

SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq 10  $\mu$ L、ROX Reference Dye II 0.25  $\mu$ L に滅菌精製水を加え、全量を 20  $\mu$ L とし、Mx3000<sup>®</sup> Real-Time PCR System を用いて以下のプロトコールでそれぞれ反応を行った。CYP2C8 および UGT1A1 mRNA の定量の際には、ホールド反応を 95 $^{\circ}$  C で 30 秒行った後、解離反応を 94 $^{\circ}$  C で 4 秒、アニーリングと伸長反応を 64 $^{\circ}$  C で 20 秒とし、35 サイクル行った。血清アミロイド (SA) A1 および SAA2 mRNA の定量の際には、ホールド反応を 95 $^{\circ}$  C で 30 秒行った後、解離反応を 94 $^{\circ}$  C で 4 秒、アニーリングと伸長反応を 60 $^{\circ}$  C で 20 秒とし、35 サイクル行った。CYP3A4 および SULT1A1 mRNA の定量の際には、ホールド反応を 95 $^{\circ}$  C で 60 秒行った後、解離反応を 94 $^{\circ}$  C で 15 秒、アニーリングを 65 $^{\circ}$  C で 15 秒、伸長反応を 72 $^{\circ}$  C で 30 秒とし、35 サイクル行った。それぞれの反応終了後、95 $^{\circ}$  C で 60 秒、55 $^{\circ}$  C で 30 秒、95 $^{\circ}$  C で 30 秒反応させ、融解曲線の測定を行った。PCR 産物の蛍光強度は MxPro software (ver. 4.10) を用いて解析した。すべてのサンプルは 2%アガロースゲルで電気泳動をして目的のフラグメントが特異的に増幅されているか確認した。同じサンプルを用いてハウスキーピング遺伝子である GAPDH について Real-time RT-PCR を行い、補正した。

B-8 マウス肝ミクロソーム、サイトソルおよびミトコンドリアの調製

マウス肝ミクロソームおよびサイトソル画分は摘出した肝試料より常法 (Yamazaki et al., 1999) に従って調製、ミトコンドリア画分も調製し、それぞれ TGE buffer に懸濁した。タンパク質濃度は Bradford 法 (Bradford, 1976) に従い、 $\gamma$ -グロブリンを標準蛋白とし Bio-Rad (Hercules, CA) の Protein Assay kit を用いて測定した。各サンプルを適当に希釈した溶液 20  $\mu$ L と Brad 溶液 980  $\mu$ L を混合し、室温で反応させ、595 nm の吸光度を Biotrak II plate reader (GE Healthcare) を用いて測定した。

B-9 SDS-PAGE および Western blot 解析

B-8 で調製したミクロソーム画分を使用し、Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、以下のように行った。ラビット抗 CYP2C8 抗体を用いる場合はミクロソーム 20  $\mu$ g、ヤギ抗 CYP3A 抗体を用いる場合は 2  $\mu$ g に対して、それぞれサンプル処理液と 2-メルカプトエタノールを 32 : 5 の割合で混合した溶液を等量加えた後、100 $^{\circ}$ C で 3 分間煮沸し、厚さ 1 mm、10% ポリアクリルアミドゲル、泳動 buffer を用いて SDS-PAGE を行った。

その後、Transfer cell を用い、電氣的にゲル上のタンパク質を PVDF 膜に 10 V で 30 分間転写した。その際、ろ紙、ポリアクリルアミドゲル、PVDF 膜は Transfer buffer に浸して行った。転写後、PVDF 膜を 3% スキムミルクと 0.1% Tween 20 を含む PBS 溶液に浸して 1 時間ブロッキングし、PBS により 5 分間ずつ 3 回洗浄後、1 次抗体として、ラビット抗 CYP2C8 抗体 (1 × PBS で 5,000 倍希釈) を用いた場合は、抗体反応を室温で 1 時間行った。1 次抗体として、ヤギ抗 CYP3A 抗体 (1 × PBS で 200 倍希釈) を用いた場合は、抗体反応を室温で 3 時間行った。次に PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後、2 次抗体反応を室温でそれぞれ 30 分間行った。2 次抗体にはそれぞれビオチン化抗ラビット IgG およびビオチン化抗ヤギ IgG (1 × PBS で 2,000 倍希釈) を用いた。その後、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、3 次抗体反応を 30 分間行った。3 次抗体にはペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体 (1 × PBS で 2,000 倍希釈) を用い、さらに 10 分間ずつ 3 回 PBS で洗浄した後、0.06% の DAB で発色させた。

#### B-10 CYP 酵素活性の測定

下記の CYP 酵素活性において、反応溶液中の有機溶媒濃度は 1% 未満とした。

#### B-10-1 パクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化酵素活性

CYP2C8 で触媒されるパクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化酵素活性 (PTXOH) は、Willey ら (1993) の方法に修正を加え、以下のように測定した。最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、20  $\mu$ M パクリタキセル、0.5 mg/mL ミクロソームタンパク質 (II-2-8 で調製) となるように精製水を加えて全量を 180  $\mu$ L とした。37 $^{\circ}$  C で 2 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を 20  $\mu$ L 添加することにより反応を開始した。37 $^{\circ}$  C で 10 分間インキュベートした後、3 M NaCl を 1 mL およびジクロロメタンを 2 mL 加え激しく攪拌することにより反応を停止した。内標準物質として 100  $\mu$ M テストステロンを 10  $\mu$ L 加えた。2,000 rpm (650 g) で 10 分間遠心分離し、ジクロロメタン層を採取し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を移動層 200  $\mu$ L に溶解し、100  $\mu$ L を HPLC に注入した。HPLC による分析には、L-2130 ポンプ (日立, Tokyo, Japan)、L-2200 オートサンプラー (日立)、L-2350 カラムオープン (日立)、L-2400 UV 検出器 (日立) を用いて、溶離液を 227 nm でモニターした。分析カラムは Mightysil RP-18 (4.6 × 150 mm) を用いた。移動層は 45%

アセトニトリル/20 mM 酢酸アンモニウムを使用し、カラム温度は 35° C、流速は 1.0 mL/min とした。保持時間は 6a-水酸化パクリタキセルが 9.0 分、パクリタキセルが 14.7 分であった。

#### B-10-2 デキサメタゾン 6-水酸化酵素活性

CYP3A4 で触媒されるデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性 (DEXOH) は、Tomlinson ら (1997) の方法に修正を加え、以下のように測定した。最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、100  $\mu$ M デキサメタゾン、1 mg/mL ミクロソームタンパク質 (B-8 で調製) となるように精製水を加えて全量を 180  $\mu$ L とした。37° C で 2 分間プレインキュベートした後、NADPH 生成系を 20  $\mu$ L 添加することにより反応を開始した。37° C で 30 分間インキュベートした後、酢酸エチルを 1.5 mL 加え激しく攪拌することにより反応を停止した。3 M NaCl を 25  $\mu$ L および内標準物質として 10 ng/ $\mu$ L 6-水酸化テストステロンを 10  $\mu$ L 加えた。2,000 rpm (650 g) で 10 分間遠心分離し、酢酸エチル層を採取し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を移動層 200  $\mu$ L に溶解し、100  $\mu$ L を HPLC に注入した。HPLC 装置および分析カラムは B-10-1 と同じものを使用し、溶離液を

243 nm でモニターした。移動層は 23% アセトニトリル/0.015%ギ酸を使用し、カラム温度は 35° C、流速は 1.0 mL/min とした。なお、6-水酸化デキサメタゾンの保持時間はデキサメタゾンヒト CYP3A4 発現系ミクロソームと反応させた溶液を用いて確認した。保持時間は 6-水酸化デキサメタゾンが 4.8 分、デキサメタゾンが 37.7 分であった。

#### B-11 GST 酵素活性の測定

GST 酵素活性は Habig ら (1974) の方法に修正を加え、以下の方法により測定した。測定用セルに第一基質溶液を 0.8 mL 取り、B-8 で調製したサイトソル画分を 0.1 mL 添加し、軽く攪拌した。CDNB 溶液を 0.1 mL 添加することにより反応を開始した。反応開始直後から 340 nm の吸光度を 10 秒間隔で 120 秒まで測定し、単位時間あたりの酵素活性を算出した。

#### B-12 SOD2 酵素活性の測定

Cayman chemical (Ann Arbor, MI) の Superoxide dismutase assay kit を用い、以下の方法で SOD2 酵素活性の測定を行った。96 well plate に radical detector を 190  $\mu$ L 加え、II-2-8 で調製したミトコンドリア画分を 1  $\mu$ g apply し、2 mM のシアン化カリウムを 10  $\mu$ L 加えた。そ

の後 xanthine oxidase 溶液を 20  $\mu$ L 加え、20 分後に 450 nm の吸光度を Biotrak II Plate reader (GE Healthcare) を用いて測定した。

B-13 プロテインカルボニル含量の測定  
Cell Biolabs (Tokyo, Japan) の OxiSelect Protein Carbonyl ELISA Kit を用い、以下の方法でプロテインカルボニル含量の測定を行った。B-8 で調製したミトコンドリア画分を 10  $\mu$ g/mL に希釈し、96-well protein binding plate に 100  $\mu$ L 加え、37 $^{\circ}$  C で 3 時間反応させた。Well を洗浄し、DNPH Working Solution を 100  $\mu$ L 加え、遮光し、室温で 45 分間反応させた。Well を洗浄し、Blocking solution を 200  $\mu$ L 加え、室温で 2 時間反応させた。Well を洗浄し、抗 DNP 抗体を 100  $\mu$ L 加え、室温で 1 時間反応させた。Well を洗浄し、HRP 標識 2 次抗体を 100  $\mu$ L 加え、室温で 30 分間反応させた。Well を洗浄し、Substrate solution を 100  $\mu$ L 加え、室温で 10 分間反応させた後、Stop solution を 100  $\mu$ L 加え反応を停止させ、450 nm の吸光度を Biotrak II Plate reader (GE Healthcare) を用いて測定した。

B-14 DNA マイクロアレイによる網羅的  
遺伝子発現変動の解析と評価

DNA マイクロアレイ解析は積水メディカル (Tokyo, Japan) に委託した。マイクロアレイは Affymetrix (Santa Clara, CA) の GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を使用した。マイクロアレイ上の各遺伝子プローブにはパーフェクトマッチ (PM) とミスマッチ (MM) の 2 種類を用いている。理論上 MM には RNA が結合しないため、MM で蛍光が検出された場合は非特異的な結合とする。PM および MM 領域内で複数のポイントについて蛍光強度を計測し、PM と MM 間での有意差検定を行う。危険率が 5% 未満で有意差ありとされた遺伝子は present、危険率が 10% 以上の場合には absent と判定する。この中間は marginal と判定する。ヒト遺伝子発現の誘導および抑制の評価は、2 倍以上または 1/2 以下の変動を基準とし、absent と判定された遺伝子は排除した。

B-15 統計解析

各群における統計学的評価は Dunnett's post hoc test により解析し、 $P < 0.05$  の時、統計学的に有意と判断した。

## C. 実験結果

### C-1 トログリタゾンおよびBSO投与による亜急性肝障害の検討

キメラマウスに、1日1回2週間トログリタゾンを経口で1,000 mg/kg連続投与し、BSO投与群においては、同時に10 mM BSOを飲水投与した。BSOは、 $\gamma$ -GCSの特異的かつ不可逆的な阻害剤である。投与前、投与3、7、10日後、および最終投与の24時間後に血漿を採取し、AST、ALT、LDH、総ビリルビン、および間接ビリルビン値を測定した。その結果、トログリタゾンのみを投与した群では、最終投与の24時間後においてAST、ALT、および総ビリルビン値の上昇傾向（AST:  $266 \pm 89$  U/L, ALT:  $173 \pm 92$  U/L, Total bilirubin:  $1.13 \pm 0.32$  mg/dL）が、非投与群（AST:  $147 \pm 65$ , ALT:  $91 \pm 43$  U/L, Total bilirubin:  $0.77 \pm 0.06$  mg/dL）と比べて認められ、直接ビリルビン値の上昇傾向も認められた（Fig. 10, Table 3）。

一方、BSOのみ、およびBSOとトログリタゾンを同時投与した群ではAST、ALT、およびビリルビン値の上昇は認められなかった。LDH値の上昇は、どの投与群においても認められなかった（Table 1）。ま

た、投与3、7、および10日後においては、AST、ALT、LDH、総ビリルビン、および間接ビリルビン値のいずれにも変化が認められなかった（data not shown）。

さらに、キメラマウスにおけるトログリタゾン連続投与による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。結果として、トログリタゾンのみを投与した群で、非投与群を比べて肝組織の変化は認められなかった（data not shown）。

### C-2 トログリタゾンおよびBSO投与による薬物動態関連因子への影響

C-1で用いたキメラマウスの肝試料を、最終投与の24時間後に採取し、以後の検討で用いた。トログリタゾンの代謝物の大部分は硫酸抱合体（M1）であり、より少ない量ではあるが、グルクロン酸抱合体（M2）、および酸化物であるキノン体（M3）も生成する（Chojkier, 2005）。硫酸抱合は主に硫酸転移酵素（SULT）分子種の一つであるSULT1A1が、グルクロン酸抱合は主にUGT1A1が、酸化は主にCYP2C8とCYP3A4が触媒することが報告されている（Honma et al., 2002; Yamazaki et al., 1999; Yoshigae et al., 2000）。

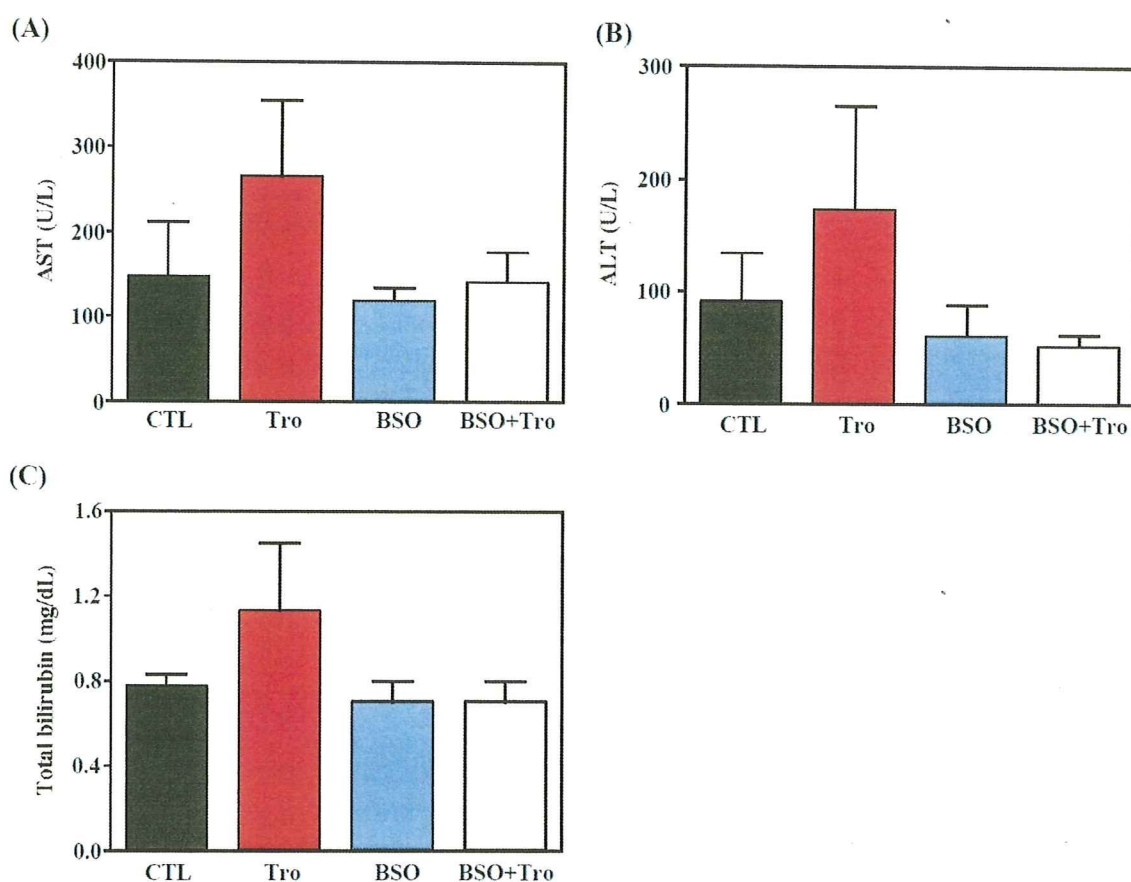


Fig. 1. Subacute toxicity effects of troglitazone and/or BSO in chimeric mice. Troglitazone was orally administered 0 or 1,000 mg/kg once a day for two weeks. 10 mM BSO was administered via drinking water for two weeks. AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 24 h after the last administration. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3).

#### C-2-1 ヒト CYP2C8 の発現

トログリタゾンまたは BSO のみ、およびその両方を投与した群では、非投与群と比べて、ヒト CYP2C8 mRNA 発現量および酵素活性の有意な増加が認められ (Figs. 2A and 2C)、ヒト CYP2C8 タンパク質発現量は増加傾向が認められた (Fig. 2B)。

#### C-2-2 ヒト CYP3A4 の発現

トログリタゾンまたは BSO のみ、およびその両方を投与した群では、非投与群と比べて、ヒト CYP3A4 酵素活性の有意な上昇が認められ (Fig. 3C)、ヒト CYP3A4 mRNA およびタンパク質発現量は増加傾向が認められた (Figs. 3A and 3B)。

Table 1. Serum biochemistry in chimeric mice administered troglitazone and/or BSO for two weeks. Each parameter was measured 24 h after the last administration.

Group	Mice no.	AST	ALT	LDH	Total bilirubin	Direct bilirubin
		U/L	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL
CTL	1	147	77	1366	0.8	0.1
	2	83	56	2884	0.7	0.1
	3	212	139	1386	0.8	0.1
Tro	4	170	67	3600	0.9	0.1
	5	345	233	2520	1.5	0.4
	6	283	218	861	1	0.1
BSO	7	102	51	1728	0.8	0.2
	8	131	91	1206	0.6	0.1
	9	123	38	1504	0.7	0.1
BSO+Tro	10	175	59	1572	0.7	0.2
	11	105	55	891	0.6	ND
	12	144	39	836	0.8	0.1

ND, Not detected.

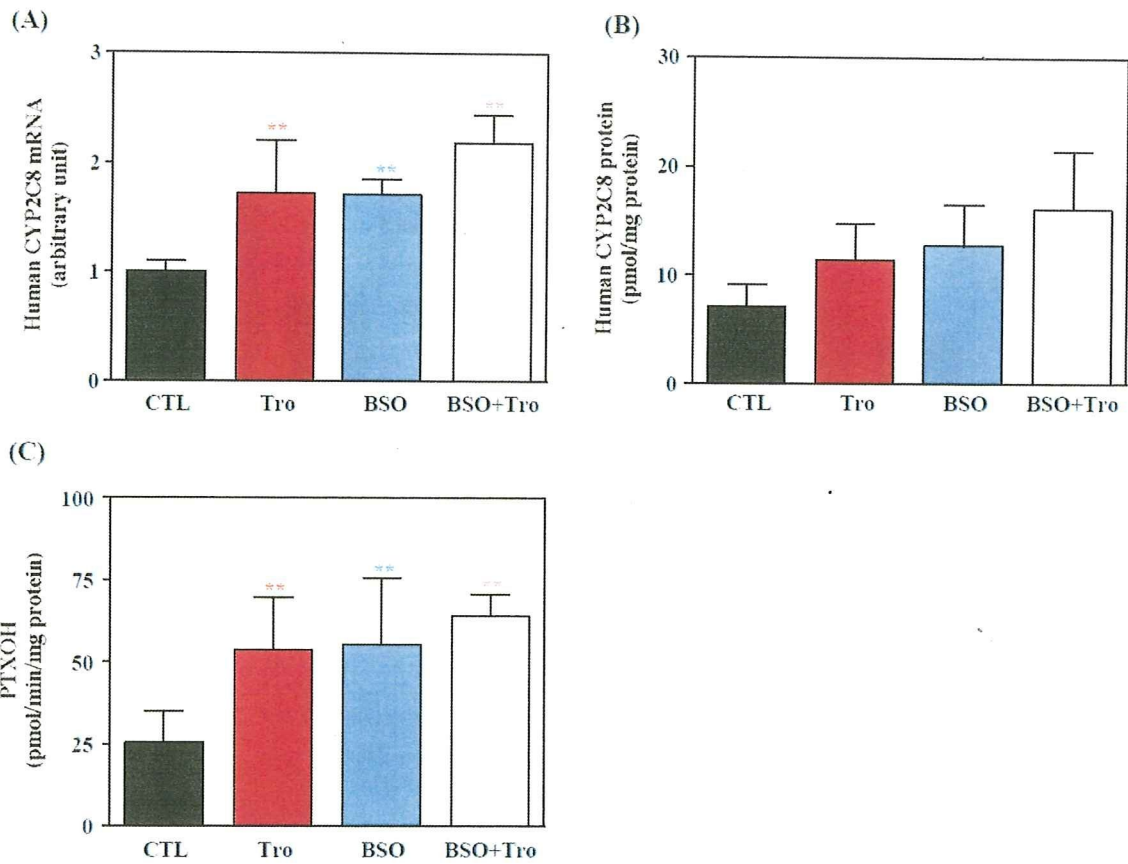


Fig. 2. Changes of human CYP2C8 expression by troglitazone and/or BSO in chimeric mice. Relative expression levels of human CYP2C8 mRNA (A), the expression of human CYP2C8 protein (B) and PTXOH (C) were measured. C, PTXOH catalyzed by CYP2C8 was measured at 20  $\mu$ M paclitaxel. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\**P* < 0.01 compared with CTL group.



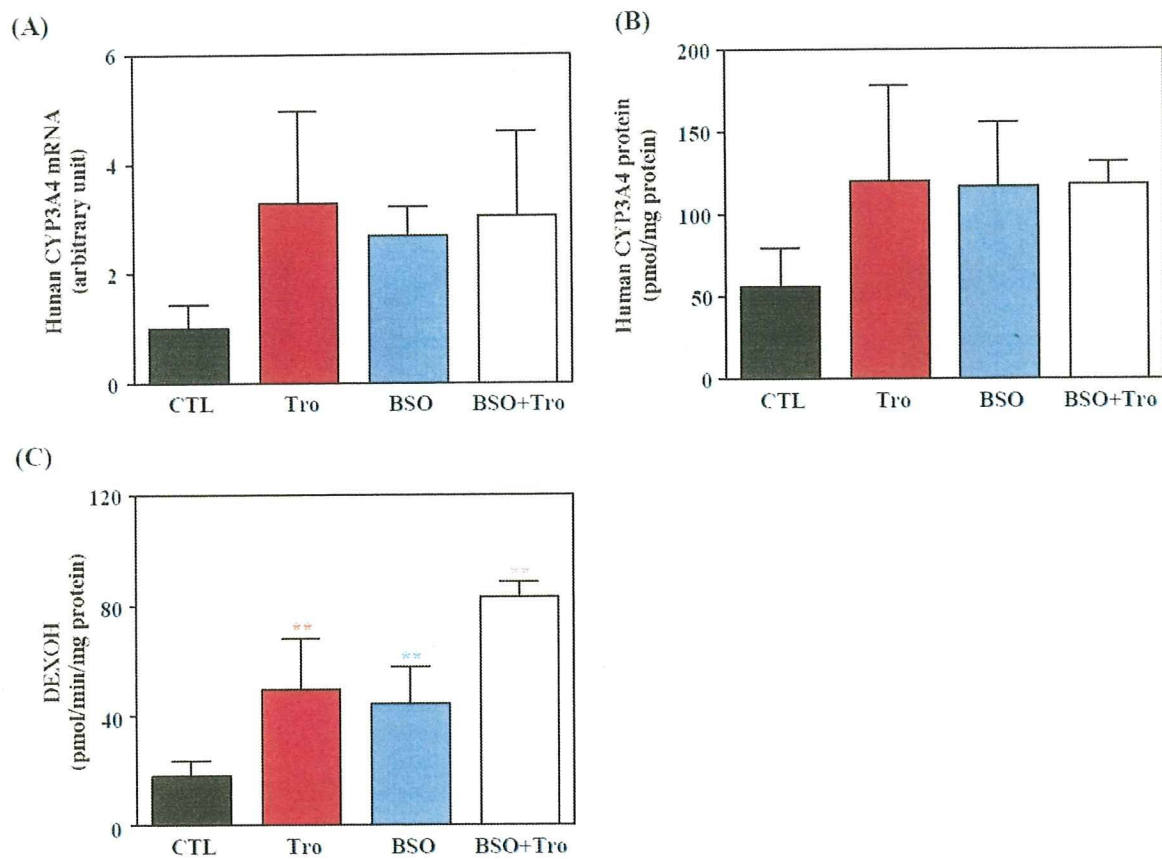


Fig. 13. Changes of human CYP3A4 expression by troglitazone and/or BSO in chimeric mice. Relative expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), the expression of human CYP3A4 protein (B) and DEXOH (C) were measured. C, DEXOH catalyzed by CYP3A4 was measured at 100  $\mu$ M dexamethasone. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\**P* < 0.01 compared with CTL group.

C-2-3 ヒト UGT1A1 および SULT1A1 mRNA の発現

トログリタゾンまたはBSOのみ、およびその両方を投与した群では、非投与群と比べて、ヒト UGT1A1 mRNA 発現量の有

意な増加が認められた (Fig. 4A)。ヒト SULT1A1 mRNA 発現量は、どの投与群においても変化が認められなかった (Fig. 4B)。

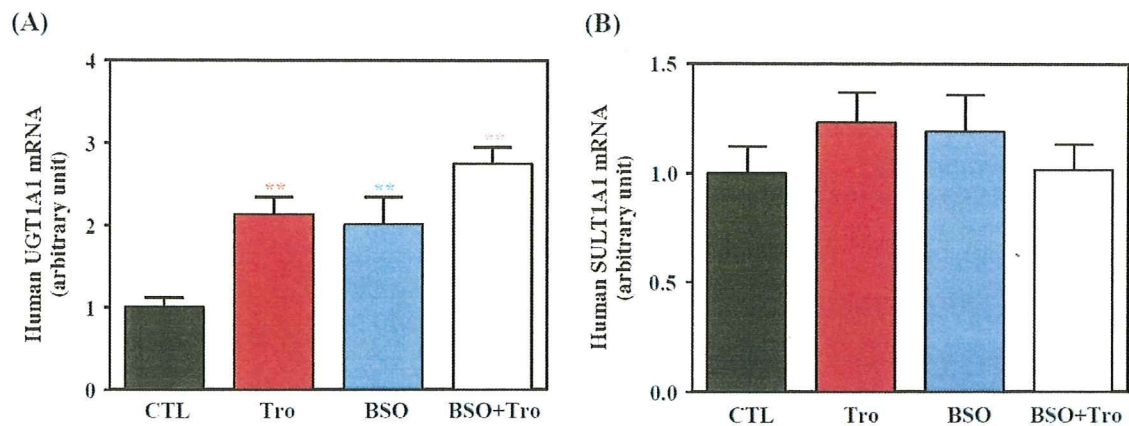


Fig. 4. Changes of relative expression of human UGT1A1 mRNA (A) and human SULT1A1 mRNA (B) expression by troglitazone and/or BSO in chimeric mice. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\* $P$  < 0.01 compared with CTL group.

C-2-4 GSH 含量および GST 酵素活性

トログリタゾンのみを投与した群では、非投与群と比べて、GSH 含量の有意な増加が認められた一方、BSO のみ、および BSO

とトログリタゾンを同時投与した群では有意な減少が認められた (Fig. 5A)。GST 酵素活性はどの投与群においても変化が認められなかった (Fig. 5B)。

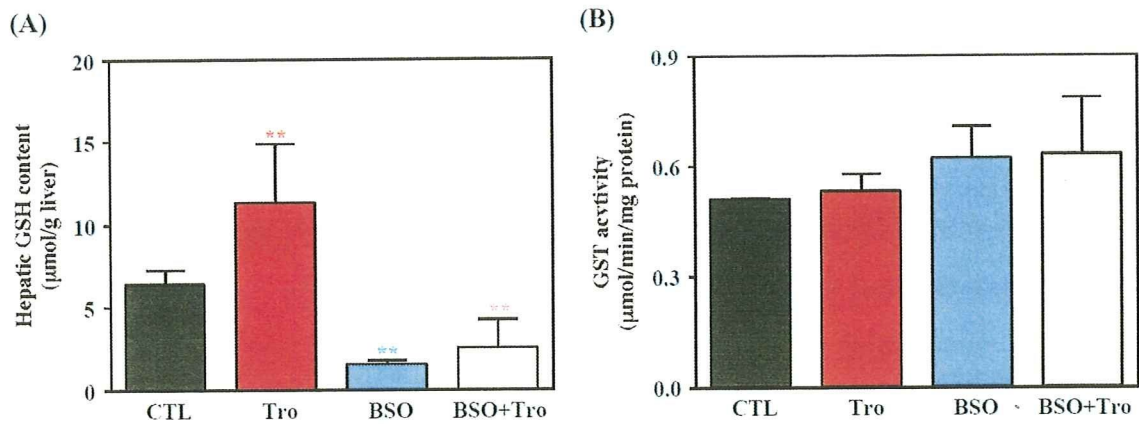


Fig. 5. Changes of hepatic GSH content (A) and GST activity (B) by troglitazone and/or BSO in chimeric mice. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P < 0.01$  compared with CTL group.

### II-3-3 トログリタゾンおよびBSO投与による酸化ストレスへの影響

BSOのみ、およびBSOとトログリタゾンを同時投与した群では、非投与群と比べてヒトSOD2酵素活性の有意な上昇が認められた一方、トログリタゾンのみを投与

した群では、ヒトSOD2酵素活性の上昇が認められなかった (Fig. 6A)。プロテインカルボニル含量は、トログリタゾンまたはBSOのみ、およびその両方を投与した群で、非投与群と比べて有意な増加が認められた (Fig. 6B)。

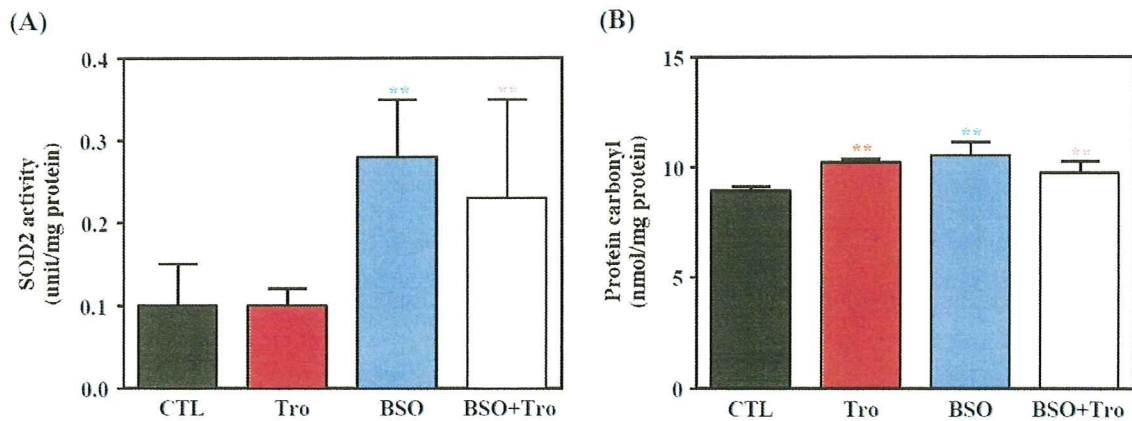


Fig. 6. Changes of SOD2 activity (A) and protein carbonyl (B) by troglitazone and/or BSO in chimeric mice. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P < 0.01$  compared with CTL group.

C-4 DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動の検討

トログリタゾンのみを投与した群および非投与群のキメラマウス各3匹について個別に遺伝子発現の解析を行い、それぞれの群で各遺伝子の発現量を平均化し、比較した。その結果、DNA マイクロアレイに組み込まれた全遺伝子中、タンパク質として翻訳されるヒト遺伝子で、トログリタゾン投与により2倍以上に増加した遺伝子は73個、1/2以下に減少した遺伝子は55個であった。変動が認められた遺伝子中に、肝臓の病態と直接的に関連す

るヒト SAA1 および SAA2 が認められた (Table 2)。

C-5 トログリタゾンおよびBSO投与によるヒト SAA1 および SAA2 mRNA 発現への影響

トログリタゾンまたはBSOのみ、およびその両方を投与した群では、非投与群と比べて、ヒト SAA1 および SAA2 mRNA 発現量の増加傾向が認められた。特にBSOとトログリタゾンを同時投与した群における増加傾向が顕著であった (Fig. 7)。

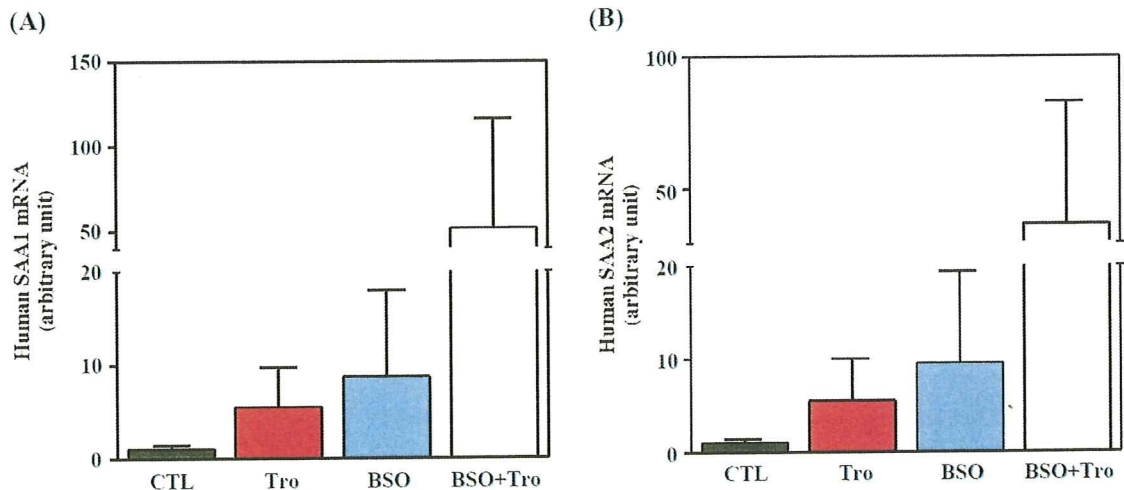


Fig. 7. Changes of human SAA1 mRNA (A) and human SAA2 mRNA (B) by troglitazone and/or BSO in chimeric mice. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3).



Table 4. Genes significantly changed by troglitazone administration in chimeric mice.

Up regulation	Gene name	Genbank ID	Common name
	Golgi reassembly stacking protein 2	NM_013530.3	GORASP2
	Interferon-induced protein 44-like	NM_006820.2	IFL44L
	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2	NM_001332.2	CTNND2
	Serum amyloid A1	NM_000331.3	SAA1
	Serum amyloid A2	NM_001127380.1	SAA2
	Abhydrolase domain containing 3	NM_138340.4	ABHD3
	Four and a half LIM domains 1	NM_001159699.1	FHL1
	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	NM_080657.4	RSAD2
	Neurofibromin 1 (neurofibromatosis, von Recklinghausen disease, Watson disease)	NM_000267.3	NF1
	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	NM_002127.5	HLA-G
	Dynein, axonemal, heavy polypeptide 3	NM_017539.1	DNAH3
	E2F transcription factor 8	NM_024680.2	E2F8
	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	NM_002897.4	RBM51
	Collamin	NM_181789.2	COLM
	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NM_000903.2	NQO1
	Hect domain and RLD 6	NM_001165136.1	HERC6
	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	NM_002201.4	ISG20
	Arginyl-tRNA synthetase	NM_002887.3	RARS
	Hypothetical protein FLJ13305	NM_032180.2	FLJ13305
	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	NM_004155.4	SERPINF9
	Serine protease inhibitor, Kazal type 1	NM_003122.3	SPINK1
	Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	NM_005101.3	G1P2
	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	NM_001276.2	CHI3L1
	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	NM_003254.2	TIMP1
	Lysozyme (renal amyloidosis)	NM_000239.2	LYZ
	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1	NM_001081637.1	LILRB1
	Hypothetical protein LOC56755	NM_001131062.1	LOC56755
	Zinc finger, DHHC-type containing 11	NM_024786.2	ZDHHC11
	Micronubule-associated protein 2	NM_001039538.1	MAP2
	Ubiquitin specific protease 18	NM_017414.3	USP18
	Zinc finger protein 165	NM_003447.2	ZNF165
	Thioredoxin domain containing 9	NM_005783.3	TXNDC9
	Interferon-induced protein with tetrapeptide repeats 3	NM_001031683.2	IFIT3
	FK506 binding protein 5	NM_001145775.1	FKBP5
	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	NM_001018073.1	PKC2
	Interferon-induced protein with tetrapeptide repeats 1	NM_001548.3	IFIT1
	Chromosome 20 open reading frame 18	NM_006462.4	C20orf18
	Elongation factor RNA polymerase II-like 3	NM_025165.2	ELL3
	3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	NM_152740.2	HIBADH
	Zinc finger protein 277	NM_021994.2	ZNF277
	C-type lectin domain family 2, member B	NM_005127.2	CLEC2B
	CD276 antigen	NM_001024736.1	CD276
	Micronubule-associated protein 6	NM_033063.1	MAP6
	Lysosomal-associated membrane protein 3	NM_014398.3	LAMP3
	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	NM_007315.3	STAT1
	Prinase, polypeptide 2A, 58kDa	NM_000947.2	PRIM2A
	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	NM_005711.3	EDIL3
	TSPY-like 1	NM_003309.3	TSPYL1
	Cardiomyopathy associated 5	NM_153610.3	CMYA5
	Aminolevulinic acid, delta-, synthase 1	NM_000688.4	ALAS1
	Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	NM_032471.4	PKIB
	Fas (TNFRSF6) binding factor 1	NM_001080542.1	FBF1
	Breast cancer 2, early onset	NM_000059.3	BRC2
	Cysteine sulfinic acid decarboxylase	NM_015989.4	CSAD
	Erythropoietin receptor	NM_000121.2	EPOR
	La ribonucleoprotein domain family, member 6	NM_018357.2	LARP6
	Phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide	NM_002646.3	PIK3C2B
	RAB23, member RAS oncogene family	NM_016277.3	RAB23
	E2F transcription factor 7	NM_203394.2	E2F7
	2'-5'-Oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	NM_006187.2	OAS3
	Glycoprotein M6B	NM_001001994.1	GPM6B
	Hypothetical protein FLJ31951	NM_144726.1	FLJ31951
	Thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme	NM_013381.2	TRHDE
	Interferon-induced protein 44	NM_006417.4	IFI44
	ZND family zinc finger C	NM_001040653.2	ZNDC
	MICAL-like 2	NM_182924.3	MICAL-L2

Continue

Heat shock 70kDa protein 1B	NM_005346.4	HSPA1B
Hect domain and RLD 5	NM_016323.2	HERC5
Major histocompatibility complex, class I, B	NM_005514.6	HLA-B
Cancer-associated nucleoprotein	NM_001142703.1	CANP
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	NM_000890.3	KCNJ5
Hypothetical protein MGC47869	NM_175874.3	MGC47869
Major histocompatibility complex, class II, DR alpha	NM_019111.3	HLA-DRA

Down regulation

Gene name	Genbank ID	Common name
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	NM_004368.4	SERPINB6
Threonyl-tRNA synthetase	NM_152295.3	TARS
RecQ protein-like 5	NM_001003715.2	RECQL5
Insulin-like growth factor binding protein 1	NM_000596.2	IGFBP1
Thioredoxin interacting protein	NM_006472.3	TXNIP
Dehydrogenase reductase (SDR family) member 10	NM_016246.2	DHRS10
Connective tissue growth factor	NM_001901.2	CTGF
Glucose-6-phosphatase, catalytic (glycogen storage disease type I, von Gierke disease)	NM_000151.2	G6PC
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	NM_002089.3	CXCL2
Syntaxin binding protein 3	NM_007269.2	STXBP3
Chromosome 14 open reading frame 168	NM_031427.2	C14orf168
Scinderin // Full length insert cDNA clone Y144D08	NM_001112706.2	SCIN
Hypothetical protein MGC26979	NM_001142301.1	MGC26979
VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A, 33kDa	NM_003574.5	VAPA
Checkpoint suppressor 1	NM_001085471.1	CHES1
Dual specificity phosphatase 6	NM_001946.2	DUSP6
Epipalakin 1	NM_031308.1	EPPK1
Hypothetical protein FLJ90036	NM_001039127.3	FLJ90036
Hypothetical protein DKFZp547K1113	NM_198526.2	DKFZp547K1113
Znotin related factor 1	NM_001129887.1	ZRF1
Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like	NM_001144978.1	MTHFD2L
KIAA1984	NM_001039374.3	KIAA1984
Tyrosine 3-monooxygenase tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	NM_001135699.1	YWHAZ
ATPase type 13A5	NM_198505.2	ATP13A5
Inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	NM_002192.2	INHBA
Zinc finger protein 239	NM_001099282.1	ZNF239
Neuronal PAS domain protein 2	NM_002518.3	NPAS2
Glycosyltransferase-like 1B	NM_152312.3	GYLTL1B
Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	NM_000104.3	CYP1B1
CNKSR family member 3	NM_173515.2	CNKSR3
Zinc finger protein 44 (KOX 7)	NM_001164276.1	ZNF44
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	NM_022739.3	SMURF2
Chromosome 20 open reading frame 161	NM_001042632.1	C20orf161
Glutamate receptor, metabotropic 6	NM_000843.3	GRM6
Fibrillin 2 (congenital contractual arachnodactyly)	NM_001999.3	FBN2
Hypothetical protein LOC284677	NM_001134233.1	LOC284677
NUAK family, SNF1-like kinase, 1	NM_014840.2	NUAK1
Zinc finger protein 540	NM_152606.2	ZNF540
Zinc finger protein 42 (myeloid-specific retinoic acid-responsive)	NM_003422.2	ZNF42
Chromosome 6 open reading frame 146	NM_173563.1	C6orf146
Multimerin 2	NM_024756.2	MMRN2
Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	NM_001042424.2	WHSC1
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	NM_002832.2	PTPN7
Dual specificity phosphatase 1	NM_004417.3	DUSP1
Hypothetical protein FLJ30294	NM_144632.3	FLJ30294
Protein phosphatase methyltransferase-1	NM_016147.1	PME-1
Zinc finger protein 426	NM_024106.1	ZNF426
FERM domain containing 4A	NM_018027.3	FRMD4A
Hypothetical protein MGC4308	NM_001167924.1	MGC4308
Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	NM_001098484.2	SLC4A4
Secreted and transmembrane 1	NM_003004.2	SECTM1
Ubiquitin specific protease 15	NM_006313.1	USP15
Adrenergic, alpha-1A-, receptor	NM_000680.2	ADRA1A
Similar to bA508N22.1 (HSPC025)	NM_001131609.2	LOC340947
Synaptosomal-associated protein, 25kDa	NM_005081.2	SNAP

#### D. 考察

前章では、GSH 減少モデルラットが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ことを明らかにした。しかし、トログリタゾン誘導性肝障害を検出するには至っていない。本章では、キメラマウスを用いてトログリタゾン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、画期的なインスリン抵抗性Ⅱ型糖尿病治療薬として1997年に上市されたが、一部のヒトにおいて重篤な肝障害が報告され、2000年に市場から撤退した。前臨床試験においては、ラットにトログリタゾンを104週間連続経口投与（土日を除く週5回投与）しているが、肝障害を示唆する変化は認められていない（Watanabe et al., 1999）。さらに、動物モデルを用いた多くの検討でヒト特異的なトログリタゾン誘導性肝障害を再現する試みがなされているが、その障害性をほとんど再現できていない（Bedoucha et al., 2001; Jia et al., 2000; Watanabe et al., 2000）。本研究では、キメラマウスにトログリタゾンを2週間連続投与し、さらに $\gamma$ -GCSを阻害するBSOの同時投与を行った。その結果、トログリタゾンのみの投与によってAST、ALT、およびビリルビン値の上昇傾向が認

められた。しかし、BSOとトログリタゾンの同時投与では上昇傾向が認められなかった（Fig. 1 and Table 1）。BSOを投与したマウスおよびラットでは、薬物誘導性肝障害の増強が認められることが報告されている（Shimizu et al., 2009; Nishiya et al., 2008）。BSO投与群ではGST酵素活性の変動は認められず、基質であるGSH含量の減少が認められた（Fig. 5）ため、BSO投与群ではGSHによる解毒能が低下していたと考えられる。よって、トログリタゾン誘導性肝障害におけるGSHの関与は小さい可能性がある。一方、酸化ストレスを減弱させるSOD2の酵素活性は、BSO投与群で有意な上昇が認められている（Fig. 6A）。GSH含量低下による酸化ストレスの増大、あるいはBSOそのものを毒物と認識した結果SOD2が誘導され、BSOとトログリタゾン同時投与群では肝障害マーカーの上昇傾向が認められなくなった可能性が考えられる。また、トログリタゾンのみの投与によってGSH含量の増加が認められた（Fig. 14A）。トログリタゾン投与によって、GSH合成律速酵素のサブユニットであるGCSHの誘導は認められず（data not shown）、GST酵素活性の低下も認められていない（Fig. 5B）。したがって、GSH増加のメカニズムを明ら

かにするには更なる検討が必要である。いずれにしても、キメラマウスを用いることによってトログリタゾン投与による肝障害マーカーの上昇傾向が認められ、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強く示唆された。また、トログリタゾン投与 10 日目まででは全く肝障害が認められず、最終投与の 24 時間後で初めて肝障害マーカーの上昇傾向が認められたため、さらに長期間トログリタゾンを連続投与することにより、障害性が増強することが予想される。

当研究室では、キメラマウス肝に CYP や 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てきた (Kato et al., 2008)。よって本キメラマウスを用いることで、ヒト特異的なトログリタゾン誘導性肝障害を再現できると考えられた。しかし、トログリタゾン投与による肝障害マーカーの上昇は非投与群と比べて有意ではなく、障害性を明確に再現するには至らなかった。キメラマウスは 70%以上の肝実質細胞がヒト肝細胞に置換されているが、肝非実質細胞および免疫細胞などはマウス由来である。キメラマウス肝では、非実質細胞であるマウス星細胞が、通常のヒト肝と同

様にヒト肝実質細胞と類洞との間のディッセ腔に隣接して存在している (Yoshizato and Tateno, 2009)。薬物誘導性肝障害は、大別すると中毒性と特異体質性から成り、特異体質性はさらに代謝性特異体質によるものとアレルギー性特異体質によるものに分類できる。厚生労働省では、トログリタゾンを代謝性特異体質によるものに分類しているが、アレルギー性機序で惹起する場合もあることに留意することとしている。アレルギー性特異体質による肝障害は薬物、またはその反応性代謝物がハプテンとなり、肝細胞の種々の構成成分と結合して免疫原性を獲得することによって生じるアレルギー反応に起因する。アレルギー性特異体質による肝障害には各種サイトカインを介した肝組織内の炎症および免疫反応が関与すると言われている (Sobue et al., 2001)。トログリタゾンにおいては、ヒト肝がん由来細胞およびサイトカインを産生可能なヒト単球由来細胞を共培養することによって、それぞれの単培養と比較して細胞障害性が増強することが報告されている (Edling et al., 2009)。本キメラマウス肝において、サイトカイン産生細胞はマウス由来であり、この種差がトログリタゾン誘導性肝障害の再現性に寄与している可能性がある。

臨床において、トログリタゾン誘導性



肝障害の発現には性差が存在し、女性で発現頻度が高いことが報告されている (Graham et al., 2003)。本研究では、この臨床データをもとに雌性のキメラマウスを用いている。しかし、本キメラマウスに投与したヒト肝実質細胞は男性由来であるため、女性由来の肝細胞を用いることが、トログリタゾン誘導性肝障害を明確に再現するために必要である可能性も否定できない。

ヒト CYP2C8 および CYP3A4 の発現はトログリタゾン投与で有意に増加し (Figs. 2 and 3)、ヒト CYP3A4 に関しては過去の報告と一致した (Koup et al., 1998; Sahi et al., 2000)。ヒト CYP2C8 および CYP3A4 は、ともに核内受容体であるプレグナン X 受容体を介して誘導されるため、同様の誘導が認められたと考えられる。ヒト UGT1A1 mRNA 発現量は、トログリタゾンによって有意に増加した (Fig. 4A)。ヒト UGT1A1 は酸化ストレスに応答した Nrf2 によって誘導されることが報告されている (Yueh and Tukey, 2007)。今回、トログリタゾン投与によって酸化ストレスマーカーであるプロテインカルボニルの増加が認められた (Fig. 6B) ため、トログリタゾン投与によって酸化ストレスが誘導され、Nrf2 を介して UGT1A1 が誘導されたと考えられる。また本研究では、BSO のみ、および BSO とトログリタゾン同

時投与によって、ヒト CYP2C8、CYP3A4、UGT1A1 の発現、およびプロテインカルボニル含量がトログリタゾンのみの投与と同様に増加した (Figs. 2 and 3)。BSO は GSH 含量を低下させるため、組織内の酸化ストレスが増大する。このため、プロテインカルボニル、およびヒト UGT1A1 の発現が増加し、酸化ストレス増大の代償反応として、解毒を担うためにヒト CYP2C8 および CYP3A4 の発現も増加したと考えられる。

トログリタゾン投与による薬物動態関連因子および酸化ストレスへの影響の検討では、トログリタゾン誘導性肝障害を惹起する因子を明らかにするまでには至らなかったため、DNA マイクロアレイによって網羅的に遺伝子発現変動を解析した。トログリタゾン投与により 2 倍以上および 1/2 以下に発現量が変動する遺伝子を絞り込んだ結果、2 倍以上に増加した遺伝子は 73 個、1/2 以下に減少した遺伝子は 55 個であった (Table 2)。酸化ストレス、炎症反応、リン酸化、および細胞の分化、増殖などの様々な生体反応に関連する遺伝子が発現変動し、その中で肝臓の病態に直接的に関係するヒト SAA1 および SAA2 に注目した。SAA1 および SAA2 は組織に沈着するアミロイド A タンパク質の血中前駆体であり、炎症急性期に肝臓で合成、分泌され、炎症性サイトカインによって調

節されている。アミロイド肝は肝臓中にアミロイドが沈着する病態であり、高頻度に肝腫大を惹起する。さらに、多くの場合血清 ALP 値が軽度の高値を示し、ビリルビン値の上昇が認められることもある。ヒト SAA1 および SAA2 mRNA 発現量を測定した結果、トログリタゾン投与による両遺伝子発現量の増加傾向が認められた。しかし、BSO および BSO とトログリタゾン同時投与ではさらに強い増加傾向が認められた (Fig. 7)。肝障害マーカーの上昇傾向は BSO とトログリタゾン同時投与では認められていないため、SAA のトログリタゾン誘導性肝障害に対する寄与は小さいと考えられる。

DNA マイクロアレイは 1 回の実験で膨大な量の遺伝子発現データを得ることができる画期的な技術である。しかし最大の欠点は、DNA マイクロアレイのみでは結果の妥当性を評価できないことであると言われている。今回用いた DNA マイクロアレイはプローブ配列が 25 塩基であり、目的遺伝子との間の特異性が低いこと、プローブに相補的な目的遺伝子が確実にプローブと結合しているかが明確でないことなどが問題点として挙げられる。このため、DNA マイクロアレイの結果を、他の方法 (Real-time RT-PCR および Northern blot など) で実験した結果と照らし合わせる必要がある。

Real-time RT-PCR を行った結果、トログリタゾン投与によってヒト CYP2C8 および CYP3A4 mRNA 発現量の増加などが認められたが、DNA マイクロアレイの結果ではこれら遺伝子の発現変動は認められていない (Table 2)。よって、DNA マイクロアレイの結果から SAA に注目したが、その他の重要な遺伝子の発現が大きく変動している可能性がある。また、解析の結果変動が認められた計 128 個の遺伝子中に、未知の重要な機能を持った遺伝子が存在することも考えられる。トログリタゾン誘導性肝障害を惹起する因子を明らかにするためには更なる検討が必要である。

トログリタゾンは、実験動物を用いた検討においてその障害性をほとんど再現できていない。本キメラマウスは最高で 95% の肝実質細胞をヒト肝細胞に置換可能である画期的なマウスである一方、肝実質細胞以外はマウス由来であり、種差を完全に克服することはできていない。しかし、トログリタゾン投与によっては ALT 値を含む肝障害マーカーの上昇傾向が認められ (Fig. 1)、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。よって本研究は、ヒト特異的なトログリタゾン誘導性肝障害の発現メカニズムを解明し、医薬品開発に貢献できる情報を提供するものと考えられる。

## E. 結論

本研究において、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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当無し

### 2. 学会発表

該当無し

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

## 参考文献

- Bedoucha M, Atzpodien E, and Boelsterli UA (2001) Diabetic KKA<sup>y</sup> mice exhibit increased hepatic PPAR $\gamma$ 1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J Hepatol* **35**: 17-23.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Edling Y, Sivertsson LK, Butura A, Ingelman-Sundberg M, and Ek M (2009) Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. *Toxicol In Vitro* **23**: 1387-1395.
- Graham DJ, Green L, Senior JR, and Nourjah P (2003) Troglitazone-induced liver failure: a case study. *Am J Med* **114**: 299-306.
- Habig WH, Pabst MJ, and Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**: 7130-7139.
- Honma W, Shimada M, Sasano H, Ozawa S, Miyata M, Nagata K, Ikeda T, and Yamazoe Y (2002) Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the

- main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab Dispos* **30**: 944-949.
- Izukawa T, Nakajima M, Fujiwara R, Yamanaka H, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Ikushiro S, Sakaki T, and Yokoi T (2009) Quantitative analysis of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A and UGT2B expression levels in human livers. *Drug Metab Dispos* **37**: 1759-1768.
- Jia DM, Tabaru A, Akiyama T, Abe S, and Otsuki M (2000) Troglitazone prevents fatty changes of the liver in obese diabetic rats. *J Gastroenterol Hepatol* **15**: 1183-1191.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K, and Yokoi T (2004) Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* **32**: 1402-1410.
- Katoh M, Tateno C, Yoshizato K, and Yokoi T (2008) Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology* **246**: 9-17.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA, and Guzelian PS (1995) Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**: 415-421.
- Koup JR, Anderson GD, and Loi CM (1998) Effect of troglitazone on urinary excretion of 6 $\beta$ -hydroxycortisol. *J Clin Pharmacol* **38**: 815-818.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Nishiya T, Mori K, Hattori C, Kai K, Kataoka H, Masubuchi N, Jindo T, and Manabe S (2008) The crucial protective role of glutathione against tienilic acid hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**: 280-291.
- Sahi J, Hamilton G, Sinz M, Barros S, Huang SM, Lesko LJ, and LeCluyse EL (2000) Effect of troglitazone on cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Xenobiotica* **30**: 273-284.
- Shimizu S, Atsumi R, Itokawa K, Iwasaki M, Aoki T, Ono C, Izumi T, Sudo K, and Okazaki O (2009) Metabolism-dependent hepatotoxicity of amodiaquine in glutathione-depleted mice. *Arch Toxicol* **83**: 701-707.
- Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H, Joh T, Itoh M, and Kakumu S (2001) Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* **36**: 544-551.
- Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, and Yoshizato K (2004) Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* **165**: 901-912.