

いる可能性が考えられる。

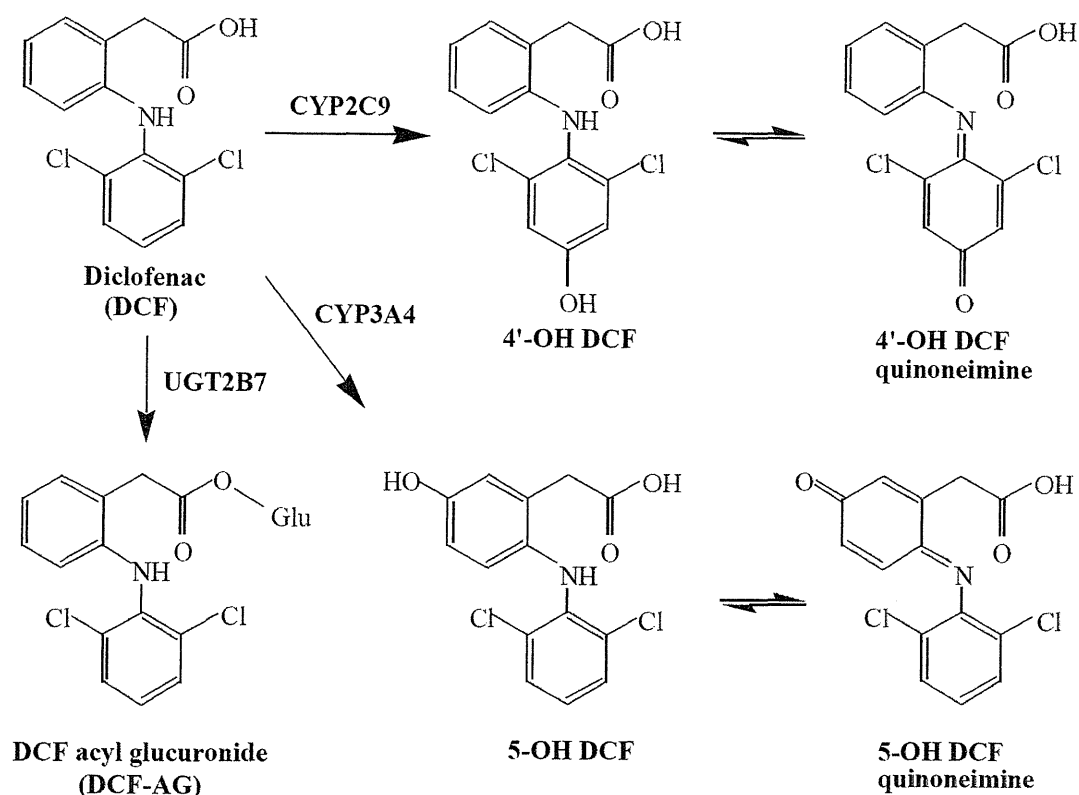


Fig. 17. Metabolic pathways of DCF.

本章では AG により生じる細胞障害性について、ヒト PBMC における炎症性因子を指標とした免疫学的視点から評価し、DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG において炎症反応が惹起されることを明らかにした。また、DCF-AG による生じる炎症反応には MAPK 経路のなかで、p38 経路が重要な働きを有することを明らかにした。次章では、AG が PBMC 中のいずれの細胞に対して影響を及ぼすかについてフローサイトメトリーにより評価した。

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。

ヒト PBMC を用いた検討により AG が炎症性因子の発現を増加させることを明らかにした。AG が PBMC 中のいずれの細胞に対して影響を及ぼすかについてフローサイトメトリーにより解析した。その結果、DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG が PBMC 中の CD14 陽性細胞にのみ細胞傷害性を示し、そのメカニズムに p38 経路が重要な役割を有することを示した。

初めに、炎症性因子の発現を強く誘導した DCF-AG を用いて、PBMC 中の 3 つの主要な細胞群 (CD3、CD14 および CD19 陽性細胞) に与える影響について解析した。DCF-AG 処置による CD3 および CD19

陽性細胞に対する影響は認められず、CD14 陽性細胞特異的に細胞傷害性が認められた。DCF-AG によって選択的に CD14 陽性細胞が傷害を受ける原因は不明であるが、Hougee ら (2005) は、フラボノイド骨格をもつアピゲニン、クリシンおよびルテオリンを PBMC に処置した際に CD14 陽性細胞特異的に細胞死が認められたことを報告していることから、薬物のもつ構造および CD14 陽性細胞のもつ細胞表面構造が毒性発現に重要であると考えられる。また、第 I 章でヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞を用いた検討において、DCF-AG を処置した際には、THP-1 に対する細胞傷害性は認められなかったことから、がん化した細胞と正常細胞で薬物に対する反応性が異なることが示唆された。炎症性因子の発現変動と同様に、DCF-AG による細胞傷害性に関して、PBMC 中の CD14 陽性細胞を指標として評価できる可能性が考えられる。

CD14 陽性細胞は測定した炎症性因子の主な産生細胞であることから (Oo and Adams, 2010; Metcalf et al., 1986; Biswas et al., 1998)、DCF-AG により CD14 陽性細胞が減少することは、炎症の減弱に繋がると考えられる。本検討において IL-8 および IL-6 は 12 時間でピークとなり 24 時間で減少していることから、Fig. 6 の結果は CD14 陽性細胞が減少した結果を反映している可能性が考えられる。しかし、MCP-1 および GM-CSF においては DCF-AG 処置後 24 時間においても発現の低下は認められなかったことから (Fig. 6)、PBMC に含まれる CD3 陽性細胞や CD19 陽性細胞との細胞間相互作用が影響している可能性が考えられるため、今

後メカニズム解明のためにさらなる検討が必要である。

DCF-AG による炎症性因子の発現誘導、および本検討における CD14 陽性細胞に対する傷害性はいずれも p38 活性化阻害剤である SB203580 により認められなくなったことから (Figs. 11 and 15)、炎症反応と細胞死が p38 経路により制御されていることが示唆された。アポトーシス誘導タンパクとして知られる Fas ligand により、カスパーゼ 1 を介して炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  が産生されるといった報告からも (Griffith et al., 1995; Miwa et al., 1998)、炎症および細胞死が本検討においても密接に関係していることが考えられる。また、*in vivo* において、血中を循環する単球 (CD14 陽性細胞) の寿命は 12 時間から 24 時間と短い、骨髄から常に産出され続けているため、単球の血中での増減は少ない (Hougee et al., 2005)。本検討において *in vitro* で認められた DCF-AG による CD14 陽性細胞に対する傷害を *in vivo* で再現するためには、さらなる研究が必要である。

DCF 以外の AG を処置した際にも、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、第 I 章を支持する結果が得られた。Ibu-AG および Nap-AG はいずれも CD14 陽性細胞に対する影響は認められなかった。DCF-AG による細胞毒性に p38 経路が関与することは示したが、他の AG における毒性メカニズムは異なることも考えられるため、第 I 章で述べた各薬物の安定性や、実際の臨床における 1 日最大投与量、血漿中および肝臓における AG の濃度などを考慮し、今後試験系

としての感度を高めていく必要があると  
考えられる。

以上本研究では、DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG が PBMC 中の CD14 陽性細胞にのみ細胞傷害性を示すことを明らかにし、DCF-AG による傷害に p38 経路が関与することを示した。

#### <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.
- Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota M, Polentarutti N, Mantovani A, Lazzarin A, Sozzani S, and Poli G (1998) Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood* **91**: 258-265.
- Boelsterli UA (2003) Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**: 307-322.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Defranco AL, Crowley MT, Finn A, Hubbleton J, and Weinstein SL (1998) The role of tyrosine kinases and map kinases in LPS-induced signaling. *Prog Clin Biol Res* **397**: 119-136.
- Endo S, Toyoda Y, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012) Stimulation of human monocytic THP-1 cells by metabolic activation of hepatotoxic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* **27**: 621-630.
- Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA, and Baillie TA (2004) Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem Res Toxicol* **17**: 3-16.
- Faed EM (1984) Properties of acyl glucuronides: implications for studies of the pharmacokinetics and metabolism of acidic drugs. *Drug Metab Rev* **15**: 1213-1249.
- Feng Y, Yang X, Liu Z, Liu Y, Su B, Ding Y, Qin L, Yang H, Zheng R, and Hu Z (2008) Continuous treatment with recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10-ESAT-6 protein activated human monocyte while deactivated LPS-stimulated macrophage. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 534-540.
- Gong JH, Nicholls EF, Elliott MR, Brown KL, Hokamp K, Roche FM, Cheung CY, Falsafi R, Brinkman FS, Bowdish DM, and Hancock RE (2010) G-protein-coupled receptor independent, immunomodulatory properties of chemokine CXCL9. *Cell Immunol* **261**: 105-113.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, and Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**: 1189-1192.
- Grillo MP, Knutson CG, Sanders PE, Waldon DJ, Hua F, and Ware JA (2003) Studies on the chemical reactivity of diclofenac acyl glucuronide with glutathione: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in rat bile. *Drug Metab Dispos* **31**: 1327-1336.
- Guengerich FP and McDonald JS (2007) Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem Res Toxicol* **20**: 344-369.
- Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012) Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* **130**: 4-16.
- Holt MP and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *The AAPS Journal* **8**: 48-54.
- Hougee S, Sanders A, Faber J, Graus YM, van den Berg WB, Garssen J, Smit HF, and Hoijer MA (2005) Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem Pharmacol* **69**: 241-248.

- Kalgutkar AS, Gardner I, Obach RS, Shaffer CL, Callegari E, Henne KR, Mutlib AE, Dalvie DK, Lee JS, Nakai Y, O'Donnell JP, Boer J, and Harriman SP (2005) A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr Drug Metab* **6**: 161-225.
- Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 489-499.
- 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 hepatocyte. *Drug Metab Dispos* **39**: 54-60.
- Knowles SR, Uetrecht J, and Shear NH (2000) Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* **356**: 1587-1591.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 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.
- Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, and Suda T (1998) Caspase 1-independent IL-1 $\beta$  release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med* **4**: 1287-1292.
- Mizuno K, Katoh M, Okumura H, Nakagawa N, Negishi T, Hashizume T, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **37**: 345-351.
- 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.
- Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, Mach F, Dallegrì F, and Ottonello L (2008) Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal* **20**: 557-568.
- Nassar AE and Lopez-Anaya A (2004) Strategies for dealing with reactive intermediates in drug discovery and development. *Curr Opin Drug Discov Devel* **7**: 126-136.
- Oketani M, Ido A, and Tsubouchi H (2011) Changing etiologies and outcomes of acute liver failure: A perspective from Japan. *J Gastroenterol Hepatol* **26**: 65-71.
- Oltmanns U, Issa R, Sukkar MB, John M, and Chung KF (2003) Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* **139**: 1228-1234.
- Oo YH and Adams DH (2010) The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J Autoimmun* **34**: 45-54.
- Park BK, Kitteringham NR, Powell H, and Pirmohamed M (2000) Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**: 39-60.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, and Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* **10**: 885-892.
- Picard N, Ratanasavanh D, Premaud A, Le Meur, and Marquet P (2005) Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* **33**: 139-146.
- Racanelli V and Rehermann B (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**: 54-62.
- 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 drug based on the chemical stability of acyl glucuronide. *Drug Metab Dispos* **38**: 1857-1864.
- Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schütz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F, and Oellerich M (1999) Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* **126**: 1075-1082.
- Song C, Hsu K, Yamen E, Yan W, Fock J, Witting PK, Geczy CL, and Freedman SB (2009) Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis* **207**: 374-383.
- Spahn-Langguth H and Benet LZ (1992) Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev* **24**: 5-47.
- Tang W, Stearns RA, Bandiera SM, Zhang Y, Raab C, Braun MP, Dean DC, Pang J, Leung KH, Doss GA, Strauss JR, Kwei GY, Rushmore TH, Chiu SH, and Baillie TA (1999) Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab Dispos* **27**: 365-372.
- Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Tukov FF, Maddox JF, Amacher DE, Bobrowski WF, Roth RA, and Ganey PE (2006) Modeling inflammation-drug interactions in vitro: a rat Kupffer cell-hepatocyte coculture system. *Toxicol In Vitro* **20**: 1488-1499.
- 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 J, Davis M, Li F, Azam F, Scatina J, and Talaat R (2004) A novel approach for predicting acyl glucuronide reactivity via Schiff base formation: development of rapidly formed peptide adducts for LC/MS/MS measurements. *Chem Res Toxicol* **17**: 1206-1216.
- 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.
- Yano A, Higuchi S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012) Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *Toxicology* **293**: 107-114.
- Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M, and Chen YZ (2005) Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab Rev* **37**: 41-213.
- F. 健康危険情報  
該当なし。
- G. 研究発表  
1. 論文発表  
該当なし。  
2. 学会発表  
Tsuyoshi Yokoi. Role of drug-metabolizing enzymes in drug-induced toxicity: influence of microRNA and immune-related factors. The 8<sup>th</sup> Congress of Toxicology in Developing Countries (8CTDC) September 10-13, 2012. Bangkok, Thailand.  
横井 毅. 特異体質性薬物性肝障害の前臨床基礎研究. シンポジウム「薬物性肝障害-最新知見を基に-」 第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17-19 日、仙台。
- H. 知的財産券の出願・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

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

分担研究者 深見達基 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

薬物性肝障害は医薬品開発や疾病治療において安全性上の重大な問題であるが、未だ発症機序には不明の部分が多く、肝毒性を確実に予測する試験系は現在のところ構築されていない。アセトアミノフェン誘導性急性肝障害モデルを中心として発症メカニズムの解析がなされているが、全体的な薬物性肝障害の発症機序を捉えるためには、肝障害性を有する種々の薬物を用いて比較検討することが肝要である。また、薬物性肝障害の発症メカニズムを把握して、そのメカニズムに基づいた毒性試験系を構築することができれば、高感度に毒性予測を行うことが可能であると考えられる。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。

第一に、ジクロフェナク誘導性肝障害のモデルマウスを作製し、発症メカニズム解析を行った。その結果、ジクロフェナク誘導性肝障害において様々な炎症性因子が肝臓において発現変動することを示した。その中でも肝障害の非常に早い段階において発現上昇が認められた IL-1b が肝障害の発症に寄与することを示した。これらの結果から、これまで当研究室で着目してきた Th 細胞関連因子に加えて、肝障害の発症初期に着目することが重要であると考えられた。

第二に、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、RAGE および 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 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示した。

#### A. 研究目的

薬物性肝障害 (drug-induced liver injury) は、医薬品開発や薬物治療における安全性上の重大な問題の一つである。米国では医薬品が市場撤退した原因の 21% が肝毒性に起因していると報告されており (Wilke et al., 2007)、我が国においても、1990 年から 2004 年の間に 12 種類の医薬品が肝毒性を惹起したために市場から撤退している (津谷, 1997)。医薬品開発における前臨床試験の動物実験は、候補化合物のヒトにおける有効性、安全性を予測し、臨床試験の安全性の確保や上市できない可能性のある化合物の開発を早期に中止するために不可欠とされている。しかし、実験動物とヒトとの種差や、ヒトにおける個体差が大きく、さらにはほとんどの場合に毒性発現機序が明らかでないため、ヒトにおける薬物性肝障害の発症を予測することは極めて困難である。

一般に多くの薬物はシトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素により代謝され、生体から排泄されるが、この課程の中で反応性代謝物が生成する場合がある。通常、この反応性代謝物はグルタチオン抱合を受けて解毒されるが、グルタチオ

ン枯渇時には、反応性代謝物がタンパク質や DNA などの生体内高分子と共有結合を形成することにより、ミトコンドリア機能障害および酸化ストレスなどを引き起こし、細胞毒性を発現することが知られている (Holt and Ju, 2006; Park et al., 2005)。現在までに、薬物の細胞毒性に関して、毒性発現機序に関する多くの研究がなされており、ラットまたはヒト初代培養肝細胞や肝癌由来細胞株を用いて、被験薬処置後の細胞生存率を調べることで、肝細胞障害性を評価することが可能である (Rachek et al., 2009; Hosomi et al., 2010)。一方で、細胞毒性だけでは薬物の肝毒性を十分に説明することが出来ない場合も多い。臨床報告により薬物性肝障害を発症した患者では、アレルギー症状や肝組織へのリンパ球や顆粒球の浸潤が認められており、免疫系の関与が強く疑われている。免疫を介した薬物性肝障害の発症メカニズムに関する報告数は多くないが、肝障害全体を考慮する場合には、免疫毒性に関する情報も把握し議論していく必要があると考えられる。

肝臓内には T 細胞、natural killer (NK) 細胞および NK cells with T cell receptor



(NKT) 細胞などのリンパ球や、クッパー細胞および類洞内皮細胞などの肝非実質細胞が豊富に存在しており、サイトカインを介した細胞間のネットワークを形成することにより免疫反応を制御している (Racanelli and Rehermann, 2006)。近年、こ

れら免疫システムの異常が薬物性肝障害の発症や悪化をもたらすことが示唆されている。肝細胞がストレスや損傷を受けると、クッパー細胞やNK細胞およびNKT細胞などの免疫細胞を活性化する

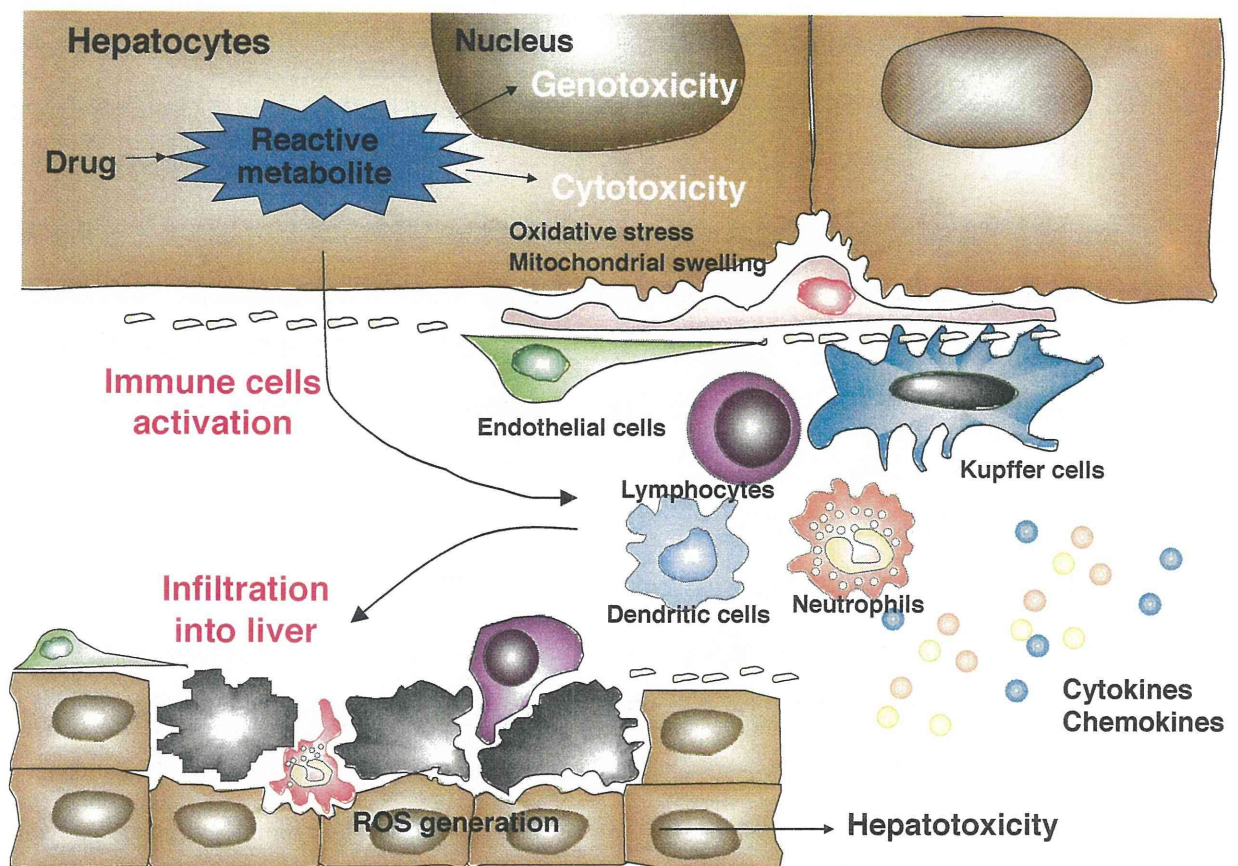


Fig. 1. Proposed mechanisms of the pathogenesis of drug-induced liver injury.

damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) と総称される様々なシグナルが放出される。DAMPs のシグナルは自然免疫および獲得免疫を含めた免疫応答の引き金になると考えられており、

免疫細胞からの tumor necrosis factor (TNF)-a、interleukin (IL)-1b、interferon (IFN)-g および macrophage inflammatory protein (MIP)-2 などの炎症性サイトカインやケモカインを放出し、さらなる免疫

活性化および好中球やリンパ球などの肝臓への浸潤を促進し、肝障害悪化に寄与する (Park et al., 2005; Holt and Ju, 2006; Kaplowitz, 2005)。加えて、これまでに当研究室において、フルタミドやカルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウスを作製し、IL-4 や IL-17 などの免疫系の因子が肝障害の発症に重要であることを示してきた (Higuchi et al., 2012a; and., 2012b)。しかし、明らかにされた様々なメカニズムが、多くの他の薬物性肝障害の発症メカニズムを説明することが出来るかは不明である。

本研究では、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試験系を開発することを目的とした。薬物誘導性肝障害における免疫学的因子の関与については、代表的なアセトアミノフェンを含め、数種類の薬物に関して検討がなされている (Liu et al., 2004; and., 2006)。しかし、600 以上の医薬品が肝障害と関連があると言われていたことを考慮すると、未だ薬物の数は少なく、種々の薬物性肝障害の全てのメカニズムと臨床所見を包括するには、情報量が不十分である。種々の薬物誘導性肝障害に適する動物モデルを作製し、そのメカニズムを解析することは前臨床段階の創薬において急務であ

ると考えられる。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。

## B. 研究方法

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。

Table 1. Sequences of primers for real-time RT-PCR analyses.

Target	Primer	Sequence
FasL	F (5'-3')	AGA AGG AAC TGG CAG AAC TC
	R (5'-3')	GCG GTT CCA TAT GTG TCT TC
GATA-3	F (5'-3')	GGA GGA CTT CCC CAA GAG CA
	R (5'-3')	CAT GCT GGA AGG GTG GTG A
IFN-g	F (5'-3')	GGC CAT CAG CAA CAT AAG C
	R (5'-3')	TGG ACC ACT CGG ATG AGC TCA
IL-1b	F (5'-3')	GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT
	R (5'-3')	CAC ACA CCA GCA GGT TAT CA
MIP-2	F (5'-3')	AAG TTT GCC TTG ACC CTG AAG
	R (5'-3')	ATC AGG TAC GAT CCA GGC TTC
MCP-1	F (5'-3')	TGT CAT GCT TCT GGG CCT G
	R (5'-3')	CCT CTC TCT TGA GCT TGG TG
STAT1	F (5'-3')	GTT TCA GCT CTG CTC CAT AC
	R (5'-3')	CTG CTG AAG CTC GAA CCA C
STAT3	F (5'-3')	TGC AGA GCA GGT ATC TTG AG
	R (5'-3')	TGC TGC TTC TCT GTC ACT AC
STAT6	F (5'-3')	ATC TTC AAC GAC AAC AGC CTC A
	R (5'-3')	GGA GAA GGC TAG TGA CAT ATT G
T-bet	F (5'-3')	CAA GTG GGT GCA GTG TGG AAA G
	R (5'-3')	TGG AGA GAC TGC AGG ACG ATC
ROR-gt	F (5'-3')	ACC TCC ACT GCC AGC TGT GTG CTG TC
	R (5'-3')	TCA TTT CTG CAC TTC TGC ATG TAG ACT GTC CC
Gapdh	F (5'-3')	AAA TGG GGT GAG GCC GGT
	R (5'-3')	ATT GCT GAC AAT CTT GAG TGA

F: Forward, R; Reverse

Target		Sequence
CXCL1	F (5'-3')	GAT5TCACCTCAAGAACATCCAGAG
	R (5'-3')	GAAGCCAGCGTTCACCAGAC
Granzyme B	F (5'-3')	TCGAGAGGACTTTGTGCTG
	R (5'-3')	CCTCTTGGCCTTACTCTTC
HMGB1	F (5'-3')	GGAGATCCTAAAAAGCCGAG
	R (5'-3')	ATAACGAGCCTTGTTCAGCCT
HSP70	F (5'-3')	GGAGTTCAAGAGGAAGCACA
	R (5'-3')	TGGATGTGTAGAAAGTCGATG
IL-12p35	F (5'-3')	TGCTGAAGACCACAGATGAC
	R (5'-3')	GAAGTCTCTCTAGTAGCCAG
NALP3	F (5'-3')	AGCCTTCCAGGATCCTCTTC
	R (5'-3')	CTTGGGCAGCAGTTTCTTTC
Perforin	F (5'-3')	ACAGTAGAGTGTTCGCATG
	R (5'-3')	ACAGCCGTGATAAAGTGC
RAGE	F (5'-3')	GAAACTTCTGATTCCCGATGG
	R (5'-3')	GCTCAACCAACAGCTGAATG
S100A8	F (5'-3')	GAGTGTCTCAGTTTGTGCAG
	R (5'-3')	TAGACATATCCAGGGACCCAG
S100A9	F (5'-3')	GATGGCCAACAAAGCACCTT
	R (5'-3')	CCTCAAAGCTCAGCTGATTG
TIM1	F (5'-3')	AGATTCCCACACGTCCTCCAA
	R (5'-3')	TGTCACCTCAGCTGTTGTCTC
TIM2	F (5'-3')	TACAAACCAGAGGCCACTAC
	R (5'-3')	AGATGCCAACATAGAAGCCC
TIM3	F (5'-3')	TTACCCTCAACTGTGTCCTG
	R (5'-3')	CATCAGTTCTGAGCAACTCG
TIM4	F (5'-3')	AAGGTCCAGTTTGGTGAAGTG
	R (5'-3')	GTCATGACTGTTGTTGGAAGC
TLR4	F (5'-3')	TTCTTCTCCTGCCTGACACC
	R (5'-3')	CCATGCCATGCCTTGTCTTC
VCAM1	F (5'-3')	AGCCTCAACGGTACTTTGGA
	R (5'-3')	GCGTTTAGTGGGCTGTCTAT

F: Forward, R; Reverse

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。ヘパラ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。96 well plateにcoating bufferに溶かしたcapture antibodyを1 wellあたり100 μL加え、4°Cで18時間静置した。Wash bufferでwellを5回洗浄しwellの水分を除き、1 x Assay Diluentを1 wellあたり200 μL加え、25°Cで1時間静置した。Wash bufferでwellを1回洗浄しwellの水分を除き、1 x Assay Diluentで2倍希釈した血漿および1 x Assay Diluentを用いて段階希釈を行った recombinant mouse IL-17 またはIL-1bを1 wellあたり100 μL加え、25°Cで2時間静置した。Wash bufferでwellを5回洗浄しwellの水分を除き、1 x Assay Diluentに溶かしたdetection antibodyを1 wellあたり100 μL加え、25°Cで1時間静置した。Wash bufferでwellを5回洗浄しwellの水分を除き、1 x Assay Diluentに溶かしたAvidin - HRPを1 wellあたり100 μL加え、25°Cで30分間静置した。Wash bufferでwellを7回洗浄しwellの水分を

除き、1 x 3, 3',5,5',-tetramethylbenzidine (TMB) solutionを1 wellあたり100 μL加え、25°Cで15分間インキュベートし、1 Mリン酸を1 wellあたり50 μL加え反応を停止させた。450 nmの吸光度をBiotrak II plate reader (GE Healthcare) 測定することにより定量した。

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。

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. 実験結果

### C-1. ジクロフェナク投与マウスの血漿生化学値

Balb/cマウスに対するジクロフェナクおよびイブプロフェン投与による血漿生化学値の影響を検討した。薬物投与はI-2-2およびI-2-3に記載した方法によった。ジクロフェナクを80および120 mg/kgで投与した群の24時間後の血漿中ALT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 (Fig. 2A)。投与量50

mg/kg の群では上昇傾向が認められた。また、イブプロフェン投与群では、120 mg/kg 投与においても血漿中 ALT 値および AST 値に変化は認められなかった (Fig. 2A)。この結果から、以降の検討ではジクロフェナクの投与量を 80 mg/kg とした。次に、ジクロフェナク投与マウスの ALT および AST 値の時間推移を検討した。その結果、ジクロフェナク投与後 12 および 24 時間において、対照群と比較して血漿中 ALT および AST 値の有意な増加が認められ、24 時間で最も高値を示した (Fig. 2B)。ジクロフェナク投与による肝障害の程度と肝組織への好中球の浸潤について検討するため、H&E 染色および抗 MPO 抗体を用いた免疫染色によって投与 24 時間後の肝組織像の評価を行った。その結果、ジクロフェナクを投与したマウスでは、肝組織におけるアポトーシスおよびネクローシス細胞が認められた。また、肝実質細胞に多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められた (Fig. 2C)。

#### C-2. ジクロフェナク投与マウスの肝臓における炎症および免疫に関連する遺伝子の mRNA の変動解析

ジクロフェナク投与後 0、1、3、6、12 および 24 時間のマウスの肝臓における炎

症および免疫に関連遺伝子の mRNA 発現変動を、検討した。各サンプルについて FasL、GATA-3、IFN-g、IL-1b、MCP-1、MIP-2、ROR-gt、STAT1、STAT3、STAT6、T-bet、TNFa および Gapdh の mRNA 発現量を測定し、Gapdh mRNA 発現量を補正に用いて、それぞれのサンプルの比の平均値に標準偏差を付した結果を示した。Fig. 3 と Fig. 4 にはそれぞれ、Th 細胞の分化に関与する転写因子 (T-bet、ROR-gt、GATA-3、STAT1、STAT3、STAT6) と、炎症性メディエーター (IL-1b、TNFa、IFN-g、MIP-2、MCP-1、FasL) の測定結果を示した。T-bet はジクロフェナク投与後 1、3、6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な減少が認められた。ROR-gt は対照群と比較して、ジクロフェナク投与 12 および 24 時間で有意な増加が認められた。GATA-3 はジクロフェナク投与後のいずれの時間においても対照群と比較して変化は認められなかった。STAT1 はジクロフェナク投与後 24 時間において対照群と比較して有意な減少が認められた。STAT3 はジクロフェナク投与後 12 および 24 時間において対照群と比較して有意な増加が認められ、12 時間で最も高値を示した。STAT6 はいずれの時間においても対照群と比較して

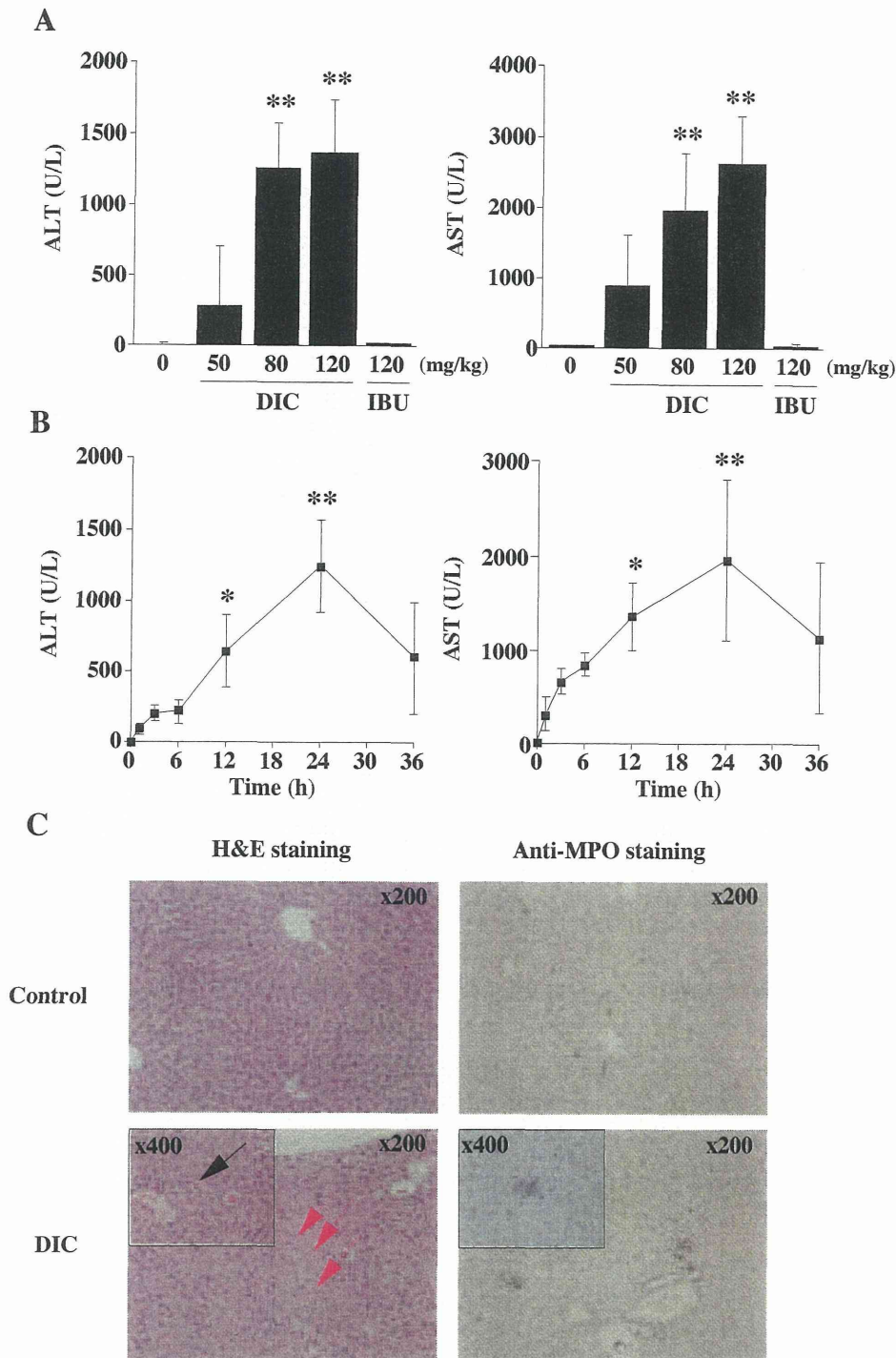


Fig. 2. Dose- and time-dependent changes of plasma ALT and AST and histopathological examination in the liver of diclofenac-administered mice. (A) Diclofenac (DIC: 50, 80 or 120 mg/kg in corn oil, *i.p.*) or ibuprofen (IBU: 120 mg/kg in corn oil, *i.p.*) were administered to mice, and plasma samples were collected for the assessment of ALT and AST 24 h after the administration. (B) Diclofenac (80 mg/kg, *i.p.*) was administered to mice and plasma samples were collected 1, 3, 6, 12, 24 and 36 h after the administration. Data are mean  $\pm$  SD (n = 4 to 5). Significantly different from vehicle-administered control mice (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01). (C) Histopathological examination of the livers from diclofenac-administered mice. Liver specimens were examined 24 h after the diclofenac administration (80 mg/kg). The liver sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody. Black arrow indicates apoptotic cells and red arrows indicate necrotic cells. (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01).

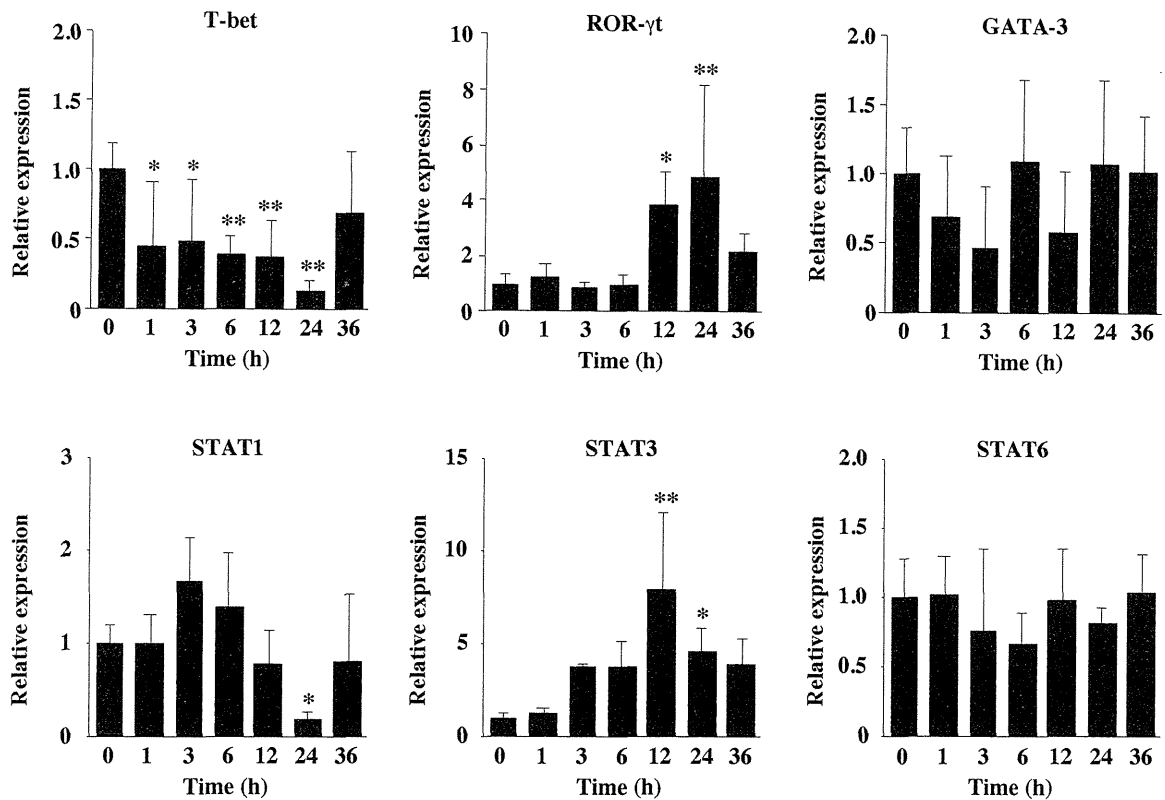


Fig. 3. Time-dependent changes in hepatic mRNA expression of CD4<sup>+</sup> Th cells-related transcriptional factors in diclofenac-administered mice. Diclofenac (80 mg/kg, *i.p.*) was administered to mice. After 1, 3, 6, 12, 24, and 36 h, the expressions of T-bet, ROR-gt, GATA-3, STAT1, STAT3, and STAT6 mRNA in the liver were measured by real time RT-PCR. The expression of hepatic mRNA was normalized to the expression of Gapdh mRNA. Data are mean  $\pm$  SD (n = 4 to 5). Significantly different from control (0 h) mice (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

変化は認められなかった。IL-1b はジクロフェナク投与後 3、6 および 12 時間において対照群と比較して有意な増加が認められ、3 時間で最も高値を示し、その後は減少傾向を示した。TNF $\alpha$  はジクロフェナク投与後 24 時間において対照群と比較して有意な増加が認められた。IFN-g はジクロフェナク投与後 24 時間において対照群と比較して有意な減少が認められた。

MIP-2 はジクロフェナク投与後 12 および 24 時間において対照群と比較して有意な増加が認められ、投与時間依存的な増加を示した。MCP-1 はジクロフェナク投与後 24 時間において有意な増加が認められ、投与時間依存的な増加を示した。FasL はジクロフェナク投与後 6 および 12 時間において対照群と比較して有意な増加が認められ、12 時間で最も高値を示した。



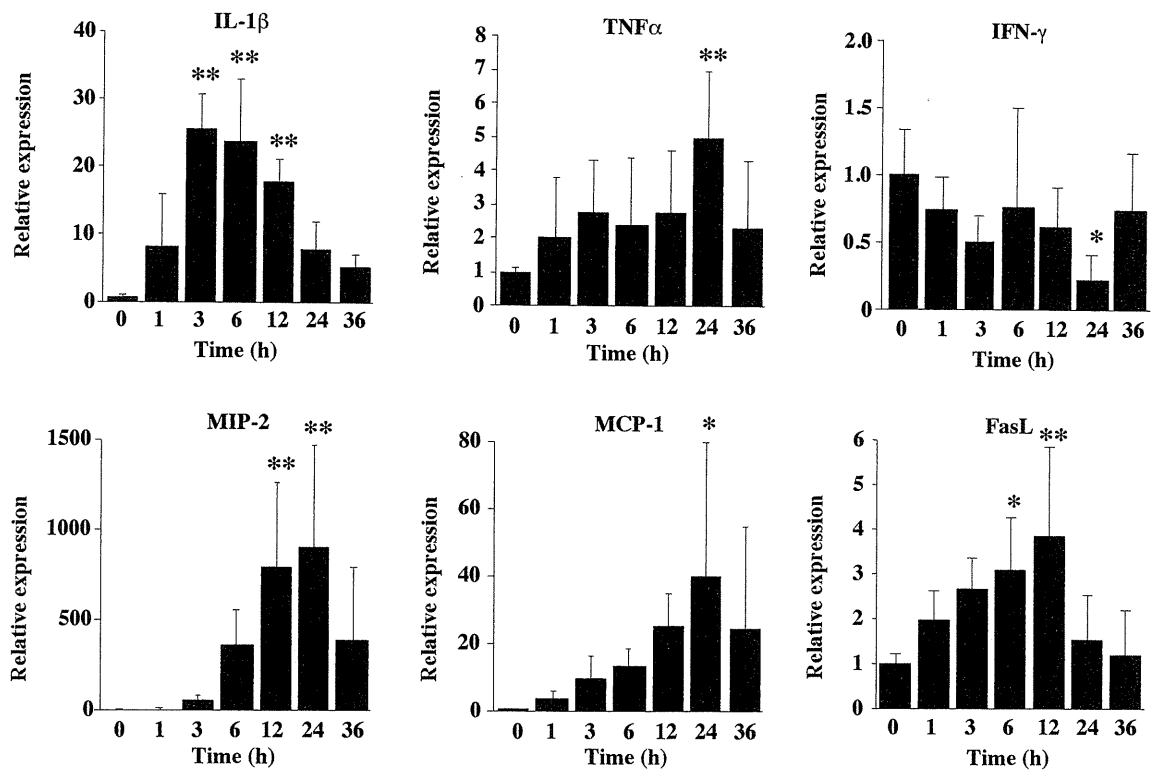


Fig. 4. Time-dependent changes in hepatic mRNA expression levels of cytokines and chemokines in diclofenac-administered mice. Diclofenac (80 mg/kg, *i.p.*) were administered to mice. After 1, 3, 6, 12, 24, and 36 h, the hepatic expressions of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF- $\gamma$ , MIP-2, MCP-1, and FasL mRNA in the liver were measured by real-time RT-PCR. The expression of hepatic mRNA was normalized to the expression of Gapdh mRNA. Data are mean  $\pm$  SD (n = 4 to 5). Significantly different from control (0 h) mice (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01).

### C-3. ジクロフェナク誘導性肝障害におけるIL-17の関与

C-2の結果より、Th17細胞系の因子がジクロフェナク誘導性肝障害に関与する可能性が示唆された。Th17系のサイトカインであるIL-17は多くの自己免疫疾患に関与することが知られている (Weaver et al., 2007)。肝臓中のIL-17 mRNAは検出不可能であったため、血漿中IL-17タンパ

ク量を定量することとした。その結果、対照群と比較してジクロフェナク投与24時間後に血漿中IL-17の有意な増加が認められ、36時間以外の時間においては検出限界以下であった (Fig. 5A)。次に、ジクロフェナク投与により誘導されたIL-17が肝障害に関与するか検討するために、monoclonal anti-IL-17抗体とジクロフェナクを併用投与する実験を行った。

その結果、ジクロフェナク単独投与群と比較してIgG2a アイソタイプコントロールを併用投与した群ではALT値に変化は認められなかった。ジクロフェナクとIgG2a アイソタイプコントロールを併用投与した群と比較して、monoclonal anti-IL-17 抗体併用投与群においてALT値の減少傾向が認められたが、有意ではなかった (Fig. 5B)。また、monoclonal anti-IL-17 抗体投与によりマウスのIL-17

が中和されているか確認するために、ジクロフェナクとIgG2aまたはIL-17を併用投与したマウスの血漿中IL-17を測定した。その結果、IgG2a投与群と比較してmonoclonal anti-IL-17抗体投与により血漿中IL-17は有意に低い値を示した (Fig. 5C)。以上の結果より、ジクロフェナク誘導性肝障害の発症においてIL-17の寄与は小さいことが示唆された。

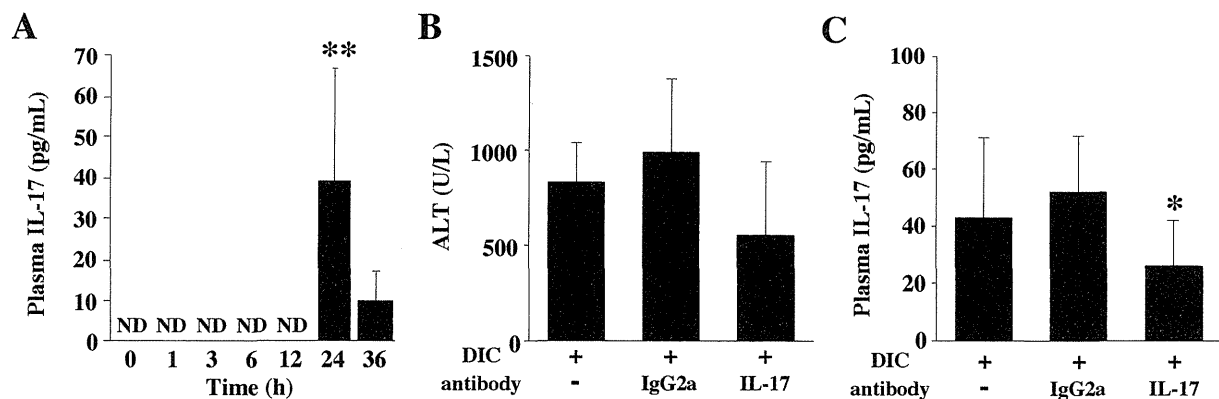


Fig. 5. Time-dependent changes of the plasma IL-17 level and effect of anti-IL-17 antibody administration to diclofenac-administered mice. (A) The plasma IL-17 level was measured by ELISA 1, 3, 6, 12, 24, and 36 h after diclofenac administration (80 mg/kg, *i.p.*). Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 4$  to  $5$ ). (B) Six hours after diclofenac (DIC) administration (80 mg/kg, *i.p.*), IgG2a (control) or anti-mouse IL-17 antibody (0.1 mg/mouse, *i.v.*) was administered. The plasma ALT level was measured 24 h after diclofenac administration. Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 8$  to  $10$ ). (C) The plasma IL-17 level after administered of anti-mouse IL-17 specific antibody or IgG2a was measured by ELISA 24 h after diclofenac administration (80 mg/kg, *i.p.*). Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 8$  to  $10$ ). Significantly different from control (0 h) mice ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ).

C-4. ジクロフェナク誘導性肝障害におけるIL-1bの関与

IL-1bは代表的な炎症性サイトカインであり、種々の免疫疾患に関与すること

が知られている (Kapoor et al., 2011)。近年では、IL-1b の下流因子として IL-17 が存在することが報告された (Coccia et al., 2012)。I-3-2 の検討により、IL-1b mRNA 発現量がジクロフェナク投与後 1 時間で

上昇が認められたことに着目し、詳細な検討を行った。はじめに、ジクロフェナク投与後の血漿中 IL-1b の量の時間推移を ELISA にて測定した。

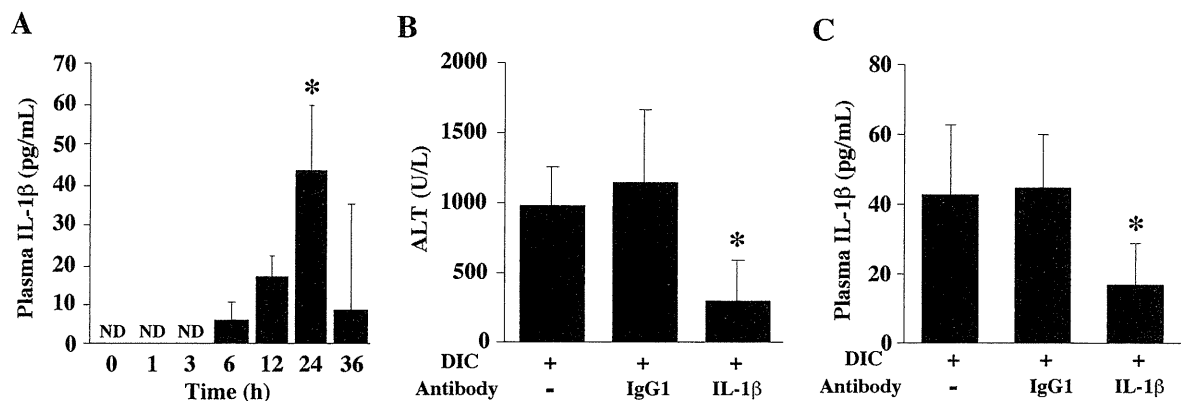


Fig. 6. Time-dependent change of plasma IL-1b level and effect of anti-IL-1b antibody administration to diclofenac-administered mice. (A) The plasma IL-1b level was measured by ELISA 1, 3, 6, 12, 24, and 36 h after diclofenac (80 mg/kg, *i.p.*) administration. (B) One hour before the diclofenac (80 mg/kg, *i.p.*) administration, IgG1 (control) or anti-mouse IL-1b antibody (0.1 mg/mouse, *i.p.*) was administered. The plasma ALT level was measured 24 h after the diclofenac administration. (C) The plasma IL-1b level after administered anti-mouse IL-1b specific antibody or IgG1 was measured by ELISA 24 h after diclofenac administration (80 mg/kg, *i.p.*). Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 4$  to 5). Significantly different from control mice (A) or IgG1-administered mice (B and C) (\* $P < 0.05$ ). ND: not detected.

その結果、対照群と比較してジクロフェナク投与後の血漿中 IL-1b 値は 6 時間後から上昇し、24 時間後に有意な上昇が認められ、最も高値を示した (Fig. 6A)。次いで、ジクロフェナク誘導性肝障害に IL-1b が関与するか検討するために、monoclonal anti-IL-1b 抗体とジクロフェナクを併用投

与する実験を行った。投与法は I-2-10 に記載した方法によった。その結果、ジクロフェナク単独投与群と比較して IgG1 アイソタイプコントロールを併用投与した群では ALT 値に変化は認められなかった。ジクロフェナクと IgG1 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-IL-1b 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 (Fig. 6B)。また、monoclonal anti-IL-1b 抗体投与によりマウスの IL-1b が中和されているか検討するために、ジクロフェナクと IgG1 または monoclonal anti-IL-1b を併用投与したマウスの血漿中 IL-1b を測定した。その結果、IgG1 投与群と比較して monoclonal anti-IL-1b 抗体投与により血漿中 IL-1b は有意に低い値を示し、中和抗体の作用を確認できた (Fig. 6C)。以上の結果より、ジクロフェナク誘導性肝障害の発症において IL-1b が重要であることが示唆された。

C-5. 薬物性肝障害モデルマウス作製および薬物投与マウスの血漿試料の生化学値

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 (Fig. 7)。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。

C-6. 網羅的な肝 mRNA の経時的発現変動解析

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。測定した因子を Table 4 に示す。

Table 4 に示した因子うち、10 種類の遺伝子の発現変動解析結果を Fig. 8 に示した。各サンプルについて S100A8、S100A9、RAGE、TLR4、IL-1b、TNF $\alpha$ 、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て、それぞれのサンプルの比の平均値を示した。また、発現変動が 10 倍以上である場合は赤色で示し、0.1 倍である場合は緑色で示した。