

確立した三次元培養による化学物質に対する試験システムの評価を行う。また、今回得られた知見やこれまでに得られている知見より、三次元培養による薬物代謝関連遺伝の発現変化に関するメカニズムを解明し、その成果を平面培養へ反映させることを試みた。

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、 3×10^7 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 μ M, dexamethasone 10 μ M, phenobarbital 250 μ M) 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_ml : 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 μ g 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。

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 (*GADI*、*CYP2B6*、*GSTP1*、*NAT2*、*GSTA3*、*SNN*、*SRD5A2*、*CHST1*) を Fig.1 示す。三次元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、phenobarbital 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、phenobarbital 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。

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である *CK8* や胆管上皮細胞のマーカである *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。

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。

以上のことより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。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

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)

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子の発現の比較

	gene symbol	3D / 2D (fold)	p-value(n=3)		
drug transporters	metallothioneins	MT2A	0.78		
		MT3	1.29		
		ABCB1	1.14		
	p-glycoprotein	ABCC1	2.15		
		GP1	1.16		
phase I metabolizing Enzymes	P450 gene family	CYP1B2	1.29		
		CYP17A1	1.53		
		CYP19A1	0.80		
		CYP11A1	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	carboxylesterase	CES2	1.54
				CES4	1.27
decarboxylase	GAD1		9.87		
dehydrogenase	ADH1B		1.29		
	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		
	LPO		1.44		
	MPO		1.29		
lipoygenase	ALOX12		1.46		
	ALOX15		0.66		
	ALOX5		1.81		
	AROE		1.30		
hydrolases	EPHX1		2.05		
	FAAH		2.02		
	FBP1		0.68		
kinases	HK2		1.32		
	FKLR		0.76		
	FKM2		1.27		
glutathione peroxidase	BLVFA		1.11		
	BLVFB		0.95		
	CYBSR3		0.89		
	GPX1		1.89		
	GPX2		1.54		
	GSR		1.66		
	MTHFR		1.26		
	NOS3		2.24		
	NQO1		1.51		
	SRD5A1		1.29		
	SRD5A2		3.37		
	PNH1		1.03		
	PNH2		1.93		
	PNH3		1.27		
	other related genes		CHST1	3.11	
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			
CGMT		1.20			
GGT1		1.17			
other related Genes		MHR	1.00		
		ARNT	1.34		
	ASNA1	2.22			
	GCKR	0.65			
	MARCKS	1.11			
	SMARCAL1	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		
	p-glycoprotein	ABCB1 1.01	0.76	0.77		
		ABCC1 0.77	1.23	1.00		
		CGI 0.77	0.89	0.74		
CYP11B2 0.81		1.10	1.10			
phase I metabolizing Enzymes	P450 gene family	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	CEB2 0.89	1.08	0.70
				CES4 0.68	1.70	0.70
			decarboxylase	GAD1 0.93	1.57	0.60
dehydrogenase	ADH1B 0.81		1.11	1.10		
	ADH1C 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		
glutathione peroxidases	GPX1 0.72		1.03	0.83		
	GPX2 1.02		1.08	1.05		
	GPX3 0.98		1.03	0.86		
	GPX4 0.70		0.86	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		
lipoygenase	GSTP1 1.67		0.82	0.61		
	GSTT1 0.95		1.18	0.95		
	GSTZ1 0.89		1.11	1.01		
	LPO 0.70		0.85	1.07		
	MPO 0.62		1.10	1.10		
	ALOX12* 1.49		0.81	0.69		
	ALOX15 0.63		0.91	1.93		
	ALOX5 1.86		0.60	1.40		
	APOE 0.93		0.83	1.08		
	hydrolases		EPHX1 0.76	0.80	1.61	
FAAH 0.73			0.98	0.80		
FBP1 1.18			0.78	1.88		
HK2 0.69			0.47	0.84		
kinases			PKLR 1.01	0.88	0.91	
			PKM2 0.81	0.88	0.92	
glutathione peroxidases			BLVRA 0.82	1.12	0.85	
			BLVRB 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	1.05		
	GSR 0.62		0.58	1.21		
	MTHFR 0.93		0.90	1.20		
	NCS3 1.25	0.88	0.85			
	NGO1 0.75	0.83	1.06			
	SRD5A1 1.50	0.65	1.05			
paraconases	SRD5A2* 0.22	0.95	0.15			
	PONI1 2.41	2.00	1.31			
other related genes	PONI2 0.90	1.18	0.95			
	PONI3 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			
other related Genes	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			
	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	0.98	0.99			
	SMARCAL1 0.84	0.97	0.75			
	SNN 0.96	0.89	0.47			
	ABP1 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 μM rifampicin、10 μM dexamethasone、250 μM 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。

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

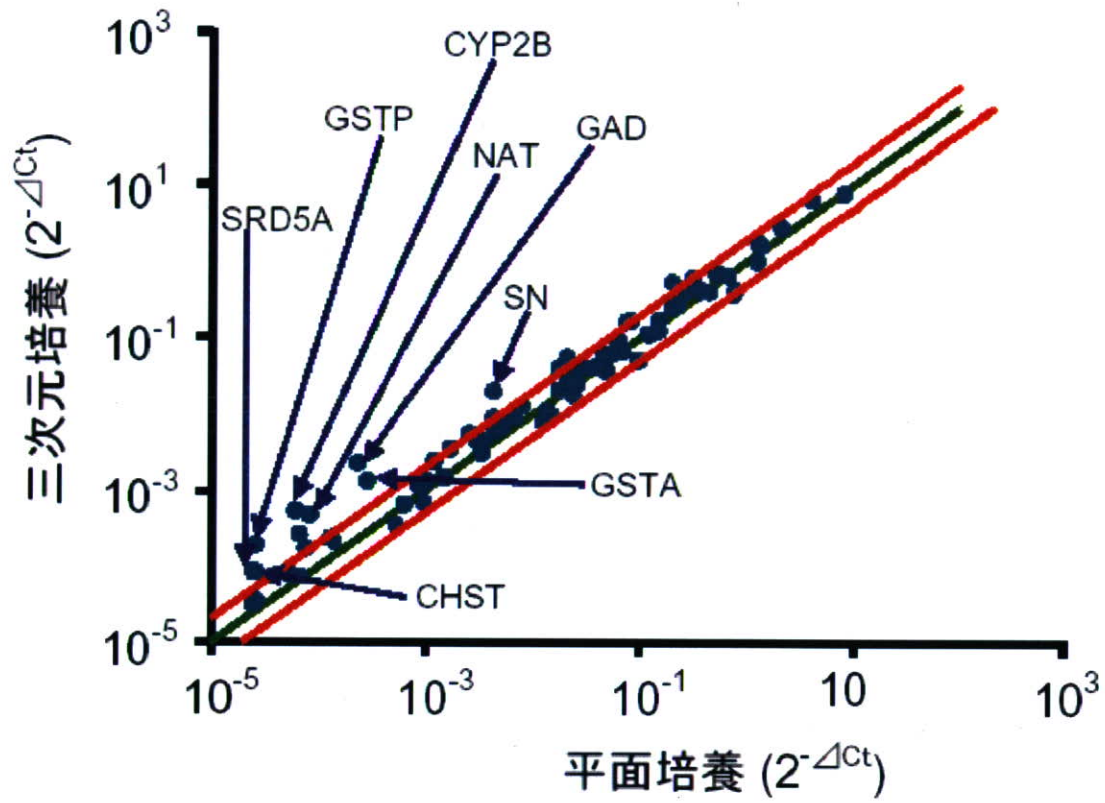
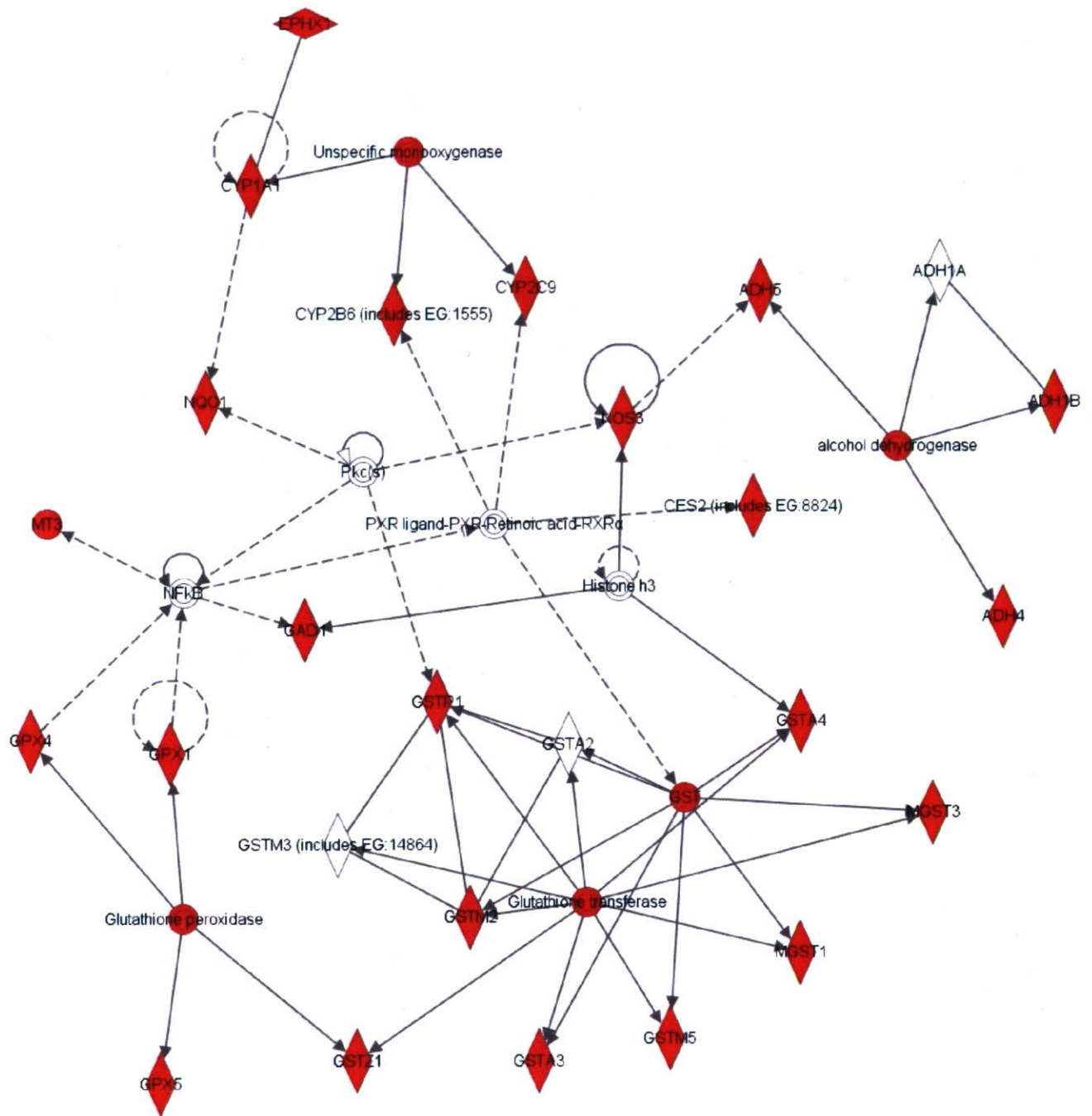


Fig.1 PCRArray による三次元培養と平面培養の薬物代謝関連遺伝子の発現比較

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)

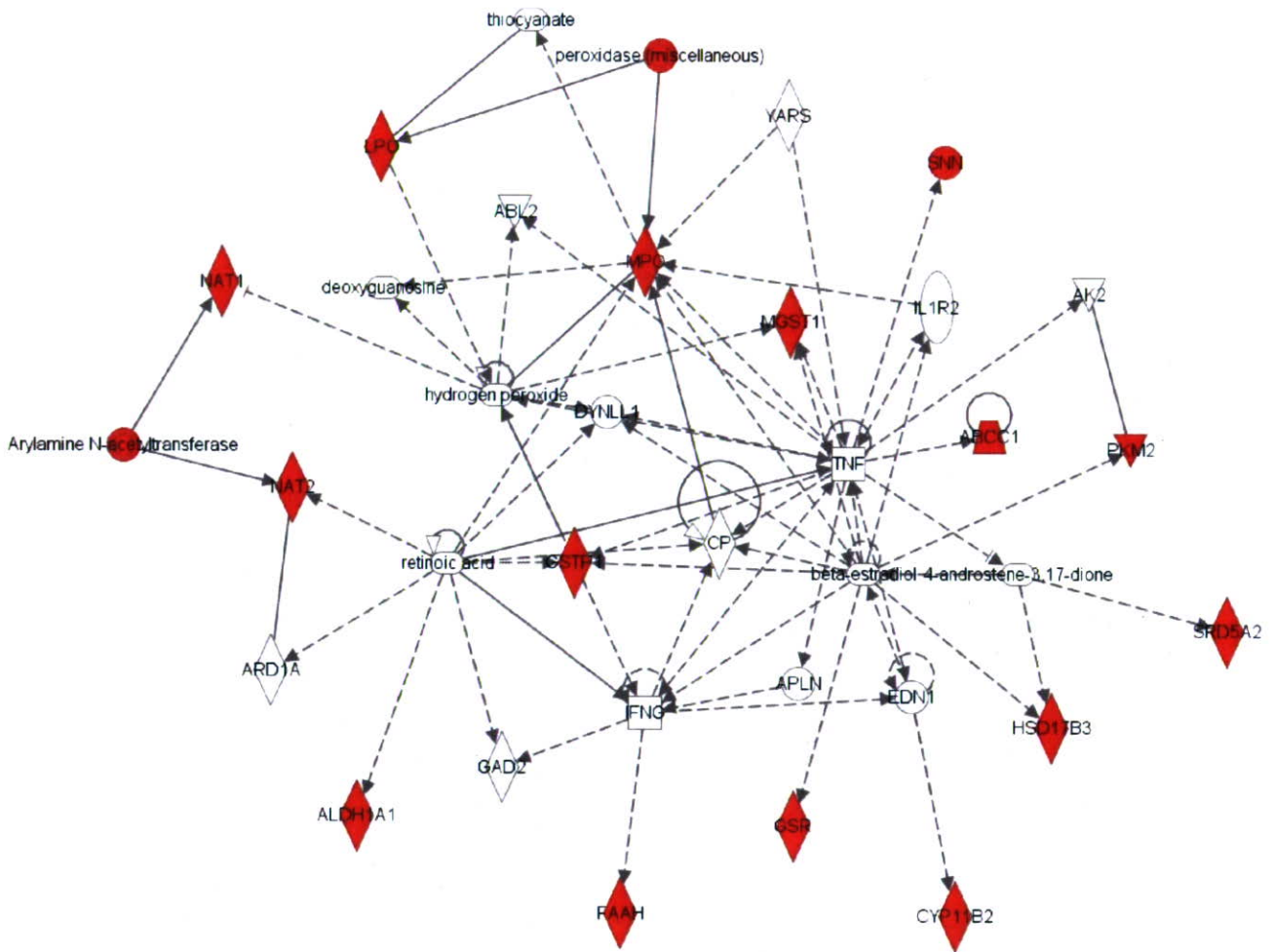


Fig.2 Ingenuity Pathways Analysis (IPA) により構築されたネットワーク

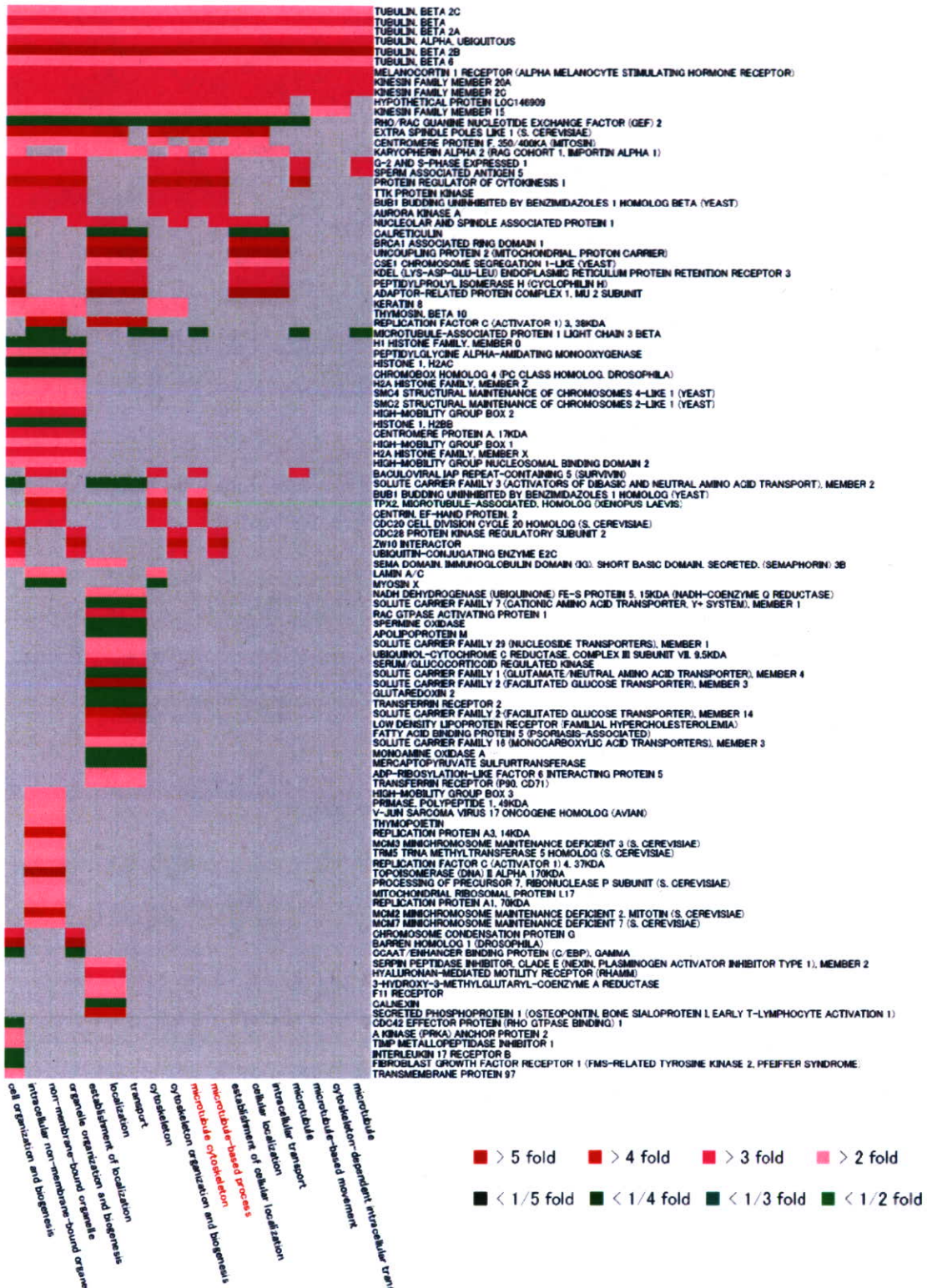
PCR-Arrayの結果、三次元培養において有意な発現上昇が確認された遺伝子をIPAにより解析し、構築されたネットワークを示した。三次元培養により有意な発現上昇が確認された遺伝子を赤で示した。

A) PXRに関するネットワーク

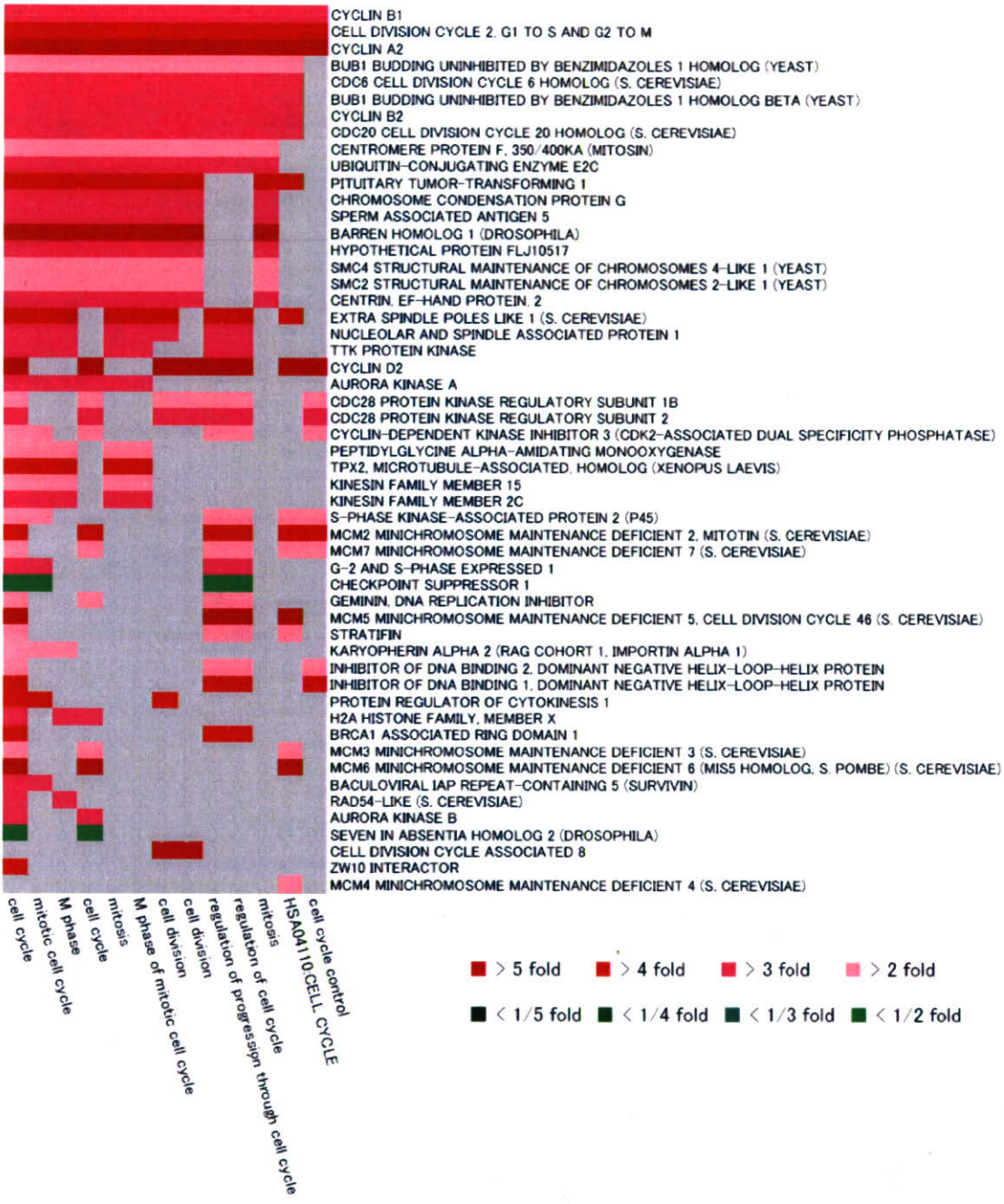
B) エストロゲン、レチノイン酸に関するネットワーク

- ◇ : 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)



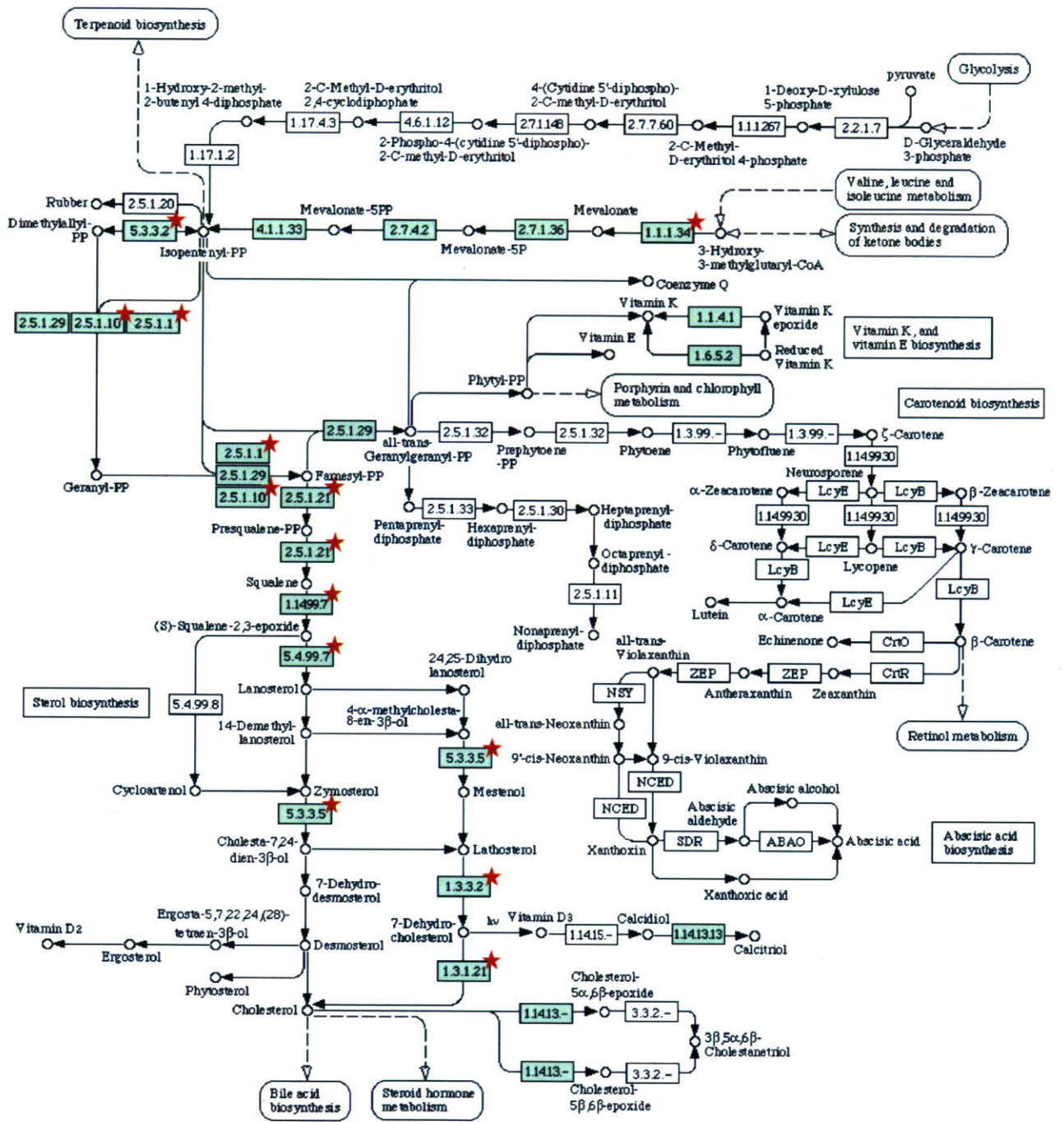


Fig. 4 ステロイド合成経路 (KEGG PATHWAY Database) において
三次元培養で発現が上昇した遺伝子

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。

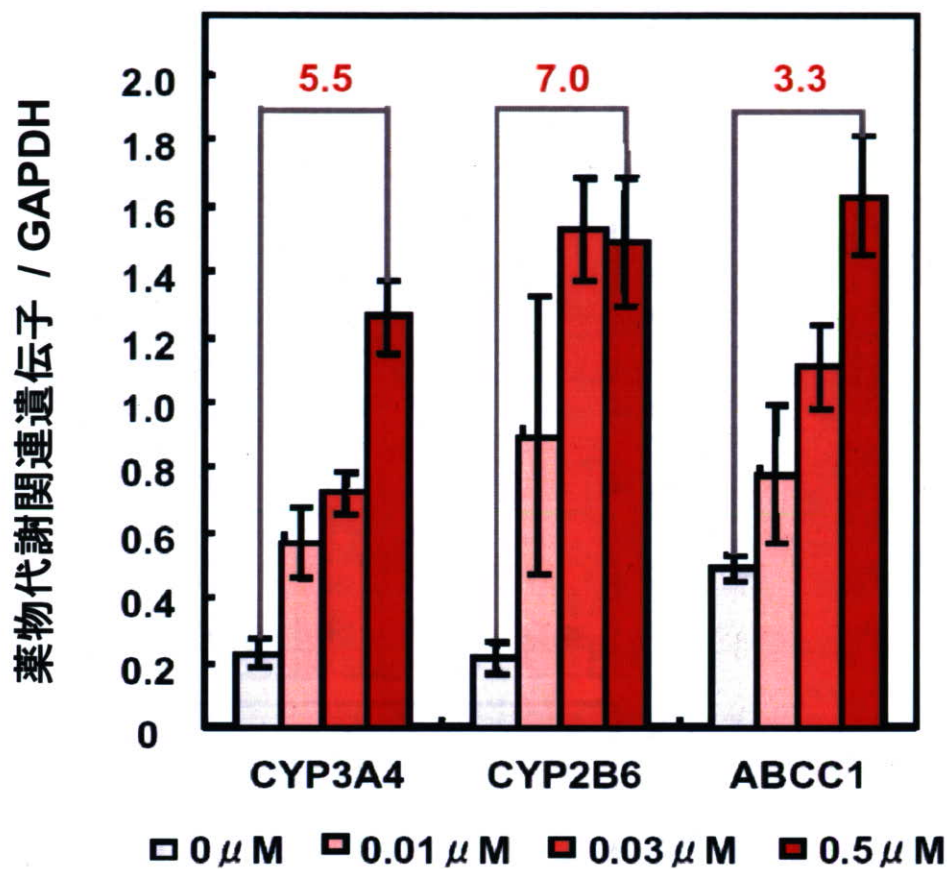


Fig. 5 paclitaxel 処理による薬物代謝関連遺伝子の発現変化

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。

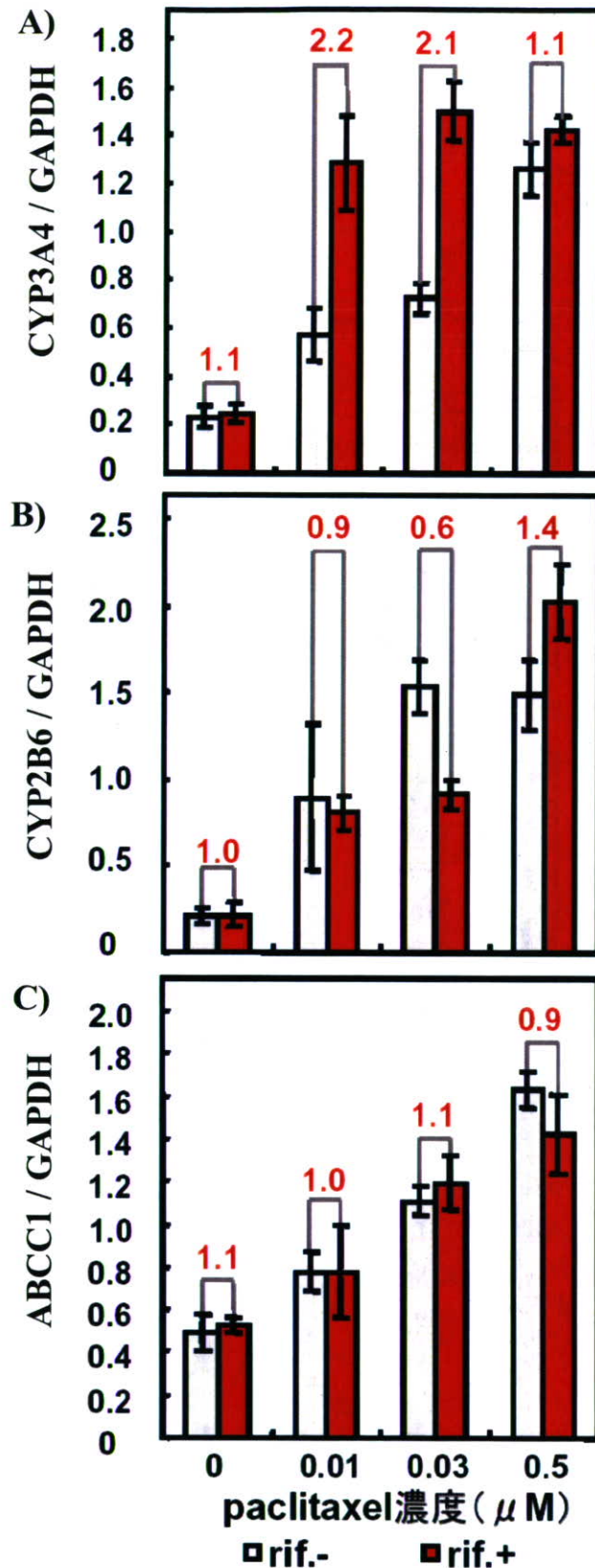


Fig. 6 paclitaxel処理のrifampicinによる誘導への影響

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

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、ヒト肝における薬物代謝酵素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microRNA(miRNA)の関与について解析を進めた。その結果、CYP3A4遺伝子の発現量と正または負の相関を示すmiRNAが存在し、これらのmiRNAがCYP3A4の発現制御に関与している可能性が示唆された。

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、かつてミクロソームや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の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、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