

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立

所属 国立小児病院小児医療研究センター
共同利用研究室
研究者 四宮 貴久

分担研究者

武田薬品工業(株)創薬研究本部 嶋本 典夫

要旨

最近、酸化ストレスによる細胞死において、生存シグナルである extra cellular signal-regulated protein kinases (ERKs) の関与が報告されてきているがその役割についてはほとんど明らかになっていない。我々はこれまでにラット初代培養肝細胞において、Cat 及び GPx 阻害による内因性酸化ストレス惹起により核凝縮および DNA 断片化を伴った apoptosis が誘導されることを明らかにしている。この apoptosis 誘導メカニズムにおいて、ERKs の活性化が大きく関与していることを見出した。

一方、初代培養肝細胞のミトコンドリア活性を MTT アッセイによりスクリーニングする過程で、阻害作用のあった免疫抑制剤の一つである FTY720 について、更に詳細に Jurkat および HeLa 等の細胞より単離したミトコンドリアを用いて作用を解析した。その結果、この薬物はミトコンドリアに直接に作用し、膜電位を下げるとともに膜透過を亢進し、ミトコンドリアからのチトクローム c の放出を誘発することが明らかとなった。

1. 研究目的

肝細胞は様々な異物の代謝を行うとともに、これらの代謝過程において酸化ストレスの関与が想定されている。また酸化ストレスが細胞障害に関与することは明らかにされており、最近特に apoptosis との関連が注目されている。酸化ストレス防御系酵素群が機能不全を起こすような病的状態を想定し、肝細胞における内因性酸化ストレスに着目した。内因性酸化ストレス惹起剤として catalase (Cat) 阻害剤の 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ), glutathione peroxidase (GPx) 阻害剤の mercaptosuccinic acid (MS) を用い、ラット肝細胞初代培養系における内因性酸化ストレスの影響を調べた。これまでに Cat および GPx の活性阻害による内因性酸化ストレス増加により、ラット初代培養肝細胞死 (apoptosis) が引き起こされ、また、この酸化ストレスに薬物代謝酵素チトクローム P450 の関与があることを報告してきた (Free Radic. Biol. Med. 27 : 1019-1026 ; 1999)。Apoptosis においては caspase 系の関与が広く知られているが、caspase 非依存的なアポトーシスも多く報告されており、その死のメカニズムについては完全に理解できていない。最近、酸化ストレスによる細胞死において、生存シグナルである extra cellular signal-regulated protein kinases (ERKs) の関与が報告されてきているがその役割についてはほとんど明らかになっていない。そこで今回、上記肝細胞死シグナルにおける caspase 及び ERKs の関与について調べた。また、アポトーシスの誘発系の一つとして、ミトコンドリアの膜電位の低下や酵素活性の阻害などにより、チトクローム c や apoptosis inducing factor (AIF) などのアポトーシス誘発因子が放出され、それらの媒介でアポトーシスの一連の反応が引き起こされることも良く知られるようになった。MTT アッセイは生細胞中のミトコンドリアの活性に依存する反応であり、アポトーシス誘発薬物のスクリーニングに適したアッセイ系であると予想されたので、ミトコンドリアとの関連を詳しく解析することも試みた。

2. 研究方法

Wistar 系雄性ラットを用いコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を単離した。単離細胞を 10 % FCS, 100 nM insulin 及び 100 nM dexamethasone を加えた WILLIAMS' E 培地を用い 95 % air / 5 % CO₂, 37 °C で培養した。内因性酸化ストレス惹起剤として Cat 阻害剤 3-amino-1,2,4-triazole、GPx 阻害剤 mercapto-succinic acid を用いた。Trypan Blue 色素排出 (%) を測定し細胞死の指標とした。また、酸化ストレスは蛍光色素である dihydroethidium (DHE) 酸化量で評価した。核の形態は Hoechst 33342 で染色し蛍光顕微鏡で観察した。DNA の断片化検出にはアガロースゲル電気泳動を行った。Caspase の酵素活性は蛍光標識ペプチドを用い、その反応量を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。また ERKs の活性は基質である Elk-1 のリン酸化量を指標としてウエスタンブロットティングで調べた。ミトコンドリアの膜電位は DiOC6(3) の取り込み活性を flow cytometry で測定した。チトクローム c の放出は、SDS 電気泳動後、抗チトクローム c 抗体を用いた Western blot により検出定量した。また、活性化型の Caspase の

Western blot による検出には、抗-Caspase 3 抗体を用いて行った。

3. 研究成果

3-1. 抗酸化剤 (vitamin C, vitamin E) の ATZ+MS 誘導細胞死に及ぼす影響

ATZ 20 mM と MS 7 mM の同時適用では生存率は培養 24 時間で 1.0 ± 0.9 %まで低下した (Fig.1-A)。さらにこのとき、Hoechst 33342 による核染色を行い蛍光顕微鏡で観察したところ ATZ+MS の処置を行った細胞では核の約 80 %に凝縮が見られた (Fig.1-B; 矢印は凝縮を起こしている核)。また、24 時間培養した細胞より DNA を抽出し DNA のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、ATZ+MS 処置を行った細胞にのみ DNA の断片化が確認された (Fig.1-C)。ATZ+MS 処置と同時に抗酸化剤 (vitamin C, vitamin E) を培養系に添加するとこれらの変化はすべて抑制された (Fig.1-A,B,C)。

3-2. 酸化ストレスの検出

蛍光色素である dihydroethidium (DHE) 酸化量を指標として、ATZ+MS 処置による酸化ストレスの増加を測定した。培養 12 時間まで酸化ストレスは時間依存的に増加しその後 plateau に達した (Fig.2)。

3-3. ATZ+MS 誘導細胞死における caspase の関与

培養 12 時間において細胞抽出液を調製し、caspase の活性 (caspase 2, 3, 7, 6, 8, 9) を測定した。ラット初代培養肝細胞における caspase 依存的 apoptosis 細胞死の positive control として、TNF- α /actinomycin D 処置を行った。ATZ+MS 処置においてはどの型の caspase の活性化も見られなかった。一方、TNF- α /actinomycin D 処置においては顕著な caspase の活性化が見られた (Fig.3)。また、汎 caspase 阻害剤である z-VAD-fmk 同時処置において ATZ+MS 誘導細胞死は影響を受けなかったのに対し、TNF- α /actinomycin D 誘導細胞死は完全に抑制された (data not shown)。

3-4. protein tyrosine kinases (PTKs) 阻害剤 (genistein, herbimycin A) の影響

ATZ+MS 処置では生存率が 1.3 ± 0.8 %であったが、PTKs 阻害剤である genistein 200 μ M または herbimycin A 20 μ M それぞれの処置で生存率は 86.1 ± 3.2 %、 89.4 ± 2.2 %であり、生存率の減少は顕著に抑制され (Fig.4-A)、さらに、核の凝縮も同様に genistein あるいは herbimycin A により顕著に抑制された (Fig.4-B)。また、両阻害剤により DNA の断片化も抑制された (Fig.4-C)。

3-5. ATZ+MS 誘導細胞死における ERKs の関与

培養 6, 9, 12 時間における細胞抽出液から活性化型 ERKs を免疫沈降させ、Elk-1 を基質とし in vitro で kinase 反応を行い、リン酸化された Elk-1 をウエスタンブロッティングで検出した。同時に ERKs をリン酸化する MEK1/2 の阻害剤である U0126 40 μ M の影響についても調べた。培養 6, 9, 12 時間において無処置群に比較して ATZ+MS 処置により ERKs の活性化が見られ、U0126 処置により活性化が抑制されることが分かった (Fig.5)。また ATZ+MS 処置では生存率が 0.9 ± 0.6 %であったが、U0126 同時処置で生存率は 90.2 ± 1.7 % であり、生存率の減少は顕著に抑制され (Fig.6-A)、さらに、核凝縮、DNA の断片化も抑制された (Fig.6-B,C)。

3-6. FTY720 は、正常の Jurkat(neo)に作用させると DNA ラダーを生じ、Caspase 3 の活性化も引き起こしたが、抗アポトーシス因子である Bcl-2 分子を強発現した遺伝子導入体である Jurkat(bcl-2)に対しては、DNA ラダーも Caspase 3 の活性化も生じなかった (Fig.7-A,-B)。その 2 種の細胞より単離したミトコンドリアに作用させると、Jurkat(neo)よりのものからはチトクローム c の放出が見られたが、Jurkat(bcl-2)のミトコンドリアからはチトクローム c の放出は見られなかった (Fig.7-C,-E)。このことから、この薬物が、ミトコンドリアからチトクローム c を放出することがアポトーシスの誘因となっていることが判明した。また、アポトーシス誘発とチトクローム c の放出は Bcl-2 により抑制されることも明らかとなった。DiOC6(3)を用いたミトコンドリア膜電位の測定では、ラット初代培養肝細胞の実験より予想されたように、膜電位の低下が起こっていた。また両細胞より得られたミトコンドリアとも同様に膜電位の低下が起こっていた。

4. 考察

ラット初代培養肝細胞において、内因性酸化ストレスにより核の凝縮および DNA の断片化を伴った apoptosis 細胞死が誘導され、Vitamin C や Vitamin E などの抗酸化剤の同時添加により細胞死は抑制された。また、DHE の酸化量が培養時間依存的に増加した。以上のことから、apoptosis に内因性酸化ストレスが影響を及ぼしていることが明らかとなった。

ATZ+MS 処置により誘導される apoptosis は caspase (2, 3, 6, 7, 8, 9) の活性化を伴わず、汎 caspase 阻害剤である z-VAD-fmk により apoptosis が抑制されなかったことから caspase 非依存的な細胞死メカニズムの可能性が示唆された。一方、同培養条件において、TNF- α /actinomycin D 処置を行った時 caspase (2, 3, 6, 7, 8, 9) の活性化が検出され、さらに z-VAD-fmk 処置によりこの apoptosis が顕著に抑制されたことから、ラット初代培養肝細胞は、caspase 依存的及び caspase 非依存的 apoptosis メカニズムの両方を有する可能性が示された。

非特異的な protein tyrosine kinases 阻害剤である genistein, herbimycin A の処置により apoptosis

が完全に抑制されたことから、protein tyrosine kinase(s) の関与が示唆された。また、ATZ+MS 誘導 apoptosis に先立って ERKs の活性化が検出され、さらに MEK1/2 の特異的阻害剤である U0126 の添加により ERKs の活性化、細胞死、核凝縮、DNA 断片化のすべてが抑制された。これより、従来生存シグナルとして考えられていた ERKs の活性化が apoptosis 誘導に関与していることが示された。最近、酸化ストレスによる細胞傷害に ERKs の活性化が関与するということが多数報告されてきており、ERKs 活性化阻害により細胞傷害が減弱されることも同様に示されている。これらの結果は、我々の実験結果を強く指示する。ATZ+MS 誘導細胞傷害における ERKs 関与の詳細なメカニズムについては今後の検討が必要である。

MTT アッセイによりミトコンドリア依存性のアポトーシス誘発薬物のスクリーニングが効率良くできる可能性が出てきた。また、詳細な薬理学的実験の道具として、更に各種の遺伝子が増えられた肝細胞が必要と思われる。

5. まとめ

Cat 及び GPx 阻害による内因性酸化ストレスラット初代培養肝細胞傷害において、ERKs の活性化が細胞死誘導メカニズムに大きく関与していると考えられる。ラット初代培養肝細胞において caspase 依存的及び caspase 非依存的 apoptosis メカニズム (ERKs の活性化介する apoptosis メカニズム) が存在する可能性が示された。また、MTT アッセイとミトコンドリア傷害がかなり密接に関係することも示唆された。

6. 研究発表

D. Shiba and N. Shimamoto. Involvement of Protein-Tyrosine Phosphatases and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Pathways in the Endogenous Oxidative Stress-Induced Apoptosis of Rat Primary Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* (2001) 投稿中

Nagahara Y, Ikekita M and Shinomiya T. Immunosuppressant FTY720 induces apoptosis by direct induction of permeability transition and release of cytochrome c from mitochondria. *J. Immunol.* 165: 3250-3259, 2000.

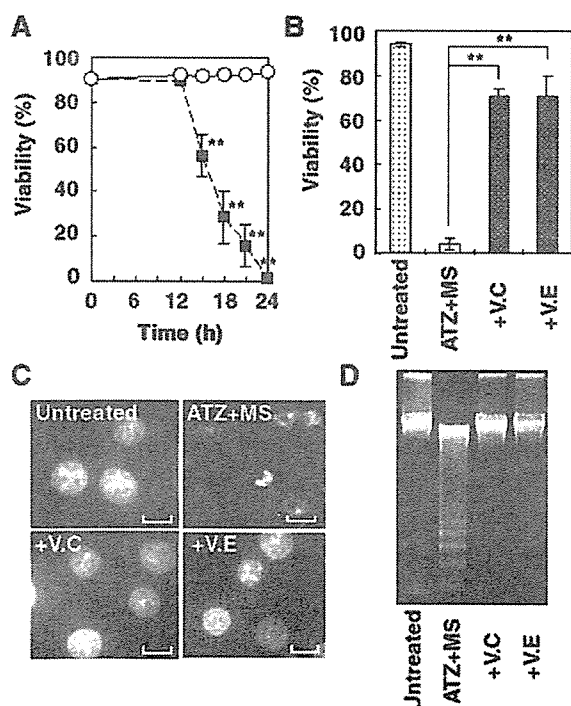


FIG. 1. Effects of antioxidants, vitamin C (V.C) or vitamin E (V.E), on ATZ and MS-induced hepatocyte apoptosis.

Primary rat hepatocytes were incubated in the absence (open circles) or presence (filled squares) of ATZ (20 mM) and MS (7 mM) for 24 h. Panel A shows a time-course for percent viability. Data represent the means \pm SE of four to five different experiments. Data were analyzed using a t-test with Bonferroni correction. P values less than 0.05 were considered significant. **, $p < 0.01$. Panel B shows the effects of V.C (1 mM) or V.E (100 μ M) on ATZ and MS-induced hepatocyte apoptosis at 24 h. Data are expressed as the means \pm SE of four to five separate experiments. Data were analyzed with Dunnett's test after one-way analysis of variance. P values less than 0.05 was considered significant. **, $p < 0.01$. Panel C shows fluorescence micrographs of Hoechst 33342 stained nuclear of hepatocytes for untreated (upper left), treatment with ATZ and MS (upper right), treatment with ATZ, MS and V.C (bottom left), treatment with ATZ, MS and V.E (bottom right), respectively (bar = 10 μ m). Panel D shows agarose gel electrophoresis results. After hepatocytes were scraped, cellular DNA was extracted and purified. The purified DNA was then electrophoresed.

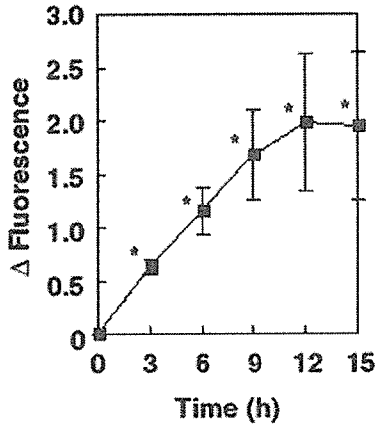


FIG. 2. Time-course for changes in dihydroethidium (DHE) oxidation. Hepatocytes were incubated in the absence or presence of ATZ and MS for 15 h. Oxidative stress was measured using DHE. This panel shows the time-course for changes in differences in fluorescence intensity of hepatocyte cultures with ATZ and MS treatments compared to that of untreated ones. Data represent the means \pm SE of three separate experiments. Data were analyzed using a t-test with Bonferroni correction. P values less than 0.05 were considered significant. *, $p < 0.05$.

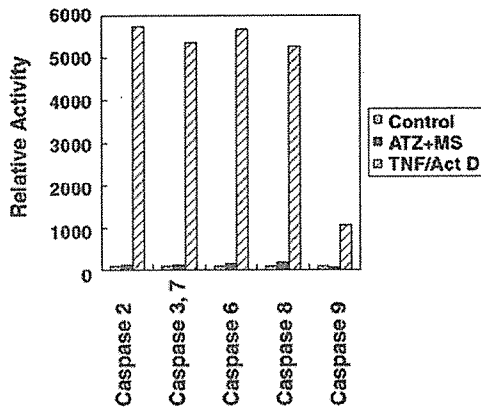


FIG. 3. Effects of ATZ and MS treatment, or TNF- α and actinomycin D treatment on caspase activity. Hepatocytes were incubated in the absence or presence of ATZ and MS, or TNF- α and actinomycin D for 12 h. Caspase activities were measured by cleavage of fluorochrome-conjugated oligopeptides. This panel shows relative activity of caspase (control = 100).

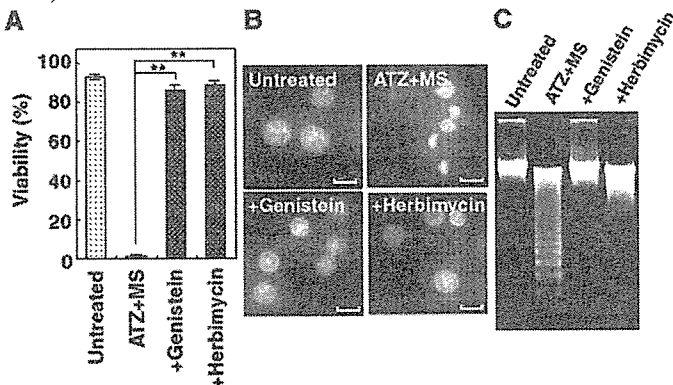


FIG. 4. Effects of PTK inhibitors, genistein or herbimycin A, on hepatocytes treated with ATZ and MS. Primary rat hepatocytes were treated with genistein or herbimycin

in combination with ATZ and MS, and then incubated for 24 h. Panel A shows the percent viability. Data are expressed as the means \pm SE of four to five separate experiments. Data were analyzed with Dunnett's test after a one-way analysis of variance. P values less than 0.05 was considered significant. **, $p < 0.01$. Panel B shows fluorescence micrographs of Hoechst 33342 stained nuclear of hepatocytes by untreated (upper left), treatments with ATZ and MS (upper right), treatments with ATZ, MS and genistein (bottom left), treatments with ATZ, MS and herbimycin (bottom right), respectively (bar = 10 μ m). Panel C shows agarose gel electrophoresis results.

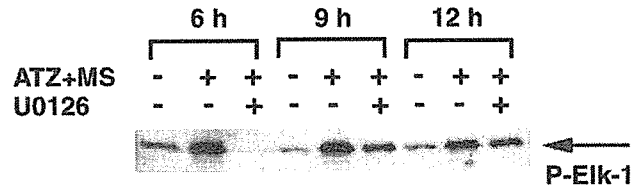


FIG. 5. Effects of ATZ and MS treatments, and co-treatment with U0126 on the ERK activity

Primary rat hepatocytes were incubated in the absence or presence of ATZ and MS for 12 h. This panel shows time-course changes in ERK activity assessed by the phosphorylation of Elk-1.

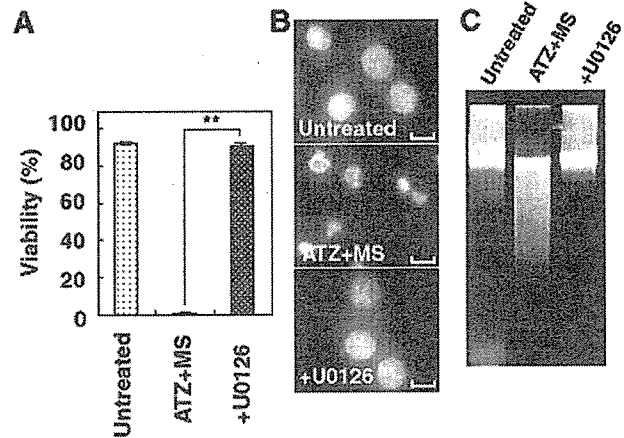


FIG. 6. Effects of U0126, a specific MEK1/2 inhibitor, on hepatocytes treated with ATZ and MS

Primary rat hepatocytes were treated with ATZ and MS in the absence or presence of U0126, and then incubated for 24 h. Panel A shows the percent viability. Data are expressed as the means \pm SE of four to five separate experiments. Data were analyzed with Dunnett's test after a one-way analysis of variance. P values less than 0.05 was considered significant. **, $p < 0.01$. Panel B shows fluorescence micrographs of Hoechst 33342 stained nuclear of hepatocytes for untreated (upper), ATZ and MS treated (middle), ATZ, MS and U0126 (bottom) treated cells, respectively (bar = 10 μ m). Panel C shows the results of agarose gel electrophoresis.

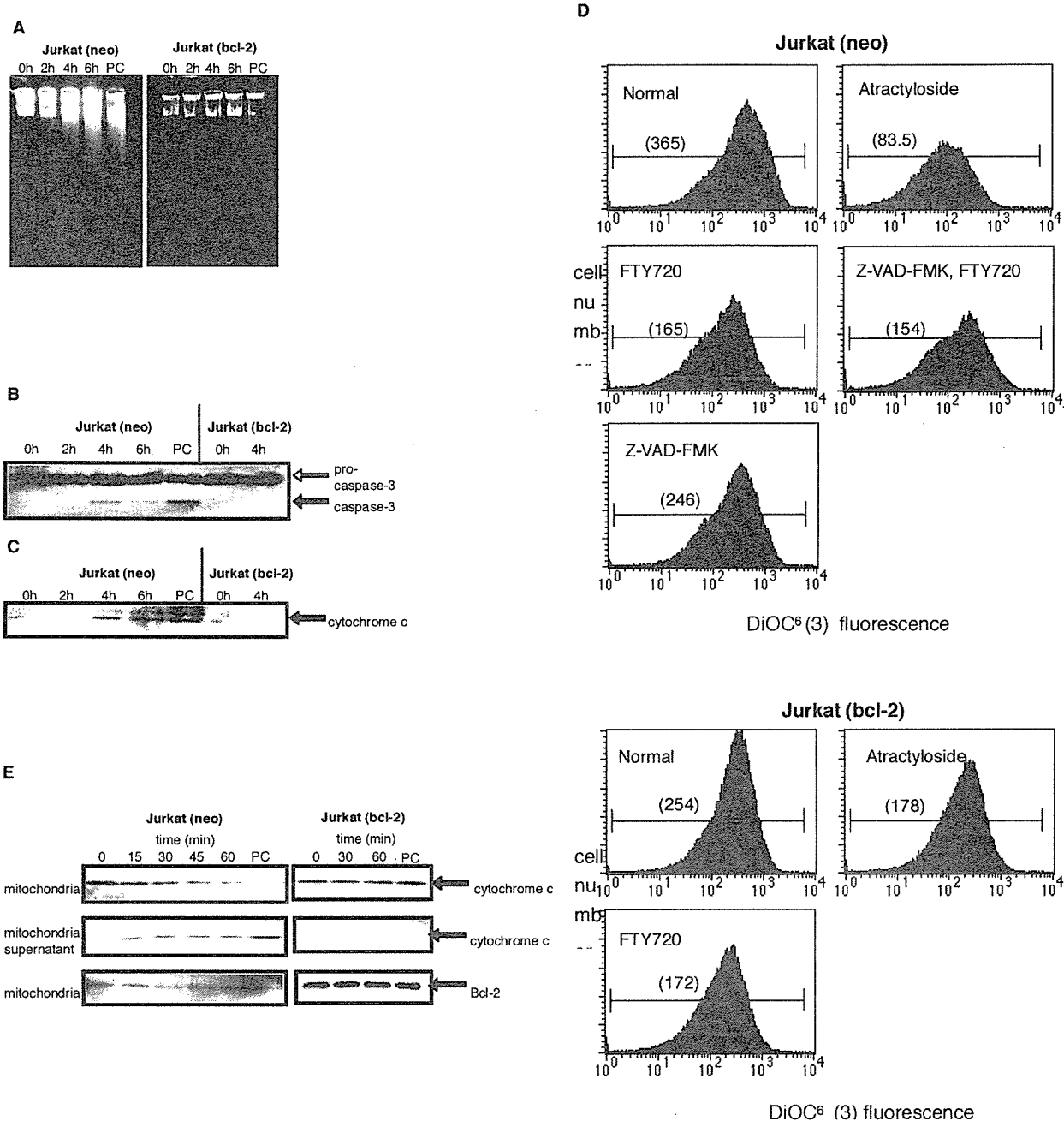


FIG. 7. FTY720-induced apoptosis, cytochrome c release, and inhibition by overexpression of bcl-2.

(A) Both Jurkat (neo) and Jurkat (bcl-2) cells (1×10^6) were incubated with $8 \mu\text{M}$ FTY720 for 0, 2, 4 and 6 h. At the indicated times, the cells were lysed and DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis. PC indicates incubation with $1 \mu\text{M}$ staurosporine for 4 h (positive control). Data are representative of three independent experiments. (B) Both Jurkat (neo) and Jurkat (bcl-2) cells (1×10^7) were incubated with $8 \mu\text{M}$ FTY720 for the indicated periods. Cytosolic fractions were prepared and pro-caspase-3 and caspase-3 was detected by Western blotting. Open arrow indicates pro-caspase-3 (32kDa); filled arrow indicates caspase-3 (17kDa); PC indicates incubation with $1 \mu\text{M}$ staurosporine for 4 h (positive control). Data is representative of three independent experiments. (C) Both Jurkat (neo) and Jurkat (bcl-2) cells (1×10^7) were incubated with $8 \mu\text{M}$ FTY720 for the indicated periods. Mitochondria and cytosolic fractions were prepared at various times and cytochrome c in cytosolic fraction was detected by Western blotting. PC indicates treatment with $1 \mu\text{M}$ staurosporine for 4 h (positive control). Data is representative of three independent experiments. (D) Mitochondria from both Jurkat (neo) and Jurkat (bcl-2) cells ($25 \mu\text{g}$ mitochondrial protein in $100 \mu\text{l}$ CFS buffer) was prepared as described under "Experimental Procedures". Mitochondria were incubated with no additives, $10 \mu\text{M}$ FTY720, $40 \mu\text{M}$ Z-VAD-FMK, FTY720 and Z-VAD-FMK together, and 5mM atractyloside (positive control) for 30 min at 37°C . Thereafter, DiOC6 (3) (50nM) was added and incubated for a further 15 min and potential was analyzed by flow cytometry. Values in parentheses indicate median fluorescence intensity. Data are representative of three independent experiments. (E) Mitochondria from both Jurkat (neo) and Jurkat (bcl-2) cells ($100 \mu\text{g}$ mitochondrial protein in $100 \mu\text{l}$ CFS buffer) prepared as described under "Experimental Procedures" were incubated with no additives, $10 \mu\text{M}$ FTY720, $40 \mu\text{M}$ Z-VAD-FMK, FTY720 and Z-VAD-FMK together at 37°C for indicated times. Mitochondria and mitochondrial supernatant were prepared, and cytochrome c was detected by Western blotting. In addition, Bcl-2 levels in mitochondria were measured. PC indicates incubation with 5mM atractyloside for 60 min (positive control). Data are representative of three independent experiments.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社