

機関番号：32525

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590157

研究課題名（和文） Th1/Th2バランスの破綻として捉える薬剤性肝障害

研究課題名（英文） Th1/Th2 balance as a determinant of drug-induced liver injury

## 研究代表者

榎 泰宏 (MASUBUCHI YASUHIRO)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10209455

研究成果の概要（和文）：Th1/Th2 反応の異なる系統のマウスにおいて、アセトアミノフェン誘発肝障害の感受性の差異を見出した。TNF- $\alpha$ /IL-6 発現比の上昇と Th1/Th2 バランスの Th1 への偏向が肝障害の重症化に寄与することを示した。このことを裏付けるフロセミド肝障害モデルを構築した。肝 GSH の回復では説明できない N-アセチルシステインやグルタチオン (GSH) 投与による薬剤性肝障害防御に Th1/Th2 バランスの回復が関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Studies on susceptible and resistant mouse strains demonstrated that acetaminophen-induced liver injury was associated with Th1-dominant response in Th1/Th2 cytokine balance and increase in TNF- $\alpha$ /IL-6 ratio. It was confirmed by another hepatotoxicity model, which was developed by furosemide. N-Acetylcysteine and glutathione were found to exert their hepatoprotective effects via mechanisms that are independent of increasing hepatic glutathione, but probably act through improvement of Th1/Th2 balance.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：副作用、薬剤性肝障害、Th1/Th2、アセトアミノフェン、マウス、N-アセチルシステイン、インターロイキン-6、グルタチオン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Th1/Th2 バランスと疾患：免疫調節に重要なヘルパーT細胞 (CD4 抗原陽性細胞) には2種類の細胞が存在して、それらが産生するサイトカインのバランスによって細胞性免疫と体液性免疫が制御されている。この免疫バランスは Th1/Th2 バランスと言われており、Th1/Th2 バランスの不均衡、さらに

は破綻によって感染症、アレルギー、癌、糖尿病、動脈硬化など様々な疾患が発症すると考えられている。本研究課題である薬剤による肝障害の過程と関連する生体反応という点では、炎症反応は Th1 細胞優位が引き起こし、組織の線維化は Th2 細胞優位が引き起こす反応に位置づけられることから、Th1/Th2 バランスと肝障害の関連に着目した。

(2) 医薬品の副作用としての薬剤性肝障害：薬剤性肝障害は、医薬品の開発中止や市販医薬品の販売中止の直接の要因となるような社会的に重大な医薬品の副作用の一つである。また、自覚症状が見られないマーカー酵素の軽微な漏出や重篤な劇症肝炎まで、その重症度は多様である。このうち前者を含めると肝臓は副作用の多い臓器といえ、実際、医療用医薬品の 5-10%が添付文書上で肝機能検査が必要とされていることから、市販の医薬品の多くは肝障害を惹起しうる化合物であるとの認識が必要である。

(3) 特異体質性肝障害：ある限られた患者群において発症する薬剤性肝障害を特異体質性肝障害という。このうち免疫学的機序によるものをアレルギー性肝障害といい、T細胞を介した機序としてハプテン仮説が提唱されてきた。我々はこれまで、ハプテン仮説を必要としないような実験的肝障害モデルにおいて、内因性リガンドとして Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR)の一つ TLR4 のリガンドや炎症性サイトカインが、肝障害の進行に深く関与することを明らかにしてきた。一方近年、病原体の感染による Th1 応答の誘導に必須か否かは明らかでないものの、TLR による自然免疫系の活性化が、抗原特異的な獲得免疫系、特に Th1 応答を誘導することが示されている。このように Th1 応答の誘導が、TLR を介した自然免疫系の活性化とリンクしていることから、組織障害過程においても重要な役割を担っていると推定された。このような背景と自己免疫性肝炎や肝炎モデルと Th1/Th2 バランスとの関連を示す知見から、薬剤性肝障害を Th1/Th2 バランスと関連づけるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

薬剤性肝障害の発症機構の解明と防御法の確立は、医薬品の開発と適正使用の両面から重要な課題である。本研究では、申請者による報告を含めたこれまでの知見から、薬剤性肝障害を Th1/Th2 バランスの破綻が引き起こす疾患として捉え、それに基づいて機構解明を行い、さらに防御法を提示することを目的とするものである。

薬剤性肝障害においては、データが最も蓄積されているアセトアミノフェン肝障害において、申請者らを含め、これまでに炎症性サイトカインの障害に対する促進的な関与、抗炎症性サイトカインの抑制的な関与が明らかにされつつある。この結果は、Th1/Th2 バランスが肝障害との関連を示唆するものであるが、Th1 細胞そのものが肝障害を誘導するかについては、これまでに作製された肝障害モデルが T細胞、マクロファージ、好中球など、多様な細胞の活性化を伴うため、明らかではない。実際、アセトアミノフェンの

肝障害においては T細胞自身が障害への関与を示す知見は得られておらず、むしろ、サイトカインのソースとしてクッパー細胞や肝実質細胞自身の寄与が大きいと考えられる。また最近、IFN- $\gamma$  の関与に関連して、ナチュラルキラー (NK) 細胞や NKT 細胞の関与も示唆されており、多様な免疫担当細胞の理解と検討が必要と考えられる。言い換えれば、Th1/Th2 バランスを Th1 細胞および Th2 細胞そのものの応答性として捉えるだけでなく、その下流あるいは上流にある Th1 あるいは Th2 サイトカイン分泌細胞の総合的なバランスとして捉えるべきであると思われた。

本研究の目的は、薬剤性肝障害において、そこに介在するサイトカインのソースを厳密に特定することではなく、Th1/Th2 バランスの不均衡や破綻という疾患概念が薬剤性肝障害にどのように当てはまるかを検証し、さらに Th1/Th2 バランスの制御を肝障害の防御に役立てることである。本研究では、種々の薬剤性肝障害モデルを構築し、まず、それらの障害進展における T細胞さらには、Th1 細胞あるいは Th2 細胞の役割を明らかにすることとした。T細胞が直接、肝障害に関与しない薬剤性肝障害についても Th1/Th2 サイトカインバランスの変動の要因を明らかにする。さらに Th1/Th2 バランスを実験的に変動させることにより肝障害の抑制を試みる。これら一連の実験により、特に特異体質性の肝障害発症要因としての免疫系の意義を明らかにするとともに、発症機構に基づく予防あるいは治療プロトコールの設計に役立てるものとする。

## 3. 研究の方法

薬剤性肝障害モデルを構築するため、Th1/Th2 反応が異なる C57BL/6 系マウス、BALB/c 系マウスならびに CD-1 マウスを用いた。肝障害惹起薬物モデルには、アセトアミノフェンおよび慢性化・線維化に進展することが知られている四塩化炭素、ならびに薬物代謝依存の肝障害モデルとして有用性が高いと考えられたフロセミドを用いた。これらのモデル薬物投与による肝障害は、肝組織切片の病理組織学的検査と血清逸脱酵素により評価した。肝グルタチオン量を DTNB 法により測定し、種々のサイトカインならびに heme oxygenase-1 (HO-1) の肝発現量を Real time RT-PCR により測定した。肝障害防御物質として既知の N-アセチルシステイン (NAC)に加えて、グルタチオン (GSH)、同エチルエステル (GSH-EE) ならびにシステイン (CYS)を用い、肝 GSH レベルの回復以外の肝障害防御機序として、Th1/Th2 バランスの回復の可能性について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) Th1/Th2 反応に基づく薬剤性肝障害のマウス系統差の検討：薬剤性肝障害発症過程における Th1/Th2 反応の役割を明らかにするため、薬剤性肝障害モデルを構築し、肝障害指標に加えて、肝障害発症に伴う Th1/Th2 反応の推移についてサイトカインを指標に検討した。一般に、C57BL/6 系は Th1 優位、また BALB/c 系は Th2 優位な系統であり、寄生虫感染やエンドトキシンなどに対する反応性が大きく異なる。この 2 系統でアセトアミノフェン誘発肝障害を比較したところ、BALB/c に比べて C57BL/6 系マウスで有意に高い感受性を示した。両系統では反応性代謝物の生成酵素である CYP2E1 含量には差がなく、生体高分子への共有結合の指標となる肝臓内 GSH の消費にも系統差は認められなかった。このことから肝障害感受性の差は薬物代謝によるものではなく、肝障害進展における炎症反応による可能性が考えられた。今回、Th1/Th2 バランスの指標となるだけでなく、肝障害進展や逆に抑制に寄与すると考えられる TNF- $\alpha$  と IL-6 の肝発現量を Real time RT-PCR で測定した。その結果、アセトアミノフェン肝障害に対して高い感受性を示した C57BL/6 マウスでは、肝障害発症に伴い TNF- $\alpha$  が高い発現量を示し、肝障害抵抗性を示した BALB/c マウスでは IL-6 が高い発現量を示した。このことは TNF- $\alpha$ /IL-6 発現比そのものが肝障害感受性を左右していること、すなわち、Th1/Th2 バランスの Th1 への偏向が、肝障害の重症化に寄与することが示唆された。本結果はこれまでの薬剤性肝障害とサイトカインの関連に関する知見を説明するとともに、Th1 抑制薬による肝障害防御の可能性を示唆している。

(2) 新規薬剤性肝障害モデルの構築：薬剤性肝障害のモデルにはアセトアミノフェン (APAP) が汎用されるが、実験事実の普遍化には他のモデルでの検証が必要である。今回、フロセミドによるマウス肝障害モデルを構築し、発症因子や防御因子に関する APAP との差異を考察した。また、APAP についても新たに雌性マウスで検討し、性差の要因としての Th1/Th2 反応の役割を調べた。雄性 CD-1 マウスに対するフロセミドによる肝障害は、ジエチルジチオカルバミン酸により顕著に阻害され APAP と同様に代謝的活性化を要することが示された。一方、APAP 投与と同程度の肝障害を惹起した実験条件において、フロセミド投与では、肝 GSH 濃度に顕著な変化は見られず、肝 HO-1 発現の増加の程度も小さかった。このことから、フロセミドの反応性代謝物は GSH との結合に優先して毒性ターゲットに結合することが示唆され、GSH 低下が誘発する毒性発現機序を除外した肝障害モデルになりうると考えられた。フロセミド肝

障害では APAP に比べて、TNF- $\alpha$ 、IL-6 など測定したいずれのサイトカインの増加も大きく、毒性の重篤度に影響しているものと考えられた。一方、雌性マウスでは雄に比べて APAP 肝障害の程度は小さかったが、雌雄間で TNF- $\alpha$ 、IL-6 発現の差異は小さく、Th1/Th2 反応が性差の決定因子にはなっていないと考えられた。

(3) Th1/Th2 反応を介した発症機序に基づく薬剤性肝障害の防御：APAP 誘発肝障害に関連して、過量摂取時の中毒解毒剤として NAC が臨床使用されており、NAC は GSH の前駆物質として働くとされるが、他の作用機序の重要性も示唆されている。今回、APAP 投与による肝 GSH レベルの低下に対して効果の異なる NAC、GSH、GSH-EE ならびに CYS を用いて、APAP 誘発肝障害に対する防御効果を比較し、肝 GSH レベルに対する効果との関連を調べた。APAP 肝障害に対して十分な防御効果が得られる NAC 投与量と同量のチオール化合物を APAP と併用投与したところ、いずれも APAP 肝障害を顕著に抑制した。用いたチオールのうち、GSH-EE のみが APAP による肝 GSH の枯渇をほぼ完全に防御した。GSH 自身の投与では肝 GSH 量の増加には至らなかった。肝 GSH に対しては NAC の効果も不完全で、CYS 投与に比べても効果は弱かった。APAP 投与による肝障害発現に先立って種々のサイトカイン肝発現レベルが増加するが、防御に働くと考えられる IL-6 が NAC あるいは GSH 併用によりさらに増加した。また、GSH の枯渇を伴わない FS 誘発肝障害に対してもこれら 2 種のチオールは防御効果を示したことから、NAC と GSH は Th1/Th2 改善することにより肝障害を防御することが示された。以上、外因性チオールによる防御機構を検討する中で、Th1/Th2 バランスの破綻が肝障害発症段階で重要な意味を持つことが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① Masubuchi, Y., Nakayama, J. and Watanabe, Y. Sex difference in susceptibility to acetaminophen hepatotoxicity is reversed by buthionine sulfoximine. *Toxicology*, in press (2011)
- ② Masubuchi, Y., Nakayama, J. and Sadakata, Y. Protective effects of exogenous glutathione and related thiol compounds against drug-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 34, 366-370. (2011)
- ③ Masubuchi, Y., Sugiyama, S. and Horie, T. Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chem Biol Interact* 179, 273-279. (2009)

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 榎渕 泰宏、井原 彩佳、島田 薫：マウスにおける四塩化炭素誘発肝障害の性差に対する IL-6 の役割. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- ② 渡邊 靖子、榎渕 泰宏：GSH 合成障害下での雌マウスのアセトアミノフェン肝障害高感受性因子の検討. 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月、静岡
- ③ 榎渕 泰宏、渡邊 靖子：アセトアミノフェン肝障害感受性の性差におけるグルタミン酸システインリガーゼと Mrp4 の役割. 第 25 回日本薬物動態学会年会、2010 年 10 月、さいたま
- ④ Yasuhiro Masubuchi, Junpei Nakayama, and Yuka Sadakata: Protective effects of glutathione and the related thiols against hepatotoxicity of acetaminophen and furosemide in mice. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 2010 年 7 月, Copenhagen, Denmark
- ⑤ 榎渕 泰宏、中山 潤平、渡邊 靖子：アセトアミノフェン誘発肝障害に対するグルタチオンならびに関連チオール化合物の防御効果の比較. 日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- ⑥ 渡邊 靖子、中山 潤平、榎渕 泰宏：雌マウスにおけるアセトアミノフェン肝障害低感受性と BSO 高感受性. 日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- ⑦ 榎渕 泰宏、小林 良樹、渡邊 靖子：マウスにおけるエチニルエストラジオールによるアセトアミノフェン誘発肝毒性防御のメカニズム. 第 24 回日本薬物動態学会年会、2009 年 11 月、京都
- ⑧ Yasuhiro Masubuchi, Junpei Nakayama, and Eriko Makita: Resistance to acetaminophen-induced hepatotoxicity in female CD-1 mice. 11th European ISSX Meeting, 2009 年 5 月, Lisbon, Portugal
- ⑨ 榎渕 泰宏、中山 潤平、渡邊 靖子：フロセミドによる肝障害誘発ならびに N-アセチルシステインによる防御. 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、京都
- ⑩ 中山 潤平、牧田 枝里子、榎渕 泰宏：マウスにおけるアセトアミノフェン誘発肝障害の性差とその要因. 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、京都
- ⑪ 榎渕 泰宏、浅野 早紀、貞方 優佳、森田 雅之：フロセミド誘発マウス肝障害モデル. 第 23 回日本薬物動態学会年会、2008 年 10 月、熊本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎渕 泰宏 (MASUBUCHI YASUHIRO)  
千葉科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：10209455