

Table.3 三次元培養と平面培養における薬剤によるCYP3A4の誘導 (RT-PCR)

system	treatment	concentration	induction fold	p-value(n=3)
plate	rifampicin	100 μ M	1.148	0.213
RFB	rifampicin	100 μ M	3.566	0.001
plate	dexamethasone	10 μ M	1.658	0.000
RFB	dexamethasone	10 μ M	2.037	0.031
plate	phenobarbital	250 μ M	0.987	0.826
RFB	phenobarbital	250 μ M	1.211	0.452

(誘導期間 3日間)

三次元培養と平面培養における薬剤処理(100 μ M rifampicin、10 μ M dexamethasone、250 μ M phenobarbital) によるCYP3A4の誘導倍率 (薬剤処理/薬剤未処理) を示した。

Table.4 微小管に関する遺伝子の発現比 (三次元培養/平面培養)

A)

gene symbol	fold(3D/plate)	gene name
ARHGEF2	0.466	RHO/RAC GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 2
AURKA	3.058	AURORA KINASE A
BIRC5	3.822	BACULOVIRAL IAP REPEAT-CONTAINING 5 (SURVIVIN)
BUB1	2.935	BUB1 BUDDING UNINHIBITED BY BENZIMIDAZOLES 1 HOMOLOG (YEAST)
BUB1B	3.573	BUB1 BUDDING UNINHIBITED BY BENZIMIDAZOLES 1 HOMOLOG BETA (YEAST)
CDC20	3.008	CDC20 CELL DIVISION CYCLE 20 HOMOLOG (S. CEREVISIAE)
CENPF	2.736	CENTROMERE PROTEIN F, 350/400KA (MITOSIN)
CETN2	3.289	CENTRIN, EF-HAND PROTEIN, 2
ESPL1	4.212	EXTRA SPINDLE POLES LIKE 1 (S. CEREVISIAE)
GTSE1	3.757	G-2 AND S-PHASE EXPRESSED 1
K-ALPHA-1	3.234	TUBULIN, ALPHA, UBIQUITOUS
KIF15	2.848	KINESIN FAMILY MEMBER 15
KIF20A	3.794	KINESIN FAMILY MEMBER 20A
KIF2C	3.264	KINESIN FAMILY MEMBER 2C
LOC146909	3.166	HYPOTHETICAL PROTEIN LOC146909
MAP1LC3B	0.439	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1 LIGHT CHAIN 3 BETA
MC1R	3.885	MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (ALPHA MELANOCYTE STIMULATING HORMONE RECEPTOR)
PRC1	4.744	PROTEIN REGULATOR OF CYTOKINESIS 1
SPAG5	3.580	SPERM ASSOCIATED ANTIGEN 5
TPX2	4.608	TPX2, MICROTUBULE-ASSOCIATED, HOMOLOG (XENOPUS LAEVIS)
TTK	3.603	TTK PROTEIN KINASE
TUBB	3.324	TUBULIN, BETA
TUBB2A	2.453	TUBULIN, BETA 2A
TUBB2B	6.120	TUBULIN, BETA 2B
TUBB2C	2.681	TUBULIN, BETA 2C
TUBB6	2.284	TUBULIN, BETA 6

B)

gene Symbol	fold(3D/plate)	DAVID gene name
ARHGEF2	0.466	RHO/RAC GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR (GEF) 2
AURKA	3.058	AURORA KINASE A
BUB1B	3.573	BUB1 BUDDING UNINHIBITED BY BENZIMIDAZOLES 1 HOMOLOG BETA (YEAST)
CKS2	3.714	CDC28 PROTEIN KINASE REGULATORY SUBUNIT 2
ESPL1	4.212	EXTRA SPINDLE POLES LIKE 1 (S. CEREVISIAE)
GTSE1	3.757	G-2 AND S-PHASE EXPRESSED 1
K-ALPHA-1	3.234	TUBULIN, ALPHA, UBIQUITOUS
KIF15	2.848	KINESIN FAMILY MEMBER 15
KIF20A	3.794	KINESIN FAMILY MEMBER 20A
KIF2C	3.264	KINESIN FAMILY MEMBER 2C
KPNA2	2.232	KARYOPHERIN ALPHA 2 (RAG COHORT 1, IMPORTIN ALPHA 1)
LOC146909	3.166	HYPOTHETICAL PROTEIN LOC146909
NUSAP1	3.757	NUCLEOLAR AND SPINDLE ASSOCIATED PROTEIN 1
PRC1	4.744	PROTEIN REGULATOR OF CYTOKINESIS 1
SPAG5	3.580	SPERM ASSOCIATED ANTIGEN 5
TTK	3.603	TTK PROTEIN KINASE
TUBB	3.324	TUBULIN, BETA
TUBB2A	2.453	TUBULIN, BETA 2A
TUBB2B	6.120	TUBULIN, BETA 2B
TUBB2C	2.681	TUBULIN, BETA 2C
TUBB3	3.885	MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (ALPHA MELANOCYTE STIMULATING HORMONE RECEPTOR)
TUBB6	2.284	TUBULIN, BETA 6
UBE2C	3.521	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2C
ZWINT	4.815	ZW10 INTERACTOR

GeneChip の結果、三次元培養と平面培養において有意な発現の差異が観察された遺伝子を DAVID により解析し、microtubule に関連する遺伝子として分類された遺伝子とその発現比 (三次元培養/平面培養) を示した。

A) microtubule cytoskeleton B) microtubule-based process

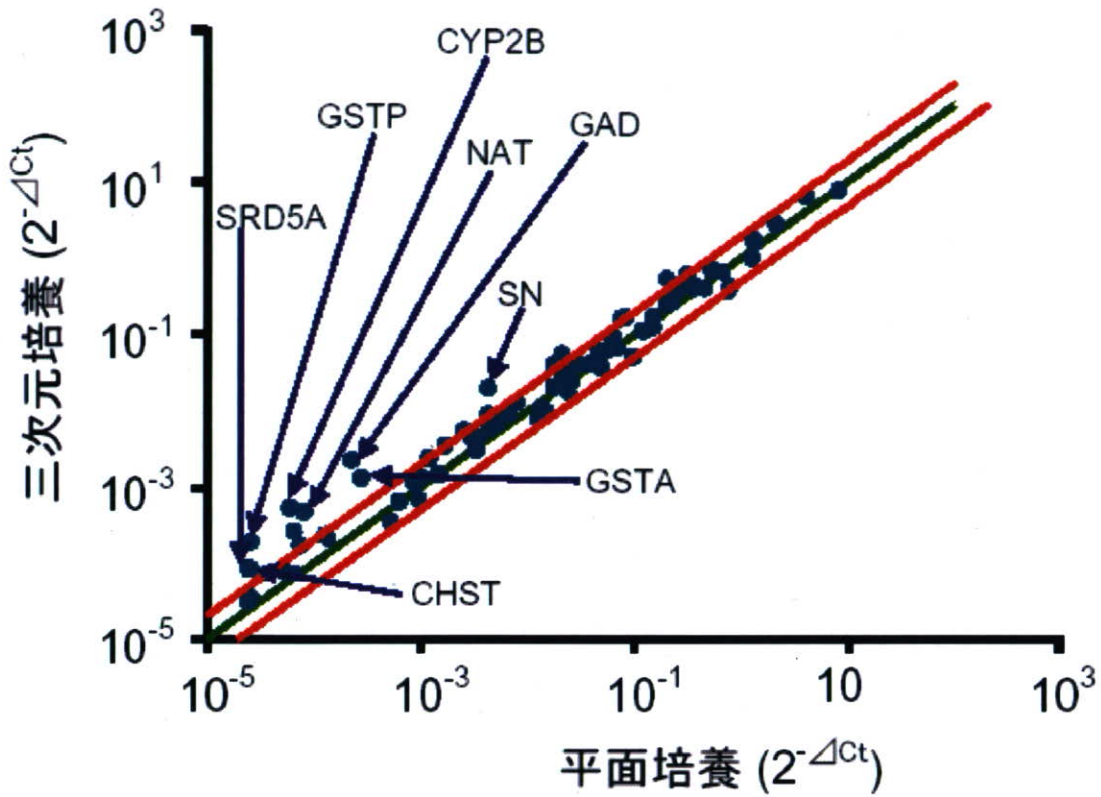
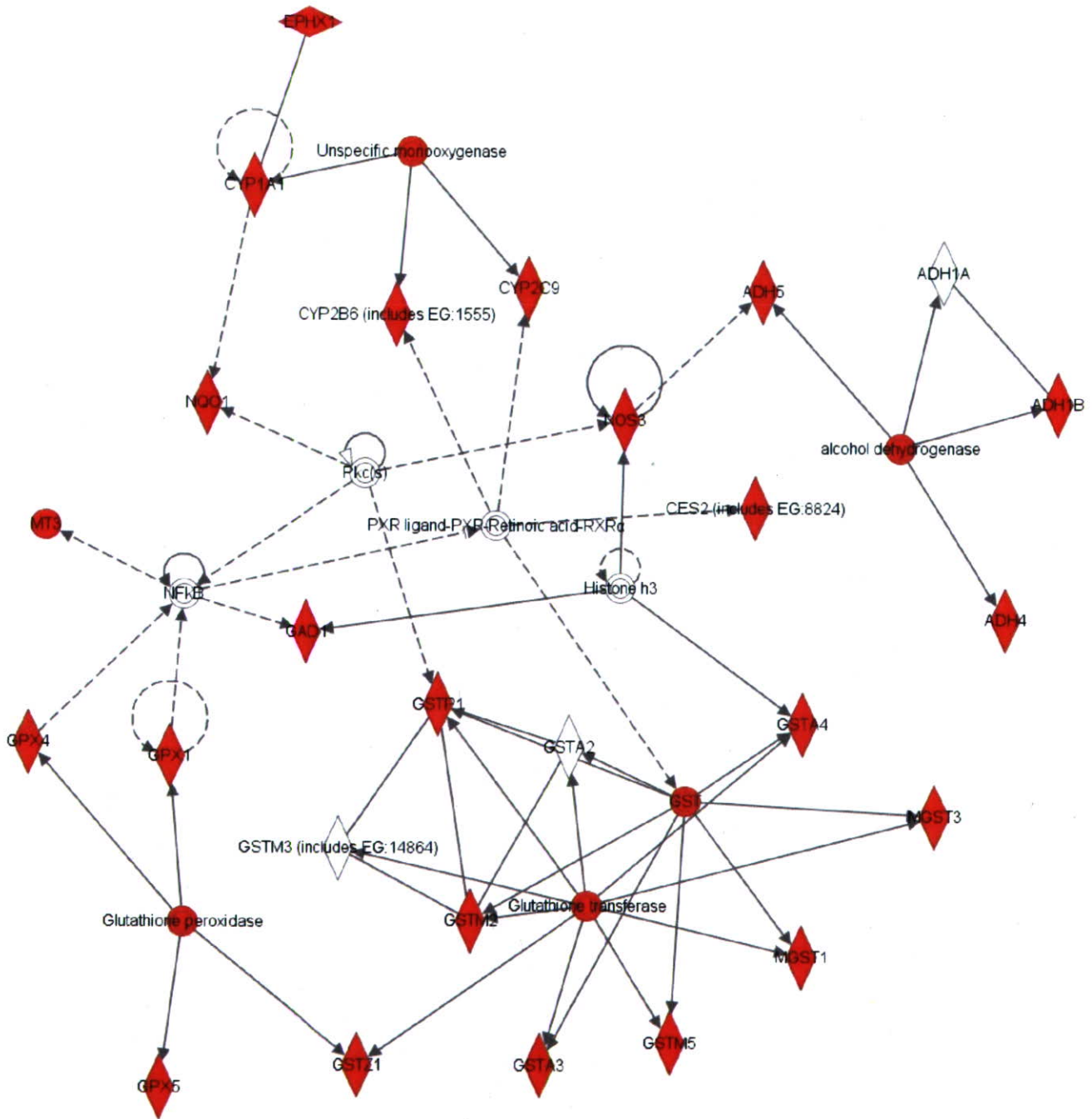


Fig.1 PCRArray による三次元培養と平面培養の薬物代謝関連遺伝子の発現比較

PCR-Array で得られた $2^{-\Delta Ct}$ より作成した scatter plot (縦軸: 三次元培養時の $2^{-\Delta Ct}$ 、横軸: 平面培養時の $2^{-\Delta Ct}$) を示した。三次元培養と平面培養における発現比が 1 となるラインを緑、三次元培養における発現が平面培養に対して 2 倍、1/2 倍となるラインを赤で示した。また、三次元培養において三倍以上の発現上昇が観察された遺伝子名を示した。

A)



B)

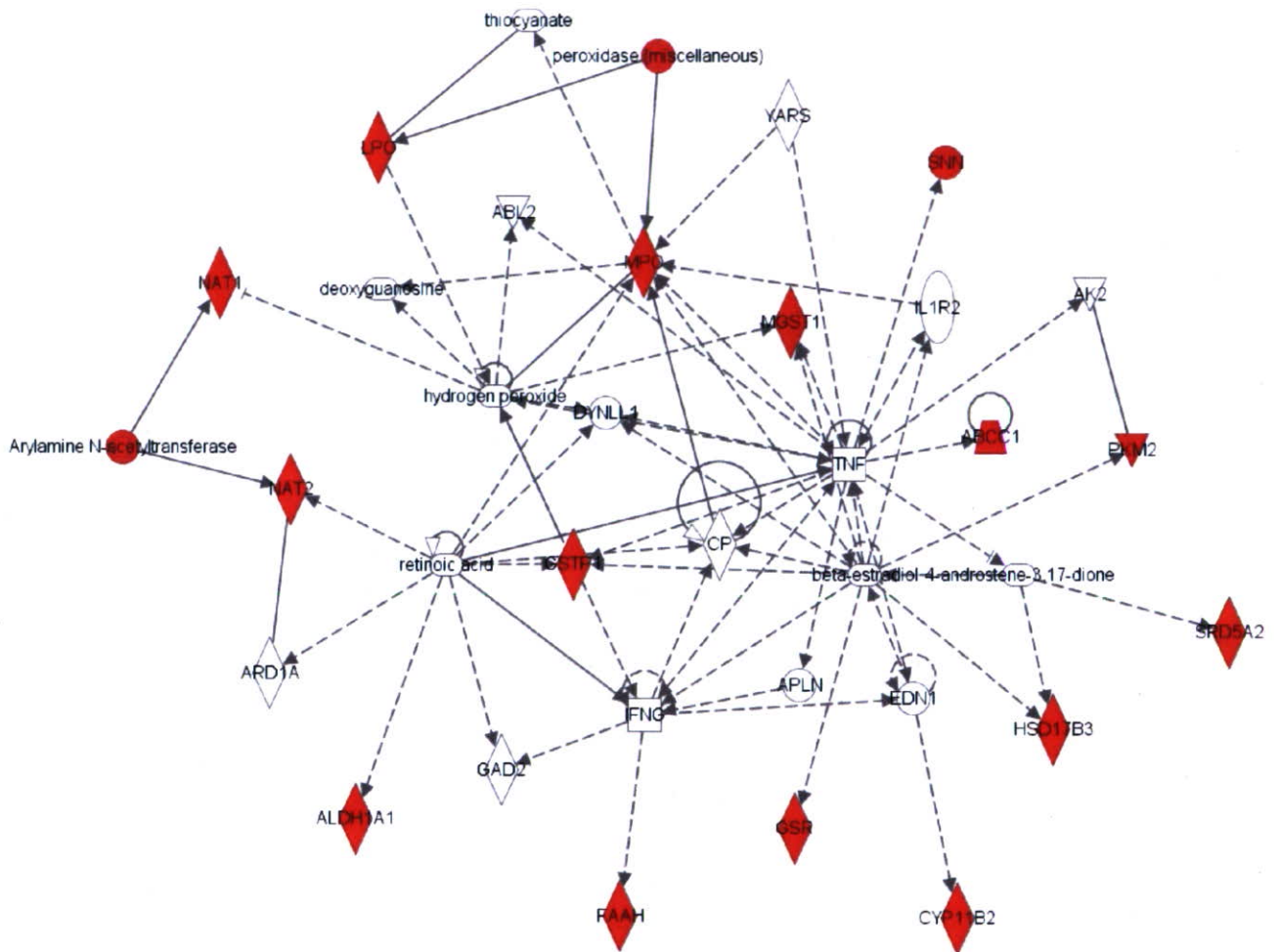


Fig.2 Ingenuity Pathways Analysis (IPA) により構築されたネットワーク

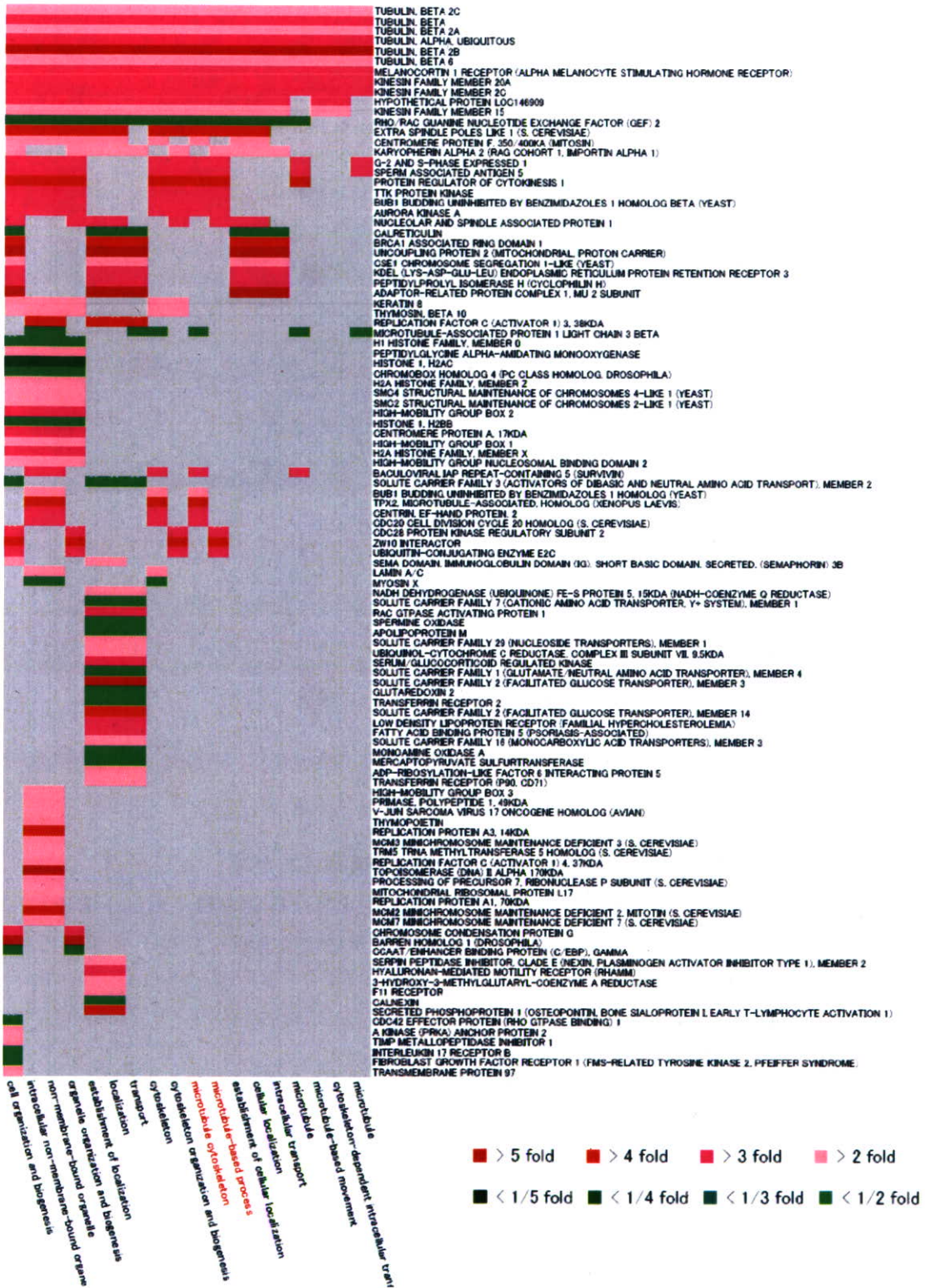
PCR-Arrayの結果、三次元培養において有意な発現上昇が確認された遺伝子をIPAにより解析し、構築されたネットワークを示した。三次元培養により有意な発現上昇が確認された遺伝子を赤で示した。

A) PXRに関するネットワーク

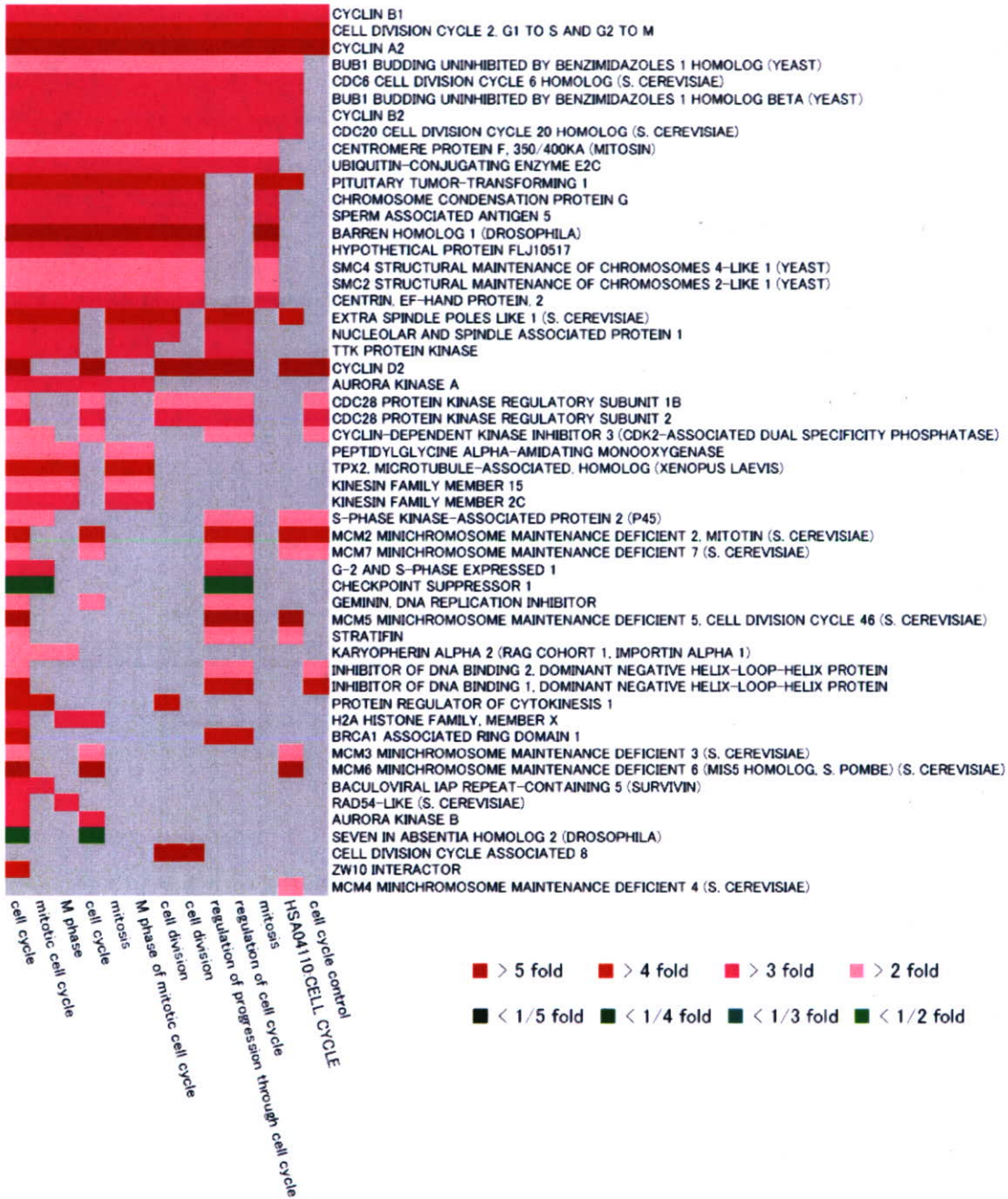
B) エストロゲン、レチノイン酸に関するネットワーク

- ◇ : 酵素
- ◎ : 複合体、またはグループ
- : キナーゼ
- ▽ : 化学物質、または薬剤
- : その他

A)



B)



C)

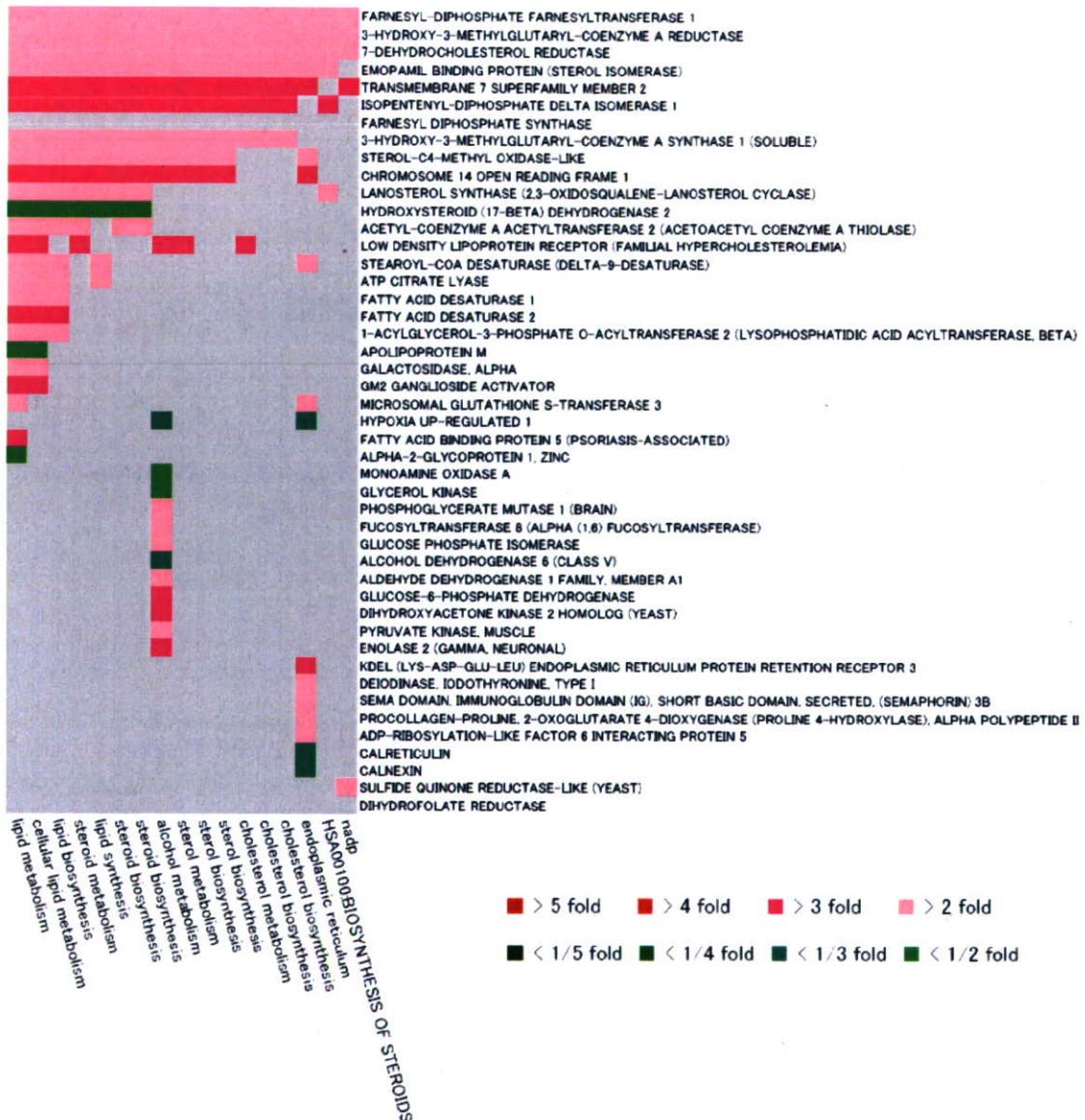


Fig. 3 DAVIDにより分類されたクラスターのHeatMap

GeneChipの結果、三次元培養と平面培養において有意な発現の差異が観察された遺伝子をDAVIDにより解析し、三次元培養により増加の傾向が観察されたクラスターを示した。また、その発現比より作成したHeatMapを示した。

- A) 細胞骨格
- B) 細胞周期に関するクラスター
- C) ステロイド、脂質、コレステロールの生合成や代謝

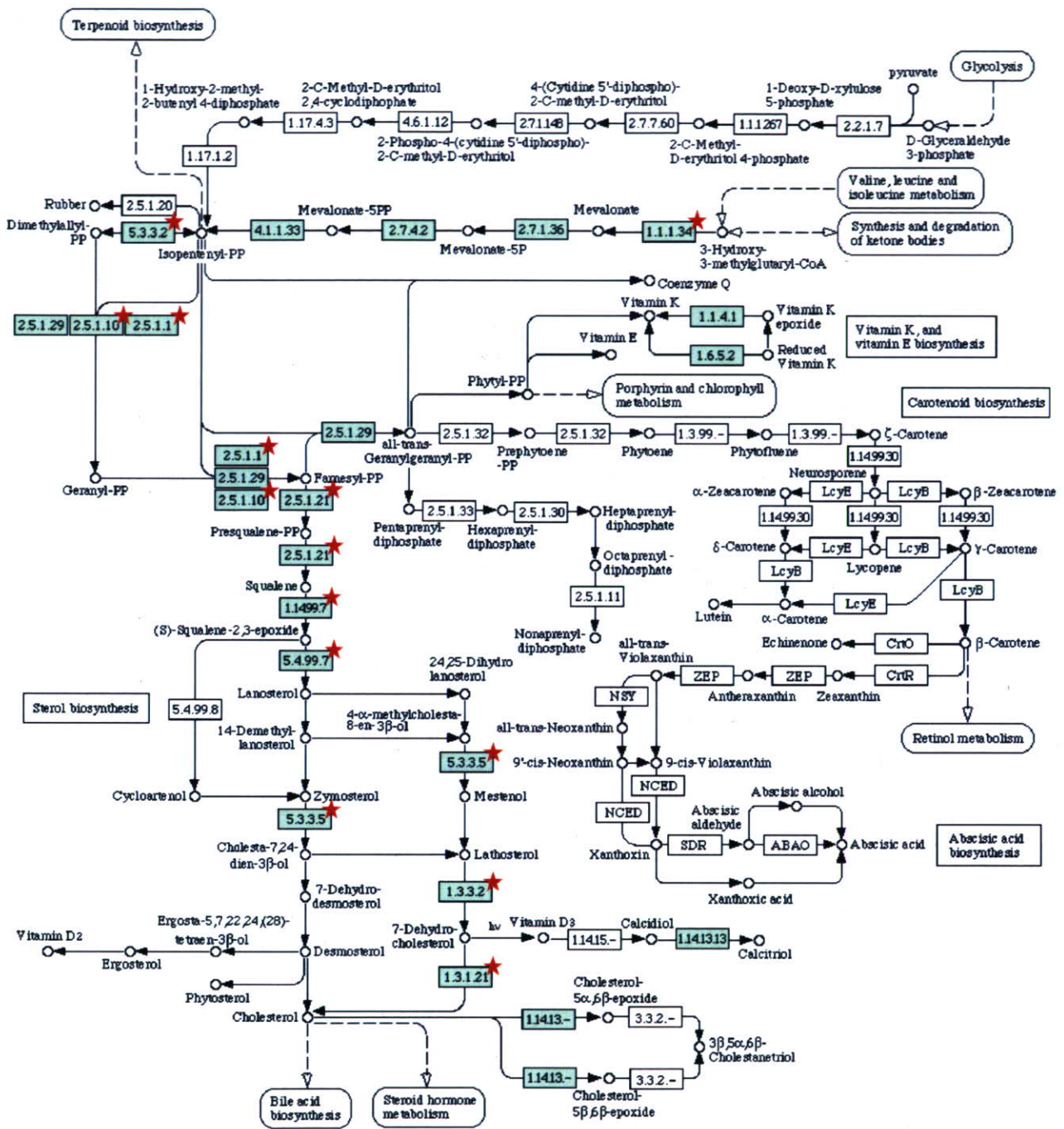


Fig. 4 ステロイド合成経路 (KEGG PATHWAY Database) において

三次元培養で発現が上昇した遺伝子

KEGG PATHWAY Database におけるステロイド合成経路を示し、三次元培養において有意に発現上昇した遺伝子に★の印を付けた。また、緑のボックスはヒトにおいて報告のある酵素を示している。

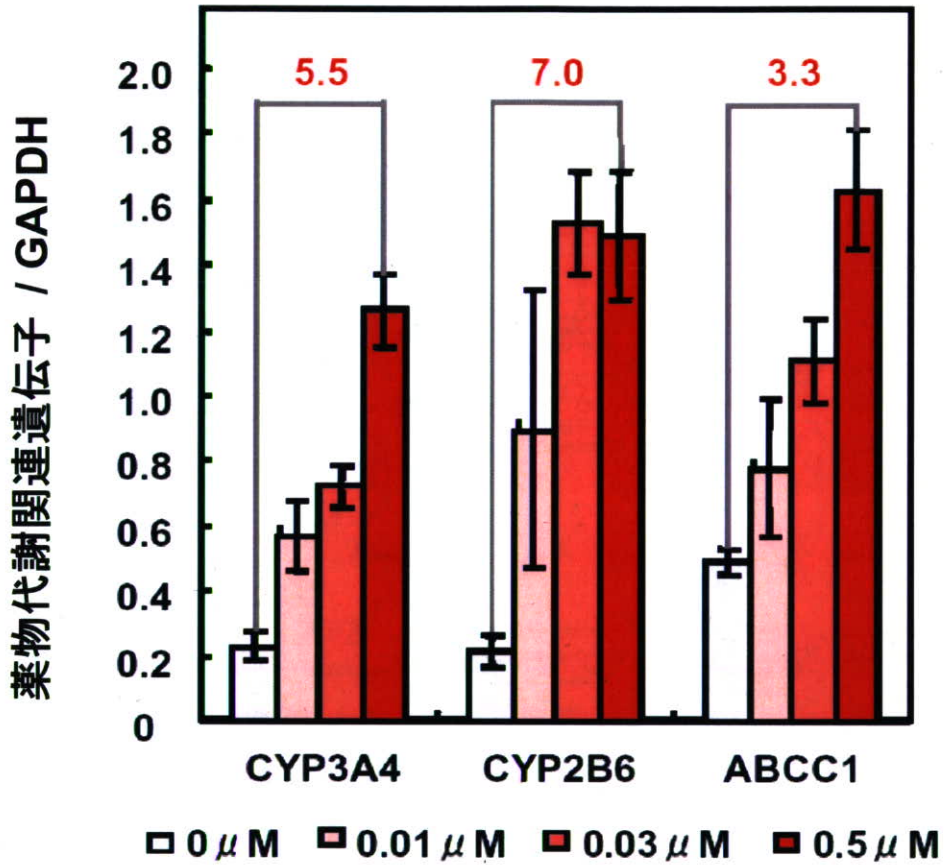


Fig. 5 paclitaxel 処理による薬物代謝関連遺伝子の発現変化

Paclitaxel 処理 (0 μM , 0.01 μM , 0.03 μM , 0.5 μM) を行った際の *CYP3A4*, *CYP2B6*, *ABCC1* の発現量を示した。各遺伝子の発現量は RT-PCR で得られた相対発現量を GAPDH の相対発現量で正規化した値である。

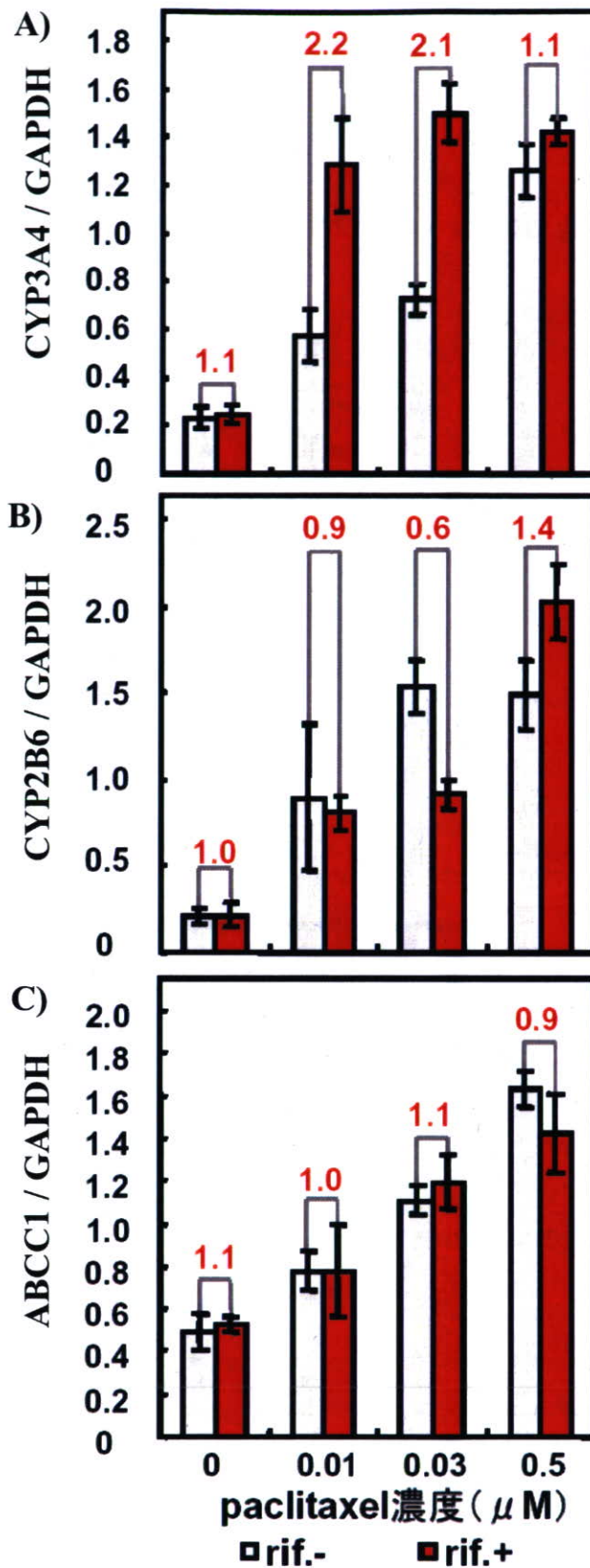


Fig. 6 paclitaxel処理のrifampicinによる誘導への影響

Paclitaxel処理 (0 μM, 0.01 μM, 0.03 μM, 0.5 μM) を行った際に、rifampicin処理を行った場合と行わなかった場合のCYP3A4, CYP2B6, ABCC1の発現量を示した。各遺伝子の発現量はRT-PCRで得られた相対発現量をGAPDHの相対発現量で正規化した値である。

A) CYP3A4 B) CYP2B6 C) ABCC1

Fig. 7. Processing pathway of miRNA

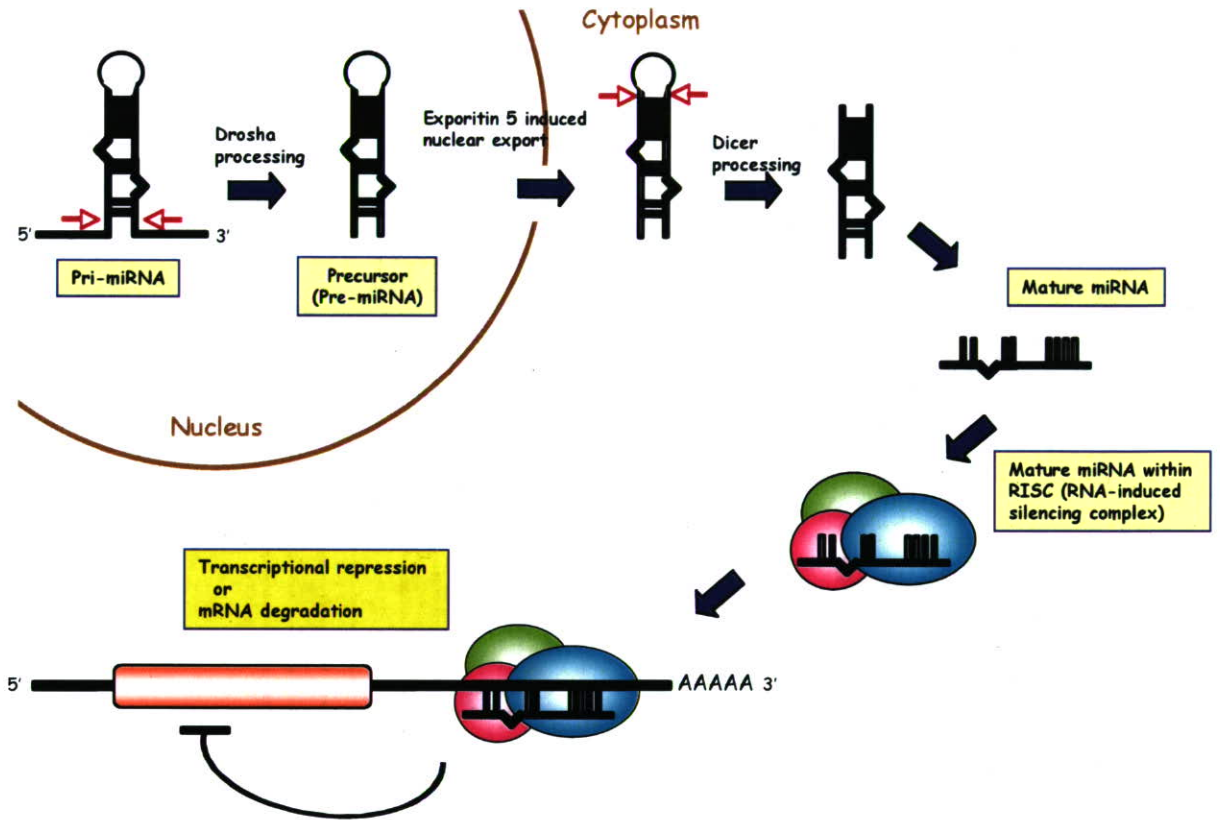


Fig. 8. CYP3A genes cluster in Chr. 7

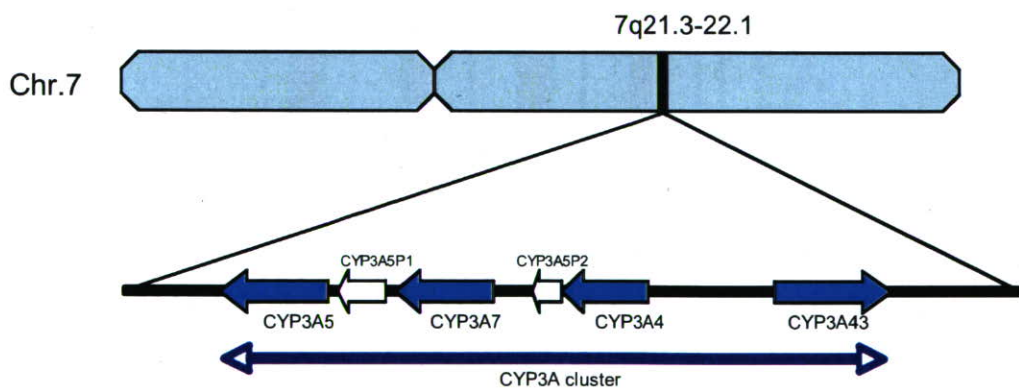


Table 5. miRBase database search results for *CYP3A* and related nuclear receptor genes

	miRNA	Score	Other candidate gene	Expression		miRNA	Score	Other candidate gene	Expression	
CYP3A4	hsa-miR-608	16.848	3A7	Undetermined	NR112 (PXR)	hsa-miR-522	16.823		Undetermined	
	hsa-miR-372	16.598		○		hsa-miR-594	16.591		○	
	hsa-miR-302d	16.598		Undetermined		hsa-miR-597	16.212	3A43	○	
	hsa-miR-330	16.593		○		hsa-miR-34a	16.142		○	
	hsa-miR-206	16.469		○		hsa-miR-296	16.142	Sloan-Kettering	○	
	hsa-miR-27a	16.446	3A43	○		NR113 (CAR)	hsa-miR-432	18.160		○
	hsa-miR-27b	16.347	3A7, 3A43	○			hsa-miR-565	17.912		○
	hsa-miR-152	16.272	3A7	○			hsa-miR-571	17.718		Undetermined
	hsa-miR-578	16.174		Undetermined			hsa-miR-503	17.709		○
	hsa-miR-216	16.149	3A43	○			hsa-miR-618	17.376	3A43	○
	hsa-miR-224	16.004	3A43	○			hsa-miR-9	17.309	3A7, 3A5	○
	CYP3A7	hsa-miR-148a	17.337	PXR			○	hsa-miR-137	17.283	3A7
CYP3A43	hsa-miR-519a	18.196		Undetermined	hsa-miR-338		16.404	3A7, 3A5	○	
	hsa-miR-613	17.356	3A4, 3A7	Undetermined						
	hsa-miR-376a#	17.161		○						

Fig. 9. miRBase database search result for *CYP3A4*

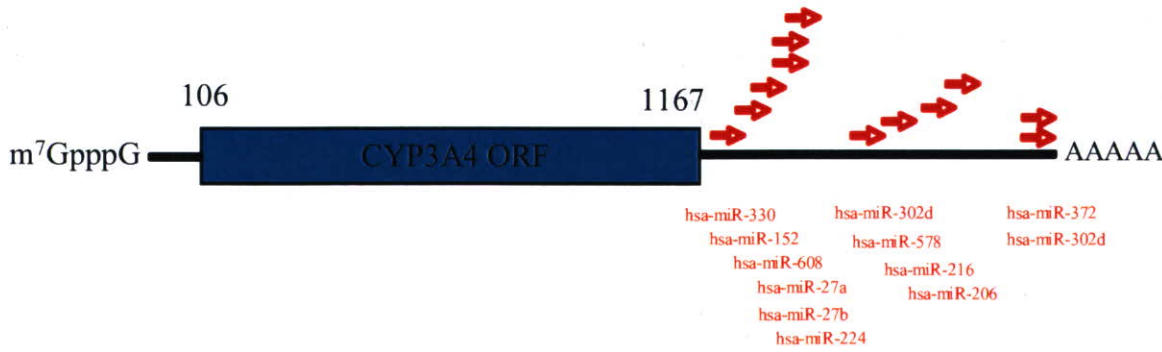
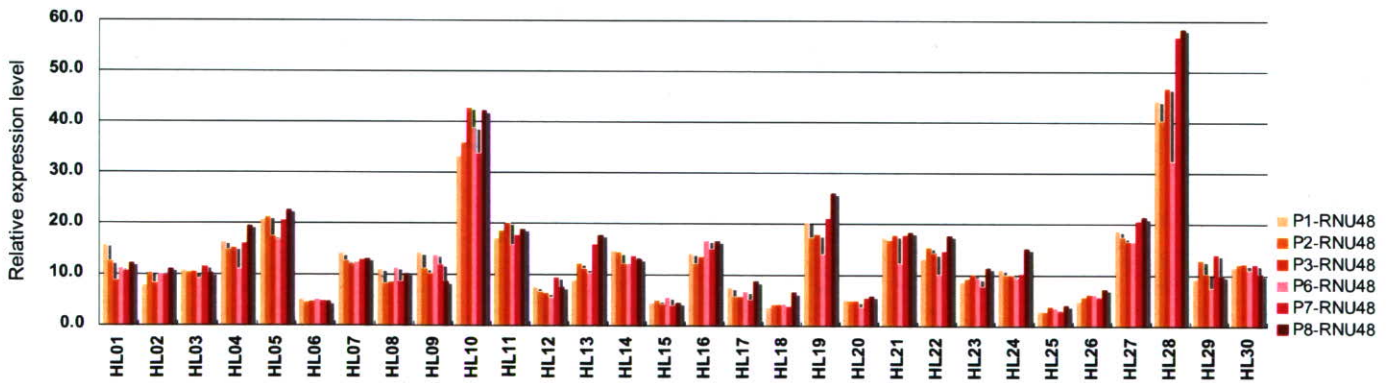


Fig. 10. Correlation of *CYP3A* mRNA levels with related nuclear receptor gene levels in liver tissues

CYP3A4	CYP3A5	CYP3A7	CYP3A43	PXR	CAR	RXRA	
	0.2778 []	0.0036 []	0.6230 **	0.6110 **	0.5247 **	0.4809 **	CYP3A4
		0.4425 *	0.1099 []	0.3021 []	0.1141 []	0.0856 []	CYP3A5
			0.0775 []	0.0821 []	-0.0991 []	-0.1077 []	CYP3A7
				0.5816 **	0.5468 **	0.3767 *	CYP3A43
					0.6597 **	0.5988 **	PXR
						0.8825 **	CAR
							RXRA

r squared
p value (**: P< 0.01, [*]: P< 0.05)

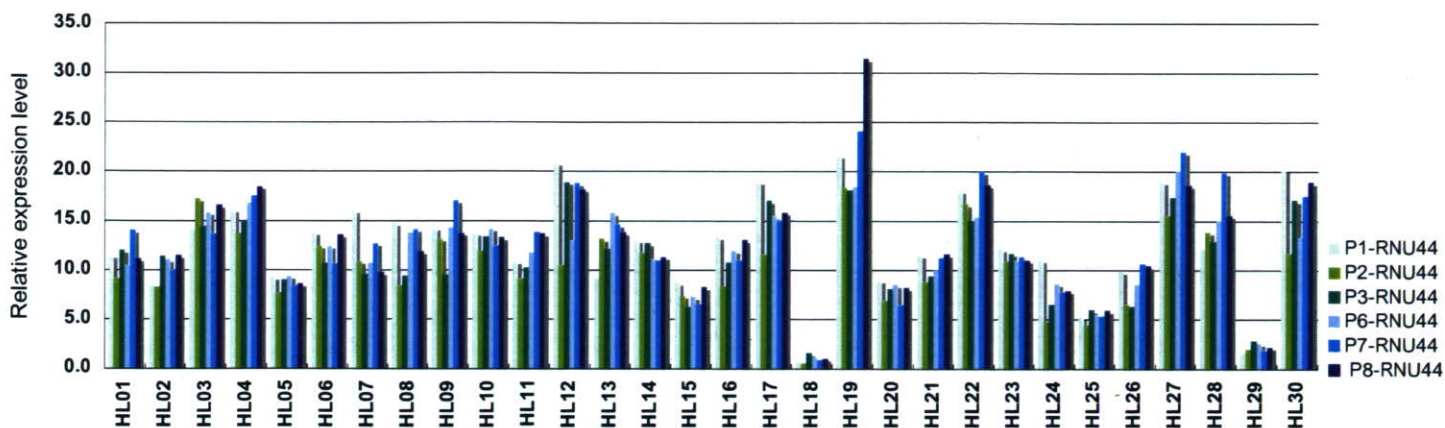
Fig. 11. The expression level of RNU48



	P1-RNU48	P2-RNU48	P3-RNU48	P6-RNU48	P7-RNU48	P8-RNU48	(r squared)
P1-RNU48	1.0000	0.9736	0.9601	0.9298	0.9635	0.9600	
P2-RNU48	**	1.0000	0.9819	0.9438	0.9623	0.9630	
P3-RNU48	**	**	1.0000	0.9534	0.9571	0.9698	
P6-RNU48	**	**	**	1.0000	0.8820	0.9051	
P7-RNU48	**	**	**	**	1.0000	0.9763	
P8-RNU48	**	**	**	**	**	1.0000	

(p value **: P<0.01)

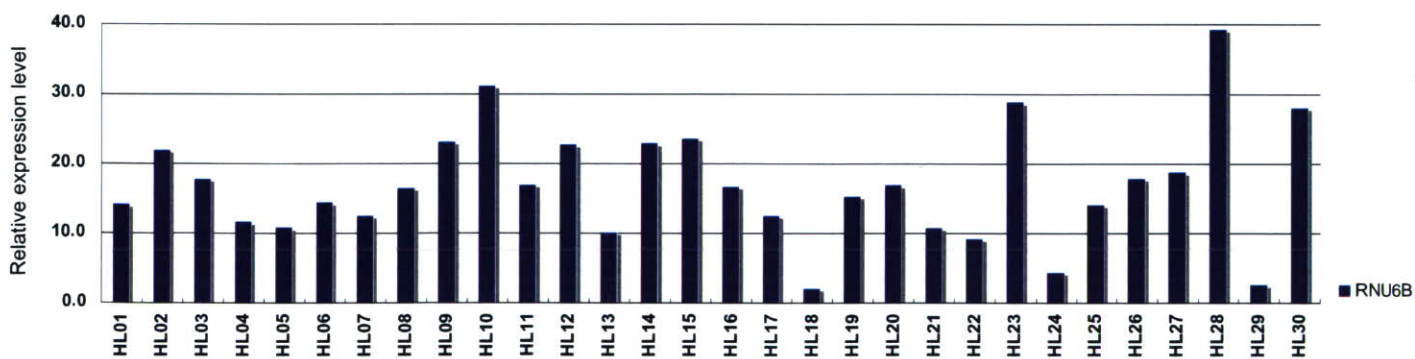
Fig. 12. The expression level of RNU44



	P1-RNU44	P2-RNU44	P3-RNU44	P6-RNU44	P7-RNU44	P8-RNU44	(r squared)
P1-RNU44	1.0000	0.7850	0.8932	0.8294	0.8678	0.8643	
P2-RNU44	[**]	1.0000	0.8347	0.9205	0.8712	0.8713	
P3-RNU44	[**]	[**]	1.0000	0.8712	0.8726	0.8827	
P6-RNU44	[**]	[**]	[**]	1.0000	0.9143	0.8768	
P7-RNU44	[**]	[**]	[**]	[**]	1.0000	0.9168	
P8-RNU44	[**]	[**]	[**]	[**]	[**]	1.0000	

(p value [**]: P<0.01)

Fig. 13. The expression level of RNU6B



	(P1-8) RNU48	(P1-8) RNU44	RNU6B	(r squared)
(P1-8) RNU48	1.0000	0.3615	0.4965	
(P1-8) RNU44	[*]	1.0000	0.3966	
RNU6B	[**]	[*]	1.0000	

(p value [**] : P< 0.01, [*] : P< 0.05)

Fig. 14. Correlation of CYP3A mRNA expression levels with miRNA levels - normalized with RNU48 -

	/RNU48	CYP3A4	CYP3A5	CYP3A7	CYP3A43	PXR	CAR	RXRA
Pool-1	miR-34a	-0.066	-0.254	0.200	-0.068	-0.213	-0.143	-0.311
	miR-372	0.394	-0.187	-0.152	0.340	0.403	0.229	0.163
	miR-9	0.107	-0.035	0.319	0.021	-0.050	-0.159	-0.253
	miR-137	0.114	-0.033	-0.096	0.219	0.407	0.423	0.554
Pool-2	miR-27a	0.185	-0.226	0.120	0.093	-0.034	-0.104	-0.205
	miR-27b	0.454	-0.100	0.001	0.353	0.076	0.146	-0.021
	miR-152	0.295	-0.120	0.182	0.247	0.058	0.022	-0.153
	miR-296	-0.233	-0.212	0.108	-0.267	-0.307	-0.257	-0.378
Pool-3	miR-148a	0.379	0.008	-0.012	0.328	0.093	0.097	-0.050
	miR-206	-0.192	0.088	0.076	-0.266	-0.034	0.149	0.307
	miR-216	0.015	0.063	0.244	-0.019	-0.087	0.102	0.051
	miR-330	-0.042	-0.219	0.115	-0.138	-0.260	-0.232	-0.359
	miR-224	-0.443	-0.345	-0.002	-0.412	-0.534	-0.354	-0.487
	miR-432	-0.015	-0.395	-0.141	-0.100	-0.198	-0.138	-0.161
Pool-6	miR-338	0.079	0.053	0.526	0.008	0.062	-0.116	-0.104
	miR-503	-0.202	-0.341	0.172	-0.169	-0.217	-0.345	-0.366
Pool-7	miR-376a	0.098	-0.331	0.006	0.076	-0.079	-0.152	-0.201
	miR-565	0.305	0.248	0.170	0.039	0.260	-0.113	0.007
	miR-594	0.333	0.003	-0.099	0.069	0.266	-0.045	0.000
	miR-597	0.482	0.010	0.258	0.379	0.259	0.120	0.076
Pool-8	miR-618	0.268	-0.098	-0.102	0.020	-0.003	-0.033	-0.118

r squared
p value (**): P<0.01, (*): P<0.05)

Red column: (+) correlation, Blue column: (-) correlation

Fig. 15. Correlation of CYP3A mRNA expression levels with miRNA levels - normalized with RNU44 -

	/RNU44	CYP3A4	CYP3A5	CYP3A7	CYP3A43	PXR	CAR	RXRA
Pool-1	miR-34a	-0.309	-0.327	0.027	-0.214	-0.140	0.285	0.201
	miR-372	0.258	-0.265	-0.283	0.220	0.401	0.283	0.265
	miR-9	-0.107	-0.100	0.121	-0.169	-0.049	-0.145	-0.115
	miR-137	-0.071	-0.013	-0.069	-0.124	0.161	0.453	0.580
Pool-2	miR-27a	-0.098	-0.229	-0.118	-0.204	0.029	0.355	0.521
	miR-27b	0.115	-0.151	-0.176	0.060	0.152	0.620	0.726
	miR-152	0.011	-0.162	-0.010	-0.011	0.122	0.500	0.571
	miR-296	-0.421	-0.215	-0.045	-0.505	-0.235	0.073	0.151
Pool-3	miR-148a	0.299	0.109	-0.068	0.453	0.262	0.224	0.167
	miR-206	-0.101	-0.013	-0.059	-0.169	0.053	0.250	0.380
	miR-216	-0.061	-0.018	0.116	-0.043	0.040	0.522	0.579
	miR-330	-0.456	-0.083	0.324	-0.415	-0.398	-0.426	-0.548
	miR-224	-0.489	-0.297	0.075	-0.414	-0.545	-0.348	-0.515
	miR-432	-0.214	-0.355	-0.221	-0.235	-0.049	0.070	0.262
Pool-6	miR-338	0.018	0.016	0.359	-0.083	0.084	0.260	0.348
	miR-503	-0.435	-0.276	0.085	-0.356	-0.298	-0.415	-0.371
Pool-7	miR-376a	-0.146	-0.342	-0.083	-0.146	-0.077	-0.092	-0.017
	miR-565	0.058	0.220	0.044	-0.167	0.100	-0.210	-0.012
	miR-594	0.064	-0.010	-0.118	-0.110	0.114	-0.152	-0.036
	miR-597	0.202	0.097	0.256	0.204	0.357	0.533	0.870
Pool-8	miR-618	0.193	-0.124	-0.301	-0.080	0.154	-0.114	-0.147

r squared
p value (**): P<0.01, (*): P<0.05)

Red column: (+) correlation, Blue column: (-) correlation

Fig. 16. Correlation of CYP3A mRNA expression levels with miRNA levels - normalized with RNU6B -

	/RNU6B	CYP3A4	CYP3A5	CYP3A7	CYP3A43	PXR	CAR	RXRA
Pool-1	miR-34a	-0.266	-0.344	-0.093	-0.274	-0.331	-0.133	-0.225
	miR-372	0.183	-0.385	-0.353	-0.010	0.116	0.002	0.060
	miR-9	-0.149	-0.214	0.020	-0.271	-0.281	-0.335	-0.293
	miR-137	-0.218	-0.097	-0.241	-0.259	-0.044	0.107	0.273
Pool-2	miR-27a	-0.312	-0.326	-0.259	-0.430	-0.320	-0.202	-0.145
	miR-27b	-0.058	-0.292	-0.327	-0.201	-0.175	0.092	0.145
	miR-152	-0.243	-0.287	-0.220	-0.344	-0.282	-0.129	-0.141
	miR-296	-0.593	-0.378	-0.216	-0.661	-0.537	-0.347	-0.338
Pool-3	miR-148a	0.011	-0.254	-0.353	-0.073	-0.130	-0.036	0.005
	miR-206	-0.138	-0.118	-0.152	-0.188	-0.013	0.122	0.242
	miR-216	-0.110	-0.250	-0.042	-0.138	-0.055	0.468	0.570
	miR-330	-0.408	-0.338	-0.168	-0.465	-0.473	-0.349	-0.387
	miR-224	-0.495	-0.356	-0.041	-0.451	-0.544	-0.329	-0.476
	miR-432	-0.327	-0.400	-0.371	-0.426	-0.271	-0.103	0.032
Pool-6	miR-338	-0.180	-0.240	0.045	-0.301	-0.256	-0.054	0.024
	miR-503	-0.473	-0.377	-0.209	-0.507	-0.414	-0.443	-0.415
Pool-7	miR-376a	-0.210	-0.352	-0.228	-0.364	-0.199	-0.224	-0.193
	miR-565	-0.061	0.008	-0.175	-0.242	-0.054	-0.258	-0.074
	miR-594	-0.021	-0.113	-0.195	-0.174	0.009	-0.198	-0.079
	miR-597	0.034	-0.094	-0.099	-0.087	-0.001	0.099	0.222
Pool-8	miR-618	0.081	-0.229	-0.257	-0.175	-0.024	-0.118	-0.126

f squared
p value (**): P<0.01, (*): P<0.05

Red column: (+) correlation, Blue column: (-) correlation

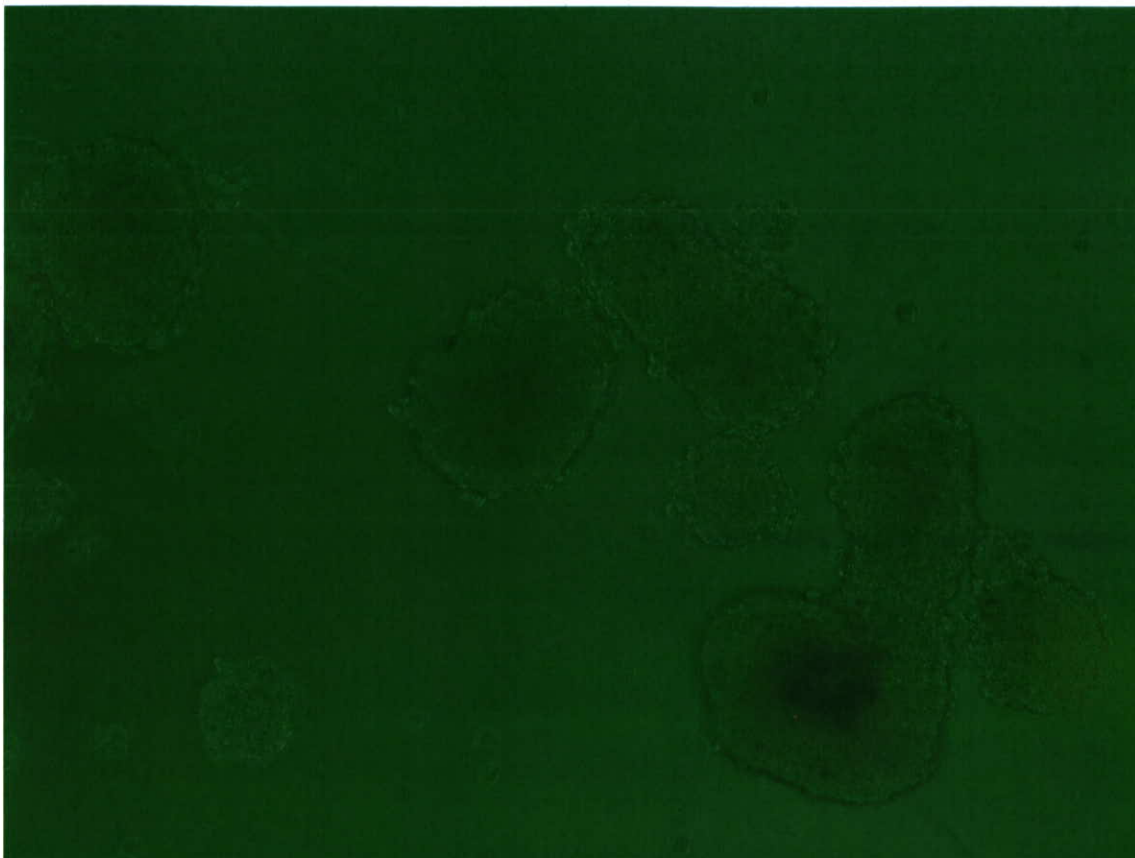


Fig. 17. SCIVAX 社ナノカルチャープレート NCP-Lにより、HepG2 細胞を 37℃、96 時間培養後に形成されたスフェロイドの位相差顕微鏡写真 (X100)。

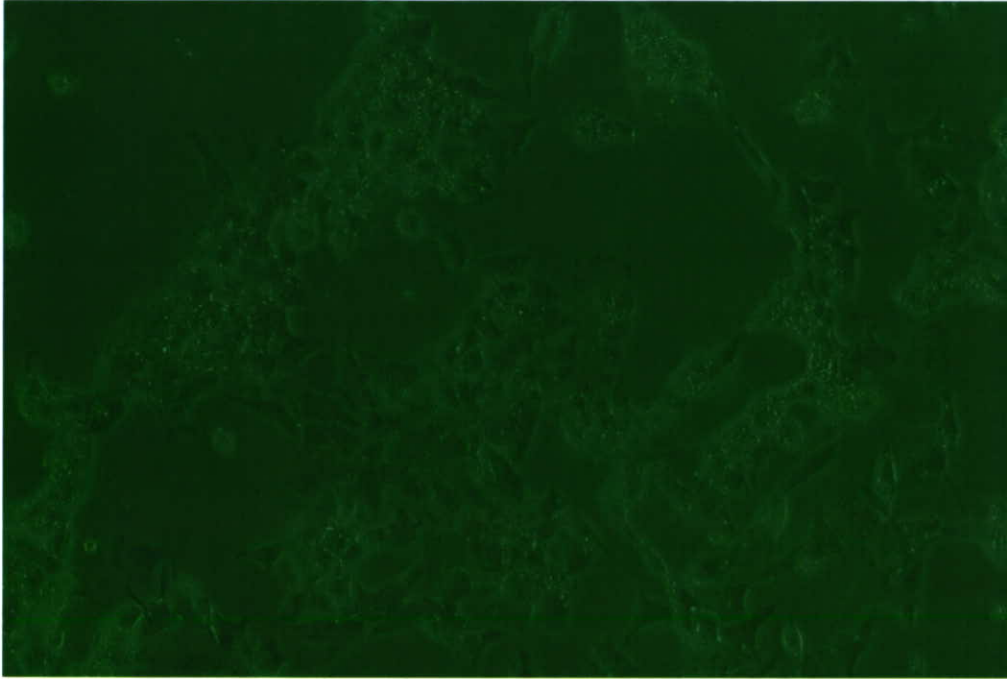


Fig. 18. Corning 社プラスチックプレートにより、HepG2 細胞を 37℃、96 時間平面培養後の細胞の位相差顕微鏡写真 (X100)。

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

分担研究者 石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 室長

研究要旨：ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を三次元培養条件下に置くことで、多くの薬物代謝関連遺伝子の発現が上昇していることや rifampicin による CYP3A4、3A5 の誘導が亢進することが明らかとなった。また、三次元培養により“細胞周期”、“ステロイドや脂質の合成、代謝”、“細胞骨格”に関する遺伝子の発現が上昇する傾向が明らかになった。細胞骨格の一つである microtubule の薬物代謝関連遺伝子の発現への影響を検討したところ、microtubule の安定化により薬物代謝関連遺伝子の発現上昇や rifampicin による誘導の亢進が観察された。本年度は、これまでに構築した三次元培養システムの可能性の評価、および、三次元培養による薬物代謝関連遺伝子の発現の変化に関するメカニズムの解明を試み、一定の成果を得た。

A. 研究目的

現在、化学物質の安全評価試験には主に動物実験が用いられているが、近年、EU 領域内における化粧品の原料における動物実験の禁止（2009年3月より施行）など、動物実験に対する規制が強まってきており、動物実験代替法の確立が急務となっている。ヒト肝初代培養細胞を用いた試験系は、肝薬物代謝活性と医薬品の安全性・有効性との関連を調べるための代替法として有力である。しかし、ヒト肝初代培養細胞は入手が困難であり、且つ培養により増やすことも困難である。また、ドナーの個人差が実験結果に反映されるため、信頼できる評価

系とはなっていない。このような状況下、容易に入手し、培養、増殖することが可能なヒト肝癌細胞を用いた健常ヒト肝における遺伝子発現を模倣する安定培養系の確立が望まれている。我々はこれまでに新規細胞培養法や培養基材を検討してきたが、担体としてハイドロキシアパタイトを用いて、ラジアルフローバイオリアクターで HepG2 を三次元培養すると、平面培養と比較して rifampicin による CYP3A4 の発現誘導が亢進することを既に確認している。本研究では CYP3A4 以外の薬物代謝関連遺伝子の発現、rifampicin 以外の薬剤を用いた CYP 誘導への三次元培養の影響を検討し、これまでに