

Fig. 7. MTT assay in adenovirus-infected HepG2 cells transfected with siScr 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.

クロザピン処置においては AdCYP2E1 感染群で 25 μ M 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、siNrf2 処置 (Fig. 6) に比べ、AdCYP2E1 感染群における細胞障害性の減弱が認められた。また、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。

タクリン処置においては AdCYP1A2 感染群で 50 および 100 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つ

た。

フルタミド処置においては AdCYP2E1 感染群で 100 μ M 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、siNrf2 処置 (Fig. 6) に比べ、AdCYP2E1 感染群における細胞障害性の減弱が認められた。また AdCYP1A2 感染群では有意な細胞生存率の低下は認められなかつた。

レフルノミド処置においては AdCYP1A2 感染群で 100 μ M 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、siNrf2 処置 (Fig. 6)

に比べ、AdCYP1A2 感染群における細胞障害性の減弱が認められた。また、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。

C-8 AdCYP1A2 および AdCYP2E1 感染 Nrf2 ノックダウン HepG2 細胞における ATP アッセイを用いた薬物による細胞障

害性の検討

C-6 の検討では細胞障害性を MTT アッセイにより検討したが、細胞障害性を検討する別の方法として細胞内 ATP 産生量を測定する ATP アッセイがある。C-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よる細胞障害性の検討を ATP アッセイにおいても検討した (Fig. 8)。

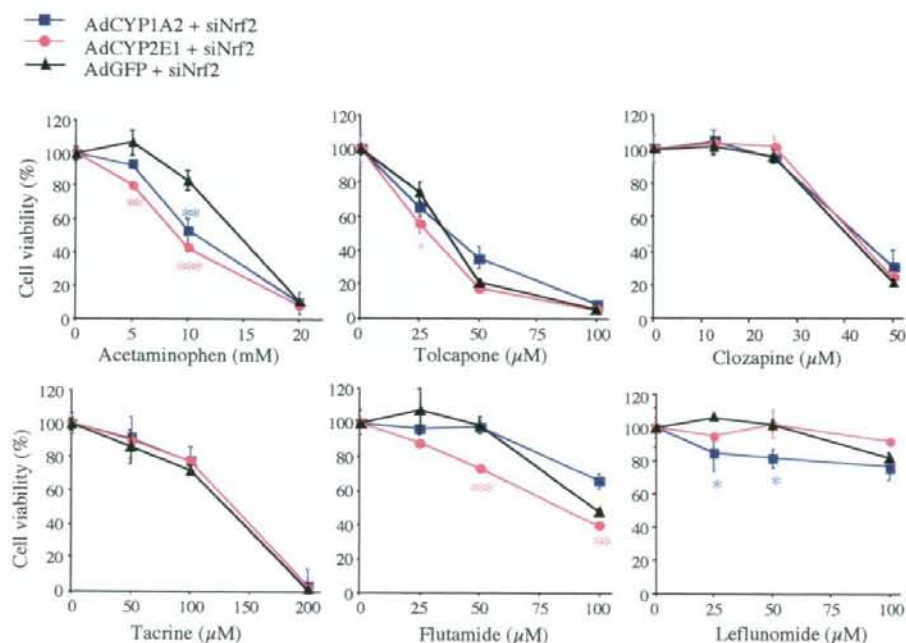


Fig. 8. ATP assay in adenovirus-infected HepG2 cells transfected with siNrf2 after 36 hr exposure of various drugs. Cell viability is expressed as percentage of solvent-treated cells. Data are mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001 compared with AdGFP-infected groups.

アセトアミノフェン処置においては AdCYP1A2 感染群で 10 mM 処置により、AdCYP2E1 感染群で 5 および 10 mM 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、3-6 の MTT アッセイの結果と同様の結果が得られた。

トルカボン処置においては AdCYP2E1 感染群で 25 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 AdGFP 感染群と比較して有意な細胞生存率の低下は認められず、3-6 の MTT アッセイの結果と一致しなかった。

クロザピンとタクリン処置においては細胞生存率に有意な差は認められなかった。クロザピンでは 3-6 の MTT アッセイの結果と一致しなかったが、タクリンでは 3-6 の MTT アッセイと同様の結果が得られた。

フルタミド処置においては AdCYP2E1 感染群で 50 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、AdCYP1A2 感染群では細胞生存率の低下が認められず、3-6 の MTT アッセイと同様の結果が得られた。

レフルノミド処置においては AdCYP1A2 感染群で AdGFP 感染群と比べて 25 および 50 μ M 処置により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が認められず、3-6 の MTT アッセイと同様の結果が得られた。

D. 考察

本研究では、ヒト CYP1A2 およびヒト CYP2E1 を発現するアデノウイルスである AdCYP1A2 と AdCYP2E1 を作製し、薬物の代謝的活性化を評価する *in vitro* 試験系を

構築した。また、様々な解毒因子の影響を排除するために Nrf2 を siRNA によりノックダウンした HepG2 細胞に AdCYP1A2 および AdCYP2E1 を感染させた。HepG2 細胞はヒト肝癌由来細胞であり、CYP への電子伝達系に関与する NADPH-cytochrome P450 reductase や cytochrome b_5 が発現していることから (Rodriguez-Antona et al., 2002; Yoshitomi et al., 2001)、ヒトにおける毒性を予測するために広く用いられている。また、siRNA 処置によるアデノウイルス感染への影響がないこと、siNrf2 処置 96 時間後まで約 80 % の Nrf2 mRNA 減少することが本研究室において既に確認されている。

薬物の代謝的活性化を評価する *in vitro* 試験系を構築するために、AdCYP1A2 および AdCYP2E1 を HepG2 細胞に感染させる条件として、MOI と感染日数を検討した。どちらのウイルスにおいても MOI 依存的な酵素活性およびタンパク質発現量の増加が認められた (Figs. 1 and 3)。しかし、MOI 30 以降になると細胞が変性を起こしたため、細胞の状態が良好で、最も高い酵素活性値を示した MOI 20 が至適であると判断した。至適感染日数の検討において、酵素活性値は AdCYP1A2 では感染 3 日後に、AdCYP2E1 では感染 5 日後に最も高値を示したが (Figs. 2 and 4)、感染日数が長くなると細胞が不健康になるため、細胞障害性を評価するために十分である活性値を示した感染 2 日目に薬物処置を行うことにした。

細胞が不健康になった原因としてはアデノウイルスによる細胞毒性が生じたことや、ヒト CYP2E1 をマウスで過剰発現させると肝障害が生じるという報告があり (Bai and Cederbaum, 2006)、P450 が過剰発現することにより細胞の形態に変化が生じたことなどが考えられる。

また、CYPIA2 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 (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 10 倍程度高い酵素活性値を示した。CYPIA2 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 (Faber et al., 2005)。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、CYPIA2 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ロゾキサゾン 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 (Sumida et al., 1999)、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 CYPIA2 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 (Sansen et al., 2007)、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 (Porubsky et al., 2008)、肝障害が報告されている薬物の中でも比較的分子量の薬物をターゲットとした (Fig. 5)。

以下、検討した薬物について一つずつ考察した。

アセトアミノフェン (APAP)

アセトアミノフェンは解熱性鎮痛薬として広く臨床で使用されているが、アセトアミノフェンが過剰に存在する場合やグルタチオンが減少すると、活性代謝物である NAPQI が肝障害を引き起こすことが報

告されている (Hoffmann et al., 1985; Hinson et al., 1995; Hongslo et al., 1994)。アセトアミノフェン5 g以上の服用では軽度の肝障害を来し、15 g以上では劇症化するとされている。有効血中濃度は33~132 μM とされ、服用後4~12時間の血中濃度と肝障害の程度との関係では4時間で1.32 mM、12時間で0.33 mMのラインを越すと約60%の割合で高度の肝障害を生じる。また、アセトアミノフェン摂取4時間後の血中濃度が1.98 mMを越えるとき激しい肝障害を生じるが、0.79 mM以下ならば生じないといった報告も存在する (カロナール坐剤インタビューフォーム)。

今回の検討において、MTT アッセイによる細胞生存率の検討では、AdCYP2E1 感染群で5 mM から、AdCYP1A2 感染群で10 mM から AdGFP 群と比較して有意な細胞生存率の低下が認められた (Fig. 6)。また、ATP アッセイにおいても MTT アッセイ同様の結果が示され、AdCYP2E1 感染群で5 mM から、AdCYP1A2 感染群では10 mM で AdGFP 群と比較して有意な差が認められた (Fig. 8)。この結果は Snawder ら (1994)

および Zaher ら (1998) による NAPQI の生成は CYP2E1 が律速であり、CYP1A2 は APAP が過剰量になると NAPQI への代謝的活性化への寄与が大きいという報告と一致した。今回、検討した薬物濃度は臨床濃度よりはるかに高い濃度であるが、細胞株でアセトアミノフェンの細胞障害性を検討している Yoshitomi ら (2001) および Bai ら (2003) の濃度を参考にした。また、NAPQI はグルタチオン抱合により解毒されるが、その反応を触媒する GST は Nrf2 により誘導を受けることが知られている。siScr 処置において APAP 5 mM で CYP2E1 による細胞生存率の低下は認められなくなり、解毒に Nrf2 で発現誘導される解毒因子の関与が示唆されたが、10 mM 以上の処置では CYP1A2 および CYP2E1 ともに siNrf2 と同程度の細胞生存率の低下を示した (Fig. 7)。この原因としては APAP 処置濃度が高いこと、CYP1A2 および CYP2E1 を過剰発現することにより NAPQI の生成量が多くなり、グルタチオン抱合が欠乏したことが考えられる。

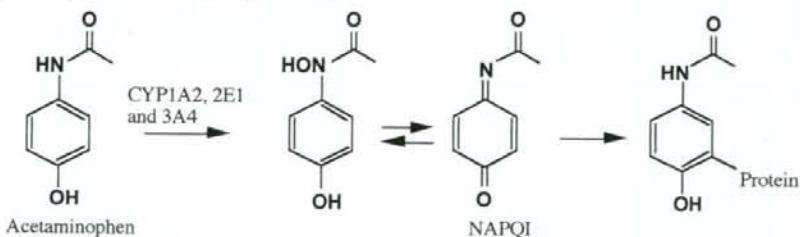


Fig. 9. Bioactivation of acetaminophen to NAPQI.

トルカボン

トルカボンはパーキンソン病の薬として臨床で使用されている COMT 阻害薬であり、肝機能障害や急性肝障害を引き起こすことが知られ、いくつかの国において販売中止となっている (Olanow, 2000)。肝障害の詳細なメカニズムは明らかになっていないが、ヒト肝ミクロソームを用いた阻害実験よりニトロ基が還元されたアミン体や、アミン体がさらにアセチル化を受けたアセチル化体が CYP1A2 および CYP2E1 により酸化を受け生成する *o*-キノンまたはキノン-イミンが活性代謝物として毒性発現に関与し、その活性代謝物はグルタチオン抱合を受けることが報告されている (Smith et al., 2002)。

今回の検討において、MTT アッセイによる細胞生存率の検討では、AdCYP1A2 と AdCYP2E1 感染群において 25 μ M から AdGFP 群と比較して有意な細胞生存率の低下が認められたが (Fig. 6)、siScr 処置において細胞生存率の低下が認められなかった (Fig. 7)。よって、CYP1A2 および CYP2E1 により活性代謝物が生成し、Nrf2 で発現誘導される解毒因子により解毒されることが示され、Smith ら (2002) の報告と一致した。しかし、ATP アッセイでは

MTT アッセイより有意な細胞生存率の差は認められなかった。原因は不明だが、ATP アッセイにおける細胞生存率の低下率は MTT アッセイと比較して大きかったことから、ATP アッセイの方が感度が良いため、より低濃度で細胞障害性を検討する必要がある可能性が考えられた。また、トルカボンが比較的低濃度においてミトコンドリア電子伝達系を阻害し、ATP 合成を阻害することで、毒性発現に関与するという報告があり (Nissinen et al., 1997)、今回、ATP アッセイにより CYP1A2 および CYP2E1 による有意な細胞生存率の低下が認められなかった原因の一つである可能性が考えられる。また、日本では販売されていないが、臨床において最大血中濃度は 25 μ M と報告されており (Korlipara et al., 2004)、投与 2 時間後において、アミン体は投与量の 3%が尿中に、6%が糞中に排泄され、アセチル化体は投与量の 1%程度が糞中に排泄されると報告されている (Jorga et al., 1999)。本試験系ではトルカボン 25 μ M において CYP1A2 および CYP2E1 により細胞障害性が認められ、臨床濃度において、CYP1A2 および CYP2E1 がトルカボンの肝障害に重要な役割を果たすことが示された。

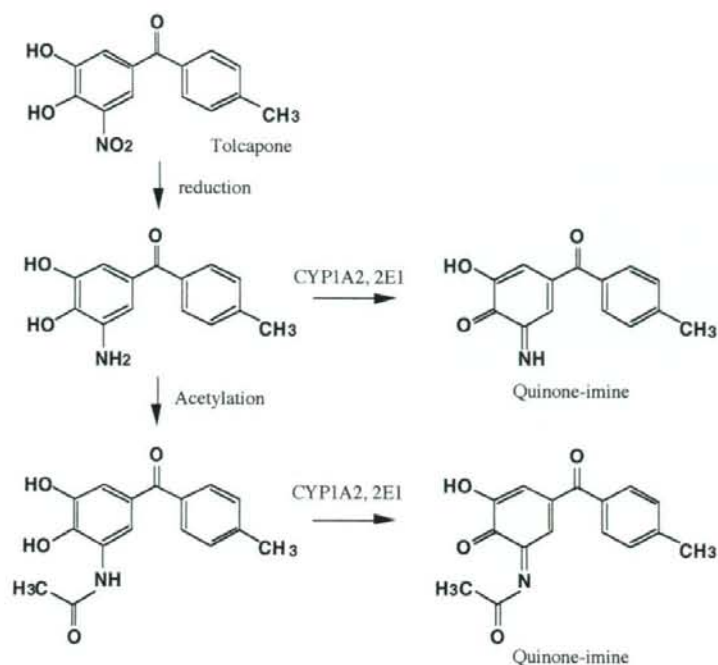


Fig. 10. CYP-mediated oxidation of tolcapone to reactive quinone-imine.

クロザピン

クロザピンは統合失調症に対する治療薬として使用されているが、CYPによる活性代謝物の蓄積が肝障害や無顆粒球症発現に関与することが知られている

(Pirmohamed et al., 1995)。日本では未承認であるが、臨床におけるクロザピン血中濃度は0.20~5.58 μM という大きな個体差が存在すると報告されている (Olesen et al., 1995)。主な代謝経路はCYP1A2による脱メチル化であり、CYP1A2は毒性発現には関与せず、CYP3A4、CYP2E1およびCYP2C9により活性代謝物を生成すると報告されている (Pirmohamed et al., 1995)。

本試験系において、AdCYP2E1感染群でAdGFP群と比較して10 μM から有意な細胞生存率の低下が認められ、AdCYP1A2感染群では細胞生存率の低下が認められなかったことから (Fig. 6)、上述の報告と一致した。また、siScr処置においてAdCYP1A2感染群に認められていた有意な細胞生存率の低下は抑制された (Fig. 7)。このことはラットへパトサイトにROSスカベンジャーであるグリチルリチン酸を処置することで細胞障害性が軽減したという報告が存在するため (Lu et al., 2008)、生成する活性代謝物の解毒にGSHなどの解毒因子が関与することが考えられる。ま

た、Lu ら (2008) の報告ではゲル包括法を用いて、3 次元的でより生体に近い培養条件で細胞障害性を検討し、クロザピン 15 μM から細胞障害性を示し、45 μM では 70 %程度の細胞生存率の減少が認められている。本試験系では CYP2E1 により 10 μM から細胞生存率の低下が認められ、50

μM では 40 %程度の細胞生存率の減少が認められた。ラットヘパトサイトでは CYP2E1 以外の分子種を含み、クロザピンの代謝的活性化への寄与は CYP3A の方が大きいことから、Lu らと比べ、50 μM における細胞生存率の減少の程度が少ない結果になったと考えられる。

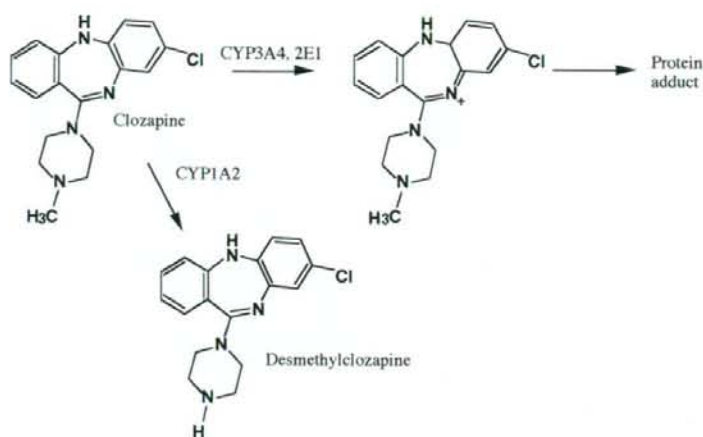


Fig. 11. Metabolic pathways of clozapine to desmethylclozapine and reactive metabolite.

タクリン

タクリンはコリンエステラーゼ阻害薬であり、アルツハイマー治療薬として使用されているが、肝障害が認められることからその使用が制限されている (Watkins et al., 1994)。これまでに、タクリンの代謝的活性化に CYP1A2 が関与することが報告されているが (Balson et al., 1995)、CYP1A2 が発現していない細胞においてもタクリンによる細胞障害性が認められるという

矛盾した報告が存在する (Benoit et al., 1997)。また、活性代謝物としてキノンメチドやヒドロキシルアミンが示唆され、これらの解毒に GST が関与することも報告されている (Walgren et al., 2005)。日本では未承認であるが、臨床で考えられる最大血中濃度は約 0.2 μM である (Cutler et al., 1990)。本試験系において siNrf2 処置細胞試験系において CYP1A2 による細胞生存率の有意な低下は認められなかった (Figs. 6 and 8)。

しかし、siScr 処置において CYP1A2 による細胞生存率の有意な低下が認められた (Fig. 7)。Nrf2 により種々の解毒因子を抑制したことで、タクリン自体の毒性が強く認められ、全ての感染群において細胞生存率が低下したことにより、CYP1A2 による代

謝的活性化の影響が認められないという結果になったことが考えられる。しかし、本研究室において、タクリンが CYP3A4 で代謝的活性化されることを明らかにしており、タクリンの肝障害メカニズム解明には更なる検討が必要である。

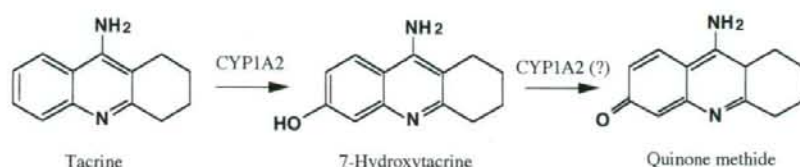


Fig. 12. Metabolic pathway of tacrine.

フルタミド

フルタミドは前立腺がん治療薬として臨床で使用されているが、重篤な肝障害を引き起こすことがある (Wysowski and Fourcroy, 1996)。臨床におけるフルタミドの最高血中濃度は 0.05 μM 程度である (オダインインタビューフォーム)。フルタミドは CYP1A2 により代謝され、細胞毒性を示さない薬理活性の高い 2 位水酸化フルタミドに変換される。また、加水分解代謝物として FLU-1 が報告され、肝障害を起こした患者における血漿中 FLU-1 濃度が高かったことと、CYP1A2 酵素活性が低いヒトで肝障害が起りやすいことから (Ozono et al., 2002; Aizawa et al., 2003)、フルタミドの肝障害には FLU-1 が重要であると考えられ、

FLU-1 が CYP3A4 により N 位水酸化を受けた FLU-1 N-OH がタンパク質と共有結合することにより肝障害に寄与するとの報告や (Ohbuchi et al., 2009)、*Cyp1a2* 欠損マウスでは野性型マウスに比べ肝障害が増強した (Matsuzaki et al., 2006) との報告がある。これらの報告より、CYP3A4 が主に代謝的活性化に、CYP1A2 が主に解毒的代謝に関与すると考えられている。また、ヒト肝ミクロソームを用いた検討により、種々の GSH 抱合体が報告されている (Kang et al., 2008)。

本試験系において、MTT アッセイと ATP アッセイのどちらにおいても臨床濃度より 1000 倍程度高い濃度ではあるが、AdCYP2E1 感染群において AdGFP 感染群

と比較して有意な細胞生存率の低下が認められた (Figs. 6 and 8)。また、siScr 処置では細胞生存率の低下が AdCYP2E1 感染群の 100 μ M 処置時のみ認められた (Fig. 7)。よって、活性代謝物の解毒に Nrf2 により誘導される解毒因子が関与していることが示唆された。また、FLU-1 による細胞障害性を MTT アッセイにて検討したが、AdCYP1A2 および AdCYP2E1 感染群で細胞生存率の低下は認められなかった (Fig. 6)。しかし、代謝物が細胞内に入らないことも考えられるため更なる検討が必要であるが、CYP2E1 による代謝的活性化の経路は FLU-1 を介さない経路である可能性が考えられる。Kang ら (2008) による報告では、2 位水酸化フルタミドや FLU-1 の他に側鎖の水酸化やニトロ基の還元を受けた 4 種類の代謝物が同定されているが、CYP2E1 により生成する代謝物の同定は行

われておらず、現在までに CYP2E1 がフルタミドの代謝および代謝的活性化に関与するという報告はない。また、CYP2E1 による毒性発現には薬物の代謝的活性化だけではなく、CYP2E1 の一原子酸素添加反応サイクルにおいて NPR との結合が弱いために、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、薬物の酸化ストレスによる細胞障害を増強することが報告されており (Lu and Cederbaum, 2005)、CYP2E1 によるフルタミドの細胞障害性は酸化ストレスを介したものである可能性も考えられる。

今回の検討において、フルタミドの肝障害に CYP2E1 が深く関与することが示唆されたが、CYP2E1 による細胞障害性のメカニズムは不明であり、更なる検討が必要である。

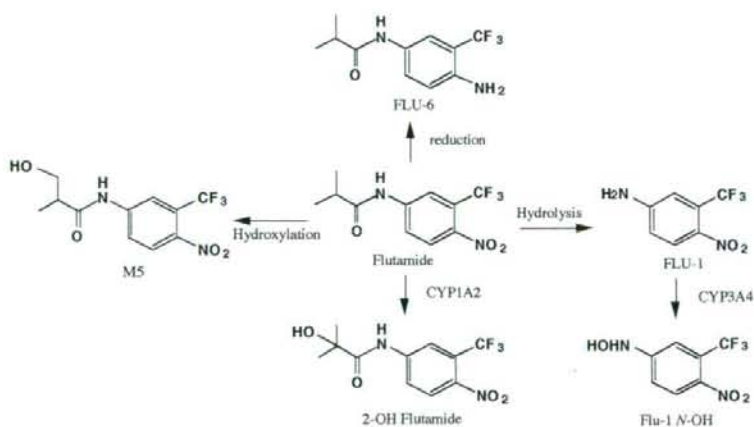


Fig. 13. Metabolic pathways of flutamide in human.

レフルノミド

レフルノミドはリウマチ治療薬として、広く臨床で使用されているが、副作用の一つとして肝障害が報告されている (van Roon et al., 2004)。*In vitro* の実験において CYP1A2、CYP2C19 および CYP3A4 が薬理活性を示す A771726 への変換に関与し、中でも CYP1A2 の寄与が最も大きいと報告している (Kalgutkar et al., 2003)。また、微量の trifluoromethylaniline (TFMA) が血漿中から検出され、チアノーゼなどの毒性発現に関与することが示されている。しかし、TFMA とレフルノミドによる肝障害との関係については知られていない (Walgren et al., 2005)。臨床において考えられる最大血中濃度は 40 μM であり (アラバインタビューフォーム)、高い転写誘導能を示す遺伝子多型の CYP1A2*1F を有する患者においてレフルノミドによる肝障害リスクが高いと報告されている (Grabar et al., 2008)。

本試験系において、AdCYP1A2 感染群において AdGFP 感染群と比較して 25 μM から有意な細胞生存率の低下が認められた (Fig. 6, 8)。よって、レフルノミドの肝障害に CYP1A2 が関与することが示唆された。siScr 処置細胞試験系において、AdCYP1A2 感染群で認められていた細胞障害性が抑制されたことから (Fig. 7)、生成される活性代謝物の解毒に GSH などの解毒因子が関与していることが考えられる。A771726 血漿中濃度と肝障害発現には関連性が認められていないため (Chan et al., 2005)、肝障害発現には他の代謝経路が関与していると考えられるが、現在までにレフルノミドの活性代謝物は報告されていない。レフルノミドの肝障害に CYP1A2 が関与することが示唆されたが、その詳細なメカニズム解明には更なる検討が必要である。

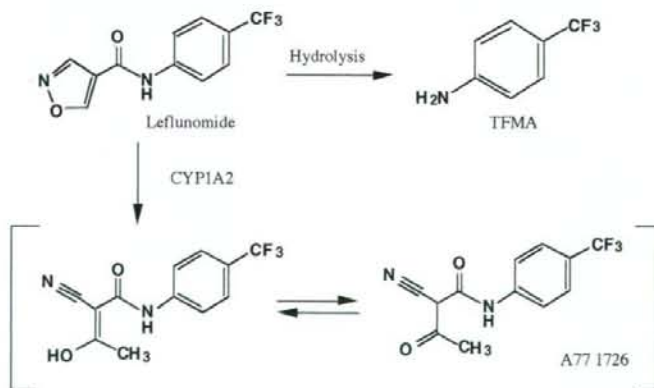


Fig. 14. Metabolic pathways of leflunomide.

本試験系において上記以外の薬物（デシ
ブラミン、ピラジナミド、フェルバメート、
ダブゾン、ベモリン、メチルドパ、スルフ
アメトキサゾール）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。

E. 結論

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。

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

参考文献

Anzenbacher P and Anzenbacherová E (2001)
Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics.
Cell Mol Life Sci **58**: 737-747.

アラバインインタビューフォーム (2006) サノフ
イ・アベンティス株式会社 1-90.

Balson R, Gibson PR, Ames D and Bhathal PS
(1995) Tacrine-induced hepatotoxicity. Tolerability
and management. *CNS Drugs* **4**: 168-181.

Bell LC and Guengerich FP (1997) Oxidation
kinetics of ethanol by human cytochrome P450 2E1.
Rate-limiting product release accounts for effects of
isotopic hydrogen substitution and cytochrome b₅ on
steady-state kinetics. *J Biol Chem* **272**: 29643-29651.

Benoit GG, Naud CF, Simard MA and Astier AL
(1997) Noninterference of cytochrome P4501A2 in
the cytotoxicity of tacrine using genetically
engineered V79 Chinese hamster cells for stable
expression of the human or rat isoform and two

- human hepatocyte cell lines. *Biochem Pharmacol* **53**: 423-427.
- Boelsterli UA and Lim PL (2006) Mitochondrial abnormalities-a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicol Appl Pharmacol* **220**: 92-107.
- Bohanec Grabar P, Rozman B, Tomsic M, Suput D, Logar D and Dolzan V (2008) Genetic polymorphism of CYP1A2 and the toxicity of leflunomide treatment in rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Pharmacol* **64**: 871-876.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- カロナール坐剤インタビューフォーム (2008) 昭和薬品化工株式会社 1-40.
- Chan V, Charles BG, Tett SE (2005) Population pharmacokinetics and association between A77 1726 plasma concentrations and disease activity measures following administration of leflunomide to people with rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* **60**: 357-264.
- 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.
- Cutler NR, Sedman AJ, Prior P, Underwood BA, Selen A, Balogh L, Kinkel AW, Gracon SI and Gamzu ER (1990) Steady-state pharmacokinetics of tacrine in patients with Alzheimer's disease. *Psychopharmacol Bull* **26**: 231-234.
- Donato MT, Lahoz A, Jiménez N, Pérez G, Serralta A, Mir J, Castell JV and Gómez-Lechón MJ (2006) Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. *Drug Metab Dispos* **34**: 1556-1562.
- Easterbrook J, Lu C, Sakai Y and Li AP (2000) Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **29**: 141-144.
- Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK and Kunze KL (1995) Role of cytochromes P450 1A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* **5**: 259-274.
- Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M and Evans WE (2006) Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* **57**: 119-137.
- Faber MS, Jetter A and Fuhr U (2005) Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **97**: 125-134.
- Gonzalez FJ (2005) Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* **569**: 101-110.
- Guengerich FP (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* **3**: 194-204.
- Hinson JA, Pumford NR and Roberts DW (1995) Mechanisms of acetaminophen toxicity: Immunochemical detection of drug-protein adducts. *Drug Metab Rev* **27**: 72-92.
- Hoffmann KJ, Streeter AJ, Axworthy DB and Baillie TA (1985) Identification of the major covalent adduct

formed *in vitro* and *in vivo* between acetaminophen and mouse liver protein. *Mol Pharmacol* **27**: 566-573.

Hongslo JK, Smith CV, Brunborg G, Söderlund EJ and Holme JA (1994) Genotoxicity of paracetamol in mice and rats. *Mutagenesis* **9**: 93-100.

Howie D, Adriaenssens P and Prescott LF (1977)

Paracetamol metabolism following overdose: Application of high performance liquid chromatography. *J Pharm Pharmacol* **29**: 235-237.

Jenden DJ (1991) Difficulties in using animal data to predict pharmacological response in man. *Neurosci Biobehav Rev* **15**: 105-107.

Jorga K, Fotteler B, Heizmann P and Gasser R (1999)

Metabolism and excretion of tolcapone, a novel inhibitor of catechol-*O*-methyltransferase. *Br J Clin Pharmacol* **48**: 513-520.

Kalgutkar AS, Nguyen HT, Vaz AD, Doan A, Dalvie DK, McLeod DG and Murray JC. (2003) *In vitro* metabolism studies on the isoxazole ring scission in the anti-inflammatory agent leflunomide to its active alpha-cyanoenol metabolite A771726: mechanistic similarities with the cytochrome P450-catalyzed dehydration of aldoximes. *Drug Metab Dispos* **31**: 1240-1250.

Kang P, Dalvie D, Smith E, Zhou S, Deese A and Nieman JA (2008) Bioactivation of flutamide metabolites by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **36**: 1425-1437.

Kola I and Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **3**: 711-715.

Korlipara LV, Cooper JM and Schapira AH (2004)

Differences in toxicity of the catechol-*O*-methyltransferase inhibitors, tolcapone and entacapone to cultured human neuroblastoma cells.

Neuropharmacology **46**: 562-569.

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

Lee SS, Buters JT, Pineau T, Fernandez-Salguero P and Gonzalez FJ (1996) Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J Biol Chem* **271**: 12063-12067.

Lee WM (2003) Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis* **23**: 217-226.

Lu Y and Cederbaum AI (2005) Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci* **89**: 515-523.

Lu Y, Meng Q, Zhang G and Bei X (2008) Clozapine-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes by gel entrapment and monolayer culture. *Toxicol In Vitro* **22**: 1754-1760.

Matsuzaki Y, Nagai D, Ichimura E, Goda R, Tomura A, Doi M and Nishikawa K (2006) Metabolism and hepatic toxicity of flutamide in cytochrome P450 1A2 knockout SV129 mice. *J Gastroenterol* **41**: 231-239.

Meng Q, Ru J, Zhang G, Shen C, Schmitmeier S and Bader A (2007) Re-evaluation of tacrine hepatotoxicity using gel entrapped hepatocytes. *Toxicol Lett* **168**: 140-147.

Nissinen E, Kaheinen P, Penttilä KE, Kaivola J and Linden IB (1997) Entacapone, a novel catechol-*O*-methyltransferase inhibitor for

Parkinson's disease, does not impair mitochondrial energy production. *Eur J Pharmacol* **340**: 287-294.

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.

沖米田 司, 甲斐 広文 (2002) アデノウイルスを用いた遺伝子導入法 日薬理誌 **119**: 337-344.

Olanow CW (2000) Tolcapone and hepatotoxic effects. *Arch Neurol* **57**: 263-267.

Olesen OV, Thomsen K, Jensen PN, Wulff CH, Rasmussen NA, Refshammer C, Sorensen J, Bysted M, Christensen J and Rosenberg R (1995) Clozapine serum levels and side effects during steady state treatment of schizophrenic patients: a cross-sectional study. *Psychopharmacology (Berl)* **117**: 371-378.

Ozono S, Yamaguchi A, Mochizuki H, Kawakami T, Fujimoto K, Otani T, Yoshida K, Ichinei M, Yamashita T and Hirao Y (2002) Caffeine test in predicting flutamide-induced hepatic injury in patients with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **5**: 128-131.

Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E and Park BK (1995) Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* **272**: 984-990.

Porubsky PR, Meneely KM and Scott EE (2008) Structures of human Cytochrome P-450 2E1: insights into the binding of inhibitors and both small

molecular weight and fatty acid substrates. *J Biol Chem* **283**: 33698-33707.

Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS and Black M (1989) Acetaminophen activation by human liver cytochromes P4502E1 and P4501A2. *Arch Biochem Biophys* **271**: 270-283.

Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, Watts PS, Castell JV and Gómez-Lechón MJ (2002) Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* **32**: 505-520.

van Roon EN, Jansen TL, Houtman NM, Spoelstra P and Brouwers JR (2004) Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: incidence and severity of hepatotoxicity. *Drug Saf* **27**: 345-352.

Sansen S, Yano JK, Reynald RL, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD and Johnson EF (2007) Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J Biol Chem* **282**: 14348-14355.

Smith KS, Smith PL, Heady TN, Trugman JM, Harman WD and Macdonald TL (2002) In vitro metabolism of tolcapone to reactive intermediates: Relevance to tolcapone liver toxicity. *Chem Res Toxicol* **16**: 123-128.

Snawder JE, Roe AL, Benson RW and Roberts DW (1994) Loss of CYP2E1 and CYP1A2 activity as a function of acetaminophen dose: relation to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 532-539.

Sumida A, Kinoshita K, Fukuda T, Matsuda H,

- Yamamoto I, Inaba T and Azuma J (1999) Relationship between mRNA levels quantified by reverse transcription-competitive PCR and metabolic activity of CYP3A4 and CYP2E1 in human liver. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 499-503.
- Thummel KE, Lee CA, Kunze KL, Nelson SD and Slattery JT (1993) Oxidation of acetaminophen to *N*-acetyl-*p*-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem Pharmacol* **45**: 1563-1569.
- Tone Y, Kawamata K, Murakami T, Higashi Y and Yata N (1990) Dose-dependent pharmacokinetics and first-pass metabolism of acetaminophen in rats. *J Pharmacobiodyn* **13**: 327-335.
- 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.
- Walgren JL, Mitchell MD and Thompson DC (2005) Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* **35**: 325-361.
- Watkins PB, Zimmerman HY, Knapp MJ, Gracon SI and Lewis KW (1994) Hepatotoxic effects of administration in patients with Alzheimers disease. *JAMA* **271**: 992-998.
- Wysowski DK and Fourcroy JL (1996) Flutamide hepatotoxicity. *J Urol* **155**: 209-212.
- Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M and Asahi S (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol In Vitro* **15**: 245-256.
- Zaher H, Buters JT, Ward JM, Bruno MK, Lucas AM, Stern ST, Cohen SD and Gonzalez FJ (1998) Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **152**: 193-199.

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究推進事業）

分担研究報告書

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

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

近年、作用機序や服用方法が多様化した新薬が次々と生み出されている一方、医薬品にまつわる健康被害の例は世界中で後を絶たず、医薬品開発において薬物の効果や副作用に限らず、生体内における挙動の幅広い理解が求められている。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。

医薬品開発において、従来の様なヒト肝ミクロソーム、種々のCYPや生体内酵素発現系、GSH付加体検出系、げっし類を用いた代謝および毒性試験系では、生細胞内で生成される代謝物の障害性を直接に評価することは困難であったと推察できる。しかし、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、目的に適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。

A. 研究目的

薬物は生体内で様々な代謝を受ける。多くの場合、薬物代謝酵素によって担われる酸化、還元、加水分解において水酸基や第一級、第二級アミン基が生成され、さらに抱合反応により極性が上がることで排泄されやすくなる。前者は第一相反応 (phase I reaction)、抱合反応は第二相反応 (phase II reaction) と呼ばれている。第一相反応においてシトクロム P450 (CYP: P450) による酸化反応は多岐にわたり、多くの脂溶性薬物を代謝し、薬物代謝の中心的役割を演じている。CYPは微生物から高等植物、哺乳動物に至るまで多くの生物体に存在し、ヒトでは主に肝に大部分が存在するが、赤血球や精子を除くほとんど全ての臓器にも分布している。細胞内においては滑面小胞体や粗面小胞体、核膜、リボソーム、ミトコンドリアなどの細胞小器官に局在しており、中でも肝ミクロソームのCYPが薬物代謝において重要である。また第二相反応には、主に

グルクロン酸抱合、硫酸抱合、GSH抱合、アセチル抱合、メチル抱合、アミノ酸抱合などが知られており、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) や硫酸転移酵素、GSHS-転移酵素 (GST) などの抱合および転移酵素の他に、種々の補酵素などが各々の反応を触媒している (加藤, 2000)。非臨床試験での薬効試験、安全性試験、薬物代謝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が主に使用されている。しかし、げっ歯類とヒトの肝では代謝活性に大きな違いがあるため、新薬候補化合物のヒトにおける体内動態を非臨床試験の段階で予測することは困難である (Nedeicheba and Gut, 1994)。実際に臨床試験中に開発中止となる候補化合物は約 90%に達し、その原因の約 80%は種差に起因するものであると言われている。例えば、ヒト肝ミクロソームにおけるCYP分子種はCYP3A4が最も多く、その組成比は約 28.8%であり、次いでCYP2Cが 18.2%、CYP1A2が 12.7%を占

めている。それに対しラットにおいては、ヒトで多く発現している CYP3A4 は存在しておらず、雄では CYP2C11、雌では CYP2C12 が主に発現しており、その他の酵素に関しても種差の報告が多い (Kato and Yamazoe, 1992)。CYP3A4 は現在臨床で使用される約 50% の薬物の代謝に関与する一方で、薬物性肝障害の主たる原因と言われている活性代謝物の生成にも寄与する場合が多いと言われている (Rendic, 1997; Nelson, 1999)。また、GST 酵素活性は、ラット肝でヒト肝の 16~24 倍であり、種差に起因する抱合活性の違いが顕著に認められる酵素の一つである (Grover, 1964)。

Glutathione (GSH) は、 γ -glutamylcysteine synthetase (γ GCS) により、グルタミン酸とシステインから γ -グルタミルシステインが合成された後、 γ -グルタミルシステインが glutathione synthetase (GSS) によってグリシンと反応することで合成される細胞内蛋白質である。この反応の律速酵素である γ GCS は、ヘテロダイマー構造を有し、catalytic サブユニット (heavy; 73 kDa) および modulatory サブユニット (light; 27.7 kDa) から構成され、catalytic サブユニット (GCS_h) は酵素活性部位として、modulatory サブユニット (GCS_l) は GSH 蓄積による GSH 合成のフィードバック阻害

を減弱することが知られている (Yang et al., 2002)。GSH は GST の補因子としてだけではなく、異物と直接的に付加体を形成することで活性代謝物の障害性を減弱させる (Weinberg et al., 1987)。これまでに当研究室において、 γ GCS の heavy chain に相補的なショートヘアピン RNA (shRNA) を発現するアデノウイルス、AdGCS_h-shRNA が作成され、GCS_h mRNA に対するノックダウン効果が *in vitro* および *in vivo* で示された (Akai et al., 2007)。

医薬品開発段階における非臨床試験において、薬物の肝障害性の予測は重要な課題と言えるが、先述した種差等の影響のため実験動物から得た肝障害に関する知見から、ヒトにおける肝障害性を予測することは困難である。そのため、*in vitro* 試験でより簡便に、多くの化合物の肝障害性を短時間で検討できる試験系の開発が求められている (堀井, 2001)。実際に、*in vitro* 試験系の材料としては、ヒトおよびラットヘパトサイトや、肝癌由来細胞が汎用されており、それらの特性を考慮して目的とする試験系を確立することが重要と考えられる。肝癌由来細胞は、実験操作上扱いやすいという利点があるが、薬物代謝酵素をはじめとした多くの細胞内因子が欠乏しているため (Le Vee et al., 2006)、薬物代謝および細胞障害性を評価

する場合は外から何らかの遺伝子を導入し目的蛋白質を発現させるなどの操作が必要となる。また、ヒトヘパトサイトは肝癌由来細胞と比較して薬物代謝酵素や細胞内因子が幅広く発現しているが、培養条件下では速やかに薬物代謝酵素の酵素活性が低下し、由来となるドナー間においても酵素活性の発現に個体差がある (Martinez-Jimenez et al., 2007)。

今日、肝障害および薬物代謝研究を目的とした種々の *in vitro* 試験系が構築されている。例えば、ヒト肝癌由来細胞の HepaRG は、DMSO 培養によりヒトヘパトサイト様に成長する。培養から 1-6 週間程度は安定に CYP 等の薬物代謝酵素やトランスポーター、転写因子を発現することから、このような特性を生かした多方面の研究への応用が期待されている。しかし、薬物代謝酵素の酵素活性が全体的に低いという点は従来の培養細胞と同様である (Kanebratt and Andersson, 2008)。また、ヒトヘパトサイトをを用いた細胞造形法によって、300 の肝障害報告がある薬物を対象とした大規模な検討も行われている。Xu らは、ミトコンドリア障害、酸化ストレス、細胞内 GSH 等を検討することで、多くの薬物の肝障害性をスコア化している (2008)。

活性代謝物が引き起こす薬物性肝障害

は、一般に予測可能である場合と予測が不可能である場合とがある。前者はアセトアミノフェンが代表的で投与量依存的な現象であり、代表的な活性代謝物である NAPQI が肝障害の要因と結論づけられている (Albano et al., 1985)。一方後者は *idiosyncratic* な肝障害として分類され、肝障害の発生に投与量依存性はなく、活性代謝物の細胞内蛋白質との結合やそれに伴う免疫反応が引き金となると考えられている。その症状は重篤であるが、発生頻度は極めて稀な特異体質的な反応と言われている (Vignati et al., 2005; Walgren et al., 2005)。そのため *idiosyncratic* 肝障害の発生メカニズムを研究する際は、活性代謝物によって惹起される肝障害性に対し、高感度となり得る宿主の遺伝子多型や環境的背景も考慮する必要がある。例えば、トログリタゾン、タクリン、イソニアジド、カルバマゼピンはいずれも *idiosyncratic* 肝障害を惹起する薬物であるが、それらは GSTM1 や GSTT1 の欠損と関連付けられるとの報告がある (Simon et al., 2000; Hussain et al., 2003; Ueda et al., 2007)。さらにその後、GSTM1 と GSTT1 欠損型は、*idiosyncratic* 肝障害に対する高感受性に広く寄与することも報告された (Lucena et al., 2008)。その他にも、活性代謝物がタンパク質と結合した高分子複合