

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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 18 年度 統括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 19 (2007) 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 ----- I

II. 分担研究報告

1. γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによる薬物誘導性
肝障害試験系の構築

横井 毅 ----- 1

2. CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた細胞障害モデル

横井 毅 ----- 39

3. CYP3A4 の代謝的活性化による細胞障害性に関する研究

横井 毅 ----- 55

4. 肝障害による肝細胞変化が薬物排泄能におよぼす影響

中島 美紀 ----- 73

5. MicroRNA によるヒト CYP1B1 の発現制御

中島 美紀 ----- 93

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 103

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 104

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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 18 年度 統括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 19 (2007) 年 4 月

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）

研究要旨

医薬品開発研究において、候補化合物が医薬品として認可されるまで10～15年の年月と200～250億円の研究費を要すると言われている。前臨床の薬効試験、安全性試験、薬物代謝試験などの多くの試験は、マウスやラットなどのげっ歯類やイヌやサルを用いて行われている。化学物質の多くは肝臓で代謝・解毒されるが、げっ歯類とヒトでは、代謝活性に大きな種差があることが知られている。臨床試験の段階で開発中止となる候補化合物は60%に達し、その原因の約80%は種差に起因するものであると言われている。とりわけ動物実験では予測できない薬物誘導性の肝障害が大きな問題となっている。平成18年度における本研究では、薬物誘導性肝障害の予測試験において、種差を克服する試験系の開発研究およびヒト特異的に発症する薬物誘導性肝障害の機構解明について、以下の5つの研究課題について報告する。

(1) GSH合成の律速酵素である γ -GCSを構成し、ノックアウトにおいて胎生致死を示し、かつ活性部位であるGCS_hに注目した。アデノウイルスベクターを用いてRNAiにより、GSHの合成をノックダウンすることに成功した。これにより、*in vitro* および*in vivo*でGSH合成を阻害し、GSH量およびGST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、GSH抱合およびGSHによって解毒される薬物の毒性発現のメカニズムの解明および、薬の活性代謝物による肝毒性を高感度に検出する系を確立でき、特許出願を行った。

(2) ヒト肝で最も多く発現している薬物代謝酵素、CYP3A4に焦点を当て、アデノウイルスを用い、ラット肝癌由来H4IIE細胞に発現させた。その結果、CYP3A4によるテストステロン6 β 水酸化酵素活性、ならびにCYP3A4 mRNAの発現を認めることができた。また、CYP3A4により生じるトログリタゾンの活性代謝物の毒性が、細胞内グルタチオン含量の減少で増強されることを、AdGCS_h-shRNAと共に感染させた系で示すことができた。今後、*in vivo*への応用を試みる予定である。

(3) ヒト肝癌由来の HepG2 細胞と CYP3A4 発現系ミクロソームを用いて CYP3A4 による代謝的活性化を検討する *in vitro* 評価系の構築をした。その結果 CYP3A4 により代謝的活性化されるトログリタゾンについて CYP3A4 存在下で細胞障害性の増強が認められた。構築した *in vitro* 評価系を用いて肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行った。ベンズブロマロン、エチゾラム、フルニトラゼパム、フルタミド、モンテルカストおよびチクロピジンは CYP3A4 による細胞障害の増強が認められた。その中で肝障害について緊急安全性情報が配布されているベンズブロマロンおよびチクロピジンは、医薬品・医療機器等安全性情報が配布されているフルニトラゼパムについてさらに詳細に検討を行ったところ、CYP3A4 による代謝的活性化の可能性が示された。今後の課題として、活性代謝物の検出や同定が望まれる。さらに、活性代謝物による細胞障害メカニズムを明らかにすることにより、薬物性肝障害のより正確な予測が可能と考えられる。

(4) 本研究では肝障害による肝細胞の変化による薬物排泄能への影響を明らかにすることを目的とし、四塩化炭素誘導性肝障害ラットについて、尿糞中薬物排泄率および肝トランスポーターの発現変動を検討した。ラットにおいて、ほとんど代謝反応の影響を受けず、主に胆汁中に排泄される薬物であるセフメタゾール (CMZ) を用いて検討し、四塩化炭素誘導性肝障害ラットにおいては、生化学的肝障害マーカーである AST や ALT 値の上昇に伴い、CMZ の尿中排泄率の増加および糞中排泄率の低下が認められた。AST 値 > 600 IU/L および ALT 値 > 200 IU/L を示したラットでは、CMZ は主に尿中に排泄された。すなわち、CMZ の尿中および糞中排泄率は、血清中 AST および ALT 値に依存して変化することを明らかにした。また、DNA マイクロアレイの結果より、肝障害時の糞中排泄から尿中排泄への変化に、肝トランスポーターの発現変動が関与している可能性を示した。薬物排泄は、薬物の体内動態を明らかにするうえで大変重要である。薬物を効果的かつ安全に使用するために、薬物のヒトにおける排泄経路や、病態時の薬物排泄能を正しく評価することが必要である。本研究結果は、病態時を考慮した医薬品適正使用および医薬品開発に対して有用な情報を提供できたと考えられる。

(5) マイクロ RNA と毒性の関わりを検討を開始した。薬物代謝酵素である CYP1 ファミリーの一分子種である CYP1B1 は肝臓にはほとんど発現せず、主に卵巣、子宮、乳腺などステロイド関連組織に発現している。CYP1B1 は様々な癌原物質の代謝的活性化およびエストロゲンの 4 位水酸化反応を触媒し、生成し

た代謝物は DNA に結合することから発癌と関連している。正常部位に比べ腫瘍部位で CYP1B1 が高く発現していることが知られている。CYP1B1 は腫瘍組織においてタンパクレベルでの過剰発現が認められるが、mRNA レベルでは大きく変化しないことが報告されていることから何らかの転写後調節を受けていることが考えられる。そこで本研究ではヒト CYP1B1 遺伝子の発現がマイクロ RNA (miRNA) によって制御されているか検討した結果、CYP1B1 は miR-27b によって転写後調節をされていることを見出した。miR-27b を競合的に抑制すると、CYP1B1 タンパク量は、細胞レベルで約 2 倍に増加した。さらに、miR-27b は乳腺組織に高く発現していることから、乳癌患者 24 名の組織について検討した結果、CYP1B1 タンパクの発現が低い組織では miR-27b の高い発現が認められたが、CYP1B1 タンパクの発現が高い組織では miR-27b の発現量が有意に低く、逆相関が認められた。このとき CYP1B1 mRNA と miR-27b の発現量には相関関係は認められた。これより乳腺において CYP1B1 の発現が miR-27b により翻訳段階で制御されることが示唆された。本研究により、マイクロ RNA が薬物代謝酵素の転写後調節に大きな役割を果たしていることを始めて明らかにできた。今後は、ヒトですでに 400 種類を超える報告があるマイクロ RNA について薬物誘導性肝障害との関わりを明らかにする。

分担研究者

中島 美紀

金沢大学大学院医学系研究科（薬学部
兼任）

研究目的

(1) 本研究では、 γ -GCS に注目した。ノックアウトにおいて胎生致死を示す遺伝子であるが、活性部位である γ -GCS の catalytic サブユニットを、アデノウイルスベクターを用いて RNAi によりノックダウンすることにより、GSH の合成を抑制することを検討した。これにより、*in vitro* および *in vivo* で GSH 合成を阻害し、GSH 量および

GST 活性を減少させた細胞実験系、またはラットを用いたモデル動物実験系を作成し、GSH 抱合および GSH によって解毒される薬物の毒性発現のメカニズムの解明や、薬の活性代謝物による肝毒性を高感度に予測する系を確立することを目的とした。アデノウイルスによる shRNA 導入法を用いてラット肝癌由来細胞中において GSH 合成を減少させる検討を行った。そこで、アセトアミノフェンによる肝毒性を、GSH 減少モデルラットを用いて高感度に検出する試験系の構築について検討した。

(2) 本研究では、ヒトにおける活性代謝物による毒性を高感度に予測するため、ヒト肝において最も発現量が多い CYP3A4 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP3A4) を作製し、AdGCSh-shRNA と共に、ラット肝癌由来 H4IIE 細胞に感染させ、細胞内における CYP3A4 発現およびグルタチオン減少が最も効率的な *in vitro* における感染条件の検討を行った。それによりヒトでの毒性予測が可能な *in vitro* 実験系を構築すること、さらに、最終的にはグルタチオン減少および CYP3A4 発現モデルラットを作製することを最終の目的とした。

(3) 現在のところ、特異体質性肝障害のメカニズムとして代謝的活性化に注目されており、代謝的活性化を予測することが重要であると考えられる。毒性試験には実験動物が用いられるが、代謝過程においてヒトと実験動物では大きな種差が存在するため、ヒトの毒性を予測するのは困難である。一方、ヒト初代培養肝細胞を用いることでより生体に近い条件下で細胞障害性の検討を行うことは可能であるが、薬物代謝酵素活性は培養開始後、速やかに減少するため、ヒトにおける代謝的活性化を評価することは難しい。また社会的、倫理的問題を伴う。これに対し、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞では主要な CYP mRNA 発現が認め

られていない。従って、ヒトでの代謝的活性化を予測するためには、ヒト由来試料で薬物代謝酵素活性を保つ工夫が必要である。そこで本研究では、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞とヒト CYP3A4 を発現させたバキュロウイルス発現系ミクロソームを用いて、活性代謝物による細胞障害性について *in vitro* 評価系を構築することを目的とした。さらに構築した系を用いて肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにすることを目的に検討を行った。最初に、トログリタゾン をポジティブコントロールとし、HepG2 細胞を用いて薬物の代謝的活性化を検討する *in vitro* 評価系の構築を目的に検討を行った。

(4) 肝障害と薬物排泄の関係に注目し、ラットにおいて未変化体で主に胆汁排泄され、さらに代謝を受けない CMZ を指標薬物として、薬物排泄に及ぼす肝障害の影響を明らかにすることを目的とした。四塩化炭素を投与した肝障害モデルラットを用いて、肝障害による尿糞中排泄率の変動および血清中薬物濃度の変化を検討した。さらに、DNA マイクロアレイを用いて肝トランスポーターの網羅的発現変動解析を行った。

(5) CYP1 ファミリーの一分子種である CYP1B1 は様々な癌原物質の

代謝的活性化およびエストロゲンの4位水酸化反応を触媒し、生成した代謝物はDNAに結合することから発癌と関連している。ほとんどの組織において正常部位に比べ腫瘍部位でCYP1B1が高く発現していることも知られている。一方、microRNA (miRNA) は近年発見された翻訳されない小分子RNAであり、標的mRNAの3'非翻訳領域(3'UTR)に結合することで翻訳抑制やmRNAの分解を引き起こす。いくつかのmiRNAは腫瘍形成に関与することが報告されているが、その標的遺伝子が不明のものがほとんどである。CYP1B1は腫瘍組織においてタンパクレベルでの過剰発現が認められるが、mRNAレベルでは大きく変化しないことが報告されている。ことから何らかの転写後調節を受けていることが考えられる。そこで本研究ではヒトCYP1B1遺伝子の発現がmiRNAによって制御されているか検討し、マイクロRNAと毒性との関わりを今後幅広く研究するための第一歩とした。

研究方法

(1) AdGCSH-shRNA および AdLuc-shRNA の構築、GCSH-shRNA および Luc-shRNA の pAxcwit ベクターへの組み換え、肝癌由来細胞に対する AdGCSH-shRNA 感染、AdGCSH-shRNA 感染 H4IIE 細胞へのトログリタゾンと APAP の処理、ラッ

トへのアデノウイルスの投与、APAP 抱合活性の測定、コロニーPCRによるインサート DNA の確認方法、プラスミド DNA の大量調製、シーケンス解析、アデノウイルスベクターのトランスフェクション法、1次ウイルスの作製、2次ウイルスの作製、3次ウイルスの作製、4次ウイルスの作製、組み換えアデノウイルスの確認、アデノウイルス液の大量調製、アデノウイルス液の力価測定、ラット肝ミクロソームおよびサイトソルの調製、タンパク定量、総 GSH 含量の測定、総 P450 含量測定、AST および ALT 値測定、総ビリルビン濃度測定、GST 活性測定、SDS-PAGE と Western blot 分析などの手法を用いて研究を実施した。(詳細は分担研究報告書を参照)

(2) AdCYP3A4 の構築、CYP3A4 遺伝子の pAxCawtit ベクターへの組み換え、テストステロン 6 β 水酸化酵素活性の測定、Real-time PCR、コロニー PCR、プラスミド DNA の大量調製、シーケンス解析、AdCYP3A4 アデノウイルスのトランスフェクション法、1次ウイルスの作製、2次ウイルスの作製、3次ウイルスの作製、4次ウイルスの作製、組み換えアデノウイルスの確認、アデノウイルス液の力価測定、H4IIE 細胞へのアデノウイルスの感染、グルタチオン含量の測定、CCK アッセイなどの手法を用いて研究を実施し

た。(詳細は分担研究報告書を参照)

(3) ヒト肝癌由来 HepG2 細胞の培養、細胞生存率の測定法、肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討などの手法を用いて研究を実施した。(詳細は分担研究報告書を参照)

(4) 肝障害ラット作製、肝障害ラットにおける CMZ 排泄試験、HPLC による CMZ 定量、DNA マイクロアレイによる肝トランスポーター遺伝子の発現解析、RT-PCR 法による肝トランスポーター mRNA 発現量の定量などの研究を実施した。(詳細は分担研究報告書を参照)

(5) miR-27b による影響を評価するため、pGL3-promoter のルシフェラーゼ遺伝子下流に miR-27b と完全に相補的な配列を組み込んだプラスミドを構築した (pGL3/miR-27b)。また CYP1B1 3'UTR の miR-27b と相同性の高い配列 MRE27b を 3 つおよび 6 つ直列に連結した配列を構築した。これらのプラスミドを phRL-TK とともに、Tfx-20 を用いて MCF-7 細胞に、lipofectamine 2000 を用いて Jurkat 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。miR-27b を阻害するアンチセンスオリゴボヌクレオチド (AsO) の MCF-7 細胞へ導入した。マイクロソーム画分を用いて SDS-PAGE を行い、ウサギ抗ヒト CYP1B1 抗体およびビオチ

ン化抗ウサギ IgG と反応させた後、CYP1B1 タンパク質の発現量を解析した。また CYP1B1 の酵素活性を測定した。日本人の乳癌患者 24 名より手術で摘出された乳癌組織および周辺の正常組織を用いて miR-27b の定量および CYP1B1 の免疫組織染色を行い、CYP1B1 タンパク質の発現量を評価した。(詳細は分担研究報告書を参照)

(倫理面等への配慮)

本アデノウイルスを用いた全ての実験は、遺伝子組換え実験安全委員会による金大 6 第 724 号の承認を受けて行った。本検討における動物実験は、全て金沢大学動物実験指針に従って行った。また、ヒト由来試料の使用については、全て試薬会社から市販で入手できるものであり、かつ倫理委員会の申請対象とならないものであることを確認済である。

研究結果

(1) GCSh をノックダウンするショートヘアピン RNA 配列を組み込んだアデノウイルス (AdGCSh-shRNA) を構築し、ラット、マウスおよびヒト肝癌由来細胞を用いて、ノックダウン効果および薬物暴露の検討を行った。次に、8 週齢の雄性 F344 ラットに AdGCSh-shRNA を投与し、アセトアミノフェン (APAP) による肝障害への影響を検討した。その結果、dGCSh-shRNA 感染によって、

ラットおよびマウス由来細胞においては GCSH mRNA が約 80%減少した。一方、細胞内総 GSH 含量の減少はラット由来 H4IIE 細胞で約 50%の減少が認められ。次に、H4IIE 細胞に対してアデノウイルス感染を行い、mRNA は感染後 3 日目において MOI 20 感染で、最大 85%の減少が認められ、GCSH タンパク質は 3 日目で 75%の発現量の減少が認められた。細胞内総 GSH 含量は MOI 20 感染では 42%の減少が認められた。さらに、AdGCSH-shRNA を感染させた H4IIE 細胞に対して APA を処理し、細胞生存率を対照群と比較検討した。結果として、AdGCSH-shRNA 感染群は、対照群と比べ細胞生存率に有意な差は認められなかった。次に、AdGCSH-shRNA をラット in vivo 投与で検討した。GCSH mRNA は対照群と比べ 8×10^{11} PFU/mL/body 投与では最大で 95%減少し、投与量依存的な mRNA の減少が認められた。mRNA の減少と同様に、AdGCSH-shRNA 投与量依存的に肝総 GSH 含量は減少し、最大で約 80%減少した。GSH 減少ラットに対して APAP を 1,000 mg/kg 単回経口投与したところ、投与 24 時間後において、AST および ALT 値が対照群に比べ有意に上昇した。さらに、肝組織像からは中心静脈周囲の肝細胞壊死が確認できた。さらに、今回作成した GSH 減少ラットは、約 80%の総 GSH 含量の減少が認められてから、2 週間の間（投与後 4 週目まで）、ラッ

ト肝総 GSH 含量の 70%の減少を保ち、3 週間の間（投与後 5 週目まで）50%の減少を保っていた。

(2) 作成した AdCYP3A4 のウイルス力価は、AdGCSH-shRNA と比較して約 10 倍低いという結果となった。AdCYP3A4 の MOI 依存的テストステロン 6 β 水酸化酵素活性の変動を測定し、MOI 10, 20, 40 で顕著なテストステロン 6 β 水酸化酵素活性の上昇が見られた。AdCYP3A4 を MOI 10 で感染させた。感染後 1, 2, 3, 5 日目に 100 μ M テストステロンを処置後、細胞培養液を抽出しテストステロン 6 β 水酸化酵素活性を測定した。その結果、感染 3 日目において最も高いテストステロン 6 β 水酸化酵素活性が認められた。感染 5 日目においては、細胞の状態が悪くなっていたため、活性値は減少したと考えられる。トログリタゾン暴露による細胞障害性の変化を測定した結果、コントロールと AdCYP3A4 感染において、トログリタゾン濃度依存的な細胞生存率の低下を示し、それに対し AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA の同時感染群は、トログリタゾン 50 μ M において、コントロール群および AdCYP3A4 感染群と比べ、約 25%の有意な細胞生存率の低下を示した。

(3) トログリタゾンの細胞障害性及び薬物処置時間の影響について

は、ATP および CCK 測定法ともにトログリタゾン 50 μM 以下では 24 時間処置と比べて 48 時間処置は細胞生存率が低値を示した。特に、トログリタゾン 50 μM では 24 時間処置と比べて 48 時間処置において ATP 測定法で 25.6%、CCK 測定法で 22.8%細胞生存率は低値を示した。トログリタゾンの細胞障害性に及ぼす CYP3A4 の影響については、ATP 測定法ではトログリタゾン 25、50 および 75 μM で CYP3A4 により細胞生存率は有意に低下した。50 μM において最も細胞生存率の差異が大きく 60.2%であった。CYP3A4 によるトログリタゾンの細胞障害性に及ぼす NADPH の影響については、CYP3A4 発現系ミクロソーム存在下で NADPH 添加により細胞生存率は低下し、細胞生存率の差異がトログリタゾン 50 μM 処置で 39.2%と最大を示した。これまでに肝障害が報告されている薬物を用いて CYP3A4 による代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。ATP 測定法で測定した 2 点の濃度ともに +20%以上を示した被験薬はフルニトラゼパムであった。また、CCK 測定法ではアマンタジンであった。ATP および CCK 測定法ともに、測定した 2 点の濃度いずれかで +20%以上を示した被験薬はフルニトラゼパム、モンテルカスト、チクロピジンであった。ATP もしくは CCK 測定法で測定した 2 点の濃度いずれかで

+20%以上を示した被験薬はアマンタジン、アミオダロン、ベンズブロマロン、エチゾラム、ケトチフェン、スリダク、トレミフェン、トリアゾラム、ワルファリン、ザフィルルカストであった。

(4) 四塩化炭素の連続投与により、様々な AST、ALT 値を示す肝障害ラットが得られた。正常ラット (AST 値 < 50 IU/L、ALT 値 < 25 IU/L) においては、CMZ は回収量の 72%が糞中に、28%が尿中に排泄された。しかし、AST や ALT 値の上昇に伴い、CMZ の尿中排泄率の増加および糞中排泄率の低下が認められた。特に、AST 値 50 - 600 IU/L および ALT 値 25 - 200 IU/L の範囲において、CMZ 排泄率が大きく変化した。AST 値 > 600 IU/L および ALT 値 > 200 IU/L を示した重度の肝障害群では、CMZ は主に尿中 (92%) に排泄された。また、四塩化炭素を 14 日間休薬し、AST や ALT 値が正常に戻った休薬群では、重度の肝障害群と比較して、CMZ 尿中排泄率が低下、糞中排泄率が増加し、正常ラットの排泄率に戻る傾向が示された。重度の肝障害群では、CMZ の AUC が正常ラットの約 2 倍であり、有意に高値を示した。DNA マイクロアレイによる肝トランスポーターの発現変動解析の結果、四塩化炭素誘導性肝障害ラットにおいて、血管側 SLC トランスポーター遺伝子の発現低下お

よび血管側 ABC トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。また、Mdr1 を除いた胆管側の ABC トランスポーターは低下する傾向が認められた。CMZ は、ヒトでは尿中に、マウスでは糞中に主に排泄される。コントロールとして用いた uPA(-/-)SCID マウスでは投与量の 60%が糞中に排泄された。

(5) CYP1B1 mRNAs の構造と miR-27b 認識配列について ; 全長 5.2 kb のヒト CYP1B1 mRNA は 3' 非翻訳領域末端 40 b 程度の領域に高い相同性が認められ、この領域が miR-27b と相補的であることを見出した。miR-27b の発現量とルシフェラーゼアッセイによる MRE27b の機能評価について ; MCF-7 細胞に発現している miR-27b の機能を阻害するため miR-27b に対するアンチセンスオリゴボヌクレオチド (AsO) を導入したところ、内因性の miR-27b により抑制されていた活性の回復が認められた。一方、miR-27b の発現が低い Jurkat 細胞では内因性の miR-27b による影響が認められず、precursor miR-27b の導入により MRE27b を組み込んだプラスミドにおいて顕著な活性の低下が認められた。miR-27b の阻害による内因性 CYP1B1 タンパク発現への影響について ; MCF-7 細胞に内因性に発現する CYP1B1 が miR-27b により制御されているか検

討した。miR-27b に対する AsO を導入したところ miR-27b の発現の低下を認め、一方で CYP1B1 タンパク発現量の増大が認められた。また、酵素活性も AsO の濃度および時間依存的に上昇することを明らかにした。乳腺組織における miR-27b の発現量と CYP1B1 タンパクの発現量の関連について ; 乳癌患者 24 人より提供戴いた乳癌組織および近接する正常組織を用いて CYP1B1 および miR-27b の発現量の関連について評価した。その結果、24 検体すべての乳癌組織において CYP1B1 抗体により癌の部位で細胞質が染色され、CYP1B1 タンパクの発現が認められた。次に正常組織および腫瘍組織における miR-27b の発現量の評価を行った (Fig. 4E)。Real-time RT-PCR により評価した precursor miR-27b の発現量は、正常組織に比べて腫瘍組織で有意に低いことを明らかにした。これより乳腺において CYP1B1 の発現が miR-27b により翻訳段階で制御されることが示唆された

考察

(1) アデノウイルスを用いたラット *in vivo* におけるノックダウン技術の確立は本研究が始めてであり、ノックアウトの作成が困難であるラットにおいて簡便な遺伝子発現調節技術を提唱することができた。種差に起因する薬物誘導性肝障害は、新薬開発におい

て大きな障害となり、その予測は非常に重要である。本研究では GSH 減少モデルラットを用いた肝毒性評価の検討から、肝毒性予測の可能性を検討したものである。本研究で構築した新しいモデルにおいて、さらに詳細な検討をすることで、GSH 減少モデルラットが新薬開発における、薬物誘導性肝障害を起こす化合物の前臨床段階におけるスクリーニングの有効な手段になることを期待する。

(2) ヒト肝で多く発現している CYP3A4 に焦点を当て、肝で特異的に発現するアデノウイルスを用い、ラット肝癌由来 H4IIE 細胞に発現させた。その結果、CYP3A4 によるテストステロン 6 β 水酸化酵素活性、ならびに CYP3A4 mRNA の発現を認めることができた。また、CYP3A4 により生じるトログリタゾンの活性代謝物の毒性が、細胞内グルタチオン含量の減少で増強されるかどうか見るため、AdGCSh-shRNA と共に感染させた。2 種類のウイルスを同時感染させ、各ウイルスの活性が個別に現れることを確認できた。薬物の毒性評価を行うためには、性質が異なるウイルスの表現型が、互いに相殺し合うことなく目的の実験系に反映されることが求められる。今後、そのような障害を解決する方法が見出され、*in vitro* においても *in vivo* においても安定した毒性予測実

験系が再現されることが期待される。

(3) 近年、薬物性肝障害が大きな問題となっているが、メカニズムとして代謝的活性化が注目されている。薬物代謝を担う重要な酵素である CYP は、ヒト初代培養肝細胞やヒト肝がん由来細胞で極めて発現量が低い。そのため、代謝的活性化を予測することは極めて難しい。本研究ではヒトにおける代謝的活性化を予測することを目的に検討を行った。最初に、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞と CYP3A4 発現系ミクロソームを用いて CYP3A4 による代謝的活性化を検討する *in vitro* 評価系の構築をした。その結果 CYP3A4 により代謝的活性化されるトログリタゾンについて CYP3A4 存在下で細胞障害性の増強が認められた。構築した *in vitro* 評価系を用いて肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行った。ベンズブロマロン、エチゾラム、フルニトラゼパム、フルタミド、モンテルカストおよびチクロピジンは CYP3A4 による細胞障害の増強が認められた。その中で肝障害について緊急安全性情報が配布されているベンズブロマロンおよびチクロピジン、医薬品・医療機器等安全性情報が配布されているフルニトラゼパムについてさらに詳細に検討を行ったところ、CYP3A4 による代謝的活性化の可能性が示された。本研究では、複数

の肝障害性薬物について CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。今後の課題として、活性代謝物の検出や同定が望まれる。さらに、活性代謝物による細胞障害メカニズムを明らかにすることにより、薬物性肝障害のより正確な予測が可能と考えられる。これより、薬物性肝障害を予測する際に有用な情報を提供できたと考えられる。

(4) 四塩化炭素の連続投与による肝障害ラットと正常ラットの間で、血清中クレアチニン濃度に有意な差は認められなかったことから、四塩化炭素による腎障害は起きなかったと考えられた。正常ラット (AST 値 < 50 IU/L、ALT 値 < 25 IU/L) においては、CMZ は回収量の 72% が糞中に、28% が尿中に排泄された。しかし、AST や ALT 値の上昇に伴い、CMZ の尿中排泄率の増加および糞中排泄率の低下が認められた。ALT 値の増加と薬物排泄能の変動に強い相関が認められることを明らかにした。DNA マイクロアレイによる肝トランスポーターの発現変動解析の結果より、肝障害時の尿中排泄の増加は、血管からの取り込みの低下、血管への排泄の増加、および胆管への排泄低下によって引き起こされる可能性が示された。

(5) 本研究により CYP1B1 の発現に

は転写調節に加えて、miR-27b による転写後調節も関与することが明らかとなった。miR-27b は乳腺において高く発現している。miR-27b の発現を制御する因子は明らかにされていないが、いくつかの miRNA の発現は腫瘍の発達とともに変化することが知られている。CYP1B1 は腫瘍組織において高い発現が認められていることから、miR-27b の発現の低下が関与していることが示唆される。検討に用いた乳癌組織はすべて ER 陽性かつ progesterone receptor 陽性であった。また miR-27b および CYP1B1 の発現量と病理学的特徴、病期およびリンパ節転位との関連は認められなかった。乳癌において過剰発現した CYP1B1 は 17 β -エストラジオールの代謝を上昇させることが考えられる。17 β -エストラジオールはエストロゲン依存的な腫瘍の発達を促進する一方で、CYP1B1 により生成する代謝物である 4-水酸化エストラジオールは DNA 損傷を引き起こすことから、ホルモンが関与する毒性に関与することが示唆された。

結論

本研究では、AdGCSH-shRNA によりラット γ -GCS 遺伝子をノックダウンすることに成功した。さらに、作成した GSH 減少ラットにおいて APAP 投与による肝障害が顕著に増強されたことから、ノックダウンによる GSH 減少ラットは

薬物誘導性肝障害を高感度に検出する有用な手段となると考えられ、創薬の前臨床安全性試験における新しい動物モデルとして期待される。今後は、この系を用いて、肝障害が報告または疑われている薬物のスクリーニングに使用できる系としての評価研究を行う。さらに、この系にCYP3Aをアデノウイルスで過剰発現させ、よりヒトに近い試験系にできるかを検討する予定である。

ヒト肝癌由来のHepG2細胞とCYP3A4発現系ミクロソームを用いてCYP3A4による代謝的活性化を検討する*in vitro*評価系の構築をした。構築した*in vitro*評価系を用いて肝障害性薬物のCYP3A4による代謝的活性化の検討を行った結果、ベンズブロマロン、エチゾラム、フルニトラゼパム、フルタミド、モンテルカストおよびチクロピジンはCYP3A4による細胞障害の増強が認められた。その中で肝障害について緊急安全性情報が配布されているベンズブロマロンおよびチクロピジンは、医薬品・医療機器等安全性情報が配布されているフルニトラゼパムについてさらに詳細に検討を行ったところ、CYP3A4による代謝的活性化の可能性が示された。今後は、この系が反応性代謝物の*in vitro*の予測試験系としての評価研究と、さらに反応性代謝物の反応機構の研究にも使用できるかについて検討する。

さらに、本研究では、四塩化炭素誘導性肝障害やマウス肝からヒト肝細胞への置換などによる肝細胞変化が薬物の排泄に影響を与えることを明らかにした。薬物を効果的かつ安全的に使用するためには、薬物排泄能を正しく評価することが必要であり、本研究は、病態時の医薬品適正使用および医薬品開発に対して有用な情報を提示できたと考えられる。

マイクロRNAの機能と役割について、毒性学的視点からのアプローチを行った。本研究はmiR-27bの発現低下が腫瘍組織におけるCYP1B1の発現上昇のひとつの要因であることを示したものであり、miRNAが薬物代謝酵素をも制御していることを初めて明らかにした。今後はマイクロRNAの毒性学的意義について広く検討を行う予定である。

健康危険情報

該当なし。

研究発表

論文発表 6件

Keiichi Minami, Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi, Simultaneous measurement of gene expression for hepatotoxicity in thioacetamide-administered rats by DNA microarrays. Mutation Research 603;

64-73, 2006.

Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Miki Katoh, Wenchao Zheng, Colin R Jefcoate, and Tsuyoshi Yokoi, Binding of steroidogenic factor-1 to the regulatory region might not be critical for transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. *Journal of Biochemistry* 139: 527-534, 2006.

Raiwan Maniratanachote, Keiichi Minami, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi, Dephosphorylation of ribosomal protein P0 in response to troglitazone-induced cytotoxicity. *Toxicology* 166: 189-199, 2006.

Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi, MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Research* 66: 9090-9098, 2006.

Yusuke Hara, Miki Nakajima, Ken-ichi Miyamoto and Tsuyoshi Yokoi, Morphine glucuronoxyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are co-administered with morphine. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 印刷中.

Rawiwan Maniratanachote and Tsuyoshi Yokoi, A mechanistic view of troglitazone hepatotoxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 印刷中.

学会発表 18件

Rawiwan Maniratanachote, Ayaka Shibata, Shuichi Kaneko, Ikuo Yamamori, Takanobu Wakasugi, Takeshi Sawazaki, Kanefusa Katoh, Shogo Tokudome, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Identification of anti-aldolase B autoantibodies in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2006.3.5-9, San Diego, USA.

高木信伍、中島美紀、土屋佑樹、加藤美紀、横井毅：ヒト CYP1B1 遺伝子の転写調節における SF-1 および PKA の関与、日本薬学会第 124 年会 2006.3.28-30 仙台

Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Ribosomal protein P0 dephosphorylation associated with troglitazone-induced cytotoxicity. The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006.5.25-27, Jeju, Korea

Yuki Tsuchiya, Shingo Takagi, Miki Nakajima, Miki Katoh, Takao Taniya,

and Tsuyoshi Yokoi. Human cytochrome P450 CYP1B1 is a target of microRNA, miR-27b. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6-18-23, Kyoto, Japan

Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Dephosphorylation of ribosomal protein P0 in response to troglitazone-induced cytotoxicity. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6-18-23, Kyoto, Japan

Keiichi Minami, Miki Nakajima, Yuto Fujiki, Miki Katoh, Frank J. Gonzalez and Tsuyoshi Yokoi. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and lipoprotein lipase via aryl hydrocarbon receptor. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6-18-23, Kyoto, Japan

南 圭一、マニラタナチョト ラウイワン、戸塚 善三郎、塩山 昇平、白谷 博忠、加藤 美紀、中島 美紀、横井 毅：チアゾリジンジオン系薬物による細胞毒性に及ぼすシャペロン蛋白質 gp96 の影響、第 33 回日本ト

キシコロジ学会 2006.7.3-5 名古屋

ラウイワン マニラタナチョト、加藤美紀、中島 美紀、横井 毅：トログリタゾン誘導性細胞傷害によるリボゾーム P0 タンパク質の脱リン酸化、第 33 回日本トキシコロジ学会 2006.7.3-5 名古屋

高木信吾、土屋佑樹、中島美紀、加藤美紀、谷屋隆雄、横井 毅：ヒト *CYP1B1* 遺伝子の発現は microRNA により制御される、日本薬学会北陸支部会 2006.7.8 金沢

奥村浩敏、加藤美紀、南 圭一、中島美紀、横井 毅：薬物排泄に及ぼす肝障害の影響、日本薬学会北陸支部会 2006.7.8. 金沢

Shingo Takagi, Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Miki Katoh, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. Human CYP1B1 is regulated by microRNA, miR-27b. 第 21 回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 シンポジウム 東京

Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation and drug induced hepatotoxicity—the troglitazone case—. 第 21 回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 シンポジウム 東京

Miki Nakajima, Masahiro Itoh, Haruko Sakai, Tatsuki Fukami, Miki Katoh, Hiroshi Yamazaki, Fred F. Kadlubar, Susumu Imaoka, Funae Yoshihiko, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation of 4-aminobiphenyl by CYP2A13 expressed in human bladder. 第21回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 東京

Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Drug-induced hepatotoxicity assay using adenovirus vector-mediated knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by short hairpin RNA. 第21回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 東京

Hirotohi Okumura, Miki Katoh, Keiichi Minami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Changes of excretory pathway of drugs by liver dysfunction. 第21回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 東京

赤井 翔、細見浩子、南 圭一、加藤美紀、中島美紀、横井 毅： γ -glutamylcysteine synthetase ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築、日本薬学会第125年会 2007.3.28-30 富山

Tsuyoshi Yokoi, Shingo Takagi, Yuki

Tsuchiya, Miki Katoh, Takao Taniya, and Miki Nakajima. Human CYP1B1 is regulated by microRNA, miR-27b. 15th International Conference on cytochrome P450. June 17-21, 2007, Bled, Slovenia.

細見浩子、赤井 翔、南 圭一、加藤美紀、中島美紀、横井 毅：グルタチオン減少および CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた薬物毒性試験系の構築、第34回日本トキシコロジー学会学術年会 2007.6.27-29 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 1件

特願：2006-320830

出願日：2006年11月27日

発明の名称：アデノウイルスベクターによるグルタチオン合成酵素ノックダウン系を用いた薬物誘導性肝障害ラットモデル

2. 実用新案登録 該当無し

3. その他 該当無し

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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 18 年度 分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 19 (2007) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築

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

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、内因性物質や薬物から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。GST 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、ヒトに比べげっ歯類で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非臨床安全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。そこで本研究では、GSH 合成の律速酵素である γ -GCS を構成する、ノックアウトにおいて胎生致死を示し、かつ活性部位である GCS_h に注目した。アデノウイルスベクターを用いて RNAi により、GSH の合成をノックダウンすることを検討した。これにより、*in vitro* および *in vivo* で GSH 合成を阻害し、GSH 量および GST 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、GSH 抱合および GSH によって解毒される薬物の毒性発現のメカニズムの解明および、薬の活性代謝物による肝毒性を高感度に検出する系を確立することを目的とした。

ラット GCS_h 遺伝子をノックダウンするアデノウイルス(AdGCS_h-shRNA) を作成した。この AdGCS_h-shRNA を用いて様々な動物種の肝癌由来細胞に感染させ、ノックダウン効率を検討し、さらにラット肝癌由来細胞である H4IIE 細胞においてアデノウイルス感染条件下で APAP およびトログリタゾン処理を行った。その結果、AdGCS_h-shRNA によるノックダウン効率には細胞株の種によって差があり、ラットおよびマウス由来細胞では mRNA レベルで約 80%、ヒト由来細胞では約 50%をノックダウンすることができた。また、GSH レベルではラット由来 H4IIE 細胞において約 50%の減少を示した。しかし、この GSH 減少条件下において、APAP およびトログリタゾン処理を行っても細胞障害性の増強は認められなかった。

次に、ラット *in vivo* において AdGCS_h-shRNA を尾静脈から投与することで、ラット肝 GSH 量を定常的に減少させる方法を確立した。この方法を用いること