

平成13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

高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用

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) 杏林大学医学部薬理学教室 遠藤仁、金井好克
- (2) 岡山大学大学院医歯学総合研究科 宮崎正博
- (3) 国立医薬品食品衛生研究所異変遺伝部 本間正充
- (4) 国立感染症研究所ウイルス第2部 鈴木哲朗、相崎英樹
- (5) 食品薬品安全センター秦野研究所 細胞毒性学研究室 梅田誠、田中憲穂
- (6) 千葉大学大学院薬学研究院 千葉 寛、細川正清
- (7) 東京慈恵会医科大学中央検査室 松浦知和
- (8) 名古屋大学大学院生命農学研究科 小田裕昭
- (9) 中外製薬株式会社 吉田 彪、西宮一尋

要旨

本研究は高機能保持ヒト由来肝細胞と新しく開発した培養細胞機能をより高めることができるバイオ人工肝（ここではラジアルフローバイオリアクター）による3次元培養法との結合システムをつくり薬物の有効性と安全性の評価法を新しく確立し、それらの基準システムとなることを目指す。ことに平成13年度は、分担研究者らの研究グループにより薬物輸送系の分子の実体が、多様性に富んだトランスポーターから構成されていることが明らかにされ、その基盤の上にFLC4の薬物輸送系の評価を主目的とする精力的な研究が追加された。

1. 研究目的

わが国の医薬品開発の現状は、動物実験後、健康人や患者での臨床試験が行われることになるが、製薬業界団体のまとめによると開発薬の約3割が予想外の毒性などで開発を中止している。

米国食品医薬品局（FDA）では、新鮮肝組織の入手が容易なため初代単層培養を主体として薬物の検定を試みているものの、この方法では肝特異機能は短時間しか保持できないとしている。したがってFDAは、1997年には薬の開発全般でヒト臓器試験を取り入れるように推奨している。また、欧米の製薬会社は、ヒト臓器を活用することで開発費用は従来の3分の1になり、動物試験では把握できない薬の相互作用の検査などにも役立っていると報告しており、ヒト臓器の利用は単に安全面だけでなく経済面、研究面でも有効であると考えられている。しかしそれに加え、わが国では肝臓移植法の成立までの経緯より明らかなように、ヒト組織利用には特殊な環境を有していることも考慮しなければならない。それ故、本研究の目的はそれらの問題点を解決し、さらに従来法に勝る検定方法を確立することにある。

本研究は高機能保持ヒト由来肝細胞と新しく開発した培養細胞機能をより高めることができるバイオ人工肝（ここではラジアルフローバイオリアクター）による3次元培養法との結合システムをつくり薬物の有効性と安全性の評価法を新しく確立し、それらの基準システムとなることを目指す。

ヒト肝癌細胞株と不死化細胞株の高機能発現

チトクローム P450 (CYP) は薬物代謝反応の約 8 割に関与し、薬物の解毒に重要である。しかし、稀に CYP 代謝に関連した肝障害がみられる。例えば、長期飲酒者がアセトアミノフェン (APAP) を服用すると CYP2E1 代謝に関連した重篤な肝障害を引き起こすことが知られている。従って、CYP2E1 関連の細胞毒性検出システムを開発することは大変重要である。従来、薬物の有効性、安全性の評価は、動物あるいはその肝細胞を用いて検討されてきた。しかし、ヒトと動物とでは肝臓の代謝機能に違いがあり、正当な評価は期待できない。ヒト肝細胞による薬物評価システムが必要となる。

ヒト肝細胞で CYP2E1 を比較的安定に発現する細胞株として知られているのは、ヒト *CYP2E1* 遺伝子を導入したヒト肝芽腫細胞株 HepG2 のみである。宮崎正博らと永森静志らは、独自に樹立したヒト肝癌細胞株既にヒト不死化細胞を樹立したが、OUMS-29 から作成された HLE にヒト CYP2E1 発現ベクターを導入し、宮崎正博らは CYP2E1 を高発現する細胞株 HLE/2E1 を樹立した。また、樹立した細胞株で APAP の細胞毒性について、さらに薬物の細胞毒性とエタノールとの相互作用について検討したので報告する。

肝機能の亢進の試み：HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現

小田 裕昭は高機能を有したヒト肝由来培養細胞株 (FLC 細胞) を用いて、三次元培養したときの肝機能の亢進を試み、その肝機能の高機能化の制御メカニズムを分子レベルで検討することを目的とした。特に転写因子レベルでの制御メカニズムの解明を目指した。そこで得られた分子メカニズムを利用し、転写因子を導入した遺伝子改変細胞の作出につなげる。

薬物代謝 1.

ヒト培養肝細胞系を用いた酵素誘導：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。薬物代謝酵素に関しては、これまでの検討から実験動物で得られたデータのヒトへの外挿の問題点が指摘されており、培養細胞等を用いた代替法の開発の必要性が論じられている。一方、臨床において多剤併用が実施されていることから、開発された薬物のヒトでの代謝過程における薬物相互作用を非臨床試験の初期の段階において評価することが望まれている。このような代謝過程における薬物相互作用は、代謝阻害と酵素誘導に大きく分けられ、前者に関しては、ヒト肝ミクロソームや発現系等を用いた *in vitro* 実験系を中心とした研究がなされており、*in vitro* から *in vivo* での薬物相互作用を予測することはある程度可能となってきている。しかしながら、酵素誘導に関しては、これまで実験動物を用いた検討がなされてきたが、例えば抗結核薬である rifampicin (RIF) は、ヒトでは cytochrome P450 (CYP) を誘導するが、ラットにおいては誘導が認められないことなど、哺乳動物間での種差の存在が明らかとなっているため、動物実験の結果を直接ヒトへ外挿することは困難であると考えられる。

この問題を解決するために、ヒト初代培養肝細胞系を用いた酵素誘導試験が行われており、このような培養細胞を用いた実験系が、酵素誘導の評価に有用であると考えられるようになってきている。しかし、ヒト初代培養肝細胞は、単離 4 日後には CYP 含量が 50% 以下になるなど、長期培養により機能の低下が認められ、長期間使用することは困難である。また、人種差・性差・生存時の薬歴・死因といった個体差や、肝臓の保存時間や細胞の *viability* などの違いから、供給された細胞により細胞の有する薬物代謝能には、ばらつきが大きく、再現性に問題があると考えられている。さらに、ヒト初代肝細胞は国内では入手が困難であり、入手には倫理的な問題も付随することから、均一で安定した形質を維持し長期間の実験が可能である細胞株の利用が望まれ、特に、高度に分化しヒト肝機能を維持した樹立細胞株の有用性が期待されている。

これまで、ヒト由来細胞系を用いた薬物代謝の研究は、初代肝細胞培養系以外にも、ヒト肝ガン由来細胞株である HepG2、大腸ガン由来細胞株である Caco-2 などの樹立細胞株においても行われており、CYP をはじめとする薬物代謝酵素の発現および誘導が報告されている。しかしながら上記の細胞株は、細胞の形態やタンパク合成能および発現している薬物代謝酵素等の点で、ヒト肝細胞と異なることが報告されており、実際の肝細胞に近い細胞株の樹立が必要であると考えられている。

千葉 寛らの研究では、FLC4、FLC5 および FLC7 細胞株を用いた。これらは日本人男性より樹立されたヒト肝由来細胞株で、これらの細胞株は、正常肝細胞に類似の形態を示しアルブミン産生能を持つなどヒト肝機能を高度に維持していることがこれまでに明らかにされている。また、これらの細胞株に薬物代謝酵素である CYP 分子種の一部が発現していることも、これまでに明らかにしてきた。また、CYP1A1/2 および CYP3A4 においては、発現および薬物による酵素誘導が起こることも明らかにしており、これらの細胞株が薬物代謝酵素誘導のモデル系として有用であることを明らかにしてきた。しかしながら、CYP 分子種の中で、肝における発現量が低い分子種においては、直接誘導を調べることが困難であると考えられた。そこで、本研究においては、ヒトゲノムライブラリーから CYP 分子種の発現調節領域のクローニングを行った。さらに、CYP 遺伝子の発現調節領域を pGL3 ベクターのルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、遺伝子を組み込んだ pGL3 ベクターを、FLC 細胞株にトランスフェクションすることにより、酵素誘導のモデルとなる細胞株の作成を行った。

薬物代謝 2.

プロドラック-カルボキシエステラーゼ (CES)

近年、バイオアベイラビリティの改善を目的として、多くのプロドラッグが開発され、臨床で使用されている。プロドラッグとは、薬物の化学構造に修飾を加え、それ自体は薬理作用を示さないが体内に吸収された後に薬効を発揮するように設計されたものであり、一般的にプロドラッグを設計する場合、修飾部位にはエステル結合、アミド結合およびチオエステル結合が導入される場合が多い。

薬物代謝に関与するエステラーゼには、コリンエステラーゼやコレステロールエステラーゼなどがあるが、その中でも代表的な酵素がカルボキシエステラーゼ (CES) である。CES は活性中心にセリン残基を有するセリン水解酵素で、エステル、アミドおよびチオエステル結合を含む化合物の加水分解反応を触媒する。このため CES は、薬物代謝の第 1 相反応のみならず、上記のようなプロドラッグの代謝活性化においても非常に重要な役割を果たすと考えられている。また、本酵素は薬物以外にも農薬、食品添加物、環境化学物質など様々な生体外物質の代謝に関与していることから、CES の質的および量的な変動は、これらの物質の解毒や代謝活性化に影響を及ぼすものと考えられる。

一方、近年臨床において、薬物血中濃度の変動によって薬物の薬効や副作用の発現に個人差がみられることが報告されている。薬物の血中濃度の差異は、主に薬物代謝酵素活性の個人差によるものと考えられており、CES においてもその活性に個人差が存在することが明らかとなっている。

CES は多くの臓器に発現しており、中でも肝において最も高い活性を示すことから、肝 CES の個人差の原因を解明することは薬物の体内動態を予測する上で重要であると考えられる。肝 CES の個人差に関しては、これまでに当研究室において種々の要因について検討がおこなわれており、ヒト肝 CES *HU1* の発現量の差異が主要な原因であることが明らかとなっている。また、発現量の個人差の原因としては、CES *HU1* 遺伝子の発現調節における個人差が関与する可能性が示唆されている。

細川 正清らは、*in vitro*でのヒト肝 CES 発現量の個人差解明のモデル細胞系として、正常肝細胞機能を保持していると考えられるヒト肝細胞ガン由来細胞株 (FLC7) を用いることにより、上記 2 種類の CES *HU1* 遺伝子の発現調節機構について、検討をおこなった

がん原性物質代謝活性系の評価

梅田 誠らの研究では、永森らによりヒト肝臓がんより樹立された、高度に機能を保持している FLC-4、FLC-5、FLC-7 の 3 つの細胞株を用いて、CYP の誘導およびがん原性物質の代謝物が FLC 細胞の生存率に及ぼす影響についての検討を行い、細胞生存率を指標とした被験物質の CYP 誘導能およびがん原性物質代謝活性化の評価系確立を目的とした。

薬物輸送系の評価: バイオリアクター上の FLC4 における輸送系 L トランスポーターの解析 L トランスポーター

薬物輸送系の分子的実体が、分担研究者らをはじめとした国内外の研究グループにより精力的な研究がなされ、多様性に富んだトランスポーターから構成されていることが明らかになった。

遠藤 仁の研究は、その基盤の上にFLC4の薬物輸送系の評価を主目的とした。

平成13年度の研究において分子クローニングに用いたFLC4は、プレート上に培養したものであったが、バイオリアクター上のFLC4に関して、同様に輸送系Lの特定及び分子クローニングを行い、バイオリアクターで培養したFLC4の輸送特性を浮き彫りにする。

抗ウイルス薬評価系の開発

主任研究者の永森と相崎、鈴木らは平成10-12年創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業を通じラジアルフロー型バイオリアクターを用い、長期に安定的に肝細胞の機能を発揮する培養系の開発に成功している。分担研究者はこれまでの成果を応用し、肝炎ウイルスをモデルに、医薬品の効果評価系を構築する事を目的としさらに安定したHCV培養の方法を検討した。

ヒト型の遺伝毒性試験法の確立

本申請事業の研究目的はヒト肝臓由来培養細胞を基礎とする遺伝毒性試験法、特に遺伝子突然変異検出法を確立することである。永森らによって樹立されたヒト肝がん由来細胞であるFLC4、FLC5、FLC7細胞は不死化された培養細胞でありながら薬物代謝酵素であるP450を高発現する極めて特異的な細胞である。これら細胞は、ヒトでの薬物代謝機能の研究に有用であるばかりでなく、医薬品のヒトへの効果判定、安全性確認に応用できる可能性がある。これら細胞を元にして、新しい遺伝毒性試験法の開発、確立を試みているが、がん細胞であるため、遺伝的に不安定であり、ゲノム構造は染色体の倍数化や、複雑なrearrangementを伴っている可能性がある。従って、従来の遺伝毒性試験をそのまま応用することは困難であると予想される。

本間 正充の研究では、これら肝細胞の遺伝的不安定を確認するため、核型分析を行うと共に、遺伝毒性試験の一つである小核試験の実施を試みる。また、遺伝子突然変異検出のターゲットとなる外来性遺伝子を導入することによりトランスジェニック細胞を樹立する。これら研究からヒト肝細胞中で薬物代謝活性を必要とする薬物によって誘発される遺伝子突然変異を評価できる新しいヒト型の遺伝毒性試験系を構築することを具体的な目的とする。

小型バイオリアクターを開発

松浦らの研究では、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することにより、ヒト肝臓に類似の機能を有するバイオ人工肝臓を作成した。実際の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、小型リアクターの開発、並列培養システムの開発が必要であった。このプロジェクトでは基本機能を維持した状態での小型化を行い、15ml容量の小型バイオリアクターを開発した。

平成13年度は、この小型バイオ人工肝臓にヒト肝臓癌細胞株(FLC)を培養し、発現するCYP活性の誘導性と、実際に培養液に添加した薬剤が代謝されるか検討した。

2. 研究方法

ヒト肝癌細胞株と不死化細胞株の高機能発現研究方法

樹立したヒト肝癌細胞株HLEは10%牛胎仔血清を含むDMEMを用いて37℃の炭酸ガス培養器内で培養し、7日毎に1/8スプリットで継代した。

米国NCIのF.J. Gonzalez博士より分与を受けたプラスミドp91023(B)-2E1から切り出したヒトCYP2E1のcDNAをpCMVβのNot I制限酵素サイトに挿入してCYP2E1発現ベクターを構築した。LipofectAMINE試薬を用いて上記発現ベクターをHLE細胞にトランスフェクションし、G-418(400 µg/ml)に耐性を示すクローンHLE/2E1を分離した。

導入したヒトCYP2E1遺伝子の発現はノーザンブロット法により確認した。また、CYP2E1酵素活性はp-ニトロフェノール(PNP)酸化活性として求めた。

薬物の細胞毒性は MTT 法により測定した。24 穴プレートに 1×10^4 個の細胞を植え込み、24 時間後に試験薬物を添加して 48 時間培養した。培地にエタノールを添加した時は、エタノールの蒸発を最小限に抑えるためプレートをパラフィルムで密閉した。試験薬物で処理した後、MTT 試薬を添加して 90 分間インキュベートし、マイクロプレート・リーダーで 450 nm の吸光度を測定した (宮崎正博)。

肝機能の亢進の試み：HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現

ラジアルフローバイオリアクターを用いてヒト肝細胞の 3 次元化を目指す。メカニズムを追究するのに小規模で多くのサンプルをこなせる方法も必要であるため、細胞外マトリクスを変えることにより三次元培養ならびに細胞の形態を変える実験を行った。再構成基底膜ゲル (EHS-gel) や、物性の異なるマトリクスゲルなどを用いて培養を行い、肝臓特異的転写因子の遺伝子発現ならびに、肝臓特異的に発現する遺伝子群の変動を解析した。FLC 細胞と他のヒト肝由来培養細胞株とも比較検討を行った。

ラジアルフローバイオリアクターで培養された FLC-4 細胞においても、HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現が増強するか調べる。細胞外マトリクスを利用して 3 次元化した場合とアパタイトやガラスなどの担体で 3 次元化した場合と、同様な制御メカニズムにより肝機能が亢進するか調べる。また、EHS-gel 上やバイオリアクター中で肝機能が亢進したメカニズムを追求するために、またヒト肝臓に比べてどの程度の分化度を示すかを調べるために、マイクロアレー技術を使い、肝機能亢進に関与する遺伝子群を網羅的に調べる。

薬物代謝 1.

ヒト初代培養肝細胞系を用いた酵素誘導：

RIF による誘導評価のために、*CYP3A4* 遺伝子上流の 2 つのシス領域 xenobiotic-responsive enhancer module (XREM) 及び proximal pregnane X receptor response element (prPXRE) を挿入したルシフェラーゼベクター-pGL3 Basic vector を作製した。また、PB については *CYP2B6* 遺伝子上流の PB-responsive enhancer module (PBREM) を挿入した pGL3 Promoter vector を作製した。また、PB による誘導評価には最も強力な誘導剤であることが報告されている TCPOBOP を合成し用いた。

CYP2C9, *CYP2C19* 遺伝子上流領域のクローニングは、ヒトゲノムプロジェクトから得られた draft sequence より *CYP2C9*, *CYP2C19* 遺伝子上流配列を予測してプライマーを設計し、ヒト肝より抽出した genome DNA を template に用いた PCR 法により行った。プロモーター領域の転写制御機構の解析は *CYP2C9*, *CYP2C19* 遺伝子の 上流領域約 400 bp について、ヒト肝癌由来細胞株である FLC7 細胞を用いて、LUC をレポーターとし deletion assay を行った。また、PXR, human CAR (hCAR) cDNA クローニングはヒト肝 cDNA library より PCR 法により cDNA を単離し、哺乳動物発現用 plasmid に挿入した (Fig. 1)。

Mouse CAR (mCAR) の cDNA クローニングは C57BL 雄性マウス肝より PCR 法により目的の cDNA を単離して哺乳動物発現用 plasmid に挿入した。PB による誘導評価系には *CYP2B6* 上流の CAR が結合する enhancer 領域を挿入した LUC reporter plasmid を用いた。また、Rif による誘導評価系には *CYP3A4* 上流の PXR が結合する enhancer 領域と promoter 領域を挿入した LUC reporter plasmid を用いた (Fig. 2)。これら誘導評価系の転写活性は PXR または CAR を co-transfection し、誘導剤を添加して測定した。*CYP2C9*, *CYP2C19* 誘導機構の解析には両遺伝子の 上流領域約 2 kb を LUC reporter plasmid に挿入し、CAR または PXR を FLC7 細胞に co-transfection して転写活性を測定した。

薬物代謝 2.

プロドラックカーカルボキシエステラーゼ (CES)

ヒト肝 CES HU1 のゲノム DNA のクローニングは、ヒトゲノム DNA ライブラリーから CES HU1 cDNA をプローブとし、plaque hybridization により行った。得られた陽性クローンについては、cycle sequence により塩基配列を決定し、CES HU1 遺伝子の転写開始点は、cap site hunting により決定した。さらに、得られた CES HU1 遺伝子の 5' 上流領域の転写活性は、ルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL3 Basic ベクターに CES HU1 の 5' 上流領域をサブクローニングした後、ヒト肝ガン由来培養細胞株で

ある FLC7 細胞にトランスフェクションレシフエラーゼ活性を測定する reporter gene analysis により求めた。

CES HU1 遺伝子の発現に関与する転写因子結合領域については、gel mobility shift assay により確認した。ヒト肝組織からのゲノム DNA は、ヒト肝組織切片約 50 mg から DNA ZOL™ Reagent (GibcoBRL, Maryland, USA) を用いて抽出した。得られた DNA 沈殿を 200 μ L の滅菌水を用いて溶解し、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い、沈殿を乾固させた後、50 μ L の滅菌 MilliQ 水に再溶解した。得られた DNA の定量および純度確認は、260 nm および 280 nm の吸光度を Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) を用いて測定した。CES HU1 exon1 については direct sequence 法により解析し、primer は Table 1 に示したものをを用いた。PCR は、ヒト肝ゲノム DNA をテンプレート DNA として用い、反応液は PCR チューブにテンプレート DNA 1.0 μ L、10 \times Ex Buffer 5 μ L、dNTP mixture 5 μ L、10 μ M primer 1 μ L、TaKaRa Ex Taq™ 0.25 μ L を混合し、滅菌 MilliQ 水で全量を 50 μ L とした。PCR 反応は Minicycler™ (MJ RESEARCH, MA, USA) を用い、initial denaturing を 94°C で 2 分間おこなった後、denaturing を 94°C で 1 分間、annealing を 60°C で 5 秒間、extension を 72°C で 30 秒間を 40 サイクルおこない、final extension を 72°C で 2 分間おこなった。PCR 産物は、2%アガロースゲルを用いて電気泳動をおこない、ethidium bromide 染色後、UV 照射により確認した。その後、目的の DNA 断片を切り出し、Quantum Prep-Freeze™ N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (BIO-RAD, USA) を用いて回収した。塩基配列は、回収した DNA をテンプレート DNA とし、CEQ™ DTCS-Quick Start Kit (BECKMAN COULTER, CA, USA) を用いて PCR 反応をおこなった後、CEQ™ 2000 DNA Analysis System (BECKMAN COULTER) により解析した。

Total RNA の抽出は、約 20 mg の肝組織切片より、RNeasy Mini Kit および QIA shredder column (QIAGEN, Germany) を用いておこなった。得られた total RNA は、260 nm および 280 nm の吸光度を測定することにより定量し、使用するまで -80°C で保存した。ヒト肝組織から抽出した total RNA (1-5 μ g) を用いて、first strand cDNA を合成した。逆転写反応には、Ready To Go You-Prime First-Strand Beads および 0.5 μ g の oligo (dT) primer (Amersham Pharmacia Biotech, USA) を用いた。得られた cDNA 0.5 μ L、SYBR® Green PCR Master Mix 12.5 μ L、10 μ M の forward および reverse primer 各 0.5 μ L、AmpErase®UNG 0.25 μ L を混合し、滅菌 MilliQ 水で全量を 25 μ L とした。Primer は Table 3 に示したものをを用いた。なお、forward primer は、2 つの配列にそれぞれ特異的なものをを用いた。Real time PCR は GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems Japan) を用いておこなった。PCR 条件は、50°C で 2 分間 UNG の活性化を行った後、denaturing を 95°C で 15 秒間、extension を 56°C で 1 分間を 40 サイクルおこなった。検量線は、ヒト肝ガン由来細胞 (FLC7) から RT-PCR により調製した cDNA を用いて、希釈倍率を変動させて検体と同様に定量することにより作製した。各検体中の total RNA 量は、CES HU1 の mRNA 量と \cdot 2-microglobulin の mRNA 量との比をとることにより補正した。

ヒト肝ガン由来細胞株 (FLC7) は、ASF104 培地 (味の素, 東京) に FBS (Gibco BRL, MD, USA) を 10% (v/v) 加えたものを培地とし、5% CO₂/95% air を気相として、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。CES HU1b の配列 (genomic clone H2B) を基に primer を設計し (Table 4)、PCR により CES HU1b の転写開始点から 5' 上流 -892 \rightarrow +122, -621 \rightarrow +122, -375 \rightarrow +122, -243 \rightarrow +122, -160 \rightarrow +122, -54 \rightarrow +122 にあたる DNA を増幅した。つぎに、pTARGET vector (Promega) に subcloning し、Kpn I および Mlu I、あるいは Mlu I および Sma I (TaKaRa) 処理によりインサート DNA を切り出した。Luciferase assay 用 vector である pGL3-Basic vector (Promega) についても Kpn I および Mlu I、あるいは Mlu I および Sma I で処理し、pTARGET vector より切り出した DNA をこれに subcloning した (Fig. 4)。CES HU1a は、CES HU1b と同一の primer を用いて、PCR により転写開始点から 5' 上流 -892 \rightarrow +124, -624 \rightarrow +124, -375 \rightarrow +124, -243 \rightarrow +124, -161 \rightarrow +124, -55 \rightarrow +124 にあたる DNA を増幅し、同様に subcloning をおこなった。Transfection の前日に、FLC7 細胞を $0.8 \sim 0.96 \times 10^6$ cell/well となるよう播種した。最初に、sample DNA 5 μ g および control vector (pRL-TK vector, Promega) 100 ng に Opti-MEM 100 μ L、PLUS reagent 6 μ L (Gibco BRL) を加え、15 分間室温放置した。つぎに、Lipofectamine (Gibco BRL) 4 μ L と Opti-MEM 100 μ L の混合液を加え、さらに 15 分間室温放置した。

これを Opti-MEM で洗浄した細胞に滴下し、CO₂ インキュベーター内で 37°C で 20 時間培養した後、培地を ASF104-10%FBS 2 mL と交換した。

Luciferase 活性の測定は、以下の方法で行った。Transfection 48 時間後の細胞を、ダルベッコ PBS (日水製薬, 東京) で洗浄し、0.5 mL の trypsin-EDTA を加え、37°C で 5 分間インキュベーションした。細胞が剥離したのを確認したら直ちに 200 μ L の 0.1% trypsin inhibitor を加え、細胞を 1.5 mL tube に回収した。この細胞を 800rpm で 5 分間遠心分離して得られた沈殿に 1 \times PLB (Promega) を 250 μ L 加えて再懸濁し、-80°C で凍結融解を 1 回行った。つぎに、この 1.5 mL tube を 30 秒間遠心分離し、得られた上清について、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) を使い、Turner Designs Model TD-20/20 Luminometer (Promega) で Luciferase 活性を測定した。なお、transfection 効率は、sample vector の Firefly luciferase の活性と control vector の *Renilla* luciferase の活性の比をとることにより補正した。

薬物輸送系の評価：バイオリアクター上の FLC4 における輸送系とトランスポーターの解析とトランスポーター

FLC4 から単離したアミノ酸輸送系とに相当するトランスポーターの cDNA の塩基配列の決定、核酸プローブ及び特異抗体を用いて生体内での組織細胞分布、及び FLC4 における発現の解析を行う。また、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた基質選択性及び機能特性の解析を行い、アミノ酸系薬物の輸送スペクトラムを明らかにする。

抗ウイルス薬評価系の開発

鈴木らは既にヒトキャリア血清をこのリアクターで培養した肝細胞で感染実験を行い、培養上清中にウイルスの増殖を確認している。そこで次に、チンパンジーに急性 C 型肝炎を発症させた全長の HCV RNA をこの培養系にトランスフェクトし、培養上清を回収し、ウイルスの産生について調べた。

がん原性物質代謝活性系の評価方法

FLC-4、FLC-5、FLC-7 細胞は、杏林大学医学部永森静志教授より提供された。細胞は以下の条件で培養した。細胞培養ディッシュを用い 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内において培養を行った。培養には 10% FBS、100 IU/ml ペニシリン、100 \cdot g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM/F12 (DF10F) を用いた。この FLC 細胞を 2 \times 10⁴ cells/ml の濃度で播種し、種々の試験に用いた。

細胞懸濁液 2 容量に対して、氷冷しておいた Collagen Acidic Solution for Tissue Culture I-AC 0.3% KOKENCELLGEN (高研) を 1 容量を加え、速やかに \cdot 100 mm dish に加え、37°C でインキュベートしてコラーゲンを固定させた。30 分後、固定したゲル上にゲルと同量の培地を加え、立体培養を行った。コラーゲンゲル中で培養した細胞を分散させる場合には、0.1% コラゲナーゼ溶液を用いた。

4°C の氷浴上で解凍した MATRIGEL Basement Membrane (BECTON DICKINSON) を、24 ウェルマイクロプレートの 1 ウェルにつき 100 \cdot l ずつ加え、37°C で 30 分間インキュベートし、マトリゲルコートした。マトリゲルがコートされた 24 ウェルプレートである BIOCOAT MATRIGEL CELLWARE (BECTON DICKINSON) は、1 ウェルにつき 0.5 ml ずつ加温した培地を加え、30 分間 37°C でインキュベートした後、培地を除去することで再水和してから使用した。

細胞生存率は MTT 法を用いて測定した。各ウェルに MTT 溶液 (5 mg/ml) を 25 \cdot l 加え、37°C で 4 時間インキュベートした。PBS で細胞を洗浄後、塩酸を 0.04 N 含むイソプロパノールを 0.5 ml 加え、プレートミキサーでプレートを 10 分間振盪、550 nm の波長で吸光度を測定した。

細胞間ギャップジャンクション形成の指標として Dye-transfer Assay を行った。 \cdot 35 mm ディッシュで、細胞をコンフルエントになるまで培養した。培地を除去し、Lucifer Yellow を PBS(-) に 0.05% の濃度になるように溶解させたものを、2 ml 添加した後、眼科用メスを用いて細胞に傷をつけた。2 分間室温でインキュベートの後、PBS を用いて細胞を洗浄し、再び培地を加え蛍光顕微鏡で鏡検した。

ヒト型の遺伝毒性試験法の確立

1) 核型分析

Spectrum Karyotyping (SKY) 法により細胞の核型分析を行った。定法により染色体標本を作製後、24種類のプローブカクテル (SkyPaint™ ; SKY kit, ASI Applied Spectral Imaging, Ha' Emek, Israel) を用いて in situ hybridization を行い、その後、DAPI 染色した。観察は SKY vision cytogenetics workstation (Applied Spectral Imaging) を用いて行い、5 metaphase について解析を行った。

2) 小核試験

FLC4 細胞、HepG2 細胞をマイトマイシンC (MMC)、メチルメタンサルホン酸 (MMS)、サイクロフォスファミド (CP)、ベンツピレン (BP) で 24 時間、もしくは 48 時間処理し、定法に従って小核標本を作製した。各処理当たり、1000 個の細胞を観察し、小核の出現頻度を測定した。また、処理中における細胞増殖もモニターし、細胞毒性も評価した。

3) ヒト肝細胞株への遺伝子導入

FLC4、FLC5、FLC7 細胞に、 λ gt10 遺伝子と pSV2Neo 遺伝子をリン酸カルシウム法によりコトランスフェクションした。2日後、G418 存在下で細胞を再はん種し約 2 週間後 G418 耐性となった細胞コロニーのクローニングを行った。各クローンの性質を調べるため DNA を抽出し、解析を行った。

4) 遺伝子突然変異の検出

細胞より回収した DNA は、ラムダパッケージングを行った後、*hfl* の大腸菌に感染させ、異なった 25°C でプラークを形成させることにより、変異体を検出した。また、37°C でプラークを形成させ、平板効率をもとめた。

小型バイオリアクターを開発

1) 播種細胞の準備

肝由来細胞は大型フラスコにより $1-5 \times 10^7$ 個まで CO₂ 培養器で増殖させる。2% EDTA 加 25 unit/ml トリプシンで単離後ラジアルフロー型バイオリアクターの調整槽に播種する。細部はリアクターと調整槽を循環する間にリアクター内担体に付着させる。付着を順調に行わせるため培養1日目には2%FCSを培養液に添加し、以後は無血清で培養した。

2) ラジアルフロー型バイオリアクター

ラジアルフロー型バイオリアクターは massflow controller で培養液の組成や流量をコントロールされ、高密度大量三次元培養が可能となっている。リアクター内の細胞培養担体としては、1 mm の径を有する空隙率 80% 程度の組織適合性の良いハイドロキシアパタイトの多孔質担体を使用した。培養液はバイオリアクター内を円筒周囲より中心部に流れ、栄養酸素を均一に供給すると共に、老廃物を速やかに排出する。

3) CYP3A の誘導と培養液中の testosterone の測定

testosterone の代謝実験の 72 時間前より、培養液に 50 μ M の rifampicine (Sigma) を添加し、CYP3A を誘導する。CYP3A の基質として、testosterone (Wako) を、培養液に 50 μ M になるように添加する。継続的に培養液をサンプリングし、testosterone 濃度を HPLC で計測した。

4) real time PCR

CYP3A4 の発現 mRNA 量の定量を、ABI7700 を用いて real time PCR にて測定した。RT-PCR 反応は、300 nM forward primer、900 nM reverse primer および 200 nM TaqMan probe を含む TaqMan One-step PCR master Mix Reagent Kit を用いて、50 μ L / tube 反応系で行った。温度条件は、48°C で 30 分間、その後 95°C で 10 分間保温した後、95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間のサイクルを 60 回くりかえし、サイクルごとに蛍光強度を測定した。

3. 研究成果

ヒト肝癌細胞株と不死化細胞株の高機能

母細胞株 HLE および *CYP2E1* 遺伝子を導入した細胞株 HLE/2E1 は、ほぼ同じ速度で増殖した。細胞集団倍加数は、それぞれ 35.2 および 30.4 時間であった。図 1 に示すように、HLE/2E1 細胞は母細胞 HLE に比べてより多くの *CYP2E1* mRNA を発現した。しかし、これら両細胞株における NADPH-cytochrome P450 reductase および cytochrome b_5 の遺伝子発現はほぼ同じであった。

次に、HLE および HLE/2E1 細胞における *CYP2E1* 酵素活性を各々の細胞のミクロソーム分画を用いて PNP の酸化反応により測定した。HLE および HLE/2E1 細胞における PNP 酸化活性は、それぞれ 2.5 および 92.8 pmol/min/mg protein であった。

HLE/2E1 細胞を 0.5–2 mM エタノールで 24 時間処理した結果、本細胞の PNP 酸化活性はエタノール濃度依存的に 1.5–2.8 倍に増加した。しかし、HLE 細胞の PNP 酸化活性は全く変化しなかった。図 2B に示すように、HLE/2E1 細胞の PNP 酸化活性は 1 mM エタノール添加後経時的に増加し、添加 24 時間後にプラトー (180 pmol/min/mg protein) に達した。

APAP、ブチオニンスルフォキシミン (BSO) 単独あるいはエタノール併用で 48 時間処理した後、HLE および HLE/2E1 細胞の生存率を MTT 法により測定した。両細胞系ともに APAP 濃度依存的に生存率が減少した。また、この細胞毒性効果は HLE/2E1 細胞でより強く認められた。1.25 mM の APAP で処理すると、HLE/2E1 細胞の生存率は対照の 79% に減少したが、母細胞株 HLE は 91% であった。次に、2 mM エタノール存在下で APAP 処理したところ、HLE/2E1 細胞に対する細胞毒性効果が有意に抑制された (図 3B)。APAP と同時にビタミン E (5 μ M) を添加すると、APAP の細胞毒性効果が 0.625–1.25 mM の濃度範囲で完全に消失した。HLE および HLE/2E1 細胞を 2 mM エタノールで 24 時間処理した後に APAP を添加すると、HLE/2E1 細胞に対する APAP の細胞毒性効果が顕著に増加した。しかし、HLE 細胞に対する毒性効果は変化しなかった。

BSO も HLE/2E1 細胞に対し濃度依存的に細胞毒性効果を示したが、母細胞 HLE には全く影響を与えなかった。HLE/2E1 細胞を 0.5 mM の BSO に暴露すると、生存率は対照の 24% に減少した。しかし、2 mM エタノールを BSO と同時に添加すると、BSO の細胞毒性が完全に消失した。同様に、ビタミン E (5 μ M) も BSO の細胞毒性を抑制した。HLE および HLE/2E1 細胞を 2 mM エタノールで 24 時間処理をした後に BSO に暴露すると、両細胞系における細胞毒性効果が顕著に増加した。

HLE および HLE/2E1 細胞株をエタノール単独で処理した場合も、200 mM 以上の濃度で両細胞系において細胞毒性効果が認められた。しかし、両細胞系の間には有意差は認められなかった。また、2 mM エタノールで 24 時間前処理しても、その後のエタノール細胞毒性には全く影響がなかった。

肝機能の亢進の試み：HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現

ヒト肝細胞 (FLC-4 細胞) を、細胞外マトリクスとして再構成基底膜ゲル (EHS-gel) を用いて、肝臓特異的遺伝子発現の変動を検討した。EHS-gel 上で培養した FLC-4 細胞は三次元的に培養され、アルブミンなどの発現の他、アポリポタンパク質など多くの肝臓分化表現型を示す遺伝子群の発現が亢進していた。肝機能に重要な肝臓特異的転写因子 HNF-4 遺伝子発現が強く誘導されていた。三次元培養により、HNF-4 遺伝子発現の亢進の他に、HNF-3a、C/EBPa などの亢進も見られた。FLC-4 細胞が三次元化に应答して肝機能を亢進する細胞であることを明らかにした。HepG2 細胞など、他のヒト肝由来細胞株では、三次元培養に应答して肝機能を亢進する現象は見られなかった。

薬物代謝 1.

ヒト初代培養肝細胞系を用いた酵素誘導成果

1. *CYP2C9*, *CYP2C19* 上流領域のクローニング *CYP2C19* 上流領域を coding region を用いて BLASTN により検索した。しかし draft sequence 中に上流配列はみつからなかった。そこで *CYP2C9* と *CYP2C19* の相同性が高いことを利用し、*CYP2C9* の上流配列からプライマーを設計し PCR をおこなった。その結果、*CYP2C19* 上流約 10 kb の DNA を得ることができた。また、*CYP2C9* については BLASTN で検索し、得られた配列よりプライマーを設計して上流約 3.5 kb の DNA を得た。

2. プロモーター領域の転写制御機構の解析 FLC7 細胞を用いて deletion assay を行ったところ、*CYP2C9*, *CYP2C19* 共に転写活性を約 10 倍上昇させる領域が -160~-140 の間に認められ、この領域が基本転写に関与していることが示唆された。また、配列の特徴からこの領域には HPF-1 (HNF-4) が結合する可能性が考えられた。さらに、*CYP2C9* は *CYP2C19* と異なり転写活性を約 7 倍上昇させる領域が -390~-160 の間に認められた。この *CYP2C9* の転写活性の上昇に関与する転写因子を検索したところ C/EBP の結合する配列が見つかったことから、肝における *CYP2C9*, *CYP2C19* の発現量の違いがこの配列に起因する可能性が示唆された。

3. *CYP2B6*, *CYP3A4* 誘導評価系の作製 *CYP2C* 分子種の誘導に用いる細胞において、CAR, PXR を介した PB, Rif による誘導が起こることを確認するため、誘導機構が解明されているヒト *CYP2B6* およびヒト *CYP3A4* の誘導評価系を作製した。PB, Rif の誘導評価用の LUC reporter vector を FLC7 細胞に核内レセプターと共に transfection し誘導剤の影響を検討したところ、明らかな転写活性の上昇が認められた (Fig. 3, Fig. 4)。また、hCAR のクローニングでは、C 末の ligand binding domain の 2 つの intron/exon junction で intron の配列をそれぞれ 12, 15 bp 含む splicing variant も同時に得ることができた。そこでこの hCAR の variant について FLC7 細胞を用いた PB 誘導モデル系で誘導への関与を検討したが、転写活性への影響は認められなかった。

4. *CYP2C9*, *CYP2C19* 誘導機構の解析 Deletion assay 法を用いて *CYP2C* の誘導に関与する領域を検討したところ、*CYP2C9* および *CYP2C19* ともに -1400 付近に PB 系の誘導に関与する領域が示唆された (Fig. 5)。また、*In vitro* 転写翻訳システムにより生成した CAR, RXR \cdot を用いて electrophoretic mobility shift assay により結合能を検討したところ、*CYP2C9*, *CYP2C19* 共に結合活性が認められた。*CYP2C9* で CAR/RXR \cdot heterodimer が結合するにもかかわらず誘導が見られなかったのは、他の領域に silencer が存在する可能性が考えられた。

薬物代謝 2.

プロドラック-カルボキシエステラーゼ (CES)

1) ヒト *CES HUI* 遺伝子の構造

これまでにヒトゲノム DNA において *CES HUI* 遺伝子の塩基配列は 2 種類あることが報告されている。しかしながら、cDNA に関しては、この 2 種類のうち 1 種類の *CES* ゲノム DNA からの転写産物と考えられる配列のみが報告されている。これまでの研究において *CES HUI* 遺伝子の構造は未だ明らかでなく、ゲノム DNA におけるこの 2 種類の配列については、allele 特異的変異、あるいは複数の *CES HUI* 遺伝子の存在などの可能性が考えられる。

ヒトゲノム DNA ライブラリーより、*CES* genomic clone H2B を得ている。また、日本人の肝組織からのゲノム DNA から、H2B とは異なる *CES* genomic clone GHL3 も得ている。そこで、ヒトゲノム DNA について、これらのゲノムに特徴的な配列を用いた PCR-RFLP 法により、遺伝子の存在比を求めたところ、ほとんどのサンプルで両方の *CES* 遺伝子を持っていることが明らかとなった。

今回ヒトゲノム DNA を用いて、*CES HUI* 遺伝子の exon 1 の部分について direct sequence 法により解析した結果、解析したすべての検体において、*CES HUIb* と同じ配列が確認された。また、いずれの検体もこの配列のホモ接合体であることが判明した。これは上記の PCR-RFLP 法の結果とは明らかに矛盾することから、この 2 つの配列を遺伝子多型とするのは困難であるものと考えられる。そこで、この報告においては genomic clone GHL3 を *CES HUIa*、genomic clone H2B を *CES HUIb* と表すこととした。

さらに、2 種類の *CES HUI* 遺伝子の配列に特異的な primer を用い、ゲノム DNA をテンプレートとして intron 1 の増幅を試みたところ、*CES HUIb* に特異的な primer を用いた場合、約 4kb の PCR 産物が得られた。これは Shibata らによって報告されている intron 1 の長さとも一致し、またこの産物を制限酵素で処理することによって得られた fragment pattern も報告されているものと一致した。ところが、*CES HUIa* に特異的な primer を用いた場合は 4kb の産物は得られなかった。今回の PCR は、4kb 以上の長さのものは増幅しにくい条件でおこなったため、*CES HUIa* をもつ exon 1 の下流には 4kb より長い intron が存在する可能性が考えられた。

2) ヒト肝 *CES HU1* 遺伝子の発現および発現調節機構

ヒトゲノム中に少なくとも2つの *CES HU1* 遺伝子が存在することが示唆された。しかしながら、ヒト肝の cDNA においては、これまでに *CES HU1a* と同じタイプのもののみが報告されており、ヒト肝における *CES HU1b* mRNA の発現は未だ確認されていない。また、この2種類の *CES HU1* 遺伝子の発現調節機構の解明は、*CES* における個人差を解明する上で重要であると考えられる。そこでヒト肝における *CES HU1a* と *CES HU1b* の mRNA 発現量を測定し、さらに2種類の *CES HU1* 遺伝子の発現調節機構について検討をおこなった。

Real time PCR 法を用いてヒト肝における *CES HU1a* および *CES HU1b* の mRNA 量を定量した結果、ほとんどの検体で両方の type の mRNA が発現していることが明らかとなった。これまでにヒト肝において報告されている *CES HU1* の cDNA は *CES HU1a* type のみであり、今回初めてヒト肝における *CES HU1b* の mRNA の発現が確認された。2種類の *CES HU1* 遺伝子のコード領域における違いは、exon 1 にのみ存在することが報告されており、また、すべての *CES* アイソザイムの exon 1 は、シグナルペプチドをコードしていることから、この2種類の mRNA によって生じる成熟 *CES HU1* タンパクは、配列および構造的にほとんど同一のものであると考えられる。さらに、2種類の mRNA の相対的な発現量を比較した結果、両者の間に相関性がみられなかったことから、この2種類の発現は互いに独立した機構で調節されている可能性が示唆された。同一個体において *CES HU1* の mRNA が2種類発現している理由に関しては、現在のところ不明である。また、今回用いた方法では同一個体における2種類の mRNA 発現量を正確に比較定量することは困難であったが、検量線の作製に用いた FLC7 において *CES HU1a* type の mRNA が多く発現していたこと、またこれまでに報告された *CES HU1* cDNA がすべて *CES HU1a* type であったことなどから、ヒト肝における *CES HU1* mRNA は *CES HU1a* の方が多く発現している可能性が考えられた。

また、今回の定量ではヒト肝における *CES HU1a* および *CES HU1b* の mRNA 量にそれぞれ最大で100倍を超える個人差が認められた。しかしながら、これまでにおこなわれた測定の結果、ヒト肝における *CES HU1* の発現量の個人差は3~10倍程度であり、またヒト肝 *CES HU1* の活性の個人差は3~30倍程度であることが明らかとなっている。

一方、2種類の *CES HU1* 遺伝子のプロモーター活性を、ヒト肝がん由来細胞株である FLC7 細胞を host cell として reporter gene assay により測定した結果、*CES HU1b* では転写開始点より5'上流-160~+122において-892~+122の64%のプロモーター活性を有し、-160~-55の欠失によりこれが92%低下した。このことから、-160~-55の領域に *CES HU1b* の基本プロモーター領域が存在すると考えられた。また、*CES HU1a* では転写開始点より5'上流-161~+122において-896~+122の138%のプロモーター活性を有し、-161~-56の欠失により78%低下したことから、-161~-56の領域に *CES HU1a* の基本プロモーター領域が存在すると考えられた。

さらに *CES HU1a* および *CES HU1b* における各領域のプロモーター活性には明らかな差異がみられた。そこで2つの5'上流の塩基配列を解析し比較したところ、両者の間には結合しうる転写因子に差異があることが判明し、これがプロモーター活性の差異の原因である可能性が考えられた。

薬物輸送系の評価: バイオリアクター上の FLC4 における輸送系 L トランスポーターの解析 L トランスポーター

研究計画の初年度にあたる平成13年度は、アミノ酸系薬物の細胞膜輸送を担当する輸送系 L の FLC4 における発現を検討し、他の培養細胞に無い新たな特性を持つ輸送系 L 活性を見出した。FLC4 の RNA を抽出し、機能発現クローニング法によりその新規輸送系 L 活性を担うトランスポーターをクローニングした。

抗ウイルス薬評価系の開発

感染性クローン RNA を RFB にトランスフェクションしたところ、培養上清中の HCV RNA はトランスフェクション後から徐々に減少し、44, 47, 51, 54 日目には 10^3 copies/ml 未満が続いたものの、その後57日目に再び 10^4 copies/ml まで増加し、100日目まで約 10^{3-4} copies/ml と持続した。トランスフェクション後100日目前後の培養液を濃縮しシロ糖密度勾配法にて分画し、コア蛋白及び HCV RNA の多い分画を電子顕微鏡で観察したところ、抗 E1 モノクローナル抗体と特異的に反応するウイルス様粒子が観察できた。

がん原性物質代謝活性系の評価の成果

1). 立体培養系を用いた CYP 誘導の検討

単層培養法でも誘導が認められた CYP1A1 については、立体培養系においても同様に誘導が認められ、FLC-4 細胞については単層培養の時より反応が良好であった。しかし、誘導剤としてフェノバルビタールを前処理しがん原性物質として NDBA を後処理した場合、またリファンピシン前処理で誘導しエストラジオールを後処理した場合については、誘導を示唆する結果は得られなかった。ピリジンで前処理し NDMA を後処理した場合は、FLC-5 細胞で細胞生存率に減少が見られ、誘導の可能性も考えられるが、減少は大きくなく、誤差の可能性も否定できなかった。ATRA で処理後エストラジオールを後処理した場合には、FLC-4 細胞で細胞生存率に減少が見られた。

2). ASF104 培地を用いた CYP 誘導

FLC 細胞で CYP を誘導する際に、用いている DF10F に含まれる血清の影響により CYP 誘導が阻害されている可能性を検討するため、無血清で細胞培養が可能な ASF104 培地を用いて、CYP 誘導の検討を行った。

CYP1A1 はこれまでの実験と同様に誘導が見られたが、CYP2B1、CYP2B6、CYP2E1 については、ASF104 培地を用いてもそれらの誘導を示唆するような結果は得られなかった。一方、ATRA で前処理した際は、FLC-4 および FLC-7 細胞では細胞生存率の減少、FLC-5 細胞では増加が見られ、リファンピシンで前処理した場合には、すべての細胞において抑制が見られた。しかし、ASF104 培地は血清を含まないため、細胞の増殖が良くない。そのため、細胞生存率測定の間で誤差が大きく出てしまっている可能性が考えられる。

3). ATRA による CYP 誘導と代謝活性化の検討

ASF104 培地を用いて培養した FLC 細胞に ATRA 前処理し、E2 を後処理した際に、FLC-4、FLC-7 細胞では細胞生存率が減少し、FLC-5 細胞では増加していたが、DF10F 培地で培養した際に細胞生存率に変化が見られなかった。ASF104 培地を用いた場合、FLC-4 細胞では濃度依存的な減少、FLC-5 細胞では濃度依存的増加、FLC-7 細胞では ATRA 1・g/ml 作用の場合でのみ減少が見られた。一方、DF10F を用いた際には FLC-4、FLC-5、FLC-7 いずれの細胞の生存率にも影響はなかった。

4). マトリゲルを用いた CYP 誘導法の検討

肝臓の機能であるアルブミン産生能はマトリゲル存在下で培養をすることで、その機能を保持できることが知られている。そこで、あらかじめマトリゲルコートされたプレート (pre-coated plate)、マトリゲルをコートしたプレート (Thin-gel plate) を用いて、CYP 誘導の検討を行った。

生細胞数の変化は培地やプレートの種類に依存し、試薬間ではあまり相違が見られなかった。Normal plate はマトリゲル未処理のプレートであるが、これまでの実験で得られた結果と異なる結果が出ている。本実験で何らかのミスを犯した可能性も考えられ、再現性を含め更なる実験が必要である。

特に Thin-gel plate は、マトリゲルをコートする時にメニスカスが生じ、ゲルの上面がくぼんでしまった。このくぼんだゲル上に細胞を播種したため、細胞がウェル中央部に集中してしまっていた。マトリゲルコートの方法、培養方法などを検討しなおす必要があると考える。

5). Dye transfer Assay

細胞の分化の指標としてギャップジャンクションの形成がある。細胞間にギャップジャンクションが形成されることで、物質や情報の伝達が可能になる。分化の度合いを細胞間連絡を指標として評価する方法の確立を試みた。今回用いた dye-transfer assay は傷をつけられた細胞から Lucifer yellow が隣接する細胞にギャップジャンクションを伝わり移行する性質を指標とする。

DF10F を用いて培養を行った場合、FLC-4、FLC-5、FLC-7 のいずれの細胞でも Lucifer yellow の移行は観察されなかった。しかし、ASF104 を用いた際には、FLC-5 細胞では色素の移行はみられなかったが、FLC-4 細胞、FLC-7 細胞では 2~3 層に渡って色素が移行していた。

ヒト型の遺伝毒性試験法の確立研究成果

1) 核型分析

SKY 法により FLC4 細胞の核型分析を行ったところ、染色体数 60-71 の 3 倍体細胞であることがわかった。染色体数の変化だけでなく、転座、欠失等の構造異常も多くの染色体で観察された。また、観察した 5 つの細胞はすべて異なるタイプの異常を呈しており、極めて不安定な染色体構成 “variegated translocation mosaicism (VTM)” の性質を持つことが明らかとなった。また、本細胞は男性由来であるにも拘わらず Y 染色体が消失していた。

2) 小核試験

FLC4 および HepG2 細胞を用いて in vitro 小核試験を試みた。自然小核の頻度は HepG2 細胞が 3.20/1000 細胞であったのに対して、FLC4 細胞では 15.44/1000 細胞と極めて高かった。このことから本細胞の遺伝的不安定性が示唆される。

FLC4 細胞、HepG2 細胞とも代謝活性化が必要ない MMC、MMS に対しては用量依存的な細胞毒性と、小核の誘発が認められた。一方代謝活性化を必要とする BP に関しては HepG2 では用量依存的な細胞毒性と、小核の誘発が認められたのに対して、FLC4 では反応性が弱かった。また、CP に関しては両細胞とも反応性が低かった。

3) トランスジェニック FLC 細胞の樹立

FLC4 細胞に λ gt10 遺伝子と pSV2Neo 遺伝子をリン酸カルシウム法によりコトランスフェクションし、全部で 43 の G418 耐性クローンを得た。PCR 法によりゲノム DNA を解析したところ、8 クローンに λ gt10 遺伝子が多コピー導入されているのが確認された。この 8 クローンの DNA をラムダパッケージングを行った後、*hfl* の大腸菌に感染させ 37°C で培養したところ 1 クローンについてプラークの形成が確認された。また、25°C においてもプラークの形成も認められたことから、遺伝子突然変異体も検出できることが明らかとなった。変異体プラークは遺伝子解析を行い、間違いなく突然変異を有することが確認された。本遺伝子突然変異検出系の自然突然変異頻度は $2.29 \sim 12.7 \times 10^{-4}$ であり、MNNG 処理により変異頻度が 10~30 倍増加した。

小型バイオリアクターを開発研究成果

testosterone は CYP3A で代謝される代表的な基質である。FLC を 15 ml 容量のリアクターで培養し、rifampicin で CYP3A の誘導後、代謝実験を行った。50 μ M の testosterone の添加後、閉鎖系で培養液をリザーバーとリアクター間で循環させ、継時的にサンプリングした。testosterone は 180 分でほぼ完全に消退した。CYP3A4 の発現 mRNA 量は、rifampicin 誘導下で、リアクター培養のサンプルでは単層培養に比較して、数十倍高かった。

4. 考察

ヒト肝癌細胞株と不死化細胞株の高機能

樹立したヒト肝癌細胞株 HLE にヒト *CYP/2E1* 遺伝子を導入し、*CYP/2E1* を過剰発現する細胞株 HLE/2E1 を樹立した。この細胞株は *CYP/2E1* の触媒活性に必須である NADPH-cytochrome P450 reductase および cytochrome b_5 の両遺伝子も強く発現する。トランスフェクション後 100 継代を越えても、HLE/2E1 細胞はこれらの遺伝子を安定に発現することから、これらの形質が不可逆的に安定化したと考えられる。

比較的低濃度 (0.5~2 mM) のエタノール処理により、HLE/2E1 細胞の *CYP/2E1* 活性はエタノール濃度依存的に増加した。しかし、*CYP/2E1* mRNA の発現は変わらなかった。*CYP/2E1* がエタノールやその他の低分子量の試薬により安定化されることは周知の事実であり、我々の結果はこれとよく一致する。*CYP/2E1* 遺伝子導入された HepG2 細胞では、50 mM エタノールにより *CYP/2E1* が安定化した。しかし、我々が用いた濃度 (0.5~2 mM) はより生理的であり、また細胞毒性がないという利点がある。

CYP/2E1 による APAP 代謝の過程で反応性の高い中間体 *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) が生じ、これが細胞タンパクのチオール基と共有結合して細胞毒性を惹起すると考えられている。また、NAPQI の大量生成により還元型グルタチオン (GSH) が枯渇し、脂質過酸化が起こる。本研究において、APAP は HLE より HLE/2E1 細胞に対してより強い細胞毒性効果を与えることが分かった。APAP 細胞毒性の競合的阻害剤であるエタノール、抗酸化剤であるビタミン E を同時に添加すると、APAP 細胞毒性効果が減弱した。一方、エタノールで前処理すると、HLE/2E1 細胞に対する APAP の細胞毒性効果が顕著に増加した。これらの結果より、APAP の HLE/2E1 細胞に対する顕著な細胞毒性効果は、*CYP/2E1* の過剰発現によると考えられる。

BSO はグルタチオン合成阻害剤であり、細胞内の還元型グルタチオン(GSH)を枯渇させる。GSH は CYP/2E1 の基質ではないが、種々の薬物毒性や酸化障害から細胞を保護する作用がある。つまり、GSH は活性酸素細胞障害の防御因子である。HLE 細胞に対して無毒な濃度の BSO が、HLE/2E1 細胞において顕著な細胞毒性効果を示した。OH ラジカル・スカベンジャーであるエタノールを同時に添加すると、HLE/2E1 細胞に対する BSO の細胞毒性効果が有意に抑制された。また、抗酸化剤であるビタミン E も BSO の細胞毒性を完全に阻害した。一方、HLE/2E1 細胞をエタノールで予め処理した後に BSO 暴露すると、BSO の細胞毒性効果が顕著に増加した。これらの結果は、CYP/2E1 代謝関連の細胞毒性が活性酸素により惹起されることを示唆する。

肝機能の亢進の試み：HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現

初代培養肝細胞で観察されているように、肝細胞は立体化することによって、その分化表現型を高く維持することができる。ヒト肝由来培養細胞株の中で、多くの細胞株は細胞の三次元化にตอบสนองして肝機能を亢進する機能を失っているが、FLC-4 細胞はこの応答性を保持した細胞株であることが明らかとなった。異なった細胞外マトリクスを用いた場合でも、重要であるのは三次元的に細胞形態が変化することであることが明らかとなった。FLC-4 細胞における三次元培養による肝機能亢進には、肝臓特異的転写因子である HNF-4 をはじめ HNF-3a や C/EBPa の発現が亢進したためであることがわかった。

薬物代謝 1.

ヒト初代培養肝細胞系を用いた酵素誘導成果

ヒト *CYP2C9* および *CYP2C19* の発現調節領域の相同性は高いものの転写因子結合配列に違いが認められ、これらが両遺伝子の酵素誘導および発現調節の差異に関与している可能性が示唆された。

薬物代謝 2.

プロドロッカーカルボキシエステラーゼ (CES)

1) ヒト *CES HU1* 遺伝子の構造

CES HU1 遺伝子にみられる 2 種類の配列は、きわめて構造の類似した 2 つの *CES HU1* 遺伝子がヒトゲノム中に存在することを示唆するものと考えられた

2) ヒト肝 *CES HU1* 遺伝子の発現および発現調節機構

ヒト肝に存在する *CES HU1* タンパクは 2 種類の mRNA から翻訳されたものの総和である可能性が示唆された。

薬物輸送系の評価：バイオリアクター上の FLC4 における輸送系 L トランスポーターの解析 L トランスポーター

本研究に用いた FLC4 は、プレート培養によるものであるが、平成 14 年度はバイオリアクターで培養した FLC4 を用いて同様な検討を行い肝細胞機能が亢進した状況下での研究を行わねばならない。そのため以下の実験系を組む必要がある。

(1) FLC4 輸送系 L トランスポーターの解析

平成 14 年度の研究において FLC4 から単離したアミノ酸輸送系 L に相当するトランスポーターの cDNA の塩基配列決定、核酸プローブ及び特異抗体を用いて生体内での組織細胞分布、及び FLC4 における発現の解析を行う。また、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた基質選択性及び機能特性の解析を行い、アミノ酸系薬物の輸送スペクトラムを明らかにする。

(2) バイオリアクター上の FLC4 における輸送系 L トランスポーターの解析

平成13年度の研究において分子クローニングに用いた FLC4 は、プレート上に培養したものであったが、平成14年度はバイオリアクター上の FLC4 に関して、同様に輸送系 L の特定及び分子クローニングを行い、バイオリアクターで培養した FLC4 の輸送特性を浮き彫りにする。

(3) FLC4 に発現する他の薬物トランスポーターの同定

平成13年度に行ったアミノ酸輸送系 L の検討と同様にして、有機アニオントランスポーター、有機カチオントランスポーターについて、そのモデル基質を用いて FLC4 の輸送特性を明らかにする。その結果に基づき、候補となるトランスポーター分子を予想し、それらに対するリアルタイム定量 RT-PCR とウエスタンブロットを用いて発現する薬物トランスポーターを定量的に評価する。

抗ウイルス薬評価系の開発

感染性のウイルス粒子を産生させることに成功した。このように培養細胞で遺伝子から感染性ウイルス粒子をつくるというリバースジェネティクスな手法を導入できたことは、今後の HCV 研究にとって非常に重要な進歩であると期待できる。HCV 全ゲノムが自己複製する細胞を樹立成功は

肝臓がん由来の培養細胞において効率よく自己複製する HCV ゲノムの一部を単離した。このゲノムを樹立した高機能保持ヒト肝培養細胞株 FLC4、あるいは FLC7 細胞などに導入し自己複製する細胞を樹立する。薬物代謝の解析に用いるためには HCV 全ゲノムが自己複製する細胞を樹立する必要があるため、この系の作成が終われば、次にはウイルス全ゲノム RNA を導入して自己複製する細胞を構築し、薬物の有用性、評価をしている本研究の共同研究者に供給する。今後この HCV 増殖培養細胞系を用い、効率よくウイルス増殖を阻止する IFN の種類、濃度、投与方法、期間などについて検討予定である。そして、従来効果的な *in vitro* 培養系がない肝炎ウイルスをモデルに、医薬品の効果評価系構築をめざす

がん原性物質代謝活性系の評価

FLC 細胞を単層で培養した際には、誘導剤の前処理およびがん原性物質後処理の処理条件にかかわらず、CYP1A1 以外の CYP の誘導によるがん原性物質の代謝活性化は認められなかった。生体内において細胞は立体的に存在し臓器を形成しているため、単層培養という生体と異なった条件下ではその機能を発揮することは難しく、細胞を立体的に培養するなど、分化機能を発揮させる状態で培養することが不可欠とされる。これまでの研究で、ハイドロキシアパタイトビーズ、ハイドロキシアパタイトコート布、ガラスファイバーフィルターを用いて FLC 細胞を立体的に培養することを試みたが、いずれの方法においても、立体培養法の確立にはいたらなかった。

今回、コラーゲンゲル中で FLC 細胞を培養することで、FLC 細胞がクランプを形成しスフェロイド状に生育することを確認した。しかしながら、立体培養系でも CYP2B1、CYP2E1 の誘導を示す結果は得られなかった。一方、血清の影響を考慮した ASF104 培地を用いた無血清培養、肝細胞の機能維持を目的としたマトリゲル培養においても、同様に CYP の誘導を示すような結果は得られていない。S9 経由法において、ニトロソアミン類を代謝活性化する場合、高濃度の S9 を必要とすることから、CYP は誘導されているが活性が低くニトロソアミン類の代謝活性化が不十分である可能性も考えられる。これまでの実験で CYP の誘導とがん原性物質の代謝活性化を同時に評価する方法の確立を目指してきたが、CYP の誘導とがん原性物質の代謝活性化を切り離して考える必要があろう。

ATRA は CYP3A4 の誘導機構を活性化し、CYP3A4 により代謝されることが知られている。立体培養では FLC-4 細胞で、無血清培養では FLC-4、FLC-7 細胞で細胞生存率の減少が見られ、FLC-5 細胞では逆に上昇が見られた。無血清培地を用いて ATRA の細胞生存率に及ぼす影響について検討したところ、FLC-4、FLC-7 細胞では細胞生存率の抑制、FLC-5 細胞では上昇が見られた。このことから、FLC-4、FLC-7 細胞では、ATRA 自身によって誘導された CYP により ATRA が代謝され毒性を、FLC-5 細胞では逆に細胞増殖促進作用を示している可能性が示唆された。しかし、ATRA によって各々の細胞で誘導される CYP の分子種、その CYP 分子種によって生成した代謝産物の作用など不明な点が多くあり、更なる検討が必要であろう。

今回の実験結果では、リファンピシン、クマリンについては培養方法間の差もさることながら、同じ培養方法を用いた場合でも実験間の差が生じている。この差が実験手技に由来するものなのか、試薬選択に起因するものなのかは分からず、結果の信頼性も低い。

プレートをコラーゲンやマトリゲルでコートする際、生じたメニスカスはそのまま固化する。ゲル中に細胞を分散させるコラーゲンゲルを用いた培養では、ゲルの厚いウェル周辺部に、ゲル上に細胞を積層させるマトリゲルを用いた培養では、ゲルの窪んでいるウェル中央部に細胞が局在化してしまい、細胞の増殖に影響を及ぼしている可能性が考えられる。メニスカスの生じにくい培養器具を使用する必要がある。

現段階では、文献により知られている CYP 誘導剤や CYP により代謝される物質を用いて実験を行っている。しかし、MCA のように CYP を誘導し、さらにそれ自身が代謝活性化される物質や、CYP による代謝産物の毒性についての評価が定まっていない物質もあり、被験試薬の選択についてもまだまだ検討の余地が残っている。

これまでのわれわれの研究では、いずれの試薬・培養方法を用いても CYP1A1 以外の CYP の誘導を確認するまでにはいたらなかった。このことから、FLC 細胞では CYP の誘導能ががん化により失われてしまった可能性が考えられた。そこで、がん化により失われた CYP 誘導能を取り戻すために、正常細胞に比べて分化段階が低いと考えられる FLC 細胞に分化誘導剤を作用させることで、より高分化な段階に戻し、CYP 誘導能を取り戻すことを試みた。細胞の分化のマーカーとしては種々の遺伝子が上げられているが、そのいずれもがん化に至る過程やシグナル伝達に関わるものであり、細胞の性質などを直接的にあらわしているものではない。がん細胞の特徴として、細胞間に存在するギャップジャンクションでの連絡が失われているという点が上げられる。その性質を利用し、細胞間連絡の有無を蛍光色素の移行を指標に評価する方法の確立を試みた。この方法により各種分化誘導剤を調べた結果は、血清を含む培地を用いた場合、色素の移行は認められなかったが、血清を含まない培地を用いて培養した場合は FLC-4 細胞、FLC-7 細胞で色素の移行が確認された。特に、FLC-7 細胞では色素の移行が広範囲に及んでおり、しかも色素が移行した細胞は、血清存在下で培養した際に敷石状になった細胞とは形態的に異なっていた。このことより、細胞ががんとしての形質を保つためには血清が必要である可能性が考えられた。しかし、これまでの研究で肝臓の機能である CYP の誘導について確認しておらず、今後各種分化誘導剤を作用させ CYP 誘導能を取り戻せるか否か、血清濃度との関係を含めて実験を進めていくことを計画している。

ヒト型の遺伝毒性試験法の確立

FLC4 細胞は核型分析、小核の発生頻度等から極めて遺伝的に不安定であることが証明された。特に SKY 解析では解析したすべての細胞が異なった核型を呈することから、いわゆる“variegated translocation mosaicism (VTM)”の性質を持つことが明らかとなった。このことは本細胞が遺伝的に不安定であるため、細胞培養中に様々な染色体異常を自然誘発することを示している。本細胞をクローニングすると、増殖性に違いのあるクローンが多数出現し、さらに増殖性の高いクローンからサブクローンを繰り返しても、同様に増殖性に違いのあるクローンが出現することが知られている。この現象には、細胞培養中の遺伝的不安定が関与しているのかもしれない。核型分析からは Y 染色体の消失、X 染色体の倍加も観察された。FLC4 細胞では X 染色体マーカーである hprt 変異株が検出できないことが知られているが、その理由は X 染色体の倍加によるものと考えられる。

小核試験において、FLC4 細胞は自然小核の頻度が極めて高いため反応性が悪く、小核試験には不向きであるのかもしれない。また、CP に対する反応性は細胞毒性についても悪かった。CP は CYP2B6 により代謝されることが知られているが、HepG2、FLC4 ともこの薬物代謝酵素活性は低いものと予想される。今後、S9 添加の実験系と比較することにより、薬物特異的な反応性について解析を進めたい。

多くの λ gt10 遺伝子導入細胞から、プラーク形成し、遺伝子突然変異試験として利用できそうな細胞株、“FLC4- λ 13 細胞”の樹立に成功した。しかしながら、自然突然変異頻度は $2.29 \sim 12.7 \times 10^{-4}$ と、これまで報告されている系の 10 倍の頻度を示した。この細胞からいくつかのサブクローンを得、再試験したところ、5 倍程度のばらつきはあるものの依然として自然突然変異頻度は高かった。

また、タイター用プレートのプラーク頻度が通常の10分の1程度しかなかった。これらのことから、高い自然突然変異頻度の原因として、導入された遺伝子のコピー数の少ないこと、何らなの要因でプラークの形成が阻害されていることなどが考えられた。しかしながら、変異プラークには突然変異が確認されること、変異原処理によってプラークの数の誘発が認められることから、遺伝子突然変異の研究には十分利用できるものと考えられる。

小型バイオリアクターを開発

ラジアルフロー型バイオリアクターによる培養下のFLC細胞では、rifampicinによるCYP3A mRNA誘導と、酵素活性の増加を認めた。FLC細胞の3次元培養系を用いることで、よりヒトに近い薬物代謝シミュレーションの系を作成できることが示された。

5. まとめ

高機能保持ヒト由来肝細胞と新しく開発した培養細胞機能をより高めることができるバイオ人工肝（ここではラジアルフローバイオリアクター）による3次元培養法との結合システムをつくり薬物の有効性と安全性の評価法を新しく確立した。

6. 研究発表

永森静志. [特集] ヒト肝細胞を利用した研究とその臨床応用. 細胞. 33 : 397-448 (2001).

永森静志 : (レビュー) 肝ヒト由来細胞の基礎的研究と医療への応用、細胞33 ; 2-5. 2001

Fukaya, K., Asahi, S., Nagamori, S., Sakaguchi, M., Gao, C., Miyazaki, M., and Namba, M. Establishment of a human hepatocyte line (OUMS-29) having CYP 1A1 and 1A2 activities from fetal liver tissue by transfection of SV40 LT. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal, 37(5), 266-269 (2001).

宮崎正博, 小林直哉, 永森静志, 田中紀章, 許南浩. ヒト不死化肝細胞. 細胞, 33 (11), 406-409 (2001).

Inoue, Y., Miyazaki, M., Tsuji, T., Sakaguchi, M., Fukaya, K., and Namba, M. Reactivation of liver-specific gene expression in an immortalized human hepatocyte cell line by introduction of the human HNF4 α 2 gene. International Journal of Molecular Medicine, 8(5), 481-487 (2001).

Senda C, Yamaura Y, Kobayashi K, Fujii H, Minami H, Sasaki Y, Igarashi T, Chiba K. Influence of the CYP2D6*10 allele on the metabolism of mexiletine by human liver microsomes. Br J Clin Pharmacol Jul;52(1):100-3(2001).

Kubota T, Chiba K. Frequencies of thiopurine S-methyltransferase mutant alleles (TPMT*2, *3A, *3B and *3C) in 151 healthy Japanese subjects and the inheritance of TPMT*3C in the family of a propositus. Br J Clin Pharmacol 51(5):475-7(2001).

Kobayashi K, Kogo M, Tani M, Shimada N, Ishizaki T, Numazawa S, Yoshida T, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Chiba K Role of CYP2C19 in stereoselective hydroxylation of mephobarbital by human liver microsomes. Drug Metab Dispos 2001;29(1):36-40(2001).

M.Hosokawa, K. Suzuki, D. Takahashi, M. Mori, T.Satoh and K. Chiba Purification, molecular cloning and expression of dog liver microsomal acyl-CoA hydrolase: A member of the carboxylesterase multigene family. Arch. Biochem. Biophys. 389, 245-253(2001)

M.Taguchi, S.Imaoka, K.Yoshii, K.Kobayashi, M.Hosokawa, N. Shimada, Y.Funae and K. Chiba, kinetics of testosterone 6b-hydroxylation in the reconstituted system with similar ratios of purified CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome B5 to human liver microsomes. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.109, 53-63(2001).

K.Tamura, Y.Yatabe, H.Sakamoto, M.Hosokawa, K.Kobayashi, K. Chiba and H. Kogo. Effect of carbanazepine on the first ovulation in gonadotropin-primed immature female rats Br. J. Pharmacol, 134(6):1328-1334(2001).

N.Yasui-Furukori, T. Kondo, T.Kubota, H. Otake, T. Ohkubo, T. Nagasaki, K. Sugawara, K. Chiba, K. Otani, S. Kaneko No correlations between the urinary ratio of 6b-hydroxycortisol to free cortisol and pharmacokinetics of alprazolam Eur. J. Clin. Pharmacol, 57, 285-288 (2001)

M. Hosokawa and T. Satoh; Measurement of carboxylesterase (CES) activities in Current Protocols in Toxicology (Eds M. Mains et. al), Jhon Wiley & Sons, New York, in press ,2002

M.Hosokawa, K. Suzuki, D. Takahashi, M. Mori, T.Satoh and K. Chiba Purification, molecular cloning and expression of dog liver microsomal acyl-CoA hydrolase: A member of the carboxylesterase multigene family.Arch. Biochem. Biophys., 389, 245-253(2001).

K.Tamura, Y.Yatabe, H.Sakamoto, M.Hosokawa, K.Kobayashi, K. Chiba and H. Kogo. Effect of carbanazepine on the first ovulation in gonadotropin-primed immature female rats Br. J. Pharmacol, 134(6):1328-1334(2001).

細川 正清 ヒト肝細胞を用いた創薬と薬物代謝 -ヒト肝細胞を利用した研究ととその臨床応用- 細胞 (The Cell) 33, 410-413(2001).

M.Taguchi, S.Imaoka, K.Yoshii, K.Kobayashi, M.Hosokawa, N. Shimada, Y.Funae and K. Chiba, kinetics of testosterone 6b-hydroxylation in the reconstituted system with similar ratios of purified CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome B5 to human liver microsomes. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.109, 53-63(2001).

細川正清、今井輝子 カルボキシルエステラーゼの分子多様性とプロドラッグの代謝活性化 ファルマシア (最前線) 37, 119-123(2001).

S. Narimatsu, N. Kobayashi, K. Asaoka, Y. Masubuchi, T. Horie, M. Hosokawa, T. Ishikawa, S. Ohmori, M. Kitada, J. Miyano, H. Kataoka, S. Yamamoto High-performance liquid chromatographic analysis of the sulfation of 4-hydroxypropranolol enantiomers by monkey liver cytosol. Chirality 13, 40-7(2001).

S. Narimatsu, T. Arai, Y. Masubuchi, T. Horie, M. Hosokawa, K. Ueno, H. Kataoka, S. Yamamoto, T. Ishikawa, AK Cho Inactivation of rat cytochrome P450 2D enzyme by a further metabolite of 4-hydroxypropranolol, the major and active metabolite of propranolol. Biol Pharm Bull. 24, 988-94(2001).

千葉 寛、細川 正清 薬理ゲノミクスと抗癌剤 実験医学 19, 25-30(2001)

細川 正清 薬物加水分解酵素系 エステラーゼ。アミダーゼ：生物化学実験法講座 15 薬物代謝学 (鎌滝哲也編集) 廣川書店、東京、2001

細川 正清 ヒト肝細胞を用いた創薬と薬物代謝 -ヒト肝細胞を利用した研究ととその臨床応用- 細胞 (The Cell) 33, 410-413(2001).

細川 正清、千葉 寛 薬物代謝酵素の誘導：生物薬剤学 (林 正弘、谷川原 祐介編集) 南江堂、東京、2001 細川 正清 ヒト肝細胞を用いた創薬と薬物代謝 -ヒト肝細胞を利用した研究ととその臨床応用-細胞 (The Cell) 33, 410-413(2001)

Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor modulates its transcriptional activity. *Hepatology* (in press).

Suzuki R, Tamura K, Li J, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280, 301-309 (2001).

Aizaki H, Matsuura Y. Report on 7th International Meeting on Hepatitis C and related viruses, Gold Coast, Australia. *Uirusu*. 51, 109-112 (2001).

Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, Miyamura T. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology*. 286, 263-75(2001).

小田裕昭、肝実質細胞の機能調節機構とその制御、細胞、33, 402-405 (2001).

Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Hirano, N., Ohsawa, K., Ohwada, T., Hayashi, M. Mutation spectrum of o-aminotoluene in the cII gene of lamda/lacZ transgenic mice (MutaTM MouseMutat. Res., 491, 211-220(2001).

Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T., and Hayashi, M. Spindel poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction. *Mutat. Res.*, 493,101-114, (2001).

Honma, M. and Sofuni, T. The mouse lymphoma assay (MLA) using the microwell method. "Genetic toxicology and cancer risk assessment" ed. by Choy, W.N. Marcel Dekker, Inc., New York, 141-161(2001).

松浦知和、斉藤勝也 ほか、肝癌細胞由来ヒト高機能肝細胞癌株の樹立、特集：人工肝臓研究—最近の進歩。外科 63 (5): 539-543(2001).

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.