

る生薬である。本研究では、シンギの基原植物及びその遺伝的多様性を確認するため、シンギの基原植物とされる *Hedysarum polybotrys* 標準植物試料並びにシンギ市場品につき核 DNA LEAFY 遺伝子の 2<sup>nd</sup> intron 領域の配列解析を行った。また、昨年度よりメジカルピン (Med) を指標とした TLC による確認試験法についても検討しているが、本年度は、同化合物がファイトアレキシンであることからシンギの個体内/間での偏在について検討した。展開溶媒は、ヘキサン/2-ブタノン/ギ酸混液 (60:40:1) を使用。10cm 展開し、薄層板を風乾した後、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧し、105℃で 3 分間加熱して検出した。

#### B-4 半夏及び天南星

ハンゲ及びテンナンショウについて、シュウ酸カルシウムの集晶の有無を特徴的な要素として、鏡検による鑑別が可能かどうか検討した。ハンゲは、原則として研究班で共同研究を行っている会社 5 社において各社毎に 100 粒、テンナンショウは 50 粒づつ使用した。

#### B-5 地竜

ジリュウは、中国産 8 検体、タイ産 14 検体を使用し、ジリュウ以外の動物生薬との TLC による鑑別法について検討した。TLC 条件 A: 酢酸エチル/アセトン/水/酢酸 (100) 混液 (10:6:3:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、風乾する。これに 4-メトキシベンズアルデヒド 1 mL にエタノール (99.5) に加えて 20 mL とした液を均等に噴霧し、希硫酸を噴霧した後、105℃で 5 分間加熱する。TLC 条件 B: -プロパノール/酢酸エチル/水/酢酸 (100) 混液 (4:4:2:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、風乾する。これにニンヒドリン試液を均等に噴霧し、105℃で 5 分間加熱する。

#### B-6. 地黄

地黄はアカヤジオウ (*Rhemannia glutinosa* var *purpurea*) またはカイケイジオウ (*R. glutinosa*) を基原とする生薬である。韓国産および国内産地黄はアカヤジオウを、中国産地黄はカイケイジオウをそれぞれ基原とするとされている。本研究では、基原の明確な地黄を参照として、核 ITS 領域及び、ミトコンドリア trnK 領域についてマーカーを検討、市場品の基原植物種について、遺伝子レベルで鑑別を検討した。

#### B-7. 蒼朮、白朮

蒼朮は 49 検体、白朮は 40 検体を使用した。これらの生薬はまず PCR-RFLP 法を用いて *A. lancea*,

*A. chinensis* および白朮を鑑別し、さらに白朮については増幅産物の塩基配列を解読して *A. japonica*, *A. ovata* の鑑別を実施した。これらの生薬を用い、メタノールエキスを調製し、エキス濃度 100mg/mL で、マクロファージ由来の細胞株の LPS 処理による NO 産生の誘導に対する抑制作用を調べた。

〈西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究〉

#### B-8 ブラックコホシユを材料とした西洋ハーブの品質評価

一般用医薬品として欧州に流通するブラックコホシユ製品は現地の薬局で購入した。我が国で健康食品として流通するブラックコホシユ製品をインターネット経由で購入した。カプセルの内容物あるいは錠剤を乳鉢乳棒で摩砕し、メタノール/水混液 (3:1) を加え、水浴上で超音波処理することにより抽出し、メンブランフィルターでろ過し、得られたろ液を試料溶液とし、USP 改良 LC-ELSD 分析法を用いて成分分析を行った。ESI-LC-MS/MS 分析における MS 部は ThermoFisher Scientific LTQ Orbitrap XL を、LC 部は Shimadzu UFLC を用い、カラム Thermo Scientific Hypersil-GOLD (1.9 μm, 2.1 x 100mm), 移動相 A = 0.1% 酢酸/水, B = 0.1% 酢酸/アセトニトリル, B = 5 -70% (30 min) -100% (35 min), 移動相流量 0.2 mL/min の条件で分析を行った。多変量解析には PCA-X 及び OPLS/DA モデルを使用した。

#### B-9 生薬製剤承認基準案の検討

単味生薬の有効性及び安全性に関するエビデンスの収集方針を議論するため、OTC 医薬品協会の生薬製品委員会と薬制委員会の協力のもと、生薬製剤承認基準案検討班会議を 4 回開催した。生薬製剤承認基準案を作成するにあたり、基準案検討の優先対象とすべき生薬を選抜し、それぞれの承認基準案策定の難易度を推定し、また、承認基準案の根拠となるエビデンスを取得するため、検討班会議参画者で分担して、主な生薬の有効性及び安全性に関する文献を検索した。エビデンス収集の報告書式として、Microsoft Excel で作成した枠組みを事務局が作成し、文献検索担当者に配布した。文献検索に使用したデータベースとして、SciFinder (American Chemical Society), J Dream II (独立行政法人科学技術振興機構), 医中誌 web ver. 4 (医学中央雑誌刊行会) 及び Pub Med (米国立生物工学情報センター) を主に利用し、また、検討班員が独自にアクセスできるデータベースを適宜活用した。

〈抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究〉

昨年度に引き続き、麻黄湯及び麻黄を対象として研究を実施した。まず、昨年度の成果をもとに、抗腫瘍活性に関与が示唆されたキナーゼに注目し、培養細胞を用いたアッセイで麻黄のキナーゼ阻害作用を検証した。また、新規な試験法として、麻黄を用いマイクロRNA (miRNA) の発現変動について解析した。さらに、麻黄の成分を分画し、本研究で確立した生物学的評価法を利用して活性を担っている化合物の同定を試みた。

#### B-10. 麻黄をモデル生薬とした評価法の開発

##### B-10.1 麻黄のキナーゼ X 阻害作用の解析

ヒト腎臓癌由来 Caki-1 細胞を用麻黄エキス添加 DMEM 培地で 24 時間インキュベートした後、細胞溶解液でタンパク質を抽出した。リン酸化されたキナーゼ X の基質タンパク質に対する抗体を用い、ウェスタンブロットで検出した。

##### B-10.2 miRNA の発現解析

ヒト肝臓癌由来 HuH-7 細胞を麻黄エキス添加 DMEM 培地で 24 時間インキュベートした後、RNA 精製用スピンカラムを用い miRNA を抽出した。未処理の HuH-7 細胞から得た miRNA をコントロールとして、ヒトで発現が確認されている 1400 種の miRNA が固定化された miRNA アレイを用いて解析した。

#### B-11 麻黄由来の活性成分の探索と評価

##### B-11.1 細胞運動能の測定

MDA-MB-231 細胞を各エキス含有 DMEM 培地に懸濁し、トランスウエルに添加し、24 時間培養した。下部ウエルに移動した細胞数を位相差顕微鏡下でカウントして運動能とした。

##### B-11.2 細胞毒性の測定

MDA-MB-231 細胞を各エキス含有 DMEM 培地に懸濁し、24 時間培養した。生細胞数を BrdU の取り込み量を ELISA キットで測定し、コントロールの取り込み量を 100%として換算した。

##### B-11.3. c-MET のチロシンリン酸化の解析

MDA-MB-231 細胞に 50 ng/ml HGF とサンプルを含有した DMEM 培地を添加して 5 分間インキュベートした後、細胞溶解液で溶解した。抗 c-Met 抗体で免疫沈降し、抗チロシンリン酸化抗体あるいは抗 c-Met 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。また、抗リン酸化 Akt 抗体、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体、ERK 抗体及び抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。

##### B-11.4 発光基質を用いたインビトロキナーゼ阻害活性の測定

発光基質による市販インビトロキナーゼ測定キットを用い、化合物 A の阻害活性を測定した。

B-11.5 キナーゼ阻害活性の測定  
50 種の組換えキナーゼによる合成ペプチド基質のリン酸化活性を LabChip3000 で測定した。この各反応系に 1  $\mu$ M の化合物 A を添加し、阻害活性を測定した。

#### 〈倫理面の配慮〉

本研究で用いているヒト癌由来細胞株 HuH7 細胞および MDA-MB-231 細胞は、研究用に頒布されている細胞株で、倫理的な問題は無い。また、その他のヒト由来材料や実験動物を用いた実験は実施していない。

#### C. 研究結果

##### 〈生薬の品質評価手法と標準化に関する研究〉

###### C-1. 党参

これまでに *Codonopsis* 属植物 2 種 2 変種約 115 検体の核 rDNA の ITS 領域の塩基配列を決定し、各種各遺伝子型を区別するマーカー配列を見出し、これを生薬「党参」の中国、香港、韓国及び日本市場品約 120 検体に適応し、ほとんどのものの基原を明らかにした。市場品が増えるごとに、植物材料では見られない塩基配列を持った遺伝子型が存在したが、6 箇所の塩基配列を調べることで、基原が推定できた。

###### C-2. 赤芍

*Paeonia* 属植物の核 rDNA の ITS 領域の長さは、ITS1 で 267 bp, 5.8S rRNA 遺伝子領域で 163 bp, ITS2 領域で 223 bp であった。これまで Sang T. らにより、*P. lactiflora* を識別するための ITS 領域の塩基配列報告と比較した結果、本研究で収集した赤芍 18 検体はすべて *P. lactiflora* 基原であった。*P. lactiflora* は種内多型が顕著であり、全検体にヘテロ型の塩基を示す箇所が認められ、交配が行われてきたことが示唆された。これまでの遺伝子解析結果に基づき多重配列アラインメント Clustal W法を用いた案内木 (系統樹) を描いた結果、*P. lactiflora* は遺伝的に南方系 (白芍系) と北方系 (赤芍系) に二大別されることが判明している。2 グループの区別には上流から 69 番目、458 番目及び 523 番目の塩基が重要であり、この 3 箇所の塩基に着目すると、南方系 (白芍系) は TAT の配列を持つのに対し、北方系 (赤芍系) はヘテロ型の Y (C/T) M (A/C) Y を示した。赤芍 18 検体はすべて後者の配列を示し、北方系 (赤芍系) であった。

###### C-3. 晋耆

オウギ及びシングの LEAFY 遺伝子の 2<sup>nd</sup> intron 領域の長さは、オウギが 411 bp、シングが 842 bp (genotype A の場合) と大きな違いを示し、多重整列解析も困難な程その内部配列には大きな違いが見られ、オウギとの区別は容易であった。

甘肅省で採集された *Hedysarum polybotrys* 標準植物試料より見出された遺伝子型は、genotypes A-D の 4 種に大別され、特に genotypes A-C の 3 タイプが頻出した。また、同じ遺伝子型のホモ体は、約半数あり、その他は、全てヘテロ体であった。また、市場品からは、genotypes A-C, E-I の 9 つに大別される遺伝子型が得られ、その主体は、標準植物試料と同じく、A-C が 80% 以上を占めたが、その他に 5 つの遺伝子型が見出された。ヘテロ型の配列を示した試料は、29 検体中 12 検体であった。*H. polybotrys* 標準植物試料から得られた遺伝子型も含めた全遺伝子型での比較では、前述の通り、genotype B が全長 161 bp だった他、genotype F も 148 bp と、他の遺伝子型との違いを示した。

次いで、Med を指標とする TLC の確認試験について検討したところ、個体により、切断したいずれの試料からも良好に検出される検体が見られる一方、いずれの切断試料からもほとんど検出されない検体も認められた。また、同一個体内においても本化合物は極めて偏在していることが確認された。そこで、確認試験として、他の候補化合物を検討したところ、UV 365nm を照射することにより検出される蛍光物質が、いずれの個体や切断部位からも良好に安定的に検出されることが判明した。さらに、本物質は、オウギから検出しないことが確認された。

#### C-4 半夏及び天南星

ほとんどのハンゲではシュウ酸カルシウムの集晶は認められないが、一部集晶を認めた個体が存在した。一方、ほとんどのテンナンショウではシュウ酸カルシウムの集晶を認めたが、一部集晶を認めない個体が存在した。

#### C-5. 地竜

条件 A の結果 (Rf 値 0.4 付近に青色のスポットを認める) と条件 B の結果 (Rf 値 0.1 付近, 0.15 付近, 0.3 付近, 0.4 付近に 4 個の赤紫色のスポットを認める) を共に確認することにより、ジリュウの確認並びに他の動物由来生薬との鑑別が可能であること判明した。

#### C-6. 地黄

アカヤジオウ、カイケイジオウ間で、ITS 領域の塩基配列に差がなかった。一方、trnK 領域では

2 箇所塩基置換が検出された。trnK 領域の上記 2 つのサイトでの塩基置換を鑑別マーカーとし地黄の基原種の鑑別を試みたところ、中国産地黄 28 検体において、8 検体がカイケイジオウを基原とするものと判定された。一方で、アカヤジオウタイプの塩基配列を示すものは全く存在していなかった。さらに 6 検体が、両者のいずれとも異なる配列タイプを示した。

#### C-7. 蒼朮, 白朮

朮類生薬のうち交雑種を除く蒼朮 39 検体 (*A. lancea* 14 検体; *A. chinensis* 25 検体) および白朮 43 検体 (*A. ovata* 8 検体, *A. japonica* 35 検体=蒼朮として入手し, *A. japonica* と同定された 4 検体を含む) からメタノールエキスを調製し、その NO 産生抑制作用 (抗炎症作用) を RAW264.7 細胞を用いて検討した。その結果、阻害率は白朮で 20±12%、蒼朮は 14±11% となり、白朮が有意に高い活性を示した。データを基原種別にして比較したところ、*A. japonica* と *A. chinensis* を基原とするものでは *A. ovata* と *A. lancea* を基原とするものより NO 産生抑制活性は有意に高くなり、*A. japonica* と *A. chinensis* 間、*A. ovata* と *A. lancea* 間では差がないことが明らかになった。

<西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究>

#### C-8. 西洋ハーブの品質評価

##### C-8.1 ブラックコホシユを材料とした西洋ハーブの品質評価

USP 法を改良し、これまで行って来た従来法よりより良好なピーク形状が得られる条件を確立した。本条件で LC-ELSD 分析を行った結果、医薬品は 6 製品全種において Actein 及び 27-Deoxyactein が検出され、全体のピークプロファイルも互いに酷似していた。一方、健康食品 21 種のうち、Actein 及び 27-Deoxyactein が検出された製品は 13 種だけであり、これら指標成分が検出されない 8 製品のうち、4 製品では全体的にピークがほとんど検出されず、4 製品では全体のピークプロファイルが医薬品のそれと著しく異なっていた。

また、1 日最大摂取量中の Actein 及び 27-Deoxyactein の含量を算出し、その合計量と求めたところ、医薬品 6 製品は平均値±50%の範囲 (0.07~0.19mg) に収まった。一方、健康食品の場合、医薬品と同程度の含量の製品もあるが、医薬品の 100 倍以上 (21.84mg) の含量の製品も存在した。

さらに、一般用医薬品及び健康食品として流通するブラックコホシユ製品を、ESI-LC-MS/MS によ

って測定し、負イオン検出データについて多変量解析による主成分分析を行った。正イオン検出データは医薬品に含まれる界面活性剤の影響で一部領域におけるピークの検出が困難であり、多変量解析に持ち込むことができなかった。解析には PCA-X 及び OPLS/DA モデルを使用した。いずれのモデルにおけるスコアプロットでも、6 種類の医薬品はすべて中央に集中した。PCA-X モデルにおけるスコアプロットでは、健康食品のうち BC-1, 5, 18, 20, 21 の 5 製品に他の製品との差異が見られ、OPLS/DA モデルにおけるスコアプロットでは BC-1, 4, 5, 18, 19, 20, 21 の 7 製品に差異が見られた。一方、Actein のピークは酢酸付加 ( $[M-H+CH_3COOH]^-$ ) に相当する  $m/z$  735 イオンとして保持時間 22.0 分に観察された。 $m/z$  735 の抽出イオンクロマトグラムにおいて、医薬品 6 種は 4 本の顕著なピークを示した。上記のスコアプロットにおいて他の製品と差異が見られた製品のうち、BC-1, 4, 5 は医薬品 6 種と共通の 4 本の特徴的なピークが観察された。

#### C-8.2 その他の西洋ハーブの品質評価

ブラックコホシュ以外に、3 品目の西洋ハーブについて良好な研究成果を得ているが、承認申請との関係において現時点では詳細の公表を見送ることとする。そのうち 1 つについては、欧州で一般用医薬品として流通する 8 製品、日本及び米国で健康食品として流通する 19 製品について HPLC による成分プロファイル分析及び指標成分の定量を行い、医薬品については高度に一定品質が確保されていることを確認し、一方で、健康食品については 1 日当たりの推奨量中の指標成分含量が 100 倍以上の振れ幅でばらついていることを確認した。2 つ目の西洋ハーブも欧州で一般用医薬品として流通している品目であるが、日本及び米国で健康食品として流通する 11 製品を入手し、TLC 及び GC により成分プロファイル分析及び指標成分の定量を行い、1 製品を除き、成分プロファイルは高度に一致するものの、指標成分含量に 10 倍近くのばらつきを観察した。3 つ目は、欧州で一般用医薬品として流通する製品の原料エキス 15 ロットについて、TLC 及び HPLC による成分プロファイル分析を行い、高度に一定品質が確保されていることを確認すると共に、承認書等に規定されていない 2 成分について同定した。

#### C-9. 生薬製剤承認基準案の検討

平成 22 年度分担分の 11 生薬の調査結果は、平成 23 年 7 月に「単味生薬の有効性及び安全性を保証するエビデンスに関する文献情報 (I)」として合計 1,146 ページからなる二分冊の冊子を作成した。

平成 23 年度分担分の 20 生薬の調査結果及び平成 22 年度分担分からの追補は、平成 24 年 3 月に「単味生薬の有効性及び安全性を保証するエビデンスに関する文献情報 (II)」として合計 1,269 ページからなる二分冊の冊子を作成した。報告書式は統一し、一般的情報としてデータベース通し番号、生薬別通し番号、文献タイトル (原文)、文献タイトル (和文)、著者、筆頭著者、筆頭著者所属、雑誌情報、記載言語、研究種別 (臨床試験、薬理実験、成分研究及び分析研究)、Abstract、特記事項・備考を集めた。「単味生薬の有効性及び安全性を保証するエビデンスに関する文献情報 (II)」で取り扱った生薬は以下の通りである。オウバク、オウレン、カゴソウ、キキョウ、木クレオソート、ケツメイシ、ゲンノシヨウコ、サフラン、サンシシ、シャゼンソウ、ジュウヤク、センブリ、ソウハクヒ、チンピ、トウガラシ、トウキ、マクリ、モクツウ、ユウタン、ヨクイニン。これらの生薬の中で、特に、オウバク、木クレオソート、サルファン、ジュウヤク、ヨクイニンに臨床報告があることが判明した。

<抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究>

#### C-10. 麻黄をモデル生薬とした評価法の開発

##### C-10.1 培養細胞を用いたアッセイによる麻黄のキナーゼ阻害作用

昨年度行ったインビトロキナーゼ測定法で見出された麻黄によって阻害され得るキナーゼのうち、抗腫瘍活性に関与が示唆されたキナーゼ X (特許申請準備中につき未掲載) に着目した。ヒト腎臓癌由来 Caki-1 細胞の培養系に麻黄を添加し、6 時間培養した後、キナーゼ X の基質タンパク質のリン酸化をウェスタンブロットで検出した結果、麻黄の添加濃度依存的にリン酸化が阻害されていることが明らかとなった。

##### C-10.2 麻黄による miRNA の発現変動の解析

近年、RNA の新しいカテゴリーとして見出された miRNA が、様々な遺伝子の発現制御に関与していることが明らかになりつつある。miRNA の異常は、様々な疾患を引き起こすが、癌はそのひとつである。また、miRNA の発現は、様々な低分子化合物によって影響されることも明らかになりつつある。従って、麻黄の成分が miRNA の発現を介して、癌の増殖や転移を抑制する可能性が示唆される。本研究では、ヒト肝臓癌由来 HuH-7 細胞増殖が麻黄によって抑制される分子機構のひとつとして、miRNA の発現の関与の可能性について検討した。麻黄エキスで処理した HuH-7 細胞の

miRNA について miRNA アレイを用いて解析した結果、2 倍以上発現が上昇している 6 種の miRNA が見出された。このうち、hsa-miR-16, hsa-miR-22, hsa-miR-192 については、発現上昇により癌の増殖や転移を抑制することが明らかとなった。

#### C-11. 麻黄由来の活性成分の探索と評価

これまでの検討から、局方で定量規格が設定されているエフェドリン類は、抗腫瘍活性を持たないことが判明している。本研究では、麻黄の成分を分画し、本研究で確立した生物学的評価法を利用して活性成分の同定を試みた。その結果、活性化合物を単離し、構造を決定した。このうち、活性成分と考えられる化合物のひとつを突き止めた（化合物 A：特許申請準備中につき未掲載）現在、これ以外にも活性を担っている化合物の存在が示唆されており、詳細かつ網羅的な検証を進めている。

##### C-11.1 細胞運動抑制能

化合物 A と構造類縁体 3 種（化合物 B, C, 及び D）各 5  $\mu$ g/mL について、ヒト乳癌由来 MDA-MB-231 細胞を用いたトランスウエルアッセイで HGF によって誘導される細胞運動に対する効果を解析した。その結果、化合物 A, B, C が有意に運動能を抑制した。次に、これらの化合物の細胞毒性について調べた結果、化合物 C は有意に細胞毒性を示したが、他の化合物は細胞毒性を示さなかった。従って、化合物 C による細胞運動の抑制効果は、細胞毒性の影響によることが示唆された。化合物 A, B は細胞毒性を示さずに、細胞運動を特異的に抑制したが、その抑制効果は、化合物 A が化合物 B の約 6 倍強いことから、構造類縁体 4 種類のうち、化合物 A が最も強い運動能抑制活性を有すること判明した。さらに、化合物 A の細胞運動に対する効果を詳細に解析した結果、化合物 A の濃度依存的に運動が抑制され、その IC<sub>50</sub> 値が 1.7  $\mu$ M であることが明らかとなった。

##### C-11.2 c-Met のリン酸化阻害作用

化合物 A と構造類縁体 3 種（化合物 B, C 及び D）について、HGF によって誘導される c-Met のチロシンリン酸化に対する効果を検討した。各化合物で処理した MDA-MB-231 細胞について c-Met のリン酸化をウェスタンブロットで解析した結果、化合物 A のみがリン酸化を阻害した。次に、化合物 A につき、c-Met とその下流シグナルについて詳細な解析を行った結果、化合物 A の濃度依存的に c-Met 及びその下流の Akt のリン酸化が抑制された。一方、ERK のリン酸化は影響を受けなかった。

#### D. 考察

<生薬の品質評価手法と標準化に関する研究>

##### D-1. 党参

党参では、甘粛省産及び貴州省産の市場品（12 検体）は *C. pilosula* であり、河南省産のもののみ *C. tangshen* であった。一方、香港市場品には *C. pilosula* var. *modesta* に由来する太い根の党参が見られ、遺伝子型は均一であった。

*C. tangshen* に由来する党参の中国市場での流通は大変少なく、湖北省や重慶市に偏っていた。日本では党参の多くを甘粛省や貴州省（貴州省では種子を甘粛省から購入）から輸入するため、その基原は *C. pilosula* であった。わずかに河南省産のものだけが *C. tangshen* であった。

香港市場では根の太い党参が上品として扱われる。根の太い党参の基原は一般に *C. pilosula* var. *modesta* のタイプであった。しかし、同タイプであっても根の細いもの、*C. pilosula* であると考えられたものでも根の太いものがあり、形態と遺伝子型との不一致も認められた。栽培法により根が太くできるのかどうかは、今後の検討課題である。

##### D-2. 赤芍

本研究で収集した赤芍 18 検体はすべて *P. lactiflora* 基原であり、69 番目、458 番目及び 523 番目の塩基が YMY を示したことから、北方系（赤芍系）であると結論した。日本市場には南方系すなわち、安徽省、四川省及び浙江省の芍薬が輸入されるため、北方系芍薬の流通がほとんどないことが確認された。

##### D-3. 晋耆

シンの主産地である甘粛省で採集した *Hedysarum polybotrys* の主たる遺伝子型 (genotypes A-C) と委託元企業より提供を受けたシン市場品の主な遺伝子型が一致した。また、核 rDNA ITS 領域及び葉緑体 DNA *matK* 領域を対象とした解析でも同様の結果が得られ、かつ、同属の近縁植物とは異なる遺伝子型を有している事が確認されていることから、現在、市場に流通しているシンの基原植物は、*H. polybotrys* のみであると判断して良いと考えられた。一方で、*H. polybotrys* 標準植物試料の ITS 配列には、9 箇所の種内変異が確認され、本研究の LEAFY 領域の解析結果と同様、同植物の遺伝的多様性は比較的広い事が推察された。

シンは、近年、栽培化が進んでいるとの指摘がなされていることから、その様子が遺伝子型の出現パターンから推定出来ないかと考えたが、明かな結果が得られなかった。

今回の研究結果からシングルコピー遺伝子であ

っても 200 bp 程度であれば、PCR 増幅が可能な生薬があることが明らかとなった。遺伝子情報を利用する生薬の純度試験への利用の観点からは、偽陽性の危険が否定出来ない多コピー遺伝子に代わる利用候補遺伝子の一つになるのではと期待される。

Med を指標とした確認試験では、同成分の植物個体内での分布のばらつきから、不適切であることが明らかになった。一方、別な蛍光成分は、全検体の全切断試料から極めて安定して検出された。今後、本成分を単離、同定し、構造決定する必要が考えられ、同作業を継続中である。

#### D-4. 半夏及び天南星

シュウ酸カルシウム集晶の有無においてはハンゲ・テンナンショウ双方において安定しない形質と考えられた。テンナンショウについては、シュウ酸カルシウム集晶が認められない種があることがすでに報告されている。報告にある *Arisaema pedatisecta* は本来 *Pinellia* 属植物に帰属すべき植物であるため、今後は天南星の基原植物として扱わないことになっているが同様に報告にある *A. amurense* は *Arisaema* 属であることに間違いなく、検討を要する。

#### D-5. 地竜

ジリュウは解熱生薬として、重要性が高いものの、これまで適切な確認試験法が規定されていなかったことから、今後、本手法についてバリデーションをとり、公定法への応用を検討する必要性が高い。

#### D-6. 地黄

中国産ジオウで得られた結果がアカヤジオウまたはカイケイジオウの種内変異によるものか、これらの生薬の基原植物がアカヤジオウ、カイケイジオウ以外の植物によるものかは明らかではない。また、その他の 14 検体では、mixed nucleotide 型の配列であり、これらの原因も不明であり、引き続き検討が必要である。

#### D-7. 蒼朮、白朮

白朮と蒼朮の比較において白朮の方が高い活性が得られたのは、たまたま白朮として用いたサンプルに *A. japonica* を基原とするものが多量に由来する。従って、NO 産生抑制活性は、蒼朮と白朮という生薬で区別されるべきでなく、基原種が重要であることが明らかとなった。

<西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究>

#### D-8. ブラックコホシユを材料とした西洋ハーブ

の品質評価

指標成分である Actein 及び 27-Deoxyactein を明確に分離できる分析法の開発に成功し、改めて医薬品及び健康食品におけるこれら指標成分の定量的成分分析を行ったところ、6 種類の医薬品が天然物由来製品として十分に許容できる範囲 (0.07~0.19mg, 平均値±50%) に収まっていることと対照的に、健康食品では 100 倍以上のばらつき (0.12~21.84mg) が観察された。また、E LSD-LC による検出限界を下回る含量の製品が 21 種中に 8 種存在し、ブラックコホシユ健康食品では、品質のばらつきが非常に大きいことが判明した。また、製剤上のばらつきも含めて考慮すると、ブラックコホシユのような西洋ハーブは積極的に一般用医薬品として流通させた方が、消費者の利益になるものと考えられた。

ESI-LC-MS/MS による主成分分析では、PCA-X モデル及び OPLS/DA モデルのスコアプロットにおいて 6 種類の医薬品はすべて中央に集中し、多くの健康食品が中央に集まる中で、他の製品と差異のあるものがそれぞれ 5 種類及び 7 種類観察された。ただし、その中には医薬品 6 種類が与える特徴的なピーク群を持つ製品もあり、データ抽出の条件あるいは解析モデルが最適ではなかった可能性がある。これは、ブラックコホシユ健康食品の成分パターンが予想以上に多様であることを示しており、例えば、「乾燥エキス」、「植物原体粉末」、「乾燥エキス及び植物原体粉末の混合物」の 3 種類に分類した上で、それぞれを「医薬品」と組み合わせて主成分分析に供し、特徴的成分の特定と予備的な分類を行った上で、全製品に対する主成分分析を行う等の工夫が必要と思われた。

#### D-9. 生薬製剤承認基準案の検討

2 年に渡り合計 31 品目の生薬について網羅的調査を行い、日本において長年の使用実績がある生薬の有効性及び安全性に関する貴重なエビデンスを収集することができた。これらの調査結果より、単味生薬製剤の効能効果として新規に追加されるにふさわしいものをいくつか見出すことができた。今後は、見出された効能効果について、さらに詳細な調査を行い、生薬製剤承認基準としてどのレベルまで要求できるか生薬毎に見極めることが重要となり、個々の生薬の状況に即した承認審査ガイドラインを作成する必要があると思われる。

<抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究>

#### D-10. 麻黄をモデル生薬とした評価法の開発

#### D-10.1 培養細胞を用いたアッセイによる麻黄のキナーゼ阻害作用

本研究の結果、麻黄の抗腫瘍活性は、癌種によってはキナーゼ X の阻害を介することが作用発現に重要であることが示唆された。従って、今後適応対象となる癌種の性質に基づいて適切な活性測定法を設定する必要があると考えられた。

#### D-10.2 麻黄による miRNA の発現変動の解析

hsa-miR-16, hsa-miR-22, hsa-miR-192 は、発現上昇により癌の増殖や転移を抑制することが判明しており、増殖抑制作用との関連が示唆された。最も発現が亢進していた hsa-miR-3935 は、極めて最近発見されたもので、機能に関する報告は無く、機能解明が新たな課題である。さらに今後、麻黄中のどの化合物が、どの miRNA の発現に影響しているのか明らかにする必要があるが、昨年度見出したキナーゼ阻害作用とともに、抗腫瘍活性に対する寄与について評価を進めることで、有効性を担保する評価項目が選定できるものと考えられる。

#### D-11 麻黄由来の活性成分の探索と評価

化合物 A は、濃度依存的に c-Met 及びその下流の Akt のリン酸化を抑制する一方、ERK のリン酸化に影響を与えなかった。Met-Akt シグナル経路は、細胞運動に関わっていることから、化合物 A の細胞運動阻害作用の作用機構を明確に示しているものと考えられる。また、この結果は、麻黄で確認されていた効果と矛盾しないことから、同化合物は麻黄の活性本体のひとつであるものと推定された。

今回新たに検討した、発光基質によるインビトロキナーゼ測定法は、1 時間程度で結果が得られ、簡便で非常に有用であった。従って、今後、バリデーションを実施する必要があるが、力価測定法として検討の価値があるものと考えられた。

本研究では、麻黄のキナーゼ阻害作用が、化合物 A に起因するか検証した。インビトロキナーゼ測定法を用い、麻黄で阻害効果が観察されたキナーゼを含む 50 種のキナーゼについて化合物 A の阻害効果を解析した（特許申請準備中につき未掲載）。麻黄で阻害されたキナーゼと化合物 A で阻害されたキナーゼに相関が観察された。その一方、c-Met に対する阻害作用は、細胞培養の結果から予期されたほど強い阻害活性が観察されなかった。発光基質を用いたインビトロアッセイでは、阻害活性が観察されていることから、活性測定に用いる組換えキナーゼ、基質ペプチド、酵素反応液の組成などの違いによるものと考えられた。したがって、網羅的解析は、未知の作用を見出すた

めのツールとして有用であるが、その結果を基にして多角的に検証を行うことが極めて重要であることが示唆された。

#### E. 結論

〈生薬の品質評価手法と標準化に関する研究〉

##### E-1. 党参

トウジン植物材料 115 検体の遺伝子情報を元に中国、香港、韓国及び日本市場品の基原を明かにできた。トウジンは日本薬局方優先収載候補品目であり、本研究の成果は、今後公的規格に反映される予定である。

##### E-2. 赤芍

*P. lactiflora* は種内多型が顕著であるが、南方系（白芍系）と北方系（赤芍系）に 2 大別され、その区別には上流から 69 番目、458 番目及び 523 番目の塩基が重要であった。日本で収集した赤芍（18 検体）の基原を検討した結果、すべて北方系の *P. lactiflora* であった。

##### E-3. 晋耆

現在市場に流通するシソ市場品の基原植物は、*H. polybotrys* のみである事が明らかになった。本品についても、局方優先収載候補品目であり、確認試験法と合わせて、本研究の成果は、公的規格に反映される予定である。

##### E-4. 半夏及び天南星

シュウ酸カルシウム集晶の有無を問う試験法は、簡便なハンゲのテンナンショウに対する純度試験法として、応用できる可能性は残るが、不安定な形質であるため、それだけで確定はできず、遺伝子的な手法での鑑別が重要であることが改めて、確認された。

##### E-5. 地竜

ジリュウの確認試験法として、TLC 試験法を確立し、局外生規への収載を検討している。

##### E-6. 地黄

国産のアカヤジオウに特異的な配列を決定した。今後、品種と効能の関連性について発展させていく予定である。

##### E-7. 蒼朮、白朮

蒼朮と白朮という生薬で区別せず、基原種ごとに比較したときは、*A. ovata* と *A. lancea* に対し、*A. japonica* と *A. chinensis* は NO 産生抑制活性が有意に高いことが判明した。

〈西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究〉

##### E-8 ブラックコホシュを材料とした西洋ハーブの品質評価

今回、医薬品及び健康食品として流通するブラックコホシユについて、改良した分離条件で詳細な成分分析を行ったところ、医薬品の高品質と対照的に健康食品の品質のばらつきは大きく、指標成分の含量において100倍以上の差が観察された。先の、政策創薬総合研究「第B分野 KHB1005 西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究」(平成19年度~21年度)における遺伝子鑑定による解析結果から、基原の正しくない健康食品の流通が確認されており、安全性の面を考慮すると、エビデンスが確立している西洋ハーブの場合には、積極的に一般用医薬品として流通させたほうが、消費者の利益になるものと考えられる。

#### E-9. 生薬製剤の承認基準案の検討

生薬製剤承認基準案策定の基盤整備として、これまでに単味生薬としての承認が望まれる20の生薬について、その有効性及び安全性を保証するエビデンスの収集を行った。漢方処方と異なり、エビデンスは一様に弱いものであったが、それを認識した上で、それぞれの生薬について個別の対応が必要と思われる。これまでの検討過程を俯瞰して、今後の検討班の基本方針は以下のようであるべきと思われる。現代の生活環境、社会構造、疾病構造を鑑みて、「局方手引きの生薬関連部分」の見直しを行ない、生薬製剤承認審査基準の原案を策定する。また、具体的な手順は下の通りである。1. 局方手引き既収載生薬(35生薬)の記載事項(用法および用量、効能又は効果、備考)の見直し 2. 局方手引き既収載生薬における新規効能効果の検討 3. 局方手引きへの新規収載候補生薬の検討。

<抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究>

#### E-10. 麻黄をモデル生薬とした評価法の開発

麻黄の抗腫瘍活性の有効性・安全性を担保するためには、キナーゼ阻害アッセイ及びmiRNA発現解析が有用であった。

#### E-11. 麻黄由来の活性成分の探索と評価

化合物Aは、麻黄で見出されている様々な抗腫瘍効果を裏付ける生物学的な活性と同様の活性が見出されているが、活性の強度等を考えると、他の化合物も抗腫瘍活性に関与しているものと考えられる。現在、これらの成分について、さらに検討を行っている。

多成分系からなる天然物医薬品の場合、このような事は当然予想できるものである。医薬品としての標準化には、特定の活性化合物の含量のコントロールと組み合わせて、活性の標準化とし

て、適切な生物学的な試験を設定していく必要があるものと考えられる。その場合、適応となる癌の性質に応じた規格試験を設定することが重要であると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表等

- 1) 合田幸広, Attendance of 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, *ファルマシア*, **46**, 375 (2010).
- 2) 合田幸広, 袴塚高志, 一般用漢方製剤の承認基準について, *医薬品情報学*, **11**, 210-216 (2010).
- 3) Kakigi Y., Hakamatsuka T., Goda Y., Takeshi Icho T., Mochizuki, N., Investigation of Biologically Active Components in Ginkgo Leaf Products on the Japanese Market, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **75**, 777-779 (2011).
- 4) 袴塚高志, 西洋ハーブの有効性・安全性を担保する品質評価に関する研究, *Aromatopia*, **20**, 8-10 (2011).
- 5) Zhu S., Bai Y.-J., Oya M., Tanaka K., Komatsu K., Maruyama T., Goda Y., Kawasaki T., Fujita M., Shibata T., Genetic and chemical diversity of *Eleutherococcus senticosus* and molecular identification of Siberian ginseng by PCR-RFLP analysis based on chloroplast trnK intron sequence, *Food Chemistry*, **129**, 1884-1850 (2011).
- 6) Hyuga, S., Shiraishi, M., Hyuga, M., Goda, Y., Hanawa, T., "Ephedrae herba, a major component of maoto, inhibits the HGF-induced motility of human breast cancer MDA-MB-231 cells through suppression of c-Met tyrosine phosphorylation and c-Met expression." *J. Trad. Med.* **28**, 128-138 (2011).
- 7) Kakigi, Y., Hakamatsuka, T., Icho, T., Goda, Y., Mochizuki, N., "Comprehensive analysis of flavonols in Ginkgo biloba products using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-violet detection and time-of-flight mass spectrometry." *Biosci. Biotech. Biochem.* **76**, in press (2012).

##### 2. 学会発表等



- 1) 合田幸広, 天然物の基原と品質, 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会, 2011 年 5 月, 東京.
- 2) 袴塚高志, 遠藤明仁, 勢ノ康代, 森田英利, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (10) ブラックコホシユによる腸内細菌遺伝子発現変動の DNA マイクロアレイ解析, 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会, 2011 年 5 月, 東京.
- 3) 丸山卓郎, 生薬の品質評価のための新たな手法の確立, 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011 年 8 月, 富山.
- 4) 日向須美子, 白石真純, 日向昌司, 合田幸広, 花輪壽彦: 麻黄湯と構成生薬の麻黄による HGF-c-Met シグナルの阻害, 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011 年 8 月, 富山.
- 5) 白石真純, 日向須美子, 日向昌司, 花輪壽彦, 抗癌剤耐性ヒト肝臓癌細胞を用いた漢方薬の MDR-1 に対する効果の解析, 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011 年 8 月, 富山.
- 6) 何敬愉, 朱姝, 小松かつ子, 合田幸広, 神谷洋, 横倉胤夫, 党参の基原と品質に関する研究 (3) -*Codonopsis* 属植物及び党参の ITS 領域の塩基配列, 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月, 東京.
- 7) 袴塚高志, 西洋ハーブの品質評価における Corona CAD の応用, CORONA USER'S FORUM 2011, 平成 23 年 10 月, 大阪.
- 8) 袴塚高志, 西洋ハーブの品質評価における Corona CAD の応用, CORONA USER'S FORUM 2011 (Tokyo), 平成 23 年 10 月, 東京.
- 9) 日向須美子, 白石真純, 日向昌司, 合田幸広, 花輪壽彦, c-Met 発現ヒト癌細胞の HGF により誘導される細胞運動, 細胞分散, 及び細胞増殖に対する麻黄湯の抑制効果, 日本薬学会 132 年会, 2012 年 3 月, 札幌.
- 10) 白石真純, 日向須美子, 日向昌司, 花輪壽彦, MDR-1 高発現ヒト肝臓癌細胞 Pac-1 を用いた漢方薬の薬剤耐性に対する効果の解析, 日本薬学会 132 年会, 2012 年 3 月, 札幌.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許出願 特願 2009-86363, 特開

2010-235529

国際特許出願 国際出願番号:

PCT/JP2010/055622

発明者: 花輪壽彦, 日向須美子, 日向昌司. 発

明名称: 麻黄を成分とする MET 阻害剤.

## アデノウイルスベクターを駆使した薬物誘発性肝障害 モデル動物の開発

所 属 独立行政法人医薬基盤研究所  
幹細胞制御プロジェクト  
研究者 水口 裕之

細胞株への薬物代謝酵素遺伝子の発現系を利用した *in vitro* 毒性評価系の構築を行った。また、ヒト CYP3A4 発現アデノウイルス (Ad) ベクターの *in vivo* における機能、ならびに昨年度開発した新規 Ad ベクターの有用性を評価した。

### 研究分担者

- (1) 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授  
横井 毅
- (2) 大阪大学大学院薬学研究科 准教授  
櫻井 文教
- (3) 小野薬品工業株式会社薬物動態グループ  
松村 直哉

### A. 研究目的

本研究では、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた遺伝子発現制御系を駆使して、薬物誘発性肝障害予測を可能にする簡便なモデル動物作成法の開発を行う。具体的には、(1) *in vivo* 肝臓で簡便かつ効率良く候補遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) を達成するための RNA 干渉 (RNAi) 誘導 Ad ベクターを開発し、(2) ヒトと齧歯類の肝薬物代謝活性の種差 (ヒト << 齧歯類) をなくすために、関連酵素の高効率ノックダウンあるいは強制発現が可能な Ad ベクターを開発する。これにより、ヒトと同程度の解毒能を有するげっ歯類を簡便に作成することが可能となれば、ヒト肝における代謝的活性化による毒性発現を実験動物で再現することが可能となり、新薬開発のスピード化ならびにコスト削減につながることを期待される。

### B. 研究方法

#### B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクタープラスミドの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。まず、昨年度作製したシャトルプラスミド pHM15-hU6/hH1 と pHM5-hU6/hH1 に、 $\gamma$  GCSH に対する shRNA をコードするオリゴ DNA 配列を挿入した。その後、作製した shRNA 発現シャトルプラスミドを適切な制限酵素で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド (pAdHM41-E3(+)) とライゲーションを行うことにより Ad ベクタープラスミドを得た。Firefly luciferase に対する shLuc 発現プラスミド pHM5-U6-shLuc を SmaI 処理し、XbaI リンカーとライゲーションした。これを XbaI/SphI 処理して得られた DNA 断片と、GFP 発現プラスミド pHM18-CG を XbaI/SphI で処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pHM18-U6-shLuc-CG を得た。その後、得られたプラスミド pHM18-U6-shLuc-CG を SphI/KpnI 処理した DNA 断片と、pHM5 を同酵素で処理した DNA 断片をライゲーションすることによりプラスミド pHM5-U6-shLuc-CG を得た。その後、得られたプラスミド pHM5-U6-shLuc-CG を I-CeuI/PI-SceI 処理した DNA 断片と、pAdHM4 および pAd $\Delta$ VVR を I-CeuI/PI-SceI 処理した DNA 断片をライゲーションすることにより Ad ベクタープラスミド pAdHM4-U6-shLuc-CG、pAd $\Delta$ VVR-U6-shLuc-CG を得た。作製した Ad ベクタープラスミドを Pac I で

消化し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、各 Ad ベクターを得た。定法により Ad ベクターの増殖、精製を行い、精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定した。また、Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech 社) を用いて生物学的タイターを測定した。

## B-2. 細胞培養

ラット肝癌由来 H4IIE 細胞は MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM (MEM ; 10%FCS、抗生物質含有) を用いて、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞および 293 細胞は High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM ; 10%FCS、抗生物質含有) を用いて 37°C、飽和蒸気圧、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

## B-3. Firefly luciferase 安定発現細胞の作製

SK HEP-1 細胞を 12 穴プレートに 1x10<sup>5</sup>cells/well で播種し、翌日、Luciferase 発現レンチウイルスベクター、LV-RVLuP 含有培養上清 1ml を作用させた。2 日間培養後、ウイルス感染効率を FACS で確認した。培養を続けスケールアップ後、Venus 陽性細胞を FACSaria にてソーティングによって Luciferase 発現 SK HEP-1 細胞、SK HEP-1-Luc 細胞を得た。

## B-4. げっ歯類 $\gamma$ GCSH 遺伝子の発現抑制効果の評価 (in vitro)

作製した Ad ベクター、AdGCSH-shRNAx4 ( $\gamma$  GCSH に対する shRNA カセットを 4 単位挿入した Ad ベクター) と AdGFP-shRNAx4 (GFP に対する shRNA カセットを 4 単位挿入した Ad ベクター: コントロールベクター) をラット肝癌由来 H4IIE 細胞 (5×10<sup>5</sup>cells/6well plate) に感染させた (3000 vector particle (VP) /cell)。感染 2、3、5 日後、細胞内における  $\gamma$  GCSH タンパク質及びグルタチオン (Glutathione-SH: GSH) 含量を測定した。タンパク質の場合は、cell lysis buffer に懸濁、15000 rpm で 15 分遠心後、上清を回収した。溶解液のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay

kit を用いて測定後、定法に従い、Western Blot 法にて  $\gamma$  GCSH タンパクの発現量を評価した。細胞内のグルタチオン (GSH) 含量に関しては、0.1M 塩酸で細胞を凍結融解 2 回を行い、0.5%SSA で適宜希釈したものをサンプルとし、total Glutathione 定量 Kit (同仁化学社) で活性を測定した。

## B-5. げっ歯類 $\gamma$ GCSH 遺伝子の発現抑制効果と肝毒性の評価 (in vivo)

マウス (C57BL/6J 雌 7 週齢 n=3) 1 匹に対して 3x10<sup>10</sup>VP の AdGCSH-shRNAx4 あるいは AdGFP-shRNAx4 を尾静脈投与し、投与 3、7、14 日後、イソフルラン麻酔下、それぞれ採血、肝臓を摘出した。採取した血液は、4°C 3000rpm 5 分間遠心分離後、血清を回収し、トランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) にて肝障害の指標である血清中 ALT、AST レベルを測定した。げっ歯類  $\gamma$  GCSH 遺伝子の発現抑制効果の評価については、マウス肝臓組織内における  $\gamma$  GCSH mRNA および  $\gamma$  GCSH タンパク質、グルタチオン含量を測定し、比較した。Total RNA は ISOGEN (nippon gene) を用いて抽出し、cDNA を合成後に定量的 RT-PCR を行うことにより細胞内  $\gamma$  GCSH mRNA 発現量を解析した。タンパク質と肝臓組織中 GSH は in vitro と同様の方法で実施した。

## B-6. 薬剤によるげっ歯類 $\gamma$ GCSH の阻害効果の検討

$\gamma$  GCS の特異的阻害剤である BSO (L-buthionie-S, R-sulfoximine) を用いて  $\gamma$  GCS の阻害効果を検討した。マウス (C57BL/6J 雌 7 週齢 n=3) に  $\gamma$  GCS の特異的阻害剤である BSO (L-buthionie-S, R-sulfoximine) を 20mM の濃度で飲水投与し、上記同様 3、7、14 日後の肝障害、肝臓組織中の GSH 量を解析した。

## B-7. shLuc 発現 HD-Ad および Ad $\Delta$ VR ベクターによる Luciferase 遺伝子の発現抑制効率の評価

SK HEP-1-Luc 細胞を 96 穴 black プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、翌日に各 Ad ベクターを 1、3、10MOI で 37°C、90 分間作用させた。24、もしくは 36 時間培養後、Pica Gene LT 2.0 (東洋インキ) を用いて Luciferase 活性を測定した。

#### B-8. HepG2 細胞におけるヒト CYP3A4 の発現

通常の cDNA 型に加え、種々のヒト CYP3A4 変異型を作製し (詳細は省略)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて HepG2 細胞へ導入した。また通常の CYP3A4 cDNA を搭載した Ad ベクター (Ad-CYP3A4) を HepG2 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/ 6well plate) に感染させた ( $3000$  vp/cell)。トランスフェクションの 2 日後、または Ad ベクターの感染 2 日後に細胞を回収し解析に用いた。タンパク質の場合は、cell lysis buffer に懸濁、15000 rpm で 15 分遠心後、上清を回収した。溶解液のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit を用いて測定後に Western Blot 法にて CYP3A4 タンパクの発現量を評価した。mRNA の場合、ISOGEN (nippon gene) を用いて total RNA を抽出し、cDNA を合成、RT-PCR を行い、ヒト CYP3A4 の発現を確認した。

#### B-9. マウス・ラットにおけるヒト CYP3A4 の発現

通常の CYP3A4 cDNA 遺伝子を搭載した Ad ベクター (Ad-CYP3A4) をマウス (C57BL/6J 雌 7 週齢  $n=3$ ) に尾静脈投与した ( $3 \times 10^{10}$  vp/mouse または  $6 \times 10^{10}$  vp/mouse)。投与 2、3、7、14 日目にインフルラン麻酔下で採血し、肝臓を摘出した。その後ヒト CYP3A4 の発現をタンパク質、mRNA レベルで評価した。タンパク質は、cell lysis buffer に懸濁し、15000 rpm で 15 分遠心後、上清を回収した。溶解液のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit を用いて測定後、定法に従い、Western Blot 法にてヒト CYP3A4 タンパクの発現量を評価した。Total RNA は ISOGEN (nippon gene 社) を用いて抽出し、cDNA を合成後に PCR を行うことにより肝臓組織内の CYP3A4 mRNA 発現を解析した。採取した血液は、4°C 3000rpm 5 分間遠

心分離後、血清を回収し、トランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) にて肝障害の指標である血清中 ALT, AST レベルを測定した。

Ad-CYP3A4 をラット (F344 雄 7 週齢) に尾静脈投与した ( $3 \times 10^{11}$  VP/rat)。投与 2 日目に肝臓を摘出し、RT-PCR 法、Western Blot 法にて、ラットにおけるヒト CYP3A4 の発現を評価した。また、ヒト CYP3A4 を発現させたラット肝臓からマイクロソームを調整し、P450-Glo assay (promega) にてラット肝臓におけるヒト CYP3A4 活性を測定した。

#### B-10. マウスにおける CYP3A4 活性測定試験

Ad-CYP3A4 によりマウス (C57BL/6J、BALB/c、ヌードマウス) で発現させたヒト CYP3A4 がマウスで代謝活性を有するか否か in vivo CYP3A4 活性を測定した。具体的には Ad-CYP3A4 投与、コントロールとして Ad-GFP 投与を投与したマウス (それぞれ  $3 \times 10^{10}$  vp/mouse、 $n=3$ ) を用意し、各 Ad ベクター投与 48 時間後に CYP3A4 の基質化合物 (C57BL/6 の場合はミダゾラム、シクロスポリン A をそれぞれ 0.1mg/kg : BALB/c、ヌードマウスの場合はミダゾラム、シクロスポリン A をそれぞれ 2mg/kg、0.5mg/kg) を経口投与した。その後、一定時間後 (C57BL/6 の場合は 10、30 分、1、3、7、24 時間後 : BALB/c、ヌードマウスの場合は 30、120 分後) に血漿を回収し、血漿 30 又は 50uL に対してアセトニトリル/エタノール (7:3) 100uL を添加して血漿中の未変化体または代謝物量を LC/MS/MS にて定量した。また、BALB/c、ヌードマウスの場合には、異なる CYP3A4 基質化合物として、デキサメタゾン (2mg/kg) を経口投与し、60 分後に血漿を回収し、血漿 30uL に対してアセトニトリル/エタノール (7:3) 100uL を添加して血漿中の未変化体または代謝物量を LC/MS/MS にて定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は、各分担研究者が所属する研究施設

の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

## C. 研究結果

### C-1. 新規 Ad 発現ベクターの *in vitro* および *in vivo* 動態学的評価

ヒト CYP3A4 やヒト CYP2C9 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP3A4, AdCYP2C9) を作製し、ヒト CYP3A4 およびヒト CYP2C9 を過剰発現させた *in vitro* 細胞障害試験系を構築することにより、ヒト CYP2C9 により肝障害性を示す薬物の代謝的活性化または解毒機能を明らかにすることを目的とした。また、種々の解毒酵素を誘導する転写因子 Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 遺伝子のノックダウンとの併用により、薬物障害の高感度検出系の確立を試みた。

AdCYP2C9 を 2 日間感染させた HepG2 細胞のジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性値と CYP2C9 タンパク質の発現量を測定し、HepG2 細胞における至適 MOI の検討した (Figure 1)。AdCYP2C9 感染において MOI 20 まで MOI 依存的なジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性と CYP2C9 タンパク質発現量の増加が認められた。一方、コントロールベクターである AdGFP では MOI 20 においてもジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および CYP2C9 タンパク質の発現は認められなかった。ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性値は AdCYP2C9 MOI 20 で最大となったが、MOI 20 では顕微鏡での観察において細胞の状態が良好ではなかったため、MOI 10 が至適であると判断し今後の実験を行うことにした。ヒトヘパトサイトにおけるジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性は 0.0734 ~ 0.317 nmol/min/mg protein (Donato MT et al., 2004; Gomez-Lechon et al., 2001; Bort et al., 1999) と報告されており、AdCYP2C9 を MOI 10 で感染させた時、これらの値の 3 倍以上の十分高い活性値 (0.957 ± 0.070 nmol/min/mg protein) を示し

た。

次に HepG2 細胞における AdCYP2C9 至適感染日数の検討を行った。HepG2 細胞に AdCYP2C9 を MOI 10 で感染させ、1、2、3 および 5 日後のジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および CYP2C9 タンパク質の発現量について検討した (Figure 2)。ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性はウイルス感染 2 日後においてピークに達したが、CYP2C9 タンパク質の発現量は感染 3 日後において最も高かった。コントロールベクターの GFP 発現 Ad ベクター AdGFP を MOI 10 で感染させた場合はジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および CYP2C9 タンパク質の発現は認められなかった。ヒト CYP2C9 のタンパク質発現量と酵素活性において至適感染日数が異なったが酵素活性を重視し、また以前本研究室で検討した AdCYP3A4 の至適感染条件が 2 日間感染であることを考慮し、以後の実験は 2 日間感染で行うことにした。ヒト CYP3A4 により代謝的活性化を受ける薬物がヒト CYP2C9 により影響を受けるかどうか検討するため、既に作製されている AdCYP3A4 も用いることにした。AdCYP2C9 と AdCYP3A4 が互いに影響を及ぼしあって酵素活性が変化しないことを確認するために、細胞生存率の測定条件下でそれぞれの感染群におけるテストステロン 6β-水酸化酵素活性を測定した (Figure 3)。AdCYP3A4 の感染条件については、以前に当研究室において確立された MOI 20 で 2 日間感染とした。なお、ウイルス感染量による影響を除くため、全ての感染群において AdGFP を用いて MOI の合計を 30 に合わせた。

そこで次に siNrf2 を処置することにより Nrf2 をノックダウンさせた HepG2 細胞に AdCYP2C9 および AdCYP3A4 を感染させ、肝障害の報告がある種々の薬物を処置し、薬物処置 24 時間後に MTT アッセイにより細胞生存率を測定し対照群と比較検討した (Figure 4)。その結果、ベンズブロマロン処置においては 10 μM 以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群で、20 μM 以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で

AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。しかし、AdCYP3A4 単独感染群では AdGFP 感染群と比べて細胞生存率に差異は認められなかった。チエニル酸処置においては 100  $\mu$ M 以上の処置により全ての感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。また、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群ではそれぞれの単独感染群よりも細胞生存率が若干低下する傾向が認められた。ジクロフェナク処置においては 200  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。また、800  $\mu$ M 処置により CYP2C9 単独感染群で同程度の細胞生存率の低下が認められた。ロサルタン処置においてはベンズブロマロンと同様に 25  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、AdCYP3A4 単独感染群では若干低下する傾向が認められた。アミオダロン処置においては 20  $\mu$ M 以上の処置により全ての感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められ、AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群ではそれぞれの単独感染群よりもさらに顕著な低下が認められた。テルピナフィン処置においては 25  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の低下が認められた。しかし、AdCYP2C9 単独感染群と AdCYP3A4 と AdCYP2C9 の同時感染群では AdGFP 感染群と比べて細胞生存率に差は認められなかった。フルバスタチン処置においては 50  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて細胞生存率の有意な低下が認められた。一方 100  $\mu$ M の処置により AdCYP2C9 単独感染群および CYP2C9 と CYP3A4 の同時感染群では細胞生存率の有意な上昇が認められた。ゾルピデム処置においては 50  $\mu$ M の処置により AdCYP3A4 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて細胞生存率の有意な低下が認められたが、AdCYP2C9 単独感染群では AdGFP

感染群と比べて有意な差異は認められなかった。バルプロ酸処置においては 25  $\mu$ M の処置により AdCYP3A4 単独感染群で AdGFP 感染群と比べて細胞生存率の有意な低下が認められたが、AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群では AdGFP 感染群と比べて有意な差異は認められなかった。フルタミド処置においては 50  $\mu$ M 以上の処置により AdCYP2C9 と AdCYP3A4 の同時感染群で AdGFP 感染群と比べて有意な細胞生存率の上昇が認められたが、AdCYP2C9 単独感染群および AdCYP3A4 単独感染群では AdGFP 感染群と比べて有意な差異は認められなかった。

## C-2. Ad ベクター発現制御系を駆使した遺伝子評価系の開発

これまでに報告されている shRNA 発現 Ad ベクターは、単一の Ad ベクターにひとつの short hairpin RNA (shRNA) 発現カセットを搭載している。その際、RNAi 誘導能の高いターゲット配列が同定されている場合には問題ないが、RNAi 誘導能の低いターゲット配列しか明らかになっていない場合や発現量の多い遺伝子を抑制したい場合、あるいは複数の遺伝子を同時に抑制したい場合には多量の Ad ベクターを作用させる必要があるため、Ad ベクターによる細胞毒性や免疫反応の誘導など、副作用を引き起こす危険性が懸念される。昨年度までに、上述の問題点を克服する新規 Ad ベクターの開発を行った。すなわち、複数の shRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターシステムを構築することにより、単一 Ad ベクター当たりの RNAi 誘導能を向上させた Ad ベクターの開発に成功した。本年度は、昨年度構築した新規 Ad ベクターに、げっ歯類グルタチオン合成酵素 ( $\gamma$  GCSH) に対する shRNA 発現カセットを 4 単位搭載した Ad ベクター、AdGCSH-shRNAx4 の作製とその機能評価を行った。

AdGCSH-shRNAx4 とコントロールとして AdGFP-shRNAx4 (GFP に対する shRNA を発現するカセットを 4 単位搭載) をラット肝癌由来 H4IIE 細

胞に感染させ、その2、3、5日後における細胞内 $\gamma$ GCSHタンパク質量及びグルタチオン含量を測定した。その結果、AdGCSH-shRNAx4を作用させることにより、 $\gamma$ GCSHタンパク量の減少がみとめられた (Figure 5A)。なお、感染2、3、5日のいずれの細胞においても $\gamma$ GCSHの発現抑制は同程度であった (Figure 5A)。また、細胞内のグルタチオン量を測定したところ、AdGCSH-shRNAx4を感染させて2日目、または3日目において約6割程度にまで減少させることに成功した (Figure 5B)。なお、感染5日目のAdGCSH-shRNAx4またはAdGFP-shRNAx4作用群においては、グルタチオン量が著明に低下していたが、いずれの群も細胞死がみとめられたため、正確な評価はできていない可能性がある。

次に作製したAd-sh $\gamma$ GCSHx4をマウスへ投与し、そのRNAi効果および肝毒性 (血清ALT、AST)を評価した。まずAd-sh $\gamma$ GCSHx4投与による血清ALT、ASTを調べたところ、投与3、7、14日のいずれの群においても上昇はみとめられなかったことから、肝毒性は生じていないことが示唆された (Figure 6A)。次に $\gamma$ GCSHノックダウン活性を $\gamma$ GCSHタンパク質、mRNA、肝臓グルタチオン量を指標に評価した。その結果、Ad-sh $\gamma$ GCSHx4を投与することにより、 $\gamma$ GCSH mRNA量は、3日目にほぼ半分、7日目以降は約3~4割程度にまで抑制可能であることが明らかとなった。また肝臓組織中のグルタチオン量を測定したところ、3日目にはAd非投与マウスとほぼ同程度であったが、7日目には約8割、14日目には約5割程度まで減少していることが分かった (Figure 6B, 6C, 6D)。なお、原因は不明であるが、コントロールベクターとして用いたAdGFP-shRNAx4投与群においては投与7日目以降にAST、ALTが著明に増加していた。別のコントロールベクターの調製が必要であると思われる。

GCSの特異的阻害剤であるBSO(L-buthionie-S, R-sulfoximine)を用いて $\gamma$ GCSの阻害効果を検討したところ、BSO 20mM 飲水

投与で、未処理のマウス肝グルタチオン量と比較し、投与3日目から既に15~20%程度と大きく減少していた。なお、7、14日目も3日目同様な $\gamma$ GCS阻害効果を認めた (Figure 7A)。また、BSO投与による肝毒性 (血清ALT、AST)にはほとんど影響は見られなかったことから (Figure 7B)、本剤の利用はGCSの抑制に極めて有効であることが示された。本剤とAd-sh $\gamma$ GCSHx4との併用することで更なる抑制が可能であると考えられる。

### C-3. ShRNA 発現 Ad ベクターの作成

RNA 干渉を誘導する場合、shRNA 発現 Ad ベクターの利用を選択することが可能である。しかしながら、cDNA を導入して遺伝子発現させる場合の Ad ベクターの高い遺伝子発現効率を考慮に入れると、その shRNA 発現 Ad ベクターにより誘導される RNAi 効果は予想されたほど高くないことが経験的に知られている。近年、野生型 Ad ゲノムにコードされる virus associated RNAs (VA-RNAs; VA-RNA I と VA-RNA II) が pre-miRNA や shRNA 前駆体の核外輸送を担う exportin5 と競合することや、Dicer に結合することでその機能を阻害し、結果として miRNA の成熟や shRNA の機能発現過程を阻害することが報告された (Figure 8)。我々の研究グループでは、VA-RNAs が Ad ベクターにも存在し、標的細胞内で VA-RNA が速やかに発現することを見出している。そこで本研究では、昨年度 VA-RNAs を欠損させた Ad ベクターを開発した。本年度は、VA-RNA 欠損 Ad ベクターに shRNA 発現カセットを搭載し、そのノックダウン効率に関して検討を行った。

shRNA 発現 Ad ベクターの RNAi 誘導能に対する VA-RNA の影響を検討するために昨年度に開発した Ad $\Delta$ VR ベクターを用いた (Figure 9)。Ad $\Delta$ VR-shLuc-CG を作製し、Luciferase 遺伝子の発現抑制効率を評価するために Luciferase 安定発現 SK HEP-1 細胞 (SK HEP-1-Luc 細胞) に作用させた。SK HEP-1-Luc 細胞は、SK HEP-1 細胞に Luciferase 発現レンチウイルスベクターを作用

させることにより取得した。その結果、従来の Ad ベクターである FG-Ad-shLuc-CG 作用群と比較して、Ad $\Delta$ VR-shLuc-CG 作用群において有意に高いノックダウン効率を示した (Figure 10)。特に 1 MOI では FG-Ad-shLuc-CG と Ad $\Delta$ VR-shLuc-CG との間に有意な差は観察されなかったが、3MOI (36 時間後) および 10MOI (24 および 36 時間後) では有意な差が見られた。

以上の結果から、VA-RNA は shRNA 発現 Ad ベクターにおける RNAi 効果を阻害していることが示された。また、Ad $\Delta$ VA ベクターは shRNA 発現による標的遺伝子ノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることが示された。

#### C-4. 薬物代謝酵素発現 Ad ベクターの開発

これまでにヒト CYP3A4 発現 Ad ベクターがげっ歯類では機能しないこと、細胞株においても CYP3A4 活性に細胞特異性が生じることが知られている。そこで本年度はその原因を明らかにする目的で、種々の変異型ヒト CYP3A4 遺伝子を作製、Ad ベクターに搭載し、マウスおよびラットでの発現を試みた。

ヒト CYP3A4 発現 Ad ベクターがマウス・ラットでは機能しないことや細胞株においても CYP3A4 活性に細胞特異性があることが知られている。そこで本年度はその原因を明らかにする目的で、5' および 3' 非翻訳領域を付加した CYP3A4 (mRNA 型) やユビキチン化を受けにくい変異型 CYP3A4 等の種々の変異型 CYP3A4 遺伝子を作製し、HepG2 細胞へ導入し、発現量を解析した。その結果、通常の cDNA 型または mRNA 型が高い発現を示した (データ略)。したがって、今後の実験は通常の cDNA 型で検討することとした。

通常の CYP3A4cDNA 遺伝子を搭載した Ad ベクター (AdCYP3A4) を新たに作製し、マウスに投与してヒト CYP3A4 の発現を解析した。その結果、げっ歯類の肝臓ではヒト CYP3A4 は発現しないとされていたにも関わらず、マウス肝臓において

ヒト CYP3A4 タンパク質の発現が確認された。さらに、その発現は AdCYP3A4 投与 14 日目まで持続することが分かった (Figure 11A)。次に AdCYP3A4 投与による肝毒性を血清 ALT、AST を指標に評価した。その結果、投与 3 日目までは ALT、AST の上昇はみとめられなかったものの、7 日目以降に ALT、AST 値上昇が認められ、Ad ベクター投与に伴う肝毒性が生じていることが示唆された (Figure 11B)。

薬物の代謝試験の多くはラットで行われるため、次に、AdCYP3A4 をラットへ投与した際のヒト CYP3A4 の発現について解析した。その結果、ラットにおいてもヒト CYP3A4 の発現することが明らかとなった (Figure 12A)。また AdCYP3A4 投与ラットの肝臓ミクロソームを調製し、P450-Glo assay にて CYP3A4 活性を測定したところ、弱いながらも認められた (Figure 2B)。しかしながら、Ad 非投与ラットミクロソームでも高い CYP3A4 活性認められたため、本キットを用いた活性測定では正確な測定ができていない可能性が考えられた。

#### C-5. ヒト CYP3A4 発現 Ad ベクターの機能評価

Ad ベクターにより導入したヒト CYP3A4 の代謝活性を評価するため、in vivo CYP3A4 活性を測定した。Ad-CYP3A4 投与、コントロールとして Ad-GFP 投与を投与したマウス (C57BL/6J 雌 7 週齢 n=3) を用意し、CYP3A4 投与マウスでは全個体 (18 匹) でヒト CYP3A4 の発現をタンパク質、mRNA レベルで確認した (Figure 13A, 13B)。そして、各 Ad ベクター投与 48 時間後に CYP3A4 の基質化合物 (ミダゾラム、シクロスポリン A) を経口投与し、一定時間後血漿を回収、HPLC にて血漿中の未変化体および/又は代謝物量を定量した。その結果、CYP3A4 発現群、GFP 発現群においても血漿中ミダゾラム、1 水酸化ミダゾラム (CYP3A4 による代謝産物)、シクロスポリン A の濃度推移に著差は見られず、CYP3A4 発現による基質化合物の代謝の亢進は認められなかった (Figure 14A)。詳



細な原因は不明であるが、可能性の一つとして、Ad ベクター投与により惹起される免疫反応が考えられた。そこでマウスの系統を変えて検討を行うこととした。BALB/c マウスおよびBALB/c-nu/nu (ヌード) マウスへ Ad-CYP3A4 または Ad-GFP を投与し、その後ミダゾラム、シクロスポリン A に加えデキサメタゾン投与群を追加して同様に *in vivo* CYP3A4 活性測定を実施した。しかしながら、BALB/c、ヌードマウスにおいても CYP3A4 発現による基質化合物の代謝の亢進は認められなかった (Figure 14B, 14C)。

#### D. 考察

本研究においてヒト CYP2C9 発現 Ad ベクターを作製して *in vitro* 細胞障害試験系を構築し、肝障害の報告がある薬物の細胞障害性について検討し、CYP2C9 による代謝的活性化についての試験系を構築した。また、GST などの解毒酵素を発現誘導する Nrf2 をノックダウンすることによりさらに細胞生存率が低下したことから、Nrf2 の下流遺伝子の解毒への関与を明らかにし、同時に細胞障害性のより高感度な検出を可能とした。今後、肝障害の報告があるその他の薬物についても検討する必要がある。しかし、生体内での細胞障害性を議論するときには、薬物濃度を考慮せねばならない。チエニル酸およびバルプロ酸以外の薬物においては本研究で検討した濃度よりも低いが、代謝的活性化を受けると考えられるヒト肝において薬物は濃縮され実際の薬物濃度を測定することは困難であるため、*in vivo* への外挿には更なる検討が必要である。

また、本研究ではげっ歯類の GCSH をノックダウンするための shRNA を発現するカセットを 4 単位搭載した Ad ベクター AdGCSH-shRNAx4 を作製し、その機能解析を *in vitro* および *in vivo* で行った。その結果、培養細胞、マウスの双方において  $\gamma$  GCSH のノックダウンが可能であることが示された。なお、げっ歯類のグルタチオン抱合活性はヒトの 10~20 倍であるため、ヒトと同程度

の解毒能を有するげっ歯類を作出するにはマウス肝臓グルタチオン量を 10%以下に低下させることが望まれるが、本ベクターの投与では、マウス肝臓のグルタチオン量は 5 割程度しか抑制されていなかった。今後、ベクター投与量やノックダウンに要する時間等、詳細に検討する必要があると思われる。そこで本年度は、GCS の特異的阻害剤である BSO を用いて  $\gamma$  GCS の阻害効果についても検討を行った。その結果、BSO を投与することにより、未処理マウスと比較し、肝グルタチオン量は 15~20%程度まで抑制可能であることが明らかとなった。したがって、本剤と Ad-sh  $\gamma$  GCSH ×4 との併用することで、ヒトの解毒能を有するマウスを作製することは十分に可能であると期待された。

本年度は、shRNA によるノックダウンに及ぼす VA-RNA の影響についても検討するため、VA-RNA を欠損させた Ad ベクター (Ad  $\Delta$  VR ベクター) に shRNA 発現カセットを搭載した。shRNA 発現 Ad  $\Delta$  VR ベクターを Luciferase 発現細胞に作用させ細胞中の Luciferase 活性を測定したところ、従来の Ad ベクターである FG-Ad-shLuc-CG 作用群と比較して、Ad  $\Delta$  VR-shLuc-CG 作用群において有意に高いノックダウン効率を示した。さらに、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域以外の全てのウイルス遺伝子を欠損させた (すなわち VA-RNA も欠損している) Helper-dependent Ad ベクターを用いた検討も行ったところ、VA-RNA 欠損 Ad ベクターと同様に、FG-Ad-shLuc-CG 作用群と比較して、有意に高いノックダウン効率を示した (データ略)。VA-RNA が shRNA と競合する過程としては、①核外へ移行 (Exportin-5 による輸送)、②Dicer による切断、③Ago2 による取り込み、及び RISC の形成が挙げられる。このなかで、特に③の Ago2 による取り込みが最も重要な過程であると考えられる。これまでに我々は、shRNA 発現 Ad ベクターとともに、Ago2 もしくは Exportin-5 を過剰発現させたところ、Ago2 を過剰発現させた場合にのみノックダウン効率が向上することを見出している (データ略)。今回、

1MOI では有意なノックダウン効率の向上は観察されなかったが、3MOI および 10MOI では有意な差が見られた。これは、1MOI では shRNA および VA-RNA の発現量が低かったために、競合阻害が起こらなかったものと考えられた。

これまでに数多くの shRNA 発現 Ad ベクターに関する研究が報告されており、優れたノックダウン効率が報告されている。しかしながら Ad ベクターは既存の遺伝子導入ベクターのなかで最も高い遺伝子導入効率を有しており、その遺伝子導入効率から考えると、それらのノックダウン効率は必ずしも高いとは言えない。その原因の一つは、ここの示すように VA-RNA による阻害が考えられる。今後は、VA-RNA 欠損 Ad ベクターのみならず、Helper-dependent Ad ベクターについても検討を行う。さらに、VA-RNA の機能について検討を進めることにより、高タイターが回収可能な VA-RNA 欠損 Ad ベクター作製システムの開発を目指すこととする。

さらに本年度は、ヒト CYP3A4 発現 Ad ベクターを開発し、げっ歯類肝臓においてヒト CYP3A4 を発現させることに成功した。本結果は、発現ベクターを用いてヒト CYP3A4 を齧歯類に過剰発現させた世界初の成果である。しかしながら現状では、マウス肝臓において発現させたヒト CYP3A4 由来の代謝活性はみとめられなかった。マウス体内でヒト CYP3A4 活性がみとめられなかった原因としては、投与ルートの問題やマウスが有する内在性 CYP3a の問題等が考えられ、これらを克服するための種々の検討が必要である。また、マウスで発現させているヒト CYP3A4 の絶対量がどの程度かも明らかにする必要もある。今後、薬物誘発性肝障害モデル動物開発にあたり、齧歯類に発現させたヒト CYP3A4 が、十分な代謝活性を有するということが本事業成功の鍵を握る。次年度は、各研究結果を融合することでさらなる改良を行い、本事業の成功を目指す。

## E. 結論

- 1) ヒト CYP3A4 またはヒト CYP2C9 を過剰発現する細胞の作製に成功し、この細胞を用いた細胞障害活性の評価系の確立に成功した。また、解毒酵素誘導遺伝子 Nrf2 のノックダウンを併用することで、より高感度な細胞障害活性評価系の確立にも成功した。
- 2) shRNA カセットを 4 単位挿入した Ad ベクターを用いることにより、細胞株ならびにマウス肝臓において、 $\gamma$  GCSH を抑制可能であること、そして GCS の特異的阻害剤である BS0 の飲水投与によりマウス肝グルタチオン量を通常の 20%程度にまで減少できることを明らかにした。
- 3) Ad $\Delta$ VA ベクターは shRNA 発現による標的遺伝子ノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることが示された。
- 4) ヒト CYP3A4 発現 Ad ベクター (AdCYP3A4) の開発に成功した。本ベクターをマウス・ラットへ投与した結果、マウス・ラット肝臓でヒト CYP3A4 を発現させることに成功した。また、マウスの場合、その発現は 2 週間程度持続することが明らかとなった。本結果は、発現ベクターを用いてヒト CYP3A4 を齧歯類に過剰発現させた世界初の成果である。
- 5) Ad ベクターにより発現させたヒト CYP3A4 は、残念ながら、現在のところマウス体内において活性を確認できていない。CYP3A4 の発現量、投与ルート等の最適化が必要だと考えられた。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

- 1) Iwamura A., Fukami T., Hosomi H., Nakajima M., Yokoi T. CYP2C9-mediated metabolic activation of losartan detected by a high sensitive cell-based screening assay. *Drug Metab. Dispos.*, 39, 838-846, 2011
- 2) Hosomi H., Fukami T., Iwamura A., Nakajima

M., Yokoi T. Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation. *Drug Metab. Dispos.*, 39, 1388-1395, 2011

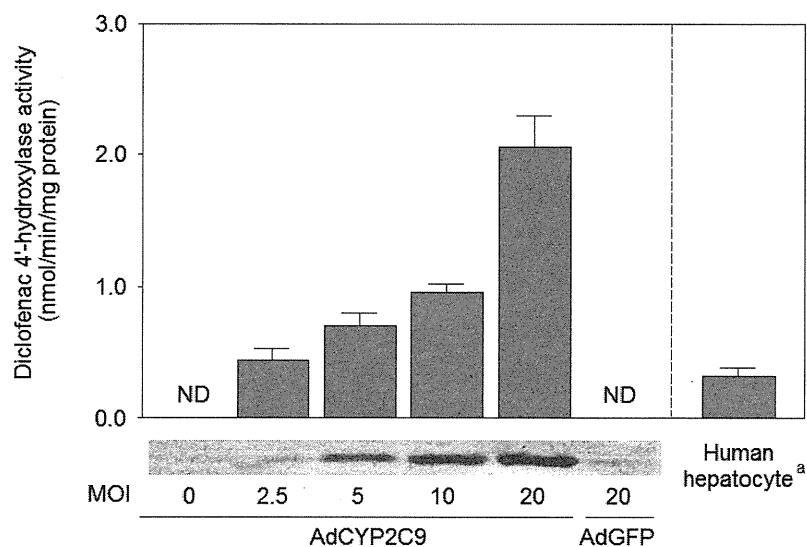
- 3) Motegi Y., Katayama K., Sakurai F., Kato T., Yamaguchi T., Matsui H., Takahashi M., Kawabata K., Mizuguchi H. An effective gene-knockdown using multiple shRNA-expressing adenovirus vectors. *J Control Release.*, 153, 149-153, 2011
- 4) Machitani M, Katayama K, Sakurai F, Matsui H, Yamaguchi T, Suzuki T, Miyoshi H, Kawabata K, Mizuguchi H. Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. *J Control Release.*, 154, 285-289, 2011
- 5) Machitani M., Yamaguchi T., Shimizu K., Sakurai F., Katayama K., Kawabata K., Mizuguchi H. Adenovirus vector-derived VA-RNA-mediated innate immune responses. *Pharmaceutics*, 3, 338-353, 2011.

#### F-2. 学会発表

- 1) Tsuyoshi Yokoi: Approaches to predict drug-induced liver injury. 4th Asia-Pacific ISSX Meeting, Symposium, Tainan, Taiwan, April, 2011
- 2) 横井 毅: 特異体質性薬物毒性の回避戦略、第 25 回日本薬物動態学会ワークショップ、東京、2011 年 5 月
- 3) 横井 毅: 薬物誘発性免疫毒性研究の新展開と反応性代謝物の役割、第 18 回 HAB 研究機構学術年会、東京、2011 年 5 月
- 4) 櫻井文教、水口裕之: マイクロ RNA による遺伝子発現制御系を付与した組換えアデノウイルスの開発、第 84 回日本生化学会、京都、2011 年 9 月
- 5) Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: Development of a virus-associated RNA-deleted adenovirus vector., American Society of Gene & Cell Therapy, 14th Annual Meeting 2011, Seattle, WA, USA, May, 2011
- 6) 町谷充洋、形山和史、櫻井文教、立花雅史、山口朋子、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之: アデノウイルス由来小分子 RNA (VA-RNA) の機能解析に向けた新規ベクターの開発、第 21 回アンチセンスシンポジウム・第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム、大阪、2011 年 9 月
- 7) Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Hiroyuki Miyoshi, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: Development of adenovirus vector lacking virus-associated RNA expression、第 17 回日本遺伝子治療学会総会、福岡、2011 年 7 月
- 8) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之: マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の非特異的な発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月

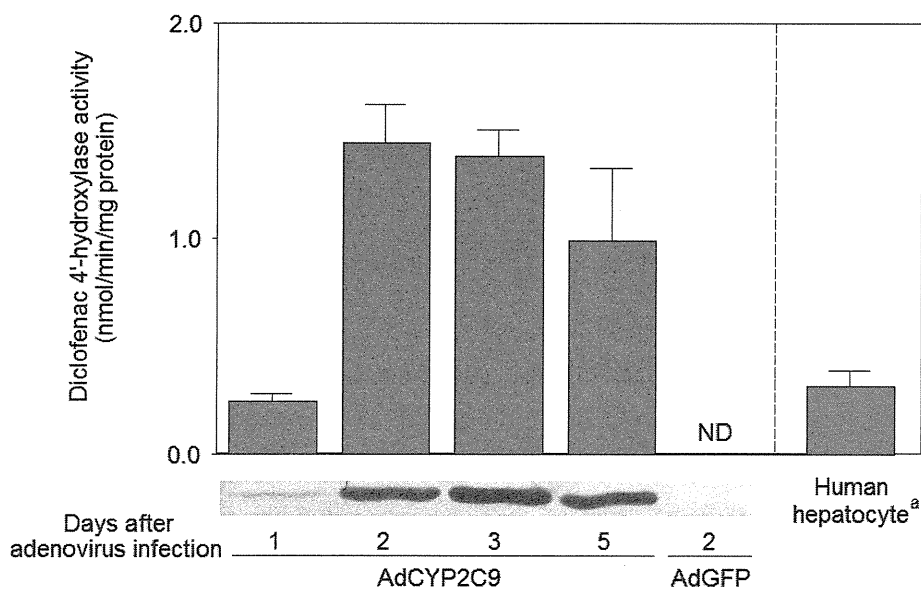
#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



**Figure 1. MOI-dependent changes of diclofenac 4'-hydroxylase activity and CYP2C9 protein level in adenovirus-infected HepG2 cells.**

HepG2 cells were infected with adenovirus for 2 days. CYP2C9 protein level was analyzed by Western blotting in total cell homogenates from adenovirus-infected HepG2 cells. Total cell homogenates (5  $\mu$ g) were separated by electrophoresis using 7.5% SDS-PAGE and the proteins were transferred to PVDF-membrane. Detection of CYP2C9 was performed using polyclonal rabbit anti-human CYP2C9 antibody. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). <sup>a</sup>Gomez-Lechon et al. (2001). ND: not detected.



**Figure 2. Time-dependent changes of diclofenac 4'-hydroxylase activity and CYP2C9 protein level in adenovirus-infected HepG2 cells.**

HepG2 cells were infected with adenovirus at MOI 10. CYP2C9 protein level was analyzed by Western blotting in total cell homogenates from adenovirus-infected HepG2 cells. Total cell homogenates (5  $\mu$ g) were separated by electrophoresis using 7.5% SDS-PAGE and the proteins were transferred to PVDF-membrane. Detection of CYP2C9 was performed using polyclonal rabbit anti-human CYP2C9 antibody. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3). <sup>a</sup>Gomez-Lechon et al. (2001). ND: not detected.