

(Raucy et al., 1989; Thummel et al., 1993)。NAPQI はグルタチオン抱合を受けて、メルカプツール酸として解毒され尿中排泄されるが、グルタチオンが減少すると、NAPQI が細胞内のタンパクや核酸と結合し肝壊死を引き起こすと言われている (Hoffmann et al., 1985; Hinson et al., 1995; Hongslo et al., 1994)。この NAPQI の生成には P450 分子種の中でも CYP2E1 の寄与が最も大きいことが報告されている (Lee et al., 1996)。

CYP2E1 はエタノールなどの比較的分子量の小さな化合物を基質とし、APAP の他にもニトロソアミン類や四塩化炭素、ハロタン、イソニアジドなどの代謝的活性化に関与している。また、CYP2E1 自体が NPR との結合が弱いために、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素種を生成し、酸化ストレスを引き起こすことが知られており (Bell and Guengerich, 1997)、CYP 分子種の中でも毒性学的に重要な分子種の一つである。

CYP1A2 は CYP2E1 に比べ APAP に対する親和性は低い、APAP の代謝的活性化に関与することが知られており、APAP が高用量の際の代謝的活性化への寄与が大きいことが報告されている (Snawder et al., 1994; Zaher et al., 1998)。加えて、CYP1A2 はチザニジン、テオフィリン、フルタミドなどの薬物の代謝や、クロザピン、タクリンなど多くの薬物の代謝的活性化にも関与する分子種である。また、芳香族アミンや多環芳香族炭

化水素などの環境化学物質も基質とし、ヘテロサイクリックアミンやニトロ芳香族アミン、アフラトキシン B₁ などの発がん物質の代謝的活性化にも関与している (Eaton et al., 1995; Anzenbacher and Anzenbacherová, 2001)。

生体内では活性代謝物による酸化ストレスや細胞障害に対する種々の防御機構が存在する。その中でも、Nrf2 は多くの解毒酵素を発現誘導する核内転写因子である。通常 Nrf2 は Keap1 と結合し、細胞質に存在するが、求電子性の薬物や活性代謝物、酸化ストレスに応答し、Keap1 から解離し核内へ移行し、GCLC、NQO1、GSTs などの解毒酵素の転写を活性化する。このように Nrf2 は薬物による毒性の防御機構として働くことが知られている (Copples et al., 2008)。

In vitro 試験で用いられるヒト由来細胞株では CYP の発現量が著しく低く、*in vitro* において CYP による代謝的活性化を検討する際に問題となる (Donato, 2008)。近年、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法が注目されている。プラスミドの発現ベクターを用いた一過性の遺伝子発現では、全ての細胞に発現させることは困難であり、ハイスループットスクリーニングの際に大変な労力と資金を伴うことなどから問題が多い。この点で、アデノウイルスベクターによる発現は一過性ではあるが、どのような細胞にも応用可能で、大量かつ全ての細胞に目的遺伝子を高発現させ、発現量をコントロールすることが可能であり、HIV ウイルスをベースとし

たレンチウイルスベクターに比べ、実験を行う際の安全性の点でも有利であるということから、ハイスループットスクリーニングにおける遺伝子導入に有用な手段である(沖米田, 甲斐, 2002)。現在、CYP3A4を発現するアデノウイルス (AdCYP3A4) が本研究室において既に作製され、CYP3A4によって誘発される薬物の毒性を高感度にスクリーニングする試験系が構築されている。

本研究では、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 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。

B. 研究方法

B-1 プライマーの塩基配列は Table 1 に示した。

Table 1. Sequence of primers used in this study.

Primer	Sequence
T7F	5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3'
pTARGET-AS	5'-ATTTAGGTGACACGATAGAATA-3'
CYP1A2cDNA-F	5'-TCTACAGTTGGTACAGATGG-3'
CYP1A2cDNA-R	5'-TCAGTTGATGGAGAAGCGCA-3'
RT-1A2-S	5'-CCAACGTCATTGGTGCCATG-3'
RT-1A2-AS	5'-GTGATGTCCCGGACACTGTTC-3'
Adeno-f	5'-GTACCTCAGCACCTTCCAGAT-3'
Adeno-r	5'-GAGTAGTGACTAGTGTTGGCC-3'
CYP2E1 cDNA F	5'-ATGTCTGCCCTCGGAGTCAC-3'
CYP2E1 cDNA R	5'-CTCATGAGCGGGGAATGACA-3'
CYP2E1 sequence	5'-CCTGATGTTCTGCTCAAGAG-3'
2E1 cDNA exon 2-AS	5'-GCATCTCTTGCCTATCCTTGA-3'
human CYP2E1 RT-S2	5'-AGAGTATGTGTCTGAAAGGG-3'
human CYP2E1 RT-AS2	5'-GCATCTCTTGCCTATCCTT-3'

B-2 AdCYP1A2 と AdCYP2E1 の作製

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 AdCYP1A2 と AdCYP2E1 を作製した。

B-2-1 CYP1A2 cDNA 組換え pAxCAwtit ベクターの構築

CYP1A2 cDNA が組み込まれた pTARGET CYP1A2 を *EcoR* I で消化し、EtBr を含む 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を切り出した。これを透析膜に入れ、電気泳動を行い DNA 溶液を回収した。DNA の精製は以下の方法に従った。フェノール/クロロホルム溶液 400 μ L を加えて 5 分間ボルテックスし、7,000 rpm (3,000 g) で 5 分間遠心分離して上清を回収した。次に 400 μ 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 rpm (3,000 g) で 5 分間遠心分離した。上清に 3 M 酢酸ナトリウムを 40 μ L と 100% 冷エタノールを 1 mL 加え、-80°C で冷却後、15,000 rpm (12,000 g)、4°C で遠心分離し、沈殿を 70% 冷エタノール 1 mL で洗浄した。沈殿を乾燥後、TE に溶解させ、DNA を精製した。精製回収後、DNA 溶液 19 μ L に 10 \times Klenow fragment buffer を 2.5 μ L、2.5 mM dNTPs を 2 μ L、Klenow fragment を 1 μ L、滅菌精製水を加えて全量を 25 μ L とし 37°C、30 分間インキュベーションした。70°C で 5 分間のインキュベーションで酵素を不活性化した後、DNA 断片を精

製した。同様に哺乳類の細胞で強力に働く CAG プロモーターを有するアデノウイルスベクターである pAxCAwtit を *Swa* I で消化し、DNA 断片を精製した。精製した DNA 断片を以下の方法に従って、連結および形質転換させた。ベクター 85 ng、インサート 560 ng、10 \times T4 DNA ligase buffer を 1 μ L、1 unit/ μ L T4 ligase を 1 μ L、滅菌精製水を加えて全量を 10 μ L とし、14°C で 6 時間反応させた。この DNA 溶液を DH5 α コンピテントセル 100 μ L に添加して氷中で 30 分間インキュベーションし、42°C で 90 秒間ヒートショックにより形質転換した。900 μ 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 14 時間培養した。寒天培地から単離したコロニーを LB-Amp 培地 500 μ L を用いて、37°C で 8 時間以上培養した。10 \times PCR 緩衝液 2.5 μ L、10 μ M の RT-1A2-S プライマーと RT-1A2-AS プライマーをそれぞれ 1 μ L、2.5 mM dNTPs 2.5 μ L、25 mM MgCl₂ 1.5 μ L、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2 μ L、滅菌精製水を加えて全量を 25 μ 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攪拌後、滅菌爪楊枝をとり、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 PCR 反応を行った。(1) 94°C で 2 分 (2) 94°C で 20 秒、54°C で 20 秒、72°C で 30 秒を 25 サイクル (3) 72°C で 3 分。反応終了後、一部を分取し EtBr を含む 2.0% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、目的の DNA

断片の有無を確認した。目的の DNA 断片が確認された培養液を 50 μ 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。これより CYP1A2 cDNA 組換え pAxCawtit プラスミドを得た。

B-2-2 CYP2E1 cDNA 組換え pCW ベクターの構築

大腸菌発現プラスミドである pCW CYP2E1 は大腸菌での発現効率改善の目的で CYP2E1 cDNA の N 末端の配列が改変されている。この N 末端の改変を除くため、ヒト肝 RT 産物 1 μ g を鋳型に、10 \times Ex Taq PCR 緩衝液 2.5 μ L、10 μ M CYP2E1 cDNA F プライマーと CYP2E1 cDNA R プライマーをそれぞれ 1 μ L、2.5 mM dNTPs 2.5 μ L、Ex Taq DNA ポリメラーゼ 0.2 μ L を加え、滅菌精製水を加えて全量を 25 μ L とし、以下の PCR 条件で CYP2E1 cDNA を増幅した。(1) 94°C で 3 分 (2) 94°C で 25 秒、59°C で 25 秒、72°C で 1.5 分を 40 サイクル (3) 72°C で 5 分。反応終了後、EtBr を含む 0.8% アガロースゲルで電気泳動を行い 2-2-1 と同様の操作で CYP2E1 cDNA を精製し、pTARGET プラスミドに組み込んだ。pCW CYP2E1 と pTARGET CYP2E1 を *Bam*H I で消化後、EtBr を含む 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を切り出し、DNA 断片を 2-2-1 と同様に精製し、連結および形質転換させ、N 末端の改変されていない pCW CYP2E1 を作製した。

B-2-3 CYP2E1 cDNA 組換え pAxCawtit ベクターの構築

CYP1A2 と同様に、CYP2E1 を発現するアデノウイルスベクターを構築するために、2-2-1 と同様の操作により形質転換を行ったが目的のプラスミドは得られなかった。pAxCawtit は 44,990 bp とサイズが大きいコスミドベクターであり、コンピテントセルを用いた形質転換では形質転換効率は低い。そのため入ファージにパッケージングさせた後、形質転換を行った。パッケージングには Gigapack III XL Packaging Extract[®] を用い、以下の方法で行った。インサートは pCW CYP2E1 10 ng を鋳型に、5 \times PrimeSTAR[™] 緩衝液 5 μ L、10 μ M CYP2E1 F プライマーと CYP2E1 R プライマーをそれぞれ 1 μ L、2.5 mM dNTPs 2 μ L、PrimeSTAR[™] DNA ポリメラーゼ 0.25 μ L を加え、滅菌精製水を加えて全量を 25 μ L とし、以下の PCR 条件でインサートを増幅した。(1) 94°C で 3 分 (2) 94°C で 25 秒、59°C で 25 秒、72°C で 1.5 分を 35 サイクル (3) 72°C で 5 分。反応終了後、PCR 産物を 2-2-1 と同様に精製した。ライゲーションは pAxCawtit ベクター 1 μ g、インサート 2 μ g、10 \times T4 DNA ligase buffer を 1 μ L、1 unit/ μ L T4 ligase を 1 μ L、滅菌精製水を加えて全量を 10 μ L とし、14°C で 8 時間反応させ、反応終了後、2-2-1 と同様にライゲーション産物を精製した。recA 大腸菌株である DH5 α を 300 μ L の LB 培地を用いて、37°C で 5 時間インキュベート後、LB-Amp (-) 寒天培地に播種し、37°C で 14 時間

培養した。シングルコロニーをつつき 0.2% マルトース添加 LB 5 mL で対数増殖期になるまで (OD_{650} が 1 を超えないように) 37°C で振とう培養後、培養液 1 mL を滅菌エッペンに取り、4°C、500 g で 10 分間遠心し上清を除き、沈澱を 10 mM $MgSO_4$ 500 μ L に穏やかに懸濁し、2 \times 菌液とした。精製したライゲーション産物 4 μ L をパッケージングエクストラクトと混合して、室温で 1.5 時間静置後、SM buffer 100 μ L を加えた。この溶液 100 μ L に、2 \times 菌液 100 μ L を混合し、室温で 15 分間静置し、感染を行った。次に、LB 培地 1 mL を加えて、37°C で 30 分間インキュベート後、LB-Amp 寒天培地に 1/100、1/10、原液を播種し、37°C で 14 時間培養した。目的プラスミドは、コロニーPCR により以下の操作により確認した。Adeno-f プライマーと CYP2E1 cDNA R プライマー以外は 2-2-1 と同じ組成の反応液を調製し、以下の条件で PCR 反応を行った。(1) 94°C で 2 分 (2) 94°C で 20 秒、60°C で 20 秒、72°C で 1.5 分を 25 サイクル (3) 72°C で 3 分。反応終了後の操作は 2-2-1 と同様に行った。これより CYP2E1 cDNA 組換え pAxCAwtit プラスミドを得た。

B-2-4 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) 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) で 15 分間遠心分離し、タンパクを除いた。あらかじめ Buffer QBT 4 mL で平衡化した QIAGEN-tip 100 に上清を付着させ、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。沈澱を 70% エタノールで洗浄し、沈澱を乾燥させた後、TE を加えて溶解させた。プラスミドの定量には Nano Drop (Nano Drop Technologies, Wilmington, USA) を用いた。

B-2-5 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 3 μ g、Reaction buffer を 3.5 μ L、10 μ M のプライマーを 0.5 μ L、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 3 μ g、Reaction buffer を 3.5 μ L、10 μ M のプライマーを 0.5 μ L、Thermo Sequenase DNA polymerase を 2 μ L、滅菌精製水を加えて全量を 31.5 μ L とし、先に分注しておいた各 dNTPs/Cy5.5-ddNTP 1 μ L に 7 μ L ずつ加

え反応液とした。サーマルサイクラーを用いて、Table 1 に示したプライマーを用いて、いずれのプライマーにおいても以下の条件でサイクルシークエンス反応を行った。94°Cで30秒、各プライマーの至適温度で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 2 μ L、100%冷エタノールを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%冷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 (GE Healthcare) により解析した。これより、インサート上に変異がないことを確認した。

B-2-6 細胞培養

293細胞は10%FBSとNEAAを含むDMEMを用いて10cmシャーレで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後1×PBS溶液4 mLをシャーレに加え、培地を5 mL入れておいた50 mLファルコン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10cm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で2分間インキュベートした。5 mLの培地を入れておいた50 mLファルコンチューブにシャーレより剥離した細胞を移し3,000 rpm (700 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-2-7 アデノウイルスベクターのトランスフェクション (COS-TPC法)

リポフェクタミン™2000 20 μ Lと無血清培地 500 μ Lを穏やかに混合し5分間静置した後、2-2-1および2-2-3で作製したプラスミド8 μ gとAdenovirus genome DNA-TPC 10 μ Lを加えて無血清培地で500 μ Lとした溶液と混合し、20分間静置した。Cell Matrix Type I-Cでコーゲンコートした6cmシャーレ上で90%コンフルエントに増殖した293細胞に、無血清培地4 mLと混合した溶液を加え、振とうした。37°Cで5時間インキュベート後培地を交換し、さらに37°Cで19時間インキュベートした。

B-2-8 1次ウイルスの作製

2-2-7でトランスフェクションした293細胞を11 mLの5%FBS-DMEMに懸濁し(A液)、トランスフェクションしていない10cmシャーレ上で90%コンフルエントに増殖した293細胞は30 mLの5%FBS-DMEMに懸濁した(B液)。0.1 mLのA液と11 mLのB液を混合し100倍希釈プレートに、また1.0 mLのA液と11 mLのB液を混合し10倍希釈プレートに、10 mLのA液を原液プレートに、それぞれ1

ウェルあたり 100 μ L ずつ播種した。

96 ウェルプレートに播種後、5 日目と 10 日目に各ウェルに 10%FBS-DMEM を 50 μ L ずつ加えた。ウイルスにより細胞が変性したウェルが 7~15 日後に現れるので、全ての細胞が変性したウェルから培養液ごと細胞を 1.5 mL エッペンに移し、ドライアイスで凍結し、-80°C で保存した。15~18 日で判定を終了し、最終的に全ての細胞で変性が認められ、比較的遅く (8 日以降) 細胞が変性したウェルから回収した培養液のエッペンを 10 個程度選んだ。選出したエッペンを、ドライアイスと 37°C 温浴で凍結融解を 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 1 次ウイルス液として -80°C で保存した。

B-2-9 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 2-2-8 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することにより、ウイルス液をすべ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 日後に細胞が完全に変性したクローンを選出し、培養液ごと細胞を回収し、2-2-8 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-2-10 組み換えアデノウイルスの確認 (1)

2-2-9 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、沈澱の細胞のみを -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。ボルト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。その後、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。エタノール沈澱後、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、1.0%アガロースゲルで電気泳動を行い、遺伝子断片の位置を確認した。目的ウイルスを制限酵素処理した場合、*Cla* I 消化により 1.0 kbp、*Xho* I 消化により 0.48 kbp のウイルス由来のバンドができる。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-2-11 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 2-2-10 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することにより、ウイルス液をすべ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日後に細胞が完全に変性し
たクローンを選出し、培養液ごと細胞を回収
し、2-2-8と同様に凍結融解を6回繰り返し、
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-2-12 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、
2-2-11で調製した3次ウイルス液50 μ Lと、
5%FBS-DMEM 2 mLを加え、プレートを数回
振とうすることにより、ウイルス液をすべて
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 5 mL
を加えた。3日後に培養液ごと細胞を回収し、
2-2-8と同様に凍結融解を6回繰り返し、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-2-13 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、ウイルスDNAの制限酵素消化による遺伝
子断片の位置を2-2-10と同様の操作で確認し
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-3 アデノウイルスの力価測定

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の力価を測定した。

2-2-6の操作に従い回収した293細胞 2.5×10^5
cells/mLの細胞懸濁液を、5%FBS-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。2-2-13で作製したウイルス原液10 μ Lと
5%FBS-DMEM 990 μ Lを混合し、10²倍のウイ
ルス希釈液を調製した。さらに10²倍のウイ
ルス希釈液100 μ Lと5%FBS-DMEM 900 μ Lを混
合し、10³倍のウイルス希釈液を調製した。同
様の操作をさらに4回繰り返し、10³から10⁷
倍のウイルス希釈液を調製し、24 well プレ
ートに100 μ Lずつ加えた。ブランクには、
5%FBS-DMEMを100 μ L加えた。5%CO₂存在
下37°Cで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100%
冷メタノールを加え、-20°Cで20分間静置し、
細胞を固定させた。その後、細胞を2回、1 \times
PBS 250 μ Lで5分間洗浄後、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

× 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 × DAB working solution を除き、各ウェルを 1 × PBS 250 μ L で細胞を 5 分間洗浄し、1 × 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。各ウイルス希釈 (dilution factor) において、視野の中に 5~50 個の茶色に染色された細胞が現れるウェルを選出し、少なくとも 5 視野で染色された細胞数を計測し、その平均値を求めた (average positive cells/field)。ウイルス力価 (Viral Titer) は以下の式に基づき算出した。なお、接眼レンズ、対物レンズともに 10 倍に設定した顕微鏡で 24 ウェルプレートを観察した場合、視野面積は 1.8 mm² である。24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり面積は 2.0 cm² なので、補正值 (Fields/well) および Viral Titer (PFU/mL) は下記の通りとなる。

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

B-4 HepG2 細胞へのアデノウイルス感染

2-2-6 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 3×10^5 cells/well となるように 12 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、各ウェルあたり MOI 0、2.5、5、10、20、30、40 および 50 となるように調製し

た AdCYP1A2、AdCYP2E1 および AdGFP ウイルス液を 200 μ L 加え、プレートを数回振とうすることにより、ウイルス液をすべ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 800 μ L を加え、72 時間後に薬物処置し CYP1A2、CYP2E1 の酵素活性測定を行い、その後、細胞を回収しタンパク定量を行った。

B-5 タンパク質定量

アデノウイルス感染、薬物処置後の HepG2 細胞において、各ウェルの培養液を回収後、トリプシン-EDTA 溶液を 500 μ L を加えた。37°C で 2 分間インキュベート後、500 μ L の培地で懸濁しながら細胞を回収した。回収後、3,000 rpm (700 g)、4°C で 5 分間遠心分離後、上清をアスピレーターで吸引し、沈澱を 1 mL の 1 × PBS で再懸濁した。10,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し、上清をアスピレーターで吸引し、50 μ L の TGE 緩衝液で懸濁した。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。タンパク定量は Bradford 法 (Bradford, 1976) に従い、Bio-Rad の Protein Assay kit を用いた。 γ -グロブリン溶液 0、5、10、15、20 mg/mL を検量線に、各サンプルを適当に希釈した細胞懸濁液 20 μ L と Brad 溶液 980 μ L を混合し、室温で反応させた。595 nm の吸光度を Biotrak II plate reader (GE Healthcare) を用いて測定した。

B-6 メトキシレゾルフィン O-脱メチル化酵素活性測定

CYP1A2 酵素活性を検討するため、2-4 の操作に従い 12 ウェルプレート上の HepG2 細胞に AdCYP1A2 ウイルスを MOI 0、2.5、5、10、20、30、40 および 50 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、1 μ M メトキシレゾルフィンを含む無血清培地 1 mL を加えた。1 時間後に培養液を採取して生成したレゾルフィンを以下の方法により測定した。培養液を 3,000 rpm (700 g) で 10 分間遠心分離後、上清 20 μ L を HPLC に注入して分析した。HPLC の移動相は 35%メタノール/20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を用い、カラムは Mightysil RP-18 GP (関東化学, Tokyo, Japan, 4.6 mm ID \times 150 mm, 5 μ m) を用いた。カラム温度は 35 $^{\circ}$ C、流速は 1.0 mL/min で溶離液を励起波長 574 nm、放出波長 596 nm でモニターした。レゾルフィンの保持時間は 3.8 分であった。

B-7 クロルゾキサゾン 6 位水酸化酵素活性測定

CYP2E1 酵素活性を検討するために、2-4 の操作に従い 12 ウェルプレート上の HepG2 細胞に AdCYP2E1 ウイルスを MOI 0、2.5、5、10、20、30、40 および 50 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、500 μ M クロルゾキサゾンを含む無血清培地 1 mL を加えた。1 時間後に培養液を採取して生成した 6-水酸化クロルゾキサゾンを以下の方法により測定した。培養液を 3,000 rpm (700 g)

で 10 分間遠心分離後、上清 20 μ L を HPLC に注入して分析した。HPLC の移動相は 35%メタノール/50 mM リン酸 2 水素カリウムを用い、カラムは Mightysil RP-18 GP を用いた。カラム温度は 35 $^{\circ}$ C、流速は 1.0 mL/min で溶離液を波長 295 nm でモニターした。保持時間は 6-水酸化クロルゾキサゾンが 4.1 分、クロルゾキサゾンが 13.5 分であった。

B-8 SDS-PAGE と Western blot 解析

2-5 で調製した細胞懸濁液を使用し、Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、以下のように行った。各サンプルのタンパク質 5 μ g に対して、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を等量加えた後、100 $^{\circ}$ C で 3 分間煮沸し、厚さ 1 mm、7.5%ポリアクリルアミドゲル、泳動用緩衝液を用いて SDS-PAGE を行った。その後、Transfer cell を用い、電気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 膜は転写用緩衝液に浸して行った。転写後、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 1 時間ブロッキングし、PBS により 5 分間ずつ 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、ウサギ抗ヒト CYP1A2 抗体 (1 \times PBS で 1,000 倍希釈)、ヤギ抗ラット CYP2E1 抗体 (1 \times PBS で 10,000 倍希釈) を用いた。次に PBS で 5 分間ずつ 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

にはビオチン化抗ラット IgG (1×PBS で 2,000 倍希釈)、ビオチン化抗ウサギ IgG (1×PBS で 2,000 倍希釈) を用いた。その後、PBS で 5 分間ずつ 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 (1×PBS で 2,000 倍希釈) を用い、さらに 10 分間ずつ 3 回 PBS で洗浄した後、DAB で発色させた。

B-9 HepG2 細胞へのアデノウイルス感染および siRNA 処置

96 ウェルプレートの 1 ウェルごとに、Lipofectamine RNAiMAX 0.1 μ L、20 μ M siRNA 0.12 μ L を含む無血清培地 40 μ L を加え、30 分間静置した。2-2-6 の操作に従い回収した

HepG2 細胞の細胞懸濁液を 2×10^5 cells/well となるように調製し、siRNA 処置した 96 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、MOI 20 となるように調製した AdCYP1A2、AdCYP2E1 および AdGFP ウイルス液 40 μ L を加え、プレートを数回振とうさせることにより、ウイルス液をすべ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 100 μ L を加えた。

B-10 薬物処置および細胞生存率測定

2-9 の操作による感染 48 時間後に、AdCYP1A2、AdCYP2E1 および AdGFP 感染 HepG2 細胞に、被検薬物を 100 μ L 処置し、36 時間後に MTT assay または ATP assay を行った。MTT assay では CCK-8 溶液を各ウェル 10 μ L ずつ加え、溶液添加 1 時間後の 450 nm の吸光度を Biotrak II Plate reader を用いて測定した。ATP assay では各ウェルに CellTiter-Glo Reagent を 100 μ L 加え、ルミノメーター 1420 ARVO MX (PelkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA) 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。

(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 ウイルス力価測定結果

B-3 の方法によって求めたウイルス液の力価測定結果を示した (Table 2)。

Table 2. Viral titer of AdCYP1A2, AdCYP2E1 and AdGFP.

	Viral Titer (PFU/mL)
AdCYP1A2	7.27×10^8
AdCYP2E1	1.09×10^9
AdGFP	2.10×10^8

今後、この測定結果に基づいてウイルス感染条件検討を行った。

C-2 AdCYPIA2感染によるMOI依存的メトキシレゾルフィン *O*-脱メチル化酵素活性およびCYPIA2タンパク質発現量の変動

2-4の操作に従い、至適MOIの検討を行うためにHepG2細胞にAdCYPIA2をMOI 0、2.5、5、10、20、30、40および50で感染させ、感染3日後にメトキシレゾルフィン *O*-脱メチル化酵素活性測定を行った (Fig. 1A)。また、AdCYPIA2をMOI 0、1.0、2.5、5および10で感染させCYPIA2タンパク質発現量をウエスタンブロットにより解析した (Fig. 1B)。その結果、MOI 50までMOI依存的なメトキシレゾルフィン *O*-脱メチル化酵素活性値の上昇が認められ、タンパク質発現量においてもMOI 10までMOI依存的な増加が認められた。しかし、MOI 30以上では、顕微鏡での観察において細胞の状態が悪かったため、細胞の状態が良好で、最も高い活性値を示したMOI 20が最適であると判断した。ヒトヘパトサイトでのメトキシレゾルフィン *O*-脱メチル化酵素活性値は 1.5 ± 0.3 pmol/min/mg

protein と報告されており (Donato et al., 2006)、MOI 20の感染ではヒトヘパトサイトよりも15倍程度高い酵素活性値が得られた。

C-3 AdCYPIA2至適感染日数の検討

AdCYPIA2の至適感染日数について検討を行った。HepG2細胞にAdCYPIA2をMOI 20で感染させ、感染後1、2、3および5日目においてメトキシレゾルフィン *O*-脱メチル化酵素活性測定とタンパク質発現量をウエスタンブロットにより解析した (Fig. 2)。この検討の際、アデノウイルス感染が酵素活性に及ぼす影響の有無を検討するため、AdGFPをMOI 20で感染させた細胞を対照群とした。その結果、AdCYPIA2感染群において酵素活性値は感染3日目に最も高値を示し、タンパク質発現量においても酵素活性値と相関する結果が得られた。しかし、感染日数が長くなると、細胞の状態が悪くなり、薬物処置時に浮遊する傾向が認められたことより、以後の実験は細胞の状態が良好で、ヒトヘパトサイトと比較して10倍程度高い酵素活性値が得られた感染2日目に薬物処置を行った。

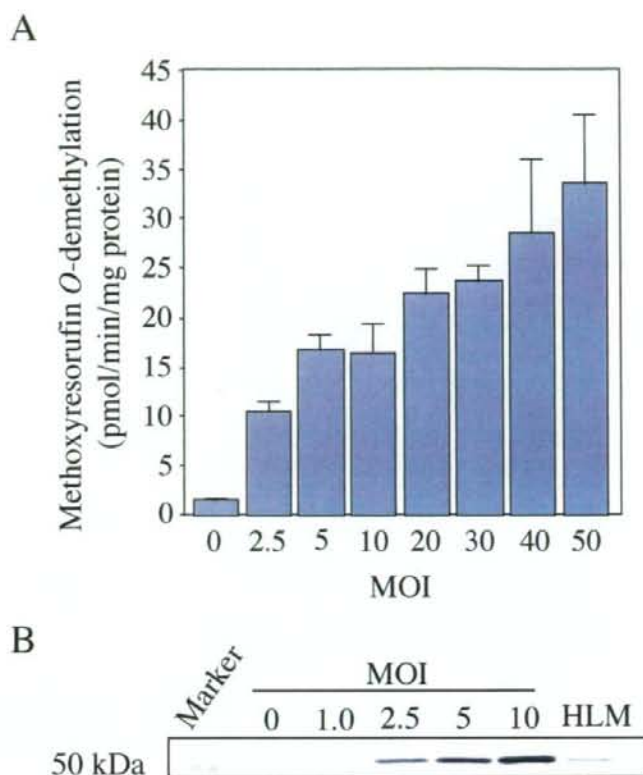


Fig. 1. MOI-dependent expression of CYP1A2 in HepG2 cells infected with adenovirus. (A) HepG2 cells were infected with AdCYP1A2 at MOI 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, and 50 for 3 days. The activity was measured by direct incubation of intact cells with 2 μ M methoxyresorufin. Data are mean \pm SD of three independent experiments. (B) Western blot analysis of CYP1A2 protein level. Total cell homogenates from the cells infected with AdCYP1A2 for 3 days (5 μ g) were separated by 7.5% SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with rabbit anti-human CYP1A2 antibody. Human liver microsomal sample (HLM, 10 μ g) was used as a control.

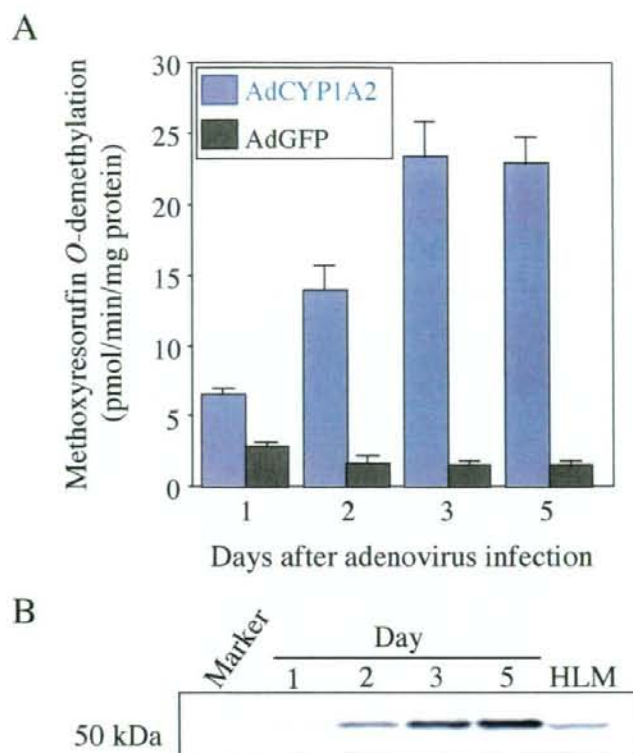


Fig. 2. Time-dependent expression of CYP1A2 in HepG2 cells infected with adenovirus. (A) HepG2 cells were infected with AdCYP1A2 at MOI 20 for 1, 2, 3 and 5 days. The activity was measured using 2 μ M methoxyresorufin. Blue and gray columns represent the activity of the cells infected with AdCYP1A2 and AdGFP, respectively. Data are mean \pm SD of three independent experiments. (B) Western blot analysis of CYP1A2 protein level. HepG2 cells were infected with AdCYP1A2 at MOI 20 for 1, 2, 3 and 5 days. Total cell homogenates from the cells infected with AdCYP1A2 (5 μ g) were separated by 7.5%SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with rabbit anti-human CYP1A2 antibody. Human liver microsome sample (HLM, 10 μ g) was used as a control.

C-4 AdCYP2E1 感染による MOI 依存的クロ

ルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性および

CYP2E1 タンパク質発現量の変動

2-4 の操作に従い、至適 MOI の検討を行うために HepG2 細胞に AdCYP2E1 を MOI 0、2.5、5、10、20、30、40 および 50 で感染させ、感染 3 日後にクロルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性測定を行った (Fig. 3A)。また、AdCYP2E1 を MOI 0、1.0、2.5、5 および 10 で感染させ CYP2E1 タンパク質発現量をウエスタンブロットにより解析した (Fig. 3B)。その結果、MOI 50 まで MOI 依存的なクロルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性値の上昇が認められ、タンパク質発現量においても MOI 10 まで MOI 依存的な増加が認められた。しかし、MOI 30 以上では、顕微鏡での観察において細胞の状態が悪かったため、細胞の状態が良好で、最も高い活性値を示した MOI 20 が最適であると判断した。ヒトヘパトサイトでのクロルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性値は 127 ± 27 pmol/min/mg protein と報告されており (Donato et al., 2006)、MOI 20 の感染ではヒトヘパトサイトよりも 4 倍程度高い酵素活性値が得られた。

C-5 AdCYP2E1 至適感染日数の検討

AdCYP2E1 の至適感染日数について検討を行った。HepG2 細胞に AdCYP2E1 を MOI 20 で感染させ、感染後 1、2、3 および 5 日目においてクロルゾキサゾン 6-水酸化酵素活性測定と、タンパク質発現量をウエスタンブロットにより解析した (Fig. 4)。この検討の際、アデノウイルス感染が酵素活性に及ぼす影響の有無を検討するため、AdGFP を MOI 20 で感染させた細胞を対照群とした。その結果、AdCYP2E1 感染群における酵素活性値は感染後 3 日から 5 日目にかけて高値を示し、タンパク質発現量においても酵素活性値と相関する結果が得られた。また、AdGFP 感染群では 6-水酸化クロルゾキサゾンは検出されなかった。しかし、感染日数が長くなると、細胞の状態が悪くなり、薬物処置時に浮遊する傾向が認められたことより、以後の実験は細胞の状態が良好で、ヒトヘパトサイトと比較して 2.5 倍程度高い活性値が得られた感染 2 日目に薬物処置を行うことにした。

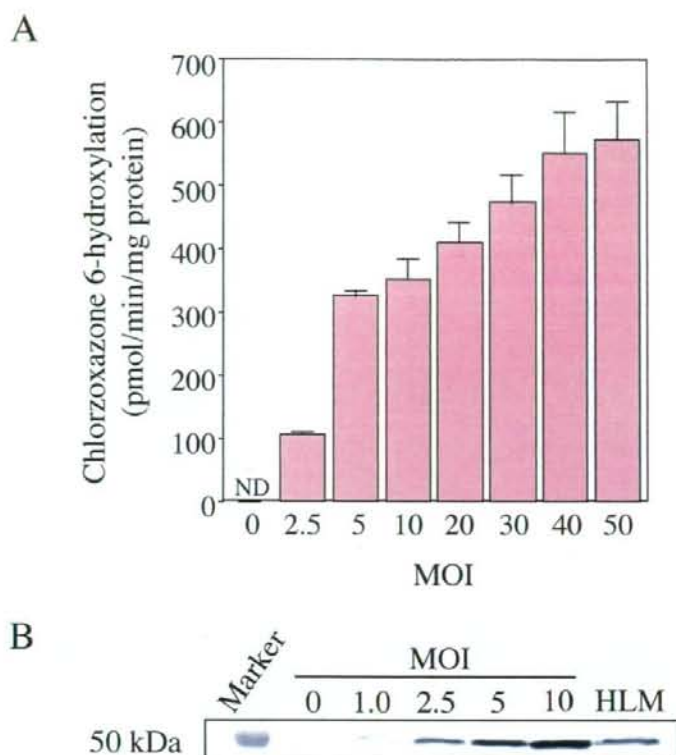


Fig. 3. MOI-dependent expression of CYP2E1 in HepG2 cells infected with adenovirus. (A) HepG2 cells were infected with AdCYP2E1 at MOI 0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 and 50 for 3 days. The activity was measured by direct incubation of intact cells with 500 μ M chlorzoxazone. Data are mean \pm SD of three independent experiments. ND, not detected. (B) Western blot analysis of CYP2E1 protein level. HepG2 cells were infected with AdCYP2E1 at MOI 0, 1.0, 2.5, 5 and 10 for 3 days. Total cell homogenates from the cells infected with AdCYP2E1 (5 μ g) were separated by 7.5% SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with goat anti-rat CYP2E1 antibody. Human liver microsomal sample (HLM, 3 μ g) was used as a control.

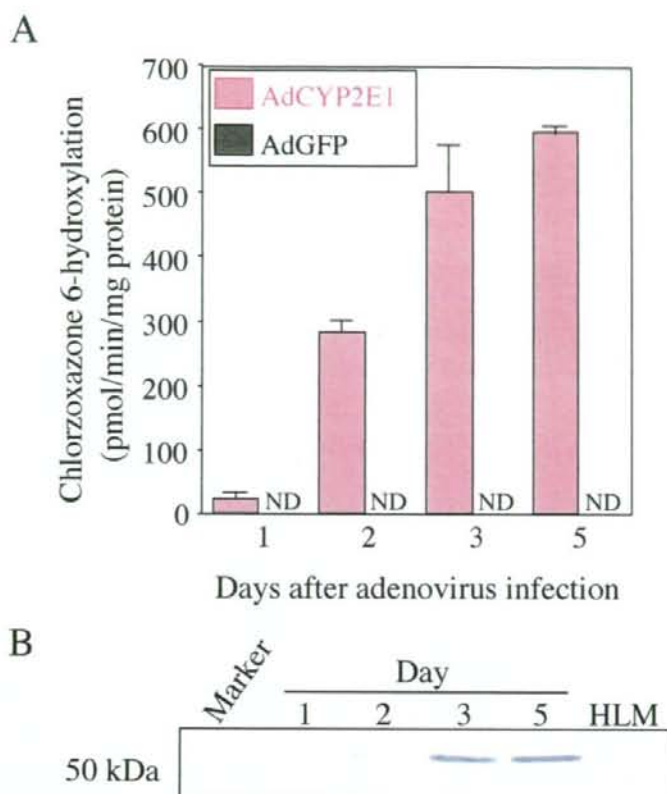


Fig. 4. Time-dependent expression of CYP2E1 in HepG2 cells infected with adenovirus. (A) HepG2 cells were infected with AdCYP2E1 at MOI 20 for 1, 2, 3 and 5 days. The activity was measured using 500 μ M chlorzoxazone. Data are mean \pm SD of three independent experiments. ND, not detected. (B) Western blot analysis of CYP2E1 protein level. HepG2 cells were infected with AdCYP2E1 at MOI 20 for 1, 2, 3 and 5 days. Total cell homogenates from the cells infected with AdCYP2E1 (5 μ g) were separated by 7.5% SDS-PAGE, followed by Western blot analysis with goat anti-rat CYP2E1 antibody. Human liver microsomal sample (HLM, 3 μ g) was used as a control.

C-6 AdCYP1A2 および AdCYP2E1 感染
Nrf2 ノックダウン HepG2 細胞における
MTT アッセイを用いた薬物による細胞障
害性の検討

Nrf2 を siRNA によりノックダウンし、
AdCYP1A2 および AdCYP2E1 を感染させ
た HepG2 細胞を用いて、肝障害の報告があ
る種々の薬物 (Fig. 5) を処置し、薬物処置

36 時間後に細胞生存率を MTT アッセイに
より測定した (Fig. 6)。対照群として
AdGFP 群を感染させた HepG2 細胞を用い
た。5-Amino-2-nitrobenzotrifluoride (FLU-1)
はフルタミドの加水分解代謝物であり、N
位水酸化体が毒性に関与する報告がある
ため用いた (Ohbuchi et al., 2009)。

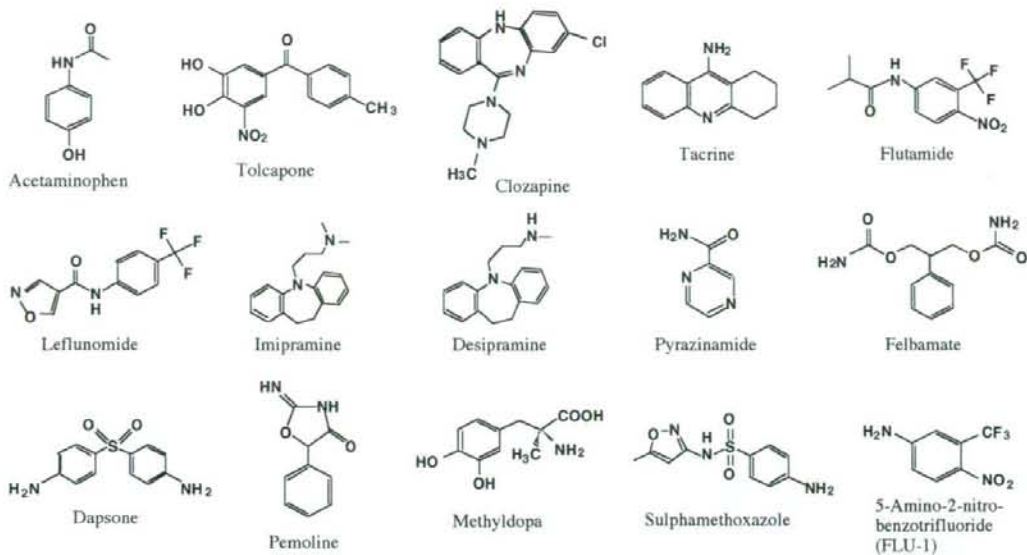
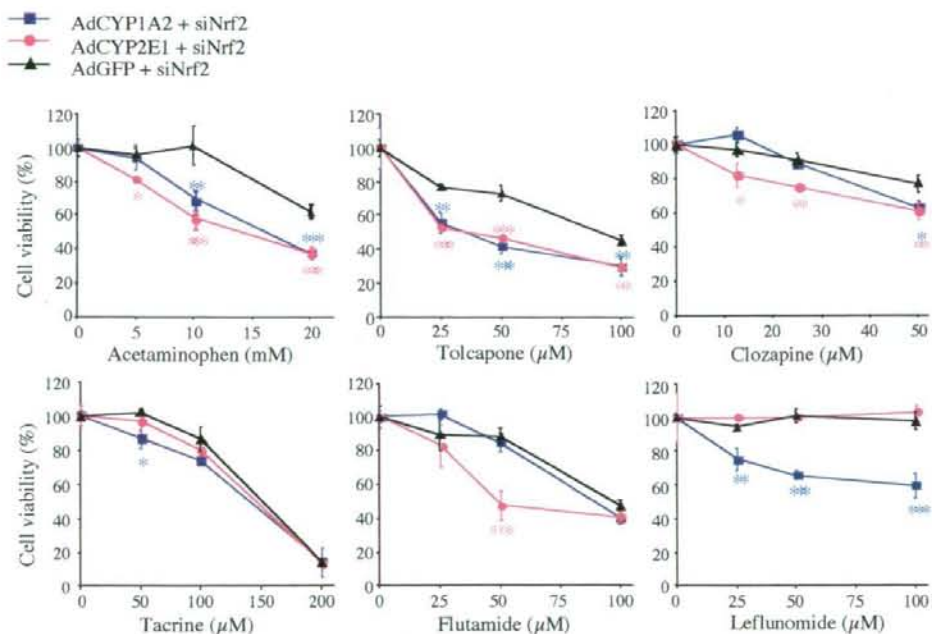


Fig. 5. Chemical structures of drugs used in the present study.



Continue

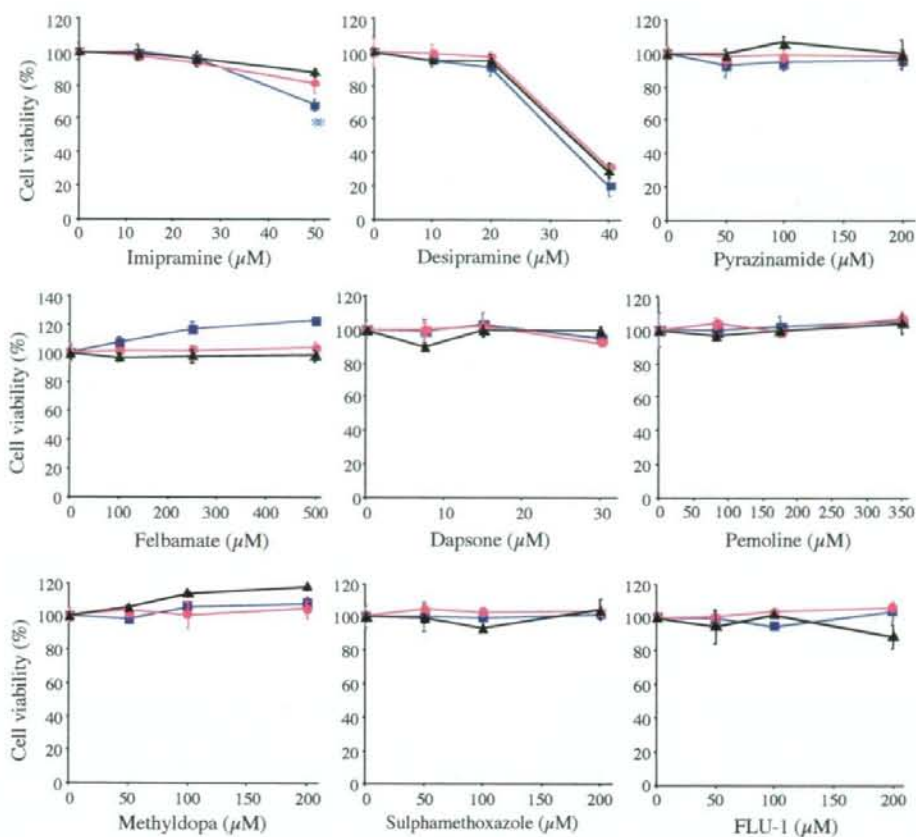


Fig. 6. MTT assay in adenovirus-infected HepG2 cells transfected with siNrf2 after 36 hr exposure of various drugs. Cell viability is expressed as percentage of solvent-treated cells. Data are mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001 compared with AdGFP-infected groups.

アセトアミノフェン処置においては AdCYP1A2 感染群で 10 mM 以上の処置により、AdCYP2E1 感染群で 5 mM 以上の処置により 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。

トルカポン処置においては 25 μ M 以上の処置により AdCYP1A2 および AdCYP2E1

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。

クロザピン処置においては AdCYP2E1 感染群では 12.5 μ M 以上の処置で、AdCYP1A2 感染群では 50 μ M 処置で、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。

タクリン処置においては AdCYP1A2 感染群で 50 μ M 処置により 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が、AdCYP2E1 感染群では有意な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 AdCYP2E1 感染群で 50 μ M 処置により 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が、AdCYP1A2 感染群では有意な細胞生存率の低下は認められなかった。

レフルノミド処置においては AdCYP1A2 感染群において 25 μ M 以上の処置により 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が、AdCYP2E1 感染群では有意な細胞生存率の低下は認められなかった。

イミプラミン処置においては AdCYP1A2 感染群において 50 μ M 処置により 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が、AdCYP2E1 感染群では有意な細胞生存率の低下は認められなかった。

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、ベモリン、メチルドパ、スルファメトキサゾール、FLU-1) では本試験系において 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。

C-7 AdCYP1A2 および AdCYP2E1 感染

HepG2 細胞を用いた薬物による細胞障害性に対する Nrf2 の影響の検討

C-6 では Nrf2 をノックダウンさせた HepG2 細胞において細胞生存率を検討したが、Nrf2 をノックダウンさせたことにより解毒因子の発現が抑制され、活性代謝物の細胞障害性をより高感度に示すことが可能になったと考えられる。そこで活性代謝物の解毒に対する Nrf2 の影響を検討するために、siNrf2 の代わりにネガティブコントロールとして siScramble を処置した HepG2 細胞を用いて、3-6 の検討で細胞生存率の低下が顕著に認められた薬物における細胞生存率の検討を MTT アッセイにて行った (Fig. 7)。

アセトアミノフェン処置においては AdCYP1A2 感染群および AdCYP2E1 感染群で 10 mM 以上の処置により 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。siNrf2 処置 (Fig. 6) に比べ、5 mM に認められていた AdCYP2E1 感染群における細胞障害性が認められなくなった。

トルカボン処置においては AdCYP1A2 感染群および AdCYP2E1 感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下は認められなかった。siNrf2 処置 (Fig. 6) に比べ、CYP1A2 および CYP2E1 による細胞生存率の低下は認められなくなった。