

主論文の要約

**Kupffer cell-mediated exacerbation of
methimazole-induced acute liver injury in rats**

ラットにおける Kupffer 細胞を介したメチマゾール誘導性
肝障害の増悪

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
分子医薬学講座 トキシコゲノミクス分野

(指導：横井 毅 教授)

赤井 翔

【緒言】

メチマゾール (MTZ) は甲状腺機能亢進症の治療薬として使用されているが、稀にヒトで肝障害を起こすことが報告されている。我々は、BALB/c マウスにグルタチオン (GSH) 合成阻害剤である L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) を投与することで MTZ 誘導性肝障害マウスモデルを作成し、その肝障害発症には interleukin-4 (IL-4) や eotaxin 等 T helper 2 (Th2) 細胞関連の免疫因子が関与していることを以前に報告している。本研究ではマウスと同様に非臨床安全性試験で使用されるラットを用いて MTZ 誘導性肝障害モデルを作成し、その肝障害発症機序の種差について検討した。

【方法】

雄性 Fischer 344 ラットに絶食条件下で BSO 700 mg/kg を腹腔内投与した 1 時間後に、MTZ を 20 mg/kg で経口投与した。また、SD 及び Wistar ラットにも同条件で投与し、系統差を確認した。MTZ 投与前、投与後 1, 3 及び 6 時間に採血を行った後に血漿及び肝臓を採取した。肝障害発現及びその程度を確認するため、血漿中 AST, ALT, ビリルビン及び high-mobility group box 1 (HMGB1) 測定、肝臓中 GSH 濃度測定、病理組織学的検査を行った。また、抗 myeloperoxidase (MPO) 及び抗 CD68 抗体を用いた免疫組織化学的検査、real-time RT-PCR 法を用いた免疫関連因子等の mRNA 発現解析を行った。さらに、Western blotting 法を用いて Toll-like receptor 4 (TLR4) の発現変動、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 及び c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化を確認した。また、Kupffer 細胞を不活化する目的で塩化ガドリニウム (GdCl₃) 10 mg/kg を MTZ 投与 48 及び 24 時間前に静脈内投与し、MTZ 誘導性肝障害に与える影響を確認した。

【結果】

SD, Wistar 及び Fischer 344 ラットに MTZ と BSO を投与したところ、全系統で ALT 上昇がみられたが (Fig. 1), その程度は Fischer 344 ラットにおいて最も顕著であったことから、以降の検討は Fischer 344 ラットを用いることにした。MTZ または BSO のみの投与では AST, ALT 及びビリルビン値の上昇、肝組織像に変化はみられなかったが、MTZ 及び BSO の併用で AST, ALT, ビリルビン及び HMGB1 上昇、小葉中心性の肝細胞壊死が好中球数増加を伴って認められた (Fig. 2)。また、肝臓中の GSH 含量は BSO 投与群, BSO 及び MTZ 併用群で低下し、酸化ストレスマーカーである還元型 GSH/酸化型 GSH (GSSG) 比は BSO 投与群と比較して、BSO 及び MTZ 併用群で低下した (Fig. 3)。肝臓中の遺伝子発現変動は、MTZ 投与群と比較して MTZ 及び BSO 併用群では、自然免疫に関連した monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) 及び interleukin-6 (IL-6) 等の mRNA 発現量の上昇がみられたが、GATA binding protein 3 (GATA3) や eotaxin 等の Th2 細胞関連免疫因子の mRNA 発現変動はみられなかった (Fig. 4)。また、Danger signal や酸化ストレスに関連する S100 calcium-binding protein A8 (S100A8), S100A9 や heme oxygenase 1

(HO-1) 等の発現量上昇が認められた (Fig. 4)。

これらの結果より、ラット MTZ 誘導性肝障害の増悪には自然免疫系が関与している可能性が示唆されたため、Kupffer 細胞と TLR4 signaling pathway に着目して追加検討を行った。肝臓における CD68 及び CD163 mRNA 発現は MTZ 及び BSO 併用群で上昇し、CD68 陽性 Kupffer 細胞数も肝障害に伴い増加した (Fig. 5)。また、HMGB1-TLR4 signaling pathway に関連する TLR4、リン酸化 ERK 及び JNK タンパク発現も増加した (Fig. 5)。以上の結果より、ラット MTZ 誘導性肝障害には Kupffer 細胞の活性化を伴う HMGB1-TLR4 signaling pathway が関わっている可能性が示された。Kupffer 細胞が MTZ 誘導性肝障害に関与していることを精査するため、MTZ 投与前に GdCl₃ を投与し、Kupffer 細胞を不活化したところ、GdCl₃ 投与群の 4/6 例において小葉中心性の肝細胞壊死の減弱及び肝臓中好中球数の減少、ALT 値の有意な減少が認められた (Figs. 6 and 7)。また、肝臓中の自然免疫及び Danger signal 因子の mRNA 発現誘導の有意な抑制がみられたが、酸化ストレスに関わる HO-1 mRNA 発現誘導は抑制されなかった (Fig. 8)。さらに、GdCl₃ 投与群では、CD68 陽性 Kupffer 細胞数の減少に加え、肝臓中の TLR4、CD68 及び CD163 mRNA 発現の有意な抑制、HMGB1-TLR4 signaling pathway に関連するタンパク発現の低下が認められた (Fig. 9)。

【考察】

肝障害モデルで汎用される医薬品のアセトアミノフェンは、マウスと比較してラットでは肝障害の程度が弱く、肝毒性増悪機序の種差検討には不向きである。一方、MTZ は BSO と併用することでマウス及びラットにおいて同程度の肝障害がみられることから、種差検討に有用だと考えた。実際に、MTZ 誘導性肝障害の増悪機序には明らかな種差がみられ、ラット MTZ 誘導性肝障害の増悪には Th2 細胞関連の免疫因子は関与せず、Kupffer 細胞が関与していることが明らかとなった。また、GdCl₃ 投与で肝障害が減弱された条件では自然免疫及び Danger signal 関連因子の発現は低下したが、酸化ストレスに関わる HO-1 mRNA 発現は低下しなかったことから、MTZ による肝障害の initiation は酸化ストレスであり、その後の増悪プロセスに Kupffer 細胞による自然免疫の活性化が関与している可能性が示された。

MTZ が投薬される甲状腺機能亢進症の Graves' disease では、酸化ストレスに対する防御機構が低下していることが報告されており、BSO 投与によって肝臓の GSH が低下した動物モデルは Graves' disease に近く、ヒトでの肝障害の発症機序を説明できる可能性が考えられる。一方、ヒトの MTZ 誘導性肝障害の多くは胆汁うっ滞型であり、げっ歯類のような肝細胞壊死の報告は少数例であることから、MTZ 誘導性肝障害モデルは、種差を検討する上では有用かもしれないが、ヒトへの外挿性を考察するためには今後更なる検討が必要である。

【結語】

MTZ 誘導性肝障害の増悪機序には明らかな種差が認められ、マウスでは Th2 細胞関

連の免疫因子が関与しているが、ラットにおける増悪には Th2 細胞関連の免疫因子は関与せず、自然免疫、特に Kupffer 細胞の活性化を伴う HMGB1-TLR4 signaling pathway が関わっている可能性が示唆された。