

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590207

研究課題名(和文)薬剤性肝障害感受性因子としての性に関する研究

研究課題名(英文)Gender as a susceptibility factor for drug-induced liver injury

## 研究代表者

榭淵 泰宏(Masubuchi, Yasuhiro)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：10209455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいて薬剤性肝障害の性差を調べ、主に雄マウスで高感受性であることを明らかにし、その要因として、以下の薬剤共通ならびに固有の因子を見出した。雌マウスではGSH合成が早く肝障害抵抗性を示すことをアセトアミノフェン肝障害モデルで解明した。一方、雄マウスで脂質過酸化が大きく、雌マウスでIL-6の発現が大きく、肝障害抵抗性を示すことを四塩化炭素肝障害モデルで見出した。以上、薬剤性肝障害の性差発現要因を検討することにより肝障害感受性を支配する要因を特定することができた。

研究成果の概要(英文)：Gender differences in drug-induced liver injury (DILI) were investigated in mice. Male mice were mostly susceptible to DILI, and following common and distinctive features in different models were suggested as susceptibility factors. Rapid recovery of hepatic GSH and the resultant resistance to DILI in females were found in acetaminophen hepatotoxicity. On the other hand, severe lipid peroxidation in males and high expression of IL-6 in females were found in carbon tetrachloride hepatotoxicity along with resistance to DILI in females. These factors with gender differences also can be indicative of determinants for interindividual difference of DILI.

研究分野：医療薬学

キーワード：薬剤性肝障害 性差 アセトアミノフェン 四塩化炭素 グルタチオン サイトカイン エストロゲン  
脂質過酸化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 性差医療と肝疾患における性差：従来、医療における性差は、生殖機能に基づく女性特有の疾患あるいは男性特有の疾患を指すものであった。しかし近年では、心疾患や糖尿病といった一見、性差とは無縁の疾患においても、発症頻度だけでなく、臨床症状や治療に対する効果の差異が明らかにされている。肝臓においても例外ではなく、ウイルス性肝疾患、自己免疫性肝疾患、アルコール性肝疾患、非アルコール性肝炎(NASH)など、様々な疾患に性差が明らかされている。代謝能など肝臓ではその本来の生理機能に性差が認められていることから、肝疾患の発現あるいは薬物による治療効果に性差の影響が見られることは、むしろ当然とも言える。しかし、临床上認められる上記肝疾患の性差は、食生活などの生活習慣に由来する男女差を除くとその実態が不明なものも多く、性ホルモンとの因果関係を中心とした基礎研究のデータも乏しいのが現状であった。

(2) 薬剤性肝障害の発症機序：薬剤性肝障害は、薬の服用により肝臓の機能が障害される副作用の一つであり、自覚症状が見られないマーカー酵素の軽微な漏出から重篤な劇症肝炎まで、その重症度は多様である。薬剤性肝障害のうち、限られた患者群において発症する特異体質性肝障害という。これまで特異体質性肝障害の免疫学的機序としてハプテン仮説やそれを発展させた危険信号仮説が提唱されてきた。申請者は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 (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、危険信号の一つと結論した。さらに Th1 優位な C57BL/6 系マウスと Th2 優位な BALB/c 系マウスを用いた検討を中心に、サイトカインを介した肝障害の進行は特定のサイトカインが担っているというよりむしろ、Th1/Th2 バランスの破綻であり、その Th1 への偏向が肝障害の重症化に関与することを明らかにした。このような発症機序に基づいて、今回新たに危険信号、防御因子あるいは Th1/Th2 バランスを支配する要因として、性ならびに性ホルモンに焦点をあてることにした。

(3) 臨床における薬剤性肝障害の性差：これまで薬剤性肝障害の頻度は、男性に比べ女性の割合がやや高いとされていた。欧米の報告では女性における投薬頻度が高いことが、また、国内の調査では健康食品の摂取も女性における高頻度の要因と考えられている。このような服用頻度や生活習慣の差も性差の要因として大きいものの、薬剤性肝障害をまとめた解析において得られる性差は、原因薬剤に共通する肝障害発症過程において、女性に特徴的な、エストロゲン依存的な肝障害発現過程が存在することを示唆している。一方、特定の原因薬物においても性差の報告は少

なくない。重篤副作用疾患別マニュアル薬物性肝障害(平成20年厚生労働省)によれば、解熱消炎鎮痛薬ジクロフェナクナトリウム、痙性麻痺に用いられるダントロレンナトリウム、ロイコトリエン受容体拮抗薬ザフィルカストによる肝障害は女性に多く、バルプロ酸ナトリウムやペニシリン系製剤では男性に多いとされている。このように薬剤固有の肝障害の性差は、薬剤固有の発症過程の性差を示す知見である。確定的ではないものの、多くの薬物の代謝に寄与する CYP3A4 は女性が、CYP2E1 では男性が高いとの報告がある。これらは薬剤固有ではあるものの、ある程度共通した発症過程を有する薬剤性肝障害の性差を説明しうるものと考えられる。このように薬剤性肝障害の性差の機序を明らかにするには、薬剤に共通する女性特有のエストロゲン依存性の肝障害過程と、その前段階として起こる薬剤固有のイニシエーション過程の性差を分別して明らかにすることが重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は薬剤性肝障害の患者側の感受性要因としての Gender および性ホルモンの役割を明らかにすることにある。そのために本研究では主にマウスを用いて肝障害モデルを *in vivo* で作製し、必要に応じて *in vitro* における肝障害性を培養肝細胞で検討する。これまで肝障害モデルには雄マウスが汎用されており、また雌を用いた場合でも、感受性の比較に基づいた Gender の選択が予備的に行われているものは稀であった。今回、文献情報に加えて多数のモデルを作製することによって、薬剤固有のイニシエーション過程と薬剤に共通する性特異的な肝障害過程を分別できると考えられる。性ホルモンが関与する薬剤固有のイニシエーション過程の有力な候補の一つは上述の薬物動態因子であり、本研究は、これらを考慮し実践されつつある個別化医療を進展させる形で、副作用回避のための性差医療の基礎データになるものと考えられる。一方、薬剤に共通する性差発現因子の解明においては、これまで申請者が明らかにしてきた TLR4 リガンドとなる危険信号や Th1/Th2 バランスの知見をもとに免疫系の制御因子としての性ホルモンの役割を明らかにしていきたい。

以上、薬剤性肝障害の性差とその機序を明らかにすることは、理論を基盤とした副作用回避のための性差医療を実践するための指針となる。また今回、薬剤性肝障害という角度から性ホルモン役割を明らかにすることは、薬剤反応性の個体差における性差のウエイトや、生体防御機構における性ホルモンの役割を明らかにするための基礎研究として意義あるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

実験動物には主に 9~10 週齢の雌雄 CD-1

系マウスを用い、必要に応じて C57BL/6 および BALB/c マウスを用いた。アセトアミノフェン肝障害モデルは投与量 150~350 mg/kg を、四塩化炭素肝障害においては投与量 0.5~10 mmol/kg を用いた。投与後 24 時間後に採血ならびに肝臓を摘出し、必要に応じて前障害過程での評価も行った。薬剤性肝障害の程度は、血清 ALT 値と病理組織所見(HE 染色)により評価した。肝ホモジネート中のグルタチオン(GSH)濃度は、dithionitrobenzoic acid-glutathione disulfide reductase recycling assay により測定した。各種因子発現量は real-time RT-PCR 法により測定し、cytochrome P450 (CYP)についてはタンパク発現を Western blot 法で、指標活性については代謝物生成量を HPLC で測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 薬剤性肝障害の性差発現の基礎要因としての肝薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP)の性差：代謝的活性化による反応性代謝物の生成は、多くの原因薬剤における肝障害発症過程の初発段階であり、生体側からみた場合、重要な肝障害感受性因子である。マウスは一般には薬物代謝型の CYP には顕著な性差はないとされているが、多数の系統にまたがる網羅的な検討例は見あたらない。本研究では、肝障害研究に汎用される代表的な近交系の C57BL/6 および BALB/c マウスならびに非近交系 CD-1 マウスの雌雄を用いて、肝 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A11 の mRNA およびタンパク発現量を測定した。その結果、いずれも雌に比べて雄でやや大きい傾向を示したが、その差は僅かであった。一方、各 CYP の指標活性についても酵素量と同様に顕著な性差は認められなかったが、一部、CD-1 マウスにおいて CYP3A11 活性が雄に比べて雌マウスで高く、検討した全系統で CYP2D9 活性が雌に比べて雄マウスで高いという特徴的な性差が検出された。しかしこれらは、以下に示す薬剤共通の顕著な薬剤性肝障害の性差の主要因にはならないと考えられた。

(2) アセトアミノフェン誘発肝障害の性差：アセトアミノフェン(APAP)によるマウス肝障害モデルは汎用されているが、これまで肝障害感受性の性差に関して、一貫した結論は得られていなかった。本研究では、上述の各系統のマウスにおいて APAP 誘発肝障害が、雌に比べて雄で顕著に出現する性差を見出した。また、APAP 投与後に枯渇する肝グルタチオン(GSH)が、雄に比べて雌で早く回復することと、これに関連して GSH 合成の律速酵素であるグルタミン酸システインリガーゼ(GCL)が、APAP 投与によって雌で高発現を示すことを明らかにした。実際、この GCL を特異的阻害剤である L-ブチオニンシルホキシミン(BSO)で阻害した条件下で APAP 誘発肝障害を調べると、雄優位な性差は消失するどころか、逆に雌マウスで高感受

性を示した。雌マウスにおいては GCL のみならず、GSH を肝臓外に排出する multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4, ABCC4)の発現も雄マウスに比べて亢進していることから、これによる GSH の顕著な枯渇が BSO 阻害下での雌マウスで肝障害悪化を招いていると考えられた。以上の結果から GSH が APAP 誘発肝障害の性差発現の重要な支配要因となっていることが明らかになった。

(3) 非アセトアミノフェン誘発肝障害の性差：GSH 枯渇を伴わない四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)等を用いて APAP 同様の検討を行った。CCl<sub>4</sub> マウス肝障害モデルも汎用されているが、これまで肝障害感受性の性差に関して、一貫した結論は得られていなかった。雌雄 CD-1 マウスに四塩化炭素を腹腔内投与した結果、雌に比べて雄マウスで高い血清 ALT 値を示した。病理組織所見においても、中心静脈周囲の高度な肝細胞壊死は雄マウスにおいてのみ認められ、雄優位な肝障害が示された。CCl<sub>4</sub> 肝障害の重要な発症プロセスである脂質過酸化は、高用量においてのみ雄優位な性差が見られ、低高投与量で障害メカニズムが異なることが示唆された。一方、いずれの投与量においても肝 GSH 量に対する CCl<sub>4</sub> 投与の影響は認められなかった。性差が顕著であった低用量の CCl<sub>4</sub> 投与で毒性発現前の CCl<sub>4</sub> 投与後 3 時間のヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) とインターロイキン-6 (IL-6) の発現量を調べたところ、HO-1 では雄で高く IL-6 は雌で高い傾向を示した。HO-1 は一般に酸化ストレスに対して防御的には働くことから、雄マウスには肝障害前段階の軽微な変化に反応した増加が見られ、むしろ毒性の結果を示すものと考えられた。一方、逆の性差(雌>雄)が見られた IL-6 は雌マウスにおける肝障害の防御に寄与していると推定された。ハロタンおよびフロセミドを用いて雌雄マウスにおける肝障害モデルの作製を試みたところ、フロセミドにおいて、CCl<sub>4</sub> と同様に雄優位な、かつ肝 GSH 枯渇を伴わない肝障害モデルが得られ、雌マウスにおける防御機構の一般化が可能であると考えられた。

(4) 四塩化炭素誘発肝障害の酵素的要因：CCl<sub>4</sub> による肝障害発現には CYP2E1 による代謝的活性化が必要であるが、肝 CYP2E1 発現量には性差は見られない。そこで、酵素発現量以外の酵素的要因として、雌雄 CD-1 マウス肝ミクロゾームを用いて kinetics 解析を行った。CYP2E1 活性に対する CCl<sub>4</sub> の阻害効果により算出した IC<sub>50</sub> 値は雄の方が顕著に小さく、これと同活性の K<sub>m</sub> 値から推定した CYP2E1 に対する CCl<sub>4</sub> の K<sub>i</sub> 値も雄の方が小さかった。このことから、雄マウスで CYP2E1 の CCl<sub>4</sub> との親和性が高く、低濃度域での CCl<sub>4</sub> 代謝速度が大きいと推定された。一方、CCl<sub>4</sub> は CYP2E1 の時間的依存阻害を惹起し、その程度は雌に比べ雄マウスで大き

い傾向が見られた。これは CCl<sub>4</sub> 代謝で生成したラジカルによる CYP2E1 の分解あるいはミクロゾーム膜の脂質過酸化を示しているため、これらが雄優位な性差の要因となることが示された。実際、CCl<sub>4</sub> 代謝に伴う脂質過酸化も雄マウスで大きい傾向を示した。以上の結果は、酵素発現量では説明できない新たな性差の酵素的要因と、共有結合以外の肝障害要因としての脂質過酸化の重要性を示している。

(5) 外因性エストロゲンによる薬剤性肝障害の制御：肝臓の雌化と肝保護効果の関連を明らかにするため、エストロゲン様作用を示すとされている大豆イソフラボンの一つゲニステインを用いて、CCl<sub>4</sub> 誘発肝障害とサイトカインバランスに対する影響を調べ、性差として表れる内因性エストロゲンとの効果と比較した。これまで通り、CCl<sub>4</sub> 誘発肝障害発現には雄優位な性差が見られた一方、大豆イソフラボンを雄マウスに処理することによって肝障害が抑制され、見かけ上の雌化が得られた。CCl<sub>4</sub> 投与による肝障害発現に先立って TNF- $\alpha$  ならびに IL-6 の肝発現量の増加が見られたが、後者のみが雌優位であった。一方、大豆イソフラボンは CCl<sub>4</sub> 投与による TNF- $\alpha$  および IL-6 いずれの増加も抑制し、雌化とは異なることから、外因性エストロゲンによる CCl<sub>4</sub> 誘発肝障害抑制においては、サイトカインの修飾は主たる要因ではないものと考えられた。以上の結果より、エストロゲンが肝保護効果を示すことが確認され、雌マウスにおける肝障害抵抗性に寄与することが示された一方、内因性と外因性のエストロゲンの作用機序ならびに強度は相当程度異なるものと推定された。

#### 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)

榎淵泰宏, ストレス応答 MAP キナーゼと薬剤性肝障害. 千葉科学大学紀要(査読有), 7, 151-158 (2014)  
<http://id.nii.ac.jp/1222/00000145/>  
Masubuchi, Y., and Kawaguchi, Y., Time-dependent inhibition of CYP3A4 by sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor. Biopharm Drug Dispos. (査読有) 34, 423-430 (2013)

[学会発表](計12件)

Masubuchi, Y., Hayashi, Y., and Nomura, M.: Protection of male mice against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by soy isoflavones. 13th European ISSX Meeting 2015/6/24 Glasgow (UK)  
三神健司, 野村美里, 花岡彩奈, 椎木綾乃, 榎淵泰宏: マウスにおけるアセトア

ミノフェン誘発肝障害に対するオルチプラズの防御効果. 日本薬学会第135年会, 2015/3/28, デザインクリエイティブセンター神戸(神戸)

永井良平, 林 裕樹, 榎淵泰宏: マウスにおける四塩化炭素誘発肝障害の性差発現における酵素的要因. 日本薬学会第135年会, 2015/3/28, デザインクリエイティブセンター神戸(神戸)

野村美里, 林 優馬, 榎淵泰宏: ゲニステインによる四塩化炭素誘発肝障害の抑制: 内因性エストロゲンとの比較. 日本薬学会第135年会, 2015/3/26, デザインクリエイティブセンター神戸(神戸)

Masubuchi, Y., and Ihara, A.: Strain and sex differences in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. 19th North American ISSX / 29th JSSX Meeting, 2014/10/21 San Francisco (USA)

林 優馬, 松村 篤, 榎淵泰宏: 大豆イソフラボンによる薬剤性肝障害の防御とそのメカニズム. 日本薬学会第134年会, 2014/3/28, 熊本市総合体育館(熊本)

花岡彩奈, 椎木綾乃, 蒔田真大, 榎淵泰宏: スルフォラファンによるアセトアミノフェン誘発肝障害の抑制とグルタチオン動態との関連. 日本薬学会第134年会, 2014/3/28, 熊本市総合体育館(熊本)

榎淵泰宏, 柳橋正哉, 渡邊靖子: 薬剤性肝障害の性差モデルとしてのアセトアミノフェンとフロセミドの比較. 日本薬学会第134年会, 2014/3/28, 熊本市総合体育館(熊本)

Masubuchi, Y., Shiiki, A., Matsumura, A., and Makita, M.: Protective effects of sulforaphane on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. 49th Congress of the European Societies of Toxicology. 2013/9/2, Interlaken (Switzerland)

椎木綾乃, 蒔田真大, 松村 篤, 榎淵泰宏: マウス薬剤性肝障害モデルによるスルフォラファンの肝保護効果の検証. 日本薬学会第133年会, 2013/3/30, パシフィコ横浜(横浜)

榎淵泰宏, 井原彩佳, 岡村壮一郎: 内因性ならびに外因性エストロゲンによる四塩化炭素誘発肝障害の抑制. 日本薬学会第133年会, 2013/3/30, パシフィコ横浜(横浜)

Masubuchi, Y.: Acetaminophen hepatotoxicity: A model to study mechanisms of idiosyncratic drug-induced liver injury. 日本薬物動態学会第27回年会, 2012/11/21, タワーホール船堀(東京)

[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：  
出願年月日：  
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

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