

雌性マウスにおいて、早い時間での mRNA 等の変動が認められたことから、雄性マウスにおける HAL 投与時間依存的な血漿トランスアミナーゼ値および CXCL1 など炎症関連因子の mRNA 発現量変動を II-2-8 の方法に従い検討した。その結果、Fig. 9 の結果と同様に、雄性マウスにおいて Prog 投与による ALT 値および AST 値の増加は全ての時間において認められなかった (Fig. 16)。雌性マウス同様に炎症メディエーター mRNA 発現量の検討を行った結果、CXCL1 では雌性マウス同様に HAL 投与 3 時間後において最も高い発現量が認められたが、Prog 投与による有意な変化は認められなかった (Fig. 17)。CXCL2 では HAL 投与 6、12 および

24 時間後において HAL 群と比較して、Prog+HAL 群での有意な増加が認められた。しかし、mRNA 増加の程度は雌性マウスと比較して低値を示した。ICAM-1 では HAL 投与 12 時間後に最も高い発現量を示し、投与 6 時間後に HAL 群と比較して、Prog+HAL 群での有意な増加が認められた。TNF α では HAL 投与 12 および 24 時間後において HAL 群と比較して、Prog+HAL 群での有意な増加が認められた (Fig. 17)。以上の結果から、雄性マウスでは Prog による肝障害悪化が認められず、CXCL1 の増加も認められなかった。また、TNF α 以外の mRNA では雌性マウスで認められたような Prog 前投与による顕著な変化は認められなかった。

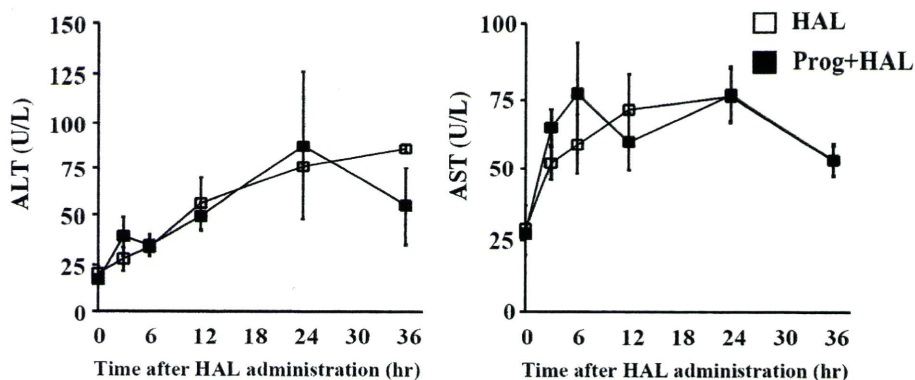


Fig. 16. Time-dependent effects of Prog pretreatment on HAL-induced liver injury. Male mice pretreated with Prog for 7 days were administered HAL (15 mmol/kg, *i.p.*). Plasma samples are collected 0, 3, 6, 12, 24 or 36 h after the HAL administration. The data are mean \pm SD of 3-4 mice.

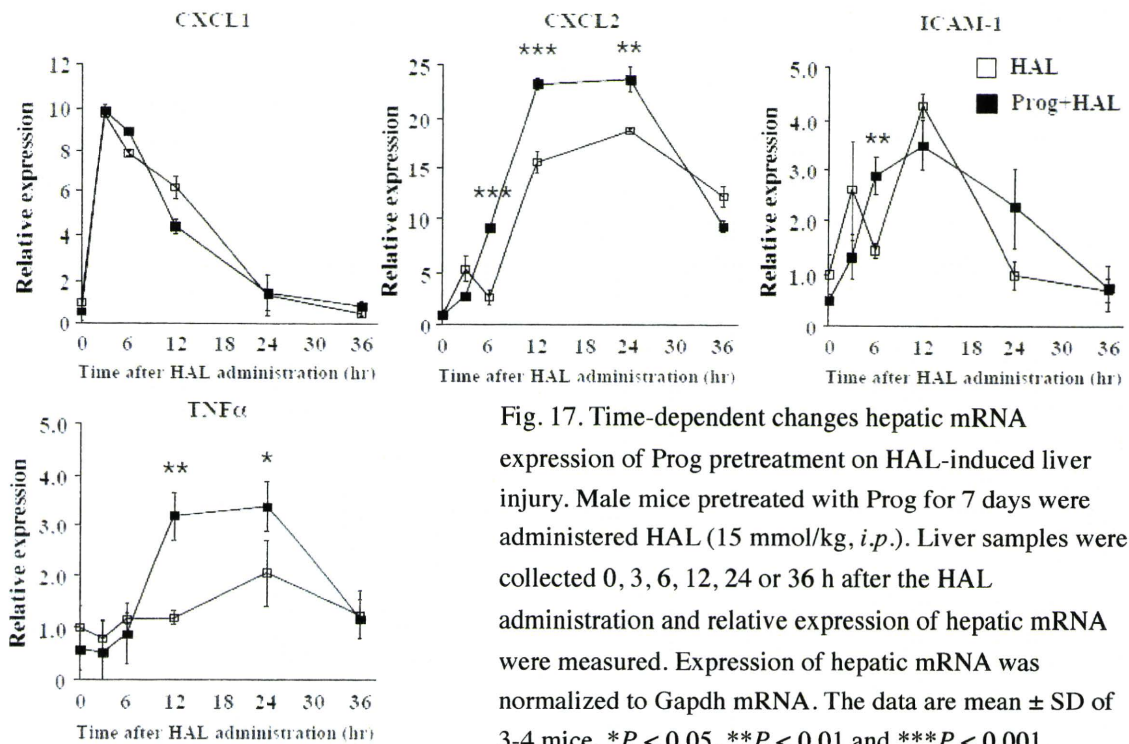


Fig. 17. Time-dependent changes hepatic mRNA expression of Prog pretreatment on HAL-induced liver injury. Male mice pretreated with Prog for 7 days were administered HAL (15 mmol/kg, *i.p.*). Liver samples were collected 0, 3, 6, 12, 24 or 36 h after the HAL administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean \pm SD of 3-4 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared with only HAL administered mice.

C-5 Prog 前投与による TA 誘導性肝障害に対する経時的変化

雌性マウスにおいて、HAL 投与後の早い時間での CXCL1 mRNA の増加が認められたことから、その他の肝障害性化合物ではどのような経時的な変動を示すか検討するために、TA 投与時間依存的な血漿トランスアミナーゼ値および mRNA 発現量変動を雌性マウスを用いて、II-2-8 の方法に従い検討した。

その結果を Fig. 18 と Fig. 19 に示した。TA 50 mg/kg 投与 24 時間後で最も高い ALT 値および AST 値の上昇が認められた。さらに、TA 投与 24 時間と 36 時間後に、TA 単独投与群と比較して Prog+TA 群での有意な ALT 値および AST 値の増加が認められた (Fig. 18)。HAL と同様に TA においても Prog 前投与は肝障害発症時間には影響せず肝障害悪化に寄与していることが示唆された。HAL と同様に、炎症関連因

子の mRNA 発現変動を解析した結果、CXCL1 では TA 投与 6 時間後に最も高い mRNA 発現量を示し、TA 単独投与群と比較して、Prog+TA 群では TA 投与 36 時間後を除く全ての時点において有意な発現増加が認められた (Fig. 19)。CXCL2 では TA 投与 24 時間後に最も高い発現量を示し、さらに TA 単独群と比較して、Prog+TA 群では投与 6 時間後からの有意な増加が認められた。ICAM-1 では TA 投与 6 時間後に最も高い発現量を示し、TA 単独群と比較して、Prog+TA 群では投与 6、12 および 24 時間において有意な増加が認められた。TNF α では投与 24 時間後に最も高い発現量を示し、TA 単独群と比較して、Prog+TA 群では投与 12 時間後から有意な増加が認められた (Fig. 19)。TA においても Prog 前投与により、HAL と類似した炎症関連因子の mRNA 発現増加を示した。

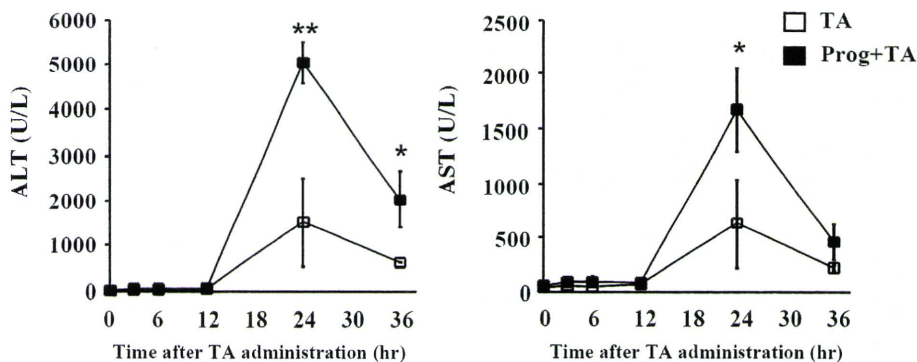


Fig. 18. Time-dependent effects of Prog pretreatment on TA-induced liver injury. Female mice pretreated with Prog were administered TA (50 mg/kg, *i.p.*). Plasma samples are collected 0, 3, 6, 12, 24 or 36 h after the TA administration. The data are mean \pm SD of 3-4 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared with only HAL administered mice.

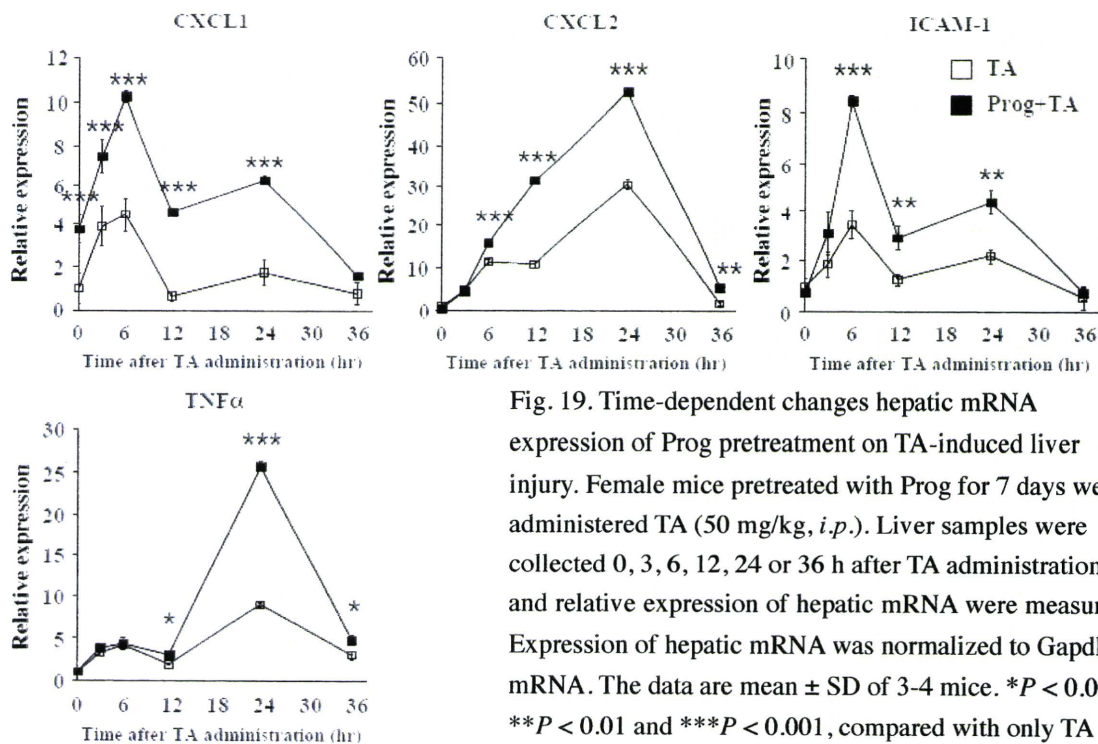


Fig. 19. Time-dependent changes hepatic mRNA expression of Prog pretreatment on TA-induced liver injury. Female mice pretreated with Prog for 7 days were administered TA (50 mg/kg, *i.p.*). Liver samples were collected 0, 3, 6, 12, 24 or 36 h after TA administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean \pm SD of 3-4 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared with only TA administered mice.

C-6 Prog 前投与による肝臓中 MAPK 活性化

MAPK は多くの細胞内シグナル伝達経路における重要な構成要素のひとつであり、代表的な MAPK として、ERK、p38 および JNK pathway が知られている。MAPK はリン酸化を受けて活性化される

ことで、シグナルカスケードおよび炎症反応の調節に関わる下流の因子を活性化する (DeFranco et al., 1998)。HAL 投与または Prog 前投与が MAPK 活性化を介して肝障害に寄与している可能性が考えられることから、HAL 投与 3 時間後における肝臓ホモジネート中の MAPK 活性化につ

いて検討した。

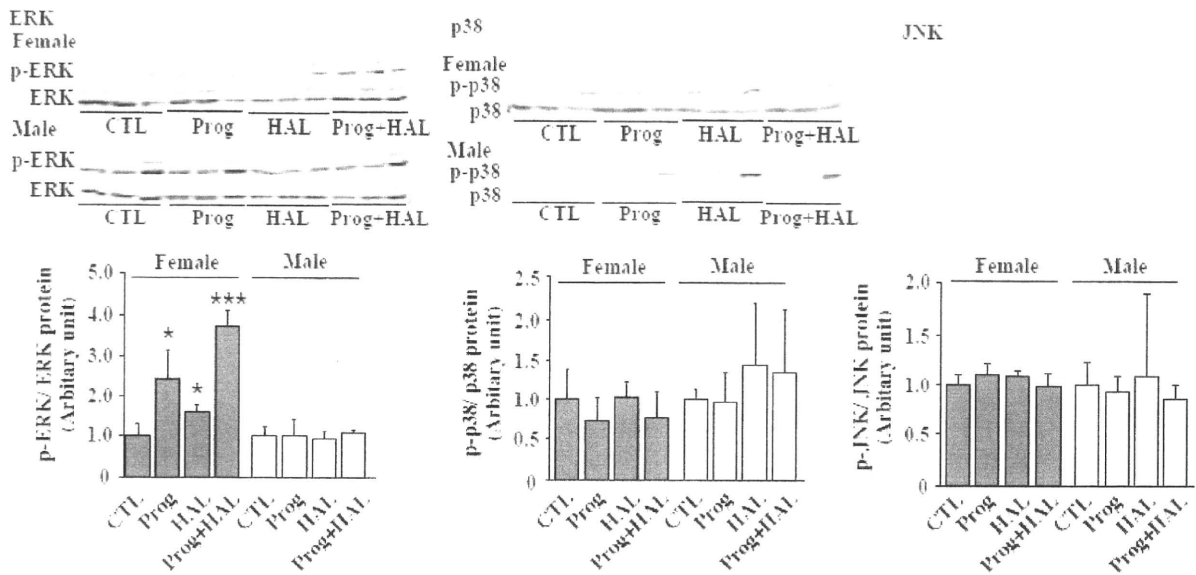


Fig. 20. Activation of MAPK signaling pathways in liver after HAL administration. Mice (male and female) were administered HAL (15 mmol/kg, *i.p.*) after 7days Prog administration. Liver samples were collected 3 h after the HAL administration. Immunoblot of MAPK proteins in whole liver homogenate were performed and quantified. Each lane showed an individual mouse (50 μ g/lane). The data are mean \pm SD of 3 mice. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, compared with CTL.

その結果、雌性マウスにおいて Prog 単独処置および HAL 単独投与での ERK リン酸化の有意な増加および、Prog+HAL 群でさらなる増加が認められた。また、この ERK リン酸化の増加は雄性マウスでは認められなかった (Fig. 20)。p38 リン酸化は Prog 前投与および HAL 投与による影響は雌雄ともに認められなかった (Fig. 20)。JNK リン酸化は、リン酸化 JNK のバンド強度が薄く、Fig 中にバンドを示すことはできなかったが、Prog 投与や HAL 投与による影響は雌雄ともに認められなかった (Fig. 20)。以上の結果より、Prog 前投与は MAPK のなかでも ERK pathway を活性化すること、および Prog 前投与による ERK 活性化は肝障害悪化の認められた雌性マウスでのみ認められることを示した。

C-7 Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害悪化に対する ERK 活性化の影響

Prog 前投与による ERK リン酸化の亢進が認められたことから、ERK 活性化を阻害する U0126 を用いて、*in vivo* において Prog による HAL 誘導性肝障害悪化に対する ERK pathway の影響について検討した。初めに U0126 投与時による ERK 活性化の阻害の影響を検討した。その結果、Prog 投与 3 時間後の肝臓において U0126 投与により ERK 活性化の約 50% の低下が認められた (Fig. 21)。続いて、この投与条件で Prog 投与による HAL 誘導性肝障害悪化に対する ERK pathway の影響について検討した。その結果、U0126 を前投与した U0126+HAL 群では HAL 単独投与群と比較して血漿トランスアミナーゼ値に有意

な変動は認められなかった (Fig. 22)。しかし、Prog+HAL 群で認められた有意な血漿トランスアミナーゼ値の増加は U0126

投与により全く認められなくなった (Fig. 22)。

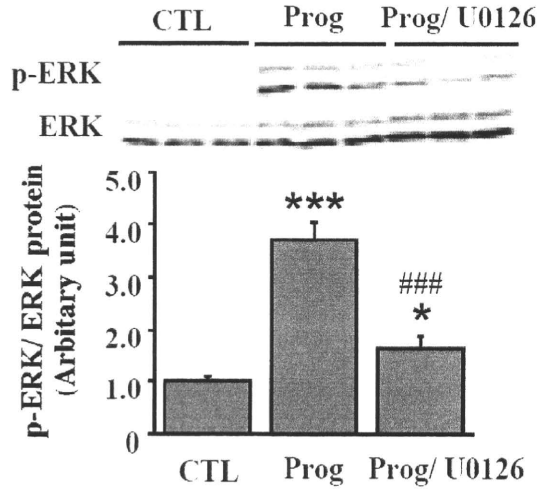


Fig. 21. Inhibitory effect of ERK activation after U0126 administration. Female mice pretreated with Prog for 7 days were administered U0126 (10 mg/kg, *i.p.*). Liver homogenate samples were collected 4 h after U0126 administration. Immunoblot of ERK proteins in whole liver homogenate were performed and quantified. Each lane showed an individual mouse (50 μ g/lane). The data are mean \pm SD of 3 mice. * P < 0.05 and *** P < 0.001, compared with CTL. ### P < 0.001, compared with Prog pretreated group.

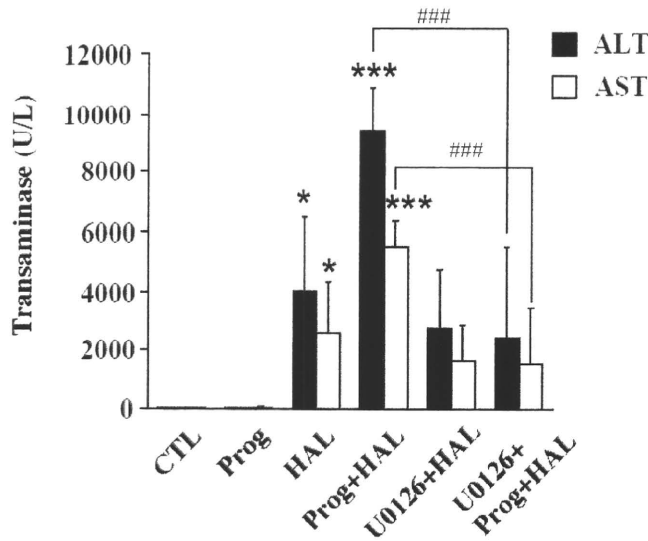


Fig. 22. The role of ERK pathway on the effect of Prog in HAL-induced liver injury. Female mice pretreated with Prog for 7 days were administered HAL (30 mmol/kg, *i.p.*) at 1 hr prior U0126 administration (10 mg/kg, *i.p.*). Serum samples were collected 24 h after the HAL administration. The data are mean \pm SD of 5-8 mice. * P < 0.05 and *** P < 0.001, compared with CTL.

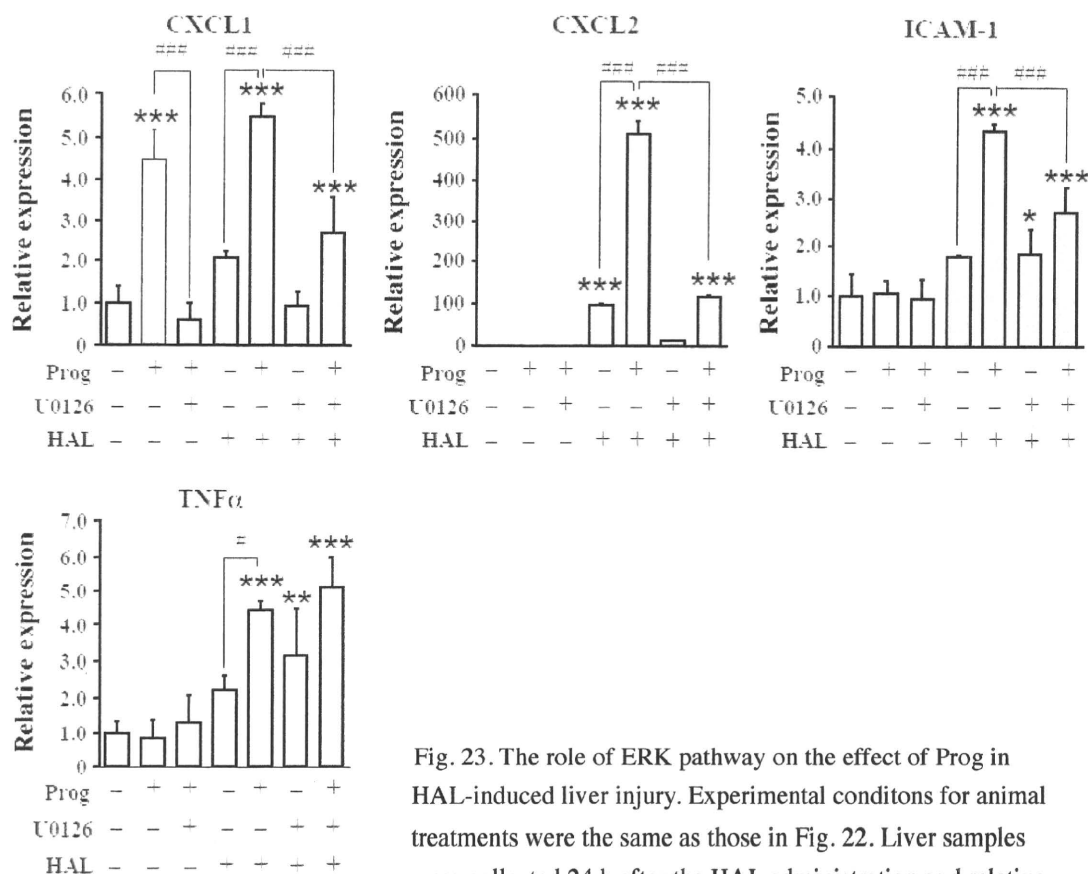


Fig. 23. The role of ERK pathway on the effect of Prog in HAL-induced liver injury. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 22. Liver samples were collected 24 h after the HAL administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean \pm SD of 5-8 mice. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$, compared with CTL.

ERK pathway の阻害が Prog による肝障害悪化作用を抑制したことから、炎症関連因子の mRNA 変動解析を行った。CXCL1 では Prog 投与による CXCL1 の有意な発現増加が U0126 を併用した U0126+Prog 群では認められなかった。また、Prog+HAL 群と比較して、U0126 を併用した U0126+Prog+HAL 群では CXCL1 発現の有意な減弱が認められた (Fig. 23)。CXCL2 および ICAM-1 では、Prog+HAL 群と比較して、U0126+Prog+HAL 群では発現の有意な減弱が認められた (Fig. 23)。TNF α では Prog+HAL 群と比較して、U0126+Prog+HAL 群では有意な発現変動

は認められなかった (Fig. 23)。これらの結果より、U0126 併用は HAL 単独の肝障害性に対して有意な変化は認められなかったが、Prog による肝障害悪化作用および、HAL 投与後の TNF α 以外の炎症関連因子の減弱が認められた。以上の結果より、Prog による HAL 誘導性肝障害の悪化の一因に Prog による ERK 活性化が関与していることが示された。

C-8 Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害悪化に対するクッパー細胞の影響

クッパー細胞は薬物や酸化ストレスなどに応答し、様々な炎症メディエーター

を放出し、APAP や肝虚血再灌流障害などの肝障害の病態に影響を与えることが報告されている (Adams et al., 2010; Laskin et al., 1990; Mosher et al., 2001)。クッパー細胞に対して Prog が作用し、CXCL1 や CXCL2 などのケモカインや TNF α などの炎症性サイトカインを放出することで、

肝障害悪化に寄与している可能性が考えられた。これらのことから、クッパー細胞を阻害することを目的に広く使用されているガドリニウムクロライド (GdCl₃) を用いて、Prog による HAL 誘導性肝障害悪化作用に対するクッパー細胞の影響について検討した。

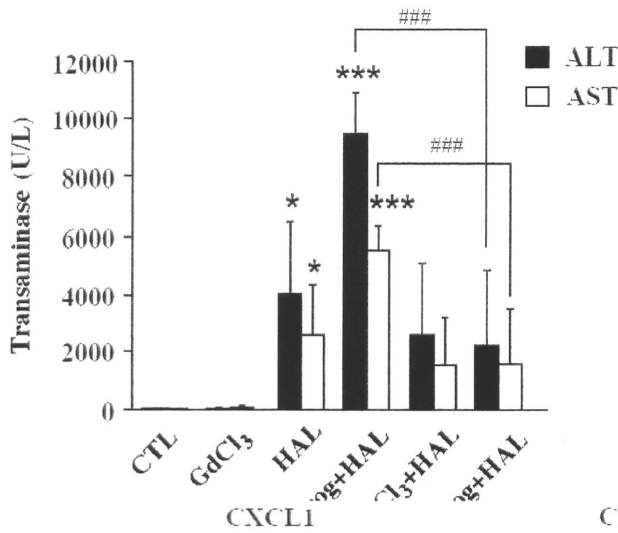


Fig. 24. The role of Kupffer cell on the effect of Prog in HAL-induced liver injury. Female mice were pretreated Prog for 7 days and administered GdCl₃ (10 mg/kg, *i.v.*) 24 and 48 hr prior to the HAL administration. Serum samples were collected 24 h after the HAL administration. The data are mean \pm SD of 5-6 mice. * P < 0.05 and *** P < 0.001, compared with CTL.

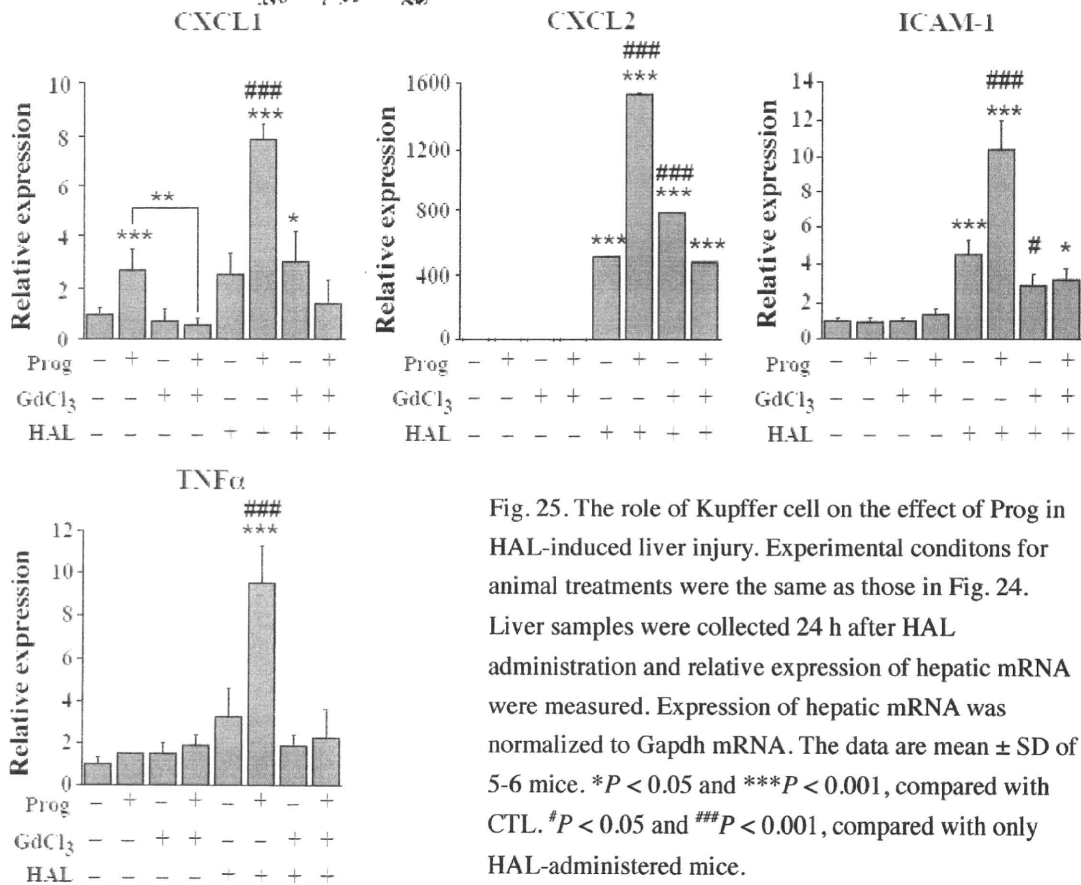


Fig. 25. The role of Kupffer cell on the effect of Prog in HAL-induced liver injury. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 24. Liver samples were collected 24 h after HAL administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean \pm SD of 5-6 mice. * P < 0.05 and *** P < 0.001, compared with CTL. # P < 0.05 and ### P < 0.001, compared with only HAL-administered mice.

GdCl₃を前投与したGdCl₃+HAL群ではHAL群と比較して、ALT値およびAST値の減少傾向が認められたが、有意な変化ではなかった (Fig. 24)。また、GdCl₃+Prog+HAL群ではProg+HAL群と比較して、有意なALT値およびAST値の減少が認められ、GdCl₃投与時にはProgによるHAL誘導性肝障害の悪化は全く認められなかった (Fig. 24)。続いて、GdCl₃投与によるProgの肝障害悪化作用の抑制が炎症反応を介したのか検討するために、肝臓における炎症関連因子のmRNA発現変動を解析した。CXCL1ではProg投与によるCXCL1の有意な増加がGdCl₃を併用したGdCl₃+Prog群で認められなかった。また、Prog+HAL群と比較して、GdCl₃+Prog+HAL群ではCXCL1発現の有意な減弱が認められた (Fig. 25)。CXCL2ではHAL群と比較して、Prog+HAL群およびGdCl₃+HAL群で有意な発現増加が認められたが、GdCl₃+Prog+HAL群では有意な発現増加は認められなかった (Fig. 25)。ICAM-1ではHAL群と比較してProg+HAL群で有意な発現増加が認められたが、GdCl₃+Prog+HAL群では有意な発現増加は認められなかった (Fig. 25)。TNF α ではHAL群と比較してProg+HAL群で有意な発現増加が認められたが、GdCl₃+Prog+HAL群では有意な発現増加は認められなかった (Fig. 25)。これらのことから、Prog前投与により増加した炎症関連因子の増加はGdCl₃の投与により認められなくなった。

これらの結果より、GdCl₃投与によりHAL単独の肝障害性に対して有意な変化は認められなかったが、Progによる肝障害悪化作用および、HAL投与後の炎症関連因子の有意な減弱が認められた。以上の結果より、ProgによるHAL誘導性肝障害悪化にはクッパー細胞を

介した炎症反応が寄与していることが示された。

C-9 RAW264.7細胞に対するProgの影響

Progによる肝障害悪化作用にはクッパー細胞が主に関与することが示されたことから、マウスマクロファージ由来RAW264.7細胞株を用いてProgによるCXCL1産生に対する影響について検討した。Progを0.01-1.0 μ Mで24時間または48時間処置し、CXCL1 mRNA発現量をRT-PCRにより定量した。CXCL1 mRNA発現量はProg処置濃度依存的に増加し、0.1および1.0 μ Mでvehicle処置と比較して有意な増加が認められた (Fig. 25A)。続いて、Progを0.1 μ Mで24時間処置し、同時にPRアンタゴニストであるRUおよびERアンタゴニストであるICIを処置した。結果、Progで認められた有意なCXCL1 mRNA発現増加はRU処置により認められなくなった。また、ICI処置ではProg群と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 25B)。次に、MAPK阻害剤の影響を検討した結果、ERKリン酸化阻害剤であるU0126処置によりProg群と比較して、CXCL1 mRNAの有意な減弱が認められた (Fig. 25C)。また、JNKのリン酸化阻害剤であるSP600125およびp38のリン酸化阻害剤であるSB203580処置ではProg処置群と比較して有意な発現増加が認められた。これらのことから、ProgによるCXCL1産生増加はマウスマクロファージ由来細胞株でも認められ、*in vivo*の検討と同様にRU処置およびU0126処置により、ProgによるCXCL1 mRNA発現増加が認められなくなった。マクロファージに存在するPRおよびERKがProgによるCXCL1および肝障害悪化に重要な役割を有することが示唆された。

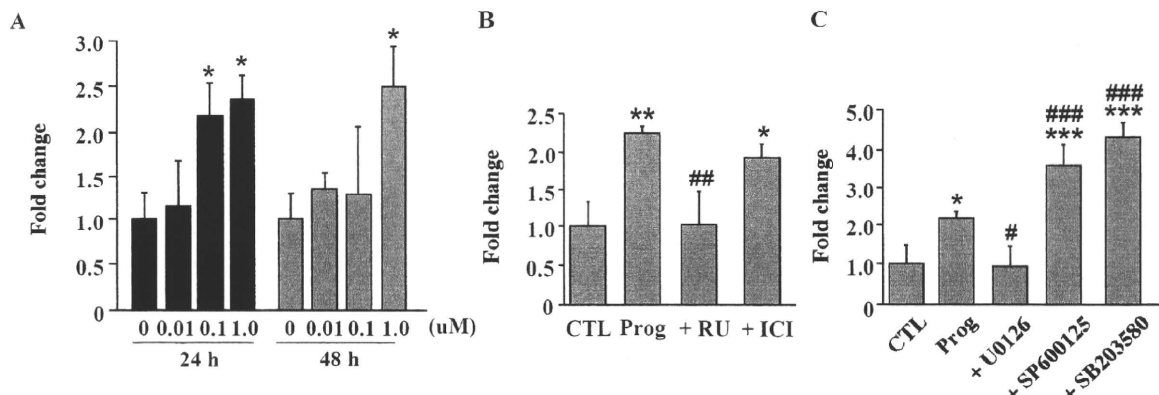


Fig. 26. The changes of the mRNA expression levels in RAW264.7 cells treated with Prog. RAW264.7 cells were treated with the indicated concentrations of Prog. After incubation for 24 h and 48 h, the mRNA expression levels of CXCL1 were measured (A). RAW cells were treated with 0.1 μ M Prog, 1 μ M receptor antagonist (RU or ICI) (B) and 1 μ M MAPK inhibitors (U0126, SP600125 or SB203580) (C) for 24 h. Expression of mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean \pm SD of triplicate determinations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared with CTL. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$, compared with only Prog treated groups.

C-10 HAL 誘導性肝障害に対する RU486 前投与の影響

本研究におけるこれまでの結果から、Prog 前投与による肝障害性化合物の肝障害悪化が認められることを示してきた。このことから、内因性の Prog もしくは Prog により活性化される経路を阻害することで、肝障害性薬物投与における炎症反応を抑制し、肝障害悪化が認められなくなることが考えられた。したがって、PR アンタゴニストである RU の前投与が HAL 誘導性肝障害に対する影響について検討した。

その結果、HAL 群と比較して、RU を 7 日間連投した RU+HAL 群では有意な ALT 値の減少および AST 値の減少傾向が認められた (Fig. 27)。同様に、CTL と比較して HAL 投与により増加が認められた CXCL1、CXCL2、ICAM-1 および TNF α mRNA 発現は RU+HAL 群において有意な発現の減弱が認められた (Fig. 28)。これらのことから、RU 前投与は HAL 投与後における炎症反応を抑制し、肝障害悪化の程度を減弱させることが示された。

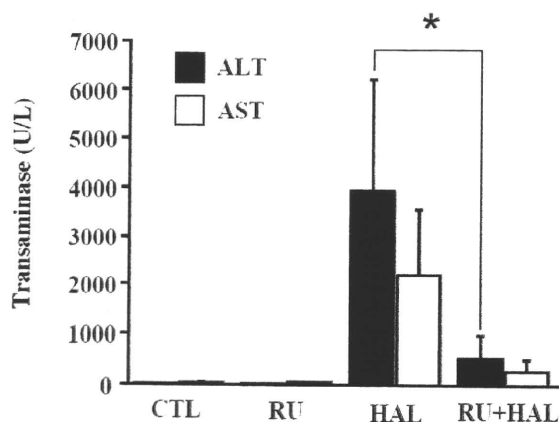


Fig. 27. Effects of pretreatment of RU on HAL-induced liver injury. Female mice pretreated with RU (50 μ g/mouse, *s.c.*) for 7days were administered HAL (30 mmol/kg, *i.p.*). ALT and AST were measured at 24 h after the HAL administration. The data are mean \pm SD of 3-6 mice.

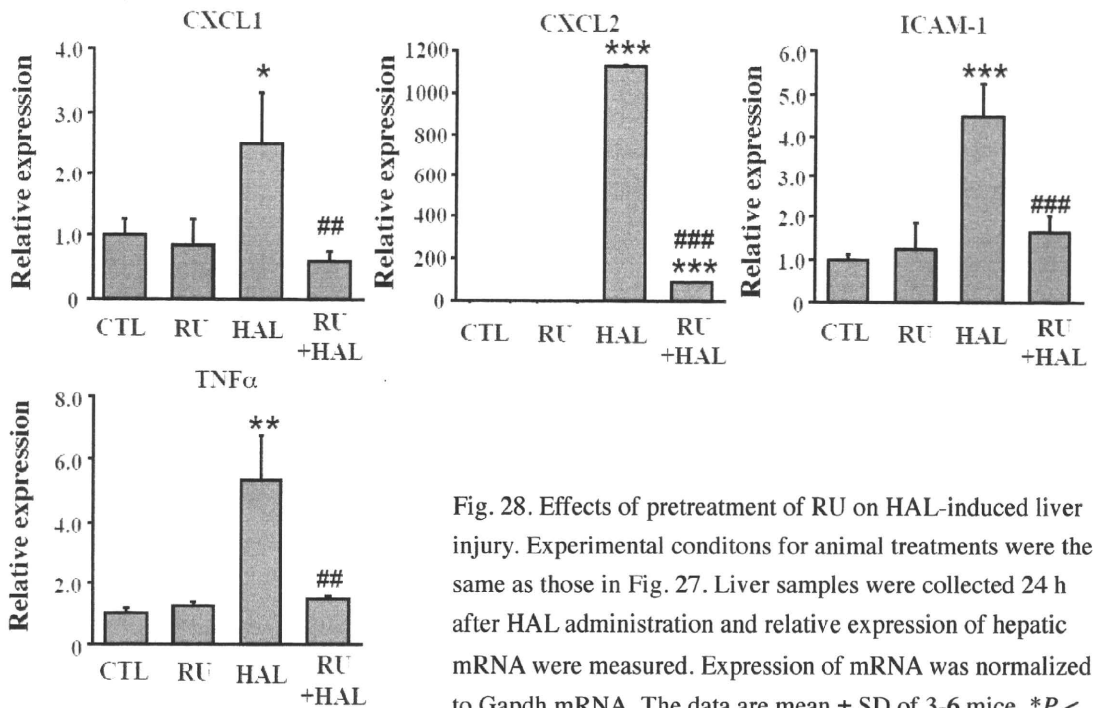


Fig. 28. Effects of pretreatment of RU on HAL-induced liver injury. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 27. Liver samples were collected 24 h after HAL administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean \pm SD of 3-6 mice. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001, compared with CTL. ## P < 0.01 and ### P < 0.001, compared with only HAL-administered mice.

C-11 HAL 誘導性肝障害に対する RU486 後投与の影響

臨床においては、薬物投与後または肝障害惹起後に対する治療が重要であることから、HAL 誘導性肝障害惹起後における RU 投与が肝障害減弱作用を示すか II-2-15 の方法により検討した。その結果、HAL 群と比較して、HAL 投与 1 時間後に RU を投与した RU+HAL 群では有意な ALT 値および AST 値の減少が認められた (Fig. 29)。RU 投与時の炎症関連因子の

mRNA 発現変動を解析した結果、CXCL1 mRNA 発現量は RU 単独投与により有意な発現減少が認められた。また、CTL と比較して HAL 投与により増加が認められた CXCL1、CXCL2、ICAM-1 および TNF α mRNA 発現は RU+HAL 群において有意な発現の減弱が認められた (Fig. 28)。以上の結果から、HAL 誘導性肝障害惹起後における RU 投与は炎症反応を抑制し、肝障害悪化の程度を減弱させることが示唆された。

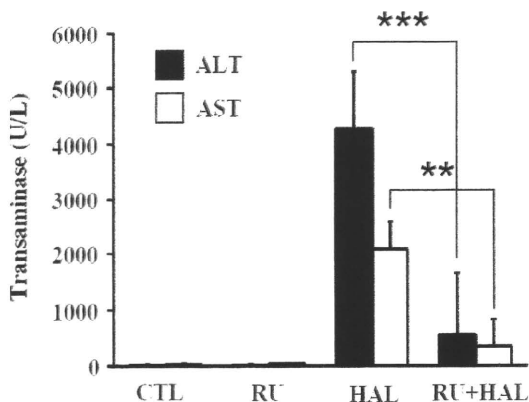


Fig. 29. Effects of RU on HAL-induced liver injury. Female mice were administered HAL (30 mmol/kg, *i.p.*) and administered RU (1 mg/kg, *i.v.*) at 1hr after the HAL administration. ALT and AST were measured at 24 h after the HAL administration. The data are mean \pm SD of 5 mice.

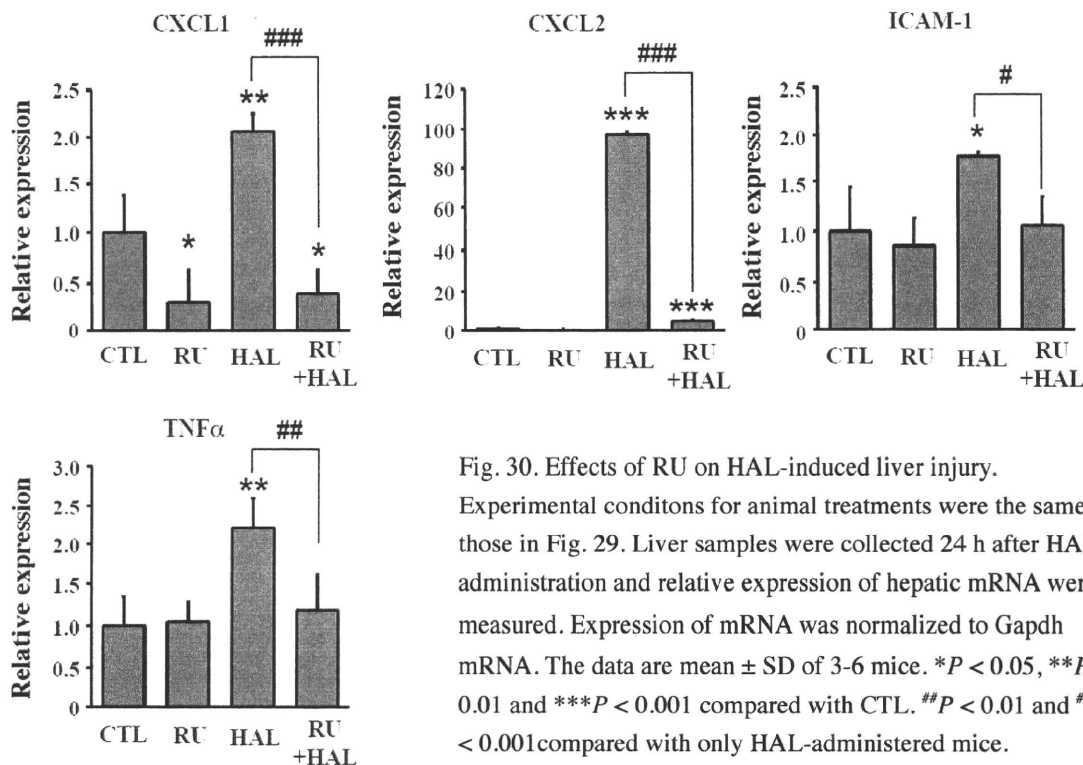


Fig. 30. Effects of RU on HAL-induced liver injury. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 29. Liver samples were collected 24 h after HAL administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean \pm SD of 3-6 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with CTL. ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ compared with only HAL-administered mice.

D. 考察

臨床において男性と比較し、女性で重篤な肝障害発症頻度が高い理由の一つとして Prog の肝障害悪化作用に着目し、その詳細なメカニズムを解明することを目的として検討を行った。その結果、Prog による肝障害悪化は HAL 特異的ではなく肝障害性を示す化合物において共通して認められ、その機序には Prog による CXCL1 発現増加、ERK 活性化およびクッパー細胞が重要な役割を有し、炎症反応悪化を介して肝障害悪化に寄与することを示した。これまでに薬物誘導性肝障害と Prog および PR との関連性を示した報告はなく、本研究が初めてである。

初めに、Prog による肝障害悪化が HAL 以外の化合物においても認められるか検

討した。肝障害性を示す薬物および化合物として様々なものが知られているが、本章では TA、ANIT および DCX の 3 種類の肝障害性化合物を選択した。TA は CYP2E1 やフラビンモノオキシゲナーゼにより TA sulfine や TA sulfate に代謝され、これらの代謝物が細胞質中のタンパク質と結合し、直接的な細胞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)。ANIT は主に胆汁うっ滞を引き起こす化合物であり、近年、その肝障害性に HAL 同様に好中球や IL-17 が関与することが報告されている (Dahm et al., 1991; Kobayashi et al., 2010)。DCX は炎症反応を伴う肝障害が多く報告され、その肝障害性には IL-4 など Th2 側の免疫因子が関与することが

報告されており、IL-17の関与は少ないと考えられている (Higuchi et al., 2011)。これらの毒性発現機序の異なる化合物を投与した際にも、Prog 前投与による肝障害悪化が認められた (Figs. 7-8)。また、肝組織学的評価においても、ANIT および TA では HAL 同様に Prog 前投与により好中球の浸潤の増加が認められ、HAL 同様に Prog が好中球浸潤を介して肝障害悪化に寄与していることが示唆された。さらに、第1章で、肝障害性の低い Iso を投与した際には Prog による肝障害悪化作用は認められなかったこと、および、雌性マウスでは Prog 前投与により HAL および TA 投与時の ALT 値および AST 値のピーク時間に変化は認められず、ALT 値および AST 値の有意な増加が認められたことから (Figs. 14 and 18)、Prog の肝障害悪化作用は肝障害発症よりも肝障害悪化の段階に寄与することが示唆された。

Prog による肝障害悪化に関与する遺伝子および経路を探索するために、DNA マイクロアレイ解析を行った。初めに Prog による肝障害悪化時に2倍以上上昇した遺伝子に対して、GO term を対応付け、選択した遺伝子群の生物学的特性について検討した結果、サイトカインやケモカインなどの免疫関連や、発がんに関与する遺伝子セット上の遺伝子に多く変動が認められることが示された (Table 4)。さらに、これらの遺伝子の解析を進め、Prog 単独投与で2倍以上の増加が認められた遺伝子および PR 下流と報告されている遺伝子である、Chi3l3、Clec4d、Clec4e、CXCL1、Irg1 および Retnlg を Prog による肝障害悪化に関わる候補遺伝子として挙げた (Table 5)。

DNA マイクロアレイ結果の再現性を確認するために個々のマウス cDNA を用いて real time RT-PCR を行ったが、CXCL1 以外では Prog 単独での有意な上昇が認められず、アレイの結果の再現が得られなかった。また、Irg1 および Retnlg では肝障害性の認められない Iso 単独投与群で HAL 単独投与群より高い結果となってしまった (Figs. 11 and 12)。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、同様のサンプル解析を行うことで信頼性の高いデータが得られることは自明のことである。しかし、コスト面の問題もあり、DNA マイクロアレイによる再試は行わなかった。また、今回解剖時の RNA サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を行ったが、CXCL1 mRNA は HAL 投与3時間後に最も高い発現量を示したことから (Fig. 15)、ALT 値のピークよりも早い時間での検討を行う必要があるかもしれない。

本章において候補遺伝子として挙げた CXCL1 は好中球遊走に関わる重要な CXC ケモカインの一つであり、肝臓中においてクッパー細胞や肝細胞など様々な細胞に発現している。健常人においては血中 CXCL1 量に性差は認められないことが報告されているが、女性では閉経前後で血中 CXCL1 量に有意な変化が認められており、CXCL1 産生に女性ホルモンが関与することが示唆されている (Kanda et al., 1997)。さらに、女性で肝障害報告の多いアルコール性肝障害患者においても肝臓中 CXCL1 量が多いことが報告されている (Maltby et al., 1996)。また、慢性アルコール摂取ラットに対して LPS 投与時には雄性ラットと

比較し、雌性ラットで CXCL1 産生および ALT 値の高い増加が認められる性差が生じること、および、この CXCL1 産生の性差は性腺摘出により認められなくなることが報告されている (Yamada et al., 1999)。このように、これまでに CXCL1 産生に女性ホルモンが影響していることやその反応性に性差が認められることが示唆されている。さらに、BALB/c マウスにおける CCl₄ 誘導性肝障害において、CXCL1 増加が好中球浸潤を介さずに直接的に肝障害悪化に寄与することも報告されている (Stefanovic et al., 2005)。Stefanovic ら (2005) の検討では recombinant CXCL1 投与により CCl₄ 誘導性肝障害の悪化が認められており、さらに CXCL1 が CXCL2 を誘導することを報告している。また、この recombinant CXCL1 の肝障害悪化作用は肝障害が生じている肝臓にのみ認められており、本検討においても Prog 単独投与で誘導された CXCL1 のみによっては肝障害を誘導しないが、薬物による肝障害が生じた際に、肝障害悪化に寄与したと一致した。本研究において肝組織学的評価から、Prog 前投与時には好中球の増加が認められているが、好中球だけでなく CXCL1 による直接的な肝障害悪化作用も今回の Prog による肝障害悪化に寄与していることが考えられる。また、HAL 投与後における CXCL1 mRNA 発現は CXCL2 mRNA 発現よりも早い時間で最も高値を示すことから、Stefanovic ら (2005) の報告と同様に CXCL1 mRNA 発現量の増加が CXCL2 mRNA の誘導を引き起こし、さらなる肝障害悪化に寄与している可能性が考えられた (Figs. 15 and 19)。

雄性マウスを用いた検討において、HAL は 30 mmol/kg 投与時において肝障害の程度に性差が認められることが報告されているが (You et al., 2006)、今回の 15 mmol/kg 投与では ALT 値の上昇が低いために、肝障害の性差が認められなかったことが考えられる (Figs. 1 and 9)。また、雄性マウスでは全ての肝障害性を示す薬物においても、Prog 前投与による肝障害悪化は認められないことが示された (Fig. 9)。この原因としては Prog の反応性の違いが考えられるが、肝臓中の PR mRNA 発現量に性差が認められなかったこと (data not shown)、マクロファージにおける PR mRNA 発現量には性差が無いという報告があることから (Huang et al., 2008)、PR 下流の経路に性差の原因があることが示唆される。Fig. 20 で示した Prog による ERK 経路活性化能の性差が寄与している可能性も考えられるが、現在までに ERK 経路に性差が存在するという報告はなく、今後より詳細な検討が必要であると考えられる。本研究における Prog の投与方法は Sugaya ら (2000) の報告を参考にし、この投与方法により卵巣摘出ラットの血漿中 Prog 濃度が 64.5 ± 10.4 ng/mL を示すことが認められている。一般に、雌性マウスでは性周期や妊娠に伴い血中 Prog 濃度が著しく変化する。性周期において血中 Prog は約 2-20 ng/mL で変動し、妊娠後期には 60-120 ng/mL の高値を示す (Wood et al., 2007; Barkley et al., 1979)。そのため、今回のマウスにおいても Prog 投与により妊娠中とほぼ同程度の血漿中濃度を示すことが示唆される。一方で雄性マウスでは Prog の変動を伴う性周期は認

められず、ほぼ一定の 4.8 ± 1.2 ng/mL の値を示す (Bosl et al., 2001)。さらに、雄性マウスでは男性ホルモンである血中テストステロン濃度が 6.9 ± 2.3 ng/mL に対して、雌性マウスでは 0.1 ng/mL 未満である (Bosl et al., 2001)。テストステロンは免疫抑制作用を有することが報告されており (Kovacs and Messingham, 2002)、このような男性ホルモンの影響によって本章での Prog 投与量では肝障害悪化作用を示さなかった可能性が考えられる。

HAL 投与後に経時的に免疫関連因子の mRNA 発現を解析した結果、雌性マウスでは CXCL1 や ICAM-1 は ALT 値のピークよりも早い時間で最も高い発現量を示し、CXCL2 は ALT 値と同様のピーク時間を示したが、雌性マウスと比較して雄性マウスでは Prog 前投与によるこれらの mRNA 発現の顕著な増加は認められなかった (Figs. 15, 17 and 19)。TNF α は Prog 投与時において雄性マウスでも有意な増加が認められたことから、TNF α の産生増加は、今回の Prog による肝障害悪化に対する寄与が小さいことが示唆された。また、CXCL1 および CXCL2 はピーク時間に違いはあるが、肝臓中 mRNA と血漿中タンパク質量に相関関係が得られ、本研究において測定している肝臓中 mRNA 発現量は血漿中タンパク質量を反映していることが示された (Fig. 15)。

MAPK 活性化は様々な転写因子の活性化や、炎症性サイトカインの産生などに関与する重要な調節機構の一つである。本研究において、Prog が MAPK の中でも ERK 経路を活性化させることが示され、さらにこの活性化は肝障害悪化の認めら

れた雌性マウスでのみ認められた (Fig. 20)。ERK は上流の MEK1/2 が活性化されることで活性化される。本研究で用いた ERK 阻害剤である U0126 は MEK1/2 活性化を阻害することで、下流の ERK 活性化を阻害することが知られている。これまでに ERK 経路を抑制することで、喘息時の抗炎症作用や肺での外傷性出血時の炎症性サイトカイン (IL-6 と TNF α)、ICAM-1 および CXC ケモカイン産生の減少、シスプラチン誘導性腎障害時の炎症やアポトーシスを減弱させることが認められており、ERK 活性化が障害に対して症状の悪化に働くことが報告されている (Duan et al., 2004; Hsu et al., 2009; Jo et al., 2005)。本研究においても U0126 投与により Prog による増加した ERK リン酸化の 50%程度の減弱が認められており、肺での外傷性出血の報告 (Hsu et al., 2009) と同様に TNF α 、CXC ケモカインおよび ICAM-1 の減弱が認められ、血漿トランスアミナーゼ値の減少が認められた (Figs. 21-23)。また、*in vitro* でマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞株を用いた検討においても、U0126 処置により Prog による CXCL1 mRNA 増加は抑制された (Fig. 25)。その他に用いた MAPK 阻害剤である SB203580 は p38 α 、p38 β の ATP 結合部位を競合的に阻害する選択的な阻害剤であり、SP600125 は JNK1/2 の選択的な阻害剤である (English and Cobb, 2002)。SB03580 は高濃度処置時には ERK 経路とその下流経路の活性化が生じることが報告されており、本検討において認められた CXCL1 mRNA 発現量増加はこれに起因するかもしれない (Mizuno et al., 2010;

Numazawa et al., 2003)。しかし、SP600125 処置によって CXCL1 mRNA の発現が増加した原因は不明である。In vivo での U0126 投与によっても Prog による CXCL1 mRNA 増加が抑制されていることから、クッパー細胞における ERK が重要な働きをしている可能性が示唆された。また、Mizuno ら (2010) はヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いた検討において、ERK 活性化が CXC ケモカインである IL-8 産生に重要であることを報告しており、今回の検討においても CXCL1 産生に ERK 活性化が重要な役割を有していることと一致すると考えられた。これらのことから、Prog による肝障害悪化の一因に Prog による ERK 経路の活性化が寄与することが示された。

クッパー細胞は酸化ストレスや薬物刺激などにより活性化されると、TNF α 、IL-1 および IL-6 などの炎症性サイトカインを放出することが知られている。また、肝虚血再灌流障害において CXCL1 や CXCL2 は好中球浸潤による肝障害に重要な働きをし、クッパー細胞がこれら CXC ケモカイン産生に重要であることが報告されている (Mosher et al., 2001)。本研究における Prog による炎症悪化作用にクッパー細胞が関与するか検討するために、in vivo および in vitro での検討を行った。本章における in vivo での GdCl₃ 投与方法は Mosher ら (2001) の方法を用い、この投与方法では肝臓中のクッパー細胞の 40-61% の減少が認められている。これまでにクッパー細胞阻害により TNF α などの炎症性メディエーターおよび酸化ストレス減弱を介した APAP、Concanavalin A、四塩化炭素やエン

ドトキシシン誘導性肝障害などの減弱が認められている (Michael et al., 1999; Nakashima et al., 2008; Edwards et al., 1993; Vollmar et al., 1996)。しかし、HAL 誘導性肝障害に対してはクッパー細胞の関与は少ないことが報告されている (Cheng et al., 2010)。また、GdCl₃ は TNF α を介した肝細胞増殖作用を有することも報告されているが (Rose et al., 2001)、GdCl₃ はクッパー細胞を阻害する目的で現在でも広く使用されている。本検討では、Cheng ら (2010) の報告と同様に GdCl₃ 投与による HAL 単独の肝障害の有意な減少は認められなかった。また、GdCl₃ 単独投与時における TNF α mRNA 産生増加は認められなかったことから、本検討では GdCl₃ 投与による直接的な肝細胞増殖作用はあまり大きくないと考えられた。さらに、GdCl₃ 投与により Prog 単独投与で認められていた CXCL1 の上昇が認められなくなり、Prog による肝障害悪化作用が認められなくなった (Figs. 24 and 25)。加えて、in vitro においてマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞株を用い、Prog による CXCL1 mRNA を指標とした検討を行ったところ、これまでの結果と同様に RU 処置による CXCL1 産生減弱が認められた (Fig. 25)。これらのことから、本研究における Prog による炎症悪化は主としてクッパー細胞を介して生じ、肝障害悪化に寄与することが示唆された。

本研究において、Prog の 7 日間連投後の薬物投与により肝障害の悪化が認められたことから、Prog で活性化される経路を PR アンタゴニストである RU 投与により阻害することで、炎症悪化を抑制し肝障害悪化を軽減させる可能性が考えられ

た。したがって、RU 投与が HAL 誘導性肝障害に与える影響について検討した。RU 前投与により、免疫因子の発現低下および HAL 誘導性肝障害の有意な減弱が認められ (Figs. 26 and 27)、さらに臨床においては薬物投与後における治療が重要であることから、HAL 投与 1 時間後における RU 投与の影響を検討した結果、RU 投与は炎症悪化を軽減させ、肝障害の悪化を減弱させることを示した (Figs. 28 and 29)。RU は日本では未承認であるが経口妊娠中絶薬として英国等で販売されており、その他に抗がん作用などを有することも示唆されている (Barry and Weiss, 1993)。中絶の目的で 600 mg 経口単回投与や、一日量 1600 mg の 2 回服用が臨床で用いられており、600 mg 単回投与の最高血中濃度は 5 μ M であることが報告されている (Heikinheimo et al., 1987)。本検討では RU 静脈内投与は 1 mg/kg で投与した際の血中濃度はマウス全血を 2.2 mL/30 g mice とすると、およそ 30 μ M となり、他の組織に影響を与える可能性も考えられるが、RU 単独投与では 5 mg/kg 投与においても ALT 値および AST 値の変動が認められなかったこと (data not shown)、さらに 1 mg/kg 投与により顕著な肝障害減弱作用を示したことから今回の投与は肝障害に対して有効であると考えられる。本検討では雄性マウスに対して HAL 30 mg/kg 投与および RU 投与による影響については検討していないが、Youら (2006) の報告において HAL 30 mg/kg 投与時には雌性マウスは雄性マウスに比べ高い ALT 値を示すことが報告されており、内因性の Prog がこの HAL 誘導性肝障害

の性差に寄与している可能性が考えられる。また、これまでに臨床において APAP や Isoniazid などの抗結核薬による肝障害に対する治療として還元型 GSH の前駆体である N-acetylcysteine (NAC) の静注および経口投与が広く用いられている (Baniasadi et al., 2010; Kelly, 1998)。今回、RU が肝障害悪化を抑制したことは主に炎症悪化の軽減によるものと考えられ、RU 投与は炎症を介した肝障害に対する治療になりうることを示唆された。また、NAC とは別のメカニズムで肝保護作用を示すため、NAC との併用によるさらなる肝保護作用が認められる可能性も考えられ、今後より詳細な検討が必要である。

本章では Prog による肝障害悪化作用が HAL 特異的ではなく、その他の肝障害性化合物において認められること、および Prog による肝障害悪化には ERK 経路やクッパー細胞が重要な働きを有していることを明らかにした。さらに、肝障害惹起後の RU 投与により HAL 誘導性肝障害の減弱が認められ、肝障害治療に対する新しい治療手段になりうる可能性を示唆した。本研究は Prog や PR と薬物誘導性肝障害の関連性について検討した初めての報告である。

E. 結論

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。

第I章では、女性での肝障害報告症例が多く、マウスにおいてもその性差が確立しているHALに着目し、HAL誘導性肝障害モデルマウスを用いてE2およびProgが肝障害に与える影響について検討した。E2は肝障害の程度を減弱させ、Progは肝障害の程度を悪化させ、さらに、これらは炎症性の反応を介して肝障害の程度に与える影響を及ぼすことを見出した。

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。

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。

<<参考文献>>

- Baniasadi S, Eftekhari P, Tabarsi P, Fahimi F, Raoufy MR, Masjedi MR, and Velayati AA (2010) Protective effect of N-acetylcysteine on antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **22**: 1235-1238.
- Bosl MR, Stein V, Hubner C, Zdebek AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF, and Jentsch TJ (2001) Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl⁻ channel disruption. *EMBO J.* **20**: 1289-1299.
- Cohen EN, Trudell JR, Edwards HD, and Watson D (1975) Urinary metabolites of halothane in man. *Anesthesiology* **43**: 392-401.
- Dahm LJ, Schultze AE and Roth RA (1991) An antibody to neutrophils attenuate α -naphthylisothiocyanate-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**: 412-440.
- DeFranco AL, Crowley MT, Finn A, Hambleton J, and Weinstein SL (1998) The role of tyrosine kinases and map kinases in LPS-induced signaling. *Proc. Clin. Biol. Res.* **397**: 119-136.
- Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, and Lempicki RA. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome. Biol.* **4**: 3.
- Duan W, Chan JH, Wong CH, Leung BP, and Wong WS (2004) Anti-inflammatory effects of mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor U0126 in an asthma mouse model. *J. Immunol.* **172**: 7053-7059.
- Dyroff MC and Neal RA (1981) Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer. Res.* **41**: 3430-3435.
- Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, and Thurman RG (1993) The involvement of kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **119**: 275-279.
- English JM and Cobb MH (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 40-45.
- Heikinheimo O, Lähteenmäki, Koivunen E, Shoupe D, Croxatto H, Luukkainen T, and Lähteenmäki P (1987) Metabolism and serum binding of RU 486 in women after various single doses. *Hum. Reprod.* **2**: 379-385.
- Higuchi S, Kobayashi M, Yoshikawa Y, Tsunayama K,

- Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2011) IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.* **200**: 139-145.
- Hsu JT, Kan WH, Hsieh CH, Chuodhry MA, Bland KI, and Chaudry IH (2009) Role of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) in 17 β -estradiol-mediated attenuation of lung injury after trauma-hemorrhage. *Surgery* **145**: 226-234.
- Hunter AL, Holscher MA, and Neal RA (1977) Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **200**: 439-448.
- Jo SK, Cho WY, Sung SA, Kim HK, and Won NH (2005) MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int.* **67**: 458-466.
- Kanda Y, Koike K, Sakamoto Y, Osako Y, Masuhara K, watanabe K, Tsurufuji S, Hirota K, and Miyake A (1997) Gro-alpha in human serum: differences related to age and sex. *Am. J. Reprod. Immunol.* **38**: 33-38.
- Kelly GS (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alt. Med. Rev.* **3**: 114-127.
- Kobayashi M, Higuchi S, Mizuno K, Tsuneyama K, Fukami T, Nakijima M, and Yokoi T (2010) Interleukin-17 is involved in α -naphthylisothiocyanate-induced liver injury in mice. *Toxicology* **275**: 50-57.
- Kovacs EJ, and Messingham KA (2002) Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Res. Health* **26**: 257-263.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laskin DL (1990) Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Semin. Liver Dis.* **10**: 293-304.
- Laskin DL, Gardner CR, Price VF, and Jollow DJ (1995) Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* **21**: 1045-1050.
- Lee WM, Hyman LS, Rossaro L, Fontana RJ, Stravitz RT, Larson AM, Davern TJ, Murray NG, McCashland T, Reisch JS, Robuck PR, and the Acute Liver Failure Study Group (2009) Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure. *Gastroenterology* **137**: 856-864.
- Maltby J, Wright S, Bird G, and Sheron N (1996) Chemokine levels in human liver homogenates: associations between GRO alpha and histopathological evidence of alcoholic hepatitis. *Hepatology* **24**: 1156-1160.
- Michael SL, Pumford NR, Mayeux PR, Niesman MR, and Hinson JA (1999) Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology* **30**: 186-195.
- Mizuno K, Fukami T, Toyoda Y, Nakajima M, and Yokoi T (2010) Terbinafine stimulates the pro-inflammatory responses in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Life Sci.* **87**: 537-544.
- Mosher B, Dean R, Harkema J, Remick D, Palma J, and Crockett E (2001) Inhibition of kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury. *J. Surg. Res.* **99**: 201-210.
- Nakashima H, Kinoshita M, Nakashima M, Habu Y, Shono S, Uchida T, Shinomiya N, and Seki S (2008) Superoxide produced by kupffer cells is an essential effector in Concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* **48**: 1979-1988.
- Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, and Karin M (2007) Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* **317**: 121-124.
- Numazawa S, Watabe M, Nishimura S, Kurosawa M, Izuno M, and Yoshida T (2003) Regulation of ERK-mediated signal transduction by p38 MAP kinase in human monocytic THP-1 cells. *J. Biochem.* **133**: 599-605.
- Rose ML, Bradford BU, Germolec DR, Lin M, Tsukamoto H, and Thurman RG (2001) Gadolinium chloride-induced hepatocyte proliferation is prevented by antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **170**: 39-45.
- Stefanovic L, Brenner DA, and Stefanovic B (2005) Direct hepatotoxic effect of KC chemokine in the liver without infiltration of neutrophils. *Exp. Biol. Med.* **230**: 573-586.
- Tietze F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**: 502-522.
- Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4340-4354.
- Vollmar B, Ruttiger D, Wanner GA, Leiderer R, and Menger MD (1996) Modulation of kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock* **6**: 434-441.
- Wang T, Shankar K, Ronis MJ, and Mehendale HM (2000) Potentiation of thioacetamide liver injury I diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**: 473-479.
- Weiss BD (1993) RU486 The progesterone antagonist. *Arch. Fam. Med.* **2**: 63-70.

Yamada S, Matsuoka H, Harada Y, Momosaka Y, Izumi H, Kohno K, Yamaguchi Y, and Eto S (1999) Effect of long-term ethanol consumption on ability to produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in the rat liver and its gender difference. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **23**: 61-66.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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

Yukitaka Yoshikawa, Yasuyuki Toyoda, Satonori 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

H. 知的財産権の出願・登録

該当なし。

ヒト肝臓における PPAR α の microRNA による発現制御

分担研究者 中島 美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) は主に肝臓に発現し、脂質代謝および異物代謝に関わる多くの酵素の発現を制御する転写因子である。PPAR α 自身の発現がどのように制御されているかについてはほとんど解明されていなかった。本研究は、ヒト肝臓における PPAR α の発現調節に microRNA が関与する可能性を検討したものである。PPAR α mRNA の 3'非翻訳領域に結合し得る microRNA を探索し、肝臓に高く発現する 6 つの microRNA について検討した。その中で miR-21 および miR-27b の過剰発現とノックダウンにより PPAR α タンパク質発現量が有意に減少および増加することを明らかにした。PPAR α mRNA 発現量は変化しなかったことから、miR-21 と 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。また、PPAR α の下流遺伝子である acyl CoA synthetase の発現にも影響を及ぼすことを示した。さらに、ヒト個人肝試料を用いた相関解析において、PPAR α タンパク質と mRNA の間に正の相関が認められず、転写後調節の関与が支持された。また、PPAR α タンパク質発現量および翻訳効率は miR-21 発現量と逆相関を示したが、miR-27b とは示さなかった。従って、ヒト肝臓における PPAR α の発現制御に対して miR-21 が大きく寄与している可能性が示された。

A. 研究目的

Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属しているリガンド依存的な転写因子である。PPAR α は主に肝臓に発現しており、他にも腎臓、心臓、筋肉などにも発現が認められる。内因性リガンドとして脂肪酸やエイコサノイド、また外因性リガンドとしてフェノフィブラートやベザフィ

ブラートといったフィブラート系薬剤が結合すると retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成する。このヘテロダイマーが fatty acid transport protein のような脂肪酸輸送に関わるタンパク質や、acyl CoA synthetase (ACS) のような脂肪酸の分解に関わるタンパク質などの標的遺伝子のプロモーター領域内に存在する PPAR α response element と呼ばれ