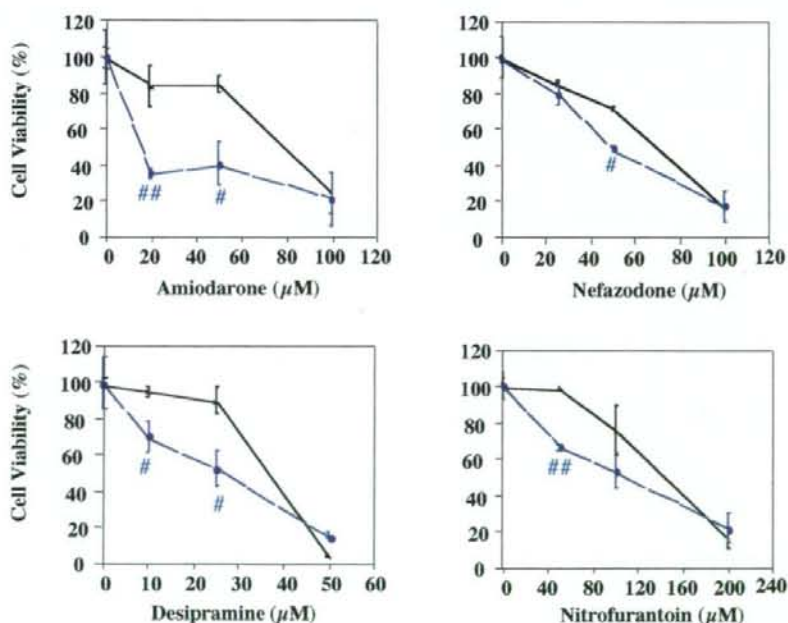


### III-3-2 薬物による細胞障害性の検討

Idiosyncratic な肝障害の報告がある 28 種の薬物および 1 種の化合物において、CYP3A4 による細胞障害性の増強との関連を検討するため、AdGFP、AdCYP3A4 の 2 群において MTT アッセイを行った。結果として、アミオダロン、デシプラミン、フェルパメート、イソニアジド、ラベタロール、レフルノミド、ネファゾドン、ニトロフラントイン、タクリン、テルピナフィン、トルカポンの 11 種類の薬物においては AdGFP 群に対し AdCYP3A4 群において有意な細胞生

存率の低下が認められた。その差は、アミオダロンにおいて 72.4% (25  $\mu$ M)、デシプラミンにおいて 41% (25  $\mu$ M)、フェルパメートにおいて 11.8% (500  $\mu$ M)、イソニアジドにおいて 30% (100  $\mu$ M)、ラベタロールにおいて 16.2% (50  $\mu$ M)、レフルノミドにおいて 36.5% (100  $\mu$ M)、ネファゾドンにおいて 22.4% (50  $\mu$ M)、ニトロフラントインにおいて 30.7% (50  $\mu$ M)、タクリンにおいて 49.6% (100  $\mu$ M)、テルピナフィンにおいて 36.7% (25  $\mu$ M)、トルカボンにおいて 28.8% (25  $\mu$ M) であった。これら薬物の結果を代表例として Fig. 8 に示す。



Continue

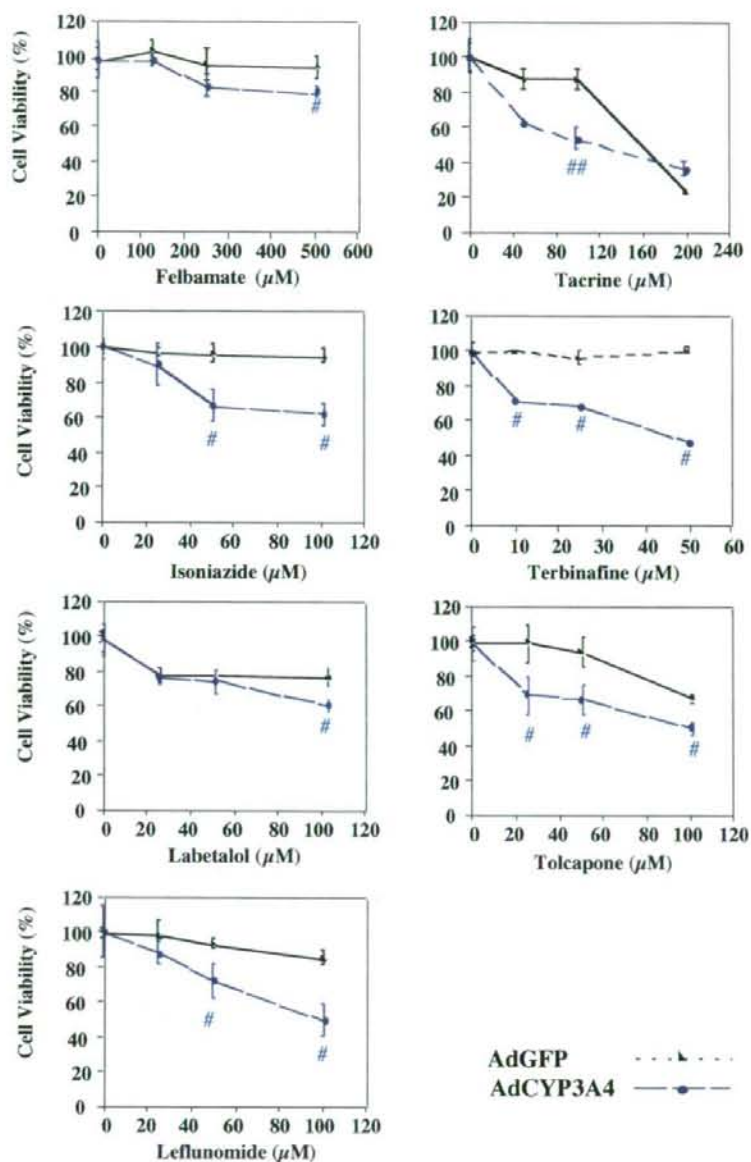


Fig. 8. Effect of CYP3A4 on cell viability measured by MTT assay in drug-treated HepG2 cells. HepG2 cells were infected with AdCYP3A4 and AdGFP for 2 days, and treated with amiodarone, desipramine, felbamate, isoniazide, labetalol, leflunomide, nefazodone, nitrofurantoin, tacrine, terbinafine, and tolcapone for 24 hrs. (●) AdCYP3A4; (▲) AdGFP. AdCYP3A4 and AdGFP were infected at MOI 10. Each point represents mean  $\pm$  SD (n = 3). #P < 0.05, ##P < 0.001 compared with AdGFP groups.

Table 6 には検討した全ての薬物および化合物において、表中に記した特定の濃度 (point of concn.) における AdGFP 群と AdCYP3A4 群の細胞生存率 (%) を示す。また、2 群において有意な差が認められた場合にはシャープを記した。CYP3A4 による細胞障害性の増強が認められた薬物は赤字で、認められなかった薬物は黒字で示す。結果として、アロプリノール、ダントロレンナトリウム、エリスロマイシン、スリンダク、ザフィレルカストにおいては、検討濃度範囲において 2 群における細胞生存率に有意な差は認められなかった。一方、赤字で示したアミオダロン、デシプラミン、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、ネファゾドン、ニトロフラントイン、タクリン、テルピナフィン、トルカポンにおいては、Fig. 8 で示した通り AdCYP3A4 群において有意な細胞生存率の低下が認められた。また、トログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピンは

AdCYP3A4 群において細胞障害性の増強は認められていないが、Fig. 7 より AdCYP3A4/siGCSH において細胞障害性が増強されたことを示している。トログリタゾンおよびフルタミドのネガティブコントロールであるロジグリタゾン、ニルタミドにおいても、AdCYP3A4 群で細胞障害性は認められていないが、今回新たに検討したアセトミノフェンのネガティブコントロールである 3HAA、クロザピンのネガティブコントロールであるアモキシサピンおよびシクリジン、テルピナフィンのネガティブコントロールであるブテナフィンにおいても、AdCYP3A4 群で細胞障害性の増強は認められなかった。また、デシプラミンと同じく三環系抗鬱薬であるアミトリプチリン、マプロチリンにおいても、AdCYP3A4 群で細胞障害性の増強は認められなかった。また、ジクロフェナクは Fig. 7 でも示した通り CYP3A4 により未変化体の細胞障害性が抑制されていた。

Table 6. Cytotoxic effect of CYP3A4 in AdCYP3A4-HepG2 cells.

	AdGFP Cell viability (%)	AdCYP3A4 Cell viability (%)	Point of concn. ( $\mu$ M)	Concn. ( $\mu$ M)
Acetaminophen	86.2 $\pm$ 3.4	74.1 $\pm$ 8.5	20 <sup>a</sup>	0, 2.5, 10, 20 <sup>a</sup>
Alloprinolol	72.7 $\pm$ 3.4	64.3 $\pm$ 9.8	100	0, 25, 50, 100
Amitriptyline	91.7 $\pm$ 11.7	19.3 $\pm$ 4.9	25	## 0, 25, 50, 100
Amoxapine	75.5 $\pm$ 1.0	79.2 $\pm$ 4.2	25	0, 10, 25, 50
Butenafine	26.6 $\pm$ 1.9	19.6 $\pm$ 2.2	25	0, 10, 25, 50
Clozapine	97.6 $\pm$ 1.9	89.7 $\pm$ 2.1	50	0, 10, 25, 50
Cyclidine	97.9 $\pm$ 4.2	95.5 $\pm$ 8.1	25	0, 10, 25, 50
Dantrolene sodium	101.0 $\pm$ 1.8	94.9 $\pm$ 8.6	25	0, 10, 25, 50
Dantrolene sodium	102.1 $\pm$ 3.5	90.7 $\pm$ 9.5	100	0, 25, 50, 100
Desipramine	90.6 $\pm$ 7.2	51.1 $\pm$ 6.7	25	# 0, 10, 25, 50
Diclofenac	49.2 $\pm$ 1.3	82.2 $\pm$ 3.5	800	## 0, 200, 400, 800
Erythromycin	91.2 $\pm$ 7.6	91.7 $\pm$ 2.6	100	0, 25, 50, 100
Felbamate	96.5 $\pm$ 6.3	84.7 $\pm$ 6.2	500	# 0, 125, 250, 500
Flutamide	96.1 $\pm$ 2.8	96.2 $\pm$ 8.4	50	0, 10, 25, 50
3HAA	99.1 $\pm$ 3.4	101.9 $\pm$ 6.1	20 <sup>a</sup>	0, 2.5, 10, 20 <sup>a</sup>
Isoniazid	95.8 $\pm$ 3.2	65.8 $\pm$ 5.6	100	# 0, 25, 50, 100
Labetalol	79.3 $\pm$ 5.3	63.1 $\pm$ 2.8	50	# 0, 25, 50, 100
Leflunomide	85.6 $\pm$ 4.2	49.1 $\pm$ 9.1	100	# 0, 25, 50, 100
Maprotiline	55.8 $\pm$ 4.4	42.3 $\pm$ 4.2	25	0, 10, 25, 50
Nefazodone	71.6 $\pm$ 1.2	49.2 $\pm$ 1.7	50	# 0, 25, 50, 100
Nitlutamide	97.3 $\pm$ 3.6	91.8 $\pm$ 4.3	50	0, 10, 25, 50
Nitrofurantoin	98.9 $\pm$ 12.3	68.7 $\pm$ 1.5	50	## 0, 50, 100, 200
Rosiglitazone	96.4 $\pm$ 10.9	89.8 $\pm$ 2.1	50	0, 25, 50, 100
Slindac	93.5 $\pm$ 3.2	86.8 $\pm$ 8.6	100	0, 25, 50, 100
Tacrine	93.2 $\pm$ 2.7	43.6 $\pm$ 2.3	200	## 0, 50, 100, 200
Terbinafine	98.9 $\pm$ 4.3	62.2 $\pm$ 2.8	25	## 0, 10, 25, 50
Tolcapone	99.3 $\pm$ 4.7	70.5 $\pm$ 11.0	25	# 0, 25, 50, 100
Troglitazone	39.1 $\pm$ 3.2	67.8 $\pm$ 1.6	50	0, 25, 50, 100
Zafirlukast	42.8 $\pm$ 2.4	39.5 $\pm$ 2.5	50	0, 25, 50, 100

Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

Significantly different from AdGFP group (\*p &lt; 0.05, \*\*p &lt; 0.001).

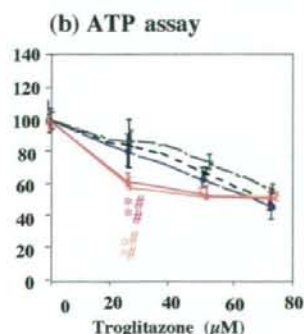
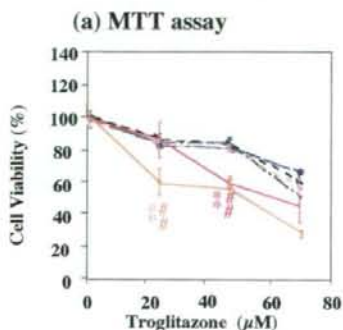
a : mM

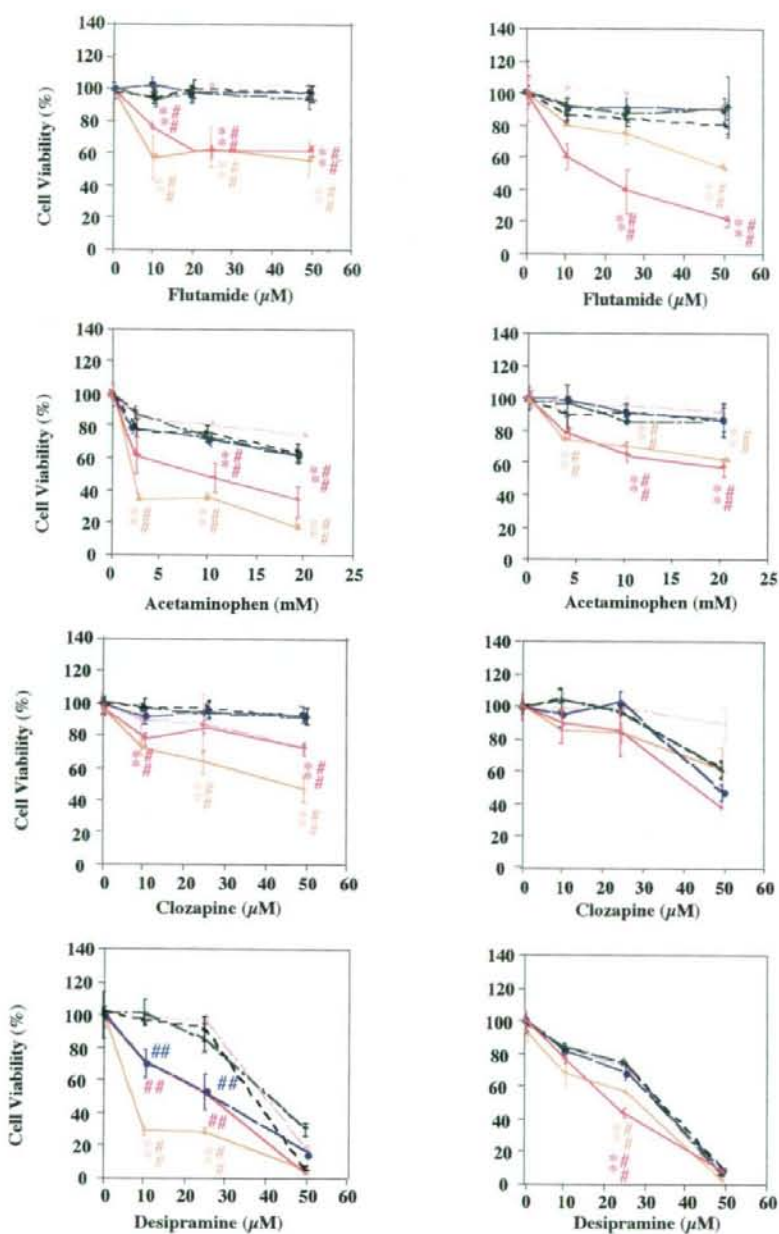
続いて Table 6 の中から、前章で使用したトログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピンの他に、デシプラミン、テルビナフィンの6薬物に注目し、CYP3A4による細胞障害性の増強と種々の解毒因子ノックダウンとの関連を検討した。最初に、上記の薬物において siGCSH または siNrf2 の siRNA を導入し、細胞障害性を検討した。Fig. 9

にはトログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピン、デシプラミン、テルビナフィンにおいて AdCYP3A4 群、AdCYP3A4/siGCSH 群、および AdCYP3A4/siNrf2 群における細胞障害性を MTT アッセイと ATP アッセイで検討した結果を示す。結果として、トログリタゾンは MTT アッセイでは AdCYP3A4/siGCSH 群において 50  $\mu$ M、

AdCYP3A4/siNrf2 群では 25  $\mu\text{M}$  において細胞障害性の増強が認められた。ATP アッセイでも両群共に 25  $\mu\text{M}$  で細胞障害性の増強が認められた。フルタミドは MTT アッセイでは AdCYP3A4/siGCSH 群と AdCYP3A4/siNrf2 群で共に 10、25、50  $\mu\text{M}$  において細胞障害性の増強が認められた。ATP アッセイにおいても AdCYP3A4/siGCSH 群は 25、50  $\mu\text{M}$ 、AdCYP3A4/siNrf2 群は 50  $\mu\text{M}$  で細胞障害性の増強が認められた。アセトアミノフェンは MTT および ATP アッセイのどちらも AdCYP3A4/siGCSH 群では 10、20 mM、AdCYP3A4/siNrf2 群では 2.5、10、20 mM において細胞障害性の増強が認められた。クロザピンは MTT アッセイでは AdCYP3A4/siGCSH 群において顕著な細胞障害性の増強は認められなかったが、AdCYP3A4/siNrf2 群においては 25、50  $\mu\text{M}$  で細胞障害性の増強が認められた。しかし、ATP アッセイではいずれの群においても細胞障害性の増強は認められなかった。デシプラミンは MTT アッセイでは AdCYP3A4 群において細

胞障害性の増強が認められたが (25、50  $\mu\text{M}$ )、AdCYP3A4/siGCSH 群において CYP3A4 の影響が増強されることはなかった。AdCYP3A4/siNrf2 群では 25、50  $\mu\text{M}$  において AdCYP3A4 群の細胞障害性がさらに増強された。しかし ATP アッセイでは AdCYP3A4 群に細胞障害性の増強が認められず、AdCYP3A4/siGCSH 群および AdCYP3A4/siNrf2 群において 25  $\mu\text{M}$  で細胞障害性の増強が認められたが、MTT アッセイ程に顕著な細胞生存率の差ではなかった。テルビナフィン は MTT アッセイで AdCYP3A4 群において細胞障害性の増強が認められ (10、25、50  $\mu\text{M}$ )、AdCYP3A4/siGCSH 群および AdCYP3A4/siNrf2 群の両群で CYP3A4 による細胞障害性が増強された。ATP アッセイでも 50  $\mu\text{M}$  において CYP3A4 による細胞障害性が認められ、AdCYP3A4/siGCSH 群および AdCYP3A4/siNrf2 群で増強されていたが、MTT アッセイ程に顕著な細胞生存率の差ではなかった。





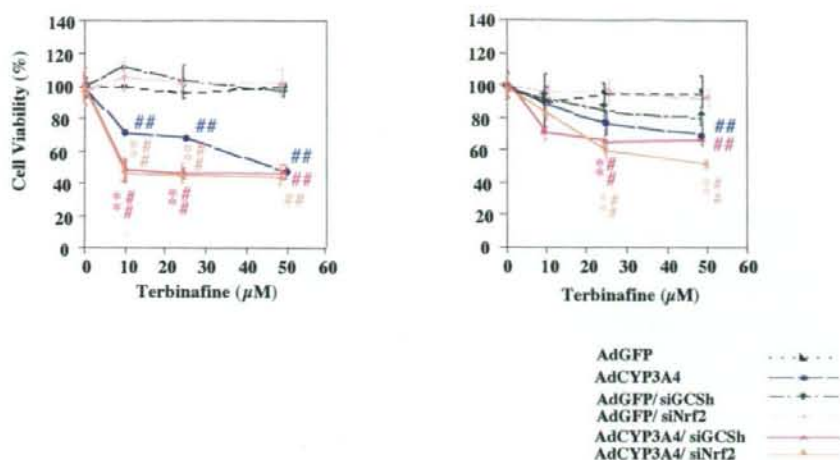


Fig. 9. Effects of various siRNA treatment on cell viability measured by MTT assay (a) and ATP assay (b) in drug-treated HepG2 cells. HepG2 cells were infected with AdCYP3A4 or AdGFP for 2 days, and treated with troglitazone, flutamide, acetaminophen, clozapine, desipramine, and terbinafine for 24 hrs. HepG2 cells were transfected with siGCSH before adenovirus infection. (▲) AdGFP; (●) AdCYP3A4; (◆) AdGFP and siGCSH; (◇) AdGFP and siNrf2; (▲) AdCYP3A4 and siGCSH; (▲) AdCYP3A4 and siNrf2. AdCYP3A4 and AdGFP were infected at MOI 10. Each point represents mean  $\pm$  SD (n = 3).  $^{###}P < 0.01$  compared with AdGFP groups,  $^{**}P < 0.01$  compared with AdCYP3A4 groups.

Table 7には、Fig. 9 で示した 6 薬物において種々の siRNA を導入して MTT アッセイで細胞生存率への影響を検討した結果をまとめた。表中に記した特定の濃度 (point of concn.) において、各 AdCYP3A4/siRNA 群における細胞生存率を、AdGFP 群および AdCYP3A4 群の細胞生存率と比較した。各薬物の項目において、上段には、AdGFP 群との比較で有意な差が生じた場合にシャープを、また下段には AdCYP3A4 群との比較で有意な差が生じた場合にアスタリスク

を記した。デシプラミンとテルビナフィン処置では、Table 6 で示されている様に AdCYP3A4 群で細胞障害性の増強が認められているため、AdCYP3A4/siRNA 群と AdGFP 群を比較した場合は、全ての群で有意な差が示されている。従って、デシプラミンとテルビナフィンの項目の上段にはいずれの siRNA を処置した群においてもシャープを記した。一方、9 種類の AdCYP3A4/siRNA 群と AdCYP3A4 群を比較した場合、デシプラミンでは AdCYP3A4/siNrf2 群、

AdCYP3A4/siTRX2 群、  
AdCYP3A4/siGSTM1 群、  
AdCYP3A4/siHO-1 群においてより細胞  
障害性の増強が認められ、特に  
AdCYP3A4/siNrf2 群、AdCYP3A4/siTRX2  
群において顕著であった。従ってデシブ  
ラミンの項目下段において、これら 4 群  
の列にはアスタリスクを記した。またテ  
ルピナフィンでは AdCYP3A4 群に対し  
AdCYP3A4/siGCSH 群、AdCYP3A4/siNrf2  
群、AdCYP3A4/siGSTM1 群でより細胞  
障害性の増強が認められ、特に  
AdCYP3A4/siGCSH 群において顕著であ  
った。従ってテルピナフィンの項目下段  
において、これら 3 群の列にはアスタリ  
スクを記した。一方、トログリタゾン、  
フルタミド、アセトアミノフェン、クロ  
ザピン処置において、Table 6 では  
AdCYP3A4 単独処置による細胞障害性  
の増強が示されていない。従って、9 種  
類の AdCYP3A4/ siRNA 群は AdGFP 群  
と比較した場合のみ細胞生存率の差が  
認められるということから、AdCYP3A4  
群との比較である下段にアスタリスク  
は記されていない。また、これらの薬物  
においてトログリタゾン、フルタミドで  
は AdCYP3A4/siGCSH 群および  
AdCYP3A4/siNrf2 群においてのみ細胞

障害性の増強が認められたことから、こ  
れら 2 群の列の上段にシャープを記し  
た。同様に、アセトアミノフェンでは  
AdCYP3A4/siGCSH 群、AdCYP3A4/siNrf2  
群、AdCYP3A4/siTRX2 群においてのみ  
細胞障害性の増強が認められたことか  
ら、これら 3 群の列の上段にシャープを  
記した。クロザピンは AdCYP3A4/siNrf2  
群、AdCYP3A4/siTRX2 群においてのみ  
細胞障害性の増強が認められ、これら 2  
群の列の上段にシャープを記した。

Table 7 で得られた結果は Table 8 にま  
とめた。9 種類の AdCYP3A4/ siRNA 群  
から、広範に影響が見えていた  
AdCYP3A4/siGCSH、AdCYP3A4/siNrf2  
の 2 群、および AdCYP3A4 の 3 群に着  
目し、細胞障害性の増強が認められた薬  
物は responsible、認められなかった薬物  
は not responsible として記した。また、  
Table 6 よりネガティブコントロールと  
して用いたロジグリタゾン、ニルタミド、  
3HAA、アモキサピン、シクリジン、ブ  
テナフィン、アミトリプチリン、マプロ  
チリンは、AdCYP3A4、  
AdCYP3A4/siGCSH および  
AdCYP3A4/siNrf2 において細胞障害性  
の増強が認められなかったことから、  
not responsible に分類した。



**Table 7. Cytotoxic effect of CYP3A4 and knockdown of cellular factors in AdCYP3A4/siRNAs-HepG2 cells.**

Comparison group	AdCYP3A4 /siGCSH	AdCYP3A4 /siNF12	AdCYP3A4 /siTRX2	AdCYP3A4 /siSOD2	AdCYP3A4 /siGSTMI	Point of concn (µM)	Concn (µM)
<b>Desipramine</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	##	##	##	##	##	
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	*	*	-	*	25 0.10, 25, 50
<b>Terbutaline</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	##	##	#	##	##	
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	*	*	-	-	*	25 0.10, 25, 50
<b>Troglitazone</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	#	##	-	-	-	
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	25, 50 0.25, 50, 100
<b>Flutamide</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	#	#	#	#	-	
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	50 0.10, 25, 50
<b>Acetaminophen</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	##	##	##	#	-	
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	20 <sup>a</sup> 0.2, 5, 10, 20 <sup>a</sup>
<b>Clozapine</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	-	#	##	-	-	
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	25 0.10, 25, 50

Continued.

Comparison group	AdCYP3A4 /SHO-1	AdCYP3A4 /SiGFX1	AdCYP3A4 /SiEPHX1	AdCYP3A4 /SiEPHX2	AdCYP3A4 /SiCAT	Point of concn (µM)	Concn. (µM)
<b>Desipramine</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	##	##	##	##	25	0, 10, 25, 50
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	*	-	-	-	-	-
<b>Terbinafine</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	#	##	##	##	25	0, 10, 25, 50
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	-
<b>Trogliatzone</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	-	-	-	-	50	0, 25, 50, 100
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	-
<b>Flutamide</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	-	-	-	-	50	0, 10, 25, 50
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	-
<b>Acetaminophen</b>	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	-	-	-	-	20 <sup>a</sup>	0, 2.5, 10, 20 <sup>a</sup>
	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	-
	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	-	-	-	-	25	0, 10, 25, 50
<b>Clozapine</b>	AdCYP3A4 (effect of siRNA)	-	-	-	-	-	-
	AdGFP (effect of CYP3A4 and siRNA)	-	-	-	-	25	0, 10, 25, 50

a: mM

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

Significantly different from AdGFP group (\* $p < 0.05$ , # $p < 0.001$ ), and AdCYP3A4 group (\* $p < 0.05$ ).

Table 8. Classification of cytotoxic effect of CYP3A4 and knockdown of GCSH or Nrf2.

		Responsible		Not responsible
		AdCYP3A4		CYP3A4 and siRNAs
		(+)	(-)	
siGCSH or siNrf2	(-)	Desipramine Terbinafine	-	Rosiglitazone Nilutamide 3HAA Amoxapine Cyclidine Amitriptyline Maprotiline Butenafine
	(+)	Troglitazone Flutamide Acetaminophen Clozapine	Desipramine Terbinafine -	

#### III-D. 考察

II 章で構築したヒト肝癌由来細胞を用いた細胞障害試験系において、idiosyncratic な肝障害の報告がなされている薬物、およびそれら薬物と類似構造を有するが重篤な肝障害性を惹起するという報告はなされていない薬物を対象とし、CYP3A4 発現細胞における細胞障害性を検討した (Table 6)。その結果、本試験系においてアミオダロン、デシプラミン、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、ネファゾドン、ニトロフラントイン、タクリン、テルビナフィン、トルカボンの処置により AdCYP3A 群で細胞障害性の増強が認められた (Fig. 8)。これらの薬物は、頻度や症状は様々であるがいずれも idiosyncratic 肝障害を惹起するとの報告がなされている (Walgren et al., 2005)。

以下に各薬物の代謝における CYP3A4 の関与について、現在報告されている知見をまとめた。

アミオダロンはカリウムチャンネル遮断薬であり、主に CYP3A4 によって *N*-脱アルキル化され、デスエチルアミオダロンに代謝されることが知られている。しかし、デスエチルアミオダロンの生成には CYP1A1、CYP1A2、CYP2C8、CYP2C19、CYP2D6 も関与すると言われており (Ohyama et al., 2000)、肝障害発生に関わる代謝物は未同定であり、CYP3A4 との関与についても不明である。

デシプラミンは三環系抗鬱薬であり、三環系抗鬱薬は全体として idiosyncratic な肝障害を惹起するとの報告がある。しかし今回の検討において、CYP3A4 による細胞障害性の増強はアミトリプチリ

ン、デシプラミン、マプロチリンの3薬物の中でもデシプラミンにおいてのみ認められた。通常、デシプラミンはCYP2D6により芳香環の水酸化を受け最終的にエポキシド体へと代謝されるが(Isobe et al., 2005)、PolasekとMinersら(2008)は、三環系抗鬱薬による肝障害発生機構として、次の経路を提唱している。それは、側鎖の窒素がジメチル体であれば、CYPによるN-脱メチル化を受けてモノメチル体となり、さらにモノメチル体がN-脱メチル化を受け、最終的にはニトロソアルカン反応種が生成されるという経路である。以下にPolasek、

Minersらが提唱した三環系抗鬱薬代謝経路を示す。アミトリプチリンは tertiary amine 型に、デシプラミンおよびマプロチリンは secondary amine 型に分類され、いずれも三環構造および側鎖の構造は異なるが、これら3種の薬物の中でもデシプラミンにおいてのみCYP3A4による細胞障害性の増強が認められことから、secondary amine 体へのCYP3A4によるN-脱メチル化は、デシプラミンの構造特異的に進行したのかもしれない。しかし、デシプラミンのCYP3A4による代謝物の細胞障害性を評価した報告はなされていない。

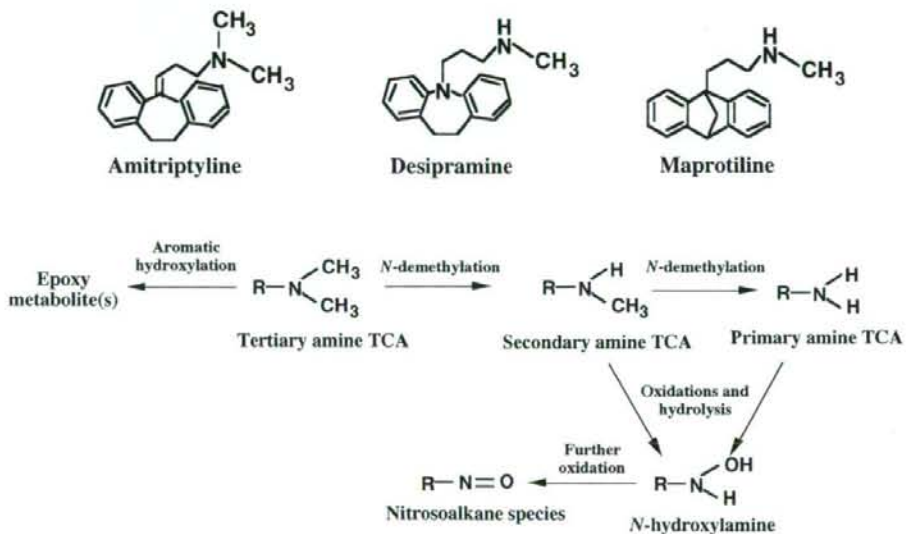


Fig. 10. Metabolic pathway of desipramine.

フェルバメートは抗てんかん薬であり、ヒトにおいて CYP3A4 および CYP2E1 による水酸化体、エステラーゼによりアルコール性カルバメートへと代謝される経路が知られている。アルコール性カルバメート体はさらにアルデヒドデヒドロゲナーゼによってカルボキシ性カルバメートへと代謝されるが、その過程の中間体であるアルデヒドカルバメートは、 $\beta$ 脱離によって 2-フェニルプロペナルを生じる。2-フェニルプロペナルは、アルデヒドデヒドロゲナーゼおよび GST 阻害作用を有し、また細胞内蛋白質の共有結合性も示されている (Thompson et al., 1996; Kapetanovic et al., 2002)。今回の結果においては CYP3A4 の代謝物である水酸化体の細胞障害性が示されたと考えられるが、フェルバメートの CYP3A4 による代謝物と肝障害性との関与は検討されていない。

イソニアジドは結核治療薬であり、大部分が *N*-アセチルトランスフェラーゼによってアセチル化されアセチルイソニアジドとなった後、アミダーゼによってイソニコチン酸とアセチルヒドラジンへと代謝される。アセチルヒドラジンはさらに CYP1A1、CYP2A6、CYP2C19、CYP3A4 によってアセチルジアゼンへと代謝され、上記 CYP に対し mechanism based inhibitor として作用することが報告されている。中でも、CYP3A4 によるミダゾラム 1 位水酸化酵素活性に対す

る  $K_i$  値は、NADPH 非存在下に 73  $\mu\text{M}$  であるのが、NADPH 存在下には 36  $\mu\text{M}$  となること、また CYP2C19 による *S*-メフェニトイン 4 位水酸化酵素活性に対しては NADPH 非存在下に  $K_i$  値 36  $\mu\text{M}$  であるのが、NADPH 存在下には 10  $\mu\text{M}$  となる (Girgis et al., 1976; Wen et al., 2002)。一方、イソニアジドはアミダーゼによりヒドラジンへと代謝される経路も知られている。ウサギを用いた実験では、イソニアジド投与後のヒドラジン血中濃度が、脂肪肝の形成や血中トリグリセリド量と相関するとの報告があり、ヒドラジンがイソニアジドによる肝障害性の主要因であるとも言われている (Sarich et al., 1999)。アセチルイソニアジドは一般に肝障害性が低い解毒代謝物であると言われていることから、今回の検討においてはアミダーゼおよび CYP3A4 の代謝物であるアセチルヒドラジン、アセチルジアゼンおよびヒドラジンが細胞障害性の増強に寄与したと考えられるが、CYP3A4 とそれら代謝物による肝障害性との関与は報告されていない。また、Fig. 8 においてイソニアジドの細胞障害性が増強されている 50  $\mu\text{M}$  以降では、CYP3A4 による代謝的活性化と同時に代謝物による酵素阻害が生じている可能性も考えられる。

ラベタロールは高血圧治療薬であるが、代謝に関わる酵素および代謝物の同定に関する検討が十分になされていない。ラベタロールを経口投与されたヒトに

おける尿中の主代謝物から、グルクロン酸および硫酸抱合体、2種類の水酸化体が検出されたとの報告はなされているものの、CYP3A4による代謝の関与および肝障害性の有無については不明である (Gal et al., 1988, Yeleswaram et al., 1993)。

レフルノミドはリウマチ治療薬であり、CYP1A2、CYP2C19 および CYP3A4 が薬理活性を示す A771726 への変換に関与すること、中でも CYP1A2 の寄与が最も大きいとの報告がある (Kalgutkar et al., 2003)。また、微量の trifluoromethylaniline (TFMA) がヒト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 CYP3A4、レフルノミドによる肝障害性との関係については知られていない。

ネファゾドンは抗鬱薬であり、CYP3A4 によって水酸化体へと代謝される。水酸化ネファゾドンはさらに、CYP3A4 によってキノニンイミン体へと代謝されるが、キノニンイミン体は CYP3A4 によるミダゾラム 1 位水酸化酵素活性を濃度依存的に阻害し、mechanism based inhibitor として作用すること、また GSH 抱合を受けることが知られている (Kalgutkar et al., 2005)。今回の結果からは、CYP3A4 の代謝物であるキノニンイミン体の細胞障害性が示されたと考えられるが、キノニンイミン体の肝障害性を評価した報告はない。

ニトロフラントインは尿路感染症治療薬であるが、肝での代謝に関わる酵素および代謝物の同定に関する検討がなされておらず、CYP3A4 による代謝の関与および肝障害発生機構については不明である。ラット盲腸および結腸において、2種類の還元体代謝物が検出されたとの報告はなされている (Aufrère et al., 1978)。

タクリンはコリンエステラーゼ阻害薬であり、CYP1A2 により水酸化体へと代謝され、水酸化されたタクリンはその後キノンメチド体へと代謝される (Balson et al., 1995)。キノンメチド体はタンパク結合性を有することから、タクリンによる肝障害性の要因の一つであると考えられている。一方で 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)。今回、CYP3A4 によるタクリンの細胞障害性の増強が示されたが、キノンメチド体による肝障害性と CYP3A4 との関与について検討した報告はない。

テルビナフィン抗真菌薬であり N-脱メチル化体、脱アミノ化体、芳香環や側差が水酸化体に交換された代謝物が知られているが、テルビナフィンの代謝には CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 といった種々の CYP 分子種が関与すると言われている。N-脱メチル化は主に CYP2C9、脱アミノ

化は主に CYP3A4、芳香環や側差の水酸化は主に CYP1A2 や CYP2C によって担われ、中でも *N*-脱メチル化の寄与が最も高いと言われている (Vickers et al., 1999)。CYP3A4 による代謝物の 7, 7-dimethylhept-2-ene-4-ynal (TBF-A) は、GSH と付加体を形成すること、また胆管の膜タンパク質に結合し胆汁うっ滞を引き起こすことから、テルビナフィンによる肝障害性の要因の一つであると考えられている (Iverson and Utrecht, 2001)。今回、テルビナフィンにおいて認められた細胞障害性は、CYP3A4 によって生成された TBF-A によるものと考えられる。

トルカポンはカテコール *O*-メチルトランスフェラーゼ阻害薬であり、CYP3A4 による代謝の関与については不明である。トルカポンの細胞障害性は、還元により生じたアミン体、および *N*-アセチルトランスフェラーゼにより代謝されたアセチル化体が、CYP1A2 および CYP2E1 の酸化を受け生成する *O*-キノンまたはキノンイミン体に起因すると言われている。また、その活性代謝物は GSH 抱合を受けることも知られている (Smith et al., 2003)。

以上の 11 種の薬物と CYP3A4 による代謝および肝障害性との関係についてまとめる。第一に、11 種類の薬物の中でこれまでに CYP3A4 による代謝物が同定され、かつその代謝物が肝障害性を惹起すると示唆されている薬物はテル

ビナフィンとネファゾドンの 2 種である。CYP3A4 による活性代謝物として、テルビナフィンでは TBF-A が、ネファゾドンではキノンメチド体が同定されている。従って本試験系ではそれら代謝物の細胞障害性が検出されたと考えられる。

次に CYP3A4 による代謝物が同定されているが、その代謝物による肝障害性については不明である薬物はアミオダロン、フェルパメート、イソニアジド、レフルノミドの 4 種である。CYP3A4 による代謝物に関しては、アミオダロンでは解毒代謝物、レフルノミドでは薬理活性を持つ活性代謝物と考えられており、各薬物の代謝物が肝障害性を示す一因であるかは不明であるが、新たに CYP3A4 による活性代謝物が肝障害性を惹起するという可能性が示唆された。

最後に、CYP3A4 による代謝物は同定されておらず、他の酵素による代謝経路が知られているもの、あるいは代謝経路について未同定な薬物は、デシプラミン、ラベタロール、ニトロフランチン、タクリン、トルカポンの 5 種である。ラベタロールおよびニトロフランチンは、代謝に関わる酵素に関して不明な点が多く、またタクリンおよびトルカポンは CYP3A4 以外の分子種による代謝物が同定されているが、今回新たに CYP3A4 による活性代謝物が肝障害性を惹起するという可能性が示唆された。一方、デシプラミンは、これまでに CYP3A4 によ

り代謝的活性化を受けるとの報告はされていないが、新たに CYP3A4 によってデシプラミンの N-脱メチル化反応が進行し、細胞障害性の強いニトロソアルカンが生成されるという可能性が示唆された。

本章より全 10 種類の解毒因子に対する siRNA と AdCYP3A4 の同時処置を行うにあたり、HepG2 細胞とヒトヘパトサイトにおける内因性の発現量を比較した。また、10 種類の siRNA を 72 時間処置することにより mRNA レベルで HepG2 細胞における解毒因子をノックダウンした (Table 5)。結果として、HepG2 細胞において Nrf2、GCSH、TRX2 を除く因子全てがヒトヘパトサイトでの mRNA 発現量の 10-20%前後であった。また、全ての解毒因子を siRNA 72 時間処置により mRNA レベルで 70%程度ノックダウンしたところ、Nrf2 と TRX2 を除く全ての因子でヒトヘパトサイトの 10%以下の発現量となった。一方、GCSH mRNA 量も同様にヒトヘパトサイトの 9%程度まで減少したが、このとき細胞内 GSH 含量は Fig. 6c より 43 nmol/mg であり、ヒト肝ホモジネート中濃度の約 10 倍高濃度となった (Shi et al., 1982; Higashi et al., 1985)。そのため GCSH mRNA 量が HepG2 細胞においてヒトヘパトサイトよりも相対的に少ないとしても、GSH 含量の影響を検討する必要があると判断した。HepG2 細胞における GCSH、Nrf2、TRX2 以外の因子

も、十分な酵素活性を有し細胞内で機能していることが重要であると考えられ、各々の酵素活性について論文報告値を検索したところ、ヒトヘパトサイトと比較した HepG2 細胞における各酵素活性値は SOD2 で約 24%、GST で約 11%、EPHX1 で約 5%、EPHX2 で約 57%であった (Marklund, 1984; Glatt et al., 1990; Ozkan and Fiskin, 2004)。HO-1、GPX1、CAT の各酵素活性は、HepG2 細胞とヒトヘパトサイトで比較することはできなかった。

HepG2 細胞での発現量が極端に低い因子の有無による影響を、細胞障害性の変化として検出することは困難であると推察されるが、実際に AdCYP3A4 と siSOD2、siGSTM1、siHO-1、siGPX1、siEPHX1、siEPHX2 の同時処置による細胞障害性の増強はほとんど見られなかった (Table 7)。これらの因子と各薬物の活性代謝物に対する解毒としての寄与を調べるには、酵素を細胞に過剰発現させる等の操作を加えるか、または他のヒト肝癌由来細胞株で検討することも可能であると思われる。

Fig. 9 より、選択した 6 つの薬物全てにおいて siGCSH または siNrf2 の導入により、CYP3A4 により生成された活性代謝物による細胞障害性の増強が認められた。細胞内に比較的高く発現している Nrf2 や GCSH は、siRNA によるノックダウンによる影響がより見えやすいという結果となったが、この際に検討したい



ずれの薬物においても siGCSH または siNrf2 と AdGFP の同時処置が AdGFP 単独処置と比較して細胞障害性が増強するという現象は認められておらず (data not shown)、GCSH や Nrf2 ノックダウンが未変化体の細胞障害性増強には影響していなかった。

デシプラミンおよびテルビナフィン は、CYP3A4 において細胞障害性の増強が認められ、さらに siGCSH、siNrf2 の同時処置において細胞障害性が増強された。それに対しトログリタゾン、フルタミド、アセトアミノフェン、クロザピン は AdCYP3A4 と siGCSH および siNrf2 の同時処置において初めて細胞障害性の増強が認められた。従って、デシプラミンおよびテルビナフィン処置では、GCSH や Nrf2 による解毒の寄与が他の 4 薬物よりもより強く認められているのではなく、CYP3A4 による代謝物の障害性がより強く見出されるという結果となった。なお、siGCSH と AdCYP3A4 の同時処置が HepG2 細胞における CYP3A4 酵素活性の発現、細胞内 GSH 含量の減少に影響しないことは Fig. 6 で示しているが、siNrf2 と AdCYP3A4 の同時処置においても、ウイルス感染 2 日目で CYP3A4 酵素活性が十分に発現していること (テストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性として 781 pmol/min/mg)、Nrf2 mRNA は 71%、Nrf2 タンパク質は 66% 発現量が低下していることを確認済みである (data not shown)。

細胞障害性の検討では、HepG2 細胞に siRNA を 10 nM で 72 時間処置した時点において薬物処置を行っている。この時点で、Nrf2 mRNA は 70%程度減少しているが、その影響が GCSH、TRX2、SOD2、HO-1、GPX1、CAT の mRNA 発現量に影響を与えているかについて検討した。その結果、scramble siRNA を 10 nM で 72 時間処置したサンプルでの発現量を 1 として相対的に比較した場合、GCSH mRNA は 1 倍、TRX2 mRNA は 0.53 倍、SOD2 mRNA は 2.3 倍、HO-1 mRNA は 0.59 倍、GPX1 mRNA は 1 倍、CAT mRNA は 0.12 倍であった (data not shown)。先述した通り、Nrf2 は GCSH、TRX2、SOD、HO-1、GPX1、CAT 等の発現調節に関与することが知られているが (Mukherjee et al., 2008; Rubiolo et al., 2008)、本検討においても他の遺伝子 mRNA 発現に変動が見られた。ただし、Nrf2 周辺遺伝子の発現に対する効果は、種々の Nrf2 活性化剤、Nrf2 ノックダウンレベル、またはノックアウト等の影響によって異なる。従って、今回 Nrf2 減少状態にある HepG2 細胞で細胞障害性が増強されるという背後には、Nrf2 減少状態下で種々の薬物および CYP3A4 による活性代謝物が暴露されることに起因する複雑な遺伝子発現変動があると考えられる。

Idiosyncratic な肝障害は一般に動物実験において再現することが困難であると言われており (FDA, 2007)、種々の遺伝子操作を施した動物モデルが作製されている (Matsuzaki et al., 2006; Lee et al., 2008)。今回、CYP3A4 発現 HepG2 細胞において GCSH および Nrf2 をノックダウンすることで高感度に CYP3A4 による活性代謝物の障害性を検出することができたことから、本試験系は肝障害性が未知の薬物においても CYP3A4 によ

る代謝的活性化の関与が疑われるものを見出すことができると考えられる。しかし先にも述べたが、本試験系はヒトヘパトサイトではなく腫瘍細胞を用いているために細胞内因子の多くが不足しており、また検討する薬物濃度範囲も限られる。従って、広義の薬物誘導性肝障害について複合的に評価する際には、本試験系で得られる結果を効果的に補うための実験動物を用いた代謝および毒性試験を行うことが必要である。

## E. 結論

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(Casseles, 2006)、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、目的に合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。

## 参考文献

- Akai S, Hosomi H, Minami K, Tsunemiya K, Katoh M, Nakajima M, and Yokoi T (2007) Knockdown of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* **282**, 23996-24003.
- Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, and Moldeus P (1985) Mechanism of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* **28**, 306-311.
- Andrade RJ, Lucena MI, Alonso A, García-Cortes M, García-Ruiz E, Benítez R, Fernández MC, Pelaez G, Romero M, Corpas R, Durán JA, Jiménez M, Rodrigo L, Noguera F, Martín-Vivaldi R, Navarro JM, Salmerón J, de la Cuesta FS, and Hidalgo R (2004) HLA class II genotype influences the type of liver injury in drug-induced idiosyncratic liver disease. *Hepatology* **39**, 1603-1612.
- Aufrère MB, Hoener BA, and Vore M (1978) Reductive metabolism of nitrofurantoin in the rat. *Drug Metab. Dispos.* **6**, 403-11.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, and Motterlini R (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* **371**, 887-895.
- Balson R, Gibson PR, Ames D, and Bhathal PS (1995) Tacrine-induced hepatotoxicity: tolerability and management. *CNS Drugs* **4**, 168-181.
- 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.* **7**, 423-427.
- Berson A, Wolf C, Chachaty C, Fisch C, Fau D, Eugene D, Loeper J, Gauthier JC, Beaune P, Pompon D, Maurel P, and Pessayre D (1993) Metabolic activation of the nitroaromatic antiandrogen flutamide by rat and human cytochromes P-450, including forms belonging to the 3A and 1A subfamilies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 366-372.
- Brogden RN and Clissold SP (1989) Flutamide. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in advanced prostatic cancer. *Drugs* **38**, 185-203.
- Casseles A (2006) Institute of medicine's new drug safety report: implications for Canada. *Can. Med. Assoc. J.* **175**, 1515-1516.
- Donato MT, Castell JV, and Gomez-Lechon MJ (1995) Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 553-558.