

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17年度～平成19年度 総合研究報告書

主任研究者 小澤 正吾

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

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基盤に関する
総合的研究 ----- 1

小 澤 正 吾

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 67

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 68

総合研究報告書

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
(H17-トキシコ一般-002)

主任研究者 小澤 正吾 岩手医科大学薬学部

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のリファンピシンによる誘導がかかることを明らかにした。リファンピシンのほか、フェノバルビタール、デキサメサゾンによる誘導が認められた。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。日本人肝組織を用いてCYP3A4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。

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。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、健康ヒト肝 mRNA の遺伝子発現を模倣する安定培養系の確立を目指す。このように、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を目的とする。この目標達成に向け、一貫した研究を遂行してきたので、本総合報告書において、研究成果を総括する。

B. 研究方法

HepG2 細胞の培養

実験に用いた HepG2 は ATCC より購入した。

平面培養：直径 10 cm の細胞培養用シャーレ (Corning) で、DMEM (Sigma) + 10 % FBS (Invitrogen) 培地中、5 % CO₂ を含む気相下 37°C 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 (RFB; 5 ml 容) を用いて行った (Fig. 1)。細胞の支持体は hydroxy apatite (Pentax Corporation)、及び、PVA (Muromachi Kagaku) 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、リアクター内の細胞密度が 5×10^6 cells/ml になるように播種した。培地は high glucose DMEM (Invitrogen) + 10 % FBS を用い、播種後細胞がハイドロキシアパタイトビーズに生着するまで培地は循環させた。その後は、一定量の新鮮な培地を供給し培養した。培地中のグルコース消費量をバイオセンサー (model BF-4: Oji Scientific Instruments) でモニターし換算することで、細胞数の推定を行った。また、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モニターし、一定になるようコントロールした。

スフェロイド形成：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た後、セルタイト スフェロイド (Sumilon) に各種細胞濃度で播種し、通常の CO₂ インキュベータ内で静置培養した。培地は一定量 (100 µl) 毎日交換した。

細胞切片の作成及び染色

RFB より細胞を回収し、10 % フォルマリンを含む緩衝液にて固定した。その後、常法に従いトルイジンブルーでの染色を行った。

薬剤による酵素誘導試験

三次元培養下、対数増殖期 (growth phase) にある細胞の培養液中に rifampicin 100 µM を添加し、3 日間暴露した。この間培地は RFB 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

RFB より細胞を回収し、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 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* 特異的プライマーと TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.) を用い、Prism 7700 real time PCR system 又は 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 *CYP3A4* の発現量を規格化した。

定常期で発現誘導される遺伝子の網羅的解析

一定期間 (播種後 7 日目：増殖期、播種後 17 日目：定常期) HepG2 細胞を三次元培養した RFB カラム下部三箇所より total RNA を回収し、常法に従いラベル後 Affymetrix 社 Human Genome U133A GeneChip にて遺伝子発現量を網羅的に定量した。増殖期と定常期の発現量を *t*-検定により比較し、有意差のあった遺伝子のうち、定常期

の発現量が増殖期の三倍以上あった遺伝子を“定常期で誘導された遺伝子”として、遺伝子情報を取得・解析した。

VEGF 産生量の定量

培地上清をシャーレ(平面培養)又は培地調整槽(RFB)より回収し、96-wells-VEGF Human Assay kit (Amersham Biosciences)を用いて定量した。

血管新生アッセイ

血管新生は血管新生定量キット (Kurabo Industries)により、回収した培地上清を添付の培地と 1:1 に混合して行った。コントロールには VEGF-A (Kurabo)を用いた。新生された血管を染色後、血管長を Angiogenesis Image Analyzer (Kurabo)で定量した。

ヒト肝組織における細胞下分画、および RNA 画分の調製と薬物代謝酵素の定量

ヒト肝組織より、細胞下分画および RNA 画分を調製し、各遺伝子の mRNA 量を TaqMan probe を用いた real time-PCR 法により測定した。また Western blot 法により CYP3A4, 3A5 蛋白含量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究においてはヒト肝癌由来樹立培養細胞を始め種々のヒト肝組織由来のサンプルを使用するが、それらは、ヒト肝組織提供者の不利益、危険性を排除するために、提供者の個人情報と連結不可能匿名化されている。このことから、提供者の人権が損なわれる恐れはほとんどない。より慎重を期して、本研究は、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」(平成 10 年厚生科学審議会答申)を遵守して遂行する。さらに、用いる細胞株の遺伝情報を解析する可能性があることから、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守する。実験動物に対する動物愛護の観点から、実験動物には無用の苦痛を与える実験計画を避け

る。研究の実施に際しては、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会に計画を申請し、審査を受けた上で研究を進める。また、遺伝子実験に関しては、国立医薬品食品衛生研究所組換え DNA 実験安全管理規則に則って行い、必要に応じて所内の関連委員会に計画を申請、審査を受けた上で研究を進める。

HepG2、JHH-1、JHH-4 細胞の培養

HepG2 細胞は ATCC より購入し、通常は DMEM (Sigma) + 10 % FBS (Invitrogen)培地または 4,500 mg/l の glucose を含む William's E + 10% FBS 培地で平面培養した。JHH-1 ならびに JHH-4 は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより購入し、通常は 4,500 mg/l の glucose を含む William's E + 10% FBS 培地で平面培養した。また、HepG2 細胞を、ヒストン脱アセチル化阻害剤、DNA メチル化阻害剤の影響を調べる実験に用いた。

スフェロイド形成

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た後、セルタイト スフェロイド (Sumilon)に各種細胞濃度で播種し、通常の CO₂ インキュベータ内で静置培養した。培地は一定量 (100 μl) 毎日交換した。

JHH-1、JHH-4 細胞の三次元培養

エイブル社製ラジアルフローバイオリアクター (RFB; 5 ml 容)を用いて行った。細胞の支持担体はハイドロキシアパタイト (Pentax Corporation)、及び、ポリビニル酢酸樹脂(以下 PVA、Muromachi Kagaku)を用いた。シャーレ上で培養している細胞をトリプシン処理により回収し、リアクター内の細胞密度が 5 ~ 6 X 10⁶ cells/ml になるように播種した。培地は 10 % FBS 含有 high glucose DMEM (Invitrogen) (HepG2) または 4,500 mg/l の glucose を含む 10% FBS 含有 William's E 培地 (JHH-1 および JHH-4) を用い、播種後細胞が細胞支持担体に生着するまで培地は循環させた。その後は、一定量の新鮮な培地を供給し培養した。細胞の増殖は 1 日あたりの培地中のグルコース消費量を測定し(グ

ルコース CII-テストワコー)、あらかじめ平面培養より得た 1 細胞あたりのグルコースの 1 日あたりの消費量をもとに換算し推定した。また、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モニターし、一定になるようコントロールした。

網羅的遺伝子解析

ラジアルフローバイオリアクターに HepG2 細胞を播種後 7 日目に、HepG2 細胞を培養装置下部三箇所より total RNA を回収した。平行して、細胞培養用シャーレ(Corning)で平面培養した sub-confluent の HepG2 から total RNA を回収した。両 total RNA を常法に従いラベル後 Affymetrix 社 Human Genome U133A GeneChip にて遺伝子発現量を網羅的に定量した。得られた平面培養と三次元培養の遺伝子発現量を *t*-検定により比較し、有意差のあった遺伝子のうち、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 以下であった遺伝子を“三次元培養で発現が変化した遺伝子”とした。該当する遺伝子は 94 であった。三次元培養で発現が変化した遺伝子のリストを 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。

マクロアレイ (PCR-Array) 解析

細胞培養用シャーレ(Corning)上、4,500 mg/l の glucose を含む William's E +10% FBS 培地中で平面培養した sub-confluent の HepG2、JHH-1、JHH-4 から total RNA を回収し、RT² PCR Array First Strand Synthesis kit(SuperArray)により、試薬に添付され、解説された方法に従い逆転写反応を行い、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 2.0 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。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た。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。

ヒト肝組織からの RNA 画分の調製および mRNA 発現量の測定

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。検体は、男性 19 検体、女性 11 検体、平均年齢 61.2 歳 (Mean age \pm SD: 61.2 \pm 11.4)であった。Total RNA 画分の抽出は、RNAqueous Small Scale Phenol-Free Total RNA Isolation Kit (Ambion Inc., USA)により行った。Total RNA サンプルを oligo d(T)₁₆もしくは random primer により RT 反応を行い、cDNA を調製した。内在性コントロールとして BACT (β -actin), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)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、薬物代謝酵素は、*CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *3A4*, *3A5*, *GSTA2*, *UGT1A1*を、核内受容体は *AHR*, *PXR*, *CAR*, *GR* および核内受容体と複合体を形成する *ARNT*, *RXRA*、転写因子は、*HNF1A*, *HNF4A* について測定した。内部標準物質として市販のヒト poly (A)⁺ RNA (Becton Dickinson, USA) サンプルを使用した。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。

ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞における薬物代謝酵素遺伝子発現レベルへの影響

HepG2 細胞を、5%炭酸ガス下 10 % FBS, penicillin-streptomycin 添加 DMEM で培養した。ヒストン脱アセチル化阻害剤、トリコスタチン A

(TSA) および DNA メチル化阻害剤アザ C (5-aza-2'-deoxycytidine, AzaC) による HepG2 細胞内薬物代謝酵素関連遺伝子の発現レベルに対する影響を調べるため、上記阻害剤で、細胞を種々の濃度、時間処理した。あらかじめ、TSA、AzaC の HepG2 細胞に対する毒性を、細胞増殖阻害を指標として調べ、細胞増殖阻害が現れない薬剤濃度を調べた。薬剤処理後、総 RNA をキアゲン社の RNeasy Mini Kit で回収し、cDNA を Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) で調製した。測定対象遺伝子は、チトクロム P450 (CYP) では、*CYP1A1*, *1A2*, *1B1*, *2A6*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *2D6*, *2E1*, *3A4*, *3A5*、核内受容体では、*PXR*, *CAR*, *AhR*, *RXR α* , *GR*, *Arnt*、転写因子では、*HNF1A*, *HNF4A* とした。

上記の種々の遺伝子特異的 TaqMan プライマー (Applied Biosystems Inc.) と TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc.) を用い、ABI Prism 7700 real time PCR system (Applied Biosystems Inc.) により各種遺伝子発現量を測定した。各種 CYP をコードする mRNA レベルを規格化するため、 *β -Actin*, *GAPDH* の発現量を測定した。

(倫理面への配慮)

今年度、樹立培養癌細胞 HepG2 細胞を用いて行った研究の内容には、遺伝子配列解析実験も含まれておらず、倫理面で配慮すべき該事項はなしと考える。本研究におけるヒト組織使用は国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会の承認を受けて行った。また、研究に使用したヒト肝組織は、獨協医科大学およびヒューマンサイエンス財団研究資源バンクにおいて、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、連結不可能匿名化され、個人を特定することはできず、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。

Rifampicin, Dexamethasone, Phenobarbital による薬物代謝酵素誘導試験

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。

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 μ M 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 μ M) 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 (mRNA, miRNA) 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 回破砕した。さらに、QIAshredder (QIAGEN, Germany) カラムに掛け、非破砕組織を取り除い

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 により miRNA 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かつとまて観察された。

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。

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°C 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°C 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

HepG2 細胞の三次元培養

三次元培養はエイブル社製ラジアルフローバイオリアクター(RFB; 5 ml 容)を用いて行った。ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 につき種々の検討を行った。本装置はカラム内に充填した細胞支持担体に細胞を生着させた後、培養状態をモニターしつつ、溶存酸素、pH 等が調整された培養液をカラム外周から中心に向かって循環させることで、細胞の三次元的高密度培養を可能にしている。細胞の種類にもよるが、今回用いた HepG2 細胞は、前記条件で一週間以上良好な増殖を示した (Fig. 2)。

粒状のハイドロキシアパタイトと孔径 130 μm の PVA スポンジを細胞支持担体として用いた。粒状のハイドロキシアパタイトはカラムに充填した後培養を行い、培養終了後はスパーテル等でかき出し細胞を回収する。そのため、回収時にサンプルの培養器内の位置情報が失われてしまう。一方、PVA は回収後も培養時の形状を維持しているため、培地の流れと細胞の機能を解析することが可能と考えられ、担体内で生育している細胞の生理的状態を培養液の流れる方向等との関連で考察することができる。

担体の種類による細胞の性質の変化

三次元培養において、単体の種類により細胞の増殖性及び薬剤に対する応答性に差異があるかを検討した。担体として hydroxy apatite と PVA を用いた。1日あたりの培地中のグルコース濃度消

費量を測定することで相対的な細胞数を計測した。その結果、播種後の lag phase は PVA が長いものの、その後、増殖期に入った後には PVA の方が細胞はよく増殖し、PVA のほうがより高い最終到達細胞密度を示した。細胞播種7日後に細胞の切片を作成しトルイジンブルーにより細胞を染色し、顕微鏡下観察したところ、細胞の重層状態、及び細胞間腔の形成に差異があった (Fig. 2)。播種後3日目から7日目までの増殖期にある細胞を 100 μM rifampicin に曝露し、total RNA を回収して、*CYP3A4* の発現量を測定した。vehicle に用いた DMSO を同濃度培地に加えた細胞をコントロールとした。細胞培養用シャーレを用いた平面培養での結果も含めた観察結果が得られた。今回用いた HepG2 細胞では、平面培養では 2.4 倍の *CYP3A4* の誘導が認められたのに対して、hydroxy apatite を担体とすると、誘導倍率は 4 倍強から 14 倍弱となり、hydroxy apatite を担体として三次元培養することにより、HepG2 細胞における *CYP3A4* 誘導能は改善した。一方、PVA を担体とした場合は誘導倍率は 3.6 倍と 1.9 倍(平均 2.8 倍)で、平面培養とほぼ同程度であった (Table 1)。

三次元培養における遺伝子発現の変化の網羅的解析

今年度は、HepG2 細胞を RFB で三次元培養した際、増殖期と定常期での遺伝子発現を Affymetrix 社 human genome U133A gene chip により網羅的に定量し、定常期で特異的に誘導された遺伝子の解析を行った。定常期の発現量と増殖期の発現量を *t*-検定により検定し、統計的有意差の認められた遺伝子のうち、定常期の発現が増殖期に比べて 3 倍以上あった遺伝子の 18 種類の内訳を調べた。そのうち、8 遺伝子が発がんに関連するものであった (例: Grb10, ATR1 など) が、その中でも vascular endothelial growth factor (VEGF) に注目し、以下の解析を行った (Table 2)。

定常期における VEGF 産生の亢進

GeneChip による解析の結果、定常期では増殖

期に比べて VEGF の発現が 3.4 倍亢進していた。そこで、実際に VEGF の産生量が増加しているかどうかを調べるため、細胞上清を培地調整槽より回収し、その中に含まれる VEGF 量を ELISA 法により定量した。定常期と増殖期の細胞間で、一日あたりの VEGF 産生量を算出することにより比較検討した。その結果、定常期では、増殖期に比べ約 3 倍の一日あたりの産生量の増加が認められた。更に、この上清をヒト臍帯血由来内皮細胞の培地上清に 1:1 で混合し血管新生能を観察した。新生された血管の長さを画像解析ソフトにより定量すると、増殖期より得た培養上清より、定常状態より得た培養上清を用いた場合において多くの血管の新生が認められた (Fig. 3)。

HepG2 細胞によるスフェロイド形成

RFB による培養は、高密度三次元状態を効率よく維持できるが、専用の装置が必要であり、またカラム容積が 5 ml と大きいため多くの細胞を必要とするので、多くの細胞株を用いた比較を行うことは容易ではない。細胞を三次元的に培養する方法として、従来よりスフェロイドを形成する方法が用いられてきた。しかしながら、その場合にはスフェロイドを維持するための特殊な培養環境が必要であった。しかしながら、近年培養器の表面加工の処理により細胞の吸着性を低くし、かつ、培養 well の形状を U 字状にすることで容易にスフェロイドの形成を行えるようになった。そこで、そのような培養器の一つである、セルタイト スフェロイド (Sumilon) 96 well culture plate による HepG2 細胞のスフェロイド形成を試みた。

平面培養で培養していた HepG2 細胞をトリプシン処理により回収し、種々の細胞濃度 (1×10^4 cell/well ~ 1×10^6 cell/well) でセルタイト スフェロイド plate に播種し、スフェロイドの形成の経過を観察した。いずれの濃度でも播種後 1 日目で既にスフェロイドの形成が認められ、3 日目にはほぼ完全なスフェロイドが形成された。細胞の播種密度が上昇するに従い、スフェロイドを形成できない細胞集団の存在も認められたが、 1×10^5 cell/well 程度まででは、播種した細胞のほぼ

100 % がスフェロイドを形成していた (Fig. 4,5)。各種細胞播種濃度によるスフェロイドの形成の差異と回収されてくる total RNA 量を検討した。細胞培養用シャーレ上で培養した HepG2 細胞をトリプシン処理により回収した後、セルタイトスフェロイド (Sumilon) に各種細胞濃度で播種し、通常の CO₂ インキュベータ内で静置培養した。培地交換は毎日行った。6 日間のスフェロイド形成では 1 well あたり 3×10^4 cell を播種し、16 well の細胞から total RNA を調製すると十分量の total RNA が回収できた。この時スフェロイドは目視できるほどの大きさになり、スフェロイドとしての形状は維持していた。

次に、6 日間の培養期間の後半の 2 日間 20 μ M rifampicin に暴露した。コントロールは vehicle として用いた 0.1 % DMSO のみに同じ期間暴露した。両サンプルから回収された total RNA を用い、*CYP3A4* の発現を TaqMan real-time PCR により比較し、同遺伝子の発現誘導を観察した。平行して、同数の細胞を細胞培養用 96 well plate (Falcon) に播き、平面培養での *CYP3A4* の発現誘導を同様に観察した。スフェロイド培養では、予備検討と同様目視できる程度の大きさの細胞塊が形成されたが、細胞塊は 1 well につき 1 個で、細胞塊を形成しない細胞はほとんど観察されなかった。また、形成された細胞塊は複数の well 間でほぼ同様の形状を示していた。この培養を行った際の平面培養およびスフェロイド培養での rifampicin 処理による *CYP3A4* の誘導を行った結果、20 μ M rifampicin 2 日間の処理により平面培養では約 2 倍の誘導が認められたが、スフェロイド培養では発現誘導は認められなかった。他の暴露条件やスフェロイド形成条件でも同様に *CYP3A4* の誘導は認められなかった。

日本人肝組織における薬物動態関連遺伝子の発現レベルの測定

日本人 24 検体の肝組織を用いて、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、*CYP1A1*, *1A2*, *2B6*, *2C9*, *3A4*, *3A5*, *3A43* の mRNA 量の個体差は 16-107 倍、

*AHR, PXR, CAR, GR*では5-40倍、*CYP3A4, 3A5*蛋白の個体差はそれぞれ9, 1560倍であった。*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た。24検体のうち、*3A5*の発現量が低いものは11検体(0.478)で、日本人における*3A5 *3/*3*の頻度にはほぼ対応していた。

CYP1A1, 1A2 mRNA発現量は強く相関していたが、これら*CYP1A*と*AHR* mRNA発現量との相関は比較的弱かった。*CYP2B6, 2C9, 3A4* mRNA発現量は互いに相関し、*PXR, CAR*両受容体の発現量とも相関していた。核内受容体と複合体を形成する*RXR α* の発現量と*PXR*や*CAR*の発現量との相関が観察された (Figs. 6-10)。

三次元培養による遺伝子発現の変化

HepG2細胞を三次元的に培養した際に発現の変化する遺伝子を、三次元培養装置でハイドロキシアパタイトを細胞支持担体とし、6日間培養した細胞から調製したtotal RNAと平面培養でsub-confluentにある細胞から調製したtotal RNAにおける遺伝子発現をAffymetrix社HG U133A GeneChipで網羅的に解析することで比較検討した。三次元培養装置で6日間培養した細胞は増殖曲線上では増殖期にある。

三次元培養での発現量と平面培養での発現量をt検定により検定し、統計的有意差の認められた遺伝子のうち、三次元培養での発現が平面培養に比べて2倍以上または2分の1以下であった遺伝子は94遺伝子であった。この94遺伝子をgene ontologyによる機能分類をもとに、クラス分けした。クラス分けは、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/>)によった。その結果、19のクラスターが得られた。その中でもクラスター内に含まれる遺伝子のgene ontologyに基づく機能の統一性が高かった4つのクラスターを得ることができた (Fig. 11)。

主に細胞周期の進行に関係する遺伝子を含むク

ラスターが得られ、それらはCluster 2とcluster 7に分類された。このクラスターに含まれる遺伝子のほとんどは細胞周期の進行に必要な遺伝子であり、その多くで三次元培養での発現上昇が認められたことは、三次元培養装置内で増殖期にある細胞は、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ている。遺伝子発現が抑制されている*checkpoint suppressor 1*は細胞周期の進行に負に働く遺伝子であり、上の結果と矛盾しない。

細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子群としてCluster 12とcluster 15が得られた。三次元培養において、これらの遺伝子の多くの発現が上昇していることは、細胞が三次元的な培養条件に置かれることによって、細胞群の形態的变化、および細胞間連絡を含めた機能変化をしていることを示唆している (Fig. 11)。

HepG2以外の肝癌由来培養細胞の三次元培養への適用

東京慈恵会医科大学永森らにより日本人肝癌患者より樹立された培養細胞株JHH-1, JHH-4を医薬基盤研究所JCRB細胞バンクより購入し、三次元培養に適用可能かを調べた。

あらかじめ4,500 mg/lのglucoseを含み、10% FBS含有William's E培地中で増やしておいたJHH-1細胞 2.5×10^7 cellを三次元培養装置に播種した。細胞支持担体としては、ハイドロキシアパタイトとPVAを並行して検討した。播種時よりバイオリクターカラムの溶存酸素、pHをモニターすることで培養条件が一定になるよう調整し、培養開始3日目からは新鮮な培地の供給も開始した。細胞の増殖状態は、1日当りバイオリクター内で消費されるグルコースの量を計算し、あらかじめ平面培養で求めておいた細胞1個あたりの1日のグルコース消費量から細胞数を推定することで観察した。

10日目から13日までの細胞数の変化の様子を観察すると、播種細胞数より増加が認められたが、ハイドロキシアパタイトとPVAの比較ではPVAの方が最終到達細胞数が高かった。しかしながら、

播種細胞数から計算すると約 2 週間培養後 PVA で約 6 倍、ハイドロキシアパタイトで約 4 倍の細胞増殖しか認められなかった (Fig. 12)。

引き続き、同様の培養条件で JHH-4 細胞を三次元培養装置に播種した。播種細胞数は 3×10^7 cell であった。細胞支持担体として、今回もハイドロキシアパタイトと PVA を用いたが、いずれの場合も良好な細胞の増殖は認められなかった。播種後 7 日目までグルコース消費量を測定し細胞数を推定したが、播種細胞数より増えることはなかった。その為、JHH-4、はいずれの単体を用いた場合でも三次元培養に耐えられないと判断し培養を中止した。

HepG2、JHH-1、JHH-4 の細胞特性の比較

現在まで三次元培養に適用してきた肝癌由来の培養細胞株 3 種、HepG2、JHH-1、JHH-4 について、平面培養における薬物動態関連遺伝子 84 種類の発現に関して比較解析を行った。

解析には RT² Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray)を用いた。これは、96 well plate に 84 種類の薬物動態関連遺伝子と 5 種類のハウスキーピング遺伝子を検出する特異的プライマーが載っているマクロアレイで、SYBR Green 検出法によりリアルタイム PCR にて発現量を $\Delta\Delta Ct$ 法により解析するものである。リアルタイム PCR による測定のため高感度でダイナミックレンジの広い解析が一度に行える利点を有している。本マクロアレイを用いることにより、84 種類の遺伝子の解析が可能であった。

HepG2 と JHH-1、JHH-4 における 84 遺伝子の発現量を *GAPDH* と *beta-2-microglobulin* を内在性のコントロールとして、 $\Delta\Delta Ct$ 法により求めた結果をまとめた。具体的には各遺伝子の Ct 値とコントロールとした 2 遺伝子の Ct 値の平均値の差 ΔCt より $2^{-\Delta Ct}$ を求め、各遺伝子のおおの細胞における相対的発現量とした。RT² Profiler PCR Array ver 2.0 には 5 種のハウスキーピング遺伝子が載っているが、そのうち *GAPDH* と *beta-2-microglobulin* は、三種の細胞

間で発現の変動が最も少ないため内在性コントロールとした。

HepG2、JHH-1、JHH-4 細胞における 84 遺伝子の相対的発現量の相関を調べた。HepG2 と JHH-1 の遺伝子発現を比較するとどちらか一方の細胞で発現が上昇している遺伝子の数は 14 個と 23 個と大きな差がなかった。一方、JHH-4 の遺伝子発現を HepG2 または JHH-1 と比較すると、いずれの場合でも JHH-4 に比べ発現が上昇している遺伝子が 34 (HepG2)、37 (JHH-1) と測定した遺伝子の 40% 以上を占めていた。

このことは、各遺伝子の相対的発現量を heat map で示すことにより、鮮明に示された。heat map とは各遺伝子の三種類の細胞における相対的発現量を、三種類の細胞の相対的発現量の median で割ることで規格化し、変化を赤 (> X 8 fold) から緑 (< 1/8 fold) の色調で示すものである。HepG2 と JHH-1 では赤で示される遺伝子と緑で示される遺伝子が交じり合っているが、JHH-4 では多くの遺伝子の発現量が緑色で示されており、HepG2、JHH-1 と比較して JHH-4 で多くの遺伝子の発現が低かった。平面培養においてではあるが、JHH-4 は他の二種の細胞と比較して薬物動態関連遺伝子の発現が低い細胞であることが示唆された。

heat map により HepG2 と JHH-1 の各遺伝子の発現パターンを比較してみると、*CYP1A1*、*CYP2C19*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP2E1* の発現が相対的に高い。このことは、RT² Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism を用いることで、細胞や培養条件の違いによる薬物動態関連遺伝子の発現を比較し、細胞や培養条件の評価が可能であることを示唆しており、同法による評価が有用であることが示された (Figs. 13,14)。

ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現

Table 3 に示す日本人 30 検体の肝組織を用いて、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、*CYP1A2*、*2B6*、*2C8*、*2C9*、*2C18*、*2C19*、*3A4*、*3A5* 遺伝子の mRNA 量の個体差は 15-120 倍、関連核内受容体 *PXR*、*CAR*、

AHR, *GR*では11-67倍、転写因子 *HNF1A*, *4A*では22, 28倍で、昨年度の24検体で解析した時と同様、*CYP1A*, *2B*, *3A*遺伝子の発現量の個体差変動の幅が大きかった。各遺伝子の発現量の相関について検討した結果、*CYP1A2*, *2B6*, *2C8*, *2C9*および *3A4*遺伝子の mRNA 発現量はお互いに相関が観察され、これらの遺伝子はそれぞれ関連核内受容体 *PXR*, *CAR*, *AHR*遺伝子の発現量と相関していた。(p<0.01 または p<0.05) 転写因子 *HNF4A* mRNA の発現量は、*CYP2C8*, *2C9*, *3A4*, *PXR*, *CAR* mRNA の発現量と相関が認められた。*HNF1A* mRNA の発現量は、*CAR* mRNA の発現量と相関が観察された。さらに、各 *CYP* 遺伝子の発現量と関連受容体遺伝子 (*Ahr*, *PXR*, *CAR*) の発現量について多変量解析を行った結果、*CYP2B6*, *2C8*, *2C18*および *3A4*遺伝子の発現量は、2つ以上の核内受容体遺伝子の発現が多因子として関与していることが示唆された (Figs.15-17)。

ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞に対する細胞毒性

ヒストン脱アセチル化阻害剤 TSA、ならびに DNA メチル化阻害剤 AzaC により、クロマチンの修飾状態を変化させた際、薬物代謝関連遺伝子の発現がどのように変化するかを調べる実験を企画した。それに先立ち、TSA や AzaC が HepG2 に対して細胞毒性を現さない濃度を決めておく必要がある。TSA および AzaC は種々の濃度で 24 - 144 時間細胞に暴露した。細胞をクリスタルバイオレット染色して細胞増殖阻害率を算出した結果、TSA による 50%細胞増殖阻害濃度は 160 ng/ml (48 時間暴露)、AzaC は 2 mM まで (96 時間暴露) 細胞増殖阻害作用は認められなかった (Figs. 18,19)。

ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞におけるハウスキーピング遺伝子レベルへの影響

ある解析対象遺伝子の発現に対する薬物の影響を調べる場合、解析対象遺伝子の mRNA レベルを、薬物の影響を受けにくいと考えられる

GAPDH や β -Actin など、いわゆるハウスキーピング遺伝子の mRNA レベルで規格化し、相対値として表わす。TSA や AzaC はクロマチン構造を変化させると考えられるので、ハウスキーピング遺伝子の発現レベルにも影響を与える可能性があることを考慮し、TSA、AzaC 処理後の GAPDH や β -Actin の mRNA レベルを測定した。その結果、TSA や AzaC のこれらハウスキーピング遺伝子発現に対する影響は、AzaC でより顕著であり、AzaC は GAPDH mRNA レベルを最大で対照の 20%程度にまで低下させることが明らかとなった。このことより、以後の実験では、 β -Actin による規格化を行った (Fig. 20)。

ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞における薬物代謝酵素関連遺伝子発現レベルへの影響

HepG2 細胞を TSA で 37°C、48 時間、AzaC で 37°C、96 時間処理し、解析対象の薬物代謝関連遺伝子の発現レベルを測定し、阻害剤処理あり、なしの間で比較した。その結果、TSA により、*CYP1A1*, *1A2*, *2E1*, *3A4*, *3A5*で、AzaC により、*CYP1A2*, *1B1*, *2D6*, *2E1*, *3A4*, *3A5*について3倍以上の発現レベルの上昇がみられた。核内受容体では、*CAR*が TSA, AzaC 処理共に mRNA レベルが7倍以上に上昇した (Figs. 21,22)。

ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤存在下の HepG2 細胞における薬物代謝酵素誘導剤の影響

HepG2 細胞を前項のように、TSA、ならびに AzaC で処理した。阻害剤処理時間の最後の 24 時間は、*CYP1A* の誘導剤であるオメプラゾール (OME)、*CYP3A* 等の誘導剤であるリファンピシン (RIF) を共存させた。その結果、OME により、*CYP1A1*, *1A2*は、TSA 非存在下でそれぞれ 17, 4 倍、TSA 存在下で 50, 22 倍程度発現が誘導され、AzaC 非存在下でそれぞれ 7, 4 倍、TSA 存在下で 18, 34 倍程度発現が誘導された (Fig. 23)。それに対し、これら阻害剤存在下で、*CYP3A4* の mRNA レベルは TSA, AzaC 通じて、11~16 倍程度上昇した (Fig. 24)。阻害剤共存下では RIF による誘

導は、あまり顕著ではなく、クロマチン構造が *CYP3A4* の発現にかなり及ぼす影響はかなり大きいことが明らかとなった (Fig. 24)。転写因子 *HNF4A* については TSA 処理の場合に 2 倍弱の mRNA レベルの上昇が見られたのみであった。*HNF1A*, *HNF4A* ともに RIF による誘導は認められなかった (Fig. 25)。

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 4)。発現量が 3 倍以上に上昇した遺伝子は 8 つ (*GAD1*, *CYP2B6*, *GSTP1*, *NAT2*, *GSTA3*, *SNN*, *SRD5A2*, *CHST1*) を Fig. 26 に示す。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. 27 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 5,6)。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 5,6)。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 6)。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 5)。

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 6)。

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 6)。

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. 28 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. 29)。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 7 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. 30)。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. 31 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 (Fig. 32)。*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 *RXRα* 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 ($p < 0.05$)、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 *RXRα* 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 *RXRα* 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 (参 Fig. 2)。

ヒト肝における miRNA の発現について (参 Fig. 1)

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 (参 Table 1、参 Fig. 3)。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つ

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 (Figs. 33-35)。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)) 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 (Figs. 36-38)。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 (Fig. 36)。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 (Fig. 37)。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. 38 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。

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 (Fig. 39, 40)。

D. 考察

三次元培養系の評価

1. 三次元培養 ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 の解析結果を参考にして、他の培養細胞株 Huh-7 について培養を試験的に行った。しかし、HepG2 細胞の 3 次元培養で用いた支持担体ハイドロキシアパタイトは必ずしもあらゆるヒト肝癌由来培養細胞株に適用できるわけではなく、細胞の種類により培養基材や培養条件を調整する必要があった。HepG2 は、ハイドロキシアパタイト以外の支持担体でも培養が可能な細胞であった。培養条件の確立と平行して、細胞の増殖状態の変化を BrdU 取り込み試験により解析した。HepG2 細胞では 3 次元培養系で薬物動態関連遺伝子 *CYP3A4* の発現及び誘導を確認すると共に、肝特異的な遺伝子発現を Affymetrix 社 GeneChip による網羅的解析で検出できた。薬物代謝酵素 *CYP3A4* の誘導の観点からは、HepG2 の三次元培養系では hydroxy apatite が有利であると考えられた。HepG2、HuH7 細胞の培養条件はほぼ確立されたので、

Affymetrix 社 GeneChip による網羅的遺伝子発現解析を行った。

2. 三次元培養における遺伝子発現の変化の網羅的解析

今年度は、HepG2 細胞を RFB で三次元培養した際、増殖期と定常期での遺伝子発現を Affymetrix 社 human genome U133A gene chip により網羅的に定量し、定常期で特異的に誘導された遺伝子の解析を行った。その結果、細胞を三次元培養すると培養後期の細胞増殖定常期において特異的に発現誘導される合計 18 の遺伝子中に、細胞の癌化にともない発現が上昇する遺伝子が複数認められた。18 種の遺伝子に含まれる Grb10 及び ATR1 は細胞癌化のマーカーとして知られており、これら以外にも 6 遺伝子が細胞の癌化との関連が知られている遺伝子であった。その中でも VEGF は癌における血管新生で重要な働きをする因子であり、実際に定常期にある三次元培養から回収した培養上清には、血管新生を促進する作用が認められた。以上、今回行われた遺伝子発現の網羅的解析の結果から、少なくともヒト肝癌由来 HepG2 細胞では、RFB による三次元高密度培養環境に細胞が置かれると、その他の培養環境と比較して細胞が腫瘍の特性を示す指標を発現するという興味深いことが明らかになった。

日本人肝組織における薬物動態関連遺伝子の発現レベルの測定

日本人 24 検体を用いて検討した結果、関連核内受容体遺伝子の発現量の個体差に比べ、その制御下にあると考えられる CYP 遺伝子の発現量の個体差の方が大きかった。CYP1A 遺伝子では、CYP1A1, 1A2 mRNA 発現量は強く相関していたが、AHR mRNA 発現量との相関は比較的弱く、AHR と複合体を形成する Arnt との相関は観察されなかった。これらの結果より、CYP1A1, 1A2 mRNA の発現制御には、AHR が関与しているが、それ以外の因子も関与している可能性が示唆された。CYP2B, 2C, 3A 遺伝子の発現については、CYP2B6, 2C9, 3A4 mRNA 発現量は互いに相関し、PXR, CAR 両受容体の発現量とも相関してい

た。核内受容体と複合体を形成する RXR α の発現量は PXR, CAR と相関が観察された。以上より CYP2B6, 2C9, 3A4 の発現量の個体差には、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。

スフェロイド形成

初年度の検討で効果的なスフェロイド形成が可能であったセルタイトスフェロイド (Sumilon) を培養器として、HepG2 細胞のスフェロイド形成と形成されたスフェロイドにおける CYP3A4 の rifampicin による発現誘導を検討した。その結果、スフェロイドにおいては CYP3A4 の発現誘導は認められなかった。理由としては、スフェロイドが目視できるほどの大きさのものを用いたため、細胞塊の内部まで培地中の薬剤や溶存酸素・増殖因子等が到達できなかった可能性がある。この点はより小さいスフェロイドを形成させることで解決できる可能性もあるが、セルタイトスフェロイドでは 1 well あたり 1 個のスフェロイドしか形成できず、total RNA の回収量を考えると實際上簡便な培養方法とは言いがたい。これらのことより、培養細胞のスフェロイド培養による薬物動態関連遺伝子の機能変化を検討することは断念した。

三次元培養による遺伝子発現の変化

Affymetrix 社 HG U133A GeneChip を用い、三次元培養 6 日目で増殖期にある HepG2 細胞における遺伝子発現を、平面培養における遺伝子発現と網羅的に比較検討した。統計的に有意差をもって 2 倍以上または 1/2 以下に発現が変化した遺伝子は 94 遺伝子あった。この 94 遺伝子を gene ontology による機能分類をもとにクラス分けした結果、細胞増殖に関連する遺伝子と細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現の上昇が認められた。

三次元培養装置では培養状態を常時モニターし、新鮮な培地を一定量供給しつつ、溶存酸素、pH 等が調整された培養液をバイオリクター内に循環させるため、細胞がより増殖し易い状況にあると考えられる。その為、前者の遺伝子が平面培養

より上昇していると推測される。初年度の検討で、HepG2 の三次元培養では培養 6 日目前後で細胞が増殖期にある状態において、*CYP3A4* の効率的な誘導が認められることがわかった。この時期の細胞の増殖性が平面培養より亢進していることは、三次元培養の培養条件の改良を考える上で興味深い知見である。

その一方で、同時期において細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現も亢進しており、細胞が平面培養と異なる細胞環境を形成していることも示唆された。既に、細胞の外部から加わる力学的 tension が幹細胞の分化を調節することが報告されている (McBeath R *et al.* Dev. Cell. 2004, 6, 483-495)。ラジアルフロー型バイオリアクターによる三次元培養においても細胞骨格や細胞間コミュニケーションに関連する遺伝子の発現が変化していたことは、この培養法により平面培養では得られない空間的・力学的な効果があることを示唆しており、幹細胞や肝細胞前駆細胞の分化培養系への応用が期待される。

HepG2 以外の肝癌由来培養細胞の三次元培養への適用

初年度までの検討では、HepG2 細胞を主に三次元培養の検討を行ってきたが、本年度はそれに加えて東京慈恵会医科大学永森らにより日本人肝癌患者より樹立された培養細胞株 JHH-1、JHH-4 について、三次元培養への適用が可能であるかの検討をした。

両細胞について、ハイドロキシアパタイトと PVA を細胞支持担体として三次元培養に供した。JHH-1 細胞は、2 週間の培養で増殖が認められたものの、播種細胞数に比べ 4~6 倍程度の増加しか示さなかった。HepG2 の場合、30 倍程度の増殖が認められていたので、JHH-1 の三次元培養への適用は HepG2 より難しいと判断している。ただし、*CYP2C19* などの遺伝子発現が認められることを考えるとまだ若干の検討の余地は残っている。それに対し、JHH-4 はいずれの細胞支持単体を用いた場合でも増殖を示さなかった。また、HepG2、JHH-1 に比べ薬物動態関連遺伝子の発

現も低かったことから、JHH-4 の三次元培養への適用は断念した。

三次元培養に用いる細胞支持担体

HepG2 においては細胞支持担体としてハイドロキシアパタイトと PVA において薬剤による *CYP3A4* の誘導性に明瞭な差異が認められた。rifampicin、dexamethasone いずれを誘導剤とした場合でもハイドロキシアパタイトを用いた場合より高倍率の誘導がみられた。JHH-1 の三次元培養における *CYP3A4* の誘導実験は未実施であるが、細胞の増殖性に明らかな違いがあり、三次元培養において細胞支持担体の果たす役割が小さくないことを示す事例が増えてきている。一方、ハイドロキシアパタイトは粒状であり、ラジアルフロー型バイオリアクターより細胞を回収した際に培養器内での細胞の方向性の情報が失われてしまう。培養器内では培地の流れに方向性があり、細胞が三次元的に増殖していく際に方向性を持っている可能性があるが、粒状のハイドロキシアパタイトでの検証は困難である。それに対し、PVA では担体ごと培養器から取り出すことが可能であり、細胞増殖や機能変化の方向性の検討が可能である。今までの検討ではハイドロキシアパタイトより間隙の小さい PVA を用いてきた。しかし現在はハイドロキシアパタイトとほぼ同等の間隙を持つ PVA の利用も可能になった。間隙の小さい PVA では HepG2 においては *CYP3A4* の誘導が認められなかったが、ハイドロキシアパタイトと同等の間隙をもつ PVA では誘導が認められることも考えられる。三次元培養と平面培養の比較で、三次元的培養による細胞の機能変化が生じていることを示唆する結果を得ているので、今後新たな支持担体の検討も必要と考えられる。

HepG2、JHH-1、JHH-4 の細胞特性の比較

平面培養した HepG2、JHH-1、JHH-4 各細胞の特性を、薬物動態関連遺伝子に特化したマイクロアレイを用いて評価した。解析に用いた RT² Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray) は 84 種類の遺伝子が載っているものである。三者の細胞の発現を相互に比較した結

果、JHH-4においてマクロアレイに載っている遺伝子の40%を超える遺伝子で発現が相対的に低い結果となった。また、HepG2とJHH-1の比較においても *CYP1A1*、*CYP2C19*、*CYP2C8*、*CYP2C9*、*CYP2E1* の発現が JHH-1 において相対的に高い結果が得られた。今後、市販されている移植不適合肝臓より調製され肝実質細胞や、ヒト肝臓由来の mRNA における遺伝子発現を検討する必要があるが、現在までに検討してきた細胞においても薬物動態関連遺伝子の発現に大きな差があることが確認された。また、この結果は、同マクロアレイが異なる細胞や種々の培養条件における薬物動態関連遺伝子の機能評価の first screening として有用である事を示していると考えられる。

ヒト肝における種々の薬物動態関連遺伝子の発現

日本人30検体の肝組織を用いて、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、24検体の解析であった昨年度と同様、*CYP1A*、*2B*、*3A* 遺伝子の発現量の個体差変動の幅が大きかった。*CYP1A2*、*2B6*、*2C8*、*2C9* および *3A4* 遺伝子の mRNA 発現量は相互に関連していると共に、これらの遺伝子はそれぞれ関連核内受容体 *PXR*、*CAR*、*AHR* 遺伝子の発現量と関連していた。(p<0.01 または p<0.05) 転写因子 *HNF4A* mRNA の発現量は、*CYP2C8*、*2C9*、*3A4*、*PXR*、*CAR* mRNA の発現量と相関が認められた。*HNF1A* mRNA の発現量は、*CAR* mRNA の発現量と相関が観察された。*CYP* 遺伝子の発現量と関連受容体遺伝子の発現量について多変量解析を行った結果、*CYP2B6*、*2C8*、*2C18* および *3A4* 遺伝子の発現量は、2つ以上の核内受容体/転写因子の遺伝子の発現が多因子として関与していることが示唆された。今回の解析対象遺伝子の発現レベルの個体差を遺伝子多型のみで説明することは困難と考えられている。今回の結果を併せて考えると、薬物代謝関連遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている核内受容体や転写因子の発現を含め、次項以下に述べる後世的クロマチン修飾（エピジェノミクス）の解析が重要であると考えられた。

ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤の HepG2 細胞における薬物代謝酵素関連遺伝子発現レベルへの影響

HepG2細胞をTSA、ならびにAzaCで処理し、解析対象の薬物代謝関連遺伝子の発現レベルを測定し、阻害剤処理あり、なしの間で比較した。測定対象遺伝子は、チトクロム P450 (CYP)では、*CYP1A1*、*1A2*、*1B1*、*2A6*、*2B6*、*2C8*、*2C9*、*2C18*、*2C19*、*2D6*、*2E1*、*3A4*、*3A5*、核内受容体では、*PXR*、*CAR*、*AhR*、*RXRα*、*GR*、*Arnt*、転写因子では、*HNF1A*、*HNF4A*とした。その結果、TSAにより、*CYP1A1*、*1A2*、*2E1*、*3A4*、*3A5*で、AzaCにより、*CYP1A2*、*1B1*、*2D6*、*2E1*、*3A4*、*3A5*について3倍以上の発現レベルの上昇がみられた。核内受容体では、*CAR*がTSA、AzaC処理共にmRNAレベルが7倍以上に上昇した。解析対象遺伝子により、ヒストン脱アセチル化、DNAメチル化阻害剤の影響の受け方が異なっていたことは興味深い。ここで認められた現象がHepG2細胞に限るのか否か、など検討が必要であると考えられる。

ヒストン脱アセチル化阻害剤、および DNA メチル化阻害剤存在下の HepG2 細胞における薬物代謝酵素誘導剤の影響

HepG2細胞をTSA、ならびにAzaCで処理する際、TSA、AzaC処理時間の最後の24時間に、CYP1Aの誘導剤であるオメプラゾール(OME)、CYP3A等の誘導剤であるリファンピシン(RIF)を共存させる実験を行った。その結果、OMEにより、*CYP1A1*、*1A2*は、TSA非存在下でそれぞれ17、4倍、TSA存在下で50、22倍程度発現が誘導され、AzaC非存在下でそれぞれ7、4倍、TSA存在下で18、34倍程度発現が誘導された。それに対し、これら阻害剤存在下で、*CYP3A4*のmRNAレベルはTSA、AzaC通じて、11~16倍程度上昇した。阻害剤共存下ではRIFによる誘導は、あまり顕著ではなく、クロマチン修飾が*CYP3A4*の発現に及ぼす影響の方が大きいことが示唆された。本現象についても、HepG2細胞以外の細胞でも認められ、普遍性があることであるのか否か、検討が必要と考えられる。転写因子*HNF4A*について

は TSA 処理の場合に 2 倍弱の mRNA レベルの上昇が見られたのみであった。*HNF1A*, *HNF4A* とともに RIF による誘導は認められなかった。

PCR-Array の結果に関する考察

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、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様に観察された。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が必要であると考える。

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、*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 *RXR α* の発現量に相関が観察された ($p < 0.01$)。 *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