

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659072

研究課題名（和文）炎症関連核内受容体と細胞間連関に着目した薬剤性肝障害の機序解明と予測系開発

研究課題名（英文）Understanding of molecular mechanism and development of prediction system of drug-induced hepatotoxicity, focusing on the inflammation-associated nuclear receptors and cell-cell interactions.

研究代表者

吉成 浩一（YOSHINARI KOUICHI）

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：60343399

研究成果の概要（和文）：本研究では、炎症反応と関連する核内受容体に着目して、それらの活性化がマクロファージの炎症関連遺伝子発現に及ぼす影響をヒトモデル細胞およびラット Kupffer 細胞を用いて解析した。その結果、核内受容体 PXR、CAR、LXR α 、PPAR α および PPAR γ の活性化は、炎症関連遺伝子の発現プロファイルに影響を及ぼすこと、その作用は受容体特異的であること、またその変動は転写レベルで制御されていることが示唆された。薬物は肝実質細胞だけでなく、非実質細胞に作用して炎症シグナルに影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have investigated the influences of treatment with the activators of inflammation-associated nuclear receptors on the gene expression profile of inflammation-related genes in human model macrophages and rat Kupffer cells. The results suggest that the activation of either PXR, CAR, LXR α , PPAR or PPAR γ elicits the changes in the gene expression of the several genes investigated, that the influence is dependent on the nuclear receptors, and that the changes are regulated at the transcriptional levels. These imply that not only parenchymal hepatocytes but non-parenchymal hepatocytes are targets for the drug- or xenobiotic-induced liver inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：医薬品情報・安全性学

1. 研究開始当初の背景

医薬品による重篤な肝障害の発症は、新規医薬品の開発や市販医薬品の販売中止を招く主要な原因の1つとなっている。しかし、既知の重篤な薬剤性肝障害についての解析は、毒作用特性の解析にとどまり、その発症機構の解明には至っていない。このため、新規薬物について、ヒトでの肝障害の発症を予測し回避するための明確な手法は確立されていない。

過去の知見より、薬剤性肝障害について次

のことが示唆されている：①投与量が少ない（10 mg/day 以下）薬物では起こりにくい。②代謝活性化反応による反応性中間体の生成は必要であるが、タンパク質結合の強さと肝障害の発症とは必ずしも関連していない。③全ての肝障害性薬物が抗原（ハプテン）として作用するわけではない（非アレルギー性薬剤性肝障害の存在）。④ヒトで肝障害を生じる薬物が、実験動物で同様の作用を示すとは限らない（種差の存在）。⑤しかし、低用量の炎症惹起物質（LPS 等）の併用は、実験動物で

の肝障害の発症率を上げる。以上のことから、薬剤性肝障害の発症には、(i)代謝活性化による反応性代謝物の生成とその生体成分への結合および(ii)炎症シグナルの活性化、の2つのトリガーが必要と考えられた。

上記(ii)について、肝障害性薬物と炎症シグナルを結びつける分子機構に関する報告はほとんどない。研究代表者らは、これらに関連した次の知見を得ている:①肝障害性薬物の多くがヒト核内受容体 PXR を活性化する。②ヒト肝癌由来 HepG2 細胞において、PXR の活性化によりサイトカインやケモカインの遺伝子発現プロファイルが変化する。③マクロファージ様細胞に分化したヒト単球系 THP-1 細胞は、PXR を含む多くの核内受容体を発現している。

2. 研究の目的

上述の研究背景を踏まえて、私は、肝障害性薬物は、肝非実質細胞(クッパー細胞等)において核内受容体の活性化を介して炎症シグナルを亢進し、間接的に実質細胞での細胞傷害を増悪化するのではないかという、新規な肝障害の発症・重篤化機序を推定した。本研究では、これらの作業仮説を実証し、非実質細胞における核内受容体の活性化を基盤とした、ヒトでの肝障害発症リスクを予測・評価可能な新規システムの提示を目指す。

上述のように、新規な化学構造を有する薬物が、ヒトで肝障害を発症するか否かを予測することは非常に困難である。肝障害の発症や増悪化における免疫系の関与は最近指摘されているが、その詳細は不明である。したがって、本研究成果は、毒性学関連分野における学術的意義が大きいと共に、医薬品開発における安全性研究への応用が期待され、この分野にブレークスルーをもたらすと期待される。

3. 研究の方法

(1) THP-1 細胞における炎症関連遺伝子の発現変動

THP-1 細胞 (Riken Bioresource Center) を 1.5×10^6 個/mL で播種して 24 時間培養した後、50 nM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) で 48 時間処置してマクロファージ様細胞 (以下 THP-1-M Φ) に分化させた。以下野処置を行なった後、常法に従い、細胞からの総 RNA 抽出および cDNA 合成を行ない、定量的 PCR により、表 1 に示す 25 遺伝子および *ACOX1*、*CD36*、*GAPDH* (内部補正用) の mRNA レベルを測定した。

① THP-1-M Φ 細胞を、ヒト PXR リガンド rifampicin (Rif; 10 μ M)、PPAR α リガンド bezafibrate (BZF; 100 μ M)、PPAR γ リガ

ド troglitazone (TGZ; 1 μ M)、LXR α リガンド 24(S)-hydroxycholesterol (24HC; 10 μ M)、ヒト CAR リガンド 6-(4-chlorophenyl) imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime (CITCO; 0.3 μ M) または溶媒 (0.1% dimethyl sulfoxide; DMSO) を含む培地で 3、6、12 または 24 時間培養した。

② THP-1-M Φ 細胞を BZF、TGZ または溶媒 (0.1% DMSO) を含む培地で 6 時間処置した。

(2) ラット Kupffer 細胞における炎症関連遺伝子の発現変動

凍結初代ラット Kupffer 細胞 (RKC) は Life Technologies 社から購入した。これを、マニュアルに従い解凍し、1 ウェル当たり 2×10^5 個の細胞を 24-well プレートに播種し 24 時間培養した。培地は 10% FCS および非必須アミノ酸、抗生物質を添加した D-MEM (高グルコース) を用いた。次いで、薬物あるいは溶媒 (0.1% DMSO) を添加した培地 (FCS 非添加) に変えて 6 時間培養した。用いた薬物は、ラット CAR 活性化物質 clotrimazole (CTZ; 5 μ M)、ラット PXR リガンド pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN; 10 μ M)、LXR リガンド GW3965 (GW; 2 μ M)、BZF (100 μ M) および TGZ (10 μ M) である。

薬物処置した RKC から SV Total RNA Isolation System (Promega) を利用して総 RNA を単離した。その後、RT SYBR Green qPCR Master mix (Qiagen) を利用して cDNA を合成し、RT² Profiler PCR Array (Qiagen; Rat Cytokines & Chemokines) を利用して mRNA レベル変動を解析した。

4. 研究成果

(1) THP-1 細胞における炎症関連遺伝子の発現変動

ヒト PXR、PPAR α 、PPAR γ および LXR α の活性化物質である Rif、BZF、TGZ および 24HC を用いて、THP-1-M Φ における各核内受容体の活性化に伴う炎症関連遺伝子の mRNA レベルの変動を解析した。THP-1-M Φ に上記の核内受容体活性化物質または溶媒を処置し、炎症関連遺伝子 25 種の mRNA レベルを経時的に測定した。各 mRNA レベルは *GAPDH* mRNA レベルで補正し、各時点での溶媒処置群の値を 1 とした相対値で表している (表 1)。なお、t 検定を行った結果、溶媒処置群と比較して有意に発現が上昇した値を赤、有意に発現が低下した値を青で示した。RIF 処置によって発現が変動した遺伝子は 15 種類あり、3 時間では 5 種類、6 時間では 8 種類、12 時間では 1 種類、24 時間では 8 種類の遺伝子の変動した。BZF

処置によって発現が変動した遺伝子は 20 種類あり、3 時間では 14 種類、6 時間では 8 種類、12 時間では 6 種類、24 時間では 9 種類の遺伝子が発現変動した。TGZ 処置によって発現が変動した遺伝子は 15 種類あり、3 時間では 4 種類、6 時間では 9 種類、12 時間では 6 種類、24 時間では 9 種類の遺伝子が発現変動した。24HC 処置によって発現が変動した遺伝子は 14 種類あり、3 時間では 2 種類、6 時間では 2 種類、12 時間では 1 種類、24 時間では 13 種類の遺伝子が発現変動した。また、いずれかの核内受容体活性化物質によって有意な発現変動が認められた遺伝子は 22 種類であった。これらの遺伝子のうち、*CCL2*、*CCL8*、*IL10* および *TNF* は BZF および TGZ 処置によって顕著に発現が低下し、*CCL20* は BZF および TGZ 処置によって顕著に発現が上昇した。

表 1. 核内受容体リガンド処理による炎症関連遺伝子の発現変動

Gene	RIF				BZF			
	3hr	6hr	12hr	24hr	3hr	6hr	12hr	24hr
<i>CCL2</i>	0.90	0.89	0.98	1.54	0.80	0.68	0.43	0.65
<i>CCL7</i>	0.84	0.80	0.84	1.14	0.71	0.76	0.70	0.98
<i>CCL8</i>	0.71	0.46	0.81	0.88	0.52	0.38	0.24	0.94
<i>CCL20</i>	1.09	0.95	1.10	1.72	2.34	2.35	2.71	3.78
<i>CCR6</i>	0.75	0.44	0.81	0.86	0.56	0.96	0.78	0.80
<i>CCR7</i>	1.18	1.57	1.28	1.63	1.63	1.18	1.07	1.51
<i>CSF3</i>	0.58	0.55	1.51	0.92	0.63	1.30	1.07	0.90
<i>CXCL1</i>	0.63	0.88	0.77	1.21	0.65	0.77	0.72	0.68
<i>CXCL3</i>	0.89	0.99	1.00	1.02	0.68	0.84	0.87	0.90
<i>CXCL13</i>	0.82	0.86	0.65	0.79	0.95	0.86	0.55	0.77
<i>IFNG</i>	0.74	0.59	0.79	0.79	0.58	1.31	0.82	0.84
<i>IL1B</i>	1.19	1.39	1.30	2.26	1.54	1.44	1.28	0.92
<i>IL1F7</i>	0.58	0.56	0.78	0.75	0.59	1.33	0.83	0.79
<i>IL1F9</i>	0.81	1.26	1.04	0.77	1.09	0.96	0.89	0.95
<i>IL3</i>	0.58	0.61	0.88	0.97	0.58	1.08	0.76	0.98
<i>IL10</i>	0.86	0.92	0.78	0.90	0.44	0.23	0.36	0.57
<i>IL12A</i>	0.57	0.69	0.89	1.15	0.61	0.82	0.84	0.97
<i>IL12B</i>	1.19	0.58	1.33	ND	1.27	ND	0.52	ND
<i>IL17C</i>	0.88	1.06	1.09	1.00	0.74	0.99	0.84	1.08
<i>IL18</i>	0.91	0.75	0.75	0.82	1.01	0.84	0.75	1.19
<i>LTB4R</i>	0.81	0.76	0.79	0.87	0.99	1.25	1.00	1.09
<i>SPP1</i>	0.86	0.89	0.80	1.05	1.02	0.93	0.88	0.80
<i>TGFB1</i>	0.92	0.92	0.99	0.98	1.17	0.87	1.12	1.11
<i>TNF</i>	1.12	1.17	1.19	1.51	0.68	0.57	0.54	0.72
<i>XCR1</i>	0.80	0.39	0.90	0.88	0.60	1.01	0.98	0.92

Gene	TGZ				24HC			
	3hr	6hr	12hr	24hr	3hr	6hr	12hr	24hr
<i>CCL2</i>	0.73	0.59	0.50	0.81	1.02	1.01	0.81	1.11
<i>CCL7</i>	0.96	0.68	0.60	0.85	1.06	0.93	0.74	0.78
<i>CCL8</i>	0.47	0.30	0.28	0.63	0.96	0.96	1.21	0.58
<i>CCL20</i>	1.75	2.12	2.25	2.72	1.18	1.02	1.22	4.12
<i>CCR6</i>	0.60	0.61	0.82	0.78	0.97	0.10	0.59	0.66
<i>CCR7</i>	1.33	1.40	1.36	1.03	1.34	1.35	1.16	3.51
<i>CSF3</i>	0.58	0.75	1.43	1.06	0.88	0.57	0.99	0.84
<i>CXCL1</i>	0.75	0.69	0.64	0.72	1.04	0.83	0.69	0.53
<i>CXCL3</i>	0.82	0.87	1.00	0.78	0.99	0.94	0.98	0.73
<i>CXCL13</i>	0.92	0.93	0.56	0.91	1.05	1.07	0.73	1.10
<i>IFNG</i>	0.73	1.08	0.85	0.70	0.99	0.23	0.61	0.57
<i>IL1B</i>	1.46	1.18	1.09	1.00	1.29	1.12	1.48	3.16
<i>IL1F7</i>	0.80	1.07	0.90	0.67	0.89	0.41	0.75	0.57
<i>IL1F9</i>	0.97	0.98	0.74	1.11	1.37	1.11	1.18	1.71
<i>IL3</i>	0.80	0.96	0.77	0.86	0.86	0.40	0.71	0.73
<i>IL10</i>	0.68	0.38	0.39	0.74	1.00	0.84	0.72	0.54
<i>IL12A</i>	0.81	0.82	0.95	1.00	0.93	0.65	0.64	1.06
<i>IL12B</i>	0.80	ND	0.68	ND	1.77	0.81	0.72	ND
<i>IL17C</i>	0.95	1.11	0.78	0.93	1.11	1.13	1.10	1.15
<i>IL18</i>	1.08	0.65	0.80	1.35	1.06	0.88	0.74	0.83
<i>LTB4R</i>	1.12	1.39	0.98	1.51	0.99	0.94	0.87	0.72
<i>SPP1</i>	0.95	1.00	0.89	1.00	0.97	0.99	0.90	1.75
<i>TGFB1</i>	0.90	1.09	1.16	1.21	1.12	1.01	0.99	1.14
<i>TNF</i>	0.87	0.63	0.60	0.89	1.04	0.99	0.98	1.12
<i>XCR1</i>	0.64	0.82	0.93	0.72	1.08	1.06	0.76	0.68

次に、BZF および TGZ 処置による遺伝子の発現変動が THP-1-MΦ における内因性の

PPARαや PPARγの活性化によるか否かを解析した。まず、PPARα/PPARγの標的遺伝子である *ACOX1* と *CD36* の mRNA レベルを測定した (表 2)。その結果、BZF および TGZ *ACOX1* と *CD36* の mRNA レベルは上昇した。

最後に、上記 mRNA レベルの変動が転写レベルでの制御によるか否かを解析するために、ラット *Aox1* の PPAR 応答配列 (PPAR response element: PPRE) を 3 コピー組み込んだレポータープラスミド p(AOX)3-tk-pGL3 を作製し、THP-1-MΦ にトランスフェクションして BZF および TGZ 処置後のレポーター活性を測定した (図 1)。レポーター活性は、コントロールプラスミド tk-pGL3 を導入し、溶媒処置した群の値を 1 とした相対値で表している。その結果、レポーター活性は BZF 処置では約 2 倍、TGZ 処置では約 3.5 倍に上昇した。

以上の結果から、BZF および TGZ 処置による炎症関連遺伝子の発現変動は、THP-1-MΦ における内因性 PPARα/PPARγの活性化によるものである可能性が示された。

表 2. BZF および TGZ 処置による PPAR 標的遺伝子の mRNA レベル変動

Gene	Relative mRNA levels			
	Vehicle	BZF	Vehicle	TGZ
<i>ACOX1</i>	1.00 ± 0.18	2.49 ± 0.70	1.00 ± 0.24	1.75 ± 0.57
<i>CD36</i>	1.00 ± 0.24	2.45 ± 0.74	1.00 ± 0.22	2.22 ± 0.91

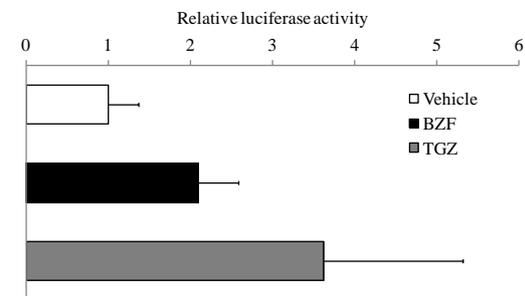


図 1. THP-1-MΦ におけるラット *Aox* レポーター遺伝子の転写活性

(2)ラット Kupffer 細胞における炎症関連遺伝子の発現変動

PCR アレイを利用して、RKC での核内受容体活性化に伴う炎症関連遺伝子の発現変動を解析した。その結果、それぞれの薬物処置により、多数の遺伝子の mRNA レベルが変動した。表 3 に、mRNA レベルが 2 倍以上または 50%以下になった遺伝子を示した。

(1)のヒト MΦモデル細胞を用いた解析結果と併せて考えると、ある種の薬物・化学物質は、肝非実質細胞である MΦ系細胞の核内受容体に作用することで、炎症に関わる多くの遺伝子発現を変動させる可能性がある。今後

は in vivo での解析や肝障害薬物を用いた解析を進める必要がある。

表 3. RKC における核内受容体活性化物質処置に伴うサイトカインおよびケモカイン遺伝子の発現変動

	CTZ	PCN	GW	BZF	TGZ
Up-regulation (>2-fold)	<i>Bmp6</i> <i>Ccl22</i> <i>Ppbb</i> <i>Vegfa</i>	<i>Ccl2</i> <i>Ccl22</i> <i>Csf3</i> <i>Il17f</i> <i>Il1a</i> <i>Ltb</i> <i>Vegfa</i>	<i>Bmp6</i> <i>C5</i> <i>Ccl17</i> <i>Ccl19</i> <i>Ccl22</i> <i>Cntf</i> <i>Cxcl13</i> <i>Faslg</i> <i>Il12a</i> <i>Il1a</i> <i>Osm</i> <i>Thpo</i> <i>Tnfsf11b</i> <i>Tnfsf13b</i> <i>Vegfa</i>	<i>Ccl22</i> <i>Csf2</i> <i>Csf3</i> <i>Il1a</i> <i>Il1b</i> <i>Ltb</i> <i>Thpo</i> <i>Vegfa</i>	<i>Bmp6</i> <i>C5</i> <i>Ccl22</i> <i>Cntf</i> <i>Csf3</i> <i>Cxcl12</i> <i>Il11</i> <i>Il15</i> <i>Il17f</i> <i>Ltb</i> <i>Tnfsf10</i> <i>Vegfa</i>
Down-regulation (<-2-fold)	<i>Bmp2</i> <i>Ccl2</i> <i>Ctf1</i> <i>Cxcl1</i> <i>Cxcl10</i> <i>Cxcl13</i> <i>Cxcl23</i> <i>Cxcl9</i> <i>Faslg</i> <i>Il1b</i> <i>Il4</i> <i>Ltb</i> <i>Tnf</i> <i>Tnfsf11b</i> <i>Tnfsf10</i>	<i>Ccl12</i> <i>Ctf1</i> <i>Cx3cl1</i> <i>Cxcl13</i> <i>Cxcl9</i> <i>Faslg</i> <i>Ifna2</i> <i>Il10</i> <i>Il16</i> <i>Il4</i> <i>Il7</i> <i>Nodal</i> <i>Tnfsf11b</i>	<i>Bmp2</i> <i>Ccl12</i> <i>Ccl24</i> <i>Ctf1</i> <i>Cxcl10</i> <i>Cxcl13</i> <i>Il10</i> <i>Il16</i> <i>Il4</i> <i>Il6</i> <i>Nodal</i> <i>Tnf</i> <i>Tnfsf10</i>	<i>Ccl12</i> <i>Ctf1</i> <i>Cxcl10</i> <i>Cxcl13</i> <i>Cxcl9</i> <i>Faslg</i> <i>Il4</i> <i>Il4</i> <i>Lif</i> <i>Tnfsf11b</i>	<i>Ccl12</i> <i>Ccl2</i> <i>Ccl24</i> <i>Ctf1</i> <i>Cxcl9</i> <i>Faslg</i> <i>Il10</i> <i>Il16</i> <i>Lif</i> <i>Nodal</i> <i>Tnfsf11b</i>

(2) 研究分担者

宮田 昌明 (MIYATA MASAOKI)
 東北大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：90239418

(3) 連携研究者

山添 康 (YAMAZOE YASUSHI)
 東北大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号：00112699

中山勝文 (NAKATYAMA MASAFUMI)
 東北大学・加齢医学研究所・助教
 研究者番号：20453582

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 平田貴大、吉成浩一、山添康：ヒトマクロファージ様細胞における炎症関連遺伝子発現に対する核内受容体リガンドの影響
 日本薬学会東北支部大会、2011 年 10 月 30 日、仙台市
- ② 吉成浩一、化学物質の有害性を左右する核内受容体：毒性発現メカニズムの理解と有害性評価への応用を目指して、第 10 回日本化学工業協会 LRI 研究報告会 (招待講演)、2011 年 8 月 26 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉成浩一 (YOSHINARI KOUICHI)
 東北大学・大学院薬学研究科・准教授
 研究者番号：60343399