

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

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

横井 毅 ----- I

資料 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

横井 毅 ----- 1

資料 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

横井 毅 ----- 31

資料 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

中島 美紀 ----- 69

資料 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

中島 美紀 ----- 107

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 129

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 135

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

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9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事が出来た。(1) γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) 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) アデノウイルスを用いた CYP3A4 の発現と薬物誘導性細胞障害 (4) トログリタゾン由来肝障害性関連蛋白質の同定と毒性発現、(5) 薬物誘導性肝障害による薬物排泄能への影響、(6) 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、(7) 肝障害化合物投与による網羅的 RNA 発現変動解析およびマイクロ RNA の発現変動とその役割の検討、(8) CYP1B1 のマイクロ RNA による発現制御と毒性、(9) 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。本研究では、2006 年に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も検討し、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) アデノウイルスを用いた CYP3A4 の発現と薬物誘導性細胞障害。

ヒト肝で最も多く発現している薬物代謝酵素 CYP3A4 に焦点を当て、アデノウイルスを用いラット肝癌由来 H4IIE 細胞に発現させた。その結果、CYP3A4 によるテストステロン 6 β 水酸化酵素活性、ならびに CYP3A4 mRNA の発現を認めることができた。また、CYP3A4 により生じるトログリタゾンの活性代謝物の毒性が、細胞内グルタチオン含量の減少で増強されることを、AdGCSh-shRNA と共に感染させた系で示すことができた

(4) トログリタゾン由来肝障害性関連蛋白質の同定と毒性発現。

突発性薬物肝障害を惹起する薬としてトログリタゾンを中心に検討し、2次元プロテオミクスを駆使し、トログリタゾンのヒト肝細胞傷害性を指標にした検討により、シャペ

ロン蛋白の一種である BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) を特定した。この蛋白の発現を siRNA 法によってノックダウンすることにより、トログリタゾンの細胞毒性が憎悪することを明らかにした。また、トログリタゾン投与により肝障害を起こした患者の血清を詳しく検討し、アルドラーゼ B に対する自己抗体の産制を見出した。この自己抗体の産制はトログリタゾンによる肝障害発症の原因とは考え難いが、肝障害のマーカーなることが明らかになった。

(5) 薬物誘導性肝障害による薬物排泄能への影響。

肝障害による肝細胞の変化による薬物排泄能への影響を明らかにすることを目的とし、四塩化炭素誘導性肝障害ラットについて、尿糞中薬物排泄率および肝トランスポーターの発現変動を検討した。ラットにおいて、ほとんど代謝反応の影響を受けず、主に胆汁中に排泄される薬物であるセフメタゾール (CMZ) を用いて検討し、四塩化炭素誘導性肝障害ラットにおいては、生化学的肝障害マーカーである AST や ALT 値の上昇に伴い、CMZ の尿中排泄率の増加および糞中排泄率の低下が認められた。AST 値 > 600 IU/L および ALT 値 > 200 IU/L を示したラットでは、CMZ は主に尿中に排泄された。すなわち、CMZ の尿中および糞中排泄率は、血清中 AST および ALT 値に依存して変化することを明らかにした。また、DNA マイクロアレイの結果より、肝障害時の糞中排泄から尿中排泄への変化に、肝トランスポーターの発現変動が関与している可能性を示した。薬物排泄は、薬物の体内動態を明らかにするうえで大変重要である。薬物を効果的かつ安全に使用するために、薬物のヒトにおける排泄経路や、病態時の薬物排泄能を正しく評価することが必要である。本研究結果は、病態時を考慮した医薬品適正使用および医薬品開発に対して有用な情報を提供できたと考えられる。

(6) 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。

(7) 肝障害化合物投与による網羅的RNA発現変動解析およびマイクロRNAの発現変動とその役割の検討。

プロテオミクス、siRNAおよびmicroRNAが関わる肝毒性の事象の評価研究のために、遺伝子の網羅的な発現変動に関する基礎的検討を行った。すなわち、薬物誘導性肝障害に関わる候補遺伝子の特定とバイオマーカーとしての評価およびDNAマイクロアレイのデータの活用法を検討した。典型的な肝障害性化合物5種類をそれぞれラットに投与し、DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、肝障害性に関係すると考えられる遺伝子を特定した。さらに、化合物に特徴的な遺伝子の動きを探り、投与量に依存しないで変動するパターンを特定した。次に、これらの中からチオアセタミドについて詳しく検討し、バイオマーカーの候補となる遺伝子の、時間依存的および投与量依存的変化の評価を行い、さらに、投与量に依存しない肝障害性のパターンの抽出を行った。この結果より、特定の蛋白質およびRNAの発現制御を行った場合において肝障害性を評価できる可能性が示された。さらに、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。

(8) CYP1B1のマイクロRNAによる発現制御と毒性。

薬物代謝酵素であるCYP1ファミリーの一分子種であるCYP1B1は肝臓にはほとんど発現せず、主に卵巣、子宮、乳腺などステロイド関連組織に発現している。CYP1B1は様々な癌原物質の代謝的活性化およびエストロゲンの4位水酸化反応を触媒し、生成した代謝物はDNAに結合することから発癌と関連している。正常部位に比べ腫瘍部位でCYP1B1が高く発現していることが知られている。CYP1B1は腫瘍組織においてタンパクレベルでの過剰発現が認められるが、mRNAレベルでは大きく変化しないことが報告されてい

ることから何らかの転写後調節を受けていることが考えられる。そこで本研究ではヒト *CYP1B1* 遺伝子の発現がマイクロ RNA (miRNA) によって制御されているか検討した結果、*CYP1B1* は miR-27b によって転写後調節をされていることを見出した。miR-27b を競合的に抑制すると、*CYP1B1* タンパク量は、細胞レベルで約 2 倍に増加した。さらに、miR-27b は乳腺組織に高く発現していることから、乳癌患者 24 名の組織について検討した結果、*CYP1B1* タンパクの発現が低い組織では miR-27b の高い発現が認められたが、*CYP1B1* タンパクの発現が高い組織では miR-27b の発現量が有意に低く、逆相関が認められた。このとき *CYP1B1* mRNA と miR-27b の発現量には相関関係は認められた。これより乳腺において *CYP1B1* の発現が miR-27b により翻訳段階で制御されることが示唆された。本研究により、マイクロ RNA が薬物代謝酵素の転写後調節に大きな役割を果たしていることを始めて明らかにできた。

(9) 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)本研究では、 γ -GCSに注目した。ノックアウトにおいて胎生致死を示す遺伝子であるが、活性部位である γ -GCSのcatalyticサブユニットを、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することにより、GSHの合成を抑制す

ることを検討した。これにより、*in vitro* および *in vivo* でGSH合成を阻害し、GSH量およびGST活性を減少させた細胞実験系、またはラットを用いたモデル動物実験系を作成し、GSH抱合およびGSHによって解毒される薬物の毒性発現のメカニズムの解明や、薬の活性代謝物による肝毒性を高感度に予測する系を確立することを目的とした。アデノウイルスによるshRNA導入法を用いてラット肝癌由来細胞中においてGSH合成を減少させる検討を行った。さらに本研究では、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) 本研究では、ヒトにおける活性代謝物による毒性を高感度に予測するため、ヒト肝において最も発現量が多い CYP3A4 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP3A4) を作製し、AdGCSh-shRNA と共に、ラット肝癌由来 H4IIE 細胞に感染させ、細胞内における CYP3A4 発現およびグルタチオン減少が最も効率的な *in vitro* における感染条件の検討を行った。それによりヒトでの毒性予測が可能な *in vitro* 実験系を構築することを目的とした。

(4) 特異体質性薬物肝障害を惹起することで有名な糖尿病薬であるトログリタゾンを中心にプロテオミクスを駆使して、肝障害に関わる蛋白を見出すことを目的とした。さらに、その機能を明らかにするために、当該蛋白の発現を siRNA によってノックダウンし、毒性発現への影響を明らかにすることを目的とした。

(5) 肝障害と薬物排泄の関係に注目し、ラットにおいて未変化体で主に胆汁排泄され、さらに代謝を受けない CMZ を指標薬物として、薬物排泄に及ぼす肝障害の影響を明らかにすることを目的とした。四塩化炭素を投与した肝障害モデルラットを用いて、肝障害による尿糞中排泄率の変動および血清中薬物濃度の変化を検討した。さらに、DNA マイクロアレイを用いて肝トランスポーターの網羅的発現変動解析を行った。

(6) CYP3A4 の代謝的活性化による細胞

障害性に関する検討として、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。

(7) プロテオミクス、siRNA および microRNA によって検討を予定している肝毒性の事象の評価研究のために、遺伝子の網羅的な発現変動に関する基礎的検討を行う必要がある。すなわち、薬物誘導性肝障害に関わる候補遺伝子の特定とバイオマーカーとしての評価および DNA マイクロアレイのデータの活用方法を検討し、肝毒性を評価できるアルゴリズムを明らかにする。さらに、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。

(8) CYP1 ファミリーの一分子種である CYP1B1 は様々な癌原物質の代謝的活性化およびエストロゲンの 4 位水酸化反応を触媒し、生成した代謝物は DNA に結合することから発癌と関連している。ほとんどの組織において正常部位に比べ腫瘍部位で CYP1B1 が高く発現していることも知られている。一方、microRNA (miRNA) は近年発見された翻訳されない小分子 RNA であり、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に結合することで翻訳抑制や mRNA の分解を引き起こす。いくつかの miRNA は腫瘍形成に関与することが報告されているが、その標的遺伝子が不明のものがほとんどである。CYP1B1 は腫瘍組織においてタンパクレベルでの過剰発現が認められるが、mRNA レベルでは大きく変化しないことが報告されている。ことから何らかの転写後調節を受けていることが考えられる。そこで本研究ではヒト *CYP1B1* 遺伝子の発現が miRNA によって制御されているか検討し、マイクロ RNA と毒性との関わりを今後幅広く研究するための第一歩とした。

(9) 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 9 項目を中心に研究を進めた。

B. 研究方法

○ AdGCSH-shRNA および AdLuc-shRNA の構築、GCSH-shRNA および Luc-shRNA の pAxcwit ベクターへの組み換え、肝癌由来細胞に対する AdGCSH-shRNA 感染、AdGCSH-shRNA 感染 H4IIE 細胞へのトログリタゾンと APAP の処理、ラットへのアデノウイルスの投与、APAP 抱合活性の測定、コロニー PCR によるインサート DNA の確認方法、プラスミド DNA の大量調製、シーケンス解析、アデノウイルスベクターのトランスフェクション法、1 次ウイルスの作製、2 次ウイルスの作製、3 次ウイルスの作製、4 次ウイルスの作製、組み換えアデノウイルスの確認、アデノウイルス液の大量調製、アデノウイルス液の力価測定、ラット肝ミクロソームおよびサイトソルの調製、タンパク定量、総 GSH 含量の測定、総 P450 含量測定、AST および ALT 値測定、総ビリルビン濃度測定、GST 活性測定、SDS-PAGE と Western blot 分析などの手法を用いて研究を実施した。SOD2 についても同様の手法でおこなった。ヒト CYP3A4 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。

○ AdCYP3A4 の構築、CYP3A4 遺伝子の pAxCawtit ベクターへの組み換え、テストステロン 6 β 水酸化酵素活性の測定、

Real-time PCR、コロニーPCR、プラスミド DNA の大量調製、シーケンス解析、AdCYP3A4 アデノウイルスのトランスフェクション法、1次ウイルスの作製、2次ウイルスの作製、3次ウイルスの作製、4次ウイルスの作製、組み換えアデノウイルスの確認、アデノウイルス液の力価測定、H4IIE 細胞へのアデノウイルスの感染、グルタチオン含量の測定、CCK アッセイなどの手法を用いて研究を実施した。

○ヒト肝癌由来 HepG2 細胞の培養、細胞生存率の測定法、肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討などの手法を用いて研究を実施した。

○肝障害ラット作製、肝障害ラットにおける CMZ 排泄試験、HPLC による CMZ 定量、DNA マイクロアレイによる肝トランスポーター遺伝子の発現解析、RT-PCR 法による肝トランスポーター mRNA 発現量の定量などの研究を実施した。

○ヒト肝癌由来 HepG2 細胞およびヒト肝初代培養細胞を用いて、トログリタゾンまたはロジグリタゾンを 0, 25, 50, 75 マイクロ M で 48 時間暴露した。細胞溶液を 2次元電気泳動で分離し、ゲルをタンパク染色後、スポットの変化を比較検討した。トログリタゾン暴露依存的に変化するスポットのアミノ酸配列分析を行い、さらに、当該蛋白質を siRNA を用いてノックダウンし、細胞毒性に及ぼす影響を検討した。自己抗体の検討については、Western ブロット、イムノブロットを使用

し、同定したスポットのタンパク質の配列を解析した。さらに当該タンパク質に対する自己抗体について、肝障害の患者および健常人の血清について検討した。

○6週齢雄性 SD ラットを用い、アセトアミノフェン、プロモベンゼン、四塩化炭素、ジメチルニトロソアミンとチオアセタミドをそれぞれ単回投与した。血清学的な生化学値は、投与後の肝障害性を示す時間を知るために測定した。肝 mRNA は、1097 の薬物反応性遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイを用いて、遺伝子の発現プロファイルを検討した。このアレイにはチトクロム P450 を初めとする Phase I の酵素の遺伝子、Phase II, 核内受容体、シグナル伝達遺伝子、トランスポーターなどが搭載されている。Quality-Threshold (QT) クラスタ解析により、個々の化合物による特徴的な遺伝子の発現変化を見出す。さらに、チオアセタミドを代表的な肝毒性化合物として用い、肝障害性のフェノタイプと特定の遺伝子の発現プロファイルの変化との相関を詳細に検討した。チオアセタミドは腹腔内に高用量 (400 mg/kg)、中用量 (150 mg/kg)、低用量 (50 mg/kg) を各群 4 匹、投与後の時間を 6, 12, 24, 36, 48 時間で検討した。

○マイクロ RNA による影響を評価するため、pGL3-promoter のルシフェラーゼ遺伝子下流に当該のマイクロ RNA と完全に相補的な配列を組み込んだプラスミドを構

築した。当該のマイクロ RNA と相同性の高い配列を 3 つおよび 6 つ直列に連結した配列を構築した。これらのプラスミドを phRL-TK とともに、Tfx-20 を用いて MCF-7 細胞に、lipofectamine 2000 を用いて Jurkat 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。阻害用アンチセンスオリゴリボヌクレオチド (AsO) の MCF-7 細胞へ導入した。マイクロソーム画分を用いて SDS-PAGE を行い、ウサギ抗ヒト CYP1B1 抗体およびビオチン化抗ウサギ IgG と反応させた後、CYP1B1 タンパク質の発現量を解析した。また CYP1B1 の酵素活性を測定した。

(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ミクロソーム、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。ただし、マイクロ RNA の研究において乳癌患者の試料を用いている。これについては、金沢大学医の倫理委員会の承認を得た後、患者に書面による同意書を得て研究に供している。

C. 実験結果

(1) GCSH をノックダウンするショートヘアピン RNA 配列を組み込んだアデノウイルス (AdGCSH-shRNA) を構築し、ラット、マウスおよびヒト肝癌由来細胞を用いて、ノックダウン効果および薬物暴露の検討を行った。次に、8 週齢の雄性 F344 ラットに AdGCSH-shRNA を投与し、アセトアミノフェン (APAP) による肝障害への影響を検討した。その結果、dGCSH-shRNA 感染によって、ラットおよびマウス由来細胞においては GCSH mRNA が約 80% 減少した。一方、細胞内総 GSH 含量の減少はラット由来 H4IIE 細胞で約 50% の減少が認められ、次に、H4IIE 細胞に対してアデノウイルス感染を行い、mRNA は感染後 3 日目において MOI 20 感染で、最大 85% の減少が認められ、GCSH タンパク質は 3 日目で 75% の発現量の減少が認められた。細胞内総 GSH 含量は MOI 20 感染では 42% の減少が認められた。さらに、AdGCSH-shRNA を感染させた H4IIE 細胞に対して APA を処理し、細胞生存率を対照群と比較検討した。結果として、AdGCSH-shRNA 感染群は、対照群と比べ細胞生存率に有意な差は認められなかった。次に、AdGCSH-shRNA をラット in vivo 投与で検討した。GCSH mRNA は対照群と比べ 8×10^{11} PFU/mL/body 投与では最大で 95% 減少し、投与量依存的な mRNA の減少が認められた。mRNA の減少と同様に、AdGCSH-shRNA 投与量依存的に肝

総 GSH 含量は減少し、最大で約 80%減少した。GSH 減少ラットに対して APAP を 1,000 mg/kg 単回経口投与したところ、投与 24 時間後において、AST および ALT 値が対照群に比べ有意に上昇した。さらに、肝組織像からは中心静脈周囲の肝細胞壊死が確認できた。さらに、今回作成した GSH 減少ラットは、約 80%の総 GSH 含量の減少が認められてから、2 週間の間（投与後 4 週目まで）、ラット肝総 GSH 含量の 70%の減少を保ち、3 週間の間（投与後 5 週目まで）50%の減少を保っていた。さらに、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) 作成した AdCYP3A4 のウイルス力価は、AdGCSH-shRNA と比較して約 10 倍低いという結果となった。AdCYP3A4 の MOI 依存性テストステロン 6 β 水酸化酵素活性の変動を測定し、MOI 10, 20, 40 で顕著なテストステロン 6 β 水酸化酵素活性の上昇が見られた。AdCYP3A4 を MOI 10 で感染させた。感染後 1, 2, 3, 5 日目に 100 μ M テストステロンを処置後、細胞培養液を抽出しテストステロン 6 β 水酸化酵素活性を測定した。その結果、感染 3 日目において最も高いテストステロン 6 β 水酸化酵素活性が認められた。感染 5 日目においては、細胞の状態が悪くなっていたため、活性値は減少したと考えられる。トログリタゾン暴露による細胞障害性の変化を測定した結果、コントロールと AdCYP3A4 感染において、トログリタゾン濃度依存的な細胞生存率の低下を示し、それに対

し AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA の同時感染群は、トログリタゾン 50 μ M において、コントロール群および AdCYP3A4 感染群と比べ、約 25% の有意な細胞生存率の低下を示した。

(4) ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いて、トログリタゾンまたはロジグリタゾンを 0, 25, 50, 75 μ M で 48 時間暴露した。2 次元電気泳動で分離し、ゲルをタンパク染色後、スポットの変化を比較検討した。分子量 75 kDa で pI 5.0 のスポットが、トログリタゾン暴露 50 と 75 μ M で最も発現増加が認められた。このスポットのアミノ酸配列分析を行った結果、そのほとんどが immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) であり、少量の protein disulfide isomerase related protein (PDHrp) も混在していた。イムノプロットの結果、BiP タンパク質は、トログリタゾンの暴露濃度依存的に発現増加し、ロジグリタゾンの暴露によっては、少しの発現増加にとどまった。この結果は、BiP タンパク質の mRNA の変動と一致した。しかし、PDHrp ではいずれの変化も認められなかった。この BiP の発現増加がトログリタゾン誘導性肝細胞傷害性に及ぼす影響を検討するために、HLE 細胞を用いて、BiP siRNA の検討を行った。その結果、BiP siRNA の導入はトログリタゾンによる細胞毒性を増悪させる結果となった。また、トログリタゾン由

来肝障害患者の血清中に肝障害に関連する自己抗体の産生の有無を検討した。40 歳と 70 歳の 2 名の女性患者が、トログリタゾン 1 日投与量 400 mg/day で、それぞれ 23.5 週と 16 週で ALT の顕著な上昇を認めた。イムノプロットおよび 2 次元電気泳動法を駆使して、患者血清中にアルドラーゼ B に対する強い抗体を両患者に認めた。この抗体は、薬物投与を中止後も、高いタイターを保ち続けた。この抗体がトログリタゾン投与患者特異的なものか否かについて、慢性肝障害患者血清 40 検体、肝硬変患者血清 40 検体および健常人血清 80 検体について ELISA を用いて検討した。その結果、いずれの患者でもアルドラーゼ B に対する自己抗体が認められ、健常人に比べて前者で $P < 0.05$ 、後者で $P < 0.001$ という有意を示した。

(5) 四塩化炭素の連続投与により、様々な AST、ALT 値を示す肝障害ラットが得られた。正常ラット (AST 値 < 50 IU/L、ALT 値 < 25 IU/L) においては、CMZ は回収量の 72% が糞中に、28% が尿中に排泄された。しかし、AST や ALT 値の上昇に伴い、CMZ の尿中排泄率の増加および糞中排泄率の低下が認められた。特に、AST 値 50 - 600 IU/L および ALT 値 25 - 200 IU/L の範囲において、CMZ 排泄率が大きく変化した。AST 値 > 600 IU/L および ALT 値 > 200 IU/L を示した重度の肝障害群では、CMZ は主に尿中 (92%) に排泄された。また、

四塩化炭素を 14 日間休薬し、AST や ALT 値が正常に戻った休薬群では、重度の肝障害群と比較して、CMZ 尿中排泄率が低下、糞中排泄率が増加し、正常ラットの排泄率に戻る傾向が示された。重度の肝障害群では、CMZ の AUC が正常ラットの約 2 倍であり、有意に高値を示した。DNA マイクロアレイによる肝トランスポーターの発現変動解析の結果、四塩化炭素誘導性肝障害ラットにおいて、血管側 SLC トランスポーター遺伝子の発現低下および血管側 ABC トランスポーター遺伝子の発現増加が認められた。また、Mdr1 を除いた胆管側の ABC トランスポーターは低下する傾向が認められた。CMZ は、ヒトでは尿中に、マウスでは糞中に主に排泄される。

(6) 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。

(7) 薬物反応性遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイを用いて検討の結果、個々の化合物はそれぞれ特徴的な遺伝子発現のプロファイルを示した。アセトアミノフェンは他の化合物とは異なるクラスターに分類された。遺伝子発現プロファイルと毒性を示す時間を考慮して、10 個の

発現が誘導される遺伝子と、10 個の発現が抑制される遺伝子と共通して pick up することが出来た。これらは肝障害に共通するマーカー遺伝子と考えられた。Quality-Threshold (QT) クラスタ解析により、個々の化合物による特徴的な遺伝子の発現変化を見出すことができた。興味深いことに、QT クラスタ解析における平均遺伝子変化は、生化学値と一致した変動を示した。さらに、この変動は、肝障害性の大小に係わらず同じパターンを示した。こうした解析を考慮し、本研究では、17 の遺伝子を肝障害性に関係する遺伝子として示すことができた。さらに、チオアセタミドを代表的な肝毒性化合物として用いて、DNA アレイで検討した結果、進化樹的クラスタリングによって、6 と 12 時間と、24、36 と 48 時間の 2 つの群に分けることが出来た。この初期段階のクラスターと後期のクラスターは、時間依存的にも、投与量依存的にも分けることができた。一方、主たる遺伝子の QT クラスタリングでは、血清学的な値の最大値を、遺伝子変化のプロファイルから予測することができた。また、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。

(8) CYP1B1 mRNAs の構造と miR-27b 認識配列について；全長 5.2 kb のヒト CYP1B1 mRNA は 3' 非翻訳領域末端 40 b 程度の領域に高い相同性が認められ、この領域が miR-27b と相補的であることを見出した。miR-27b の発現量とルシフェラーゼアッセイによる MRE27b の機能評価について；MCF-7 細胞に発現している miR-27b の機能を阻害するため miR-27b に対するアンチセンスオリゴリボヌクレオチド (AsO) を導入したところ、内因性の miR-27b により抑制されていた活性の回復が認められた。一方、miR-27b の発現が低い Jurkat 細胞では内因性の miR-27b による影響が認められず、precursor miR-27b の導入により MRE27b を組み込んだプラスミドにおいて顕著な活性の低下が認められた。miR-27b の阻害による内因性 CYP1B1 タンパク発現への影響について；MCF-7 細胞に内因性に発現する CYP1B1 が miR-27b により制御されているか検討した。miR-27b に対する AsO を導入したところ miR-27b の発現の低下を認め、一方で CYP1B1 タンパク発現量の増大が認められた。また、酵素活性も AsO の濃度および時間依存的に上昇することを明らかにした。乳腺組織における miR-27b の発現量と CYP1B1 タンパクの発現量の関連について；乳癌患者 24 人より提供戴いた乳癌組織および近接する正常組織を用いて CYP1B1 および

miR-27b の発現量の関連について評価した。その結果、24 検体すべての乳癌組織において CYP1B1 抗体により癌の部位で細胞質が染色され、CYP1B1 タンパクの発現が認められた。次に正常組織および腫瘍組織における miR-27b の発現量の評価を行った (Fig. 4E)。Real-time RT-PCR により評価した precursor miR-27b の発現量は、正常組織に比べて腫瘍組織で有意に低いことを明らかにした。これより乳腺において CYP1B1 の発現が miR-27b により翻訳段階で制御されることが示唆された。

(9) 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。アデノウイルスを用いたラット *in vivo* におけるノックダウン技術の確立は本研究が始めてであり、ノックアウトの作成が困難であるラットにおいて簡便な遺伝子発現調節技術を提唱することができた。種差に起因する薬物誘導性肝障害は、新薬開発において大きな障害となり、その予測は非常に重要である。本研究では GSH 減少モデルラットを用いた肝毒性評価の検討から、肝毒性予測の可能性を検討したものである。さらに、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。本研究ではラット 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つ

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。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) アデノウイルスを用いた CYP3A4 の発現と薬物誘導性細胞障害。近年、薬物性肝障害が大きな問題となっているが、メカニズムとして代謝的活性化が注目されている。薬物代謝を担う重要な酵素である CYP は、ヒト初代培養肝細胞やヒト肝がん由来細胞で極めて発現量が低い。そのため、代謝的活性化を予測することは極めて難しい。本研究ではヒトにおける代謝的活性化を予測することを目的に