

201131017A

平成23年度厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

いわゆる「健康食品」と医療品との併用に関わる
安全性評価に関する研究

平成23年度 研究総括報告書

主任研究者 永田 清

平成24年（2012）4月

平成23年度厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

いわゆる「健康食品」と医療品との併用に関わる
安全性評価に関する研究

平成23年度 研究総括報告書

主任研究者 永田 清

平成24年（2012）4月

目次

I.	総括研究報告	
	いわゆる「健康食品」と医薬品との併用に関わる安全性評価に関する研究	
	永田 清	1
II.	分担研究報告	
1.	いわゆる「健康食品」摂取による薬物相互作用：薬物酵素誘導の評価-1	
	永田 清	7
2.	いわゆる「健康食品」摂取による薬物相互作用：薬物酵素誘導の評価-2	
	細川 正清	12
3.	肝分化 iPS 細胞における肝特異的転写因子 HNF6 の薬物代謝酵素発現に対する影響	
	永田 清	15
4.	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	
	松永 民秀	21
5.	健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態アンケート調査-1	
	永田 清	27
6.	健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態アンケート調査-2	
	頭金 正博	35
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV.	研究成果の刊行物・別刷	45

I. 研究総括報告

総括研究報告書

研究課題： いわゆる「健康食品」と医薬品との併用に関わる安全性評価に関する研究

総括研究者：永 田 清 （東北薬科大学・教授）

研究要旨： いわゆる「健康食品」の使用実態について調査を行い、申請者らが構築した薬物代謝酵素活性阻害および酵素誘導評価法のプロトコールを基に、薬物相互作用の評価の実施およびヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を肝細胞あるいは小腸内皮細胞に分化させ、より正確な薬物相互作用評価法の構築を目指した。平成 23 年度は、1) 「健康食品」の使用状況および有害事象についての調査をまとめ、2) 薬物代謝酵素活性阻害を示す「健康食品」の探索、3) 薬物代謝酵素誘導を示す「健康食品」の探索、4) ヒト iPS 細胞の成熟肝および小腸細胞への分化、5) 新規樹立培養細胞株の酵素誘導評価についての研究を行った。

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
細川 正清 千葉科学大学薬学部・教授
頭金 正博 名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授

研究協力者

大森 栄 信州大学医学部附属病院薬剤部・教授/薬剤部長
百瀬 泰行 信州大学医学部附属病院薬剤部・副薬剤部長
鈴木 匡 名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授
榑原 明美 名古屋市立大学大学院薬学研究科・臨床教授
前田 徹 名古屋市立大学大学院薬学研究科・講師
岩尾 岳洋 名古屋市立大学大学院薬学研究科・助教
熊谷 健 東北薬科大学・講師
佐々木崇光 東北薬科大学・助教
高橋 昌悟 東北薬科大学・博士後期課程 2 年
近藤 祐樹 名古屋市立大学大学院薬学研究科・博士後期課程 1 年
佐藤 大介 名古屋市立大学大学院薬学研究科・博士後期課程 1 年

A. 研究目的

健康食品は副作用がないとの先入観から、毎日一定量、場合によっては過剰に摂取することがある。そのために、食事として取る食物中の化学物質よりも、常に多量の化学物質が体に取り込まれることになり、その結果、医薬品と相互作用を起こす可能性が高くなることが懸念される。一方、食品による医薬品との相互作用は、薬力学的に起こるものより薬物代謝酵素が関与するものの方が多く発生すると考えられている。しかしながら、

医薬品とその他の多くのいわゆる「健康食品」との薬物代謝酵素が関わる相互作用についての情報はほとんどない状態である。従って、これらの情報を医療の現場に提供することが強く求められている。

本研究の目的は、いわゆる「健康食品」の使用実態を調査した上で、申請者らが構築した薬物代謝酵素活性阻害及び酵素誘導評価法を用いて、薬物相互作用を同時に評価するところにある。また、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を肝細胞ある

いは小腸内皮細胞に分化させ、より正確な薬物相互作用評価法の構築を目指すことである。

B. 研究方法

「23年度」

1. 「健康食品」の使用状況および有害事象についての調査とまとめ（永田、頭金）

昨年は薬物代謝酵素活性阻害および薬物代謝酵素誘導を引き起こす健康食品の文献調査を行ったが、本年度は、これを基に全国の調剤薬局を対象とした健康食品の使用状況および有害事象のアンケートの実施と取りまとめを行った。

2. 「健康食品」による相互作用の測定（永田、細川）

昨年度までの文献調査および健康食品のアンケート調査によって作成された健康食品のリストを基に、水に直接溶かしたものおよびエタノール抽出物による薬物代謝酵素の活性阻害および誘導の検討を行った。

3. 抱合酵素およびトランスポーター誘導評価系の樹立（細川、永田）

UGT1A1とMDR1遺伝子のプロモーターおよび誘導に関与するエンハンサー領域のDNA断片をレポータープラスミドに挿入し、培養細胞の染色体に組み込むことにより安定的に誘導評価が可能な培養細胞株を作製する。また、小腸における薬物代謝酵素およびトランスポーター誘導の評価可能な培養細胞株の樹立を目指す。

4. 薬物代謝酵素活性を示すヒトiPS細胞分化肝細胞および小腸内皮細胞の樹立検討（松永、永田）

昨年度までにヒトiPS細胞から肝細胞および小腸内皮細胞の分化に成功したと報告したが、薬物代謝酵素活性は肝および小腸細胞の活性と比較すると低かった。本年度は高い薬物代謝酵素活性を示す肝細胞および小腸内皮細胞への分化を検討した。

C. 「進捗状況及び見込まれる研究結果（達成度）」について

本年度の主要な事業目標は、いわゆる「健康食品」の使用状況や副作用の種類についてのアンケート調査およびリスト作成、アンケート調査結果から抽出した候補健康食品による相互作用の確認、さらにより成熟したヒトiPS細胞の肝細胞および小腸内皮細胞への分化誘導である。また、いわゆる「健康食品」の使用及び有害事象発生の状況をより正確に把握するために、患者に対するアンケート調査を終え取りまとめた。これに加え、本年度から病院におけるカルテの後ろ向き調査を事業計画として新たに組み入れた。事業の進捗状況は良好に進行しており、良好な結果を得ている。

1. 「健康食品」の使用状況および有害事象についての調査とまとめ

全国の調剤薬局を対象にアンケート調査を行ったところ、アンケート送付調剤薬局の店舗回収率は37.3%で、1,034件のアンケートが回収された。アンケートを解析した結果、薬局来局者の60%は、医薬品と健康食品を併用しており、約300製品の健康食品の使用が確認された。これら製品の剤形は、錠剤が約半数を占め、次いでカプセル剤(19%)、粉剤(11%)、ドリンク剤(10%)の順であった。健康食品の服用による効果は、一定の効果を自覚している来局者が58%であるのに対し、効果不明あるいは効果なしと感じている来局者がそれぞれ29%及び7%であった。また、健康食品服用に起因した健康被害を経験した方は、3%であった。本研究から全国規模の健康食品使用実態が明らかとなり、今後の健康食品と医薬品相互作用解明を行う上で有益な情報が得られた。しかしながら、薬局来局者を対象とした調査においては、アンケート回答者本人の主観的意見のみであるため、健康食品と医薬品との相互作用を十分に抽出できていない可能性が考えられた。そこで、有害事象発生の状況をより正確に把握するために、薬剤師にも使用状況や副作用の種類などのアンケート

調査を開始した。来年度はこれに加え、現在病院におけるカルテ調査をもとに、生化学的検査値等の客観的なデータと共に健康食品と医薬品との相互作用調査を実施する準備を行っている。

2. 薬物代謝酵素の活性阻害および誘導に関する健康食品とその成分の探索

昨年度は、相互作用の測定法及び定量化についてのプロトコール及びハイスループット化した測定法を樹立したので、アンケート調査あるいは事前の文献調査から抽出した健康食品について、相互作用のスクリーニングを行った。

板藍根及びCYP3A4を誘導することが知られているセントジョーンズワートとイチヨウ葉エキスを用い、CYP3A4 レポーター活性を測定した結果、いずれも CYP3A4 を誘導した。また、市販のサプリメントについて酵素誘導を調べたところ、ピクノジェノールがCYP3A4 レポーター活性を上昇させることが明らかとなった。次に、板藍根の含有成分を用いて CYP3A4 誘導を検討した結果、インディルビンが用量依存的な CYP3A4 レポーター活性の上昇を示した。これらの結果から板藍根による CYP3A4 誘導にはインディルビンが関与することが明らかとなった。また、使用頻度の高い健康食品から薬物代謝酵素誘導を引き起こすかを検討しているが、ビタミン剤などの幾つかのものが CYP3A4 誘導を示すことを見いだしており、現在詳細な検討を行っている。

一方、酵素活性阻害については、セントジョーンズワートにより CYP3A4 が強く阻害することが明らかとなったが、現在までに検討した健康食品による代謝酵素の有意な阻害は見いだせていない。今年度は、さらにアンケート調査によって抽出された残りの健康食品についての検討を行う。

3. 抱合酵素およびトランスポーター誘導評価系の樹立

薬物代謝酵素 (CYP3A4) は肝臓のみならず小腸においても強く誘導されることが知られている。また、トランスポーターMDR1 は、肝臓よりむしろ

小腸にて強く誘導されることが知られている。そこで、CYP3A4 および MDR1 レポーター遺伝子を腸管由来細胞の染色体に組み込むことで、CYP3A4 および MDR1 の誘導評価を安定的に行うことが可能な細胞株の樹立に成功した (論文作成中)。現在この細胞株の誘導評価系を行っている。グルクロン酸抱合酵素 UGT1A1 遺伝子については、NCBI のデータベースからの遺伝子配列情報を基に PCR にて単離を何度か試みているが、まだ得られていない。データベースの情報に誤りがあるのではないかと考えている。

4. 薬物代謝酵素活性を示すヒト iPS 細胞分化肝細胞および小腸内皮細胞の樹立検討

昨年度は現在ヒト iPS 細胞から胎児肝様細胞への分化に成功したが、成熟肝が示す高い薬物代謝活性を得るまでには至っていない。今年度は、より成人の肝臓に近い機能を有する細胞への分化させるために、幾つかの肝特異的発現転写因子をアデノウイルスによって導入した。その結果、HNF-6 の導入により幾つかの薬物代謝酵素 mRNA 発現が強く上昇することが判明した。中でも CYP3A4 mRNA の発現量は成人肝の 1/10 まで達していた。しかし、成人の肝臓に近い機能を有する細胞への分化には至っていない (論文作成中)。現在、他の転写因子の導入を引き続き行うと共に、近年細胞の分化等に関わることが明らかとなっている microRNA を用いた分化誘導実験を行っている。一方、小腸の細胞 (腸管上皮細胞) に近い機能を有する細胞への分化については、培養液中に分化誘導が期待できる液性因子の添加により、腸管上皮細胞に非常に類似した性質を有する細胞分化に成功している (論文作成中)。CYP3A4 および CYP1A1/1A2 レポーター遺伝子を染色体に組み込みについては、クローン細胞の単離に至っておらず、引き続き検討中である。

D. 考察

アンケート調査は当初 1000 名を目標として始めた。初年度は回収率が 30%程度で約 400 名しか

回収できなかった。23年度は、幾つかのチェーン店に依頼してアンケート調査を行った。その結果1000名以上のアンケートが得られた。本調査において、健康食品を服用している来局者の多くは、健康食品の効果の有無には関わらず、日常的に健康食品を服用していることが明らかになり、また健康被害の経験者は3%存在していた。しかしながら、薬局来局者を対象とした調査においては、アンケート回答者本人の主観的意見のみであるため、健康食品と医薬品との相互作用を十分に抽出できていない可能性が考えられた。信州大学医学部附属病院においては、持参薬や日常的に摂取している健康補助食品の情報を電子カルテ上に記載し、さらに摂取している健康補助食品の効能や成分を薬剤師は調査している。そこで、信州大学医学部との共同研究として、入院患者の年齢、性別、原疾患名、持参した健康食品名及び持参あるいは処方された医薬品名、薬剤アレルギー・副作用に関する診療情報および血液・生化学検査値を総括的に解析し、健康食品による健康被害および相互作用の調査を平成24年度に行うこととした。

平成23年度は健康食品としてビタミン剤および市販のサプリメント中心に薬物代謝酵素誘導評価を行った。酵素誘導を調べた健康食品の中でも中国では一般に使用されている漢方薬である板藍根が強い酵素誘導を引き起こすことが確認され、含有成分についてさらに誘導評価を行ったところ、インディルビンがCYP3A4を強い誘導を引き起こすことが明らかとなった。インディルビンはヒトの尿中からも検出され、CYP1A1を強く誘導する内因性の誘導剤として報告されている。現在、板藍根がCYP1A1およびCYP1A2を誘導するか検討している。一方、サプリメントとして市販されているプエラミリフィリカ(DHC)、ピクノジェノール(DHC)およびビタミン剤をエタノールで抽出し、セントジョーンズワートを対照とし酵素誘導を調べた。その結果、ピクノジェノールとビタミン剤で誘導効果が見られた。平成24年度はピクノジェノールおよびビタミン剤中に

含まれている誘導成分について詳細に検討する予定である。薬物代謝酵素活性阻害については、現在までに幾つかの健康食品について検討したが、対照に用いた薬物ほどの有意な阻害は認められなかった。すでに報告のあるセントジョーンズワートは本研究において確立した系においても強い阻害が認められた。また、アンケート調査結果から抽出された残りの健康食品について、薬物代謝酵素の活性阻害および誘導の探索を行う。

MDR1(P糖タンパク質)は排出型のトランスポーターであり、薬物投与により小腸において誘導を受けるために多剤併用により薬物相互作用を引き起こすために問題となっている。同様に、CYP3A4についても小腸において誘導されることが知られているが、誘導を引き起こす薬物の構造相関性は明確になっていない。平成23年度は小腸での誘導評価を行うことが可能な新規培養細胞株の単離を試み成功した。平成24年度はこの培養細胞株を用いて健康食品のスクリーニングを行うと同時に誘導剤の構造相関性についても検討する。

HepG2細胞にHNF6を過剰発現させることにより、薬物代謝に関与する多くのCYPに対し、発現調節に寄与していることを初めて明らかとした。また、各種細胞を用いた検討から、HNF6は、CYPの発現に対し、ヒト成人肝細胞における寄与よりむしろ、肝細胞が成熟するに至る過程において発現調節に寄与している可能性が示唆された。一方、iPS細胞の肝分化誘導過程中に発現させることで、一部の薬物代謝酵素発現量を上昇させることが明らかとなった。しかしながら、胎児肝細胞及びヒト肝初代培養細胞の結果から、HNF6は肝細胞が成熟するに至る過程において薬物代謝酵素発現に寄与する可能性が高いが、本肝分化iPS細胞は、未だ成熟な肝細胞の分化に至っていないことが示唆された。また、低分子化合物Xを168時間添加すると、ヒトiPS細胞から肝細胞への分化を促進し、リファンピシンに対する応答性が肝細胞と類似していることが明らかとなった。一方、成熟腸管細胞への分化の検討については、腸管幹細胞

のマーカである LGR5 や腸管上皮に豊富に存在する sucrase-isomaltase、DPP4 に加え、薬物動態学的に重要な代謝酵素である CYP3A4 や、SLC15A1、SLC46A1 などのトランスポーター発現も認められた。さらに、腸管上皮細胞に特異的に存在する sucrase-isomaltase が発現する細胞においてペプチドトランスポーターの基質である

β -Ala-Lys-AMCA の取り込みも認められたことから、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞と類似した機能を有する細胞へ分化誘導することができたと考えられた。しかし、各マーカ遺伝子の発現レベルから、今回行った方法での分化誘導効率は十分ではなく、より効率的に、均一な腸管上皮様細胞を得ることが必要であると考えられる。さらに、薬物動態試験に応用するためには、より高いトランスポーターや代謝酵素の発現が望まれた。

E. 結論

薬局来局者を対象とした調査においては、3%ほどの有害事象の報告があったがアンケート回答者本人の主観的意見のみであるため、健康食品による有害事象を十分に抽出できていない可能性が考えられ、客観的に評価可能な手法が求められた。一方、健康食品の薬物相互作用スクリーニングから酵素誘導を示すものが幾つか見いだされた。iPS 細胞から薬物代謝酵素活性を示す肝細胞への分化を促進する条件を検討し、発現上昇は認められたが、まだ成熟肝あるいは小腸細胞と同等活性を示す細胞の分化には至らなかった。

F. 著書

1. Satoh T and Hosokawa M、Carboxylesterases: Overview、structure、function and polymorphism. Anticholinesterase Pesticides: Metabolism、Neurotoxicity、and Epidemiology (EDs、Satoh T and Gupta RC) 2011 A John Wiley & Sons、INC.、Hoboken、New Jersey、USA

2. 永田 清、化学物質の代謝・代謝的活性化、「考える衛生化学」、第4版 平山晃久編 広川書店

pp. 415-443 (2011)

G. 研究発表 (原著論文によるものに限る。)

(1) 国内 4件

1. 松永民秀: 薬物動態研究における実験材料及び評価系開発の最近の動向. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26、5-6 (2011).

2. 岩尾岳洋、松永民秀: ヒト ES および iPS 細胞から肝細胞様細胞および腸管組織への分化誘導. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26、7-14 (2011).

3. Kumagai T、Suzuki H、Sasaki T、Sakaguchi S、Miyairi S、Yamazoe Y、Nagata K. Polycyclic aromatic hydrocarbons activate CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27 (2)、200-206 (2012).

4. 岩尾岳洋、松永民秀: 薬物動態研究におけるヒト多能性幹細胞の活用. *薬剤学* 72、88-94 (2012).

(2) 海外 2件

1. Hori T、Jin L、Fujii A、Furihata T、Nagahara Y、Chiba K、Hosokawa K. Dexamethasone-mediated transcriptional regulation of rat carboxylesterase 2 gene. *Xenobiotica* 2012、1-10.

2. Tohkin M、Kaniwa N、Saito Y、Sugiyama E、Kurose K、Nishikawa J、Hasegawa R、Aihara M、Matsunaga K、Abe M、Furuya H、Takahashi Y、Ikeda H、Muramatsu M、Ueta M、Sotozono C、Kinoshita S、Ikezawa Z. A whole-genome association study of major determinants for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Pharmacogenomics J.* 2011 1-10.

H. 学会発表

1. 松永 民秀、近藤 祐樹、岩尾 岳洋、大森 栄：ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化と薬物代謝酵素の発現、日本法中毒学会第 30 年会、2011 年 6 月（長崎）
2. 近藤 祐樹、岩尾 岳洋、三森 佳代、吉橋 幸美、大森 栄、松永 民秀：ヒト人工多能性幹細胞からの肝細胞への効率的な分化方法の検討、第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会、2011 年 7 月（名古屋）
3. 菅原 亮輔、熊谷 健、三浦 真知、高橋 昌悟、佐々木崇光、坂口 修平、宮入 伸一、永田 清：板藍根による CYP3A4 活性誘導の検討、第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011 年 10 月（仙台）
4. 山田健太、佐々木崇光、高橋昌悟、松永民秀、永田 清：iPS 細胞を用いた肝分化誘導法の検討、第 50 回日本薬学会東北支部大会、2011 年 10 月（仙台）
5. Sasaki T、Tanaka Y、Takahashi S、Kumagai T、Sakaguchi S、Matsunaga T、Nagata K. Hapatocyte nuclear factor-6 enhances expression of CYP3A4 in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting、 November 2011（広島）.
6. Kumagai T、Sugawara R、Miura M、Sasaki T、Miyairi S、Nagata K. Indirubin、 a component of Ban-Lan-Gen、 activates CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. 26th JSSX Annual Meeting、 November 2011（広島）.
7. Iwao T、Nagata K、Matsunaga T. Differentiation into the enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting、 November 2011（広島）.
8. Kondo Y、Iwao T、Saito M、Niwa T、Kurose K、Nagata K、Matsunaga T. Effect of quercetin on differentiation into hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting、 November 2011（広島）.
9. 近藤 祐樹、杉山 留理、三森 佳代、吉橋 幸美、岩尾 岳洋、黒瀬 光一、松永 民秀：ヒト人工多能性幹細胞から肝細胞への分化に対する低分子化合物の効果、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月（横浜）.
10. 中村 克徳、近藤 祐樹、杉山 留理、相川 香織、松永 民秀、大森 栄：ヒト人工多能性幹細胞から分化させた肝細胞様細胞による薬物代謝酵素の酵素誘導評価、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月（札幌）.
11. 坂口 修平、三浦 彩佳、高橋 昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清：In vitro での酸化ストレスモデルとしての鉄存在下 actinomycin D による TNF- α 誘導肝細胞障害の構築と NO の影響、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月（札幌）.

Ⅱ. 研究分担報告

いわゆる「健康食品」摂取による薬物相互作用：薬物酵素誘導の評価-1

研究代表者 永田 清 東北薬科大学・教授

研究協力者 熊谷 健 東北薬科大学・講師

研究要旨：本研究では、現在市販されている健康食品や民間生薬と医薬品との相互作用の可能性を検討する目的から、中国で汎用され、日本においても流通している民間生薬である「板藍根」のヒトの肝臓や小腸における主要な CYP 分子腫であり薬物体内動態に深く関与していることが知られている CYP3A4 誘導活性について検討を行った。その結果、板藍根は用量依存的な CYP3A4 レポーター活性の上昇を示した。また板藍根成分中のインディルビンが CYP3A4 レポーター活性上昇並びに CYP3A4 mRNA 発現誘導を示した。さらにインディルビンによる CYP3A4 レポーター活性の上昇は、CYP3A4 の転写活性化に関与している核内受容体である pregnane X receptor (PXR) の発現量に相関して変化が認められた。これらの結果より、板藍根による CYP3A4 誘導は、板藍根成分中のインディルビンが PXR を介して誘導することが示唆された。

A. 研究目的

近年、健康志向の高まりに伴い健康食品やサプリメント（民間生薬）の使用が増加している。一方、これらの薬物代謝酵素に及ぼす影響には不明な点が多く、臨床の場において医薬品との相互作用を引き起こす可能性が指摘されている。この薬物相互作用は、薬物の吸収、分布、代謝、排泄などの過程でも起こるが、その発生頻度は薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) において最も高いことが知られている。CYP3A4 は、ヒトの肝臓や小腸における主要な CYP 分子腫であり、現在臨床で用いられている薬物の約 60% の代謝に関与している他、CYP3A4 は薬物や他の環境因子により酵素誘導を受けることが知られている。また CYP3A4 の転写活性化には、主に pregnane X receptor (PXR) と呼ばれる核内受容体を介することが知られている。

「板藍根」は中国では一般に使用されている漢方薬であり、日本においても入手可能であるが、副作用や他の医薬品との相互作用については不明である。そこで本研究では、多くの薬物代謝に関与している CYP3A4 に及ぼす板藍根の影響につ

いて検討を行った。

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、CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（3-1-20 細胞）を用いた。

アデノウイルス：本実験では、ヒト PXR 過剰発現にはヒト PXR 過剰発現アデノウイルス

(AdhPXR)、ヒト PXR ノックダウンにはヒト PXR-shRNA 発現アデノウイルスを用いた。また AdLacZ をコントロールアデノウイルスとして用いた。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼ活性測定は Luciferase Assay System（プロメガ）を用いて測定を行った。すなわち、3-1-20 細胞を 48-well プレートに播種し、10% FBS-DMEM 中、37℃、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、化合物含有培地に交換、さらに 48 時間培養を行った。培養後、細胞を PBS で洗浄し、passive lysis buffer (PLB) を添加して細胞を溶解した。溶解液を遠心（2,000 rpm、10 min、4℃）

後、上清 (20 μ l) を 96-well white plate に移し、各 well に luciferase assay reagent を加え Glomax⁹⁶ Microplate Luminometer (プロメガ) により測定を行った。測定値は細胞タンパク質量により補正し、結果は、薬物未処理群に対する薬物処理群の割合で示した。

ウイルス感染

3-1-20 細胞を 24-well プレートに播種し、10% FBS-DMEM 中、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、各濃度の multiplicity of infection (MOI) に調整したウイルス溶液を各 well に添加し、48 時間感染を行った。感染後、ウイルス含有培地を除き、薬物含有培地を加え 48 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。ウイルスの力価は、Karber の式を用いた 50%細胞変性終末点 (50% tissue culture infection dose、TCID₅₀) を計算する方法を用いた。

リアルタイム PCR

Total RNA の抽出は TRI REAGENT (Molecular Research Center) を用い、同社のプロトコールに従って行った。すなわち、HepG2 細胞を 24-well プレートに播種し、10% FBS-DMEM 中、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養後、化合物含有培地に交換、さらに 48 時間培養を行った。培養後、細胞を PBS で洗浄し、TRI REAGENT を各 well に加え、total RNA の抽出を行った。逆転写反応は total RNA 2 μ g を鋳型として M-MLV reverse transcriptase (プロメガ) を用いて行った。逆転写反応後の試料は、因子特異的プライマーと SYBR Premix EX Taq (Perfect Real Time、Takara) を用い、リアルタイム PCR を行った。反応後、比較 Ct 法により各因子の mRNA 発現量の評価を行った。

C. 研究結果および考察

板藍根による CYP3A4 転写活性化の検討

初めに板藍根と CYP3A4 を誘導することが知られているセントジョーンズワートとイチヨウ葉エキスを用い、CYP3A4 レポーター活性を測定し

た結果、板藍根において CYP3A4 レポーター活性の上昇が認められた (図 1A)。また各濃度の板藍根を用い CYP3A4 誘導を検討した結果、板藍根は用量依存的な CYP3A4 レポーター活性の上昇を示した。(図 1B)。これらの結果から板藍根が CYP3A4 を誘導することが示唆された。

板藍根成分の CYP3A4 誘導能の検討

板藍根にはインディルビン (IND)、インディオ (IDG)、イサチン (IST)、インディカン (IDC)、トリプタントリン (TPT)、 β -シトステロール (β -sit) などの成分が含まれていることが報告されている。そこで、板藍根成分中の CYP3A4 レポーター活性誘導に関与する因子について検討を行った。各 5 μ M の板藍根含有成分を用い CYP3A4 レポーター活性を測定した結果、CYP3A4 を誘導することが知られているリファンピシン (RIF) と同様に IND 処理群において明らかな CYP3A4 レポーター活性の上昇が認められた (図 2A)。また、HepG2 細胞における内因性の CYP3A4 mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR を用いて検討した。その結果、IND 処理により CYP3A4 mRNA 発現誘導が観察された (図 2B)。この結果より、板藍根による CYP3A4 誘導には板藍根成分中の IND の関与が示唆された。

IND の CYP3A4 誘導における PXR 関与の検討

IND による CYP3A4 誘導活性における PXR の関与についてアデノウイルスを用いたヒト PXR 過剰発現系、及び、shRNA 発現系を用いた PXR ノックダウン系を使って検討を行った。その結果、PXR 過剰発現系において、IND 処理群は RIF 処理群と同様に MOI 依存的な CYP3A4 レポーター活性の上昇が観察された (図 3A)。また、PXR ノックダウン系では、IND 処理群は RIF 処理群と同様に MOI 依存的な CYP3A4 レポーター活性の低下が観察された (図 3B)。これらの結果より、IND による CYP3A4 誘導には PXR を介した経路が関与していることが示唆された。

E. 結論

本研究の結果から、板藍根がCYP3A4を誘導し、その誘導に関与する因子として板藍根中のINDが示唆された。また、INDはPXRを介してCYP3A4を誘導することが強く示唆された。

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumagai T, Suzuki H, Sasaki T, Sakaguchi S, Miyairi S, Yamazoe Y, Nagata K. Polycyclic aromatic hydrocarbons activate CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 27 (2), 200-206 (2012).

2. 著書

該当なし

3. 学会発表

1. 菅原 亮輔、熊谷 健、三浦 真知、高橋 昌悟、佐々木崇光、坂口 修平、宮入 伸一、永田 清：板藍根によるCYP3A4活性誘導の検討、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月（仙台）

2. Kumagai T, Sugawara R, Miura M, Sasaki T, Miyairi S, Nagata K. Indirubin, a component of Ban-Lan-Gen, activates CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. 26th JSSX Annual Meeting, November 2011（広島）.

4. 坂口 修平、三浦 彩佳、高橋 昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清：In vitroでの酸化ストレスモデルとしての鉄存在下 actinomycin D によるTNF- α 誘導肝細胞障害の構築とNOの影響、日本薬学会第132年会、2012年3月（札幌）.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

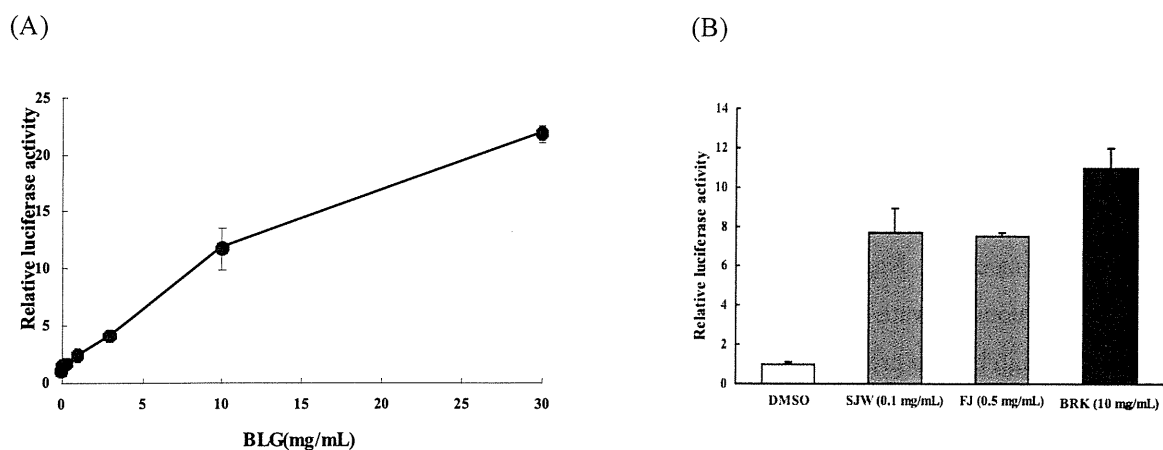


図1 CYP3A4 レポーター活性に及ぼす板藍根の影響。A：セントジョーンズワート (SJW)、イチョウ葉エキス (GBE)、板藍根 (BLG) における CYP3A4 レポーター活性の比較。B：板藍根の用量依存的な CYP3A4 レポーター活性の検討

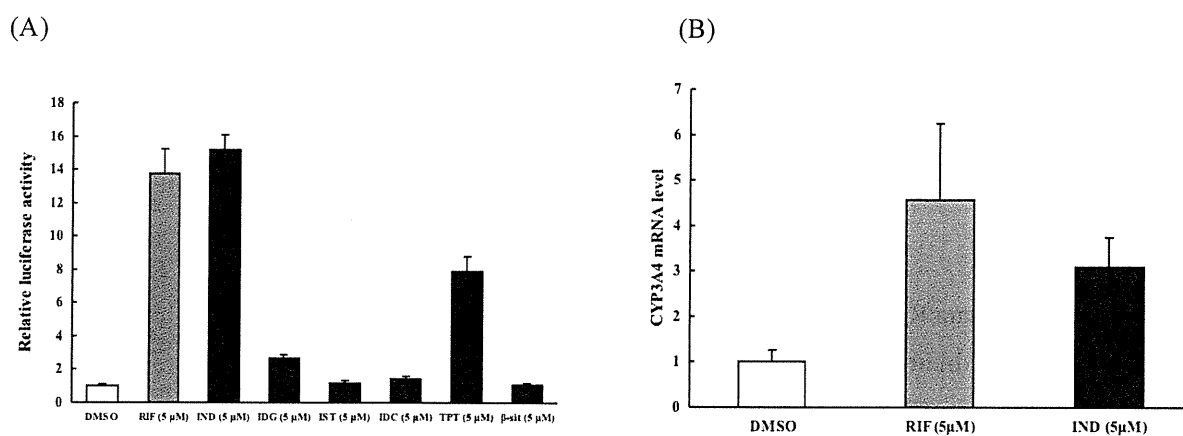
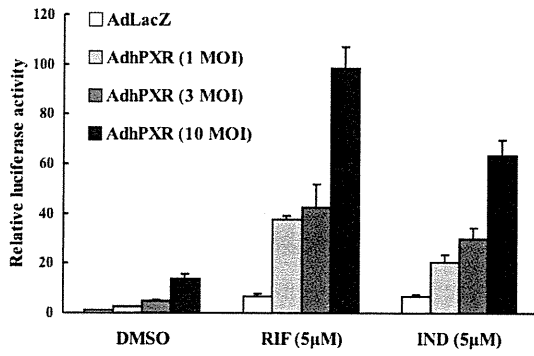


図2 板藍根成分の CYP3A4 誘導能の検討。A：代表的な板藍根成分であるインディルビン (IND)、インディゴ (IDG)、イサチン (IST)、インディカン (IDC)、トリプタントリン (TPT)、β-シトステロール (β-SIT) の CYP3A4 レポーター活性の比較。ポジティブコントロールとしてリファンピシン (RIF) を使用。B：内因性の CYP3A4 mRNA 発現に及ぼすインディルビンの影響

(A)



(B)

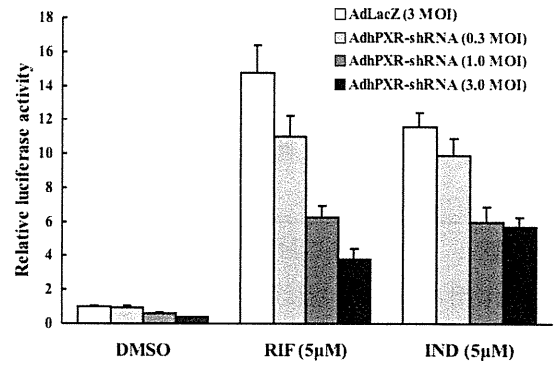


図3 インディルビンによる CYP3A4 誘導における PXR の関与の検討。A:アデノウイルスを用いた PXR 過剰発現系でのインディルビンによる CYP3A4 レポーター活性への影響。B:アデノウイルスを用いた PXR ノックダウン系でのインディルビンによる CYP3A4 レポーター活性への影響。

いわゆる「健康食品」摂取による薬物相互作用：薬物酵素誘導の評価-2

研究分担者 細川 正清 千葉科学大学薬学部・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、昨年度に引き続き標準的なプロトコールの作成を目的として検討を行うと共に、市販のサプリメントを用いて、酵素誘導を調べた。その結果、3-1-10 細胞および 5-1 細胞を用いた場合の薬物の曝露時間は 48 時間が適切であり、サプリメントからの抽出方法に関しては、エタノールが最適であることが示された。これらの条件を用いて市販のサプリメントについて酵素誘導を調べたところ、3-1-10 細胞に対してピクノジェノールが酵素誘導を示した。

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うとともに、市販のサプリメントを用いて酵素誘導の有無を調べた。

B. 研究方法

細胞：本実験に用いた細胞は、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（3-1-10 細胞）および、CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞株）を用いた。

ルシフェラーゼアッセイ（1）

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 1×10^5 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% CO₂ 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ことで、誘導剤の曝露を開始した。薬物曝露 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×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、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 × g、2 分間延伸を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。上清 20 μL に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25 μL を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turter designs, Sunnyvale, CA, USA) により測定した。

ルシフェラーゼアッセイ（2）

CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 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。
5-1 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% CO₂ 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ことで、誘導剤の曝露を開始した。薬物曝露 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×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、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 × g、2 分間延伸を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。上清 20 μL に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25 μL 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 μ L、A 試薬 25 μ L、B 試薬 200 μ 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

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株

3-1-10 細胞を用いた酵素誘導の検討

昨年度に引き続き、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、酵素誘導に関する検討を行った。リファンピシンの曝露時間について検討したところ、48 時間では、酵素誘導倍率が最も高かったため、この実験においては、曝露時間を 48 時間とした。

リファンピシンを 1 から 5 μ M の濃度で暴露した結果、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、濃度依存的な酵素誘導が認められた。また、市販のセントジョーンズワート (DHC) を用いて、抽出方法の検討を行ったところ、エタノールを用いた場合が、抽出が高いことが示され、以後の実験ではエタノールを用いて抽出を行った。

CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株 5-1 細胞株を用いた酵素誘導の検討

1) で用いた 3-1-10 細胞は、CYP3A4 レポーター遺伝子安定細胞株であるが、ここでは CYP1A2 の酵素誘導を調べる方法を確立するために、CYP1A2 レポーター遺伝子安定細胞株である 5-1 細胞を用いて酵素誘導に関する検討を行った。ここでは標準的な酵素誘導剤として、オメプラゾール

を用いた。3-1-10 細胞と同様に曝露時間を検討したところ、48 時間が最適であることが示された (Data not shown)。また、オメプラゾールを 30 μ M および 100 μ M の濃度で暴露した結果、濃度依存的に誘導が認められた (図 1)。さらに、セントジョーンズワートの CYP1A2 誘導成分であるヒペリシンを用いて検討したところ、125 μ M の濃度の曝露で酵素誘導が認められた (図 2)。さらに、市販のセントジョーンズワート (DHC) を用いて、抽出方法の検討を行ったところ、3-1-10 細胞同様にエタノールを用いた場合が、抽出が高いことが示された (図 2)。

市販のサプリメントを用いた酵素誘導の検討 (3-1-10 細胞)

プエラミリフィリカ (DHC)、ピクノジェノール (DHC) をエタノールで抽出し、セントジョーンズワートと同様な方法で酵素誘導を調べた。その結果、ピクノジェノールでは誘導効果が見られたので、来年度はピクノジェノールの誘導成分であるプロシアジニンについて詳細に検討する必要がある (図 3)。

D. 結論

今回の検討により、CYP3A4 の誘導評価系である 3-1-10 細胞を用いた場合は、被検物質曝露時間は 48 時間で、抽出にはエタノールが最適であることが示された。実際に、この条件で市販のサプリメントについて、検討したところピクノジェノールで酵素誘導が示された。また、CYP1A2 の誘導評価系である 5-1 細胞を用いた場合も被検物質曝露時間は 48 時間で、抽出にはエタノールが最適であることが示された。これらの結果により評価の方法が確立されたため、来年度は、市販のサプリメントについて、スクリーニングを行う予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Hori T, Jin L, Fujii A, Furihata T, Nagahara

Y、 Chiba K、 Hosokawa K.

Dexamethasone-mediated transcriptional regulation of rat carboxylesterase 2 gene. *Xenobiotica* in press

2. 著書

1. Satoh T and Hosokawa M. Carboxylesterases: Overview、 structure、 function and polymorphism. Anticholinesterase Pesticides: Metabolism、 Neurotoxicity、 and Epidemiology (EDs、 Satoh T and Gupta RC) 2011 A John Wiley & Sons、 INC.、 Hoboken、 New Jersey、 USA

3. 学会発表

該当なし

F. 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

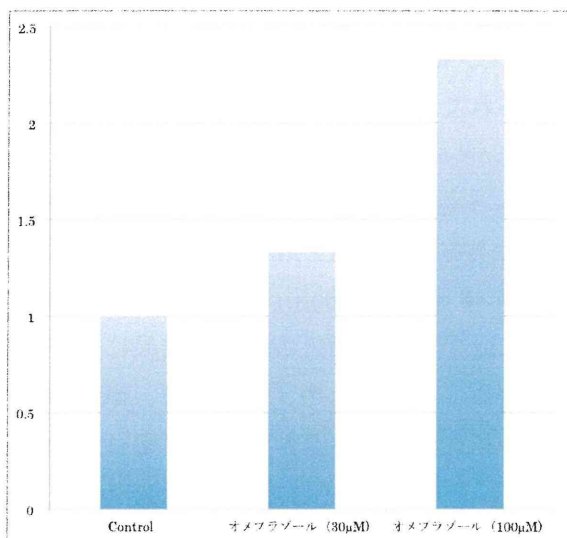


図 1 CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 5-1 細胞を用いたオメプラゾールに対する酵素誘導

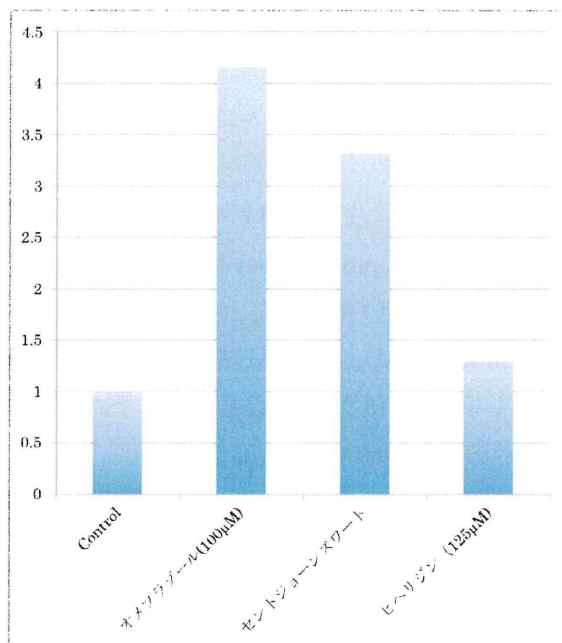


図 2 CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 5-1 細胞を用いたオメプラゾール、セントジョーンズワートおよびヒペリジンに対する酵素誘導

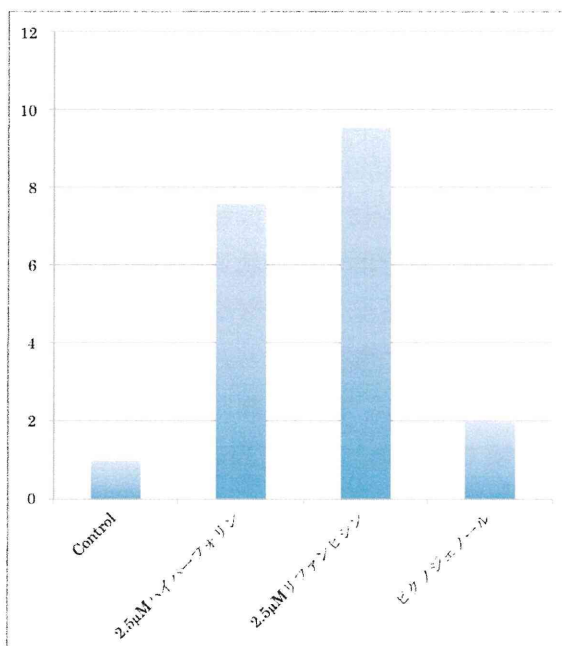


図 3 CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いたピクノジェノールに対する酵素誘導

肝分化 iPS 細胞における肝特異的転写因子 HNF6 の薬物代謝酵素発現に対する影響

研究代表者 永田 清 東北薬科大学 薬学部 教授

研究協力者 佐々木崇光 東北薬科大学 薬学部 助教

研究要旨： 医薬品相互作用等の薬物動態研究は、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が樹立されたことから、ヒト型薬物動態機能を十分に反映した新規ヒト肝臓モデル細胞による発展が期待されている。本研究は、昨年度に同定した iPS 細胞の肝分化誘導におけるキー遺伝子（肝特異的転写因子 HNF6）の影響を検討した。iPS 細胞の肝分化誘導過程中に HNF6 をアデノウイルスを用いて導入し、薬物代謝酵素発現量の変化を測定した結果、多くの CYP 分子種で発現量の増大が認められた。特に CYP3A4 は、HNF6 発現アデノウイルス非感染肝分化 iPS 細胞と比較して、約 1400 倍もの発現量の増大が認められた。本研究は、HNF6 が iPS 細胞の肝分化誘導に重要であることを証明し、さらに初めて CYP3A4 等の薬物代謝酵素の発現に関与することも明らかにした。

A. 研究目的

現在までに我々は、ヒト iPS 細胞から肝細胞に分化誘導した肝分化 iPS 細胞を用い、薬物代謝酵素誘導について検討を行ってきた。その結果、AhR を介した薬物代謝酵素誘導機構が十分に機能していることを明らかにした。しかしながら、本肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現量は、未だヒト肝初代培養細胞と比較して著しく低い状況にある。しかし、本研究課題において、iPS 細胞の肝分化誘導におけるキー遺伝子「肝特異的転写因子 HNF6」の同定に成功した。肝特異的転写因子 (LETF) は、肝細胞の発生から成人肝細胞の機能維持に至る過程において非常に重要な役割を果たしており、中でも HNF6 は、HNF1 α 、HNF3 β 、HNF4 α と共に、他の LETF や肝機能に重要な酵素群の発現調節に関与する key regulator に位置づけられている。しかしながら、HNF6 は薬物代謝酵素発現調節への関与はもとより、iPS 細胞の肝分化誘導へ寄与に関する知見は報告されていない。そこで、本研究においては、HNF6 に着目し、iPS 細胞の効率的肝分化誘導法の確立と共に薬物代謝酵素発現調節への寄与について検討を行った。

B. 研究方法

HepG2 細胞、ヒト胎児肝細胞 (HFL 細胞)、ヒト肝初代培養細胞を用いた HNF6 の薬物代謝酵素発現誘導の測定

HepG2 細胞を 1.0×10^5 cells/well (24-well) で播種し、24 時間後に HNF6 発現アデノウイルスを感染させた。HFL 細胞及びヒト肝初代培養細胞については、それぞれ 5.0×10^4 cells/well 及び 1.0×10^5 cells/well (コラーゲンコート 24-well) で播種した。72 時間後、細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出を行った。次に、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR 法により薬物代謝酵素発現量の変化を測定した。

肝分化 iPS 細胞を用いた HNF6 の薬物代謝酵素発現誘導の測定

ヒト iPS 細胞 (10 cm ディッシュ 1 枚) を既に確立した肝分化プロトコール (松永分担報告書参照、図 1) (18、22、25 日間培養、24-well plate 使用) に従い、肝分化 iPS 細胞を作製した。この肝分化誘導過程中的 day 15、day 19、day 22 に HNF6 発現アデノウイルスを感染させ、72 時間後に細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出