

らの結果は、再現性の高い実験が可能となり、最終データの比較を行う上で、非常に高い信頼性を得ることが可能であることを示している。

E. 結論

本研究では、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 および CYP3A4 をモデル酵素として、アデノウイルス P450 発現システムの構築を行った。その結果、リコンビナント酵素やヒト肝ミクロソームなどのこれまで用いられてきた *in vitro* 実験系と同等のヒトの薬物代謝を得ることが可能であった。また、P450 発現細胞を凍結することにより必要時に一定の酵素活性を示す酵素試料の提供が可能であることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saeki M, Kurose K, Hasegawa R, Tohkin M. Functional analysis of genetic variations in the 5'-flanking region of the human MDR1 gene. *Molecular Genetics and Metabolism* 102, 91-98 (2011)
2. Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinoshita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R; JSAR research group. HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Epilepsia*. 51, 2461-2465 (2010)
3. Tohkin M, Ishiguro A, Kaniwa N, Saito Y, Kurose K, Hasegawa R. Prediction of severe adverse drug reactions using pharmacogenetic biomarkers. *Drug Metab Pharmacokinet*. 25, 122-133 (2010)
4. Maekawa K, Harakawa N, Yoshimura T, Kim SR, Fujimura Y, Aohara F, Sai K, Katori N, Tohkin M, Naito M, Hasegawa R, Okuda H, Sawada J, Niwa T, Saito Y. CYP3A4*16 and CYP3A4*18 alleles found in East Asians exhibit differential catalytic activities for seven CYP3A4 substrate drugs. *Drug Metab Dispos*. 38, 2100-2104 (2010)

2. 学会発表

Masahiro Tohkin, Mayumi Saeki, Ryuichi

Hasegawa, Yoshiro Saito, and Kouichi Kurose
EPIGENETIC REGULATION OF MDR1 GENE EXPRESSION
第 25 回日本薬物動態学会年会 (大宮) 平成 22 年
10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

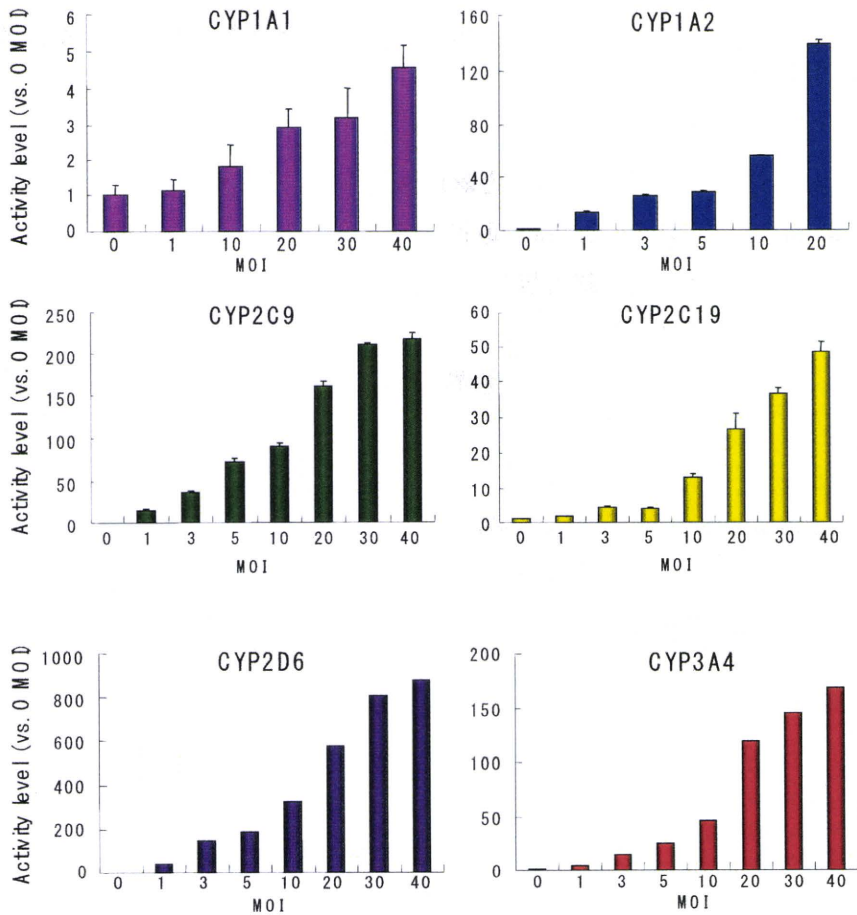


図 1. 単一の P450 分子種発現時における MOI 依存的な酵素活性

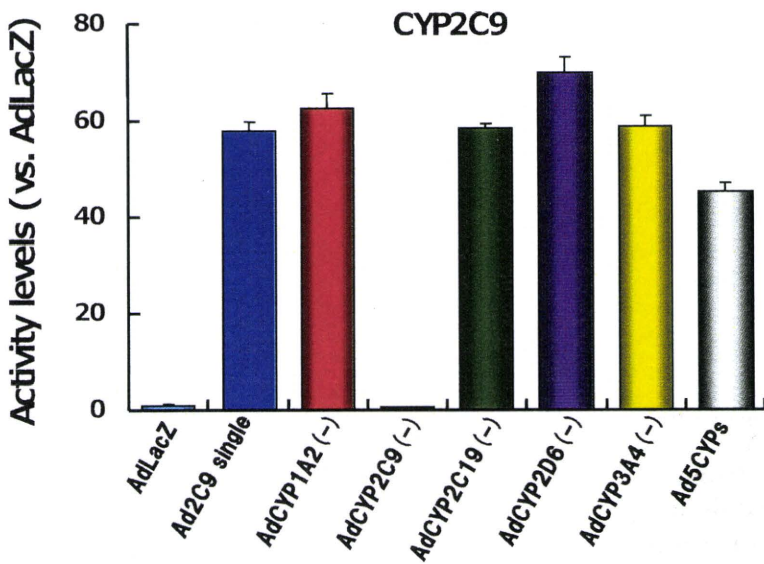


図 2. 5 種類同時感染における CYP2C9 活性

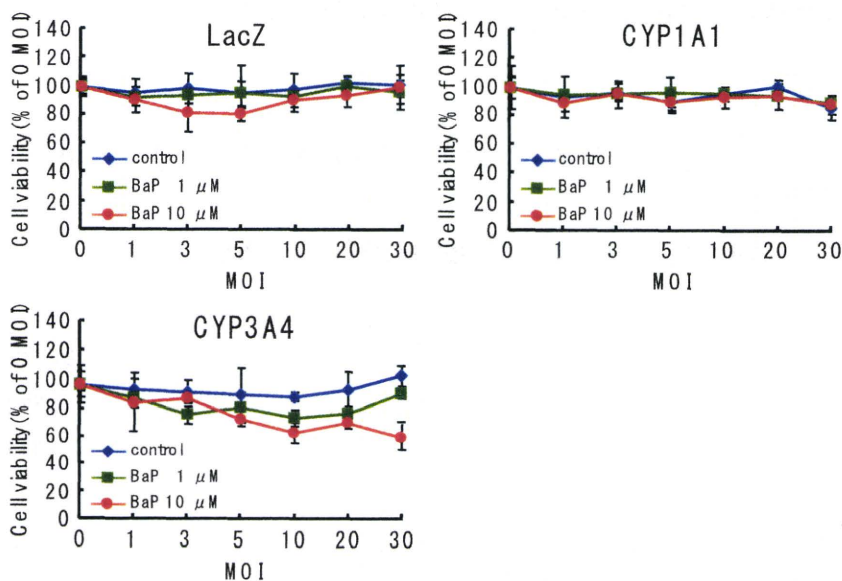


図 3. 本システムを用いた BaP 誘発性毒性発現評価

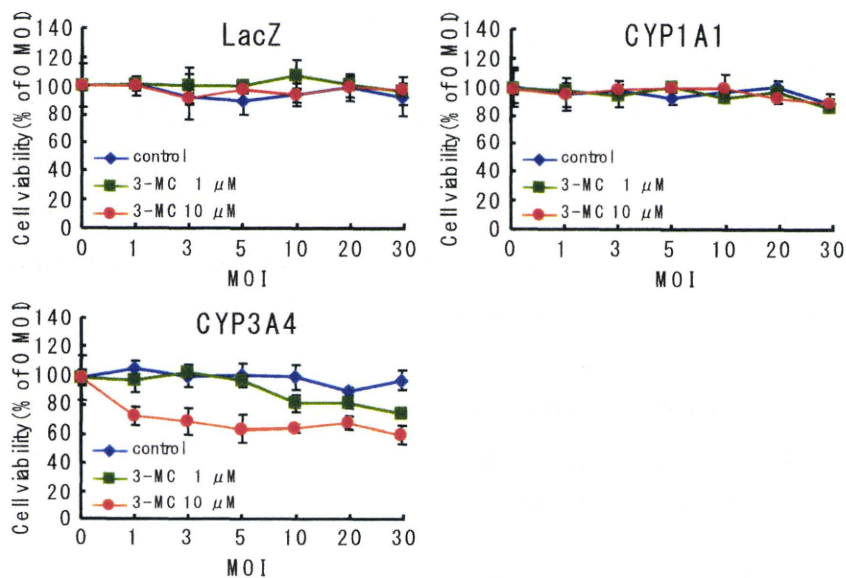


図 4. 本システムを用いた 3-MC 誘発性毒性発現評価

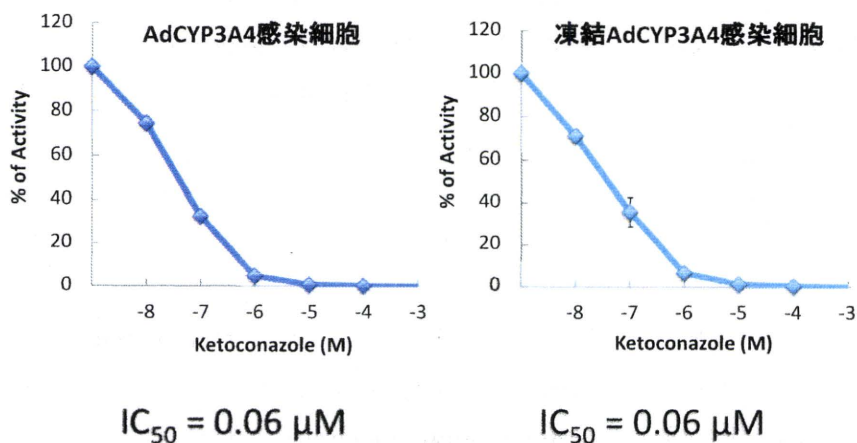


図 5. 本システムの凍結融解細胞を用いた CYP3A4 活性のケトコナゾールによる阻害実験
平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

薬物代謝酵素誘導を介した薬物相互作用の評価における標準的プロトコールの確立

研究分担者 細川正清 千葉科学大学 薬学部薬物動態学研究室 教授

研究要旨：本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、標準的なプロトコールの作成を目的として検討を行った。その結果、細胞にトランスフェクションした方法よりも、CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いた方が、安定した結果が得られることが示された。さらに薬物の曝露時間に関しては 24 時間が適切であることが示された。また、サプリメントからの抽出方法に関しては、セントジョーンズワートを用いた検討からエタノールが最適であることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、酵素誘導の標準的なプロトコールの作成を目的として検討を行った。

B. 研究方法

細胞：本実験に用いた細胞は、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞、ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞および東北薬科大学薬学部永田清教授より提供された CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（ルシフェラーゼ測定系）：3-1-10 細胞を用いた。

ベクターDNA：本実験においてはルシフェラーゼ測定用ベクターとしてヒト CYP3A4 の上流の XREM と prPXRE の部分を pGL3Basic のホタルルシフェラーゼの上流に組み込んだ XREM-prPXRE/pGL3 ベクターおよびウミシイタケルシフェラーゼを TK プロモーターの下流に組み込んだコントロールベクターの PhRL-TK ベクターを用いた。またトランスフェクション用ベクターとしてヒト PXRcDNA を pTARGET ベクターに組み込んだ PXR/pTARGET およびヒト HNF4αcDNA を pTARGET ベクターに組み込んだ HNF4α/pTARGET を用いた。

トランスフェクション法

Transfection の前日に、FLC7 細胞および HEK293 細胞を 24 well plate に 2.5×10^5 cell/well となるよう播種した。TransIT-LT1 0.6 μ l/well (Mirus, USA) と Opti-MEM 21.0 μ l/well (Invitrogen) を混和し、15 分間室温で放置した後、plasmid DNA 200 ng/well および control DNA (phRL-TK vector, Promega) 4 ng/well を混和し、20 分間室温で放置した後、細胞に滴下し、約 24 時間、37°C、5%CO₂ でインキュベートした。

ルシフェラーゼアッセイ (1)

ルシフェラーゼ活性測定は、以下の方法で行った。薬物曝露から 24 時間後の細胞をダルベッコ PBS (日水製薬, 東京) 0.5 ml/well で洗浄した後、PLB 100 μ l/well を加え、15 分間振とうした。得られた上清について、Dual-Luciferase® Repoter Assay System (Promega) を用いて TD-20/20 Luminometer (Turtter designs, Sunnyvale, CA, USA) により測定した。なお、transfection 効率は、sample vector の firefly luciferase の活性と control vector の renilla luciferase の活性で比をとることでより補正した。

ルシフェラーゼアッセイ (2)

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 (ルシフェラーゼ測定系) : 3-1-10 細胞を用いた場合、ルシフェラーゼアッセイは次のように行った。

3-1-10 細胞を 5×10^4 cells/well になるよう 10% FBS-DMEM 中 (NEAA, pen-st) で調整し、24 穴プレートに播種し、 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。播種 24 時間後に、薬物の入った培地に交換するか、または薬物を直接添加することで、誘導剤の曝露を開始した。薬物曝露 12 時間、24 時間または 48 時間後に、培地を除去後 PBS で 2 回洗浄を行った後、 $1 \times \text{PBL}$ を 0.1 mL/well それぞれ添加した。室温でプレートを 160 r.p.m で 30 分間浸透した後、マイクロチューブに移した後、 $12,000 \times \text{g}$ 、2 分間延伸を行い、得られた上清を別のマイクロチューブに移した。上清 $20 \mu\text{L}$ に Luciferase Assay System (Promega #E1501) $25 \mu\text{L}$ を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turter designs, Sunnyvale, CA, USA) により測定した。

タンパク定量法

タンパク定量はウシ血清アルブミンをスタンダードとし、DC protein assay kit II (Bio-Rad Laboratories) を用いて行った。マイクロプレートに sample protein $5 \mu\text{l}$ 、A 試薬 $25 \mu\text{l}$ 、B 試薬 $200 \mu\text{l}$ を添加し室温で 15 分間静置した後、 750 nm の吸光度を Multispectro Microplate Reader VARIOSKAN (Thermo Electron Corporation) を用いて測定した。

C. 研究結果および考察

1) Transfection に使用する細胞の選択

最初にヒト由来細胞に XREM-prPXR/pGL3 に PhRL-TK ベクターおよび PXR/pTARGET をコトランスフェクションして測定したが、HEK293 細胞に関しては、HNF4 α の発現が少ないため、 $5 \mu\text{M}$ のリファンピシンを用いても、1.5 倍程度の酵素誘導しか認められないため、HNF4 α /pTARGET コトランスフェクションし、酵素誘導を調べた。その結果、

3.0 倍の誘導が認められたが、コトランスフェクションするベクターが多すぎるため、次に HNF4 α の発現が多いことが報告されている HepG2 細胞を用いて検討したところ、 10 倍以上の誘導が認められたため、トランスフェクションを行う細胞として HepG2 を選択した。(data not shown)

2) *In vitro* 実験系を用いたリファンピシンとハイパーフォリンによる誘導

1) の HepG2 の実験系でトランスフェクション 24 時間後の DMEM 培地に CYP3A4 の酵素誘導のコントロールとしてのリファンピシンおよびセントジョーンズワートの中の酵素誘導成分であるハイパーフォリンを曝露して検討した。実験はリファンピシンの最終濃度が $0.5 \mu\text{M}$ 、ハイパーフォリンの最終濃度がそれぞれ 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 $0.5 \mu\text{M}$ になるように調整し、播種 24 時間後に培地交換することにより薬物の曝露を行い、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、図 1 に示したように $0.5 \mu\text{M}$ リファンピシンで 10.8 倍、ハイパーフォリンでは $0.1 \mu\text{M}$ で 23 倍で濃度依存的に誘導率が増加し、 $0.5 \mu\text{M}$ では 40.1 倍の誘導が認められた。この結果から、この実験系は酵素誘導の *in vitro* 実験系として有用であることが示された。

3) 市販のサプリメントを用いた検討

2) で *in vitro* モデル系が出来たので、実際に市販のセントジョーンズワート (DHC, ソフトカプセル) を用いて検討した。セントジョーンズワート 1 粒 (3 粒 510 mg にハイパーフォリンとして 15.3 mg 含有)、を 50 mL の遠心管に入れ滅菌 MilliQ 水 3.8 mL 加え 37°C で 15 分間インキュベートする。ボルテックスミキサーで良く攪拌した後、滅菌 MilliQ 水、メタノールまたはエタノールを 34.2 mL 加えた後 37°C で 15 分間インキュベートする。ボルテックスミキサーで良く攪拌した後、 $10,000 \times \text{g}$ で 10 分間遠心分離し、上清を希釈した後フィルター濾過してサンプルとした。

その結果、図2に示したように滅菌 MilliQ 水で抽出したものに比べてメタノールまたはエタノールで抽出した場合の方が酵素誘導が高く、抽出にはメタノールまたはエタノールが適していることが示された。

4) CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 3-1-10 細胞を用いた検討

これまで、ヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞を用いて in vitro 系の検討を行って来たがトランスフェクションするベクターの種類が多いため実験が煩雑になってしまうことが考えられた。そこで、東北薬科大学から提供された、CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いて検討を行った。この方法だと、トランスフェクションをする手間が省けるため、サプリメントの影響を検討しやすいというアドバンテージがある。

はじめに、リファンピシシンを用いて薬物曝露の方法について検討した。その結果、培地に薬物を添加し培地交換によりリファンピシシンを曝露した場合、結果のばらつきが大きいことが示され、薬物を直接添加することにした (data not shown)。次にリファンピシシンの曝露時間について検討したところ、12 時間では、誘導が十分ではなく、48 時間では、酵素誘導倍率はかなり高くなったが、高い濃度 (3 μ M 以上) において細胞毒性のためと考えられる誘導倍率の低下がみられた (data not shown)。そのため、この実験においては、曝露時間を 24 時間とした。

リファンピシシンを 1 から 5 μ M の濃度で添加して 24 時間後の結果を図3に示した。この結果に示されているように、濃度依存的に誘導が認められた。さらに、ハイパーフォリンについて同様な検討を行ったところ、図3に示したように濃度依存的な酵素誘導が認められた。これらの結果は、2) の細胞にトランスフェクションした結果と同等であった。さらに、3) の実験と同様に MilliQ 水、メタノールおよびエタノールで抽出したセン

トジオーンズワートを用いて検討したところ、図4に示したように、MilliQ 水に比べてメタノールおよびエタノールの方が抽出が高いことがしめされた。

E. 結論

今回の検討により、細胞にトランスフェクションした方法よりも、CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いた方が、実験系がシンプルで、安定した結果が得られることが示された。さらに薬物の曝露時間に関しては 24 時間が適切であること、さらにサプリメントからの抽出方法に関しては、セントジオーンズワートを用いた検討からエタノールが最適であることが明らかとなった。次年度はこの系を用いて種々のサプリメントについて検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Holmes RS, Wright MW, Laulederkind SJ, Cox LA, Hosokawa M, Imai T, Ishibashi S, Lehner R, Miyazaki M, Perkins EJ, Potter PM, Redinbo MR, Robert J, Satoh T, Yamashita T, Yan B, Yokoi T, Zechner R, Maltais LJ Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins. *Mamm Genome*. 21, 427-441, (2010)

2. Sai K, Saito Y, Tatewaki N, Hosokawa M, Kaniwa N, Nishimaki-Mogami T, Naito M, Sawada J, Shirao K, Hamaguchi T, Yamamoto N, Kunitoh H, Tamura T, Yamada Y, Ohe Y, Yoshida T, Minami H, Ohtsu A, Matsumura Y, Saijo N, Okuda H. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*. ;70, 222-233. (2010)

3. Hori T, Hosokawa M. DNA methylation and its involvement in carboxylesterase 1A1 (CES1A1) gene expression. *Xenobiotica*. 40, 119-128. (2010)

4. Satoh T, Hosokawa M. Carboxylesterases: Structure, Function and Polymorphism in Mammals. *J. Pestic. Sci*, 35, 218-228 (2010)

5. Imai T, Hosokawa M. Prodrug approach using carboxylesterases activity: Catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue. *J. Pestic. Sci*, 35, 229-239 (2010)

6. Hosokawa M. Are non-human primates useful experimental animals for pre-clinical study? *Drug Metab Pharmacokinet.* 25, 221-222 (2010)

7. Igarashi M, Osuga J, Uozaki H, Sekiya M, Nagashima S, Takahashi M, Takase S, Takanashi M, Li Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Hosokawa M, Fledelius C, Jacobsen P, Yagyu H, Fukayama M, Nagai R, Kadowaki T, Ohashi K, Ishibashi S. The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. *Circulation Research*, 107, 1387-1395 (2010)

2. 著書

細川正清：3・4 薬物の加水分解反応に関与する酵素系 3・4・1 エステラーゼ、3・4・2 エポキシドヒドロラーゼ 薬物代謝学（第3版）医療薬学・医薬品開発の基礎として（加藤隆一、山添康、横井毅 編集）東京化学同人、東京、68-71、2010

細川正清：2・2・2 第I相反応に関与する酵素とその反応 g.カルボキシルエステラーゼ、医療薬物代謝学（鎌滝哲也、高橋和彦、山崎浩史 編

集）医学評論社、東京、50-53、2010

細川正清、斉藤浩司：5章 代謝 コンパス生物薬剤学（岩城正宏、伊藤智夫 編集）南江堂、東京、69-104 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

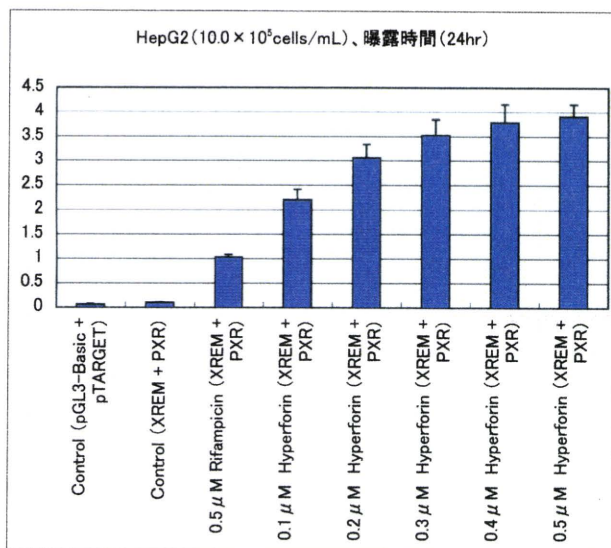


図1 HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによる、rifampicin と hyperforin に対する CYP3A4 の酵素誘導

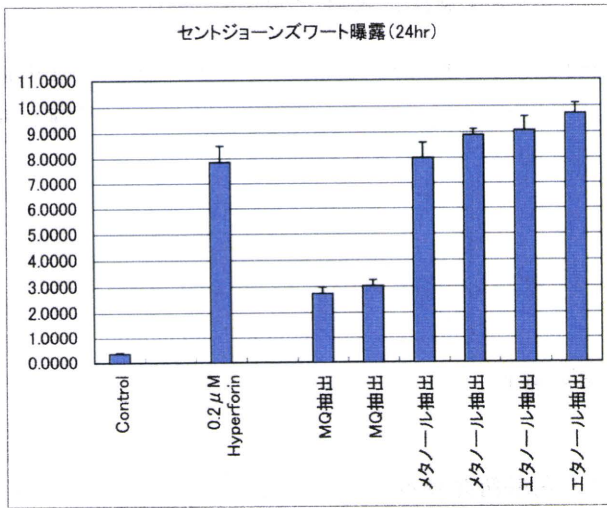


図2 市販のセントジョーンズワート (DHC) の CYP3A4 酵素誘導実験系に対する酵素誘導効果における MilliQ 水、メタノールおよびエタノール抽出の違い

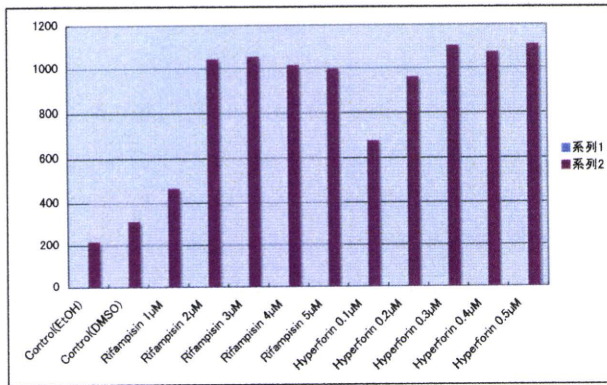


図3 CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いた rifampicin と hyperforin に対する CYP3A4 の酵素誘導

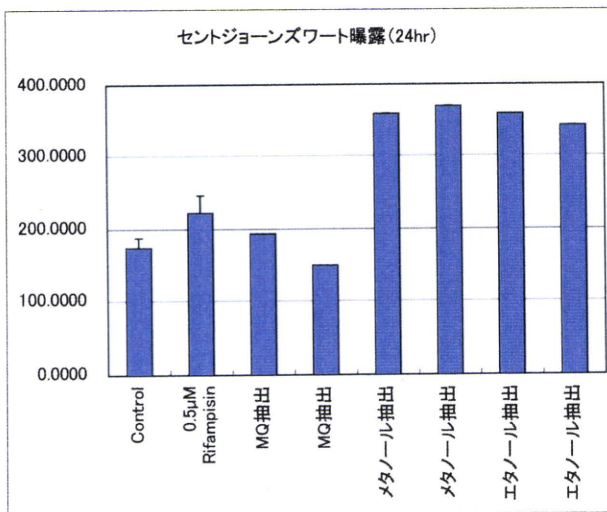


図4 3-1-10 細胞を用いた市販のセントジョーンズワート (DHC) の CYP3A4 酵素誘導実験系に対する酵素誘導効果における MilliQ 水、メタノールおよびエタノール抽出の違い

ヒト iPS 細胞から肝・腸管上皮細胞への分化および誘導評価

研究分担者	松永民秀	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	教授
研究協力者	鈴木 匡	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	教授
研究協力者	前田 徹	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	講師
研究協力者	岩尾 岳洋	名古屋市立大学	大学院薬学研究科	助教

研究要旨：ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、薬物代謝研究の新規材料として期待されている。我々は、ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）を肝細胞様細胞に分化誘導する方法を確立している。一方、小腸上皮細胞は薬物動態の予測に重要であるが、ES 細胞や iPS 細胞の小腸上皮細胞への分化はほとんど報告されていない。本研究では、ヒト iPS 細胞から肝細胞様細胞あるいは小腸上皮細胞様細胞へ分化誘導することを目的とした。その結果、ヒト iPS 細胞においても肝細胞マーカーの発現が認められ肝細胞様細胞に分化していることが明らかとなった。また、分化誘導法を変えることで小腸上皮細胞のマーカーも発現したことから、小腸上皮細胞様細胞への分化が示唆された。

た。

A. 研究目的

肝細胞、腎尿細管上皮細胞、小腸上皮細胞、脳血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞などのヒトの試料は、創薬研究の薬物動態試験や毒性試験において極めて有用な実験材料であるが、入手が困難な場合が多く、たとえ入手できたとしてもロット間差が大きいうえに、量も限られている。特に腸管には多くのトランスポーターや代謝酵素が存在することから、薬物動態を制御する臓器として、肝臓と同様非常に重要であるが、ヒト組織から入手が困難なうえに、適切なモデル細胞がない。したがって、機能を持った小腸上皮細胞を自由に分化誘導することができれば、小腸と肝臓を結ぶモデル系を構築することも夢ではない。近年、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）がヒトより樹立された。iPS 細胞は胚性幹細胞（ES 細胞）と同様、生体を構成する全ての細胞に分化する能力を秘めていることから、薬物動態研究における新しい実験材料として注目されている。そこで、本研究においてはヒト iPS 細胞から肝細胞様細胞あるいは小腸上皮細胞様細胞へ分化誘導することを目的とし

B. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約 70%になった状態で開始した。0.5% FBS、100 ng/mL activin A、100 units/mL penicillin G、100 μ g/mL streptomycin sulfate を含む RPMI + GlutaMax medium で 3 日間、2% knockout serum replacement (KSR)、100 ng/mL activin A、100 units/mL penicillin G、100 μ g/mL streptomycin sulfate を含む RPMI + GlutaMax medium で 2 日間培養した。Activin A 処理後、Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ阻害剤である Y-27632 を 10 μ M となるように添加し、5% CO₂/95% air 条件下 CO₂ インキュベーター中 37°Cにて 60 分間処理した細胞を accutase にて剥離し、あらかじめヒト iPS 細胞用培地にて 30 倍に希釈した GFR Matrigel にてコートした細胞培養用 6 well-plate もしくは細胞培養用 6 cm ディッシュに

播種した (Y-27632 は播種後 24 時間、培地に添加した)。その後、20% KSR、1% GlutaMax、1% non essential amino acid、0.1 mM β -mercaptoethanol、1% dimethylsulfoxide、100 units/mL Penicillin G、100 μ g/mL Streptomycin Sulfate を含む KnockOut Dulbecco's modified Eagle's medium で 7 日間、10 ng/mL hepatocyte growth factor、20 ng/mL oncostatin M、 10^{-7} M dexamethasone を含む変法ランフォード培地で 9 日間、変法ランフォード培地で 4 日間培養することにより行った。分化誘導後、細胞をキアゲンの細胞溶解液にて回収した。

Testosterone 6β -水酸化活性測定は下記のようにして測定した。すなわち、分化後最終濃度が 100 μ M となるように testosterone を変法ランフォード培地に加え、6 時間培養した。培養後、内部標準物質として 1 μ M ethoxyresorufin 10 μ L を回収した培地に添加し、1.25 mL 酢酸エチルと混合懸濁して遠心した。有機相をマイクロ遠心チューブに移し、酢酸エチルを窒素ガスで蒸発させた後、サンプルは 10 mM ammonium acetate、0.1% formic acid を含む methanol 100 μ L に溶解させた。代謝物は LC-MS/MS で分析した。

2. ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞様細胞への分化

小腸上皮細胞様細胞への分化はフィーダーフリー条件下で 2 日間培養したヒト iPS 細胞 (#51) を用い、以下に示した 2 種類のプロトコールに従って行った。

(プロトコール 1)

ヒト iPS 細胞を、0.5% FBS、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 3 日間培養後、2% KSR、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 2 日間培養した。その後 accutase を用いて継代し、あらかじめヒト iPS 細胞用培地で 30 倍に希釈した GFR Matrigel でコートした 24 well-plate に播種した。12% KSR、250 ng/mL bFGF、1% GlutaMax、1% 非必須アミノ酸 (NEAA)、0.1 mM β -mercaptoethanol、100

units/mL penicillin G、100 μ g/mL streptomycin sulfate を含む KO-DMEM で 7 日間、5% FBS、10 ng/mL epidermal growth factor (EGF)、2 mM L-glutamine、1% ITS、100 units/mL penicillin G、100 μ g/mL streptomycin sulfate を含む DMEM で 11 日間培養後 mRNA 測定用サンプルとして細胞を回収した。

(プロトコール 2)

ヒト iPS 細胞を、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で FBS の濃度を 0%、0.2%、2% と変化させ 3 日間培養後、2% FBS、500 ng/mL FGF4、500 ng/mL Wnt3a、1% GlutaMAX を含む DMEM/F12 で 4 日間培養した。その後 accutase を用いて継代し、500 ng/mL R-spondin 1、100 ng/mL Noggin、50 ng/mL EGF を含む Matrigel に包埋して 24 well plate に播種した。10% FBS、500 ng/mL R-spondin 1、100 ng/mL Noggin、50 ng/mL EGF、B27/N2 supplement、2 mM L-glutamine、1% NEAA、100 units/mL penicillin G、100 μ g/mL streptomycin sulfate を含む DMEM/F12 で 15 日間培養後 mRNA 測定用サンプルとして細胞を回収した。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

ヒト iPS 細胞を 24 well-plate で分化させた細胞において、25 日の分化で肝細胞マーカーである AFP、ALB、CYP7A1 の mRNA の発現が認められた (Fig. 1)。また CYP3A4 の誘導に関与する核内受容体 PXR や転写因子 HNF4 α 及び PGC1 α の mRNA の発現も認められた (図 1)。細胞外マトリックスとして GFR Matrigel を用いた場合、collagen I と比較して、ALB、PXR 及び HNF4 α は 4~5 倍高い発現が認められた (図 1)。さらに、CYP3A4 の誘導剤である DEX あるいは RIF 処理では、control と比較して CYP3A4 の mRNA が約 1.5~3 倍に誘導された。また、ビリルビンのグルクロン酸抱合反応を触媒する UGT1A1 の mRNA 発現は、OME 処理により control と比較して約 20

倍に増加した (図 2)。

CYP3A4 特異的な testosterone 6 β -水酸化活性は、24 well-plate において DEX 及び RIF 処理により collagen I では各々 2.3 及び 2.7 倍、GFR Matrigel では各々 1.2 及び 1.9 倍に誘導された。しかし、96 well-plate を使用した場合、testosterone 6 β -水酸化活性は、collagen I では DEX あるいは RIF 処理で約 1.5 倍上昇していたが、GFR Matrigel では control と比較して差は認められなかった (図 3)。

2. ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞様細胞への分化

図 4 及び 5 に示すように、小腸幹細胞のマーカである leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5) や、小腸上皮細胞に豊富に存在する solute carrier family 15 (oligopeptide transporter)、member 1 (SLC15A1)、dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) の mRNA の発現はいずれのプロトコールに従って分化を行った場合においても認められたが、sucrase-isomaltase はプロトコール 1 に従って分化を行った場合でのみ発現が認められた。

D. 考察

肝細胞マーカー、薬物代謝酵素、あるいは CYP3A4 の誘導に関与する核内受容体や転写因子の mRNA 発現が認められた。また、分化後の細胞における CYP3A4 や UGT1A1 の誘導剤に対する mRNA の発現が、肝細胞と類似した応答性を示したことから、ヒト iPS 細胞が肝細胞様細胞へ分化したと考えられた。また、ヒト iPS 細胞から肝細胞様細胞への分化において、collagen I を細胞外マトリックスとするよりも、GFR Matrigel の方がより肝細胞様細胞に分化しやすいことが明らかとなった。さらに、CYP3A4 特異的な testosterone 6 β -水酸化活性も検出されたことから、分化した細胞において CYP3A4 の機能を有した形で発現されていることが明らかとなった。

マウス ES 細胞での方法を応用し、初めてマウ

ス iPS 細胞から三胚葉よりなる EB を形成して腸管組織への分化誘導が 2010 年に報告されている。また、ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導に関してもごく最近報告された。しかし、これらは形態学的に腸管組織としての特徴を有するが、薬物動態学的な解析に応用できるまでの機能評価はされておらず、小腸上皮細胞への分化に関してはほとんど研究が進んでいないのが現状である。今回検討したいいずれの分化誘導法においても、腸管幹細胞に局在するとされる LGR5、腸管上皮細胞に存在する DPP4 の発現に加え、ペプチドトランスポーターである SLC15A1 (PEPT1) の発現も確認された。以上の結果より、小腸上皮細胞様細胞への分化が誘導されたと考えられた。しかし、FGF や Wnt のシグナルは後腸への分化を促進させ、このマーカーである CDX2 陽性の細胞系譜へと分化させることや、R-spondin 1 は腸管上皮細胞の増殖促進作用があることなどが知られているが、今回の結果からはこれらの影響を十分に確認することはできなかった。一方で、両プロトコールに共通して使用した FGF 及び EGF は分化の過程において重要な因子であることが考えられるため、今後は、これらの因子に加えてより効率的に分化を促進する因子の探索や、培養法の検討に加え、薬物代謝能や輸送能に関する機能解析を行っていく予定である。

E. 結論

以上の結果により、ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞あるいは小腸上皮細胞様細胞への分化が示唆された。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

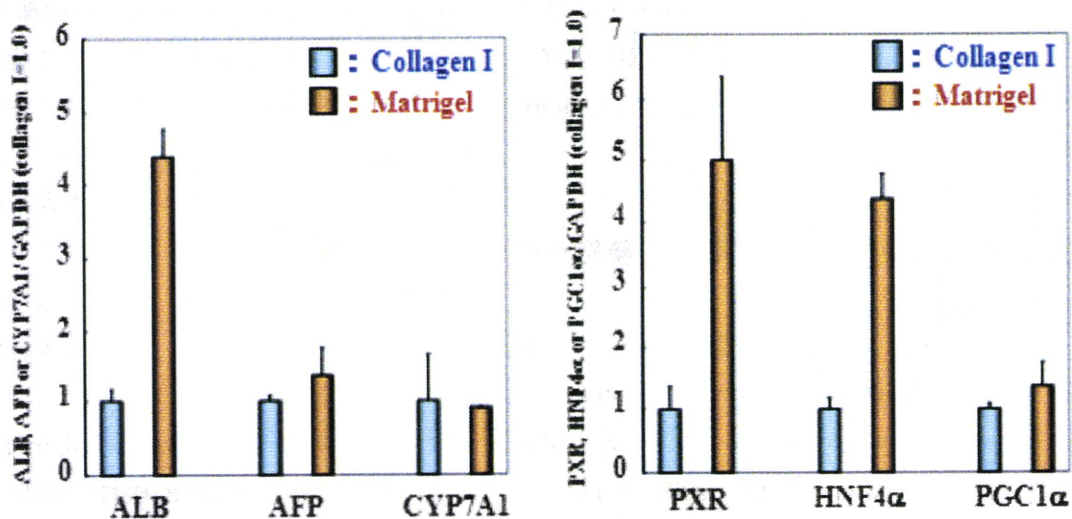


図 1 ヒト iPS 細胞より分化した細胞における肝細胞マーカー及び核内転写因子の mRNA 発現

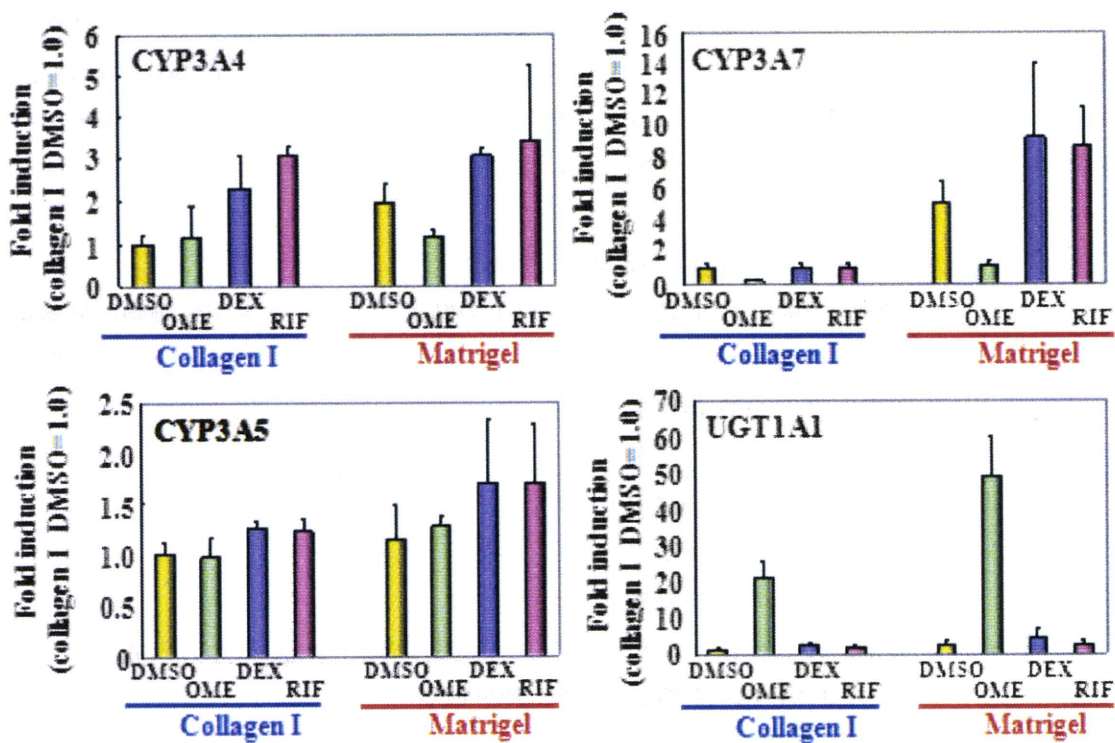


図 2 ヒト iPS 細胞より分化した細胞における CYP3As および UGT1A1 mRNA 発現

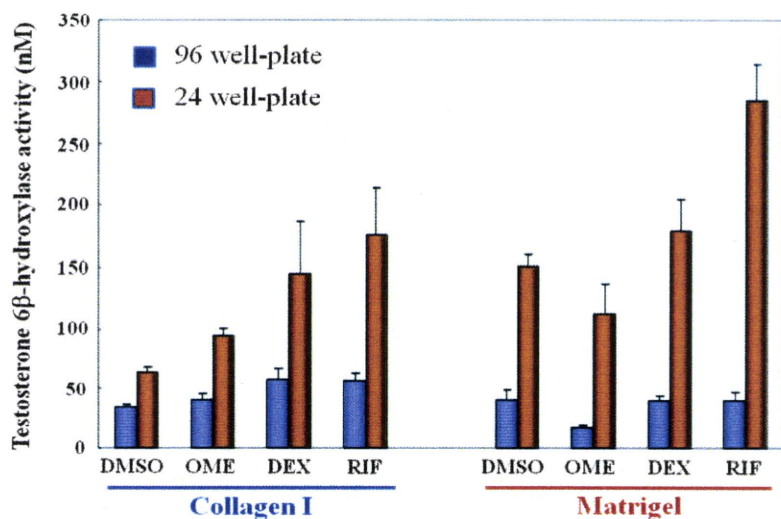


図 3 ヒト iPS 細胞より分化した細胞の testosterone 6β-水酸化活性

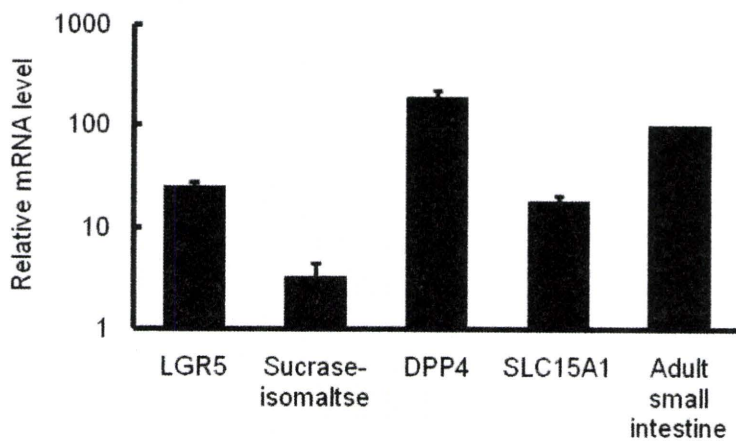


図 4 小腸幹細胞および上皮細胞マーカーの mRNA 発現解析 (プロトコール 1)

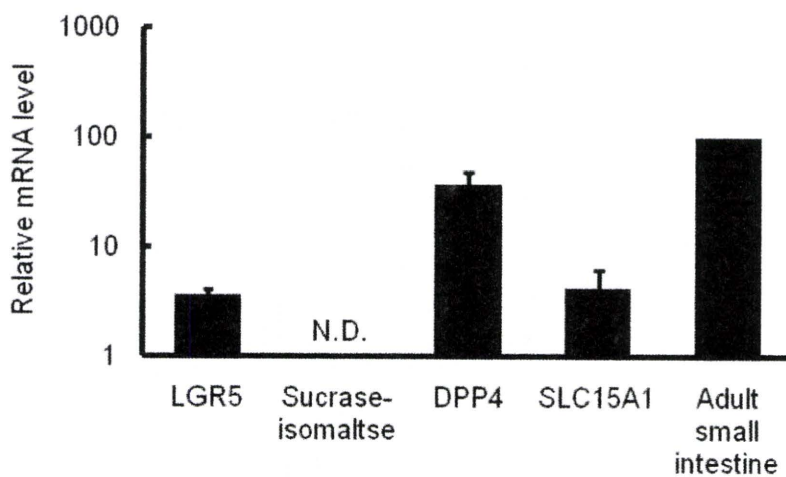


図 5 小腸幹細胞および上皮細胞マーカーの mRNA 発現解析 (プロトコール 2)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する
一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
佐々木崇光、永田清	チトクロムP-450を介した薬物代謝	奥山 茂、 斉藤亜紀 良、山田久陽	創薬研究のストラテジー	金芳堂	京都	187-193	2011
永田 清	薬物代謝酵素の個人変動の要因	吉原新一、 繪柳玲子	予防医学としての衛生化学-健康と環境-	広川書店	東京	241-251	2010
永田 清	酵素誘導	加藤隆一、 山添康、横井毅	薬物代謝学 第3版	化学同人	東京	127-139	2010
永田 清	医薬品の毒性に影響する要因	吉田武美、竹内幸一	医薬品安全性学 第2版	広川書店	東京	49-67	2010
細川正清	薬物の加水分解反応に関与する酵素系	加藤隆一、 山添康、横井毅	薬物代謝学 第3版	化学同人	東京	68-71	2010
細川正清	第I相反応に関与する酵素とその反応 g.カルボキシルエステラーゼ	鎌滝哲也、高橋和彦、山崎浩史	医療薬物代謝学	医学評論社	東京	50-53	2010
細川正清、斉藤浩司	代謝	岩城正宏、伊藤智夫	コンパス生物薬剤学	南江堂	東京	69-104	2010

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Sakaguchi S, Nagata K.	Progression of Alcoholic and Non-alcoholic Steatohepatitis: Common Metabolic Aspects of Innate Immune System and Oxidative Stress	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	226	30-46	2011
Matsuda T, Nagata K, Yamazoe Y	Tumor Necrosis Factor-Alpha-Nuclear Factor-Kappa B-Signaling Enhances St2b2 Expression during 12-O-Tetradecanoylphor bol-13-acetate-Induced Epidermal Hyperplasia	<i>Biol Pharm Bull</i>	34	183-190	2011
Saeki M, Tohkin M	Functional analysis of genetic variations in the 5' -flanking region of the human MDR1 gene	<i>Molecular Genetics and Metabolism</i>	102	91-98	2011
Sato W, Nagata K	Construction of a system that simultaneously evaluates CYP1A1 and CYP1A2 induction in a stable human-derived cell line using a dual reporter plasmid	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	25	180-189	2010
Suzuki H, Nagata K	Malondialdehyde-modifi ed low density lipoprotein (MDA-LDL)-induced cell growth was suppressed by polycyclic aromatic	<i>J Toxicol Sci</i>	35	137-147	2010

	hydrocarbons (PAHs)				
Kaniwa N, Tohkin M, Hasegawa R	JSAR research group. HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients	<i>Epilepsia</i>	51	2461-2465	2010
Tohkin M, Hasegawa R	Prediction of severe adverse drug reactions using pharmacogenetic biomarkers	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	25	122-133	2010
Maekawa K, Tohkin M, Saito Y	CYP3A4*16 and CYP3A4*18 alleles found in East Asians exhibit differential catalytic activities for seven CYP3A4 substrate drugs	<i>Drug Metab Dispos</i>	38	2100-2104	2010
Holmes RS, Hosokawa M, Maltais LJ	Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins	<i>Mamm Genome</i>	21	427-441	2010
Sai K, Hosokawa M, Okuda H	Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients	<i>Br J Clin Pharmacol</i>	70	222-233	2010
Hori T, Hosokawa M	DNA methylation and its involvement in carboxylesterase 1A1	<i>Xenobiotica</i>	40	119-128	2010

	(CES1A1) gene expression				
Satoh T, Hosokawa M	Carboxylesterases: Structure, Function and Polymorphism in Mammals	<i>J Pestic Sci</i>	35	218-228	2010
Imai T, Hosokawa M	Prodrug approach using carboxylesterases activity:Catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue	<i>J Pestic Sci</i>	35	229-239	2010
Hosokawa M	Are non-human primates useful experimental animals for pre-clinical study?	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	25	221-222	2010
Igarashi M, Hosokawa M, Ishibashi S	The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages	<i>Circulation Research</i>	107	1387-1395	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Review

Progression of Alcoholic and Non-alcoholic Steatohepatitis: Common Metabolic Aspects of Innate Immune System and Oxidative Stress

Shuhei SAKAGUCHI*, Shougo TAKAHASHI, Takamitsu SASAKI, Takeshi KUMAGAI and Kiyoshi NAGATA
Department of Environmental and Health Science, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan

Full text of this paper is available at <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/dmpk>

Summary: Growing evidence indicates that the innate immune system and oxidative stress caused by gut-derived endotoxins play a key role in alcoholic liver disease (ALD). Intracellular mechanisms associated with endotoxin-induced signaling play a crucial role in the initiation and progression of ALD. It is now widely accepted that activation of the innate immune system and increased release of pro-inflammatory cytokines and other mediators play an important role in the development of ALD. Accumulating evidence suggests that alcohol-mediated upregulation of CYP2E1 expression may initiate lipid peroxidation *via* reactive oxygen species. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a liver disease characterized by histopathological features similar to those observed in ALD, but in the absence of significant alcohol consumption. Initial efforts to clarify the mechanisms that promote the progression from steatosis to steatohepatitis somewhat artificially divided disease mechanisms into "first and second hits." This model considered the development of steatosis to be the "first hit," increasing the sensitivity of the liver to the putative "second hit," leading to hepatocyte injury, inflammation, and oxidative stress. We have emphasized the important role of gut-derived bacterial toxins, the innate immune system, and oxidative stress in the common pathogenic mechanism in ALD and NASH progression.

Keywords: alcoholic liver disease (ALD); non-alcoholic steatohepatitis (NASH); non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); gut-derived endotoxin; innate immune system; oxidative stress; CYP2E1

Introduction

Hepatic injury is induced under various stressful conditions including ischemia/reperfusion, hemorrhagic shock and resuscitation, hepatectomy, liver cirrhosis, endotoxemia, and chronic alcoholic consumption. Histology has showed that nearly 75% of hepatocytes in ethanol-fed mice exhibit steatosis. Although the mechanism responsible for hepatic injury differs for each type of stress, there are common factors such as the activation of inflammatory processes, overproduction of reactive oxygen species (ROS), and microcirculatory disturbances. Alcoholic hepatitis and other forms of alcoholic liver disease (ALD) are major complications of chronic excessive ethanol intake. Long-term excessive consumption of alcohol can result in a spectrum of liver abnormalities, ranging from simple fatty liver (steatosis) to scar tissue formation (fibrosis), the destruction of the normal liver structure (cirrhosis), and even liver cancer. Early on, alcohol-induced steatohepatitis is

characterized by the accumulation of fat molecules in liver tissue, accompanied by the migration into the liver of cells associated with inflammatory processes. It has become increasingly clear that alcohol alone is not solely responsible for the initiation and/or progression of ALD. In the United States, the number of ALD patients is estimated to exceed 2 million. Some patients with cirrhosis and alcoholic hepatitis have a 65% mortality rate over a four-year period, with most deaths occurring in the first few months.¹⁾ The pathogenesis of injury resulting from acute and chronic alcohol consumption is multi-factorial with diverse consequences in different cell types. Alcohol-induced injury occurs at multiple levels, ranging from innate immune cells to the liver parenchymal cells, *i.e.*, hepatocytes. Immune cells, including hepatic macrophages (Kupffer cells), play a pivotal role in early alcohol-induced liver injury *via* the recognition of endotoxin/lipopolysaccharide (LPS) in the portal circulation. Of the many factors that contribute to the pathogenesis of ALD, gut-derived endotoxin plays a central

Received; August 25, 2010, Accepted; November 8, 2010, J-STAGE Advance Published Date: December 7, 2010

*To whom correspondence should be addressed: Shuhei SAKAGUCHI, Department of Environmental and Health Science, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan. Tel. +81-22-727-0134, Fax. +81-22-275-2013, E-mail: shuhei@tohoku-pharm.ac.jp