

Fig. 6. Changes of ROS and superoxide anion productions in adenovirus infected BRL3A cells after 24 hr exposure to various drugs. Data are mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 compared with AdLuc-shRNA infected groups.

D. 考察

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 (Fig. 1)、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 (Tarze et al., 2007)。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 (Fig. 2) 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。また、マウスおよびヒト肝癌由来細胞では SOD2 mRNA の有意な減少は認められなかった。これは shRNA が RISC に取り込まれる際に認識する SOD2 mRNA に対する塩基配列の相同性が関与していると考えられる。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 (Fig. 3)。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 の中の 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 (Fig. 4)。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 (Dieter et al., 2000)。

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 (Fig. 5)、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 (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。一般に生体内の pH において、スーパーオキシドアニオンの寿命は 10 万分の 1 秒であると言われている (Fridovich., 1975)。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。これはニフェジピンの AdSOD2-shRNA 単独感染における結果と類似していた。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。フルタミドは前立腺癌の治療薬として用いられており、日本においても承認されている薬物である。細胞毒性を示す薬物、たとえば抗癌薬はその作用が現れるときに SOD2 を誘導することが知られている (Akashi et al., 1996 : Das et al., 1998)。フルタミドは抗癌薬であり、また、今回の検討で低濃度において細胞生存率の減少 (約 20% の減少) が対照群の AdLuc-shRNA でも認められていることから、フルタミド自身の毒性

によって SOD2 が誘導され、活性酸素種およびスーパーオキシドアニオンの生成量に影響が認められなかった可能性も考えられる。ジドブジンは、スーパーオキシドアニオンの生成量を減少するという報告がある (Modica-Napolitano., 1993)。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 (Elimadi et al., 1997)。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。しかしながら、ニメスリドは興味深い結果であり、ニメスリドを SOD2 ヘテロノックアウトマウスに投与するとワイルドタイプのマウスに比べて肝毒性が増強したという報告がある (Ong et al., 2006)。今回の結果はこの Ong らの報告とは一

致しなかった。これにはニメスリドの毒性に CYP3A4 が関与しなかったことが考えられる。CYP3A4 以外の CYP 分子種を発現させるアデノウイルスを感染させることで異なる結果が得られるかもしれない。

本章での検討結果から、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。

E. 研究発表

1. 論文発表 論文作成中
2. 学会発表

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 (発表予定、抄録提出済)

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願準備中。

H. 参考文献

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

Akashi M, Takagi S, and Hachiya M (1996) Anti-cancer agent OK432 induces manganese superoxide dismutase in human granulocytes. *Int J Cancer* **68**:384-390.

Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, and Moldeus P (1985) Mechanisms of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol Pharmacol* **28**:306-311.

Beyer W, Imlay J, and Fridovich I (1991) Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40**:221-253.

Boelsterli UA and Lim PL (2006) Mitochondrial abnormalities-a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol* **220**:92-107.

Callahan SM, Boquet MP, Ming X, Brunner LJ, and Croyle MA (2006) Impact of transgene expression on drug metabolism following systemic adenoviral vector administration. *J Gene Med* **8**:566-576.

Carter WO, Narayanan PK, and Robinson JP (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* **55**:253-258.

Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, and Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**:855-862.

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.

Crettaz J, Berraondo P, Mauleon I, Ochoa L, Shankar V, Barajas M, van Rooijen N, Kochanek S, Qian C, Prieto J, Hernandez-Alcoceba R, and Gonzalez-Aseguinolaza G (2006) Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice. *Hepatology* **44**:623-632.

Das KC, Guo XL, and White CW (1998) Protein kinase C delta-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J Biol Chem* **273**:34639-34645.

Davidson DG and Eastham WN (1966) Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br Med J* **2**:497-499.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W,

- Yalcin A, Weber K, and Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498.
- Elbashir SM, Lendeckel W, and Tuschl T (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**:188-200.
- Elimadi A, Morin D, Albengres E, Chauvet-Monges AM, Allain V, Crevat A, and Tillement JP (1997) Differential effects of zidovudine and zidovudine triphosphate on mitochondrial permeability transition and oxidative phosphorylation. *Br J Pharmacol* **121**:1295-1300.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
- Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **44**:147-159.
- 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.
- Haouzi D, Lekéhal M, Moreau A, Moulis C, Feldmann G, Robin MA, Lettéron P, Fau D, and Pessayre D (2000) Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* **32**:303-311.
- Hinson JA, Pohl LR, Monks TJ, and Gillette JR (1981) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Life Sci* **29**:107-116.
- Howie D, Adriaenssens P, and Prescott LF (1977) Paracetamol metabolism following overdose: Application of high performance liquid chromatography. *J Pharm Pharmacol* **29**:235-237.
- Kohle C, Badary OA, Nill K, Bock-Hennig BS, and Bock KW (2005) Serotonin glucuronidation by Ah receptor- and oxidative stress-inducible human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* **69**:1397-1402.
- 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.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, and Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial

- injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**: 9782-9787.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, and Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**:147-157.
- Miner DJ and Kissinger PT (1979) Evidence for the involvement of *N*-acetyl-*p*-quinoneimine in acetaminophen metabolism. *Biochem Pharmacol* **28**: 3285-3290.
- Modica-Napolitano JS (1993) AZT causes tissue-specific inhibition of mitochondrial bioenergetic function. *Biochem Biophys Res Commun* **194**:170-177.
- Ong MM, Wang AS, Leow KY, Khoo YM, and Boelsterli UA (2006) Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous Sod2(+/-) mice. *Free Radic Biol Med* **40**:420-429.
- Ong MM, Latchoumycandane C, and Boelsterli UA (2006) Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicol Sci* **97**:205-213.
- Pal-Bhadra M, Bhadra U, and Birchler JA (1997) Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is polycomb dependent. *Cell* **90**:479-490.
- Peng Z (2005) Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* **16**:1016-1027.
- Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, and Wolf G (1997) 2,7-Dihydrodichloro fluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett* **416**:175-178
- Runge D, Köhler C, Kostrubsky VE, Jäger D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE, and Michalopoulos GK (2000) Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **273**:333-341.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman R, and Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-264.
- Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N, Zamzami N, Jan G, Kroemer G, and Brenner C (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene* **26**:2606-2620.

Temple R (2001) Hepatotoxicity through the years : Impact on the FDA, presented 12 Feb 2001, www.fda.gov/cder/livertox/presentations/im1389/sld001.htm *Biophys* **346**:161-169.

Tone Y, Kawamata K, Murakami T, Higashi Y, and Yata N (1990) Dose-dependent pharmacokinetics and first-pass metabolism of acetaminophen in rats. *J Pharmacobiodyn* **13**:327-335.

Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:4350-4354.

Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang TT, Epstein CJ, and Richardson A (1999) Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch Biochem Biophys* **363**:91-97.

Volkman X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, Macfarlane M, Cohen GM, Manns MP, Schulze-Osthoff K, and Bantel H (2007) Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* **46**:1498-1508.

Yamazaki H and Shimada T (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem*

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

CYP3A4 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

分担研究者 中島 美紀 金沢大学大学院医学系研究科准教授

研究要旨

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。章 A-1 では、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。章 A-2 では、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。章 A-3 では、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。

A. 研究目的

薬物の多くは体内に吸収されると薬物代謝酵素により代謝される。薬物代謝酵素による代謝は主に薬物の排泄を促す解毒的代謝であるが、一部では化学的に不安定な反応性代謝物が生じる代謝的活性化を引き起こす。チトクロム P450 (CYP) は主要な薬物代謝酵素で肝臓に高く発現しているが、腸管、腎臓、肺、皮膚などほとんどの臓器に分布している。中でも一分子種である CYP3A4 はヒト肝総 CYP の約 30% を占め (Shimada et al., 1994)、臨床で使用されている薬物の約 50% を代謝するといわれている重要な分子種である (Guengerich, 1995)。

肝障害の主な原因の一つに薬物が挙げられ、薬物誘導性肝障害は急性肝不全の約半数を占める (Kaplowitz, 2001)。また肝障害との関連が 1 件以上示唆されている薬物は約 1000 種類にのぼる (Zimmerman, 1999)。薬物性肝障害は中毒性と特異体質性の大きく 2 種類に分類される。中毒性肝障害は薬物の投与量依存的に、ほとんど個体差なく発症するため、非臨床試験による再現が可能であるとされている。

一方、特異体質性肝障害は発症の個体差が大きく、発症頻度は 100 から 10 万人に 1 人程度と非常に低いため、医薬品の研究・開発段階で発見されにくい (Utrecht, 1999)。そのため医薬品の承認販売後に肝障害が発覚し、しばしば発売中止となることがある。発売中止となる薬物には不安定な反応性代謝物の存在が報告されているものが多い (Guengerich and MacDonald, 2007)。反応性代謝物は主に CYP によって生成し、活性酸素の産生、チオール酸化、内在性巨大分子への結合を行なうことで細胞の機能を障害する (Riley et al., 1988)。しかしヒト肝癌由来培養細胞において CYP の発現量は極めて低く、ヒト初代培養肝細胞では長期培養に伴って CYP の発現量が低下するため、*in vitro* において CYP による代謝的活性化のメカニズムを解明することは非常に困難である。

これまでに当研究室で Vagnati ら (2005) の方法を基に、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞とヒト CYP3A4 を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソームを用いて薬物の代謝的活性化を検討する *in vitro* 評価系を構築した

(中川, 2007)。糖尿病治療薬であるトログリタゾンは特異体質性肝障害を引き起こし発売中止となった薬物で、CYP3A4による代謝的活性化が示唆されている (Yamamoto et al., 2002)。本実験系において、トログリタゾンの細胞障害性が CYP3A4 によって増強されることを再現できた。従って、本評価系によって CYP3A4 による代謝的活性化が予測可能であると考えられる。

そこで本研究では、これまでに肝障害が報告されている薬物を中心に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。

【以下3項目の研究内容について A-1, A-2, A-3として分けて記載】

A-1. 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

フルニトラゼパムはベンゾジアゼピン系誘導体 (Fig. 1) で催眠剤、麻酔

前投薬、麻酔導入剤および局所麻酔時の鎮静剤として使用されている。フルニトラゼパムの重大な副作用として肝機能障害、黄疸などが報告されているが (サイレースインタビューフォーム)、詳細なメカニズムは解明されていない。そこで Fig. 1 に示した13種のベンゾジアゼピン系薬物について CYP3A4 による代謝的活性化の有無を検討した。

B. 研究方法

B-1. 実験材料および実験方法

B-1-1 試薬

ウシ胎児血清 (FBS)、非必須アミノ酸 (NEAA) はインビトロジェン (Carlsbad, CA) から、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) は日水製薬 (Tokyo, Japan) から購入した。酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP⁺)、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) はオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) から購入した。CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソーム (CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 発現系

ミクロソーム) およびコントロール
ミクロソームは BD-Gentest (Woburn,
MA) より購入した。なお、これらの
ミクロソームは NADPH-チトクロム
P450 還元酵素 (NPR) とチトクロム b_5
(b_5) を同時発現させたものである。ク
ロバザム、ジアゼパム、ロラゼパム、
ニメタゼパム、ニトラゼパム、オキサ
ゼパム、ロラゼパム、還元型グルタチ
オンは和光純薬工業 (Osaka, Japan)
より、プロマゼパム、クロルジアゼポ
キシド、デスメチルジアゼパム、フル
ニトラゼパム、フルラゼパム、ノルフ
ルジアゼパム、テマゼパムは
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購
入した。CellTiter-Glo Luminescent Cell
Viability Assay および CellTiter-Blue
Cell Viability Assay はプロメガ
(Madison, WI) から購入した。

B-1-2 ヒト肝癌由来 HepG2 細胞の 培養

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞は理研ジ
ーンバンク (Tsukuba, Japan) より購
入した。HepG2 細胞は 10% FBS、NEAA
を含む DMEM を培養液として用いて
10 cm ディッシュで培養した。継代時、
培地をアスピレート除去した後トリ
プシン-エチレンジアミン- N,N,N',N' -
四酢酸溶液 4 ml をディッシュに加え、
37°C、3~5 分間インキュベートした。
培養液を 6 ml 入れておいた 50 ml ファ
ルコンチューブにディッシュより剥
離した細胞を移し、250 g、4°C で 5 分
間遠心分離した。得られた沈殿を再度
培養液に懸濁し、40 μ m セルストレイ
ナーで濾過した濾液をディッシュに
まき、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

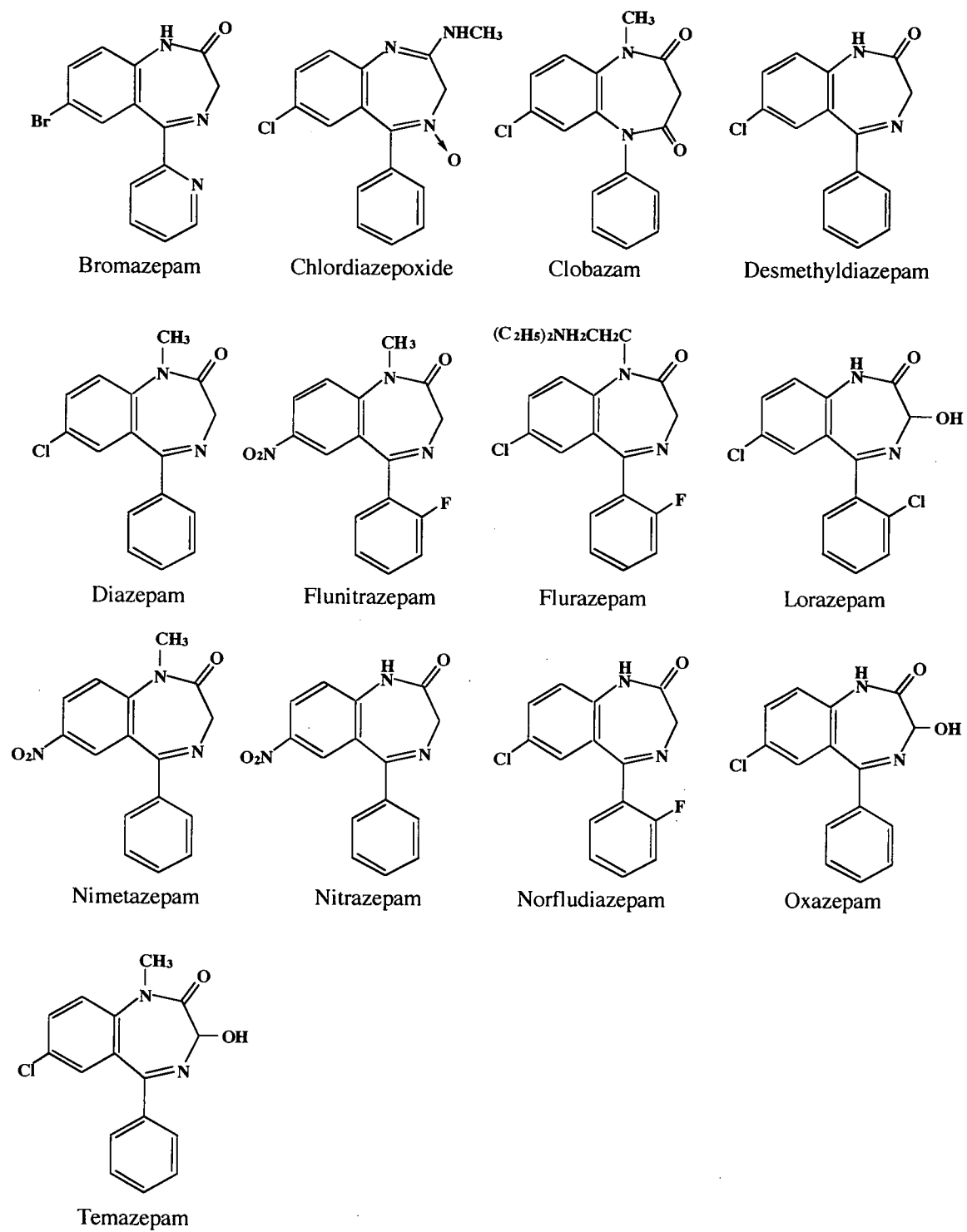


Fig. 1. Structures of benzodiazepine analogues.

B-1-3 細胞生存率の測定法

細胞生存率は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (ATP 測定法) と CellTiter-Blue Cell Viability Assay (MTT 測定法) の 2 種類で検討した。ATP および MTT 測定法はマニュアルに従い、以下のように測定した。ATP 測定法は、96 well-plate に CellTiter-Glo Reagent 100 μ l を加え PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA) のルミノメーター1420 ARVO MX にセットし、2 分間振とう後、10 分間静置して発光を測定した。MTT 測定法は、96 well-plate に CellTiter-Blue Reagent 20 μ l を加え、10 秒間振とう後、CO₂ インキュベーター内で 90 分間呈色反応を行なった。その後ルミノメーター1420 ARVO MX で 570 nm の蛍光を測定した。

B-1-4 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

最終濃度が 10,000 cells/well の HepG2 細胞、62.4 μ g/ml CYP3A4 発現系マイクロソーム (CYP3A4 として 8 nM)、3% FBS を含む DMEM、1 mM NADPH となるように混合した溶液に

被験薬を加え、96 well-plate に 100 μ l/well ずつまき、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間インキュベートし、その後 I-2-3 の ATP 測定法および MTT 測定法により細胞生存率を測定した。被験薬としてブロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロバザム、デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルニトラゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパム、テマゼパムを用いた。被験薬の濃度は 50、100、200、400 μ M で検討した。なお、DMSO の最終濃度は 0.2% とした。また対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。

B-1-5 ニトロベンゾジアゼピンの CYP2C9 および CYP2C19 による代謝的活性化の検討

最終濃度が 10,000 cells/well の HepG2 細胞、22.4 μ g/ml CYP2C9 (CYP2C9 として 8 nM) または 37.6 μ g/ml CYP2C19 発現系マイクロソーム (CYP2C19 として 8 nM)、3% FBS を含む DMEM、1 mM NADPH となるよう

に混合した溶液に被験薬を加え、96 well-plate に 100 μ l/well ずつまき、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間インキュベートし、その後 I-2-3 の ATP 測定法および MTT 測定法により細胞生存率を測定した。被験薬としてフルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムを用いた。被験薬の濃度は 50、100、200、400 μ M で検討した。なお、DMSO の最終濃度は 0.2% とした。また対照としてコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。

B-1-6 ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合反応

反応系は最終濃度が 100 mM Kpi (pH 7.4)、50 nM CYP3A4 発現系マイクロソーム、10 mM 還元型グルタチオン、100 μ M 被験薬となるように混合し全量を 200 μ l とした。最終濃度が 1 mM になるように 10 mM NADPH 生成系 (1.94 mM NADP⁺、4.13 mM グルコース 6-リン酸、4.13 mM Kpi (pH 7.4)、0.5 unit/ml グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ) を 50 μ l 添加することにより反応を開始した。なお、被験薬は

DMSO に溶解し、反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下とした。また対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。37°C で 60 分間インキュベートした後、氷冷したメタノール 750 μ l を加え、激しく攪拌することにより反応を停止した。15000 g で 5 分間遠心分離し、上清 10 μ l を 4000 Q TRAP liquid chromatography-tandem mass spectrometry (4000 Q TRAP LC-MS/MS; Applied Biosystems, Lincoln, CA) に注入した。

B-1-7 ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体検索

ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体の検索には Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた。装置は 4000 Q TRAP LC-MS/MS を用いた。カラムは Inertsil ODS-3 (100 mm x 2.1 mm ID, 3 μ m, GL Science, Tokyo, Japan) を用いた。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリルを用い、アセトニトリルは試料注入後 0-6 分では 5%、6-11 分では 90%、11-15

分では5%とした。カラム温度は40°C、流速は0.2 ml/minとした。ターボガスは450°Cとし、ネブライジングガス、ターボガスには空気、カーテンガスには窒素を用い、それぞれ60、60、12 psiとした。コリジョンエネルギーは-30 Vとした。フルニトラゼパムおよびニメタゼパムの保持時間は約4分であった。positive-electrospray ionization (ESI) mode を用い、precursor ion scan (m/z 272, negative) で分析した。

B-1-8 フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合反応

I-2-6 の方法に準じた。ただしCYP3A4発現系マイクロソームの最終濃度は100 nMとし、反応液の全量を225 μ lとした。最終濃度が1 mMになるように5 mM NADPH生成系(3.88 mM NADP⁺、8.25 mM グルコース 6-リン酸、8.25 mM Kpi (pH 7.4)、1 unit/ml グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ)を25 μ l 添加することにより反応を開始した。遠心分離後6サンプルの上清を混合し40°C、減圧下で濃縮し、300 μ lの50%メタノールに再溶解した後、遠心濾過し、濾液10 μ lをliquid

chromatography ion trap time-of flight mass spectrometer (LCMS-IT-TOF; 島津製作所, Kyoto, Japan) に注入した。

B-1-9 ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体の構造解析

フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体はLCMS-IT-TOFを用い構造解析を行なった。測定条件はI-2-7の方法に準じた。ただしコリジョンエネルギーは30 Vとした。フルニトラゼパムおよびニメタゼパムの構造解析はESI modeを用い、それぞれ m/z 621、 m/z 601のイオンをproduct ion scan (positive) で分析した。

B-1-10 統計解析

各群における統計学的評価はStudent t-testにより解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C-1. 実験結果

C-1-1. 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

13種のベンゾジアゼピン系薬物

(Fig. 1) 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。その結果を Fig. 2 に示した。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムを 100 μ M 以上処置した HepG2 細胞において、CYP3A4 発現系ミクロソーム処置群でコントロールミクロソーム処置群に比べて細胞生存率は 25% 以上低下した。また細胞生存率の低下は薬物の濃度依存的であった。一方、ブロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロバザム、デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパム、テマゼパムではコントロールミクロソーム処置群と CYP3A4 発現系ミクロソーム処置群の間で細胞生存率に顕著な変動は認められなかった。デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルラゼ

パム、ロラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパムではコントロールミクロソーム処置群において薬物濃度依存的な細胞生存率の低下を示した。

C-1-2. ニトロベンゾジアゼピンの CYP2C9 および CYP2C19 による代謝的活性化の検討

フルニトラゼパム、ニメタゼパムおよびニトラゼパムに関して、CYP2C9 および CYP2C19 による代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。その結果を Fig. 3 に示した。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムではコントロールミクロソーム処置群と CYP2C9 および CYP2C19 発現系ミクロソーム処置群の間で細胞生存率に顕著な変動は認められなかった。

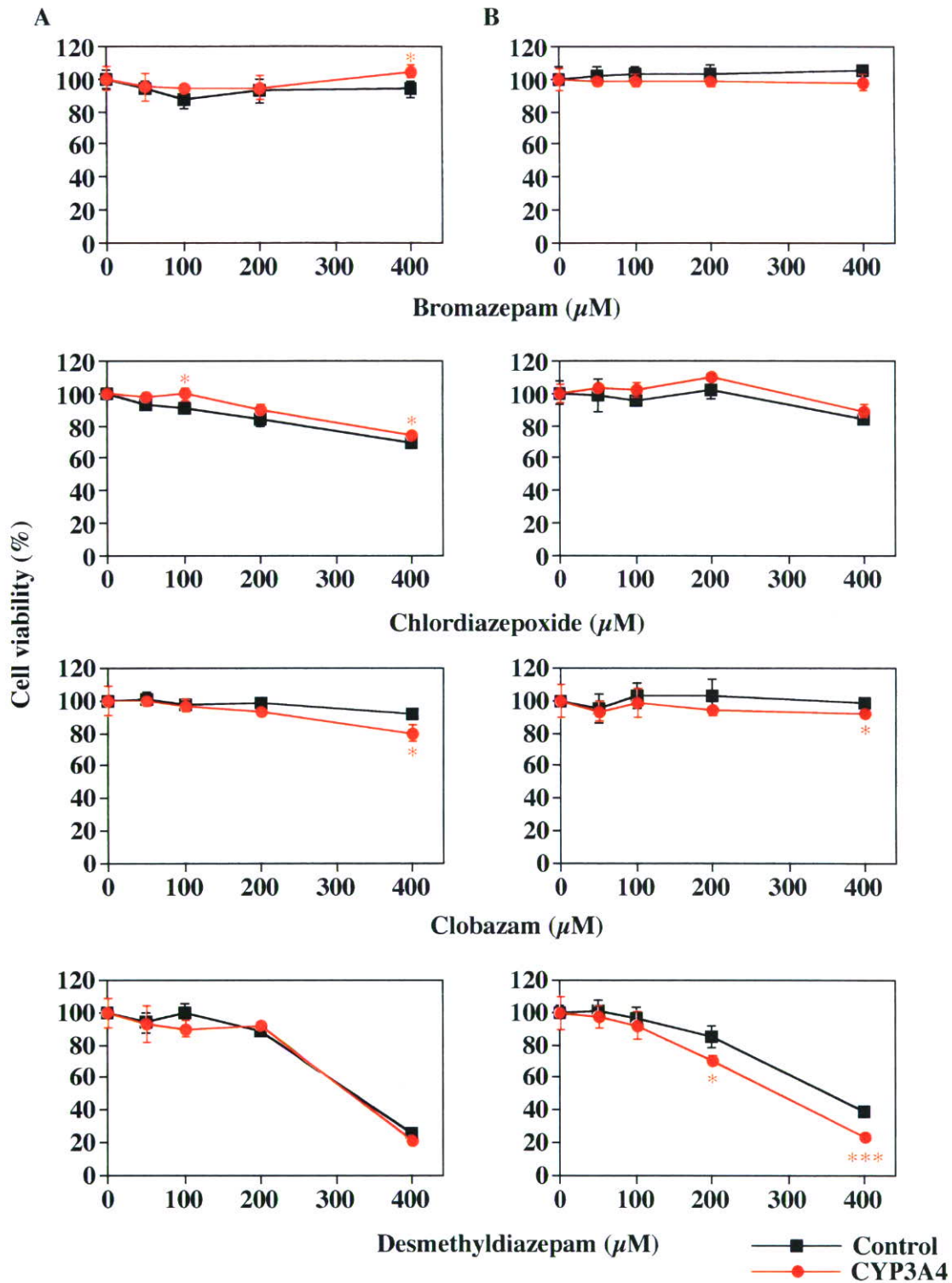


Fig. 2. Changes in the cytotoxicity of benzodiazepine analogues by CYP3A4 on HepG2 cells.. The concentrations of drugs were 50, 100, 200 and 400 μM . Data represent the mean \pm SD of three independent experients. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control. A, ATP assay; B, MTT assay.

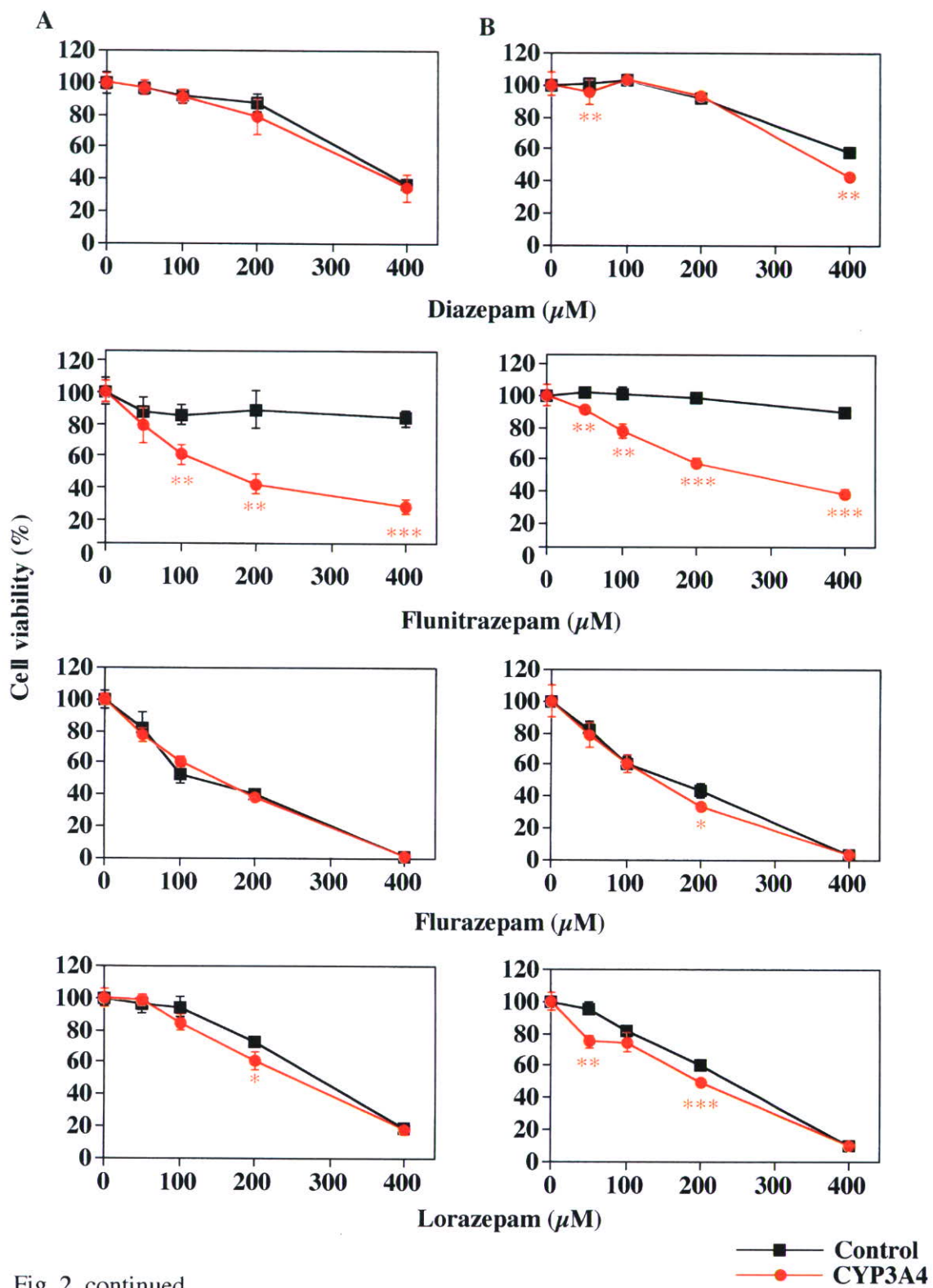


Fig. 2. continued.