

論文の内容の要旨

論文題目 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

指導教官 小俣政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 中川 勇人

<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重要な細胞内シグナル伝達経路の一つであり、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。近年、MAPK の一つである c-jun N-terminal kinase (JNK)が、薬剤性肝障害や非アルコール性脂肪性肝炎、虚血再還流障害など、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。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いるが、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。治療法としては 1980 年代に N-acetyl-cystein の有効性が示されて以降進歩がなかったが、近年肝障害に JNK が中心的役割を果たすと報告され、JNK 阻害薬の臨床応用が期待されている。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。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。

近年酸化ストレスを介した JNK、p38 の活性化に Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) が重要な役割を果たしていることが報告されて

いる。ASK1 は広範に発現している MAPKKK で、活性酸素種や Tumor necrosis factor- α 、lipopolysaccharide 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。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。

これらの背景から、本研究では ASK1 ノックアウトマウス (ASK1^{-/-}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。

<方法>

8-10 週齢オスの ASK1^{-/-}マウスと同週齢の野生型マウス(WT マウス)にアセトアミノフェン 300mg/kg を腹腔内投与し、6 時間後と 24 時間後に屠殺。血清 ALT と病理組織で障害の程度を比較し、アポトーシスを TUNEL 染色にて評価した。また JNK の関与を確認するため、JNK1 ノックアウト (JNK1^{-/-})、JNK2 ノックアウト(JNK2^{-/-})マウス、および JNK 阻害薬 SP600125 を 1 時間前に投与したマウスについても同様の検討を行った。また ASK1 の下流因子を調べるため、WT マウスと ASK1^{-/-}マウスのアセトアミノフェン投与前後の肝臓における遺伝子発現を、マイクロアレイを用いて比較した。上記 5 種類のマウスの肝臓における MKK4、JNK の活性化を Western blot で比較検討した。WT マウスにおいて ASK1 の活性化を Western blot で検討するとともに、ASK1 の活性化阻害物質である Thioredoxin (Trx) との結合状態を免疫沈降法にて検討した。アセトアミノフェン肝障害における p38 の関与については、p38 α ヘテロノックアウトマウス (p38 α ^{-/-}マウス) と p38 阻害薬 SB203580 を用いて検討した。またアセトアミノフェンによる直接的な細胞障害を評価するため、WT マウスと ASK1^{-/-}マウス由来の初代培養肝細胞を用いて、MAPK 活性化や細胞障害について比較検討した。さらに、アセトアミノフェン肝障害における炎症反応への ASK1 の関与を検討するために、肝組織中の炎症性サイトカイン発現量を Real-time PCR 法により検討するとともに、WT マウスと ASK1^{-/-}マウス由来の初代培養脾細胞を壊死肝細胞により刺激し、MAPK 活性化とサイトカイン分泌量を検討した。そのほかの肝障害における ASK1-JNK 経路の関与について検討するために、四塩化炭素誘発性肝障害モデルを用いた。

<結果>

ASK1^{-/-}マウスにおけるアセトアミノフェン投与 6 時間後、24 時間後の血清 ALT 値は、WT マウスに比べて有意に低かった。組織学的にも中心静脈周囲壊死が軽度であり、アポトーシスが著明に抑制されていた。また JNK 阻害薬はほ

ば完全に障害を抑制しており、JNK1^{-/-}、JNK2^{-/-}でも障害が軽減されていた。マイクロアレイを用いた検討では、JNK 依存性遺伝子でアセトアミノフェン肝障害との関連が報告されている *jun* と *fos* の誘導が、ASK1^{-/-}マウスにおいて有意に抑制されていた。これらより ASK1-JNK 経路のアセトアミノフェン肝障害への関与が示唆された。

ASK1 はアセトアミノフェン投与 3-6 時間後に活性化しており、同時に ASK1 と Trx の解離を認めた。また、ASK1^{-/-}マウスではアセトアミノフェン投与 6 時間後の MKK4 と JNK の活性化が減弱していた。さらに JNK 活性化の時間推移は、1.5 時間では WT マウスと ASK1^{-/-}マウスで同程度であるのに対し、3-6 時間では ASK1^{-/-}で有意に減弱していたことから、ASK1 は JNK の持続的活性化に関与すると考えられた。また、ASK1^{-/-}マウスの肝臓では p38 の持続的活性化も減弱していたが、p38 ヘテロ欠損マウスおよび p38 阻害薬投与マウスを用いた検討では対象群と肝障害に差はなく、p38 の肝障害への関与は否定的であった。

初代培養肝細胞においても、ASK1^{-/-}マウス由来肝細胞ではアセトアミノフェンによる MAPK 活性化が減弱しており、細胞障害も軽度であった。また、*in vivo* の結果と同様に、JNK 阻害薬はアセトアミノフェンによる細胞死を抑制したが、p38 阻害薬は有意な効果を示さなかった。

アセトアミノフェンによる炎症性サイトカインの誘導は、ASK1^{-/-}マウスにおいて有意に低下していた。しかし脾細胞を用いた *in vitro* の検討では、壊死肝細胞による MAPK 活性化およびサイトカイン分泌量いずれも WT と ASK1^{-/-}脾細胞で同程度であり、*in vivo* での炎症の違いは直接的細胞障害の違いに起因するものと考えられた。

四塩化炭素肝障害モデルでは、JNK1^{-/-}マウスは肝障害が抑制されたが、ASK1^{-/-}マウスでは WT マウスと差がみられなかった。JNK 活性化に関しても、ASK1^{-/-}マウスと WT マウスは同程度であった。

<考察>

ASK1 は近年、神経変性疾患や虚血性心疾患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。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、ASK1 は MAPK の持続的な活性化を通じて細胞死を誘導することが報告されている。今回の検討でも、ASK1^{-/-}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。一

方、ASK1^{-/-}マウスは p38 の持続的活性化も低下していたが、p38 の肝障害への関与は否定的であった。

ASK1 の活性制御には抗酸化物質である Trx が重要な役割を果たしていると考えられているが、今回の検討でも、ASK1 活性化と一致して ASK1 と Trx の解離が認められた。このことは、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を示唆している。

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から成るが、近年 ASK1 が炎症反応にも関わっていることが報告されている。しかし本研究の結果からは、アセトアミノフェンによる炎症反応に ASK1 の関与は否定的であった。しかしながら、今回の検討だけで ASK1 の炎症への関与を完全には否定できず、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。

四塩化炭素肝障害モデルでは、ASK1-JNK 経路の関与は否定的であった。肝障害における同経路の関与が、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、特に慢性 C 型肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎など、その他の酸化ストレスを介した肝障害における 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にした。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。