

ンの肝障害発生メカニズムに関する報告は多岐に渡っており、活性代謝物の生成という観点だけではなく、ミトコンドリア機能障害やシグナル伝達経路に及ぼす影響という観点からも様々な検討がなされている (Ong et al., 2007)。細胞障害性の検討においては、AdGFP 群と AdCYP3A4 群において細胞生存率の推移が類似していたことから、AdCYP3A4 群において CYP3A4 による代謝物の影響は見られなかった。しかし、AdCYP3A4/AdGCSh-shRNA 群においては細胞障害性の増強が認められたことから、CYP3A4 による細胞障害性の強い代謝物が GSH により解毒されたことが示された。ロジグリタゾンはトログリタゾンと同様に TZD 系に属する抗糖尿病薬であるが、本検討においても細胞障害性は示されなかった。

フルタミドはヒトおよびラット肝において、CYP3A4、または CYP1A2 により酸化された後、ミクロソームタンパク質に結合し、代謝物である水酸化フルタミドは GSH 付加体を形成することが示されている (Berson et al., 1993; Fau et al., 1994)。中でも、ミクロソーム中で CYP が代謝に関与する前に、カルボキシルエステラーゼによって生成された 4-nitro-3-(trifluoromethyl) phenylamine

(FLU-1) がさらに CYP3A4 により水酸化されることで生じる FLU-1-N-OH は、フルタミドによる肝障害の要因の一つとの報告もなされている (Goda et al., 2006; Ohbuchi et al., 2008)。細胞障害性の検討においては、トログリタゾン同様に AdCYP3A4/AdGCSh-shRNA 群においてのみ細胞障害性の増強が認められ、CYP3A4 による代謝物が GSH により解毒されることが示された。過去の報告から推察すると、このとき過剰発現させた CYP3A4 の基質は H4IIE 細胞内のエステラーゼにより生成された FLU-1 であるとは考えられるが、実際に本試験系において FLU-1 を細胞に処置した場合、フルタミドよりも強く細胞障害が惹起されるという結果は得られなかった (data not shown)。FLU-1 は細胞内で生成される代謝物であるため、今回の試験系の様に細胞外から処置するという方法では細胞毒性を評価できなかった可能性も考えられる。

アセトアミノフェンは、高投与量において CYP2E1, CYP3A4, CYP1A2 などの酸化を受けて *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) に代謝される (Patten et al., 1993; Thummel et al., 1993)。アセトアミノフェンによる肝障害は、肝細胞中の GSH が欠乏することで、NAPQI による

細胞内蛋白質への結合が増加し、肝ネクロシスが惹起されることに基づくと言われている (Albano et al., 1985)。細胞障害性の検討においては、

AdCYP3A4/AdGCSh-shRNA 群においてのみ細胞障害性の増強が認められ、CYP3A4 による代謝物が GSH により解毒されることが示された。過去の報告より、CYP3A4 による代謝物は NAPQI であることが考えられる。

AdGCSh-shRNA を感染させて 3 日後の細胞における GSH 含量は、約 50 nmol/mg まで減少させることができたが、実際のヒトおよびラット肝ホモジネートにおける GSH 含量は各々 3.9 nmol/mg、7 nmol/mg 程度と言われている (Shi et al., 1982; Higashi et al., 1985)。また本検討で用いている薬物の処置濃度は実際のヒト血中濃度よりも高いため、本試験系を *in vivo* で起こり得る現象を外挿する目的で直接使用することはできないと考えられる。しかし MTT アッセイおよびクリスタルバイオレット染色の結果から、薬物が CYP3A4 により細胞障害性が高い代謝物に代謝されること、およびその様な活性代謝物に対する GSH の解毒としての寄与を定性的に検出することは可能であることが示された。また、本試験系で検討する薬物の

濃度は、使用する培養細胞に対して未変化体の細胞障害性が強く示されない範囲に限られることから、未変化体の細胞障害性が強い薬物では CYP3A4 による影響を見ることは困難であり、一方で未変化体の細胞障害性が弱い薬物では検討濃度の幅をどの様に設定するかが問題となる。本研究では薬物毎に培養細胞で影響が見えやすい濃度を検討し、CYP3A4 による代謝的活性化の関与の有無を判別しているが、目的に応じて実際のヒトにおける薬物の血中濃度、門脈中濃度、肝細胞中における濃度等を考慮して濃度範囲を決定し、各々の条件において独立した解釈をすることが必要と考えられる。

本検討では MTT アッセイとクリスタルバイオレット染色を用いているが、前者はミトコンドリア脱水素酵素活性を指標とした評価方法であるのに対し、後者は薬物処置から 48 時間後にプレートのウェル上に存在する生細胞の数を指標とした評価方法である。そのため、今回は細胞障害の発生機序としてはミトコンドリア機能という一点でしか評価されていない。本来ならば複数の要因に基づいて細胞障害性を評価することが望ましく、本検討においても細胞内 ATP 量を指標とする ATP アッセイを試みた

が、H4IIE 細胞において最適なアッセイ条件を設定することができなかった (data not shown)。

AdGCSh-shRNA を用いて GCSh ノックダウンラットを当研究室で作製した (Akai et al., 2007)。その研究に続き、今回の検討をラットで再現させることを目的とし、AdCYP3A4 を種々の条件でラットに投与したが、肝において CYP3A4 mRNA およびタンパク質を検出することはできなかった (data not

shown)。CYP3A4 はヒトにおいて機能的に重要であり、かつラット CYP3A と類似した cDNA 配列を有するという点から (相同性 77%)、異物として認識され排除されやすいことが推察されたが、CYP3A4 タンパク質が発現しない詳細な理由については不明である。以後、本研究では CYP3A4 過剰発現ラットの作成を断念し、*in vitro* で種々の検討を行うこととした。

## II 章 ヒト肝由来細胞を用いたCYP3A4 発現 GSH 減少細胞の作製および薬物 の細胞障害性の検討

### II-A. 緒言

I 章ではラット肝癌由来細胞を用いて CYP3A4 による活性代謝物の細胞障害性を評価するための試験系を構築したが、さらにヒト由来の細胞を用いて各薬物の細胞障害性に対する感受性の違いを比較検討することは、種差の影響を考慮する上で重要であり、また薬物の代謝的活性化と解毒に関してより詳細に検討することが可能であると考えられる。そこで第 II 章ではヒト肝癌由来細胞を用いて I 章と同様の評価系を構築することを目的とした。

ニルタミドはフルタミドの同効薬であり、現在 idiosyncratic な肝障害を惹起するとの報告はない。しかし、ニルタミドはフルタミドとは異なり、CYP を経由しない機序により肝障害性を示すことが示唆されている (Fau et al., 1992; McLeod, 1997)。クロザピンは非定型抗精神薬であり、ジクロフェナクは非ステロイド性消炎鎮痛剤であるが、クロザピン、ジクロフェナクともに idiosyncratic な肝障害を惹起すること

が知られている (Purcell, 1991; Hummer et al., 1997; Walgren et al., 2005)。本章では第 I 章で使用した薬物に上記 4 薬物を加え、ラット肝癌由来細胞とヒト肝癌由来細胞を用いた実験系において比較検討した。なお、I 章で用いたラット GCSH ノックダウンアデノウイルス AdGCSH-shRNA は、その塩基配列がヒトと異なるためにヒト肝由来細胞に用いることはできない。そのため siRNA でヒト GCSH (Accession NM\_001498) をノックダウンすることとした。

### II-B. 研究方法

#### II-B-1 実験材料および試薬

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) より購入した。ヒト肝癌由来 HLE 細胞、Huh7 細胞はそれぞれ Japan Collection of Research Biosources (Tokyo, Japan) および RIKEN BioResource Center (Ibaraki, Japan) より購入した。ヒト肝癌由来 Hep3B 細胞、Huh6 細胞、HLF 細胞は金沢大学医学部第一内科より御供与頂いた。

#### II-B-2 細胞培養および薬物処置

HepG2 細胞、Hep3B 細胞、Caco-2 細

胞は 10% FBS と NEAA を含む DMEM を用い培養した。Huh7 細胞、Huh6 細胞、HLE 細胞、HLF 細胞は 10% FBS を含む DMEM を用い培養した。Fa2-N4 細胞は 10% FBS を含む MFE を用いて培養し、プレートには I-2-4-2 における コラーゲンコート処理を施した。細胞培養は 10 cm プレートを用いた。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。

#### II-B-3 細胞へのアデノウイルス感染

I-B-5 の方法に準じた。

#### II-B-4 タンパク質定量

I-B-6 の方法に準じた。

#### II-B-5 テストステロン 6β水酸化酵素

#### 活性の測定およびキネティックパラメーターの算出

I-B-7 の方法に準じた。またキネティックパラメーターの算出は、コンピューターソフト Kaleida Graph (Synergy software, Reading, PA) を用いた。速度論的解析により得られた反応速度を以下に示す Michaelis-Menten 式に当てはめることでキネティックパラメーター ( $K_m$ , ミカエリス定数;  $V_{max}$ , 最大反応速度) を算出した。

$$V = V_{max} \cdot S / (K_m + S)$$

#### II-B-6 細胞への siRNA 処置

##### Stealth Select RNAi for GCSH

(siGCSH) は Lipofectamine™RNAiMAX Reagent を用いて細胞に導入した。12 ウェルプレートでは Lipofectamine™RNAiMAX Reagent と siRNA を無血清培地で混合した溶液を全量 200 μL/well として各ウェルにアプライした。また 96 ウェルプレートでは、Lipofectamine™RNAiMAX Reagent と siRNA を無血清培地で混合した溶液を全量 40 μL/well として各ウェルにアプライした。Lipofectamine™RNAiMAX Reagent は 12 ウェルプレートにおいて 1 μL/well、96 ウェルプレートにおいて 0.1 μL/well とした。siGCSH は 10 nM で

処置した。10-20 分間室温で放置し、II-2-2 の方法で回収した細胞を播種した。細胞は 24 時間 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で培養し、アデノウイルス感染を行った。本章で使用した siRNA の配列を以下に示す。

Stealth Select RNAi for GCSH, Line 1:  
UAGAUGUGCAGGAACUGGAGGAU  
CC, Line 2:  
GGAUCCUCCAGUUCCUGCACAUCU

A

II-B-7 Total RNA の調製

I-B-8 の方法に準じた。

II-B-8 Real-time RT PCR

I-B-9 の方法に準じ、ヒト GCSH、GAPDH mRNA 量を測定した。本章で用いたプライマーの配列は Table 2 に示す。

**Table 2. Sequence of primers for human CYP3A4, human GCSH, and human GAPDH.**

Primer	Sequence
<b>Human CYP3A4</b>	<b>FP: 5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'</b> <b>RP: 5'-ATGCAGTATTCTGAACTACC-3'</b>
<b>Human GCSH</b>	<b>FP: 5'-ATTAGAAGAAAATCAGGCTC-3'</b> <b>RP: 5'-GTAGCCAAGTATCATAAAG-3'</b>
<b>Human GAPDH</b>	<b>FP: 5'-GCTCCCCCTGCAAATGA-3'</b> <b>RP: 5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTC-3'</b>

## II-C. 研究結果

II-C-1 ヒト肝および大腸癌由来細胞におけるテストステロン 6β水酸化酵素活性およびキネティックパラメーター

本節では AdCYP3A4 をヒト肝癌由来である HLE 細胞、HLF 細胞、Huh7 細胞、Huh6 細胞、HepG2 細胞、Hep3B 細胞、不死化ヒト肝細胞である Fa2-N4 細胞に感染させ、CYP3A4 酵素活性を測定した

(Fig. 5)。先の検討結果を受けて、ウイルス処置量は MOI 10、感染日数は 2 日として行った。その結果、HepG2 細胞において最も高い CYP3A4 酵素活性値が得られ、その値は 670 pmol/min/mg であった。次いで、Huh7 細胞で 233 pmol/min/mg、Huh6 細胞および Fa2-N4 細胞で 84 pmol/min/mg であった。その他の各種肝由来細胞においては、今回のウイルス感染条件で十分な CYP3A4 酵素活

性を得られなかったため、以降の検討は

HepG2 細胞を用いて行うこととした。

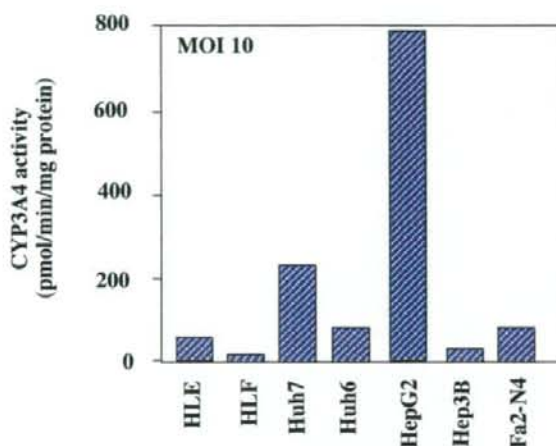


Fig. 5. CYP3A4 activity in various cell lines infected with AdCYP3A4. Cells were infected with AdCYP3A4 at MOI 10 for 2 days, and testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity was measured as described in materials and methods. Data are mean of two independent experiments.

Table 3 には H4IIE 細胞、HepG2 細胞、ヒトヘパトサイト、およびヒト肝ミクロソームにおけるテストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性キネティックパラメーターを示す。結果として、H4IIE 細胞および HepG2 細胞における  $V_{max}$  値は各々 325 pmol/min/mg、799 pmol/min/mg となり、ヒトヘパトサイトを用いた場合よりも高い値が得られた。また  $K_m$  値は H4IIE

細胞および HepG2 細胞で各々 46  $\mu$ M、53 $\mu$ M となり、ヒト肝ミクロソームを用いた場合よりも低値が得られた。以上の結果から、2 種類の細胞を用いた本試験系は共に現在 *in vitro* 試験で汎用されているヒトヘパトサイトやヒト肝ミクロソームと機能的に類似し、十分な CYP3A4 酵素活性を有する培養細胞系であることが示された。

Table 3. CYP3A4 activity in H4IIE and HepG2 cells infected with AdCYP3A4, human hepatocyte, and human liver microsomes.

	Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation	Kinetic analysis
	K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)	V <sub>max</sub> (pmol/min/mg)
H4IIE cells infected with AdCYP3A4	46	325
HepG2 cells infected with AdCYP3A4	53	799
Human hepatocyte <sup>a</sup>	96	177 $\pm$ 98
Human liver microsomes <sup>b</sup>	46.4 $\pm$ 1.9	5260 $\pm$ 80

<sup>a</sup> Donato *et al.*, 1995

<sup>b</sup> Walsky and Obach., 2004

II-C-2 siGCSH 処置 AdCYP3A4 感染  
HepG2 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

前章においてラット肝癌由来である H4IIE 細胞には、AdGCSH-shRNA を用い細胞内 GSH 含量を減少させたが、ヒト肝癌由来である HepG2 細胞にはラット由来の塩基配列を用いた AdGCSH-shRNA を用いることはできない。そこで、ヒト GCSH をノックダウンのために siRNA を用いることとした。今回使用したヒト GCSH に対する siRNA (siGCSH) は、reverse transfection により細胞に導入するため、細胞播種時に siGCSH を処置し、その翌日 AdCYP3A4 および AdGFP を感染させた。Fig. 6 には

アデノウイルス感染から 2 日および 3 日後の CYP3A4 酵素活性 (a)、GCSH mRNA 量 (b)、細胞内 GSH 含量 (c) の結果を示す。その結果、siGCSH 処置後 AdCYP3A4 感染を行った HepG2 細胞においても、CYP3A4 酵素活性は感染 2 日目および 3 日目で各々 781 pmol/min/mg、670 pmol/min/mg となり、AdCYP3A4 単独感染と同様に高い酵素活性値が得られた (a)。一方 GCSH mRNA 量および GSH 含量は siGCSH 処置後 AdCYP3A4 感染を行った HepG2 細胞において感染 3 日目で各々 AdGFP 群に対し 62%、48%減少し、AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 処置を行った H4IIE 細胞と類似した結果となった (Fig. 2、Fig. 3b)。以上の結果から、siGCSH 処置後 AdCYP3A4 感染を行った HepG2 細胞においても、H4IIE 細胞と同



様の CYP3A4 発現 GSH 減少状態となっ

ていることを確認した。

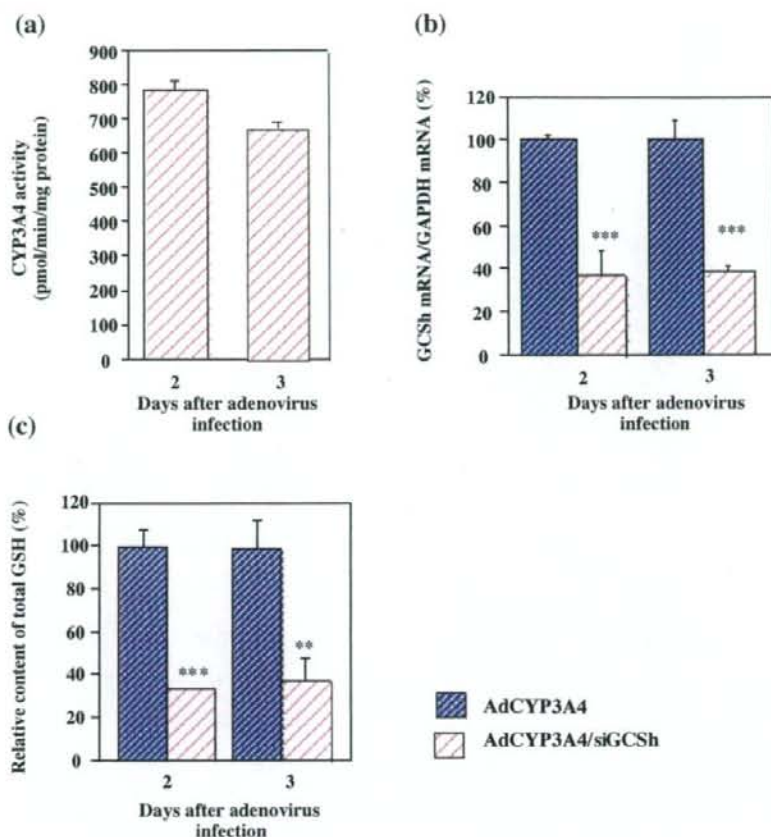


Fig. 6. Time-dependent changes of CYP3A4 activity (a) and relative expression levels of GCSH mRNA (b) and decrease of total GSH (c) in HepG2 cells treated with AdCYP3A4 and siGCSH. HepG2 cells were infected with the adenoviruses for 3 days, and testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase activity (a), GCSH mRNA (b), and total GSH (c) were measured as described in materials and methods. AdCYP3A4 was infected at MOI 10, and siGCSH was transfected at 10 nM. In (c), total GSH content in AdCYP3A4/siGCSH group was 43  $\pm$  5 nmol/mg 2 days after infection, and 49  $\pm$  14 nmol/mg 3 days after infection. Each column represents mean  $\pm$  SD (n = 3).

\*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 compared with AdCYP3A4 group.

### II-C-3 薬物による細胞障害性の検討

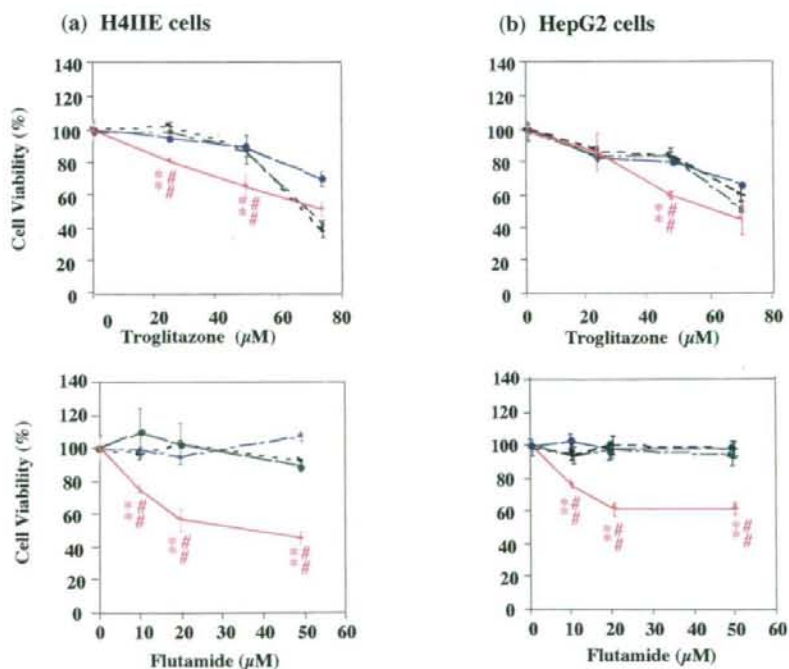
CYP3A4 発現 GSH 減少状態となっ  
ている H4IIE 細胞と HepG2 細胞において、

薬物の細胞障害性に対する感受性に差  
異が認められるかを検討するため、両細  
胞系を用いて MTT アッセイを行った。

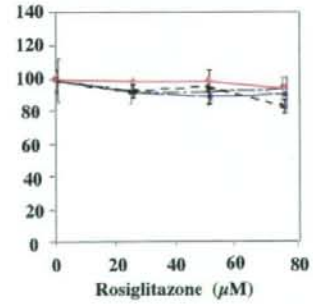
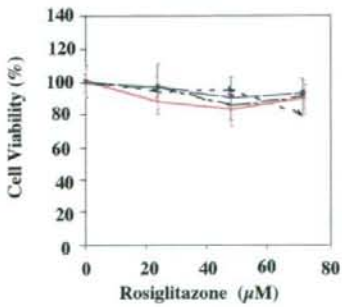
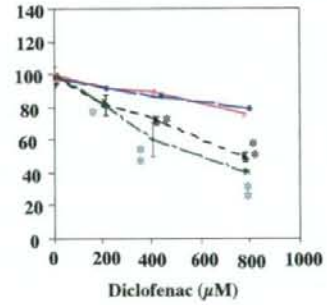
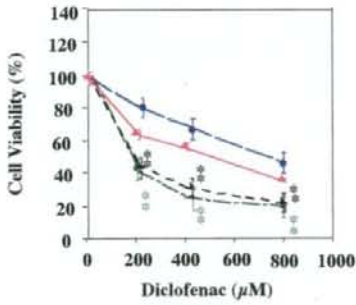
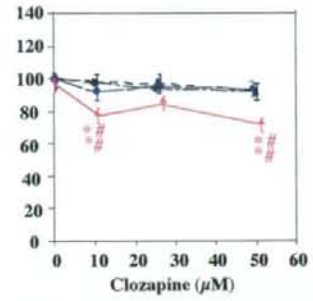
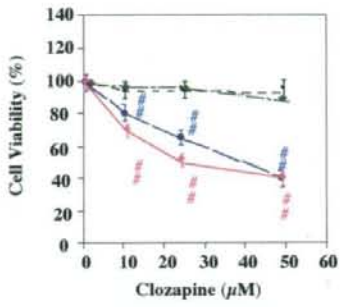
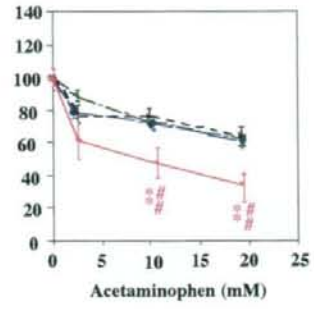
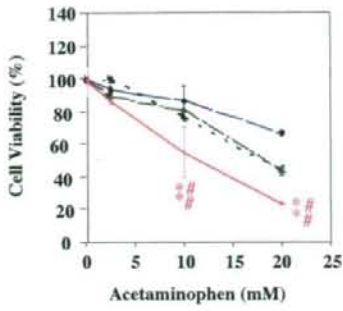
本章では I 章で用いたトログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、ロジグリタゾンにクロザピン、ジクロフェナクを加え、さらにフルタミドに対するネガティブコントロールとしてニルタミドを用いた (Fig. 7)。結果として、両細胞においてトログリタゾン処置では 50  $\mu\text{M}$ 、フルタミド処置では 10、25、50  $\mu\text{M}$ 、アセトアミノフェン処置では 10、20 mM で CYP3A4 発現 GSH 減少細胞の細胞障害性が他の 3 群に対し有意に増強された。一方、ロジグリタゾン、ニルタミド処置においてはどちらの細胞においても CYP3A4 発現 GSH 減少細胞の細胞障害性増強は認められなかった。

クロザピンおよびジクロフェナク処

置では、2つの細胞で異なる結果が得られた。クロザピン処置においては、H4IIE 細胞のみで CYP3A4 発現による細胞障害性の有意な増強が認められた (10、25、50  $\mu\text{M}$ )。一方 HepG2 細胞においては、有意ではあるものの CYP3A4 発現細胞において細胞障害性の増強は認められなかった。ジクロフェナクにおいては高濃度まで処置しているということもあり、両細胞共に未変化体の障害性が強く出ているが、CYP3A4 発現細胞においては細胞障害性の増強が抑制された。クロザピンおよびジクロフェナク処置のどちらにおいても H4IIE 細胞の方が HepG2 細胞よりも高感受性となったことから、種差が示された。



Continue



Continue

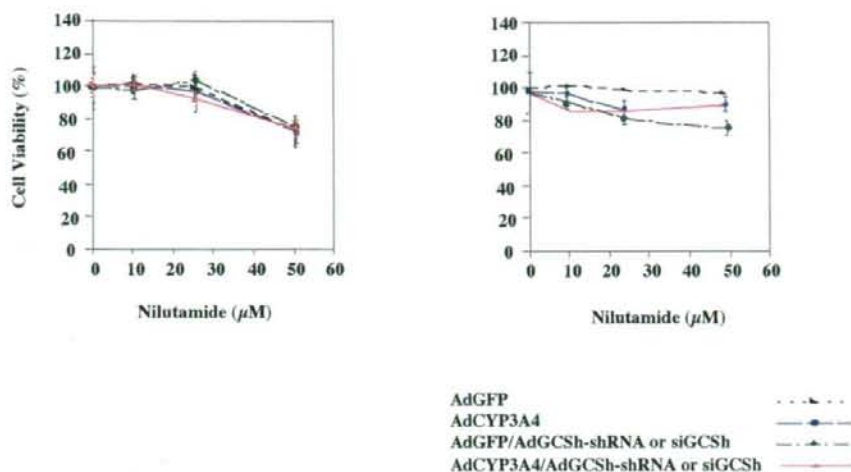


Fig. 7. Cell viability measured by MTT assay in drug-treated H4IIE (a) and HepG2 (b) cells. H4IIE and HepG2 cells were infected with various adenoviruses for 2 days, and treated with troglitazone, flutamide, acetaminophen, clozapine, diclofenac, rosiglitazone, and nilutamide for 24 hrs. HepG2 cells were infected with adenoviruses after siGCSH transfection. (▲) AdCYP3A4 and AdGCSH-shRNA or siGCSH; (●) AdCYP3A4; (■) AdGFP; (◆) AdGFP and AdGCSH-shRNA or siGCSH. 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.

#### II-D. 考察

ラット肝癌由来細胞を用いた細胞障害試験系に引き続き、ヒト肝癌由来細胞を用いた細胞障害試験系を構築するため、最初に使用するヒト肝癌由来細胞を選択した。Fig. 5 では第1章で導き出した感染条件を参考に、7種類のヒト肝癌由来細胞に AdCYP3A4 を MOI 10 で2日間感染させた。結果として、HepG2細胞で CYP3A4 酵素活性は 670

pmol/min/mg となり、最も高い値が得られた。次いで Huh7 細胞で高値が得られたが、全体として HepG2 細胞と同程度の高発現を示す細胞はなかった。Table 3 より、H4IIE 細胞を用いた際の CYP3A4 酵素活性キネティックパラメーターにおいて、 $V_{max}$  値は 325 pmol/min/mg となり高値が得られている。HepG2 細胞と H4IIE 細胞で比較的高い CYP3A4 酵素活性が得られた理由の一つとして、これ

ら二つの細胞にはCYP酵素活性の発現において重要であるNADPH P450還元酵素がヒトヘパトサイトと同様に発現していることが考えられる(Glatt et al., 1990)。さらにHepG2細胞とH4IIE細胞のどちらにおいてもKm値はヒトヘパトサイトの約半分の値となった。従って、従来の細胞障害性、薬物代謝試験で汎用されているヒトヘパトサイトと比較しても、本試験系ではCYP3A4の機能的な影響をより評価しやすいと考えられる。

続いて、HepG2細胞における細胞内GSH含量を減少させるため、siRNAによるヒトGCSHのノックダウンを試みた。その結果、Fig. 6よりsiRNAとAdCYP3A4を同時処置してもCYP3A4酵素活性はAdCYP3A4単独感染と同程度に発現しており(Fig. 5)、GSH含量はウイルス感染2日目でAdCYP3A4単独感染の40%、3日目で52%までに減少した(Fig. 6c)。従って、siGCSHを用いた場合はAdGCSH-shRNAの感染よりも1日早く、かつ50%程度までGSH含量が減少することを確認した(Fig. 3b)。

以上の条件検討を踏まえH4IIE細胞とHepG2細胞における薬物の肝障害性に対する感受性の違いをトログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピン、ジクロフェナク、ロジグリ

タゾン、ニルタミドを用いて比較検討した(Fig. 7)。

トログリタゾンは第1章でも述べた通り、CYP3A4による活性代謝物が肝障害発生要因の一つとして考えられている。H4IIE細胞を用いた検討では、25および50  $\mu$ Mの濃度で

AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA群において細胞障害性の増強が認められたが、HepG2細胞においても50  $\mu$ MでAdCYP3A4/siGCSH群において細胞障害性の増強が認められた。未変化体の障害性による影響も両細胞において類似していた。

フルタミド処置においては、H4IIE細胞のAdCYP3A4/AdGCSH-shRNA群において濃度依存的な細胞障害性の増強が認められたが、今回HepG2細胞においても同様に10  $\mu$ Mから細胞生存率が低下し始め、類似した結果が得られた。アセトアミノフェン処置においてもHepG2細胞ではH4IIE細胞と同様に10 mMから細胞生存率が低下し始めるという結果であった。フルタミドの同効薬であるニルタミドは、フルタミドと同じく胆汁うっ帯を伴う肝障害の報告がなされているが、CYPによる代謝的活性化の報告はなされていない。ニルタミドはNADPH P450還元酵素によってニト

ロアニオンフリーラジカルを生じ、好気的条件下では酸素と反応しスーパーオキシドとなるが、嫌気的条件下ではヒドロキシルアミンとなって GSH と付加体を形成するとの報告がある (McLeod, 1997)。今回の検討においても、H4IIE 細胞と HepG2 細胞どちらの細胞においても各細胞群で細胞生存率に差は見られず、CYP3A4 による活性代謝物生成の関与は認められなかった。

非定型抗精神薬であるクロザピンは、顆粒球減少症や無顆粒球症といった副作用の他に、idiosyncratic な肝障害を惹起する。クロザピンは CYP3A4、CYP1A2 によって *N*-脱メチル化体に、CYP3A4 やフラビン含有モノオキシゲナーゼによって *N*-オキサイドに代謝されること、またその様な CYP 代謝物はミクロソームタンパク質および GSH と結合することが報告されている (Fang et al., 1998)。一般に *N*-オキサイド体は肝障害性が強い場合が多いが、クロザピン *N*-オキサイド生成反応は可逆的であることから、クロザピン *N*-オキサイドが肝障害の一因となる代謝物であるかは不明である (Pirmohamed et al., 1995)。今回、クロザピン処置においては、H4IIE 細胞と HepG2 細胞とで異なる挙動が示された。H4IIE 細胞においては、AdCYP3A4 感染

を行った二群において 10  $\mu$ M 処置から濃度依存的細胞生存率の減少が認められた。一方 HepG2 細胞においては、AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群で 10  $\mu$ M、および 50  $\mu$ M で他の 3 群との有意な細胞生存率の差が認められているが、濃度依存的な推移ではないことから、CYP3A4 の代謝的活性化による細胞障害性は認められなかった。今回 H4IIE 細胞と HepG2 細胞で影響が異なった理由としては、両細胞内に存在する解毒因子の CYP3A4 により生成される活性代謝物への寄与が異なるためと考えられる。また、H4IIE 細胞においては AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群と AdCYP3A4 群では細胞生存率の推移が類似していることから、GSH の解毒による影響が十分に認められなかった。GCSH をノックダウンした際、両細胞の GSH 含量はほぼ同等であることから、両細胞において GSH 付加以外の機構が活性代謝物の解毒に寄与していると推察される。

ジクロフェナクは非ステロイド性消炎鎮痛剤の一種であるが、ジクロフェナクも idiosyncratic 肝障害を惹起する。ジクロフェナクは CYP3A4 による 5 位水酸化体、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によるアシルグルクロニド、CYP2C9 によ

る4位水酸化を経て生成されるキノンイミン等の代謝物が知られているが、中でもアシルグルクロニドやキノンイミンがアレルギー性肝障害性を惹起する代謝物と考えられている

(Kreutz-Rommel and Boelsterli, 1993)。本検討において、ジクロフェナクは最大800  $\mu\text{M}$  までと高濃度で処置したが、H4IIE細胞とHepG2細胞のどちらにおいてもCYP3A4の活性化による細胞障害性の増強は認められず、AdCYP3A4群およびAdCYP3A4/AdGCSH-shRNA群において未変化体の障害性が軽減されたことから、CYP3A4による解毒的代謝が示された。また、未変化体の障害性はH4IIE細胞でより顕著に現われており、クロザピン同様に細胞障害性に対する感受性において種差が認められた。

H4IIE細胞とHepG2細胞において、

CYP3A4により活性代謝物が生成されるとの報告がなされている薬物の細胞障害性を比較検討した結果、トログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、ジクロフェナク、ロジグリタゾン、ニルタミドの処置においては類似した結果が得られた。一方クロザピン処置ではH4IIE細胞においてのみCYP3A4による細胞障害性の増強が認められ、また全体的に肝障害性に対する感受性はH4IIE細胞の方が高い傾向があった。従ってCYPの発現効率や細胞内GSH含量以外の細胞株における種差の影響を考慮するためにも、異なる種の代表的な細胞株を用いて比較検討することは有用であるが、その前提として細胞内に発現する薬物代謝酵素や解毒因子に関する基礎情報を把握することが重要と考えられる。

III 章 CYP3A4 の発現と細胞内解毒因子のノックダウンが idiosyncratic 肝障害性薬物の細胞障害性に与える影響

### III-A. 緒言

Idiosyncratic な肝障害は、薬物の代謝的活性化を経て惹起されると言われている。これまでに idiosyncratic な肝障害を惹起すると言われている多くの薬物において、ヒト肝ミクロソームや代謝酵素発現系を用いた検討がなされており、実際に活性代謝物が同定されているものも少なくはない。しかし肝障害発生要因を解明する際には、薬物の推定代謝経路を導き出すことと同時に、生細胞内における代謝物の細胞障害性、タンパク質との共有結合性、その他因子への影響等を考慮する必要がある。

CYP3A4 はヒト肝において主要な CYP 分子種であり、多くの薬物の代謝に関わるため、idiosyncratic な肝障害を惹起する薬物の代謝的活性化においても幅広く関与していることが推測される。第 III 章では過去に idiosyncratic な肝障害の症例が出たという報告のある薬物を対象とし、本試験系において CYP3A4 の代謝による細胞障害性増強が認められるかについて検討した。また、第 I 章、第 II

章では GCSH のノックダウンにより細胞内 GSH 含量を減少させたが、第 III 章では、新たにヒト Nrf2 (Accession NM\_006164)、TRX2 (Accession NM\_012473)、SOD2 (Accession NG\_008729)、GSTM1 (Accession NM\_000561)、HO-1 (Accession NM\_002133)、GPX1 (Accession NM\_000581)、CAT (Accession NM\_001752)、EPHX1 (Accession NM\_000120)、EPHX2 (Accession NM\_001979) の解毒因子を mRNA レベルでノックダウンし、その中で活性代謝物の障害性がより顕著に認められた条件に着目して詳細な検討を行った。

本検討では、第 I 章、II 章で使用したトログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピン、ロジグリタゾン、ニルタミドに加え、アロプリノール、アミオダロン、アミトリプチリン、ダントロレンナトリウム、デシプラミン、エリスロマイシン、フェルバメート、イソニアジド、ラベタロール、レフルノミド、マプロチリン、ネファゾドン、ニトロフラントイン、スリダク、タクリン、テルピナフィン、トルカポン、ザフィルルカストを用いたが、いずれも idiosyncratic な肝障害の報告がある薬物



である (Kaplowitz, 2005)。一方、3-hydroxyacetanilide (3HAA) はアセトアミノフェンの位置異性体であるが、マウスにおいては肝障害性が認められておらず、高投与量下でもアセトアミノフェンで生じる GSH の枯渇が生じない (Nelson, 1980)。ブテナフィンはテルピナフィンの同効薬であり、アモキサピン、シクリジンはともにクロザピンと類似構造を有する薬物であるが、それらにおいては idiosyncratic な肝障害の報告がなされていない。

### III-B. 研究方法

#### III-B-1 実験材料および試薬

ヒトヘパトサイトは日本チャールス・リパー (Kanagawa, Japan) より購入した。Stealth Select RNAi for GCSH、Nrf2、TRX2、GSTM1、HO-1、GPX1、CAT、EPHX1、EPHX2、Stealth RNAi negative control (medium GC) および Alexa Fluor 680 ヤギ抗ウサギ IgG は Invitrogen (Melborne, Australia) より購入した。ウサギ抗ヒト Nrf2 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より購入した。Silencer R Pre-designed siRNA for SOD2 は Ambion (TX, USA) より購入した。

#### III-B-2 細胞培養および薬物処置

II-B-2 に準じた。

#### III-B-3 細胞への siRNA 処置

Stealth Select RNAi for GCSH (siGCSH)、Nrf2 (siNrf2)、TRX2 (siTRX2)、GSTM1 (siGSTM1)、HO-1 (siHO-1)、GPX1 (siGPX1)、CAT (siCAT)、EPHX1 (siEPHX1)、EPHX2 (siEPHX2)、Silencer R Pre-designed siRNA for SOD2 (siSOD2)、Stealth RNAi negative control (scramble siRNA) は Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent を用いて細胞に導入した。siGCSH、siNrf2、siTRX2、siGSTM1、siHO-1、siGPX1、siEPHX1、siEPHX2 は全て 10 nM で使用し、siCAT、siSOD2 は各々 2.5 nM、3 nM で使用した。操作は II-2-6 の方法に準じた。本章で使用した siRNA の配列を以下に示す。

Stealth Select RNAi for GCSH; Line 1:  
UAGAUGUGCAGGAACUGGAGGAUC  
C, Line 2:  
GGAUCCUCCAGUCCUGCACAUCUA  
Stealth Select RNAi for Nrf2; Line 1:  
CUUUCAGGCAGGCAUAUUCUUGG  
G, Line 2:  
CCCAAGGAAUAUGCCUGCCUGAAAG  
Stealth Select RNAi for TRX2; Line 1:  
AUACUCA AUGGCGAGGUCUGUGUG

G, Line 2:

CCACACAGACCUCGCCAUUGAGUAU

Stealth Select RNAi for GSTM1; Line 1:

UAUGGUUGUCCAUGGUCUGGUUCU

C, Line 2:

GAGAACCAGACCAUGGACAACCAUA

Stealth Select RNAi for HO-1; Line 1:

AUCUCCAGGAAGUUAUGCGGGAG

C, Line 2:

GCUCCCGCAUGAACUCCUGGAGAU

Stealth Select RNAi for GPX1; Line 1:

AAGAGCAUGAAGUUGGGCUCGAAC

C, Line 2:

GGUUCGAGCCCAACUUCAUGCUCUU

Stealth Select RNAi for CAT; Line 1:

AAUUUGUGCAUCCUUCAGGUGGCC

G, Line 2:

CGGCCACCUGAAGGAUGCACAAAUU

Stealth Select RNAi for EPHX1; Line 1:

AAUAUAGGCAGCCAGACCCACAGGA,

Line 2:

UCCUGUGGGUCUGGCUGCCUAUAU

U

Stealth Select RNAi for EPHX2; Line 1:

UAAAUGAGGAUCUGAUUCACCUCG

G, Line 2:

CCGAGGUGAAUCAGAUCUCAUUA

A

Silencer R Pre-designed siRNA for SOD2;

Line 1: GGCCUGAUUAUCUAAAAGCtt,

Line 2: GCUUUUAGAUAAUCAGGCCtg

### III-B-4 Total RNA の調製

I-B-8 の方法に準じた。

### III-B-5 Real-time RT PCR および

#### RT-PCR

I-B-10 の方法に準じ、ヒト GCSH、Nrf2、TRX2、SOD2、HO-1、GPX1、CAT、EPHX1、EPHX2、GAPDH mRNA 量を測定した。用いたプライマーの配列は Table 4 に示す。また GSTM1 mRNA 量の測定は、以下の手法にて行った。cDNA 溶液 1  $\mu$ L に 10 $\times$ PCR Buffer を 2.5  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs を 2.5  $\mu$ L、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 1.5  $\mu$ L または 2  $\mu$ L、10  $\mu$ M sense primer および antisense primer をそれぞれ 1  $\mu$ L、Taq DNA polymerase を 0.2  $\mu$ L 加え、滅菌精製水を加えて全量を 25  $\mu$ L とした。サーマルサイクラーを用いて、94 $^{\circ}$ C で 3 分間を 1 サイクル行った後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、58 度で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 14 秒間を 40 サイクル行った。反応終了後、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。バンド強度の定量には Odyssey software (ver. 1.2) を用いて行った。

Table 4. Sequence of primers for human GCSH, human Nrf2, human TRX2, human SOD2, human GSTM1, human HO-1, human CAT, human GPX1, human EPHX1, human EPHX2, and human GAPDH.

Primer	Sequence
Human GCSH	FP: 5'-ATTAGAAGAAAATCAGGCTC-3' RP: 5'-GTAGCCAACCTGATCATAAAG-3'
Human Nrf2	FP: 5'-CAACACACGGTCCACAGC-3' RP: 5'-CAATATTAAGACACTGTAACCTC-3'
Human TRX2	FP: 5'-ACCTGACTTTCAAGACCGAG-3' RP: 5'-ACCGCTGACACCTCATACTCA-3'
Human SOD2	FP: 5'-CAGATAGCTCTTCAGCCTGCAC-3' RP: 5'-GAGCCTTGGACACCAACAGATG-3'
Human GSTM1	FP: 5'-TCACCCAGAGCAACGCCATCT-3' RP: 5'-GCTTCAGTTTCTCAAATTCTGGA-3'
Human HO-1	FP: 5'-ATAGAGCGAAACAAGCAGA-3' RP: 5'-TAGAGCTGTTTGAACCTGG-3'
Human CAT	FP: 5'-AAAGAAGACTCCCATCGCAG-3' RP: 5'-ATGCAGAGACTCAGGACGTA-3'
Human GPX1	FP: 5'-TACACCCAGATGAACGAGC-3' RP: 5'-AGTTCCAGGCAACATCGTT-3'
Human EPHX1	FP: 5'-AGATACCCTCACTTCAAGAC-3' RP: 5'-GGGCAGATGACTTCAAAAAC-3'
Human EPHX2	FP: 5'-TACTGCCATCCTCACCAAC-3' RP: 5'-TTTACTGTCACGTACCCAT-3'
Human GAPDH	FP: 5'-GCTCCCCCTGCAAATGA-3' RP: 5'-CCAGGGCTGCTTTAACTC-3'

### III-B-7 ATP アッセイ

I-B-5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 CellTiter-Glo Reagent 100  $\mu$ lを加えた。PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA) のルミノメーター1420 ARVO MX にセットし、2分間振とう後、10分間静置して発光を測定した。

### III-C. 実験結果

III-C-1 HepG2細胞およびヒトヘパトサイトにおける解毒因子の mRNA 発現量  
ヒトヘパトサイトおよび HepG2細胞

における解毒因子である抱合酵素やその転写因子等の発現量を比較検討するため、ヒトヘパトサイトおよび siRNA 処置した HepG2細胞における解毒因子の mRNA 量を real-time RT PCRにより比較検討した。ヒトヘパトサイトにおける発現量を1とした相対値で表した結果を Table 5に示す。なお、siRNA-HepG2 cellsは各遺伝子の siRNAを72時間処置時の HepG2細胞における相対的 mRNA 量を示す。対照群である HepG2細胞には scramble siRNAを処置した。結果として、Nrf2のみ HepG2細胞でヒトヘパト

サイトよりも高く発現しており、1.6倍であった。しかしその他の scramble siRNA 処置した HepG2 細胞における mRNA 発現量は、ヒトヘパトサイトに対し GCSH で 0.3、TRX2 で 0.5、SOD2 で 0.06、GSTM1 で 0.06、HO-1 で 0.13、GPX1 で 0.2、CAT で 0.18、EPHX1 で 0.24、EPHX2 で 0.07 となり、多くの因子が低値を示した。特に GCSH、TRX2 以外の因子は、HepG2 細胞においてヒトヘパトサイトの約 30%以下の mRNA 発現量であった。一方、各解毒因子に対する siRNA を 72 時間処置した場合の mRNA 発現量は、scramble siRNA を処置した HepG2 細胞に対し GCSH で 29%、Nrf2 で 19%、TRX2 で 30%、SOD2 で 30%、GSTM1 で 50%、HO-1 で 31%、GPX1 で 25%、CAT で 31%、EPHX1 で 13%、

EPHX2 で 29%までの減少を示した。なお、GSTM1 については cDNA を PCR により特異的なプライマーで増幅し、電気泳動後のバンド強度から算出した値である。以上より、今回の HepG2 細胞を用いた試験系では、多くの解毒因子において常在的な発現量がヒトヘパトサイトと比較して低いということ、また siRNA 処置によりそれら因子をノックダウンした際は、ヒトヘパトサイトの数%程度にまで減少していることが示された。使用したヒトヘパトサイトは一種類のロットであるため、いくつかのロットのヘパトサイト cDNA を pooled としたものを用いた場合には若干異なる値が得られる可能性はあるが、HepG2 細胞で細胞障害性を検討する上では十分に考慮すべき結果と考えられる。

**Table 5. Relative mRNA expression of human GCSH, Nrf2, TRX2, SOD2, GSTM1, HO-1, GPX1, CAT, EPHX1, and EPHX2 in human hepatocyte, HepG2, and siRNA-transfected HepG2 cells.**

	Human hepatocyte	HepG2 cells	siRNA-HepG2 cells
Human GCSH	1 ± 0.03	0.3 ± 0.03	0.09 ± 0
Human Nrf2	1 ± 0.03	1.6 ± 0.35	0.24 ± 0.13
Human TRX2	1 ± 0.09	0.5 ± 0.08	0.15 ± 0.04
Human SOD2	1 ± 0.3	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0
Human GSTM1	1 ± 0.12	0.06 ± 0	0.03 ± 0
Human HO-1	1 ± 0.04	0.13 ± 0	0.04 ± 0
Human GPX1	1 ± 0.15	0.2 ± 0.07	0.06 ± 0.01
Human CAT	1 ± 0.12	0.18 ± 0.05	0.02 ± 0
Human EPHX1	1 ± 0.14	0.24 ± 0.02	0.03 ± 0
Human EPHX2	1 ± 0.09	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0

Data are expressed as mean ± SD (n = 3).