

g)、4°Cにて30分間遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させた後、Formamide loading dyeを6 µL加えて溶解させ、Long-Read Tower DNA Sequencer (Tokyo, Japan)により解析した。これらの操作は蛍光強度の減弱を避けるため、アルミホイルで遮光しながら行った。この操作よりインサートが順方向に入っていることを確認した。

B-2-5. アデノウイルスベクターのトランスフェクション法

6 cm プレートに90%コンフルエントな293細胞を用意し、リポフェクタミン™2000 16 µLとDMEM 400 µLを穏やかに混合し5分間静置し、I-2-2-1で作製したプラスミド 10 µgとAdenovirus genome DNA-TPC 8 µLを加えて無血清培地で400 µLとした。また、両者を混合後、20分間静置した。無血清培地で2回洗浄した6 cmプレートのコンフルエントに増殖した293細胞に無血清培地 3.2 mLと混合した溶液を加え、振とうした。5時間インキュベートした後培地を交換し、さらに19時間インキュベートした。

B-2-6. 1次ウイルスの作製

インキュベートした293細胞を剥離し回収した。回収した細胞懸濁液の原液、10倍希釈液および100倍希釈液のそれぞれをコラーゲンコート(1 mM HClとその1/30量のCell Matrix TypeI-Cを混合した溶液を各ウェルに適量加えたあと、1時間放置し、1×PBSで2回洗浄した。)した96ウェルプレート3枚に播種した。細胞数が各プレートで大きく異ならないように10倍希釈、および100倍希釈液には10 cmシャーレで培養しておいた293細胞を以下の割合で混ぜて細胞数をそろえ、1ウェルあたり100 µL播種した。操作は以下の通りである。

トランスフェクションした6 cmシャーレの293細胞を11 mLの培地に懸濁し(A)、トランスフェクションしていない10 cmシャーレの293細胞は30 mLの培地に懸濁した(B)、100倍希釈プレートとして0.1 mLのAと11 mLのBを混合し、また10倍希釈プレートとして0.1 mLのAと11 mLのBを混合し、10 mLのAを原液プレートとした。5日後と10日後に各ウェルに

10% FBS-DMEM を 50 μ L 加えた。ウイルスが変性したウェルが7-15日の間に現れるので、全ての細胞が変性したウェルの培養液を 1.5 mL チューブに移し、ドライアイスで凍結し、-80°C で保存した。15 日で判定を終了し、最終的に細胞の変性が見られたウェルが 10 ウェル程度のプレートから、比較的遅く (8 日以降) 細胞が変性したウェルから回収した培養液のチューブを 10 個程度選んだ。選び出したチューブを、ドライアイスと 37°C 温浴で凍結融解を 6 回繰り返し、5,000 rpm (1,500 g)、5 分間、4°C で遠心分離した上清を 1 次ウイルス液として-80°C で保存した。

B-2-7. 2 次ウイルスの作製

Cell matrix でコラーゲンコートした 24 ウェルプレートに、90% コンフルエントに増殖した 293 細胞を用意し、ウェルごとに 1 次ウイルス液の各サンプル 10 μ L と、5% FBS-DMEM 100 μ L を加え、プレートを数回振とうさせた。このプレート振とう操作を 15 分間隔で 3 回行い、その間細胞は、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。1 時間の感染

後 5% FBS-DMEM 4 mL を加え、3 日後に完全に変性したクローンを選び出し、培養液ごとに細胞を回収し、B-2-6 と同様に凍結融解を 6 回繰り返し、5,000 rpm (1,500 g)、5 分間、4°C で遠心分離した上清を 2 次ウイルス液として-80°C で保存した。

B-2-8. 組み換えアデノウイルスの確認 (1)

B-2-7 で回収した 2 次ウイルスの細胞液を 5,000 rpm (1,500 g)、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を除き、細胞のみを-80°C で保存した。これを cell pack とする。Cell pack に 10 \times TNE を 40 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) を 4 μ L 加え、滅菌蒸留水で全量 400 μ L とした。ボルテックスミキサーで cell pack を十分に懸濁し、10% SDS を 4 μ L 加えさらに十分に懸濁する。50°C、1 時間インキュベートし、フェノール/クロロホルム抽出を 2 回行った後、クロロホルム抽出を 2 回行った。エタノール沈殿後、20 μ g/mL RNaseA を含む TE Buffer 50 μ L に溶解した。そのうち 15 μ L を用いて、*Cla* I 制限酵素処理し、1% 寒天培地を用いてアガロース電気泳動を

行い、制限酵素切断パターンを検討した。

B-2-9. 3次ウイルスの作製

Cell matrix でコラーゲンコートした6 ウェルプレートに、90%コンフルエントに増殖した293細胞を用意し、ウェルごとに2次ウイルス液の各サンプル15 μ L と、5% FBS-DMEM 500 μ L を加え、プレートを数回振とうさせた。このプレート振とう操作を15分間隔で3回行い、その間細胞は、5% CO₂ 存在下37°C でインキュベートした。1時間の感染後5% FBS-DMEM 4.5mL を加え、3日後に完全に変性したクローンを選び出した。培養液ごとに細胞を回収し、I-2-2-6と同様に凍結融解を6回繰り返す、3,000 rpm (700 g)、10分間、4°C で遠心分離した上清を3次ウイルス液として-80°C で保存した。

B-2-10. 4次ウイルスの作製

Cell matrix でコラーゲンコートした75 cm² フラスコに、90%コンフルエントに増殖した293細胞を用意し、3次ウイルス液の各サンプル50 μ L と、5% FBS-DMEM 2 mL を加え、プレートを

数回振とうさせた。このプレート振とう操作を15分間隔で3回行い、その間細胞は、5% CO₂ 存在下37°C でインキュベートした。1時間の感染後5% FBS-DMEM 13 mL を加え、3日後に培養液ごと細胞を回収し、B-2-6と同様に凍結融解を6回繰り返す、3,000 rpm (700 g)、10分間、4°C で遠心分離した上清を4次ウイルス液として-80°C で保存した。

B-2-11. 組み換えアデノウイルスの確認 (2)

24 ウェルプレートの293細胞の1ウェルあたり、5 μ L の4次ウイルスを感染させ、増殖したウイルスDNAの制限酵素切断パターンをI-2-2-8の方法で確認した。

B-3. 細胞培養

293細胞は10% FBS と Non Essential Amino Acid (NEAA) を含むDMEMを用いて10 cm シャーレで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後1 \times PBS 溶液4 mL をシャーレに加え、培地を5 mL 入れておいた50 mL のチューブにシャーレより剥離した細胞

を移し、4,000 rpm (1,000 g)、4°Cで5分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してシャーレに播種し、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。Hepal-6 細胞および HLE 細胞は 10% FBS を含む DMEM を用いて 10 cm シャーレで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後 1 × PBS 溶液 4 mL をシャーレに加え、培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のチューブにシャーレより剥離した細胞を移し、4,000 rpm (1,000 g)、4°Cで5分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してシャーレに播種し、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

BRL3A 細胞は 10% FBS を含む Ham's F12 を用いて 10 cm シャーレで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後 1 × PBS 溶液 4 mL をシャーレに加え、培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のチューブにシャーレより剥離した細胞を移し、4,000 rpm (1,000 g)、4°Cで5分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してシャーレに播種し、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

H4IIE 細胞は 10% FBS を含む

α-MEM を用いて 10 cm シャーレで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後トリプシン-EDTA 溶液 4 mL をシャーレに加え 37°C、2 分間インキュベートした。培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のチューブにシャーレより剥離した細胞を移し、4,000 rpm (1,000 g)、4°Cで5分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してシャーレに播種し、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

B-4. アデノウイルス液の調製

Cell matrix でコラーゲンコートした 75 cm² フラスコに、90%コンフルエントな 293 細胞を用意し、4 次ウイルス液 MOI 10 を 2 mL を加え、フラスコを数回、振とうさせた。この振とう操作を 15 分間隔で 3 回行い、その間細胞は、5% CO₂ 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後 5% FBS-DMEM 13 mL を加え、3 日後に培養液ごとに細胞を回収し、B-2-6 と同様に凍結融解を 6 回繰り返す、3,000 rpm (700 g)、10 分間、4°C で遠心分離した上清を *in vitro* 試験で用いるウイルス液として -80°C で保存した。

B-5. アデノウイルス液の力価測定

QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay Kit を用い、添付のプロトコールに従い以下の方法でアデノウイルス液の力価を測定した。B-2 の操作に従い回収した 293 細胞 2.5×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を、5% FBS を含む DMEM を用いて調製した。コーゲンコートした 24 ウェルプレートに 293 細胞懸濁液を各ウェル 1 mL ずつ加え、1 時間 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。作製したウイルス原液 10 μ L と 5% FBS を含む DMEM 990 μ L を混合し、 10^{-2} ウイルス液を作製した。さらに 10^{-2} ウイルス液 100 μ L と 5% FBS を含む DMEM 900 μ L を混合し、 10^{-3} ウイルス液を作製した。同様の操作をさらに 4 回繰り返して、 10^{-3} から 10^{-7} 倍のウイルス希釈液を作成し、24 well プレートの左端のウェルから 100 μ L ずつ加えた。一番右端のウェルはブランクとして、5% FBS を含む DMEM を 100 μ L 加えた。その後 48 時間 5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。48 時間後培養液を回収し、各ウェルに 0.5 mL ずつ冷メタノールを加え、20 分間、-20°C

に置き、細胞を固定させた。細胞を 2 回、1 \times PBS 250 μ L で 5 分間洗浄した。1% BSA in 1 \times PBS を各ウェル 250 μ L ずつ加え、1 時間室温で振とうした。1% BSA in 1 \times PBS を除き diluted 1 \times anti-Hexon antibody を各ウェルに 250 μ L ずつ加え、1 時間室温で振とうした。細胞を 2 回、1 \times PBS 250 μ L で 5 分間洗浄した。diluted 1 \times Secondary antibody solution を各ウェル 250 μ L ずつ加え、1 時間室温で振とうした。細胞を 3 回、1 \times PBS 250 μ L で 5 分間洗浄した。Diluted 1 \times DAB working solution を各ウェル 250 μ L ずつ加え、10 分間室温で振とうした。Diluted 1 \times DAB working solution を回収し、各ウェルを 1 \times PBS 250 μ L で細胞を 5 分間洗浄し、1 \times PBS 1 mL を加えた。接眼レンズ、対物レンズともに 10 倍に設定した顕微鏡で各ウェルを観察した。視野の中に約 20 個の茶色に染色された細胞が現れるウイルス希釈 (dilution factor) のウェルを選び出し、少なくとも 5 視野の染色された細胞数を計測し、その平均値を求めた (average positive cells/field)。ウイルス力価 (Viral Titer) は以下の式に基づ

き算出した。なお、接眼レンズ、対物レンズともに 10 倍に設定した顕微鏡で 24 ウェルプレートを観察した場合、視野面積は 1.8 mm^2 である。24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり面積は 2.0 cm^2 であるので、補正值 (Fields/well) および Viral Titer (ifu/mL) は下記の通りとなる。

$$(\text{Fields/well}) = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ cm}^2 \times 10^2 \text{ cm}^2 = 79$$

$$\text{Viral Titer (PFU/mL)} = (\text{average positive cells/field} \times (79 \text{ fields/well}) \times (\text{dilution factor}) / (0.1 \text{ mL}))$$

B-6. BRL3A 細胞への AdSOD2-shRNA 感染

B-3 の操作に従い回収した BRL3A 細胞の細胞懸濁液を調製し、細胞を $2 \times 10^5 \text{ cells/well}$ となるように 12 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、各ウェルあたり、ウイルス感染量 MOI 0、5、10、20、50、100 および 200 となるように調製した AdSOD2-shRNA ウイルス液 $200 \mu\text{L}$ を加え、プレートを数回ゆっくりと振と

うさせ、ウイルス液をすべての細胞に浸潤させた。この振とう操作を 15 分間隔で 3 回行い、その間細胞は、5% CO_2 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後、5% FBS-DMEM 1.8 mL を加え、72 時間後に細胞を回収し、SOD2 mRNA およびタンパク定量した。

B-7. 肝癌由来細胞への AdSOD2-shRNA 感染

B-3 の操作に従い回収した BRL3A、H4IIE、Hepa1-6 および HLE 細胞の細胞懸濁液を調製し、細胞を $6 \times 10^5 \text{ cells/well}$ となるように 12 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、各ウェルあたり、ウイルス感染量 MOI 100 となるように調製した AdSOD2-shRNA ウイルス液 $200 \mu\text{L}$ を加え、プレートを数回ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞に浸潤させた。この振とう操作を 15 分間隔で 3 回行い、その間細胞は、5% CO_2 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後、5% FBS-DMEM 1.8 mL を加え、72 時間後に細胞を回

収し、SOD2 mRNA および SOD2 タンパク量を測定した。

B-8. 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)。B-6 の操作に従い BRL3A 細胞に AdSOD2-shRNA ウイルス液を MOI 100 で、AdCYP3A4 ウイルス液を MOI 0、5、10、20、50 および 100 で感染させた。感染 72 時間後に培養液をアスピレーターで吸引し、100 μ M テストステロンを含む培地 1mL を加えた。1 時間後に培地を採取して生成した 6 β 水酸化テストステロンを以下の方法により測定した。採取した培地 500 μ L にジクロロメタン 4 mL、精製水 500 μ L、内部標準物質として 100 μ M のコルチコステロン 20 μ L 加えて激しく攪拌した。3,000 rpm (700 g) で 10 分間遠心分離後、ジクロロメタン層を別の試験管に移し、窒素気流下乾固させた。すべての溶液を乾固させた後、試験管に 200 μ L の 45%メタノールを加え、1 分間ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、2,000 rpm (500 g) で 5 分間遠心分

離し、40 μ L を HPLC に注入して分析した。HPLC による分析には、ポンプ (日立 L-2130)、オートサンプラー (日立 L-2200)、カラムオープン(日立分光 CO-965)、UV 検出器 (日立 L-2400) を用いて、溶離液を 240nm でモニターした。カラムは Mightsil RP-18 GP-150-4-6 5 μ M (関東化学) を用いた。移動相は 50%MeOH/10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) を使用し、流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

B-9. AdSOD2-shRNA 感染 BRL3A 細胞への薬物処置

B-3 の操作に習い回収した BRL3A 細胞の細胞懸濁液を調製し、各ウェル 6×10^3 cells となるよう 96 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、各ウェルに AdSOD2-shRNA および AdCYP3A4 ウイルス感染量それぞれ MOI 100、MOI 50 となるように調製したウイルス液をすべての細胞に浸潤させた。2 日後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し被検薬物入りの培養液を加えた。24 時間後 CCK アッセイにより細胞生存率を測定し

た。

B-10. タンパク質定量

ウイルス感染 24、48、72、および 120 時間後の BRL3A 細胞において、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、1 × PBS 500 μL を加えた。セルスクレイパーで細胞をウェルから剥離し、1 × PBS で懸濁しながら細胞を回収した。回収後、液体窒素と 37°C 温浴で凍結融解を 3 回繰り返し、ボルテックスミキサーでよく混和した。得られた細胞溶液 20 μL と Brad 溶液 1 mL を混合し、15 分間室温で反応させた。96 ウェルプレートに 200 μL ずつ加え 595 nm の吸光度を Biotrak II plate reader (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK) を用いて測定した。

B-11. SDS-PAGE と Western blot 分析

Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、SDS-PAGE を行った。厚さ 1 mm、15% ポリアクリルアミドゲルを用いて行い、サンプルのタンパク質量が 10 μg

になるようにアプライした。Western blotting 分析は以下の方法により行った。SDS-PAGE 後、Transfer cell を用い、電氣的にゲル上のタンパク質を PVDF 膜に 10 V、30 分間転写した。その際、ろ紙、ポリアクリルアミドゲル、PVDF 膜は転写用緩衝液に浸して行った。次に PVDF 膜を 3% スキムミルクと 0.1% Tween 20 を含む PBS 溶液に浸して 3 時間ブロッキングし、PBS により 3 回洗浄後、一次抗体反応を室温で 3 時間行った。一次抗体として、anti-SOD2 (rabbit IgG, polyclonal) を用いた。次に PBS で 3 回洗浄後、二次抗体反応を室温で 30 分間行った。二次抗体にはビオチン化抗ウサギ IgG を用いた。その後、PBS により 3 回洗浄し、三次抗体反応を 30 分間行った。三次抗体にはペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体を用い、さらに PBS で洗浄した後、3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩で発色させた。バンド強度は ImageQuant TL Image Analysis Software (Amersham Biosciences) により定量した。

B-12. 肝癌由来細胞からの total RNA

の調製

RNA iso を用いて total RNA を調製した。12 ウェルプレートにおけるそれぞれの肝癌由来細胞に RNA iso 500 μL を加えてピペッティングにより懸濁した後、室温で 5 分間放置した。100 μL のクロロホルム溶液を加え、15 秒間激しく攪拌し、再度室温で 5 分間放置した。15,000 rpm (12,000 g)、4°C にて 15 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、250 μL のイソプロパノールを加え、室温で 5 分間放置した。15,000 rpm (12,000 g)、4°C にて 10 分間遠心分離し、沈殿を 75% エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、15,000 rpm (12,000 g)、4°C にて 10 分間遠心分離し、DEPC 処理精製水に溶解させた。60°C の水浴で 10 分間インキュベートした後、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

B-13. Real-time RT-PCR による SOD2 遺伝子ノックダウンの解析

B-12 により得られた total RNA から以下の方法により cDNA を合成した。

Total RNA 2 μg 、ランダムヘキサマー (150 ng/ μL) 1 μL に DEPC 処理精製水を加えて全量を 23 μL とした。70°C 水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。さらに、5 × 逆転写反应用緩衝液 8 μL 、2.5 M dNTP 8 μL 、ReverTraAce (100 units/ μL) 1 μL を加えて全量を 40 μL とし、30°C で 10 分間、42°C で 1 時間、98°C で 10 分間、サーマルサイクラーを用いて反応させた。得られた cDNA から以下の方法により PCR を行った。cDNA 溶液を 1 μL 、2 × SGI 溶液を 12.5 μL 、10 μM SOD2 forward primer および SOD2 reverse primer を 1 μL 、滅菌水 9.5 μL を加えて全量を 25 μL とした。GAPDH の mRNA についても forward および reverse primer を用いて同様に行った。スマートサイクラー (Cepheid Smart Cycler™ System; CA, USA) を用いて、95°C で 30 秒間、94°C で 4 秒間、64°C で 20 秒間を 45 サイクルで反応を行った。45 サイクル終了後、60°C から 95°C まで、0.2°C/sec を上昇させて融解曲線の測定を行った。PCR に用いたプライマーの配列を以下に示す (Table .1)。

Table 1. Sequences of primers for real-time RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
rSOD2	5'-GAG GCT ATC AAG CGT GAC TTT GG-3'	5'-AAG CGT GCT CCC ACA CAT CAA TC-3'
mSOD2	5'-AGA TCA TGC AGC TGC ACC ACA G-3'	5'-GCT TGA TAG CCT CCA GCA ACT C-3'
hSOD2	5'-CAG ATA GCT CTT CAG CCT GCA C-3'	5'-GAG CCT TGG ACA CCA ACA GAT G-3'
rGAPDH	5'-GTT ACC AGG GCT GCC TTC TC-3'	5'-GGG TTT CCC GTT GAT GAC C-3'
mGAPDH	5'-TCA CCA GGG CTG CCA TTT G-3'	5'-CTC ACC CCA TTT GAT GTT AGT-3'
hGAPDH	5'-CCA GGG CTT TTA ACT C-3'	5'-GCT CCC CCC TGC CCA AAT GA-3'

R: rat, m: mouse, h: human

B-14. SOD2 酵素活性の測定

Cayman chemical 社の Superoxide dismutase assay kit を用い、以下の方法で AdSOD2-shRNA および AdLuc-shRNA 感染 BRL3A 細胞における SOD2 酵素活性の測定を行った。B-10 の方法に準じて細胞を回収し、96 well plate に radical detector を 190 μ L 加え、回収した細胞を 1 μ g apply し、10 mM のシアン化カリウムを 10 μ L 加えた。その後 xanthine oxidase 溶液を 20 μ L 加え、正確に 20 分経った後、450 nm の吸光度を Biotrak II Plate reader を用いて測定した。

B-15. CCK アッセイ

同仁化学研究所の Cell counting kit-8 を用い、以下の方法で AdSOD2-shRNA・AdLuc-shRNA および AdCYP3A4 感染 BRL3A 細胞における CCK アッセイを行った。それぞれ MOI 100、MOI 100、MOI 50 で感染させた。B-9 の操作に従い、トログリタゾン溶液・ダブソン溶液・フルタミド溶液・カルバマゼピン溶液・イソニアジド溶液・トラゾドン溶液・ニメスリド溶液・スルファメトキサゾール溶液・ニフェジピン溶液・ジドブジン溶液・ダントロレン溶液・アルベンダゾール溶液を 24 時間処理した BRL3A 細

胞に、CCK-8 溶液を各ウェル 10 μ L ずつ加えた。溶液添加 2 時間後における 450 nm の吸光度を Biotrak II Plate reader を用いて測定した。

B-16. ROS の測定

Possel らの方法に準じて測定を行った (Possel et al., 1997)。B-9 の操作に従い BRL3A 細胞に AdSOD2-shRNA または AdLuc shRNA ウイルス液を MOI 100 で、また AdCYP3A4 ウイルス液を MOI 50 で感染させた。48 時間後に培養液をアスピレーターで吸引し、I-2-15 で用いた薬物含む培地 100 μ L を加えた。処置後 24 時間後にジクロロフルオレセインジアセテートが 30 μ M になるよう加え、2 時間インキュベートし、1 \times PBS で 2 回 wash し、1 \times PBS を 200 μ L 加え、1 時間インキュベートしたあと excitation 485 nm、emission 538 nm で測定した。

B-17 スーパーオキシドアニオンの測定

Carter らの方法に準じて測定を行った (Carter et al., 1994)。B-9 の操作に従い BRL3A 細胞に AdSOD2-shRNA また

は AdLuc shRNA ウイルス液を MOI 100 で、また AdCYP3A4 ウイルス液を MOI 50 で感染させた。48 時間後に培養液をアスピレーターで吸引し、B-15 で用いた薬物含む培地 100 μ L を加えた。処置後 24 時間後にジヒドロエチジウムが 10 μ M になるよう加え、30 分間インキュベートし、1 \times PBS で wash し、トリプシンで細胞をはがし懸濁させた液を excitation 352 nm、emission 590 nm で測定した。

B-18. 倫理

本アデノウイルスを用いた全ての実験は、金沢大学遺伝子組換え実験安全委員会による金大 6 第 724 号の承認を受けて行った。

C. 実験結果

C-1 . BRL3A 細胞を用いた AdSOD2-shRNA 感染による SOD2 のノックダウン

In vivo において AdSOD2-shRNA によるノックダウンの効率を検討する前に、細胞レベルで AdSOD2-shRNA による SOD2 mRNA ノックダウンの検討を BRL 3A 細胞を用いて行った。

論文を参考にした shRNA の配列を含む アデノウイルス (配列 A-AdSOD2-shRNA) および B-Bridge 社から購入した shRNA の配列を含む ウイルス (配列 B-AdSOD2-shRNA) を感染させ、至適 MOI の検討を行った。Fig. 1 には AdSOD2-shRNA を感染させた BRL3A 細胞の SOD2 mRNA 量を GAPDH mRNA で補正し、各々 MOI 100 とした相対値で表した結果を示す。配列 A-Ad SOD2-shRNA 感染群においては、MOI 100 および MOI 200 でそれぞれ約 40%、約 50% の SOD2 mRNA の減少が認められた。しかしながら、配列 A-Ad SOD2-shRNA 感染群では MOI 依存的に GAPDH mRNA の上昇が認められたため、見かけ上 SOD2 mRNA が減少しているように思われた。配列 A-AdSOD2-shRNA を用いた感染は不適切であると判断し、今後の検討において配列 A-AdSOD2-shRNA での感染は行わないこととした。配列 B-AdSOD2-shRNA 感染群においては MOI 依存的な SOD2 mRNA の減少が認められ、MOI 100 で約 70%、MOI 200 で約 80% の SOD2 mRNA 減

少が認められた。また、GAPDH mRNA の上昇は認められなかった。しかし、MOI 200 では大半の細胞が浮いてきてしまったため、MOI 100 で今後の実験を行うことにした。また今後の AdSOD2-shRNA は配列 B-AdSOD2-shRNA を指す。

C-2. 肝癌由来細胞を用いた AdSOD2-shRNA 感染による SOD2 のノックダウン

AdSOD2-shRNA は、ラット SOD2 配列を使用して作製したため、shRNA の配列の相同性が動物種によって異なる。また、細胞株によるウイルス感染の効率が異なることが予想されたので、ノックダウンの最終目的動物であるラットの細胞においては2種類の細胞を用いて検討した。Fig. 2 には AdLuc-shRNA を感染させた各々の細胞株に対して、AdSOD2-shRNA を感染させた細胞株の SOD2 mRNA 量を、それぞれの GAPDH mRNA で補正し、AdLuc-shRNA 感染群における値を 100 とした相対値で示した。

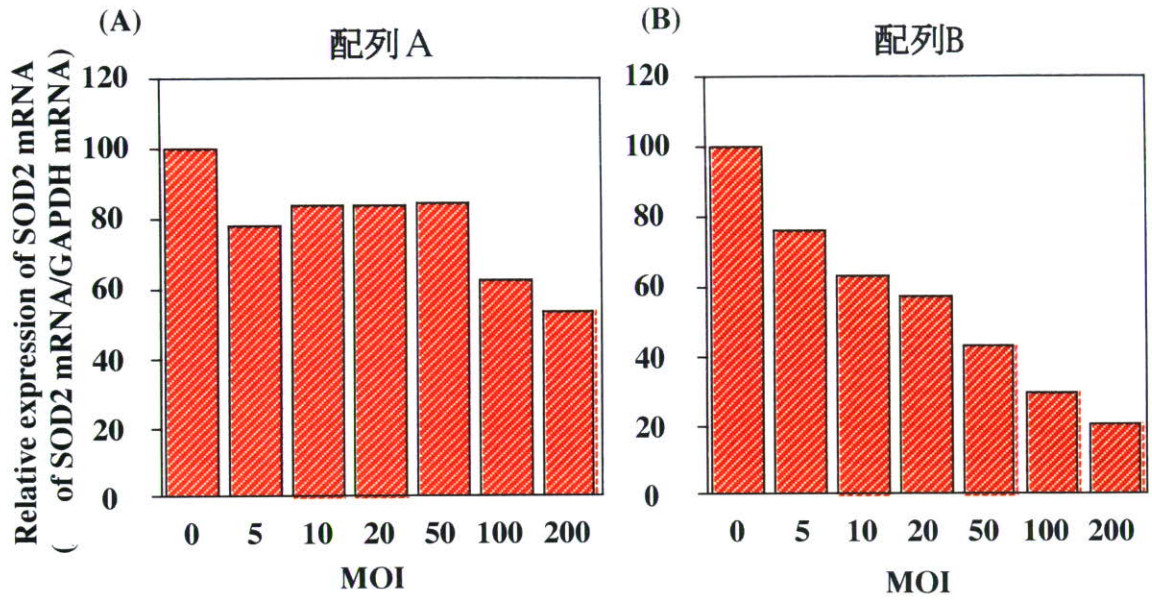


Fig. 1. MOI-dependent knockdown effect of sequence A (A) and sequence B (B) -AdSOD2-shRNA in BRL3A cells. Data are mean of two independent experiments.

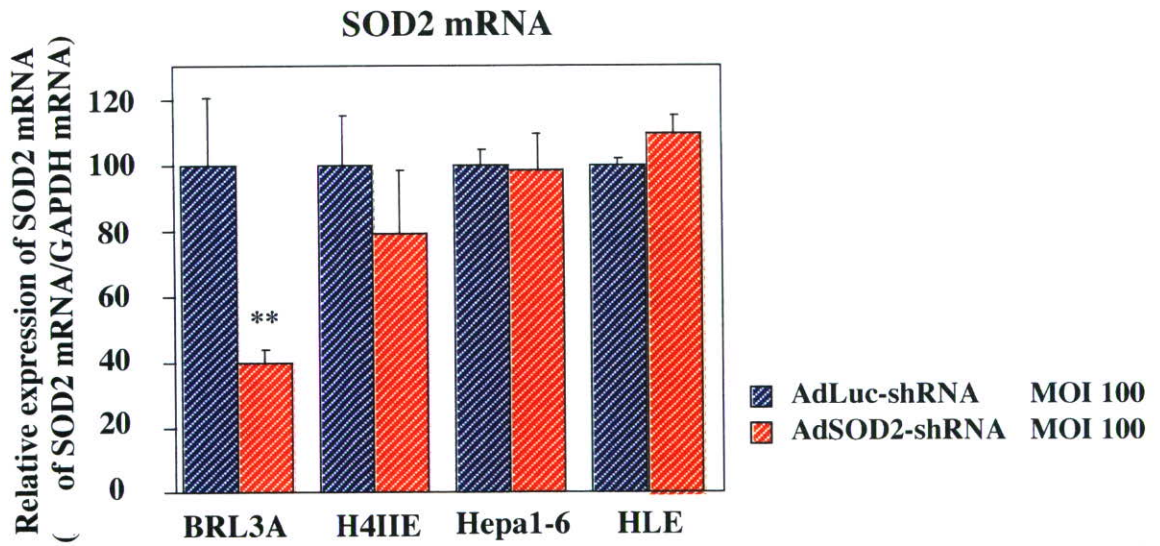


Fig. 2. Changes of SOD2 mRNA expression in various hepatic cell lines. Data are means \pm SD (n = 3). ** $P < 0.01$ compared with AdLuc-shRNA infected groups.

ラット肝癌由来細胞である BRL3A 細胞では AdSOD2-shRNA を MOI 100 で 3 日間感染させた条件で約 60% の有意な減少が認められた。しかし、同じラット肝癌由来細胞の H4 II E 細胞では有意な減少が認められなかった。マウス肝癌由来細胞の Hepa1-6 細胞およびヒト肝癌由来細胞の HLE 細胞でも有意な減少は認められなかった。

C-3 . BRL3A 細胞における AdSOD2-shRNA 感染の至適条件の検討

前記の実験において BRL3A 細胞で最もノックダウン効率が優れていたため、さらに詳細な検討を行った。BRL3A 細胞に MOI 100 で感染を行い、感染後 1、2、3、5 日目の SOD2 mRNA、タンパク質および酵素活性値のノックダウン効率について検討した。その結果を Fig. 3 に示す。

AdLuc-shRNA を MOI 100 で感染させた細胞を対照とした。SOD2 mRNA の発現量は感染後 1 日目においては、対照群と比べて有意な差は認められなかった。しかし、ウイルス感染後 2 日目においては約 50%、3 日目には約

65%、5 日目には 55% の SOD2 mRNA の有意な減少が認められた。

SOD2 タンパク質はウイルス感染後 1、2 日目においては、対照群と比べて有意な差は認められなかった。しかし、ウイルス感染後 3 日目において約 60%、5 日目においては約 45% の SOD2 タンパク質の有意な減少が認められた。

SOD2 酵素活性においてはウイルス感染後 1、2 日目においては、対照群と比べて有意な差は認められなかった。しかし、ウイルス感染後 3 日目において約 50%、5 日目においては約 30% の SOD2 酵素活性の有意な減少が認められた。

この結果より、以後の実験は従来通りの感染 3 日後に行うことにした。

C-4. テストステロン 6 β 水酸化酵素活性の測定

BRL3A 細胞には CYP の酵素活性がほとんど発現していないため、被検薬物は代謝的活性化を受けないと考えられる。薬物誘導性肝障害を AdSOD2-shRNA のみを感染させた BRL3A 細胞を用いて検討するよりも、

本研究室に既存の AdCYP3A4 を同時感染させたほうがより SOD2 ノックダウンの影響が検討しやすいと考え、AdCYP3A4 と AdSOD2-shRNA の同時感染を行うこととし、最初にその至適条件を検討した。Fig. 4 では AdCYP3A4 単独感染、および AdCYP3A4・AdSOD2-shRNA 同時感染におけるテストステロン 6 β 水酸化酵

素活性を示した。

AdCYP3A4 の MOI 依存的に活性値は上昇した。MOI 50 ではほぼプラトーに達した。また、MOI 100 ではほとんどの細胞が浮いてしまった。これより、今後の薬物処置における細胞障害性の実験は AdSOD2-shRNA MOI 100、AdCYP3A4 MOI 50 で行うことにした。

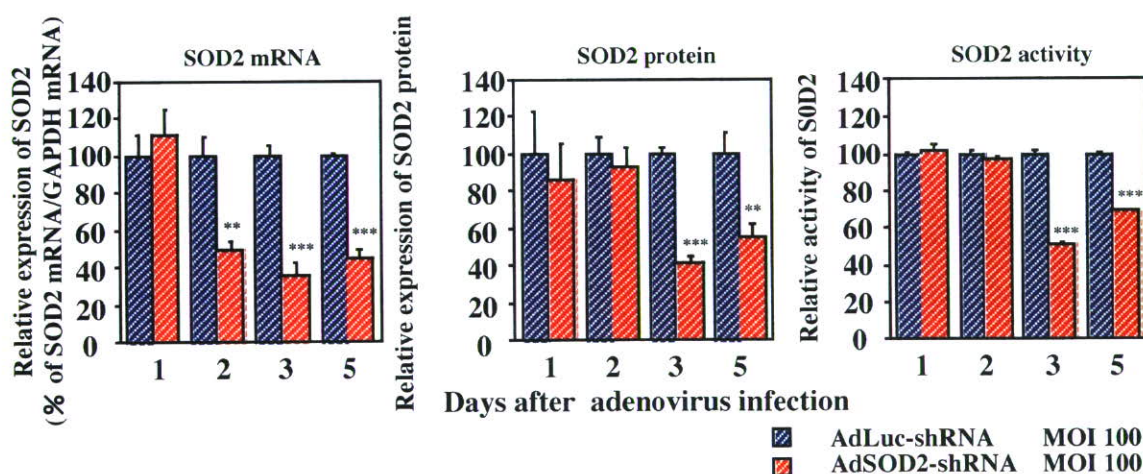


Fig. 3. Time dependent knockdown effect of AdSOD2-shRNA in BRL3A cells. Data are mean \pm SD (n = 3). ** P < 0.01, *** P < 0.001 compared with AdLuc-shRNA infected groups. SOD2 activity was measured using water soluble tetrazolium as a substrate.

C-5. AdCYP3A4 および AdSOD2-shRNA 同時感染 BRL3A 細胞における薬物による細胞障害性の検討

AdCYP3A4 および AdSOD2-shRNA

を同時感染させた BRL3A 細胞を用いて、肝細胞障害性が知られる種々の薬物を処置し、薬物処置 24 時間後における細胞

生存率を対照群と比較検討した (Fig.

5)。ダブソン処置においては AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において 10 μ M 以上の処置により

AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。

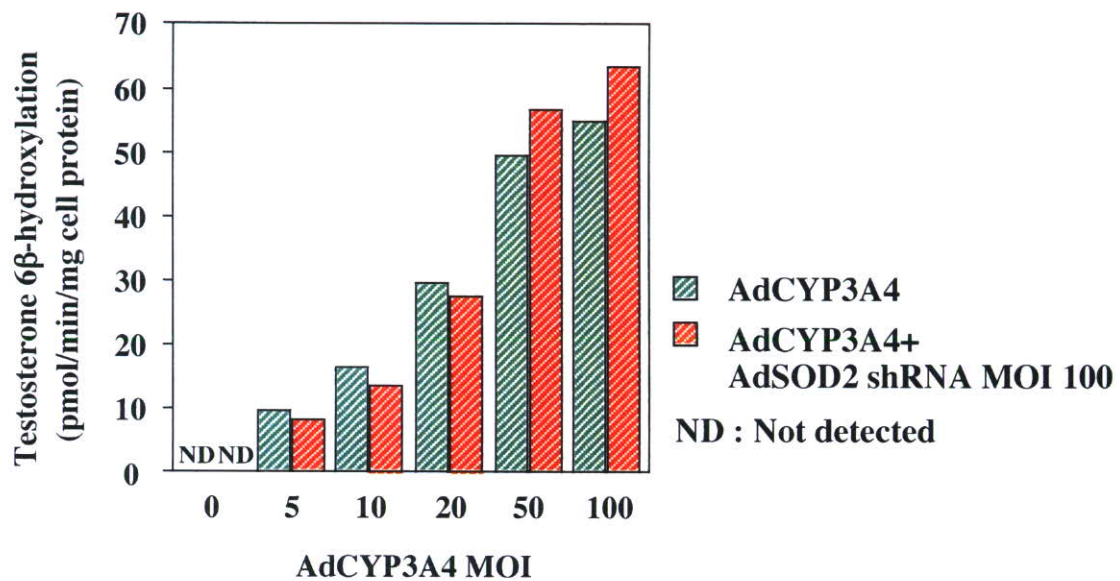
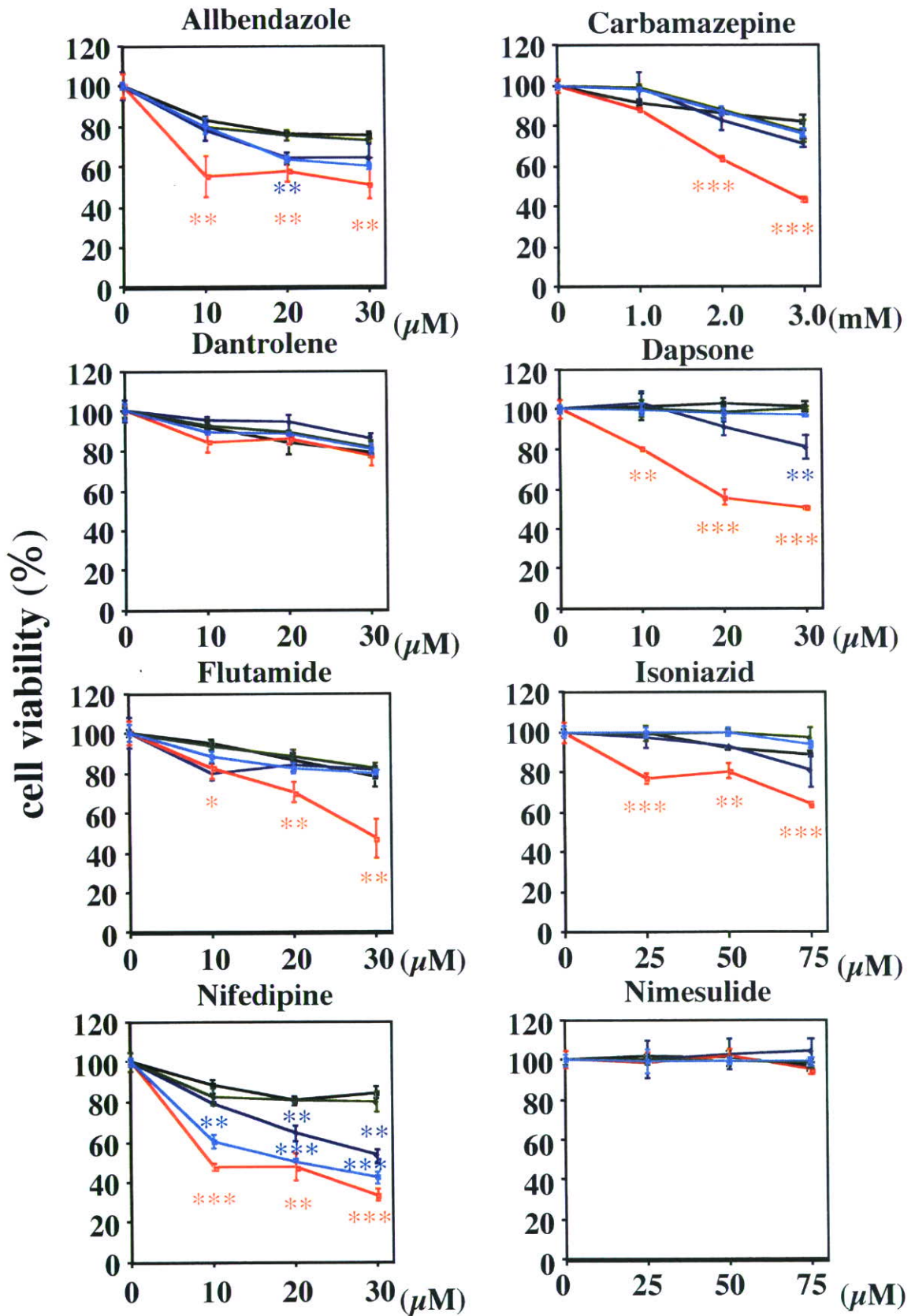


Fig. 4. AdCYP3A4 MOI dependent effect of CYP3A4 activity in BRL3A cells. Data are mean of two independent experiments.

また AdCYP3A4 + AdLuc-shRNA 感染群において、30 μ M の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められたが AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群ほどの細胞生存率の低下は認められなかった。フルタミド処置においては

AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において 10 μ M 以上の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。カルバマゼピン処置においては AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において 2 mM 以上の処置により Ad



Continue

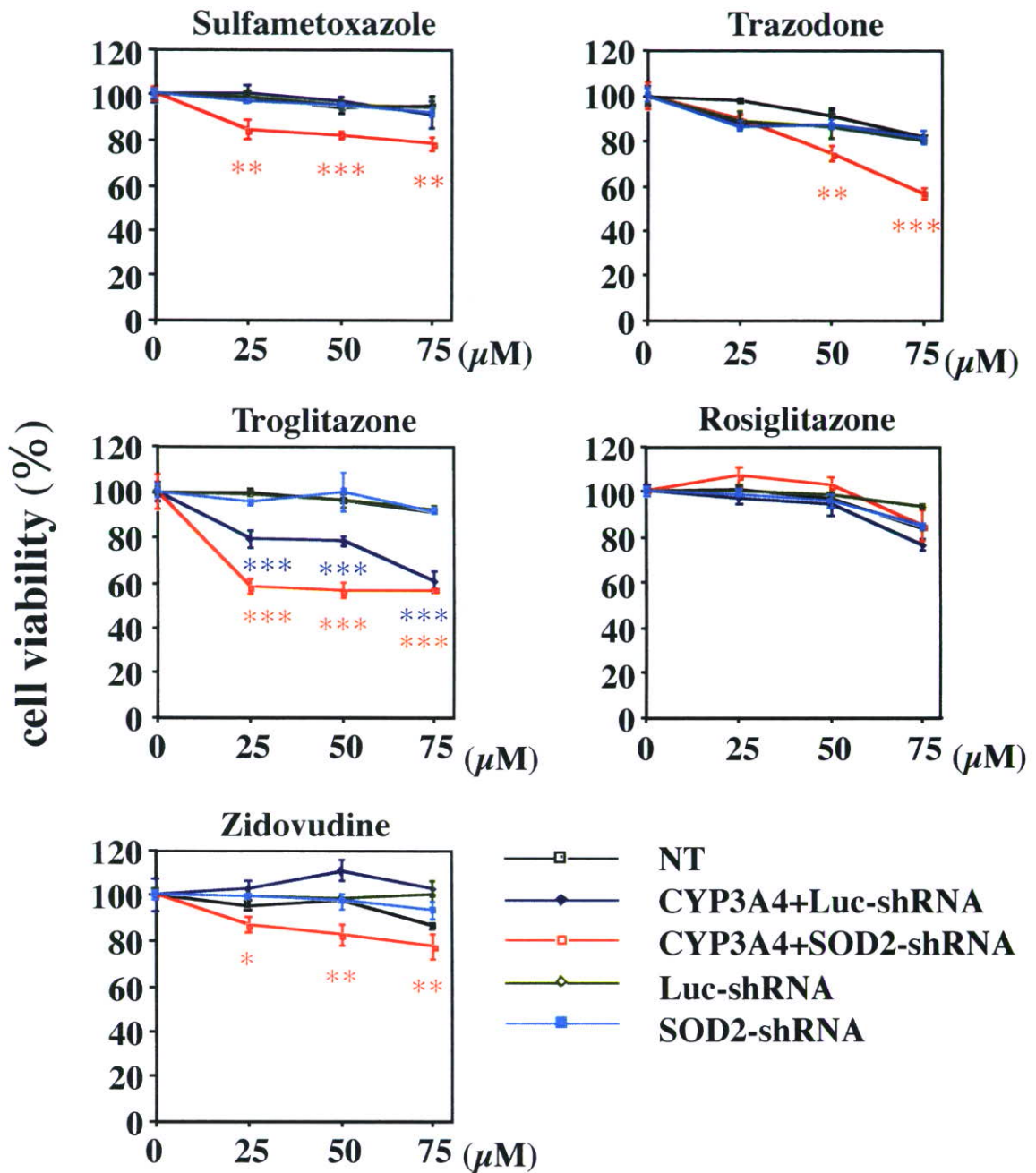


Fig. 5. MTT assay in adenovirus infected BRL3A cell2 after 24 hour exposure to various drugs. Cell viability is expressed as percentage of solvent treated cells. Data are mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 compared with AdLuc-shRNA infected groups.

Luc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。イソニアジド、スルファメトキサゾールおよびジドブジン処置においては AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において 25 μ M 以上の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。トラゾドン処置においては AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において 50 μ M 以上の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。トログリタゾン処置において、AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において、25 μ M 以上の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。また、AdCYP3A4 + AdLuc-shRNA 感染群において、25 μ M および 50 μ M の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められたが AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群ほどの細胞生存率の減少は認められなかった。アルベンダゾール処置においては AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において 10 μ M 以上の処置に

より AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。また AdCYP3A4 + AdLuc-shRNA 感染群および AdSOD2-shRNA 感染群において、20 μ M の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められたが AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群ほどの細胞生存率の減少は認められなかった。ニフェジピン処置においては AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において 10 μ M 以上の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。また AdCYP3A4 + AdLuc-shRNA 感染群および AdSOD2-shRNA 感染群においても 10 μ M 以上の処置により AdLuc-shRNA 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められたが AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群ほどの細胞生存率の減少は認められなかった。ダントロレン、ニメスリドおよびロシグリタゾン処置においてはいずれの群においても細胞生存率の有意な差異は認められなかった。

C-6. AdCYP3A4 および AdSOD2-shRNA 同時感染 BRL3A 細胞における薬物による活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの影響

C-5 では AdCYP3A4 および AdSOD2-shRNA 同時感染 BRL3A 細胞における細胞生存率を検討したが、細胞生存率の低下が認められた細胞においては SOD2 ノックダウンの影響による活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンが増加していることが考えられる。そこで細胞生存率の低下が最も顕著に認められた薬物濃度において活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの測定を行った(Fig. 6)。ダブソン、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、ニフェジピン処置においては AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において AdLuc-shRNA 感染群と比べて活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの有意な増加が認められた。またニフェジピン処置においては

AdSOD2-shRNA 感染群においても AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において AdLuc-shRNA 感染群と比べて活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの有意な増加が認められた。カルバマゼピンおよびイソニアジド処置においては、AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群において AdLuc-shRNA 感染群と比べて活性酸素種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有意な増加は認められなかった。一方、AdCYP3A4 + AdSOD2-shRNA 感染群における細胞生存率の有意な減少が認められたフルタミド処置においては活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの有意な増加は認められなかった。また、ダントロレン、ニメスリドおよびロシグリタゾン処置においてはいずれの群においても活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの有意な増加は認められなかった。