

200501378A

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

特異体質性薬物肝障害発症の機構解明と予測実験系の開発

平成17年度 統括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成18(2006)年4月

目 次

I. 総括研究報告

特異体質性薬物肝障害発症の機構解明と予測実験系の開発

横井 毅 ----- 1

II. 分担研究報告

1. RNA 干渉法による薬物誘導性肝障害試験系の開発に関する検討

横井 毅 ----- 11

2. トログリタゾン由来肝細胞毒性へのシャペロンタンパク質の関与

横井 毅 ----- 19

3. トログリタゾンにより肝障害をおこした患者血清中にアルドラーゼ B に対する自己抗体の発見

横井 毅 ----- 41

4. 肝毒性化合物 5 種類の投与による網羅的遺伝子発現変動解析

中島 美紀 ----- 59

5. 肝毒性化合物の投与量と遺伝子発現の相関解析

中島 美紀 ----- 81

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 97

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 98

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）

統括研究報告書

特異体質性薬物肝障害発症の機構解明と予測実験系の開発

主任研究者 横井 毅 金沢大学大学院医学系研究科
(薬学部兼任) 教授

研究要旨

特異体質性薬物肝障害は殆どの場合、ヒトに特異的に発症するため、実験動物を用いた研究が難しいことが、この分野の研究の進展を困難にしている。その理由の1つとして、実験動物におけるグルタチオン抱合活性がヒトに比べて著しく高いために、薬物またはその活性中間体が解毒されやすいために肝障害が起き難いと考えられている。そこで、本研究では、グルタチオン合成酵素である γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -Gcs) に注目し、この酵素の産生をアデノウイルスの系を用いて shRNA 法によりノックダウンすることを検討した。その結果、細胞を用いた系において、 γ -Gcs を mRNA レベルおよびタンパクレベルで 80%以上の抑制を得られた。しかし、これまでに GSH 含量は約 50%程度の減少にとどまった。細胞レベルで薬物誘導性の肝障害を検討するためには、細胞に活性代謝物の生成能が存在することが必須である。このため CYP3A4 の過剰発現用のアデノウイルスの系を作製した。現在この系での活性代謝物生成能とグルタチオン生成能の関係を考慮した細胞毒性試験について検討中である。

突発性薬物肝障害を惹起する薬として、トログリタゾンを中心に検討し、2次元プロテオミクスを駆使し、トログリタゾンのヒト肝細胞傷害性を指標にした検討により、シャペロン蛋白の一種である BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) を特定した。この蛋白の発現を siRNA 法によってノックダウンすることにより、トログリタゾンの細胞毒性が憎悪することを明らかにした。また、トログリタゾン投与により肝障害を起こした患者の血清を詳しく検討し、アルドラーゼ B に対する自己抗体の産制を見出した。この自己抗体の産制はトログリタゾンによる肝障害発症の原因とは考え難いが、肝障害のマーカーなることが明らかになった。

プロテオミクス、siRNA および microRNA が関わる肝毒性の事象の評価研究の

ために、遺伝子の網羅的な発現変動に関する基礎的検討を行った。すなわち、薬物誘導性肝障害に関わる候補遺伝子の特定とバイオマーカーとしての評価および DNA マイクロアレイのデータの活用法を検討した。典型的な肝障害性化合物 5 種類をそれぞれラットに投与し、DNA マイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、肝障害性に関係すると考えられる遺伝子を特定した。さらに、化合物に特徴的な遺伝子の動きを探り、投与量に依存しないで変動するパターンを特定した。次ぎに、これらの中からチオアセタミドについて詳しく検討し、バイオマーカーの候補となる遺伝子の、時間依存のおよび投与量依存的变化の評価を行い、さらに、投与量に依存しない肝障害性のパターンの抽出を行った。この結果より、特定の蛋白質および RNA の発現制御を行った場合において肝障害性を評価できる可能性が示された。

近年 microRNA に関する研究領域が急速な進展をしている。発生や分化のみならず、薬や生体内異物を代謝する酵素の転写後調節への関与を明らかにし、毒性発現との関わりを検討した。ヒトにおいて代謝的活性化に関わる代表的な CYP 酵素の 1 つである CYP1B1 に、microRNA の 1 つである miR-27b の関与を見出した。この miR-27b を細胞内に強制発現させると CYP1B1 のタンパク量および酵素活性が著しく上昇することを見出した。すなわち、この microRNA の作用によりヒト CYP1B1 は転写後に抑制的な状態にあることが明らかになった。CYP1B1 はヒトにおいて生殖器関連臓器に発現が高く、E2 の代謝的活性化に主に関与し、主な発癌メカニズムの 1 つと考えられている。さらに、ヒト肝における microRNA についても検討を開始している。

分担研究者 中島美紀 金沢大学大学院医学系研究科

れており、これを予測するための研究が急がれている。

A. 研究目的

臨床で用いられている薬または開発途中の候補化合物による重篤な副作用として、QT延長、横紋筋融解症と共に、薬物誘導性肝障害、とりわけ特異体質性(idiosyncratic)肝障害が発症することは希ではない。薬の開発後期において、ヒトにおける肝障害発症によって開発を断念する頻度が現在でも高いことは良く知ら

3年間の研究予定期間の1年目である平成17年度に、この研究命題について下記の4つのアプローチを終了または継続中であり、さらに2年目に向けて新たな研究の展開をしている。

- 1) 動物におけるグルタチオン抱合活性がヒトに比べて著しく高いために、薬物またはその活性中間体が解毒されやすく肝障害が起きる確率が低いという問題がある。そこで、本研究

では、グルタチオン合成酵素である γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -Gcs) に注目し、この酵素の産生をアデノウイルスの系を用いて shRNA 法によりノックダウンすることを検討した。これにより解毒代謝能が低い実験動物モデルを作出し、ヒトに特異的に起きる肝障害を予測できることが期待される。

- 2) 特異体質性薬物肝障害を惹起することで有名な糖尿病薬であるトログリタゾンを中心にプロテオミクスを駆使して、肝障害に関わる蛋白を見出すことを目的とした。さらに、その機能を明らかにするために、当該蛋白の発現を siRNA によってノックダウンし、毒性発現への影響を明らかにすることを目的とする。
- 3) プロテオミクス、siRNA および microRNA によって検討を予定している肝毒性の事象の評価研究のために、遺伝子の網羅的な発現変動に関する基礎的検討を行う必要がある。すなわち、薬物誘導性肝障害に関わる候補遺伝子の特定とバイオマーカーとしての評価および DNA マイクロアレイのデータの活用法を検討し、肝毒性を評価できるアルゴリズムを明らかにする。これは、今後の様々な条件でのノックダウンなどの研究のための重要な手法となることが期待される。
- 4) 近年 microRNA に関する研究領域

が急速な進展をしている。ヒトにおける発生や分化の報告が多い。本研究では、薬や生体内異物を代謝する酵素の転写後調節への関与を明らかにする目的で microRNA について検討した。これにより、代謝的活性化を触媒する酵素の酵素誘導のメカニズムを明らかにし、薬物誘導性の事象への関与について明らかにすることを旨とする。

B. 研究方法

1) グルタチオン生成阻害のための、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスの作成、感染および総グルタチン含量の測定と細胞毒性への影響評価

ラット γ -Gcs catalytic subunit mRNA の配列から siRNA 配列を選択し、*in vitro* においてノックダウン効果を確認した後、その配列を用いて二本鎖オリゴ DNA を作成し、pU6 プロモーターを持つ pGSU6-GFP ベクターに組み込んだ。制限酵素 *Hinc* II で目的配列および pU6 プロモーターを切り出し、pAxcwit コスミドベクターに組み込んだ。ラット肝癌由来細胞の H4IIE 細胞および BRL3A 細胞、マウス肝癌由来細胞の Hepa1-6 細胞、ヒト肝癌由来細胞 HLE 細胞を用いた。細胞を 6 well または 12 well プレートにまき、70~100%コンフルエントまで培養した。培地を除き、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスを MOI 10、MOI 20 で 1 時間感染させた。対照

として Luc (ルシフェラーゼ) shRNA 発現アデノウイルスを同様に感染させた。

1) 時間感染操作を行った後に培地を添加し、その 3 日後における mRNA の発現を real-time RT PCR にて、タンパク量を Western blotting にて測定した。また、総グルタチオン含量の測定も行った。

2) トログリタゾン由来肝障害性関連タンパク質の同定と毒性への関与

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞およびヒト肝初代培養細胞を用いて、トログリタゾンまたはロジグリタゾンを 0, 25, 50, 75 マイクロ M で 48 時間暴露した。細胞溶液を 2 次元電気泳動で分離し、ゲルをタンパク染色後、スポットの変化を比較検討した。トログリタゾン暴露依存的に変化するスポットのアミノ酸配列分析を行い、さらに、当該蛋白質を siRNA を用いてノックダウンし、細胞毒性に及ぼす影響を検討した。自己抗体の検討については、Western ブロット、イムノブロットを使用し、同定したスポットのタンパク質の配列を解析した。さらに当該タンパク質に対する自己抗体について、肝障害の患者および健常人の血清について検討した。

3) 肝毒性化合物のラットへの投与による遺伝子発現変動の解析

6 週齢雄性 SD ラットを用い、アセトアミノフェン、プロモベンゼン、四塩化炭素、ジメチルニトロソアミンとチオアセタミドをそれぞれ単回投与した。血清学的な生化学値は、投与後の肝障害性

を示す時間を知るために測定した。肝 mRNA は、1097 の薬物反応性遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイを用いて、遺伝子の発現プロファイルを検討した。このアレイにはチトクロム P450 を初めとする Phase I の酵素の遺伝子、Phase II、核内受容体、シグナル伝達遺伝子、トランスporterなどが搭載されている。Quality-Threshold (QT) クラスタ解析により、個々の化合物による特徴的な遺伝子の発現変化を見出す。さらに、チオアセタミドを代表的な肝毒性化合物として用い、肝障害性のフェノタイプと特定の遺伝子の発現プロファイルの変化との相関を詳細に検討した。チオアセタミドは腹腔内に高用量 (400 mg/kg)、中用量 (150 mg/kg)、低用量 (50 mg/kg) を各群 4 匹、投与後の時間を 6, 12, 24, 36, 48 時間で検討した。

4) 代謝的活性化酵素の発現調節における microRNA の役割の解明

ヒト CYP1B1 の 3' 非翻訳領域およびその部分配列を用いて、ゲルシフト分析、ルシフェラーゼ分析などを行う。

【倫理面への配慮】

ヒト由来の試料の使用については、市販で入手できる試料の場合を除いて、金沢大学大学院医学系研究科「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会」<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med/rinri/index.html> に申請し、許可を得て実施している。

C. 実験結果

1) グルタチオン生成阻害のための、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスの作成、感染および総グルタチン含量の測定と細胞毒性への影響評価

アデノウイルス系 γ -Gcs shRNA 導入によって、ラット肝癌由来細胞 H4IIE において、mRNA およびタンパク質レベルにおいて、80%以上の有意な低下を認めた。グルタチオン含量においては、約50%の減少を示した。さらに、CYP3A4 のアデノウイルス発現系を構築し、CYP3A4 活性が全く無い H4IIE 細胞に、ヒト肝細胞とほぼ同じレベルの活性を発現させた。現在この系を用いて細胞毒性におよぼす代謝的活性化とグルタチオン解毒について in vitro および実験動物で研究を進行中である。

2) トログリタゾン由来肝障害性関連タンパク質の同定と毒性への関与

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いて、トログリタゾンまたはロジグリタゾンを 0, 25, 50, 75 マイクロ M で 48 時間暴露した。2次元電気泳動で分離し、ゲルをタンパク染色後、スポットの変化を比較検討した。分子量 75 kDa で pI 5.0 のスポットが、トログリタゾン暴露 50 と 75 マイクロ M で最も発現増加が認められた。このスポットのアミノ酸配列分析を行った結果、そのほとんどが immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP)であり、少量の protein disulfide isomerase related

protein (PDIrp)も混在していた。イムノブロットの結果、BiP タンパク質は、トログリタゾンの暴露濃度依存的に発現増加し、ロジグリタゾンの暴露によっては、少しの発現増加にとどまった。この結果は、BiP タンパク質の mRNA の変動と一致した。しかし、PDIrp ではいずれの変化も認められなかった。この BiP の発現増加がトログリタゾン誘導性肝細胞傷害性に及ぼす影響を検討するために、HLE 細胞を用いて、BiP siRNA の検討を行った。その結果、BiP siRNA の導入はトログリタゾンによる細胞毒性を増悪させる結果となった。また、トログリタゾン由来肝障害患者の血清中に肝障害に関連する自己抗体の産生の有無を検討した。40歳と70歳の2名の女性患者が、トログリタゾン1日投与量 400 mg/day で、それぞれ 23.5 週と 16 週で ALT の顕著な上昇を認めた。イムノブロットおよび2次元電気泳動法を駆使して、患者血清中にアルドラーゼBに対する強い抗体を両患者に認めた。この抗体は、薬物投与を中止後も、高いタイターを保ち続けた。この抗体がトログリタゾン投与患者特異的なものか否かについて、慢性肝障害患者血清 40 検体、肝硬変患者血清 40 検体および健常人血清 80 検体について ELISA を用いて検討した。その結果、いずれの患者でもアルドラーゼBに対する自己抗体が認められ、健常人に比べて前者で $P<0.05$ 、後者で $P<0.001$ という有意を示した。

3) 肝毒性化合物のラットへの投与による遺伝子発現変動の解析

薬物反応性遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイを用いて検討の結果、個々の化合物はそれぞれ特徴的な遺伝子発現のプロファイルを示した。アセトアミノフェンは他の化合物とは異なるクラスターに分類された。遺伝子発現プロファイルと毒性を示す時間を考慮して、10 個の発現が誘導される遺伝子と、10 個の発現が抑制される遺伝子と共通して pick up することが出来た。これらは肝障害に共通するマーカー遺伝子と考えられた。Quality-Threshold (QT) クラスター解析により、個々の化合物による特徴的な遺伝子の発現変化を見出すことができた。興味深いことに、QT クラスター解析における平均遺伝子変化は、生化学値と一致した変動を示した。さらに、この変動は、肝障害性の大小に係わらず同じパターンを示した。こうした解析を考慮し、本研究では、17 の遺伝子を肝障害性に関係する遺伝子として示すことができた。さらに、チオアセタミドを代表的な肝毒性化合物として用いて、DNA アレイで検討した結果、進化樹的クラスタリングによって、6 と 12 時間と、24, 36 と 48 時間の 2 つの群に分けることが出来た。この初期段階のクラスターと後期のクラスターは、時間依存的にも、投与量依存的にも分けることができた。一方、主たる遺伝子の QT クラスタリングでは、血清学

的な値の最大値を、遺伝子変化のプロファイルから予測することができた。

4) 代謝的活性化酵素の発現調節における microRNA の役割の解明

ヒト CYP1B1 の 3' 非翻訳領域 (+5348 から +4381) に miR-27b が結合することを MCF-7 細胞において明らかにした。MiR-27b のアンチセンスオリゴを導入した場合には、ヒト CYP1B1 のタンパク量も活性も著しく上昇した。薬物動態関連遺伝子ではこのような報告はなされていない。現在さらなる検討を行っている。

D. 考察

1) グルタチオン生成阻害のための、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスの作成、感染および総グルタチン含量の測定と細胞毒性への影響評価

グルタチオン転移酵素には多くのサブファミリーがあり、さらに基質特異性が比較的低いとされている。よって、本研究ではグルタチオン生成酵素に関わる酵素であり、他の経路がない γ -Gcs を選択した。ShRNA 発現ベクターを用いて、アデノウイルスでの導入を試みた。その結果、mRNA および蛋白発現レベルでは十分な抑制効果を得ることができたが、実際のグルタチオン含量の低下はこれまでの結果では、50%程度に留まっている。最近の論文で、神経細胞を用いた同様の検討が 1 報のみ発表されたが、グルタチオンの低下は本研究と同程度である。今

後、さらにグルタチオンを低下させる検討を行う予定である。具体的には、感染後の時間の検討、感染時のウイルスのMoiの検討、ウイルスの純化の検討などを行う。さらに、*in vitro*における細胞毒性への影響の評価を行い、また実験動物を用いた*in vivo*の検討も行う。

2) トログリタゾン由来肝障害性関連タンパク質の同定と毒性への関与

トログリタゾンを肝癌由来細胞およびヒト初代培養肝細胞に暴露し、2次元プロテオミクスにより、同効薬による影響の排除した条件で検索をおこなうと、非常にわずかの蛋白スポットが変化を示すに過ぎなかった。具体的には3種類の蛋白スポットが明らかな変化を示したにすぎなかった。よってトログリタゾン特異的な肝細胞毒性への関与の期待があった。その代表がBiPであり、同定し、siRNA法により毒性発現への寄与を細胞レベルで明らかにすることができ、成果を挙げることができた。しかし、*in vivo*でのsiRNAの効果が大きくなかった、この系を*in vivo*で検討することについては考慮中である。BiPは肝障害性の原因であることは確実であろうが、他にも関与している蛋白があるために、毒性発現への寄与が大きくなかったものと考えている。よって、さらなる候補の検索を行っている最中である。これまで、heat shock proteinの一種であるgp-96と、ミトコンドリアのPO蛋白が候補として同定できており、現在検討中である。

3) 肝毒性化合物のラットへの投与による遺伝子発現変動の解析

DNAチップによる遺伝子発現プロファイルの解析は、論文2報となり、一定の成果を挙げている。しかし、この検討は本研究プロジェクトにおいては、予備的検討に位置付けられる。すなわち、今後肝障害の候補遺伝子または候補microRNAを同定できた場合に、ノックダウンや導入などの手法により肝細胞および実験動物での肝障害を評価するためのバックデータになる。この研究により、化合物の肝障害性についてDNAチップを用いた発現プロファイル解析で理解できることが示された。今後の研究展開におけるさらなる応用を期待している。

4) 代謝的活性化酵素の発現調節におけるmicroRNAの役割の解明

miR-27bというmicroRNAの一種で、ヒトCYP1B1の転写後調節を明らかにすることができた。この研究は現在進行中であり、まとまったデータには成っていないので、今回の分担報告には詳しく述べていない。今後は、肝障害特異的に変動するmicroRNAを同定して、そのアンチセンスなどの手法を用いてさらなる検討を行う予定である。

E. 結論

本研究において、グルタチオンを低下させるアデノウイルスの手法が、グルタチオン低下モデル動物作製にとって有効であることを示唆しているが、実際に

はデータが不足しており、現在鋭意検討中である。トログリタゾンと2次元プロテオミクスのアプローチでは、一定の成果を挙げることができた。しかし、肝障害性に関わる機能遺伝子の1つを同定したにすぎず、さらなる候補タンパクの同定と機能解析を継続中であり、機能の相乗効果でさらなる結果がでることを期待したい。また、DNAチップを用いた検討でも、論文として成果を報告することができた。今後本研究で同定・評価するタンパク質やmicroRNAの効果を評価する準備ができたと考える。以上、初年度は概ね予定通りに進捗しているが、少々遅れている部分もあるため、2年目に鋭意努力して結果を出す予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Maniratanachote, R., Shibata, A., Kaneko, S., Yamamori, I., Wakasugi, T., Sawazaki, T., Katoh, K., Tokudome, S., **Nakajima, M., Yokoi, T.**, Detection of autoantibody to aldolase B in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. *Toxicology*, **216**, 15-23 (2005).

2) Hara, Y., **Nakajima, M.**, Miyamoto, K., **Yokoi, T.**, Inhibitory effects of psychotropic drugs on mexiletine metabolism in human

liver microsomes: prediction of *in vivo* drug interactions. *Xenobiotica*, **35**, 549-560 (2005).

3) Minami, K., Saito, T., Narahara, M., Tomita, H., Kato, H., Sugiyama, H., Katoh, M., **Nakajima, M., Yokoi, T.**, Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats. *Toxicological Sciences*, **87**, 296-305 (2005).

4) Maniratanachote, R., Minami, K., Katoh, M., **Nakajima, M., Yokoi, T.** Chaperone proteins involved in troglitazone-induced toxicity in human hepatoma cell lines. *Toxicological Sciences*, **83**, 293-302 (2005).

5) Minami, K., Maniratanachote, R., Katoh, M., **Nakajima, M., Yokoi, T.** Simultaneous measurement of gene expression for hepatotoxicity in thioacetamide-administered rats by DNA microarrays. *Mutation Research*, **603**, 64-73 (2006).

2. 学会発表

1) **Yokoi, T.**, Mechanistic approach to drug induced idiosyncratic hepatotoxicity, 1st Indo-Japanese International Conference on Advances in Pharmaceutical Research and Technology. Nov. 25-29, Mumbai, India (2005).

- 2) **Yokoi, T.**, Idiosyncratic drug reactions and pharmacogenetics: The troglitazone case. Symposium for Mechanism of Adverse Drug Reactions. 13th North-America ISSX and 20th JSSX joint meeting, Oct. 23-27, Hawaii, USA (2005).
- 3) **横井 毅**, 創薬研究における安全性評価の現状と展望, 第 22 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー, 10 月 4 日, 東京 (2005).
- 4) **横井 毅**, 薬物誘導性肝障害について, 第 53 回質量分析総合討論会, シンポジウム, 5 月 25-27 日, 大宮 (2005).
- 5) **Maniratanachote, R., Shibata, A., Kaneko, S., Yamamori, I., Wakasugi, T., Sawazaki, T., Katoh, K., Tokudome, S., Nakajima, M., Yokoi, T.**, Identification of autoantibodies to aldolase B in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. 13th North-America ISSX and 20th JSSX joint meeting, Oct. 23-27 Maui, USA (2005).
- 6) **Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Katoh, M., Yokoi, T.**, Limited impact of steroidogenic factor-1 on the transcriptional regulation of human *CYP11B1* gene. 13th North-America ISSX and 20th JSSX joint meeting, Oct. 23-27 Maui, USA (2005).
- H. 知的財産権の出願・登録
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事業）
分担研究報告書

RNA 干渉法による薬物誘導性肝障害試験系の開発に関する検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学大学院医学系研究科

研究要旨

グルタチオン (5-L-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) は、グリシン、グルタミン酸およびシステインから構成されるトリペプチドであり、内因性物質や薬物より生じるフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護している。グルタチオン-S-転移酵素は薬物および活性代謝物を解毒することに深く関わっているが、ヒトよりもげっ歯類において酵素活性が高いことが知られており、この代謝能の違いが前臨床毒性試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。本研究では、グルタチオン合成酵素である γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -Gcs) に注目し、この酵素の産生をアデノウイルスの系を用いて RNA 干渉法によりノックダウンすることを検討した。その結果、細胞を用いた系において、 γ -Gcs を mRNA レベルおよびタンパクレベルで 80%以上の抑制を得られた。しかし、GSH 含量は約 50%の減少にとどまった。細胞レベルで薬物誘導性の肝障害を検討するためには、細胞自信に活性代謝物の生成能が存在することが必須である。このため CYP3A4 の過剰発現用のアデノウイルスの系を作製した。現在この系での活性代謝物生成能と細胞毒性試験について検討中である。

A. 研究目的

本研究では、グルタチオン合成酵素である γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -Gcs) に注目し、この酵素の産生をアデノウイルスの系を用いて RNA 干渉法によりノックダウンすることを検討する。これにより、*in vitro* および *in vivo* でグルタチオン合成を阻害し、グルタチオ

ンおよびグルタチオン-S-転移酵素活性を減少させた細胞実験系またはモデル動物実験系を作成し、グルタチオン抱合される薬物の毒性発現のメカニズムの解明および、ヒトにおける毒性発現予測に役立つことを目的として検討した。

B. 研究方法

B-1. 研究材料

Wister 系ラット（雄性、7 週齢）は日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version) はタカラバイオ株式会社(Otsu, Japan)より購入した。

GeneSilencer shRNA Vector Kits は Gene Therapy Systems (San Diego, U.S.) より購入した。CCK-8 は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。

B-2. γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスの作成

ラット γ -Gcs catalytic subunit mRNA の配列から siRNA 配列を選択し、*in vitro* においてノックダウン効果を確認した後、その配列を用いて二本鎖オリゴ DNA を作成し、pU6 プロモーターを持つ pGSU6-GFP ベクターに組み込んだ。制限酵素 *Hinc* II で目的配列および pU6 プロモーターを切り出し、pAxcwit コスミドベクターに組み込んだ。以後のアデノウイルス作成は Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version)を用い、マニュアルに従って行った。

B-3. γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスの細胞への感染

細胞はラット肝癌由来細胞の H4IIE 細胞および BRL3A 細胞、マウス肝癌由来細胞の Hepa1-6 細胞、ヒト肝癌由来細胞 HLE 細胞を用いた。細胞を 6 well または 12 well プレートにまき、70~100% コンフルエントまで培養した。培地を除き、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスを MOI 10、MOI 20 で 1 時間感染させ

た。対照として Luc (ルシフェラーゼ) shRNA 発現アデノウイルスを同様に感染させた。1 時間感染操作を行った後に培地を添加し、その 3 日後における mRNA の発現を real-time RT PCR にて、タンパク量を Western blotting にて測定した。また、総グルタチオン含量の測定も行った。

B-4. 総グルタチオン含量測定

総グルタチオン含量は Maas らの方法 (*Toxicol In Vitro* 14: 523-530 :2000) に修正を加え、以下の方法により測定した。凍結融解を 3 回繰り返した細胞懸濁液 50 μ L に 5%メタリン酸液 25 μ L を氷上で加え、10 分間放置した。0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) /5 mM EDTA 溶液を 225 μ L 添加して攪拌した。15,000 g で 5 分間遠心分離後、上清 100 μ L を分取し、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液/5 mM EDTA 溶液を加えて全量を 1.9 mL とした。1 mg/mL OPT を 100 μ L 添加することにより反応を開始した。遮光し、室温で 15 分間放置した後、蛍光強度を E_x (励起波長) : 350 nm、 E_m (蛍光波長) : 420 nm で測定した。

B-5. γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルス感染細胞への薬物処置後 CCK による細胞生存率の検討

H4IIE 細胞を 96 well プレートにまき、コンフルエントとした後、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスを 1 時間感染させた。72 時間後に肝毒性化合物であるトログリタゾンおよびアセトアミノフェンを処置し、24 時間後に各 well に試薬 10 μ L

を加え、1 hr 培養した。その後、GE Healthcare Amersham Bioscience (Tokyo, Japan) のプレートリーダーで吸光度を測定した。

B-6. ラットへの γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルス投与

Wister 系ラットをジエチルエーテルで麻酔し、塩化セシウム密度勾配を用いて精製した γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルス、および対照として Luc shRNA 発現アデノウイルスを 1×10^{10} PFU/kg で *i.v.*した。4 日後に、アセトアミノフェン 1000 mg/kg を *i.p.*投与し、0、20、60、120、180 分後に尾静脈より採血した。

B-7. γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルス投与ラットにおけるアセトアミノフェンおよび代謝物の血中濃度推移

血清 50 μ L に、内標準物質であるテオフィリンを 2 nM 添加し攪拌した。その後、冷メタノール 150 μ L を加え、10 分間氷上放置した後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清 100 μ L に精製水 200 μ L を加え攪拌し、この溶液を 50 μ L、HPLC に注入した。分析カラムは Mightysil RP-18 (4.6 mm x 150 mm, 関東化学, Tokyo, Japan) を用い、移動相は 5%メタノール、0.75%酢酸、100 mM リン酸緩衝液とした。カラム温度は 35°C、流速は 1.0 mL/min、溶離液を 254 nm でモニターした。

C. 研究結果

C-1. γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルス

によるノックダウン効率の確認

ラット、マウスおよびヒト肝癌由来細胞を用い、real-time RT PCR で各々の動物種における γ Gcs mRNA を定量した。その結果、ラット肝癌由来細胞である BRL3A および H4IIE 細胞においては対照群と比べて 80%以上の有意な減少を示した。なおヒト肝癌由来細胞 HLE 細胞および、マウス肝癌由来細胞 Hepa1-6 細胞において、減少は認められたが、対照群と比べ有意な差ではなかった (Fig.1.)。次に、mRNA レベルで有意に減少が認められたラット肝癌由来細胞 2 種において総グルタチオン含量を測定したところ、Luc shRNA 発現アデノウイルス処置の対象群と比較して、BRL3A 細胞で約 30%、H4IIE 細胞で約 50%の細胞内総グルタチオン含量の減少が認められた (Fig.2.)。しかしながら HLE 細胞および Hepa1-6 細胞においては殆どグルタチオン含量の減少は認められなかった (data not shown)。細胞内総グルタチオン含量の減少が著しかった H4IIE 細胞において、Western blotting を行い、 γ -Gcs catalytic subunit タンパク質の発現を定量したところ、約 80%以上のタンパク発現レベルの減少が認められた (Fig.3.)。また、 γ -Gcs modulatory subunit タンパク発現量も同様に Western blotting で確認したところ、対照群と比べて γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルス処置群とタンパク発現量に差は認められなかった (data not shown)。

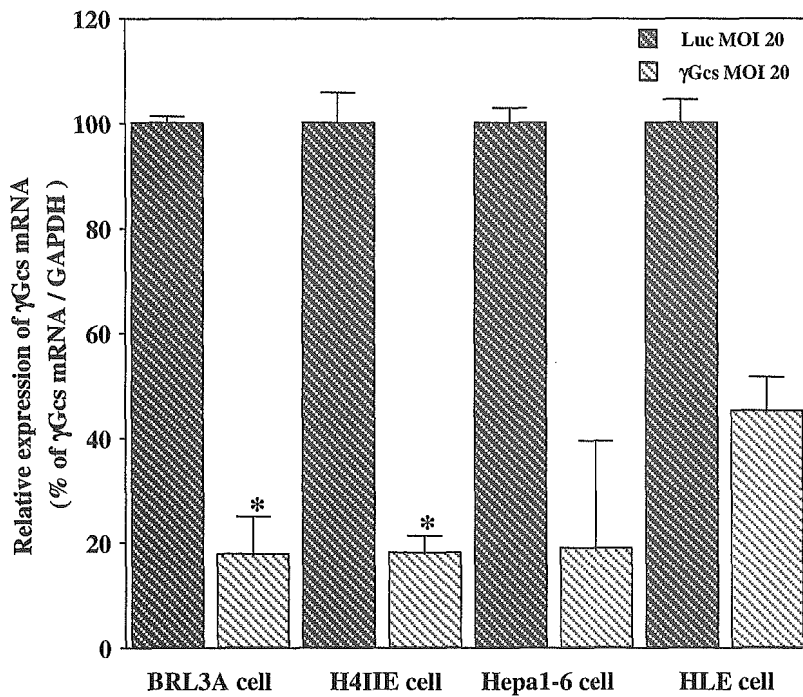


Fig.1. Changes of γ -Gcs mRNA expression by γ -Gcs shRNA adenovirus-treatment. Data are mean \pm SD (n = 3). * P < 0.001 compared with control.

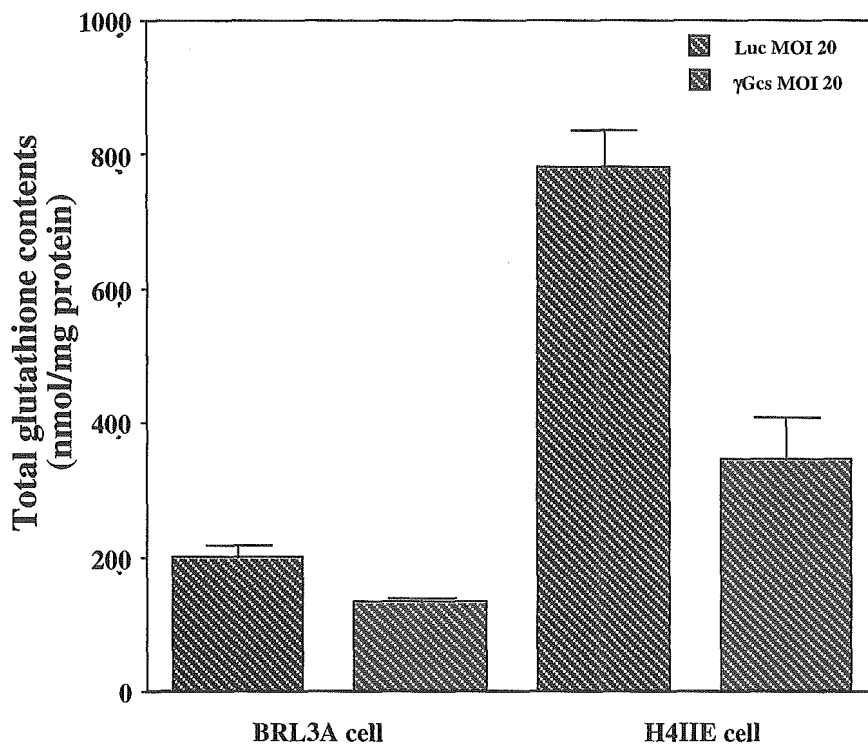


Fig.2. Effect of γ -Gcs shRNA adenovirus-treatment on total glutathione contents in BRL3A and H4IIE cells. Data are mean \pm SD (n = 3).



Fig.3. Effect of γ -Gcs shRNA adenovirus-treatment on the γ -Gcs proteine expression.

C-2. γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスの細胞への薬物毒性の影響
 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスを H4IIE 細胞に感染させ、3 日後に肝毒性化合物であるトログリタゾン 25、50、100

μ M およびアセトアミノフェン 0.1、0.5、1、5 mM を 24 時間処置したところ、対照群と比べて細胞毒性への影響に有意な差は認められなかった(Fig.4)。

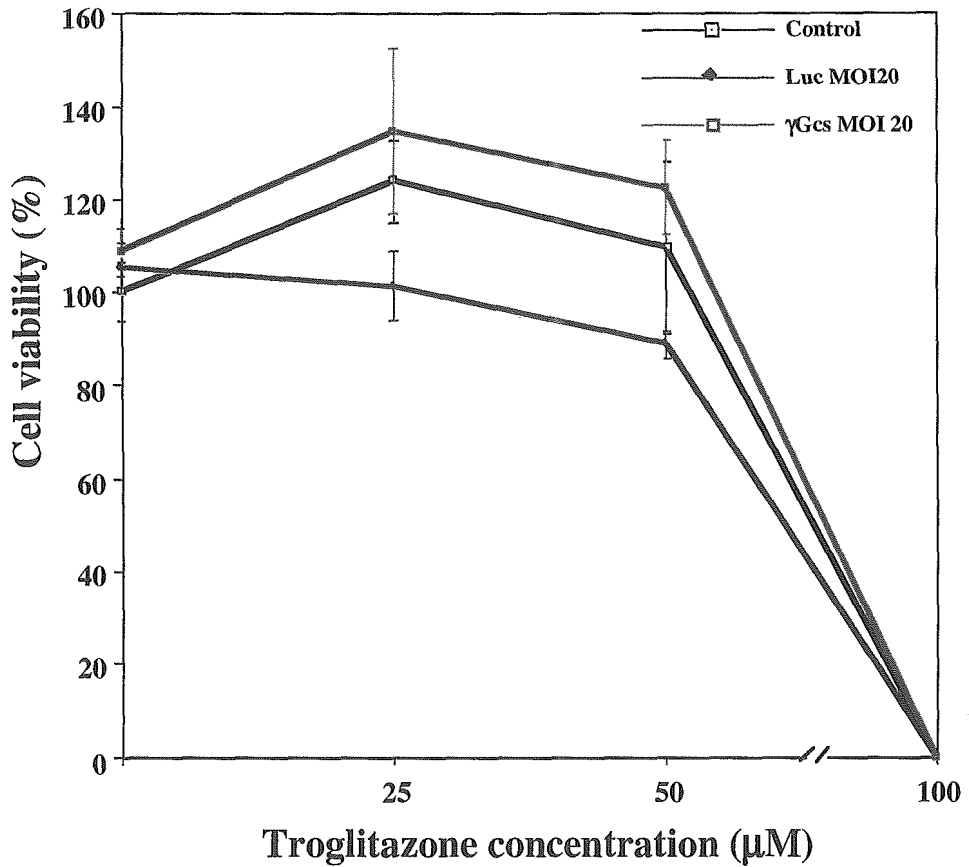


Fig.4. Effect of γ -Gcs shRNA adenovirus-treatment on cytotoxicity of troglitazone. Data are mean \pm SD (n =4).

C-3. γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルス投与ラットにおけるアセトアミノフェンの毒性への影響

γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスおよび Luc shRNA 発現アデノウイルスを投与したラットおよびウイルス投与を行っていないラットに対し、アセトアミノ

フェン 1000 mg/kg を *i.p.*投与後、アセトアミノフェングルタチオン抱合体 (APAP-GSH) 濃度を 3 時間に渡って測定したが、有意な差は認められなかった (Fig.5.)。

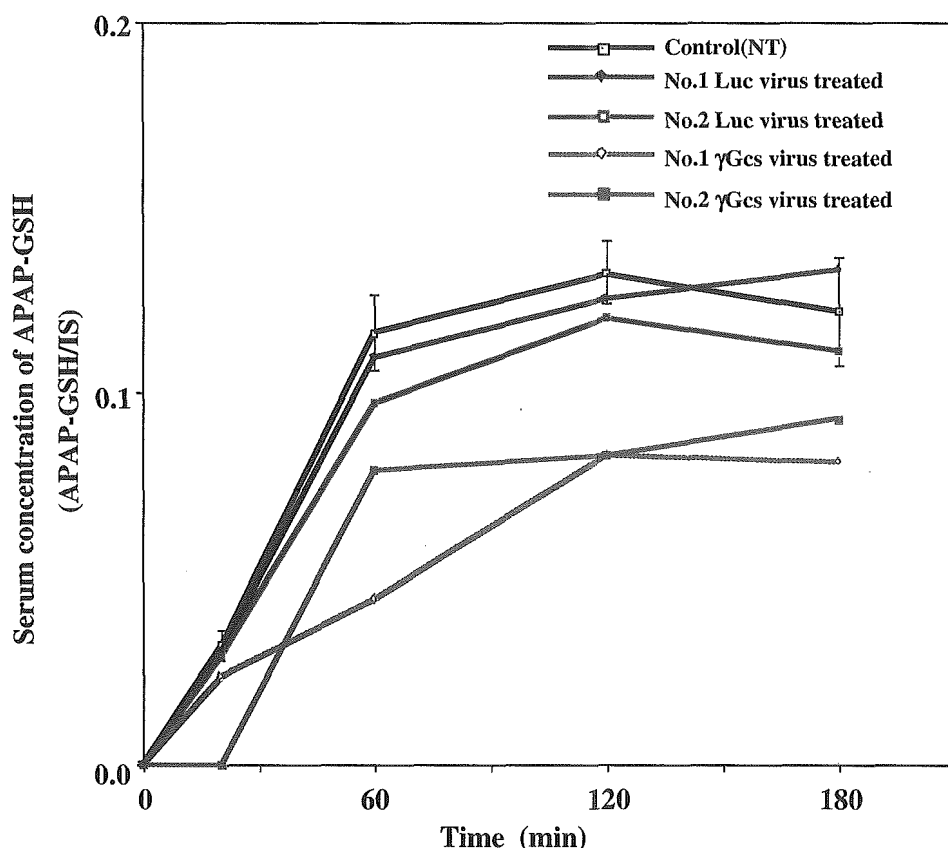


Fig.5. Serum concentration of APAP-GSH in γ -Gcs shRNA adenovirus-treated rat. Control represents the mean of three independent measurements.

D. 考察

本研究では、*in vitro* および *in vivo* において、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスを処置することで、グルタチオン合成を抑制することにより、解毒的な代謝能を低下させ、肝毒性化合物の毒性を増強される系の構築について検討した。

γ -Gcs は、catalytic subunit および

modulatory subunit によるヘテロダイマーで形成されている。今回選択した shRNA の配列は、*in vitro* において γ -Gcs catalytic subunit の発現を mRNA レベルおよびタンパクレベルで 80% 以上を有意に抑制できた。しかし、 γ -Gcs はグルタチオン合成における律速酵素でありながら、細胞内総グルタチオン含量を約 50% 程度しか抑制できなかったことを考

えると、グルタチオン合成能は、 γ -Gcs タンパク質の発現がかなり抑制された状態でも、グルタチオン濃度を維持するように働く機構であると考えられる。

トログリタゾンによる肝毒性はヒトでは認められるが、げっ歯類においては認められない。げっ歯類はヒトと比べて肝臓内グルタチオン含量およびグルタチオン抱合能が数倍高いことがその理由として考えられている。今回、*in vitro* の検討でラット肝癌由来細胞を用い、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスを処置することで、細胞内グルタチオン含量を減少させ、トログリタゾン処置することで細胞毒性の増強が認められるか否か検討を行った。しかし、対照群と比べて細胞生存率に有意な差を認めることはできなかった。トログリタゾンの毒性は、トログリタゾン未変化体の毒性と、活性代謝物による毒性が考えられる。グルタチオンが関わる解毒機構はトログリタゾンの活性代謝物に対するものであると考えられるので、P450 を発現していない肝癌由来細胞では、活性代謝物が産生されず、グルタチオン減少による毒性への影響が確認できなかったと考えられる。現在、CYP3A4 過剰発現アデノウイルス作成に成功している。今後、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイルスとのカクテルウイルスを作成し、CYP3A4 により活性代謝物を産生させ、グルタチオンが減少した条件においてトログリタゾンを処置し、細胞毒性が増強するかの検討を行っていく予定である。

Wister 系ラットを用いたアセトアミノフェン投与による *in vivo* の検討においては、 γ -Gcs shRNA 発現アデノウイル

スを投与した群においてグルタチオン合成が減少し、APAP-GSH 産生量がコントロールと比べて減少することが予測された。結果として対処群およびウイルス処置群において、APAP-GSH 抱合体、その他代謝物血清中濃度に有意な差は認められなかった。投与実験終了後、各々のラット肝臓から RNA を採取し、 γ -Gcs catalytic subunit mRNA 発現量を real-time RT PCR 法によって測定したが、発現量に差は認められなかった。今回ラット 1 個体に対して、ウイルスを 1×10^{10} PFU/kg 投与で行った。このウイルス濃度では、ラット *in vivo* において十分なノックダウン効果を得ることができなかったと考えられるため、今後さらにウイルス精製を行い、高力価ウイルスを作成し、*in vivo* での検討を継続していく予定である。

F. 結論

細胞レベルにおける γ -Gcs の mRNA および蛋白の発現は十分に抑制できていると考えられる。今後、CYP3A4 による代謝的活性化能とのバランスを調整し、細胞レベルでの検出系を確立する。さらに、ウイルスの力値を上げ、ラットを用いた *in vivo* での検討も行う予定である。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

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事業）
分担研究報告書

トログリタゾン由来肝細胞毒性へのシャペロンタンパク質の関与

Chaperone Proteins Involved in Troglitazone-induced Toxicity

主任研究者 横井 毅 金沢大学大学院医学系研究科

研究協力者 Rawiwan Maniratanachote

財団法人 日本公定書協会 流動研究員

研究要旨

抗糖尿病薬であるトログリタゾンは特定の患者に突発性の薬物誘導性肝障害を起こすことが知られている。一方、同効薬であり現在広く使用されているロジグリタゾンにおいては、このような報告はない。本研究では、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いて、トログリタゾンまたはロジグリタゾンを 0, 25, 50, 75 マイクロ M で 48 時間暴露した。細胞溶液を 2 次元電気泳動で分離し、ゲルをタンパク染色後、スポットの変化を比較検討した。分子量 75 kDa で pI 5.0 のスポットが、トログリタゾン暴露 50 と 75 マイクロ M で最も発現増加が認められた。このスポットのアミノ酸配列分析を行った結果、そのほとんどが immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) であり、少量の protein disulfide isomerase related protein (PDIrp) も混在していた。イムノプロットの結果、BiP タンパク質は、トログリタゾンの暴露濃度依存的に発現増加し、ロジグリタゾンの暴露によっては、少しの発現増加にとどまった。この結果は、BiP タンパク質の mRNA の変動と一致した。しかし、PDIrp ではいずれの変化も認められなかった。この BiP の発現増加がトログリタゾン誘導性肝細胞傷害性に及ぼす影響を検討するために、HLE 細胞を用いて、BiP siRNA の検討を行った。その結果、BiP siRNA の導入はトログリタゾンによる細胞毒性を憎悪させる結果となった。以上の検討より、BiP の発現増加は、肝小胞体におけるトログリタゾン由来肝細胞傷害を軽減させる働きがあることを明らかにした。

Troglitazone (TRO), an effective thiazolidinedione antidiabetic agent, was reported to produce idiosyncratic hepatotoxic effects in some individuals. In contrast, rosiglitazone (RSG), in the same group of agents, has no significant toxic effects and now is widely used. In this study, human hepatoma (HepG2) cell lines were exposed to various doses of TRO as well as RSG (0, 25, 50 and 75 μ M) for 48 h. Cell lysates were separated by 2-dimensional electrophoresis and the gels were stained with Coomassie brilliant blue to compare the spot profiles. The greatest protein expression at a molecular weight of 75 kDa and isoelectric point of 5.0 was specifically increased with TRO treatments of 50 and 75 μ M. The spot was identified as a mixture of immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) and, to a lesser extent, protein disulfide isomerase related protein (PDI_r). Immunoblot analyses showed that the BiP protein was dose-dependently increased by TRO treatment and, to a lower degree, by RSG. These effects were also correlated with the high induction of BiP mRNA by TRO (50 and 75 μ M) and the lower induction by RSG. However, both treatments showed no significant effects on PDI_r expression. The toxic effects of TRO in relation to the overexpression of BiP were also demonstrated in HLE cells, another human hepatoma cell line. In HLE cells, the inhibition of BiP expression by small interference RNA rendered cells more susceptible to the toxic effects of TRO. These results suggest that the overexpression of BiP is a defense mechanism of the endoplasmic reticulum in response to TRO-induced toxicity.