

伝子数を赤字で、縦軸の細胞で発現が上昇している遺伝子数を緑字で示した。HepG2とJHH-1の遺伝子発現を比較するとどちらか一方の細胞で発現が上昇している遺伝子の数は14個と23個と大きな差がなかった。一方、JHH-4の遺伝子発現をHepG2またはJHH-1と比較すると、いずれの場合でもJHH-4に比べ発現が上昇している遺伝子が34(HepG2)、37(JHH-1)と測定した遺伝子の40%以上を占めていた。

このことは、Fig. 6 Dの各遺伝子の相対的発現量をheat mapで示したものでより鮮明に示されている。このheat mapは各遺伝子の三種類の細胞における相対的発現量を、三種類の細胞の相対的発現量のmedianで割ることで規格化し、変化を赤(> X 8 fold)から緑(< 1/8 fold)の色調で示したものである。HepG2とJHH-1では赤で示される遺伝子と緑で示される遺伝子が交じり合っているが、JHH-4では多くの遺伝子の発現量が緑色で示されており、HepG2、JHH-1と比較してJHH-4で多くの遺伝子の発現が低いということが見て取れる。平面培養においてではあるが、JHH-4は他の二種の細胞と比較して薬物動態関連遺伝子の発現が低い細胞であることが示唆された。

同じFig. 6 Dのheat mapでHepG2とJHH-1の各遺伝子の発現パターンを比較してみると、*CYP1A1*、*CYP2C19*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP2E1*の発現が相対的に高い。このことは、RT² Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolismを用いることで、細胞や培養条件の違いによる薬物動態関連遺伝子の発現を比較し、細胞や培養条件の評価が可能であることを示唆しており、同法による評価が有用であることが示された。

D. 考察

スフェロイド形成

初年度の検討で効果的なスフェロイド形成が可能であったセルタイトスフェロイド(Sumilon)を培養器として、HepG2細胞のスフェロイド形成と形成されたスフェロイドにおける*CYP3A4*のrifampicinによる発現誘導を検討した。その結果、Fig. 1に示すように、スフェロイドにおいては*CYP3A4*の発現誘導は認められなかった。理由としては、スフェロイドが目視できるほどの大きさのものをういたため、細胞塊の内部まで培地中の薬剤や溶存酸素・増殖因子等が到達できなかった可能性がある。この点はより小さいスフェロイドを形成させることで解決できる可能性もあるが、セルタイトスフェロイドでは1 wellあたり1個のスフェロイドしか形成できず、total RNAの回収量を考えると實際上簡便な培養法要とは言いがたい。これらの点を鑑みて、培養細胞のスフェロイド培養による薬物動態関連遺伝子の機能変化を検討することは断念した。

三次元培養による遺伝子発現の変化

Affymetrix社HG U133A GeneChipを用い、三次元培養6日目で増殖期にあるHepG2細胞における遺伝子発現を、平面培養における遺伝子発現と網羅的に比較検討した。統計的に有意差をもって2倍以上または1/2以下に発現が変化した遺伝子は94遺伝子あった。この94遺伝子をgene ontologyによる機能分類をもとにクラス分けした結果、細胞増殖に関連する遺伝子と細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現の上昇が認められた

(Fig. 3)。

三次元培養装置では培養状態を常時モニターし、新鮮な培地を一定量供給しつつ、溶存酸素、pH 等が調整された培養液をバイオリアクター内に循環させるため、細胞がより増殖し易い状況にあると考えられる。その為、前者の遺伝子が平面培養より上昇していると推測される。初年度までの検討で、HepG2 の三次元培養では培養 6 日目前後で細胞が増殖期にある状態において、*CYP3A4* の効率的な誘導が認められることがわかっている。この時期の細胞の増殖性が平面培養より更新していることは、三次元培養の培養条件の改良を考える上で興味深い知見である。

その一方で、同時期において細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現も亢進しており、細胞が平面培養と違う細胞環境を形成していることも示唆された。既に、細胞の外部から加わる力学的 tension が幹細胞の分化を調節することが報告されている (McBeath R *et al.* Dev. Cell. 2004, 6, 483-495)。ラジアルフロー型バイオリアクターによる三次元培養においても細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現が変化していたことは、この培養法により平面培養では得られない空間的・力学的な効果があることを示唆しており、幹細胞や肝細胞前駆細胞の分化培養系への応用が期待される。

HepG2 以外の肝癌由来培養細胞の三次元培養への適用

初年度までの検討では、HepG2 細胞を主に三次元培養の検討を行ってきたが、本年度はそれに加えて東京慈恵会医科大学永森らにより日本人肝癌患者より樹立された培

養細胞株 JHH-1、JHH-4 について、三次元培養への適用が可能であるかの検討をした。

両細胞について、ハイドロキシアパタイトと PVA を細胞支持担体として三次元培養に供した。JHH-1 の結果は Fig. 4 に示すが、2 週間の培養で増殖が認められるものの、播種細胞数に比べ 4~6 倍程度の増加しか示さなかった。HepG2 の場合、30 倍程度の増殖が認められていたので、JHH-1 の三次元培養への適用は HepG2 より難しいと判断している。ただし、Fig. 6 D で見られたような *CYP2C19* などの遺伝子の発現の特性を考えるとまだ若干の検討の余地は残していると考えている。それに対し、JHH-4 はいずれの細胞支持単体を用いた場合でも増殖を示さなかった。Fig. 6 D でも HepG2、JHH-1 に比べ薬物動態関連遺伝子の発現も低く、JHH-4 の三次元培養への適用は断念した。

三次元培養に用いる細胞支持担体

HepG2 においては細胞支持担体としてハイドロキシアパタイトと PVA において薬剤による *CYP3A4* の誘導性に明瞭な差異が認められた。rifampicin、dexamethasone いずれを誘導剤とした場合でもハイドロキシアパタイトを用いた場合より高倍率の誘導がみられた。JHH-1 の三次元培養における *CYP3A4* の誘導実験は未実施であるが、細胞の増殖性に明らかな違いがあり (Fig. 4)、三次元培養において細胞支持担体の果たす役割が小さくないことを示す事例が増えてきている。一方、Fig. 2C に示すようにハイドロキシアパタイトは粒状であり、ラジアルフロー型バイオリアクターより細胞を回収した際に培養器内での細胞の方向性の情報が失われてしまう。Fig. 2 B に示す

ように培養機内では培地の流れに方向性があり、細胞が三次元的に増殖していく際に方向性を持っている可能性があるが、粒状のハイドロキシアパタイトでの検証は困難である。それに対し、PVA では担体ごと培養器から取り出すことが可能であり、細胞増殖や機能変化の方向性の検討が可能である。今までの検討ではハイドロキシアパタイトより間隙の小さい PVA を用いてきた。しかし現在はハイドロキシアパタイトとほぼ同等の間隙を持つ PVA の利用も可能になった。間隙の小さい PVA では HepG2 においては *CP3A4* の誘導が認められなかったが、ハイドロキシアパタイトと同等の間隙をもつ PVA では誘導が認められることも考えられる。三次元培養と平面培養の比較で、三次元的培養による細胞の機能変化が生じていることを示唆する結果を得ている (Fig. 3) ので、今後新たな支持担体の検討も必要と考えられる。

HepG2、JHH-1、JHH-4 の細胞特性の比較

平面培養した HepG2、JHH-1、JHH-4 各細胞の特性を、薬物動態関連遺伝子に特化したマクロアレイを用いて評価した。解析に用いた RT² Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray) は 84 種類の遺伝子が載っている (Fig. 5)。三者の細胞の発現を相互に比較した結果、JHH-4 においてマクロアレイに載っている遺伝子の 40 % を超える遺伝子で発現が相対的に低い結果となった。また、HepG2 と JHH-1 の比較においても *CYP1A1*、*CYP2C19*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP2E1* の発現が JHH-1 において相対的に高い結果が得られた (Fig. 6 D)。今後、市販されている移植不適合肝臓より調製され肝実質細胞や、ヒ

ト肝臓由来の mRNA における遺伝子発現を検討する必要があるが、現在までに検討してきた細胞においても薬物動態関連遺伝子の発現に大きな差があることが確認された。また、この結果は、同マクロアレイが異なる細胞や種々の培養条件における薬物動態関連遺伝子の機能評価の first screening として有用である事を示していると考えられる。

E. 結論

本年度の研究により以下のことが明らかとなった。

- ① セルタイトスフェロイド (Sumilon) により形成されたスフェロイドにおける *CYP3A4* の誘導性を検討した結果、同法による遺伝子発現レベルでの細胞機能変化の検討は実用上無理があると判断した。
- ② 平面培養と比較して、三次元培養では細胞周期を進行させる遺伝子と細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現の上昇が認められた。
- ③ HepG2 以外のヒト肝が由来倍予細胞株として日本人肝癌患者より樹立された JHH-1 および JHH-4 を三次元培養に適用した。その結果、HepG2 の増殖性よりはるかに劣るが JHH-1 において細胞の増殖が認められた。JHH-1 細胞の増殖性はハイドロキシアパタイトと PVA を細胞支持担体として用いた場合で異なっていた。JHH-4 に関しては三次元培養装置での増殖は認められなかった。
- ④ HepG2、JHH-1、JHH-4 の平面培養での 84 種の薬物動態関連遺伝子の発現を比較検討した結果、JHH-4 において 40 % を

超える遺伝子の発現が他の 2 種の細胞に比較して低かった。また、HepG2 と JHH-1 の比較でも *CYP1A1*, *CYP2C19*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2E1* のように JHH-1 で発現が高い遺伝子が存在した。

以上の結果をふまえて、最終年度の検討課題としては以下のことが挙げられる。

ア) スフェロイドによる細胞機能の改善は困難であったので、三次元培養に中心をずえて検討を進める。

イ) 平面培養との比較の結果、細胞の増殖が良い状態において *CYP3A4* の効率的誘導が認められるとの結果をふまえ、三次元培養の改良を行う。

ウ) 三次元培養では細胞骨格や細胞間コミュニケーションの変化が示唆されている。ラジアルフロー型バイオリアクター内の培地の流路を考えると、培養器内の方向性と機能発現の関係の解析は興味深い点である。新たに入手可能になった口径の異なる PVA 担体でヒドロキシアパタイトの *CYP3A4* 誘導性が再現できるかを確認し、再現可能であれば、培養後の PVA 担体から切片を作成し、種々の肝細胞マーカーなどで免疫染色を行い、培養器の方向性と機能発現の解析を行う。本解析により幹細胞や肝前駆細胞の三次元条件における分化という新たな研究の方向性を示せる可能性がある。

エ) 平面培養した三種の細胞の薬物動態関連遺伝子のマクロアレイによる解析を行った結果、細胞間の特異性が明らかとなった。市販されている移植不適合肝臓より調製された肝実質細胞や、ヒト肝臓由来の mRNA における遺伝子発現を同方法により解析し基礎データを蓄積する。この基礎データを活用することで、三次元培養による細胞機

能の変化を遺伝子レベルで検討することが可能になると考えられる。

オ) 二年度目までは、誘導剤として rifampicin のみを用いてきたが、最終年度は上記の検討で確立した条件においてその他の代表的誘導剤に三次元培養した細胞を暴露することで、どのような細胞機能の変化が起きるかを遺伝子レベル、タンパクレベルで検討する。代表的誘導剤に対する細胞応答を精査することで、構築した三次元培養システムによる種々の化合物の毒性評価の系を確立できるかを検討する。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

The 1st Asia Psific ISSX Meeting, May 25 ~ 27, 2006, Korea

日本生物工学会、9月11日～13日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

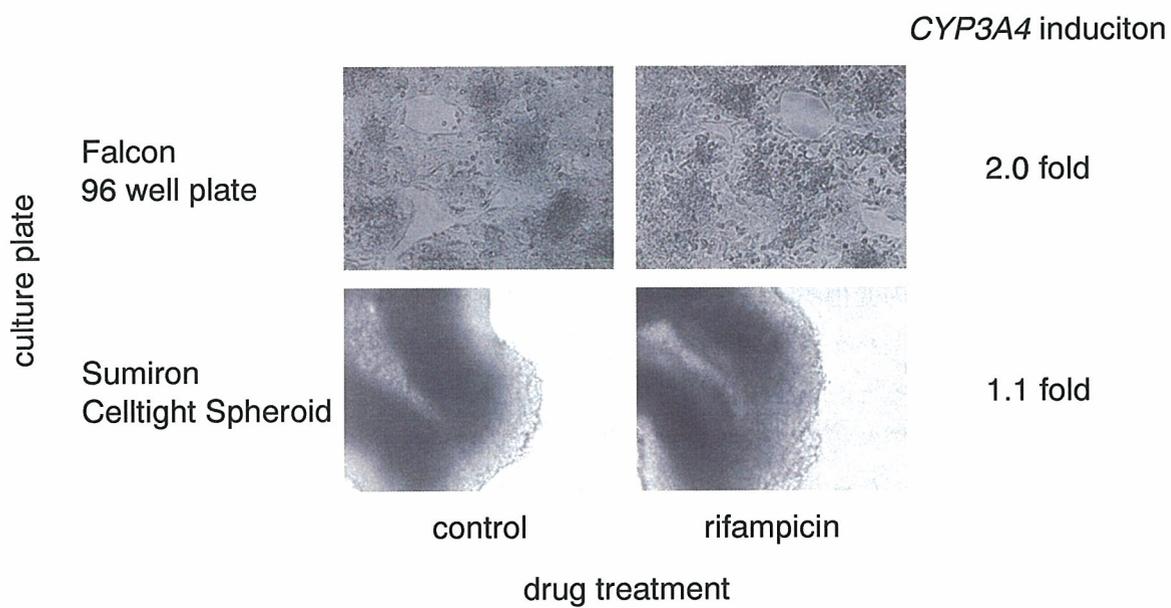


Fig. 1 HepG2 細胞の平面培養とスフェロイド培養の比較

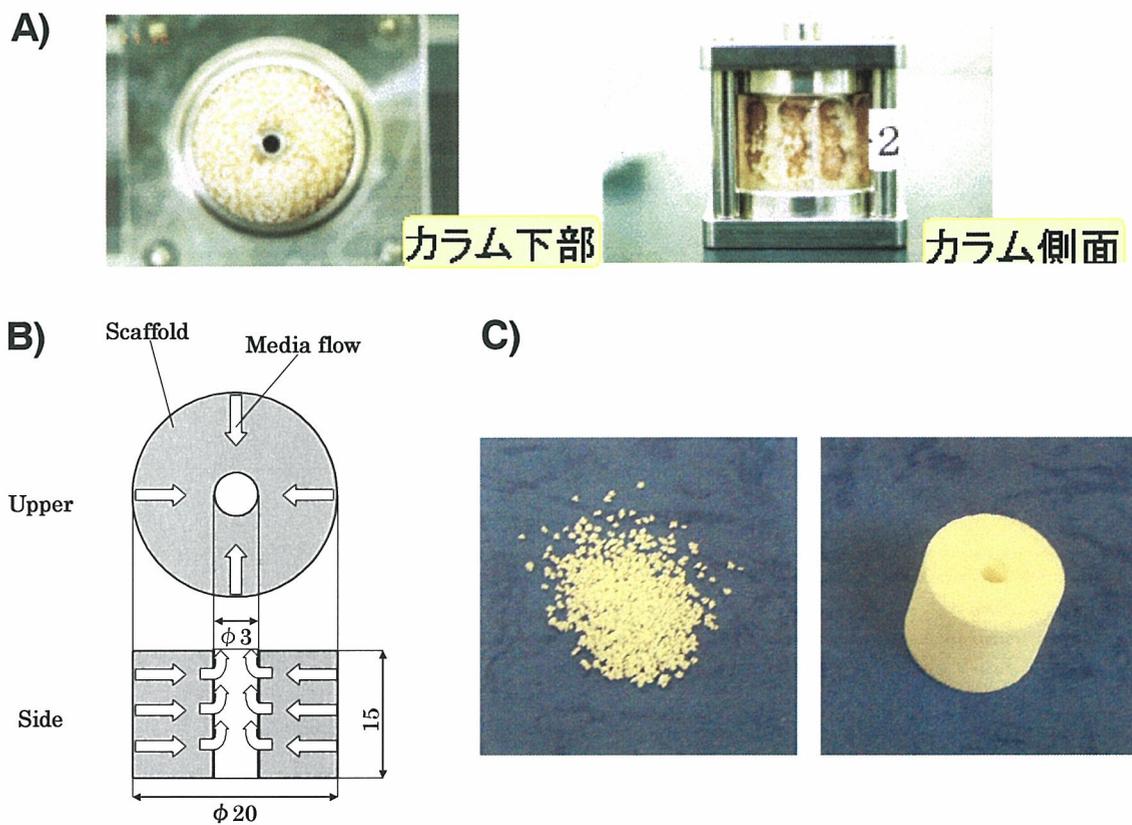
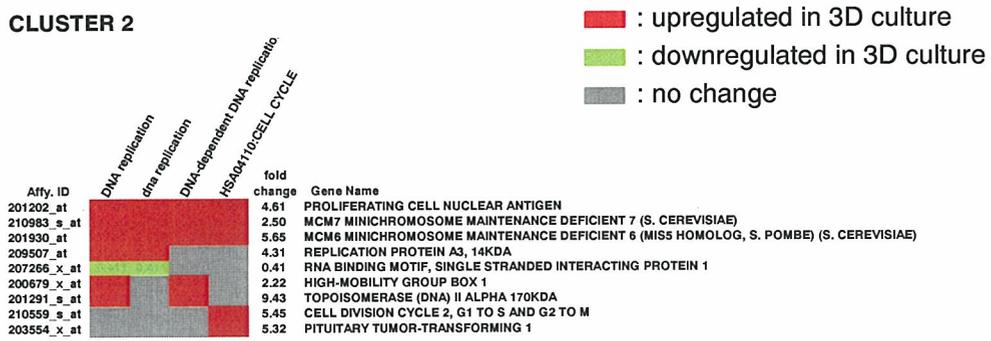
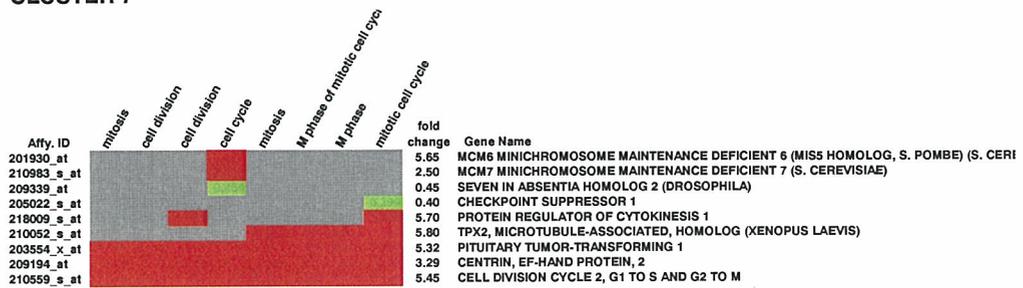


Fig. 2 3次元培養装置の概要と細胞支持担体

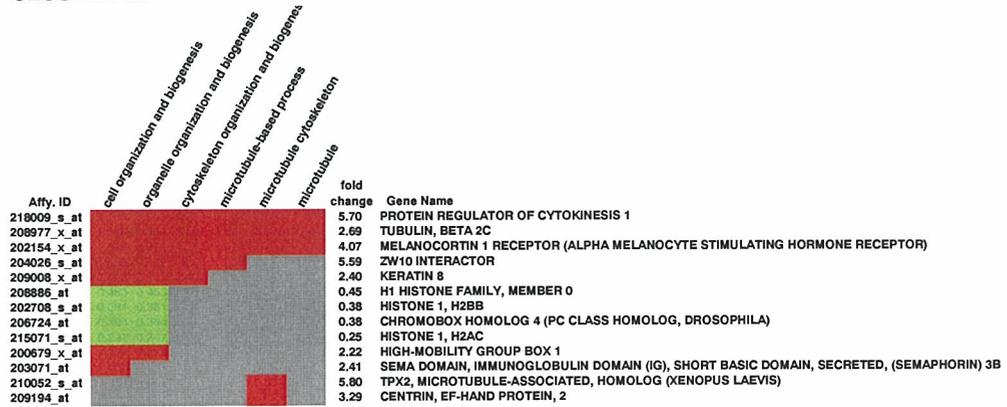
CLUSTER 2



CLUSTER 7



CLUSTER 12



CLUSTER 15

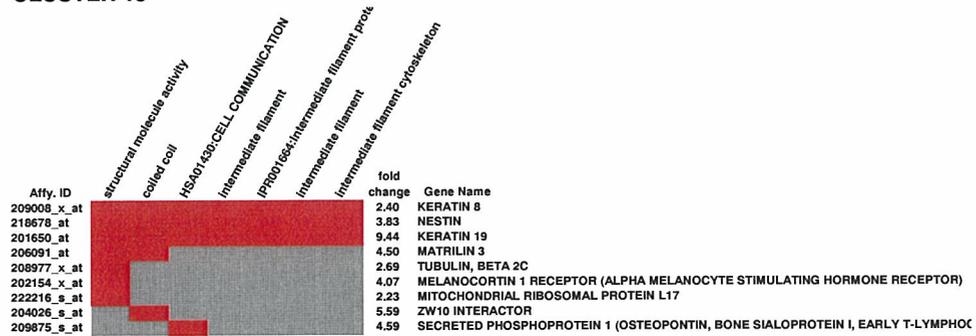


Fig. 3 平面培養と3次元培養における遺伝子発現の網羅的比較

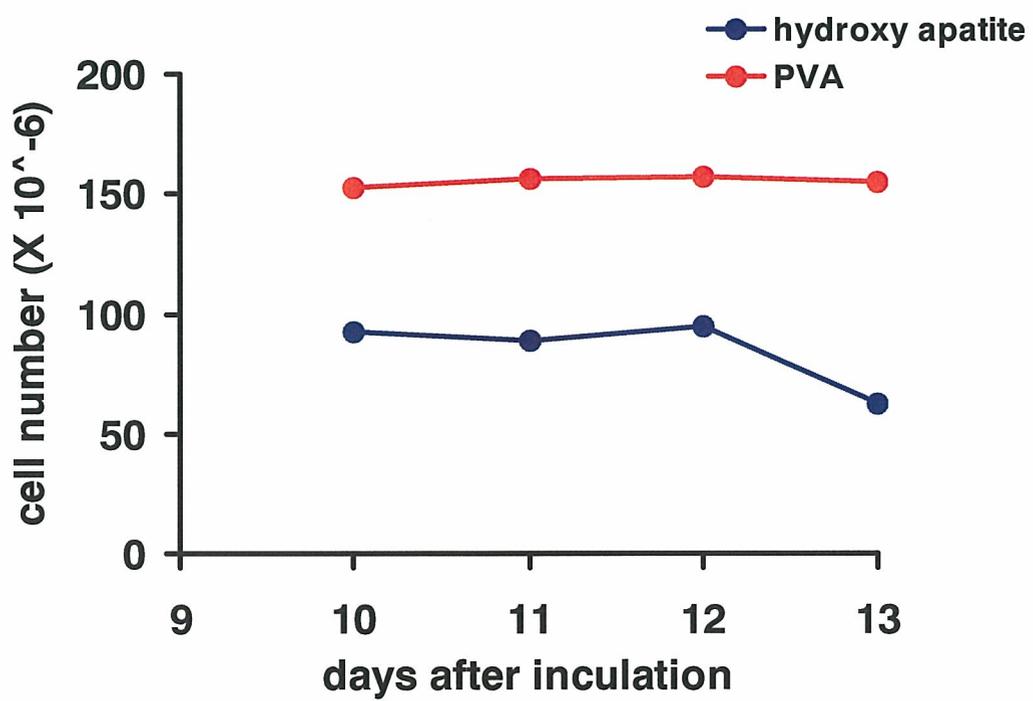


Fig. 4 JHH-1 細胞の 3 次元培養における増殖の状況

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABCB1	ABCC1	ABP1	ADH1B	ADH1C	ADH4	ADH5	ADH6	AHR	ALAD	ALDH1A1	ALOX12
B	ALOX15	ALOX5	APOE	ARNT	ASNA1	BLVRA	BLVRB	CES2	CES4	CHST1	COMT	CYP11B2
C	CYP17A1	CYP19A1	CYP1A1	CYP2B6	CYP2C19	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6	CYP2E1	CYP2F1	CYP2J2	CYP3A5
D	CYB5R3	EPHX1	FAAH	FBP1	GAD1	GCKR	GGT1	GPI	GPX1	GPX2	GPX3	GPX4
E	GPX5	GSR	GSTA3	GSTA4	GSTM2	GSTM3	GSTM5	GSTP1	GSTT1	GSTZ1	HK2	HSD17B1
F	HSD17B2	HSD17B3	LPO	MARCKS	MGST1	MGST2	MGST3	MPO	MT2A	MT3	MTHFR	NAT1
G	NAT2	NOS3	NQO1	PKLR	PKM2	PON1	PON2	PON3	SMARCAL1	SNN	SRD5A1	SRD5A2
H	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

: Drug Metabolism関連遺伝子
 : control遺伝子

Fig. 5 RT² Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray)に搭載されている遺伝子

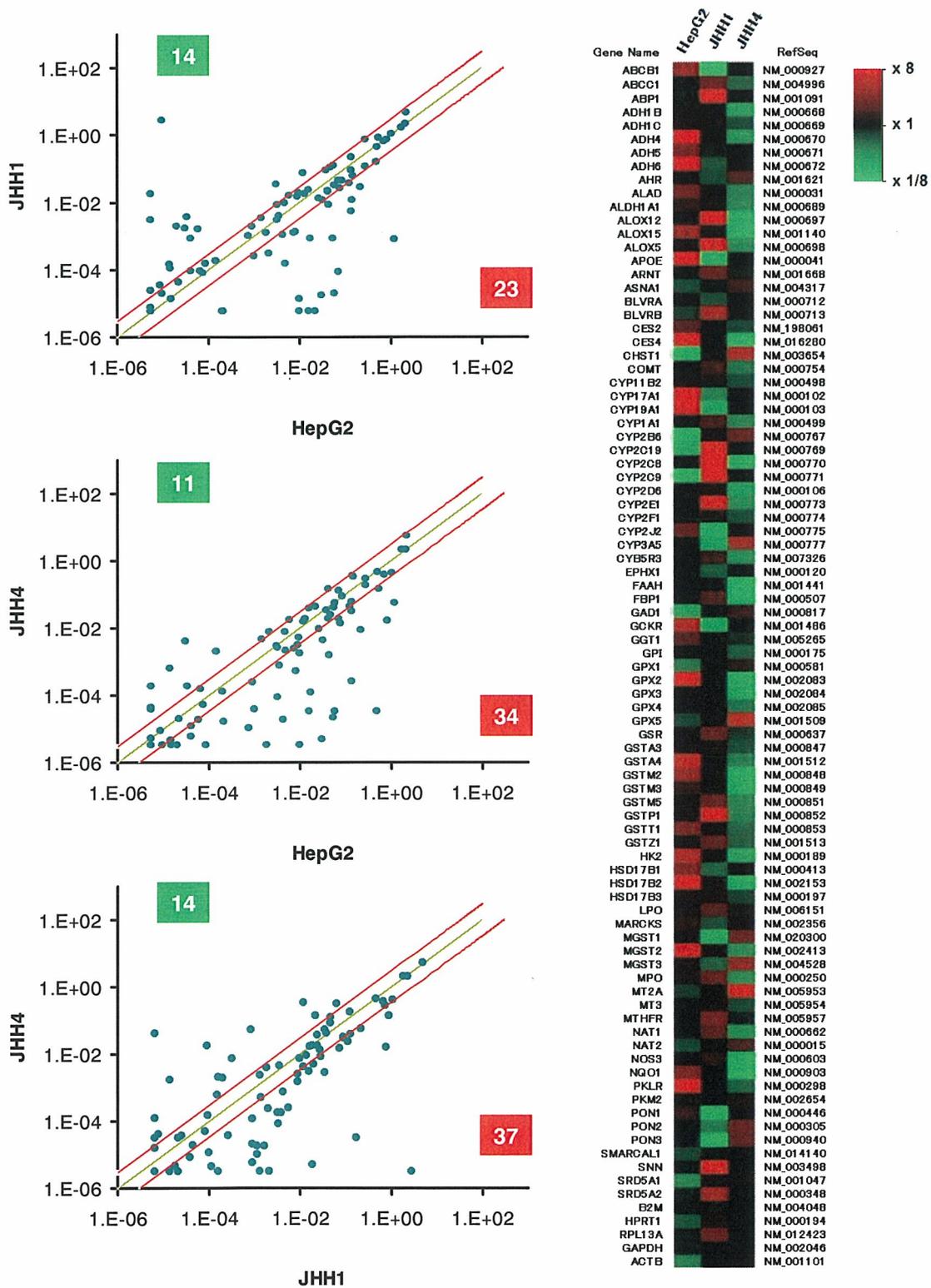


Fig. 6 平面培養における HepG2、JHH-1、JHH-4 の薬物動態関連

遺伝子の発現の比較

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告

ヒト肝3次元培養系、マウス・ヒト肝細胞融合系による新規医薬品毒性評価系に
関する基盤研究

遺伝子発現調節機構の解析に関する研究

分担研究者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 主任研究官

研究要旨：ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現を模倣する細胞系の構築を目指す上で、チトクロームP450(CYP)の発現機構の解析は重要である。本研究では、CYP3A4の個人差を引き起こす要因の決定を目的として、CYP3A4遺伝子の発現制御におけるエピジェネティクス機構の関与について解析を進めた。HepG2細胞株においては、CYP3A4は非誘導時の発現にヒストン修飾およびDNAのメチル化が大きく関与していることが示唆された。

A. 研究目的

医薬品および化学物質の有効性・安全性評価において、近年、実験動物を用いた試験法の限界が指摘され、ヒトにおける有効性・安全性を評価するための試験系の確立が必要になっている。ヒトの組織を用いた薬物代謝実験は、かつてマイクロソームやS9など肝細胞分画が用いられる事が多かったが、近年、ヒトの肝細胞を用いた試験系が、薬物動態を総合的に評価できることから有用視されてきている。しかしながら、現在利用できるヒトの肝細胞は、日本国内においては倫理的な問題、臓器移植法の問題があり、移植不適合臓器を研究に使用できず、海外からの輸入市販品に頼らざるを

得ない。ヒトにおいて薬物の代謝に関わっている主要な薬物代謝酵素はチトクロームP450(CYP)であるが、CYP活性量には、大きな個体差が存在することが知られている。インタクトな肝細胞を用いた試験系においても、各々の肝細胞が遺伝多型や薬歴（酵素阻害および誘導）などに由来する酵素活性の変動（個体差）を持つことを常に考慮しなければならない。そこで、インタクトな細胞の状態でCYP活性を安定的に評価できる細胞の開発が望まれている。

本研究では、ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現を模倣する細胞系を目指しており、昨年度は、ヒト肝組織24検体について、薬物動態関連遺伝子のmRNAレ

ベルを測定し、主要な遺伝子の発現量のプロフィールを得、以下のことを明らかにした。

1. *CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C9*, *3A4*, *3A5*, *3A4*とその発現制御に関わっていると考えられる核内受容体*AHR*, *PXR*, *CAR*, *GR*の発現量の個体差を比較した結果、下流の遺伝子の発現量の変動幅の方が大きかった。

2. *CYP3A5*の発現量は2相性を示し、蛋白発現量とmRNA発現量は高い相関を示し、その頻度は、日本人における*3A5*3/*3*の頻度にほぼ対応していた。

3. *CYP3A4*遺伝子の発現量の個体差には、関連核内受容体*PXR*, *CAR*の発現量の個体差が関与していることが示唆された。

本年度は、さらに6検体を追加することができ、総計30検体について、主要な薬物動態関連遺伝子のmRNA発現レベルのプロフィールを得た。また、*CYP3A4*遺伝子の発現量の個体差には、関連核内受容体*PXR*, *CAR*の発現量個体差が関与していることが明らかになったことから、*PXR*がその遺伝子の発現に関与していることが報告されている*GSTA2*および*UGT1A1*遺伝子についても測定し、計19遺伝子の発現量の相関について検討を行った。

薬物代謝において主要な役割を果たす*CYP3A*には大きな個体差が存在することが知られている。現在までに*CYP3A4*遺伝子には*1-19のほか44種類の多型が報告されているが、この個体差を説明し得る遺伝子多型は見つかっておらず、それ以外の要因がむしろ積極的に関与していると考えられる。一方、近年ヒストンのアセチル化やDNAのメチル化をはじめとするエピジェネティクス機構が、塩基配列を超えて選択的な

遺伝子の活性化および不活性化に關与するという報告がなされ始めた。薬物代謝酵素*CYP*遺伝子について*CYP1A*遺伝子についてこの機構が関与する可能性が示唆された。そこで、本年度より*CYP3A4*の個人差を引き起こす要因の決定を目的として、ヒト肝癌由来細胞株HepG2細胞を用いて、*CYP3A*遺伝子の発現制御におけるエピジェネティクス機構の関与について解析を進めた。

B. 研究方法

ヒト肝組織からのRNA画分の調製およびmRNA発現量の測定

ヒト肝臓組織は、獨協医科大学およびHS研究資源バンクより供給された転移性肝癌患者における肝臓非腫瘍部位30例を測定検体として使用した。検体は、male 19 検体、female 11検体、average age±S.D. = 61.2 ±11.4であった。Total RNA画分の抽出は、RNAqueous Small Scale Phenol-Free Total RNA Isolation Kit (Ambion Inc., USA)により行った。Total RNAサンプルをoligo d(T)₁₆もしくはrandom primerによりRT反応を行い、cDNAを調製した。内在性コントロールとしてBACT (β -actin), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)を用い、TaqMan probeを用いたreal-time PCR反応によりmRNA発現量を定量した。対象遺伝子として、薬物代謝酵素は、*CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *3A4*, *3A5*, *GSTA2*, *UGT1A1*を、核内受容体は*AHR*, *PXR*, *CAR*, *GR* および核内受容体と複合体を形成する*ARNT*, *RXRA*、転写因子は、*HNF1A*, *HNF4A*について測定した。内部標準物質として市販のヒトpoly (A)⁺ RNA (Becton Dickinson, USA) サンプルを使用した。

CYP1A1, 1A2, 2B6, 2C19, 3A4, AHR, PXR, CAR, GR 遺伝子の発現量については、上記各遺伝子および *GAPDH* 遺伝子の発現ベクタープラスミド (Genecopoeia, USA) を用いて、発現 copy 数について検討した。調製した RNA 画分の quality は、Agilent Bioanalyzer により rRNA の 18S, 28S のピークにより確認した。

HepG2細胞におけるヒストン脱アセチル化阻害剤およびDNAメチル化阻害剤の処理

HepG2細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) (USA) より購入した。HepG2細胞は、10% fetal bovine serum (FBS)、penicillin-streptomycinを含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)にて、37°C、5% CO₂-95% インキュベーターにて培養した。ヒストン脱アセチル化阻害剤としてTrichostatin A (TSA) (Sigma)、DNAメチル化阻害剤として5-aza-2'-deoxycytidine (AzaC) (Sigma) を使用した。CYP1Aの誘導剤としてomeprazole (OME) (Sigma)、CYP3Aの誘導剤としてrifampicin (RIF) (Sigma) を用いた。細胞を直径10cmのdishに、TSA処理の場合は1 x 10⁶ cells、AzaC処理の場合は0.5 x 10⁶ cells播種し、翌日より、TSA (100 ng/mL) 48時間またはAzaC (5 μM) 96時間処理した。培養の最終24時間は、TSA、AzaCに加えて、CYP誘導剤 OME (50 μM) またはRIF (25 μM) を含む培養液で処理した。細胞は血清、抗生物質を含まないDMEMで2回洗浄後、Lysis Bufferにて回収した。薬剤の処理時における溶剤のDMSOの濃度は0.2%とした。培養液は24時間毎に交換した。

HepG2細胞からのRNA画分の調製およびmRNA発現量の測定

RNA画分は、RNeasy Mini Total RNA preparation kit (QIAGEN, USA)により調製した。薬物代謝酵素遺伝子のmRNA発現レベルは、ヒト肝細胞のRNA画分と同様、TaqMan probeを用いたreal-time PCR反応により定量した。まず、TSA、AzaC処理細胞のmRNA発現について、ヒトでよく知られているCYP遺伝子 (*CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5*) および核内受容体遺伝子 (*AHR, PXR, CAR, GR*) を対象遺伝子として測定した。次に、CYP1AおよびCYP3Aに絞り、誘導剤を処理したサンプルに対して、CYP遺伝子 (*CYP1A1, 1A2, 3A4, 3A5*)、核内受容体遺伝子 (*AHR, PXR, CAR, ARNT, RXRA*)、転写因子遺伝子 (*HNF1A, HNA4A*) について検討した。

ヒストン脱アセチル化阻害剤およびDNAメチル化阻害剤の細胞毒性の測定

HepG2細胞を96 well plateに1×10⁴ cells/well となるように播種した。1日間培養後、TSA (25-1600ng/mL) およびAzaC (4-2000 μM) を含む培養液に交換して、24-144時間培養した。培養液は24時間毎に交換した。細胞をリン酸緩衝液 (PBS(-)) にて2回洗浄し、0.4% crystal violet - methanol 溶液にて染色した。IC₅₀値は、薬剤未処置の細胞のgrowthを100%として算出した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用したヒト肝臓組織は、獨協医科大学およびHS研究資源バンクにおいて、

正式なルートに基づいて書面にてドナーより同意を得て取得した試料である。いずれの試料も、ドナーを特定するような情報は一切消去され、個人を特定することは出来ないようにされており、提供者の人権を損害する危惧はない。提供された試料は本研究にのみ使用し、使用後は定められた基準に従い廃棄した。

C. 研究結果

ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現について

解析に使用した検体のリストをTable 1に示した。日本人30検体の肝組織を用いて、CYPおよび関連薬剤反応性遺伝子の発現量の個体差について検討した結果、*CYP1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *3A4*, *3A5*遺伝子のmRNA量の個体差は15-120倍で、関連核内受容体*PXR*, *CAR*, *AHR*, *GR*では11-67倍、転写因子*HNF1A*, *4A*では22, 28倍で、昨年度24検体で解析した時と同様、*CYP1A*, *2B*, *3A*遺伝子の発現量の個体差変動の幅が大きかった (Fig. 1)。*CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C19*, *3A4*, *AHR*, *PXR*, *CAR*, *GR*遺伝子の発現量については、各遺伝子の発現ベクタープラスミドを用いて、発現copy数について検討した。発現copy数は*GAPDH*遺伝子の発現copy数に対する比を求めた。その結果、*CYP*遺伝子の発現copy数は核内受容体遺伝子に比べて高く、特に*CYP3A4*遺伝子の発現copy数が高かった。核内受容体遺伝子*AHR*, *PXR*, *CAR*, *GR*の中では、*CAR*遺伝子の発現copy数が高かった。

次いで、各遺伝子の発現量の相関について検討した (Fig. 2)。*CYP1A*遺伝子の発現については、*CYP1A1*, *CYP1A2*, *AHR*間だけ

でなく、他の*CYP*遺伝子や核内受容体遺伝子とも相関が観察された。*CYP2B*, *2C*遺伝子の発現についてもそれぞれ他の*CYP*遺伝子との相関や、核内受容体遺伝子との相関が観察された。*CYP3A4*遺伝子の発現量は、*CYP1A*, *2B*, *2C*遺伝子、核内受容体の*AHR*, *PXR*, *CAR*各受容体の発現量と相関していた。*CYP3A5*遺伝子は、今回測定したいずれの遺伝子のmRNA発現量とも相関がなかった。*GSTA2*遺伝子の発現量は、*CYP1A1*, *1A2*, *2C18*, *UGT1A1*遺伝子との相関が観察された。*UGT1A1*遺伝子の発現量は、*GSTA2*同様、*CYP1A1*, *1A2*, *2C18*, *GSTA2*遺伝子との相関が観察された。核内受容体*AHR*, *PXR*, *CAR*遺伝子の発現量は、*CYP1A*, *2C*, *3A*遺伝子との相関が観察された。*GR*遺伝子の発現量は、*CAR*および*RXR α* 遺伝子との相関が観察された。核内受容体*AHR*と複合体を形成する*ARN T* の発現量は、*CYP2C8*, *2C19*, *PXR*との相関が観察された。核内受容体と複合体を形成する*RXR α* の発現量は、*CYP2B*, *2C*, *3A*遺伝子および核内受容体遺伝子との相関が観察された。転写因子*HNF1A*遺伝子の発現量は、*CAR*遺伝子との相関が観察され、*HNF4A* 遺伝子の発現量は、*CYP2C8*, *2C9*, *3A4*, *PXR*, *CAR* 遺伝子の発現量と相関が観察された。以上の相関をまとめると、*CYP1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, および*3A4*遺伝子の発現量は、お互いに相関が観察され、これらの遺伝子はそれぞれ関連核内受容体*PXR*, *CAR*, *AHR*遺伝子の発現量と相関していた。(p<0.01 または p<0.05)

さらに、各*CYP*遺伝子の発現量と関連受容体遺伝子 (*AHR*, *PXR*, *CAR*) の発現量について多変量解析を行った (Fig. 3)。その結果、*CYP1A2*は*AHR*と、*2B6*は*AHR*および*P*

XRと、2C8はPXRと、2C9および2C18はAHR, PXR, CARすべてと、3A4はAHR, PXRとそれぞれ関連しており、CYP2B6, 2C8, 2C18および3A4遺伝子の発現量は、2つ以上の核内受容体遺伝子の発現が多因的に関与していることが明らかとなった。

HepG2細胞におけるCYP3A4遺伝子発現へのエビジェネティック修飾の関与について

HepG2に対する、ヒストン脱アセチル化阻害剤 Trichostatin A (TSA)およびDNAメチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (AzaC)処理、CYP1A誘導剤 omeprazole (OME)、CYP3A誘導剤としてrifampicin (RIF)処理の概略図をFig. 4に示した。はじめに、TSA, AzaCのHepG2細胞に対する細胞毒性について検討した (Fig. 5)。増殖後期のHepG2細胞を96 well plateに播種し、1日間培養後、各薬剤を含む培地に交換し、plateを各日数培養後、crystal violetにより生細胞を染色する方法により評価した。TSAは、0, 25, 100, 400, 1600ng/mLの4倍希釈系列、AzaCは0, 4, 31, 250, 2000 μ Mの8倍希釈系列を作成した。その結果、TSA処理では、培養1日後では、緩やかな細胞増殖阻害曲線となり、最高濃度の1600ng/mLにおいても増殖の阻害は40%程度であった。培養2, 3, 6日目に測定した細胞増殖阻害曲線は、ほぼ同様のカーブを描いた。このことから細胞は培養2日目までに強くTSAによる影響を受けると考えられる。今回実験に使用した、48時間目のIC50値は、160 ng/mLであった。AzaCでは、培養1, 2, 3, 6日目共に細胞増殖阻害は20%以下であった。今回実験に使用した96時間のAzaC処理では、最高濃度の2 mMにおいてもHepG2細胞は、

細胞増殖阻害を受けていないことが示された。

HepG2細胞にTSA (50および100 ng/mL)を48時間、AzaC(5 μ M)を96時間処理し、回収した細胞より調製したRNAサンプルのGAPDHおよびBACT遺伝子の発現量について検討した結果をFig. 6に示した。図は、それぞれ各6サンプルを示したが、TSA処理では、50および100 ng/mLともにGAPDHおよびBACT遺伝子の発現量は共に、それほど変化がなかったが、AzaCの処理では、BACT遺伝子の発現量には差はなかったが、GAPDH遺伝子の発現量の抑制が観察された。この濃度のAzaCはHepG2に細胞毒性を示す濃度ではないことから、AzaCがGAPDH遺伝子の発現機構に作用して発現量が抑制されたと考えられる。この結果をうけ、今後の発現量の解析においては、BACT遺伝子の発現量を内部標準として使用した。

次に、TSA 100ng/mL処理による、CYP各遺伝子の発現量および核内受容体遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討した (Fig. 7)。検討したCYP遺伝子のうち、CYP2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19については、HepG2細胞においてbasalの発現量が低く、今回のTaqMan法によっては検出できなかった。測定できたCYP遺伝子についてTSAの作用を比較してみると、CYP2A6, 2C9, 2D6の発現にはそれほど影響を及ぼしておらず、CYP2A6においては抑制が観察された。これに対して、CYP1A1, 1A2, 1B1, 2E1, 3A4, 3A5においては発現の上昇が観察され、特にCYP2E1, 3A4においては8倍前後まで上昇していた。核内受容体遺伝子の発現については、AHR, PXR, CAR, GRいずれの遺伝子もTSA処理により発現量の上昇が観察され、特にCA

Rにおいては8倍程度まで上昇していた。AzaC 5 μ M処理による、CYP各遺伝子の発現量および核内受容体遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討した結果をFig. 8に示した。検討したCYP遺伝子のうち、CYP2C遺伝子については、HepG2細胞においてbasalの発現量が低く、今回のTaqMan法によっては検出できなかった。測定できたCYP遺伝子についてAzaCの作用を比較してみると、CYP2A6はほとんど影響を受けなかったものの、他の遺伝子では発現の上昇が観察され、特にCYP1B1, 3A4においてはそれぞれ約10, 8倍まで上昇していた。核内受容体遺伝子の発現については、TSA処理の結果と同様、AHR, PXR, CAR, GRいずれの遺伝子もAzaC処理により発現量の上昇が観察され、特にCARにおいては7倍程度まで上昇していた。CYP1A2, 3A4, 3A5, CARは、TSA, AzaC処理により同程度の発現量の上昇が観察されたが、CYP1A1, 2E1の発現量はTSA処理、CYP1B1の発現量はAzaC処理による影響を強く受けていた。

そこで、CYP1AおよびCYP3Aに絞り、誘導剤を処理したサンプルに対して、CYP遺伝子(CYP1A1, 1A2, 3A4, 3A5)、核内受容体遺伝子(AHR, PXR, CAR, ARNT, RXRA)、転写因子遺伝子(HNF1A, HNF4A)についてさらに検討した。CYP1A関連遺伝子についての結果をFig. 9に示す。CYP1A1, 1A2遺伝子の発現量は、TSA処理により約5倍上昇した。さらにCYP1Aの誘導剤であるOMEを共存させると、さらに発現量はそれぞれ約50, 22倍に上昇した。上昇倍率はTSA処理の場合ほどではないが、AzaC処理においても同様の結果が観察された。

CYP1Aの発現に係わる核内受容体AHRの発

現量については、TSA処理により2倍に上昇したが、他はほとんど変化がなかった。核内受容体と複合体を形成するARNTにおいてはTSA, AzaC処理によりほとんど影響を受けなかった。CYP3A関連遺伝子については、CYP3A4, 3A5遺伝子の発現量は、各遺伝子共にTSA処理により発現量の上昇が観察されたが、CYP3A4の方が顕著で、約11倍に上昇した(Fig. 10)。CYP3Aの誘導剤であるRIFを共存させると、発現量は僅かに上昇し、13倍であった。AzaC処理においてもTSA処理の場合と同様の結果が観察されたCYP3Aの発現に係わる核内受容体PXR, CARの発現量については、TSA処理によりPXRは2倍、CARは8倍に上昇した。RIFを共存させると、TSA単独処理に比べて発現量は減少し、それぞれ約1.5, 5倍であった。AzaC処理によっては、PXRはほとんど変化がなく、CARは約5倍に上昇した。RIFを共存させると、CARではAzaC単独処理に比べて発現量は僅かに上昇し、約6倍であった。核内受容体PXR, CARと複合体を形成するRXRAの発現量はTSA, AzaC処理によりほとんど影響を受けなかった(Fig. 11)。転写因子のHNF1A, HNF4Aについては、HNF1Aの発現量はTSA, AzaC処理によりほとんど影響を受けなかったが、HNF4Aについては、HNF1Aの発現量はTSA, AzaC処理によりほとんど影響を受けなかったがTSA処理およびRIFの共存により、約2倍の上昇が観察された。

D. 考察

ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現について

日本人30検体の肝組織を用いて、CYPお

よび関連薬剤反応性遺伝子の発現量の個体差について検討した結果、*CYP1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *3A4*, *3A5*遺伝子のmRNA量の個体差は15-120倍で、その発現制御に関わっていると考えられる関連核内受容体では11-67倍、転写因子では22, 28倍下流の遺伝子の発現量の変動幅の方が大きかった。

主な遺伝子について実際の発現copy数について検討した結果、*CYP*遺伝子の発現copy数は核内受容体遺伝子に比べて高く、特に*CYP3A4*遺伝子の発現copy数が高く、核内受容体の中では*CAR*遺伝子の発現copy数が高かった。核内受容体の中でも、basalの発現量のレベルが異なるという結果は、*PXR*, *CAR*が*RXRα*を複合体の相手として共通に持つことを考えると両者による発現制御機構の解明において大変興味深い。

各遺伝子の発現量の相関について検討した結果、*CYP1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, および*3A4*遺伝子の発現量は、お互いに相関が観察され、これらの遺伝子はそれぞれ関連核内受容体*PXR*, *CAR*, *AHR*遺伝子の発現量と相関しており、さらに、各*CYP*遺伝子の発現量と関連受容体遺伝子の発現量について多変量解析を行った結果、*CYP2B6*, *2C8*, *2C18*および*3A4*遺伝子の発現量は、2つ以上の核内受容体遺伝子の発現が多因的に関与していることが明らかとなった。*CYP*遺伝子の発現には、これまでに主要な経路として解析されてきた経路に加えて、さらに複雑なクロストーク機構が関与していると考えられる。

HepG2細胞におけるCYP3A4遺伝子発現へのエピジェネティック修飾の関与について

HepG2細胞に対する、ヒストン脱アセチル化阻害剤TSA およびDNAメチル化阻害剤AzaC処理の影響について検討した結果、*BACT*遺伝子の発現量には影響がなかったが、AzaCの処理では、*GAPDH*遺伝子の発現量の抑制が観察された。この濃度のAzaCはHepG2に細胞毒性を示す濃度ではないことから、AzaCが*GAPDH*遺伝子の発現機構に作用して発現量が抑制されたと考えられた。

TSA, AzaC処理による、*CYP*各遺伝子の量および核内受容体遺伝子の発現量に及ぼす影響について検討した結果、*CYP*遺伝子、核内受容体遺伝子により発現量に影響を大きく受ける遺伝子と、ほとんど影響を受けなかった遺伝子が大別された。また、影響を受けた遺伝子の中でも、TSAにより強く影響を受ける遺伝子 (*CYP1A1*, *2E1*)、AzaCにより強く影響を受ける遺伝子 (*CYP1B1*)、両者の影響を同程度に受ける遺伝子 (*CYP1A2*, *3A4*, *3A5*, *CAR*) があり、それぞれの遺伝子の発現に対する、ヒストン修飾およびDNAのメチル化の関与の差があることが示唆された。

さらに、*CYP1A* および *CYP3A* に絞り、誘導剤を処理したサンプルに対して、*CYP* 遺伝子、核内受容体遺伝子、転写因子遺伝子について検討した結果、*CYP1A* と *CYP3A* 遺伝子発現に対する、TSA および AzaC 処理 および誘導剤の影響を比較すると、その影響パターンには相違があり、HepG2 細胞株においては、*CYP3A4* は非誘導時の発現、*CYP1A1* は誘導時の発現に、ヒストン修飾 および DNA のメチル化が大きく関与していることが示唆された。

本研究で、HepG2 細胞において、*CYP3A4* の発現、ヒストン修飾および DNA のメチル

化が関与の可能性が示唆されたことは、CYP3A4 の個人差を引き起こす要因の一つとして解明されることが期待される。また、核内受容体遺伝子では、*CAR* 遺伝子の発現量のみが TSA および AzaC 処理の影響を強く受けたことは、*PXR*, *CAR* 各遺伝子の下流遺伝子の発現制御機構を考える上で、大変興味深い知見である。

今回得られた結果が、HepG2 細胞において特異的に観察された現象である可能性も考えられる。他の細胞株、ひいてはヒトの肝細胞においても同じ現象が起こっているのかについては、今後の検討課題となる。まずは、ヒト肝癌由来細胞株である HuH7 を用いて、比較検討を進める予定である。

E. 結論

本年度の研究により以下の点が明らかとなった。

1. ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞において、TSA および AzaC 処理により *CYP3A4* および *3A5* 遺伝子の mRNA 発現が上昇した。核内受容体 *CAR* 遺伝子の mRNA 発現も上昇した。
2. *CYP3A* 誘導剤 RIF を共存させると、さらに、*CYP3A4* および *3A5* 遺伝子の mRNA 発現上昇が観察された。
3. HepG2 細胞株においては、*CYP3A4* は非誘導時の発現、ヒストン修飾および DNA のメチル化が大きく関与していることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

A Miyajima-Tabata, S Ozawa, S Ishida, and K Nakazawa Effects of histone acetylation and DNA methylation on the mRNA expressions of *CYP1A* and *3A* in HepG2 cells. 46th Annual Meeting of Society of Toxicology (Charlotte, USA), March. 29, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Characteristics of subjects in liver tissues

Patient	Diagnosis	Gender	Age (year)
C01	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	61
C02	N/A	M	71
C03	肝門部胆管癌	F	62
C04	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	39
C05	胆管癌	M	71
C06	肝癌	M	66
C07	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	56
C08	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	55
C09	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	53
C10	肝内結石	M	56
C11	胆嚢癌	M	67
C12	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	56
C13	転移性肝癌(S字結腸癌由来)	F	56
C14	胆管癌	F	35
C15	胆管癌	M	76
C16	肝癌	F	56
C17	転移性肝癌(大腸癌由来)	F	57
C18	転移性肝癌(S字結腸癌由来)	M	68
C19	胆管癌	M	50
C20	胆嚢癌	F	79
C21	転移性肝癌(大腸癌由来)	F	54
C22	肝癌	F	82
C23	転移性肝癌	M	70
C24	肝門部胆管癌	F	70
C25	転移性肝癌	F	55
C26	転移性肝癌	M	74
C27	局限性結節性過形成肝外側区域切除	M	不明
C28	不明	F	76
C29	肝癌	M	52
C30	不明	M	52
Total		M=19	61.2±11.4
(Mean±S.D.)		F= 11	

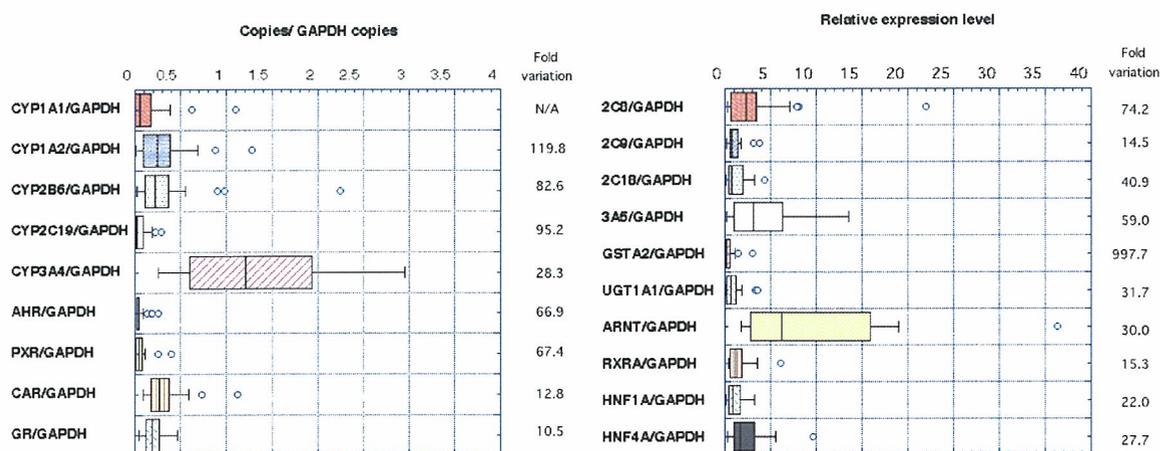


Fig. 1 Expression levels of *CYP* and its related nuclear receptor genes in Japanese liver tissues

