

Fig. 2. Dose- and time-dependent changes of cell viability (A) and expression levels of TNF α and IL-8 mRNA (B) in THP-1 cells treated with DCF and DCF-AG. THP-1 cells were treated with DCF, DCF-AG (0, 50 or 100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h or THP-1 cells were treated with DCF, DCF-AG (100 μ M) for 0, 3, 6, 12 and 24 h. Cell viability in THP-1 cells were measured by MTT assay as described in Material and Methods. TNF α and IL-8 mRNA were measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, compared with CTL. # p < 0.05, ## p < 0.01, compared with DCF.

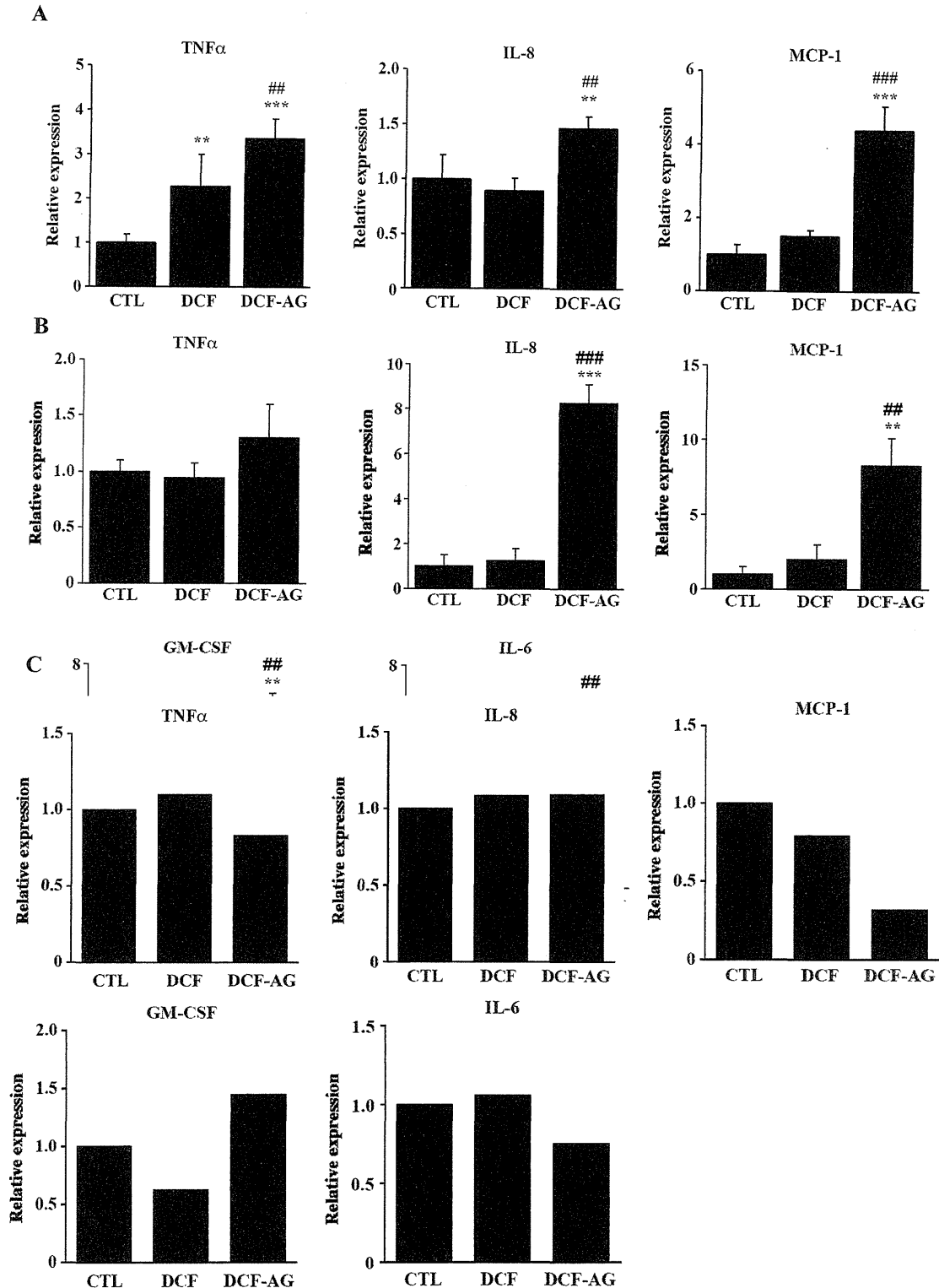


Fig. 3. Effects of DCF and DCF-AG on expression levels of TNF α , IL-8 and MCP-1 mRNA in THP-1 cells (A), and TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA in human PBMC (B) and total liver cells (C). Each cell was treated with DCF, DCF-AG (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. Expression of mRNA was measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean \pm SD (n = 3) or the mean (n = 2). ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared with CTL. ## p < 0.01, ### p < 0.001, compared with DCF.

た (Fig. 3C)。DCF-AG 処置により発現増加が認められた IL-8、MCP-1 mRNA では、THP-1 細胞では IL-8 が約 1.5 倍、MCP-1 が約 4 倍であるのに対し、PBMC においては IL-8 が 8 倍、MCP-1 が約 8 倍であり、発現増加の割合が大きかった。

以上の結果より、DCF-AG による炎症性因子の発現誘導は、PBMC を用いることにより高感度に評価できることが示唆された。

C-3. PBMC および total liver cells の lot 差の検討

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。実験方法は I-2-3、I-2-4 および I-2-9 に従った。

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 (Fig. 4)。

Total liver cells を用いた場合、lot H0911 において DCF および DCF-AG 処置により TNF α 、IL-8、MCP-1、GM-CSF および IL-6 mRNA の増加傾向が認められた。lot H0614 および lot H0796 においては、DCF および DCF-AG 処置による発現変動は認められなかった (Fig. 5)。以上より PBMC および total liver cells には lot 差が存在することが明らかとなった。また、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。

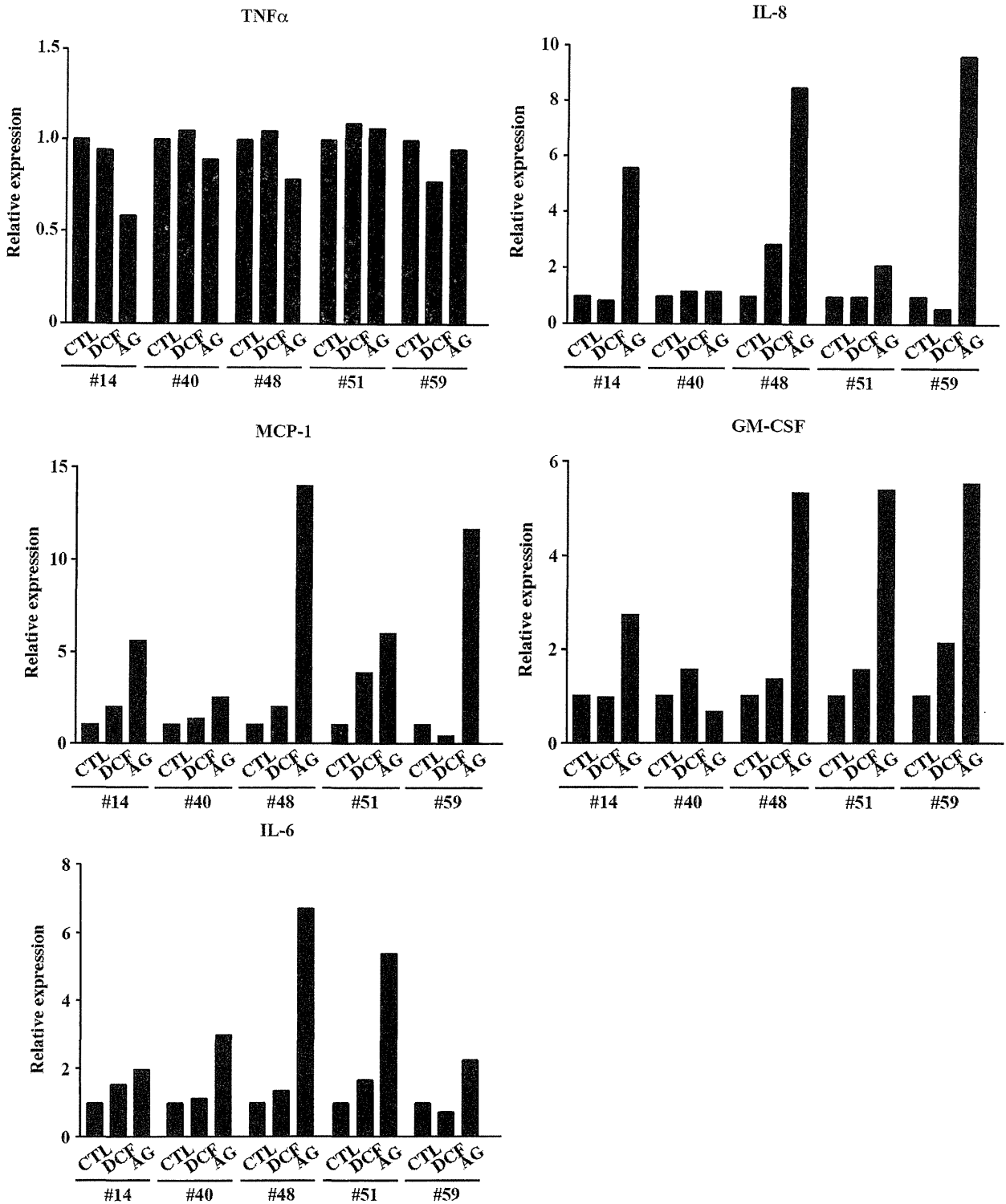


Fig. 4. Individual differences in the mRNA expression levels of TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA in human PBMC treated with DCF and AG. Each cell was treated with DCF, DCF-AG (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. Expression of mRNA were measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean (n = 2).

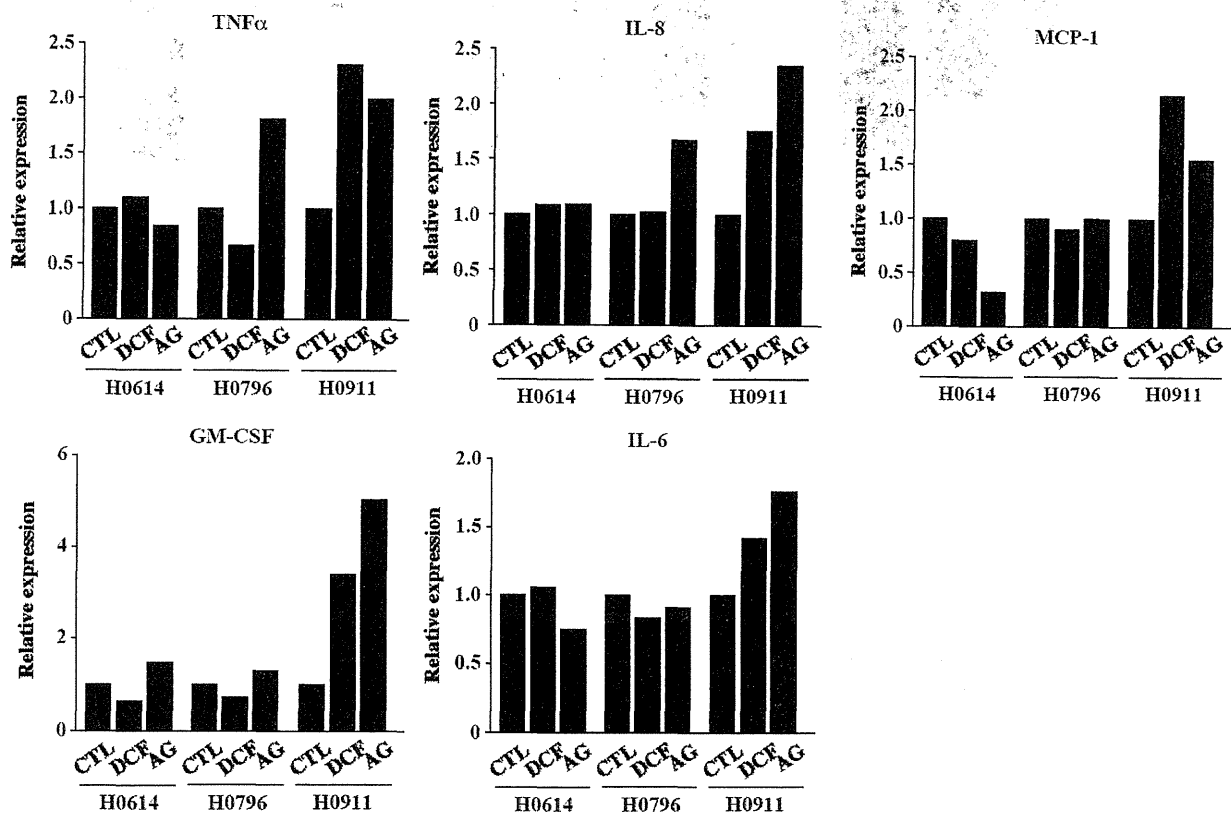


Fig. 5. Individual differences in the mRNA expression levels of TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA in total liver cells treated with DCF and AG. Each cell was treated with DCF, DCF-AG (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. Expression of mRNA were measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean (n = 2).

C-4. PBMCにおけるDCFおよびDCF-AG処置濃度および時間依存的な炎症性因子の発現変動

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 (Fig. 6A)。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 (Fig. 6B)。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。

C-5. AG 処置による炎症性因子発現変動

DCF 以外の薬物の AG が PBMC に与える影響について評価した。本検討では AG を生成する薬物として下記に記す Probenecid (Pro)、Tolmetin (Tol)、Ibuprofen (Ibu) および Naproxen (Nap) を選択した。IL-8 mRNA に関しては、Tol と比較し Tol-AG 処置群において有意な発現増加が認められた。MCP-1 mRNA に関しては、Pro と比較し Pro-AG 処置群において有意な発現増加が認められた。IL-6 mRNA に関しては、Tol と比較し Tol-AG 処置群において有意な発現増加が認められた。GM-CSF mRNA に関しては、いずれの処置群においても変動は認められなかった。また Nap、Ibu およびその AG 処置における各炎症性因子の発現変動は認められなかった (Fig. 7)。以上より DCF-AG の他に Tol および Pro の AG においても炎症性因子を活性化させることが示唆された。しかし、Pro-AG および Tol-AG において認

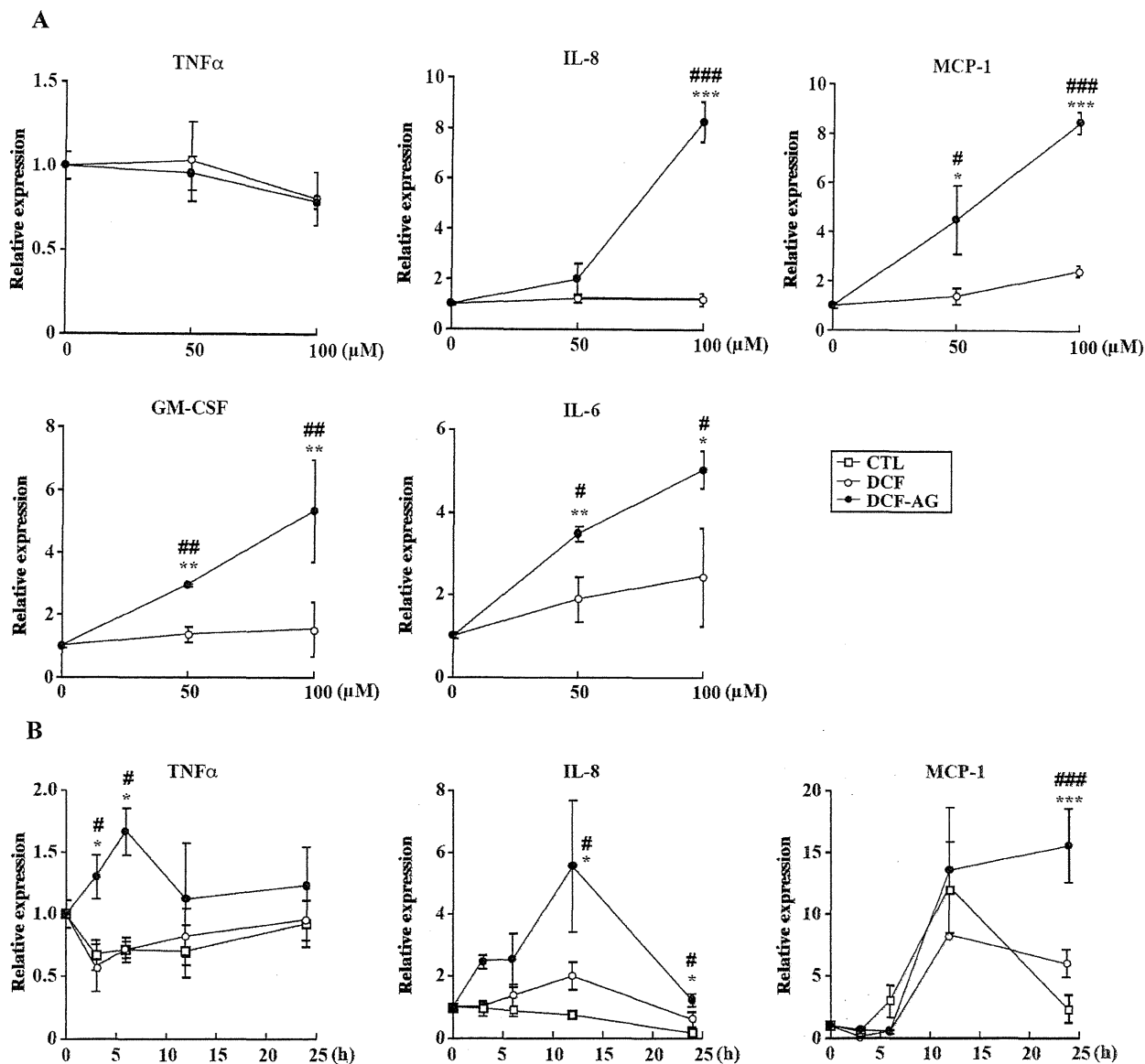
められた各炎症性因子の増加は、DCF-AG と比較すると軽微なものであった。以上の結果より、PBMC に対する細胞障害性は炎症性因子を指標とした場合 DCF-AG、Tol-AG、Pro-AG の順に強いことが示唆された。以後、本研究では PBMC に対する影響が最も顕著に認められた DCF-AG に着目し、より詳細な検討を行うこととした。

C-6. DCF およびその代謝物が PBMC に与える影響

DCF の代謝物は AG の他に CYP2C9 により 4'-hydroxy diclofenac (4'-OH DCF) が、CYP3A4 により 5-hydroxy diclofenac (5-OH DCF) が生成することが報告されている (Boelsterli, 2003)。これらの代謝物はいずれもキノニン体を生成することにより、タンパク質との共有結合の形成および酸化ストレスを引き起こすと考えられている (Boelsterli, 2003; Tang et al., 1999)。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 (Fig. 8)。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。



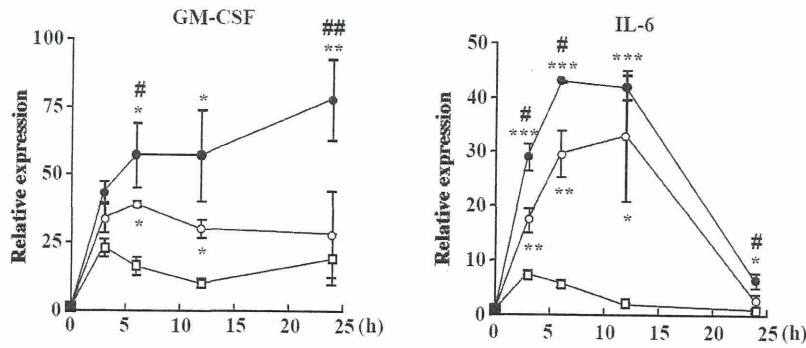


Fig. 6. Dose- and time-dependent effects of DCF and DCF-AG on expression levels of TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA in human PBMC. PBMC were treated with DCF, DCF-AG (0, 50 or 100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h (A) or were treated with DCF, DCF-AG (100 μ M) for 0, 3, 6, 12 and 24 h (B). TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA were measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared with CTL. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, compared with DCF.

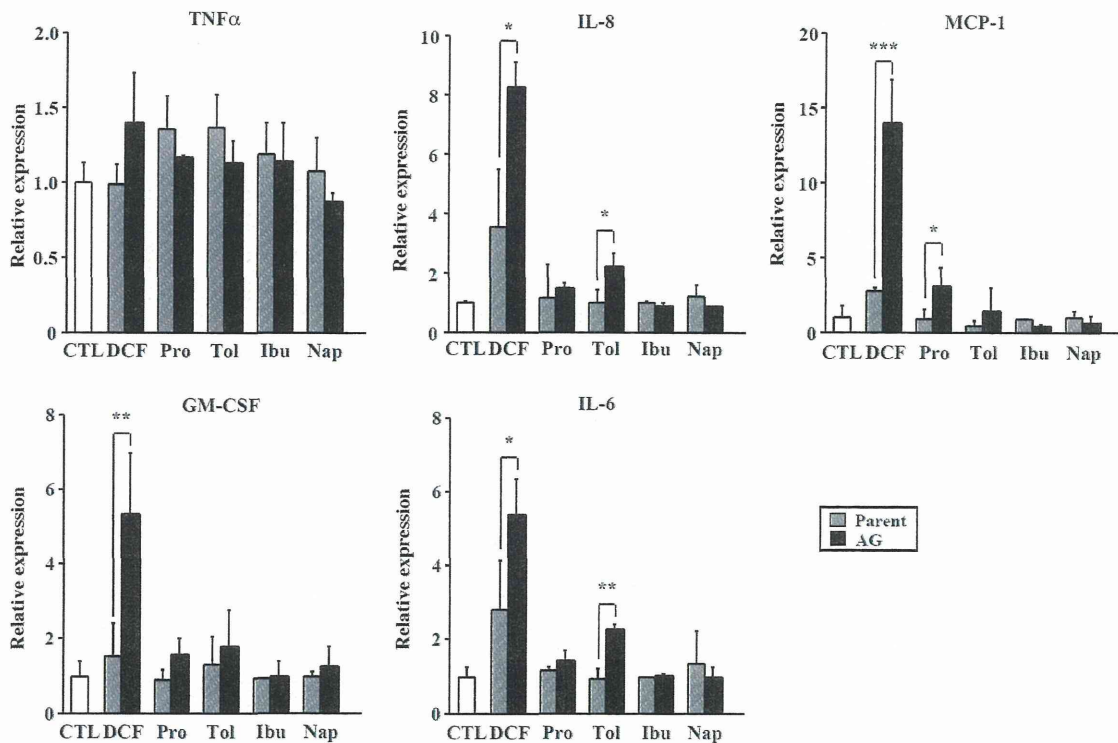


Fig. 7. Effects of drugs on expression levels of TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA in human PBMC. Human PBMC were treated with DCF, DCF-AG, Pro, Pro-AG, Tol, Tol-AG, Ibu, Ibu-AG, Nap or Nap-AG (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA were measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared with parent drugs.

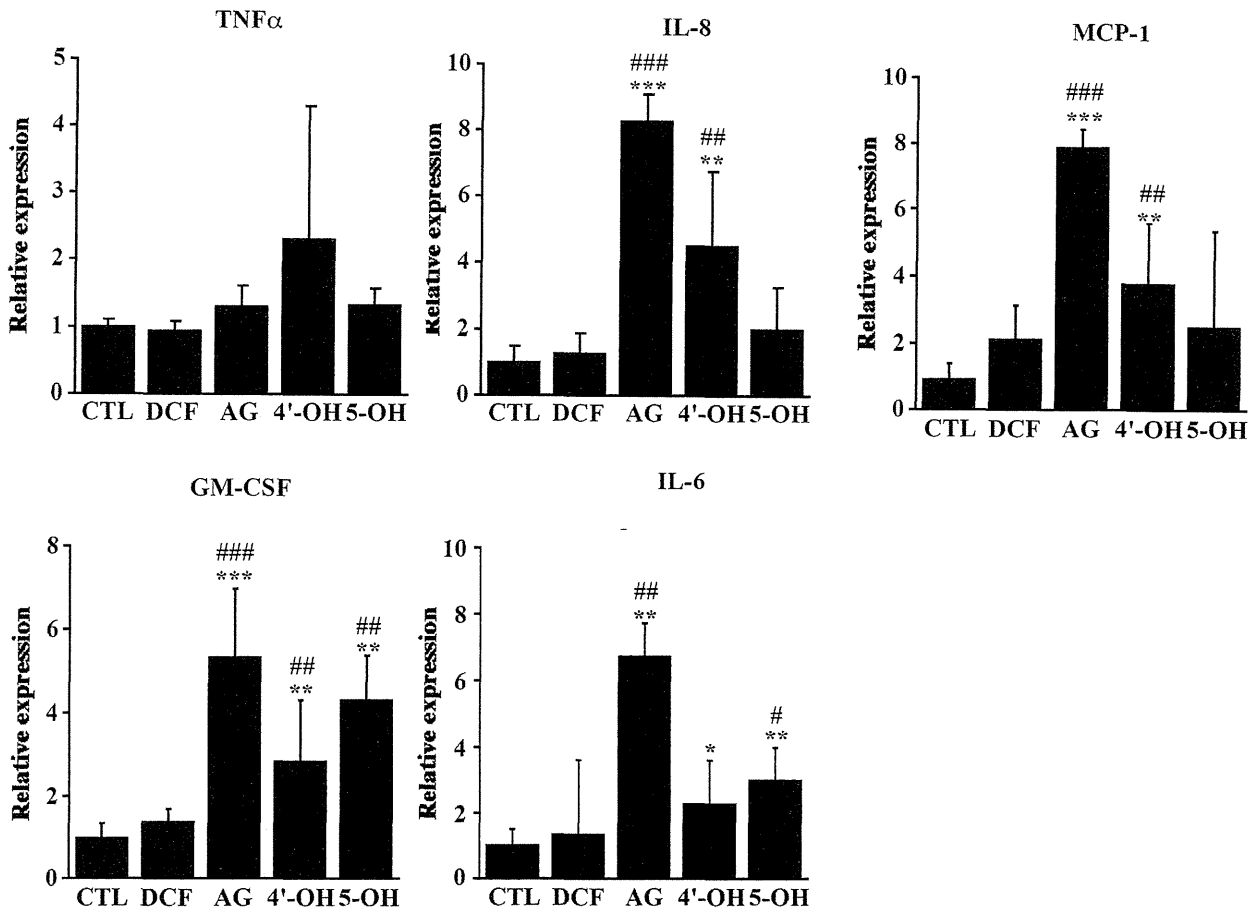


Fig. 8. Effects of DCF and its metabolites on expression levels of TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA in human PBMC. Human PBMC were treated with DCF, DCF-AG, 4'-OH DCF or 5-OH DCF (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA were measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared with CTL. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, compared with DCF.

C-7. DCF-AG 処置による MAPK の活性化

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することで、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因子を活性化する (Payne et al., 1991; DeFranco et al., 1998)。

DCF-AG が MAPK 活性化を介して炎症性因子の活性化に関与している可能性が考えられることから、DCF-AG 処置 0.5、1 および 3 時間後における MAPK 活性化についてヒト PBMC を用いて検討した。その結果、DCF-AG 処置群では、CTL および DCF 処置群と比較し 0.5、1 および 3 時間において、p38 リン酸化体の有意な増加が認められた (Fig. 9)。また、DCF 処置群では 0.5 時間において、JNK リン酸化体の

増加傾向が認められ、DCF-AG 処置群においては、CTL 群と比較し 0.5、1 および 3 時間において、JNK リン酸化体の有意な増加が認められ、DCF-AG 処置後 0.5 時間において高値を示した。ERK では、いずれの処置においても 0.5、1 および 3 時間ではリン酸化体のバンドが検出されず (Fig. 9)、12 および 24 時間後において ERK リン酸化体の増加傾向が認められた

(data not shown)。しかし、CTL 群と比較して、DCF および DCF-AG 処置 12 および 24 時間における ERK リン酸化体の変動は認められなかった (data not shown)。以上の結果より、DCF-AG は MAPK のなかでも p38 および JNK pathway を活性化すること、および DCF-AG による炎症性因子の活性化に p38 および JNK 活性化が関与することが示唆された。

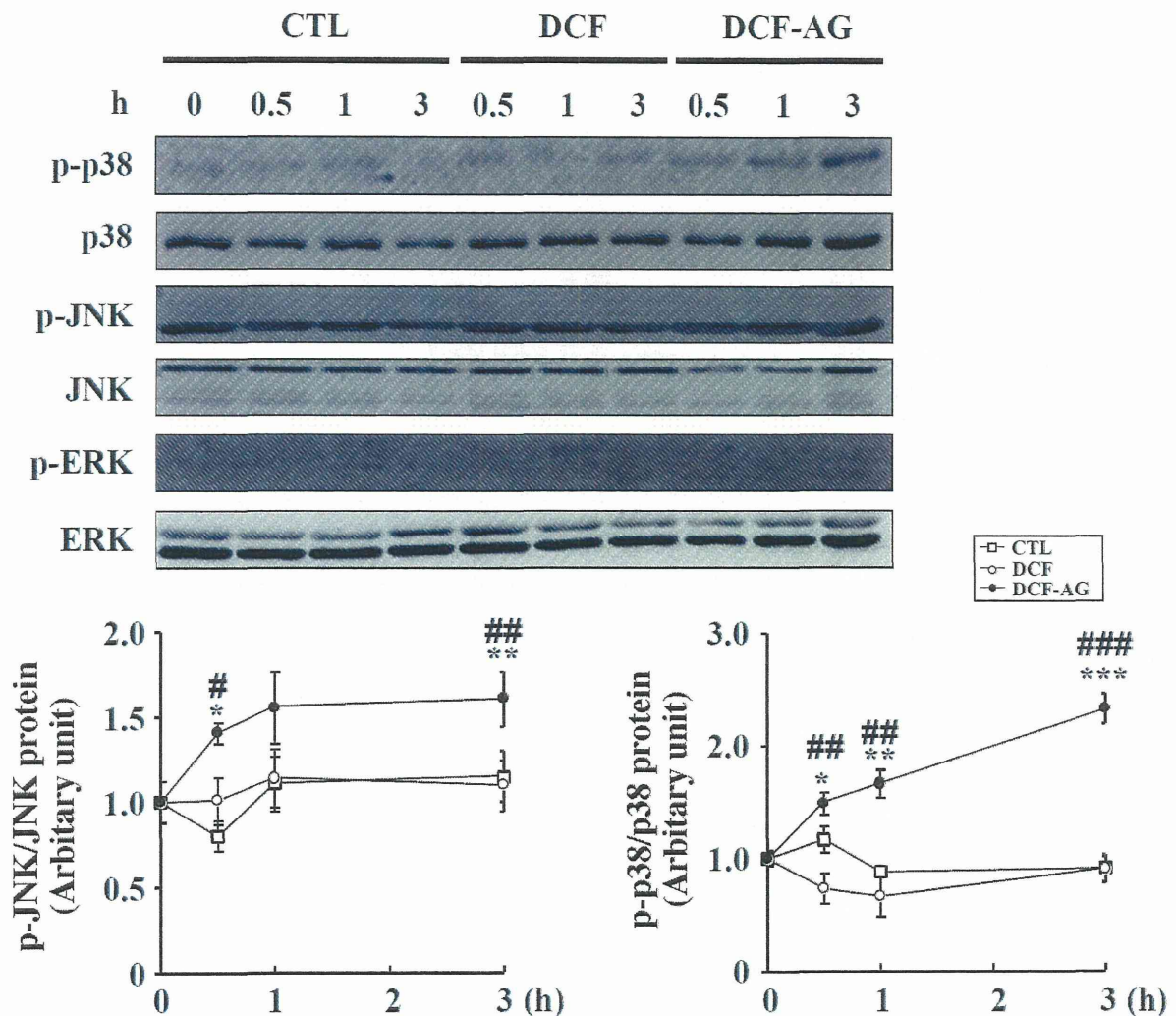


Fig. 9. Effects of DCF and DCF-AG on activation of MAPK signaling pathways in human PBMC. PBMC were treated with DCF, DCF-AG (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. Immunoblot of MAPK proteins in cell homogenate were performed and quantified. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared with CTL. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, compared with DCF.

C-8. DCF-AG による炎症性因子の発現増加に対する MAPK 活性化の影響

DCF-AG 処置により p38 および JNK リン酸化の亢進が認められたことから、p38 活性化を阻害する SB203580、および JNK 活性化を阻害する SP600125 を用いて、DCF-AG による炎症性因子の発現増加に対する p38 および JNK pathway の影響について検討した。また ERK pathway の影響についても ERK 阻害剤である U0126 を用いて同時に検討した。初めに SB203580 処置による p38 の阻害、および SP600125 処置による JNK の阻害の影響について、ヒト PBMC を用いて 2-5 の方法に従い検討した。その結果、DCF-AG 処置 3 時間において、SB203580 処置により p38 活性化の約 50% の低下が、SP600125 処置により JNK 活性化の約 40% の低下が認められた (Fig. 10)。薬物処置 3 時間における ERK のリン酸化体のバンドは認められなかった (data not shown)。

次に、この実験条件で DCF-AG による炎症反応に対する p38、JNK および ERK pathway の影響について検討した。TNF α mRNA では各薬物処置による発現変動は認められなかった。IL-8 mRNA では、DCF-AG 処置による IL-8 mRNA の有意な発現増加が、SB203580 併用群および SP600125 併用群では認められなかった。MCP-1 mRNA では、DCF-AG 群と比較し

て、SB203580 処置および U0126 処置において発現の有意な低下が認められた。

GM-CSF mRNA では、DCF-AG 群と比較して、各阻害剤による発現変動は認められなかった。IL-6 mRNA では、DCF-AG 群と比較して、SB203580 処置において発現の有意な低下が認められた (Fig. 11)。これらの結果より、DCF-AG による炎症性因子の発現増加の一因に DCF-AG による p38 および JNK 活性化が関与し、特に p38 が主要な pathway であることが示された。

C-9. DCF-AG の PBMC に対する影響

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 (Fig. 13)。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。

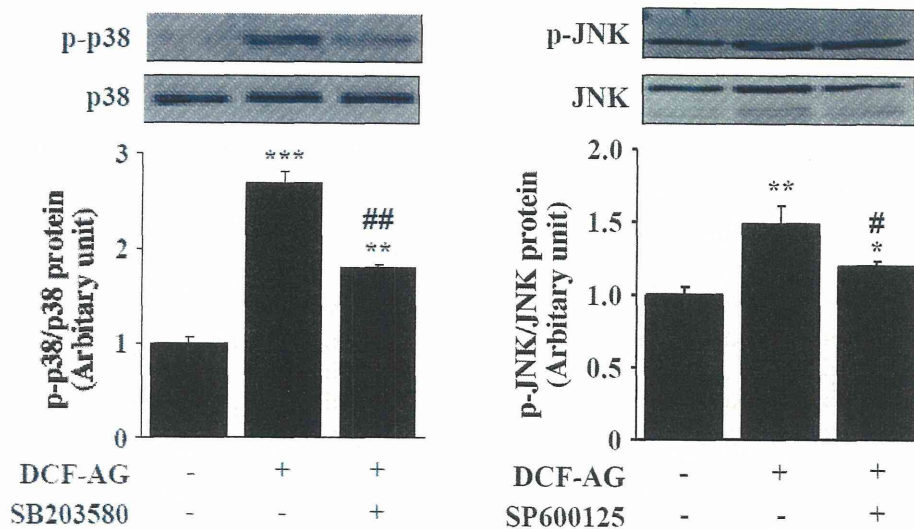


Fig. 10. Inhibitory effect of SB203580 and SP600125 treatment on p38 and JNK activation in human PBMC. Before the treatment with DCF-AG, human PBMC were pretreated with SB203580 (2.5 μ M), SP600125 (1 μ M) or U0126 (10 μ M) for 1 h. After 3 h incubation with DCF-AG, cell lysates were subjected to immunoblot analyses using antibodies of anti-Thr180/Tyr182 phosphorylated p38 MAP kinase, and Thr183/Tyr185 phosphorylated JNK1/2. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared with CTL. # p < 0.05, ## p < 0.01, compared with DCF-AG.

C-10. DCF-AG 処置濃度および時間依存的な変動

DCF-AG 処置濃度および時間依存的な細胞生存率の変動を検討した。CD3 および CD19 陽性細胞は DCF および DCF-AG 処置による細胞生存率の変動は認められなかった。CD14 陽性細胞では DCF-AG 処置濃度依存的に細胞生存率の低下が認められ、50 および 100 mM の DCF-AG 処置により DCF 処置群と比較し有意な細胞

生存率の低下が認められた。経時的な生存率の変動を解析した結果、DCF-AG 処置時間依存的に CD14 陽性細胞の生存率の低下が認められ 3、12 および 24 時間の処置において、DCF と比較し有意な生存率の低下が認められた (Fig. 14)。

IDCF-AG が単球を主とした 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。

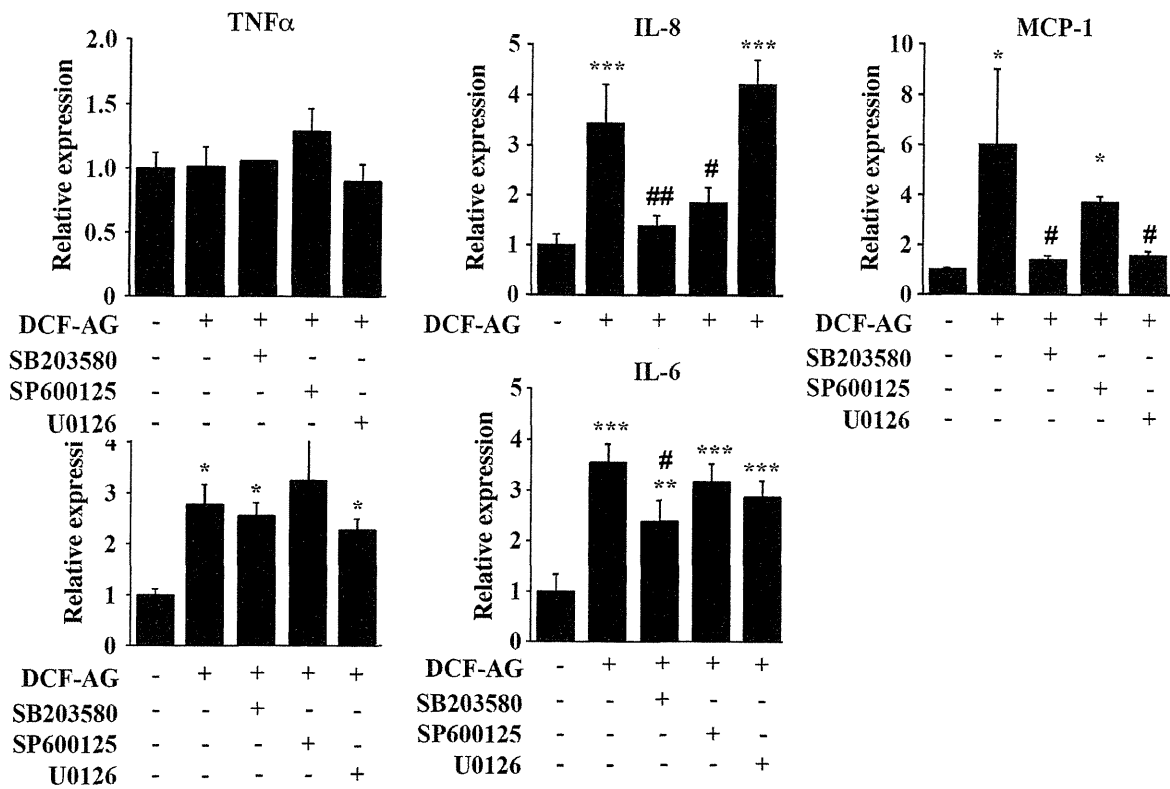


Fig. 11. The role of p38, JNK and ERK pathways on the effect of DCF-AG-induced inflammatory responses. Experimental conditions were same as those in Fig. 10. Human PBMC were collected 24 h after the treatment with DCF-AG. TNF α , IL-8, MCP-1, GM-CSF and IL-6 mRNA were measured by real-time RT PCR and normalized with GAPDH. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared with CTL. # p < 0.05, ## p < 0.01, compared with DCF-AG.

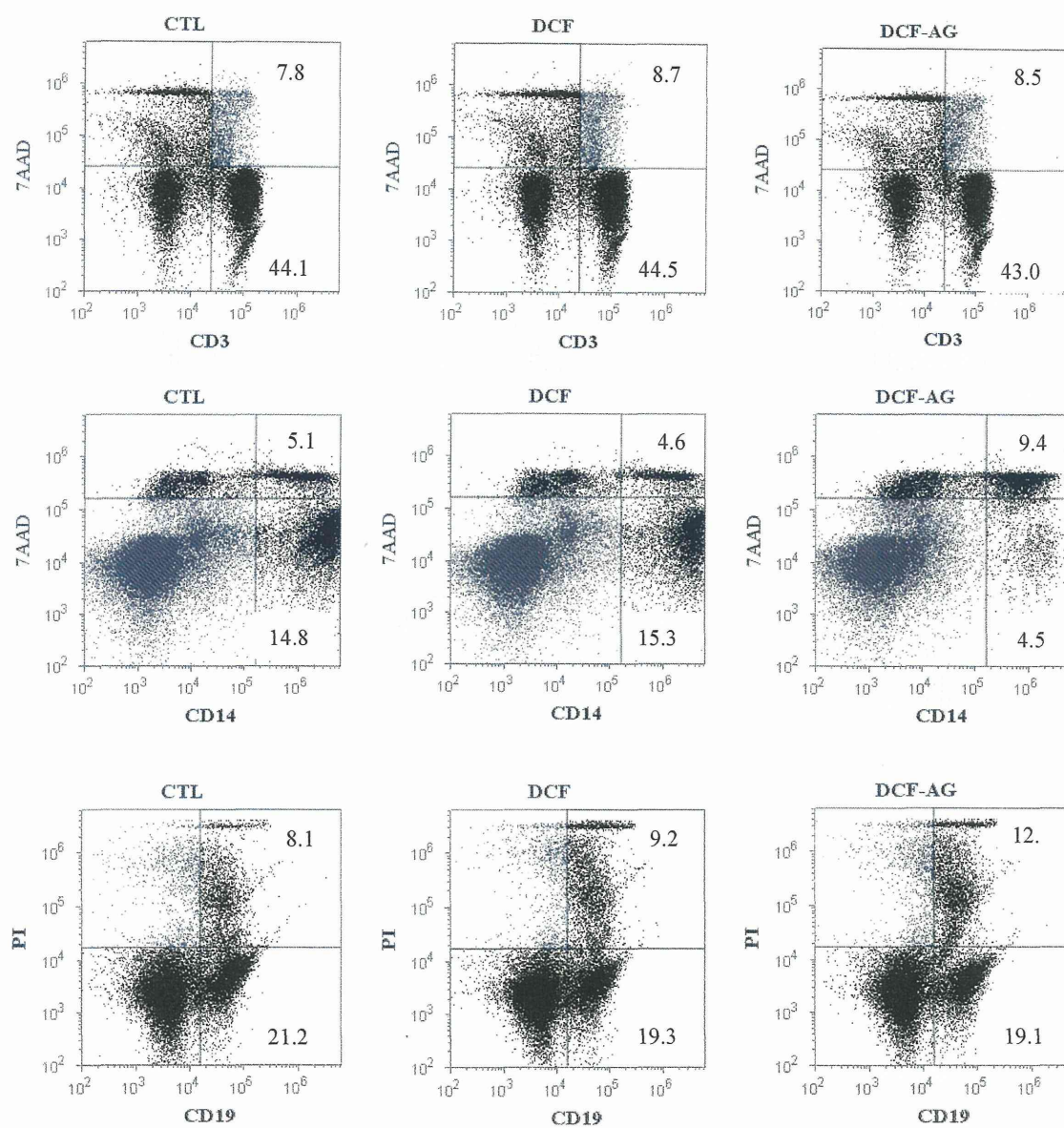


Fig. 13. Flow cytometry analysis of human PBMC treated with DCF or DCF-AG. Human PBMC were treated with DCF, DCF-AG (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. Cell death of CD3⁺, CD14⁺ and CD19⁺ cells induced by DCF and DCF-AG were measured by PI or 7AAD assay as described in Material and Methods.

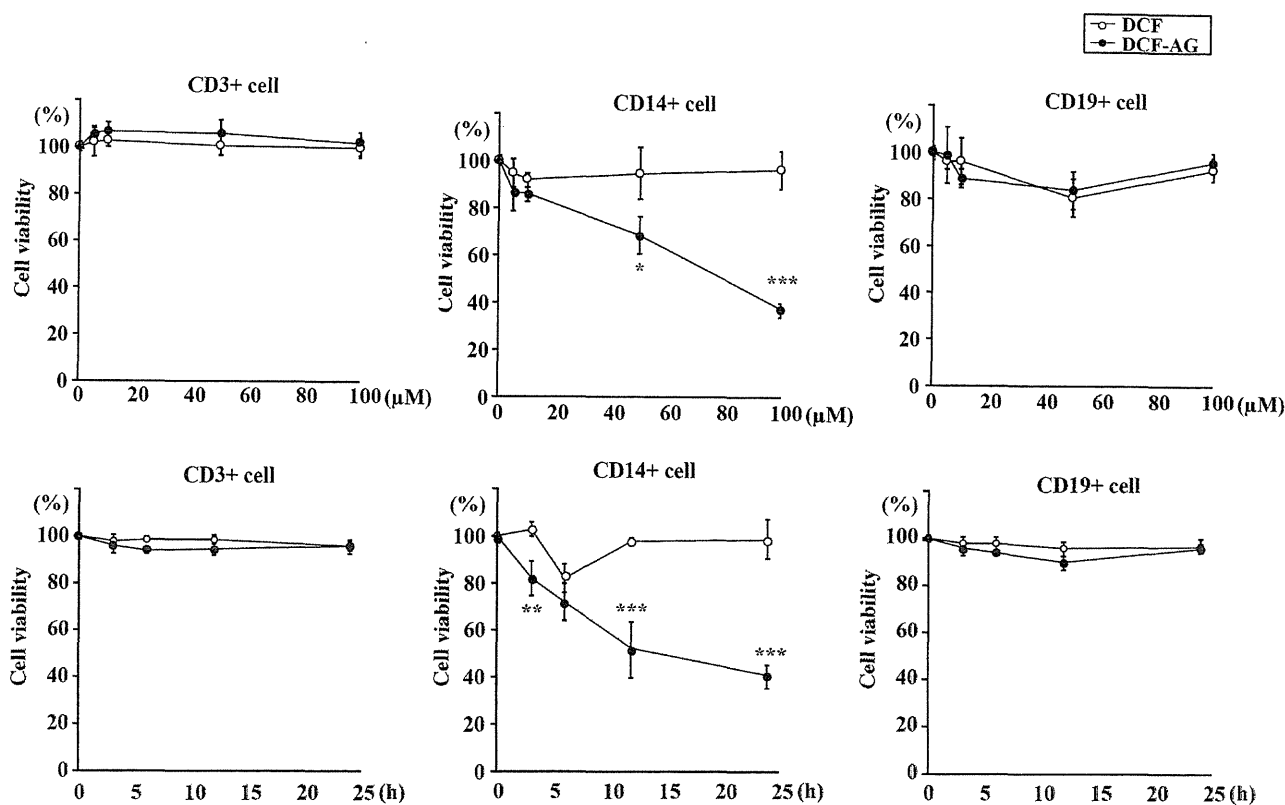


Fig. 14. Dose- and time-dependent effects of DCF and DCF-AG on cell viability of CD3⁺, CD14⁺ and CD19⁺ cells in human PBMC. Human PBMC were treated with DCF, DCF-AG (0, 50 or 100 μM) or 1% methanol (CTL) for 24 h or were treated with DCF, DCF-AG (100 μM) for 0, 3, 6, 12 and 24 h. Cell viability of CD3⁺, CD14⁺ and CD19⁺ cells were measured by PI or 7AAD assay as described in Material and Methods. Data represent the mean ± SD (n = 3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, compared with DCF.

C-11. DCF-AG 処置による CD14 陽性細胞傷害に対する MAPK 活性化の影響

最初の検討において、DCF-AG により MAPK 経路の活性化が認められたことから、各阻害剤を用いて、DCF-AG による CD14 陽性細胞に対する細胞傷害性における MAPK 経路の影響について II-2-4 および II-2-5 の方法に従い検討した(Fig. 15)。

DCF-AG 処置により認められた細胞生存率の低下は SB203580 併用により減弱が認められた。SP600125 および U0126 併用群においては DCF-AG と比較し有意な細胞生存率の変動は認められなかった (Fig. 15)。これらの結果より、DCF-AG による CD14 陽性細胞に対する細胞傷害の一因に、DCF-AG による p38 活性化が関与していることが示唆された。

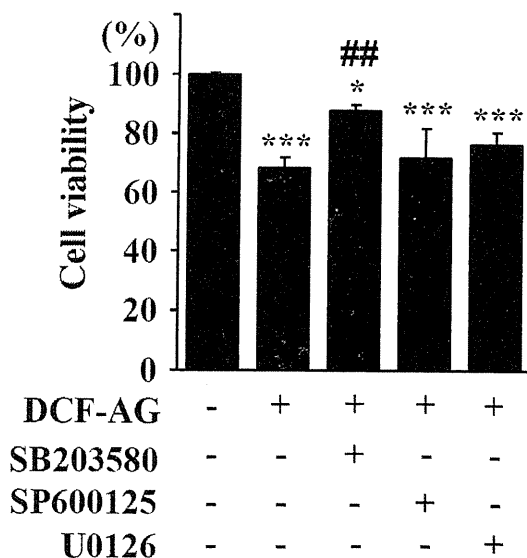


Fig. 15. Effects of inhibitors of MAPK on the CD14⁺ cell viability. Experimental conditions were same as those in Fig. 10. PBMC were collected 24 h after the treatment with DCF-AG. Cell viability of CD14⁺ cells were measured by 7AAD assay as described in Material and Methods. Data represent the mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, *** p < 0.001, compared with CTL. ## p < 0.01, compared with DCF-AG.

C-12. 他の薬物の AG の PBMC に対する影響

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 (Fig. 16)。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 (Fig. 16)。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。

D. 考察

近年、薬物性肝障害において、その発症や悪化に炎症性因子が関与することが明らかとなり、その原因の一つとして薬物の代謝的活性化による反応性代謝物が

関与することが示唆されている (Holt et al., 2006; Lohse et al., 2010; Adams et al., 2010)。また、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。AG は比較的反応性に富み、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 (Faed, 1984; Spahn-Langguth and Benet, 1992; Grillo et al., 2003)。In vitro において代謝的活性化による毒性を評価するため、さまざまな検討が報告されている。薬物の求電子性およびタンパク質への共有結合が肝障害との関連が示唆され (Zhou et al., 2005)、多くの製薬企業は、薬物代謝酵素の不可逆的阻害を利用した阻害アッセイ、GSH などの捕捉剤を用いたトラッピングアッセイおよび、放射性標識した薬物を用いた共有結合量測定などを段階的に実施することにより反応性代

謝物による毒性を評価している (Nassar et al., 2004; Evans et al., 2004; Kalgutkar et al., 2005)。共有結合性試験やトラッピング試験は、薬物の反応性の高さおよび安定性などを予測する際には有用であるが、実際に薬物により生じる毒性を予測するという観点からは不十分なものである。そのため反応性代謝物による毒性発症機序を解明し、メカニズムに基づく試験系を構築することが求められる。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評価し、そのメカニズムを解明することを目的として検討した。その結果、DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG により、IL-8、MCP-1 または IL-6 などの炎症性サイトカインの放出が促進され、DCF-AG による炎症性因子の発現増加には MAPK 経路活性化が重要な役割を有していることを示した。

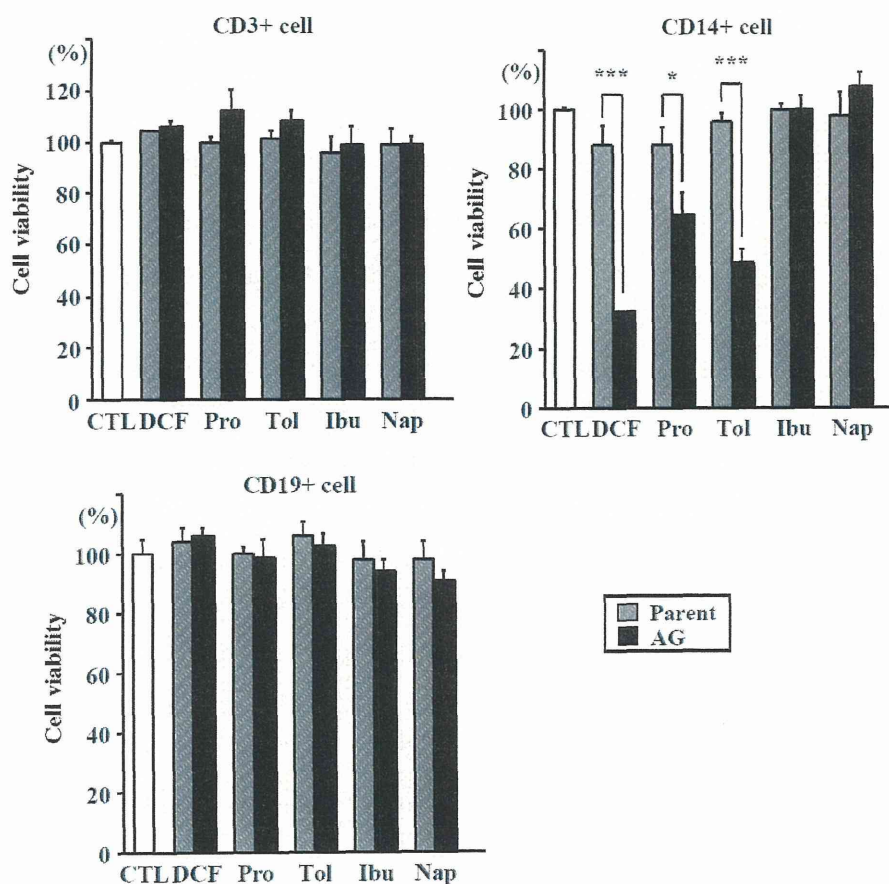


Fig. 16. Effects of drugs on cell viability of CD3⁺, CD14⁺ and CD19⁺ cells in PBMC. PBMC were treated with DCF, DCF-AG, Pro, Pro-AG, Tol, Tol-AG, Ibu, Ibu-AG, Nap or Nap-AG (100 μ M) or 1% methanol (CTL) for 24 h. Cell viability of CD3⁺, CD14⁺ and CD19⁺ cells were measured by PI or 7AAD assay as described in Material and Methods. Data represent the mean \pm SD (n = 3). **p* < 0.05, ****p* < 0.001, compared with parent drugs.

本研究では初めに Sawamura ら (2010) の報告を参考に、リン酸緩衝液中、血清アルブミン中および血漿中における半減期が短く、FDA により warning drug に分類されている DCF に着目し、DCF-AG を THP-1 細胞に処置することにより、細胞傷害性および炎症性因子の発現変動を解析した。当研究室で THP-1 細胞を用いた研究において、駆虫薬メベンダゾール、抗真菌薬テルビナフィンおよび抗不整脈薬アミオダロンの処置により炎症性サイトカインである TNF α 、ケモカインである IL-8 産生が増加したことを報告しており (Mizuno et al., 2011 and Endo et al 2012)、本検討においてもこれら炎症性因子を指標として検討を行った。DCF-AG 処置による THP-1 細胞の細胞生存率に対する影響は認められなかったが、DCF と比較し炎症性因子である IL-8 および TNF α mRNA の有意な増加が認められたことから、DCF-AG が炎症性因子の発現を誘導させることが示唆された (Fig. 2)。

薬物や化合物による炎症性の反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒト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ことから、本検討において、THP-1 細胞以外にヒト PBMC およびヒト total liver cells を用いて、DCF-AG に対する炎症性因子の発現変動を比較し評価した。また、TNF α および IL-8 以外に MCP-1、GM-CSF および IL-6 を炎症反応の指標とした。MCP-1 はクッパー細胞、好中球、単球および内皮細胞などから放出され、炎症部位への免疫細胞の浸潤に関与することが知られている (Oo and Adams, 2010)。GM-CSF はリンパ球、単球、内皮細胞および線維芽細胞な

どから放出されるサイトカインである (Metcalf et al., 1986.)。IL-6 は T リンパ球、B リンパ球、単球、線維芽細胞、内皮細胞などから産生される炎症性サイトカインである (Biswas et al., 1998)。DCF-AG 処置により THP-1 細胞において炎症性因子である TNF α 、IL-8 および MCP-1 の増加が、PBMC において IL-8、MCP-1、GM-CSF および IL-6 の mRNA 発現量の増加が認められた。また、DCF-AG による IL-8、MCP-1 mRNA の増加率は、THP-1 細胞と比較し PBMC において大きかった (Fig. 3)。ヒト単球系 THP-1 細胞と比較しヒト末梢血単核球 PBMC において、薬物処置による IL-8 および IL-6 の産生量が多いという報告や (Feng et al., 2008; Gong et al., 2010)、単球を単一培養した場合と比較し、単球とリンパ球を共培養した場合において、薬物処置による MCP-1 といった炎症性因子の産生増加が認められていることから (Song et al., 2009)、THP-1 細胞と比較し、PBMC において DCF-AG に対する反応性が高いことが考えられる。また、PBMC には lot 差が存在することが示されたが (Fig. 5)、反応性の高い lot (#48) を選択することで、DCF-AG による炎症性因子の発現誘導を高感度に評価できることが示唆された。Total liver cells においては DCF-AG 処置による炎症性因子の発現変動は認められなかった (Fig. 4)。Total liver cell 中において各細胞が占める割合はヘパトサイトが約 75% であり、免疫関連細胞であるクッパー細胞、単球リンパ球および顆粒球は約 8% であることから、炎症反応を惹起させるために必要な免疫細胞が少ないことが今回 total liver cells で DCF-AG 処置による炎症性因子の発現変

動が認められなかった原因のひとつとして考えられる。これらのことから PBMC (#48) を用いることで DCF-AG による炎症性因子の発現誘導をより高感度に評価できると考え、以降 PBMC (#48) を用いてより詳細な検討を行った。

DCF-AG 処置による炎症性因子の経時的な発現変動を解析した結果、GM-CSF および IL-6 は DCF-AG 処置後 3 時間と早い段階から増加が認められた (Fig. 6)。IL-6 は MCP-1 および IL-8 を誘導することが報告されており (Biswas et al., 1998)、本検討においても DCF-AG による IL-6 mRNA の発現は、IL-8 および MCP-1 mRNA 発現よりも早い時間で高値を示すことから、Biswas ら (1998) の報告と同様に IL-6 が IL-8 および MCP-1 の誘導を引き起こし、さらなる炎症反応を惹起させる可能性が考えられた (Fig. 6)。

DCF-AG 以外の AG においても炎症反応が惹起されるか評価した。本研究では AG を生成する薬物として Pro、Tol、Ibu および Nap を選択した。Pro、Ibu および Nap は anaphylaxis、Stevens-Johnson 症候群の副作用を、Tol は上記に加え肝障害等の重篤な副作用を理由に米国の FDA で warning drugs に分類されている薬物であり、AG の毒性発現に関与することが示唆されている (Sawamura et al., 2010)。これら AG を処置した際に、Pro-AG により MCP-1 mRNA が CTL と比較し約 3 倍、Tol-AG により IL-8 mRNA が CTL と比較し約 2 倍、IL-6 mRNA が CTL と比較し約 2 倍発現増加した (Fig. 7)。しかし、Ibu-AG および Nap-AG においては各炎症性因子の発現変動は認められなかったことから、全ての AG が炎症性因子の発現を誘導す

るわけではないことが示唆された。当研究室におけるマウスを用いた検討において Ibu が肝障害を惹起しないことが示唆されていることから (Yano et al., 2012)、Ibu-AG は細胞毒性が生じにくいことが考えられる。また、Ibu および Nap はイソプロピオン酸誘導体であるのに対し、DCF および Tol は酢酸誘導体である (Fig. 1)。AG の反応性はイソプロピオン酸誘導体と比較し酢酸誘導体において高い傾向があり、立体傷害に起因することが示唆されている (Wang et al., 2004)。また Pro は安息香酸誘導体であり、酢酸誘導体およびイソプロピオン酸誘導体と比較し安定であると考えられるが、パラ位に電子吸引性基であるスルホンアミド基があるために不安定であることが報告されている (Sawamura et al., 2010)。これらのことから PBMC を用いた際に、各 AG による炎症性因子の発現変動の程度が異なることは各 AG の安定性に起因する可能性が考えられる。本検討における炎症性因子の発現増加の程度においても DCF-AG、Tol-AG、Pro-AG の順であり、Sawamura ら (2010) が報告しているヒト血清アルブミン中における各 AG の半減期 DCF-AG (0.2 ± 0.0) (h)、Tol-AG (0.5 ± 0.0) (h)、Pro-AG (0.8 ± 0.0) (h) の結果を支持する結果が得られた。Ibu-AG および Nap-AG におけるヒト血清アルブミン中半減期は、Ibu-AG (1.3 ± 0.0) (h) および Nap-AG (1.0 ± 0.1) (h) であり、DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG と比較すると安定であることから本検討において炎症性因子の発現増加の認められなかった可能性が考えられる。しかしながら、Sawamura ら (2010) の報告ではリン酸緩衝液中における各 AG

の半減期が、特異体質性の薬物毒性との相関性が良いと考察している。リン酸緩衝液中の各 AG の半減期は、それぞれ DCF-AG (0.7 ± 0.0) (h)、Pro-AG (0.3 ± 0.0) (h)、Tol-AG (0.4 ± 0.0) (h)、Ibu-AG (2.7 ± 0.1) (h) および Nap-AG (2.2 ± 0.1) (h) であり、本検討において認められた DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG による炎症性因子の発現増加の程度とは異なる。Koga ら (2011) の報告において、細胞内で生成された AG のほとんどが細胞外に排出される、ということ を考慮すると、AG が細胞外から各細胞に対して影響を与えることも考えられるため、組織中だけではなく、血中等の細胞外の環境における AG の安定性も重要であると考えられる。以上より、AG の細胞毒性を評価する際には、細胞内および細胞外における安定性を考慮する必要があると考えられる。

本検討における評価では AG 処置濃度を *in vitro* 試験における最大処置濃度である、 $100 \mu\text{M}$ に統一し検討を行ったが、実際に *in vitro* で得られた結果を *in vivo* に外挿するためには臨床における 1 日投与量、血漿中および肝臓における AG の濃度などを考慮する必要がある。*In vivo* においても AG により炎症反応が惹起され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。

DCF は AG の他に CYP2C9 により 4'-OH DCF が、CYP3A4 により 5-OH DCF が生成することが報告されている (Boelsterli, 2003) (Fig. 12)。これらの代謝物はそれぞれキノニン体を生成することにより、タンパク質との共有結合の形成および酸化ストレスを引き起こすと考えられているが、炎症性の反応に対する

影響は不明である (Boelsterli, 2003; Tang et al., 1999)。DCF-AG とこれら代謝物が炎症性の反応に与える影響について検討したところ 4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置においても炎症性因子の発現増加が認められた (Fig. 9)。各代謝物による炎症性因子の発現増加は、DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF において異なることから、各代謝物により PBMC に対する反応性が異なることが考えられる。

MAPK 活性化は細胞増殖、様々な転写因子の活性化や、炎症性サイトカインの産生に関与する重要な調節機構のひとつである (Payne et al., 1991; Defranco et al., 1998)。本研究において、DCF-AG が MAPK 中の p38 および JNK 経路を活性化させることが示された。また、DCF-AG による IL-8、MCP-1、IL-6 の増加は、p38 MAPK 経路の阻害剤である SB203580 の前処置により抑制されたことから (Fig. 11)、DCF-AG 処置による炎症性因子の発現増加の多くに p38 経路が重要な役割を果たすことが示された。

ERK1/2 の活性化は DCF-AG 処置後 3 時間において認められなかったが、12 および 24 時間後において活性化が認められていることから (data not shown)、本検討において ERK1/2 阻害により MCP-1 の増加が抑制された可能性が考えられる (Figs. 6 and 11)。GM-CSF においては JNK1/2 経路および Akt 経路により制御されることが報告されている (Oltmanns et al., 2003; Montecucco et al., 2008)。本検討ではいずれの MAPK 経路阻害剤を用いた際にも DCF-AG による GM-CSF 発現増加の抑制は認められなかったことから、MAPK 経路以外の経路により制御されて