

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、日本薬学会北陸支部第 118 回例会 2008.7.5

口頭 金沢

9. 茂利拓也、中島美紀、高木信伍、横井毅、microRNA によるヒト VDR の発現制御、第 23 回日本薬物動態学会年会、ポスター、10.30-11.1, 熊本 (2008)

10. 高橋志織、加藤美紀、斉藤敬志、中島美紀、横井毅、カルボキシエステラーゼ酵素活性阻害におけるラットとヒトの種差、第 23 回日本薬物動態学会年会、口頭、10.30-11.1, 熊本 (2008)

11. 吉川幸孝、細見浩子、森田麻友、常山幸一、中島美紀、横井毅、SOD2 ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築、第 23 回日本薬物動態学会年会、ポスター、10.30-11.1, 熊本 (2008)

12. 細見浩子、赤井翔、吉川幸孝、中島美紀、横井毅、CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害メカニズムの検討、第 23 回日本薬物動態学会年会、口頭、10.30-11.1, 熊本 (2008)

13. 丸一泰雅、加藤美紀、高橋志織、深見達基、中島美紀、横井毅、ヒト肝カルボキシエステラーゼの発現量および酵素活性の個体差、第 23 回日本薬物動態学会年会、ポスター、10.30-11.1, 熊本 (2008)

14. 泉川 健、中島美紀、藤原亮一、山中洋幸、深見達基、高宮正隆、青木康博、生城真一、榊 利之、横井 毅：ヒト肝における UGT1A および UGT2B 各分子種の発現量の定量的評価 日本薬学会第 129 年会 2009.3.26-28 ポスター 京都

【国際学会発表 6 件】

1. Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Knockdown of g-glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced
2. Miki Nakajima, Akiko Nakamura, Eriko Higashi, Hiroyuki Yamanaka, and Tsuyoshi Yokoi. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region of human UGT2B7 affect the Nrf2-dependent transcriptional regulation. 17th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2008.7.6-10, Saratoga Springs, NY, USA.
3. Miki Nakajima, Haruko Sakai, Hiroyuki Yamanaka, Ryoichi Fujiwara, and Tsuyoshi Yokoi. N-Glycosylation is required to exert full enzyme activity for human UGT1A9. 12th International Glucuronidation and UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) Workshop. 2008.7.24-27, Québec City,

Canada.

4. Ryoichi Fujiwara, Miki Nakajima, Tetsunori Yamamoto, Hidemi Nagao, and Tsuyoshi Yokoi. Homology-modeling and molecular dynamics simulations of human UGT1A9 and UGT1A8. 12th International Glucuronidation and UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) Workshop. 2008.7.24-27, Québec City, Canada.

5. Ryoichi Fujiwara, Miki Nakajima, Hiroyuki Yamanaka, and Tsuyoshi Yokoi. Key amino acid residues that are responsible for the difference in the substrate binding affinity of human UGT1A9 and UGT1A8. 12th International Glucuronidation and UDP-Glucuronosyltransferases (UGTs) Workshop. 2008.7.24-27, Québec City, Canada.

6. Yuktaka Yoshikawa, Hiroko Hosomi, Mayu Morita, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Knockdown of superoxide dismutase 2 in BRL3 cell and rat to evaluate the drug-induced hepatotoxicity. SOT 48th Annual Meeting, 2009.3.15-29 Baltimore-USA. Poster

【それ以外の発表（招聘講演等） 10 件】

1) 横井 毅；臨床開発に役立つバイオ

マーカー選択の科学、日本薬学会薬学研究ビジョン部会、第 9 回創薬ビジョンシンポジウム、2008 年 1 月 24-25 日、東京

2) 横井 毅、反応性代謝物を考慮した肝障害性予測試験系、日本薬物動態学会第 2 2 回ワークショップ、2008 年 4 月 17, 18 日、東京

3) 横井 毅、薬物相互作用と薬物動態、福井大学医学部特別講義、2008 年 4 月 25 日、福井

4) Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima, CYP enzymes and cancer: regulation by steroids and miRNA、126th Advanced Course on "Steroid Enzymes and Cancer" Ettore Majorana Fondation, May 3-8, 2008 Erice, Italy

5) 横井 毅、薬物動態からみた小児、子どもシンポジウム「子どもの臨床試験に入る前に理解すること」、日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26-28 日、東京

6) Tsuyoshi Yokoi, Shingo Takagi, Yuki Tsuchiya, Takuya Mohri, and Miki Nakajima、MicroRNAs regulate the expression of human cytochrome P450 1B1 and P450 3A4、Plenary Session on 17th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations、2008 年 7 月 6-10 日、Saratoga Springs, New York, USA

7) 横井 毅、薬物毒性研究の新展開、
第 12 回薬物動態談話会セミナー、2008
年 8 月 20-22 日、筑波

8) 中島美紀、高木信吾、駒形小夜香、
茂利拓也、土屋祐樹、横井 毅、薬物代
謝酵素の核内レセプターの microRNA によ
る発現調節、第 23 回日本薬物動態学会年
会、2008 年 10 月 30 日～11 月 1 日、熊本

9) 横井 毅、薬物動態関連遺伝子の多
型と薬物相互作用、日本 DNA 多型学会第
17 回学術集会、2008 年 11 月 20～21 日、
東京

10) 横井 毅、薬物代謝酵素の新規発
現調節機構と蛋白質間相互作用、岐阜薬
科大学大学院特別講演、2008 年 12 月 1
日、岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2 件；

(1) 発明人：横井 毅、吉川幸孝
特願 2008-243131 出願日：2008 年 9 月 22
日

発明の名称：アデノウィルスベクターに
よる SOD2 酵素ノックダウンの系を用いた
薬物誘導性肝障害ラットモデル

(2) 発明人：横井 毅、小林鋭祐
特願 2009-075280 出願日：2009 年 3 月 25
日

発明の名称：哺乳動物の薬物誘導性肝障
害の抑制薬

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 19 年度 分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

分担研究者 中 島 美 紀

平成 21 (2009) 年 4 月

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

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系

研究要旨

チトクローム P450 (CYP)2C9 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(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。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。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。

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。

米国では急性肝障害の 50%以上は薬物誘導性肝障害であり、600 以上の医薬品が肝障害に関与しているといわれている (Lee, 2003; Park et al., 2005)。臨床試験において薬

物誘導性肝障害が原因で新薬の開発が中止となることもあり、動物実験では後の臨床試験や販売後に起こるリスクを予測するのは困難である。また、急性肝障害の10%以上は特異的体質によるもので、この原因は不明な点が多い (Kaplowitz, 2005)。

薬物は生体内で様々な代謝を受ける。中でもシトクロム P450 (CYP) による酸化反応は多岐にわたり、薬物代謝の約75%に関与し、薬物代謝の中心的役割を果たしている (Guengerich, 2008)。ヒトでは主に肝臓に存在するが、腎、肺、消化管、脳、胎盤、心臓などほとんど全ての臓器に分布している。薬物代謝の主な役割は解毒であるが、中には代謝的活性化により毒性を示すものもある。肝障害を引き起こすとされている活性代謝物は多数報告されており、活性代謝物がタンパク質やDNAに共有結合することで障害を起こすと言われている (Park et al., 2005)。

ヒト肝ミクロソームにおける CYP 分子種の組成比は CYP3A4 が約30%と最も多く、次いで CYP2C が約20%、CYPIA2 が約12%を占めている (Shimada et al., 1994)。ヒト CYP2C には CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19 が存在しており、その中でも CYP2C9 は主要な分子種である。また、CYP が関与する薬物代謝のうち約60%は CYP3A4 あるいは CYP2C9 が関与している (Guengerich, 1996)。よって、CYP の中でも CYP3A4 と CYP2C9 は薬物代謝に主要な役

割を担っており、薬物の代謝的活性化あるいは解毒に大きく関わっていることが考えられる。事実、肝障害の報告のある薬物の代謝に関与する薬物代謝酵素としては CYP3A4 が最も多く、次いで CYP2C9 が多い (Li, 2002)。培養細胞を用いた細胞障害性を指標とした CYP3A4 による代謝的活性化の検出系の報告があり (Vignati et al., 2005)、当研究室においてもヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いて細胞障害試験系を用いて肝障害の報告のあるベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにしてきた (Mizuno et al., 2009) が、CYP2C9 による薬物の代謝的活性化についてはあまり報告されていない。しかし、CYP2C9 も薬物代謝に深く関わる分子種であることから代謝的活性化を引き起こす、もしくは活性代謝物を解毒する可能性が考えられる。また、CYP の発現量には大きな個体差が存在し、薬物の体内動態の個体差に深く関与している。その要因はさまざまであり、これらの個体差をすべて説明することは困難である。この個体差が薬物による毒性発現の個体差すなわち体質特異的な肝障害に関与している可能性が考えられる。

通常 *in vitro* で汎用される培養細胞株では、CYP の発現量はヒトへパトサイトと比較して著しく低く (Donato et al., 2008; Wilkening et al., 2003)、培養細胞をそのまま用いてヒトの体内動態を反映した毒性を予測することは困難であり、そのためにはヒトへパトサ

イトのレベルまで発現させる必要がある。ウイルスベクターは陽イオン性脂質やポリマーなどからなる非ウイルスベクターに比べ遺伝子発現効率が圧倒的に高く、アデノウイルスベクターは一過性ではあるが、現存するウイルスベクターの中で最も目的遺伝子を高発現させることが可能なもののひとつである(水口ら, 2003)。また、ウイルスの量を調節することで目的遺伝子の発現量をコントロールすることも可能である。さらに、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面でも有利である。現在最も汎用されているアデノウイルスベクターは、ヒトアデノウイルス 5 型由来のもので、E1 および E3 遺伝子が欠失している。E1 遺伝子が欠失しているため、この組み換えアデノウイルスは E1 遺伝子を持続的に発現している 293 細胞 (ヒト胎児腎由来細胞樹立株) では複製増殖できるが、通常の細胞内では複製増殖できない。また、E3 遺伝子は *in vitro* の増殖には必要ではないが、*in vivo* において免疫監視機構との関連が知られている (Schagen et al., 2004)。

Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は酸化ストレスに応答し、種々の解毒酵素を誘導する転写因子であり、細胞の酸化および化学的ストレスに対する防御機

構において最も重要な調節因子である。Nrf2 で制御される解毒酵素には、Glutathione S-transferase (GST)、Heme-oxygenase 1 (HO-1)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO)、Superoxide dismutase (SOD)、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) などが知られている (Copples et al., 2008)。Nrf2 のホモノックアウトマウスにおいて、解毒酵素の発現が低下し、アセトアミノフェンによる肝障害や ALT 値の増加が認められた (Chan et al., 2000; Enomoto et al., 2001)。このことから、Nrf2 を siRNA によりノックダウンさせることによりこれらの解毒酵素をノックダウンさせ、薬物の細胞障害性をより高感度に検出することが可能であると考えられる。

現在、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。

B. 研究方法

Table 1 に記載した。

B-1 実験で用いたプライマーの配列は

Table 1. Sequence of primers used in the present study.

Primer	Sequence
CYP2C9-F	5'- ATGGATTCTCTTGTGGTCCTT -3'
CYP2C9-R	5'- AGATGGATAATGCCCCAGAG -3'
Adeno-F	5'- GTACCTCAGCACCTTCCAGAT -3'
Adeno-R	5'- AGGAATCATGGGAAATAGGCC -3'
2C9 RT-S	5'- CAGATCTGCAATAATTTTTCTC -3'
2C9 RT-AS	5'- CTTTCAATAGTAAATTCAGATG -3'
2Cs RT-AS	5'- TCATGAGGGAGAAACGCCGG -3'
2C9 exon7-F	5'- GACCTGTGACATTAAATTCAG -3'

B-2 細胞培養

293 細胞は 10% FBS と 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 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。

HepG2 細胞は 10% FBS と 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トリプシン-EDTA 溶液 5 mL をシャーレに加え 37°C、3 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-3 AdCYP2C9 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 AdCYP2C9 を作製した。

B-3-1 CYP2C9 の pAxCawtit ベクターへの組み換え

CYP2C9 を発現するアデノウイルスを得るには、CYP2C9 cDNA (Accession No. M61857) を組み込んだアデノウイルスベクターが必要である。まず、鋳型 DNA としてヒト肝の cDNA 4 μL、10 × Ex Taq Buffer 10

μL 、 $10\ \mu\text{M}$ の CYP2C9-F プライマー、CYP2C9-R プライマーをそれぞれ $4\ \mu\text{L}$ 、 $2.5\ \text{mM}$ dNTPs $8\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \text{U}/\mu\text{L}$ Ex Taq DNA ポリメラーゼ $1\ \mu\text{L}$ 、滅菌精製水を加えて全量を $100\ \mu\text{L}$ とし、サーマルサイクラー (Takara PCR Thermal CyclerSP; Osaka, Japan) を用いて以下の条件で CYP2C9 cDNA を増幅する PCR 反応を行った。(1) 94°C で 3 分、(2) 94°C で 25 秒、 55°C で 25 秒、 72°C で 1 分 30 秒を 30 サイクル、(3) 72°C で 5 分。反応終了後、 0.8% 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 ($1544\ \text{bp}$) 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 $1\ \text{mM}$ 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、 $0.5 \times \text{TBE}$ $400\ \mu\text{L}$ 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で行った。フェノー ル・クロロホルム溶液 $400\ \mu\text{L}$ を加えて 5 分間ボルテックスし、 $7,000\ \text{rpm}$ ($3,000\ \text{g}$)、室温で 5 分間遠心分離して上清を回収した。次に $400\ \mu\text{L}$ のクロロホルム溶液を加え 5 分間ボルテックスし、 $7,000\ \text{rpm}$ ($3,000\ \text{g}$)、室温で 5 分間遠心分離した。上清に $3\ \text{M}$ 酢酸ナトリウムを $40\ \mu\text{L}$ と 100% エタノールを $1\ \text{mL}$ 加え、 -80°C で 30 分以上冷却後、 $15,000\ \text{rpm}$ ($12,000\ \text{g}$)、 4°C で 30 分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿を 70% エタノール $1\ \text{mL}$ で洗浄した。その後、 $15,000\ \text{rpm}$ ($12,000\ \text{g}$)、 4°C で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿を乾燥後、滅菌精製水 $10\ \mu\text{L}$ に溶解させ、

DNA を精製した。アデノウイルスベクター pAxCawtit $80\ \text{ng}$ 、インサート $300\ \text{ng}$ 、 $10 \times \text{T4}$ DNA ligase buffer を $1.4\ \mu\text{L}$ 、 $1\ \text{unit}/\mu\text{L}$ T4 ligase を $1\ \mu\text{L}$ 、滅菌精製水を加えて全量を $14\ \mu\text{L}$ とし、 14°C で 8 時間反応させた。この DNA 溶液を DH5 α コンピテントセル $100\ \mu\text{L}$ に添加して水中で 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。 $900\ \mu\text{L}$ の LB 培地を加えて 37°C で 1 時間培養後、LB-Amp 寒天培地に播種し、 37°C で 12 時間培養した。これより CYP2C9 組換え pAxCawtit プラスミドを得た。

B-3-2 コロニー PCR

寒天培地から単離したコロニーを LB-Amp 培地 $500\ \mu\text{L}$ 中で 37°C 、8 時間以上培養した。 $10 \times \text{PCR Buffer}$ $2.5\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ の CYP2C9-F プライマー、Adeno-R プライマーをそれぞれ $1\ \mu\text{L}$ 、 $2.5\ \text{mM}$ dNTPs $2.5\ \mu\text{L}$ 、 $25\ \text{mM}$ MgCl_2 $1.5\ \mu\text{L}$ 、Taq DNA ポリメラーゼ $0.2\ \mu\text{L}$ ($1.0\ \text{U}$)、滅菌精製水を加えて全量を $25\ \mu\text{L}$ 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、(1) 94°C で 3 分、(2) 94°C で 30 秒、 56°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 ($1653\ \text{bp}$) が得られたクローンの大腸菌培養液を $50\ \mu\text{L}$ 取り、 60% (v/v) グ

リセロールを 50 μ L 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-3-3 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、LB-Amp 培地 25 mL で 16 時間培養した。培養液を 5,000 rpm (1,500 g)、 4°C で 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)、 4°C で 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)、 4°C で 30 分間遠心分離した。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。得られたプラスミドは *Cla* I 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 (1574 bp) が挿入されていることを確認した。

B-3-4 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、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 dNTPs/Cy5.5-ddNTP 1 μ L に 7 μ L ずつ加え反応液とし、以下のように PCR 反応を行った。(1) 94°C で 2 分、(2) 94°C で 30 秒、各プライマーのアニール温度で 30 秒、 72°C で 90 秒を 45 サイクル。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 で 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 μ L 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。この操作より挿入

した CYP2C9 cDNA に変異がないことを確認した。なお、プライマーは Adeno-F プライマー、Adeno-R プライマー、2C9 RT-S プライマー、2C9 RT-AS プライマー、2Cs RT-AS プライマー、2C9 exon7-F プライマーを用いた。

B-3-5 アデノウイルスベクターのトランスフェクション法

コラーゲンコート (1 mM HCl とその 1/30 量の Cell Matrix Type1-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 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 20 μL と DMEM 500 μL を穏やかに混合し 5 分間静置し、2-3-3 で調整したプラスミド 8 μg と Adenovirus genome DNA-TPC 10 μL を加えて無血清培地で 500 μL とし、両液を混合後、20 分間静置した (これを A 液とする)。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 4 mL と A 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-3-6 1 次ウイルスの作製

2-3-5 でインキュベートした 293 細胞を剥離して回収し、その細胞懸濁液の原液、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 (これを A 液とする)、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 (これを B 液とする)。100 倍希釈プレートとして 0.1 mL の A 液と 11 mL の B 液を混合し、また 10 倍希釈プレートとして 1 mL の A 液と 10 mL の B 液を混合し、10 mL の A 液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 μL 加えた。ウイルスが変性したウェルが 7 から 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、液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。15 日で判定を終了し、最終的に全ての細胞で変性が見られたプレートから、比較的遅く (8 日以降) 細胞が変性したウェルの細胞をチューブに回収した。そのうち 10 個選び出し、液体窒素と 37°C 温浴で凍結融解を 6 回繰り返す、5,000 rpm (1,500 g)、4°C で 5 分間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-3-7 2 次ウイルスの作製

コラーゲンコートした 24 ウェルプレート

上で90%コンフルエントに増殖した293細胞に、ウェルごとに2-3-6で調製した1次ウイルス液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ることにより、ウイルス液を全ての細胞に浸潤させ5% CO₂存在下37°Cでインキュベートした。15分間隔で3回プレートを振とうさせ、1時間後に5% FBS-DMEM 400 μ Lを加えた。3、4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、2-3-6と同様に凍結融解を6回繰り返して、5,000 rpm (1,500 g)、4°Cで5分間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-3-8 組み換えアデノウイルスの確認 (1)

2-3-7で回収した2次ウイルスの細胞液を5,000 rpm (1,500 g)、4°Cで5分間遠心分離し、上清を除いた後、沈殿の細胞のみを-80°Cで保存し、これを cell pack とした。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した。50°Cで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 または *Xho*I で制限酵素処理し、0.8%寒天培地を用いてアガロース電気泳動を行い、遺伝子断片

の位置を確認した。目的の遺伝子断片サイズは *Cla*I で消化した場合は1.0 kbp、*Xho*I で消化した場合は0.48 kbpである。これより、目的遺伝子の組み込まれたアデノウイルスを確認した。

B-3-9 3次ウイルスの作製

コラーゲンコートした6ウェルプレート上で90%コンフルエントに増殖した293細胞に、ウェルごとに2-3-8で目的のウイルスが確認できた2次ウイルス液15 μ Lと、5% FBS-DMEM 500 μ Lを加え、プレートを数回振とうさせることにより、ウイルス液を全ての細胞に浸潤させ、5% CO₂存在下37°Cでインキュベートした。15分間隔で3回プレートを振とうさせ、1時間後に5% FBS-DMEM 4.5 mLを加えた。3、4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、2-3-6と同様に凍結融解を6回繰り返して、3,000 rpm (700 g)、4°Cで5分間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-3-10 4次ウイルスの作製

コラーゲンコートした10 cm シャーレ上で90%コンフルエントに増殖した293細胞に、ウェルごとに2-3-9で調製した3次ウイルス液の各サンプル50 μ Lと、5% FBS-DMEM 2 mLを加え、シャーレを数回振とうさせることにより、ウイルス液を全ての細胞に浸潤させ、5% CO₂存在下37°Cで

インキュベートした。15分間隔で3回シャーレを振とうさせ、1時間後に5% FBS-DMEM 5 mLを加えた。3日後に培養液ごと細胞を回収し、2-3-6と同様に凍結融解を6回繰り返して、3,000 rpm (700 g)、4°Cで5分間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-3-11 組み換えアデノウイルスの確認

(2)

コラーゲンコートした24ウェルプレート上で90%コンフルエントに増殖した293細胞に、1ウェルあたり5 μ Lの4次ウイルスを感染させ、増殖したウイルスDNAの制限酵素消化による遺伝子断片の位置を2-3-8と同様の方法で確認した。これより、目的の遺伝子を含んだ高力価のアデノウイルスが得られた。

B-4 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。2-2の操作に従い回収した 2.5×10^5 cells/mLの293細胞懸濁液を、5% FBSを含むDMEMを用いて調製した。コラーゲンコートした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、5% CO₂存在下37°Cで1時間培養した。作製したウイルス原液10 μ Lと5% FBSを含むDMEM 900 μ Lを混合し、100倍のウイルス希釈液を作

製した。さらに100倍ウイルス希釈液100 μ Lと5% FBSを含むDMEM 900 μ Lを混合し、1,000倍ウイルス希釈液を作製した。同様の操作をさらに4回繰り返して、10⁴から10⁷倍のウイルス希釈液を作成し、24ウェルプレートに100 μ Lずつ加えた。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時間培養後、培養液をアスピレーターで吸引し、各ウェルに0.5 mLずつ冷メタノールを加え、20分間、-20°Cに静置し、細胞を固定させた。その後、細胞を2回、1 \times PBS 250 μ Lで5分間洗浄した。1 \times PBS (1% BSA)を各ウェル250 μ Lずつ加え、1時間室温で振とうした。1 \times PBS (1% BSA)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、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、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を除き、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希釈倍率 (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 mm^2 である。24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり面積は 2.0 cm^2 であるので、補正值 (fields/well) および Viral Titer (PFU/mL) は下記の通りとなる。

$$\begin{aligned} \text{Fields/well} &= 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ cm}^2 \times 10^2 \text{ cm}^2 = 79 \\ \text{Viral Titer (PFU/mL)} &= (\text{average positive cells/field} \times (79 \text{ fields/well}) \times (\text{dilution factor}) / (0.1 \text{ mL}) \end{aligned}$$

B-5 HepG2 細胞へのアデノウイルス感染

2-2 の操作に従い回収した HepG2 細胞の細胞懸濁液を調製し、細胞を 12 ウェルプレートでは 3×10^5 cells/well、96 ウェルプレートでは 1×10^4 cells/well となるように播種した。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液を、12 ウェルプレートでは 200 μL 、96 ウェルプレートでは 40 μL を加え、プレートを数回振とうさせることによりウイルス液を全ての細胞に浸潤させ、5% CO_2 存在下 37°C でインキュベートした。15 分間隔で 3 回シャーレを振とうさせ、1 時間後に 5% FBS- DMEM を 12 ウェルプレートでは 800 μL 、96 ウェルプレートでは 100 μL 加えた。

B-6 タンパク質量

HepG2 細胞にトリプシン-EDTA 溶液 500 μL を加え、 37°C で 3 分間インキュベートした後、培地 500 μL を加え細胞を回収し、5000 rpm、 4°C で 5 分間遠心分離した。その上清をアスピレーターで吸引し、沈殿した細胞を $1 \times \text{PBS}$ で懸濁した後、10,000 rpm、 4°C で 5 分間遠心分離した。その上清を再度アスピレーターで吸引し、沈殿した細胞を TGE buffer 50 μL で懸濁した。細胞懸濁液を液体窒素と 37°C 温浴で凍結融解を 3 回繰り返し、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 (GE Healthcare Bio-Sciences) を用いて測定した。

B-7 ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の測定

12 ウェルプレートで 2-5 の操作に従い HepG2 細胞に AdCYP2C9 ウイルス液を MOI 0、2.5、5、10 および 20 で感染させ、48 時間後に培養液をアスピレーターで吸引し、100 μM ジクロフェナクを含む無血清培地を 1 mL 加えた。1 時間後に培地を採取して生成した 4'-水酸化ジクロフェナク量を以下の方法により測定した。採取した培地を 5,000 rpm、 4°C で 5 分間遠心分離し、上清 20 μL 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)、カラムオープン (日立分光 CO-965)、UV 検出器 (日立 L-2400) を用いて、溶離液を 280 nm でモニターした。カラムは Mightysil RP-18 (関東化学, Tokyo, Japan, 4.6mm ID × 150mm, 5 μ m) を用いた。移動相は 35% アセトニトリル/20 mM 過塩素酸ナトリウム (pH 2.5) を使用し、流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とした。保持時間は 4'-水酸化ジクロフェナクが 8.1 分、ジクロフェナクが 22.8 分であった。

B-8 テストステロン 6 β -水酸化酵素活性の測定

Yamazaki と Shimada (1997) の方法に従い測定した。2-5 の操作に従い HepG2 細胞に AdCYP3A4 ウイルス液を MOI 0、2.5、5、10 および 20 で感染させ、48 時間後に培養液をアスピレーターで吸引し、100 μ M テストステロンを含む無血清培地 1 mL を加えた。1 時間後に培地を採取して生成した 6 β -水酸化テストステロン量を以下の方法により測定した。採取した培地を 5,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し、上清 40 μ L を HPLC に注入して分析した。HPLC 装置およびカラムは 2-7 と同じものを使用し、溶離液を 240 nm でモニターした。移動相は 50% メタノール/10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を使用し、流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とした。保持時間は 6 β -水酸化テストステロンが 5.0 分、テストステロンが 18.3

分であった。

B-9 HepG2 細胞への siNrf2 処置

1 ウェルあたり Lipofectamine RNA iMAX 0.05 μ L、20 μ M NFE2L2 Stealth™ RNAi または Stealth™ RNAi Negative Control Medium GC Duplex #2 0.06 μ L に無血清培地を加え全量を 40 μ L とし、96 ウェルプレートにアプライした。30 分間静置した後、2-5 の操作に従い HepG2 細胞を播種し、アデノウイルスを感染させた。

B-10 アデノウイルス感染 HepG2 細胞への薬物処置

2-9 の操作に従い siNrf2 処置した HepG2 細胞に AdGFP、AdCYP2C9 もしくは AdCYP3A4 を感染させた。AdGFP 感染群は AdGFP を MOI 30、AdCYP2C9 単独感染群は AdGFP と AdCYP2C9 をそれぞれ MOI 20、MOI 10、AdCYP3A4 単独感染群は AdGFP と AdCYP3A4 をそれぞれ MOI 10、MOI 20、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 同時感染群は AdCYP2C9 と AdCYP3A4 をそれぞれ MOI 10、MOI 20 で感染させた。48 時間後、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、MTT アッセイまたは ATP アッセイにより細胞生存率を測定した。なお、ベンズブロマロン、チエニル酸、ジクロフェナク、アミオダロン、テルピナフィン、ゾルピデム、バルプロ酸、フルタミド、フルバスタチン

は DMSO に溶かし、DMSO の最終濃度が 0.1% になるように 5%FBS を含む培養液に溶かした。ロサルタンは滅菌精製水に溶かし、5%FBS を含む培養液に溶かした。

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、以下のようにを行った。サンプルはサンプル処理液と 2-メルカプトエタノールを 32:5 の割合で混合した溶液とタンパク質量が 5 μ g になるように希釈したサンプル溶液を 1:1 で混合し、100°C で 3 分間煮沸処理した。泳動 buffer で満たした泳動装置 AE-6500 (ATTO, Tokyo, Japan) と厚さ 1 mm、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。Western blot 分析は以下の方法により行った。SDS-PAGE 後、Transfer cell (Bio-Rad) を用い、電氣的にゲル上のタンパク質を PVDF 膜に 10 V で 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 Transfer buffer 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 1 時間行った。一次抗体として、ポリクローナルウサギ抗ヒト CYP2C9 抗体 (PBS で 2,000 倍希釈) 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 (PBS で 2,000 倍希釈) 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 (PBS で 2,000 倍希釈) を用い、さらに PBS で 3 回洗浄した後、0.06% の 3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩で発色させた。

B-12 MTT アッセイ

Cell counting kit-8 (CCK-8) を用い、以下の方法で AdGFP、AdCYP2C9 および AdCYP3A4 感染 HepG2 細胞における細胞の生存率を測定した。2-10 の操作に従い、ベンズブロマロン、チエニル酸、ジクロフェナク、ロサルタン、アミオダロン、テルピナフィン、フルバスタチン、バルプロ酸、ゾルピデム、フルタミドを 24 時間処置した HepG2 細胞に、CCK-8 溶液を各ウェル 10 μ L ずつ加えた。溶液添加 1 時間後、Biotrak II Plate reader を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

B-13 ATP アッセイ

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用い、以下の方法で AdGFP、AdCYP2C9 および AdCYP3A4 感染 HepG2 細胞における細胞の生存率を測定した。2-10 の操作に従い、ベンズブロマロン、チエニル酸、ジクロフェナク、ロサルタン、アミオダロン、テルピナフィン、フルバスタチン、バルプロ酸、ゾルピデム、フルタミドを 24 時間処置した HepG2 細胞に、

CellTiter-Glo Reagent 100 μ L を加え

PerkinElmer Life Science (Wellesley, MA) のルミノメーター1420ARVO 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。

B-14 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、 $P < 0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

(倫理面等への配慮)

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. 研究結果

C-1 ウイルス力価測定

AdCYP2C9、AdCYP3A4、AdGFP のウイルス力価を 2-4 の操作に従い測定した (Table 2)。

Table 2. Viral titer of AdCYP2C9, AdCYP3A4 and AdGFP.

	Viral titer (PFU/mL)
AdCYP2C9	8.6×10^8
AdCYP3A4	6.4×10^8
AdGFP	2.1×10^8

今後、この測定結果に基づいてウイルス感染条件の検討を行った。

C-2 HepG2 細胞を用いた AdCYP2C9 感染至適 MOI の検討

2-7、2-11 の操作に従い、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 (Fig. 1)。

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 $0.0734 \sim 0.317$ 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。

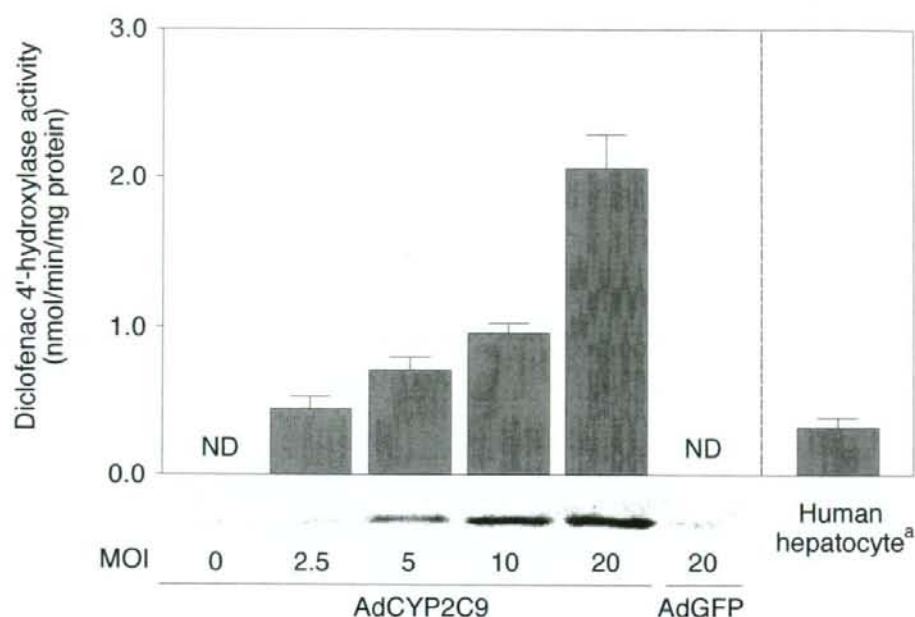


Fig. 1. MOI-dependent changes of diclofenac 4'-hydroxylase activity and CYP2C9 protein level in adenovirus-infected HepG2 cells. HepG2 cells were infected with adenovirus for 2 days. CYP2C9 protein level was analyzed by Western blotting in total cell homogenates from adenovirus-infected HepG2 cells. Total cell homogenates (5 μ g) were separated by electrophoresis using 7.5% SDS-PAGE and the proteins were transferred to PVDF-membrane. Detection of CYP2C9 was performed using polyclonal rabbit anti-human CYP2C9 antibody. Data are mean \pm SD (n = 3). ^aGomez-Lechon et al. (2001). ND: not detected.

C-3 HepG2 細胞における AdCYP2C9 至適感染日数の検討

HepG2 細胞における AdCYP2C9 至適感染日数の検討を行った。3-2 と同様に HepG2 細胞に AdCYP2C9 を MOI 10 で感染させ、1、2、3 および 5 日後のジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および CYP2C9 タンパク質の発現量について検討した (Fig. 2)。

ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性はウ

イルス感染 2 日後においてピークに達したが、CYP2C9 タンパク質の発現量は感染 3 日後において最も高かった。AdGFP を MOI 10 で感染させた場合はジクロフェナク 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。CYP2C9 のタンパク質発現量と酵素活性において至適感染日数が異なったが酵素活性を重視し、また以前本研究室で検討した AdCYP3A4 の至適感染条件が 2 日間感染で

あることを考慮し、以後の実験は2日間感染で行うことにした。

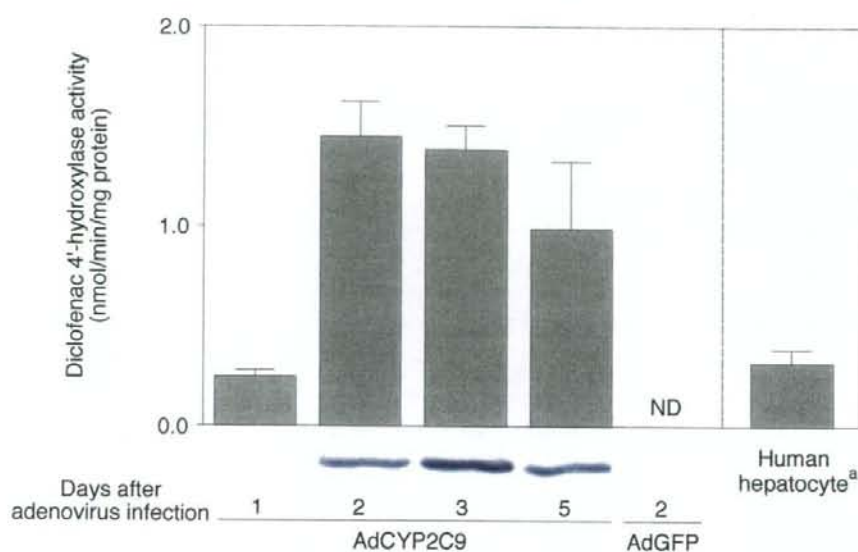


Fig. 2. Time-dependent changes of diclofenac 4'-hydroxylase activity and CYP2C9 protein level in adenovirus-infected HepG2 cells. HepG2 cells were infected with adenovirus at MOI 10. CYP2C9 protein level was analyzed by Western blotting in total cell homogenates from adenovirus-infected HepG2 cells. Total cell homogenates (5 μ g) were separated by electrophoresis using 7.5% SDS-PAGE and the proteins were transferred to PVDF-membrane. Detection of CYP2C9 was performed using polyclonal rabbit anti-human CYP2C9 antibody. Data are mean \pm SD (n = 3). ^a Gomez-Lechon et al. (2001). ND: not detected.

C-4 アデノウイルス感染 HepG2 細胞におけるテストステロン 6 β -水酸化酵素活性

CYP3A4により代謝的活性化を受ける薬物がCYP2C9により影響を受けるかどうか検討するため、当研究室において既に作製されているAdCYP3A4も用いることにした。AdCYP2C9とAdCYP3A4が互いに影響を及ぼしあって酵素活性が変化しないことを確認するために、細胞生存率の測

定条件下でそれぞれの感染群におけるテストステロン6 β -水酸化酵素活性を測定した (Fig. 3)。AdCYP3A4の感染条件については、以前に当研究室において確立されたMOI 20で2日間感染とした。なお、ウイルス感染量による影響を除くため、全ての感染群においてAdGFPを用いてMOIの合計を30に合わせた。

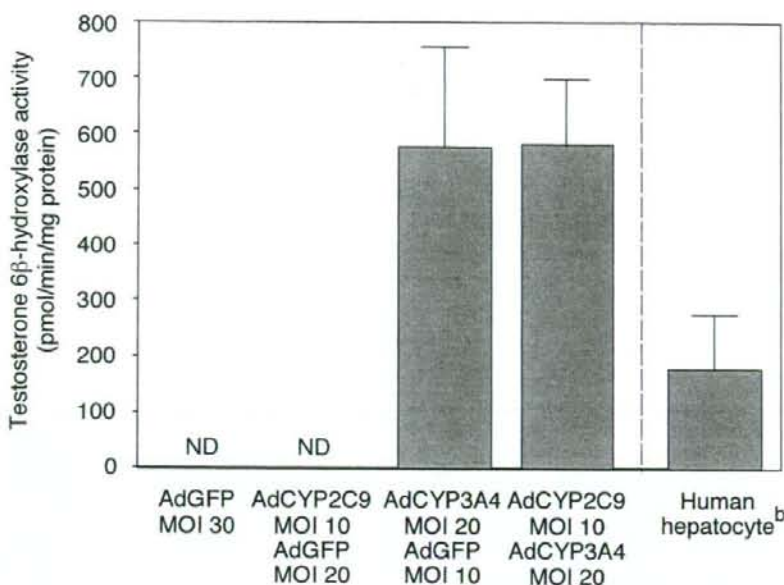


Fig. 3. Testosterone 6β-hydroxylase activity in adenovirus-infected HepG2 cells. HepG2 cells were infected with adenovirus for 2 days. Data are mean ± SD (n = 3). ND: not detected. ^a Donato et al. (1995).

AdCYP3A4 単独感染群および

AdCYP3A4 と AdCYP2C9 の同時感染群においてのみテストステロン 6β-水酸化酵素活性が認められ、両者の酵素活性値に大きな差は認められなかった。よって、AdCYP3A4 と AdCYP2C9 の同時感染より酵素活性に影響を与えないと考えられた。ヒトヘパトサイトにおけるテストステロン 6β-水酸化酵素活性は 177 pmol/min/mg protein (Donato et al., 1995) と報告されており、両者共にこの値の 3 倍以上の十分高い酵素活性値 (577.2 ± 177.5 and $581.3 \pm$

117.5 pmol/min/mg protein) を示した。

C-5 siNrf2 処置 HepG2 細胞における CYP2C9 および CYP3A4 による薬物の細胞障害性への影響

siNrf2 を処置することにより Nrf2 をノックダウンさせた HepG2 細胞に AdCYP2C9 および AdCYP3A4 を感染させ、肝障害の報告がある種々の薬物 (Fig. 4) を処置し、薬物処置 24 時間後に MTT アッセイにより細胞生存率を測定し対照群と比較検討した (Fig. 5)。