

合も多いことから、免疫系を介した肝障害メカニズムも併せて考慮することが重要であると考えられる。

肝臓の非実質細胞にはクッパー細胞や樹状細胞等の免疫細胞が存在し、炎症性サイトカインやケモカインの産生および放出により、免疫反応を制御している。Toll-like receptor (TLR) や receptor for advanced glycation end products (RAGE) はクッパー細胞や樹状細胞に存在する受容体であり、主に自然免疫系の活性化に寄与する (Hennessy, 2010; Thornalley, 1998)。これらの受容体は high-mobility group box 1 (HMGB1) や S100 タンパク質等の damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) をリガンドとし、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β および macrophage inflammatory protein (MIP)-2 等の炎症性サイトカインやケモカインを放出することで、炎症反応が促進される (Lotze et al., 2007)。DAMPs は通常、活性化したマクロファージや損傷を受けた細胞から放出されるが、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) 等による酸化ストレスによって活性化されることも報告されている (Yao and Brownlee, 2010)。

当研究室ではこれまでに flutamide、diclofenac および carbamazepine 等の薬物

において DILI モデルマウスを作製し、T細胞により産生される炎症性サイトカインである IL-4、IL-17 が DILI の発症に重要な役割を果たすことを示している (Higuchi et al., 2012-1; Yano et al., 2011; Higuchi et al., 2012-2)。しかし、*in vivo* における DILI モデルは未だ数が少なく、これまでに見出された因子が、他の様々な薬物の肝障害メカニズムに寄与するかは不明である。そのため、薬物の肝障害性を包括的に検討するためには、さらに数多くの DILI モデルを作製し、そのメカニズムを解析することが必要であると考えられる。

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 (Dejaco et al., 2003; Maltzman et al., 2003; Dubinsky et al., 2004)。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 (Marinaki et al., 2004; Takatsu et al., 2009)、このうち肝障害の発症は、約 2% の患者で認められている (Aithal, 2011)。

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

一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 (El-Beshbishy et al., 2011; Amin and Hamza, 2005)。

ヒトにおける AZA の推定代謝経路を Fig. 1 に示した (イムランインタビューフォーム、2011)。

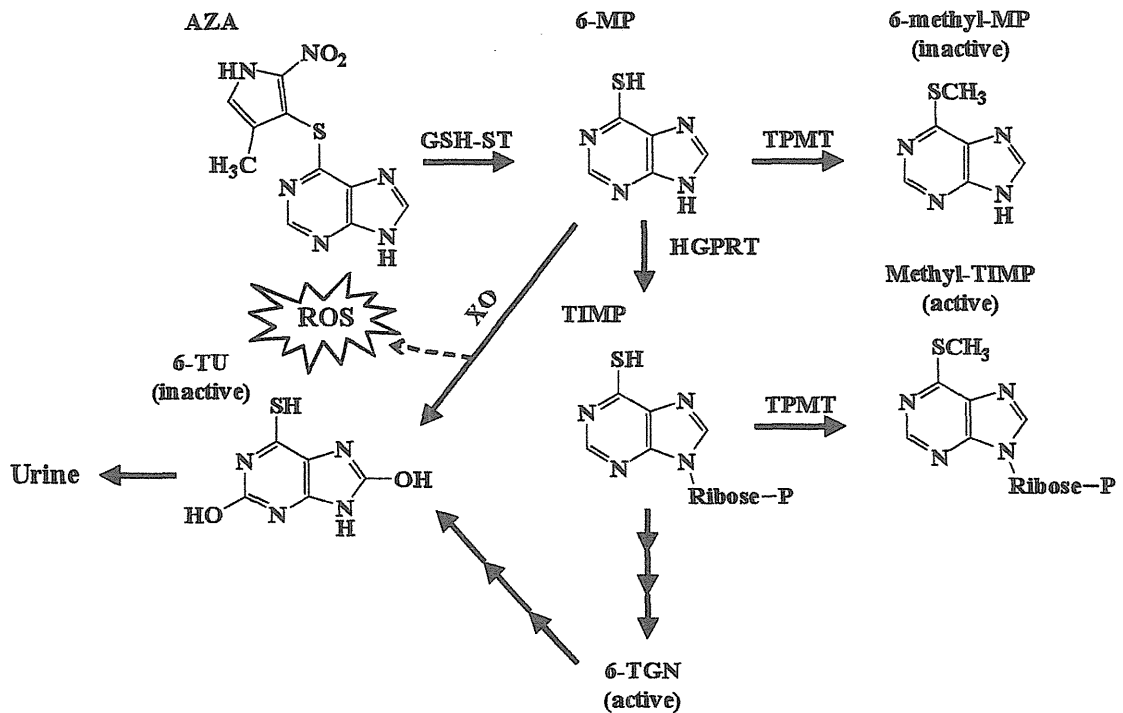


Fig. 1. Presumptive metabolic pathway of AZA in human

AZA : azathioprine, 6-MP : 6-mercaptopurine, 6-TU : 6-thiouric acid, TIMP : thioinosine monophosphate, 6-TGN : 6-thioguanine, GSH-ST : glutathione S-transferase, XO : xanthine oxidase, TPMT : thiopurine S-methyltransferase, HGPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

AZA は肝臓中で glutathione S-transferase (GSH-ST) により、6-mercaptopurine (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 (Wong et al., 2007; Hisamuddin et al., 2007)。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

(Metyl-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 (Petit et al., 2008; Ansari et al., 2008)。

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 (Jeurissen et al., 1990)、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 実験材料および実験試薬

AZA は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。Tempol は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より購入した。Allopurinol は和光純薬工業 (Osaka,

Japan) より購入した。Eritoran はエーザイ (Tokyo, Japan) より供与して頂いた。

RNAiso、ランダムヘキサマー、SYBR Premix Ex Taq は宝酒造 (Osaka, Japan) より購入した。ReverTra は東洋紡 (Tokyo, Japan) より購入した。プライマーは北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。Rabbit polyclonal antibody against myeloperoxidase (MPO) は DAKO (Carpinteria, CA) より購入した。HMGB1 ELISA kit II はシノテスト (Tokyo, Japan) より購入した。Protein Carbonyl ELISA kit は Enzo LifeScience (Farmingdale, NY) より購入した。Superoxide Dismutase Assay kit は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) より購入した。Hydrogen Peroxide Assay kit は Bio Vision (Milpitas, CA) より購入した。富士ドライケムスライド GPT/ALT-PHII および GOT/AST-PHII は富士フイルム (Tokyo, Japan) より購入した。

B-2 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 にビニルピリジンを 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-4 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-5 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。

Table 1

Sequences of primers used for real-time RT-PCR analyses

Gene		Sequence
TLR2	FP	5'-GAAAAGATGTCGTTCAAGGAG-3'
	RP	5'-TTGCTGAAGAGGACTGTTATG-3'
TLR4	FP	5'-TTCTTCTCCTGCCTGACACC-3'
	RP	5'-CCATGCCATGCCTTGTCTTC-3'
RAGE	FP	5'-GAAACTTCTGATTCCCGATGG-3'
	RP	5'-GCTCAACCAACAGCTGAATG-3'
S100A8	FP	5'-GATGGCCAACAAAGCACCTT-3'
	RP	5'-TAGACATATCCAGGGACCCAG-3'
S100A9	FP	5'-GATGGCCAACAAAGCACCTT-3'
	RP	5'-CCTCAAAGCTCAGCTGATTG-3'
T-bet	FP	5'-CAA GTG GGT GCA GTG TGG AAA G-3'
	RP	5'-TGG AGA GAC TGC AGG ACG ATC-3'
GATA3	FP	5'-GGA GGA CTT CCC CAA GAG CA-3'
	RP	5'-CAT GCT GGA AGG GTG GTG A-3'
ROR- γ t	FP	5'-ACC TCC ACT GCC AGC TGT GTG CTG TC-3'
	RP	5'-TCA TTT CTG CAC TTC TGC ATG TAG ACT GTC CC-3'
IFN- γ	FP	5'-GGC CAT CAG CAA CAT AAG C-3'
	RP	5'-TGG ACC ACT CGG ATG AGC TCA-3'
TNF- α	FP	5'-TGT CTC AGC CTC TTC TCA TTC C-3'
	RP	5'-TGA GGG TCT GGG CCA TAG AAC-3'
IL-1 β	FP	5'-GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT-3'
	RP	5'-CAC ACA CCA GCA GGT TAT CA-3'
NALP3	FP	5'-AGCCTTCCAGGATCCTCTTC-3'
	RP	5'-CTTGGGCAGCAGTTTCTTTC-3'
MIP-2	FP	5'-AAG TTT GCC TTG ACC CTG AAG-3'
	RP	5'-ATC AGG TAC GAT CCA GGC TTC-3'
GAPDH	FP	5'-AAA TGG GGT GAG GCC GGT-3'
	RP	5'-ATT GCT GAC AAT CTT GAG TGA-3'

FP, forward primer; RP, reverse primer.

B-6 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-7 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-8 H₂O₂ 濃度測定

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 H₂O₂ 濃度は Hydrogen Peroxide Assay kit のマニュアルに従い、以下の方法で測定した。96 well プレートに 1 well あたり血漿 25 μL、Assay buffer 25 μL を添加後、1 well あたり Assay buffer 46 μL、OxiRed™ Probe solution 2 μL および HRP solution 2 μL の混合液を全量加えることで反応を開始し、室温で 10 分間静置後、570 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。

B-9 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-10 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。

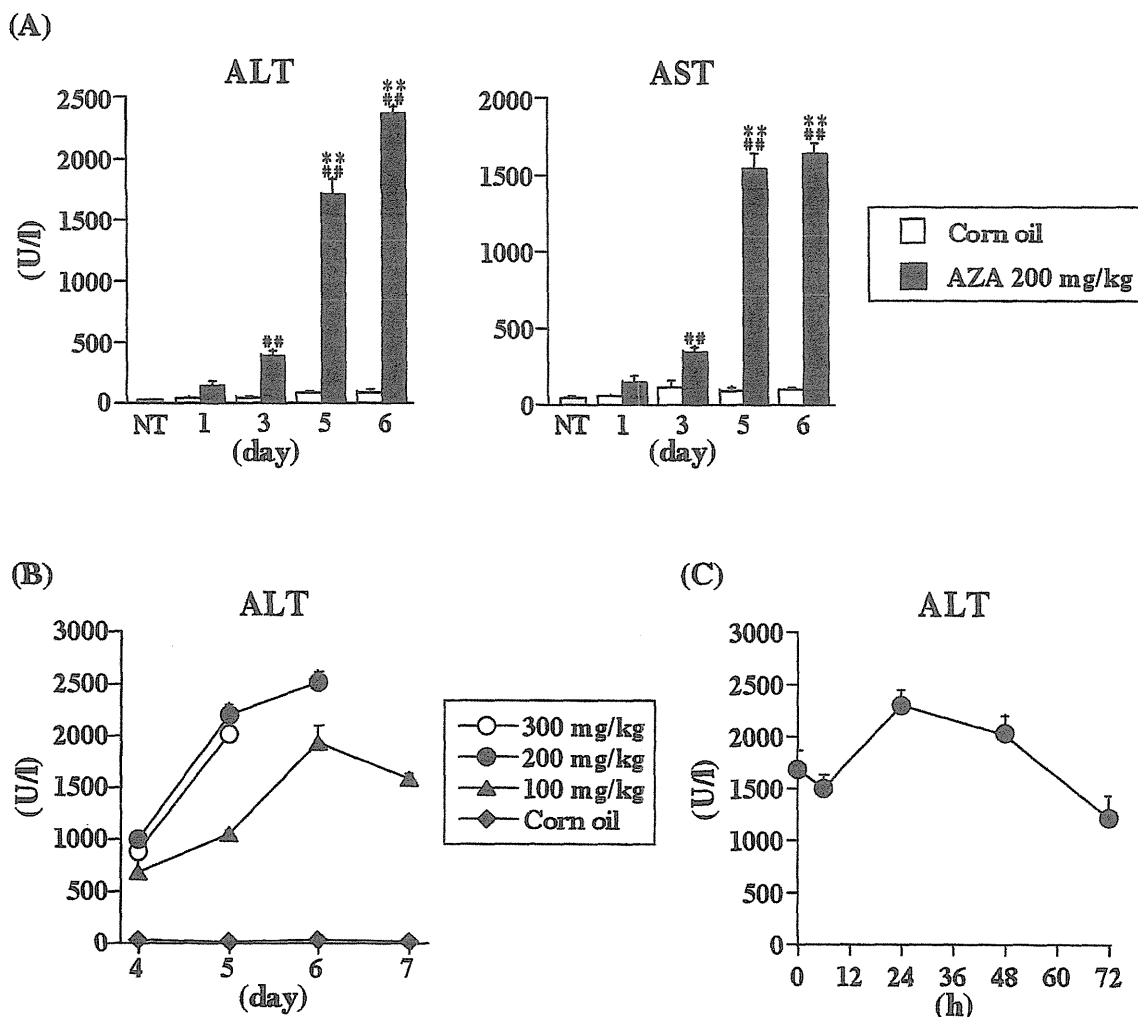
C. 実験結果

C-1 AZA 投与による肝障害モデルマウス作製

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 (Fig. 2B)。また、Fig. 2B において ALT 値が最高値を示した投与条件である、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 (Fig. 2C)。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 (Fig. 2D)。



(D)

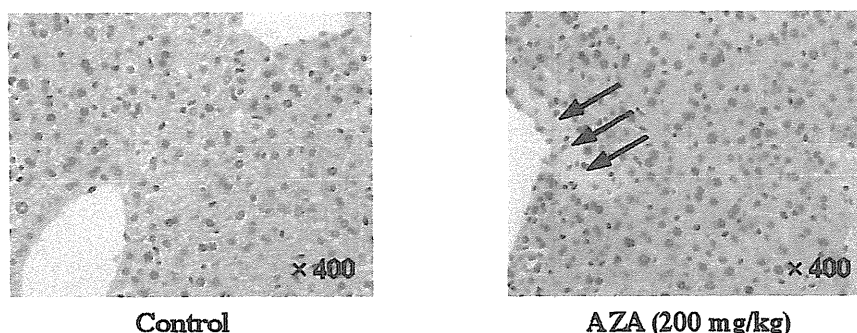


Fig. 2. Dose- and time-dependent changes in the plasma ALT and AST levels and histopathological examination of the liver of AZA-treated mice. (A) The mice were administered AZA (200 mg/kg in 10 ml/kg corn oil, *p.o.*) once daily for six days. Mice that were orally administered corn oil once daily for six days were used as the control. The plasma ALT and AST levels were measured 24 h after AZA was administered for period of one, three, five, and six days. (B) The mice were administered AZA at a dose of 100, 200, and 300 mg/kg once daily for seven, six, and five days, respectively. The plasma ALT levels were measured 24 h after AZA was administered for period of four through seven days. (C) The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) once daily for six days. The plasma ALT levels were measured 0, 6, 24, 48, and 72 h after the last administration. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). ^{**}^{###}Significantly different compared with the non-treated (NT) mice (^{**} $p < 0.01$) and control mice (^{###} $p < 0.01$). (D) The liver sections from the AZA-treated mice (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*, once daily for six days) were stained with H&E. The black arrows indicate necrotic cells.

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

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。

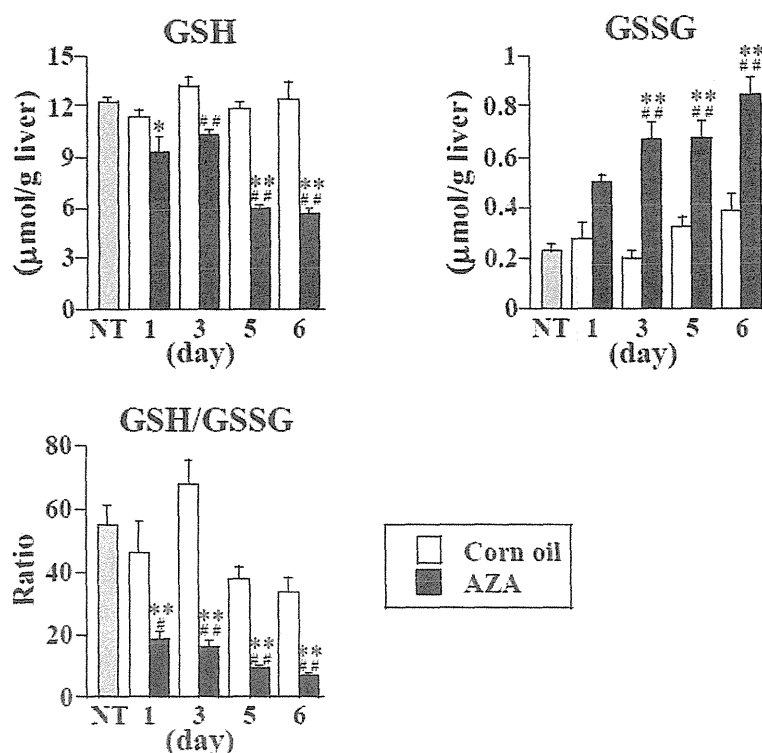


Fig. 3. Time-dependent changes in the hepatic GSH and GSSG levels and the GSH/GSSG ratio in AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) once daily for six days. Mice that were orally administered corn oil were used as the control. The hepatic GSH and GSSG levels and the GSH/GSSG ratio. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$).
 ***# Significant difference compared with the non-treated (NT) mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) and control mice (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).

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。プロテインカルボニルは、酸化ストレスによる脂質酸化の指標として一般的に用いられるバイオマーカーである。SOD は反応性の高いスーパーオキシドラジカルを反応性の弱い酸素と過酸化水素 (H_2O_2) に不均化する反応を触媒する酵素であり、ROS の解毒に関わる

(Fridovich, 1989)。そのため、SOD 活性は酸化ストレスマーカーとして用いられ、APAP 誘導性肝障害モデルマウスの肝臓において活性の低下が認められている (Agarwal et al., 2011)。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 (Fig. 4A)。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 (Fig. 4B)。

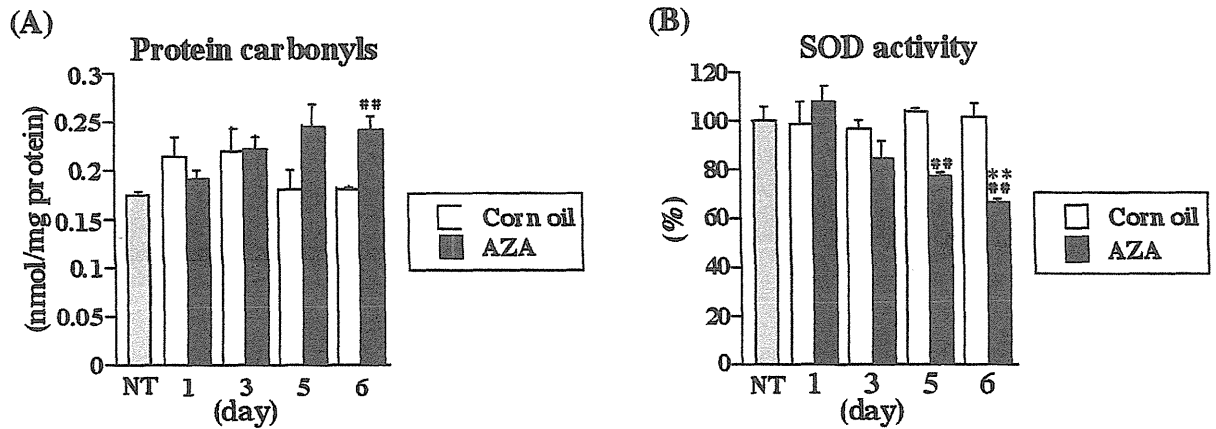


Fig. 4. Time-dependent changes the oxidative stress marker levels in AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) once daily for six days. Mice that were orally administered corn oil were used as the control. The hepatic protein carbonyls (A) and SOD activities (B) were measured 24 h after AZA was administered for period of 1, 3, 5, and 6 days. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). ^{##}^{###}Significantly different compared with the non-treated (NT) mice (^{**} $p < 0.01$) and control mice (^{###} $p < 0.01$).

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 (Fig. 5A)。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 (Fig. 5B)。

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 代謝経路の一つである 6-MP から 6-TU の反応は、XO により触媒される。XO を介した反応においては、ROS が発生することが知られており、6-MP から 6-TU への代謝により発生する ROS が酸化ストレスの原因であることが示唆される (Petit et al., 2008; Ansari et al., 2008)。そこで、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。

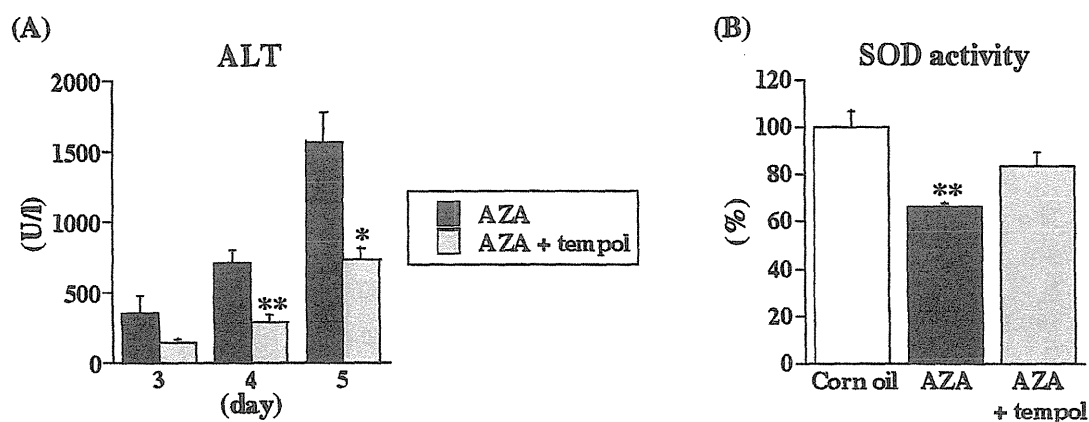


Fig. 5. The effect of the administration of antioxidant in AZA-induced liver injury. (A) The mice were administered tempol (200 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) and AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) simultaneously for a period of up to five days. The plasma ALT levels were measured 24 h after AZA was administered for three, four, and five days. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). ***Significantly different compared with the AZA-treated mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (B) The mice were administered tempol (200 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) and/or AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) simultaneously for five days. The hepatic SOD activities were measured 24 h after the last administration. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). **Significantly different compared with the corn oil-treated mice (** $p < 0.01$).

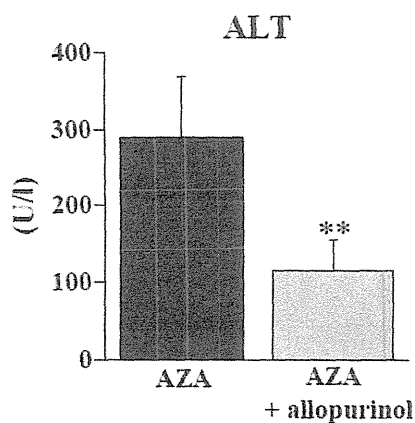


Fig. 6. Effect of a xanthine oxidase inhibitor on the plasma ALT levels in AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) and allopurinol (30 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) simultaneously for three days. The plasma ALT levels were measured 24 h after the last administration. **Significantly different compared with AZA-treated mice (** $p < 0.01$).

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 allopurinol 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、allopurinol 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 時間後に有意な低下が認められた。

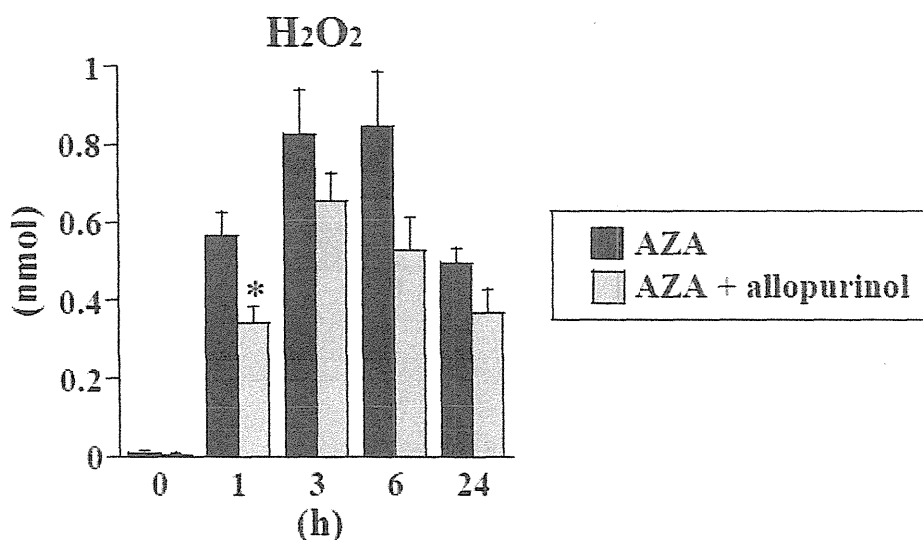


Fig. 7. Time-dependent changes in the plasma H_2O_2 levels in mice with AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) and allopurinol (30 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) simultaneously for three days. The plasma H_2O_2 levels were measured 1, 3, 6, and 24 h after the last administration. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-5$). ***Significantly different compared with AZA-treated mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

C-7 自然免疫系および DAMPs 関連遺伝子の mRNA 変動解析

TLR、RAGE およびそれらのリガンドとなる danger signal 関連因子は、酸化ストレスや ROS により誘導されることが近年報告されている (Yao and Brownlee, 2010)。カルシウム結合タンパク質 S100ファミリーである S100A8 および 9 は複合

体を形成し、マクロファージや単球等が活性化されることで細胞外に放出される (Foell et al., 2007)。Fig. 3 および 4 において、AZA 誘導性肝障害における酸化ストレスや ROS の関与が示されたことから、AZA 誘導性肝障害における DAMPs を介した自然免疫系の関与が疑われた。そのため、DAMPs やそれらをリガンドとする

受容体の肝臓中 mRNA 発現の経日的な測定を行った。

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。

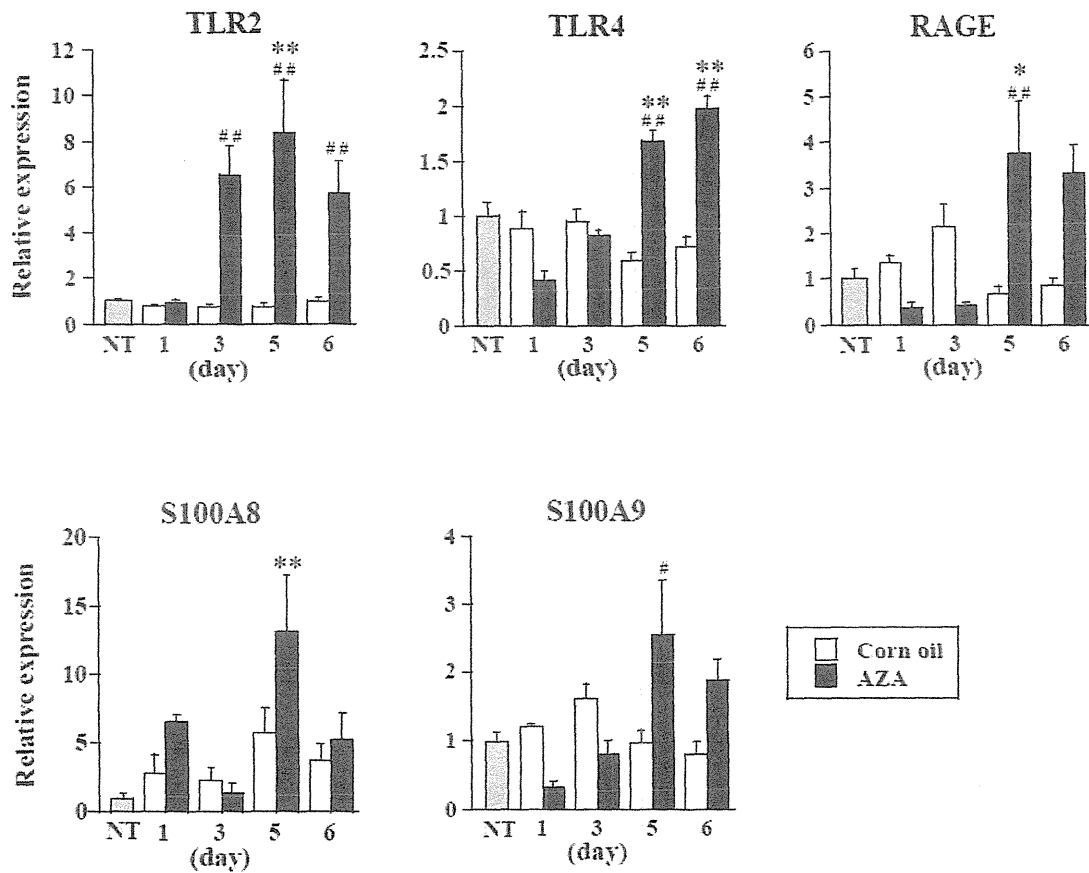


Fig. 8. Time-dependent changes in the hepatic mRNA expression levels of DAMP-related genes in mice with AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) once daily for six days. Mice that were orally administered corn oil were used as the control. The hepatic mRNA expression levels of DAPM-related genes were measured 24 h after AZA was administered for one, three, five, and six days. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). ^{***#}Significantly different compared with non-treated (NT) mice ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$) and corn oil-treated mice ($# p < 0.05$, $## p < 0.01$).

C-8 血漿中 HMGB1 タンパク質量の測定

細胞の核内に存在する非ヒストン DNA 結合タンパク質である HMGB1 は、主に p53 や NF- κ B 等の転写因子の機能発現に重要な役割を果たすが、細胞外に放出されると S100 タンパク質と同じく、DAMPs として受容体を介して自然免疫系を活性化する (Antoine et al., 2010)。HMGB1 の炎症誘導機能は敗血症、関節リウマチおよび筋萎縮性側索硬化症等の様々な炎症性疾患において関与が認められている (Andersson and Tracey, 2003; Taniguchi et

al., 2003; Lo Coco et al., 2006)。

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 (Wang et al., 2004)。そのため、ELISA により血漿中 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 (Fig.9)。

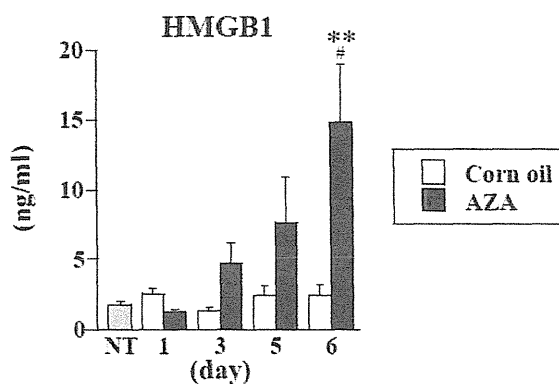


Fig. 9. Time-dependent changes in the plasma HMGB1 protein levels in mice with AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) once daily for six days. Mice that were orally administered corn oil were used as the control. The plasma HMGB1 protein levels were measured 24 h after AZA was administered for one, three, five, and six days. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). ***[#] Significantly different compared with non-treated (NT) mice (** $p < 0.01$) and corn oil-treated mice ([#] $p < 0.05$).

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

Fig. 8 および 9 から、AZA 誘導性肝障害に S100 タンパク質や HMGB1 等の DAMPs が関与することが示唆された。TLR4 はこれらをリガンドとして認識し、炎症反応を誘導することが知られている。

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(Fig.10)。

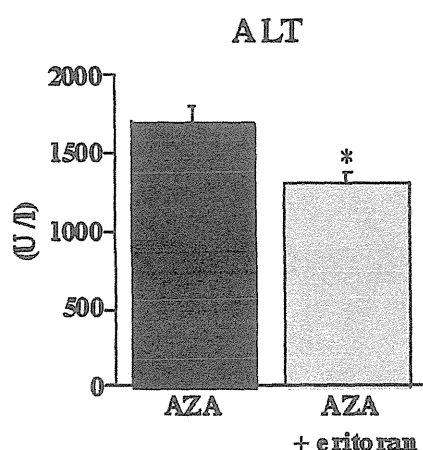


Fig. 10. The effect of a TLR4 antagonist on the plasma ALT levels in mice with AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) once daily for five days, and eritoran (50 μ g/mouse in 0.2 ml sterile saline, *i.v.*) was administered with the last AZA administration (on day 5). The plasma ALT levels were measured 24 h after the last administration. The data represent the mean \pm SEM (n = 4-6). *Significantly different compared with AZA-treated mice (* $p < 0.05$).

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が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(Fig.11)。

Th 細胞には Th1、Th2、Th17 および制御性 T 細胞の 4 つのサブセットが存在しており、様々な転写因子やサイトカインにより複雑に制御されている。T-bet、GATA3 および ROR- γ t は、それぞれ Th1、Th2 および Th17 の転写因子である (Kidd, 2003; Steinman,

2007)。

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。

TNF- α および IL-1 β はマクロファージ、マスト細胞、樹状細胞等の様々な免疫細胞から産生される炎症性サイトカインである (Tracey, 1994; Arend et al., 2008)。NALP3 はインフラマソーム複合体を形成し、ROS や DAMPs より活性化されることで IL-1 β や IL-18 を産生し、炎症反応を誘導することが知られている (Agostini et al., 2004)。MIP-2 はマクロファージから放出されるケモカインであり、局所への白血球遊走により炎症反応を強く誘導することが報告されている (Bajt et al., 2001)。

炎症性サイトカインおよびケモカインの肝臓中 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が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。

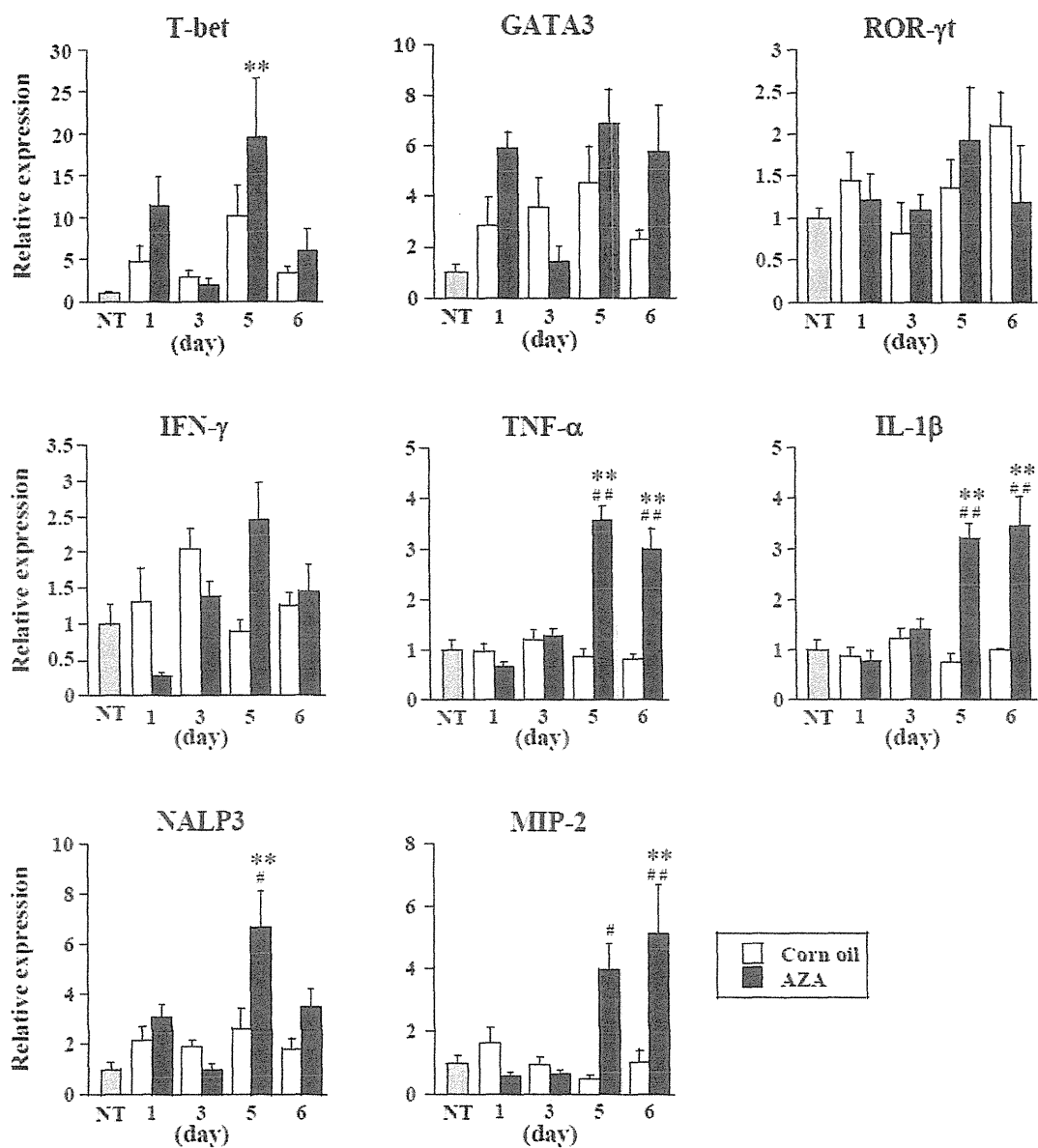


Fig. 11. Time-dependent changes in the hepatic mRNA expression levels of T-cell transcription factors and inflammation-related factors. AZA was administered using the dosing schedule described in Fig. 8. The data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). ***,##,### Significantly different compared with non-treated (NT) mice (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) and corn oil-treated mice (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).

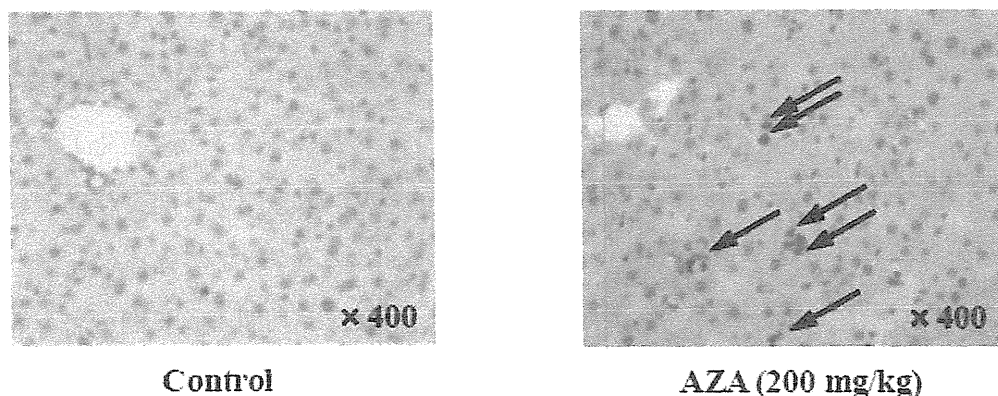


Fig. 12. The mononuclear cell infiltration in AZA-induced liver injury. The mice were administered AZA (200 mg/kg in corn oil, *p.o.*) once daily for six days. The mononuclear cell infiltration was assessed by immunostaining for MPO. The black arrows indicate MPO-positive cells.

D. 考察

現在、最もモデルが確立された DILI モデルは APAP 誘導性肝障害であり、*in vivo* および *in vitro* において様々な検討がなされている。しかし、APAP 誘導性肝障害モデルのみで数多くの薬物における肝毒性メカニズムを理解することは困難であり、種々の薬物における DILI モデルを構築し、メカニズム解析を行うことでより正確で包括的な予測が可能になると考えられる。また、現在報告されているモデル動物の多くが単回投与により肝障害を発症させているが、臨床における DILI のほとんどは反復投与中に発生し、より臨床に近い条件を再現するためには、反復投与により肝毒性を引き起こすモデルの構築が必要であると考えられる。

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 誘導性肝障害の動物モデルは、ラットへの AZA (25 mg/kg) の 4 週間反復経口投与や、マウスへの AZA (50 mg/kg) の単回腹腔内投与により作製した報告がある。しかし、いずれのモデルにおいても ALT 値の上昇はコントロールの 2.5 倍以下であり、肝組織においてもごく一部でネクローシスが認められる程度の軽微な肝障害

であることから、(El-Beshbishy et al., 2011; Amin and Hamza, 2005)、メカニズム解析を行う動物モデルとしては不十分であることが考えられる。そこで、本研究ではより顕著な肝障害が認められる AZA 誘導性肝障害モデルマウスを確立し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

まず、AZA 誘導性肝障害モデルマウスを作製するために投与条件および期間の検討を行った。臨床において AZA は経口投与で使用されていることから、AZA のマウスへの処置は経口投与で行った。AZA の投与量依存的な ALT 値の変動より、以降の実験は ALT 値が最も上昇する条件である 200 mg/kg で行うこととした (Fig. 2B)。また、AZA 投与後の ALT 値の時間推移より、以降の実験における ALT 値の測定は AZA 最終投与の 24 時間後とした (Fig. 2C)。決定した投与条件において AZA をマウスに投与したところ、ALT および AST 値の有意な上昇は投与 3 日後から認められ、5 日および 6 日後においてはさらに顕著な上昇となった (Fig. 2A)。さらに、肝切片の組織評価において AZA 6 日間投与による肝細胞のネクロシスが確認された (Fig. 2D)。以上の結果より、AZA 反復経口投与により肝障害が引き起こされ、200 mg/kg の 6 日間投与 24 時間

後に最も重症化することが示された。そのため、本研究においては AZA 200 mg/kg を反復経口投与し、AZA 誘導性肝障害モデルマウスを作製することとした。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。

臨床において、急性および慢性の AZA 誘導性肝障害は、それぞれ AZA 使用開始から数年および 1-5 年後に患者の約 2% に認められる (Aithal, 2011)。本研究ではヒトにおける 1 日投与量 (1-5 mg/kg) の約 40-200 倍である 200 mg/kg の AZA をマウスに投与したため、臨床報告よりも短期間かつ高頻度に肝障害が発症したと思われる。

肝臓中 GSH は AZA の 6-MP への変換において消費されるため、AZA 投与による GSH の減少および GSSG の増加は、この反応による影響が大きいと考えられる (Fig. 3)。GSH は反応性代謝物および ROS など酸化ストレスの原因物質に対して保護的に作用する。そのため、AZA の投与によりマウスは酸化ストレスに対して脆弱な状態になることが示唆される。酸化ストレスが AZA 誘導性肝障害に起因していることは、肝臓中プロテインカルボニルの上昇および SOD 活性の低下 (Fig. 4)、さらに抗酸化剤 tempol の併用により、血

漿中 ALT 値の上昇および肝臓中 SOD 活性の低下が抑制されたことから示された (Fig. 5)。

XO 阻害剤である allopurinol の併用投与により、AZA 投与による血漿中 ALT 値の上昇が抑制されたことから、6-MP から 6-TU の反応が肝障害の要因となる可能性が示された (Fig. 6)。また、ROS の一種である H_2O_2 の血漿中濃度も allopurinol の併用により低下したことから、AZA の肝毒性発現に ROS 産生が関与することが示唆された (Fig. 7)。しかし、allopurinol 併用投与による ALT 値上昇の抑制は、AZA 反復経口投与の 5 日および 6 日においては認められなかったことから (data not shown)、ROS 産生は主に肝障害の発症初期に関与することが考えられる。

パターン認識レセプターである TLR や、そのリガンドとなる HMGB1 や S100 タンパク質は ROS によって誘導されることが知られている (Yao and Brownlee, 2010)。また、それらはモデルマウスを用いた検討により、APAP や carbamazepine の肝毒性に関与することが報告されている (Antoine et al., 2009; Higuchi et al., 2012-2)。TLR4 のアンタゴニストである eritoran の併用投与により、肝障害が減弱したことから、AZA 誘導性肝障害においても TLR4 を介したシグナル経路が関与することが

示された (Fig. 10)。Eritoran は AZA 反復投与期間の 5 日目のみ併用投与を行ったため、AZA 投与による ALT 値上昇の抑制はそれほど顕著なものではなかったと思われる。また、TLR2 等の肝臓中 mRNA も AZA 反復投与により上昇していることから (Fig. 8)、他の受容体を介したシグナル経路も AZA 肝毒性に関与することが考えられる。

当研究室において Th2 関連因子は dicloxacillin および methimazole の肝毒性に、Th17 関連因子は carbamazepine および diclofenac の肝毒性に関与することが示されている。免疫関連因子の mRNA を解析したところ、Th 細胞の転写に関連する GATA3 や ROR- γ t 等の因子に大きな変動は認められなかった (Fig. 11)。Th1 の転写因子である T-bet は 5 日間 AZA 投与後に上昇が認められたが、主に Th1 から産生される炎症性サイトカインである IFN- γ に変動は認められなかった。AZA の薬理作用は DNA 合成阻害による免疫抑制作用であり、T 細胞の増殖が抑制されたことで、Th 関連因子に大きな変動が認められなかったと考えられる。一方、炎症反応に関連するサイトカインおよびケモカインである TNF- α や IL-1 β mRNA においては、有意な発現上昇が認められた。また、抗 MPO 抗体による免疫染色に