

体により惹起される免疫反応の過程で、ヒト白血球型抗原 (HLA) class II allele が混合型肝障害発生に関連するという報告もなされている (Andrade et al., 2004)。

Idiosyncratic 肝障害は、活性代謝物の生成を経由して惹起されることが示唆されているため、ヒト肝において主要な分子種の CYP3A4 による代謝的活性化への寄与は高いと考えられる。また、細胞内で生じた活性代謝物をの細胞障害性を実験的に検討するには、細胞内に発現している解毒因子の影響を評価することも重要であると考えられる。しかし実際には、idiosyncratic な肝障害を惹起する薬物で CYP3A4 による活性代謝物が同定されているものも少なくはないが、見出された代謝物自身の肝障害性については確認されていない場合が多い。代表的な解毒因子としては、上にも述べた GCSH や GSTM1 などの酵素が挙げられるが、その他の注目すべき因子を以下に示す。

NF-E2 p-45-related factor 2 (Nrf2) は塩基性ロイシンジッパー構造を有する cap'n'collar (CNC) 転写因子に分類される転写因子である (Moi et al., 1994)。通常の細胞内において、Nrf2 はアクチン関連タンパク質である Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) と結合した状態でサイトゾルに局在している (Itoh et al., 1999)。細

胞が抗酸化剤および親電子性物質などに暴露されると Nrf2 は Keap1 より解離し、核内に移行し小 Maf と呼ばれる転写因子とヘテロ二量体を形成する。Nrf2/Maf 二量体は遺伝子のプロモーターに存在する antioxidant responsive element (ARE) に結合し、標的遺伝子の転写を促進する (Itoh et al., 1997)。Nrf2 が発現を制御する因子としては heme oxygenase-1 (HO-1) (Balogun et al., 2003)、NAD(P)H: quinine oxidoreductase 1 (NQO1) (Moi et al., 1994)、GST (Hayes et al., 2005)、GCS (Jeyapaul and Jaiswal, 2000) 等が知られており、酸化ストレスに対する重要な防御因子と考えられている。

Thioredoxin (TRX) は細胞内酸化還元伝達分子であり、TRX1 は全身に、TRX2 はミトコンドリアに存在する。TRX は GSH の 1000 分の 1 の細胞内濃度であるが、耐性致死の遺伝子であり、GSH では補うことのできない役割を担っていると考えられる (Matsui et al., 1996; Nonn et al., 2003)。また、ペルオキシドレドキシシンと共役して過酸化水素の除去を担うほか、活性酸素種の存在下 apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) との複合体を解除し ASK1 下流の apoptosis や stress signal の活性化を引き起こす (Fujino et al., 2007)。

Super oxide dismutase (SOD) は、スーパーオキシドの解毒を担う不均化酵素であり、SOD1 はサイトゾルに、SOD2 はミトコンドリアに存在する。SOD1、SOD2 ともに耐性致死の遺伝子であり、SOD2 に関しては近年ヘテロノックアウトマウスにおいてトログリタゾンの肝障害性が検出された (Lebovitz et al., 1996; Ong et al., 2006)。

HO は heme の一酸化炭素、遊離鉄、ビリルベルジンへの分解における律速酵素であり、哺乳類では HO-1、HO-2、HO-3 が存在する (Maines et al., 1986; Maines, 1988)。中でも HO-1 は肝、脾臓、マクロファージ等に存在し、紫外線、重金属、虚血、過酸化水素等により誘導され、酸化ストレスや腫瘍形成時の生体防御機構において重要な役割を担う (Keyse and Tyrrell, 1989; Tyrrell et al., 1993)。

Glutathione peroxidase (GPX) は電子供与体である GSH の消費を伴って過酸化水素の分解を行う。哺乳類細胞においては少なくとも4つの GPX 分子種が知られており、中でも GPX1 はサイトゾルとミトコンドリアに存在する主要分子種である (Esworthy et al., 1997; Legault et al., 2000)。

Catalase (CAT) も GPX 同様に細胞内の過酸化水素の分解を担い、主にサイトゾルとペルオキシソームに存在する

(Michiels et al., 1994)。CAT はラットの心臓を除き、ミトコンドリアには存在しない。また高濃度の過酸化水素の解毒において重要な役割を担うと言われている (Radi et al., 1993)。

Epoxide hydrolase (EPHX) は反応性の高い求電子剤であるエポキシドを近接するジオールに変換する。ヒト細胞内にはミクロソーム型の EPHX1、サイトゾル型の EPHX 2 が存在し、一般に EPHX1 はアルキル化剤としての作用が強いエポキシドの分解を担うと言われている (Oesch et al., 1971; Oesch, 1973)。

本研究では、ヒト肝において最も発現量が多い CYP3A4 を細胞内で過剰発現するアデノウイルス、AdCYP3A4 を作製した。そこでヒトにおける活性代謝物による障害性を高感度に予測することができる細胞障害試験系を構築することを目的とし、ラットおよびヒト肝癌由来細胞に AdCYP3A4 を感染させ、種々の薬物の肝障害性について検討した。アデノウイルス感染を行うことの利点として、実験操作が簡便である肝癌由来細胞においても細胞培養条件下であるヒトヘパトサイト以上に目的とする酵素の活性を得ることが可能であり、さらにアデノウイルス感染量を調節することができるため、ヒトヘパトサイトのドナー間における酵素活

性の個体差を再現できるという点が挙げられる。また、本試験系においては生細胞内において生成する CYP3A4 の活性代謝物が及ぼす影響を直接に評価することができる等といった利点がある。

第 I 章においては、AdCYP3A4 と AdGCSh-shRNA をラット肝癌由来 H4IIE 細胞に同時感染させ、細胞内における CYP3A4 発現および GSH 含量の減少が認められる実験条件の検討を行った。最適化された条件において、肝障害を惹起するとの報告がある薬物の細胞障害性を検討した。続いて第 II 章においては、AdCYP3A4 を多くのヒト肝癌由来細胞に感染させ、CYP3A4 酵素活性の高発現が認められる細胞株を選び出し、第 I 章と同様に最適化された条件において、肝障害を惹起するとの報告がある薬物の細胞障害性を検討した。ヒト肝癌由来細胞には siRNA を処置することで GSH 含量を減少させた。こうした手法により CYP3A4 による代謝と GSH による解毒の影響を見ることができる試験系を構築し、薬物の肝障害性への影響を比較検討した。第 III 章では、第 I 章および第 II 章で構築した試験系を用い、idiosyncratic な肝障害を惹起する薬物の障害性を CYP3A4 の代謝的活性化の有無という観点から評価した。さらに、従来の試験系と比較してより細胞

障害に対し高感受性な試験系とすることを目的とし、上に述べた 10 遺伝子のノックダウンが及ぼす活性代謝物の細胞障害性への影響について検討した。

I 章 ラット肝癌由来細胞における CYP3A4 発現アデノウイルスおよび GCSH ノックダウンアデノウイルスの *in vitro* 代謝酵素活性の検討および薬物による細胞障害性の検討

#### I-A. 緒言

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 遺伝子が欠失されている。よって、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。そこで第 1 章では、このようなアデノウイルスベクターに CYP3A4 cDNA を組み込み、293 細胞にトランスフェクションすることにより、CYP3A4 発現アデノウイルス AdCYP3A4 を作製した。さらに AdCYP3A4 を、CYP3A4 が発現していないラット肝癌由来 H4IIE 細胞に感染させ、CYP3A4 活性を発現させた。また、本章ではラット GCSH (Accession J05181) をノックダウンするアデノウイルス、AdGCSH-shRNA を導入し、H4IIE 細胞に AdCYP3A4 と同時感染させた。各ウイルスの *in vitro* における影響を、mRNA 測定、テストステロン 6 $\beta$  水酸化酵素活性、および GSH 含量により

評価した。さらに薬物による細胞障害性への影響を MTT アッセイ、およびクリスタルバイオレット染色により検討した。また、AdCYP3A4 に対するネガティブコントロールウイルスとして、アデノウイルスベクターに green fluorescent protein (GFP) の cDNA を組み込んだ GFP 発現アデノウイルス AdGFP を使用した (本研究室で作製済み)。

トログリタゾンは 2, 4-thiazolidinedione (TZD) 骨格を有する経口抗糖尿病薬であり、PPAR 受容体にアゴニストとして作用することでインスリン抵抗性を改善する (Henry, 1997)。フルタミドは非ステロイド性抗アンドロゲン薬であり、前立腺癌の治療に用いられる (Brogden and Clissold, 1989; McLeod, 1993)。トログリタゾン、フルタミドともに idiosyncratic 肝障害を惹起する (Walgren et al., 2005)。またアセトアミノフェンは解熱鎮痛薬であるが、アセトアミノフェンによる肝障害は idiosyncrasy な応答ではなく過剰投与によるものと特徴付けられている (Prescott, 1971)。1 章の検討では、これら 3 薬物に加えトログリタゾンの同効薬であり肝障害性が極めて低いと言われているロジグリタゾンをを用いた (Scheen, 2001; Lloyd et al., 2002)。

## I-B. 研究方法

### I-B-1 細胞培養および薬物処置

293 細胞は 10% FBS と NEAA を含む DMEM を用いて 10 cm プレートで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後 1 × PBS 溶液 4 mL をプレートに加え、培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のファルコンチューブにプレートより剥離した細胞を移し、4,000 rpm、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プレートにまき、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。

H4IIE 細胞は 10% FBS を含む α-MEM を用いて 10 cm プレートで培養した。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 4 mL をプレートに加え 37°C で 2 分間インキュベートした。培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のファルコンチューブにプレートより剥離した細胞を移し、4,000 rpm、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プレートにまき、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養した。細胞障害性の検討においては、DMSO 溶液とした薬物を 5% FBS 含有細胞培養液で希釈した。各濃度の DMSO 濃度は 0.1-0.4% の範囲内で統一した。

### I-B-2 AdCYP3A4 の構築

Takara の Adenovirus Expression Vectir kit を用い、プロトコルを参考に以下の方法で AdCYP3A4 を作製した。

#### I-B-2-1 CYP3A4 遺伝子の pAxCAwtit ベクターへの組み換え

CYP3A4 遺伝子を発現するウイルスベクターを得るには、CAG プロモーターの下流にターゲット遺伝子を組み換えた発現プラスミドが必要である。よって CYP3A4 遺伝子を有するベクター pCW CYP3A4 を制限酵素 *Cla*I で切断することで CYP3A4 の全長を切り出し、同様に *Cla*I 処理した CAG プロモーターを有する pAxCAwtit に挿入することで目的のプラスミドを得た。pCWCYP3A4 を *Cla*I で消化し、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メスで切り出した。これをあらかじめ 2% (w/v) 炭酸水素ナトリウムおよび 1 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 × TBE 400 μL を加えた後、電気泳動により 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 μL を加えて 5 分間ボルテックスし、8,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を回収した。次に 400 μL のクロロホルム溶液を加え 5 分間ボルテックスし、8,000 rpm

で5分間遠心分離した。上清に3 M 酢酸ナトリウムを40  $\mu$ Lと100%エタノールを加え、-80°Cで冷却後、15,000 rpm、4°Cで遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄した。沈殿を乾燥後、TE 10  $\mu$ Lに溶解させ、DNAを精製した。同様にしてpAxCawtitを*Cl*Iで消化した後、精製した。回収したベクター50 ng/ $\mu$ Lを10  $\mu$ L、インサート20 ng/ $\mu$ Lを2  $\mu$ L、10  $\times$  T4 DNA ligase bufferを2  $\mu$ L、1 unit/ $\mu$ L T4 ligaseを1  $\mu$ L、滅菌精製水を加えて全量を20  $\mu$ Lとし、16°Cで12時間反応させた。このDNA溶液をXL-1 Blue コンピテントセル500  $\mu$ Lに添加して氷中で90分間インキュベーションし、42°Cで2分間ヒートショックして形質転換した。5 mLの2  $\times$  YT培地を加えて37°C、1時間培養後、2  $\times$  YT-Amp 寒天培地に播種し、37°C、14時間培養した。これよりCYP3A4 遺伝子組み換えpAxCawtit プラスミドを得た。

#### I-B-2-2 コロニーPCR

寒天培地から単離したコロニーを2  $\times$  YT-Amp 培地 3 mL 中で37°C、8時間以上培養した。10  $\times$  PCR 緩衝液 2.5  $\mu$ L、10 pmol/ $\mu$ LのプライマーCYP3A4-574-593FP (5'-AAC ATC GAC TCT CTC AAC AA-3'; 574-593)、PCW-R プライマー (5'-GCG TAT CAC GAG GCC CTT TC-3')をそれ

ぞれ1  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 2.5  $\mu$ L、25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2  $\mu$ L (1.0 U)、滅菌精製水を加えて全量を25  $\mu$ Lとした反応液を作成した中に上記の培養液を突ついた滅菌爪楊枝を入れて混ぜた後、滅菌爪楊枝を取り除いた後、以下の条件でPCR反応を行った。(1) 94°Cで3分(2) 94°Cで30秒、54°Cで30秒、72°Cで2分を30サイクル(3) 72°Cで5分反応後、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。目的の遺伝子断片が得られたもののみ、PCR産物を適当な制限酵素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断片が挿入されていることを確認した。目的のDNA断片が含まれている培養液を50  $\mu$ L取り、60% (v/v)グリセロールを50  $\mu$ 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。

#### I-B-2-3 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、2  $\times$  YT-Amp 培地 25 mLで一晩培養した。培養液を5,000 rpm、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、15分間遠心分離し、タンパク質を除いた。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、30分間、4°Cで遠心分離した。沈殿を70%エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させた後、TE 30  $\mu$ 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)を用いた。

#### I-B-2-4 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  $\mu$ g、Reaction bufferを3.5  $\mu$ L、プライマーCYP3A4-574-593FPを2 pmol、Thermo Sequenase I DNA polymeraseを1  $\mu$ L、滅菌精製水を加えて全量を27  $\mu$ Lとし、先に分注しておいた各dNTPs/Cy5-ddNTP 2  $\mu$ Lに6  $\mu$ Lずつ加え反応液とした。Cy5.5では、プラスミドを2  $\mu$ g、Reaction bufferを3.5  $\mu$ L、プライマーを2 pmol、Thermo Sequenase DNA

polymeraseを2  $\mu$ L、滅菌精製水を加えて全量を31.5  $\mu$ Lとし、先に分注しておいた各dNTPs/Cy5.5-ddNTP 1  $\mu$ Lに7  $\mu$ Lずつ加え反応液とした。Takara PCR Thermal CyclerSP (Osaka, Japan)を用いて、94°Cで2分、94°Cで30秒、52°Cで30秒、72°Cで90秒を45サイクルの反応を行った。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  $\mu$ L、グリコーゲン溶液を2  $\mu$ L、氷冷しておいた100%エタノールを30  $\mu$ L加え、-30°Cで20分間放置し、その後、15,000 rpm、4°Cにて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  $\mu$ L加えて溶解させ、Long-Read Tower DNA Sequence (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。

#### I-B-3 AdCYP3A4の調製

##### I-B-3-1 アデノウイルスのトランスフェクション法

6 cm プレートに90%コンフルエントな293細胞を用意し、Lipofectamine™2000 16  $\mu$ LとDMEM 400  $\mu$ Lを穏やかに混合し5分静置した(\*1とする。)。I-2-3で作製したプラスミド 10 mgと Adenovirus genome DNA-TPC 8  $\mu$ Lを加えて無血清培

地で 400  $\mu\text{L}$  とした (\*2 とする。)。\*1 と \*2 を混合し (\*3 とする。)、20 分静置した。無血清培地で 2 回洗浄した 6 cm プレーートのコンフルな 293 細胞に無血清培地 3.2 mL と \*3 を加え、振とう攪拌した。5 時間インキュベーションした後培地を交換し、さらに 19 時間インキュベートした。

#### I-B-3-2 1 次ウイルスの作製

I-B-4-1 でインキュベートした 293 細胞を剥離し回収した。回収した細胞懸濁液の原液、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

(1 mM HCl とその 1/30 量の Cell Matrix TypeI-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  $\times$  PBS で 2 回洗浄した。) した 96 ウェルプレートに播種した。細胞数が各プレートで大きく変わらないように 10 倍希釈、および 100 倍希釈液には 10 cm プレートで培養しておいた 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  $\mu\text{L}$  とした。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 プレーートの 293 細胞を 11 mL の培地に懸濁し (A)、トランスフェクションしていない 10 cm プレーートの 293 細胞は 30 mL の培地に懸濁した (B)。100 倍希釈プレートとして 0.1 mL の A と 11 mL の B を混合し、

また 10 倍希釈プレートとして 0.1 mL の A と 11 mL の B を混合し、10 mL の A 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  $\mu\text{L}$  を加えた。ウイルスが変性したウェルが 7-15 日の間に現れるので、全ての細胞が変性したウェルごとに培養液とともに細胞を 1.5 mL チューブに移し、ドライアイスで凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。15 日で判定を終了し、最終的に細胞の変性が見られたウェルが 10 ウェル程度のプレートから、比較的遅く (8 日以降) 細胞が変性したウェルから回収した培養液のチューブを 10 個程度選んだ。選び出したチューブを、ドライアイスと  $37^{\circ}\text{C}$  温浴で凍結融解を 6 回繰り返す、5,000 rpm、5 分、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離した上清を 1 次ウイルス液として  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### I-B-3-3 2 次ウイルスの作製

I-B-3-2 の方法に準じ Cell matrix でコラーゲンコートした 24 ウェルプレートに、90% コンフルエントな 293 細胞を用意し、ウェルごとに 1 次ウイルス液の各サンプル 10  $\mu\text{L}$  と、5% FBS-DMEM 100  $\mu\text{L}$  を加えた。プレートをシーソーのように数回、ゆっくりと振とうさせた。この操作を 15 分おきに 3 回行い、その間細胞は、5%  $\text{CO}_2$  存在下  $37^{\circ}\text{C}$  で培養した。1 時間の感染後



5% FBS-DMEM 0.4 mL を加え、3 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、I-2-4-2 と同様に凍結融解を 6 回繰り返し、5,000 rpm、5 分、4°C で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。

#### I-B-3-4 組み換えアデノウイルスの確認

##### (1)

I-B-3-3 で回収した 2 次ウイルスの細胞液を 5,000 rpm、5 分、4°C で遠心分離し、上清を除き、細胞だけを -80°C で保存した (Cell pack)。Cell pack に 10 × TNE を 40 μL、Proteinase K (20 mg/mL) を 4 μL 加え、滅菌蒸留水で全量 400 μL 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 μL 加えさらに十分懸濁した後、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。エタノール沈殿後、20 mg/mL RNaseA を含む TE Buffer 50 μL に溶解した。そのうち 15 μL を用いて、制限酵素 *Cla*I で処理し、1% 寒天培地を用いてアガロース電気泳動を行った。

#### I-B-3-5 3 次ウイルスの作製

I-B-3-2 の方法に準じ Cell matrix でコーゲンコートした 6 ウェルプレートに、90% コンフルエントな 293 細胞を用意し、

ウェルごとに 2 次ウイルス液の各サンプル 15 μL と、5% FBS-DMEM 500 μL を加えた。プレートをシーソーのように数回、ゆっくり振とうさせた。この操作を 15 分おきに 3 回行い、その間細胞は、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後 5% FBS-DMEM 4.5 mL を加え、3 日後に完全に変性したクローンを選び出した。培養液とともに細胞を回収し、I-2-4-2 と同様に凍結融解を 6 回繰り返し、3,000 rpm、10 分間、4°C で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。

#### I-B-3-6 4 次ウイルスの作製

I-B-3-2 の方法に準じ Cell matrix でコーゲンコートした 75 cm<sup>2</sup> フラスコに、90% コンフルエントな 293 細胞を用意し、3 次ウイルス液の各サンプル 50 μL と、5% FBS-DMEM 2 mL を加え、プレートをゆっくり振とうさせた。この操作を 15 分おきに 3 回行い、その間細胞は、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後 5% FBS-DMEM 13 mL を加え、3 日後に培養液ごと細胞を回収し、I-B-3-2 と同様に凍結融解を 6 回繰り返し、3,000 rpm、10 分間、4°C で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。

### I-B-3-7 組み換えアデノウイルスの確認

(2)

4次ウイルス液5  $\mu\text{L}$ を24ウェルプレート1ウェルに293細胞に感染させ、増殖したウイルスDNAの制限酵素パターンをI-2-4-4の方法に準じて確認した。

### I-B-5 アデノウイルス液の力価測定

使用するアデノウイルスは、293細胞で大量調整する度に力価を測定した。

QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay kitを用い、プロトコ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。

I-2-2の操作に従い回収した293細胞  $2.5 \times 10^5$  cells/mLの細胞懸濁液を、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、1時間5%  $\text{CO}_2$ 存在下37°Cで培養した。作製したウイルス原液10  $\mu\text{L}$ と5% FBSを含むDMEM 990  $\mu\text{L}$ を混合し、 $10^{-2}$ ウイルス液を作製した。さらに $10^{-2}$ ウイルス液100  $\mu\text{L}$ と5% FBSを含むDMEM 900  $\mu\text{L}$ を混合し、 $10^{-3}$ ウイルス液を作製した。同様の操作をさらに4回繰り返し、 $10^{-3}$ から $10^{-7}$ 倍のウイルス希釈液を作成し、24ウェルプレートの左端のウェルから100  $\mu\text{L}$ ずつ加えた。一番右端のウェルはブランクとして、5% FBSを含むDMEMを100  $\mu\text{L}$ 加えた。その後48時間5%  $\text{CO}_2$ 存在下37°Cで

培養した。48時間後、培養液を回収し、各ウェル0.5 mLずつ冷メタノールを加え、20分間-20°Cで細胞を固定させた。細胞を2回、1  $\times$  PBS 250  $\mu\text{L}$ で5分間洗浄した。1% BSA 1  $\times$  PBSを各ウェル250  $\mu\text{L}$ ずつ加え、1時間室温で振とうした。1% BSA in 1  $\times$  PBSを除き diluted 1  $\times$  anti-Hexon antibodyを各ウェル250  $\mu\text{L}$ ずつ加え、1時間室温で振とうした。細胞を2回、1  $\times$  PBS 250  $\mu\text{L}$ で5分間洗浄した。diluted 1  $\times$  Secondary antibody solutionを各ウェル250  $\mu\text{L}$ ずつ加え、1時間室温で振とうした。細胞を3回、1  $\times$  PBS 250  $\mu\text{L}$ で5分間洗浄した。Diluted 1  $\times$  DAB working solutionを各ウェル250  $\mu\text{L}$ ずつ加え、10分間室温で振とうした。Diluted 1  $\times$  DAB working solutionを回収し、各ウェルを1  $\times$  PBS 250  $\mu\text{L}$ 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60個の茶色に染色された細胞が現れるウイルス希釈(dilution factor)のウェルを選び出し、少なくとも5ヶ所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倍に設定した電子顕微鏡で24ウェルプレートを観察

した場合、視野面積は 1.8 mm<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> であるので、補正值 (Fields/well) および Virus Titer (ifu/mL) は下記の通りとなる。

$$\text{(Fields/well)} = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ cm}^2 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 = 79$$

$$\text{Viral Titer (ifu/mL)} = (\text{average positive cells/field}) \times (79 \text{ fields/well}) \times (\text{dilution factor}) / (0.1 \text{ mL})$$

#### I-B-5 細胞へのアデノウイルス感染

I-B-1 の方法に準じ細胞懸濁液を調製し、12 ウェルプレート、24 ウェルプレート、および 96 ウェルプレートに播種した。12 ウェルプレート使用時は細胞を 300,000 cells/well で播種し、AdGFP および AdCY3A4 は MOI 10、AdGCSh-shRNA は、MOI 20 となるように調整したウイルス液を 200 μL/well で各ウェルに加えた。プレートをゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞に浸潤させる操作を 15 分おきに 3 回行い、1 時間後 5% FBS を含む細胞培地を 1.8 mL 加えた。その間細胞は、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C でインキュベートした。24 ウェルプレート使用時は細胞を 100,000 cells/well で播種し、AdGFP および AdCY3A4 は MOI 10、

AdGCSh-shRNA は、MOI 20 となるように調整したウイルス液を各ウェルに 100 μL/well 加え、1 時間後 5% FBS を含む細胞培地を 0.9 mL 加えた。96 ウェルプレート使用時は細胞を 20,000 cells/well で播種し、AdGFP、および AdCY3A4 は MOI 10、AdGCSh-shRNA は、MOI 20 となるように調整したウイルス液を各ウェルに 40 μL/well 加え、1 時間後 5% FBS を含む細胞培地を 100 μL 加えた。

#### I-B-6 タンパク質定量

12 ウェルプレート培養下の細胞において、各ウェルの培養液をアスピレーターで吸引し、1 × PBS 500 μL で洗浄した。トリプシン-EDTA 溶液 500 μL で細胞をウェルから剥離し、3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。トリプシン-EDTA 溶液をアスピレーターで吸引し、再度 1 × PBS 500 μL を加え同様に遠心分離し洗浄した。得られた細胞は 1 × PBS 100 μL に懸濁し液体窒素と 37°C 温浴で凍結融解を 3 回繰り返す。ボルテックスミキサーで十分に混和した。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。

#### I-B-7 テストステロン 6β水酸化酵素活性の測定

Yamazaki と Shimada の方法に従い測定した (Yamazaki and Shimada, 1997)。

I-2-6-1 の方法に従いウイルス感染させた細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下培養した。24、48、72 時間後、培養液をアスピレーターで吸引し、100 μM テストステロンを含む培地 1 mL を加えた。1 時間後に培地を採取して生成した 6β水酸化テストステロンを以下の方法により測定した。採取した培地 500 μL にジクロロメタン 4 mL、精製水 500 μL、内部標準物質として 100 μM のコルチコステロン 20 μL を加えて激しく攪拌した。2,500 rpm で 10 分間遠心分離後、ジクロロメタン層を別の試験管に移し、窒素気流下乾固させた。溶液全てを乾固させた後、試験管に 200 μL の 45% メタノールを加え、1 分間ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、2,000 rpm で 5 分間遠心分離し、40 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 (日本分光 CO-965)、UV 検出器 (日立 L-2400) を用いて、溶離液を 240 nm でモニターした。カラムは Mightsyl RP-18 GP-150-4-6 5 μM (関東化学) を用いた。移動相は 50% MeOH/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。

#### I-B-8 Total RNA の調製

ISOGEN を用いて total RNA を調製した。6 ウェルプレート of 細胞に ISOGEN 500 μL を加えてピペッティングにより懸濁した後、室温で 5 分間放置した。100 μL のクロロホルム溶液を加え、15 秒間激しく攪拌し、再度室温で 2-3 分間放置した後、15,000 rpm、4°C、15 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、250 μL のイソプロパノールを加え、室温で 8 分間放置した。15,000 rpm、4°C にて 10 分間遠心分離し、沈殿を 75% エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、15,000 rpm、4°C にて 10 分間遠心分離し、DEPC 処理精製水に溶解させた。60°C の水浴で 10 分間インキュベートした後、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

#### I-B-9 Real-time RT-PCR

I-B-8 により得られた total RNA から以下の方法により cDNA を合成した。Total RNA 2 μg、ランダムヘキサマー (150 ng/mL) 1 μL に DEPC 処理精製水を加えて全量を 23 μL とした。70°C 水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。さらに、5 × 逆転

写反応用緩衝液 8  $\mu$ L、2.5 M dNTP 8  $\mu$ L、ReverTraAce (100 units/mL) 1  $\mu$ L を加えて全量を 40  $\mu$ L とし、30°C で 10 分間、42°C で 1 時間、98°C で 10 分間、サーマルサイクラーを用いて反応させた。得られた cDNA から以下の方法により PCR を行った。cDNA 溶液を 1  $\mu$ L、5  $\times$  SGI 溶液を 5  $\mu$ L、10 mM CYP3A4 forward primer および CYP3A4 reverse primer を 1  $\mu$ L、DEPC 処理精製水を加えて全量を 25  $\mu$ L とした。

ラット GCSH、ラット GAPDH の mRNA ついても forward と reverse primer を用いて同様に行った。スマートサイクラー (Cepheid Smart Cycler™ System) を用いて、95°C で 30 秒間、94°C で 4 秒間、64°C で 20 秒間を 45 サイクル行った。45 サイクル終了後、60°C から 95°C まで、0.2°C/sec を上昇させて融解曲線の測定を行った。本章で用いたプライマーの配列を Table 1 に示す。

**Table 1. Sequence of primers for human CYP3A4, rat GCSH, and rat GAPDH.**

Primer	Sequence
Human CYP3A4	FP: 5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3' RP: 5'-ATGCAGTATTCTGAACTACC-3'
Rat GCSH	FP: 5'-ACAAACTCAGATTCACCTAC-3' RP: 5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'
Rat GAPDH	FP: 5'-GGGTTTCCCGTTGATGACC-3' RP: 5'-GTTACCAGGGCT GCCTTCCT-3'

#### I-B-10 GSH 含量の測定

Tietze の方法を用い一部改良して、以下の方法で GSH 含量を測定した (Tietze, 1969)。I-2-7 の操作で得られた細胞液 40  $\mu$ L に 5% メタリン酸溶液 20  $\mu$ L を加え、10 分間氷中放置した。Stock buffer を 180  $\mu$ L 加え、15,000 rpm、4°C にて 10 分間遠心分離し上清を得た。検量線は 200  $\mu$ M GSH を 0.5% スルホサリチル酸 100

$\mu$ L を用いて、100、50、25、12.5、6.25、3.13 および 1.56  $\mu$ M となるよう希釈して使用した。96 ウェルプレートにおいて、各ウェルに 0.3 mM  $\beta$ -NADPH 溶液 140  $\mu$ L と 4.8 mM DTNB 溶液を 25  $\mu$ L 加え、5 分間室温で反応させた後、検量線溶液と上記操作で得られた細胞溶液の上清を 20  $\mu$ L ずつ加えた。Glutathione Reductase (4 Units/mL) 25  $\mu$ L を加え、5

分後 405 nm の吸光度を BiotrakII plate reader を用いて測定した。

#### I-B-11 MTT アッセイ

I-2-6において96ウェルプレートで24時間薬物処置した細胞に、Cell Counting Kit-8 溶液を各ウェル 10  $\mu$ L ずつ加えた。1 時間後および 2 時間後に 450 nm の吸光度を BiotrakII plate reader を用いて測定した。

#### I-B-12 クリスタルバイオレット染色

Hashimoto らの方法 (Hashimoto et al., 1995) に従った。I-2-6 において 24 ウェルプレートで 48 時間薬物処置した H4IIE 細胞の培地を取り除き、1  $\times$  PBS で 2 回洗浄した。500  $\mu$ L の 3.7% 中性緩衝ホルマリン溶液により室温で 15 分間固定した後、0.1% クリスタルバイオレット PBS 液にて 10 分間染色した。その後、流水下で余分な染色液を除き、風乾後 2% SDS 水溶液 2 mL で溶出し、620 nm における吸光度を BiotrakII plate reader を用いて測定した。

#### I-C. 研究結果

##### I-C-1 H4IIE 細胞におけるテストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性

AdCYP3A4 の培養細胞への適切な感染条件を検討するため、H4IIE 細胞に AdCYP3A4 を感染させ、テストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素の MOI 依存的な活性を測定した。また、Fig. 1 (a) において感染期間は 3 日で行ったが、Fig. 1 (b) では時間依存的な CYP3A4 酵素活性の変動についても検討するため、感染日数を 1、2、3、5 日とした。結果として Fig. 1 (a) では MOI 20 まで MOI 依存的な CYP3A4 酵素活性の上昇が認められたが、MOI 200 の高濃度ウイルス処置では減少した。一方、(b) において AdCYP3A4 を MOI 10 で 1、2、3、5 日間感染させたところ、CYP3A4 酵素活性は感染 2 日および 3 日目で各々 215 pmol/min/mg、204 pmol/min/mg となり高値が得られたが、感染 5 日目では減少した。ウイルスの高濃度処置および長時間処置ではウイルスによる毒性が強く現れたため、CYP3A4 酵素活性が減少したと考えられる。CYP3A4 酵素活性は MOI 20 で最も高い値となったが、MOI 10 においても MOI 20 と近い値が得られたことから、以後 AdCYP3A4 の H4IIE 細胞への感染は、MOI 10 で感染 2 日もしくは 3 日で行うこととした。

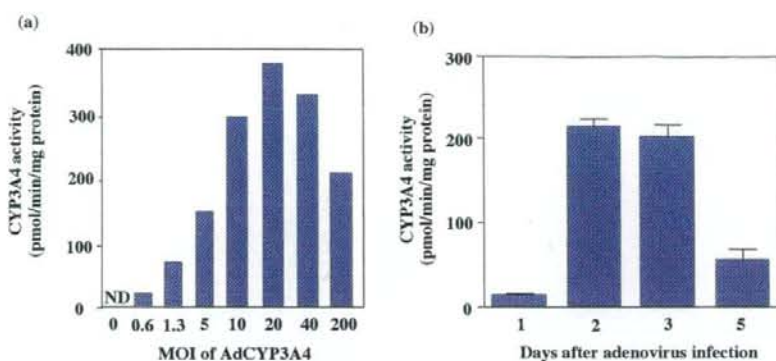


Fig. 1. MOI- and time-dependent changes of CYP3A4 activities in H4IIE cells. H4IIE cells were infected with AdCYP3A4 for 2 days with different MOIs (a), and at MOI 10 for 1, 2, 3, 5 days (b). Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity was measured as described in materials and methods. Data are the mean of two independent experiments (a), and mean  $\pm$  SD (b, n = 3). ND: not detected.

I-C-2 アデノウイルス同時感染 H4IIE 細胞におけるテストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性、GCSH mRNA 量および GSH 含量

AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA の同時感染による影響を検討するため、H4IIE 細胞に AdCYP3A4 または AdGFP に対するネガティブコントロールウイルスである AdGFP、および AdGCSH-shRNA を各々 MOI 10、10、20 で同時感染させた。AdGCSH-shRNA の感染条件は Akai らの方法を参考に決定

した (Akai et al., 2007)。Fig. 2 にはアデノウイルス同時感染下における GCSH mRNA 量を示す。なお、Control 群はアデノウイルスを処置していない。結果として、アデノウイルス感染 3 日目の AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群および AdGFP/ AdGCSH-shRNA 群において、Control 群に対し各々 67%、58% の GCSH mRNA の有意な減少が認められた。また AdCYP3A4 単独感染と Control 群の間において GCSH mRNA 量の有意な差は認められなかった。

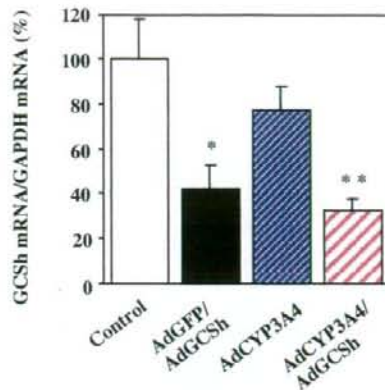


Fig. 2. Relative expression levels of GCSH mRNA in H4IIE cells infected with the various adenoviruses. H4IIE cells were infected with adenovirus (AdCYP3A4, AdGFP, and AdGCSH-shRNA) for 3 days, and GCSH mRNA was measured by real-time RT-PCR. AdCYP3A4, AdGFP and AdGCSH-shRNA were infected at MOI 10, 10 and 20, respectively. Each column represents the mean  $\pm$  SD (n = 3).

\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared with control groups. Control; adenovirus untreated.

Fig. 3 には、時間依存的な CYP3A4 酵素活性 (a)、および細胞内 GSH 含量 (b) を示す。結果として、(a) において感染 1 日目では AdCYP3A4 感染群の CYP3A4 酵素活性は 38-70 pmol/min/mg となり低値であったが、感染 3 日目では AdCYP3A4 群、AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群において共に 216 pmol/min/mg となり、AdGCSH-shRNA 同時感染による CYP3A4 酵素活性への影響は認められなかった。一方 Control 群および AdGFP/AdGCSH-shRNA 群において CYP3A4 酵素活性の発現は認められなかった。また (b) において、Control 群における細胞内

GSH 含量は  $81 \pm 2.1$  nmol/mg であったが、感染 3 日目の AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群および AdGFP/AdGCSH-shRNA 群では、CTL に対し各々 46%、42% の有意な減少が認められた。以上の結果より、AdCYP3A4 と AdGCSH の同時感染においても感染 3 日目で各ウイルスが機能していることが確認できた。

#### I-C-3 薬物による細胞障害性の検討

AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA を同時感染させた H4IIE 細胞では、CYP3A4 発現 GSH 減少状態となっていることを確認した。Fig. 4 では、この細胞試験系に



において、肝障害の報告がなされている薬物の細胞障害性が検出できるかについて、MTTアッセイおよびクリスタルバイオレット染色により検討した。結果として、MTTアッセイおよびクリスタルバイオレット染色の両方法で、トログリタゾン処置では25、50  $\mu$ M、フルタミド処置では20、50  $\mu$ M、アセトアミノフェン処置では10、20 mMにおいて

AdCYP3A4/AdGCSh-shRNA 群の細胞障害性が AdGFP 群、AdCYP3A4 群、AdGFP/AdGCSh-shRNA 群に対し有意に増強された。ロジグリタゾン処置においてはどちらの方法においても AdCYP3A4/AdGCSh-shRNA 群の細胞障害性増強は認められなかった。

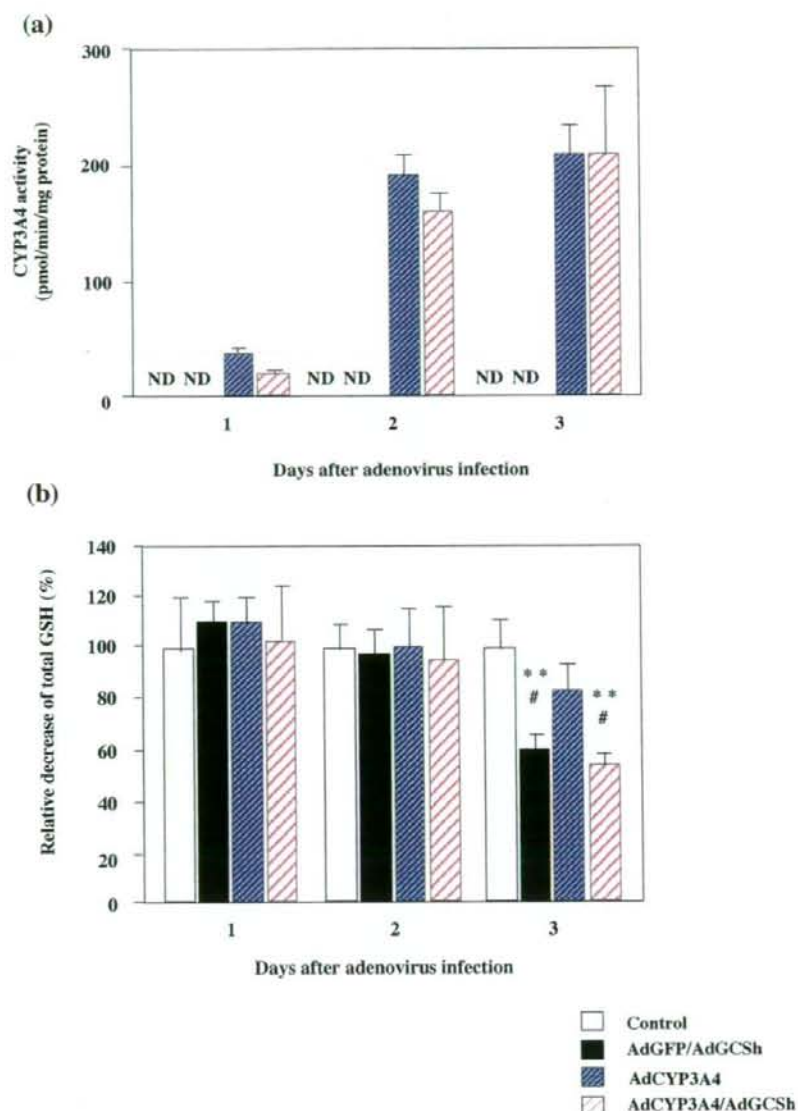


Fig. 3. Time-dependent changes of CYP3A4 activity (a) and decrease of total GSH (b) in H4IIE cells infected with the various adenoviruses. H4IIE cells were infected with the adenoviruses for 3 days, and testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity (a) or total GSH (b) was measured as described in materials and methods. AdCYP3A4, AdGFP and AdGCSH-shRNA were infected at MOI 10, 10 and 20, respectively. In (b), total GSH content in the control group was  $81 \pm 2.1$  nmol/mg. Each column represents mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).  $**P < 0.01$  compared with control groups, and  $^{\#}P < 0.05$  compared with AdCYP3A4 groups. Control; adenovirus untreated. ND: not detected.

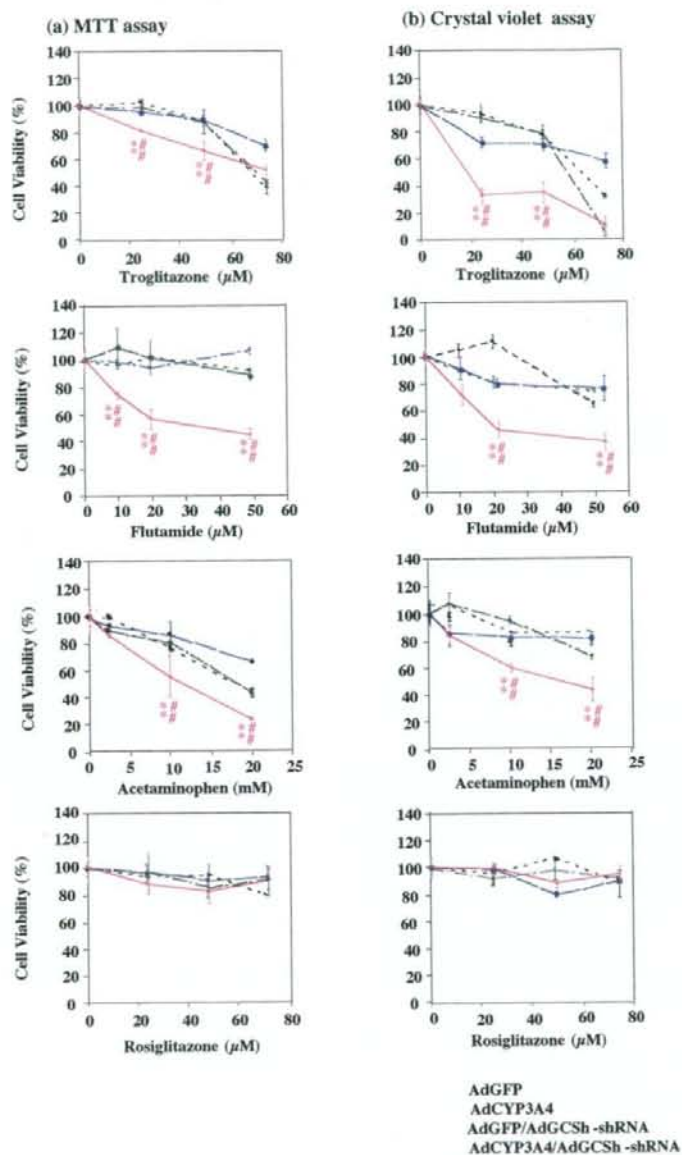


Fig. 4. Cell viability measured by MTT assay (a) and crystal violet assay (b) in drug-treated H4IIE cells. H4IIE cells were infected with various adenoviruses for 2 days, and treated with troglitazone, flutamide, acetaminophen, and rosiglitazone for 24 hrs (MTT assay) or 48 hrs (Crystal violet assay). (▲) AdCYP3A4 and AdGCSH-shRNA; (●) AdCYP3A4; (▲) AdGFP; (◆) AdGFP and AdGCSH-shRNA. AdCYP3A4, AdGFP and AdGCSH-shRNA were infected at MOI 10, 10 and 20, respectively. Each point represents mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P < 0.01$  compared with AdCYP3A4 groups, ## $P < 0.01$  compared with AdGFP groups.

#### I-D. 考察

アデノウイルス発現ベクターは、神経系を含む多くの分化、未分化動物培養細胞で100%に近い発現効率を示すだけでなく、細胞を死滅させずにその機能を調べることが出来る。利用対象となる動物種はマウス、ラットを含む広い範囲にわたっており、動物個体への直接投与による遺伝子発現も可能である。さらに、shRNA 発現アデノウイルスは、耐性致死遺伝子をノックダウンさせることが可能であり、作製も簡便であることから、アデノウイルスを用いた遺伝子操作は、今後様々な応用が期待される遺伝子導入方法であると言える。

今回、AdCYP3A4、AdGCSH-shRNA をウイルスカラムに基づいて希釈し、H4IIE 細胞に感染させ、ウイルス感染効率が最適な MOI と感染時間を検討した。12 ウェルプレートにおける AdCYP3A4 の H4IIE 細胞への感染は、活性値と細胞の形態から MOI 10 が適切であり (Fig. 1a)、さらにテストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性の発現は、感染 2 日および 3 日後で顕著な上昇を示した (Fig. 1b)。さらに本研究室で作製済みであった AdGCSH-shRNA と AdCYP3A4 を同時感染させた場合、Control 群と比較して GCSH mRNA は 67%、GSH 含量は 44%

減少し、また CYP3A4 酵素活性もアデノウイルスの同時感染による影響を受けないことを確認した (Fig. 2、Fig. 3)。なお、細胞内 GSH 含量のノックダウン効果については、Akai らの報告と近い値が得られた (Akai et al., 2007)。以上の結果を受け、トログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、ロジグリタゾン処置による細胞障害性を MTT アッセイおよびクリスタルバイオレット染色により検討した (Fig. 4)。

トログリタゾンは重篤な肝障害を惹起するとして、販売中止となった経口抗糖尿病薬である (Gitlin et al., 1998; Neuschwander-Tetri et al., 1998)。トログリタゾンは未変化体および CYP による代謝物の両方が肝障害の要因となることが示唆されており (Yamazaki et al., 1999; Masubuchi, 2006)、これまでに CYP による代謝物の GSH 付加体が検出されている (Kassahun et al., 2001)。中でも CYP3A4 による代謝で生成するキノン体は、トログリタゾンのクロマン環が開環した構造を有する。対象に用いたロジグリタゾンはクロマン環を有さないため、クロマン環が TZD 系抗糖尿病薬の中でもトログリタゾンに代表される様な肝障害の要因であると考えられている (Walgren et al., 2005)。トログリタゾ