

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590210

研究課題名(和文) 反応性代謝物を介する肝障害発現に関与する機能タンパク質の解明

研究課題名(英文) Involvement of metabolic enzymes and transporters in diclofenac-induced liver injury

研究代表者

岩城 正宏 (IWAKI, Masahiro)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：30140346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ジクロフェナク (DF)の肝障害発現に関わる機能タンパク質として、CYP2C9, UGT2B7, MRP2 およびMRP3を取り上げ、siRNAにより各タンパク質機能を低下させた。実験には、ラット初代培養肝細胞を用い、機能タンパク質とDFおよびDFのグルクロン酸抱合体 (DF-Glu)の細胞内蓄積と毒性との関連を評価したところ、MRP2ノックダウンでMRP3ノックダウン細胞に比べ細胞内にDF-Gluが蓄積することが明らかとなった。また、DF-Gluが蓄積したMRP2ノックダウン細胞で細胞障害が認められ、MRP2の遺伝的欠損ラットではその傾向が顕著であった。

研究成果の概要(英文)：We examined the involvement of CYP2C9, UGT2B7, MRP2 and MRP3 in induction of diclofenac (DF)-induced hepatotoxicity. In primary cultured rat hepatocytes, the knockdown for MRP2 resulted in the accumulation of DF-Glu to cells. Whereas, the knockdown for MRP3 exhibited little alterations in the accumulation of DF-Glu to cells. The higher hepatotoxicity was observed in MRP2 knockdown cells compared with MRP3 knockdown cells, suggesting that MRP2 is more important in induction of hepatotoxicity by DF.

研究分野：薬物動態・代謝

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学

### 1. 研究開始当初の背景

体内に取り込まれた薬物は薬物代謝酵素により極性化され、一般に排泄されやすい安定な代謝物に変換される。しかし、一部の薬物では代謝により化学的反応性のある代謝物(親電子性反応代謝物,ERM)になり、機能性タンパク質や核酸に共有結合する結果、細胞機能障害、細胞ストレスや細胞死などの毒性を示す。ジクロフェナク(DF)などの非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)は肝臓でシトクロム P450 (CYP)による酸化代謝(第相反応)、カルボキシル基に対するグルクロン酸抱合(第相反応)、つづく排出トランスポーターによる胆汁中への排泄(第相反応)を受ける。また、同時に肝内でERMとなりうるアシル-CoA エステル生成も起こる。グルクロン酸抱合体は安定な代謝物と考えられていたが、近年NSAIDsのアシルグルクロン酸抱合体は、ERMとして認識され、免疫学的肝毒性の原因の一つと考えられている。

共有結合体生成による肝障害は医薬品開発において重要な問題であり、ERMの生成がヒト肝ミクロソームへの共有結合体試験やヒト初代肝細胞をはじめ様々な方法で検討されている。しかし、特異体質性肝障害の発生はERM自身の反応性のみならず、ERM生成に関係する代謝酵素やERMの排泄に関わるトランスポーターといった解毒能にも大きく関与すると考えられる。しかし、それらの寄与についてはほとんど明らかになっていない。そのため、第相反応における解毒過程が機能的に低下した場合に肝毒性が発生しやすいのかを明らかにする試験系を確立することは特異体質性肝障害発生を予測するうえで意義があると思われる。

### 2. 研究の目的

薬物毒性発現の原因の一つとして、薬物代謝により生成した反応性代謝物によるタンパク質との共有結合体生成がある。共有結合体は免疫学的毒性やアナフィラキシー反応を誘発すると考えられるが、詳細な機序は不明である。本研究ではNSAIDsのERMの共有結合生成にいずれの肝解毒機構(肝代謝酵素およびトランスポーター)の機能低下が関与しているのか siRNA および阻害剤を用い *in vitro* で検討を行う。また、*in vivo* で siRNA 発現アデノウイルスベクターを用いたノックダウン法による検討を行う。

### 3. 研究の方法

ラットより初代培養肝細胞をコラゲナーゼ灌流法により調製し、生存率が85%以上の

ものを実験に用いた。細胞は  $3.0 \times 10^5$  cells/mL に調製したものを播種し、コラーゲンコートプレートに単層培養およびマトリゲルを用いたサンドイッチ培養を行った。サンドイッチ培養では、bile pocket が形成される培養開始5日目を実験に用いた。各細胞にDFを添加し、経時的に細胞内外のDFおよびジクロフェナクグルクロン酸抱合体(DF-Glu)濃度をHPLC法により測定した。また、細胞毒性をLDH漏出量より評価するとともに、グルタチオンレベルをGSH測定した。

### 4. 研究成果

siRNAによるMRP2およびMRP3発現のノックダウン作用を複数のsiRNA配列を用い評価したところ、siRNA添加24時間においてmRNA発現量を有意にノックダウンできる配列が示された(Fig. 1)。これらの配列を用い以後の検討を行うこととした。

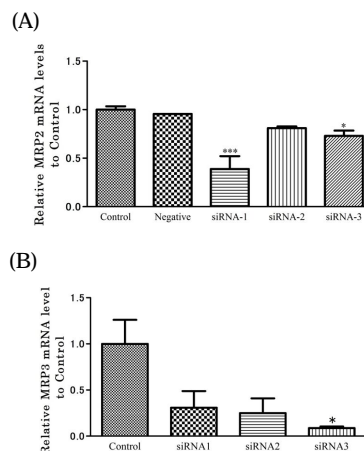


Fig. 1. Knockdown efficiencies of siRNA for (A) MRP2 and (B) MRP3 mRNA in rat hepatocyte 24 hr after transfection. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control group.

MRP2 または MRP3 ノックダウン細胞に対してDFを添加し、経時的に細胞内外のDFおよびDF-Glu濃度を測定したところ、MRP2ノックダウン時には細胞内DF-Gluの蓄積が認められたのに対して、MRP3ノックダウン時にはほとんど蓄積がみられなかった(Fig. 2)。

次に、DFおよびDF-Gluの細胞内蓄積と細胞障害性を培地中へのLDH漏出量を指標に評価した。MRP2ノックダウン細胞では、controlに比べ有意に高いLDH値がみられたのに対して、MRP3ノックダウン細胞ではほとんど変化がみられなかった(Fig. 3)。これより、DF-Gluの細胞内蓄積が毒性発現に関与する可能性が示唆された。

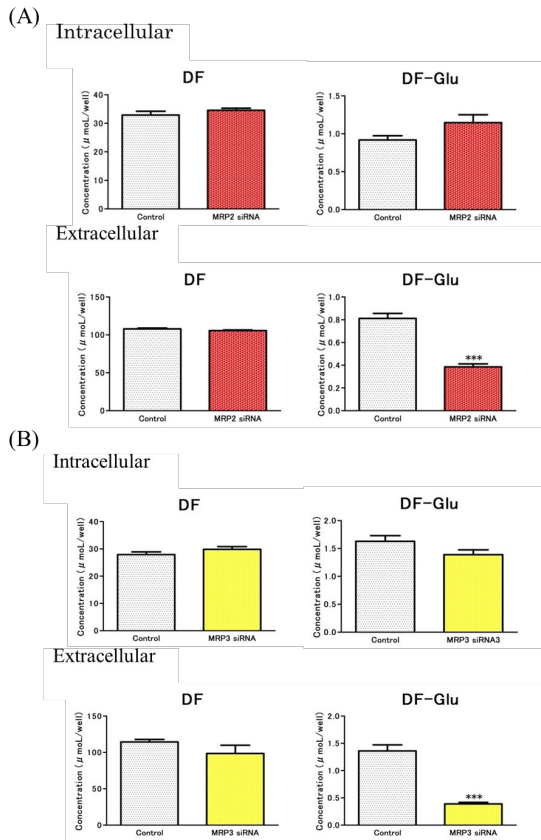


Fig. 2. Intracellular and extracellular DF and DF-Glu concentrations in (A) MRP2 knockdown hepatocytes and (B) MRP3 knockdown hepatocytes. Rat hepatocytes were seeded into a 24 well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well. After an overnight incubation, hepatocytes were exposed to 300  $\mu$ M DF. At 3 hr, the concentration of DF and DF-Glu were determined by HPLC methods. \*\*\* $p < 0.001$  vs control group.

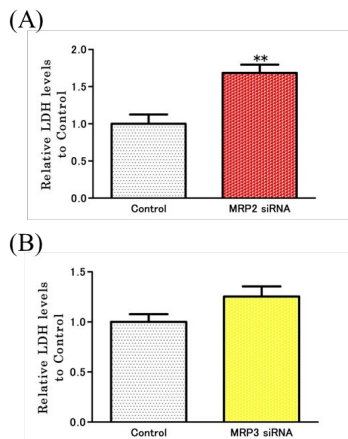


Fig. 3. Cytotoxicities in (A) MRP2 knockdown hepatocytes and (B) MRP3 knockdown hepatocytes. Rat hepatocytes were seeded into a 24 well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well. After an overnight incubation, hepatocytes were exposed to 300  $\mu$ M DF. At 3 hr, the LDH levels in medium were measured. \*\* $p < 0.01$  vs control group.

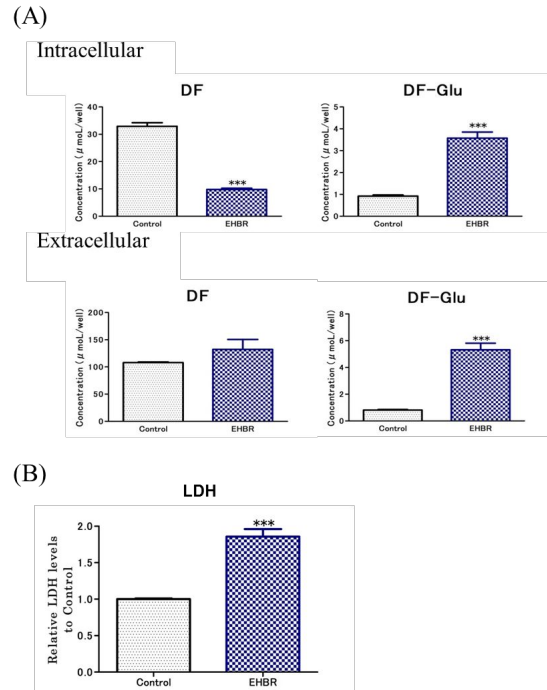


Fig. 4. (A) Intracellular and extracellular DF and DF-Glu concentrations and (B) cytotoxicities in hepatocytes of EHBR rats. Rat hepatocytes were seeded into a 24 well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well. After an overnight incubation, hepatocytes were exposed to 300  $\mu$ M DF. At 3 hr, the DF, DF-Glu and LDH levels were determined. \*\*\* $p < 0.001$  vs control group.

これまでの結果より, MRP3 に比べ MRP2 が DF-Glu の細胞内蓄積に関与しており, DF-Glu の細胞内蓄積が細胞障害と関連することが示唆された。そこで, MRP2 を遺伝的に欠損する EHBR ラット由来肝細胞を用い, 同様の検討を行った。EHBR ラット由来肝細胞に DF を添加し, 3 時間後の細胞内および細胞外 DF, DF-Glu 濃度を検討したところ, EHBR ラットにおいて細胞内 DF 濃度が有意に低下するとともに, DF-Glu 濃度が有意に上昇した (Fig. 4A)。このときの培地中 LDH 値を測定したところ, EHBR は control に比べ有意に高い値を示した (Fig. 4B)。EHBR は siRNA ノックダウンに比べ著しく MRP2 活性が低下しており, MRP2 の活性低下が細胞内の DF-Glu 蓄積および毒性発現に大きく関与することが明らかとなった。今後は, 免疫担当細胞と共培養するなど免疫系の関与を評価するとともに, *in vivo* で MRP2 ノックダウンの影響を検討するために, アデノウイルスベクターを利用するなどの手法により特異体質性肝障害の発症機序について検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩城正宏 (IWAKI, Masahiro)  
近畿大学・薬学部・教授  
研究者番号：30140346

(2)研究分担者

川瀬篤史 (KAWASE, Atsushi)  
近畿大学・薬学部・講師  
研究者番号：80411578