

administration. Data are mean \pm SEM (n = 2 to 5). * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with 0 hr group.

D. 考察

薬物誘導性肝障害の発症は薬物代謝酵素により生成される反応性の高い代謝物が生体内高分子と共有結合することが主な原因と考えられている。しかし、薬物誘導性肝障害の動物モデルを用いて、肝障害に対する反応性代謝物の関与を明らかにした報告は極めて少ない。本検討ではラットを用いて、副作用として肝障害が報告されている CBZ を用いて肝障害モデル作製し、CBZ 誘導性肝障害発症に関与する代謝物および代謝酵素を明らかにすることを目的とした。

本検討ではラットでの CBZ 誘導性肝障害モデル作製にあたり、Higuchi ら (2012) がマウスで CBZ 誘導性肝障害を惹起させる際に用いた投与条件を参考にし、CBZ を 4 日間 400 mg/kg で反復投与し、5 日目に投与量を上げ 800 mg/kg で経口投与を行ったが、ALT 値の上昇はほとんど認められなかった (data not shown)。*In vitro* の検討において、細胞内の GSH は CBZ による細胞毒性とタンパク質への共有結合率を減少させることが報告されている (Pirmohamed et al., 1992)。そこで GSH 合

成阻害剤である BSO を CBZ 最終投与前に併用投与したところ、ALT 値の顕著な上昇が認められた (Fig. 2B)。また、この条件下で CBZ 最終投与量を 600 mg/kg に下げた際にも ALT 値の上昇が認められた。ラットとマウスで肝障害への感受性が異なる例として、抗ガン剤として開発されたが肝障害により開発中止となった *N*-methylformamide (NMF) が報告されている。NMF をラットおよびマウスに投与した場合、マウスでは NMF 200 mg/kg 以上の投与量で ALT 値の上昇が認められるが、ラットでは NMF 1,000 mg/kg の投与量でも ALT 値の上昇はほとんど認められておらず、ラットではマウスと比較して NMF 誘導性肝障害に対して感受性が低いことが示されている。ラットではマウスと比較して NMF の尿中未変化体排泄率が高いため、NMF 誘導性肝障害への感受性の種差は、ラットではマウスと比較して代謝効率が悪いことが原因であると考えられている (Tulip and Timbrell, 1988)。また、ラットおよびマウスの肝 GSH 含量はそれぞれ約 7 mmol/g tissue (Wister ラット、雄性、12-16 週齢) (Allameh et al., 1997) と約 8 mmol/g tissue (B6CF3 マウス、雄性、7 週齢) (Watanabe et al., 2003) であり、ラットおよびマウス間でほとんど差は認められない。しかし、glutathione *S*-transferase

活性はマウスと比較してラットでは約 1.7 倍高い (Grover and Sims, 1963)。このため、ラットではマウスと比較して反応性代謝物が GSH 抱合を受けて解毒される効率が低い可能性が考えられ、この違いが CBZ 誘導性肝障害に対する感受性の種差につながっているかもしれない。

CBZ 反復投与の検討において、CBZ 最終投与量 800 mg/kg 群では CBZ 最終投与 24 時間後までに 8 匹中 5 匹のラットが死亡した。死亡した個体の中で CBZ 最終投与 6 時間後まで生存していた個体 (死亡個体 5 匹中 4 匹) に関しては ALT 値の上昇が認められた (ALT = 4984 ± 1759 U/l) ため、肝障害により死亡したことが考えられる。CBZ 最終投与量 600 mg/kg 群においても 7 匹中 1 匹のラットが死亡したが、800 mg/kg 投与群と比較して死亡率は低かった。よって、CBZ 誘導性肝障害モデルの作製条件は CBZ 最終投与量 600 mg/kg と BSO の併用投与とした。CBZ 最終投与量 600 mg/kg 群では肝障害発症の程度に大きな個体差が存在し、CBZ 最終投与 24 時間後に ALT 値が有意に上昇する個体 (high responder) と変動しない個体 (low responder) が認められた (Fig. 2C)。この原因に関しては不明であるが、肝障害が原因で市場から撤退した降圧利尿剤である TA もまた、TA 300 mg/kg と

BSO をラットに併用投与した場合、6 匹中 3 匹のみで ALT 値の上昇が認められている (Nishiya et al., 2008)。BSO による GSH 合成阻害の程度に個体差が生じた可能性が考えられるが、肝 GSH 含量の測定は行っていないため詳細は不明である。また、CBZ 誘導性肝障害に CYP の自己誘導が関与している可能性が示された (Figs. 6, 7 and 8) ため、CYP の誘導能の差が個体差に起因している可能性も考えられる。

肝組織染色の結果より high responder 群において小葉中心性ネクロシスが認められた (Fig. 3A)。CYP は主に肝組織の中心静脈周辺 (zone 3) に発現しているため、CYP により生成される反応性代謝物がネクロシスの原因となる場合は zone 3 に障害が生じる場合が多く、APAP や halothane により障害が生じる場合もネクロシスは zone 3 において認められる (Mitchell et al., 1973; You et al., 2006)。よって、CBZ による肝障害においても CYP が関与していることが示唆された。ヒトにおいて CBZ による肝障害は hypersensitivity を伴う予後良好なタイプとネクロシスと炎症を伴う予後不良なタイプに分類される (Björnsson, 2008)。今回作製したラットモデルではネクロシスは認められたが好酸球が認められなか

った (Figs. 3A and 3B) ことから、ヒトにおける予後不良なタイプに類似していることが考えられる。

CBZ 誘導性肝障害に関与する代謝物を推定するために同一個体より経時的に採血し、CBZ 最終投与 24 時間後までの血漿中濃度を測定したところ、3-hydroxy CBZ においてのみ high responder と low responder 群の差が顕著に現れ、high responder と比較して low responder 群ではより高い血漿中濃度を示した (Fig. 4)。

Higuchi ら (2012) のマウスを用いた検討では、TAO または KTZ 併用投与により肝障害の増悪が認められ、この際 CBZ および 3-hydroxy CBZ の血漿中濃度の有意な上昇が認められていた。このように、ラットとマウス間で 3-hydroxy CBZ の血漿中濃度の変動の傾向が異なっていた。しかし、マウスで想定されている 3-hydroxy CBZ を経て反応性代謝物が生成する仮説がラットでも同様に適用されるか不明である。ラットでは 3-hydroxy CBZ を介さない代謝経路を経て反応性代謝物が生成する可能性も考えられるため、今回の検討のみではラットとマウスで 3-hydroxy CBZ の血漿中濃度の変動の傾向が異なる理由を説明することはできない。また、2-hydroxy CBZ から 2-hydroxyiminostilbene を経て生成される iminoquinone はチオー

ル基を含有する NAC との結合体を形成するため、生体内高分子と結合することが示唆されている (Ju and Uetrecht. 1998)。

しかし、今回のラットモデルでは high responder と low responder 群において 2-OH CBZ の血漿中濃度にほとんど差が認められなかったことから、ラットにおいて iminoquinone は肝障害発症に関与していない可能性が考えられた。しかし、今回は検討したラット数が少ないため、今後ラット数を増やす必要がある。

マウスを用いた検討において、Cyp3a 阻害薬である TAO または KTZ を併用投与すると CBZ による肝障害の増悪が認められている (Higuchi et al., 2012)。しかし、今回のラットを用いた検討では CBZ による肝障害が TAO または KTZ の併用投与により認められなくなった (Fig. 5)。ヒトにおいては CYP3A4 以外に CBZ から CBZ-10, 11-epoxide への代謝には CYP2C8、CBZ から 3-OH CBZ への代謝には CYP2B6 が関与する (Fig. 1)。マウスおよびラットにおいて各々の代謝物の生成に関与する CYP 分子種は同定されていないが、CYP3A の阻害により相反する結果が得られた原因として CBZ の代謝に関与する酵素の種差が考えられる。CYP3A の阻害により CBZ の代謝に関与する CYP3A 以外の酵素の寄与が大きくなり、マウス

ではCBZから毒性発現経路への代謝反応が亢進され、ラットでは解毒経路への代謝反応が亢進されたことが考えられる。

CBZの反復投与によりCYP3Aが誘導されること (Figs. 6A and 6B)、CYP3A阻害薬併用投与により肝障害発症の抑制が認められたこと (Fig. 7) およびCBZの単回投与では肝障害が発症しないこと (Fig. 2A) から、CBZの反復投与によるCYP3Aの誘導が肝障害発症に重要であることが考えられた。今回の検討で用いたDEXは強力なCYP3A誘導薬として知られており、ラットにおいてもCYP3A mRNA量、CYP3Aタンパク質量およびtestosterone 6b位水酸化酵素活性を上昇させることが報告されている (Lake et al., 1998; Kocarek et al., 1994)。CBZとBSOを単回投与する前にDEXを反復投与した際、CBZ投与3-12時間後まで時間依存的にALT値の有意な上昇が認められた (Fig. 8)。よって、CBZ誘導性肝障害発症にCYP3Aの自己誘導が関与していることが示唆された。しかし、DEXはラットにおいてCYP3A以外のCYP分子種も誘導する (Lake et al., 1998) ため、CYP3A以外のCYPが関与している可能性も否定できない。また、CBZを投与しなくともDEX反復投与のみにおいてALT値が約400 U/lまで上昇した。マウスでDEX反復投与に

よりALT値が上昇することが報告されている (Madhu et al., 1992) ため、今後DEXをALT値が上昇しない投与量まで下げる等、投与方法を再試行する必要がある。しかし、Fig. 8で用いた投与条件では肝障害発症の程度に関する個体差が小さかったことから、今後のCBZ誘導性肝障害発症に関与する代謝物を推定する際に有用であると考えられる。

本検討はラットを用いてCBZ誘導性肝障害を惹起させることに成功し、肝障害発症にはGSH枯渇下での反応性代謝物の生成が重要であること、およびCBZ反復投与によるCYP3Aの誘導とCYP3Aによる代謝が関与していることを明らかにした。本検討ではCBZ誘導性肝障害発症に関与する代謝物および代謝酵素の同定まで至っていないため更なる検討が必要ではあるが、今回明らかとなった結果が薬物誘導性肝障害のメカニズム解明に対して助力となることを期待する。

<参考文献>

[Akai S, Hosomi H, Minami K, Tsuneyama K, Katoh M, Nakajima M and Yokoi T \(2007\) Knock down of \$\gamma\$ -glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* 282: 23996-24003.](#)

[Allameh A, Vansoun EY and Zarghi A \(1997\) Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mech Ageing Dev* 95: 71-79.](#)

- Björnsson E (2008) Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand* **118**: 281-290.
- Chen W, Koenigs LL, Thompson SJ, Peter RM, Rettie AE, Trager WF and Nelson SD (1998) Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and nontoxic catechol metabolites by baculovirus-expressed and purified human cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chem Res Toxicol* **11**: 295-301.
- Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM and Walker MC (2006) Adult epilepsy. *Lancet* **367**: 1087-1100.
- Emoto C, Yamazaki H, Yamasaki S, Shimada N, Nakajima M and Yokoi T (2000) Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidations in mouse intestinal microsomes. *Xenobiotica* **30**: 943-953.
- Grimsley SR, Jann MW, Carter JG, D'Mello AP and D'Souza MJ (1991) Increased carbamazepine plasma concentrations after fluoxetine coadministration. *Clin Pharmacol Ther* **50**: 10-15.
- Grover PL and Sims P (1964) Conjugations with glutathione. Distribution of glutathione S-aryltransferase in vertebrate species. *Biochem J* **90**: 603-606.
- Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2012) Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* **130**: 4-16.
- Jaeschke H (2005) Role of inflammation in the mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **1**: 389-397.
- Ju C and Uetrecht JP (1998) Detection of 2-hydroxyiminostilbene in the urine of patients taking carbamazepine and its oxidation to a reactive iminoquinone intermediate. *Pharmacol Exp Ther* **288**: 51-56.
- Kaniwa N, and Hasegawa R (2009) Exploratory studies on genetic biomarkers related to serious drug adverse reaction. *Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* **127**: 1-14.
- Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 489-499.
- 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.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA and Guzelian PS (1994) Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**: 415-421.
- Lake BG, Renwick AB, Cunnigham ME, Price RJ, Surry D and Evans DC (1998) Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology* **131**: 9-20.
- Lu W and Uetrecht JP (2008) Peroxidase-mediated bioactivation of hydroxylated metabolites of carbamazepine and phenytoin. *Drug Metab Dispos* **36**: 1624-1636.
- Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, Hamilton G, Rizzo C, Jolley S, Gilbert D, Downey A, Mudra D, Graham R, Carroll K, Xie J, Madan A, Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E and Gan LS (2002) CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **30**: 795-804.
- Madhu C, Maziasz T and Klaassen CD (1992) Effect of pregnenolone-16 α -carbonitrile and dexamethasone on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **115**: 191-198.
- Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR and Brodie BB (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. *J Pharmacol Exp Ther* **187**: 185-194.
- Nishiya T, Mori K, Hattori C, Kai K, Kataoka H, Masubuchi N, Jindo T and Manabe S (2008) The crucial protective role of glutathione against tienilic acid hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**: 280-291.
- 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.
- Pearce RE, Lu W, Wang Y, Uetrecht JP, Correia

MA and Leeder JS (2008) Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro. III. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2,3-dihydroxycarbamazepine. *Drug Metab Dispos* **36**: 1637-1649.

Pirmohamed M, Kitteringham NR, Guenther TM, Breckenridge AM and Park BK (1992) An investigation of the formation of cytotoxic, protein-reactive and stable metabolites from carbamazepine in vitro. *Biochem Pharmacol* **43**: 1675-1682.

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.

Shorvon S (2000) Oxcarbazepine: a review. *Seizure* **9**: 75-79.

Sudo C, Maekawa K, Segawa K, Hanatani T, Sai K and Saito Y. (2012) Trends in drug-induced liver injury based on reports of adverse reactions to PMDA in Japan. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* **130**: 66-70.

Tateishi T, Asoh M, Nakura H, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T and Kobayashi S (1999) Carbamazepine induces multiple cytochrome P450 subfamilies in rats. *Chem Biol Interact* **117**: 257-268.

Tulip K and Timbrell JA (1988) Comparative hepatotoxicity and metabolism of N-methylformamide in rats and mice. *Arch Toxicol* **62**: 167-176.

Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W and Manabe S (2003) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci* **28**: 455-469.

You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D and Ju C (2006) Role of neutrophils in a mouse model of heliothane-induced liver injury. *Hepatology* **44**: 1421-1431.

E. 健康危険情報
該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし（英文論文作成中）

2. 学会発表

飯田あずみ、矢野 梓、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：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 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉

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

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

分担研究者 中島美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授

【目的】 薬物誘導性肝障害は重篤な副作用の一つであり、医薬品の市場からの撤退の主な原因となるため、安全性上重大な問題である。その発症メカニズムを明らかにするため多くの肝障害モデル動物が作製されているが、中でも 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。

MicroRNA (miRNA) は 22 塩基程度の non-coding RNA であり、標的 mRNA の主に 3'-非翻訳領域に部分相補的に結合して標的遺伝子の発現を負に制御することで様々な生命現象に関与している。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。

【方法】 HAL 誘導性肝障害モデル作製のため、雌性の Balb/c マウス (8 週齢) に HAL (30 mmol/kg in 2 mL olive oil) を腹腔内投与し、投与から 0.5、1、3、6、12 および 24 時間後に解剖し、肝臓および血液を採取した。また、HAL と同効薬であり構造類似体である Isoflurane (ISO; 30 mmol/kg in 2 mL olive oil) を腹腔内投与したマウスを薬効のコントロールとして用いた。肝障害の程度は血漿中 ALT 値および肝臓中炎症性サイトカイン mRNA 発現量を Real-time RT-PCR により測定することにより確認した。薬物投与後の肝臓中 total RNA を抽出した後に、TaqMan MicroRNA Array を用いて miRNA の発現量を網羅的に解析した。溶媒投与群と比較して発現量が 2 倍以上に変動した miRNA を抽出した。また、HAL および ISO 投与 1 および 3 時間後に変動した miRNA を比較解析し、HAL および ISO 特異的に発現変動した miRNA について、標的遺伝子の予測をコンピューターにより解析し、各 miRNA の予測された標

的遺伝子が関与する経路を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway 解析によりアノテーションすることでその機能を調べた。標的遺伝子として報告されている遺伝子は miRTarbase により調べた。さらに、これらの遺伝子が肝障害の発症や進行に関与しているか MeSH (Medical Subject Headings) を用いて Inflammation、Innate immunity、Apoptosis、Necrosis および Oxidative stress などのキーワードにより免疫、炎症および肝障害に関連する遺伝子を調べた。免疫および炎症に関連する遺伝子を標的とする miRNA について、標的遺伝子の mRNA 発現量を real-time RT-PCR にて、タンパク質発現量を Western blotting 法により測定した。

【結果・考察】 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にするため、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。

分担研究者：中島 美紀

A. 研究目的

薬物誘導性肝障害 (Drug-induced liver injury: DILI) は医薬品開発や臨床における薬物治療において重要な問題の一つである。米国では急性肝障害の 50%以上が薬物に起因していると報告されており、600 以上の医薬品に肝障害発症の可能性があるとされている (Lee, 2003; Park et al., 2005)。また、医薬品の承認販売後に肝障害が報告され、販売中止となる事例もある。販売中止となる薬物の多くには、不安定な反応性代謝物が存在することが報告されている (Guengerich and MacDonald, 2007)。

反応性代謝物は主にシトクロム P450 (CYP) による代謝的活性化により産生され、タンパク質や DNA などの生体内高分子と共有結合し、細胞の機能障害を引き

起こす (Park et al., 2005; Riley et al., 1988)。

反応性代謝物による直接的な細胞毒性に加えて、共有結合を形成し修飾されたタンパク質は免疫原性を獲得し、免疫反応を惹起することが示唆されている (Knowles et al., 2000; Park et al., 2000; Utrecht, 1999)。

臨床で報告されている薬物誘導性肝障害の多くは、炎症などの免疫反応が関係していることが報告されている (Deng et al., 2006; Shaw et al., 2007)。免疫学的な肝障害発症機序のひとつに、免疫反応に伴う炎症ストレスの重要性が示唆されており、薬物などのストレスにより生体内の免疫機構が活性化されると、過剰な免疫反応に伴う炎症性ストレスが発現し、肝障害の発症原因となると考えられている (Ganey et al., 2004; Roth et al., 2003; Tafazoli et al., 2005)。肝臓における自然免

疫には、肝臓へ浸潤している単球やマクロファージ、肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞などが関与する。また、炎症性サイトカインやケモカインはリンパ球や好中球を刺激し、肝臓への浸潤を引き起こす炎症反応の引き金となることが知られている。

最も多くの研究がなされているアセトアミノフェン (APAP) の例では、過量投与およびグルタチオン (GSH) 減少時に、重篤な肝障害が生じることが知られ、毒性発現に CYP1A2、CYP2E1 および CYP3A4 による代謝的活性化により生じる *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) が重要であることが報告されている (Albano et al., 1985)。APAP は通常の投与量においては、硫酸抱合やグルクロン酸抱合体に代謝され体外に排泄されるが、過量投与時には、抱合代謝過程が飽和し、NAPQI が生成する (Raucy et al., 1989; Thummel et al., 1993)。通常、NAPQI は生体内の GSH により捕捉され解毒されるが、過剰の NAPQI 生成時には細胞内の GSH が枯渇し、細胞内に存在する様々な生体高分子と結合し、細胞毒性を引き起こす (Hoffmann et al., 1985; Hinson et al., 1995; Hongslo et al., 1994)。このように、代謝的活性化により生じる反応性代謝物が毒性発現初期に重要な役割を担うことが示唆

されている (Utrecht, 1999; Walgren et al., 2005)。

APAP と同様に CYP による代謝的活性化を受け、肝障害を示す薬物として吸入型全身麻酔薬である Halothane (HAL) が挙げられる。HAL は軽度なもの、または無症候性の症例を含めると 20% 以上の患者において血清中トランスアミナーゼの上昇が起こること (Spracklin et al., 1997)、さらに約 10,000 人に 1 人の割合で劇症化が生じることが報告されている (Moult and Sherlock, 1975)。You ら (2006) の検討においてマウスを用いて HAL 誘導性肝障害を再現性良く惹起できる投与方法が提唱された。その発症メカニズムとして、肝臓で主に CYP2E1 により代謝され、生成する活性代謝物のトリフルオロアセチルラジカルが生体内高分子と共有結合し、トリフルオロアセチル化タンパク質 (TFA-adduct) を生成することが知られている (Spracklin et al., 1997; Kennna et al., 1992) (Fig. 1)。HAL による肝障害患者の血清からは抗 TFA 抗体および抗 CYP2E1 抗体が検出されることが報告されている (Park et al., 2005)。しかし、TFA-adduct 生成は肝障害を引き起こさない実験動物においても認められており、adduct 生成以降に存在するメカニズムが肝障害の原因として重要であることが示唆されている

(Feng et al., 2009)。近年の報告において、HAL 誘導性肝障害発症に好中球、NKT 細胞、NK 細胞および好酸球などの免疫細胞に加え、Th17 細胞が主に産生する IL-17 などの様々な炎症性サイトカインの活性化が関与することが明らかにされている (You et al., 2006; Kobayashi et al., 2009; Cheng et al., 2010, Proctor et al., 2012)。

MicroRNAs (miRNAs) はタンパク質をコードしない 22 塩基程度の小さな RNA である。Fig. 2 には miRNAs の生合成過程を示す。miRNAs の前駆体はタンパク質をコードする遺伝子と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写される (Kim, 2005)。この転写産物は primary miRNA (pri-miRNA) と呼ばれ、核内で Drosha と呼ばれる酵素により約 60~80 塩基程度の precursor miRNA (pre-miRNA) に切断される。その後、Exportin 5 により核内から細胞質へと輸送され、さらに Dicer により 22 塩基程度の miRNA duplex (miRNA/miRNA*) に切り出される。RISC (RNA-induced silencing complex) を形成する 1 本鎖 RNA となった成熟 miRNA (mature miRNA) は、guide strand と呼ばれ、標的 mRNA の主に 3'-非翻訳領域に部分相補的に結合して標的遺伝子の発現を負

に制御する。miRNA* は passenger strand と呼ばれ、Ago2 に取り込まれる過程で分解されると考えられてきたが、近年、機能的な例も複数報告されてきている (Kalscheuer et al., 2008)。現在、ヒトで 2000 種類、マウスで 1200 種類以上の mature miRNAs が同定されており (<http://www.mirbase.org/>, version 19)、miRNAs の塩基配列は種で保存されている。miRNAs は発生、増殖、分化および細胞死などの多彩な生命現象に関与すること、さらに、その発現異常が癌をはじめとするさまざまな疾患に関与すること (Johnson et al., 2005) などが明らかになっている。

近年、miRNA と毒性との関連についての研究が盛んに行われている。miRNAs が血中に存在することが Mitchell ら (2008) により初めて報告された後、血中 miRNA が癌や肝障害などの様々な疾患のバイオマーカーとしての可能性を持つ研究が急速に進展してきた。さらに、組織中での miRNA の発現変動は標的遺伝子の発現の変化をもたらし、様々な疾患の発症や進行に関与することが報告されている (Seike et al., 2009; Wang et al., 2011)。

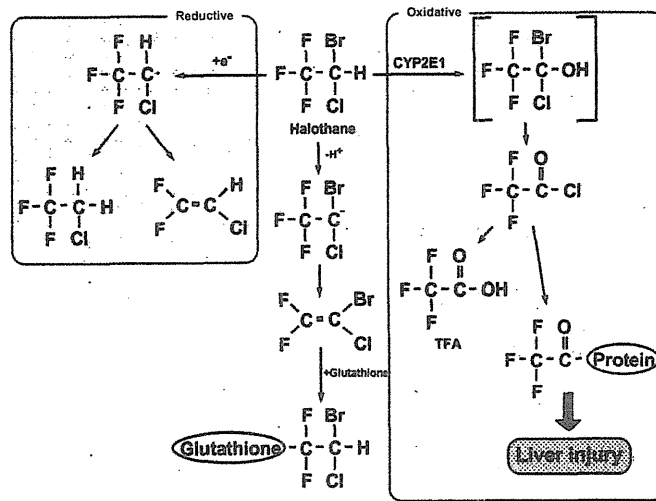


Fig. 1. Metabolic pathways of halothane (Gut et al., 1993).

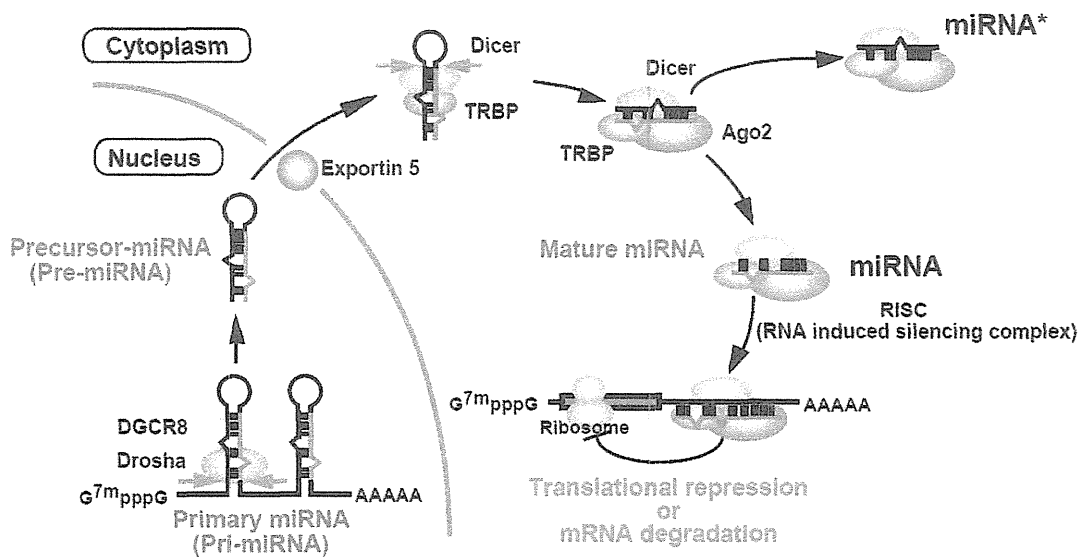


Fig. 2. Proposed mechanism of gene silencing by miRNAs. miRNA genes are transcribed by an RNA polymerase II to generate the primary miRNA (pri-miRNA) transcripts. The initiation step is mediated by the Drosha in the nucleus. The product of the nuclear processing is ~80-nt precursor miRNA (pre-miRNA). This structure can serve as a signature motif that is recognized by the nuclear export factor, Exportin 5. Upon export, the cytoplasmic RNase III Dicer participates in the second processing step to produce miRNA duplexes. The duplex is separated and usually one strand is selected as the mature miRNA, whereas the other strand is degraded. Mature miRNAs are incorporated into the effector complexes, RISC. RISC recognizes target mRNA and causes translational repression or mRNA degradation.

このため、疾患における組織中での miRNA の発現変動も注目を集めている。また、環境ストレス、化学物質、毒物および医薬品などの外来異物に反応して組織中での miRNA の発現プロファイルが変化することが示唆されている (Hou et al., 2011)。例えば、喫煙によりマウスおよびラットの肺組織において多くの miRNA が発現低下し、これらの miRNA が発がんに関与する可能性が報告されている (Izzotti et al., 2011)。また、ラットに強力な発がん作用を示す薬物であるタモキシフェンを 24 週間投与すると、肝臓中の発がんに関与する miRNA が発現変動することが報告されている (Pogribny et al., 2007)。肝障害の例としては、Roderburg ら (2011) は、四塩化炭素 (CCl₄) 誘導性肝線維症モデルマウスの肝臓中 miR-29 の発現が低下することを示し、miR-29 が線維化に重要な TGF- β (transforming growth factor- β) やコラーゲンの発現調節に寄与していることを報告している。また、DILI において肝臓中の miRNA 発現変動に着目した研究も報告されている。Fukushima ら (2007) はラットに APAP または CCl₄ をそれぞれ単回投与し、24 時間後に共通して肝臓中で発現変動した miRNA の中で、チオレドキシシンレダクターゼを含む酸化ストレス関連遺伝子を制御すること

が推定されている miR-298 および miR-370 が発現低下することを示している。これらの 2 つの miRNA の発現低下は肝障害発症よりも早い時間において認められたことから、毒性発現前の早期段階において miRNA が発現変動すると考えられている。当研究室においても、急性肝障害である肝細胞障害型および胆汁鬱滞型、慢性肝障害である脂肪肝、脂肪性肝炎および肝線維症の各ラットモデルにおいて、血中 miRNA がそれぞれの病型に応じた特異的な発現プロファイルを示すことを明らかにした。さらに、肝障害の血中マーカーである ALT よりも早期かつ鋭敏に miR-122 が血中で発現上昇することから、血中 miRNA のバイオマーカーとしての有用性を示している (Yamaura et al., 2012)。また、Wang ら (2009) は APAP 誘導性肝障害モデルマウスにおいて肝臓に高発現する miR-122 および miR-192 が肝障害により血中に漏出するために、肝臓中で低下し血中で増加する関係にあることを報告している。しかし、組織中での miRNA の発現変動と標的遺伝子の発現の変化の関係は十分には理解されておらず、他の薬物による肝障害における miRNA の役割や、肝障害発症前の早期段階での miRNA の発現変動および免疫や炎症との関連性に焦点を当てた研究はこ

れまでに行われていない。

そこで、本研究では免疫学的な視点から、DILIの発症前におけるmiRNAの役割について明らかにすることを目的とした。はじめに、DILIの原因薬物の中でも、免疫関連因子の関与が多く認められているHALをモデル薬物として、薬物投与から経時的にmiRNA arrayによる肝臓中miRNAの網羅的な発現変動解析を行った。また、発現変動したmiRNAの推定標的遺伝子の機能を網羅的に解析した。さらに、肝障害発症前にHAL特異的に発現変動したmiRNAのうち、免疫および炎症と関連のある遺伝子を制御するmiRNAとその標的遺伝子の発現量との関係を明らかにした。その結果、Th17分化を担うSTAT3遺伝子を発現制御するmiRNAsがHAL誘導性肝障害の発症に寄与する可能性を初めて明らかにした。

B. 実験方法

B-1 実験材料および試薬

Halothane (HAL) は武田薬品工業 (Osaka, Japan) より、Isoflurane (Iso) はアボットジャパンより購入した。オリーブ油、99% 2-プロパノール溶液、クロロホルムは和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。マウス用の通常食 (Standard

diet, StdD) はオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) より購入した。血液マーカー (ALT) 測定用の富士ドライケムスライドはFUJIFILM (Saitama, Japan) より購入した。TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit、*mirVana* PARIS kit、Megaplex Primer Pools Rodent Pools、2× TaqMan Universal Master Mix NoAmp Erase UNG、TaqMan Rodent MicroRNA Array v2.0 は Applied Biosystems (Foster City, CA) より購入した。RNAiso Plus はタカラバイオ (Shiga, Japan) より購入した。PVDF膜 (Immobilon-P) は Millipore (Bedford, MA) より購入した。ReverTra Ace は東洋紡 (Osaka, Japan) より、逆転写用 dNTPs はグライナー・ジャパン (Tokyo, Japan) より購入した。SYBR[®]Premix Ex Taq[™]、RNAiso とランダムヘキサマーは宝酒造 (Kyoto, 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。プライマーの塩基配列は Table 1 に示した。その他の試薬は和光純薬工業 (Osaka, Japan) 等の特級または生化学用のものを用いた。

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR analyses in this study.

Target	Primer	Sequence
BAK1	S	5' - CCT ACG AAC TCT TCA CCA AG - 3'
	AS	5' - TCA GCC AAA AAG CAG GTC AC - 3'
BCL2L11	S	5' - ACT TGG ATT CAC ACC ACC TC - 3'
	AS	5' - GCA ATT GTC CAC CTT CTC TG - 3'
CXCL1	S	5' - GAT TCA CCT CAA GAA CAT CCA GAG - 3'
	AS	5' - GAA GCC AGC GTT CAC CAG AC - 3'
FasL	S	5' - AGA AGG AAC TGG CAG AAC TC - 3'
	AS	5' - GCG GTT CCA TAT GTG TCT TC - 3'
FLT1	S	5' - ACA GTG AGA TCT CCA AGC AG - 3'
	AS	5' - GGC CAA AGT CGC AAA TCT TC - 3'
ICAM-1	S	5' - CAA GGA GAT CAC ATT CAC GG - 3'
	AS	5' - CTT CCA GGG AGC AAA ACA AC - 3'
IL-1 β	S	5' - GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT - 3'
	AS	5' - CAC ACA CCA GCA GGT TAT CA - 3'
IL-6	S	5' - CCA TAG CTA CCT GGA GTA CA - 3'
	AS	5' - GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA-3'
MAPK14	S	5' - GAA CGA AGA CTG TGA GCT CA - 3'
	AS	5' - GAA ACA ACG TTC TTC CGG TC - 3'
MIP-2	S	5' - AAG TTT GCC TTG ACC CTG AAG - 3'
	AS	5' - ATC AGG TAC GAT CCA GGC TTC - 3'
PTEN	S	5' - ATC ACC TGG ATT ACA GAC CC - 3'
	AS	5' - TAC ATG AAC TTG TCC TCC CG - 3'
ROR γ t	S	5' - ACC TCC ACT GCC AGC TGT GTG CTG TC - 3'
	AS	5' - TCA TTT CTG CAC TTC TGC ATG TAG ACT GTC CC - 3'
STAT3	S	5' - TGC AGA GCA GGT ATC TTG AG - 3'
	AS	5' - TGC TGC TTC TCT GTC ACT AC - 3'
TNF α	S	5' - TGT CTC AGC CTC TTC TCA TTC C - 3'
	AS	5' - TGA GGG TCT GGG CCA TAG AAC - 3'

S; Sense primer, AS; Antisense primer, BAK1; BCL2-antagonist/killer 1, BCL2L11; BCL2-like 11, CXCL1; Chemokine (C-X-C motif) ligand 1, FasL; Fas Ligand, FLT1; FMS-like tyrosine kinase 1, ICAM-1; Intercellular adhesion molecule-1, MAPK14; mitogen-activated protein kinase 14, MIP-2; macrophage inflammatory protein 2, PTEN; phosphatase and tensin homolog, ROR γ t; RAR-related orphan receptor γ t, STAT3; signal transducer and activator of transcription 3, TNF α ; tumor necrosis factor α

B-2 BALB/c マウスへの薬物投与 (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) を 2 mL 投与
BALB/c マウス (雌性、8 週齢 16-21 g; した。HAL 投与 0.5、1、3、6、12 および
日本 SLC, Shizuoka, Japan) に溶媒、HAL 24 時間後に下行大静脈より採血を行った
(30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) または ISO 後、肝臓を採取した。ISO 投与 1 および 3

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。各群4匹のマウスを使用した。

B-3 TaqMan miRNA array によるマウス肝臓中 miRNA 発現量の網羅的な測定

TaqMan miRNA array 解析に用いる RNA は RNAiso Plus により抽出した。マウス肝臓より精製した RNA をそれぞれの群において等量ずつプールし、全量を 1,000 µg/3 µL とした。RNA 溶液 3 µL に Nuclease-free water 0.2 µL、25 mM MgCl₂ 0.9 µL、10× RT Buffer 0.8 µL、10× Megaplex™ RT primers 0.8 µL、100 mM dNTPs (with dTTP) 0.2 µL、20 U/µL RNase Inhibitor 0.1 µL、50 U/µL Multi Scribe™ RT 1.5 µL を加え、全量を 7.5 µL とし、5 分間氷冷した。16°C で 2 分、42°C で 1 分、50°C で 1 秒の反応を 40 サイクル行った後、85°C で 5 分間処理することで酵素を失活させた。7900HT Fast real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いてアレイ解析を行った。得られた全量 7.5 µL のうち 6 µL に 2× TaqMan Universal Master Mix NoAmp Erase UNG 450 µL と Nuclease-free water 444 µL を加えて転倒攪拌した。TaqMan microRNA array のポートに 100 µL ずつ注入し、1,200 rpm で 1 分間の遠心分注を 2 回行った後、シールした。

50°C で 2 分、95°C で 10 分反応させた後、95°C で 15 秒、60°C で 1 分の反応を 40 サイクル行った。

B-4 miRNA の標的遺伝子の抽出および KEGG pathway および MeSH 解析

得られたマイクロアレイデータの解析を行った。各時間において溶媒投与群と比較して 2 倍以上に発現変動した miRNA の機能を調べるため、miRNA の標的遺伝子が関与する経路を DIANA miRpath v.2.0 (<http://83.212.96.7/DianaToolsNew/index.php?r=mirpath>) により調べた。DIANA miRpath は miRNA の標的遺伝子の予測サイトである DIANA-microT-CDS に基づいて予測された遺伝子群を、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) の KEGG pathway を用いて解析可能なウェブツールであり、多数の miRNA の標的遺伝子が関与する生体内経路を網羅的かつハイスループットに解析することが出来る。DIANA-microT-CDS は標的遺伝子の coding region (CDS) および 3'-UTR に結合する miRNA を予測するサイトである。また、肝臓中で発現変動していた miRNA が発現調節に関与していることが報告されている標的遺伝子は miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) により探索した。なお、それらは、ヒト、マウス、ラットでの実験的な検討により明らか

かとされたものである。次に、これらの遺伝子が肝障害の発症に関与しているのか Medical Subject Headings (MeSH) 解析 (Gendoo: <http://gendoo.dbcls.jp/>) を用いて調べた。MeSH とは米国国立医学図書館が医学文献の分類に用いている主題見出し用語を用いており、遺伝子に付与 (アノテーション) することにより、データが示す生物学的意義を推測することが出来る解析法である。MeSH に免疫、炎症および肝障害に関連する Apoptosis、Cell Adhesion、Glutathione、Hepatitis、Immunity、Innate、Inflammation、Liver Diseases、Necrosis、Oxidative Stress の 9 つのキーワードを入力し、関連遺伝子を抽出した。なお、MeSH 解析ではマウスにおける遺伝子について調べた。探索した miRNA の標的遺伝子とこれらの抽出遺伝子を比較することで、発現変動した miRNA の肝障害への関与を検討した。

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、多群間における統計学的評価は ANOVA および Tukey 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に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 HAL 誘導性肝障害モデルマウスの作製および評価

免役因子が肝障害発症に関与する報告の多い薬物である HAL を投与することで、肝障害モデルマウスの作製を行った。HAL 投与 0.5、1、3、6、12 および 24 時間後の血漿中 ALT 値を Fig. 3 に示す。HAL 投与 12 および 24 時間後において、溶媒投与群と比較して HAL 投与群において血漿中 ALT 値の有意な上昇が認められた。以上より、HAL 投与群において肝障害が惹起され、HAL 誘導性肝障害モデルマウスが作製されたことを確認した。

続いて、HAL 投与後 12 時間以前の HAL 投与群において、ALT 値ではモデルマウスが作製出来ているかの評価は出来ないため、mRNA 発現量を測定することによりモデルが作製されたことを確認した。これまでに HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおいて発現増加することが報告されている CXCL1、ICAM-1、IL-1 β 、IL-6、MIP-2、TNF α 、STAT3 および ROR γ t mRNA 発現量を測定した。各 mRNA 発現量は GAPDH の値で補正した (Fig. 4)。

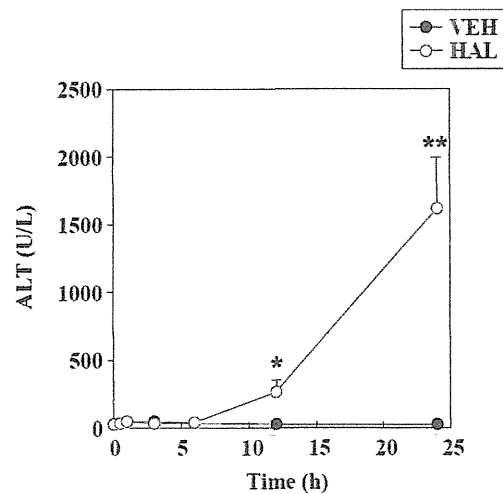


Fig 3. Time-dependent changes of plasma ALT levels in HAL-induced liver injury. Mice were administered intraperitoneally HAL at a dose of 30 mmol/kg. At 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 h after the administration, the animals were sacrificed and the blood were collected for assessment of the plasma ALT levels. Data are mean \pm SEM (n = 4). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with VEH group of each time point. VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group.

CXCL1 mRNA 発現量は HAL 投与 0.5 および 3 時間後において溶媒投与群と比較して有意な増加が認められ、12 時間後では溶媒投与群と比較して有意な減少が認められた。ICAM-1 mRNA 発現量は HAL 投与 3 時間後において溶媒投与群と比較して有意な増加が認められた。IL-1 β mRNA 発現量は投与 0.5 および 1 時間後において溶媒投与群と比較して有意な減少が認められたが、HAL 投与 3-24 時間後において有意ではないが増加傾向が認められた。IL-6 mRNA 発現量は HAL 投与 3-24 時間後において溶媒投与群と比較し

て増加傾向が認められた。MIP-2 mRNA 発現量は投与 3 時間後において溶媒投与群と比較して有意な増加が認められ、24 時間後において有意ではないが顕著な増加傾向が認められた。TNF α mRNA 発現量は投与 1 時間後において有意な増加が認められ、HAL 投与 3-24 時間後においても有意ではないが増加傾向が認められた。STAT3 mRNA 発現量は HAL 投与 3 時間後において有意な増加が認められた。ROR γ t mRNA 発現量は HAL 投与 24 時間後において有意な増加が認められた。

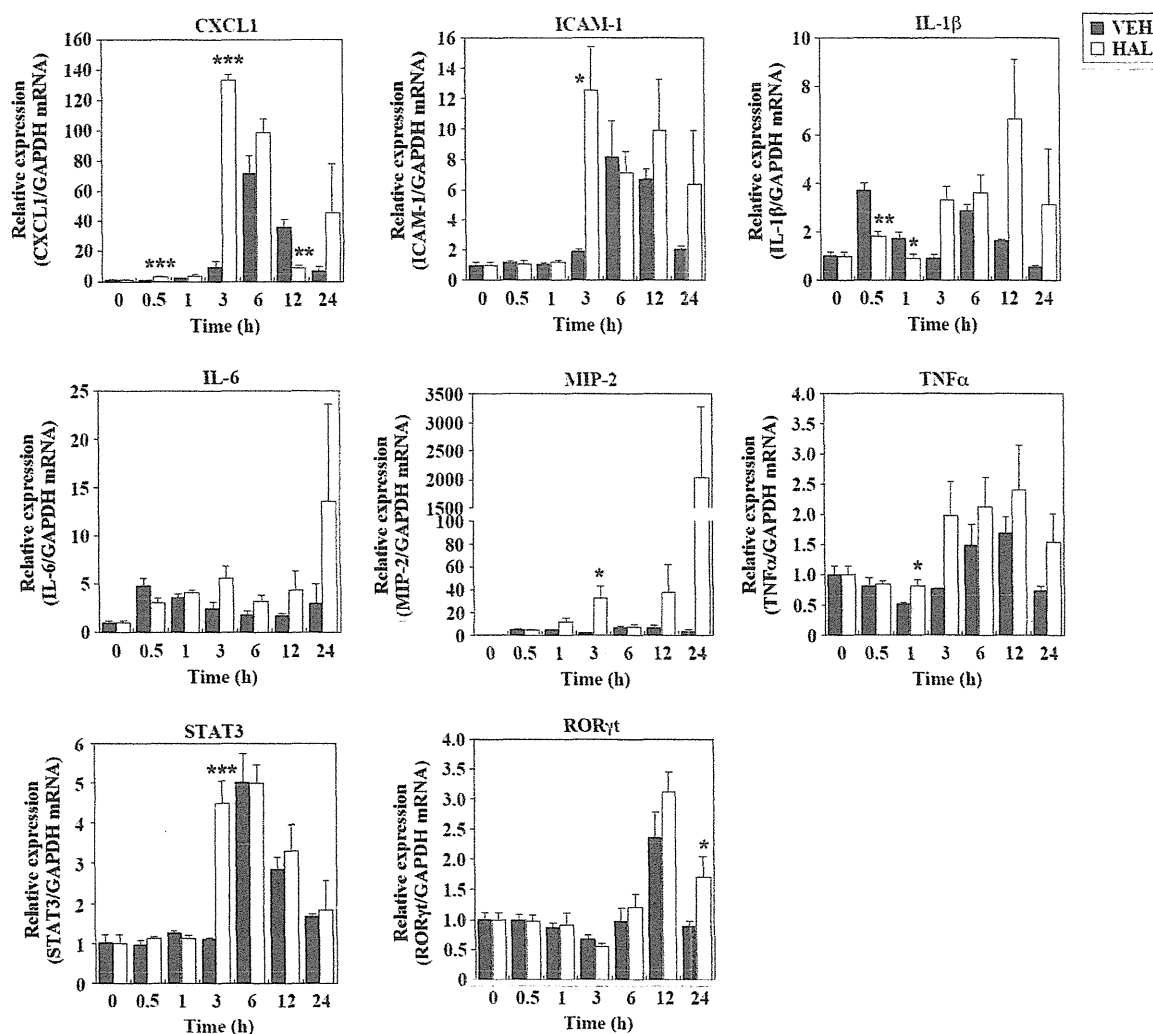


Fig 4. Time-dependent changes of the hepatic mRNA expression levels in HAL-induced liver injury. Mice were administered intraperitoneally HAL at a dose of 30 mmol/kg. At 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 h after the administration, the livers were collected for assessment of the expression levels of the hepatic mRNA. Expression of hepatic mRNA was normalized to GAPDH. Data are mean \pm SEM ($n = 4$). Relative expression levels were calculated relative to non-treated mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with VEH group of each time point. VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group.

以上の結果より、HAL 投与により肝障害が認められる投与 24 時間よりも早い時間における炎症性サイトカインおよびケモカインの産生量の増加、また、投与 3 時間後の STAT3 mRNA および投与 24 時

間後における ROR γ t mRNA 発現量の増加が認められたように、HAL 誘導性肝障害に特徴的な Th17 関連遺伝子の mRNA 発現量の誘導が認められた。従って、HAL 誘導性肝障害モデルが構築されたことを

確認した。HAL 投与 3-12 時間後に関しては各 mRNA 発現量の増加が認められたことから、HAL 投与による影響が認められたことが確認された。投与 0.5 および 1 時間後は、いずれの mRNA の発現変動が顕著には認められなかったため、miRNA アレイは HAL 投与 0.5 時間後に行わず、投与 1 時間後以降のマウス肝臓を用いて検討することとした。

C-2 HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおける肝臓中 miRNA の網羅的な発現変動解析

HAL 誘導性肝障害モデルマウスの肝臓中 miRNAs の発現を TaqMan miRNA array を用いて網羅的な発現変動解析を行った。TaqMan miRNA array は 2 つのサブセット (A と B) で構成されている。A array には、機能が同定されている、または発現レベルが高い 375 種類の miRNAs に対するプローブが、B array には機能が

まだ解明されていない、または発現レベルが低い 210 種類の miRNAs に対するプローブが搭載されている。このうち 149 種類の miRNAs にはプローブが 2 箇所を設定されており、全プローブ数は 734 である。本検討においては、(40-Ct) 値を解析に用い、この値が高いと発現レベルが高いことが判断しやすいようにした。

Table 2 には、40 サイクルの PCR 反応中に増幅された miRNA のうち、各時間において溶媒投与群と比較して HAL 投与群において 2 倍以上発現変動した miRNA の数を示した。なお、カットオフ値として (40-Ct) 値が 5 以上の miRNA を解析対象とした。各時間における HAL 投与群において、(40-Ct) 値が 5 以上を示した miRNA が多く認められたことから、miRNAs が肝臓中に常在的に存在することが示された。また、いずれの時間においても HAL 投与により多くの miRNA が発現変動していることが示された。

Table 2. Number of miRNA changed at different time points after HAL administration

Time after administration (h)	Up (> 2-fold)	No Change	Down (< 0.5-fold)	Total
1	10	110	97	217
3	58	131	34	223
6	30	178	31	239
12	25	166	47	238
24	47	150	42	239