

Fig. 5. Acute hepatotoxic effects of flutamide in AdGCSH-shRNA infected rats. Flutamide was orally administered 0, 1,000 or 1,500 mg/kg. AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 24 h after administration. Data are mean \pm SD (n = 4 to 5). ^{**}*P* < 0.01 compared with each AdLuc-shRNA infected group.

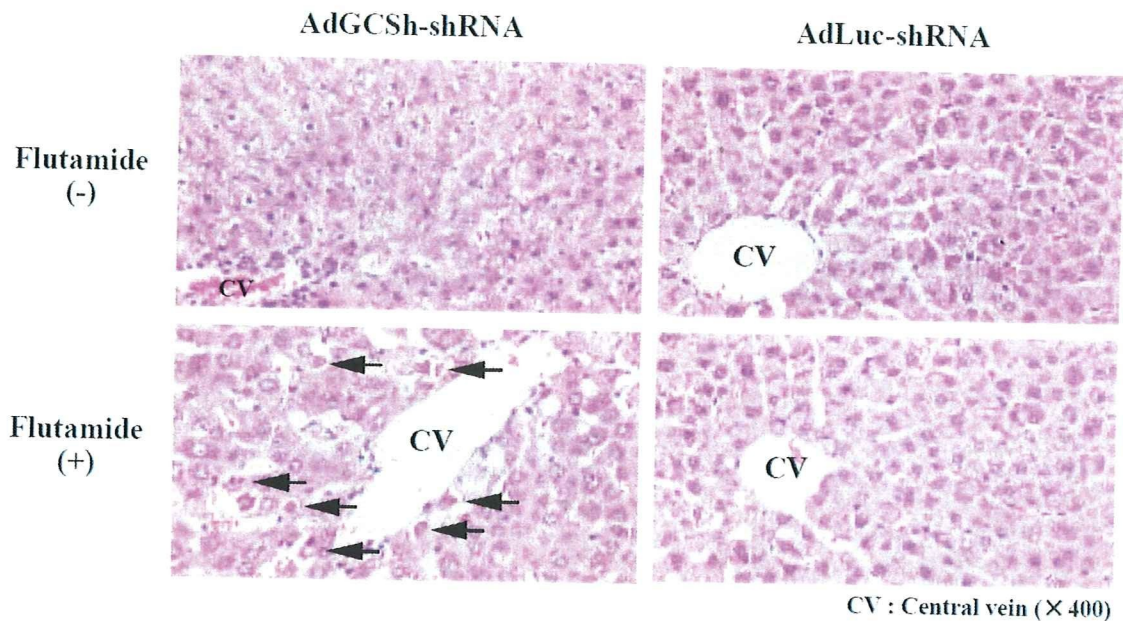


Fig. 6. Histopathological examination of liver 24 h after administration of flutamide in AdGCSH-shRNA infected rats. Arrows indicate area of degenerated hepatocyte in HE stained section caused by flutamide (1,500 mg/kg).

C-6 フルタミドによる亜急性肝障害の検討

AdGCSH-shRNA またはネガティブコントロールである AdLuc-shRNA を投与し、10 日間が経過したラットに、1 日 1 回 1 週間フルタミドを経口で 0、100、および 500 mg/kg 連続投与した。最終投与を行った 24 時間後に血漿を採取し、AST、ALT、および総ビリルビン値を測定した。その結果、AdLuc-shRNA を投与した群においては、非投与群と比べて、100 および 500 mg/kg のフルタミド投与による AST および ALT 値の有意な上昇は認められなかった。しかし、AdGCSH-shRNA を投与した群においては、最終投与から 24 時間後において、

500 mg/kg のフルタミド投与で、有意な ALT 値の上昇 (36 ± 22 U/L) が AdLuc-shRNA 投与群 (10 ± 2 U/L) と比べて認められた。一方 AST 値は、AdGCSH-shRNA 投与群において、500 mg/kg のフルタミド投与でわずかながら上昇が認められた (AdGCSH-shRNA infected group: 51 ± 30 U/L, AdLuc-shRNA infected group: 20 ± 1 U/L)。また、100 mg/kg のフルタミド投与では、有意な AST および ALT 値の上昇 (AST: 28 ± 2 U/L, ALT: 16 ± 1 U/L) が AdLuc-shRNA 投与群 (AST: 22 ± 2 U/L, ALT: 9 ± 1 U/L) と比べて認められた (Figs. 7A and 7B)。

一方、総ビリルビン値は AdLuc-shRNA
および AdGCSh-shRNA 投与群ともにフルタ

ミド投与による有意な上昇は認められな
かった (Fig. 7C)。

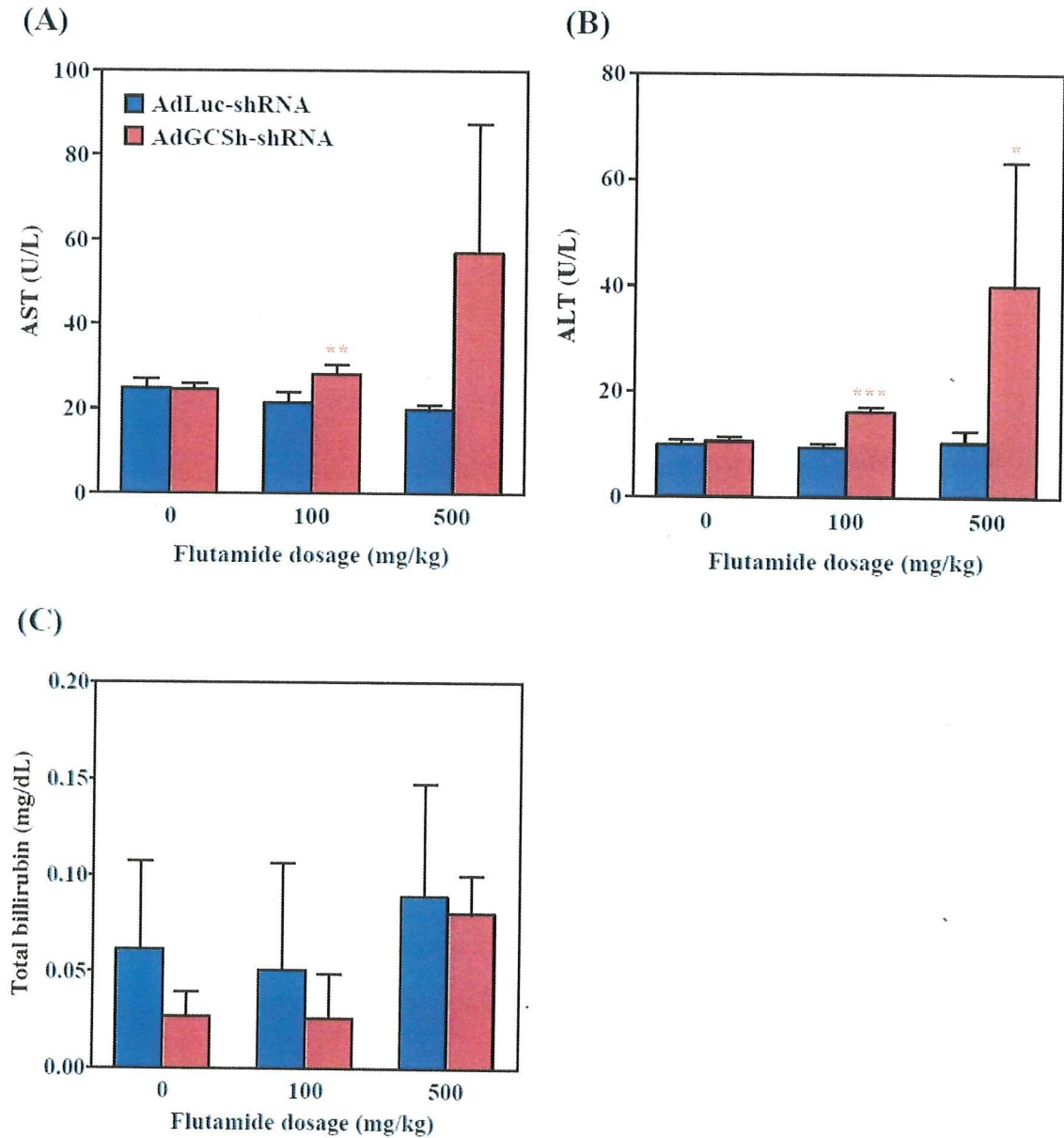


Fig. 7. Subacute hepatotoxic effects of flutamide in AdGCSh-shRNA infected rats. Flutamide was orally administrated 0, 100 or 500 mg/kg once a day for a week. AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 24 h after the last administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with each AdLuc-shRNA infected group.

AdGCSh-shRNA 投与ラットにおけるフルタミド連続投与の肝障害性を検討するた

め、HE 染色による肝組織像の検討を行った (Fig. 8)。結果として、AdGCSh-shRNA 投与ラットにおいてのみ、フルタミド投

与によって矢印で示すように、肝細胞の変性が認められ、さらに肝細胞の脱落もいくつか認められた。

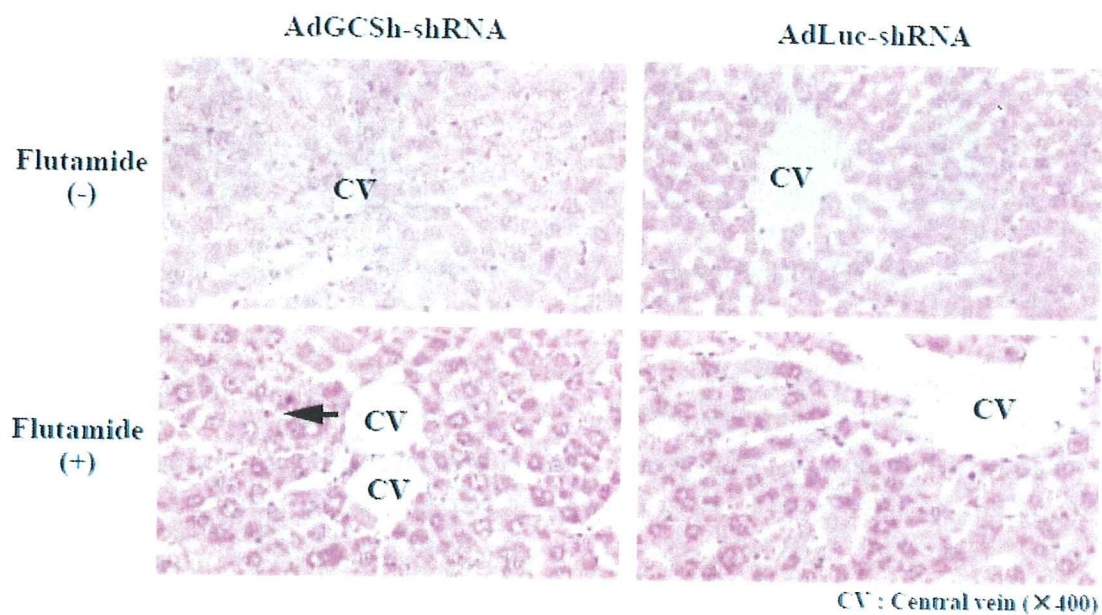


Fig. 8. Histopathological examination of liver 24 h after the last administration of flutamide in AdGCSh-shRNA infected rats. Arrow indicates area of degenerated hepatocyte in HE stained section caused by flutamide (500 mg/kg).

C-7 フルタミド投与ラットにおける肝臓中総 GSH 含量の変動

フルタミドによる肝障害を検討したラットにおいても、GSH 含量が減少していたかを確認するため、急性の肝障害を検討する単回投与では投与 24 時間後、亜急性の肝障害を検討する連続投与では最終投与から 24 時間後に肝臓を採取し、GSH

含量を測定した (Fig. 9)。

その結果、単回および連続投与における検討で、AdGCSh-shRNA を投与した群では、AdLuc-shRNA を投与した群と比べて、有意に肝臓中 GSH 含量が減少していたことを確認した。また、フルタミドを投与することにより GSH 含量の増加が認められた。

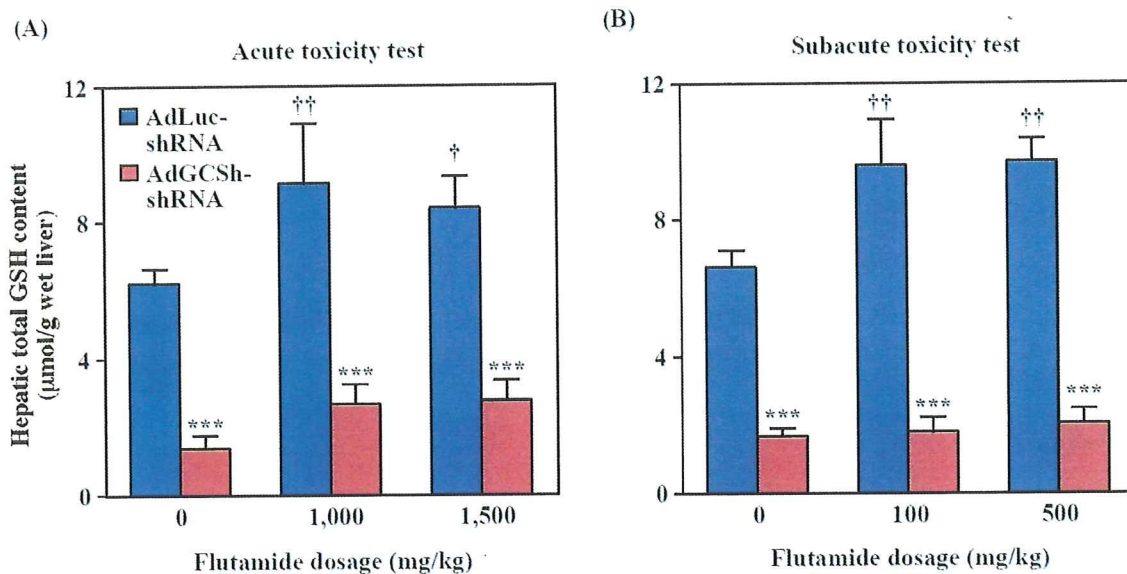


Fig. 9. Effects of AdGCSH-shRNA infection on hepatic total GSH content in flutamide administered rats in acute or subacute toxicity test. Hepatic total GSH content is measured 24 h after administration in acute toxicity test (A) and 24 h after last administration in subacute toxicity test (B). Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). *** P < 0.001 compared with each AdLuc-shRNA infected group. † P < 0.05 and †† P < 0.01 compared with each AdLuc-shRNA infected and no drug administered group

D. 考察

トログリタゾン、ジクロフェナク、およびフルタミドは前臨床試験において肝障害が認められていない。しかし、上市後の調査では頻度は低いものの肝障害が報告されており、トログリタゾンは市場から撤退している。これらの薬物により惹起される肝障害を評価できる動物モデルは報告されていない。肝障害発現の種差の原因として、薬物代謝反応の一つである酸化および抱合などの酵素活性の差異が挙げられる。薬物の代謝的活性化に重要な役割を持つ酸化反応は関与する酵

素が多く、種差も大きいためそのすべての遺伝子変動を把握することは困難である。一方、代謝的活性化によって生成した反応性代謝物の抱合反応による解毒は、最終的にはGSHとそれを利用する酵素系が担うとされている。GSHを補酵素とするGSTには基質特異性の異なる多数の分子種が存在するため、すべての発現を制御することは困難であるが、GSHの合成経路は一つのみであり、GSH合成酵素を制御することでGSHによる解毒能を調節できると考えられる。よって本研究では、GSH

およびその合成酵素に注目し、一部のヒトにおいて重篤な肝障害が発現すると報告されている前述の薬物を、GSH 減少モデルラットに単回および連続投与した。これにより、前臨床試験で頻繁に用いられるげっ歯類であるラットにおいて薬物誘導性の急性および亜急性の肝障害を高感度に検出できるかについて検討した。

トログリタゾンについては、単回および連続投与において肝障害が認められなかった (Fig. 1)。よって、トログリタゾン誘導性肝障害の種差は GSH による解毒のみでなく、他の因子も大きく関与していることが示唆される。トログリタゾンによる細胞障害メカニズムについては多くの仮説が存在し、反応性代謝物の蓄積、ミトコンドリア障害、酸化ストレス、胆汁酸塩の排泄阻害、アポトーシス誘導などが原因として挙げられている (Chojkier, 2005)。臨床においては、GSTT1-GSTM1 遺伝子欠損とトログリタゾン誘導性肝障害の発現との間に相関関係が存在している (Watanabe et al., 2003a)。*In vivo* 試験では、スーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2) のヘテロノックアウトマウスにトログリタゾンを 4 週間連続投与することによって、肝障害が認められることが報告されている (Ong et al., 2007)。SOD2 はミトコンド

リアに局在し、酸化ストレス産生の一因である $O_2^{\cdot -}$ を除去するため、酸化ストレスの関与が示唆される。しかしその後、Fujimoto ら (2009) によってこの肝障害は再現できないとも報告されている。GSH 減少モデルラットにおける検討結果から、トログリタゾン誘導性肝障害の種差は GSH の解毒能のみでは説明できず、さらに実験動物のヒトへの予測性を高めるための研究が必要であることが示唆された。

ジクロフェナクについては、単回投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 100 mg/kg の投与で肝障害が認められた (Fig. 2)。しかし、肝組織像での検討で変化は認められなかった。今回の検討では AST 値が特に上昇した (Fig. 2A)。また、ジクロフェナクは重大な副作用として肝障害以外にうっ血性心不全が挙げられる。AST および ALT は肝臓に多く含まれるが AST が最も多く含まれるのは心筋である。よって、AST 値の上昇は心疾患も寄与していたため、肝組織像で変化が認められなかったという可能性も考えられる。連続投与の検討においては、どの投与群においても肝障害が認められなかった (Fig. 3)。いずれにしても単回投与の検討結果から、GSH 減少モデルラットはジクロフェナクによる急性の肝障害を高感度に検出できることを示した。

ジクロフェナクは代謝されて反応性代謝物となり、GSH 抱合を受けるとされている。今回、GSH 減少モデルラットにおいてジクロフェナクによる肝障害の増強が認められたことから、ジクロフェナクの解毒に GSH が関与していることが示された。一方、Akai ら (2007) の報告によると、GSH 減少モデルラットでは CYP2C11 タンパク質の発現量が減少しており、APAP を投与した際の、血中 APAP の抱合体代謝物は、グルクロン酸抱合体が増加し、硫酸抱合体が減少している。この報告の中で筆者らは、APAP のグルクロン酸抱合体は multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) の基質であり (Xiong et al., 2000)、MRP2 の発現量は GSH 濃度に依存するという報告がある (Sekine et al., 2006) とし、GSH 減少による MRP2 発現量の低下で APAP のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄が減少し、血清中のグルクロン酸抱合体が増加したと考察している。ジクロフェナクの反応性代謝物として、ヒトにおいては UGT によってグルクロン酸抱合されたアシルグルクロナイド、および CYP2C9 あるいは CYP3A4 により酸化代謝を受けたキノニンが報告されている (Tang, 2003)。GSH 減少による影響として、UGT により生成されるアシルグルクロナイドの寄与は小さいと考えられ

るが、CYP2C9 と相同性が高い分子種であるラットの CYP2C11 により生成されるキノニンの寄与は無視できないと考えられる。よって、GSH 減少モデルラットにおけるジクロフェナクの障害性増強のメカニズムについてはさらに詳しい検討が必要であると考えられる。

フルタミドについては、単回投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 1,000 および 1,500 mg/kg の投与で肝障害が認められた (Fig. 5)。1,500 mg/kg 投与群において、投与量が増えているにもかかわらず 1,000 mg/kg 投与群と比べて肝障害の増強が認められなかったのは、薬物の吸収が飽和した可能性があると考えられる。500 mg/kg の投与では GSH 減少モデルラットおよび AdLuc-shRNA 投与ラットともに肝障害が認められなかった (data not shown)。連続投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 500 mg/kg の投与で肝障害が認められた (Fig. 7)。肝臓の病態としては大きく分けて肝細胞障害型と胆汁うっ滞型の二つが挙げられる。AST および ALT 値は主に肝細胞障害のマーカーとして、総ビリルビン値は主に胆汁うっ滞のマーカーとして用いられている (赤木ら, 2006)。今回、AST および ALT 値の上昇に加えて総ビリルビン値の上昇も認められたことから、フルタ

ミドによる肝障害は胆汁うっ滞も寄与していると考えられる。単回および連続投与の検討の結果から、GSH 減少モデルラットはフルタミドによる急性および亜急性の肝障害を高感度に検出できることを示した。

フルタミドもジクロフェナクと同様に、代謝されて反応性代謝物となり、GSH 抱合を受けるとされている。今回、GSH 減少モデルラットにおいてフルタミドによる肝障害の増強が認められたことから、フルタミドの解毒に GSH が関与していることが示された。フルタミドの代謝は主に CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4、および CYP3A5 などが関与するとされており、GSH 減少モデルラットにおける CYP2C11 の減少の影響はあまりないと考えられる。

ジクロフェナクおよびフルタミド連続投与の検討においては、単回投与の検討と比較して、障害の程度が減弱した。薬物毒性の応答性は、しばしば先の薬物暴露によって減弱することが知られており、一般的にこの現象を薬物耐性と呼ぶ。薬物耐性は、毒性発現部位へ到達する毒物量の減少や組織の薬物反応性の低下によるとされているが、詳しい機序は不明である (Eaton and Klaassen, 2001)。本研究における連続投与の検討で肝障害が減弱した原因の一つとして、薬物耐性が考

えられる。

本研究では、フルタミドの投与によって、GSH 減少モデルラットおよび AdLuc-shRNA 投与ラットで肝臓中総 GSH 含量の増加が認められた (Fig. 9)。今回、AdGCSH-shRNA 投与によってノックダウンした GSH 合成酵素である γ -GCS は、様々な環境因子、酸化物、抗酸化物および炎症による刺激に応答するプロモーター領域の activator protein-1 (AP-1) responsive element、および antioxidant response element (ARE) などの転写因子認識配列によって制御されていることが示されてきている (Jaiswal, 1994; Pinkus et al., 1996)。AP-1 は主に、Jun および Fos と呼ばれる癌原遺伝子から発現したタンパク質の二量体から構成されている。しかし Jun は、塩基性-ロイシンジッパー (b-zip) 構造を持つ転写因子である nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) -related factor-1 (Nrf1)、Nrf2 および small Maf とも二量体を形成すると報告されている (Motohashi and Yamamoto, 2004)。しかし、転写制御におけるこれら二量体の生物学的な重要性は明らかになっていない。Nrf は ARE に結合することが知られているが、ARE は NF-E2 結合配列として知られる Maf recognition element と非常に似た配列

を示している。また、Nrf2 が求電子剤やフェノール系抗酸化剤による、ARE を介した γ -GCS 遺伝子の誘導に不可欠であることが報告されている (Hayes and McLellan, 1999)。さらに、Nrf が酸化ストレスになどによって ARE に結合することが報告されている (Dhakshinamoorthy et al., 2000)。ARE は Nrf2 のリン酸化を引き起こす protein kinase C (PKC) や mitogen-activated protein kinase (MAPK) によって制御されることが示されてきている (Huang et al., 2000; Yu et al., 2000)。フルタミドによって、Nrf2 のリン酸化を引き起こす PKC や MAPK の一つである extracellular signal-regulated kinase (ERK) の発現が、それぞれラットの前立腺、ヒト前立腺癌細胞で増加したという報告がある (Montalvo et al., 2002; Zhu et al., 1999)。今回、フルタミドを投与することによって、フルタミドが反応性代謝物となり酸化ストレスが増大すること、PKC あるいは ERK、またはその両方の発現が増加し、Nrf2 がリン酸化されることによって ARE を介した γ -GCS の誘導が引き起こされ、GSH 含量が増加した可能性も考えられる。

アデノウイルスおよびフルタミド投与によりラット肝重量が増加する傾向が認

められた (data not shown)。GSH 減少モデルラットにフルタミドを単回投与すると、微小脂肪滴が認められたため、フルタミドの検討においては、肝重量増加の原因の一つとして脂肪沈着が考えられる。一方、アデノウイルス投与のみでは微小脂肪滴は認められないため、アデノウイルスによる肝重量の増加は、免疫系の活性化などにより肝肥大が引き起こされたためかもしれない。しかし、アデノウイルスあるいはフルタミドのみの投与では、AST および ALT 値の上昇や肝組織像の変化は認められなかったため、肝障害性を検討する際には考慮しなくても問題ないと考えられる。

本研究で使用した GSH 減少モデルラットでは、GSH 含量が最も低くなる AdGCSh-shRNA 投与後 2 週間から、投与後 4 週間までは同程度の GSH 含量を保てると報告されている (Akai et al., 2007)。そこで、ジクロフェナクおよびフルタミドの亜急性の肝障害の検討では、GSH 含量が低く保たれている期間において検討を行うために、薬物の投与期間を AdGCSh-shRNA を投与後 10 日間から 1 週間という短い期間に設定した。これは肝障害の発現を検討するためには、十分な期間であったと考えられる。

L-ブチオニンスルホキシミン (BSO)

は、 γ -GCS の特異的かつ不可逆的な阻害剤である (Griffith, 1982)。BSO を肝障害が認められない用量でマウスに投与することにより、GSH 含量が 50%程度減少する (Watanabe et al., 2003b)。しかし、わずかながら日内変動が認められること、薬物相互作用が発現する可能性があることが問題点である。本研究で用いた GSH 減少モデルラットは、GSH 含量の日内変動が認められず (Akai et al, 2007)、薬物相互作用が発現することもないため、薬物誘導性肝障害を検出する際に有用であると考えられる。

薬物誘導性肝障害は、用量依存的な肝障害がすべてのヒトに発現し、実験動物でも再現可能な中毒性、および用量依存性がなく実験動物で再現できない特異体質性に分類できる。本研究で用いた薬物の投与量は、臨床用量および最高血中濃度を考慮すると過剰であり、ヒトへの外挿は難しいため、今後はさらにヒトにおける毒性発現に近い実験系を確立する必要があると考えられる。しかし、特異体質性肝障害は実験動物で再現できないとされているにも関わらず、今回の GSH 減少モデルラットは、通常の実験動物で障害性が認められない用量で被験薬の障害性を検出可能であることを示した。

マウスやラットは、飼育しやすいこと

や、個体同士で代謝が類似していることから、医薬品開発における研究に用いられることが多い。マウスはラットに比べて代謝速度が速く、血液や尿などのサンプルを大量にあるいは連続して回収することが困難であるという欠点がある。このため、ラットは医薬品開発における動態研究および安全性研究において頻繁に用いられている (Gad et al, 2007; Johnson and Gad, 2007)。本章において、GSH 減少モデルラットがジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害を高感度に検出できることを示し、これらの薬物の解毒に GSH が関与していることを明らかにした。今後、安全性研究において GSH 減少モデルラットを用いることで、急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出することに本モデルラットが貢献できると考えられる。

E. 結論

本研究では、GSH 合成酵素をノックダウンすることで GSH 減少モデルラットを構築した。このラットを用いて、トログリタゾン、ジクロフェナク、およびフルタミドの肝障害の発現について検討し、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出できることを明らかにした。マウスやラットは、飼育しやすいことや、個体同士で代謝が類似していることから、医薬品開発における研究に用いられることが多く、特に

ラットは医薬品開発における動態研究および安全性研究において頻繁に用いられている。よって、GSH 減少モデルラットは急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出する有用な手段となり得ると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Mayu Morita, Sho Akai, Hiroko Hosomi, Koichi Tsuneyama, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Drug-induced hepatotoxicity test using γ -glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol. Lett.*, **189**: 159-165 (2009).

Yukitaka Yoshikawa, Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Establishment of knockdown of superoxide dismutase 2 and expression of CYP3A4 cell system to evaluate drug-induced cytotoxicity. *Toxicol. in Vitro*, **23**: 1179-1187 (2009).

Yukitaka Yoshikawa, Mayu Morita, Hiroko Hosomi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Knockdown of superoxide dismutase-2 enhances acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. *Toxicology*, **264**: 89-95 (2009).

Hiroko Hosimi, Sho Akai, Keiichi Minami, Yukitaka Yoshikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. An

in vivo drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and γ -glutamylcysteine synthetase knockdown cells. *Toxicol. in Vitro*, **24**: 1032-1038 (2010).

2. 学会発表

Katsuhiko Mizuno, Miki Katoh, Hirotohi Okumura, Nao Nakagawa, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. 3rd Asia Pacific ISSX Meeting, 2009.5.10-12, Bangkok, Thailand.

吉川幸孝、細見浩子、森田麻友、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：SOD2 ノックダウン試験系を用いた薬物誘導性肝障害の評価、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 2009.7.6-8 口頭&ポスター 盛岡

細見浩子、赤井 翔、吉川幸孝、南 圭一、深見達基、中島美紀、横井 毅：CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた高感度な薬物誘導性細胞障害試験系の構築、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 2009.7.6-8 口頭&ポスター 盛岡

豊田泰之、深見達基、中島美紀、横井 毅：CYP1A2 および CYP2E1 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 2009.7.6-8 口頭&ポスター 盛岡
岩村 篤、深見達基、細見浩子、中島美

紀、横井 毅：CYP2C9 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性肝障害の評価、第36回日本トキシコロジー学会学術年会 2009.7.6-8 口頭&ポスター 盛岡

古賀利久、藤原亮一、深見達基、中島美紀、横井 毅：アシルグルクロニドの細胞毒性および遺伝毒性に関する検討、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

横井 毅：代謝物を考慮した薬物誘導性肝障害の予測試験系の検討、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 シンポジウム 沖縄

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

Akai S, Hosomi H, Minami K, Tsuneyama K, Katoh M, Nakajima M, and Yokoi T (2007) Knock down of γ -glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* 282: 23996-24003.

赤木 宏行、鈴木 和夫、安仁屋 洋子、吉田 武美、玄番 宗一、稲津 教久、成松 鎮雄、石田 隆、田中 慶一、越前 宏俊、山本 郁男、渡辺 和人、木方 正 (2006) 器官毒性、医薬品トキシコロジー 第3版 (佐藤 哲男、仮屋 公夫、北田 光一 編): pp 110-127. 南江堂、東京.

Chojkier M (2005) Troglitazone and liver injury: in search of answers. *Hepatology* 41: 237-246.

Dalton TP, Dieter MZ, Yang Y, Shertzer HG, and Nebert DW (2000) Knockout of the mouse glutamate cysteine ligase catalytic subunit (Gclc) gene: embryonic lethal when homozygous, and proposed model for moderate glutathione deficiency when heterozygous. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 324-329.

Dhakshinamoorthy S, Long DJ II, and Jaiswal AK (2000) Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul* 36: 201-216.

Eaton DL and Klaassen CD (2001) Principles of Toxicology, in *CASARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY: THE BASIC SCIENCE OF POISONS*, 6th ed (Klaassen CD ed): pp 11-34. McGraw-Hill, NY.

Fujimoto K, Kumagai K, Ito K, Arakawa S, Ando Y, Oda S, Yamoto T, and Manabe S (2009) Sensitivity of liver injury in heterozygous Sod2 knockout mice treated with troglitazone or acetaminophen. *Toxicol Pathol* 37: 193-200.

Gad SC, Frith CH, Goodman DG, and Boysen BG (2007) The mouse, in *Animal models in toxicology*, 2nd ed (Gad SC ed): pp 19-146. Applied Taylor & Francis, NW.

Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 257: 13704-13712.

Grillo MP, Hua F, Knutson CG, Ware JA, and Li C (2003) Mechanistic studies on the bioactivation of diclofenac: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in vitro in incubations with rat and human hepatocytes. *Chem Res Toxicol* **16**: 1410-1417.

Grover PL and Sims P (1964) Conjugations with glutathione. Distribution of glutathione S-aryltransferase in vertebrate species. *Biochem J* **90**: 603-606.

Hayes JD and McLellan LI (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* **31**: 273-300.

Huang HC, Nguyen T, and Pickett CB (2000) Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12475-12480.

Huang CS, Chang LS, Anderson ME, and Meister A (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**: 19675-19680.

Jackson MA, Stack HF, Rice JM, and Waters MD (2000) A review of the genetic and related effects of 1,3-butadiene in rodents and humans. *Mutat Res* **463**: 181-213.

Jaiswal AK (1994) Jun and Fos regulation of

NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene expression. *Pharmacogenetics* **4**: 1-10.

Johnson MD and Gad SC (2007) The rat, in *Animal models in toxicology*, 2nd ed (Gad SC ed): pp 147-276. Applied Taylor & Francis, NW.

Kang P, Dalvie D, Smith E, Zhou S, and Deese A (2007) Identification of a novel glutathione conjugate of flutamide in incubations with human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **35**: 1081-1088.

Kassahun K, Pearson PG, Tang W, McIntosh I, Leung K, Elmore C, Dean D, Wang R, Doss G, and Baillie TA (2001) Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates in vitro and in vivo. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. *Chem Res Toxicol* **14**: 62-70.

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

Lu SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* **13**: 1169-1183.

Montalvo L, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, and Carmena MJ (2002) Regulation of the expression of protein kinase C isoenzymes in rat ventral prostate: effects of age, castration and flutamide treatment. *Life Sci* **71**: 2257-2266.

- Motohashi H and Yamamoto M (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10**: 549-557.
- Nakagawa Y, Koyama M, and Matsumoto M (1999) Flutamide-induced hepatic disorder and serum concentrations of flutamide and its metabolites in patients with prostate cancer. *Hinyokika Kyo* **45**: 821-826.
- Nedeicheva V and Gut I (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**: 1151-1175.
- Ong MM, Latchoumycandane C, and Boelsterli UA (2007) Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicol Sci* **97**: 205-213.
- Osculati A and Castiglioni C (2006) Fatal liver complications with flutamide. *Lancet* **155**: 209-212.
- Pinkus R, Weiner LM, and Daniel V (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* **271**: 13422-13429.
- Poon GK, Chen Q, Teffera Y, Ngui JS, Griffin PR, Braun MP, Doss GA, Freedman C, Stearns RA, Evans DC, Baillie TA, and Tang W (2001) Bioactivation of diclofenac via benzoquinone imine intermediates-identification of urinary mercapturic acid derivatives in rats and humans. *Drug Metab Dispos* **29**: 1608-1613.
- Prabhu S, Fackett A, Lloyd S, McClellan HA, Terrell CM, Silber PM, and Li AP (2002) Identification of glutathione conjugates of troglitazone in human hepatocytes. *Chem Biol Interact* **142**: 83-97.
- Purcell P, Henry D, and Melville G (1991) Diclofenac hepatitis. *Gastroenterology* **32**: 1381-1385
- Reed DJ (1986) Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* **35**: 7-13.
- Sekine S, Ito K, and Horie T (2006) Oxidative stress and Mrp2 internalization. *Free Radic Biol Med* **40**: 2166-2174.
- Sims P and Grover PL (1965) Conjugations with glutathione. The enzymic conjugation of some chlorocyclohexene. *Biochem J* **95**: 156-160.
- Soglia JR, Contillo LG, Kalgutkar AS, Zhao S, Hop CE, Boyd JG, and Cole MJ (2006) A semiquantitative method for the determination of reactive metabolite conjugate levels in vitro utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry and novel quaternary ammonium glutathione analogues. *Chem Res Toxicol* **19**: 480-490.
- Tang W (2003) The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab* **4**: 319-329.

- Tang W, Stearns RA, Bandiera SM, Zhang Y, Raab C, Braun MP, Dean DC, Pang J, Leung KH, Doss GA, Strauss JR, Kwei GY, Rushmore TH, Chiu SH, and Baillie TA (1999) Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab Dispos* **27**: 365-372.
- Tevell A, Lennernäs H, Jönsson M, Norlin M, Lennernäs B, Bondesson U, and Hedeland M (2006) Flutamide metabolism in four different species in vitro and identification of flutamide metabolites in human patient urine by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **34**: 984-992.
- Walker AM (1997) Quantitative studies of the risk of serious hepatic injury in persons using nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* **40**: 201-208.
- Wang QZ, Lv YH, Diao Y, and Xu R (2008) The design of vectors for RNAi delivery system. *Curr Pharm Des* **14**: 1327-1340.
- Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yasumo H, Koishi R, Takahashi T, Miyoshi K, Nakamura K, Izumi T, Matsushita Y, Furukawa H, Haruyama H, and Koga T (2003a) A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther* **73**: 435-455.
- Watanabe T, Ohashi Y, Yasuda M, Takaoka M, Furukawa T, Yamoto T, Sanbuissho A, and Manabe S (1999) Was it not possible to predict liver dysfunction caused by troglitazone during the nonclinical safety studies? –Reevaluation of safety- *Iyakuhin Kenkyu* **30**: 537-546.
- Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W, and Manabe S (2003b) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci* **28**: 455-469.
- Xiong H, Turner KC, Ward ES, Jansen PL, and Brouwer KL (2000) Altered hepatobiliary disposition of acetaminophen glucuronide in isolated perfused livers from multidrug resistance-associated protein 2-deficient TR(-) rats. *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 512-518.
- Yu R, Chen C, Mo YY, Hebbar V, Owuor ED, Tan TH, and Kong AN (2000) Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem* **275**: 39907-39913.
- Yueh MF and Tukey RH (2007) Nrf2-Keap1 signaling pathway regulates human UGT1A1 expression in vitro and in transgenic UGT1 mice. *J Biol Chem* **282**: 8749-8758.
- Zhu X, Li H, Liu JP, and Funder JW (1999) Androgen stimulates mitogen-activated protein kinase in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **152**: 199-206.

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物誘導性肝障害に関する研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

研究要旨

薬物誘導性肝障害は、医薬品開発や臨床薬物療法における主要な問題の一つであるが、その発現には大きな種差が存在し、前臨床試験における毒性の予測を困難にしている。薬物が肝臓をはじめ各組織で代謝を受けた場合には、より極性が高くなり、排泄されやすくなる場合が多い。しかし、代謝的活性化を受け反応性代謝物を生成することで、肝障害を惹起する例も少なくない。肝障害発現の種差の原因として、薬物代謝反応の一つである酸化および抱合などの酵素活性の差異が挙げられる。酸化反応は薬物の代謝的活性化の大部分を担うが関与する酵素が多く、種差も大きいためそのすべての遺伝子変動を把握することは困難である。ヒトに比べてげっ歯類で酵素活性が高いことが知られており、この代謝能の違いが前臨床試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。本研究においては、ヒト肝細胞キメラマウスにおけるトログリタゾン投与実験を行った結果、GSH 減少モデルラットでは認められなかった肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、さらに、薬物動態関連因子や酸化ストレスの変動なども認められた。キメラマウスは肝実質細胞の70%以上がヒト肝細胞に置換されており、CYP や UGT などのヒト薬物代謝酵素が発現し、ドナーと同程度の酵素活性を示すこと、ヒトと類似した CYP の誘導や阻害が認められること、薬物排泄経路がヒトと類似していることが当研究室で示されてきている。よって、キメラマウスがよりヒトに近い毒性プロファイルを持ち、トログリタゾン誘導性肝障害を明確に再現できる可能性を示唆した。本研究で検討したモデル動物が医薬品開発の安全性研究で用いられ、前臨床試験におけるスクリーニングの段階で薬物誘導性肝障害を高感度に検出し、ヒトにおける副作用を未然に防ぐ有用な手段になることを期待する。

A. 研究目的

GST はヒトとげっ歯類で代謝能が異なるが、その他の第 I 相、第 II 相酵素についてもヒトと実験動物で基質特異性が異なり、かつ、肝臓における発現の程度が異なること、体表面積に由来した基礎代謝量が異なることが知られている。主要な第 I 相酵素であるシトクロム P450 (CYP) は、ヒト肝での薬物代謝に中心的な役割を果たし、薬物の解毒に関与する一方で、反応性代謝物の生成を触媒する。酵素誘導に関しては、候補化合物を実験動物に連続投与し薬物代謝酵素の発現変動を検討することが多いが、誘導能についても種差の存在が明らかになっている (Kocarek et al., 1995)。

このような薬物代謝酵素の種差の問題を解決する手段の一つとして、最高でマウス肝の 95% をヒト肝細胞に置換可能なヒト肝細胞キメラマウス (キメラマウス) がある (Tateno et al., 2004)。以前、当研究室では、キメラマウス肝に CYP や UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) などのヒト薬物代謝酵素が発現しており、ドナーと同程度の酵素活性を示すこと、ヒトと類似した CYP の誘導や阻害が認められること、薬物排泄経路がヒトと類似していることを明らかにした (Katoh et al., 2008)。これより、本キメラマウスがヒトと類似した毒性プロファイルを示

すことが示唆される。

本研究では、キメラマウスにトログリタゾン投与することで、トログリタゾンによるヒト特異的な薬物誘導性肝障害の発現とそのメカニズムについて検討した。トログリタゾンはこれまで、動物モデルを用いた検討において、ヒトにおける肝障害をほとんど再現できていない。そこで、マウス肝の 70% 以上がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスにトログリタゾンを投与することでヒト特異的な肝障害の発現について検討した。

B. 実験材料および実験方法

B-1 実験動物

キメラマウスはフェニックスバイオ (Hiroshima, Japan) に委託生産した。本研究ではキメラマウスのドナーとして BD Gentest (Woburn, MA) 社の凍結ヒト肝細胞 (黒人、男性、5 歳) を用いた。キメラマウスは、生後 20 から 30 日齢の urokinase plasminogen activator^(+/+) severe combined immunodeficiency disease (uPA^(+/+)SCID) マウスの脾臓にヒト肝細胞を投与することにより構築した。使用したキメラマウスを Table 1 に示す。生後 13 週齢の雌性キメラマウスを使用した。なお、ELISA 法により測定したキメラ

Table 1. Chimeric mice used in the troglitazone administering study.

Group	Mice No.	hAlb in the blood	Approximate RI
		mg/mL	%
CTL	1	8.7	77
	2	11.4	85
	3	9.1	78
Tro	4	12.4	87
	5	10.4	82
	6	7.5	73
BSO	7	14.7 ^a	92
	8	6.8	70
	9	9.0	78
BSO+Tro	10	7.1	71
	11	7.9	74
	12	8.6	77

^aSerum hAlb

マウスの血中 hAlb 濃度とヒト特異的サイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色から算出した置換率 (replacement index, RI) は相関が認められているため (Tateno et al., 2004)、Table 1 に併記した。

B-2 実験材料および試薬

L-ブチオニンスルホキシミン (BSO) およびパクリタキセルは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、ランダムヘキサマー、RNAiso、SYBR[®] Premix Ex Taq および ROX Reference Dye II はタカラバイオ (Shiga, Japan) より、逆転写酵素

ReverTra Ace は東洋紡 (Osaka, Japan) より購入した。オリゴヌクレオチドは北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。ウサギ抗 CYP2C8 抗体は日本農産 (Yokohama, Japan) より、ヤギ抗 CYP3A 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) より、ビオチン化抗ウサギ IgG、ビオチン化抗ヤギ IgG、ペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体は Vector (Burlingame, CA) より、PVDF 膜 (Immobilon-P) は Millipore (Bedford, MA) より購入した。6 β -水酸化テストステロンは第一化学薬品 (Tokyo, Japan)

より、6 α -水酸化パクタキセルおよびヒト CYP2C8 および CYP3A4 を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソームは BD Gentest (Woburn, MA) より購入した。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸酸化型 (NADP⁺)、グルコース 6-リン酸 (G-6-P) およびグルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G-6-P DH) はオリエンタル酵母工業 (Tokyo, Japan) より、1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン (CDNB)、デキサメタゾンおよびテストステロンは和光純薬 (Osaka, Japan) より購入した。RNA の定量には NanoDrop Technologies (Wilmington, DE) の ND-1000 を使用した。Real-time RT-PCR には STRATAGENE (La Jolla, CA) の Mx3000[®] Real-Time PCR System を使用した。電気泳動装置はバイオクラフト (Tokyo, Japan) の BE-122 型または BE-560 型泳動槽と PA-055 型泳動用電源を用いた。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または生化学用のものを用いた。

B-3 薬物投与

生後 13 週齢の雌性キメラマウスに、0.5% CMC に懸濁させたトログリタゾン (1,000 mg/kg) を 1 日 1 回 2 週間経口投与した。各群 3 匹のマウスを使用した。BSO 投与群においては、トログリタゾン投

与開始と同時に 10 mM BSO を飲水投与した。3、7、および 10 日後に BSO 含有水を更新した。トログリタゾン投与前、投与 3、7、および 10 日後に眼窩採血を行い、最終投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-4 AST、ALT、および LDH 値と総ビリルビンおよび間接ビリルビン濃度の測定

AST、ALT、および LDH 値と総ビリルビンおよび間接ビリルビン濃度の測定には DRI-CHEM (富士フィルム, Tokyo, Japan) を用いた。

B-5 マウス肝組織からの total RNA の調製

約 50 mg のマウス肝に対して RNAiso1 mL を加えた。氷冷下、ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、1.5 mL チューブに分注後、室温で 5 分間放置した。200 μ L のクロロホルムを加えて 15 秒間激しく攪拌し、室温で 5 分間静置した。その後 15,000 rpm (15,000 g)、4 $^{\circ}$ C にて 15 分間遠心分離した。水層を新しいチューブに移し、500 μ L のイソプロパノールを加えて転倒攪拌し、室温で 5 分間静置した。15,000 rpm (15,000 g)、4 $^{\circ}$ C にて 15 分間遠心分離し、デカント後、沈殿を 500 μ L の 75% エタノールで洗浄した。15,000 rpm

Table 2. Sequence of primers for real-time RT-PCR.

Primer	Sequence
CYP2C8 S ^a	5'-AGATCAGAATTTTCTCACCC-3'
CYP2C8 AS ^a	5'-AACTTCGTGTAAGAGCAACA-3'
CYP3A4 S ^a	5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'
CYP3A4 AS ^a	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
SAA1 S	5'-GGGAACTATGATGCTGCCAAAAGG-3'
SAA1 AS	5'-TGATCAGCCAGCGAGTCCTC-3'
SAA2 S	5'-GCTACAGCACAGATCAGCACCATG-3'
SAA2 AS	5'-TAGGCTCTCCACATGTCCCGAG-3'
SULT1A1 S	5'-ATGGAGACTCTGAAAGACACACCGG-3'
SULT1A1 AS	5'-TGTGCTGAACCACGAAGTCCACG-3'
UGT1A1 S ^b	5'-CCTTGCCTCAGAATTCCTTC-3'
UGT1A1 AS ^b	5'-ATTGATCCCAAAGAGAAAACAC-3'
GAPDH S ^a	5'-CCAGGGCTTTTAACTC-3'
GAPDH AS ^a	5'-GCTCCCCCTGCAAATGA-3'

S, Sense primer, AS, Antisense primer.

SAA, Serum amyloid A.

^aFrom Katoh et al. (2004). ^bFrom Izukawa et al. (2009).

(15,000 g)、4° Cにて5分間遠心分離し、デカント後、エタノールを完全に除去した。この沈殿を風乾し、DEPC処理精製水に溶解させ、260 nmにおける吸光度をNanoDrop ND-1000により測定した。

B-6 逆転写酵素による cDNA の合成

B-5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 4 μg、ランダムヘキサマー (150 ng/μL) 1 μL に DEPC 処理精製水を加えて 23 μL とし、70° C 水浴中で 10 分間熱処理後、氷冷し

た。5 × Reaction buffer for ReverTra Ace 8 μL、2.5 mM dNTPs 8 μL、逆転写酵素 ReverTra Ace 1 μL を加えて全量を 40 μL とし、サーマルサイクラーを用いて 30° C で 10 分間、42° C で 60 分間、98° C で 10 分間反応させ、cDNA を合成した。

B-7 Real-time RT-PCR による mRNA の定量

B-6 で得た cDNA サンプル 1 μL に 10 pmol/μL の Sense primer および Antisense primer をそれぞれ 0.8 μL、