

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790603

研究課題名(和文) 薬剤性肝傷害の新規治療戦略としての小胞体ストレス - CHOP 経路の制御

研究課題名(英文) role of endoplasmic reticulum stress in acetaminophen-induced liver injury

研究代表者

石塚 洋一 (ISHITSUKA, Yoichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：70423655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：アセトアミノフェン(APAP)誘発肝傷害に対する新規治療法としての小胞体ストレス制御の可能性評価を行った。本検討により、小胞体ストレスを感知するERAIマウスにAPAPを投与すると顕著なGFPの発現が見られること、小胞体ストレス関連転写因子C/EBP homologous protein遺伝子欠損マウスではAPAP誘発肝傷害が軽減されること、小胞体ストレス抑制薬である4-phenylbutyric acidのマウスへの投与によりAPAP誘発肝傷害が顕著に軽減されることを見出した。

本研究成果は、APAP誘発肝傷害病態形成に重要な小胞体ストレスの制御が新たな治療ターゲットとなることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to evaluate the role of endoplasmic reticulum (ER) stress in acetaminophen-induced liver injury in mice. We demonstrated the hepatic Xbp1 mRNA splicing induction by APAP injection using ERAI (ER stress activated indicator) transgenic mice. In addition, we proved that C/EBP homologous protein, an ER stress related-transcriptional factor, null mice were protected from APAP induced hepatotoxicity compared with wild-type mice. Furthermore, we also found that 4-phenylbutyric acid (4-PBA), an ER stress suppressor, significantly attenuated the APAP-induced liver injury in mice. These results indicate that ER stress plays important role in the development of APAP hepatotoxicity in mice, and suggest that ER stress suppression is a promising therapeutic strategy against APAP-induced liver injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：小胞体ストレス アセトアミノフェン 肝障害 有害事象 フェニル酪酸 4-phenylbutyrate 4-PBA  
CHOP

## 1. 研究開始当初の背景

一般用医薬品にも配合される解熱鎮痛薬として古くから世界中で汎用されているアセトアミノフェン(APAP)は二面性を持つ。アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬と比較して胃腸障害やライ症候群発症など副作用の発現頻度は低く安全性の高い薬と認識されている半面、小児の誤飲や自殺企図などで過量服用された際にほぼ確実に肝傷害を誘発する。世界保健機構WHOのデータでは重篤な薬剤性肝傷害の約40%はAPAPが原因と報告されており(図1)、薬剤性肝傷害の最も代表的な起因薬物として問題視され、現在も世界中で精力的な研究が行われている。

APAP肝傷害に対する唯一の治療薬であるN-アセチルシステイン(NAC)は、APAPの毒性代謝物N-acetyl-p-benzoquinone imineを解毒・抱合するグルタチオンの補充作用や抗炎症作用により効果を示すが、NACによる十分な治療効果が得られないケースが多数存在することや催吐作用等により治療継続が困難な例も多い。したがって救命・救急医療の現場では、NACに勝る新規治療薬の開発が切望されている。

申請者は、2009-2010年度科研費補助金研究にて、APAP肝傷害マウスモデルにおいて、トロンボキサンA2合成酵素阻害薬オザグレル塩酸塩が既存の治療薬NACを凌駕する卓越した効果を有することを見出した(特願2010-250367)。このメカニズムを調べると、意外なことに、オザグレルの効果にトロンボキサンA2合成阻害作用はほとんど影響していなかった。様々な検討を行う過程で、APAP投与による肝組織中のDNA断片化・アポトーシス様細胞死に付随し、小胞体ストレス誘導性の転写因子CHOPの発現亢進が確認され、オザグレルはこれらに対し劇的な抑制効果を示すことを見出した。これらの結果から、オザグレルの肝傷害抑制効果の少なくとも一部に、CHOPの制御が関与している可能性が想起された。

細胞内外の様々なストレスに保護的に働く小胞体への過剰なストレス、いわゆる“小胞体ストレス”は、細胞・臓器機能に破綻を来す。なかでも小胞体ストレス-CHOP経路の活性化は炎症・アポトーシスを誘導し、種々の疾患の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている(Mol Med.2010,16:254-61, J Immunol. 2006,176:6245-53他)。よって、APAP肝傷害においても、小胞体ストレス-CHOP経路の活性化を介して肝細胞傷害を誘発している可能性が考えられるが、明確なエビデンスは存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究では、APAP誘発肝障害マウスモデルにおける小胞体ストレスの役割を解明し、小胞体ストレス抑制薬の有効性を評価することを目的として、小胞体ストレスを感知しgreen fluorescence protein(GFP)を発現するendoplasmic

reticulum stress activated indicator(ERAI)マウスを用いてAPAP誘発肝傷害における小胞体ストレス誘導を確認し、小胞体ストレス誘導性細胞死に關与するCCAAT-enhancer binding protein homologous protein(CHOP)欠損マウスを用いAPAP誘発肝傷害におよぼすCHOPの影響を調べ、APAP誘発肝傷害における小胞体ストレス抑制薬4-phenylbutyric acid(4-PBA)投与の影響を調べた。

## 3. 研究の方法

### 試薬・実験動物

APAPおよび4-phenylbutyric acid, Solutol HS15は、Sigma社(St.Louis, Missouri, USA)より購入したもので、CCl<sub>4</sub>およびコーンオイルは、和光純薬工業株式会社製(Japan)より購入したものをを用いた。マウスにはC57BL/6Jcl雄性マウスを日本クレア株式会社から購入したものをを用いた。ER stress activated indicator(ERAI)マウスは群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット、岩脇隆夫氏より恵与されたものを、Chop遺伝子欠損マウスは大阪大学免疫学フロンティア研究センター、審良静男教授より恵与されたものをを用いた。

### APAP誘発肝障害マウスモデルの作成

APAP誘発肝障害マウスモデルはAPAP(400mg/kg)をPBS(phosphate buffered saline)に溶解(約60)し、各種マウスに腹腔内投与することで作成した。

### CCl<sub>4</sub>誘発肝障害マウスモデルの作成

CCl<sub>4</sub>誘発肝障害マウスモデルはCCl<sub>4</sub>(0.025-1 mL/kg)をコーンオイルに溶解し、各種マウスに腹腔内投与することで作成した。

### CCl<sub>4</sub>誘発肝線維化マウスモデルの作成

CCl<sub>4</sub>肝線維化マウスモデルはCCl<sub>4</sub>(0.05 mL/kg)をコーンオイルに溶解し、マウスに、週2回、4週間腹腔内投与することで作成した。

### 4-PBAの投与

4-PBA(100, 200 mg/kg)は、7%(in PBS) HS 15 solutionに溶解し、腹腔内投与した。

### サンプルの採取

APAP投与後、各時間経過後、マウスにジエチルエーテルによる吸入麻酔を施し、メスにて開腹して腹部大静脈よりテルモシリンジ1mL SS-01T ツベルクリン用およびテ

ルモ注射針 26G×1/2 S・B (TERUMO corporation, Tokyo, Japan) にて採血を行った。血清サンプルは常温で30-50分間インキュベーションし、遠心分離 (12000g, 10分, 4度) 後, 上清を採取した。抽出した肝臓サンプルは-80度で保存した。

アラニントランスアミナーゼ (ALT) 活性の測定

血清サンプルをスポットケム™ GPTおよびSPOTCHEM™ EZ SP-4430 (アークレイ株式会社, Japan) を用い, 手順に従い測定した。

アンモニア濃度の測定

血液サンプルを commercial assay kits (Wako Pure Chemical Industries, Japan) を用い, 手順に従い測定した。

H&E染色, TUNEL法

マウスより抽出した肝臓を10%中性緩衝ホルマリン溶液で組織固定を行い, 病理組織標本を作成した。定法により固定組織をパラフィン包埋し, マイクロトームにより約 3 $\mu$ m の薄切標本を作成した後, hematoxylin and eosin (H&E) 重染色, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate Nick-End Labeling (TUNEL) assayを行った。染色した肝臓切片はKEYENCE BIOREVO BZ-9000 (Keyence株式会社, Osaka, Japan) を用いて撮影した。定量には, 1つの肝臓切片あたり無作為に5カ所選出し撮影したものを, 画像処理・解析ソフト GNU Image Manipulation Program version 2.6.11およびImage J 1.34sを用い染色部分を定量し, その平均をサンプル肝臓の染色面積 (%) (染色面積/全面積) とした。

免疫染色

マウスより抽出した肝臓を4%パラホルムアルデヒドで組織固定を行い, 病理組織標本を作成した。定法により固定組織をパラフィン包埋し, マイクロトームにより約 3 $\mu$ m の薄切標本を作成した後, 免疫染色 (CHOP抗体, ニトロチロシン抗体, GFP抗体) を行った。染色した肝臓切片はKEYENCE BIOREVO BZ-9000 (Keyence株式会社, Osaka, Japan) を用いて撮影した。

RT-PCR法によるmRNA発現

APAP投与後各時間で肝臓を抽出し, 肝湿

重量1g当たり10 mLのTRIzol (Invitrogen社製) を加えホモジナイズし, 同試薬添付文書のプロトコールに従い, RNA回収・精製を行った。得られたRNA (total RNA) をGene Quantを用いて, UV260 nmにおける吸光度から収量を求め, 1~2 $\mu$ g/ $\mu$ LのRNA水溶液を調製した。調製したRNAをHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems社製) を用いcDNAに逆転写した後, StepOne™リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems社製, Foster City, California, United States) のSYBR Green FASTモード  $\Delta\Delta$ Ct法を用いてmRNAの相対発現量を測定した。各RNAのcDNA特異的PCRプライマーの塩基配列は以下の通りで,  $\beta$ -actinは内標準として測定した。

**Mouse Chop**

Forward

AGCTGGAAGCCTGGTATGAGGA

Reverse AGCTAGGGACGCAGGGTCAA

**Mouse Bim**

Forward CCGGAGATACGGATTGCAC

Reverse CAGCCTCGCGGTAATCATTTG

**Mouse Ero-1 $\alpha$**

Forward

TTAAGTCTGCGAGCTACAAGTATTC

Reverse

AGTAAGTCCACATACTCAGCATCG

**Mouse GRP78**

Forward CTCCACGGCTTCCGATAATCA

Reverse

TCCAGTCAGATCAAATGTACCCAGA

**Mouse  $\beta$ -actin**

Forward CATCCGTAAAGACCTCTAT

GCCAAC

Reverse ATGGAGCCACCGATCCACA

#### 4. 研究成果

APAP誘発肝障害における小胞体ストレスの役割解明

ERAIマウスを用いた検討から, APAP誘発肝障害において, 肝実質細胞が壊死する過程で小胞体ストレスが生じることが示された。また, APAP過剰投与により肝臓における小胞体ストレス関連遺伝子 (Chop mRNAなど) の発現量が顕著に増加した。さらに, 小胞体ストレス誘導性細胞死に重要であるCHOPが欠損したChop<sup>-/-</sup>マウスでは, WTマウスと比較しAPAP投与後の血清ALT値の有意な低下が見られた。また, 病理組織学的に見ても, Chop<sup>-/-</sup>マウスにおいて肝細胞壊死およびTUNEL陽性細胞数の

減少が見られ、APAP誘発肝障害の抑制効果が示された。以上の結果より、APAP誘発肝障害マウスモデルにおける病態形成に小胞体ストレスおよびその下流のCHOPは重要な役割を持つことが示された。

一方で、WTマウスと *Chop*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、CCl<sub>4</sub>誘発肝障害（急性期）および肝線維化（慢性期）の程度に差は見られなかったことから、CCl<sub>4</sub>誘発肝障害の病態形成におけるCHOPの重要度は低いと考えられる。

#### APAP誘発肝障害に対する4-PBAの有効性評価

4-PBA（100 or 200 mg/kg）をAPAPの1時間前に投与すると、用量依存的にAPAP投与後の血清ALT値を低下させ、肝細胞壊死を減少させた。APAP投与後の各時間の血清ALT値および肝細胞壊死を見たところ、APAP投与8および24時間後において、4-PBA（200 mg/kg）による有意な血清ALT値の低下および肝細胞壊死の減少が確認された。また、4-PBAをAPAPの1時間後に投与してもAPAP投与後の血清ALT値を低下させ、肝細胞壊死を減少させた。さらに、4-PBAは、DNA断片化の指標であるTUNEL陽性細胞および酸化ストレスの指標であるニトロチロシン陽性細胞を減少させた。以上より、4-PBAはAPAP誘発肝障害マウスモデルに対して肝障害抑制効果を持つことが示された。

CCl<sub>4</sub>（0.025 or 1 mL/kg）は用量依存的に血清ALT値上昇および肝細胞壊死を誘発したが、4-PBAは、低用量のCCl<sub>4</sub>（0.025 mL/kg）における肝障害のみ抑制した。このことから、4-PBAは軽度のCCl<sub>4</sub>誘発肝障害に対しては有効性を持つ可能性が示された。

これらの結果は、APAP誘発肝障害の病態機序解明および新規治療戦略の開発につながる有用な基礎データになるものと考えられる。

#### 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11件）

1. Shimizu D and Ishitsuka Y, Miyata K, Iwawaki T, Oike Y, Irie T et al., Protection afforded by pre- or post-treatment with 4-phenylbutyrate against liver injury induced by acetaminophen overdose in mice,

Pharmacological Research, Accepted, 査読有り

2. Tanaka Y and Ishitsuka Y, Motoyama K, Arima H, Matsuo M, Irie T et al., Influence of Npc1 genotype on the toxicity of hydroxypropyl-β-cyclodextrin, a potentially therapeutic agent, in Niemann-Pick Type C disease models, *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 1, 19-30 (2014) 査読有り
3. Aritomi K and Ishitsuka Y, Kai H, Irie T et al., Evaluation of three-dimensional cultured HepG2 cells in a nano culture plate system: an in vitro human model of acetaminophen hepatotoxicity, *Journal of Pharmacological Sciences*, 124, 218-229 (2014) 査読有り
4. Ishitsuka Y, Hamasak N, Irie T et al., Comparative effects of phosphoenolpyruvate (PEP), a glycolytic intermediate, as an organ preservation agent with glucose and N-acetylcysteine against organ damage during cold storage of mouse liver and kidney, *ISRN Pharmacology*, 2013, 375825 (2013) 査読有り
5. Tanaka K, Ishitsuka Y, Katsuki H, Irie T et al., Comparative effects of respiratory stimulants on hypoxic neuronal cell injury in SH-SY5Y cells and in hippocampal slice cultures from rat pups, *Pediatrics International*, 55, 320-327 (2013) 査読有り
6. Tomishima Y and Ishitsuka Y, Ohdo S, Irie T et al., A selective thromboxane A2 synthase inhibitor, ozagrel hydrochloride, ameliorates liver injury induced by acetaminophen overdose in mice, *BMC Gastroenterology*, 13, 21 (2013) 査読有り
7. Kondo Y and Ishitsuka Y, Hamasaki N, and Irie T et al., Phosphoenolpyruvate (PEP), a glycolytic intermediates with antioxidant activity; the potential for cellular and organ protective application, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 390-401 (2013) 査読有り
8. Somekawa-Kondo T, Yamaguchi K and Ishitsuka Y, Irie T et al, Therapeutic doses of aminophylline induce guinea pig hippocampal neuronal cells under low-tidal volume hypoxic conditions, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65, 102-114 (2013) 査読有り
9. Kadowaki D, Ishitsuka Y, Narita Y, Irie T et al., Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine

induced renal failure model rats, *Life Sciences*, 91, 1304-1308 (2012) 査読有り

10. Irikura M, Minami E, Ishitsuka Y, Kawase A, Kondo Y and Irie T, Abnormal Movements Following Treatment with Midazolam in Japanese Neonatal Intensive Care Unit Patients: Incidence and Associated Factors, *ISRN Pharmacology*, 2012, 950603 (2012) 査読有り
11. Kondo Y and Ishitsuka Y, Kadowaki D, Kuroda M, Tanaka Y, Nagatome M, Irikura M, Hirata S, Sato K, Maruyama T, Hamasaki N, and Irie T, Phosphoenolpyruvic acid (PEP), an intermediary metabolite of glycolysis, as a potential cytoprotectant and anti-oxidant in HeLa cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35 606-611 (2012) 査読有り

(学会発表) (計 16 件)

1. 志水大介, 石塚洋一, 宮田敬士, 福崎久美子, 富島善朗, 近藤悠希, 入倉 充, 岩脇隆夫, 尾池雄一, 入江徹美: アセトアミノフェン肝障害の新規治療戦略としての小体ストレス制御, 第 30 回日本薬学会九州支部大会 (2013 年 12 月 7 日), 長崎, 長崎国際大学
2. 有富航平, 石塚洋一, 富島喜朗, 近藤悠希, 首藤剛, 甲斐広文, 入江徹美: アセトアミノフェン誘発肝障害の新規 in vitro 評価系の構築, 第 30 回日本薬学会九州支部大会 (2013 年 12 月 7 日), 長崎, 長崎国際大学
3. 阿部名月, 竹浦宏幸, 石塚洋一, 近藤悠希, 入倉充, 下石和樹, 陣上祥子, 福永栄子, 入江徹美: 成人におけるアセトアミノフェン坐剤の使用実態と肝障害発現頻度および関与因子の解析, 第 30 回日本薬学会九州支部大会 (2013 年 12 月 7 日), 長崎, 長崎国際大学
4. 梅崎至高, 庵原大輔, 安楽誠, 石塚洋一, 入江徹美, 上釜兼人, 平山文俊: シクロデキストリンを用いた水酸化フラレン親水性ナノ粒子の調製と抗酸化能評価, 第 30 回日本薬学会九州支部大会 (2013 年 12 月 7 日), 長崎, 長崎国際大学
5. 富島喜朗, 石塚洋一, 松永直哉, 古庄弘和, 入倉 充, 大戸茂弘, 入江徹美: アセトアミノフェン誘発肝障害におけるオザグレルのミトコンドリア保護作用, 第 38 回西日本薬剤学研究会 (2013 年 8 月 23 日), 大分, 九州地区国立大学九重共同研修所
6. 志水大介, 石塚洋一, 宮田敬士, 福崎久美子, 富島善朗, 入倉 充, 岩脇隆夫, 尾池雄一, 入江徹美: アセトアミノフェン肝障害に対する 4-phenylbutyric acid の効果, 第 8 回トランスポーター研究会年会 (2013 年 6 月 15-16 日), 熊本, 熊本大学薬学部
7. 田中雄太, 石塚洋一, 早坂真里奈, 入倉充, 入江徹美: PBL 小胞体ストレス応答を制御する tauroursodeoxycholic acid による bleomycin 誘発肺線維症の軽減, 日本薬学会第 133 年会 (2013 年 3 月 27-30 日), 横浜, パシフィコ横浜
8. 志水大介, 石塚洋一, 宮田敬士, 福崎久美子, 富島善朗, 入倉充, 岩脇隆夫, 尾池雄一, 入江徹美, 薬剤性肝障害発症における CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP) の役割, 第 6 回トランスポーター研究会九州部会 (2012 年 9 月 1 日) 福岡, 福岡県歯科医師会館
9. 古庄弘和, 富島喜朗, 永留美菜子, 石塚洋一, 松永直哉, 入倉充, 大戸茂弘, 入江徹美, アセトアミノフェン誘発肝傷害に対するオザグレルの有効性評価および作用機序の検討, 医療薬学フォーラム 2012/第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2012 年 7 月 14 日) 福岡, 福岡国際会議場
10. 富島喜朗, 石塚洋一, 有富航平, 志水大介, 古庄弘和, 福崎久美子, 首 剛, 甲斐広文, 入倉充, 入江徹美, 3 次元培養を利用したアセトアミノフェン誘発肝障害のヒト in vitro 評価系の確立, 医療薬学フォーラム 2012/第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2012 年 7 月 14 日) 福岡, 福岡国際会議場
11. 志水大介, 石塚洋一, 宮田敬士, 福崎久美子, 富島善朗, 入倉充, 尾池雄一, 入江徹美, 薬剤性肝障害における小胞体ストレス-CHOP 経路の役割, 医療薬学フォーラム 2012/第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2012 年 7 月 14 日) 福岡, 福岡国際会議場
12. 石塚洋一, 竹浦宏幸, 田添光二, 野田寛子, 入倉充, 永田浩泰, 秋吉明子, 陣上祥子, 吉田稔, 福永栄子, 入江徹美, 高用量アセトアミノフェン坐剤の製剤特性およびその有効性・安全性に関する研究, 第 15 回 日本医薬品情報学会 総会・学術大会 (2012 年 7 月 8 日) 東大阪, 近畿大学
13. 阿部名月, 入江徹美, 竹浦宏幸, 石塚洋一, 入倉充, 陣上祥子, 福永栄子, 成人におけるアセトアミノフェン坐剤の使用実態と肝障害発現頻度の解析, 第 15 回 日本医薬品情報学会 総会・学術大会 (2012 年 7 月 8 日) 東大阪, 近畿大学
14. 富島喜朗, 石塚洋一, 松永直哉, 古庄弘和, 入倉充, 大戸茂弘, 入江徹美, 急性薬剤性肝障害の発症抑制剤としてのオザグレルの

有用性評価および作用機序 解明, 日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月 28 日-31 日) 札幌、北海道大学

15. 石塚洋一、有富航平、富島喜朗、入倉充、入江徹美, 3D-HepG2 を用いたアセトアミノフェン誘発肝傷害 in vitro 評価系の構築と薬理学的評価, 第 64 回日本薬理学会西南部会 (2011 年 11 月 20 日) 福岡、福岡国際会議場
16. 有富 航平, 富島 喜朗, 志水 大介, 古庄 弘和, 福崎 久美子, 石塚 洋一, 入倉 充, 入江 徹美 アセトアミノフェン誘発肝傷害の新規 in vitro 評価系の構築, 第 36 回西日本薬剤学研究会 (2011 年 8 月 26 日-27 日) 大分、九州地区国立大学九重共同研修所

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

(その他)

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/dcci/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石塚 洋一 (ISHITSUKA, Yoichi)  
熊本大学・生命科学研究部・講師  
研究者番号: 70423655

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者