

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 Kyo* **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.

【資料 2】 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 (Boelsterli 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(Ong 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、Tuschl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。シーケ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'-ggccgcttccaaaaaCAAGGGAGATGT

TACAACtcaagcttcAGTTGTAACATCT
CCCTTGg-3'

配列 B

Top strand:

5'-gatccCCACATATGTGTAAGCATAg
aagcttgTATGCTTACACATATGTGGttt
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

ベーションし、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

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 μL と、5% FBS-DMEM 500 μL 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% 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 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 cm^2 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 μL 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% 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 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 μL 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。Hepa1-6 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、 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 mm² である。24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり面積は 2.0 cm² 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 2×10^5 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 μ L を加え、プレートを数回ゆつくりと振と

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% 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 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 6×10^5 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 μ L を加え、プレートを数回ゆつくりと振とうさせ、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% 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 1.8 mL を加え、72 時間後に細胞を回