

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

課題番号				
71253 20000997A	71253	臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究	大野 泰雄	…… 1
20001001A	72001	日本におけるヒト肝細胞の保存・管理に関する基準の検討	小林 英司	…… 10
20001002A	72002	日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型	遠藤 仁	…… 14
20001004A	72003	ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究 －産学共同のネットワーク作りをめざして－	松浦 成昭	…… 21
20000998A	72004	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立	永森 静志	…… 25
20001003A	72005	ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開 －医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－	水柿 道直	…… 29
20001005A	72006	臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究	乾 賢一	…… 39
20001000A	72007	エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究	棚元 憲一	…… 45
20000999A	72008	肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立と病的細胞の分子生物学的解析	香坂 隆夫	…… 55

高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立

所属 杏林大学医学部薬理学

研究者 永森静志

分担研究者

- | | |
|--------------------|----------------------|
| (1)東京慈恵会医科大学 | (永森静志)、蓮村哲、松浦知和、川田雅昭 |
| (2)岡山大学医学部 | 宮崎正博 |
| (3)食品薬品安全センター秦野研究所 | 梅田誠、佐々木澄志 |
| (4)国立医薬品食品衛生研究所 | 本間正充 |
| (5)千葉大学薬学部 | 千葉寛、細川正清 |
| (6)中外製薬(株) | 吉田彪 |

要旨

医薬品の安全性確認・効果判定のための薬物動態解析にヒト肝組織を用いる試験法の開発が急がれている。本研究は肝機能を保持したヒト培養肝細胞株を樹立し、リアクターで高密度培養し薬物代謝酵素を誘導するシステムを開発するため細胞を用いる各種試験系の開発、とくに薬物代謝機能を追求し医薬品のヒトへの効果判定、安全性確認のための新システムを提案し構築を進めた。

1. 研究目的

- (1) ヒト肝由来細胞培養系確立、同細胞系への遺伝子導入による改良開発、
- (2) 細胞の機能を十分発揮させるためのバイオリアクターの改良、
- (3) (1)(2)を応用した医薬品の有効性や安全性確認装置の開発、
- (4) 実際の医薬品の有効性や安全性の検討である。各研究施設が緊密に連携しながら汎用システムの確立をめざした。

2. 研究方法

3次元展開型ラジアルフロー型バイオリアクターでヒト肝由来細胞を培養しヒト肝臓に類似の機能を有するバイオ人工肝臓を作成。

バイオ人工肝臓を利用してヒト肝と類似の薬物代謝評価系を開発、薬物や環境汚染物質の代謝や代謝物質の細胞毒性や変異原性を検討する為の基礎研究を行った。

具体的にはリアクターで培養した細胞に主な薬物代謝酵素であるチトクローム P450(CYP)やカルボキシエステラーゼ(CES)が存在することの確認。その分子種特にヒト肝特異分子種の存在を調べた。薬物代謝動態評価系への応用のためには、複数の条件で検討する必要があり小型化をめざした。

3. 研究成果

永森と慈恵グループはリアクター本体の小型化は30ml、5mlを作成した。それぞれについて機能を検討し30mlリアクターでは従来の中型リアクターと同レベルの機能が発現されることをアルブミン産生能の比較により確認した。

担体の開発は従来使用中のシランに類似の、径と空隙率と孔径を有するハイドロキシアパタイト担体を旭光学工業と開発した。

ラジアルフロー型バイオリアクターに充填しFLC細胞を培養したところ、細胞は密に3次元配列し表面には発達した微絨毛が、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察された。細胞株について、FLC-7細胞はクローニングが難しいとされてきたが、FLC-4と7細胞より10数個の細胞群をクローニングした。薬物がFLC細胞(各クローンを含む)により代謝活性化される現象を、培養細胞を用いて検索する方法の確立を目的としている。このための各種試みのうち、ハイドロキシアパタイト布上でFLC細胞が増殖することを確かめた。

ラジアルフロー型バイオリアクターで培養したヒト肝由来細胞がヒト肝に特異的な CYPs と CES の分子種の保持を蛋白レベルと酵素活性レベルで確認できた。

さらに、FLC-5 を用いて、ヒト CYP 分子種の約 30% を占める CYP3A の薬物相互作用を検討する系を構築した。このシステムで testosterone の 3 時間以内での代謝システムを構築できた。このため testosterone の代謝システムはこの条件を満たし、ヒト CYP 分子種で特に重要な CYP3A を介した薬物相互作用をシミュレーションするのに適していることを示した。

宮崎らは高機能不死化ヒト肝細胞株の樹立を試みた。

薬物の有効性、安全性を適正に評価するためには正常ヒト肝細胞が必要であるが、その継代培養が困難である。この代替えとして高分化型ヒト肝癌由来細胞株が使われてきたが腫瘍性がなく無限の増殖能を有し機能的に正常ヒト肝細胞に近似する不死化ヒト肝細胞株の開発に取り組んだ。

ヒト胎児肝臓の培養肝細胞に simian virus 40 large T antigen (SV40Tag) 及び neomycin phosphotransferase の遺伝子を含む plasmid DNA pSV3neo をリポフェクション法によりトランスフェクションしてヒト不死化肝細胞株(OUMS-29)を樹立した。

3次元培養すると、アンモニア (NH₃) 由来の最終産物である尿素の産生が時間依存的に増加することを認めた。ヒト肝臓の cDNA ライブラリーよりクローニングした肝転写因子 HNF4 α 遺伝子 (HNF4 α 2 遺伝子に相当する) を、リポフェクション法により OUMS-29 細胞に導入した H-11 細胞株は親細胞株 OUMS-29 には見られないアポリポプロテイン AI (ApoAI)、poCII、ApoCIII 遺伝子を発現した。

さらに HNF1 α 、human blood coagulation factor X、 α 1-antitrypsin などの遺伝子発現が顕著に増加した。H-11 細胞株は親株 OUMS-29 よりさらに高分化型であり、薬物の有効性、安全性評価に極めて有用な細胞系であると考えられた。

梅田らは、FLC 細胞株を用いた一般毒性、変異原性形質転換の解析を行った。

しかし、薬物代謝作用は動物種によって異なり、ヒトに対する遺伝毒性作用を正確に反映していない可能性が考えられる。ヒト正常肝細胞は分化機能を維持した状態での長期培養が難しい。ヒトの正常肝細胞の機能をよく保持しているヒト肝細胞由来の (FLC-4、FLC-5、FLC-7) と V79 細胞を FLC 細胞と共培養し、変異原物質を加え、V79 細胞の突然変異率を求める FLC-V79 法の開発を試みた。

さらに、通常のコロニー形成法による突然変異試験も行い、突然変異率を比較することで FLC-V79 法の有用性を検討した。

結果は、1) ミクロゾーム経由法において、突然変異率は S9 濃度により変化し、各変異原物質ごとに最適な濃度がある。

2) ミクロゾーム経由法と FLC-V79 法において、変異原物質の用量依存性は、0.1 μ g/ml BP 及び 0.5 μ g/ml MCA では、FLC-V79 法の方が通常のコロニー形成法より高い突然変異率を示した。

一方、0.10 μ g/ml CP、0.2 mg/ml NDMA、0.1 μ g/ml AFB1 では、低い突然変異率を示したか、または全く突然変異を誘導しなかった。また 0.2 μ g/ml MNNG と 0.5 mg/ml EMS では、FLC-V79 法において、代謝による変異原活性の失活は認められなかった。

3) FLC-V79 法において、P450 誘導物質の明確な影響は認められなかった。

4) FLC-V79 法において、セルカルチャーインサートを用い、FLC 細胞と V79 細胞が接触しないように共培養した群を設け、BP (1 μ g/ml) を処理したところ、突然変異は誘導されなかった。故に V79 細胞が突然変異するには、FLC 細胞との接触が必要であることが分かった。この研究から、FLC 細胞は細胞経由法を用いた突然変異試験に応用出来ることが示された。特に、芳香族炭化水素の突然変異原性を調べる上で、有用な実験系となることが示唆された。しかし、他の変異原物質はあまりよく検出されなかった。今後、FLC 細胞の代謝活性化系をコメットアッセイに応用し、変異原物質がよく検出されるかどうかとも検討する。

千葉、細川らグループは、FLC 細胞での薬物代謝に関する機能特性の検討をした。

新薬開発において臨床試験を安全に実施するために、開発の初期の段階でヒトでの薬物代謝に関する情報をより正確に得ることの重要性が認識されている。さらに FLC 細胞においてはチトクローム P450 の分子種、数種が発現されていることを蛋白レベルと代謝活性の基質特異性から証明し、それらの一部はプロトンポンプインヒビタ

一等により酵素誘導が生じることを確認した。カルボキシエステラーゼの発現については、各 FLC 細胞の promoter gene の領域に細胞株間で差異があり、すなわちその発現調節機構に個人差のあることを明らかにした。

バイオリクターでの薬物代謝では P450 を代謝酵素とするアンチピリンの代謝速度は遅かった。一方カルボキシエステラーゼを代謝酵素とするナファモスタットの代謝速度は良好で、代謝産物の AN や PGBA の産生も等量産生された。

実験動物で得られたデータへのヒトへの外挿の問題点も指摘されており、培養細胞を用いた代替法の開発の必要性が論じられているが、ヒトの薬物代謝において既に多くの個人差が報告されていることから、in vivo での薬物の代謝を予測する上で、個人差の要因の解明が必要とされている。

現在、個人差の要因として薬物、環境化学物質や嗜好品などによる環境要因と遺伝子多型が原因となる遺伝的要因が考えられている。本研究においては正常肝細胞機能をおおく保持している FLC4、FLC5、FLC7 および HepG2 細胞を用い、薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) およびカルボキシエステラーゼ (CES) の環境要因による酵素誘導を調べると共に、CES に関しては、転写制御領域における遺伝子多型と発現の個人差の関係について検討を行った。

カルボキシエステラーゼ (CES) に関しては、主要亜種酵素の HU1 と HU3 の存在を認めた。またナファモスタットの代謝活性も認めたため、この点からもカルボキシエステラーゼの存在が確認された。

すでにヒトの in vivo において CYP1A の誘導が報告されている omeprazole、および 3 種の PPI を用いて検討を行った。その結果、用いた細胞全てにおいて EROD 活性が上昇し、さらに、CYP1A1 含量および mRNA の増加が全ての細胞において確認された。CYP3A に関しては、誘導剤として rifampicin を添加、FLC7 において testosterone 6 β -水酸化活性の上昇ならびに CYP3A 含量の濃度依存的な増加が認められた。結果から、FLC 細胞株において CYP1A1 ならびに CYP3A の酵素誘導能を持つことが明らかとなり、FLC 細胞が酵素誘導の in vitro モデル系として利用できる可能性が示唆された。

CES 活性とヒト肝に発現している主要な CES アイソザイムである HU1 の発現量を調べたところ、著しい差異が認められた。上記細胞株の核タンパク抽出液を用いて CES HU1 の 5' 上流領域をプローブに用いてゲルシフトアッセイし特異的な結合が認められたことから、FLC 細胞株の核タンパク抽出液中に CESHU1 の発現調節領域と特異的に結合する転写因子が存在することが明らかになった。

これら 4 種の細胞株のゲノム DNA から得られた CES HU1 の 5' 上流領域を調べたところ、Sp1, HNF-1, HNF-3, AP-1, AP2, HNF-2, C/EBP などの転写調節因子の結合しうる配列およびイニシエーターの配列が認め、これらの配列が肝細胞において CES HU1 の転写を調節している可能性が示唆された。さらに、細胞間での CES HU1 の発現量の差異が、CES HU1 遺伝子の 5' 上流領域にある DNA 配列の遺伝子多型に基づくものと推察されたことから、これらの細胞株が in vitro でのヒト個人差解明のモデル細胞系として有用である可能性が示唆された。

本間は医薬品や環境汚染物質等の安全性に関わる検索。

特に、ほ乳類細胞を用いた遺伝子突然変異の研究に関しては、in vitro、in vivo 試験系で多くの新しい方法を開発してきた。FLC-4、FLC-5、および FLC-7 にラムダファージベクターを導入するための条件検討を行った。その結果、ほ乳類細胞で選択可能な遺伝マーカーをもつ Zap express ベクターが最適であり、トランスフェクションの条件を確立した。

ヒト肝細胞株 FLC-4、FLC-5、および FLC-7 にラムダファージベクター Zap express をトランスフェクションし、ゲノム上に安定して組み込まれた細胞のクローニングを行いそれら細胞を用いて、ラムダファージ上に存在する lacZ 遺伝子、もしくは cII 遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異試験が可能かどうかを検討。現在得られた変異体に関しては、突然変異を遺伝子レベルで解析している。

4. 考察

このシステムの有利な点は、初代肝細胞よりはるかに扱いやすく、機能も安定していることである。

また、FLC4 細胞は無血清培地での培養が可能なので血清蛋白の影響を除外して検討も可能であり、逆に蛋白を添加すれば in vivo での環境に似せて検討も可能である。さらに担体を組織親和性のよいものに変えることにより、一層ヒト肝近似の環境を作成できる可能性を有している。

5. 結論

ヒト肝実質細胞由来の樹立株化細胞 (FLC cell lines) の正常肝細胞が保有する重要な肝機能発現を多面的に確認し、3次元展開型のバイオリアクターの利用でさらに高度な安定した肝機能を期待できる。したがって研究班がめざす医薬品の安全性や有効性試験に利用できる可能性が大きい。またこのシステムにより大量の安定した均一の機能を有するマイクロブームを抽出し薬物代謝系の試験に利用できる。

6. 研究発表

Nagamori S, Hasumura S, Matsuura T, Aizaki H, Kawada M. Developments in bioartificial liver research: concepts, performance, and applications. *J Gastroenterol* 2000; 35(7): 493-503.

永森静志. [Editorial] バイオ人工肝の臨床応用への道程、*肝臓* 2000;41:783-788, 2000.

永森静志, 水谷 悟、蓮村 哲: [Review] 劇症肝炎の分子機構と治療; バイオ人工肝の現状, *Molecular Medicine* 2000;37:1402-1410.

永森静志: 肝移植の現況と展望: 人工肝の開発: その意義と問題点、*肝胆膵* 2000;41:929-938.

永森静志. 肝移植: 現況と展望 V. 人工肝臓, *日本内科学会雑誌* 2001;90:91-103.

Different expression of positive and negative regulators of hepatocyte growth in growing and shrinking hepatic lobes after portal vein branch ligation in rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 2000, 5, 173-179

Kobayashi, N., Miyazaki, M., Fukaya, K., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Uemura, T., Noguchi, H., Kondo, A., Tanaka, N., and Namba, M. Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. *Transplantation*, 2000, 69, 202-207.

Oh, S. -H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., Shima, N., Higashio, K., and Namba, M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 279, 500-504.

Tsuchiya, T., Katoh-Masatsuji, E., Tsuzuki, T. and Umeda, M.: Anti-transforming nature of ascorbic acid and its derivatives examined by two-stage cell transformation using BALB/c 3T3 cells. *Cancer Lett.*, 2000, 160:51-58.

Ohashi, R., Gao, C., Miyazaki, M., Hamazaki, K., Tsuji, T., Inoue, Y., Uemura, T., Hirai, R., Shimizu, N., and Namba, M. Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Research*, 2001, in press.

Moore, M., Honma, M., Clements, J., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrison-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myher, B., O'Donovan, M., Oudelhkim, M., San, R., Shimada, H., and Stankowski, F. Mouse lymphoma thymidine kinase locus gene mutation assay: International workshop on genotoxicity test procedures working report. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2000, 35, 185-190.

Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J., and Hayashi, M. Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosomal integrity. *Mol. Carcinog.*, 2000, 28, 203-214.

Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Honma, M., Kubo, Y., Ohnishi, H., Hayashi, T. and Seyama, T. NK-mediated elimination of mutant lymphocytes that have lost expression of MHC class I molecule. *J. Immunol.*, 2000, 165, 3555-3563.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社