

で、AdGCSH-shRNA を 2×10^{11} PFU/mL/body 尾静脈投与し、14 日目以後から少なくとも 2 週間の間、ラット肝臓中の総 GSH 含量の約 70~80% の減少状態が持続し、アデノウイルス投与自体による肝障害の影響は全く認められないことが示せた。また、肝総 GSH の減少は、BSO 摂取による GSH 減少のような日内変動は認められず、常に一定の値まで減少していた。次に、肝総 GSH 含量が約 80% 減少した GSH 減少ラットを用いて APAP 投与による薬物誘導性肝障害検討を行った。その結果、非絶食状態の対照群では 1,000 mg/kg の APAP を経口投与することで毒性が認められなかったが、AdGCSH-shRNA 投与 14 日目における肝総 GSH 含量が減少した状態では、同投与量の APAP により AST および ALT 値の顕著な上昇が認められ、肝組織像からも薬物誘導性肝障害が検出されたことが新たに示せた。

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初めてであり、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。

A. 研究目的

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 (Kola et al., 2004)。

グルタチオン (5-L-glutamyl-L-cysteinyl glycine, 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 (Reed et al., 1986; Lu et al., 1999)。グルタチオン *S*-転移酵素 (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 (Sims et al., 1965; Jackson et al., 2000)、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。GSH は γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) により、グルタミン酸とシステインから γ -グルタミルシステインが合成され、さらに glutathione synthetase (GSS) によってグリシンと γ -グルタミルシステインから合成される (Orlowski et al., 1971)。この反応の律速酵素である γ -GCS は、ヘテロダイマー酵素であり、catalytic サブユニット (heavy chain; 73 kDa) および modulatory サブユニット (light chain; 27.7 kDa) から構成されており、catalytic サブユニットは酵素活性部位として、modulatory サブユニットは GSH 蓄積による GSH 合成のフィードバック阻害を減弱させることが知られている (Huang et al., 1993)。

一方、薬物に起因する毒性発現を予測する動物試験モデルを作成する為、 γ -GCS 遺伝子をノックアウトしたマウスを作成しようと現在までに様々な試みがなされている。catalytic サブ

ユニットのノックアウトマウスは胎生致死であるが (Dalton et al., 2000)、modulatory サブユニットをノックアウトしたマウスでは、肝臓内 GSH 含量が約 80%減少したことが報告されている (Yang et al., 2002)。しかしながら、前臨床動物試験における安全性試験において用いられるのは、専らラットであることから、GSH 減少モデル動物としてはラットが望ましいと考えられる。

現在、ある特定の遺伝子がどのような影響を及ぼすかを検討する方法として、RNAi による標的遺伝子のノックダウンが簡便なものとして利用されている。RNAi は二本鎖 RNA が生体内に取り込まれた後、RNase III ファミリーに属する Dicer という酵素によって 2 塩基のオーバーハングを持つ 20 塩基程度の siRNA に分割され (Elbashir et al., 2001b)、その siRNA が RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、相補的な配列を持つ RNA を分解するという現象である (Hammond et al., 2000)。初期には RNAi は線虫 (Fire et al., 1998) やショウジョウバエ (Pal-Bhadra et al., 1997) において報告されたが、哺乳類細胞には起こらないとされてきた。哺乳類細胞への 150 塩基以上の二本鎖 RNA を導入すると、長い二本鎖 RNA に応答して活性化される RNase L によって非特

異的に RNA の分解が誘発されるため、この経路はウイルスの感染に対するインターフェロン応答の一部と考えられている (Stark et al., 1998)。しかし、Tuschl らの研究グループがあらかじめ 21 塩基の短い二本鎖 RNA として導入することで哺乳類細胞での RNAi を成功させた (Elbashir et al., 2001a)。それ以来哺乳類細胞に対する RNAi が盛んに行われるようになり、様々研究分野に応用されはじめている。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法が *in vivo* での簡便な遺伝子導入法として注目されており、遺伝子治療の分野で様々な検討がなされている (Peng et al., 2005; Chu et al., 2004; Kruyt et al., 2002)。さらに近年、生体内で siRNA として作用するショートヘアピン RNA (shRNA) を発現する配列を組み込んだアデノウイルスを用いた検討がマウスで行われ、ノックダウンを行うことによる目的遺伝子の生体での意義、薬物開発のターゲット因子の決定等の検討がされている (Xu et al., 2006)。しかし、マウスにおいては、ES 細胞系が確立しているため、目的遺伝子が胎生致死遺伝子であったり、その遺伝子をノックアウトすることがその他の因子に大きく影響を与えたりしない場合は、ノックアウトマウスを作成することで、目的遺伝子の評価をすることが出来ると考

えられる。しかし、ラットにおいては分化能が完全である ES 細胞は確立されておらず、ノックアウトラットを作成する為には、*N-ethyl-N-nitrosourea* を用いて化学的に塩基配列上に突然変異をランダムに起こさせて、スクリーニングをかけて作成する方法 (Zan et al., 2003)、および核移植を用いた方法 (Zhou et al., 2003) が考えられる。前者は目的遺伝子にターゲットを絞ってノックアウトすることが出来ない為、作成に労力と時間がかかり、後者は、この技術を用いてクローンラットが作成された例から推察して有望である。しかし、ラット生殖細胞における核移植が困難である為、成功率が非常に低く、現在ノックアウトラットを作成することは非常に困難である。しかし、ラットはマウスの約 10 倍のサイズ (体重) であり、血液・尿などの生体材料の採取も容易であるなどの利点があり、薬物動態、毒性、神経、生理学等の研究において重要なモデルとして頻用されている (Alison Abbott 2004)。従って、ラットにおいて目的遺伝子を発現および減少させる技術を確立することは有用であると考えられる。

本研究ではアデノウイルスベクターに注目した。アデノウイルスベクターは一過性ではあるが、目的遺伝子を高発現させることができる。マウスに

においてはアデノウイルスを用いた方法によって *in vivo* でノックダウンを行った報告がなされている (Xu et al., 2006)。しかしラットにおいては、レンチウイルスベクターに shRNA を組み込み、受精卵の段階で投与する方法により、*in vivo* におけるノックダウンに成功したとの報告がなされているが (Dann et al., 2006)、アデノウイルスベクターを用いたラット *in vivo* でのノックダウンの成功例は報告されていない。

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。

アセトアミノフェン (APAP) は常用量では解熱鎮痛薬として広く使用されている。その作用機序は、体温調節中枢に作用して皮膚血管の拡張を

起こし、熱放散を増大して解熱作用を示す。また、視床と大脳皮質に作用して痛覚閾値を高めて軽度の痛みを抑制することで鎮痛作用を示す。APAP は抗炎症作用を持たず、非ステロイド性抗炎症薬などの他の鎮痛作用を示す薬物とは異なる。一般大衆薬の風邪薬にも配合され服用が簡便である。しかし、APAP を過剰投与すると肝小葉に壊死が起こり肝障害を発症する (Davidson and Eastham, 1966)。また、ラットでは APAP により腎臓の尿細管の機能が投与量依存的に弱まり、GSH の減少も腎障害が発症する要因の一つと報告されている (Trumper et al., 1992)。また、APAP のプロドラッグとして長く使用されてきたフェナセチンが、濫用や長期大量服用により慢性腎不全や膀胱癌などの腎臓での副作用例が多く報告されてきたため、我が国では 2001 年 4 月 20 日に製造販売が中止された。

APAP は 55% がグルクロン酸抱合を、30% が硫酸抱合を受けて尿中に排泄される (Howie et al., 1977; Tone et al., 1990)。しかし、少量は肝ミクロソーム画分の CYP を介して代謝され、毒性を有する活性中間代謝産物である *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine (NAPQI) を生じる (Miner and Kissinger, 1979; Hinson et al., 1981; Albano et al., 1985; van de Straat et al., 1988)。これは通常、

GSHにより解毒され、メルカプツール酸として尿中に排泄される。しかし、APAPを過剰に服用した場合には、APAPが主にCYP1A2やCYP2E1を介して代謝され、NAPQIの産生量が増加する。このNAPQIの解毒のため肝内GSHは消費され、過剰のNAPQIが細胞内のタンパクや核酸と結合し壊死を引き起こす。これが一般にAPAPの肝障害発症のメカニズムであると考えられている。

本研究では、第I章において、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、APAP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。

B. 研究方法

B-1. AdGCSH-shRNA および

AdLuc-shRNA の構築

Adenovirus Expression Vector Kit (Dual version) を用い、添付のプロトコールを参考に以下の方法でAdGCSH-shRNA および AdLuc-shRNA を作製した。

B-2. GCSH-shRNA および Luc-shRNA の pAxcwit ベクターへの組み換え

ラット GCSH mRNA に対する

shRNA を発現するウイルスベクターを得るには、hU6 プロモーターのような RNA ポリメラーゼ III プロモーター下流に shRNA を組み込んだ発現プラスミドが必要である。そこで、

GeneSilencer shRNA Vector Kits の pGSU6-GFP ベクターに shRNA 配列を組み込んだ。第一に、GCSH 遺伝子当該配列の 2 本鎖オリゴ DNA を調製するため、Top strand および Bottom strand を最終濃度 35 μ M となるように 1 \times アニリングバッファー中に添加し 95 $^{\circ}$ C、5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25 $^{\circ}$ C まで徐冷した。ラット GCSH 遺伝子 (Accession J05181) に対する shRNA 配列となるオリゴ DNA の配列は、

Top strand:

5'-gatccGTGTGAATGTCCAGAGTTAgaagcttgTAACTCTGGACATTCACACtttttggagc-3' Bottom strand:

5'-ggccgcttccaaaaaGTGTGAATGTCCAGAGTTAcaagcttcTAACTCTGGACATTCACACg-3' である。上記配列のうち、アルファベット大文字の配列は GCSH に相補的な部分の配列であり、小文字の配列はそれ以外の部分を示している。ネガティブコントロールである Luciferase 遺伝子に対する shRNA 配列となるオリゴ DNA 配列は

GeneSilencer shRNA Vector Kits に添付されていたものをそのまま使用した。

B-3. 肝癌由来細胞に対する AdGCSh-shRNA 感染

細胞を 6×10^5 cells/well となるように 12 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、各ウェルあたり、ウイルス感染量 MOI 20 となるように調製した AdGCSh-shRNA および AdLuc-shRNA ウイルス液 $200 \mu\text{L}$ を加え、プレートを数回ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞に浸潤させた。この振とう操作を 15 分間隔で 3 回行い、その間細胞は、5% CO_2 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後、5% FBS-DMEM 1.8 mL を加え、72 時間後に細胞を回収し、GCSh mRNA および総 GSH 含量を測定した。

B-4. AdGCSh-shRNA 感染 H4IIE 細胞への Troglitazone と APAP の処理

H4IIE 細胞の細胞懸濁液を調製し、各ウェル 2×10^4 cells となるよう 96 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、各ウェルに AdGCSh-shRNA および AdLuc-shRNA ウイルス感染量 MOI 20 となるように調製したウイルス液 $40 \mu\text{L}$ を加え、プレートを数回ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞に浸潤させた。この振とう操作を 15 分間隔で 3

回行い、その間細胞は、5% CO_2 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後 5% FBS- α MEM $160 \mu\text{L}$ を加えた。3 日後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、濃度が 0, 5, 10, 20, 30, 50, 75 および $100 \mu\text{M}$ の Troglitazone 溶液、または濃度が 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 および 5 mM の APAP 溶液を $200 \mu\text{L}$ 加えた。24 時間後 CCK アッセイにより細胞生存率を測定した。

B-5. ラットへのアデノウイルスの投与

Fisher 344 系ラット (雄性、8 週齢 $140 \sim 160 \text{ g}$; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) に、AdGCSh-shRNA または AdLuc-shRNA を尾静脈より投与 (1 mL/body) した。アデノウイルス投与量依存的なノックダウン効果を検討するために、AdGCSh-shRNA を 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0×10^{11} PFU/mL に、AdLuc-shRNA は 1.0, 2.0×10^{11} PFU/mL に調製した。また、肝総 GSH 減少の持続時間を検討する実験、および APAP 投与実験ではアデノウイルス液を 2.0×10^{11} PFU/mL に調製した。アデノウイルス投与 2 週間後に APAP 投与実験および、アデノウイルス投与量依存的なノックダウン効率の確認実験を行い、また、アデノウイルス投与 2, 3, 4, 5 週間後における肝総 GSH

減少の持続時間の検討を行った。さらに、日内変動の確認を行うために、8時間おきにラットから肝臓を採取し、肝臓中の GSH 含量を測定した。肝臓中の GSH 含量には日内変動が認められるため、日内変動確認実験以外の総 GSH 含量を測定する実験では、ラットの解剖および肝臓の採取を午前 10~11 時の間に行った。

B-6. APAP 抱合活性の測定

Yoon (2006) らの方法を一部修正して以下の方法で測定を行った。ラット血清 50 μ L にアセトニトリル 50 μ L を加え混合した。15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清 80 μ L を別の試験管へ移し、窒素気流下で乾固させ、残渣を精製水 200 μ L に溶解した。そのうちの 50 μ L を HPLC で分析した。HPLC による分析にはポンプ (日立製作所、Tokyo, Japan, D-2130)、オートサンプラー (日立製作所、D-2200)、UV 検出器 (日立製作所、L-2400)、インテグレーター (日立製作所、D-2500)、ノイズベースクリーン (ユニオン、Takasaki, Japan) を使用した。カラムは Mightysil RP-18 (150 \times 4.6 mm; 関東化学, Tokyo) を用い、移動相には 10% メタノール/ 1.5% 酢酸を使用した。カラム温度は 35 $^{\circ}$ C とし、流速 1.0 mL/min、検出波長を 248 nm とした。本条件における化合物の保持時間は、APAP が

4.2 分、APAP グルクロン酸抱合体が 2.9 分、APAP 硫酸抱合体が 5.9 分、APAP3-GSH 抱合体が 4.7 分、APAP メルカプトツール酸抱合体が 9.0 分、APAP システイン抱合体が 3.2 分であった。

B-7. その他の方法

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、シークエンス解析、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 分析は、常法によった。Real-time PCR による GCSH 遺伝子ノックダウンの解析の PCR に用いたプライマーの配列を以下に示す (Table .1)。

(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。

Table 1. Sequences of primers for real-time PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer
rGCSH	5'-ATG CAG TAT TCT GAA CTA CC-3'	5'-ACA AAC TCA GAT TCA CCT AC-3'
mGCSH	5'-TCT AAC AAG AAA CAT CCG GCA-3'	5'-GGT CAG GTC GAT GTC GAT GTC ATT GTA-3'
hGCSH	5'-ATT AGA AGA AAA TCA GGC TC-3'	5'-GTA GCC AAC TGA TCA TAA AG-3'
rGAPDH	5'-GTT ACC AGG GCT GCC TTC TC-3'	5'-GGG TTT CCC GTT GAT GAC C-3'
mGAPDH	5'-TCA CCA GGG CTG CCA TTT G-3'	5'-CTC ACC CCA TTT GAT GTT AGT-3'
hGAPDH	5'-CCA GGG CTT TTA ACT C-3'	5'-GCT CCC CCC TGCCC AAA TGA-3'

r: rat, m: mouse, h: human

C. 実験結果

C-1. 細胞を用いた AdGCSH-shRNA 感染による GSH 生成のノックダウン

In vivo において AdGCSH-shRNA によるノックダウン効率を検討する前に、細胞レベルで AdGCSH-shRNA による GCSH mRNA のノックダウンについて、肝癌由来細胞を用いて検討した。AdGCSH-shRNA は、ラット GCSH 配列を使用して作成したため、shRNA 配列の相同性が種によって異なる。また、細胞株によるウイルス感染効率が異なることが予測されたので、ノックダウンの最終目的動物であるラットの細胞においては2種類の細胞を用い

て検討した。Fig. 1 には対照群である AdLuc-shRNA を感染させた各々の細胞株に対して、AdGCSH-shRNA を感染させた細胞株の GCSH mRNA の減少率を、それぞれの GAPDH mRNA で補正した値で示した結果、および細胞内総 GSH 含量の減少を示す。mRNA レベルにおいては、ラット肝癌由来細胞である BRL-3A および H4IIE 細胞では AdGCSH-shRNA を MOI 20 で3日間感染させた条件で約 80%が有意に減少した。また、マウス由来細胞である Hepa1-6 細胞も同様に mRNA レベルで約 80%が有意に減少した。しかし、ヒト由来細胞である HLE 細胞においては、mRNA レベルで約 50%の減少が

認められる程度であった。

GCSH mRNA ノックダウンのフェノタイプへの影響と考えられる細胞内総 GSH 含量の減少は、全ての細胞において認められたが、ヒト由来細胞である HLE 細胞では殆ど認められなかった。マウス由来 Hepa1-6 細胞およびラット由来 BRL3A 細胞においては、mRNA レベルで約 80%の有意な減少が認められたにもかかわらず、総 GSH 含量の減少は約 20%であった。一方、ラット由来細胞である H4IIE 細胞にお

いては、同じラット由来細胞である BRL3A 細胞と異なり、細胞内総 GSH 含量が対照群と比べて約 50%減少した。

C-2. H4IIE 細胞における AdGCSH-shRNA 感染の検討

細胞株の差における AdGCSH-shRNA 感染によるノックダウン効率の検討を前記の実験で行った。

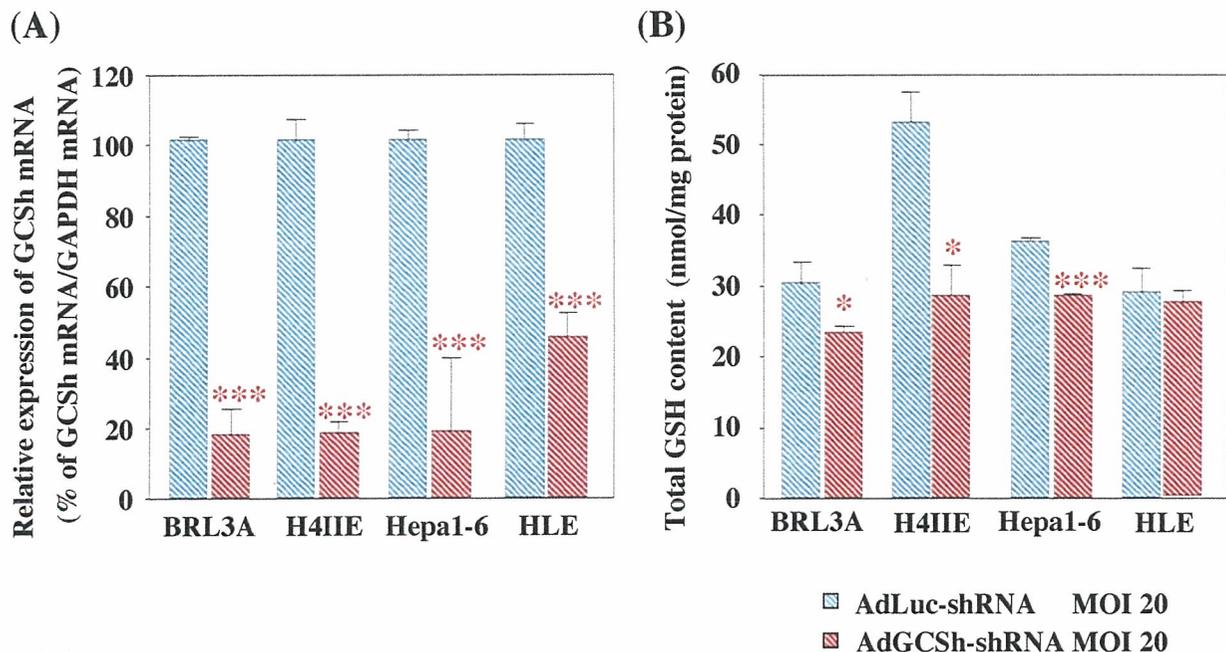


Fig. 1. Changes of GCSH mRNA expression and total glutathione contents in various hepatoma cell lines. Real-time quantitative RT-PCR (A) and total GSH content measurement (B) were conducted on each cell line after 3 days AdLuc-shRNA or AdGCSH-shRNA infection. Data are mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05 and * P < 0.001 compared with AdLuc-shRNA infected groups.**

その結果、最も GCSH mRNA レベル、総 GSH 含量レベルでノックダウン効率が優れていた H4IIE 細胞を用いてさらに詳細な検討を行った。H4IIE 細胞に対し、MOI 10 および MOI 20 でアデノウイルス感染を行い、感染後 1、2、3 および 5 日目における MOI 依存および時間依存的ノックダウン効率について mRNA 量、タンパク質量および総 GSH 含量を指標として検討した。その結果を Fig. 2 に示す。

AdLuc-shRNA を MOI 20 で感染させた細胞を対照とした。mRNA の発現量はウイルス感染量に関わらず、感染 1 日目において、約 40% 減少を示した。MOI 20 感染の 3 日目が最も mRNA 量が減少しており、85% の減少が認められた (Fig. 2A)。

GCSH タンパク質はウイルス感染後 1 日目においては、対照群と比べて有意な発現量の減少は認められなかった。しかし、ウイルス感染後 2 日目においては MOI 10 感染では 47%、MOI 20 感染では 59% の有意な発現量の減少が認められ、ウイルス感染量に関わらず、3 日目で約 75%、5 日目で約 83% の GCSH タンパク質発現量の有意な減少が認められた (Fig. 2B)。

細胞内総 GSH 含量は AdGCSH-shRNA、MOI 10 感染では減少率は少なく、対照群と比較して 1、2 日目で約 5%、3 日目で 22%、5 日目で 28% であった。

一方 MOI 20 感染では 1 日目で 18%、2 日目で 25%、3 日目で 42%、5 日目で 48% の減少が認められ、MOI 20 感染の方が MOI 10 感染よりも

AdGCSH-shRNA 感染によるノックダウン効率が優れていた (Fig. 2C)。結果として、5 日目が最も総 GSH 含量が減少していたが、細胞の状態が 5 日目では著しく悪いために、以後の検討では、薬物処理による細胞障害性実験はアデノウイルス感染後 3 日目に行うことにした。

C-3. AdGCSH-shRNA 感染 H4IIE 細胞における薬物による細胞障害性の検討

H4IIE 細胞における AdGCSH-shRNA 感染による細胞内総 GSH 含量の減少が薬物による細胞障害に及ぼす影響を検討するため、AdGCSH-shRNA を MOI 20 で 3 日間感染後、典型的な、肝細胞障害性を引き起こす薬物として知られている APAP および Troglitazone を処理し、薬物処理 24 時間後における細胞生存率を対照群と比較検討した (Fig. 3)。100 μ M Troglitazone 処理では全ての群において細胞生存率は約 20% であり、AdGCSH-shRNA 感染群は対照群と比べ有意な差は認められなかった。また各々の濃度の Troglitazone 処理においても全ての群において細胞生存

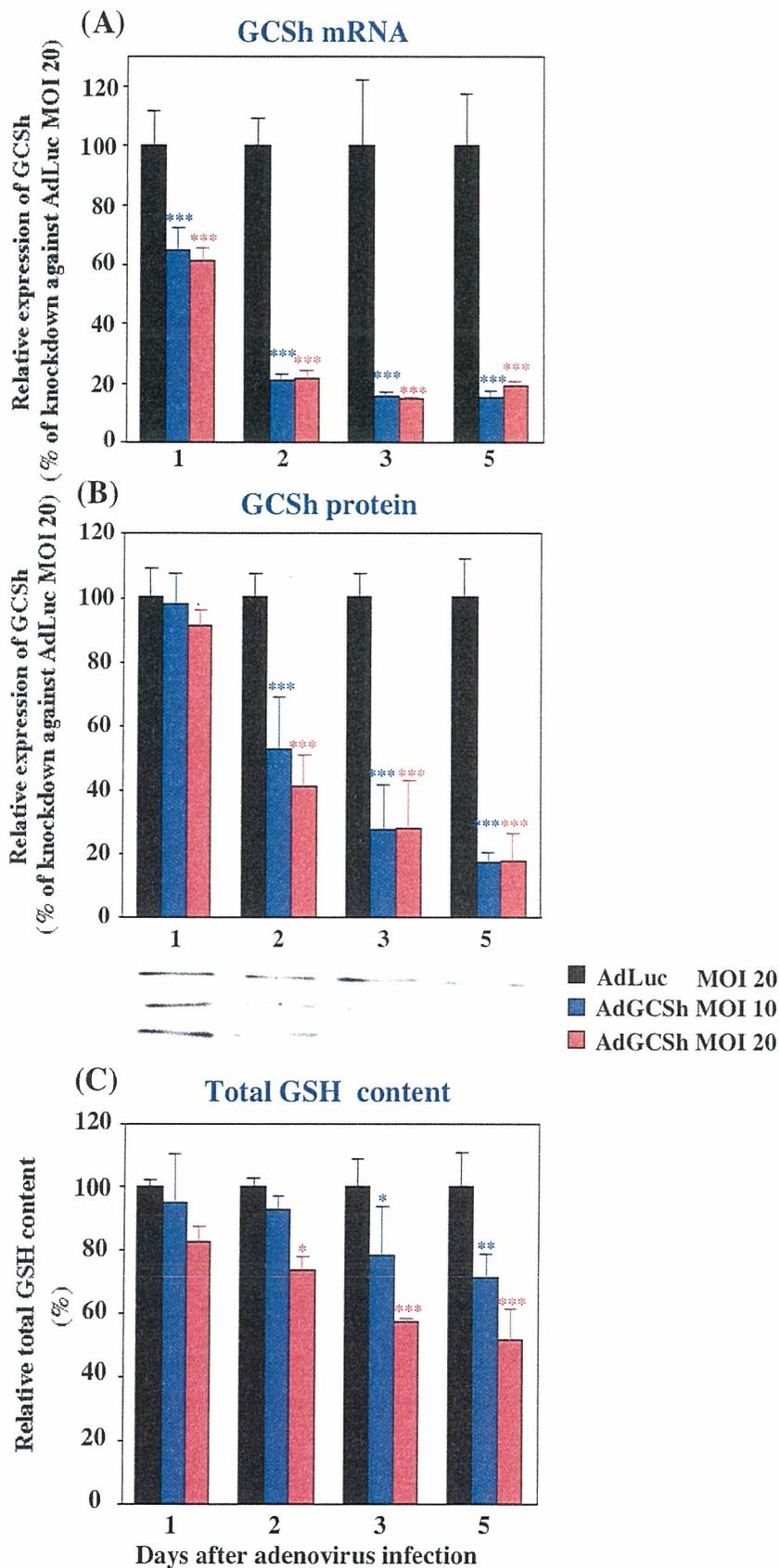


Fig. 2. Time dependent knockdown effect of AdGCSH-shRNA in H4IIE cells. H4IIE cells were infected with AdLuc-shRNA or AdGCSH-shRNA. GCSH mRNA (A), GCSH protein (B) and, total GSH were determined (C). Data are mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 compared with AdLuc-shRNA infected groups.

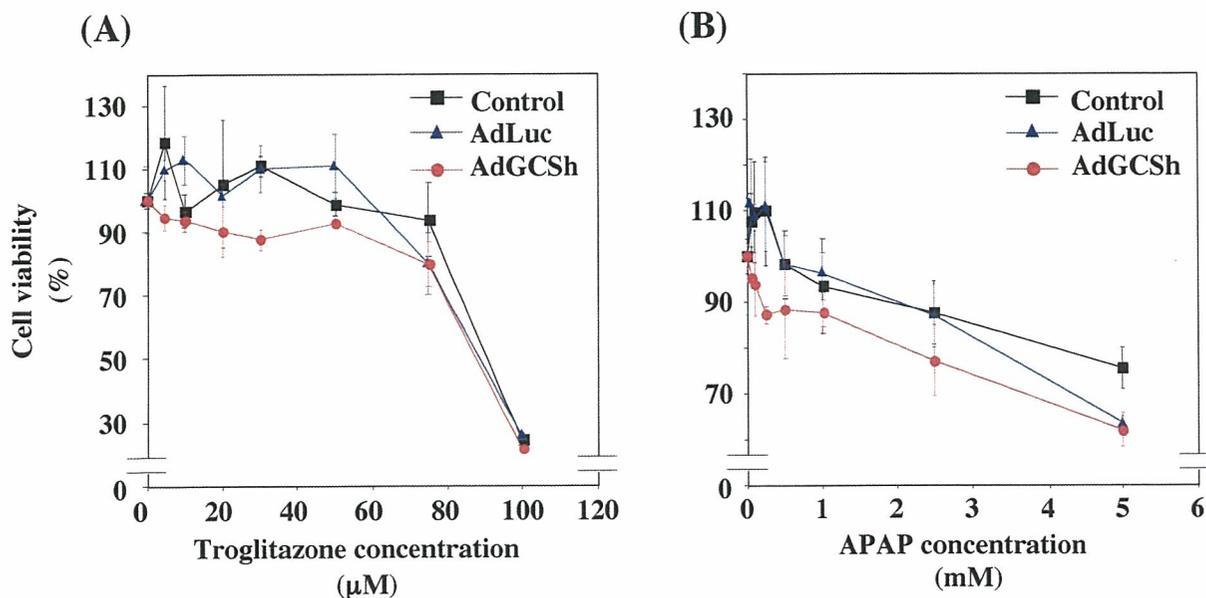


Fig. 3. CCK assay in adenovirus infected H4IIE cells after 24 hour exposure to APAP or troglitazone. Cell viability is expressed as percentage of solvent treated cells. Data are mean \pm SD (n = 4).

率に有意な差は認められなかったことから、細胞内総 GSH 含量の減少はトログリタゾン処理に対して影響を及ぼさなかったと考えられる (Fig. 3A)。また、APAP は最大で 5 mM 処理まで行ったが、5 mM 処理においても全ての群で細胞生存率は 70% 程度であり、APAP 処理による細胞障害性への影響は殆ど認められなかった (Fig. 3B)。

C-4. ウイルス投与量依存的なラット肝臓中 GCSH mRNA と総 GSH 含量の変動

アデノウイルスは主に肝組織に感染することが知られている。そこで、AdGCSH-shRNA をラット尾静脈より

投与することによりラット肝臓中 GCSH mRNA および総 GSH 含量の変化を検討した。この検討を行う前に Fisher 344 ラットを用い、投与量 8×10^{11} PFU/mL/body で 7、10 および 14 日目におけるラット肝臓中 GCSH mRNA および総 GSH 含量測定を行った。その結果、mRNA レベルでは 7 日目より約 80% の減少が認められ、総 GSH 含量は 7 日目で 20%、10 日目で 50%、14 日目で約 75% の減少が認められた (data not shown)。この結果に基づき、今回はアデノウイルス投与 14 日後に肝臓を採取し、アデノウイルス投与量依存的な減少を検討した (Fig. 4)。最小投与量である 0.25×10^{11} PFU/mL/body で GCSH mRNA は PBS

投与群と比べ約 51%、 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 (Fig. 4A)。AdLuc-shRNA 投与を行ったラット肝臓中 GCSH mRNA も測定したが、PBS 投与群と比べ有意な差は認められなかった (data not shown)。

肝臓中総 GSH 含量は PBS 投与群では $6.0 \mu\text{mol/g wet liver}$ であり (Fig. 4B)、この値は PBS またはウイルス投与を行っていない Fisher 344 ラット 10 週齢の値と同程度であった。mRNA の減少と同様に、AdGCSH-shRNA 投与量依存的に総 GSH 含量は減少し、その減少は投与量 0.25×10^{11} PFU/mL/body から順に 4.5、4.3、2.5、1.4、 $1.2 \mu\text{mol/g wet liver}$ となり、 8×10^{11} PFU/mL/body 投与では $1.2 \mu\text{mol/g wet liver}$ であった (Fig. 4B)。アデノウイルスの投与量 4×10^{11} PFU/mL/body が最も総 GSH 含量が減少しており、その減少は PBS 投与群と比べ、約 80%の有意な減少であった。また、ネガティブコントロールである AdLuc-shRNA 投与群は投与量 1、 2×10^{11} PFU/mL/body を行ったのみであるが、PBS 投与群と比べてわずかながら有意な総 GSH 含量の増加が認められた。

C-5. ウイルス投与量依存的な AST および ALT 値の変動

ラットにおいて大量のアデノウイルスを尾静脈より投与すると急性および慢性の肝障害を引き起こすことが知られている (Callahan et al., 2006)。薬物誘導性肝障害の評価系において薬物投与前から肝障害の徴候が見られる場合には、*in vivo* の評価系として成り立たない。そこで上記実験で使用したラットから血液を採取し、肝障害時に上昇する血清パラメーターである AST および ALT の測定を行った (Fig. 5)。そこで上記実験で使用したラットから血液を採取し、肝障害時に上昇する血清パラメーターである AST および ALT の測定を行った (Fig. 5)。AST は AdGCSH-shRNA 投与量 2×10^{11} PFU/mL/body までは PBS 投与群と比べ有意な上昇は認められず、投与量 4×10^{11} PFU/mL/body 以上で有意な上昇が認められた。ALT は PBS 投与群と比べ投与量 4×10^{11} PFU/mL/body までは有意な上昇は認められず、投与量 8×10^{11} PFU/mL/body で約 2 倍程度の有意な値の上昇が認められた。また、ネガティブコントロールである AdLuc-shRNA 投与群では、投与量 1、 2×10^{11} PFU/mL/body とともに PBS 投与群と比べ有意な AST および ALT 値の上昇は認められなかった。

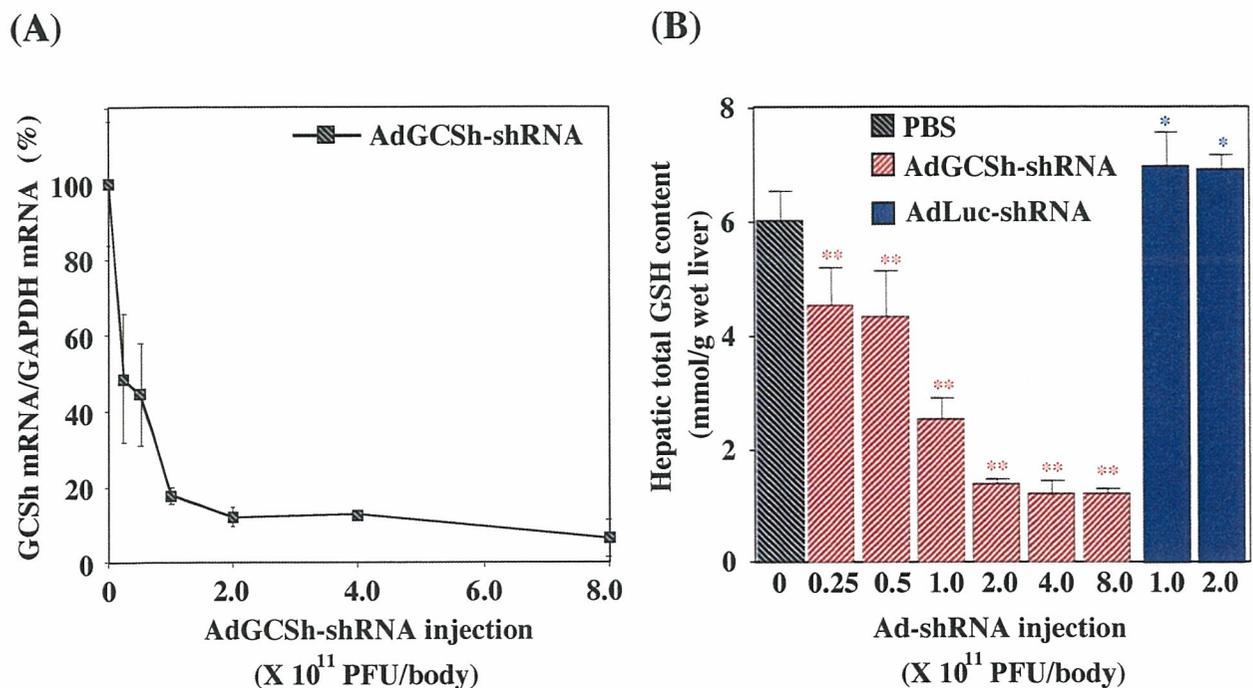


Fig. 4. Dose dependent changes of hepatic GCSH mRNA and total GSH content in rat infected with adenovirus. GCSH mRNA and total GSH content were examined 14 days after administration of AdGCSH-shRNA or AdLuc-shRNA. Data are mean \pm SD (n = 4 or 5). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with control.

C-6. ラットにおける APAP による肝障害性の検討

ラットに対し、経口で APAP 投与を行う際、絶食または非絶食条件における肝障害性について検討する必要がある。そこで、APAP 投与 24 時間前に絶食を行った群、および絶食を行わなかった群の 2 群に分け、APAP を 0、300 および 1,000 mg/kg 投与した。APAP 投与を行った 24 時間後に血清を採取し、AST および ALT 値を測定した (Fig. 6)。その結果、非絶食条件においては APAP 1,000 mg/kg を投与しても血清パラメーターの上昇は殆

ど認められなかったが、24 時間絶食を行った群においては、300 mg/kg 投与では血清値の上昇は認められず、1,000 mg/kg 投与によって AST 値が対照群と比べて有意に上昇した (1202 ± 1005 IU/L)。また、ALT も同様に対照群と比べて増加傾向が認められた (492 ± 425 IU/L)。また、絶食を行ったラットにおいて時間依存的な AST および ALT 値の変化を検討したが、APAP 投与 12 時間後までは AST および ALT 値の上昇は認められず、24 時間後に始めて上昇が認められた (data not shown)。

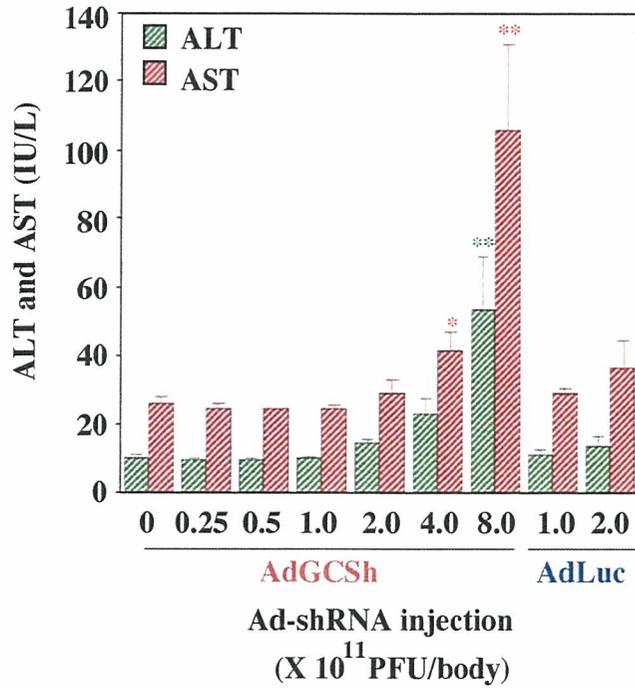


Fig. 5. Dose dependent change of ALT and AST in rat infected with adenovirus. ALT and AST levels were examined 14 days after administration of AdGCSH-shRNA or AdLuc-shRNA. Data are mean \pm SD (n = 4 or 5). * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with control.

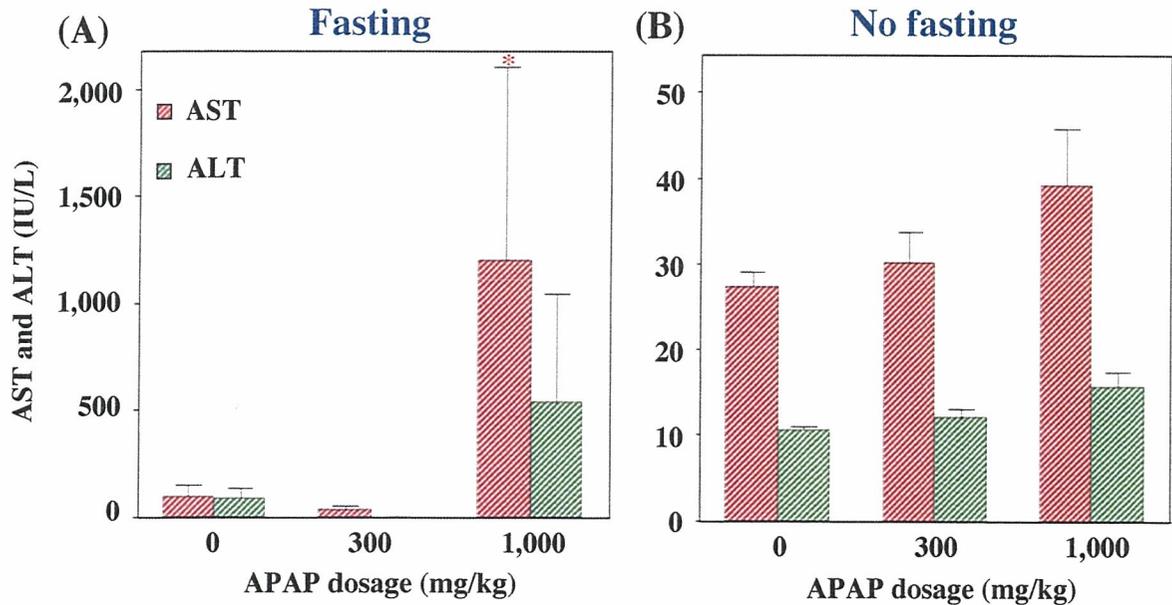


Fig. 6. Effect of fasting on serum AST or ALT level in APAP-treated normal rats. Serum AST and ALT levels were measured 24 hr after *p.o.* administration of APAP. Data are mean \pm SD (n = 3 or 4). * P < 0.05 compared with control.

C-7. GCSH ノックダウンラットにおける APAP による肝障害の検討

II-3-1 および II-3-2 において、アデノウイルス投与による肝障害を生じず、肝臓中総 GSH 含量が最も減少した条件を用いることにした。APAP 投与実験においては、アデノウイルスの投与量が 2×10^{11} PFU/mL/body、ウイルス投与 14 日後の条件で行った。一般的に APAP 投与実験はラットを 24 時間程度絶食させた後に行うが、絶食はラット肝臓中の GSH 含量を減少させ、CYP2E1 の誘導を引き起こすことが知られている (Fry et al., 1999)。本検討の目的は、AdGCSH-shRNA 投与による GSH 減少を明らかにすることであるため、II-3-3 の検討結果も含め、絶食を行わない条件で APAP 投与実験を行った。

その結果、Fig. 7 に示すように、AdLuc-shRNA を 2×10^{11} PFU/mL/body 投与した群においては、300 mg/kg および 1,000 mg/kg の APAP 投与による AST および ALT 値の上昇は認められなかった。しかし、AdGCSH-shRNA 投与群においては、APAP 投与量 300mg/kg では AST および ALT 値の上昇は認められなかったが、1,000 mg/kg 投与によって顕著な AST (2159 ± 1156 IU/L) および ALT (924 ± 667 IU/L) 値の上昇が認められた (Figs. 7A and 7B)。

一方、AdGCSH-shRNA 投与を行った

ラットに対し、300 mg/kg APAP 投与を行った群においては、わずかながら AST および ALT 値の上昇 (AST 91.5 ± 21.5 IU/L, ALT: 46.8 ± 17.6 IU/L) が 0 mg/kg 投与群 (AST 59.9 ± 34.3 IU/L, ALT: 28.1 ± 20.0 IU/L) と比べて認められた。APAP 投与により、血清中総ビリルビン濃度が上昇している可能性が考えられたため、総ビリルビン濃度の測定を行った。その結果、AdLuc-shRNA 投与群 および AdGCSH-shRNA 投与群ともに APAP 投与による有意な血清中総ビリルビン濃度の上昇は認められなかった (Fig. 7C)。しかし、AdGCSH-shRNA 投与群と AdLuc-shRNA 投与群を比べると、APAP 投与量に関わらず、AdGCSH-shRNA 投与群において約 2 倍の総ビリルビン濃度の上昇が認められた。しかし、総ビリルビン濃度約 0.1 mg/dL までの上昇は肝障害の影響に起因するものではないと考えられる。さらに AdGCSH-shRNA 投与ラットにおける APAP 投与による肝障害性への影響を検討するため、HE 染色による肝組織像の検討を行った (Fig. 8)。結果として、AdGCSH-shRNA 投与を行ったラットにおいてのみ、APAP 投与によって矢印の部分であるが、中心静脈周辺の肝細胞壊死が認められた。これは、薬物誘導性肝障害の一般的な所見である。AdLuc-shRNA 投与を行っ

たラットにおいて、肝細胞壊死は全く認められなかった。また、AdLuc-shRNA 投与を行ったラット肝

臓において細胞質の淡明化が認められた。

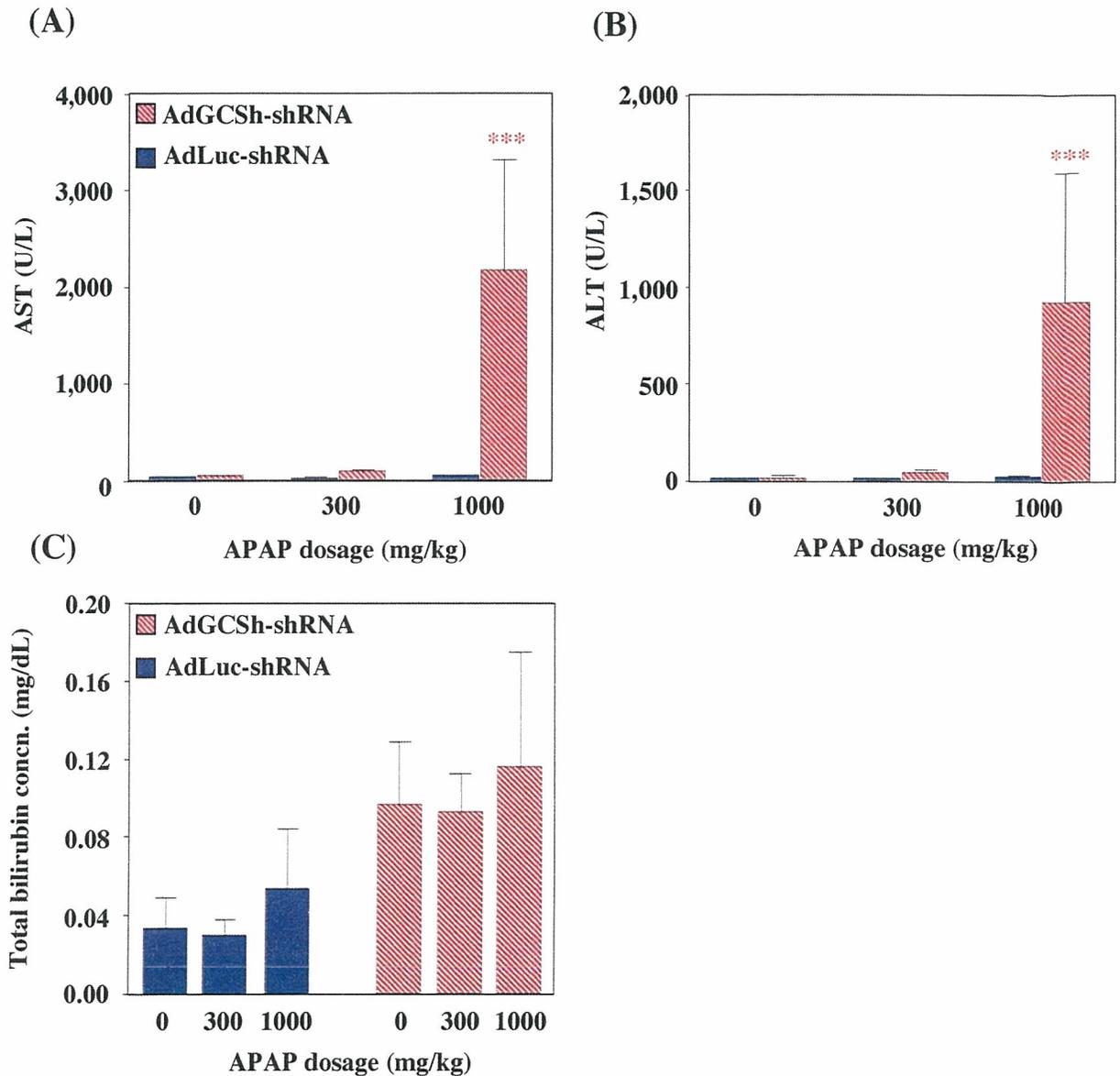


Fig. 7. Effects of APAP on serum AST, ALT, and total bilirubin in AdGCSH-shRNA infected rat. APAP were orally administrated 0, 300, or 1,000 mg/kg without fasting. Serum AST (A), ALT (B), and total bilirubin concentration (C) were measured 24 hours after administration. Data are mean SD \pm 4 or 5. ^{***} $P < 0.001$ compared with AdLuc-shRNA infected group.

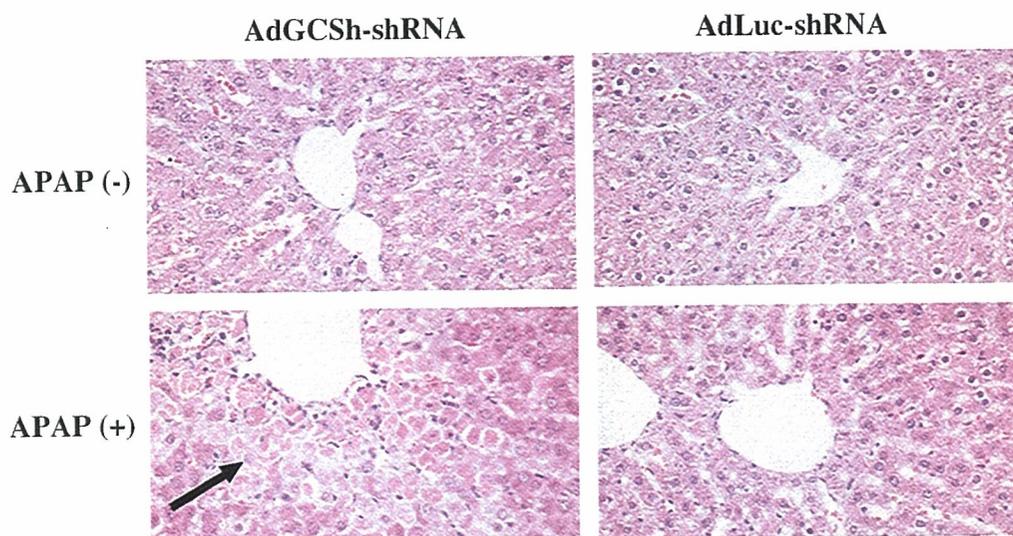


Fig. 8. Histopathological examination of rat liver 24 hours after administration of APAP treated by AdGCSH-shRNA and AdLuc-shRNA. Arrow indicates area of hepatic necrosis in HE stained section caused by APAP (1,000 mg/kg) treatment.

C-8. AdGCSH-shRNA 投与による肝臓中の総 GSH 含量減少の持続期間の検討

アセトアミノフェンを用いた検討より、AdGCSH-shRNA 投与 2 週間目までは肝臓中総 GSH 含量が減少しており、APAP 投与による毒性が増強されることを示すことができた。さらに、この GSH 減少モデルを亜急性、慢性毒性試験に用いることができるかについて検討するため、AdGCSH-shRNA 投与後、肝臓中の総 GSH 含量の減少の持続期間を検討した。

AdLuc-shRNA を 2×10^{11} PFU/mL/body 投与したラットにおける肝臓中の総 GSH 含量の変動を 2、3、4 および 5 週目まで検討した結果を

Fig. 9 に示す。今回の検討では、II-3-1 の検討より AdLuc-shRNA 投与群と PBS 投与群とでは総 GSH 含量に殆ど差が認められないことが明らかになっていたため、対照群として AdLuc-shRNA 群ではなく、PBS 投与群を設定した。PBS 投与群では、投与後 2~4 週目までは殆ど総 GSH 含量に変化は認められず、約 $6 \mu\text{mol/g wet liver}$ であったが、5 週目において総 GSH 含量が約 $5 \mu\text{mol/g wet liver}$ とわずかに減少した。また、AdGCSH-shRNA 投与群においては PBS 投与群と比べると、2 週目で 79%、3 週目で 74%、4 週目で 59%、5 週目で 44% と全ての週において有意な減少を認め、減少の程度は順に低下した。

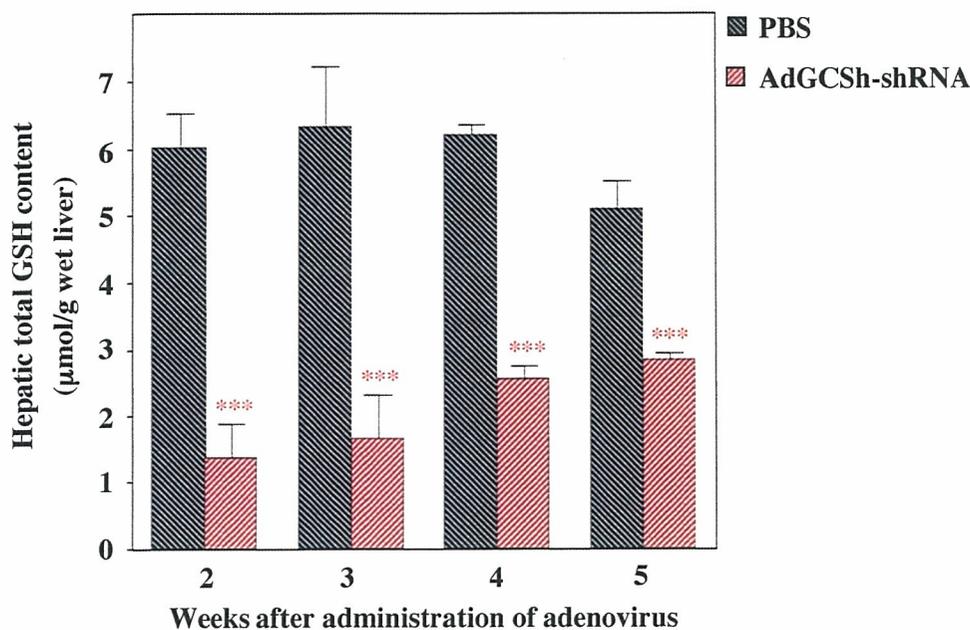


Fig. 9. Time dependent change of total GSH content in rat liver infected with Aduc-shRNA or AdGCSh-shRNA. Rats were anesthetized with ether, and excised livers at 2, 3, 4 or 5 weeks after administration of adenovirus. Total GSH contents were determined. Data are mean \pm SD 3 to 5. * $P < 0.001$ compared with PBS treated group.**

C-9. AdGCSh-shRNA 投与による肝臓中の総 GSH 含量の日内変動の検討

序論でも述べたように、BSO を用いたグルタチオン減少モデルの肝 GSH 減少は、ラットの活動時間帯における BSO 摂取量が関わっており、日内変動が顕著に現れるという問題点がある。AdGCSh-shRNA 投与による肝 GSH の減少の日内変動を検討するため、ラットに対し、AdGCSh-shRNA を 2×10^{11} PFU/mL/body 投与してから 14 日後の午前 1 時、午前 9 時および午後 5 時に肝臓を採取し、肝総 GSH 含量の測定を行った (Fig. 10)。

AdGCSh-shRNA 投与ラットの肝総 GSH 含量に日内変動は認められず、全ての時間帯において、PBS 投与群と比べて有意に減少しており、午前 1 時では 66%、午前 9 時では 72%、午後 5 時では 80% の GSH 減少が認められた。

C-10. 肝ミクロソームにおけるチトクロム P450 含量および肝サイトソルにおける GST 活性の変動

アデノウイルス投与が薬物代謝酵素の活性に影響を与えるという報告がなされている(Callahan et al., 2006)。本検討では、アデノウイルスを投与したラットから肝ミクロソームおよび

サイトソルを作成し、チトクロム P450 含量の測定 (Fig. 11A)、および CDNB を基質として GST 活性 (Fig. 11B) を測定した。その結果、AdGCSh-shRNA 投与によって AdLuc-shRNA 投与群と比べ、有意なチトクロム P450 含量の増大が認められた。また、PBS 投与を行ったラット肝ミクロソーム中のチトクロム P450 含量は AdLuc-shRNA 投

与を行ったラットと同程度であった (data not shown)。一方 GST 活性は AdGCSh-shRNA 投与群において AdLuc-shRNA 投与群と比べわずかながら増大傾向が認められた。また、PBS 投与を行ったラットサイトソル中の GST 活性は AdLuc-shRNA 投与群と同程度であった (data not shown)。

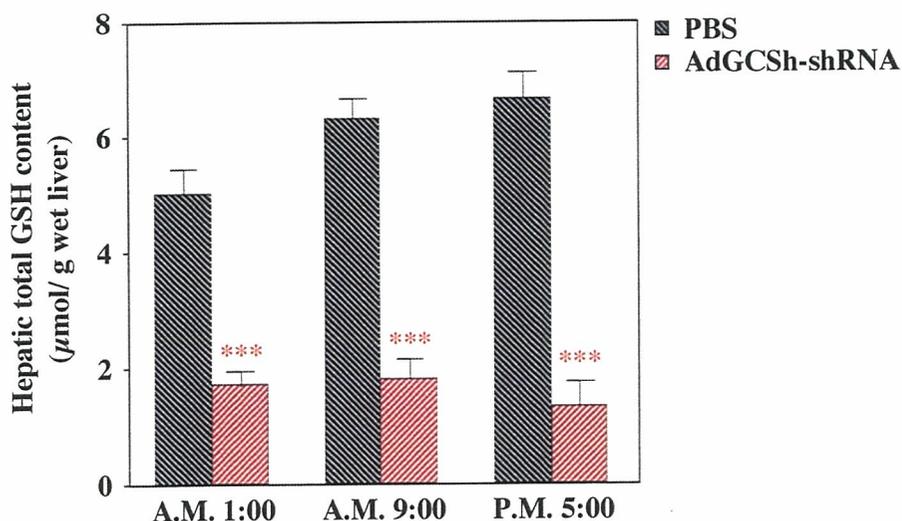


Fig. 10. Circadian change of total GSH content in rat liver infected with AdGCSh-shRNA. Rats were anesthetized with ether, and excised livers every 8 hours. Data are mean \pm SD (n = 3). *** $P < 0.001$ compared with PBS treated group.

C-11. アデノウイルス投与による肝ミクロソームにおける CYP 発現量の変動

アデノウイルス投与によるチトクロム P450 含量の変動が認められたため、Western blotting によって雄性ラットに主要な CYP 分子種の発現量を比較検討した。AdLuc-shRNA 投与群に

おける CYP 発現量に対して、AdGCSh-shRNA 投与群における CYP 発現量の変化比率を Fig. 12 に示す。

その結果、AdGCSh-shRNA 投与群における CYP1A2 の発現量は約 20%減少し、CYP2E1 の発現量は約 10%増大する傾向が認められ、CYP3A2 の発現量は殆ど変化せず、いずれも有意な差