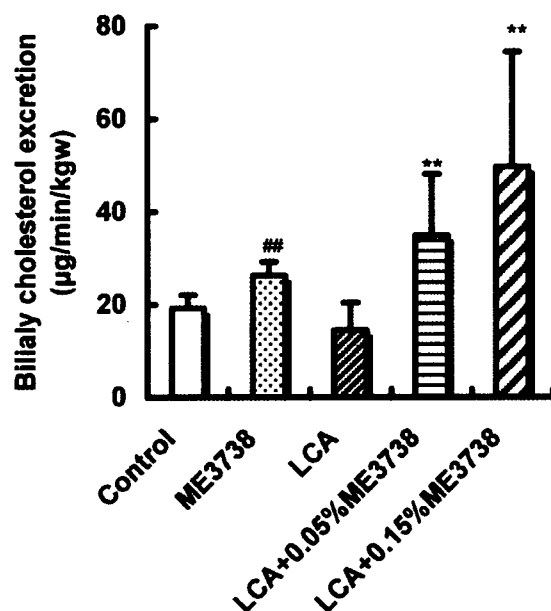


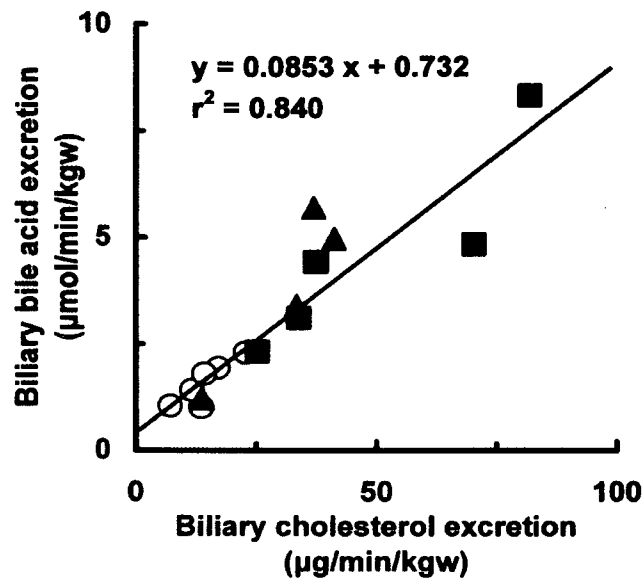
**Table 2 Bile flow, biliary cholesterol, phospholipid, bile acid and glutathione excretion in wild-type mice fed a control or ME3738 diet for 6 days**

	Bile flow ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{kgw}$ )	Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{kgw}$ )	Phospholipid ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{kgw}$ )	Bile acid ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{kgw}$ )	Glutathione ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{kgw}$ )
Control	67.3 $\pm$ 7.1	9.5 $\pm$ 1.8	355 $\pm$ 57	2.19 $\pm$ 0.41	50.9 $\pm$ 2.4
ME3738	67.3 $\pm$ 13.5	17.9 $\pm$ 6.1*	380 $\pm$ 66	2.30 $\pm$ 0.60	45.6 $\pm$ 10.1

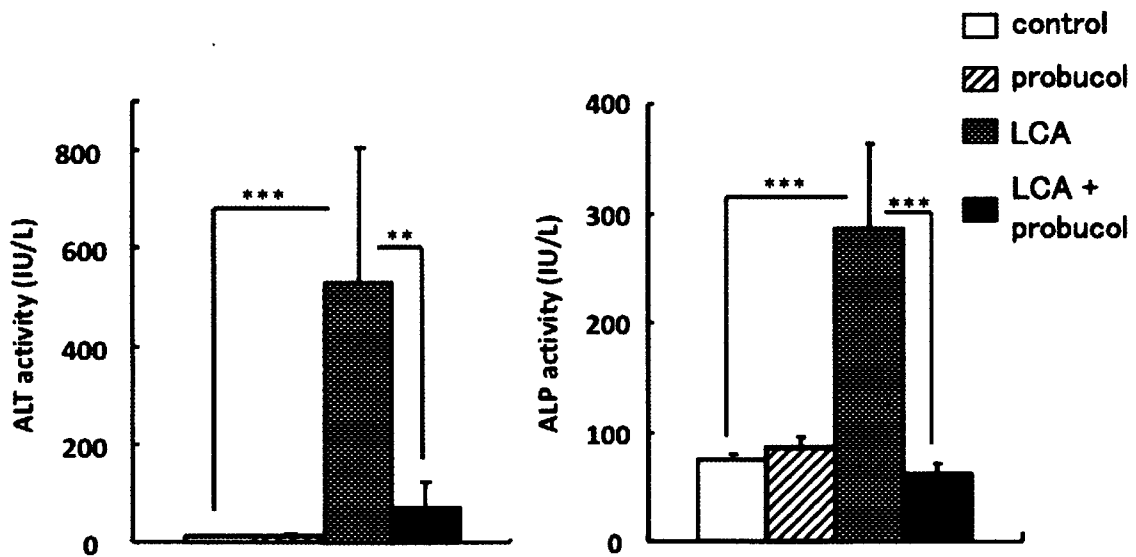
#: Significantly different from control group ( $P < 0.05$ )



**Fig. 7 Biliary cholesterol excretion.** Bile was collected by bile duct cannulation from C57BL/6N mice fed a control, 0.15% ME3738, 0.75% LCA, LCA+0.05% ME3738 or LCA+0.15% ME3738 diet for 6 days. Biliary cholesterol concentration was measured by enzyme-colorimetric method. Data are shown as the mean + S.D.(n=5). ## Significantly different from control group ( $P < 0.01$ ), \*\* Significantly different from LCA group ( $P < 0.01$ )



**Fig. 8 Correlation between biliary excretion of cholesterol and bile acid.** Biliary bile acid and cholesterol concentrations were measured by enzyme-colorimetric method. The bile was collected by bile duct cannulation from C57BL/6N mice fed a 0.75% LCA (open circle), LCA+0.05% ME3738 (closed triangle) or LCA+0.15% ME3738 (closed square) diet for 6 days.



**Fig. 9 Influence of co-treatment with probucol on LCA-induced hepatotoxicity** C57BL/6 female mice were fed a control diet or the diet supplemented with 0.5% probucol and/or 0.5% LCA for 9 days. Data are shown as the mean  $\pm$  S.D. (n =4-6).  
 \*\*\*,  $p < 0.001$  vs control group; ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs LCA group.

**Table 3. Changes in serum triglyceride , phospholipid , total cholesterol and cholesterol ester contents**

	TG (mg/ml)	PL (mg/ml)	T-Chol (mg/ml)	CE (mg/ml)
Control	1.37 ± 0.18	1.23 ± 0.12	0.59 ± 0.08	0.46 ± 0.06
Probucol	0.65 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>a</sup>
LCA	1.17 ± 0.15	1.59 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.15	0.24 ± 0.08 <sup>a</sup>
LCA + probucol	0.95 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.07 <sup>a,b</sup>	0.13 ± 0.07 <sup>a,b</sup>	0.08 ± 0.07 <sup>a,b</sup>

C57BL/6 female mice were fed a control diet or the diet supplemented with 0.5% probucol, 0.5% lithocholic acid or both of them for 9 days. Data are shown as the mean ± S.D. (n=4-6).

<sup>a</sup> p<0.05 compared with control group. <sup>b</sup> p<0.05 compared with LCA group. TG ; triglyceride  
PL ; phospholipid T-Chol ; total cholesterol CE ; cholesterol ester.

**Table 4. Changes in hepatic triglyceride, phospholipid, total cholesterol and cholesterol ester contents**

	TG (mg/g liver)	PL (mg/g liver)	T-Chol (mg/g liver)	CE (mg/g liver)
Control	16.7 ± 3.4	15.4 ± 1.4	2.42 ± 0.33	0.16 ± 0.25
Probucol	21.9 ± 3.0	12.9 ± 2.7	2.21 ± 0.51	0.37 ± 0.26
LCA	10.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	11.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.43	0.25 ± 0.21
LCA + probucol	14.8 ± 1.6 <sup>b</sup>	13.1 ± 4.2	1.99 ± 0.46 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.48

C57BL/6 female mice were fed a control diet or the diet supplemented with 0.5% probucol , 0.5% lithocholic acid or both of them for 9 days. Data are shown as the mean ± S.D. (n=4-8).  
<sup>b</sup>p<0.05 compared with LCA group.

**Table 5. Changes in biliary phospholipid, total cholesterol and bile acid contents.**

	PL (mg/min/g liver)	T-Chol (mg/min/g liver)	BA (nmol/min/g liver)
Control	6.95 ± 2.19	0.35 ± 0.07	69.6 ± 18.2
Probucol	11.41 ± 1.72 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.16 <sup>a</sup>	107.8 ± 32.6 <sup>a</sup>
LCA	1.20 ± 0.60 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.10	37.6 ± 13.5 <sup>a</sup>
LCA + Probucol	7.70 ± 3.08 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.22 <sup>a,b</sup>	89.6 ± 8.3 <sup>b</sup>

C57BL/6 female mice were fed a control diet or the diet supplemented with 0.5% probucol , 0.5% lithocholic acid or both of them for 9 days. Data are shown as the mean ± S.D. (n=4-6 ).

<sup>a</sup> p<0.05 compared with control group <sup>b</sup> p<0.05 compared with LCA group.

ヒト特異的に発症する肝障害に対する動物モデルの作製と機序解明

分担研究者 宮田昌明 東北大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨 前立腺癌治療薬 flutamide はヒト特異的に遅延型の肝障害を誘発することが知られている。これまで、flutamide による肝障害を実験動物で再現するのは困難とされてきた。そのため、flutamide 誘発肝障害の機序にはいまだ不明な点が多い。我々は flutamide の加水分解で生じる主代謝物の 5-amino-2-nitrobenzotrifluoride (FLU-1) を用いてマウスによる肝障害モデルを作製した。本研究ではこの肝障害モデルと *in vitro* の解析を組み合わせて、細胞障害性の認められる FLU-1N-水酸化体を中心に代謝の面から flutamide 誘発肝障害の機序の解析を実施した。肝障害モデルとして C57BL/6N 雄性マウスに FLU-1(200 mg/kg weight)を 5 日間経口投与した。TCPOBOP(3 mg/kg weight)を前半の 3 日間腹腔内投与し、肝内の GSH を枯渇させるため後半 2 日間絶食を行った。FLU-1・TCPOBOP 併用投与群では対照群に比べ有意な ALT 値の上昇が認められた。TCPOBOP を投与した群では肝ミクロソーム中の FLU-1 N-水酸化活性が対照群と比較して約 5 倍上昇した。肝内 GSH レベルは TCPOBOP および FLU-1 単独投与群では対照群と比べ有意な差は認められなかったが、FLU-1・TCPOBOP 併用群では有意な減少が認められた。絶食 2 日でマウス肝内 GSH は約 60%減少したが、FLU-1・TCPOBOP 併用群で絶食を行わないと、ALT 値は有意に低下した。FLU-1 N-OH を GSH、マウス肝細胞質画分とともに反応させると代謝産物として FLU-1 N-OH の親化合物である FLU-1 が検出された。また FLU-1 N-OH をミクロゾームタンパクと反応させると付加体タンパクがイムノプロット法により検出された。一方 FLU-1、flutamide、OH-flutamide との反応では付加体タンパクは検出されなかった。以上の結果より FLU-1 の N-水酸化代謝物はタンパクとの反応性を有し、FLU-1 N-OH は GSH によって FLU-1 へと還元されることが明らかとなった。GSH による FLU-1 N-OH の FLU-1 への還元は FLU-1 N-OH の解毒機構の一つであると考えられ、flutamide による肝障害誘発に、肝臓における FLU-1 N-OH の生成増加と肝内 GSH 枯渇の両方が重要であることが示唆された。

研究協力者

山添 康 東北大学大学院薬学研究科

教授

## A. 研究目的

ヒト特異的な肝障害が医薬品の開発と安全使用の面で大きな問題となっている。この肝障害は、薬物投与直後ではなく、遅延発症型でしかも既知の免疫系の亢進によるアレルギー関連の機序とは異なる。しかも動物実験で検出されず、ヒトに投与して初めて現れ、発生すると重篤な副作用を示す。実際、かなりの開発候補薬物が、開発初期の段階で予知できない肝障害のために、無駄になり、多くの労力とコストが浪費されている。また市販された後にヒトで重篤な肝障害が認められるなど大きな社会問題となっている。よってヒト特異的に起こる肝障害の機序解明と予測系の開発は必要不可欠と考えられる。そこで本研究ではヒト特異的に肝障害を誘発させるモデル化合物として前立腺癌治療薬の flutamide を用いた。Flutamide は服用している患者の10%以上で肝障害を誘発させるが通常の動物実験では肝障害は認められていない。平成17年度の研究により flutamide 主代謝物 FLU-1 を用いたマウス肝障害モデルの作製に成功した。18年度の研究によりヒト薬物代謝酵素を用いてヒト

flutamide 代謝を解析し、ヒトとマウスの代謝における種差を明らかにした。本年度はそれらの結果をふまえ、flutamide 誘発肝障害に関与すると考えられる、flutamide 代謝物の FLU-1N-OH 体の生成、分解と肝障害の関連について解析し、肝障害誘発の機序を解明するとともにヒトにおける肝障害を誘発し易い条件を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

Flutamide, 2-hydroxyflutamide (OH-flutamide), 4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenylamine (FLU-1), は Schering-Plough (Bloomfield, NJ) より供与された。FLU-1N-OH、flutamide 抗体は日本化薬(株)で作製されたものを供与された。

### 2. 動物処理

9~10 週齢の雄マウスに、0.5% carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na) に懸濁させた flutamide または FLU-1 を 200 mg/kg、5 日間強制経口投与した。TCPOBOP は corn oil に懸濁させ、3 mg/kg を前半 3 日間腹腔内投与した。マウスは固形試料 (CE-2) とフィルターろ過水道水を自由摂取させたが 3 日目の投与後、肝内グルタチオン濃度を減少させる目的で

固形試料を取り除き絶食を行った。最終投与の 4 時間後に解剖を行い、血液、肝臓を採取した。

### 3. 肝内 GSH レベル

肝ホモジネート(75 mM KCl/Kpi buffer (pH 7.4) で 3 倍希釈)に 4 倍量の trichloroacetic acid buffer を加え、よくボルテックスし 9000 g、4°C、5 分間遠心する。酸を除くため、上清に等量のジエチルエーテルを加え、抽出したものをサンプルとした。抽出操作は 5 回行った。

0.3 mM NADPH 700  $\mu$ l、6mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 100  $\mu$ l を加え、適宜希釈した(100-1000 倍希釈程度)したサンプルまたは、検量線用の GSH 溶液(0.675-10  $\mu$ M 程度)を 200  $\mu$ l 加え、2 分間のプレインキュベーションを行い、50 u/ml GSH reductase を 10  $\mu$ l 加えた後、1.5 分ごとに 6 分後まで 414 nm における吸光度を測定した。単位時間当たりの 414nm における吸光度の変化量と検量線用 GSH 濃度を用いて、検量線を作製し、肝内 GSH 濃度を求めた。

### 4. 肝内 malondialdehyde (MDA) レベル

肝臓を 2 倍量の 75 mM KCl/Kpi buffer (pH 7.4) でホモジナイズし、サンプルとした。肝内 MDA 濃度は MDA-586 assay (Biotech)を用いて測定した。

### 5. FLU-1 N-hydroxylase 活性

10 mM FLU-1 10  $\mu$ l、肝ミクロソーム 50  $\mu$ g、1M Kpi (pH 7.4) 50  $\mu$ l、MilliQ 水を加え 460  $\mu$ l とした。プレインキュベーションとして 37°C で 5 分間反応させた。NADPH generating system を 40  $\mu$ l 加え、正確に 37°C で 10 分間反応させた(これを反応液とする)。反応後反応液に冷却した methanol を 1000  $\mu$ l、10 mM umbelliferone (internal standard) を 0.5  $\mu$ l、10 mM ascorbic acid を 10  $\mu$ l それぞれ加え、3,000 g、4°C、5 分間遠心しタンパクを沈殿させた。上清中の有機溶媒を窒素ガスを用いて留去したものをサンプルとした。サンプルは HPLC にて解析した。

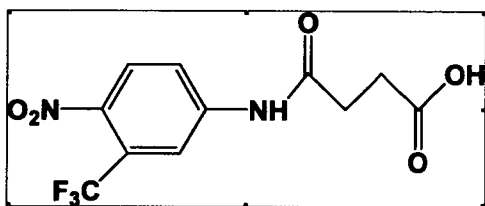
### 6. Flutamide 代謝物のタンパク相互作用

タンパクモデルとして BSA を用いて検討した。BSA (0.1-1.0 mg/ml) を flutamide、OH-flutamide、FLU-1、FLU-1 N-OH (各 10  $\mu$ M) と 24 時間反応させた。反応終了後、2 倍量の冷却 methanol と internal standard (umbelliferone) を加えた後、3,000 g、4°C、5 分遠心してタンパクと強く相互作用した化合物を沈殿させた。上清をサンプルとして、HPLC にて flutamide および各代謝物の濃度を求めた。

### 7. 抗 flutamide 抗体を用いた薬物-タンパク複合体の検出

抗 flutamide 抗体は日本化薬株式会社、

長井より供与された。Keyhole limpet hemocyanin (KLH) に以下のハプテン



を結合させ、抗原(Hapten-KLH conjugate)を作成した。この抗原をウサギに免疫し、抗血清(抗 flutamide 抗体)を得た。上記の抗 flutamide 抗体を用いて Western blot 法により、薬物-タンパク複合体を検出した。Flutamide、OH-flutamide、FLU-1、FLU-1 N-OH (500  $\mu$ M) と肝ミクロソーム (2 mg/ml) を 0.1 M KCl/Kpi (pH 7.4) 中で 37 $^{\circ}$ 、2 時間反応させた。タンパクは等体積の 2x サンプルバッファーおよび 5%(v)の 2-melcapto ethanol と混合し、沸騰水浴中で 2 分間加熱処理した。ゲルは 10%のポリアクリルアミドゲル分離ゲルに 4%濃縮ゲルを重層し作製した。肝ミクロソームタンパク (50 $\mu$ g) は SDS-PAGE にて分離し、ニトロセルロース膜に 1.2A、70 分間転写した。転写後、膜を 20% FCS を用いブロッキングを行った。一次抗体として、抗 flutamide 抗体 (0.1% BSA/T-PBS で 3000 倍希釈、1.5 時間)、二次抗体として Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich) (T-PBS で 3000 倍希釈、1 時間)を用い、膜を順次振とうさせた。以上の操作はすべて室温で行い、各操作後には、T-PBS で 5 回の振とう洗浄をそれぞれ 5 分行い、余分な抗体を取り除いた。膜は 0.15 M バルビタール

ナトリウム/酢酸バッファー(pH 9.6)中で 10 分間振とうさせた後、発色基質溶液(アルカリホスファターゼ法)にて発色させた。

## 8. FLU-1 N-OH reductase 活性

FLU-1 N-OH (50  $\mu$ M) をプレインキュベーションさせた GSH (10 mM)、細胞質画分 (0.1 mg/ml)/MgSO<sub>4</sub> (5 mM) 混合液に加え、37  $^{\circ}$ C で反応させた。1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) はプレインキュベーション前に加えた。反応後、2 倍量の冷却 methanol と umbelliferone (internal standard) を加え、3,000 g、4  $^{\circ}$ C で 5 分間遠心しタンパクを沈殿させた。上清中の有機溶媒を窒素ガスを用いて留去したものをサンプルとした。サンプルは HPLC にて解析した。

## 9. Ames 試験

1.5% Nutrient agar-0.3% NaCl 懸濁液をオートクレーブ(120  $^{\circ}$ C、20 分)にて溶解および滅菌し、約 25ml ずつ滅菌済みシャーレに分注し、アガープレートを作製した。これに *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、YG1024、TA102 を前培養し、-80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

Nutrient broth 液(200ml)を三角フラスコにて、オートクレーブ滅菌(120  $^{\circ}$ C、20 分)した。これに冷凍保存してある菌株を、白金耳で加え、37 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養した。なお、使用する前に菌の細胞周



期を G<sub>2</sub> 期にそろえるために、氷上で約 1 時間静置した。β-naphthoflavone (100 mg/kg) を 3 日間腹腔内投与したマウスから、肝臓を採取し無菌的に S9 を調製した。S9mix (500 μl) を入れたモルトン少試に、DMSO または滅菌水に溶解した化合物、前培養した菌液 (100 μl) を加え、37°C で 20 分間、振とうさせながら反応させた。反応後、反応液にトップアガー (2 ml) を加え、基礎寒天培地にまいた。37°C で 48 時間培養後、変異復帰コロニー数を算出した。

## 10. 統計処理

各実験で得られた値は平均値および標準偏差を算出した。統計パッケージ PRISM4.0 を使用し、二群間の有意差検定には student' s t 検定を、多群間の場合には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った後、有意な場合には Tukey 型および Dunnet 型の多重比較検定をそれぞれ行った。有意水準は両側 5%以下とした。

## C. 研究結果

### 1. Flutamide 代謝物を用いた肝障害モデルの構築

絶食が肝内 GSH に与える影響について検討した。C57BL/6N 雄性マウスを 2 日間絶食させたとき、肝内 GSH は約 60%減少した。以下、特に記述のない限り、マウスを絶食させ肝内 GSH が枯渇した状況で実験を

行った。

マウスに flutamide または FLU-1 (200 mg/kg weight) を 5 日間経口投与した。TCPOBOP (3 mg/kg weight) は前半の 3 日間、腹腔内投与した。また後半の 2 日間はマウスを絶食させた。FLU-1 の最終投与 4 時間後に解剖し、肝障害パラメーター ALT 値を測定した。

TCPOBOP および FLU-1 単独投与群では対照群に比べ ALT 値の上昇は認められなかったが、FLU-1・TCPOBOP 併用投与群では対照群、および FLU-1 単独投与群に比べ有意な ALT 値の上昇が認められた (Fig. 1)。Flutamide と TCPOBOP の併用投与についても検討を行ったが、ALT 値の有意な上昇は認められなかった。

### 2. 肝障害モデルにおける絶食の影響

肝障害モデルにおける肝内 GSH 濃度は、TCPOBOP または FLU-1 単独投与では対照群と比較し有意差は認められなかったが、FLU-1・TCPOBOP 併用群では対照群、および FLU-1 単独投与群と比べ有意に減少した (Fig. 2)。肝内 GSH 枯渇が肝障害誘発に与える影響を明らかにするために、FLU-1・TCPOBOP 併用群で、絶食の有無により ALT 値が変動するか否かについて検討した。絶食をさせた FLU-1・TCPOBOP 併用群は絶食を行わなかった群に比べ有意に高い ALT を示した。 (Fig. 3)

### 3. 肝障害誘発における脂質過酸化の関与

生体膜脂質の過酸化は膜構造の破壊を引き起こし、細胞障害を引き起こす。例えば四塩化炭素、acetaminophen などによる肝障害やアルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝障害などにおいて脂質過酸化の関与が示唆されている。Flutamide 誘発肝障害における脂質過酸化の関与を明らかにするため、肝内 malondialdehyde (MDA) を測定した。しかし、対照群と比較していずれの群においても有意な差は認められなかった (Fig. 4.)

#### 4. 肝ミクロソーム中 FLU-1 N-水酸化活性

近年、flutamide を服用した患者の尿中から FLU-1 N-水酸化代謝物 (FLU-1 N-OH) の抱合体が検出された。また FLU-1 N-OH はラット初代培養肝細胞に細胞毒性を誘起することが示された。そこで FLU-1 N-OH の肝障害誘発への関与を明らかにするため肝ミクロソーム中の FLU-1 N-水酸化活性を HPLC により測定した。マウス肝ミクロソームを用いて FLU-1 を基質として代謝実験を行い、反応液を HPLC にて解析したところ、代謝物として FLU-1 N-OH が検出された (Fig. 5)。肝ミクロソーム中の FLU-1 N-水酸化活性を測定したところ、TCPOBOP を投与した群では FLU-1 N-水酸化活性が対照群と比較して約 5 倍上昇した (Fig. 6)。FLU-1 単独投与群においても対照群と比較して約 2 倍の活性上昇が認められた。

ヒトにおいて FLU-1 の N-水酸化は主に CYP3A4、一部 CYP1A2 により触媒されることが報告されている。Western blot 法により、肝ミクロソーム中の Cyp3a、Cyp1a の発現量を測定したところ、TCPOBOP 投与によりミクロソーム中の Cyp3a、Cyp1a の、FLU-1 投与により Cyp1a の含量がそれぞれ増加した。肝ミクロソーム中の FLU-1 N-水酸化活性の上昇はそれぞれ代表的なげっ歯類の Cyp3a、Cyp1a の誘導物質である pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN)、 $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF) の投与によっても認められた。対照群に比べ PCN はミクロソーム中 Cyp3a を約 29 倍、 $\beta$ -NF は Cyp1a を約 41 倍、それぞれ増加させた。マウスにおいてもヒトと同様に FLU-1 N-水酸化反応は Cyp3a、Cyp1a により触媒されることが示唆された。

#### 5. 抗 flutamide 抗体を用いた flutamide -タンパク複合体の検出

Flutamide 代謝物のタンパク結合について bovine serum albumin (BSA) をタンパクモデルとして検討した。FLU-1 N-OH、FLU-1 を BSA と反応させた後、BSA に結合した化合物を取り除くためメタノールを加え遠心し、上清中に存在する BSA 非結合型化合物の濃度を HPLC により測定した。FLU-1 N-OH の上清中濃度は BSA の濃度依存的、また反応時間依存的に減少した (Fig. 7A)。BSA の代わりにミクロソームタンパクを用いた場合でも、同様の結果が得られた。一方、FLU-1 の上清中濃度は

BSA 添加や反応時間によらず一定のままだった (Fig. 7B)。Flutamide と OH-flutamide についても検討を行ったが、FLU-1 と同様に BSA 添加や反応時間による上清中濃度の低下は認められなかった。Flutamide に keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合させた flutamide 抗原をウサギに免疫し、抗 flutamide 抗体を作製した。Flutamide、OH-flutamide、FLU-1、FLU-1 N-OH をそれぞれマイクロソームタンパクと反応させた後、薬物-タンパク複合体を抗 flutamide 抗体を用いて Western blot 法により検出した。FLU-1 N-OH と反応させたマイクロソームタンパクではその他の化合物と反応させたタンパクよりも特に 37-75 kDa の間に複数の強いバンドが認められた (Fig. 8)。

## 6. FLU-1 N-OH の解毒代謝における GSH の役割

FLU-1 N-OH をマウス肝細胞質画分、GSH とともに反応させ、その反応液を HPLC を用いて解析した。その結果、FLU-1 N-OH の親化合物である FLU-1 が代謝物として検出された。(Fig. 9A.) FLU-1 N-OH の GSH 抱合体の生成も予想されたが、本実験では FLU-1 N-OH-GSH 複合体と予想されるピークは検出されなかった。FLU-1 N-OH の FLU-1 への還元反応は反応時間依存的に進行し、FLU-1 の生成は FLU-1 N-OH の減少のうち約 40-60% を占めた (Fig. 9B)。FLU-1 の生成以外には、FLU-1 N-OH の細胞質タンパクへの結合などが FLU-1 N-OH

の減少として考えられる。FLU-1 N-OH の FLU-1 への還元は GSH 存在下であっても細胞質画分未添加時には進行せず、(Fig. 9C) また熱失活した細胞質画分を添加しても反応は進行しなかった。GSH による FLU-1 N-OH の FLU-1 への還元は非酵素的には進行せず、何らかの細胞質中に含まれる酵素の触媒が必要であることが考えられた。細胞質画分添加時において FLU-1 の生成が認められたが、これは細胞質画分に含まれる GSH が影響した可能性が考えられた。

FLU-1 N-OH の FLU-1 への還元は、glutathione S-transferases (GSTs) の代表的な基質である 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を反応系に加えると、CDNB の濃度依存的に、最大で約 90% 阻害された (Fig. 9D)。単位タンパクあたりの FLU-1 N-水酸化活性と FLU-1 N-OH 還元活性を比較すると、対照群および FLU-1 単独投与群では還元活性のほうが N-水酸化活性よりも高い活性値が得られ、FLU-1・TCPOBOP 併用群では両活性値はほぼ同程度であった (Table 1.)。

## 7. Fltuamide 代謝物の変異原性

FLU-1、FLU-1 N-OH を用いて Ames 試験を行った。酵素源には、 $\beta$ -NF を前処理したマウスから無菌的に調整した肝 S9 を用いた。試験には代表的な菌株である *Salmonella typhimurium* TA98、TA100 に加え、O-acetyltransferase 過剰発現株 YG1024、および酸化物質の変異原性を高

感度に検出できると報告のある TA102 を用いた。様々な多環芳香族アミンにおいて、N-ヒドロキシアミノ基に対する O-アセチル化は N-O 結合の開裂を促進し、変異原物質の DNA 損傷を増強することが報告されている。また、過酸化水素やキノン体、アルデヒドなどの酸化物質は活性酸素種の産生を介して間接的に DNA 損傷を誘発することが報告されている。YG1024 や TA102 を用いることにより、FLU-1 N-OH の変異原性を高感度に検出できると予想されたが、FLU-1 および FLU-1 N-OH はいずれの菌株においても変異復帰コロニー数に有意な増加を示さなかった。

#### D. 考察

絶食下のマウスに FLU-1 と TCPOBOP を併用投与することで、*in vivo* 肝障害モデルを作製した。本肝障害モデルマウスは軽度な ALT 値 ( $91 \pm 25$  IU/L) の上昇を示し、ヒトにおける肝障害誘発初期の軽度な肝毒性を再現したと考えられる。ALT 値の上昇には TCPOBOP の前処理が必要であり、FLU-1 より派生した活性代謝物が肝障害を誘発した可能性が考えられた。FLU-1 N-水酸化活性はマウス肝ミクロソーム中に認められたことから、マウスにおいてもヒトと同様に、肝臓にて FLU-1 の N-水酸化代謝物が生成することが示唆され、マウスはヒトと類似した代謝経路を有することが予想される。本研究にて構築した肝障害モデルマウスは、flutamide につい

てヒトと類似した代謝経路を有し、また遅延型の肝障害を誘発したという点でヒトにおける臨床報告を反映している。Flutamide 誘発肝障害の機序を解明する上で、我々が構築した肝障害モデルは、特に flutamide 服用患者にしばしば認められる軽度な ALT 値上昇のメカニズムの解明するための、有用なツールになると考えられる。

肝ミクロソーム中の FLU-1 N-OH の生成は TCPOBOP 投与により促進され、FLU-1 N-OH には他の代謝物に比べ強力なタンパク結合性が認められた。また、FLU-1 N-OH は強い細胞毒性を示すことも報告されている。以上の結果は FLU-1 N-OH の肝障害誘発への関与を示唆している。FLU-1 N-OH の細胞内タンパクへの結合は、flutamide による肝障害誘発の一つの機序として考えられる。

本研究において、肝内 GSH が低下する絶食時には FLU-1 による肝障害が強く認められた。肝内 GSH は加齢により減少することが報告されている。加齢による GSH の減少の詳細なメカニズムは不明だが、GSH 生合成能の機能低下が一つの原因だと考えられている。高齢者では肝内 GSH が低下しやすく、flutamide による肝障害を発症しやすいのかもしれない。Flutamide 誘発肝障害における肝内 GSH の役割についてはさらなる研究が必要である。

本研究により、提唱された flutamide 誘発肝障害の機序を Fig. 6. に示す。

Flutamideの加水分解により生じたFLU-1は肝にてN-水酸化されタンパク結合能を有するFLU-1 N-OHへ代謝される。FLU-1 N-OHはGSTs存在下でGSHによりFLU-1へ還元される。肝内GSH枯渇時には、FLU-1 N-OHはGSHによる解毒代謝を免れ、細胞内タンパクに結合することで肝障害を誘発する可能性が考えられた。

これまで、flutamide誘発肝障害について有効な動物モデルは確立されていなかった。またflutamideによる肝障害誘発には、活性代謝物の関与やGSHの防御的役割が示唆されてきたが、具体的な活性代謝物やGSHの機能については不明であった。本研究はflutamide肝障害誘発の機序を解明するために*in vivo*肝障害モデルを構築し、FLU-1 N-OHがタンパク結合を介して肝障害誘発に関与していることを示唆した。また、GSHはFLU-1 N-OHを還元することでFLU-1 N-OHの解毒代謝に寄与していることを示した。本研究により見出されたFLU-1 N-OHのFLU-1への還元反応はFLU-1 N-OHの重要な解毒代謝機構の一つであると考えられる。本研究はflutamide誘発肝障害において、肝臓でのFLU-1 N-OHの生成増加と肝内GSH枯渇の両方が重要であることを示唆した。

現在まで、FLU-1のような単環ニトロ芳香族アミンが生体で肝障害を誘発するという報告は限られている。また、FLU-1 N-OHはタンパク結合性を認めるが、*Salmonella typhimurium*に対する変異原性は認めないという点において特徴的な

化合物である。FLU-1 N-OHがどのようにしてタンパクに結合し、また遅延型の肝障害を誘発するののかについての詳細な研究は、医薬品の研究開発における薬剤性肝障害の予測に役立つかもしれない。

## E. 結論

Flutamideの加水分解で生じる主代謝物の5-amino-2-nitrobenzotrifluoride (FLU-1)とTCPOBOPを併用し、絶食を組み合わせることでマウス肝障害モデルを作製した。本研究ではこの肝障害モデルと*in vitro*の解析を組み合わせ、細胞障害性の認められるFLU-1N-水酸化体を中心に代謝の面からflutamide誘発肝障害の機序の解析を実施した。絶食下のFLU-1・TCPOBOP併用投与群では対照群に比べ有意なALT値の上昇が認められた。TCPOBOPを投与した群では肝ミクロソーム中のFLU-1 N-水酸化活性が対照群と比較して約5倍上昇した。肝内GSHレベルはTCPOBOPおよびFLU-1単独投与群では対照群と比べ有意な差は認められなかったが、FLU-1・TCPOBOP併用群では有意な減少が認められた。絶食2日でマウス肝内GSHは約60%減少したが、FLU-1・TCPOBOP併用群で絶食を行わないと、ALT値は有意に低下した。FLU-1 N-OHをGSH、マウス肝細胞質画分とともに反応させると代謝産物としてFLU-1 N-OHの親化合物であるFLU-1が検出された。またFLU-1 N-OHをマイクロゾームタンパクと反応させ

ると 37-75 kDa の間に複数の付加体タンパクが抗 flutamide ハプテン抗体を用いたイムノブロット法により検出されたが、flutamide, OH-flutamide, FLU-1 ではほとんど認められなかった。

以上の結果より FLU-1 の N-水酸化代謝物はタンパクとの反応性を有し、肝障害誘発に関与することが示唆された。GSH 存在下での FLU-1 N-OH の FLU-1 への還元は FLU-1 N-OH の解毒機構の一つであると考えられ、flutamide による肝障害誘発に、肝臓における FLU-1 N-OH の生成増加と肝内 GSH 枯渇の両方が重要であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

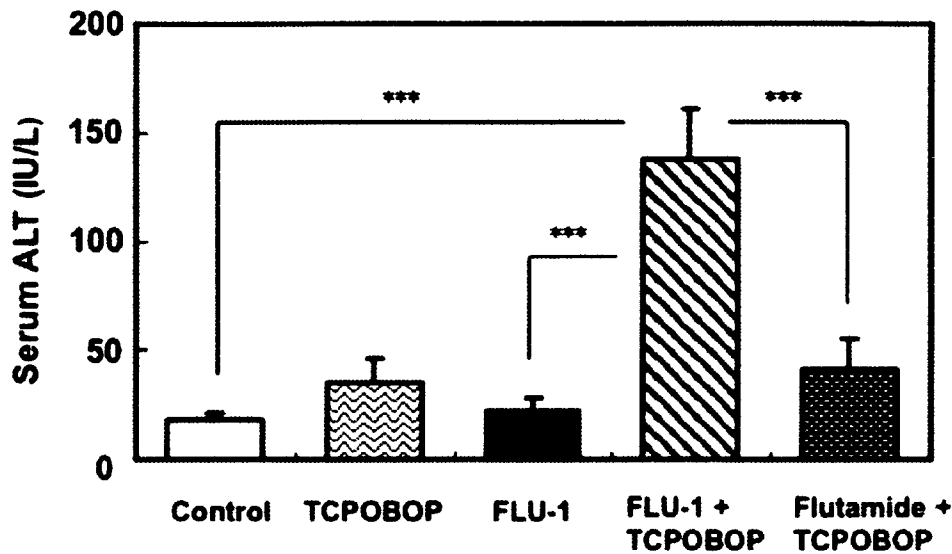
##### 1. 論文発表

- 1) M. Ohbuchi, M. Miyata, D. Daichi, M. Shimada, K. Yoshinari and Y. Yamazoe  
Involvement of N-hydroxylation of flutamide metabolites and hepatic GSH depletion in flutamide-induced hepatotoxicity *Drug Metab. Rev.* 39, supplement 1 36 (2007)

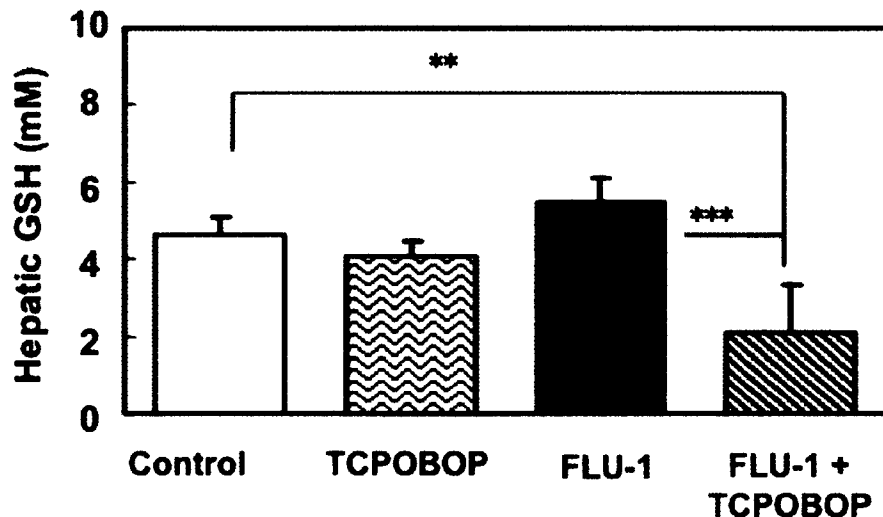
##### 1) 学会発表

- 1) M. Ohbuchi, M. Miyata, D. Nagai, M. Shimada, K. Yoshinari and Y. Yamazoe  
Involvements of N-hydroxylation of flutamide metabolite and hepatic GSH depletion in flutamide-induced hepatotoxicity. 8<sup>th</sup> ISSX meeting, 2007. Sendai

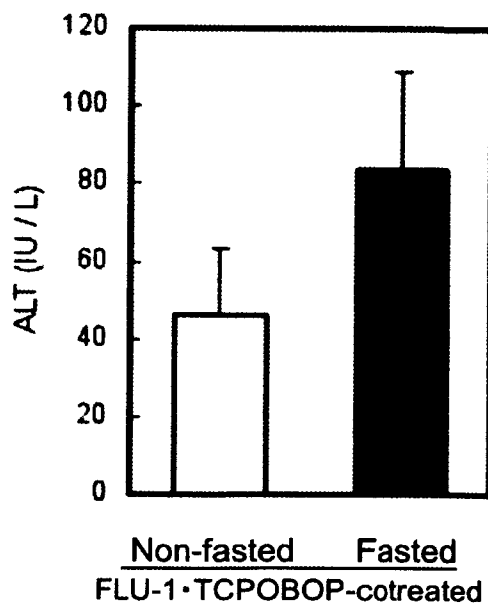
#### G. 知的財産権の出願、登録状況 登録および登録予定共になし



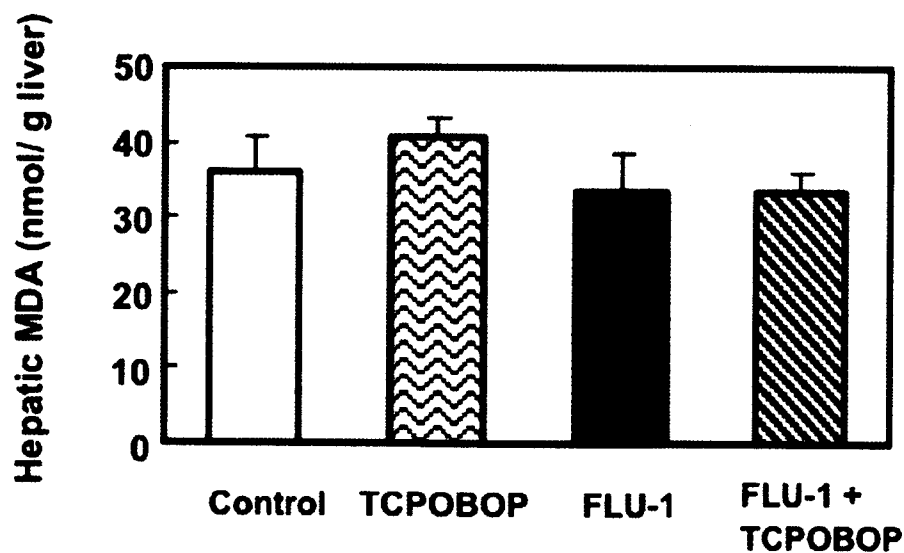
**Fig. 1 Influence of TCPOBOP on FLU-1-induced liver injury.** Flu-1 or flutamide and TCPOBOP were coadministered to C57BL/6N male mice. FLU-1 or flutamide (200 mg/kg) was given p.o. for five days and TCPOBOP (3 mg/kg) was given i.p. for the first three days. Mice were fasted for the last two days. Serum ALT levels are shown as mean  $\pm$  SD. (n = 5-6) and analyzed by Tukey's tests. \*\*\*, Significantly different between the indicated groups (P < 0.001.)



**Fig. 2 Hepatic GSH levels in FLU-1- and TCPOBOP-cotreated mice.** Flu-1 and TCPOBOP were coadministered to C57BL/6N male mice. FLU-1 or flutamide (200 mg/kg) was given p.o. for five days and TCPOBOP (3 mg/kg) was given i.p. for the first three days. Mice were fasted for the last two days. Hepatic GSH levels are shown as mean  $\pm$  SD. (n = 4-5) and analyzed by Tukey's tests. \*\*, \*\*\*, Significantly different between the indicated groups (P < 0.01, P < 0.001 respectively).

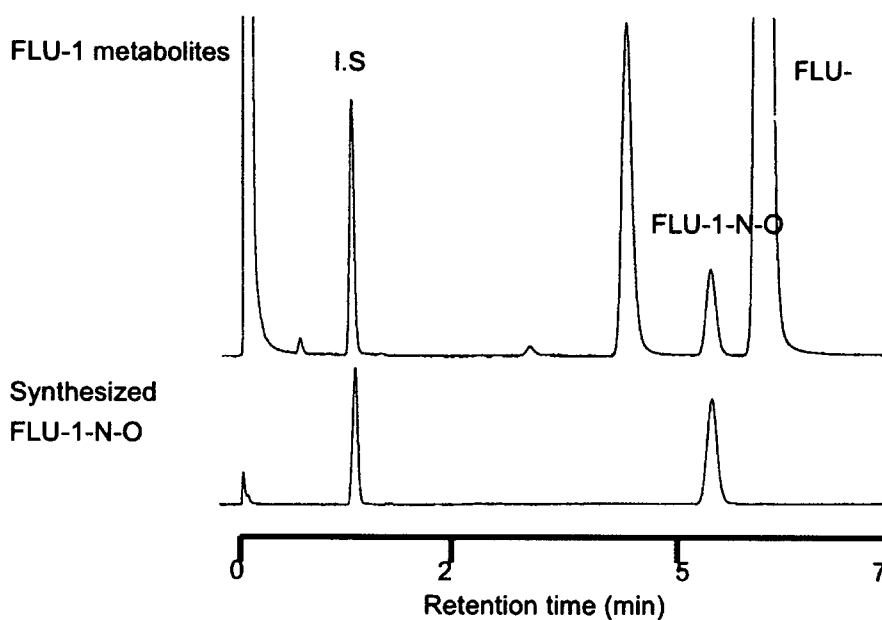


**Fig. 3. Influence of fasting on FLU-1-induced liver injury.** Mice were treated with FLU-1 and TCPOBOP and fasted for the last two days or fed *ad libitum*. Serum ALT activities are shown as the mean  $\pm$  S.D. (n = 5-6) and analyzed by Student's unpaired *t* tests. \*, P < 0.05. (Significant difference between the indicated groups).

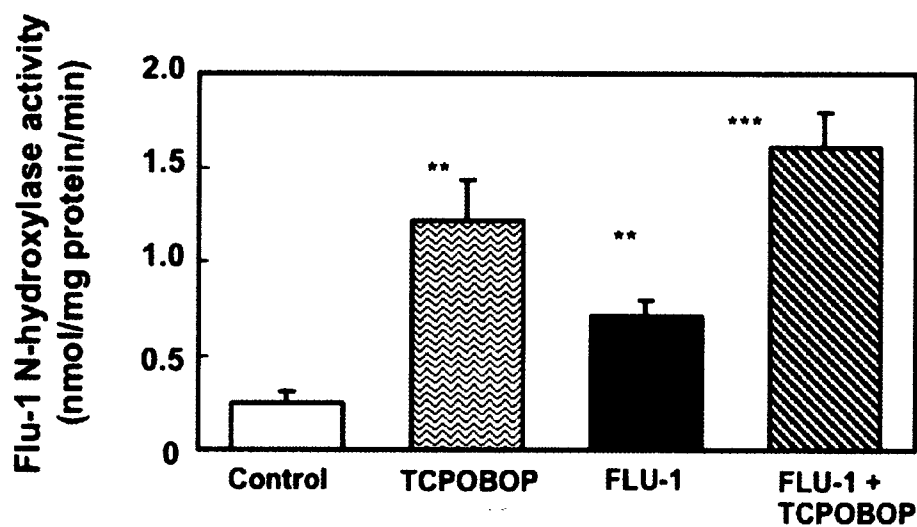


**Fig. 4 Hepatic MDA levels in FLU-1 and TCPOBOP-cotreated mice.** Hepatic MDA was determined using the reaction with N-methyl-2-phenylindole. Data are shown as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4).

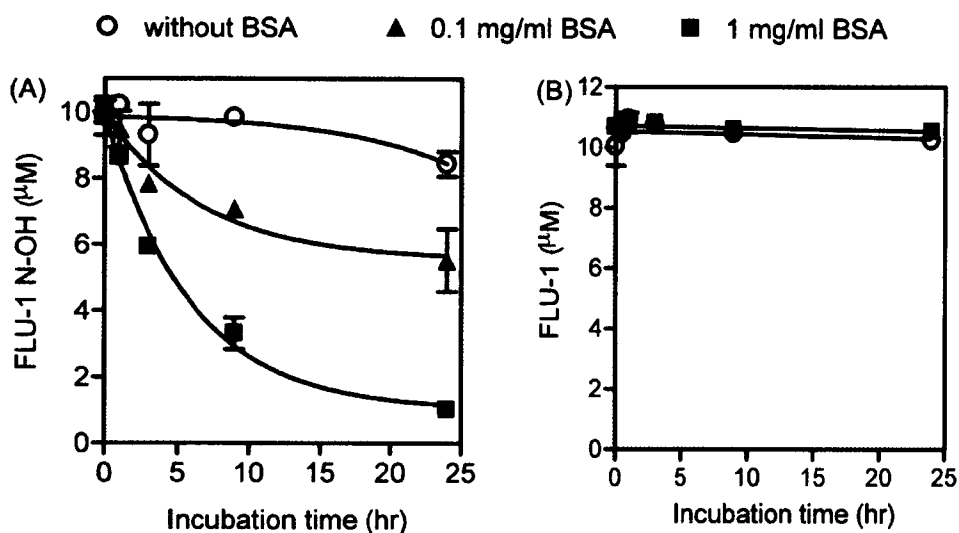




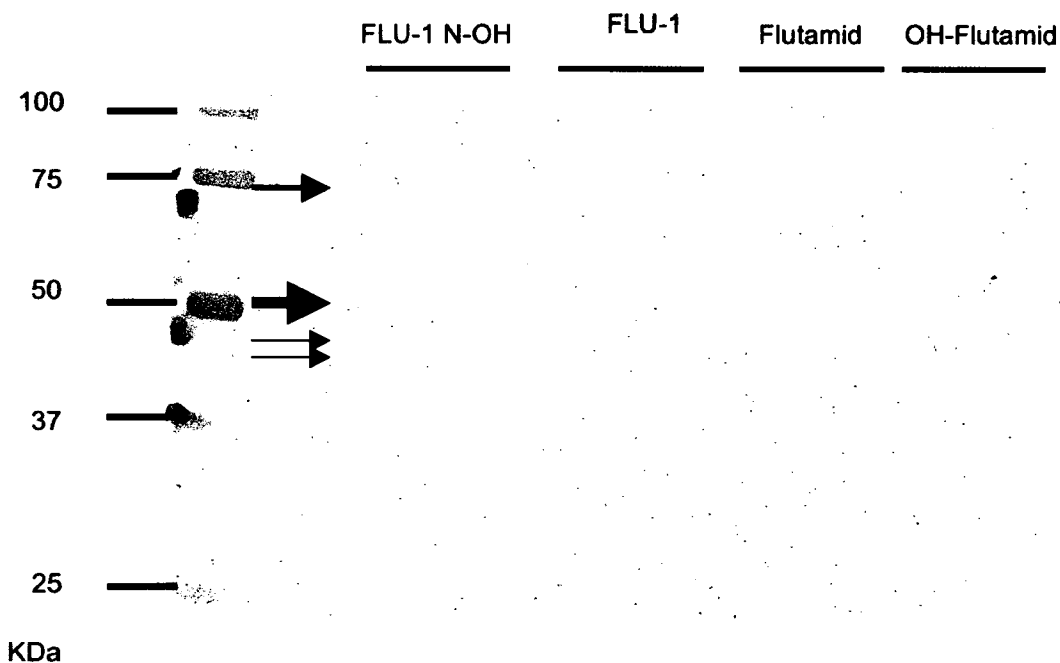
**Fig. 5. HPLC chromatogram of FLU-1 metabolites.** FLU-1 (200  $\mu$ M) was incubated with mouse liver microsomes (0.1 mg/ml) prepared from TCPOBOP treated mice at 37°C for 10 min. The reaction mixture was analyzed by HPLC ( $\lambda = 366$  nm). I.S., Internal standard (umberifellone).



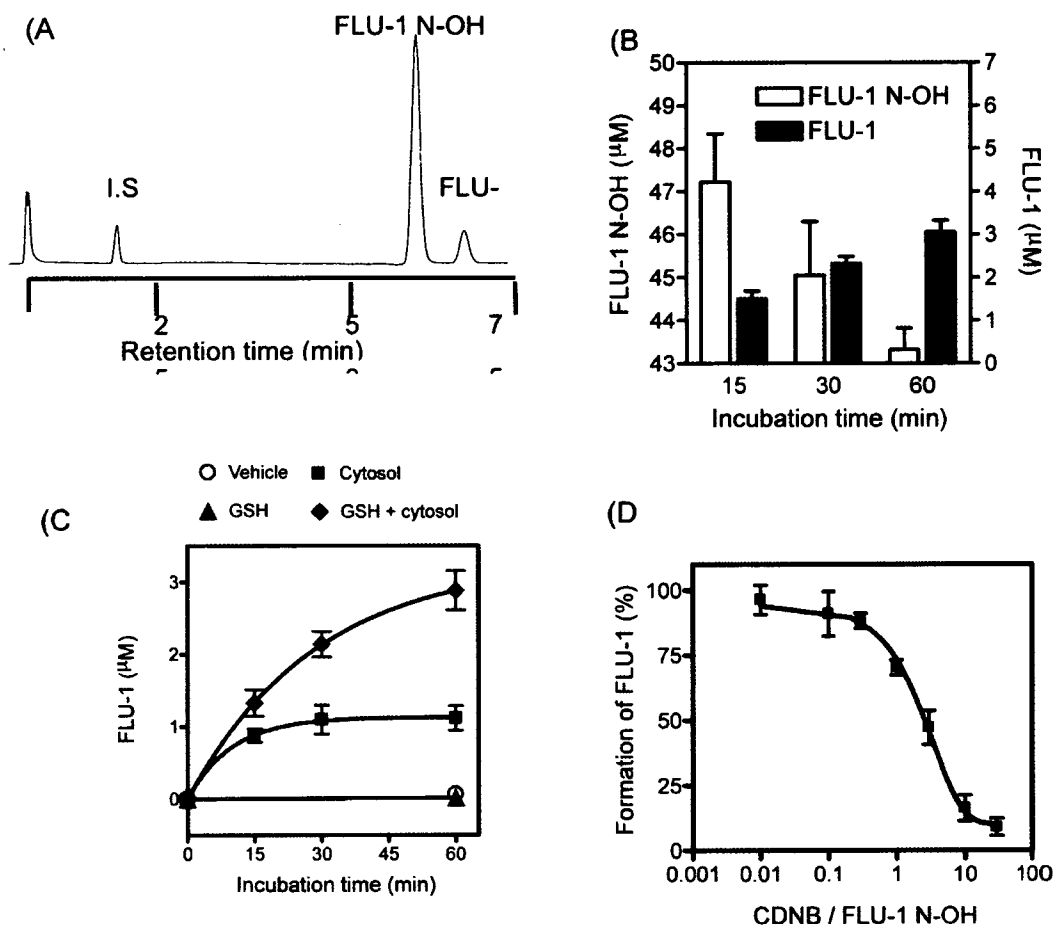
**Fig. 6. Influence of TCPOBOP on FLU-1 N-hydroxylation in mouse liver microsomes.** FLU-1 (200  $\mu$ M) was incubated with mouse liver microsomes (0.1 mg/ml) at 37°C for 10 min and FLU-1 N-hydroxylation was determined by HPLC ( $\lambda = 366$  nm). Data are shown as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4-5) and analyzed by Tukey's tests. \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001. (Compared to control group).



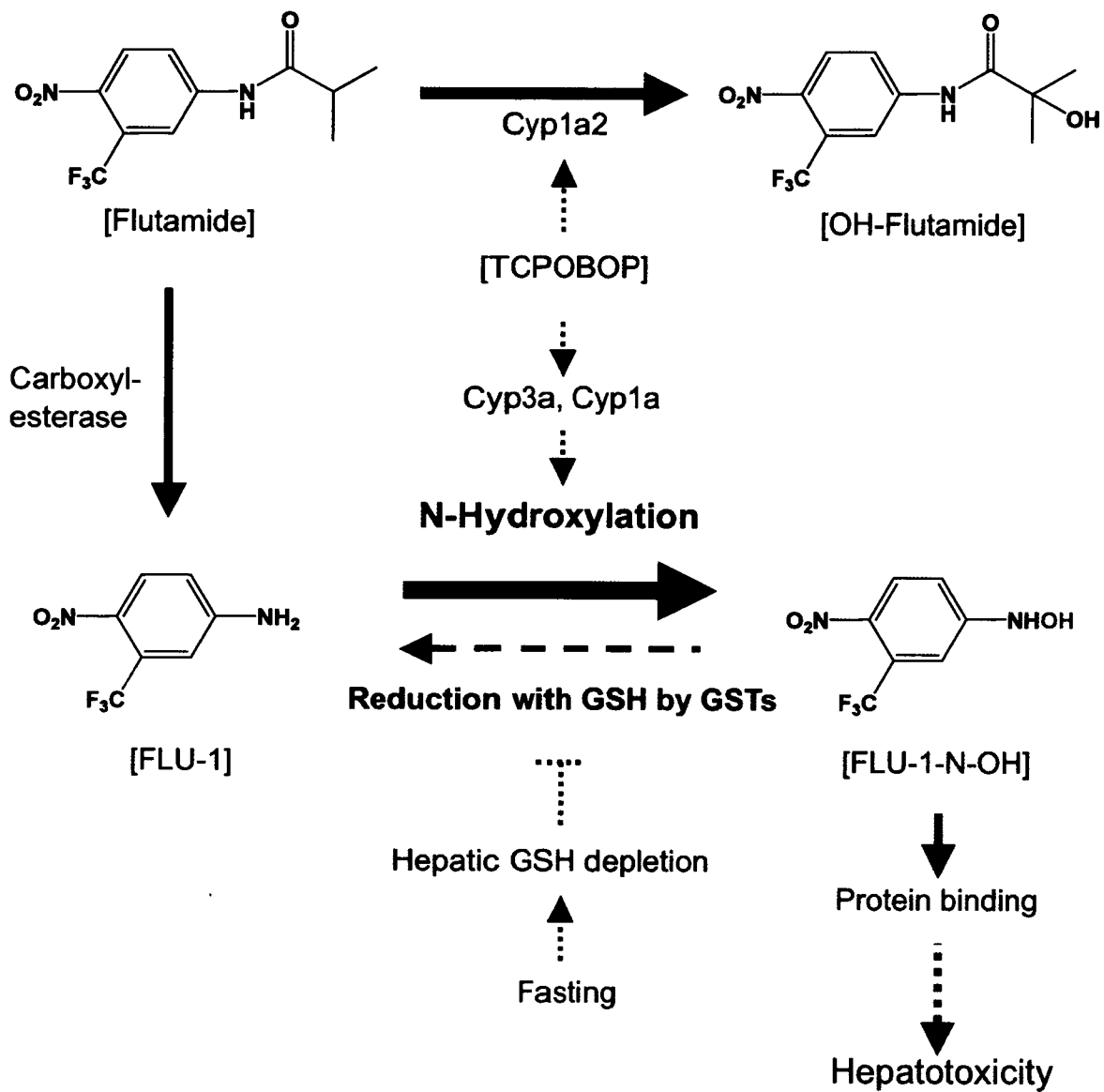
**Fig. 7 FLU-1-N-OH, but not FLU-1, interacted with BSA.** (A) FLU-1 N-OH or (B) FLU-1 ( $10 \mu\text{M}$ ) was incubated with BSA at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hours. To remove BSA, reaction mixture was centrifuged after methanol was added. The supernatant was collected and FLU-1 or FLU 1-N-OH was determined by HPLC. Data are shown as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).



**Fig. 8 Detection of flutamide metabolite-protein complex.** FLU-1-N-OH, FLU-1, flutamide and OH-flutamide ( $500 \mu\text{M}$ ) was incubated with hepatic microsomal protein ( $2 \text{ mg/ml}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 2 hours. Microsomal proteins were separated by SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gel. Drug-protein complex was detected by Western blot analysis with antibody against flutamide. Data are shown as two representative samples.



**Fig. 9 Reduction of FLU-1 N-OH with GSH to FLU-1.** FLU-1-N-OH ( $50 \mu\text{M}$ ) was incubated with hepatic cytosolic protein ( $0.1 \text{ mg/ml}$ ) and GSH ( $10 \text{ mM}$ ). Reaction mixture was analyzed by HPLC (A) HPLC chromatogram of FLU-1 N-OH incubated with cytosolic protein and GSH. (B-C) Formation of FLU-1 was determined for indicated incubation period. (D) CDNB ( $0.5\text{-}1500 \mu\text{M}$ ) was added 3 min before the incubation. Incubation was carried out at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min and formation of FLU-1 was determined.



**Fig. 10 Proposed mechanism of flutamide-induced liver injury.**