

図3.ラット尿中 APAP 代謝物の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (6.5~8.0ppm)

表 1 . APAP 投与ラットの尿中内因性代謝物濃度

metabolite mM	APAP mg/kg				APAP mg/kg(PB100mg/kg 前処理)			
	0	100	500	800	0	100	500	800
glucose	2.61	2.02	1.53	1.50	2.65	2.53	1.99	1.75
lactate	0.24	0.24	0.26	0.22	0.24	0.26	0.33	0.21
citrate	20.4	19.8	12.5	8.30	22.4	22.2	17.9	8.45
2-oxoglutarate	10.1	8.74	5.58	3.47	9.59	9.39	7.31	3.26
succinate	0.74	0.72	0.66	0.41	1.19	1.25	1.02	0.55
fumarate	0.16	0.12	0.06	0.04	0.13	0.12	0.08	0.04
hippurate	11.9	10.5	8.20	5.30	12.9	12.1	10.1	7.5
allantoin	36.0	36.3	29.8	20.1	36.3	35.2	30.3	26.0
1-methyl nicotine formate	0.27	0.24	0.24	0.27	0.24	0.22	0.23	0.22
	0.62	0.57	0.51	0.38	0.72	0.70	0.67	0.57
TMAO	1.14	0.95	0.68	0.46	1.00	0.98	0.86	0.50
creatinine	7.15	7.15	7.00	6.35	8.75	8.80	6.03	5.39
urea	963	836	748	589	636	638	658	681

表2. APAP 投与ラットの尿中 APAP 代謝物濃度

metabolite mM	APAP mg/kg				APAP mg/kg(PB100mg/kg 前処理)			
	0	100	500	800	0	100	500	800
sulfate	0	22.9	33.1	48.6	0	23.1	52.7	60.4
glucronide	0	0	31.2	39.6	0	7.78	43.8	53.7
mercapturate	0	0	13.8	15.9	0	2.22	22.1	25.9
APAP	0	0	11.8	14.0	0	0	8.94	11.0

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）

「非侵襲資料を用いた新規高感度安全性予測系の開発」

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防御因子の解析

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及びその防御の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)の毒性発現及びその防御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 $\alpha$ -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結果、毒性発現が生体内の脂質代謝の変動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リン脂質、脂肪酸、トリグリセリドの顕著な濃度低下が認められ、障害を軽減させる PCN を併用するとそれらの濃度の回復が認められた。障害発生時、軽減時の生体内脂質動態の変動に關与する可能性のある脂質代謝関連遺伝子に注目して、その発現レベルを RT-PCR 法により解析した。変動パターンを LCA 誘発肝障害の防御因子と考えられている Cyp3a11, Sult2a1 と比較した。LCA による障害発生時の変動 (LCA 群 vs control 群) と PCN 併用による障害軽減時の変動 (LCA/PCN 群 vs LCA 群) で解析すると、遺伝子発現変動パターンは、障害のレベルに対して正あるいは負の関係で変動するグループとそれ以外の 2 つのグループに分類された。Cyp3a11, Sult2a1 mRNA レベルは後者に属し、障害発生時、PCN 併用による障害軽減時に共に発現が増加する。脂質の肝内取り込みに關与する CD36, 脂肪酸合成に關わる fatty acid elongase, stearoyl-CoA desaturase, 胆汁酸排泄に關わる Mrp3 等が Cyp3a11 や Sult2a1 と同様な発現変動パターンを示した。これらの遺伝子は肝内脂質濃度の増加や胆汁酸レベルの減少に關与すると考えられ、LCA 誘発肝障害の防御因子となりうる候補遺伝子とも考えられた。遺伝子発現パターンを複数の指標で分類することで障害との関連で重要な遺伝子を抽出出来る可能性が示された。

## 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（メタボノミクス）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。次に抽出された内在性代謝物の変動をより具体的な遺伝子発現変動で説明出来るかどうか RT-PCR 法により解析された遺伝子発現変動から検証する。これらの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毒性マーカーや障害の防御因子の同定を行う手法の開発を目的とした。

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。LCA 誘発肝障害の防御の機序としては LCA 代謝酵素の CYP3A や hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A) による代謝亢進が知られている。

本研究では前年度の網羅的発現変動解析により導き出された脂質代謝変動に注目して、防御因子と考えられる Cyp3a11 や Sult2a1 の発現変動と比較することにより脂質関連遺伝子の発現変動から毒性マーカー、障害の防御因子となりうる遺伝子を抽出する手法の開発を試みた。

## 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%あるいは 0.75%LCA を含有させた粉末飼料 (CE-2) を、9 日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 4 日間、100 mg/kg の pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (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、LCA 投与群にも、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レーションを施し、5分間の平衡化後、胆汁を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. 遺伝子発現解析

マウス肝臓から RNA を調製し Ready-To-Go により cDNA を合成した。この cDNA と特異的プライマーにより RT-PCR 反応を実施してその反応物のバンド強度を定量した。

#### 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%あるいは 0.75%を混餌で摂取させ、また LCA0.6%に PCN を併用して毒性パラメーターの変動を解析した (Fig. 1)。マウスに LCA0.6%

あるいは 0.75%を 9 日摂取させると血清 ALT 活性、ALP 活性の上昇が認められた。PCN を LCA(0.6%) 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 処置により上昇し、PCN 併用により低下した。

##### 2. 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変動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、LCA(0.6%) 群、LCA/PCN 群、PCN 群で測定した。肝内トリグリセリド、遊離脂肪酸、リン脂質においてはいずれも、LCA 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 (Fig. 2)。一方、LCA/PCN 群、PCN 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。さらに肝臓からの脂質の排泄を検討するため、コントロール群、LCA 群、LCA/PCN 群、PCN 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。LCA 群の胆汁酸、リン脂質、コレステロールの胆汁排泄速度はすべてコントロール群に比べて有意に減少した (Fig.

3)。一方 LCA/PCN 群では LCA 群と比較して、これらの脂質排泄速度の有意な増加が認められた。

## 2. 脂質関連遺伝子の発現変動

上記の肝内脂質レベル、脂質の胆汁排泄レベルの変動から LCA 誘発肝障害の機序あるいは防御の機序と関連する遺伝子を抽出するため、肝内脂質レベルの変動に関与する可能性が考えられる脂質関連遺伝子について RT-PCR 法により発現レベルを検討し、LCA 誘発肝障害の防御に関与すると考えられる Cyp3a11 や Sult2a1 の発現パターンと比較した (Table 1)。脂質関連遺伝子として脂質の胆汁排泄トランスポーター (Bsep, Mdr2, Abcg5, Abcg8)、脂肪酸、胆汁酸の肝内取り込みトランスポーター (CD36, Ntcp) 血管側への胆汁酸排出トランスポーター (Mrp3, Mrp4)、脂質関連核内受容体 (FXR, SHP, PPAR $\gamma$ )、脂質合成関連遺伝子 (Cyp7a1, phosphatidic acid phosphatase (Pap), stearyl-CoA desaturase (Scd), acetyl CoA carboxylase (Acc-1), lipoprotein lipase (Lpl), fatty acid elongase (Fae), CPC phosphocholine cytidyl transferase (Cpct), fatty acid synthetase (Fas))、リン脂質関連遺伝子の phospholipid scramblase (Pls)、annexin A2 に関して測定した。コントロール群に対する 0.6%LCA 群、0.75%LCA 群、PCN 群の変動と 0.6%LCA 群に対する 0.6%LCA/PCN 群の変動を解析した。これらの遺伝子は網羅

的発現変動解析 (マイクロアレイ解析) で有意な変動が認められたものと、認められなかったものから成る。Table 1 にはマイクロアレイ解析と RT-PCR 法の結果を示した。マイクロアレイ解析で大きく発現変動をしている遺伝子は RT-PCR 法においても同様な結果が得られた。一方マイクロアレイ解析で有意な変動が認められなかった遺伝子においても RT-PCR 法により変動は解析されたが、その変動レベルは 2 倍以下であった。遺伝子変動として LCA による肝障害発現時の変動 (LCA 群 vs control 群) とともに PCN 併用により障害が軽減される過程での遺伝子変動 (LCA/PCN 群 vs LCA 群) の 2 つのパラメータを組み合わせることにより、遺伝子発現変動パターンを 4 つに分類した (Fig. 4)。障害のレベルに対して正あるいは負の関係で変動するグループとそれ以外の 2 つのグループに分類された。LCA 誘発肝障害の防御因子と考えられる Cyp3a11 と Sult2a1 は LCA 障害時に増加し、PCN 併用による障害の軽減時にも増加した。これと同様な発現変動を示したのが、Mrp3, CD36, PPAR $\gamma$ , Scd, Fae だった。また障害のレベルと正の相関 (障害の発生で発現が増加し、軽減で発現が減少する) で発現変動をする遺伝子として Mdr2, Pap, Lpl, Pls, Annexin2 が認められた。逆に負の相関を示すものは Abcg5, Abcg8, Ntcp, Mrp4, FXR, Cpct 等だった。

#### D. 考察

昨年度の LCA 誘発肝障害における網羅的遺伝子発現変動解析の結果から LCA 誘発肝障害の機序あるいはその防御の機序と脂質代謝変動との関連が示唆されていた。肝内脂質レベルや脂質胆汁排泄速度が障害の認められる LCA 群で有意に減少し、PCN 併用により障害が軽減すると、これらのレベルが回復したことより上記の網羅的遺伝子発現変動解析からの仮説は支持された。さらに網羅的遺伝子発現変動解析に加え RT-PCR 法による個々の遺伝子発現変動データを加えて比較すると共に発現変動パターンを分類して解析した。網羅的遺伝子発現変動解析で得られた大きく発現変動する遺伝子の結果は RT-PCR 法により支持された。網羅的遺伝子発現変動解析で有意な変動が認められなかった遺伝子についても RT-PCR 法により変動は検出されたがその変動のレベルは 2 倍以内であった。LCA 群 vs コントロール群と LCA+PCN 群 vs LCA 群の 2 つの変動パターンの組み合わせにより 4 種に遺伝子発現変動パターンが分類された。LCA 誘発肝障害の防御因子と考えられる Cyp3a11 と Sult2a1 は LCA 障害時に増加し、PCN 併用による障害の軽減時にも増加した。この Cyp3a11 と Sult2a1 の発現変動は障害発生時には生体防御のための適応応答により増加し、薬物処理 (PCN) に応答してさらにその発現が亢進したと考えられた。薬物応答の結果発現

がさらに大きく亢進したため、Cyp3a11 と Sult2a1 は障害の軽減に関与したと考えられた。これらと同様に考えると Cyp3a11 や Sult2a と同様な発現変動をする Mrp3, CD36, PPAR $\gamma$ , Scd, Fae は障害の防御因子となる可能性を有していると考えられる。上記の遺伝子は肝内の脂肪酸レベルの亢進あるいは胆汁酸レベルの低下に関与すると考えられることより、これらの事実も、発現変動パターンからの仮説を支持するものである。

これらの遺伝子の発現変動はマイクロアレイデータでは検出されなかったことからマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動解析では解析出来ない部分があることも明らかとなった。また障害の変動と正あるいは負に平行に変動する遺伝子が多く認められた。これらの遺伝子は障害の原因あるいは障害の軽減の原因となるものではなく、肝臓内の障害のレベルの変動の結果を反映して発現変動する一群の遺伝子と見なすことが出来るかもしれない。本実験での RT-PCR による個別の発現変動解析により一連の機能に関与する遺伝子群でも発現変動パターンが異なり、それらを区別することにより生体応答に対応した有益な遺伝子発現情報を抽出出来る可能性が示された。

#### E. 結論

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等のデータと内在性代謝物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加え、肝臓の内在性代謝物(脂質)レベルの変動データより LCA 誘発肝障害と脂質代謝異常との関連を考えた。さらに RT-PCR 法による個別の遺伝子発現変動データをマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析データと比較しマイクロアレイデータの有用性と限界についても明らかにした。遺伝子発現変動を 2 つ以上の変動パラメーターを組み合わせることにより場合分けすることで、意味のある発現変動をしている遺伝子の抽出が出来る可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M. Miyata, Y. Matsuda, H. Tsuchiya, H. Kitada, T. Akase, M. Shimada, K. Nagata, F. J. Gonzalez and Y. Yamazoe  
Chenodeoxycholic acid-mediated activation of the farnesoid X receptor negatively regulates hydroxysteroid sulfotransferase  
*Drug Metab. Pharmacokin.* 21, 315-323 (2006)
- 2) M. Miyata, H. Watase, W. Hori, M. Shimada, K. Nagata, F. J. Gonzalez, and Y. Yamazoe  
Role for enhanced fecal excretion of bile acid in hydroxysteroid sulfotransferase-mediated protection against lithocholic acid-induced liver toxicity  
*Xenobiotica* 36, 631-644 (2006)

##### 2. 学会発表

- 1) 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

- 2) 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
- 3) 松田良樹、宮田昌明、永田 清、Frank J. Gonzalez、山添 康  
Hydroxysteroid sulfotransferase 発現の FXR シグナルによる抑制 日本薬学会第 126 回年会、2006. 仙台
- 4) M. Miyata FXR-dependent enhancement of biliary lipid excretion is a critical determinant for protection against cholic acid-induced liver toxicity. Symposium: Modulation on Phase I metabolizing Enzymes Expression, 1<sup>st</sup> Asia Pacific ISSX Meeting, 2006. Jeju, Korea
- 5) M. Miyata, M. Nomoto, T. Mizuki, S. Yokokawa, S. Ninomiya, Y. Yamazoe  
Hepatic phospholipid depletion and LCA-induced cholestatic liver injury. 1<sup>st</sup> Asia Pacific ISSX Meeting, 2006. Jeju, Korea
- 6) 水木朋宏、野本眞博、永易美穂、大淵雅人、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序—生体内脂質レベルの変動 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006. 名古屋
- 7) 宮田昌明、野本眞博、水木朋宏、横川伸也、二宮真一、山添 康  
網羅的遺伝子発現解析から予測されるリトコール酸誘発肝障害の機序 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006. 名古屋
- 8) 野本眞博、宮田昌明、芝崎茂樹、黒沢亨、神藤康弘、山添 康  
リトコール酸誘発肝障害の防御因子としてのケルステロール排泄促進—リトコール酸誘発肝障害モデルマウスにおける ME3738 の有効性— 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006. 名

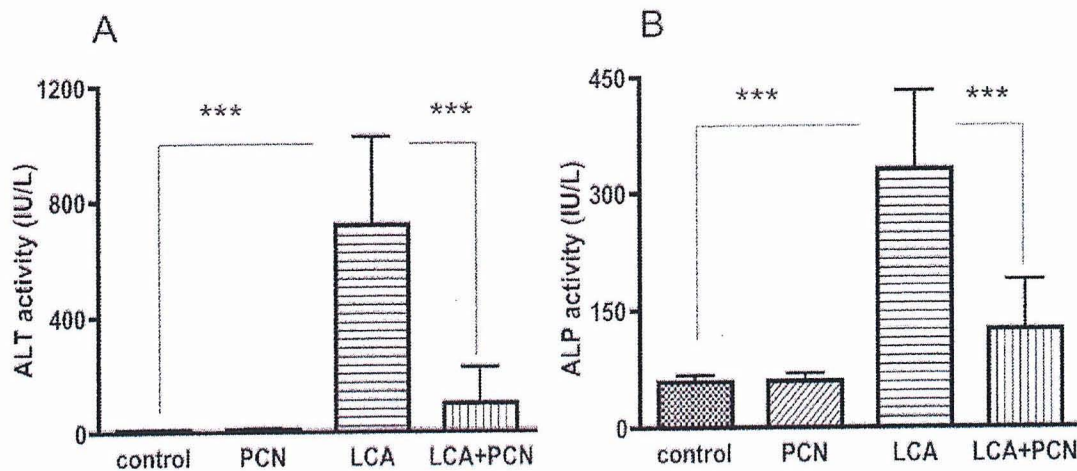
古屋

- 9) 宮田昌明、野本眞博、水木朋宏、横川伸也、二宮真一、山添 康 新規リトコール酸誘発肝障害に対する防御機序：生体内脂質レベルの検討 第4回東日本胆汁酸研究会、2006. 東京
- 10) M. Miyata, W. Hori, H. Watase, M. Shimada and Y. Yamazoe, 2次胆汁酸誘発肝毒性の防御におけるヒドロキシステロイドスルホトランスフェラーゼの役割 シンポジウム：Phase II代謝酵素と薬効・毒性 第21回日本薬物動態学会年会、2006. 東京
- 11) 宮田昌明、松田良樹、野本眞博、Frank J. Gonzalez、山添 康 肝内胆汁酸レベルの調節における胆汁酸吸収の役割 第21回 日本薬物動態学会 2006 東

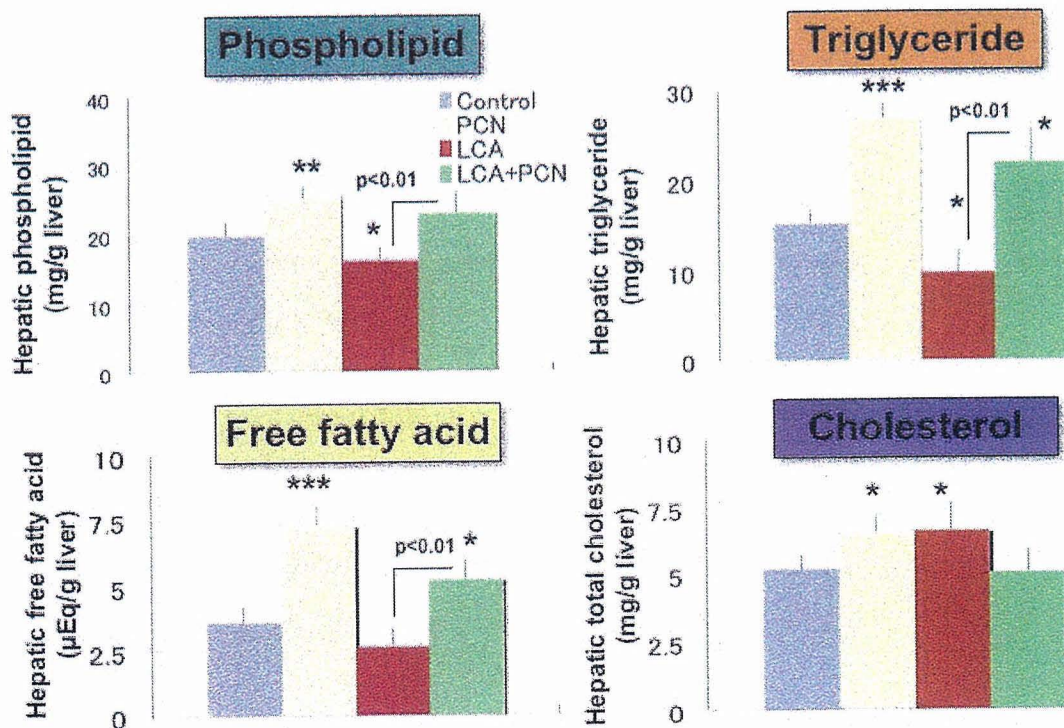
**Table.1** Relative mRNA levels of lipid-related genes

	PCN	0.6% LCA	0.6% LCA + PCN	0.75% LCA
<b>Metabolizing enzyme</b>				
Cyp3a11	1.8 (1.3)	1.3 ( * )	2.3 (1.2) <u>1.8</u>	2.8
Sult2a1	4.3 (3.5)	1.8 ( * )	4.6 (3.2) <u>2.6</u>	1.9
<b>Transporter</b>				
Bsep	1.0 ( * )	0.6 (0.6)	0.4 ( * ) <u>0.6</u>	0.6
Mdr2	1.3 (0.8)	1.9 (1.3)	0.9 ( * ) <u>0.5</u>	2.8
Abcg5	1.1 (1.5)	0.6 ( * )	0.8 (1.7) <u>1.3</u>	0.6
Abcg8	1.0 (1.3)	0.7 (0.4)	0.8 ( * ) <u>1.2</u>	0.2
Cd36	1.2 ( * )	1.7 ( * )	2.7 ( * ) <u>1.6</u>	2.0
Ntcp	1.0 ( * )	0.5 ( * )	0.5 ( * ) <u>1.1</u>	0.4
Mrp3	1.5 ( * )	1.4 ( * )	2.1 ( * ) <u>1.5</u>	1.8
Mrp4	1.2 ( * )	0.9 ( * )	1.2 ( * ) <u>1.2</u>	0.6
<b>Nuclear receptor</b>				
Fxr	0.8 ( * )	0.7 (0.4)	0.7 ( * ) <u>1.1</u>	0.5
Shp	0.7 (0.6)	0.6 (0.6)	0.5 ( * ) <u>0.8</u>	0.4
Ppar $\gamma$	1.4 ( * )	1.4 ( * )	1.7 ( * ) <u>1.2</u>	1.2
<b>Synthetase</b>				
Cyp7a1	0.9 ( * )	0.4 (0.03)	0.2 ( * ) <u>0.4</u>	0.1
Pap	1.4 ( * )	3.1 (4.6)	2.1 ( * ) <u>0.7</u>	2.8
Scd	1.8 ( * )	1.6 ( * )	2.1 ( * ) <u>1.3</u>	1.8
Acc-1	1.1 ( * )	1.4 ( * )	1.8 ( * ) <u>1.3</u>	1.0
Lpl	1.2 ( * )	5.7 (9.3)	1.6 ( * ) <u>0.3</u>	6.3
Fae	1.1 ( * )	1.3 ( * )	1.8 ( * ) <u>1.3</u>	1.4
Cpct	1.1 ( * )	0.7 ( * )	0.9 ( * ) <u>1.3</u>	0.4
Fas	1.4 ( * )	1.1 ( * )	1.5 ( * ) <u>1.4</u>	0.8
<b>Others</b>				
Pls	1.1 ( * )	3.6 (7.1)	0.8 ( * ) <u>0.2</u>	5.0
Annexin A2	1.4 ( * )	5.5 (18,3)	2.5 ( * ) <u>0.5</u>	8.2

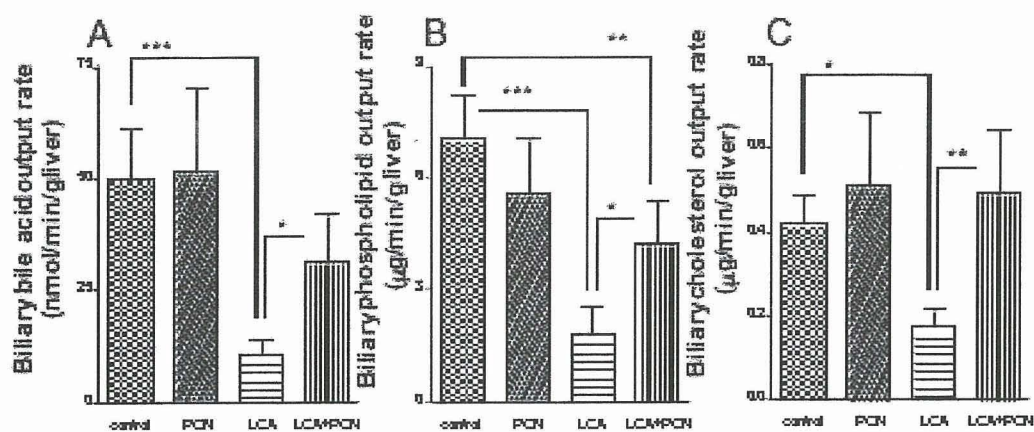
Data represent fold change relative to control group. Fold changes relative to 0.6% LCA group are underscored. Microarray data are given in parentheses. \*, no significant difference.



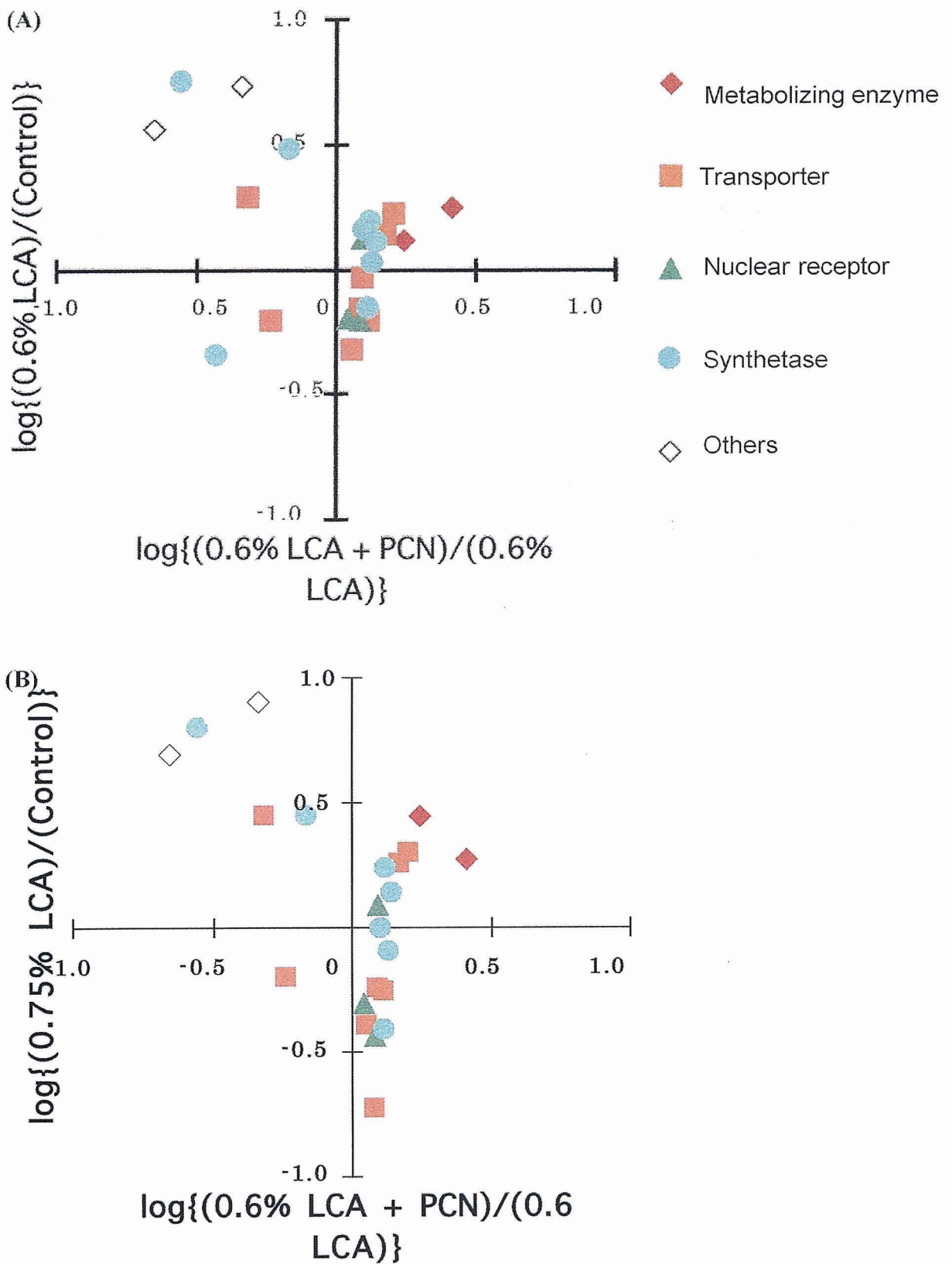
**Fig. 1** Serum ALT (A) and ALP (B) activity. C57BL/6 female mice fed a control diet or the diet supplemented with 0.6% lithocholic acid for 9 days and cotreated with PCN (100 mg/kg) or corn oil for last 4 days. Data are shown as the mean  $\pm$  SD. (n=5-8). (\*\*\*)  $p < 0.001$



**Fig. 2** Changes in hepatic phospholipids, triglyceride, free fatty acid and cholesterol concentrations. C57BL/6 female mice fed a control diet or the diet supplemented with 0.6% lithocholic acid for 9 days and cotreated with PCN (100 mg/kg) or corn oil for last 4 days. Data are shown as the mean  $\pm$  SD. (n=5-8). (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ )



**Fig. 3** Changes in biliary bile acid (A), phospholipid (B) and cholesterol (C) output rate. C57BL/6 female mice fed a control diet or the diet supplemented with 0.6% lithocholic acid for 9 days and cotreated with PCN (100 mg/kg) or corn oil for last 4 days. Data are shown as the mean  $\pm$  SD. (n=5-8). (\*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\* p<0.001)



**Fig. 4** Expression profiles of lipid-related genes.  
 (A) Plots of  $\log\{(0.6\% \text{LCA} + \text{PCN})/(0.6\% \text{LCA})\}$  vs  $\log\{(0.6\% \text{LCA})/(\text{Control})\}$ .  
 (B) Plots of  $\log\{(0.6\% \text{LCA} + \text{PCN})/(0.6\% \text{LCA})\}$  vs  $\log\{(0.75\% \text{LCA})/(\text{Control})\}$ .

厚生労働科学研究費補助金（トキシコゲノミクス研究事業）

「非侵襲資料を用いた新規高感度安全性予測系の開発」

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製と機序解明

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薬物性肝障害の機序を解明するためには、実験動物モデルの作製と共に、ヒトにおける薬物の代謝を解析して実験動物との差異を明らかにする必要がある。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、ヒトにおける flutamide の代謝を解析した。ヒト肝臓マイクロゾームを用いた解析により flutamide の主要代謝物が 2-hydroxyflutamide (OH-flutamide) と 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (FLU-1) であることが明らかとなった。さらにラット初代培養肝細胞で顕著な細胞毒性が認められ、肝障害の誘発に関与すると考えられる FLU-1-N-OH が FLU-1 から生成することが示された。低濃度 (1 $\mu$ M) の FLU-1 を基質とした時、FLU-1-N-OH の生成はヒト CYP3A4 と CYP1A2 でのみ検出され、その活性の程度は CYP3A4 で 10 倍以上高かった。またヒトマイクロゾーム中の FLU-1 の N-水酸化活性は CYP3A4 阻害剤の miconazole (10 $\mu$ M) により 50% 以下まで低下したが CYP1A 阻害剤の ellipticine (1 $\mu$ M) では低下しなかった。一方マウスにおいては  $\beta$ -naphthoflavone 処置により FLU-1 の N-水酸化活性は 5 倍以上に増加し、 $\alpha$ -naphthoflavone (20  $\mu$ M) で有意な阻害が認められた。Flutamide を服用している前立腺癌患者の尿中 flutamide 代謝物を LC/MS で解析すると FLU-1-N-OH はそのほとんどが抱合体として検出されたが、肝障害の認められた群と認められない群との間で、FLU-1-N-OH の尿中排泄に顕著な差異は認められなかった。

ヒトとマウスでは FLU-1 の N-水酸化活性を触媒する主要な酵素の分子種が異なることが示唆された。またヒトにおいて flutamide 誘発肝障害には FLU-1-N-OH 生成に加えてその他の未知な因子の関与が示唆された。

研究協力者

山添 康 東北大学大学院薬学研究科  
教授

#### 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。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。平成17年度の研究により flutamide 主代謝物 FLU-1 を用いたマウス肝障害モデルの作製に成功した。それをふまえてヒトでの flutamide 代謝を解析することによって、マウスとの比較等によりヒトで特異的に

肝障害が認められる機序を代謝の面から明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 試薬

Flutamide, 2-hydroxyflutamide (OH-flutamide), 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (FLU-1), N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]-acetamide (FLU-2), 2-amino-5-nitro-4-(trifluoromethyl)phenol (FLU-3), N-[4-amino-3-(trifluoromethyl)phenyl]-acetamide (FLU-4), 2-hydroxy-2-methyl-N-[4-amino-3-(trifluoromethyl)-phenyl]-propanamide (FLU-5) 2-methyl-N-[4-amino-3-(trifluoromethyl)-phenyl]-propanamide (FLU-6) は Schering-Plough (Bloomfield, NJ)より供与された。FLU-1N-OH、bicalutamide は日本化薬(株)で合成された。組換えヒト CYP (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4)を発現させたヒト B lymphoblastoid 細胞のマイクロゾーム画分は Gentest Corp (Woburn, MA)より取得した。ヒト肝臓のマイクロゾーム画分は (Jpn J Cancer Res 79, 1159-1167, 1988)に記載してある方法により取得した。

##### 2. ヒト肝およびヒト CYP 発現細胞の



マイクロゾームを用いた代謝

反応液 (1 ml) 中に 100 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.4), 100  $\mu$ M 基質 (flutamide, OH-flutamide, FLU-1, FLU-2) と 0.5 mg ミクロゾームタンパクを加えた。反応は NADPH (1.6  $\mu$ mol) を加えて開始し、30 分、37°C でインキュベーションした後 0.01% ascorbic acid を含む 4 ml の ethyl ether を添加して反応を停止した。Bicalutamide (1  $\mu$ g) を内部標準として加え、代謝物を抽出した後 ammonium-acetate buffer (25 mM, pH 5)/methanol (50/50) に溶解して LC/MS で解析した。阻害実験は carboxylesterase、CYP1A1/1A2、CYP3A4 の阻害剤として、各々 bis-(p-nitrophenyl)phosphoric acid (BNPP) (500  $\mu$ M)、ellipticine (1  $\mu$ M)、miconazole (10  $\mu$ M) を用いた。ヒト CYP 発現細胞のマイクロゾームを用いた時には 1 mg タンパクを反応系に加え、120 分反応させた。

3. マウス肝マイクロゾームを用いた代謝

反応液の組成は、基質濃度を 200  $\mu$ M とし、0.5 mg ミクロゾームタンパクで 37°C、30 分間反応させた。

4. 患者の尿採取

少なくとも 12 週間 flutamide と LH-RH agonist の併用療法を受けた患者 29 人から尿を採取した。1 日 3 回 125 mg の

flutamide を経口で服用して、朝の服用の 3 時間後に尿を採取した。本研究は両病院の倫理委員会の承認を得て、全ての患者からインフォームドコンセントを得て実施された。

5. 尿中代謝物の解析

尿サンプル (0.5 ml) に 1  $\mu$ g の bicalutamide を内部標準物質として加え、1 ml の 0.2 M acetic acid を加えた後 SEP-PAK C18 カートリッジに吸着させ水で洗浄後 ethanol で溶出した。Ethanol を除去した後、methanol/ammonium-acetate buffer (25 mM, pH 5) (1/1) に溶解させて LC/MS 解析を行った。尿中 flutamide とその代謝物の抱合型を定量するために、尿サンプルに  $\beta$ -glucuronidase と sulfatase を加えて 37°C で 20 h 反応させた後、LC/MS 解析した。

6. LC/MS による解析

LC/MS システムは GULLIVER SERIES PU-980 (Jasco International), PLATFORM (Micromass,) と CAPCELL PAK C<sub>18</sub> SG-120 column (4.6 × 150 mm, 5  $\mu$ m, Shiseido) から構成された。Methanol と ammonium-acetate buffer (25 mM, pH 5) のグラジエントにより代謝物を分離した。以下の条件で MS スペクトルを採取した。

Ion mode: negative ion mode

Cone voltage: 50 V

Source heater: 180°C

Capillary voltage: 3.5 KV

[M-H]<sup>+</sup> ions, flutamide (m/z 275), OH-flutamide (m/z 291), FLU-1 (m/z 205), FLU-2 (m/z 247), FLU-3 (m/z 221), FLU-4 (m/z 217), FLU-5 (m/z 261), FLU-6 (m/z 245), FLU-N-OH (m/z 291), OH-FLU-N-OH (m/z 307), FLU-1-N-OH (m/z 221), FLU-2-N-OH (m/z 263)。

## 7. 統計処理

データは平均と標準偏差で表示した。2群間の比較はtテストで実施した。

## C. 研究結果

### 1. ヒト肝マイクロゾームによる代謝

これまでに同定されている flutamide の代謝経路と代謝物の構造を Fig. 1 に示した。FLU-1-N-OH 体はラットの初代培養肝細胞に細胞毒性を誘発させることが我々の実験で示されているが、実際にヒトの肝で FLU-1-N-OH が生成されるかどうか、ヒト肝マイクロゾームを用いて検討した。FLU-1 とヒト肝マイクロゾームを反応させた後、抗酸化剤の存在下で代謝物を抽出すると、FLU-3 に加えて新たな m/z 221 を示す代謝物が検出された。その代謝物のリテンションタイムは合成された FLU-1-N-OH と一致した (Fig. 2)。さらにこの新たに検出された代謝物のスペクトルは合成された FLU-1-N-OH と一致した。次に10個体のヒト肝マイクロゾームを用い

て FLU-1-N-OH 体が生成するか検討した。10個体のうち7個体で FLU-1-N-OH 体が検出された (Fig. 3C)。FLU-1 から FLU-1-N-OH 体への代謝速度は 0.1 nmol/mg/min 以下で FLU-3 生成速度より低かった。さらに flutamide, OH-flutamide, FLU-2 を基質にしてそれらの N-水酸化体が検出されるか検討したが対応する N-水酸化体の生成は検出出来なかった (Fig 3A, B, D)。Flutamide は OH-flutamide と FLU-1 さらに少量だが FLU-3 にも変換された。OH-flutamide は FLU-1 に FLU-2 は FLU-1 と少量だが FLU-3 に代謝された。

### 2. 阻害剤を用いた検討

FLU-1-N-OH は flutamide から FLU-1 を経由して主に生成されると考えられるがこの代謝経路に関与する代謝酵素について解析するため、NADPH 依存性や carboxylesterase、CYP1A 及び CYP3A4、の阻害剤である各々 BNPP (500 μM), ellipticine (1 μM) 及び miconazole (10 μM) の添加効果を検討した (Table 1)。NADPH を反応系から取り除くと flutamide から OH-flutamide あるいは FLU-1 から FLU-1-N-OH, FLU-3 への代謝が阻害されたが、flutamide から FLU-1 への代謝は阻害されなかった。一方、BNPP の添加は flutamide から FLU-1 への代謝を完全に阻害し、この反応が carboxylesterase により行われていることが示唆された。また

ellipticine の添加は flutamide から OH-flutamide への代謝を約 70%阻害したが FLU-1 からの FLU-1-N-OH, FLU-3 への代謝は阻害しなかった。Miconazole の添加は flutamide から OH-flutamide への代謝を阻害しなかったが、FLU-1 から FLU-1-N-OH 生成を 53%、FLU-3 の生成を 19%阻害した。

### 3. ヒト組み換え酵素を用いた検討

Flutamide 代謝に関与するヒト CYP 分子種を同定するため、ヒト組み換え酵素発現細胞マイクロゾームを用いて解析した。組み換え酵素としては CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 と CYP3A4 を用いた。各々 flutamide から OH-flutamide (Fig. 4), FLU-1 から FLU-1-N-OH (Fig. 5), FLU-1 から FLU-3 (Fig. 6)への代謝について検討した。どの代謝についても基質濃度を 1  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で検討した。活性値はそのままの値と肝臓中でのその CYP の寄与率を考慮するためヒトの肝臓中での全 CYP 含量に対するその CYP が占める割合を掛けた値でも示した。ヒト肝臓中での CYP 含量は (Shimada et al. J Pharmacol Exp Ther 270, 414-423, 1994)のデータを用いた。Flutamide から OH-flutamide への代謝は CYP1A2 で最も高い活性を示した。基質濃度 1  $\mu\text{M}$  において CYP1A1, CYP2C9 と CYP2C19 は

CYP1A2 の各々 1/4, 1/6, 1/20 の活性を示した。基質濃度 100  $\mu\text{M}$  においては CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19 と CYP3A4 は CYP1A2 の各々 1/10, 1/4, 1/20, 1/20 の活性を示した (Fig. 4)。FLU-1 から FLU-1-N-OH への代謝は基質濃度 1  $\mu\text{M}$  では CYP3A4 と CYP1A2 のみで認められ、CYP3A4 が CYP1A2 に比べて約 10 倍高かった (Fig. 5)。基質濃度 100  $\mu\text{M}$  ではその他に CYP2C9, CYP2A6 でも活性が認められ、CYP3A4 と CYP2C9 が同程度寄与することが明らかとなった。FLU-1 から FLU-3 への代謝は基質濃度 1  $\mu\text{M}$  において CYP3A4 で最も高く CYP2A6 さらに CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 でも認められた。基質濃度 100  $\mu\text{M}$  でも同様に CYP3A4 で高い活性が認められた (Fig. 6)。

### 4. ヒト尿サンプル中の代謝物の解析

前立腺癌患者で flutamide 服用患者の尿を採取して flutamide 代謝物を解析した。肝障害の認められない 25 人と肝障害の認められる 4 人の尿中に FLU-1-N-OH が検出された (Fig. 7)。それ以外の N-水酸化体は認められなかった。ほとんどの FLU-1-N-OH 体は抱合型で検出された。血漿中には FLU-1-N-OH 体は検出されなかった (1 nM 以下)。肝障害の認められた群と認められない群間で FLU-1-N-OH 体さらにその他の flutamide 代謝物の間に有意な量的差異は認められなかった。尿中に

は OH-flutamide より FLU-3 が主代謝物として認められた。その他 FLU-1, FLU-4, FLU-5 と FLU-6 が検出されたが、FLU-2 は検出されなかった。

#### 5. マウス肝臓マイクロゾームでの検討

マウスにおける FLU-1 から FLU-1-N-OH 体を生成する酵素を解析するため誘導剤 ( $\beta$ -naphthoflavone, pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile) 処理による Cyp 含量の変動と活性の変動を解析した。CYP1A1 及び CYP1A2 の誘導剤である  $\beta$ -naphthoflavone 処理により FLU-1-N-OH 体の生成が 5 倍増加した (Fig. 8)。またこのマイクロゾームを用い CYP1A の阻害剤である a-naphthoflavon (50  $\mu$ M) の添加で約 60% の活性が阻害された。また Cyp3a の誘導剤である pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN) を FLU-1 と併用処理したマイクロゾームでは Cyp3a の顕著な誘導が認められたが、FLU-1 の N-水酸化活性の有意な増加は認められなかった (Fig. 9)。

#### D. 考察

FLU-1-N-OH 体はラット初代培養肝細胞に強い細胞毒性を誘起し、またグルタチオンに対して強い反応性を示す。よってヒトにおける flutamide の肝障害に関連する代謝中間体だと考えられている。そこで今回ヒトの肝臓のマイクロゾームあるい

はヒト組み換え CYP タンパクを用いて FLU-1-N-OH 体が生成するか検討した結果、ヒト肝臓マイクロゾームにより FLU-1-N-OH 体が生成することが示唆された。さらにヒト組み換え CYP 発現系を用いた解析により CYP3A4 が FLU-1 から FLU-1-N-OH 体を生成する主要な CYP 分子種であることが示唆された。この結果は CYP3A4 阻害剤である miconazole を用いた実験によっても支持された。Fig. 10 に本研究により同定されたヒトにおける flutamide の主要代謝経路とその代謝に関与する薬物代謝酵素を示した。Flutamide は CYP1A2 により OH-flutamide に代謝される。この経路は解毒経路と考えられている。実際 Cyp1a2 欠損マウスでは野生型マウスで障害が認められないにも関わらず、肝障害が認められている。FLU-1 は OH-flutamide から生成するが、flutamide から carboxylesterase により代謝されて主に生成されると考えられた。FLU-1 は主に CYP3A4 により FLU-1-N-OH 体や FLU-3 に代謝される。ヒトにおいては CYP1A2 が解毒に、CYP3A4 が代謝活性化に関与すると考えられた。一方、マウスにおいてはむしろ FLU-1-N-OH 体の生成は CYP1A が中心に担っていると考えられ、ヒトとマウスの間で代謝活性化酵素に種差が存在することが示唆された。前立腺癌患者の尿中代謝物の解析では肝障害の認められた群と認められない群の