

スターにおいて向き合った構造をしているだけでなく、同じプロモーターを介して発現誘導が起こることが報告されている。*CYP3A4*, *3A43* 遺伝子の場合には、*CYP1A* 遺伝子に比べると両遺伝子間の距離が離れているため、*CYP1A* と同じような制御を受けるかどうかについては不明であるが、今後発現制御機構の解明においては、興味深い知見である。また、*CYP3A5* 遺伝子と *CYP3A7* 遺伝子発現量に相関が観察され、他の遺伝子との相関は見られなかったことも、両遺伝子がタンデムに並んだ構造を取っていることを考えると、発現制御機構の上で何かの繋がりがある可能性が考えられる。

ヒト肝における miRNA の発現について

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。薬剤処理によりハウスキーピング遺伝子の発現量が変わったり、細胞内の構造が変わったり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 画分を大分子すべてを一緒に回収することにより、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。

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. 39)。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

本事業の研究により以下のことが明らかとなった。

- ① 三次元培養装置ラジアルフローバイオリクターで担体としてハイドロキシアパタイトを用いてヒト肝癌由来樹立培養癌細胞 HepG2 を三次元培養すると、平面培養と比較して rifampicin による CYP3A4 の発現誘導が明確に亢進した。本研究では CYP3A4 以外の薬物代謝関連遺伝子の誘導につき、rifampicin 以外に、dexamethasone、phenobarbital を用いた CYP 誘導への三次元培養の影響を検討し、明瞭な誘導を認めた。本研究において用いた三次元培養システムにより化学物質による薬物代謝動態関連遺伝子の誘導を試験し、医薬品の安全性に資する系を確立することに成功した。
- ② 平面培養と比較して、三次元培養では細胞周期を進行させ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。これら三次元培養条件で発現レベルが上昇することが、薬物代謝酵素の構成的発現レベルの上昇や、薬物代謝酵素をコードする mRNA の発現誘導の原因であるか、結果であるかを明確にすることは、肝機能のマーカーとして意義深いことであると考えられた。
- ③ HepG2 以外のヒト肝癌由来培養細胞株として日本人肝癌患者より樹立された JHH-1 および JHH-4 を三次元培養に適用した。その結果、HepG2 の増殖性よりはるかに劣るが JHH-1 において細胞の増殖が認められた。JHH-1 細胞の増殖性はハイドロキシアパタイトと PVA を細胞支持担体として用いた場合で異なっていた。JHH-4 に関しては三次元培養装置での増殖は認められなかった。
- ④ HepG2、JHH-1、JHH-4 の平面培養での 84 種の薬物動態関連遺伝子の発現を比較検討した結果、JHH-4 において 40 %を超える遺伝子の発現が他の 2 種の細胞に比較して低かった。また、HepG2 と JHH-1 の比較でも CYP1A1、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9、CYP2E1 のように JHH-1 で発現が高い遺伝子が存在した。
- ⑤ 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。

⑥ *CYP3A4* だけではなく、三次元培養により rifampicin による *CYP3A5* の誘導を亢進させることができた。

⑦ 三次元培養と平面培養における遺伝発現を GeneChip により測定した結果、三次元培養することにより“細胞周期”、“ステロイドや脂質の合成、代謝”、“細胞骨格”に関連する遺伝子の発現が上昇していた。また、肝実質細胞や胆管上皮細胞のマーカー遺伝子が上昇していることが確認された。

⑧ 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。

⑨ *CYP2B6*、*2C8*、*2C18* および *3A4* 遺伝子の発現レベルの個体差には、関連核内受容体 *PXR*、*CAR*、*AHR* 遺伝子 mRNA の発現が多因子的に関与することが示唆された。

⑩ ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞において、TSA および AzaC 処理により *CYP1A*、*CYP2E1*、*CYP3A4* および *3A5* 遺伝子の mRNA 発現が上昇した。

⑪ *CYP3A* 誘導剤 RIF を共存させると、さらに誘導が観察された。これに対して、*PXR* の発現はほとんど影響を受けなかった。

⑫ HepG2 細胞株においては、*CYP3A4* は非誘導時の発現、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。

⑬ ヒト肝における *CYP3A4* 関連薬物動態関連遺伝子の発現について mRNA レベルで解析を行い、*CYP3A* クラスター遺伝子の発現量と関連核内受容体遺伝子の発現量のプロファイルを得た。

⑭ *CYP3A4* 遺伝子の発現量と核内受容体 *PXR*、*CAR*、*RXR α* 遺伝子の発現量に相関が観察された。*CYP3A4* 遺伝子の発現量と *3A43* 遺伝子の発現量に相関が観察され、*CYP3A43* 遺伝子の発現量も、*PXR*、*CAR*、*RXR α* 遺伝子の発現量と相関していた。

⑮ 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。

⑯ 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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表	2件
原著論文による発表	0件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

そのうち主なもの

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)

2) 海外

口頭発表	6件
原著論文による発表	1件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

T. Hongo, M. Kajikawa, S. Ishida, S. Ozawa, Y. Ohno, J. Sawada, Y. Ishikawa and H. Honda: Gene expression property of high density

three-dimensional tissue of HepG2 formed in radial-flow bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 2006; 101(3):243-250.

学会発表

A Miyajima-Tabata, S Ozawa, M Sunouchi, Y Kamikawa, K Kubota and Y Ohno: Interindividual variation of expression level of CYP3A4 and its related pharmacogenetic genes in Japanese liver tissue. Annual Meeting of Society of Toxicology, Mar 6-10, 2005, New Orleans LA.

Atsuko Miyajima-Tabata, Shogo Ozawa, Hiromasa Tanaka, Kenya Nakai, Momoko Sunouchi, Jun-ichi Sawada, Yuichiro Kamikawa, Keiichi Kubota, Hiroyasu Ogata, Yasuo Ohno The Crosstalk of Nuclear Receptors on the Expression of CYP Isoforms in Japanese Liver Tissue. ISSX/JSSX Meeting (Maui, Hawaii), Oct. 26, 2005

S Ishida, S Ozawa et al., The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, May 25 ~ 27, 2006, Korea

A Miyajima-Tabata, S Ozawa, S Ishida, and K Nakazawa. 46th Annual Meeting of Society of Toxicology (Charlotte, USA), March. 29, 2007

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

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

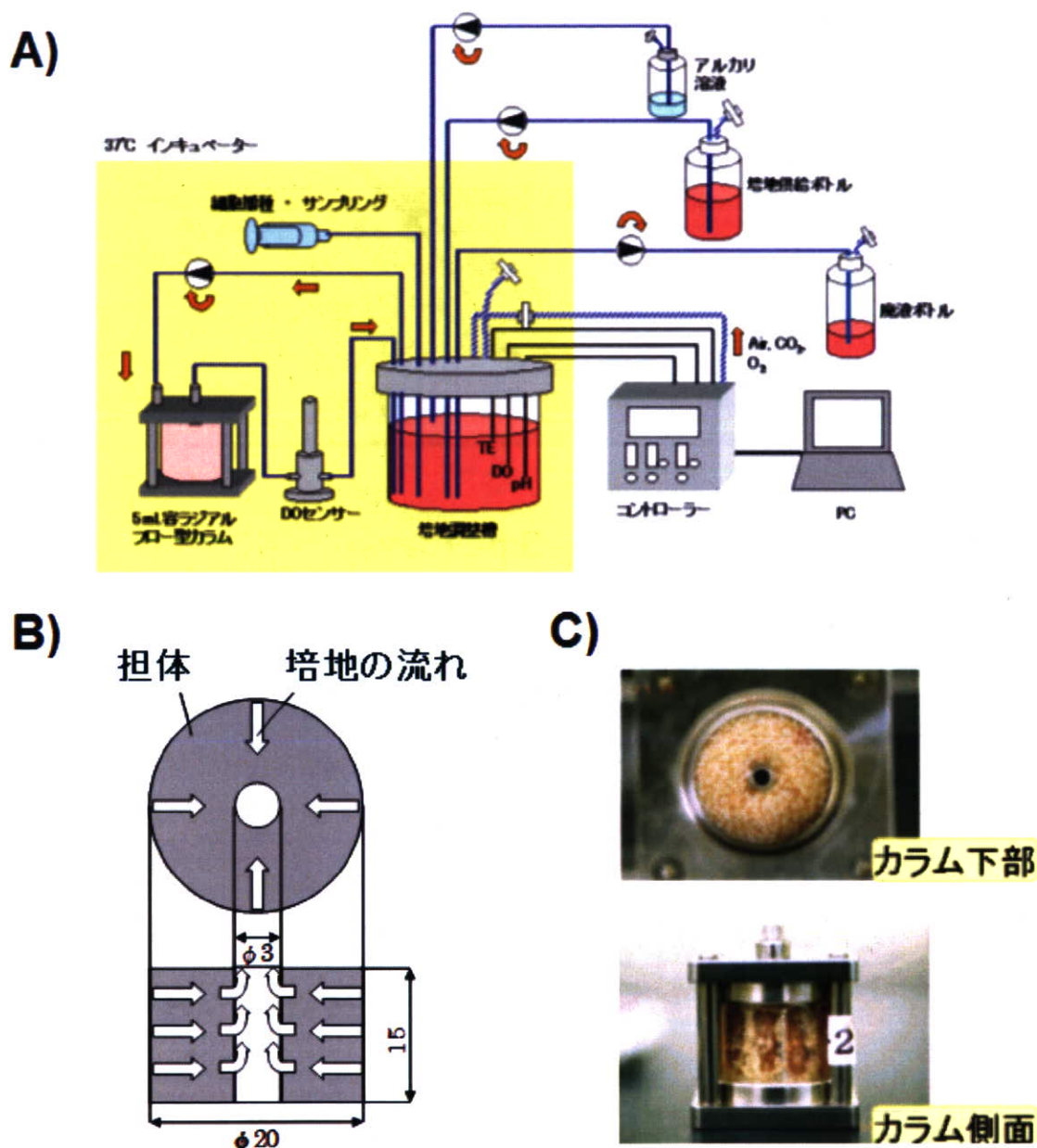


Fig. 1 ラジアルフローバイリアクター (RFB) 装置

A) 細胞培養装置のシステムフロー図。B) RFB内の培地の流れ C) 5 ml RFBにおける細胞培養の様子

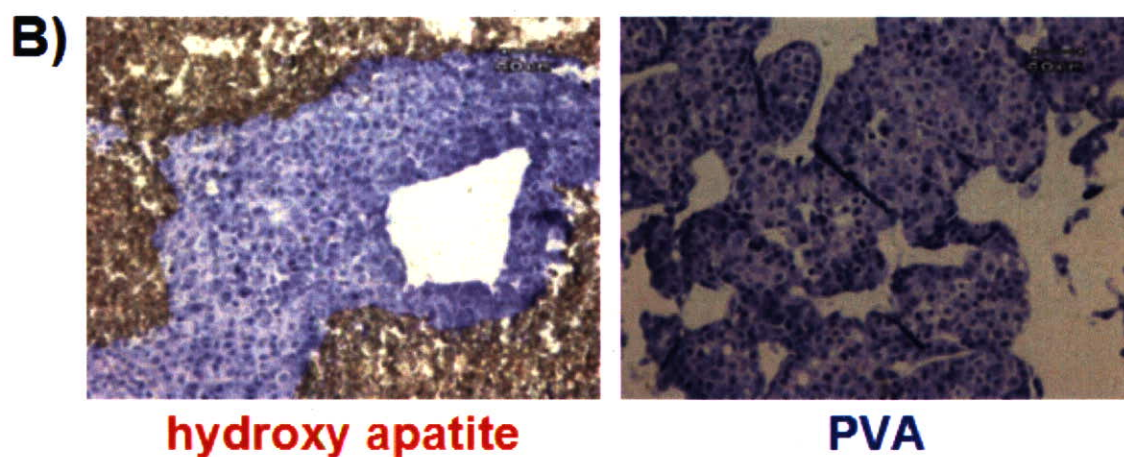
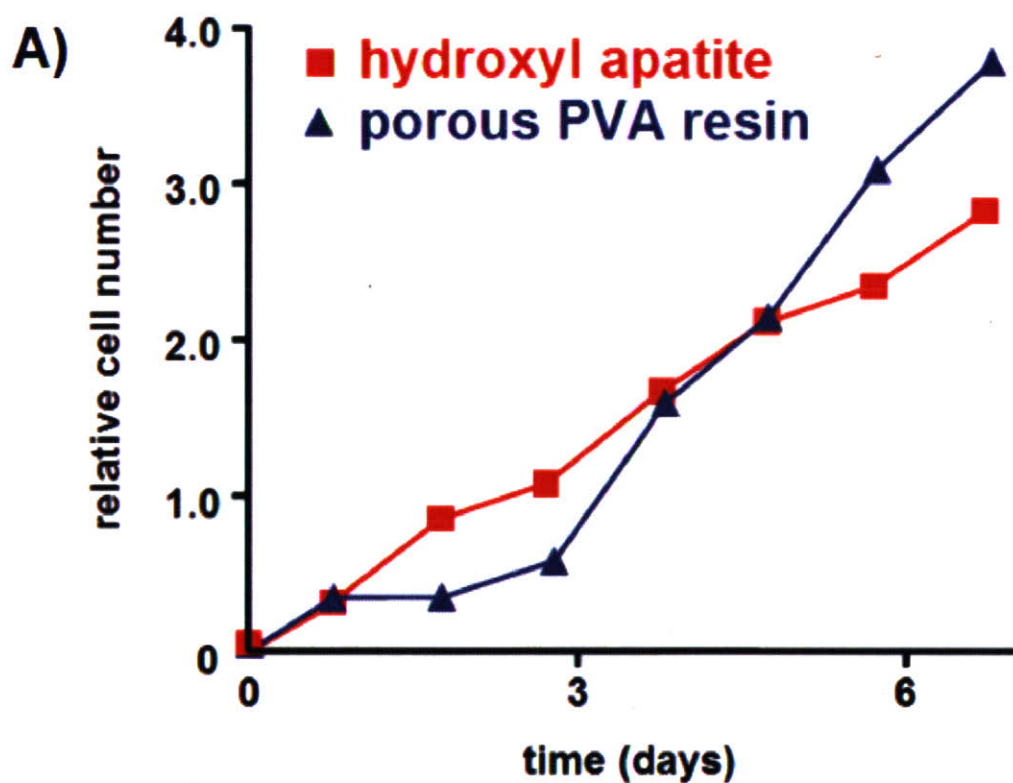


Fig. 2 異なる担体による細胞増殖の違い

HepG2細胞を二種の担体(hydroxy apatiteとPVA)で培養した。A) 細胞増殖曲線。B) RFB内の細胞増殖の様子。切片を作成後、トルイジンブルーで染色した。

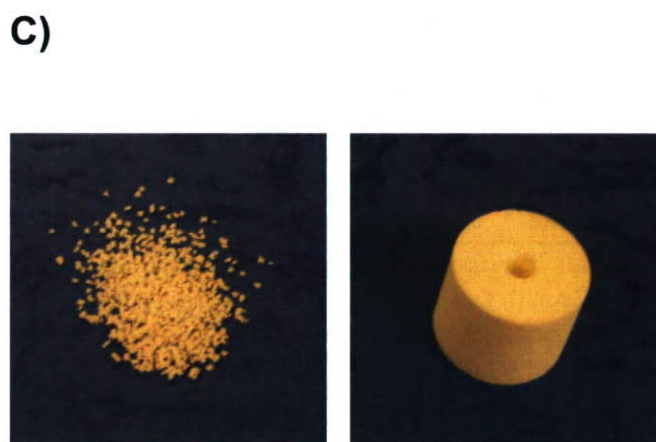
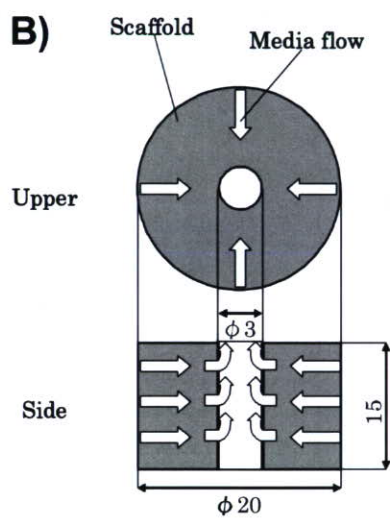


Fig. 2-2 3次元培養装置の概要と細胞支持担体

Table 1 担体の違いによるCYP3A4の誘導倍率の違い

system	scaffold	growth phase	exp. no	sampling	induction fold
plate	-	-	1	n=2	2.35
RFB	hydroxy apatite	stable	1	lower 3 portions upper 3 portions	0.59 1.35
RFB	hydroxy apatite	growing	1	lower 3 portions upper 3 portions	13.99 4.23
RFB	hydroxy apatite	growing	2	lower 3 portions upper 3 portions	7.34 5.67
RFB	PVA	growing	1	2 portions	3.64
RFB	PVA	growing	2	2 portions	1.87

(100 μ M rifampicin 3日間 処理)

Table 2 定常期で誘導された遺伝子リスト

Gene	Accession no.	Fold
Insulin-like growth factor binding protein 3	BF340228	11.09
Growth factor receptor-bound protein 10	U66065	5.11
Angiotensin II receptor, type 1	NM_000685	4.65
B cell RAG associated protein	NM_014863	3.97
Apolipoprotein L, 1	AF323540	3.89
A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	3.83
Sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	AV728268	3.64
Vascular endothelial growth factor	AF022375	3.43
Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	BG326045	3.41
Adrenomedullin	NM_001124	3.34
Family with sequence similarity 13, member A1	NM_014883	3.34
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	NM_006931	3.32
KIAA1199 protein	AB033025	3.28
Lysyl oxidase	NM_002317	3.27
Ribonuclease T2	NM_003730	3.15
Mitochondrial ribosomal protein S6	AI867198	3.14
Carbonic anhydrase IX	NM_001216	3.10
Solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	NM_006342	3.00

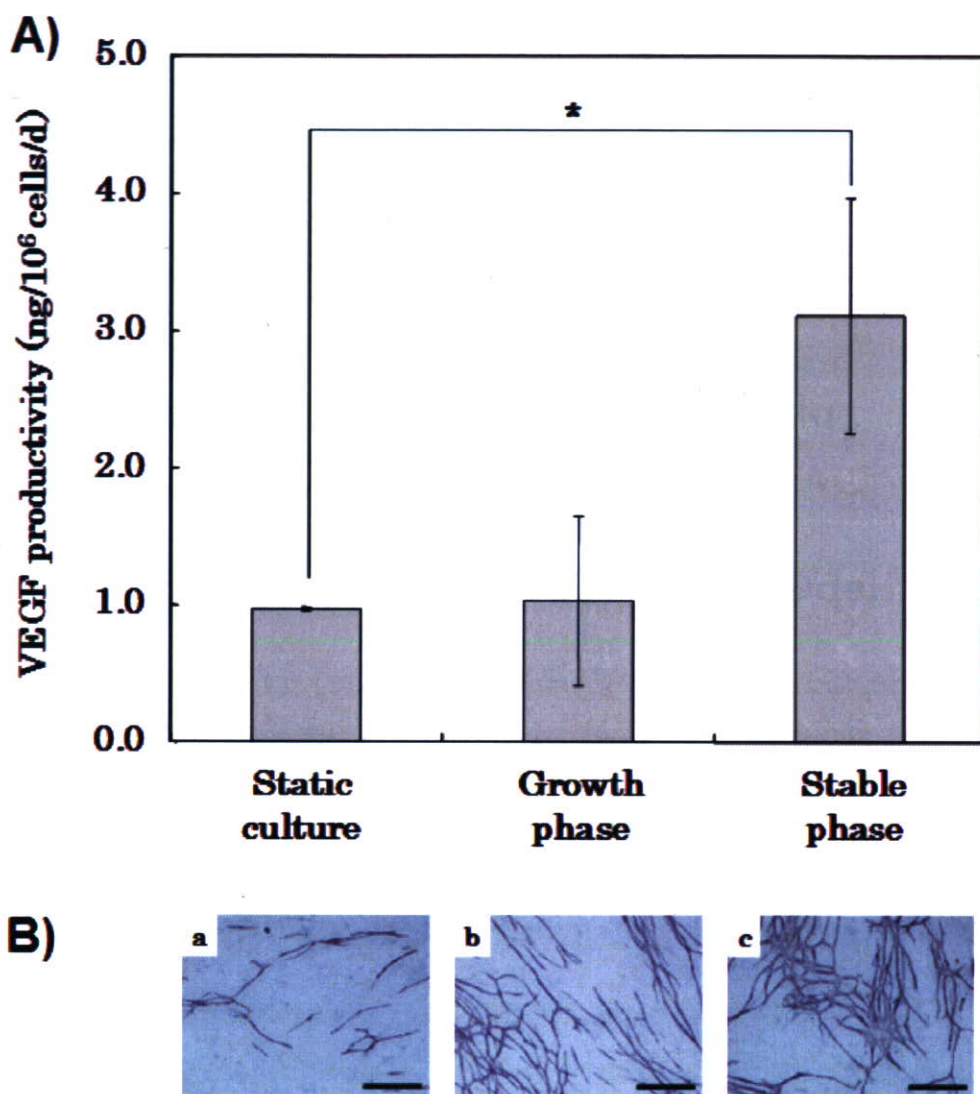


Fig. 3 異なる増殖状態でのHepG2細胞のVEGF産生の差異

通常の培養dishによる培養上清(static culture)及びRFB培養の増殖期(growth phase)と定常期(stable phase)の培養上清を回収し、A) VEGFの産生量をELISA法により定量した。(* P < 0.01) B) それぞれの培養上清を用いて血管新生アッセイを行った。a : static culture, b: growth phase, c : stable phase。

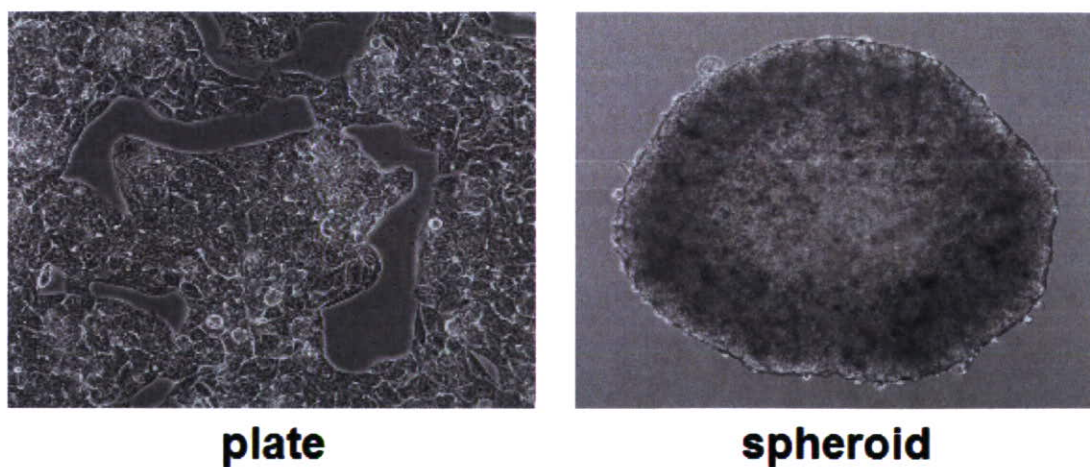


Fig. 4 HepG2細胞のスフェロイド形成の様子

HepG2細胞を通常の培養dish (plate)及びスミロンセルタイト スフェロイド (spheroid)で培養した様子。

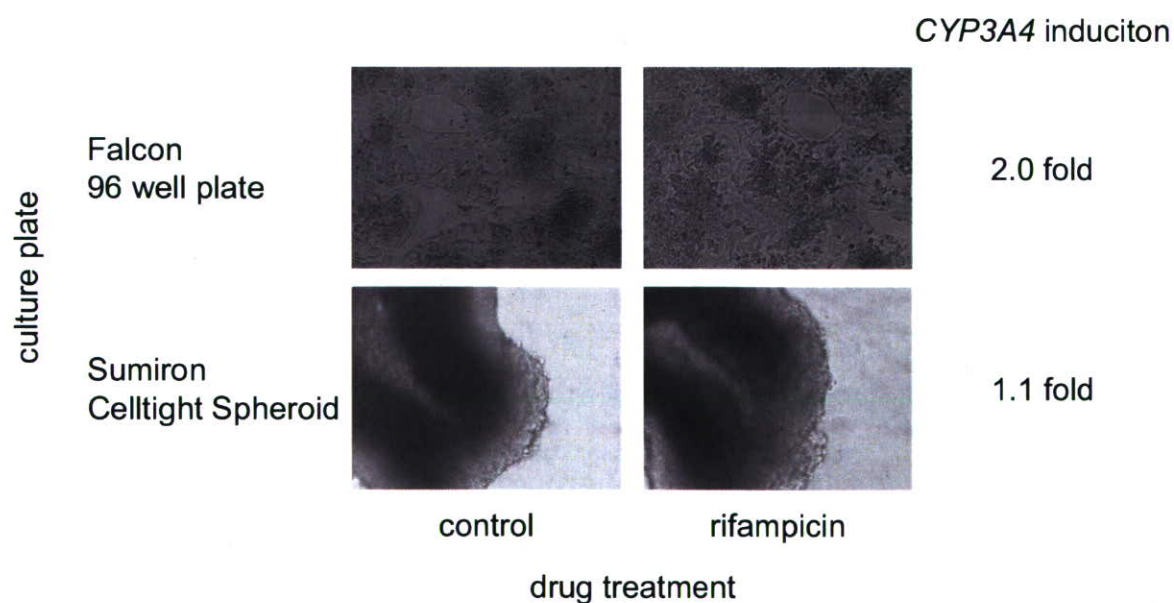


Fig. 5 HepG2 細胞の平面培養とスフェロイド培養の比較

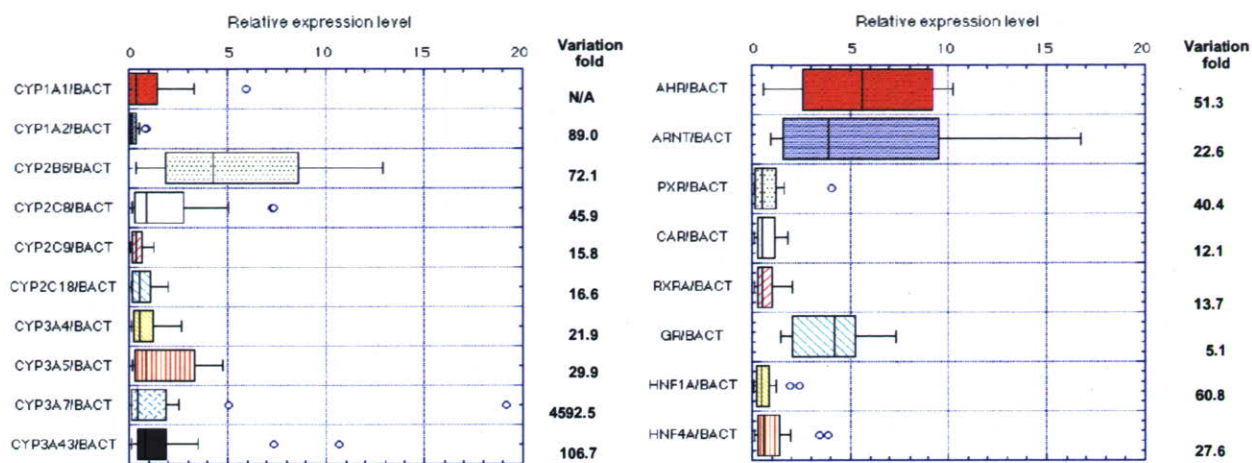


Fig. 6 Relative expression levels of *CYP* and its related nuclear receptor genes in liver tissues

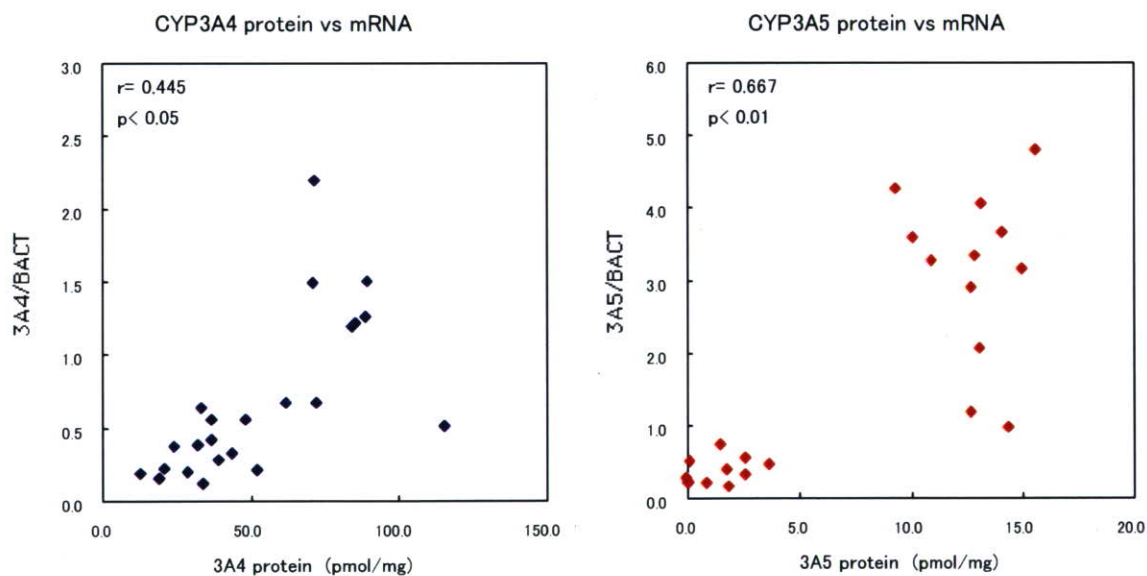


Fig. 7 Correlation between protein and mRNA expressions in CYP3A4, and 3A5

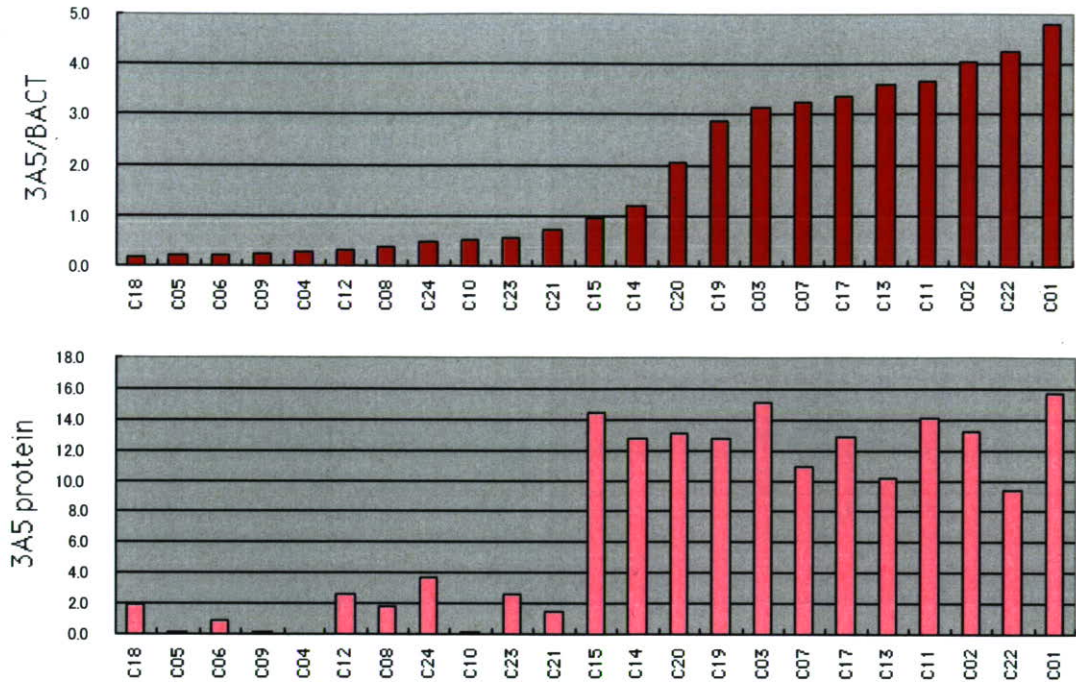


Fig. 8 Profiles of CYP3A5 mRNA and protein expressions

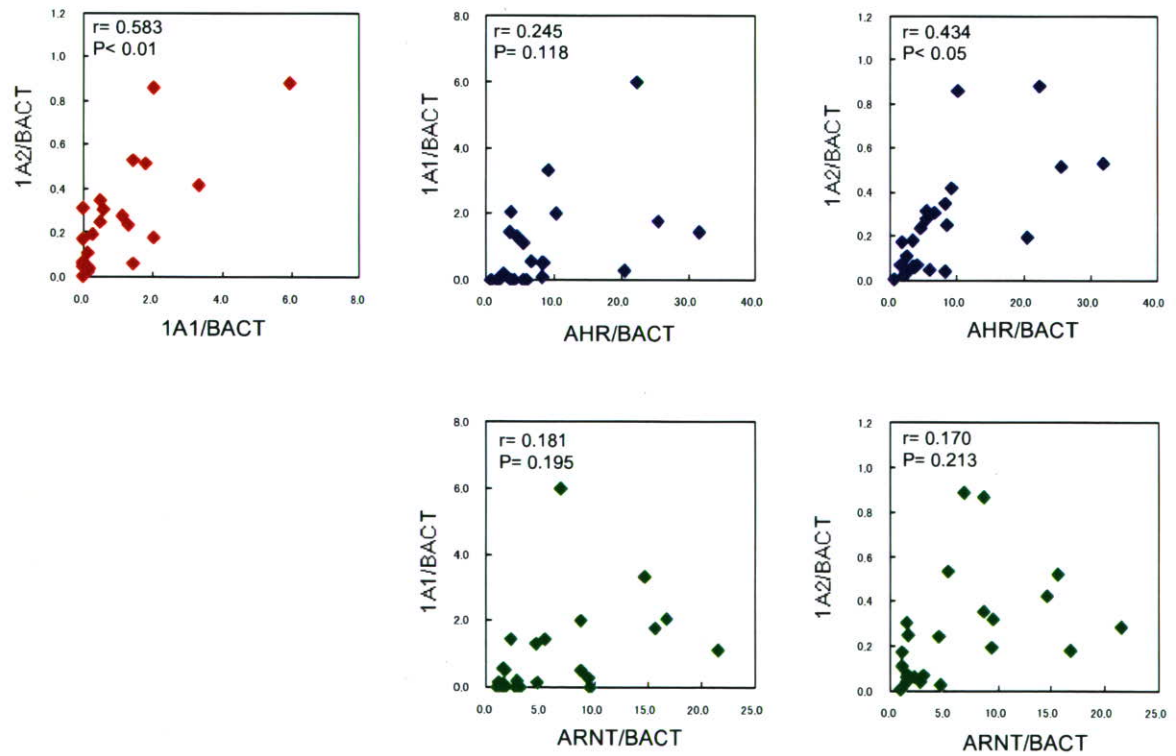


Fig. 9 Correlation of *CYP1As* mRNA levels with those of genes regulated commonly with *CYP1As* in liver tissues

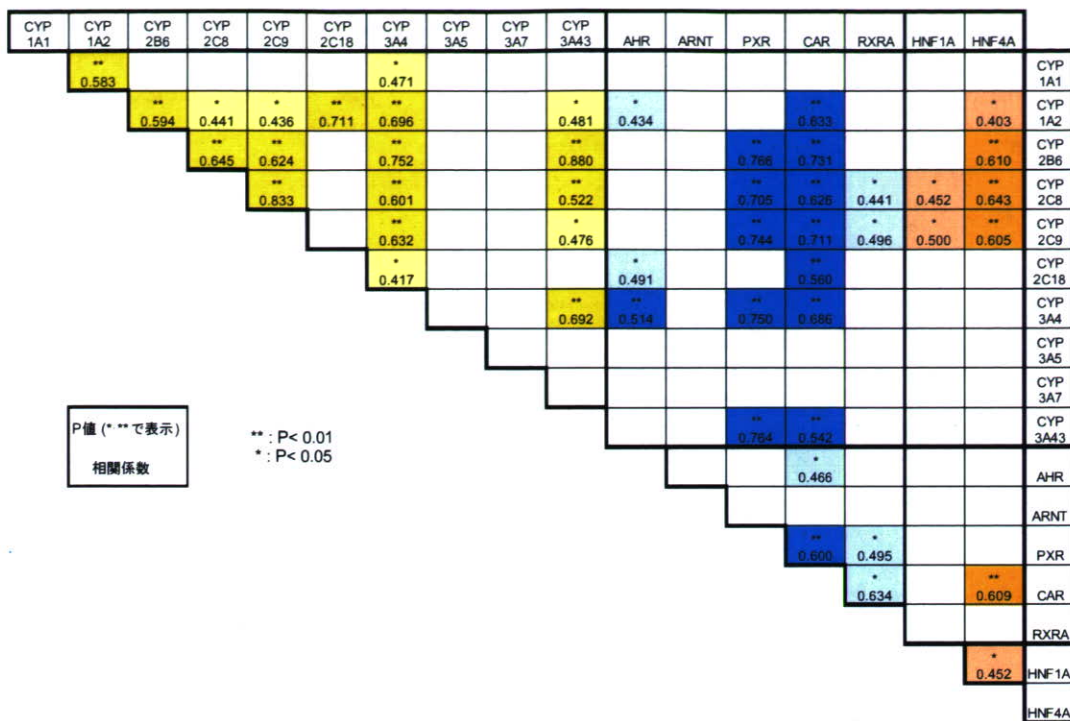
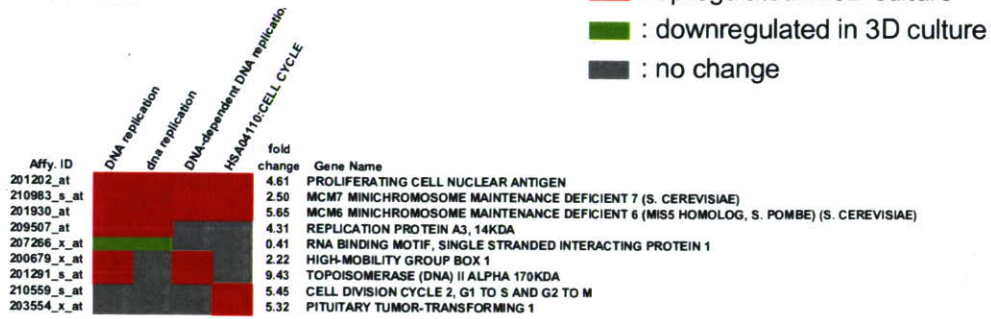
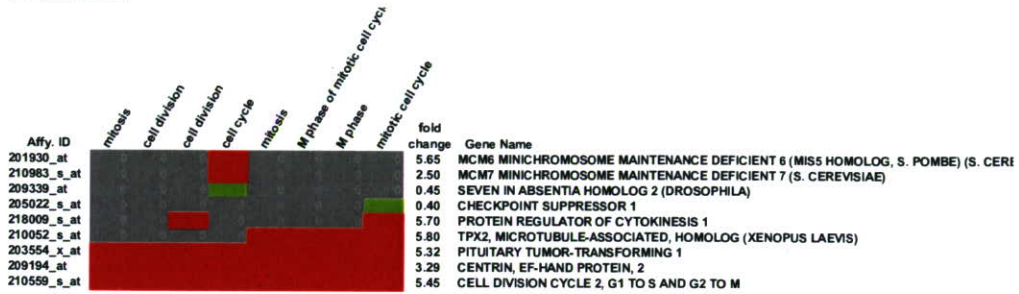


Fig. 10 Correlation of *CYP* mRNA levels with those of genes regulated commonly with *CYP* in liver tissues

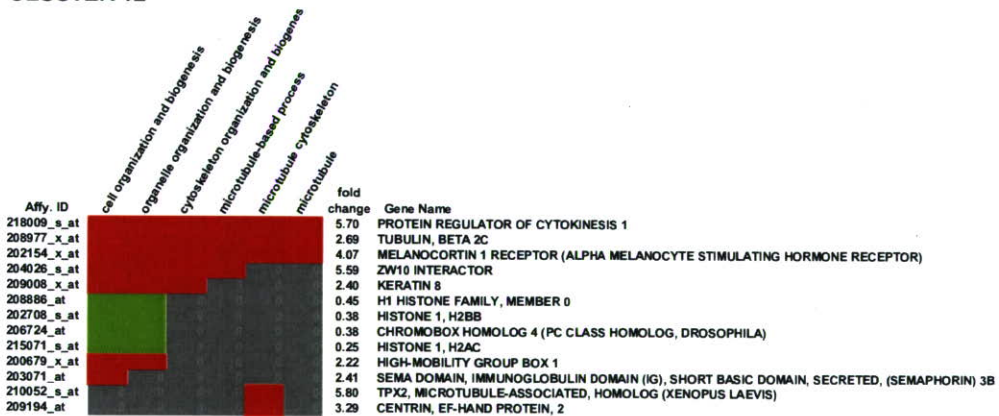
CLUSTER 2



CLUSTER 7



CLUSTER 12



CLUSTER 15

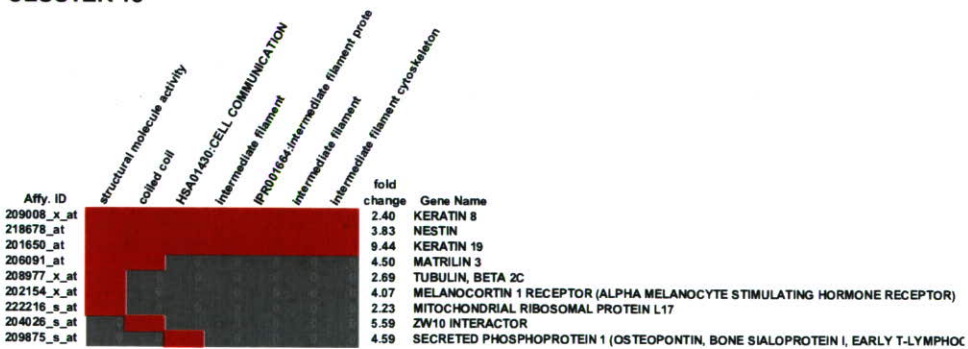


Fig. 11 平面培養と3次元培養における遺伝子発現の網羅的比較

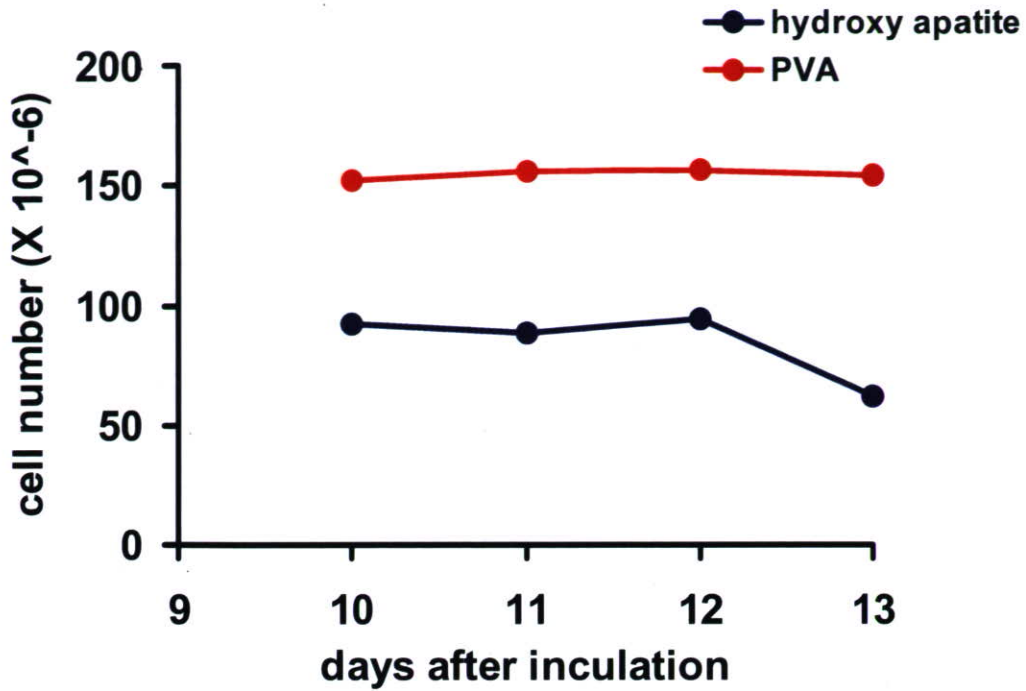


Fig. 12 JHH-1 細胞の 3 次元培養における増殖の状況

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ABCB1	ABCC1	ABP1	ADH1B	ADH1C	ADH4	ADH5	ADH6	AHR	ALAD	ALDH1A1	ALOX12
B	ALOX15	ALOX5	APOE	ARNT	ASNA1	BLVRA	BLVRB	CES2	CES4	CHST1	COMT	CYP11B2
C	CYP17A1	CYP19A1	CYP1A1	CYP2B6	CYP2C19	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6	CYP2E1	CYP2F1	CYP2J2	CYP3A5
D	CYB5R3	EPHX1	FAAH	FBP1	GAD1	GOKR	GGT1	GPI	GPX1	GPX2	GPX3	GPX4
E	GPX5	GSR	GSTA3	GSTA4	GSTM2	GSTM3	GSTM5	GSTP1	GSTT1	GSTZ1	HK2	HSD17B1
F	HSD17B2	HSD17B3	LPO	MARCKS	MGST1	MGST2	MGST3	MPO	MT2A	MT3	MTHFR	NAT1
G	NAT2	NOS3	NQO1	PKLR	PKM2	PON1	PON2	PON3	SMARCAL1	SNN	SRD5A1	SRD5A2
H	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Drug Metabolism 関連遺伝子

control 遺伝子

Fig. 13 RT² Profiler PCR Array ver 2.0 Drug Metabolism (SuperArray) に搭載されている遺伝子

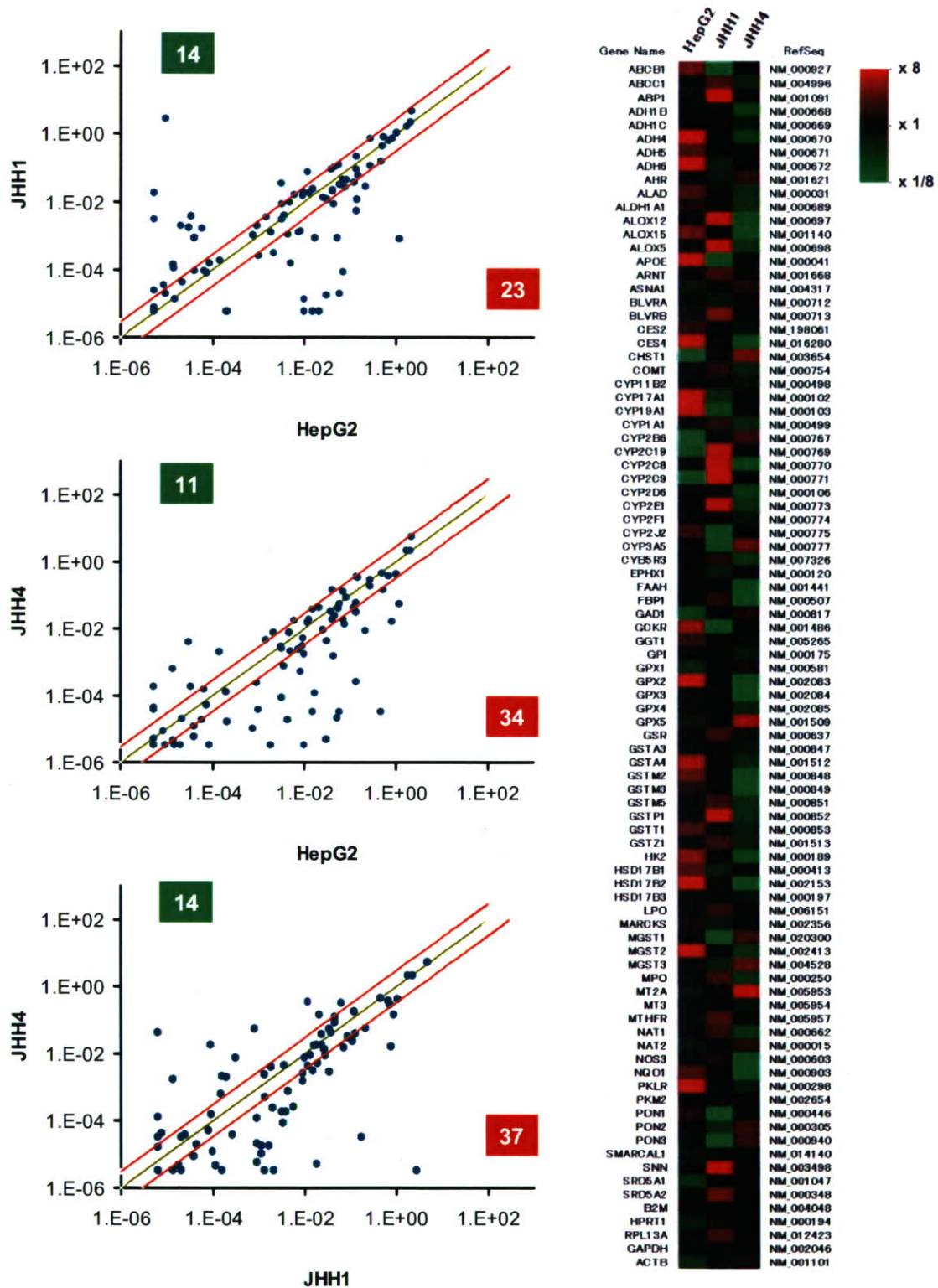


Fig. 14 平面培養におけるHepG2、JHH-1、JHH-4の薬物動態関連遺伝子の発現の比較

Table 3 Characteristics of subjects in liver tissues

Patient	Diagnosis	Gender	Age (year)
C01	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	61
C02	N/A	M	71
C03	肝門部胆管癌	F	62
C04	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	39
C05	胆管癌	M	71
C06	肝癌	M	66
C07	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	56
C08	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	55
C09	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	53
C10	肝内結石	M	56
C11	胆嚢癌	M	67
C12	転移性肝癌(大腸癌由来)	M	56
C13	転移性肝癌(S字結腸癌由来)	F	56
C14	胆管癌	F	35
C15	胆管癌	M	76
C16	肝癌	F	56
C17	転移性肝癌(大腸癌由来)	F	57
C18	転移性肝癌(S字結腸癌由来)	M	68
C19	胆管癌	M	50
C20	胆嚢癌	F	79
C21	転移性肝癌(大腸癌由来)	F	54
C22	肝癌	F	82
C23	転移性肝癌	M	70
C24	肝門部胆管癌	F	70
C25	転移性肝癌	F	55
C26	転移性肝癌	M	74
C27	局限性結節性過形成肝外側区域切除	M	不明
C28	不明	F	76
C29	肝癌	M	52
C30	不明	M	52
Total		M=19 F=11	61.2±11.4
(Mean ±S.D.)			

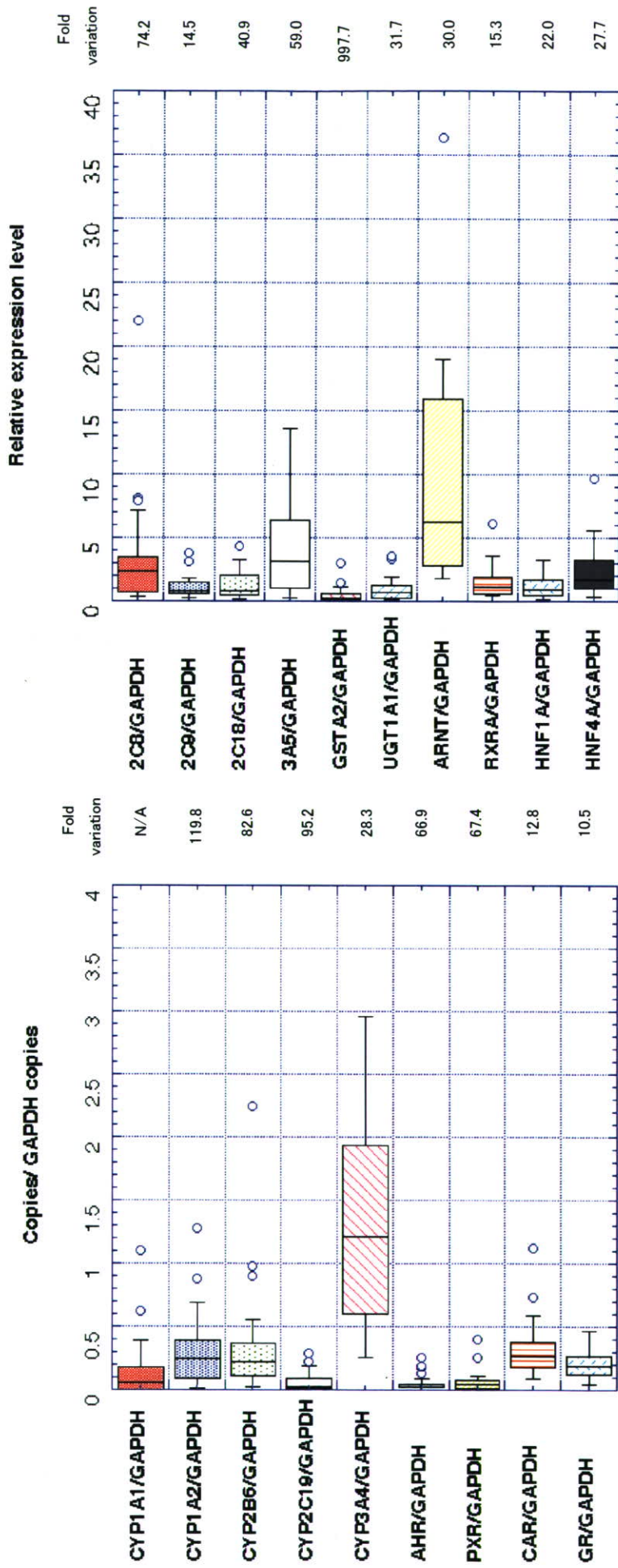


Fig. 15 Expression levels of CYP and its related nuclear receptor genes in Japanese liver tissues

Dependent variable	Explanatory variable								
	AHR/GAPDH		PXR/GAPDH		CAR/GAPDH				
	F value	P value	F value	P value	F value	P value			
1A2/GAPDH	6.515	0.017	[*]	0.101	0.753	[]	1.154	0.293	[]
2B6/GAPDH	5.675	0.025	[*]	4.721	0.039	[*]	2.803	0.106	[]
2C8/GAPDH	2.003	0.169	[]	18.0349	0.0002	[**]	1.3185	0.2613	[]
2C9/GAPDH	10.475	0.003	[**]	51.817	0.0000001	[**]	10.556	0.003	[**]
2C18/GAPDH	19.232	0.000	[**]	8.397	0.008	[**]	6.955	0.014	[*]
2C19/GAPDH	0.575	0.455	[]	2.388	0.134	[]	0.212	0.649	[]
3A4/GAPDH	6.745	0.015	[*]	10.635	0.003	[**]	1.160	0.291	[]

Fig. 17 Correlation of CYP mRNA levels with those of their relating genes in multiple regression analysis