

一部は活性代謝物として未変化体のトログリタゾンと共に細胞障害性を示す。トログリタゾンの活性代謝物であるキノン体は、グルタチオン抱合により解毒的代謝を受ける (Yamamoto et al., 2001)。これらの薬物を検討に使用した。

B. 研究方法

B-1. AdCYP3A4 の構築

Takara の Adenovirus Expression Vectors Kit を用い、プロトコルを参考に AdCYP3A4 を作製した。

B-2. CYP3A4 遺伝子の pAxCAwtit ベクターへの組み換え

CYP3A4 遺伝子を有するベクター pCW CYP3A4 を制限酵素 *Cla*I で切断することで CYP3A4 の全長を切り出し、同様に *Cla*I 処理した CAG プロモーターを有する pAxCAwtit に挿入することで目的のプラスミドを得た。

B-3. テストステロン 6 β 水酸化酵素活性の測定

Yamazaki と Shimada の方法に従い測定した (Yamazaki and Shimada, 1997)。I-

B-4. Real-time PCR

Real-time PCR に用いたプライマーの配列を Table に示す。

Table 3. Sequence of primers for Human CYP3A4, Rat γ GCS, and Rat GAPDH.

Primer	Sequence
Human CYP3A4	RP: 5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3' FP: 5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
Rat γ GCS	RP: 5'-ATGCAGTATTCTGAACTACC-3' FP: 5'-ACAAACTCAGATTCACCTAC-3'
Rat GAPDH	RP: 5'-GTTACCAGGGCT GCCTTCCT-3'

B-5. その他の実験方法

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、total RNA の調製、タンパク質定量

C. 研究結果

C-1. ウイルス力価測定結果

I-2-5 の方法によって求めたウイルス液の力価測定結果を Table 4 に示す (Table.4)。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。今後、この測定結果に基づいてウイルス感染条件検討を行った。

C-2. 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

12 ウェルプレートにおいて H4IIE 細胞を細胞数 3×10^5 cells/well、 6×10^5 cells/well で用意し、AdCYP3A4 感染を行った。感染は MOI 0.08, 0.15, 0.3, 0.6,

1.25, 5, 10, 20, 40, 200 で行い、感染 3 日目において 100 μ M テストステロン処置後、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。Fig.1 は H4IIE 細胞に AdCYP3A4 の MOI を変えて感染させた場合における CYP3A4 のテストステロン 6 β 水酸化酵素活性値 (pmol/min/mg cell protein) を、細胞数ごとに示している。その結果、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。しかし MOI 20, 40 よりも、顕微鏡での観察において MOI 10の方が細胞の状態が良好であったため、12 ウェルプレートにおける H4IIE 細胞への AdCYP3A4 感染は、MOI 10で行うと判断した。MOI 200ではウイルス暴露量が強すぎるためか、活性値は減少した。

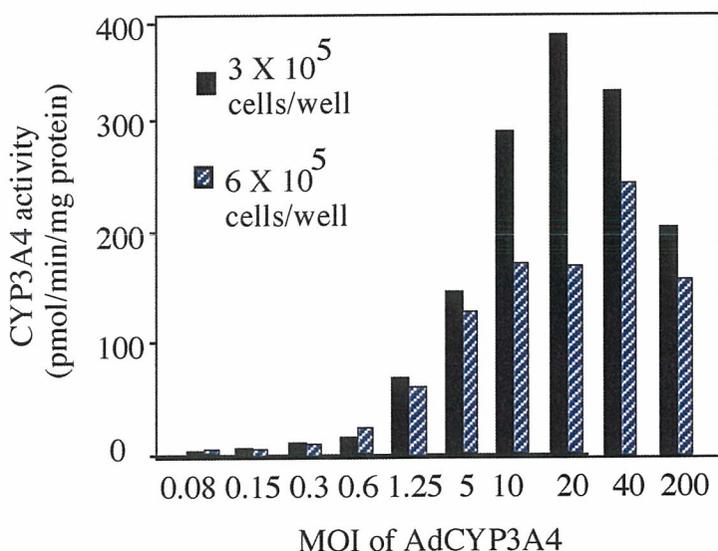


Fig.1. MOI-dependent changes of CYP3A4 activity in H4IIE cells. Data represent the mean of duplicate determinations.

C-3. AdCYP3A4 の時間依存的テストステロン 6β水酸化酵素活性の変動

12 ウェルプレートにおいて H4IIE 細胞を細胞数 3×10^5 cells/well で用意し、AdCYP3A4 を MOI 10 で感染させた。感染後 1, 2, 3, 5 日目に 100 μM 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 6β水酸化酵素活性を測定した。Fig.2 は、感染 1, 2, 3,

5 日目における CYP3A4 のテストステロン 6β水酸化酵素活性値 (pmol/min/mg cell protein) を示している。その結果、感染 3 日目において最も高いテストステロン 6β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。

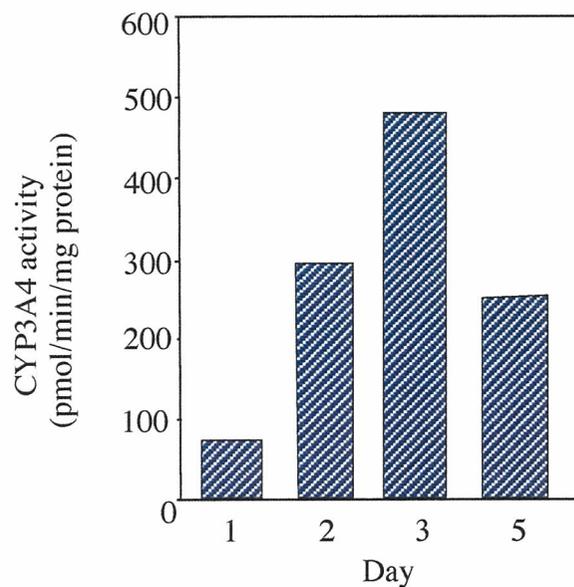


Fig.2. Time-dependent changes of CYP3A4 activity in H4IIE cells. Data represent the mean of duplicate determinations.

C-4. AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA 同時感染における GCSH mRNA 減少

12 ウェルプレートにおいて H4IIE 細胞を細胞数 6×10^5 cells/well で用意し、AdCYP3A4 を MOI 5, 10 で、また AdGCSH-shRNA を MOI 10, 20 で同時感染させた。また、AdGCSH-shRNA に対するコントロールウイルスとして、

AdLuc-shRNA を AdGCSH-shRNA と同様に MOI 10, 20 で同時感染させ、感染 3 日目の mRNA を定量した。AdGCSH-shRNA のウイルス感染における MOI は、当研究室において先に濃度検討を行った結果を参考にした。Fig. 3 は AdCYP3A4 MOI 10/AdLuc-shRNA MOI 20 における各

mRNA 量を基準とした CYP3A4 mRNA 量と GCSH mRNA の相対値を示している。結果、AdCYP3A4 MOI 10/AdGCSH-shRNA MOI 20 においても、AdCYP3A4 MOI 5/AdGCSH-shRNA MOI 10 においても、GCSH mRNA は約 90%減少した。また、CYP3A4 mRNA 発現量は、MOI 5 においても MOI 10 においても大きな違いは認められなかった。この結果より、AdCYP3A4 MOI 10 感染条件において、AdGCSH-shRNA を MOI 10 もしくは 20

で同時感染させても、GCSH mRNA が減少することを見出した。なお、CYP3A4 mRNA に対するコントロール群を設定していないが、ラット肝癌由来である H4IIE 細胞には CYP3A4 は発現していないことは Real-time PCR 法により確認済みである。よって、今回 CYP3A4 mRNA を検出できたことにより、AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA の同時感染においても、CYP3A4 mRNA の発現を認めた。

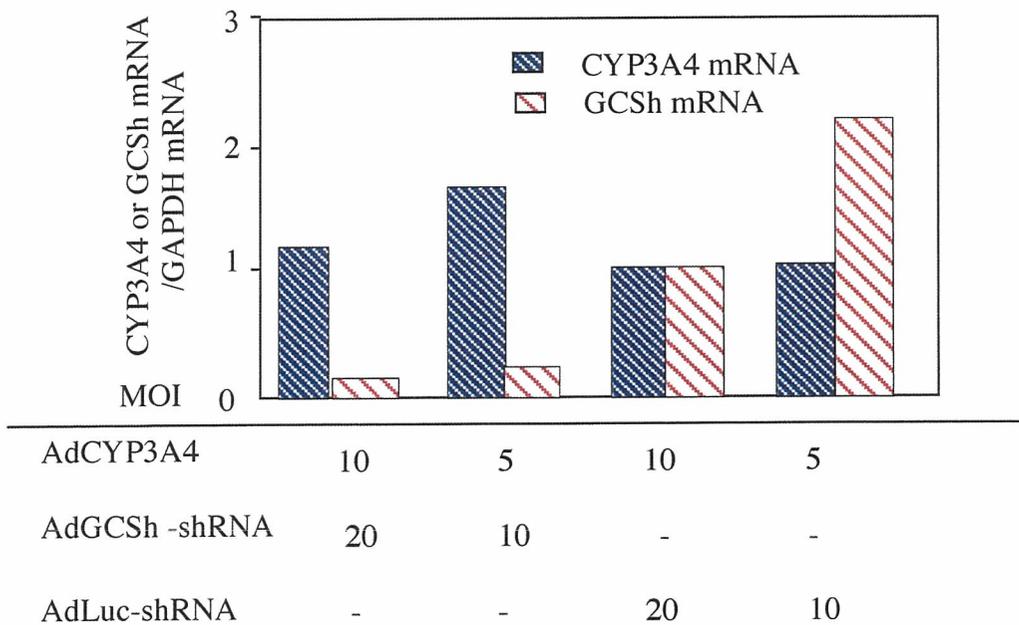


Fig.3. Relative expression of CYP3A4 mRNA and GCSH mRNA in H4IIE cells. Data represent the mean of duplicate determinations.

C-5. 時間依存的テストステロン 6β水酸化酵素活性の変動
12 ウェルプレートにおいて H4IIE 細

胞を細胞数 3×10^5 cells/well で用意し、AdCYP3A4 を MOI 10、AdGCSH-shRNA および AdLuc-shRNA

をともに MOI 20 で感染させた。感染後 1, 2, 3 日目において 100 μ M テストステロン処置後、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。Fig. 4 はウイルス感染 1, 2, 3 日目において、12 ウェルプレート 1 ウェル分に相当するテストステロン 6 β 水酸化酵素活性値 (pmol/min/mg cell protein) を示している。結果、

AdCYP3A4 と AdGCSh-shRNA を同時感染させても、感染 2 日から 3 日目において活性の顕著な上昇が認められた。また、AdGCSh-shRNA に対するコントロールウイルスとして使用している AdLuc-shRNA の同時感染では、AdGCSh-shRNA との同時感染よりも AdCYP3A4 による活性が十分に得られなかった。

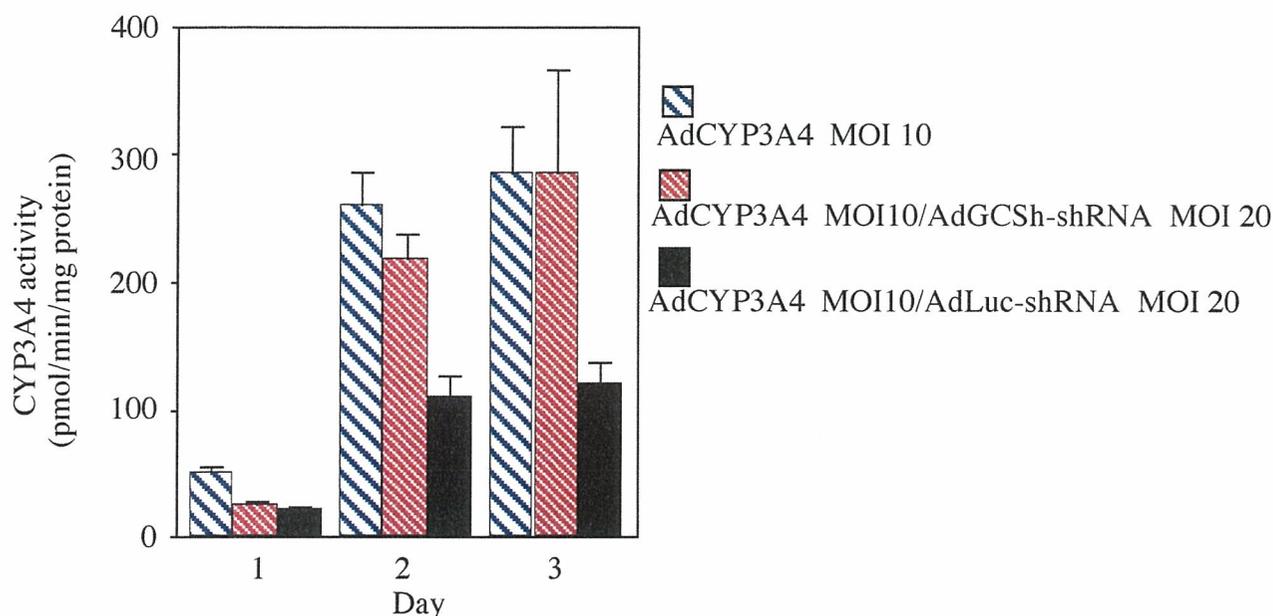


Fig.4. Time-dependent changes of CYP3A4 activity in H4IIE cells after AdCYP3A4, AdGCSh-shRNA, and AdLuc-shRNA infection.

Data are expressed as mean \pm SD from three experiments.

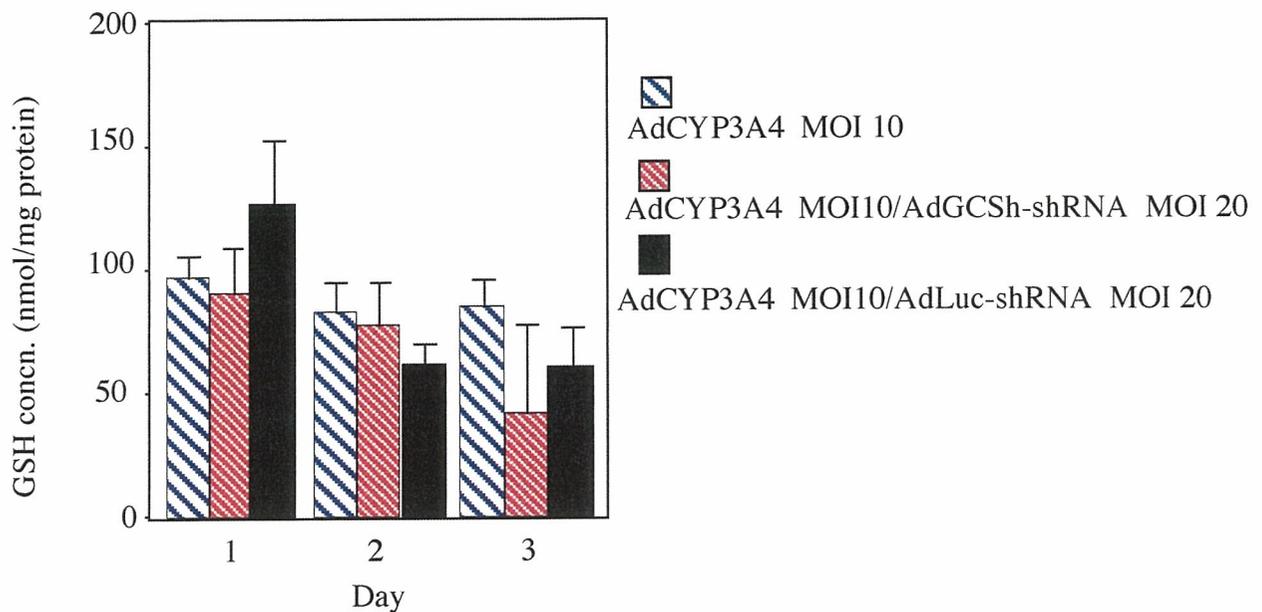
C-6. 時間依存的グルタチオン含量の変動

12 ウェルプレートにおいて H4IIE 細胞を細胞数 6×10^5 cells/well で用意し、AdCYP3A4 を MOI 10、

AdGCSh-shRNA および AdLuc-shRNA を MOI 20 で感染させた。感染後 1, 2, 3 日目において細胞内グルタチオン含量 (nmol/mg protein) を測定した。Fig. 5 はウイルス感染 1, 2, 3 日目において

12 ウェルプレート 1 ウェル分に相当する細胞内総グルタチオン含量を示している。その結果、感染 1 日目と 2 日目においては、AdCYP3A4 単独感染と AdGCSh-shRNA 同時感染間において、グルタチオン含量の差は認められなかったが、3 日目にして約 50%の差

が認められた。しかし、AdCYP3A4 と AdLuc-shRNA の同時感染群と、AdCYP3A4 と AdGCSh-shRNA 同時感染群とを比較して、感染 3 日目においてもグルタチオン含量の差は認められなかった。



.Fig.5. Time-dependent changes of total glutathione content in H4IIE cells after AdCYP3A4, AdGCSh-shRNA, and AdLuc-shRNA infection. Data are expressed as mean \pm SD from three experiments.

C-7. トログリタゾン暴露による細胞障害性の変化

96 ウェルプレートにおいて H4IIE 細胞を細胞数 2×10^4 cells/well で用意し、AdCYP3A4 を MOI 10、AdGCSh-shRNA を MOI 50 で感染させた。感染 2 日目にトログリタゾン 0, 25, 50, 75 μ M を 24 時間処置後、細胞障害

性を CCK アッセイにより測定した。Fig. 6 は各ウイルス処置群のトログリタゾン 25, 50, 75 μ M における吸光度を、トログリタゾン未処置群における吸光度で補正して細胞生存率とし、トログリタゾン処置濃度に対して示した。その結果、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 μM 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。なお、AdGCSh-shRNA は MOI 50 で感染させたが、感染条件を検討した結果、96 ウェルプレートでのウイルス感染においては、適切である

と判断した結果を受けて設定したものである (data not shown)。さらに AdLuc-shRNA も AdGCSh-shRNA に対するコントロールとして、MOI 50 で AdCYP3A4 と同時感染させたが、細胞への毒性が強く現れ、コントロールウイルスとして使用できないと判断したため、本検討においては用いなかった。

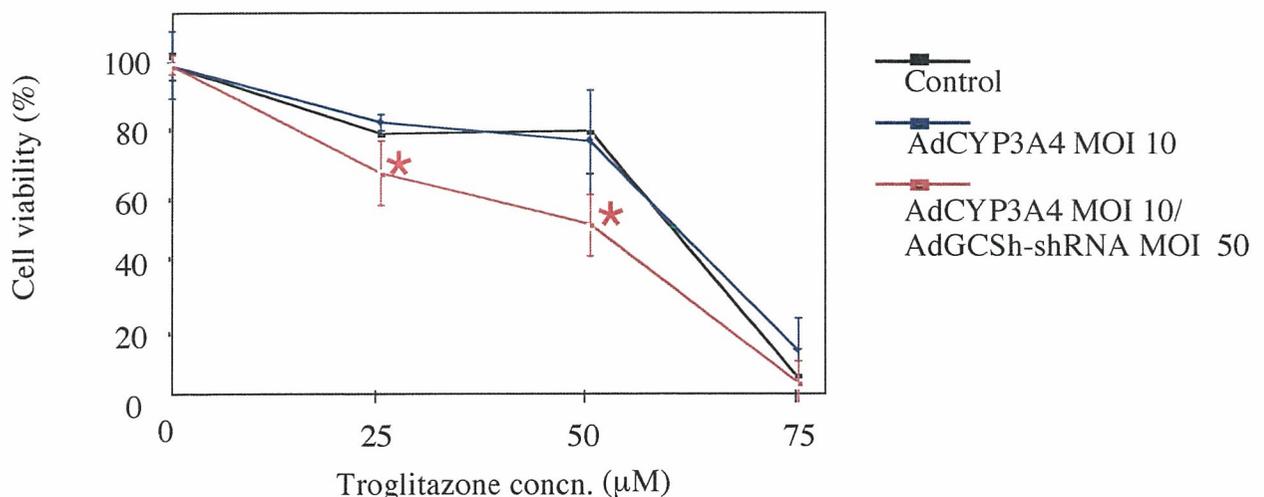


Fig.6. Cytotoxicity of Troglitazone in H4IIE cells after AdCYP3A4 and AdGCSh-shRNA infection. Data are expressed as mean \pm SD from three experiments. Significantly different from AdCYP3A4 group (* $P < 0.05$).

D. 考察

アデノウイルス発現ベクターは、神経系を含む多くの分化、未分化動物培養細胞で 100% に近い発現効率を示すだけでなく、細胞を死滅させずにその機能を調べることが出来る。利用できる動物種もマウス、ラットを含む広い

範囲にわたっており、動物個体への直接投与による遺伝子発現が可能である (鐘ヶ江, 斉藤, 1999)。さらに、shRNA 発現アデノウイルスは、耐性致死遺伝子をノックダウンさせることが可能であり、作製も簡便である。従ってアデノウイルスを用いた遺伝子

操作は、今後様々な応用が期待される遺伝子導入方法であると言える。

CYP3A4は、ヒト肝において最も多く存在する分子種であり、多くの薬物の代謝を担う酵素である。またその代謝機構は、薬物の解毒だけでなく代謝的活性化による細胞障害にも関与しているが、不明な点が多い。一方、医薬品開発における非臨床試験ではラットが汎用されているが、ラットにおいてCYP3A4は発現していない。従って非臨床試験の段階でCYP3A4の代謝的活性化による肝障害及び細胞障害を予測することは極めて困難である。本研究では、ヒトアデノウイルス5型遺伝子に、CYP3A4遺伝子を組み込み、ラット肝においてCYP3A4を発現させ、非臨床試験における毒性予測モデルラットを作製することを目的とし、CYP3A4発現アデノウイルスの作製ならびに *in vitro* における検討を行った。

今回、AdCYP3A4、AdGCSh-shRNA および AdLuc-shRNA をウイルス力価に基づいて希釈し、H4IIE細胞に感染させ、ウイルス感染効率が最適なMOIと感染時間を検討した。12ウェルプレートにおけるAdCYP3A4のH4IIE細胞への感染は、活性値と細胞の形態からMOI 10が適切であり (Fig. 1)、さらにテストステロン6 β 水酸化酵素活性の発現は、感染3日後で顕著な上昇を示した (Fig. 2)。また本研究室で作製

済みの AdGCSh-shRNA および AdLuc-shRNA を導入し、AdCYP3A4 と同時感染させたところ、同時感染においても各ウイルスの mRNA への影響は認められた (Fig. 3)。しかし AdCYP3A4 と AdLuc-shRNA の同時感染を行った群において、GCSh mRNA 量が大きく変動するという結果となり、その理由は不明であった。また Fig. 1 では AdCYP3A4 は MOI 5 よりも MOI 10 の方が活性値は約 2 倍高いという結果であるが、Fig. 3 に示すように mRNA は MOI 5 の方が若干高く発現していた。Fig. 3 における感染群は AdGCSh-shRNA の MOI も同一ではないので、おそらく細胞へのウイルス暴露量の違いが、転写後調節への何らかの影響として現れたのかもしれない (Callahan et al., 2006)。AdCYP3A4 と AdGCSh-shRNA の同時感染においても各ウイルスの表現型が現れることを見出したが (Fig. 4, Fig. 5)、AdLuc-shRNA の同時感染では十分なテストステロン 6 β 水酸化酵素活性および細胞内グルタチオン含量の減少は認められなかった。以上の検討結果を受け、CCK アッセイにより AdCYP3A4 と AdGCSh-shRNA の同時感染において、AdCYP3A4 単独感染およびコントロールに対し、トログリタゾン濃度依存的細胞生存率の低下が認められた (Fig. 6)。コントロールと AdCYP3A4 単独感染において、細胞生存

率にほとんど差が見られないが、理由は CYP3A4 によるトログリタゾンの活性代謝物が生成されても、 γ GCS をノックダウンしていない H4IIE 細胞では、正常にグルタチオン抱合による解毒機構が機能しているためと考えられる。また、AdLuc-shRNA との同時感染では細胞への毒性が強く現れるため、細胞生存率への検討では用いなかった。

Yamamoto らは、2002 年にトログリタゾンおよびその代謝物が HepG2 細胞 (ヒト肝癌由来) に与える障害性の検討について報告しており、トログリタゾンの代謝物として種々の quinone epoxide の存在が明らかとなっている。その中でも、特に代謝物 M-3、M-C が HepG2 細胞への障害性が強いと考えられた。M-3 は CYP3A4 の代謝物であるが、M-C が何により代謝されて生成されるのかは明らかにされていない (Yamamoto et al., 2001)。従って、今回のように H4IIE 細胞に CYP3A4 を発現させ、トログリタゾンによる濃度依存的細胞障害性が認められたのは、M-3 だけでなく M-C の生成にも CYP3A4 が関与していることが考えられ、また同時に quinone epoxide 以外の反応課程で生成する中間体の毒性も、 γ GCS のノックダウンにより増強したと考えられる。今回トログリタゾンにおいては、CYP3A4 による代謝物の毒性に着目していたが、Vansant や Rezulin ら

は、その他にも詳細は不明であるが様々な障害性発生機構が存在するという点、CYP3A4 の誘導への関与を報告している (Vansant et al., 2006, Rezulin et al., 2000)。一方、検討には使用していないが、トログリタゾン同様に peroxisome proliferators-activated receptor- γ (PPAR- γ) の agonist であるピオグリタゾンは、Wister ラットにおいて Endotoxin 暴露による CYP3A2 と CYP2C11 の減少に対し保護的に作用するという報告があり、そのメカニズムには PPAR- γ の活性化が免疫応答関連因子の転写活性化の抑制に関与していると言われている (Ueyama et al., 2004)。従ってウイルス感染だけでなく、使用する薬物によっては、細胞の免疫応答関連因子およびタンパク質を変化させ、代謝酵素に対して質的あるいは量的に影響を与えらるる。

ウイルス感染が *in vivo* および *in vitro* で与える影響についてはいくつかの報告がなされている。例えば、Callahan らの報告によると、E.coli β -galactosidase 発現アデノウイルス、マウス、ラットにおける erythropoietin 遺伝子を発現するアデノウイルス、挿入遺伝子を含んでいないアデノウイルスの 3 種のアデノウイルスを SD ラットに感染させた結果、E.coli β -galactosidase 発現アデノウイルスおよび挿入遺伝子を含んでいないアデ

ノウイルス感染群は、ウイルス非感染群と比較して CYP3A2 と CYP2C11 における mRNA 量および活性が減少した。一方、erythropoietin 遺伝子を発現するアデノウイルス感染群は、CYP3A2 と CYP2C11 における mRNA 量および活性が共に増加していた (Callahan et al., 2006)。これはウイルス感染により内因性の erythropoietin の増加が細胞に保護的に作用し、転写活性化やタンパク安定化が生じたことが原因であるとのことであった。またこの報告によると、挿入遺伝子を含んでいないアデノウイルスも CYP3A2 と CYP2C11 の機能に影響を与えたが、アデノウイルスが宿主で起こす翻訳調節に関しては、同じラットにおいても種によって異なるという報告がなされている (Lefesvre et al., 2003)。Lefesvre らの報告によれば、Luciferase 発現アデノウイルス、および E.coli β -galactosidase 発現アデノウイルスを Brown Norway ラットと Wag/Rij ラットに投与したところ、アデノウイルスの肝臓での存在量は各ラットにおいてほとんど違いは認められなかったものの、mRNA およびタンパク量は、Brown Norway ラットにおいて Wag/Rij ラットのおよそ 8~10 倍の発現が認められた。このようなアデノウイルス感染において見受けられる翻訳後調節の詳細は現在明らかにされていないが、Shayakhmetov や Schagen らは、ウ

イルス感染や腫瘍形成による免疫関連機構の変動、また宿主細胞内での機能タンパクの変性による細胞内シグナル伝達経路の異常が、CYP の活性に関与しているのではないかと報告している (Shayakhmetov et al., 2003, Schagen et al., 2004)。

ウイルス暴露の検討で最も重要であるのは、ウイルス暴露による細胞への毒性を抑えながら、高い活性が得られる条件を設定することである。しかし titer 測定でウイルスの力価を知ることが出来ても、特定の細胞株に活性が現れるかどうか、またその程度を感染前に予測することは不可能である。実際に AdLuc-shRNA はコントロールウイルスとして使用していたが、AdGCSh-shRNA よりも細胞への毒性が強く現れてしまい、AdCYP3A4 と同時感染した場合に活性値が低い値となった (Fig. 4, Fig. 5)。その主な理由としては、AdLuc-shRNA が発現する shRNA は H4IIE 細胞において相補的な mRNA が存在せず、H4IIE 細胞内において蓄積してしまうため、それによって細胞に悪影響を与えている可能性が考えられる (Grimm et al., 2006)。さらに、先述したこれまでの報告から、AdLuc-shRNA に組み込まれた遺伝子が宿主細胞において Luciferase 遺伝子以外の遺伝子に結合することで、翻訳段階の前後に関わる調節に関与し、結果として機能するタンパク質の正常

な発現に何らかの障害をもたらすことや、AdGCSh-shRNA とは異なった何か特異な免疫応答を刺激したという可能性も考えられる。また、同じウイルスでも作製日が異なる場合、ウイルス力価に大きな差がなくても、感染させた細胞の応答が異なることがあった。おそらくウイルスの変性や突然変異、またはウイルス由来のタンパク質が何らかの影響を及ぼした結果であろう。本研究において、CYP3A4 発現配列、ラット GCSh 遺伝子および Luc 遺伝子ノックダウン配列をアデノウイルスに組み込んだが、どの検討においても AdCYP3A4 は AdGCSh-shRNA および AdLuc-shRNA よりも細胞の変性が顕著であった。CYP3A4 はもともとラット肝癌由来 H4IIE 細胞には発現していないタンパク質を発現させるため、AdGCSh-shRNA や AdLuc-shRNA よりも、より強く免疫応答を刺激したと考えられる。

アデノウイルス感染における宿主細胞へのあらゆる毒性、および erythropoietin 遺伝子を発現するアデノウイルスで報告があったような保護的な作用は、ウイルスタンパク、挿入遺伝子、および感染させる動物種において多岐に渡った影響として現れる。アデノウイルス感染は、目的遺伝子による表現系の発現以外にも、実に複雑な細胞応答を伴う。そこで、重要視すべき表現型への影響と、そうでない影

響とを判別し、目的の実験系を構築するにあたりそれらを適切に評価することが重要である。従って今回のように同時感染でウイルス個々の活性を見ることを目的とした場合、単独感染で見られた傾向を忠実に反映するための実験条件は、使用する細胞種やウイルス感染条件に関する細かな検討結果をもとに決定しなくてはならない。

E. 結論

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 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。としても、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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

I. 参考文献

Casseles A (2006) Institute of Medicine's new drug safety report: implications for Canada. *Can Med Assoc J* **175**: 1515-1516.

Morgan ET (2001) Regulation of Cytochrome P450 by Inflammatory Mediators: Why and how? *Drug Metab Dispos* **29**:207-212.

Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC (2004) Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**:51-70.

Glover PL and Simis P (1964) Conjugations with Glutathione, Distribution of glutathione S-aryltransferase in vertebrate species. *Biochem. J* **90**:603-606.

Gimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay

MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/ short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**: 537-541.

Li J, Kaneko T, Wang Y, Qin LQ, Wang PY, Sato A (2002) Troglitazone enhances the hepatotoxicity of acetaminophen by inducing CYP3A4 in rats. *Toxicology* **176**:91-100.

Le HT, Boquet MP, Clark EA, Callahan SM, Croyle MA (2006) Renal Pathophysiology After Systemic Administration of Recombinant Adenovirus: Changes in Renal Cytochromes P450 Based on Vector Dose. *Hum Gene Ther* **17**:1095-1111.

Park IN, Cho IJ, Kim SG (2004) Ceramide Negatively Regulates Glutathione S-transferase Gene Transactivation via Repression of Hepatic Nuclear Factor-1 That Is Degraded by the Ubiquitin Proteasome System. *Mol Pharmacol* **65**:1475-1484.

Bail J and Cederbaum AI (2006) Adenovirus-Mediated Expression of CYP2E1 Produces Liver Toxicity in Mice. *Toxicol Sci* **91**:365-371.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **45**:51-88.

Ueyama J, Kitaichi K, Nadai M, Iwase M, Tomyo N, Kanazawa H, Suzuki R, Takagi K, Takagi K, Hasegawa T (2004) Effect of pioglitazone on endotoxin-induced decreases in hepatic drug-metabolizing enzyme activity and expression of CYP3A2 and CYP2C11. *Eur J Pharmacol* **498**:257-265.

Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K (2002) Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol* **63**:889-896.

Kato R and Yamazoe Y (1992) Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex-and species-related differences in drug toxicity. *Toxicol Lett* **64-65**:661-667.

加藤 隆一、鎌滝 哲也 (2000) 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として **2**:6-8.

Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter

- R, Monshower M (2005) An in vitro approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent biotransformation of xenobiotics. *Toxicology* **216**:154-167.
- Mari M and Cederbaum AI (2000) CYP2E1 Overexpression in HepG2 Cells Induces Glutathione Synthesis by Transcriptional Activation of γ -Glutamylcysteine Synthetase. *J Biol Chem* **275**:15563-15571.
- 村松 正實、山本 雅 (1999) 実験医学別冊新遺伝子工学ハンドブック改訂第 3 版 **5**:202-207.
- Nedeicheva V and Gut I (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**:1151-1175.
- Lefesvre P, Attema J, Lemckert A, Havenga M, van Bekkum D (2003) Genetic heterogeneity in response to adenovirus gene therapy. *BMC Mol Biol* **4**:4.
- Schagen FH, Ossevoort M, Toes REM, Hoeben RC (2004) Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**:51-70.
- Shayakhmetov DM, Li ZY, Ternovoi V, Gagar A (2003) Gp190 domain and the cellular attachment receptor determines the intracellular trafficking route of adenoviruses. *J Virol* **77**:3712-3723.
- Callahan SM, Ming X, Lu SK, Brunner LJ, Croyle MA (2004) Considerations for Use of Recombinant Adenoviral vectors: Dose Effect on Hepatic Cytochromes P450. *J Pharmacol Exp Ther* **312**:492-501.
- Callahan SM, Boquet MP, Ming X, Brunner LJ, Croyle MA (2006) Impact of transgene expression on drug metabolism following systemic adenoviral vector administration. *J Gene Med* **8**:566-576.
- Lebrun S, Golka K, Schulze H, Follmann W (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms and ochratoxin A toxicity in primary human urothelial cells. *Toxicology* **224**:81-90.
- Pebernard S and Iggo RD (2004) Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation* **72**:103-111.
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**:502-522.
- Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibuya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W, Manabe S (2003) A Novel Model of Continuous Depletion of Glutathione in Mice Treated with L-Buthionine (S,R)-Sulfoximine *J Toxicol Sci* **28**:455-469.
- Vansant G, Pezzoli P, Saiz R, Birch A, Duffy C, Ferre F, Monforete J (2006) Gene expression analysis in cell culture: a case for in vitro platforms combined with gene expression analysis for early (idiosyncratic) toxicity screening. *Int J Toxicol* **2**:85-94.
- Yamazaki H and Shimada T (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **346**:161-169.
- Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP (2002) Initial Characterization of the Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit Gclm (-/-) Knockout Mouse. *J Biol Chem* **277**:49446-49452.
- Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M, 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.
- Yamamoto Y, Yamazaki H, Ikeda T, Watanabe T, Iwabuchi H, Nakajima M, Yokoi T (2002) Formation of A Novel Quinone Epoxide Metabolite of Troglitazone with Cytotoxic to HepG2 Cells. *Drug Metab Dispos* **30**:155-160.

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

CYP3A4 の代謝的活性化による細胞障害性に関する研究

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、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、本研究は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。

A. 研究目的

肝臓は薬物代謝を担う主要な臓器であり、多くの薬物は肝臓で代謝されることにより水溶性が増し、体外へ排泄されやすくなる。この代謝過程にお

いて、反応性の高い活性代謝物が生成し、細胞障害を引き起こすことがある。一般的に経口投与された薬物は消化管から吸収された後、肝臓に運ばれるため肝臓は高濃度の薬物にさらされ

ることになる。従って、肝臓は薬物による障害を受ける可能性が他の臓器より高いとされている。

肝障害は薬物性、ウイルス性、アルコール性、自己免疫性および脂肪肝の5つに分類できる。薬物性障害性はさらに発症機序により2つに大別できる。親化合物もしくは活性代謝物による中毒性肝障害と、個人の体質に由来する特異体質性肝障害である。中毒性肝障害は一般的に薬物の用量依存的であり、個人の体質に依存せず、動物実験で再現することが可能である。代表的な薬物として、アセトアミノフェンが報告されている (Jaeschke and Bajt, 2006)。約80%の薬物が中毒性肝障害を引き起こす可能性があるが、予測可能なため肝障害発現を回避することができると考えられている (Knowles et al., 2000)。一方、特異体質性肝障害はアレルギー性肝障害もしくは代謝酵素異常性肝障害とも言われ、代表的な薬物としてトログリタゾンが報告されている (Ikeda, 2006)。中毒性肝障害と異なり実験動物での再現が困難なことが多く、近年問題となっている。特に肝臓は腎臓や肺など他の臓器よりも特異体質性の障害が多く認められている (Nassar and Lopez-Anaya, 2004)。薬物代謝酵素、薬物トランスポータおよび薬物受容体についての遺伝的因子が特異体質性肝障害肝障害の要因として挙げられている

(Meyer, 2000)。

代表的な薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) は、臨床で使用されている多くの薬物の代謝に関与していることから、代謝活性化は主に CYP によるものと考えられている。最も代謝的活性化に関与している分子種は CYP3A4 であり、ついで CYP2C9、CYP2E1 と言われている (Li, 2002)。CYP3A4 により代謝的活性化される薬物として、カルバマゼピン、ジクロフェナク、エラナプリル、フェルバメート、ネファドゾン、フェニトインおよびトログリタゾンが挙げられる (Li, 2002)。またトログリタゾンは活性代謝物が細胞障害を示すことが明らかになっている (Yamamoto et al., 2002)。

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 (Utrecht, 2006)。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 (Rodrigues and Rushmore, 2002)、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 (Yoshitomi et al., 2001)。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、第1にヒト肝癌由来 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。第2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、トログリタゾンを用いて 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。

B. 研究方法

B-1. ヒト肝癌由来 HepG2 細胞の培養

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞は理研ジーンバンク (Tsukuba, Japan) より購入した。HepG2 細胞は 10% FBS を含む DMEM を培養液として用いて 10 cm ディッシュで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後トリプシン-エチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸溶液 4 ml をディッシュに加え、37°C、3分間インキュベートした。

培養液を 10 mL 入れておいた 50 mL のファルコンチューブにディッシュより剥離した細胞を移し、4,000 rpm、4°C で 5分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培養液に懸濁してディッシュにまき、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

B-2. 細胞生存率の測定法

細胞生存率は Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit を用いた ATP 測定法、Cell Counting Kit-8 を用いた CCK 測定法の 2 種類で検討した。ATP および CCK 測定法はそれぞれのキットのマニュアルに従い、以下のように測定した。ATP 測定法は、96 well-plate に Cell Titer-Glo Reagent 100 μL を加え PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA) のルミノメーター 1420 ARVO MX にセットし、2分間振とう後、10分間静置して発光を測定した。CCK 測定法は、96 well-plate に CCK-8 溶液 (水溶性テトラゾリウム塩 WST-8) 10 μL を加え、CO₂ インキュベータ内で 2時間呈色反応を行った。その後、GE Healthcare Amersham Bioscience (Tokyo, Japan) の Biotrak II で 450 nm の吸光度を測定した。

B-3. 肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

最終濃度が 10,000 cells/well の HepG2 細胞、0.122 mg/mL CYP3A4 発

現系ミクロソーム (16 nM CYP3A4)、3% FBS を含む DMEM、1 mM NADPH となるように混合した溶液に被験薬を加え、96 well-plate に 100 μ L/well ずつまき、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間インキュベートし、その後 I-2-3 の ATP 測定法および CCK 測定法により細胞生存率を測定した。被験薬として、アマンタジン、アミオダロン、アムロジピン、ベンズブロマロン、クラリスロマイシン、クロチアゼパム、エチゾラム、フルニトラゼパム、フルタミド、イミプラミン、ケトチフェン、マプロチリン、メトホルミン、ミルナシプラン、モンテルカスト、フェニトイン、プレドニゾロン、ラベプラゾール、ラロキシフェン、レバミピド、シンバスタチン、スリンダク、テプレノン、トレミフェン、トラニラスト、トリアゾラム、ワルファリン、ザフィルルカスト、ゾルピデムを用いた。被験薬の濃度は 30 および 100 μ M で検討した。ただし ATP 測定法では、ベンズブロマロンは 25 および 50 μ M、トラニラストは 10 および 50 μ M で検討した。なお、培養液中の DMSO の最終濃度は、メトホルミンおよびミルナシプランは 0%、アミオダロン、エチゾラム、ケトチフェンおよびフェニトインは 0.2%、クラリスロマイシン、トレミフェンおよびトリアゾラムは 0.5%、そ

の他の被験薬は 0.1%とした。対照としてコントロールミクロソームを CYP3A4 発現系ミクロソームと同一のタンパク質濃度で添加した。

C. 研究結果

C-1. トログリタゾンの細胞障害性に及ぼす薬物処置時間の影響

トログリタゾンの細胞障害性を評価するために、HepG2 細胞を用いて CYP3A4 発現系ミクロソーム非存在下におけるトログリタゾン処置時間の検討を行った。その結果を Fig. 1 に示した。ATP および CCK 測定法ともにトログリタゾン 50 μ M 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 μ M 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。また 100 μ M トログリタゾン処置においては両測定法ともに細胞生存率が 10%以下であった。

C-2. トログリタゾンの細胞障害性に及ぼすリン酸カリウム緩衝液の影響

In vitro における薬物代謝反応の緩衝液として用いられる Kpi による細胞障害性の検討を行い、その結果を Fig. 2 に示した。

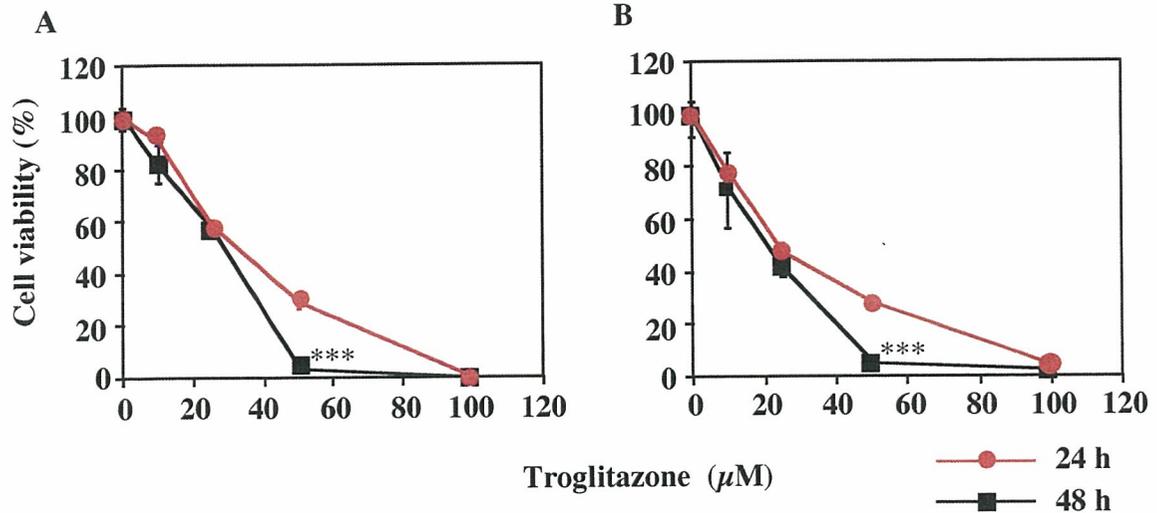


Fig. 1. Changes in the cytotoxicity of troglitazone by incubation time in HepG2 cells. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *** $P < 0.001$, compared with 24 h incubation. A, ATP assay; B, CCK assay.

なお本検討は CYP3A4 発現系マイクロソーム非存在下で行った。ATP および CCK 測定法ともにトログリタゾン 0 μM の細胞生存数が Kpi 存在下は Kpi 非存在下の 1/10 であった。また Kpi

非存在下ではトログリタゾン濃度依存的な細胞生存率の減少が認められたが、Kpi 存在下では認められなかった。

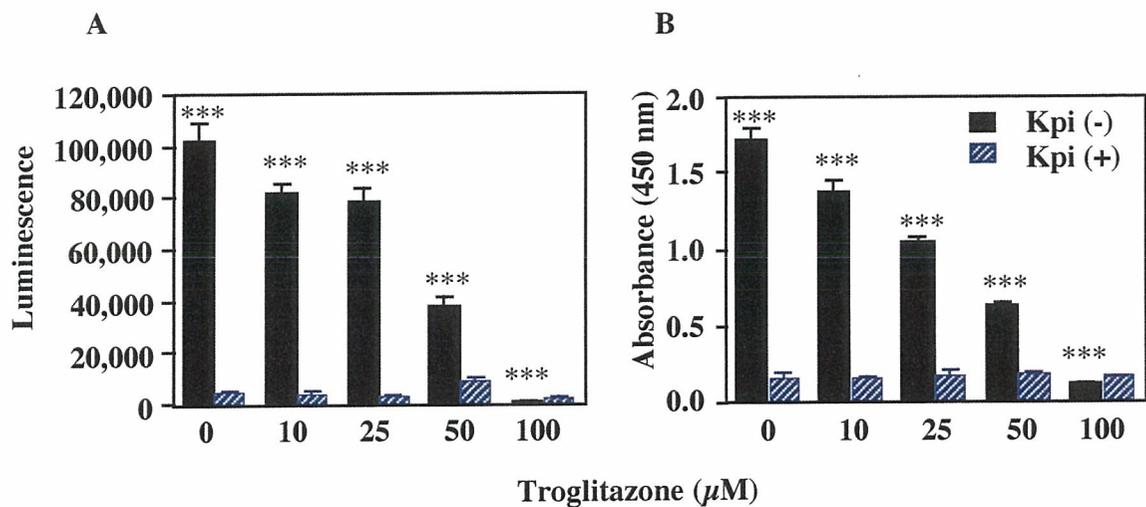


Fig. 2. Effect of Kpi on the cytotoxicity of troglitazone in HepG2 cells. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *** $P < 0.001$, compared with Kpi (+). A, ATP assay; B, CCK assay.

C-3. トログリタゾンの細胞障害性に及ぼす CYP3A4 の影響

トログリタゾンの細胞障害性に及ぼす CYP3A4 の影響を Fig. 3 に示した。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。また、CCK 測定法

ではトログリタゾン 25、50、75 および 100 μM で CYP3A4 により細胞生存率は有意に低下した。75 μM においても最も細胞生存率の差異が大きく 18.1%であった。なお、トログリタゾン 25 から 75 μM では CYP3A4 による細胞生存率の低下が CCK 測定法より ATP 測定法で顕著であった。

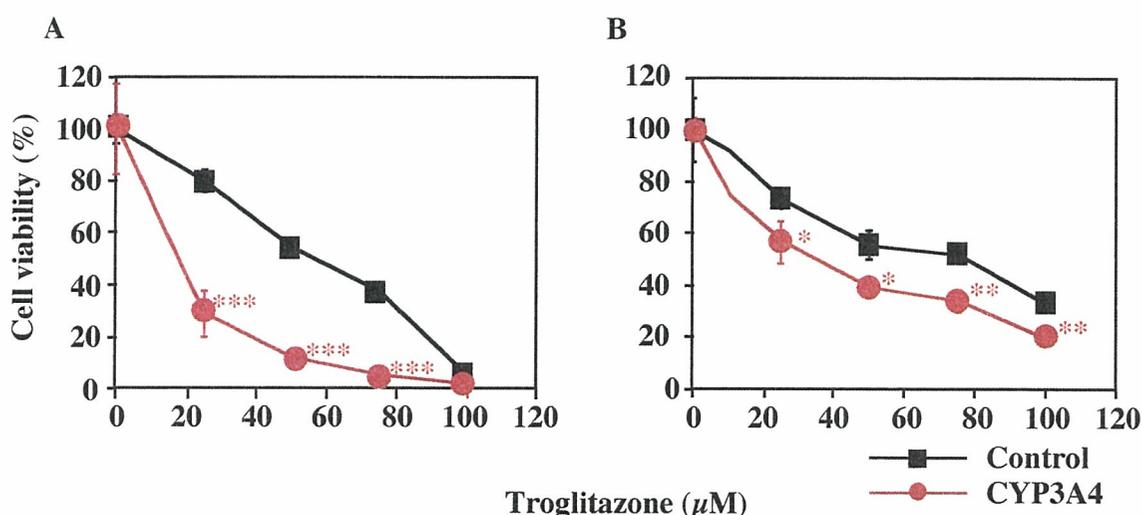


Fig. 3. Changes in the cytotoxicity of troglitazone by CYP3A4 in HepG2 cells. The concentration of CYP3A4 was 16 nM. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared with control. A, ATP assay; B, CCK assay.

C-4. 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

CYP3A4 による代謝反応に NADPH は必須である。そこで、CYP3A4 によるトログリタゾンの細胞障害について、NADPH の影響を ATP 測定法で検討した。その結果を Fig. 4 に示した。

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。またコントロールミクロソームでは NADPH 添加による細胞生存率の差異は認められなかった。

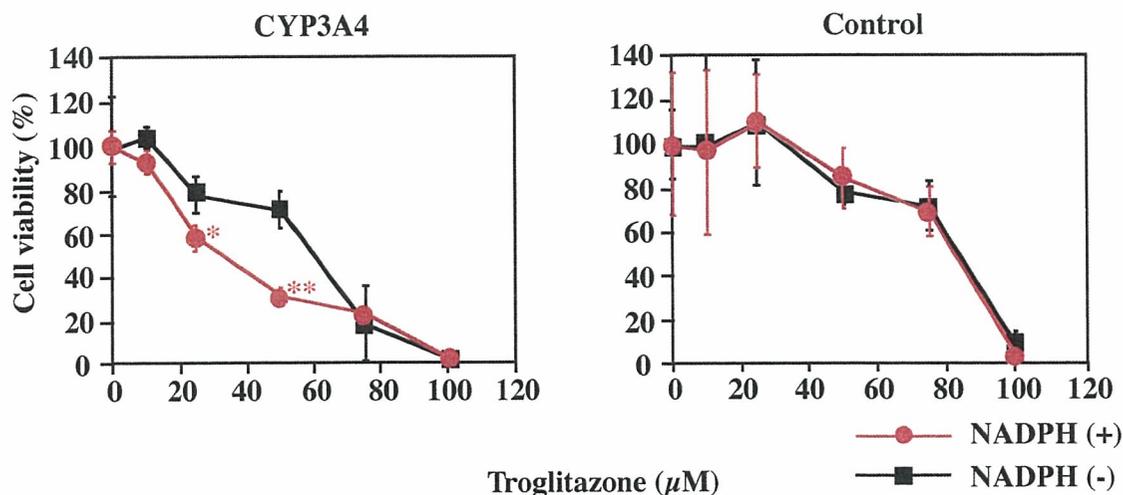


Fig. 4. Changes in the cytotoxicity of troglitazone by CYP3A4 in the presence of NADPH measured by ATP assay in HepG2 cells. The concentration of CYP3A4 was 16 nM. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with NADPH (-).

C-5. 肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

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。その結果を Table 1 と Fig. 5 に示した。Table 1 は被験薬各濃度において、コントロールマイクロソーム存在下の細胞生存率から CYP3A4 発現系マイクロソーム存在下の細胞生存率を差し引いた値を代謝的活性化の指標として示した。正の値は CYP3A4 により細胞障害性は増強、負の値は CYP3A4 により細胞障害性は減弱したと考えられる。本章では+20%以上の値を示した被験薬は CYP3A4 による代謝的活性化の可能性が高いとみな

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、スリンダク、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。