

血液肝臓間相互作用を加味したミトコンドリア膜透過性遷移  
の関わる肝障害機序の探索

2022年

池山 佑豪

目次	
略語一覧	3
第1章 概要	4
第2章 一過的低酸素 (H/R)が MPT 誘導性肝細胞死に及ぼす影響	6
第1節 序	6
第2節 方法	8
第3節 結果	13
3-1 ガラクトースと高酸素条件の組み合わせは酸化リン酸化を活性化させる	13
3-2 培養糖源置換と高酸素培養は乳酸産生量を減少させる	13
3-3 H/R 処置による mtROS の産生は Gala 条件でのみ観察される	13
3-4 Gala 培養と H/R の組み合わせは MPT 誘導剤による細胞死を引き起こす	13
第4節 考察	20
4-1 MPT 誘導能の評価系構築の可能性	20
4-2 ジクロフェナクで MPT 誘導性の細胞死が確認されなかった理由について	21
4-3 薬物高濃度曝露で見られた MPT 非依存的な細胞死について	21
4-4 MPT 依存的な細胞毒性における H/R と mtROS の重要性	22
第5節 小括	23
第3章 血液凝固に関わる (血小板) が MPT 誘導性肝細胞死に及ぼす影響	24
第1節 序	24
第2節 方法	26
第3節 結果	34
3-1 APAP は MPT を介して血小板を活性化する	34
3-2 APAP 投与における肝内浸潤細胞プロファイル	34
3-3 APAP 投与におけるミトコンドリア機能変化	35
3-4 APAP による肝障害と血小板蓄積は BMDCs の MPT 依存的に起こる	35
3-5 APAP による肝ミトコンドリア機能変化は BMDCs の MPT 依存的に起こる	36
第4節 考察	43
4-1 APAP 肝障害発症機序における血小板の関与	43
4-2 BMDCs の MPT は APAP の障害発症過程のみに関与するか?	44
4-3 血小板が肝細胞と相互作用を及ぼすか	44
4-4 薬物による BMDCs の浸潤	45
4-5 ヒトでの MPT 誘導能評価への可能性	46

総括	47
参考文献	48
主論文目録	53
謝辞	54
審査委員	55

## 略語一覽

APAP: Acetaminophen  
ATP: Adenosine triphosphate  
BM: Bone marrow  
BMDC: Bone marrow derived cell  
BM-KO: Bone marrow cyclophilin D knock out  
BM-LM: Bone marrow cyclophilin D littermate  
BSEP: Bile salt export pump  
CypD: Cyclophilin D  
Dic: Diclofenac  
Dic-AG: Diclofenac Acyl Glucuronide  
DILI: Drug induced liver injury  
Gala: Galactose  
Gluc: Glucose  
LPS: lipopolysaccharide  
MPT: Mitochondrial permeability transition  
Mt: Mitochondria  
MtDNA: Mitochondrial DNA  
MtROS: Mitochondrial reactive oxygen species  
NAPQI: N-acetyl-p-benzoquinoneimine  
OXPHOS: Oxidative phosphorylation  
PS: phosphatidylserine  
RCI: Respiratory chain inhibitor  
RCR: Respiratory control ratio  
ROS: Reactive oxygen species

## 第1章 概要

研究技術の発展により、医薬品が創出され適切な治療技術が開発され続けている一方で、重篤な薬物有害反応の報告数は依然として多い。中でも肝毒性は心毒性と同様、臨床開発の中止または市販後の市場撤退の要因として大きな割合を占めている。肝毒性は、実験動物やヒト由来細胞を用いた非臨床試験で見られた毒性と臨床で見られる毒性発現の一致率は50%であり他臓器と比較すると低いことに加え、非臨床試験における肝毒性発現濃度が臨床血中濃度よりもはるかに高いことなどを考えると、肝毒性予測について未だ十分に対応できているとは言えない。

薬物性肝障害（DILI）の発症機序には、過剰な免疫反応、反応性代謝物の生成、胆汁酸排泄トランスポーター（BSEP）の阻害による胆汁酸蓄積、ミトコンドリア毒性などが挙げられる。ミトコンドリアは肝臓でのエネルギー産生、脂肪分解に関わるオルガネラで、薬物によるミトコンドリア毒性は乳酸アシドーシス、脂肪肝、肝細胞死に至る可能性があるため、DILI 発症における重要な因子の1つとして注目されている。実際にアメリカ食品医薬品局によって重篤 DILI の黒枠警告がなされている医薬品の半数以上がミトコンドリア毒性を有しており、医薬品開発早期にミトコンドリア毒性を適切に評価し、臨床での重篤 DILI リスクが高い薬物を同定して排除することが望まれる。

ミトコンドリア毒性には、電子伝達系の阻害、アデノシン三リン酸（ATP）合成の阻害、活性酸素種（ROS）の誘導、脂肪酸 $\beta$ 酸化の阻害、ミトコンドリア膜透過性遷移（MPT）の誘導などが挙げられる。その中でMPTはミトコンドリアの内膜と外膜を貫通する孔（ポア）を形成する現象である。MPTポアは内膜の $F_0F_1$ ATP合成酵素のc-リングにより構築され、シクロフィリンD（CypD）やATP合成酵素を制御因子に持つことが知られている。MPTはシトクロームCの漏出を介したアポトーシスやネクローシスを誘導することが報告されている。また、MPTは重篤な肝障害を誘発する薬物に共通する性質であるため、MPT誘導性DILIの詳細な機序の理解、さらにはそれに基づく適切な評価系の構築がDILIリスクの予測改善につながると考えられる。

単離ミトコンドリアを用いた *in vitro* の系でMPT誘導が見られる薬物は多数報告されているが、これらを動物に *in vivo* で単独投与してもMPT誘導性の肝毒性には至らない。そこで我々は、少量のリポ多糖（LPS）を動物に処置した後に薬物投与を行うことで、薬物単独では生じ得ない肝障害を再現できる、いわゆるLPS併用DILIモデルに着目した。この手法に従って少量のLPSを投与後、MPT誘導薬であるジクロフェナクを投与すると、肝障害マーカーの著しい上昇が見られた。

さらにこの上昇はヘパリン投与で減弱することも確認した。また単離ミトコンドリアを用いた評価から、LPSを投与することでROSを介したMPT感受性増強が起こること、この現象も同じくヘパリン投与で減弱することを確認した。これらから、LPSが引き起こす一過的な虚血・再灌流(I/R)がROSを介してMPT感受性を増強させたと考えられる。また、臓器移植に伴うI/Rが脳、肺、心臓、肝臓のMPT誘導に働くことが示されており、これら臓器においてROSがMPT感受性を増強する共通因子となっている可能性が考えられる。

I/Rによる臓器障害の発症メカニズムについては、i) 虚血による酸素供給不足、ii) 血液凝固因子である血小板活性化の関与が報告されている。具体的には、虚血による酸素供給不足が一過性低酸素(H/R)を経てROSを生じ、これがMPT誘導を介した細胞死を引き起こすこと、活性化した血小板が直接・間接的に実質細胞に作用し、細胞死へ導くことなどが分かっている。特に血小板については、その活性化にMPTの関与も知られ、「酸素供給不足」と「血小板の活性化」が肝障害に及ぼす影響を区別して解析することで、MPT誘導性DILIの発症機序をより深く理解できると期待される。そこで本研究では、「酸素供給不足」とMPT誘導性の肝細胞死の関係を*in vitro*で、「血小板の活性化」とMPT誘導性DILIとの関係を*in vivo*および*in vitro*で解析し、DILI発症におけるMPT誘導の位置づけを多面的に理解することを目指した。

## 第2章 一過的低酸素 (H/R)が MPT 誘導性肝細胞死に及ぼす影響

### 第1節 序

薬物性肝障害 (DILI) の発症機序としてミトコンドリア毒性 (Fromenty, 2020) が注目されている。アメリカ食品医薬品局によって重篤 DILI の黒枠警告がなされている医薬品の半数以上がミトコンドリア毒性を有しており (Dykens and Will, 2007; Rana et al., 2021)、開発早期にミトコンドリア毒性を適切に評価することはより安全な医薬品の創出につながると考えられる。

ミトコンドリア毒性メカニズムとして電子伝達系の阻害や脂肪酸  $\beta$  酸化の阻害などが知られているが、重篤 DILI リスクとの関連からは特にミトコンドリア膜透過性遷移 (MPT) の誘導が注目されている。MPT はシクロフィリン D (Cyp D) や ATP 合成酵素を制御因子に持ち、ミトコンドリアの内膜と外膜を貫通する孔 (ポア) を形成する現象である。細胞で MPT が起こるとシトクローム C の漏出を介してアポトーシスやネクロースが誘導される (Armstrong et al., 2018)。また、MPT は重篤 DILI 薬物に共通の性質 (Labbe et al., 2008) であることが知られているため、MPT 誘導性 DILI の詳細な機序の理解、さらにはそれに基づく予測系構築が DILI リスク予測性の改善につながると考えられる。

単離ミトコンドリアを用いた評価では MPT を誘導する薬物は多く報告されている (Porceddu et al., 2012)。一方で、その多くが *in vivo* に単独投与しても MPT 誘導性の肝毒性には至らず、MPT に起因した肝毒性の発症機序の理解が進んでいない。そこで我々は、先行研究から実験動物に少量のリポ多糖 (LPS) の前処置と薬物投与を併用した肝毒性モデルに着目して検討を進めた。その結果、LPS モデルに MPT 誘導薬であるジクロフェナクを投与することで肝障害マーカーが著しく上昇すること、さらにその毒性がヘパリン投与で減弱することを確認した。また単離ミトコンドリアを用いた評価から、LPS の前投与が ROS を介して MPT 感受性を増強させ、この増強分はヘパリン投与で抑制されることも確認した (Arakawa et al., 2019)。上述の結果を総合すると LPS が引き起こす一過的な虚血・再灌流 (I/R) が ROS を介して MPT 感受性増強に至ったと考えられる。また I/R と MPT との関連について、臓器移植時に発生する I/R が各種臓器 (脳 (Li et al., 2018)、肺 (Tian et al., 2018)、心臓 (Zhang et al., 2019b)、肝臓 (Kalogeris et al., 2012)) において MPT を誘導することが報告されている。MPT 感受性は I/R によって誘導されるミトコンドリア ROS (mtROS) により変化することも示されている。動物モデルの解析においては、2 型糖尿病ラットモデル (Segawa et al., 2018) や

スーパーオキシドジスムターゼ-2 ヘテロマウスモデル(Lee et al., 2013)においても同様に、MPT 感受性に与える mtROS の影響が示されており、細胞内での mtROS 産生が MPT 誘導を左右する重要な因子となると考えられる。

培養細胞を用いたミトコンドリア毒性は ATP の減少(Swiss et al., 2013)、酸素消費量の阻害(Beeson et al., 2010)そして培養糖源をグルコースからガラクトースに変えた際の細胞毒性感受性の比(Marroquin et al., 2007)によって評価が行われている。この中でも、薬物に対する培養糖源ごとの細胞毒性感受性比を用いた評価方法はヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞(Marroquin et al., 2007)やラット初代培養肝細胞(Liu et al., 2016)での報告があり、実際に新薬開発段階の前臨床試験でも多く用いられている。特にラット初代培養肝細胞ではガラクトース培養に加え高酸素濃度での培養を行うことで、呼吸鎖複合体の阻害と ROS 産生を介した細胞毒性の感受性が増強するが、MPT 誘導薬物では毒性の増強は確認されなかった(Liu et al., 2016)。またこれは HepG2 細胞にて培養糖源をグルコースからガラクトースに変えた場合にも細胞毒性の変化は見られなかった(Hynes et al., 2013)。MPT に起因した細胞死を誘導するには特定の条件を付加する必要性が示唆された。

これらの事実を基に *in vitro* においても mtROS を負荷することで薬物に対する MPT 感受性を増大させることが期待される。本研究ではマウス初代培養肝細胞を用いて I/R を模した一過性低酸素 (H/R) 処置により mtROS を負荷させることで、MPT が既知である薬物による MPT を介した細胞毒性が増大すると仮説を立てて検討を行った。その結果、最適化された条件下で、特定の MPT 誘導剤によって MPT 依存性の細胞死が特異的に観察されることが実証された。

## 第2節 方法

### 試薬

本研究で用いた主な試薬を以下に示す。塩類など一般的な試薬はここでは記載しない。また、下記記載およびその他の試薬はすべて分析用、特級、生化学あるいは細胞培養用試薬を用いた。

Williams' medium E (WME)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
MitoSOX-Red	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Fet al bovine serum (FBS)	Biosera (Kansas, MO, USA)
1.8 g/L Galactose WME	Cells Science & Technology Inst., Inc. (Sendai, Japan)
Collagenase	FUJIFILM Wako Pure (Osaka, Japan)
Insulin	FUJIFILM Wako Pure (Osaka, Japan)
Dexamethasone	FUJIFILM Wako Pure (Osaka, Japan)
Lactate dehydrogenase (LDH, pig heart)	FUJIFILM Wako Pure (Osaka, Japan)
Glutamate pyruvate transaminase	Roche Applied Science (Manheim, Germany)
Amiodarone	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Benzbromarone	FUJIFILM Wako Pure (Osaka, Japan)
Diclofenac	FUJIFILM Wako Pure (Osaka, Japan)
Flutamide	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
Troglitazone	FUJIFILM Wako Pure (Osaka, Japan)

### 実験動物

C57BL/6J 由来シクロフィリン D (CypD) 欠損 (KO) マウス (B6;129-Ppif<sup>tm1Maf/J</sup>) は Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した。本エスエルシー(株)より購入した実験用動物飼料 (FR-1)を与え、水および飼料は自由に摂取させた。購入したマウスは温度コントロール(25±2°C)の環境下にて 12 時間明暗サイクルで飼育し、8-12 週齢のマウスを使用した。すべての動物は National Institutes of Health により刊行されたガイドラインに従って処置を行った

## 肝細胞の単離および精製

マウス肝細胞の単離生成は過去の報告通り行った(Takemura et al., 2019)。CypD KO または同腹仔 (LM) オスマウスを麻酔後、手術台に背位固定した。門脈にカニューレを施し、41°C に加温した perfusion buffer にて灌流を行った後、collagense buffer を 10 分程灌流した。その後肝臓を単離し滅菌済みビーカー中で振盪分離し、ナイロンメッシュでろ過した。ろ液を遠沈管に移して、4°C 条件下 50 x g で 3 min 遠心分離した後、上清を除去した。50% percoll 溶液を加え、再懸濁し、4°C条件下 50 x g で 15 min 遠心した。上清を除去した後 DMEM を 15 mL 程添加し再懸濁後、ナイロンメッシュでろ過し 4°C 条件下で 50 x g で 3 min 遠心した。上清除去した後 DMEM を 10 mL 添加し得られた細胞を Trypan blue exclusion test により生存率を算出し、85 %以上のものを用いた。

各種 Buffer, 50% Percoll 溶液の組成は以下に示す。

### 10 x Base buffer

KCl	4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	600 mg/L
NaCl	80 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	480 mg/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	980 mg/L

### Perfusion buffer (pH 7.2)

10 x Base buffer	100 mL
HEPES	2.38 g/L
EGTA	0.228 g/L
Glucose	1 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	1.29 g/L

900 mL の滅菌済み milliQ にフィルター滅菌しながら希釈し使用

### 10 x HBSS (Ca<sup>2+</sup> free)

NaCl	80 g/L
KCl	4 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.772 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	3.5 g/L

### 50% Percoll 溶液

DMEM	12 mL
Percoll	10.8 mL
10 x HBSS	1.2 mL

milliQ にてメスアップして 500 mL に調整

## 肝細胞の播種・サンドイッチ培養

単離・精製後の肝細胞を plating medium にて希釈し  $1.25 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> になるようにコラーゲンを乗せた培養プレートに播種した。接着しなかった細胞を除去するために播種後 6 時間後に plating medium にて培地交換を行った。播種後 24 時間後に culture medium にて 0.75 mg/mL に希釈した Matrigel (Corning) を添加した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> で維持培養を行った。高酸素培養条件では、細胞播種後に 40% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> ガス供給で調整) で培養した。一過性低酸素培養 (H/R) は Fig. 1-1 で示すように day 3 に細胞を 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> (N<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> ガス供給で調整) で 4 時間培養し、その後 40% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> で 2 時間 (mtROS 測定) または 20 時間 (細胞死評価) で培養した。通常条件 (N) として細胞を 40% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> にて 6 時間 (mtROS 測定) または 24 時間 (細胞死評価) 培養した。

plating medium 及び culture medium の組成は以下に示す。

<u>Plating medium</u>		<u>Culture medium</u>	
WME	500 mL	WME または Galactose-WME	500 mL
FBS	25 mL	ITS premix	500 µL
5 mg/mL insulin in 50 mM HCl	400 µL	Anti-Anti	5 mL
5 mM Dexamethazone	10 µL	5 mM Dexamethazone	10 µL
Anti-Anti	5 mL	Gluta MAX	5 mL
Gluta MAX	5 mL		
1M HEPES pH 7.4	7.5 mL		

## 酸素消費量の測定

グルコースまたはガラクトース培地で培養した初代培養マウス肝細胞の酸素消費量は、蛍光酸素プローブが付加されているプレート (OxoDish®OD24, PreSens, Regensburg, Germany) (Buck et al., 2014) を用いて過去の報告通り行った (Ikeyama et al., 2020)。具体的には、新鮮なメディアウムに交換して測

定開始した時間を Time 0 として 10 分毎の酸素分圧を SDR SensorDish® Reader (PreSens, Regensburg, Germany)にて測定した。30 分間の酸素消費量を算出した。

#### 乳酸産生量の測定

培養 24 時間で培地中に細胞より放出された乳酸量を過去の報告通り測定した(Ikeyama et al., 2020b)。

#### mtROS の測定

mtROS 量は MitoSOX-Red を用いて測定した。96 穴プレートにマウス肝細胞を播種し上述する方法で培養した。N または H/R 群の培養培地を除去後、5  $\mu$ M MitoSOX-Red 含有培地を 100  $\mu$ L 添加し、37°C で 30 分間培養を行い、MitoSOX-Red を培地交換によって除去した細胞を BZ-X700 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて画像を取得した。MitoSOX-Red の染色時、核染色として Hoechst 33342 でも染色を行った。取得した画像は、BZ-X Analyzer で算出した。MitoSOX-Red の蛍光強度は、Hoechst 33342 の細胞数で補正した。

#### 薬物曝露と H/R 処置

試験薬物 (アミオダロン、ベンズブロマロン、ジクロフェナク、フルタミド、トログリタゾン) はすべて DMSO に溶解後、最終濃度が 0.2% DMSO となるように培養培地に添加し、細胞に曝露した。各種薬物は H/R 処置を同時に行い 24 時間曝露した。

#### 細胞死の評価

Day 4 のマウス肝細胞に薬物曝露を行い 24 時間後の培養上清を回収した。細胞死は細胞から露出する LDH の活性を LDH Cytotoxicity Detection kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて測定することで評価した。LDH の活性は、DMSO 処置したコントロール細胞での活性に対する割合 (1% Triton X-100 を含む培地で細胞溶解した時のポジティブコントロール細胞での活性を 100%とした) として下記に示す計算方法で評価した。492 nm の吸光度は Multiscan JX system (Labsystems, Inc., Vienna, VA, USA)を用いて測定した。

$$\left( \frac{(\text{測定サンプルの吸光度}) - (\text{コントロール細胞の吸光度})}{((\text{ポジティブコントロール細胞の吸光度}) - (\text{コントロール細胞の吸光度}))} \right) \times 100$$

## 統計解析

実験データは平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。すべての統計解析には GraphPad Prism 8 ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を使用した。有意差検定は、2 群間検定について unpaired Student's t-test、多群間検定について Tukey または Dunnett 法を用いた。有意水準を 0.05 とし、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

### 第3節 結果

#### 3-1 ガラクトースと高酸素条件の組み合わせは酸化的リン酸化を活性化させる

ミトコンドリア毒性の検出には、ミトコンドリア酸化的リン酸化（OXPHOS）の活性化が必要である。先行研究においてラット初代肝細胞を用いた検討では、培液の糖源をグルコース（Gluc）からガラクトース（Gala）に切り替えることでミトコンドリア OXPHOS が促進することを示しており（Liu et al., 2016）、同様の手法を本検討で用いるマウス初代肝細胞にも適用した（Fig.1-1）。Gluc では酸素消費量が経日的に減少したが、Gala では酸素消費量は高いままであり、（Fig. 1-2）ミトコンドリア OXPHOS 活性化高い状態を維持していると考えられる。またラット初代肝細胞の検討において、Gala 条件に加えて高 O<sub>2</sub> 条件を組み合わせることでミトコンドリア OXPHOS をさらに活性化することを示した（Liu et al., 2016）。そこで 40% O<sub>2</sub> 条件での酸素消費率を評価したところ、培養 4 日目の両糖源条件で溶存 O<sub>2</sub> 量が維持された（Fig. 1-2）。これらの結果は、40% O<sub>2</sub> 条件下での気液界面からの酸素供給が、マウス初代肝細胞の酸素需要を完全に満たすことが示唆された。

#### 3-2 培養糖源置換と高酸素培養は乳酸産生量を減少させる

ミトコンドリアの OXPHOS 活性化に対応して、解糖系活性が抑制されていると考えられる。その点を評価するために、ピルビン酸代謝の副産物であり解糖系活性の指標の 1 つである乳酸量を測定した。Gala 培地で培養した肝細胞は、20% O<sub>2</sub> 条件下 Gluc 培地で培養した肝細胞よりも、培地中への乳酸の放出量が少なかった（Fig. 1-3）。さらに 40% O<sub>2</sub> 条件下で培養した肝細胞は、糖源の違いにかかわらず 20% O<sub>2</sub> 条件下の肝細胞よりもはるかに乳酸産生量が少なかった。これらの結果は、Gala 培地と高酸素条件によって解糖系活性が抑制されることを示し、O<sub>2</sub> 消費量の結果から解釈した OXPHOS 活性化を示唆するものである。ガラクトース培地と 40% O<sub>2</sub> を組み合わせて 4 日間培養することで他の条件よりも乳酸産生量が最も少なくなり、OXPHOS が最も活性化されたことが示唆された。40% O<sub>2</sub> 条件下では 3 日目と 4 日目に Gluc と Gala の間に僅かな、しかし統計的に有意な差が観察された。この差は非常に小さいことから生物学的な意義は少ないと思われる。2-1、2-2 の結果より、以降では 40% O<sub>2</sub> 条件下での培養を通常培養条件として種々検討を行った。

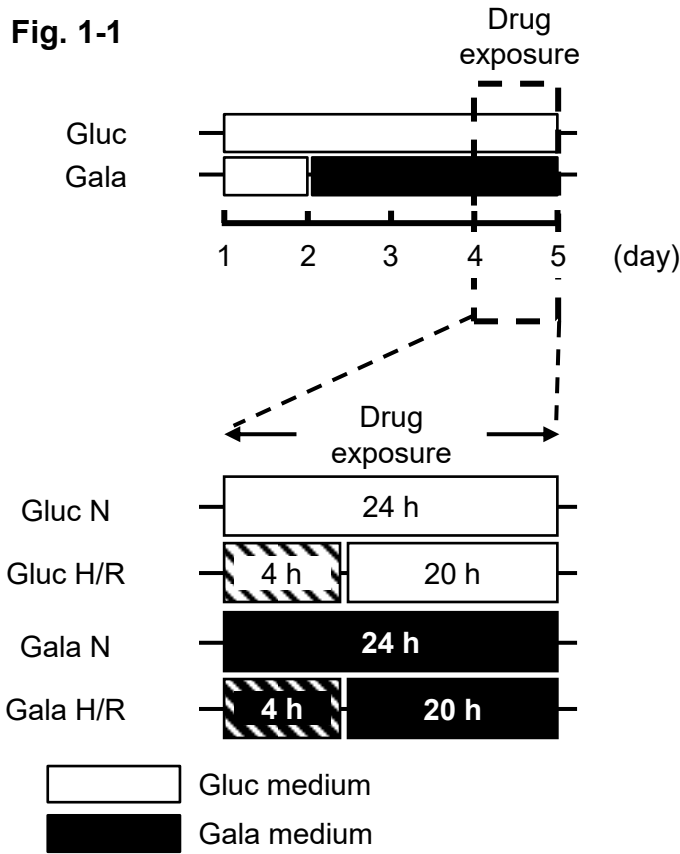
#### 3-3 H/R 処置による mtROS の産生は Gala 条件でのみ観察される

肝移植モデルにおいて、I/Rにより誘導された ROS が MPT を引き起こすことが報告されている (Kalogeris et al., 2012)。そこで、I/R を模倣した H/R 処理による mtROS 産生への影響を評価した。Fig. 1-4A で示すように、通常の培養条件では糖源の種類にかかわらず、mtROS はほとんど検出されなかった。H/R 処理条件において、Gluc 培地では mtROS は検出されなかったが、Gala 培地では mtROS を検出した。さらに画像を基にした半定量的解析により、これらの観察結果を確認した (Fig. 1-4B)。

### 3-4 Gala 培養と H/R の組み合わせは MPT 誘導剤による細胞死を引き起こす

H/R 処理によって生成された mtROS が MPT 依存的な細胞死を誘導するか調べるため、各種培養条件下で培養したマウス肝細胞に、MPT 誘導能が既知の化合物を 24 時間曝露して細胞死の感受性変化を評価した。MPT 誘導薬物としてアミオダロン (Varbiro et al., 2003)、ベンズブロマロン (Shirakawa et al., 2015)、ジクロフェナク (Arakawa et al., 2019)、フルタミド (Shirakawa et al., 2015)、トログリタゾン (Segawa et al., 2018) を用いた。低濃度曝露では、H/R 無処置 Gluc 培地 (Gluc N)、H/R 処置 Gluc 培地 (Gluc H/R)、H/R 無処置 Gala 培地 (Gala N) で細胞死は認められなかった (12.5  $\mu$ M アミオダロン、2.5  $\mu$ M ベンズブロマロン、75  $\mu$ M フルタミド、25  $\mu$ M トログリタゾン) (Fig. 1-5)。一方 H/R 処置 Gala 培地 (Gala H/R) では、ジクロフェナクを除く 4 薬物で Cyp D LM マウスの肝細胞において細胞死の有意な増加を認めた。ここで認めた細胞死の MPT 依存性を確認するため、Cyp D KO マウスから単離した肝細胞でも同様の評価を行なった。その結果、Cyp D LM 肝細胞の Gala H/R 条件で認められた細胞死 (LDH 漏出) は、Cyp D KO 肝細胞で有意に抑制された (Fig. 1-5 A, B, D, E)。これらの結果は、糖源置換と H/R 処理を組み合わせることで MPT 依存的な細胞死を効率的に誘導できることを示している。ここで、アミオダロン、ベンズブロマロン、フルタミド、トログリタゾンの 4 薬物についてはある特定の濃度までは MPT 依存性の細胞死を示したが、それ以上の高濃度域では MPT 依存性が消失し、Cyp D KO 肝細胞でも Cyp D LM 肝細胞と同等の細胞死を認めた (Fig. 1-6)。このことから、高濃度域で生じる細胞死は MPT とは関係ないことが示唆された。

**Fig. 1-1**

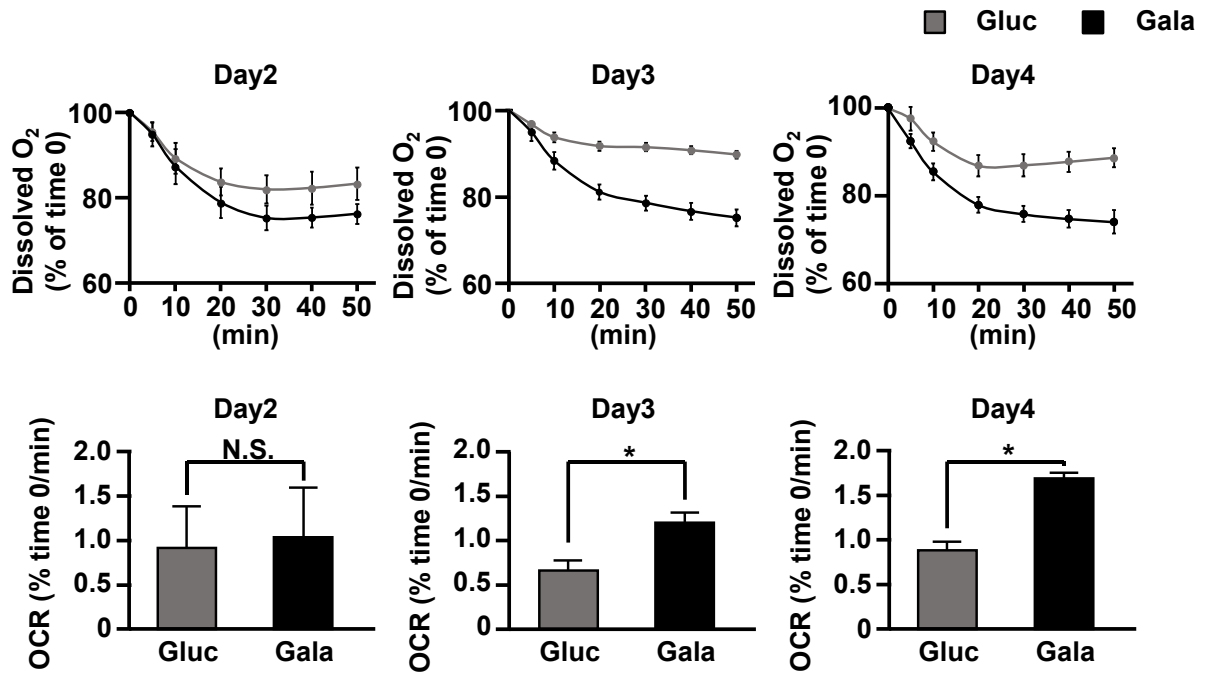


**Fig. 1-1. Time course of glucose or galactose culture mouse primary hepatocyte**

After isolation, hepatocytes were cultured in glucose medium for 24 h. From day 2, cells were cultured in glucose (Gluc) or galactose (Gala) medium for 3 days. On day 4, hepatocytes were exposed to drugs under each condition (Gluc or Gala). For H/R treatment, after exposing drugs, hepatocytes were incubated in 1% O<sub>2</sub> condition for 4 h (shading symbols) and then incubated in 40% O<sub>2</sub> (no shading symbols). For normal conditions (N), hepatocytes were incubated in 40% O<sub>2</sub> (no shading symbols).

Fig. 1-2

A



B

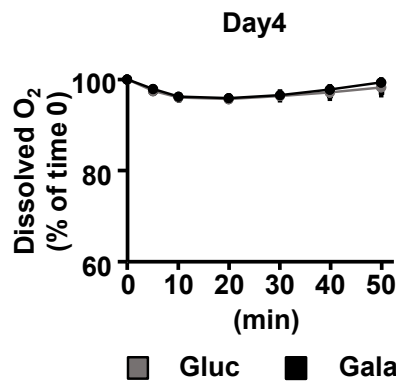


Fig. 1-2. Effect of O<sub>2</sub> consumption of mouse primary hepatocytes cultured in Gluc or Gala medium in 20% O<sub>2</sub> or 40% O<sub>2</sub> condition.

O<sub>2</sub> consumption of hepatocytes cultured as mentioned in glucose (gray symbol) or galactose (black symbol) medium. hepatocytes were cultured as mentioned in Fig. 1. The O<sub>2</sub> concentration was measured after replacing the medium with fresh medium. Data was normalized to the initial O<sub>2</sub> partial pressure (pO<sub>2</sub>) in the medium (100%). A) The initial pO<sub>2</sub> in medium on each day is day 2, 3 and 4 in 20% O<sub>2</sub> culture (solid line) and day 4 in 40% O<sub>2</sub> culture (dotted line). B) O<sub>2</sub> consumption in 20% O<sub>2</sub> culture was calculated as relative consumption during the first 30 min from the data shown in Fig. 2A. Data are means  $\pm$  S.D., n=3, \*p<0.05 vs glucose. Statistical analysis was performed using Student's t-test.

Fig. 1-3

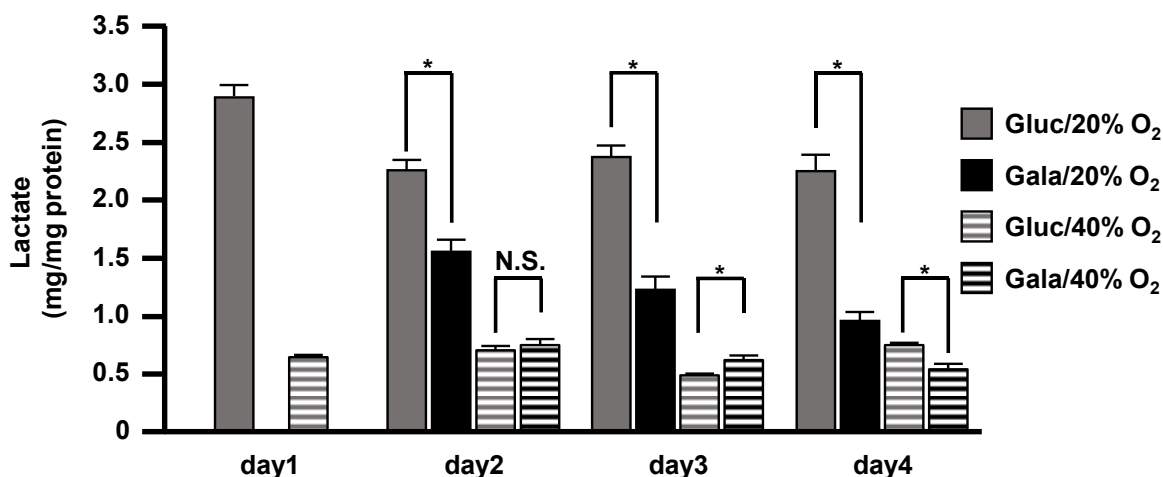


Fig. 1-3. Effect of substituting medium Gluc with Gala in 20% or 40% O<sub>2</sub> condition on extracellular lactate release.

Cells were cultured as mentioned in Fig. 1. In 20% or 40% O<sub>2</sub> condition. Gluc and Gala medium were changed every day, and the lactate released into the medium within 24 h was measured. Data are means ± S.D., n=3, \*p<0.05. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA.

Figure 1-4

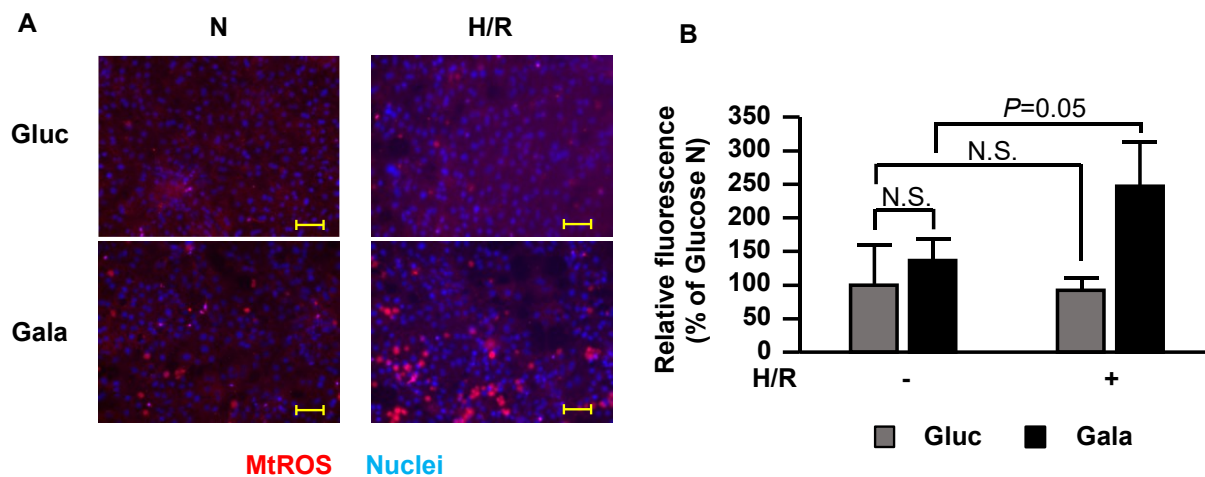
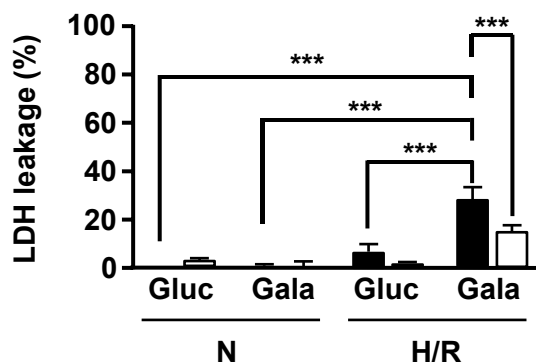


Fig. 1-4. Effect of hypoxia/reoxygenation (H/R) treatment on mitochondria reactive oxygen species (mtROS) measurement

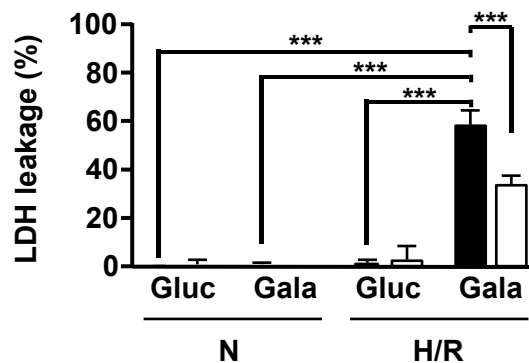
On day 4, hepatocytes were cultured in 1% O<sub>2</sub> for 4hr, and then cultured in 40% O<sub>2</sub> for 2 h. mtROS was measured as in Materials and methods. mtROS production was defined as MitoSOX fluorescence. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342. (A) Images overlaid with mtROS (red) and nuclei (blue). Typical confocal images are shown. Scale bars = 100 μm. (B) mtROS production and nuclei number are quantified using BZ-X analyzer. Data are means ± S.D., n=3, N.S.=Not Significant. Statistical analysis was performed using Student's t-test.

Fig. 1-5

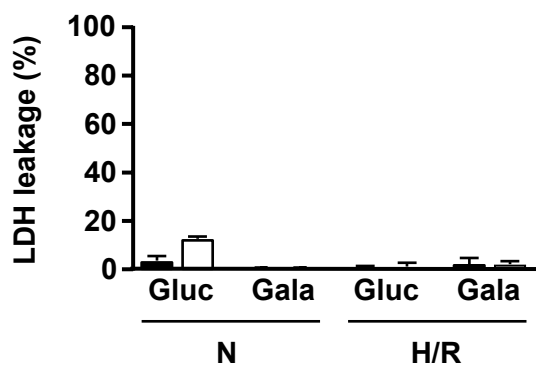
(A) Amiodarone



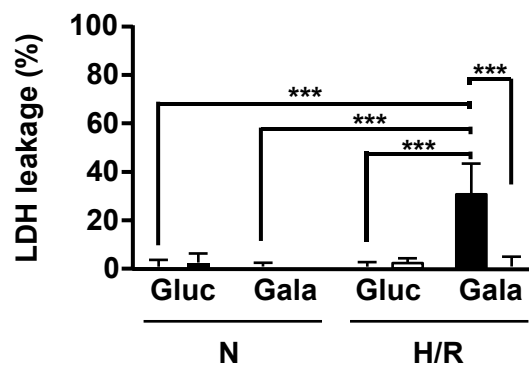
(B) Benzbromarone



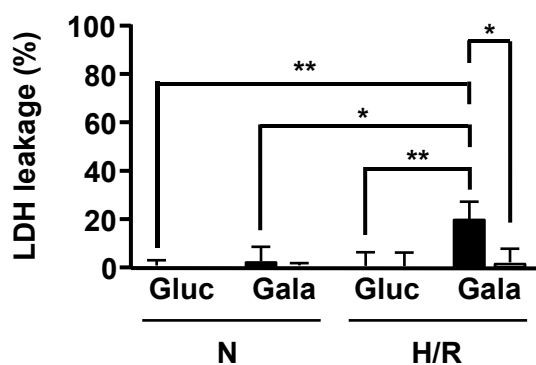
(C) Diclofenac



(D) Flutamide



(E) Troglitazone

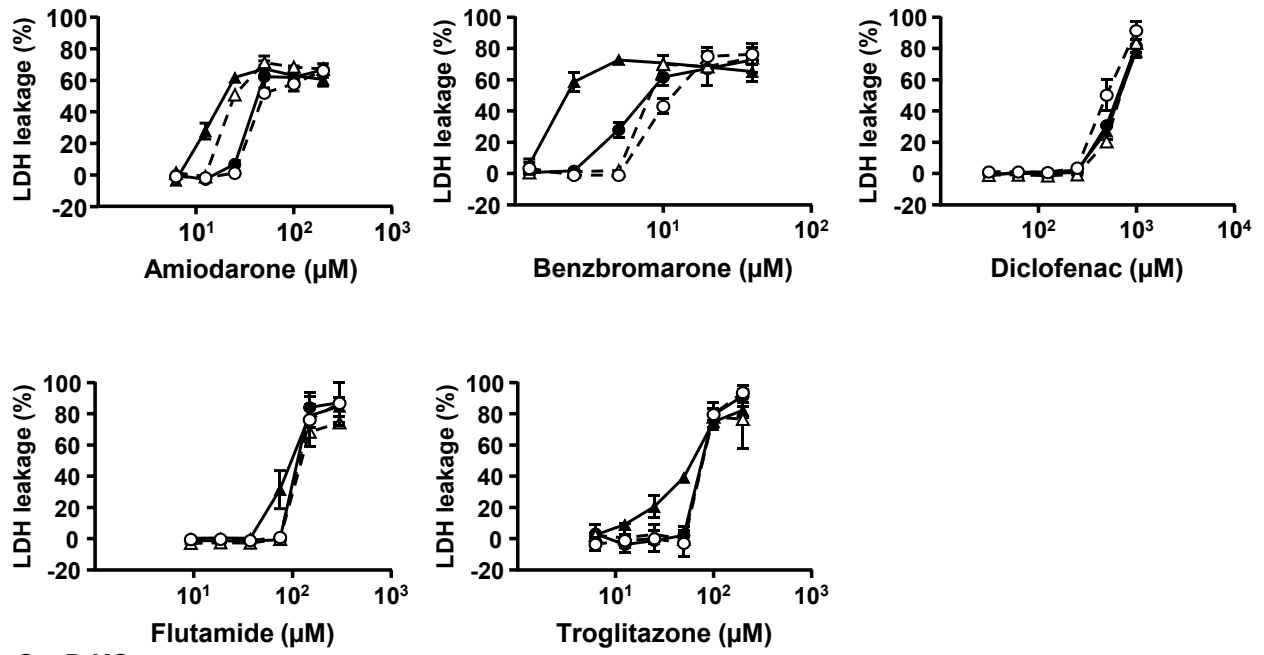


■ CypD LM  
□ CypD KO

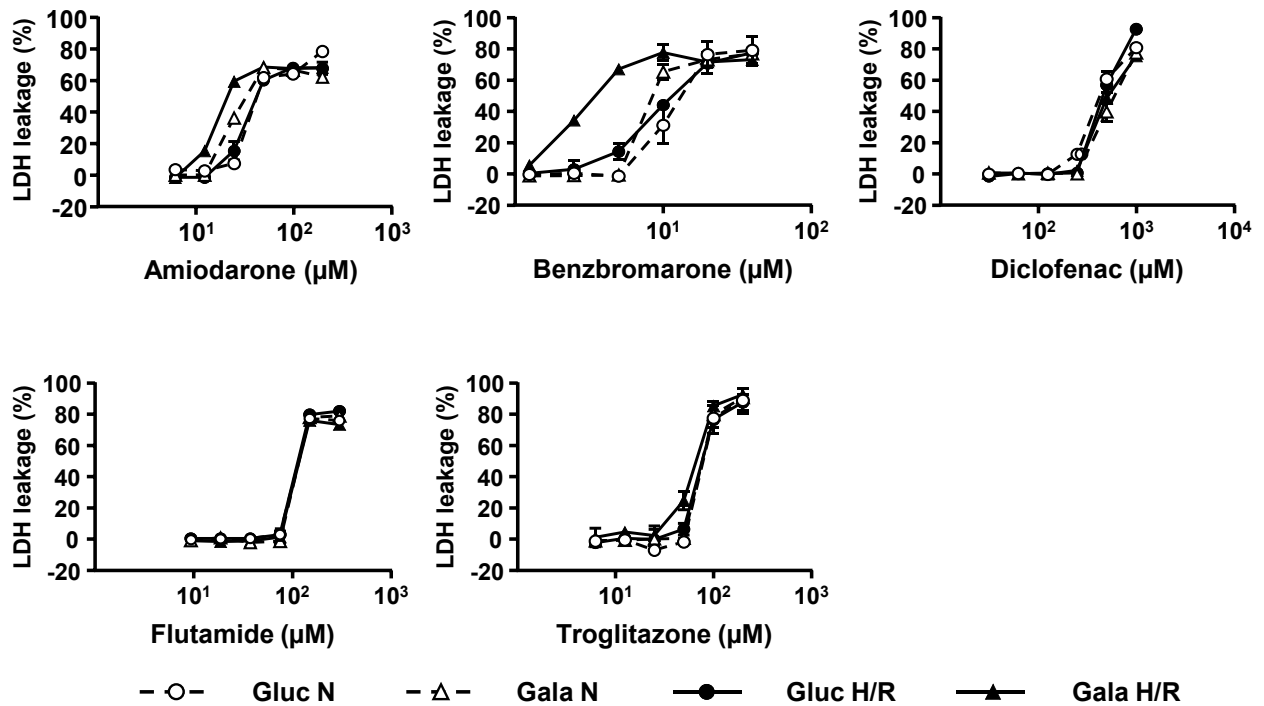
Fig. 1-5. Effect of MPT-induced cytotoxicity by drug with H/R treatment.

On day 4 after littermate mice (CypD LM) or Cyclophilin D KO (CypD KO) mice hepatocyte isolation, the hepatocytes were treated with drugs inducing mitochondrial permeability transition ((A) 12.5  $\mu$ M amiodarone, (B) 2.5  $\mu$ M benzbromarone, (C) 250  $\mu$ M diclofenac, (D) 75  $\mu$ M flutamide, (E) 25  $\mu$ M troglitazone) on Gluc N, Gala N, Gluc H/R, Gala H/R condition. For H/R treatment, they were cultured in 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> condition for 4 h, and then cultured in 40% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> condition for 20 h after drug treatment. The cytotoxicity was assessed by LDH release into the medium. Data is shown as means  $\pm$  S.D., n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA. N.S.=not significant.

**Fig. 1-6**  
**CypD LM**



**CypD KO**



**Fig. 1-6. Dose-dependent effect of cell death by MPT inducers with gala and H/R treatment on LM and KO hepatocytes.**

On day4 after LM or KO mice hepatocytes isolation, the hepatocytes were treated with drugs inducing mitochondrial dysfunction on Gluc N, Gala N, Gluc H/R, Gala H/R condition. For H/R treatment, they were cultured in 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 94% N<sub>2</sub> condition for 4 h, and then cultured in 40% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> condition for 20 h after drug treatment. The cell toxicity was assessed by LDH release into the medium. Data is shown as means  $\pm$  S.D., n=3.

## 第4節 考察

### 4-1 MPT 誘導能の評価系構築の可能性

MPT はミトコンドリア毒性発現機構の一つで、重篤な DILI 誘発薬物の多くに共通の性質として知られる(Arakawa et al., 2019; Segawa et al., 2018; Shirakawa et al., 2015; Varbiro et al., 2003)。そこで本研究では、MPT 誘導性肝障害に関与する因子を探索した。我々は先行研究において、LPS により引き起こされた I/R が mtROS を産生させ、肝細胞の MPT 感受性を増大させる可能性を見出した(Arakawa et al., 2019)。本研究では、LPS 投与時に肝臓で生じる I/R を *in vitro* で模倣するため、ガラクトース培地と H/R を組み合わせ、ここに薬物を曝露することで MPT 依存性細胞死を誘導することに成功した。一方で、ヒトとげっ歯類では薬物代謝活性等に大きな種差があるため、毒性評価の観点からは凍結初代ヒト肝細胞を用いた評価系構築が求められる。しかしながら、ミトコンドリア毒性に起因した評価系の構築に凍結初代ヒト肝細胞を用いることは一般に困難である。理由は、凍結保存されたヒト肝細胞ではミトコンドリアが著しく損傷され、糖源置換後の生存率が低下するからである(Ikeyama et al., 2020)。凍結初代ヒト肝細胞に機能面で類似する細胞（ヒト肝キメラマウス由来の細胞や高機能なヒト肝がん由来細胞である HepaRG）に今回確立したプロトコルを適用し、MPT 依存性細胞死の誘導が見られるかについては今後検証していく必要がある。また、本手法を医薬品開発段階に適用する場合、スクリーニングスループットの観点からは今回の 4 条件（Gluc N, Gluc H/R, Gala N, Gala H/R）比較の煩雑さがボトルネックとなり得る。さらには、実験に用いるマルチガスインキュベーター内の酸素濃度は厳密に保つ必要があり、プレートの出し入れによる実験結果への影響も無視できない。評価結果の安定性の観点からは、例えば培養プレートを小型ガス・チャンバーに別々に封入し、それぞれに直接かつ瞬時にガス供給が行えるシステムを利用するなどの改善余地がある(Zhang et al., 2019b)。

4 つの薬物（アミオダロン、ベンズブロマロン、フルタミド、トログリタゾン）による MPT を介した細胞死は、最大 40%に制限されている。この結果は、MPT を介した直接的な肝細胞死だけでは、重症 DILI 患者に見られる著しい肝細胞死を説明するのに十分でないことを示唆している。肝細胞のミトコンドリア損傷は、toll-like receptor 9 依存的に他の炎症細胞を活性化し、さらなる細胞死を導くことが報告されている(Cai et al., 2017)。そのため、本研究で観察された薬物による MPT 依存性の肝細胞死は、*in vivo* での炎症細胞の活性化にも重要な役割を果たす可能性がある。この考

えを進展させ、例えば今回の肝細胞培養プロトコールに免疫細胞との共培養を組み合わせることで、免疫細胞を介した肝障害の増強メカニズムも含めた DILI 予測が可能になると考えられる。

#### 4-2 ジクロフェナクで MPT 誘導性の細胞死が確認されなかった理由について

試験に用いた 5 種類の MPT 誘導剤のうち、ジクロフェナクだけが MPT 依存性の細胞死を誘導しなかった(Gala H/R、Fig. 1-5, 6)。ジクロフェナクは、ラットとマウスの両者において肝臓の単離ミトコンドリアを膨潤させる (MPT の指標) ことが既知だが、*in vivo* ではラットでのみ LPS と併用時に肝障害が増強する一方(Arakawa et al., 2019) 、マウスではそのような増強がほとんど見られない (Ikeyama et al., unpublished observation)。ラットとマウスでの肝障害の出方の違いは、ジクロフェナクの代謝経路の種差により一部説明できる。ラットでは主に 4'-ヒドロキシジクロフェナクが生成される一方(Niu et al., 2015)、マウスではジクロフェナク-アシルグルクロニド (dic-AG) が主に生成する(Oda et al., 2017)。これらの代謝物については、MPT ポアの構成要素の一つでもある  $F_0F_1$ ATP 合成酵素に対する阻害能が異なることが知られ、マウスの主代謝物である dic-AG は ATP 合成酵素に対する阻害が 4'-ヒドロキシジクロフェナクに比べて弱い(Syed et al., 2016)。ジクロフェナクによる MPT を介した細胞毒性の有無をより詳細に議論するためには、マウス肝細胞を MPT 誘導能のより高いジクロフェナク代謝物 (例えば 4'-ヒドロキシジクロフェナク) で処理するなどの工夫が必要かもしれない。

#### 4-3 薬物高濃度曝露で見られた MPT 非依存的な細胞死について

高濃度の薬物曝露時に観察された細胞死は、Cyp D KO 肝細胞でも抑制されなかった (Fig. 1-5 F)。高濃度の薬物が活性酸素を発生させ、それにより細胞死が誘導された可能性が考えられる。実際、肝臓で MPT 誘導能を持つ NAPQI に代謝変換されることが知られるアセトアミノフェン (APAP) を用いた肝障害モデルにおいて、Cyp D KO マウスは、低用量 (200 mg/kg) では肝障害から保護される(Ramachandran et al., 2011)一方、高用量 (600 mg/kg) では保護されない(LoGuidice and Boelsterli, 2011)ことが分かっている。特に、APAP 高用量投与時に見られる肝障害では、ミトコンドリア膜の Cyp D 非依存的な透過性遷移が誘導されること(Rodriguez-Enriquez et al., 2004)、NO ドナーのペルオキシナイトライト (活性酸素の一種) 分解触媒の併用により肝障害が抑制される (LoGuidice and Boelsterli, 2011)ことなどが報告されている。これらを踏まえると、高濃度の薬物曝露時に観察された細胞死は、酸化ストレスによる MPT 非依存的な細胞死である可能性が考えられ

る。この仮説を検証するためには、酸化ストレスを軽減する薬剤を用いたさらなる検討が必要である。

#### 4-4 MPT 依存的な細胞毒性における H/R と mtROS の重要性

H/R により MPT を介した細胞死が誘導される一方、H/R 非処置群においてはいずれの濃度においても細胞死が誘導されなかった。この結果より、H/R を介した mtROS は MPT 誘導の ON/OFF を制御する重要な因子であることが示唆された。MPT 誘導と mtROS の関連は 2 型糖尿病ラットモデル(Segawa et al., 2018)やスーパーオキシドジスムターゼ-2 ヘテロマウスモデル(Lee et al., 2013)においても同様に示唆されている。さらに、序論で述べた臓器移植に伴い生じる I/R も同様に MPT を誘導することが、脳(Li et al., 2018)、肺(Tian et al., 2018)、心臓(Zhang et al., 2019a)、肝臓(Kalogeris et al., 2012)でそれぞれ報告されている。これらの報告においても同様に、I/R によって誘導され mtROS が MPT 誘導を制御する可能性が示されている。しかしながら、I/R は臓器移植やアテローム硬化、さらには全身性炎症反応症候群とそれに続く多臓器機能不全症候群といった特殊な条件下で生じる現象であり、それに付随する H/R そのものが DILI 一般に共通する背景因子とは考えにくい。

I/R が生じた際に認められる mtROS 誘導の機序については、H/R 以外に、血小板を介した液性因子の関与が報告されている(Bhogal et al., 2012)。H/R により活性化された血小板から放出される CD154 (CD40 のリガンド) が肝細胞表面の CD40 に結合し、mtROS が誘導される。血小板は血液凝固において中心的な役割を果たすことから、血小板に対する薬物の影響も加味することで MPT を介した肝障害の発症機序がより詳細に明らかになると期待される。

## 第5節 小括

上記検討より、マウス肝細胞にて以下の結果が得られた。

1. 糖源置換と高酸素培養を組み合わせることでミトコンドリア機能が亢進した。
2. ミトコンドリア機能賦活時に H/R による mtROS 産生が増加した。
3. H/R によって MPT 誘導が既知の 4 薬物で MPT 依存的な肝細胞死が誘導された。

以上の結果から、これまで MPT 誘導性の肝障害発症機序に I/R によって生じる H/R が重要な因子となることが明らかになった。これら事実は今まで詳細に解明されていなかった MPT 誘導性の肝障害の機序解明に重要な知見となる。さらに、これまで十分な評価法が確立されていなかった MPT 評価系の構築にもつながり、医薬品開発過程における DILI リスク化合物の早期発見と排除に貢献する可能性を示した。

### 第3章 血液凝固に関わる（血小板）がMPT誘導性肝細胞死に及ぼす影響

#### 第1節 序

肝臓は様々な機能を有しており、その1つとしてプロトロンビンなどの血液凝固因子の合成が挙げられる。肝機能低下時では血液凝固因子が低下し血液凝固系に異常が生じることを利用して、肝障害の診断（プロトロンビン時間の延長）に用いられるなど(He et al., 2022)、肝臓と血液凝固については強く関連している。一般的に凝固は、血管壁の損傷により開始され、その後、露出した内皮下の細胞外マトリックスに血小板が急速に接着、活性化、凝集することで行われる。同時に、凝固因子が活性化した血小板の表面に凝集し、架橋フィブリンの網目を形成して血小板栓を強固にする(Sang et al., 2021)。特に血小板はコラーゲンなどの細胞外マトリックスに対する受容体を有しており、止血時に活性化すること、さらに活性化した際には赤血球と相互作用することで凝固に関わるプロトロンビン合成が促進することが分かっている(Klatt et al., 2018)。このように血小板が血液凝固系の中で主たる役割を果たしている。

近年、血小板はDILIとの関連も注目されている。DILI発症患者の原因薬物の調査によると、抗血小板薬は他の薬効群に比べてDILI報告件数が少ないことに加え、DILIの慢性化例も少ないことが示されており(Licata et al., 2017)、血小板活性化がDILI発症に何らかに関わる可能性が考えられる。また、我々が行なった先行研究においても、LPSとジクロフェナクをラットに共投与した際に観察される肝障害が、直接プロトロンビン阻害剤であるヘパリンによって抑制されることを報告している(Arakawa et al., 2019)。これら結果を踏まえて前章では、血液凝固に起因する一過性低酸素を利用することで*in vitro*においてMPTを介した細胞死を誘導することに成功したものの、最終的にH/RそのものがDILI一般に共通の背景因子とは考えにくいとの考察に至った。そこで本章では、血液凝固に至るまでの過程に着目し、その主たる因子である血小板のDILI発症への関与を検証することとした。

血小板は血液凝固以外にも臓器損傷からの修復や免疫応答などの重要な役割を持つことがすでに知られている(Lisman and Porte, 2016)。中でも免疫応答については、血液中で好中球やマクロファージとの相互作用を介して自然免疫応答を制御するほか(Lisman and Porte, 2016)、肝類洞を通過する際には肝臓常在型マクロファージであるクッパー細胞に一時接着することで「Touch & Go」と呼ばれる特殊な血管内動態を示し、細菌感染に対する防御をはじめとする自然免疫応答を制御する(Wong et al., 2013)。肝障害時の応答として、中和抗体を用いて血小板を除去するとAPAP誘導性の肝障害

を抑制できることや(Miyakawa et al., 2015)、血小板特異的にトランスフォーミング増殖因子- $\beta$  を欠損させることで四塩化炭素による肝繊維化を抑制すること(Ghafoory et al., 2018)が報告されている。また、部分肝切除モデルを用いた検討では、肝細胞にエンドサイトーシスを介して取り込まれ、内包される肝細胞増殖因子や上皮成長因子等をコードする mRNA を肝細胞に受け渡すことで肝再生を促進することが示されるなど(Lisman and Porte, 2016)、血小板と肝臓の相互作用は通常時ならびに障害時のさまざまな状況で重要な役割を持つ。

興味深いことに、本研究で注目している MPT は血小板においても重要な役割を持つことが報告されている。血小板は通常、刺激を受けることで活性化し、細胞内に含まれる  $\alpha$  顆粒の放出・血小板同士の結合を介した一次止血などの役割を有する(Lisman and Porte, 2016)。一方で、強い刺激を受けた場合には小胞化、フィブリノーゲンの保持、高頻度でホスファチジルセリン (PS) を細胞外に露出するなど通常とは異なる活性化を起こし、この異常活性化には MPT が関与することが報告されている(Jobe et al., 2008)。以上の報告から、MPT 誘導性 DILI 発症には肝細胞のみならず血小板における MPT 誘導も関与する可能性を考えた。

そこで本研究では、MPT を介した血小板活性化が肝障害発症に及ぼす影響を APAP 肝障害モデルで評価した。APAP は解熱鎮痛薬として世界中で使用されるが、安価で容易に入手可能なため誤った服用方法による肝障害の報告は後を立たず、現在においても欧米で問題となっている(Lee, 2017)。APAP における肝障害メカニズムについては APAP の反応性代謝物である N-アセチル-p-ベンゾキノニン (NAPQI) による MPT の誘導がすでに *in vivo/iv vitro* にて証明されている(Masubuchi et al., 2005; Ramachandran et al., 2011)。また APAP 肝障害モデルを用いた近年の研究では、肝障害発症のごく初期から血小板が肝臓内に蓄積すること、中和抗体で血小板を除去することにより肝障害が抑制されることが示されており(Miyakawa et al., 2015; Shan et al., 2021)、肝障害モデルとして適切と考えた。以上より本章では、APAP をモデル薬物とし、MPT 誘導性の肝障害発症に血小板での MPT を介した異常活性化が寄与する可能性を、マウス *in vivo* にて検証した。

## 第2節 方法

### 試薬

本研究で用いた主な試薬を以下に示す。塩類など一般的な試薬はここでは記載しない。また、下記記載およびその他の試薬はすべて分析用、特級、生化学あるいは細胞培養用試薬を用いた。第2章で用いた試薬についてはここでは省略する。

4-hydroxy acetanilide (APAP)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)
NAPQI	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cyclosporine A (CsA)	Fujifilm Wako Chemicals (Osaka, Japan)
Rotenone	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

### 実験動物

C57BL/6J 雄性マウス (5-8 週齢) を日本チャールズリバー(株)より購入した。購入したマウスは日本エスエルシー(株)より購入した FR-1 を与え、水および飼料は自由に摂取させた。購入したマウスは温度コントロール (25±2°C) の環境下にて 12 時間明暗サイクルで飼育し、購入後最低 1 週間以上飼育したものを実験に使用した。すべての動物は National Institutes of Health により刊行されたガイドラインに従って処置を行った。特に骨髄移植に用いた C57BL/6J 雄性マウス (5 週齢) については、ケージ別換気式アイソラック (LABEX of MA, Worcester, MA, USA) を用いてより無菌的に飼育を行った。

CypD KO マウスについては第2章と同じ。

### マウス血小板の単離と血小板の活性化

CypD LM または CypD KO マウスを麻酔下で経静脈採血し、3.2% クエン酸ナトリウム溶液 (最終濃度: 0.32%) を含む 1.5 mL チューブに移す。100 x g 5 分で遠心し、上清を 200 x g 5 分遠心することで多血小板血漿画分を得る。その後、1000 x g 10 分で遠心することで血小板を得た、得られた血小板は  $2 \times 10^7$  /mL となるように Tyrode modified buffer に懸濁し、血小板の活性化評価に用いた。血小板の活性化評価については血小板 (最終濃度  $5 \times 10^6$  /mL) にトロンピンと試験薬物 (APAP、NAPQI、トログリタゾン) を合わせて曝露し、30 分 37°C でインキュベートする。30 分後の活性化

状態は下記にまとめた蛍光標識抗体によって曝露と同時に染色を行い、EC800 (Sony, Tokyo, Japan) を用いたフローサイトメトリーにて評価し、CD41 陽性細胞中の PS 陽性細胞の割合を血小板活性化の指標とした

抗体名 (クローン名)	製造元	希釈倍率
PE Rat anti-mouse CD41 (MwReg30)	BioLegend	1:500
FITC Annexin V	BioLegend	1:500

各種 Buffer の組成は以下に示す。

#### Tyrode modified buffer (pH 7.4)

NaCl	94.58 g/L	MgCl <sub>2</sub>	0.20 g/L
KCl	0.22 g/L	Glucose	0.90 g/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.12 g/L	Bovine serum albumin (BSA)	0.5 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	1 g/L	CaCl <sub>2</sub>	0.22 g/L
HEPES	4.77 g/L		

#### APAP 投与肝障害モデルと肝障害評価

実験のタイムコースは、過去の報告(Miyakawa et al., 2015)に従った。具体的には野生型雄性マウス (または骨髄移植雄性マウス) を 15 時間絶食させ、300 mg/kg APAP またはその陰性対照である生理食塩水を腹腔内投与し絶食を解除した。各時間において頸静脈採血を行い、予めヘパリンナトリウム処置済み 1.5 mL チューブに移し 8,000 x g 3 分にて遠心し血漿を得た。肝障害評価は ALT 活性評価と肝切片の組織学的評価により行った。ALT 活性評価については、トランスアミナーゼ CII-テストワコー(POP・TOOS 法) (Fujifilm Wako Chemicals, Osaka, Japan) を用いてプロトコル通りに行なった。肝切片の作製については、マウスから単離した肝臓を 5 mm 四方のブロックに切り出し、4% パラホルムアルデヒドで 24 時間 4 °C にて固定し、15% スクロース溶液そして 30% スクロース溶液で洗浄を行った。固定した切片は 15% スクロース溶液と O.C.T. Compound (サクラファインテックジャパン(株)) を 1:2 で混合した溶液で包埋し、クライオスタット (CM3050S, Leica) によ

り-15-20°C 下で 8  $\mu$ m の薄切切片を作成した。作製した切片は風乾させ、使用時まで-80°Cで保存した。

#### 骨髄移植を用いた骨髄由来細胞 (BMDCs) 特異的遺伝子欠損マウスの作製

BMDCs 特異的遺伝子欠損マウスの作製方法は、過去の報告(Miyakawa *et al.*, 2015)に従った。具体的には、内因性骨髄細胞を破壊するため、6 週齢の野生型 C57BL/6J 雄性マウスに、MBR-1520R-3 X 線照射装置 (日立パワーソリューションズ(株)) を用いて、2 時間間隔で 2 回、5.5 Gy (合計 11 Gy) を照射した。CypD LM または CypD LM のマウスの大腿骨と脛骨から骨髄細胞を分離し、尾静脈から照射マウスに注入した。マウスは前述の方法で飼育し、4 週間、FR-1 とエクテシン液 (明治製菓ファルマ) (1 mg/mL) 入り滅菌水を自由にアクセスさせた。その後、2 週間は抗生物質無添加の水を使用した。骨髄移植マウスでの検討では、過去の報告(Miyakawa *et al.*, 2015)から野生型マウスと同様の肝障害が生じる、やや低用量の APAP (250 mg/kg) を使用した。骨髄細胞特異的に CypD が欠損していることは肝臓および血小板から抽出したタンパクを用いたウエスタンブロッティングにて確認している (Fig. 2-1A)

#### マウス肝臓の H&E 染色

作製した薄切切片を常温にて静置した後(10-15 分)、PBS に 10 分程浸潤させた。軽く精製水にて水洗し、マイヤー・ヘマトキシリン液に 5 分浸ける。そのあと精製水で水洗した後、40°C の精製水に 4 分浸け色だしを行った。0.5% エオシンアルコール液に 8 分浸した後、精製水にて水洗し以下の条件にて脱水処理を行った。その後ヘキサンにて透徹処理 4 分行い、Entellan® (Merck Millipore; Billerica, MA, USA)で封入し BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan) にて画像を取得した。

#### 脱水条件

70% EtOH	30 秒
90% EtOH	1 分
99% EtOH	10 分
無水エタノール	30 秒

## 組織免疫染色

凍結保存した切片を常温に戻し PBS に 10 分浸潤処理した後、0.1% BSA in PBS にて希釈した 1 次抗体を反応させた。反応後 PBS にて洗浄後、0.1% BSA in PBS で希釈した蛍光標識 2 次抗体及び Hoechst 33342 を室温にて 1 時間反応させた。反応後 PBS にて洗浄後、VECTASHIELD (Vector Laboratories) で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss) にて画像を取得した。

使用した抗体、染色試薬は以下の通りである。

抗体名 (クローン名)	製造元	希釈倍率
Rat anti-mouse CD41 (MwReg30)	Becton Dickinson	1:400
Goat anti- albumin (11657)	Bethyl Laboratories	1:400
5 mg/mL Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific	1:1000

## マウス肝臓内浸潤 BMDCs の評価

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、肝臓を単離する。肝臓を SC-2 にて脱血後、Collagenase buffer にてすりつぶし 40 分間 37°C にした水浴で振とうさせる。その後 100  $\mu$ m セルストレーナーを通して 50 mL 遠沈管に移す。その後、マクロファージ、好中球の単離法 (A 法) と血小板の単離法 (B 法) に分けるため単離した肝臓を含んだ Collagenase buffer を 2 つに分ける。A 法では 600 x g で 7 分遠心後、上清を除去し ACK lysis buffer を加え 5 分間静置する。その後 2% FBS in PBS にて反応を停止させ、600 x g で 7 分遠心する。上清を除去し 35% Percoll 溶液で再懸濁し、600 x g で 15 分遠心し、死細胞を除去した。その後、2% FBS in PBS で再懸濁し、600 x g で 7 分遠心する。上清を除去し 500 倍希釈 Fc blocker (2.4 G2; BD PharMingen, San Diego, CA) in 2% FBS in PBS で 30 分静置する。その後 600 x g で 7 分遠心し、沈殿画分を下記にまとめる蛍光免疫染色を行った。B 法では 1,300 x g で 10 分遠心後、上清を除去し ACK lysis buffer を加え 5 分間静置する。その後 2% FBS in PBS にて反応を停止させ、1,300 x g で 10 分遠心する。上清を除去し 35% Percoll 溶液で再懸濁し、2,000 x g で 10 分遠心し、死細胞を除去した。その後、2% FBS in PBS で再懸濁し、1,300 x g で 10 分遠心する。上清を除去し 500 倍希釈 Fc blocker (2.4 G2; BD PharMingen, San Diego, CA) in 2% FBS in PBS で 30 分静置する。その後 1,300 x g で 10 分遠心し、沈殿画分を下記にまと

める蛍光免疫染色を行った。蛍光は EC800 (Sony, Tokyo, Japan) を用いたフローサイトメトリーにて評価した。得られた結果は Flowlogic ソフトウェア (Inivai Technologies, Victoria, Australia) にて解析を行った。蛍光は EC800 (Sony, Tokyo, Japan) を用いたフローサイトメトリーにて評価した。得られた結果は Flowlogic ソフトウェア (Inivai Technologies, Victoria, Australia) にて解析を行った。また各種細胞は下記の結果に従ってゲートを行った。

好中球: Ly6G<sup>+</sup>

M1 マクロファージ: Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>

M2 マクロファージ: Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>

血小板: CD41<sup>+</sup>

抗体名 (クローン名)	製造元	希釈倍率
FITC anti-mouse F4/80 (BM8)	BioLegend	1:400
PE anti-mouse Ly6G (1A8)	BioLegend	1:400
PE/Cy7 anti-mouse/human CD11b (M1/70)	BioLegend	1:400
APC anti-mouse Ly6C (HK1.4)	BioLegend	1:400
PE Rat anti-mouse CD41 (MwReg30)	BioLegend	1:400

各種 Buffer の組成は以下に示す。

<u>10 x SC-2 buffer</u>		<u>SC-2 buffer (pH 7.4)</u>		<u>Collagenase buffer (pH 7.4)</u>	
NaCl	80 g/L	10 x SC-2 buffer	100 mL/L	SC-2 buffer	20 mL
KCl	4 g/L	CaCl <sub>2</sub>	0.444 g/L	DNaseI	0.4 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.036 g/L	Glucose	2 g/L	Collagenase	16 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.882 g/L				
HEPES	23.83 g/L				

ACK lysis buffer

NH <sub>4</sub> Cl	8.29 g/L
KHCO <sub>3</sub>	1 g/L
2Na-EDTA	37.2 mg/L

35% Percoll 溶液

RPMI1640	2.6 mL
Percoll	1.28 mL
10 x HBSS	0.12 mL

## マウス肝臓ミトコンドリアの単離

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、肝臓を単離する。脱血 Buffer により脱血後、同 Buffer 中でホモジェナイズし、770 x g で 5 分遠心分離する。上清を 9800 x g で 10 分遠心分離し、上清を除去したのち沈殿を遠心 Buffer で懸濁。4500 x g で 10 分遠心分離した。APAP 投与マウス肝ミトコンドリアについては沈殿を洗浄後、懸濁 Buffer に懸濁した。薬物による MPT 誘導能の評価については再度沈殿を遠心 Buffer で懸濁し 2000 x g で 2 分遠心分離したのち連続して 4500 x g で 8 分遠心分離する。沈殿を洗浄後、懸濁 Buffer に懸濁し、Lowry 法にてタンパク定量して実験に使用した。脱血後の操作についてはすべて氷上で行った。

各種 Buffer の組成は以下に示す。

脱血 buffer (pH 7.4)

Sucrose	94.58 g/L
100 mM HEPES-KOH (pH 7.4)	100 mL/L
EGTA	183.26 mg/L

遠心 buffer (pH 7.4)

Sucrose	94.58 g/L
100 mM HEPES-KOH (pH 7.4)	100 mL/L
EGTA	109.96 mg/L

懸濁 buffer (pH 7.4)

Sucrose	94.58 g/L
100 mM HEPES-KOH (pH 7.4)	100 mL/L

## ミトコンドリアの膨潤の観測 (Swelling アッセイ)

30°C に保った Swelling buffer 中にミトコンドリア (最終濃度: 0.5 mg protein/mL) を加えて 1 分程度 pre-incubation したのち薬物を加えて反応を開始し、紫外可視分光光度計 (UV-2550、島津製作所(株)) にて 540 nm の吸光度の変化を観測した。APAP 投与による MPT 感受性の変化については

MPT 誘導が既知である  $\text{Ca}^{2+}$  (最終濃度: 12.5  $\mu\text{M}$ ) をミトコンドリアに曝露してから 200 秒間での吸光度の変化量を MPT 感受性の指標とした。

各種 Buffer の組成は以下に示す。

#### Swelling buffer (pH 7.4)

Sucrose	42.78 g/L
100 mM HEPES-KOH (pH 7.4)	100 mL/L
KCl	4.95 g/L
Succinate	1.18 g/L
Rotenone	0.99 mg/L

#### 呼吸機能の評価

呼吸 Buffer 中にミトコンドリア (最終濃度: 1 mg/mL)、コハク酸 (最終濃度: 4 mM) を加えて Buffer 中の酸素濃度を SDR SensorDish Reader (Presens) を用いて経時的に測定した。その 2 分後に ADP (最終濃度: 0.2 mM) を加えた。ADP 添加による酸素消費の亢進が収束するのを待って測定を終了した。ADP 存在下の酸素消費速度 (State 3) と ADP 枯渇後の酸素消費速度 (State 4) を計算し、その比 (State 3/State 4) を Respiratory Control Ratio (RCR) として算出した結果を呼吸機能とした。

各種 Buffer の組成は以下に示す。

#### 呼吸 buffer (pH 7.4)

Sucrose	77.02 g/L
KCl	0.745 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.02 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.68 g/L
EGTA	0.19 g/L
100 mM Tris-HCl (pH 7.4)	200 mL/L

## 膜電位の測定

Swelling Buffer 中に Rhodamine123 (最終濃度: 0.5  $\mu$ M)、ミトコンドリア (最終濃度: 1 mg protein/mL) を加えて 5 分インキュベーションし、8000 x g で 30 秒間遠心分離した。上清をマイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダー (FilterMax F5、Molecular Devices) にて Ex: 485nm / Em: 535nm で蛍光強度を測定した。膜電位は、蛍光強度から計算した上清中の Rhodamine123 濃度より Nernst の式を用いて算出した。

## 統計解析

第 2 章と同じ

### 第3節 結果

#### 3-1 APAP は MPT を介して血小板を活性化する

血小板は MPT を介した活性化において PS を高頻度に細胞外に露出することが報告されている (Jobe *et al.*, 2008)。また、MPT を介した血小板の活性化には血小板の凝固因子であるトロンビンによる mtROS の産生が必要であることも報告されている (Choo *et al.*, 2012)。そこで、3 薬物 (APAP、NAPQI、トログリタゾン) について肝ミトコンドリア MPT の誘導および MPT 依存的な血小板の活性化について検討した (Fig. 2-1)。肝ミトコンドリアでは 3 薬物のうち、2 薬物 (NAPQI、トログリタゾン) において肝ミトコンドリアの膨潤を確認できた。このミトコンドリアの膨潤は Cyp D に結合し MPT を阻害する CsA の併用により抑制された (Fig. 2-1A)。またマウス血小板における MPT 依存的な活性化を確認するため、マウス全血より単離した血小板にトロンビンと薬物を共曝露し 30 分後に細胞外に PS を露出する細胞 (以下、活性化血小板) の割合を評価した (Fig. 2-1B)。その結果、トロンビン併用によりミトコンドリアでの結果と同様に 2 薬物 (NAPQI、トログリタゾン) において有意な活性化血小板の増加が確認された。この活性化血小板の増加が MPT 依存的であるかを検証するため、CypD KO マウスより単離した血小板においても同様に評価を行った結果、活性化血小板の増加は確認されなかった。以上の結果より、MPT 誘導薬物は血小板の MPT を介した活性化を誘導することが明らかとなった。

#### 3-2 APAP 投与における肝内浸潤細胞プロファイル

APAP による肝障害では、BMDCs である血小板 (Miyakawa *et al.*, 2015) ・好中球 (Yang *et al.*, 2019) ・マクロファージ (Chauhan *et al.*, 2020) が肝内に蓄積することが報告されている。本検討では肝障害発症過程における BMDCs の関与を明らかにするため、APAP 投与後 1-6 時間における肝障害への影響 (Fig. 2-2A) および BMDCs (血小板・マクロファージ・好中球) の肝内への浸潤 (Fig. 2-2B) を評価した。肝障害の評価は肝障害マーカーとして知られている血中への ALT の漏出量を測定した。Fig. 2-2A で示すように投与後 6 時間でのみ有意な ALT の上昇を認めた。また肝臓内に蓄積した血液細胞を評価した結果、血小板、マクロファージについては投与後 1 時間より有意に上昇し、好中球は 6 時間後において有意に上昇した。その一方でマクロファージの分化状態については APAP の投与による変化は見られなかった。また、APAP 投与時間依存的な血小板の蓄積につい

て、肝切片を用いた蛍光免疫染色による評価も行った。その結果フローサイトメトリーでの結果と同様に投与時間依存的に血小板を示す赤色蛍光の集積が確認された (Fig. 2-2C)。

### 3-3 APAP 投与におけるミトコンドリア機能変化

APAP 肝障害モデルにおいて、肝障害が十分に認められた時点で単離した肝ミトコンドリアでは  $\text{Ca}^{2+}$  により誘導される MPT 感受性が增大することが報告されている (Masubuchi et al., 2005)。本検討では肝障害発症過程に着目し、ALT の有意な上昇を認める前、つまり APAP 投与後 1 または 2 時間後における肝ミトコンドリアの機能 (Fig. 2-3A) および MPT 感受性 (Fig. 2-3B) の評価を行った。肝ミトコンドリアの機能についてはミトコンドリアの呼吸鎖複合体における呼吸機能の指標である respiratory control ration (RCR) 値とプロトン濃度勾配によって生じる膜電位を指標とした。その結果 Fig. 2-3A で示すように、APAP 投与群では呼吸機能・膜電位ともに有意な低下が認められた。また MPT 感受性については Fig. 2-3B で示すように、 $\text{Ca}^{2+}$  非曝露時では APAP 投与の有無に関わらず有意な吸光度の低下が認められなかったの対し、 $\text{Ca}^{2+}$  曝露時では APAP 投与群において有意な吸光度の低下が確認された。以上の結果より、APAP 投与により ALT の上昇前にミトコンドリアの機能低下・MPT 感受性の増大が起きることが確認された。

### 3-4 APAP による肝障害と血小板蓄積は BMDCs の MPT 依存的に起こる

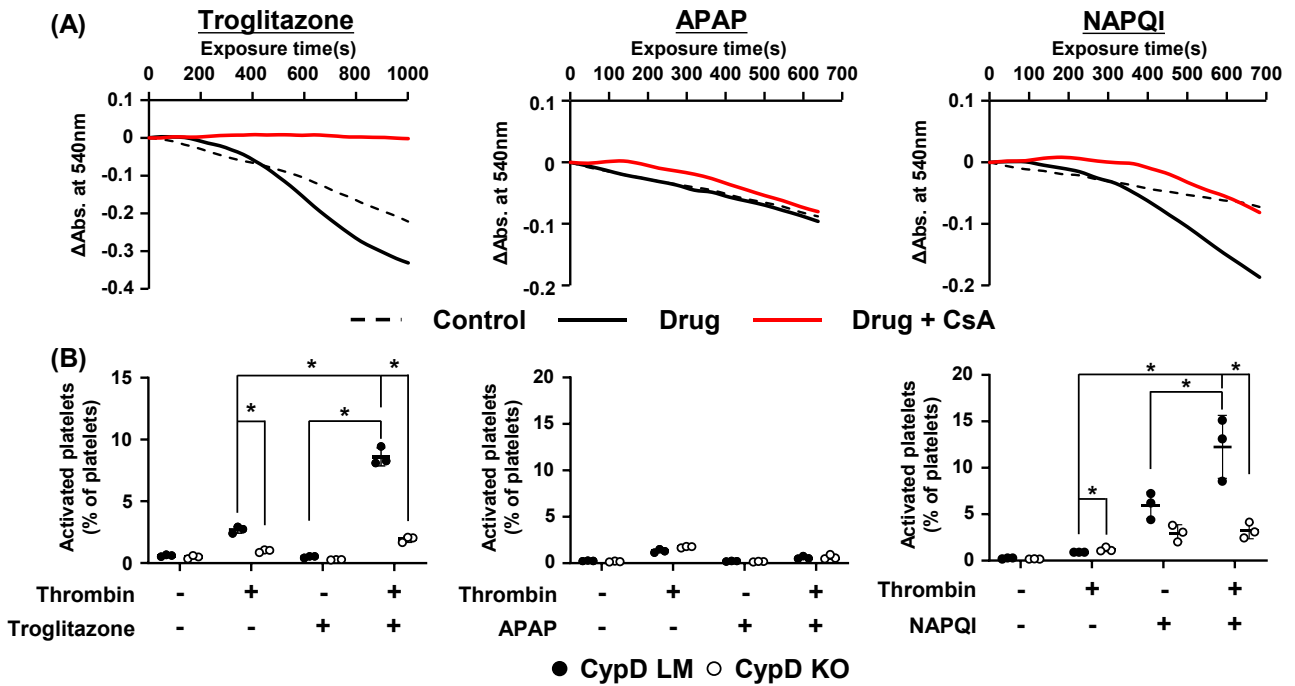
APAP による肝障害は BMDCs の 1 つである血小板の除去によって抑制されることが報告されている (Miyakawa et al., 2015)。3-4 では血小板の MPT が APAP 肝障害発症過程で関与することを検証するため、BMDCs 特異的 CypD KO マウス (BM-KO) およびその対照群 (BM-LM) を作製した。BMDCs 特異的な CypD の欠損は、血小板と肝臓の CypD タンパク発現評価において BM-KO マウスの血小板サンプルでのみ CypD のシグナルが消失することで確認している (Fig. 2-4A)。このマウスを用いて 3-2 で見られた APAP による肝障害 (Fig. 2-4B and C) ならびに血液細胞の肝内への浸潤 (Fig. 2-4D and E) を評価した。肝障害については、APAP 投与 6 時間後に BM-LM で有意な ALT 上昇が認められた。この ALT の上昇は BM-KO で有意に抑制されていた (Fig. 2-4A)。また 6 時間後の時点の肝組織切片を HE 染色で評価したところ、BM-LM では中心静脈を中心に広範な肝細胞死が認められ、既報通りの APAP による肝障害が再現されていることが確認された。また BM-LM で見られた肝細胞死は BM-KO では部分的に抑制されていた (Fig. 2-4B)。血液細胞の肝組織への浸潤については BM-LM では血小板のみが投与時間依存的にその割合が増加しており、マクロファ-

ジの割合またはその分化状態は変化がなかった。BM-KO では血小板・マクロファージともに APAP 投与による変化が確認できなかった (Fig. 2-4C)。また、APAP 投与後 2 時間後に見られた血小板の蓄積について、肝切片を用いた蛍光免疫染色による評価も行った。その結果 Fig. 2-4E で示すように BM-LM で血小板を示す赤色蛍光の集積が確認された。さらに BM-LM で見られた血小板の蓄積は、BM-KO では確認されなかった。

### 3-5 APAP による肝ミトコンドリア機能変化は BMDCs の MPT 依存的に起こる

3-3 では野生型マウスで APAP 投与により肝ミトコンドリア機能の抑制と MPT 感受性の増強が起こることを確認した。この変化が BMDCs の MPT 依存的であるかを検証するため、BM-LM と BM-KO でも同様の評価を行った。その結果、BM-LM の肝ミトコンドリアでは APAP 投与 1 時間後より呼吸機能と膜電位の有意な低下が認められた。一方で、BM-KO の肝ミトコンドリアではこれらの有意な低下は確認されなかった (Fig. 2-5A)。さらに、肝ミトコンドリアの MPT 感受性を BM-LM で検討した結果、Ca<sup>2+</sup>非曝露では吸光度の有意な低下を認めなかった一方で、Ca<sup>2+</sup>曝露群では APAP 投与 1 時間後より吸光度の有意な低下を認めた。APAP 投与による MPT 感受性増強は BM-KO では観察されず、肝ミトコンドリアの MPT 感受性増強は BMDCs の MPT 依存的に生じることが示された (Fig. 2-5B)。

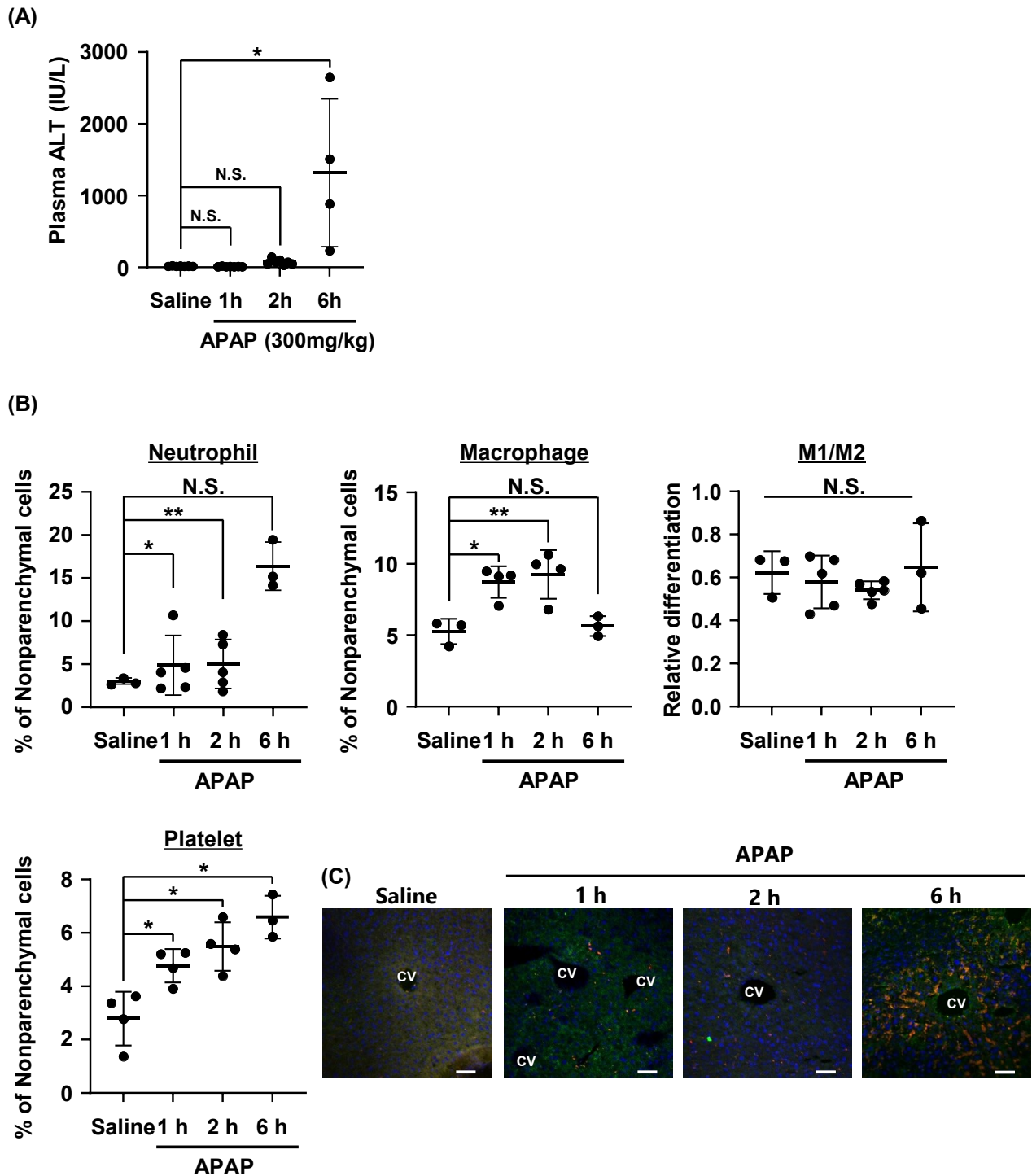
Fig. 2-1



**Fig. 2-1. Platelets was also activated by APAP via MPT induction**

MPT was evaluated using a swelling assay (A) and platelet activation (B). (A) In swelling assay, the absorbance of mitochondrial preparations at 540 nm was monitored after the addition of 3 drugs (12.5  $\mu$ M troglitazone, 5 mM APAP and 50  $\mu$ M NAPQI). CsA (5  $\mu$ M) was added at same time with drug treatment to confirm MPT dependency. (B) In platelet activation, platelets isolated from CypD LM or CypD KO were treated with drug (12.5  $\mu$ M troglitazone, 5 mM APAP and 25  $\mu$ M NAPQI) and/or thrombin for 30 min. The activate platelet was assessed by PS externalization using flowcytometric analysis. Data is shown as means  $\pm$  S.D., n=3 \* $p$ <0.05.

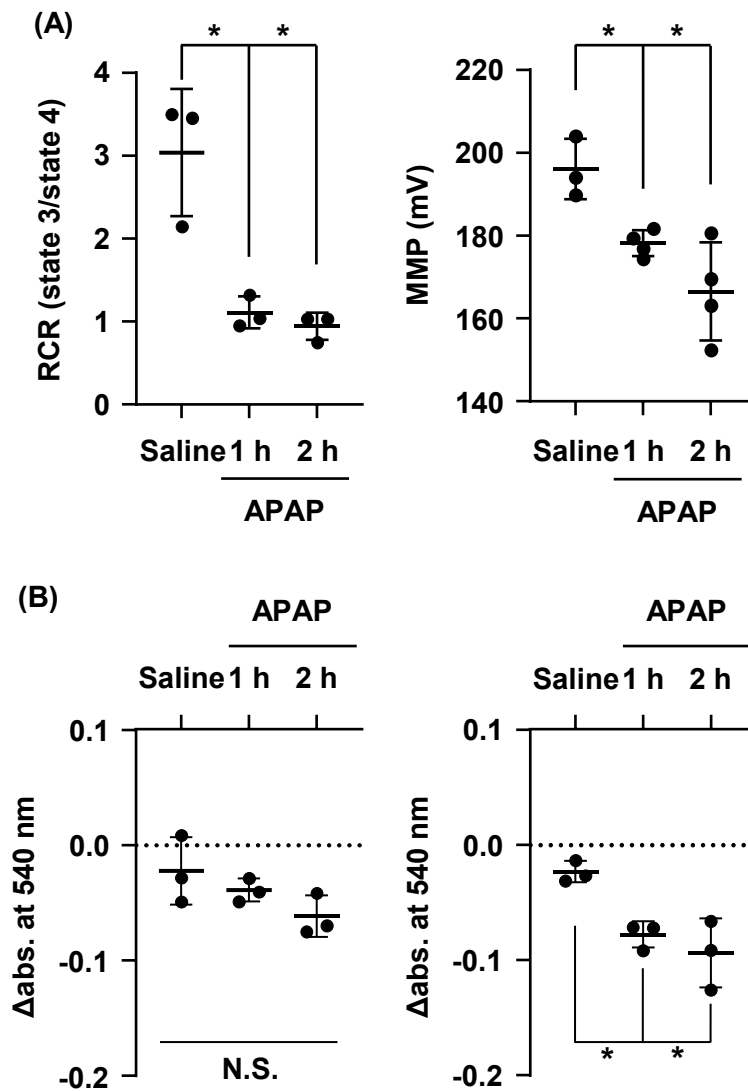
Fig. 2-2



**Fig. 2-2. Effect on liver injury and BMDCs infiltration by APAP in wild type mice.**

Mice were administered APAP (300 mg/kg) i.p or saline vehicle after overnight fasted. (A) ALT activity in plasma. (B) Assessed infiltrated BMDCs (neutrophil, macrophage, macrophage differentiation and platelet) in liver at 1, 2 and 6h after treatment APAP or 6h after saline vehicle treatment. (C) At 1, 2 and 6 h after treatment APAP or saline vehicle, liver sections in each mouse were stained with anti- CD41 (red, platelet marker), anti-albumin (green, hepatocyte marker), and Hoechst 33342 (blue, nuclei). Data are shown as means  $\pm$  S.D. (n = 3-7, \* $p$  < 0.05).

Fig. 2-3

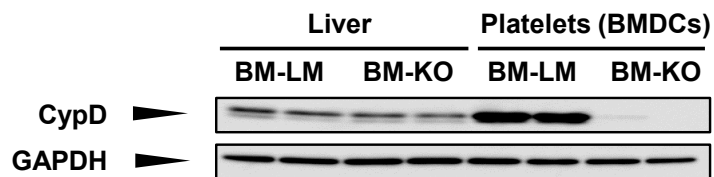


**Fig. 2-3. Effect on mitochondrial function by APAP treatment in wild type mice**

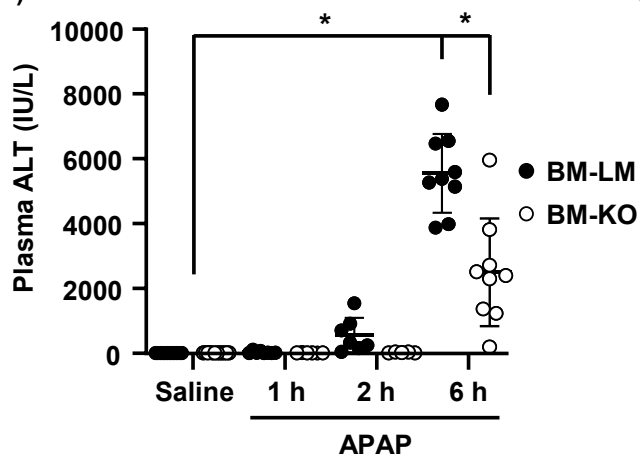
Mice were administered APAP (300 mg/kg) i.p or saline vehicle after overnight fasted. (A) In mitochondrial function, respiration activity (left panel) and membrane potential (right panel) was measured using mitochondria isolated from mice with APAP (1, 2 and 6 h treatment) or saline treatment. (B) MPT sensitivity in mitochondria isolated from mice with APAP (1, 2 and 6 h treatment) or saline treatment was evaluated by absorbance at 540 nm with water (as control; left panel) or  $Ca^{2+}$  (12.5  $\mu$ M) treatment (right panel). Data are shown as means  $\pm$  S.D. (n = 3-4, \* $p$  < 0.05).

Fig. 2-4

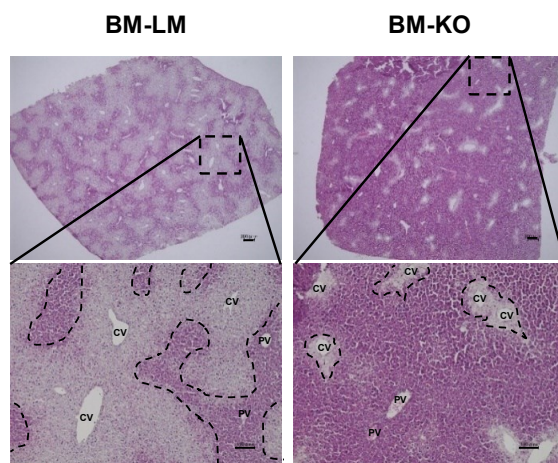
(A)



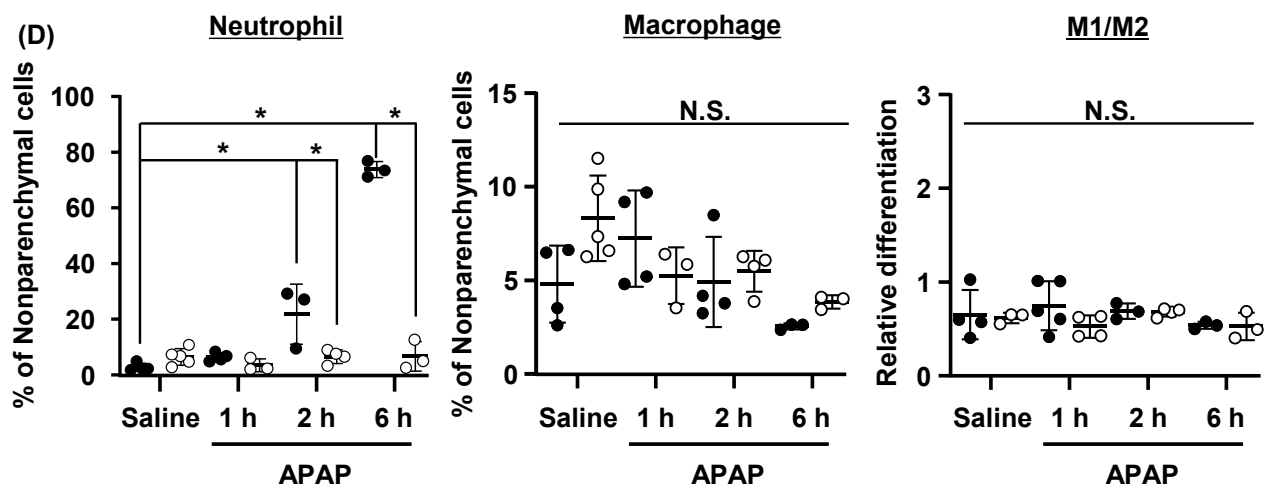
(B)



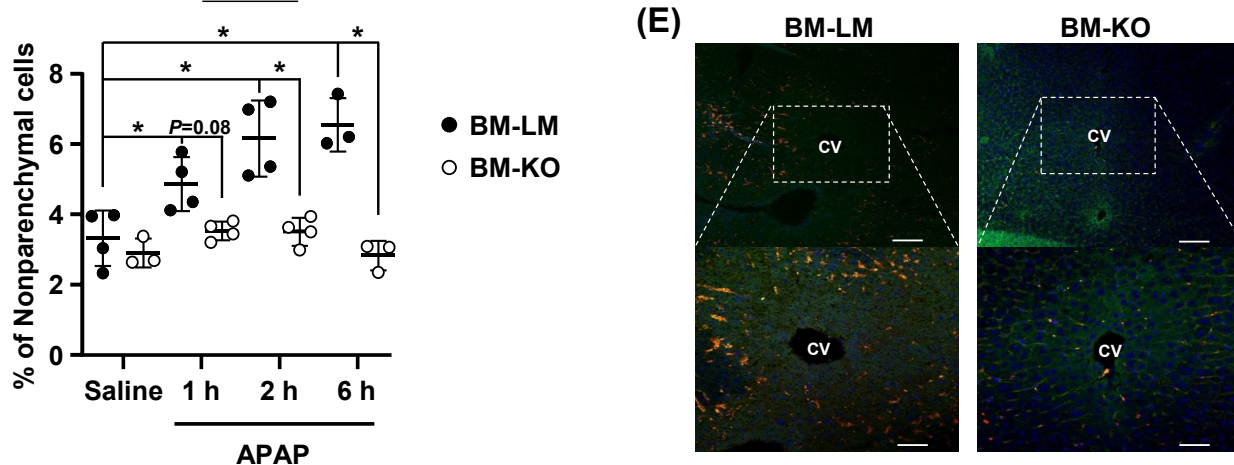
(C)



(D)



(E)



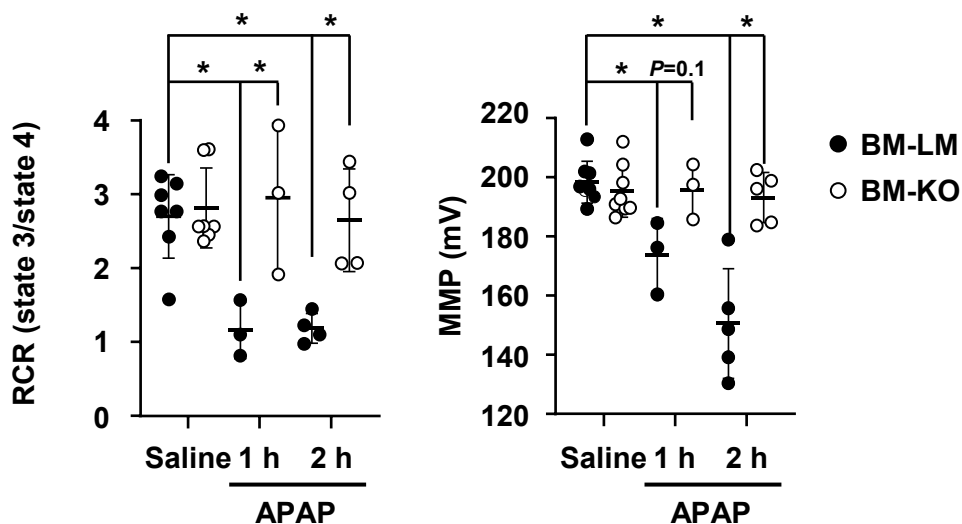
## Fig. 2-4 continued

### Fig. 2-4. Effect on liver injury and BMDCs infiltration by APAP in Bone marrow transplantation (BMT) mice

(A) Representative western blotting of liver and platelets protein extracts in BM-LM and BM-KO mice with anti-CypD and anti-GAPDH. (B-E) BM-LM and BM-KO mice were administered APAP (250 mg/kg) i.p or saline vehicle after overnight fasted. (B) ALT activity in plasma at 1, 2 and 6 h with APAP or saline vehicle (6 h). (C) H&E staining of liver sections in 6 h treatment BM-LM and BM-KO mice. The area enclosed by the dotted line means hepatocellular necrosis region. Scale bar = 300  $\mu\text{m}$  (upper panel) or 100  $\mu\text{m}$  (lower panel). (D) Assessed infiltrated BMDCs (neutrophil, macrophage, macrophage differentiation and platelet) in liver at 1, 2 and 6h after treatment APAP or saline vehicle (6h). (E) At 2 h after treatment, liver sections in each mouse were stained with anti- CD41 (red, platelet marker), anti-albumin (green, hepatocyte marker), and Hoechst 33342 (blue, nuclei). Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (upper panel) or 50  $\mu\text{m}$  (lower panel). Data are shown as means  $\pm$  S.D. (n = 3-7, \* $p$  < 0.05).

Fig. 2-5

(A)



(B)

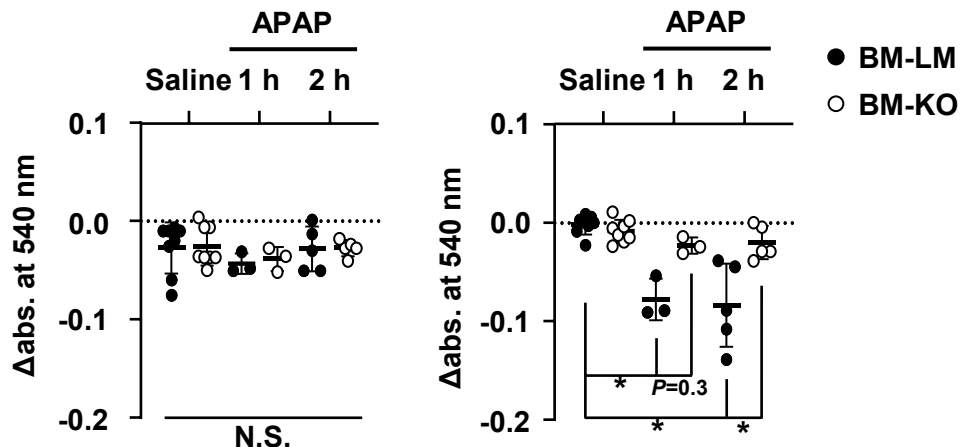


Fig. 2-5. Effect on mitochondrial function by APAP treatment in BMT mice

BM-LM and BM-KO Mice were administered APAP (250 mg/kg) i.p or saline vehicle after overnight fasted. (A) In mitochondrial function, respiration activity (left panel) and membrane potential (right panel) was measured using mitochondria isolated from mice with APAP (1, 2 and 6 h treatment) or saline treatment. (B) MPT sensitivity in mitochondria isolated from mice with APAP (1, 2 and 6 h treatment) or saline treatment was evaluated by absorbance at 540 nm with water (as control; left panel) or  $\text{Ca}^{2+}$  (12.5  $\mu\text{M}$ ) treatment (right panel). Data are shown as means  $\pm$  S.D. (n = 3-7, \* $p$  < 0.05).

## 第4節 考察

### 4-1 APAP 肝障害発症機序における血小板の関与

本章では、過去の報告で見られたように APAP による肝障害の初期段階から血小板が肝臓内に蓄積すること (Fig. 2-2)、骨髄特異的に CypD を欠損させることで APAP による肝障害を抑制できるとともに肝臓内への血小板の蓄積が抑制されること (Fig. 2-4D and E) を確認した。APAP による肝障害では、BMDCs である血小板(Miyakawa et al., 2015)・好中球(Yang et al., 2019)・マクロファージ (Chauhan et al., 2020)が肝障害発症に関与することが報告されている。しかし、肝障害発症より前の影響に着目してこれら細胞の関与を詳細に調べた研究は、血小板を除いて存在しなかった。そのため本研究では APAP 投与後のごく早期の段階における BMDCs の肝組織への浸潤も併せて評価した。その結果、肝障害発症よりも前に血小板とマクロファージの浸潤が見られること、その中でも特に血小板の浸潤が BMDCs の MPT 依存的に生じることが確認された (Fig. 2-2C, 2-4D and E)。これらの結果より、血小板の MPT が肝障害発症に何らかの寄与することが考えられた。血小板が肝細胞の障害に影響するメカニズムについては、物理的な肝細胞との相互作用による直接的な影響、血小板から放出される液性因子による間接的な影響、の2つの可能性が考えられる。物理的な相互作用については、活性化血小板が肝細胞に RNA を転移させることで肝細胞の性質を変えることがすでに報告されている(Kirschbaum et al., 2015)。間接的な影響については、H/R の下流で血小板が活性化し、放出された CD154 (CD40 のリガンド) が肝細胞表面の CD40 に結合することで mtROS が誘導され、肝細胞死に至ることが報告されている(Bhogal et al., 2012)。特に mtROS は薬物を介した MPT 誘導性の細胞死に重要であることは第2章の考察 (4-4) で述べた通りである。さらに、単離血小板を用いた MPT 依存的な活性化の評価の実験で添加しているトロンビン、血小板において mtROS を産生させることで MPT 誘導を起こしやすくするための必要な条件であることも(Choo et al., 2012)報告されている。以上より、MPT を誘導した血小板との相互作用が肝細胞の MPT 誘導能をさらに高める可能性も考えられる。この点については、予備的な検討において、MPT 誘導能を持ち血小板の活性化を起こすトログリタゾン (Fig. 2-1B) を血小板に曝露した直後に肝細胞に添加して培養すると、血小板の MPT 依存的な肝細胞接着が増加する傾向を確認している (data not shown)。しかしながら肝細胞死の誘導までは認められず、*in vivo* で観察された血小板 (厳密には BMDCs) の MPT 依存的な肝障害増強の機序についてはさらなる検討が必要である。

#### 4-2 BMDCs の MPT は APAP の障害発症過程のみに関与するか？

本検討において、BMDCs の MPT 依存的に認められる APAP 投与後ごく初期 (1-2 時間) の変化として、肝臓内の血小板数が特に顕著であったことから (Fig. 2-4D)、この現象が主に肝障害発症過程に関与すると想定したが、一方で血小板は障害からの修復過程にも関与することが知られ、長期的にはその観点からの影響も考える必要がある。血小板は再生に寄与する細胞として知られ、部分肝切除モデルにおいて、血小板増加作用を持つトロンボポエチンを処置すると肝再生が促進される (Liang et al., 2021)。しかしながら血小板は、APAP 誘導性肝障害では血小板を含む複合体 (von Willebrand 因子) を形成することで修復を阻害すること (Groeneveld et al., 2019)、血小板の C 型レクチン受容体が好中球の浸潤を抑制することで肝障害からの修復を遅延させることなどが報告されている (Chauhan et al., 2020)。APAP 誘導性の肝障害において、血小板は障害初期の発症過程と後半の修復過程の両者に関わる。本検討では特に発症過程に限定して検討を行ったが、今後は修復過程についても MPT 依存的な血小板活性化の影響を検討していく必要がある。

#### 4-3 血小板が肝細胞と相互作用を及ぼすか

今回の検討では、肝ミトコンドリアの MPT 感受性が APAP 誘導性肝障害時に増強するとの過去の報告 (Masubuchi et al., 2005) を踏まえ、肝障害発症のごく初期の段階において肝ミトコンドリア機能がどのように変化するかについても調べた。その結果、APAP 投与からわずか 1 時間で肝ミトコンドリア機能 (呼吸・膜電位) の低下、ならびに MPT 感受性の増強が認められること (Fig. 2-3)、そしてこれら変化が全て BMDCs の MPT に依存すること (Fig. 2-5) が明らかとなった。特に ALT の有意な上昇を認める以前のごく初期段階で血小板が肝臓内に集積していること (Fig. 2-2B, 2-4D and E) から、活性化して肝臓内局所に集積した血小板が、肝細胞と直接的・間接的に相互作用している可能性が示された。血管から肝組織内に浸潤するメカニズムについては、血小板の活性化に伴い表面に誘導される P-セレクチンが微小血管内皮表面に発現するリガンド分子 PSGL1 などに結合することが知られている (Massberg et al., 1998)。今回の検討では P-セレクチンの発現量について検討していないが、一般に血小板は活性化することで P-セレクチンの発現が上昇することから (Jobe et al., 2008)、仮に NAPQI が MPT 誘導を介して血小板が活性化しているならば、そこでも P-セレクチンの発現は上昇している可能性が高い。今回の結果のみでは、肝臓内に蓄積した血小板が果たして肝組織内部まで浸潤しているのか、あるいは微小血管内に留まっているかの区別はつかないが、血小板は多岐に渡る細胞 (マクロファージ (Ludwig et al., 2022) やがん細胞 (Guillem-Llobat et

al., 2016)、そして肝細胞(Bhagal et al., 2012))との直接的、間接的な相互作用が知られているため、肝臓内局所に蓄積し、活性化した状態にある血小板が肝細胞およびそれ以外の周辺の細胞に影響を与えている可能性は高い。4-1 で述べたような肝細胞への影響に加え、肝組織を構成する他の細胞に対する血小板の影響も評価することでMPTを介した肝障害発症機序の全容理解につながると期待される。

#### 4-4 薬物による BMDCs の浸潤

血小板の蓄積が認められた一方で、マクロファージや好中球については初期段階において血小板ほどの蓄積は認められなかった (Fig. 2-2B and 2-4D)。一般に、マクロファージや好中球などの免疫細胞については、肝実質細胞などの細胞が障害を受けた際に放出されるダメージ関連分子パターンやケモカインによって遊走されることが報告されている(Tacke and Zimmermann, 2014)。特に今回の検討で、APAP 投与後 1 時間のごく初期の段階ではいずれのマウスにおいても有意な ALT 上昇を認めなかったことから、免疫細胞自身が薬物によって活性化され、これにより肝細胞が傷害される可能性は低いと考えられる。一方で血小板は、クッパー細胞への一時接着を介して(Wong et al., 2013)平時から肝細胞近傍の血管内滞留時間が長く、また *in vitro* における MPT を介した血小板の活性化は 5 分程度と比較的短時間に生じることも示されている(Jobe et al., 2008)。今回の *in vitro* の検討においても、トログリタゾン、NAPQI を血小板に曝露すると 30 分までに血小板の活性化が十分に認められている (Fig. 2-1B)。マウスに APAP を 200 mg/kg 経口投与すると 30 分以内に NAPQI が最高血中濃度に達し、その時の濃度は約 50  $\mu\text{M}$  と報告されている(Zhang et al., 2018)。NAPQI は、肝細胞内で主に生成して血管側へ放出され、特に CYP 発現量の多い中心静脈付近の類洞内腔濃度は末梢血よりも高いと考えられる。*in vitro* では 25  $\mu\text{M}$  の NAPQI 曝露で血小板の活性化を認めたが、先述のように *in vivo* ではより高濃度の NAPQI が血小板に曝露されていた可能性がある。以上を踏まえると、Touch & Go の機構によって類洞内腔に一時的な滞留した血小板に NAPQI が高濃度曝露され、MPT 誘導を介した活性化した後何らかの機序で肝細胞に作用し、肝ミトコンドリア機能に変化することで最終的に肝細胞の MPT 感受性が増強したと考えられる。2 章で示したように、MPT 感受性が増強した肝細胞では MPT 誘導剤による細胞死が起こりやすくなるため、APAP 投与後 2 時間以降に顕著な肝障害が観察されたと考えられる。

#### 4-5 ヒトでの MPT 誘導能評価への可能性

本章では、単離血小板を用いた予備的な検討から、トログリタゾンや NAPQI などの MPT 誘導能が知られる DILI リスク薬物が血小板を MPT 依存的に活性化することも確認した (Fig. 2-1B)。

MPT 誘導は重篤な DILI を誘発する薬物に共通の性質であるため (Arakawa et al., 2019; Segawa et al., 2018; Shirakawa et al., 2015; Varbiro et al., 2003)、開発早期にこのポテンシャルの有無を判定することが望ましいが、現状はげっ歯類から単離したミトコンドリアや第 2 章で述べた特殊な実験条件下でのげっ歯類由来の肝細胞での評価に留まっている。その一方で、種差や動物実験削減の観点からヒト由来細胞を用いた評価系構築が望ましく、本章の検討から血小板を用いることでこれらの問題を解決できることが期待される。実際に、Chen らは MPT に依存した血小板の活性化を簡便かつ高スループットに検出する方法を報告しており (Chen et al., 2018)、今後はこれら手法を組み合わせるなどしてヒト血小板を用いた MPT 誘導能の評価系を構築していくことが望まれる。

DILI の多くは特異体質的に生じ、その最たる理由は各個人の遺伝的背景の違いあると考えられている (Stolz, 2022)。遺伝的背景としては薬物代謝酵素、解毒酵素ならびにヒト白血球抗原の違いで議論されることが多いが、特にミトコンドリア毒性の関連する DILI ではミトコンドリア DNA

(mtDNA) の変異に関する報告が近年なされている (Lee et al., 2019)。以上のように、DILI 発症の個人差を考える上で遺伝的背景を評価することは重要だが、この点において患者個々の血小板の薬物に対する感受性評価は有用な手法となり得る。ヒト血小板の mtDNA ハプロタイプによって肝細胞の呼吸機能や薬物に対する呼吸鎖阻害の感受性が変化すること (Ball et al., 2021)、ヒト血小板の mtDNA を肝がん由来細胞の HepG2 に取り込ませることで血小板と同様の呼吸鎖阻害感受性変化を再現できること (Ball et al., 2022)、などが最近報告されている。これらの研究は、薬物に対する肝細胞の感受性の個人差を血小板を用いて代替評価することを意図している。今回の研究で得られた知見を応用することで、血小板を用いた MPT 評価系の構築という新たな視点を含めた代替評価系の開発にも繋がりうる。今後は、MPT を介した DILI リスク薬物の評価系構築を見据えて、各薬物のヒトにおける DILI リスクと MPT を介したヒト血小板活性化の相関を調べ、その上で薬物による MPT 誘導能とそこに対する個人差の影響の有無についても詳細に評価していく必要がある。

## 第4章 総括

本研究の第2章では、マウス初代培養細胞において高酸素培養と糖源置換を組み合わせによりミトコンドリアを賦活化させることができた。また、先行研究で見られた I/R によって引き起こる一過的な H/R を *in vitro* 条件で再現することにより、mtROS を誘導し MPT 薬物によって誘導される細胞死を検出することができた。その一方で本実験系の基となった一過性虚血という条件の特殊性から虚血に至るまでの過程で起きるイベントに着目した研究を行う必要性が生じた。そこで第3章では、虚血過程に関わる血液凝固系の中でも血小板に着目し、MPT 誘導薬物が肝細胞と同様に単離血小板の MPT を介した活性化を誘導することが分かった。また生体内における血小板の MPT の関与を示すため、骨髄特異的な CypD KO マウスに APAP を投与した時の肝障害の変化を観察したところ、APAP により起こる肝障害・血小板の肝内への蓄積・肝ミトコンドリア機能の低下・MPT 感受性の増大がすべて骨髄細胞での MPT 依存的に起こるイベントであることが確認された。

DILI は上市した医薬品の中で肝毒性が原因で市場撤退した主たる理由であることが報告されている。よって、肝毒性のポテンシャルを有する化合物を前臨床試験で適切に評価する必要があると考えられる。その中でもミトコンドリア毒性機序を持つ薬物は高いオッズ比を示すこと (Rana *et al.*, 2021) から、ミトコンドリア毒性の予測が未だ不十分であることが分かる。しかし過去の報告では MPT による肝障害の発症は薬物が直接肝細胞死を導くことのみに着目されており、その過程で起こる血液細胞や肝非実質細胞にある MPT については着目されていなかった。特に血小板は無核細胞であることから血液細胞としても重要性が薄れてしまっていることが考えられ、今後は血小板を含む血液細胞を加味していくことでより MPT を介した DILI メカニズムの解明につながることを期待される。

本研究では血小板の MPT を介した詳細な発症メカニズムの解明は十分に行えていない。今後はこの点に関してより詳細な検討を重ねることで、メカニズムに基づいた *in vitro* のスクリーニング系を構築し医薬品開発においてより安全性の高い候補化合物の創出への貢献だけでなく、臨床においても肝障害の予後不良を精度よく検出できるバイオマーカー探索や重篤な DILI 発症時の治療薬の創出にも貢献できると考えている。

## 参考文献

- Arakawa, K., Ikeyama, Y., Sato, T., Segawa, M., Sekine, S., and Ito, K. (2019). Functional modulation of liver mitochondria in lipopolysaccharide/drug co-treated rat liver injury model. *J Toxicol Sci* *44*, 833-843. 10.2131/jts.44.833.
- Armstrong, J.A., Cash, N.J., Ouyang, Y., Morton, J.C., Chvanov, M., Latawiec, D., Awais, M., Tepikin, A.V., Sutton, R., and Criddle, D.N. (2018). Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift. *The Journal of biological chemistry* *293*, 8032-8047. 10.1074/jbc.RA118.003200.
- Ball, A.L., Bloch, K.M., Rainbow, L., Liu, X., Kenny, J., Lyon, J.J., Gregory, R., Alfirevic, A., and Chadwick, A.E. (2021). Assessment of the impact of mitochondrial genotype upon drug-induced mitochondrial dysfunction in platelets derived from healthy volunteers. *Archives of toxicology*. 10.1007/s00204-021-02988-3.
- Ball, A.L., Jolly, C.E., Lyon, J.J., Alfirevic, A., and Chadwick, A.E. (2022). The generation of HepG2 transmitochondrial cybrids to reveal the role of mitochondrial genotype in idiosyncratic drug-induced liver injury: a translational &in vitro& study. *bioRxiv*, 2022.2003.2021.485109. 10.1101/2022.03.21.485109.
- Beeson, C.C., Beeson, G.C., and Schnellmann, R.G. (2010). A high-throughput respirometric assay for mitochondrial biogenesis and toxicity. *Anal Biochem* *404*, 75-81. 10.1016/j.ab.2010.04.040.
- Bhogal, R.H., Weston, C.J., Curbishley, S.M., Adams, D.H., and Afford, S.C. (2012). Activation of CD40 with platelet derived CD154 promotes reactive oxygen species dependent death of human hepatocytes during hypoxia and reoxygenation. *PloS one* *7*, e30867. 10.1371/journal.pone.0030867.
- Buck, L.D., Inman, S.W., Rusyn, I., and Griffith, L.G. (2014). Co-regulation of primary mouse hepatocyte viability and function by oxygen and matrix. *Biotechnol Bioeng* *III*, 1018-1027. 10.1002/bit.25152.
- Cai, S.Y., Ouyang, X., Chen, Y., Soroka, C.J., Wang, J., Mennone, A., Wang, Y., Mehal, W.Z., Jain, D., and Boyer, J.L. (2017). Bile acids initiate cholestatic liver injury by triggering a hepatocyte-specific inflammatory response. *JCI insight* *2*, e90780. 10.1172/jci.insight.90780.
- Chauhan, A., Sheriff, L., Hussain, M.T., Webb, G.J., Patten, D.A., Shepherd, E.L., Shaw, R., Weston, C.J., Haldar, D., Bourke, S., et al. (2020). The platelet receptor CLEC-2 blocks neutrophil mediated hepatic recovery in acetaminophen induced acute liver failure. *Nature communications* *11*, 1939. 10.1038/s41467-020-15584-3.
- Chen, M.X., Ward, E., Caivano, M., Toh, S., Searle, K., Ramachandran, S., Lacroix, Y., Ahmed, M., and Rutter, A.R. (2018). Probing Mitochondrial Permeability Transition Pore Activity in Nucleated Cells and Platelets by High-Throughput Screening Assays Suggests Involvement of Protein Phosphatase 2B in Mitochondrial Dynamics. *Assay and drug development technologies* *16*, 445-455. 10.1089/adt.2018.872.
- Choo, H.J., Saafir, T.B., Mkumba, L., Wagner, M.B., and Jobe, S.M. (2012). Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *32*, 2946-2955. 10.1161/atvbaha.112.300433.

Dykens, J.A., and Will, Y. (2007). The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug discovery today* 12, 777-785. 10.1016/j.drudis.2007.07.013.

Fromenty, B. (2020). Alteration of mitochondrial DNA homeostasis in drug-induced liver injury. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 135, 110916. 10.1016/j.fct.2019.110916.

Ghafoory, S., Varshney, R., Robison, T., Kouzbari, K., Woolington, S., Murphy, B., Xia, L., and Ahamed, J. (2018). Platelet TGF- $\beta$ 1 deficiency decreases liver fibrosis in a mouse model of liver injury. *Blood Adv* 2, 470-480. 10.1182/bloodadvances.2017010868.

Groeneveld, D., Cline-Fedewa, H., Baker, K.S., Williams, K.J., Roth, R.A., Mittermeier, K., Lisman, T., Palumbo, J.S., and Luyendyk, J.P. (2019). Von Willebrand factor delays liver repair after acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Journal of hepatology*. 10.1016/j.jhep.2019.09.030.

Guillem-Llobat, P., Dovizio, M., Bruno, A., Ricciotti, E., Cufino, V., Sacco, A., Grande, R., Alberti, S., Arena, V., Cirillo, M., et al. (2016). Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget* 7, 32462-32477. 10.18632/oncotarget.8655.

He, Y., Yao, H., Ageno, W., Méndez-Sánchez, N., Guo, X., and Qi, X. (2022). Review article: thromboelastography in liver diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 10.1111/apt.17080.

Hynes, J., Nadanaciva, S., Swiss, R., Carey, C., Kirwan, S., and Will, Y. (2013). A high-throughput dual parameter assay for assessing drug-induced mitochondrial dysfunction provides additional predictivity over two established mitochondrial toxicity assays. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 27, 560-569. 10.1016/j.tiv.2012.11.002.

Ikeyama, Y., Sato, T., Takemura, A., Sekine, S., and Ito, K. (2020). Successful energy shift from glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation in freshly isolated hepatocytes from humanized mice liver. *Toxicology in Vitro* 65, 104785.

Jobe, S.M., Wilson, K.M., Leo, L., Raimondi, A., Molkentin, J.D., Lentz, S.R., and Di Paola, J. (2008). Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood* 111, 1257-1265. 10.1182/blood-2007-05-092684.

Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., and Korthuis, R.J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology* 298, 229-317. 10.1016/b978-0-12-394309-5.00006-7.

Kirschbaum, M., Karimian, G., Adelmeijer, J., Giepmans, B.N., Porte, R.J., and Lisman, T. (2015). Horizontal RNA transfer mediates platelet-induced hepatocyte proliferation. *Blood* 126, 798-806. 10.1182/blood-2014-09-600312.

Klatt, C., Kruger, I., Zey, S., Krott, K.J., Spelleken, M., Gowert, N.S., Oberhuber, A., Pfaff, L., Luckstadt, W., Jurk, K., et al. (2018). Platelet-RBC interaction mediated by FasL/FasR induces procoagulant activity important for thrombosis. *The Journal of clinical investigation* 128, 3906-3925. 10.1172/jci92077.

Labbe, G., Pessayre, D., and Fromenty, B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* 22, 335-353. 10.1111/j.1472-8206.2008.00608.x.

Lee, L.N., Huang, C.T., Hsu, C.L., Chang, H.C., Jan, I.S., Liu, J.L., Sheu, J.C., Wang, J.T., Liu, W.L., Wu, H.S., et al. (2019). Mitochondrial DNA Variants in Patients with Liver Injury Due to Anti-Tuberculosis Drugs. *J Clin Med* 8. 10.3390/jcm8081207.

Lee, W.M. (2017). Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? *Journal of hepatology* 67, 1324-1331. 10.1016/j.jhep.2017.07.005.

Lee, Y.H., Goh, W.W., Ng, C.K., Raida, M., Wong, L., Lin, Q., Boelsterli, U.A., and Chung, M.C. (2013). Integrative toxicoproteomics implicates impaired mitochondrial glutathione import as an off-target effect of troglitazone. *Journal of proteome research* 12, 2933-2945. 10.1021/pr400219s.

Li, N., Qin, S., Xie, L., Qin, T., Yang, Y., Fang, W., and Chen, M.H. (2018). Elevated Serum Potassium Concentration Alleviates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Mitochondrial Preservation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 48, 1664-1674. 10.1159/000492289.

Liang, C., Takahashi, K., Furuya, K., Oda, T., and Ohkohchi, N. (2021). Platelets Stimulate Liver Regeneration in a Rat Model of Partial Liver Transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 27, 719-734. 10.1002/lt.25962.

Licata, A., Minissale, M.G., Calvaruso, V., and Craxì, A. (2017). A focus on epidemiology of drug-induced liver injury: analysis of a prospective cohort. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 112-121.

Lisman, T., and Porte, R.J. (2016). Mechanisms of platelet-mediated liver regeneration. *Blood* 128, 625-629. 10.1182/blood-2016-04-692665.

Liu, C., Sekine, S., and Ito, K. (2016). Assessment of mitochondrial dysfunction-related, drug-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* 302, 23-30. 10.1016/j.taap.2016.04.010.

LoGuidice, A., and Boelsterli, U.A. (2011). Acetaminophen overdose-induced liver injury in mice is mediated by peroxynitrite independently of the cyclophilin D-regulated permeability transition. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54, 969-978. 10.1002/hep.24464.

Ludwig, N., Hilger, A., Zarbock, A., and Rossaint, J. (2022). Platelets at the Crossroads of Pro-Inflammatory and Resolution Pathways during Inflammation. *Cells* 11. 10.3390/cells11121957.

Marroquin, L.D., Hynes, J., Dykens, J.A., Jamieson, J.D., and Will, Y. (2007). Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 97, 539-547. 10.1093/toxsci/kfm052.

Massberg, S., Enders, G., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Vestweber, D., Krombach, F., and Messmer, K. (1998). Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 92, 507-515.

Masubuchi, Y., Suda, C., and Horie, T. (2005). Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of hepatology* 42, 110-116. 10.1016/j.jhep.2004.09.015.

Miyakawa, K., Joshi, N., Sullivan, B.P., Albee, R., Brandenberger, C., Jaeschke, H., McGill, M.R., Scott, M.A., Ganey, P.E., Luyendyk, J.P., and Roth, R.A. (2015). Platelets and protease-activated receptor-4 contribute to acetaminophen-induced liver injury in mice. *Blood* *126*, 1835-1843. 10.1182/blood-2014-09-598656.

Niu, X., de Graaf, I.A., van de Vegte, D., Langelaar-Makkinje, M., Sekine, S., and Groothuis, G.M. (2015). Consequences of Mrp2 deficiency for diclofenac toxicity in the rat intestine ex vivo. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* *29*, 168-175. 10.1016/j.tiv.2014.10.004.

Oda, S., Shirai, Y., Akai, S., Nakajima, A., Tsuneyama, K., and Yokoi, T. (2017). Toxicological role of an acyl glucuronide metabolite in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *Journal of applied toxicology : JAT* *37*, 545-553. 10.1002/jat.3388.

Porceddu, M., Buron, N., Roussel, C., Labbe, G., Fromenty, B., and Borgne-Sanchez, A. (2012). Prediction of liver injury induced by chemicals in human with a multiparametric assay on isolated mouse liver mitochondria. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* *129*, 332-345. 10.1093/toxsci/kfs197.

Ramachandran, A., Lebofsky, M., Baines, C.P., Lemasters, J.J., and Jaeschke, H. (2011). Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free radical research* *45*, 156-164. 10.3109/10715762.2010.520319.

Rana, P., Aleo, M.D., Wen, X., and Kogut, S. (2021). Hepatotoxicity reports in the FDA adverse event reporting system database: A comparison of drugs that cause injury via mitochondrial or other mechanisms. *Acta Pharm Sin B* *11*, 3857-3868. 10.1016/j.apsb.2021.05.028.

Rodriguez-Enriquez, S., He, L., and Lemasters, J.J. (2004). Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* *36*, 2463-2472.

Sang, Y., Roest, M., de Laat, B., de Groot, P.G., and Huskens, D. (2021). Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev* *46*, 100733. 10.1016/j.blre.2020.100733.

Segawa, M., Sekine, S., Sato, T., and Ito, K. (2018). Increased susceptibility to troglitazone-induced mitochondrial permeability transition in type 2 diabetes mellitus model rat. *J Toxicol Sci* *43*, 339-351. 10.2131/jts.43.339.

Shan, Z., Li, L., Atkins, C.L., Wang, M., Wen, Y., Jeong, J., Moreno, N.F., Feng, D., Gui, X., Zhang, N., et al. (2021). Chitinase 3-like-1 contributes to acetaminophen-induced liver injury by promoting hepatic platelet recruitment. *eLife* *10*. 10.7554/eLife.68571.

Shirakawa, M., Sekine, S., Tanaka, A., Horie, T., and Ito, K. (2015). Metabolic activation of hepatotoxic drug (benzbromarone) induced mitochondrial membrane permeability transition. *Toxicology and applied pharmacology* *288*, 12-18. 10.1016/j.taap.2015.06.018.

Stolz, A. (2022). Newly identified genetic variants associated with idiosyncratic drug-induced liver injury. *Curr Opin Gastroenterol* *38*, 230-238. 10.1097/mog.0000000000000822.

Swiss, R., Niles, A., Cali, J.J., Nadanaciva, S., and Will, Y. (2013). Validation of a HTS-amenable assay to detect drug-induced mitochondrial toxicity in the absence and presence of cell death. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* *27*, 1789-1797. 10.1016/j.tiv.2013.05.007.

Syed, M., Skonberg, C., and Hansen, S.H. (2016). Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 31, 93-102. 10.1016/j.tiv.2015.11.020.

Tacke, F., and Zimmermann, H.W. (2014). Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of hepatology* 60, 1090-1096. 10.1016/j.jhep.2013.12.025.

Takemura, A., Gong, S., Sekine, S., and Ito, K. (2019). Inhibition of biliary network reconstruction by benzbromarone delays recovery from pre-existing liver injury. *Toxicology* 423, 32-41. 10.1016/j.tox.2019.05.004.

Tian, W.F., Zeng, S., Sheng, Q., Chen, J.L., Weng, P., Zhang, X.T., Yuan, J.J., Pang, Q.F., and Wang, Z.Q. (2018). Methylene Blue Protects the Isolated Rat Lungs from Ischemia-Reperfusion Injury by Attenuating Mitochondrial Oxidative Damage. *Lung* 196, 73-82. 10.1007/s00408-017-0072-8.

Varbiro, G., Toth, A., Tapodi, A., Veres, B., Sumegi, B., and Gallyas, F., Jr. (2003). Concentration dependent mitochondrial effect of amiodarone. *Biochemical pharmacology* 65, 1115-1128. 10.1016/s0006-2952(02)01660-x.

Wong, C.H., Jenne, C.N., Petri, B., Chrobok, N.L., and Kubes, P. (2013). Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nature immunology* 14, 785-792. 10.1038/ni.2631.

Yang, W., Tao, Y., Wu, Y., Zhao, X., Ye, W., Zhao, D., Fu, L., Tian, C., Yang, J., He, F., and Tang, L. (2019). Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nature communications* 10, 1076. 10.1038/s41467-019-09046-8.

Zhang, C.X., Cheng, Y., Liu, D.Z., Liu, M., Cui, H., Zhang, B.L., Mei, Q.B., and Zhou, S.Y. (2019a). Mitochondria-targeted cyclosporin A delivery system to treat myocardial ischemia reperfusion injury of rats. *Journal of nanobiotechnology* 17, 18. 10.1186/s12951-019-0451-9.

Zhang, X., Li, R., Hu, W., Zeng, J., Jiang, X., and Wang, L. (2018). A reliable LC-MS/MS method for the quantification of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, acetaminophen glutathione and acetaminophen glucuronide in mouse plasma, liver and kidney: Method validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 32, e4331. 10.1002/bmc.4331.

Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, Z., Li, S., Jiang, W., Li, X., and Lv, J. (2019b). LncRNA MALAT1 cessation antagonizes hypoxia/reoxygenation injury in hepatocytes by inhibiting apoptosis and inflammation via the HMGB1-TLR4 axis. *Molecular immunology* 112, 22-29. 10.1016/j.molimm.2019.04.015.

## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Ikeyama Y, Sato T, Takemura A, Sekine S, Ito K.

Hypoxia/reoxygenation exacerbates drug-induced cytotoxicity by opening mitochondrial permeability transition pore: Possible application for toxicity screening

Toxicol *In vitro*. 67, 104889. 2020

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 伊藤 晃成 教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、御懇切なる御指導と、御助言を賜りました元千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 関根 秀一 講師に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大な御助言、御指導を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 青木 重樹 講師に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、御懇切なる御指導ならびに実験上のご助力を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 竹村 晃典 助教に心より感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、技術指導及び有益なご助言を賜りました千葉大学大学院医学研究院画像診断・放射線腫瘍学 宇野 隆 教授、斉藤 正好 先生に心より感謝の意を表します。

本研究のために犠牲となった実験動物に深く感謝と哀悼の意を表します。

最後に、今日まで御指導、御支援を頂きました数多くの方々と良き友人達、そして終始温かく見守り、支えて下さった家族の皆様に心より御礼申し上げます。

2022 年 7 月吉日 池山 佑豪

## 審査委員

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 中村 浩之

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 医学博士 高野 博之

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 畠山 浩人