

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 $\beta$ 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  $\mu$ 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 $\beta$  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  $\mu$ L にジクロロメタン 4 mL、精製水 500  $\mu$ L、内部標準物質として 100  $\mu$ M のコルチコステロン 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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)、カラムオーブン(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  $\mu$ 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  $6 \times 10^3$  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 回繰り返す、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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  のク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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{g}$ 、ランダムヘキサマー (150 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$  に DEPC 処理精製水を加えて全量を 23  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、2.5 M dNTP 8  $\mu\text{L}$ 、ReverTraAce (100 units/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$  を加えて全量を 40  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、2 × SGI 溶液を 12.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  SOD2 forward primer および SOD2 reverse primer を 1  $\mu\text{L}$ 、滅菌水 9.5  $\mu\text{L}$  を加えて全量を 25  $\mu\text{L}$  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 Cycloer™ 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  $\mu$ L 加え、回収した細胞を 1 $\mu$ g apply し、10 mM のシアン化カリウムを 10  $\mu$ L 加えた。その後 xanthine oxidase 溶液を 20  $\mu$ 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・ダプソン溶液・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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L を加えた。処置後 24 時間後にジヒドロエチジウムが 10  $\mu$ 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。

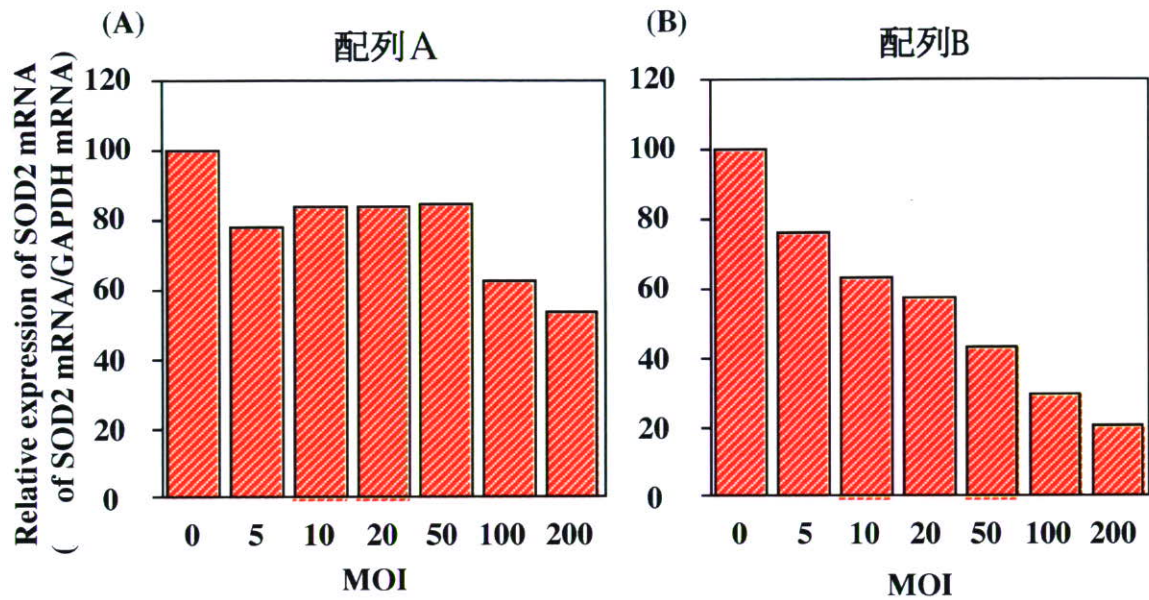


Fig. 1. MOI-dependent knockdown effect of sequence A (A) and sequence B (B) -AdSOD2-shRNA in BRL3A cells. Data are mean of two independent experiments.

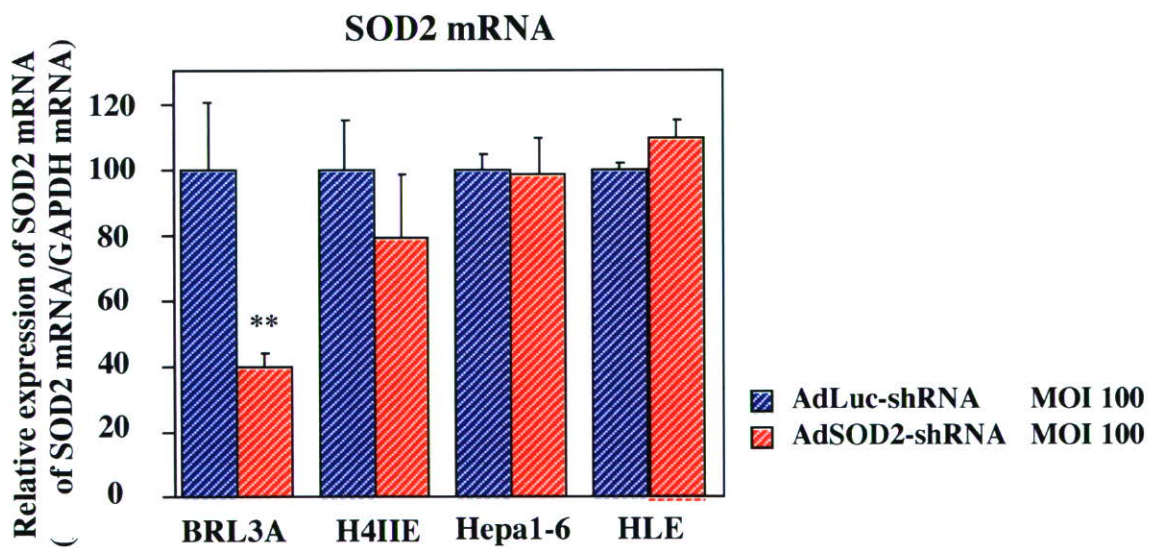


Fig. 2. Changes of SOD2 mRNA expression in various hepatic cell lines. Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P < 0.01$  compared with AdLuc-shRNA infected groups.

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 H4II 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 Hepal-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 $\beta$ 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 $\beta$  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。

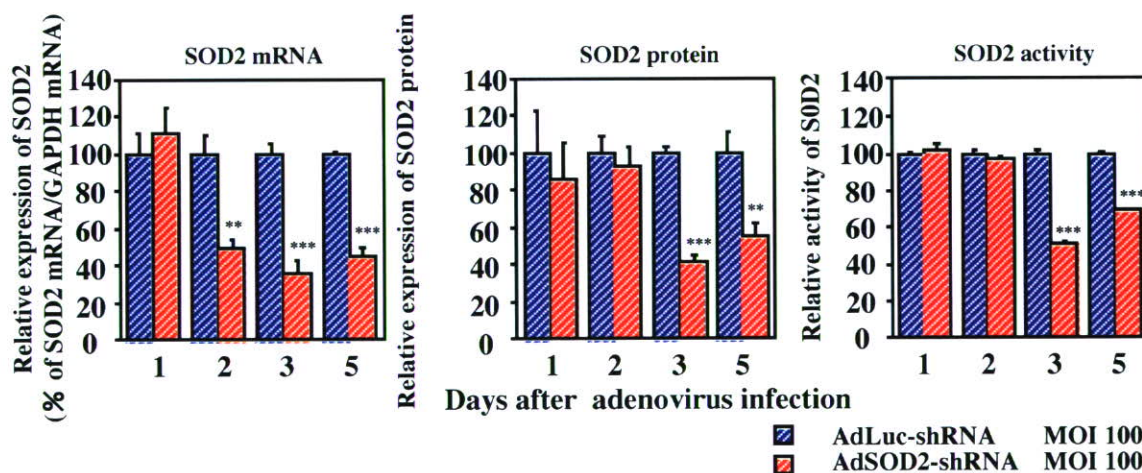


Fig. 3. Time dependent knockdown effect of AdSOD2-shRNA in BRL3A cells. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 compared with AdLuc-shRN A infected groups. SOD2 activity was measured using water soluble tetrazolium as a substrate.

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

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

AdCYP3A4 および AdSOD2-shRNA

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  $\mu$ 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。

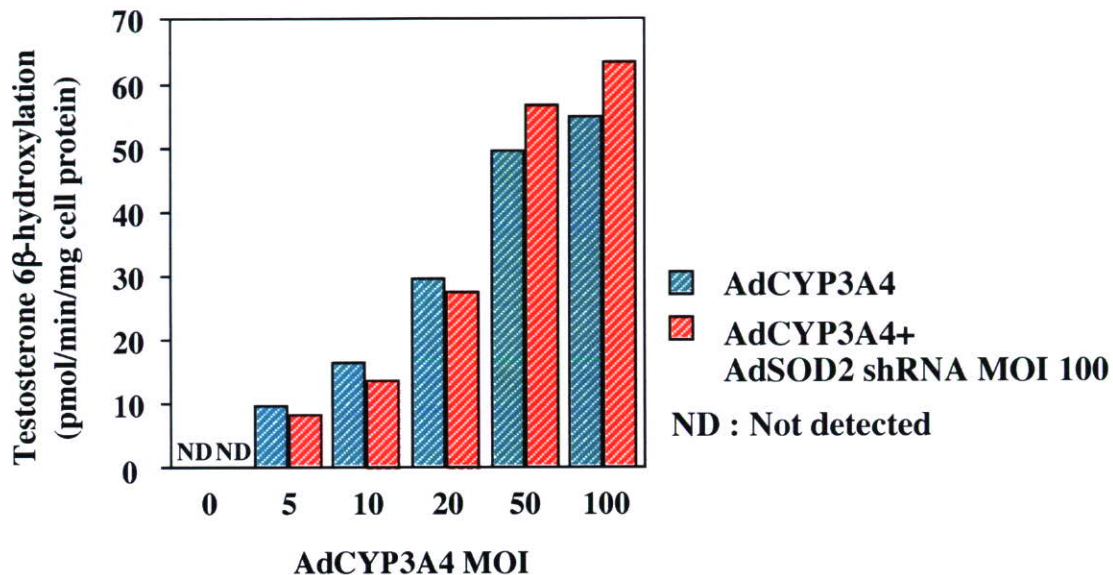
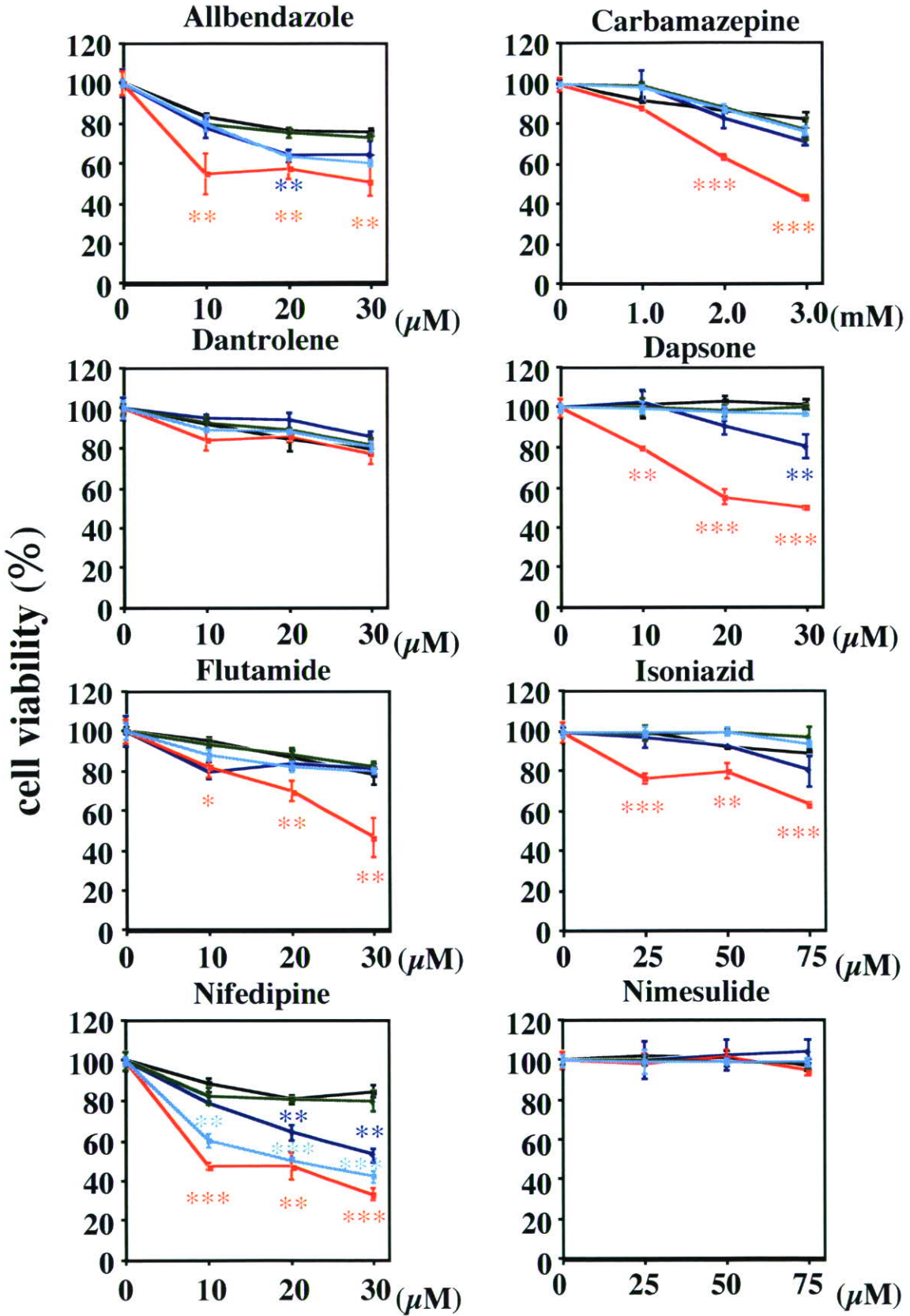


Fig. 4. AdCYP3A4 MOI dependent effect of CYP3A4 activity in BRL3A cells. Data are mean of two independent experiments.

また AdCYP3A4 + AdLuc-shRNA 感染群において、30  $\mu$ 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  $\mu$ 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

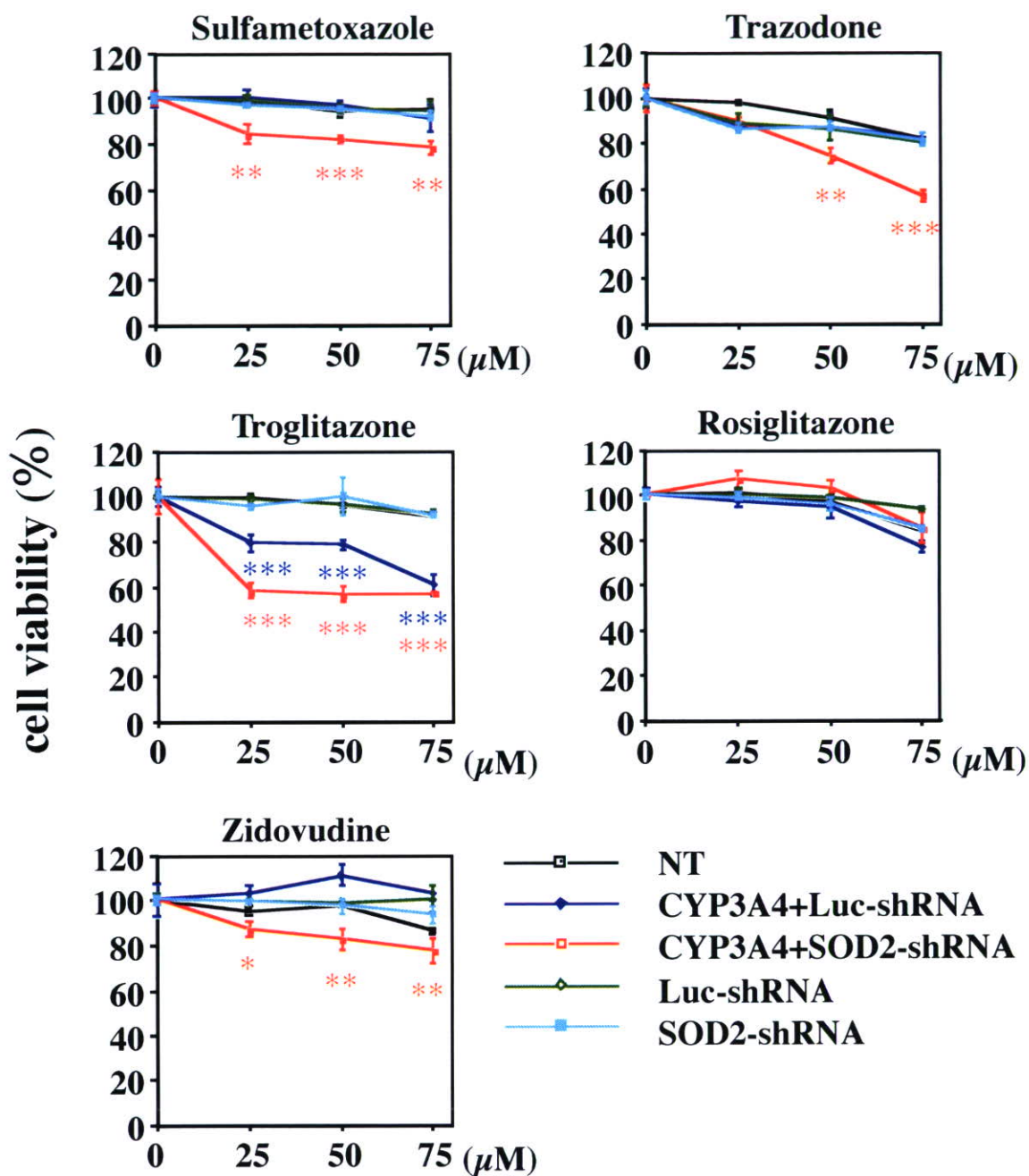


Fig. 5. MTT assay in adenovirus infected BRL3A cell2 after 24 hour exposure to various drugs. Cell viability is expressed as percentage of solvent treated cells.

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M および 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

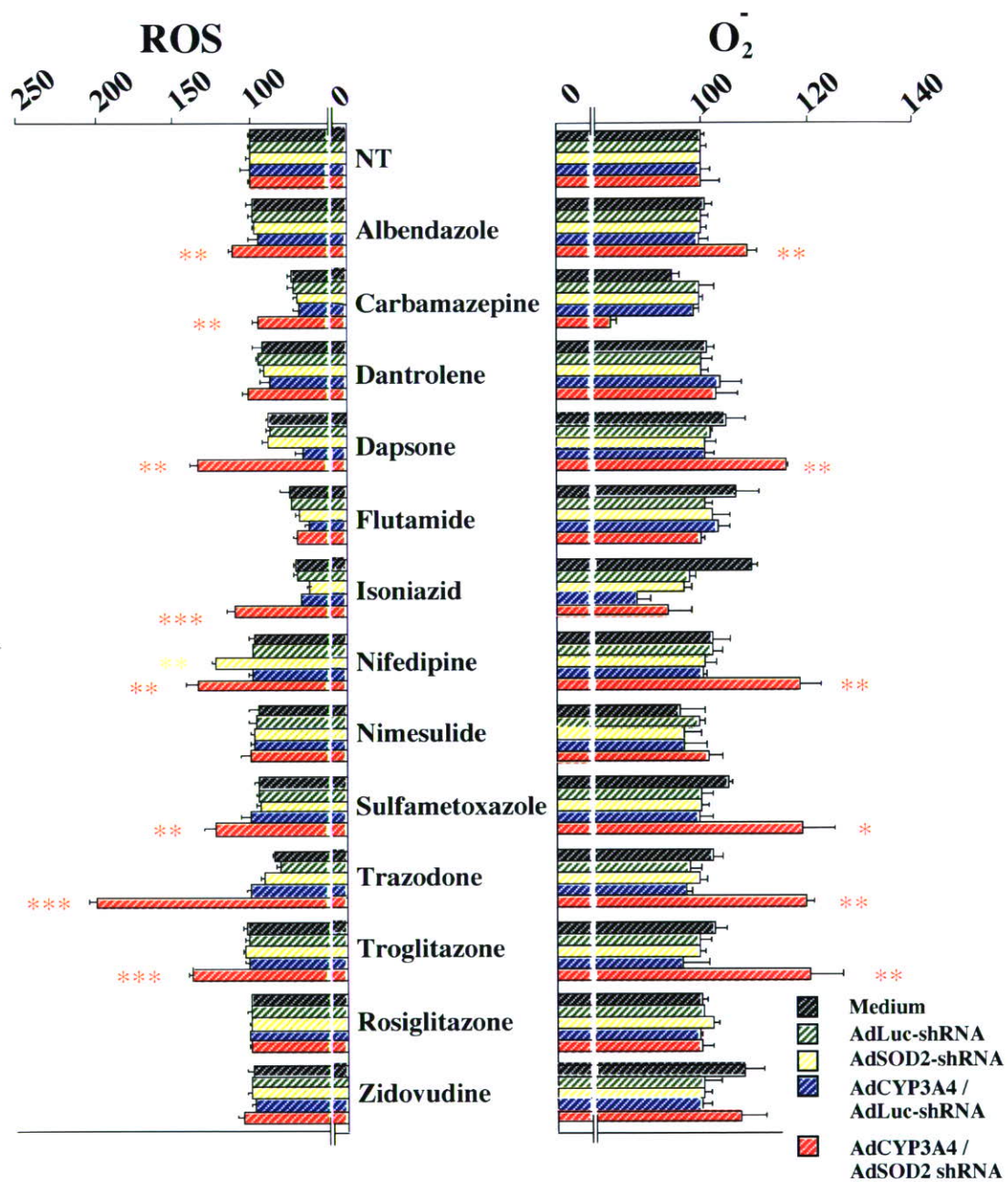


Fig. 6. Changes of ROS and superoxide anion productions in adenovirus infected BRL3A cells after 24 hr exposure to various drugs. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with AdLuc-shRNA infected groups.

#### 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,