

マウス肝障害モデルにおける *Apoptosis*  
*signal-regulating kinase 1 (ASK1)-MAPK* 経路の役割

中川 勇人

# 目次

## 2 項 目次

## 3 項 研究の背景および目的

## 7 項 方法

- 1). マウス
- 2). アセトアミノフェン肝障害モデル
- 3). Western blot 法および免疫沈降法
- 4). マウス初代培養肝細胞を用いた実験法
- 5). 肝組織中グルタチオン量および過酸化脂質量の測定方法
- 6). アセトアミノフェン肝障害の病理学的評価
- 7). Real-Time PCR 法および Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 法
- 8). マイクロアレイ解析
- 9). 統計解析

## 13 項 結果

- 1). ASK1 および JNK のアセトアミノフェン肝障害への関与
- 2). アセトアミノフェン肝障害における ASK1 依存性遺伝子発現の検討
- 3). ASK1 のアセトアミノフェンによる活性化と JNK シグナルへの影響
- 4). ASK1 の p38 経路への影響に関する検討
- 5). アセトアミノフェンによる直接的細胞障害に関する検討
- 6). 肝障害における炎症反応への ASK1 の関与
- 7). その他の肝障害モデルにおける ASK1-JNK 経路の関与

## 33 項 考察

## 39 項 結語

## 40 項 参考文献

## 50 項 謝辞

## 研究の背景および目的

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)経路は、細胞外からの多様な刺激によって活性化される細胞内シグナル伝達機構の重要な経路の一つであり、細胞増殖や細胞分化、細胞死など様々な生命現象に関与している(1)。近年、MAPK の一つである c-jun N-terminal kinase (JNK)が、アセトアミノフェン肝障害や非アルコール性脂肪性肝炎、虚血再還流障害、肝発癌、胆汁酸による肝細胞障害など、特に酸化ストレスを介した肝障害に重要な役割を果たすことが報告され注目されている(2-6)。酸化ストレスは多くの肝疾患に関与しており、例えば C 型肝炎におけるコア蛋白や鉄沈着、アルコール性肝障害に併発するエンドトキシン血症、非アルコール性脂肪性肝炎における脂肪酸代謝亢進、薬剤性肝障害における中間代謝産物などは酸化ストレスを増強し、疾患の進展に大きな役割を果たすと考えられている(7-11)。しかし、酸化ストレスによる MAPK 活性化機序や、肝障害を起こすメカニズムについては十分解明されていない。そこで本研究ではマウスにおいても人間と同様の機序で障害が再現できるアセトアミノフェン肝障害モデルを用いて、酸化ストレスを介した肝細胞死におけるシグナル伝達経路について検討した。

アセトアミノフェンは解熱鎮痛剤として広く用いられており、適正量で使用すれば非常に安全な薬剤である。しかしながら、過剰に服用すると致死的な急性肝障害を生じ、欧米では薬剤起因性の重症肝障害の原因として最も多い(12)。アセトアミノフェン

肝障害は用量依存性で、マウスやラットにおいても過量投与によって同様の肝障害を再現できるため、その障害機序はよく研究されている。過量に投与されたアセトアミノフェンはシトクローム P450 によって反応性の高い N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)に代謝される(13、14)。NAPQI はグルタチオン抱合によって不活化されるが、一旦細胞内のグルタチオンが枯渇するとさまざまな細胞内蛋白と結合し、酸化ストレスやミトコンドリア障害、DNA 損傷などを起こし肝細胞を死に至らせる(15、16)。さらに障害を受けた肝細胞によって炎症細胞が活性化し、さまざまなサイトカインが分泌されることによって二次的な炎症反応が起き、さらに肝障害が重症化すると考えられている(17-19)。しかしアセトアミノフェンが肝障害を起こすメカニズムには未だ不明な点が多く、実際の臨床における治療法としては 1980 年代に N-acetyl-cystein (NAC) の有効性が示されて以降進歩がない(20)。

最近アセトアミノフェン肝障害において JNK が中心的役割を果たすと報告され、JNK 阻害薬が治療薬として注目されている(2、21)。現在推定されているアセトアミノフェン肝障害の障害機序を図 1 に示す。従来の N-acetyl-cystein による治療はグルタチオンの補充による NAPQI の排除や酸化ストレスの軽減が主な作用機序であるため、アセトアミノフェン過量摂取から 8 時間以内、最低でも 24 時間以内に投与しないと効果が発揮されないことが問題であった。それに対して JNK 阻害薬はさらに後の段階で細胞死を抑えることができるため、マウスモデルにおいて N-acetyl-cystein に比

べ時間が経過してから投与しても効果があることが報告され、有望視されている(21)。  
しかし一方で JNK は肝臓の再生にも重要な分子であり、重症肝障害の状態では JNK 阻害薬を投与することは、肝再生不全を惹起する懸念がある(22)。そのためアセトアミノフェンによる特異的な JNK 活性化経路を同定し、そこを阻害するような治療法が望まれる。ただアセトアミノフェンによる JNK 活性化には酸化ストレスの関与が推察されているものの、その上流についてはよくわかっていない。

JNK はリン酸化カスケードによって活性化され、転写因子をはじめとするさまざまな標的分子をリン酸化することにより多彩な機能を発揮するが(23)、特にその持続的活性化は細胞死に重要な役割を果たしていると考えられている(24、25)。JNK カスケードの上流には、apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)、MAP/ERK kinase kinase (MEKKs)、TGF- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1)などいくつかの MAPK kinase kinase (MAPKKK)が同定されており、活性化した MAPKKKs は MAPK kinase (MKK) 4 や MKK7 を活性化し、MAPK へとシグナルを伝達する(23)。細胞外から加わるさまざまな刺激や細胞内の環境の変化に対して、それぞれ異なった MAPKKKs が応答して MAPK 経路を活性化すると考えられており、MAPKKKs はストレスの受容・認識・変換点として、いわば分子スイッチの役割を果たしていると考えられている。そして近年酸化ストレスを介した JNK、p38 の活性化に ASK1 が重要な役割を果たしていることが報告されている(26)。

ASK1 は広範に発現している MAPKKK で、活性酸素種(ROS)や Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、lipopolysaccharide (LPS)、小胞体ストレスなど、様々なストレス刺激に応答し、JNK および p38 経路を活性化させる(26-29)。当初酸化ストレスやサイトカイン刺激に対してアポトーシスを誘導する分子として同定されたが、近年それ以外にも自然免疫やサイトカイン誘導などにも関与することが報告されている(28)。

これらの背景から、本研究では ASK1 ノックアウトマウス(ASK1<sup>-/-</sup>マウス)を用いて、ASK1-MAPK 経路のアセトアミノフェン肝障害の病態への関与について検討した。

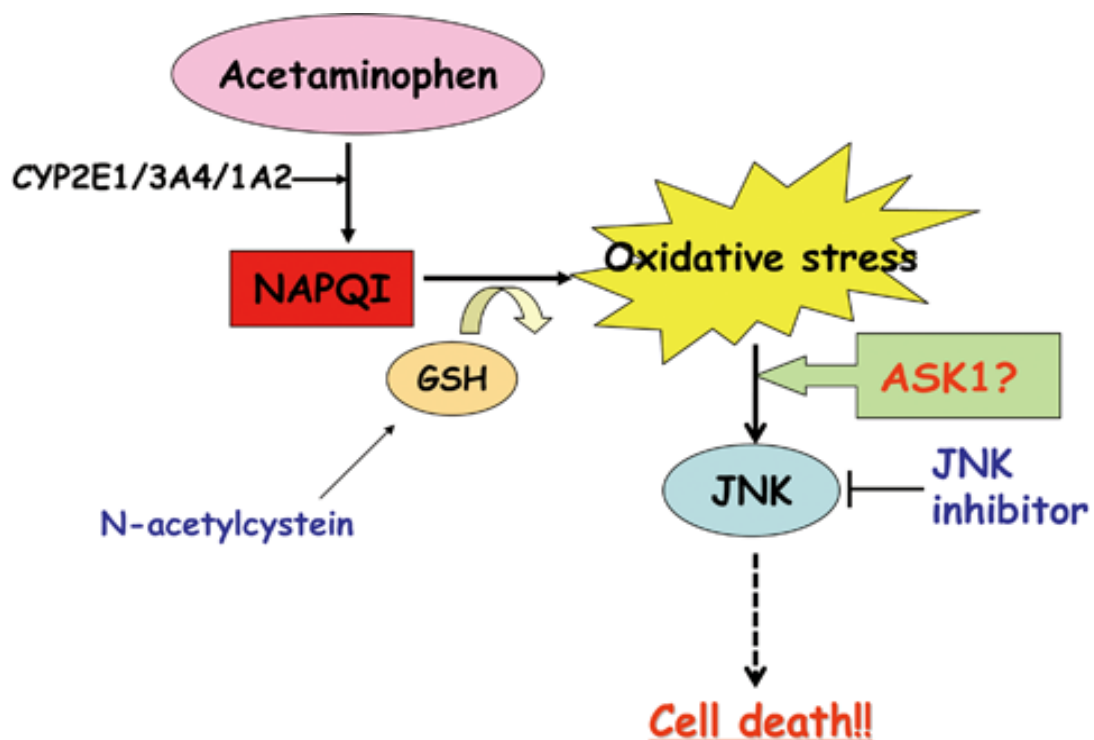


図 1. アセトアミノフェン肝障害の推定機序

## 方 法

### 1) マウス

ASK1<sup>-/-</sup>マウスは、東京大学薬学系研究科細胞情報学教室、一條秀憲教授より供与されたものを用いた(30)。JNK1 ノックアウトマウス(JNK1<sup>-/-</sup>マウス)、JNK2 ノックアウトマウス(JNK2<sup>-/-</sup>マウス)、p38 $\alpha$ ヘテロノックアウトマウス(p38 $\alpha$ <sup>+/-</sup>マウス)は、カリフォルニア大学サンディエゴ校 Michael Karin 教授より供与されたものを用いた(31、32)。これらのマウスは少なくとも C57BL/6 マウスと6代以上戻し交配が行われている。実験には8-10週齢の雄マウスを用い、Clea Japan 社より購入した同週齢の C57BL/6 マウスを野生型マウス(WT マウス)として使用した。いずれのマウスも標準的な飼育環境下(室温 23°C $\pm$ 2°C、湿度 55% $\pm$ 5%、12/12 時間の明暗周期)で市販の食餌(Clea Japan)と水を与えて飼育した。なお、実験動物を含むすべての手順は東京大学動物実験実施マニュアルおよび東京大学医学部動物実験指針に従って行った。

### 2) アセトアミノフェン肝障害モデル

Sigma 社より購入したアセトアミノフェンを 42°Cに温めた生理食塩水に溶解し、マウスの腹腔内に投与することによって肝障害モデルを作成した。アセトアミノフェン肝障害は摂食状態が障害の程度に影響を与えるため、アセトアミノフェン投与前 20 時間は絶食とし、飲水のみ可能な状態とした。JNK 阻害薬 SP600125(BIOMOL)は

40%ポリエチレングリコールに溶解した後、PBS で希釈してアセトアミノフェン投与 1 時間前に腹腔内投与した。上記溶媒のみではアセトアミノフェン肝障害に影響を与えないことを事前に確認した。P38 阻害薬 SB203580 (Wako) は DMSO に溶解後 PBS で希釈して JNK 阻害薬と同様の方法で投与したが、DMSO はアセトアミノフェン肝障害を軽減する効果があることが報告されているため(33)、対象群のマウスにも溶媒のみを投与した。また、両阻害薬はいずれも 15mg/kg で投与した。

### 3) Western blot 法および免疫沈降法

*In vivo* モデルでは、マウス肝臓全体を溶解液(50mM Tris HCl、1% Triton-X、5mM EDTA、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、50mM NaF、protease inhibitor cocktail [Complete Mini、Roche])に入れ、ホモジナイザーを用いて粉碎して遠心後、その上清を用いた。ホモジネートの蛋白濃度を測定して調整した後に 10%SDS-PAGE にて展開し、PVDF メンブレン(Amersham Bioscience)へ転写した。4°Cの条件下で一晩、一次抗体と反応させたあと、horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体(Amersham Bioscience)と反応させ、HRPシグナルをECL-plus(Amersham Bioscience)で検出した。培養細胞を用いた実験においても、上記の溶解液を用いて細胞を回収し、同様の手技にて実験を行った。抗 JNK1/2 抗体(希釈率 1:1000)、抗 JNK2 抗体(1:1000)、抗リン酸化 JNK 抗体(1:1000)、抗 MKK4 抗体(1:1000)、抗リン酸化 MKK4 抗体(1:1000)、抗 p38 抗体



(1:1000)、抗リン酸化 p38 抗体(1:1000)は、Cell Signaling 社より購入した。抗 ASK1 抗体(1:1000)、抗 JNK1 抗体(1:1000)は Santa Cruz 社より購入した。抗 Thioredoxin 抗体(1:3000)は Redox Bio Science 社より、抗マウス $\beta$ -actin 抗体(1:3000)は Sigma-Aldrich 社より購入した。抗リン酸化 ASK1 抗体(1:2000)は、東京大学薬学系研究科細胞情報学教室、一條秀憲教授より供与されたものを用いた(34)。

免疫沈降は、上記方法でマウス肝臓から抽出したタンパクを、抗 ASK1 抗体と protein A/G sepharose beads (Santa Cruz)を用いて反応させ、10%SDS-PAGE にて展開した。

#### 4) マウス初代培養肝細胞および脾細胞を用いた実験法

まずネンブタール麻酔下のマウスを開腹して門脈へカニューレを挿入し、コラゲナーゼで灌流した。柔らかくなった肝臓をシャーレに取り、先太駒込ピペットでピペッティング後、細胞ろ過器でろ過した。次いで得られた粗分散細胞浮遊液を遠心分離し、沈殿した肝細胞をプレートに撒いて 10% fetal bovine serum (FBS)-RPMI1640 培養液にて培養した。アセトアミノフェンは温めた生理食塩水に溶解したあと、肝細胞培養液中に添加して実験を行った。細胞障害は Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を用いた MTT assay にて評価した。SP600125 および SB203580 は DMSO に溶解し、最終 DMSO 濃度が 0.1%以下となるように調整して、アセトアミノフェン投与 1 時間前に 15  $\mu$

M の濃度で肝細胞培養液に加えた。また対象群には同濃度の DMSO を培養液中に添加した。

マウス脾細胞は、摘出した脾臓を押しつぶしたあと、70  $\mu$ m のナイロンメッシュに通して濾過し、プレートに撒いた。壊死肝細胞は、初代培養肝細胞を $-80^{\circ}\text{C}$ と室温による凍結融解を3回繰り返すことによって作成し、脾細胞に添加して刺激した。

#### 5) 肝組織中グルタチオン含有量および過酸化脂質量の測定方法

肝組織中グルタチオン含有量は、マウスにアセトアミノフェンを投与した後、各時点でサンプルを採取し、Total Glutathione Quantification Kit (Dojindo)を用いてプロトコールに従って測定した。また、肝組織中の過酸化脂質の定量は Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay にて行ったが、Oxitek TBARS Assay Kit (Zeptomatrix)を用いてプロトコールに従い測定した。

#### 6) アセトアミノフェン肝障害の病理学的評価

取り出した肝臓の切片を10%ホルマリンにて固定し、H&E染色からネクロシスをスコア化した (Histopathology Score; grade 0: 障害なし、grade 1: 数個の肝細胞障害のみ、grade 2: 中心静脈周囲に1-2列の肝細胞壊死がみられる、grade 3: 中心静脈周囲に2-3列の肝細胞壊死がみられる、grade 4: 中心静脈周囲に3-4列の肝細胞

壊死がみられる、grade 5:5 列以上の中心静脈周囲壊死と出血を伴う) (35)。

アポトーシスの評価には、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) Assay を施行した。TUNEL 染色は ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit (Clontech)を用いて、プロトコールに従って行った。TUNEL 陽性肝細胞数は、5 つの異なる視野で陽性細胞数を算出した後に平均を示した。

#### 7) Real-Time PCR 法および Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法

アセトアミノフェン肝障害での炎症性サイトカイン発現量を定量するために Real-time PCR 法を用いた。Total RNA は、ISOGEN 試薬 (Nippon Gene)にて抽出し、SuperScript 2 (Invitrogen Life technologies)を用いて逆転写反応を施行した。定量的 PCR 反応は LightCycler (Roche)を用い、定められたプロトコールに従って行った。内在性コントロールとして Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH) 発現量を定量した。また細胞上清中のサイトカイン分泌量測定には、マウス IL-6 ELISA Kit (R&D)を用いた。

#### 8) マイクロアレイ解析

マイクロアレイは上記方法でマウス肝臓から Total RNA を抽出後、60-mer のオリ

ゴヌクレオチドプローブを含む Agilent Mouse Whole Genome Array (Agilent Technologies)を用いて行った。信号強度の測定は製造元のプロトコールに従って行った(Takara Bio Inc)。また、データ解析には Agilent Gene Spring GX9 を用いた。

## 9) 統計解析

得られた値は各群の平均値±標準偏差として示した。結果は2群間の比較の検定にはt-検定を、3群間以上の比較にはDunnett検定を用いた。得られたP値は0.05未満を統計学的に有意であるとした。

## 結 果

### 1). ASK1 および JNK のアセトアミノフェン肝障害への関与

WT マウスの腹腔内へアセトアミノフェン 300mg/kg を投与したところ、6 時間後から血清 ALT が急上昇し、24 時間後にはピークを迎える急性肝障害を生じた。そこでアセトアミノフェン肝障害における ASK1 の関与を調べるため、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにアセトアミノフェンを投与し WT マウスと肝障害の程度を比較することとした。なお、事前に ASK1<sup>-/-</sup>マウスの肝臓において ASK1 蛋白が完全に消失していることを確認した(図 2)。アセトアミノフェン投与 6 時間後と 24 時間後の血清 ALT を測定したところ、ASK1<sup>-/-</sup>マウスでは WT マウスに比べ有意に血清 ALT の上昇が抑えられていることがわかった(図 3A)。肝障害の時間推移が両者で異なる可能性を除外するため、3 時間後と 48 時間後の血清 ALT も比較したが、それらの時点では差は認められなかった(図 3B)。またアセトアミノフェンの投与量を 200mg/kg、300mg/kg、400mg/kg と変えて 6 時間後の血清 ALT を比較したところ、200mg/kg、300mg/kg では ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に血清 ALT が低かったが、致死量である 400mg/kg では血清 ALT に有意差がなかった(図 3C)。しかしながら、60 時間後の生存率は WT マウス 44%に対して ASK1<sup>-/-</sup>マウス 78.5%と有意に高かった(図 3D)。また、アセトアミノフェン肝障害における JNK の中心的役割を確認するため、JNK1 ノックアウトマウス(JNK1<sup>-/-</sup>マウス)、JNK2 ノックアウトマウス(JNK2<sup>-/-</sup>マウス)および、1 時間前に JNK 阻害薬 SP600125 を投与したマウス

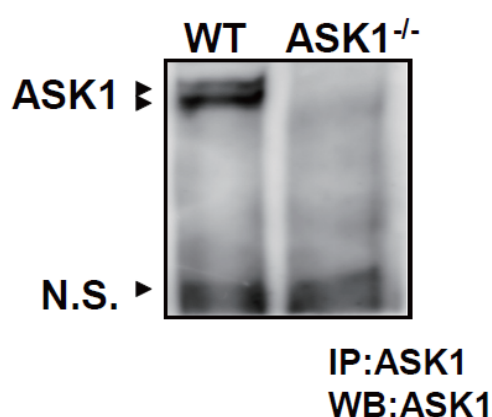
にもアセトアミノフェンを 300mg/kg 腹腔内投与し、血清 ALT を調べた。既報通り WT マウスに比較して、JNK2<sup>-/-</sup>マウスでは軽度、JNK 阻害薬投与マウスでは著明に血清 ALT 上昇が抑制されていた。JNK1<sup>-/-</sup>マウスでは 6 時間後の血清 ALT 上昇は抑制されていたものの、24 時間後では差が認められなかった(図 3A)。

次いでアセトアミノフェン投与後の肝臓切片を用いて、HE 染色にて病理学的に肝細胞壊死の程度を比較した。WT マウスでは 6 時間後に grade 3 以上の著明な中心静脈周囲壊死を認め、24 時間後には出血を伴う広範な壊死反応が認められたのに対し、ASK1<sup>-/-</sup>マウスではそれらの変化が有意に軽度であった。また JNK1<sup>-/-</sup>マウス、JNK2<sup>-/-</sup>マウスでは軽度、JNK 阻害薬投与マウスでは著明に障害が抑制されていた(図 4A、B)。

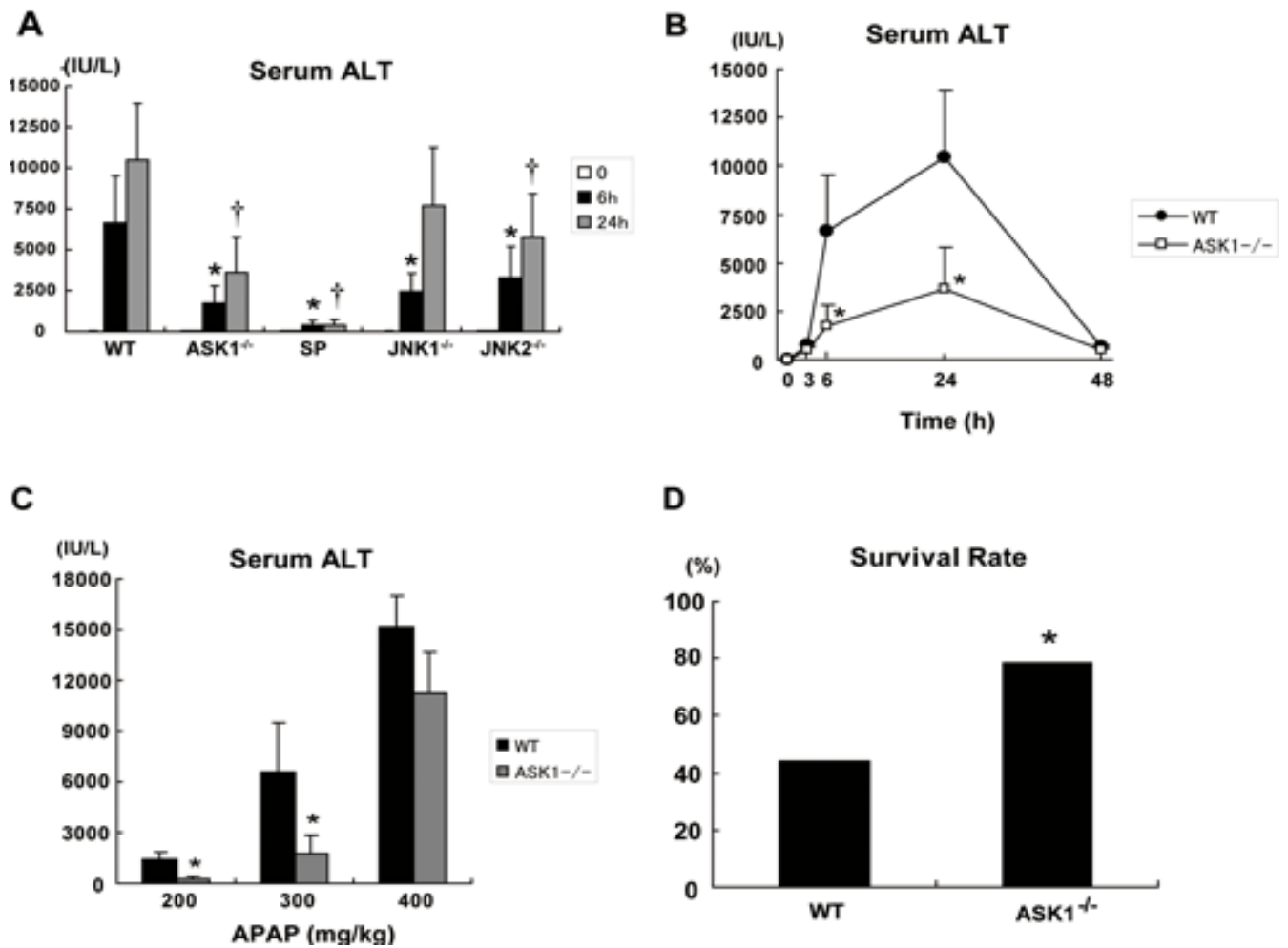
アセトアミノフェンによる肝細胞死は主にネクローシスと考えられているが(36)、アポトーシスも関与していることが報告されている(37、38)。そこでアポトーシスの程度を TUNEL assay にて検討したところ、WT マウスでは 6 時間後には中心静脈周囲に多数の TUNEL 陽性細胞を認めた。それに対して ASK1<sup>-/-</sup>マウスや JNK 阻害薬投与マウスでは少数の陽性細胞を認めるのみであり、アポトーシスが著明に抑制されていることが示された(図 4C、D)。

上記のような肝障害の違いが、アセトアミノフェンの代謝の違いに起因する可能性を除外するために、肝臓に含まれるグルタチオン(GSH)量の変化を調べた。肝

組織中 GSH 含有量の減少は、アセトアミノフェンの中間代謝物質産生量の指標としてよく使用されているものである(35)。アセトアミノフェン投与前、投与 1.5 時間後、6 時間後の肝組織中 GSH 含有量は、JNK 阻害薬投与マウスの 6 時間後データを除いては有意な差は認められなかった。JNK 阻害薬投与マウスにおいて 6 時間後の GSH 含有量がより回復していたことは、おそらく肝障害が著明に軽減されていることに起因するものと考えられた(図 5A)。さらに WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスの ROS 産生量を比較するために、脂質過酸化の程度を TBARS assay を用いて測定した。過酸化脂質量はアセトアミノフェン投与 3 時間後に一過性に上昇していたが、その程度は両者に差はなかった(図 5B)。これらの結果から、肝障害の違いはアセトアミノフェン代謝の違いに起因するものではなく、ASK1 と JNK が何らかの形で肝障害に関与していることを示唆していると考えられた。



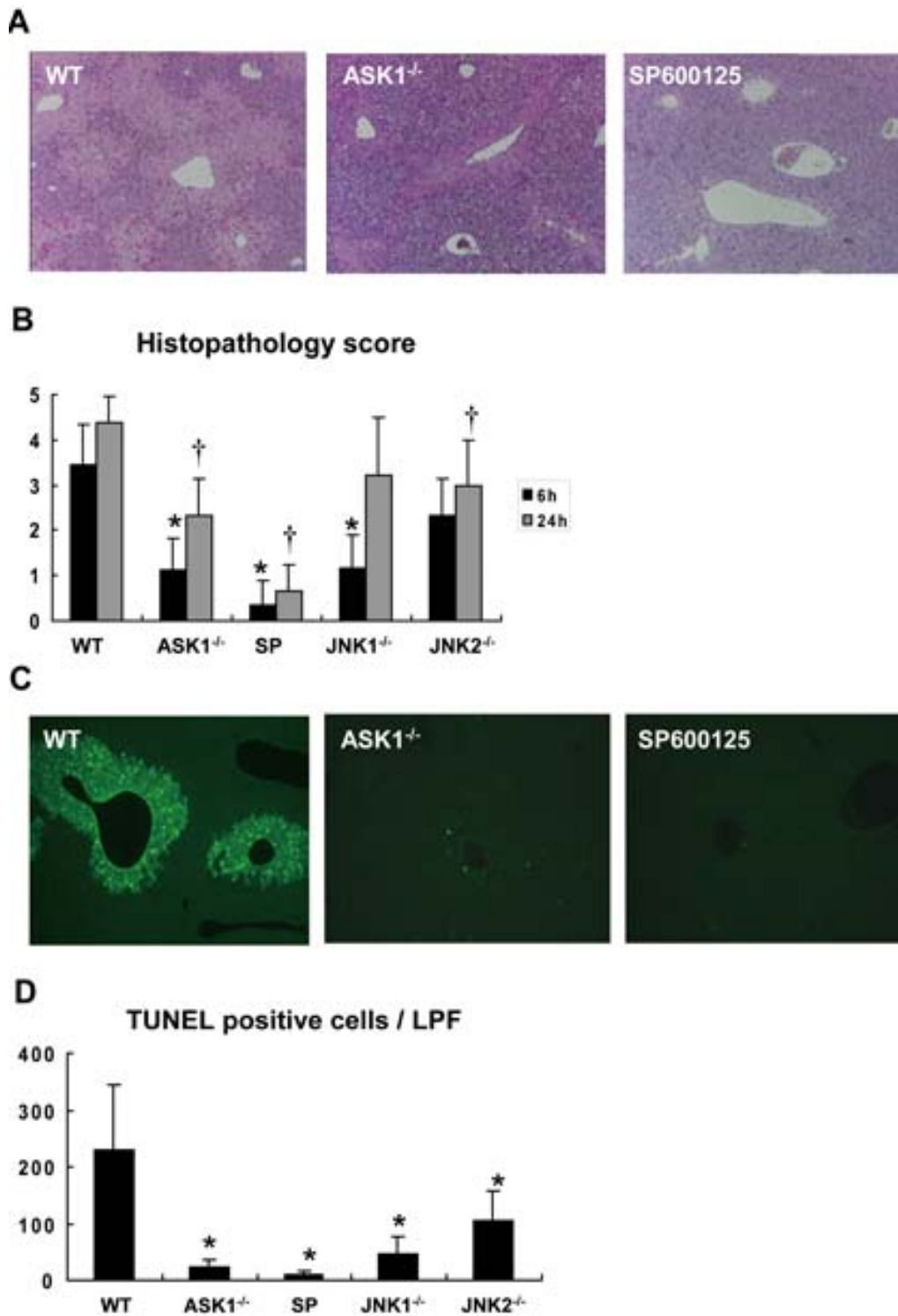
**図 2. ASK1<sup>-/-</sup>マウス肝組織における ASK1 蛋白の欠損**



**図 3. 各マウスにおけるアセトアミノフェン肝障害の比較**

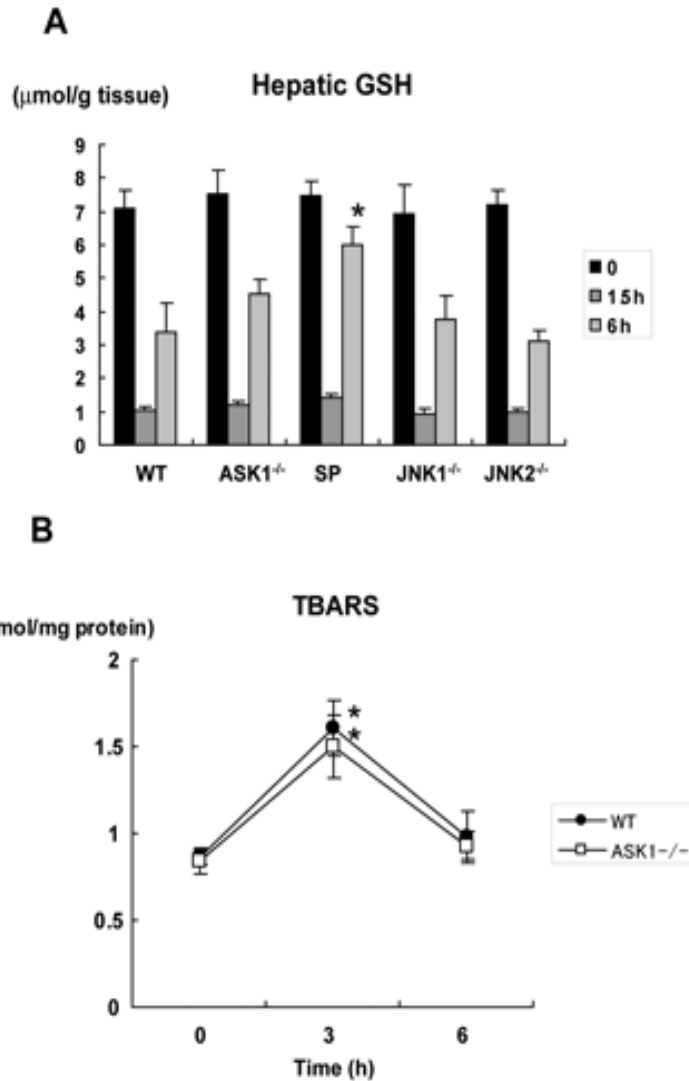
(A) WT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬前投与群の各マウスにおける、アセトアミノフェン 300mg/kg 投与 6 時間後、24 時間後の血清 ALT 値(WT、ASK1<sup>-/-</sup>マウス n=8; JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬投与マウス n=5)。\*P<0.05 vs WT マウス 6 時間後 ALT 値、†P<0.05 vs WT マウス 24 時間後 ALT 値。(B) WT、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおけるアセトアミノフェン 300mg/kg 投与後の血清 ALT 値の時間推移 (6、24 時間 n=8; 0、3、48 時間 n=3)。\*P<0.05 vs 各時間の WT マウス ALT 値。(C) WT、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおけるアセトアミノフェン 200mg/kg、300mg/kg、400mg/kg 投与 6 時間後の血清 ALT 値(300mg/kg n=8; 200mg/kg、400mg/kg n=3)。\*P<0.05 vs 各投与量の WT マウス ALT 値。(D) WT、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおけるアセトアミノフェン 400mg/kg 投与 60 時間後の生存率の比較(WT マウス n=18、ASK1<sup>-/-</sup>マウス n=14)。\*P<0.05 vs WT マウスの生存率。





#### 図4. 肝病理組織における検討

(A) WT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬前投与群の各マウスにおける、アセトアミノフェン 300mg/kg 投与 24 時間後の肝病理組織像(H&E 染色)。(B) WT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬前投与群の各マウスにおける Histopathology score の比較(WT、ASK1<sup>-/-</sup>マウス n=8; JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬投与マウス n=5)。\*P<0.05 vs WT マウス 6 時間後のスコア、†P<0.05 vs WT マウス 24 時間後のスコア。(C) WT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬前投与群の各マウスにおける、アセトアミノフェン 300mg/kg 投与 6 時間後の TUNEL 染色。(D) WT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬前投与群の各マウスにおける TUNEL 陽性細胞数の比較(各マウス n=3)。\*P<0.05 vs WT マウスの陽性細胞数。

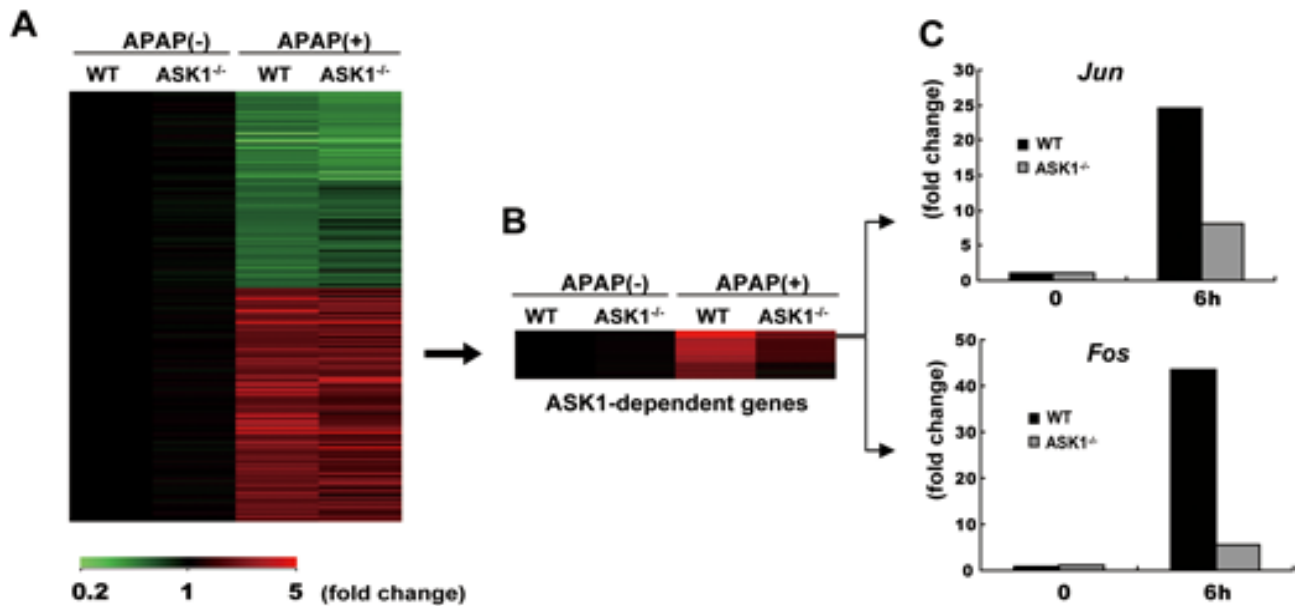


**図 5. 肝組織中 GSH 含有量と過酸化脂質量の推移**

(A) WT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬前投与群の各マウスにおける、アセトアミノフェン投与後の肝組織中 GSH 含有量の推移(投与前 各マウス n=3; 投与 1.5、6 時間後 n=5)。\*P<0.05 vs 各時間の WT マウス肝組織中 GSH 含有量。(B) WT、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおけるアセトアミノフェン投与後の肝組織中 TBARS 含有量の推移(各マウス n=3)。\*P<0.05 vs 各マウスの投与前肝組織中 TBARS 含有量。

## 2). アセトアミノフェン肝障害における ASK1 依存性遺伝子発現の検討

ASK1 依存性に起きる肝障害のメカニズムを解明するため、WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスのアセトアミノフェン投与前後の肝臓から RNA を抽出し、Agilent whole-mouse microarray を用いて、遺伝子発現レベルを比較検討した。まず 41,252 遺伝子のうち WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスのベースラインの発現レベルが同程度であり、さらに WT マウスにおいてアセトアミノフェン投与後に 3 倍以上発現が亢進する、もしくは低下する 959 遺伝子をアセトアミノフェン依存性遺伝子として定義した(図 6A)。さらにその中から、ASK1<sup>-/-</sup>マウスよりも WT マウスで 2.5 倍以上発現が亢進している 140 遺伝子を ASK1 依存性遺伝子として抽出した(図 6B)。ASK1 依存性遺伝子には、JNK 依存性遺伝子として知られ、かつその発現レベルがアセトアミノフェンによる肝障害の程度と相関していると報告されている *jun* と *fos* が含まれており(39)、ASK1 の下流には JNK シグナルが存在する可能性が示唆された(図 6C)。



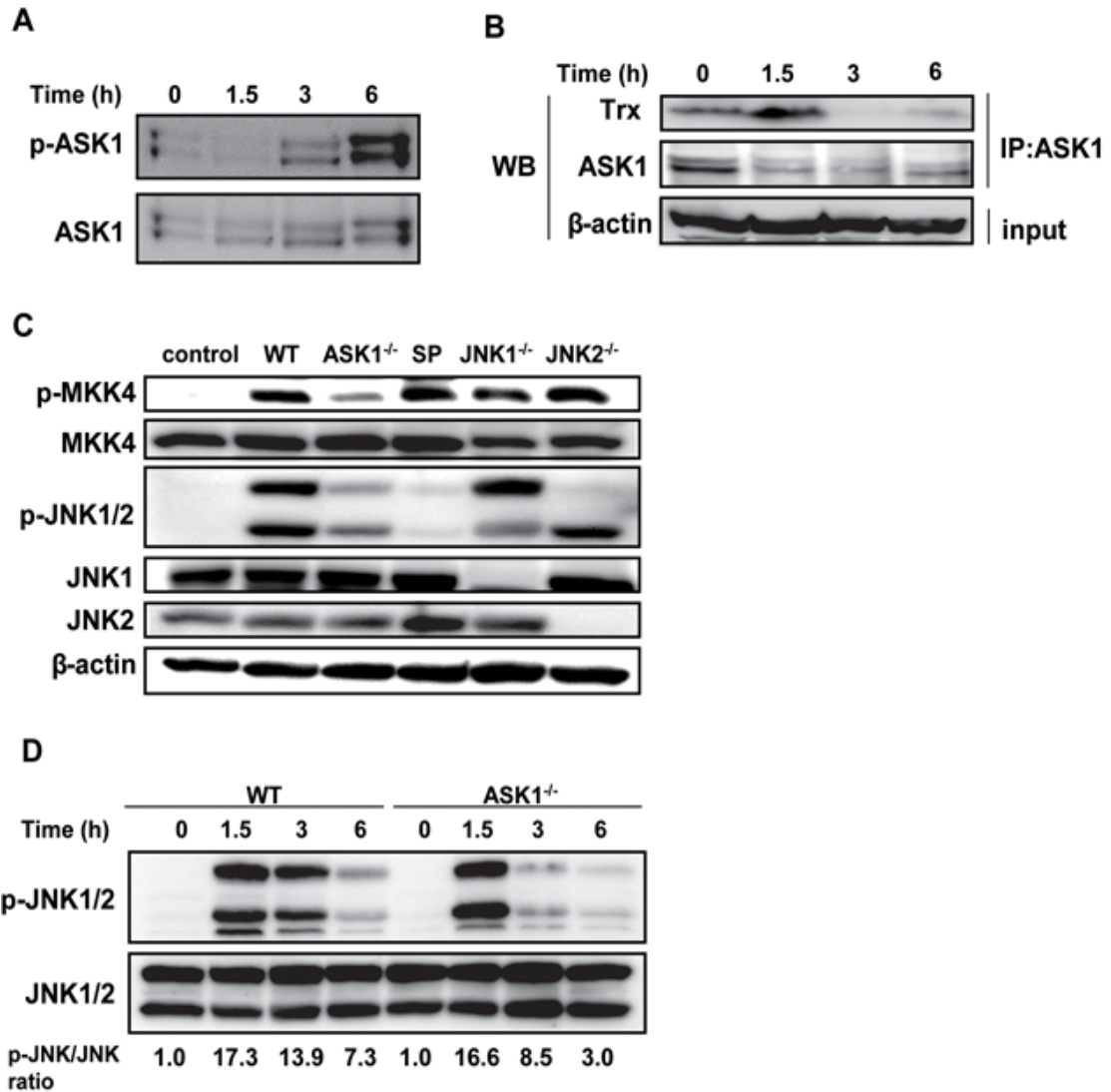
**図 6. アセトアミノフェン肝障害における ASK1 依存性遺伝子発現の検討**

WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup> マウスにおける、アセトアミノフェン投与前後の肝組織中遺伝子発現レベルの比較検討。(A) ベースラインの遺伝子発現量が WT と ASK1<sup>-/-</sup> マウスで同程度であり(発現量の違いが 1.3 倍以上)、アセトアミノフェン投与後に WT マウスにおいて発現が 3 倍以上亢進ないし低下する 959 遺伝子。(B) ASK1<sup>-/-</sup> マウスに比べ、WT マウスにおいて 2.5 倍以上発現が亢進している 140 遺伝子(ASK1 依存性遺伝子)。(C) 代表的な ASK1 依存性遺伝子。

### 3). ASK1 のアセトアミノフェンによる活性化と JNK シグナルへの関与

WT マウスにアセトアミノフェン 300mg/kg を投与し、肝組織中の ASK1 活性化を Western blot 法にて検討したところ、ASK1 はアセトアミノフェン投与 3 時間後から活性化し、6 時間後には強く活性化していた(図 7A)。近年、ASK1 の活性制御機構においては、抗酸化物質である Thioredoxin (Trx)が重要な役割を果たしていることが報告されている。定常状態では Trx が ASK1 に直接結合することによって ASK1 の活性化を抑えているが、細胞内に酸化ストレスが生じ Trx が酸化されると、Trx が ASK1 から解離して ASK1 が活性化すると考えられている。そこでアセトアミノフェン肝障害においても、同様のメカニズムを介して ASK1 の活性化が起きているか検討した。抗 ASK1 抗体で免疫沈降後、抗 Trx 抗体で Western blot することにより ASK1 と Trx の結合を調べたところ、アセトアミノフェン投与 3 時間後に Trx が解離しており、6 時間後には再びわずかに結合し始めていることがわかった(図 7B)。次に ASK1 蛋白欠損による JNK 経路への影響を検討するために、各マウスにおける MKK4 と JNK のリン酸化を Western blot で比較した。ASK1<sup>-/-</sup>マウスは WT マウスに比べ、JNK リン酸化が有意に減弱していた。加えて、JNK 阻害薬は JNK リン酸化をほぼ完全に抑制しており、JNK1<sup>-/-</sup>マウス、JNK2<sup>-/-</sup>マウスでは、それぞれのアイソフォームに対応するバンドが減弱ないし消失していることが確認された。それに対して MKK4 リン酸化は ASK1<sup>-/-</sup>マウスでのみ減弱しており、ASK1 は MKK4-JNK 経路を活性化していることが示唆された

(図 7C)。続いて JNK リン酸化の時間推移を WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスで比較したところ、アセトアミノフェン投与後 1.5 時間の時点では両者に差がなかったが、3 時間後と 6 時間後では ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意にリン酸化が減弱しており、ASK1 は JNK の持続的活性化に関与している可能性が示唆された(図 7D)。



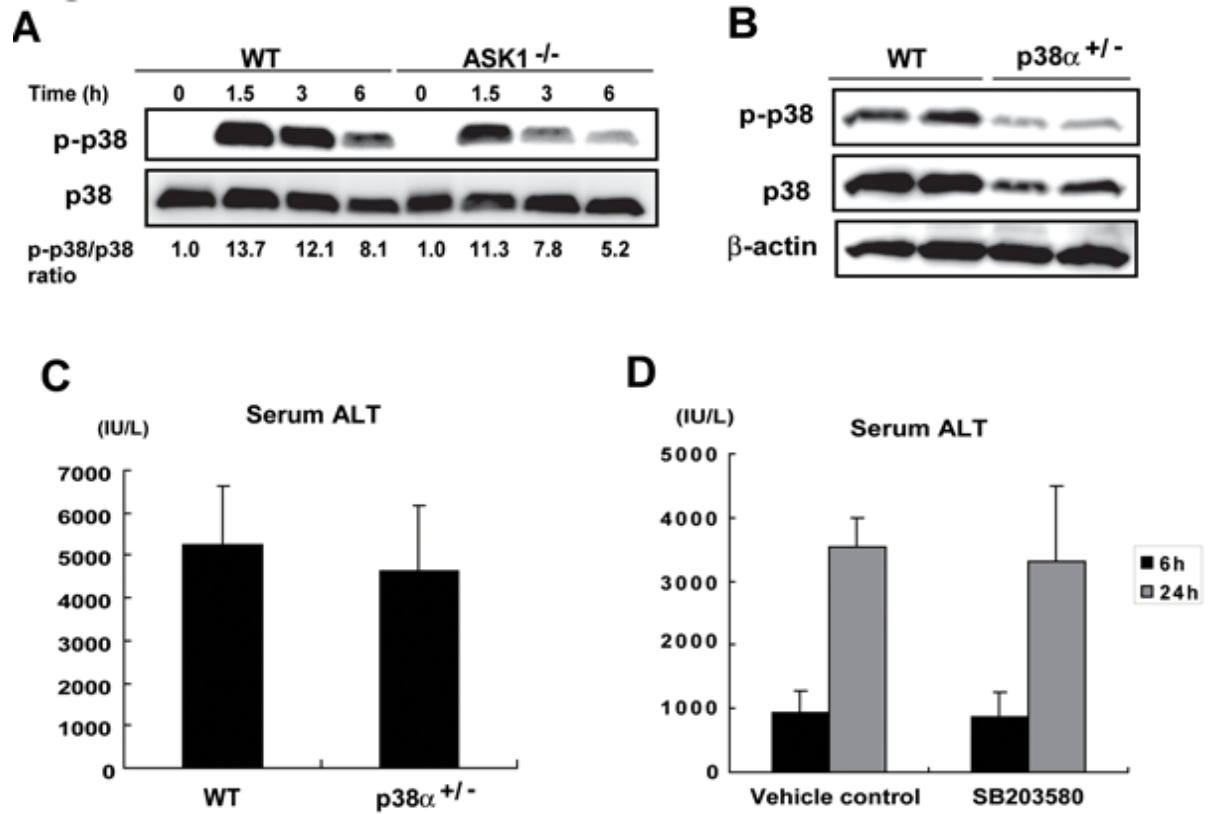
**図 7. アセトアミノフェンによる ASK1、MKK4、JNK 活性化の諸検討**

(A) WT マウスの肝臓において、アセトアミノフェン 300mg/kg 投与後の ASK1 活性化を Western blot にて検討。(B)アセトアミノフェンによる ASK1 と Trx の解離に関する検討。アセトアミノフェン投与前後の肝組織から抽出したタンパクを抗 ASK1 抗体にて免疫沈降後、抗 Trx 抗体を用いて Western blot した。(C) WT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>、JNK 阻害薬前投与群の各マウスにおける、アセトアミノフェン投与 6 時間後の MKK4 と JNK の活性化を Western blot にて検討。内在性コントロールとして  $\beta$ -actin を使用した。(D) WT、ASK1<sup>-/-</sup> マウスにおける、アセトアミノフェンによる JNK 活性化の時間推移を Western blot にて検討。下の数字はアセトアミノフェン投与前の JNK リン酸化レベルを 1.0 として、バンドの強さを定量化したもの。

#### 4). アセトアミノフェン肝障害における ASK1-p38 経路の関与

ASK1 は JNK 経路だけでなく p38 経路も活性化することが知られている。そこで ASK1 ノックアウトによる p38 経路への影響について検討したところ、ASK1<sup>-/-</sup>マウスでは、JNK と同様に p38 も持続的リン酸化が減弱していることがわかった(図 8A)。そのためアセトアミノフェン肝障害における p38 経路の関与について検討するため、p38 $\alpha$ <sup>+/-</sup>マウス(p38 ホモノックアウトマウスは胎生致死)を用いて同様の肝障害モデルを作成した。図のように p38 $\alpha$ <sup>+/-</sup>マウスでは、トータルの p38 発現量が減少しており、アセトアミノフェン投与 6 時間後の p38 リン酸化レベルも減弱していた(図 8B)。しかしながら、血清 ALT 値には差がみられなかった(図 8C)。さらにアセトアミノフェン投与 1 時間前に p38 阻害薬 SB203580 を投与して検討してみたが、6 時間後、24 時間後の血清 ALT レベルに溶媒投与群と差がなかった(図 8D)。これらの結果から、アセトアミノフェン肝障害における p38 経路の関与は否定的と考えられた。



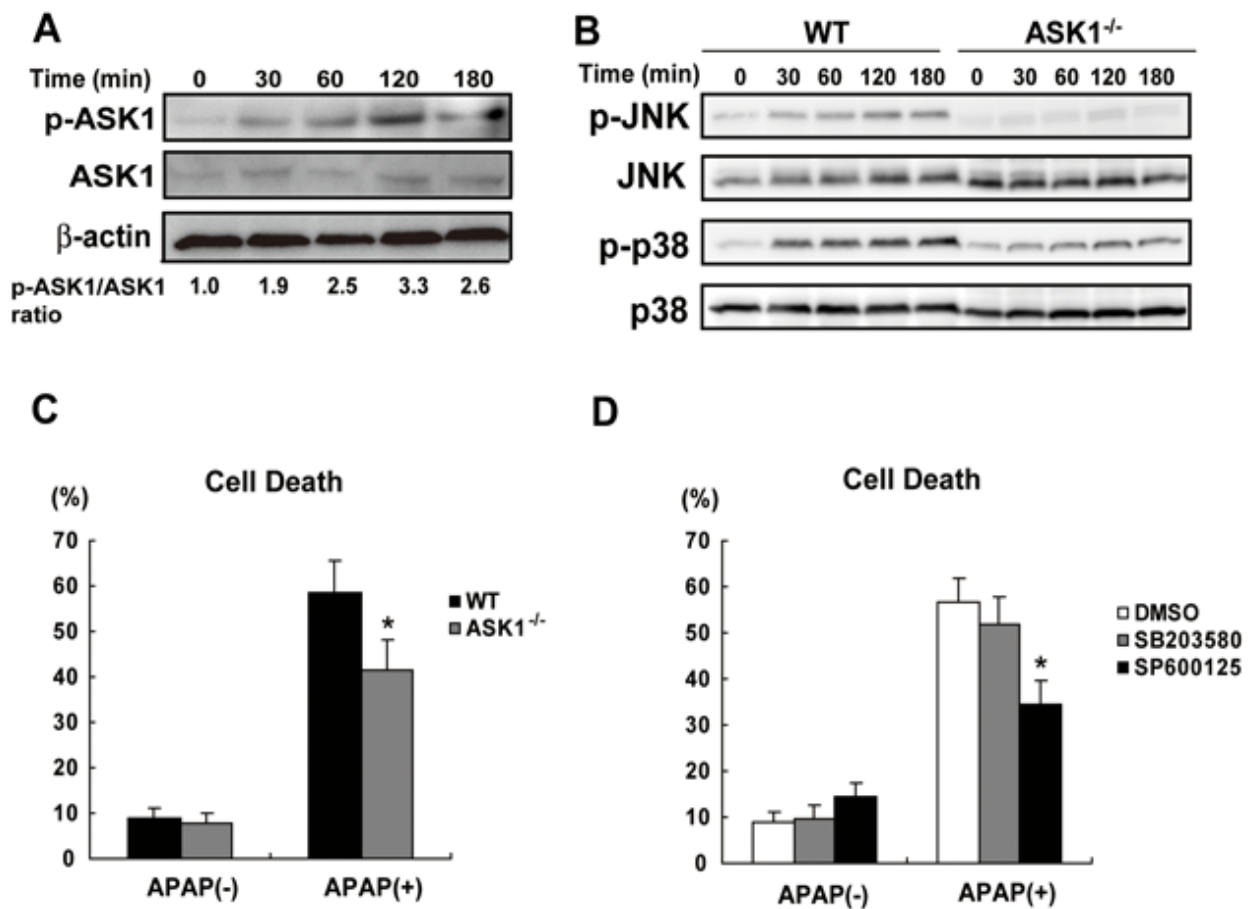


**図 8. アセトアミノフェン肝障害における ASK1-p38 経路の関与についての検討**

(A) アセトアミノフェン 300mg/kg 投与 6 時間後の WT と ASK1<sup>-/-</sup>マウス肝組織における p38 活性化を Western blot にて比較。(B) WT と p38 $\alpha$ <sup>+/-</sup>マウスにおけるアセトアミノフェンによる肝組織中 p38 活性化を Western blot にて比較。(C) WT と p38 $\alpha$ <sup>+/-</sup>マウスにおけるアセトアミノフェン投与 6 時間後の血清 ALT 値(各マウス n=4)。(D) アセトアミノフェン肝障害における p38 阻害薬の効果の検討。p38 阻害薬投与群と溶媒投与群におけるアセトアミノフェン投与 6 時間後の血清 ALT 値(各マウス n=4)。

## 5). アセトアミノフェンによる直接的細胞障害における ASK1-MAPK 経路の関与

次に、アセトアミノフェンによる直接的細胞障害における ASK1 の関与について検討するために、初代培養肝細胞を用いて実験を行った。まず WT マウス由来の初代培養肝細胞の上清中にアセトアミノフェン 5mM を添加し、ASK1 が活性化することを確認した(図 9A)。次いで、WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウス由来の初代培養肝細胞にアセトアミノフェンを添加して JNK と p38 の活性化を比較したところ、ASK1<sup>-/-</sup>肝細胞ではいずれの活性化も減弱していた(図 9B)。さらに WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウス由来の初代培養肝細胞に 10mM のアセトアミノフェンを添加し、24 時間後の細胞生存率を MTT assay にて比較したところ、ASK1<sup>-/-</sup>肝細胞は有意に細胞障害が少ないことがわかった(図 9C)。また、直接的細胞障害における JNK と p38 の役割について検討するため、アセトアミノフェン添加の 1 時間前に JNK 阻害薬と p38 阻害薬を添加し、細胞死への影響を調べたところ、*in vivo* の結果と同様に、JNK 阻害薬は有意に細胞死を抑制したのに対して、p38 阻害薬は効果が認められなかった(図 9D)。これらの結果から、アセトアミノフェンによる直接的細胞障害において、ASK1-JNK 経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。



### 図 9. アセトアミノフェンによる直接的肝細胞障害における検討

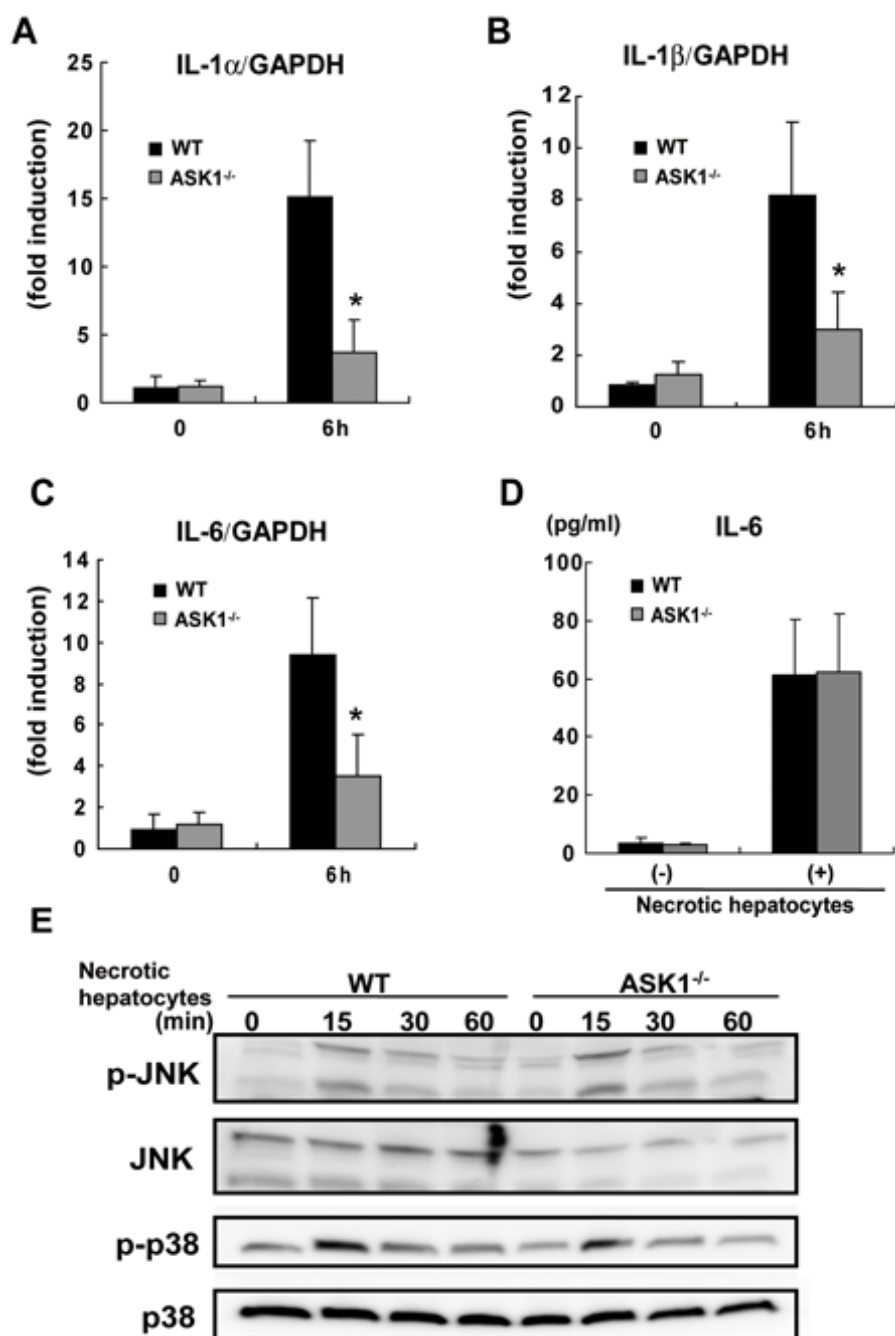
(A) WT マウス由来の初代培養肝細胞にアセトアミノフェン 5mM を添加し、ASK1 の活性化を Western blot にて検討。(B) WT と ASK1<sup>-/-</sup> マウス由来の初代培養肝細胞にアセトアミノフェン 5mM を添加し、JNK と p38 の活性化を Western blot にて比較検討。(C) WT と ASK1<sup>-/-</sup> マウス由来の初代培養肝細胞にアセトアミノフェン 10mM を添加し、24 時間後の細胞死を MTT assay にて検討。\*P<0.05 vs WT マウス由来肝細胞。(D) WT マウス由来の初代培養肝細胞に、15  $\mu$ M の JNK 阻害薬と p38 阻害薬およびコントロールとして溶媒のみを添加。その 1 時間後にアセトアミノフェン 10mM を添加し、24 時間後の細胞死を比較した。\*P<0.05 vs 溶媒投与群。

## 6) アセトアミノフェン肝障害における炎症反応への ASK1 の関与

アセトアミノフェン肝障害は、アセトアミノフェンによる直接的な肝細胞障害と引き続いて起こる炎症反応の 2 相から成り立っていると考えられている(17-19)。最近、死んだ肝細胞によって引き起こされる炎症反応には IL-1 と IL-6 が重要な役割を果たしていると報告されているが、炎症細胞は Toll-like receptor と MyD88 を介した経路を通じて死細胞を認識し、IL-1 や IL-6 を分泌すると考えられている(42、43)。また、ASK1-p38 経路は、炎症細胞において LPS による炎症性サイトカイン誘導に関与すると報告されているが、それも Toll-like receptor と MyD88 を介した経路である(28)。そこで、アセトアミノフェン肝障害の炎症反応における ASK1 の関与について検討するために、アセトアミノフェン投与 6 時間後の WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスの肝組織中炎症性サイトカインの発現量を Real-time PCR 法を用いて比較した。アセトアミノフェン投与により IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 いずれも発現量が増加していたが、ASK1<sup>-/-</sup>マウスではいずれのサイトカイン誘導も WT マウスに比べて少ないことがわかった(図 10A-C)。しかしこれらの所見は、ASK1 が炎症反応にも寄与していると捉えることができる反面、最初の肝細胞障害が少ないために二次的な炎症反応も軽度であるという可能性も考えられる。

そこで WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスから脾細胞を初代培養し、それらを壊死肝細胞で刺激して、分泌される IL-6 量を ELISA 法で比較した。壊死肝細胞は初代培養

肝細胞を凍結融解処理することによって作成した。壊死肝細胞投与 24 時間後には脾細胞培養上清中に IL-6 が分泌されていたが、その分泌量は WT 脾細胞と ASK1<sup>-/-</sup>脾細胞の間で差がなかった(図 10D)。また壊死肝細胞によって引き起こされる JNK と p38 の活性化を WT 脾細胞と ASK1<sup>-/-</sup>脾細胞の間で比較したところ、両者の活性化レベルは同程度であった(図 10E)。これらの結果から、*in vivo* でみられた炎症性サイトカインの差は、最初の肝細胞障害の違いに起因するものの可能性が高いと考えられた。



**図10. アセトアミノフェン肝障害における炎症反応へのASK1の関与**

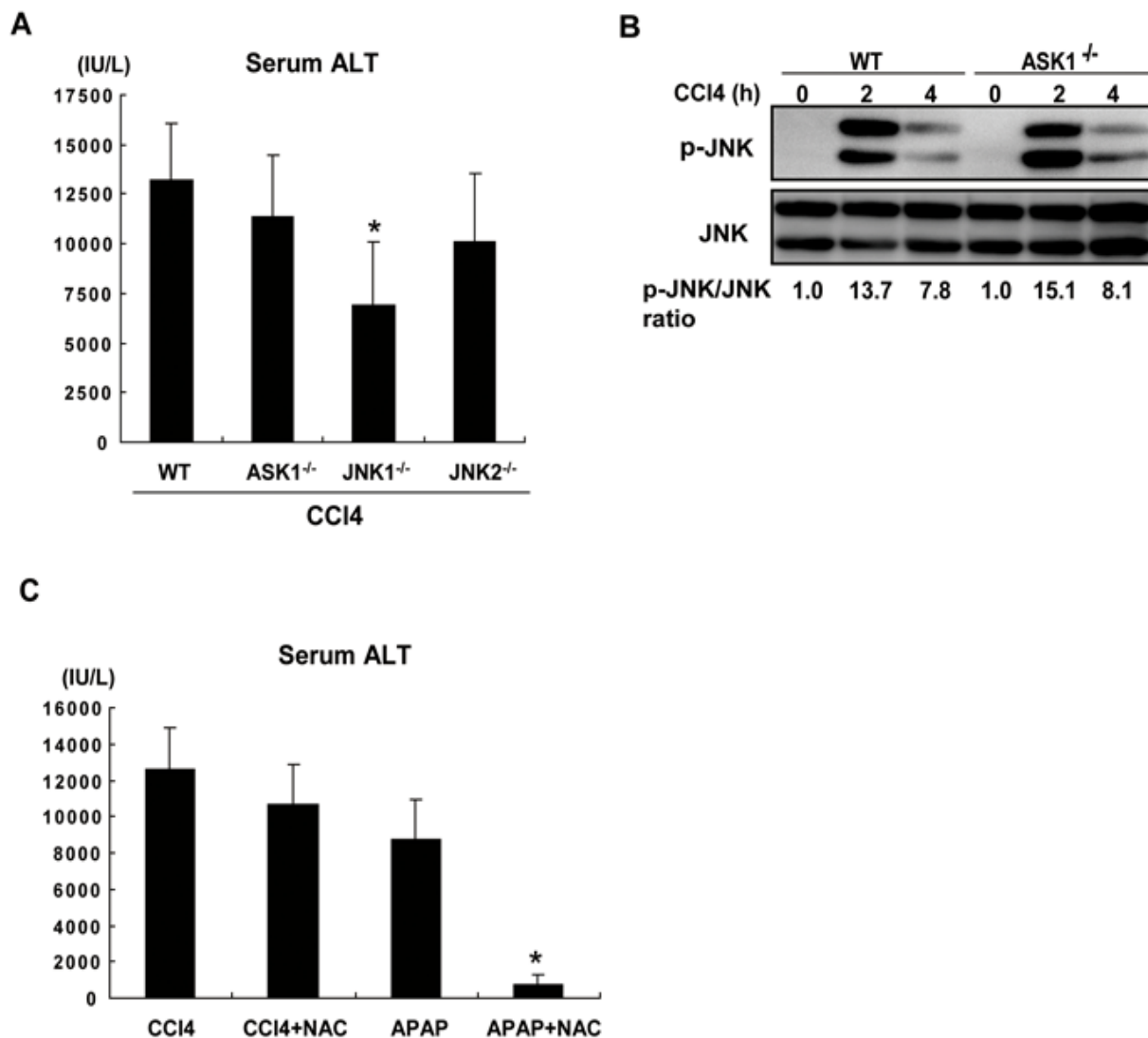
WTとASK1<sup>-/-</sup>マウスの肝組織における炎症性サイトカイン発現量の比較。アセトアミノフェン投与前と投与6時間後の肝組織中(A)IL-1 $\alpha$ 、(B)IL-1 $\beta$ 、(C)IL-6 mRNA発現量をReal-Time PCR法にて比較検討した(各マウスn=5)。\*P<0.05 vs WTマウス。(D)WTとASK1<sup>-/-</sup>マウス由来の脾細胞に、初代培養肝細胞を凍結融解して作成した壊死肝細胞を添加し、24時間後に上清中IL-6濃度をELISAで測定した。(E)WT、ASK1<sup>-/-</sup>マウス由来脾細胞における、壊死肝細胞によるJNKとp38活性化の比較。

## 7) その他の肝障害モデルにおける ASK1-JNK 経路の関与

四塩化炭素は、アセトアミノフェンと同様に肝細胞で CYP2E1 によって代謝され、酸化ストレス産生を介して肝障害を引き起こす(44)。そこで、四塩化炭素誘発性肝障害モデルにおいても ASK1-JNK 経路が関与しているか検討した。WT マウス、ASK1<sup>-/-</sup> マウス、JNK1<sup>-/-</sup> マウス、JNK2<sup>-/-</sup> マウスの腹腔内に四塩化炭素 2ml/kg を投与し、24 時間後の血清 ALT 値を比較した。WT マウスと比較して、JNK1<sup>-/-</sup> マウスはわずかではあるが有意な ALT 値の低下を示したが、ASK1<sup>-/-</sup> マウスでは有意な差は認められなかった(図 11A)。さらに WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup> マウスの肝組織において、四塩化炭素投与 2 時間後と 4 時間後の JNK 活性化を比較したが、両者は同程度であった(図 11B)。これらの結果から、JNK1 は四塩化炭素肝障害に関与している可能性があるが、ASK1 は JNK の主な活性化因子ではないことが示された。

アセトアミノフェン肝障害において、NAC は NAPQI をグルタチオン抱合し除去するだけでなく、抗酸化物質として働き、酸化ストレスを減少させることによっても肝障害を軽減すると考えられている(45、46)。そこで NAC のアセトアミノフェン肝障害と四塩化炭素肝障害に対する効果を比較したところ、アセトアミノフェン肝障害では著明に血清 ALT を低下させたが、四塩化炭素肝障害では効果が認められなかった(図 11C)。これらの結果は、アセトアミノフェン肝障害と四塩化炭素肝障害において異なった種類の ROS が関与している可能性を示唆しており、ASK1 が四塩化炭素肝障害では関

与しなかった理由の一つである可能性が考えられた。



**図11. 四塩化炭素誘発性肝障害モデルにおけるASK1-JNK経路の関与**

(A) 四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)をコーンオイル:四塩化炭素=4:1で混合し、2ml/kgの量でWT、ASK1<sup>-/-</sup>、JNK1<sup>-/-</sup>、JNK2<sup>-/-</sup>マウスに腹腔内投与して、各マウスの24時間後の血清ALT値を比較(各マウス n=4ないし5)。(B) WTとASK1<sup>-/-</sup>マウスの肝臓における四塩化炭素によるJNKの活性化を、Western blotにて比較検討。(C) 四塩化炭素肝障害とアセトアミノフェン肝障害におけるNACの効果に関する検討。WTマウスにNAC 600mg/kgもしくは溶媒であるPBSを腹腔内投与した30分後、アセトアミノフェン 300mg/kgおよび四塩化炭素 2mg/kgを腹腔内投与して、24時間後の血清ALT値を測定(各マウス n=3)。\*P<0.05 vs 溶媒投与群。



## 考 察

ASK1 は近年、神経変性疾患(47)や虚血性心疾患(48)などいくつかのヒト疾患モデルにおける関与が報告されてきたが、肝疾患における報告はほとんどなかった(49)。今回の検討から ASK1 はアセトアミノフェン肝障害において、JNK 活性化を通じて肝細胞死に重要な役割を果たしていることが示唆された。

細胞や刺激の種類によって異なるが、一過性 JNK 活性化は遺伝子発現や細胞増殖、細胞分化などを誘導するのに対し、持続的 JNK 活性化は細胞死を誘導すると報告されている(25、50)。ASK1 は、ASK1<sup>-/-</sup>マウス由来の胎児線維芽細胞を用いた検討において、TNF- $\alpha$ や過酸化水素による刺激に対して、JNK と p38 の持続的活性化を通じて細胞死を誘導したと報告されている(30)。同報告において、ASK1<sup>-/-</sup>マウス由来胎児線維芽細胞は、刺激に対して短期の JNK/p38 活性化レベルは同程度であるものの、その後の持続的な活性化が減弱していた。今回の検討でも、ASK1<sup>-/-</sup>マウスの肝臓において JNK の持続的活性化が低下していたことから、ASK1 は JNK 活性化を持続させることによって肝障害を誘導しているものと推察された。また、ASK1<sup>-/-</sup>マウスではアセトアミノフェンによる p38 の持続的活性化も減弱していたが、p38 $\alpha$ <sup>+/-</sup>マウスや p38 阻害薬を用いた検討、さらには初代培養肝細胞を用いた検討の結果から、アセトアミノフェン肝障害における p38 の関与は否定的であった。一方、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおいて JNK 活性化が完全には抑えられていないことから、今回の結果には示し

ていないが、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおける JNK 阻害薬の効果についても検討したところ、JNK 阻害薬は有意に障害を抑制した。そのためアセトアミノフェンによる JNK 活性化には ASK1 以外の MAPKKK もしくは他の JNK 活性化メカニズムも関与していると考えられ、更なる検討が必要である。

Whole-mouse microarray を用いた検討から、ASK1<sup>-/-</sup>マウスの肝臓では JNK 依存性遺伝子として知られ、かつその発現レベルがアセトアミノフェン肝障害の程度と相関すると報告されている *jun* と *fos* の誘導が著明に低下していることがわかった(39)。これらは互いに結合し転写因子 AP-1 複合体を形成するが、JNK/AP-1 経路は肝細胞死の誘導に深く関わっていると報告されており(51)、ASK1 の下流因子としてアセトアミノフェン肝障害に関わっている可能性がある。一方で、アセトアミノフェン代謝に関連する酵素群シトクローム P450 や、抗酸化防御系に關与するグルタチオン還元酵素やチオレドキシン還元酵素などの発現誘導レベルは、WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスで同程度であった。これらの結果は、WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおける肝障害の程度の違いが、アセトアミノフェン代謝や酸化還元状態の違いに起因するものではないことを示唆している。さらに、JNK を脱リン酸化することによって持続的活性化を阻害する働きをもつ MAPK phosphatase の一つで、その誘導レベルがアセトアミノフェン肝障害と相関すると報告されている MAPK phosphatase 5 (*Dusp10*)に関しても、WT マウスと ASK1<sup>-/-</sup>マウスの間に差は認められなかった(39)。よって、ASK1<sup>-/-</sup>マウスに

において JNK の持続的活性化が減弱していたことは、MAPK phosphatase の誘導の違いによるものでなく、ASK1 依存性の持続的 JNK 活性化が阻害されている結果であると考えられる。

アセトアミノフェン肝障害には酸化ストレスが関与しているが、酸化ストレスを介した細胞死に ASK1 の活性化は重要な役割を担っており、その活性制御機構において鍵となる分子の一つが抗酸化物質 Trx である。細胞内に酸化ストレスがない状態では、Trx が ASK1 の N 末端に結合することによってその活性化を抑制している。しかし過剰な酸化ストレスが発生すると Trx が酸化され ASK1 から解離し、結果として酸化ストレス依存性 ASK1 シグナルが活性化される(40、41)。つまり Trx は ASK1 シグナル経路のいわば”safty lock”の役割を担っていると考えられている。今回の検討でも、アセトアミノフェン投与により ASK1 と Trx の解離が認められたが、その時間経過は ASK1 活性化と一致しており、酸化ストレスが ASK1 と Trx の解離を介して ASK1-JNK 経路を活性化し、肝細胞死へと導いていることが示唆される所見である。TBARS assay でみた酸化ストレス産生状態もアセトアミノフェン投与 3 時間後がピークであり、ASK1 と Trx の解離のタイミングと一致していたこともこれを支持する。近年、強力な酸化力を持つ NO 由来の反応性窒素酸化物である peroxynitrite がアセトアミノフェン肝障害の重要な mediator であると報告されているが(52)、peroxynitrite は虚血後の心筋障害において Trx を ASK1 から解離させて細胞死を起こすと報告されており(53)、

同様のメカニズムがアセトアミノフェン肝障害にも関与しているのかもしれない。ただ、肝細胞死に続く炎症反応によって産生される TNF  $\alpha$  が ASK1 を二次的に活性化している可能性も完全には否定できない。今回の検討では Real-time PCR にて TNF  $\alpha$  mRNA の誘導がほとんど認められなかったことからそれ以上 TNF  $\alpha$  については検討していないが、今後 TNF  $\alpha$  ノックアウトマウスなどを用いた実験も検討すべきである。

肝細胞を含むほとんどの細胞で 2 つの JNK 遺伝子、JNK1 と JNK2 が発現している。JNK1 と JNK2 は、一次配列上の相同性が 80%以上あり、生化学的な性質にもほとんど差異が認められないことから、生体内では同じ機能を果たしており、互いに補い合うことができる分子であると考えられてきた。JNK1 と JNK2 を同時にノックアウトしたマウスは胎生致死であるのに対して、どちらか一方だけであれば致死とはならないこともそれを示唆する所見である(54)。しかしながら、細胞や刺激の種類によっては、互いに相反する作用を持っていることも報告されている(55)。今回の検討では、JNK1<sup>-/-</sup>マウスおよび JNK2<sup>-/-</sup>マウスで軽度肝障害が抑制され、JNK1、JNK2 両者を阻害する JNK 阻害薬 SP600125 によって著明に障害が抑制されたことから、アセトアミノフェン肝障害では JNK1 と JNK2 が互いに相補的な役割を担っていると考えられる。

アセトアミノフェン肝障害は直接的な肝細胞死と、引き続き起こる二次的炎症反応をからなる(17-19)。最近 ASK1 は炎症細胞において、p38 経路の活性化を通じて炎症性サイトカインの誘導に関与すると報告されている(28)。そのため ASK1<sup>-/-</sup>マウ

スにおいてアセトアミノフェン肝障害が軽度であったのは、二次的炎症反応が抑えられていることに起因する可能性があり、実際に肝組織における IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の誘導が ASK1<sup>-/-</sup>マウスでは有意に少なかった。しかしながら初代培養脾細胞を用いた *in vitro* の検討では、ASK1 は壊死肝細胞による JNK/p38 の活性化やサイトカイン分泌には関与していなかった。これらの結果は、ASK1<sup>-/-</sup>マウスにおける炎症性サイトカイン誘導の低下は直接的な肝細胞死が減少することに起因する可能性が高いことを示唆し、ASK1<sup>-/-</sup>初代培養肝細胞がアセトアミノフェンに耐性であったこともこれを支持する。ただ実際には脾細胞よりも Kupffer 細胞やマクロファージを用いたほうがより *in vivo* の状態に近いと考えられるが、Kupffer 細胞の分離培養は培養できる細胞数が少なく実験が困難であり、また腹腔内マクロファージの培養も試みたが、ASK1<sup>-/-</sup>マウスではマクロファージが安定して培養できなかつたために、最終的に安定して実験を行うことができる脾細胞を用いて検討するに至った。そのため今回の検討だけで炎症反応における ASK1 の関与を完全に否定できるわけではなく、骨髄移植モデルや臓器特異的ノックアウトマウスなどを用いたさらなる検討が必要である。

今回の検討から、ASK1 がアセトアミノフェン肝障害の治療標的となる可能性が示唆されたが、前述のように JNK 経路は肝再生にも重要な経路である。そのため ASK1 阻害薬を重症肝障害の状態で投与するには、肝再生への ASK1-JNK 経路の関与について更なる検討が必要である。

アセトアミノフェン肝障害においては、ASK1 が JNK を介した細胞死に重要な役割を果たしていることが示唆された一方で、同様に肝細胞で代謝され酸化ストレスを介して肝障害を起こす四塩化炭素肝障害では、ASK1 の関与は否定的であった。その理由の一つとして、抗酸化物質 NAC による改善効果が四塩化炭素肝障害では認められなかったことより、ROS の種類がそれぞれの障害において異なっている可能性が考えられた。既報によると、アセトアミノフェン肝障害では peroxynitrate や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、四塩化炭素では CCl<sub>3</sub>・の関与が報告されており、それらによる ASK1 活性化能に違いが存在するのかもしれない。肝障害における ASK1-JNK 経路の関与が、アセトアミノフェン肝障害においてのみ認められる特別な現象なのか、他の肝障害でも共通する経路なのか、今後の検討課題である。特に現在日本で問題になっている慢性 C 型肝炎や、今後メボリックシンドロームを背景に増加することが予想される非アルコール性脂肪性肝炎などは、酸化ストレスを介した肝障害であると考えられており、これらの疾患における ASK1-MAPK 経路の関与について今後研究をすすめていきたい。

## 結 語

本研究では ASK1 ノックアウトマウスを用いたアセトアミノフェン肝障害モデルによる検討から、ASK1 は Trx の解離を介して活性化し、JNK の持続的活性化を通じて肝障害に関与していることを明らかとした。また初代培養肝細胞を用いた検討から、ASK1 はアセトアミノフェンによる直接的な肝細胞死に寄与していることが示された。これらの結果から、ASK1 がアセトアミノフェン肝障害の治療標的となる可能性が示唆された。

## 参考文献

1. Chang L, and M. Karin. Mammalian MAP kinase signalling cascade. *Nature* 2001;410:37–40
2. Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N. c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2006;131:165–78.
3. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ. JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2006;43:163–72.
4. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK, Brenner DA. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol*. 2005;42:850–9.
5. Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M. Loss of hepatic NF- $\kappa$ B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10544–51.
6. Qiao L, Han SI, Fang Y, Park JS, Gupta S, Gilfor D, Amorino G, Valerie K, Sealy L, Engelhardt JF, Grant S, Hylemon PB, Dent P. Bile acid regulation of C/EBP $\beta$ , CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated



- kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 2003;23:3052-66.
7. Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2001;61:4365-70.
  8. Furutani T, Hino K, Okuda M, Gondo T, Nishina S, Kitase A, Korenaga M, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM, Sakaida I, Okita K. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology.* 2006;130:2087-98.
  9. Siegmund SV, Brenner DA. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:102S-109S.
  10. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346:1221-31.
  11. Gunawan BK, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis.* 2007;11:459-75.
  12. Lee WM. Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social/medical issue. *Hepatology* 2007;46:966-70.

13. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:1327-31.
14. Snawder JE, Roe AL, Benson RW, Roberts DW. Loss of CYP2E1 and CYP1A2 activity as a function of acetaminophen dose: relation to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:532-9.
15. Burcham PC, Harman AW. Acetaminophen toxicity results in site-specific mitochondrial damage in isolated mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 1991;266:5049-54.
16. Pumford NR, Halmes NC. Protein targets of xenobiotic reactive intermediates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:91-117.
17. Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;133:43-52.
18. Liu ZX, Govindarajan S, Kaplowitz N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004;127:1760-74.
19. Jaeschke H. Role of inflammation in the mechanism of

- acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005;1:389-97.
20. Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. Analysis of the national multicenter study (1976 to 1985). *N Engl J Med*. 1988;319:1557-62.
21. Henderson NC, Pollock KJ, Frew J, Mackinnon AC, Flavell RA, Davis RJ, Sethi T, Simpson KJ. Critical role of c-jun (NH2) terminal kinase in paracetamol-induced acute liver failure. *Gut* 2007;56:982-90.
22. Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, Brenner DA. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2003;37:824-32.
23. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000;103:239-52.
24. Chen YR, Meyer CF, Tan TH. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:631-4.
25. Guo YL, Baysal K, Kang B, Yang LJ, Williamson JR. Correlation between

- sustained c-Jun N-terminal protein kinase activation and apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha in rat mesangial cells. *J Biol Chem* 1998;273:4027-34.
26. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997;275:90-94.
27. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* 1998;2:389-95.
28. Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, Ichijo H. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 2005;6:587-92.
29. Sekine Y, Takeda K, Ichijo H. The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Curr Mol Med* 2006;6:87-97.
30. Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained

- activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2001;2:222–8.
31. Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF $\alpha$ -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 2006;124:601–13.
32. Tamura K, Sudo T, Senftleben U, Dadgar AM, Johnson R, Karin M. Requirement for p38 $\alpha$  in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 2000;102:221–31.
33. Yoon MY, Kim SJ, Lee BH, Chung JH, Kim YC. Effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of acetaminophen in mice. *Biol Pharm Bull*. 2006 ;29:1618–24.
34. Tobiume K, Saitoh M, Ichijo H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol* 2002;191:95–104.
35. Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MM, Boelsterli UA. Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2007;45:412–21.
36. Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death

- after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis?  
Toxicol Sci 2002;67:322–8.
37. Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Tran A, Trébédén H, Jaffray P, Malassagne B, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 2001;33:1173–80.
38. Vaquero J, Bélanger M, James L, Herrero R, Desjardins P, Côté J, Blei AT, Butterworth RF. Mild hypothermia attenuates liver injury and improves survival in mice with acetaminophen toxicity. *Gastroenterology* 2007;132:372–83.
39. Beyer RP, Fry RC, Lasarev MR, et al. Multicenter study of acetaminophen hepatotoxicity reveals the importance of biological endpoints in genomic analyses. *Toxicol Sci* 2007;99:326–37.
40. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998;17:2596–606.
41. Fujino G, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol* 2006;16:427–35.

42. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 2007;13:851–6.
43. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88–dependent IL–6 production. *Science* 2007;317:121–4.
44. Kim SG, Chung HC, Cho JY. Molecular mechanism for alkyl sulfide–modulated carbon tetrachloride–induced hepatotoxicity: the role of cytochrome P450 2E1, P450 2B and glutathione S–transferase expression. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1058–66.
45. Bajt ML, Knight TR, Lemasters JJ, Jaeschke H. Acetaminophen–induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N–acetyl cysteine. *Toxicol Sci* 2004;80:343–9.
46. Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen–induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:509–16.
47. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S,

- Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 2002;16:1345-55.
48. Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotsu S, Kashiwase K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Watanabe T, Asahi M, Taniike M, Matsumura Y, Tsujimoto I, Hongo K, Kusakari Y, Kurihara S, Nishida K, Ichijo H, Hori M, Otsu K. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15883-8.
49. Gilot D, Loyer P, Corlu A, Glaise D, Lagadic-Gossmann D, Atfi A, Morel F, Ichijo H, Guguen-Guillouzo C. Liver protection from apoptosis requires both blockage of initiator caspase activities and inhibition of ASK1/JNK pathway via glutathione S-transferase regulation. *J Biol Chem* 2002;277:49220-9.
50. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. *J. Biol. Chem.* 1996;250:31929-36.
51. Czaja MJ. The future of GI and liver research: editorial perspectives. III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G875-9.
52. Knight TR, Ho YS, Farhood A, Jaeschke H. Peroxynitrite is a critical mediator



- of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:468–75.
53. Tao L, Jiao X, Gao E, Lau WB, Yuan Y, Lopez B, Christopher T, RamachandraRao SP, Williams W, Southan G, Sharma K, Koch W, Ma XL. Nitrate inactivation of thioredoxin-1 and its role in postischemic myocardial apoptosis. *Circulation* 2006;114:1395–402.
54. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron*. 1999;22:667–76.
55. Sabapathy K, Hochedlinger K, Nam SY, Bauer A, Karin M, Wagner EF. Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell*. 2004;15:713–25.

## 謝 辞

本論文の作成にあたり懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました東京大学医学部消化器内科小俣政男教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりましては以下の先生方に特に多大なる御協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学薬学系研究科細胞情報学教室

一條秀憲教授、野口拓也先生

朝日生命成人病研究所

引場陽子氏

東京大学消化器内科

前田慎先生、小椋啓司先生、大前知也先生、芝田渉先生、柳内綾子先生、

坂本啓先生、坪内光子氏、小川早苗氏

University of California, San Diego

Dr. Michael Karin

その他、様々な点で御協力頂いた東京大学消化器内科の先生方に感謝いたします。