

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唆された。

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関与するという報告がなされ始めた。薬物代謝酵素*CYP1A*遺伝子についてこの機構が関与するという報告がなされた。そこで、昨年度より、*CYP3A4*の個人差を引き起こす要因の決定を目的として、*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。昨年度は、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2細胞を用いて、*CYP1A*および*3A*遺伝子の発現における、ヒスト

ン脱アセチル化およびDNAメチル化の関与について検討した。HepG2細胞に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を処理し、CYP各遺伝子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い遺伝子が大別された。*CYP1A1*, *2E1*の発現量はTSAにより強く影響を受け、*CYP1B1*の発現量はAzaCにより強く影響を受けた。*CYP1A2*, *3A4*, *3A5*, *CAR*遺伝子の発現量は、TSAおよびAzaCの影響を同程度に受け、それぞれのCYP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された。

さらに *CYP1A* および *CYP3A* 遺伝子誘導剤を処理して検討した結果、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。

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 (Fig. 1)。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。

そこで本年度は、*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、昨年のヒストンのアセチル化やDNAのメチル化に関する検討に加え、miRNAの関与について検討した。

B. 研究方法

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ートより、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*RXRα*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 の検索結果を、Table 1 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. 3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。

C. 研究結果

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* および関連薬物動態関連遺伝子の発現量の相関について検討した結果を、Fig. 4に示した。*CYP3A4* 遺伝子の発現量は、*CYP3A4* 3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* 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。*CYP3A4* 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* 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* 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 1)。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Hep G2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. 5, 6, 7)。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. 7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. 8, 9, 10)。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. 8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. 9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. 10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。

D. 考察

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、CYP3A4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

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られ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ったが、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と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。

E. 結論

本年度の研究により以下の点が明らかとなった。

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

1. 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、CYP3A4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。

2. CYP3A4遺伝子の発現量と核内受容体 PXR, CAR, RXRA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, RXRA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

3. 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。
4. 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。

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 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

なし

Fig. 1. Processing pathway of miRNA

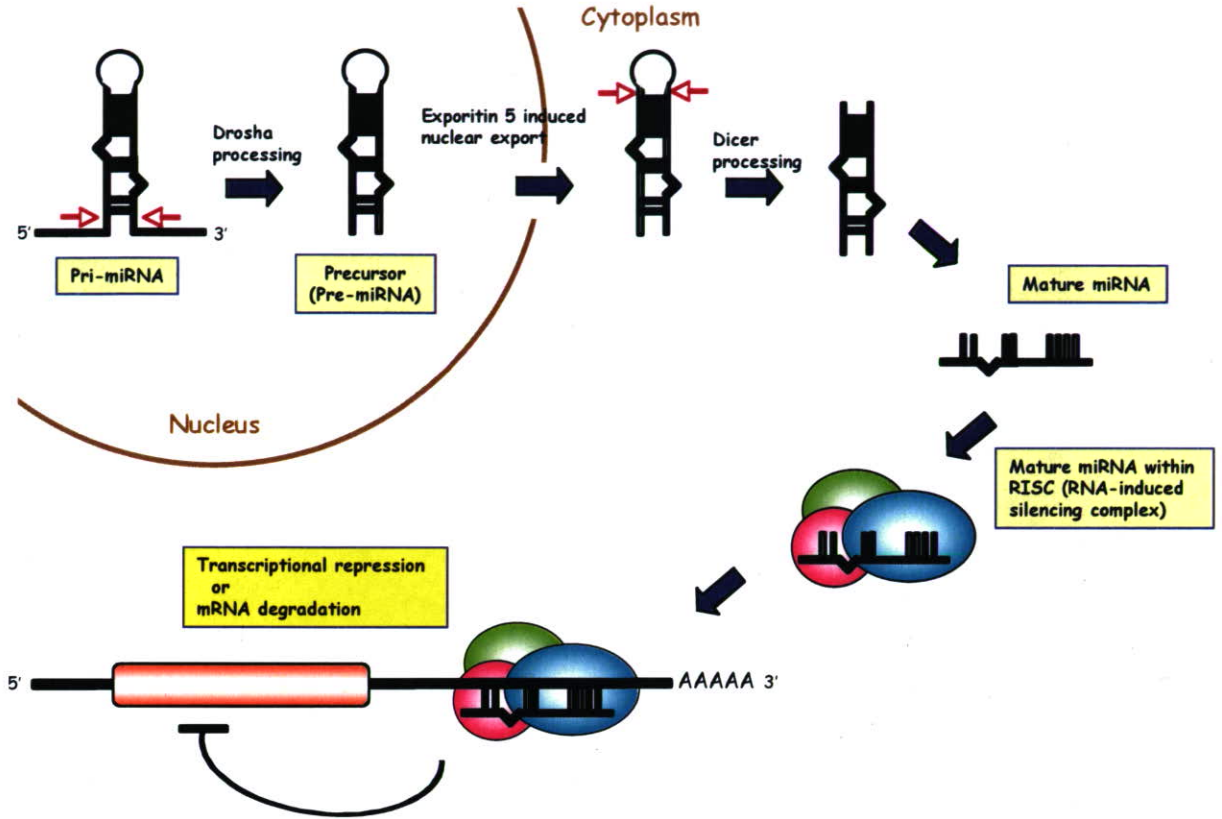


Fig. 2. CYP3A genes cluster in Chr. 7

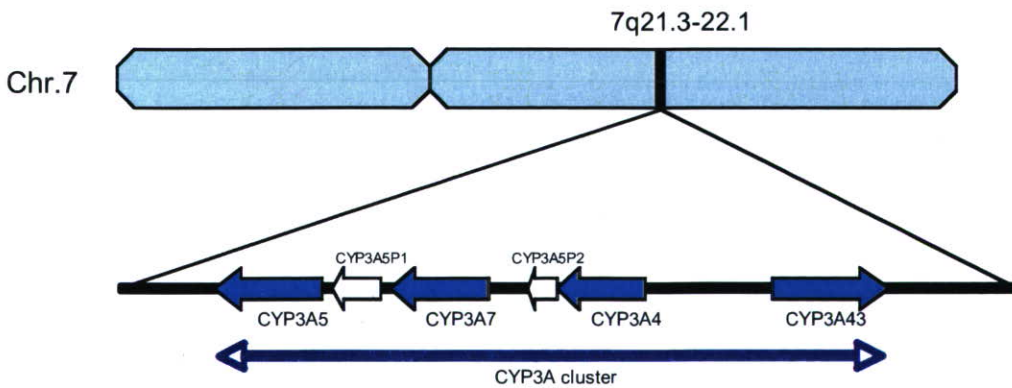


Table 1. miRBase database search results for *CYP3A* and related nuclear receptor genes

	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. 3. miRBase database search result for *CYP3A4*

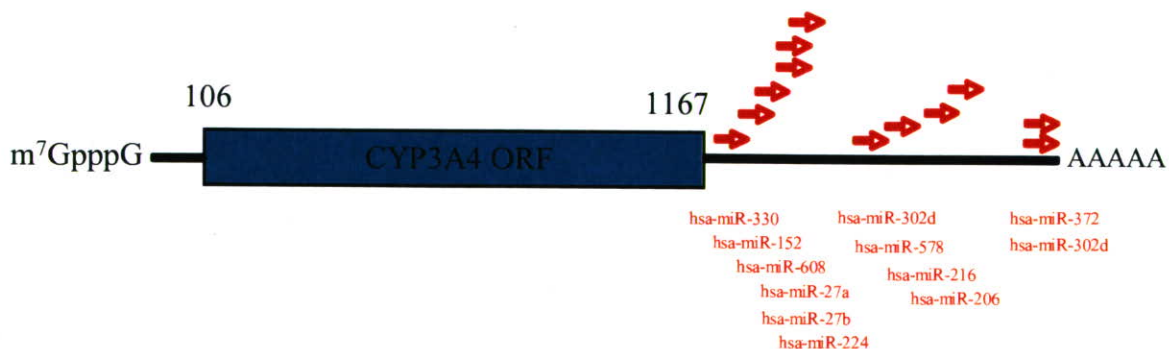
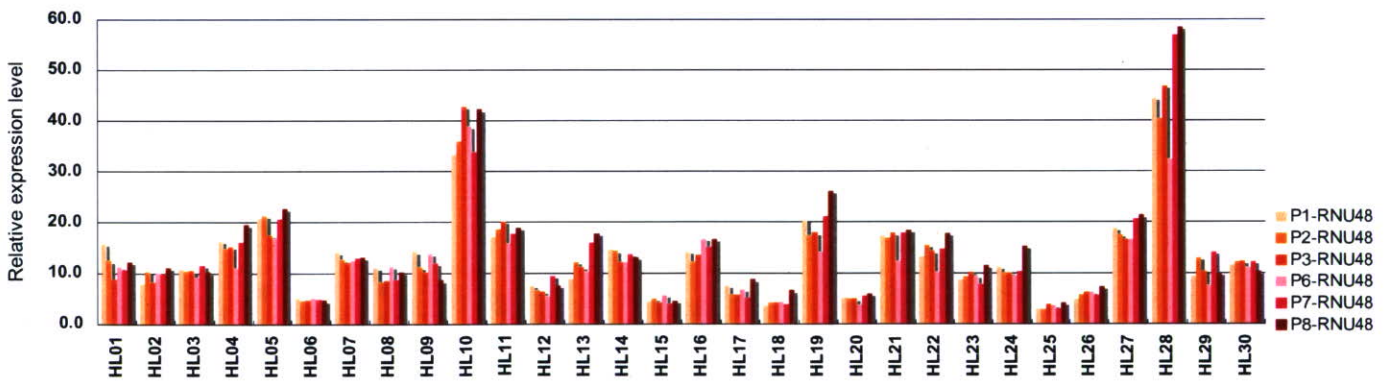


Fig. 4. Correlation of *CYP3A* mRNA levels with related nuclear receptor gene levels in liver tissues

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)

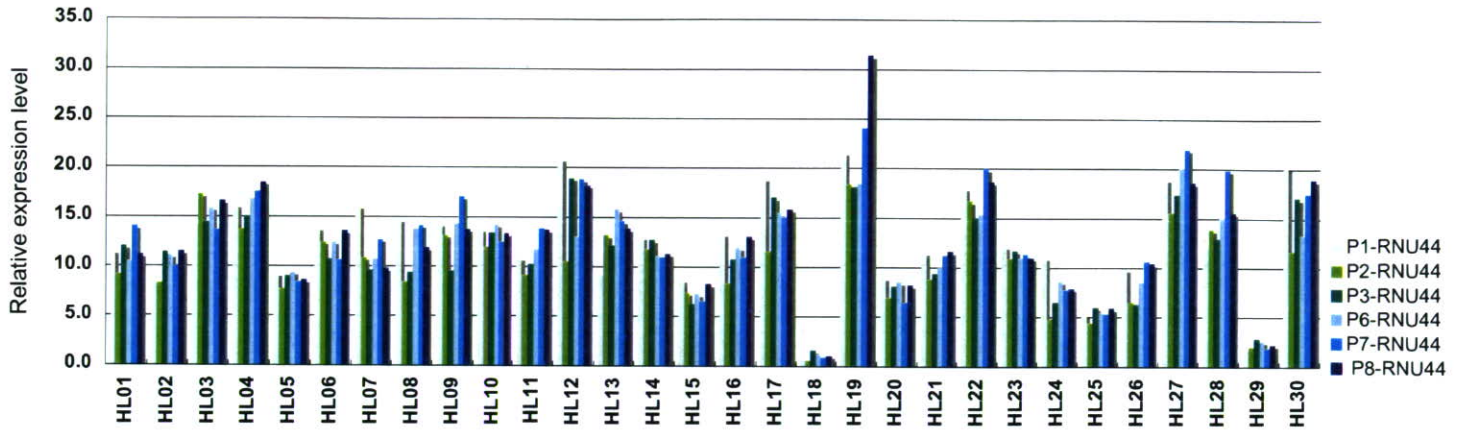
Fig. 5. The expression level of RNU48



	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)

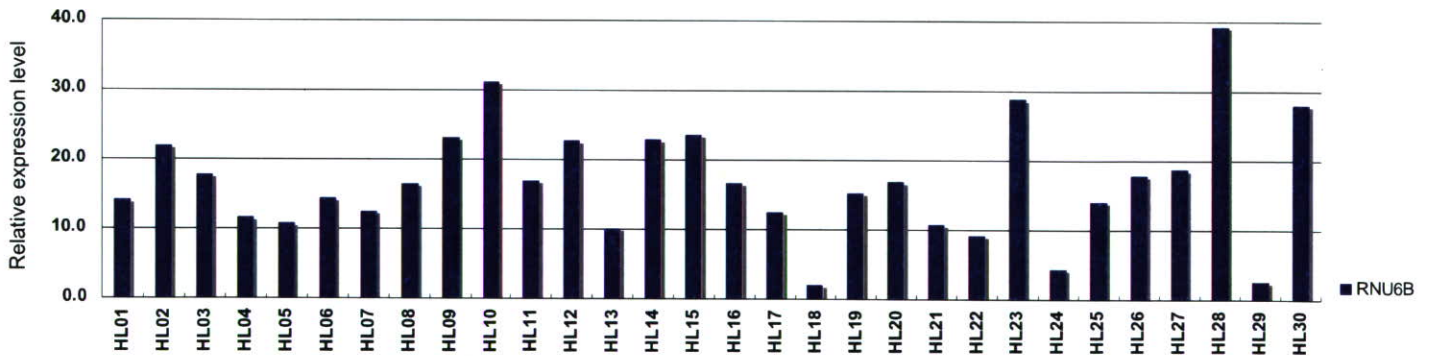
Fig. 6. The expression level of RNU44



	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. 7. 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. 8. 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	0.462	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. 9. 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	0.265	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	0.560
	miR-27a	-0.098	-0.229	-0.118	-0.204	0.029	0.355	0.521
Pool-2	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
	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
Pool-3	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	-0.546
	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
	miR-338	0.018	0.016	0.359	-0.083	0.084	0.260	0.348
Pool-6	miR-503	-0.435	-0.276	0.085	-0.356	-0.298	-0.415	-0.371
	miR-376a	-0.146	-0.342	-0.083	-0.146	-0.077	-0.092	-0.017
Pool-7	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	0.670
	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. 10. 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	0.488	0.570
	miR-330	-0.408	-0.338	-0.168	-0.489	-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

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

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

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 小澤 正吾 岩手医科大学薬学部 教授

研究要旨：本研究組織では、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 をエイブル社ラジアルフローバイオリアクターで三次元培養し、細胞の高密度培養を行った。Rifampicin 等により CYP3A4 の誘導が亢進することを明らかにした。この間、SCIVAX 社により、ナノテクノロジーを用い、種々の癌種の組織由来の樹立培養細胞株でスフェロイド形成を通じた三次元培養プレートが開発された。岩手医科大学では、本年度、同三次元培養プレートを用いて HepG2 細胞の培養を試みた。HepG2 細胞は培養2日目より、スフェロイド様構造形成を始め、96時間経過後大部分の細胞がスフェロイドを形成した。

A. 研究目的

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。ヒトと実験動物肝の間には大きな種差があることなどから、現時点ではヒト肝初代培養細胞に全面的に依存して薬物代謝酵素の誘導等の試験が行われている。しかし、ヒト肝初代培養細胞の入手が著しく困難であるので、この状況を打破するため、本研究事業では、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。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、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切望されている。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今年度までに確認した。ごく最近、SCIVAX 社により、ナノテクノロジーを用い、種々の癌種の組織由来の樹立培養細胞株でスフェロイド形成を通じて三次元

環境を形成したと考えられる培養プレートが開発された。岩手医科大学では、本年度、同三次元培養プレートを用いてHepG2細胞の培養を試みた。本プレートは種々癌種由来の細胞について、平面培養における生育時の形態とは全く異なるスフェロイド様構造を形成したとされているが、HepG2細胞での三次元的培養、ならびに薬物代謝動態関連遺伝子発現については検討されていない。今年度はHepG2細胞が、本プレート上で平面培養時の形態とは異なり、確かにスフェロイド様構造を形成したことを確認した。

B. 研究方法

SCIVAX 社ナノカルチャープレートにおける細胞培養

細胞：ATCC よりヒト肝癌細胞株 HepG2 (ATCC 番号：HB-8065) を入手した。

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。

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

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. 1 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. 2 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

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. 1)。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 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。

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. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

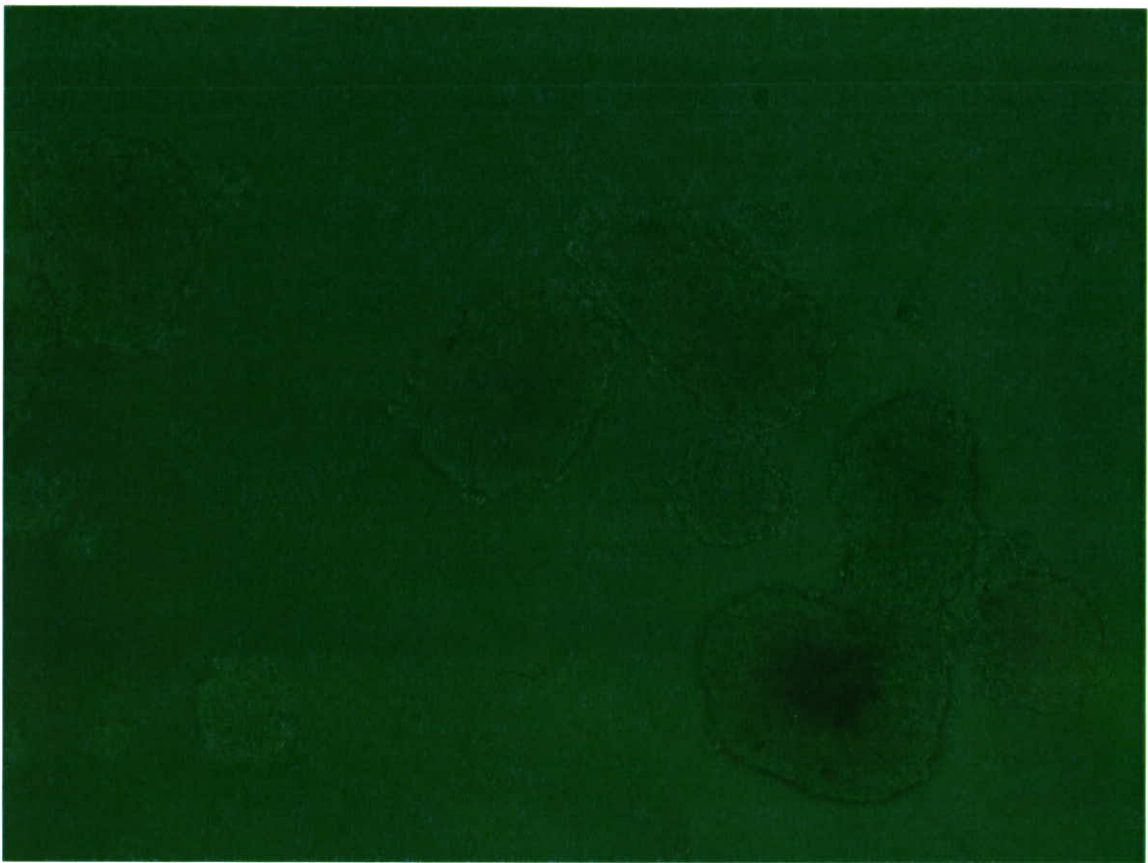


Fig. 1. SCIVAX 社ナノカルチャープレート NCP-L により、HepG2 細胞を 37℃、96 時間培養後に形成されたスフェロイドの位相差顕微鏡写真 (X100)。

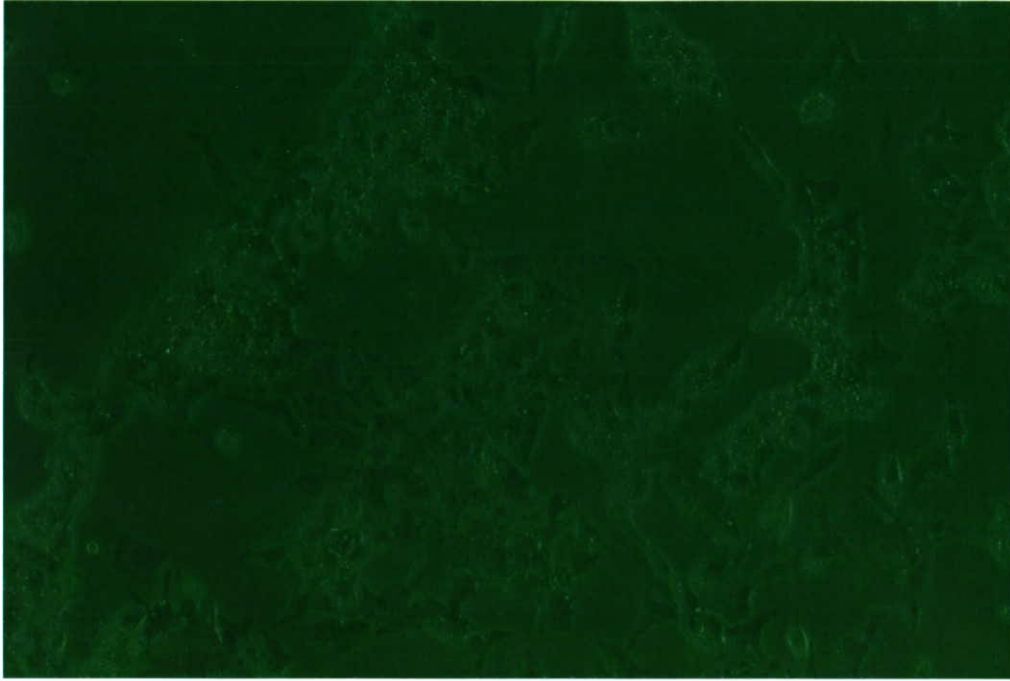


Fig. 2. Corning 社プラスチックプレートにより、HepG2 細胞を 37℃、96 時間平面培養後の細胞の位相差顕微鏡写真 (X100)。