

201207006A

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24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横井 毅

平成25(2013)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試験系の開発研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 25 (2013) 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試験系の
開発研究

横井 毅 ----- I

II. 分担研究報告

1. THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの
肝障害性評価試験系の構築

横井 毅 ----- 1

2. アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析

中島美紀 ----- 27

3. 薬物性肝障害の動物モデルの確立と機序解析とスクリーニング
試験系の開発研究

深見 達基 ----- 59

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 96

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 101

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 24 年度 総括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 25 (2013) 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、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、薬物誘導性の肝障害の予測性は向上してい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示唆されているが、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。本研究成果により、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2年目であるが、全体として予定を上回る成果を発表することができた。2年目に業績（原著論文）として発表することができた特筆できるものとしては、以下の3つの研究成果を挙げるができる。

1. 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（原著論文業績#6）である。鎮痙薬であるカルバマゼピン 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。さらに、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。その結果、連投による肝障害モデルを世界で最初に確立することができ、その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。

2. 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 (原著論文業績 #7): 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、肝硬変や肝臓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。

3. 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 (原著論文業績 #11): 本研究では、臨床で高い頻度で使用され、稀に重篤な肝障害を惹起することが知られているジクロフェナク (DIF) 誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について明らかにすることを目的として検討した。その結果、投与方法を工夫すること

によって、DIF 投与マウスにおいて血漿中 ALT 値および AST 値の上昇が認められるモデルと確立することができた。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-1 β 、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) - γ t 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) の有為な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、DIF 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。

その他の業績として、メチマゾール誘導性肝障害モデルマウスにおいて、Th2 細胞の関与を明らかにした (原著論文業績 #12)。さらに、フルタミド誘導性の肝障害においても、投与法を工夫して肝障害モデルマウスの系を確立することができ、さらに、Th2 細胞が肝障害の増悪に関与することを報告した(原著論文業績 #15)。また、臨床において稀に極めて重篤な肝障害を発症した為に、発売停止になった糖尿病治療薬であるトログリタゾンについても、経口投与によって初めて肝障害モデルを作製することに成功した(原著論文業績 #5)。これはマウスの肝臓の約 90%をヒトに置き換えたヒト肝細胞キメラマウスを用いることで確立することができた。このマウスは SCID であるために、詳しい発症メカニズムを明らかにすることが出来なかった。しかし、代謝的活性化の明確な関与や、活性代謝物の定量的生成を示唆する結果は得る事が出来なかったことから、代謝に起因するメカニズム以外の関与が示唆された。

以上、今年度に論文発表できた内容について概略を述べた。論文の別刷写しは、本報告書の後半に添付されている。

以後の総括・分担研究報告書には、今年度まだ論文発表にはなっていないものの研究結果について得られた内容を以下の 3 項目について詳しく報告する。以下の 3 項目以外にも複数の研究が進行中であり、最終の来年度にはまとめて報告することができるように、鋭意研究実施中である。

(1) THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの肝障害性評価試験系の構築

本研究においては、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いて代謝的活性化を考慮した *in vitro* 試験系を構築し、反応性代謝物による免疫学的因子の活性化につ

いて評価した。肝障害を惹起する報告のある 10 種の薬物について検討した結果、アルベンダゾール、アミオダロン (AMD) および代謝物であるデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、CYP3A4 による CD 発現量の有意な増加が認められた。AMD 処置 24 時間後の DEA およびその代謝物であるジデスエチルアミオダロン (DiDEA) 生成量を HPLC により定量した結果、AMD の約 40%が DEA に、約 1.3%が DiDEA に代謝されていることを明らかとした。また、AMD および DEA 処置により、TNF α および IL-8 の mRNA 発現量およびタンパク質産生量を測定した結果、CYP3A4 存在下において処置濃度依存的な増加が認められた。以上、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た。

(2) アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析

近年、薬物または反応性代謝物による直接のストレスの他に、免疫細胞活性化に伴う炎症反応を介した肝障害が注目されている。アシルグルクロニド (AG) は比較的反応性が高いことから細胞毒性に対する関与が示唆されているが、その毒性を直接証明した報告はない。本研究では AG による細胞毒性について炎症性因子を指標として評価検討した。最初に、AG による炎症性因子の発現誘導についてヒト末梢血単球細胞 (PBMC) を用いて評価し、ジクロフェナクアシルグルクロニド (DCF-AG)、プロベネシドアシルグルクロニド (Pro-AG) およびトルメチンアシルグルクロニド (Tol-AG) において炎症性因子の発現が誘導されることを見出した。また、DCF-AG が炎症性因子の発現を強く誘導することから、そのメカニズム解明のために MAPK 経路を解析した結果、DCF-AG による炎症性因子の発現誘導には p38 および c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路が関与することが示された。次に、PBMC 中の各細胞に与える影響についてフローサイトメトリーにより検討した。PBMC 中の CD3 および CD19 陽性細胞に対する AG の影響は認められなかったが、CD14 陽性細胞においてのみ DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG により細胞生存率の低下が認められた。また DCF-AG 処置による CD14 陽性細胞に対する細胞傷害には p38 経路が関与することを明らかにした。本研究では、AG が炎症性因子の発現を誘導すること、PBMC 中の CD14 陽性細胞特異的に細胞傷害性を示すこと、それらに p38 経路が関与することを初めて明らかにし、AG が薬物誘導性肝傷害の原因の一因になる可能性を示した。本研究で明らかにした AG の細胞毒性およびメカニズムの情報は、臨床における薬物誘導性肝障害の予測に役立ち、医薬品開発に資することが期待される。

(3) 薬物性肝障害の動物モデルの確立と機序解析とスクリーニング試験系の開発研究：本研究では、薬物性肝障害の発症機序について新たな知見を与え、毒

性を予測できる試験系を開発することを目的とした。これまでに薬物性肝障害において関与することが報告されてきた因子が、一般的なメカニズムとして提唱できるかについて検討するために、複数の薬物性肝障害をマウスに惹起させ、肝臓中の mRNA 発現変動解析により肝障害発症に重要なメディエーターの探索を行った。薬物性肝障害における炎症性因子の発現変動パターンは薬物によって多様であることが明らかとなった。S100A8、S100A9、Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)および NACHT-LRR-PYD-containing protein 3 (NALP3)は複数の薬物性肝障害に共通して発現量の増加が認められ、これらの因子が免疫を介した肝障害を予測する毒性マーカーとして有用である可能性が示唆された。また、薬物投与によって Toll-like receptor 4 (TLR4)および RAGE のリガンドが誘導されることが、薬物性肝障害の発症の一因である可能性を初めて示した。これにより、免疫学的因子が関与する薬物性肝障害を *in vitro* の細胞系で予測する系の構築の為にデータが得られた。今後、*in vitro* の予測系の構築の研究を進める。

詳しく記載した上記の 3 項目以外にも複数の研究が進行中であり、最終の来年度にはまとめて報告することができるように、鋭意研究実施中である。

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次第に明らかになってきている。その主な原因は、免疫学的因子の関与がほとんど考慮・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、その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。

(1) THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの肝障害性評価試験系の構築: ヒト CYP3A4 による代謝的活性化を評価する系として、HepG2 細胞の細胞障害性を指標とした *in vitro* 評価系の構築が 2005 年に報告されている。当研究室においても、バキュロウイルス発現系またはアデノウイルスを用いた CYP3A4 による代謝的活性化を評価する試験系を構築してきた。しかし、いずれも代謝的活性化を介した直接的な細胞障害性は評価可能であるが、炎症・免疫反応の関与については評価することは極めて困難である。肝障害性薬物と炎症性因子 (外毒素である LPS、炎症性サイトカインである TNF α など) の同時暴露により、ヒトまたはラット初代

培養肝細胞とヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いて細胞毒性を評価している報告が 2009 年に報告されているが、この評価系では、肝障害性薬物と炎症性因子の相乗効果について *in vitro* の系として検討することが可能であるが、肝障害性薬物が直接的に免疫担当細胞を活性化しているか否かを判別することはできない。さらに、*in vitro* から *in vivo* への外挿性についても不明である。

薬物や化合物による免疫反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒトの末梢血から単離した単核球や T 細胞、B 細胞などを用いることが多い。しかし、ヒト末梢血から調製する試料の使用では、ロット間の個体差や、コストの問題が生じるため、*in vitro* の大規模スクリーニングには適さない。近年、このような問題を回避した *in vitro* 評価系として、ヒト単球系細胞株の有用性が注目されている。ヒト単球系細胞株は、単球やマクロファージ、骨髄球などの免疫担当細胞における分化や活性化のメカニズム解明に頻用されている細胞株である。これまでに市場から撤退した薬物である抗凝固薬キヌメラガトランまたは糖尿病治療薬トログリタゾンの暴露により、ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 細胞の炎症性サイトカインやケモカインの産生が増加することが報告され、炎症反応活性化が肝障害の副作用に関与することが示された。また、当研究室においても、駆虫薬

メベンダゾールおよび抗真菌薬テルビナフィンの暴露により THP-1 細胞の炎症性サイトカインおよびケモカイン産生量が増加したことを報告した。しかし、これらの検討において代謝物の評価は検討しておらず、これまでに免疫学的な肝障害に関与する代謝的活性化を評価した報告はない。本研究では、代謝的活性化を介した反応性代謝物による免疫活性化を評価することを目的とした。初めに、THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標とし、活性代謝物による代謝的活性化を評価可能な試験系を構築し、様々な肝障害性薬物における CYP3A4 による代謝的活性化の評価を行った。

(2) アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析

薬物の多くは体内に吸収されると薬物代謝酵素により代謝される。一般に、薬物は薬物代謝酵素により酸化、還元および加水分解を受け水酸基や第一級、第二級アミン基を生成し、さらに抱合反応により極性が上がることで、排泄を促す。しかし、一部の薬物では代謝により化学的に不安定な反応性代謝物が生じる代謝的活性化を引き起こす。

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) による *N*-または *O*-グルクロニドの生成は主要な第 II 相薬物代謝反応の一つであり薬物の解毒に関与するが、カルボン酸含有薬物はグルクロン酸によりアシルグルクロ

ニド (AG) を生成することが知られている。AG は反応性に富み、直接またはグルクロン酸内での分子内アシル転移を介して生体内タンパク質や高分子に共有結合することが知られており、これにより細胞毒性を示すと考えられている。また、リン酸カリウム緩衝液、ヒト血清アルブミンおよびヒト血漿中における AG の安定性と特異体質性の薬物毒性の発症頻度との相関関係を評価し、AG の安定性が副作用のリスクを予測する因子となり得ることが示唆されている。しかしながら、実際に AG による細胞毒性を直接証明した報告はほとんどない。

臓器移植後の拒絶反応の予防に用いられている Mycophenolic acid (MPA) は主に UGT2B7 によりアシル基がグルクロン酸抱合され MPA-AG が生成する (Shipkova et al., 1999; Picard et al., 2005)。MPA-AG はヒト単核白血球からの TNF α や IL-6 などのサイトカインの放出を促進させることが報告されている。また、当研究室においてヒト UGT 発現系 HEK293 細胞およびヒトヘパトサイトを用いて Diclofenac (DCF)、Ibuprofen (Ibu)、Ketoprofen および Naproxen (Nap) の AG による細胞傷害性および遺伝毒性を評価した結果、それらの毒性は認められなかったことから、AG の毒性に炎症反応が関与する可能性が考えられた。一般に、カルボン酸含有薬物はグルクロン酸により AG を生成することが知られている。

本研究では AG を生成する薬物として Diclofenac (DCF)、Ibuprofen (Ibu)、Naproxen (Nap)、Probenecid (Pro) および Tolmetin (Tol) を選択した。Ibu、Nap および Pro は anaphylaxis、Stevens-Johnson 症候群の副作用を、DCF および Tol は上記に加え肝障害等の重篤な副作用発症を理由に、米国の Food and Drug Administration (FDA) で warning drugs に分類されている薬物であり、AG が毒性に関与することが疑われている。

本研究では、AG により生じる細胞障害性を、炎症性因子を指標として *in vitro* において評価し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

(3) 薬物性肝障害の動物モデルの確立と機序解析とスクリーニング試験系の開発研究: 本研究課題では、薬物性肝障害の発症機序について明らかにし、その機序に基づいて、毒性を事前に予測する *in vivo* 試験系を開発することを目的とした。本研究では、第一にジクロフェナク誘導性肝障害のマウスモデルを作製し、肝臓中の炎症関連因子の発現変動を解析することにより、発症メカニズムの解析を行った。第二に、薬物性肝障害全体を包括するメカニズムを提唱することを目的として、複数の薬物性肝障害マウスモデルを用いて、肝臓中の炎症性因子の mRNA 発現変動を網羅的に解析した。次いで、肝障害性薬物において共通した発現変動

を示した因子を新規肝障害マーカーとして見出し、それらの因子の薬物性肝障害発症への寄与や、既存の肝障害マーカーである ALT との応答性の比較を行った。

(2) 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。

(1) THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの肝障害性評価試験系の構築: CYP3A4 による代謝的活性化の検討は、 1×10^6 cells/mL の THP-1 細胞、CYP3A4 発現系マイクロソーム (CYP3A4 として 15 nM) および 1 mM NADPH となるように調製した溶液に被験薬を加え、24 well plate に 1 mL ずつ播種し培養した。FACS による CD86 および CD54 発現量の定量および細胞生存率の測定については細胞を 0.1% BSA を含む $1 \times$ PBS で 2 回洗浄した後、新しく用意した 1.5 mL チューブに FITC 標識モノクローナル抗体 (抗ヒト CD86 抗体 (clone: Fun-1)、抗ヒト CD54 抗体 (clone, 6.5B5) および FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識マウス IgG1 κ アイソタイプコントロール (clone, MOPC-21)) を加え、そこに洗浄した細胞を分注し、4°C、暗所において 30 分間インキュベーションを行い、細

胞染色を行った。その後、0.1% BSA を含む $1 \times \text{PBS}$ で 1 回洗浄した後、FACS flow に PI (propidium iodide) を 0.625 mg/mL とした溶液に懸濁し、フローサイトメトリーを用いて分析を行った。なお、CD 発現量の解析の際には死細胞はゲートにより取り除き、計 10,000 個の生細胞を解析した。CD86 および CD54 発現の指標として用いた相対発現量は算出式により計算した。

(2) アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析：実験材料であるヒト末梢血単核球 (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 (total liver cells) は ADMET Technologies (North Carolina, USA) より購入した。ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞は 10%FBS を含む RPMI1640 を培養液として培養した。継代時、細胞培養液をピペッティングにより懸濁し、50 mL フアルコンに回収し、3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培養液に懸濁し培養した。実験時、THP-1 細胞を 24-well または 96-well plate に 1×10^6 cells/well または 1×10^5 cells/well にて播種し、同時に DCF および DCF-AG を処置し培養した。ヒト末梢血単核球 PBMC の培養は以下の方法で行った。ヒト末梢血単核球 PBMC は液体窒素中で凍結保存

してあるものを融解した後、24-well または 96-well plate に 3×10^6 cells/well または 5×10^5 cells/well にて播種した。同時に各薬物を処置し培養した。薬物として DCF、DCF-AG、Pro、Pro-AG、Tol、Tol-AG、Ibu、Ibu-AG、Nap および Nap-AG を用いた。薬物処置後、24-well plate を用いた検討では細胞培養液をピペッティングにより懸濁し、1.5 mL チューブに移した。24 時間培養した細胞生存率を CellTiter-Blue Cell viability Assay のマニュアルに従い、以下のように測定した。培養後の 96-well plate に CellTiter-Blue Reagent 20 μL を添加し、10 秒間振とう後、CO₂ インキュベーター内で 90 分間呈色反応を行った。その後、Wallac 1420 ARVOMX で蛍光 (excitation: 338 nm, emission: 458 nm) を測定した。Total RNA の調製、Reverse transcription (RT) 反応、Real-time RT-PCR による mRNA の測定、ホモジネートの調製およびタンパク質定量、SDS-PAGE および Western blot 解析は常法に従って行った。統計解析において、多群間における統計学的評価は ANOVA および Tukey または Dunnett 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

(3) 薬物性肝障害の動物モデルの確立と機序解析とスクリーニング試験系の開発研究： Ready-SET-GO! Mouse Interleukin-17A (IL-17A) と

Ready-SET-GO! Mouse Interleukin-1b (IL-1b)は eBioscience (San Diego, CA) より、monoclonal anti-mouse IL-17 antibody、monoclonal anti-IL-1b antibody、ラット IgG2a isotype control およびラット IgG1 isotype control は R&D Systems (Minneapolis, MN) より購入した。Rabbit polyclonal antibody against myeloperoxidase (MPO) は DAKO (Carpinteria, CA) より購入した。ジクロフェナク誘導性肝障害モデルマウス作製は、Balb/cCrSlc (Balb/c) 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 (in corn oil) で単回腹腔内投与した。投与 1、3、6、12、24 および 36 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。マウス肝臓 total RNA の調製や、Reverse transcription (RT) 反応は常法により行った。ELISA による血漿中 IL-17 および IL-1b の定量は、以下の方法で測定した。ヘパリナイズした器具を用いて採取したマウスの全血を 1,500 g、4°C で 15 分間遠心分離を行った後、上清をサンプルチューブに移し血漿とした。血漿中の IL-17 または IL-1b の濃度を Ready-Set-Go!のマニュアルに従って以下の方法で測定した。統計解析において、2 群間における統計学的評価は Student's t-test により、多群間における統計学的評価は ANOVA および Tukey 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的

に優位であると判断した。

(3) 研究結果

(1) THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの肝障害性評価試験系の構築：アミオダロン (AMD) およびデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD54 発現量の有意な増加が認められた。アルベンダゾール処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD86 発現量の有意な増加が認められた。一方、その他の薬物ではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群の間に CD 発現量の顕著な変動は認められなかった。12 時間後において、AMD および DEA 処置による CD54 発現量は CYP3A4 発現系処置群により有意な変化は認められなかった。AMD および DEA 処 IL-8 および TNF α の mRNA 発現量は AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 6 時間後から 24 時間後まで有意に増加し、12 時間後において最も高値を示した。また、IL-8 タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処

置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において時間依存的に増加が認められ、24 時間後において最も高値を示した。TNF α タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 6 時間から 12 時間後まで認められ、12 時間後において最も高値を示した。AMD 処置による炎症性サイトカインの増加は代謝物である DEA 処置による代謝的活性化の寄与が大きいと考えられた。AMD 処置により IL-8 および TNF α 産生はコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において、濃度依存的な増加が認められた。20 mM の AMD 処置により TNF α mRNA 発現量はコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において有意に増加したが、TNF α タンパク質産生量の有意な増加には 30 mM ではじめて認められた。CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での AMD 処置 12 時間後、DEA は 7.4 mM 生成し、DiDEA は検出されなかった。また、AMD 濃度は処置時間依存的に減少した。また、CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での AMD 処置 24 時間後、DEA は 11.7 mM、DiDEA は 0.4 mM 生成した。CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での DEA 処置 12 時間後、DiDEA は 0.3 mM 生成した。CYP3A4 発現系マイクロソーム処

置群での DEA 処置 24 時間後、DiDEA は 0.5 mM 生成した。一方、コントロールマイクロソーム処置群においては、いずれの条件においても代謝物は検出されなかった。

(2) アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析： DCF および DCF-AG が THP-1 細胞に与える影響について、細胞傷害性および炎症性因子の mRNA 発現変動の観点から解析した。処置濃度を 0、50 および 100 μ M にて検討したところ、いずれの処置濃度においても THP-1 細胞の生存率は 70 % 以上であり、DCF-AG による THP-1 細胞に対する細胞傷害性は認められなかった。また、上記の濃度において炎症性因子 mRNA の発現変動を解析した結果、DCF-AG 処置群において TNF α および IL-8 mRNA の濃度依存的な発現増加が認められた。続いてこれら炎症性因子の経時的な発現変動を解析するために薬物処置 0、3、6、12 および 24 時間後における THP-1 細胞の mRNA 発現変動を解析した。その結果、DCF-AG 処置群において TNF α および IL-8 mRNA の時間依存的な発現増加が認められた。また TNF α では、DCF 処置群と比較し、DCF-AG 処置後 12 および 24 時間において、IL-8 では DCF 処置群と比較し、DCF-AG 処置後 6、12 および 24 時間において有意な発現の増加が認められた。

ヒト PBMC およびヒト total liver cells

の lot 差の検討を行った。5 検体 (#14、#40、#48、#51 および #59) の PBMC および 3 検体 (H0614、H0796 および H0911) の total liver cells を用い、DCF および DCF-AG が各細胞に与える影響について検討した。TNF α mRNA は各 PBMC において DCF および DCF-AG 処置による発現変動は認められなかった。IL-8 mRNA は PBMC (#14、#48 および #59) において DCF 処置群と比較し、DCF-AG 処置により発現増加が認められた。また、PBMC (#48 および #59) においては他の PBMC と比較し、DCF-AG による IL-8 mRNA の発現増加が顕著であった。MCP-1 mRNA は PBMC (#14、#48 および #59) において DCF 処置群と比較し DCF-AG 処置により発現増加が認められた。また、PBMC (#48 および #59) において他の PBMC と比較し、DCF-AG による MCP-1 mRNA の発現増加が顕著であった。GM-CSF mRNA は PBMC (#14、#40、#48 および #59) において、DCF 処置群と比較し DCF-AG 処置により発現増加が認められた。また、PBMC (#40、#48 および #59) において他の PBMC と比較し、DCF-AG による GM-CSF mRNA の発現増加が顕著であった。IL-6 mRNA は PBMC (#40、#48、#51 および #59) において、DCF 処置群と比較し DCF-AG 処置により発現増加が認められた。PBMC (#48) において、DCF-AG による IL-6 mRNA の発現増加する割合が最も大きかった。PBMC では lot 48 が DCF-AG によ

る各炎症性因子の発現誘導が最も大きかったことから、以後の検討では PBMC (#48) を用いることとした。

DCF-AG 処置濃度による炎症性因子の発現変動を解析するため検討を行った。TNF α mRNA は DCF および DCF-AG 処置 24 時間における発現変動は認められなかった。IL-8、MCP-1、GM-CSF および IL-6 mRNA においては DCF 処置による発現変動は認められなかったが、DCF-AG 処置群により処置濃度依存的に発現増加が認められた。次に、これら炎症性因子の経時的な発現変動を解析した。その結果、TNF α mRNA では DCF-AG 処置後 3 時間 および 6 時間で、DCF 処置群と比較し有意な増加が認められた。IL-8 mRNA は DCF-AG 処置後 12 および 24 時間で、DCF 群と比較し有意な増加が認められた。MCP-1 mRNA は DCF 群と比較し、DCF-AG 処置群 24 時間後において有意な増加が認められた。GM-CSF mRNA では DCF および DCF-AG 処置群において、3 時間後から増加傾向が認められ、6、12 および 24 時間において有意な増加が認められた。IL-6 mRNA は DCF および DCF-AG 処置群において、3 時間後から CTL 群と比較し有意な増加が認められ、12 時間後に最も高値を示した。また GM-CSF および IL-6 mRNA の各時間における発現は、DCF 処置群と比較し、DCF-AG 処置群において有意な増加が認められた。これら炎症性因子を指標とす

る場合、各炎症性因子により発現ピーク時間が異なることから、各因子に適したピーク時間を選択し解析することが望ましいが、DCF-AG 処置後 24 時間において IL-8、MCP-1、GM-CSF および IL-6 において DCF と比較し有意な発現増加が認められたことから、今後の検討において、炎症性因子発現変動を解析する際には、薬物処置時間を 24 時間とすることとした。

DCF-AG とこれらの代謝物が炎症性因子の発現に与える影響について検討した。TNF α mRNA はいずれの薬物処置群において発現変動は認められなかった。IL-8 mRNA では、CTL と比較し DCF-AG および 4'-OH DCF 処置群において、IL-8 mRNA の有意な発現増加が認められた。MCP-1 mRNA では、CTL と比較し DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置群において、MCP-1 mRNA の有意な発現増加が認められた。GM-CSF mRNA では、CTL と比較し DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置群において、GM-CSF mRNA の有意な発現増加が認められた。IL-6 mRNA では、CTL と比較し DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置群において、IL-6 mRNA の有意な発現増加が認められた。またこれら炎症性因子は DCF-AG 処置群において最も高値を示した。以上の結果より、DCF-AG だけでなく 4'-OH DCF および 5-OH DCF においても、ヒト PBMC に対して炎症性因子を発現増加させ、なかでも DCF-AG が最

も炎症性因子の増加が大きいことが示唆された。

DCF-AG とこれらの代謝物が炎症性因子の発現に与える影響について検討した。TNF α mRNA はいずれの薬物処置群において発現変動は認められなかった。IL-8 mRNA では、CTL と比較し DCF-AG および 4'-OH DCF 処置群において、IL-8 mRNA の有意な発現増加が認められた。MCP-1 mRNA では、CTL と比較し DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置群において、MCP-1 mRNA の有意な発現増加が認められた。GM-CSF mRNA では、CTL と比較し DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置群において、GM-CSF mRNA の有意な発現増加が認められた。IL-6 mRNA では、CTL と比較し DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置群において、IL-6 mRNA の有意な発現増加が認められた。またこれら炎症性因子は DCF-AG 処置群において最も高値を示した。以上の結果より、DCF-AG だけでなく 4'-OH DCF および 5-OH DCF においても、ヒト PBMC に対して炎症性因子を発現増加させ、なかでも DCF-AG が最も炎症性因子の増加が大きいことが示唆された。

PBMC は T リンパ球、B リンパ球、単球および顆粒球で構成される細胞群であるが、AG がいずれの細胞に対して影響を及ぼしているかは不明である。T リンパ球に発現する CD3、単球に発現する

CD14、およびBリンパ球に発現するCD19を各抗体により検出し、AGによるPBMC中の各細胞に対する影響をII-2-5の方法に従い評価した。その結果、CD3およびCD19陽性細胞では、DCFおよびDCF-AG処置による細胞生存率への影響は認められなかった。CD14陽性細胞ではDCF-AG処置により、生存率の低下が認められた。以上の結果よりDCF-AGがCD14陽性細胞特異的に細胞傷害性を示すことが示唆されたため、以後、CD14陽性細胞に着目し検討を行うこととした。

DCF以外の薬物におけるAGがPBMCに与える影響について評価した。CD3陽性細胞およびCD19陽性細胞においては各薬物による細胞生存率への影響は認められなかった。CD14陽性細胞においてはCTL群と比較し、Pro-AG処置により約40%、Tol-AG処置により約50%の細胞生存率の低下が認められた。Ibu-AGおよびNap-AG処置による細胞生存率の変動は認められなかった。以上より、DCF-AG以外にProおよびTolのAGがCD14陽性細胞特異的に細胞傷害性を示すことが示唆された。

(3) 薬物性肝障害の動物モデルの確立と機序解析とスクリーニング試験系の開発研究：肝障害性を有する薬物であるAPAP、HAL、DIC、FLUおよびDIXとそれぞれの薬効類似体であるISO、IBU、BICおよびAMPをBalb/cマウスに投与し、薬

物投与による血漿生化学値への影響を検討した。APAP投与により3時間後からALTおよびAST値の上昇が認められ、24時間後に最も高値を示した。HAL投与後24時間後に血漿中ALTおよびAST値の有意な上昇が認められた。DICおよびDIX投与により1時間後から血漿中ALTおよびAST値の上昇が認められ、6時間後に最も高値を示した。FLU投与3時間後からALTとAST値の上昇が認められ、6時間後に最も高値を示した。薬効類似体薬物であるISO、IBU、BICおよびAMP投与による血漿中ALTおよびAST値に対する影響はいずれの時間においてもほとんど認められなかった。

薬物投与後0、1、3、6および24時間のマウス肝臓における炎症および免疫に関与する遺伝子のmRNA発現変動を検討した。各サンプルについてS100A8、S100A9、RAGE、TLR4、IL-1b、TNF α 、IL-6、NALP3、MIP-2、TIM1およびGapdhのmRNA発現量を測定し、Gapdh mRNA発現量を補正に用いた。S100A8はAPAP、HAL、DICおよびDIX投与により10倍以上の発現量の増加が認められ、IBUでは6倍程度の増加が認められた。ISO、FLUおよびBICでは2倍以下の発現変動であった。S100A9はAPAP、HAL、DIC、IBUおよびDIXで20倍以上の発現量の増加が認められ、ISOおよびAMPでは5倍程度の増加が認められた。FLU、BICではほぼ1倍の発現変動を示した。RAGEは、FLU

およびDIXで10倍以上の発現量の増加が認められ、APAP、HAL、DICおよびIBUで3~10倍の発現量の増加傾向が認められた。TLR4 mRNA 発現量はいずれの薬物を投与しても2倍以下の発現変動であった。IL-1bはDICおよびDIXにおいて10倍以上の発現量の増加が認められ、APAP、HALおよびIBU、AMPで5倍以上の増加が認められた。TNF α はDICおよびIBU投与により10倍以上の発現量の増加が認められ、IBUで顕著であった。HAL、DIXおよびAMPにおいて4倍程度の増加が認められた。IL-6はAPAP、HAL、DIC、IBUおよびDIXで10倍以上の増加が認められ、FLUで増加傾向が認められた。NALP3はAPAP、HAL、DIC、IBU、DIXおよびAMPにより増加傾向が認められた。MIP-2はAPAP、HAL、DICおよびDIXにより100倍以上の発現量の増加が認められ、FLUでは50倍以上の増加を示した。TIM1はいずれの薬物を投与してもmRNA発現変動はほぼ1倍であった。

薬物投与後の炎症関連因子のmRNA発現変動の中で、薬効類似体投与群と比較して肝障害性薬物投与群における発現量の増加が大きかった因子を探索し、5種類の炎症性因子(S100A8、S100A9、RAGE、NALP3、IL-1b)を見出した。解析に用いた5種類の肝障害性薬物のうち、5種類すべてで増加が認められた因子はなかったが、4種類以上の肝障害性薬物投与によりS100A8、S100A9、RAGE、NALP3

およびIL-1b mRNA 発現量の増加が認められた。さらに、本検討で見出した各因子が*in vivo*で肝障害を予測するマーカーとなる可能性を考え、肝障害に対する反応性を血漿中ALT値の変動と比較評価した。その結果、HALおよびDIC投与後のS100A8とS100A9、FLUおよびDIX投与後のRAGE、DICおよびDIX投与後のNALP3、HAL、DICおよびDIX投与後のIL-1bでは、薬物投与後のALT値は6または24時間で上昇が認められた一方で、それぞれの因子の肝臓中mRNA発現量はALT値よりも早い時間で上昇が認められた。また、S100A8およびS100A9はHAL投与後のALT値が上昇していない6時間において顕著な増加を示したことから、これらの因子が肝障害に鋭敏に応答することが示された。

TLR4またはRAGEシグナリングと、薬物性肝障害との関係を検討するために、TLR4アンタゴニストであるエリトラン併用投与によるTLR4阻害実験、およびmonoclonal anti-RAGE抗体併用投与によるRAGE中和実験を行った。投与法はII-2-7およびII-2-8によった。HAL、DICまたはDIX単独投与した各群と比較して、エリトラン投与によりALT値の有意な減少が認められた。また、DIXとIgG2aアイソタイプコントロールを併用投与した群を比較して、monoclonal anti-RAGE抗体併用投与群においてALT値の有意な減少が認められた。

D. 考察

(1) THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの肝障害性評価試験系の構築: 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 mM および DEA 濃度 10 mM 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。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 mM、DEA 濃度は 0.6-5.7 mM であり、肝臓中 AMD 濃度は 7.1-1379.2 mM、DEA 濃度は 15.4-10530.2 mM 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 mM 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