

ール誘導体のラジカル消去活性、第 20 回生体機能関連化学シンポジウム、名古屋、(2005,9)

16) 西澤千穂、中西郁夫、大久保 敬、竹下啓蔵、鈴木和夫、宮田直樹、奥田晴宏、福住俊一、小澤俊彦、伊古田暢夫、福原 潔、NADH 誘導体によるピリジン N-オキシド誘導体の光還元による活性酸素生成、第 20 回生体機能関連化学シンポジウム、名古屋、(2005,9)

17) 箱田奈南、福原 潔、及川伸二、及川佐枝子、平工雄介、奥田晴宏、宮田直樹、川西正介、紫外線照射下におけるアントラセン誘導体による DNA 損傷、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、(2005,9)

18) 福原 潔、石井明子、川崎ナナ、川西 徹、宮田直樹、奥田晴宏、脂溶性平面型カテキンの抗酸化作用とがん細胞増殖阻害効果、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、(2005,9)

19) 福原 潔、奥田晴宏、がん予防を目的とした天然カテキンの誘導化、第 11 回日本がん予防研究会、岐阜(2005,7)

20) 川島知憲、中西郁夫、乳井美奈子、川口久美子、大久保 敬、金澤秀子、奥田晴宏、福原 潔、福住俊一、小澤俊彦、伊古田暢夫、プロトン性溶媒中におけるフェノール性抗酸化剤のラジカル消去反応に対する金属イオンの触媒作用、第 15 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(SRM2005)、大阪(2005,6)

21) 福原 潔、中西郁夫、小原美紀、小澤俊彦、伊古田暢夫、宮田直樹、斎藤慎一、奥田晴宏、新規抗酸化物質の開発-平面型カテキン誘導体へのリジンの導入-、第 27 回日本フリーラジカル学会学術集会、岡山、(2005,6)

22) 中西郁夫、川島知憲、乳井美奈子、薬丸晴子、川口久美子、大久保 敬、金澤秀子、奥田晴宏、福住俊一、小澤俊彦、福原 潔、伊古田暢夫、フェノール性抗酸化剤のラジカル消去反応における塩基触媒作用、第 27 回日本フリーラジカル学会学術集会、岡山、(2005,6)

23) K. Fukuhara, I. Nakanishi, Y. Kawamura, T. Kawashima, H. Kanazawa, S. Urano, N. Ikota, A. Ishii, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Ozawa,

H. Okuda, Planar Catechin Analogues as a New Type of Synthetic Flavonoids, International Society of Cancer Prevention Symposium (ISCaP) symposium, Kyoto, (2005,5)

H. 知的財産権の出願・登録状況
登録および登録予定共になし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した
肝障害の機序解明

分担研究者：宮田昌明 東北大学大学院薬学研究科

研究要旨 トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合による毒性発現機序の解析手法を確立することを最終目的として胆汁鬱滞型の肝障害を誘発する lithocholic acid (LCA)の毒性発現の機序の解明をマウスを用いて試みた。LCA は遅延性の肝障害を誘発することより経時的な変化や毒性を軽減させる薬物、pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) 併用の影響から多面的に網羅的遺伝子発現解析を行った。内在性代謝物（脂質、糖、アミノ酸、核酸）の代謝や輸送に関連する遺伝子の発現変動に注目し解析した結果、毒性発現が脂質特にリン脂質の肝内低下と密接に関連する可能性を見いだした。そこで LCA 処置マウス肝内、胆汁中の脂質レベルを測定すると特にリン脂質の顕著な濃度低下が認められ、障害を軽減させる PCN や probucol を併用するとリン脂質濃度の増加が認められた。これらの結果は遺伝子発現解析から推測した障害誘発の機序を支持している。

A. 研究目的

近年医薬品の安全性評価等の解析のためマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の手法が導入されている。この解析により多くの発現情報が得られるが、必ずしも、その中から有益な情報を抽出し、毒性の機序解明や毒性マーカーの検索に結びついているとはいえない。これらの原因として解析手法の問題や細胞内機能の変化が必ずしも mRNA レベルに反映されない点が考えられる。そこで実際の機能を反映している内在性代謝物の

網羅的解析（メタボロミクス）を組み合わせた総合的な解析手法の開発が必要とされる。本研究ではこれらの解析手法の初期段階の試みとして内在性代謝物（脂質、糖、アミノ酸、核酸）の代謝や輸送に関連する遺伝子に注目し、網羅的遺伝子発現解析の結果から予測される変化を生体内代謝物の変動で説明出来るか検証するというステップを繰り返すことにより実際の毒性と関連した生体内機能変化に対応した遺伝子発現変動や生体内代謝

物変動を抽出する手法の開発を目的とした。解析の精度を向上させるため薬物処理の経時的変化や薬物の併用の影響から多面的に解析した。

モデル化合物として遅延性の胆汁鬱滞型肝障害を誘発する lithocholic acid (LCA) を用い経時的に解析した。LCA は生体内で生成される 2 次胆汁酸で、肝胆道系に局在する肝指向性の生体内物質である。疎水性が強く細胞毒性が認められている。雌性マウスで感受性が高く、肝実質細胞の障害の指標となる AST や ALT 活性が上昇した後、胆道系の障害の指標となる ALP 活性が上昇する。これらの毒性発現機序については未知の部分が多い。本研究では LCA 誘発肝障害を軽減することが知られている pregnenolone-16 α -carbonitrile(PCN) を併用することで脂質の動態に注目して、肝障害の機序を網羅的遺伝子発現解析と内在性代謝物の変動の両面から解析した。

B. 研究方法

1. 動物と薬物処理

10 週齢の C57BL/6 雌性マウスに、0.6%LCA を含有させた粉末飼料 (CE-2) を 3 日 (LCA3 群) , 5 日 (LCA5 群) , 9 日 (LCA9 群) 間自由に摂取させた。また併用群として投与開始 5 日目から 2 日 (LCA7/PCN2 群) あるいは 4 日間 (LCA9/PCN4 群) , 100mg/kg の PCN を corn oil に懸濁させたものを腹腔内に投与した。コントロール群、LCA9 群には、

同量の corn oil を腹腔内に投与した。

2. 肝臓、血清、胆汁の採取

エーテル麻酔下で開腹し血液を下大静脈より採取し、肝臓を単離後、遺伝子発現解析のため肝臓の一部を RNAlater (Ambion) 中に保存した。胆汁はエーテル麻酔下で胆管カニューレーションを施し、5 分間の平衡化後 30 分間採取した。

3. 肝障害マーカー、脂質の測定

AST、ALT 活性はトランスアミナーゼ CII-テストワコー(和光純薬)を用いて ALP 活性測定はアルカリ性ホスファ B-テストワコー(和光純薬)を用いて測定した。総胆汁酸量は総胆汁酸—テストワコー(和光純薬)を用い、リン脂質、遊離脂肪酸、トリグリセリドはそれぞれリン脂質 C-テストワコー、NEFA C-テストワコー、トリグリセライド E-テストワコー (和光純薬) を用いた。

4. 網羅的遺伝子発現解析

20~30mg 肝臓をホモジネートし、RNeasy Mini Kit (キアゲン) を用いて total RNA を精製した。精製した total RNA 8~15 μ g を用いて One-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix) により標識 cRNA を調製した。ビオチン標識 cRNA は Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリシ、データを取得した。スキャナーは GeneChipR

Scanner 3000 (Affymetrix) を用いた。遺伝子発現データの取得は Affymetrix 社のマニュアルに基づいて行った。データ解析には統計解析ソフト avadis(Strand Genomics 社)を用いた。データの正規化には RMA 法を用いた。One-WAY ANOVA、階層的クラスター解析、主成分分析には、GeneChip システムによって与えられる P(Present)、M (Marginal)、A(Absent) の指標をもとに有意に発現していると判断した 8450 の遺伝子を用いた。

C. 研究成果

1. LCA 誘発肝障害の変動

C57BL/6 雌性マウスに LCA0.6%を混餌で経時的に処理し、また pregnenolone-16 α -carbonitrile を併用して毒性パラメーターの変動を解析した。マウスに LCA0.6%を 3日摂取させると ALT 活性の上昇が認められ、以後時間依存的に活性の増加が認められた (Fig. 1)。一方胆道系の障害の指標である ALP 活性は 5日目においても増加が認められなかったが、9日目では有意な増加が認められた。5日目より 2日間あるいは4日間 PCN を LCA と併用すると、ALT, ALP 活性はほとんど無処置レベルまで低下した。また PCN 単独投与では ALT, ALP 活性の上昇は認められなかった。肝内胆汁酸レベルも ALT 活性と同様に LCA 処置により経時的に上昇し、PCN 併用により低下した。

2. 網羅的遺伝子発現解析

遅延性の LCA 誘発肝障害の機序あるいは毒性マーカーを探索することを目的としてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。解析した肝臓の遺伝子はコントロール群、LCA3 群、LCA5 群、LCA9 群、LCA 7/PCN2 群、LCA9/PCN4 群、PCN4 群である。主成分解析により各群は明確に分離されることが示された (Fig. 2)。階層的クラスター解析により障害の増強と軽減による遺伝子発現レベルの大きな変動が認められた (Fig. 3)。特に LCA5 群と LCA9 群で遺伝子発現レベルが大きく変動している可能性が考えられた。そこでまず、コントロール群と LCA9 群で比較して大きな発現変動の認められる遺伝子のうち内在性代謝物の動態に関連する遺伝子を抽出した。その内、脂質の動態に関与する遺伝子群で注目する変動が認められた。LCA9 群で 2倍以上変動している遺伝子を示した (Table 1)。注目されるのは細胞膜でリン脂質の結合タンパクである annexin ファミリーが 6種類、2倍から 18倍上昇していることである。LCA 5 群でも 2種類の annexin の増加が認められた。またリン脂質の膜移動に関与する phospholipid scramblase が 7倍上昇していた。この遺伝子も LCA 5 群で発現上昇が認められる。また膜構成成分のリン脂質 (フォスファチジルコリンやフォスファチジルエタノールアミン) やトリアシルグリセロールの生合成のための必須の代謝中間体のフォスファ

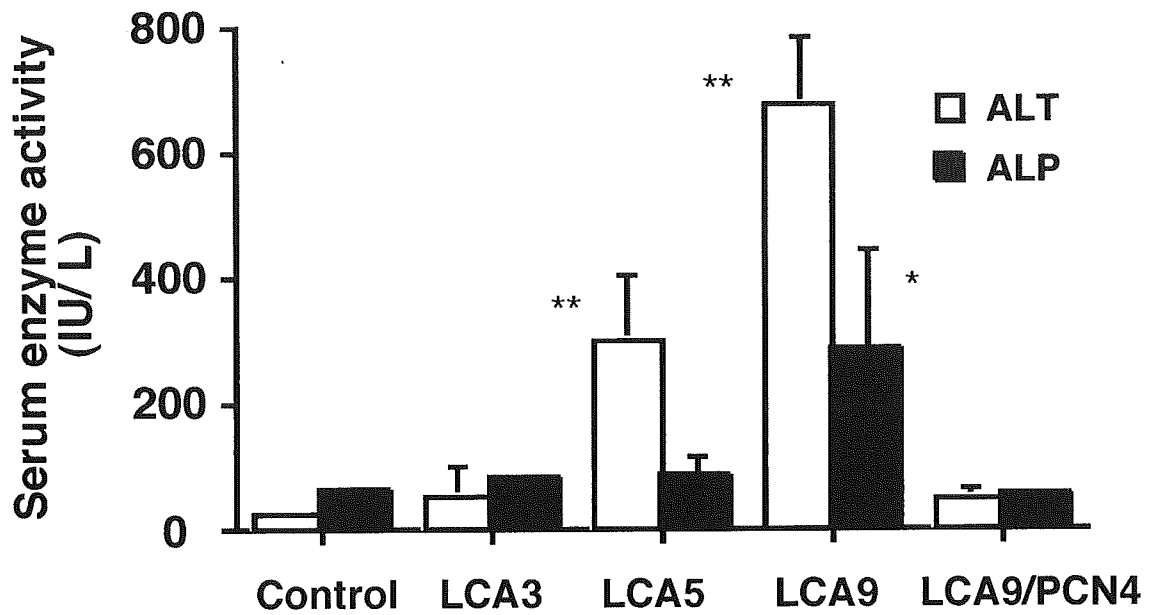
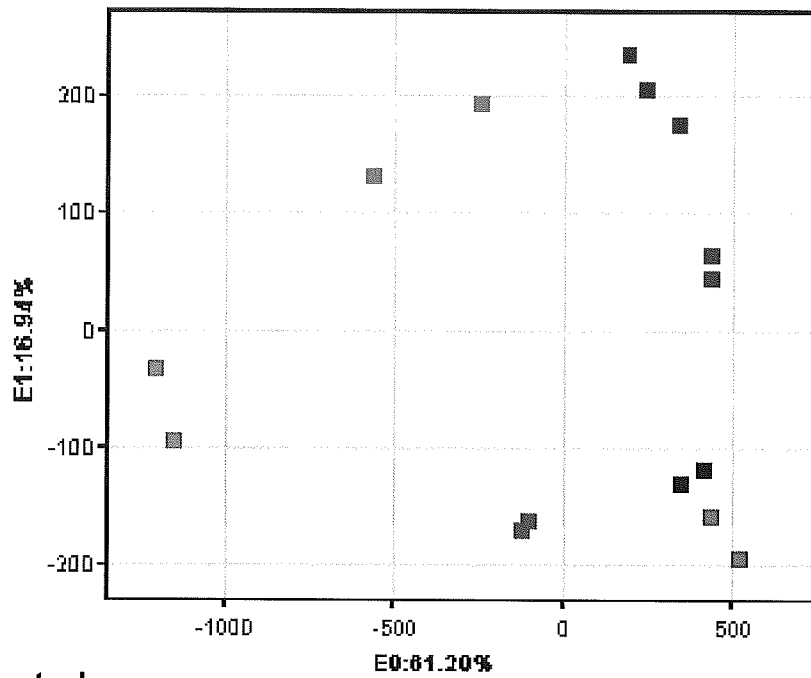


Fig. 1 Changes in serum ALT and ALP activities of LCA-fed mice. Mice were fed a diet supplemented with 0.6% LCA for 3, 5, or 9 days with PCN (100 mg/kg) or corn oil for last 4 days. Data are shown as the mean \pm S.D. (n=3-4).

*, significant difference from control group ($p < 0.05$). **, ($p < 0.01$).



- Control
- LCA3
- LCA5
- LCA7/PCN2
- LCA9
- LCN9/PCN4
- PCN4

Fig. 2 Principal component analysis of gene expression profiles.

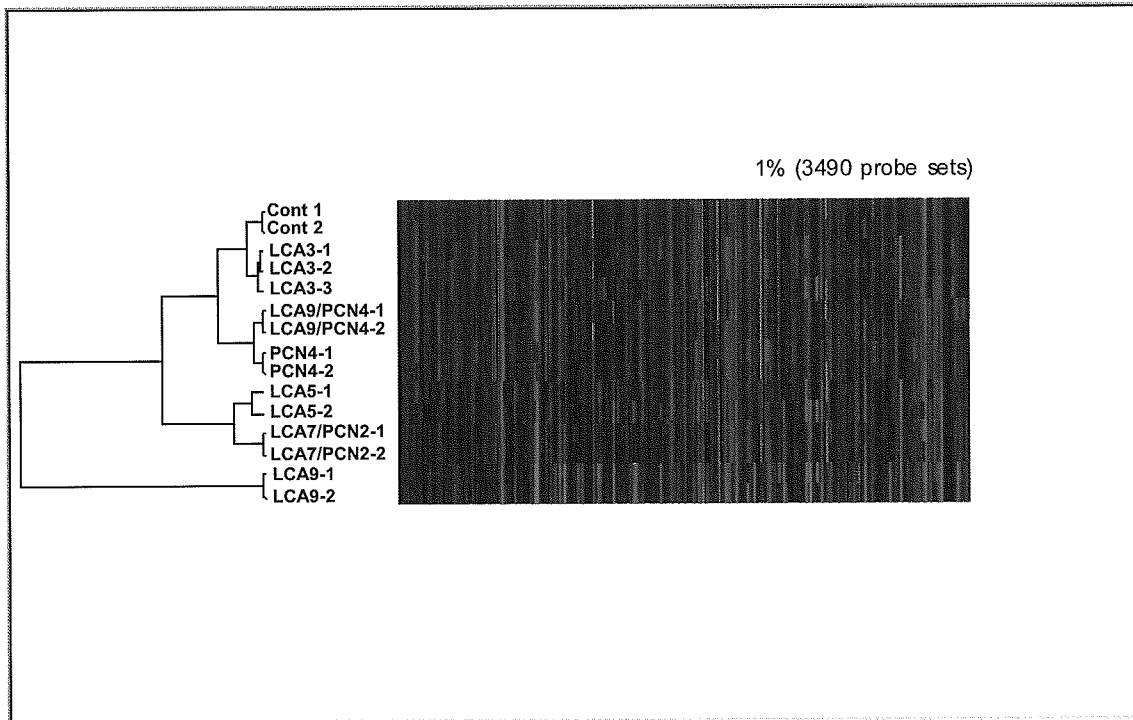


Fig.3 Hierarchical clustering of gene expression profiles.

Table 1 Expression profile of genes involved in lipid metabolism and transport

Gene name	Fold-change					
	LCA3	LCA5	LCA7/ PCN2	LCA9	LCA9/ PCN4	PCN4
annexin A2	*	6.1	3.7	18.3	*	*
lipoprotein lipase	*	*	*	9.3	*	*
annexin A1	*	4.3	*	7.2	*	*
phospholipid scramblase 1	*	5.8	2.3	7.1	*	*
annexin A5	*	*	1.7	4.9	*	*
phosphatidic acid phosphatase type 2c	*	*	*	4.6	*	*
annexin A3	*	*	2.3	4.1	*	*
apolipoprotein A-IV	*	*	*	3.1	*	*
annexin A4	*	*	1.7	3.0	*	*
apolipoprotein C-II	*	*	*	2.9	*	*
annexin A7	-1.7	*	1.5	2.1	*	*
phosphatidylinositol transfer protein, alpha	*	1.6	*	2.0	*	*
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	*	*	*	-2.0	*	*
phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine	*	*	*	-2.0	*	*
diacylglycerol O-acyltransferase 2	*	*	*	-2.1	*	*
mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase	*	*	*	-2.1	*	*
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	*	*	*	-2.2	*	*
lecithin cholesterol acyltransferase	*	*	-1.8	-2.3	*	*
carnitine palmitoyltransferase 2	*	*	*	-2.3	*	*
cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1	*	*	*	-2.4	*	*
low density lipoprotein receptor	-2.1	*	*	-2.4	*	*
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	*	-1.7	*	-2.5	*	*
ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	*	-1.7	*	-2.5	*	*
Abcg8	*	-1.6	*	-2.6	*	*
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	-3.2	*	*	-2.6	*	*
ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	*	-1.9	*	-2.7	2.0	1.5
phosphatidylcholine transfer protein	-1.5	-1.8	*	-2.8	*	*
hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase type II	*	-1.7	-1.5	-2.8	*	*
cytosolic acyl-CoA thioesterase 1	*	*	-1.8	-2.8	*	-2.0
bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase	*	*	*	-2.8	*	*
cytochrome P450, family 51	*	*	*	-2.9	*	*
acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	*	*	*	-3.2	*	*
epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	*	-1.9	-1.8	-3.3	*	*
peroxisome proliferator activated receptor alpha	*	-2.1	-2.1	-3.3	*	*
acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	*	-2.3	*	-3.6	*	*
fatty acid desaturase 1	*	*	*	-3.6	*	*
stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	*	-1.9	*	-4.0	*	*
acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	*	*	-2.0	-4.1	*	*
carnitine O-octanoyltransferase	*	*	*	-4.2	*	*
sterol regulatory element binding factor 1	*	*	*	-4.3	-2.0	*
fatty acid desaturase 2	-1.9	-1.5	*	-4.5	*	*
lipase, hepatic	*	*	-2.1	-5.4	*	*
cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	*	*	*	-5.5	*	*
acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	*	*	*	-5.5	*	*
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	*	-3.2	-2.1	-8.5	*	*
cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	*	*	*	-8.6	*	*
acetyl-Coenzyme A synthetase 2 (ADP forming)	-4.2	*	*	-8.7	*	*
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	*	-3.5	-2.2	-8.9	*	-1.5
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	*	*	-4.2	-10.5	*	*
cytochrome P450 7 a 1	-16.4	-31.1	-3.9	-30.0	*	*
cytochrome P450 8 b1	-13.0	-38.3	-25.6	-52.8	-5.1	*
cytochrome P450 4 a10	*	-3.9	7.5	-82.7	-2.8	-1.9
cytochrome P450 4a14	*	-2.3	-5.3	-91.0	-3.1	-3.0

Data represent fold change relative to control group. *, no significant change.
-a indicates 1/a.

チジン酸からジアシルグリセロールを生成する *phosphatidic acid phosphatase type2c* が 4.6 倍増加していた。一方ジアシルグリセロールをトリアシルグリセロールにする *diacylglycerol O-acyltransferase 2* は半分以下に発現が低下していた。肝臓/血漿間の脂質移行に関わる遺伝子発現の変動も多く認められ *apolipoprotein A-IV* や *apolipoprotein C-II* 等のアポリポプロテインが 3 倍前後増加していた。LCA9 群で胆汁酸合成酵素、コレステロール合成酵素の発現が低下したと共に、脂肪酸 β 酸化、TCA サイクルに関与する遺伝子の多くが 1/2 (-2) 以下に発現低下していた。また *acetyl-CoA* からの脂肪酸合成の律速酵素である *acetyl-Coenzyme A carboxylase (beta)* が 5 分に 1 以下に減少していた。上記の遺伝子発現変動の多くは LCA3 群、LCA5 群、LCA7/PCN2 群、LCA9/PCN4 群、PCN4 群では認められないか、あるいは軽度の変動だった。これらの結果より LCA の毒性誘発の機序、特に後期に起こる ALP 活性の増加を伴う、胆道側の障害の発生が肝内脂質、特にリン脂質の欠乏と密接に関連している可能性が示された。

また我々はすでに LCA 誘発肝障害の防御に薬物代謝酵素で LCA の硫酸抱合を触媒する *hydroxysteroid sulfotransferase (Sult2a)* が関与することを *farnesoid X receptor(FXR)* 欠損マウスを用いて明らかにしている。今回の網羅的遺伝子発現解

析における *Sult2a* の発現変動は、LCA9 群では有意な変動は認められなかったが、LCA9/PCN4 群あるいは PCN4 群でそれぞれ 3.2 倍、3.5 倍の増加が認められた。

3. 肝、胆汁中の脂質レベル

網羅的遺伝子発現解析の結果より LCA 誘発肝障害は肝内脂質レベルの低下と密接に関連している可能性が示された。そこで実際の肝内脂質（トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質、コレステロール、胆汁酸）レベルをコントロール群、LCA9 群、LCA9/PCN4 群、PCN4 群で測定した。トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質においてはいずれも、LCA9 群ではコントロール群に比べて有意な減少が認められた (Table 2)。一方、LCA9/PCN4 群、PCN4 群では逆にコントロール群と比較して上記脂質濃度の有意な増加が認められた。総コレステロール、総胆汁酸レベルにおいては LCA9 群でコントロール群に比べて有意な増加が認められたが LCA9/PCN4 群ではコントロール群のレベルまで低下した。肝臓からの脂質の排泄を検討するため、コントロール群と LCA9 群で胆管カニュレーションにより胆汁を採取して胆汁酸、リン脂質、コレステロールの排泄速度を解析した。LCA9 群の胆汁流量はコントロール群に比べ 41%まで減少した (Fig. 4)。さらに胆汁酸排泄速度は 55%まで、コレステロールで 68%まで減少したが、リン脂質の排泄速

Table 2 Hepatic lipid levels

Lipid	Control	LCA9	PCN4	LCA9/PCN4
Free fatty acid (mEq/g liver)	35.5±5.8	26.1±7.4	72.5±7.5 ^b	51.9±7.2 ^a
Phospholipid (mg/g liver)	19.8±2.0	16.1±2.0 ^a	25.3±1.6 ^b	23.0±3.0 ^a
Triglyceride (mg/g liver)	15.3±1.6	9.8±2.5 ^a	27.0±1.7 ^b	22.1±4.2 ^a
Bile acid (mmol/L)	240±82	2761±1957 ^b	111±25 ^a	361±109
Cholesterol (mg/g liver)	5.20±0.46	6.61±1.01 ^a	6.53±0.69 ^a	5.08±0.82

Significantly difference from control group (^ap <0.05, ^bp <0.01).

度はコントロール群の 17%まで減少し、胆汁中の濃度自体も有意に減少した。

LCA と高脂血症治療薬のプロブコールを併用した場合も肝障害が PCN と同様に軽減された。プロブコールは胆汁中へのコレステロール、リン脂質の排泄速度を増加させる作用が認められているが、LCA との併用により肝内リン脂質濃度と胆汁中へのリン脂質排泄速度は LCA 単独群より増加した。

D. 考察

新規高感度安全性予測系の構築を目指し、まずその前段階の肝障害の機序あるいは防御の機序の解明、あるいは毒性マーカーの検索のため、網羅的遺伝子発現解析のデータと実際の生体内物質の変動を結び付ける解析手法の開発を試みた。網羅的遺伝子発現解析においても経時的変化や薬物併用の影響から多面的に解析した。今回用いた LCA 誘発肝障害モデルにお

いて特に LCA 処置の後期に起こる ALP 活性の上昇に注目して網羅的遺伝子発現解析データを解析した。今回 LCA5 群で変動せず、LCA9 群で大きな変動が見られる遺伝子群のうち脂質の動態に関与する遺伝子に注目した。発現量が大きく増加している遺伝子群として *annexin*, *phospholipid scramblase* に注目し膜のリン脂質に何か変化が起こっているのではないかと考えた。胆汁酸の *cholic acid* により肝障害の誘発する FXR 欠損マウスの肝遺伝子発現変動では上記の遺伝子変動は全く認められない。さらにリン脂質、トリグリセリド、遊離脂肪酸の動態に関与する遺伝子の多くで変動が認められ、それらの変動から胆道側の障害は肝内の脂質特にリン脂質の欠乏と密接に関連している可能性を考えた。実際のマウスの肝内のリン脂質、トリグリセリド、遊離脂肪酸は LCA9 群で減少が認められ、胆汁中のリン脂質排泄速度は著しく減少していた。一方毒性が軽減する LCA9/PCN4

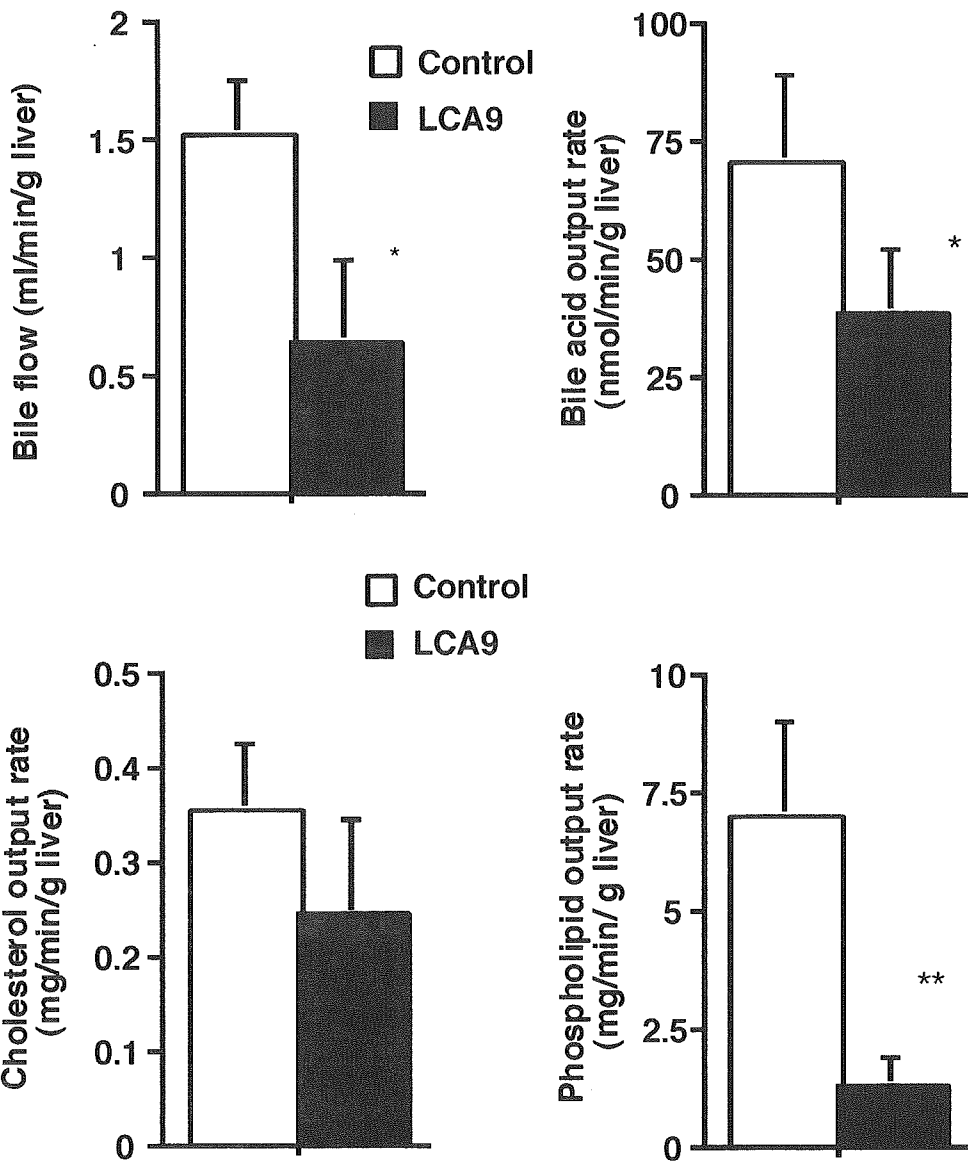


Fig. 4 Changes in bile flow and biliary lipid output rates in 0.6% LCA-fed mice. *, significant difference from control group ($p < 0.05$). **, ($p < 0.01$).

群や PCN4 群ではコントロール群と比べて上記肝内脂質レベルが増加した。これらの脂質レベルの変動は網羅的遺伝子発現解析からの仮説を支持する。興味深いことに PCN4 群で肝内脂質レベルは増加するが、その事実を支持する遺伝子発現変動は認められない。この PCN4 の例は遺伝子発現変動の解析だけでは内在性代謝物の変動を全て予測出来ないことを示唆している。また胆汁中へのリン脂質の排泄を促進するプロブコールが LCA 誘発肝障害を軽減することより胆汁中へのリン脂質の排泄促進により LCA 誘発肝障害が軽減される可能性も示唆された。

本研究では網羅的遺伝子発現解析のデータ解析より LCA 誘発肝障害の機序として脂質動態に着目し、実際に脂質レベルを測定することにより新規毒性発現機序の解明を試みた。実際に肝臓や胆汁中の脂質レベルの解析の後、遺伝子発現データを再度解析することでより深い解析が可能となり、今後目指しているトキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合による毒性発現機序の解明の有用性が示唆された。

E. 結論

LCA 誘発肝障害をモデルとして網羅的遺伝子発現解析と内在性代謝物（脂質）の肝内及び胆汁中レベルの解析の組み合わせにより、肝障害の誘発機序あるいは防

御の機序、毒性マーカーの検索を実施した。網羅的遺伝子発現解析データより導き出した、LCA 誘発肝障害が脂質レベルの変動と密接に関連するという仮説は実際に内在性代謝物（脂質）レベルを測定することによって支持された。今後、尿サンプル中の内在性代謝物の網羅的解析を実施して今回明らかとなった肝障害と関連する遺伝子発現変動、肝内、胆汁中の脂質レベルの変動のデータを組み合わせることにより内在性代謝物の毒性マーカーを検索する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

○渡瀬 広崇、宮田昌明、Frank J Gonazalez, 山添康 Lithocholic acid 誘発肝障害に対する防御機構の検討—防御因子としての Cyp3a と hydroxysteroid sulfotransferase 第32回 日本トキシコロジー学会学術年会、2005. 東京

○永易美穂、堀 弥、宮田昌明、山添康 リトコール酸誘発肝障害に対する防御機構の解明—プロブコールの効果—第44回 日本薬学会東北支部大会、2005. 仙台

○水木朋宏、堀 弥、宮田昌明、山添
康 リトコール酸誘発肝障害への NO
ドナーの影響 第 126 年会 日本薬学
会 2006. 仙台

○宮田昌明、渡瀬広崇、堀 弥、永田
清、Frank J. Gonzalez、山添 康
Hydroxysteroid sulfotransferase による 2
次胆汁酸誘発肝障害の防御機序—硫酸
抱合型胆汁酸の体内動態の解析 第
126 年会 日本薬学会 2006. 仙台

F. 知的財産権の出願・登録状況

無し

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作成と機序解明

分担研究者：宮田昌明 東北大学大学院薬学研究科

研究要旨 ヒト特異的に発症する肝障害の機序解明のため前立腺癌治療薬として臨床の場で使用されている flutamide をモデル化合物とし、C57BL/6 雄性マウスを用いて肝障害の実験動物モデルの作製を試みた。また、flutamide 代謝物の解析系を確立し代謝の面から毒性発現機序の解明を実施した。その結果、flutamide の主代謝物である 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (FLU-1)を 5 日間 200 mg/kg で経口投与し、核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) のアゴニストである 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) を 1 日目から 3 日間 3 mg/kg 腹腔内投与することでマウスに肝障害を誘発させることに成功した。FLU-1 単独あるいは flutamide と TCPOBOP 併用では肝障害は認められなかった。Flutamide の代謝物である FLU-1-N-OH 体に細胞毒性があることが見出されている。そこで肝ミクロゾーム中の FLU-1 N-水酸化活性を測定したところ、ヒト肝ミクロゾームでは活性が認められたが、マウスのコントロール群では検出限界以下だった。またマウス TCPOBOP 群、FLU-1 群、TCPOBOP/FLU-1 併用群で同程度の活性が認められた。これらの結果より FLU-1-N-OH 体の生成は肝障害誘発に関わると考えられるがそれ以外の因子が毒性の発現の律速となっていることが示唆された。

A. 研究目的

ヒト特異的な肝障害が医薬品の開発と安全使用の面で大きな問題となっている。この肝障害は、薬物投与直後ではなく、遅延発症型でしかも既知の免疫系の亢進によるアレルギー関連の機序とは異なる。しかも動物実験で検出されず、ヒトに投与して初めて現れ、発生すると重篤な副作用を示す。実際、かなりの開発候補薬物が、開発初期の段階で予知できない肝障害のために、無駄になり、多くの労力とコストが浪費されている。また市販された後にヒトで重篤な肝障害が認められるなど大きな社会問題となっている。よってヒト特異的に起こる肝障害の機序解明と予測系の開発は必要不可欠と考えられる。ヒト特異的に発症する肝障害の機序解明と予測系開発のためにはまず第一に実験動物モデルの開発が必要である。そこで本研究ではヒト特異的に肝障害を誘発させるモデル化合物として前立腺癌治療薬の flutamide を用いた。Flutamide は服用している患者の 10% 以上で肝障害を誘発させるが通常の動物実験では肝障害は認められていない。そこで flutamide によるマウス肝障害モデルの作製を試み、その肝障害モデルを用いてフルタミドの肝障害誘発の機序を代謝の面から解析した (Fig. 1)。最終的にはヒトでのみ障害が誘発される原因を明らかにすると共に他の薬に応用出来るヒトでの

安全性予測系の構築を目指している。

B. 研究方法

1. 動物と薬物処置

9~10 週齢の C57BL/6 雄性マウスに、carboxymethylcellulose sodium(CMC-Na)に懸濁させた flutamide あるいは 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (FLU-1)を 200 mg/kg、5 日間強制経口投与した。対照群には CMC-Na を 5 日間強制経口投与した。TCPOBOP は corn oil に懸濁させ、3 mg/kg を前半 3 日間腹腔内投与した。対照群には corn oil を 3 日間腹腔内投与した。また、前半 3 日間は固形試料(CE-2)を摂取させ後半 2 日間は肝内グルタチオン濃度を減少させる目的で固形試料を取り除き絶食を行った。

2. 血清採取

マウスにジエチルエーテル麻酔を処理し大静脈より採血を行った。血液は常温で 1 時間静置した後、15,000 rpm、4℃、20 分間遠心を行い、上清を採取して再び 15,000 rpm、4℃、20 分間遠心を行い、その上清を血清サンプルとした。

3. 血清中 ALT 活性測定

トランスアミナーゼ C II -テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

4. 肝ミクロゾームの調製

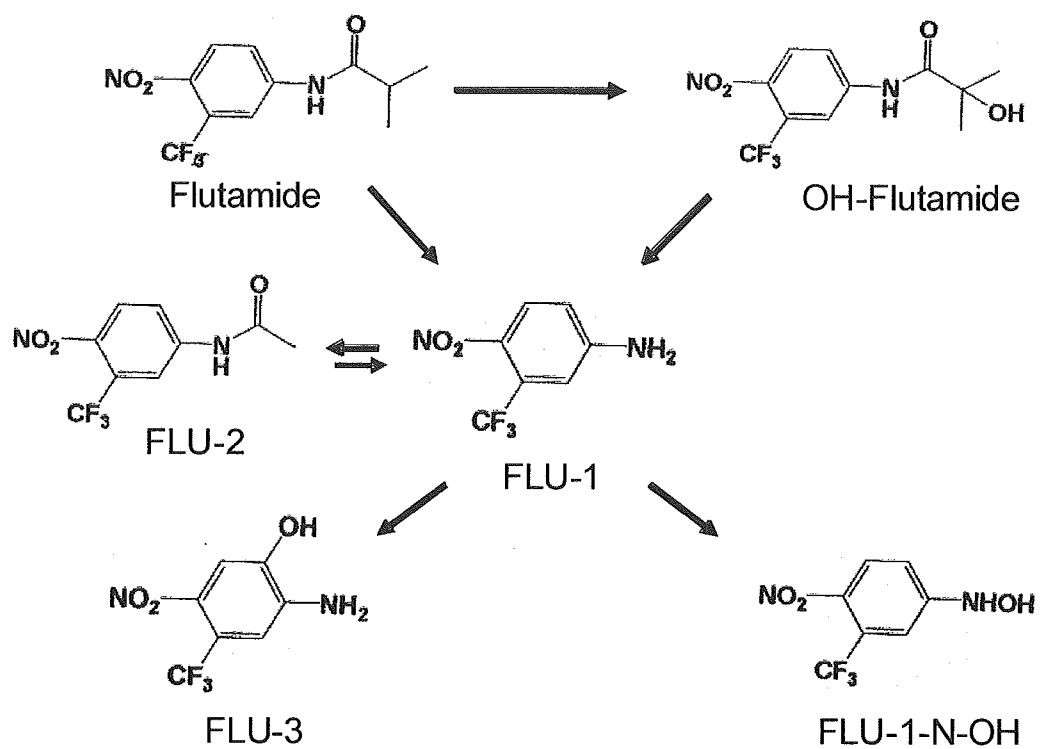


Fig. 1. Major metabolic pathway of flutamide

マウスをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓を PBS で軽く洗浄し、水分を取り除いて重量を測定した。肝重量の 2 倍量(v/w)の 75 mM KCl-Kpi buffer を加えホモジナイズし、肝ホモジネートとした。肝ホモジネートを 4℃、9,000 x g で 20 分間遠心し、その上清をさらに 4℃、105,000 x g で 60 分間遠心した。上清（可溶性画分）を取り除いた後、沈殿を少量の 75 mM KCl-Kpi buffer ですすいで脂肪分を除去したものに肝重量と同量(v/w)の 20% glycerol in Kpi buffer を加えてホモジナイズしたものをマイクロゾームとした。

5. Flutamide esterase 活性

1 mg/ml に希釈した肝マイクロゾーム 100 μ l に基質として methanol に溶解した 10 mM flutamide を 1 μ l、酸化防止剤として精製水に溶解した 10 mM ascorbic acid を 1 μ l それぞれ加え、よく攪拌した後 37℃ で 5 分間プレインキュベーションした。反応開始液として NADPH generating system を 20 μ l 加え、正確に 37℃ で 30 分間インキュベーションした。Acetonitrile を 200 μ l、10 mM *p*-nitroaniline (internal standard) を 1 μ l それぞれ加え、1,800 x g で 2 分間遠心しタンパクを沈殿させた。上清をサンプルとして、HPLC で解析し flutamide esterase 活性を算出した。HPLC の条件は次に示した。PU-980（日本分

光)ポンプ、ODS-80 Ts (TSK gel) column (SHIMADZU)を使用した。流速 0.8 ml/min で分離し、UV-970（日本分光）検出器を用い 340nm で検出した。Acetonitrile/water 0 分 (40:60), 10 分 (50:50), 20 分 (60:40), 25 分 (60:40)で分離した。この条件での検出限界は 0.1 μ M であった。

6. FLU-1 N-hydroxylase 活性

1 mg/ml に希釈した肝マイクロゾーム 100 μ l に基質として methanol に溶解した 10 mM FLU-1 を 2 μ l、酸化防止剤として精製水に溶解した 10 mM ascorbic acid を 1 μ l それぞれ加え、よく攪拌した後 37℃ で 5 分間プレインキュベーションした。反応開始液として NADPH generating system を 20 μ l 加え、正確に 37℃ で 30 分間インキュベーションした。Methanol を 200 μ l、10 mM umbelliferone (internal standard) を 1 μ l それぞれ加え、1,800 x g で 2 分間遠心しタンパクを沈殿させた。上清をサンプルとして、HPLC で解析し FLU-1 N-hydroxylase activity を算出した。HPLC の条件は次に示した。この条件での検出限界は 0.3 μ M であった。PU-980（日本分光)ポンプ、ODS-80 Ts (TSK gel) column (SHIMADZU)を使用した。流速 0.6 ml/min で分離し、UV-970（日本分光）検出器を用い 366nm で検出した。Methanol/25mM ammonium-acetate buffer + 2mM acetohydroxamic acid (pH=5.0) 40: 60 で 55

分分離した。

7. 統計処理

各実験で得られたデータは平均値および標準偏差を算出した。3群以上の有意差検定には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った後、多重比較を行った。多重比較の方法としてまず、群間で F 検定を行い、分散が等しい場合には Student t 検定、そうでない場合には Welch 検定を行った。有意水準を 5%以下と設定し、ボンフェローニ補正を行い実験系全体の有意水準を 5%以下に保った。

C. 研究成果

1. Flutamide 肝障害モデルの作製

現在までに flutamide をマウスに投与するだけでは肝障害は認められていない。そこで、flutamide と TCPOBOP を併用することを検討した。TCPOBOP はげっ歯類において、核内受容体である constitutive androstane receptor (CAR) のアゴニストで様々な薬物代謝酵素を誘導する作用を持つ。これまで局所麻酔薬 cocaine、解熱鎮痛薬 acetaminophen などで、TCPOBOP を併用することで代謝活性化が促進し肝障害を引き起こすことが、マウスを用いた *in vivo* の実験で報告されている。Flutamide についても TCPOBOP と併用することでマウスに肝障害が認められるか検討した。薬物最終投与の 4 時間後に採

血を行い、肝障害マーカーである血清中 alanine aminotransferase (ALT) 活性を測定した (Fig. 2)。Control 群では 18.1 ± 3.3 IU/L、TCPOBOP 投与群では 35.6 ± 10.1 IU/L、flutamide/TCPOBOP 併用群では 41.6 ± 13.6 IU/L であった。各群間で有意差は認められなかった。

2. FLU-1 を用いた肝障害モデルの作製

Flutamide 誘発肝障害には flutamide の代謝物の関与が示唆され、また代謝物の一つである FLU-1-N-OH には細胞毒性が認められている。そこで flutamide の主代謝物であり FLU-1-N-OH の前駆体でもある FLU-1 を単独で、または TCPOBOP を併用することで肝障害がマウスに認められるか再度検討を行った。

薬物の最終投与の 4 時間後に採血を行い、肝障害マーカーである血清中 ALT 活性を測定した (Fig. 3)。Control 群では 18.1 ± 3.3 IU/L、TCPOBOP 投与群では 35.6 ± 10.1 IU/L、FLU-1 投与群では 22.3 ± 5.9 IU/L、FLU-1/TCPOBOP 併用群では 138.1 ± 22.9 IU/L であった。Control 群に比べ、FLU-1/TCPOBOP 併用群では約 8 倍 ALT 活性が上昇し、有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

3. HPLC を用いた flutamide 代謝物の分離

Flutamide 代謝物を解析するための基礎

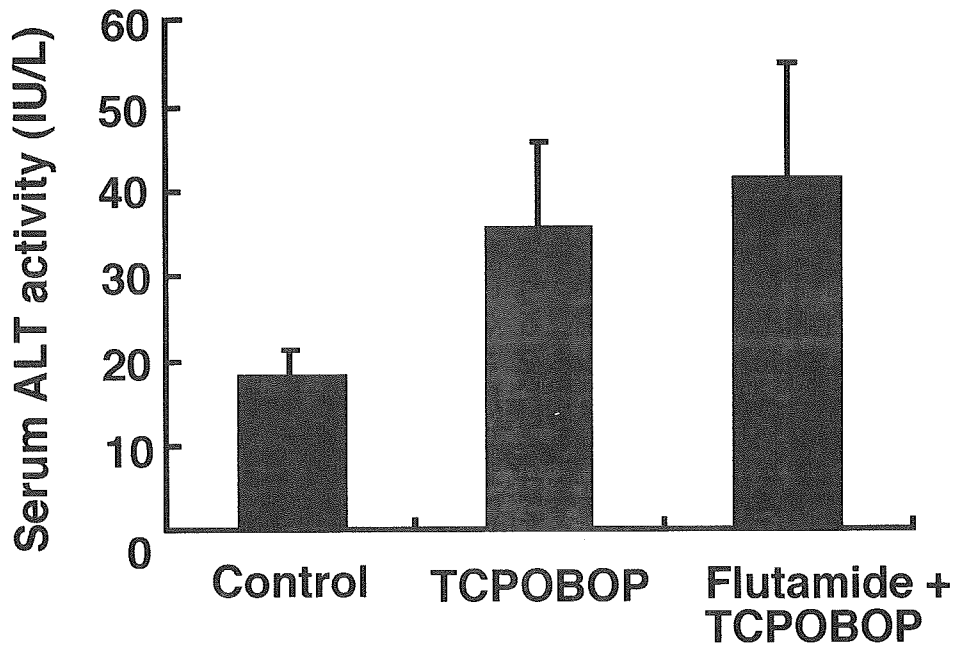


Fig. 2 Influence of TCPOBOP on flutamide-induced hepatotoxicity. Values are mean \pm S.D. (n=4-5).

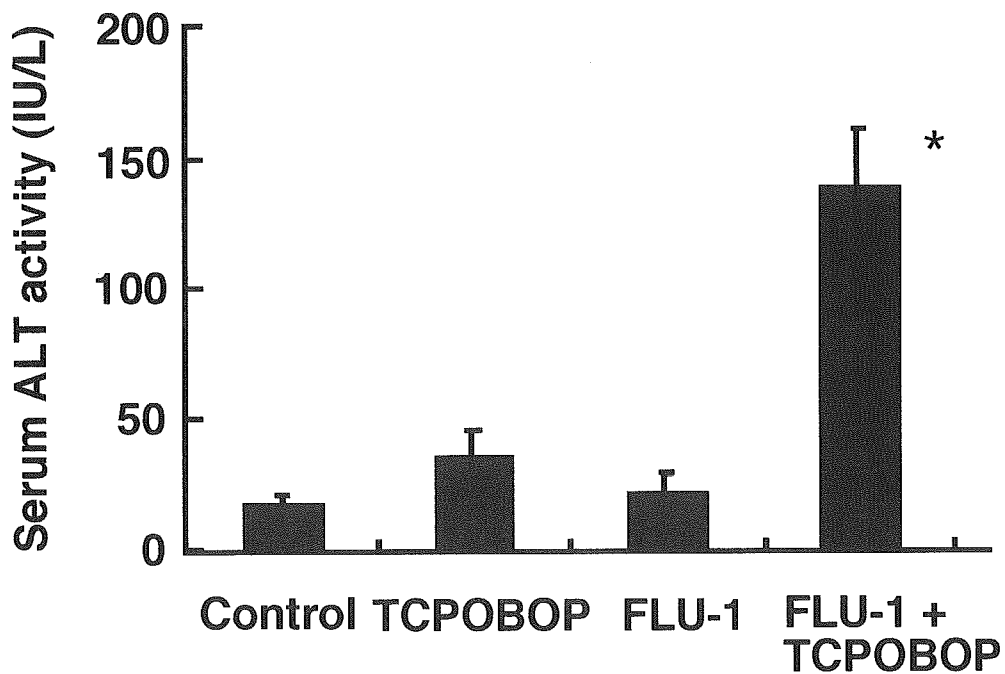


Fig. 3 Influence of TCPOBOP on FLU-1-induced hepatotoxicity. Values are mean \pm S.D. (n=4-5). Significant difference from control group (* $p < 0.01$).

的な分析法を確立することを目的とした。さらに、flutamide 代謝物を解析し肝障害誘発の機序を解明するため、flutamide による肝障害が認められるヒトとマウスとの間で flutamide 代謝に違いが認められるか検討を行った。また、肝障害が認められた FLU-1/TCPOBOP 併用群と肝障害が認められなかった FLU-1 投与群との間で flutamide 代謝に違いが認められるかについても検討を行った。Flutamide は 300 nm 付近に吸収極大が認められ flutamide の代謝物である FLU-1 は 380 nm 付近に吸収極大が認められた。そこで、flutamide、FLU-1、2 つの化合物を検出するため、吸光光度計の波長を 340 nm に設定して flutamide 代謝物を検出した。Flutamide 代謝物と各種標品のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。RT = 7.8 min のピークは p-nitroaniline (内標準物)、RT = 13.7 min のピークは FLU-1、RT = 20.8 min のピークは flutamide と、それぞれ同定した。RT = 14.4 min のピークは FLU-1 と共に flutamide の主代謝物として検出されたため hydroxy-flutamide と考えられるが標品を所有していないため同定にはいたらなかった。さらに FLU-3 と FLU-1-N-OH を同定するため FLU-1 を基質にして分離分析を行った。上記の分離方法では FLU-3 と FLU-1-N-OH を分離出来なかったので移動層に methanol と酸性緩衝液の混合液を用い、さらに酸化分解されやすいヒド

ロキシルアミンの酸化防止を目的として acetohydroxamic acid を移動層に添加し、FLU-1-N-OH の吸収極大が認められた 366 nm で解析した。

FLU-1 代謝物と各種標品のクロマトグラムを Fig. 5 に示した。その結果、RT = 14 min のピークは umbelliferone (内標準物)、RT = 45 min のピークは FLU-1-N-OH、RT = 47 min のピークは FLU-1 と、それぞれ同定した。RT = 42 min のピークは FLU-3 と考えられるが同定にはいたらなかった。また、この系の検出限界は 0.3 μ M であった。

4. ヒトとマウスの flutamide 代謝の比較

Flutamide の代謝においてヒトとマウスに相違点があり、その代謝の違いがこれまで認められている flutamide 誘発肝障害の種差の要因となっていると考えられた。そこで、マウス肝ミクロゾームを用いて flutamide の代謝経路および代謝活性を測定し、ヒト肝ミクロゾームを用いた実験結果と比較した。その結果、flutamide から FLU-1 への代謝活性には有意な差異は認められなかったが、FLU-1 の代謝において違いが認められた。ヒト肝ミクロゾームでは FLU-1 N-OH 化活性が認められた (0.2 ~ 0.6 nmol/mg protein/min) のに対し、マウス肝ミクロゾームではこの活性は検出限界 (0.055 nmol/mg protein/min) 以下だった。