

Fig. 7. Plasma ALT or AST levels in mouse models of hepatotoxicity induced by the administration of hepatotoxic compounds (APAP: 300 mg/kg, *i.p.*, HAL: 30 mmol/kg, *i.p.*, DIC: 150 mg/kg, *i.p.*, FLU: 1500 mg/kg, *p.o.*, DIX: 600 mg/kg, *i.p.*) or control compounds (ISO: 30 mmol/kg, *i.p.*, IBU: 150 mg/kg, *i.p.*, BIC: 1500 mg/kg, *p.o.*, AMP: 1000 mg/kg, *i.p.*). Each drug was administered to mice and plasma samples were collected for the assessment of ALT and AST 1, 3, 6, and 24 h after the administration. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 5). Significantly different from control (0 h) mice (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01).

Table 4. Inflammatory-related factors measured in this study.

Type	Factors
Th cells-related factors	GATA3, ROR $\gamma$ t, T-bet, STAT1, STAT3, STAT6
Cytokines	IFN-g, IL-1b, IL-6, IL-12, TNFa
Chemokines	CXCL1, MCP-1, MIP-2, VCAM1
DAMPs	HMGB1, HSP70, S100A8, S100A9
Receptors	NALP3, RAGE, TLR4
CD8 positive cells-related factors	FasL, Granzyme B, Perforin
TIM family	TIM1, TIM2, TIM3, TIM4

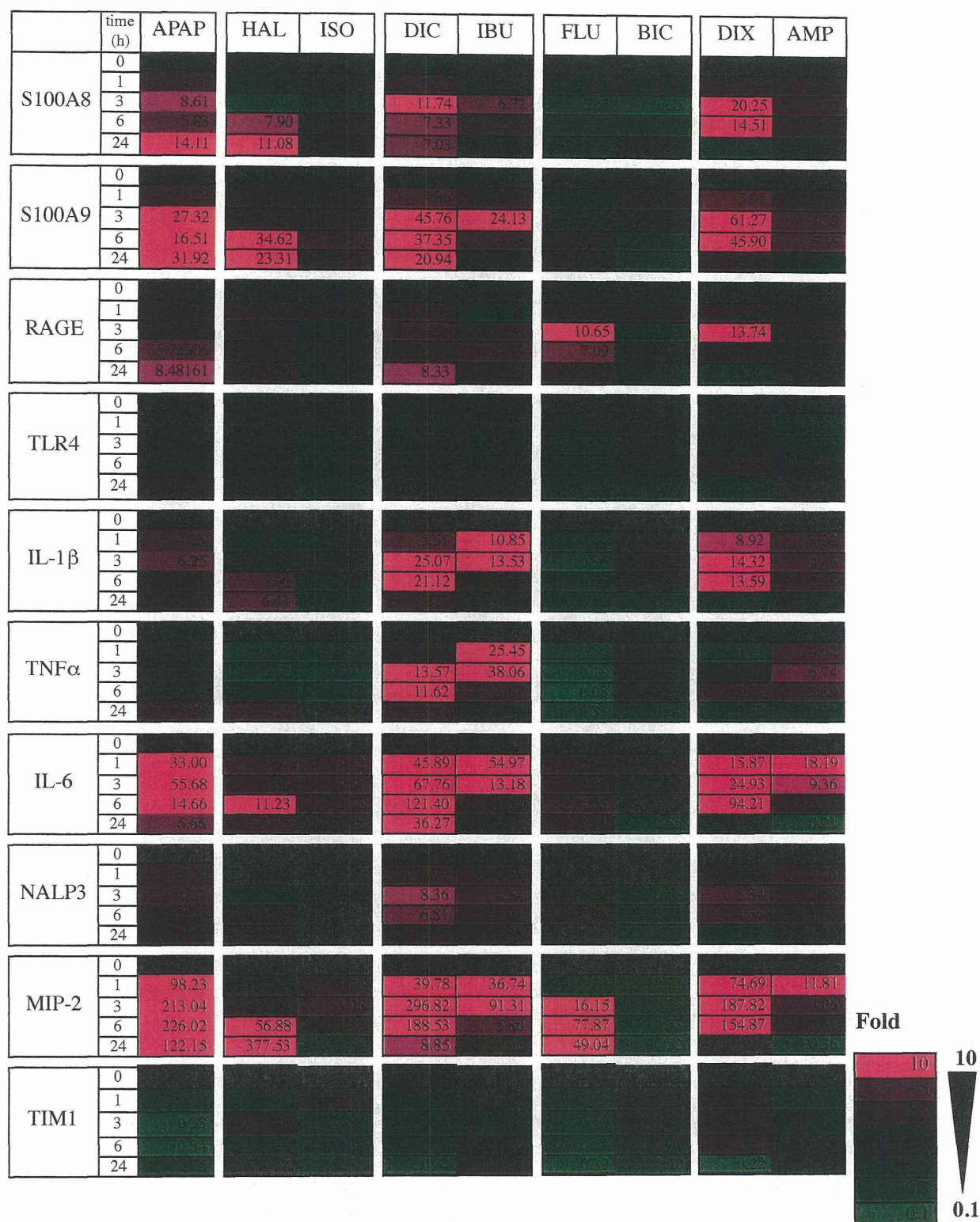


Fig. 8. Changes of mRNA expression profiles of inflammation-related factors in mouse models of drug-induced liver injury. Each drug was administered to mice. After 1, 3, 6, and 24 h, the expressions of S100A8, S100A9, RAGE, TLR4, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, NALP3, MIP-2 and TIM1 mRNA in the mouse liver were measured by real-time RT-PCR. The expression of hepatic mRNA was normalized to the expression of Gapdh mRNA. Data are mean from 5 independent experiments.

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。TNFa 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

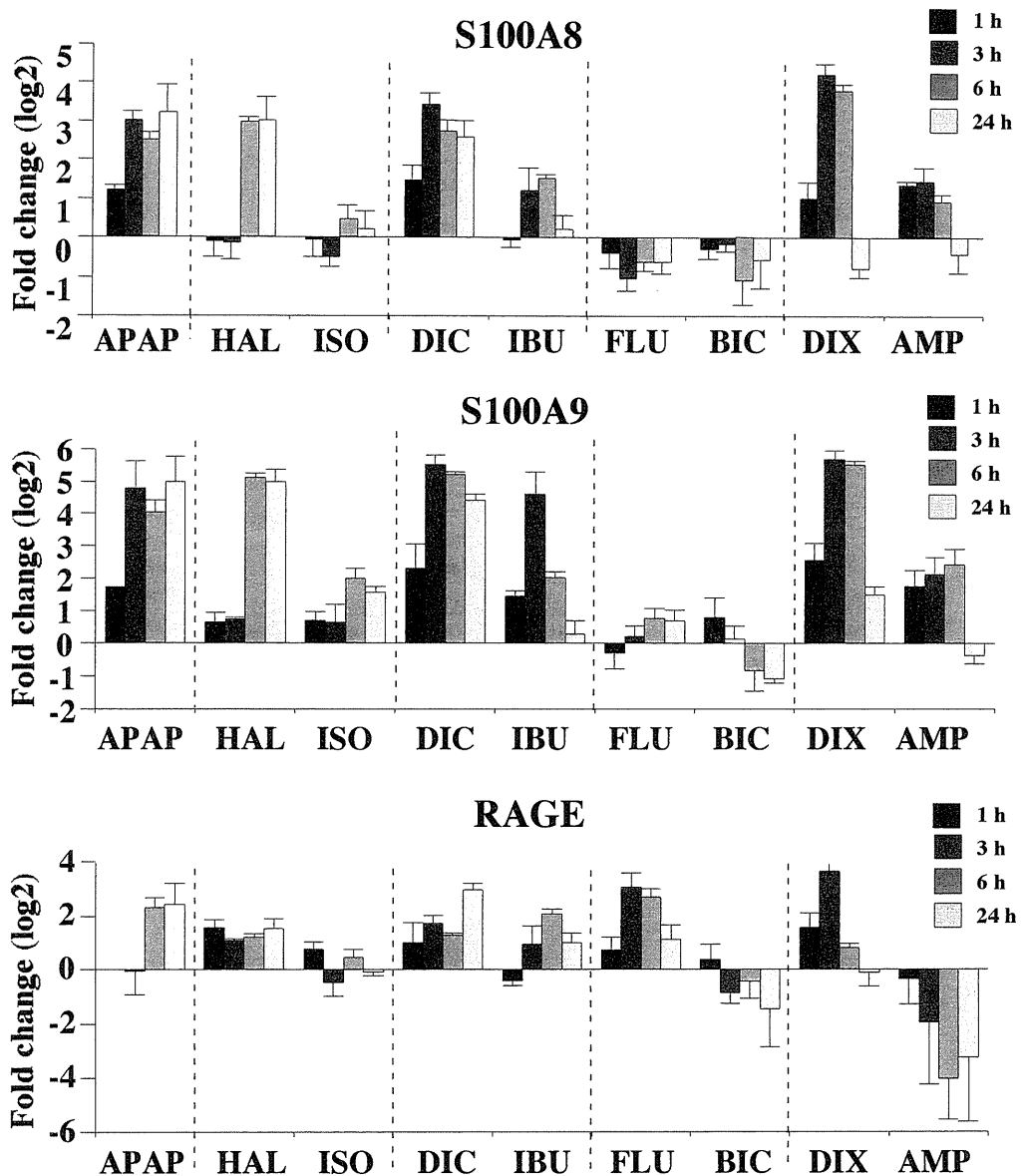
では 50 倍以上の増加を示した。TIM1 はいずれの薬物を投与しても mRNA 発現変動はほぼ 1 倍であった。Fig. 8 に記載されていない因子は、1) 肝障害性薬物において発現量の増加が認められなかった、または、2) 薬効類似体投与群における mRNA 発現量が肝障害性薬物投与群よりも高値を示した場合のいずれかであった。また、APAP 投与は絶食後に行ったが、絶食が肝障害および肝臓中炎症性因子の発現量に与える影響を検討するために、絶食を 18 時間施行したマウスと、非絶食群のマウスの比較検討を行った。その結果、絶食を施行したマウスの ALT 値は  $25.3 \pm 2.2$  U/L、一方で非絶食群では  $17.2 \pm 3.2$  U/L と同程度であったことから、絶食が肝障害に与える影響はないことが示された。また、炎症性因子の肝臓における mRNA 発現量は、非絶食群と比較してもいずれの因子においても 0.5 倍以上または 2 倍以下の発現変動であったため、炎症性因子に対しても絶食の影響はほとんどないと考えられたため (data not shown)、APAP 投与群の対照群として非絶食条件下で薬物未投与のマウスを用いた。

C-7. 薬物性肝障害において共通して発現変動が認められた因子の解析

C-5. で検討し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。それぞれの mRNA 発現量の時間的な推移を Fig. 9 に示す。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 (Fig. 9)。



Continued

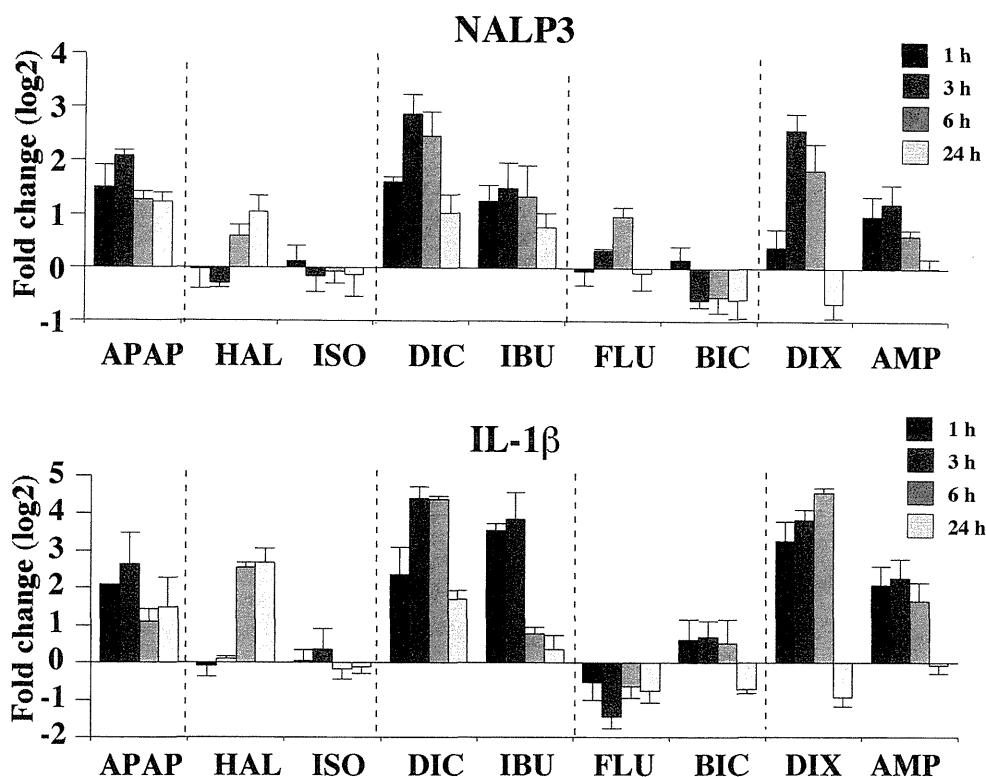
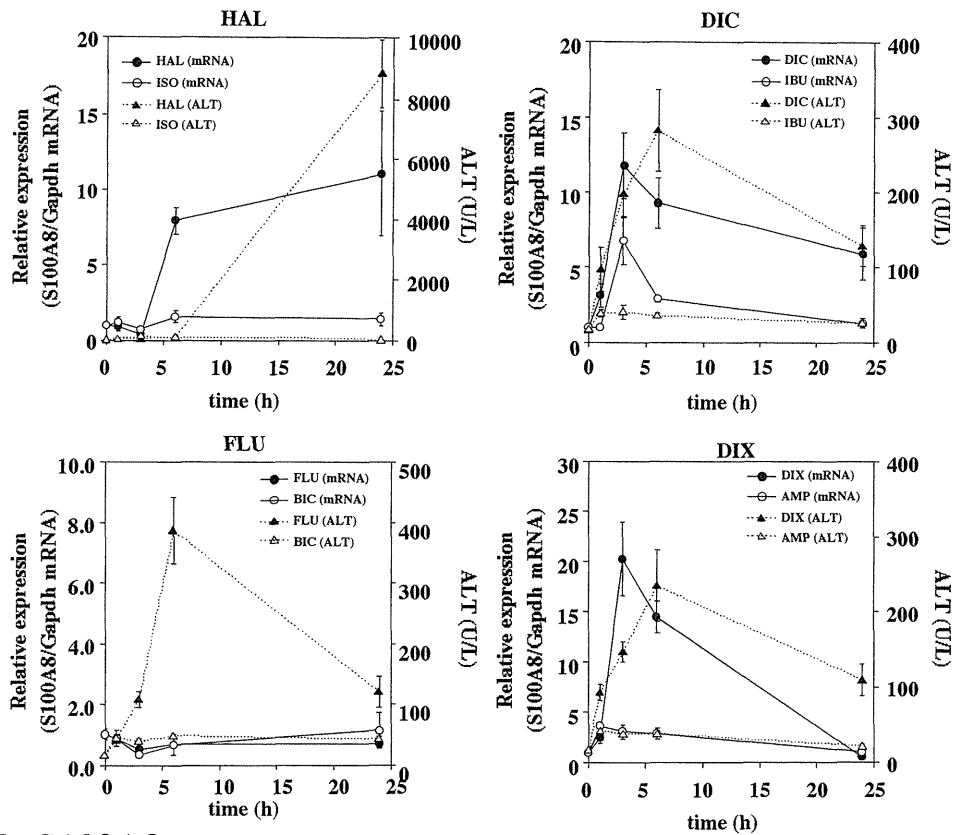


Fig. 9. Time-dependent changes of the mRNA expression in drug-induced liver injury. One, 3, 6, and 24 h after the administration, the hepatic expressions of S100A8, S100A9, RAGE, NALP3, and IL-1 $\beta$  mRNA in the liver were measured by real-time RT-PCR. The expression of hepatic mRNA was normalized to the expression of Gapdh mRNA. Data are presented as log<sub>2</sub> value  $\pm$  SEM (n = 5).

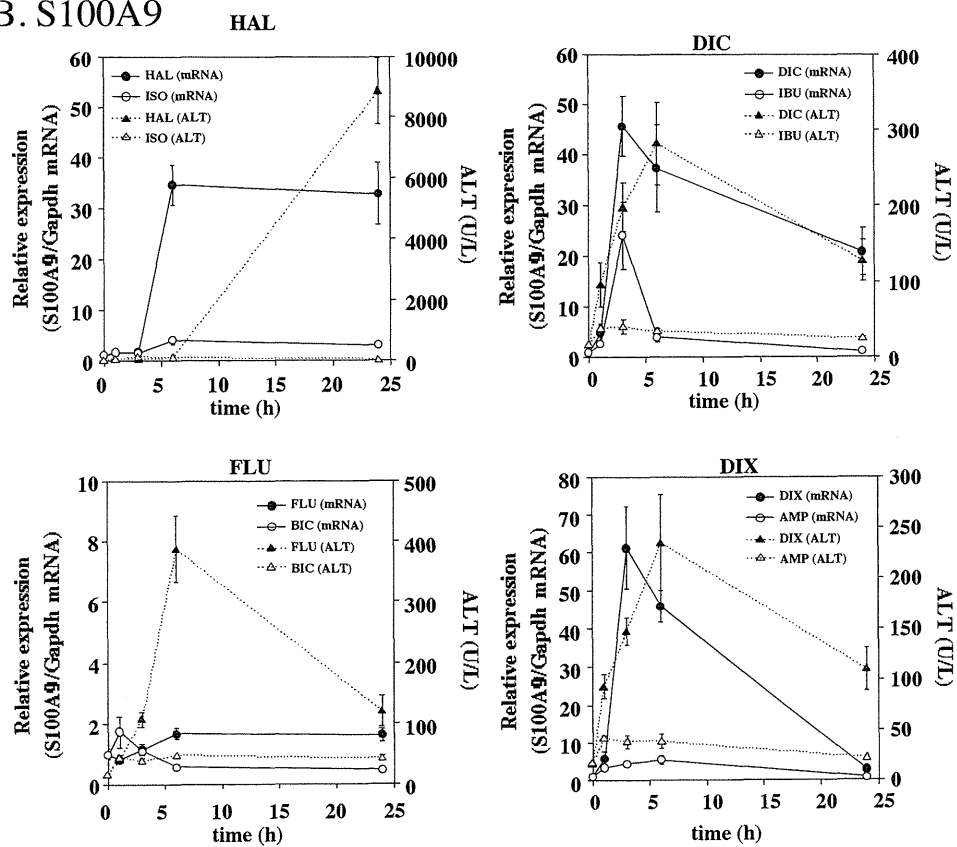
さらに、本検討で見出した各因子が *in vivo* で肝障害を予測するマーカーとなる可能性を考え、肝障害に対する反応性を血漿中 ALT 値の変動と比較評価した (Fig. 10)。その結果、HAL および DIC 投与後の S100A8 と S100A9、FLU および DIX 投与後の RAGE、DIC および DIX 投与後の NALP3、HAL、DIC および DIX 投与後の IL-1 $\beta$  では、薬物投与後の ALT 値は 6 ま

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 (Figs. 10A, B, C, D, and E)。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 (Figs. 10A and B)。

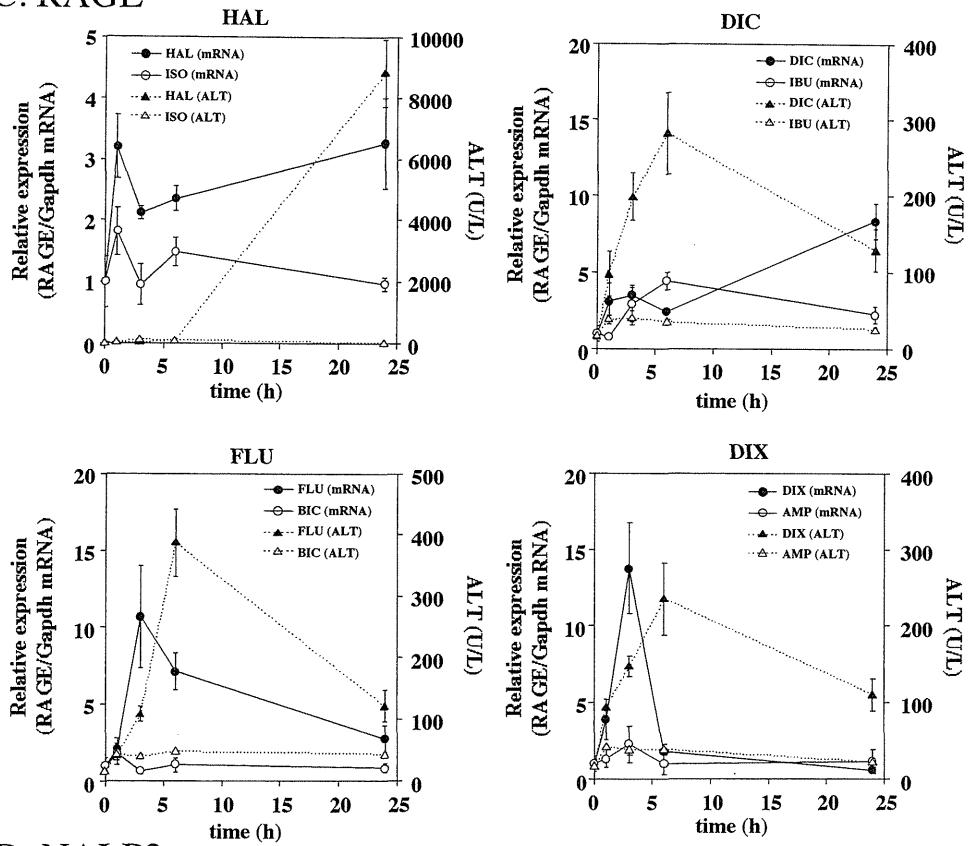
## A. S100A8



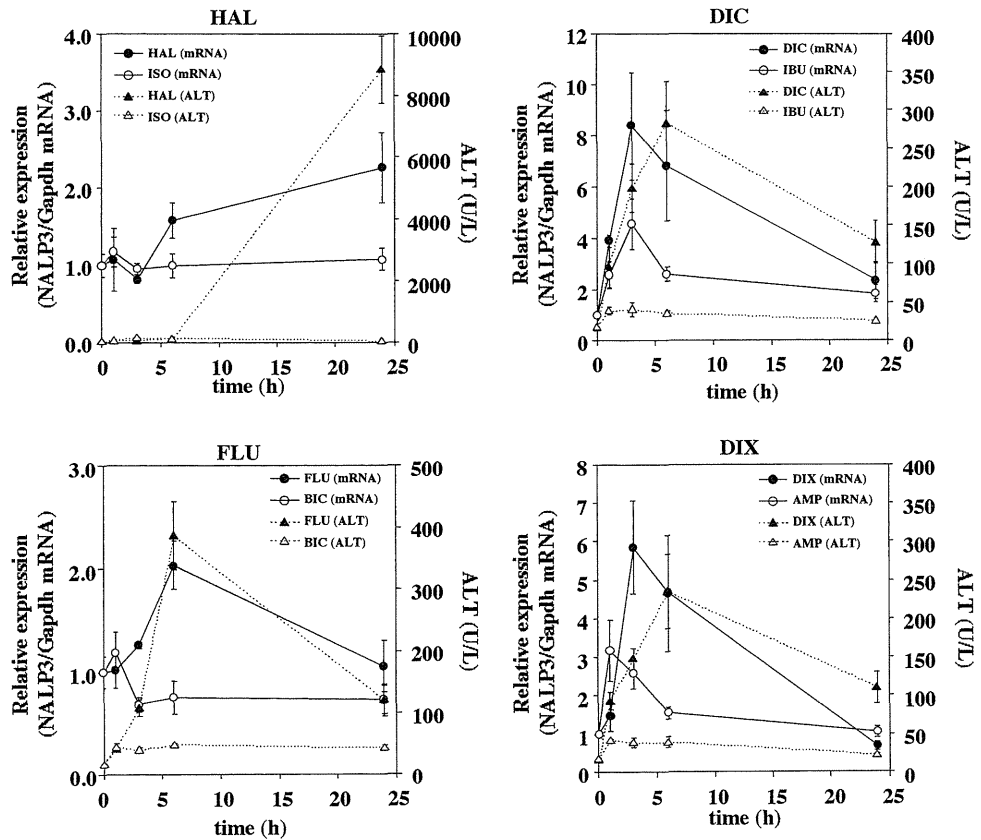
## B. S100A9



### C. RAGE



### D. NALP3



## E. IL-1 $\beta$

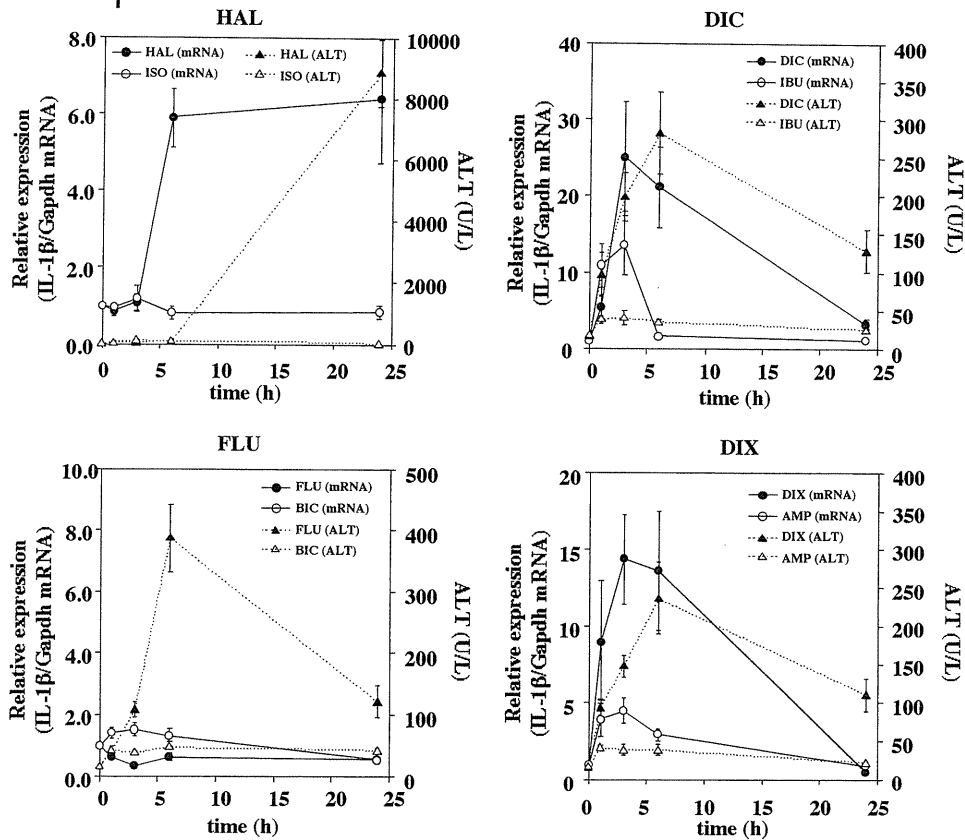


Fig. 10. Comparison of time-dependent changes of the plasma ALT level and the expression level of S100A8, S100A9, RAGE, NALP3 and IL-1 $\beta$  mRNA in HAL, ISO, DIC, IBU, FLU, BIC, DIX, and AMP-administered mice liver. The plasma ALT level and hepatic mRNA levels were measured 1, 3, 6, and 24 h after the drugs administration. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 5).

### C-8. 血漿中 HMGB1 の測定

HMGB1 は活性化した免疫細胞からだけでなくネクロシスした細胞からも放出されるために (Lotze et al., 2007)、S100A8 や S100A9 と同様に、TLR4 や RAGE のリガンドである HMGB1 に注目し、血中 HMGB1 タンパク量を定量した。

Fig. 11 には薬物投与後の血漿中 HMGB1 値の時間推移を示した。APAP 投与により、血中 HMGB1 が増加することは既に報告されているため (Antoine et al., 2010)、本検討では APAP 投与後の血中 HMGB1 濃度は測定しなかった。



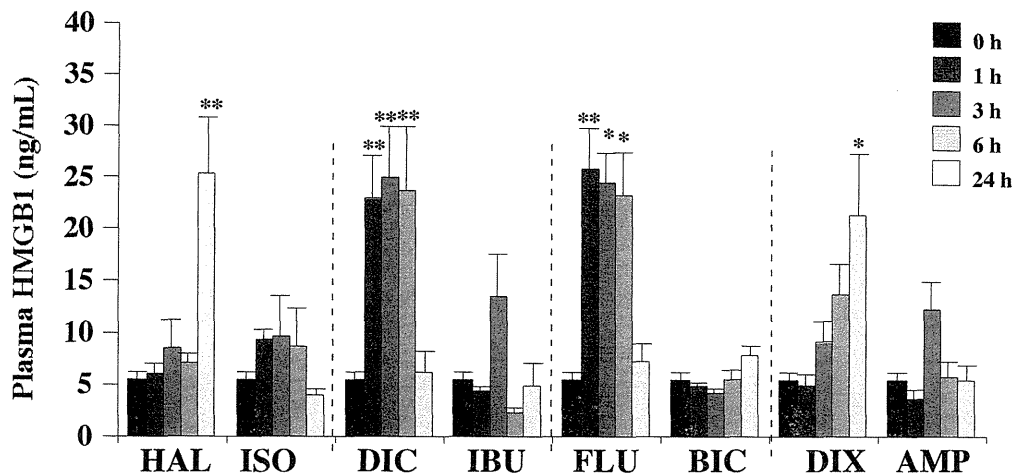


Fig. 11. Time-dependent changes of the plasma HMGB1 level measured by ELISA. Each drug was administered to mice. After 1, 3, 6, and 24 h, the plasma HMGB1 levels were measured by ELISA. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 5). Significantly different from control (0 h) mice (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01).

その結果、対照群と比較して HAL 投与 24 時間後において HMGB1 の有意な増加が認められた。DIC および FLU 投与後 1 時間から血中 HMGB1 値の有意な増加が認められ、6 時間後まで高値を示した。DIX 投与 3 時間後から HMGB1 の増加が認められ、24 時間後において有意な増加が認められ、最も高値であった。ISO、IBU および AMP では薬物投与により軽微な上昇が認められたものの、肝障害性薬物の増加と比較すると有意ではなかった。

S100A9 などの TLR4 と RAGE のリガンドの増加が認められた。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。

#### C-9. 薬物性肝障害における TLR4 および RAGE の関与

II-3-3 および II-3-4 の結果より、肝障害性薬物投与により HMGB1、S100A8、

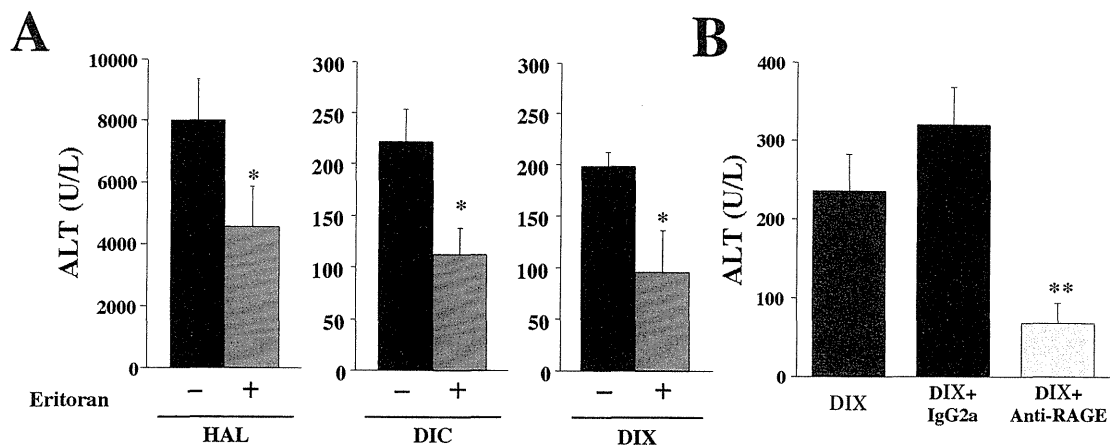


Fig. 12. Role of TLR4 and RAGE in the pathogenesis of drug-induced liver injury. (A) At the time of HAL (30 mmol/kg, *i.p.*), DIC (150 mg/kg, *i.p.*), and DIX (600 mg/kg, *i.p.*) administration, eritoran (50 ug/mouse, *i.v.*) was administered. The plasma ALT level was measured 6 h after DIC and DIX administration, and 24 h after HAL administration. (B) At the time DIX administration, IgG2a (control) or anti-mouse RAGE antibody (0.1 mg/mouse, *i.p.*) was administered. The plasma ALT level was measured 6 h after DIX administration. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 5). Significantly different from drug alone-administered mice (A) or IgG2a-administered mice (B) (\* $P$  < 0.01, \*\* $P$  < 0.01).

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 (Fig. 12A)。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 (Fig. 12B)。DIX 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。

#### D. 考察

非ステロイド性抗炎症薬ジクロフェナクは稀ではあるが、重篤な肝障害を惹起

することが知られている (Bhogaraju et al., 1999)。臨床報告から、免疫学的因子の関与が疑われるものの、実験動物でそれらの毒性を示した報告は未だにない。本章では、薬物性肝障害の発症機序に新たな知見を見出すことを目的として、ジクロフェナクを用いてその肝障害の発症機序の検討を行った。本研究は、ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について *in vivo* で検討した初めての報告である。

初めに、ジクロフェナク誘導性肝障害マウスを作製した。免疫学的因子に関して検討する際に、多くの研究で用いられている Balb/c マウスを用いることとし、

投与法の検討を行った (Kobayashi et al., 2009)。一般に、薬物の投与経路としては臨床投与時と同様の経路が望ましいが、ジクロフェナクは副作用として消化管潰瘍などの消化器系の症状が知られている (ボルタレンインタビューフォーム、2010)。したがって、消化器系の副作用を避けるため、投与経路は腹腔内投与とした。ジクロフェナクを 80 mg/kg および 120 mg/kg で投与した群のいずれにおいても、投与 24 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値の有意な上昇が認められた (Fig. 2A)。しかし、ジクロフェナクを 80 mg/kg で投与した群と 120 mg/kg で投与した群の血漿中 ALT 値の上昇が同程度であることに対し、AST 値は 80 mg/kg を投与した群と比較して 120 mg/kg を投与した群では高い値を示した (Fig. 2A)。ALT および AST はいずれも肝細胞中に多く存在しており、肝細胞傷害により血中に逸脱するため、血漿中の ALT および AST 値の測定は、肝機能障害のマーカーとなることが知られている (Ozer et al., 2008)。しかし、ALT が主に肝臓に存在しているのに対し、AST は肝臓のみならず心筋、骨格筋、腎臓および赤血球などにも広く存在している (Ozer et al., 2008)。このことから 120 mg/kg 投与した群では 80 mg/kg 投与した群と比較して肝臓以外の臓器における障

害が悪化していることが示唆された。ジクロフェナクは重大な副作用として肝障害以外にうっ血性心不全が知られており、今回の AST 値の上昇は心臓障害が寄与している可能性が考えられた。その他の臓器の副作用をなるべく回避することで肝障害について検討しやすくなると考え、以降の検討ではジクロフェナクの投与量は 80 mg/kg とした。

また、生理食塩水に溶解させたジクロフェナク (150 mg/kg, *i.p.*) を投与したところ、ALT 値の上昇が軽微であったが (184±63 U/L)、ジクロフェナクを corn oil に溶解させ投与した結果、血漿中 ALT 値および AST 値の有意な上昇が認められ、肝障害を再現良く強く惹起させることができた (Figs. 2A and B)。生理食塩水を溶媒として投与した際と比較して、溶媒を corn oil に変更したことにより薬物の体内への吸収、代謝および排出などの体内動態が異なること、および体内で代謝物の生成や肝臓内への蓄積などに変化が生じたことが肝障害を惹起できた一因であると考えられるが、詳細な理由は不明である。

ジクロフェナクの同効薬であり、臨床で広く使用され、肝障害性が低いと考えられているイブプロフェン (Rainsford, 2009) をマウスに投与した時には血漿中

ALT および AST 値の上昇は認められなかった (Fig. 2A)。このことから、ジクロフェナク誘導性肝障害の発症には薬理作用であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 活性阻害ではなく、ジクロフェナク自体の寄与が大きいことが示唆された。

ジクロフェナク投与後の経時的な変動を解析した結果、ジクロフェナク投与後の血漿中 ALT および AST 値は 24 時間後に最も高値を示した (Fig. 2B)。また、24 時間後において H&E 染色および MPO 抗体を用いた染色により組織学的評価を行った。H&E 染色は、組織の形態を観察する目的で細胞核および細胞質を染色する方法であり、肝細胞の損傷について確認するために行った (Fig. 2C)。また、MPO 染色は好中球を確認するために多くの研究で頻用されており、MPO が主に好中球に存在していることを利用した染色法である (Kumada et al., 2004)。発症に免疫が関与すると考えられているアセトアミノフェンおよびハロタン誘導性肝障害モデルマウスにおいても肝細胞壊死や、肝組織への好中球浸潤が認められている (Liu et al., 2004 and, 2006; Kobayashi et al., 2009)。組織染色の結果、肝細胞の損傷および好中球の浸潤が認められたことから、ジクロフェナクにより肝障害が引き起こされていること、および好中球による炎

症反応が関与していることが示唆された。

これまでに当研究室の研究により、薬物性肝障害に Th2 細胞関連因子である IL-4 がジクロキサシリン、メチマゾールおよびフルタミド誘導性肝障害に関与することや、Th17 細胞関連因子である IL-17 がハロタン、カルバマゼピンおよび ANIT 誘導性肝障害に関与することを明らかにしてきた。ジクロフェナク誘導性肝障害においてどのような免疫学的因子が関与しているか検討するために、はじめに Th 細胞関連因子に着目して、ジクロフェナク投与後の肝臓中 mRNA 発現変動を解析した。mRNA 解析の結果から、ジクロフェナク投与により ROR-gt および STAT3 などの Th17 関連因子の発現上昇が認められたため、ジクロフェナク誘導性肝障害に Th17 因子が関与している可能性が示唆された (Fig. 3)。Th17 細胞への分化には IL-1b、IL-6、IL-23、transforming growth factor (TGF) -b、STAT3 および ROR-gt シグナルが重要であると言われている (Usui, 2007)。Th17 細胞から産生される IL-17 は、ハロタンおよび a-naphthylisothiocyanate (ANIT) 誘導性肝障害の発症に関与することが明らかにされている (Kobayashi et al., 2009 and, 2010)。また、薬物誘導性肝障害を発症した約 60% の患者において血漿中で IL-17 が検

出されることが報告されていることから (Li et al., 2009)、薬物誘導性肝障害の発症に関与する因子の一つとして注目されている。よって、ジクロフェナク誘導性肝障害において IL-17 が関与しているか検討することとした。ジクロフェナク投与後の血漿中 IL-17 濃度を測定した結果、血漿中 IL-17 の上昇が認められた (Fig. 5A)。しかし、抗 IL-17 抗体をジクロフェナクと併用投与しても肝障害減弱の程度が小さかったことから (Fig. 5B)、IL-17 の肝障害への寄与は大きくないことが示唆された。ジクロフェナク投与により血中 IL-17 の増加が認められたにもかかわらず、肝障害への寄与が低かった原因としては、血中 IL-17 の増加が比較的遅い、薬物投与後 24 時間に認められたことが考えられた (Fig. 5A)。従って、以降の検討では薬物投与後の早い段階に着目することとした。

ROR $\gamma$ t や STAT3 に加えて、ジクロフェナク投与により IL-1b などの炎症性サイトカインや MCP-1 や MIP-2 などの好中球の浸潤に関与するケモカインの mRNA 発現上昇が認められた (Fig. 4)。IL-1b は、内皮細胞、単球およびマクロファージなどから放出される炎症性サイトカインであり、自然および獲得系の免疫応答に関与し、様々な自己免疫疾患の発症の一因

であると考えられている (Kapoor et al., 2011)。また、MCP-1、MIP-2 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)。中でも MIP-2 は好中球の遊走作用が強く、ハロタン誘導性肝障害においても顕著な上昇が認められている (Kobayashi et al., 2009)。これら MIP-2 などのケモカインの上昇により、ジクロフェナク投与後の肝組織において好中球の浸潤が認められた可能性が示唆された。

これらの因子の中でも IL-1b がジクロフェナク投与後の早期において顕著な増加が認められた (Fig. 4)。さらに、IL-1b の中和により肝障害の減弱が認められたことから、IL-1b が肝障害発症に関与していることが示唆された (Fig. 6B)。IL-1b は、強力な炎症性サイトカインであり、単球や樹状細胞、さらにヘパトサイトや好中球からも産生される (Arend et al., 2008)。IL-1R は血管内皮細胞、リンパ球、マクロファージなど様々な細胞に発現しており、IL-1b が作用すると血管内皮細胞への接着促進や IL-1、IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-17 および IL-8 などの種々のサイトカイン、ケモカイン、炎症性メディエーターなどの発現を誘導し、炎症を引き起こすことが知られている。また、肝臓への好中球の遊走

を促すことが報告されており (Bajt et al., 2001)、活性化した好中球はプロテアーゼであるエラスターゼを放出し、組織損傷を引き起こすことが知られている。これまでに、虚血性再灌流肝障害や、アセトアミノフェンによる肝障害モデル動物においても、肝臓への好中球の浸潤が組織損傷を引き起こすことが報告されている (You et al., 2006)。本検討においても、ジクロフェナク投与後のマウス肝臓では好中球の浸潤が認められていたことから、IL-1b によって肝臓に遊走された活性化好中球が細胞傷害のエフェクター細胞として働き、肝細胞の壊死を引き起こした可能性が考えられる。

また、ジクロフェナクにより重篤な肝障害を引き起こした患者の約 77%が骨関節炎を発症していることが報告されており (Banks et al., 1995)、骨関節炎の病態では局所において IL-1b を始めとする様々な炎症性サイトカインの濃度が上昇している (Kapoor et al., 2011)。骨関節炎を発症した患者がジクロフェナク誘導性肝障害を発症する場合は多い一因として、関節炎などの病態により生体内の IL-1b などの炎症性サイトカイン量が比較的に高い状態にある場合、肝障害に伴う炎症反応が強く惹起され、重篤な肝障害発症に至る可能性が考えられた。

さらに、免疫学的因子の SNP がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与していることも genome-wide association study (GWAS) での検討により明らかにされており、主に Regulatory T cell (Treg) から産生される抗炎症性サイトカインである IL-10 の転写活性が低下しているヒトでは、変異を持たないヒトと比較してジクロフェナク誘導性肝障害を 3 倍程度引き起こしやすいことが報告されている (Aithal et al., 2004)。このことから、免疫応答における個体差がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与してくること、また、IL-1b や IL-17 だけでなく IL-10 を含めた複数のサイトカインによりジクロフェナクによる炎症反応が制御されていることが考えられる。IL-1b や IL-17 を始めとする炎症性因子は NK、NKT 細胞、樹状細胞および単球などの複数の免疫細胞から産生される (Korn et al., 2009; Racanelli and Rehermann, 2006)。肝臓内の免疫応答のネットワークは非常に複雑であり IL-1b や IL-17 だけでなく、TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインやケモカインの mRNA の発現量の増加も認められていることから (Fig. 4)、様々な炎症および免疫学的因子がジクロフェナク誘導性肝障害を発症する一因になることが考えられる。

以上、本章では、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。

薬物性肝障害の発症メカニズムに関する多くの研究は、薬物ごとに行われてきたが、薬物性肝障害の発症機序を捉えるためには薬物間において、比較検討することが肝要であると考えられる。複数の薬物性肝障害モデルマウスを用いて肝臓中の炎症関連因子の mRNA 発現変動を解析することにより、肝障害性薬物に共通して発現変動する因子を見出した。本研究は、薬物性肝障害発症メカニズムを複数の薬物を比較解析した初めての報告である。

本検討の解析には、雌性 Balb/c マウスを用いた。Balb/c マウスは免疫学的因子を検討する際に、多くの研究で用いられている。また、雄性マウスと比較して雌性マウスの方がハロタン誘導性肝障害の感受性が高いことや (Dugan et al., 2010)、薬物性肝障害発症のリスクファクターとしては女性が挙げられていることから (Ostapowicz et al., 2002)、本検討では雌性マウスを解析に使用した。

薬物性肝障害の発症メカニズムを解析

するために、肝障害性薬物としてアセトアミノフェン、ハロタン、ジクロフェナク、フルタミドおよびジクロキサシリンを用いた。これらの薬物は、ヒトにおいて重篤な肝障害を引き起こすことが知られており、近年、肝障害の動物モデルが確立されている (Bourdi et al., 2002; You et al., 2006; Yano et al., 2012; Higuchi et al., 2012a; Higuchi et al., 2011)。それら肝障害の発症には Th 細胞関連因子や好中球、炎症性サイトカインなどの免疫学的因子が関与することが報告されている。また、マウスに対する薬物の薬理作用の影響や、サーカディアンリズムを考慮するために、薬効類似体を投与したマウスをネガティブコントロールとして用いて解析を行った。各薬物の構造類似体または薬効類似体として、吸入麻酔薬であるハロタンに対してイソフルラン、非ステロイド性炎症薬であるジクロフェナクにはイブプロフェン、非ステロイド性抗アンドロゲン薬であるフルタミドにはビカルタミド、抗菌薬であるジクロキサシリンにはアンピシリンを用いたが、これらの薬物による肝障害の臨床報告はほとんどない。アセトアミノフェンは非ピリン系解熱鎮痛薬であるが、薬理作用機序が不明であり、構造類似体も存在しないため、本検討ではアセトアミノフェンのネガティブコン

トロールは作製しなかった。肝障害性薬物に投与により、ALT 値の上昇が認められた一方で、薬効類似薬物では ALT 値の上昇が認められなかったことから (Fig. 7)、薬物の薬効は肝障害の発症には直接関係しないことが示唆され肝障害の早期に変動する因子に着目した検討を行う必要性が考えられたため、解析する時間は投与後、1、3、6、24 時間後の 4 点とした。

薬物性肝障害発症メカニズムを提唱することを目的として、これまでに肝障害発症に関与することが報告され、または関与することが考えられる炎症関連因子の肝 mRNA 発現変動を解析した。測定した因子は Th 細胞関連因子、サイトカイン、ケモカイン、DAMPs、CD8 陽性細胞関連因子、TIM ファミリー分子である。Th 細胞関連因子は、これまでに当研究室の研究により Th2 や Th17 細胞関連因子である IL-4 や IL-17 が、ハロタンやジクロキサシリン誘導性肝障害に関与することが明らかにされている (Kobayashi et al., 2009; Higuchi et al., 2011)。TNFa は LPS 誘導性肝障害におけるキーファクターとなる炎症性サイトカインとして知られている (Nowak et al., 2000)。TIM ファミリーの一つである TIM1 は肝虚血性再灌流障害時において免疫活性化を促す増悪因子として働くと報告されている (Uchida et al.,

2010)。これらの報告を受けて、我々は上記に示した因子の発現変動を網羅的に解析し、その結果を Fig. 8 に示した。

薬物投与後の mRNA 発現変動を解析した結果、薬物によって変動する因子、時間、上昇する程度および発現変動パターンが異なることが明らかとなった (Fig. 8)。また、肝障害性薬物だけでなく、薬効類似薬物においても多くの因子の発現上昇が認められた。例えば、イブプロフェンやビカルタミド投与後に TNFa mRNA 発現量の顕著な上昇が認められており、肝障害性薬物であるジクロフェナクと同程度であった (Fig. 8)。解析した因子の中から、1) 薬効類似薬物と比較して肝障害性薬物において顕著な発現量の増加が認められた因子、2) 解析に用いた 5 種類の肝障害性薬物のうち 4 種類以上の肝障害性薬物に共通して発現量の増加が認められた因子に該当したのは、S100A8、S100A9、RAGE、NALP3 および IL-1b であった (Fig. 9)。

見出した因子はそれぞれ次のような機能を有することが知られている。S100A8 および S100A9 は、カルシウム結合タンパク質として知られており、本来は細胞内シグナル伝達に関与しているが、マクロファージ、単球、好中球などの食細胞にも豊富に存在し、S100A8/A9 複合体を形



成している (Foell et al., 2007)。細胞の活性化により能動的に放出され内皮細胞の活性化、白血球の遊走および TLR4 に作用することで炎症を促進する働きを持つ。HMGB1 は、虚血性再灌流障害や APAP 誘導性肝障害において TLR4 を介して炎症を促進することが報告されており (Antoine et al., 2010; Wang et al., 2013)、外傷による免疫応答の誘導に広く関わっていることが知られている。RAGE は S100A8、S100A9 および HMGB1 などの DAMPs をリガンドとする受容体であり、NF- $\kappa$ B を介して炎症を促進する。NALP3 は、NOD-like receptor (NLR) の一つであり、細胞内の異物認識センサーとして機能する。また、NALP3 は顆粒球、単球、樹状細胞、B 細胞および T 細胞などの免疫細胞内に存在し (Kummer et al., 2007)、活性化すると下流に存在する caspase-1 を活性化体に変換し、IL-1 $\beta$  や IL-18 などの炎症性サイトカインを細胞外に放出することが知られている。IL-1 $\beta$  は前述のように強力な炎症性サイトカインである。以上より、見出した 5 種類の因子はそれぞれ自然免疫応答の促進に強く関連する因子であることが明らかとなり、これらの因子が薬物性肝障害の発症に重要である可能性が示唆された。実際に II-3-5 の検討より、TLR4 および RAGE シグナリング

を介して肝障害が発症することが示されたため (Fig. 12)、TLR4 および RAGE リガンドの誘導が肝障害発症のリスクファクターとなる可能性が示唆された。さらに、興味深いことに、HAL 投与後の S100A8 および S100A9 mRNA 発現量は ALT 値よりも早い時間で上昇が認められ、肝障害発症への関与する可能性だけでなく、肝毒性を予測するマーカーとして有用である可能性が示された (Figs. 10A and B)。

これらの因子の誘導メカニズムについて、酸化ストレスとの関連を示唆する報告が存在する。近年では、ROS が TLR4 を選択的に活性化することや (Matsuzawa et al., 2005)、大動脈内皮細胞において S100 タンパクや HMGB1 などの DAMPs の発現を増加させることが報告された (Yao and Brownlee, 2010)。また、NALP3 インフラマソーム活性化は ROS や細胞内に取り込まれた ATP に起因すると考えられている (Petrilli et al., 2007; Mariathasan et al., 2006)。従って、本検討における各炎症性因子の発現量増加には、薬物暴露による細胞内ストレスに起因することが予想される。しかしながら、薬物が細胞ストレスに与える影響を評価するだけでは、薬物性肝障害の発症機序を十分に説明することや、肝障害リスクを

評価することができないため、炎症性因子が誘導されるためには細胞ストレス以外にも重要な事象が存在することが予想される。本章では詳細な検討は行っていないが、これら因子が肝臓において薬物により誘導されるメカニズムを明らかにすることは、さらなる薬物性肝障害の発症機序の解明のためにも重要な結果であると考えられる。

以上、本章では薬物性肝障害において、S100A8 や S100A9 などの様々な炎症性因子が発現上昇することを示した。また、そ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、NALP3 および IL-1b 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、肝障害発症に関与することを示した。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。

<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.

Aithal GP, Ramsay L, Daly AK, Sonchit N, Leathart JBS, Alexander G, Kenna JG, Galdwell J, and Day CP (2004) Hepatic adducts, circulating antibodies, and cytokine polymorphisms in patients with diclofenac hepatotoxicity. *Hepatology* **39**: 1430-1440.

Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Lavery H, and Park BK (2010) Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during acetaminophen hepatotoxicity. *Mol Med* **16**: 479-490.

Arend WP, Palmer G, and Gabay C (2008) IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* **223**: 20-38.

Bajt ML, Farhood A, and Jaeschke H (2001) Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G1188-G1195.

Banks AT, Zimmerman HJ, Ishak KG, and Harter JG (1995) Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the food and drug administration as adverse reactions. *Hepatology* **22**: 820-827.

Bhogaraju A, Nazeer S, AL-Baghdadi Y, Rahman M, Wrestler F, and Patel N (1999) Diclofenac-associated hepatitis. *South Med J* **92**: 711-713.

ボルタレン インタビューフォーム (2010) ノバルティスファーマ株式会社 1-33.

Bourdi M, Masubuchi Y, Reilly TP, Amouzadeh HR, Martin JL, George JW, Shah AG, and Pohl LR (2002) Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology* **35**: 289-298.

Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, and Maloy KJ (2012) IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med* **209**: 1595-1609.

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.
- Dugan CM, MacDonald AE, Roth RA, and Ganey PE (2010) A mouse model of severe halothane hepatitis based on human risk factors. *J Pharmacol Exp Ther* **333**: 364-372.
- 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.
- Foell D, Wittkowski H, Vogl T, and Roth J (2007) S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* **81**: 28-37.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, and Gallo R (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**: 713-733.
- Higuchi S, Kobayashi M, Yano A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012a) Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J Appl Toxicol* **32**: 815-822.
- Higuchi S, Kobayashi M, Yoshikawa Y, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2011) IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett* **200**: 139-145.
- Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012b) 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.
- Hosomi H, Akai S, Minami K, Yoshikawa Y, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2010) An *in vitro* drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and g-glutamylcysteine synthetase knockdown cells. *Toxicol In Vitro* **24**: 1032-1038.
- Jenden DJ (1991) Difficulties in using animal data to predict pharmacological response in man. *Neurosci Biobehav Rev* **15**: 105-107.
- 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.
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, and Fahmi H (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**: 33-42.
- Kobayashi E, Kobayashi M, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol Sci* **111**: 302-310.
- Kobayashi M, Higuchi S, Ide M, Nishikawa S, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012) Th2 cytokine-mediated methimazole-induced acute liver injury in mice. *J Appl Toxicol* **32**: 823-833.
- Kobayashi M, Higuchi S, Mizuno K, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2010) Interleukin-17 is involved in a-naphthylisothiocyanate-induced liver injury in mice. *Toxicology* **275**: 50-57.
- Koeffler HP, and Golde DW (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line

- responsive to colony-stimulating activity. *Science* **200**: 1153-1154.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, and Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* **27**: 485-517.
- Kumada T, Tsuneyama K, Hatta H, Ishizawa S, and Takano Y (2004) Improved 1-h rapid immunostaining method using intermittent microwave irradiation: practicability based on 5 years application in Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital. *Mod Pathol* **17**: 1141-1149.
- Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, and Tschopp J (2007) Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* **55**: 443-452.
- Li J, Zhu X, Liu F, Cai P, Sanders C, Lee WM, and Uetrecht J (2009) Cytokine and autoantibody patterns in acute liver failure. *J Immunotoxicol* **7**: 157-164.
- Liu ZX, Govindarajan S, and Kaplowitz N (2004) Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* **127**: 1760-1774.
- Liu ZX, Han D, Gunawan B, and Kaplowitz N (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* **43**: 1220-1230.
- Lotze MT, Zef HJ, Rubarteli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tör M, and Billiar T (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**: 60-81.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, and Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**: 228-232.
- Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, and Ichijo H (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**: 587-592.
- Nakayama S, Atsumi R, Takakusa H, Kobayashi Y, Kurihara A, Nagai Y, Nakai D, and Okazaki O (2009) A zone classification system for risk assessment of idiosyncratic drug toxicity using daily dose and covalent binding. *Drug Metab Dispos* **37**: 1970-1977.
- Nassar AE, and Lopez-Anaya A (2004) Strategies for dealing with reactive intermediates in drug discovery and development. *Curr Opin Drug Devel* **7**: 126-136.
- Nowak M, Gaines GC, Rosenberg J, Minter R, Bahjat FR, Rectenwald J, MacKay SL, Edwards CK 3rd, and Moldawer LL (2000) LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF- $\alpha$  and the TNF-p55 receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**: R1202-R1209.
- Oo YH, and Adams DH (2010) The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J Autoimmun* **34**: 45-54.
- Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, and Lee WM (2002) Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* **137**: 947-954.
- Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, and Schomaker S (2008) The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* **245**: 194-205.
- 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.