チトクロム P450 阻害によるキノン肝毒性の亢進

石原 康宏

Enhancement of Quinone Hepatotoxicity by Cytochrome P450 Inhibition

Yasuhiro Ishihara

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University; 1-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8521, Japan.

(Received April 15, 2013)

Quinones are widely distributed in nature, and some quinone compounds are used as therapeutic agents such as anti-cancer, anti-malarial or anti-bacterial drugs. However, their therapeutic use is limited in some cases because the use of most quinones is accompanied by adverse effects derived from their cytotoxicity, especially for hepatocytes. Two mechanisms have been proposed to explain quinone toxicity: oxidative stress *via* redox cycle and the arylation/alkylation of intracellular nucleophiles. A drug metabolizing enzyme, cytochrome P450 is closely involved in the hepatotoxicity of therapeutic agents in general, but quinone hepatotoxicity has been considered not to contribute to cytochrome P450 because the structure of quinone is not modified by cytochrome P450 and thus quinone compounds are thought to be metabolized mainly *via* a conjugation process. However, we have recently shown that quinone hepatotoxicity is enhanced under conditions of cytochrome P450 inhibition, indicating clearly the involvement of cytochrome P450 in quinone hepatotoxicity. Here, we revisit the generally accepted mechanisms of quinone hepatotoxicity and propose the importance of cytochrome P450 systems in quinone-induced hepatotoxicity on the basis of our recent work.

Key words—quinone; cytochrome P450; toxicity; redox cycle; oxidative stress

1. はじめに

キノン系化合物は高等植物、菌類、細菌類、及び、動物界を通して自然界に広く分布しており、細胞呼吸や光合成といった多くの電子伝達-生合成過程に重要な役割を有する。また、指甲花（ヘナ）に含まれるローソン（2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノンは、赤橙色の染料として、*Streptomyces* 由来のアドリアマイシン（ドキソルビシン）やマイトマイシン C は、抗がん薬として臨床で使用されている。2,3-ジメチルベンゾキノンのようなキノン系化合物は、昆虫や節足動物において毒性防御系を形成し、フェナントレンキノンやアンドラキノンのようなキノン系化合物は、環境汚染物質として、大気中の微粒子、たばこの煙、ディーゼル排気中になどにも広く分布している。このような自然界における広い

分布から、キノン系化合物は様々な分野で研究されており、中でも、一部の天然、あるいは、合成キノン系化合物が治療薬として臨床の場で使用されていることを鑑みると、キノン化合物の毒性発現メカニズムは重要な研究対象である。本稿では、キノン化合物の毒性発現メカニズムを概説した後、われわれが発見したキノン毒性とチトクロム P450 との新しい相互作用について解説したい。

2. キノン系化合物の毒性発現機序

キノン系化合物の毒性発現機序については現時点でも論争があるが、キノン系化合物の毒性発現機序はその化学構造に依存しており、¹⁾ (i) アリレーション/アルキレーションと (ii) レドックスサイクルとに大別される。アリレーション/アルキレーションにおいて、キノン系化合物が、細胞内チオール基のような求核性官能基と直接反応し、共有結合を形成することにより、還元型グルタチオンの枯渇、活性中心のシステイン残基との反応による機能性タンパク質の失活を引き起こすことにより、細胞障害が誘導される (Fig. 1).²⁾ レドックスサイクルにおいて、

The author declares no conflict of interest.

広島大学大学院総合科学研究科行動科学講座（〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1）

e-mail: ishiyasu@hiroshima-u.ac.jp

本総説は、平成 24 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Mechanism of Quinone Hepatotoxicity³⁾

Quinone cytotoxicity is induced by two principal mechanisms: (i) arylation/alkylation of nucleophiles among important biological constituents, for example, quinones react covalently with thiols, such as GSH or cysteine residues of proteins, to form arylation/alkylation products that eventually cause cellular damage, and (ii) oxidative stress *via* redox cycling. Redox cycling quinones accept one electron from intracellular reductases to form semiquinone radicals, which are auto-oxidized by donating one electron to molecular oxygen. In this process, massive superoxide anion radicals are produced, leading to oxidative stress. GSH, Reduced glutathione.

キノン系化合物はまず、細胞内の還元酵素による1電子付加を受け、セミキノンラジカルへと変換される。セミキノンラジカルは一般的に不安定であるため、近傍の酸素分子に電子を付加し、キノンへと自動的に酸化され、この過程でスーパーオキシドアニオンが生じる。⁴⁾ スーパーオキシドアニオンは、それ自身の反応性が高く、様々な生体内分子を酸化するほか、金属イオンの存在下、ハーバー-ワイス反応やフェントン反応により、さらに反応性の高いラジカル種であるヒドロキシルラジカルへと変換される (Fig. 2)。

このような過程で生じる反応性の高い酸素ラジカル [活性酸素種: reactive oxygen species (ROS)] により酸化ストレスが惹起され、細胞が障害される (細胞障害を含む ROS や酸化ストレスの作用については、Dröge が総説としてまとめているので、参照されたい)。⁵⁾

3. アリレーションとレドックスサイクルの肝毒性比較

キノン系化合物の毒性は化学構造に起因し、アリレーション/アルキレーションを介する機序とレドックスサイクルを介する機序に大別されるが、実際のキノン系化合物の毒性には両者の機序が関与している。アリレーションを介して毒性を発現するキノンである1,4-ベンゾキノン (1,4-benzoquinone; BQ) と1,4-ナフトキノン (1,4-naphthoquinone; NQ)⁶⁾ は、レドックスサイクルを介して毒性を発現するキノンである2,3-ジメトキシ-1,4-ナフトキノン (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone; DMNQ)⁷⁾ に比べて

Fig. 2. The Iron-catalyzed Harber-Weiss Reaction

毒性が強いことが報告されており,^{8,9)} 一般的に、アリレーションを介する毒性がレドックスサイクルを介する毒性より強いと考えられてきた。しかし、われわれがラット初代培養肝細胞に対するキノン毒性を調べたところ、短時間培養 (培養1時間) ではDMNQ と比べて BQ の毒性が強い一方、長時間培養 (培養5時間) では毒性の強さはほぼ同等であった。¹⁰⁾ レドックスサイクルは、還元酵素により触媒されるが、肝臓においてレドックスサイクルを触媒する主要な還元酵素は、NADPH-チトクロム P450 還元酵素である。そこで、NADPH-チトクロム P450 還元酵素活性が異なる細胞株を用いて DMNQ による細胞毒性を調べたところ、DMNQ 細胞毒性は NADPH-チトクロム P450 還元酵素活性に比例することが明らかとなった。¹¹⁾ したがって、レドックスサイクリングキノンの毒性は、還元酵素活性が低い組織で低く、高い組織で高くなることが予想される。肝臓は、NADPH-チトクロム P450 還元酵素を始めとした還元酵素活性が、他の組織と比較して高いことが分かっており、よって、肝臓においては、レドックスサイクリングキノンの毒性への寄与はアリレーションキノンに比べて同等となると考えられる。ラット初代肝細胞では、NADPH-チトクロム P450 還元酵素活性は、培養とともに低下することが明らかとなっており (石原ら、未発表データ)、HepG2 細胞など、一般的に使用されている肝細胞株の NADPH-チトクロム P450 還元酵素活性は、初代培養のそれと比較して著しく低い。¹¹⁾ また、還元酵素活性は、細胞種によって大きく異なることが報告されている。¹²⁻¹⁵⁾ これらのことを考えると、レドックスサイクリング活性を有するキノン系化合物

石原康宏

2001 年関西学院大学理学部化学科卒業、2006 年大阪大学大学院理学研究科 (武田薬品工業連携大学院) 博士後期課程修了、同年徳島文理大学香川薬学部薬理学講座助手、2011 年より、広島大学大学院総合科学研究科助教。専門分野は、薬理学 (毒性学)、酸化ストレス。

を治療薬として開発する際、毒性の評価には NADPH-チトクロム P450 還元酵素活性の高い標本を用いる必要がある。

4. キノン系化合物の代謝と排泄

キノン系化合物は広範な薬理学的作用を有するため、抗がん剤、抗マラリア薬、抗菌薬や気管支喘息治療薬など、幅広い用途で使われている。¹⁶⁻¹⁹⁾ しかし、それらの毒性、特に、肝毒性のために臨床での使用が制限されている。キノン系化合物などの生体異物は種々の代謝酵素により代謝され体外に排出される。代謝酵素は大きく Phase I と Phase II の 2 グループに分けられる。Phase I グループのなかで、主として肝臓の小胞体膜に存在するチトクロム P450 は、生体異物に対して 1 酸素原子の付加反応により代謝し、Phase II 酵素は Phase I 酵素による代謝物の抱合反応を行う。しかし、キノン系化合物はチトクロム P450 による代謝を受けず、主に、Phase II における抱合反応により代謝され、体外へ排出される。^{20,21)} すなわち、肝臓において、キノン系化合物は、NAD(P)H:キノン酸化還元酵素 1 による 2 電子還元を受け、ヒドロキノンを生じる。²⁰⁻²²⁾ ヒドロキノンは、セミキノンラジカルと比較して安定であり、容易に自動酸化されず、また、ヒドロキノンには、グルクロン酸抱合酵素、硫酸抱合酵素などの Phase II 抱合酵素群による抱合反応を受け、尿中、あるいは、胆汁中に排泄される。したがって、キノン系化合物による肝毒性は主として未変化体によると考えられる。

化学物質の生体での毒性を考える上で、チトクロム P450 を始めとした代謝酵素と化学物質との相互作用は、毒性発現における極めて重要な因子であるが、先に述べたように、キノン系化合物の代謝は、主として抱合反応によるものであり、^{20,21)} チトクロム P450 はキノン代謝に関連しないことから、チトクロム P450 はキノン毒性と関連しないと考えられてきた。しかし、キノンからセミキノンラジカルへの還元は、NADPH-チトクロム P450 還元酵素や NADH-チトクロム *b₅* 還元酵素により触媒されることが知られており、これら還元酵素の生理的な基質はチトクロム P450 である (Fig. 1)。以上の背景から、われわれは、キノン化合物による肝毒性、特に、レドックスサイクリングキノンの肝毒性とチトクロム P450 との相互作用に焦点を当てて解析

した。

5. チトクロム P450 阻害下におけるレドックスサイクルの亢進とレドックスサイクリングキノンの毒性増大

5-1. チトクロム P450 阻害によるキノン肝細胞毒性の亢進 —ラット初代肝細胞を用いた評価—

一般的に使われている肝細胞株は、チトクロム P450 発現していないか、発現していてもその発現量は極めて少ない。²³⁻²⁷⁾ また、ラット初代肝細胞は、単離・培養直後は高いチトクロム P450 含量を示すが、培養時間に伴ってチトクロム P450 含量は減少し、単離後 24 時間では、単離直後の約 1/3 量まで低下する (石原ら、未発表)。そこで、われわれは、キノン系化合物による肝毒性とチトクロム P450 との関連を評価する実験系として、単離後 2 時間培養し、培養ディッシュに接着させたラット初代肝細胞を使用した。ラット初代肝細胞をチトクロム P450 阻害薬である SFK-525A で処理した後、レドックスサイクリングキノンである DMNQ で処理すると、DMNQ の肝細胞毒性が大きく増進した (Fig. 3)。¹⁰⁾ この作用は、ケトコナゾールやメチラポンなど、他のチトクロム P450 阻害薬にも認められた (Fig. 3)。¹⁰⁾ 一方、アリレーティングキノンである BQ の肝細胞毒性は、チトクロム P450 阻害薬による影響は受けなかった。¹⁰⁾ したがって、レドックスサイクルを機序とするキノン肝毒性は、チトクロム P450 阻害下で亢進することが明らかとなった。

Figure 1 に示したように、レドックスサイクリングキノンは、スーパーオキシドアニオン生成を介して酸化ストレスを惹起し、細胞を障害する。そこで、チトクロム P450 阻害下における DMNQ 肝毒性亢進について、酸化ストレスの関与を調べた。ラット初代肝細胞を DMNQ で処置したとき、スーパーオキシドアニオン生成と過酸化脂質量の増加が認められ、肝細胞を SFK-525A で前処理した後に DMNQ で処置すると、スーパーオキシド生成、及び、脂質過酸化はいずれも亢進した。¹⁰⁾ 以上の結果より、チトクロム P450 阻害下におけるレドックスサイクリングキノンの毒性増大のメカニズムとして、レドックスサイクルの亢進による酸化ストレスの増大が示唆された。

5-2. チトクロム P450 阻害によるキノン肝毒性の亢進 —*in vivo* での評価—

次に、上述のよう

Fig. 3. Enhancement of DMNQ-induced Toxicity by Cytochrome P450 Inhibition in Rat Primary Hepatocytes

Primary rat hepatocytes were pretreated with SKF (30 μ M), ketoconazole (30 μ M) or metyrapone (1 mM) for 20 min and then incubated in the presence of DMNQ (60 μ M). Cell viability was estimated as the percentage of LDH activity in the medium after incubation for 5 h. The values are given as the mean $\pm$ S.E. of five separate experiments. Data were analyzed using Student's *t*-test or Dunnett's test with the Bonferroni correction for multiple comparisons. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. ***p* < 0.01, **p* < 0.05, and ##*p* < 0.01.

Fig. 4. Potentiation of DMNQ-induced Hepatotoxicity by Cytochrome P450 Inhibition in Rats

DMNQ (100 mg/kg) was intraperitoneally administered in male rats 3 h after pretreatment with SKF (30 mg/kg, i.p.), cimetidine (100 mg/kg, i.p.) or ketoconazole (30 mg/kg, i.p.). Blood was collected 24 h after DMNQ administration, and then, serum was separated, followed by measurements of ALT activity. The values are given as the mean $\pm$ S.E. of five to eight separate experiments. Data were analyzed using Student's *t*-test or Dunnett's test with the Bonferroni correction for multiple comparisons. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant. ***p* < 0.01 and ##*p* < 0.01. ALT, alanine aminotransferase.

な現象が *in vivo* で生じるか否かを検討した。ラットに DMNQ を腹腔内投与したところ、血中アラニントランスアミナーゼ、及び、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性が増大したことから、肝障害が起きていることが明らかとなった。次に、チトクロム P450 阻害薬である SKF-525A を前投与した後、DMNQ を投与したとき、DMNQ による肝毒性は有意に増大した (Fig. 4).²⁸⁾ この肝毒性の増進は、チトクロム P450 阻害薬であるケトコナゾールやシメチジンの前投与でも認められた (Fig. 4).²⁸⁾ 一方、アリレーティングキノンである NQ による肝毒性は、SKF-525A により影響を受けなかった。²⁸⁾ DMNQ の投与は肝の GSH 量を減少させ、GSSG 量及び脂質過酸化を増大させた。SKF-525A の前投与は、DMNQ によるこれらの作用をいずれも増進させた。²⁸⁾ また、DMNQ 単独投与による肝障害、及び、DMNQ と SKF-525A の併用による肝障害ともに、抗酸化薬である α -トコフェロールの投与により完全に抑制された。²⁸⁾ したがって、*in vivo* において、レドックスサイクリングキノンの肝毒性は、チトクロム P450 阻害により亢進するこ

と、さらに、その亢進には、酸化ストレスの増大が係わることが明らかとなった。

6. チトクロム P450 阻害による肝毒性増大機序

DMNQ は、レドックスサイクルを介して NADPH の酸化を亢進させる (Fig. 1)。NADPH-チトクロム P450 還元酵素阻害薬である diphenyleneiodonium により NADPH-チトクロム P450 還元酵素を阻害すると、DMNQ による NADPH 酸化が抑制されるとともに、DMNQ による肝毒性も抑制された。¹⁰⁾ また、異なる還元酵素活性を有する細胞種を用いた実験により、DMNQ による細胞毒性は還元酵素活性と比例することが明らかとなり、DMNQ 毒性が還元酵素により媒介される電子供給に依存していることが示された。¹¹⁾ SKF-525A は、DMNQ による NADPH 酸化を亢進し、diphenyleneiodonium は SKF-525A による NADPH 酸化の亢進も抑制した。¹⁰⁾

ここまで述べてきた研究結果より、レドックスサイクリングキノンの肝毒性及びチトクロム P450 阻害による毒性増大機序について、Fig. 5 のような仮説を提案する。すなわち、チトクロム P450 が正常に機能する状態でキノン系化合物が処置されたとき、

Fig. 5. Enhancement of Quinone Hepatotoxicity under Cytochrome P450 Inhibition: a Putative Mechanism³⁾

In the liver, cytochrome P450 accepts an electron from NADPH-cytochrome P450 reductase or NADH-cytochrome b_5 reductase. When redox cycling quinones are used under conditions where cytochrome P450 is operating functionally, NADPH-cytochrome P450 reductase or NADH-cytochrome b_5 reductase supplies electrons to both cytochrome P450 and redox cycling quinones. In other words, quinones compete with cytochrome P450 for electron flow from the reductases. However, under cytochrome P450 inhibition, reductases are not able to transfer an electron to cytochrome P450 and, thus, they donate an electron only to redox cycling quinones, forming semiquinone radicals. As a result, the quinone redox cycle can be potentiated by cytochrome P450 inhibition.

NADPH-チトクロム P450 還元酵素や NADH-チトクロム b_5 還元酵素はキノン系化合物とチトクロム P450 双方へ電子を供給すると考えられる。言い換えると、還元酵素によって供給される電子をキノン系化合物とチトクロム P450 で競合する。しかし、チトクロム P450 阻害状態では、還元酵素はキノンのみに電子を供与する。したがって、レドックスサイクルの亢進により、スーパーオキシドアニオンの生成量が増大し、酸化ストレスを亢進することにより、レドックスサイクリングキノンの肝毒性をさらに増大させる。

7. 結論

本稿では、キノン系化合物の毒性発現機序と、われわれが明らかにしたチトクロム P450 阻害下で生じるレドックスサイクリングキノンの毒性亢進について述べてきた。この成果は、キノン化合物のチトクロム P450 を介した新たな毒性機構を提唱した点で意義があり、さらに、キノン系医薬品の適正使用のみならず、キノン系医薬品開発においても、非常に重要な知見となることが期待される。加えて、一般的に使用されている細胞株はチトクロム P450 や還元酵素活性が低く、初代肝細胞においても、培養条件によりチトクロム P450 含量が変化することから、キノン系化合物の毒性評価に際しては、実験系の選択が重要となるであろう。また、チトクロム P450 がレドックスサイクルを調節する化合物の酸化ストレスを調節して、生体機能を制御する役割を果たしている可能性が示唆され、今後の展開が期待

される。

謝辞 本研究をまとめる機会を与えて頂いた、日本薬学会薬学雑誌編集委員の先生方に感謝申し上げます。本研究は、大阪大学大学院（武田薬品工業連携大学院）及び、徳島文理大学香川薬学部において遂行されたものであり、嶋本典夫元大阪大学教授・徳島文理大学教授、朝日 知武田薬品工業薬物代謝研究所所長、岩崎正彦武田薬品工業主席研究員に心より御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Obrien P. J., *Chem. Biol. Interact.*, **80**, 1-41 (1991).
- 2) Brunmark A., Cadenas E., *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 435-477 (1989).
- 3) Ishihara Y., Shimamoto N., "Hepatotoxicity: From Genomics to *in Vitro* and *in Vivo* Models," ed. by Sahu S., John Wiley & Sons, Chichester, 2007, pp. 275-281.
- 4) Kappus H., Sies H., *Experientia*, **37**, 1233-1241 (1981).
- 5) Dröge W., *Physiol. Rev.*, **82**, 47-95 (2002).
- 6) Rossi L., Moore G. A., Orrenius S., O'Brien P. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 25-35 (1986).
- 7) Gant T. W., Rao D. N., Mason R. P., Cohen G. M., *Chem. Biol. Interact.*, **65**, 157-173 (1988).
- 8) Henry T. R., Wallace K. B., *Arch. Toxicol.*,

- 70, 482–489 (1996).
- 9) Schmieder P. K., Tapper M. A., Kolanczyk R. C., Hammermeister D. E., Sheedy B. R., Denny J. S., *Toxicol. Sci.*, **72**, 66–76 (2003).
- 10) Ishihara Y., Shiba D., Shimamoto N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **214**, 109–117 (2006).
- 11) Ishihara Y., Tsuji K., Ishii S., Kashiwagi K., Shimamoto N., *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 634–638 (2012).
- 12) van der Hoeven T., Galivan J., *Biochim. Biophys. Acta*, **931**, 59–67 (1987).
- 13) Hoban P. R., Walton M. I., Robson C. N., Godden J., Stratford I. J., Workman P., Harris A. L., Hickson I. D., *Cancer Res.*, **50**, 4692–4697 (1990).
- 14) Ooe H., Kon J., Miyamoto S., Ozone Y., Ninomiya S., Mitaka T., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1667–1671 (2006).
- 15) Pillai V. C., Snyder R. O., Gumaste U., Thekkumkara T. J., Mehvar R., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **38**, 846–853 (2011).
- 16) Lown J. W., *Mol. Cell. Biochem.*, **55**, 17–40 (1983).
- 17) Powis G., *Pharmacol. Ther.*, **35**, 57–162 (1987).
- 18) Vennerstrom J. L., Eaton J. W., *J. Med. Chem.*, **31**, 1269–1277 (1988).
- 19) Kurokawa T., Matsumoto T., Ashida Y., Sasada R., Iwasa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 383–385 (1994).
- 20) Lind C., Hochstein P., Ernster L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 178–185 (1982).
- 21) Radjendirane V., Joseph P., Lee Y. H., Kimura S., Klein-Szanto A. J., Gonzalez F. J., Jaiswal A. K., *J. Biol. Chem.*, **273**, 7382–7389 (1998).
- 22) Thor H., Smith M. T., Hartzell P., Bellomo G., Jewell S. A., Orrenius S., *J. Biol. Chem.*, **257**, 12419–12425 (1982).
- 23) Gomez-Lechon M. J., Donato T., Jover R., Rodriguez C., Ponsoda X., Glaise D., Castell J. V., Guguen-Guillouzo C., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1448–1459 (2001).
- 24) Yoshitomi S., Ikemoto K., Takahashi J., Miki H., Namba M., Asahi S., *Toxicol. in Vitro*, **15**, 245–256 (2001).
- 25) Rodriguez-Antona C., Donato M. T., Boobis A., Edwards R. J., Watts P. S., Castell J. V., Gomez-Lechon M. J., *Xenobiotica*, **32**, 505–520 (2002).
- 26) Wilkening S., Stahl F., Bader A., *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1035–1042 (2003).
- 27) Aninat C., Piton A., Glaise D., Le Charpentier T., Langouet S., Morel F., Guguen-Guillouzo C., Guillouzo A., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 75–83 (2006).
- 28) Ishihara Y., Ishii S., Sakai Y., Yamamura N., Onishi Y., Shimamoto N., *J. Appl. Toxicol.*, **31**, 173–178 (2011).