ハロタンなどの薬物誘導性肝障害への関与が明らかにされている IL-17 のタンパク質量の増加が認められた。以上より、DIC 誘導性肝障害において様々な免疫学的因子が発現変動すること、その中でも IL-17 を初めとする Th17 因子の関与が示唆された。

A. 研究目的

薬物誘導性肝障害は、今日の医薬品開発や臨床における重大な問題の一つであり、医薬品の開発中止や市販後の警告あるいは販売中止となる主な原因である。臨床で使用されている 1000 以上の薬物は発生頻度や重症度に差があるものの肝

障害を起こす可能性があり、わが国では急性肝炎の 10%が薬物に起因するとされている（Kaplowitz, 2005; Oketani et al., 2011）。薬物誘導性肝障害は中毒性と特異体質性の 2 種類に分類される。中毒性肝障害は薬物またはその代謝物が毒性を有することに起因し、投与量依存的に発症

するため、ラットなどの実験動物を用いた非臨床試験による再現が可能であるとされている。このような薬物を臨床において使用する場合、適切な用量設定、薬物濃度/バイオマーカーのモニタリングによる毒性発現の予防あるいは初期段階で投薬を中止することにより重篤化を防ぐことが可能である (Ikeda, 2006)。一方、臨床時に認められる薬物誘導性肝障害の多くは特異体質性に属すると言われてい (Kaplowitz, 2005)。特異体質性肝障害は薬物が抗原性を獲得することや、薬物代謝関連酵素などの遺伝的要因等の個体差に起因し、用量依存性がなく、発症頻度は 1,000 から 100,000 人に 1 人程度と非常に低いことが知られている。また、実験動物で再現ができず、医薬品の研究・開発段階で予測が困難なことが多いため、市場後初めて発症が認められる場合がほとんどである (Teranishi and Manabe, 2008)。薬物誘導性肝障害の病態は他の肝疾患とも類似性があるため、肝障害発症メカニズムについて研究することは薬の安全性の確保に貢献するだけでなく、様々な肝疾患に対する新規薬物治療戦略を提供し得ると考えられる (Park et al., 2005)。

薬物誘導性肝障害の発症に関してこれまでに様々なメカニズムが提唱されており、薬物あるいは Cytochrome P450 (CYP) や Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) などの薬物代謝酵素により生成された反応性代謝物に起因すると考えられている。薬物代謝酵素の主要な役割は本来その解毒作用に

あるが、代謝物が化学的に高い反応性を獲得し、肝細胞内のタンパク質、脂質および核酸などの生体内高分子と共有結合を形成することでタンパク質の機能障害、DNA 損傷、酸化ストレスおよびミトコンドリアの機能障害等を生じる結果、細胞壊死を引き起こし肝障害発症に至ることが知られている (Holt and Ju, 2006; Park et al., 2005)。

近年、薬物あるいは反応性代謝物による細胞障害の機序に加え、免疫細胞の活性化による炎症反応が肝障害の発症および増悪に関与することが報告されている (Adams et al., 2010)。肝臓内には T 細胞、NK 細胞および NKT 細胞などのリンパ球や、クッパー細胞および類洞内皮細胞などの肝非実質細胞が豊富に存在しており、サイトカインを介した細胞間のネットワークを形成することにより免疫反応を制御している (Racanelli and Rehermann, 2006)。薬物あるいはその代謝物による刺激に加え、ストレスを受けた細胞や壊死細胞から放出される damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) などのシグナルは自然免疫および獲得免疫を含めた免疫応答の引き金になると考えられており、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ および MIP-2 などの様々な炎症性サイトカインやケモカインが放出されることで、好中球やリンパ球の肝臓への浸潤や炎症反応を引き起こし肝障害の悪化に寄与すると考えられている (Park et al., 2005; Holt and Ju, 2006; Kaplowitz, 2005)。

これまでにハロタン誘導性肝障害において好中球 (You et al., 2006)、NKT

(Cheng et al., 2010) および IL-17 (Kobayashi et al., 2009) が発症に関与することや、ジクロキサシリン誘導性肝障害において IL-4 を含めた Th2 因子が関与すること (Higuchi et al., 2011)、 α -naphthylisothiocyanate (ANIT) 誘導性肝障害に Th17 因子である IL-17 が関与する

ことが明らかにされており (Kobayashi et al., 2010)、Th 細胞の分化バランスの破綻や免疫細胞の過剰な活性化が、薬物誘導性肝障害に関与することが示唆されている。しかし、このような免疫学的機序を介す薬物誘導性肝障害についての検討は極めて少ない。

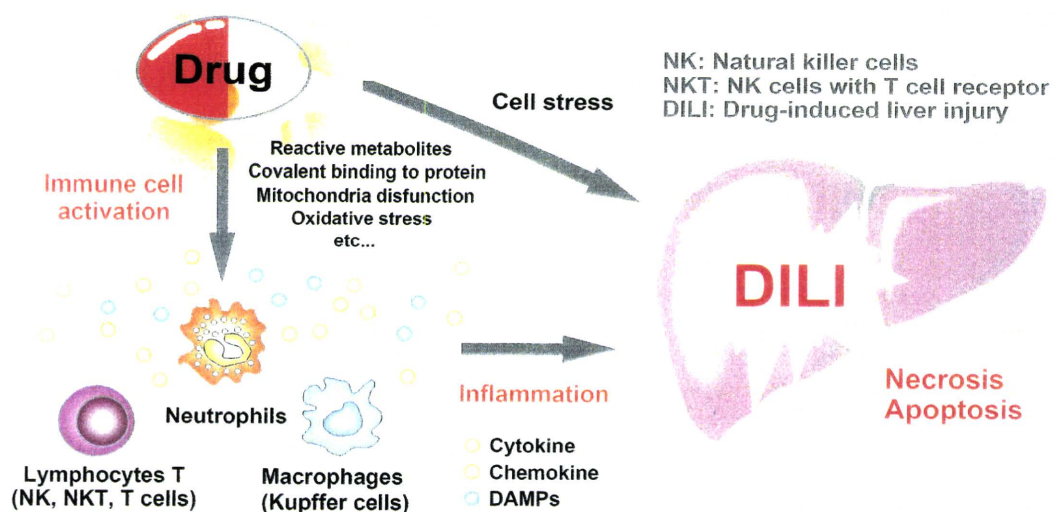


Fig. 1. Hypothesis of the pathogenesis of drug-induced liver injury.

ジクロフェナクは非ステロイド性消炎鎮痛剤の一種であり、解熱鎮痛薬として臨床で広く用いられている。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、炎症や疼痛などに関与するプロスタグランジンの合成を阻害すると考えられている。ジクロフェナクは副作用として消化管潰瘍やうっ血性心不全などが挙げられ、長期服用した場合には多くの患者にこれらの症状が認められる (ボルタレンインタビューフォーム, 2010)。また、ジクロフェナクは肝障害を引き起

こすことが知られており、軽度または無症候的な症例を含めると約 15%の患者において血清中のトランスアミナーゼの上昇が認められること、さらに稀に重篤な肝障害を惹起することが報告されている (Bhogaraju et al., 1999)。これまでにジクロフェナクによる肝障害の発症機序に関しては、様々なメカニズムが提唱されている。例えば、ジクロフェナクは CYP2C9 により主代謝物である 4-hydroxy diclofenac を生成するが、他にも CYP3A4 により 5-hydroxy diclofenac も生成する (ボルタレンインタビューフォーム, 2010)。

これらの代謝物はそれぞれキノイミン体を生成することにより、タンパク質との共有結合の形成および酸化ストレスを引き起こすと考えられている (Boelsterli, 2003; Tang et al., 1999)。また、*in vivo* 動物モデルを用いた検討については、acyl glucuronide を肝臓から胆汁中へ排出するトランスポーターである

Mrp2/Mrp3/Bcrp1 をノックアウトしたマウスや (Lagas et al., 2010)、アデノウイルスを用いて γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) をノックダウンしたラットでは (Morita et al., 2009)、ジクロフェナクによる肝毒性の影響を受けやすくなることが報告されており、Diclofenac acyl glucuronide の肝臓内での蓄積や GSH による解毒反

応も肝障害に関与すると考えられている。一方で、ラットに対し Lipopolysaccharide (LPS) とジクロフェナクを併用投与すると肝障害の増悪が認められること (Deng et al., 2006)、およびジクロフェナクの服用により肝障害を発症した患者において、肝細胞壊死、血中における自己抗体の検出、肝組織へのリンパ球の浸潤および炎症を伴う場合が多く認められることから、ジクロフェナク誘導性肝障害に免疫学的因子を介した反応が関与することが疑われているが、その機序については未だに明らかにされていない。本研究はジクロフェナク誘導性肝障害の発症に対する免疫学的因子の関与について明らかにすることを目的として検討を行った。

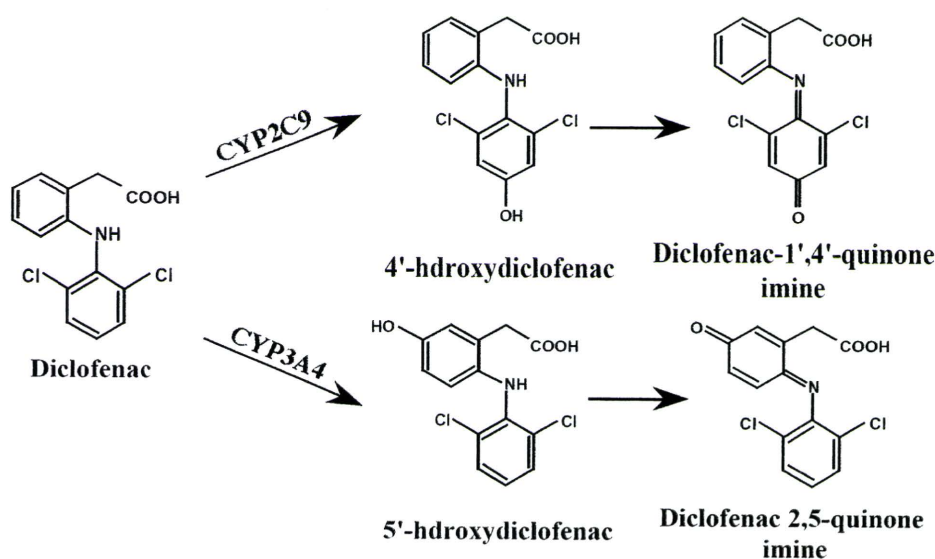


Fig 2. Metabolic pathways of diclofenac.

B. 研究方法

ジクロフェナク誘導性肝障害モデルマウス作製は、Balb/cCrSlc マウス (雌性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、ジクロフェナクを 50、80 および 120

mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 6、12 および 24 時間後に、下行大静脈より採血を行い、同時に肝臓を採取した。マウスへのイブプロフェン投与は、Balb/cCrSlc マウス (雌性、8 週齢) を馴化飼育後、イ

ブプロフェンを 120 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 24 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った。血漿中肝生化学値は DRI-CHEM 4000V (富士フィルム, Tokyo, Japan) を用いて、富士ドライケムスライドに血漿 10 μ L を点着させ、吸光度を測定して値を求めた。Real time RT-PCR による、mRNA の測定は、Stratagene (La Jolla, CA) の Mx3000P を用いて real time RT-PCR にて行った。反応条件を以下に示した。2-6 で得られた cDNA 試料 1 μ L、10 μ M Forward primer (FP) 0.8 μ L、10 μ M Reverse primer (RP) 0.8 μ L、SYBR Premix Ex Taq™ バッファー 10 μ L、5 μ M Reference Dye 0.25 μ L に滅菌精製水を加え、全量を 20 μ L とした。CXCL1、Gapdh、IL-1 β 、IL-6、STAT1、STAT6、T-bet、IFN- γ 、

GATA-3、ROR- γ t を測定した。40 サイクルの反応を終了後、60°C から 95°C まで、0.2°C/sec 温度を上昇させて融解曲線の測定を行った。融解曲線の測定により、産物が単一物であるかを推定することができる。反応終了後、2~4%アガロースゲルで電気泳動を行い特異的に増幅されるバンドの再確認を行った。

C. 研究結果

C-1. ジクロフェナク投与マウスの血漿試料の生化学検査

Balb/c マウスに対するジクロフェナクおよびイブプロフェン投与による血漿生化学値の影響を検討した。投与 24 時間後の血漿試料中の ALT および AST の平均値に標準偏差を付した結果を示した。

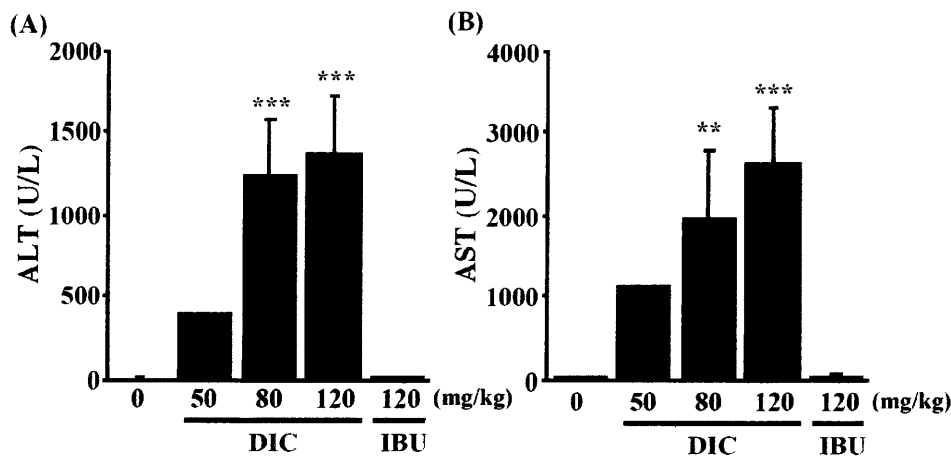


Fig. 3. Dose-dependent changes of plasma ALT (A) and AST (B) in diclofenac-induced liver injury. Mice were administered diclofenac (DIC: 50, 80 or 120 mg/kg in corn oil, *i.p.*) or ibuprofen (IBU: 120 mg/kg in corn oil, *i.p.*), and plasma were collected 24 hr after the administration. Data are mean \pm SD (n = 2 to 5). Significantly different from control mice (** p < 0.01, *** p < 0.001).

ジクロフェナクを 80 および 120 mg/kg で投与した群の 24 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値は対照群と比較して有意な上昇が認められた (Figs. 3A and B)。投

与量 50 mg/kg の群では上昇傾向が認められた。また、イブプロフェン投与群では、120 mg/kg 投与においても血漿中 ALT 値および AST 値に変化は認められなかった

(Figs. 3A and B)。この結果から、以降の検討ではジクロフェナクの投与量を 80 mg/kg とした。

ジクロフェナク投与後 6、12 および 24

時間の血漿試料中の ALT 値および AST 値の平均値に標準偏差を付した結果を示した。

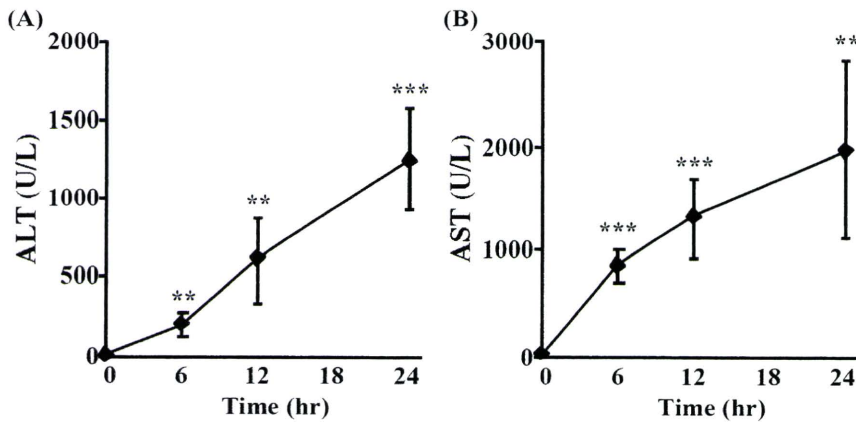


Fig. 4. Time-dependent changes of plasma ALT (A) and AST (B) in diclofenac-induced liver injury. Mice were administered diclofenac (80 mg/kg, *i.p.*) and plasma were collected 6, 12 and 24 hr after the administration. Data are mean \pm SD (n = 4 to 5). Significantly different from control mice (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

ジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても、対照群と比較して血漿中 ALT 値および AST 値の有意な増加が認められた。投与 24 時間で最も高値を示した (Figs. 4A and B)。

また、ジクロフェナク投与による肝障害の程度および肝組織への好中球の浸潤について、H&E 染色および抗 MPO 抗体を用いた免疫染色によって投与 24 時間後の肝組織像の評価を行った。その結果、ジクロフェナクを投与したマウスでは、肝組織におけるアポトーシスおよびネクロトーシス細胞が認められた。また、肝実質細胞に多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められた (Fig. 5)。

C-2 ジクロフェナク投与マウスの肝臓における炎症および免疫に関する

遺伝子の mRNA の変動解析

ジクロフェナク投与 6、12 および 24 時間後のマウスの肝臓における炎症および免疫に関する遺伝子の mRNA の発現変動を検討した。各サンプルについて CXCL1、IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、GATA-3、STAT1、STAT3、STAT6、T-bet、ROR- γ t、MIP-2、MCP-1 および Gapdh の mRNA 発現量を測定し、Gapdh mRNA 発現量を補正に用いて、それぞれのサンプルの比の平均値に標準偏差を付した結果を示した。A、B および C にはそれぞれ、Th 細胞の分化に関する転写因子 (T-bet, ROR- γ t, GATA-3, STAT1, STAT3, STAT6)、炎症性サイトカイン (IFN- γ , IL-6, IL1 β)、ケモカイン (MIP-2, MCP-1, CXCL1) の結果を示した。