

表 題 アセトアミノフェン急性肝不全の病態解明と新規治療開発

論文の区分 博士課程

著 者 名 山田 直也

担当指導教員氏名 高橋 将文 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
血液・免疫疾患学 分野
炎症免疫学

2020年1月10日申請の学位論文

目次

略語一覧

1. はじめに	1
2. 実験材料と方法	5
2-1. 使用動物	
2-2. アセトアミノフェン急性肝不全モデルの作成	
2-3. ハイドロダイナミクス遺伝子導入法	
2-4. 血清 AST、ALT 測定	
2-5. 組織学的解析	
2-6. 免疫組織染色	
2-7. グルタチオン含有量測定	
2-8. アポトーシス解析 (TUNEL 染色)	
2-9. マロンジアルデヒド定量	
2-10. Real-time RT-PCR	
2-11. ウェスタンブロット法	
2-12. 脂質メディエーターの質量分析	
2-13. ホスファチジルコリン構造異性体の質量分析	
2-14. 統計学的解析	
3. 結果	14
3-1. アセトアミノフェン急性肝不全モデルマウスの作成	
3-2. アセトアミノフェン急性肝不全に対する Fer-1 の効果	
3-3. アポトーシス・ネクロプトーシスの関与	
3-4. 炎症細胞・炎症性サイトカインの関与	

3-5. アセトアミノフェン急性肝不全に対する鉄キレート剤の効果	
3-6. 脂質メディエーターの質量分析結果	
3-7. ACSL4 ノックアウトマウス・ノックダウンマウスでの検討	
3-8. 血清 PCOOH 構造異性体の解析 (LC-MS/MS)	
3-9. アセトアミノフェン急性肝不全に対する α -Tocopherol の効果	
4. 考察	38
5. おわりに	42
6. 謝辞	43
7. 参考文献	44

略語一覧

AA: arachidonic acid

ACSL4: acyl-CoA synthetase long chain family member 4

ALT: alanine aminotransferase

AM404: Arachidonyl-aminophenol

APAP: acetaminophen

AST: aspartic aminotransferase

α -Toc: α -tocopherol

CCl2: chemokine (C-C motif) ligand 2

COX: cyclooxygenase

CYP: cytochrome P450

CYP2E1: cytochrome P450 2E1

DAMPs: damage-associated molecular patterns:

DFO: Deferoxamine:

DGLA, dihomo- γ -linolenic acid

Emr-1: EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like sequence 1

FACL-4: Fatty acid-CoA ligase 4

Fe: iron

Fer-1: Ferrostatin-1

GFP: green fluorescent protein

GPX4: glutathione peroxidase 4

GSH: glutathione

GSSG: glutathione disulfide

HE: hematoxylin and eosin

HETE: hydroxyeicosatetraenoic acid

HMGB1: high mobility group box 1

4-HNE: 4-hydroxyl-2-noneal

Il1b: interleukin-1 beta

Il6: interleukin-6

8-iso-PGF2 α : 8-iso-Prostaglandin F2 α

LA: linoleic acid

Lip-1: lipoxstatin-1

LOX: lipoxygenase

LT: leukotriene

Ly6g: Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D

MDA: Malondialdehyde

MLKL: mixed-lineage kinase domain-like

MRM: multiple reaction monitoring

NAC: N-acetylcysteine

NAPQI: *N*-acetyl-*p* benzoquinone imine

PBS: phosphate-buffered saline

PCOOH: phosphatidylcholine hydroperoxide

PG: prostaglandin

PGD₂: Prostaglandin D₂

PGF₂ α : Prostaglandin F₂ α

Ptgs2: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2

PUFA: polyunsaturated fatty acid

RCD: regulated cell death

RIPK: receptor interacting protein kinase

RIPK3: receptor-interacting protein kinase 3

Tnfa: tumor necrosis factor alfa

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling

WT: wild-type

xCT: cystine-glutamate antiporter

1. はじめに

アセトアミノフェン (N-acetyl-*p*-aminophenol, APAP) は日常臨床で頻用される解熱鎮痛薬であるが、過剰摂取した場合の副作用として肝障害を引き起こすことが知られており、欧米諸国では、長年に渡って急性肝不全の原因で最多となっている (1, 2)。APAP による肝障害が重篤化し、一度急性肝不全に至った場合には肝移植しか確立された治療手段がないため、世界的に移植ドナー・移植臓器の不足が叫ばれている状況下で、医学的かつ社会的に大きな問題である (3, 4)。

体内に吸収された APAP は肝細胞内で *p*-aminophenol に代謝された後、中枢神経系へ移行し、Arachidonyl-aminophenol (AM404) となる (5)。AM404 は痛覚閾値を下げることで鎮痛効果を発揮し、また視床下部体温中枢へ作用し、末梢毛細血管拡張作用によって解熱効果を発揮すると考えられている。しかしながら、APAP を過剰摂取した場合には、肝細胞内でシトクロム P450 2E1 (CYP2E1) によって代謝され、*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) へと代謝される (6)。NAPQI は反応性が高く、細胞内のグルタチオン (glutathione, GSH) の存在下で GSH 抱合により無毒化され、メルカプツール酸として尿中へ排泄されるが、GSH が低下した場合に、肝細胞内のオルガネラや細胞膜、タンパクや脂質などを障害し、肝細胞死を引き起こすと考えられている (7) (図 1)。APAP 肝障害の発生時には NAPQI によってミトコンドリア活性酸素種が発生し、さらにミトコンドリア膜透過性を伴い、強いミトコンドリア傷害を生じることが知られているが、細胞障害から細胞死に至る過程は未だ不明瞭である (8)。

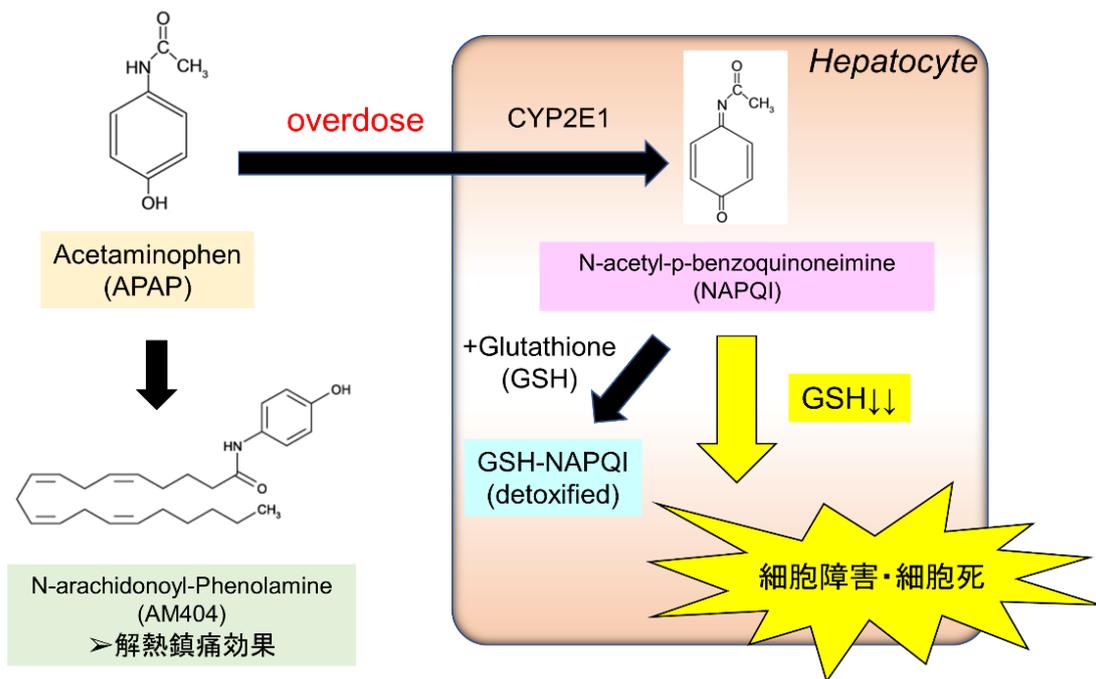


図1. アセトアミノフェン (APAP) 急性肝不全の発症機序

過剰摂取した APAP は肝細胞内で CYP2E1 によって代謝され、NAPQI となる。NAPQI はグルタチオン (GSH) 存在下ではグルタチオン抱合によって無毒化されるが、GSH 低下をきたした際に、ミトコンドリアを始めとする様々なタンパク、脂質、細胞内小器官 (オルガネラ) を傷害し、細胞障害・細胞死を引き起こすと考えられている。

2012年に新たな制御された細胞死 (regulated cell death, RCD) である ferroptosis (以下フェロトーシス) がコロンビア大学の Stockwell らによって報告された (9, 10)。フェロトーシスは、Ras 遺伝子変異を有する癌細胞を選択的に殺傷する低分子化合物をスクリーニングする過程で見出された。Stockwell らは、癌細胞において新規化合物である RSL-3 と Erastin によって生じる細胞死に着目し、RSL-3 は細胞内で GSH 依存的に抗脂質酸化作用を発揮するグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) を直接阻害すること、Erastin はシステイントランスポーターである systemXc- (xCT) を阻害し、GSH を低下させることで間接的に GPX4 の作用を阻害することを発見した。GPX4 が直接、もしくは GSH レベルの低下によって間接的に障害された場合に、細胞内脂質過酸化物の異常蓄積によって細胞死がもたされ、かつこの脂質過酸化と細胞死は鉄キレート剤で抑制されることから、「鉄依存的な細胞死=フェロトーシス」と命名された (10, 11) (図 2)。近年、フェロトーシスは特定の癌細胞のみならず、神経変性疾患や腎疾患、呼吸器、心血管疾患など様々な病態に関与することが報告されている (10, 12)。肝疾患においては虚血再灌流障害やヘモクロマトーシス、アルコール性肝炎や非アルコール性肝炎への関与が近年、相次いで報告されている。(13-17)。

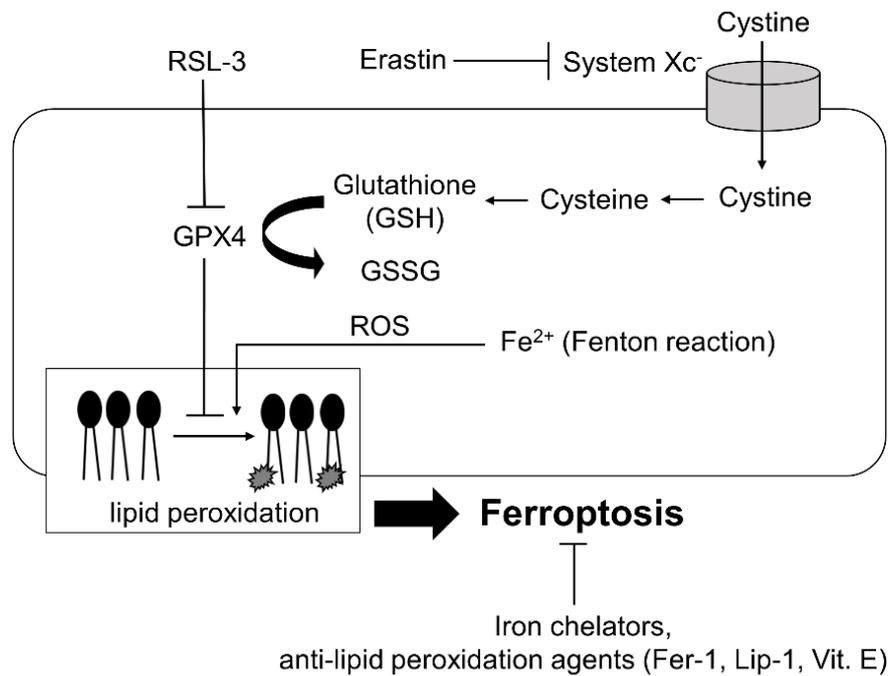


図 2. 古典的 Ferroptosis (フェロトーシス) のメカニズム

フェロトーシスは当初、RSL-3 が GPX4 を直接阻害した場合、もしくは Erastin によって System Xc⁻ が阻害された際に GSH 低下により間接的 GPX4 が阻害された場合、鉄依存性の細胞膜リン脂質の過酸化物の蓄積によってもたらされる細胞死として発見された。フェロトーシスは Ferrostatin-1 (Fer-1) や Liproxstatin-1 (Lip-1) が特異的な阻害剤であり、また鉄キレート剤やビタミン E (vit.E) でも抑制されることが知られている。

APAP 急性肝不全肝障害の発生時には GSH の低下が起点となることから、フェロトーシスが関与することが推察される。初代培養肝細胞、および肝細胞株を用いた実験では、APAP 刺激で誘導される細胞死の一部が、フェロトーシス阻害剤で抑制されることが報告されているが、その詳細なメカニズムや生体内での APAP 急性肝不全への関与の有無は不明瞭である (18)。今回私は、APAP 急性肝不全とフェロトーシスに関連について、病態モデルマウスを用いて解析を行い、生体内でのフェロトーシスの関与とその分子機構、フェロトーシス制御を標的とした臨床応用の可能性を検討した。

2. 実験材料と方法

2-1. 使用動物

C57BL5 マウス、雄、8~10 週齢（日本 SLC から購入）を用いた。いずれも標準的な飼育環境下（室温 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\%\pm 5\%$ 、12/12 時間の明暗周期）で飼育し、市販の食餌（CE-2、日本クレア）と水を与えて飼育した。実験動物を含む全ての手順は自治医科大学動物実験規定を遵守した上で行った（承認番号 No. 17141-01）。長鎖脂肪酸アシル CoA 合成酵素（Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4, ACSL4）ノックアウトマウスとその Littermates である野生型マウス（雄、8~10 週齢）は、昭和大学薬学部衛生化学教室で繁殖されているものを使用し、同施設動物実験規定を遵守した上で、実験は同研究室にて実施した（承認番号 No. 29026）。

2-2. APAP 急性肝不全モデル

APAP (Sigma, St. Louis, MO) は、37°Cに加温した生理食塩水に超音波振動下に溶解し、30G 針を用いて腹腔内投与した。APAP 肝障害は摂食状態 (GSH 生合成レベル) や日内変動 (サーカディアン) が影響するため、実験前日の 17 時から 16 時間の絶食・自由飲水とし、実験当日の午前 9 時に APAP 投与を行った。APAP 投与後も絶食・自由飲水とし、生存解析の実験については 6 時間経過以降、自由食餌・飲水とした。マウスはイソフルラン全身麻酔下に腹部を切開し、後大静脈から 400 μ l の採血を行った後、門脈から phosphate-buffered saline (PBS) 1 ml をフラッシュした後、肝組織を採取し、安楽死させた。

APAP 肝障害に対する抑制効果を検討するため、Ferroptosis 阻害剤である Ferrostatin-1 (Fer-1, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) 及び鉄キレート剤 Deferoxamine (DFO, Abcam, Cambridge, MA)、 α -Tocopherol (α -Toc, 和光ケミカル、大阪、日本) の投与を行った。Fer-1 と α -Toc は PEG400 (和光ケミカル) に溶解した後、TWEEN80 (和光ケミカル) 及び蒸留水で希釈し、それぞれ Fer-1 (10 mg/kg) と α -Toc (100 mg/kg) を APAP 投与の 1 時間前に腹腔内投与し、コントロール群には溶媒のみ (vehicle) を投与した。DFO は PBS に溶解し、APAP 投与 6 日前から、APAP 投与当日の 1 時間前まで、合計 7 回 (100 mg/kg/日) 腹腔内投与を行い、コントロール群には PBS のみを投与した。

2-3. ハイドロダイナミクス遺伝子導入法

長鎖脂肪酸アシル CoA 合成酵素 (Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4, ACSL4)、及び緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein, GFP) を標的とする sgRNA を CRISPR direct (<https://crispr.dbcls.jp/>) で設計し (19)、Bbs I-linearized pX330 vector (Addgene, #42230) へクローニングし、プラスミド DNA を精製した。使

用した sgRNA 配列は以下の通りである (表 1)。

表 1 sgRNA 配列

px330-ACSL4-FP	CACCGAAGTGTGTGACAGAGCGATA
px330-ACSL4-RP	AAACTSTCGCTCTGTCACACACTTC
px330-GFP-FP	CACCGGAGCTGGACGGCGACGTAAA
px330-GFP-RP	AAACTTTACGTCGCCGTCCAGCTCC.

ハイドロダイナミクス遺伝子導入法は 8 週齢のマウスを Isoflurane 麻酔下に陰茎静脈に 25G 針を穿刺し、プラスミド DNA 溶液 (10 μ g/1.6 mL 生理食塩水) を 5 秒間で急速静注した。注入後は一時的な下顎挙上と換気補助を行い、十分な自発呼吸と麻酔覚醒を確認後にケージ内へと戻した。ハイドロダイナミクス法実施の 1 週間後に APAP 投与実験を実施した。

2-4. 血清 AST、ALT 測定

血液はキャピジェクト (テルモ、東京、日本) に回収し、遠心分離し血清を回収した。血清を aspartic aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT) 測定用のスライドに滴下し、Fuji-drychem (富士フィルム、東京、日本) を用いて測定した。

2-5. 組織学的解析

肝組織は 10% 中性ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋した。肝組織切片は 4 μ m 厚で作成し、Hematoxylin-eosin (HE) 染色を行い、APAP 肝障害病理組織スコアを用いて行った (20) (表 2)。

表 2 APAP 肝障害病理組織スコア

Grade 0	障害なし
Grade 1	数個の肝細胞障害のみ
Grade 2	中心静脈周囲に 1-2 列の肝細胞壊死
Grade 3	中心静脈周囲に 2-3 列の肝細胞壊死
Grade 4	中心静脈周囲に 3-4 列の肝細胞壊死
Grade 5	5 列以上の中心静脈周囲壊死と出血を伴う

2-6. 免疫組織染色

酸化ストレスマーカー (4-hydroxy-2-nonenal [4-HNE]) と、白血球マーカー (CD45)、ACSL4 (FACL-4)、CYP2E1 の検出を行った。4-HNE 染色は、組織切片を脱パラフィン、Target Retrieval Solution (DAKO, CA, USA) で抗原賦活、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ後にヤギ血清でブロッキングを行った。その後、MOM mouse IgG blocking reagent (MOM Immunodetection Kit; Vector Laboratories, CA, USA) でブロッキングし、4-HNE 抗体 (clone HNEJ-2, 日研ザイル、静岡、日本) を 4°C、overnight でインキュベートした。Biotin 標識抗体および avidin-peroxidase (VECTASTAIN ABC kit; Vector Laboratories) と反応させ、DAB substrate kit (Vector Laboratories) で発色させた。

CD45 及び Fatty acid-CoA ligase 4 (FACL-4)、CYP2E1 染色については抗原賦活、内因性ペルオキシダーゼブロック後に 1%BSA でブロッキングを行った。その後、Rat Anti-MouseCD45 抗体 (BD Bioscience、#550539)、Gout Anti-MouseFACL-4 抗体 (Abcam、ab155282)、Rabbit Anti-Mouse CYP2E1 抗体 (Proteintech、#19937-1-AP) を 4°C、overnight でインキュベートした。ニチレイシンプルステインマウス MAX-PO(Rat) (ニチレイバイオサイエンス、東京、日本) を室温で 1 時間反

応させ、DAB substrate kit で発色させた。全てヘマトキシリンを用いて対比染色を行い、脱水・透徹後に封入した。各種スライドはデジタル蛍光顕微鏡 (FSX-100; オリンパス、東京、日本) を用いて撮影した。

2-7. グルタチオン含有量測定

肝組織中のグルタチオン含有量は、採取した肝組織を用いて Total Glutathione Quantification Kit (Dojindo)を用い、プロトコールに従って測定した。総グルタチオン量 (Total GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) を測定し、還元型グルタチオン (GSH) は $GSH = \text{total GSH} - 2GSSG$ にて算出した。

2-8. アポトーシス解析 (TUNEL 染色)

組織切片を脱パラフィンし、MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct (MBL、愛知、日本)キットを用い、プロトコールに従って行った。陽性コントロールにはラット胸腺組織を使用し、スライドはデジタル顕微鏡 (FSX-100; オリンパス、東京、日本) を用いて撮影した。

2-9. マロンジアルデヒド測定

肝組織中のマロンジアルデヒド (MDA) の定量は TBARS Assay Kit (Cayman) キットを用い、プロトコールに従って測定した。

2-10. Real-time RT-PCR 法

肝組織から ISOGEN (ニッポン・ジーン、東京、日本) を用いて RNA を抽出した。Superscript VILO™ cDNA Synthesis Kit (life technologies, MD, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA とした。逆転写は 25°C、10 分、続けて 42°C、60 分で反応

させ、85°C、5分保温して反応を停止させた。合成した cDNA は SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ、滋賀、日本)、Takara TP960 PCR Thermal Cycler Dice Detection System (タカラバイオ)を用いて mRNA を検出した。PCR 条件は 95°C、30 秒の前反応後、2-step PCR (95°C、5 秒) アニーリング・伸長反応(60°C、30 秒)を 40 サイクルとして行った。内部標準 (*Actb*) に対する目的の mRNA の比を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて計算した。結果は、コントロールマウスに対する割合で示した。

使用したプライマー配列は表 3 のとおりである。

表 3 プライマー配列

Gene	Forward	Reverse
<i>Actbt</i>	5'-CACAGCTTCTTTGCAGCTCCTT-3'	5'-AGCGCAGCGATATCGTCAT-3'
<i>Ccl2</i>	5'-GGCTCAGCCAGATGCGTTAAC-3'	5'-GCCTACTCATTGGGATCATCTTG-3'
<i>Cyp2e1</i>	5'-GGGACATTCTGTGTCCAG-3'	5'-CTTAGGGGAAAACCTCCGCAC-3'
<i>Emr</i>	5'-CCTGGACGAATCCTGTGAAG-3'	5'-GGTGGACCACAGAGAGTTG-3'
<i>Ly6g</i>	5'-TGCTCTGGAGATAGAAGTTATTGTG-3'	5'-TTACCAGTGATCTCAGTATTGTCCA-3'
<i>Il1b</i>	5'-TGAAGTTGACGGACCCCAA-3'	5'-TGATGTGCTGCTGTGAGATT-3'
<i>Il6</i>	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'	5'-CACGATTTCCAGAGAACATGTG-3'
<i>Ptgs2</i>	5'-GGGAGTCTGGAACATTGTGAA-3'	5'-GTGCACATTGTAAGTAGGTGGACT-3'

2-11. ウェスタンブロット法

マウス肝組織を RIPA buffer (プロテアーゼ阻害剤カクテル、PMSF、NaF、Na₃VO₄ を添加) に入れ、ホモジナイザーを用いて粉碎して遠心し、その上清を用いた。ホモジネートのタンパク濃度を測定し、調整した後、Laemmli サンプルバッファーを加えて、95°C、5分処理した。SDS-PAGE で分離し、PVDF

膜に転写した。PVDF 膜を Blocking-One (ナカライテスク、京都、日本)で1時間ブロッキングした後、1次抗体(表4)で4°C、overnightでインキュベートした。続いて2次抗体を室温で1時間インキュベートした。検出はWestern Blot HRP Substrate (タカラバイオ)を用いて化学発光させ、Amersham Imager 680 (GE Healthcare Life Sciences, USA)で撮影した。

表4 1次抗体

抗体	由来種	メーカー	型番	希釈率
caspase-3/cleaved caspase-3 抗体	Rabbit	Cell Signaling	#9665	1:1000
RIP3K 抗体	Rabbit	Cell Signaling	#95702	1:1000
CYP2E1 抗体	Rabbit	Proteintech	#19937-1-AP	1:1000
GPX4 抗体	Mouse	Santa Cruz	sc-166570	1:1000
xCT 抗体	Rabbit	Proteintech	#26864-1	1:1000

2-12. 脂質メディエーターの質量分析

APAP 投与後3時間後の肝組織を門脈からPBS 1 mLフラッシュした後に採取し、解析まで-80°Cで保存した。LC/MS解析は既報を参考に行った(21)。肝組織を内部標準と0.1%ギ酸を含むメタノール中でホモジナイズし、抽出した。分離したメタノール層をStrata X polymer reserved phase column (33 µm, 10 mg; Phenomenex, Torrance, CA)を用いて抽出した。カートリッジを0.1%ギ酸、15%エタノール、石油エーテル各1 mLで洗浄した後、0.1%ギ酸を含むメタノール300 µLで脂質を溶出した。溶解液を蒸発させ、30 µLのメタノールに再構成した。抽出した脂質を、LC-MS-8060 (Shimadzu, Kyoto, Japan)で解析し、脂質メディエーターバージョン2ソフトウェアパッケージ(Shimadzu)を用いて分析した(21)。

Deuterium-labeled 6-keto prostaglandin F1 α -d4、prostaglandin F2 α -d4、prostaglandin E2-d4、prostaglandin D2-d4、Leukotriene B4-d4、15(S)-HETE-d8、12(S)-HETE-d8、5(S)-HETE-d8、PAF C-16-d4、oleoyl ethanolamide-d4 は Cayman Chemical (An Arbor, MI)から購入し、内部標準として使用した。

2-13. ホスファチジルコリン過酸化物 (PCOOH) の構造異性体解析

APAP 投与後のマウス血液を下大静脈から採取し、4000 rpm、4°C、20 分間遠心し血清を分離し、解析まで-80°Cで保存した。脂質成分の抽出と LC-MS/MS による PCOOH 異性体の解析は、東北大学大学院農学研究科 機能分子解析学教室で既報に従って実施した (22, 23)。

血清 200 μ L に 0.9% KCl 溶液 400 μ L を加え、2.4 mL クロロホルム/メタノール (2:1, v/v) を添加し、5 分間攪拌した後、遠心分離 (1,000 g、4°C、20 分間) を行った。その後、脂質層 (下層) を回収し、残った中間層と下層にクロロホルム/メタノール (10:1, v/v) を 1.6 mL 加え、再度抽出 (攪拌 [5 分間]、遠心分離 [2,000 g、4°C、20 分間]) した。再抽出後に得られた下層を回収し、回収済の下層 (脂質層) と合わせて乾固させた。乾固後、得られた総脂質画分をクロロホルム/2-プロパノール (2:1, v/v) 600 μ L に溶解し、Silica Sep-Pak cartridge (Waters, Tokyo, Japan)を用いて固相抽出した。固相抽出カラムは 1.5 mL のクロロホルム/2-プロパノール (2:1, v/v) で平衡化した後、500 μ L のサンプル溶液をロードし、1.5 mL のクロロホルム/2-プロパノール (2:1, v/v) で洗浄後、2 mL のメタノールで溶出した。溶出したメタノール溶液を乾固し、再度 200 μ L のエタノールに再溶解し、20 μ L を LC-MS/MS 解析に用いた。

LC-MS/MS 解析における LC 条件は下記の通りである。

- ・カラム : CHIRALPAK IB-3 column (2.1 mm i.d. \times 150 mm, 3 μ m, Daicel, Osaka,

Japan)

・移動相：

A：水、B：メタノール

グラジエント条件：

(min)	0.0	13.1	13.2	22.0
B (%)	80	84.6	100	100
流速 (mL/min)	0.30	0.23	0.30	0.30

・カラム温度：40°C

トリプル四重極型質量分析計は 4000 QTRAP mass spectrometer (SCIEX, Tokyo, Japan)を使用した。Multiple reaction monitoring (MRM) モードで、以下の PCOOH 異性体を測定した；PCOOH bearing 9-10*E*,12*Z*-hydroperoxyoctadecadienoic acid (HPODE) (9-10*E*,12*Z*-HPODE PC); m/z 812.7 > 388.2, 9-10*E*,12*E*-HPODE PC; m/z 812.7 > 388.2, 10-8*E*,12*Z*-HPODE PC; m/z 812.7 > 684.5, 12-9*Z*,13*E*-HPODE PC; m/z 812.7 > 683.5, 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC; m/z 812.7 > 541.5, and 13-9*E*,11*E*-HPODE PC; m/z 812.7 > 541.5)。

2-14. 統計学的手法

数値データは、平均値±標準誤差で表示し、独立 2 群間の比較には Student's *t* 検定、もしくは Mann-Whitney 検定を用いた。多群間比較には Kruskal-Wallis 検定、もしくは Mann-Whitney 検定を用い、Bonferroni の補正を行った。統計解析は GraphPad Prism7 (Graphpad Software.CA, USA)を用いて行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

3- 結果

3-1. APAP 急性肝不全モデルマウスの作成

APAP を 100 mg/kg、150 mg/kg、200 mg/kg と投与量を変え、APAP 投与 6 時間後に採血を行い、血清 AST、ALT を測定したところ、200 mg/kg の投与で顕著な AST、ALT 上昇を認め、Fer-1 投与群では抑制された (図 3A)。続けて APAP 200 mg/kg を投与し、1、3、6、24 時間後に採血を行い、血清 AST、ALT の経時的変化を評価したところ、3~6 時間の時点でピークを取り、その後は低下傾向であった。(図 3B)。以上から、APAP 投与後の肝細胞死は、投与後 3 時間の早期の時点で発生しており、今後の検討は APAP 200 mg/kg 投与を基本とし、投与後 3 時間での血清、及び肝組織を解析する方針とした。

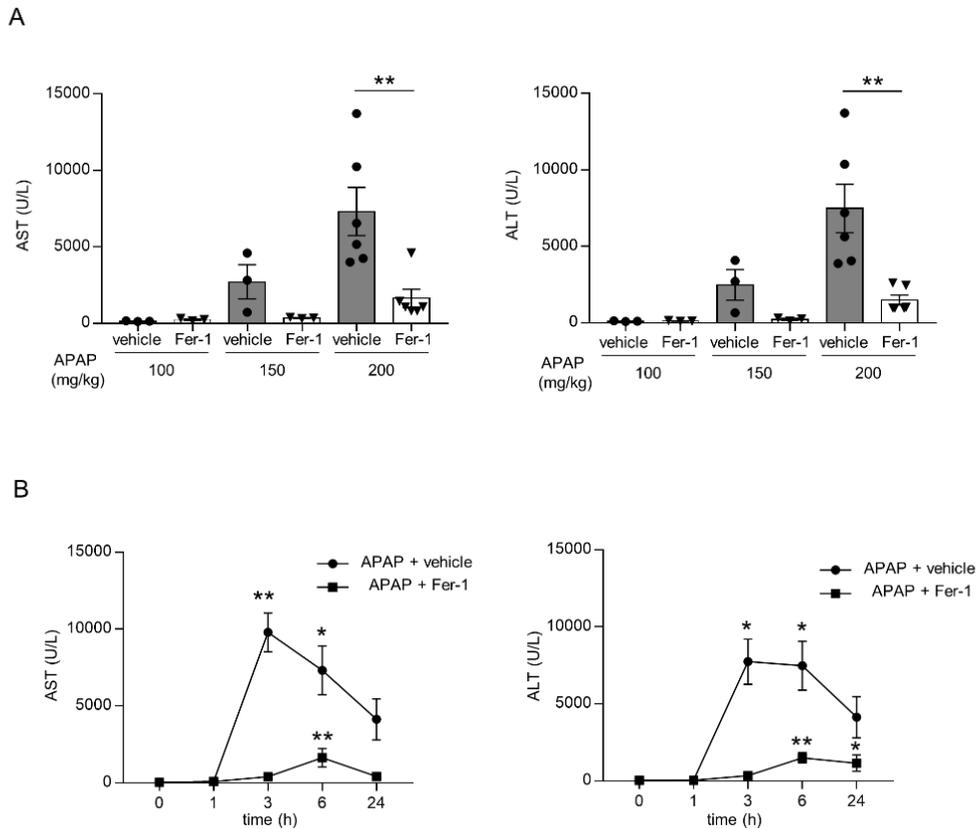


図 3. APAP 急性肝不全モデルの作成

C57BL/6 マウス (8~10 週齢、雄) に対し 16 時間の絶食後に APAP を腹腔内投与し、血清 AST、ALT 値を測定した。(A) APAP 投与量を変え、6 時間後に血清 AST、ALT 値を測定した(n=3-6 匹)。(B) APAP 200 mg/kg 投与後に経時的に採血を行い、血清 AST、ALT 値を測定した (n=3 匹)。

3-2. APAP 急性肝不全に対する Fer-1 の効果

APAP 200 mg/kg 投与 3 時間後に血清 AST、ALT 値の測定を行ったところ、vehicle 群では血清 AST、ALT 値の上昇を認め、Fer-1 投与で抑制された(図 4A)。HE 染色による組織学的評価では、APAP 投与によって APAP 肝障害に特徴的な zone3 領域の変性・壊死が認められ、この組織障害は Fer-1 投与群

で著明に抑制された(図 4B)。さらに、致死量 (400 mg/kg) の APAP を投与し、生存解析を行ったところ、vehicle 群では 24~48 時間で全マウスが死亡したのに対し、Fer-1 投与群では全例が 72 時間以上生存した(図 4C)。

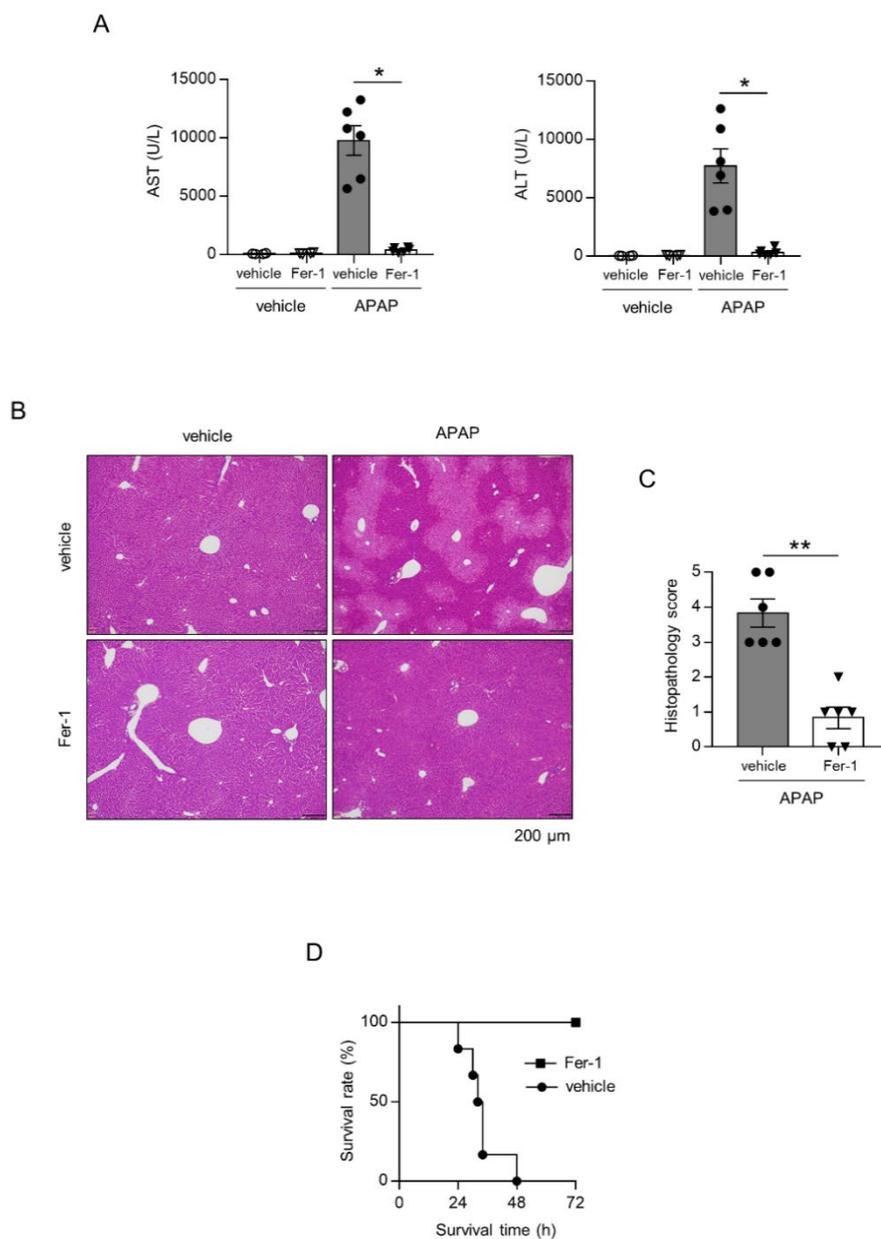


図 4. Fer-1 によるアセトアミノフェン (APAP) 急性肝不全抑制効果

Fer-1 投与後に APAP を投与し、3 時間後に血清 AST 値、ALT 値を測定(A)と組織学的評価 (B,C) を評価した。(D) 致死量の APAP (400 mg/kg) を投与し、生存率を解析した(n=3-6 匹)。

APAP 肝障害の発生は CYP2E1 に依存するため、Fer-1 が CYP2E1 の mRNA 発現やタンパク発現に影響しないことを確認した (図 5)。

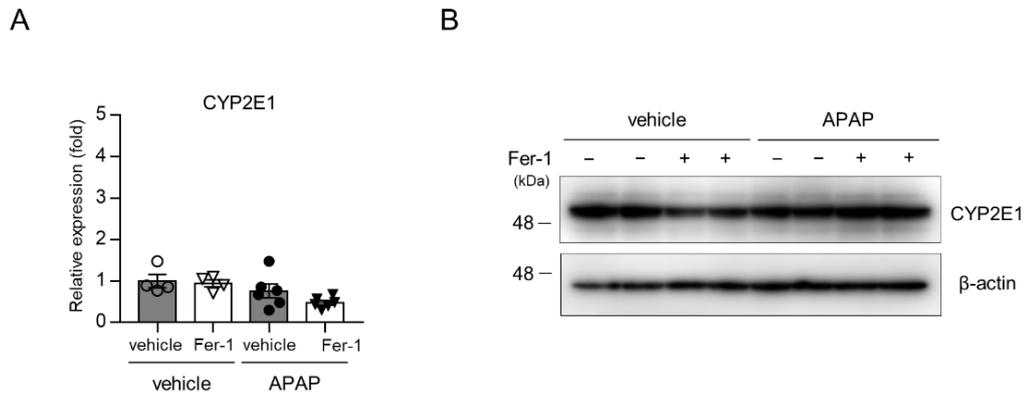


図 5. Fer-1 投与の CYP2E1 への影響

APAP を投与し、3 時間後の肝組織を用いて CYP2E1 の発現を RT-PCR (A, n=4-6 匹)、及びウェスタンブロット法 (B, n=2 匹) で解析した。

フェルトーシス発生時の特徴的な脂質過酸化マーカーとして、*in vivo* での組織レベルでは *Ptgs2* mRNA 上昇、MDA 量の上昇、4-HNE 染色陽性像が知られている。APAP 投与によって肝組織中の *Ptgs2* mRNA の上昇を認め、Fer-1 によって抑制された (図 6A)。また MDA 量も、APAP 投与によって増加し、Fer-1 で抑制された (図 6B)。4-HNE 染色では、APAP 投与によって肝静脈周囲の zone3 の障害部位に一致して陽性像を認め、Fer-1 投与群では抑制された (図 6C)。

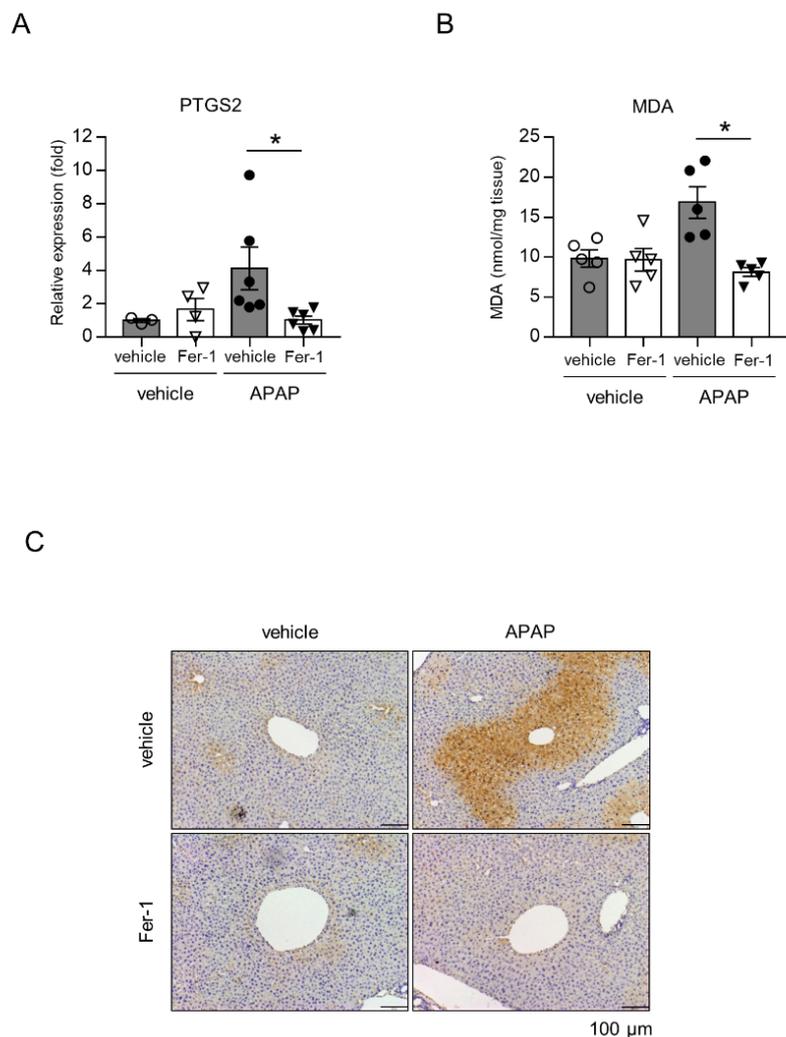


図 6. Fer-1 投与による脂質過酸化の抑制効果

APAP を投与 3 時間後の肝組織を用いて *Ptgs2* mRNA 発現を RT-PCR で (A)、組織中の MDA 量を MDA-TBARS で解析した(n=4-6 匹)。(C)4-HNE 染色を行った(n=4-6 匹)。

フェロトシスは当初、癌細胞において GPX4 が直接阻害された時、もしくは System Xc⁻ (xCT) が阻害された際に細胞内 GSH 低下が生じることで発生すると報告されたことから、これら分子のタンパク発現を解析したところ、APAP や Fer-1 の投与による有意な発現変化は認めなかった (図 7A)。一方、APAP 肝障害は GSH 低下によって発生することが知られており、GSH の

測定を行ったところ、還元型 GSH を APAP 投与で減少を認めたが、Fer-1 投与群でその低下が抑制されていた。酸化型グルタチオン (GSSG) は有意な増減は認めなかった。

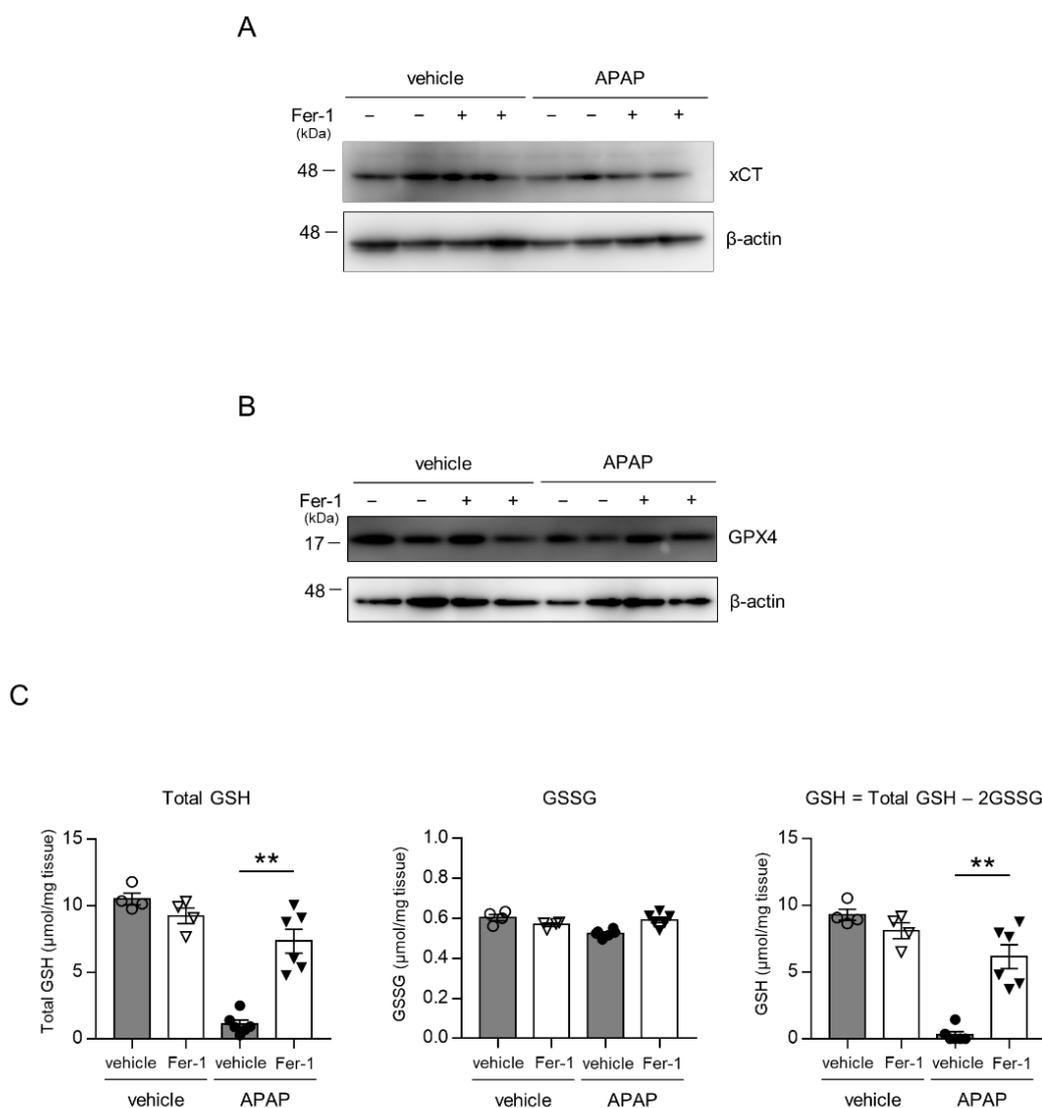


図 7. Fer-1 投与による xCT、GPX4 発現と GSH の変化

APAP 投与 3 時間後の肝組織を用いて xCT (A) 及び GPX4 (B) について、タンパク発現をウェスタンブロット法で解析した (n=2 匹)。また組織中の還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) 量を測定した (C)。

3-3. APAP 急性肝不全におけるアポトーシス、ネクロプトーシスの関与

他の RCD の関与を検討するため、アポトーシスの実行因子である caspase-3、cleaved caspase-3 の発現をウェスタンブロット法で評価したが、APAP 投与による caspase-3 の発現変化や cleaved caspase-3 は検出されなかった(図 8A)。ポジティブコントロールにはマウス胸腺を用い、デキサメサゾン (DEX) 100 mg/kg、500 mg/kg 投与後 6 時間後に採取した。TUNEL 染色でもその陽性細胞は検出されず、アポトーシスの関与は否定的だった(図 8B)。さらに、ネクロプトーシスの実行因子である RIP3K のウェスタンブロットでは、肝組織において RIP3K は検出されず、ネクロプトーシスの関与も否定的であった(図 8C)。ポジティブコントロールにはマウス線維芽細胞 (L929) を用いた。

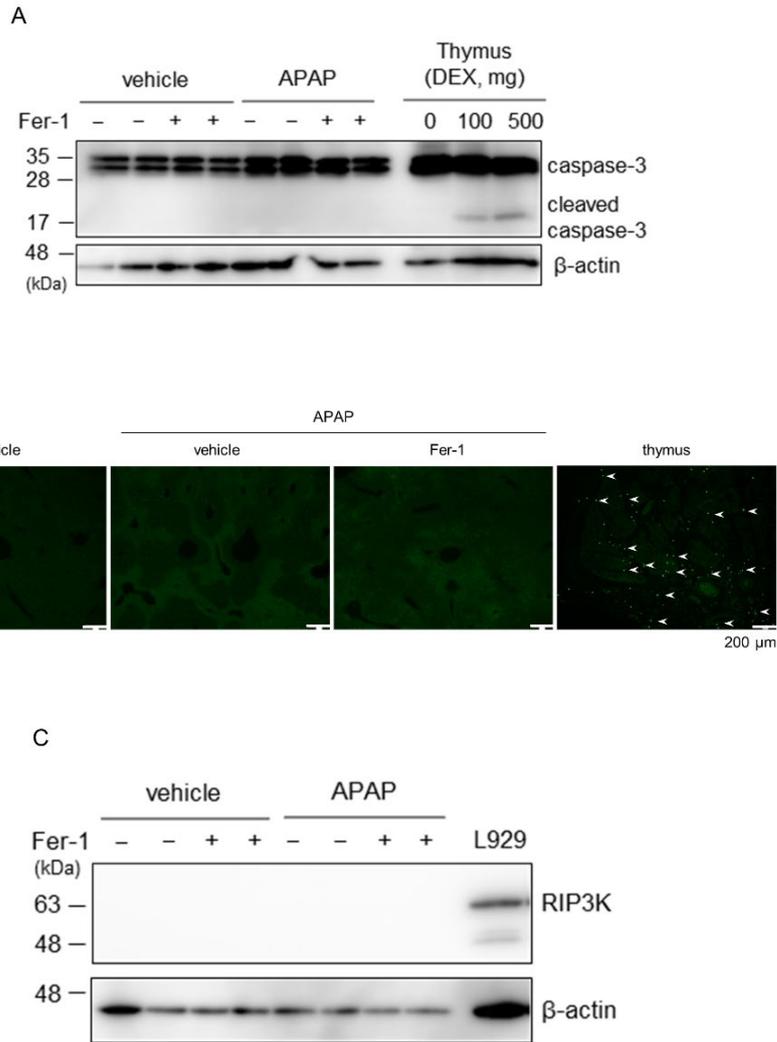


図 8. apoptosis、necroptosis の関与

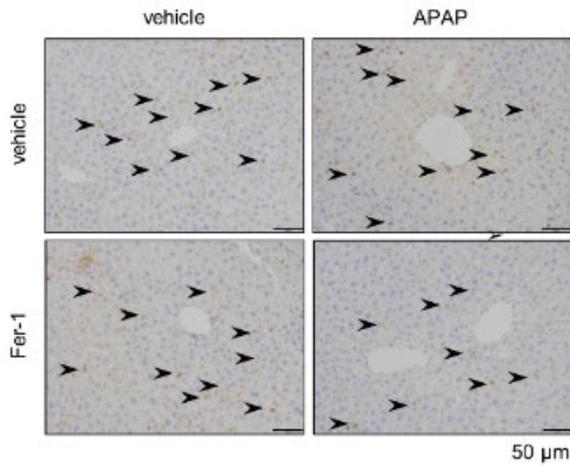
(A) APAP 投与 3 時間後の肝組織を用いて caspase-3、及び cleaved caspase-3 の発現をウェスタンブロット法で解析した。(B) TUNEL 染色の評価を行った。Positive control はラット胸腺組織を用いた。(C) RIP3K の発現をウェスタンブロット法で解析した。

3-4. APAP 急性肝不全における炎症細胞・炎症性サイトカインの関与

APAP 肝障害における炎症細胞の関与を検討したが、免疫組織染色で CD45 染色陽性細胞の有意な変化を認めず、*Ly6g* や *Emr-1*、*Ccl2* の mRNA も有意な変化を認めなかった。*Il1b*、*Tnfa*、*Il6* の mRNA 発現も有意な増減を認めなかった。すなわち、フェロトーシス初期においては、炎症細胞や炎症性サイ

トカインの関与は認められなかった。

A



B

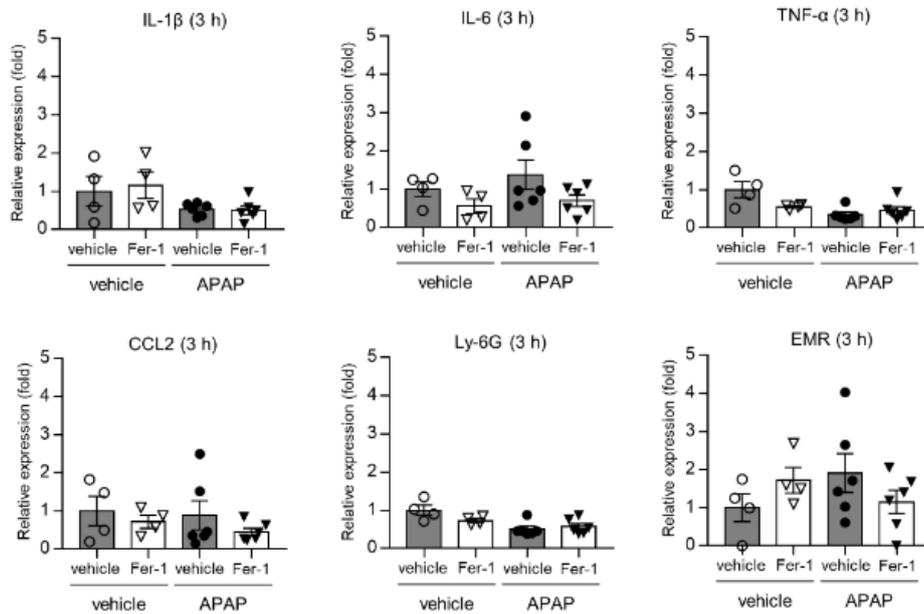


図 9. Fer-1 投与による xCT、GPX4 発現と GSH の変化

(A) アセトアミノフェン (APAP) 投与 3 時間後の肝組織を用いて CD45 免疫染色を行った。(B) また *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Ccl2*, *Ly6g*, *Emr* の mRNA 発現を RT-PCR で解析した。(n=4-6 匹)。

3-5. APAP 急性肝不全に対する鉄キレート剤の効果

フェロトーシスは鉄依存的な細胞死であり、鉄キレート剤で抑制される (9, 10)。そこで、APAP 急性肝不全が鉄依存性に発生するか否かを検討するため、鉄キレート剤 DFO を用いて検討した。DFO 100 mg/kg の 7 日間連続投与により、コントロール群と比較して肝組織中の鉄量が有意に減少することを確認した。

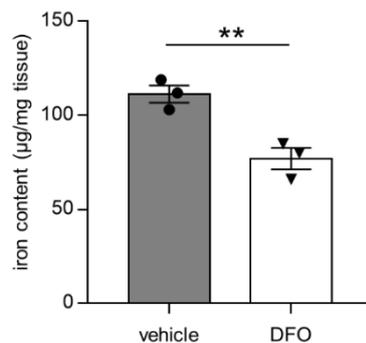
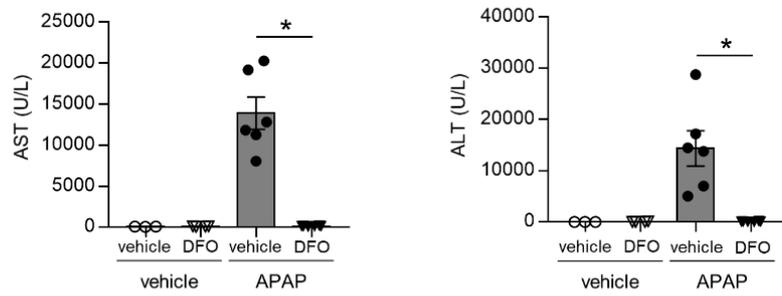


図 10. DFO 投与による肝組織中鉄含有量の減少

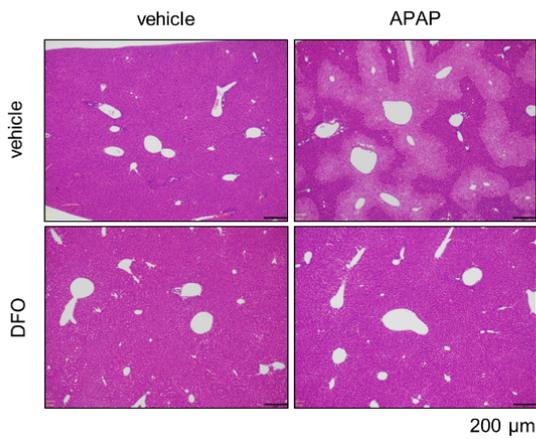
DFO (100 mg/kg, 7 日間) 投与後の肝組織中の鉄量を測定した。

DFO 投与後に APAP 200 mg/kg 投与を行ったところ、3 時間後の血清 AST、ALT 値の上昇は DFO 投与群で抑制された (図 11A-D)。また肝組織障害も DFO 投与群で抑制された。DFO 投与の有無で CYP2E1 mRNA 発現には影響ないことを確認した (図 11E)。

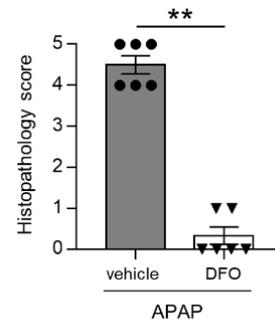
A



B



C



D

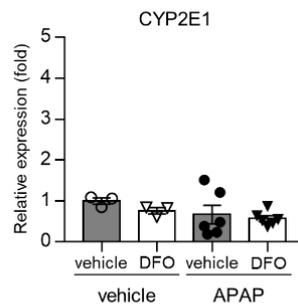


図 11. DFO 投与のアセトアミノフェン (APAP) 急性肝不全への影響

DFO (100 mg/kg, 7日間) 投与後に APAP を投与し、(A) 血清 AST、ALT 値、(B,C) 肝組織障害を評価した (n=4-8 匹)。(D)DFO 投与による CYP2E1 発現への影響を RT-PCR で解析した。

4-HNE 染色陽性領域や Ptgs2 mRNA の上昇、組織中 MDA の上昇も DFO 投与で抑制され、総グルタチオン量の低下も認めなかった。以上から、APAP 急性肝不全における初期の細胞死とそれに伴う脂質過酸化は鉄キレート剤で抑制され、フェロトーシスが主体であることが支持された。

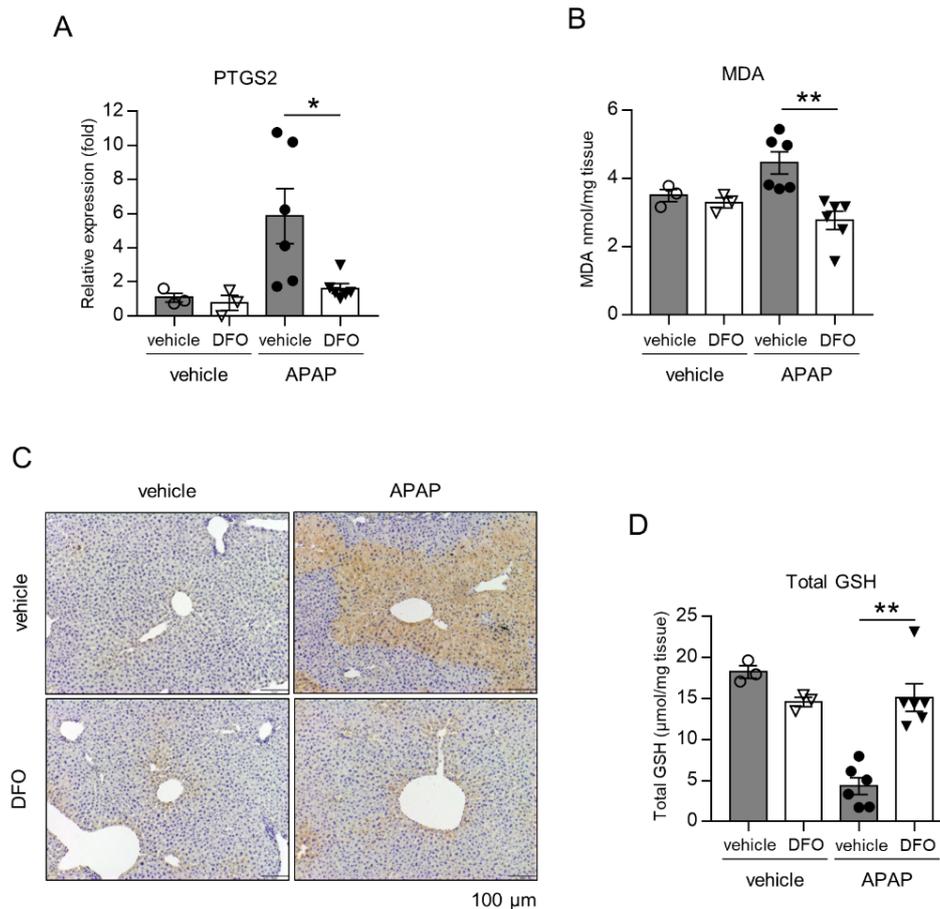


図 12. DFO 投与による脂質過酸化の抑制効果

APAP を投与 3 時間後の肝組織を用いて Ptgs2 mRNA 発現を RT-PCR で (A)、組織中の MDA 量を MDA-TBARS で解析した(n=4-6 匹)。(C)4-HNE 染色を行った(n=4-6 匹)。

3-6. 脂質メディエーターの質量分析結果

APAP 肝障害におけるフェロトキシシス発生時の脂質過酸化を APAP 投与後の肝組織を用いて脂質メディエーターに注目して質量分析を行った。測定した 158 成分の脂質メディエーターのうち、29 種類で APAP 投与による有意な上昇を認め、それらは Fer-1 で抑制された。これらの脂質メディエーターは n-6 系多価脂肪酸由来の代謝産物であり、大部分 (29 種類中 23 種類) がアラキドン酸由来の代謝産物だった。一方で n-3 系多価不飽和脂肪酸由来の代謝産物は有意な増減を認めなかった。

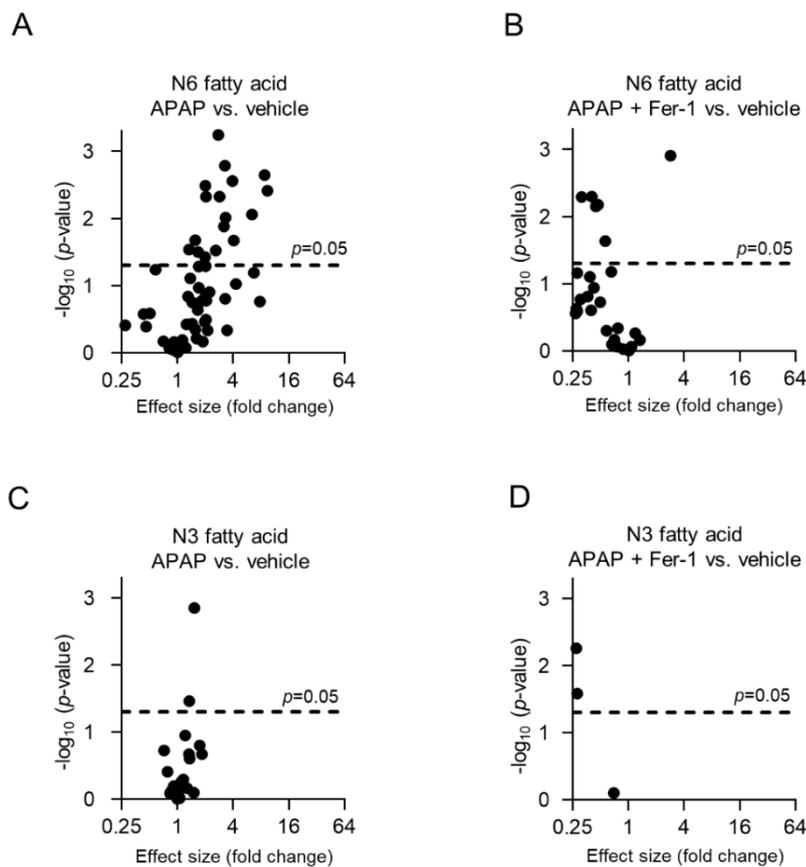


図 13. 肝組織中の脂質メディエーターに対する LC/MS

APAP を投与 3 時間後の肝組織を用いて LC/MS で解析し、volcano plot で表示した(n=3 匹)。

アラキドン酸代謝産物は、代表的な3つの酵素酸化（シクロオキシゲナーゼ [COX]、リポキシゲナーゼ [LOX]、シトクロム P450 [CYP]）によって代謝される。COX 経路で生成される PGD2、LOX で生成される LTC4 と 12-HETE、CYP で生成される 20-HETE と、いずれの経路からの生成物で APAP 投与による上昇と、Fer-1 での抑制を認めた。また、ラジカル酸化で発生する 8-iso-PGF2 α も APAP 投与による上昇と、Fer-1 での抑制が認められた。以上から、APAP 投与によって肝組織中のアラキドン酸をはじめとする n-6 系不飽和脂肪酸の非特異な酸化反応が生じていることが明らかになった

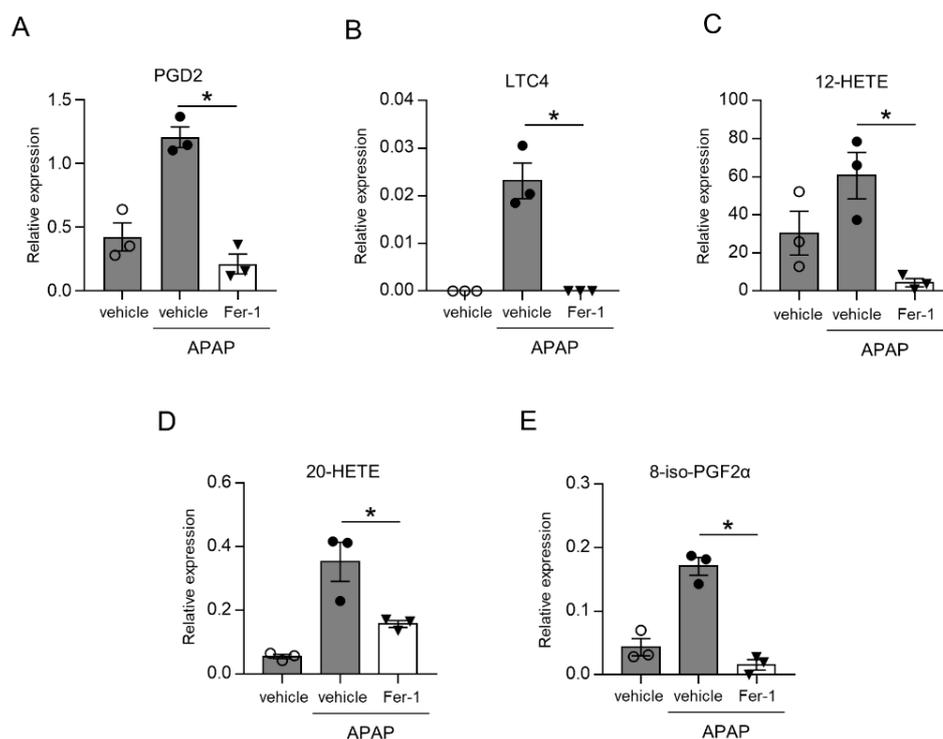


図 14. 肝組織中の脂質メディエーターに対する LC/MS

LC/MS 結果を検出した酸化物毎に相対値で示す。(A)PGD2, (B)LTC4, (C) 12HETE, (D) 20-HETE, (E) 8-iso-PGF2 α (n=3 匹)。

3-7. ACSL4 ノックアウトマウス・ノックダウンマウスでの検討

フェロトーシスの発生には、細胞膜脂質において多価不飽和脂肪酸にアシル CoA を付加する酵素である ACSL4 が必須であるとされている (24, 25)。肝臓での ACSL4 発現を免疫染色で検討したところ、zone3 領域に局在しており、これは CYP2E1 発現部位、さらに APAP での障害部位と一致した(図 15)。

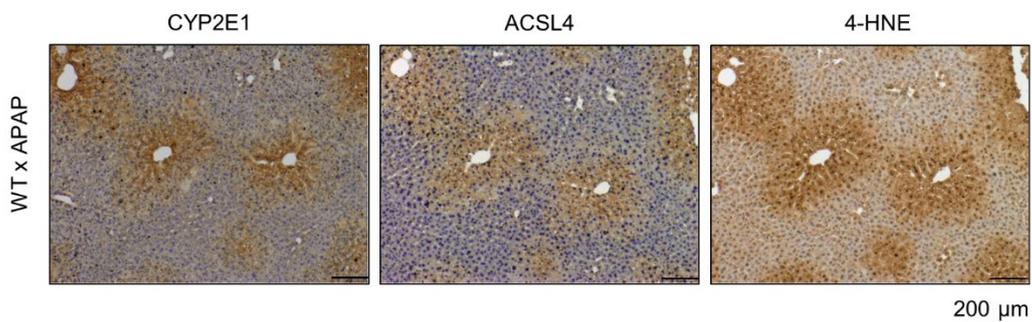


図 15. APAP 投与後の肝組織における ACSL4 発現

APAP 投与後の肝組織で CYP2E1、ACSL4(FACL-4)、4-HNE 染色を同一部位で評価した (n=3 匹)。

APAP 急性肝不全が ACSL4 依存的に発生するかを検討するため、ACSL4 ノックアウトマウスに APAP 投与を行い検討したところ、血清 AST、ALT の上昇は Littermates マウスと比較して抑制された (図 16)。

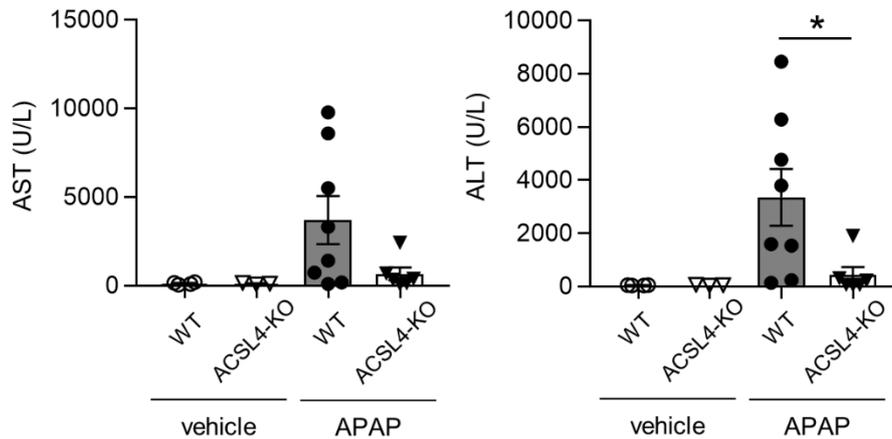


図 16. ACSL4 ノックアウトマウスに対するアセトアミノフェン (APAP) 投与 ACSL4 ノックアウトマウスと野生型マウスに対し、APAP 投与 3 時間後の血清 AST、ALT 値を測定した(n=3-8 匹)。

次に、肝細胞特異的な ACSL4 の役割を検討するため、ハイドロダイナミクス法で肝特異的 ACSL4 ノックダウンマウスを作成し、検討した。まず、蛍光色素 (Kusabira-Orange) を用いて、ハイドロダイナミクス法で肝組織中への遺伝子導入が十分に達成されていることを確認した(図 17A)。次に、ACSL4 の sgRNA を作成し、マウス hepatoma 細胞株である Hepa1.6 へ Lenti-CRISPR ウイルスベクターを用いて導入し、ACSL4 発現低下を確認した(図 17B)。続けて、CRISPR/cas9 システムベクターである px330 へ sgRNA を導入し、プラスミドを作成した(図 17C)。このプラスミドをハイドロダイナミクス法で投入することによって、肝組織中の肝静脈周囲の zone3 領域における ACSL4 発現の低下が生じることを免疫組織染色で確認した。

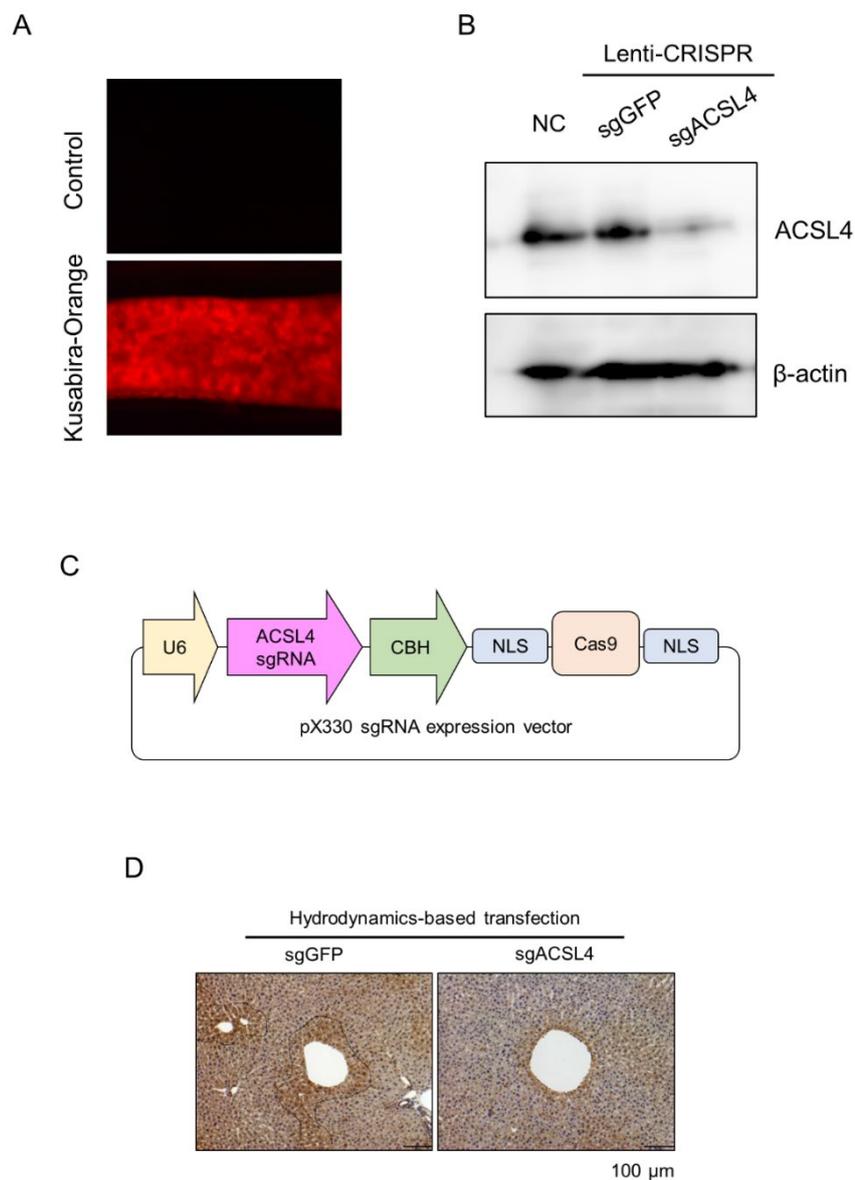


図 17. ハイドロダイナミクス法による ACSL4 ノックダウンマウスの作成
 (A) 蛍光色素 (Kusabira-Orange) をハイドロダイナミクス法で投与し、導入効率を確認した。(B)sgACSL4 を設計し、lenti-CRISPR を用いて Hepa1.6 細胞へ導入し、ACSL4 タンパク発現をウェスタンブロット法で確認した。(C) px330 へ sgACSL4 を導入した。(D) マウスへハイドロダイナミクス法で px330 を投与し、1 週間後に免疫染色で ACSL4 発現を評価した (n=3 匹)。

ハイドロダイナミクス法による肝特異的 ACSL4 ノックダウンマウス作成 1 週間後に APAP を投与したところ、血清 AST、ALT 上昇と組織障害はコントロール群と比較して有意に抑制された(図 18A-C)。また、ACSL4 のノックダウンが CYP2E1 発現に影響ないことも RT-PCR 法で確認した(図 18D)。

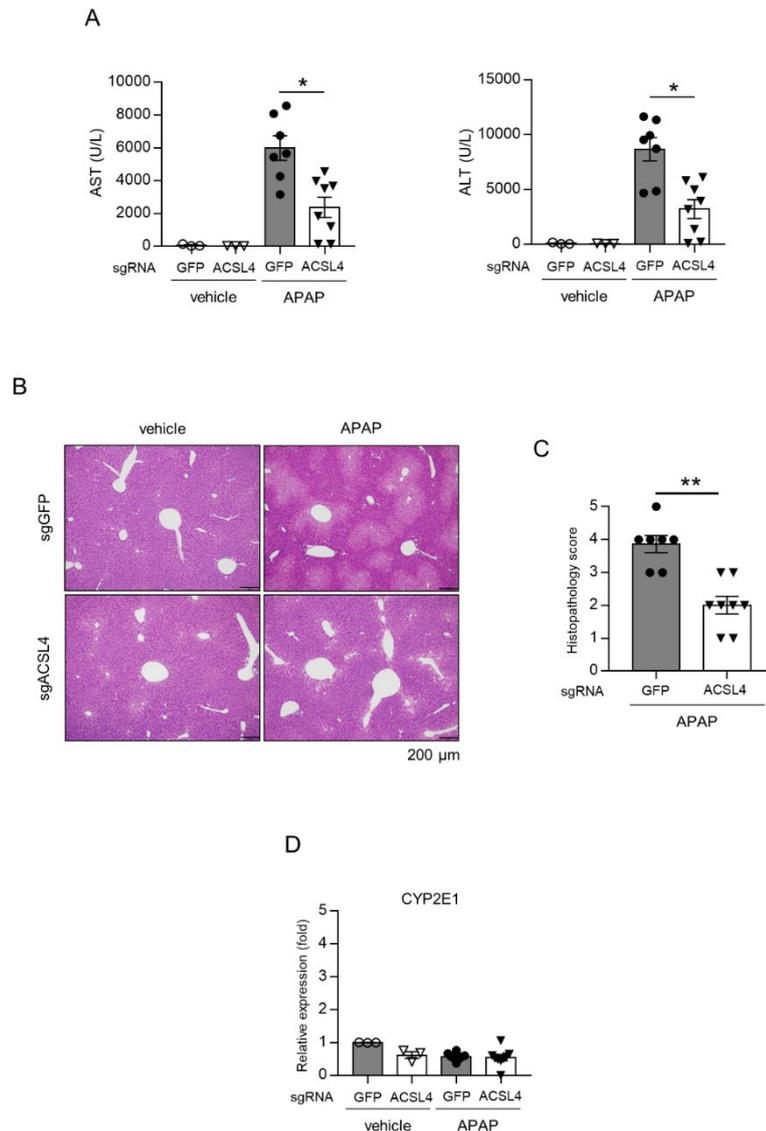


図 18. ACSL4 ノックアウトマウスに対するアセトアミノフェン (APAP) 投与ハイドロダイナミクス法の 1 週間後に APAP 投与を行い、血清 AST、ALT 値の測定 (A)、組織学的評価 (B、C) を行った。また、CYP2E1 発現を RT-PCR で評価した。(n=4-8 匹)。

4-HNE 染色陽性領域や Ptgs2 mRNA の上昇、組織中 MDA の上昇も ACSL4 のノックダウンマウスで抑制され、総グルタチオン量の低下も認めなかった。以上から、APAP 急性肝不全におけるフェロトーシスは ACSL4 依存的なアラキドン酸を始めとする n-6 系多価不飽和脂肪酸の脂質過酸化によってもたらされることが明らかになった。

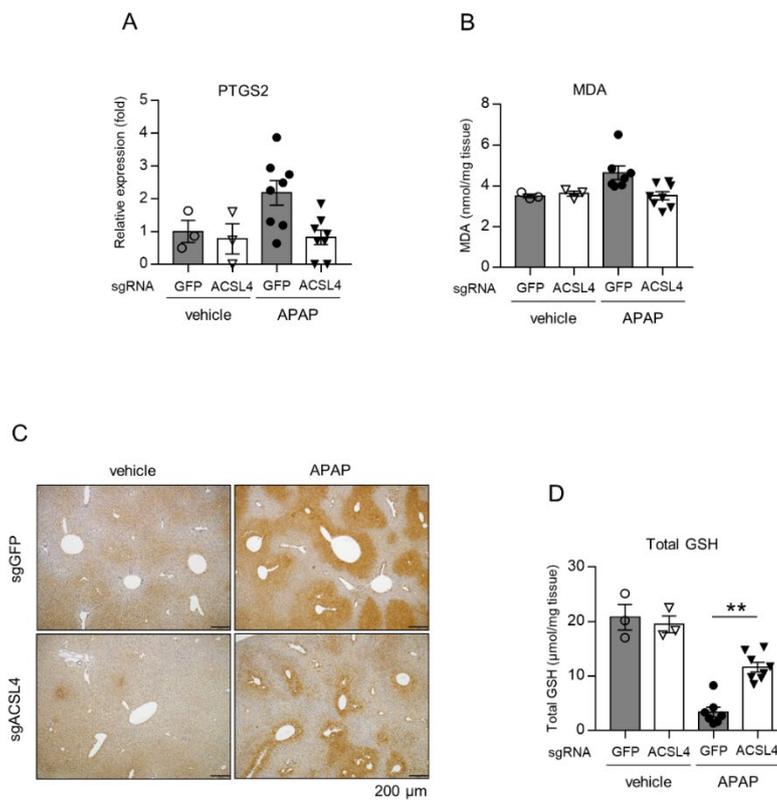


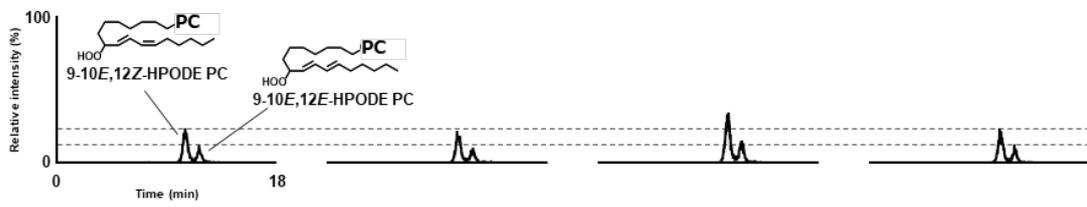
図 19. 肝特異的 ACSL4 ノックダウンマウスにおける脂質過酸化

APAP を投与 3 時間後の肝組織を用いて Ptgs2 mRNA 発現を RT-PCR で (A)、組織中の MDA 量を MDA-TBARS(B)で解析した(n=3-8 匹)。(C)4-HNE 染色を行った(n=3-6 匹)。(D)GSH 量を測定した(n=3-8 匹)。

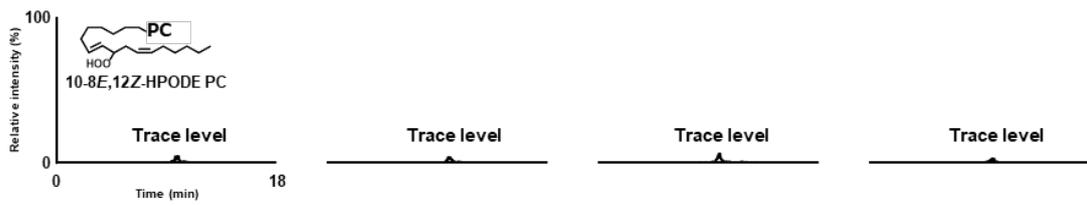
3-8. PCOOH 構造異性体の解析 (LC-MS/MS)

生体内で脂質過酸化は、ラジカル酸化 (自動酸化)、酵素酸化、一重項酸素酸化の 3 つの酸化様式で生じることが知られている。東北大学農学部機能分子解析学教室では、血清や組織中の PCOOH 構造異性体を質量分析 (LC-MS/MS) で解析することで、脂質酸化物の酸化様式を識別する方法を確立していることから、共同研究により、この解析を試みた。APAP 投与によって起こる脂質過酸化の酸化様式を検討するため、APAP 投与後の血清を用いて 6 種類の PCOOH 構造異性体 (PCOOH; 9-10*E*,12*Z*-HPODE PC, 9-10*E*,12*E*-HPODE PC, 10-8*E*,12*Z*-HPODE PC, 12-9*Z*,13*E*-HPODE PC, 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC, and 13-9*E*,11*E*-HPODE PC) の質量分析を行った。これらの 6 種類の PCOOH 構造異性体のうち、ラジカル酸化で生じる 4 種類の構造異性体 (9-10*E*,12*Z*-HPODE PC, 9-10*E*,12*E*-HPODE PC, 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC, and 13-9*E*,11*E*-HPODE PC) は、APAP の投与によって明瞭な増加を認め、かつ Fer-1 で抑制された。一方、一重項酸素酸化で生成される 10-8*E*,12*Z*-HPODE PC や 12-9*Z*,13*E*-HPODE PC は、トレースレベルで、生成量はわずかであった。また、酵素酸化で生成する異性体 (9-10*E*,12*E*-HPODE PC, 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC) はラジカル酸化、一重項酸素酸化でも生成し得るが、その生成量から酵素酸化の影響は小さいと考えられた。以上から、APAP による脂質過酸化はラジカル酸化が主体であると考えられた。

9-10E,12E-HPODE PC and 9-10E,12Z-HPODE PC



10-8E,12Z-HPODE PC



12-9Z,13E-HPODE PC



13-9E,11E-HPODE PC and 13-9Z,11E-HPODE PC

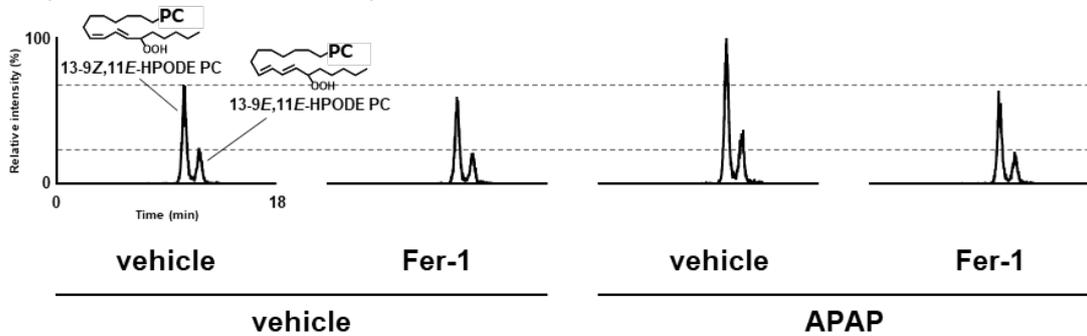


図 18. PCOOH 構造異性体の LC/MS/MS

APAP を投与 3 時間後の血清を用いて、6 種類の PCOOH 構造異性体を LC-MS/MS で解析した。

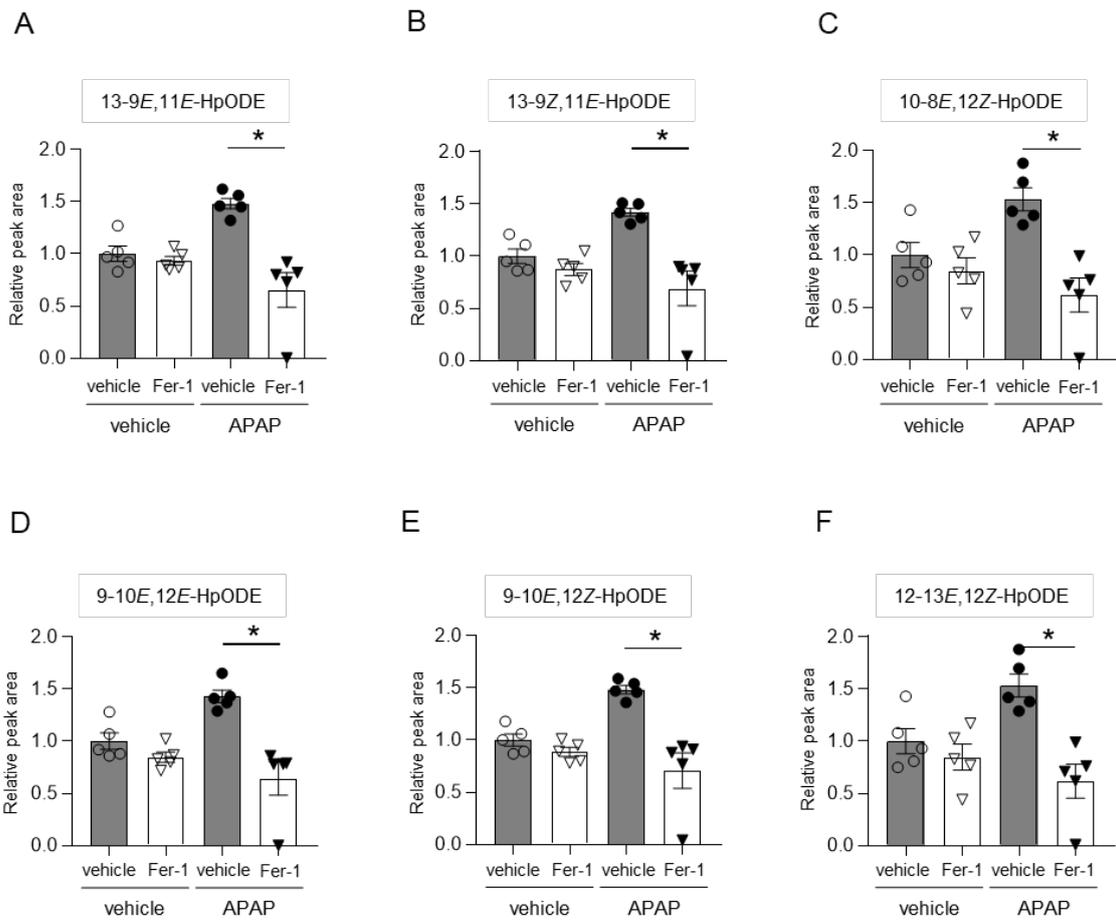


図 19. PCOOH 構造異性体の LC-MS/MS 解析結果

各々の PCOOH 構造異性体の生成量を APAP、及び Fer-1 投与の有無で比較した。(n=5 匹)

3-9. α -Tocopherol の効果

α -Tocopherol (vitamin E) は Fer-1 に類似した抗脂質過酸化作用があるとされ、臨床的にも安全に投与可能である。そこで、臨床応用の可能性を踏まえ、 α -Tocopherol(100 mg/kg)投与後に APAP 200 mg/kg 投与を行い評価した。3 時間後の血清 AST、ALT の上昇や組織障害は α -Toc で抑制された。また、CYP2E1 発現には影響ないことを確認した。

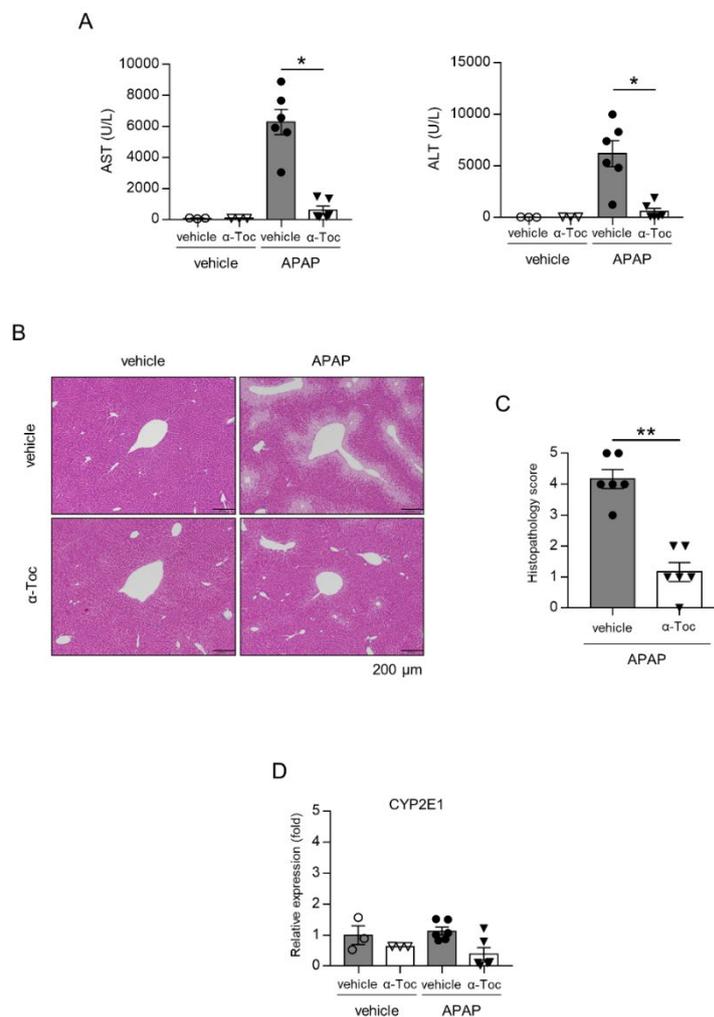


図 20. α -Tocopherol 投与のアセトアミノフェン (APAP) 急性肝不全への影響
DFO (100 mg/kg, 7 日間) 投与後に APAP を投与し、(A) 血清 AST、ALT 値、(B,C)
肝組織障害を評価した (n=4-8 匹)。(D)DFO 投与による CYP2E1 発現への影響を RT-
PCR で解析した。

4-HNE 染色陽性領域や組織中 MDA 上昇は α -Toc で抑制され、総グルタチオン量の低下も認めなかった。以上から、 α -Toc は APAP 急性肝不全におけるフェロトーシスを抑制することが示された。

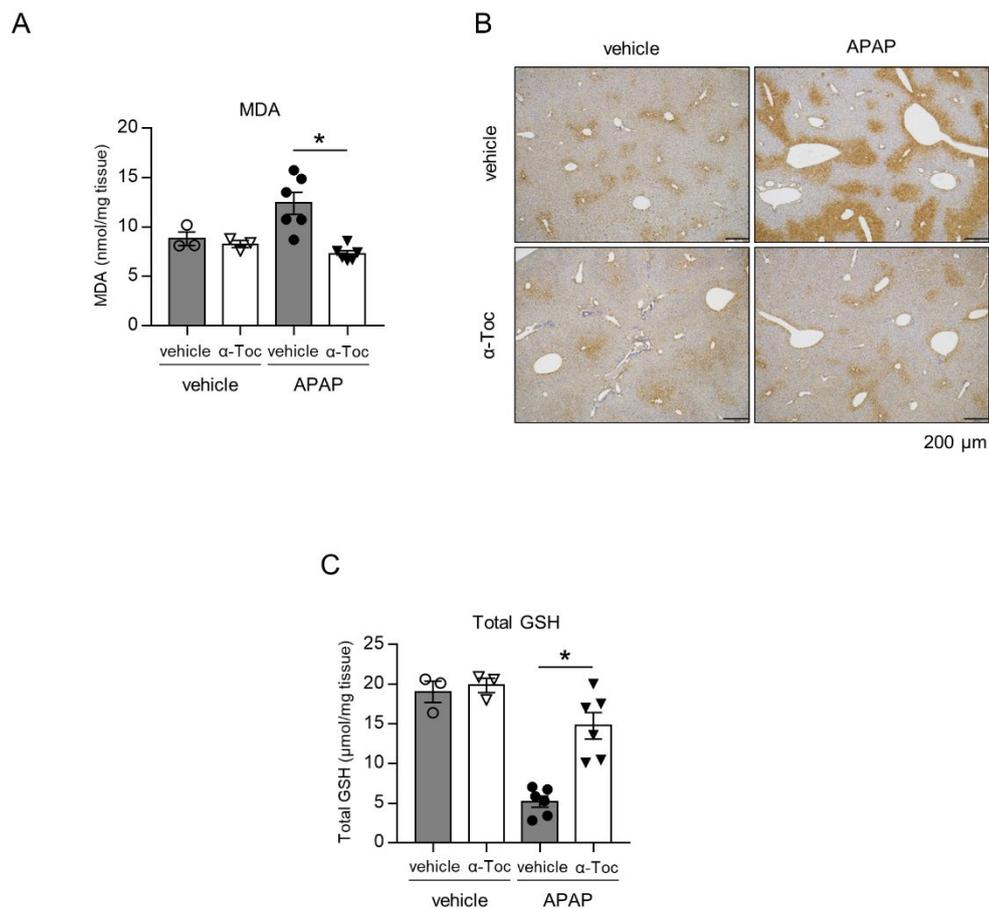


図 21. α -Tocopherol 投与による脂質過酸化の抑制効果

APAP を投与 3 時間後の肝組織を用いて Ptg2 mRNA 発現を RT-PCR で (A)、組織中の MDA 量を MDA-TBARS で解析した(n=4-6 匹)。 (C)4-HNE 染色を行った(n=4-6 匹)。

4. 考察

本研究結果をまとめると以下のようなになる。

1) APAP 肝障害とフェローシスに特徴的な脂質過酸化は Fer-1 と鉄キレート剤で顕著に抑制された。2) APAP 急性肝不全の発症早期の細胞死において、アポトーシスやネクロプトーシスの関与は認められなかった。3) 脂質メディエーターに着目した質量分析では、APAP 投与によってアラキドン酸を代表とする n-6 系多価不飽和脂肪酸由来の代謝産物が増加し、Fer-1 で抑制された。4) ACSL4 全身ノックアウトマウス、及び肝特異的ノックダウンマウスでは APAP 肝障害は抑制された。6) PCOOH 構造異性体の質量分析からラジカル酸化が主体であった。7) APAP 急性肝不全で発生するフェロトーシスは α -Tocopherol でも抑制された。以上から、APAP 急性肝不全の病態には肝細胞のフェロトーシスが重要であり、そのフェロトーシスはアラキドン酸を代表とする n-6 系多価不飽和脂肪酸の非特異的なラジカル酸化によって生じることが明らかになった。(図 22)

APAP 急性肝不全は実験モデルとして確立されており、これまで多数の研究報告がなされてきた。しかしながら、APAP 肝不全の病態形成には発生初期に肝細胞死が重要な起点となることは明らかであるが、そのメカニズムは不明瞭である。従って、病態解明が不十分であるが故に、有効な予防・治療方法が確立されておらず、未だに急性肝不全に至る患者が多数存在する。私の作成したモデルマウスでは、他の研究報告よりも比較的少ない APAP 投与量で強い肝障害を認めている。これは APAP 投与後 6 時間まで絶食を維持したことで、GSH の枯渇状態が遷延し、フェロトーシスによる細胞死がより顕著に誘発されたものと推察される。実際の臨床場面では、APAP 摂取時には絶食や低栄養状態が遷延していることが多く、この結果はより臨床的状況に近いと考えられる。

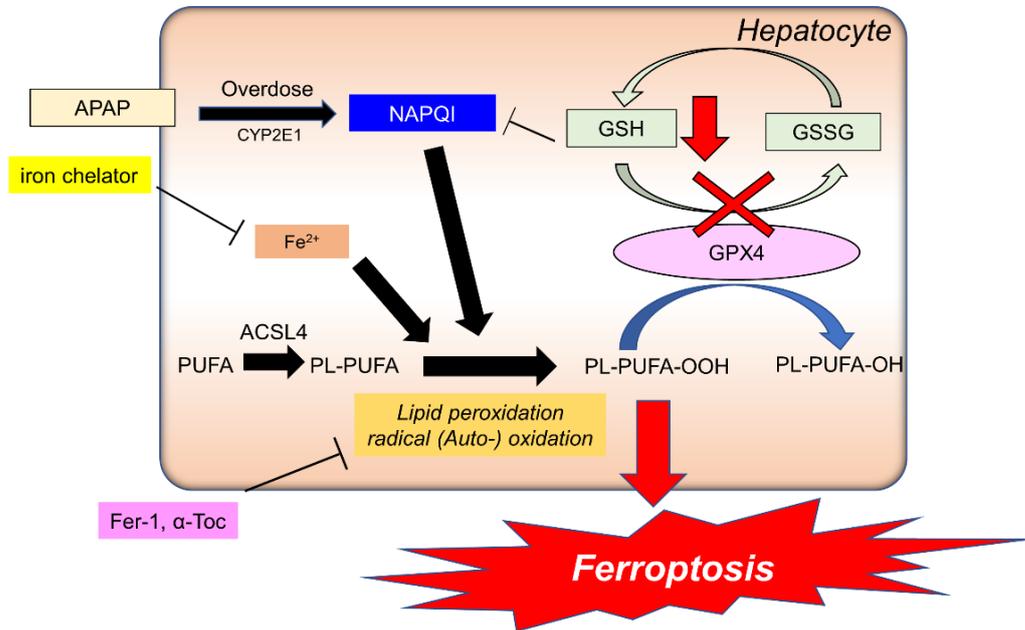


図 22. 本研究から提唱されるアセトアミノフェン (APAP) 急性肝不全の病態

APAP 肝障害における細胞死の形態は、かつてはアポトーシスやネクロプトーシスなどの細胞死の関与が考えられていた (26)。しかしながら、近年は実行因子やその特異的阻害剤による制御に基づく詳細な解析が行われるようになった結果、アポトーシスの実行因子である caspase-3 の活性化は伴わず、またネクロプトーシスの実行因子である RIP3K は肝細胞で元々低発現であることに加え、そのリン酸化も認められず、これらの細胞死の関与は否定的であると報告されている (27-32)。従って、最近の論文では APAP 肝障害で生じる細胞死はネクロトーシス様の細胞死と記載されるにとどまっている (8,26)。私の実験でも肝障害早期にはアポトーシスやネクロプトーシスの関与は否定的であった。一方、Fer-1 や DFO により肝障害と脂質過酸化は顕著に抑制され、生存率の大幅な改善効果が認められた。すなわち APAP 肝不全の病態には早期に生じるフェロトーシスが重要であることが生体レベルで証明された。

フェロトーシスの過程には、15-Lipoxygenase (LOX) に代表される LOX の作用によってもたらされる細胞膜脂質過酸化が重要であると報告されており、従来 Fer-1 や α -Toc の作用は LOX の阻害に基づくものと考えられてきた (11, 25, 33, 34)。一方で、近年は、Fer-1 の LOX 阻害作用は限定的であり、細胞膜脂質においてラジカルスカベンジャーとして作用することで、細胞膜リン脂質過酸化を阻止するとも報告されている (35)。今回の私の研究では、肝組織中にラジカル酸化由来の生成物である 8-iso-PGF2 α の蓄積を認め、血清 PCOOH の解析結果からも APAP 肝障害時に生じる脂質過酸化は酵素酸化ではなくラジカル酸化が主体であることから、後者の仮説を支持する結果だった。従って、LOX を標的とした酵素酸化の抑制がフェロトーシスの関連する病態に有効な治療標的になると推察されているが、APAP 肝障害には有効でない可能性がある。さらに、APAP 肝障害における GSH 低下は NAPQI によって、NAPQI-GSH adduct を形成することで生じると考えられていたが、Fer-1 や鉄キレート剤、ACSL4 欠損によって GSH 低下が阻止されていた。このことは、GSH 低下が、NAPQI によるもの以外に、鉄依存的な脂質過酸化物 ($\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$) によってももたらされることを示唆している。さらに、脂質過酸化物は、鉄を含む遷移金属と反応し、4-HNE や MDA などの活性カルボニル種を産生し、これらの活性カルボニル種は GSH と速やかに結合する。このように、APAP 肝障害時のフェロトーシスのトリガーとなる GSH の低下は複雑で、かつ多段階的に発生すると考えられた。

私の検討において、抗脂質過酸化作用を有する α -Toc (ビタミン E 製剤) の高用量投与が APAP 肝障害を十分に抑制できることが明らかとなった。APAP 急性肝不全発症の危険因子として、CYP2E1 活性状態 (遺伝子変異、アルコール摂取、併用薬剤) や GSH 低下状態 (絶食、低栄養) が知られており、さら鉄過剰状態

(ヘモクロマトーシスや輸血後、肝炎・肝硬変)も危険因子になり得ると考えられる。ビタミンE製剤は臨床的に安全に使用可能であり、これらの高リスクが予測される患者への APAP 高容量使用時には α -Toc が肝障害予防に有効である可能性がある。実際の臨床応用には投与量や投与方法、タイミングが問題であり、今後の大動物実験や臨床試験での検証が望まれる。さらに、フェロトーシスの発生には ACSL4 が不可欠であると報告されている。実際 ACSL4 ノックアウトマウスでは APAP 肝障害が実際に抑制された。この点に関して抗糖尿病薬であるチアゾリジン系薬剤は PPAR γ 非依存的に ACSL4 を阻害し、フェロトーシス抑制作用があるとされており (24)、APAP 肝障害を制御する脂質メディエーターの開発や、APAP 肝障害の発生リスクを評価する脂質マーカーなどの開発へと発展できる可能性がある。

本研究にはいくつかの課題が残されている。私は、初代マウス肝細胞や Huh-7 細胞に代表されるフェロトーシス感受性を有する肝癌由来細胞株に対し、APAP や NAPQI で刺激を様々な条件下に行ったが、Fer-1 で抑制される細胞死は認められなかった。CYP2E1 の活性や、硫酸抱合、グルタチオン抱合の程度、NAPQI による直接的なミトコンドリアをはじめとするオルガネラ障害などが関与すると考えられ、逆に培養細胞を用いた実験系には、その実験条件を注意深く解釈する必要があると考えられた。さらに、フェロトーシスにおいては、如何にして細胞膜脂質過酸化が細胞死につながるのかが十分に解明されておらず、特にどのオルガネラ細胞膜が細胞死の起点となるのか、現在も議論の分かれるところである (36-40)。APAP 肝障害は、強いミトコンドリア障害を伴うことが知られているが、ミトコンドリア膜間腔 (intermembrane space) には GPX4 が豊富に存在し、フェロトーシスの起点になり得ると考えられている (24, 39, 41)。APAP 肝障害時のフェロトーシスはミトコンドリアが起点となると推測されるが、詳

細な解明が待たれる。また、興味深いことに我々の実験モデルでは鉄キレート剤が Fer-1 や α -Toc を上回った効果が認められた。フェロトーシスの開始には、トランスフェリン受容体の発現亢進を伴うトランスフェリン結合鉄の取り込みや、フェリチン特異的オートファジーであるフェリチノファジーが働いて能動的に鉄の取り込みが起こるとされている (42-45)。一方で、近年鉄キレート剤の投与によってミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジーが Parkin 非依存的に誘導されることが報告されている (46)。これらを統合すると、鉄キレート剤の投与がフェロトーシス発生時の鉄由来の ROS の軽減のみならず、マイトファジーを誘導することで効率的に傷害ミトコンドリアを効率的に除去している可能性が考えられるが、それを証明するにはさらなる追加検討が必要である。

5. おわりに

APAP 急性肝不全の発生初期にフェロトーシスによる肝細胞死が重要な役割を果たし、さらにそのフェロトーシスが多価不飽和脂肪酸のラジカル酸化で発生することを明らかにした。フェロトーシス阻害作用のある Fer-1 や DFO、 α -Toc が APAP 急性肝不全の予防に有効であり、特に α -Toc は臨床応用が期待できる。本病態にはラジカル酸化が重要であることが示されたが、フェロトーシスにつながる脂質過酸化の発生部位や脂質過酸化からいかにして細胞死へ至るかが解明されておらず、さらなる検討が必要である。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導を頂いた自治医科大学大学院炎症・免疫研究部 高橋将文教授、自治医科大学大学院消化器一般移植外科学分野 佐田尚宏教授、佐久間康成教授、移植外科 水田耕一前教授に深く感謝します。

また、研究の遂行にあたり御指導・御協力頂きました、東北大学農学部機能分子解析学 仲川清隆教授、伊藤隼哉助教、昭和大学薬学部衛生化学 原俊太郎教授、桑田浩講師、自治医科大学解剖学組織学部門 大野伸彦教授に深く感謝します。研究の計画・遂行にあたり様々なご助言を頂き、日々の研究生活を支えて下さった、自治医科大学分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部、自治医科大学 消化器一般移植外科学教室の皆様にご心より御礼申し上げます。

7. 参考文献

1. William Bernal GA, Anil Dhawan, Julia Wendon. Acute liver failure. *Lancet*. 376:190–201.2010.
2. Lee WM. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? *J Hepatol*. 67:1324-1331.2017.
3. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, Clinical practice guidelines p, Wendon J, Panel m, Cordoba J, Dhawan A, Larsen FS, Manns M, Samuel D, Simpson KJ, Yaron I, representative EGB and Bernardi M. EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. *J Hepatol*. 66:1047-1081.2017.
4. Chiew AL, Gluud C, Brok J and Buckley NA. Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdose. *Cochrane Database Syst Rev*. 2:CD003328.2018.
5. Hogestatt ED, Jonsson BA, Ermund A, Andersson DA, Bjork H, Alexander JP, Cravatt BF, Basbaum AI and Zygmunt PM. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem*. 280:31405-12.2005.
6. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R and Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS drug reviews*. 12:250-75.2006.
7. Jaeschke H. Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Dig Dis*. 33:464-71.2015.
8. Jaeschke H, Ramachandran A, Chao X and Ding WX. Emerging and established modes of cell death during acetaminophen-induced liver injury. *Arch Toxicol*. 93:3491-3502.2019.
9. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE,

- Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd and Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 149:1060-72.2012.
10. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascon S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA and Zhang DD. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 171:273-285.2017.
11. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL and Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 156:317-331.2014.
12. Conrad M, Kagan VE, Bayir H, Pagnussat GC, Head B, Traber MG and Stockwell BR. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. *Genes & development*. 32:602-619.2018.
13. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Radmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Forster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Bornkamm GW, Geissler EK, Thomas SB, Stockwell BR, O'Donnell VB, Kagan VE, Schick JA and Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*. 16:1180-91.2014.
14. Wang H, An P, Xie E, Wu Q, Fang X, Gao H, Zhang Z, Li Y, Wang X, Zhang J, Li G, Yang L, Liu W, Min J and Wang F. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis. *Hepatology*. 66:449-465.2017.

15. Aizawa S, Brar G and Tsukamoto H. Cell Death and Liver Disease. *Gut and Liver*.2019.
16. Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, Nakasone M, Sakamoto T, Matsuoka M, Imai H, Yuet-Yin Kok C, Okochi H, Nakano H, Miyajima A and Tanaka M. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis.* 10:449.2019.
17. Zhou Z, Ye TJ, Bonavita G, Daniels M, Kainrad N, Jogasuria A and You M. Adipose-Specific Lipin-1 Overexpression Renders Hepatic Ferroptosis and Exacerbates Alcoholic Steatohepatitis in Mice. *Hepatology Commun.* 3:656-669.2019.
18. Lorincz T, Jemnitz K, Kardon T, Mandl J and Szarka A. Ferroptosis is Involved in Acetaminophen Induced Cell Death. *Pathol Oncol Res.* 21:1115-21.2015.
19. Naito Y, Hino K, Bono H and Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics.* 31:1120-3.2015.
20. Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MMK and Boelsterli UA. Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology.* 45:412-421.2007.
21. Yamada M, Kita Y, Kohira T, Yoshida K, Hamano F, Tokuoka SM and Shimizu T. A comprehensive quantification method for eicosanoids and related compounds by using liquid chromatography/mass spectrometry with high speed continuous ionization polarity switching. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 995-996:74-84.2015.
22. Kato S, Nakagawa K, Suzuki Y, Asai A, Nagao M, Nagashima K, Oikawa S and Miyazawa T. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of human plasma 1-palmitoyl-2-hydroperoxyoctadecadienoyl-phosphatidylcholine isomers via promotion of sodium adduct formation. *Anal Biochem.* 471:51-60.2015.

23. Ito J, Nakagawa K, Kato S, Hirokawa T, Kuwahara S, Nagai T and Miyazawa T. A novel chiral stationary phase HPLC-MS/MS method to discriminate between enzymatic oxidation and auto-oxidation of phosphatidylcholine. *Anal Bioanal Chem.* 408:7785-7793.2016.
24. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, Irmeler M, Beckers J, Aichler M, Walch A, Prokisch H, Trumbach D, Mao G, Qu F, Bayir H, Fullekrug J, Scheel CH, Wurst W, Schick JA, Kagan VE, Angeli JP and Conrad M. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol.* 13:91-98.2017.
25. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JP, Doll S, Croix CS, Dar HH, Liu B, Tyurin VA, Ritov VB, Kapralov AA, Amoscato AA, Jiang J, Anthony-muthu T, Mohammadyani D, Yang Q, Proneth B, Klein-Seetharaman J, Watkins S, Bahar I, Greenberger J, Mallampalli RK, Stockwell BR, Tyurina YY, Conrad M and Bayir H. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol.* 13:81-90.2017.
26. Iorga A, Dara L and Kaplowitz N. Drug-Induced Liver Injury: Cascade of Events Leading to Cell Death, Apoptosis or Necrosis. *Int J Mol Sci.* 18.2017.
27. Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, Toriguchi K, Tanabe K, Tanaka H, Seo S, Taura K, Machida K, Takeda N, Saji S, Uemoto S and Asagiri M. Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. *FEBS Open Bio.* 4:777-87.2014.
28. Dara L, Johnson H, Suda J, Win S, Gaarde W, Han D and Kaplowitz N. Receptor interacting protein kinase 1 mediates murine acetaminophen toxicity independent of the necrosome and not through necroptosis. *Hepatology.* 62:1847-57.2015.
29. Guicciardi ME, Gores GJ and Jaeschke H. Acetaminophen knocks on death's

- door and receptor interacting protein 1 kinase answers. *Hepatology*. 62:1664-6.2015.
30. Dara L, Liu ZX and Kaplowitz N. Questions and controversies: the role of necroptosis in liver disease. *Cell Death Discov*. 2:16089.2016.
31. Jaeschke H, Duan L, Akakpo JY, Farhood A and Ramachandran A. The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 118:709-718.2018.
32. Schwabe RF and Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 15:738-752.2018.
33. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS and Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113:E4966-75.2016.
34. Wenzel SE, Tyurina YY, Zhao J, St Croix CM, Dar HH, Mao G, Tyurin VA, Anthonymuthu TS, Kapralov AA, Amoscato AA, Mikulska-Ruminska K, Shrivastava IH, Kenny EM, Yang Q, Rosenbaum JC, Sparvero LJ, Emler DR, Wen X, Minami Y, Qu F, Watkins SC, Holman TR, VanDemark AP, Kellum JA, Bahar I, Bayir H and Kagan VE. PEBP1 Wards Ferroptosis by Enabling Lipoxygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell*. 171:628-641 e26.2017.
35. Zilka O, Shah R, Li B, Friedmann Angeli JP, Griesser M, Conrad M and Pratt DA. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent Sci*. 3:232-243.2017.
36. Feng H and Stockwell BR. Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLoS Biol*. 16:e2006203.2018.
37. Gaschler MM, Hu F, Feng H, Linkermann A, Min W and Stockwell BR. Determination of the Subcellular Localization and Mechanism of Action of Ferrostatins in Suppressing Ferroptosis. *ACS Chem Biol*. 13:1013-1020.2018.

38. Magtanong L, Ko PJ, To M, Cao JY, Forcina GC, Tarangelo A, Ward CC, Cho K, Patti GJ, Nomura DK, Olzmann JA and Dixon SJ. Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. *Cell Chem Biol.*2018.
39. Conrad M and Pratt DA. The chemical basis of ferroptosis. *Nat Chem Biol.* 15:1137-1147.2019.
40. Friedmann Angeli JP, Krysko DV and Conrad M. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion. *Nat Rev Cancer.*2019.
41. Gao M, Yi J, Zhu J, Minikes AM, Monian P, Thompson CB and Jiang X. Role of Mitochondria in Ferroptosis. *Mol Cell.* 73:354-363 e3.2019.
42. Bellelli R, Federico G, Matte A, Colecchia D, Iolascon A, Chiariello M, Santoro M, De Franceschi L and Carlomagno F. NCOA4 Deficiency Impairs Systemic Iron Homeostasis. *Cell Rep.* 14:411-421.2016.
43. Gao M, Monian P, Pan Q, Zhang W, Xiang J and Jiang X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res.* 26:1021-32.2016.
44. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R and Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Mol Cell.* 59:298-308.2015.
45. Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW and Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature.* 509:105-9.2014.
46. Allen GF, Toth R, James J and Ganley IG. Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep.* 14:1127-35.2013.