

表6 日米韓でのピオグリタゾンの1日平均処方量（再診時）

Japan	Korea	USA
21.18 (n=21,750,429)	15.00 (n=266,295)	30.58 (n=1,342,005)

(単位 mg/day)

日米韓でのピオグリタゾンの承認用量

	Japan	Korea	USA
Maximum		With insulin	
	45	30	45
Maintenance	15~30	15	
starting		15	15
strengths	15,30	15,30	15,30,45

(単位 mg/day)

表7 日米韓でのシタグリプチンの1日平均処方量（再診時）

Japan	Korea	USA
52.52 (n=24,744,465)	97.48 (n=329,393)	88.40 (n=867,657)

(単位 mg/day)

日米韓でのシタグリプチンの承認用量

	Japan	Korea	USA
Maximum	100	100	100
Maintenance	50	100	100
starting			
strengths	25,50,100	25,50,100	25,50,100

(単位 mg/day)

図1 米国内での各人種における抗凝固薬の1日平均処方量 (単位 mg/day)

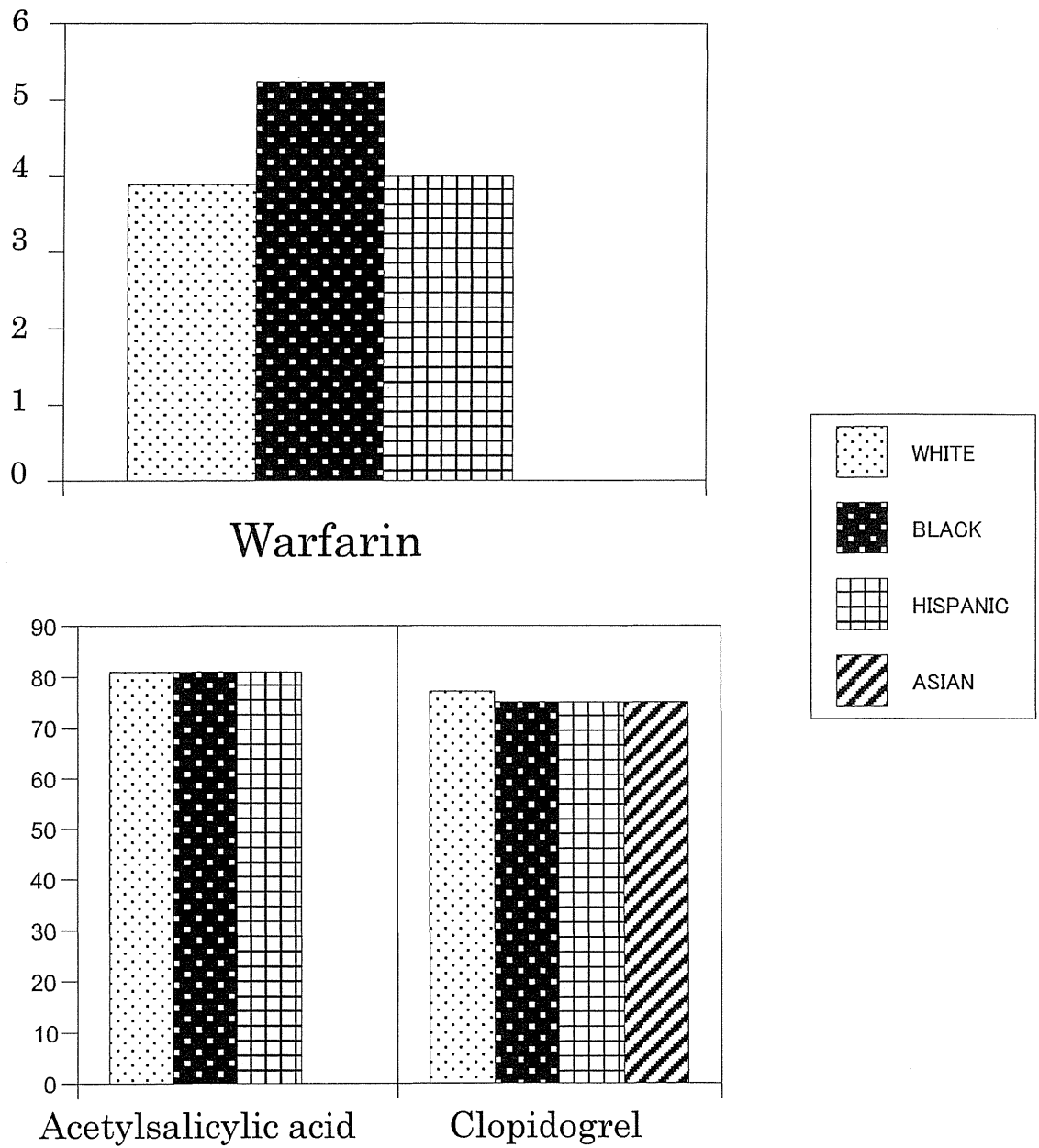
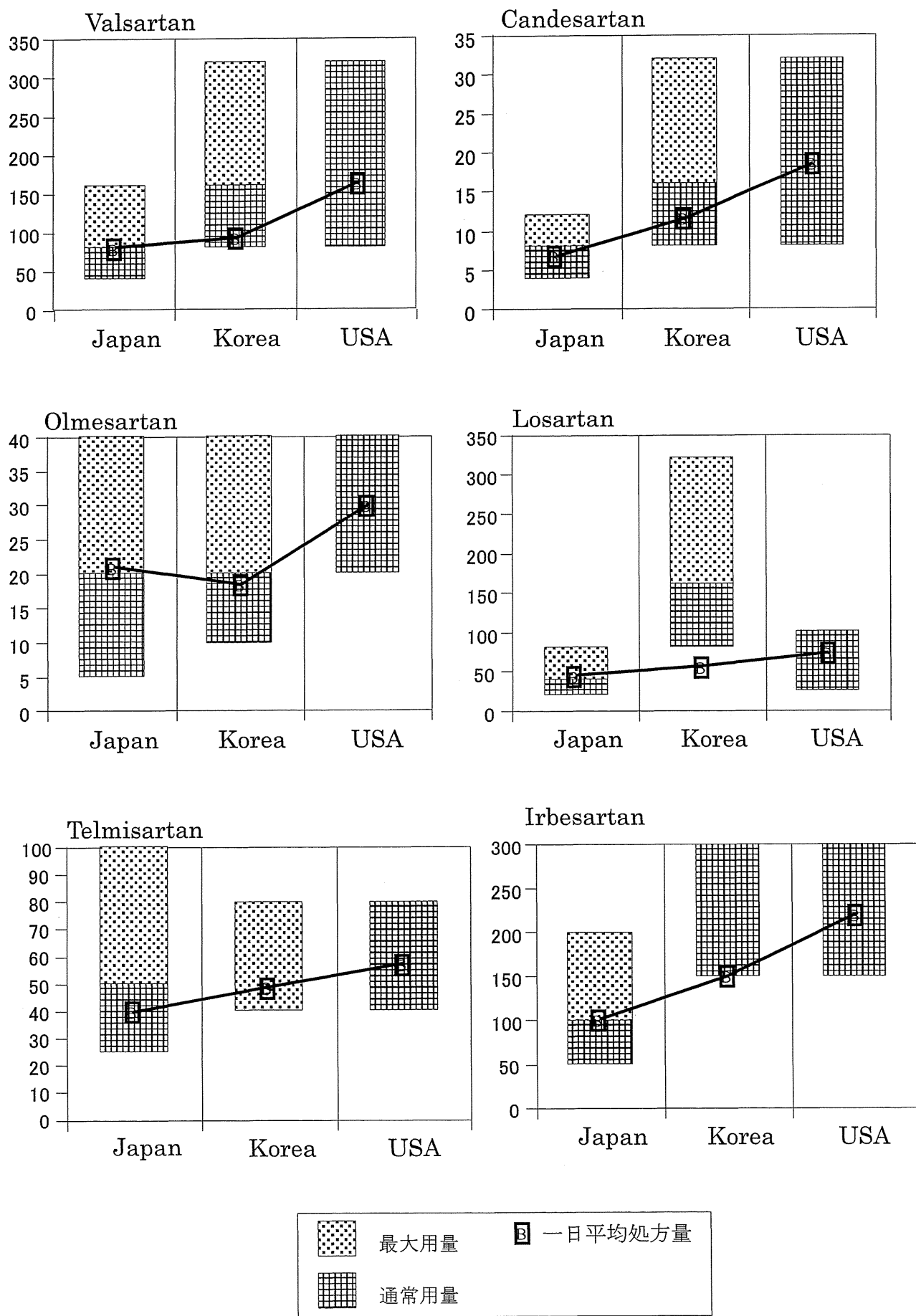


図2 日米韓でのARB及びカルシウム拮抗薬の承認用量と一日平均処方量(単位 mg/day)



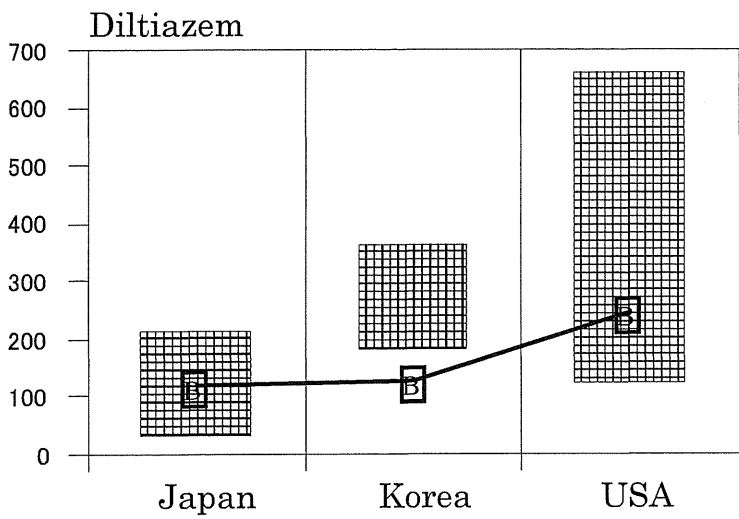
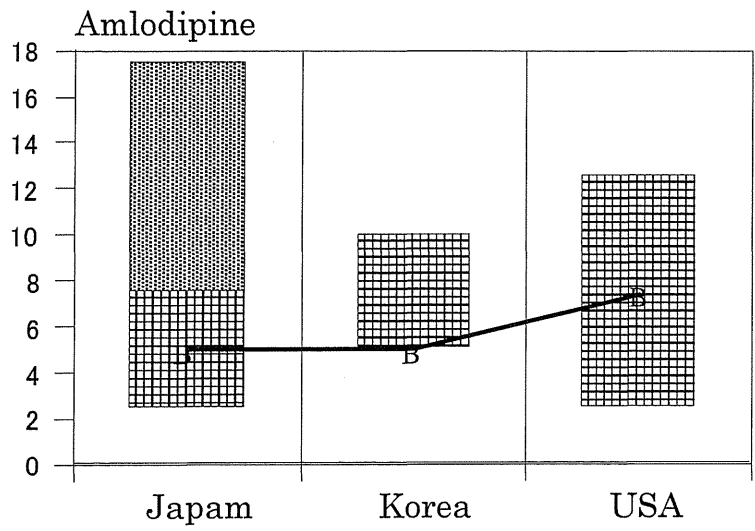


図3 米国内での各人種におけるARBの1日平均処方量 (単位 mg/day)

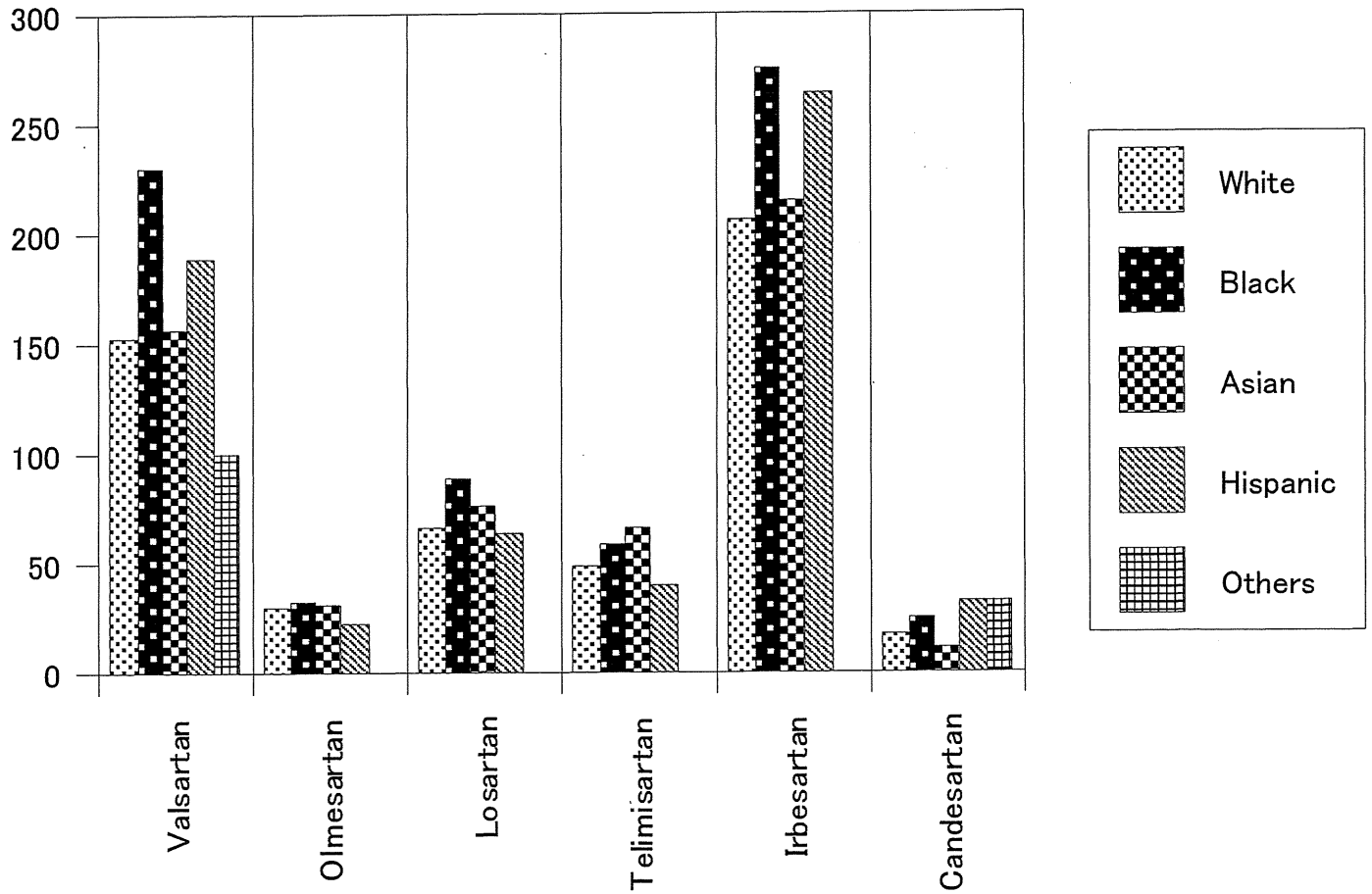


図4 米国内での各人種におけるカルシウム拮抗薬の1日平均処方量 (単位 mg/day)

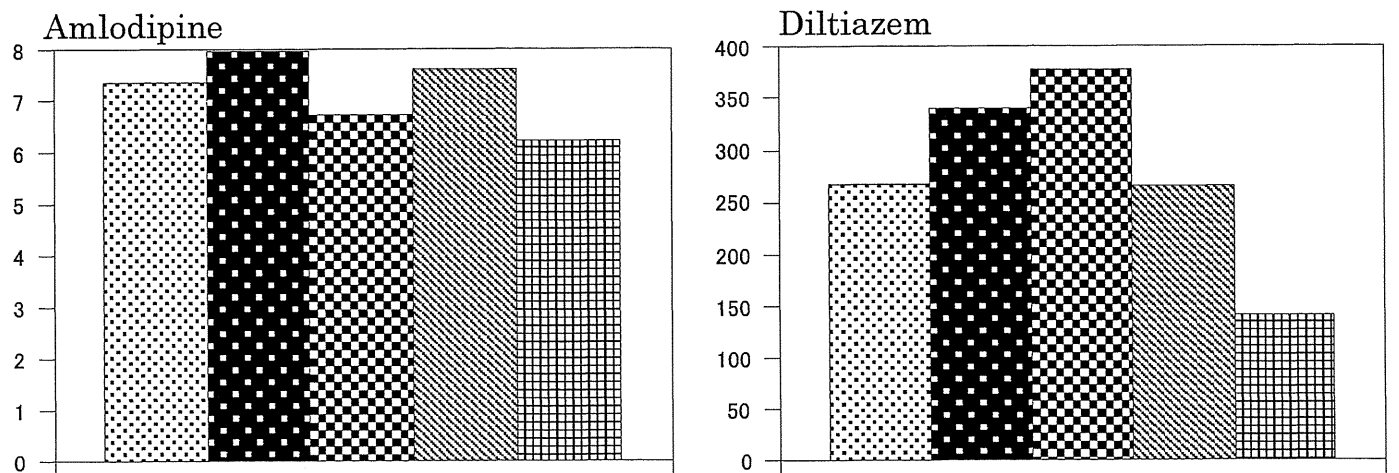
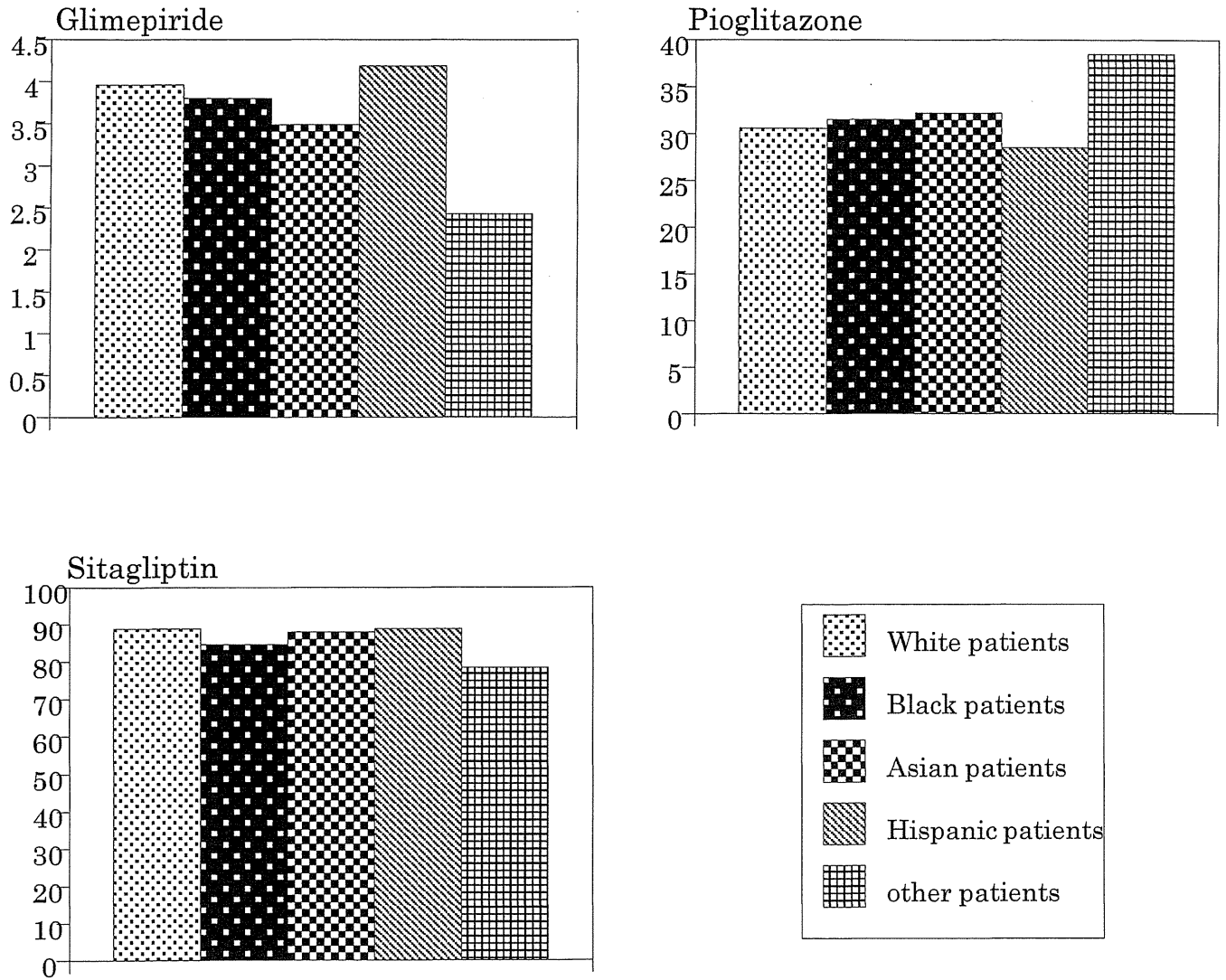


図5 米国内での各人種における抗糖尿病薬の1日平均処方量（単位 mg/day）



多地域臨床試験における地域一貫性指標に関する統計的考察

研究分担者 竹内 正弘 北里大学薬学部 教授
研究協力者 高橋 史朗 北里大学薬学部 講師
研究協力者 吉田 顕臣 北里大学大学院薬学研究科

研究要旨：

国際共同試験では地域を併合した薬効に主たる興味があるが、民族的要因による薬効の違いに関しても詳細な吟味を必要とする。興味のある地域の薬効を評価するために、他の地域のデータを利用する経験ベイズ法は有用な手法であると考えられた。特に事前分布の妥当性を検討する指標は、多地域における薬効の一貫性または一様性を評価する指標として有用な場合があることがモンテカルロシミュレーションより示唆された。

A. 研究目的：

医薬品開発の国際化に伴い、同一のプロトコールに従った国際共同試験が数多く実施されるようになった。国際共同試験における主たる目的は、全地域を併合した全症例での薬効の違いを検出することである。全地域での薬効差が検出された際には、その結果が各地域に適応可能であるかを判断することが重要な問題となる。なぜならば、人種や遺伝的要因などの内的要因と医療設備や社会環境などの外的要因により地域間で薬効が若干変動することがあるからである。

2007 年厚生労働省は「国際共同治験に関する基本的考え方」の Q&A おいて、興味のある地域の結果とそれ以外の地域の結果の一貫性を示す方法として二つの方法を例示した。方法 1 は、興味のある地域を日本とした場合、その薬効差を θ_{Japan} 、全地域を併合した薬効差を θ_{All} と表すと、 $\theta_{Japan}/\theta_{All} > \pi$ （所与の値）が成立することを示す方法である。方法 2 は、地域 i の薬効差を θ_i とすると、全ての地域 i で $\theta_i > 0$ が成立することを示す方法である。これらの一貫性指標に基づき各地域の症例数を算出する方法が近年数多く提案され、試験の実施可能な範囲でいずれかの一貫性指標を満たすように計画された国際共同試験が数多く実施されてきた。

2010 年 Hung ら (Pharm. Stat. 2010;9:173-178) は、地域を併合した際に有意差が検出される状況において、一貫性が示せない確率を理論的に導出した。これによると、四つの地域での症例数が等しく、地域を併合した際の薬効差の検定の p 値が

5%の状況において、いずれか一つの地域で薬効が反転する確率は 38%、二つの地域で薬効が反転する確率は 11%と算出され、約 50%の確率で一貫性が示せないことを指摘した。さらに、実際の国際共同試験では 4 地域の症例数が同数になることは稀であり、症例数の少ない地域が増えるにつれて一貫性を示すことが難しくなることも指摘している。このように厚生労働省が例示した 2 つの方法は、単に点推定値のみを用いた評価方法であり、その推定値の不確実性を考慮していないため、治療効果の地域一貫性の指標として十分な性能がないのではないかといった疑問が生じた。

そこで本研究では、これらの問題を克服する方法として宇野（北里ハーバードシンポジウム）や河内（北里大学大学院薬学研究科博士論文）によって提案された経験ベイズ法に基づく方法に着目した。より詳細には、Efron (JASA 1996; 91:538-550) によって提案された経験ベイズ法に基づく事前分布の妥当性を評価する指標に基づき、治療効果の類似度を評価する方法である。この方法に若干の修正を加え、質的交互作用を検出する方法を本研究で新たに提案する。提案方法の特性を評価するために、一貫性証明確率を指標として、提案指標、厚生労働省が例示した二つの方法、そして既存の一貫性/一様性指標をモンテカルロシミュレーションを通して比較することを目的とする。

B. 研究方法：

地域 i ($i = 1, \dots, K$) において、対照群の第 j 番目の症例の治療効果を X_{iCj} 、治療群の第 j 番目の症

例の治療効果を X_{ij} で表すとする。治療効果 X_{iC} および X_{iT} は、それぞれ独立に同一の正規分布 $N(\mu_{iC}, \sigma^2)$ および $N(\mu_{iT}, \sigma^2)$ に従うとする。地域 i の薬効差を $\theta_i = \mu_{iT} - \mu_{iC}$ と表記する。さらに、興味のある地域を $i=1$ としたとき、興味のある地域以外の未観測母数 $\theta_i (i=2, \dots, K)$ は、独立に同一の事前分布 $N(M, A)$ に従うと仮定する。一方、興味のある地域 1 の未観測母数 θ_1 の事前分布としては、確率 h_a で興味のある地域と他の地域が類似している集団と考えられる状況を表現する事前分布 g_a と確率 $h_b (=1-h_a)$ で興味のある地域と他の地域の薬効が大きくばらつき、類似しているとはうかがえない状況を表す無情報事前分布 g_b の混合分布を想定する。ここでは、 g_a は他の地域と同じ $N(M, A)$ を想定し、 g_b としては $N(M, \infty)$ とする。

以上の設定のもと、地域 2 から地域 K の情報を利用した経験ベイズ法を用いて、興味のある地域が類似した他の地域と同じ事前分布から抽出されたのか、それとも類似しているとは考えづらい状況から抽出されたのかをベイズファクターを用いて評価する。より詳細には、まず第 1 に、興味のある地域以外の観測データ $\hat{\theta}_i (i=2, \dots, K)$ に基づいて事前分布の未知母数 M と A を推定する。 $\hat{\theta}_i (i=2, \dots, K)$ と $\theta_i (i=2, \dots, K)$ の同時分布から未観測母数 $\theta_i (i=2, \dots, K)$ を積分することにより周辺標本分布

$$f = \prod_{i=2}^K \frac{1}{\sqrt{2\pi(A+\sigma_i^2)}} \exp\left(-\frac{(\hat{\theta}_i - M)^2}{2(A+\sigma_i^2)}\right)$$

が得られ、これを最大化することにより推定値

$$\hat{M} = \sum_{i=2}^K W_i \hat{\theta}_i / \sum_{i=2}^K W_i$$

$$W_i = 1 / (\hat{A} + \hat{\sigma}_i^2)$$

$$\hat{A} = \max\left(0, \frac{\sum_{i=2}^K w_{i0} (\hat{\theta}_i - \hat{\theta}_{w0})^2 - (K-1)}{\sum_{i=2}^K w_{i0} - \sum_{i=2}^K w_{i0}^2 / \sum_{i=2}^K w_{i0}}\right)$$

$$\hat{\sigma}_i^2 = (1/n_{iC} + 1/n_{iT}) \hat{\sigma}^2$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{\sum_{i=2}^K \sum_{g=(C,T)} \sum_{j=1}^{n_{ig}} (X_{ij} - \bar{X}_{ig})^2}{\sum_{i=2}^K \sum_{g=(C,T)} (n_{ig} - 1)}$$

$$\theta_{w0} = \sum_{i=2}^K W_{i0} \hat{\theta}_i / \sum_{i=2}^K W_{i0}$$

$$W_{i0} = 1 / \hat{\sigma}_i^2$$

を得る。第 2 に、その推定量に基づき興味ある地域の未知母数 θ_1 の事前分布を更新する。すなわち、

θ_1 の事前分布は $N(\hat{M}, \hat{A})$ となる。なお、類似性が疑われる無情報事前分布の場合には $\hat{A} = \infty$ となる。そして、興味ある地域で実際に観測された $\hat{\theta}_1$ を与えたもとの θ_1 の事後分布に基づいて推測を行う。実際には、一様な事前分布を選択した際の事後確率は、

θ_1 の事前分布は $N(\hat{M}, \hat{A})$ となる。なお、類似性が疑われる無情報事前分布の場合には $\hat{A} = \infty$ となる。そして、興味ある地域で実際に観測された $\hat{\theta}_1$ を与えたもとの θ_1 の事後分布に基づいて推測を行う。実際には、一様な事前分布を選択した際の事後確率は、

一様でない事前分布を選択した際の事後確率は、

$$h_a(\hat{\theta}_1) = h_a d_a(\hat{\theta}_1) / d(\hat{\theta}_1)$$

一様でない事前分布を選択した際の事後確率は、

$$h_b(\hat{\theta}_1) = h_b d_b(\hat{\theta}_1) / d(\hat{\theta}_1)$$

となる。ただし、 $d_a(\hat{\theta}_1) = \int g_a(\theta_1) f_{\theta_1}(\hat{\theta}_1) d\theta_1$,

$$d_b(\hat{\theta}_1) = \int g_b(\theta_1) f_{\theta_1}(\hat{\theta}_1) d\theta_1, \text{ そして}$$

$d(\hat{\theta}_1) = h_a d_a(\hat{\theta}_1) + h_b d_b(\hat{\theta}_1)$ である。ベイズファクターは、これらの事後確率の比

$$BF_{ab}(\hat{\theta}_1) = h_a(\hat{\theta}_1) / h_b(\hat{\theta}_1)$$

と定義される。本研究では質的な相互作用を取り扱うため、

$$BF_{ab} = \min\{BF_{ab}(\hat{\theta}_i), i=1, \dots, K\}$$

を一様性の統計量とすることを提案する。

Jeffreys(Theory of Probability. Oxford, 1961) は、ベイズファクターが 10 より大きいときは分子の状況、すなわち事前分布が g_a である強い根拠があるといった解釈を与えている。また、Kass & Raftery (JASA 1995; 90: 773-795) では 3 より大きいならば事前分布が g_a である根拠があるといった解釈を与えている。そこで本研究では BF_{ab} が 3 より大きい場合、および 10 より大きい場合について検討する。

提案法の特性をモンテカルロ・シミュレーションによって評価するために、比較対照として 5 つの方法を取り上げる。

1) 厚生労働省が例示した方法 1 の変法

$$\{\hat{\theta}_i / \hat{\theta}_{All} > 1/K, \text{ for all } i\}.$$

以下、厚労省方法 1 とよぶ。

2) 厚生労働省が例示した方法 2

$$\{\hat{\theta}_i > 0, \text{ for all } i\}.$$

以下、厚労省方法 2 とよぶ。

3) Meta 解析でよく用いられる一様性指標である Cochran の Q 統計量。

4) 質的交互作用を検出するための制約つきの尤度比検定 (Gail & Simon, Biometrics 1985; 41: 361-372)。以下、GS 法とよぶ。

5) 質的交互作用検定をベイズへ拡張した方法 (Bayman, Chaloner & Cowles; Statistics in Medicine 2010; 29: 455-463)。

モンテカルロ・シミュレーションを以下の条件で実施する。

症例数設計：薬効差 0.2 (分散 0.5) を有意水準両側 5%，検出力 90% で検出するために必要な症例数として 528 例。なお、地域への症例の配分によってシミュレーションごとに症例数が変動する。

地域数：K=4, 5

地域への症例分配比：

A1) (0.25, 0.25, 0.25, 0.25)

A2) (0.10, 0.30, 0.30, 0.30)

A3) (0.20, 0.20, 0.20, 0.20, 0.20)

A4) (0.05, 0.10, 0.25, 0.30, 0.30)

対照群の乱数生成： $X_{icj} = \beta_i + \varepsilon_{icj}$

$\beta_i \square N(0, .01) iid, \varepsilon_{icj} \square N(0, .49) iid$

治療群の乱数生成： $X_{itj} = \beta_i + \varepsilon_{itj}$

$\beta_i \square N(\beta_i, .01) iid, \varepsilon_{icj} \square N(0, .49) iid$

B1) $\beta = (.2, .2, .2, .2)$

B2) $\beta = (.1, .2, .2, .2)$

B3) $\beta = (.05, .2, .2, .2)$

B4) $\beta = (.05, .1, .2, .2)$

B5) $\beta = (.2, .2, .2, .2, .2)$

B6) $\beta = (.1, .2, .2, .2, .2)$

B7) $\beta = (.05, .2, .2, .2, .2)$

B8) $\beta = (.05, .1, .2, .2, .2)$

繰り返し回数：1 万回

評価指標：地域を併合した際に有意差が認められ、かつ一貫性あり/一様性あり/質的交互作用なしの頻度

C. 研究結果：

表 1 に母平均が全て正の値をとる一貫性のある状況でのシミュレーション結果を示した。ベイズファクターを 10 に設定し、事前分布の事前確率を 0.5 に設定した際の提案法の一貫性証明確率は、地域数、症例数の分配比、および平均の構造

に大きな影響を受けず、いずれの場合であっても約 77 - 83% の確率で一貫性を示した。興味のある地域がそれ以外の地域と同様であるという事前情報があり、その事前確率を 0.9 へ高めた状況、およびベイズリスクのカットオフ値を 3 と低く設定する状況では、一貫性証明確率は約 88 - 95% へと増加した。厚労省方法 1 では、4 地域で平均構造がすべての地域で 0.2 と等しい場合の一貫性証明確率は約 45% であった。一貫性証明確率は地域の平均が 0.05 とゼロに近い状況では約 35% と、さらに症例数が少ない地域が含まれる状況では約 25 - 30% までに低下した。厚労省方法 2 では、4 地域で平均構造がすべての地域で 0.2 と等しい場合の一貫性証明確率は約 65% であった。平均がゼロに近い状況や症例数が少ない地域が増える状況において一貫性証明確率は低下する。Cochran の Q 統計量の一貫性証明確率は、厚労省方法 2 と同程度であった。GS の一貫性証明確率は、地域数によらず、各地域の症例数が等しい場合に、約 98% 以上であった。地域数の不均一になり、症例数の少ない地域が増えることにより一貫性証明確率は約 80% まで低下した。Bayman らの方法の一貫性証明確率は、厚労省方法 2 の方法と同様の挙動を示し、約 4 - 8% の高値を示した。

D. 考察

本研究では Efron によって提案された階層経験ベイズモデルにおける事前分布の妥当性を評価する指標を用いて、国際共同試験における新たな地域一貫性指標を提案した。この指標を計算するにあたり、興味のある地域が多地域と同様であるかを示す事前確率 h_a を設定する必要がある。この値は各地域の規制当局との合意によって設定することが望ましいが、難しい場合には無情報を意味する 0.5 に設定するのが妥当であると考えられる。またベイズリスクのカットオフ値に関しては、強い根拠を与える 10 などの大きな値を用いることが薦められる。全ての地域の真の薬効差が正の場合に限られたシミュレーション条件下ではあるが、無情報事前分布を表す事前確率を 0.5 およびベイズリスクのカットオフ値を 10 と設定した際の提案法の一貫性証明確率は、症例数の少ない地域の影響を受けることなく、地域を併合した薬効差が検出されたという条件のもとで約 80% と良好な性能を示したと考えられる。その一方で、興味ある地域の症例数が少なく、真の薬効が逆転している状況においては、提案法は全地域を併合した薬効差が有意な違いがある状況において一貫性ありと誤った判断する可能性の高い方法であることが予想される。現在もシミュレーション

プログラムのデバッグを実施中であるが、今後は提案法および既存法の長所と短所を様々なシミュレーション条件で明確にしていく必要があると考える。現在は等分散な状況、すなわち地域によってデータの質が同じ状況を想定しているが、今後は地域によるデータの質が異なる状況についても考えていく必要があるかもしれない。また、2013年 Huang ら (Pharm. Stat 2013;12:59-64) は、興味のある国の薬効差の事前分布に、薬効がない状態と他国と同じ状態の分布の混合分布を想定し、薬効差の事後分布がゼロ以上となる確率を計算する経験ベイズ法を提案した。今後はこの方法とも性能比較を行う必要があると考える。

E. 健康危険情報：

該当項目なし

F. 研究発表：

1. M. Takeuchi, H. Uno, A. Yoshida, M. Takeuchi, F. Takahashi, Statistical Analysis for Multi-National Clinical Trials in Inter-Variations among Regions, FDA/Industry Workshop, 2012年9月, USA
2. 吉田顕臣, 高橋史朗, 竹内正弘, 地域一貫性指標に関する一考察, RIMS 共同研究 Asymptotic Expansions for Various Models and Their Related Topics 研究会, 2013年3月4日, 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況：

該当項目なし

H. 添付資料

該当項目なし

表 1 : シミュレーション結果 (地域間変動の分散 : 0.01, 観測誤差の分散 : 0.49 の場合)

地域数	例数					平均構造					t 検定	提案法 > 10		提案法 > 3		厚労省	厚労省	Cochran Q-stat.	Gail- Simon	Bayman < 3
												ha=0.5	ha=0.9	ha=0.5	ha=0.9	方法 1	方法 2			
4	0.25	0.25	0.25	0.25	-	0.2	0.2	0.2	0.2	-	8009	0.809	0.942	0.887	0.953	0.459	0.659	0.652	0.993	0.733
						0.1	0.2	0.2	0.2	-	7220	0.794	0.918	0.872	0.946	0.399	0.584	0.616	0.988	0.643
						0.05	0.2	0.2	0.2	-	6765	0.770	0.895	0.856	0.931	0.352	0.534	0.582	0.984	0.584
						0.05	0.1	0.2	0.2	-	5655	0.774	0.906	0.862	0.938	0.319	0.500	0.589	0.984	0.531
	0.1	0.3	0.3	0.3	-	0.2	0.2	0.2	0.2	-	7987	0.805	0.915	0.880	0.942	0.451	0.633	0.515	0.975	0.699
						0.1	0.2	0.2	0.2	-	7596	0.792	0.910	0.871	0.939	0.362	0.547	0.473	0.940	0.589
						0.05	0.2	0.2	0.2	-	7453	0.777	0.909	0.866	0.942	0.314	0.477	0.436	0.918	0.511
						0.05	0.1	0.2	0.2	-	6429	0.776	0.905	0.864	0.938	0.286	0.452	0.441	0.919	0.474
5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	8109	0.826	0.942	0.905	0.968	0.361	0.516	0.645	0.994	0.623
						0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	7557	0.815	0.933	0.896	0.961	0.303	0.452	0.615	0.991	0.547
						0.05	0.2	0.2	0.2	0.2	7115	0.806	0.925	0.888	0.953	0.278	0.424	0.603	0.986	0.499
						0.05	0.1	0.2	0.2	0.2	6197	0.803	0.927	0.886	0.956	0.240	0.380	0.587	0.987	0.429
	0.05	0.1	0.25	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	8027	0.803	0.929	0.889	0.957	0.333	0.472	0.310	0.930	0.546
						0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	7851	0.800	0.927	0.887	0.956	0.277	0.394	0.297	0.882	0.461
						0.05	0.2	0.2	0.2	0.2	7805	0.794	0.916	0.880	0.948	0.256	0.379	0.275	0.853	0.418
						0.05	0.1	0.2	0.2	0.2	7503	0.788	0.923	0.883	0.956	0.211	0.317	0.262	0.831	0.353

ヒト肝薬物代謝能の個人差・民族間差の原因解明に向けた脂質関連転写因子によるヒト CYP 発現調節機
序の解析

研究分担者 吉成 浩一 東北大学 准教授

研究要旨：

薬物代謝活性には大きな個人差、民族間差が認められる。その原因解明のため、遺伝的要因、特に遺伝子多型に関する解析が進み、CYP2C19 や CYP2D6 などの個人差・民族間差の理解は進んだ。一方、CYP3A4 や CYP1A2 では遺伝的要因よりもむしろ後天的要因が個人差・民族間差の原因となっていると考えられている。これら酵素に関しては、異物応答性の転写因子である PXR、CAR、Ah 受容体などによる発現調節機構の解析が進み、発現量の違いの一部は異物暴露に伴うこれら転写因子の活性化に起因する可能性がある。他方、栄養状態や生理状態が薬物代謝に影響を及ぼすことは古くから知られているが、その詳細は不明である。本研究では、最近の分担者のマウスでの知見に基づき、コレステロールと CYP3A4 および CYP1A2 の発現調節との関連を解析した。その結果、コレステロール代謝物のオキシステロールにより活性化される核内受容体 LXR α は、ヒト肝細胞において CYP3A4 の転写を活性化すること、一方で PXR による CYP3A4 転写活性化に対しては抑制的に作用することが明らかになった。さらに、LXR α は、CYP1A1 および CYP1A2 遺伝子の転写を共通の転写調節領域を介して活性化することも明らかになった。以上の結果より、コレステロール代謝と CYP3A4 および CYP1A1/1A2 の発現調節が関連しており、コレステロール摂取量、代謝能力の差が、CYP3A4 および CYP1A1/1A2 の発現レベルの個人差・民族間差を生じる一因となっている可能性が示された。

A. 研究目的：

薬物代謝は、医薬品の体内動態や薬効を決定する主要な要因である。その中心的役割を果たすのが第一相薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) であり、ヒト CYP の 5 つの分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4) は臨床使用されている医薬品の 7 割以上の代謝に関与することが知られている。これらの CYP 分子種の発現レベルには大きな個人差や人種・民族間差が認められる。その原因として、CYP2C9、CYP2C19 および CYP2C19 では遺伝的要因（遺伝子多型）の寄与が大きいとされている。一方、CYP1A2 や CYP3A4 では後天的要因が大きいと考えられているが、その詳細は明確になっていない。

CYP の発現レベルは薬物暴露により増加することが古くから知られており、CYP1A2 の誘導には Ah 受容体が、CYP3A4 の誘導には PXR や CAR と呼ばれる核内受容体が関与することが知られている。CYP の発現レベルはまた、疾病や栄養・生理状態の変化によっても影響を受けることが古くから知られているが、その分子機構は不明である。分担者のグループでは、栄養成分のうち、コレステロール摂取量の変化が、ステロイド応答性の転写因子である SREBP-2 や LXR α を介してマウス肝における *Cyp3a11* 発現レベルに影響を及ぼ

すことを報告している (*Mol Pharmacol*, 79: 148-156, 2011)。

食習慣の違いにより、食事成分の摂取量が個人間だけでなく民族間でも異なる可能性、また人種・民族により生体内コレステロール代謝能に差が認められる可能性があり、食事成分による CYP 発現変動機構の解明は、これら薬物代謝酵素の発現レベルの個人間差・民族間差の原因解明に有用と思われる。そこで本年度は、マウスで得られた知見に基づき、ステロイド応答性転写因子 LXR α によるヒト CYP3A4 および CYP1A2 の発現調節機構の解明を試みた。

B. 研究方法：

1. LXR α による CYP3A4 遺伝子の発現調節

1-1. レポーターアッセイ

既知の PXR 応答配列を含む、当研究室で既に作製した CYP3A4 遺伝子の luciferase レポーター遺伝子 (p3A4, *Mol Pharmacol*, 75, 677-684, 2009) を基に、各種欠失・変異プラスミドを作製した。これらを利用して HepG2 細胞をでレポーターアッセイを行った。ヒト LXR α (hLXR α) 発現プラスミドは当研究室で作製したものをを用いた

(*Toxicol Lett*, 215, 16-24, 2012)。レポーター活性の測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System

(Promega) を用いた。

1-2. ヒト肝細胞における mRNA レベル測定

凍結ヒト肝細胞は Biopredic または Life Technologies から購入し、常法に従って融解、培養した。HepaRG 細胞は Life Technologies から購入し、説明書に従って融解・培養した。これら細胞を各種薬物で 48 時間処置した後、SV Total RNA Isolation System (Promega) および High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を利用して総 RNA 抽出と cDNA 合成を行った。定量的 PCR は GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用いて行った。

1-3. siRNA 利用実験

HepaRG 細胞に INTERFERin (Polyplus transfection) を利用して、2 種類のヒト LXR α 標的二本鎖 siRNA (Life Technologies) を導入し、48 時間後から各種薬物を 48 時間処置し、上記手法で mRNA レベルを測定した。

2. LXR α によるヒト CYP1A1/CYP1A2 遺伝子の発現調節

2-1. レポーターアッセイ

当研究室では、CYP1A1 の転写活性を luciferase 活性として、CYP1A2 の転写活性を secreted form of alkaline phosphatase (SEAP) 活性として測定可能なデュアルレポーターコンストラクトを作製している (*Mol Pharmacol* 69, 1924-1930, 2006; *Biochem Pharmacol* 76, 139-145, 2008; *Biochem Pharmacol* 79, 261-269, 2010)。本研究ではこれらを用いて HuH-7 細胞にてレポーターアッセイを行った。点変異コンストラクトは QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) を利用して作製した。

2-2. ゲルシフトアッセイ

核内受容体タンパク質インビトロ合成用プラスミドは PCR により増幅した cDNA を pTNT (Promega) に導入して作製した。常法に従い、³²P で標識した二本鎖 DNA プローブとインビトロで合成した LXR α および hRXR α を反応させ、電気泳動により分離した。その後 FLA-3000 を利用してバンドを検出した。なお、インビトロタンパク質合成には TNT SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を用いた。

(倫理面での配慮)

ヒト肝細胞、ヒト肝由来試料を用いた実験に関しては、東北大学大学院薬学研究科ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果および考察：

1. LXR α による CYP3A4 遺伝子の発現調節

1-1. hLXR α による CYP3A4 転写活性化

まず、LXR α が CYP3A4 遺伝子の転写活性化作用を有するか否かを明らかにするために、HepG2 細胞および p3A4 レポーター遺伝子を用いてレポーターアッセイを行った (Fig. 1)。その結果、hLXR α を発現させ、LXR α リガンドの GW3965 または 24S-hydroxycholesterol (24S-HC) を処置することで、レポーター活性が上昇した。これらの結果から、活性化型 hLXR α は CYP3A4 遺伝子の転写を正に調節する作用を有することが示された。

次に、CYP3A4 プロモーター上の hLXR α 応答配列を同定するために、p3A4 の欠失または変異コンストラクトを作製し、レポーターアッセイを行った (Fig. 2)。LXR α の DNA 配列選択性は CYP3A4 の異物応答性発現誘導に関与する PXR と類似していることから、PXR 応答配列に特に着目して解析を行った。その結果、hLXR α は、既に PXR 応答配列として報告されている 2 つの核内受容体結合モチーフ (dNR1 および eNR3A4) を介して CYP3A4 遺伝子の転写を活性化することが示唆された。当研究室では、PXR による CYP3A4 遺伝子の発現には eNR3A4 が重要であり、eNR3A4 を変異させたレポーターコンストラクトでは、dNR1 モチーフが残っていても PXR による転写活性化が認められないことを報告しているが (*Mol Pharmacol*, 75: 677-684, 2009)、hLXR α は dNR1 または eNR3A4 モチーフ単独で CYP3A4 の転写を活性化すると考えられた。実際に、dNR1 または eNR3A4 モチーフのみを 5 個タンデムに連結し、tk プロモーター上流に導入したレポータープラスミドを用いた場合にも、hLXR α による転写活性化は認められた (data not shown)。さらに、hLXR α が、RXR α ヘテロダイマーとして dNR1 および eNR3A4 モチーフに結合することは、ゲルシフトアッセイによっても確認された (data not shown)。

1-2. CYP3A4 転写における LXR α と PXR のクロストーク

上記結果から、CYP3A4 遺伝子発現において、hLXR α と PXR が相互に影響しあうクロストークの存在が示唆された。そこで次に、hLXR α の活性化が PXR を介した薬物による CYP3A4 誘導に及ぼす影響を解析した。

まず、p3A4 および HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイにおいて、hLXR α と hPXR を共発現させ、LXR α リガンド GW3965 の存在下および非存在下における hPXR リガンド rifampicin 処置による転写活性の上昇作用を比較した (Fig. 3)。その結果、GW3965 非存在下では、rifampicin 処置によりレポーター活性は約 19 倍に上昇したのに対

し、GW3965 存在下では、rifampicin 処置に伴うレポーター活性の上昇率は 2.4 倍と低かった。GW3965 単独処置で約 4 倍にレポーター活性が上昇したことを併せて考えても、GW3965 と rifampicin の同時処置時のレポーター活性は、rifampicin 単独処置時より低く、溶媒処置群の約 10 倍であった。以上の結果から、hLXR α の活性化は、hPXR を介した CYP3A4 遺伝子の転写活性に対して抑制的に作用すると考えられた。

次に、この現象が実際にヒト肝細胞でも認められるか否かを、初代ヒト肝細胞の代替細胞として近年利用されている HepaRG 細胞における CYP3A4 mRNA レベルを測定することで解析した (Fig. 4A)。その結果、CYP3A4 mRNA レベルは、rifampicin 処置により約 11 倍、GW3965 単独処置で約 3 倍、GW3965 と rifampicin の同時処置で約 7 倍となり、レポーターアッセイの場合と同様に、GW3965 の存在により rifampicin の CYP3A4 発現亢進作用は著しく減弱した (11 倍 vs 2.2 倍)。

同じサンプルを用いて、CYP3A4 と同様に PXR や CAR を介して酵素誘導を受ける CYP2B6 の mRNA レベルを測定した (Fig. 4B)。その結果、CYP2B6 mRNA レベルは、rifampicin や CITCO (ヒト CAR リガンド) 処理により上昇したが、GW3965 存在下では、その上昇は全く認められなかった。

次に 3 ロットのヒト肝細胞を用いて同様の実験を行った (Fig. 4C)。その結果、これらの細胞では GW3965 処置による CYP3A4 mRNA レベルの上昇は認められず、むしろ若干低下傾向を示した。しかし、いずれのロットにおいても、rifampicin と GW3965 の同時処置時の CYP3A4 mRNA レベルは、rifampicin 単独処置時のレベルの 15%~78% であり、GW3965 存在下では rifampicin による CYP3A4 誘導が抑制されることが示唆された。

最後に、hLXR α の hPXR に対する抑制作用を検証するために、siRNA を利用して、HepaRG 細胞において hLXR α の発現抑制が rifampicin 処置に伴う CYP3A4 mRNA レベルの上昇に及ぼす影響を解析した (Fig. 5)。その結果、hLXR α の発現を抑制すると、構成的な CYP3A4 mRNA レベルは著しく低下した。さらに、この条件下では、rifampicin 処置による CYP3A4 mRNA レベルの増加率は、GW3965 の存在下および非存在下でほぼ同程度であった。

以上の結果から、LXR α は CYP3A4 遺伝子転写活性化作用を有しており、LXR α はヒト肝細胞における CYP3A4 の構成的発現に寄与している可能性が示された。一方で、LXR α の活性化は PXR を介した CYP3A4 誘導に対して抑制的に作用することが示唆された。LXR α は、コレステロール代謝

物 (オキシステロール等) により活性化されることから、したがって、コレステロール摂取量や生体内・細胞内コレステロールレベルが CYP3A4 の発現レベルに影響をおよぼす可能性があり、これが CYP3A4 発現レベルの個人間差や民族間差の一因となっている可能性がある。

2. LXR α によるヒト CYP1A1/CYP1A2 遺伝子の発現調節

ヒト CYP1A1 および CYP1A2 遺伝子は、第 15 番染色体上に、約 23 kb 隔てて互いに逆向きに転写される位置で存在している。そのため、両遺伝子の発現は共通の転写因子や転写領域により制御されている可能性がある。そこでまず、両遺伝子の約 23 kb のプロモーター領域をすべて含むデュアルレポータープラスミドおよびその欠失コンストラクトを用いて、HuH-7 細胞に hLXR α を共発現させてレポーターアッセイを行った (Fig. 6)。その結果、hLXR α は、CYP1A1 の -511~-554 および -461~-510 の領域を介して CYP1A1 と CYP1A2 両遺伝子を共に転写活性化する可能性が示された。

次いで、ゲルシフトアッセイにより hLXR α 結合配列の同定を試みた。まず、-511~-554 の領域について解析した。この領域には既に当研究室で同定した CAR 結合配列の ER8 型モチーフ (ER8₁ と命名) が含まれることから、hLXR α が ER8₁ モチーフに結合するか否かを調べた (Fig. 7)。その結果、hLXR α /hRXR α ヘテロダイマーは野生型の ER8₁ プローブ (P6) には結合したが、変異プローブには結合しなかった。

次にもう一つの領域の解析を行った (Fig. 8)。-461~-510 の領域をカバーする長鎖のプローブを用いた解析により、hLXR α /hRXR α ヘテロダイマーは -451~-487 の間に結合すると考えられた。この領域には ER8 型のモチーフ (ER8₂ と命名) が含まれていたことから、野生型および変異型 ER8₂ プローブを用いて解析した結果、hLXR α /hRXR α ヘテロダイマーはこの ER8₂ モチーフに結合することが示された。

最後に、hLXR α 結合モチーフとして同定した ER8₁ および ER8₂ モチーフの転写活性化における寄与を確認するために、両モチーフに単独または同時に変異を導入したレポーターコンストラクトを用いてレポーターアッセイを行った (Fig. 9)。その結果、ER8₁へ変異を導入すると hLXR α 依存的な CYP1A1 および CYP1A2 の転写活性化は減弱したが、完全には消失しなかった。しかし、さらに ER8₂ モチーフに変異を導入したところ、hLXR α 依存的な両遺伝子の転写活性化は全く認められなくなった。

以上の結果から、hLXR α は *CYP1A1* 転写開始点近傍の2つの ER8 型モチーフを介して *CYP1A1* および *CYP1A2* 遺伝子の転写を共に活性化することが示唆された。今回の結果では、両遺伝子はともに活性化されるが、ヒト肝では、*CYP1A2* は構成的に発現しているが、*CYP1A1* はほとんど発現していない。現在のところこの分子種特異的な発現機構はわかっていないが、当研究室においてヒト肝細胞を GW3965 で処置すると *CYP1A2* mRNA レベルは有意に上昇するが *CYP1A1* mRNA レベルは変化しないという結果を得ている。したがって、hLXR α は、ヒト肝臓においては *CYP1A2* の構成的および誘導的発現に寄与するが、*CYP1A1* の発現には関与しない可能性も考えられる。

3. 総括

hLXR α はコレステロールホメオスタシスなど肝機能に重要な転写因子であり、その活性化レベルはコレステロール摂取量や細胞内コレステロールレベルの影響を受け、個人間差も大きいと考えられる。これまで hLXR α のヒト薬物代謝酵素発現における役割は不明であったが、本年度の研究により、*CYP3A4* および *CYP1A1/1A2* のヒト肝における発現が hLXR α による制御を受けている可能性が示された。他のステロール応答性転写因子の寄与や細胞内コレステロールレベルと *CYP* 発現の関連性の詳細な解析を進め、*CYP3A4* や *CYP1A1/1A2* の発現におけるコレステロール関連物質の寄与をより明確にする必要がある。

D. 健康危険情報：

該当なし

E. 研究発表：

学術論文

1. Araki K, Watanabe K, Yamazoe Y, Yoshinari K. Liver X receptor α bidirectionally transactivates human *CYP1A1* and *CYP1A2* through two cis-elements common to both genes. *Toxicol Lett*, 215, 16-24, 2012.

学会発表

1. 吉成浩一、荒木希久子、山添康. 核内受容体 LXR α によるヒト *CYP1A1* および *CYP1A2* 遺伝子の転写活性化、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日—19 日、仙台

2. Yoshinari K., Araki K, Yamazoe Y. Transcriptional activation of human *CYP1A1* and *CYP1A2* genes by LXR α . 6th international congress of ASIATOX, 2012 年 7 月 17 日—20 日、

仙台

3. Yoshinari K., Watanabe K, Sakurai K, Yamazoe Y. Transcriptional regulation of *CYP3A4* by oxysterol-responsive nuclear receptor LXR α 、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012 年 11 月 20 日—22 日、東京

F. 知的財産権の出願・登録状況：

該当なし

G. 添付資料

1. Araki K, Watanabe K, Yamazoe Y, Yoshinari K. Liver X receptor α bidirectionally transactivates human *CYP1A1* and *CYP1A2* through two cis-elements common to both genes. *Toxicol Lett*, 215, 16-24, 2012.

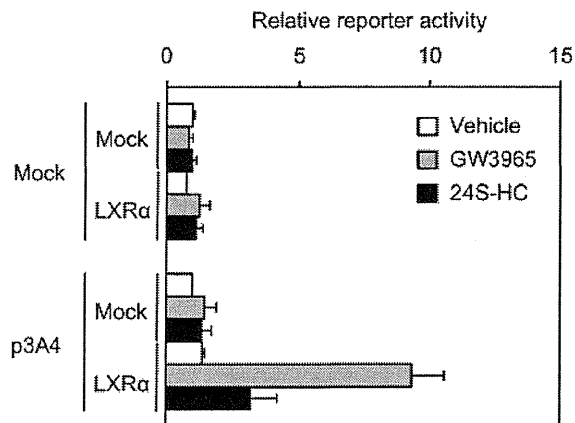


Fig. 1. hLXR α -mediated transactivation of *CYP3A4*.

HepG2 cells (3×10^4 cells/well in 48-well plate) were transfected with each reporter plasmid (0.5 μ g), pRL-TK (0.025 μ g) and either pTarget-hLXR α or empty pTarget (0.1 μ g). Twenty hours after transfection, the cells were treated with vehicle (0.1% DMSO), GW3965 (2 μ M) or 24S-HC (10 μ M) for 48 h, and reporter activities were measured. Firefly luciferase activities were normalized with *Renilla* luciferase activities. Data are expressed as relative activities to those in vehicle-treated cells for each reporter construct. Data are the mean \pm SD (n = 4) of one representative experiment from 2 independent experiments.

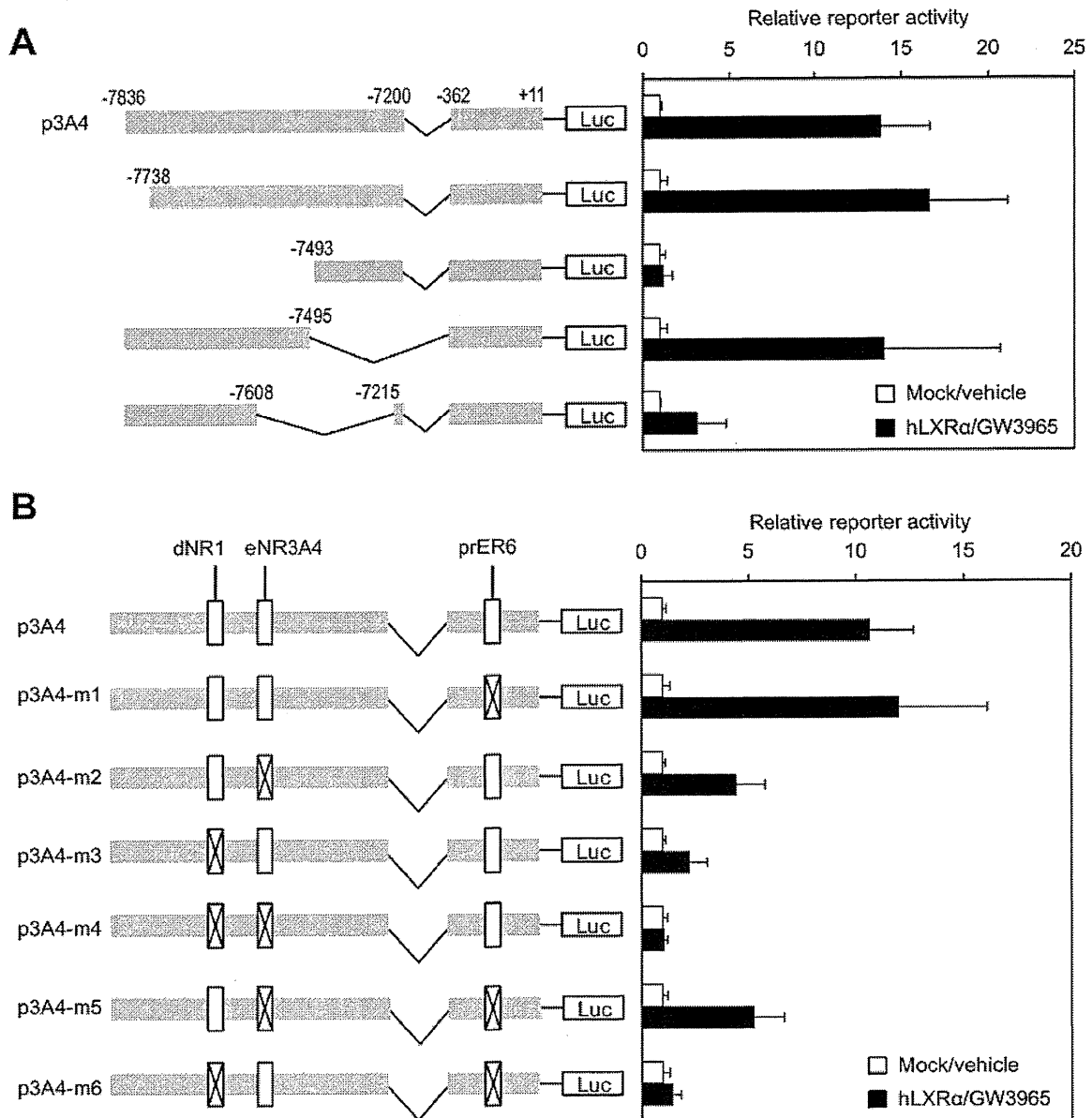


Fig. 2. Identification of the hLXR α -responsive elements in the *CYP3A4* promoter.

A, B. HepG2 cells were seeded and transfected with plasmid DNA as in Fig. 1. Twelve hours after transfection, the cells were treated with vehicle (0.1 % DMSO) or GW3965 (2 μ M) for 48 h and harvested, and reporter activities were determined as described in Section 2. The numbers above the constructs indicate the positions relative to the transcription start site. Firefly luciferase activities normalized with *Renilla* luciferase activities are shown as ratio to those in control cells (Mock/vehicle) for each reporter construct. Data are the mean \pm S.D. (n=4) of one representative experiment from 2 independent experiments. C. HepG2 cells seeded in 48-well plates at density of 3×10^4 cells/well were transfected with 0.2 μ g of reporter construct (pGL3-promoter (Control), (dNR1)₃-pGL3 or (eNR3A4)₃-pGL3), 0.05 μ g of expression plasmid, and 0.0125 μ g of pRL-TK. The cells were treated with vehicle (0.1% DMSO) or GW3965 (2 μ M) for 24 h, and reporter activities were determined. The results are presented as in A and B. Data are the mean \pm S.D. (n=4) of one representative experiment from 2 independent experiments. D. EMSAs were performed as described in Section 2 with radiolabeled oligonucleotides shown above and in vitro synthesized nuclear receptors. Asterisks represent non-specific bindings.

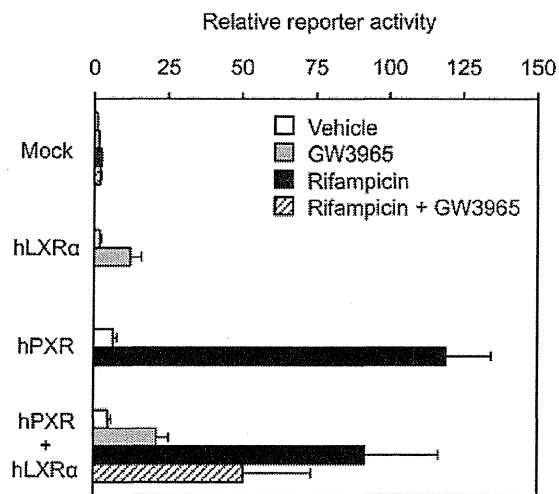


Fig. 3. Influences of hLXR α activation on the PXR-dependent *CYP3A4* transactivation in reporter assays.

HepG2 cells (3×10^4 cells/well in 48-well plate) were transfected with p3A4 (0.5 μ g), pRL-TK (0.025 μ g) and expression plasmids (hLXR α ; pTarget-hLXR α (0.05 μ g) and empty pTarget (0.05 μ g), hPXR; pTarget-hPXR (0.05 μ g) and empty pTarget (0.05 μ g), hPXR + hLXR α ; pTarget-hPXR (0.05 μ g) and pTarget-hLXR α (0.05 μ g)). Twenty hours after transfection, the cells were treated with vehicle (0.2% DMSO), GW3965 (2 μ M) or rifampicin (10 μ M) for 48 h, and reporter activities were measured. Firefly luciferase activities were normalized with *Renilla* luciferase activities. Data are expressed as relative activities to those in Mock-transfected and vehicle-treated cells (top bar). Data are the mean \pm SD ($n = 4$) of one representative experiment from 3 independent experiments.

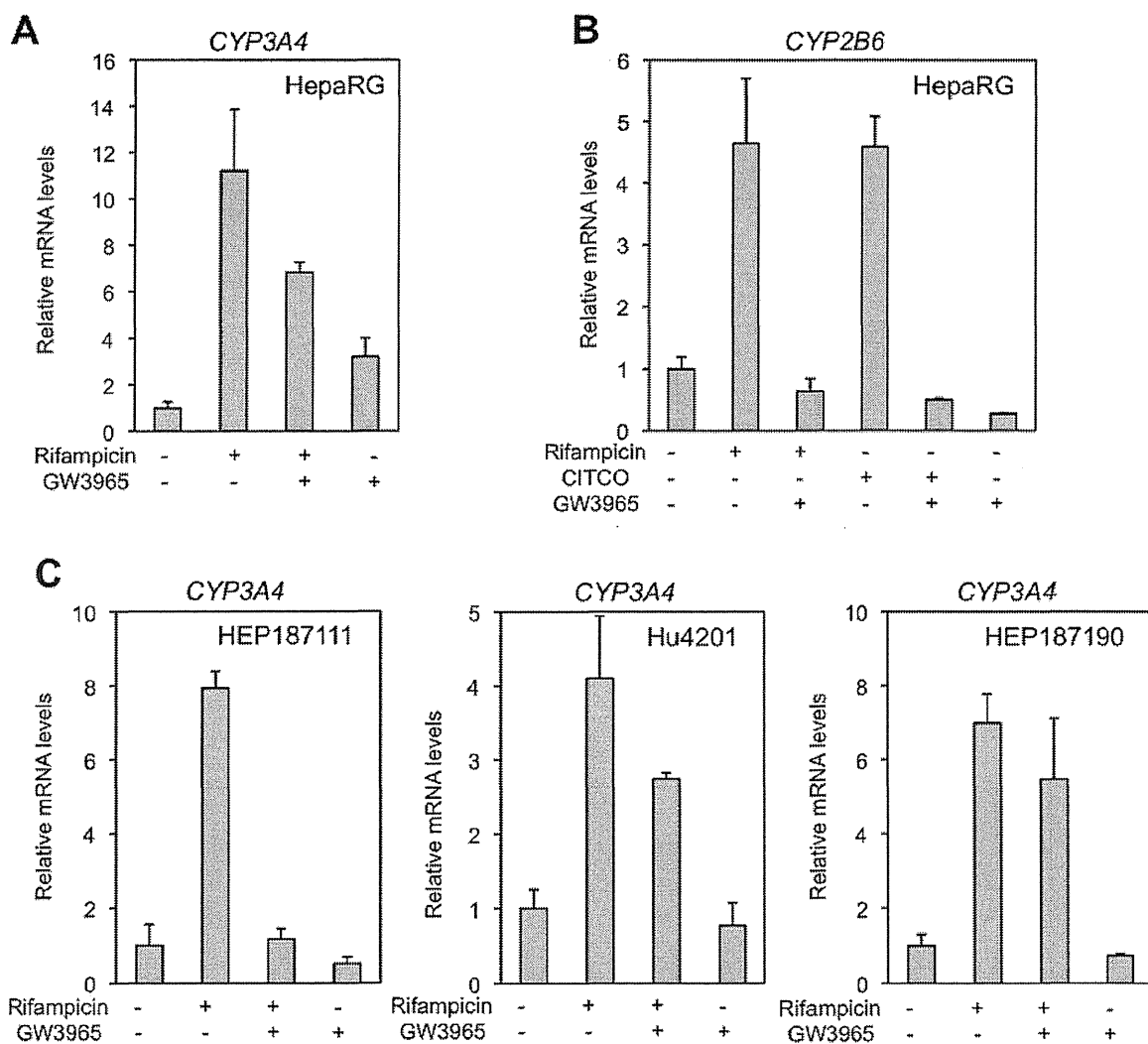


Fig. 4. Influences of GW3965 treatment on *CYP3A4* mRNA levels in human hepatocytes.

Differentiated HepaRG cells (A, B) and primary human hepatocytes (C) were treated with vehicle (0.2% DMSO), rifampicin (10 μ M) or CITCO (0.3 μ M) in the absence or presence of GW3965 (2 μ M) for 48 h. *CYP3A4*, *CYP2B6* and *ACTB* (for normalization) mRNA levels were determined. The results are expressed as relative mRNA levels to those in vehicle-treated cells. Data are the mean \pm SD ($n = 3-4$). Experiments with HepaRG cells were carried out twice and representative data from one experiment are shown.

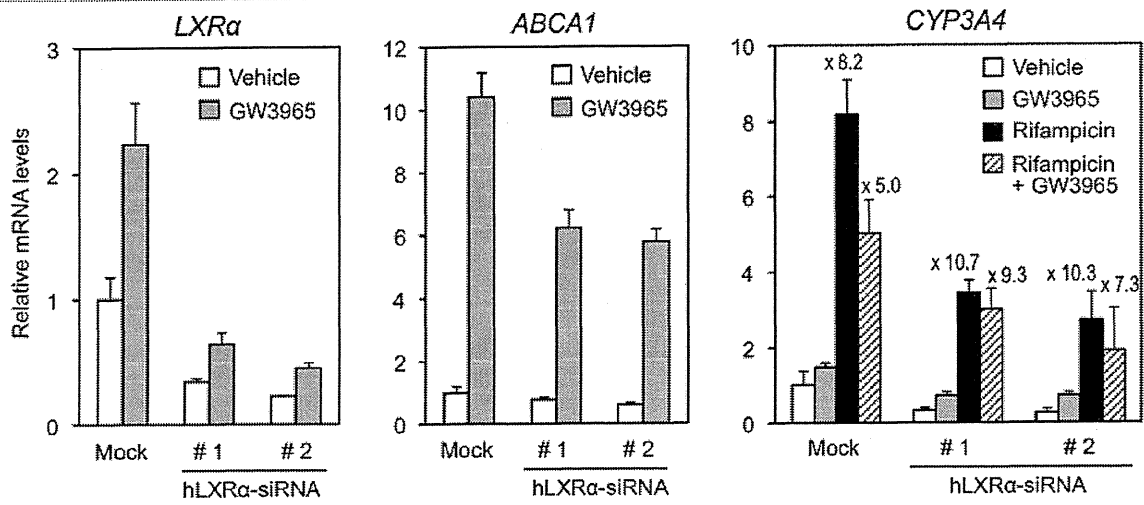


Fig. 5. Influence of hLXRα knock-down on GW3965- and/or rifampicin-induced changes in *CYP3A4* mRNA levels.

HepaRG cells were transfected with control or hLXRα-targeting siRNA (#1 and #2) and were treated with vehicle (0.2% DMSO), GW3965 (2 μM) and/or rifampicin (10 μM) for 48 h. mRNA levels were determined and are expressed as relative levels to those in control siRNA-transfected and vehicle-treated cells. Data are the mean ± SD (n = 4) of one representative experiment from 2 independent experiments.

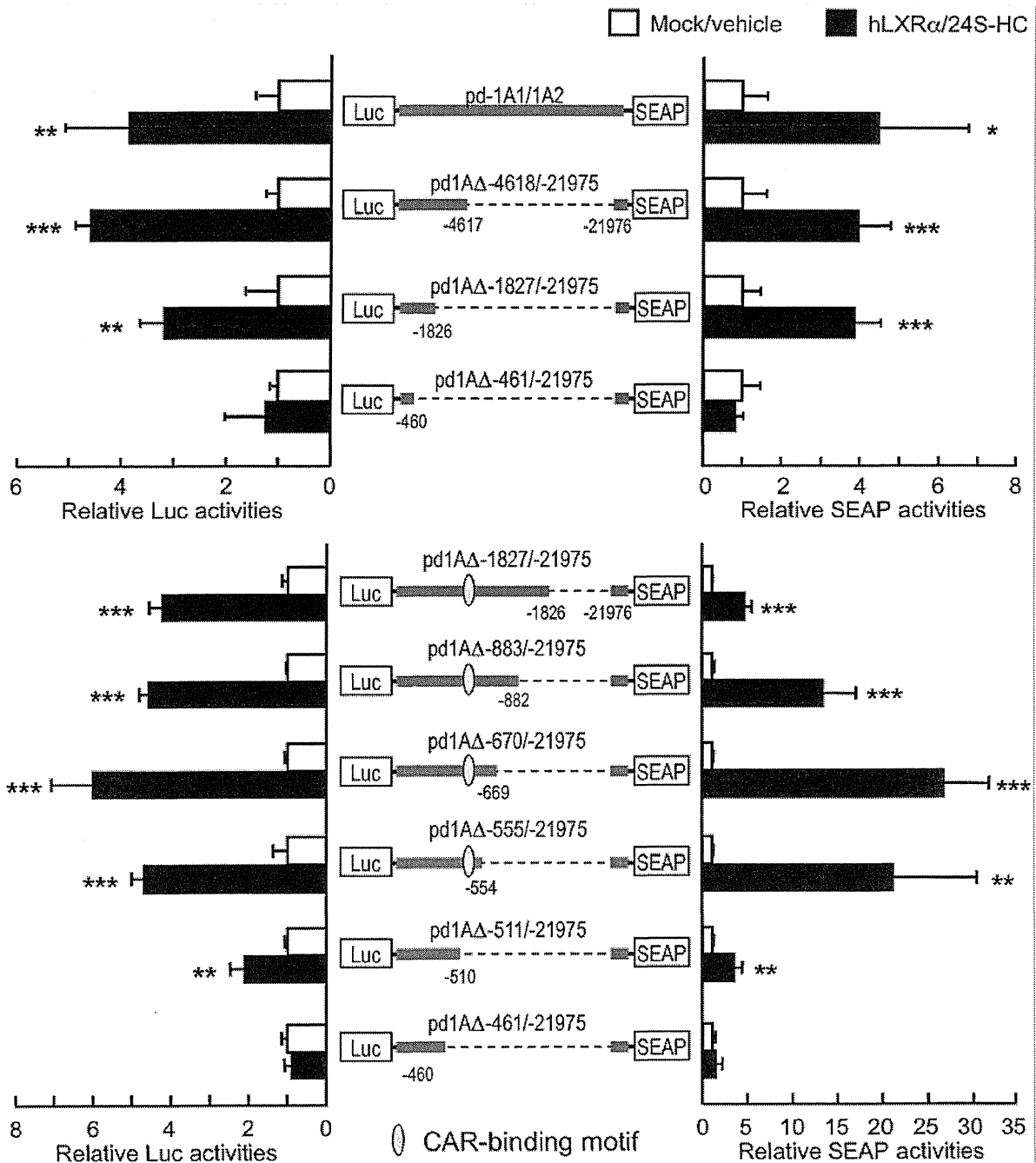


Fig. 6. Influence of hLXRα activation on the transcription of hCYPIA1 and hCYPIA2.

Schematic structure of the dual reporter plasmid (pd-1A1/1A2) is shown on the top. The numbers above and below the plasmid represent the positions from the transcriptional starting points of hCYPIA2 and hCYPIA1, respectively. HuH-7 cells (3×10^4 cells in 48-well plate) were transfected with reporter plasmid (300 ng), pRL-tk (10 ng), and either control (mock) or hLXRα expression plasmid (20 ng). Eight hr after transfection, cells were treated with 10 μM 24S-HC or vehicle (0.1% DMSO) for 40 hr, and reporter activities were measured. Firefly luciferase and SEAP activities normalized with *Renilla* luciferase activities are shown as ratios to those in control plasmid-transfected and vehicle-treated cells (Mock/vehicle). Data are shown as the mean ± S.D. (n = 3-4). *, **, ***, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, respectively, versus corresponding Mock/vehicle groups (Student's t-test).