

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460220

研究課題名(和文) 酸化ストレスを介した薬剤性肝障害における感受性因子の探索

研究課題名(英文) Explore the drug-induced hepatotoxic susceptibility by oxidative stress

研究代表者

菅野 秀一 (KANNO, Shuichi)

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00347907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アセトアミノフェン(AA)は解熱鎮痛薬として汎用されているが、酸化ストレスを介した肝障害の発現が問題とされている。本研究はマウスを用いてAAによる肝障害の感受性を予測できるか血中mRNAを用いて検討を行った。マウスにAAを処置したところ、肝障害の発症には個々のマウスで感受性の差異が認められたもの、AA血中濃度とは相関が認められなかった。AA投与前における血中mRNAの変動を検出したところ、Il1b, Il10, TNF, Ttr, Mt1, GPX3の変動と肝障害の発現に相関が見られた。以上の結果は、相関が認められたmRNAがAA肝障害の感受性因子であると示唆される。

研究成果の概要(英文)：Acetaminophen (AA) is a widely used analgesic and antipyretic drug. This study evaluated to identify mRNAs (carried in the blood of male ddY mice) capable of predicting susceptibility to AA-induced hepatotoxicity. Blood AA concentration did not differ significantly between mice with and without AA-induced hepatotoxicity. We compared blood mRNA expression levels between mice with (positive, serious or lethal injury) and without hepatotoxicity in the AA-treated group. The transcript levels of interleukin-encoding loci Il1, Il10, and tumor necrosis factor (Tnf) were increased in the lethal injury group. Transcripts of the loci encoding transthyretin (Ttr) and metallothionein 1 (Mt1) showed increases in the liver injury group, while those of the glutathione peroxidase 3 encoding locus (Gpx3) were decreased. These results indicate that these mRNA expression in mouse blood may provide useful surrogate markers of AA-induced hepatotoxicity.

研究分野：毒性薬理学

キーワード：酸化ストレス 薬剤性肝障害 感受性因子 アセトアミノフェン 抗酸化酵素 活性酸素 血中濃度
リアルタイムPCR

1. 研究開始当初の背景

生物は生きていられる限り酸素を利用して呼吸をしている。時にこの酸素は、生体内で活性酸素となり生体を外敵から防御している反面、生体を侵襲することもある。薬物による酸化ストレスの発現についても、多くの関与が示唆されている。特に、解熱鎮痛薬として汎用されているアセトアミノフェンによる肝障害の発現機構については、活性代謝物である *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミン (*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine; NAPQI) が酸化ストレスを引き起こし、肝障害を引き起こすことが知られている。アセトアミノフェンによる酸化ストレスを介した肝毒性の発現に対し、松果体ホルモンであるメラトニンの抗酸化作用によって肝毒性の発現は抑制されるもの、薬理効果である解熱鎮痛作用については有意な影響がないことを以前に報告した (Syu-ichi Kanno et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(3), 472-476 2006)。このように、細胞内外の物質が生体内で変動することにより、薬物による肝細胞への障害性を左右する事実は、副作用の発現を軽減することや薬剤性肝障害発現機構の解明に対して大変に意義が深いと考える。

2. 研究の目的

薬剤性の肝障害は医薬品の安全使用において極めて重要な副作用である。特に、解熱鎮痛薬として一般用医薬品に多く含まれる主成分のアセトアミノフェンは薬局で安易に購入できて使用しやすい反面、重篤な肝障害の発現が問題となる。この薬剤による肝障害は、代謝的活性物質の産生による酸化ストレスの関与が知られている。もしも、あらかじめこのような酸化ストレスを介して薬剤性肝障害を生じやすい患者または使用者の感受性危険因子を予測することが可能となれば、医薬品の適正使用に大きく貢献できることが予想されるであろう。本研究は、酸化ストレスを介して肝障害を生ずる薬剤性肝障害の感受性危険因子を探索し、薬剤性肝障害の発生を阻止すること、そして肝障害のあらゆる治療戦略を開発することに寄与する研究である。

3. 研究の方法

実験動物としてマウスを使用し、候補遺伝子の genotyping を行う。その後マウスへ酸化ストレスを介して肝障害を誘発する薬剤を投与して生化学的検査を行い、各マウスにおける肝障害の発現頻度や重症度をスコア化する。得られた肝障害のデータと genotyping の結果を照合し、肝障害を引き起こす感受性の規定因子となり得る遺伝子の発現を解析する。

実験には ddY 系の雄性マウスを使用した。生後 4 ~ 5 週齢時に採血をし、total RNA を抽出後、cDNA を合成した。鋳型として cDNA を用い、リアルタイム PCR にて酸化ストレス

の関連遺伝子群(mRNA, 24 種類)の発現を検出した。5 ~ 6 週齢時にアセトアミノフェン (Acetaminophen; AA) 500 mg/kg を経口投与し、18 時間後に採血をした。肝障害は血清中の AST, ALT 活性を指標とし、血清中の AA 濃度は HPLC にて測定した (Fig.1)。

【Treatment schedule】

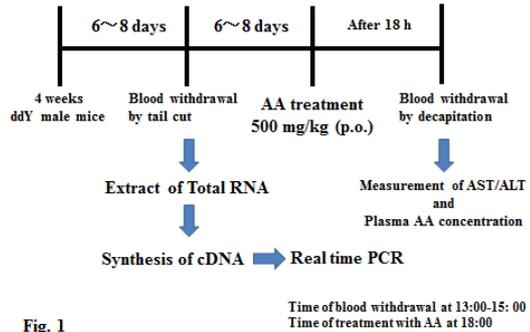


Fig. 1

4. 研究成果

AA 投与後におけるマウスの肝障害の発現度を分類した。肝障害の発現が認められないものを A 群、A 群以外の肝障害の発現が認められたものを B 群とし、B 群のうち、さらに重症肝障害を発症した群を C 群、死亡した群を D 群としてグループ化を行った (Fig. 2)。

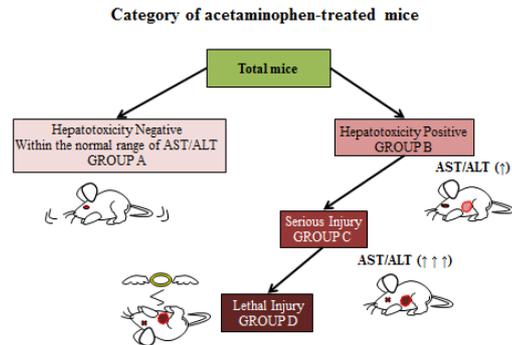


Fig. 2

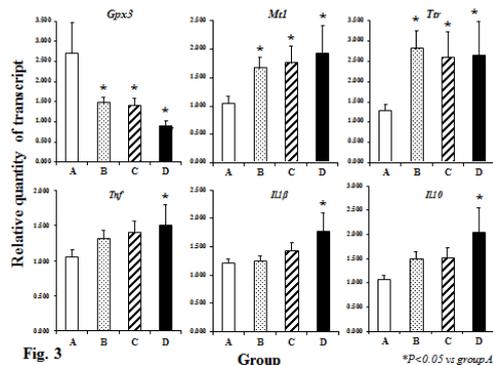
AA 投与後、約 6 割のマウスに肝障害を発症し、その内で死亡率は約 1 割であったが、肝障害の有無に関わらず AA 血中濃度の有意な差は認められなかった (Table 1)。

Table 1. Acetaminophen (AA) hepatotoxicity in ddY mice.

Category of group (number)	AST (Karmen Units)	ALT (Karmen Units)	Plasma concentration of acetaminophen (AA) (ng/mL)	Ratio
Total (150)	1358 ± 275	1499 ± 365	865 ± 39	100.0%
Group A (55) "Hepatotoxicity-Negative"	110 ± 4	43 ± 3	974 ± 54	36.8%
Group B (95) "Hepatotoxicity-Positive"	2250 ± 441	2539 ± 592	789 ± 55	62.2%
Group C (53) "Serious Injury"	4596 ± 803	5175 ± 1147	797 ± 101	35.3%
Group D (18) "Lethal Injury"	none	none	none	12.0%

候補遺伝子群(mRNA, 24 種類)のうち、投与前における血液中の mRNA 発現をリアルタイム

△ PCRにて解析すると、*Tnf*, *Il1* や *Il10* は死亡群において発現が高く、*Ttr* や *Mt1* の発現はAA肝障害発症群で上昇を示し、*Gpx3* は明らかに低下していた。他の因子には有意な差は認められなかった(Fig.3)。



一晩絶食をした後にAAを投与すると、肝障害の発現は著しく増大したが(絶食後は100%肝障害を発現, Table 2)、絶食によるAA血中濃度の差は見られず、絶食前後で血液中mRNAの変動もなかった(Fig. 4)。

Table 2. Acetaminophen (AA) hepatotoxicity in ddY mice (Fasted group).

Category of group (number)	AST (Karmen Units)	ALT (Karmen Units)	Plasma concentration of acetaminophen (AA) (ng/mL)	Ratio
Total (80)	7791 ± 725	4478 ± 549	926 ± 40	100.0%
Group A (0) "Hepatotoxicity/Negative"	none	none	none	0%
Group B (80) "Hepatotoxicity/Positive"	7791 ± 725	4478 ± 549	926 ± 40	100%
Group C (51) "Serious Injury"	8360 ± 723	4805 ± 567	932 ± 43	63.8%
Group D (24) "Lethal Injury"	none	none	none	30.0%

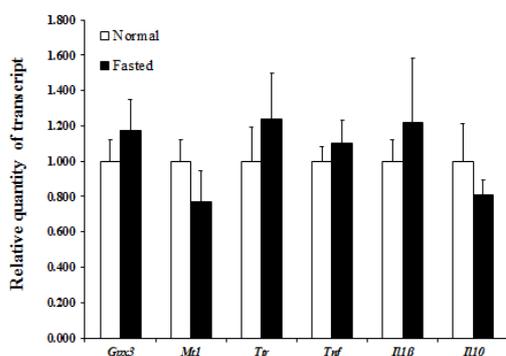


Fig. 4

以上のことから、マウス血液中のmRNA発現として*Gpx3*, *Mt1*, *Ttr*, *Tnf*, *Il1*, *Il10*は食餌の影響を受けることのないAA肝障害の感受性因子として示唆された。

本研究はAAによる肝障害の発現が、投与後における血中濃度と相関せず、あらかじめ投与前の採血により、感受性危険因子の発現量を検出することで、AA肝障害の発現と程度を予測することが可能であることを示唆している。

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 1 件)

Detecting mRNA Predictors of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mouse Blood Using Quantitative Real-Time PCR.

Kanno Syu-ichi, Tomizawa Ayako, Yomogida Shin.

Biol Pharm Bull. 査読有

2016 Mar 1; **39(3)**:440-5.

doi: 10.1248/bpb.b15-00734.

〔学会発表〕(計 3 件)

マウスにおけるアセトアミノフェン肝障害の発現に関与するリアルタイムPCRを用いた血中感受性因子の探索

菅野秀一、蓬田伸、富澤亜也子、石川正明
日本薬学会第135年会

2015年3月25日~28日 神戸

デザイン・クリエイティブセンター神戸

マウス血液を用いたアセトアミノフェン肝障害に関与する感受性因子の探索

菅野秀一、富澤亜也子、蓬田伸

第42回日本毒性学会年会学術年会

2015年6月29日~7月1日 金沢

石川県立音楽堂

Detecting mRNA Predictors of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mouse Blood Using Quantitative Real-Time PCR.

Syu-ichi Kanno, Ayako Tomizawa, Shin Yomogida.

51st congress of the European Societies of Toxicology

2015年9月13日~16日

Alfandega Congress Centre

ポルトガル、ポルト市

〔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
http://www.tohoku-mpu.ac.jp/pharmacy/about/lp_e06/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 秀一 (KANNO Syu-ichi)
東北薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：00347907

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：