

今回、AdGCSh を 1.5×10^{11} PFU/body で投与しても、2 週間後において同程度の GSH 含量の減少が認められた (data not shown)。

ジクロフェナクによる肝障害を検討したラットにおいても、GSH 含量が減少していたかを確認するため、急性の肝障害を検討する単回投与では投与 24 時間後、亜急性の肝障害を検討する連続投与では最終投与から 6 時間後に肝臓を採取し、GSH 含量を測定した (Fig. 7.)。

その結果、単回および連続投与における検討で、AdGCSh-shRNA を投与した群では、AdLuc-shRNA あるいは PBS を投与した群と比較して、有意に肝臓中 GSH 含量が減少していたことを確認した。

C-6 フルタミド投与ラットにおける肝臓中総 GSH 含量減少の確認

フルタミドによる肝障害を検討したラットにおいても、GSH 含量が減少していたかを確認するため、急性の肝障害を検討する単回投与では投与 24 時間後、亜急性の肝障害を検討する連続投与では最終投与から 24 時間後に肝臓を採取し、GSH 含量を測定した (Fig. 8)。

その結果、単回および頻回投与における検討で、AdGCSh-shRNA を投与した群では、PBS を投与した群と比較して、有意に肝臓中 GSH 含量が減少していたことを確認した。また、単回投与群においてフルタミドを投与することにより GSH 含量の増加が認められた。

D. 考察

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 (Fig. 1)。

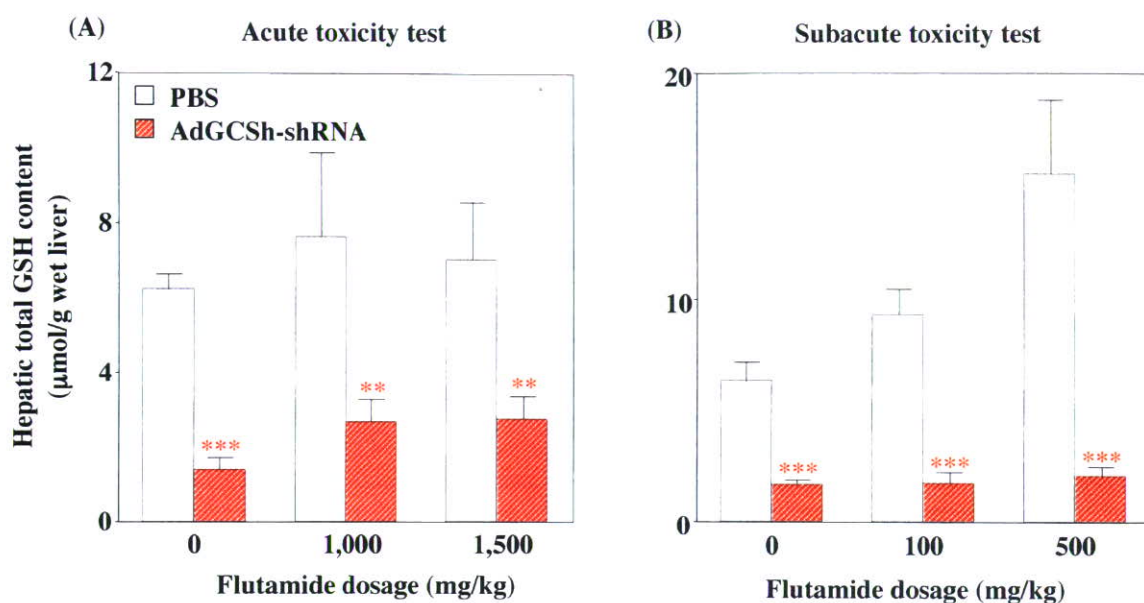


Fig. 8. Effect of AdGCSH-shRNA infection on hepatic total GSH content in flutamide administered rat in acute or subacute toxicity test. Hepatic total GSH content is measured 24 hrs after administration in acute toxicity test (A) and 24 hrs after last administration in subacute toxicity test (B). Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). ** P < 0.01 and *** P < 0.001 compared with each PBS treated group.

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 (Fig. 1A)。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っ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 (Fig. 2)。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。一方、Akai らの報告によると、GSH 減少モデルラットでは CYP2C11 タンパク質の発現量が減少しており、APAP を投与した際の、血中 APAP の抱合体代謝物は、グルクロン酸抱合体が増加し、硫酸抱合体が減少している。この報告の中で筆者らは、APAP のグルクロン酸抱合体は multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) の基質であり (Xiong et al., 2000)、MRP2 の発現量は GSH 濃度に依存するという報告がある (Sekine et al., 2006) とし、GSH 減少による MRP2 発現量の低下で APAP のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄が減少し、血清中のグルクロン酸抱合体が増加したと考察している。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 (Figs. 3 and 4)。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 (Fig. 5)。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。肝臓の病態としては大きく分けて肝細胞障害と胆汁うっ滞の二つが挙げられる。AST および ALT 値は主に肝細胞障害のマーカーとして、総ビリルビン値は主に胆汁うっ滞のマーカーとして用いられて

いる (赤木ら, 2006)。今回、AST および ALT 値の上昇に加えて総ビリルビン値の上昇も認められたことから、フルタミドによる肝障害は胆汁うっ滞も寄与していると考えられる。単回および頻回投与の検討の結果から、GSH 減少モデルラットはフルタミドによる急性および亜急性の肝障害を高感度に検出できることを示した。フルタミドもジクロフェナクと同様に、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。

一方、フルタミドの投与によって、グルタチオン減少モデルラットおよび PBS 投与ラットで肝臓中総 GSH 含量の増加が認められた (Fig. 8)。今回、AdGCSH-shRNA 投与によってノックダウンした GSH 合成酵素である γ -GCS は、様々な環境因子、酸化物、抗酸化物および炎症による刺激に応

答する、プロモーター領域の activator protein-1 (AP-1) responsive element および antioxidant response element (ARE) などの転写因子認識配列によって制御されていることが示されてきている (Jaiswal, 1994; Pinkus, 1996)。AP-1 は主に、Jun および Fos と呼ばれる癌原遺伝子から発現したタンパク質の二量体から構成されている。しかし Jun は、塩基性-ロイシンジッパー (b-zip) 構造を持つ転写因子である nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor-1 (Nrf1)、Nrf2 および Maf とも二量体を形成すると報告されている (Motohashi and Yamamoto, 2004)。しかし、転写制御におけるこれら二量体の生物学的な重要性は明らかになっていない。Nrf は ARE に結合することが知られているが、ARE は NF-E2 結合配列として知られる Maf recognition element (MARE) と非常に似た配列を示している。また、Nrf2 が求電子剤やフェノール系抗酸化剤による、ARE を介した γ -GCS 遺伝子の誘導に不可欠であることが報告されている (Hayes and McLellan, 1999)。さらに、Nrf が酸化ストレスになどによって ARE に結合することが報告されている (Dhakshinamoorthy et al.,

2000)。ARE は Nrf2 のリン酸化を引き起こす protein kinase C (PKC) や mitogen-activated protein kinase (MAPK) によって制御されることが示されてきている (Huang et al., 2000; Yu et al., 2000)。フルタミドによって、Nrf2 のリン酸化を引き起こす PKC や MAPK の一つである extracellular signal-regulated kinase (ERK) の発現が、それぞれラットの前立腺、ヒト前立腺癌細胞で増加したという報告がある (Montalvo et al., 2002; Zhu et al., 1999)。今回フルタミドを投与することによって、フルタミドが活性代謝物となり酸化ストレスが増大すること、PKC あるいは ERK、またはその両方の発現が増加し、Nrf2 がリン酸化されることによって ARE を介した γ -GCS の誘導が引き起こされ、GSH 含量が増加した可能性も考えられる。

アデノウイルスおよびフルタミド投与によりラット肝重量が増加する傾向が認められた (data not shown)。グルタチオン減少モデルラットにフルタミドを単回投与すると、微小脂肪滴が認められたため、フルタミドの検討においては、肝重量増加の原因の一つとして脂肪沈着が考えられる。一方、アデノウイルス投与のみでは微小脂

肪滴は認められないため、アデノウイルスによる肝重量の増加は、免疫系の活性化等により肝肥大が引き起こされたためかもしれない。しかし、アデノウイルスあるいはフルタミドのみの投与では、AST および ALT 値の上昇や肝組織像の変化は認められなかったため、肝障害性を検討する際には、考慮しなくても問題ないと考えられる。

本研究で使用した GSH 減少モデルラットでは、GSH 含量が最も低くなる AdGCSh-shRNA 投与後 2 週間から、投与後 4 週間までは同程度の GSH 含量を保てると報告されている (Akai et al., 2007)。そこで、亜急性の肝障害の検討では、GSH 含量が低く保たれている期間において検討を行うために、薬物の投与期間を AdGCSh-shRNA を投与後 10 日から 1 週間という短い期間に設定した。これは肝障害の発現を検討するためには、十分な期間であったと考えられる。一方、アデノ随伴ウイルスベクターは今回用いたアデノウイルスと比較して、*in vivo* において半年から 1 年程度と長期間目的遺伝子を発現できるとされており (Grimm et al., 2006)、ヒトにおける病原性は知られていない。アデノ随伴ウイルスを用

いれば、長期間安定した GSH 減少を持続させることができ、慢性毒性試験のような長期間の薬物投与ができる GSH 減少モデルラットの作製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ウイルスが必要であると報告されている (Russell and Kay, 1999)。よって、本研究で用いた GSH 減少モデルラットと同程度の GSH 含量の減少を引き起こすことは困難と考えられる。

マウスやラットは、飼育しやすいことや、個体同士で代謝が類似していることから、医薬品開発における研究に用いられることが多い。マウスはラットに比べて代謝速度が速く、血液や尿などのサンプルを大量にあるいは連続して回収することが困難であるという欠点がある。このため、ラットは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頻繁に用いられている (Gad et al, 2007; Johnson and Gad, 2007)。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。

E. 結論

グルタチオン(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、ヒトに比べて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、GSH 減少モデルラットを用いて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。しかし、ヒトにおいて毒性が認められる投与量と比べると薬物の投与量が過剰であ

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、あるいはヒトと比べてラットで高い代謝能を持つ酵素をさらにノックダウンさせるなどして、ヒトにおける毒性発現に近い実験系を確立する必要があると考えられる。種差に起因する代謝能の違いは、医薬品開発中止の主な原因の一つである薬物誘導性肝障害の予測を困難にしている。このため、ヒトにより近いモデル動物の作成が望まれている。今回、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する有用な手段となり得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。

F. 研究発表

1. 論文発表 論文作成中

2. 学会発表

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（発表予定、抄録提出済）

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

H. 参考文献

Akai S, Hosomi H, Minami K, Tsuneyama K, Katoh M, Nakajima M, and Yokoi T (2007) Knock down of γ -glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* 282: 23996-24003.

赤木 宏行、鈴木 和夫、安仁屋 洋子、吉田 武美、玄番 宗一、稲津 教久、成松 鎮雄、石田 隆、田中 慶一、越前 宏俊、山本 郁男、渡辺 和人、木方 正 (2006) 器官毒性、医薬品トキシコロジー 第 3 版 (佐藤 哲男、仮屋 公夫、北田 光一 編): pp 110-127. 南江堂、東京.

有吉 範高、重松 秀成、吉田 武美 (2000) 薬物代謝と毒性学、薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として 第 2 版 (加藤 隆一、鎌滝 哲也 編): pp 169-212. 東京化学同人、東京.

Cetin M, Demirci D, Unal A, Altinbaş M, Güven M, and Unlühizarci K (1999) Frequency of flutamide induced hepatotoxicity in patients with prostate carcinoma. *Hum Exp Toxicol* 18: 137-140.

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.

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.

Dhakshinamoorthy S, Long DJ II, and Jaiswal AK (2000) Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul* **36**: 201-216.

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

Gad SC, Frith CH, Goodman DG, and Boysen BG (2007) The mouse, in *Animal models in toxicology*, 2nd ed (Gad SC ed): pp 19-146. Applied Taylor & Francis, NW.

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

Grillo MP, Hua F, Knutson CG, Ware JA, and Li C (2003) Mechanistic studies on the bioactivation of diclofenac: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in vitro in incubations with rat and human hepatocytes. *Chem Res Toxicol* **16**: 1410-1417.

Gomez JL, Dupont A, Cusan L, Tremblay M, Tremblay M, and Labrie F (1992) Simultaneous liver and lung toxicity related to the nonsteroidal antiandrogen nilutamide (Anandron): a case report. *Am J Med* **92**: 563-566.

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.

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.

Hayes JD and McLellan LI (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* **31**: 273-300.

Huang HC, Nguyen T, and Pickett CB (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated

- phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12475-12480.
- Huang GS, Chang LS, Anderson ME, and Meister A (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**: 19675-19680.
- Jackson MA, Stack HF, Rice JM, and Waters MD (2000) A review of the genetic and related effects of 1,3-butadiene in rodents and humans. *Mutat Res* **463**: 181-213.
- Jaiswal AK (1994) Jun and Fos regulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene expression. *Pharmacogenetics* **4**: 1-10.
- Johnson MD and Gad SC (2007) The rat, in *Animal models in toxicology*, 2nd ed (Gad SC ed): pp 147-276. Applied Taylor & Francis, NW.
- Kang P, Dalvie D, Smith E, Zhou S, and Deese A (2007) Identification of a novel glutathione conjugate of flutamide in incubations with human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **35**: 1081-1088.
- Kola I and Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **3**: 711-715.
- Kretz-Rommel A and Boelsterli UA (1993) Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **120**: 155-161.
- 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.
- Lee WM (2003) Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis* **23**: 217-226.
- Lu SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* **13**: 1169-1183.
- 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.
- Montalvo L, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, and Carmena MJ. (2002) Regulation of the expression of protein kinase C isoenzymes in rat ventral prostate: effects of age, castration and flutamide treatment. *Life Sci* **71**: 2257-2266.
- Motohashi H and Yamamoto M (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10**: 549-557.
- Nakagawa Y, Koyama M, and Matsumoto M (1999) Flutamide-induced hepatic disorder

- and serum concentrations of flutamide and its metabolites in patients with prostate cancer. *Hinyokika Kiyo* **45**: 821-826.
- 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.
- Orlowski M and Meister A (1971) Isolation of highly purified γ -glutamylcysteine synthetase from rat kidney. *Biochemistry* **10**: 372-380.
- Osculati A and Castiglioni C (2006) Fatal liver complications with flutamide. *Lancet* **155**: 209-212.
- Peng Z (2005) Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* **16**: 1016-1027.
- Pinkus R, Weiner LM, and Daniel V (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* **271**: 13422-13429.
- Poon GK, Chen Q, Teffera Y, Ngui JS, Griffin PR, Braun MP, Doss GA, Freedden C, Stearns RA, Evans DC, Baillie TA, and Tang W (2001) Bioactivation of diclofenac via benzoquinone imine intermediates-identification of urinary mercapturic acid derivatives in rats and humans. *Drug Metab Dispos* **29**: 1608-1613.
- Purcell P, Henry D, and Melville G (1991) Diclofenac hepatitis. *Gastroenterology* **32**: 1381-1385
- Reed DJ (1986) Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* **35**: 7-13.
- Russell DW and Kay MA (1999) Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* **94**: 864-874.
- Sekine S, Ito K, and Horie T (2006) Oxidative stress and Mrp2 internalization. *Free Radic Biol Med* **40**: 2166-2174.
- Sima N, Wang W, Kong D, Deng D, Xu Q, Zhou J, Xu G, Meng L, Lu Y, Wang S, and Ma D (2007) RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis*, in press.
- Sims P and Grover PL (1965) Conjugations with glutathione. The enzymic conjugation of some chlorocyclohexene. *Biochem J* **95**: 156-160.
- Soglia JR, Contillo LG, Kalgutkar AS, Zhao S, Hop CE, Boyd JG, and Cole MJ (2006) A semiquantitative method for the determination of reactive metabolite conjugate levels in vitro utilizing liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry and novel quaternary ammonium glutathione analogues. *Chem Res Toxicol* **19**: 480-490.
- Tang W, Stearns RA, Bandiera SM, Zhang Y, Raab C, Braun MP, Dean DC, Pang J, Leung KH, Doss GA, Strauss JR, Kwei GY, Rushmore TH, Chiu SH, and Baillie TA (1999) Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab Dispos* **27**: 365-372.
- Temple R (2001) Hepatotoxicity Through the Years: Impact on the FDA, Presented 12 February 2001. www.fda.gov/cder/livertox/Presentations/im1389/sld001.htm.
- Tevell A, Lennernäs H, Jönsson M, Norlin M, Lennernäs B, Bondesson U, and Hedeland M (2006) Flutamide metabolism in four different species in vitro and identification of flutamide metabolites in human patient urine by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **34**: 984-992.
- 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.
- Walker AM (1997) Quantitative studies of the risk of serious hepatic injury in persons using nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* **40**: 201-208.
- Wysowski DK and Fourcroy JL (1996) Flutamide hepatotoxicity. *J Urol* **155**: 209-212.
- Xiong H, Turner KC, Ward ES, Jansen PL, and Brouwer KL (2000) Altered hepatobiliary disposition of acetaminophen glucuronide in isolated perfused livers from multidrug resistance-associated protein 2-deficient TR(-) rats. *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 512-518.
- 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.
- Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, and Kong AN (2000) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem* **275**: 39907-39913.
- Zhu X, Li H, Liu JP, and Funder JW (1999) Androgen stimulates mitogen-activated protein kinase in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **152**: 199-206.

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

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

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

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。

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、種々の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。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。細胞実験系は動物モデルを用いる場合に比べて試験期間が短く、使用薬物量が少量で済むといった利点が挙げられるため、簡便なスクリーニングの手段となることが考えられる。酸化ストレスによる薬物誘導性肝障害は従来のモデル動物で評価することは困難であり、酸化ストレスに高感受性のモデル動物を用いることが必要であると考えられる。今後、SOD2減少ラットを用いて、APAP以外の薬物による肝毒性への影響を検討する必要があると考えられる。本研究においてSOD2減少細胞実験系およびSOD2減少モデルラットを構築した。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。

A. 研究目的

薬物誘導性肝障害は今日の医薬品開発および臨床における主要な問題の一つである。新薬開発において、この予期せぬ副作用により、新規化合物の開発の中止や、既に市場に出た多くの薬がドロップアウトしている。しかし、この副作用の発現機構等は明らかになっていないことが多く、個々人の遺伝的要因や後天的な要因など、さまざまな原因が考えられるが、未だ解決されていない (Bo elsterli and Lim., 2006)。

ミトコンドリアは多くの薬物の毒性に関与していることが報告されて

いる(O ng et al., 2005 ; Volkmann et al., 2007 ; Haouzi et al., 2000)。肝細胞において、ミトコンドリアはアポトーシスに必須のメディエーターであり、薬物誘導性のストレスを含むさまざまなストレスは、ミトコンドリアにおけるアポトーシスを促進することが言われており、これらはシトクロム c や Smac/diablo などを介して起こることが報告されている (Liu et al., 1996 ; Chai et al., 2000)。また、ミトコンドリアはスーパーオキシドラジカルの主な産生部位であり、これはマトリックスおよび膜間腔において放出される。スーパーオキシドは過酸化水素など

の活性酸素種を産生する。このスーパーオキシドは多くの薬物の暴露により細胞中で増加し、酸化ストレスを引き起こすことが知られている。

ミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの解毒を、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2) が担っている。SOD2 遺伝子のホモのノックアウトマウスはニューロンの未分化などの原因により生後まもなく死亡してしまう (Lebovitz et al., 1996) が、ヘテロのノックアウトマウスは正常であり、寿命の短縮や臨床的な異常も認められず、野生型のマウスに比べ、約 50% の肝 SOD2 活性の減少が認められている (Van Remmen et al., 1999)。また、このヘテロノックアウトマウスを用いて、薬物誘導性肝障害を引き起こす薬物の典型例として挙げられるトログリタゾンの肝障害が初めて報告された (Ong et al., 2006)。ミトコンドリア異常を示す動物モデルとして SOD2 減少モデルは有用であると考えられる。一方で、前臨床動物試験における安全性試験において用いられるのは、専らラットであるが、ミトコンドリア異常モデルとなりうる SOD2 減少ラットの構築

に関する検討は現在までに報告されていない。

現在、ある特定の遺伝子がどのような生態の機能に影響を及ぼすかを検討する方法として、RNAi による標的遺伝子のノックダウンが簡便な方法として利用されている。RNAi は二本鎖 RNA が生体内に取り込まれた後、RNase III ファミリーに属する Dicer という酵素によって 2 塩基のオーバーハングを持つ 20 塩基程度の siRNA に分割され (Elbashir et al., 2001a)、その siRNA が RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、相補的な配列を持つ RNA を分解するという現象である (Hammond et al., 2000)。初期には RNAi は線虫 (Fire et al., 1998) やショウジョウバエ (Pal-Bhadra et al., 1997) において報告されたが、哺乳類細胞には起こらないとされてきた。哺乳類細胞への 150 塩基以上の二本鎖 RNA を導入すると、長い二本鎖 RNA に応答して活性化される RNase L によって非特異的に RNA の分解が誘発されるため、この経路はウイルスの感染に対するインターフェロン応答の一部と考えられている (Stark et al., 1998)。

しかし、Tuschkeらの研究グループがあらかじめ 21 塩基の短い二本鎖 RNA として導入することで哺乳類細胞での RNAi を成功させた (Elbashir et al., 2001b)。それ以来哺乳類細胞に対する RNAi を用いた検討が盛んに行われるようになり、毒性学を含めた様々な分野に応用されはじめている。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法が *in vivo* での簡便な遺伝子導入法として注目されており、遺伝子治療の分野で様々な検討がなされている (Peng et al., 2005; Chu et al., 2004; Kruyt and Curiel., 2002)。本研究室において、生体内でグルタチオン合成律速酵素である γ -glutamylcystein synthetase (γ GCSH) の siRNA として作用するショートヘアピン RNA (shRNA) を発現する配列を組み込んだアデノウイルスをラットに投与し、標的遺伝子をノックダウンすることによることに成功し、グルタチオン減少ラットを構築した (Akai et al., 2007)。また、アデノウイルスベクターは一過性ではあるが、目的遺伝子を高発現させることができ、HIV ウイルスをベースとしたレンチウイルスベクターに

比べ、実験を行う際の安全性の点でも有利である。

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。第 I 章において、*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。第 II 章では、SOD2 減少ラットを作製し、肝毒性を引き起こす典型的な化合物である APAP の肝毒性への影響を検討した。

B. 研究方法

B-1. 実験材料および試薬

ラット肝癌由来 BRL 3A 細胞、H4IIE 細胞、ヒト肝癌由来 HLE 細胞およびヒト胎児腎由来 293 細胞は、大日本製薬 (Osaka, Japan) から購入した。マウス肝癌由来 Hepa1-6 細胞は金沢大学医学部第一内科より御供与頂いた。DMEM

培地および Ham's F12 培地は日水製薬 (Tokyo, Japan) より、 α -MEM 培地、ウシ胎児血清 (FBS)、T4 ligase、リポフェクタミン™2000 およびアガロースはインビトロジェン (Melbourne, Australia) より、10 × PCR 緩衝液、dNTP、Taq DNA ポリメラーゼはグライナージャパン (Tokyo, Japan) より、DH5 α コンピテントセル、T4 polynucleotide kinase および ReverTra Ace は東洋紡 (Osaka, Japan) より、バクトトリプトンとバクトイーストエクストラクトは Difco (Detroit, MI) より、Cell matrix TypeI-C は新田ゼラチン (Osaka, Japan) より、制限酵素は New England Biolabs (Beverly, MA)、宝酒造 (Kyoto, Japan) より、Plasmid Midi Kit はキアゲン (Tokyo, Japan) より購入した。シークエンス反応にはベリタス (Tokyo, Japan) の Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit と Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いた。GeneSilencer shRNA Vector Kits は Gene Therapy Systems (CA, USA) より、アデノウイルス液の調製に用いた Adenovirus Expression Vector Kit (Dual

version) および Adenovirus genome DNA-TPC はタカラバイオ (Osaka, Japan) より、ウイルス力価測定に用いた QuickTiter™ Adenovirus Titer Immuno-assay Kit はコスモバイオ (Tokyo, Japan) より、抗ウサギ SOD2 抗体は Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) より、ビオチン化抗ウサギ IgG、ペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体は Vector (Burlingame, CA) より、PVDF 膜 (Immobilon-P) は Millipore (Bedford, MA) より、Bovine serum albumin (BSA)、ダブソン、イソニアジド、ニメスリド、アルベンダゾール、ジクロロフルオレセインジアセテートは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、Cell Counting Kit-8 は同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) より、Bio-Rad Protein Assay kit は Bio-Rad (Hercules, CA) より、SYBR®Premix Ex Taq™、RNA iso、TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version とランダムヘキサマーは宝酒造より購入した。プライマーは北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。トログリタゾンは第一三共 (Tokyo, Japan) より御供与頂いた。APAP、フルタミド、

カルバマゼピン、スルファメトキサゾール、ニフェジピン、ダントロレン、ジドブジン、ジヒドロエチジウムは和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。電気泳動は BIO CRAFT (Tokyo, Japan) の BE-560 型泳動槽と PA-055 型泳動槽を用いた。Superoxide dismutase assay kit はフナコシより購入した。6 cm プレート、10 cm プレート、75 cm² フラスコ、12 ウェルプレート、24 ウェルプレート、96 ウェルプレートは Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ) より、6 ウェルプレートは Nunclon Δ TM Surface (Denmark) より購入した。セルスクレイパーはイワキ (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または生化学用のものを用いた。

B-2. AdSOD2-shRNA の構築

Adenovirus Expression Vector Kit (Dual version) を用い、添付のプロトコールを参考に以下の方法で AdSOD2-shRNA を作製した。

B-2-1. SOD2-shRNA の pAxcwit ベク

ターへの組み換え

ラット SOD2 mRNA に対する shRNA を発現するウイルスベクターを得るには、hU6 プロモーターのような RNA ポリメラーゼ III プロモーター下流に shRNA を組み込んだ発現プラスミドが必要である。そこで、hU6 プロモーターを有する GeneSilencer shRNA Vector Kits の pGSU6-GFP ベクターに shRNA 配列を組み込んだ。最初に、SOD2 遺伝子当該配列の 2 本鎖オリゴ DNA を調製するため、Top strand および Bottom strand を最終濃度 35 μ M となるように 1 \times アニーリングバッファー中に添加し 95 $^{\circ}$ C、5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25 $^{\circ}$ C まで徐冷した。ラット SOD2 遺伝子 (Accession NM_017051) に対する shRNA 配列となるオリゴ DNA の配列は、

配列 A

Top strand:

5'-gatccCAAGGGAGATGTTACA
ACTgaagcttgAGTTGTAACATCTCCCTT
Gtttttgaagc-3'

Bottom strand:

5'-ggcccgttccaaaaaCAAGGGAGATGT

TACAACtcaagcttcAGTTGTAACATCT
CCCTTGg-3'

配列 B

Top strand:

5'-gatccCCACATATGTGTAAGCATAg
aagcttgTATGCTTACACATATGTGGtttt
ttggaagc-3'

Bottom strand:

5'-ggccgcttccaaaaaaCCACATATGTGT
AAGCATAcaagcttcTATGCTTACACA
TATGTGGg-3'

であり、配列 A は論文を参考に選出したものであり、配列 B は B-Bridge 社 (USA, California) に依頼して選出した配列中の 1 つを使用した。上記配列のうち、アルファベット大文字の配列は SOD2 に相補的な部分の配列であり、小文字の配列はそれ以外の部分を示している。GSU6-GFP を *BamH* I および *Not* I で消化し、アガロースゲルで電気泳動を行い、目的の DNA 断片が含まれる部分を切り出した。これをあらかじめ 2% (w/v) 炭酸水素ナトリウムおよび 1 mM EDTA (pH 8.0) を含む

水溶液中で煮沸処理を行った透析膜に入れ、0.5 × TBE 400 μL を加えた後、電気泳動をして DNA 溶液を回収した。DNA の精製は以下の方法に従った。フェノール・クロロホルム溶液 400 μL を加えて 5 分間ボルテックスし、7,000 rpm (3,000 g) で 5 分間遠心分離して上清を回収した。次に 400 μL のクロロホルム溶液を加え 5 分間ボルテックスし、7,000 rpm (3,000 g) で 5 分間遠心分離した。上清に 3 M 酢酸ナトリウムを 40 μL と 100% エタノールを 1 mL 加え、-80°C で冷却後、15,000 rpm (12,000 g)、4°C で遠心分離し、沈殿を 70 % エタノール 1 mL で洗浄した。沈殿を乾燥後、TE 10 μL に溶解させ、DNA を精製した。2 本鎖オリゴ DNA を制限酵素処理した pGSU-GFP プラスミドに挿入することで目的のプラスミドを得た。回収したベクター 50 ng/μL を 10 μL、インサート 20 ng/μL を 2 μL、10 × T4 DNA ligase buffer を 2 μL、1 unit/μL T4 ligase を 1 μL、滅菌精製水を加えて全量を 20 μL とし、14°C、12 時間反応させた。この DNA 溶液を DH5α コンピテントセル 100 μL に添加して氷中で 30 分間インキュ

バージョンし、42°Cで90秒間ヒートショックして形質転換した。900 µLの2 × YT 培地を加えて37°C、1時間培養後、2 × YT-Amp 寒天培地に播種し、37°C、14時間培養した。これよりSOD2-shRNA 組換え pGSU-GFP プラスミドを得た。この組換えプラスミドをさらに *Hinc* II で消化し、同様の方法で hU6 プロモーターおよび shRNA 配列発現用 DNA 配列を含む部分 (インサート) を分離精製し、さらに pAxcwit を *Swa* I で制限酵素処理し精製した。回収した pAxcwit ベクター50 ng/µL の 10 µL に、インサート 20 ng/µL を 2 µL、10 × T4 DNA ligase buffer を 2 µL、1 unit/µL T4 ligase を 1 µL、滅菌精製水を加えて全量を 20 µL とし、上記と同様の方法で ligation および形質転換を行い、SOD2-shRNA の pAxcwit 組み換えベクターを得た。

B-2-2. コロニーPCR

寒天培地から単離したコロニーを 2 × YT-Amp 培地 3 mL 中で 37°C、8時間以上培養した。10 × PCR 緩衝液 2.5 µL、10 pmol/µL の Adeno-F プライマー (5'-GTA CCT CAG CAC CTT CCA

GAT -3')、Adeno-R プライマー (5'-AGG AAT CAT GGG AAA TAG GCC -3') をそれぞれ 1 µL、2.5 mM dNTPs 2.5 µL、25 mM MgCl₂ 1.5 µL、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2 µL (1.0 U)、滅菌精製水を加えて全量を 25 µL とした反応液を作成した中に上記の培養液をつついた滅菌爪楊枝を入れて混ぜた後、滅菌爪楊枝をとり (1) 94°C で 3分、(2) 94°C で 30秒、54°C で 30秒、72°C で 2分を 30サイクル、(3) 72°C で 5分の PCR 反応を行った。反応後、一部を分取し EtBr を含む 0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。目的の遺伝子断片が得られたもののみ、PCR 産物を適切な制限酵素で消化しアガロースゲルを用いて電気泳動を行うことにより目的の DNA 断片が挿入されていることを確認した。目的の DNA 断片が含まれている培養液を 50 µL 取り、60% (v/v) グリセロールを 50 µL 加え大腸菌のグリセロールストックとし、-80°C で保存した。

B-2-3. プラスミド DNA の大量調製

保存した大腸菌のグリセロールストックを滅菌爪楊枝でつつき、2 ×

YT-Amp 培地 25 mL で 20 時間培養した。培養液を 5,000 rpm (1,500 g)、15 分間遠心分離することにより集菌した。プラスミドの大量調製は Plasmid Midi Kit を用い、以下の方法により行った。大腸菌ペレットに Buffer P1 を 4 mL 加えて転倒攪拌し、Buffer P2 を 4 mL 加えて転倒攪拌し室温で 5 分間放置した。Buffer P3 を 4 mL 加えて転倒攪拌し氷上で 15 分間放置した。15,000 rpm (12,000 g)、15 分間遠心分離し、タンパクを除いた。上清をあらかじめ Buffer QBT 4 mL で平衡化してある QIAGEN-tip 100 に付着させ、Buffer QC 20 mL で洗浄した後、Buffer QF を 5 mL 加えて DNA を溶出させ、3.5 mL の 100 %イソプロパノールを加えて 15,000 rpm (12,000 g)、30 分間、4°C で遠心分離した。沈殿を 70 %エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させた後、TE 30 μ L 加えて溶解させた。プラスミドの定量には Nano Drop (Nano Drop Technologies : Wilmington, USA) を用いた。

B-2-4. シークエンス解析

Thermo Sequenase Cy5 Dye

Terminator Kit および Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて以下のように反応液を調製した。Cy5 では、プラスミドを 2 μ g、Reaction buffer を 3.5 μ L、Adeno-F プライマーを 2 pmol、Thermo Sequenase I DNA polymerase を 1 μ L、滅菌精製水を加えて全量を 27 μ L とし、先に分注しておいた各 dNTPs/Cy5-ddNTP 2 μ L に 6 μ L ずつ加え反応液とした。Cy5.5 では、プラスミドを 2 μ g、Reaction buffer を 3.5 μ L、プライマーを 2 pmol、Thermo Sequenase DNA polymerase を 2 μ L、滅菌精製水を加えて全量を 31.5 μ L とし、先に分注しておいた各 dNTPs/Cy5.5-ddNTP 1 μ L に 7 μ L ずつ加え反応液とした。サーマルサイクラー (Takara PCR Thermal CyclerSP; Osaka, Japan) を用いて、94°C で 2 分、94°C で 30 秒、52°C で 30 秒、72°C で 90 秒を 45 サイクルの反応を行った。反応終了後、各反応チューブに 7.5 M 酢酸アンモニウム 2 μ L、グリコーゲン溶液を 2 μ L、氷冷しておいた 100%エタノールを 30 μ L 加え、-30°C で 20 分間放置し、その後、15,000 rpm (12,000