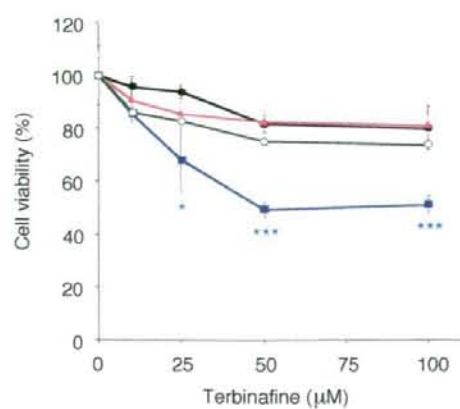
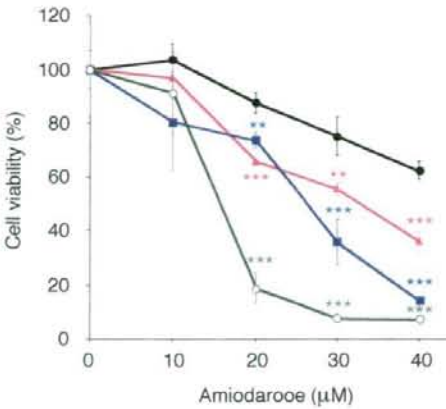
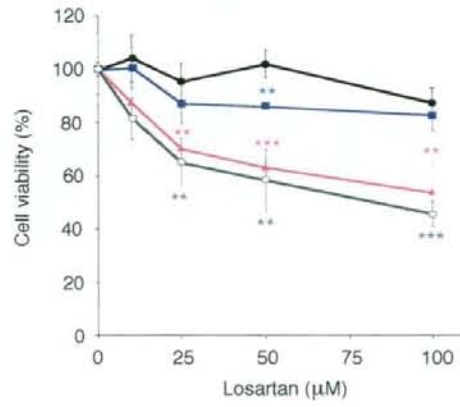
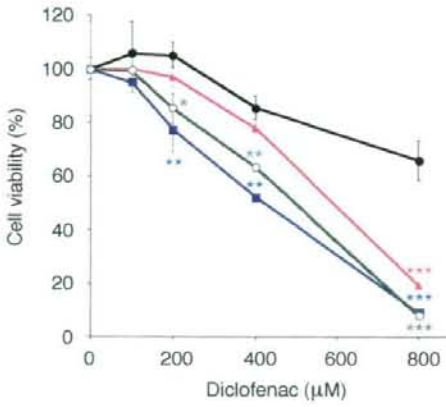
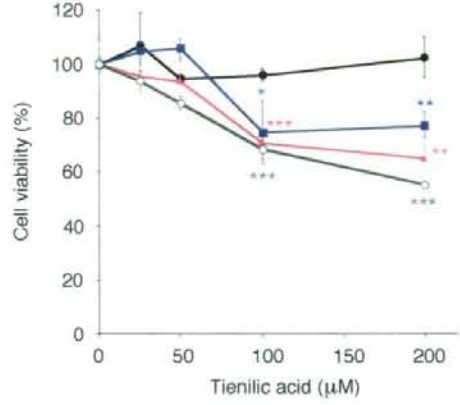
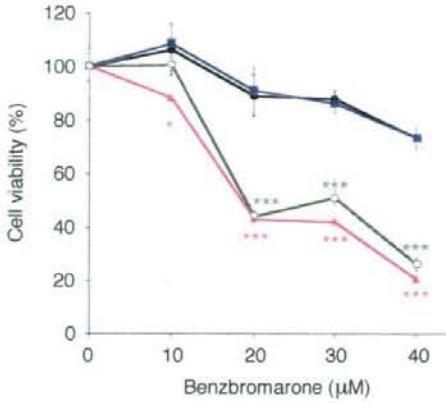


Fig. 4. Chemical structures of hepatotoxic drugs used in the present study.



Continue

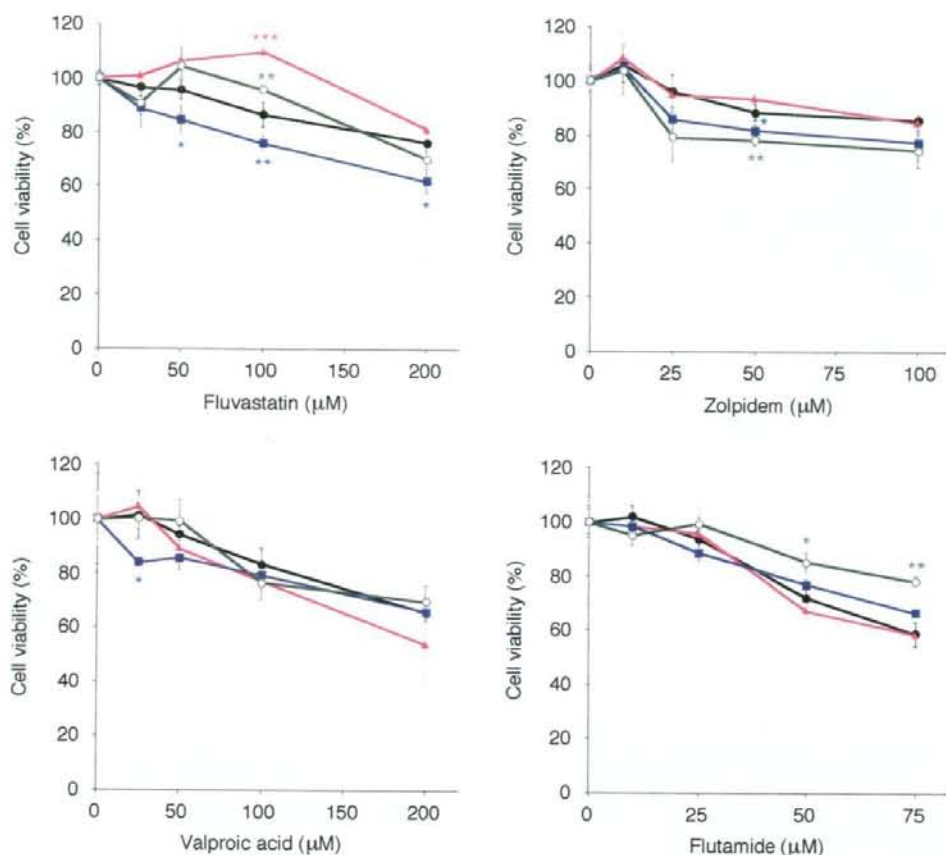


Fig. 5. MTT assay in adenovirus-infected HepG2 cells transfected with siNrf2 after 24 hour exposure of hepatotoxic drugs. Cell viability is expressed as percentage of solvent-treated cells. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001 compared with AdGFP-infected groups.

ベンズプロマロン処置においては 10  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群で、20  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。しかし、AdCYP3A4 単独感染群では AdGFP 感染群と比べて細胞生存率に

差異は認められなかった。

チエニル酸処置においては 100  $\mu$ M 以上の処置により全ての感染群で AdGFP 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、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群ではそれぞれの単独感染群よりも細胞生存率が若干低下する傾向が

認められた。

ジクロフェナク処置においては 200  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 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、800  $\mu\text{M}$  処置により CYP2C9 単独感染群で同程度の細胞生存率の低下が認められた。

ロサルタン処置においてはベンズプロマロンと同様に 25  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、AdCYP3A4 単独感染群では若干低下する傾向が認められた。

アミオダロン処置においては 20  $\mu\text{M}$  以上の処置により全ての感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群ではそれぞれの単独感染群よりもさらに顕著な低下が認められた。

テルピナフィン処置においては 25  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。しかし、AdCYP2C9 単独感染群と AdCYP3A4 と AdCYP2C9 の同時感染群では AdGFP 感染群と比べて細胞生存率に差は認められなかった。

フルバスタチン処置においては 50  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群

で AdGFP 感染群と比べて細胞生存率の有意な低下が認められた。一方 100  $\mu\text{M}$  の処置により AdCYP2C9 単独感染群および CYP2C9 と CYP3A4 の同時感染群では細胞生存率の有意な上昇が認められた。

ゾルピデム処置においては 50  $\mu\text{M}$  の処置により AdCYP3A4 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて細胞生存率の有意な低下が認められたが、AdCYP2C9 単独感染群では AdGFP 感染群と比べて有意な差異は認められなかった。

バルプロ酸処置においては 25  $\mu\text{M}$  の処置により AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて細胞生存率の有意な低下が認められたが、AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群では AdGFP 感染群と比べて有意な差異は認められなかった。

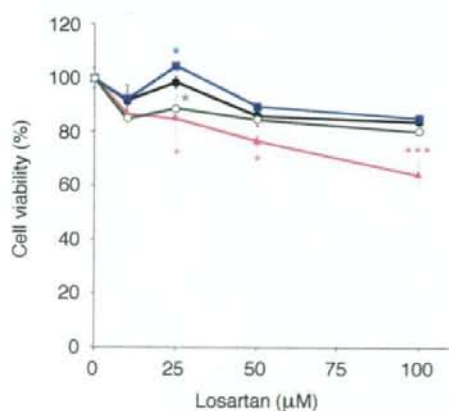
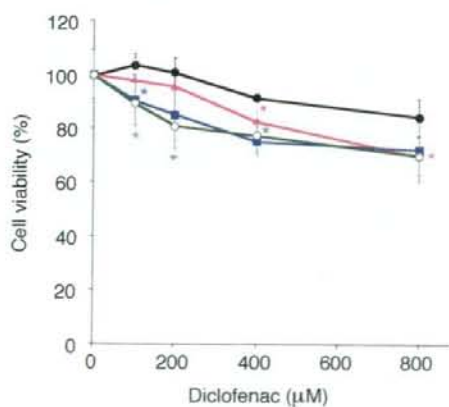
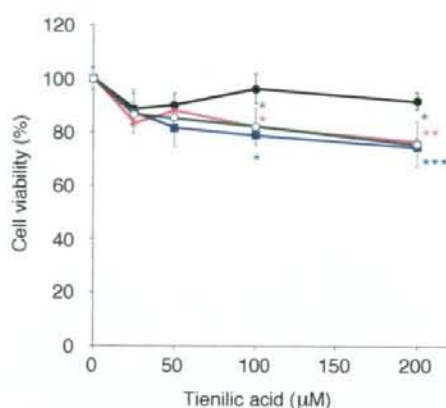
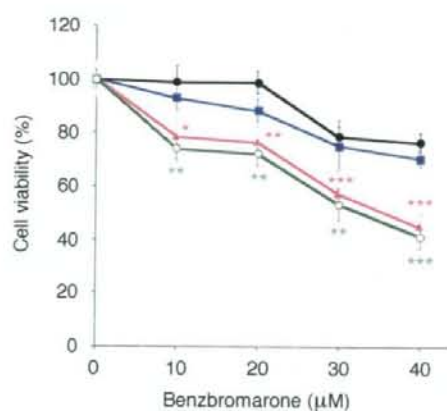
フルタミド処置においては 50  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の上昇が認められたが、AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP3A4 単独感染群では AdGFP 感染群と比べて有意な差異は認められなかった。

C-6 siScramble 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

3-5 の検討において細胞生存率に顕著な

差が認められたベンズブロマロン、ロサルタン、チエニル酸、ジクロフェナク、アミオダロン、テルピナフィンについて siNrf2 の代わりにネガティブコントロールとし

て siScramble (siScr) を用いて 3-5 と同様の検討を行い、CYP により誘発された毒性の解毒に Nrf2 の下流遺伝子が関与するかどうか検討した (Fig. 6)。



Continue

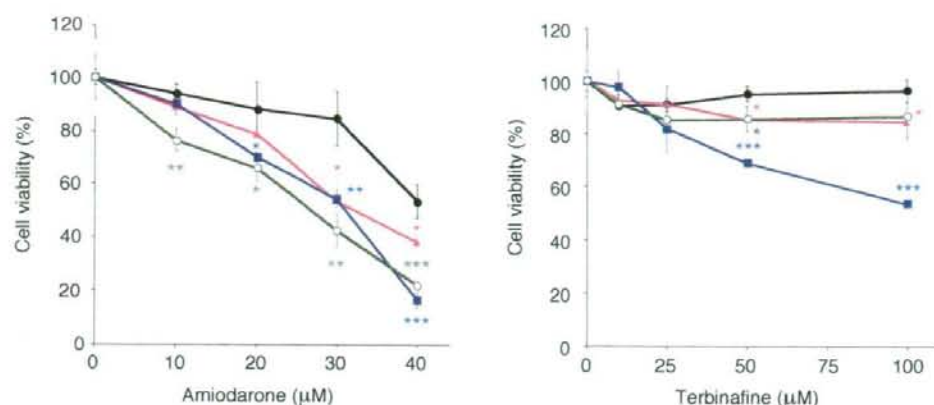


Fig. 6. MTT assay in adenovirus-infected HepG2 cells transfected with siScr after 24 hour exposure of hepatotoxic drugs. Cell viability is expressed as percentage of solvent-treated cells. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001 compared with AdGFP-infected groups.

ベンズプロマロン処置においては3-5での検討と同様、10  $\mu$ M以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下したが、細胞生存率の値が全体的に高くなる傾向が認められた。

チエニル酸処置においては100  $\mu$ M以上の処置により全ての感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。しかし、3-5の結果と比較すると細胞生存率の差は減少した。

ジクロフェナク処置においては400  $\mu$ M以上の処置により CYP2C9 単独感染群で、100  $\mu$ M、400  $\mu$ Mの処置により CYP3A4 単独感染群で、100  $\mu$ M、200  $\mu$ M、400  $\mu$ Mの処置により CYP2C9 と CYP3A4 の同時感染

群で AdGFP 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、チエニル酸と同様に3-5の結果と比較すると細胞生存率の差は減少した。

ロサルタン処置においては25  $\mu$ M以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群で、25  $\mu$ Mの処置により AdCYP3A4 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。

アミオダロン処置においては30  $\mu$ M以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群で、20  $\mu$ M以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群で、10  $\mu$ M以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 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、3-5の結果と

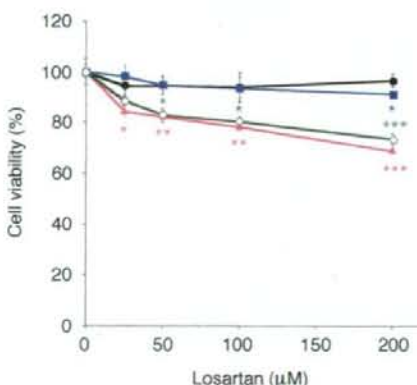
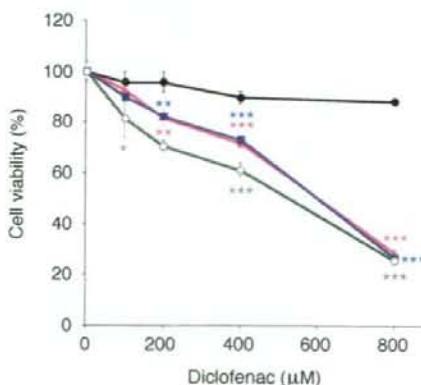
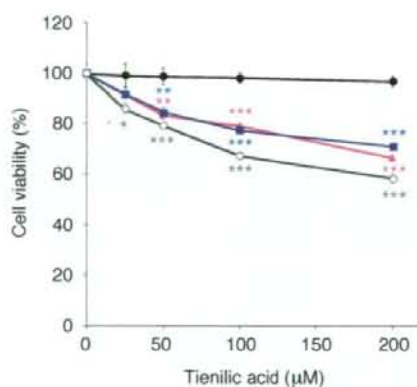
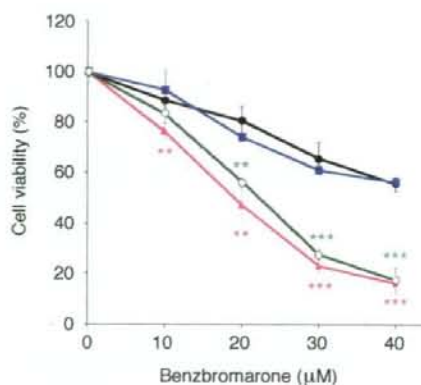
比較すると全体的に細胞生存率が上昇し、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染と AdCYP2C9 または AdCYP3A4 の単独感染群との差は認められなくなった。

テルビナフィン処置においては 50  $\mu\text{M}$  の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で、50  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、3-5 の結果と同様

に AdCYP3A4 単独感染群で顕著に低下する傾向が認められたが、低濃度域においては有意な差異は認められなかった。

### C-7 ATP アッセイによる細胞生存率の測定

3-5 における検討で細胞生存率に顕著な差が認められた薬物について更に細胞障害性の検討を行うため、ATP アッセイにより細胞生存率を測定した (Fig. 7)。



Continue

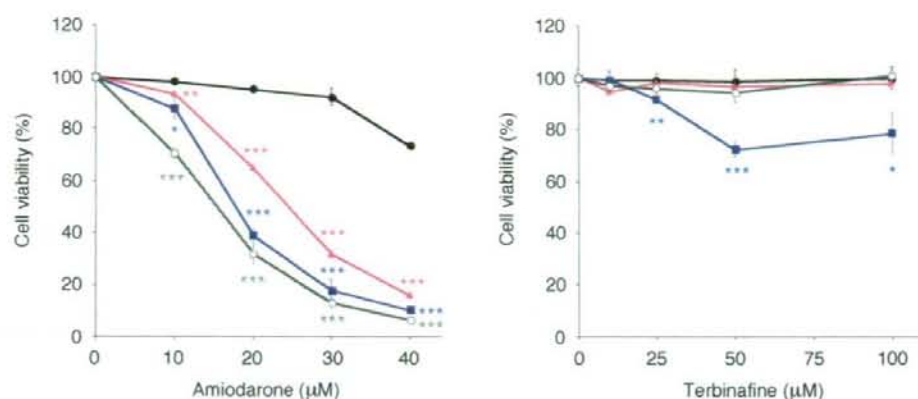


Fig. 7. ATP assay in adenovirus-infected HepG2 cells transfected with siNrf2 after 24-hour exposure of hepatotoxic drugs. Cell viability is expressed as percentage of solvent-treated cells. Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  compared with AdGFP-infected groups.

ベンズブロマロン処置においては 10  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群で、20  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、3-5 の結果と同様な傾向が認められた。

チエニル酸処置においては 50  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP3A4 単独感染群で、25  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、3-5 の結果と類似した結果となった。

ジクロフェナク処置においては 200  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP3A4 単独感染群で、100  $\mu\text{M}$  と AdCYP2C9 単独感染群および

以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、3-5 の結果と類似した結果となった。

ロサルタン処置においては 100  $\mu\text{M}$  の処置により AdCYP3A4 単独感染群で、25  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で、10  $\mu\text{M}$  以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、3-5 の結果と同様な傾向が認められた。

アミオダロン処置においては 10  $\mu\text{M}$  以上の処置により全ての感染群で AdGFP 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、3-5 の結果と比較する AdCYP3A4 単独感染群で細胞生存率が低



下する傾向が認められた。

テルビナフィン処置においては 25  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、3-5 の結果と同様な傾向が認められた。

#### D. 考察

本研究では当研究室にて作成済の 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 による薬物の代謝的活性化または解毒について細胞障害性を指標として明らかにすることを目的とした。ヒト CYP2C9 を発現するアデノウイルスを作製し、そのアデノウイルスを HepG2 細胞に感染させてジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および CYP2C9 タンパク質発現量を指標とし、CYP2C9 発現の至適感染条件を確立した。AdCYP2C9 の MOI 依存的にジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および CYP2C9 タンパク質発現量が増加し、細胞の状態が比較的良好であり、かつジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性が最も高い MOI 10 が最良と判断した (Fig. 1)。さらに、AdCYP2C9 MOI 10 で感染させたところ、感染 2 日後においてジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性はピークに達したため (Fig. 2)、感染日数は 2 日が最良と判断

した。そして、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 6 $\beta$ -水酸化酵素活性が認められ、また AdCYP3A4 と AdCYP2C9 の同時感染によりテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性に影響がないことも確認した (Fig. 3)。

上記の条件でアデノウイルスを感染させた HepG2 細胞に薬物処置した後、MTT アッセイおよび ATP アッセイにより細胞生存率の測定を行った。

#### ベンズブロマロン

AdCYP2C9 単独感染群と AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、ベンズブロマロンの毒性発現に CYP2C9 が関与している可能性が示唆された。しかし、ベンズブロマロン 100 mg 単回投与後の最高血中濃度 (Cmax) は 5.4  $\mu$ M (ユリノームインタビューフォーム, 2005) と報告されており、今回の検討において細胞生存率に差が生じ始めた 10  $\mu$ M よりも低い値であった。ベンズブロマロンは CYP2C9 によって主代謝物である 6-水酸化体に代謝されることが知られている (ユリノームインタビューフォーム, 2005)。また、さらに代謝され、カテコール体を介して reactive quinone を生成しタンパク質共有結合を形成するといわれている (McDonald and

Rettie, 2007)。よって、代謝的活性化により reactive quinone が生成し、細胞障害を引き起こすと考えられる。また、Nrf2 ノックダウンにより細胞障害性の増強が認められたことから、Nrf2 の下流遺伝子はその解毒に関与していると考えられる。実際ベンズプロマロンから生成する reactive quinone はグルタチオン抱合を受けることが報告されており (McDonald and Rettie, 2007)、Nrf2 ノックダウンにより glutamylcysteine synthetase (GCS) および GST 発現量が低下し、グルタチオン抱合能が低下したことが原因と考えられる。

#### チエニル酸

全ての感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、チエニル酸の毒性発現に CYP2C9 および CYP3A4 が関与している可能性が示唆された。チエニル酸 250 mg 単回投与後の Cmax は 53.1  $\mu\text{M}$  (Kerremans et al., 1982) と報告されており、今回の検討において細胞生存率に差が生じ始めた 25~100  $\mu\text{M}$  とほぼ同程度の値であった。チエニル酸は CYP2C9 によってスルホキシドを介し、5-水酸化体を生成するが、スルホキシドが CYP2C9 タンパク質と共有結合し CYP2C9 を阻害する、またはその他のタンパク質に共有結合することが知られている (Jean et al., 1996)。よって、代謝的活性化によりスルホキシドが生成し、細胞障害を引き起こすと考えられるが、

CYP3A4 による代謝的活性化および毒性との関与についての報告は存在せず、更なる検討が必要である。また、ベンズプロマロンと同様に Nrf2 ノックダウンにより細胞障害性の増強が認められたことから、Nrf2 の下流遺伝子はその解毒に関与していると考えられる。実際チエニル酸のタンパク共有結合はグルタチオン存在下において減少することが報告されており (Bonierbale et al., 1999)、Nrf2 ノックダウンにより GCS および GST 発現量が低下し、グルタチオン抱合能が低下したことが原因と考えられる。

#### ジクロフェナク

チエニル酸と同様に全ての感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、ジクロフェナクの毒性発現に CYP2C9 および CYP3A4 が関与している可能性が示唆された。しかし、ジクロフェナク 100 mg 単回投与後の Cmax は 1.3  $\mu\text{M}$  (ボルタレンインタビューフォーム, 2005) と報告されており、今回の検討において細胞生存率に差が生じ始めた 100~200  $\mu\text{M}$  よりも低い値であった。ジクロフェナクは CYP2C9 により主代謝物である 4'-水酸化体を生成するが、他にも CYP3A4 より 5-水酸化体も生成する (ボルタレンインタビューフォーム, 2005)。これらの代謝物はそれぞれキノニンイミンを生成し、このキノニンイミンがタンパク質共有結合の形成お

よび酸化ストレスを引き起こすといわれている (Boelsterli, 2003; Tang et al., 1999b)。また、ジクロフェナクにおいても Nrf2 ノックダウンにより細胞障害性の増強が認められたことから、Nrf2 の下流遺伝子がその解毒に関与していると考えられる。実際ジクロフェナクから生成するキノニンイミンはグルタチオン抱合を受けることが報告されており (Tang et al., 1999a)、Nrf2 ノックダウンにより GCS および GST 発現量が低下し、グルタチオン抱合能が低下したことが原因と考えられる。

#### ロサルタン

ベンズプロマロンと同様に AdCYP2C9 単独感染群と AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、ロサルタンの毒性発現に CYP2C9 が関与していることが示唆された。しかし、ロサルタン 100 mg 単回投与後の Cmax は 1.7  $\mu\text{M}$  (ニューロタンインタビューフォーム, 2008) と報告されており、今回の検討において細胞生存率に差が生じ始めた 25  $\mu\text{M}$  よりも低い値であった。ロサルタンは CYP2C9 により主代謝物である薬理活性の強いカルボン酸体の E3174 を生成するが、その他にも多数の代謝物が報告されている (Stearns et al., 1995; ニューロタンインタビューフォーム, 2008)。しかし、ロサルタンやその代謝物の肝障害に関する報告はなく、どの代謝物

が細胞障害に関与しているかは不明であるため、今後更なる検討が必要である。また、ロサルタンにおいても Nrf2 ノックダウンにより細胞障害性の増強が認められたため、Nrf2 によって誘導される解毒酵素がその解毒に関与している可能性が高いと考えられた。

#### アミオダロン

AdCYP2C9 および AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて有意に細胞生存率が低下し、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群ではさらに顕著な細胞生存率の低下が認められた。よって、アミオダロンの毒性発現に CYP3A4 および CYP2C9 が関与し、さらにそれらが共存すると毒性が相乗的に惹起されることが示唆された。しかし、アミオダロン 400 mg 単回投与後の Cmax は 1.8  $\mu\text{M}$  (アンカロンインタビューフォーム, 2006) と報告されており、今回の検討において細胞生存率に差が生じ始めた 10-20  $\mu\text{M}$  よりも低い値であった。アミオダロンは主に CYP3A4 によって *N*-脱アルキル化され、デスエチルアミオダロン (DEA) に代謝されることが知られているが、DEA は他にも CYP1A1、CYP1A2、CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6 によって生成する (Ohyama et al., 2000)。DEA が主代謝物であるが、他にも脱ヨウ素化、*O*-脱アルキル化、水酸化、グルクロン酸抱合など複雑多岐な代謝経路が存在し (アンカロ

ンインタビューフォーム,2006)、アミオダロンまたはその代謝物と肝障害との関与については不明な点が多いため、今後更なる検討が必要である。

### テルビナフィン

テルビナフィンでは AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて細胞生存率の低下が認められたが、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群では有意な差異は認められなかった。よって、テルビナフィンの毒性発現に CYP3A4 が関与する一方で CYP2C9 はその解毒として働くことが明らかとなった。しかし、テルビナフィン 125 mg 単回投与後の Cmax は 2.2  $\mu\text{M}$  (ラミシールインタビューフォーム,2007) と報告されており、今回の検討において細胞生存率に差が生じ始めた 25  $\mu\text{M}$  よりも低い値であった。テルビナフィンの代謝経路には *N*-脱メチル化、脱アミノ化、芳香環や側鎖の水酸化があり、様々な CYP 分子種 (CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4) が関与する。*N*-脱メチル化は主に CYP2C9、脱アミノ化は主に CYP3A4、芳香環や側鎖の水酸化は主に CYP2C、CYP1A2 が触媒し、それぞれの代謝経路の寄与は *N*-脱メチル化が最も高く、次いで脱アミノ化、芳香環や側鎖の水酸化である (Vickers et al., 1999)。そして、テルビナフィンの脱アミノ化による代謝物のひとつである TBF-A はグルタチオン抱合を受け

た後、胆管へ移行し胆管膜タンパク質に結合し、胆汁うっ滞を引き起こすことが知られている (Iverson and Uetrecht, 2001)。以上のことから、CYP3A4 によって生成した TBF-A が細胞内タンパク質に結合することで細胞障害を引き起こすが、CYP2C9 による *N*-脱メチル化や水酸化によって TBF-A の生成が減少し、細胞障害性が軽減されると考えられる。また、テルビナフィンにおいては高濃度域において Nrf2 ノックダウンの影響は認められず、ベンズプロマロン、チエニル酸、ジクロフェナクおよびロサルタンとは異なる結果となった。よって、テルビナフィンによる細胞障害の解毒において Nrf2 の下流遺伝子は関与しておらず、胆汁うっ滞の場合とは発現機序が異なる可能性が考えられた。

### フルバスタチン

AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、AdCYP2C9 単独感染群では有意な細胞生存率の上昇が認められたが、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群では有意な差異は認められなかった。よって、フルバスタチンの毒性発現に CYP3A4 が関与し、解毒には CYP2C9 が関与している可能性が示唆された。しかし、フルバスタチン 30 mg 単回投与後の Cmax は 0.62  $\mu\text{M}$  (ローコールインタビューフォーム,2003) と報告されており、今回の検討において細

胞生存率に差が生じ始めた 50  $\mu$ M よりも低い値であった。ヒトにおいてフルバスタチンは主に水酸化、脱イソプロピル化、 $\beta$ -酸化を受けるが、CYP2C9 は水酸化および脱イソプロピル化、CYP3A4 は 5'-水酸化を触媒することが報告されている (Dain et al., 1993; Fischer et al., 1999)。また、血漿中における主代謝物は脱イソプロピル-2-プロピオン酸体と報告されており (ローコールインタビューフォーム, 2003)、脱イソプロピル化を伴うことから CYP2C9 が関与していると考えられる。

### ゾルピデム

ゾルピデムにおいては AdCYP3A4 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群においては細胞生存率の低下が認められたが、AdCYP2C9 単独感染群においては認められなかった。よって、ゾルピデムの毒性発現に CYP3A4 が関与しているが、CYP2C9 は関与していない可能性が示唆された。しかし、ゾルピデム 10 mg 単回投与後の  $C_{max}$  は 0.31  $\mu$ M (マイスリーインタビューフォーム, 2008) と報告されており、今回の検討において細胞生存率に差が生じた 50  $\mu$ M よりも低い値であった。ゾルピデムにはいくつかの代謝物が存在し、中でも M-3 が 80%以上を占め、その代謝反応には主に CYP3A4 が、その他にも CYP2C9、CYP1A2、CYP2C19、CYP2D6 が関与することが知られている (Pichard

et al., 1995; Von Moltke et al., 1999)。しかし、ゾルピデムまたはその代謝物と肝障害との関与には不明な点が多いため、今後更なる検討が必要である。

### バルプロ酸

バルプロ酸の代謝経路には $\beta$ 酸化と水酸化が存在し、共に CYP2C9、CYP2A6、CYP2B6 が触媒するが、中でも CYP2C9 が最も寄与が大きい (Kiang et al., 2006)。特に、 $\beta$ 酸化により生成する 4-ene-VPA は肝毒性の原因化合物と言われており (Jurima-Romet et al., 1996)、さらに 4-ene-VPA が(E)-2,4-diene VPA に代謝されるとミトコンドリアの $\beta$ 酸化を阻害することが報告されている (Tang et al., 1995)。バルプロ酸 200 mg 単回投与後の  $C_{max}$  は 144  $\mu$ M (バルプロ酸ナトリウムインタビューフォーム, 2008) と報告されており、今回の検討における濃度とほぼ同程度であったが、CYP2C9 による細胞障害性の増強は認められなかった。以前、ヒトおよびラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* における検討ではバルプロ酸のタンパク共有結合は検出されなかったが、*in vivo* における検討ではバルプロ酸のタンパク共有結合が多量検出されたという報告が存在する (Leone et al., 2007)。よって、*in vitro* において欠如している生体内の何らかの因子がバルプロ酸の毒性発現に関与している可能性がある。

## フルタミド

フルタミドの血漿中の主代謝物は2-水酸化体である (オダインインタビューフォーム, 2008) が、他にも加水分解によって FLU-1 を生成し、さらに、CYP3A および CYP1A により *N*-水酸化体に代謝されることで肝毒性を示すことがマウスにおいて証明されている (Ohbuchi et al., 2009)。また、ヒト肝ミクロソームを用いた検討において FLU-1 は高濃度においては CYP2C9、低濃度においては CYP3A4 によって *N*-水酸化体に代謝されるとの報告もある (Goda et al., 2006)。よって、CYP3A4 および CYP2C9 はフルタミドの肝毒性発現に関与していることが予想されたが、本研究において AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群において細胞生存率の上昇が認められ、上記の報告と一致しない結果となった。また、フルタミド 125 mg 単回投与後の  $C_{max}$  は  $0.88 \mu\text{M}$  (オダインインタビューフォーム, 2008) と報告されており、今回の検討における濃度よりも低い値であった。しかし、フルタミドの肝障害発現メカニズムについては不明な点も多いため、今後更なる検討が必要である。

## E. 結論

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增强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 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のが、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。

薬物の代謝的活性化および解毒を予測することは医薬品開発において極めて重要であるが、*in vitro* で予測することは困難である。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。

#### 参考文献

- アンカロンインタビューフォーム (2006) サノフィ・アベンティス株式会社 1-47.
- Boelsterli UA (2003) Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**: 307-322.
- Bonierbale E, Valadon P, Pons C, Defosses B, Dansette PM and Mansuy D (1999) Opposite behaviors of reactive metabolites of tienilic acid and its isomer toward liver proteins: use of specific anti-tienilic acid-protein adduct antibodies and the possible relationship with different hepatotoxic effects of the two compounds. *Chem Res Toxicol* **12**: 286-296.
- Bort R, Mace K, Boobis A, Gomez-Lechon MJ, Pfeifer A and Castell J (1999) Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem Pharmacol* **58**: 787-796.
- Chan JY and Kwong M (2000) Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* **1517**: 19-26.
- G. 研究発表  
学会発表  
第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2009 年 7 月 6-8 日) で発表予定
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し
- Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR and Park BK (2008) The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology* **246**: 24-33.
- Dain JG, Fu E, Gorski J, Nicoletti J and Scallen TJ (1993) Biotransformation of fluvastatin sodium in human. *Drug Metab Dispos* **21**: 567-572.
- Donato MT, Castell JV and Gomez-Lechon MJ (1995) Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **23**: 553-558.
- Donato MT, Jimenez N, Castell JV and Gomez-Lechon MJ (2004) Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **32**: 699-706.
- Donato MT, Lahoz A, Castell JV and Gomez-Lechon MJ (2008) Cell Lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* **9**: 1-11.
- Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T and Yamamoto M (2001) High sensitivity of Nrf2 knockout mice

to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci* **59**: 169-177.

Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E, Baldeck JP and Robinson WT (1999) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* **27**: 410-416.

Goda R, Nagai D, Akiyama Y, Nishikawa K, Ikemoto I, Aizawa Y, Nagata K and Yamazoe Y (2006) Detection of new *N*-oxidized metabolite of flutamide, *N*-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]hydroxylamine, in human liver microsomes and urine of prostate cancer patients. *Drug Metab Dispos* **34**: 828-835.

Gomez-Lechon MJ, Donato T, Jover R, Rodriguez C, Ponsoda X, Glaize D, Castell JV and Guguen-Guillouzo C (2001) Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. *Eur J Biochem* **268**: 1448-1459.

Guengerich FP (1996) *In vitro* techniques for studying drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* **24**: 521-533.

Guengerich FP (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* **21**: 70-83.

Iverson SL and Utrecht JP (2001) Identification of a reactive metabolite of terbinafine: insights into terbinafine-induced hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* **14**: 175-181.

Jean P, Lopez-Garcia P, Dansette P, Mansuy D and

Goldstein JL (1996) Oxidation of tienilic acid by human yeast-expressed cytochromes P-450 2C8, 2C9, 2C18 and 2C19. Evidence that drug is a mechanism-based inhibitor specific for cytochrome P-450 2C9. *Eur J Biochem* **241**: 797-804.

Jurima-Romet M, Abbott FS, Tang W, Huang HS and Whitehouse LW (1996) Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology* **1**: 69-85.

Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 489-499.

Kerremans AL, Gribnau FW, Tau Y and van Ginneken CA (1982) Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of tienilic acid in healthy volunteers. *Eur J Pharmacol* **22**: 512-521.

Kiang TK, Ho PC, Anari MR, Tong V, Abbott FS and Chang TK (2006) Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the CYP2C9\*1/\*1 genotype. *Toxicol Sci* **94**: 261-271.

ラミシールインタビューフォーム (2007) ノバルティス ファーマ株式会社 1-42.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lee WM (2003) Drug-induced hepatotoxicity. *New Engl J Med* **349**: 474-485.

Leone AM, Kao LM, McMillian MK, Nie AY, Parker JB, Kelley MF, Usuki E, Parkinson A, Lord



PG, and Johnson MD (2007) Evaluation of felbamate and other antiepileptic drug toxicity potential based on hepatic protein covalent binding and gene expression. *Chem Res Toxicol* **20**: 600-608.

Li AP (2002) A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the "multiple determinant hypothesis" for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity. *Chem Biol Interact* **142**: 7-23.

ローコールインタビューフォーム (2003) ノバルティス ファーマ株式会社 1-44.

マイスリーインタビューフォーム (2008) サノフィ・アベンティス株式会社 1-39.

McDonald MG and Rettie AE (2007) Sequential metabolism and bioactivation of hepatotoxic benzbromarone: formation of glutathione adducts from a catechol intermediate. *Chem Res Toxicol* **20**: 1833-1842.

水口裕之、早川堯夫 (2003) 遺伝子機能解析のための遺伝子導入ベクター 蛋白質 核酸 酵素 **48**: 1653-1662.

Mizuno K, Katoh M, Okumura H, Nakagawa N, Negishi T, Hashizume T, Nakajima M and Yokoi T (2009) Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **37**: 345-351.

ニューロタンインタビューフォーム (2008) 万有製薬株式会社 1-61

オダインインタビューフォーム (2008) 日本化薬株式会社 1-39.

Ohbuchi M, Miyata M, Nagai D, Shimada M,

Yoshinari K and Yamazoe Y (2009) Role of enzymatic *N*-hydroxylation and reduction in flutamide metabolite-induced liver toxicity. *Drug Metab Dispos* **37**: 97-105.

Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (2000) A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone *N*-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos* **28**: 1303-1310.

Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 177-202.

Pichard L, Gillet G, Bonfils C, Domerque J, Thenot JP and Maurel P (1995) Oxidative metabolism of zolpidem by human liver cytochrome P450s. *Drug Metab Dispos* **23**: 1253-1262.

Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE and Hoeber RC (2004) Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**: 51-70.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.

バルプロ酸ナトリウムインタビューフォーム (2008) エルメッド エーザイ株式会社 1-32.

Stearns RA, Chakravarty PK, Chen R and Chiu SH (1995) Bioactivation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos* **23**: 207-215.

Tang W, Borel AG, Fujimiya T and Abbott FS (1995) Fluorinated analogues as mechanistic probes in valproic acid hepatotoxicity: hepatic microvesicular steatosis and glutathione status. *Chem Res Toxicol* **8**: 671-682.

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 SHL and Baillie TA (1999a) 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.

Tang W, Stearns RA, Wang RW, Chiu SHL and Baillie TA (1999b) Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol* **12**: 192-199.

Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4350-4354.

ユリノームインタビューフォーム (2005) 鳥居

薬品株式会社 1-32

Vickers AE, Sinclair JR, Zollinger M, Heitz F, Glanzel U, Johanson L and Fischer V (1999) Multiple cytochrome P-450s involved in the metabolism of terbinafine suggest a limited potential for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* **27**: 1029-1038.

Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter R and Monshouwer M (2005) An in vitro approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* **216**: 154-167.

ボルタレンインタビューフォーム (2005) ノバルティスファーマ株式会社 1-33.

Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Granda BW, Duan SX, Grassi JM, Venkatakrisnan K, Harmatz JS and Shader RI (1999) Zolpidem metabolism *in vitro*: responsible cytochromes, chemical inhibitors, and *in vivo* correlations. *Br J Clin Pharmacol* **48**: 89-97.

Wilkening S, Stahl F and Bader A (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* **31**: 1035-1042.

Yamazaki H and Shimada T (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **346**: 161-169.

ヒト CYP1A2 および CYP2E1 による薬物の代謝的活性化の検討

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

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系を構築した。その結果、アセトアミノフェン、トルカポン、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、ダブソン、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与する報告が多い。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ポ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。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。

A. 研究目的

今日の医薬品開発において、薬物誘導性の

毒性により約40%の新薬候補化合物が開発

段階でドロップアウトし、医薬品として上市

された後に、予期せぬ副作用の発現により市場から撤退する例が珍しくない (Kola and Landis, 2004)。薬物誘導性の毒性において最もよく見られる症状は肝障害であり、薬物誘導性肝障害は急性肝障害の50%以上を占め、医薬品のドロップアウトの主な原因である (Lee, 2003)。しかし、このような薬物誘導性の毒性発現機構は未だに解明されていないことが多い (Boelsterli and Lim, 2006)。新薬候補化合物が医薬品として認可されるまで10~15年の年月と200~250億円の研究費を要するため、開発初期段階での毒性のスクリーニングがコスト面においても重要であり、毒性を示す薬物は非臨床試験の段階でスクリーンアウトされるべきである。しかし、非臨床試験などの毒性試験で用いられるマウスやラットなどのげっ歯類、ウサギやサルなどの実験動物とヒトでは大きな種差が存在するため、新薬候補化合物のヒトにおける毒性や薬物動態を非臨床試験の段階で予測することは困難である (Jenden, 1991)。その種差の最も大きな因子の一つが薬物代謝である。

生体内に投与された薬物は主に肝臓で代謝され、異なる構造の化合物に変換される。薬物代謝反応は大きく第一相反応、第二相反応の二つに分類され、第一相薬物代謝反応には酸化、還元、加水分解が含まれ、それらを触媒する主な酵素はシトクロム P450 (CYP: P450)であり、第一相薬物代謝反応の約80%に関与する薬物代謝において中心的な役割

を担う薬物代謝酵素である (Eichelbaum et al., 2006)。多くの薬物はCYPによる第一相反応を受け、さらに第二相反応である抱合反応を受けて極性が増大し体外へ排泄される。しかし、CYPはこのような薬物の不活性化(解毒)に関与するだけでなく、代謝的活性化により活性代謝物を生成し毒性発現にも関与することが知られている (Gonzalez, 2005)。CYPは主に肝臓に発現しているが、腎や肺、脳などほとんどすべての組織に分布しており、現在までにヒトP450は57分子種が同定されている。ヒト肝ミクロソームにおけるCYP分子種の発現量はCYP3A4が最も高く、次いでCYP2C (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19)、CYP1A2, CYP2E1, CYP2D6の順に高く発現しており、これらの分子種でヒト肝総CYP含量の約70%を占め、CYPに関わる薬物代謝の95%以上に関与している (Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001; Guengerich, 2003)。

CYPによる代謝的活性化を受ける薬物として、解熱性鎮痛薬として広く使用されているAPAPが有名であり、薬物誘導性肝障害を引き起こすことが知られている。通常、APAPは生体内で55%がグルクロン酸抱合、30%が硫酸抱合を受けて尿中排泄される (Howie et al., 1977; Tone et al., 1990)。しかし、過剰量のAPAPが存在する場合には、グルクロン酸抱合、硫酸抱合が飽和し、CYP1A2, CYP2E1およびCYP3A4などのCYPにより代謝され、活性代謝物であるNAPQIを生成する