

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 杏林大学医学部総合医療学
研究者 永森静志

分担研究者

遠藤仁,金井好克 杏林大学医学部薬理学教室
宮崎正博 岡山大学大学院医歯学総合研究科
本間正充 国立医薬品食品衛生研究所異変遺伝部
鈴木哲朗,相崎英樹 国立感染症研究所ウイルス第2部
梅田誠, 食品薬品安全センター秦野研究所
千葉 寛,細川正清 千葉大学大学院薬学研究大学院
松浦知和 東京慈恵会医科大学中央検査科
小田裕昭 名古屋大学大学院生命農学研究科
杉山俊博 妹尾春樹 秋田大学医学部生化学・解剖学
中沼安二 金沢大学医学部病理学
下遠野邦忠 京都大学医学部ウイルス研究所
西宮一尋 吉田 彪 中外製薬株式会社

要旨

われわれはこれまでの研究で明らかになった高機能保持ヒト由来肝細胞(本研究ではおもにFLC系細胞)やヒト不死化細胞での結果からその病態研究や臨床応用への利用範囲の可能性を追求してきた。肝臓特異的転写因子の発現の証明、薬物代謝、薬物輸送系の分子実体、薬物の有効性検定へ利用、細胞毒性試験利用研究などである。本稿では樹立した継代ヒト肝細胞由来培養FLC4を主体とした培養細胞の評価を中心に上記の分野の研究を紹介する。

また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。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。

1. 研究目的と研究方法

本研究は手段として高機能保持ヒト由来肝細胞(とくにFLC-series)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クター:RFB)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した。

1. 1. 1. ヒト培養肝細胞系を用いた酵素誘導(1)(1-1,2,3,4,5,6)

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、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のなかで、代謝酵素阻害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た。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、供給された細胞間での酵素誘導にはばらつきが大きく、再現性に問題があると考えられる。さらに、新鮮な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 寛らは、FLC4、FLC5およびFLC7細胞株を用いて薬物代謝酵素誘導の検討を行った。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。

結果はFLC細胞を用いることにより、ヒトCYP3A4およびCYP2B6の誘導モデル系を作成した。さらにこれまで不明であった、ヒトCYP2C9およびCYP2C19の発現調節および酵素誘導について解明するとともに、両遺伝子の酵素誘導および発現調節の差異が遺伝子の5'上流領域にみられる配列の差異である可能性が示唆された。

1. 1. 2. プロドラッグの代謝に関与する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、CES HU1遺伝子の発現調節機構の解明を目的として詳細な検討をおこなった。

結果 1) ヒトCES HU1 遺伝子の構造。 CESの発現調節機構に関しては、ヒトゲノムDNAのクローニングにより、CES HU1をコードすると考えられる2つの独立した遺伝子、HU1aおよびHU1bの存在が明らかとなった。これら2つの遺伝子の相同性は約90%であったが、両遺伝子の転写調節領域にはTATA boxは認められずSp1, NF-1, 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られた。しかしながら、HU1aに認められるSp1およびC/EBPの結合領域の一部がHU1bには認められないなど、転写に重要な部位に差異が認められた。

2) ヒト肝CES HU1遺伝子の発現および発現調節機構。 FLC7細胞を用いて5'上流領域についてreporter gene analysisを行ったところ、CES HU1a, HU1bの2種の遺伝子間で配列の異なる領域の転写活性においては、明らかな差異がみられた。また、転写活性が異なる領域についてgel mobility shift assayを行ったところ、結合する転写因子に差異が認められた。さらに、肝に発現する2つのCESのmRNA発現量をRT-PCR法により調べたところ、両遺伝子間で全く相関が認められなかったことから、互いに独立して発現していることが示唆された。また、cDNAの配列から推定されるアミノ酸配列を調べたところ、アミノ酸の違いはシグナルペプチド部位にしか認められなかったことから、ヒト肝に発現しているCES HU1は、両遺伝子からの総和であることが示唆された。現在、両遺伝子の発現の割合を正確に定量することにより、ヒトCES HU1発現の個人差の解明を試みている。

1. 2. アミノ酸輸送系の評価：FLC4における輸送系Lトランスポーターの解析(2-1,2,3)

肝細胞は、多くのアミノ酸代謝系を有し、体内のアミノ酸代謝において中心的役割を果たしている。従って、肝細胞は細胞膜を介して盛んにアミノ酸の取り込み、放出を行っているはずであるが、その細胞膜透過を媒介するトランスポーターの分子実体は明らかになっていない。細胞膜を介するアミノ酸輸送の研究は、Ehrlich腹水癌細胞や赤血球等を用いて1960年代から開始され、アミノ酸の多様性を反映して、多くの輸送系が記述されてきた。その分子実体解明の研究は、1990年代に入って実を結びはじめ、過去10年間に多様なアミノ酸トランスポーター分子が同定された(2-1)。しかし、未だに肝細胞におけるアミノ酸輸送の分子機序は十分には説明できず、さらに未同定のトランスポーターが肝細胞において重要な役割を果たしていると考えられてきた。特に、肝細胞が担う重要なアミノ酸代謝として分枝アミノ酸代謝があるが、肝細胞膜の分枝アミノ酸輸送を司るトランスポーターの実体は明らかにされていない。

金井らは、FLC4細胞のアミノ酸輸送特性を検討し、それが他の多くの培養細胞と著しく異なることを見出した。例えば、ヒト膀胱癌由来のT24細胞においては、分枝アミノ酸であるロイシンの取り

込みはほぼ完全に輸送系L選択的古典的抑制薬BCH (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid) によって抑制される。このT24細胞の輸送系Lの分子実体は、金井らが腫瘍細胞型輸送系Lトランスポーターとして分子実体を明らかにしたLAT1 (L-type amino acid transporter 1) である (2-2)。LAT1の機能特性を反映し、T24細胞のロイシンの取り込みは、LAT1の基質である分枝アミノ酸、芳香族アミノ酸の他、アミノ酸構造を持つ甲状腺ホルモンやメルファランによって抑制される (2-3)。FLC4細胞のロイシンの取り込みも、同様にBCHによって抑制され、輸送系Lを介するものであることがわかるが、興味深いことに甲状腺ホルモンやメルファランによっては抑制されず、芳香族アミノ酸による抑制の程度も低く、分枝アミノ酸選択的な抑制プロフィールを示す。これは、肝細胞に存在すると考えられてきた分枝アミノ酸選択的な輸送系に相当するものであると考えられる。FLC4細胞は、肝細胞特異的な分枝アミノ酸輸送系を発現する貴重な細胞株であり、これからpoly(A)⁺RNAを抽出し、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能発現クローニングにより、分枝アミノ酸輸送系の分子実体を明らかにできると期待される。

1. 3. 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 (3-1,2,3,4)

小田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。

現在までに6つのクラスの肝臓特異的転写因子 (正確には肝臓で豊富に存在する因子 (liver-enriched transcription factor)) がクローニングされてきた (HNF-1 (Hepatocyte Nuclear Factor-1)、HNF-3、HNF-4、HNF-6、C/EBP、DBP) a-c)。肝臓特異的転写因子の制御下にある遺伝子は膨大な数にのぼり、肝臓特異的に発現する遺伝子の制御には、複数の肝臓特異的転写因子が複合的に作用して肝臓特異性の発現に貢献していると考えられている。肝臓特異的転写因子の中で、HNF-4が最も肝臓分化表現型と関連する因子であり、肝臓分化表現型のマーカーとして利用できる因子であることを示してきた。肝臓特異的転写因子は、それぞれがお互いに調節しあっていることがわかっており、現在までの知見を総合するとピラミッド型のヒエラルキーやそのトップにいるような因子はないと考えられている a)。薬物代謝や脂質代謝の調節因子として、肝臓に豊富に存在するオーファン核内受容体 (肝臓特異的オーファン核内受容体) が重要な働きをしていることが明らかとなってきた。「肝臓特異的オーファン核内受容体」は、肝臓特異性を決める因子というよりは、むしろ個別の肝臓表現型の調節を行う転写因子でないかと推測される。これらのことから、肝機能を維持させようとした場合、単独の因子だけでなく複数の肝臓特異的転写因子の発現を高く維持させなければならないことが必要である。さらに、薬物代謝や脂質代謝、コレステロール・胆汁酸代謝などを維持させようとした場合、肝臓特異的転写因子だけでなく、これら「肝臓特異的オーファン核内受容体」の発現を高く維持させなければならないことが推測される。

ヒト肝細胞株の機能を肝臓レベルに引き上げる試みはほとんどされていないので d)、まず三次元培養を行ってヒト肝由来細胞株の肝機能の亢進を試みた。再構成基底膜ゲルである EHS-gel を用いて、HepG2細胞、Hep3B細胞、HuH-6細胞、HuH-7細胞、H4IIE細胞の三次元培養を行ったが、どの肝細胞株も三次元培養による肝機能亢進を示さなかった。しかし、FLC-4細胞が三次元培養にตอบสนองすることがわかり、詳細な検討を行った。EHS-gel上で培養したFLC-4細胞は、HNF-4、HNF-3□、C/EBP□などの肝臓特異的転写因子や、アルブミン、□-フェトプロテインなどの血清タンパク質や、アポリポタンパク質 A-I、アポリポタンパク質 C-III、アポリポタンパク質 Eなどの遺伝子発現が亢進していた。EHS-gel上で培養したFLC-4細胞のmRNAレベルは、ヒト肝臓と十分比較し得るものであった。ヒト肝臓と比較し得るほどの肝機能を有したヒト肝細胞株は、FLC-4細胞が世界で最初であると思われる。

3次元培養に用いたEHS-gelの主要成分であるラミニンやIV型コラーゲン上で培養したFLC-4細胞は扁平で肝機能の亢進を示さず、成長因子を低下させたEHS-gelを用いた場合では、通常のEHS-gelと同様に肝機能を顕著に誘導した。これらの結果から、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ことがわかった。

1.4.がん原性物質代謝活性系の評価 (4-1,2,3)

1. 薬物代謝には種差があることが知られており、ヒト肝を用いることの意義は大きいですが、入手が困難であり、機能を維持した状態での長期培養も難しい。永森らにより樹立された肝がん細胞株 (FLC-4、FLC-5、FLC-7) は一部のヒト正常肝細胞の代謝機能をよく保持しており、ヒトでの代謝や、生きた細胞を使用することによる薬物代謝酵素誘導などに応用できる。

V79 細胞 (チャイニーズハムスター肺由来) を FLC 細胞と共培養し、被験物質の FLC 細胞による代謝を経由しての V79 細胞の突然変異率を求める FLC-V79 法、FLC 細胞の単独培養による P450 誘導を試みた。

2. FLC 細胞と V79 細胞の共培養による検索

FLC 細胞により代謝活性化された原がん原性物質が V79 細胞に作用して突然変異を誘起する細胞経由法を指標にして(4-1)、変異原物質の代謝活性化について検討した。本実験では FLC 細胞上に V79 細胞を播種後、変異原物質で処理した。混合状態の FLC 細胞と V79 細胞を ouabain 培地で培養することで FLC 細胞を選択的に除去し、残った V79 細胞を 6-thioguanine (6-TG)培地で培養し、6-TG 耐性細胞の出現を指標にした。

Benzo[a]pyrene (BP)、3-methylcholanthrene (MCA)では FLC-V79 法がラット S9 法より高い突然変異率を示した。cyclophosphamide、N-nitrosodimethylamine、aflatoxin B1 では FLC-V79 法の S9 法と比較して優位性は認められなかった。上記の物質について種々の P450 誘導剤(4-2,3)を前処理突然変異の誘導を調べたが、これらの P450 誘導剤による明確な影響は認められなかった。

またティッシュカルチャーインサートを用いて、FLC 細胞と V79 細胞の直接接触が突然変異誘発に及ぼす影響を検討したが突然変異は誘導されなかった。よって V79 細胞の突然変異には、FLC 細胞の直接の接触が必要であることが分かった。

3. FLC 細胞の単独培養による CYP 1A1 の誘導

MCA や BP は CYP 1A1 を誘導し、誘導された CYP 1A1 により代謝活性化されることで毒性を示す。そこで、MCA や BP を FLC 細胞に作用させた際に生じる細胞生存率減少を指標に、P450 の誘導および代謝活性化についての検討を行った。FLC 細胞を播種し、1 日後に MCA もしくは BP を 3 日間作用させ、被験物質を含まない培地でさらに 3 日間培養した。結果として FLC-5、FLC-7 細胞では濃度依存的に細胞生存率が抑制され、FLC-4 細胞でも細胞生存率の抑制がやや見られた。これら 3 つの細胞において、P450 の誘導能に差があることを示すものであり、CYP 1A1 の誘導を評価する際には FLC-7 細胞が適切であると考えられた。

4. 他の P450 分子種誘導方法の検討

CYP 1A1 は単層で培養することで誘導された。そこで CYP 1A1 の誘導と同様の実験を phenobarbital、rifampicin、cyclophosphamide などの P450 誘導剤を用いて行ったが、P450 の誘導を認めるような結果は得られなかった。誘導が認められない原因として、培養に際に用いている培地に含まれる血清の影響、生体内と培養器具内の相違の影響、FLC 細胞の分化段階など種々の要因が考えられた。

2. ヒト型の遺伝毒性試験法の確立 (5-1,2)

本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、とくに遺伝子突然変異検出法を確立することである。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。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ている。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し進められている。

3. 抗ウイルス薬評価系の開発 (6-1)

C型肝炎ウイルス(HCV)には効率良く複製可能な培養細胞系がなく、またチンパンジー以外の感受性を示す実験動物がないため、詳細なウイルス増殖のメカニズムを解析する研究の大きな障害となっている。永森と相崎、鈴木らは既に平成 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、100 日以上長期にわたり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。相崎ら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。細胞は肝細胞癌由来細胞株 FLC4 を用いた。感染材料はヒトおよびチンパンジーに感染性を示したヒトキャリア血清(type 1b)、および NIH の Dr. Bukh より供与された *typela* の感染性 cDNA クロームを用いた (6-2)。

この培養細胞系にヒトおよびチンパンジーに感染性を示した血清を接種し、培養上清中の HCV RNA を調べた。感染後いったん検出されなくなった RNA が、2 週間目から陽性となり、増殖したことから、HCV がこの系で複製しているものと考えられた。次に、感染性 cDNA クロームから合成した RNA を RFB にトランスフェクトしたところ、培養上清中の HCV RNA は 1 ヶ月目に測定不可能なレベルまでいったん減少したものの、その後増加し、100 日目まで感染を持続した。また、培養上清中のコア蛋白の増加も確認できた。上清中の HCV RNA は RNase 処理に抵抗性を示し、また、連続シヨ糖密度勾配遠心法により同じ分画に HCV RNA とコア蛋白が存在していたことから、ウイルス粒子の形成が示唆された。さらに、トランスフェクション後 110 日目の細胞が HCV のマイナス鎖特異的 PCR にて陽性になり、また、培養上清中 HCV の HVR 変異も認められたことから、トランスフェクトした HCV RNA が感染し複製していることを示唆している。

RFB で培養した肝細胞で核酸および蛋白レベルで HCV の複製を強く示唆するデータを得た。この系はウイルスの感染複製機構解析等の基礎研究はだけでなく、抗ウイルス剤やワクチンの開発にも有用であると考えられる。

4. 薬物評価系のための新しい機能的ヒト肝細胞株の開発 (7-1,2,3)

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ことは上述のとおりである。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。このような危険を未然に防ぐためには、ヒト肝細胞による CYP2E1 関連の細胞毒性検出システムを開発することが重要である。

CYP2E1 を比較的安定に発現するヒト肝細胞株は少なく、ヒト CYP2E1 遺伝子を導入したヒト肝芽腫細胞株 HepG2 の他にはほとんど見当たらない。宮崎正博らと永森静志らは、種々のレベルで CYP2E1 を発現するヒト肝癌細胞株およびヒト不死化肝細胞株を樹立した (4-1, 4-2)。また、宮崎正博らはヒト肝癌細胞株 HLE にヒト CYP2E1 発現ベクターを導入し、CYP2E1 を高発現する細胞株 HLE/2E1 を樹立した。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 (4-3)。

結果： 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 (4-3)。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 b5 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、CYP2E1 mRNA の発現は変わらなかった。CYP2E1 がエタノールやその他の低分子化合物により安定化されることは周知の事実であり、本結果はこれとよく一致する。CYP/2E1 遺伝子導入した 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、宮崎らが用いた濃度 (0.5~2 mM) はより生理的である。

APAP 細胞毒性は、CYP/2E1 による代謝過程で生じる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)と細胞タンパクのチオール基との共有結合に基づくと考えられている。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ことも細胞毒性の一因であると考えられる。APAP の HLE/2E1 細胞に対する細胞毒性は、母細胞 HLE と比較して極めて顕著であった。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。これらの結果は、APAP の HLE/2E1 細胞に対する強い細胞毒性効果が CYP/2E1 の過剰発現に基づくことを示唆する。

ブチオニンスルフォキシミン(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強した。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可能性を示唆する。

5. バイオリアクター-RFB により肝機能増幅 (8-1)

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る。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。

2001年は、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。

結果；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。

まとめ

幹細胞やES細胞に関する研究の発展には注目すべき点が多いが、培養下で継代可能なヒト正常肝細胞機能を長期間保持し利用することは、現在のところ不可能である。私たちの研究は *in vitro* で継代可能かつ正常の肝実質細胞機能を多く保有する細胞の樹立とその利用を試みてきた。その代表的な成果の樹立株の一つがヒト肝細胞がん由来の FLC series である。とくに FLC-4 は USA 特許も取得し豊富な機能が解明されつつある肝細胞由来細胞株である。その特性については現在世界各地で報告が相次いでされている。また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 (ラジアルフローバイオリアクター：RFB) による 3 次元培養法との結合システムをつくり新しい薬物の有効性と安全性の評価法の確立をめざしている。

さいごに

これらの研究は創薬等ヒューマンサイエンス総合事業研究の第7分野の課題番号 KH7 1 0 6 8 による。

文献

- 1-1. K. Takanashi, K. Takanashi, et.al. *Pharmacogenetics*, 10, 95-104, (2000)
- 1-2. M. Chida, T. Yokoi, Y. et.al. *Pharmacogenetics* 9: 601-605, 1999.
- 1-3. M. Hosokawa, K. Suzuki, et.al. *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 245-253(2001)
- 1-4. S. Kudo, K. Umehara, et.al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 294, 80-88, (2000)
- 1-5. T. Satoh and M. Hosokawa. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38, 257-288 (1998)
- 1-6. 細川 正清、篠原 洋子、ほか *組織培養研究* 18(3), 245-252 (1999)
- 2-1. Kanai, Y, and Endou, H: *Curr. Drug Metab.* 2: 339-354 (2001)
- 2-2. Kanai, Y, Segawa, H. et.al *J. Biol. Chem.* 273: 23629-23632 (1998).

- 2-3. Kim,DK, Kanai,Y, et.al. *Biochim. Biophys. Acta*, in press
- 3-1.小田裕昭: *細胞*, 33: 402-405, 2001.
- 3-2. Oda H: *Connect. Tissue*, 30: 225-232, 1998.
- 3-3. 小田裕昭: *組織培養研究*, 18: 203-219, 1999.
- 3-4. Kawada M, Nagamori S, et al.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 34: 109-115, 1998.
- 4-1.Kuroki T, et al. *Cancer Res.* 42: 1859-1865, 1982
- 4-2.Sawada M and Kamataki T : *Mutation Res.* 411: 19-43, 1998
- 4-3.Madan A, et al. *Drug Metab. Dispos.* 27: 327-335, 1999
- 5-1.Honma, M., Momose, M.et.al.*Mutat. Res.*, 493,101-114, (2001).
- 5-2.Honma, M, Sofuni, T. "Genetictoxicology and cancer risk assessment" ed. by Choy, W.N. Marcel Dekker, Inc., New York,141-161(2001).
- 6-1. Choo, Q.L. et al. (1989) *Science* 244, 359-362.
- 6-2. Yanagi, M. et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8738-8743.
- 7-1. Fukaya, K., Asahi, S., et.al. *In Vitro Cell.Develop.Biol-Animal* , 37(5), 266-269 (2001).
- 7-2. 宮崎正博, 小林直哉, ほか. *細胞*, 33 (11), 406-409 (2001).
- 7-3. Nozaki, I., Tsuji, T., et.al. *In Vitro Cell.Develop Biol.-Animal*, 36, 566-570 (2000).
- 8 - 1 . 松浦知和、斉藤勝也、ほか、*外科* 63 (5): 539-543(2001).