

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物肝障害発症の機構解明と予測実験系の開発

平成 19 年度 統括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 20 (2008) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

統括研究報告書

特異体質性薬物肝障害発症の機構解明と予測実験系の開発

主任研究者 横井 毅 金沢大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

ヒトに初めて投与される開発候補薬や、市販後に多くの患者に投与されて初めて重篤な薬物誘導性肝障害が発現する場合は現在でも多く報告されており、創薬の大きな障害となっている。本研究では、特異体質性薬物誘導性肝障害の予測試験系の構築とその評価を目的とした。特にヒト肝における反応性代謝物の生成系を考慮した *in vitro* 細胞スクリーニング試験系と、*in vivo* 試験ラットの作出と評価研究を主な目的とし、主に以下の 5 項目について研究を行い概ね当初の予定どおりの成果を挙げることが出来た。(1) γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによるグルタチオン減少モデルラットを用いた薬物誘導性肝障害試験系の評価、(2) スーパーオキシドデスムターゼ 2 ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築、(3) CYP3A4 による代謝的活性化に関する薬物誘導性肝障害試験系構築の研究、(4) 肝障害化合物投与によるマイクロ RNA の発現変動とその役割の検討、(5) マイクロ RNA によるヒト PXR の発現制御と CYP3A4 の個人差に関する検討。

(1) γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによるグルタチオン減少モデルラットを用いた薬物誘導性肝障害試験系の評価 グルタチオン転移酵素 (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、ヒトに比べてげっ歯類で酵素活性がかなり高いことが知られており、この代謝能の違いが前臨床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。本研究においては、前年度に確立し、特許申請を行ったグルタチオン (GSH) 減少モデルラットを用いてさらなる検討を行った。ジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害の発現について検討し、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出できることを明らかにした。本研究で検討した GSH 減少モデルラットが医薬品開発の安全性研究で用いられ、前臨床試験におけるスクリーニングの段階で薬物誘導性肝障害を高感度に検出し、ヒトにおける副作用を未然に防ぐ有用な手段になることを期待する。

(2) スーパーオキシドデスムターゼ 2 (SOD2) ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試

験系の構築 SOD2 はミトコンドリアにおけるスーパーオキシドアニオンの解毒を担っており、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。近年、酸化ストレスによる薬物誘導性肝障害が問題となっている旨の多くの報告がなされているが、これは酸化ストレスに対する感受性の高い有用なモデル動物および細胞実験系が乏しいために、非臨床安全性試験における酸化ストレスの関与する薬物の毒性予測が困難であることが原因の一つと考えられる。そこで本研究ではミトコンドリアのスーパーオキシドを解毒し、ホモノックアウトにおいては生後まもなく死亡してしまう、SOD2 遺伝子のノックダウンの系を構築することにした。これにより *in vitro* および *in vivo* で SOD2 酵素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、酸化ストレスの関与が考えられる薬物の毒性発現メカニズムの解明および薬物の活性代謝物による肝毒性を高感度に検出できる系の確立を目的とした。本研究では、ラット SOD2 遺伝子をノックダウンするアデノウイルス (AdSOD2-shRNA) を作製した。この AdSOD2-shRNA と本研究室既存の CYP3A4 を発現するアデノウイルス (AdCYP3A4) をラット肝癌由来細胞である BRL3A 細胞に感染させ、薬物について細胞生存率、活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンについて検討した。その結果、ダブソンやトログリタゾンなどの、酸化ストレスが肝毒性に影響する薬物で細胞生存率の低下、また活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの生成の増加が認められた。以上の結果より、本研究で確立した実験系は CYP3A4 により活性代謝物が生成し、活性酸素種を生成する薬物の毒性評価に有用であることが示唆された。さらに、CYP3A4 に限らず、他の CYP 分子種を発現するアデノウイルスを同時感染させることで、同様の薬物の毒性評価が可能であると考えられる。今後、これら実験系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が期待される。

(3) CYP3A4 による代謝的活性化に関する薬物誘導性肝障害試験系構築の研究 薬物の代謝的活性化は薬物性肝障害の原因の一つとして、近年注目されている。しかし *in vitro* において CYP の発現を維持するのは非常に困難であるため、*in vitro* における CYP による代謝的活性化の予測は難しいとされる。本研究では当研究室で構築した *in vitro* 実験系を用いて、CYP による代謝的活性化の予測を行なった。ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討およびグルタチオン抱合体の検出を行なった。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムでは CYP3A4 存在下で細胞障害の増強が認められ、CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。またフルニトラゼパムおよびニメタゼパムは CYP3A4 とインキュベートすることによりグルタチオン抱合体が検出されたことから、ニトロベンゾジアゼピンのニトロ基が反応性代謝物の生成に重

要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、チエノピリジン誘導体の CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行なった。チクロピジンおよびクロピドグレルでは CYP3A4 による細胞障害の増強が認められ、CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。HMG-CoA 還元酵素阻害薬の CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行なった。フルバスタチンでは CYP3A4 による細胞障害の増強が認められ、CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。本研究では、複数の薬物で CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにし、さらに反応性代謝物の一部がグルタチオン抱合を受けることを示した。今後は代謝的活性化を受ける薬物の反応性代謝物を同定し、細胞障害メカニズムを解明することで、代謝的活性化の予測にさらに役立つ有益な情報を提供できると考えられる。

(4) 肝障害化合物投与によるマイクロ RNA の発現変動とその役割の検討 網羅的にマイクロ RNA の変動を検出できる miRNA マイクロアレイを用い、典型的肝障害性薬物であるチオアセタミド処置後、早期において変動する miRNA について探索した。毒性に関与する miRNA として、miR-21 が見出され、その変動は複数の肝毒性化合物において認められた。見出された miR-21 について、*in vitro* 実験系を用いて miR-21 抑制状態が及ぼす薬物誘導性細胞障害を検討した。検討に用いたシンバスタチン、ロバスタチンにおいて細胞障害性が miR-21 のアンチセンスオリゴヌクレオチド導入によって増強され、miR-21 の働きは細胞の保護作用であることを薬物誘導性細胞障害の面から明らかにした。今後の、miRNA の毒性学的な機能解析の研究に情報を提供するものである。

(5) マイクロ RNA によるヒト PXR の発現制御と CYP3A4 の個人差に関する検討 プレグナン X 受容体 (Pregnane X receptor, PXR) は、チトクローム P450(CYP)3A4 をはじめとする薬物代謝酵素やトランスポーターなどの誘導的な発現の制御に関わる主たる核内因子の 1 つであることが知られている。この研究で、我々は 25 名のヒト肝の試料について検討し、PXR mRNA の発現量が PXR たんぱく質の発現レベルと全く相関しないことを新たに見出した。このことは PXR が転写後に何らかの発現制御を受けていることを示唆している。さらに、この PXR の 3' 非翻訳領域にマイクロ RNA (miR)-148a によって認識されると考えられる配列があることを新たに見出した。ルシフェラーゼを用いたレポータージーンアッセイにより miR-148a は、PXR mRNA の miR-148a 認識様配列を認識することを示した。細胞レベルでの検討において、PXR タンパク質は miR-148a を過剰発現させると発現が減少し、miR-148a をアンチセンスオリゴヌクレオチドで阻害すると発現が増加した。また、miR-148a 依存的な PXR の増減は、CYP3A4 mRNA の発現量に影響を及ぼしていた。さらに、PXR の翻訳効率の指標である PXR タンパク質/PXR mRNA 比は、miR-148a の発現量と逆の相関にあることを 25 名のヒト肝試料について明らかに

した。このことは、miR-148a がヒト肝において PXR の発現制御の役割をしていることを意味する。実際、ヒト肝における PXR タンパク質の発現量は、CYP3A4 の mRNA およびタンパク質の発現量を相関した。本研究で、我々は miR-148a がヒト PXR の発現を転写後調節しており、これによりヒト肝における CYP3A4 の常在的および誘導的発現が制御されていることを見出した。この研究結果は、これまで解明されていなかったヒト CYP3A4 活性の大きな個人差の説明として新たな知見を提供するものである。

分担研究者：金沢大学大学院医学系研究科・准教授 中島美紀

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年もの年月と150~200億円の研究費を要すると言われている。前臨床の薬効試験、安全性試験や薬物動態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、実験動物とヒトでは、代謝活性に大きな種差があることが知られている。このため、ヒトにおける体内動態を前臨床試験の段階で予測することは困難であり、実際に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。平成19年度における本研究では、薬物誘導性肝障害の予測試験系の構築を目指して、種差を考慮した試験系の開発研究およびヒト特異的に発症する薬物誘導性肝障害の機構解明について、以下の5つの相互に関連した研究内容で研

究を行った。(1)前年度に特許申請した γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)のノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系のラットモデルの更なる検討として、本研究では、ジクロフェナクおよびフルタミドを用いて、GSH減少モデルラットが薬物による急性、および亜急性の薬物誘導性肝障害を広く、高感度に検出する際に有用であるかについて検討した。(2)活性酸素の主たる解毒系酵素であるスーパーオキシドデスムターゼ2(SOD2)のノックダウン試験系の構築をした。すなわち、本研究では、SOD2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を行うことで、SOD2を減少させた細胞実験系およびラットによるモデル動物実験系を作製し、薬物誘導性のスーパーオキシドが関与する肝障害を高感度に予測する系を確立することを目的とした。*In vitro*でアデノウイルスを用いたshRNA発現法を用いてラット肝癌由来細胞においてSOD2を減少させる検討を行い、被検薬物による細胞生存率への影響を検討した。(3)CYP3A4の代謝的活性化による細胞障害性に関するさらなる検

討として、これまでに肝障害が報告されている薬物であるベンゾジアゼピン系薬物、チエノピリジン誘導体、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬に対して、CYP3A4 による代謝的活性化の有無を明らかにすることを目的とした。(4) 薬物誘導性肝障害に関与するマイクロ RNA の検討として、本研究では、チオアセタミド(TA) を処置したラットにおける miRNA の発現変動を検討した。この際、miRNA の作用システムである転写抑制を考慮し、毒性を発現する前の投与後の早い段階における変動を検討した。また、マイクロアレイの結果から見出された miRNA について、他の 4 つの肝毒性化合物においても同様の時間帯において発現変動を検討した。次に、*in vitro* の系を用いて、マイクロアレイの結果見出された miRNA の発現量をアンチセンスオリゴ (AsO) の導入によってコントロールした際の細胞生存率への影響を検討した。(5) ヒト肝における含量が最も多く、反応性代謝物の生成原因であり、発現の個人差が解明されていない CYP3A4 について、マイクロ RNA による制御が個人差の原因であるかの解明、の 5 項目を中心に検討を進めた。

B. 研究方法

γ -GCS および SOD2 について short hairpin RNA (shRNA) の発現手法、ヒト

CYP 3A4 の発現ベクターの作成、および細胞への感染実験、ラットへの投与実験などは全て、昨年度までに確立した方法および常法に従って行った。その他、培養細胞およびラットを用いた実験を行った(詳細は各分担報告書を参照)。

(倫理面への配慮)

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承認を受けて行った。本検討における動物実験は、金沢大学動物実験指針に従って、承認を受けた後に行った。本研究で用いたヒト肝マイクロゾーム、ヒト肝 RNA などのヒト由来試料は、全て市販品として入手できるものを用いており、倫理委員会の申請対象とならないことを確認済である

C. 実験結果

(1) 前年度に γ -GCS についてアデノウイルスベクターを用いた shRNA 発現手法により、グルタチオン(GSH)合成をノックダウンすることに成功し、ラット *in vivo* において、アセトアミノフェンの肝障害性を高感度に予測できた。本年はこの系の評価を目的としてフルタミドとジクロフェナクについてラット *in vivo* で評価検討し、期待どおりに肝障害性を高感度に検出できる系であることを示すことができた。すなわち通常のラットでは肝障害をまったく発症しない投与量において、

このモデルラットは顕著な肝障害を示し、その投与量の差異は5〜10倍であった。論文作成中である。(2) SOD2のノックダウン/アデノウイルス系を培養細胞レベルで構築することに成功した。この細胞を用いてダブソンおよびトログリタゾンによる細胞障害性を高感度に検出できることを示した。すなわち昨年の本研究でCYP3A4をヒトと同様の活性に発現させた細胞にSOD2ノックダウンのアデノウイルスを用いてSOD2の発現抑制を併せると、さらなる感度の上昇が得られた。これは、GSHのみならずSOD2による活性酸素種の発生も同時に細胞障害性関わっていることを明らかにした系である。この系は化合物のスクリーニング方法としてすぐに活用することができるものである。特許申請準備中である。さらにin vivoラットモデルとしての検討をおこなっている。なお、ヒトCYP3A4をラットin vivoで高発現させる系の検討を鋭意試みたが成功に至らなかった。これはラットin vivoではヒトCYP3A4タンパク質は非自己として速やかに排除されることが示唆された。(3) ヒトCYP3A4が反応性代謝物の生成に主たる要因であることを示すために、ベンゾジアゼピン系薬物について検討した。13種類のうち3種類のみがCYP3A4による細胞障害性を発現した。これらの化合物に共通した構造の部分にGSH付加体が形成されていることを証明した。

(4) 肝障害時におけるマイクロRNAの役割を明らかにするために、典型的な肝障害性薬物を投与したラット試料について検討を行い、miR-21の発現が増加することを見出した。さらにこの増加は肝障害性を防御する働きを持つことを明らかにした。しかし、その詳しいメカニズムの解明には至らなかった。(5) マイクロRNAとヒト肝で最も重要なCYP3A4個人差の関わりを検討した。反応性代謝物生成に主たる役割を果たすCYP3A4の個人差発現の原因が解明されなければならない。本研究ではヒトCYP3A4の発現と誘導に関わる核内受容体であるPXRがmiR-148aによって制御されていることを初めて明らかにした。細胞レベルでmiR-148aを強制発現させるとリファンピシンによる誘導も完全に阻害されること等を明らかにした。現在J Biol Chemに印刷中である。

D. 考察

(1) γ -Glutamylcysteine synthetaseノックダウンによるグルタチオン減少モデルラットを用いた薬物誘導性肝障害試験系の評価、

ジクロフェナクおよびフルタミドは前臨床試験において肝障害が認められていない。しかし、販売後の調査ではともに頻度は低いものの肝障害が報告されている。本研究では、一部のヒトにおいて重篤な肝障害が発現すると報告されている

ジクロフェナクおよびフルタミドを、AdGCSH-shRNA を投与したGSH減少モデルラットに単回および連続投与することにより、前臨床試験で頻繁に用いられるげっ歯類であるラットにおいて薬物誘導性の急性および亜急性の肝障害を高感度に検出できるかについて検討した。ジクロフェナクについては、単回投与の検討においては、GSH減少モデルラットでのみ100 mg/kgの投与で肝障害が認められた。しかし、肝組織像での検討で顕著な変化は認められなかった。今回の検討ではAST値が特に上昇した。また、ジクロフェナクは重大な副作用として肝障害以外にうつ血性心不全が挙げられる。ASTおよびALTは肝臓に多く含まれるがASTが最も多く含まれるのは心筋である。よって、血清肝障害マーカーの上昇は心疾患も寄与していたため、肝組織像で顕著な変化は認められなかったという可能性も考えられる。連続投与の検討においては、どの投与群においても肝障害が認められなかった。単回投与の際、ASTおよびALT値の上昇は6時間後と比べて24時間後では小さくなっていた。今回、連続投与ではジクロフェナクを1日1回で投与したため、肝毒性が蓄積せず肝障害が認められなかったと考えられる。いずれにしても単回投与の検討結果から、GSH減少モデルラットはジクロフェナクによる急性の肝障害を高感度に検出できることを示し

た。

ジクロフェナクは代謝されて活性代謝物となり、GSH抱合を受けるとされている。今回、GSH減少モデルラットにおいてジクロフェナクによる肝障害の増強が認められたことから、ジクロフェナクの解毒にGSHが関与していることが示された。ジクロフェナクは活性代謝物として、ヒトにおいてはUGTによってグルクロン酸抱合されたacyl glucuronide、およびCYP2C9あるいはCYP3A4により酸化的代謝を受けたquinoneimineが報告されている。GSH減少による影響として、UGTにより生成されるacyl glucuronideへの寄与は小さいと考えられるが、CYP2C9と相同性が高い分子種であるラットのCYP2C11により生成されるquinoneimineへの寄与は無視できないと考えられる。よって、GSH減少モデルラットにおけるジクロフェナクの毒性増強のメカニズムについてはさらに詳しい検討が必要であると考えられる。

フルタミドについては、単回投与の検討においては、GSH減少モデルラットでのみ1,000および1,500 mg/kgの投与で肝障害が認められた。1,500 mg/kg投与群において、投与量が増えているにもかかわらず1,000 mg/kg投与群と比べて肝障害の増強が認められなかったのは、薬物の吸収が飽和した可能性があると考えられる。連続投与の検討においては、GSH減少

モデルラットでのみ 500 mg/kg の投与で肝障害が認められた。単回投与の検討と比較して肝障害の程度は穏やかだが、投与を続けることによってさらに強い肝障害が認められる可能性が考えられる。今回 GSH 減少モデルラットにおいてフルタミドによる肝障害の増強が認められたことから、フルタミドの解毒に GSH が関与していることが示された。フルタミドの代謝は主に CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A5 などが関与するとされており、グルタチオン減少モデルラットにおける CYP2C11 の減少の影響はあまりないと考えられる。本研究において、GSH 減少モデルラットがジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害を高感度に検出できることを示した。今後、安全性研究において GSH 減少モデルラットを用いることで、急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出することに本モデルラットが貢献できると考えられる。

(2) スーパーオキシドデスムターゼ 2 ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築

本章ではラット SOD2 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 BRL3A 細胞における SOD2 mRNA、タンパク質、酵素活性を指標とし

たノックダウン効率を検討した。今回、2 種の shRNA を構築した。配列 B-AdSOD2-shRNA では良好なノックダウンが認められた。一方、配列 A-SOD2-shRNA においては GAPDH mRNA の MOI 依存的な増加が認められたが、GAPDH はアポトーシスを引き起こす調節因子であることが知られている。MOI 依存的に GAPDH mRNA が増加したことから配列 A-SOD2-shRNA 処置によって細胞死が誘導されたことが考えられるが、配列 B-SOD2-shRNA 処置では GAPDH mRNA の増加は認められなかった。このことから配列 A-SOD2-shRNA の配列が GAPDH mRNA の増加に関与していることが考えられる。

様々な動物種由来肝細胞を用いた検討では、ラット肝由来の BRL3A 細胞において約 60% の SOD2 mRNA の減少が認められたが、ラット肝癌由来細胞である H4IIE 細胞では SOD2 mRNA の有意な減少は認められなかった。H4IIE 細胞に MOI 100 で AdSOD2-shRNA を感染させると細胞変性が認められたため、ノックダウンの影響が明確に見られなかったことが考えられる。本研究において、標的としたラット SOD2 遺伝子に対しては 100% の相同性を持つように shRNA を設計した。マウス SOD2 遺伝子に対しては 63% (19 mer 中 12 mer の相同性)、ヒト SOD2 遺伝子に対しては 58% (19 mer 中 11 mer の相同性) であった。今回設計した shRNA はラット SOD2

mRNA の 3' -UTR に結合するため、ラット SOD2 mRNA とマウス SOD2 mRNA との相同性は約 87.2% と高いが、今回設計した配列部分の相同性は低かったと考えられる。本実験によりラット肝由来細胞である BRL3A でのみ SOD2 mRNA の有意な減少が認められたので AdSOD2-shRNA 感染による詳細な検討を、BRL3A 細胞を用いて行った。SOD2 mRNA は感染後 2 日目で減少傾向が認められたが、タンパク質および酵素活性値においては感染後 3 日目で有意な減少が認められた。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 の減少に遅れて生じたことが考えられる。また、感染後 5 日目でも SOD2 mRNA、タンパク質および活性値は有意な減少が認められたが、感染 3 日目ほどの減少は認められなかった。これは感染後 5 日目では細胞の状態が悪いため、ノックダウン効率が低下したことが考えられる。結果として感染後 3 日目で最大約 60% の SOD2 mRNA、約 60% の SOD2 タンパク質および約 50% の SOD2 酵素活性値の減少が認められた。

薬物誘導性肝障害は主として CYP などにより代謝的活性化を受けることで起こることが知られている。BRL3A 細胞には CYP がほとんど発現していないため活性代謝物を生成させるには CYP を BRL3A 細

胞に発現させることが必要であると考えられる。以前、本研究室において CYP3A4 を発現するアデノウイルス (AdCYP3A4) が構築されていたため、今回様々な CYP 中の CYP3A4 を発現させることとした。AdCYP3A4 単独感染 BRL3A 細胞と AdCYP3A4 と AdSOD2-shRNA 同時感染 BRL3A 細胞における CYP3A4 の活性値にはそれほど差は認められなかった。AdCYP3A4 MOI 50 でほぼプラトーとなり、また、AdCYP3A4 MOI 100 では半数以上の細胞で変性が起こっていたため AdCYP3A4 と AdSOD2-shRNA との同時感染の条件は AdCYP3A4 が MOI 50、AdSOD2-shRNA が MOI 100 で行うことにした。今回 AdCYP3A4 を感染させた BRL3A 細胞の CYP3A4 酵素活性値は 50 pmol/min/mg protein であったが、これはヒトヘパトサイトにおける酵素活性値 (30~100 pmol/min/mg protein) とほぼ同程度であった。

上記の条件で AdCYP3A4 と AdSOD2-shRNA 同時感染させた BRL3A 細胞で細胞生存率の検討、また、活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの生成量への影響を検討した。ダブゾン、スルファメトキサゾール、トラゾドン、トログリタゾン、アルベンダゾールおよびニフェジピンにおいては細胞生存率が対照群の AdLuc-shRNA 感染群に比べて有意に減少し、活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの生成量の有意な増加が認

められた。ニフェジピンにおいては AdSOD2-shRNA 単独感染においても有意な細胞生存率の低下および活性酸素種生成の有意な増加が認められたが、スーパーオキシドアニオンの生成量の変化は認められなかった。スーパーオキシドアニオンは生体内タンパク質や核酸に即座に反応するので、AdSOD2-shRNA 単独感染におけるニフェジピン処置においてはスーパーオキシドアニオンの生成量が上述の薬物に比べて少なかったためにその影響が認められなかったと考えられる。また、カルバマゼピンおよびイソニアジドにおいては細胞生存率が対照群の Aduc-shRNA 感染群に比べて有意に減少し、活性酸素種生成量の有意な増加が認められたが、スーパーオキシドアニオンの生成量の変化は認められなかった。フルタミドおよびジドブジンにおいては細胞生存率が対照群の Aduc-shRNA 感染群に比べて有意に減少したが、活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの有意な変化は認められなかった。一方で、ジドブジンの毒性は酸化ストレスが関与していることが示唆されているが、ジドブジンの活性代謝物であるジドブジン三リン酸化合物は細胞毒性を示さないことが知られている。これら報告を統合すると、今回の結果はジドブジンのこれら両面性が見られたためと考えられる。ダントロレン、ニメスリドおよびロシグリタゾンにおいては対

照群の AdLuc-shRNA 感染群との細胞生存率、活性酸素種およびスーパーオキシドアニオン生成量への有意な差は認められなかった。本研究での検討結果から、ラット SOD2 遺伝子をノックダウンするアデノウイルス (AdSOD2-shRNA) を構築し、また、AdCYP3A4 と AdSOD2-shRNA を BRL3A 細胞に同時感染させた実験系において CYP3A4 により代謝的活性化を受け、酸化ストレスを引き起こす薬物の細胞障害性の検討がこの実験系を用いることで簡便に行えることが示された。

(3) CYP3A4 による代謝的活性化に関する薬物誘導性肝障害試験系構築の研究、

平成 13 年 7 月に厚生労働省医薬局から代表的なベンゾジアゼピン系薬物であるフルニトラゼパムの肝機能障害について注意を喚起する医薬品・医療用具等安全性情報 (168 号) が出された。我が国では数多くのベンゾジアゼピン系薬物が承認されており臨床で使用されている。そこで 13 種のベンゾジアゼピン系薬物に関して、CYP3A4 による薬物の代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。検討した被験薬には代謝物も含まれている。代表薬であるジアゼパムの主代謝経路は 1 位の脱メチル化と 3 位の水酸化である。従ってデスメチルジアゼパム、テマゼパムおよびオキサゼパムはジアゼパムの代

謝物である。同様にフルラゼパムの代謝物はノルフルジアゼパムであり、ニメタゼパムの代謝物はニトラゼパムであると考えられる。結果として、フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムにおいてCYP3A4の存在下でHepG2細胞に対する細胞障害が増強した。他のベンゾジアゼピン系薬物は上述の3種ほど顕著な変動は認められなかった。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムは7位にニトロ基を有するニトロベンゾジアゼピンである。同じくニトロベンゾジアゼピンであるクロナゼパムは臨床で抗てんかん薬として使用されている薬物である。溶解度の問題から400 μ Mまで検討できなかったが、100 μ MにおいてはCYP3A4により細胞生存率がコントロールと比較してATP測定法で57%、MTT測定法で35%減少した。検討した他のベンゾジアゼピン系薬物はニトロ基を有していなかったため、7位のニトロ基の存在が、ベンゾジアゼピン系薬物のCYP3A4による代謝的活性化に重要な役割を果たしていると考えられる。置換基が及ぼす細胞障害への影響について以下に述べる。ここで使用した被験薬の7位はニトロ基以外にハロゲンが導入されている。7位以外は同じ構造であるジアゼパムとニメタゼパムあるいはデスメチルジアゼパムとニトラゼパムを比較すると、コントロールミクロソーム存在下では7位に塩素を有する構造が

特に高濃度において細胞障害が増強した。しかし、CYP3A4存在下では低濃度においてニトロ基を有する薬物の細胞生存率が減少した。7位の置換基はCYP3A4による代謝的活性化だけでなく、親化合物の細胞障害性にも影響を与えていると考えられる。

ニトロベンゾジアゼピンについてさらに複数のCYP分子種による代謝的活性化の有無について検討した。ヒトにおいてフルニトラゼパムの代謝物は血中で1-脱メチル体、尿中で3-水酸化体および7-アミノ体が検出されており、1-脱メチル化反応は主にCYP2C9およびCYP2C19、3-水酸化反応はCYP3A4によって触媒されるまた、HepG2細胞においてフルニトラゼパムの7-アミノ化にNPRが関与しているとの報告がある。ニメタゼパムはマウス、ラット、イヌにおいて1-脱メチル化体、3-水酸化体、7-アミノ化体が、ヒトにおいて1-脱メチル化体、3-水酸化体に代謝される(エリミンインタビューフォーム)。ニトラゼパムのヒトにおける代謝物は7-アミノ体および7-アセトアミド体が主で、他に2-アミノ-5-ニトロベンゾフェノンおよび3-水酸化体が認められている(ネルボンインタビューフォーム)。従ってフルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムは類似した代謝を受けると考えられる。ニトロベンゾジアゼピンの代謝に関与するCYP2C9およびCYP2C19は代謝的

活性化に関与しないことから、ニトロベンゾジアゼピン系薬物の代謝的活性化はCYP3A4 特異的であることが示唆された。本研究では、CYP3A4 によりニトロベンゾジアゼピンが代謝的活性化を受けることを明らかにした。フルニトラゼパムによる肝障害についてのメカニズムは未だ明らかにされていないが、CYP3A4 による代謝的活性化が一因であることが示された。

(4) 肝障害化合物投与によるマイクロRNA の発現変動とその役割の検討、肝におけるmiRNA として、miR-122a が最も多く存在しており、様々な検討がなされているものの、薬物誘導性肝障害との関与はこれまでに報告されておらず、miRNA による肝毒性への関与についての研究は進んでいないのが現状である。本研究では、miRNA においても応用されているマイクロアレイ技術を用いて、チオアセタミド (TA) 処置後の網羅的なmiRNA 発現変動の解析を行った。今回用いたラットにおける過去の報告はないために完全な比較を行うことは難しいが、確認できた一部のmiRNA については発現パターンが似通っているものも、そうでないものも存在していた。実験条件として、TA 投与直後よりかなり早い段階における変動について検討を行った。miRNA による転写調節は、転写された primary miRNA から mature miRNA になるとすぐにその作用

を發揮すると考えられるためである。今回変動が認められたmiRNA は増加が10種、減少が14種であったが、ラットにおいて同一クラスターに属するものは存在しなかった。また、これら24種のmiRNAのうち、すでに論文として報告されているものは一部であった。本研究ではmiR-21に興味を持ち、詳細な検討を行った。PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrezdb=PubMed>)のウェブサイトによると、2007年12月21日現在、miR-21で検索を行うと37報の報告が表示されるが、そのうちの27報までが2007年出版の雑誌に掲載されている。このことからmiR-21の検討が現在盛んに行われていることがわかる。このmiR-21について、5種類の化合物においてその発現変動パターンを検討した。その結果、肝障害の発症時間に相関し、毒性発症が早いAPAPおよび四塩化炭素において投与後1時間において発現の増加が認められ、逆にそれ以外の比較的毒性発現が遅い化合物のBB, DMN, TAにおいては早い段階での抑制が認められた。次に、miR-21の抑制状態における細胞障害性の影響について検討を行った。しかし、本研究における検討に用いたHeLa細胞において、TA処置による細胞毒性を引き起こすことができなかった。肝由来ではない上に、薬物代謝能が低下している培養系において毒性を引き起こすために必要なTAの濃度が非常に高

くなってしまう、生存率の測定系にも影響が出たためである。それに加えて、miR-21 の標的蛋白質を複数の予測サイトによる検討の結果、PPAR- α を本検討における標的蛋白質として設定した。そこで、PPAR- α のアゴニストとして知られるフィブラート系薬剤との併用で、横紋筋融解症を引き起こすことが知られるスタチン系薬剤について検討した。脂溶性のシンバスタチン、ロバスタチンと、対照薬として水溶性のプラバスタチン、フルバスタチンについて検討を行ったところ、脂溶性スタチンにおいてのみ濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。しかしながら、標的蛋白質の発現を検出することができず、As0 による蛋白質への影響を検討することはできなかった。前述の通り、miR-21 は現在急速に研究が進められている miRNA であるが、薬物誘導性細胞障害との関係を明らかにした報告は初めてである。一方、予備検討においてシンバスタチン処置前に miR-21 precursor 導入について検討したが、細胞障害性への影響は認められなかった。影響しなかった理由として、HeLa 細胞には他の細胞株と比較して miR-21 が少ないとしても、正常組織より過剰な miR-21 が発現していたため影響を見ることができなかったと考えられる。As0 を導入した群において SCR と比較して 50% 程度の細胞生存率の減少が見られた。以上の結果から、見出され

た miR-21 の誘導は、薬物誘導性細胞障害に対して保護的な作用を示すことが示唆された。しかしながら、細胞障害に対する保護作用を示したと考えられる、HeLa 細胞における miR-21 の具体的な標的となる遺伝子を見出すには至らなかった。今後の検討課題として、*in vivo* における As0 の導入もしくは安定発現系を用い、生体内における miR-21 の抑制による薬物誘導性肝障害への影響の検討が考えられる。

(5) マイクロ RNA によるヒト PXR の発現制御と CYP3A4 の個人差に関する検討。PXR は薬物代謝や薬の排泄に関わる 40 以上の蛋白質の発現の制御に関わっている。PXR の制御機構の研究は、薬物の pharmacokinetics の個人内および個人間変動の理解には重要な情報になると考えられる。多くの報告がヒト肝試料における PXR mRNA の変動について報告しているが、そのタンパク質レベルでの発現量との相関については明らかにしていない。この研究で最初に我々は、PXR の mRNA とタンパク質の発現量が相関しないことを見出した。このことは、マイクロ RNA の関与の可能性を示唆するものである。ルシフェラーゼアッセイにより内因性および外因性の miR-148a を発現させることにより PXR の miR-148a 認識配列 (PXR MRE148) が機能していることを明らかにした。さらに内因性の PXR タンパク

質はmiR-148aを過剰発現させることにより消失し、阻害することにより誘導されることを示した。これにより、ヒト PXR は転写後調節を受けていることが明らかになった。さらに、LS180 細胞を用いて、CYP3A4 の誘導が miR-148a に依存した PXR の変動によって制御されていることを見出した。興味あることに miR-148a が認識すると考えられる配列が CYP3A4 mRNA の下流に存在する。結合エネルギー計算では CYP3A4 が PXR よりも優位と思われた。しかし、この配列は全く機能していないことをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。よって、CYP3A4 は miR-148a によって直接制御される可能性は無いと考えられた。ヒト肝パネルで miR-148a は PXR 蛋白質の発現量と反比例していた。このことは miR-148a が PXR に機能していることを示唆していた。一方、CYP3A4 は mRNA レベルと蛋白質レベルの発現量は相関していたことは、過去の多くの報告を支持するものであった。ヒト肝において、PXR 蛋白質量は CYP3A4 mRNA 発現量と相関していたことは、miR-148a が PXR を介して CYP3A4 の発現に影響をしていることを示す。一方、ヒト MDR1 および CYP2B6 の発現に miR-148a は影響をしていなかった。さらに CYP3A4 mRNA は HNF4 α や CAR の蛋白質発現量とも相関していなかった。ヒトと齧歯類を比較すると、PXR の ligand-binding domain はかなり保存さ

れているために、種差の大きな影響はないと予想される。さらに、ほとんどのマイクロ RNA は進化論的にもかなり保存されていることも知られており、種差の影響が少ないと予想される。実際 miR-148a の結合配列は、ヒトとラットで1塩基の差である。よって、ラット PXR も miR-148a で制御されることが予想される。本研究において、ヒト PXR は miR-148a によって転写後調節を受け、ヒト肝における CYP3A4 の発現量に影響を及ぼしている。この発見は、ヒト CYP3A4 の大きな個人差の説明の糸口になると考えられる。

E. 結論

(1) γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによるグルタチオン減少モデルラットを用いた薬物誘導性肝障害試験系の評価

本年までに特許を申請し、Journal of Biological Chemistry に論文報告した。さらにアセトアミノフェンに加えて2種類の薬について評価を終了した。このラット in vivo モデルについては、製薬メーカーの関心が高く、20年4月から1社で評価研究をスタートしているところである。今後、データを評価しつつ対象とする製薬会社を増やしていき、大きな規模で評価研究を行う予定をしている。我が国の創薬研究に資する試験系に育つようにしていれば幸いと考えている。し

かし、アデノウイルスが多量に必要であることが速やかな研究の進展に障害となっているが、解決は難しいのが現状である。また、組み換え遺伝子の規制を遵守する必要あるため、大学外での実験可能な施設に限られることもデメリットの一つである。

(2) スーパーオキシドデスムターゼ2ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築

この系はグルタチオンによる解毒系以外の主たる解毒系であるSOD2についての試験系を確立したものである。現在までに細胞を用いた系での検討が成功・終了しており、ダブソンなどでこれまでに検出できなかった明確な細胞毒性を検出することができた。In vitro のデータについて現在論文を作成中である。今後、in vivo ラットによる検討を急ぎ、上記のGSHの系と一緒に評価できる試験系として確立する予定である。In vivo ラットの系が確立したら、製薬会社での評価試験をお願いする予定である。一方、細胞レベルのみであっても、十分に評価に値するというので、20年4月から製薬会社1社で評価研究がスタートしようとしている。今後、SOD2が薬物誘導性の肝障害への関与についてのデータを集積していきたい。

(3) CYP3A4による代謝的活性化に関する薬物誘導性肝障害試験系構築の研究

CYP3A4がその代謝的活性化反応に関与

しないとこれまで考えられていた一連の薬についてその関与を明確にする目的で行った。予想通り3種類のベンゾジアゼピン系薬でのみ細胞毒性が明確になり、構造式との相関性も明確にすることができた。この内容について論文を作成中である。これまで我々が確証がそれほど無い状態で考えていたCYP3A4の関与が明確になったことで、今後の製薬会社における非臨床における試験系の組み立てにも影響を及ぼすものと考えている。

(4) 肝障害化合物投与によるマイクロRNAの発現変動とその役割の検討

マイクロRNAが生命現象の根幹にも関わっていることが明らかにされつつあるが、そのターゲット蛋白質の同定は極めて難しい。同じようなresponsible element配列を有していても機能に影響を及ぼすかの推定ができず、多くの候補蛋白質を絞りこめないことが大きな問題である。しかし、影響が出てもその寄与率を推定することは極めて難しい。今後広くマイクロRNAに関心が新しい研究手法により、in vivoでの寄与を定量的に考え得ることが必要である。今後さらなる検討を継続していきたい。

(5) マイクロRNAによるヒトPXRの発現制御とCYP3A4の個人差に関する検討

Mir-148aがヒトCYP3A4活性の個人差に大きく寄与していることを明らかにできた。これは大変大きな意味のある成果

であると考えている。。CYP3A4 はヒト肝でもっとも多く重要な分子種である。本研究内容は、現在 Journal of Biological Chemistry に印刷中である。本研究結果により、個人差の主因は明らかにできたが、定量的な予測が今後の課題である。すなわち、miR-148a の発現制御機構が不明であるため、miR-148a 量を予測する手段がないのが現状である。残念ながら現在まで、マイクロ RNA の発現量の決定因子は不明であるため、今後の研究が期待されている。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

国内原著論文 0 件

海外原著論文 6 件

海外総説原著 2 件

Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Koichi Tsuneyama, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Knock down of γ -glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 282: 23996-24003, 2007.

Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Haruko Sakai, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi.

CYP2A13 metabolizes the substrates of human CYP1A2, phenacetin, and theophylline. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 335-339, 2007.

Yusuke Hara, Miki Nakajima, Ken-ichi Miyamoto, and Tsuyoshi Yokoi.

Morphine glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are co-administered with morphine. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 22: 103-112, 2007.

Hirotohi Okumura, Miki Katoh, Keiichi Minami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Change of drug excretory pathway by CCl₄-induced liver dysfunction in rat. *Biochem. Pharmacol.*, 74: 488-495, 2007.

Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Miki Katoh, and Tsuyoshi.

Glucuronidation of thyroxine in human liver, jejunum, and kidney microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 1642-1648, 2007.

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya Mohri, and Tsuyoshi Yokoi. Post-transcriptional regulation of human

pregnane X receptor by microRNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.*, in press.

Miki Nakajima. Smoking behavior and related cancers: the role of *CYP2A6* polymorphisms. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 9: 538-544, 2007.

Rawiwan Maniratanachote, and Tsuyoshi Yokoi. A mechanistic view of troglitazone hepatotoxicity. S.C. Sahu Ed. *In Hepatotoxicity: From Genomics to in vitro and in vivo.* John Wiley & Sons, Ltd. pp299-311, 2007.

2. 学会発表

国内学会発表 8 件

国際学会発表 5 件

それ以外の発表 (招聘講演等)

6 件

赤井 翔、細見浩子、南 圭一、加藤美紀、中島美紀、横井 毅: γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築、日本薬学会第125年会 2007. 3. 28-30 富山

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

山中洋幸、藤原亮一、中島美紀、生城真一、榊 利之、横井 毅: ヒト UGT1A 分子種間の相互作用による酵素活性への影響、第10回 P450 研究会 2007. 7. 21-22 富山

高木信吾、中島美紀、茂利拓也、横井毅: ヒト PXR の microRNA による転写後調節、第5回ながの遺伝子発現調節研究会 2007. 11. 24-25 上諏訪

高木信伍、中島美紀、茂利拓也、加藤美紀、横井 毅: miR-148a によるヒト pregnane X receptor (PXR) の発現制御と CYP3A4 の発現に及ぼす影響、第17回アンチセンスシンポジウム 2007. 12. 3-4 金沢

森田麻友、赤井 翔、細見 浩子、加藤美紀、中島美紀、横井 毅; グルタチオン合成酵素ノックダウンラットを用いた薬物誘導性肝障害の検討 第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月26-28日 東京 (発表予定、抄録提出済)

吉川幸孝、細見浩子、加藤美紀、中島美

紀、横井 毅 ; SOD2 ノックダウンおよび CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性細胞障害試験系の構築 : 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008 年 6 月 26-28 日 東京 (発表予定、抄録提出済)

水野 克彦、加藤美紀、中島美紀、横井 毅 ; ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化 : 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008 年 6 月 26-28 日 東京 (発表予定、抄録提出済)

Tsuyoshi Yokoi, Shingo Takagi, Yuki Tsuchiya, Miki Katoh, Takao Taniya, and Miki Nakajima. Human CYP1B1 is regulated by microRNA, miR-27b. 15th International Conference on cytochrome P450, 2007. 6.17-21 Bled-Slovenia

Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Ryoichi Fujiwara, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. Thyroxine glucuronidation in human liver jejunum, and kidney microsomes were catalyzed by UGT1A1, 1A7, 1A8 and 1A10: effects of UGT-UGT interactions. 8th International ISSX meeting, 2007. 10.9-12 Sendai-Japan

Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi.

MicroRNA post-transcriptionally regulates human PXR affecting the expression level of CYP3A4. 8th International ISSX meeting, 2007. 10.9-12 Sendai-Japan

Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Haruko Sakai, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. CYP2A13 has high catalytic activity toward substrates of CYP1A2 and CYP2E1. 8th International ISSX meeting, 2007. 10.9-12 Sendai-Japan

Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA regulates CYP enzymes. Special Seminar for Biomedical Research Centre, University of Dundee 2007.9.12 Dundee-UK

Tsuyoshi Yokoi, Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Miki Katoh, and Miki Nakajima. Investigation of drug induced hepatotoxicity by knockdown of glutathione synthesis. 8th International ISSX Meeting, 2007.10.9-12 Sendai-Japan

横井 毅 : 薬物代謝と毒性発現-代謝物の安全性も含めて-, 日本薬学会関東支部第 21 回シンポジウム 2007. 11. 10 東京

横井 毅 : 薬物相互作用と薬物動態関連遺伝子の多型、福井大学医学部特別講義

2007. 6. 2 福井

横井 毅：医薬品の代謝物の安全性評価、
第34回日本トキシコロジー学会学術年会
2007. 6. 27-29 東京 ワークショップ

横井 毅：代謝物の安全性情報と副作用、

第24回日本TDM学会学術大会

2007. 7. 28-29 金沢 シンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況
本年度該当なし。