

インフォームドコンセントに基づいた外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制の確立とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション

所属 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター・薬理部
研究者 大野 泰雄

分担研究者

- | | |
|-------------------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 大野泰雄 |
| (2) 獨協医科大学薬理学研究室 | 上川雄一郎 |
| (3) 獨協医科大学病院腫瘍外科 | 砂川正勝 |
| (4) 獨協医科大学病院消化器外科 | 窪田敬一 |
| (5) 東京大学農学部獣医学科 | 唐木英明 |
| (6) 塩野義製薬(株)新薬研究所 | 馬場隆彦 |
| (7) ファイザー製薬(株)中央研究所 | 嶋田 薫 |
| (8) 第一製薬(株)創剤代謝研究所 | 岡崎 治 |
| (9) 田辺製薬(株)創薬研究所 | 山田泰弘 |
| (10) 三共(株)薬物動態研究所 | 徳井太郎 |
| (11) 第一化学薬品(株)薬物動態研究所 | 二宮真一 |
| (12) アベンティスファーマ(株)開発研究所 | 森田繁道 |
| (13) 大日本製薬(株)開発研究所 | 寺内嘉章 |
| (14) 武田薬品工業(株)創薬研究本部 | 朝日 知 |
| (15) 中外製薬(株)富士御殿場研究所 | 名淵義明 |
| (16) 日本新薬(株)開発研究所 | 中村明生 |
| (17) 万有製薬(株)薬物代謝研究所 | 安盛俊雄 |
| (18) 三菱ウェルファーマ(株)総合研究所 | 森 尋昭 |
| (19) 明治製菓(株)薬品総合研究所 | 奥平典子 |
| (20) 持田製薬(株)総合研究所 | 大西修平 |

要旨

外科手術切除ヒト大腸、子宮平滑筋、および肝組織を用いた研究により、ヒト組織がヒト特異的な薬理作用や代謝活性や酵素誘導能の予測に有用であることを示した。また、遺伝子多型を持つヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝評価系を確立した。

1. 研究目的

本研究事業では厚生労働省等の公的ガイドラインに従い、提供者の同意（インフォームドコンセント）の取得を必須とした外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制の構築、並びに主として獨協医科大学から医薬品企業、国立医薬品食品衛生研究所及び東京大学などの共同研究者へ提供される多種類の日本人組織を用い、日本人に特有な薬物動態並びに薬理作用を明らかにし、臨床での薬効や副作用、薬物相互作用における予測の向上を促して、創薬開発における効率化と被験者の安全性を考慮した臨床試験に資することを目的とした。本研究では、主にヒト組織の薬理、臨床、薬物代謝能の観点からヒト組織の有効利用について検討した。具体的には、主に日本人由来の組織を用いて、1) 大腸平滑筋および子宮平滑筋の生理活性と薬理学的特性、2) 胃癌組織を用いた抗癌剤感受性試験の代替法開発、3) 生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化、4) 手術切除肝組織からの肝細胞・肝細胞画分の調製と代謝活性評価、5) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション、6) *in vivo* 代謝予測のための凍結肝細胞を用いた評価系の確立、および7) 小腸組織における代謝酵素の特性について検討した。さらに、8) 各施設における倫理申請の現状に関する調査を行った。

2. 研究方法

ヒト組織を用いた本研究は、それぞれの参加施設において、倫理審査委員会の承認の下に行われた。提供されたヒト組織は、IV ウィルス、C型肝炎ウィルス、梅毒等が陰性の患者で、摘出組織の研究利用に関して文書による同意が得られた患者から提供されたものである。提供組織は匿名化された。なお、実験操作は、各施設のヒト組織取り扱いに関する規定等に従って実施した。また、HS組織バンク(HSRRB)および米国から入手したヒト肝細胞についても、同様の措置が講じられたものを用いた。

2-1) ヒト平滑筋組織を用いた研究

大腸癌患者 19 名および胃癌患者 13 名から外科的に切除された S 状結腸および胃体部より肉眼的に癌細胞浸潤のない平滑筋部分と粘膜部分を、オルガンバス内の Krebs 栄養液中に懸垂して、凍結保存方法の開発、粘膜筋板の神経支配、粘膜標本からの 5-HT や acetylcholine 遊離量を検討し、実験動物におけるそれと比較した。また、子宮平滑筋より条片を作成し、その収縮張力をマグヌス法により等尺性に記録した。各種 PKC アイソザイムの抗体を用い、Western blot 法により、PKC 発現パターンを解析した。RT-PCR 法により mRNA の発現量を比較した。

2-2) ヒト胃癌組織を用いた研究

進行胃癌症例 57 例を対象にテロメラーゼ活性測定、5FU に対する抗癌剤感受性試験、TS 蛋白量・DPD 活性測定、survivin mRNA 発現量、OPRT・TP の mRNA 発現量を測定した。

2-3) 病的肝細胞の機能変化の解明

術前の肝内門脈枝塞栓術 (TIPE) を行った 19 例 (男性、平均年齢 62.6 歳; 38~77 歳) について検討した。肝胆道系悪性腫瘍 18 例 (肝門部胆管癌 5 例、中部胆管癌 1 例、肝細胞癌 5 例、肝内胆管癌 2 例、転移性肝癌 5 例)、良性胆管狭窄 1 例に対して行った。肝細胞癌については TAE を先行させ、トランスアミナーゼ等改善の後に TIPE を行った。肝内門脈枝塞栓前後の術中門脈圧、術前および第 14 病日には ICG-R15 (黄疸症例には減黄後に評価) を測定し、また CT volumetry から非塞栓葉容積の算定を行ってビリルビン値などを考慮して術式を決定した。

2-4) 手術切除日本人肝組織からの肝細胞・肝細胞画分調製と代謝活性評価

獨協医科大学において、切除された肝組織を氷冷ヘパリン含有生理食塩水にて脱血し、氷冷 L-15 培地に交換した後、氷冷下オートパイ便にて国立医薬品食品衛生研究所へ搬送した。この肝組織からコラゲナーゼ 2 段階灌流法により肝細胞を分離した後、遠心分離を繰り返し肝細胞の精製を行った。肝細胞は 24-well plate に 1 well あたり 4×10^5 cell を播種し、5% CO₂-air 下、37℃にて 30 分間予備インキュベーションを行った。調製した遊離肝細胞の代謝能評価のため、7-エトキシクマリン (75 μM、2 時間インキュベーション) およびテストステロン (250 μM、2 時間インキュベーション) を基質として、生成した代謝物を HPLC にて分析した。HSRRB および獨協医科大学より入手した肝組織から常法に従い肝細胞分画を調製し、薬物代謝関連の酵素蛋白および指標酵素活性を測定した。

2-5) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション

非凍結ヒト肝細胞は、米国 GenTest 社から 24-well plate に接着済みのもの (HH121 Lot 46 および HH128 Lot 53) を購入した。典型的誘導剤として、3-メチルコランスレン (3-MC; 0.1、0.2、0.5 μM)、β-ナフトフラボン (BNF; 1、2、5 μM) およびオメプラゾール (OPZ; 2.5、5、10、20 μM) を用いた。これらを 24 時間暴露後、エトキシレゾルフィン O-脱エチル化 (EROD) 活性を指標として、CYP1A2 酵素の誘導能を 2 回の実験にて評価した。また、凍結保存されたヒト肝細胞を融解後に培養した肝細胞と未凍結の初代培養ヒト肝細胞における薬物代謝酵素 CYP3A4 の誘導 (リファンピシン; RIF 10 μM、フェノバルビタール; PB 1mM、96 時間暴露) について、無血清培地 3 種、有血清培地 1 種を用いて行い、どちらの細胞系でどの培地が適しているかをテストステロン (250 μM) の 6β-水酸化体を LC/MS にて測定した。

2-6) 凍結ヒト肝細胞を用いた in vivo 代謝予測のための評価系

遺伝子多型の存在が知られている CYP2D6 薬物代謝酵素活性データを元に、市販の凍結ヒト肝細胞から Poor metabolizer (PM) の候補細胞を選出し (IVT 社 15 ロット、XenoTech 社 8 ロット)、Allelic Discrimination Kit (Applied Biosystems)、Multiplex Long PCR 法およびダイレクトシーケンシング法にて SNPs を判定した。その結果判明した PM 細胞 (GenTest 社、Lot.H318) および Extensive metabolizer (EM; In Vitro Technologies; IVT 社、Lot. CYE) 細胞をその後の実験に用いた。凍結ヒト肝細胞は、96 well プレートに播種し、培養液に浮遊させた状態で試験に供した。CYP2D6 の基質であるデキストロメトルファン (DEX; 最終濃度 0.4、2、10 μM) を 37℃ で反応させた。1 時間および 2 時間後の反応液をサンプリングし、親化合物 (DEX) の他、デキストロメトルファン (DXO)、3-メトキシモルヒナン (3-MEM)、3-ヒドロキシモルヒナン (3-HM)、

DXO-glucuronide (DXO-glu)を定量し、生成速度を算出した。培養液中の未変化体および代謝物の測定には、LC/MS/MSを用いた。EM肝細胞とPM肝細胞それぞれのCYP3A4の活性には、ミダゾラム(MDZ; midazolam)の1-水酸化活性を指標として比較した。また、凍結ヒト肝細胞を米国のXenoTech, LLC社より入手し、フルルビプロフェン(10 μ M)の代謝を検討し、in vivoデータと比較した。

2-7) ヒト小腸組織における代謝酵素の特性

代謝実験用のヒト小腸組織は入手できなかったことから、本年度はラットを用いて小腸における代謝活性の特性について検討した。7週齢Wistar/STラットを用い十二指腸から回腸にかけて切除し反転腸管を調製した、また、十二指腸、空腸、回腸を含んだ20cmごとの3つの領域における上皮細胞から、常法に従いマイクロソームを調製した。これら組織における各種薬物代謝関連酵素活性を測定した。トログリタゾンをヒト小腸マイクロソーム、肝マイクロソームまたはUGT発現系マイクロソームとUDP-グルクロン酸存在下でインキュベートし、代謝物をHPLC-UV法により測定した。

2-8) 各施設における倫理申請の現状に関する調査

ヒト肝細胞を用いた薬物代謝実験および、代謝誘導能の共同研究を行うにあたり、本研究班肝臓グループに参加の15施設に対して、各施設が倫理委員会に提出する倫理申請書ならびにプロトコルの記載内容等について、アンケート調査を行った。本調査は、平成14年6月下旬から、約2ヶ月間にわたり電子調査法を用いて行い、全施設から回答を得た。なお、本調査に先立って行った倫理申請程度の実態調査の結果をも踏まえて報告する。

3. 研究成果

3-1) ヒト平滑筋組織を用いた研究

ヒト大腸輪状平滑筋に対するcarbachol(0.01-30 μ M)の用量依存的収縮反応や100mM KClによる収縮高を指標にして、各種凍結保存液の有用性を検討したところ、日水製薬の無血清培地SFM101で最も良好な収縮反応が再現された。なお、凍結氷害防止剤のdimethylsulfoxide(DMSO)は凍結保存液の必須成分であった。粘膜筋板を支配する神経としてはNO作動性抑制神経が優位であった。また、ヒトの大腸や胃の粘膜標本ではモルモットとは異なり内因性acetylcholineの自発的な遊離は認められなかったが、消化管機能調整薬KW5092(10-30 μ M)によって著明な遊離が認められた。

ヒト子宮筋は、Cキナーゼの活性化薬であるホルボールエステル(PDBu)によって収縮したが、ラットでは収縮は認められなかった。また、高濃度Kで刺激した筋に、PDBuを投与すると、ヒト子宮筋では収縮が増強され、cPKC選択的阻害剤で強く抑制された。ヒトではPKCサブタイプのうち β サブタイプの発現が上昇していた。一方、ラット子宮筋においてもいずれのPKCファミリーも発現していた。なかでもcPKCファミリーの一つであるPKC α が多量に発現していた。

3-2) ヒト胃癌組織を用いた研究

抗癌剤(5-FU)感受性試験に対する胃ガン組織の感受性は0-80%の幅(36.1 \pm 26.6%)があった。また、50%以上の増殖抑制効果を示した抗癌剤感受性陽性症例は32.2%に認めた。胃癌組織でのテロメラーゼ活性は80.7%に認めた。テロメラーゼ活性の半定量値は32.71 \pm 46.62 U/ μ g proteinであった。このテロメラーゼ活性値と抗癌剤感受性試験での増殖抑制率との間には関連を認め、テロメラーゼ活性が高い場合に感受性が高いことが示唆された。また、5FUの代謝活性化酵素であるTPやOPRTは、代謝の律速酵素であることから、発現が高い症例で5FUの効果が高いことが予測されているが、酵素の高い発現例で効果が高い傾向が認められたものの有意差は見られなかった。

3-3) 病的肝細胞の機能変化の解明

本研究は臨床例を対象としており、本研究に限りHBVおよびHCV非陰性組織についても検討を加えた。肝切除症例の14例(右葉切除術2例、拡大右葉切除術5例、拡大右葉切除+胆管切除術6例、肝臓同時切除術1例)は全例が耐術した。非切除症例は4例、手術拒否は1例であった。切除症例では、肝細胞癌症例のうち4例が慢性肝炎(HBV陽性1例、HCV陽性1例、非B非C2例)、1例が肝硬変(HCV陽性)であった。また肝門部胆管癌症例のうち1例は肝硬変(HCV陽性)。このほかの8例は正常肝であった。測定項目の結果から①術中門脈圧の上昇(塞栓前平均17.5cmH₂Oから塞栓直後22.4cmH₂O、p<0.0001)、②非塞栓葉容積の増大(平均35.7%から48.6%、p<0.0001)、③門脈血流の増加(平均18.1cm/secから25.7cm/secに増加、p=0.008)、④脾容積の増大(平均181.4mlから228.6ml、p=0.004)の4項目にはいずれも有意差が認められた。これらの結果から、TIPE後の非塞栓葉の再生と門脈血流の増加の間に最も相関が認められ、また、術中門脈圧の変化と術後の脾容積の増加にも相関が認められた。術前経過中のビリルビン値の低下

は順調で、ICG-R15 値は改善した。

3-4) 手術切除日本人肝組織からの肝細胞・肝細胞画分調製と代謝活性評価

ヒト遊離肝細胞調製のため、53才から77才までの6例(男女各3例)の摘出肝臓片が提供された。肝切除事由は、肝硬変1例、転移性肝癌3例、胆管症1例および肝細胞癌1例であった。獨協医科大学から国立医薬品食品衛生研究所への肝臓片搬送には、オートバイ便で通常約2時間、降雪時には約3時間を要した。また、肝細胞の調製は、肝臓片の摘出からほぼ6時間~9時間後に開始した。摘出肝臓片6例(A-F)の重量は1.6~6.23gの範囲内であった。提供された肝臓片のうち肝硬変症の患者から提供された1例(A)は、偽小葉が形成され、黄色の脂肪組織状を呈しており肝細胞調製のための灌流は不可能であった。肝灌流のできた他5例より得られた遊離肝細胞のViabilityは45.8~84.7%の範囲であった。一方、生細胞の収率は極めて低かった。試料Bは、灌流操作が順調で肝細胞の高収率が期待されたが、収率は極めて低かった。この肝臓は大部分が脂肪細胞で構成され、肝実質細胞は極めて少ないことが精製の段階で判明した。試料Dは、肝鍵状間膜を含み灌流は困難であった。試料Eからは代謝活性の測定に必要な生細胞 2.08×10^6 cellsが得られものの、肝臓1g当たりの収率は 0.38×10^6 cellsであった。この肝細胞(E)のテストステロン 6β -水酸化活性は $567.7 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$ であった。また、同じくCYP3A4酵素により生成される 2β -水酸化体も多く認められた。また、 16β -水酸化体の生成も確認されたが、 16α -水酸化体および 2α -水酸化体はマイナーな代謝物であった。一方、7-エトキシクマリンの代謝活性は、 $20.4 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$ を示した。本測定条件下において、検出された代謝物は、7-水酸化クマリンのグルクロン酸抱合体が最も多く、次いで7-水酸化クマリンであった。7-水酸化クマリンの硫酸抱合体は検出されなかった。一連の肝細胞調製を通じて、試料Fから最も多くの肝細胞が得られた($8.44 \times 10^6 \text{ cells}$)が、肝実質細胞以外の小さな細胞の混入が多く認められた。試料Fから調製した肝細胞の代謝能は現在検討中である。なお、4例の肝組織片については、摘出時間が遅い時間帯となり搬送手段を確保できなかったこと、また、摘出肝重量が1g以下のため肝細胞調製が困難であることから、凍結標本として -80°C にて保存した。

HSRRBより供給された2検体の日本人肝組織から調製したマイクロソーム画分における総P450含量、シトクロムc還元酵素活性、シトクロム b_5 含量は、それぞれ180, 138 (pmole/mg)、46.5, 57.7(nmole/mg/min)、190, 181(pmole/mg)であった。欧米人肝マイクロソーム画分mixでは、それぞれ274 pmole/mg、99.4 (nmole/mg/min)、252 (pmole/mg)であった。CYP3A4含量については日本人の2検体では、5.9、11.0 (pmol/mg)、欧米人では117.5 pmol/mgであった。テストステロン 6β -水酸化活性は日本人由来の2検体が383, 483、欧米人検体では2110 (pmol/min/mg)であった。

3-5) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション

第1回目のEROD誘導実験では、施設間のバラツキが大きく、また、一部の施設では3-MCおよびBNF処置群で、濃度依存的な酵素誘導が観察されなかった。そこで、溶剤、誘導剤溶液の容器への吸着、誘導剤の析出、基質7-エトキシレゾルフィンへの微量レゾルフィンの混入、検量線等について検証し改善点を反映したプロトコールにて第2回目の誘導実験を行った。溶剤はアセトニトリルからDMSOに変更した。その結果、いずれの誘導剤でも、単位タンパク当たりの酵素活性は、最低濃度(3-MC; $0.1 \mu\text{M}$, BNF; $1 \mu\text{M}$, OPZ; $2.5 \mu\text{M}$)から濃度依存的に増加(3-MC; 4.0~15.5倍, BNF; 3.0~9.5倍, OPZ; 2.5~15.2倍)が観察され、一部の施設を除いて、低用量の酵素誘導剤の影響も検知できることが明らかとなった。

CYP3A4誘導におよぼす培地の影響について調べた。その結果、RIFとPBによるCYP3A4誘導は、初代培養ヒト肝細胞において、Long-term culture medium = Lanford medium > HepatoZYMEの順で強く、また、CYP3A4誘導度は、凍結肝細胞では低かった。

3-6) 凍結ヒト肝細胞を用いたin vivo代謝予測のための評価系

まず、CYP2D6のPMにおける薬物動態を、非凍結ヒト肝細胞を用いたin vitro代謝評価系によるバリデーションを行った。市販の23ロットのヒト凍結肝細胞のCYP2D6 genotypingを実施した結果、Lot#272とH318の2ロットでCYP2D6のPM細胞がgenotypingにより検出された(今後の代謝試験にはLot#H318を使用)。その他のロットはEMと判定されたが10ロットでヘテロであり、これら以外のロット及びCYP2D6、CYP3A4の酵素活性を考慮してLot#CYEをEM細胞と判定し、以後の代謝試験に使用することとした。

PM肝細胞を用いDEXの代謝について8研究施設で検討した。肝細胞融解後のバイアビリティーは、EMは $48 \pm 22\%$ 、PMは $54 \pm 13\%$ であり高くはなかった。PM、EM肝細胞ともに、濃度依存的($0.4\text{--}10 \mu\text{M}$)に代謝物DXO、3-MEMの生成速度が上昇した。PM、EM肝細胞ともに、3-MEMの生成速度はDXOに比べて低いが、特にEM肝細胞においてはその傾向は顕著であった。PM肝細胞では、3-MEMの生成速度は濃度依存的に増加し、 $10 \mu\text{M}$ ではDXOの生成速度を上回

る結果が得られた。これらはヒトの臨床結果と一致していた。3-HMの生成速度は、DXO、3-MEMの生成速度に比べかなり低く、これも臨床での結果を反映していた。DXO-gluの生成量はPM、EM肝細胞ともに、DEXの生成量と比べると、臨床での値より低いと考えられる。DXOを基質にしたPM、EMそれぞれのグルクロン酸抱合実験で得られたデータを見ると、PMがEMより低かったが、それを考慮に入れても、PMのDXO-gluはEMのその数十分の1~100分の1程度であり、この傾向は臨床での結果と一致していた。最後に、補償的代謝経路が働いたかどうかについて解析したところ、1-OH MDZで補正した3-MEMの生成速度は、全体としてPMではEMに比べいずれの濃度(0.4, 2, 10 μ M)においても上回っており(比が1以上)、ほとんどの施設で補償的代謝経路が働いているとの結果が得られた。いくつかの施設で10 μ Mの濃度において補償的代謝経路が働いていないようにも見えた原因の一つとして、今回用いたEMとPMのlotにおいてEMのCYP3A4活性がPMより高く、また抱合活性もEMが高かったため、EM活性を過小評価していることによる可能性が考えられた。そこで、MDZの減少でCYP3A4活性を補正してみると、全施設・全濃度で補償的代謝経路が働いているという結果が得られた。

また、非ステロイド性抗炎症薬であるフルルピプロフェンのin vivo代謝を、非凍結肝細胞を用いて検討し、グルクロン酸抱合体と代謝物M1およびM1のグルクロン酸抱合体を確認した。

3-7) ヒト小腸組織における代謝酵素の特性

小腸のモデルとしてのラット反転腸管の酵素源としての有用性について、ミクロソームでの活性と比較検討した。CYP3Aの指標となるテストステロン6 β -水酸化酵素活性においてのみミクロソーム調製による活性の有意な低下が認められ、小腸上部で活性が約半分まで低下した。また、凍結融解による活性の低下は、反転腸管を酵素源とした場合ECOD活性およびテストステロン6 β -水酸化酵素活性において認められた。また小腸ミクロソームを酵素源とした場合、凍結融解によりECOD活性およびブフラロール1'-および6-水酸化酵素活性で低下し、テストステロン6 β -および16 α -水酸化酵素活性では検出限界以下にまで顕著に酵素活性が低下した。また、CYP3AとCYP2Bタンパクの発現が確認できた、CYP3Aはラット小腸上部から中間部へとタンパク発現が減少してゆき、下部ではタンパク質の発現が認められなかった。

13例のヒト肝ミクロソームによるトログリタゾングルクロン酸抱合活性は2.2倍の個体差が認められた。またUGT1A1の指標活性であるエストラジオール-3-グルクロン酸抱合活性と有意な相関を示した。また小腸ミクロソームにおいて高いトログリタゾングルクロン酸抱合活性が認められた。In vitroにおけるキネティックパラメーターより求めた小腸クリアランス(7237 μ L/min/kg)は肝クリアランス(2322 μ L/min/kg)より3倍高値を示した。トログリタゾングルクロン酸抱合活性はヒト肝ミクロソームではUGT1A1の基質であるビリルビンにより強く阻害され(IC_{50} =19.0 μ M)、ヒト小腸ミクロソームではUGT1A8およびUGT1A10の基質であるエモジンにより強く阻害された(IC_{50} =15.6 μ M)。トログリタゾングルクロン酸抱合反応には、肝臓では主にUGT1A1、小腸ではUGT1A8およびUGT1A10が関与し、肝より小腸のクリアランスが大きいことが示唆された。

3-8) 倫理申請の現状

ヒト組織の使用時において、倫理申請書への記載内容は各施設で異なっていたが、これは、各施設で倫理申請に関わる組織構成の差に起因するものであり、倫理審査に必要と考えられている項目については各施設で一致していた。各施設で対応が異なるものの一つとして、海外からのいわゆる市販品の肝細胞を用いる研究について大部分の施設では倫理委員会の審査対象とし、評価物質毎に審査が必要としていたが、倫理委員会の判断により審査対象外としている施設もあった。また、プロトコル記載事項の詳細度(概要で良い場合と、詳細な最終版が要求される場合)、申請書類の内容、特にプロトコル変更時の対応(変更部分の届け出か、あるいは再審査か)が施設毎に若干異なっていた。

4. 考察

4-1) ヒト平滑筋組織を用いた研究

貴重なヒト摘出標本を薬効評価に利用するためには、組織保存技術の開発が重要である。今回、ヒト大腸輪状筋を凍結保存するための基礎的検討を行い無血清培地がよいこと、DMSOが必須であることを明らかにした。また、今回はじめてヒト大腸粘膜筋板の神経性反応を検出できたが、モルモットと異なり抑制性NO作動性神経、興奮性コリン作動性神経、抑制性アドレナリン作動性神経の3種類によって支配されていることを明かにできた。また、ヒト大腸や胃の粘膜標本からの自発的5-HT遊離や薬物誘発acetylcholine遊離を測定することができた。この遊離を指標にすれば、消化器作用薬の薬効評価を行うことが可能となり、臨床的意義は高い。

ヒトとラット子宮筋収縮におけるCキナーゼの役割の違いが明らかとなった。すなわち、受容体刺激によってPI代謝回転が活性化されCキナーゼの内因性活性化因子であるジアシルグリセロールが産生される。ヒトでは逆に収縮蛋白系に働いて促進的に作用しているが、ラットではこのジアシルグリセロールが細胞内Ca濃度を低下させて抑制的（ネガティブフィードバック）に働くことを示している。ヒト子宮筋の収縮蛋白系への増強作用の中で、妊娠で増強される部分については、cPKCファミリーのうちでPKC β が関与すること、さらにその下流に位置するCPI-17が関与することも確かめられた。一方、ラット子宮筋における収縮抑制作用には、cPKCファミリーのうちでPKCaが関与する可能性が示唆された。

4-2) ヒト胃癌組織を用いた研究

胃癌組織を用いた抗癌剤感受性試験において、癌細胞の不死化に関与しているテロメラーゼ活性と抗癌剤感受性試験との間に関連が認められた。このテロメラーゼ活性が存在する場合には、癌の増殖能が高いことだけでなく、染色体の不安定性も生じやすく5FUの効果が高く出ていることが推察される。

4-3) 病的肝細胞の機能変化の解明

生体肝移植手術における病的肝細胞の機能変化について検討した。門脈塞栓術は門脈圧の上昇を来し、その結果非塞栓葉の門脈血流量を増加させ、肝再生を促進するものと考えられた。現時点では、肝機能正常で肝切除量が60%を越える症例、軽度肝機能障害例で肝切除量が40-60%の症例に門脈塞栓術を適応しており、この基準での施行例は良好な結果を示している。本門脈塞栓術は肝切除の適応を拡大させる有効な手技と考えられる。

4-4) 手術切除日本人肝組織からの肝細胞・肝細胞画分調製と代謝活性評価

日本人の肝臓片6例を用いて肝細胞を調製し、その代謝酵素能を評価した。提供された肝臓片は治療目的で切除された組織であることから、病巣部分ではないものの組織がかなり硬かったり、肝臓片が強く黄色味を帯びている等、正常肝とはかなり異なる様相を示していた。また、肝実質細胞は、肝切除術としての虚血・再灌流により発生するラジカルの影響を最も受けやすいとされることから、Viabilityと生細胞の収率の低さの原因としては、疾患の影響と肝切除術としての虚血の影響が示唆された。1g当たりの肝細胞の収率は、正常ウサギ(2.02 x 10⁷ alive cells/g liver)の場合に比べ極めて低かったが、ヒト組織は肝細胞以外の組織の含量が多いことも起因していると考えられた。一連の肝細胞調製において、収率の良かった2例は、切断面が一面であったことから、効率的な灌流には、切断面が一面であることが必要と考えられた。

肝細胞(E)について、ヒト肝臓の主要なP450の構成分子種であるCYP3A4の標的酵素であるテストステロン6 β -水酸化活性について測定したところ、肝細胞の調製条件等は異なるものの、文献値(Steinberg et al DMD 27, 1415-1422, 1999)と比較してもほぼ同等、もしくは、高いレベルの活性が確認された。また、同様にCYP3A4依存性であることが知られているテストステロン2 β -水酸化も6 β 水酸化に次いで高い活性を発現していた。さらにヒト肝細胞では16 β -水酸化活性(CYP2B6)が発現していたこと、16 α -水酸化体および2 α -水酸化体は、マイナーな代謝物であることなど、ヒト肝におけるテストステロン代謝パターンのプロフィールを良く示していた。このように、ヒト肝細胞にCYP3A4が強く発現していたが、これは、治療薬にはPaclitaxel (taxol)、Isosfamide、Dexamethazone、RifampicinのようにCYP3A4誘導が報告されているものが多くあることから、投薬による影響も考えられたが、今回の患者については、投薬情報が提供されていないため、投薬の影響が否かについては確認出来なかった。今後は、ドナーの薬歴情報が必須と考えられた。また、ECOD活性は、上記文献報告の範囲内にあるものの、低い活性レベルを示した。ヒトの第2相では、ほとんどがグルクロン酸抱体で、硫酸抱合体は検出できなかった。以上、手術切除肝組織から、代謝活性の高い遊離肝細胞を調製することが出来た。今後は収率を高めるための検討を重ねると同時に、測定系のスモールサイズ化による多検体への適用が検討課題として残った。

HSRRBより供給された2検体の肝組織ミクロソームの総P450含量、シトクロムc還元酵素活性、シトクロムb₅含量はいずれも欧米人由来肝ミクロソーム値の50%~75%程度であった。CYP1A2、CYP3A4含量は、いずれも欧米人の5分の1から10分の1を示した。一方、日本人肝において、CYP3A依存性活性であるテストステロン6 β -水酸化活性は、欧米人の18-22%であった。即ち、欧米人肝組織より活性が数倍低かったとはいえ、CYP3A4含量当たりの比活性は、日本人で高かった。CYP3A4含量が活性に比べて低いという今回の結果は日本人においてCYP3A5が発現している可能性を示唆している。HSRRBより提供される日本人由来肝組織の研究利用を促進するためには、肝組織の薬物代謝活性を測定してその品質評価を行うことが必要である。

4-5) 非凍結ヒト肝細胞を用いた代謝酵素誘導能評価系のバリデーション

CYP1A2誘導能の低い薬物の評価が非凍結ヒト肝細胞で可能か否かを検討するために低用量の

誘導剤の影響を検討し、本方法がそのような薬物の評価にも有用であることをプロトコールを改善した2回の実験において明らかにした。改善したプロトコールは24well plateを用いる方法であり、平成10-12年度のフラスコでの試験系と比べ、多検体(多試験条件)の処理が可能であるので、試験の迅速化と試験成績の拡充が期待される。

非凍結・凍結ヒト肝細胞を用いたRIFならびにPBによるCYP3A4誘導能におよぼす培地の影響について検討したところ、両細胞においてCYP3A4誘導能は、無血清培地のLong-term culture mediumとLanford's mediumで強い誘導能を示した。これらの結果は、培地の選択により、凍結肝細胞においても、誘導能評価試験に使用できることが示唆された。

4-6) in vivo代謝の予測のための凍結ヒト肝細胞の有用性

8施設でヒト肝細胞を用いてDEXを代謝させたところ、Phase Iでの代謝物(3-MEM、DXOおよび3-HM)とPhase IIの代謝物(DXO-Glu)が検出され、in vitroの代謝実験においても生体内(in vivo)での代謝反応を再現することができた。この結果は、薬物の代謝評価実験(代謝物プロファイル、代謝クリアランス、代謝酵素の阻害および誘導などの評価)を行う場合、マイクロソームなどの細胞分画試料だけを用いて検討するより、インタクトな細胞を用いて総合的に代謝評価を行うことが重要であることを示している。また、今回の検討ではCYP2D6-PM細胞は2例のみの検出であったが、ヘテロ型と判定された多くの細胞でCYP2D6の薬物代謝酵素活性が低いことから、ダイレクトシーケンス法での評価で他の多型を検出できる可能性があると考えられる。DEXの2つの代謝物3-MEMとDXOの生成量を測定した結果、両代謝物の比(3-MEM/DXO)は、PM、EM間で大きな差が見られた。すなわちCYP2D6 PM肝細胞では、臨床と同様O-脱メチル化の補償的代謝が働き、3-MEMの生成速度がEMに比べて大きくなっていった。また、PMにおけるDXO-Gluの生成はEMに比べ著しく低いものであった。これらの事実は定性的にヒトの臨床結果とよく一致していた。また、これらが異なる施設で観察されたことから、本研究の再現性が示された。従って、CYP2D6 PM肝細胞を用いればPMのヒトの体内動態を予測できる可能性が示された。また、CYP2D6 PM以外の遺伝多型を示すP450(CYP2C19など)に関しても今回の研究手法を応用する予定である。

また、非凍結肝細胞を用いたフルルビプロフェンの代謝パターンは、in vivoの結果に類似しており、昨年度報告で示した他の薬物での結果と合わせ、凍結ヒト肝細胞が臨床予見性を高める上で有用な評価方法であることが示された。

4-7) 小腸組織における代謝活性の特性

反転腸管の薬物代謝酵素の検討については、テストステロン6 β -水酸化酵素活性を指標に検討した結果、活性は十二指腸から回腸に下降するに従って低下した。調製直後の反転腸管は、単位タンパクあたりで比較すると小腸マイクロソームに比べて約2倍のテストステロン6 β -水酸化酵素活性が認められた。また、単位P450含量あたりで換算すると肝マイクロソームに比べ小腸マイクロソームは約2倍高いテストステロン6 β -水酸化活性が認められた。これらのことからラット小腸におけるP450は腸管における薬物代謝に一定の役割を担っていることが示唆された。一方、トログリタゾンのグルクロン酸抱合には、肝および小腸において異なったUGT分子種が関与し、肝臓ではUGT1A1、小腸では主にUGT1A10により触媒されていることが明らかになった。今後さらなる検討によって、UGTの遺伝子多型の影響や相互作用についての予測が可能になるものと考えられる。

4-8) 各施設における倫理申請の現状

倫理申請のための基本的な項目については、遺伝子解析の有無、入手先にかかわらず、多くの施設で記載されていた。記載内容の一部に施設間差が見られた。この原因としては各施設における研究システム/組織構成の違いによるものと考えられた。また、海外から入手される肝細胞(市販品)の取り扱いに、施設間差が見られた。共同研究を行う上ではこれらに大きな差が無いことが望ましい。

5. まとめ

ヒト摘出胃・大腸標本を用いて、凍結保存方法の開発、粘膜筋板の神経支配、粘膜標本からの5-HT遊離量を検討し、実験動物におけるそれと比較した。凍結保存液として無血清培地が有用であった。粘膜筋板を支配する神経としてNO作動性抑制神経が優位であった。ヒト摘出大腸・胃粘膜標本からの内因性5-HT・acetylcholine遊離を測定することができ、今後の薬効評価に役立てられることが明らかになった。抗癌剤投与による胃癌組織のアポトーシス誘導とミトコンドリア遺伝子の関連について免疫組織学的検討を行った。抗癌剤投与前の胃癌生検組織においてBcl-x、p53が低値の場合、化学療法が有効な可能性が示唆された。また、術前肝内門脈枝塞栓術によりもたらされた非塞栓葉への門脈血流の増加が、TIPE後の肝再生に最も関与したと考えられた。

薬物代謝に関連して、獨協医科大学あるいはHSRRBより提供された日本人肝組織から、5例のヒト遊離肝細胞調製、およびミクロソーム等の細胞画分調製を行い、その薬物代謝能の評価を行った。収率の良かったヒト肝細胞では、テストステロン6β-水酸化活性(CYP3A4)は高いレベルを示し、また、他の代謝物についてもヒトに特徴的な代謝プロフィールを示した。一方、日本人肝ミクロソームにおけるCYP3A4依存的活性は、ミクロソームタンパク量で補正した場合、欧米人由来組織に比べて低いもののCYP3A4含量で補正した比活性は日本人組織がむしろ高かった。今年度の検討により、肝細胞およびヒト細胞画分を用いた試験研究ネットワークが具現化されたが、良質組織の収集、肝細胞収率の向上、測定系のスモールサイズ化が課題として残った。

接着非凍結ヒト遊離肝細胞を用いた軽微な誘導能の評価系として、EROD活性を指標としたCYP1A酵素誘導をモデルとして、被検物質の低濃度からの誘導評価が、本評価系で可能であることが認められた。また、培地を選択することにより凍結ヒト肝細胞も、誘導能評価試験に利用できることが判明した。

遊離肝細胞を用い、PMの薬物動態(代謝)が予見できるかどうかを、CYP2D6の基質であるデキストロメトルファンをプローブとして検討した。その結果、代謝物の生成速度において、臨床結果と同様の結果が再現された。またグルクロン酸抱合が容易に追跡できたことに加え、従来ミクロソーム系で観察されなかった補償的代謝反応が観察されたことは、肝細胞を用いる有用性を明確に示すものである。PM凍結ヒト肝細胞を用いた代謝評価試験は、臨床試験以前にPMのヒトの代謝パターンを把握できることから、臨床試験の予見性を高めるために極めて有用で応用性の広い評価法であると考えられる。また、小腸では、部位依存性のCYP3A4活性が認められ、腸管における薬物代謝への寄与が示唆された。

このように、ヒト肝由来特に日本人肝由来組織の代謝研究利用は、日本人の薬物代謝の特性を考慮した医薬品開発および化学物質の安全性評価に、極めて重要と考えられる。そのためには、今後、薬物代謝酵素の特性に鑑みて、日本人肝における薬物代謝能評価とともにその背景となる関連遺伝子の解析が必須であることが示唆された。

また、ヒト組織取り扱い時に倫理委員会に申請すべき項目は、いずれの施設においても同様であったが、その内容や変更時の取り扱いなど、施設により差が見られた。

6. 研究発表

Ishida S, Shigemoto-Mogami Y, Kagechika H, Shudo K, Ozawa S, Sawada J, Ohno, Y., Inoue K. Clinically potential subclasses of retinoid synergists revealed by gene expression profiling. *Mol Cancer Ther.*, 2, 49-58 (2003)

Murayama, N., Nakamura, T., Saeki M., Soyama, A., Saito Y., Sai, K., Ishida. S., Nakajima O, Itoda, M., Ohno, Y., Ozawa, S., Sawada, J. CYP3A4 gene polymorphisms influence testosterone 6b-hydroxylation. *Drug Metabol, Pharmacokin.* 17, 150-156 (2002)

Ozawa S, Hamada M, Murayama N, Nakajima Y, Kaniwa N, Matsumoto Y, Fukuoka M, Sawada J, Ohno, Y. Cytosolic and microsomal activation of doxifluridine and tegafur to produce 5-fluorouracil in human liver. *Cancer Chemother Pharmacol.* 50, 454-458 (2002)

Sakemi K, Ito R, Umemura T, Ohno, Y., Tsuda M. Comparative toxicokinetic/toxicodynamic study of rubber antioxidants, 2-mercaptobenzimidazole and its methyl substituted derivatives, by repeated oral administration in rats. *Arch Toxicol.* 76, 682-91 (2002)

Ozawa S, Katoh T, Inatomi H, Imai H, Kuroda Y, Ichiba M, Ohno, Y. Association of genotypes of carcinogen-activating enzymes, phenol sulfotransferase SULT1A1 (ST1A3) and arylamine N-acetyltransferase NAT2, with urothelial cancer in a Japanese population. *Int J Cancer.* 102, 418-421 (2002)

Ishida S, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ando M, Ohno, Y., Ozawa S, Sawada J. Characterization of human CYP1A1/1A2 induction by DNA microarray and alpha-naphthoflavone. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 172-177 (2002)

Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno, Y. Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci.* 68, 32-42 (2002)

Kojima, S., Ikeda, M., Shibukawa, A. & Kamikawa, Y. Modification of 5-hydroxytryptophan-evoked 5-hydroxytryptamine formation of guinea pig colonic mucosa by reactive oxygen species. *Jpn. J. Pharmacol.*, 88: 114-118 (2002).

Kojima, S., Ikeda, M., Shibukawa, A. & Kamikawa, Y. Modification of 5-

hydroxytryptophan-evoked 5-Hydroxytryptamine formation of guinea pig colonic mucosa by reactive oxygen species. *Jpn. J. Pharmacol.*, **88**, 114-118 (2002).

Kojima, S., Sugiura, T., Waku, K. & Kamikawa, Y. Contractile response to a cannabimimetic eicosa-noid, 2-arachidonoylglycerol, of longitudinal smooth muscle from the guinea-pig distal colon in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **444**, 203-207 (2002).

Kamikawa, Y., Shibukawa, A., Uchida, K., Sakuma, A., Kubota, K. & Ohno, Y.: Comparison of motor reactivity of the colonic muscularis mucosae isolated from human, guinea pig and rat in vitro. *Pol. J. Pharmacol.* **54**, 261-266 (2002).

M Nagamachi, K Sasaki, K Miyachi, M Sunagawa, Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase activities and mRNA expressions in gastric cancer ; relationship to chemotherapeutic effects to Neovascularization. *Dokkyo Journal of Medical Sciences* 29(1), 2002. 3, in press

Ozaki, H., Kim, Y.-S., Yasuda, K., Egawa, M., Kanzaki, H., Nakazawa, H., Hori M. and Karaki, H. The role of protein kinase C/CPI-17 pathway in the augmented contraction of human myometrium after gestation. *Biology of Reproduction* 投稿中

Kim B, Kim YS, Ahn J, Kim J, Cho S, Won KJ, Ozaki H, Karaki H and Lee SM , Conventional-type protein kinase C contributes to phorbol ester-induced inhibition of rat myometrial tension. *Br J Pharmacol* (2003in press)

Miyachi K, Fujita M, Tanaka N, Sasaki K, Sunagawa M. Correlation between telomerase activity and telomeric-repeat binding factors in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 21: 269-75 (2002)

Murata T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Biol Chem.* 277: 44085-92 (2002)

Oka, T., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Karaki, H. FcεRI cross-linking-induced actin assembly mediates calcium signalling in RBL-2H3 mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 136, 837-846 (2002)

Oka, T., Sato, K., Hori, M., Ozaki, H., Karaki, H. Xestospongine C, a novel blocker of IP3 receptor, attenuates the increase in cytosolic calcium level and degranulation that is induced by antigen in RBL-2H3 mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1959-1966 (2002)

Ozaki, H., Hori, M., Kim, Y.S., Kwon, S.C., Ahn, D.S., Nakazawa, H., Kobayashi, M., Karaki, H. Inhibitory mechanism of xestospongine-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1207-1212 (2002)

Won, K.J., Torihashi, S., Mitsui-Saito, M., Hori, M., Sato, K., Suzuki, T., Ozaki, H., Karaki, H. Increased smooth muscle contractility of intestine in the genetic null of the endothelin ETB receptor: a rat model for long segment Hirschsprung's disease. *Gut* 50, 355-360 (2002)

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願 嶋田薫 平成 14 年 8 月 30 日 (特願 2002-255626)
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし