

16 遺伝カウンセリングの必要性及びその体制

遺伝子発現のみを解析するため、遺伝カウンセリングの必要性はない。

17 研究資金の調達方法

平成 20 年度 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

研究課題名 「トキシコゲノミクス研究の臨床への展開」（課題番号 H20-バイオ一般-003）
（平成 22 年度まで継続予定）

倫理委員会審査申請書

平成 22年 1月 29日提出

学長 殿

申請者名 萩原 誠久 (印)

所属名 循環器内科学

職名 主任教授

※受付番号 _____

1. 課題名 アミオダロンによる肺障害の予測法の開発		
2. 実施(研究)責任者名	所属	職名
萩原 誠久	循環器内科学	主任教授
3. 実施(研究)分担者名	所属	職名
志賀 剛	循環器内科学	准教授
安藤 仁	自治医科大学臨床薬理学	准教授
太田昌一郎	自治医科大学臨床薬理学	講師
牛島健太郎	自治医科大学臨床薬理学	助教
藤村昭夫	自治医科大学臨床薬理学	教授
4. 実施(研究)事項等の概要 アミオダロンは、難治性、致死性不整脈に有効なⅢ群抗不整脈薬であるが、有害反応として肺障害の出現が臨床的に問題となる。しかし、現在のところ、その機序は不明であり、肺障害を十分に予測する方法もない。そこで本研究は、アミオダロンを投与する予定の患者またはアミオダロンによる肺障害の既往のある患者より末梢血を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行うことにより肺障害を予測する遺伝子発現マーカーを見出すことを目的とする。 アミオダロンを初めて投与する予定の患者より、本研究への協力の同意を文書にて取得した後に、投与前と投与後早期に末梢静脈血をそれぞれ10 ml採取し、肺障害出現の有無を1年間以上観察する。また、アミオダロンによる肺障害の既往がある(現在は治療している)患者からも文書にて同意取得後に1回のみ末梢血10 mlを採取する。これらの末梢血液中細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、肺障害出現の有無で発現パターンを比較することにより、肺障害を投与前または投与後早期に予測する遺伝子発現マーカーを探索する。さらに、同定した遺伝子マーカーや遺伝子パスウェイよりアミオダロンによる肺障害の機序を推察し、その解明につなげる。肺障害を予測する遺伝子マーカーが見つかり、そのマーカー遺伝子の発現量(もしくは発現変化)が血清を用いた検査(たとえばマーカー蛋白の定量など)により予測できる可能性が生じた場合には、保存しておいた血清を用いてその検証を行う。		
5. 実施(研究)事項等の対象及び実施場所 対象は東京女子医科大学病院循環器内科で診療中の成人患者のうち、アミオダロンの投与を初めて開始することが決まった者、またはアミオダロンによる肺障害の既往がある者、計100名とする。入院・外来の別および性別は不問とするが、本人から本研究への参加の同意が得られる者のみを対象とし、全身状態が悪く同意取得に支障がある場合、高度の貧血(ヘモグロビン濃度<8 g/dL)がある場合、医師により対象者として不適当と判断された場合は除外する。 検体の採取は大学病院外来または病棟で行い、二重連結可能匿名化した検体および臨床情報を自治医科大学医学部薬理学講座臨床薬理学部門に送付し、遺伝子発現解析は同部門で行う。		

注. 実施計画書、インフォームドコンセントの説明書・同意書及び審査に必要と思われる参考文献・資料等を各18部添付すること。

注. ※印欄は、記入しないこと。

6. 本課題実施の医学的・医療的意義

アミオダロンは、他剤が無効な致死的不整脈に使用される臨床的に重要な薬物である。しかしながら、肺障害を惹起することがあり、そのために投与を中止せざるを得なくなるばかりか、肺障害が致死的になることもある。したがって、本研究の成果により、アミオダロンの投与前あるいは投与後早期に肺障害出現の予測が可能になれば、アミオダロンの安全性が飛躍的に向上することになり、極めて大きな医療的意義をもたらす。

7. 倫理的配慮について

①実施(研究)等により個人が受ける不利益並びに危険

・本研究に参加しなくてもなんら不利益は受けない。またいつでも自由にやめることができる。
・本研究は日常の診療・治療下で行う。研究対象薬のアミオダロンは、対象患者に治療のために投与されている、あるいは投与予定の医薬品である。
・本研究により提供者に実施される行為は採血のみであり、その量は比較的少なく、高度の貧血を有する患者は除外するため、提供者の危険は十分に小さい。また、本研究による提供者の費用負担はなく、採血は入院中または外来受診時のみに行う(本研究のためだけに来院することはない)ため、特に不利益はないと予測される。

②実施(研究)等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

研究計画の概要について、説明文書により患者に説明する。研究への参加に同意を得た場合には、説明を行った医師名を記載し、同意書に同意年月日、住所の記載と、氏名の自署をしていただく。

③その他(対象となる個人の人権擁護など)

二重連結匿名化(具体的な方法を記載してください)
自治医科大学へ送付する試料等は、匿名化された状態のもののみとし、個人情報とは本学からは一切出さないようにする。

8. その他

※検査の結果

1) 承認 2) 条件付承認 3) 変更の勧告 4) 不承認 5) 対象外

※倫理委員長印

※通知年月日 平成 年 月 日

※通知番号

臨床試験実施計画書

「アミオダロンによる肺障害の予測法の開発」

第1版 平成21年3月25日作成

第2版 平成22年1月28日作成

1. 背景と目的：

アミオダロンは、難治性、致死性不整脈および心房細動に有効な第Ⅲ群抗不整脈薬であるが、有害反応として重篤な肺障害が知られている。[1] アミオダロンによる肺障害は約10%が致死性になるといわれ、その予知は治療を行ううえで重要な課題であるしかし、現在のところ、その機序は不明であり、肺障害を十分に予測する方法もない。さらに日本人では低用量療法であってもアミオダロンによる肺障害が、2.1%/年の頻度に出現している。[2] そこで本研究は、アミオダロンを投与する予定の患者またはアミオダロンによる肺障害の既往のある患者より末梢血を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行うことにより肺障害を予測する遺伝子発現マーカーを探索する。

2. 研究意義：

アミオダロンによる肺障害出現を予測できれば、危険性が高い患者への投与をあらかじめ避けることが可能になる。さらに、アミオダロンの毒性メカニズムが明らかになれば、肺障害の予防法や肺障害のない薬物の開発につながり、不整脈治療の安全性が飛躍的に向上する。

3. 研究方法：

1) 対象

東京女子医科大学病院循環器内科で診療中の①または②の患者のうち、以下の選択基準をすべて満たし、かつ、除外基準のいずれにも該当しない者

- ① アミオダロンの投与が初めて開始される。
- ② アミオダロンによる肺障害の既往がある（ただし、担当医により治癒したと判断されている）。

【選択基準】

1. 年齢：20歳以上
2. 性別：不問
3. 入院、外来：不問
4. 本人から本研究への参加の同意が文書で得られる。

【除外基準】

1. 全身状態が悪く、同意取得に支障がある。
2. 高度の貧血（ヘモグロビン濃度<8 g/dL）が確認されている。
3. その他、医師により試料等提供者として不適当と判断された。

2) 方法

アミオダロンを投与する予定の患者より、本研究への協力の同意を文書にて取得した後、投与前（1ヶ月以内）と投与後早期（投与開始1ヵ月後±2週間）に末梢静脈血を採取

し、肺障害出現の有無を1年間以上観察する。また、アミオダロンによる肺障害の既往がある（現在は治癒している）患者からも文書にて同意取得後に1回のみ末梢血を採取する。提供者の予定人数は合わせて100名とする。これらの末梢血液中細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、肺障害出現の有無で発現パターンを比較することにより、肺障害を投与前または投与後早期に予測する遺伝子発現マーカーを探索する。さらに、同定した遺伝子マーカーや遺伝子パスウェイよりアミオダロンによる肺障害の機序を推察し、その解明につなげる。なお、採血は入院中または外来受診時に行い、通常の診療において採血がある場合にはその採血時に追加で研究用検体を採取することとし、本研究のためだけの採血はできるだけ行わないようにする。採取する検体は1回につき、血液10mlとし、そのうち5mlを遺伝子発現解析に用い、残りの5mlからは血清を採取する。

検体は、東京女子医科大学において二重連結可能匿名化した上で保存し、数回に分け匿名化の状態で自治医科大学に送付する。自治医科大学では、遺伝子発現用検体よりRNAを抽出し、網羅的遺伝子発現解析はAffymetrix Gene Chipシステムを用いて行う。選択した遺伝子群については、real-time PCR法によりmRNA発現量を確認する。その結果、肺障害を予測する遺伝子マーカーが見つかり、そのマーカー遺伝子の発現量（もしくは発現変化）が血清を用いた検査（たとえばマーカー蛋白の定量など）により予測できる可能性が生じた場合には、保存しておいた血清を用いてその検証を行う。また、遺伝子マーカーが血中薬物濃度に影響している可能性がある場合には、保存血清を用いて薬物濃度測定を行う。

4. 研究期間：

許可を得てから平成24年3月31日まで

5. 試料等の種類、量、予定人数

種類	静脈血	量	10 ml/回, 2回または1回 計 20 ml または 10 ml	予定人数	100名
----	-----	---	---------------------------------------	------	------

予定人数の内訳：新規服薬例 80名、既服薬者 20名

6. 予測される結果：

アミオダロンによる肺障害の予測が可能になり、アミオダロンの安全性が向上する。

7. 予測される危険・不利益：

本研究により提供者に実施される行為は採血のみであり、その量は比較的少なく、高度の貧血を有する患者は除外するため、提供者の危険は十分に小さい。また、本研究による提供者の費用負担はなく、採血は入院中または外来受診時のみに行う（本研究のためだけに来院することはない）ため、特に不利益はないと予測される。

8. 個人情報の保護の方法：

提供者の個人情報は、東京女子医科大学にて連結可能匿名化する。対応表は自治医科大学に提供しない。自治医科大学では、匿名化された試料等のみを扱い、個人情報は入手しない。

個人情報管理者：東京女子医科大学 循環器内科学 講師 村崎かがり

9. 遺伝情報の開示に関する考え方：

本研究では遺伝子自体は解析しないため、該当しない。また、遺伝子発現解析の結果についても、各個人の結果を試料等提供者に開示することはしない。

10. 研究実施前提供試料等の使用：

なし

11. 試料の提供について：

東京女子医科大学からは匿名化された試料の提供のみ行う。個人情報の提供は一切行わない。自治医科大学以外の機関には提供・委託しない。

12. 試料等の保存：

(1) 研究遂行中の試料等の保管

保管責任者の所属・職名・氏名	自治医科大学臨床薬理学 准教授 安藤 仁
保管場所及び方法	自治医科大学臨床薬理学の研究室の冷凍庫に匿名化した状態で保管する。

(2) 研究期間の終了後の試料等の保存

採取した血清、血液および抽出・合成された核酸は臨床薬理学において匿名化のまま保存し、本研究期間終了後は直ちに廃棄する。ただし、本研究の解析には長期間を要するため、研究期間終了後に新たな肺障害予測マーカーや肺障害発症機序が推察された場合に備えて、提供者より同意が得られた場合に限り、血清と核酸の保存を継続する。なお、本研究以外の目的で試料を利用する必要が生じた場合には、新たに東京女子医科大学倫理委員会および自治医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会の審査をうける。

(3) ヒト細胞・遺伝子・組織バンクへの試料等の提供

試料等は提供しない。

(4) 試料等の廃棄方法及びその際の匿名化の方法

試料等は匿名化された状態でオートクレーブ処理し破棄する。

1 3. 研究組織、共同研究者の職名、氏名、役割：

東京女子医科大学 循環器内科学	准教授	志賀 剛	研究（試料等採取）の実施・統括
東京女子医科大学 循環器内科学	主任教授	萩原誠久	研究（試料等採取）責任者
自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門	准教授	安藤 仁	遺伝子発現解析
自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門	講師	太田昌一郎	遺伝子発現解析
自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門	助教	牛島健太郎	遺伝子発現解析
自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門	教授	藤村昭夫	研究（遺伝子発現解析等） 責任者

1 4. 参考文献

1. Magro SA, Lawrence EC, Wheeler SH, Krafchek J, Lin HT, Wyndham CR. Amiodarone pulmonary toxicity: prospective evaluation of serial pulmonary function tests. *J Am Coll Cardiol.* 12:781-8, 1988
2. Yamada Y, Shiga T, Matsuda N, Hagiwara N, Kasanuki H. Incidence and predictors of pulmonary toxicity in Japanese patients receiving low-dose amiodarone. *Circ J* 71: 1610-1616, 2007

「アミオダロンによる肺障害の予測法の開発」への協力をお願い

はじめに

アミオダロン（商品名 アンカロン）は、重症の不整脈治療に有効な抗不整脈薬であり、他の薬が効かない場合などには必要となる薬です。しかしながら、内服した患者様の数%に、間質性肺炎などの肺障害が副作用として出現することが知られています。現在のところ、この肺障害がどうして起こるのかはわかっておらず、予防法はありません。もしも、アミオダロン治療を始める前、あるいは治療開始後の早い時期に肺障害の危険性が予測できれば、未然にアミオダロンの減量ないし中止をすることが可能になります。また、アミオダロンによる肺障害がどうして起こるのかがわかれば、肺障害を予防する薬や肺障害を起こさない新しい抗不整脈薬を開発することができるかもしれません。

1. 研究の目的

この研究では、アミオダロンの内服を開始される患者様、または、アミオダロンによる肺障害を起こしたことのある患者様を対象に、末梢静脈血 1回 10 ml（2回または1回）を提供いただき、アミオダロンにより肺障害の起こる方と起こらない方の体の状態がどのように異なっているのかを網羅的遺伝子発現解析という方法を用いて調べ、アミオダロンによる肺障害の予測法や予防法を開発することを目的とします。

2. この研究への参加予定期間と参加予定者数

この研究は倫理委員会承認後から平成 24 年 3 月まで行なわれ、アミオダロンの処方を受けた患者様（これから初めて内服を開始される方と、以前にアミオダロンで肺障害を起こしたことがあり現在はアミオダロンを中止し肺障害が治っている方）計 100 名の方にご協力いただく予定です。

なお、採血させていただく時期と回数は次のとおりです。

《初めてアミオダロンの内服を開始される方の場合》

①と②の 2 回

①アミオダロンの内服を始める前 1 ヶ月以内

②アミオダロンの内服を開始して約 1 ヶ月後

《アミオダロンによる肺障害を起こしたことがある方の場合》

この研究に同意いただいた後に 1 回のみ

3. この研究の組織

この研究は、自治医科大学医学部薬理学講座臨床薬理学部門との共同研究で行います。この研究の意義や倫理的妥当性については、東京女子医科大学および自治医科大学において、それぞれの倫理委員会で内容が審査され、その倫理的観点から妥当性が認められまし

た。この研究について何か不明点や相談したいことがありましたら患者様の治療を担当する医師に遠慮なくお尋ねください。

4. 安全性について

患者様にご協力いただくことは通常の方法で行われる腕からの静脈血採血のみであり、その採血量は10mlであり、高度の貧血を有する患者様には参加をお願いしていません。よって、この研究のために新たに加わる危険性はほとんどありません。

5. 患者様の利益と将来の患者様への利益

この研究にご協力いただく患者様ご自身には直接的な利益はないと考えています。しかし、今後、同じようにアミオダロンの内服が必要になる患者様にとっては、安全な治療を受けられるようになることが期待されます。

6. この研究に関わる費用について

この研究に対して、患者様が費用を負担することは一切ありません。

7. 研究への協力を同意しない場合でも不利益を受けないこと

この研究に協力するかどうかは、患者様の自由意志で決められます。この研究への協力を同意いただけても、当院での治療法が異なることはありません。また、このために患者様が診療に不利益を受けることは一切ありません。

8. 研究への協力を同意した場合でも随時これを撤回できること

患者様がこの研究への協力を同意した後であっても、自由に随時これを撤回できます。同意を撤回される場合は担当医に申し出てください。その場合でも患者様が診療に不利益を受けることは一切ありません。

9. プライバシーの保護について

患者様の検体には、患者様が誰であるのか、お名前はわからないように符号を付して自治医科大学に送ります。また、この研究によって集められる患者様の記録についてもお名前を取り除き、患者様が誰であるのかわからないようになっています。これら患者様の検体および記録と符号の対応は、第三者の個人情報管理者によって管理され、研究者が患者様を特定できない方法で解析いたします。最終的な結果は、学術雑誌や学会にて公表する予定ですが、患者様のお名前や個人を特定できる内容が使われることは一切ありません。

10. 連絡先

ご不明な点がございましたら、遠慮なく担当医師にお尋ねください。

連絡先：東京女子医科大学病院 循環器内科
准教授 志賀 剛
〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1
Tel 03-3353-8111

平成 22 年 1 月 28 日
東京女子医科大学 循環器内科学
主任教授 萩原誠久

同意書

東京女子医科大学
循環器内科学 主任教授 萩原誠久 殿

私は「**アミオダロンによる肺障害の予測法の開発**」について、研究分担者より文書による説明を受け、研究の意義について理解いたしましたので、この研究に参加することに同意いたします。

<本人署名欄>

同意日： 年 月 日

氏 名： _____

住 所： _____

<説明医師欄>

説明日： 年 月 日

職 名： _____

医師名： _____

- 得られたデータは、個人が特定できないようになっており、プライバシーは保護されます。
- この調査研究への協力は自由で、同意が得られない場合においても、診療に不利益を受けることは一切ありません。
- この調査研究への協力を同意をされてもいつでも取り消すことができます。
- ご不明な点がございましたら、遠慮なく担当医師にお尋ねください。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍
なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Araki N, Tsuruoka S, Wang N, Hasegawa G, Yanagihara H, Ando H, Omasa T, Enosawa S, Nagai H, Fujimura A.	Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: in vitro screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity.	Xenobiotica	38(11)	1355-64	2008
Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, Shiramoto M, Tsuru T, Irie S, Fujimura A, Kaneko S.	Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes.	Diabetologia	52(2)	329-35	2009
Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Nakamura S, Kumazaki M, Kurita S, Misu H, Togawa N, Fukushima T, Fujimura A, Kaneko S.	The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.	Biochem Biophys Res Commun	380(3)	684-8	2009
Koshimizu T, Tsujimoto G.	New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: vasopressin and pain perception.	J Pharmacol Sci	109(1)	33-7	2009
Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Koshimizu T, Itsubo C, Sadakane K, Awaji T, Tsujimoto G.	Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1).	Mol Pharmacol	75(1)	85-91	2009
Tanaka T, Yano T, Adachi T, Koshimizu T, Hirasawa A, Tsujimoto G.	Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells.	Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol	377(4-6)	515-22	2008
Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu T, Hirasawa A, Tsujimoto G.	Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120.	Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol	377(4-6)	523-7	2008
Hirasawa A, Itsubo C, Sadakane K, Hara T, Shinagawa S, Koga H, Nose H, Koshimizu T, Tsujimoto G.	Production and characterization of a monoclonal antibody against GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1).	Biochem Biophys Res Commun	365(1)	22-8	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ushijima K, Tsuruoka S, Tsuda H, Hasegawa G, Obi Y, Kaneda T, Takahashi M, Maekawa T, Sasaki T, Koshimizu T, Fujimura A.	Cranberry juice suppressed the diclofenac metabolism by human liver microsomes, but not in healthy human subjects.	Br J Clin Pharmacol	68(2)	194-200	2009
Aoyagi T, Koshimizu T, Tanoue A.	Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice.	Kidney Int	76(10)	1035-9	2009
Kojima Y, Sasaki S, Oda N, Koshimizu T, Hayashi Y, Kiniwa M, Tsujimoto G, Kohri K.	Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha(1)-adrenoceptor antagonist naftopidil in	Prostate	69(14)	1521-8	2009
Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Sadakane K, Itsubo C, Iga T, Adachi T, Koshimizu T, Hashimoto T, Asakawa Y, Tsujimoto G.	Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40.	Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol	380(3)	247-55	2009
Stojilkovic SS, He ML, Koshimizu T, Balik A, Zemkova H.	Signaling by purinergic receptors and channels in the pituitary gland.	Mol Cell Endocrinol	314(2)	184-91	2010
Kumazaki M, Ando H, Sasaki A, Koshimizu T, Ushijima K, Hosohata K, Oshima Y, Fujiimura	Protective effect of alpha-lipoic acid against arsenic trioxide-induced acute cardiac toxicity in	J Pharmacol Sci	115(2)	244-8	2011
Koshimizu T, Tsuchiya H, Tsuda H, Fujiwara Y, Shibata K, Hirasawa A, Tsuiimoto G.	Inhibition of heat shock protein 90 attenuates adenylylate cyclase sensitization after chronic	Biochem Biophys Res Commun	392(4)	603-7	2010
Koshimizu T, Fujiwara Y, Sakai N, Shibata K, Tsuchiya H.	Oxytocin stimulates expression of a noncoding RNA tumor marker in a human neuroblastoma cell line.	Life Sci	86(11-12)	455-60	2010

Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: *In vitro* screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity

N. ARAKI¹, S. TSURUOKA^{1,6}, N. WANG^{1,2,3}, G. HASEGAWA¹,
H. YANAGIHARA¹, H. ANDO¹, T. OMASA⁴, S. ENOSAWA⁵,
H. NAGAI², & A. FUJIMURA¹

¹Departments of Clinical Pharmacology and, ²General Surgery, Fichi Medical University, Tochigi, Japan, ³General Surgery Department II, China Medical University No. 1 Affiliated Hospital, Shenyang, China, ⁴Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, Japan, ⁵Department of Innovative Surgery, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan, and ⁶Department of Nephrology, Institute of Clinical Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

(Received 24 April 2008; revised 9 September 2008; accepted 10 September 2008)

Abstract

1. The aims were to attest whether HepG2-GS-3A4, a cell line into which the human CYP3A4 gene was introduced, can be used for a screening of chemicals that will inhibit CYP3A4 activity.

2. The capacity of the cells for metabolizing CYP3A4 substrates *in vitro* was evaluated. Also determined was the effect of CYP3A4 inhibitors and non-inhibitors on nifedipine hydroxylation. Western blot, immunohistochemistry and determination of β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-reductase activity were performed.

3. HepG2-GS-3A4 selectively metabolized substrates of CYP3A4 (diazepam, nordiazepam, lidocaine, atorvastatin, and nifedipine) to a greater degree than control. The metabolites were easily detected in the culture medium. Values of V_{max} of HepG2-GS-3A4 were about 30- to 100-fold higher than those of the control, while values of K_m were comparable. Pre-incubation of cimetidine and ketoconazole significantly inhibited nifedipine hydroxylation, while addition of inhibitors specific to other isoforms of CYPs had no substantial effect. The HepG2-GS-3A4 expressed a higher amount of CYP3A4 protein and mRNA than control. Most NADPH reductase activity was detected in microsomal fractions.

4 In conclusion, HepG2-GS-3A4 sufficiently and selectively metabolize substrates of CYP3A4, and inhibitors of CYP3A4 reduced the metabolism. Because the metabolites were easily detected in the culture medium, this cell might be useful for the new and easy screening of new drugs for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity *in vitro*.

Correspondence: S. Tsuruoka, Department of Nephrology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan. Tel/Fax: +81-29-853-3202. E-mail: tsuru@md.tsukuba.ac.jp

ISSN 0049-8254 print/ISSN 1366-5928 online © 2008 Informa UK Ltd.
DOI: 10.1080/00498250802468645

Keywords: CYP3A4, screening, drug-interaction, HepG2

Introduction

The drug-related adverse reaction is one of the important problems in clinical practice. It is reported that the incidence of such adverse reactions is increasing with a number of drugs administered at the same time. Pharmacokinetic drug interaction, which is caused by competition of an enzyme for drug metabolism, is the most common reason for drug–drug adverse reactions (Edwards 1997). Cytochrome P450 (CYP) 3A4 is one of the major enzymes for drug metabolism (Edwards 1997), and many drugs such as calcium channel blockers (for example, verapamil and nifedipine), anti-anxiety drugs (for example, diazepam, alprazolam), and macrolide antibiotics (for example, clarithromycin, and erythromycin) are metabolized by this enzyme (Zhou 2008). To develop a new drug, it is important to determine whether a candidate of drugs will inhibit CYP3A4 activity (Spilker 1997) because co-administration of several drugs metabolized by CYP3A4 may cause pharmacokinetic drug–drug interactions (Edwards 1997). Antifungal drugs (for example, ketoconazole and itraconazole), macrolide antibiotics (for example, clarithromycin and erythromycin), and anti-ulcer drugs (for example, cimetidine) are well-known examples which inhibit CYP3A4 activity. Co-administration of such inhibitor and substrate of CYP3A4 causes intoxication of the substrate (Zhou 2008). *In vivo* screening and *in vitro* screening by human hepatocyte or microsome are currently performed to evaluate inhibition of CYP3A4 activity. However, these take time and labour. Therefore, an easy method for evaluation is not available at present.

The authors have previously established a cell line from HepG2, into which genes of human CYP3A4 and glutamine synthetase (GS), enzyme-metabolizing ammonia, were introduced. By using the novel cell and new technology for three-dimensional cell culture, a new bioreactor was developed for the successful treatment of acute liver failure and concomitant diazepam intoxication in an animal model (Omasa et al. 2005; Wang et al. 2005). Because the capacity of drug metabolism via CYP3A4 is extremely high in the cell and metabolites in the culture medium can easily be detected, it is speculated here that our cell might be applied to the new and easy screening of new chemicals that inhibit CYP3A4 activity *in vitro*.

The purpose of this study was to determine whether the cells, named HepG2-GS-3A4, can metabolize several chemicals that are known to be substrates of CYP3A4. Also evaluated by various techniques was the expression of CYP3A4 protein and mRNA. Finally, it was evaluated whether these cells can be used in the screening of chemicals which possess CYP3A4-inhibiting activity by using well-known inhibitors of this enzyme.

Materials and methods

Cells (Omasa et al. 2005; Wang et al. 2005)

The HepG2 cell, a cell line that originated from human hepatoblastoma, was obtained from the RIKEN cell bank (Tsukuba, Japan). HepG2-GS-3A4, a cell transduced from both the hamster GS gene and the human cytochrome p450 3A4 gene, was established as follows: pBudCE4 plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), which had two multicloning sites, with the human cytomegalovirus gene and the human elongation 1-alpha subunit gene as promoters, was used for the vector. After ligation with the hamster GS gene and the human

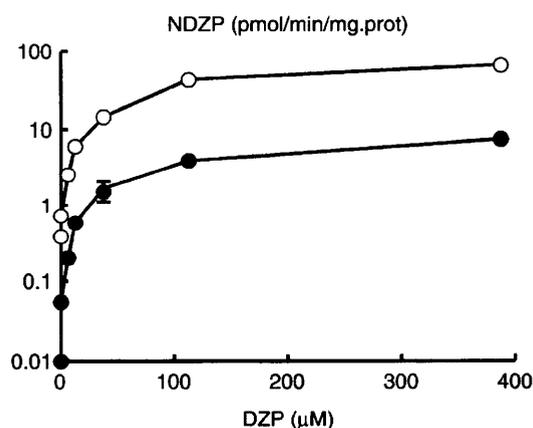


Figure 1. Formation of nordiazepam (NDZP) from diazepam (DZP) in HepG2-GS-3A4 and control (HepG2-GS) cells. DZP was applied in the culture medium, and NDZP was detected in the culture medium. Data are the mean \pm standard error (SE), $n=4-7$ in each (HepG2-GS-3A4, (○); and HepG2-GS, (●)).

cytochrome p450 3A4 gene, it was introduced by lipofection, and a positive clone was selected as an index of resistance against zeocin. HepG2-GS-3A4 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12:Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (1:1), with 10% foetal calf serum (FCS) + zeocin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 37°C with 5% CO_2 . HepG2 cells were cultured under the same conditions, except antibiotics were changed to penicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) and streptomycin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Evaluation of CYP3A4 and glutamine synthetase activities

The 10^5 cells were inoculated to a 10-cm dish. When cells were nearly confluent, the medium was replaced by 10 ml of medium containing ammonia, diazepam (DZP; at a concentration of $0.38-385 \mu\text{M}$; $0.1-100 \mu\text{g ml}^{-1}$), nordiazepam (NDZP; $0.38-385 \mu\text{M}$; $0.1-100 \mu\text{g ml}^{-1}$), a metabolite of diazepam (Figure 1), lidocaine (at a concentration of $0.03-7.0 \mu\text{M}$), atorvastatin (at a concentration up to $100 \mu\text{M}$), nifedipine (at a concentration of $0.1-114 \mu\text{M}$; $0.5-40 \mu\text{g ml}^{-1}$), or ammonia ($0.01-1 \text{ mM}$). Of the samples, 0.25 ml were collected from the medium sequentially at zero, 1, and 4 h after the incubation at 37°C with 5% CO_2 . Finally, the medium was replaced by 10 ml of 1 M NaOH to digest the cells for measurement of protein concentration.

In order to evaluate the inhibitory effect of drugs on nifedipine hydroxylation (as an index of CYP3A4 activity), cimetidine (up to $0.57 \mu\text{M}$; $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$), ketoconazole (up to $3.96 \mu\text{M}$; $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$), omeprazole (an inhibitor and substrate of CYP 2C19; Quinn and Day 1997; $0.87 \mu\text{M}$; $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$), fluvoxamine (an inhibitor of CYP1A2; Quinn and Day 1997; $1 \mu\text{M}$), quinidine (an inhibitor of CYP2D6; Quinn and Day 1997; $10 \mu\text{M}$), and sulfaphenazole (an inhibitor of CYP2C9; Quinn and Day 1997; $10 \mu\text{M}$) were pre-treated for 1 h. Nifedipine concentration in the medium for the inhibition assay was $28.5 \mu\text{M}$ ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Assays

Concentrations of DZP, lidocaine, nifedipine, atorvastatin, and their metabolites were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Chen et al. 1992;

Azzam et al. 1998; Jemal et al. 1999; Maezono et al. 2005). The amount of protein in the cell lysate was measured by spectrophotometry using a protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Ammonia was measured by Berthelot reactions (Hindriks and Groen 1978).

Western blot analysis and immunohistochemistry for human cytochrome P450 3A4

The 10^5 cells were disrupted with isotonic buffer by nitrogen cavitation. A total of 20 μg of protein was resolved by 7% sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) electrophoresis, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with human CYP3A4 antibody (WB human CYP3A4 kit, BD Genetest, Franklin Lakes, NJ, USA). Pooled human liver microsome (BD Genetest) was used as a standard. The chemiluminescence method was used for signal detection. For quantitative measurement, densitometric analysis was performed. Immunohistochemistry was performed with the same antibody using the LSAB2/HRP (DAB)-kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) after fixation of the cells.

Determination of NADPH-cytochrome reductase activity in the microsome

The cell suspension was homogenized and centrifuged at 600g for 5 min to remove unhomogenized cells. The supernatant was centrifuged at 10 000g for 20 min to remove nuclei and mitochondria. The supernatant was further centrifuged at 105 000g for 1 h. The microsomal fraction was suspended to sucrose buffer with glycerol and kept at -80°C until the assay.

NADPH-cytochrome P450 reductase activity was determined spectrophotometrically as the reduction rate of cytochrome c, as described elsewhere (Strobel and Dignam 1978). Briefly, the reaction mixture contained 40 nmol l^{-1} cytochrome c, 100 nmol l^{-1} NADPH, 270 $\mu\text{mol l}^{-1}$ potassium phosphate, and protein (70–172 μg) in 100 μl , with pH 7.7. The reaction was started by the addition of NADPH and detected the increase of absorbance at 550 nm at room temperature. The activity was calculated using an extinction coefficient of 21 $\text{cm}^{-1}\cdot\text{mmol l}^{-1}$.

Statistics

Values were expressed as the mean \pm standard error (SE). Analysis of variance (ANOVA) and a Student's *t*-test were used as appropriate for statistical comparison. $p < 0.05$ was regarded as being statistically significant.

Results

Metabolism of DZP, lidocaine, atorvastatin, and ammonia by HepG2-GS-3A4 cells in vitro

After the incubation of HepG2-GS-3A4 cells with DZP, time- and concentration-dependent reductions were observed from 0.38 to 385 μM (0.1–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of DZP. At the same time, NDZP and temazepam (TZP; the metabolites of DZP) were also detected. The production of NDZP was higher than that of TZP, and it was the main metabolite in this system. The amounts of these metabolites appearing in the medium were time- and DZP concentration-dependent. Such capacities were significantly higher in HepG2-GS-3A4 than in HepG2 cells (Figure 1). Also evaluated was the metabolism of NDZP using the same cells. NDZP in

Table I. Mean values of K_m and V_{max} of drugs in HepG2-GS-3A4 and HepG2-GS cells.^a

	HepG2-GS		HepG2-GS-3A4	
	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	K_m (μM)	V_{max} ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
Diazepam <i>N</i> -desmethylation	14.97	2.48	24.05	106.90
Diazepam 3-hydroxylation	39.63	0.13	42.26	85.13
Nordiazepam dehydroxylation	21.92	0.05	22.28	1.49
Lidocaine monodeethylation	3.9	209	5.8	5722
Atrovastatin acid 2-hydroxylation	n.d. ^b	n.d.	58.7	1852
Atrovastatin lactone	167	68	175	62
Nifedipine hydroxylation	n.d.	n.d.	21.4	136

^aConcentrations of metabolites in the culture medium were measured; $n = 5-7$ in each.

^bn.d., Concentrations of 2-hydroxyl-atrovastatin acid and hydroxyl-nifedipine in the medium of HepG2-GS cells were less than the detection limit of the assay; therefore K_m and V_{max} for HepG2-GS cells were not obtained.

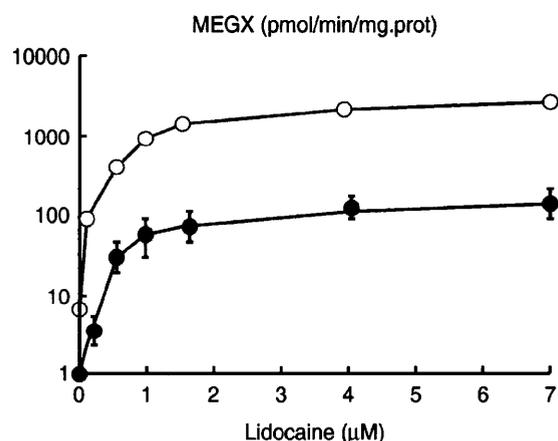


Figure 2. Formation of monoethylglycylxylodide (MEGX) from lidocaine in HepG2-GS-3A4 and control (HepG2-GS) cells. Lidocaine was applied in the culture medium, and MEGX was detected in the culture medium. Data are the mean \pm standard error (SE), $n = 4-7$ in each (HepG2-GS-3A4, (○); and HepG2-GS, (●)).

the medium significantly decreased and oxazepam (OZP), a metabolite of NDZP, increased in the medium in a concentration- and time-dependent manner. These capacities were significantly higher in HepG2-GS-3A4 than in control cells. K_m - and V_{max} -values for DZP metabolism in HepG2-GS-3A4 were $24.05 \mu\text{M}$ and $106.90 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ for DZP *N*-demethylation, and $42.26 \mu\text{M}$ and $85.13 \text{ pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ for DZP 3-hydroxylation, respectively (Table I). Compared with HepG2-GS, V_{max} -values of diazepam metabolism in HepG2-GS-3A4 were more than ten-fold higher than those in HepG2-GS, while K_m -values were rather comparable (Table I).

The metabolite lidocaine, another substrate of CYP3A4, was also detected in the medium. The formation was also significantly higher in HepG2-GS-3A4 cells than in the control cells (Figure 2). Formation of 2-hydroxyl atorvastatin acid was also significantly higher in the HepG2-GS-3A4 cells than in the control cells (Table I). The formation was increased in a concentration- and time-dependent manner. K_m - and V_{max} -values were

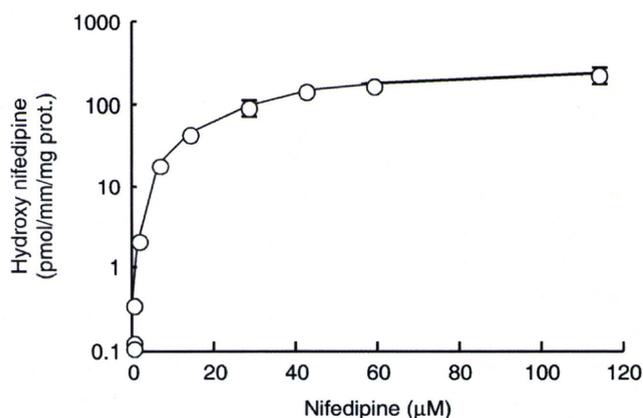


Figure 3. Formation of hydroxylated nifedipine from nifedipine in HepG2-GS-3A4 cells. Nifedipine was applied in the culture medium, and hydroxy-nifedipine was detected in the culture medium. Data are the mean \pm standard error (SE), $n=4-7$ in each. Hydroxyl-nifedipine in control (HepG2-GS) cells was less than the detection limit of the assay at all concentrations (HepG2-GS-3A4, (o)).

58.7 μM and 1852 $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. On the other hand, formation of atorvastatin lactone, the metabolite of atorvastatin via several CYPs, was not different between the two cell groups (Table I). Metabolism of nifedipine, a substrate of CYP3A4, was also evaluated. Formation of hydroxyl-nifedipine in HepG2-GS-3A4 cells was time- and concentration-dependent. K_m - and V_{max} -values were 21.4 μM and 136 $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, respectively (Figure 3 and Table I). In the medium of the HepG2-GS cells, concentrations of hydroxylated nifedipine and hydroxylated atorvastatin were less than the detection limit in all experiments. The ammonia concentration was decreased with a time of incubation up to 4 h. The reduction rate was not different between HepG2-GS-3A4 and HepG2-GS cells (40.7 ± 1.62 (95% confidence interval (CI) = 36.7 and 44.2) and 39.5 ± 2.47 (95% CI = 34.8 and 44.9) $\text{mg mg}^{-1} \text{protein h}^{-1}$, respectively). Because the reduction was not saturated up to 1 mM, K_m - and V_{max} -values were not obtained.

Inhibition of nifedipine hydroxylation by ketoconazole, cimetidine and non-CYP3A4 inhibitors in HepG2-GS-3A4 cells

Next, the effect of pretreatment of several drugs known to be inhibitors of CYP3A4 activity on nifedipine hydroxylation was evaluated. Nifedipine was used at a concentration of 28.5 μM (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). As shown in Figure 4, pretreatment of cimetidine (as a non-selective inhibitor of CYPs) and ketoconazole (as an inhibitor of CYP3A4) for 1 h inhibited the formation of hydroxyl-nifedipine in a concentration-dependent manner only in HepG2-GS-3A4 cells. These effects were not observed in HepG2-GS cells because hydroxylated nifedipine was not detected. On the other hand, pretreatment of 0.87 μM (0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of omeprazole (an inhibitor and substrate of CYP 2C19), 1 μM of fluvoxamine (an inhibitor of CYP1A2), 10 μM of quinidine (an inhibitor of CYP2D6), and 10 μM of sulfaphenazole (an inhibitor of CYP2C9), for 1 h did not affect the formation of hydroxyl-nifedipine – the transforming rate of hydroxyl nifedipine with the addition of 28.5 μM nifedipine = 133.8 ± 8.6 (95% CI = 118.5 and 142.8; $n=6$), 131.7 ± 9.0 (95% CI = 114.5 and 141.1; $n=6$), 124.8 ± 9.3 (95% CI = 112.0 and 140.2) $n=4$), 121.0 ± 9.7 (95% CI = 115.8 and