

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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 ……	589
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 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
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 ……	966

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 …… 979
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 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込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 …… 1021
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 …… 1042
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 …… 1054
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 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

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型慢性肝炎患者の組織等を用いて、病態の進展と関連遺伝子発現との相関を明らかにし、オーダーメイド医療の実施にむけての有用な情報を得た。ヒト肝薬物代謝能再現のため構築した複数の新規評価系は、創薬開発のための有用なヒト肝細胞代替系となりうることが示された。

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科
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) 大日本住友製薬(株)
薬物動態研究所 | 小室勢津子 |
| (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 | 曾川裕介 |
| (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)
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) アステラス製薬(株)
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、創薬開発においては、安全で迅速な候補医薬品の開発が求められており、その薬物動態および薬物相互作用の評価には、ヒト肝実質細胞の利用が不可欠である。しかし、我が国では、移植不適合ヒト組織の研究利用が認められなかったことから、研究に用いるヒト肝細胞のほとんどは、海外からの市販品に依存している。また、ヒト肝細胞には、遺伝子多型や環境要因に由来する個体間のばらつきが大きいこと、同一ロットでの供給量が少ないことなどが、同一条件下における薬物動態および薬物相互作用の評価を困難にしている。これらの点を考慮すると、創薬においては、ヒト肝実質細胞の機能を *in vitro* で再現し、安定した条件下での薬物動態研究を可能にする新規試験系の確立が急務となっている。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、疾病時における薬物動態関連遺伝子等における発現の変動について検討し、薬物動態および薬物相互作用の新規評価系の確立に資するための研究を行った。

具体的には、

- 1) 呼吸器疾患患者の気管支肺胞洗浄液(BAL)中の炎症性細胞数とヒト単球様白血病細胞THP-1の炎症性サイトカインによるLTC₄合成酵素mRNAの発現と、ヒト末梢血単核球からのLTC₄放出
- 2) 肝癌細胞におけるインターフェロン γ (IFN γ)レセプターR2発現におよぼす鉄イ

オンの調節効果と IFN γ の抗腫瘍効果

- 3) 日本人の C 型慢性肝炎患者における薬物動態関連遺伝子等の発現と病態の進展
- 4) ヒト PXR のマウス肝での発現のための新技術開発
- 5) ヒト肝癌由来樹立細胞株の三次元培養と遺伝子解析
- 6) ヒト肝細胞の中空糸モジュール培養法による肝薬物代謝誘導評価系の確立
- 7) ヒト肝腫瘍由来細胞株 HepaRG 細胞を用いた肝薬物代謝誘導評価系の確立
- 8) アデノウイルスを用いたヒト CYP3A4 発現 HepG2 細胞を用いた代謝能評価系の確立

について検討した。なお、6)-8)については、共通プロトコールのもと、それぞれ6施設、8施設および7施設にてバリデーション試験を行った。

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、 β -actin あるいは 18S RNA の発現量を用いた。

CYP1A1/2 および CYP3A4/5 の測定: CYP1A1/2 (フェナセチン; 終濃度 40 μ M) 活性および CYP3A4/5 活性 (ミダゾラム; 終濃度 5 μ M、テストステロン; 終濃度 100 μ M) は、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ /95% Air インキュベーターにて 60 分間反応させた。培地あるいは反応液中のフェナセチン O-脱エチル化体とミダゾラム 1'-水酸化体は、LC/MS/MS により測定した。基質の溶解に用いる DMSO の最終濃度は 0.1%あるいは 0.1%以下とした。

B-1) 喘息治療の個別化に関する研究

獨協医科大学呼吸器・アレルギー内科を受診した呼吸器疾患患者から得られた気管支肺胞洗浄液 (BALF) を、血球成分を遠心分離した後、-70 $^{\circ}$ C で保存した。細胞培養液に添加するため、20 mL の BALF を CENTRIPREP (Millipore) 限外濾過膜で 1 mL に濃縮し、細胞培養液で 2.5 mL に希釈して細胞に投与した。末梢血単核球は 48 時間薬物刺激した後、タイロド液中で 5 μ M の A23187 で 15 分間刺激した。メディウム中に放出された cysteinyl leukotriene (cysLT) LTC $_4$ を EIA 法 (Cayman Chemical) により測定した。

B-2) 肝癌細胞の IFN γ -R2 発現に及ぼす影響因子

肝細胞癌株 HUH7 と SNU449 を通常の細胞培養液、鉄イオンキレート剤であるデスフェロキサミン (DFO) 添加培養液、IFN γ 添加培養液、DFO+IFN γ 添加培養液を用いて培養した。1) DFO および IFN γ による R1 と R2 発現を fluorescence-activated cell sorters (FACS) により、2) 増殖抑制効果を MTT 法により、3) アポトーシスの関与を annexin V 染色により FACS で検討した。

B-3) C 型慢性肝炎患者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発現レベルの測定: 薬物代謝酵素の第一相から、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5 の各遺伝子を、第二相から、UGT1A1、SULT2A1、SULT2B1、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。今年度は、CYP2C8、第二相薬物代謝酵素の発現レベル、さらに、薬物代謝動態関連遺伝子の発現調節因子をコードする PPAR α 、CAR、PXR、VDR mRNA レベルを測定に加えた。

遊離ヒト肝細胞の調製・凍結・培養: 獨協医科大学から提供・搬送された新鮮な外科手術摘出ヒト組織から、コラゲナーゼ二段階灌流法にて遊離肝細胞を調製した。

B-4) ヒト型酵素誘導モデルの作成と応用

in vitro および in vivo における農薬の CYP3A4 誘導能の評価: CYP3A4 レポーターを安定的に発現するヒト肝癌細胞 HepG2 由来細胞株

(3-1-10 細胞) を種々の農薬 (和光純薬工業) あるいはリファンピシンで処理した後、

Luciferase assay system (Promega) を用いてレポーター活性を測定した。雄性 ICR マウスに当教室で作製したヒト PXR 発現アデノウイルスおよび CYP3A4 レポーター発現アデノウイルスを尾静脈より投与し、2 日後から薬物を 2 日間連続経口投与した。最終投与 1 日後にマウスを屠殺し、肝臓の可溶性画分を調製して上記と同様にレポーター活性を測定した。

mPXR および mCAR の siRNA 発現アデノウイルスの構築: TaKaRa のアルゴリズムを元に作製した siRNA 発現用オリゴヌクレオチドを当研究室

で作製したヒト H1 遺伝子プロモーターを含む pShuttle ベクターに挿入し、AdEasy System (MP Biomedicals) を用いて siRNA 発現アデノウイルスを構築した。これらアデノウイルスを雄性 C57BL/6 マウスに尾静注し、投与 7 日後にマウスを屠殺し、肝より RNA を調製してリアルタイム PCR [SYBR Green PCR Master Mix (Applied

Biosystems) を使用] により *PXR*, *CAR* および *Cyp3a11* の mRNA レベルを測定した。

B-5) ヒト肝細胞の三次元培養と遺伝子解析
三次元培養: 肝癌由来培養細胞株 JHH-1 と JHH-4 (ATCC) 細胞、 $2.5 \sim 3.0 \times 10^7$ を昨年度と同様の方法にて三次元培養装置 (エイブル社製ラジアルフローバイオリアクター; 5 mL 容、支持担体; ハイドロキシアパタイト又はポリビニル酢酸; PVA) に播種し、pH および溶存酸素の調整された新鮮培地を循環させつつ培養し、観察した。

HepaRG 細胞: 提供された HepaRG 細胞 (Bio-Predic 社) において、1) 肝実質細胞様に分化させたもの (single density)、2) HepaRG 細胞の分化後、混在する胆管上皮様細胞を除き、肝実質様細胞のみを 2 倍の密度で播種しなおしたもの (double density)、3) HepaRG をコラーゲン処理培養ディッシュに播種し肝実質細胞に分化させたもの (collagen) を用意した。細胞を入手後、DMSO (終濃度; 2%) を添加して 2 日間培養し、細胞の形態を観察した。その後、DMSO (終濃度; 2%)、フェノバルビタール (終濃度 500 μ M) およびリファンピシン (終濃度 3 μ M) 含有培地で 2 日間培養し、各細胞より total RNA を調製し、関連遺伝子の発現を測定した。

B-6) ヒト肝細胞の中空系モジュール培養法による肝薬物代謝酵素誘導能の評価

東洋紡績株式会社において、プレート接着能を有したヒト凍結肝細胞 (Lot No. BAD: in vitro technology) を中空系内に充填し、1 週間培養した TESTLIVER -human- (Lot. HS7111) を、3 回に分けて入手した。培養および誘導・代謝反応はすべて 37°C、5% CO₂/95% Air、60-70 rpm 振とう下で実施し、誘導培地 (ヒト肝細胞無血清培地: TMHM-001) は 24 時間毎に交換した。Trial 1: TESTLIVER の培養 8 日目と 15 日目に、また、15 日以降、フェノバルビタール 30-3000 μ mol/L またはリファンピシン 0.3-30 μ mol/L (n=2、各 12 bundle) を 72 時間暴露させて、CYP3A 活性を測定した。

Trial 2: 培養 8 日目からフェノバルビタールまたはリファンピシンを 72 時間暴露させ、誘導前後の CYP3A 活性を測定した。

Trial 3: 培養 8 日目からフェノバルビタール 300 μ mol/L、リファンピシン 3 μ mol/L、デキサメサゾン 100 μ mol/L、フェニトイン 10 μ mol/L、カルマゼピン 100 μ mol/L を 72 時間暴露し、CYP3A 活性を測定した。

B-7) HepaRG 細胞を用いた CYP 誘導評価系

昨年度と同様のプロトコールを用い、CYP1A2 および CYP3A4 活性誘導の再現性を確認すると共に、mRNA レベルについて調べた。

24-well plate に接着された HepaRG 細胞 (Lot. HPR301081、HPR301082) は、到着後、LV-41 培地に交換し、24 時間前培養した。LV0303-1 培地下、CYP1A 誘導剤としてオメプラゾール (OMP; 1-100 μ M) と β -ナフトフラボン (BNF; 0.1-10 μ M) を、CYP3A 誘導剤としてフェノバルビタール (PB; 100-1000 μ M) とリファンピシン (RNF; 0.3-30 μ M) を 72 時間暴露し、CYP1A2 および CYP3A4/5 活性を測定した。また、誘導剤暴露 48 時間後の *CYP1A2* および *CYP3A4* の mRNA の発現レベルを測定した。昨年度 (Lot. HPR301013) の結果と併せ本試験系の有用性を検討した。

B-8) ヒト CYP3A4 発現細胞による代謝能評価系

CYP3A4 代謝活性の評価: 24-well plate に HepG2 細胞 (継代数 10 以下、 0.5×10^5 cells in 0.5 ml/well) を播種し、2 日間培養した後、希釈ウイルス液 (0, 10, 20, 50 MOI/well、MOI; Multiplicity of Infection) を感染させた。感染操作終了後、各 well に培養液を加えて全量を 500 μ L とし、3 日間 37°C の 5% CO₂/95% Air インキュベーターにて培養した。

1 回目の試験において、CYP3A4 活性の発現に施設間差が認められたことから、2 回目の試験では、以下の 2 対応項目 a) HepG2 細胞播種後の培養時間の延長、および b) 希釈ウイルス液 (0, 10, 20, 50 MOI/well) の添加容量について改良し、CYP3A4 活性の再評価を行った。

ケトコナゾールによる CYP3A 活性の阻害試験: 同時に 2 回目の試験では、50 MOI で感染させた細胞から培養液を除去し、阻害剤添加培養液 (ケトコナゾール終濃度: 0, 0.01, 0.1, 1 μ M) を 500 μ L 加え、37°C の 5% CO₂/95% Air インキュベーター中で 15 分間インキュベートした。培養液を除去後、阻害剤含有ミダゾラム添加培養液を加え、60 分間インキュベートした。また、同様の別 plate を用意し、ウイルス感染日および代謝活性測定日に、細胞数を計測した。

(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、アレルギー内科および薬理学、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植不適合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を使用した。

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

BEAS-2B細胞のcysLT1とcysLT2受容体、ならびにLTC4合成酵素mRNA発現に対するBALFの効果：気管支上皮細胞由来BEAS-2B細胞はGAPDH mRNA 100万コピーに対して、cysLT1やcysLT2受容体、LTC4合成酵素のmRNAは40コピー以下と構成的な発現量は少なかった。epidermal growth factorによる変化はみられなかった。THP-1細胞のLTC4 mRNA発現にたいするBALFの効果：喘息患者と非喘息呼吸器疾患患者のBALFで24時間刺激後、LTC4SのmRNAレベルを検討した。生理食塩水処置群に比べて、喘息患者のBALF処置群では69%、非喘息患者群で54%まで低下した。

BALF中の炎症性細胞数とその百分率：喘息患者のBALFでは、好酸球とリンパ球の増加がみられた。非喘息患者群は、胸部X線で異常陰影が認められた者4例、サルコイドーシス1例であるが、喘息群に比べてBALF中の細胞数がおおよそ2倍で、好酸球は少なく、リンパ球と好中球が増加していた。THP-1細胞に対するLTC4合成酵素のmRNAレベルの抑制効果とBALF中の細胞数には負の相関が見られた。好酸球数と好中球数とは相関はなかったが、リンパ球数とは弱いながら相関が見られた。

ヒト末梢血単核球からのLTC4放出：正常人と喘息患者から得られた末梢血単核球を生理食塩水と吸入ステロイド薬であるフルチカゾン(0.1 μM)で48時間処置した後、カルシウムイオノフォアA23187(5 μM)で刺激して、LTC4の放出を調べた。正常人では生理食塩水群が194.5 pg/10⁶ cells、フルチカゾン群が105.0 pg/10⁶ cellsであった。喘息患者群ではそれぞれ2057 pg/10⁶ cellsと38.0 pg/10⁶ cellsであった。basalな放出量は喘息患者で高かった。フルチカゾンは両群で強く放出を抑制した。

C-2) 肝細胞のIFNγ-R2発現におよぼす影響因子

癌細胞株(HUH7とSNU449)におけるIFNγレセプター(R1とR2)の発現を検討したところ、DFOにおいてR2の有意な発現増加を認めた。R1については有意な変化を認めなかった。次に、IFNγの増殖抑制効果を、MTT法を用いて検討した。その結果、DFOおよびIFNγにおいては対照に比して、肝癌細胞株の増殖が有意に抑制された。さらにDFOとIFNγ併用群においては、それぞれ単独よりもさらに強い増殖抑制効果を認めた。最後にこれらIFNγの抗腫瘍効果のメカニズムにおけるアポトーシスの関与について検討したところ、併用群においてアポトーシス細胞が増加していることが判明した。

C-3) C型慢性肝炎患者における薬物動態関連遺伝子の発現

ヒト肝組織試料：今期、虎ノ門病院からは、HCV 63例(15-60才)が供与され、うち男性は34例、女性は29例であった。繊維化ステージが1の試料32例(男性16例、女性16例)、ステージ2の試料12例(男性6例、女性6例)、ステージ3の試料19例(男性12例、女性7例)であった。63例のうち、喫煙者と飲酒者数は、それぞれ20例と21例であった。RNA検体中の、18S、28S RNAが検出されない8検体を臨床データとの相関解析から除外した。また今年度は、獨協医科大学より、HIVおよびHCV等に非感染の肝検体14例(36-80歳)が供与された。そ

のうち男性 5 例、女性 9 例であった。病因は、胆管ガン、大腸ガンおよび S 字状結腸ガンの肝転移、胆のうガン、肝腫瘍および肝内結石であった。

肝繊維化のステージと臨床情報： C 型慢性肝炎患者の肝繊維化ステージの進展と、血液学および血液生化学的検査結果との関連性を 63 名の患者について検討した。肝繊維化ステージの進展とプロトンピン時間およびヒアルロン酸レベルとは、正の相関を示した。

C 型慢性肝炎患者の薬物動態関連遺伝子発現レベル： 今回解析対象の集団 (n=55) は、臨床的に C 型慢性肝炎の特徴を示していることが確認されたことから、C 型慢性肝炎患者の肝生検試料について、薬物代謝酵素の第一相と第二相、薬物トランスポーター、さらにこれら遺伝子の発現調節因子の mRNA 発現レベルと肝繊維化のステージとの関連性について解析した。その結果、薬物代謝酵素 *CYP1A2*、*CYP2E1*、*CYP3A4*、および薬物トランスポーターである *NTCP*、*OATP-C*、*OCT1* の発現低下と繊維化のステージの進展とが統計的に有意に相関することが示された。

今年度、獨協医科大学より、遊離肝細胞調製に適した新鮮肝の病巣除去組織が供与されなかったことから、遊離ヒト肝細胞の調製を断念した。

C-4) ヒト型酵素誘導モデルの作成と応用

in vitro および in vivo における農薬の CYP3A4 誘導能の評価； 3-1-10 細胞株を用いて、20 種の農薬の CYP3A4 レポーター遺伝子の転写活性化能を測定したところ、いくつかの化合物は強い誘導活性を示し、中でもピリプチカルブは 1 μM 以下の濃度ではリファンピシンよりも強い誘導能を示した。次に、ヒト *PXR* の siRNA 発現アデノウイルスを用いて、ピリプチカルブによる *CYP3A4* 誘導における *PXR* の関与をレポーターアッセイにより解析したところ、*PXR* 発現量の抑制の程度に応じて *CYP3A4* レポーター活性は低下した。また、HepG2 細胞におけるピリプチカルブ処理に伴う *CYP3A4* mRNA レベルの増加は、siRNA 発現アデノウイルスの感染によりほぼ消失した (データ示さず)。以上の結果より、ピリプチカルブによる *CYP3A4* の誘導は *PXR* を介していることが示唆された。そこで次に、ピリプチカルブを被験化合物としてマウスを用いた in vivo レポーターアッセイを行なった。その結果、ヒト *PXR* 非発現時には、ピリプチカルブ投与による *CYP3A4* レポーター活性の上昇は認められなかったが、ヒト *PXR* を発現させた場合には約 4 倍のレポーター活性の上昇が認められた。この結果は、ピリプチカルブはマウス *PXR*

をほとんど活性化せずにヒト *PXR* を選択的に活性化することを示唆しており、また、本 in vivo レポーターアッセイを用いることで、そのようなヒト *PXR* 選択的な *CYP3A4* 誘導物質の検出も可能となることを示している。

C-5) ヒト肝細胞の三次元培養と遺伝子解析

三次元培養： JHH-1 の細胞数は、播種細胞数当たりでは 10 日の培養期間で、ハイドロキシアパタイトでは 4 倍、PVA では 6 倍の細胞増殖が認められた。一方、JHH-4 に関しては細胞の増殖を 7 日間観察したが、明瞭な増殖は認められなかった。

HepaRG 細胞： 肝癌由来の培養細胞の 3 次元培養装置への適用と並行して、より肝実質細胞に近い性質を示すと考えられる HepaRG 細胞について、三次元培養装置での培養を前提とした検討を行った。single density と collagen の細胞は、形態上大きな差異は認められなかったが、double density では肝実質細胞様の細胞の割合が増加していた。

次に、各培養条件における遺伝子の発現について測定した。その中で *PXR*、*CAR*、*CYP3A4* および *CYP2B6* は、double density においては、いずれの遺伝子も single density の発現の 2 倍程度に上昇していた。リファンピシンおよびフェノバルビタールいずれも *CYP3A4* を効率よく誘導した。*CYP2B6* は過去の文献にあるように、フェノバルビタールで効率よく誘導された。両遺伝子とも HepaRG 細胞の肝実質細胞の分化を維持する 2% DMSO では、コントロールと比較して高発現していた。

C-6) ヒト肝細胞の中空糸モジュール培養法による肝薬物代謝酵素誘導能の評価

予備培養による影響： 7 日間および 14 日間の予備培養を実施した時の *CYP3A* 活性に、概ね大きな差は認められず、培養 15 日目 (播種後 28 日目) までは安定した *CYP3A* 活性を保持していた。一部に、8 日目より 15 日目の方が 1.5~2.5 倍高い活性を示した施設が見られた。これは、細胞の輸送によるストレスの回復によると思われる。

CYP3A4 活性の誘導； 1st Trial および 2nd Trial の結果、フェノバルビタールを曝露した細胞群においては、30-300 μM において濃度依存的な *CYP3A* 活性の上昇が認められた。一方、リファンピシンの曝露群では、0.3-30 μM において、濃度依存的な *CYP3A* 活性の上昇が確認され、3 μM 以上の曝露群では、ほぼ 1 μM 曝露群と

同程度の誘導倍率を示した。

3rd Trial では、10 μM フェニトイン、100 μM デキサメタゾン、300 μM フェノバルビタール、3 μM リファンピシンおよび100 μM カルバマゼピンのいずれの誘導剤においても3-7倍のCYP3A活性が認められた。各誘導剤における施設間差は6.4倍-11.5倍であったが、リファンピシン誘導率に対する各誘導剤の誘導率を求めたところ、その施設間差は1.5倍-4.4倍と減少した。

C-7) HepaRG細胞を用いたCYP酵素誘導評価系

HepaRG細胞において β -ナフトフラボンおよびオメプラゾールはCYP1A2を、リファンピシンとフェノバルビタールはCYP3A4のmRNA発現レベルを濃度依存的に増加した。また、CYP1A1/2、CYP3A4/5活性においても濃度依存的な上昇が認められ、CYP1A2およびCYP3A4 mRNAと関連した酵素活性の誘導が確認された。3 μM β -ナフトフラボンと100 μM オメプラゾール濃度において、CYP1A2 mRNAの誘導率は、それぞれ、65倍と290倍を、対応するCYP1A1/2活性の誘導率は、それぞれ11倍と17倍を示した。30 μM リファンピシンと750 μM フェノバルビタール濃度において、CYP3A4 mRNAの誘導率は、それぞれ125倍と130倍を示した。また、CYP3A4/5活性の上昇が認められたが、フェノバルビタール250 μM 以上では活性は頭打ちとなり、また、リファンピシン0.3 μM 以上では、既に活性はほぼ最高に達していた。

誘導倍率の用量反応曲線から、CYP1A2誘導の施設内施設間変動を評価するオメプラゾールと β -ナフトフラボン濃度をそれぞれ30 μM と3 μM に、同様にCYP3A4誘導評価のためのフェノバルビタールとリファンピシン濃度をそれぞれ250 μM と0.3 μM に設定した。施設内変動(CV%, n=3)はCYP1A2とCYP3A4でそれぞれ5.2%-73.8%、16.3%-82.3%であった。施設間変動(全施設の平均のCV%, n=7)はCYP1A2とCYP3A4でそれぞれ23.5%-36.8%、24.3%-28.1%であった。施設の相対誤差(RE%)はCYP1A2とCYP3A4でそれぞれ-60.7%-50.6%、-39.9%-40.0%の範囲であった。

C-8) ヒトCYP3A4発現細胞を用いた代謝活性の評価

CYP3A4代謝活性の評価； Ad CYP3A4を感染させた時のミダゾラムおよびテストステロン代謝活性とも、ウイルス感染価(MOI)量依存的に上昇し、50 MOIでそれぞれ61.1 \pm 11.6 pmol/well/hrと342.0 \pm 38.5 pmol/well/hr(播種時

の細胞数；0.5 \times 10⁵ cells/well)を示した。本細胞のCYP3A4活性が2種類の基質においてMOI依存的なミダゾラムの1'-水酸化活性の上昇が観察されたが、ウイルス無添加群を含めて施設間差が大きいことから、施設間差軽減のため、プロトコールの改良を行った。

2回目の実験では、感染時の細胞数をconfluentに近づけるため、前培養を2日間から3日間に延長した。またウイルス感染時に、細胞状態の悪化を防ぐため、1well当たりのウイルス液を増量した。実験1回目と同様、ミダゾラムの1'-水酸化活性は、MOI依存的に上昇し、50 MOIで49.58 \pm 26.22 pmol/well/hrを示し、1回目と同様十分なCYP3A4活性値が認められた。活性レベルにおける施設間のばらつきは1回目に比べ減少した。

ケトコナゾールによるCYP3A活性の阻害試験；ケトコナゾールによるCYP3A4活性の阻害が観察された。本阻害試験では、各施設において良好な阻害活性プロファイルを示した。各施設の平均から、IC₅₀値を概算すると約0.06 μM となり、昨年度実施した、ヒト凍結肝細胞から算出した値とほぼ一致した。

細胞あたりの活性値算出のため、細胞数のカウントを行ったが、24wellより細胞を剥離する操作が難しく、細胞が塊状になり、正確な細胞数をカウントすることが困難であった。そのため、細胞数による補正データは、正確さに欠けることから、本報告書にデータを記載しないこととした。

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IL-4、IL-5、IL-13を過剰産生し、遊走してきた好酸球の活性化と生存延長によっておこる慢性炎症を特徴とする病態と考えられている。今回、喘息患者と非喘息患者のBALF中の細胞分布を比べると、喘息患者で好酸球が増加しており、また、リンパ球も認められることから、Th2タイプの炎症は持続していると思われる。しかし、喘息患者群のBALF中細胞数は、非喘息患者群の50%であったことから、喘息の寛解時を反映していると思われる。

THP-1細胞をBALFで刺激すると、LTC₄合成酵素のmRNAレベルが抑制され、BALF中の細胞数と負の相関がみられた。THP-1細胞のLTC₄合成酵素のmRNA発現はTh2サイトカインであるIL-4、IL-5、IL-13では変化がなく、IFN- γ によって抑制されることはすでに報告している。

今回、BALFの濃縮に使用した限外濾過膜は10 kDa以下のヒスタミンやアラキドン酸代謝物、低分子サイズの神経伝達物質などを除去することから、実験に使用した呼吸器疾患患者のBALF濃縮液にはその病態を反映するサイトカインなどが含まれていると考えられる。また、IFN- γ はTh1サイトカイン炎症の中心的役割を果たしているが、喘息患者のBALF中でも増加しているという報告もあり、BALFによるTHP-1細胞のLTC₄合成酵素mRNA発現抑制にもIFN- γ が関与している可能性がある。

ヒト末梢血単核球からのLTC₄の放出は喘息患者で明らかに高く、LTC₄が喘息病態へ関与していることを強く示唆している。吸入ステロイドであるフルチカゾンには両群で放出を強く抑え、喘息治療で炎症を抑制するのに最も有効性が高いステロイドの有用性を確認した。末梢血好酸球は正常人では1-2%と少ないために採血量が多くなることに加えて、分離操作に時間と高価な抗体カラムを必要とする。一方、末梢血単核球は少量の採血量で十分であり、分離操作も安価・簡便で短時間で調製できる。LTC₄の作用点であるcysLT₁受容体の拮抗薬はおよそ60%の喘息患者に有効であるが、ノンリスボンダーも存在し、治療経過中に無効となる例も少なからず報告されている。末梢血単核球のLTC₄産生能と薬物の効果を解析することで、個々の患者に対する薬物治療薬を選択するオーダーメイド医療の実践に際し、エビデンスの一つとして利用できる可能性が示唆された。

D-2) 肝細胞のIFN γ -R2発現におよぼす影響要因

肝細胞癌に対しては現在も有効な化学療法が存在しない。本研究はIFN γ の生理作用の一つである抗腫瘍効果を肝細胞癌治療に用いるべく検討したものである。近年、IFN γ の生理作用が標的細胞の発現しているR1とR2のバランスに左右されることが、Tリンパ球を用いた検討で明らかにされてきた。しかしこのメカニズムがTリンパ球以外にも存在するか否かは不明であった。本研究はIFN γ レセプター、特にR2が鉄イオンをキレートすることで肝細胞癌細胞膜上に発現増加すること、これがIFN γ の抗腫瘍効果の増強につながることを初めて明らかにした。今後は臨床応用に用いることができるよう、検討を進める予定である。

D-3) C型慢性肝炎患者の病態と関連遺伝子の発現

臨床検査項目、なかでもプロトロンビン時間とヒアルロン酸値は、慢性C型肝炎の繊維化ステージと正の相関を示し、臨床で考えられてい

る知見と一致した。また、繊維化のステージが進展するとともに、CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4、NTCP、OATP-CおよびOCT1の発現レベルは、有意差をもって低下した。遺伝子発現が低下したなかには慢性C型肝炎の治療に用いられる薬物の肝取り込みに関与すると考えられるトランスポーターが含まれていることから、肝生検の結果、薬物トランスポーターの低下が大きい場合、同様に低下が認められた薬物動態関連遺伝子によって治療薬の動態が規定されている場合には、治療薬の投与量および投与間隔の変更などの対応が必要となると考えられる。このような状況時において、その薬物投与時の血中濃度や、薬物応答性等についての知見を集積することは、C型慢性肝炎患者のテーラーメイド医療にとり有用な情報となることが期待される。

発現の低下がみられた遺伝子と核内受容体には有意な相関は認められなかった。細菌等の感染防御に関与するIL-6、TNF α 等のサイトカインは一般に薬物代謝酵素の発現を低下させることが知られていることから、これらの遺伝子の発現調節領域とサイトカインとの関連を調べることは、慢性C型肝炎罹患時の薬物動態関連遺伝子発現の変化の機構を解明する上で重要と考えられる。

今年度、遊離肝細胞調製用に適した肝組織片の提供はなかったが、創薬研究にヒト組織利用、特に候補医薬品の薬物代謝酵素誘導評価は必須であることから、*in vitro*代替法の開発と共に、移植不適合臓器の研究利用へ道が開かれることが期待される。

D-4) ヒト型酵素誘導モデルの作成と応用

*in vitro*スクリーニングにより見出したCYP3A4誘導作用を有する農薬ピリブチカルブを用いて*in vivo*レポーターアッセイを行なったところ、経口投与により摂取させたピリブチカルブはマウス肝においてもCYP3A4レポーター活性化作用を示すことが明らかになった。これらの結果は、CYP3A4レポーター安定発現培養細胞を用いた*in vitro*レポーターアッセイとマウス個体を用いた*in vivo*レポーターアッセイの組み合わせは、ヒトCYP3A4誘導性化合物のスクリーニングシステムとして有用であることを示している。

しかしながら、現時点の*in vivo*レポーターアッセイシステムでは、マウス核内受容体の影響を排除することができないため、本研究ではさらに、siRNA発現アデノウイルスを利用することで、より選択的なヒト型核内受容体活性化作用の*in vivo*評価系の確立を目指した。しかしながら、これまでに作製したmPXRおよびmCARのsiRNA発現ウイルスではマウス肝において両

核内受容体の発現を抑制することはできなかった。そこで、現在、別のアルゴリズムを利用して作製したオリゴヌクレオチドを用いて新規コンストラクトを作成中である。今後これらのコンストラクトの有効性を確認した後にヒト型核内受容体を発現するマウスを作製し、*in vivo* レポーターアッセイを行なう予定である。

D-5) ヒト肝細胞の三次元培養と遺伝子解析

本年度までに検討した細胞 (HepG2、JHH-1、JHH-4) の三次元培養装置での増殖や薬剤応答性の結果を総合的に判断すると、細胞株に応じて三次元培養に適・不適があると考えられる。分子的な機構は不明であるが、HepaRG 細胞を三次元培養に適用する際には、HepaRG が前駆細胞から培養環境の変化に応じて肝実質細胞様細胞と胆管上皮様細胞に分化する特性を考え併せると、分化過程のどの段階にある HepaRG 細胞を用いるか慎重な検討が必要であることが示唆された。今後は、三次元培養に適応可能な細胞の特異性について、分子レベルでの詳細な検討ならびに支持単体等の培養条件についての検討が必要である。

三次元培養の条件検討と平行して HepaRG 細胞の遺伝子発現におよぼす細胞密度の検討を行った。肝実質細胞様に分化した細胞を選択トリプシン処理により得て、2 倍の密度で培養器に播種しなおした系では、各種薬物動態関連遺伝子の発現に関わっていると考えられる核内受容体 *PXR* および *CAR* の basal level での発現が約 2 倍上昇していた。また、転写調節経路では *PXR* および *CAR* の下流にあると考えられている *CYP3A4*、*CYP2B6* やその他今回測定した遺伝子 (*CYP2C8*、*CYP2C9*、*UGT1A1*) はいずれも basal level の発現上昇が認められ、*PXR* と *CAR* の basal level での発現上昇によるとものと考えられた。これらの結果は、HepaRG 細胞の細胞機能が培養条件により変化することを示唆していた。

D-6) ヒト肝細胞の中空糸モジュール培養法による肝薬物代謝酵素誘導能の評価

プレートでの通常のヒト遊離肝細胞の単層培養では、CYP 活性は経時的に減少することが知られており、薬物代謝評価、誘導能評価を困難にしている。一方、ヒト肝細胞中空糸モジュール TEST LIVER は、培養期間 2 週間までは安定した CYP3A 活性レベルを保持している。また、フェノバルビタールやリファンピシンの様な典型的な CYP3A4/5 誘導剤以外の誘導剤による

CYP3A4/5 酵素活性の誘導が濃度依存的に認められた。

以上のことから、本系は医薬品開発での酵素誘導評価系として有用なツールとして利用できることが示唆された。また、一定の活性が維持され、また長期間培養が可能であるため、長期にわたる試験、阻害試験および酵素誘導試験における回復試験等の他の薬物動態試験への応用することが可能であると考えられた。

D-7) HepaRG 細胞を用いた CYP 誘導評価系

HepaRG 細胞を用いて CYP1A1/2 および CYP3A4/5 誘導能を β -ナフトフラボンおよびオメプラゾール、また、フェノバルビタールとリファンピシンを対象に評価した。CYP1A1/2 および CYP3A4/5 活性および CYP1A2 および CYP3A4 mRNA 発現レベルとも、濃度依存的な誘導が確認された。誘導倍率の施設間変動はいずれも施設内変動よりも小さかったことから、HepaRG 細胞を用いた酵素誘導試験における変動の要因は、施設間の手技よりも細胞の状態等に関する要因が主であると考えられた。さらに全施設の誘導倍率の総平均に対する各施設の誘導倍率の相対誤差 (RE%) は 50% 程度であり、同一のプロトコールで実施する条件においては、データの施設間比較も十分可能であることが示唆された。得られたバリデーション試験のパラメーターを総じて評価した結果、HepaRG 細胞を用いた酵素誘導試験は生物学的な評価に用いる系として十分な精度を有していると判断された。

D-8) ヒト CYP3A4 発現細胞による代謝能評価系 アデノウィルスベクターとしてヒト

CYP3A4 遺伝子 (Ad *CYP3A4*) を HepG2 細胞に導入し、CYP3A4 活性をミダゾラムとテストステロンとを用いて評価した。昨年度は、Ad *CYP3A4* 感染後の細胞が凍結状態にて供給されたが、その供給量には限界が有ること、細胞の凍結融解と搬送による細胞状態の悪化が懸念された。そこで、今年度は、各施設においてウィルス感染操作を実施する評価系の確立を目指した。本年度 1 回目の試験結果を受けて、2 回目の試験では、細胞培養時間の延長と感染ウィルス液を増量した改良プロトコールにて行った。その結果、1) より多くの施設で高い CYP3A4 活性が認められ、2) 施設間差も 1 回目に比べて減少し、3) MOI に依存的な CYP3A4 活性の上昇が認められた。ま

た、昨年度の凍結細胞を用いた結果に比べ、全体の活性値は約 1.5 倍上昇した。さらに、各施設においてケトコナゾールにより良好な阻害活性プロファイルが得られたことから、阻害試験への適用も可能と思われる。今後は、さらに実験プロトコールを最適化することにより、より施設間差が少なく、発現レベルの高い結果が得られる可能性が示唆された。ヒト肝細胞の代替実験系として、他の CYP 分子種の発現、さらに複数の CYP を共発現させた系の確立は、遺伝多型（欠損モデルなど）を反映する CYP カクテルモデルが構築できれば、医薬品開発において有用なツールとなりうることを期待される。

E. 結論

呼吸器疾患患者の BALF にはその病態を反映するサイトカインが含まれており、オーダーメイド医療の実践に活用できる。ヒト単球様白血球細胞 THP-1 細胞の LTC₄ 合成酵素 mRNA 発現は呼吸器疾患患者の BALF 刺激で抑制され、BALF 中の炎症性細胞数と負の相関が認められた。

鉄キレート剤と INF γ の併用が肝細胞癌の有効な治療戦略となることが示唆された。

日本人の C 型慢性肝炎患者の肝生検試料を用いて、C 型慢性肝炎の繊維化ステージと、*CYP1A2*、*CYP2E1*、*CYP3A4*、*NTCP*、*OATP-C* および *OCT1* 発現レベルの低下との関連が明確になった。C 型慢性肝炎の罹患時において、上記遺伝子の発現が低下することの臨床的意義を解析するためには、病態（肝繊維化）のステージと治療薬の薬物動態や薬物応答性のデータを蓄積することが極めて重要であることが示され、慢性 C 型肝炎疾患時におけるテーラーメイド薬物療法確立のための有用な情報が得られた。

ヒト肝癌由来培養細胞株を用いる新規三次元培養法には、細胞により適・不適のあることを明らかにした。また、HepaRG 細胞を三次元培養に適用する際は、分化過程のどの段階にある細胞を用いるか慎重な検討が必要であることが示唆された。HepaRG 細胞に関しては、肝実質細胞様に分化した細胞を高密度に播種しなおすことで、核内受容体 *PXR* と *CAR*、さらに *CYP3A4*、*CYP2B1* 遺伝子の basal level での発現がいずれも約 2 倍上昇した。これは、HepaRG を三次元培養へ適用した際、より肝実質細胞に近い細胞機能が発現される可能性を示しており、培養・増殖が可能な HepaRG による安定した新規薬物代謝評価試

験系の確立が可能なが示された。

ヒト肝細胞中空系モジュールを用いた CYP3A 活性誘導試験系のバリデーション評価を行った結果、本試験系は、18 日間にわたり安定した CYP3A 活性と濃度依存的な誘導が認められ、長期間の評価に利用可能と考えられた。今後は、他の CYP についても、同様のバリデーションデータを取得すれば、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可能性が示唆された。

HepaRG 細胞を用いた酵素誘導試験は十分な精度を有していると判断された。変動の要因としては、施設間の手技よりも細胞ロットなど細胞の状態に関する要因が主で、同一のプロトコールで実施する条件においては、データの施設間比較も十分可能であることが示唆された。*in vitro* スクリーニングにより見出した CYP3A4 誘導能を有する農薬 PRY は、*in vivo* レポーターアッセイ経口投与後にマウス肝で CYP3A4 レポーター活性化作用 *VDR* は *PXR* や *CAR* と同様のプロモーター領域を介して *MDR1* 遺伝子の転写活性化と引き起こすことが明らかとなり、その領域（71bp）を含むレポーターコンストラクトを用いることで、これら 3 種類の核内受容体を介した *MDR1* 誘導評価系を構築することが可能であると考えられた。

薬物代謝酵素（CYP3A4）を強制的に発現させたヒト肝臓由来 HepG2 細胞は、有意な CYP3A4 活性を有し、かつ、ウイルス感染価依存的な代謝活性の上昇が認められた。このことから、本手法を用いてヒト肝細胞機能をミミックし得る試験系を確立できることが示唆された。

アデノウイルス（Ad CYP3A4）感染 HepG2 細胞の CYP3A4 活性は、MOI に依存的な上昇を示した。改良プロトコールにより、多くの施設においてより高い CYP3A4 活性が認められ、また、施設間差も減少した。ケトコナゾールによる阻害試験では、凍結ヒト肝細胞と同様、良好な阻害活性プロファイルが示されたことから、本試験系の有用性が示された。今後さらに試験系の最適化を行うとともに、アデノウイルスに組み込む CYP 分子種の多様化を行い、それらを組み合わせることにより、遺伝多型（欠損モデルなど）、等を反映する CYP カクテルモデルが構築できれば、医薬品開発において有用なツールとなりうることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kojima, S., Uchida, K., Sasaki, K., Sunagawa, M., Ohno, Y., Kamikawa, Y.: The suppressant effect of GEA3162 on spontaneous serotonin release from human mucosa in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **550**: 162-165, 2006.
- 2) Okada T, Sawada T, Kubota K. Deferoxamine enhances anti-proliferative effect of interferon-gamma against hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* **248** 24-31, 2007.
- 3) Matsubara T, Noracharttiyapot W, Toriyabe T, Yoshinari K, Nagata K, Yamazoe Y: Assessment of human pregnane X receptor-involvement in pesticide-mediated activation of CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* (2007) *in press*.

2. 学会発表

- 1) Domae, M., Sagara, H., Fukuka, T., Kamikawa, Y.: Proinflammatory cytokines regulate the expression of leukotriene C4 synthase mRNA in the human monocytic leukemia THP-1 cells. American Thoracic Society International Conference, San Diego, 5月, 2006.)
第42回日本肝癌研究会(東京)
- 2) 堂前真理子、相良博典、福田健、上川雄一郎: TGF- β は単球系 THP-1細胞のロイコトリエンC4合成酵素発現を増強する。第46回日本呼吸器学会学術講演会、東京、6月、2006.
- 3) 堂前真理子、相良博典、福田健、上川雄一郎: TGF- β によるロイコトリエンC4合成酵素の発現調節の細胞内機序。第56回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、11月、2006.
- 4) Sawada, T., Okada, T., Kubota, K.: Iron chelation enhanced anti-proliferative effect of IFN3 against hepatocellular carcinoma. FOCIS, The 6th Annual International Meeting (San Francisco, USA.) (2006.6.1-5)
- 5) 澤田登起彦、岡田としえ、窪田敬一. 鉄調節とIFN- γ による肝細胞癌治療の可能性について。第42回日本肝癌研究会(東京)(2006.7.6-7)
- 6) Matsubara T, Noracharttiyapot W, Toriyabe T, Yoshinari K, Nagata K, Yamazoe Y: A herbicide pyributicarb is more potent inducer of CYP3A4 expression interacting with pregnane X

receptor than rifampicin. The 22th JSSX(The Japanese Society for the Study of Xenobiotics) Annual Meeting (2006.11.29. Tokyo, Japan)

- 7) Murayama, N., Okazaki, O., Shimada, K., Mizuno, K., Sunouchi, M., Nakamura, A., Kamiyama, Y., Kato, M., Terauchi, Y., Sogawa, Y. and Ohno, Y.: Feasibility and validation of CYP1A and CYP3A induction in HepaRG, a novel human cell line obtained from a differentiated hepatoma. The 22th JSSX Annual Meeting (2006.11.29-12.1. Tokyo, Japan) .

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18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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