

201234002A

平成24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」と医薬品との併用に関わる

安全性評価に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永 田 清

平成24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」と医薬品との併用に関わる

安全性評価に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 永 田 清

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する安全性評価に関する研究

永 田 清 1

II. 分担研究報告

1. 肝分化 i P S 細胞への肝特異的転写因子の薬物代謝酵素発現に対する影響

永 田 清 9

2. 健康食品使用実態調査で使用が確認された健康食品による酵素誘導調査

永 田 清 18

3. 薬物代謝酵素誘導を介した薬物相互作用の評価

細 川 正 清 22

4. いわゆる「健康食品」と医薬品との併用実態に関する調査研究

頭 金 正 博 29

5. ヒト i P S 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 38

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 45

IV. 研究成果の刊行物・別刷 48

I. 総括研究報告

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

総括報告書

課題番号：H22-食品一般-003

総括研究者：永田 清 東北薬科大学 薬学部 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24年度は、1）薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の測定と定量化、2）ヒトiPS細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討、3）ヒトiPS細胞から肝に分化した細胞における薬物代謝酵素誘導評価、4）培養細胞を用いた細胞増殖への影響評価、5）病院カルテを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査、6）定量化された薬物代謝酵素活性誘導のデータベースの構築を行った。

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
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3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2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。また、現在健康食品は、錠剤やカプセルに濃縮されて販売されるものが多く、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。

「(倫理面への配慮)」
遺伝子組換え実験を行うに当たっては、各施設において許可を得た後に、規則を十分に遵守して行う。遺伝子組換え研究は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じて行う。iPS細胞

B. 研究方法

[平成24年度]実際に行った研究

① 薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の測定と定量化(永田、細川)

活性阻害および誘導を示した健康食品は含まれている個々の成分について、別途、薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の評価を行い、そのデータを数値化してまとめる。

② ヒトiPS細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討(松永、永田)

申請者らは現在ヒトiPS細胞から肝細胞への基本的な分化に成功しているが、より成人の肝臓・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を検討するとともに細胞に分化した後に誘導評価が可能なヒトiPS細胞株を作製する。

③ ヒトiPS細胞から肝に分化した細胞における薬物代謝酵素誘導評価(松永、永田)

iPS細胞株が作製されれば肝細胞へ分化させ、CYP3A4およびCYP1A1/1A2の評価を試み、先の結果と比較しその有用性を検証する。

④ 培養細胞を用いた細胞増殖への影響評価(永田、細川)

培養細胞を用いて健康食品が細胞増殖に影響を与えるかを調べる。

⑤ 病院カルテを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査(松永、頭金、永田)

細胞の作製等については、東北薬科大学および名古屋市立大学薬学研究科の倫理委員会の承認を得ている。また病院カルテを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査についても、東北薬科大学の倫理委員会の承認を得て行った。

信州大学医学部付属病院薬剤部に於てカルテから健康食品の使用状況並びに薬の服用状況の調査を行う。

⑥ 定量化された薬物代謝酵素活性阻害および誘導のデータベースの構築(永田、頭金)

初年度に作成したリストにどの程度の摂取により相互作用が生じるか等の情報を加え、データベース化したものを公開することを検討する。

C. 進捗状況及び見込まれる研究結果(達成度)

① 薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の測定と定量化

アンケート調査結果から243品目の健康食品の使用が確認されたので、これらの薬物代謝活性阻害および誘導の評価を行った。酵素誘導については現在までに約200品目の製品の評価を行った。その結果、程度に差はあるものの約40%の商品に誘導が認められた。中でも、すでに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の他、ダイエット系健康食品やウコン含有健康食品において臨床で使用されている医薬品でCYP3A4を強く誘導することが明らかとなっているRIF(1 μ M)と同程度またはそれ以上の強いレポーター活性を示す製品が認められた。またマルチビタミン剤でも比較的強い誘導が認められたが、その程度には各社の製品間で違いが認められた。一方、CYP1A1/1A2の誘導については、オメプラゾールの酵素誘導を基準にして、酵

素誘導が8倍以上のものは、9品種であり、これらのサプリメントは薬物相互作用を引き起こす可能性が示唆された。誘導を示した健康食品については、詳細な用量依存的な検討を行い、誘導の強さの数値化を行った。

薬物代謝酵素活性阻害については、実験を行う上で大きなトラブルが生じたために、あまり進まなかった。現在、阻害実験を精力的に行っているが、以下のものに強い阻害作用が認められた。キャツクロー、デビルスクロー、フーバーフュー、ペポゲスト、レッドクローバー、シビリアンエルセロ、中でもキャツクローは、今回行ったCYP1A2, CYP2C9, CYP2D6およびCYP3A4のいずれの活性も強く阻害した。

② 培養細胞を用いた細胞増殖への影響評価 (永田、細川)

薬物代謝酵素誘導の評価を行うと同時に細胞の増殖に対する影響も調べた。顕微鏡下で細胞増殖を観察し、その結果、程度の差はあるものの約20%の製品において細胞増殖抑制が観察された。現在はより正確な細胞評価法として用いられているMTTアッセイ法を用いて、評価を行っている。

③ ヒトiPS細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討 (松永、永田)

ヒトiPS細胞から分化した肝様細胞に薬物代謝酵素を発現させるために、2つの手法を用いた。一つは薬物代謝酵素の発現に必要な転写因子を強制発現させるものであり、他方は薬物を用いて発現量を高める手法である。いずれも成熟肝細胞までには届かなかったが、薬物代謝活性を測定することに成功した。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を本研究にて世界で初めて成功した。これらの成果は、本年度の日本薬物動態学会でベストポスター賞を2つ受賞し、現在本論文は投稿中である。

④ ヒトiPS細胞から肝に分化した細胞における薬物代謝酵素誘導評価 (松永、永田)

薬物代謝活性を有する肝様細胞を用いて、CYP3A4およびCYP1A1/1A2を誘導するとされている代表的な化学物質を用いて誘導評価を試みた。いずれも誘導が確認された(投稿中)。

⑤ 病院カルテを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査(松永、頭金、永田)

信州大学医学部附属病院薬剤部にてカルテから健康食品の使用状況並びに薬の服用状況の調査を行った。

⑥ 定量化された薬物代謝酵素活性阻害および誘導のデータベースの構築 (永田、頭金)

平成23年度は、全国約100店舗の調剤薬局を対象に、健康食品の使用状況を把握するためのアンケート調査を行った。その結果、アンケート送付調剤薬局の店舗回収率は36.4%で、1,034件のアンケートが回収され、いわゆる健康食品については、243製品の使用が確認された。このアンケート調査情報を基に、既に確立済みの薬物代謝酵素誘導評価細胞等を用いて、使用が確認された243製品の大部分について評価を完了した。本年までに得られている文献情報並びに本研究グループで行ったアンケート調査及びこれに基づくin vitro試験結果をまとめ、現在、公開するためのデータベース化を進めている。文献情報は、アンケート調査により使用が確認されたいわゆる健康食品のうち主な含有成分、163成分を対象として調査を行った。その調査内容は、相互作用(誘導/阻害)、基質薬物、試験対象P450、試料(ヒト/株化細胞/実験動物)等とし、情報があるものに関してはPubMed上のabstractへリンクを貼付している。次に、我々が検討した結果については、アンケート調査により使

用が確認された健康食品を同種同効製品ごとに分類し、まとめた。各製品に含まれる主な成分を表示し、文献情報がある成分については、PubMed へのリンクを貼付した。in vitro 試験結果は、CYP 誘導活性、CYP 阻害活性（現在、調査中）のデータを公開する。この結果については、数値及びそれをまとめたグラフデータも本データベースの使用登録者のみに公開することを考えている。

D. 考察

健康食品による薬物相互作用の調査について、アンケート調査結果から 243 品目の健康食品の使用が確認されたので、これらの薬物代謝活性阻害および誘導の評価を行った。酵素誘導は約 200 品目の製品の検討を行ったが、CYP3A4 と CYP1A1 の誘導について予測以上に多くの健康食品が酵素誘導（CYP3A4 と CYP1A1 を合わせると 40%）を引き起こすことが明らかとなった。誘導の強さには差が認められたが、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の他、ダイエット系健康食品やウコン含有健康食品において臨床で使用されている医薬品で CYP3A4 を強く誘導することが明らかとなっている RIF (1 μ M) と同程度またはそれ以上の強いレポーター活性を示す製品が認められた。また、CYP1A1/1A2 の誘導については、オメプラゾールの酵素誘導を基準にして、酵素誘導が 8 倍以上のものは、9 品種であり、これらの健康食品は薬物相互作用を引き起こす可能性が示唆された。また、マルチビタミン剤でも誘導が認められ、含有成分には大きな差がないにもかかわらずその程度は製品間で大きく異なっていた。恐らく、ビタミンの含有量あるいはそれ以外の化合物によって異なると予測された。一方、細胞増殖抑制を示す健康食品が調べた製品の 20%において見いだされた。この点については、今後のさらに詳細の検討が必要であると考えている。

酵素阻害については、当初予定していた実験成果が得られなかった。その原因について、本研究で用いる予定であった薬物代謝 CYP および核内レセプター発現アデノウイルスは既に作製を終え、 -80°C 下でストックとして保存していたのであるが、本研究で使用するために解凍増殖させると、高い発現量が得られなかった。ウイルスのタイターを上げるため種々の努力を行ったが、どうしても作製した当時(5年前)の活性が得られなかった。本理由が分からない(ウイルスは増える)ことから、やもえず手法を変えて新たにこれらの発現アデノウイルスを作製することとなった。このために、酵素阻害実験は 2 年以上の遅れとなり、また、in vivo 実験は行えなかった。

iPS から肝臓への分化は、種々の幹細胞マーカータンパク質の発現から推測すると胎児肝細胞にまでは達したと考えられる。本研究において肝臓特異的転写因子を強制発現することにより薬物代謝活性を示す細胞の分化に成功した。特に、HNF6 と HNF4 の共同発現により CYP3A4 および CYP1A2 の高い発現が認められた。しかし、発現の増加の認められない P450 分子種も存在し、さらなる検討が必要である。小腸への分化についても成功したが、高い薬物代謝活性を有する細胞への分化にはさらなる工夫が必要であると考えられた。本研究において行った健康食品の使用調査、研究結果および文献調査はデータベース化して、ホームページに掲載することを想定し準備をしてきたが、本研究班の中で健康食品の製品名をそのまま公開することは問題にはならないかとの議論がなされた。このまま公表するとメーカー側からのクレーム等が予測されるとの意見から、ホームページへの掲載と公開については、慎重に検討することとした。

E. 結論

アンケート調査結果から 243 品目の健康食品の使用が確認されたので、これらの薬物代謝活性阻害および誘導の評

価を行った。酵素誘導については現在までに約 200 品目の製品の評価を行った。その結果、程度に差はあるものの約 40% の商品に誘導が認められた。また、約 20% の製品において細胞増殖抑制が観察された。ヒト iPS 細胞の肝・腸管上皮細胞への分化においては、薬物代謝活性を有する肝細胞への分化に成功した。さらに、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も世界で初めて成功した。また、本研究成果の公開するためのデータベース化の基礎構築が完了した。

F. 研究発表

(1) 国内 4 件

「永田 清」

1. 坂口修平、高橋昌吾、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしての TNF- α 誘導肝細胞死と酸化ストレス - シグナル伝達機構からのアプローチ- 日本エンドトキシン・自然免疫研究会、筒井ひろこ、小谷穰治、横地高志、エンドトキシン・自然免疫研究 15 - 飛躍する自然免疫研究-、医学図書出版、東京、53-57, 2013
2. 永田 清、化学物質の吸収・排泄経路、衛生薬学 - 健康と環境- 第5版、(平塚明、姫野誠一郎、長沼章、編集) 広川書店、349-355、2012
3. 永田 清、薬物相互作用、薬害・副作用学 第1版、(川西正祐、小野秀樹、賀川義之 編集) 南山堂、2012
4. Takahashi S, Miura A, Sasaki H, Sakaguchi S, Nagata K. TNF- α /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of hepatocyte injury. *J Tohoku Pharm Univ.* 59, 69-74 (2012)

(2) 海外 12 件

「永田 清」

1. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 653-657 (2012).
 2. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Chemical Stabilizer, CoCl(2) and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 398-404 (2012).
 3. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Kumagai T, Matsunaga T, Omori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 enhances the expression of the CYP3A4 gene in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 in press
- 「松永民秀」
5. Nakamura K, Matsuzawa N, Ohmori S, Ando Y, Yamazaki H, Matsunaga T. Clinical evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28: 38-43 (2013).
 6. Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, Ohmori S. Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and expression analyses of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism. *Biol Pharm Bull.* 36, 292-298 (2012).
 7. Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori S. Evaluation of

human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 598-604 (2012).

8. Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S. Lower expression of HNF4 α and PGC1 α might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 430-438, 2012.

「細川正清」

9. Suzaki Y, Uemura N, Takada M, Ohyama T, Itohda A, Morimoto T, Imai H, Hamasaki H, Inano A, Hosokawa M, Tateishi M, Ohashi K. The effect of carboxylesterase 1 (CES1) polymorphisms on the pharmacokinetics of oseltamivir in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 69, 21-30 (2013).
10. Suzaki Y, Uemura N, Hosokawa M, Ohashi K. Gly143Glu polymorphism of the human carboxylesterase 1 gene in an Asian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 69, 735-736 (2012).

「頭金正博」

11. Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y. Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 447-450 (2012).

H. 学会発表 (22 件)

1. 佐々木崇光、沼田 喜弘、成田 昌

代、高橋 昌悟、田中 大、松永 民秀、永田 清：肝特異的転写因子 HNF-6 による薬物代謝酵素発現誘導：新規薬物代謝研究ツールを志向した肝分化 iPS 細胞樹立への応用、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。

2. 熊谷 健、中澤 洋一、野崎 智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。
3. Iwao T, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).
4. Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Sasaki T, Matsunaga T, Nagata K. Enhanced expression of Cytochrome P450 genes by hepatocyte nuclear factor-6 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).
5. Ishii Y, Koba H, Oizaki T, Iwamoto Y, Ikushiro S, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. Alteration in the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by Cytochrome P450 3A4: Different susceptibility of UGT isoforms and UGT1A7 variants, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).

6. Miyauchi Y, Ishii Y, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and 1A9 suppress Cytochrome P450 3A4 function: Evidence for the involvement of the cytosolic tail of UGT in the suppression, 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands).
7. 小西麻美子、奥崎 恭子、北畠 知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、榊原 明美、鈴木 匡、松永 民秀、頭金 正博、細川 正清、大森 栄、永田 清：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調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム 2012 年 7 月 (福岡)。
8. 齋藤詩奈子、高橋 昌悟、角間 元美、榊 聡美、伏見 彩、佐々木崇光、永田 清：健康食品によるシトクロム P450 活性阻害の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
9. 齋藤 雄大、笠原 彩、中澤 洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
10. 沼田 喜弘、佐々木崇光、千葉 文博、菅野 高弘、高橋 里菜、吉田美都里、松永 民秀、永田 清：HNF6 導入時期による肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
11. 菅野 高弘、佐々木崇光、沼田 喜弘、千葉 文博、吉田美都里、高橋 里菜、松永 民秀、永田 清：microRNA 導入による肝薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
12. Miyauchi Y, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. Post-translational regulation of cytochrome P450 3A4 activity through protrin-protein interactions with UDP-glucuronosyltransferase 2B7 and 1A9: The UGT domain(s) contributing to the interaction, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
13. Iwao T, Nakamura K, Nagata K, Matsunaga T. Generation of human induced pluripotent stem cell derived enterocytes with peptide transport function, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
14. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Sugiyama R, Sasaki T, Nagata K, Kurose K, Niwa T, Yamaori S, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T. Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
15. Nakamura T, Miyauchi Y, Takeda T, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Yuji Ishii Y. Cytochrome P450 3A1 alters the function of UDP-glucuronosyltransferase 2B3 which lacks potential glycosylation sites, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
16. Kinoshita K, Koba H, Miyauchi Y, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Yuji Ishii Y. Cytochrome P450 3A4 alters the affinity of UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms toward UDP-glucuronic acid, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
17. Sasaki T, Numata Y, Kanno T, Chiba

- F, Takahashi R, Yoshida M, Matsunaga T, Nagata K. MicroRNA enhances the expression of CYP genes in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
18. Numata Y, Sasaki T, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Kanno S, Nagata K. Identification of a novel transactivation mechanism of the MRP3 gene, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
19. Sasaki T, Numata Y, Takahashi S, Kumagai T, Matsunaga T, Nagata K. Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development, International Symposium for Neurosciences 2013, 2013年2月(仙台).
20. 宮内 優、石井祐次、永田 清、山添 康、マッケンジー・ピーター、山田英之：Cytochrome P450 3A4 活性の UDP-glucurinosyltransferase (UGT) 2B7 による抑制：UGT2B7 と calnexin の C 末端 cytosolic tail 置換による抑制作用の消失、日本薬学会第133年会、2013年3月(横浜)。
21. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清：HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- α 誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と

HO-1 の関与、日本薬学会第133年会、2013年3月(横浜)。

22. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清：健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第133年会、2013年3月(横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 発明の名称：人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法

発明者：松永民秀、岩尾岳洋、近藤祐樹、吉橋幸美

出願番号：特願 2012-247010

出願日：2012年11月19日

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

2. 発明の名称：人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法

発明者：松永民秀、岩尾岳洋

出願番号：特願 2013-036434

出願日：2013年2月26日

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II. 分担研究報告

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）

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

研究分担報告書

肝分化 iPS 細胞への肝特異的転写因子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 高橋 昌悟

東北薬科大学 薬学部 博士後期課程 3 年

研究要旨：ヒト肝細胞は、医薬品開発における薬物動態試験等を行う上で必要不可欠なツールである。しかしながら、十分な細胞数を確保することは困難であり、近年、樹立された人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は、新規肝細胞リソースとして期待されている。昨年度、我々は肝分化 iPS 細胞へ HNF6 を導入することにより、CYP3A4 を高発現させることに成功した。そこで、他の肝特異的転写因子(LETf)を HNF6 と共に導入し、薬物代謝酵素発現量の変化を測定した結果、HNF6 と他の LETf の組み合わせにより、多くの CYP 分子種で発現量の増加が認められた。本研究により、LETf の協調作用は、iPS 細胞の肝分化誘導に重要であることが示され、さらに、HNF6 および HNF4 α の同時導入では CYP1A2 および CYP3A4 発現量の相乗的な上昇を初めて明らかにした。

A. 研究目的

我々は、iPS 細胞を胎児肝細胞類似の遺伝子発現パターンを示す細胞まで分化させることに成功した。加えて、HNF6 発現アデノウイルスベクターを用いた分化法により、医薬品代謝に極めて重要な酵素である CYP3A4 を高発現した細胞への分化が可能となった。しかしながら、未だヒト肝細胞と比較して薬物代謝酵素群の発現は低く、その酵素活性も認められなかった。そこで、Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) および CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) ファミリーに代表される肝特異的転写因子(LETf)に注目した。中でも、HNF6、HNF1 α 、HNF3 β 、HNF3 γ 、HNF4 α および C/EBP α は、互いに協調し合いながら肝細胞において重要な役割を担っている。そこで、本研究では、これらを同時導入することにより、薬物代謝評価系にも応用可能な肝細胞への分

化を目指した。

B. 研究方法

ヒト胎児肝細胞(HFL 細胞)を用いた LETf 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定

HFL 細胞を 1.0×10^5 cell/well(collagen-coated 24-well plate)で播種し、24 時間後に LETf 発現アデノウイルス(Ad-LETf)を感染させた。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、各遺伝子の発現量を測定した。

肝分化 iPS 細胞を用いた LETf 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定および CYP3A4 活性測定

ヒト iPS 細胞を既に確立した肝分化プロトコールに従い、肝分化 iPS 細胞を作製した。この肝分化誘導中の day 9, day 12, day 15 に各 Ad-LETF を感染させ、day 20 に細胞を 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) を用いたりアルタイム PCR 法によりアルブミン (ALB) および P450 発現量の変化を測定した (分化肝細胞における ALB および CYP3A4 の発現量を 1 としたときの相対値を黒から赤のヒートマップで示した)。また、day 19 に Ad-LETF を感染させ、72 時間後に、CYP3A4 の代表的基質であるテストステロン (300 μ M) を暴露させ、6 時間後の代謝物 (6 β -ヒドロキシテストステロン) の濃度を測定した。

C. 研究結果および考察

HFL 細胞を用いた LETF 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定

HFL 細胞を用いて、肝細胞マーカーである ALB および CYP3A4 に対する LETF の影響について検討した (図 2.)。ALB においては、HNF1 α と HNF6、HNF1 α と C/EBP α 、HNF3 γ と HNF6、HNF3 γ と C/EBP α 、HNF4 α と HNF6 および HNF6 と C/EBP α の組み合わせにより、それぞれ約 11 倍、11 倍、15 倍、31 倍、15 倍および 119 倍の発現量の上昇が認められた。次に、CYP3A4 について検討したところ、HNF1 α および C/EBP α の単一感染、HNF1 α と HNF6、HNF3 γ と C/EBP α および HNF4 α と HNF6 の組み合わせ導入により、それぞれ、18 倍、26 倍、54 倍、57 倍および 67 倍の発現量の上昇が認められた。以上、本研究により LETF の 2 種同時導入により、ALB および CYP3A4 発現量を上昇させることが明らかとなった。特に、ALB における HNF6 および C/EBP α 同時導入、CYP3A4 に対する HNF4 α および HNF6 の同時導入においは、他の組み合わせと比較しても、著しい発現上

昇効果であり、この発現上昇効果は初めて明らかとなった。これらから、HNF6 は、LETF の相互作用の中でも中心的な役割を担っていることが示唆された。

肝分化 iPS 細胞を用いた LETF 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定および CYP3A4 活性測定

iPS 細胞の肝分化過程に Ad-LETF を感染させ、ALB および CYP3A4 への影響を検討した (図 3)。その結果、day 12 おける LETF 導入が、ALB 発現量を上昇させる傾向が認められた。特に、HNF6 および C/EBP α の同時導入において、コントロールと比較して約 100 倍の発現量の上昇が認められた。この 2 因子による肝分化 iPS 細胞における ALB の相乗的な上昇は、本研究により得られた初めての知見である。また、HNF1 α および HNF6 の同時導入においても顕著な増加が認められた。これらの結果から、HNF6 は他の LETF との同時導入により、肝分化を促進させる可能性が示唆された。続いて、同様に CYP3A4 発現量においても検討した。CYP3A4 においても、感染時期により、LETF による影響が異なることが示唆された。特に、day 9、day 12 における HNF1 α 、HNF3 β の同時導入により、11 倍および 23 倍の著しい発現上昇が認められた。また、胎児肝細胞期である Day 15 においては、HNF4 α および HNF6 の同時導入により、12 倍の発現量の相乗的な上昇が認められた。この知見も、本研究により初めて明らかとなった。そこで、HNF4 α および HNF6 同時導入により CYP3A4 発現量の顕著な増加が認められたことから、肝分化 iPS 細胞における CYP3A4 酵素活性を測定した (図 4)。2 因子同時感染において、ヒト肝細胞の約 2% の CYP3A4 活性を示した。また、データは示せないが肝特異的な発現を示す CYP1A2 の

発現量は1000倍の上昇が認められた。肝分化 iPS 細胞は、薬物代謝能を有さないことが大きな問題となっているが、HNF4 α およびHNF6の導入により、薬物代謝能を有する細胞へ分化促進できたと考えている。これらの結果からも、HNF6は、薬物代謝能を有する肝細胞への分化に重要である可能性が示唆された。

D. 結論

HNF6と他のLETfの協調作用は、薬物代謝酵素や肝細胞マーカーの発現調節に寄与している可能性が、HFL細胞と肝分化iPS細胞を用いた検討から明らかとなった。また、HNF4 α とHNF6の胎児肝細胞期の肝分化iPS細胞へ導入させることで、CYP3A4酵素活性を有する細胞へ分化することに成功した。今後は、HNF6と他のLETf導入の感染時期や3種以上の組み合わせを含めた更なる検討により、薬物代謝能を十分に有した分化肝細胞の確立を目指す。

F. 研究発表

(1) 国内 1 件

1. Takahashi S, Miura A, Sasaki H, Sakaguchi S, Nagata K. TNF- α /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of hepatocyte injury. *J Tohoku Pharm Univ.* 59, 69-74 (2012)

(2) 海外 3 件

- 「永田 清」
2. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Kumagai T, Matsunaga T, Omori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 enhances the expression of the CYP3A4 gene in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.

Drug Metab Pharmacokinet. 2013 in press

3. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 653-657 (2012).
4. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 α Chemical Stabilizer, CoCl₂ and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 398-404 (2012).

2. 著書 3 件

1. 永田 清、化学物質の吸収・排泄経路、衛生薬学 - 健康と環境- 第5版、(平塚明、姫野誠一郎、長沼章、編集) 広川書店、349-355、2012
2. 永田 清、薬物相互作用、薬害・副作用学 第1版、(川西正祐、小野秀樹、賀川義之 編集) 南山堂、2012
3. 坂口修平、高橋昌悟、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしてのTNF- α 誘導肝細胞死と酸化ストレス、エンドトキシン・自然免疫研究15 - 飛躍する自然免疫研究-、(筒井ひろこ、小谷穰治、谷 徹、横地高志 編集)、医学図書出版、東京、53-57、2013.

3. 学会発表 22 件

1. 佐々木崇光、沼田 喜弘、成田 昌代、高橋 昌悟、田中 大、松永 民秀、永田 清：肝特異的転写因子HNF-6による薬物代謝酵素発現誘導：新規薬物代謝研究ツールを志向した肝分化iPS細胞樹立への応用、平成24年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012年5月

- (仙台).
2. 熊谷 健、中澤 洋一、野崎 智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台).
 3. Iwao T、Nagata K、Matsunaga T. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 4. Takahashi S、Numata Y、Narita M、Tanaka Y、Sasaki T、Matsunaga T、Nagata K. Enhanced expression of Cytochrome P450 genes by hepatocyte nuclear factor-6 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 5. Ishii Y、Koba H、Oizaki T、Iwamoto Y、Ikushiro S、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. Alteration in the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by Cytochrome P450 3A4: Different susceptibility of UGT isoforms and UGT1A7 variants、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 6. Miyauchi Y、Ishii Y、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and 1A9 suppress Cytochrome P450 3A4 function: Evidence for the involvement of the cytosolic tail of UGT in the suppression、19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12th European Regional ISSX Meeting、June 2012 (Netherlands).
 7. 小西麻美子、奥崎 恭子、北畠 知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、榊原 明美、鈴木 匡、松永 民秀、頭金 正博、細川 正清、大森 栄、永田 清：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調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム 2012 年 7 月 (福岡).
 8. 齋藤詩奈子、高橋 昌悟、角間 元美、榊 聡美、伏見 彩、佐々木崇光、永田 清：健康食品によるシトクロム P450 活性阻害の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 9. 齋藤 雄大、笠原 彩、中澤 洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 10. 沼田 喜弘、佐々木崇光、千葉 文博、菅野 高弘、高橋 里菜、吉田美都里、松永 民秀、永田 清：HNF6 導入時期による肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 11. 菅野 高弘、佐々木崇光、沼田 喜弘、千葉 文博、吉田美都里、高橋 里菜、松永 民秀、永田 清：microRNA 導入による肝薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森).
 12. Miyauchi Y、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. Post-translational regulation of cytochrome P450 3A4 activity through protrin-protein interactions with UDP-glucuronosyltransferase 2B7

- and 1A9: The UGT domain(s) contributing to the interaction, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
13. Iwao T, Nakamura K, Nagata K, Matsunaga T. Generation of human induced pluripotent stem cell derived enterocytes with peptide transport function, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 14. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Sugiyama R, Sasaki T, Nagata K, Kurose K, Niwa T, Yamaori S, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T. Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 15. Nakamura T, Miyauchi Y, Takeda T, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Cytochrome P450 3A1 alters the function of UDP-glucuronosyltransferase 2B3 which lacks potencial glycosylation sites, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 16. Kinoshita K, Koba H, Miyauchi Y, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Cytochrome P450 3A4 alters the affinity of UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms toward UDP-glucuronic acid, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 17. Sasaki T, Numata Y, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Matsunaga T, Nagata K. MicroRNA enhances the expression of *CYP* genes in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 18. Numata Y, Sasaki T, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Kanno S, Nagata K. Identification of a novel transactivation mechanism of the *MRP3* gene, 27th JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
 19. Sasaki T, Numata Y, Takahashi S, Kumagai T, Matsunaga T, Nagata K. Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development, International Symposium for Neurosciences 2013, 2013年2月(仙台).
 20. 宮内 優、石井祐次、永田 清、山添 康、マッケンジー・ピーター、山田英之: Cytochrome P450 3A4 活性の UDP-glucurinosyltransferase (UGT) 2B7 による抑制: UGT2B7 と calnexin の C 末端 cytosolic tail 置換による抑制作用の消失、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜).
 21. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清: HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- α 誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と HO-1 の関与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜).
 22. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清: 健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)
- 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

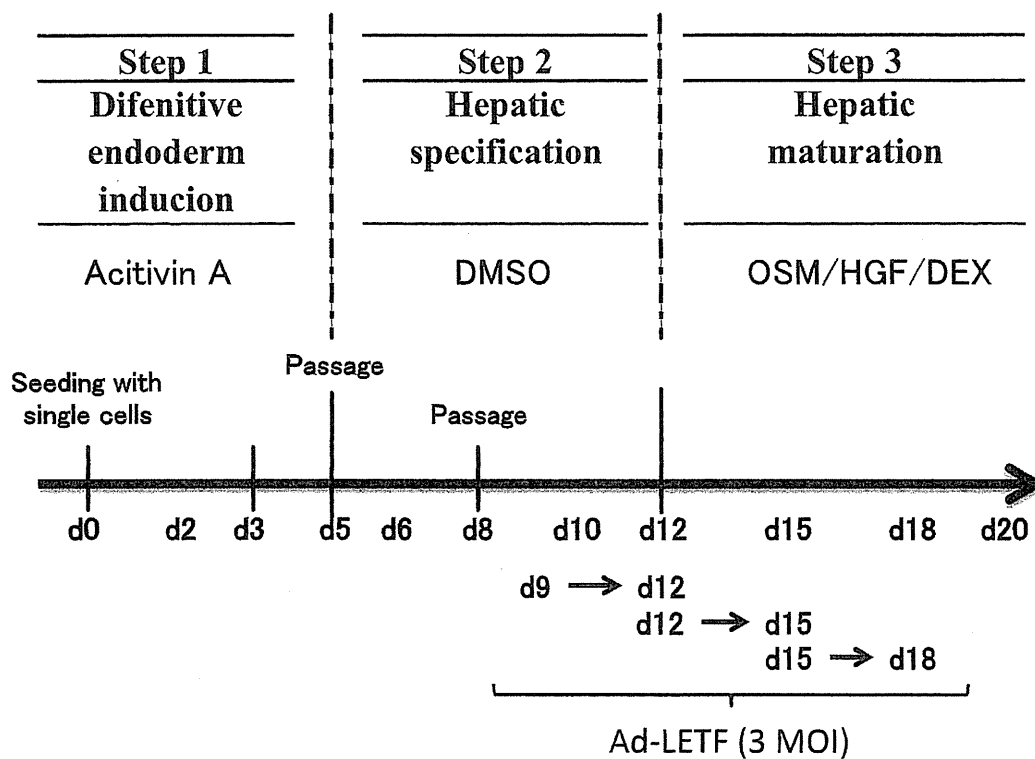


図1. iPS細胞の肝分化誘導およびAd-LETf感染プロトコール

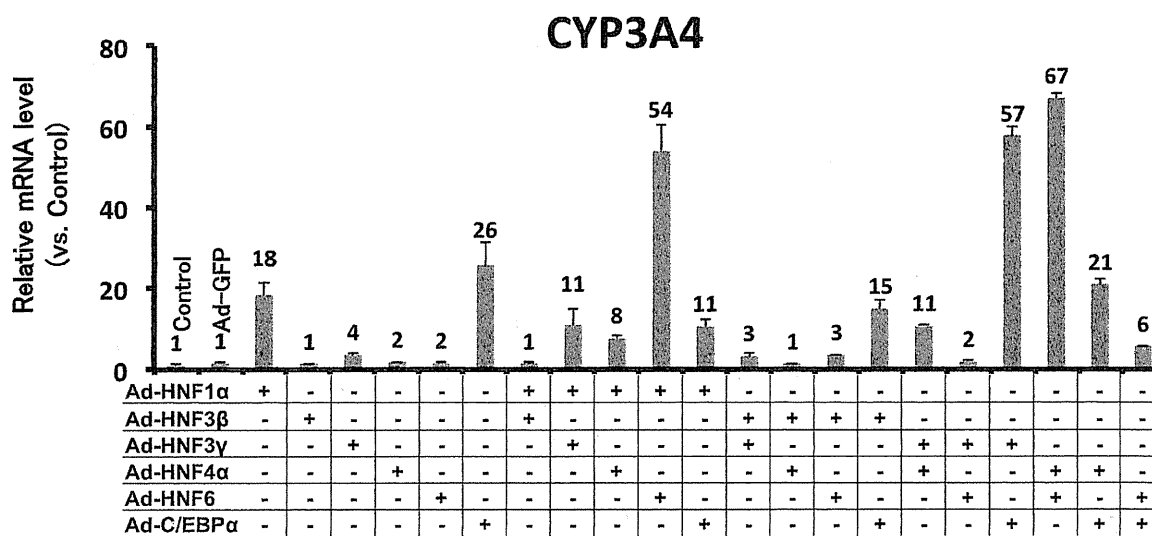
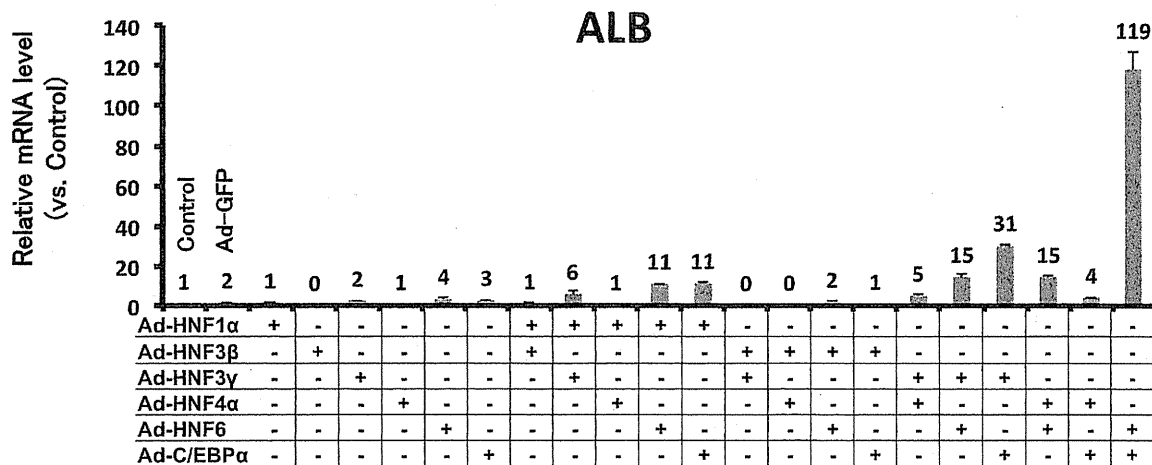


図2. HFL細胞におけるLETf導入によるALBおよびCYP3A4への影響