

示すことが報告されている (Gardner et al., 2003; Tukov et al., 2007; Shaw et al., 2009b; Zou et al., 2009)。

CD54 は表面抗原分子である MHC class II であり、抗原提示細胞と T 細胞との細胞間相互作用時に働く。別名 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) として知られ、T 細胞に発現している共刺激分子 lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) との結合によって、T 細胞を活性化させる。また、細胞表面受容体としての機能を持つため、細胞内シグナルの伝達の初期段階にも関与する (Lebedeva et al., 2005)。また、THP-1 細胞における CD54 発現量は THP-1 細胞活性化の指標とされている (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2007)。

MCP-1 (CCL2) は単球走化性タンパクであり、炎症性メディエーターの 1 つである。その機能はメモリー T 細胞と似ており、酸化ストレス、サイトカインおよび増殖因子によって誘導されるため、炎症時の指標とすることができる (Carr et al., 1994)。

詳細な実験条件として、Ashikaga ら (2006) の報告を参考にし、THP-1 細胞の前培養時間を 48 時間、細胞処置濃度  $1 \times 10^6$  cells/mL および薬物処置時間は 24 時間とした。

今回の検討において、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 および TOL、アナフィラキシーや SJS を惹起する報告がある NPX および IBP、アナフィラキシーを惹起する報告がある PBC

および、ヒト PBMC への曝露によって IL-6 および TNF $\alpha$  mRNA 発現量の増加が報告されている MPA (RxList The Internet Drug Index; Wieland et al., 2000) について評価を行った。薬物は全て 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  $\mu$ M とした。この検討を行った時点では、当研究室に保管していた NPX および IBP の AG が 50  $\mu$ M 以上にならなかったため、50  $\mu$ M にて検討を行っている。

IL-8、TNF $\alpha$  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 (Figs. 1A, B and D)。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 (Fig. 1C)。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。実験条件は購入時の添付文書および THP-1 細胞における実験条件を参考に、細胞処置濃度を  $3 \times 10^6$  cells/mL とし、薬物処置時間は 24 時間、各 AG およびその親薬物の処置濃度は 100  $\mu$ M とした (NPX および NPX-AG は 50  $\mu$ M)。

IL-6 は多機能な炎症性サイトカインであり、炎症を促進するだけでなく、リンパ球の分化および接着分子の発現を調節し炎症を抑制する方向にも働く。IL-6 をノックアウトしたマウスに LPS を投与したところ、野生型マウスと比較して早い段階においては血清中アルブミン A が減少したという報告があり (Fattor et al., 1994)、急性炎症反応を抑制する作用がある。しかし、IL-6 は急性炎症反応時に発現量が増加することから、炎症反応の評価の指標となる。

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) は造血成長因子として同定された因子だが、リンパ球、単球、内皮細胞、線維芽細胞およびいくつかの悪性細胞を含む多くの細胞種において生成される炎症性サイトカインであり、細胞の分化を促進する (Metcalf et al., 1986; Clark and Kamen, 1987)。

PBMC を用いた検討において、NPX-AG、IBP-AG およびその親薬物処置時の IL-8 mRNA 発現量はコントロールと同レベルであった (Fig. 2A)。これらの薬物は IL-6 および MCP-1 mRNA においても発現上昇が認められなかった (Fig. 2B and D)。DCF-AG および TOL-AG 処置時、4 つの全ての因子において mRNA 発現量は増加し、また、それらの親薬物と比較して高い発現

量を示した (Fig. 2)。今回検討を行った薬物の中で DCF および TOL にのみ副作用として薬物誘導性肝障害の報告がある。

これらの結果から、DCF-AG は THP-1 細胞および PBMC を用いた検討のどちらにおいても免疫を活性化することが示唆された。よって、これからの検討において DCF およびその AG に焦点を絞って行うこととした。

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。NSAID を服用する患者の約 2、3 割が持続的な消化器症状を引き起こし、全患者中の 1 割以上が NSAID による薬物治療を中止することになる (Emery et al., 1999)。このため、最大投与量には個人差があり、薬物治療において、その使用量は制限されている。

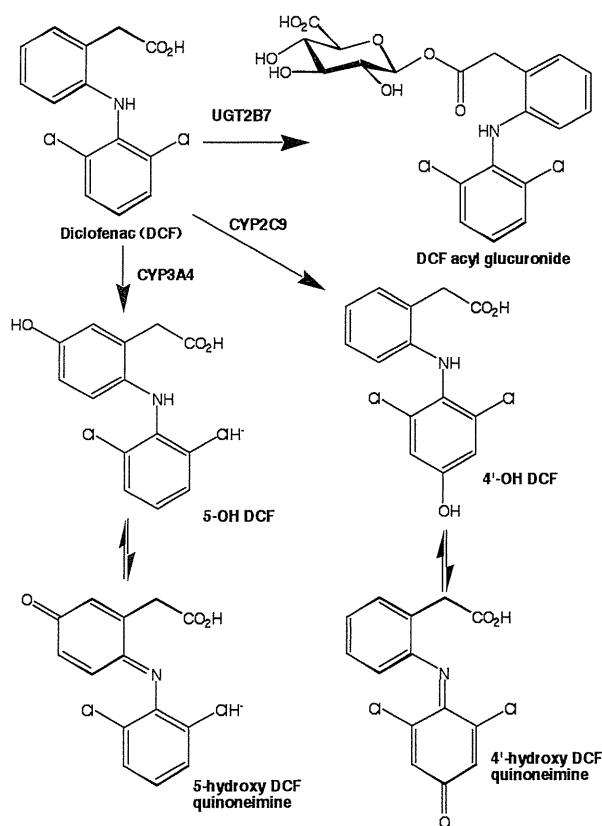
ヒトにおいて DCF 服用時、早いタイプ・遅いタイプの過敏性刺激が起こることが知られている (Naisbitt et al., 2006)。これから解析するにあたって、DCF-AG による免疫活性化が処置時間とともにどのように変化し、どの時間において最も活性化するのかを検討する必要がある。よって、処置時間毎における mRNA 産生量の変化について検討を行った。THP-1 細胞を用いた実験において処置時間を 0、3、6、12 および 24 時間とし、IL-8、TNF $\alpha$  および CD54 の mRNA 発現量を指標として評価した。THP-1 細胞は  $3 \times 10^5$  cells/mL にて播種後の継代時には doubling time が 24-48 時間であるため、24 時間以上処置した場合、処置後に増殖分裂したために薬物の影響を受

けていない細胞が増加する可能性が考えられた。このため、処置時間の最大は24時間とした。

指標とした3つの因子全てにおいて、処置時間が0-6時間まではmRNA発現量の有意な上昇は認められなかったが、mRNA発現量は処置後24時間まで時間依存的な上昇を示した。12時間以降、DCF-AG処置群において0時間処置に対して有意な上昇が認められた (Fig. 3)。また、IL-8およびTNF $\alpha$ においては12時間処置時、DCF-AG処置群はDCF処置群と比較して有意な上

昇が認められた。CD54においては24時間処置のみ有意な上昇が認められた。

Terbinafine および Mebendazole を THP-1 細胞に処置したとき、IL-8 および TNF $\alpha$  mRNA 発現量はそれぞれ3時間および5-6時間後において最も高く、それ以降は減少する (Mizuno et al., 2010; Mizuno et al., 2011)。これらの薬物と比較して DCF-AG の免疫関連因子の活性化は反応までに時間のかかる機序であると考えられる。



**Fig. 8. Metabolic pathways of N-Diclofenac.**

Major metabolite is 4'-OH DCF.

PBMCにおけるDCF-AG処置後の経時的変化の検討として、ELISAを用いて培養後の上清中に存在するIL-8およびMCP-1タンパク質を定量した。IL-8およびMCP-1はAGをPBMCに24時間処置した際、DCF-AG処置によりmRNA発現量の顕著な増加が認められたため指標として用いた。PBMCは癌細胞由来であるTHP-1細胞とは異なり、基本的に培養時に細胞が増殖して増えることはない。薬物処置の影響を受けていない細胞と入れ替わることがないため、処置時間は0、3、6、12、24、36および48時間とした。

DCF-AG処置によってIL-8タンパク質は時間依存的な上昇を示し、24時間以降はプラトーへと近づいた (Fig. 4A)。タンパク質は安定であるため、上清中にタンパク質が蓄積されてゆくと考えられる。よって、上昇幅の最も大きな時間において最も多くタンパク質が産生されていることとなる。MCP-1タンパク質はDCF-AG処置後24時間までは時間依存的な上昇を示した (Fig. 4B)。これらの結果から、DCF-AG処

置後のタンパク質産生量は 24 時間付近にピークがあることが示唆された。

DCF には AG 以外に CYP による代謝物として、主に CYP2C9 によって代謝されて生成される 4'-OH DCF および CYP3A4 によって生成される 5-OH DCF がある (Fig.8)。BALB/C 株マウスにこれらの代謝物を 5 日間皮下注射で連投し、その耳介リンパ節細胞を [<sup>3</sup>H]チミジン存在下で 24 時間培養したところ、チミジンの取り込みは DCF-AG および 4'-OH DCF 処置群においてはコントロールと同程度であったが、5-OH DCF 処置群においては有意に増加したという報告がある (Naisbitt et al., 2006)。また、4'-OH DCF も、ベンゾキノン体にて処置した場合はチミジンの取り込みが有意に増加するとも報告している。このことから、これらの水酸化体はキノン体を形成することで毒性を持つ可能性が示唆されている。

今回の検討において THP-1 細胞へ DCF およびその代謝物を処置したところ、5-OH DCF 処置群においてコントロール処置群に対して有意に mRNA が増加したのは MCP-1 のみであった (Fig. 6)。一方で DCF-AG 処置群は 4 つ全ての因子の mRNA においてコントロールおよび DCF 処置群に対して有意な増加を示し、4'-OH DCF 処置群においてもコントロールおよび DCF 処置群に対して IL-8、CD54 および MCP-1 mRNA 発現量の有意な増加が認められた。また、4'-OH DCF 処置群における mRNA 発現量は DCF-AG 処置群と同程度、もしくはそれ以上であった。これらの結果は Naisbitt ら (2006) のマウスを用いた検討

とは異なるものとなった。5-OH DCF 処置時、THP-1 細胞が活性化されていないことから、マウスの耳介リンパ節細胞を用いた検討とは活性化の機序が異なる可能性が考えられた。また、ベンゾキノン体を形成しやすい環境であるかどうかも 5-OH DCF による免疫活性化に関係していると思われる。

マウスの耳介リンパ節には単球が多く含まれる。そのため、単球やリンパ球から構成される PBMC における検討ではより近い条件であると言える。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 発現量は全てコントロール処置群と比較して有意に上昇した (Fig.7)。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。DCF-AG は THP-1 細胞よりも PBMC の方がマウスの耳介リンパ節細胞に近い場合か、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。

以上の結果より、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

が示唆された。

今回の検討では、いくつかの免疫関連因子の活性化は認められたが、その活性化機序については明らかにすることができていない。薬物の免疫学的活性化の機序として、ハプテン化や p-i 仮説 (pharmacological interaction concept) が考えられる。単体では抗原性を示さない小分子薬物が、高分子の物質と結合することで抗原性を示すようになるというのが薬物のハプテン化である (Stockl et al., 2001)。しかし、臨床におけるデータにおいては、T 細胞を介した遅延型過敏反応を発症した患者の 1~2% において薬物とタンパクとの結合が検出されていない (Kanny et al., 2005)。こういった薬物の免疫学的な副作用を説明できるのが p-i 仮説である。その機序は小分子薬物がタンパクとの結合を介することなく、免疫受容体である MHC および TCR (major histocompatibility complex, T cell receptor) に作用して特異的に T 細胞を活性化するとされている (Pichler et al., 2006)。今回の検討において THP-1 細胞や PBMC を用いた試験系では、このような活性化機序が明確でなくとも、薬物の免疫毒性を予測することができるため、有用であると考えられる。

現在、医薬品開発の初期においてカルボニル基を持つ薬物は、体内で代謝されることで AG を形成する可能性を孕んでいるために忌避されることがある。AG の毒性を高感度で定量的に予測・評価する試験系の構築により、医薬品開発の確立が向上することが期待される。

#### <参考文献>

- Adams DH, Ju C, Ramaiah SK, Uetrecht J, and Jaeschke H (2010) Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicol. Sci.* **115**: 307-321.
- Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3031-3038.
- Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, and Aiba S (2002) Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol. In Vitro* **16**: 711-716.
- Baggiolini M, Dewald B, and Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**: 97-179.
- Boelsterli UA, Zimmerman HJ, and Kretz-Rommel A (1995) Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology. *Crit. Rev. Toxicol.* **25**: 207-235.
- Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermüller S, Tiegs G, and Wendel A (1996) DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am. J. Pathol.* **149**: 1381-1393.
- Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, and Trautwein C (1998) Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* **275**: G387-392.
- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, and Springer TA (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3652-3656.
- Clark SC and Kamen R (1987) The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* **236**: 1229-1237.
- Deng X, Stachlewitz RF, Liguori MJ, Blomme EA, Waring JF, Luyendyk JP, Maddox JF, Ganey PE, and Roth RA (2006) Modest inflammation enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: role of neutrophils and bacterial translocation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**: 1191-1199.
- Edling Y, Sivertsson L, Andersson TB, Porsmyr-Palmertz M, and Ingelman-Sundberg M (2008) Pro-inflammatory response and adverse drug reactions: mechanisms of action of ximelagatran on chemokine and cytokine activation in a monocyte in vitro model. *Toxicol. In Vitro* **22**: 1588-1594.
- Edling Y, Sivertsson LK, Butura A, Ingelman-Sundberg M, and Ek M (2009) Increased sensitivity for troglitazone-induced

- cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. *Toxicol. In Vitro* **23**: 1387-1395.
- Emery P, Zeidler H, Kvien TK, Guslandi M, Naudin R, Stead H, Verburg KM, Isakson PC, Hubbard RC, and Geis GS (1999) Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomised double-blind comparison. *Lancet* **354**: 2106-11.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, and Katz SI (1993) An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 $\beta$  in the initiation of primary immune responses in skin. *J. Immunol.* **150**: 3698-3704.
- Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, and Poli V (1994) Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**: 1243-1250.
- Ganey PE, Luyendyk JP, Maddox JF, and Roth RA (2004) Adverse hepatic drug reactions: inflammatory episodes as consequence and contributor. *Chem. Biol. Interact.* **150**: 35-51.
- Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Chiu H, Durham SK, Zhou P, Bruno M, Gerecke DR, Gordon MK, and Laskin DL (2003) Exaggerated hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking tumor necrosis factor receptor-1. Potential role of inflammatory mediators. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**: 119-130.
- Guengerich FP and McDonald JS (2007) Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem. Res. Toxicol.* **20**: 344-369.
- Holt MP and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* **8**: E48-54
- Kanny G, Pichler W, Morisset M, Franck P, Marie B, Kohler C, Renaudin JM, Beaudouin E, Laudy JS, and Moneret-Vautrin DA (2005) T cell-mediated reactions to iodinated contrast media: evaluation by skin and lymphocyte activation tests. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**: 179-185.
- Knowles SR, Uetrecht J, and Shear NH (2000) Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* **356**: 1587-1591.
- Koga T, Fujiwara R, Nakajima M, and Yokoi T (2011) Toxicological evaluation of acyl glucuronides of nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human embryonic kidney 293 cells stably expressing human UDP-glucuronosyltransferase and human hepatocytes. *Drug. Metab. Dispos.* **39**: 54-60.
- Levedeva T, Dustin ML, and Sykulev Y (2005) ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 251-258.
- Lee WM (2003) Acute liver failure in the United States. *Semin. Liver Dis.* **23**: 217-226.
- Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, and Raffeld M (1991) Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J. Invest. Dermatol.* **96**: 690-694.
- Liu ZX, Han D, Gunawan B, and Kaplowitz N (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* **43**: 1220-1230.
- Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Brucoleri A, Blazka ME, and Yucesoy B (2001) Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* **120**: 317-321.
- Luyendyk JP, Shaw PJ, Green CD, Maddox JF, Ganey PE, and Roth RA (2005) Coagulation-mediated hypoxia and neutrophil-dependent hepatic injury in rats given lipopolysaccharide and ranitidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**: 1023-1031.
- Lohse AW, Weiler-Normann C, and Tiegs G (2009) Immune-mediated liver injury. *J. Hepatol.* **52**: 136-144.
- Metcalf D, Begley CG, Johnson GR, Nicola NA, Vadas MA, Lopez AF, Williamson DJ, Wong GG, Clark SC and Wang EA (1986) Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **67**: 37-45.
- Mizuno K, Toyoda Y, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2011) Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.* **85**: 199-207.
- 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.
- Naisbitt DJ, Sanderson LS, Meng X, Stachulski AV, Clarke SE, and Park BK (2006) Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenac metabolites. *Toxicol. Lett.* **168**: 45-50.
- Park BK, Kitteringham NR, Powell H, and Pirmohamed M (2000) Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**: 39-60.
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 177-202.
- Pichler WJ, Beeler A, Keller M, Lerch M, Posadas S, Schmid D, Spanou Z, Zawodniak A, and Gerber B (2006) Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept. *Allergol. Int.* **55**: 17-25.
- Ritter JK (2000) Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic

- bioactivation reactions. *Chem. Biol. Interact.* **129**: 171-193.
- Roth RA, Luyendyk JP, Maddox JF, and Ganey PE (2003) Inflammation and drug idiosyncrasy--is there a connection? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**: 1-8.
- Rougier N, Redziniak G., Schmitt D, and Vincent C (1998) Evaluation of the capacity of dendritic cells derived from cord blood CD34+ precursors to present haptens to unsensitized autologous T cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **110**: 348-352.
- RxList The Internet Drug Index;  
http://www.rxlist.com/script/main/hp.asp
- Sakaguchi H, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, and Suzuki H (2007) Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1. *Arch. Dermatol. Res.* **298**: 427-437.
- Sawamura R, Okudaira N, Watanabe K, Murai T, Kobayashi Y, Tachibana M, Ohnuki T, Masuda K, Honma H, Kurihara A, and Okazaki O (2010) Predictability of idiosyncratic drug toxicity risk for carboxylic acid-containing drugs based on the chemical stability of acyl glucuronide. *Drug. Metab. Dispos.* **38**: 1857-1864
- Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, and Amigorena S (2008) Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* **28**: 258-270.
- Shaw PJ, Hopfensperger MJ, Ganey PE, and Roth RA (2007) Lipopolysaccharide and trovafloxacin coexposure in mice causes idiosyncrasy-like liver injury dependent on tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Toxicol. Sci.* **100**: 259-266.
- Shaw PJ, Fullerton AM, Scott MA, Ganey PE, and Roth RA (2009a) The role of the hemostatic system in murine liver injury induced by coexposure to lipopolysaccharide and trovafloxacin, a drug with idiosyncratic liability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**: 293-300.
- Shaw PJ, Beggs KM, Sparkenbaugh EM, Dugan CM, Ganey PE, and Roth RA (2009b) Trovafloxacin enhances TNF-induced inflammatory stress and cell death signaling and reduces TNF clearance in a murine model of idiosyncratic hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **111**: 288-301.
- Stockl J, Majdic O, Fischer G, Maurer D, and Knapp W (2001) Monomorphic molecules function as additional recognition structures on haptenated target cells for HLA-A 1-restricted, hapten-specific CTL. *J. Immunol.* **167**: 2724-2733.
- Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, and Marks RM (1989) Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- $\alpha$ , LPS, and IL-1 $\beta$ . *Science* **243**: 1467-1469.
- Tafazoli S, Spehar DD, and O'Brien PJ (2005) Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab. Rev.* **37**: 311-325.
- Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, and Roth RA (2007) The role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury. *Toxicol. Sci.* **100**: 267-280.
- Utrecht JP (1999) New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 387-395.
- Wang JH, Redmond HP, Watson RW, and Bouchier-Hayes D (1995) Role of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induction of hepatocyte necrosis. *Am. J. Physiol.* **269**: G297-304.
- Wieland E, Shipkova M, Schellhaas U, Schütz E, Niedmann PD, Armstrong VW, and Oellerich M (2000) Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? *Clin. Biochem.* **33**: 107-113.
- Williams AM, Worrall S, de Jersey J, and Dickinson RG (1992) Studies on the reactivity of acyl glucuronides--III. Glucuronide-derived adducts of valproic acid and plasma protein and anti-adduct antibodies in humans. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 745-755.
- You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, and Ju C (2006) Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology* **44**: 1421-1431.
- Zia-Amirhosseini P, Ding A, Burlingame AL, McDonagh AF, and Benet LZ (1995) Synthesis and mass-spectrometric characterization of human serum albumins modified by covalent binding of two non-steroidal anti-inflammatory drugs: tolmetin and zomepirac. *Biochem. J.* **311**: 431-435.
- Zou W, Beggs KM, Sparkenbaugh EM, Jones AD, Younis HS, Roth RA, and Ganey PE (2009) Sulindac metabolism and synergy with tumor necrosis factor- $\alpha$  in a drug-inflammation interaction model of idiosyncratic liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**: 114-121.

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

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).

Azusa Yano, Satonori Higuchi, Koichi  
Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima,  
and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of  
immune-related factors in diclofenac-induced  
acute liver injury in mice. Toxicology, 293:

107-114 (2012).

## 2.学会発表

古賀利久、藤原亮一、深見達基、中島美  
紀、樫山英二、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18回HAB研究機構学術年会  
2011.5.21-22 ポスター 東京

H. 知的財産権の出願・登録  
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）  
分担研究報告書

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

分担研究者 中島 美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授

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 飲酒暦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。Steatosis および NASH は近年、肥満人口の増加とともに発症率の増加している慢性肝障害であるが、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。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。しかしながら、E2 が HFD 誘導性の steatosis に対して保護的に作用するという報告からも、マウスにおいて E2 が肝障害に対する防御因子であることが示唆されているため、本検討における steatosis および NASH モデルマウスに対しても TAM による E2 作用により肝障害が減弱したと

考えられる。また、TAMはSERMであるため、今後マウスを用いて検討するうえで肝臓以外の組織、特に steatosis および NASH 発症に関与する脂肪組織における TAM の作用、また E2 作用との比較も必要と思われる。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。

#### A. 研究目的

肝臓は糖新生、胆汁の合成および分泌や異物代謝などの様々な働きを持ち、生体にとって最も重要な臓器の一つである。肝臓は、門脈より消化管からの血液が流入し、心臓からの血液が肝動脈から流入するため、肝臓は流入する血液量が多く、高濃度に異物に曝される臓器の一つである (Park et al., 2005)。また、肝臓は薬物や抗原に対する感受性が高いことが知られ、障害を受けやすい臓器の一つである。一般に肝障害は急性型と慢性型に分類され、さらに急性型は肝細胞障害型 (hepatocellular injury type)、胆汁うっ滞型 (cholestasis type) および混合型 (mixed type)、慢性型は、脂肪肝 (steatosis)、脂肪性肝炎 (steatohepatitis)、肝線維症 (fibrosis)、肝硬変 (cirrhosis) および肝癌 (hepatoma) に分類される。

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 (Browning et al.,

2004)。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 (Ono and Saibara, 2006)。

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 (Brunt, 2010)。また Ludwig ら (1980) は、飲酒歴、薬剤服用歴、小腸バイパス手術歴の無い様々な患者で、アルコール性肝障害に類似した肝生検所見を呈する 20 例を報告した。これら患者における肝組織では中心静脈周囲の大滴性脂肪沈着、肝小葉内の炎症細胞浸潤、肝細胞の風船状変性、マロリー小体、中心静脈周囲および肝細胞線維化といった、一般にアルコール性肝障害において認められる病態を示し、このようなアルコール性肝障害類似の病理象を呈する症例を非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) と称した (Ludwig et al., 1980)。

Steatosis の発症メカニズムには肝臓を中心とした脂肪酸代謝が関与しており、肝臓における脂肪酸代謝は肝臓の機能や生存にとって必要であるばかりでなく、

全身のエネルギーバランスを保つ上で重要とされる。また、エネルギー基質の需要と供給の変化に対応するために肝臓は他の組織とも協調しているが、特に脂肪組織との協調が重要である (Donnelly et al., 2005)。飢餓状態においては血中インスリン値が低下し脂肪組織における中性脂肪の加水分解が生じ、脂肪酸の産生と血中への分泌が亢進し、血中遊離脂肪酸が増加し肝臓に取り込まれる。取り込まれた脂肪酸はミトコンドリアやペルオキシソームで酸化されケトン体となりエネルギー源として貯蔵される。肝臓における脂肪酸の取り込みと合成が脂肪酸の酸化と排泄を上回ったときに、肝臓における脂肪酸が増加し、主に中性脂肪として肝細胞に蓄積されることが steatosis 発症メカニズムの一つと考えられている (Michel et al., 2010; Seong et al., 2009)。

NASH は遺伝的素因を背景に steatosis とインスリン抵抗性を基礎に発症すると考えられており、その発症機序として “two hit theory” が提唱されている。first hit は、肥満、糖尿病などのメタボリックシンドロームを基盤に生じる steatosis である。second hit として酸化ストレスによる脂質過酸化、エンドトキシンおよび TNF- $\alpha$  をはじめとする炎症性サイトカインなどの関与が重視されている (Day and James, 1998)。Steatosis の全てが脂肪肝炎へ進行するわけではないため、second hit の程度や遺伝的素因などが NASH の発症に関与する可能性が示唆されている。しかし、これらの steatosis および NASH の治療に対して一般に運動食事療法が挙げ

られるが、適切な薬物療法は確立されていない。

Estrogen は Estrogen receptor (ER) に結合し、様々な生態反応に関与していることが知られており、ER には ER $\alpha$  と ER $\beta$  の 2 つの subtype が存在する。肝臓において、ER $\alpha$  は高く発現しているが、ER $\beta$  はほとんど発現が認められないことが知られている (Kuiper et al., 1997)。ER $\alpha$  agonist である Ethinylestradiol (EE2) の過剰投与により、肝胆汁うっ滞が惹起されることが知られており、ER $\alpha$  は肝障害発症に関与することが示唆されている (Yamamoto et al., 2006)。一方で、マウスにおいて薬理当量の E2 投与は様々な肝障害を抑制することも報告されており、肝虚血再灌流モデルを用いた検討や肝障害性化合物である diethylnitrosoamine を投与したマウスを用いた検討で、雄性マウスに比べ雌性マウスにおいて肝障害性の程度が低いこと、また雄性マウスへの E2 への投与により肝障害性が減弱することが報告されている (Harada et al., 2004; Naugler et al., 2007)。これらのことから肝障害発症に対して E2 が保護的に作用することが示唆されているが、肝障害発症後における E2 との関連を示した報告はない。

Tamoxifen (TAM) は selective estrogen receptor modulator (SERM) の一種であり、今日、aromatase 阻害薬に代わり乳癌の治療薬として頻用されている (Howell et al., 2005)。SERM は ER に対して agonist 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 (Behjati and Frank, 2009)。TAM は乳腺では ER に対する

antagonist として作用するが、子宮および骨組織では agonist として作用する (Osborne and Fuqua, 1994)。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 (Mitlak and Cohen, 1997; Cosman and Lindsay, 1999)。

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。

## B. 研究方法

ウサギ抗ヒト ERK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト Thr202/Thr204 リン酸化 ERK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト p38 抗体、ウサギ抗ヒト Thr180/Thr182 リン酸化 p38 抗体、ウサギ抗ヒト JNK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト Thr183/Thr185 リン酸化 JNK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト eIF2 $\alpha$  抗体およびウサギ抗ヒト Ser51 リン酸化 eIF2 $\alpha$  抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) より購入した。マウス抗 KDEL モノクローナル抗体およびウサギ抗ヒト GAPDH 抗体は Imgenex (San Diego, CA) より購入した。IRDye680 ヤギ抗マウス IgG 抗体、

IRDye680 ヤギ抗ウサギ IgG および Blocking Buffer は Li-COR Biosciences (Lincoln, NE) より購入した。

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  $\mu$ 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。肝ホモジネートの調整およびタンパク質定量、SDS-PAGE および Western blot 解析についても、常法に従って行った。統計解析は、各群における統計学的評価は Student's *t*-test または Dunnett's post hoc test により解析し、 $P < 0.05$  の時、統計学的に有意と判断した。

本検討における動物実験については、全て金沢大学動物実験指針に従って行った。

## C. 研究結果

C-1 Steatosis モデルマウスに対する TAM 投与の影響

Steatosis モデルマウスに対する TAM 投与の影響について検討した。TAM 未投与群と比べて、TAM 投与群において血漿 ALT 値および AST 値の有意な減少が認められた (Fig. 1)。肝組織染色の結果から、TAM 未投与群において肝細胞の肥大化、炎症および脂肪滴が認められたのに対し、

TAM 投与群では TAM 未投与群と比べて、細胞の肥大化および炎症の軽減が認められた。また、脂肪滴は認められなかった (Fig. 2)。以上より、TAM が steatosis モデルマウスに対して肝障害減弱に作用することが示唆された。

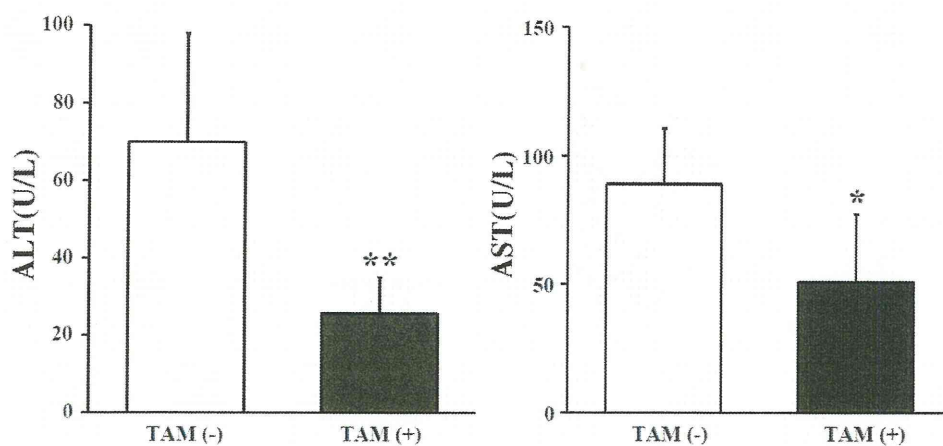


Fig. 1. Effects of TAM on ALT and AST in steatosis in model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Plasma ALT and AST were measured 12 hr after the last administration of TAM. The data are mean  $\pm$  SD of 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with TAM-unadministered mice.

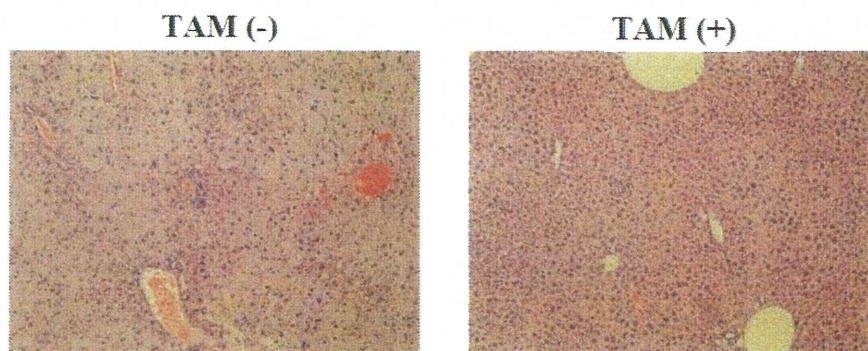


Fig. 2. Histopathological examination of mouse liver 12 hr after the last administration of TAM (1 mg/kg, *i.p.*). Hematoxylin-eosin staining was performed in section of NASH model mice liver.

### C-2 TAM 投与による GSH 含量の変動

TAM 投与による肝障害減弱作用に、酸化ストレス作用を有する GSH が関与するか検討するため、TAM 投与による GSH

含量の変動を測定した。GSH 含量はいずれの群においても変動は認められなかった (Fig. 3)。この結果より、TAM による肝障害減弱に GSH 含量は関与していないことが示唆された。

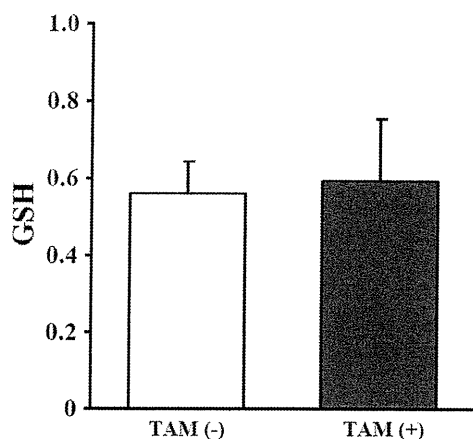


Fig. 3 Effects of TAM on hepatic total GSH content in steatosis model mice. Hepatic total GSH content is measured 12 hr after the last administration of TAM. GSH content of TAM (-) and TAM (+)-steatosis model mice is normalized with that of normal mice ( $11.66 \pm 1.35 \mu\text{mol/g liver}$ ). The data mean  $\pm$  SD of 5 mice.

### C-3 TAM 投与による酸化ストレスの影響

TAM による肝障害減弱作用が酸化ストレスの減弱作用によるものか検討した。

TAM 投与群において MDA 含量の減少傾向が認められたが、有意ではなかった (Fig. 4)。この結果より TAM は酸化ストレスに影響を与えないことが示唆された。

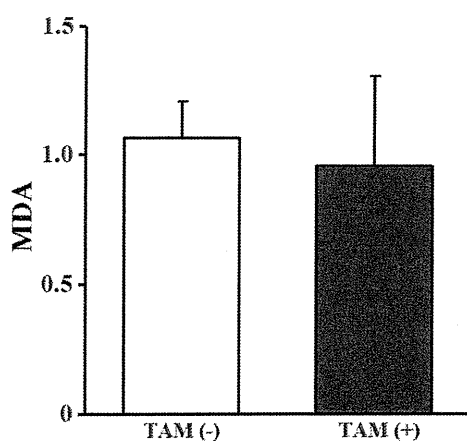


Fig. 4. Change of lipid peroxidation. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). MDA content of TAM (-) and TAM (+)-steatosis model mice is normalized with that of normal mice ( $0.79 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ). The data mean  $\pm$  SD of 5 mice.

### C-4 TAM 投与による炎症関連遺伝子の mRNA の発現変動

TAM 投与により炎症細胞浸潤の減少が

認められたことから、TAM により炎症性因子である TNF- $\alpha$  および MCP-1 mRNA の発現変動に影響が認められるか、検討

した。TAM 未投与群と比べて、TAM 投与群では、TNF- $\alpha$  および MCP-1 mRNA 発現量の有意な減少が認められた (Fig. 5)。

TAM による肝障害減弱作用の直接的な原因であるかは不明であるが、組織評価との相関が得られた。

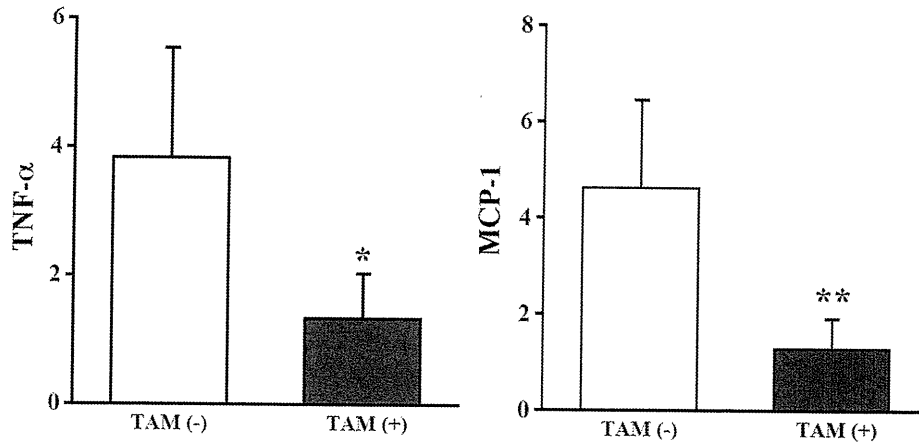


Fig. 5. Effects of TAM on hepatic mRNA of TNF- $\alpha$  and MCP-1 in steatosis model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh. Hepatic mRNA of TAM (-) and TAM (+)-steatosis model mice is normalized with that of normal mice. The data mean  $\pm$  SD of 5 mice. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01, compared with TAM-unadministered mice.

#### C-5 TAM 投与による脂肪酸合成および分解因子に対する影響

細胞の肥大化の軽減が認められたことから中性脂肪の減少および脂肪酸の減少が示唆されたため、steatosis 発症に主要な脂肪酸に関与する遺伝子の mRNA の発現変動について検討した。TAM 未投与群と比べて、TAM 投与群における FASN および SREBP-1 mRNA は発現の変動は認められなかった。TAM 投与群における CPT-1 mRNA は TAM 未投与群と比べて発現の有意な減少が認められた (Fig. 6)。これらの結果より、TAM による肝障害減弱作用において脂肪酸合成および分解は関与していないことが示唆された。

#### C-6 TAM 投与による MAPK 経路に対する影響

TAM による肝障害減弱作用が肝再生および炎症反応のシグナル伝達に影響するか検討するために、細胞増殖、分化および炎症反応の調節に関与することが知られている MAPK 経路への影響について検討した。TAM 投与群では、TAM 未投与群と比べて ERK1/2MAPK リン酸化の有意な増加が認められた。また、JNK1/2 および p38 のリン酸化に TAM 投与による変動は認められなかった (Fig. 7)。これらの結果より、TAM による ERK 活性化の増強が肝障害減弱の一因であることが示唆された。

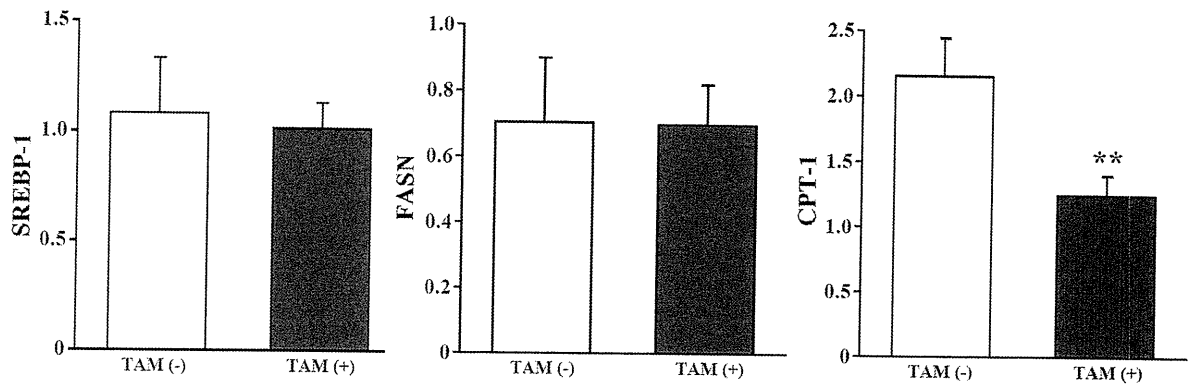


Fig. 6. Effects of TAM on hepatic mRNA of SREBP-1, FASN, and CPT-1 in steatosis model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh. Hepatic mRNA of TAM (-) and TAM (+)-steatosis model mice is normalized with that of normal mice. The data mean  $\pm$  SD of 5 mice. \*\* $p < 0.01$ , compared with TAM-unadministered mice.

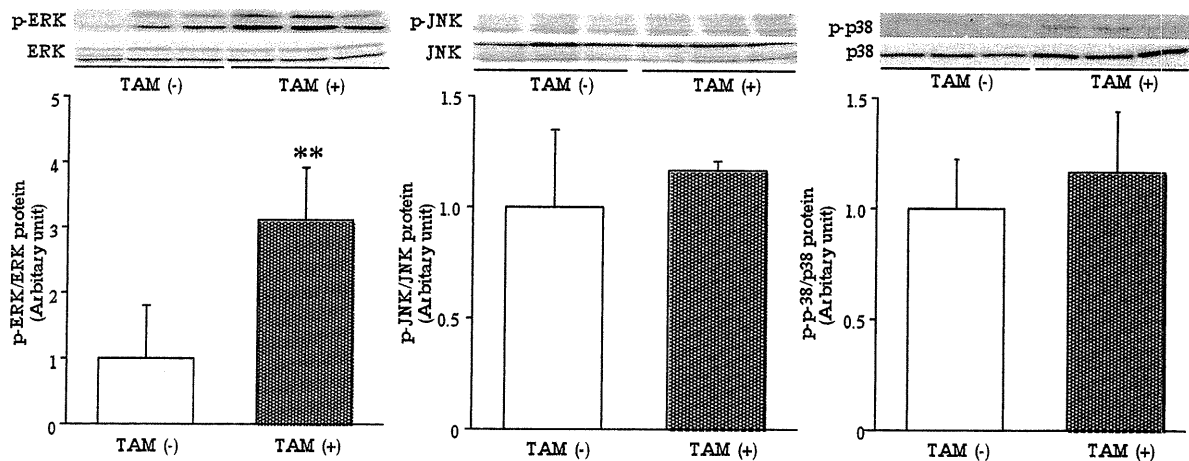


Fig. 7. Effects of TAM on MAPK signaling pathways in steatosis model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Equal protein sample (50  $\mu$ g) were subjected to immunoblot analyses using antibodies of anti-Thr202/Thr204 phosphorylated ERK1/2, anti-Thr183/Thr185 phosphorylated JNK1/2 and anti-Thr180/Thr182 phosphorylated p38 MAPK. The data mean  $\pm$  SD of 3 mice. \*\* $p < 0.01$ , compared with TAM-unadministered mice.

### C-7 TAM 投与による小胞体ストレスシグナルに対する影響

Steatosis 発症には小胞体ストレスの関与することが報告されている (Ozcan et al., 2004)。したがって、TAM 投与による

小胞体ストレスへの影響を検討した。いずれの群においても TAM 投与による小胞体ストレスおよびストレスシグナルの変動は認められなかった (Fig. 8)。この結果より steatosis モデルマウスに対する TAM の肝障害減弱作用に小胞体スト



レスは関与しないことが示唆された。

### C-8 NASH モデルマウスに対する TAM 投与の影響

作製した NASH モデルマウスに対する TAM の影響を検討した。TAM 未投与群と比べて、TAM 投与群において血漿 ALT 値の有意な低下および AST 値の減少傾向が

認められた(Fig. 9)。肝組織染色の結果より、TAM 未投与群において脂肪滴、炎症および軽度の線維化が認められた。一方、TAM 投与群において脂肪滴および炎症の減少が認められた。また、TAM 投与により線維化は認められなくなった (Fig. 10)。以上より TAM が肝障害減弱に作用することが示唆された。

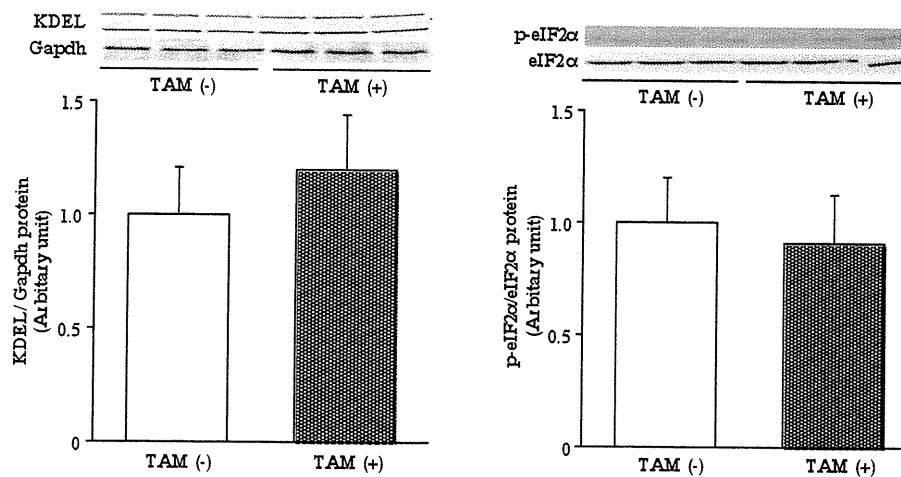


Fig. 8. Effects of TAM on ER stress and signaling pathways in steatosis model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Equal protein sample (50  $\mu$ g) were subjected to immunoblot analyses using antibodies of anti-KDEL and anti-Ser51 phosphorylated eIF2 $\alpha$ . The data mean  $\pm$  SD of 3 mice.

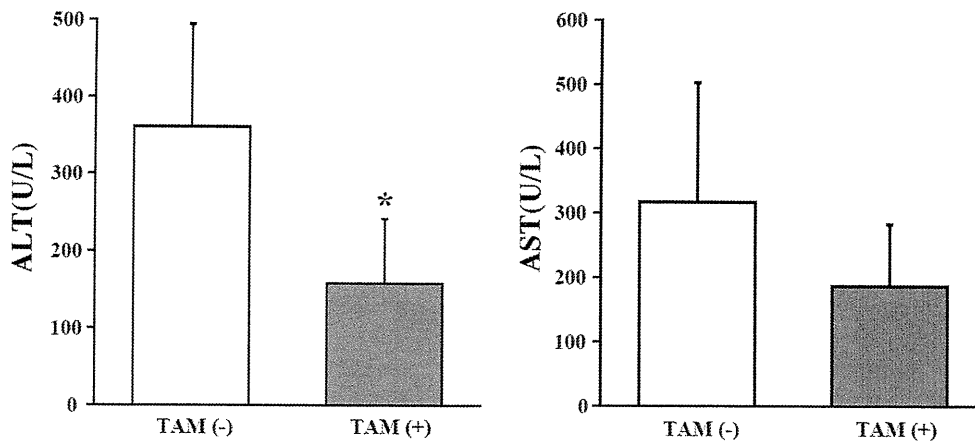


Fig. 9. Effects of TAM on NASH model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Plasma ALT and AST were measured 12 hr after the last administration of TAM. The data are mean  $\pm$  SD of 5 mice. \* $p$  < 0.05, compared with TAM-unadministered mice.

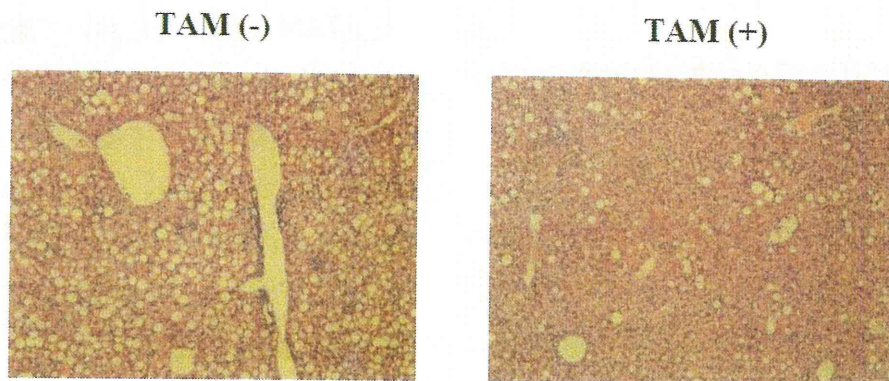


Fig. 10. Histopathological examination of liver 12 hr after the last administration of TAM (1 mg/kg, *i.p.*). Hematoxylin-eosin staining was performed in section of NASH model mice liver.

#### C-9 TAM 投与による GSH 含量の変動

NASH 発症に関与する因子である酸化ストレスが、TAM 投与による肝障害減弱に関与するかを検討した。GSH 含量はいずれの群においても変動は認められなかった (Fig. 11)。この結果より、抗酸化ストレス作用を有する GSH は TAM による肝障害減弱に関与しないことが示唆された。

#### C-10 TAM 投与による酸化ストレスの影響

TAM による肝障害減弱作用が酸化ストレスの減弱によるものかを検討した。MDA 含量はいずれの群においても変動は認められなかった (Fig. 12)。この結果より、TAM による肝障害減弱作用に酸化ストレスは関与しないことが示唆された。

#### C-11 TAM 投与による炎症関連遺伝子の mRNA の発現変動

NASH 発症には炎症性因子が関与することが知られているため、TAM による肝障害減弱における炎症性因子の影響を 2-7 の方法に従い検討した。TAM 投与群では、TAM 未投与群と比べて TNF- $\alpha$  および MCP-1 mRNA の有意な減少が認められた (Fig. 13)。この結果より、TAM 投与による肝障害減弱に炎症性因子が関与することが示唆された。

#### C-12 TAM 投与による MAPK 経路に対する影響

これまでの結果より、TAM 投与により肝障害の程度の減弱が認められたこと、また炎症性因子の低下が認められたことから、TAM が肝再生および炎症反応のシグナル伝達に影響する可能性が考えられる。したがって肝再生および炎症反応の調節に関与することが知られている MAPK 経路に対する影響を検討した。

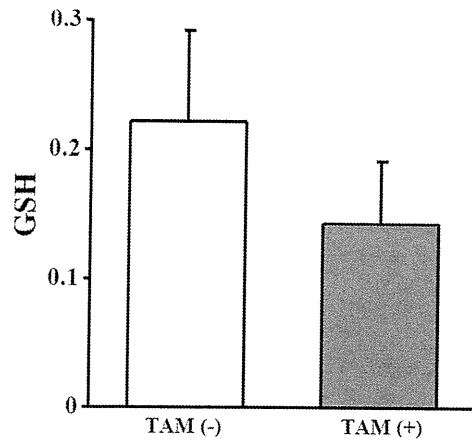


Fig. 11. Effects of TAM on hepatic total GSH content in NASH model mice. Hepatic total GSH content is measured 12 hr after the last administration of TAM. GSH content of TAM (-) and TAM (+)-NASH model mice is normalized with that of normal mice ( $11.66 \pm 1.35 \mu\text{mol/g liver}$ ). The data mean  $\pm$  SD of 5 mice.

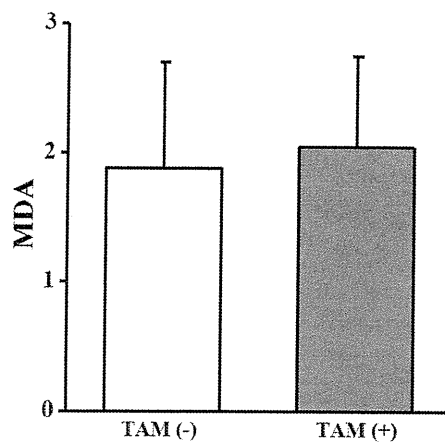


Fig. 12. Change of lipid peroxidation. Mice were administered TAM for 5 days ( $1 \text{ mg/kg, i.p.}$ ). MDA content of TAM (-) and TAM (+)-NASH model mice is normalized with that of normal mice ( $0.79 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ). The data mean  $\pm$  SD of 5 mice.

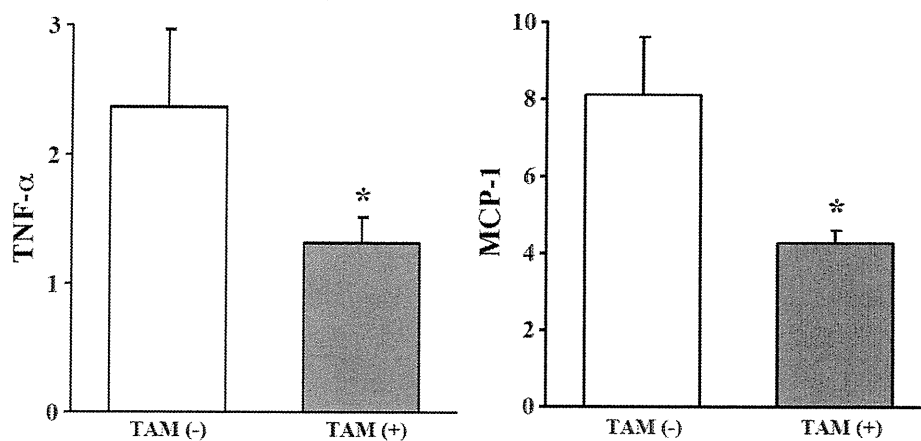


Fig. 13. Effects of TAM on hepatic mRNA of TNF- $\alpha$ , MCP-1 in TAM-administered NASH model mice. Mice were administered TAM for 5 days ( $1 \text{ mg/kg, i.p.}$ ). Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh. Hepatic mRNA of TAM (-) and TAM (+)-NASH model mice is normalized with that of normal mice. The data mean  $\pm$  SD of 5 mice. \* $p < 0.05$ , compared with TAM-unadministered mice.

TAM 投与群では、TAM 未投与群と比べて ERK1/2 リン酸化体の有意な増加が認められた。また、TAM 投与群において JNK1/2 リン酸化の有意な低下が認められた。p38 MAPK においては、TAM 投与による変動は認められなかった (Fig. 14)。これらの結果より、TAM による肝障害減弱には ERK1/2 活性化の増強および JNK1/2 活性化の減弱が関与することが示唆された。

グナル経路に対する影響

NASH 発症には小胞体ストレスの関与が報告されているため、TAM による小胞体ストレスに対する影響を検討した。KDEL に関しては TAM 投与による変動は認められなかった。また、TAM 投与群において、eIF2 $\alpha$  リン酸化の有意な低下が認められた (Fig. 15)。これらの結果より、TAM による肝障害減弱に小胞体ストレスシグナルが関与することが示唆された。

### C-13 TAM 投与による小胞体ストレスシ

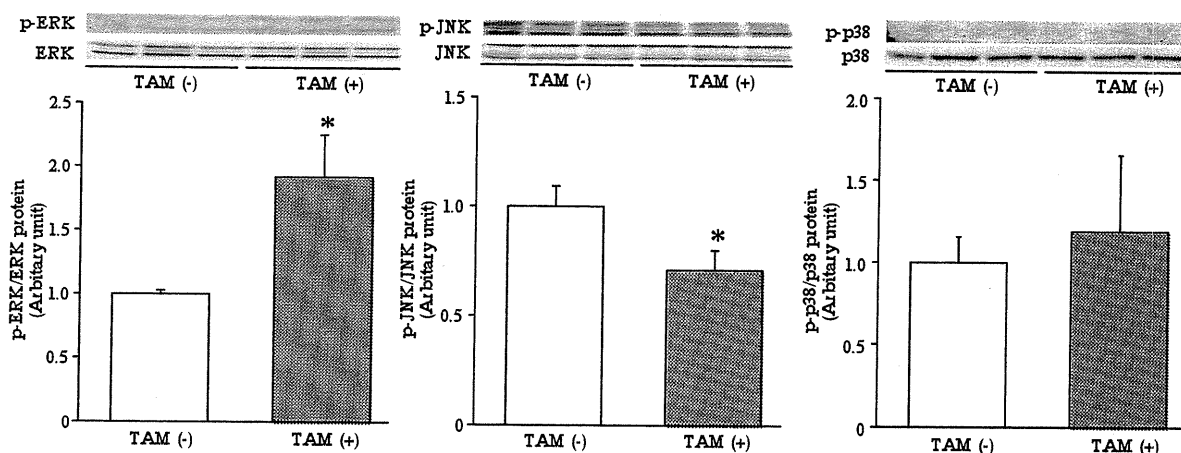


Fig. 14. Effects of TAM on MAPK signaling pathways in NASH model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Equal protein sample (50  $\mu$ g) were subjected to immunoblot analyses using antibodies of anti-Thr202/Thr204 phosphorylated ERK1/2, anti-Thr183/Thr185 phosphorylated JNK1/2 and anti-Thr180/Thr182 phosphorylated p38 MAPK. The data mean  $\pm$  SD of 3 mice. \* $p < 0.05$ , compared with TAM-unadministered mice.

### D. 考察

Steatosis および NASH は近年、肥満人口の増加とともに発症率の増加している慢性肝障害であるが、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 TAM の影響を検討した。

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