

ストレス応答MAPキナーゼと薬剤性肝障害

Stress-responsive MAP kinase and drug-induced liver injury

梶淵 泰宏

Yasuhiro MASUBUCHI

転写因子c-JunのN末端をリン酸化するc-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) は、細胞に対するストレス刺激により活性化することから、ストレス応答MAPキナーゼと称される。解熱鎮痛薬アセトアミノフェンの過量投与によって、マウスに肝障害が誘発される過程においてもJNKの活性化が観察される。JNK欠損マウスやJNKの阻害剤であるSP600125ならびにレフルノミドを用いた検討から、JNK、特にJNK2の持続的な活性化は、アセトアミノフェン誘発肝障害の悪化に関与し、薬剤性肝障害における“death signal”として働くことが結論されている。ミトコンドリアはJNK活性化の原因であり、かつJNKのターゲットにもなっている。アセトアミノフェンの活性代謝物によって障害を受けたミトコンドリアから生じる活性酸素によって、JNKが活性化され、ミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア透過性遷移を惹起し、肝細胞死に至ると推定されている。一方、JNKと結合し、その活性化を妨げる分子としてglutathione S-transferaseが見出されており、また、JNKを活性化に導く上流の因子として、apoptosis signal-regulating kinase 1などのMAP kinase kinase kinaseが同定されている。JNK自身はもちろん、それを制御する分子も、薬剤性肝障害の発症しやすさを左右する生体側の要因になっていると考えられ、特異体質性肝障害との関連に興味を持たれる。また、JNKの阻害は薬剤性肝障害に対する新たな治療ターゲットとして期待される。

1. はじめに

MAPキナーゼ (MAPK) は、mitogen-activated protein kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ) の略称で、細胞外からのシグナルを細胞内で核に伝達する主要な分子として働くセリン/スレオニンキナーゼの一つである。さまざまな刺激を伝達し、遺伝子発現を制御することにより、細胞応答を誘導するため、MAPキナーゼによるシグナル伝達は、細胞増殖、分化、遺伝子発現、アポトーシスなどに関与する。MAPキナーゼは、古典的MAPKと新規MAPKとに大別され、後者の代表として、転写因子c-JunのN末端をリン酸化するc-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) が知られている。JNKは、細胞に対するストレス刺激により活性化することから、ストレ

ス応答MAPキナーゼ (stress-activated protein kinase, SAPK) とも呼ばれている¹⁻⁴⁾。

薬による肝臓の障害も肝細胞に対するストレス刺激と捉えることができる。薬剤性肝障害は、医薬品の開発中止や市販医薬品の販売中止の直接の原因となるような重大な医薬品の副作用の一つである。元来、医薬品そのものの構造、物理化学的性質、薬物体内動態特性に基づくものであるが、薬剤性肝障害の発症しやすさという観点からは、薬剤を投与される生体側の要因も重要であり、近年、その一つとして、JNKの関与が指摘されている。本稿では、研究領域としてはこれまで接点の乏しかった薬剤性肝障害とストレス応答性MAPキナーゼとの関連を取り上げ、薬剤性肝障害発症過程におけるJNKの役割について、研究の経緯と最近の知見をまとめた。

連絡先：梶淵泰宏 ymasubuchi@cis.ac.jp

千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2013年10月1日受付, 2013年12月18日受理)

2. アセトアミノフェンによる肝障害における共有結合説

近年問題になっている薬剤性肝障害の多くは、発症頻度が極めて低いので特異体質性に分類され、一般に、実験動物では再現できないため、動物モデルでの研究が難

しいとされている。一方、解熱鎮痛薬として汎用されているアセトアミノフェンは通常用量では安全であるが、過量に服用すると肝障害を起こすため、中毒性肝障害に分類される。実験動物においても臨床事例に類似した肝障害を惹起するため、アセトアミノフェンそのものの肝障害研究のみならず、特異体質性を含め、広く薬剤性肝障害全般の研究のための実験モデルとして用いられている。アセトアミノフェンによる肝障害の発症メカニズムは、過去40年に渡る研究から蓄積されているが、毒性発現後期の過程に議論の分かれる点も多く、毒性発現全体を説明できるスキームは完成していない⁵⁻⁸⁾。

アセトアミノフェンを過量投与すると主要代謝経路である硫酸抱合やグルクロン酸抱合が飽和し、cytochrome P450 (CYP) 依存の代謝的活性化による活性代謝物*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) の生成が増加する。NAPQIはグルタチオン (GSH) 抱合を受けるが、大量のNAPQI生成はGSHの枯渇を招き、GSH抱合を免れたNAPQIがタンパク質と共有結合することにより肝細胞壊死を惹起する (図1)。

この共有結合説は1970年代前半に提唱され^{9,10)}、その10年後に活性代謝物としてNAPQIが実際に同定された¹¹⁾。この共有結合説を実証するには共有結合と肝細胞壊死との関係を明らかにすることが必要なため、NAPQIと結合する多数のタンパク質が検討され、同定されるに至った^{12,13)}。しかし、それらの機能低下により肝細胞障害を招く決定的なものではなく、特定のタンパク質との共有結合では、アセトアミノフェンによる肝障害を説明できないことも指摘された¹²⁾。後述するように、現在では、

特定のタンパク質への共有結合より、むしろ、NAPQIあるいはGSH枯渇が招いたミトコンドリア内酸化還元バランスの破綻が、肝障害の引き金として重要視されている¹⁴⁻¹⁶⁾。

3. GST欠損マウスにおけるアセトアミノフェン誘発肝障害の軽減

NAPQIはGSHによって捕捉されるため、GSH抱合を触媒する glutathione S-transferase (GST)、中でも効率的に触媒する GST Pi¹⁷⁾ の肝障害抑制への役割は大きいものと考えられた。そこで、GST Pi 欠損マウス (*GstP1/P2*-null mice) におけるアセトアミノフェン肝障害が調べられたが、予想に反して、GST Pi 欠損マウスでは野生型に比べて、アセトアミノフェン肝障害に対して抵抗性を示しGST Piが解毒酵素として働いていないと考えられた¹⁸⁾。GST Pi欠損マウスでは、アセトアミノフェン投与に伴うGSH消費が抑えられている以外、抵抗性の要因を示す結果は得られていないが、GST PiはJNKを阻害することから¹⁹⁾、GST Pi欠損マウスでは、JNKが機能し、これが肝保護的に働く様々な遺伝子を調節するc-Junを活性化することにより抵抗性を示したと考察している¹⁸⁾。このことは一つの推定に過ぎないが、GSTが肝障害の悪化に関わるというインパクトを含め、その後の肝障害におけるMAPキナーゼの役割を調べる様々な研究の発端となった。

その後、実際、GST Pi欠損マウスにおける常在型のJNKの活性化が、c-Junのリン酸化の亢進により示され、c-Junのダイマーからなるactivator protein-1 (AP-1) の

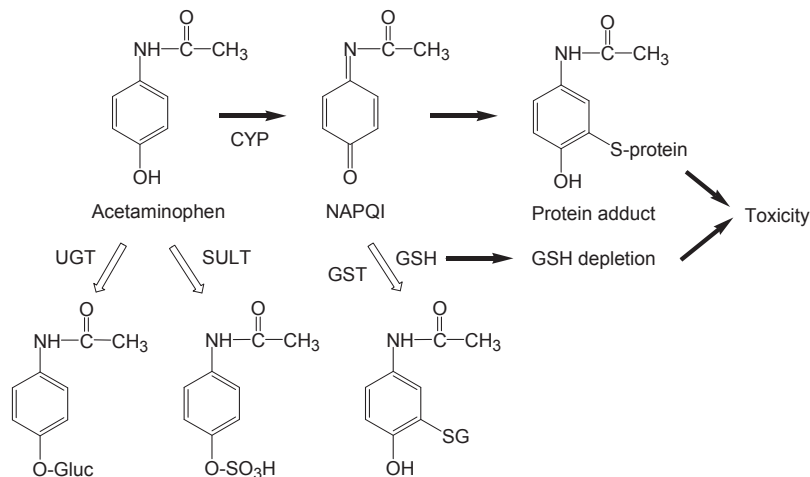


図1 アセトアミノフェンの代謝的活性化と解毒経路

CYP、SULT、UGT、GSTはそれぞれの酵素反応を触媒する cytochrome P450、sulfotransferase、UDP-glucuronyltransferase、glutathione S-transferaseを示す。黒矢印は活性化、白矢印は解毒を示す。NAPQIはGSHに捕捉されるが、高濃度になるとGSHが枯渇し、フリーのNAPQIがprotein adduct (共有結合)を形成する。GSHの枯渇による酸化還元バランスの破綻と共有結合がToxicity (肝障害)を惹起する。

DNA 結合活性の上昇や、AP-1 の標的遺伝子で抗酸化酵素 heme oxygenase-1 (HO-1) の増加も示され²⁰⁾、GST Pi 欠損マウスにおける肝障害抵抗性がある程度説明できた。しかし、GST Pi 欠損はアセトアミノフェン投与による JNK や AP-1 経路の活性化には影響しなかったことから、アセトアミノフェン投与以前に GST Pi 欠損による JNK シグナルの増加を通して、化学的ストレスに対応する防御能が亢進したと推定している²⁰⁾。また、HO-1 や抱合酵素 UDP-glucuronosyltransferase 1A6 の誘導は、既知の nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf) / antioxidant response element (ARE) 解毒系も関与することから、Nrf2 との関連も考慮すべき要因であると考えられた。

4. アセトアミノフェン誘発肝障害における JNK の役割

JNK がアセトアミノフェン誘発肝障害発症過程で活性化することの意義が、その後、様々なアプローチで検討された。マウス培養肝細胞の GSH 濃度を GSH 枯渇剤やアセトアミノフェンによって低下させることにより、c-Jun の発現量およびリン酸化が増大し、JNK の活性化が観察された²¹⁾。また、アセトアミノフェンの肝細胞障害性が、ATP 拮抗型の JNK 阻害剤である SP600125²²⁾ (図2) によって軽減され、JNK が細胞障害の発現に関与することが示された²¹⁾。

マウス *in vivo* においても、アセトアミノフェン投与により JNK が活性化され、また、JNK 阻害剤の併用によって肝障害は抑制された²³⁾。一方、他の MAP キナーゼである p38 や Erk の阻害剤の効果は見られなかった。JNK 阻害剤は、四塩化炭素やコンカナバリン A による肝障害には無効であったことから、薬剤性肝障害に普遍的な経路、活性化酵素である CYP2E1、ならびに TNF- α には影響しないことが示唆された。JNK をコードする遺伝子は少なくとも3つあり、このうち肝臓に発現する2つの JNK、JNK1 および JNK2 の選択性が、それぞれのノックアウトマウスならびにアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたノックダウン法により検討され、JNK2 の関与が大きいと結論された²³⁾。

その後、別の研究グループによっても、SP600125 ならびにペプチド型の JNK 阻害剤 D-JNKI1 によるアセトアミノフェン肝障害の抑制が示された²⁴⁾。しかし、既報²³⁾と異なり、JNK1 欠損マウスと JNK2 欠損マウスどちらを用いてもアセトアミノフェン肝障害の重症度は野生型と変わらず、著者らは JNK1 および2の冗長化によるもので、両方を阻害しないと効果がないと推察している²⁴⁾。また、JNK 阻害剤による TNF- α を抑制することを見出し、JNK 阻害による TNF- α を介した肝障害防御の可能性を示唆している²⁴⁾。一方、逆に JNK2 欠損マウスでアセトアミノフェン誘発肝障害が悪化することから、

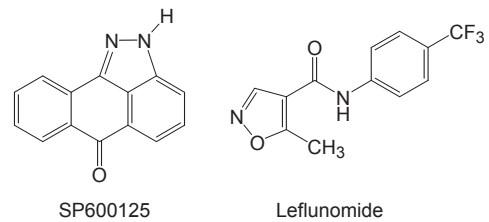


図2 JNK 阻害剤の化学構造

JNK2 は防御的に働くとの報告もなされた²⁵⁾。この報告では、JNK2 欠損による悪化を肝細胞分化や修復システムの欠如によるものと推定しており、JNK-c-Jun-AP-1 シグナル経路が HO-1 など解毒酵素の誘導を介して肝障害の防御に働くという当初の見解²⁰⁾を支持している。また、前2報^{23,24)}で投与溶媒に用いた DMSO がアセトアミノフェンの活性化を抑えたり²⁶⁾、自然免疫の寄与を大きくする²⁷⁾ので、注意を要するとしている。その後、野生型マウスの亜系統の選択の問題から、著者ら自身により再考され²⁸⁾、JNK2 欠損マウスの肝障害抵抗性が支持されたことから、JNK2 がアセトアミノフェン誘発肝障害における“death signal”であることが一定の結論になっている。しかし、他にも JNK2 の関与を否定してはいないものの、JNK2 欠損マウスでもアセトアミノフェン肝障害感受性は野生型と変わらないとの報告はあり²⁹⁾、JNK 欠損マウスによる結果は、論文間でかなり異なることから、JNK2 が多かれ少なかれ肝障害進展に関わるとしても、その寄与の程度は、実験条件の違いに左右される可能性があると考えられる。

5. アセトアミノフェン誘発肝障害に対するレフルノミドの効果

レフルノミド (図2) は、プロドラッグ型の抗リウマチ薬で、活性代謝物である A771726 (テリフルノミド) が、*de novo* ピリミジン生合成を阻害するため、ピリミジンヌクレオチドに依存している活性化リンパ球の増殖を抑制すると考えられている。この T 細胞抑制作用により、T 細胞依存のコンカナバリン A 誘発肝障害を抑制することが報告されている³⁰⁾。また、JNK2 を阻害する³¹⁾ことから、アセトアミノフェン肝障害に対する効果が調べられた。不死化ヒト肝細胞に対するアセトアミノフェンの細胞障害性はレフルノミドによって抑制された³²⁾。これはレフルノミドによる JNK の早期のリン酸化の阻害によるもの、これによって抗アポトーシスタンパク Bcl-2 のリン酸化 (不活性化) を抑え、ミトコンドリア障害を抑制した。この T 細胞に依存せず、ミトコンドリアが関与する肝障害防御効果はマウス *in vivo* でも検討され、レフルノミドをアセトアミノフェン投与の4時間後に投与し、肝障害を防御すること、また、自然免疫の阻害によ

るものではないことも示唆している³³⁾。レフルノミドはCYPにより代謝されるため、アセトアミノフェンの代謝的活性化に対する影響も検討された。肝ミクロゾームにおいてアセトアミノフェンから生成するNAPQIをGSH抱合体として測定し、レフルノミドの効果を調べたところ、マウスでは阻害が見られるが、ヒトでは見られなかった³⁴⁾。また、代謝物による阻害であるが、テリフルノミドによるものではないこと、CYP1A2に対する阻害作用であることなど、アセトアミノフェン肝障害に対するレフルノミドの防御効果への関与が小さいことを示す一連の結果が得られた³⁴⁾。

6. JNKを介した肝障害におけるミトコンドリアの重要性

アセトアミノフェンによる肝障害に対するレフルノミドの抑制効果が明らかになる過程で、抗アポトーシスタンパク Bcl-2のリン酸化(不活性化)の阻害によるミトコンドリア保護の重要性も明らかになった^{32,33)}。これに加え、上述のGunawanの報告においても、JNKの標的の一つとしてBax (Bcl-2-associated X protein) が示唆されている²³⁾。Bax はBcl-2ファミリー属すプロアポトーシス蛋白で、細胞質に存在するが、death signalに従ってミトコンドリアへと移行し、そこではシトクロム cの放

出を促進し、アポトーシスを誘発する。これらの報告において、肝障害発現に直接関与し、逆に肝障害回避のための防御ターゲットと指摘されたのがミトコンドリア透過性遷移 (mitochondrial permeability transition, MPT) である。MPTは、 Ca^{2+} 濃度依存的にミトコンドリアの透過性が上昇する現象で、膜電位の低下、ミトコンドリア膨潤、ATP合成の低下を招くため、細胞死に至る³⁵⁻³⁷⁾。MPTは、反応性代謝物や活性酸素種 (ROS) によるミトコンドリアの酸化還元バランスの破綻により、外膜、内膜、マトリックスのタンパク複合体であるMTP poreが開孔する現象と考えられている。既述の通り、NAPQIの共有結合における致命的な標的タンパクの確定には至っていない一方、筆者らおよび他のグループにより、肝障害の直接要因としてNAPQIによるMPTが提案されており^{14,16)}、近年の総説におけるスキームにも記載されている。図3AにMPTを介したアセトアミノフェンによる肝障害発現機序を示した。

このように様々な角度から、ミトコンドリアがJNKの活性化後の下流の重要なターゲットとなることが示されたが、JNK活性化の要因としての役割も提示されている。アセトアミノフェン投与によるJNKの活性化に先立って、ミトコンドリア内GSHが枯渇するとともにミトコンド

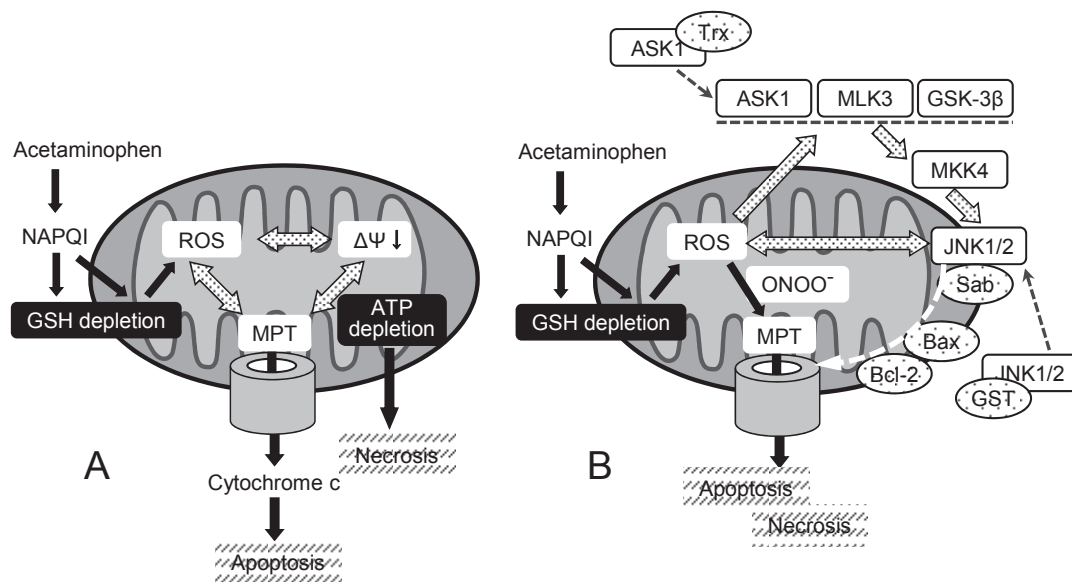


図3 アセトアミノフェンによるミトコンドリア透過性遷移 (MPT) と肝障害のメカニズム

A、MPTによる障害モデル:ミトコンドリア内GSHが低下すると、活性酸素(ROS)の生成が増加し、MPT poreの開孔(MPT)、膜電位の低下($\Delta\Psi\downarrow$)が連鎖的に起こる。膜電位の低下は、脱共役、さらにATP合成の低下を招き、MPTは、cytochrome cの漏出を招く。それらは、肝細胞のnecrosisおよびapoptosisの主たる要因となる。

B、JNKを想定したMPTによる肝障害モデル:ミトコンドリアROSにより、ASK1のTrxとの結合、JNKのGSTとの結合が解かれ、JNKおよび上流のキナーゼ(ASK1、MLK3、GSK-3 β)が活性化される。JNKは、MKK4を介してリン酸化され、ミトコンドリアに移行し、ROS生成を促進し、peroxynitrite (ONOO $^-$)とともに、MPTを惹起する。JNKはアポトーシス関連分子(Baxの活性化とBcl-2の不活性化)を介してもMPTを促進し、necrosisおよびapoptosis主たる要因となる。

リアから過酸化水素が発生し、ミトコンドリア由来の活性酸素種がJNKの活性化に関与することが示された³⁸⁾。一方、アセトアミノフェンとJNK阻害剤を投与することによりJNK非依存的に酸化還元バランスを崩したミトコンドリアに、直接、精製した活性化JNKを加えると、ミトコンドリアの呼吸機能が失われるが、正常なミトコンドリアに加えてもその機能には影響しなかった³⁸⁾。また、MPTの阻害剤であるシクロスポリンはJNKの添加効果を抑制した。このことから、アセトアミノフェンによるミトコンドリアのGSH枯渇とROS生成によるJNK非依存的で緩和な呼吸障害では細胞障害には不十分であるが、JNKが活性化され、活性化JNKはミトコンドリアへ移行すると、さらなるダメージ“second hit”を与え、MPTを惹起し、細胞障害に至ると推定された³⁸⁾。こうして、ミトコンドリアが細胞死の起点、かつJNKによる“second hit”を受けるモデルが提唱された³⁹⁾。

このようにMPTは、JNKを介したアセトアミノフェン肝障害の発現にも重要な役割を果たしていることが明らかにされたが、MPT poreを構成する分子がリン酸化される実験事実は得られておらず、JNKによる直接的なMPTには否定的な報告もある。過酸化亜硝酸 (peroxynitrite, ONOO⁻) は、superoxideと一酸化窒素(NO)との反応により生じる最も強力な過酸化物質(oxidant)で、アセトアミノフェン肝障害の関与⁴⁰⁾やJNKの活性化への関与³³⁾も示唆されている。JNK阻害に汎用されているSP600125は、ミトコンドリアへのBaxの移行やアポトーシス誘導因子(apoptosis-inducing factor, AIF)の遊離を抑える一方、酸化ストレスとさらなるperoxynitrite生成を抑えることから、ミトコンドリアを介したアポトーシスに加えて、peroxynitriteによるMPTがJNKを介したアセトアミノフェン肝障害発現に関与することを示唆している²⁹⁾。図3BにはJNK経路を含めたMPTを介したアセトアミノフェンによる肝障害発現機序を示した。

7. JNKによるアセトアミノフェン誘発肝障害の増強における上流および下流因子

JNKの肝障害における役割が明らかになることで、肝障害の防御を目指した治療ターゲットとしての興味も増し、より効果的な治療ターゲットを探索すべく、JNKの上流および下流の因子について検討された。数種のMAP kinase kinase(MAPKK)がJNKを活性化するキナーゼとして、さらに数種のMAP kinase kinase kinase(MAPKKK)がその上流のキナーゼとして同定されている。MAPKKKの一つapoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)の役割が欠損マウスを用いて解析された。JNKのリン酸化はアセトアミノフェン投与後1.5時間で最大値となり、ASK1欠損マウスでも同様であったが、それ以降3~6時間にかけて、ASK1欠損マウスでは野生型に比べて

JNKのリン酸化が減弱した⁴¹⁾。また、ASK1欠損マウスでは、アセトアミノフェンによる肝障害も部分的に抑えられた。このことから、ASK1は、肝障害増悪に関わるJNKの持続的な活性化に必要なものの、他のキナーゼもJNK活性化に関与すると結論している⁴¹⁾。また、P38 MAPKの活性化にもASK1が関与するが、既報²³⁾と同様に、P38は肝障害には関与しないことが確認された。さらに、酸化還元調節タンパク質であるチオレドキシン(Trx)は、通常ASK1と結合しているが、アセトアミノフェン投与によって酸化され、ASK1から解離することが明らかになった。このASK1とTrxの解離が、肝障害に至るASK1-JNK経路の活性化を導いていると結論している⁴¹⁾。

また、MAPK、MAPKK、MAPKKKのミトコンドリア移行も比較され、アセトアミノフェンを投与したマウス肝ではリン酸化されたJNKおよびMAP kinase kinase 4(MKK4)は移行するが、MMK7や上述のASK1は移行しないことがわかった⁴²⁾。また、ミトコンドリア外膜上でのJNKの初期ターゲットとなりうるタンパク質として新たにSab(SH3 domain-binding protein that preferentially associates with BtkあるいはSH3 domain-binding protein 5)を想定し、shRNAを用いてその発現を抑制すると、JNKの活性化が阻害され、アセトアミノフェンによる肝障害が抑えられた。このことから、MKK4を介したJNKの活性化とSabを介したJNKのミトコンドリア外膜への動員は、アセトアミノフェン誘発肝障害に必須であることが示された⁴²⁾。

近年、他のMAPKについても検討され、アセトアミノフェン投与により“death signal”としてJNKがリン酸化されるのに対して、活性代謝物を生成するがミトコンドリアへの移行性が低く肝障害には至らないアセトアミノフェンのメタ異性体(3'-hydroxyacetanilide)投与では、“prosurvival signal”として、他のMAPKであるextracellular signal-regulated protein kinase(ERK)がリン酸化されることが示された⁴³⁾。また、MAPKの脱リン酸化に関与するMAPK fosファクターゼ(Mkp)の一つでJNKの調節因子であることが知られているMkp-1の役割が、欠損マウスで検討され、野生型に比べMkp-1欠損マウスでは、JNK活性の上昇とアセトアミノフェン肝障害の重症化が認められ、Mkp-1がJNKの調節を介して、肝障害に対して防御的役割を担っていることが明らかになった⁴⁴⁾。また、上流のキナーゼに関しても、前述の通り、ASK1⁴¹⁾がアセトアミノフェン肝障害時のJNKの持続的な活性化を引き起こすのに対して、glycogen synthase kinase 3β(GSK-3β)⁴⁵⁾やmixed-lineage kinase 3(MLK3)⁴⁶⁾が、早期のJNKの活性化とそれに伴う肝障害誘発に関与することが明らかにされた。さらにこれらの下流のターゲットとして、どちらもGSH合成の律速酵素であるgluta-

mate cysteine ligase (GCL)の阻害を挙げている^{45,46)}のは興味深い。

8. GST欠損マウスにおけるアセトアミノフェン誘発肝障害に対する抵抗性の再検証とJNKと代償的に働く因子の検討

アセトアミノフェンによる肝障害発症過程で、JNKがdeath signalとして働くことは確立しつつあるが、発端となったGST Pi欠損マウスでの肝障害軽減¹⁸⁾は、GST Pi欠損マウスではJNKが常に活性化されているため、JNKを防御因子と仮定しなければ説明できない²⁰⁾。これに関連して、新たに類似の解毒酵素であるGST M1欠損マウス (*Gstm1*-null mice) において、アセトアミノフェン誘発肝障害が調べられた。GST Pi欠損と同様に、GST M1欠損マウスにおいてもアセトアミノフェン誘発肝障害の軽減が観察され⁴⁷⁾、NAPQIを抱合解毒する酵素として働いていないことが示された。GST Pi欠損²⁰⁾と異なり、GST M1欠損マウスでは常在型でのJNKの活性化は見られず、一方、GST Pi欠損と同様に、アセトアミノフェン投与によるJNKのリン酸化の増加は、GST M1欠損マウスでは抑えられた⁴⁷⁾。このことから、現時点ではJNKがGSTと結合していないこととの関連は不明であるが、これらGST欠損マウスでは、JNKが活性化されにくいことが肝障害抵抗性に深くかかわっていると推定できる。

チオレドキシン還元酵素 (Txnrd1) は、先に示したTrxを還元する酵素で、この還元によりTrxとASK1との結合を促進し、ASK1の活性化を減弱させ、さらにはJNKの活性化を抑制すると考えられる。しかし、Txnrd1欠損マウスでは、野生型に比べてアセトアミノフェン誘発肝障害が軽減された一方、アセトアミノフェン投与によるJNKのリン酸化の亢進は両群で同様に認められた⁴⁸⁾。また、Txnrd1欠損マウスでは、様々なNrf2ターゲット遺伝子の代償的とも言える発現増加が見られ、実際、アセトアミノフェン投与により枯渇したGSHが、Txnrd1欠損マウスでは早期に回復し、解毒酵素群の亢進が反映しているものと考えられた⁴⁸⁾。MAPK系を実験的に修飾するための処理が他の経路により大きく作用したり、MAPK系が他の経路とリンクすることが、MAPKの役割を理解する上で注意を要する。

9. おわりに

以上、薬剤性肝障害に対するストレス応答MAPキナーゼの役割について、アセトアミノフェン肝障害に対するJNKの役割を中心にまとめた。図3ABに示したように、JNKが肝障害の直接的要因であるMPTにどの程度寄与するか、JNKの下流のターゲットがMPT poreであるのか、活性化JNKと常在型JNKの役割は全く異なる

のかなど、未解明の課題は少なくないが、JNKとその上流・下流因子によるアセトアミノフェン誘発肝障害の修飾に関する知見は、近年の薬剤性肝障害に関する研究の中心的な進展の一つである。最近、プロテインキナーゼCaなど他のキナーゼの関与も明らかにされるなど⁴⁹⁾、今回網羅しきれなかった知見も多数あり、それらは薬剤性肝障害とシグナル伝達に関する最近の総説を参照されたい^{50,51)}。薬剤性肝障害とシグナル伝達は、特異体質性肝障害の要因や、薬剤性肝障害の治療ターゲットを提示するだけでなく、他の要因による肝障害や肝細胞の死そのものにも重要な情報を与えるものと考えられ、その進展を引き続き注視したい。

参考文献

- 1) Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M: Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain, *Genes Dev.* 7(11), 2135-2148, 1993.
- 2) Davis RJ: Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell.* 103(2), 239-252, 2000.
- 3) Johnson GL, Nakamura K: The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease, *Biochim Biophys Acta.* 1773(8), 1341-1348, 2007.
- 4) 森靖典, 後藤由季子: ストレス応答性MAPキナーゼファミリー JNKの機能, 蛋白質核酸酵素. 53(10), 1252-1257, 2008.
- 5) Bessems JG, Vermeulen NP: Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches, *Crit Rev Toxicol.* 31(1), 55-138, 2001.
- 6) 榊泰宏: アセトアミノフェンの肝毒性とサイトカイン, 薬物動態. 16(2), 151-156, 2001.
- 7) James LP, Mayeux PR, Hinson JA: Acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Drug Metab Dispos.* 31(12), 1499-1506, 2003.
- 8) Jaeschke H, Williams CD, Ramachandran A, Bajt ML: Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity, *Liver Int.* 32(1), 8-20, 2012.
- 9) Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism, *J Pharmacol Exp Ther.* 187(1), 185-194, 1973.
- 10) Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB: Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II.

- Role of covalent binding in vivo, *J Pharmacol Exp Ther.* 187(1), 195-202, 1973.
- 11) Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD: N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen, *Proc Natl Acad Sci USA.* 81(5), 1327-1331, 1984.
- 12) Cohen SD, Pumford NR, Khairallah EA, Boekelheide K, Pohl LR, Amouzadeh HR, Hinson JA: Selective protein covalent binding and target organ toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol.* 143(1), 1-12, 1997.
- 13) Qiu Y, Benet LZ, Burlingame AL: Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen in vivo in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *J Biol Chem.* 273(28), 17940-17953, 1998.
- 14) Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ: Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes, *Hepatology.* 40(5), 1170-1179, 2004.
- 15) Masubuchi Y, Suda C, Horie T: Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice, *J Hepatol.* 42(1), 110-116, 2005.
- 16) Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA: Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes, *J Pharmacol Exp Ther.* 312(2), 509-516, 2005.
- 17) Coles B, Wilson I, Wardman P, Hinson JA, Nelson SD, Ketterer B: The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: a stopped-flow kinetic study, *Arch Biochem Biophys.* 264(1), 253-260, 1988.
- 18) Henderson CJ, Wolf CR, Kitteringham N, Powell H, Otto D, Park BK: Increased resistance to acetaminophen hepatotoxicity in mice lacking glutathione S-transferase Pi, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23), 12741-12745, 2000.
- 19) Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z: Regulation of JNK signaling by GSTp, *EMBO J.* 18(5), 1321-1334, 1999.
- 20) Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR, Park BK: Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi, *J Biol Chem.* 278(25), 22243-22249, 2003.
- 21) Matsumaru K, Ji C, Kaplowitz N: Mechanisms for sensitization to TNF-induced apoptosis by acute glutathione depletion in murine hepatocytes, *Hepatology.* 37(6), 1425-1434, 2003.
- 22) Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW: SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(24), 13681-13686, 2001.
- 23) Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N: c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity, *Gastroenterology.* 131(1), 165-178, 2006.
- 24) Henderson NC, Pollock KJ, Frew J, Mackinnon AC, Flavell RA, Davis RJ, Sethi T, Simpson KJ: Critical role of c-jun (NH2) terminal kinase in paracetamol-induced acute liver failure, *Gut.* 56(7), 982-990, 2007.
- 25) Bourdi M, Korrapati MC, Chakraborty M, Yee SB, Pohl LR: Protective role of c-Jun N-terminal kinase 2 in acetaminophen-induced liver injury, *Biochem Biophys Res Commun.* 374(1), 6-10, 2008.
- 26) Jaeschke H, McGill MR, Williams CD, Ramachandran A: Current issues with acetaminophen hepatotoxicity--a clinically relevant model to test the efficacy of natural products, *Life Sci.* 88(17-18), 737-745, 2011.
- 27) Masson MJ, Carpenter LD, Graf ML, Pohl LR: Pathogenic role of natural killer T and natural killer cells in acetaminophen-induced liver injury in mice is dependent on the presence of dimethyl sulfoxide, *Hepatology.* 48(3), 889-897, 2008.
- 28) Bourdi M, Davies JS, Pohl LR: Mismatching C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A liver injury, *Chem Res Toxicol.* 24(6), 794-796, 2011.
- 29) Saito C, Lemasters JJ, Jaeschke H: c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity, *Toxicol Appl Pharmacol.* 246(1-2), 8-17, 2010.
- 30) Imose M, Nagaki M, Kimura K, Takai S, Imao M, Naiki T, Osawa Y, Asano T, Hayashi H, Moriwaki H: Leflunomide protects from T-cell-mediated liver injury in mice through inhibition of nuclear factor kappaB, *Hepatology.* 40(5), 1160-1169, 2004.
- 31) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K: An active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of serum amyloid A protein in human hepatocytes, *Rheumatology (Oxford).* 44(4), 443-448, 2005.
- 32) Latchoumycandane C, Seah QM, Tan RC, Sattabongkot J,

- Beerheide W, Boelsterli UA: Leflunomide or A77 1726 protect from acetaminophen-induced cell injury through inhibition of JNK-mediated mitochondrial permeability transition in immortalized human hepatocytes, *Toxicol Appl Pharmacol.* 217(1), 125-133, 2006.
- 33) Latchoumycandane C, Goh CW, Ong MM, Boelsterli UA: Mitochondrial protection by the JNK inhibitor leflunomide rescues mice from acetaminophen-induced liver injury, *Hepatology.* 45(2), 412-421, 2007.
- 34) Tan SC, New LS, Chan EC: Prevention of acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity by leflunomide via inhibition of APAP biotransformation to N-acetyl-p-benzoquinone imine, *Toxicol Lett.* 180(3), 174-181, 2008.
- 35) Zoratti M, Szabo I: The mitochondrial permeability transition, *Biochim Biophys Acta.* 1241(2), 139-176., 1995.
- 36) Bernardi P: The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death, *Biochim Biophys Acta.* 1275(1-2), 5-9, 1996.
- 37) Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B: The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy, *Biochim Biophys Acta.* 1366(1-2), 177-196, 1998.
- 38) Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N: Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury, *J Biol Chem.* 283(20), 13565-13577, 2008.
- 39) Kaplowitz N, Shinohara M, Liu ZX, Han D: How to protect against acetaminophen: don't ask for JUNK, *Gastroenterology.* 135(4), 1047-1051, 2008.
- 40) Cover C, Mansouri A, Knight TR, Bajt ML, Lemasters JJ, Pessayre D, Jaeschke H: Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity, *J Pharmacol Exp Ther.* 315(2), 879-887, 2005.
- 41) Nakagawa H, Maeda S, Hikiba Y, Ohmae T, Shibata W, Yanai A, Sakamoto K, Ogura K, Noguchi T, Karin M, Ichijo H, Omata M: Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation, *Gastroenterology.* 135(4), 1311-1321, 2008.
- 42) Win S, Than TA, Han D, Petrovic LM, Kaplowitz N: c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice, *J Biol Chem.* 286(40), 35071-35078, 2011.
- 43) Stamper BD, Bammler TK, Beyer RP, Farin FM, Nelson SD: Differential regulation of mitogen-activated protein kinase pathways by acetaminophen and its nonhepatotoxic regioisomer 3'-hydroxyacetanilide in TAMH cells, *Toxicol Sci.* 116(1), 164-173, 2010.
- 44) Wancket LM, Meng X, Rogers LK, Liu Y: Mitogen-activated protein kinase phosphatase (Mkp)-1 protects mice against acetaminophen-induced hepatic injury, *Toxicol Pathol.* 40(8), 1095-1105, 2012.
- 45) Shinohara M, Ybanez MD, Win S, Than TA, Jain S, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N: Silencing glycogen synthase kinase-3 β inhibits acetaminophen hepatotoxicity and attenuates JNK activation and loss of glutamate cysteine ligase and myeloid cell leukemia sequence 1, *J Biol Chem.* 285(11), 8244-8255, 2010.
- 46) Sharma M, Gadang V, Jaeschke A: Critical role for mixed-lineage kinase 3 in acetaminophen-induced hepatotoxicity, *Mol Pharmacol.* 82(5), 1001-1007, 2012.
- 47) Arakawa S, Maejima T, Fujimoto K, Yamaguchi T, Yagi M, Sugiura T, Atsumi R, Yamazoe Y: Resistance to acetaminophen-induced hepatotoxicity in glutathione S-transferase Mu 1-null mice, *J Toxicol Sci.* 37(3), 595-605, 2012.
- 48) Patterson AD, Carlson BA, Li F, Bonzo JA, Yoo MH, Krausz KW, Conrad M, Chen C, Gonzalez FJ, Hatfield DL: Disruption of Thioredoxin Reductase 1 Protects Mice from Acute Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity through Enhanced NRF2 Activity, *Chem Res Toxicol.* 26(7), 1088-1096, 2013.
- 49) Saberi B, Ybanez MD, Johnson HS, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N: Protein kinase C (PKC) participates in acetaminophen hepatotoxicity through c-jun-N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent signaling pathways, *Hepatology.* in press 2013.
- 50) Seki E, Brenner DA, Karin M: A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches, *Gastroenterology.* 143(2), 307-320, 2012.
- 51) Han D, Dara L, Win S, Than TA, Yuan L, Abbasi SQ, Liu ZX, Kaplowitz N: Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria, *Trends Pharmacol Sci.* 34(4), 243-253, 2013.