

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790146

研究課題名（和文）薬剤性肝障害発症基盤としての肝臓 GSH 低下に関わる分子機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism of hepatic GSH decrease during drug induced liver injury.

研究代表者

伊藤 晃成 (ITO KOUSEI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30323405

研究成果の概要（和文）：薬剤性肝障害(DILI)を動物で再現することは通常困難であるが、菌体外毒素リポポリサッカリド(LPS)の少量暴露により薬剤感受性が上昇することが報告されている。LPS の効果は主に炎症性サイトカイン産生亢進によると考えられてきたが、今回新たに、肝細胞 GSH 低下も重要なDILI増悪の相乗要因となること、また、GSH低下の様式には種差があり、ラットではLPS処理直後の血管側へのGSH排出亢進、マウスでは代謝過程の変化が主に関与することが示された。

研究成果の概要（英文）：It is known that pretreatment of minimum amount of lipopolysaccharide (LPS) increases the animals to drug-induced liver injury, otherwise they are hardly affected by drug alone. In addition to previously proposed inflammatory cytokines produced by LPS pre-treatment, we have demonstrated that hepatic GSH decrease is an important factor cooperatively aggravates DILI in this LPS model. Moreover, species difference of the mechanism of hepatic GSH decrease after LPS treatment was emerged; basolateral efflux of GSH was increased in rat, while metabolic pathway was somehow involved in mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010	2,000,000	600,000	2,600,000
2011	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：医療・福祉、薬剤反応性、薬剤性肝障害、トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

臨床で用いられる多くの薬物においてその代謝は肝臓で行なわれ、さまざまな代謝産物が出現するために副作用として肝障害が最も多いと一般に考えられている。重症化例においては長期に渡る入院治療、更には生体肝移植を要するなど生命予後にも影響を与える。薬剤性肝障害の多くは前臨床における毒性試験や市販前の少規模臨床試験ではその危険性を予見することが困難であり、2000年のトログリタゾンによる薬剤性肝障害とそれに引き続く販売中止例のように、市販後に大多数の患者に用いられて初め

て発覚する場合が多い。このように開発段階、市販後いずれにおいても薬物性肝障害は解決されるべき問題として残されており、そのためには発症メカニズムの解明が必須である。

薬剤性肝障害には大きく中毒性と特異体質性があり、一般に前者は投与量に依存するもの、後者は依存しないものと考えられている。多くは特異体質性により生じるもので、その特徴は発症に個人差が大きく、また発症までの投与期間においても数日～数ヶ月と大きな差が見られることである。投与量や投与期間にも依存しないとされ、動物実験での再現も困難と考えられてき

た。この点については、近年リポポリサッカライド (LPS) を感作させた動物が薬物に対する肝障害感受性が高まるとして注目されている (Roth et al., J Pharmacol Exp Ther, 2003, 307, 1-8)。すなわち、単独で肝障害を生じない程度の微量の LPS (1mg/kg) を事前投与したラットに、単独で肝障害を生じない量の薬物を投与することで肝障害が惹起できるというものである。LPS は腸内細菌であるグラム陰性細菌の細胞壁構成成分であり菌体外毒素の一種である。微量の LPS を投与することにより敗血症までは至らないものの軽度な感染状態を再現することが可能である。しかしながら LPS との併用により肝細胞にどのような変化が生じた結果、薬剤への感受性が増強するのかについては十分解明されていない。

一方で、申請者の所属するグループが行ったこれまでの研究では、肝障害を惹起した患者血清の解析から、肝臓内 GSH の低下と薬剤性肝障害発症との関連を示唆する知見を得ている。一般に細胞内 GSH 量低下は腫瘍壊死因子などへの細胞死感受性を高めることが知られている。興味深いことに、Jaeschke らは LPS を投与 (15mg/kg) したラットでは、わずか1時間で肝細胞内 GSH+GSSG 量が約半分低下し、その低下が肝細胞から血液側への排出亢進によって説明可能であることが示されている (Jaeschke, Am J Physiol, 1992, 26, G60-68)。

## 2. 研究の目的

上記これまでの背景を踏まえて申請者は、薬剤性肝障害発症を左右する重要な要因として、肝細胞内 GSH 低下に着目した。そして薬物性肝障害モデルのひとつである LPS 併用動物ではクッパー細胞の活性化により様々な炎症性サイトカインが放出されることが知られるが、それと並行して肝細胞内 GSH 低下が生じ、最終的に薬物一般に対する感受性を増加していると考えた。さらにその GSH 低下には合成の低下、消費増大、細胞外への流出増加などいくつかのメカニズムが想定されるが、いずれの過程が変化することで GSH が低下するのかを明らかにすることを目的とした。特に肝細胞からの GSH 流出過程については過去に細胞から血液への排出過程に関わる輸送体分子の存在が示唆されながらも同定には至っていない。この点についても最終的に分子同定することも目的としている。

## 3. 研究の方法

1) 薬剤性肝障害発症における GSH の重要性の確認を行う。LPS はクッパー細胞を刺激することにより肝細胞内 GSH を低下させるほか、TNF  $\alpha$  や IL2, IL6 などのサイトカインを多量放出するため、薬剤性肝障害発症における GSH 低下の重要性を直接評価することが困難である。そこで、まず薬剤性肝障害増強の下地として肝細胞内 GSH 低下が重要であることを証明するため、それぞれ異なる作用によって GSH の量を低下さ

せる Butionin Sulfoxymin (BSO)、Diethyl maleic acid (DEM) をラットに事前投与し、肝臓内 GSH 残存量と薬剤性肝障害の程度に相関が見られるかを検証する。BSO は GSH 生合成の律速段階である  $\gamma$  グルタミルシステインシンセターゼ ( $\gamma$  GCS) の阻害剤である一方、DEM は GSH と結合して代謝的に消失させる。肝障害を惹起するモデル薬物としては、臨床において薬剤性肝障害の頻度が高いジクロフェナクを用いる。

2) LPS による GSH 排出亢進現象の確認と薬剤性肝障害における重要性の確認を行う。Roth らは、ラットにおいて薬剤単独では見られない肝障害が、1mg/kg の LPS を事前投与して 2 時間後に薬剤を投与すると観察できることを報告しているが、このときの肝臓内 GSH 量に関する情報は無い。一方で Jaeschke らは 5mg/kg の LPS 投与により肝臓から血液の GSH 排出亢進を報告している。Roth らが薬剤性肝障害モデルで用いている低投与量の LPS、すなわち 1mg/kg 投与時においても GSH 排出亢進が起こっているかは不明である。そこでまず、1mg/kg の LPS を投与した際に肝臓から血液側に排出される GSH 量と、肝臓内 GSH 量の関係について定量比較を行う。LPS 投与量を変化させ、肝臓内 GSH 量とジクロフェナクによる肝障害程度の関係について調査する。以上の一連の検討により、肝臓内 GSH 量低下が薬剤性肝障害発症の基盤となるか、更には GSH 低下が細胞外への排出亢進によって説明可能であるかが実験的に示される。

3) LPS 投与による GSH 排出促進の分子メカニズムの詳細について、候補輸送体遺伝子の in vivo ノックダウン実験、そして将来的には遺伝子改変動物を用いることを視野に入れ、操作の容易なマウスを用いて LPS 投与による GSH 量変動の再現を行なう。

## 4. 研究成果

臨床における薬剤性肝障害を動物で再現することは困難と考えられてきたが、近年、リポポリサッカライド (LPS) の低用量前投与により多くの薬物で肝障害を再現できるとの報告がなされている。LPS は一般に免疫系を活性化し種々の炎症性サイトカインを誘導することで肝細胞の薬剤感受性を高めると考えられるが、加えて申請者は肝細胞内 GSH の低下も重要な要素であり、その低下が GSH の肝細胞外への排出亢進によるとの仮説を考え、これらの点を詳細に検証した。ラットに 1mg/kg の LPS を投与することで肝臓の GSH は約 70% に低下し、この低下分は肝静脈中濃度と末梢血濃度の差分から算出される肝細胞から血液側への GSH 排出量とほぼ等しかった。LPS 1mg/kg 投与 2 時間後にジクロフェナク (DCLF) 100mg/kg を投与することにより肝障害マーカーは著しく上昇した一方、いずれか片方のみの投与では肝障害マーカーの上昇は見られなかった。LPS と DCLF を併用したラットに対し

GSH あるいは N アセチルシステインを投与することで肝臓内 GSH を維持した場合には肝障害マーカーの上昇は抑制された。以上より、LPS による DCLF の肝障害発症には肝細胞内 GSH の低下が必要であり、GSH の低下の大部分は肝細胞から血液側への排出亢進によることが示された。また、GSH を化学的に消去する DEM 投与により LPS 投与時と同程度まで肝臓内 GSH を低下させた状態のラットに、LPS により誘導される種々炎症性サイトカイン mix (TNF  $\alpha$  + IL1  $\beta$  + IL6 + INF  $\gamma$ ) ならびに DCLF を投与した場合、著しい肝障害マーカーの上昇が観察され、いずれか一つの要素を欠いた場合にはその上昇は僅かなものであった。以上より、肝細胞内 GSH 低下と炎症性サイトカイン上昇は、薬物に対する肝細胞障害感受性を相乗的に高めていることが示された。

以上の検討により、薬物性肝障害の実験動物モデルとして用いられるリポポリサッカライド (LPS) 低用量の事前投与処理は、ラットにおいて肝細胞内 GSH を約 30% 低下させること、この低下は肝細胞から血液側への排出亢進によること、GSH 低下と種々炎症性サイトカイン上昇が相乗的に薬物誘発性の肝障害増悪に寄与することが示された。

血液側への GSH 排出輸送体を分子同定するには、各種輸送体ノックアウトの利用、shRNA アデノウイルスを用いた vivo での投与実験を行なうのが効率的と考え、マウスにおいても LPS 投与による同様の GSH 排出亢進の再現を試みた。しかし、当初の予想と異なり、マウスでは LPS 投与 2 時間までの短期間で生じる GSH 排出亢進がほとんど起こらないことが判明した。このことは、マウスでは LPS 事前投与 2 時間後に薬物投与することによる DILI 発症が認められない結果とも矛盾しなかった。LPS 投与 2 時間後時点での肝臓内 GSH は DDY、BALB、ICR マウスなど複数系統マウスいずれでも低下せず、LPS 投与後の GSH 排出にはラットとマウスの間で種差がある可能性が示された。一方、マウスでは LPS 投与 6 時間の時点で排出亢進以外のメカニズムによると思われる GSH 量低下が観察されたことから、この時点で薬物を投与したところ、DILI 発症が見られた。このことから、ヒト血清中のメタボローム解析から示唆され、かつラットにおける LPS+薬物投与実験により支持されていた我々の仮説である、“肝細胞内 GSH 低下が DILI に重要である”という点に関しては、マウスにおいても概ね成立すると考えられた。

以上、ラットとマウスでは LPS に対する反応性、特に肝細胞 GSH の変動について種差が存在することが明らかとなった。一方で肝細胞内 GSH 量の低下は、種を超えて、薬物に対する肝細胞死感受性を亢進させる要因であることが示された。このことは臨床において DILI 患者においても肝臓での GSH 低下を示唆するデータと矛盾しないものであり、肝細胞内 GSH 低下が DILI 発症

に重要な普遍因子であり、各薬物による肝障害惹起を前臨床段階で漏れなく評価するためにはこの点を考慮した適切な肝障害評価モデルを利用することが肝要であることが示された。本研究の最終目的は「薬剤性肝障害発症基盤としての肝臓 GSH 低下に関わる分子機序」の解明であり、この点について結論を得るには至らなかった。同じげっ歯類に属するラットとマウスでも、例えば LPS に対して生じる GSH 低下の分子機序は同一でなく、種差の存在が示唆された。これまでの検討から DILI 患者に共通して生じているとされた肝細胞内 GSH 低下についても、その分子機序に関しては患者個々において多様である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Sekine S, Mitsuki K, Ito K, Kugioka S and Horie T (2012) Sustained intrahepatic glutathione depletion causes proteasomal degradation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1822: 980-987. 査読有
- ② Yoshikado T, Takada T, Yamamoto T, Yamaji H, Ito K, Santa T, Yokota H, Yatomi Y, Yoshida H, Goto J, Tsuji S and Suzuki H (2011) Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. *Mol Pharmacol* 79: 241-250. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Ito K, Ikebuchi Y, Honma M, Kozawa M, Yamamoto T and Suzuki H (2012 年 1 月 16 日～18 日) Hepatic glutathione decrease and inflammatory cytokines are key factors in lipopolysaccharide pre-administered drug-induced liver injury model. International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics (PPF) - Integration of Basic Science, Drug Development and Regulation Tokyo, Japan.
- ② 伊藤晃成, 池淵祐樹, 本間雅, 小沢政成, 山本武人 and 鈴木洋史 (2011 年 12 月 17 日～18 日) 薬物誘発性肝障害モデル動物における肝臓内グルタチオン量変化の重要性. 日光シンポジウム 日光.
- ③ 関根秀一, 伊藤晃成 and 堀江利治 (2011 年 11 月 24 日～25 日) 酸化ストレス誘発性胆汁うっ滞時における MRP2 の局在制御機構の解明. 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 岡山.
- ④ 伊藤晃成, 関根秀一, 堀江利治 and 鈴木

木洋史 (2011 年 3 月 28 日～30 日)  
Post-translational regulation of ABC  
transporters involved in bile flow formation.  
第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本  
解剖学会総会・全国学術集会 横浜.

- ⑤ Ikebuchi Y, Ito K, Honma M, Kozawa M,  
Yamamoto T and Suzuki H (2010 年 11 月  
27 日～28 日) Hepatic glutathione and  
inflammatory cytokines cooperatively  
regulate onset of drug-induced liver injury.  
第 4 回次世代を担う若手医療薬科学シン  
ポジウム 東京.
- ⑥ Ikebuchi Y, Ito K, Honma M, Kozawa M,  
Yamamoto T and Suzuki H (2010 年 10 月 7  
日～9 日) Glutathione decrease is one of  
key factors for drug-induced liver injury in  
rats induced by lipopolysaccharide and  
diclofenac coadministration 25th JSSX  
Annual Meeting 大宮.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/todaiyak/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 晃成 (ITO KOUSEI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 30323405

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: