

201307007A

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25年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横井 毅

平成26(2014)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 25 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 26 (2014) 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 - XLIII

II. 分担研究報告

1. アミオダロン誘導性肝障害における代謝反応を考慮した毒性メカニズ
ムに関する研究

横井 毅 ----- 1 - 32

2. アザチオプリン誘導性肝障害における酸化ストレスと免疫よび炎症関
連因子の関与

横井 毅 ----- 33 - 60

3. ラットにおける代謝を考慮したカルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズ
ム解析

深見 達基 ----- 61 - 82

4. 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の発症における miRNA の関与

中島美紀 ----- 83 - 136

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 137 - 142

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 143 - 295

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

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、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。また、2013年12月に武田薬品工業株式会社が、第III相臨床試験の後期で、肝障害発症により開発を中止した糖尿病治療薬 fasiglifam (TAK-875)も記憶に新しい。近年、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認識されるようになってきた。その主な原因は、*danger signal* と言われる肝障害発症における様々な因子の中で、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我々は考えている。こうした研究は殆ど行われていない。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年計画の最終年度であるが、全体として当初の予定を上回る成果を発表することができた。本年度は関連論文10報と総説1報を発表することができた。3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6つの研究成果を挙げるができる。

1. 薬物性肝障害の *in vivo* マウスモデルの確立と機序解析と

cell-based のスクリーニング試験系の開発研究（研究成果に関する一覧表

(P. 138) #1) である。薬物性肝障害の発症機序を包括的に捉えるためには、肝障害性を有する種々の薬物を用いて多くのモデルにお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。

2. フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症メカニズムの検討（研究成果に関する一覧表 (P. 138) #2) : 薬物性肝障害の原因薬

物は多岐にわたるが、特に抗菌薬は薬物性肝障害の注意喚起が多いことで知られている。抗菌薬の中でもイソキサゾリル系の合成ペニシリンであるフルクロキサシリンはペニシリナーゼ耐性をもつ優れた抗生物質であり、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が関与する感染症に適用される。しかし、フルクロキサシリンを服用した患者においてまれに重篤な肝障害を発症することがあり、重篤化した患者の中には死亡例や肝移植例も報告されている。発症頻度は 10 万人に 8.5 人であり、比較的

高い割合である。フルクロキサシリンにより肝障害を発症した患者の中には発熱、好酸球増多、免疫細胞の浸潤といったアレルギー様の症状を伴うことより、免疫反応の関与が示唆されている。現在までの報告では、フルクロキサシリン誘導性肝障害を実験動物で再現した例はなく、また免疫学的因子に着目してメカニズムを研究した報告もない。そこで、本研究はフルクロキサシリン誘導性肝障害をマウスで再現し、その発症メカニズムを解明することを目的とした。その結果、本研究においてフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおいて免疫学的因子が発症および増悪に関与していることを明らかにした。その中でも high mobility group box 1 (HMGB1) と Toll like receptor (TLR) 4 が関係するシグナル伝達が発症に関与している可能性、さらにインターイキン (IL-17) が増悪因子である可能性を示すことができた。よって、得られた結果はフルクロキサシリン誘導性肝障害および他の薬物性肝障害の発症メカニズム解明に有用な情報を提供しうると考えられる。

3. 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の発症における miRNA の関与(研究成果に関する一覧表 (P. 138) #3) : Halothane (HAL) 誘導性肝障害モデルマウスは好中球および Interleukin (IL)-17 などの炎症性サイトカイン等の様々な免疫因子が関与することが知られ、免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の代表的なモデルである。近年 miRNA が免疫細胞の分化や増殖、サイトカイン産生などを制御していることが報告され、免疫因子との関連が示されている。本研究では、肝臓中の miRNA が肝障害の発症前に変動することで、その発症に関与している可能性を明らかにすることを目的とした。HAL 誘導性肝障害モデルマウスを用いて、経時的に肝 miRNA の発現を網羅的に解析したところ、HAL 投与後いずれの時間においても、検出された miRNA の約 25-50% が 2 倍以上の発現変動しており、肝障害の発症よりもかなり早期の段階から多くの肝 miRNA が発現変動することを明らかにした。これらの変動した miRNA の生体内での機能を明らかとするため、各 miRNA の標的遺伝子が関与する経路を KEGG pathway 解析によりアノテーションすることで調べた。HAL 投与後いずれの時間においても免疫および炎症に関わる経路に加え、多くの経路が変動している可能性が示された。特に、HAL 投与 3 時間後以降と比較して、1 時間後に発現が低下する miRNA の推定標的経路において、免疫および炎症関連の経路が多く予測されたため、mRNA の誘導よりも早期に miRNA がそれらの発現調節を担っている可能性が示された。また、ISO 投与群で認められた経路と比較して、HAL 投与 1 時間後において発現低下

する miRNA の推定標的経路において、免疫および炎症に関する経路が多く認められた。よって、HAL 投与 1 時間後において顕著に発現低下する miRNA の中で、報告されている標的遺伝子が免疫、炎症および肝障害に関連する遺伝子である miRNA に注目した。その結果、miR-21、miR-29b、miR-106b、miR-125b-5p および miR-200c の 5 種類の miRNA が該当した。それぞれの miRNA の発現量およびその標的遺伝子の発現量を測定した。その中で、HAL 投与による miR-106b の発現低下およびその標的遺伝子である STAT3 タンパク質発現量の有意な増加が認められた。従って、HAL 誘導性肝障害におけるメカニズムにおいて最も特徴的な免疫因子である IL-17 の産生を担う転写因子である STAT3 の関与を、肝障害発症よりも早期に発現変動した miRNA だけを解析することから見出した。さらに、これまでに HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおいて報告されている IL-17 産生を、STAT3 が担っているかを、P-STAT3 を測定することで検証した。その結果、HAL 投与 6 時間後において STAT3 の有意な活性化が認められた。以上、HAL 誘導性肝障害における肝障害発症機序の一つとして、HAL 投与による miR-106b の発現低下に続く、STAT3 mRNA およびタンパク質発現量の増加が亢進され、STAT3 の活性化によって IL-17 の産生を担う Th17 細胞への分化が促進されている可能性が示された。本研究は、薬物誘導性肝障害において、肝 miRNA の早期の発現変動を指標にした機構解析が可能であることを示した。なお、本研究内容は、分担研究者 中島美紀の報告書に詳しく記載している (p. 83 から)。

4. アザチオプリン誘導性肝障害における酸化ストレスと免疫および炎症関連因子の関与 (研究成果に関する一覧表 (P.138) #5) : アザチオプリン

(Azathioprine, AZA) は免疫抑制剤の一つであり、治療患者の約 2%に肝障害が認められている。これまでの報告から、AZA 誘導性肝障害には酸化ストレスが関与することが示唆されている。しかし、酸化ストレスの要因は明らかにされておらず、発症メカニズムには不明な点が多く残されている。また、AZA 投与患者において発熱や発疹といった症状が稀に認められていることから、免疫および炎症反応の寄与が疑われるが、免疫系および炎症関連因子の関与を検討した報告は未だにない。本研究では AZA 誘導性肝障害モデルを作製し、発症メカニズムにおける酸化ストレス、免疫および炎症関連因子の関与について検討を行った。

マウスへの AZA 反復経口投与を行ったところ、6日間 AZA 200 mg/kg 投与において、肝障害マーカーである血漿中 ALT 値は最高値を示した。この結果から、以降の検討では

AZA 200 mg/kgを反復経口投与することによりAZA誘導性肝障害モデルを作製し、詳細なメカニズムを解析することとした。また、AZA 200 mg/kgの7日間投与により、約50%のマウスの死亡が認められたことから、反復投与期間は6日間までとした。AZA誘導性肝障害における酸化ストレスの関与を検討するため、抗酸化物質であるグルタチオンの肝臓中含量を測定したところ、AZA投与により有意な低下が認められた。また、酸化ストレスマーカーである肝臓中プロテインカルボニル含量およびSOD活性は、AZA投与によりそれぞれ経日的な上昇および減少が認められた。さらに、抗酸化剤tempolを併用投与したところ、血漿中ALT値の有意な低下が認められ、肝臓中SOD活性の低下が抑制された。これらの結果から、AZA誘導性肝障害に酸化ストレスが関与していることが示された。キサンチンオキシダーゼによる活性酸素(reactive oxygen species, ROS) 産生がAZA誘導性肝障害に関与するか検討する目的で、キサンチンオキシダーゼ阻害剤allopurinolを併用投与した。その結果、血漿中ALT値とROSの一種であるH₂O₂の血漿中濃度に有意な低下が認められた。このことから、キサンチンオキシダーゼにより触媒される反応によって産生されるROSが、酸化ストレスの要因となりAZAの肝毒性を惹起する可能性が示された。AZA投与後の自然免疫の活性化に関与する因子の肝臓中mRNA発現変動を解析したところ、TLR-2、TLR4、receptor for advanced glycation end products、S100A8およびS100A9において有意な発現上昇が認められた。また、TLR4のリガンドであるhigh-mobility group box 1の血漿中タンパク質濃度は、AZA投与により経日的な上昇が認められた。さらに、TLR4アンタゴニストeritoranを併用投与したところ、血漿中ALT値の有意な低下が認められた。これらの結果から、AZA誘導性肝障害にTLR4シグナル経路を介した自然免疫系の活性化が関与することが示された。AZA投与後の炎症関連因子の肝臓中mRNA発現変動を解析したところ、炎症性サイトカインであるinterleukin-1 β およびtumor necrosis factor- α や、好中球の遊走に関わるケモカインであるmacrophage inflammatory protein-2の有意な発現上昇が認められた。また、AZA投与後の肝臓において、抗ミエロペルオキシダーゼ抗体陽性細胞が認められた。これらの結果から、AZA誘導性肝障害に好中球の肝臓への浸潤を伴った炎症反応が関与することが示唆された。以上、本研究ではAZA誘導性肝障害モデルマウスを作製し、ROS産生に伴う酸化ストレスおよび自然免疫系を介した炎症反応が関与することを明らかとした。本研究において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ものと期待される。なお、本研究内容は、主任研究者 横井毅の報告書に詳しく記載している (p. 33から)。

5. 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 (研究成果に関する一覧表 (P. 138) #6) :

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。また第 I 章と同様に、MAPK 経路の解析の結果、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。

6. フェニトイン誘導性肝障害マウスの作出と発症メカニズムの解明 (研究成果に関する一覧表 (P. 138) #7) :

抗てんかん薬フェニトイン (DPH) は、肝障害や薬物過敏性症候群を引き起こす事が報告されている。ヒトにおける DPH 誘導性肝障害では、肝組織に免疫細胞の浸潤が認められる事から免疫因子の関与が示唆されている。しかし、これまでに DPH 誘導性肝障害モデル動物の報告はなく、その発症メカニズムは不明な点が多い。本研究では、DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作出し

、免疫や炎症反応及び薬物代謝酵素による代謝的活性化の視点から、肝障害発症メカニズムを解析した。雌性 C57BL/6 マウスに DPH と L-buthionine sulfoximine (BSO) を 5 日間併用投与する事で肝障害モデルを作製し、肝臓中の抗酸化物質、免疫及び炎症に関する因子を測定した。P450 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (ABT) を併用投与し、代謝的活性化の影響を検討した。DPH と BSO の 5 日間の併用投与により、DPH 最終投与後 24-48 時間後に ALT 値が有意に上昇した。自然免疫因子においては、NACHT, LRR and PYD domains-containing protein (NALP) 3, interleukin (IL)-1 β mRNA の有意な発現上昇が見られ、血漿中 high-mobility group box (HMGB) 1 タンパク質の上昇が認められた。獲得免疫系では Retinoic acid-related orphan receptor (ROR)- γ t, IL-6, IL-23 mRNA の有意な発現上昇及び、血漿中 IL-17 タンパク質の上昇が認められた事から、T helper (Th) 17 細胞の関与が示唆された。ABT の投与により ALT 値の有意な低下が認められた。以上、DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作出し、肝障害発症における代謝的活性化及び免疫因子の関与を明らかにした。

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。

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 2 項目 (アミオダロン誘導性肝障害における代謝反応を考慮した毒性メカニズムに関する研究 および、ラットにおける代謝を考慮したカルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズム解析) について詳しく報告する。さらに、2014 年に論文発表を行った 2 項目 (アザチオプリン誘導性肝障害における酸化ストレスと免疫及び炎症関連因子の関与 および、免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の発症における miRNA の関与) を加えて、4 項目についての詳しい分担報告を以下に行った。

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

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

A. 研究目的

薬効が秀でた薬や開発候補化合物が、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。

以下には、各項目において、A. 研究目的、B. 研究方法、C. 研究結果、D. 考察を記載する。

(1) アミオダロン誘導性肝障害における代謝反応を考慮した毒性メカニズムに関する研究：

A. 研究目的：アミオダロン (AMD) は Vaughan-Williams 分類で III 群に分類される抗不整脈薬であり、生命に危険のある再発性不整脈で他の抗不整脈薬が無効又は使用できない場合に経口剤が、生命に危険のある不整脈で難治性かつ緊急を要する場合および電氣的除細動抵抗性の心室細動あるいは無脈性心室頻拍による心停止に注射剤が用いられる。AMD の主代謝物はデスエチルアミオダロン (DEA) であり、主に CYP3A4 により *N*-脱アルキル化反応を受けることで生成される。DEA はさらに *N*-脱アルキル化を受けてジ-*N*-デスエチルアミオダロン (DiDEA) に変換される。AMD および DEA はそれぞれ水酸化を受けてヒドロキシアミオダロン (OH-AMD) および 3'-ヒドロキシデスエチルアミオダ

ロン (3'-OH DEA) が生成する。OH-AMD の構造について詳細は不明である。また AMD、DEA および DiDEA から *O*-脱アルキル化や酸化的脱アミノ化を受けて *O*-デスアルキルアミオダロン (ODAA) やデアミノアミオダロン (DAA) も生成される。さらに脱ヨード化体の生成も報告されている。AMD は薬物性肝障害の発現頻度が高いことが知られており、服用患者の約 4 分の 1 に血清中 ALT 値の上昇、1-3% に肝炎の症状が認められている。AMD の肝毒性発現には代謝物の関与が示唆されており、これまで *in vitro* において DEA、DiDEA、ODAA および DAA がミトコンドリア毒性や細胞毒性を示すことが報告されている。AMD の代謝物の中でも DEA はヒトにおいて最も高い血漿中濃度を示し、AMD 同様高い臓器蓄積性を示すことから毒性発現に大きく寄与していることが考えられる。これまで *in vitro* における検討により、HepG2 細胞に CYP3A4 発現系マイクロソーム存在下で AMD を処置することにより細胞毒性の増悪が認められたこと、ヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞に CYP3A4 発現系マイクロソーム存在下で AMD を処置することにより THP-1 細胞の活性化が認められたこと、ラット肝細胞に AMD の誘導体を処置した結果より DEA、DiDEA、3'-OH DEA が毒性を示したこと (Waldhauser et al., 2006) が報告されており、いずれも CYP3A による代謝物が AMD の肝毒性に関与することを示唆

している。AMD 誘導性肝障害に代謝物が関与するか実験動物を用いて検討した例はない。本研究では AMD 誘導性肝障害に代謝物が関与するか検討するため、DEA 生成を触媒する Cyp3a を誘導するデキサメタゾン Maus に投与することにより、代謝反応を考慮した肝毒性の発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 実験方法

B-1 アミオダロンおよびデキサメタゾンの投与

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。Balb/cCrSlc マウス (雄性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、デキサメタゾン (60 mg/kg in corn oil) を 10 mL/kg で 3 日間腹腔内投与した。デキサメタゾン最終投与から 24 時間後に AMD (1,000 mg/kg in corn oil) を 10 mL/kg で経口投与した。AMD 投与 0、1、3、6、12 および 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-2 ケトコナゾールの投与

デキサメタゾンおよび AMD を投与し、ケトコナゾール (50 mg/kg in corn oil) を AMD 投与 1 時間前に腹腔内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-3 1-アミノベンゾトリアゾールの投与

デキサメタゾンおよび AMD を投与し、1-アミノベンゾトリアゾール (100 mg/kg in saline) を AMD 投与 1 時間前に腹腔内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大

静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-4 塩化ガドリニウムの投与

デキサメタゾンおよび AMD を投与し、塩化ガドリニウム (10 mg/kg in saline) を AMD 投与 48 および 24 時間前に静脈内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-5 統計解析

2 群間における統計学的評価は

Student's *t*-test 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。

C. 実験結果

C-1 アミオダロン投与マウスの血漿中 ALT 値に対するデキサメタゾンの影響

Balb/c マウスに AMD を単回投与したところ、血漿中 ALT 値は 6 時間後に軽微な上昇を示し、24 時間後には正常値まで低下した。そこで、デキサメタゾン前処理することで AMD による肝障害を惹起されるか検討を行った。デキサメタゾンを 3 日間反復投与することで ALT 値が上昇したものの、6 および 24 時間後においても同じ値で推移した。デキサメタゾン前処理したマウスに AMD を投与したところ、6 および 24 時間後における血漿中 ALT 値が有意に高値を示し、時間依存的な ALT 値の上昇が認められた。

C-2 血漿および肝臓中アミオダロンおよびデスエチルアミオダロンの濃度

AMD 投与 24 時間後の血漿および肝臓中の AMD および DEA 濃度の測定を行った。AMD のみを投与したマウスと比較して、デキサメタゾン前処理したマウスに

において血漿中 AMD 濃度が有意に低い値を示し、血漿中 DEA 濃度は高値を示す傾向が認められた。また、肝臓中 AMD の濃度はデキサメタゾン前処理の有無による差が認められず、肝臓中デスエチルアミオダロン濃度は高値を示す傾向が認められた

C-3 1-アミノベンゾトリアゾール併用投与がデキサメタゾンを前処理したアミオダロン投与マウスの肝障害に与える影響

Cyp 分子種を非特異的に阻害する 1-アミノベンゾトリアゾールをデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスに併用投与し、血漿中 ALT 値に違いが認められるか検討し、その結果 1-アミノベンゾトリアゾール併用投与を行っていないマウスと比較して併用投与を行ったマウスにおいて血漿中 ALT 値が有意に高値を示した。血漿中 ALT 値と血漿中および肝臓中 AMD および DEA 濃度の関係の評価したところ、血漿中 DEA 以外の濃度と血漿中 ALT 値との間に有意な相関関係が認められた。以上より、血漿中 AMD 濃度、肝臓中 AMD 濃度と DEA 濃度の上昇が肝毒性発現に関与している可能性が示された。

C-4 デキサメタゾンを前処理したアミオダロン投与マウスの肝障害に対するクッパー細胞の関与

ヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞に CYP3A4 発現系マイクロソームと AMD を処置しインキュベートすると単球の活性化マーカーである CD54 および CD86 の発現上昇と、炎症性

サイトカインである IL-8 および tumor necrosis factor a (TNFa) の産生上昇が認められている。そこで、肝臓内に存在する組織マクロファージであるクッパー細胞の枯渇剤である塩化ガドリニウムをデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスに併用投与し、ALT 値に差が認められるか検討した。その結果、塩化ガドリニウム併用投与することにより血漿中 ALT 値が有意に低値を示した。

C-5 肝臓中 GSH および GSSG 量の測定

AMD 誘導性肝障害における酸化ストレスの関与を検討するため、肝臓中の GSH および GSSG 量を測定し、GSH/GSSG 比を算出した。AMD 投与マウスと比較してデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて AMD 投与 0 時間における GSH が有意に低値を示した。また、投与 24 時間後における GSH/GSSG 比が有意に低値を示した。この結果より、AMD 誘導性肝障害の発症に酸化ストレスが関与する可能性が示された。C-6 ミトコンドリア毒性に関する検討

血漿中の triglyceride 量を測定することにより β 酸化が阻害されているか検討を行った。AMD 投与マウスおよびデキサメタゾン投与マウスと比較して、デキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて血漿中 triglyceride 量が高値を示した。したがって、デキサメタゾン前処理により β 酸化が阻害された結果として血漿中 triglyceride 量が増加した可能性が示された。以上の結果より、デキサメタゾンに

よりアポトーシス経路が活性化され、肝細胞死が生じやすい条件となっており、AMDによる肝障害を増悪させている可能性が示された。

D. 考察

ヒトにおいてDEA生成を触媒する主代謝酵素はCYP3A4である。マウスにおけるDEA生成反応の責任酵素は不明であるが、マウスCyp3a分子種の中で最も発現量の高いCyp3a11はヒトCYP3A4と76%の高いアミノ酸相同性を有する。よって、ヒトと同様にマウスにおいてもCyp3a分子種がDEA生成反応を担うと考え、Cyp3aを誘導することで肝毒性を発現させることを考えた。Cyp3aの誘導剤としてはデキサメタゾンの他にpregnan X receptor (PXR) のリガンドであるpregnenolone-16-carbonitrile (PCN) やconstitutive androstane receptor (CAR) の活性化剤であるフェノバルビタールが考えられた。AMDとDEAはCypに対してmechanism-based inhibition (MBI) を起こすことが知られており、AMDとDEAがそれぞれ有する三級または二級アミンがニトロソアルカン ($R-N=O$) を形成し、P450のヘム鉄に結合して不可逆的に阻害すると考えられている。また、AMDとDEAが有するフラン環もMBIの原因として知られている。したがって、本実験ではAMDの反応性代謝物の生成を亢進させると考えられるデキサメタゾンを前処理することで肝障害を発症させることにした。

デキサメタゾン前処理した後にAMDを投与することで血漿中AMD濃度は有意に低値を示した。これはCyp誘導により代謝能が亢進された結果であると考えられる。一方、血漿中DEA濃度、肝臓中AMD濃度およびDEA濃度にはデキサメタゾン前処理による影響は認められなかった。また、血漿中ALT値と肝臓中AMD濃度または肝臓中DEA濃度との間に有意な正の相関が認められた。したがって、AMDとDEAのいずれが毒性発現に関与するか本検討では明らかにできなかった。

DEAはヒトにおいてCYP3A4よりも寄与は小さいがCYP1A2, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6などのCYP分子種によっても生成される。マウスにおいても同様に複数のCyp分子種によりDEAが生成される可能性が考えられる。1-アミノベンゾトリアゾールはMBIによりCYP分子種非選択的に結合することで代謝活性を阻害することが知られている。ことから、血漿中ALT値およびDEAの濃度に影響するか検討を行った。その結果、予想に反してALT値が低値を示すことが考えられたが、ALT値が有意に高値を示した。また、血漿中AMD濃度、肝臓中AMDおよびDEA濃度が有意に高値を示し、これらと血漿中ALT値の間に有意な相関関係が認められた。血漿中および肝臓中AMD濃度は肝毒性に反映しないことが考えられる一方で、肝臓中DEA濃度が高いことが肝毒性発現に対して最も寄与が大きいことが考えられた。DEAはLogP = 6.4と

いう非常に高い脂溶性を示すため、肝臓内に高濃度で貯留し続けることが肝毒性発現につながると考えられる。

クッパー細胞の枯渇剤である塩化ガドリニウムを投与することで ALT 値が低値を示したことから、*in vivo* においても単球/マクロファージ、特にクッパー細胞が毒性発現に関与することを示した。クッパー細胞は肝臓内に存在する組織マクロファージであり、アセトアミノフェンおよびハロタン誘導性肝障害の発症に関与することが知られている。クッパー細胞は組織マクロファージの 80-90% を占めることから肝臓のみならず全身の防御に重要な役割を果たしている。クッパー細胞が肝毒性を発現させるメカニズムとして IL-1 β や TNF α といった炎症性サイトカインの放出並びに酸化ストレスの増悪による肝細胞への攻撃が考えられている。炎症性サイトカインは炎症が起こることで初めて誘導されるタンパク質であり、mRNA 発現量測定により組織固有の免疫細胞等から放出されたサイトカイン・ケモカインの発現量の増減を評価できる。そこで、炎症性因子が肝臓において発現増加しているか mRNA 量を測定することにより検討したが、デキサメタゾン投与マウスと比較してデキサメタゾンを前処理した AMD 投与マウスにおいてサイトカイン・ケモカイン等の発現量は高値を示さなかった。これはデキサメタゾンの免疫抑制作用が原因であると考えられる。

AMD 投与により IL-1 β 、IL-18、MIP-2 の発現量が低値を示した原因は転写活性等の阻害が考えられるが詳細は不明である。よって、炎症性因子の放出はデキサメタゾンを前処理した AMD 投与マウスにおける肝毒性には関与していない可能性が示された。一方、酸化ストレスマーカーとなる GSH/GSSG 比が AMD 投与マウスと比較してデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて有意に低値を示したことから酸化ストレスの関与が示された。

以上よりクッパー細胞はサイトカイン・ケモカインの放出ではなく、酸化ストレスの増悪により肝毒性を発現させていることが示された。

本検討ではマウスにおいてデキサメタゾンを前処理することにより AMD 誘導性肝障害を発症させることに成功した。また、AMD 誘導性肝障害において代謝物である DEA が肝臓に貯留することにより肝毒性が発現すること、マクロファージが酸化ストレスを増悪することで肝細胞を損傷していること、デキサメタゾン前処理によりミトコンドリア毒性が起こることでアポトーシスが生じ、肝細胞死が引き起こされていることを明らかにした。本研究結果により AMD 誘導性肝障害の発症メカニズムを *in vivo* において初めて明らかにし、薬物性肝障害の発症メカニズムに新たな知見を得ることができた。

(2) アザチオプリン誘導性肝障害に

における酸化ストレスと免疫および炎症

A. 研究目的

Azathioprine (AZA) は免疫抑制剤の1つであり、慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎の治療および臓器移植後の拒絶反応を抑制する目的で使用されている。しかし、治療患者の15-28%に骨髄抑制、肝毒性および胃腸障害等の副作用が発生し、このうち肝障害の発症は、約2%の患者で認められている。ラットを用いた *in vivo* の検討により、AZA の肝障害性が再現されており、AZA 投与によりプロテインカルボニルやマロンジアルデヒドといった酸化ストレスマーカーの上昇が認められていることから、酸化ストレスの関与が示唆されている。

AZA は肝臓中で glutathione S-transferase (GSH-ST) により、6-mercaptoprine (6-MP) へと速やかに変換された後、3つの経路により代謝を受ける。1つは thiopurine methyltransferase (TPMT) により 6-MP がメチル化され、薬理活性をもたない 6-methyl mercaptopurine (6-methyl-MP) に代謝される経路である。2つ目は hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HGPRT) により thioinosine monophosphate (TIMP) へと代謝される経路であり、TIMP がさらに代謝を受け、methyl-thioinosine monophosphate (Methyl-TIMP) や 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) に変換されることで薬理作用を発揮する。そして、3つ目は xanthine oxidase (XO) により不活性な代謝物であ

関連因子の関与：

る 6-thiouric acid (6-TU) に代謝される経路であり、6-TU は尿中へと排泄されることから、これは解毒経路であると考えられる。しかし、この XO に触媒される反応では ROS の産生が伴い、この経路によって産生される ROS が酸化ストレスの原因となることが示唆されている。また、AZA 投与患者において発熱や発疹といった症状が稀に認められていることから、免疫および炎症反応が AZA 誘導性肝障害に寄与することが示唆されるが、免疫系および炎症関連因子の関与を検討した報告は未だにない。本研究では、AZA 誘導性肝障害の発症メカニズムにおける酸化ストレス、免疫および炎症関連因子の関与について検討を行った。

B. 実験方法

B-1 マウスへのアザチオプリン投与

Balb/cCrSlc (Balb/c) マウス (雌性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、AZA を 100、200 および 300 mg/kg (in corn oil) で単回経口投与または 2-7 日間反復経口投与した。投与 6、24、48 および 72 時間後に採血または肝臓を採取した。

B-3 GSH および GSH disulfide (GSSG) 含量測定

Tietze (1969) の方法を一部修正して、以下の方法により肝臓中総 GSH 含量を測定した。マウス肝臓 100 mg に対して 5% スルホサリチル酸 1 mL を加え、ガラスホ

モジナイザーでホモジェナイズし、1.5 mL チューブに分注後、6,500 g、4°C で 10 分間遠心後、上清を新しいチューブに移した。96 well プレーートの各ウェルに 0.3 mM β -NADPH 溶液 140 μ L と 4.8 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 溶液を 25 μ L 加え、5 分間室温で反応させ、上記操作で得られた肝ホモジェナイズ溶液の上清を 20 μ L ずつ加えた。GSH reductase 溶液 (4 Unit/mL) 25 μ L を加え、5 分後 405 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。GSSG を測定する際には、肝ホモジェナイズ溶液の上清 100 μ L にピニルピリジンを 2 μ L を加え、室温で 1 時間放置後に同様の操作を行った。

B-2 プロテインカルボニル含量測定

肝臓中プロテインカルボニル含量は Protein Carbonyl ELISA kit のマニュアルに従い、以下の方法で測定した。2-4 で調整した肝ホモジェネートを 4 mg/mL となるように精製水で希釈し、サンプル 50 μ L に対して、dinitrophenylhydrazine (DNP) 溶液を 200 μ L 加え 45 分間室温で放置した。その後、5 μ L を 1 mL の緩衝液中に移すことで反応を停止し、このうち 200 μ L を ELISA 用 96 well プレーートに移し、4°C で over night 静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、blocking solution を 1 well あたり 250 μ L 加え 30 分間室温で静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、anti-DNP biotin antibody を 1 well あたり 200 μ L 加え

1 時間 37°C で静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、streptavidin HRP を 1 well あたり 200 μ L 加え 1 時間室温で静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、Chromatin reagent を 1 well あたり 200 μ L 加え 20 分間室温で静置した。Stopping reagent を 100 μ L 加え反応を停止させた後、450 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。

B-3 SOD 活性測定

肝臓中 SOD 活性は Superoxide Dismutase Assay kit のマニュアルに従い、以下の方法で測定した。2-4 で調整した肝ホモジェネートを 100 μ g/mL となるように精製水で希釈後、96 well プレーートに希釈サンプル 10 μ L および tetrazolium salt 溶液 200 μ L を添加した。Xanthine oxidase 溶液 20 μ L を加えることで反応を開始させ、20 分後に 450 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。

B-4 抗酸化剤投与

Balb/cCrSlc マウスに 3、4 および 5 日間 AZA (200 mg/kg, *p.o.*) と tempol (200 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) の同時投与を行った。AZA および tempol 最終投与 24 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した

B-5 XO 阻害剤投与

Balb/cCrSlc マウスに、3 日間 AZA (200 mg/kg, *p.o.*) と allopurinol (30 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) の同時投与を行った。AZA および allopurinol 最終投与 0、1、3

および 6 時間後に尾静脈より、24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-6 TLR4 アンタゴニスト投与

Balb/cCrSlc マウスに、5 日間 AZA (200 mg/kg, *p.o.*) を投与し、5 日目に AZA (200 mg/kg, *p.o.*) と eritoran (50 µg/mouse in 0.2 mL sterile saline, *i.v.*) の同時投与を行った。AZA および eritoran 投与 24 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-7 統計解析

2 群間における統計学的解析は Student's t-test により、多群間における統計学的解析は ANOVA および Tukey 検定により解析し、 $P < 0.05$ のとき、統計学的に有意であると判断した。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 AZA 投与による肝障害モデルマウス作製

C-2 グルタチオンの検討

GSH は反応性代謝物や ROS の解毒に重要な役割をもつことが知られている。また、GSH は酸化ストレスに反応して酸化型である GSSG に変換されるため、それぞれの比をとった GSH/GSSG の値は酸化ストレスの指標として用いられる。AZA 投与における肝臓中 GSH は、corn oil 投与や NT と比較し、1、3、5 および 6 日間投

ウス作製

AZA 投与による血漿中生化学パラメータ値の変動を検討した。血漿中 ALT および AST 値は、AZA 200 mg/kg 投与 3 日間で溶媒 (corn oil) 投与および non-treated (NT) と比較し有意な上昇が認められ、5 日間および 6 日間ではさらに顕著な上昇が認められた (Fig. 2A)。Corn oil 投与において ALT および AST 値の上昇は認められなかった。AZA 投与時の投与量依存性を検討したところ、AZA 投与量 100、200 および 300 mg/kg において ALT 値の最高値はそれぞれ約 1900、2500 および 2000 (U/l) であった。AZA 200 mg/kg の 6 日間投与後の ALT 値の時間推移を検討したところ、最終投与 24 時間後において最も高い値を示した。さらに、肝切片の H&E 染色による組織評価を行ったところ、AZA 投与マウスの肝臓において、肝小葉構造の変形、肝細胞の肥大および凝固性壊死が認められた。

与後において有意な減少が認められた。一方、肝臓中 GSSG は AZA 投与において、corn oil 投与や NT と比較し 3、5 および 6 日間投与後において有意な上昇が認められた。さらに、GSH/GSSG は GSH と同様に、AZA 投与において corn oil 投与や NT と比較し 1、3、5 および 6 日間投与後において有意な減少が認められた。

C-3 酸化ストレスマーカーの測定

酸化ストレスの関与をさらに検討するため、酸化ストレスマーカーとして用いられるプロテインカルボニルと SOD 活性の値を測定した。肝臓中プロテインカルボニルは AZA 投与により経日的な上昇傾

向が見られ、6日間投与後において corn oil 投与と比較し有意な上昇が認められた。

一方、肝臓中の SOD 活性は AZA 投与により経日的な減少傾向が見られ、5日間および6日間投与後において、corn oil 投与や NT と比較し有意な減少が認められた。

C-4 抗酸化剤併用投与による AZA 誘導性肝障害への影響

抗酸化剤である tempol を AZA と同時に投与し、ALT 値および肝臓中 SOD 活性を測定した。血漿中 ALT 値は AZA 単独投与と比較し tempol 併用投与において、4および5日間投与後に有意な減少が認められた。また、5日間 AZA 投与後における SOD 活性の減少は、tempol の併用投与により有意に抑制された。

C-5 XO 阻害剤併用投与による AZA 誘導性肝障害への影響

AZA 誘導性肝障害における XO の関与を検討するため、AZA と XO 阻害剤である allopurinol の併用投与を行い、血漿中 ALT 値を測定した。AZA 単独投与と比較し allopurinol 併用投与において、血漿中 ALT 値に有意な減少が認められた。

C-6 AZA 誘導性肝障害における ROS の関与

AZA 誘導性肝障害における ROS の関与を検討するため、AZA と XO 阻害剤である allopurinol の併用投与を行い、血漿中 ALT 値および ROS の一種である H_2O_2

濃度を測定した。3日間 AZA 単独または allpourinol 併用投与後の血漿中 H_2O_2 濃度を経時的に測定したところ、allpourinol 併用投与において血漿中 H_2O_2 濃度の低下傾向が見られ、最終投与1時間後において有意な低下が認められた。

C-7 自然免疫系および DAMPs 関連遺伝子の mRNA 変動解析

TLR2、TLR4、RAGE、S100A8 および S100A9 の肝臓中 mRNA 発現を測定したところ、AZA 投与において corn oil 投与

や NT と比較し、TLR2 は 3、5 および 6 日間投与後に、TLR4 は 5 および 6 日間投与後に、RAGE、S100A8 および S100A9 は 5 日間投与後に有意な上昇が認められた。

C-8 血漿中 HMGB1 タンパク質量の測定

HMGB1 は活性化された免疫細胞から

能動的に放出されるものと、ネクローシスを起こした細胞から受動的に放出されるものがあるため、肝臓中 mRNA 発現と血漿中タンパク質濃度に相関が得られない場合がある。そのため、ELISA により

C-9 TLR4 アンタゴニスト併用投与による AZA 誘導性肝障害への影響

TLR4 シグナル経路が AZA 誘導性肝障害に関与するか検討するために、TLR4 のアンタゴニストである eritoran の併用投

C-10 炎症関連遺伝子、サイトカインおよびケモカインの mRNA 変動解析

AZA 誘導性肝障害に獲得免疫系や炎症反応に関与するか検討するため、T 細胞の転写関連因子として T-bet、GATA3 および ROR- γ t を、炎症性サイトカインおよびケモカインとして IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、NALP3 および MIP-2 の肝臓中 mRNA 発現を測定した。T 細胞の転写関連因子の肝臓中 mRNA 発現は AZA 投与において corn oil 投与や NT と比較し、T-bet は 5 日間投与後において有意な上昇が認められた。一方、GATA3、ROR- γ t の肝臓中 mRNA 発現変動は認められなかった。

炎症性サイトカインおよびケモカイン

D. 考察

免疫抑制剤として臨床で使用されている AZA も頻度は低いですが、肝障害の発症が報告されている。肝障害発症の原因として酸化ストレスが関与することが示唆さ

血漿中 HMGB1 タンパク質濃度を測定した。その結果、AZA 投与において corn oil 投与や NT と比較し、6 日間投与後に有意な上昇が認められた。

与を行い、血漿中 ALT 値の測定を行った。その結果、AZA 単独投与と比較し eritoran 併用投与において、血漿中 ALT 値に有意な減少が認められた。

の肝臓中 mRNA 発現は AZA 投与において corn oil 投与や NT と比較し、NALP3 は 5 日間投与後に、TNF- α 、IL-1 β および MIP-2 は、5 および 6 日間投与後において有意な上昇が認められた。一方、IFN- γ の肝臓中 mRNA 発現変動は認められなかった。

C-11 AZA 誘導性肝障害における免疫細胞浸潤

AZA 誘導性肝障害に肝臓への好中球の浸潤に関与するか検討するため、抗 MPO 抗体による肝切片の免疫染色を行った。その結果、6 日間 AZA 投与において、MPO 陽性細胞が肝実質細胞に認められたが、corn oil 投与においては認められなかった。

れているが、臨床報告においては発熱や発疹等の症状も認められていることから、免疫系および炎症反応の関与も疑われている。しかし、AZA の肝毒性と免疫系の関連を示す報告は未だされていない。AZA