

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小澤 正吾

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

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	1
--	---

小澤正吾

II. 分担研究報告

1. In vitro 細胞系の遺伝子発現解析	38
石田誠一	
2. 遺伝子発現調節機構の解析	58
宮島敦子	
3. ナノテクノロジーによる HepG2 細胞の三次元培養系	72
小澤正吾	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業（トキシコゲノミクス研究））
総括研究報告書

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

主任研究者 小澤 正吾 岩手医科大学・薬学部 教授

研究要旨 肝薬物代謝活性と医薬品安全性・有効性との関連を試験する系は薬事行政の重要な部分であるが、現時点では供給が著しく困難なヒト肝初代培養細胞に全面的に依存している。この状況を打破するため、ヒト肝機能を模倣するヒト肝由来細胞の *in vitro* 培養系を、近來の新技术を用いて構築する研究に着手した。ヒト肝癌由来HepG2細胞をラジアルフローバイオリアクターで三次元培養し、ほぼ増殖期細胞のみで、薬物代謝型P450であるCYP3A4の誘導がかかることを明らかにした。増殖期の細胞では発癌関連遺伝子の発現が亢進していたと共に、細胞周期の進行に必要な遺伝子の発現上昇が認められ、増殖期細胞は、平面培養の細胞に比較して細胞増殖が亢進している事を示唆した。また、細胞骨格や細胞間コミュニケーション関連遺伝子発現上昇が見出された。最近SCIVAX社がナノテクノロジーにより開発したナノカルチャープレート (NCP) を用い、HepG2がスフェロイドを効率よく形成する条件を見出した。日本人肝組織を用いてCYP3A4やその構成的発現・誘導に重要であるPXRの発現を制御するmicroRNAにつき新しい知見を得た。

石田 誠一・国立医薬品食品衛生
研究所主任研究官、
宮島 敦子・国立医薬品食品衛生
研究所主任研究官

A. 研究目的

医薬品による有害事象発現に影響をする重要な因子として薬物代謝能の著明な低下あるいは著しい酵素誘導が考えられている。その原因となる代謝酵素の欠損変異遺伝子も知られており、遺伝因子によることもあるが、遺伝子異常が認められない大きな薬物代謝能の個体間変動が認められることもある。また、環境因子や代謝動態に関わるタンパクの発現調節因子のレベルが低下する場合もあり、体内動態関連遺伝子それ自体だけでは説明ができない事象も多い。ヒト肝薬物代謝動態能は低分子化合物による誘導の影響を受けるため、ヒト肝初代培養細胞を用いた薬物代謝動態能の評価が常時行われている。しかし、薬物代謝酵素誘導能を有する肝初代培養細胞の入手は容易ではなく、信頼できる評価系とは言い難い。この問題を克服するため、生体に近い肝機能を再現する *in vitro* 細胞培養系の構築が有用な方策の一つと考えられる。培養系としては、3次元培養、スフェロイド培養、プレート培養の条件を種々検討することが考えられる。本研究では、近年の新規細胞培養基材や培養方法を採用しヒト肝癌細胞を種々の新規培養環境に置くことにより、健常ヒト肝 mRNA の遺伝子発現を模倣する安定培養系の確立を目指す。本研究チームの上記目標は、環境因子による薬物代謝を始めとする肝機能に影響を及ぼす機構を解明することとも関係している。本研究に

おいて、近年入手可能になったヒト肝組織を用いて、各種薬物動態関連遺伝子の mRNA レベルを測定し、基礎的データを取得した。すなわち、初年度にヒト肝組織 24 検体、昨年度 6 検体を追加し、総計ヒト肝組織 30 検体を用いて、薬物動態関連遺伝子の mRNA レベルを測定し、遺伝子発現量のプロファイルを得た。各遺伝子の発現量の相関について検討した結果、*CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C9*, *3A4*, *3A5*, *3A4* とこれら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* の発現量の個体差は、下流の遺伝子の発現量の変動幅の方が大きいことを明らかにした。また、*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* の頻度にはほぼ対応していることを示した。さらに、*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されている。このように薬物代謝において主要な役割を果たす *CYP3A4* を始めとして、薬物代謝酵素の発現レベルには大きな個体差が存在することが知られてきた。*CYP3A4* 等の遺伝子発現調節機構の解析を目指し、ヒト肝における、*CYP3A4* 遺伝子の発現量 (mRNA レベル) について検討が進んできた。さらに主要な CYP 遺伝子の発現量および、関連受容体、転写因子遺伝子の発現量について解析を進めている。近年、遺伝子発現調節に、低分子

RNA(non-coding RNA, ncRNA)が関与することが知られてきた。本研究の細胞培養系での薬物代謝酵素遺伝子の ncRNA による発現調節、ならびにヒト肝組織を用いた薬物代謝酵素遺伝子の発現調節機構の研究に、ncRNA レベルの解析による新たな検討を加えた。microRNA (miRNA)は、細胞内に存在する20-30塩基からなる1本鎖RNAで、遺伝子の発現調節機能を有する non-coding (nc) RNA の一種である。miRNA 前駆体はヘアピン型のループ構造を持ち、Drosha によりプロセッシングを受け、Exportin5 により核内から細胞質へ移行する。さらに Dicer により切断され、最終的に成熟した一本鎖の miRNA となる。mature miRNA は、RISC (RNA-induced silencing complex) と共に mRNA に結合して、mRNA の翻訳抑制や mRNA の分解を引き起こすことにより遺伝子の発現を制御することが報告されている。ヒト miRNA は、現在 500 種類ほどが同定され、データベースに登録されているが、さらに数多くの未知の miRNA が存在することが予想される。近年、miRNA に関する研究が進み、miRNA の発現量変化が、発生、形態形成だけでなく、癌の発生や進展に関与することが相次いで報告され、miRNA が癌抑制遺伝子や癌遺伝子などの発現制御において重要な役割を担っていることが明らかになってきた。また薬物代謝酵素遺伝子の発現制御に関しても、human *CYP1B1* 遺伝子の発現制御に hsa-miR-27b が関与しているという報告がなされ、他の CYP においてもその発現の制御に miRNA の関与している可能性が考えられた。

昨年度までに、*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

いての解析として、ヒストンのアセチル化や DNA のメチル化に関する検討を行ってきた。本年度はそれに加え、以上述べたように miRNA の関与について検討した。

これらの遺伝子発現調節に関する解析結果を総合し、最終的には、健常ヒト肝 mRNA の遺伝子発現を模倣する安定培養系の確立を目指していく。今年度までに、*CYP3A4* 遺伝子の誘導がかかる三次元細胞培養系を HepG2 細胞について確立した。最終年度は、実際に各種医薬品および、一般化学物質の毒性評価を行い、系の有用性を評価する。また、今後、薬物代謝動態関連遺伝子の発現変動をもたらす物質のスクリーニング系構築の可能性を探求するため、最近開発された SCIVAX 社、ナノテクノロジープレート (NCP) 上で HepG2 細胞を培養し、スフェロイド様の構造の形成を通じて、三次元的に培養する系を試みた。NCP の各ウェル上に細胞が接着するわけではないが、スフェロイド形成効率には、NCP のウェル底面の材質がかなり影響することが明らかとなった。このように、本研究の主眼は、ヒト肝由来細胞培養法に様々な改変を加えることで、安定かつ再現性の高い新規医薬品の安全性評価系の構築を通じて、厚生労働行政に資することである。また、本研究を通じて、肝機能維持に必要な遺伝子発現を明らかにすることも可能であると考えられるので、科学的な価値が高い研究を展開できることが期待される。

B. 研究方法

細胞培養

細胞：ヒト肝癌細胞株 HepG2 は ATCC より入手した。

平面培養：HepG2 細胞の継代培養は、直径 10 cm の細胞培養用シャーレ(Corning)にて、DMEM (Sigma) + 10 % FBS (Invitrogen)培地中、5 % CO₂を含む気相下 37℃で行った。薬剤による酵素誘導試験の際には、直径 6 cm の細胞培養用シャーレ、high glucose DMEM (Invitrogen) + 10 % FBS 培地中、5 % CO₂を含む気相下 37℃で培養した。

三次元培養：エイブル社製ラジアルフローバイオリアクター(5 ml 容)を用いて行った。培地は high glucose DMEM (Invitrogen) + 10 % FBS、細胞の支持担体は hydroxy apatite (Pentax Corporation)を用いた。シャーレ上で培養している HepG2 細胞をトリプシン処理により回収し、3 X 10⁷ cells を調整槽へ播種した。細胞が支持担体に接着するまで細胞懸濁液をリアクター内で循環させた。その後は、一定量の新鮮な培地を供給し培養した。培地中の溶存酸素、pH、培地温度はリアクターの培地流出部で連続的に測定し、調整槽において一定になるよう調整した。培地中のグルコース消費量をグルコース C II-テスト (和光純薬) で測定し、平面培養で得られた値と比較することで細胞数の換算を行った。

薬剤による酵素誘導試験

三次元培養と平面培養下において、対数増殖期にある細胞の培養液中に目的の薬剤 (rifampicin 100 μM, dexamethasone 10 μM, phenobarbital 250 μM) を添加し、3 日間暴露した。この間培地はリアクター内を循環させ、薬剤を含む新鮮な培地と 1 日毎に交換した。

RNA 調製

細胞を回収し、PBS で二回洗浄後、RNeasy Mini Total RNA preparation kit (Qiagen)にて RNA を調製した。

TaqMan real-time PCR

調製した total RNA を TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems Inc.)により、添付の方法に従い逆転写した。CYP3A4 特異的 TaqMan プライマー(Cat. No. Hs00430021_m1 : Applied Biosystems Inc.)と TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.)を用い、Prism 7900 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.)により CYP3A4 の発現量を測定した。GAPDH の発現量をコントロールとし各サンプルの目的遺伝子の発現量を規格化した。

PCR-Array 解析

各条件下で得た total RNA 1.0 μg を RT² PCR Array First Strand Synthesis kit (SuperArray) により逆転写し cDNA を得た。得られた cDNA を RT² Real-Time PCR SYBR Green/ROX (SuperArray) と混合後、RT² Profiler PCR Array ver 3.0 Drug Metabolism (SuperArray)に添加し Prism 7900 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.)によりリアルタイムを実行し増幅データを得た。得られた Ct 値を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法により発現量の変化を解析した。なお、今回用いた RT² Profiler PCR Array では一度に 84 種類の薬物代謝関連遺伝子の発現を観察することができる。得られたデータは ingenuity systems の Ingenuity Pathways Analysis (IPA) ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った。

網羅的遺伝子解析

HepG2 細胞をラジアルフローバイオリアクターにて 7 日間培養した後、培養装置の上部、下部三箇所より HepG2 細胞を回収し、その細胞より total RNA を抽出、回収した。平行して、細胞培養用シャーレ(Corning)で平面培養したサブコンフルエントな状態の HepG2 から total RNA を回収した。両 total RNA を常法に従いラベル後 Human Genome U133A GeneChip (Affymetrix) にて遺伝子発現量を網羅的に測定した。測定は各サンプル duplicate で行った。平面培養と三次元培養で得られた遺伝子発現量を以下の条件で検定した。1) 同サンプルを duplicate で測定した際のシグナル値が 1.5 倍未満、2) 発現量の多いサンプルのシグナル値が 600 以上、3) t-検定により比較し p-value が 0.05 以下、4) 三次元培養での発現量が平面培養での発現量の 2 倍以上または 2 分の 1 以下。以上の条件を満たした遺伝子を“三次元培養で発現が変化した遺伝子”とした。三次元培養で発現が変化した遺伝子のリストは National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH の運営するバイオインフォマティクスツール DAVID Bioinformatics Resources 2007 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) にてクラス分けした。同時に同サイトより遺伝子のアノテーション情報を得た。

Paclitaxel 処理

Paclitaxel で microtubule を安定化させ、薬物代謝関連遺伝子の発現への影響を調べた。Paclitaxel の処理濃度を決定するために、HepG2 に対する paclitaxel の毒性試験を行った。毒性試験は 96 well プレートにて HepG2 を 1 日間培養した後、様々な濃度の paclitaxel に 3 日間曝露した。Paclitaxel への

曝露終了後、生細胞をクリスタル・バイオレットにより染色し、吸光度が未処理群の 1/2 となる paclitaxel 濃度 (IC₅₀) を求めた。その結果、IC₅₀ は 0.1 μM であった。薬物代謝関連遺伝子の発現への microtubule の影響を調べるにあたり、IC₅₀ の前後の濃度 (0, 0.01, 0.03, 0.5 μM) で paclitaxel 処理を行った。サブコンフルエントな状態の 10cm シャーレから 6cm シャーレへ 1/4 濃度で細胞を播種し 24 時間培養した後、paclitaxel を添加した培地に交換して 3 日間培養した。この間、1 日毎に培地の交換を行った。

ヒト肝組織からの RNA 画分の調製

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。肝組織は、入手後使用するまで -80℃ で保管した。

RNA の調製は、mRNA を含む大分子 RNA 画分については、RNAqueous small scale phenol-free total RNA Isolation kit (Ambion Inc., USA) を用い、miRNA を含む小分子 RNA 画分については、mirVana miRNA Isolation kit (Ambion Inc., USA) を使用した。肝サンプル(50 - 200mg 程度)に、各 kit の Lysis/Binding を加え、polytron homogenizer (KINEMATICA, Switzerland)を用いて 15 秒 x3 回 破碎した。さらに、QIASHredder (QIAGEN, Germany) カラムに掛け、非破碎組織を取り除いたモホジネットより、上記の RNA 抽出キットを用いて、各 RNA 画分を調製した。RNA 濃度は、ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Inc., USA) を用いて OD260 を測定した。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。

ヒト肝組織における mRNA 発現量の測定

mRNA を含む大分子 RNA 画分を oligo d(T)₁₆ により reverse transcription (RT) 反応を行い、cDNA を調製した。内在性コントロールとして *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、*CYP3A4* 関連の薬物代謝酵素は、ヒト 7 番染色体に存在する *CYP3A* クラスターに存在する *CYP3A4*, *3A5*, *3A7*, *3A43* を、核内受容体は *PXR*, *CAR* および核内受容体と複合体を形成する *RXR α* について測定した。定量の際の内部標準 RNA として市販のヒト poly (A)⁺ RNA (Becton Dickinson, USA) サンプルを使用した。

CYP3A4 および関連遺伝子に対する候補 miRNA の検索

CYP3A4 および *CYP3A* クラスターに属する *CYP3A5*, *3A7*, *3A43* および関連受容体 *PXR*, *CAR* 遺伝子について、miRBase Targets database (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/>) を用いて、候補 miRNA を検索した。各遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有する候補 miRNA 28 種について、ヒト肝組織における発現量の測定を試みた。miRBase Targets database を検索した。候補 miRNA の中には、数種類の *CYP3A* 遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有するものや、*CYP3A* 遺伝子と関連核内受容体の両遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有する miRNA が数多くヒットした。miRBase

Targets database により、*CYP3A4* 遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有する miRNA を検索した。*CYP3A4* 遺伝子の 3'側非翻訳領域の中に、miRNA 結合しやすい部分が見つかるまで観察された。

ヒト肝組織における miRNA 発現量の測定

miRNA 発現量の測定は、TaqMan Micro RNA Assay probe を用いて行った。その際、RT 反応は各 miRNA に対応した primer set を用いて行い、その cDNA 産物に対して specific な primer を用いて real-time PCR を行う必要がある。RT 用の primer set に関して、内在性コントロール miRNA の RNU48 および RNU44 を含む 50 種の primer set を混合した primer pool (pool 1~8) が発売されたため、RT 反応に primer pool が使用できるものについては、該当の primer pool を使用して反応を行った。

測定した miRNA は、has-miR-34a, -372, -9, -137 (以上 primer pool-1)、-27a, -27b, -152, -296, -302d (以上 primer pool-2)、-148a, -206, -216, -330, -224, -432 (以上 primer pool-3)、-338, -503, -522 (以上 primer pool-6)、-618, -608, -578, -613 (以上 primer pool-8)、-519a, -571 (以上該当 primer pool なし) である。内在性コントロールとして、primer pool に含まれる RNU48、RNU44 に加えて、miRNA 研究において使用されることが多い RNU6B(U6) についても検討した。

(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。

スフェロイド形成

SCIVAX 社ナノカルチャープレートにおける培養によるスフェロイド様構造の形成：96穴タイプの SCIVAX 社ナノカルチャープレート(NCP-L[低接着性プレート])を用いて行った。HepG2 細胞を1ウェルあたり、10,000 細胞播種し、high glucose DMEM (Invitrogen) + 10 % FBS, 0.1 mL 中、5 % CO₂ を含む気相下 37℃で96時間培養を行い、その間の形態を観察した。

C. 研究結果

三次元培養環境下における薬物代謝関連遺伝子の発現変化

三次元培養環境下において7日間培養した増殖期の細胞と平面培養において5日間培養した増殖期の細胞における薬物代謝関連遺伝子(84種類)の発現をPCR-Arrayにより定量し比較したところ、三次元環境下で培養することにより44の遺伝子の発現が有意(p value<0.05)に変化することが明らかになった。発現が有意に変化した44遺伝子のうち39遺伝子発現が三次元間培養により上昇していた(Table.1)。発現量が3倍以上に上昇した遺伝子8つ(*GAD1*、*CYP2B6*、*GSTP1*、*NAT2*、*GSTA3*、*SNN*、*SRD5A2*、*CHST1*)をFig.1示す。三次元間培養により発現が上昇した39遺伝子のリストをIPAによりネットワーク解析したところ、

PXR-RXR 複合体、エストラジオールやレチノイン酸により制御されている遺伝子が多く存在した (Fig.2 A), B))。

薬剤による酵素誘導

新規薬物候補の安全性を評価する際、その化合物による薬物関連遺伝子の発現誘導の評価は重要である。そこで、発現誘導に関する作用機作が異なる薬物 rifampicin、dexamethasone、phenobarbital を用いて、これらの薬物による薬物代謝関連遺伝子の発現誘導を PCR-Array により調べた。なお、PCR-Array のプレートには代表的な薬物代謝酵素である *CYP3A4* が搭載されていないため、別途 RT-PCR により *CYP3A4* の発現誘導を調べた。RT-PCR と PCR-Array の結果より、三次元培養と平面培養における薬剤による誘導倍率の比 (三次元培養/平面培養) を算出し比較した。その結果、三次元培養によって誘導倍率が2倍以上となった遺伝子が、rifampicin では *CYP3A4* を合わせて4、dexamethasone では2、phenobarbitale では0だった (table.2, 3)。逆に三次元培養によって誘導倍率が1/2以下となった遺伝子が rifampicin では8、dexamethasone では4、phenobarbitale では5だった (table.2, 3)。それぞれの薬剤に対する詳細は以下に示す。

rifampicin

三次元環境下で培養を行うことにより *CYP3A4* の発現誘導が平面培養と比較して約3.2倍亢進することが明らかになった (Table.3)。また、*CYP3A5* の発現誘導も三次元培養により約2.2倍亢進することが明らかになった (Table.2)。

dexamethasone

三次元培養のサンプルとプレート培養のサンプルともに *CYP3A4* 発現誘導が確認された (Table.3)。

phenobarbital

三次元培養のサンプルとプレート培養のサンプルともに *CYP3A4* 発現誘導が確認できなかった (Table.3)。

三次元培養による遺伝子発現変化の網羅的解析

三次元培養により薬物代謝関連遺伝子の発現上昇や *CYP3A4* の発現誘導の亢進が観察された。これらのメカニズム解明を目的として、対数増殖期の三次元培養による遺伝子発現変化を GeneChip により網羅的に調べ、DAVID により解析した。GeneChip より得られたデータを B. 研究方法に記した条件により検定した結果、三次元培養で発現が有意に変化した遺伝子は 355 あった。有意差が確認された遺伝子のリストを DAVID によりオントロジーにもとづくクラスターに分類した。上位 10 のクラスターの中で、“細胞周期”、“ステロイドや脂質の合成、代謝”、“細胞骨格”に関するクラスターは、そのクラスターに属する遺伝子の発現が三次元培養によって上昇している傾向が強く観察された (Fig.3 A), B), C))。更に“ステロイドや脂質の合成、代謝”に関するクラスターに属する遺伝子は KEGG PATHWAY Database

(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) による解析により、コレステロール合成経路に関する遺伝子が多く含まれ、そのすべての遺伝子の発現が上昇していることが明

らかになった (Fig.4)。また、三次元培養によって有意に発現が上昇した遺伝子には肝実質細胞のマーカーとなる *CK8*(約 2.4 倍) が含まれており、胆管上皮細胞のマーカーである *CK19* も有意とは判定されなかったが三次元培養によって約 8.0 倍上昇していた。

微小管が薬物代謝関連遺伝子の発現へ及ぼす影響

DAVIDによる解析の結果、細胞骨格に関する遺伝子の発現が三次元培養によって上昇していることが明らかになり、“細胞骨格”に関するクラスターには微小管に関する遺伝子が多く含まれていた (Table.4 A), B))。これまでに、薬剤により微小管を安定化させると *CYP3A4* やの発現が上昇すること (*Clin. Cancer. Res.* 2005, 11(17) 6359-6369)、薬剤により微小管を破壊すると *CYP3A4*、*2B6*、*2C8*、*2C9*、*2C16* の発現や他の薬剤による *CYP* の誘導が低下すること (*Mol. Pharmacol.* 2003, 64 160-169) が報告されている。そこで微小管と薬物代謝関連遺伝子の発現の関連性を明らかにするために、微小管の安定化剤である paclitaxel で HepG2 を処理することによる薬物代謝関連遺伝子の発現変化や rifampicin による誘導能の変化を調べた。

なお、発現を測定する遺伝子として、三次元培養により発現が上昇した *CYP2B6* と *ABCC1*、三次元培養により rifampicin による誘導が亢進した *CYP3A4* を選択した。その結果、すべての遺伝子において paclitaxel 処理濃度に依存した発現の上昇が観察された (Fig. 5)。また、paclitaxel 処理が rifampicin の誘導へ及ぼす影響として、*CYP3A4* におい

て2倍以上の誘導の亢進が観察された (Fig. 6 A), B), C))。この誘導の亢進は、今回実験に用いた paclitaxel 濃度においては濃度が低いほど程度が大きかった。

ヒト肝組織を用いた薬物代謝関連 mRNA、miRNA の解析

昨年度までに、*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の解析として、ヒストンのアセチル化や DNA のメチル化に関する検討を行ってきた。本年度はそれに加え、以上述べたように miRNA (Fig. 7) の関与について検討した。*CYP3A4* および *CYP3A* クラスター (Fig. 2) に属する *CYP3A5*, *3A7*, *3A43* および関連受容体 *PXR*, *CAR* 遺伝子について、miRBase Targets database (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/>) を用いて、候補 miRNA を検索した。各遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有する候補 miRNA 28 種について、ヒト肝組織における発現量の測定を試みた。miRBase Targets database を検索した結果を Table 5 に示した。候補 miRNA の中には、数種類の *CYP3A* 遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有するものや、*CYP3A* 遺伝子と関連核内受容体の両遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有する miRNA が数多くヒットした。Fig. 9 に、miRBase Targets database により、*CYP3A4* 遺伝子の 3'側非翻訳領域に相補的な配列を有する miRNA を検索した結果を模式的に示したが、*CYP3A4* 遺伝子の 3'側非翻訳領域の中に、miRNA 結合しやすい部分がいくつかまとまって観察された。

ヒト肝における *CYP3A4* 関連薬物動態関連

遺伝子の発現について

日本人 30 検体の肝組織を用いて、*CYP3A4* および関連薬剤反応性遺伝子の発現量の相関について検討した結果を、Fig. 10 に示した。*CYP3A4* 遺伝子の発現量は、*CYP3A43* 遺伝子、核内受容体 *PXR*, *CAR* 遺伝子、これらの核内受容体と複合体を形成する *RXR α* の発現量に相関が観察された ($p < 0.01$)。 *CYP3A5* 遺伝子と *CYP3A7* 遺伝子発現量に相関が観察されたが ($p < 0.05$)、他の遺伝子との相関は見られなかった。*CYP3A43* 遺伝子の発現量は、*CYP3A4* 遺伝子の発現量に相関し、*CYP3A4* 同様に、核内受容体 *PXR*, *CAR* 遺伝子、これらの核内受容体と複合体を形成する *RXR α* の発現量に相関が観察された。核内受容体 *PXR*, *CAR* 遺伝子および *RXR α* の発現量は、お互いに相関が観察され、*CYP3A* 遺伝子では、*CYP3A4*, *3A43* 遺伝子の発現量に相関が観察された。

ヒト肝における miRNA の発現について

28 種の候補 miRNA について、ヒト肝における発現量を測定した結果、このうち 7 種の miRNA (has-miR-608, -302d, -578, -519a, -613, -522, -571) については、発現を検出することができなかった (Table 5)。 mRNA の発現量の検討においては、*GAPDH* や *BACT* 遺伝子の発現量を内在性コントロールとして、これらの遺伝子に対する相対発現量で比較するのが通常であるが、肝組織においてその発現量が大きく変動しないことが確認されているからである。昨年度の研究において、TSA, AzaC を処理した HepG2 細胞株においては、TSA 処理では、*GAPDH* および *BACT* 遺伝子の発現量は共にほとんど

変化がなかったが、AzaC の処理では、*GAPDH* 遺伝子の発現量の抑制が観察された。miRNA 研究においては、RNU6B(U6) の発現量を内在性コントロールとして相対発現量を比較している論文が多くあるが、肝組織においてその発現量を内在性コントロールとして使用することに問題がないのか確認されているわけではない。また、今回 RT 反応に使用した primer pool には、RNU48, 44 の 2 種の miRNA が内在性コントロール用として混合されている。しかしながら、これらの 2 種の RNU を、肝組織の miRNA 発現解析において内在性コントロールとして使用することに問題がないのか、確認されたデータはなかった。そこで、今回ヒト肝における miRNA の発現量を測定するにあたり、30 検体における、RNU48, 44, 6B(U6) の発現量を比較した (Fig. 11, 12, 13)。RT の反応に供する RNA 量を一定にして反応した際の、発現量 (HL01-10 の小分子 RNA 画分の mixture の希釈系列を standard としている) を比較したところ、RNU48, 44 および 6B のヒト肝組織における発現量は、それぞれ変動していることが明らかになった。RNU44, 48 については、各 primer pool における発現量を比較し、RT 効率に差がないことを確認した。(pool-1 ~ pool-8 の相関 : $P < 0.01$, $r^2 = 0.88-0.98$ (RNU48), $0.79-0.92$ (RNU44)) Fig. 13 に RNU48, 44 および 6B の発現量の相関を示したが、RNU48, 44 および 6B(U6) の発現量には相関が観察されたものの ($P < 0.01$ または 0.05), $r^2 = 0.36-0.50$ で相関係数は、mRNA 発現における *GAPDH* vs. *BACT* に比較してもそれほど高い値ではなかった。そこで、今回の解析においては、3 種の RNU

をそれぞれ内在性コントロールとして miRNA の発現量の比較を行うことにした (Fig. 14, 15, 16)。RNU48 を内在性コントロールとした場合の、*CYP3A* 関連遺伝子の発現量と候補 miRNA の発現量の相関を調べた結果を Fig. 14 に示した。その結果、has-miR-372, -27b, -148a, -597 の発現量は、*CYP3A4* の発現量に正の相関を示し ($P < 0.01$ または 0.05)、has-miR-224 は負の相関を示した ($P < 0.05$)。核内受容体については、has-miR-372, -137 が *PXR* と正の相関、has-miR-224 が負の相関を示し、has-miR-137 が *CAR* と正の相関を示した。次に、RNU44 を内在性コントロールとした場合の、*CYP3A* 関連遺伝子の発現量と候補 miRNA の発現量の相関を調べた結果を Fig. 15 に示した。その結果、has-miR-296, -330, -224, -503 の発現量は、*CYP3A4* の発現量に負の相関を示した ($P < 0.01$ または 0.05)。核内受容体については、has-miR-372 が *PXR* と正の相関、has-miR-330, -224 が負の相関、has-miR-137, -27b, -152, -216, -597 が *CAR* と正の相関、has-miR-330, -503 が負の相関を示した。RNU6B(U6) を内在性コントロールとした場合の、*CYP3A* 関連遺伝子の発現量と候補 miRNA の発現量の相関を調べた結果を Fig. 16 に示した。その結果、has-miR-296, -330, -224, -503 の発現量は、*CYP3A4* の発現量に負の相関を示した ($P < 0.01$ または 0.05)。核内受容体については、has-miR-296, -330, -224, -503 が *PXR* と負の相関、has-miR-216 が *CAR* と正の相関、has-miR-503 が負の相関を示した。

スフェロイド形成

(ナノカルチャープレート(NCP-L)培養環

境下における HepG2 細胞の形態)

NCP-L 環境下において 96 時間 HepG2 細胞を培養した。NCP-L は SCIVAX 社がこれまでに開発してきた種々の NCP の中で、低接着型に分類されるプレートである。本プレートで、培養開始後 2 日後には細胞の凝集像が認められ、スフェロイド様の構造をとり始めた。96 時間培養後、Fig.17 に示すように、細胞は凝集塊となり、スフェロイド様構造をとった。対照として示した Fig.18 のような典型的な平面培養時の HepG2 の細胞像とは明瞭に異なっていた。

D. 考察

PCR-Array の結果、薬物代謝関連遺伝子の発現は三次元培養下において上昇するものの割合が多く (Fig.1)、この傾向は Drug トランスポーター、第一相酵素、第二相酵素にかかわらず一様に観察された (Table.1)。このことより三次元培養は HepG2 の薬物代謝機能を向上させていると判断した。

RT-PCR や PCR-Array の結果より PXR-RXR の制御下の遺伝子の発現が三次元培養により上昇することや rifampicin による *CYP3A4* や *CYP3A5* の発現が三次元培養により亢進することが明らかになった。rifampicin は PXR を活性化することにより *CYP3A4* をはじめとする薬物代謝関連遺伝子の発現を誘導することが知られている。以上のことから、三次元培養による薬物代謝関連遺伝子の発現や薬剤誘導の変化のメカニズムを解明するために、今回観察された三次元培養による変化への PXR の関与について検討する必要があると考える。

Paclitaxel により microtubule を安定化させることにより、薬物代謝関連遺伝子である

CYP3A4、*CYP2B6*、*ABCC1* の発現が上昇し、さらに rifampicin による *CYP3A4* の誘導が亢進することが明らかになった。ここで興味深いのは三次元培養による上昇が確認されている *CYP2B6*、*ABCC1* の発現が paclitaxel によっても上昇していることや三次元培養よって rifampicin による誘導の亢進が観察されている *CYP3A4* のみで paclitaxel 処理にともなう rifampicin による誘導の亢進が観察されたことである。これらのことより、microtubule が薬物代謝関連遺伝子の発現や誘導に関与していることが示唆され、三次元培養による microtubule 関連遺伝子の発現増加が三次元培養による薬物代謝関連遺伝子の発現や誘導の変化に関与していることが推察される。

三次元培養と平面培養における GeneChip のデータを比較したところ、実質肝細胞のマーカーである *CK8* や胆管上皮細胞のマーカーである *CK19* の発現が三次元培養によって上昇していることが明らかになった。このことから三次元培養下の HepG2 は平面培養下の細胞より肝細胞に近い状態にあると思われる。また、三次元培養と平面培養において有意な差が確認された遺伝子のリストを DAVID により解析した結果、細胞骨格に関する遺伝子の発現が三次元培養により上昇している傾向が明らかになった。細胞骨格を構成する遺伝子は、今回検討を行った微小管に関する遺伝子だけではなく、アクチンやサイトケラチンに関する遺伝子も薬物代謝などの肝臓の機能に影響していることが報告されている。たとえば *CK8* をノックアウトしたマウスでは胆汁の流量が 20% 減少すること (*Am. j. Patbol.* 1997, 151 1673-1683) やラットの実質肝細胞において

アクチン繊維や微小管がCYP2B1/2Bの誘導に必要となること(Biochem.Pharmacol. 2008, 75 (5) 1209-1217) が挙げられる。特にCK8ノックアウトマウスに関する報告は、三次元培養を行うことによってCK8の発現が有意に上昇していることからもとても興味深い知見であり、CK8の発現上昇が三次元培養による薬物代謝関連遺伝子の発現変化に関与している可能性が考えられる。以上のことから、三次元培養による薬物代謝関連遺伝子の発現や薬剤誘導の変化のメカニズム解明は、細胞骨格の変化と薬物代謝をはじめとする肝臓の機能との関連性を明らかにすることに結びつくと考えられる。

ヒト肝における CYP3A4 関連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、CYP3A4 および関連薬剤反応性遺伝子発現量の相関について検討した結果、昨年、一昨年にヒト肝における 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と同様、CYP3A4 遺伝子の発現量と核内受容体 PXR, CAR 遺伝子、これらの核内受容体と複合体を形成する RXRA の発現量に相関が観察された(p<0.01)。本年は、CYP3A クラスター遺伝子の発現に注目し、CYP3A5, 3A7, 3A43 の各遺伝子の発現量についても検討を行ったが、その結果、CYP3A4 遺伝子と 3A43 遺伝子の発現量に相関が観察された。ヒトにおいて、CYP1A1 および 1A2 遺伝子は、CYP3A4, 3A43 遺伝子のように、遺伝子構造が CYP1A クラスターにおいて向き合った構造をしているだけでなく、同じプロモーターを介して発現誘導が起こることが報告されている。CYP3A4, 3A43 遺伝子の

場合には、CYP1A 遺伝子に比べると両遺伝子間の距離が離れているため、CYP1A と同じような制御を受けるかどうかについては不明であるが、今後発現制御機構の解明においてことは、興味深い知見である。また、CYP3A5 遺伝子と CYP3A7 遺伝子発現量に相関が観察され、他の遺伝子との相関は見られなかったことも、両遺伝子がタンデムに並んだ構造を取っていることを考えると、発現制御機構の上で何かの繋がりがある可能性が考えられる。

ヒト肝における miRNA の発現について

今回、初めてヒト肝における miRNA の発現量を測定した。測定方法として、TaqMan Micro RNA Assay probe を用いて行ったが、最初に課題となったのが、発現量を標準化するための内在性コントロールの選択であった。mRNA の発現量の比較の場合には、GAPDH や BACT 遺伝子の発現量を内在性コントロールとして、これらの遺伝子に対する相対発現量で比較するのが通常である。昨年度の細胞株における実験のように、薬剤処理によりハウスキーピング遺伝子の発現量に変化したり、細胞内の構造が変化することが予想される場合には、それぞれの状態における各遺伝子の発現量を測定し、適した内在性コントロール遺伝子を選択することができた。しかしながら、今回は同じヒトの肝組織由来であることから、内在性コントロールとする miRNA としてどれが有効であるかが、文献的にも分からない状態であった。ABI のセミナーや、パンフレット等の情報では、ヒトの各組織における発現量の比較、またヒト由来の細胞株間での比較においては、RNU48, 44 および

6B(U6)のいずれを用いても良好な結果が得られるとのことであったが、今回実際に、RNU48, 44 および 6B の発現量を 30 検体のヒト肝組織において RT の反応に供する RNA 量を一定にして測定してみると、RNU48, 44 および 6B は、3 種の miRNA の発現量には相関があるものの、変動していることが明らかになった。r squared=0.36-0.50 で、相関係数は mRNA 発現における *GAPDH* と *BACT* の相関係数に比較すると低い値であった。3 種の内在性コントロール RNU 間では、RNU48 と 6B 間の相関が最も高かった。今回の研究では、*CYP3A4* 遺伝子の発現制御に関与する miRNA のスクリーニングの段階であることから、敢えて、RNU48, 44 および 6B それぞれを内在性コントロールとした場合の結果を比較検討することにした。今回の miRNA の調製は、RNA の大分子画分、および小分子画分の調製を別々のキットを用いて行ったため、肝組織において安定な発現が知られている mRNA である *GAPDH* や *BACT* を miRNA の発現量の内在性コントロールとして用いることができなかつたが、今後、RNA 画分を大分子～小分子すべてを一緒に回収することによりそのような解析を行うことにより、より信頼性の高い統計解析を行うことができるのではないかと期待される。

3 種の RNU をそれぞれ内在性コントロールとして miRNA の発現量の比較を行った結果、*CYP3A4* 遺伝子の発現量と正の相関を示す miRNA と負の相関を示す miRNA が存在した。また、*CYP3A4* 遺伝子の発現量と相関を示す miRNA のうち、核内受容体 PXR または CAR とも相関を示すものが幾つかあった。*CYP3A4* 遺伝子の発現量と相関を示

した miRNA は、内在性コントロール RNU48 では正の相関と負の相関の両方が観察されたが、RNU44, 6B では負の相関のみであり、4 つの miRNA は共通であった。核内受容体遺伝子 *PXR* との相関では、内在性コントロール RNU48, 44 では正の相関と負の相関の両方が観察されたが、RNU6B では負の相関のみであった。また、*CAR* との相関では、内在性コントロール RNU48 では正の相関のみ、RNU44, 6B では正と負の相関の両方が観察された。3 種の内在性コントロール RNU において共通に *CYP3A4* 遺伝子の発現量に相関が観察された miRNA は has-miR-224、RNU44, 6B において共通に相関が観察された miRNA は has-miR-296, -330, -224, 503 であった。核内受容体遺伝子に関しては、3 種の内在性コントロール RNU において共通に *PXR* 遺伝子の発現量に相関が観察された miRNA は、has-miR-224 であった。has-miR-372 は RNU48,44 において共通に正の相関、has-miR-330 は RNU44, 6B において共通に正の相関、が観察された。*CAR* 遺伝子に関しては、3 種の内在性コントロール RNU において共通に *CAR* 遺伝子の発現量に相関が観察された miRNA はなく has-miR-137 が RNU48,44 において共に正の相関、has-miR-216 が RNU44, 6B において共に正の相関、has-miR-503 が RNU44, 6B において共に負の相関が観察された。

miRNA の作用機序を考えると、mRNA の発現量と負の相関を示した miRNA は、ターゲット遺伝子の 3'側非翻訳領域に結合することにより mRNA の分解や翻訳抑制を行っている可能性が高い。しかしながら今回、mRNA の発現量と正の相関を示した miRNA も幾つか存在し、この miRNA は直

接ターゲット遺伝子の 3'側非翻訳領域に結合するのは異なる作用により *CYP3A4* の発現制御していると考えられ、別の遺伝子の発現制御が *CYP3A4* の発現制御に関わっている可能性もあり得る。

今後、今回得られた結果をもとに、これらの候補 miRNA が実際に関与しているかについて次のような研究を進める予定であり、*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。

候補となった miRNA について、HepG2, HuH7 および他の細胞株（非肝由来）における候補 miRNA の発現量と *CYP3A4* の発現レベルを調べる

1. 候補となった miRNA について、HepG2, HuH7 および他の細胞株（非肝由来）における候補 miRNA の発現量と *CYP3A4* の発現レベルを調べる。
2. 実際の 3'-UTR 配列および候補 miRNA 相補配列を組み込んだ発現ベクターを作成し、レポーターアッセイを行う。
3. 候補 miRNA の precursor および anti-sense oligoribonucleotide を細胞に導入し *CYP3A4* の発現の変化を検討する。

SCIVAX 社ナノカルチャープレートにおける細胞培養

SCIVAX 社がナノテクノロジーにより、培養細胞をスフェロイド様の形態にして三次元的に培養可能なナノカルチャープレート (NCP) を開発した。NCP はそのナノテクノロジー素材の種類により細胞の接着性が異なったプレートが準備されている。今年度、予備的に複数種のナノテクノロジー素材による 96 穴プレートによる培養を試験したが、スフェロイド形成能は、素材に

よりかなり異なることが明らかとなった。HepG2 細胞に関しては低接着性の NCP-L プレートを用いることにより、細胞播種後 24 時間目から徐々にスフェロイド様の構造をとり始め、96 時間後には大部分の細胞がスフェロイドを形成している様子が観察された (Fig. 17)。三次元的な環境の細胞系とするためには、プレート素材や、培養液、あるいは血清について、十分な予備試験が必要であった。

E. 結論

本年の研究より以下のことが明らかになった。

1. PCR-Array で測定した 84 の薬物代謝関連遺伝子のうち 44 の遺伝子において、三次元培養による発現の上昇を認めた。上昇した遺伝子は特定の機能に偏っておらず、第一相酵素、第二相酵素、トランスポーターに関する遺伝子を含んでいた。
2. 三次元培養により rifampicin による *CYP3A4*, *CYP3A5* の誘導を亢進させることができた。
3. 三次元培養と平面培養における遺伝発現を GeneChip により測定した結果、三次元培養することにより“細胞周期”、“ステロイドや脂質の合成、代謝”、“細胞骨格”に関連する遺伝子の発現が上昇していた。また、肝実質細胞や胆管上皮細胞のマーカー遺伝子が上昇していることが確認された。
4. Paclitaxel により microtubule を安定化させることにより、薬物代謝関連遺伝子である *CYP3A4*, *CYP2B6*, *ABCC1* の発現が上昇し、さらに rifampicin による

CYP3A4 の誘導が亢進することが明らかになった。

ヒト肝における *CYP3A4* 関連薬物動態関連遺伝子の発現について

5. ヒト肝における *CYP3A4* 関連薬物動態関連遺伝子の発現について mRNA レベルで解析を行い、*CYP3A* クラスター遺伝子の発現量と関連核内受容体遺伝子の発現量のプロファイルを得た。
6. *CYP3A4* 遺伝子の発現量と核内受容体 *PXR*, *CAR*, *RXR α* 遺伝子の発現量に相関が観察された。*CYP3A4* 遺伝子の発現量と *3A43* 遺伝子の発現量に相関が観察され、*CYP3A43* 遺伝子の発現量も、*PXR*, *CAR*, *RXR α* 遺伝子の発現量と相関していた。

ヒト肝における miRNA 発現について

7. ヒト肝における miRNA 発現について検討した結果、内在性コントロール miRNA・RNU48, 44, 6B の発現量には相関が観察されたが相関係数は低く、ヒト肝組織間で変動があることが明らかとなった。
8. 3種の RNU をそれぞれ内在性コントロールとして miRNA の発現量の比較を行った結果、*CYP3A4* 遺伝子の発現量と正の相関を示す miRNA と負の相関を示す miRNA が存在し、*CYP3A4* の発現制御に関して異なる作用を示す可能性が示唆された。
9. SCIVAX 社ナノテクノロジー素材による NCP プレートにより HepG2 細胞をスフェロイド様構造にした培養条件を達成できた。

ラジアルフローバイオリアクターを用いた三次元培養システムの可能性と今後の課題を述べる。

これまでに構築した三次元培養システムにより第一相酵素、第二相酵素、トランスポーターに関する多くの遺伝子発現を上昇させることのできたことから、HepG2 における薬物代謝に関する機能は全般的に上昇していることが予想される。しかし、一般的に行われているヒト肝初代培養細胞を用いた試験系と比較すると、HepG2 を用いた三次元培養システムでは薬物による誘導倍率の面において十分であるとは言えない。そのため、この三次元培養システムを実際の薬物安全性試験系に用いるためには、ヒト肝初代培養細胞により近く培養することが可能な細胞を用いることを考える必要があるだろう。また、実質肝細胞のマーカーである *CK8* や胆管上皮細胞のマーカーである *CK19* の発現が三次元培養によって上昇していたことから、今回の三次元培養システムを用いることにより肝臓由来の細胞を実際の肝臓における正常細胞に近い状態にすることが可能になるかもしれない。

GeneChip の解析結果より細胞骨格に注目し、Paclitaxel による microtubule の安定化が薬物代謝関連遺伝子の発現や誘導に及ぼす影響を調べたところ、paclitaxel 処理により薬物代謝関連遺伝子の発現の上昇や誘導の亢進が観察された。このことより薬物代謝関連遺伝子三次元培養と平面培養の比較より得られた知見を細胞の培養や改変に反映させることにより、より薬物試験に適した細胞培養システムや細胞を構築することができるかもしれない。

SCIVAX 社、NCP を用いた三次元培養システムでは、プレート培養の系であるため、薬物等による薬物代謝酵素誘導能の評価が、ラジアルバイオリアクターに比較すると多数の検体について、一度に可能になると思われる。ただし、予備実験の結果、用いる細胞と、培養プレート底面の材質の組み合わせにより、スフェロイド様の構造の形成効率には大きな差異が認められた。用いる細胞を変える場合は、その都度予備検討が必要である。スクリーニング系として用いるのであれば、多数の検体について酵素誘導が同時に評価可能である。すなわちスループットを上げることができる。スクリーニングへの課題としては、以下のことが想定される。HepG2 細胞は培養開始後2日目で早くもスフェロイドの形成が認められる。細胞塊が大きくなった後、被検物質と細胞を接触させた場合、薬剤透過性が悪くなることが考えられる。従って、細胞播種と同時に被検物質を接触させる必要があると考えられる。細胞内の薬物代謝酵素の発現・誘導のレベルに依存するが、形成したスフェロイドはかなり強固であり、培養液をピペティングで吸い上げた程度では凝塊がほぐれることはない。従って、スフェロイド内での薬物代謝酵素タンパク質レベルを Western blot 法で測定することはそれ程困難ではないと思われた。薬物代謝酵素を誘導させた後、その酵素活性を測定することがその次の課題であると考えられる。その場合にも、酵素活性を測定するための基質となる化合物の透過性が問題となろう。酵素誘導をかけ、さらに酵素活性を測定する場合は、酵素誘導剤を作用させた後の酵素基

質を加えるタイミングが問題となる。以上のべた一連の問題をうまく解決することで、本系の薬物代謝酵素誘導/酵素活性測定系としての有用性が高まると思われる。また、本研究事業で一貫して試みてきたラジアルフローバイオリアクターで得られた非常に貴重な知見を生かして、速やかに系を有用なものとして行くことができると考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

2-1. 日本薬学会 第128回年会 (横浜)

「ラジアルフローバイオリアクターを用いた三次元培養条件下における薬物動態関連遺伝子の発現変化」

堀内 新一郎¹ 石田 誠一¹ 小澤 正吾

² 宮島 敦子¹ 簾内 桃子¹

本郷 有克³ 石川 陽一³ 中澤 憲一¹

(¹国立衛研、²岩手医大薬、³エイブル)

2-2. A Miyajima-Tabata, S Ozawa, S Ishida, and K Nakazawa Participation of microRNA in the regulation of human CYP3A4 expression.

47th Annual Meeting of Society of Toxicology (Seattle, USA), March. 18, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Table.1 三次元培養と平面培養における薬物代謝関連遺伝の発現の比較

	gene symbol	3D / 2D (fold)	p-value(n=3)		
drug transporters	metallothioneins	MT2A	0.78		
		MT3	1.29		
	p-glycoprotein	ABCB1	1.14		
		ABCC1	2.15		
		GP1	1.16		
phase I metabolizing Enzymes	P450 gene family	CYP1B2	1.29		
		CYP17A1	1.53		
		CYP19A1	0.80		
		CYP1A1	1.97		
		CYP2B6	8.95		
		CYP2C19	1.48		
		CYP2C8	1.87		
		CYP2C9	1.29		
		CYP2D6	1.31		
		CYP2E1	4.05		
		CYP2F1	1.33		
		CYP2J2	0.66		
		CYP3A5	1.46		
		phase II metabolizing enzymes	carboxylase/ase	CES2	1.54
				CES4	1.27
decarboxylase	GAD1		9.87		
	ADH1B		1.29		
dehydrogenase	ADH1C		1.09		
	ADH4		2.66		
	ADH5		1.32		
	ADH6		1.22		
	ALAD		0.73		
	ALDH1A1		2.77		
	HSD17B1		0.92		
	HSD17B2		0.55		
	HSD17B3		2.36		
	glutathione peroxidase		GPX1	1.89	
GPX2			1.54		
GPX3			0.50		
GPX4			1.33		
GPX5			1.29		
GSTA3			4.73		
GSTA4			1.42		
GSTM2			1.37		
GSTM3			1.00		
GSTM5			1.29		
GSTP1			7.31		
GSTT1			0.98		
GSTZ1			1.19		
lipoxygenase	LPO		1.44		
	MPO		1.29		
	ALOX12		1.46		
	ALOX15		0.66		
	ALOX5		1.81		
hydrolases	ABCE		1.30		
	EPHX1		2.05		
	FAAH		2.02		
	FBP1		0.68		
	HK2		1.32		
	kinases		PKLR	0.76	
			PKM2	1.27	
			BLVRB	1.11	
			BLVRE	0.95	
			CYB5R3	0.89	
glutathione peroxidases	GPX1		1.89		
	GPX2		1.54		
	GSR		1.66		
	MTHFR		1.26		
	NCS3		2.24		
	NQO1		1.51		
	SRD5A1		1.29		
	SRD5A2		3.37		
	PON1		1.03		
	PON2		1.93		
peroxidases	PON3		1.27		
	CHST1		3.11		
other related genes	GSTM2		1.37		
	GSTM3		1.00		
	GSTM5	1.29			
	GSTP1	7.31			
	GSTT1	0.98			
	MGST1	1.50			
	MGST2	0.53			
	MGST3	1.52			
	NAT1	2.15			
	NAT2	5.91			
other related Genes	CCM1	1.20			
	GGT1	1.17			
	AHR	1.00			
	ARN1	1.34			
	ASNA1	2.22			
	GCKR	0.65			
	MARCKS	1.11			
SNARCAL1	1.31				
SNN	4.67				
ABP1	1.54				

三次元培養と平面培養における薬物代謝関連遺伝子の発現比（三次元培養/平面培養）を示した。発現比は PCR-Array で得られた $2^{-\Delta Ct}$ より算出した。発現比が 2 以上をピンク、1/2 以下を水色で表示、三次元培養と平面培養の比較で p-value が 0.05 以下を赤で表示した。

Table.2 三次元培養と平面培養における薬剤による誘導倍率の比較 2

	gene symbol	3D-rif./2D-rif.	3D-dex./2D-dex.	3D-PB/2D-PB		
drug transporters	metallothioneins	MT2A	1.42	1.47	1.30	
		MT3	0.81	1.11	1.10	
		ABCB1	1.01	0.76	0.77	
	p-glycoprotein	ABCC1	0.77	1.23	1.00	
		GPI	0.77	0.89	0.74	
phase I metabolizing Enzymes	P450 gene family	CYP11B2	0.81	1.10	1.10	
		CYP17A1	0.44	0.47	1.82	
		CYP19A1	0.62	0.89	0.68	
		CYP1A1	1.55	1.39	0.60	
		CYP2B6	0.36	1.00	0.81	
		CYP2C19	0.04	1.21	1.13	
		CYP2C8	0.98	1.23	1.15	
		CYP2C9	0.81	1.11	1.10	
		CYP2D6	1.34	0.92	0.89	
		CYP2E1	1.86	0.25	0.74	
		CYP2F1	0.36	1.02	1.10	
		CYP2J2	1.32	0.96	1.13	
		CYP3A5	2.19	1.33	1.13	
		phase II metabolizing enzymes	carboxylesterase	CES2	0.89	1.08
	CES4		0.68	1.70	0.70	
decarboxylase	GAD1		0.93	1.57	0.60	
	ADH8		0.81	1.11	1.10	
dehydrogenase			ADH8	0.75	4.22	0.39
			ADH4	0.50	0.91	0.62
			ADH5	0.73	0.95	0.74
			ADH6	0.70	0.92	0.68
			ALAD	1.02	0.82	0.86
			ALDH1A1	0.64	1.00	0.60
			HSD17B1	1.18	0.61	1.00
			HSD17B2	1.01	0.81	0.93
			HSD17B3	1.08	1.33	0.71
			GPX1	0.72	1.03	0.83
glutathione peroxidases			GPX2	1.02	1.08	1.06
			GPX3	0.98	1.03	0.86
			GPX4	0.70	0.96	0.83
			GPX5	0.74	1.11	0.96
			GSTA3	0.45	0.91	0.47
			GSTA4	0.97	1.02	0.88
			GSTM2	0.84	0.90	0.88
			GSTM3	1.07	1.71	0.59
			GSTM5	0.81	1.11	1.10
			GSTP1	1.67	0.82	0.61
			GSTT1	0.95	1.18	0.95
			GSTZ1	0.89	1.11	1.01
			LPO	0.70	0.95	1.07
lipoxigenase			MPO	0.62	1.10	1.10
			ALOX12	1.49	0.81	0.69
			ALOX15	0.63	0.91	1.93
hydrolases			ALOX5	1.86	0.60	1.40
			APCE	0.93	0.83	1.08
kinases			EPH2	0.76	0.80	1.61
			FAAH	0.73	0.96	0.80
glutathione peroxidases			FBP1	1.18	0.78	1.88
			HK2	0.69	0.47	0.84
			PKLR	1.01	0.88	0.91
			PKM2	0.81	0.88	0.92
			BLVRA	0.82	1.12	0.85
			BLVRE	0.73	0.90	0.88
			CYBSR3	0.75	1.12	1.33
			GPX1	0.72	1.03	0.83
			GPX2	1.02	1.08	1.06
			GSR	0.62	0.58	1.21
			MTHFR	0.93	0.90	1.20
			NCES3	1.25	0.88	0.85
			NGO1	0.75	0.83	1.06
	SRD5A1	1.50	0.65	1.05		
	SRD5A2	0.22	0.95	0.15		
paraoxonases		PON1	2.41	2.00	1.31	
		PON2	0.90	1.18	0.95	
other related genes		PON3	1.09	1.16	0.83	
		CHST1	2.07	2.12	0.61	
		GSTM2	0.84	0.90	0.88	
		GSTM3	1.07	1.71	0.59	
		GSTM5	0.81	1.11	1.10	
		GSTP1	1.67	0.82	0.61	
		GSTT1	0.95	1.18	0.95	
		MGST1	0.88	1.02	1.04	
		MGST2	1.27	1.02	1.42	
		MGST3	0.95	1.15	0.90	
		NAT1	1.07	0.89	0.81	
		NAT2	0.39	0.92	0.65	
		COMT	0.74	0.92	0.94	
other related Genes		GGT1	1.01	0.88	0.90	
		AHR	0.94	0.40	0.99	
		ARNT	1.33	1.05	0.17	
		ASNA1	0.59	1.01	0.70	
		GSKR	1.03	1.11	0.80	
		MARCKS	0.98	0.96	0.99	
		SMARCA1	0.84	0.97	0.75	
	SHN	0.96	0.89	0.47		
	ASP1	0.81	0.66	1.09		

三次元培養と平面培養において薬剤処理（100 μ M rifampicin、10 μ M dexamethasone、250 μ M phenobarbital）を行った際の薬物関連遺伝子に関する誘導倍率の比（三次元培養/平面培養）を示した。誘導倍率の比は PCR-Array より得られた誘導倍率（薬剤処理時の $2^{-\Delta Ct}$ /薬剤未処理時の $2^{-\Delta Ct}$ ）を三次元培養と平面培養で比較して求めた。誘導倍率の比が2以上を赤、1/2以下を緑で表示した。