

201107007A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の
作用機序解明と 予測試験系の開発研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横井毅

平成24(2012)年5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の

作用機序解明と予測評価試験系の開発研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の作用機序解明と予測評価試験系の開発研究

横井 毅 ----- I

II. 分担研究報告

1. フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および
発症メカニズムの検討
横井 毅 ----- 1
2. カルバマセピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製および
メカニズムの解析
横井 毅 ----- 17
3. α -ナフチルイソチオシアネート (ANIT) 誘導性肝障害モデル
マウスにおけるインターロイキン-17 の関与
横井 毅 ----- 47
4. アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討
横井 毅 ----- 65
5. NASH および Steatosis モデルマウスに対するタモキシフェンの
影響
中島 美紀 ----- 85
6. フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する酵素の検討
深見 達基 ----- 105

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	125
VI. 研究成果の刊行物・別刷	-----	129

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の

作用機序解明と予測評価試験系の開発研究

平成 23 年度 総括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 24 (2012) 年 5 月

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の作用機序解明と
予測試験系の開発研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

医薬品の開発において、現在、安全な薬の開発と使用を妨げる最大の課題は、ヒト特異的に発現する予測困難な毒性・副作用にある。医薬品による重篤な副作用の中で薬物性肝障害の報告数は多く、我が国においては2007年に2,473例の報告がある。薬効が秀でた薬や開発候補化合物が、開発途中で断念することや、臨床試験の中止や上市後の販売停止は、製薬会社のみならず患者や社会にとっても大きな損失である。特に最近FDAが、解決すべき最重要課題としている「ヒト特異的薬物性肝障害の発現の早期解決」が切望されている。最近、反応性代謝物の生成量を *in vitro* で精査する手法が急速に一般化したものの、予測性は向上しないことが明らかになった。その主な原因は、免疫学的因子の関与が全く考慮・評価されていないことに起因していると考えられているが、研究はほとんど進展していない。我々はこの問題を解決し、我が国の創薬に資することを目的として研究を進めている。本研究により、開発の臨床試験段階または市販後に肝障害で薬が潰れることを防ぐことが高い確立で期待でき、我が国の医薬品開発に資すること大であると考えられるとともに、患者の利益を向上させるなど、極めて社会性が高い研究であると考えられる。

本年は3年計画の初年度であるが、当初の予定を遥かに上回る成果を発表することができた。本報告書の後半には、原著論文を印刷したものを添付してある為に、それらの原著論文の内容については、分担報告書としての掲載は割愛した。この総括・分担研究報告書には、まだ論文発表にはなっていないものの、一定の研究結果を得られた内容について、以下の6項目について報告するものである。

(1) フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症メカニズムの検討：薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、特に抗菌薬は薬物性肝障害の注意喚起が多いことで知られている。抗菌薬の中でもイソキサゾリル系の合成ペニシリンであるフルクロキサシリンはペニシリナーゼ耐性をもつ優れた抗生物質であり、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が関与する感染症に適用される。しかし、フ

フルクロキサシリンを服用した患者においてまれに重篤な肝障害を発症することがあり、重篤化した患者の中には死亡例や肝移植例も報告されている。発症頻度は10万人に8.5人であり、比較的高い割合である。フルクロキサシリンにより肝障害を発症した患者の中には発熱、好酸球増多、免疫細胞の浸潤といったアレルギー様の症状を伴うことより、免疫反応の関与が示唆されている。現在までの報告では、フルクロキサシリン誘導性肝障害を実験動物で再現した例はなく、また免疫学的因子に着目してメカニズムを研究した報告もない。そこで、本研究はフルクロキサシリン誘導性肝障害をマウスで再現し、その発症メカニズムを解明することを目的とした。その結果、本研究においてフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおいて免疫学的因子が発症および増悪に関与していることを明らかにした。その中でも high mobility group box 1 (HMGB1) と Toll like receptor (TLR)4 が関係するシグナル伝達が発症に関与している可能性、さらにインターイキン (IL-17) が増悪因子である可能性を示すことができた。よって、得られた結果はフルクロキサシリン誘導性肝障害および他の薬物性肝障害の発症メカニズム解明に有用な情報を提供しうると考えられる。

(2) カルバマゼピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製およびメカニズム解析 : 鎮痙薬である carbamazepine (CBZ) は稀に肝障害を惹起することが報告されている。CBZ 連投により種々の CYP が誘導され、毒性を有する反応性代謝物を生成すると考えられている。これまでの *in vitro* における報告などから、反応性代謝物が肝臓のタンパク質と結合し、免疫反応およびネクロシスなどの細胞傷害が起きることで肝障害が惹起されると考えられているが、実験動物でその肝障害の再現に成功した例はない。そこで CBZ 誘導性肝障害マウスモデルを確立し、そのメカニズムを免疫・代謝の両面から検討した。10 週齢の BALB/c マウスに CBZ を 4 日間 400 mg/kg を、5 日目に 800 mg/kg を投与した群において血中 ALT と AST 値の有意な上昇が認められ、肝組織染色において、著しいネクロシスが認められた。一方で、構想類似薬であるオクスカルバゼピン(OXC)投与群では肝障害は惹起されなかった。以降、肝障害の惹起された条件におけるメカニズムの詳細な検討を行った。血中濃度の検討から、CBZ 誘導性肝障害の発症に 3-OH CBZ が関与する可能性が示された。炎症を惹起する S100A8、S100A9 およびそれらのレセプターである TLR4 と RAGE の肝臓 mRNA の上昇が認められた。炎症性サイトカインやケモカインの mRNA を網羅的に解析したところ、IL-17 が免疫系細胞の浸潤を介して、CBZ 誘導性肝障害の発症に関与することが示された。本研究では CBZ 誘導性肝障害モデルマウスを作出に成功し、肝障害のメカニズムを代謝・免疫の両面から明らかにした。本研究で作製した肝障害モデルと肝障害メカニズムの情報は、臨床における薬物誘導性肝障害発症の回避

に繋がる研究に役立つものと期待される。

(3) α -ナフチルイソチオシアネート(ANIT)誘導性肝障害モデルマウスにおける IL-17 の関与 : ANIT は胆管および肝細胞を障害する肝毒性物質であり、げっ歯類に投与することでヒト胆汁うっ滞のモデルとして利用されることが知られている。ANIT は肝細胞中でグルタチオン抱合を受け、胆管側に発現する薬剤排出に関わるトランスポーターである **multiple resistance-associated protein 2** により胆汁中に排泄され、そこでグルタチオンおよび ANIT に解離される。肝細胞による胆汁中の ANIT の取り込みによって胆管細胞中では ANIT 濃度が上昇する。胆汁中への分泌および取り込み作用の繰り返しによって直接的な肝細胞の障害に繋がっていると考えられている。一方で、ANIT は主に肝小葉辺縁において好中球の浸潤が強く見られることが知られている。本研究では、マウスにおける ANIT 誘導性肝障害に免疫学的因子が関与しているかどうかについて検討を行った。その結果、ANIT 投与により Th17 細胞の分化に関わる主要な転写調節因子である ROR γ t の肝臓中 mRNA 発現上昇および Th17 細胞から産生される IL-17 の血漿中濃度が上昇した。また、IL-17 により好中球の遊走・活性化を促す CXC ケモカインである **macrophage inflammatory protein (MIP-2)** の肝臓中 mRNA 発現が ANIT 投与で上昇した。これら一連の動きは、IL-17 抗体投与により肝障害の程度とともに抑制され、**recombnant IL-17** 投与では上昇したことから、IL-17 が MIP-2 を介して好中球の遊走および活性化を促すことで肝障害誘導に寄与していることが示された。このことは IL-17 が薬物誘導性肝障害において重要な役割を果たしていることが示されるとともに、特に免疫系を介した肝障害メカニズムを考察する上で有用であると考えられた。

(4) アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討 : NSAID に代表される、カルボニル基を持つ薬物は第二相抱合反応によってグルクロン酸抱合を受け、アシルグルクロン酸抱合体 (AG) を形成する可能性が高い。Acyl 基は比較的反応性が高いため、細胞内のタンパク質分子等と共有結合することで特異体質的な毒性を惹起すると考えられている。近年、特異体質的な反応が薬物とタンパクの結合体形成に関与していることが示唆されてはいるが、薬物とタンパクの結合体が形成されることと薬物の毒性とを結び付ける、メカニズムに基づいた直接的な証拠はない。また、本研究室において、これまでにヒト胎児腎臓細胞である HEK293 細胞を用いた検討において、AG が細胞毒性および遺伝毒性を持たないことが示唆された。本研究では、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞とヒト末梢血単核球である PBMC を用いて、代謝物による免疫関連因子の活性化を考慮した肝障害発症機構について検討した。ヒトにおいてジクロフェナク (DCF) 起因する過敏性刺激が起こることが知られている。PBMC へ 5-OH DCF を処置したところ、IL-8、IL-6、GM-CSF および MCP-1 mRNA

発現量はコントロール処置群と比較して有意に上昇した。DCF 処置群に対しても IL-8、IL-6 および MCP-1 mRNA において有意に上昇した。DCF-AG 処置群は全ての因子、4'-OH DCF 処置群では IL-6 以外の因子において DCF 処置群に対しても有意な上昇を示した。DCF-AG は THP-1 細胞よりも PBMC の方が、5-OH DCF 処置によって免疫活性化が惹起された。一方で THP-1 細胞および PBMC とともに、4'-OH DCF および DCF-AG 処置によって免疫が活性化されたため、これらの免疫活性化機序はどちらの細胞においても同じであると考えられた。以上より、THP-1 細胞や PBMC を用いて AG の免疫毒性を評価することが可能であった。また、DCF-AG は免疫学的機序による薬物性肝障害に関与することが初めて示された。

(5) NASH および Steatosis モデルマウスに対するタモキシフェンの影響：近年、非アルコール性脂肪肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) の罹患率が増加している。NAFLD とは 飲酒歴を有さないものの肝への脂肪沈着を認める疾患群 (Steatosis) であり、欧米では人口の約 30%が NAFLD を有していると推測されている。NAFLD の多くは肥満、耐糖能異常、脂質異常症を始めとしたメタボリック症候群に起因しており、肥満や糖尿病とともに今後も世界的な増加が予想される疾患である。Steatosis は今まで悪性ではないと考えられていたが、肝硬変や肝癌へと進行する病型が潜んでいることが明らかになってきたが、適切な治療薬は存在しない。本検討ではこれらの肝障害モデルマウスを作製し、作製したモデルマウスに対するタモキシフェン (TAM) の影響を検討した。その結果、Steatosis モデルマウスにおいて、TAM が肝障害の程度を減弱させることを示した。また、その作用の一因として TAM による ERK1/2 活性化が関与することが示唆された。Steatosis に対して TAM を投与して改善を示した報告は本研究が初めてである。Steatosis は肥満により肝臓における中性脂肪の過剰な蓄積が生じ、細胞が変性することで発症するといわれている。TAM 投与により steatosis モデルマウスの ALT 値および AST 値の低下が認められ、組織染色においては、細胞の肥大化および炎症の減弱が認められた。また遺伝子レベルにおいても炎症性因子の低下が認められた。本研究は、steatosis および NASH モデルマウスに対して、TAM の post 投与が肝障害改善作用を示すことを初めて明らかにした報告であり、また肝障害に対する薬物治療を考える上で役立つ有用な情報が提供できると考えられる。

(6) フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する酵素の検討：解熱鎮痛薬であるフェナセチンは腎盂腎炎、腎細胞がん、血液毒性などの副作用が知られている。フェナセチンは約 70 – 80%が主に CYP1A2 により薬理活性を有する代謝物である APAP に代謝される。この反応とは別に加水分解により *p*-フェネチジンが生成し、さらに *N*位が水酸化された *N*位水酸化フェネチジンが毒性発現に関与すると考

えられている。しかし、実際にこの代謝経路がフェナセチンの毒性発現に関与しているか実証された例はない。その原因の 1 つとしてはこの一連の代謝を触媒する酵素が不明であるという背景がある。フェナセチン誘発性の血液毒性として Met-Hb 血症が知られている。当研究室の最近の研究でヒトでは、AADAC がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関与する可能性が示唆された。本研究では、マウスにフェナセチンを投与することで Met-Hb 血症誘発に加水分解代謝経路が関与しているのか詳細な検討を行い、さらに *in vitro* において Met-Hb 血症発現に関わる酵素を同定することを目的とし検討を行った。フェナセチンをマウスに経口投与したところ、加水分解代謝物である *p*-フェネチジンが投与 15 分から 1 時間で高い血漿中濃度を示し、Met-Hb 濃度は投与 1 時間後に最大値を示した。さらに、加水分解酵素阻害剤である TOTP を前投与することでフェナセチン投与による Met-Hb 濃度と *p*-フェネチジンの血漿中濃度の低下が認められた。以上の結果より、加水分解代謝経路がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症の発現に重要な役割を有することが示唆された。また、発現系を用いた検討などにより、AADAC、CYP1A2 および CYP2E1 がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症発現に高い寄与を有することを明らかにした。

以上の 6 項目の検討は、いずれも研究内容を論文にまとめる段階にあり、一部については、論文投稿中である。今後報告内容の全ての項目について速やかに英文論文とする予定である。以上、すでに論文として本冊子の後半に別刷で報告してある内容については割愛し、上記の 6 項目について本報告書にて報告する。

分担研究者：

金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授
中島美紀

金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教
深見達基

A. 研究目的

薬効が秀でた薬や開発候補化合物が、開発途中で断念することや、臨床試験の中止や上市後の販売停止は、製薬会社のみならず患者や社会にとっても大きな損失である。最近、反応性代謝物の生成量を *in vitro* で精査する手法が急速に一般化したものの、予測性は向上しないことが明らかになった。その主な原因は、免

疫学的因子の関与が全く考慮・評価されていないことに起因していると考えられているが、研究はほとんど進展していない。我々はこの問題を解決し、我が国の創薬に資することを目的として研究を進めている。

(A-1) フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症

メカニズムの検討: 薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、特に抗菌薬は薬物性肝障害の注意喚起が多いことで知られている。抗菌薬の中でもイソキサゾリル系の合成ペニシリンであるフルクロキサシリンはペニシリナーゼ耐性をもつ優れた抗生物質であり、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が関与する感染症に適用される。しかし、フルクロキサシリンを服用した患者においてまれに重篤な肝障害を発症することがあり、重篤化した患者の中には死亡例や肝移植例も報告されている。発症頻度は10万人に8.5人であり、比較的高い割合である。フルクロキサシリンにより肝障害を発症した患者の中には発熱、好酸球増多、免疫細胞の浸潤といったアレルギー様の症状を伴うことより、免疫反応の関与が示唆されている。現在までの報告では、フルクロキサシリン誘導性肝障害を実験動物で再現した例はなく、また免疫学的因子に着目してメカニズムを研究した報告もない。そこで、本研究はフルクロキサシリン誘導性肝障害をマウスで再現し、その発症メカニズムを解明することを目的とした。

(A-2) カルバマゼピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製およびメカニズム解析: 鎮痙薬である carbamazepine (CBZ) は、稀に Stevens-Johnson 症候群や肝炎などの重篤な副作用を引き起こすことが知られている。CBZ を服用する患者のうちの約 20%において副作用が認められ、そのうちの 10~15%ほどが肝臓に関する副作用である。また、CBZ 誘導性肝

障害の発症に関して、性差は認められないことや、1日の服用量とは依存性がないことが報告されている。CBZ 誘導性肝障害は、青年から高齢者に起こるとされる肉芽腫性の肝炎で hypersensitivity の症状を伴うものと、小児から青年に起こるとされる肝細胞のネクロシスや炎症を伴う肝障害とに分類できる。好酸球の増多などの hypersensitivity の症状が認められた患者において重症化や死亡した例はなく、hypersensitivity の症状が出た場合には一般的により転帰をとるとされているが、代謝的に誘導された肝障害は重症化する可能性があることが報告されている。ほぼ全ての肝障害患者において肝臓の炎症が認められることや、CBZ によって劇症肝炎が発症した患者では、肝臓ミクロソームに対する自己抗体が産生されると報告されていることなどから、CBZ 誘導性肝障害の発症には免疫系の因子が関与することが考えられている。本研究では CBZ 誘導性肝障害モデルを作製することおよび、そのメカニズムを代謝と炎症の両面から検討することを目的とした。はじめに肝障害報告の少ない OXC をネガティブコントロールとして、CBZ を単回投与または反復投与により肝障害モデルマウスを作製できるか検討し、研究を進める中で代謝と炎症が CBZ 誘導性肝障害の発症に寄与する結果が得られ、発症に関与する因子の特定の検討も行うことにより、そのメカニズムを明らかにすることを目指した。

(A-3) α -ナフチルイソチオシアネー

ト(ANIT)誘導性肝障害モデルマウスにおける IL-17 の関与 : ANIT は胆管および肝細胞を障害する肝毒性物質であり、げっ歯類に投与することでヒト胆汁うっ滞のモデルとして利用されることが知られている。ANIT は肝細胞中でグルタチオン抱合を受け、胆管側に発現する薬剤排出に関わるトランスポーターである multiple resistance associated protein 2 により胆汁中に排泄され、そこでグルタチオンおよび ANIT に解離される。肝細胞による胆汁中の ANIT の取り込みによって胆管細胞中では ANIT 濃度が上昇する。胆汁中への分泌および取り込み作用の繰り返しによって直接的な肝細胞の障害に繋がっていると考えられている。一方で、ANIT は主に肝小葉辺縁において好中球の浸潤が強く見られることが知られている。本研究では、マウスにおける ANIT 誘導性肝障害に免疫学的因子が関与しているかどうかについて検討を行った。第一に、ANIT 投与マウスの肝臓において Th1、Th2、Treg および Th17 細胞への分化に関わるそれぞれの転写調節因子 T box expressed in T cells (T-bet)、 GATA-binding protein (GATA-3)、forkhead box P3 (FoxP3) および retinoid related orphan receptor γ (ROR γ t) 遺伝子ならびにそれぞれ Th 細胞に特徴的なサイトカイン遺伝子の mRNA 発現変動について解析を行った。次に、ANIT 誘導性肝障害への IL-17 の関与を検討するために、血漿中 IL-17 濃度を測定するとともに IL-17 抗体投与による IL-17 中和実験および recombinant

マウス IL-17 (rIL-17) 併用投与実験を行った。

(A-4) アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討 : 体内の代謝経路において、第二相抱合反応としてグルクロン酸抱合がある。この反応により極性が上がることで排泄を促す解毒反応であるが、カルボニル基を持つ薬物はグルクロン酸抱合を受けた時に不安定な代謝物である acyl glucuronide (AG) を形成する。Acyl 基は分子内の転移よりも、アシル転移によってタンパクおよび高分子の求核性基と反応し、結合する方が早いと言われており、AG はその求電子的な反応性の高さから、細胞毒性および薬物過敏性反応に関する多くの副作用に関係していると考えられてきた。NSAIDs の多くのは細胞内外においてタンパクと共有結合し、免疫学的な副作用を惹起する因子の 1 つとして作用すると考えられている。また、細胞内タンパクの機能変化を惹起することで、細胞毒性を示すことが示唆されている。しかし、HEK (Human embryonic kidney) 293 細胞を用いた実験により、NSAIDs の AG は細胞毒性および遺伝毒性を示さないことが示唆された。また、AG のタンパクへの共有結合能の高さと、AG の毒性発現メカニズムを繋ぐ直接的な証拠はない。本研究では、AG による免疫反応への影響を評価することを目的とした。初めに、AG を形成する薬物において THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標とし、その免疫活性化能を評価することとした。

(A-5) NASH および Steatosis モデルマウスに対するタモキシフェンの影響: タモキシフェン (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。SERM は ER に対して agonist と antagonist の両方の作用をもち、その作用は臓器において異なる。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。また、肝臓においては agonist 作用を示すことが報告されている。当研究室のマウスを用いた検討において、TAM を 5 日間連投し、その後 Acetaminophen、Bromobenzene、Diclofenac または Thioacetamide の肝障害性化合物に対して TAM の前投与によって肝障害の減弱が認められることを明らかにした。この検討において急性肝障害に対する TAM の肝保護作用は示されたが、慢性肝障害に対して TAM 投与が肝保護に与える影響は検討されていない。本研究では慢性肝障害モデルとして steatosis および NASH モデルマウスを作製し、TAM による肝保護作用および肝障害へ及ぼす影響について検討した。

(A-6) フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に關与する酵素の検討: フェナセチンは解熱鎮痛薬として広く使用されていたが、腎盂腎炎や腎細胞がんといった重篤な副作用のために日本では 2001 年に販売中止となった。ヒトにおいてフェナセチンは CYP1A2 による脱エチ

ル化反応により薬理活性代謝物であるアセトアミノフェン (APAP) に変換される主代謝経路と、AADAC が触媒する加水分解反応により *p*-フェネチジンに代謝される経路がある。*p*-フェネチジンはさらに *N* 位水酸化を受け *N* 位水酸化フェネチジンに変換される。フェナセチンは腎毒性の他に血液毒性の副作用も知られており、この水酸化代謝物が腎毒性や血液毒性の原因物質として考えられている。そのため毒性の発症は加水分解代謝経路が関与していると考えられるが、詳細は明らかにされていない。フェナセチンの血液毒性としてメトヘモグロビン (Met-Hb) 血症が知られている。Met-Hb とは赤血球中に存在するヘモグロビンが過剰に酸化された状態を意味しており、ヘモグロビンは酸素運搬能を有するのに対し、Met-Hb は酸素運搬能を有していない。そのため血中の Met-Hb 濃度の上昇にともなってチアノーゼや意識障害などの症状が現れる。この毒性発現にはフェナセチンの加水分解およびそれに続く水酸化反応が関与していると考えられているが、この加水分解代謝経路が毒性発現に関与していることを証明した例はない。そこで本研究ではフェナセチンの血液毒性に AADAC による加水分解反応とそれに続く水酸化反応が関与するのか明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

本検討における動物実験については、すべて金沢大学動物実験指針に従って行っ

た。

(B-1) フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症メカニズムの検討

メカニズムの検討:フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウス作製は、Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、フルクロキサシリンを 300, 600, 800 および 1,000 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 1.5、3、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。対照群としてアンピシリンを 1,000 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 3 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った。Total RNA の調製および Reverse transcription (RT) 反応などは、常法に従って行った。

(B-2) カルバマゼピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製およびメカニズム解析

メカニズム解析: CBZ および OXC の投与方法は、Balb/cCrSlc マウス (雄性、8 ~ 10 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育した後、CBZ を 400 mg/kg (10 mL/kg of corn oil) で4日間、1日1回経口投与し、5日目に400または800 mg/kg で経口投与した。Total RNA の調製、Reverse transcription (RT) 反応、Real-time RT-PCR、ELISA は、常法に従って行った。

(B-3) α -ナフチルイソチオシアネート (ANIT) 誘導性肝障害モデルマウス

における IL-17 の関与: Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢) を使用した。一晚、

絶食したマウスに ANIT 50 mg/kg を投与容量 5 mL/kg で単回経口投与し、ANIT 投与 1 時間後に給餌を再開した。投与 24 時間後、下行大静脈より採血を行い、同時に肝臓を採取した。AST、ALT および T-Bil 値は、富士ドライケムスライドに血漿 10 μ L を点着させ、Dri-Chem 4000 (富士フィルム, Tokyo, Japan) の操作手順に従って測定した。ELISA による血漿中 IL-17 の定量は、採取した血漿を用い、血漿中 IL-17 濃度を Ready-Set-Go! のマニュアルに従って測定した。mRNA の測定は、Mx3000P (Stratagene) を用いて real time RT-PCR を常法に従って行った。

(B-4) アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討

の免疫毒性の検討: ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞は、理研ジーンバンク (Tsukuba, Japan) より購入した。ヒト末梢血単核球 (PBMC)、CTL-Anti AggregateTM および CTL-TestTM medium は CTL (Ohio, USA) より購入した。ヒト非実質細胞入りヘパトサイト (UMIX) は ADMET Technologies (North Carolina, USA) より購入した。細胞培養上清中の IL-8 および CCL2 タンパク質濃度は Human IL-8 ELISA Ready-Set-Go!TM および Human CCL2 ELISA Ready-Set-Go!TM のマニュアルに従って測定した。Total RNA の調製および Real-time RT-PCR による GAPDH、IL-8、IL-6、TNF α 、CD54、MCP-1 および GM-CSF mRNA の定量は、常法に従って行った。

(B-5) NASH および Steatosis モデル

ルマウスに対するタモキシフェンの影響：慢性肝障害モデルマウス作製については、ICR マウス (雌性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) に high fat diet (HFD) を 10 週間与え steatosis モデルマウスを、Methionine and Choline deficient diet (MCDD) を 10 週間与え NASH モデルマウスを作製した。モデルマウスへの TAM 投与については、作製したモデルマウスに TAM を 5 日間連投 (1 mg/kg in saline, *i.p.*) した。最終投与 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。ALT 値および AST 値などの、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。Total RNA の調製および Real-time RT-PCR は常法に従って行った。

(B-6) フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する酵素の検討：マウスへのフェナセチンおよび加水分解酵素阻害剤 TOTP 投与については、6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを 1 週間予備飼育後、250 mg/kg フェナセチン (in 9% solutol) を単回経口投与した。血液中の Met-Hb 濃度および薬物濃度の経時的变化を検討するために、投与 0、0.25、0.5、1、2、3、6 時間後にヘパライズした器具を用いて下行大静脈より採血を行った。以下の式を用いて、総ヘモグロビン中に占める Met-Hb の割合 (Met-Hb 濃度) を算出した。Met-Hb (%) = $(A_1 - A_2) / (A_3 - A_4) \times 100$

C. 研究結果

(C-1) フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症

メカニズムの検討：フルクロキサシリンを 800 および 1,000 mg/kg で投与した群において 6 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。時間依存的変化の検討を行った結果、ALT 値、AST 値および T-Bil はいずれもフルクロキサシリン投与後 1.5 時間後から有意な上昇が認められ、ALT 値はフルクロキサシリン投与後 3 から 6 時間後、AST 値と T-Bil は 3 時間後に最も高値を示した。S100A8 mRNA は投与 3 時間後に、S100A9 mRNA は投与 1.5 時間後および 3 時間後に有意な上昇が認められた。血漿中 HMGB1 は投与 1.5 時間後および 3 時間後に、IL-1 β はフルクロキサシリン投与 3 および 6 時間後に、TNF α はフルクロキサシリン投与 6 時間後に、MCP-1 は投与 3 時間後および 12 時間後に、CXCL1 は 1.5 時間後および 3 時間後に、MIP-2 は投与 1.5 時間後および 3 時間後において対照群と比較して有意な上昇が認められた。GSH/GSSG 比はフルクロキサシリン投与 1.5 時間後および 3 時間後にかけて減少傾向が認められたが有意ではなかった。抗 IL-17 抗体などの投与実験を行った。

(C-2) カルバマゼピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製およびメカニズム解析：10 週齢の雄性 BALB/c マウ

スに CBZ を 4 日間 400 mg/kg を、5 日目に 800 mg/kg を投与した群において血中 ALT と AST 値の有意な上昇が認められ、肝組織染色において、著しいネクロシスが認められた一方で、OXC 投与群では肝障害は惹起されなかった。以降、肝障害の惹起された条件におけるメカニズムの詳細な検討を行った。血中濃度は CBZ、CBZ-10,11-epoxide および

Trans-10,11-diOH CBZ において最終投与 1.5 時間後に最大値を示し、3-OH CBZ は 3 時間後に最大値を示した。Cyp3a 阻害剤を併用投与した際、CBZ 単独投与群と比較して、血中 ALT および AST 値の上昇が認められ、CBZ と 3-OH CBZ の血中濃度が上昇したが、CBZ-10,11-epoxide の血中濃度は減少した。また、肝障害が起きなかった CBZ の単回投与時の血中濃度は、CBZ と CBZ-10,11-epoxide の血中濃度の上昇と 3-OH CBZ の減少が認められた。

3-OH CBZ はさらに代謝を受けると反応性代謝物となることが報告されており、CBZ 誘導性肝障害の発症に 3-OH CBZ が関与する可能性が示された。

炎症を惹起する S100A8、S100A9 およびそれらのレセプターである TLR4 と RAGE の肝臓 mRNA の上昇が認められた。また、CBZ 誘導性肝障害の発症に TLR4 または RAGE の活性化が関与するか検討し、TLR4 アンタゴニストまたは RAGE 抗体により、CBZ 誘導性肝障害が減弱された。TLR4 や RAGE の活性化は、炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されており、CBZ 誘導性肝障害において、それらの関与が示唆された。炎症

性サイトカインやケモカインの mRNA を網羅的に解析したところ、IL-6 や IL-23 の mRNA の上昇が認められた。IL-6 や IL-23 は IL-17 という強力な炎症性サイトカインを誘導することから、血中 IL-17 と IL-23 タンパク質量を測定したところ、CBZ 誘導性肝障害時に上昇が認められた。IL-17 が CBZ 誘導性肝障害の発症に関与するか検討するために、IL-17 抗体を CBZ と併用投与したところ、血中 ALT と AST 値の減少が認められ、肝組織染色では好中球およびマクロファージの浸潤の減少が認められた。

(C-3) α -ナフチルイソチオシアネート (ANIT) 誘導性肝障害モデルマウス

における IL-17 の関与：ANIT 投与により Th 17 cells の分化に関わる主要な転写調節因子である ROR γ t の肝臓中 mRNA 発現上昇および Th 17 細胞から産生される IL-17 の血漿中濃度が上昇した。また、IL-17 により好中球の遊走・活性化を促す CXC ケモカインである MIP-2 の肝臓中 mRNA 発現が ANIT 投与で上昇した。これら一連の動きは、IL-17 抗体投与により肝障害の程度とともに抑制され、recombinant IL-17 (rIL-17) 投与では上昇したことから、IL-17 が MIP-2 を介して好中球の遊走および活性化を促すことで肝障害誘導に寄与していること示された。

(C-4) アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討

：ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞とヒト末梢血単核球

である PBMC を用いて、代謝物による免疫関連因子の活性化を考慮した肝障害発症機構について検討した。ジクロフェナク (DCF) は COX (cyclooxygenase) を阻害することでプロスタグランジンの産生を抑制し、解熱・鎮痛作用を示す NSAID の 1 つである。ヒトにおいて DCF 起因する過敏性刺激が起こることが知られている。PBMC へ 5-OH DCF を処置したところ、IL-8、IL-6、GM-CSF および MCP-1 mRNA 発現量はコントロール処置群と比較して有意に上昇した。DCF 処置群に対しても IL-8、IL-6 および MCP-1 mRNA において有意に上昇した。DCF-AG 処置群は全ての因子、4'-OH DCF 処置群では IL-6 以外の因子において DCF 処置群に対しても有意な上昇を示した。DCF-AG は THP-1 細胞よりも PBMC の方が、5-OH DCF 処置によって免疫活性化が惹起された。一方で THP-1 細胞および PBMC とともに、4'-OH DCF および DCF-AG 処置によって免疫が活性化されたため、これらの免疫活性化機序はどちらの細胞においても同じであると考えられた。

(C-5) NASH および Steatosis モデルマウスに対するタモキシフェンの影響 : Steatosis モデルマウスにおいて、TAM が肝障害の程度を減弱させることを示した。また、その作用の一因として TAM による ERK1/2 活性化が関与することが示唆された。Steatosis に対して TAM を投与して改善を示した報告は本研究が初めてである。Steatosis は肥満により肝臓における中性脂肪の過剰な蓄積が生じ、細胞

が変性することで発症するといわれている。TAM 投与により steatosis モデルマウスの ALT 値および AST 値の低下が認められ、組織染色においては、細胞の肥大化および炎症の減弱が認められた。また遺伝子レベルにおいても炎症性因子の低下が認められた。炎症性因子が直接 steatosis 悪化に関与している報告はない。しかし、TAM により肝障害が改善され、その結果、炎症性因子が低下したことも考えられた。通常マウスへの TAM 投与による脂肪酸の増加が、steatosis の原因の一つと考えられているが、また、モデルマウス間においても TAM による反応性の違いが、MAPK や小胞体ストレスシグナルにおいて認められたことから、各病態によっても TAM の作用が異なることが示唆された。

(C-6) フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する酵素の検討 :

フェナセチンをマウスに単回経口投与したところ、1 時間後に Met-Hb 濃度および加水分解代謝物である *p*-フェネチジンの血中濃度の上昇が認められ、加水分解酵素阻害剤であるトリ-*o*-トリルホスフェート (TOTP) を前投与することで Met-Hb および *p*-フェネチジンの濃度の有意な減少が認められた。*In vitro* における検討で、フェナセチンと種々の加水分解酵素発現系およびヒトシトクロム P450 (CYP) 発現系をマウス赤血球とインキュベートし Met-Hb 濃度を測定したところ、AADAC 発現系と CYP1A2 もしくは CYP2E1 発現系を併用した群において Met-Hb 濃度は

高値を示した。さらに酵素源にヒト肝ミクロソームを用いた際、AADAC に対して強力な阻害作用を有するエセリンを添加することで Met-Hb 濃度は約 75%低下し、AADAC がフェナセチンの毒性発現に関与することを明らかにした。

D. 考察

(D-1) フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症メカニズムの検討: 本検討では初めてフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルを作製し、発症に免疫学的因子が関与していることを示唆した。これまでフルクロキサシリンの毒性を明らかにした例はほとんどなく、動物モデルも存在しなかったため詳細な検討はなされてこなかった。本検討はフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスを用いて、肝障害発症に TLR4 リガンドが関与している可能性があること、IL-17 が増悪因子であることを示唆した初めての報告である。TLR4 は初め細菌感染に対する宿主防衛のためのパターン認識受容体として同定されたが、内因性のリガンドが同定されるにつれて、様々な疾患において関与することが示唆されてきている。TLR4 のリガンドとしては特に S100A8、S100A9 および HMGB1 が知られている。本検討では、フルクロキサシリン誘導性肝障害において、リガンドによる TLR4 活性化によりサイトカインおよびケモカインが産生された可能性が示された。また、免疫細胞の遊走に関与する CXCL1 および MIP-2 の

mRNA が顕著に上昇したことから、肝障害に免疫細胞の浸潤が関与する可能性が示された。さらに、フルクロキサシリン誘導性肝障害において IL-17 は発症への寄与は小さいが、増悪因子としては作用することを示した。

(D-2) カルバマゼピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製およびメカニ

ズム解析: 本研究では初めに、CBZ を 400 mg/kg で 5 日間連投しても肝障害が起きないのに対し、400 mg/kg で 4 日間連投後、5 日目に 800 mg/kg で投与した際に肝障害が惹起されることを初めて見出した。肝障害が惹起される状態での最大血中濃度 ($10.36 \pm 2.18 \mu\text{g/mL}$) はヒトでの CBZ の至適血中濃度 ($4 \sim 12 \mu\text{g/mL}$) の範囲に入っていた。しかし、連投中の血中濃度は測定していないので、連投中も至適血中濃度の範囲内に入っていたかは不明である。CBZ を 800 mg/kg で単回投与した群 ($18.52 \pm 0.78 \mu\text{g/mL}$) と、KTZ または TAO 併用投与群 (19.18 ± 4.39 、 $21.17 \pm 3.28 \mu\text{g/mL}$) における血中濃度は全て中毒濃度 ($> 15 \mu\text{g/mL}$) に達していた。このことから、臨床において CYP3A を阻害する作用がある薬物と CBZ を併用投与するのは危険であると考えられる。添付文書においても CYP3A を阻害する作用を持つイトラコナゾールなどとは併用を注意するように記載されている。CBZ の血中濃度が中毒域に達していたにも関わらず、単回投与時にはいかなる投与量においても肝障害が惹起されなかったことから、連投時の代謝酵素の誘導または自己抗体の

産生などが CBZ 誘導性肝障害の発症において非常に大きな役割を果たしていると考えられる。ヒトにおいて、3-OH CBZ を産生する酵素反応は CYP3A4 と CYP2B6 が担うが、CYP3A4 と CYP2B6 は CBZ の投与により誘導されるため、反復投与下で CBZ の投与量を上げることは 3-OH CBZ の産生を増大させることにつながり、肝障害のリスクを高くすると考えられる。

(D-3) α-ナフチルイソチオシアネート (ANIT) 誘導性肝障害モデルマウスにおける IL-17 の関与: MPO 抗体を用いた免疫組織化学的検査の結果から、ANIT 投与マウスにおいて多くの MPO 陽性細胞が肝臓に浸潤していることが示され、肝臓で好中球の浸潤が誘導されていることが推察された。そこで、肝臓中の Th 細胞の分化に関わる転写調節因子およびサイトカイン遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、Th17 細胞の主要な転写調節因子である ROR γ t および CXC ケモカインの 1 つである MIP-2 遺伝子の mRNA が ANIT 投与群において顕著に上昇した。これらは、Th17 細胞および MIP-2 が ANIT 誘導性肝障害に関与している可能性を示す結果であった。Th17 細胞によって産生されるサイトカイン IL-17 について、肝臓組織中の IL-17 遺伝子の mRNA 発現変動解析を real time PCR 法により試みたが、定量的に検出することが困難であった。好中球は肝障害誘発に関わることで、虚血-再還流障害モデル、アルコール性肝炎モデル、胆管結紮による胆汁うっ滞モデルおよびアセ

トアミノフェン肝障害モデルなどの肝障害モデルにおいて示されている。また、IL-17 が好中球の遊走および活性化のような多くの炎症および免疫反応を誘導していることが示されている。今回の検討では、血漿中 IL-17 濃度の変動と肝障害の軽減および悪化との関係が示されたことから、マウスにおける ANIT 誘導性肝障害に IL-17 が重要な役割を果たしていることが示された。また、血清中の IL-17 が臨床における急性肝障害の程度を推定する有用なバイオマーカーとなりうることが報告されており、今回の検討結果は、肝障害に対する IL-17 の重要性をさらに支持するものであった。

(D-4) アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討: 代謝されることで AG を形成し、肝障害、アナフィラキシーおよびスティーブンスジョンソンシンドローム (SJS) を惹起する報告がある DCF について評価を行った。薬物は methanol に溶解し、methanol の濃度は THP-1 細胞の生存率に影響しない程度 (data not shown) の 1%となるようにした。薬物濃度は通常、*in vitro* の実験における最大濃度として用いられる 100 μ M とした。IL-8、TNF α および MCP-1 mRNA 発現量は全ての AG 処置時、増加傾向が認められた。CD54 mRNA 発現量は PBC-AG 以外の AG 処置時において増加傾向が認められた。MPA-AG 処置群は各因子で高い発現量が認められたが、MPA 処置群においても同程度の発現が認められた。よって、培養中に MPA-AG が加水分解等されて生じた MPA が THP-1 細

胞を活性化した可能性が示唆された。一方、DCF-AG 処置時、各因子の mRNA 発現量は増加傾向にあり、かつ、親薬物である DCF と比較して高い発現量が認められた。この結果から、検討を行った薬物の中で DCF が最も AG によって、THP-1 細胞の活性化を引き起こすことが示唆された。THP-1 細胞は単一の細胞株であり、個体差がないために免疫活性化の評価に用いられる。一方、PBMC は個人差があるが、肝臓中の非実質細胞に近い性質を有している。よりヒト生体内に近い系において検討を進めるために、PBMC においても AG 処置による免疫活性化能を評価した。PBMC へ 5-OH DCF を処置したところ、IL-8、IL-6、GM-CSF および MCP-1 mRNA 発現量は全てコントロール処置群と比較して有意に上昇した。DCF 処置群に対しても IL-8、IL-6 および MCP-1 mRNA において有意に上昇した。DCF-AG および 4'-OH DCF 処置群は 4 つ全ての因子においてコントロール処置群に対して有意な上昇を示し、DCF-AG 処置群は全ての因子、4'-OH DCF 処置群では IL-6 以外の因子において DCF 処置群に対しても有意な上昇を示した。THP-1 細胞および PBMC ともに、4'-OH DCF および DCF-AG 処置によって免疫が活性化されたため、これらの免疫活性化機序はどちらの細胞においても同じであると考えられた。

(D-5) NASH および Steatosis モデルマウスに対するタモキシフェンの影響 : Steatosis モデルマウスにおいて、TAM が肝障害の程度を減弱させることを

示した。また、その作用の一因として TAM による ERK1/2 活性化が関与することが示唆された。Steatosis に対して TAM を投与して改善を示した報告は本研究が初めてである steatosis モデルマウスにおいて GSH 含量に対する TAM 投与の影響は認められなかったことから、GSH 含量は本検討による TAM の肝障害減弱の原因に直接関わる因子ではないものと考えられる。本検討では脂肪酸合成に関与する因子として SREBP-1 および FASN を測定したが、TAM 投与による発現変動が認められなかったことから、脂肪酸合成においては TAM が関与しないことが示唆された。本研究では steatosis モデルマウス同様、NASH モデルマウスに対しても TAM が肝障害の程度を減弱させることを示した。また、その作用の一因として TAM による ERK1/2 活性化の増加による肝再生能の上昇、JNK1/2 活性化の減少による炎症性因子の低下、および小胞体ストレス eIF2 α 活性化の減少によるアポトーシスの抑制が関与することが示唆された。TAM により肝障害の程度が減弱し、またその減弱の一因が NASH 発症および増悪に関与する炎症性因子の低下であることが示唆された。

(D-6) フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する酵素の検討 : 薬物代謝酵素には質的および量的な差異が存在するため、ヒトにおけるフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関与する酵素の同定には *in vitro* におけるヒトに外挿できる検討が必要である。フェナセチン、