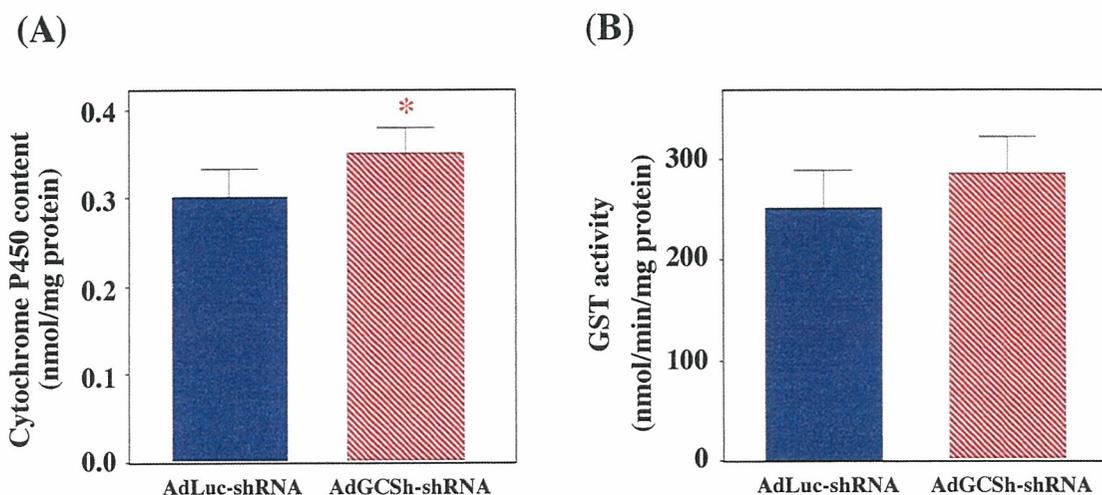


は認められなかった。しかし、雄性ラットにおいて最も発現量が多い分子種である CYP2C11 は、AdGCSH-shRNA 投与群において AdLuc-shRNA 投与群と比べ約 25%の有意な発現量の低下が認められた。

PBS 投与群と比べ、AdGCSH-shRNA

投与群において、CYP1A2 の発現量は 26%、CYP2C11 は 40%、CYP2E1 は 15%減少し、CYP3A2 は殆ど変化しなかった。また、AdLuc-shRNA 投与によって、CYP1A2 の発現量は 10%、CYP2C11 は 20%、CYP2E1 は 24%、CYP3A2 は 7%減少した (Fig. 12)。



**Fig. 11. Effect of AdLuc-shRNA or AdGCSH-shRNA administration on hepatic cytochrome P450 content and cytosolic GST activity at 14 days after adenovirus administration. Data are mean  $\pm$  SD (n = 4 or 5). \* $P < 0.05$  compared with AdLuc-shRNA infected group.**

#### C-12. GCSH ノックダウンラットにおける APAP 抱合体生成活性の検討

AdGCSH-shRNA または AdLuc-shRNA 投与を行ったラットに対して、APAP を 1,000 mg/kg 経口投与を行った際の APAP およびその抱合体代謝物の血中濃度を測定した。未変化体である APAP は両群において血中濃度に殆ど

差は認められず、APAP 投与 1 時間以内に最大血中濃度を示した。APAP の主代謝物であるグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体は、投与するアデノウイルスによりその代謝物量に差が認められた。AdGCSH-shRNA 投与ラットにおいて、グルクロン酸抱合体は、AdLuc-shRNA 投与ラットと比べて、投与後 30 分~3 時間で有意な血中濃度の上昇が認められ、投与後 1 時間で

最大 2.3 倍を示した。また、硫酸抱合体は最大 23%の血中濃度の減少が認められた。

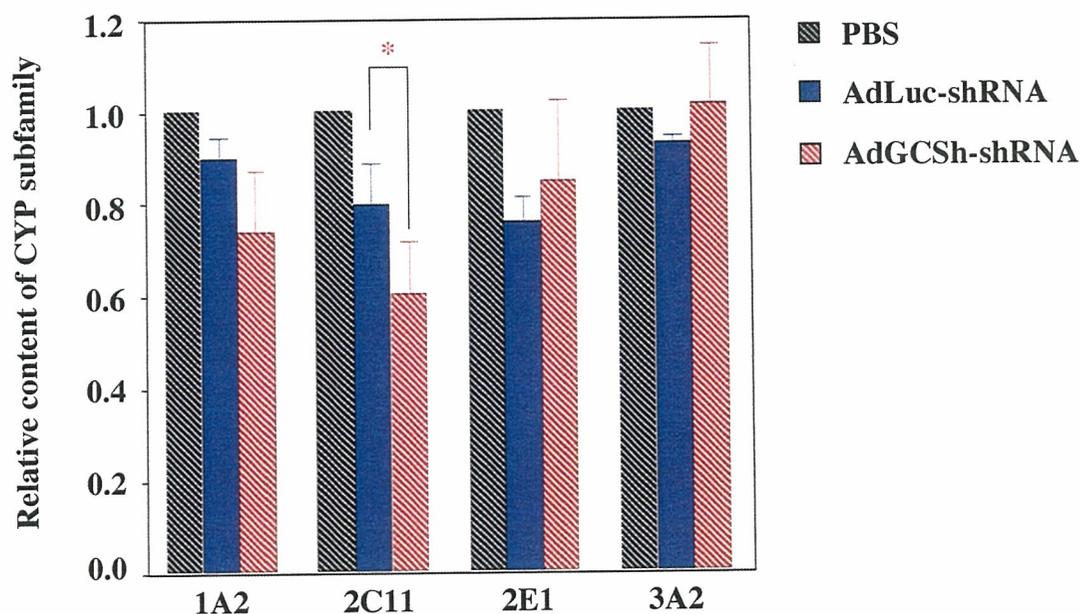


Fig. 12. Changes of the expression of hepatic CYP protein 14 days after adenovirus administration. Male Fisher 344 rats were infected with AdLuc-shRNA or AdGCSH-shRNA. Data are mean  $\pm$  SD (n = 4 or 5), except PBS (n = 1). \* $P < 0.05$  compared with each AdLuc-shRNA infected group.

一方、GSH 抱合体は AdGCSH-shRNA 投与ラットにおいて、AdLuc-shRNA 投与ラットと比べ、APAP 投与を行った 60 分後において約 1.6 倍の血中濃度の上昇を示した。GSH 抱合体を経て産生されるシステイン抱合体およびメルカプツール酸抱合体も同様に、APAP 投与を行った後、3 時間以内では AdGCSH-shRNA 投与群の方が AdLuc-shRNA 投与群と比べて高い血中濃度を示した。しかし、AdGCSH-shRNA 投与ラットにおいて、メルカプツール酸抱合体、システイン

抱合体は APAP 投与を行った 1 時間以後において減少傾向が認められたが、AdLuc-shRNA 投与群ではアセトアミノフェン投与の 24 時間後まで殆ど血中濃度推移に変化が認められなかった。

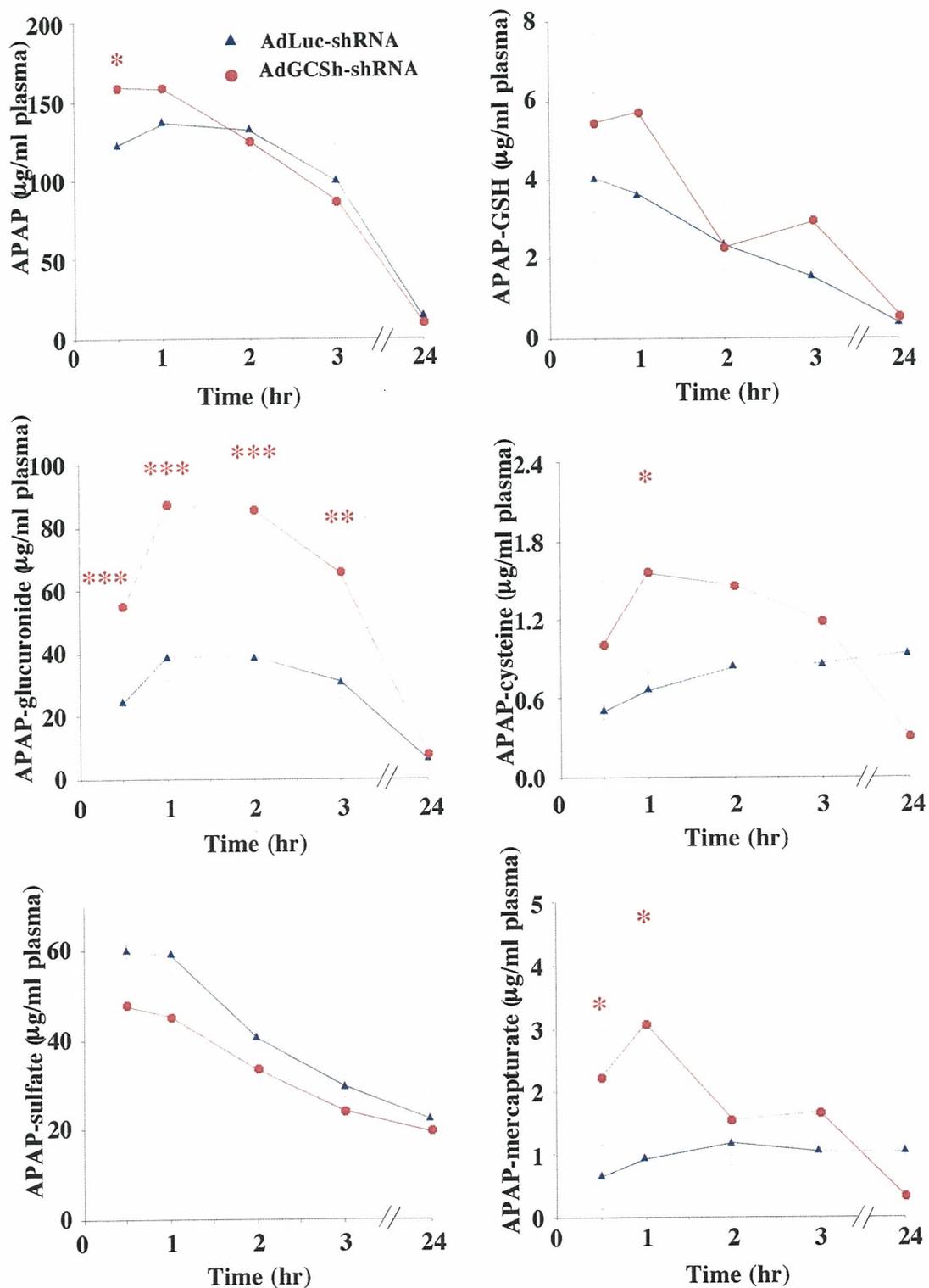
#### D. 考察

本研究ではラット GCSH をノックダウンする shRNA を発現するアデノウイルスを構築し、そのアデノウイルスを用いて培養細胞株におけるノックダウン効率の差異の検討、および

mRNA、タンパク質、総 GSH 含量を指標としてノックダウン効率を検討した。様々な種由来肝癌細胞を用いた検討では、ラット肝癌由来細胞およびマウス由来細胞においては約 80%の有意な mRNA 減少が認められた (Fig. 1)。マウス由来細胞である Hepa1-6 においてはばらつきが大きい結果が得られたが、これはアデノウイルス感染によって Hepa1-6 が細胞変性を起こしたことが原因として考えられる。BRL3A、H4IIE および HLE 細胞はアデノウイルス感染 3 日目において細胞変性像は殆ど認められなかった。また、mRNA レベルにおいて HLE 細胞のみ約 50%の mRNA の減少が認められたが、これは shRNA が RISC に取り込まれた際に認識する GCSH mRNA に対する塩基配列の相同性が関係していると考えられる。本研究において、標的としたラット GCSH 遺伝子対して 100%の相同性を持つように shRNA を設計した。そのため、マウスにおいては 100%の相同性であるが、ヒトにおいては 89%の相同性 (19 mer 中 17 mer の相同性) であった。RNAi による遺伝子ノックダウンは 1 塩基でも相同性が異なるとノックダウン効率が極端に低下することが知られている (Elbashir et al., 2001c)。今回のラットおよびマウス由来細胞においては mRNA が約 80%減少したが、ヒト由来

細胞において同様の結果が得られなかったことは、shRNA の相同性が原因であることが示唆された。

一方、細胞内総 GSH 含量の減少は H4IIE 細胞でのみ約 50%の有意な減少が認められ、BRL3A 細胞および Hepa1-6 細胞では約 20%の減少、HLE 細胞においては殆ど減少が認められなかった。HLE 細胞における mRNA レベルにおける約 50%の減少が認められた結果と、総 GSH 含量が殆ど減少していない結果は相関しているが、BRL3A 細胞と Hepa1-6 細胞では H4IIE と同様な総 GSH 含量の減少が認められなかった。アデノウイルスが細胞に感染する為には、細胞表面に発現している coxsackie and adenovirus receptor (CAR) を介する必要がある (Huang et al., 2005)。この発現量は細胞によって異なることが知られており、アデノウイルスによるノックダウン効率の差異が認められた原因と考えられる。しかし、GCSH mRNA レベルでは H4IIE 細胞と同程度の減少が認められた点を考慮すると、細胞内において GSH 減少が生じた際の GSH 合成のレスポンスの差異が考えられる。また、medium 中のメチオニン濃度が細胞における GSH 合成に依存していることも理由として考えられる (Takada et al., 1984)。



**Fig. 13.** Changes of the plasma concentrations of APAP and its metabolites in adenovirus-treated rats. Rats infected with AdLuc-shRNA or AdGCSH-shRNA were treated with APAP (1,000 mg/kg, *p.o.*). Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  or  $4$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared with AdLuc-shRNA infected groups.

*In vitro* で細胞株による GSH 減少の差異の検討を行うには、全て同じ組成の培地を用いて実験する必要があると考えられる。

本実験で用いた細胞を比較して、H4IIE 細胞を用いた検討において最も総 GSH 含量が減少していたため、AdGCSH-shRNA 感染による詳細なノックダウンの検討を、H4IIE 細胞を用いて行った (Fig. 2)。GCSH mRNA はウイルス感染後 1 日目で減少傾向が認められたが、タンパク質レベルでは 2 日目以降から約 80% の減少が認められた。RNAi による遺伝子ノックダウンは標的 mRNA を切断し、分解することで成立する。そのため、先行して mRNA が減少し、mRNA の翻訳産物であるタンパク質の発現量の減少が mRNA の減少より遅れて生じたと考えられる。GSH は  $\gamma$ -GCS および GSS を介して合成される為、 $\gamma$ -GCS タンパクの発現量の減少に伴って細胞内 GSH 含量が減少することが予測された。結果として、1 日目においては総 GSH 含量の減少は殆ど認められなかったが、3 および 5 日目においては最大で 49% の減少が認められた。mRNA、タンパク質の発現量は約 80% 減少したにもかかわらず、最終生成物である GSH は約 50% の減少であった。このことから、GSH 合成に関わる  $\gamma$ -GCS は常に細胞に十分な量が発現している

状態であり、それにより、80% 程度のタンパク質発現量の減少は、GSH 合成能を 50% 程度抑えたと考えられる。今回の実験では 5 日目まで検討を行ったが、細胞にアデノウイルスを感染させた後、培地交換を行わずに細胞を維持したため、5 日目では細胞が不健康な状態となり、これ以降の検討を行うことは不可能と判断したためである。また、今回使用した組換えアデノウイルスは細胞感染後増殖することは無く、ウイルス感染時点で細胞がコンフルエントの方が、感染効率が良好である。そのため、5 日間培地交換を行わずコンフルエントで細胞培養を行った。*In vitro* での詳細な検討を行うためには、ウイルス感染後、数日毎に培地交換を行い、細胞の状態を良好に保つための条件検討を行うことが必要であるが、ウイルス感染の維持等の検討を併せて行う必要がある。

H4IIE 細胞を用い、感染時間およびウイルス量依存的ノックダウン効率の検討を行った結果、ウイルス感染条件は MOI 20 で 3 日間が最も良好であると判断した。この感染条件により細胞内総 GSH 含量が減少した状態で薬物処理による細胞障害性を評価するため、APAP およびトログリタゾン进行处理し、24 時間後に細胞生存率を測定した (Fig. 3)。その結果、AdGCSH-shRNA 感染によって細胞内

総 GSH 含量は減少したが、GSH 減少による細胞障害性の増強が殆ど認められなかった。H4IIE 細胞には薬物代謝酵素である P450 が殆ど発現していない。APAP は主に CYP2E1、CYP1A2、CYP3A4 によって細胞障害性を示す活性代謝物である NAPQI に代謝される。この活性代謝物が産生されなかったため、NAPQI を解毒する GSH 量が減少している状態であっても細胞障害性が認められなかったと考えられる。HepG2 細胞に様々な CYP を発現させ、APAP の毒性実験を行った報告があるが、CYP を発現していない HepG2 細胞では 10 mM 処理でも細胞障害性が少なく、CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 を発現させた HepG2 細胞においては有意に細胞生存率が低下していた (Yoshitomi et al., 2001)。この報告からも H4IIE 細胞に APAP を代謝する CYP を発現させない限り、細胞障害性に差異は認められないと考えられる。

一方、トログリタゾンの細胞障害性を引き起こす活性代謝物の生成には CYP3A4 が関わっていると報告されている (He et al., 2001)。以前本研究室において、トログリタゾンおよびその代謝物の HepG2 細胞に与える細胞障害性を検討した (Yamamoto et al., 2001)。その結果、トログリタゾン未変化体に細胞障害性があることが示され、さらにトログリタゾンの代謝物として

種々の quinone epoxide が検出され、中でも特に代謝物 M-3、M-C が HepG2 細胞に対する障害性を示した。また、HepG2 細胞に CYP3A4 発現ミクロソームとトログリタゾンを同時に処理することで、トログリタゾンの低濃度処理でも有意に細胞障害性が増強されたとの報告もある (Vignati et al., 2005)。従って、H4IIE 細胞のように CYP を発現していない肝癌由来細胞では、APAP と同様、GSH が減少状態であってもトログリタゾン処理による細胞障害性の増強が認められなかったと考えることができる。本章での検討結果から、*in vitro* においてアデノウイルスによるノックダウン手法を用いて細胞内総 GSH 含量を減少させることにはじめて成功した。

次にさらに、ラット *in vivo* においてアデノウイルスを用い、GCSH 遺伝子をノックダウンする方法について検討した。マウス *in vivo* においては肝臓中 Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1) 遺伝子を、アデノウイルスを用いたノックダウン法により減少させたと報告があるが (Xu et al., 2006)、ラットにおいてアデノウイルスを用いたノックダウン法が成功した例は報告されていない。レンチウイルスベクターを用いた方法によりラットにおいて目的遺伝子をノックダウンすることに成功したとの報告は

あるが、その方法はレンチウイルスベクターを受精卵に注入する方法であるため (Dann et al., 2006)、アデノウイルスを用いた方法に比べ非常に困難であり、安全性にも問題があると考えられる。また本検討は、肝臓における GSH を減少させることが目的であるため、主に肝組織に感染するアデノウイルスを用いた。

本研究では、アデノウイルスベクターを用い目的遺伝子をノックダウンし、その影響がフェノタイプとして現れる条件を最適化し、この方法をはじめてラットに適用させることによって、新しい遺伝子操作方法を確立することを検討した。また、GCSH 遺伝子をノックダウンすることでラット肝臓中 GSH 含量を減少させ、それに伴う GSH による解毒能が低下した状態を確立した。この条件で APAP を投与することで、薬物誘導性肝障害が高感度に検出できるか検討を行った。その結果、AdGCSH-shRNA の投与量が  $2 \times 10^{11}$  PFU/mL/body であり、ウイルス投与 14 日目において、アデノウイルス投与による AST、ALT 値の上昇が認められず、肝組織像の結果からも肝障害が生じていないことが示せた。また、同条件において、ラット肝臓中、GCSH mRNA を約 90%、総 GSH 含量を最大で約 80%減少させることに成功した (Fig. 4 and 5)。この結果から、GCSH

mRNA の減少が、 $\gamma$ -GCS 酵素の活性低下を引き起こし、GSH 生成が減少したことが示唆された。ネガティブコントロールとして AdLuc-shRNA を  $2 \times 10^{11}$  PFU/mL/body で投与し、同様の検討を行ったところ、肝臓中総 GSH 含量の減少および AST、ALT 値の上昇は認められず、肝組織像の結果からも肝障害は生じていなかった。この結果から、AdGCSH-shRNA 投与が GSH 生成量を減少させ、アデノウイルス自体が肝臓中の総 GSH 含量の減少に関わっていないことが示唆された。

AdLuc-shRNA 投与を行ったラット肝臓の組織像では APAP 投与に関わらず、細胞質の淡明化が認められた。この細胞質の淡明化は切片を作成する際に生じた人為的な空隙と考えることができる。しかし、AdLuc-shRNA が発現する shRNA はラットにおいて相補的な配列が存在しないため、shRNA が細胞内に高濃度で蓄積することが考えられる。その結果、このような淡明化像が認められたとも考えられる。この淡明化について詳細に検討を行うには、肝切片について電子顕微鏡を用いてさらに詳しく観察する必要がある。

AdLuc-shRNA 投与群と PBS 投与群との間に、有意な GSH の減少は認められず、ウイルス投与による肝障害の影響も全く認められなかったことか

ら、今後、ネガティブコントロールとして AdLuc-shRNA に代わり、PBS 投与群で検討することが可能であると考えられる。また、AST、ALT 値の上昇が認められた AdGCSh-shRNA 投与量  $8 \times 10^{11}$  PFU/mL/body においても肝組織像からは肝障害を確認することは出来なかった (data not shown)。

今回、AdGCSh-shRNA の投与量については、 $8 \times 10^{11}$  PFU/mL/body を最高投与量として実験を行っているが、以前の検討において約  $16 \times 10^{11}$  PFU/mL/body 投与を行った際、Fisher 344 ラット 4 匹中 3 匹が 3 日以内に死亡する結果となった (data not shown)。そのため、今回はアデノウイルス投与によって死亡することの無いウイルス量  $8 \times 10^{11}$  PFU/mL/body で実験を行った。アデノウイルス投与後 14 日目までは、毒性実験に用いることは無いため、肝障害マーカーの測定はそれ以前の時点で行わなかった。また、ラット肝重量がアデノウイルス投与量  $1 \sim 8 \times 10^{11}$  PFU/mL/body の間において、増大する傾向が認められた。アデノウイルス投与により投与早期の段階で免疫系の活性化等が生じ、肝肥大が生じたためと考えることができる。また同様に脾臓も肥大傾向が認められた (data not shown)。しかし、アデノウイルス投与量が  $2 \times 10^{11}$  PFU/mL/body 以下で、AST、ALT 値の上昇や肝組織像

の変化は認められなかったため、問題ないと考えられる。

本検討中における総 GSH 含量減少の持続期間を検討する実験において、約 80% の総 GSH 含量の減少が認められてから、少なくとも 2 週間の間 (投与後 4 週目まで)、ラット肝臓中総 GSH 含量の減少を 70%、3 週間の間 (投与後 5 週目まで) 50% を保つことが示された (Fig. 9)。アデノウイルス投与実験開始後 5 週目において、PBS 投与群の肝総 GSH 含量が 2~4 週目における値より約  $1 \mu\text{mol/g wet liver}$  減少していた。ラットを長期間飼育することにより GSH 日内変動に僅かながら誤差が生じたことが原因として考えられるが、この理由は不明である。これらの結果を総合すると、薬物投与に長期間を要する慢性毒性試験にこのモデルを用いることは難しいと考えられるが、急性毒性試験、および亜急性毒性試験モデルとして、新薬候補化合物に対する高感度毒性試験系として GSH 減少モデルラットを用いることができると考えられる。

アデノ随伴ウイルスベクターは *in vivo* においてアデノウイルスに比べ、半年から 1 年程度と長期間目的遺伝子を発現できることが知られている (Grimm et al., 2006)。アデノ随伴ウイルスにおいて、今回使用した U6 プロモーターおよび shRNA 配列を組み込む

ことで、長期間安定した GSH 減少を持続させることができ、慢性毒性試験用 GSH 減少モデルラットを作成することが可能であると考えられる。しかし、アデノ随伴ウイルスはゲノムが 1 本鎖 DNA であるため、遺伝子発現が起こるには 2 本鎖になる必要があり、発現効率が良好ではないため、ある程度の発現量を得るには膨大な量のベクターが必要であると報告されている(Russell et al., 1999)。従って、今後アデノ随伴ウイルスを用いて実験を行うには更なる検討が必要と思われる。

APAP 投与による急性毒性実験において、通常は 24 時間の絶食が行われるが、絶食はラットにおける肝臓中 GSH 含量の低下を引き起こし、CYP2E1 の誘導を引き起こす (Fry et al., 1999)。今回の検討結果からも、絶食を行うことで 1,000 mg/kg で APAP 投与を行うと肝毒性が認められたが、非絶食条件で APAP 投与を行うと肝毒性は認められなかった (Fig. 6)。このことから、肝臓中 GSH 減少により、APAP 誘導性肝障害が起こりやすくなることが示唆された。一方、APAP から活性代謝物である NAPQI への代謝は主に CYP2E1 によって触媒される。そのため、絶食による CYP2E1 の誘導および GSH 減少は、AdGCSh-shRNA 投与が引き起こす GSH 減少に起因する APAP による肝毒性の検討を、困難

にすることが予測された。従って、絶食によるラット肝臓中チトクロム P450 の分子種の存在比の変化が及ぼす影響を考慮し、本研究では絶食を行わなかった。その結果、AdGCSh-shRNA 投与群において、APAP 1,000 mg/kg 投与を行った場合のみ、肝障害が認められた (Figs. 7 and 8)。APAP 投与 24 時間後における AST および ALT 値は、個体間においてばらつきが大きかったが、APAP 投与による肝障害発現に個体差が生じるという結果は、過去の報告と一致していた (Heinloth et al., 2004)。

APAP による肝障害の影響で血清中総ビリルビン値が上昇することが考えられた。しかし、AdGCSh-shRNA 投与群のうち、APAP 投与群と CMC 投与群を比較したところ、血清色に違いが認められ、APAP 投与群は黄褐色を示していたが、総ビリルビン値に違いは認められなかった。興味深いことに、AdGCSh-shRNA 投与群が AdLuc-shRNA 投与群と比べ、APAP 投与に関わらず、総ビリルビン濃度が約 2 倍に上昇していた。ビリルビンを排泄するトランスポーターとして multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) が知られているが、このトランスポーターは GSH および GSH 抱合体も輸送することが知られている (Fardel et al., 2005)。主な GSH 合成は

肝臓で行われることが知られているが、肝臓中での GSH 合成が AdGCSH-shRNA 投与により低下することで、それを輸送するトランスポーターである MRP2 が down regulation を受け、発現量の低下に伴いビリルビンの胆管排泄が減少し、血液中ビリルビン濃度が上昇したと推測されるが、さらに詳しい検討を必要とする。

AdGCSH-shRNA 投与ラットにおいて、肝における総 GSH 含量の減少を示すことができた。肝における総 GSH 含量が減少することで、APAP の GSH 抱合体の生成量が減少することが推測されたため、HPLC を用いて血漿中の APAP およびその代謝物を測定した (Fig. 13)。その結果、AdGCSH-shRNA 投与ラットが AdLuc-shRNA ラットと比べ、GSH 抱合体濃度が約 1.7 倍上昇していた。このような結果が得られた理由として、GSH 減少ラットにおける GST 活性の上昇が考えられた。GST 活性が上昇することで、アセトアミノフェン投与の投与初期の段階で、通常よりも過剰な GSH 抱合反応が生じたと考えられる。

今回の検討では、APAP 投与を行った 3 時間以後の経時採血を行わなかったため、その後の GSH 抱合体濃度の変動を比較検討することができなかった。しかし、今回行った HPLC の検討結果より、AdLuc-shRNA 投与群で

は、肝臓において通常量の GSH が存在するため、肝障害を引き起こす NAPQI の GSH 抱合反応が、APAP 投与から 24 時間後にも継続していたと考えられる。一方、AdGCSH-shRNA 投与群では APAP 投与から 3 時間の間に肝 GSH が消費され、その後は GSH 抱合体の生成が低下し、NAPQI による肝障害が生じたと考えられる。そのため、アセトアミノフェン投与を行った 24 時間後において、メルカプツール酸抱合体、システイン抱合体量が AdLuc-shRNA 投与群と比べて減少していたと考えられる。

現在までに、BSO による肝 GSH 減少がアセトアミノフェンのグルクロン酸抱合活性を上昇させ、硫酸抱合活性を減少させるという報告がなされている (Manning et al., 1991)。この報告の中で著者らは肝 GSH 量の減少はグルクロン酸抱合活性に関係なく、BSO による他の誘導機構があると考察している。今回の AdGCSH-shRNA 感染による GSH 減少モデルラットの検討においても同様の結果が得られた。また、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* の検討において、酸化ストレスが、アセトアミノフェンを代謝する分子種である UGT1A6 の発現を誘導するという報告がなされている (Kohle et al., 2005)。これらの結果を総合して、肝 GSH 量の減少は、グルクロン酸抱合活

性を上昇させることが示唆された。また、硫酸抱合活性の減少はグルクロン酸抱合活性上昇による付随的なものと考えられる。

GSH 減少モデルラットはアセトアミノフェンによる肝障害を高感度に検出することができるが、グルクロン酸抱合活性を上昇させ、硫酸抱合活性を減少させるため、これらの酵素で主に代謝される薬物の肝毒性試験を行う際には、注意が必要である。

現在までの報告で、ラットにおいて $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現させるアデノウイルスを導入することで CYP3A2 および CYP2C11 活性、およびそれらのタンパク発現量が減少したとの報告があるが (Callahan et al., 2006)、その原因としてウイルスベクターが発現するタンパクや、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの配列に対する免疫応答の誘発が原因であると述べている。同様に本検討においても、CYP2C11 タンパクの発現量が減少したという結果が得られたことから、ウイルスベクターが発現するウイルス由来タンパクが免疫応答系に作用して、CYP2C11 の発現を減少させていると考えられる (Fig. 12)。しかし、APAP 肝障害性に関与するといわれている CYP2E1 および CYP1A2 は発現量に差は殆ど認められなかったことから、少なくとも今回の APAP 投与実験においては

CYP 発現量の減少は問題ないと考えられる。

一方、AdGCSh-shRNA 投与群において、ラット肝臓 CYP で発現量が最も高い CYP2C11 の発現が減少していたにもかかわらず、チトクロム P450 含量が AdLuc-shRNA 投与群、PBS 投与群と比べて上昇していたが、その理由は不明である。他の CYP 分子種が誘導された可能性も考えられる。GST 活性は CDNB を用いて測定したところ、GSH 減少による活性値の変動は認められなかった。他の GST 分子種に特異性の高い基質を用いて活性測定を行うことで異なった結果が得られるかもしれない。

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ため、今回は肝臓以外の臓器について、GSH の変動の検討を行わなかった。しかし、アデノウイルスを尾静脈から投与しても脾臓、心臓、肺のような肝外臓器に発現が認められるとの報告を考慮すると (Crettaz et al., 2006)、本研究においても、GSH 減少モデルラットの最適化のため、肝外臓器における GSH 発現量測定を行うなど、今後の更なる検討が必要と考えられる。また、序論でも述べたが、BSO による GSH 減少には、BSO の摂取時間が影響していると推測される日内変動が存在し、このことが BSO を用いた GSH 減少モデルの

欠点であると考えられる。そこで、今回作成した GSH 減少モデルラットを用い、8 時間毎に肝臓 GSH 含量の測定を行った。PBS 投与群では、わずかながら日内変動が認められた。これは、ラットの摂食に関係した変動であることが示唆された。しかし、GSH 減少ラットではこのような GSH の日内変動は認めらず、24 時間の間、一定した GSH 減少を示した (Fig. 10)。この結果より、AdGCSH-shRNA による GSH 合成のノックダウン法は、BSO を用いた方法よりも安定した GSH 減少を保つことができることを示した。

アデノウイルスを用いた方法により、ラット *in vivo* におけるノックダウンに成功した例は今回が初めてであり、ノックアウトラットの作成が困難である現在、肝臓特異的ではあるが、目的遺伝子を減少させることができる方法を確立したことにより、今後の医薬品開発における動態研究および安全性研究において、マウスよりも扱いやすく、頻用されているラットを用いた研究が行われるようになると考えられる。

## E. 結論

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 $\gamma$ -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 GCSH 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 GCSH 遺伝子をノックダウンするアデノウイルス(AdGCSH-shRNA) を作成した。この AdGCSH-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、AdGCSH-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。肝癌由来細胞に CYP の発現が認められないことが主な原因であると考えられる。

ラット *in vivo* において AdGCSH-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で、AdGCSH-shRNA を  $2 \times 10^{11}$  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。この結果は第 I 章の結果を支持するものであり、CYP 存在下で GSH 減少が引き起こされると、反応性代謝物による薬物誘導性肝障害が増強されることを示している。しかし、アデノウイルス投与により CYP2C11 発現量に有意な減少が認められた事、さらにヒトにおいて毒性が認められる投与量と比べると 1,000 mg/kg 投与は過剰量投与である点を考慮すると、今後は、ラット肝臓中にヒト CYP を過剰発現させる方法を確立し、本方法と併用することにより、よりヒトにおける毒性発現条件に近い実験系を確立する必要があると考えられる。

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。さらにこの方法を用いることで、ノックアウトでは評価することのできない胎生致死遺伝子も *in vivo* において評価できると考えられる。

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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 学会発表

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 口頭 東京

赤井 翔、細見浩子、南 圭一、加藤美紀、中島美紀、横井 毅： $\gamma$ -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 ポスター 富山

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

I. 参考文献

Abbott A (2004) Laboratory animals: The renaissance rat. *Nature* **428**: 464-466.

Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD and Moldeus P (1985) Mechanisms of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol Pharmacol* **28**: 306-311.

Callahan SM, Boquet MP, Ming X, Brunner LJ and Croyle MA (2006) Impact of transgene expression on drug metabolism following systemic adenoviral vector administration. *J Gene Med* **8**: 566-576.

Chu RL, Post DE, Khuri FR and van Meir EG (2004) Use of replicating oncolytic adenoviruses in combination therapy for cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 5299-5312.

Crettaz J, Berraondo P, Mauleon I, Ochoa L, Shankar V, Barajas M, van Rooijen N, Kochanek S, Qian C, Prieto J, Hernandez-Alcoceba R and Gonzalez-Aseguinolaza G (2006) Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice. *Hepatology* **44**: 623-632.

Kohle C, Badary OA, Nill K, Bock-Hennig BS and Bock KW (2005) Serotonin glucuronidation by Ah receptor- and oxidative stress-inducibile human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* **69**:

1397-1402.

Dalton TP, Dieter MZ, Yang Y, Shertzer HG and Nebert DW (2000) Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 324-329.

Dann CT, Alvarado AL, Hammer RE and Garbers DL (2006) Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 11246-11251.

Davidson DG and Eastham WN (1966) Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J* **5512**: 497-499.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.

Elbashir SM, Lendeckel W and Tuschl T (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**: 188-200.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W and Tuschl T (2001c) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* **20**: 6877-6888.

Fardel O, Jigorel E, Le Vee M and Payen L (2005) Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed Pharmacother* **59**: 104-114.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Fry JR, Sinclair D, Piper CH, Townsend SL and Thomas NW (1999) Depression of glutathione content, elevation of CYP2E1-dependent activation, and the principal determinant of the fasting-mediated enhancement of 1,3-dichloro-2-propanol hepatotoxicity in the rat. *Food Chem Toxicol* **37**: 351-355.

Griffith OW, Bridges RJ and Meister A (2000) Transport of gamma-glutamyl amino acids: role

of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 6319-6322.

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F and Kay MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**: 537-541.

Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**: 7130-7139.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D and Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.

He K, Woolf TF, Kindt EK, Fielder AE and Talaat RE (2001) Troglitazone quinone formation catalyzed by human and rat CYP3A: an atypical CYP oxidation reaction. *Biochem Pharmacol* **62**: 191-198.

Heinloth AN, Irwin RD, Boorman GA, Nettesheim P, Fannin RD, Sieber SO, Snell ML, Tucker CJ, Li L, Travlos GS, Vansant G, Blackshear PE, Tennant RW, Cunningham ML and Paules RS (2004) Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicol Sci* **80**: 193-202.

Hinson JA, Pohl LR, Monks TJ and Gillette JR (1981) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Life Sci* **29**: 107-116.

Howie D, Adriaenssens P and Prescott LF (1977) Paracetamol metabolism following overdose: Application of high performance liquid chromatography. *J Pharm Pharmacol* **29**: 235-237.

Huang GS, Chang LS, Anderson ME and Meister A (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**: 19675-19680.

Huang KC, Altinoz M, Wosik K, Larochelle N, Koty Z, Zhu L, Holland PC and Nalbantoglu J (2005) Impact of the coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on glioma cell growth and invasion: requirement for the C-terminal domain.

*Int J Cancer* **113**: 738-745.

Jackson MA, Stack HF, Rice JM, Waters MD (2000) A review of the genetic and related effects of 1,3-butadiene in rodents and humans. *Mutat Res* **463**: 181-213.

Kiyosawa N, Ito K, Sakuma K, Niino N, Kanbori M, Yamoto T, Manabe S and Matsunuma N (2004) Evaluation of glutathione deficiency in rat livers by microarray analysis. *Biochem Pharmacol* **68**: 1465-1475.

Kola I and Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **3**: 711-715.

Kruyt FA and Curiel DT (2002) Toward a new generation of conditionally replicating adenoviruses pairing tumor selectivity with maximal oncolysis. *Hum Gene Ther* **13**: 485-495.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lu SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* **13**: 1169-1183.

Maas WJ, Leeman WR, Groten JP and van de Sandt JJ (2000) Cryopreservation of precision-cut rat liver slices using a computer-controlled freezer. *Toxicol In Vitro* **14**: 523-530.

Manning BW, Franklin MR and Galinsky RE (1991) Drug metabolizing enzyme changes after chronic buthionine sulfoximine exposure modify acetaminophen disposition in rats. *Drug Metab Dispos* **19**: 498-502.

Miner DJ and Kissinger PT (1979) Evidence for the involvement of *N*-acetyl-*p*-quinoneimine in acetaminophen metabolism. *Biochem Pharmacol* **28**: 3285-3290.

Omura T and Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**: 2370-2378.

Orlowski M and Meister A (1971) Isolation of highly purified gamma-glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Biochemistry* **10**: 372-380.

Pal-Bhadra M, Bhadra U and Birchler JA (1997) Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is polycomb dependent. *Cell* **90**: 479-490.

Peng Z (2005) Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* **16**: 1016-1027.

Russell DW and Kay MA (1999) Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* **94**: 864-874.

Reed DJ (1986) Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* **35**: 7-13.

Sims P and Grover PL (1965) Conjugations with glutathione. The enzymic conjugation of some chlorocyclohexene. *Biochem J* **95**: 156-160.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman R and Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**: 227-264.

Takada A and Bannai S (1984) Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* **259**: 2441-2445.

Tietze F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**: 502-522.

Tone Y, Kawamata K, Murakami T, Higashi Y and Yata N (1990) Dose-dependent pharmacokinetics and first-pass metabolism of acetaminophen in rats. *J Pharmacobiodyn* **13**: 327-335.

Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4350-4354.

Trumper L, Girardi G and Elias MM (1992) Acetaminophen nephrotoxicity in male Wistar rats. *Arch Toxicol* **66**: 107-111.

van de Straat R, Vromans RM, Bosman P, de Vries J and Vermeulen NP (1988) Cytochrome P-450-mediated oxidation of substrates by

- electron-transfer; role of oxygen radicals and of 1- and 2-electron oxidation of paracetamol. *Chem Biol Interact* **64**: 267-280.
- Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter R and Monshouwer M (2005) An *in vitro* approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* **216**: 154-167.
- Yamamoto Y, Yamazaki H, Ikeda T, Watanabe T, Iwabuchi H, Nakajima M and Yokoi T (2002) Formation of a novel quinone epoxide metabolite of troglitazone with cytotoxicity to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos* **30**: 155-160.
- Yamazaki H, Nakajima M, Nakamura M, Asahi S, Shimada N, Gillam EMJ, Guengerich FP, Shimada T, and Yokoi T (1999) Enhancement of cytochrome P450 3A4 catalytic activities by cytochrome *b<sub>5</sub>* in bacterial membranes. *Drug Metab Dispos* **27**: 999-1004.
- Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW and Dalton TP (2002) Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *J Biol Chem* **277**: 49446-49452.
- Yoon MY, Kim SJ, Lee BH, Chung JH and Kim YC (2006) Effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of acetaminophen in mice. *Biol Pharm Bull* **29**: 1618-1624.
- Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M and Asahi S (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol In Vitro* **15**: 245-256.
- Xu H, Wilcox D, Nguyen P, Voorbach M, Suhar T, Morgan SJ, An WF, Ge L, Green J, Wu Z, Gimeno RE, Reilly R, Jacobson PB, Collins CA, Landschulz K and Surowy T (2006) Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in *ob/ob* mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun* **349**: 439-448.
- Zan Y, Haag JD, Chen KS, Shepel LA, Wigington D, Wang YR, Hu R, Lopez-Guajardo CC, Brose HL, Porter KI, Leonard RA, Hitt AA, Schommer SL, Elegbede AF and Gould MN (2003) Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* **21**: 625-627.
- Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A and Cozzi J (2003) Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* **302**: 1179.

CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた細胞障害モデル

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

近年、作用機序や服用方法が多様化した新薬が次々と生み出されている一方、医薬品にまつわる健康被害の例は世界中で後を絶たない (Casseles, 2006)。そこで非臨床試験、および臨床試験の段階において、それら薬物が生体にとって安全に薬効を示すか、過去の臨床データを様々な角度から評価し、明らかにしていく必要がある。薬物が体内で毒性化合物となる化学修飾メカニズムには、多くの場合、異物の解毒に関わる酵素、それと関連した合成酵素が関与してくるが、その機能は、年齢、人種、遺伝子多型、環境因子などに多いに影響される。よって非臨床試験の段階で、起こりうるあらゆる副作用や危険性を予測するには、実際に生じた事例の検討結果を受け、想定される薬物代謝経路を構築することが望まれている。

本研究では、実際にヒト肝で多く発現している薬物代謝酵素、CYP3A4 に焦点を当て、肝で特異的に発現するアデノウイルス5型を用い、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 $\beta$ 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。組み込んだ配列やウイルスの暴露量によっては、宿主の遺伝子やタンパクに対して何らかの影響があることが示唆されている。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。

A. 研究目的

薬物は生体内で様々な代謝を受ける。  
多くの場合、薬物代謝酵素によって担

われる酸化、還元、加水分解において  
水酸基や第一級、第二級アミン基が生  
成され、さらに抱合反応により極性が

上がることで排泄されやすくなる。前者は第一相反応 (phase I reaction)、抱合反応は第二相反応 (phase II reaction) と呼ばれている。第一相反応においてシトクロム P450 (CYP) による酸化反応は多岐にわたり、ほとんどの脂溶性薬物を代謝し、薬物代謝の中心的役割を演じている。また代謝的活性化による薬物の毒性発現にも CYP は関与することが知られている。CYP は微生物から高等植物、哺乳動物に至るまで多くの生物体に存在する。ヒトでは主に肝に大部分が存在するが、赤血球や精子を除くほとんど全ての臓器にも分布している。細胞内においては滑面小胞体や粗面小胞体、核膜、リボソーム、ミトコンドリアなどの細胞小器官に局在しており、中でも肝ミクロソームの CYP が薬物代謝では重要である。また第二相反応には、主にグルクロン酸抱合、硫酸抱合、グルタチオン抱合、アセチル抱合、メチル抱合、アミノ酸抱合などが知られており、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)、硫酸転移酵素、グルタチオン S-転移酵素 (GST)、その他種々の補酵素などが各々の反応を触媒している (加藤, 鎌谷, 2000)。

一方、非臨床試験での薬効試験、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る。ところがげっ歯類とヒトの肝臓では代謝活性に大きな違いがあるため、新薬

候補化合物のヒトにおける体内動態を非臨床試験の段階で予測することは困難である (Nedeicheba et al., 1994)。実際に臨床試験中に開発中止となる候補化合物は約 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。例えばヒト肝ミクロソームにおける CYP 分子種は CYP3A4 が最も多く、その組成比は約 28.8%である。次いで CYP2C が 18.2%、CYP1A2 が 12.7%を占めており、第一相反応を担っている。それに対しラットにおいては、ヒトで多く発現している CYP3A4 は存在しておらず、雄では CYP2C11、雌では CYP2C12 が主に発現しており、その他の酵素に関して種差の報告も多い (Kato et al., 1992)。さらに、第二相反応を担う GST 抱合能は、ラットにおいてヒトの 16-24 倍であり、種差に起因する抱合活性の違いが顕著に認められる酵素の一つである (Glover and Sims, 1963)。一方、GST 抱合を担うグルタチオンは  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) により、グルタミン酸とシステインから  $\gamma$ -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  $\gamma$ -グルタミルシステインから合成される。この反応の律速酵素である  $\gamma$ -GCS は、ヘテロダイマー酵素であり、catalytic サブユニット (heavy; 73 kDa) および modulatory サブユニット (light; 27.7 kDa) から構成さ

れており、catalytic サブユニット (GCS<sub>h</sub>) は酵素活性部位として、modulatory サブユニット (GCS<sub>l</sub>) はグルタチオン蓄積によるグルタチオン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 (Yang et al., 1993)。現在、 $\gamma$ -GCS の heavy chain に相補的なショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するアデノウイルス (AdGCS<sub>h</sub>-shRNA) は本研究室においてすでに作成され、 $\gamma$ -GCS mRNA に対するノックダウン効果を *in vitro* および *in vivo* で確認している。そこで本研究では、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、AdGCS<sub>h</sub>-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目的とした。

現在最も汎用されているアデノウイルスベクターは、ヒトアデノウイルス 5 型由来のもので、E1 および E3 遺伝子が欠失されている。E1 遺伝子が欠失しているため、この組み換えアデノ

ウイルスは E1 遺伝子を持続的に発現している 293 細胞 (ヒト胎児腎細胞樹立株) では複製増殖できるが、通常の細胞内では複製増殖できない。また、E3 遺伝子は *in vitro* の増殖には必要ではなく、*in vivo* において免疫監視機構との関連が知られている (Ueno et al., 2000)。そこで本検討では、このようなアデノウイルスベクターに CYP3A4 cDNA を組み込み、293 細胞にトランスフェクションすることにより、AdCYP3A4 を作製した。さらに AdCYP3A4 を、CYP3A4 が発現していない H4IIE 細胞 (ラット肝癌由来細胞) に感染させ、CYP3A4 活性を発現させた。また、ノックダウンウイルスである、AdGCS<sub>h</sub>-shRNA および AdGCS<sub>h</sub>-shRNA に対するコントロールウイルスの AdLuc-shRNA を導入し、H4IIE 細胞に AdCYP3A4 と同時感染させた。AdLuc-shRNA は Luciferase 遺伝子に相補的な配列 19 bp を含むショートヘアピン型 RNA (shRNA) を発現するアデノウイルスである。そこで、各ウイルスの *in vitro* における影響を、mRNA 測定、テストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性、および GSH 含量により評価した。さらに薬物処置による細胞障害性への影響を CCK アッセイにより検討した。

トログリタゾン は、硫酸抱合、グルクロン酸抱合、CYP3A4 による代謝を受けるが、CYP3A4 により代謝された