

## 論文の内容の要旨

論文題名 高脂肪食給餌マウスにおける thioacetamide 誘発肝細胞壊死減弱メカニズムの解析

氏名 白井 真人

肝臓は薬物の毒性標的となりやすく、薬剤誘発性肝毒性は医薬品の開発あるいは販売中止の主要要因のひとつである。薬剤誘発性肝毒性の機序として、薬物代謝による反応性代謝物生成、細胞内シグナル伝達の変化および酸化ストレスなどがある。医薬品投与の対象となる患者と健常人では、これらの薬物誘発性肝毒性の機序に関連する因子に差があると報告されていることから、肝毒性誘発ポテンシャルの予測精度を上げて医薬品開発の成功確率を向上させるためには、患者の肝臓の状態を反映した病態モデル動物を用いて評価を行うことが有用である。しかしながら、医薬品の非臨床安全性評価は通常健常動物で行っており、病態モデル動物を用いて検討した報告は少ない。そこで、本研究では非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) モデル動物である高脂肪食給餌 (HFD) マウスを用いて、肝毒性物質として汎用される thioacetamide (TA) 誘発性肝毒性の検討を行った。

はじめに、薬物誘発性肝毒性が HFD マウスで標準食給餌 (ND) マウスと比較して変化するかどうかを確認することを目的として、3 週齢の雄 C57BL/6J マウスに 60 kcal% の脂肪を含有する高脂肪食あるいはげっ歯類用標準飼料をそれぞれ 8 週間給餌して作製した 11 週齢の HFD マウスおよび ND マウスに、TA を 50 mg/kg 単回腹腔内投与して肝臓の病理組織学的検査を行った。また、肝臓中の総 glutathione (GSH) 量および GSH の酸化型である glutathione disulfide (GSSG) 量の測定も行った。加えて TA とその代謝物の血漿中濃度についても測定した。さらに、HFD マウスと ND マウスにおける肝薬物代謝酵素発現の差を検討するため、TA 非投与動物について肝臓の cytochrome P450 E1 (CYP2E1) と glutathione S-transferase (GST) の発現検索も実施した。その結果、HFD マウスの肝臓は脂肪肝であることが確認され、また HFD マウス、ND マウスと

もに TA 投与 24 および 48 時間後に肝細胞壊死が起こるが、HFD マウスでは ND マウスと比較して軽度であることが示された。このように HFD マウスでは ND マウスと比較して TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが分かったが、TA およびその代謝物 thioacetamide sulfoxide (TASO) の血漿中濃度については HFD マウスと ND マウスの間で明らかな差はなかった。また、TA が肝毒性を発揮するために必要な代謝酵素である CYP2E1 の発現量は HFD マウスの肝臓の方が ND マウスよりも有意に高かった。したがって、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死の減弱は、血中の TA および TASO 量や肝臓の薬物代謝酵素の発現量の差によるものではないことが示唆された。一方、グルタチオン抱合に関与する酵素である GST の肝臓中の量および活性は HFD マウスで ND マウスより低いにもかかわらず、総 GSH 量は投与 8 時間後に HFD マウスで ND マウスよりも有意に低値であった。このことから、HFD マウスでは、TA 投与後に抗酸化作用など抱合以外の機序により GSH 消費がおけると示唆された。以上の結果から、NAFLD モデル動物である HFD マウスでは TA 誘発肝細胞壊死が減弱すること、およびその機序に肝臓 GSH の減少が寄与している可能性が示唆された。

次に、HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死減弱における GSH の役割を解明する目的で、HFD マウスと ND マウスに TA を 100 mg/kg 単回腹腔内投与し、肝臓の病理組織学的検索、TA および TASO の血中濃度測定、酸化ストレス測定、GSH 代謝物の metabolomics 解析を実施した。また、ND マウスに抗酸化剤である butylated hydroxyanisole (BHA) を投与した上で TA を投与し、肝細胞壊死について BHA 未処置 ND マウスと比較した。さらに、HFD マウスに GSH 合成阻害薬である L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO) を処置した上で TA を投与し、肝細胞壊死、肝臓の酸化ストレスおよび GSH について BSO 未処置 HFD マウスと比較した。その結果、100 mg/kg の TA を投与した場合においても、両マウスで投与 24 時間後から肝細胞壊死は重篤化するが、HFD マウスでは ND マウスと比較して TA 誘発肝細胞壊死が有意に減弱することが分かった。また、HFD マウスと ND マウスとで TA および TASO の血中濃度に明らかな差はなかった。一方、TA 投与 ND マウスでは投与 24 および 48 時間後に TA 非投与 ND マウスと比較して肝臓の酸化ストレス

マーカーが有意に増加したのに対し、HFD マウスでは TA 投与 48 時間後まで酸化ストレスマーカーの増加はみられなかった。また、肝臓酸化ストレスが増加する ND マウスに TA と抗酸化剤 BHA を併用投与することにより、TA 誘発肝細胞壊死は有意に減弱した。metabolomics 解析の結果、TA 投与 HFD マウスの肝臓では TA 非投与マウスと比較して投与 8 および 24 時間後に GSH 量の減少と、ophtalmate の増加や cysteine の減少などの GSH 生合成の亢進を示す代謝物量の変動が認められた。これに対し、TA 投与 ND マウスの肝臓では GSH 関連代謝物量の変動は認められたものの、ophtalmate 量が TA 投与 24 時間後では減少するなど、それらの変動は GSH 生合成の亢進を示すものではなかった。この結果は、HFD マウスの肝臓では ND マウスと比較して TA 投与後の GSH 生合成と消費が亢進することを示している。さらに、HFD マウスに TA と BSO を併用投与して肝臓 GSH を減少させると、TA 誘発肝細胞壊死および肝臓酸化ストレスが増加した。以上のことから、HFD マウスの肝臓では TA 投与後に GSH の消費と生合成が亢進することで TA 誘発酸化ストレスが打ち消され、その結果として TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが示唆された。

次いで、薬物誘発性肝毒性への関与が報告されている肝臓の p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) に着目して実験を行った。HFD マウスおよび ND マウスに TA 100 mg/kg を単回腹腔内投与し、肝臓の p38 MAPK の発現について Western blot 法で解析した。p38 MAPK はキナーゼであり、自身がリン酸化されること活性化することが知られているため、リン酸化 p38 MAPK およびリン酸化 p38 MAPK と非リン酸化 p38 MAPK の総量である総 p38 MAPK について解析した。また、p38 MAPK は炎症を制御することが知られているため、TA 投与後の肝臓中の炎症誘発に関連する脂質代謝物について metabolomics 解析を行った。さらに、p38 MAPK の特異的阻害薬である SB203580 hydrochloride (SB) と TA を ND マウスに併用投与し、TA 投与 SB 未投与 ND マウスと肝細胞壊死の程度を比較した。その結果、HFD マウスでは TA 投与 8 時間後からリン酸化 p38 MAPK が減少したのに対し、ND マウスでは TA 誘発肝細胞壊死が重篤になる投与 24 時間後でのみ肝臓のリン酸化 p38 MAPK が減少した。総 p38 MAPK については、TA 投

与 8 時間以降、HFD マウスと ND マウスの間に投与による発現の差は認められなかった。metabolomics 解析の結果、TA 投与 HFD マウスの肝臓では TA 非投与 HFD マウスと比較して投与 24 時間後に 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) のみが増加した。これに対し、TA 投与 ND マウスでは TA 非投与 ND マウスと比較して 12-HETE、15-HETE および 12-hydroxyeicosapentaenoic acid の増加と omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acids 比の減少がみられた。これらの結果から、HFD マウスの肝臓は ND マウスと比較して TA 投与 24 時間後に炎症誘発の程度が弱いことが示唆された。さらに、TA 投与後のリン酸化 p38 MAPK 減少が遅い ND マウスに p38 MAPK 阻害剤である SB を併用投与すると TA 誘発肝細胞壊死が減弱したことから、マウスにおける TA 投与後の速やかな p38 MAPK の抑制が TA 誘発肝細胞壊死を減弱させることが明らかになった。以上の結果から、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死を減弱させる要因の一つとして、p38 MAPK の TA 投与後の迅速な不活性化が示唆された。

本研究により、NAFLD モデル動物である HFD マウスでは ND マウスと比較して TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが明らかになった。また、その機序として、HFD マウスの肝臓では TA 投与後に、GSH の合成が亢進するため TA 誘発酸化ストレスが打ち消されること、および TA 誘発肝細胞壊死に関与する p38 MAPK が速やかに不活性化することが考えられた。本研究で得られた成果は罹患状態では健常状態と比較して薬物誘発性肝毒性の程度が変化しうることを示すものであり、患者における医薬品開発候補化合物の肝毒性ポテンシャルの予測精度を上げるために病態モデル動物を用いた薬物誘発性肝毒性評価が有用である可能性を示すものである。