

研究種目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	アデノウイルスベクターを利用したNSAIDsの肝毒性発現機構の解明	
研究者所属・氏名	研究代表者：薬学部 医療薬学科 講師 川瀬篤史	

1. 研究目的・内容

NSAIDsによる特異体質性肝障害の発症機序に薬物代謝酵素やトランスポーターの機能低下が関与するか明らかにするために親電子性反応性代謝物(ERM)の生成に関わるCYPおよびUGT, ならびに肝細胞からの排出に関わるトランスポーターMRP2およびMRP3, さらにグルタチオン抱合に関わるGSTsについてアデノウイルスベクターを利用したsiRNAによるノックダウン法により検討する。

2. 研究経過及び成果

NSAIDsをはじめとするカルボキシル基を有する薬物の多くは肝臓で第1相代謝であるCYPによる酸化反応のほか, 第2相代謝としてUGTによるグルクロン酸抱合を受け, アシルグルクロン酸抱合体を生成する。しかし, アシルグルクロン酸抱合体はERMと呼ばれ, 求電子性で血清アルブミンや細胞内タンパク質などの生体高分子と共有結合体を形成し, 免疫学的毒性やアナフィラキシー反応を引き起こす。

実験では, モデル薬物としてNSAIDsのジクロフェナク(DF)およびトルメチン(Tol)を用い, これらの第1相~第3相解毒に関わる分子機能低下とERMの肝内動態の関係を検討した。図1に示すNSAIDsの肝臓における解毒経路に関わる因子のうち, 今回MRP2およびMRP3に対するshRNAを設計し, それらを発現ベクターに組み込み, ターゲット遺伝子発現抑制効果を*in vitro*で評価した。その結果, MRP2およびMRP3に対して80%以上発現を抑制する配列を明らかにした。次に, これらの配列をアデノウイルスベクターへと組み込み*in vivo*での検討に用いる予定である。また, *in vitro*ラット初代培養肝細胞を用い, 肝細胞内でのDF共有結合の生成におけるCYPまたはUGTの寄与について評価するためにそれぞれの阻害剤を用いて検討した。ここでは, CYP2C阻害剤としてスルファフェナゾール, UGTの阻害剤としてボルネオールを用いた。スルファフェナゾールを併用した場合, DF-Glu量および細胞毒性の指標であるLDH量に大きな変化は見られなかったことより, CYP2Cによる代謝物である4'OH-DFあるいは4'OH-DFの生成過程においては, 主な細胞毒性を引き起こす原因はないものと考えられた。また, ボルネオールを用いた検討より, 細胞内のDF量が有意に減少した。DFの取り込みは主に受動拡散により起こることよりUGT阻害が他の代謝経路への移行を引き起こすことが考えられた。

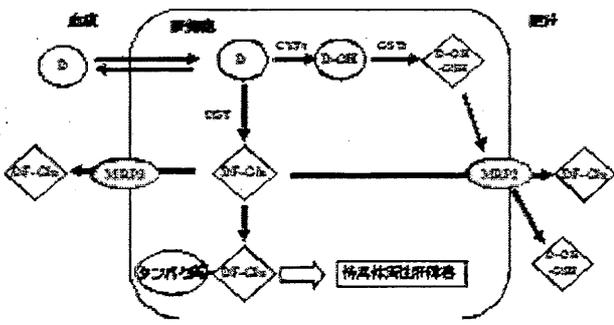


図1. 肝臓における薬物代謝経路と特異体質性肝障害

以上, 今回得られた主な研究成果として,
1. MRP2およびMRP3に対して効果的にノックダウン可能なshRNA配列を見出した。2. *in vitro*でCYPおよびUGTが直接共有結合の生成と毒性と関連していないことを明らかにした。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

選択した shRNA をアデノウイルスベクターに組み込み、それらを用い *in vivo* で DF 共有結合生成における MRP2 および MRP3 の寄与について検討を行う。具体的な手順としては、作製したアデノウイルスベクターをマウスに静脈内投与し、2-3 日経過後、肝臓を採取し、mRNA およびタンパク質レベルで MRP2 または MRP3 の変動を検討する。次に、これらの影響により DF-Glu 産生量と肝毒性発現にどのような影響があるかを評価する。このとき、MRP2 または MRP3 単独のノックダウンに加え同時にノックダウンする場合、他の阻害剤と併用する場合を併せて検討する。このことは、薬物相互作用および遺伝的多型に起因する NSAIDs の特異体質性肝障害を未然に防ぐことにつながるものと考えられる。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
PSWC2010	ポスター	平成 22 年 11 月 15 日