

[別紙2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 白井 真人

肝疾患患者と健常人では薬物誘発性肝毒性への感受性に差があるため、病態モデル動物を用いて肝毒性評価を行うことが有用であると考えられる。そこで、申請者は本研究において、非アルコール性脂肪肝モデル動物である高脂肪食給餌 (HFD) マウスを用い、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 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各種検索を行った。その結果、HFD マウスでは ND マウスと比較して TA 誘発肝細胞壊死が軽度であることが示された。しかし、TA およびその代謝物の血漿中濃度や TA が肝毒性を発揮するために必要な代謝酵素である cytochrome P450 E1 の発現量からは HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死減弱が説明できなかった。一方、glutathione (GSH) 抱合酵素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 消費がおり、TA 誘発肝細胞壊死が減弱するものと推測された。

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 マウスおよび ND マウスに TA を 100 mg/kg 単回腹腔内投与し、各種検索を行った。その結果、TA 投与 ND マウスでは TA 誘発肝細胞壊死が重篤化する投与 24 および 48 時間後に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、TA 誘発肝細胞壊死が減弱する HFD マウスでは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 マウスに抗酸化剤 BHA を TA と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 8 および 24 時間後において、HFD マウスの肝臓では ND マウスと比較して抗酸化物質 GSH 生合成と消費が亢進することが示された。さらに、HFD マウスに GSH 合成阻害剤 BSO を TA と併用投与して肝臓 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ため TA 誘発酸化ストレスが打ち消され、その結果 TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが示唆された。

次いで、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 を 100 mg/kg 単回腹腔内投与し、肝臓のリン酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK) および p-p38 MAPK と非リン酸化 p38 MAPK の総量である総 p38 MAPK について Western blot 法で解析した。その結果、HFD マウスでは TA 投与 8 時間後から p-p38 MAPK が減少したのに対し、ND マウスでは投与 24 時間後でのみ肝臓の p-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。また、metabolomics 解析の結果、HFD マウスの肝臓では ND マウスと比較して増加する炎症性脂質メディエーターの数が少なく、炎症誘発の程度が弱いことが示された。さらに、TA 投与後の p-p38 MAPK の減少が遅い ND マウスに p38 MAPK 阻害剤である SB203580 hydrochloride を TA と併用投与すると TA 誘発肝細胞壊死が減弱した。以上の結果から、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱メカニズムの一つとして、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、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り、その機序として、HFD マウスの肝臓では TA 投与後に GSH の合成が亢進して 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、非アルコール性脂肪肝患者における薬物誘発性肝毒性のリスク評価をより高い精度で行うために、HFD マウスが重要であることを示すものである。よって審査員一同、本論文が博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。