

Fig. 7. Effects of 1-aminobenzotriazole (ABT) on plasma ALT levels in AMD+DEX-administered mice. Mice were administered DEX (60 mg/kg, *i.p.*) for 3 days. One hour before AMD-administration, mice were treated with ABT (100 mg/kg, *i.p.*). Twenty-four hours after the final administration of DEX, mice were treated with AMD (1000 mg/kg, *p.o.*). Twenty-four hours after AMD-administration, blood was collected. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 5). \*  $p < 0.05$ , compared with AMD+DEX-administered mice.

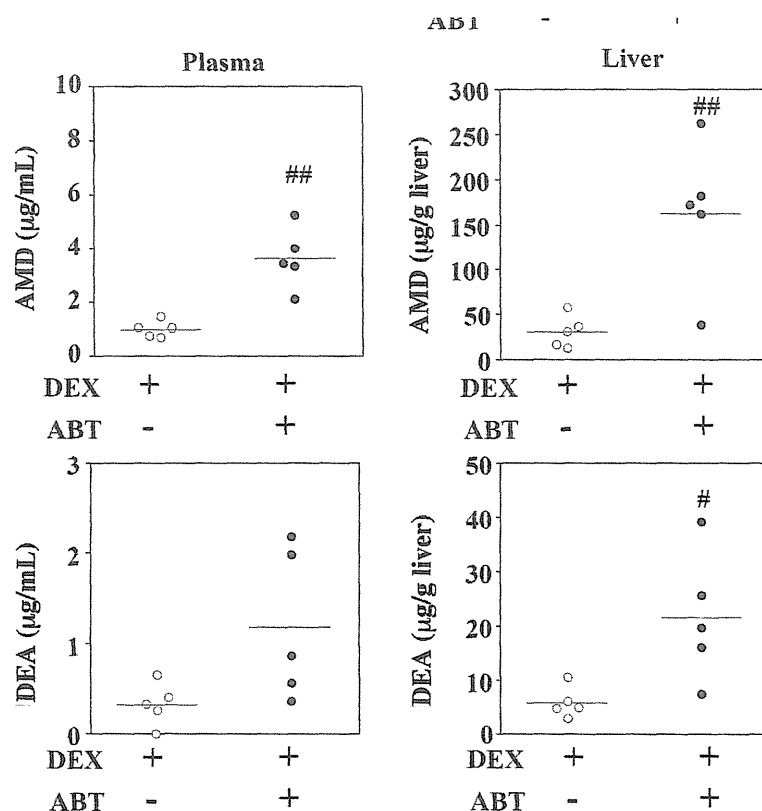


Fig. 8. Plasma and hepatic concentrations of AMD and DEA in AMD+DEX- or AMD+DEX+ABT-administered mice. #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$ , compared with AMD+DEX-administered mice.

血漿中 ALT 値と血漿中および肝臓中 AMD および DEA 濃度の関係を評価したところ、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 (Fig. 9)。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。

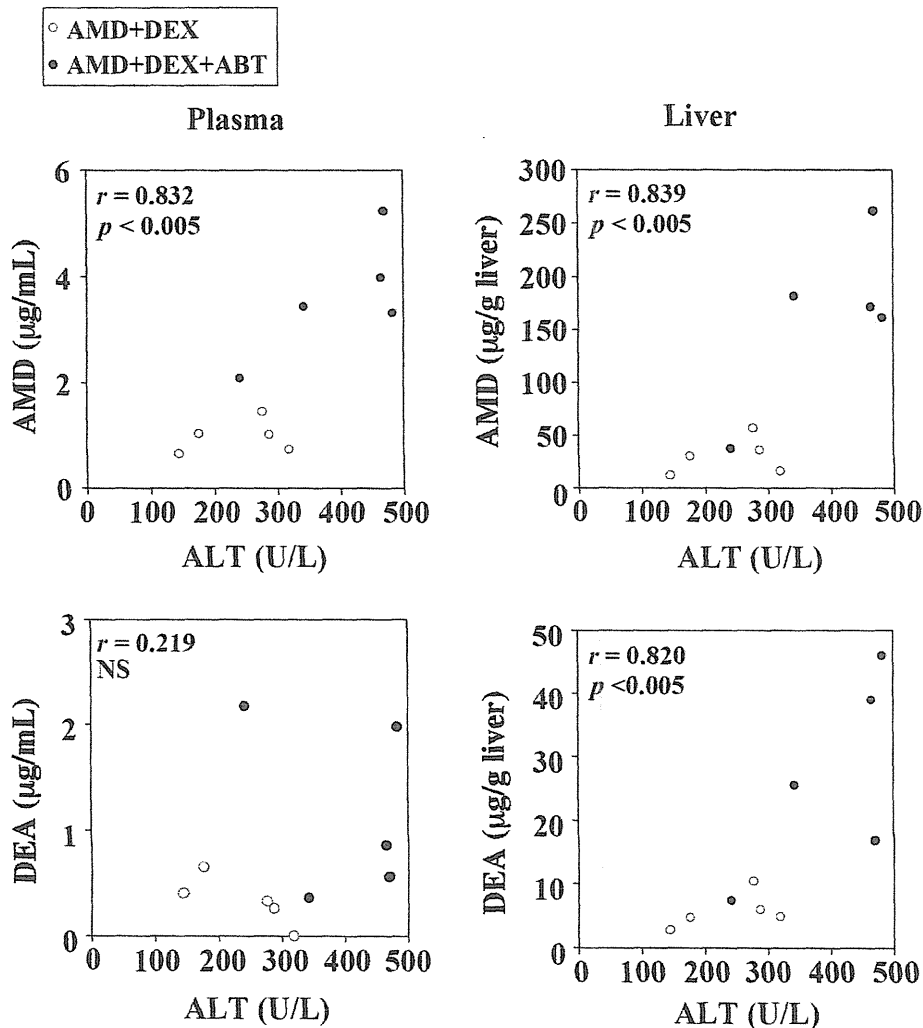


Fig. 9. Correlation between plasma ALT levels and concentrations of AMD or DEA in plasma or liver in AMD+DEX- or AMD+DEX+ABT-administered mice.

C-5 テストステロン 6β-水酸化酵素活性測定による Cyp3a 活性の評価

デキサメタゾンによる Cyp3a 誘導効果、  
ケトコナゾールまたは 1-アミノベンゾト

リアゾール併用投与による Cyp3a 阻害効果  
が認められるか確認するため、マウス  
肝ミクロソームを用いてテストステロン  
6β-水酸化酵素活性を測定した。Fig. 10 に

示すようデキサメタゾン投与群でコントロール群と比較してテストステロン 6β-水酸化酵素活性が有意に高値を示したことから、Cyp3a の誘導が示唆された。また、デキサメタゾンを前処理した AMD 投与群においてデキサメタゾン投与群と比較してテストステロン 6β-水酸化酵素活性が低値を示した。これは AMD または DEA が Cyp3a を不可逆的に阻害したことによるものと考えられる。さらにケトコナゾールを併用投与した群ではデキサメ

タゾンを前処理した AMD 投与群との間に酵素活性の差は認められなかった。また、1-アミノベンゾトリアゾールを併用投与した群の間でも酵素活性の差は認められなかった (Fig. 10)。これらはデキサメタゾンにより Cyp3a が誘導されたところに AMD および DEA で阻害かかかっているため、ケトコナゾールまたは 1-アミノベンゾトリアゾールによるさらなる阻害効果が認められなかったことが原因であると考えられた。

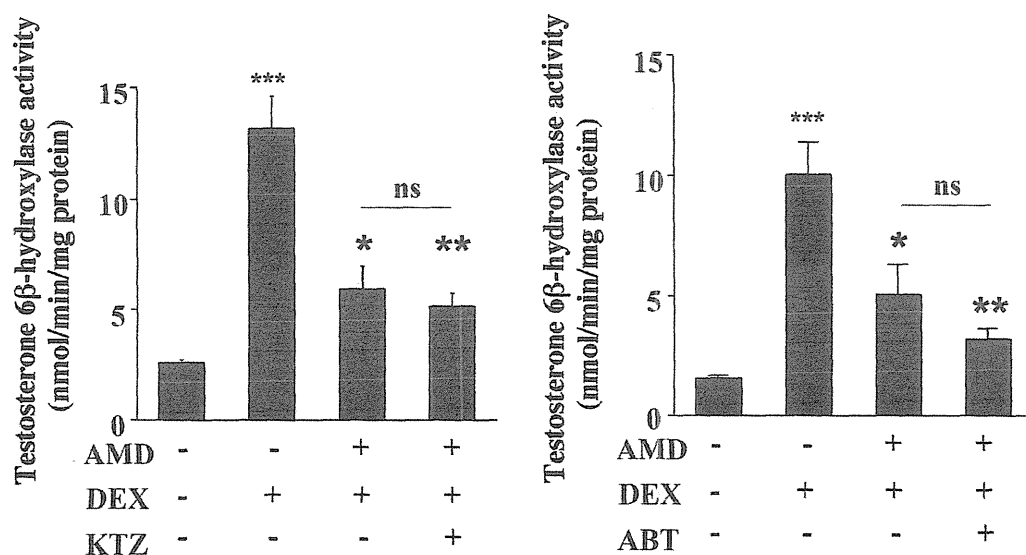


Fig. 10. Effects of AMD, DEX, KTZ and ABT on testosterone 6b-hydroxylase activity of hepatic microsomes. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4 to 5). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001, compared with control mice. ns: not significant.

C-6 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

Endo ら (2012) の研究において、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 (TNF $\alpha$ ) の産生上昇が認められている。そこで、肝類洞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 (Fig. 11)。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。

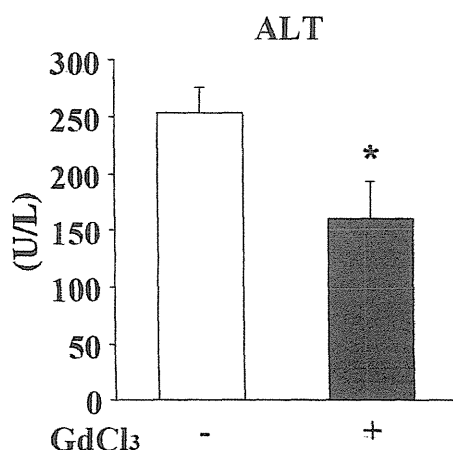


Fig. 11. Effects of gadolinium chloride (GdCl<sub>3</sub>) administration on plasma ALT levels in AMD+DEX-administered mice. Mice were administered DEX (60 mg/kg, *i.p.*) for 3 days. Forty-eight and twenty-four hours before the AMD-administration, mice were treated with GdCl<sub>3</sub> (10 mg/kg, *i.v.*). Twenty-four hours after the final administration of DEX, mice were administered AMD (1000 mg/kg, *p.o.*). Twenty-four hours after the AMD administration, blood was collected. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4 and 8). \**p* < 0.05, compared with AMD+DEX-administered mice.

クッパー細胞は炎症性サイトカインの放出または酸化ストレスの増悪を介して肝障害に関与する。炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF $\alpha$  の肝臓中 mRNA 発現量を測定した。また、単球の走化性因子である monocyte chemotactic and activating factor (MCP-1)、免疫細胞に発現して apoptosis を引き起こす Fas ligand (FasL) とその受容体である Fas、helper T

細胞を誘導する転写因子である T-bet、マクロファージ活性化因子である interferon-g (IFN-g)、好中球の走化性因子である macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) の測定を行った。その結果 AMD 投与により IL-1 $\beta$ 、MIP-2 および IL-18 mRNA の発現量が低値を示した。TNF $\alpha$  と MCP-1 mRNA 発現量は高値を示す傾向が認められたものの有意ではなかった。

Fas と T-bet mRNA では発現量に差異が認められなかった。IL-6、IFN-g および FasL mRNA 発現量は定量限界以下であった

(Fig. 12)。以上より、サイトカイン等の免疫学的因子が肝毒性発現に関与しないことが示唆された。

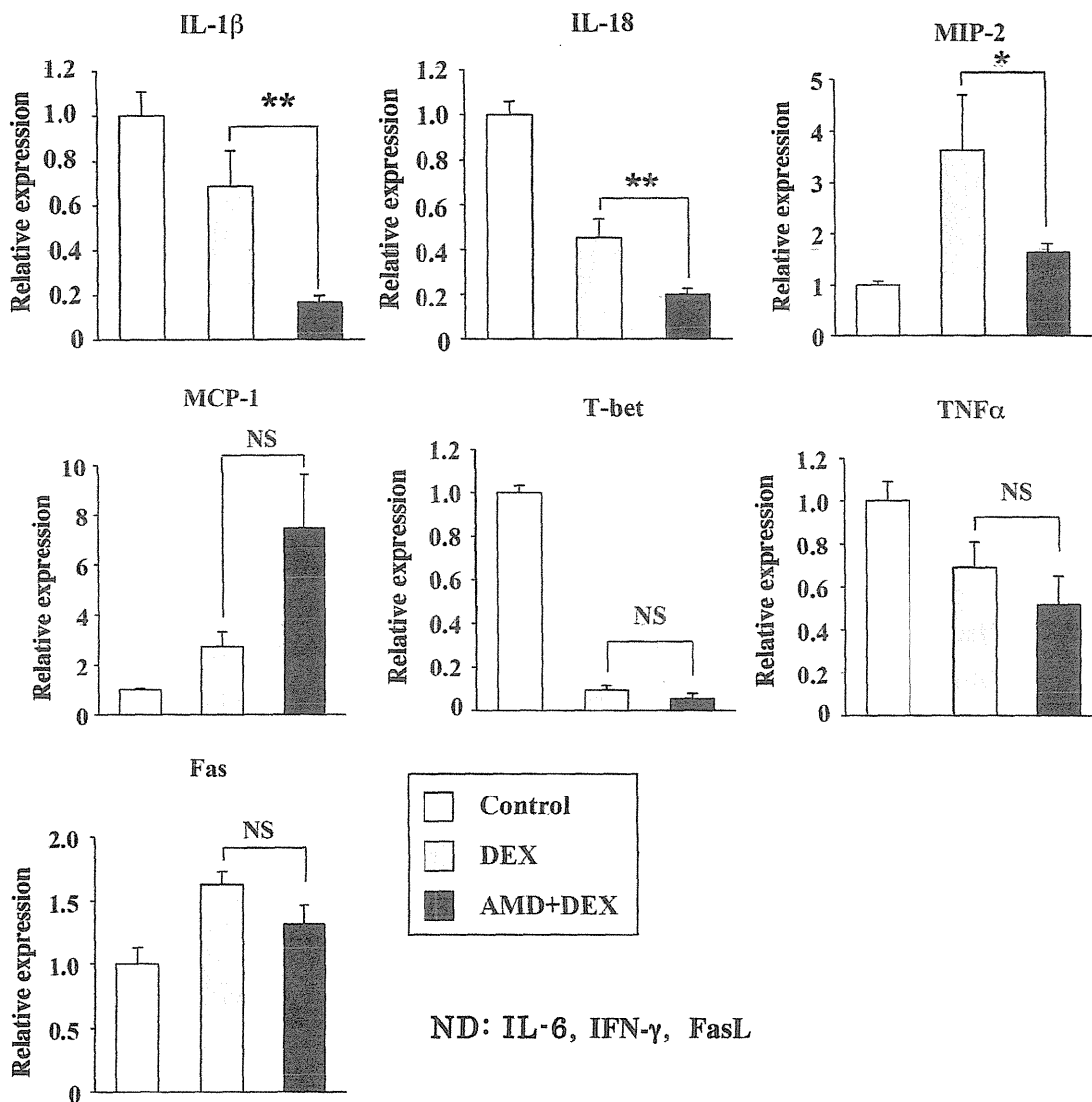


Fig. 12. Changes in the mRNA expressions of inflammatory-related factors by AMD administration. Mice were administered DEX (60 mg/kg, *i.p.*) for 3 days. Twenty-four hours after the final administration of DEX, mice were treated with AMD (1000 mg/kg, *p.o.*). Twenty-four hours after AMD administration, livers were collected. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  and  $8$ ). \* $p < 0.05$ , and \*\* $p < 0.01$ , compared with DEX-administered mice. ND: Not detected. NS: Not significant.

### C-7 肝臓中 GSH および GSSG 量の測定

抗酸化物質である GSH は酸化ストレスと反応して GSSG を生成する (Haddad et al., 2005)。すなわち GSH/GSSG 比の減少は酸化ストレスマーカーとなる。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 (Fig. 13)。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。

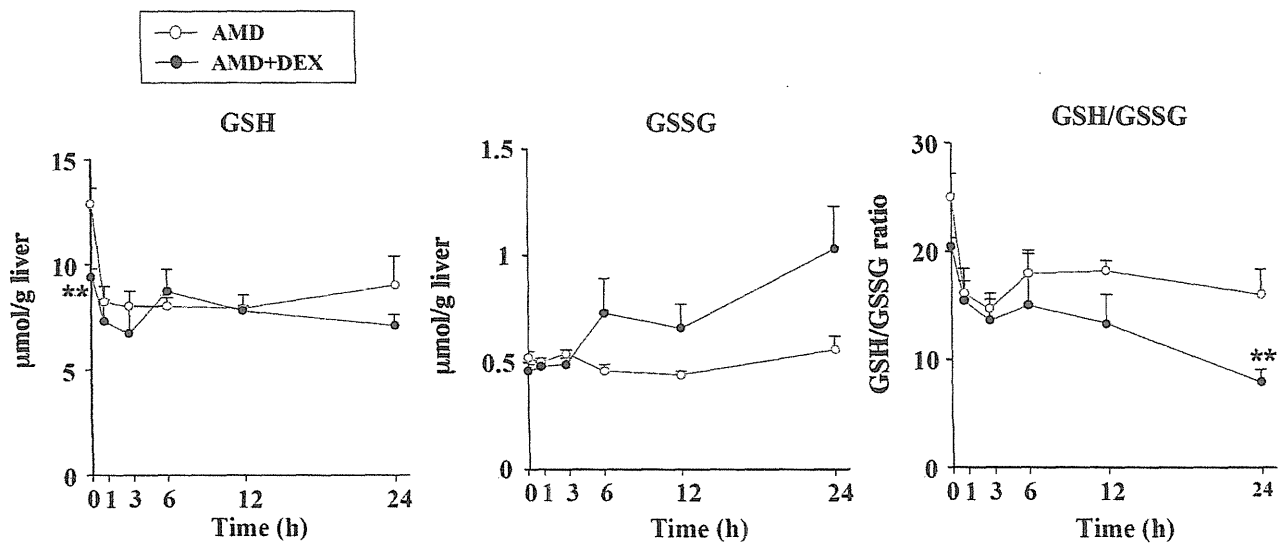


Fig. 13. Time-dependent changes in hepatic GSH and GSSG levels, and GSH/GSSG ratio in AMD- or AMD+DEX-administered mice. GSH and GSSG in liver homogenates were measured. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4 to 8). \*\* $p < 0.01$ , compared with AMD-administered mice.

### C-8 ミトコンドリア毒性に関する検討

ミトコンドリアにおける  $\beta$  酸化がマウスに AMD を投与することにより阻害されることが報告されており、これが steatosis 等の AMD 誘導性肝障害の原因となっていると考えられている (Fromenty et al., 1990)。そこで血漿中の triglyceride

量を測定することにより  $\beta$  酸化が阻害されているか検討を行った (Fig. 14)。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  $\beta$  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。

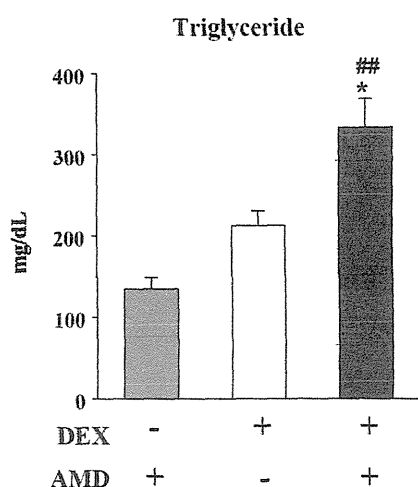


Fig. 14. Plasma triglyceride levels in AMD-, DEX- and AMD+DEX-administered mice. Mice were administered DEX (60 mg/kg, *i.p.*) for 3 days. Twenty-four hours after the final administration of DEX, mice were treated AMD (1000 mg/kg, *p.o.*). Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  to 8). <sup>##</sup> $p < 0.01$ , compared with AMD-administered mice. <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , compared with DEX-administered mice.

$\beta$  酸化の阻害はミトコンドリア毒性を示唆している。ミトコンドリア毒性により細胞死が起こる経路は2つ存在し、ATP 枯渇によるネクローシスと caspase-3 活性化によるアポトーシスである (Pessayre et al., 2012)。ミトコンドリアの機能低下が起こると膜電位が低下することにより ATP 合成能が低下し、細胞がネクローシスを引き起こす。一方、ミトコンドリア毒性が原因で細胞質に放出された cytochrome c は apoptosis protease-activating factor と相互作用し ATP 存在下で caspase-9 を経由して caspase-3 を切断し、cleaved caspase-3 を生成することでアポトーシスを引き起

こすことが知られている。デキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスに対するこの2つの経路の関与について検討を行った。肝臓中の ATP 量を測定したところ、AMD 投与後いずれの時間においてもデキサメタゾン前処理の有無によって肝臓中 ATP 量に有意な差は認められなかった (Fig. 15)。一方、肝臓中の cytochrome c および cleaved caspase-3 は AMD 投与マウスではほとんど発現が認められず、デキサメタゾン投与マウスおよびデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて発現が認められた (Fig. 16)。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。

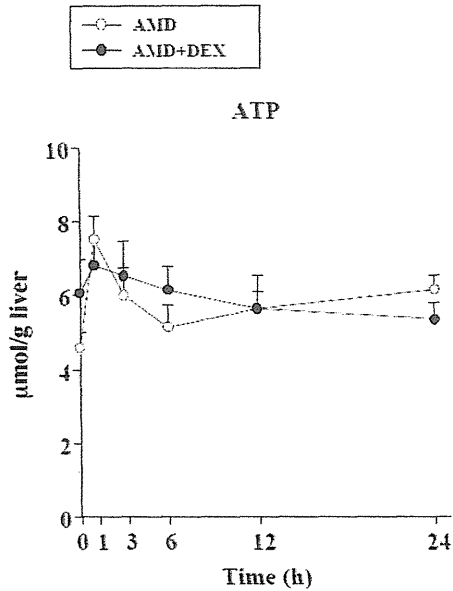


Fig. 15. Time-dependent changes of hepatic ATP levels in AMS- or AMD+DEX-administered mice. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4 to 8).

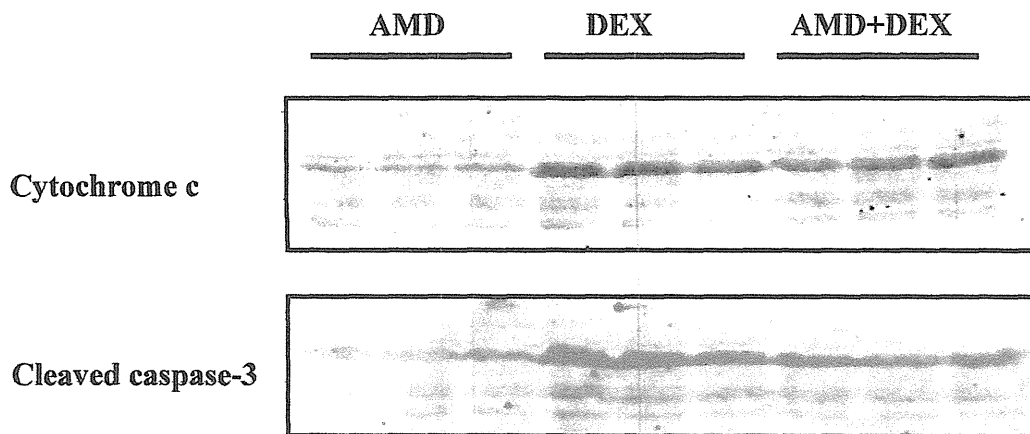


Fig. 16. Expression of hepatic cytochrome c and cleaved caspase-3 levels in AMD-, DEX-, or AMD+DEX-administered mice.

#### D. 考察

AMD 誘導性肝障害発症に対する薬物代謝の関与について、HepG2 細胞を用い

た検討 (Zahno et al., 2011)、ヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞を用いた検討 (Endo et al., 2012) やラット



肝細胞に DEA、DiDEA、3'-OH DEA および合成した誘導体を処置した検討 (Waldhauser et al., 2006) がなされており、いずれも CYP3A が関与することが示唆されている。しかし、代謝物が AMD の肝毒性発現に関与することを *in vivo* において明らかにした報告は存在していなかった。本研究では、個体差の小さい近交系マウスに対して Cyp3a の誘導作用があるデキサメタゾンを経口投与することにより ALT 値の上昇を伴う AMD 誘導性肝障害の惹起に成功した (Fig. 2)。

ヒトにおいて DEA 生成を触媒する主代謝酵素は CYP3A4 である (Fig. 1)。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 (Yanagimoto et al., 1989)。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。Larrey ら (1986) はラットに PCN

やフェノバルビタールを前投与するよりもデキサメタゾンを経口投与した後に AMD を投与した方がミクロソーム中の P450 と AMD 代謝物の複合体が多く検出されたことを報告している。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 (Ohayama et al., 2000a)、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 (Fontana et al., 2005; Larrey et al., 1986)。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 (Fontana et al., 2005)。MBI はジクロフェナクやチクロピジンなど種々の薬物において肝障害発症と関連することが示唆されている (Feng and He, 2013)。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経口投与することで肝障害を発症させることにした。

AMD の投与量は Kikkawa ら (2006) の報告を参考に、臨床投与量よりも過剰な 1000 mg/kg で検討を行った。AMD 投与マウスにおける平均血漿中 AMD 濃度は 1440 ng/mL、DEA 濃度は 303 ng/mL、デキサメタゾンを経口投与した AMD 投与マウスにおける平均血漿中 AMD 濃度は 557

ng/mL、DEA 濃度は 594 ng/mL であった (Fig. 3)。患者における AMD および DEA の平均血漿中濃度がそれぞれ 1163.3 ng/mL と 970.6 ng/mL であることを考慮すると (Ha et al., 2005)、臨床に近い条件で AMD 誘導性肝障害を惹起できたと考えられる。

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 (Fig. 3)。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 (Fig. 3)。これはデキサメタゾンを前処理したラットおよびマウスに AMD を投与することで P450 と AMD 代謝物の adduct の増加が認められた Larrey ら (1986) の報告から、デキサメタゾンにより発現増加した Cyp に DEA が結合した結果として血漿中・肝臓中に遊離している濃度に反映されなかったためと考えられる。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 (Fig. 4)。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。

デキサメタゾンを前処理した AMD 投

与マウスで発症した肝障害における Cyp3a の関与を明らかにするため、Cyp3a の阻害剤として用いられるケトコナゾールを併用投与した。しかし、ALT 値に差は認められず (Fig. 5)、血漿中 AMD 濃度および DEA 濃度、肝臓中 DEA 濃度にも有意な差異が認められなかった (Fig. 6)。ケトコナゾール投与で認められた肝臓中 AMD 濃度の低下は DEA 生成以外の代謝が亢進、または吸収および排泄過程に対してケトコナゾールが影響を与えた可能性が考えられた。ヒトケラチノサイトにおいてケトコナゾールにより AhR-Nrf2 が活性化されることが報告されており (Tsuji et al., 2012)、CYP1A の誘導剤である 3-メチルコラントレンをラットに投与することにより AMD の代謝物と P450 の複合体が低値を示したという報告もあることから (Larrey et al., 1986)、Cyp1a により生成される代謝物が増大して排泄された可能性が考えられる。しかし、DEA、DiDEA、3'-OH DEA 以外の代謝経路については関与する Cyp 分子種などについての報告がないため、Cyp1a によりどのような代謝物が生成されるかは不明である。また、肺上皮細胞において取り込みトランスポーターである organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) が AMD の細胞内蓄積に関与することが

報告されており (Seki et al., 2009)、Oatp2b1 がマウス肝臓においても発現することが知られていることから (Cheng et al., 2005)、ケトコナゾールがマウス Oatp2b1 を阻害したため、肝臓中の AMD 濃度が低値を示した可能性も考えられる。AMD の排泄に関与するトランスポーターについての報告はなく、こちらの詳細は不明である。

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 (Ohyama et al., 2000b)。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 (Emoto et al., 2003) 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 (Figs. 7-9)。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 (Fig. 7)。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 (Fig. 8)、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 (Fig. 9)。デキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて ALT 値が有意

に高値を示したにもかかわらず血漿中 AMD 濃度が有意に低値を示したこと (Fig. 3)、KTZ 投与により肝臓中 AMD 濃度が有意に低値を示したにもかかわらず ALT 値に変動が認められなかったこと (Fig. 5) を考えると、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  $\text{LogP} = 6.4$  という非常に高い脂溶性を示すため (Lapenna et al., 2007)、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。

ケトコナゾールおよび 1-アミノベンゾトリアゾール併用投与による Cyp3a 活性への影響をテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性を測定することにより評価したが、これらの併用投与の有無により Cyp3a 活性に影響は認められず、阻害効果が認められないことが示された (Fig. 10)。

Wilson VS と LeBlanc GA (2000) はケトコナゾール投与により Cyp3a 活性の阻害効果を、Balani ら (2004) は 1-アミノベンゾトリアゾール投与により Cyp 分子種非特異的基質であるアンチピリンの代謝が阻害されることから Cyp の阻害効果を確認している。本検討ではデキサメタゾンを Cyp3a の誘導剤として投与しているた

め、Cyp3a 誘導作用が阻害剤の作用よりも強力であったことが阻害効果を確認できなかった、または AMD および DEA で阻害かかかっているため、ケトコナゾールまたは 1-アミノベンゾトリアゾールによるさらなる阻害効果が認められなかったことが原因であると考えられた。また、1-アミノベンゾトリアゾール併用投与により血漿中および肝臓中 AMD 濃度と肝臓中 DEA 濃度が上昇したのは Cyp3a 以外の Cyp 分子種が阻害されたことによるものであると考えられた。

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 (Fig. 11)、*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。クッパー細胞は肝類洞内に存在する組織マクロファージであり (Roberts et al., 2007)、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 (Liu et al., 2006; Toyoda et al., 2012)。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 (Bilzer et al., 2006)。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-1b や TNF $\alpha$  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 (Bilzer et al., 2006; Jaeschke et al., 2012)。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 (Fig. 12)。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 $\beta$ 、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 (Fig. 13)。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。

AMD 誘導性肝障害の一因はミトコンドリア毒性に由来する報告も存在する (Pessayre et al., 2012)。AMD は陽イオン性の両親媒性を有する化合物であり、脂溶性に富む部位とアミン基を持つことからプロトン化を受けてミトコンドリア内に蓄積し、 $\beta$ 酸化の阻害、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖の抑制を引き起こす (Pessayre et al., 2012)。 $\beta$ 酸化の阻害は脂質代謝異常を引き起こすため体内の脂質を上昇させ、呼吸鎖抑制により酸化ストレスが上昇する。AMD 誘導性肝障害の臨床像はアルコール性肝障害に類似しており (Lewis et al., 1990)、 $\beta$ 酸化阻害による triglyceride 上昇により steatosis に至った状態と考えられている。マウスに AMD を投与することにより triglyceride が高値を示すことが報告されているが (Fromenty et al., 1990)、この報告では ALT 値については解析されておらず、*in vivo* においてはミトコンドリア毒性と ALT 値の上昇をともなう AMD 誘導性肝障害の関連性は明確ではなかった。Fig. 14 においてデキサメタゾンを経前処理した AMD 投与マウスで血漿中 triglyceride 量の有意な上昇が認められたことから、ALT 値の上昇原因の一つがミトコンドリア毒性である可能

性が示された。AMD の肝毒性については *in vitro* での検討においてネクローシスとアポトーシスの両方の関与を示唆する報告が存在し、ヒト肝がん由来細胞である HepG2 細胞に AMD を処置することでネクローシスが認められること (Di Matola et al., 2000)、ヒト子宮頸癌由来細胞である Hela 細胞に DEA 処置することでアポトーシス細胞が増加すること (Felser et al., 2013) が報告されている。しかし、どちらの細胞死経路の寄与が大きいのか検討はなされていなかった。デキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて肝臓中 ATP 濃度が減少せず、cytochrome c および cleaved caspase-3 の発現増加が認められたことからアポトーシス経路が AMD 誘導性肝障害に関与する可能性が示された (Figs. 15 and 16)。しかし、デキサメタゾンのみ投与したマウスとデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスとの間において cytochrome c および cleaved caspase-3 の発現量に差異が認められなかったことから、デキサメタゾンがミトコンドリア毒性を増強させた結果、AMD 誘導性肝障害の増悪を亢進したことが考えられた。アポトーシスを引き起こした細胞は通常マクロファージ等の食細胞により除去されるため (Canbay et al., 2004)、逸脱酵素である ALT が血中に検出されな

いことが予想されるが、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-xL および Mcl-1 をノックアウトしたマウスにおいて生後から血清 ALT 値が高値を示すことが報告されていることから (Hikita et al., 2009; Takehara et al., 2004)、肝細胞のアポトーシスにより ALT 値が上昇することは十分に考えられる。以上より、デキサメタゾンによるアポトーシスが起きている状態が AMD 投与による肝障害の増悪に関与し、血漿中 ALT 値の上昇につながったと考えられた。

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。

#### <参考文献>

Adams PC, Holt DW, Storey GC, Morley AR,

- Callaghan J, and Campbell RW (1985) Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation* **72**: 1064-1075.
- Balani SK, Li P, Nguyen J, Cardoza K, Zeng H, Mu DX, Wu JT, Gan LS, and Lee FW (2004) Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in guinea pigs and mice using serial sampling. *Drug Metab Dispos* **32**: 1092-1095.
- Bilzer M, Roggel F, and Gerbes AL (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* **26**: 1175-1186.
- Björnsson E and Olsson R (2005) Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* **42**: 481-489.
- Canbay A, Friedman S, and Gores GJ (2004) Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* **39**: 273-278.
- Cheng X, Maher J, Chen C, and Klaassen CD (2005) Tissue distribution and ontogeny of mouse organic anion transporting polypeptides (Oatps). *Drug Metab Dispos* **33**: 1062-1073.
- Di Matola T, D'Ascoli F, Fenzi G, Rossi G, Martino E, Bogazzi F, and Vitale M (2000) Amiodarone induces cytochrome c release and apoptosis through an iodine-independent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 4323-4330.
- Emoto C, Murase S, Sawada Y, Jones BC, and Iwasaki K (2003) *In vitro* inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**: 287-295.
- 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.
- Felser A, Blum K, Lindinger PW, Bouitbir J, and Krähenbühl S (2013) Mechanisms of hepatocellular toxicity associated with dronedarone-A comparison to amiodarone. *Toxicol Sci* **131**: 480-490.
- Feng S and He X (2013) Mechanism-based inhibition

- of CYP450: an indicator of drug-induced hepatotoxicity. *Curr Drug Metab* **14**: 921-945.
- Fontana E, Dansette PM, and Poli SM (2005) Cytochrome P450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity. *Curr Drug Metab* **6**: 413-454.
- Fromenty B, Fisch C, Labbe G, Degott C, Deschamps D, Berson A, Letteron P, and Pessayre D (1990) Amiodarone inhibits the mitochondrial  $\beta$ -oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **255**: 1371-1376.
- Giri S, Nieber K, and Bader A (2010) Hepatotoxicity and hepatic metabolism of available drugs: current problems and possible solutions in preclinical stages. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**: 895-917.
- Ha HR, Bigler L, Binder M, Kozlik P, Stieger B, Hesse M, Altorfer HR, and Follath F (2001) Metabolism of amiodarone (part I): Identification of a new hydroxylated metabolite of amiodarone. *Drug Metab Dispos* **29**: 152-158.
- Ha HR, Bigler L, Wendt B, Maggiorini M, and Follath F (2005) Identification and quantitation of novel metabolites of amiodarone in plasma of treated patients. *Eur J Pharm Sci* **24**: 271-279.
- Haddad JJ and Harb HL (2005) L-g-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol Immunol* **42**: 987-1014.
- Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hennighausen L, Tatsumi T, and Hayashi N (2009) Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* **50**: 1217-1226.
- 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 (2012b) 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 (2012c) Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* **130**: 4-16.
- Jaeschke H, McGill MR, and Ramachandran A (2012) Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* **44**: 88-106.
- Jin H, Dai J, Chen X, Liu J, Zhong D, Gu Y, and Zheng J (2009) Pulmonary toxicity and metabolic activation of dauricine in CD-1 mice. *J Pharmacol Exp Ther* **332**: 738-746.
- Kaniwa N and Hasegawa R (2009) Exploratory studies on genetic biomarkers related to serious drug adverse reaction. *Bull Natl Inst Health Sci* **127**: 1-14.
- Kaplowitz N (2001) Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf* **24**: 483-490.
- Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 489-499.
- Kikkawa R, Fujikawa M, Yamamoto T, Hamada Y, Yamada H, and Horii I (2006) *In vivo* hepatotoxicity study of rats in comparison with *in vitro* hepatotoxicity screening system. *J Toxicol Sci* **31**: 23-34.
- 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.
- Kozlik P, Ha HR, Stieger B, Bigler L, and Follath F

- (2001) Metabolism of amiodarone (Part III): Identification of rabbit cytochrome P450 isoforms involved in the hydroxylation of mono-*N*-desethylamiodarone. *Xenobiotica* **31**: 239-248.
- Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Neri M, Giamberardino MA, and Cuccurullo F (2007) Amiodarone inhibits tocopherol-mediated human lipoprotein peroxidation. *Biochem Pharmacol* **74**: 265-272.
- Larrey D, Tinel M, Letteron P, Geneve J, Descatoire V, and Pessayre D (1986) Formation of an inactive cytochrome P-450Fe(II)-metabolite complex after administration of amiodarone in rats, mice and hamsters. *Biochem Pharmacol* **35**: 2213-2220.
- Lewis JH, Mullick F, Ishak KG, Ranard RC, Ragsdale B, Perse RM, Rusnock EJ, Wolke A, Benjamin SB, Seeff LB, and Zimmerman HJ (1990) Histopathologic analysis of suspected amiodarone hepatotoxicity. *Hum Pathol* **21**: 59-67.
- Lewis JH, Ranard RC, Caruso A, Jackson LK, Mullick F, Ishak KG, Seeff LB, and Zimmerman HJ (1989) Amiodarone hepatotoxicity: prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients. *Hepatology* **9**: 679-685.
- Liu ZX and Kaplowitz N (2006) Role of innate immunity in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**: 493-503.
- Lu J, Jones AD, Harkema JR, Roth RA, and Ganey PE (2012) Amiodarone exposure during modest inflammation induces idiosyncrasy-like liver injury in rats: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Toxicol Sci* **125**: 126-133.
- McDonald MG, Au NT, Wittkowsky AK, and Rettie AE (2012) Warfarin-amiodarone drug-drug interactions: determination of  $[I](u)/K(I,u)$  for amiodarone and its plasma metabolites. *Clin Pharmacol Ther* **91**: 709-717.
- Merot J, Charpentier F, Poirier JM, Coutris G, and Weissenburger J (1999) Effects of chronic treatment by amiodarone on transmural heterogeneity of canine ventricular repolarization *in vivo*: interactions with acute sotalol. *Cardiovasc Res* **44**: 303-314.
- Mosher B, Dean R, Harkema J, Remick D, Palma J, and Crockett E (2001) Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury. *J Surg Res* **99**: 201-210.
- Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, and Yokoi T (2000a) Inhibitory effects of amiodarone and its *N*-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: prediction of *in vivo* drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* **49**: 244-253.
- Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H, and Yokoi T (2000b) A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone *N*-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos* **28**: 1303-1310.
- Pessayre D, Fromenty B, Berson A, Robin MA, Lett eron P, Moreau R, and Mansouri A (2012) Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev* **44**: 34-87.
- Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, and Klaunig JE (2007) Role of the kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci* **96**: 2-15.
- Scheer N, Ross J, Kapelyukh Y, Rode A, and Wolf CR (2010) *In vivo* responses of the human and murine pregnane X receptor to dexamethasone amethasone in mice. *Drug Metab Dispos* **38**: 1046-1053.
- Sasaki E, Matsuo K, Iida A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2013) A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. *Toxicol Sci* **136**: 250-263.
- Seki S, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, and Iseki K (2009) Contribution of organic anion transporting polypeptide OATP2B1 to amiodarone accumulation in lung epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1788**: 911-917.
- Shayeganpour A, Somayaji V, and Brocks DR (2007) A liquid chromatography-mass spectrometry assay method for simultaneous determination of



- amiodarone and desethylamiodarone in rat specimens. *Biomed Chromatogr* **21**: 284-290.
- Shimizu S, Atsumi R, Itokawa K, Iwasaki M, Aoki T, Ono C, Izumi T, Sudo K, and Okazaki O (2009) Metabolism-dependent hepatotoxicity of amodiaquine in glutathione-depleted mice. *Arch Toxicol* **83**: 701-707.
- Shimizu S, Atsumi R, Nakazawa T, Izumi T, Sudo K, Okazaki O, and Saji H (2011) Ticlopidine-induced hepatotoxicity in a GSH-depleted rat model. *Arch Toxicol* **85**: 347-353.
- Spaniol M, Bracher R, Ha HR, Follath F, and Krähenbühl S (2001) Toxicity of amiodarone and amiodarone analogues on isolated rat liver mitochondria. *J Hepatol* **35**: 628-636.
- Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker, EB3rd, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, and Hayashi N (2004) Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* **127**: 1189-1197.
- Toyoda Y, Endo S, Tsuneyama K, Miyashita T, Yano A, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012) Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury. *Toxicol Sci* **126**: 16-27.
- Trivier JM, Pommery J, Libersa C, Caron J, and Lhermitte M (1992) High-performance liquid chromatographic assay for amiodarone N-deethylation in microsomes of rat liver. *J Chromatogr* **579**: 269-276.
- Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Matsuda T, Chiba T, Takeuchi S, Yasukawa F, Moroi Y, and Furue M (2012) Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect. *J Invest Dermatol* **132**: 59-68.
- Waldhauser KM, Török M, Ha HR, Thomet U, Konrad D, Brecht K, Follath F, and Krähenbühl S (2006) Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* **319**: 1413-1423.
- Wilson VS and LeBlanc GA (2000) The contribution of hepatic inactivation of testosterone to the lowering of serum testosterone levels by ketoconazole. *Toxicol Sci* **54**: 128-137.
- Yanagimoto T, Itoh S, Muller-Enoch D, and Kamataki T (1992) Mouse liver cytochrome P-450 (P-450IIIAM1): its cDNA cloning and inducibility by dexamethasone. *Biochim Biophys Acta* **1130**: 329-332.
- 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.
- Zahno A, Brecht K, Morand R, Maseneni S, Török M, Lindinger PW, and Krähenbühl S (2011) The role of CYP3A4 in amiodarone-associated toxicity on HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* **81**: 432-441.
- E. 健康危険情報  
該当なし。
- F. 研究発表  
1. 論文発表  
Shohei Takai, Satonori Higuchi, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.  
Involvement of immune- and inflammatory-related factors in flucloxacillin-induced liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, in press (2014).
2. 学会発表  
高井翔平、深見達基、中島美紀、横井 毅：  
アミオダロン誘導性肝障害マウスの作出とその肝毒性メカニズムの解析 第41回日本毒学会学術年会にて発表予定  
2014.7.2-4 神戸
- G. 知的財産権の出願・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

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

主任研究者 横井 毅 名古屋大学大学院医学系研究科 教授

【背景・目的】 薬物誘導性肝障害は医薬品開発および薬物治療において、安全性上の重大な問題となっている。しかし、その発症機序には未だ不明な点が多く、実験動物で薬物の肝毒性を再現できない場合が多いため、ヒトにおける薬物誘導性肝障害発症の予測は現在のところ困難である。近年、発症メカニズムを解析するために、アセトアミノフェン誘導性肝障害モデルを用いた様々な検討がなされ、代謝過程で生成される反応性代謝物によるミトコンドリア障害や、酸化ストレス等が原因となることが明らかとされている。しかし、アセトアミノフェン誘導性肝障害モデルのみで様々な薬物における肝毒性メカニズムを説明できるかは不明である。

アザチオプリン (Azathioprine, AZA) は免疫抑制剤の一つであり、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臨床において使用されているが、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。

【実験方法】 8週齢の雌性BALB/cマウスにAZAを100、200および300 mg/kg (in corn oil, 10 mL/kg) で単回経口投与または2-7日間反復経口投与し、24時間後に採血または肝臓を採取した。血漿中ALT値は吸光度を測定することにより値を求め、肝臓中グルタチオン量、プロテインカルボニル量、スーパーオキシドジスムターゼ

(superoxide dismutase, SOD) 活性および血漿中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度はキットを用いて測定した。また、肝臓中mRNA発現量はreal-time RT-PCRにより、血漿中タンパク質濃度はELISAにより測定した。さらに、抗酸化剤tempol (200 mg/kg in sterilize PBS, 10 mL/kg, i.p.)、キサンチンオキシダーゼ阻害剤allopurinol (30 mg/kg in sterilize PBS, 10 mL/kg, i.p.) およびtoll-like receptor (TLR)-4アンタゴニストeritoran (50 µg/mouse in 0.2 mL sterile saline, i.v.) を併用投与し、血漿中ALT値を測定した。肝臓への好中球の浸潤は、抗ミエロペルオキシダーゼ抗体を用いた免疫染色により評価した。

【結果・考察】 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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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 $\beta$ およびtumor necrosis factor- $\alpha$ 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。

#### A. 研究目的

臨床および医薬品開発の治験段階における薬物の予期せぬ毒性発現は、患者の健康を脅かすだけでなく、製薬企業にとっても経済上大きな負担となる。その中でも肝毒性は、米国における医薬品市場撤退の21%に起因することが報告されており (Wilke et al., 2007)、開発早期において肝毒性を予測することが急務とされている。候補化合物の有効性及び安全性を予測するため、医薬品開発の全臨床試験における動物実験は不可欠とされている。しかし、ヒトと実験動物の種差などにより薬物の肝障害性を再現できない場合が多く、現在のところ薬物誘導性肝障害 (drug-induced liver injury, DILI) の発症予

測は困難であり、毒性発現機序にも不明な点が多く残されている。

薬物の肝障害性を予測するため、第一に生体内におけるメカニズムを解明することが最も重要な課題であると考えられる。動物モデルにおける DILI メカニズム解析において、acetaminophen (APAP) 誘導性肝障害は最も広く行われ、主に代謝の過程で生成される反応性代謝物によるミトコンドリア障害や、酸化ストレス等が原因となることが明らかとなっている (Holt and Ju, 2006; Park et al., 2005)。しかし、DILI の発症を酸化ストレスに起因するメカニズムだけで説明することは困難であり、DILI を発症した患者において発熱や発疹等のアレルギー症状が認められる場