

外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究

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

研究要旨 1)日本人の気管支喘息、C型肝炎、肝癌疾患患者組織における疾患関連遺伝子発現と病態との関連性を調べると共に、C型肝炎再発の早期予測系について検討した。2)CYP2C19 Poor metabolizer 由来ヒト肝細胞、ヒト不死化肝細胞、肝癌由来細胞の三次元培養によるヒト代謝・誘導評価系、およびヒト型 CYP3A4 導入マウスによるヒトの In vivo 誘導評価系を構築した。3)中国における非営利ヒト組織供給機関を調査し、ヒト肝細胞の研究利用における法的・倫理的妥当性を調査した。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
大野泰雄
- (2) 獨協医科大学 薬理学教室
上川雄一郎
- (3) 獨協医科大学 第二外科
窪田敬一
- (4) 東北大学大学院薬学研究所
薬物動態学分野
山添 康
- (5) 第一化学薬品(株)薬物動態研究所
二宮真一
- (6) ファイザー(株)中央研究所
嶋田 薫
- (7) 田辺製薬(株)薬物動態研究所
山田泰弘
- (8) 塩野義製薬(株)新薬研究所
馬場隆彦
- (9) 大日本製薬(株)薬物動態研究所
寺内嘉章
- (10) 日本新薬(株)創薬研究所
中村明生
- (11) 協和発酵工業(株)医薬研究センター
田代 智
- (12) 第一製薬(株)創剤代謝研究所
岡崎 治
- (13) 三共(株)薬劑動態研究所
三浦慎一
- (14) 中外製薬(株)前臨床研究第一部
加藤基浩
- (15) アベンティス ファーマ(株)
薬物動態研究所
森田繁道
- (16) 山之内製薬(株)代謝研究所
神山佳輝

A. 研究目的

欧米では、移植不適合ヒト組織および臓器を研究資源として利用し得る体制が、入手方法ならびに配布のためのルールも含めて、いち早く確立され、医薬品開発等のため利用されている。一方、我が国では、平成12年度にHS財団によりヒト組織バンクが設立されたものの、移植不適合ヒト組織の研究利用が認められなかったため、特に遺伝子解析が可能なヒト組織の供給は数的にも量的

にも少なく、研究に利用されているヒト肝組織は、主に米国から入手しているのが現状である。

種々の生体内反応ならびに薬物に対する反応には、動物種差、人種差および個体差が知られている。そこで、日本人の外科手術摘出組織を用いたオーダーメイド医療を目指す一環として、疾患関連遺伝子の発現と病態および発症との関連性、さらに疾病時の薬物動態関連遺伝子の発現について検討した。また近年、医薬品開発におけるヒト肝細胞の需要が拡大していることから、海外からの非凍結および凍結ヒト肝細胞の供給が将来不安定となることが予想される。しかし現時点では、分量の日本人肝細胞を入手することは極めて困難である。そのため、医薬品開発に必須なヒト肝細胞を用いた薬物代謝および酵素誘導能評価のための代替法開発が必須となっている。また、日本人のみならず東洋人に特異的な薬物動態ならびに関連遺伝子の検討を可能にするため、日本国内からのヒト組織の入手を試みつつも、Mongolian由来のヒト組織入手経路の拡大が必要である。そこで初年度は、

- 1) 気管支喘息患者における関連受容体の発現
- 2) 肝細胞癌組織における疾患関連遺伝子発現および多型に関する研究
- 3) HCV感染患者における薬物動態関連遺伝子の発現
- 4) CYP2C19 PM/EM凍結ヒト肝細胞を用いたOmeprazoleの代謝評価
- 5) 正常ヒト肝由来の不死化細胞によるCYP1A2およびCYP3A4/5誘導能バリデーション
- 6) ヒト肝癌由来培養細胞株を用いた三次元培養法による薬物代謝酵素誘導能
- 7) ヒト型CYP3A4誘導マウスの作成と応用
- 8) 外国由来ヒト組織提供機関からのヒト組織入手の倫理的・法的妥当性について検討した。

B. 研究方法

市販のキットを用いて、ヒト組織あるいは細胞から RNA 画分を調製し、Reverse Transcription Reagent により cDNA を合成し、各遺伝子の mRNA 量を real time-PCR 法により測定した。コントロールとして、GAPDH、 β -actin あるいは 18S RNA の発現量を用いた。

B-1) 気管支喘息患者における関連受容体の発現

細胞は、獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科にて採取された末梢血から得られた 98%以上の好酸球を含む細胞分画を使用した。ヒト単球様白血病細胞 THP-1 はヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。フローサイトメトリーには、Cayman 社から購入した Cysteinyl leukotriene (cysLT)₁ 受容体・cysLT₂ 受容体抗体および阿部博士 (福岡大学医学部薬理学) から供与された LTC₄ 合成酵素抗体を用いた。解析は FACSCalibur (Becton Dickinson)で行った。

B-2) 遺伝子発現を指標とした HCV および HCC の再発予測

肝細胞癌に対する根治的肝切除術の摘出検体 (n=44) を以下の 3 つのカテゴリー、(I): 3 ヶ月以内の再発例 (n= 6)・非再発例 (n=38)、(II): 3~6 ヶ月間の再発例 (n= 4)・非再発例 (n= 34)、(III): 6~12 ヶ月再発例 (n= 4)・非再発例 (n= 30) に分類した。Real-time PCR 法により E-cadherin (Ecad)、Osteopontin (OPN) の発現を定量化した。発現値: $t = (\text{copy number of Ecad or OPN} / \text{copy number of GAPDH}) \times 1000$ を各カテゴリー内で比較し、Mann-Whitney U-test により有意差検定で、P 値が 0.05 以下を統計的有意差ありとした。

B-3) 日本人における薬物動態関連遺伝子の発現

薬物動態関連遺伝子の測定項目として薬物代謝酵素の第一相から、CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 を、薬物トランスポーターとして、MDR1, MDR3, MRP1, MRP2, MRP3, BCRP, OATP-A, OATP-B, OATP-C, OAT2, OCT1, NTCP, BSEP を選択した。

B-4) CYP2C19*2/*2 ヒト PM 凍結肝細胞を用いた Omeprazole の代謝評価

CYP2C19 の poor および extensive metabolizer の凍結ヒト肝細胞 (PM; Lot.TSR, *2/*2, EM; FNL, wt/wt) は、米国 In Vitro Technologies (IVT) 社で調製されたものを用いた。肝細胞は、96 well プレートに蒔き、培養液に浮遊させた状態で試験に供した。Omeprazole(OPZ)は、最終濃度 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M となるように加え、37°C (1hr, 2hrs) で反応させた。反応液中の OPZ の他、5-水酸化体(5-OH

OPZ) とスルホン体 (OPZ-sulfone) を LC/MS/MS 測定し、生成速度 (pmol/min/10⁶ cell) を算出した。EM 肝細胞と PM 肝細胞それぞれの CYP3A4 活性は、Midazolam (MDZ) の 4-水酸化活性 (CYP3A4) で補正した。

B-5) 正常ヒト肝由来不死化細胞による CYP1A2 および CYP3A4/5 誘導能バリデーション

凍結不死化ヒト肝細胞 Fa2N-4 細胞 (米国、Gentest 社) は、日本農産工業から入手した。薬物代謝酵素誘導能の評価では、CYP1A2 誘導剤 β -Naphthoflavone (BNF) および OPZ を、また CYP3A4/5 誘導剤として Phenobarbital (PB) と Rifampicin (RIF) を用いた。今回の検討では、低濃度領域での弱い酵素誘導 (72 時間) を検知できるか否かを検討することも目的の一つであるので、各誘導剤の終濃度は、BNF; 0.1, 0.3, 1, 3 および 10 μ M, OPZ; 1, 3, 10, 30 および 100 μ M, PB; 100, 250, 500, 750 および 1000 μ M, RIF; 0.3, 1, 3, 10 および 30 μ M に設定した。誘導剤暴露後に Phenacetin (40 μ M; 240 分) あるいは MDZ (5 μ M; 60 分間) を含む培地を添加し反応させた。反応後、反応液上清を LC/MS あるいは LC/MS/MS に注入した。活性値は、pmol/hr/well で表示した。

B-6) ヒト肝癌由来培養細胞株を用いた三次元培養法による薬物代謝酵素誘導能

HepG2 細胞は ATCC より購入し、常法に従い平面培養した。三次元高密度培養にはエイブル社製ラジアルフローパイオリクター (RFB; 5 ml 容) を用いた。同装置のカラム内に充填した細胞支持体に、HepG2 細胞 (5 X 10⁶ cells/ml) を生着させた後、培養状態をモニターしつつ、溶存酸素、pH 等が調整された培養液を循環させることで、細胞の三次元的高密度培養を行った。細胞数は、培地中のグルコース消費量をバイオセンサー (model BF-4: Oji Scientific Instruments) でモニターし、換算することで推定した。薬剤による酵素誘導は、対数増殖期にある細胞の培養液中に RIF 100 μ M (3 日間)、又は Dexammethazone 10 μ M (DEX, 2 日間) を暴露して行った。この間、培地は RFB を循環させ、薬剤を含む新鮮な培地と 1 日毎に交換した。遺伝子発現の網羅的解析は、細胞より調製した RNA を biotin でラベル後、Affymetrix 社製 Human Genome U133A GeneChip にて行った。

B-7) ヒト型酵素誘導モデルマウスの作成と応用

雄性マウス (CD-1, 体重 30-33 g, 6 週齢) は日本チャールズリバーより購入し、東北大学大学院薬学研究科実験動物飼育施設において通常の条件下で飼育した。なお、動物実験は「東北大学における動物実験に関する指針」に従って行った。

293 細胞、HepG2 細胞は American Type Culture Collection より購入したものを維持、継

代して使用した。AdCYP3A4 レポーターコンストラクトおよび AdhPXR は COS-TPC 法および AdEasy 法によりそれぞれ Adenovirus Expression Vector Kit (宝酒造)、AdEasy Vector System (Quantum Biotechnologies) を用いて、その説明書に準じて作製した。

B-8) 外国由来ヒト組織提供機関からのヒト組織入手の倫理的・法的妥当性

Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. LTD (RILD 社)、中国および上海において要職にある研究者、行政官、マスコミ関係者に中国人由来ヒト組織の日本への提供の妥当性に関する情報提供を求めた。疑問点については RILD 社に問い合わせた。上海薬学会主催シンポジウムに出席した際に RILD 社を訪問し、当社におけるヒト組織の取扱いの妥当性について、施設・設備およびソフト面から実地調査を行った。また、RILD 社の回答に関し、中国の政府や国立研究機関職員、マスコミ関係者に意見を求めた。また、第三者的な立場の者による調査を科学技術文明研究所の張博士に依頼し、再度上海に赴き、RILD 社および RILD にヒト組織を提供している上海紅十字会 (赤十字) 認定病院を訪問し、それらの妥当性について調査した。

(倫理面への配慮)

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。ヒト組織は、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供与された。ヒト組織は、提供者が特定できないように、提供機関で匿名化措置が講じられた。また、受け入れ施設によっては、さらに匿名化が行われた。また、提供試料は本研究の目的にのみ使用した。米国から入手した凍結ヒト肝細胞および不死化ヒト肝細胞は、正式なルールに基づいて移植不適合臓器の研究利用肝から調製されたものであり、提供者の人権を侵害する危惧はない。

また、バイオハザード関連では、ヒト遊離肝細胞の調製に使用される肝臓は、HIV、B 型肝炎および C 型肝炎ウイルス等が陰性であるドナー由来の試料のみが使用された。なお、実験操作は、各施設のバイオハザードに関する規定等に従って実施した。

C. 研究結果

C-1) 気管支喘息患者における関連受容体の発現
cysLTs のアレルギー性炎症病態への関与を明らかにするため、正常人と呼吸器疾患患者の末梢血分離好酸球とヒト単球様細胞 THP-1 を用いて、cysLT 受容体と LTC4 合成酵素の発現について検討した。cysLT1 受容体、cysLT2 受容体 mRNA レベルは喘息群に比べて非喘息群で高い傾向があった。LTC4 合成酵素 mRNA レベルは喘息群で高い傾向がみられた。cysLT1 受容体蛋白は両群で

ほとんど発現していなかった。cysLT2 受容体は非喘息群で高い傾向があった。LTC4 合成酵素の発現は両群で違いが認められなかった。

THP-1 細胞には cysLT1 受容体 mRNA が構成的に強く発現していた。Th2 サイトカインである IL-4 の刺激により、cysLT2 受容体の mRNA レベルが上昇した。一方、抗アレルギー作用があり Th2 サイトカインの作用に拮抗するという報告がある Th1 サイトカイン IFN- γ で刺激しても、cysLT1 受容体 mRNA は強く上昇した。THP-1 細胞表面に発現している両受容体レベルは、好酸球に比べて高かった。IL-4 刺激で cysLT2 受容体発現が増強された。さらに IFN- γ によって cysLT1・cysLT2 受容体タンパク質発現が著明に上昇した。IFN- γ の作用は用量依存的であった。LTC4 合成酵素については、mRNA、タンパク質ともに強く発現しており、Th1 サイトカインである IFN- γ でこの発現が増強した。

C-2) 遺伝子発現を指標とした HCV および HCC の再発予測

HCV 陽性肝細胞癌 (HCV/HCC) 治療後の再発を早期に予測するため、癌組織中に発現する Ecad、OPN の mRNA を定量化することで、HCV/HCC 早期再発症例の予測が可能かどうかについて検討した。いずれのカテゴリにおいても再発群では非再発群に比べ、Ecad の t 値が有意に低下していた。また、OPN では、再発群の t 値が非再発群に比して高値である傾向を認めたが、統計的有意差はなかった。

手術後一年以内における再発症例、非再発症例全例で比較したところ、HCC 肝切除後 1 年以内の全再発症例 (n=14) と全非再発症例 (n=30) において、Ecad の t 値は再発群が 3.7、非再発群が 33.0 を示し (p<0.05)、正常肝細胞における Ecad t 値の中央値は 17.8 であった。今閾値を 10.0 と設定すると、手術後早期再発予測の sensitivity は 78.6%、specificity は 90.0% であった。次に、OPN の t 値は再発群が 147.8、非再発群が 53.5 であった (p<0.05)。正常肝細胞における OPN の t 値の中央値は 48.0 であり、OPN の閾値を 100.0 に設定すると早期再発予測の sensitivity は 64.3%、specificity は 70.0% であった。

C-3) 慢性 C 型肝炎患者の薬物動態関連遺伝子発現レベル

C 型肝炎ウイルス感染時に、肝臓でどのような薬物動態関連遺伝子の発現が変化するかについては十分に理解されていない。そこで慢性 C 型肝炎患者の薬物動態関連遺伝子発現の特性について調べた。今回は、獨協医科大学から供与された非感染肝の非腫瘍部分 12 検体の内 10 検体と、虎ノ門病院から供与された慢性 C 型肝炎患者の肝生検試料 6 検体を分析に用いた。CYP1A2、CYP3A4 については、非感染肝の非腫瘍部分と、慢性 C 型肝炎

炎患者試料との間に、mRNA レベルでの差は認められなかった。それに対し、CYP2B6 は、慢性 C 型肝炎患者の肝では、非感染肝に比して、統計的有意差をもって mRNA 発現レベルが低下していることが示された。なお、出発肝組織重量が 10 mg 未満であるにも拘わらず、再現性よく種々の薬物動態関連遺伝子の mRNA を抽出することが出来た。

C-4) CYP2C19 PM/EM 凍結ヒト肝細胞を用いた Omeprazole の代謝評価

遺伝的多型が知られている CYP2C19 の PM および EM 由来肝細胞における代謝を 3 施設において調べ、in vitro データと臨床薬物動態データとの関連性、さらに CYP2C19 以外の代謝活性が PM で代償的に上昇するかどうか、を中心に検討した。3 施設においては同様の結果が得られ、OPZ の臨床血漿中遊離型濃度付近に相当する 0.3 μ M の CYP2C19 活性(5-OH OPZ 生成速度)は、PM 肝細胞では EM 肝細胞の約 1/8~1/5 と低かった。しかしながら高濃度側では両者に逆転が見られた。OPZ 3.0 μ M での OPZ-sulfone の生成速度(CYP3A4)は PM 肝細胞、EM 肝細胞で差は認められなかったが、高濃度(30 μ M)では PM 肝細胞が EM 肝細胞に比し約 3 倍高い値を示した。OPZ 3.0 μ M 付近での PM 肝細胞、EM 肝細胞での 5-OH OPZ の生成速度に対する OPZ-sulfone の生成速度比 (CYP3A4/CYP2C19 活性比) はそれぞれ 0.11、0.04 と、PM 細胞が EM 細胞の約 3 倍高い値を示した。

C-5) 正常ヒト肝由来不死化細胞による CYP1A2 および CYP3A4/5 誘導能バリデーション

CYP1A2 に関しては、一部の例外を除き添加濃度範囲では、BNF の方がやや強い誘導を示した。誘導倍率は 20~30 倍と、明瞭な誘導が観察された。次に、CYP3A4/5 については、ややロット差があるものの、PB と RIF で同程度の誘導を示した。誘導倍率は 5 倍程度と低めであったが、誘導前の活性に対して、明瞭な誘導レスポンスが観察された。次に、今回同様の試験をほぼ同時期に実施した 10 施設の結果では、CYP1A2 については中央値付近であり、CYP3A4/5 についても同様であったが、やや高めの誘導を示した。なお、細胞を凍結融解して懸濁した段階では、2 回目と 3 回目のロットには、凝集塊が観察されたが、接着してコンフルエントとなった状態では、顕著な差異は認められなかった。

C-6) ヒト肝癌由来培養細胞株を用いた三次元培養法による薬物代謝酵素誘導能

三次元培養下における HepG2 の増殖状態について検討した。5 X 10⁶ cells/ml で細胞播種後、2~3 日目より細胞は指数関数的に増え始め(対数増殖期)、約 2 週間後 1 X 10⁸ cells/ml を超えたところで増殖は認められなくなり(定常期)、その

後、約 1 週間ほぼ同数の生細胞密度を維持していた。遺伝子発現の網羅的解析により、対数増殖期の発現と比較して、定常期で 13 の既知遺伝子の発現が有意に低下していた。そのうち 6 つの遺伝子 *ribonucleotide reductase M2 polypeptide*, *cyclin A2*, *CDC20 cell division cycle 20 homolog*, *replication protein A3, 14kDa*, *cell division cycle 2* および、*cyclin B2* が、細胞周期の進行に深く関与していることが判明した。この結果と BrdU 取り込み実験から、定常期にある細胞は、増殖を停止していることが示された。

細胞増殖の変化により CYP3A4 の誘導が変化するかを、誘導剤 RIF 及び dexamethasone(DEX) を用いて検討した。ATCC より購入した HepG2 は、平面培養では 100 μ M RIF 3 日間の処理によっても CYP3A4 の誘導は認められなかった。一方、対数増殖期にある細胞を、RIF により 3 日間処理し、CYP3A4 の発現量を RT PCR により測定した。その結果、平均して 6.4 倍の CYP3A4 の発現誘導が認められた。また、DEX を添加した場合は、2.9 倍の発現誘導が認められた。細胞が定常期にある時、RIF を誘導剤として同様の実験を行ったが、CYP3A4 の発現誘導は認められなかった。

C-7) ヒト型酵素誘導マウスの作成と応用

CYP3A 誘導を引き起こす核内レセプター(PXR)のリガンド結合ドメイン配列は動物種間で大きく異なり、その違いが CYP3A 誘導の種差を引き起こしている。そこで、ヒト CYP3A4 誘導評価が可能な in vivo 実験系の構築のため、まず、アデノウイルスヒト CYP3A4 レポーターコンストラクトと hPXR をマウスに共発現させることで誘導の評価を試みた。誘導剤である RIF は水に難溶性であるため DMSO(15%)・polyethylene glycol (25%)滅菌水を溶媒として用いたところ、活性の顕著な上昇が見られ、バラツキも低下した。アデノウイルスの発現は、ウイルス投与から 28 週間後でも効果の持続が確認された。しかし、マウス内因性の Cyp11a の活性を示す Testosterone(TS) 6 β -水酸化活性は時間の経過に伴う変化が認められなかった。

CYP3A4 誘導に関わる Cis-element について検討した。CYP3A4 遺伝子の 5' 上流プロモーター領域には、PXR の結合配列であると同定された everted repeat separated by six nucleotides (ER-6)、新たに転写開始点より約 7k~8k 上流の xenobiotic-responsive enhancer module (XREM) 中に存在する distal nuclear receptor binding element-1 (dNR-1)、dNR-2、dNR-3 が見出された。dNR-2 は ER-6 配列であり、dNR-1 と dNR-3 は direct repeat separated by three nucleotides (DR-3) 配列であった。これらの配列には PXR が RXR とヘテロダイマーを形成することで CYP3A 遺伝子に存在する ER-6 や dNR-1 (DR-3) に結合し、これにリガンドとなる薬物が結合し CYP3A 遺伝子が転写活性化すると

考えられている。また、この領域を含んだレポーターコンストラクトを用いてレポータージーンアッセイを行ったところ、RIFによる高い誘導がみられた。一方、本研究室において dNR-1 よりやや下流に存在する a major inducer responsible element of the CYP3A4 (mIE3A4) も CYP3A4 の転写活性化に大きく寄与していることを明らかにした。しかしながら、これらのエレメントが生体中でどのように誘導に関わっているかは明らかでない。そこで ER-6、dNR-1 (DR-3) と新規シスエレメント mIE3A4 が RIF による CYP3A4 誘導にどのように関与するかについて *in vitro* および *in vivo* 実験系において検討した。まず、ラットのコンストラクトである CYP3A1-171 を用いて実験を行った結果、マウス肝に hPXR を発現させても RIF による転写活性化は見られなかった。しかしながら、マウスにおいて DEX による約 10 倍の転写活性化が認められた。

一方、mIE3A4 を含む AdCYP3A4-362-7.7k が約 15850 倍見られたのに対し、mIE3A4 を含む領域を取り除いた AdCYP3A4-362-7.7kΔHinc II を用いて検討したところ、hPXR を発現時における RIF による転写活性化が 31 倍と著しく低下した。これらの結果は *in vitro* で得られた結果と一致した。次に従来、誘導に関与すると報告されている ER-6、dNR-1 (DR-3) に変異を施して転写活性化を調べたところ、dNR-1 のみに変異を施したレポーターコンストラクト CYP3A4-362-7.7km を用いた検討では、RIF による転写活性化がコントロールの約 2000 倍見られた。一方、dNR-1 と ER-6 に変異を施したコンストラクト CYP3A4-362m-7.7km において、RIF による転写活性化がコントロールの約 350 倍認められた。

C-8) 外国由来ヒト組織提供機関からのヒト組織入手の倫理的・法的妥当性

a) 中国上海におけるヒト組織倫理面に関して

中国上海において臓器移植は、欧米と同様事前にインフォームドコンセントが得られた提供者から実施されている。異なる点は、米国では脳死患者の組織から得られるが、上海市紅十字会・第二軍大学紅十字会の「上海市献体登録申請表（添付資料 1）」に事前登録された献体提供者の臓器を用いて行われている。事前登録は、部分的な臓器の提供も可能であり、献体する組織を特定して記載することも出来る。この登録者には、ドナーカードが渡される。この献体の意思の登録の抹消を望む場合には、「上海市献体記念証」とドナーカードを登録機関に持参し抹消の手続きをすることが出来る。献体として提供された臓器は、臓器移植不適合となった場合にのみ研究用材料として調製される。

b) 組織の適格性 試験材料として提供される組織は、米国から得られる試料と同様に HBV、HCV、HIV 1、HIV 2 の検査がなされ、陰性のものが使用される。その他、提供される情報として

は、性別、年齢、薬歴、死因があるが、個人を特定する情報は保護されている。

c) 日本への輸出許可と検疫 提供される試験材料は、関係当局の輸出許可と医療用特殊物品出入国管理と衛生検疫の強化に関する通知（2003 年 8 月 6 日：衛生部、国家質検総局：添付資料 2）、医療用微生物に関すること、人体物質、科学研究用生物製品、血液及びその製品等医療用特殊品出入国検疫管理に関する事項で規制されており、これに従って検疫が実施されている。なお、米国から提供される研究用試薬は、検疫が実施されていない。

d) 中国上海からの研究用材料 ヒト組織から調整された研究用材料は、ミクロソーム、凍結肝細胞、新鮮肝細胞等がある。これらの材料には、米国から得られる材料と同様、上記情報の他に、薬物代謝に関するデータも添付されている。

e) 上海のヒト組織提供機関である RILD 社について実地調査を 2 回行い、その手続き、IRB などの組織とその運営、施設、設備、記録等が適切に行われていることを確認した。

f) RILD 社からのヒト組織購入に関し、国立衛研の倫理委員会に申請を行った。

D. 考察

D-1) 気管支喘息患者における関連受容体の発現

末梢血好酸球は、喘息治療薬である cysLT1 受容体拮抗薬の抗炎症作用の標的と LTD4 による遊走作用等への寄与が知られている。気管支平滑筋収縮作用を初めとするアレルギー性喘息の重要な伝達物質として知られている cysLT1 受容体タンパク質の発現は、検知下限レベルの弱さであったことから、*in vivo* での遊走阻害作用は、ケモカインなどその他の因子との相互作用を介した抑制である可能性が考えられた。炎症部位における好中球で産生される LTC4 合成酵素蛋白の発現は両群で大きな違いはないようである。

単球はマクロファージの前駆細胞で、cysLT 産生系の解析に使用されている。単球様白血病細胞 THP-1 細胞では、IL-4 で cysLT2 受容体 mRNA およびタンパク質レベルで増加した。一方、Th1 サイトカインである IFN- γ によっても cysLT1・cysLT2 受容体の mRNA レベルは増加し、用量依存的にタンパク質の発現量も増加した。さらに LTC4 合成酵素の発現も上昇した。cysLTs は毛細血管透過性を亢進する作用があることから、IFN- γ による THP-1 細胞における受容体や LTC4 合成酵素のアップレギュレーションは炎症初期の局所への遊走を増強している可能性が考えられる。

D-2) 肝細胞癌組織における疾患関連遺伝子発現および多型に関する研究

Ecad は上皮性糖タンパクであり、その発現低下は上皮性細胞の中皮細胞化と捉えられ、一般に上皮性癌の悪性度との相関が示唆されてきた。研

究結果は Ecad の mRNA の発現低下と HCV/HCC の早期再発の間には有意な相関を示した。一方、OPN の発現増加と癌細胞の悪性度には相関が示唆されており、OPN 発現亢進と肝細胞癌の予後に関する報告は多い。しかし、本研究では肝切除後早期再発群において OPN 発現が亢進する傾向を認めたが、各カテゴリー内では統計的有意差を認めなかった。但し、術後 12 ヶ月以内に再発した全症例での統計学的解析では、再発群における OPN の発現は、非再発群に比べ有意に亢進していた。

D-3) HCV 感染患者における薬物動態関連遺伝子の発現

C 型肝炎患者における薬物動態関連遺伝子の発現レベルの変化を 1 mg~10 mg 程度の肝生検試料で Taq Man 法により捉えることが可能であった。疾病群では *CYP2B6* の発現低下傾向が見られたが、さらに検体数を増やす必要がある。*CYP2B6* は、核内受容体 Constitutive Androstane Receptor (CAR) による発現調節を受けることが知られているが、他に CAR による発現調節を受ける遺伝子、また、CAR そのものの機能と病態との関連について解析を行なう必要がある。今後は、C 型肝炎のグレード、GOT、GPT 等の臨床検査値の情報等と遺伝子発現のデータとの関連を解析し、病態のグレードと薬物動態関連遺伝子の発現レベルと変化との関連を明らかにしたい。

D-4) CYP2C19 PM/EM 凍結ヒト肝細胞を用いたオメプラゾールの代謝評価

低濃度側の OPZ 0.3 μM (約 100 ng/mL) ~1 μM (約 300 ng/mL) は OPZ の臨床用量での血中濃度域に相当し、この濃度域での PM 肝細胞の CYP2C19 活性は、EM 細胞の約 1/8 と低く、肝細胞の genotype を反映した結果であった。また CYP2C19 の変異型遺伝子のホモ接合体を有する PM 被験者と野生型のホモ接合体を有する EM 被験者に OPZ 20mg を服用させた時の AUC には約 13 倍の差があることが報告されており、今回 *in vitro* 試験で得られた結果は、臨床での EM と PM 被験者の体内動態の差をほぼ定性的に予測しうるものであると考えられた。一方、高濃度(10 μM 以上)の OPZ では、両者の活性は逆転したが、これは 5-OH OPZ の生成に関与する CYP2C19 は low K_m 、high V_{max} であることに由来すると考えられた。また CYP2C19 の活性に対する CYP3A4 の活性の比は、臨床用量での OPZ 血中濃度に近い低濃度側で特に大きな差が認められ、PM 細胞では低い CYP2C19 活性の代わりに CYP3A4 活性が代償的に OPZ を代謝していることが考えられた。

D-5) 不死化細胞を用いた CYP1A2 および CYP3A4/5 誘導能バリデーション

安全かつ有効な新薬を開発するためには、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 誘導評価試験の実施が

不可欠であるが、非凍結新鮮ヒト肝細胞の入手制限およびヒト肝細胞における動態関連因子の個体差が大ききことなどが問題となっている。そこでヒト代謝をシミュレートする新技術として、米国の MultiCell Technologies, Inc. において作製された形態的にも機能的にも正常ヒト肝細胞に近い不死化ヒト肝細胞 Fa2N-4 を用いた CYP 誘導試験系のバリデーションを行った。最初に CYP 誘導試験のプロトコールを作製し、そのプロトコールに基づいて予備的検討を行った後、Fa2N-4 細胞について、製薬企業の 10 施設(研究所)でバリデーションデータを取得した。

今回の検討では、施設内および施設間でも多少のばらつきが認められたために、やや不明瞭な結果となったが、CYP1A2 では十分な誘導強度が観察された。これに対して、CYP3A4/5 については、やや倍率が低かったが、活性増強の濃度依存性を認めた。レスポンスが悪いながらも、今回検討した個体は、元々 CYP3A4/5 には反応が弱く、CYP1A2 に対してより敏感に反応する性質のものであったと推察される。

また、今回の検討では、すべての施設でコラーゲンプレートへの播種を行なったのちに誘導試験を実施した。この処理条件が厳密には同一ではないため、施設間の変動が生じたものと推察している。また、これによって、誘導の反応性が若干影響を受ける可能性が否定できないので、施設間でデータを比較する場合や、時期の異なる別ロットでのデータの比較などでは、注意する必要があると考えられ、陽性対照データによる勘案が推奨される。

D-6) ヒト肝癌由来培養細胞株を用いた三次元培養法による薬物代謝酵素誘導能

RFB による培養は細胞播種後、対数増殖期を経て約二週間後に定常期になった。定常期は一週間以上の維持が可能であった。定常期にある細胞は細胞周期の進行が停止していることが示された。次に、*CYP3A4* の誘導剤である RIF 及び DEX を対数増殖期にある細胞に暴露すると、*CYP3A4* の顕著な誘導が認められた。今回用いた HepG2 細胞は、平面培養では RIF による *CYP3A4* の誘導が認められないことを考えると、RFB による三次元高密度培養が、肝癌由来培養細胞の肝臓における薬物代謝を再構築する系として有用であることが示唆された。また、平面培養で誘導がさらにかかりやすい細胞株を用いることで、誘導能の一層の改善が期待される。そこで、今後複数のヒト肝癌由来細胞株に関して同様の実験を行うことで、より誘導効率のよい系が確立できると考える。RFB 内で対数増殖期にある細胞と定常期にある細胞が、肝実質細胞の機能のどの部分を再現しているのか、詳細な検討が今後の課題のひとつであると考えられる。あわせて、他の薬剤による *CYP3A4* の発現誘導及び他の薬物代謝関連遺伝子の発現誘導が細胞の増殖状態によってどのように

変化するかを明らかにする必要がある。

D-7) ヒト型酵素誘導モデル実験動物の作成と応用

マウスにアデノウイルスベクターを用いて CYP3A4 レポーターコンストラクトと hPXR を共発現させることにより、誘導能の著しい増強が認められた。この結果より従来、マウスやラットでは評価できなかった RIF による誘導が CYP3A4 レポーター遺伝子と hPXR の共発現により認められたことから、CYP3A4 誘導におけるマウスのヒト化に成功した。

次に mIE3A4 に存在する DR-2、 α と β を含む DR-4 の RIF による転写活性化に対する関与について *in vitro* およびマウス *in vitro* 実験系において解析した。その結果、DR-4 配列が残る AdCYP3A-362-7.7kAlu/Alu では *in vitro* および *in vivo* 実験系において hPXR を発現させることで RIF による有意な転写活性化の増強が認められた。しかし、DR-4 を欠失させたコンストラクト AdCYP3A4-362-7.7kmIEa においては hPXR を発現させても RIF による転写活性化が *in vitro* および *in vivo* 実験系においてごくわずかしき認められなかったことから、mIE3A4 に存在する PXR 結合配列の DR-2、DR-4 の中でも DR-4 が RIF による誘導に深く関与していることがマウスを用いた *in vivo* 実験系において示唆された。一方、*in vitro* で AdCYP3A4-362-7.7k Δ mIEa を用いた実験において薬物無処置、hPXR 非発現下の活性値がコントロールの約 30% に低下したことより、DR-4 が基礎的な CYP3A4 遺伝子の転写活性化に関与していることが示唆され、また、RIF による CYP3A4 誘導に必須なシスエレメントであることがマウスを用いた *in vivo* 実験系において明らかとなった。

また、本研究室において現在、mIE3A4 領域に含まれる ϵ と α サイトを含む DR-4 や α 、 β 、 χ 、 δ 、 ϵ サイトそれぞれのハーフサイトの機能についてそれぞれ配列に変異を加え *in vitro* で解析中であるが、すでに α と ϵ サイトが RIF による誘導に関与するという結果を得ている。即ち、 ϵ と α サイトを含む DR-4 が CYP3A4 遺伝子の転写活性化に最も重要であると考えられる。しかしながら、mIE3A4 γ および mIE3A4 δ サイトを含む領域を欠失させた場合にも RIF に対する応答が低下することから、mIE3A4 を構成し転写活性化に関わるハーフサイトは mIE3A4 ϵ および mIE3A4 α サイト以外にも存在する可能性が推察された。また、核内レセプターである CAR も CYP3A4 誘導に関与していると報告されており、本研究室において CAR による CYP3A4 誘導に mIE3A4 が関与している結果も得ている。mIE3A4 中の DR-4 配列は、CAR の主要なターゲット遺伝子である CYP2B6 遺伝子上にある NR-1、NR-2 と同様の配列であり、非常に類似している。そのため、CAR が mIE3A4 中の DR-4 配列に直接結合し、CYP3A4 誘導に関

与している可能性も考えられる。さらに今後、mIE3A4 を構成するハーフサイトを同定するだけでなく関与する転写因子についての検討や *in vivo* における検討の余地があると思われる。また、ゲルシフトアッセイにより核内レセプターが mIE3A4 領域に結合することを確認する必要がある。

D-8) 外国由来ヒト組織提供機関からのヒト組織入手の倫理的・法的妥当性

ヒト組織の研究利用と国外への提供に関する中国の法規制および上海におけるヒト組織供給機関 (RILD 社) の実地調査の結果と考察に基づき、RILD 社からヒト肝臓を購入する件について、倫理的に妥当と考えた。また、法的な面では中央政府の許可の必要性について、若干の不明確なところは残ったが、上海政府と税関の輸出許可証が出ていることから、法的な問題は無いと考え、国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会に申請した。

E) 結論

気管支喘息患者生検から調製したヒト末梢血好酸球には cysLT1 受容体、cysLT2 受容体、LTC4 合成酵素の mRNA が発現していたが、cysLT1 受容体タンパク質発現レベルはきわめて低く、cysLT1 受容体拮抗薬の作用点は他の炎症性細胞の受容体である可能性が示唆された。

また、HCV/HCC の肝切除後早期再発のマーカーとして、肝細胞癌組織中の Ecad-mRNA 発現の低下、OPN-mRNA 発現の亢進が有用な指標となることが考えられた。

日本人の非感染肝試料および C 型慢性肝炎患者の肝生検試料を用い、薬物代謝酵素ならびに薬物トランスポーター等の薬物動態関連遺伝子の変動について調べたところ、疾病群において CYP2B6 の発現低下傾向が見られることが判明した。今後さらに検体数を増やして解析を行なうと共に、同分子種の発現調節に関わる核内受容体 CAR 等の因子との関連を調べ、C 型肝炎の病態との関連性について解析することは重要な課題である。

以上、病態と病態時における関連遺伝子発現の研究は、病態の解明および疾病再発の早期診断に有用であることが示された。

遺伝多型が知られている薬物代謝酵素チトクロム P450 のうち、CYP2C19 の欠損した PM 凍結遊離ヒト肝細胞を用い、PM の薬物動態 (代謝) が予見できるかどうかを検討した。その結果代謝物の生成において、臨床結果と同様の結果が再現された。PM 凍結ヒト肝細胞を用いた代謝試験は、今までに行った CYP2D6、CYP2C9 と同様、CYP2C19 でも臨床試験以前に 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た。

ヒト代謝をシミュレートするための新技術として、不死化ヒト肝細胞を用いた本試験系で、

CYP1A2 および CYP3A4/5 に対する酵素誘導を比較的正確に検知することができ、被検薬物による軽微な誘導や誘導強度を正確に判定できる可能性が示された。この不死化ヒト肝細胞は製薬企業での有効かつ安全な薬を開発するための有用なツールであることが判明した。その一方で、本試験系を実用化するために、いくつかの留意点も明らかとなった。特に、今回の1回目の試験に用いたロットは、後の2回分のものに比べると継代数が少なく、やや誘導のレスポンスが良かった。継代を重ねることで、CYP 誘導のレスポンスが鈍る可能性もあるので、この点はさらに検証する必要があると考えられた。

HepG2 細胞を RFB による高密度三次元培養に供することで、CYP3A4 の発現誘導能が著しく改善された。このことは、同培養法が生体内の肝細胞の機能を再構築する系として有用であることを示している。また、細胞数の増加が認められない時期において、細胞が細胞周期の進行を停止することが示された。用いる細胞の種類を変えることで、より良い再構築系の確立が期待される。

本研究において樹立したアデノウイルスベクター *in vivo* 発現システムは、*in vitro* 実験系と比較して顕著な転写活性化が見られたため、高感度に薬物の誘導能を評価できることが期待された。このシステムを用い *in vivo* 実験系を用いて RIF による hPXR を介した転写活性化に関わるシスエレメントを解析した結果、当研究室で見いだした mIE3A4 が、従来報告されている ER-6 や DR-3 よりも RIF による転写活性化に深く関与することが *in vivo* 実験系においても明らかとなった。

中国上海におけるヒト組織供給機関(RILD 社)によるヒト組織のわが国への提供の法的・倫理的妥当性について調査した結果、妥当と考え、倫理委員会に申請した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamikawa, Y., Shibukawa, A., Uchida, K., Sasaki, K., Sunagawa, M., Ohno, Y.: Preservative solution for freeze-storage of surgically excised human colon to enable study of smooth muscle function *in vitro*. *Journal of Smooth Muscle Research*. 40: 177-182, 2004.
- 2) 児嶋修一、池田雅志、上川雄一郎：過敏性腸症候群 (IBS) 治療標的としてのタキキニン NK₂ 受容体：大腸粘膜からのセロトニン放出制御機構におけるタキキニン受容体の役割。日薬理誌. 124: 87-88, 2004.
- 3) T. Hongo, M. Kajikawa, S. Ishida, S. Ozawa, Y. Ohno, J. Sawada, A. Umezawa, Y. Ishikawa, T. Kobayashi, and H. Honda: Three-dimensional high density culture of HepG2 cells in a 5-ml radial-flow bioreactor for construction

of artificial liver. *J. Biosci. Bioeng.* in press.

- 4) T. Takada, K. Nagata and Y. Yamazoe. Protective role of hydroxysteroid sulfotransferase in lithocholic acid-induced liver 1. Differences in transactivation between rat CYP3A1 and human CYP3A4 genes by human pregnane X receptor. *Drug Metab. Pharmacokin.*, 19, 103-113 (2004)
- 5) M. Miyata, H. Takano, L.Q. Guo, K. Nagata and Y. Yamazoe. Grapefruit juice intake does not enhance but rather protects against aflatoxin B1-induced liver DNA damage through a reduction in hepatic CYP3A activity. *Carcinogenesis*, 25, 203-209 (2004)
- 6) M. Shimada, R. Terazawa, Y. Kamiyama, W. Honma, K. Nagata and Y. Yamazoe. Unique properties of a renal sulfotransferase, St1d1 in dopamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 310, 808-814 (2004)
- 7) T. Matsubara, H.J. Kim, M. Miyata, M. Shimada, K. Nagata and Y. Yamazoe. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 309 1282-1290 (2004)

2. 学会発表

- 1) 児嶋修一、池田雅志、上川雄一郎：過敏性腸症候群 (IBS) 治療標的としてのタキキニン NK₂ 受容体：大腸粘膜からのセロトニン放出制御機構におけるタキキニン受容体の役割。第 32 回薬物活性シンポジウム、大阪、11 月、2004.
- 2) 児嶋修一、池田雅志、上川雄一郎：止瀉薬ロペラミドはタキキニン NK₃ 受容体の刺激による大腸粘膜からのセロトニン放出を抑制する。第 32 回獨協医学会、壬生、12 月、2004.
- 3) 堂前真理子、上川雄一郎：ヒト単球白血病細胞 THP-1 におけるシステイニルロイコトリエン受容体発現に対する炎症性サイトカインの影響。第 78 回日本薬理学会年会、横浜、3 月、2005.
- 4) 磯 幸博、窪田敬一：肝細胞癌における E cadherin Snail システムと臨床的悪性度との関連について 第 104 回日本外科学会 (2004 年 大阪)
- 5) 磯幸博、澤田登起彦、北 順二、下田 貢、六角 丘、加藤正人、根本猛彦、窪田敬一：分子マーカーを用いた肝細胞癌悪性度評価 第 59 回日本消化器外科学会 (2004 年)
- 6) Hiromasa Tanaka, Shogo Ozawa,

- Fumitaka Suzuk, Hiromitsu Kumada, Kenya Nakai, Kazuhiko Hanada, Hiroyasu Ogata, Yasuo Ohno, Kei-ichi Kubota, Yuichiro Kamikawa : Individual expression of messenger RNA encoding drug metabolism enzymes and drug transporters in the liver of patients with chronic hepatitis C: A preliminary study. 第19回日本薬物動態学会年会 (2004年 金沢)
- 7) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、大野泰雄、澤田純一、梅沢彰、石川陽一：高密度3次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 第三回日本再生医療学会総会 (2004年 千葉)
 - 8) 大野泰雄、酒見和枝、簾内桃子：手術摘出肝組織からの肝細胞調製とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション 第25回日本学術会議薬理学研連「臨床薬理シンポジウム」「ヒト組織の研究利用体制構築と研究応用」(2004年 静岡)
 - 9) 本郷有克、梶河真理子、石田誠一、小澤正吾、大野泰雄、澤田純一、梅沢彰、石川陽一：高密度3次元培養時におけるヒト肝ガン由来細胞 HepG2 の機能評価 日本生物工学会平成16年度大会 (2004年 名古屋)
 - 10) A Miyajima-Tabata, S Ozawa, M Sunouchi, Y Kamikawa, K Kubota and Y Ohno: Interindividual variation of expression level of CYP3A4 and its related pharmacogenetic genes in Japaneseliver tissue. Annual Meeting of Society of Toxicology, Mar 6-10, 2005, New Orleans LA.
 - 11) 宮島敦子、小澤正吾、何晋徳、田中宏昌、仲井健也、簾内桃子、上川雄一郎、窪田敬一、緒方宏泰、大野泰雄：ヒト肝におけるCYP1A, 2B, 2C, 3A 遺伝子および関連核内受容体遺伝子の発現量の個人差 日本薬学会第125年会 (2005年 東京)
 - 12) 松原 勤、関谷裕次、永田 清、山添 康 CYP3A4 および CYP2B6 遺伝子転写に関わる核内受容体について 第19回日本薬物動態学会、2004、金沢
 - 13) Yamazoe Yasushi, Yoko Nagai, Noracharttiyapot Wachiraporn and Kiyoshi Nagata Estimation of CYP3A4 induction using stable lines, 7th International ISSX meeting, 2004 Vancouver
 - 14) Yamazoe Yasushi, Masaaki Miyata, Tsutomu Matsubara and Kiyoshi Nagata, Metabolic nuclear receptors and fates if xenobiotics and endobiotics, The University of Tokyo International Symposium “Frontiers in Drug Development” 2005
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 知的所有権の取得状況
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし