

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	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	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 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

## 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  
研究者 大野 泰雄

研究要旨 日本人の気管支喘息およびC型肝炎患者の組織における疾患関連遺伝子発現と病態との相関について検討した。薬物の代謝・誘導能の新規評価系を構築した。特に新規CYP3A4発現細胞は、有用なヒト肝細胞代替系となりうることが示唆された。

### 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                 | 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<br>薬物動態学分野    | 山添 康  |
| (5) 第一化学薬品(株)<br>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) 大日本住友製薬(株)<br>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)<br>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)薬剤動態研究所              | 三浦慎一  |
| (14) 中外製薬(株)<br>前臨床研究第一部       | 加藤基浩  |
| (15) アベンティス ファーマ(株)<br>薬物動態研究所 | 森田繁道  |
| (16) アステラス製薬(株)<br>代謝研究所       | 神山佳輝  |

### A. 研究目的

医薬品の有効性や安全性は薬物の体内動態と標的部位の薬物感受性によって決まる。一方、薬物動態関連酵素およびその遺伝子には、遺伝子多型が存在し、体内動態における個体差の大きな要因となっている。また、疾患そのものにも様々な病態があり、患者に応じた薬物治療が必要である。病態と関連する酵素の種類および酵素レベルの変化は、病態の種類とそのステージにより様々である。そのため、医薬品の使用等オーダーメイド医療に際しては、病態と薬物動態関連因子について

の詳細な情報が求められている。一方、薬物代謝酵素および薬物動態関連因子には種差が認められることから、創薬における薬物動態および誘導能の評価には、ヒト肝実質細胞の利用が不可欠である。しかし、我が国において、ヒト肝実質細胞を安定して入手することは困難であること、また、ヒト肝実質細胞には、遺伝子多型等に由来する個体間の大きなばらつきがあることを考慮すると、創薬開発においては、ヒト肝実質細胞の機能を *in vitro* で再現し、安定した条件下で薬物動態および誘導能の評価を可能にするヒト CYP 発現細胞や不死化ヒト肝細胞を開発して利用する新評価試験系の確立が急務となっている。また、薬物動態に関係する酵素およびその関連遺伝子には、東洋人 (Mongolian) と欧米人 (Caucasian) との間で人種差が認められることから、医薬品開発においては、日本人に特有な代謝過程を予測することが必要で、日本人もしくは東洋人の肝組織も用いる必要がある。日本における医薬品開発を促進するためには、国内からの入手拡大を計るとともに、Mongolian 由来のヒト組織入手経路を拡大することが急務である。

そこで、本研究では、まず日本人の外科手術摘出組織等を用いて疾病関連遺伝子の発現と病態、発症との関連性と疾病時における薬物動態関連遺伝子発現の変動についての検討、薬物代謝能及び誘導能の新規評価系の確立、および最近中国人肝組織の日本への提供を計画していた、中国上海市の Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. LTD (RILD) からのヒト組織供給に関する検討、の3つの関連する研究を行った。

具体的には、

- 1) 喘息発症に関わる重要な脂質伝達物質である cysteinyl leukotriene (cysLT) C4、D4、E4 の産生に関与する LTC4 合成酵素の発現調節

- に焦点をあて、ヒト単球様白血球細胞 THP-1 細胞を用いた炎症性サイトカインによる LTC4 合成酵素 mRNA の発現に対する作用
- 2) 癌組織中に発現する E-cadherin (Ecad)、Osteopontin (OPN) の mRNA 発現量による肝細胞癌 (HCC)、特に C 型肝炎ウイルス (HCV) 陽性 HCC (HCV/HCC) の超早期再発症例の予測
  - 3) HCV 感染患者の肝組織における病態レベルと薬物動態関連遺伝子の関連性
  - 4) アデノウイルスを用いてヒト CYP3A4 を発現させた HepG2 細胞 (Ad CYP3A4) を用いた代謝能評価系の確立
  - 5) 形態的、機能的にもヒト肝細胞に類似し、薬物代謝能を有する HepaRG 細胞およびヒト臍帯血幹細胞由来肝細胞様細胞である MD へパ細胞の有用性
  - 6) ヒト肝癌由来樹立細胞株の三次元高密度培養法によりヒト肝薬物代謝酵素誘導能を探索する新試験系の確立
  - 7) ヒト型酵素誘導モデルの作成と応用
  - 8) 昨年度の RILD 社および中国での肝組織提供に関する調査結果を踏まえ、中国からのヒト肝組織の入手および研究利用の可否を判断するための法的・倫理的妥当性
- について検討した。なお、4)と5)については、共通プロトコールのもと、代謝能評価試験系および酵素誘導能評価試験系のバリデーションを行った。

## B. 研究方法

RNA の調製と Real-time PCR : 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は GAPDH、 $\beta$ -actin あるいは 18S RNA の発現量を用いた。

### B-1) 喘息治療の個別化に関する研究

ヒト単球様白血球細胞 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、RPMI 1640 で培養した。PCR 産物の増幅は蛍光色素 SYBR Green I で検出し、融解曲線と電気泳動で単一バンドであることを確認した。

### B-2) C 型肝炎患者における薬物動態関連遺伝子の発現

薬物代謝酵素の第一相から、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5 の各遺伝子を、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。今回は、獨協医科大学から供与された B 型、C 型肝炎ウイルス、梅毒、HIV 感染が見られない肝

の非腫瘍試料 (以下非感染肝と略す) 26 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 (以下、HCV 肝と略す) 55 検体を分析に用いた。今回、55 検体について、繊維化のステージの判定結果の整理が完了したため、ステージと各種 mRNA レベルとの相関を調べた。

### B-3) ヒト CYP3A4 発現細胞による代謝能評価系

Ad CYP3A4 細胞による代謝能評価試験 : Ad CYP3A4 細胞と CYP3A4 を発現していないコントロール HepG2 (Ad control) 細胞は、東北大学大学院薬学研究科・薬物動態研究室 (山添 康 教授ら) から提供された。細胞は、凍結下、万国郵便条約の通常郵便に関する施行規則等に基づき搬送された。詳細は、倫理面への配慮の項を参照されたい。また、凍結ヒト肝細胞 (米国 XenoTech 社製品 H1000、H15、Lot No. 580) は、日本農産工業 (株) から購入した。

Ad CYP3A4、Ad control 細胞およびヒト肝細胞を 48-well plate に well あたり  $0.8 \times 10^5$  cells を播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>-Air 下にて 30 分間プレインキュベートした後、阻害剤であるケトコナゾール (終濃度 : 0.003- 3  $\mu$ M) を添加した。その 15 分後に、CYP3A4 の基質であるミダゾラム (MZD) (終濃度 : 5  $\mu$ M) を加え、60 分間インキュベートして、培地上清中 1' -水酸化ミダゾラム (1' -OH MDZ) を LC/MS あるいは LC/MS/MS にて測定した。

### B-4) HepaRG 細胞および MD へパ細胞による CYP 誘導能の評価試験

Hepa RG 細胞 : HepaRG 細胞 (24-well plate 接着型、Lot. HPR301013 ; 13- passage、viability; 96%) は、株式会社ケー・エー・シー経由にて Biopredic International 社 (フランス) から購入した。受領後、37°C、5%CO<sub>2</sub>-Air 下、24 時間培養後、CYP1A2 誘導剤 (オメプラゾール (OMP) : 0-100  $\mu$ M、 $\beta$ -ナフトフラボン (BNF) : 0-10  $\mu$ M) および CYP3A4 誘導剤 (フェノバルビタール (PB) : 0-1000  $\mu$ M、リファンピシン (RIF) : 0-30  $\mu$ M) 含有培地を 24 時間毎に交換して、誘導剤を 72 時間暴露した。CYP1A2 活性の指標として、フェナセチン (終濃度 : 40  $\mu$ M、反応時間 : 120 分) の O-脱エチル化体を、CYP3A4 活性の指標として、MDZ (終濃度 : 5  $\mu$ M、反応時間 : 60 分) の 1' -OH 体を LC/MS/MS にて測定した。

MD へパ細胞 : MD へパ細胞は、(株) エフエクター細胞研究所で調製されたものを用いた。細胞は施設に搬入後 96 穴プレートに 1 well あたり  $2 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$  の密度で播種した。実験系の妥当性を保証するため、ヒト凍結肝細胞あるいは

ヒト肝ミクロソームを陽性対照として用いた。活性の測定と誘導剤の暴露は、HepaRG細胞を用いた実験に準じた。

#### B-5) ヒト肝細胞の三次元培養と遺伝子解析

**三次元培養:** ATCCより購入したHepG2細胞をエイブル社製ラジアルフローバイオリアクター(5ml容)にて、ペンタックス社製ハイドロキシアパタイト、又はPVAを担体として三次元高密度培養した。一定期間三次元培養したHepG2細胞よりtotal RNAを回収し、常法に従いラベル後Affymetrix社Human Genome U133A GeneChipにて遺伝子発現を網羅的に解析した。

**HepaRG細胞:** フランスINSERM U522、C. Guguen-Guillouzoらにより樹立されたHepaRG細胞を入手し、10% FCS、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、5 µg/ml insulin、5 X 10<sup>-7</sup> M hydrocortisone hemisuccinate 含有William's E培地で培養した。継代は2週間ごとに行い、細胞播種後2週間目からは上記培地に2%のDMSOを添加し、hepatocyte様細胞への分化を誘導した。CYP3A4の誘導は、hepatocyte様細胞に分化した細胞をトリプシン処理し、2倍の密度で播種後、上記培地(DMSOは含まない)にRIF(終濃度: 20 µM)を添加し、72時間培養することで行った。

#### B-6) ヒト型酵素誘導モデルの作成と応用

CYP3A4誘導に必要なとされているプロモーター領域および、約7k上流のエンハンサー領域を含むレポーターコンストラクトCYP3A4-362-7.7kをヒト肝臓ガン由来培養細胞株HepG2細胞に、トランスフェクトした。得られた複数の細胞株について誘導評価系としての有効性について種々の検討を行った。また、mIE3A4が欠失されたpCYP3A4-362-7.7k-mIEを作成し、PXRが結合することが予測された各DNA配列は、プライマーを用いてXhoIサイトを導入した改変により作成した。HepG2細胞へのトランスフェクションは、リン酸カルシウム法によった。レポーター活性は、Lusiferase assay systemにより測定した。

#### B-7) 中国ヒト組織提供機関からのヒト組織入手について

Research Institute for Liver Diseases (Shanghai) Co. LTD (RILD社)から、中国人由来組織の日本への提供が可能であるとの情報を得たが、その法的・倫理的妥当性について確認する必要がある。そこで、中国および上海において要職にある研究者、行政官、マスコミ関係者に情報提供を求めてきた。そこで明らかになった疑問点

について、RILD社に問い合わせた。また、平成16年に2回にわたり上海で実地調査を行った。特に、2回目の調査では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、共に調査を行った。今年度はこれらの調査に基づき、国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会に購入の可否についての判断を求めた。

#### (倫理面への配慮)

本研究を行うにあたり、国立医薬品食品衛生研究所、獨協医科大学外科および薬理学、虎ノ門病院分院では、それぞれの研究倫理委員会において本研究計画の倫理的妥当性に関して承認を受けた。また、検体の採取にあたり、提供者すべてから書面にて同意を得ている。さらに、供与された試料は、提供者個人が特定出来ないよう、採取施設および国立医薬品食品衛生研究所にて二重に匿名化を行っており、提供者の人権を侵害する危惧はない。提供試料は本研究の目的にのみ使用した。海外から入手した凍結ヒト肝細胞は、正式なルールに基づいて移殖不適合臓器の研究利用肝から調製されたものであり、提供者の人権を損害する危惧はない。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。

また、本研究におけるCYP発現細胞(Ad CYP3A4およびAd Control)は、アデノウイルス感染HepG2であることから、試験の開始にあたり、各施設の『遺伝子組換え実験安全委員会』および『病原体等安全管理委員会』の承認を得た後に細胞を入手し、実験はP2施設において実施した。なお、Ad CYP3A4およびAd Control細胞の授受は、万国郵便条約の通常郵便に関する施行規則第413条“伝染性の材料を包有する郵便物の引受条件及び表示”、また、各施設における病原体等安全管理規程(国立衛研の場合; 国立医薬品食品衛生研究所病原体等安全管理規程第15条第3項の規定(病原体等(レベル2)の移動; 受入))に従った。搬送には、タイベック社製の感染性物質輸送用コンテナシステムSaF-T-PAK(STP-320; カテゴリーB用、家田貿易(株))を用いた。

## C. 研究結果

### C-1) 喘息治療の個別化に関する研究

THP-1細胞ではLTC4合成酵素とGAPDHのmRNAレベルの比が0.2と構成的にLTC4合成酵素mRNAが豊富に発現していた。Th2サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-13(各10 ng/ml)で24時間刺激してもLTC4合成酵素のmRNAレベルは変化しな

かった。Th3 サイトカインである TGF- $\beta$  刺激では mRNA レベルが 0.3 ng/ml から用量依存性に増加し、10 ng/ml で 3 倍に増加した。この増加作用は 24 時間で最大となり、72 時間まで持続した。一方、Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  では 10 U/ml から mRNA レベルが減少し、300 U/ml で 0.3 倍に減少した。IFN- $\gamma$  の抑制効果は 24 時間で最大となり、72 時間まで持続した。さらに IFN- $\gamma$  (200 U/ml) は TGF- $\beta$  (10 ng/ml) による増加を強く抑制した。TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) も LTC4 合成酵素 mRNA レベルを減少させ、TGF- $\beta$  による増強を抑制した。TGF- $\beta$  の細胞内情報伝達抑制因子 smad7 の mRNA レベルは TGF- $\beta$  刺激で上昇したが、IFN- $\gamma$  では変化しなかった。

#### C-2) C 型肝炎患者における薬物動態関連遺伝子の発現

今期は獨協医科大学より、日本人の HIV や HCV 等に非感染の肝 14 例が国立医薬品食品衛生研究所に供与された。そのうち男性、女性とも各 7 例であり、病因は、大腸ガンおよび S 字状結腸ガンの肝転移が 7 例、胆管ガン 5 例、肝腫瘍 1 例、限局性結節性肝外区域除去 1 例であった。虎ノ門病院からは、HCV 肝 49 例 (39-60 才) が供与され、うち男性は 26 例、女性は 23 例であった。

今までに獨協医科大学より RNA および細胞画分調製のために供与された非感染肝は、29 例で、男性 18 例、女性 11 例 (35-82 才) であった。病因は、胆管ガン 12 例、大腸ガンおよび S 字状結腸ガンの肝転移が 10 例、肝腫瘍 3 例、胆嚢ガン 2 例、限局性結節性肝外区域除去 1 例、肝内結石 1 例であった。今回は、そのうちの 26 例について検討した。虎ノ門病院からは、HCV 肝 55 例 (39-60 才) が供与され、うち男性は 29 例、女性は 26 例であった。繊維化のステージ 1 の試料 28 例 (男性 14 例、女性 14 例)、ステージ 2 の試料 11 例 (男性 5 例、女性 6 例)、ステージ 3 の試料 16 例 (男性 10 例、女性 6 例) であった。

#### 慢性 C 型肝炎患者の薬物動態関連遺伝子発現レベル

今までに集積した HCV 感染肝と非感染肝について、種々の薬物動態関連遺伝子の発現レベルを比較した。その結果、HCV 肝における CYP3A4 mRNA レベルは、非感染肝に比べ有意に低下していた。また、CYP2B6 についても、HCV 肝では、非感染に比べ、CYP2B6 mRNA の発現レベルが統計的有意差をもって低下していた。これは昨年までの結果と同様であった。また、CYP2B6 や CYP3A4 の発現調節には PXR や CAR が関わり、共通の部分が多いと考えられる。今回の結果では、HCV 肝、非感染肝共に CYP2B6 と CYP3A4 両者の mRNA レベルに相

関があることが新たに判明した。HCV 肝、非感染肝を通じて両遺伝子には共通の発現調節機構が関わるのが強く示唆された。また、慢性 C 型肝炎患者の肝繊維化のステージが進むにつれ、CYP1A2 や CYP2E1 の発現が有意に低下することが今年度新たに明確になった。

遊離ヒト肝細胞の調製・凍結・培養：今年度、獨協医科大学より、遊離肝細胞調製のため供与された新鮮肝の病巣除去組織は 1 例のみであった。本試料 (2.5g) は、薄片状を呈し、切断面は 2 面のみであったが、血管が表裏を貫通していたこと、また、組織も硬く灌流は不可能であった。そのため、本提供組織からの遊離ヒト肝細胞の調製を断念したことから、遊離ヒト肝細胞利用に関する検討は実施できなかった。

#### C-3) ヒト CYP3A4 発現細胞による代謝能評価系

本バリデーションは、5 施設において、ほぼ同時期に、共通プロトコール、同一ロットの Ad CYP3A4 細胞、Ad control および凍結ヒト肝細胞を用いて、ケトコナゾールによる CYP3A4 活性の阻害実験を行った。参加施設における Ad CYP3A4、Ad control およびヒト肝細胞の解凍後の平均生存率は、いずれの細胞でも 81% 以上を示し良好であった。基質に MDZ を用いたときの平均 CYP3A4 活性は、ヒト肝細胞で  $1126.5 \pm 557.4$  (491-1886) pmol/h/ $10^6$  cells、Ad CYP3A4 細胞で  $63.5 \pm 40.5$  (32.8-130) pmol/h/ $10^6$  cells、Ad control 細胞で  $2.7 \pm 3.5$  pmol/h/ $10^6$  cells であり、Ad CYP3A4 細胞の活性はヒト肝細胞に比べ約 1/20 であったが、Ad control 細胞に比べ明らかに高く、ヒト CYP3A4 遺伝子の発現を裏付けるものであった。また、CYP3A4 活性には施設間差が認められたが、ケトコナゾールの阻害効果はヒト肝細胞および Ad CYP3A4 細胞で認められ、どちらも同様の阻害プロファイルを示した。それぞれの IC<sub>50</sub> 値は、0.067 および 0.046  $\mu$ M であった。阻害効果の施設間差は小さかった。

#### C-4) HepaRG 細胞および MD ヘパ細胞による CYP 誘導能の評価試験

HepaRG 細胞による CYP 活性誘導能評価：HepaRG 細胞による CYP 活性誘導試験のバリデーションは、8 施設において実施した。OMP の誘導実験では、指標となるフェナセチン O-脱エチル化活性は、濃度依存的に上昇し、高濃度では 210-455 pmol/hr/well (中央値) に達し、30  $\mu$ M で誘導倍率 (中央値) は 23 倍であった。また、BNF の誘導実験ではフェナセチン O-脱エチル化活性は、濃度依的に上昇し、10  $\mu$ M では 207 pmol/hr/well (中央値)

に達し、同濃度における誘導倍率(中央値)は10.8倍であった。一方、PBの誘導実験では、指標となるMDZ 1'-OH活性は、低濃度領域では、濃度依存的に上昇し、750、1000  $\mu\text{M}$  では頭打ちになり、272-302 pmol/hr/well(中央値)であった。また高濃度領域(750、1000  $\mu\text{M}$ )における誘導倍率(中央値)は23倍程度であった。また、RIFの誘導実験ではMDZ 1'-OH活性は、測定濃度範囲において、明確な濃度依存性が見られず、1942-2671 pmol/hr/well程度、誘導倍率はそれぞれ12-18倍であった。

MDヘパ細胞によるCYP活性誘導評価: MDヘパ細胞において、MDZの代謝物が微量に確認されたものの、7-エトキシマリン、プロプラノロールを基質とした時、顕著な基質の減少は見られず、薬物代謝酵素活性は低かった。また、OMPとRIFによる誘導能はいずれの場合も明確な誘導活性は見られなかった。

C-5) 樹立ヒト肝細胞三次元培養法による薬物代謝酵素誘導能

三次元培養: 培養担体には従来より用いているハイドロキシアパタイトビーズとPVAを用い、HepG2の増殖能、RIFによるCYP3A4の発現誘導におよぼす単体の影響について比較検討した。HepG2においては、両担体間で、播種後初期の増殖速度や最終到達細胞密度に大きな差異はなかった。しかしながら、CYP3A4の誘導を比較すると、ハイドロキシアパタイトでは平均約10倍(n=2)の誘導が認められたのに対し、PVAでは平均2.5倍強(n=2)の誘導しか認められなかった。同じHepG2細胞を通常の培養dishにて培養し、同様にRIFに暴露した際のCYP3A4の誘導は2.3倍程度であった。

三次元培養における網羅的遺伝子発現解析: HepG2をラジアルフローバイオリアクターにて培養し、増殖期にある細胞及び定常期にある細胞からtotal RNAを回収し、Affymetrix社human genome U133A GeneChipにより遺伝子の発現を網羅的に解析した。その結果、細胞が増殖期から定常期に移行すると、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現が統計的に有意に上昇していた。そこで、回収した培養上清を用い、培養液中へ分泌されるVEGF量をELISA法で測定すると、網羅的発現解析と同様にVEGF量の増加が認められた。また、回収した培養上清でHUVEC細胞を培養すると、血管の新生が認められ、定常期のHepG2細胞から活性を有するVEGFが分泌されていることが確認された。

HepaRG細胞: HepaRG細胞の播種後の形態は、 $2 \times 10^6$  cell/75cm<sup>2</sup>で播種した翌日では、細胞は繊維芽細胞様の形態を示すが、2日毎に培地交換をし

ながら2週間培養すると細胞密度の上昇に伴い、形態が変化し、敷石状を示すようになる。この状態で2%のDMSOを添加した培地で更に2週間培養を続けると、hepatocyte様の細胞が細胞集団の半数以上を占めるようになる。この細胞をトリプシン処理により培養フラスコより回収し、2倍の密度で播種しなおしたものを以下の実験に用いた。播種後DMSOを含まない培地で1日培養し、その後、20  $\mu\text{M}$ のRIFに3日間暴露した後、CYP3A4の発現を測定した。コントロールとしては、vehicleとしたDMSOのみを等量(0.1%)培地に添加し培養した細胞より回収したtotal RNAを用いた。内部標準遺伝子として $\beta$ -actin及びGAPDHの発現量を併せて測定し、その発現量でCYP3A4の発現量を補正した後の相対的発現量は、いずれの内部標準遺伝子で補正した場合でも、mRNAレベルで30倍以上のCYP3A4の誘導が認められた。

C-6) ヒト型酵素誘導モデルの作成と応用

RIFおよびクロトリマゾール(CTZ)によるmIE3A4のDRを介した転写活性化の比較検討:  $\alpha$ ハーフサイトに変異を導入したpCYP3A4-362-7.7k  $\alpha$ および $\beta$ ハーフサイトに変異を導入したpCYP3A4-362-7.7k  $\beta$ において、RIF添加によるレポーター活性値は、正常なコンストラクトに比べ著しく減少した(それぞれ1.7倍、2.2倍)。また、 $\gamma$ ハーフサイトに変異を導入したコンストラクトにおいて、RIF添加によるレポーター活性値は若干減少した。一方、 $\alpha$ または $\beta$ ハーフサイトに変異を導入したコンストラクトでは、CTZに対する応答は減少するものの、有意な転写活性化が認められた(それぞれ1.8倍、1.5倍)。さらに、 $\gamma$ ハーフサイトに変異を導入したコンストラクトにおいても、CTZ添加に対する応答が減少した。種々の誘導物質によるCYP3A4遺伝子の転写活性化に関する解析: 本実験では、誘導物質としてRIFとCTZのほか、PXRのリガンドと考えられているPB、コルチコステロン、ニフェジピン、及び我々がCYP3A4転写活性化を引き起こすことが明らかにした農薬のDithiopyr、EPN、Isoxathionを用いた。まず、HepG2細胞を用いたレポーターアッセイ系にて、各種誘導物質の添加によるレポーター活性の変動を調べた。ここで用いたコンストラクトはプロモーター領域のみを含むpCYP3A4-362とエンハンサーおよびプロモーター領域を含むpCYP3A4-362-7.7kである。

pCYP3A4-362を用いて検討した結果、CTZとIsoxathionでレポーター活性の上昇が認められた(2.7倍、3.6倍)。これに対しRIFや他の誘導物質ではほとんど応答が認められなかった。次に、

エンハンサー領域を介した応答を比較検討するため pCYP3A4-362-7.7k を用いて実験を行った。RIF、CTZ、Isoxathion 添加により著しいレポーター活性の上昇が認められた (19 倍、7 倍、15 倍)。また、コルチコステロン、ニフェジピン、Dithiopyr、EPN 添加によっても活性の上昇が認められたが (4.6 倍、2.6 倍、3 倍、4.9 倍)、PB 添加では大きな変動が認められなかった (2 倍)。

各シスエレメントを介した CYP3A4 遺伝子の転写活性化に関する解析： CYP3A4 遺伝子の転写活性化に強く関わるシスエレメントである dNR-1、ER-6、mIE3A4 が各誘導物質による応答にどのように関わっているかについて検討した。

pCYP3A4-362-7.7k に対し dNR-1 に変異を施した pCYP3A4-362-7.7km において、今回用いた全ての誘導物質に対する応答は大幅に減少した。一方、ER-6 に変異を施した pCYP3A4-362m-7.7k では、RIF 添加による応答が減少し、CTZ、コルチコステロンでは減少傾向が認められた。しかし、ニフェジピン、Dithiopyr、EPN および Isoxathion 添加による応答は減少しておらず、pCYP3A4-362-7.7k と同等の転写活性が残存していた。

次に mIE3A4 の領域を欠失させた pCYP3A4-362-7.7k DmIE を用いて同様の実験を行った。RIF、PB、コルチコステロン、ニフェジピンおよび dithiopyr 添加による応答は消失した。それに対し CTZ、EPN、isoxathion 添加による応答は減少するが、有意な転写活性化が認められ、特に CTZ と isoxathion において高い転写活性化が認められた。よって、mIE3A4 を介した転写活性化の挙動の違いから、今回用いた誘導物質を RIF 型と CTZ 型の 2 つに分類することができると考えられた。なお、mIE3A4 の機能解析より、RIF と CTZ による転写活性化機構の違いは、mIE3A4 の  $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$  ハーフサイトに起因することが明らかとなった。

そこで、 $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$  の各ハーフサイトに変異を導入したコンストラクトを用いて、各誘導物質による転写活性化の比較検討を行った。

RIF、PB、コルチコステロンおよびニフェジピンでは  $\alpha$  または  $\beta$  ハーフサイトに変異を導入することにより、応答の消失が認められるが、 $\gamma$  ハーフサイトに変異を導入することによる応答への影響は認められなかった (20 倍、2.1 倍、3.4 倍、2.3 倍)。一方、CTZ では  $\alpha$ 、 $\beta$  または  $\gamma$  ハーフサイトに変異を導入することにより、応答が減少したが (3 倍、3.3 倍、3.8 倍)、いずれの変異コンストラクトにおいても有意な転写活性化が認められた。Isoxathion でも同様に  $\alpha$ 、 $\beta$  または  $\gamma$  ハーフサイトに変異を導入することにより、応答が減少したが (4.5 倍、4.5 倍、9 倍)、いずれの変異コンス

トラクトにおいても転写活性が残存しており、特に  $\gamma$  ハーフサイトの変異コンストラクトで高い転写活性が認められた。また、EPN および Dithiopyr による応答は全体的に低い、Isoxathion と類似した転写活性化の挙動を示していた。(EPN は 1.7 倍、1.8 倍、5.2 倍、Dithiopyr は 1.4 倍、1.3 倍、2 倍)

C-7) 中国ヒト組織提供機関からのヒト組織入手について (本項は、考察を交えて報告する。)

1) 中国人の組織を研究利用することについての倫理委員会での審議結果

中国上海におけるヒト組織供給機関 (RILD 社) の調査結果については昨年までの報告書に記載した。これらにの結果に基づき倫理委員会で審議を受けるために、再度検討した。また、最新情報に基づく考察を行った。

1-1) 法的妥当性： RILD 社において中国人ヒト組織を研究利用することの法的妥当性については、今までの報告に述べたように、RILD 社は上海市の定めた「上海市献体条例 (2001. 3. 1)」により設定された医療および医学研究のためのヒト組織提供ネットワークに基づき、心臓死者から提供された組織を用いており、入手・利用の手続き等についても問題は無いと思われた。また、上記の条例は日本の遺伝子操作を伴わないヒト組織の研究利用に関する基準と照らしても問題があるとは思われなかった。これらは、ドナーからの摘出段階を除き、2 回における実地調査で確認した。また、中国中央政府レベルでの規制に抵触するところはなく、法的に妥当と思われた。因みに、ヒト組織を用いた科学研究を行うことを目的に設立された RILD 社自身、政府の設立したベンチャービジネスのためのインキュベーター (張江 Hitech Park) 内に設置されており、中央政府からの委託によるヒト組織を用いた研究も行っていることを、我々の第一回目の訪問調査の時に確認しており、中国の中央政府および上海政府は RILD 社の行っているヒト組織を用いた研究の合法性について疑問は持っていないと考えられる。

なお、肝臓は死後の生物学的活性の低下が早いことから、一般に脳死状態或いは生体肝から摘出した肝臓が移植に用いられている。また、手術時に摘出した臓器の非疾患部分が肝細胞調製に用いられている。一方、中国では何例かの脳死移植の実施例が報道されてはいるが、法的には認められていない。第二回目の訪問調査の時に同行した国立生育医療センターの絵野沢博士は心臓死のものからの移植としては、移植成績が良いとの指摘をしていた。脳死者から摘出しているとなると、脳

死移植法の存在しない中国では違法行為となるが、そのような事実は移植病院訪問時には認識されなかった。成績が良い理由としては、心臓死から摘出までの時間が死亡確認のために必要な時間が経過した直後に摘出することによると回答された。

1-2) 倫理的妥当性： 中国人のヒト組織を研究利用することの倫理的妥当性については、前記上海市条例に基づいて、日本の基準から見ても妥当と思われる手続きに基づいて、志願者から提供されている。志願者が記入する informed consent の様式も医療および研究のために用いるに十分な内容であり、問題は無いと思われた。また、その記録も実地調査時に確認した。しかし、第二回目の訪問調査時に中国では死刑囚から摘出した臓器を移植に用いているとの情報が科学技術文明研究所の張博士により指摘されていた。その後、平成 17 年 11 月に中国衛生部の黄潔夫次官がマニラで開かれた国際会議で、中国国内で実施している臓器移植に用いられている臓器の大多数(95%以上)が死刑囚から提供されていることを認めた(毎日新聞 2005 年 12 月 9 日)。黄次官は本人および家族から同意を得ており、倫理的問題は無いとしているが、わが国及び欧米諸国では許容されていないことである。上海市では多数の臓器提供者の名前を刻印した顕彰碑もあり、上海市で行われている臓器移植と研究のための臓器が死刑囚から得られたものであるとは思われなかったが、95%以上が死刑囚からであるとの黄次官の発言は上海市でもそのようなことが行われている可能性を強く示唆していることから、より慎重な対応が必要と思われた。

1-3) 日本で利用することの法的妥当性： ヒト組織を外国へ供給することについては、平成 16 年度報告で述べたように 1998 年に中国の衛生部及び科学技術部により通知された「ヒト遺伝子資源管理暫定法 (Interim Measures for the Administration of Human Genetic Resources, Promulgated by the General Office of the State Council upon the approval of the State Council on June 10, 1998)」により、中国ヒト遺伝子資源室による出境証明許可を得なければならないとされている。また、2003 年に中国の衛生部、国家質検総局の「医療用特殊物品出入国管理と衛生検査の強化に関する通知 (衛科教発(2003)230 号)」では、家系や特定地区、及びヒト遺伝子資源に関わらない少標本(100 人分以下、100 人を含む)の医療用特殊物品の出国の場合は省レベルの地方政府により許可できるとされている。一方、RILD 社は 1998 年の規制を作成した経緯から、疾患と関連した遺伝子資源を許可無く中国国外へ移動するこ

とを禁じたものであり、疾患と関連の無い肝組織の提供は問題無いと考えている。また、RILD 社のヒト肝細胞の日本への輸出について上海税関及び上海政府の輸出許可が発行されていた。また、調査に同行した上海政府担当官の言動からも、日本への輸出に特に問題は無いとも思われた。しかし、行政法規の内容と実際の運用とが混然としており、慎重な対応が必要と思われた。

1-4) 中国人の組織を日本で研究利用することの倫理的妥当性： 中国人のヒト組織を外国へ供給することの倫理的妥当性については、上海において臓器提供の事務を担当している上海市紅十字会の作成した「上海市遺体献体 申請登記表」には「私は自己の意志により無条件で私の遺体を医学科学事業のために提供します。祖国の医学教育と疾病対策レベルの向上のための私の最後の貢献です。」と書かれており、提供者は外国に自己の臓器を提供する事を許可していないとも読める。これに対して、提供された試料が世界の医学研究に用いられ、世界の医学が進歩することにより、結果として中国の人々にも貢献することになるとの説明であった。一方、平成 16 年の調査に同行した張博士からは貧しい国から臓器を入手することの倫理的問題を指摘された。これは臓器売買につながることを危惧したものである。

1-5) 中国人の組織を日本で利用することの社会的な問題点： 日本に対する中国の特殊な感情を考えると慎重に行うべきと考えた。そこで、中国への 2 回にわたる訪問調査時に積極的に新聞記者のインタビューを受け、ヒト組織の研究利用の重要性と中国人臓器の日本での利用への期待を述べた。2 社の記者は好意的であったが、インタビューの結果がどのように報道され、どのような反響があったかについての情報を得ていない。また、記者への問い合わせに対して文書での返事を得ていない。その他、知人や学術・行政関係者にも問い合わせたが、返事を得ることはできなかった。

## 2) 国立衛研の倫理委員会での対応

平成 17 年 3 までに得られた情報を元に、RILD 社からのヒト組織を購入し、研究に利用することについての判断を仰ぐため、倫理委員会に倫理審査申請を行った。倫理委員会では 3 度の審議を経て、倫理委員会で取り扱う内容ではないとの結論を出した。これを受け、また、申請後の情報を含めて我々は RILD 社からヒト組織を購入することの可否を検討し、現時点では中央政府による許可が出ていないこと、また、ヒト組織提供者が死刑囚で有ることを否定できないことから、購入することを断念した。

## D. 考察

### D-1) 喘息治療の個別化に関する研究

アレルギー性喘息は、ヘルパーT細胞がTh2タイプのサイトカインを過剰産生することを特徴とする病態と考えられている。一方、Th1サイトカイン投与によりTh2サイトカインの作用を抑制し、Th1/Th2サイトカインのアンバランスを是正して喘息を寛解する可能性について様々な報告がある。Th1サイトカインIFN- $\gamma$ はTHP-1細胞に構成的に発現しているLTC4合成酵素のmRNAレベルを抑制した。さらにTNF- $\alpha$ によってもmRNAレベルが減少した。このようにTh1サイトカインはLTC4合成酵素 mRNA 発現に抑制的に作用する可能性が示唆された。

TGF- $\beta$ は多機能な調節因子であり、免疫反応や炎症反応の正あるいは負の制御因子として様々な病態に関与し、呼吸器疾患では気管支喘息の不可逆的な機能変化や重症化の原因となる気道リモデリングや、肺の線維化のため機能不全を来す肺線維症などに関与することが報告されている。気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液中にはTGF- $\beta$ やcysLTsが認められることが報告されている。THP-1細胞においてTGF- $\beta$ はLTC4合成酵素のmRNAレベルを増加した。さらにこの増強はIFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ で抑制された。IFN- $\gamma$ によるTGF- $\beta$ の作用抑制には、細胞内抑制性因子であるsmad7の誘導が報告されている。しかし本研究においてはIFN- $\gamma$ によるsmad7 mRNAの誘導作用は認められなかった。IFN- $\gamma$ とTGF- $\beta$ の相互作用は個々の細胞の機序を解析する必要があると思われる。

近年、気管支喘息ではcysLTsが気道のリモデリングに関与することが知られるようになってきている。マウスの喘息モデルではcysLT1受容体拮抗薬が抗原刺激による気道リモデリングを減弱する。さらに5-リポキシゲナーゼやcysLT2受容体の欠損マウスでは、プレオマイシンによる肺線維症様の症状が著明に軽減することも報告されている。これらのことからTGF- $\beta$ によるLTC4産生増強は炎症組織のリモデリングに寄与し、IFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ はその制御機構として働いている可能性が推察される。

### D-2) C型肝炎患者における薬物動態関連遺伝子の発現

昨年度までの研究ではCYP2B6など、疾病群で発現低下傾向が見られたが、非癌部組織のサンプル数は未だ30に満たなかったため、信頼性の高い結果を得るため、更に50位まで、検体数を増やす必要があった。CYP2B6は、核内受容体Constitutive Androstane Receptor (CAR)、ならびにPregnane X

Receptor (PXR)による発現調節を受けることが知られている。CYP3A4もCARやPXRによる発現調節を受ける遺伝子であり、今回、HCV肝、非感染肝を通じて両遺伝子のmRNAレベルに相関が認められたことは妥当であると考えられた。今年度慢性C型肝炎の検体数は55に達したので、確定した臨床情報であるC型肝炎の繊維化のステージと各種mRNAレベルとの相関を調べたところ、CYP2E1やCYP1A2は繊維化のステージが上がるとともに発現レベルが統計的有意差をもって低下することが明らかとなった。今後GOT、GPT等の臨床検査値の情報の確認を完了した後、これら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。CARと慢性C型肝炎という病態には関連があるとも考えられ、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。

遊離肝細胞調製用に提供された組織は、今年度1例と少なく、また、組織片の状態が遊離肝細胞調製には不適であった。創薬研究にヒト組織利用は必須であることから、現在検討されている臓器移植法改正に際しては、移植不適合臓器の研究利用が望まれる。

### D-3) ヒトCYP3A4発現細胞による代謝能評価系

MDZを基質に用いAd CYP3A4細胞におけるCYP3A4の酵素活性を評価した。各施設におけるAd CYP3A4細胞のCYP3A4活性は、ヒト肝細胞の約1/20(1/9-1/30)とその活性レベルは低かった。その要因の一つとして、搬送のために行った凍結保存による影響が考えられる。また、東北大学ではHepG2細胞へのアデノウィルス感染時間の延長によりCYP3A4遺伝子の高発現を確認しており、今後、CYP3A4遺伝子導入等の最適化により、CYP3A4の高発現が期待される。また、Ad CYP3A4細胞におけるCYP3A4活性の、ケトコナゾールによる阻害プロファイルおよびIC<sub>50</sub>値はヒト凍結肝細胞と同様であり、施設間差も小さかったことから、Ad CYP3A4細胞はヒト凍結肝細胞を用いたCYP3A4活性阻害試験の代替試験系として極めて有望であることが示された。さらに、CYP分子種との共発現、特定分子種を欠損させたヒトPM、EM実験モデルなど、今後、遺伝子多型を顧慮したヒト肝細胞の有用な代替試験系としても期待される。

### D-4) HepaRG細胞およびMDヘパ細胞によるCYP誘導能の評価試験

HepaRG細胞によるCYP活性誘導能評価：OMP、BNFのCYP1A2の誘導およびPB、RIFのCYP3A4の

誘導に関して HepaRG 細胞を用いて検討した。その結果、いずれの場合も明らかな誘導が観察され、臨床結果と定性的によく一致していた。この結果は、本 HepaRG 細胞系が、医薬品開発の初期段階における誘導評価系として適用できる有用性を示すものである。今後は、細胞のロット間差および RIF による CYP3A4 誘導倍率の濃度依存性についての詳細な検討が必要と考えられた。

**MD ヘパ細胞による CYP 活性誘導能評価:** MD ヘパ細胞では、明確な代謝活性および誘導能が観察されなかったことから、MD ヘパ細胞を薬物動態試験に用いるためには、さらに培養方法の改善などの検討が必要と思われる。

#### D-5) 樹立ヒト肝細胞を用いた三次元培養法による薬物代謝酵素誘導能

HepG2 を三次元高密度培養の環境下に置くと、細胞機能に変化が起きることが示された。細胞増殖は増殖期を経て定常期にいたるが、増殖期では肝機能のひとつと考えられる CYP3A4 の誘導能が認められる一方、定常期では VEGF が産生されていた。これは細胞機能が細胞増殖の状態に応じて二相性に変化することを示唆している。しかしながら、遺伝子発現パターンの比較は、三次元高密度培養でも正常肝臓の細胞機能とは隔たりがあることを示唆している。細胞の増殖状態に応じて、その他の肝機能がどの程度回復されているかが重要と考え、担体の違いによる細胞機能の差異の検討、及び、より肝実質細胞に近いと考えられる HepaRG 細胞の初期検討を行った。今回は従来用いていたハイドロキシアパタイトと PVA の比較を行ったが、細胞増殖速度や最高到達細胞密度では大きな差異がないにもかかわらず、CYP3A4 の誘導では顕著な差異が認められた。通常の培養 dish による培養での誘導倍率が 2.3 倍程度であることを考えると、PVA で三次元培養を行った際は HepG2 の CYP3A4 の誘導能の向上はほとんど認められなかったことになる。ハイドロキシアパタイトで見られた著しい改善(誘導倍率 10 倍前後)と比較して、際立った差異があり、今後培養担体と他の培養細胞株との組み合わせの検討が重要であることを示唆している。そのため、平行して、フランス INSERM より hepatocyte 前駆細胞様培養細胞株と位置づけられる HepaRG 細胞を導入し、培養条件の確立を行った。その結果、30 倍以上の CYP3A4 遺伝子の誘導倍率が認められ、hepatocyte 様細胞への分化誘導系を導入することができた。

#### D-6) ヒト型酵素誘導モデルの作成と応用

本研究において、mIE3A4 に注目し、RIF と CTZ

による転写活性化の比較検討を行った。mIE3A4 には、核内受容体等の転写因子が結合すると予想される DR モチーフが認められ、DR モチーフを形成するハーフサイトとして TGAAGT や TGTCTC に類似した DNA 配列が複数存在している。これらのハーフサイトの中でも  $\alpha$  または  $\beta$  ハーフサイトのどちらかに変異を導入することにより、RIF 添加に対する応答が消失した。それに対し、CTZ 添加に対する応答が消失することはなく、有意な転写活性化が認められた。この結果より、RIF と CTZ による転写活性化機構の違いは、 $\alpha$  および  $\beta$  ハーフサイトによって形成される DR-4 モチーフに結合している転写因子の違いに起因すると予想された。しかし、CTZ による転写活性化には  $\alpha$  および  $\beta$  ハーフサイトに加えて  $\gamma$  ハーフサイトが重要であることが初めて明らかとなった。そのため、RIF と CTZ による転写活性化機構の違いが、DR-4 モチーフを形成する  $\alpha$  および  $\beta$  ハーフサイトだけではなく、 $\gamma$  ハーフサイトを含む領域に結合している転写因子に起因すると考えられた。

様々な誘導物質による CYP3A4 遺伝子の転写活性化機構の解析を行い、その機構の違いより各誘導物質を RIF 型と CTZ 型に分類することを試みた。その結果、RIF 型に分類される誘導物質としてコルチコステロン、ニフェジピンおよび Dithiopyr が挙げられ、CTZ 型に分類される誘導物質として isoxathion が見いだされた。今後は、mIE3A4 に対しトランスアクチベーターとして機能する転写因子の同定および機能解析も行う必要があると思われる。

#### E. 結論

単球様白血病細胞 THP-1 細胞では、TGF- $\beta$  が LTC4 合成酵素発現を増強し、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  がその制御機構として重要な役割を果たしていた。また、日本人の非感染肝の病巣除去試料および C 型慢性肝炎患者から集積した肝生検試料 55 検体を用い、薬物代謝酵素や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、疾病群において CYP2B6 の発現低下傾向が見られることを確認した。また、慢性 C 型患者の肝繊維化のステージが進むにつれ、CYP1A2 や CYP2E1 の発現が有意に低下することが今年度新たに明確になった。今後さらに検体数を増やして解析を行い、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るとともに、C 型肝炎の病態と CAR との関連性についても解析することは重要な課題と考えられる。

ヒトにおける薬物代謝および誘導をシミュレー

トするための新技術について検討した。CYP3A4 発現細胞は、ケトコナゾールによる CYP3A4 活性阻害プロファイルから、*in vitro* 試験での有用性が示された。さらに、本 CYP 導入技術を活用することで、遺伝子多型モデルの作成が可能であることから、極めて有望なヒト肝細胞の代替評価系となり得ることが期待される。新規ヒト肝様細胞 HepaRG 細胞は、酵素誘導試験をはじめとする薬物動態試験に適用可能であることが確認された。

CYP3A4 誘導評価を迅速、そして高い再現性、かつ高感度で検出することが可能であり、しかも、異なった誘導様式を示すヒト肝由来の細胞株を樹立した。リファンピシンとクロトリマゾールのヒト CYP3A4 誘導様式の違いには、mIE3A4DNA 領域に存在するシス-エレメントの関与が明らかとなった。さらに、mIE3A4DNA 領域における CYP3A4 遺伝子転写活性化の違いから、化学物質はリファンピシン型誘導とクロトリマゾール型誘導を示すものに分類された。本培養細胞株を用いた CYP3A4 誘導応答測定は、操作が簡便で、高感度であることや、長期にわたってレポーター活性を維持する特性から、誘導評価のハイスループット系への適応が可能であることが示唆された。

HepG2 を三次元高密度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。しかしながら、用いる担体により、機能の改善に差異があることも今回の検討で明らかとなった。今後は、用いる細胞株と培養支持単体の組み合わせの検討をする必要があると考える。三次元高密度培養した HepG2 においても正常肝臓とは細胞機能の隔たりがあることを示唆する結果が得られている。より肝実質細胞に近い培養細胞を用いることで、より良い再構築系の確立が期待できると考え、フランス INSERM より肝実質細胞様に分化させることが可能な肝前駆細胞株 HepaRG を導入した。今後は、同細胞の三次元培養系への適応の検討が急務である。

中国ヒト組織提供機関 RILD 社からヒト肝臓を購入する件については、概ね倫理的、法的に妥当と考えたが、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こと、日本では認められていない死刑囚からの提供の可能性が否定できなかったことから、国立医薬品食品衛生研究所の研究グループでは購入しないこととした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kamikawa, Y., Takayama, N.: *In vitro* comparison of the intrinsic activity of functional antagonism between  $\beta$ -agonists and spasmogens in the guinea-pig tracheal muscle. *Allergology International*. **54**: 99-106, 2005.
- 2) Kojima, S., Ikeda, M., Kamikawa, Y.: Loperamide inhibits tachykinin NK3-receptor-triggered serotonin release without affecting NK2-receptor-triggered serotonin release from guinea pig colonic mucosa. *J Pharmacol Sci*. **98**: 175-180, 2005.
- 3) Iso Y, Sawada T, Okada T, Kubota K. Loss of E-cadherin and gain of osteopontin mRNA are useful markers for detecting early recurrence of HCV-related hepatocellular carcinoma. *J. Surgical Oncology* **92**:304-311, 2005.
- 4) Kubo, T., Kim, S.R., Sai, K., Saito, Y., Nakajima, T., Matsumoto, K., Saito, H., Shirao, K., Yamamoto, N., Minami, H., Ohtsu, A., Yoshida, T., Saijo, N., Ohno, Y., Ozawa, S. and Sawada, J.: Functional characterization of three naturally occurring single nucleotide polymorphisms in the CES2 gene encoding carboxylesterase 2 (hCE-2). *Drug Metab Dispos*. **33**:1482-1487, 2005.
- 5) 大野泰雄、酒見和枝、籾内桃子、ヒト組織の研究利用体制の構築と研究応用、4. 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. *臨床薬理*, **36**, 127-128, 2005.
- 6) 籾内桃子、酒見和枝、窪田敬一、北 順二、上川雄一郎、内田幸介、三浦慎一、繁原英治、藤岡弘之、大野泰雄：日本人由来の手術切除肝組織提供体制構築の試み. *国立医薬品食品衛生研究所報告*. **123**; 68-72, 2005.
- 7) Hongo, T., Kajikawa, M., Ishida, S., Ozawa, S., Y. Ohno, J. Sawada, Y. Ishikawa and H. Honda: Gene expression property of high density three-dimensional tissue of HepG2 formed in radial-flow bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.*, in press, 2006.
- 8) Noracharttiyapont, W., Nagai, Y., Matsubara, T., Miyata, M., Shimada, M., Nagata, K. and Yamazoe, Y.: Construction of several human-derived stable cell lines displaying distinct profiles of CYP3A4 induction. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2006. in press.

### 2. 学会発表

- 1) 堂前真理子、相良博典、福田健、上川雄一郎:ロイコトリエン C4 合成酵素発現に対する

- 炎症性サイトカインの影響. 第14回 Airway Club in Sendai 研究会、仙台、9月、2005.
- 2) 堂前真理子、相良博典、福田健、上川雄一郎：炎症性サイトカインによるロイコトリエンC4合成酵素の発現調節の検討. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会、盛岡、10月、2005.
  - 3) 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：分子マーカーによる肝細胞癌再発の Predicting value について. 第105回日本外科学会総会. 名古屋. 5月、2005.
  - 4) 磯幸博、澤田登起彦、岡田としえ、北順二、六角丘、加藤正人、根本猛彦、下田貢、窪田敬一：Ecard、OPNのmRNAによるHCV-HCC術後早期再発の予測に関する検討. 第64回日本癌学会. 札幌、9月、2005.
  - 5) Nakai, K., Ozawa, S., Suzuki, F., Kumada, H., Tanaka, H., Hanada, K., Sunouchi, M., Kubota, K., Kamikawa, Y., Ogata, H. and Ohno, Y.: Levels of messenger RNA encoding drug metabolism enzymes and drug transporters in the liver of chronic hepatitis C patients. ISSX/JSSX meeting (Maui, Hawaii) (2005.10.22-27)
  - 6) Miyajima-Tabata, A., Ozawa, S., Tanaka, H., Nakai, K., Sunouchi, M., Sawada, J., Kamikawa, Y., Kubota, K., Ogata, H. and Ohno, Y.: The Crosstalk of nuclear receptors on the expression of CYP isoforms in Japanese liver tissue. ISSX/JSSX meeting (Maui, USA) (2005.10.22-27)
  - 7) Kurebayashi, H. and Ohno, Y.: In vitro metabolism of ametryne and prometryne by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms. ISSX/JSSX meeting (Maui, USA) (2005.10.22-27)

#### 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

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社