

200809002A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討
および予測評価試験系の開発研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討

および予測評価試験系の開発研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 21 (2009) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および予測評価試験系の
開発研究

横井 毅 ----- I

II. 分担研究報告

1. CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価

横井 毅 ----- 1

2. ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討

横井 毅 ----- 35

3. CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築

横井 毅 ----- 73

4. ハロタンによる肝障害誘導メカニズム

中島 美紀・横井 毅 ----- 107

5. ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割

中島 美紀 ----- 129

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 241

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 244

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討

および予測評価試験系の開発研究

平成 20 年度 総括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 21 (2009) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

統括研究報告書

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および

予測評価試験系の開発研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

研究要旨

前臨床における医薬品開発の大きな障害の一つは、ヒトにおける肝障害の発現が予測困難であることである。Phase I 臨床試験、または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が現在でも多く報告されており、製薬メーカーのみならず社会的損失は大きい。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可能にすることを目的とした。特にヒト肝臓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行うと共に、免疫学的な因子の解析とマイクロ RNA の関与についても検討を行った。申請者は平成 17 年～19 年度までの 3 年間の創薬基盤推進研究事業の補助を受けて、多くの研究成果を報告してきた。中でも主たる解毒系であるグルタチオンをヒトと同レベルまでノックダウンしたラットの作出に成功し、アセトアミノフェンによる肝障害を高感度に検出できることを 2007 年の *J Biol Chem* に報告し、特許も出願した。このラットの使用申し込みが多くの製薬会社から寄せられている。さらに、ヒトにおける主たる CYP である CYP3A4 が反応性代謝物の生成にも少なからず関与しており、さらに CYP3A4 活性の大きな個人差がマイクロ RNA に基因することも平成 19 年度の研究報告書において報告し、2008 年付けの *J Biol Chem* の論文として発表できた。今期の 1 年目にも引き続きさらなる研究成果をあげることができた。

培養細胞では CYP は全く発現していない。申請者は CYP3A4 をヒト肝と同レベルまたはそれよりも高く安定的に発現する細胞を作出した。通常のベクターの導入法では 1/10 程度の活性が得られるに過ぎないために、アデノウイルス系を用いた。反応性代謝物を生成する CYP3A4 以外の CYP 酵素の高発現にも適用した研究を今期に行った

(研究報告1および2)。この細胞を用いて、肝障害発現に関わるバイオマーカー/ターゲットを siRNA 法によって発現を制御することによって、ハイスループットで毒性機構解明とスクリーニング試験を可能にすることを確立した。すでに CYP3A4 によって生成された反応性代謝物の解毒経路を siRNA で制御し、簡便なスクリーニング系の構築に成功し、CYP3A4 が関わる活性代謝物のスクリーニング試験系の構築の研究をまとめることができ、現在論文を作成中である(研究報告3)。さらに、薬物誘導性肝障害発症における免疫学に関連する因子の探索と、そのメカニズムの研究を目的として研究を行い、ハロタンによる肝障害の発症には Th17 が関わっており、IL-17 に対する抗体およびプロスタグランジン E1 によって、そのメカニズムと治療方法を発見することができた(研究報告4)。本件は、2009年3月25日に特許出願することができた。同時に論文も投稿中である。また、さらに引き続き microRNA の毒性的関わりについての基礎的研究も行っており、CYP24 について研究をまとめることができた(研究報告5)。以上、3年計画の1年目である平成20年度には、以下の5項目について研究を行い、その結果当初の予定以上の成果を挙げることが出来た。(1) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価、(2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討、(3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築(4) ハロタンによる肝障害誘導メカニズム、(5) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割、について研究を完遂することができた。

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

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92%に達し、その原因の約60%は種差に起因するものであると言われている。平成20年度(3年計画の1年目)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) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価研究。CYP3A4 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP3A4) は本研究室において既に作製され、*in vitro*において培養細胞株にCYP3A4を過剰発現させることによる*in vitro*細胞障害試験系を構築している。そこで本研究では AdCYP3A4 に加え、CYP2C9 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP2C9) を新たに作製し、CYP2C9 および CYP3A4 を過剰発現させた *in vitro* 細胞障害試験系を構築することにより、CYP2C9 により肝障害性を示す薬物の代謝的活性化または解毒機能を明らかにすることを目的とした。

(2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討においては、肝発現量が高く、薬物や発がん性物質の代謝的活性化に関与する報告の多いCYP1A2およびCYP2E1を発現するアデノウイルス (AdCYP1A2 と AdCYP2E1) を作製し、RNAi により Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) をノックダウンしたヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞に

感染させ、*in vitro*において薬物がCYPによる代謝的活性化を受けて生成する活性代謝物の薬物誘導性肝障害を高感度に予測することを目的とした。

(3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築の研究においては、AdCYP3A4 と AdGCSh-shRNA をラット肝癌由来 H4IIE 細胞に同時感染させ、細胞内におけるCYP3A4発現およびGSH含量の減少が認められる実験条件の検討を行った。最適化された条件において、肝障害を惹起するとの報告がある薬物の細胞障害性を検討した。続いて、AdCYP3A4 を多くのヒト肝癌由来細胞に感染させ、CYP3A4 酵素活性の高発現が認められる細胞株を選び出し、肝障害を惹起するとの報告がある薬物の細胞障害性を検討した。ヒト肝癌由来細胞には siRNA を処置することでGSH含量を減少させた。こうした手法によりCYP3A4による代謝とGSHによる解毒の影響を見ることができ試験系を構築し、薬物の肝障害性への影響を比較検討した。さらに、idiosyncraticな肝障害を惹起する薬物の障害性をCYP3A4の代謝的活性化の有無という観点から評価した。さらに、従来試験系と比較してより細胞障害に対し

高感受性な試験系とすることを目的とし、多くの解毒酵素の遺伝子のノックダウンが及ぼす活性代謝物の細胞障害性への影響について検討した。

(4) ハロタンによる肝障害誘導メカニズムの研究では薬物によるアレルギー性肝障害の発症には他のいくつかの免疫性の疾患と同様に、Th1/Th2 サイトカインが関与しており、Th1/Th2 のバランスの個人差は肝障害のリスクファクターとなるという仮説を立て、それについて検証するために、アレルギー性肝障害を起こす典型的な薬物であるハロタンを肝障害の程度と免疫学的なバックグラウンドの異なる 2 種類の系統のマウスに投与し、Th1/Th2 サイトカインの産生能の変動等について評価した。さらに近年脚光を浴びている新たな Th 細胞サブセットである Th17 がハロタン誘導性肝障害に関与することを示唆する実験データが得られた。そこで Th1 および Th2 サイトカインの産生能の変動に加えて、ハロタン誘導性肝障害と IL-17 の関与についての検討も併せて行った。

(5) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割についての研究では CYP24 の過剰発現に miRNA による発現調節が関与しているか明らかにすること

を目的とした。種々の細胞株における CYP24 発現量および miR-125b の発現量を検討し、実験に用いる細胞株を決定した。次に、ルシフェラーゼ発現ベクターに CYP24 mRNA の 3' -UTR に存在する miR-125b 結合サイトを組み込んだプラスミドを作成し、ルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を検討した。さらに、内因性の CYP24 発現量への影響を検討するため、細胞の total cell lysate を用いたウエスタンブロッティングによりタンパク発現量を、培養細胞中での酵素活性を HPLC で測定し、活性に及ぼす影響について詳細に検討した。以上の 5 項目を中心に検討を進めた。

B. 研究方法

Short hairpin RNA (shRNA) の発現手法、ヒト CYP 3A4, CYP1A2, CYP2E1, CYP2C9 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、マウスを用いたハロタンの免疫毒性に関する研究手法や様々な研究手法は詳細に各分担報告書に記載をした。

(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。

C. 研究結果

(1) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価研究。CYP2C9 を発現するアデノウイルスベクターを作製し、発現系 (AdCYP2C9) を構築した。AdCYP2C9 を 2 日間感染させた HepG2 細胞のジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性値と CYP2C9 タンパク質の発現量を測定し、HepG2 細胞における至適 MOI の検討した。AdCYP2C9 感染において MOI 20 まで MOI 依存的なジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性と CYP2C9 タンパク質発現量の増加が認められた。一方、コントロールウイルスである AdGFP では MOI 20 においてもジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および CYP2C9 タンパク質の発現は認められなかった。ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性値は AdCYP2C9 MOI 20 で最大となったが、MOI 20 では顕微鏡での観察にお

いて細胞の状態が良好ではなかったため、MOI 10 が至適であると判断し今後の実験を行うことにした。ヒトヘパトサイトにおけるジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性は 0.0734~0.317 nmol/min/mg protein (Donato MT et al., 2004; Gomez-Lechon et al., 2001; Bort et al., 1999)と報告されており、AdCYP2C9 を MOI 10 で感染させた時、これらの値の 3 倍以上の十分高い活性値 (0.957 ± 0.070 nmol/min/mg protein) を示した。CYP2C9 で代謝的活性化を受けることが報告されているベンズプロマロン、チエニル酸およびジクロフェナクが CYP2C9 により細胞障害性が增强することを本試験系で示した。さらに、新たにロサルタンでは CYP2C9、チエニル酸では CYP3A4、アミオダロンでは CYP2C9 と CYP3A4 が毒性発現に関与し、テルピナフィンとフルバスタチンは CYP3A4 が毒性に関与するが、CYP2C9 により解毒されることを明らかにした。また、GST(グルタチオン S-転移酵素)などの解毒酵素を発現誘導する Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) をノックダウンすることによりさらに細胞生存率が低下したことから、Nrf2 の下流遺伝子の解毒への関与を明らかにし、同時に細胞障害性のより高感度

な検出を可能とした。

(2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討。肝発現量が高く、薬物や発がん性物質の代謝的活性化に関する報告の多い CYP1A2 および CYP2E1 を発現するアデノウイルス (AdCYP1A2 と AdCYP2E1) を作製し、RNAi により Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) をノックダウンしたヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞に感染させ、*in vitro*において薬物が CYP による代謝的活性化を受けて生成する活性代謝物の薬物誘導性肝障害を高感度に予測する系を構築した。その結果、アセトアミノフェン、トルカボン、クロザピンにおいて、CYP1A2 によって細胞障害性が高くなった。レスルノミドにおいては、CYP2E1 によって細胞障害性が高くなることを示した。その他の薬物 (デシプラミン、ピラジナミド、フェルバメート、ダプソン、ペモリン、メチルドパ、スルファメトキサゾール) では CYP1A2 および CYP2E1 による有意な細胞生存率の低下は認められなかった。これらの薬物では肝障害報告があるものの、CYP1A2 および CYP2E1 が毒性に関与するという報告は現在のところ存在しない。CYP1A2 や CYP2E1 は喫煙や食餌など様々な生理的条件により誘導される

分子種であり、様々な薬物や、発がん性物質の代謝的活性化に関する報告が多い。本研究では、アデノウイルスを用いて HepG2 細胞に CYP1A2 および CYP2E1 を発現させ、アセトアミノフェンやトルカボンの細胞障害性を感度良く検出できる *in vitro* 試験系を構築した。この試験系により、新たにフルタミドとレフルノミドの肝障害に CYP1A2 および CYP2E1 が関与することを見出した。

(3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築。ヒト肝に多く発現している薬物代謝酵素、CYP3A4 を肝特異的に発現するアデノウイルスを用い、ラット肝癌由来細胞、およびヒト肝癌由来細胞に発現させた。さらに、ノックダウンアデノウイルスや siRNA を用いた手法により細胞内 GSH 含量を減少させることで、肝障害報告がある種々の薬物の細胞障害性が増強されることを見出した。また、CYP3A4 による代謝的活性化の関与が報告されている薬物、報告されていない薬物を含め、idiosyncratic 肝障害の報告がある複数の薬物において CYP3A4 による代謝が細胞障害性の増強に起因していることを見出した。さらに 10 個の解毒因子が活性代謝物の解毒に及ぼす影響についても検討を行ったが、Nrf2 および GCSH のノックダ

ウンにより細胞障害性の増強が幾つかの薬物において認められ、活性代謝物の障害性に対してより高感度な試験系を構築することができた。

(4) ハロタンによる肝障害誘導メカニズムの研究では、ハロタンによる肝障害モデル動物の作成、肝組織像の評価および炎症や免疫に関連した遺伝子の発現変動について検討した。ハロタンに対し高い感受性を示す BALB/c マウスにおいて肝組織の障害、好中球の浸潤、Th1 と Th2 のバランスの変化および MIP-2 の発現の顕著な誘導が認められた。さらに、ハロタンによる肝障害に対する脾臓細胞の寄与を調べるために初代培養脾臓細胞の IFN γ および IL-4 の産生能の変化をマイトジェンに対する応答性を測定することで評価した。BALB/c マウスにおいて脾臓細胞の IFN γ および IL-4 の産生能はハロタンの投与によって減少することを示唆する結果となり、脾臓に由来するこれらサイトカインの肝障害に対する寄与は低いと考えられた。また、PGE $_1$ を BALB/c マウスに投与することで Th1 と Th2 のバランスや好中球の浸潤が変化し、肝障害の程度に影響が現れるかについて検討した。PGE $_1$ の投与によって肝障害の軽減、好中球の浸潤の抑制、変動していた Th1 と Th2 のバランスの回復および

MIP-2 の誘導の抑制が認められた。Th1 と Th2 のバランスおよび好中球の肝臓への浸潤については肝障害の発症に関わることが報告されて。IV 章ではハロタンによる肝障害に対する IL-17 の影響について検討した。抗 IL-17 抗体による IL-17 の中和は MIP-2 の発現を抑制し、肝障害を軽減することが明らかとなった。

(5) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割の研究では、最初に、コンピューター解析によって CYP24 mRNA の 3' -UTR に miR-125b が結合する領域 (MRE125b) が見いだされ、乳癌において CYP24 が過剰発現することおよび miR-125b の発現が低下することが報告されており CYP24 の発現調節における miR-125b の関与が考えられた。最初に、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞および MDA-MB-435 細胞、ヒト卵巣顆粒膜細胞癌由来 KGN 細胞、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞およびヒト胚腎由来 HEK293 細胞における CYP24 mRNA およびタンパク発現量、さらに miR-125b の発現量を調べた。その結果、CYP24 タンパク発現量と miR-125b の発現量との間に有意な逆相関関係が認められ、CYP24 は miR-125b によって転写後調節を受ける可能性が示された。次に、CYP24 の MRE125b に対して miR-125b が機能

的に作用するかどうかルシフェラーゼアッセイにより検討した。ルシフェラーゼ遺伝子の下流に MRE125b を含むさまざまな領域を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、miR-125b 陰性の MCF-7 細胞と miR-125b 陽性の KGN 細胞に導入した。KGN 細胞では内因性の miR-125b によるルシフェラーゼ活性の低下が認められ、MCF-7 細胞では pre-miR-125b を導入することにより同様に活性の低下が認められた。さらに、内因性の miR-125b を阻害するため KGN 細胞に miR-125b に対する AsO を導入したところ、ルシフェラーゼ活性の回復が認められた。これらのことから、CYP24 の MRE125b に miR-125b が機能的に作用することが明らかになった。さらに、miR-125b が内因性の CYP24 に対しても機能することを明らかにした。MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入することで CYP24 タンパクが減少し、KGN 細胞に AsO を導入することで CYP24 タンパクが増加した。このとき CYP24 mRNA の変動はタンパクとは異なる挙動を示したことから、CYP24 は転写後調節を受けたことが示され、miR-125b は内因性の CYP24 の発現調節に関与することが明らかになった。

D. 考察

(1) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価研究。本研究において CYP2C9 発現アデノウイルスを作製し、*in vitro* 細胞障害試験系を構築し、肝障害の報告がある薬物の細胞障害性について検討した。CYP2C9 で代謝的活性化を受けることが報告されているベンズプロマロン、チエニル酸およびジクロフェナクが CYP2C9 により細胞障害性が増強することを本試験系で示した。そして、新たにロサルタンでは CYP2C9、チエニル酸では CYP3A4、アミオダロンでは CYP2C9 と CYP3A4 が毒性発現に関与し、テルビナフィンとフルバスタチンは CYP3A4 が毒性に関与するが、CYP2C9 により解毒されることを明らかにした。また、GST などの解毒酵素を発現誘導する Nrf2 をノックダウンすることによりさらに細胞生存率が低下したことから、Nrf2 の下流遺伝子の解毒への関与を明らかにし、同時に細胞障害性のより高感度な検出を可能とした。今後、肝障害の報告があるその他の薬物についても検討する必要がある。しかし、生体内での細胞障害性を議論するときには、薬物濃度を考慮せねばならない。チエニル酸およびバルプロ酸以外の薬物においては本研究で検討した濃度よりも低い

代謝的活性化を受けると考えられるヒト肝において薬物は濃縮され実際の薬物濃度を測定することは困難であるため、*in vivo*への外挿には更なる検討が必要である。

(2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討。
CYP1A2 のプローブ活性であるメトキシレゾルフィン O-脱メチル化酵素活性値はヒトヘパトサイトでは 1.5 ± 0.3 pmol/min/mg protein と報告されており、MOI 20 で 2 日感染させた場合、ヒトヘパトサイトと比較して 10 倍程度高い酵素活性値を示した。CYP1A2 は遺伝的要因や環境的要因により、mRNA レベルで 40 倍、酵素活性レベルでは最大で 60 倍までの個人差が報告されているが、一般的には 5~15 倍の個人差であるとされている。ヒトヘパトサイトにおける酵素活性値を個人差の平均として考えると、最大で約 11 pmol/min/mg protein まで考えられ、本試験系における活性値が 14 pmol/min/mg protein であることから、CYP1A2 酵素活性の高いヒトの活性値と同程度であると考えられる。

CYP2E1 のプローブ活性であるクロルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性値はヒトヘパトサイトでは 127 ± 27 pmol/min/mg protein と報告されてお

り (Donato et al., 2006)、MOI 20 で 2 日感染させた場合、ヒトヘパトサイトと比較して 2.5 倍程度の酵素活性を示した。CYP2E1 酵素活性の個人差は約 3.6 倍であり、ヒトヘパトサイトでの活性値を個人差の平均として考えると、最大で約 230 pmol/min/mg protein まで考えられ、本試験系における活性値が 283 pmol/min/mg protein であることから、CYP2E1 酵素活性の高いヒトの活性値と同程度であると考えられる。薬物の細胞障害性をより高感度に予測・評価するためにアデノウイルス感染に加えて、siRNA により Nrf2 をノックダウンした試験系を用いて薬物による細胞障害性を検討した。検討薬物は CYP1A2 の基質認識サイトが 406 \AA^3 と比較的小さく、ナフトフラボンのような平面的な化合物を基質とすること、また CYP2E1 も基質認識サイトが 190 \AA^3 と CYP の中で最も小さいことから、肝障害が報告されている薬物の中でも比較的低分子量の薬物をターゲットとした。

本試験系において、アセトアミノフェン、トルカボン、クロザピンにおいて、CYP1A2 によって細胞障害性が高くなった。レスルノミドにおいては、CYP2E1 によって細胞障害性が高くなることを示した。デシプラミン、ピラジナミド、フ

エルバメート、ダブソン、ベモリン、メチルドバ、スルファメトキサゾールでは CYP1A2 および CYP2E1 による有意な細胞生存率の低下は認められなかった。これらの薬物では肝障害報告があるものの、CYP1A2 および CYP2E1 が毒性に関与するという報告は現在のところ存在しない。これらの薬物の肝障害発現メカニズムには CYP1A2 および CYP2E1 以外の代謝酵素が関与していることや、もしくは薬物自体が高濃度になることで細胞障害性を示すことが考えられる。また、本試験系では細胞障害性型の肝障害は評価可能だが、胆汁うっ滞型の肝障害を評価することは困難であることも、これらの薬物の肝障害を評価できなかったことの原因の一つであると考えられる。

(3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築。デシプラミンおよびテルピナフィン、CYP3A4 において細胞障害性の増強が認められ、さらに siGCSH、siNrf2 の同時処置において細胞障害性が増強された。それに対しトログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピンは AdCYP3A4 と siGCSH および siNrf2 の同時処置において初めて細胞障害性の増強が認められた。従って、デシプラミンおよびテルピナフィン処置では、GCSH

や Nrf2 による解毒の寄与が他の4薬物よりもより強く認められているのではなく、CYP3A4 による代謝物の障害性がより強く見出されるという結果となった。なお、siGCSH と AdCYP3A4 の同時処置が HepG2 細胞における CYP3A4 酵素活性の発現、細胞内 GSH 含量の減少に影響しないことは Fig. 6 で示しているが、siNrf2 と AdCYP3A4 の同時処置においても、ウイルス感染2日目で CYP3A4 酵素活性が十分に発現していること(テストステロン6 β 水酸化酵素活性として781 pmol/min/mg)、Nrf2 mRNA は71%、Nrf2 タンパク質は66%発現量が低下していることを確認済みである。

細胞障害性の検討では、HepG2 細胞に siRNA を10 nM で72時間処置した時点において薬物処置を行っている。この時点で、Nrf2 mRNA は70%程度減少しているが、その影響がGCSH、TRX2、SOD2、HO-1、GPX1、CATのmRNA発現量に影響を与えているかについて検討した。その結果、scramble siRNA を10 nM で72時間処置したサンプルでの発現量を1として相対的に比較した場合、GCSH mRNA は1倍、TRX2 mRNA は0.53倍、SOD2 mRNA は2.3倍、HO-1 mRNA は0.59倍、GPX1 mRNA は1倍、CAT mRNA は0.12倍であった。Nrf2はGCSH、

TRX2、SOD、HO-1、GPX1、CAT等の発現調節に関わることが知られている、本検討においても他の遺伝子 mRNA 発現に変動が見られた。ただし、Nrf2 周辺遺伝子の発現に対する効果は、種々の Nrf2 活性化剤、Nrf2 ノックダウンレベル、またはノックアウト等の影響によって異なる。従って、今回 Nrf2 減少状態にある HepG2 細胞で細胞障害性が增强されるという背後には、Nrf2 減少状態下で種々の薬物および CYP3A4 による活性代謝物が暴露されることに起因する複雑な遺伝子発現変動があると考えられる。

(4) ハロタンによる肝障害誘導メカニズムの研究では、BALB/c マウスと C57BL/c マウスとではハロタン誘導性肝障害の発症に系統差があり、感受性を示す BALB/c マウスにおいて特に Th1 と Th2 の応答性が Th2 にシフトしている可能性があることを示してきた。しかし Th2 の応答が優位であるにも関わらず、Th1 によって産生すると言われている TNF α の肝臓における mRNA の発現はハロタンを投与した BALB/c マウスにおいて誘導される傾向にあり、Th1 以外の細胞による TNF α の発現が誘導されることが示唆された。TNF α が MIP-2 の誘導に関与することが報告されており、本研究において TNF α の下流の因子につ

いては検討を行っていないが、ハロタンを投与することで見られた TNF α の誘導は BALB/c マウスと C57BL/6 マウスにおいて同程度であり、MIP-2 の顕著な誘導は TNF α のみでは説明することはできないと考えられた。そこで本章では TNF α を発現し、IL-17 を介して MIP-2 を含む様々なケモカインの誘導に関与する Th17 について検討を行った。

次に ELISA のよる肝臓中および血漿中の IL-17 タンパク質の検出を行い、BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスに対してハロタンを投与することによる変動を検討した。肝臓において IL-17 タンパク質が非常に高濃度に存在している、または肝臓中に ELISA による測定に影響を与える物質があるのかも知れない。一方、血漿中の IL-17 タンパク質については、BALB/c マウスにおいてハロタン投与後 24 時間で有意な増加が認められ、C57BL/6 マウスにおいてはハロタンの投与による変動は認められなかった。血漿中の IL-17 タンパク質は BALB/c マウスにおいてのみ変動が見られ、ハロタンによる肝障害の発症または増悪に寄与している可能性が示唆された。

本章においてハロタン誘導性肝障害を発症する BALB/c マウスに抗 IL-17 抗体を投与することによって血漿中の AST お

よびALTが有意に減少することを明らかにした。一方、IgG2aの投与ではASTおよびALTの有意な減少は見られなかった。よってハロタン誘導性肝障害の軽減は抗IL-17抗体に特異的な事象であり、IL-17はハロタンによる肝障害の誘導に関与することが示された。抗IL-17抗体の投与によって肝臓のTNF α / β -actinのmRNAの比はIgG2a投与に比べ有意に減少しており、ハロタンの投与によるTNF α の発現の変動はTh1ではなくTh17に由来することが示唆された。また肝臓のMIP-2/ β -actinのmRNAの比も抗IL-17抗体の投与によって減少傾向にあり、IL-17によって誘導されたMIP-2がハロタンによる肝障害に関与することが示唆された。抗IL-17抗体を投与したマウスについて肝障害の程度とMIP-2のmRNAの発現量を個体ごとに評価すると、MIP-2のmRNAの誘導が強く抑制されたマウスほどASTおよびALTが低値を示しており、MIP-2が肝障害の発症または増悪に寄与するという仮説を支持していた。IL-17によって誘導される他のケモカインについてもMIP-2と同様に変動し、肝障害に寄与している可能性がある。今回、抗IL-17抗体の投与時間の詳細な検討を行っていないため、適切な時間に投与することでハロタンによる肝障害を、

より軽減できると考えられる。

血漿中のIL-17タンパク質、肝臓中のTNF α およびMIP-2のmRNAは、Th1とTh2の変動の後で誘導されており、ハロタンによるIL-17、TNF α およびMIP-2の誘導はTh1とTh2の影響を受けている可能性が示唆された。また抗IL-17抗体を用いた検討によってハロタンによる肝障害の誘導に対してIL-17が寄与することが明らかとなった。IL-17を主に産生するTh17の系統差の存在は明らかとはされていないが、BALB/cマウスとC57BL/6マウスのハロタンに対する感受性の違いはTh17の応答性に系統差があることを示唆している。また血清中のIL-17がヒトにおける急性肝障害の有用なマーカーとなり得ることが報告されており、肝障害に対するIL-17の重要性を支持している。しかしTh17の分化についてヒトとマウスとは完全に異なっているとされており(Acosta-Rodriguez et al., 2007)、この他にもTh17の性質については様々な種差の存在が報告されている(Romagnani, 2008)。よって実験動物で得られた結果をヒトへ外挿する場合にはこのような種差に関して考慮しなければならないと考えられる。

IL-17の上流にはstat-3やROR γ tな

どの転写因子や核内受容体があり (Nishihara et al., 2007; Ivanov et al., 2006)、下流には p38 MAPK、ERK、C/EBP、NF- κ B および AP-1 など様々な経路が存在しており、遺伝子の発現を調節している。また p38 MAPK と NF- κ B は IL-10 ノックアウトマウスにハロタンを投与することで活性化されることがわかっている。これらの経路のハロタンによる肝障害への寄与が考えられる。IL-17 に関連する様々な因子について検討することで様々な肝障害のメカニズムが明らかになるのではないかと考えられる。

(5) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割の研究。CYP24 mRNA の MRE125b は miR-125b に対して全体的な相補性は低いものの、seed sequence が完全に相補的である。このため、miR-125b が CYP24 の MRE125b を標的として認識し、ルシフェラーゼ活性の変動が認められたと考えられる。pGL3/UTR2 において大きな活性の低下が認められたため、miR-125b は CYP24 mRNA 全長に対しても機能的に働くことが示唆された。本研究においても 25(OH)D₃ を基質とした場合、CYP27B1 の代謝物である 1 α ,25(OH)₂D₃ の生成は認められず (Fig. 11: retention time

45.0 min) これらの報告と一致した。このことから、MCF-7 細胞においては 25(OH)D₃ から 1 α ,25(OH)₂D₃ への経路を考える必要がなく、CYP24 活性を評価できたと考えられる。

E. 結論

(1) CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価研究。本研究において CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた *in vitro* 細胞障害試験系を構築し、CYP2C9 が毒性および解毒に関与する薬物を新たに見出した。今後、薬物誘導性肝障害の発現メカニズムの解明や医薬品開発における薬物誘導性肝障害の予測の有用な手段となることが期待される。

(2) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討。本研究では、アデノウイルスを用いて HepG2 細胞に CYP1A2 および CYP2E1 を発現させ、APAP やトルカボンの細胞障害性を感度良く検出できる *in vitro* 試験系を構築した。この試験系により、新たにフルタミドとレフルノミドの肝障害に CYP1A2 および CYP2E1 が関与することを見出した。これらの薬物の肝障害メカニズムを解明するためには更なる詳細な検討が必要である。今日、医薬品開発初

期において薬物の毒性を高感度に予測・評価することが重要であり、本試験系が *in vitro* において薬物による細胞障害性を予測・評価する際の有用な手段となることが期待される。

(3) CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度細胞障害検出試験系の構築。本研究では薬物誘導性肝障害に関する検討を行った。薬物が生体内で毒性化合物となる化学修飾メカニズムには、多くの場合、異物の解毒に関わる酵素、それと関連した合成酵素が関与してくるが、その機能は、性、年齢、人種、遺伝子多型、環境因子などによって大きく影響される。従って、実際に薬物が生体内で惹起する応答を、非臨床試験の段階で予測し危険性を評価するには、研究レベルで個々の危険因子に関する知見を集積し、多方面からの影響を鑑みた評価が求められる。

本研究では、実際にヒト肝に多く発現している薬物代謝酵素、CYP3A4 を肝特異的に発現するアデノウイルス 5 型を用い、ラット肝癌由来細胞、およびヒト肝癌由来細胞に発現させた。さらに、ノックダウンアデノウイルスや siRNA を用いた手法により細胞内 GSH 含量を減少させることで、肝障害報告がある種々の薬物の細胞障害性が増強されることを見出した。また、CYP3A4 による代謝的活性

化の関与が報告されている薬物、報告されていない薬物を含め、idiosyncratic 肝障害の報告がある複数の薬物において CYP3A4 による代謝が細胞障害性の増強に起因していることを見出した。さらに 10 個の解毒因子が活性代謝物の解毒に及ぼす影響についても検討を行ったが、Nrf2 および GCSH のノックダウンにより細胞障害性の増強が幾つかの薬物において認められ、活性代謝物の障害性に対してより高感度な試験系を構築することができた。従来法に本試験系の様な代謝的活性化を考慮した細胞試験系を追加することで、目的に合った詳細な検討を行うことが可能となる。後に続く *in vivo* 試験をより成果のあるものとするためにも、今後の *in vitro* 試験系の発展と医薬品開発への貢献が期待される。

(4) ハロタンによる肝障害誘導メカニズムの研究では、ハロタン誘導性肝障害の発症には Th1 と Th2 のバランスの変動および IL-17 を介した MIP-2 の誘導による好中球の肝臓への浸潤が関与しており、これらの変動は PGE₁ の投与によって抑制されることを明らかにした。本研究は薬物誘導性肝障害のメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

(5) ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割の研究では本章では内

因性の CYP24 に対して miR-125b が転写後調節を行うこと、さらに miR-125b による CYP24 タンパク発現抑制が CYP24 の酵素活性にも影響を及ぼすことを明らかにし、miRNA の動態学および毒性学の解明の一端となる有用な情報を提供できたと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

国内原著論文 0 件
海外原著論文 10 件
海外総説原著 0 件

1) Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya Mohri, and Tsuyoshi Yokoi: Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by microRNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.*, **283**: 9674-9680 (2008).

2) Shiori Takahashi, Miki Katoh, Takashi Saitoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi: Allosteric kinetics of human carboxylesterase 1: species differences and interindividual variability. *J. Pharm. Sci.*, **97**: 5434-5445 (2008).

3) Tatsuki Fukami, Miki Katoh, Tsuyoshi

Yokoi, and Miki Nakajima; Human cytochrome P450 2A13 efficiently metabolizes chemicals in air pollutants: naphthalene, styrene, and toluene. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**: 720-725 (2008).

4) Keiichi Minami, Miki Nakajima, Yuto Fujiki, Miki Katoh, Frank J. Gonzalez, and Tsuyoshi Yokoi. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and lipoprotein lipase by aryl hydrocarbon receptor. *J. Tox. Sci.*, **33**: 405-413 (2008).

5) Akiko Nakamura, Miki Nakajima, Hiroyuki Yamanaka, Ryoichi Fujiwara, and Tsuyoshi Yokoi. Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 1461-1464 (2008).

6) Hirotada Shiratani, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Species differences in UGT-glucuronosyltransferase activities in mice and rats. *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 1745-1752 (2008).

7) Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Taiga Maruichi, Shiori Takahashi, Howard L. McLeod, Masataka Takamiya, Yasuhiro Aoki, and Tsuyoshi Yokoi. Structure and characterization of human carboxylesterase 1A1, 1A2, and 1A3 genes. *Pharmacogenet. Genomics*, **18**: 911-920 (2008).

8) Katsuhiko Mizuno, Miki Katoh, Hirotohi Okumura, Nao Nakagawa, Toru Negishi,

Takanori Hashizume, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Mitabolic activation of benzodiazepine by CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.*, **37**: 345-351 (2009).

9) Shiori Takahashi, Miki Katoh, Takashi Saitoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi; Species differences in carboxylesterase inhibition in rat and human. *Drug Metab. Dispos.*, in press.

10) Takuya Mohri, Miki Nakajima, Shingo Takagi and Tsuyoshi Yokoi; MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer*, in press.

2. 学会発表

国内学会発表 14 件

国際学会発表 6 件

それ以外の発表 (招聘講演等) 10 件

【国内学会発表 14 件】

1. 中島美紀、駒形小夜香、高木信伍、加藤美紀、横井 毅：ヒト CYP24 の発現調節における microRNA の役割、日本薬学会第 128 年会 2008.3.26-28 ポスター 横浜
2. 白谷博忠、加藤美紀、中島美紀、横井 毅：グルクロン酸抱合酵素活性の動物種差と臓器差に関する検討、日本薬学会第 128 年会 2008.3.26-28 ポスター 横浜
3. 水野克彦、加藤美紀、中島美紀、

横井 毅：ベンゾジアゼピン系薬物による代謝的活性化、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008.6.26-28 口頭 & ポスター 東京

4. 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

2008.6.26-28 口頭 & ポスター 東京

5. 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毒性試験系の構築、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会

2008.6.26-28 口頭 & ポスター 東京

6. 水野克彦、加藤美紀、中島美紀、横井 毅：CYP3A4 によるベンゾジアゼピン系薬物の肝細胞障害性の検討、日本薬学会北陸支部第 118 回例会 2008.7.5 口頭 金沢

7. 森田麻友、赤井 翔、細見浩子、中島美紀、横井 毅：ラットを用いたグルタチオン合成酵素ノックダウンによる薬物誘導性肝障害の検討、日本薬学会北陸支部第 118 回例会 2008.7.5 口頭 金沢

8. 吉川幸孝、細見浩子、中島美紀、横井 毅：SOD2 ノックダウンおよび