

肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素誘導及び肝特異的転写因子発現パターン解析 健康食品使用状況調査に関するアンケート調査

研究分担者 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。本研究では、既に確立した iPS 細胞の肝分化誘導法により得られた肝分化 iPS 細胞を用いて、薬物代謝酵素誘導に関する検討を行った。また、併せて iPS 細胞のより効率的且つ機能的な肝細胞化を目的に、肝分化誘導におけるキー遺伝子の同定を試みた。その結果、本肝分化 iPS 細胞は、CYP1A1/1A2 の代表的な誘導剤である 3-MC、B[a]P、TCDD 処理によって CYP1A1 mRNA の著しい誘導が認められた。さらに、HNF-6 及び C/EBP- の発現時期並びに発現量は、ヒト肝臓に匹敵する肝分化 iPS 細胞を作製する上で重要であることを見出した。また、iPS 細胞を用いた新規薬物相互作用評価系の構築に加え、アンケートによる健康食品の使用状況調査を実施した。

A . 研究目的

健康志向が高い現代において、健康食品は副作用がないとの先入観から、医薬品との安易な併用による薬物相互作用に起因した健康被害が頻発する可能性が高い。しかしながら、数多くの健康食品が販売されている中、医薬品との相互作用を検討した例は少なく、薬物相互作用の主要因と考えられる薬物代謝酵素誘導及び阻害について、多検体の試料を正確且つ効率的に評価する方法は確立されていない。そこで、本研究では新規薬物相互作用評価系の確立を目的に、肝細胞に分化誘導した iPS 細胞（肝分化 iPS 細胞）による薬物代謝酵素誘導機能について検証を行った。本肝分化 iPS 細胞については、既に肝分化マーカーに加え、主要な薬物代謝酵素及び核内レセプター等の発現を測定しており、肝細胞としての機能性を有していることを確認している。また、これまでに報告されている肝分化 iPS 細胞の作製方法は、ヒト肝細胞機能には及ばないことから、更なる成熟性の向上を目指して、iPS 細胞の肝分化誘導におけるキー遺伝子の同定を試みた。さらに、健康食品の使用状況の把握するため、地域性などのバイアスを排除するために全国レベルでのアンケート調査を開始した。

B . 研究方法

肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素誘導の測定

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）（25 日間培養、12-well plate 使用）に従い、肝分化 iPS 細胞を作製し、薬物処理による CYP1A1/1A2 の誘導測定を行った。肝分化誘導 23 日目に 3-MC（1 μ M）、B[a]P（1 μ M）、TCDD（1 nM）を含有した変法ランフォード培地を添加し、48 時間暴露後に細胞を TRI REAGENT にて回収した。この薬物処理による CYP1A1/1A2 誘導は、SYBR Premix Ex Taq（TaKaRa）を用いたリアルタイム PCR 法により行った。

肝分化 iPS 細胞の肝特異的転写因子発現パターン解析

作製した肝分化 iPS 細胞の肝特異的転写因子群の遺伝子発現パターン解析を行った。HNF-1、HNF-3、HNF-3、HNF-4、HNF-6、c/EBP、c/EBP を解析対象遺伝子とし、SYBR Premix Ex Taq（TaKaRa）を用いたリアルタイム PCR 法により発現パターンの測定を行った。

健康食品に関するアンケート調査

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。アンケートは、無記名による連結不可能匿名化を行い、東北薬科大学倫理委員会の審査及び規定に従い実施中である。

C. 研究結果および考察

肝分化 iPS 細胞の転写因子を介した薬物代謝誘導能の確認

本肝分化 iPS 細胞は、CYP1A1/1A2 の代表的な誘導剤である 3-MC、B[a]P、TCDD 処理によって CYP1A1 mRNA の著しい誘導が認められた（図 1 及び 2）。3-MC では約 10 倍、B[a]P では約 3 倍、TCDD では約 25 倍の CYP1A1 mRNA 発現誘導が確認された。この 3 化合物は AhR の強力なリガンドであることから、本肝分化 iPS 細胞においては、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が明らかとなった。

ヒト iPS 細胞の効率的分化誘導因子の同定

ヒト iPS 細胞のより効率的かつ機能的な肝細胞化を目的に、肝細胞の発生に必要不可欠な肝特異的転写因子の遺伝子発現パターン解析を行った（図 3）。その結果、本肝分化 iPS 細胞は、iPS 細胞と比較して、未分化細胞が内胚葉系細胞に分化する際に重要な HNF-1 β 及び HNF-3 β の mRNA 発現量が高く、さらに、内胚葉系細胞が胎児型肝細胞に分化する際に重要な因子 HNF-3 α 、HNF-4 α 、c/EBP- β についても HepG2 細胞と同程度もしくはそれ以上の mRNA 発現が認められた。しかし、胎児型肝細胞が成熟肝細胞へ分化する際に重要であると考えられている HNF-6、c/EBP- α に関しては肝分化誘導による顕著な mRNA 発現上昇は確認されなかった。即ち、本肝分化 iPS 細胞は、発現不足が予想される HNF-6、C/EBP- α を直接導入することで、より機能的な肝細胞の作製が期待できることが明らかとなった。

全国調剤薬局を対象とした健康食品使用状況調査

全国約 100 店舗の調剤薬局のうち、83 店舗にアンケート調査票の送付を行った。本年度のアンケート回収率は 34%で、継続して調査を実施中である。なお、現時点で効能効果情報の明らかな健康食品（インターネット等で公開）は、本アンケート調査において 135 品目の使用を確認している。

E. 結論

本肝分化 iPS 細胞は、薬物代謝酵素誘導機構が存在していることが確認できた。さらに、肝特異的転写因子の遺伝子発現パターン解析から HNF-6 及び C/EBP- α の両遺伝子は、より機能的な肝細胞の作製において重要である可能性を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

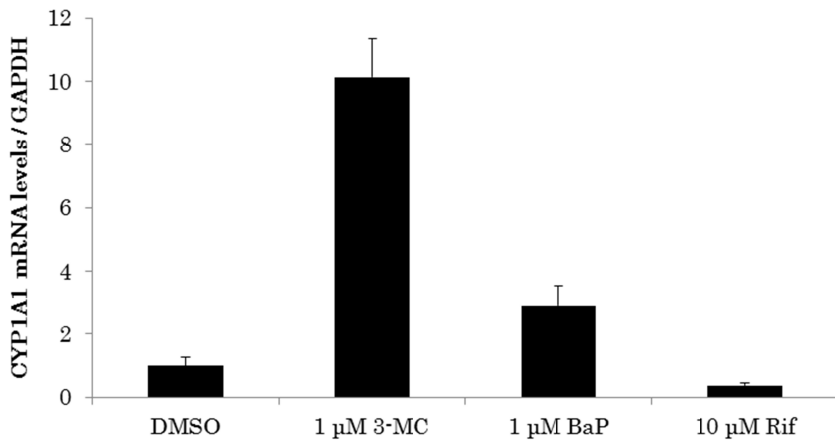


図 1 . 本肝分化 iPS 細胞の 3-MC 及び BaP による CYP1A1 誘導の確認

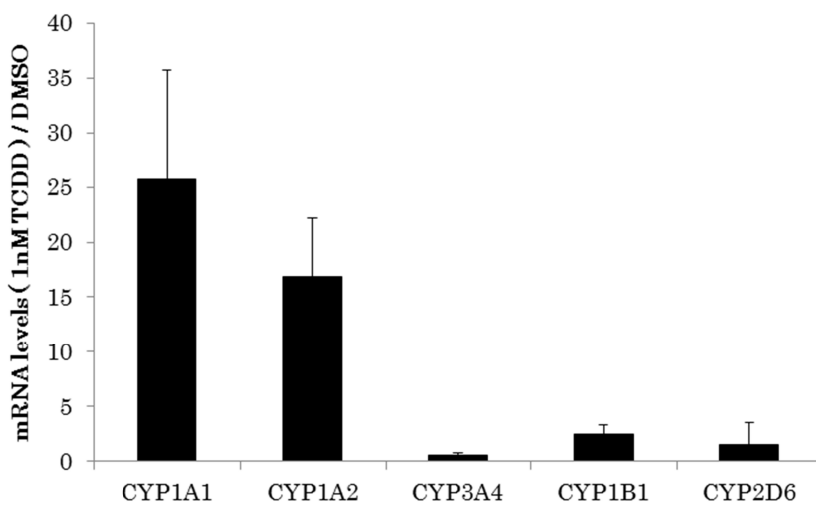


図 2 . 本肝分化 iPS 細胞の TCDD による CYP1A1 誘導の確認

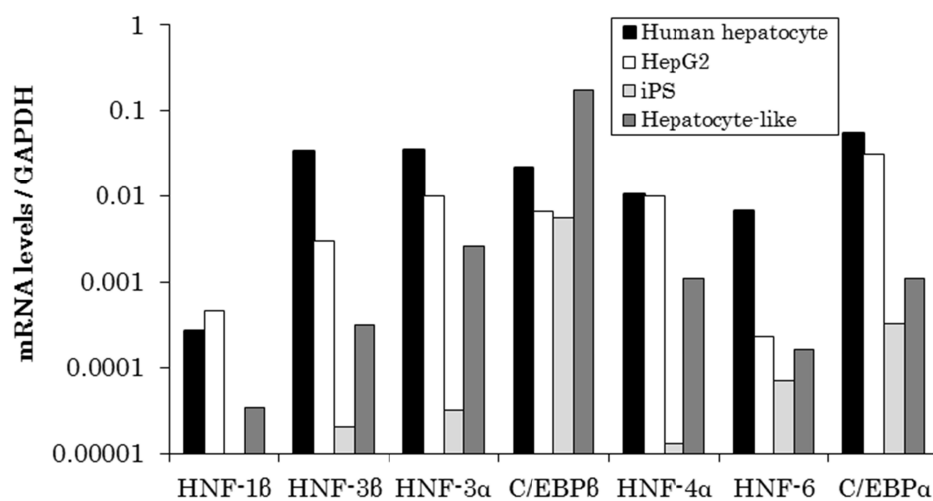


図 3 . 本肝分化 iPS 細胞の肝特異的転写因子発現パターン解析

研究分担者 永田 清 東北薬科大学 環境衛生学教室 教授
研究協力者 熊谷 健 東北薬科大学 環境衛生学教室 講師

研究要旨：本研究では CYP1A1、CYP1A2 遺伝子間約 23 kb を含むレポーター遺伝子を安定に発現する細胞を構築し、その有用性についての検討を行った。構築した細胞株は、TCDD の濃度、及び処置時間さらには細胞数依存的なレポーター活性の上昇を示した。また TCDD 以外のこれまでに報告された CYP1A1/1A2 の誘導剤に対してもすべて誘導応答を示し、内因性の CYP1A1、CYP1A2 mRNA 発現解析の結果はレポーター活性の測定結果と類似する傾向を示した。従って、本細胞株を用いたレポーターアッセイの結果は、細胞内の誘導を反映しており、信頼性の高いものであることが示唆された。

A . 研究目的

薬物代謝の中心的な役割を担っている cytochrome P450 (CYP)の中でも CYP1A1/1A2 は医薬品の代謝の加え、食物成分や環境汚染物質の解毒の代謝あるいは、発がん性物質の代謝活性化にも関与しており、様々な薬物や化合物により強力に誘導されることが報告されている。従って、これらの酵素誘導は、医薬品投与による治療効果の低下や発がんの要因になるため、医薬品開発においては CYP1A1/1A2 の誘導評価を初期の段階に行い、これらの酵素活性を変動させない候補化合物を絞り込むことが重要である。また、近年ヒト CYP1A1 及び CYP1A2 をコードする遺伝子は第 15 番染色体上で隣接して存在し、これらの酵素は互いの転写調節領域を共有しているため、協調的に誘導されることが明らかになり、遺伝子配列を考慮した同時誘導評価を行うことが望ましいと考えられる。一方、医薬品開発においては候補化合物ライブラリーの中から有望な候補化合物を短時間且つ低コストで絞り込むことが重要であり、初期段階のスクリーニングの効率化が求められている。現在、*in vitro*における薬物代謝酵素の誘導評価系には操作が簡便で感度が非常に高いという点からレポーターアッセイと呼ばれる手法が汎用されているが、そのほとんどが単一の CYP

にした報告はほとんどない。

そこで本研究は、CYP1A1/1A2 誘導を迅速且つ同時に予測評価を行うことが可能な新規培養細胞系システムの構築を目的として行った。

B . 研究方法

CYP1A1/1A2 デュアルレポーター遺伝子安定発現細胞株の構築

CYP1A1/1A2 遺伝子間全長約 23 kb の転写調節領域を 2 つの異なるレポーター遺伝子間に挿入したデュアルレポーター遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子をライゲーション (モル比 5:1) し、ヒト肝がん由来細胞株の HepG2 細胞に導入した。その後、700 ~ 900 µg/mL のゲネチシンを含む培地で培養し、セレクションを行った。次に、この作製した安定発現細胞株のコロニーを 24-well plate に個別に回収し、さらに培養後、-naphthoflavone (-NF) 10 µM を誘導剤としてレポーターアッセイを行った。なお、CYP1A1 誘導は luciferase (Luc)、CYP1A2 誘導は secreted alkaline phosphatase (SEAP) 活性にて測定した。また、本安定発現細胞株の有用性を明らかにするために、既に報告されている 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD)をはじめとする様々な CYP1A1/1A2 の誘導剤を処置し、レポーターアッセイを行うと共にリアルタイム PCR による mRNA 発現解析による CYP1A1/1A2 誘導評価も行った。

分子種を対象にしたもので、複数の分子種を対象

ルシフェラーゼアッセイ

安定発現株における Luc 活性は、Luciferase Assay System を用いて測定を行った。すなわち、24-well plate で培養した細胞を PBS で洗浄後、各 well に passive lysis buffer (PLB) を 100 μ L 添加し、細胞を溶解した。溶解液を 4、2,000 rpm で遠心分離後、上清 20 μ L を 96-well white plate に移し、各 well に Luciferase Assay Reagent を加え、化学発光検出装置にて Luc 活性を測定した。

SEAP アッセイ

SEAP 活性は Great EscApe™ SEAP Detection Kit を用いて測定を行った。すなわち、細胞培養上清 25 μ L に 5 \times dilution buffer を 75 μ L 加え、65、30 分インキュベート後、2 分氷冷した。氷冷後、室温に戻し、substrate solution を 100 μ L 加えた。室温で 15 分インキュベート後これを測定サンプルとし、96-well white plate に移し、化学発光検出装置にて SEAP 活性を測定した。

C . 研究結果および考察

本安定発現細胞株は、得られたクローンの中でも -NF に対して Luc 及び SEAP 活性が共に高かったクローン番号 5-1 を使用した (表 1)。次に、TCDD に対する反応性を確認したところ、濃度、処置時間及び細胞数依存的なレポーター活性の上昇が認められた (図 1、2)。続いて、これまでに報告されている様々な CYP1A1/1A2 の誘導剤を処置したところ、処置したすべて誘導剤でレポーター活性の上昇が認められた (表 2)。併せて、内因性の CYP1A1、CYP1A2 mRNA 発現解析も行った結果、mRNA 発現誘導率はレポーターアッセイによる結果と類似の傾向が観察された (表 3)。これより、本細胞株を用いたレポーターアッセイの結果は、細胞内における CYP1A1/1A2 の誘導を反映し、信頼性の高いものであることが示唆された。

さらに自動車の排気ガスやタバコの煙、あるいは加熱処理した食物中に含まれ、人体への暴露機会が非常に多い様々な多環芳香族炭化水素類 (PAHs) について本細胞株を用いて誘導評価を行った。その結果、PAHs 間でレポーター活性に差が

認められ、特に dibenz[*a,h*]anthracene が両酵素を強力に誘導し、CYP1A2 において他の PAHs とは異なる誘導パターンを示すことが観察された (図 3)。これより、CYP1A1 と CYP1A2 間で異なる誘導機構が存在する可能性が示唆され、詳細な誘導機構解明の手がかりとなる新たな知見が見出された。

本研究では CYP1A1、CYP1A2 の誘導を同時に評価可能な新規培養細胞系システムを構築することが出来た。本細胞株は迅速かつ高感度に CYP1A1/1A2 の誘導を同時評価可能であり、医薬品の研究開発における候補化合物の CYP1A1/1A2 関連薬物相互作用の予測を始めとする様々なスクリーニングを行う上で今後非常に有用なツールになるものと考えられる。また、本細胞株のさらなる有用性を明らかにすることで CYP1A1/1A2 の誘導機構、構造活性相関の解析の際にも利用することが可能であると思われる。医薬品開発の迅速化が求められている現在、このような検討を基に、候補化合物のスクリーニングの効率化へ貢献し、安全な新規医薬品が医療の現場に早く届くようになることが期待される。

E . 結論

本研究において CYP1A1/1A2 の誘導を同時に評価可能なヒト肝由来の新規培養細胞系システムを樹立することが出来た。本細胞株は迅速かつ高感度に CYP1A1/1A2 の誘導を同時評価可能であり、医薬品の研究開発における候補化合物の CYP1A1/1A2 関連薬物相互作用の予測を始めとする様々なスクリーニングを行う上で今後非常に有用なツールとなるものと考えられる。また、本細胞株は、さらなる有用性を明らかにすることで CYP1A1/1A2 の誘導機構、構造活性相関の解析の際にも利用することが可能であると思われる。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. W. Sato, H. Suzuki, T. Sasaki, T. Kumagai, S. Sakaguchi, M. Mizugaki, S. Miyairi, Y. Yamazoe, K. Nagata, Construction of a

system that simultaneously evaluates CYP1A1 and CYP1A2 induction in a stable human-derived cell line using a dual reporter plasmid. Drug Metab Pharmacokinet. 25: 180-189 (2010)

2. H. Suzuki, T. Sasaki, T. Kumagai, S. Sakaguchi, K. Nagata, Malondialdehyde-modified low density lipoprotein (MDA-LDL)-induced cell growth was suppressed by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J Toxicol Sci. 35: 137-147 (2010)
3. T. Matsuda, M. Shimada, A. Sato, T. Akase, K. Yoshinari, K. Nagata, Y. Yamazoe, Tumor Necrosis Factor-Alpha-Nuclear Factor-Kappa B-Signaling Enhances St2b2 Expression during 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced Epidermal Hyperplasia. Biol Pharm Bull. 34:183-190 (2011).
4. S. Sakaguchi, S. Takahashi, T. Sasaki, T. Kumagai, K. Nagata, Progression of Alcoholic and Non-alcoholic Steatohepatitis: Common Metabolic Aspects of Innate Immune System and Oxidative Stress. Drug Metab Pharmacokinet. 226:30-46 (2011)

2. 著書

1. 佐々木崇光、永田 清、チトクロムP-450を介した薬物代謝、創薬研究のストラテジー、(奥山 茂、斉藤亜紀良、山田久陽 編集)金芳堂、京都、187-193、2011
2. 永田 清、薬物代謝酵素の個人変動の要因、予防医学としての衛生化学 —健康と環境—、(吉原新一、繪柳玲子 編集)広川書店、241-251、2010
3. 永田 清、医薬品の毒性に影響する要因、医薬品安全性学 (第2版)、(吉田武美、竹内幸一 編集)広川書店、49-67、2010
4. 永田 清、酵素誘導、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、127-139、2010

3. 学会発表

1. Ishii Y, Miyauchi Y, Koba H, Takeda S, Nagata K, Mackenzie IP, Yamazoe Y, Yamada H, Protein-protein Association of cytochrome P450 and UDP-Glucosyltransferase: Its Relevance to Enzyme Function. 25th JSSX Annual Meeting In Tokyo, Omiya, October 2010 p180
2. Kobe H, Ishii Y, Nurrochmad A, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie IP, Yamada

H. Comparison of Catalytic Properties between UDP-Glucosyltransferase 1A7*3, an Allelic Variant, and Its Wild-type 1A7*1. 25th JSSX Annual Meeting In Tokyo, Omiya, October 2010 p283

3. CYP3A4転写活性に影響を与えるFBS中誠分の同定 福士素子、熊谷健、佐々木崇光、永田清 第49回日本薬学会東北支部大会 福島 2010年10月 p61
4. MRP3における新規転写誘導機構の解明 沼田善弘、佐々木崇光、佐藤渉、松井怜美、鳥谷部貴洋、山添康、永田清 第49回日本薬学会東北支部大会 福島 2010年10月 p62

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

Clone number	% of control CYP1A1 (Luc)	% of control CYP1A2 (SEAP)
1-1	115	180
1-3	158	123
1-5	113	33
1-7	394	62
1-8	113	109
1-9	28	150
1-11	7655	64
1-12	91	158
5-1	3928	413
5-5	1466	160
5-7	2387	166
5-10	435	247
5-11	1426	372

表 1. 単離した CYP1A1/1A2 誘導評価細胞のクローン間における -NF に対する誘導性の違い

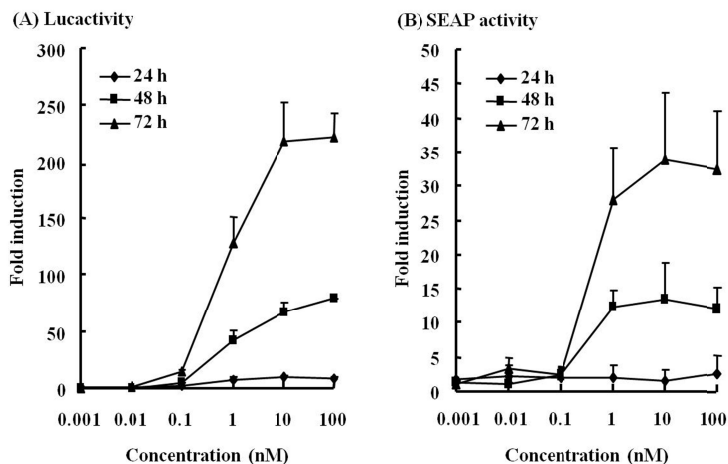


図 1. 安定発現細胞 (クローン 5-1) の TCDD に対する濃度及び処置時間依存性

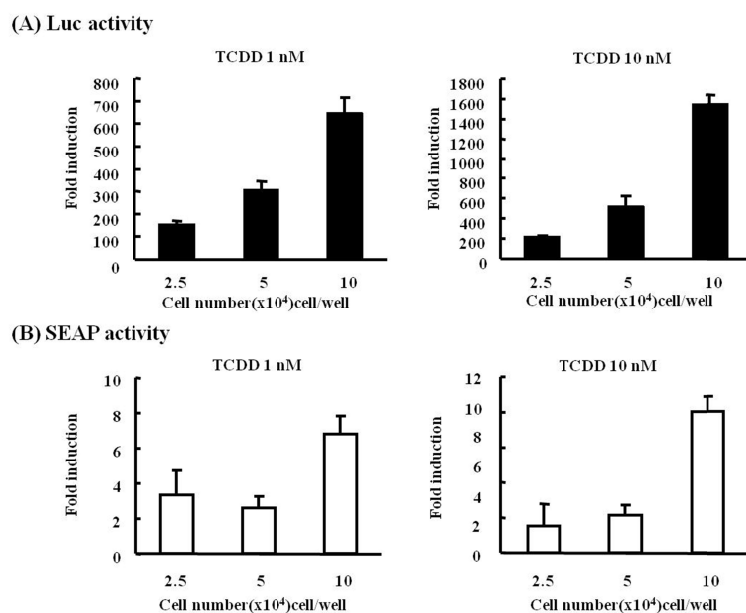


図 2. 安定発現細胞 (クローン 5-1) の TCDD の誘導に対する細胞数依存性

Compounds	Concentration	CYP1A1 (Luc)	CYP1A2 (SEAP)
		Fold induction (vs control)	Fold induction (vs control)
TCDD	1 nM	263.6 ± 49.9	9.1 ± 4.7
β-NF	10 μM	7.5 ± 1.7	2.8 ± 0.7
3-MC	1 μM	31.1 ± 2.2	7.4 ± 1.5
B[a]P	3 μM	17.7 ± 1.3	3.9 ± 0.9
OME	25 μM	17.1 ± 5.2	2.3 ± 0.8
LPZ	20 μM	9.2 ± 1.0	2.7 ± 1.1
ALB	3 μM	9.0 ± 1.4	2.2 ± 0.3
IND	10 μM	19.5 ± 2.9	2.7 ± 0.6

表 2. 安定発現細胞 (クローン 5-1) の各種 CYP1A1/1A2 誘導剤に対するレポーター活性

Compounds	Concentration	CYP1A1 mRNA	CYP1A2 mRNA
		Fold induction (vs control)	Fold induction (vs control)
TCDD	1 nM	1190.3 ± 104.3	124.6 ± 61.6
β-NF	10 μM	6.6 ± 5.7	15.3 ± 21.8
3-MC	1 μM	270.1 ± 122.8	37.8 ± 4.5
B[a]P	3 μM	177.2 ± 87.1	44.2 ± 14.9
OME	25 μM	39.3 ± 12.9	2.4 ± 1.2
LPZ	20 μM	30.2 ± 9.3	6.2 ± 1.7
ALB	3 μM	42.3 ± 19.7	19.8 ± 3.8
IND	10 μM	62.8 ± 27.0	6.3 ± 2.9

表 3. 安定発現細胞 (クローン 5-1) の各種 CYP1A1/1A2 誘導剤に対する mRNA 誘導レベル

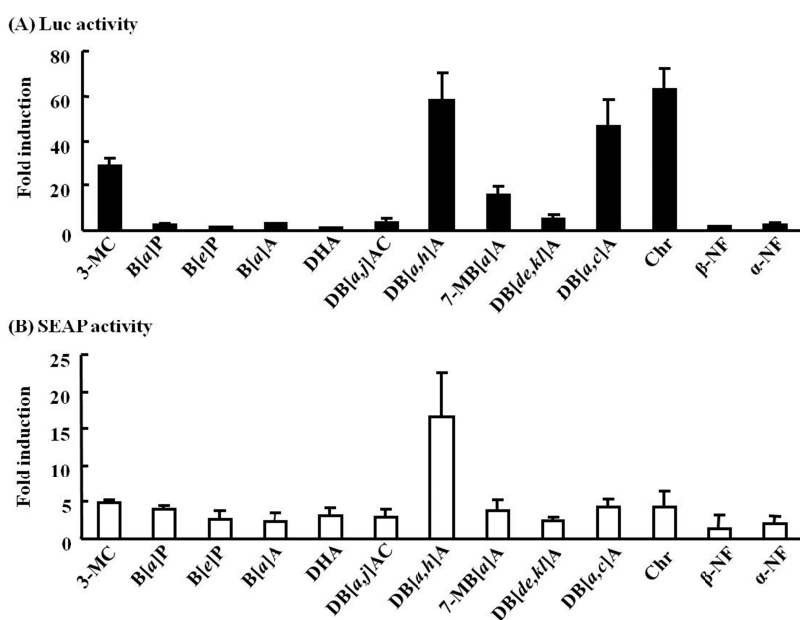


図 3. 本安定発現細胞の PAHs に対する反

P450 発現アデノウイルスベクターを用いた薬物代謝毒性発現予測系の確立

研究分担者	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 教授
研究協力者	中村 克徳	信州大学 医学部 准教授

研究要旨：本研究では、宿主に目的タンパク質を高発現可能なアデノウイルスベクターを用い P450 を培養細胞に単独あるいは同時発現させ、代謝活性の異なる培養細胞を作成することにより、個人差を考慮した薬物代謝毒性予測系の確立を試みた。本システムは、発現量を調節することにより個人差を模倣可能であり、また、凍結したアデノウイルス感染培養細胞を再培養して用いても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* 実験系と同様の結果が得られた。これらの結果より本発現システムはヒトの薬物代謝を予測するうえで有用な実験系になり得ることが示唆された。

A . 研究目的

薬物代謝は、薬物の活性本体の消失やプロドラッグの活性化に関わる重要な行程であり、血中薬物濃度の主要な決定因子であることから、薬効および毒性発現に関わる重要な因子として考えられている。それは主に肝臓に存在する薬物代謝酵素により行われており、中でもシトクロム P450 (CYP) は薬物の解毒代謝あるいは活性化に深く関わっている。しかしながら、ヒトにおける薬物代謝の個人差が明らかになり、薬物の薬効および毒性発現において問題となってきた。その主な原因は、遺伝的要因、食物、食品添加物、環境汚染物質などの種々の環境的要因、さらに、年齢差や性差などが挙げられる。医薬品開発を行う上で、薬物代謝を考慮することは必要不可欠であり、種差および個人差を考慮したヒトにおける正確な薬物代謝予測系が求められている。そこで、本研究では、宿主に目的タンパク質を高発現可能なアデノウイルスベクターを用い P450 を培養細胞に単独あるいは同時発現させ、代謝活性の異なる培養細胞を作成することにより、個人差を考慮した薬物代謝毒性予測系の確立を試みた。

B . 研究方法

P450 発現ウイルスの感染および薬物代謝酵素活性

ヒト主要 P450 である CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 および CYP3A4 の 5 種をヒト肝がん由来細胞である HepG2 細胞に単独あるいは同時発現させ、各 CYP 遺伝子の発現量を Real-time PCR、酵素活性を HPLC 及び P450-Glo™ Assays を用いて測定した。続いて、P450 発現ウイルス感染細胞に polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) である benzo[a]pyrene (BaP) および 3-methylcholanthrene (3-MC) を曝露し、その 24 時間後における細胞毒性を MTT assay を用いて測定することにより、P450 による毒性的代謝活性化評価を行った。

凍結細胞の薬物代謝活性

細胞培養 1 日目に AdCYP3A4 溶液(ウイルス力価 1×10^9 pfu/mL のものを D-MEM により 10 倍希釈し 1×10^8 pfu/mL に調製したものを使用)200 μ L を DMEM 800 μ L と混合し、DMEM を取り除いた HepG2 細胞播種 dish に添加する。CO₂ インキュベーターで 1 h 培養した後(15 min ごとに dish を揺らす)、DMEM 9 mL 加え、CO₂ インキュベーターで 24 h 培

養する。2 日目にアデノウイルス感染細胞の培養 dish から上清を取り除き、DPBS 10 mL で wash した後、0.1% Trypsin 溶液で 3 min 処置する。DMEM 10 mL で回収した後、1,000 rpm、5 min 遠心する。上清を取り除き、ペレットを TC プロテクター 1 mL でクライオチューブに移し、BICELL を用いて -80 にて保存する。3 日目に DMEM 10 mL/tube にて細胞を融解し、1,000 rpm、5 min 遠心した後、10 cm²dish に播種した。5 日目に培養 dish から上清を取り除き、DPBS 10 mL で wash した後、0.1% Trypsin で 3 min 処置する。DMEM 10 mL でアデノウイルス感染細胞を 15 mL tube に回収した後、1,000 rpm、5 min 遠心する。上清を取り除き、ペレットを DMEM 10 mL で溶解し、細胞計数を行う。細胞溶液を 96 well-plate (clear bottom) あるいは 48 well-plate に播種する。これを 72 h 培養し、P450-Glo™ Assays による CYP3A4 活性測定並びにケトコナゾールを用いた阻害実験を行った。

C . 研究結果および考察

前臨床試験におけるヒト肝の薬物代謝予測系としての応用の可能性を CYP1A1、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 および CYP3A4 をモデル酵素として検討した。まず、単一の P450 分子種発現時における本システムの特長について解析したところ、multiplicity of infection (MOI) に応じてその mRNA 発現量および酵素活性が調節可能であることが明らかとなった(図 1)。また、P450 発現ウイルス複数同時感染の場合でも、その mRNA 発現量は MOI 依存的にコントロール可能であり、かつ、CYP2C9、CYP2C19 および CYP2D6 においてはその酵素活性についてもアデノウイルス感染の有無により調節が可能であることが示された(図 2)。これら個人差の大きい分子種について、その発現量を調節することにより個人差を模倣可能な本システムは、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* 実験系と同様にヒトの薬物代謝を予測するうえ

で有用な実験系になり得ることが示唆された。また、構築したアデノウイルス P450 発現システムの応用として、PAHs の毒性発現様式の解明を検討した(図 3、4)。CYP1A1 は古くから PAHs の代謝活性化に関わるとされていたが、CYP1A1 発現細胞では細胞毒性の発現が認められなかった。近年、BaP 誘発性毒性発現は CYP1A1 欠損マウスにおいて増強されるとの報告がなされた。これは、CYP1A1 が PAHs の毒性化よりも解毒へ寄与することを現しており、今回の結果と一致したものとなった。一方、CYP3A4 発現培養細胞において、PAHs 濃度および MOI 依存的な細胞毒性が見られたことから、PAHs 毒性発現には CYP3A4 による代謝活性化が関係すると予測される。CYP3A4 はヒト肝において aflatoxin B₁、B₂ のような mycotoxin や PAH-diol 体を代謝活性化するなど、化合物の毒性的代謝にも関与すると報告されており、これについては、本研究結果を支持するものである。今後、いわゆる健康食品による薬物代謝活性への影響を調べていく上で、一定の薬物代謝活性を有す酵素減を確保することが重要である。そこで、本アデノウイルス P450 発現システムによって P450 が発現した培養細胞を一旦凍結し、再度培養したときに薬物代謝酵素活性を示すかについて検討を行った。凍結した細胞の薬物代謝酵素活性は、凍結しない細胞とほぼ同程度であった。また、酵素活性阻害について CYP3A4 を発現した細胞にて調べた。ケトコナゾールによる CYP3A4 酵素活性阻害定数の Ki は、凍結に関係なく既に報告されている値と同じであった(図 5)。

本アデノウイルス P450 発現システムにより発現させ、凍結することにより一定の酵素活性を示す酵素資料の提供が可能であることが判明した。これらの結果は、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

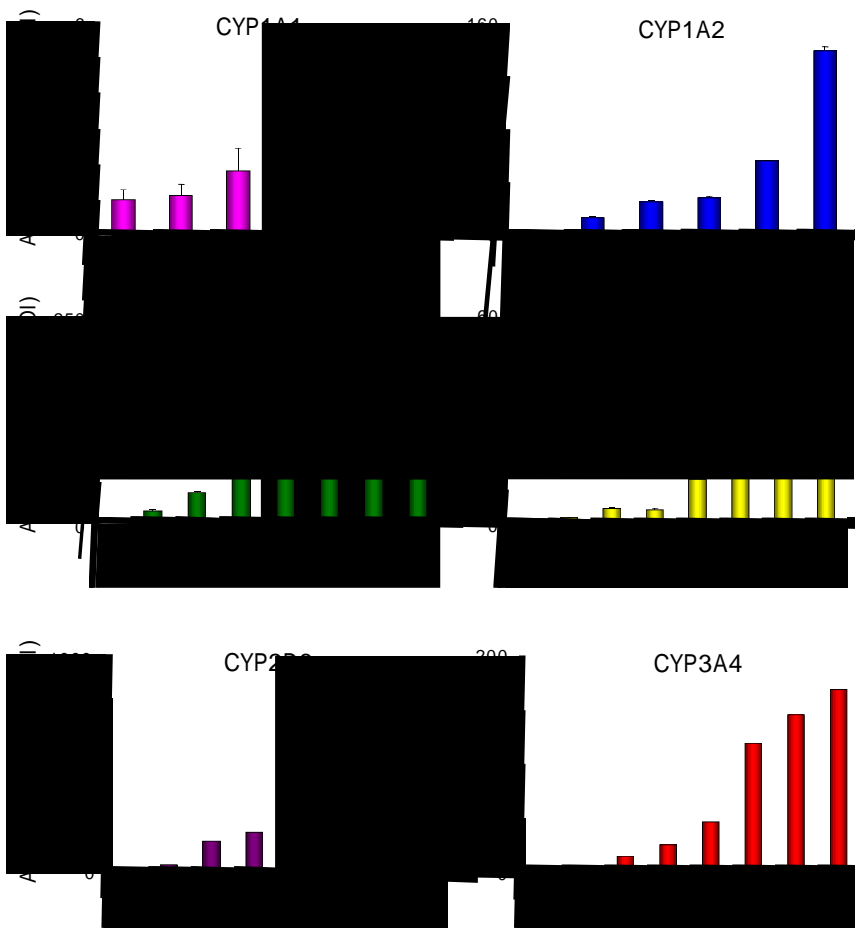


図 1. 単一の P450 分子種発現時における MOI 依存的な酵素活性

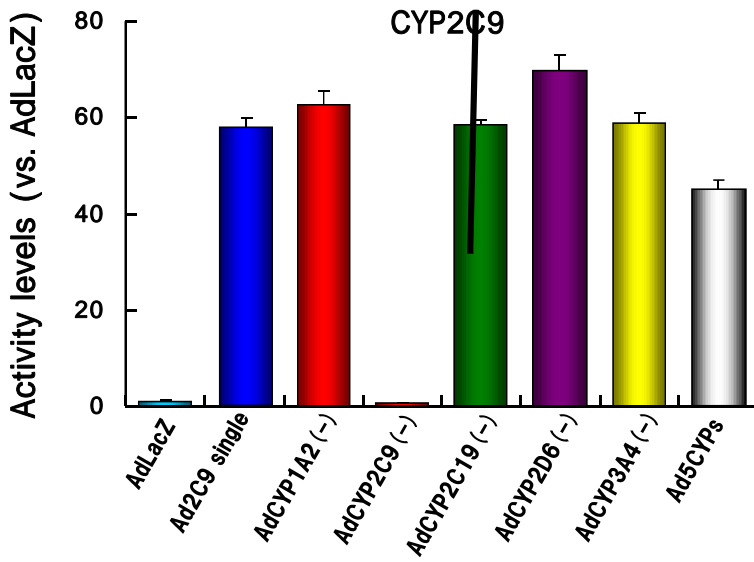


図 2. 5 種類同時感染における CYP2C9 活性

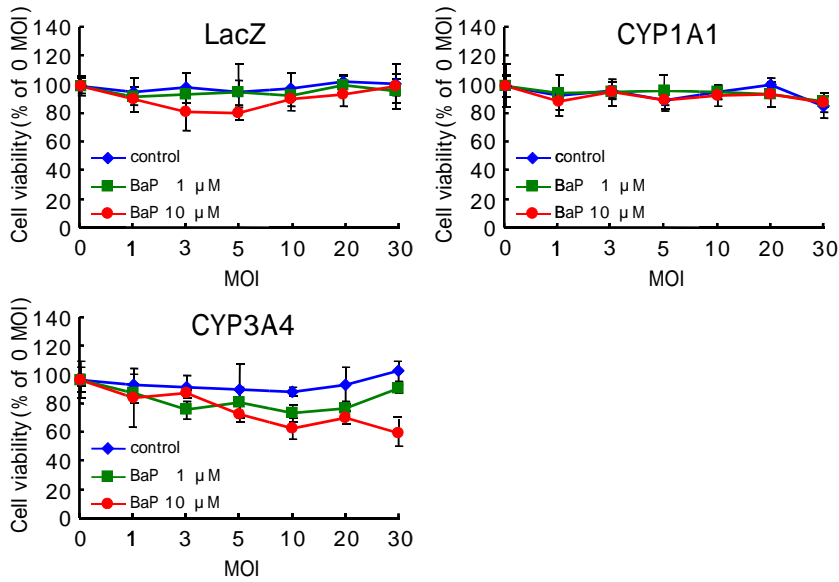


図 3. 本システムを用いた BaP 誘発性毒性発現評価

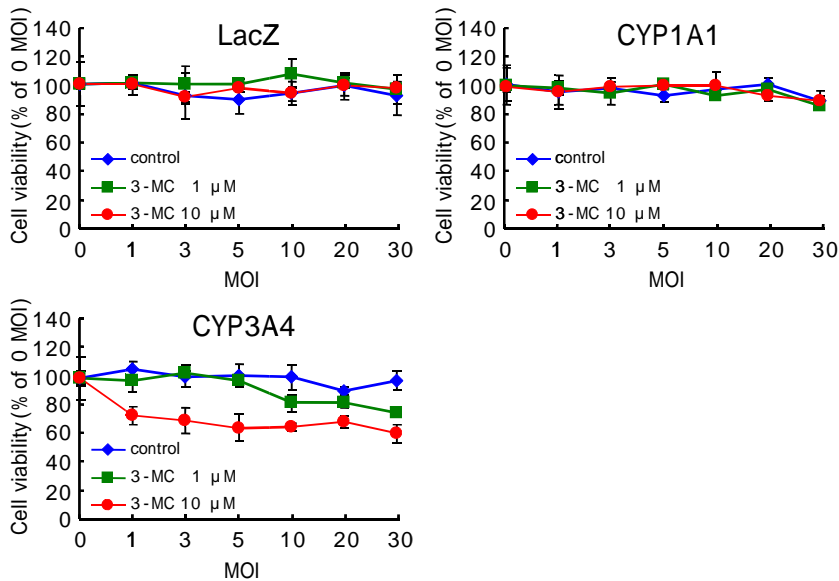


図 4. 本システムを用いた 3-MC 誘発性毒性発現評価

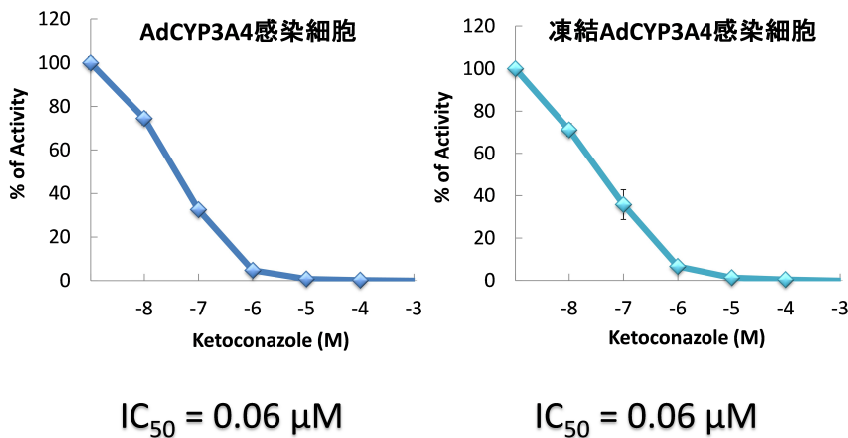


図 5. 本システムの凍結融解細胞を用いた CYP3A4 活性のケトコナゾールによる阻害実験
平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安心・安全確保推進研究事業)

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 HNF4 α cDNA を pTARGET ベクターに組み込んだ HNF4 α /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 (白水製薬, 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 (Turner 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により補正した。

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℃、5% CO₂存在下で培養した。播種 24 時間後に、薬物が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 xPBL 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 x 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 µL に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25 µL を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turner 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 (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。マイクロプレートに sample protein 5 µl、A 試薬 25 µl、B 試薬 200µl を添加し室温で 15 分間静置した後、750nm 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、HNF4αの発現が少ないため、5 µM 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、HNF4α/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 HNF4α 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 µM、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 µM 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 µM リファンピシンで 10.8 倍、ハイパーフォリンでは 0.1 µM で 23 倍で濃度依存的に誘導率が増加し、0.5 µM 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 3.8mL 加え 37℃ 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℃ 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 x 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、リファンピシンを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 μM 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。

リファンピシンを 1 から 5 μM 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、ハイパーフォー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ョ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。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(2):222-33. (2010)
3. Hori T, **Hosokawa M**. DNA methylation and its involvement in carboxylesterase 1A1 (CES1A1) gene expression. *Xenobiotica*. 40(2):119-28. (2010)
4. Satoh T, **Hosokawa M**. Carboxylesterases: Structure, Function and Polymorphism in Mammals. *J. Pestic.Sci*, 35(3), 205- (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(3), 229-239 (2010)
6. **Hosokawa M**. Are non-human primates useful experimental animals for pre-clinical study? *Drug Metab Pharmacokinet*. 25(3):221-2 (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, 1387-95, (2010)

2. 著書

細川正清：3・4 薬物の加水分解反応に関する酵素系 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相反応に関する酵素とその反応 g.カルボキシエステラーゼ、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

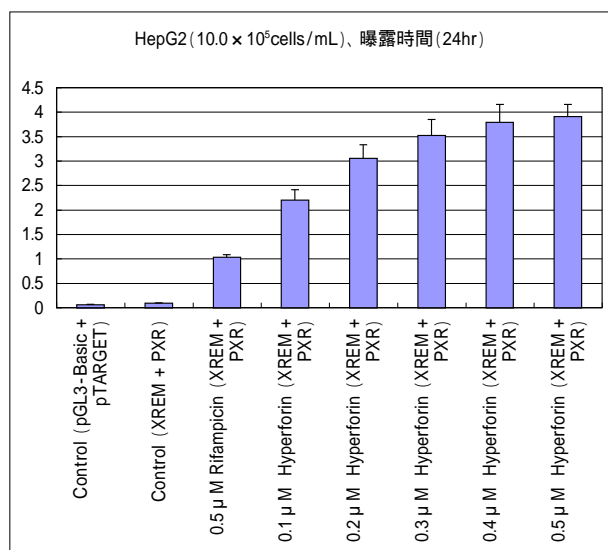


図 1 HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによる、rifampicin と hyperforin に対する CYP3A4 の酵素誘導

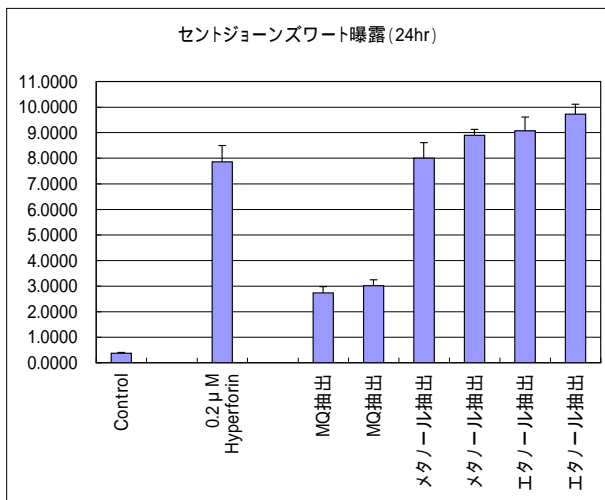


図2 市販のセントジョーンズワート (DHC) の CYP3A4 酵素誘導実験系に対する酵素誘導効果における MilliQ 水、メタノールおよびエタノール抽出の違い

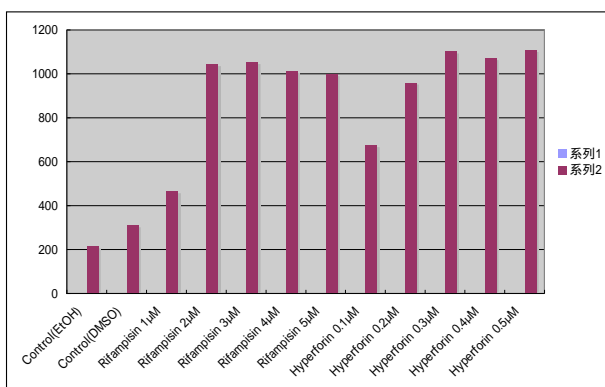


図3 CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いた rifampicin と hyperforin に対する CYP3A4 の酵素誘導

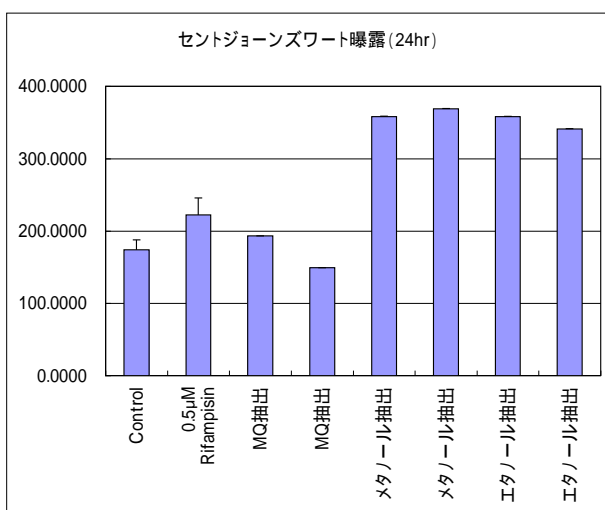


図4 3-1-10 細胞を用いた市販のセントジョーンズワート (DHC) の CYP3A4 酵素誘導実験系に対する酵素誘導効果における MilliQ 水、メタノールおよびエタノール抽出の違い

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。

1. ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

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というに、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た。

B. 研究方法

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 6 β -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 の誘導に関する核内受容体 PXR や転写因子 HNF4 及び PGC1 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 と比較して、ALB、PXR 及び HNF4 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 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 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 の誘導に關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 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-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適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

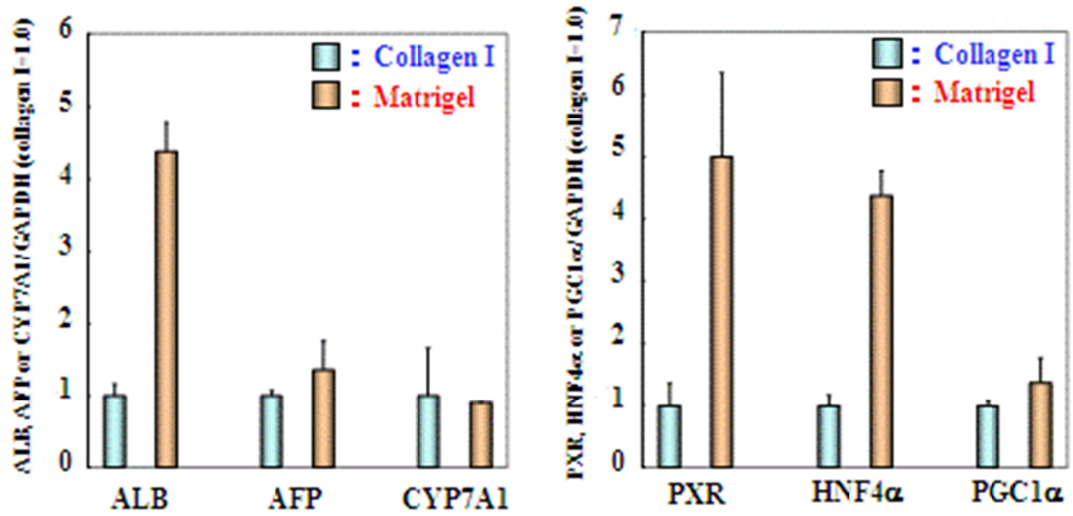


図 1 ヒト iPS 細胞より分化した細胞における肝細胞マーカー及び核内転写因子の mRNA 発現

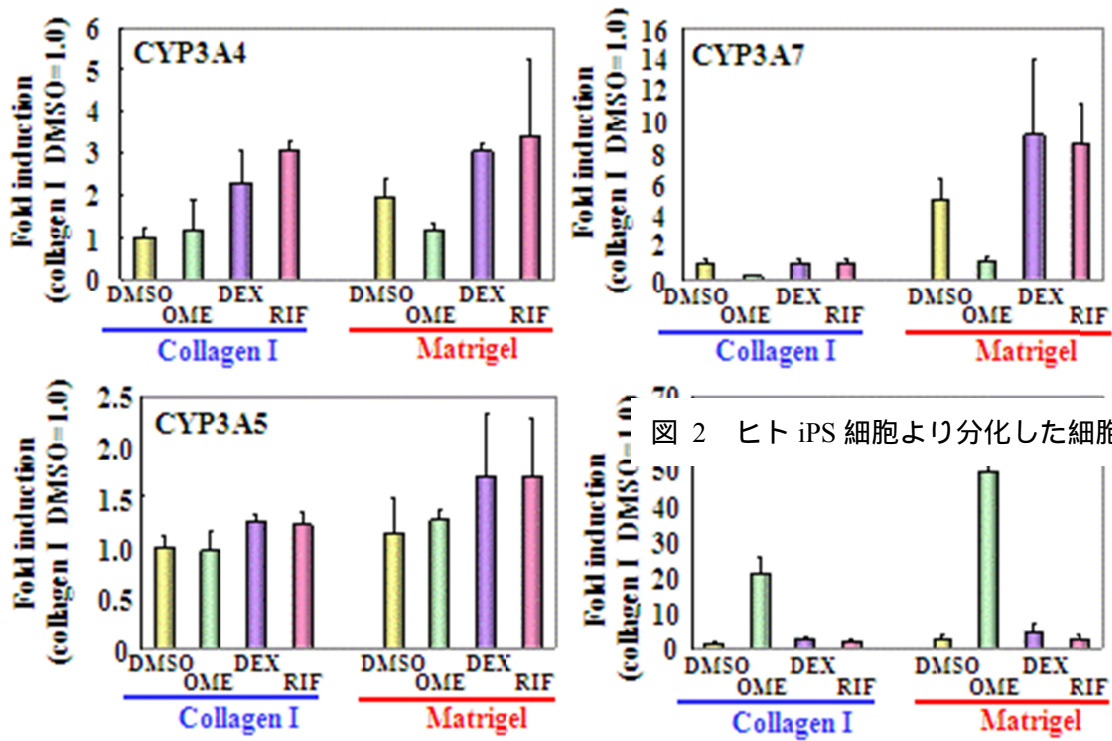


図 2 ヒト iPS 細胞より分化した細胞における CYP3As お

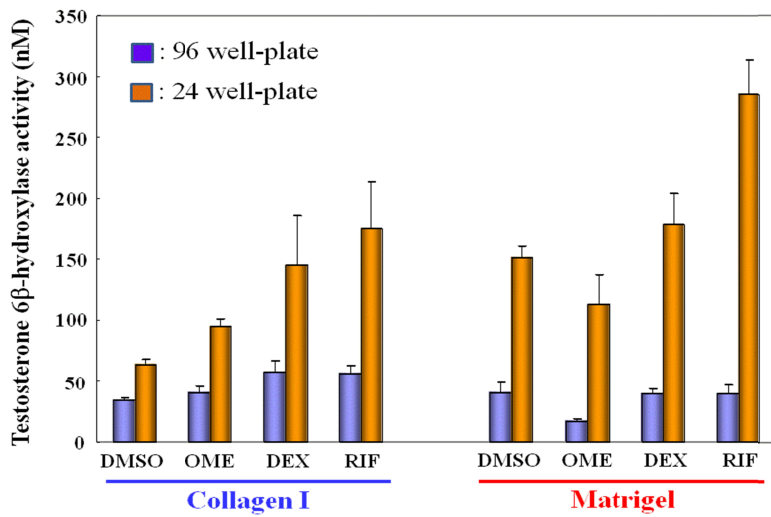


図 3 ヒト iPS 細胞より分化した細胞の testosterone 6β-水酸化活性

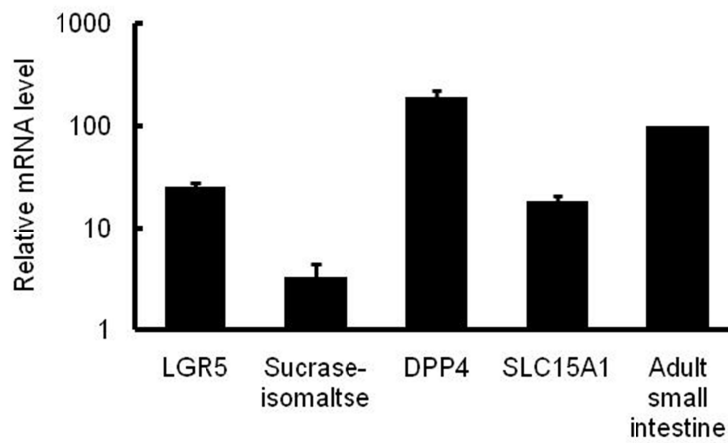


図 4 小腸幹細胞および上皮細胞マーカーの mRNA 発現解析 (プロトコール 1)

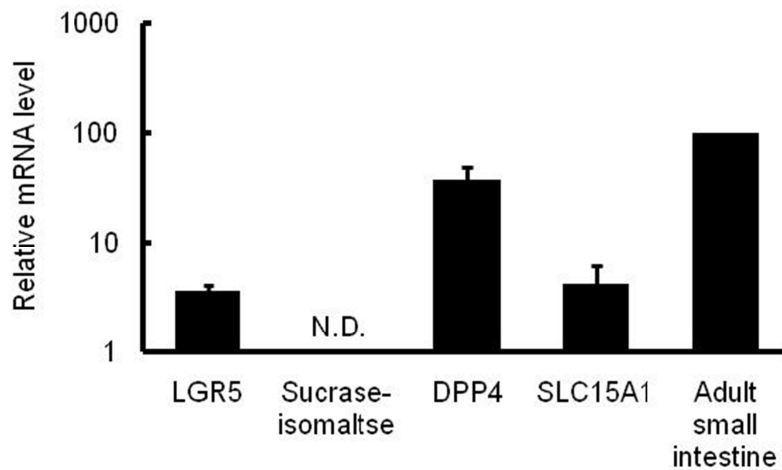


図 5 小腸幹細胞および上皮細胞マーカーの mRNA 発現解析 (プロトコール 2)

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ピンが CYP3A4 レポーター活性上昇並びに CYP3A4 mRNA 発現誘導を示した。さらにインディルピンによる 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ピンが 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、排泄の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 µl）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% CO_2 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、 TCID_{50}) 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% CO_2 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 μg 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ピン (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) 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關与する因子について検討を行った。各 5 μM 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 の關与が示唆された。

IND の CYP3A4 誘導における PXR 關与の検討

IND による CYP3A4 誘導活性における PXR の關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 を介した経路が關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、その誘導に關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

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).

3 . その他
該当なし

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)

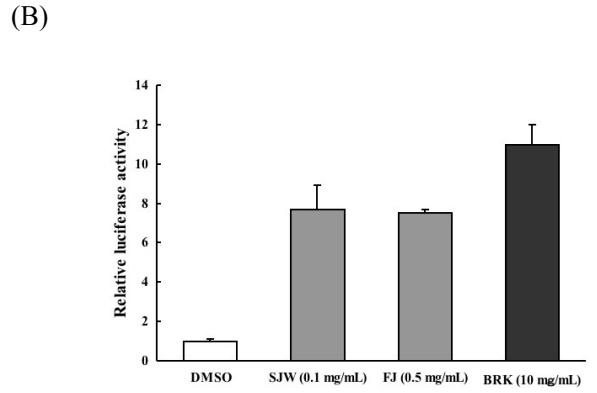
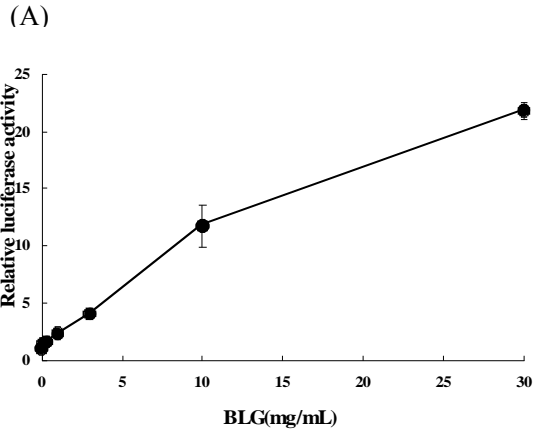
2. Kumagai T、 Sugawara R、 Miura M、 Sasaki T、 Miyairi S、 Nagata K. Indirubin、 a component of Ban-Lan-Gen、 activates CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. 26th JSSX Annual Meeting、 November 2011 (広島).

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- 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



響。A：セント

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

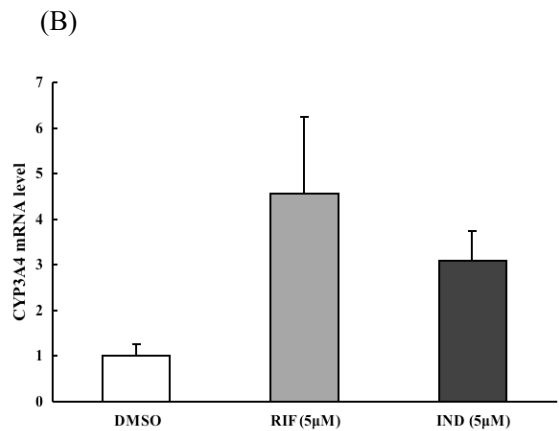
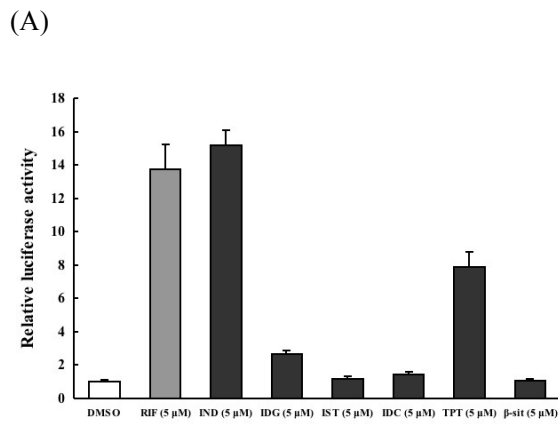


図2 板藍根成分の CYP3A4 誘導能の検討。A：代表的な板藍根成分であるインディルビン (IND)、インディゴ (IDG)、イサチン (IST)、インディカン (IDC)、トリプタントリン (TPT)、β-シトステロール (β-SIT) の CYP3A4 レポーター活性の比較。ポジティブコントロールとしてリファンピシ (RIF) を使用。B：内因性の CYP3A4 mRNA 発現に及ぼすインディルビンの影響

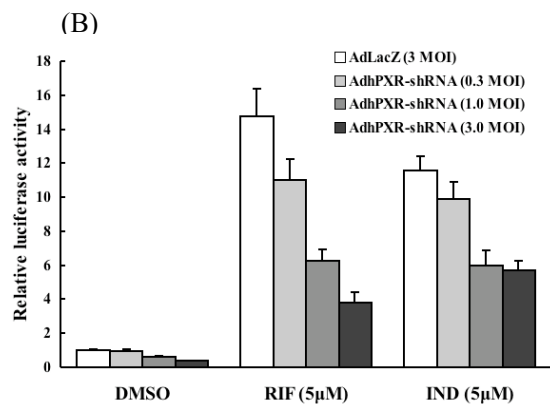
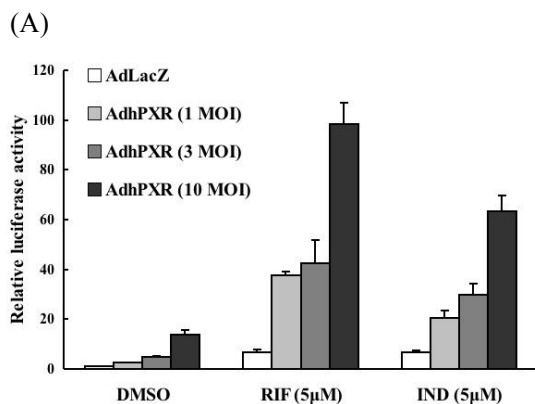


図3 インディルビンによる CYP3A4 誘導における PXR の関与の検討。A：アデノウイルスを用いた PXR 過剰発現系でのインディルビンによる CYP3A4 レポーター活性への影響。B：アデノウイルスを用いた

PXR ノックダウン系でのインディルピンによる 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、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 (Turner 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、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 (Turner 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 (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

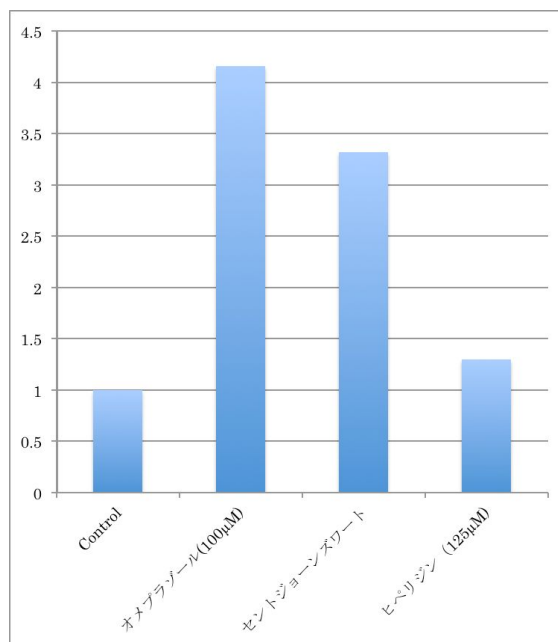


図 2 CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 5-1 細胞を用いたオメプラゾール、セントジョーンズワートおよびヒペリジンに対する酵素誘導

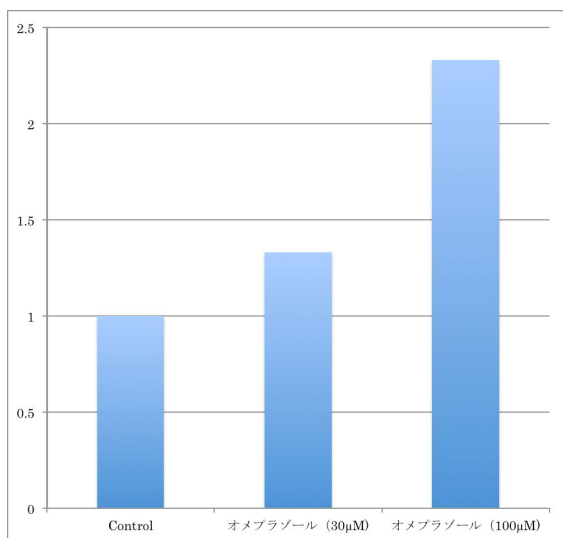


図 1 CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 5-1 細胞を用いたオメプラゾールに対する酵素誘導

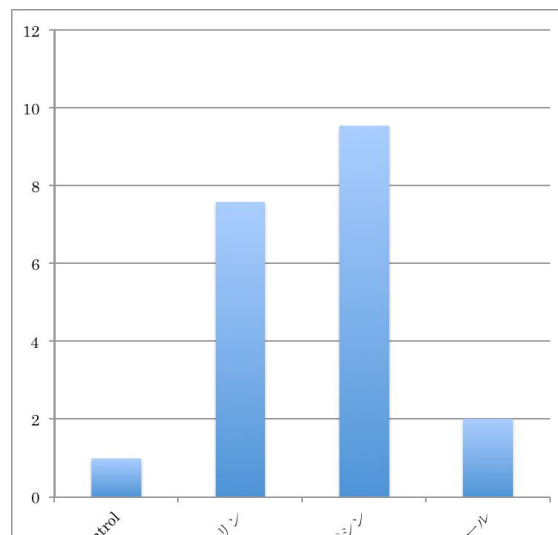


図 3 CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10細胞を用いたピクノジェノールに対する酵素誘導

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(LTF)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 LTF 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の 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。

C. 研究結果および考察

HepG2 細胞、HFL 細胞、ヒト肝初代培養細胞にお

ける HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

HepG2 細胞を用いて、主に薬物代謝に関与する CYP に対し、HNF6 の影響について検討したところ、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A7 の著しい発現量の上昇が認められた (図 2)。一方、CYP1A1、CYP1A2、CYP2D6 については、HNF6 発現アデノウイルスの感染による影響は認められなかった。また、HNF6 は、肝細胞のマーカー遺伝子であるアルブミン (ALB) や α -フェトプロテイン (AFP) の発現にも寄与することが明らかになった。HFL 細胞に関しては、HepG2 細胞と同様に CYP の発現に影響を及ぼすことが確認され、特に CYP3A4 においては、その mRNA 発現上昇は最大で約 120 倍と強い誘導が認められた (図 3)。次に、HNF6 の胎児肝レベルでの CYP3A4 発現誘導への寄与が明らかになったことから、ヒト成人肝細胞であるヒト肝初代培養細胞においても同様の検討を行った。その結果、ヒト肝初代培養細胞においては、HNF6 は CYP3A4 の発現誘導へは関与していない可能性が示唆された (図 4)。以上、本研究より HNF6 は、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が初めて明らかとなった。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。

肝分化 iPS 細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

iPS 細胞の肝分化誘導過程において HNF6 発現アデノウイルス感染させた結果、CYP3A4 mRNA 発現量は約 1400 倍と極めて強い発現誘導が認められ、ヒト肝初代培養細胞における CYP3A4 発現量の約 1/10 程度に達した (図 5)。また、CYP3A7 は約 8 倍、CYP1A2 は約 40 倍の発現上昇が確認された。一方、CYP1A1、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 については著しい発現上昇は認められなかった。また、ALB 及び AFP については HNF6 発現アデノウイルスの感染による影響は認められなかった。以

上の結果から、HNF6 は、iPS 細胞の肝分化誘導過程において発現させることで、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、HFL 細胞及びヒト肝初代培養細胞の結果から明らかのように、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ことから、本肝分化 iPS 細胞は、未だ未成熟な肝細胞であることが示唆された。

D . 結論

HNF6 は、薬物代謝酵素発現調節に寄与していることが種々の細胞を用いた検討から明らかになった。また、iPS 細胞の肝分化誘導過程において HNF6 を発現させることで CYP3A4 は、成人レベルに極めて近い発現量に達することが確認できた。今後は、HNF6 と同様に iPS 細胞の肝分化誘導におけるキー遺伝子として同定した C/EBP α を導入することで、よりヒト成人肝細胞に類似した肝分化 iPS 細胞の樹立を目指す。

E . 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 著書

該当なし

3. 学会発表

1. 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 回記念日本薬学会東北支部大会、2011 年 10 月 (仙台)。

2. 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

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

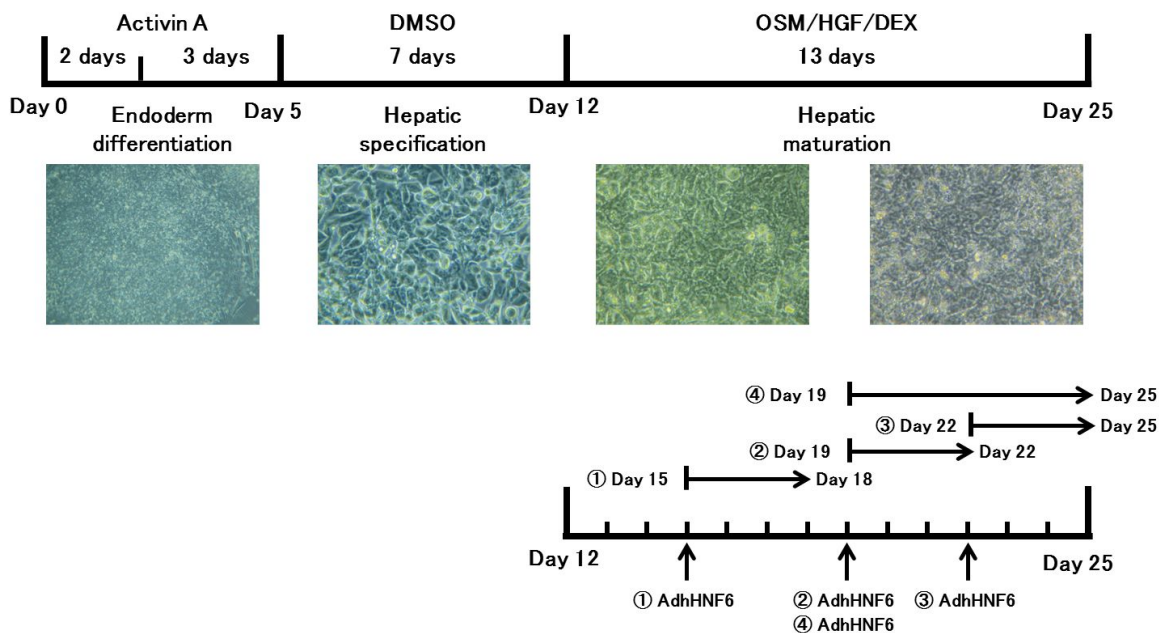


図 1 . iPS 細胞の肝分化誘導プロトコール

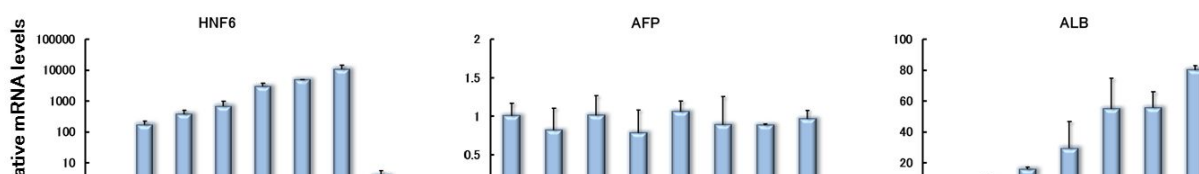


図 2 . HepG2 細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

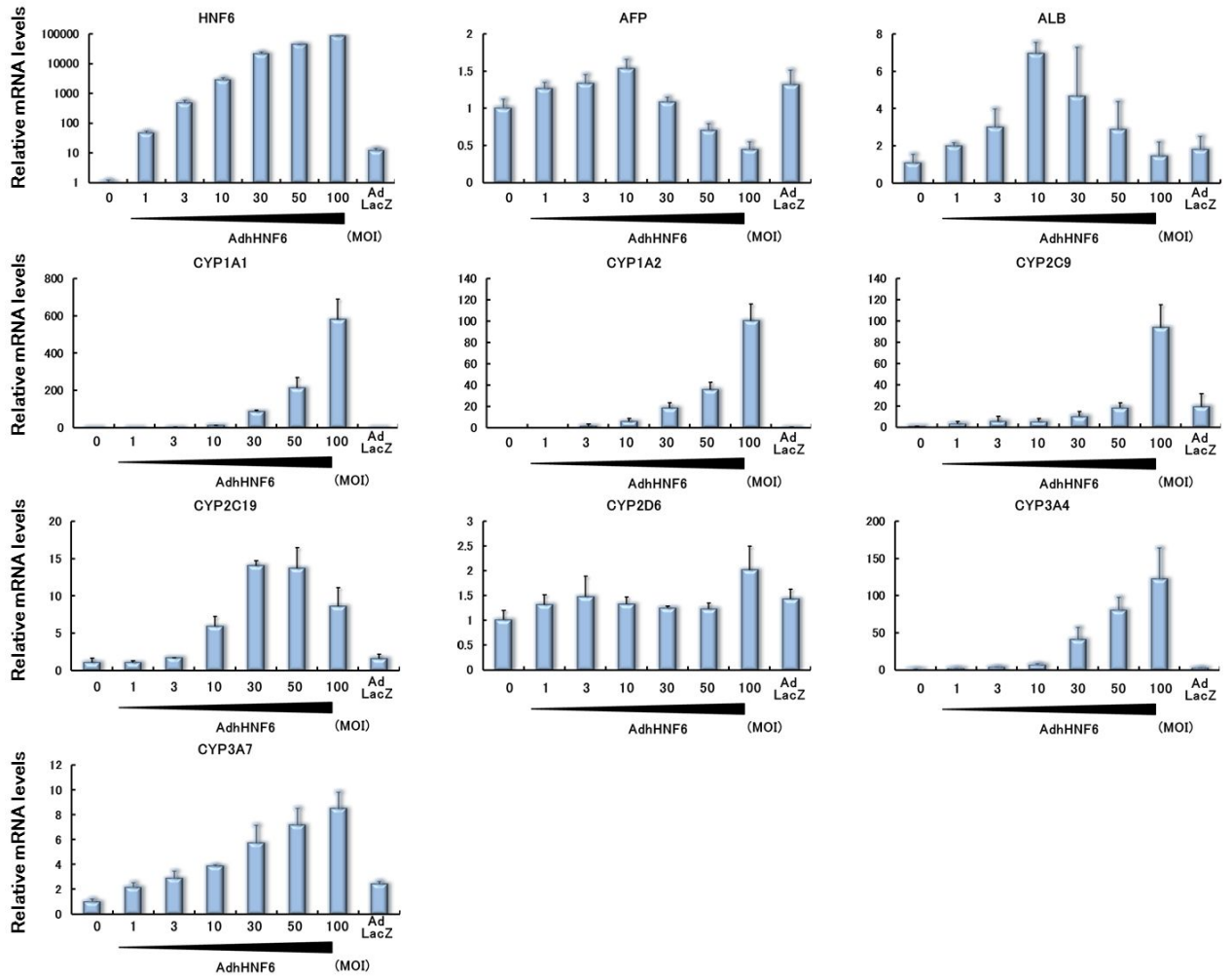


図 3 . HFL 細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

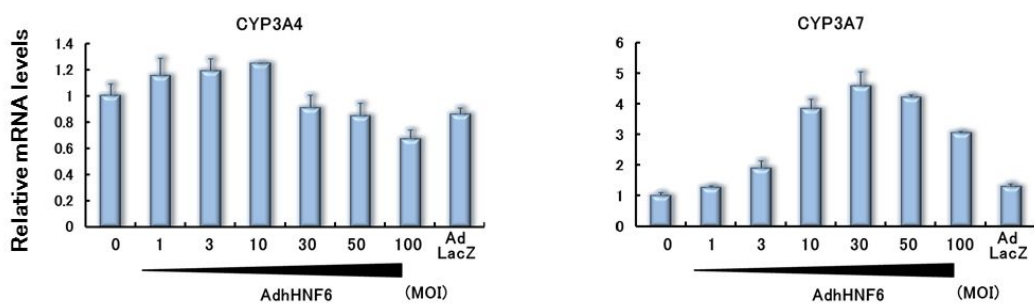


図 4 . ヒト肝初代培養細胞における HNF6 の CYP3A 発現量への影響

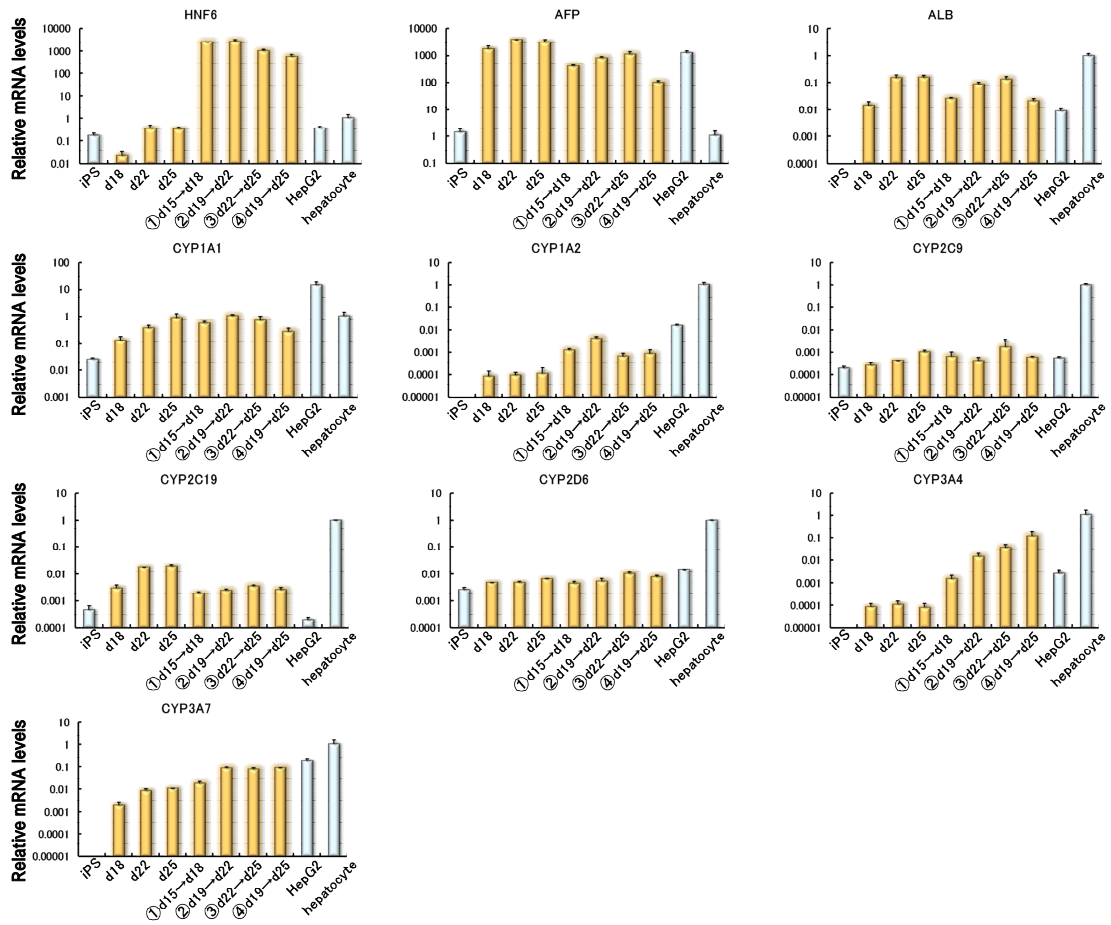


図5. 肝分化 iPSC 細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

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 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
研究協力者 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
研究協力者 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

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。ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導において低分子化合物 X を添加することにより肝細胞マーカーである albumin および tyrosine aminotransferase は各々約 31 倍および 4 倍、核内受容体 pregnane X receptor は約 21 倍 mRNA 発現の増加が認められた。また、小腸上皮細胞マーカーの mRNA が発現しており小腸上皮細胞様細胞に分化していることが明らかとなった。さらに、分化誘導した腸管上皮様細胞は、ペプチドトランスポーターの基質である β -Ala-Lys-AMCA の取り込みが認められ、かつ腸管上皮細胞に特異的に存在する sucrase-isomaltase の発現も認められた。

A. 研究目的

薬物動態研究において、ヒト初代肝細胞が用いられているが、ロット間差が大きく、良質の肝細胞を安定して入手することが難しいため、研究の障害となっている。人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞は、多能性と高い増殖性を有するため、細胞の安定した供給源として創薬研究への利用が期待されている。現在、iPS 細胞から肝細胞への分化誘導方法がいくつか報告されている。その主な方法として分化誘導に増殖因子等の液性因子が用いられているが、分化効率の面で不十分なうえに、非常に高価であることが課題となっている。本研究では、ロット間差が少なく安価な低分子化合物を分化誘導因子として用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に与える影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

iPS 細胞は国立成育医療研究センターにおいて樹立されたヒト iPS 細胞株 (Windy) を用いた。ヒト iPS 細胞を activin A 処理することで内胚葉に、

続いて dimethyl sulfoxide にて肝芽細胞に分化させ、oncostatin M、dexamethasone、hepatocyte growth factor によって成熟させる方法にて肝細胞への分化誘導を行った。また、分化の際に低分子化合物 X を添加 (72 時間、168 時間もしくは 312 時間処理) し、肝細胞への分化に及ぼす影響について検討した。なお、分化終了 48 時間前より CYP3A の誘導剤である rifampicin (RIF) の処理を行い、薬物応答性についても検討を行った。分化終了後、iPS 細胞由来肝細胞様細胞の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞様細胞への分化

ヒト iPS 細胞を、0.5% FBS、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 48 時間培養後、2% FBS、100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 24 時間培養した。引き続き、2% FBS、1% GlutaMax を含む DMEM/F12 で 4 日間培養した。このとき、250 ng/mL FGF2 もしくは FGF4 と 50 ng/mL の Wnt3a を組み合わせ、腸管幹細胞様細胞への最適な分化条件の検討を行った。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。2%もしくは 10% FBS、20 ng/mL epidermal growth factor (EGF)、B27 supplement、N2 supplement、2 mM L-glutamine、1% NEAA、100 units/mL penicillin G、100 µg/mL streptomycin sulfate を含む DMEM/F12 で 19 日間培養後 mRNA 測定用サンプルとして細胞を回収した。分化させた細胞を用いて、腸管上皮細胞特異的なペプチドトランスポーターの基質である β-Ala-Lys-AMCA の取り込みおよび腸管上皮細胞の特異的マーカーである sucrase-isomaltase の免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

分化後の mRNA 解析を行ったところ、肝細胞マーカーである albumin (ALB)、α-fetoprotein (AFP)、tyrosine aminotransferase (TAT)、主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現が認められた。また、低分子化合物 X の添加時期について検討を行ったところ、低分子化合物 X をある時期に 168 時間添加すると、分化後の細胞において ALB で約 31 倍、TAT で約 4 倍、pregnane X receptor (PXR) で約 21 倍の mRNA 発現の増加が認められた。CYP3A4 については、低分子化合物 X 168 時間添加群で約 8 倍の mRNA 発現の増加が認められた。CYP3A の誘導剤である rifampicin (RIF) 処理を行ったところ、低分子化合物 X の添加により増加した CYP3A4 の mRNA 発現が、さらに約 12 倍に誘導された (Fig. 1、2)。

ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞様細胞への分化

腸管幹細胞様細胞への分化において各種因子類の検討を行ったところ、FGF2 と比較して FGF4 を添加することで、CDX2 (中腸/後腸のマーカー) の発現レベルは数倍高かったが、逆に LGR5 (腸管幹細胞のマーカー) の発現レベルは FGF2 添加群で 4 倍程度高かった。なお、両マーカー発現に

対して、Wnt3a の影響は認められなかった (Fig. 3)。腸管上皮様細胞への分化において、血清の影響を検討したところ、濃度を 2%とすることで LGR5 や sucrase-isomaltase、あるいは主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 やペプチドトランスポーター SLC15A1 の発現レベルが高い傾向にあった (Fig. 4)。また、CDX2 や腸管上皮に豊富に存在する dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) や葉酸トランスポーター SLC46A1 の mRNA 発現はヒトの成人小腸と同レベルであった (Fig. 5)。また、分化誘導した腸管上皮様細胞は、ペプチドトランスポーターの基質である β-Ala-Lys-AMCA の取り込みが認められ、かつ腸管上皮細胞に特異的に存在する sucrase-isomaltase の発現も認められた (Fig. 6)。

D. 考察

ヒト iPS 細胞が肝細胞様細胞に分化したことが示唆された。また、低分子化合物 X を 168 時間添加することは、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進し、RIF 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。

近年、腸管幹細胞に関する研究が進みつつあるが未解明な部分が多い。また、腸管への分化に関してもマウスおよびヒトの iPS 細胞から 3 次元的に培養を行うことで腸管組織を作製することができたと報告されたが、これらは再生医療を目指しており、薬物動態試験に利用できるまでの機能評価はされていない。今回の我々の検討では、腸管幹細胞のマーカーである 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、各マーカー遺伝子の発現レ

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。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る。したがって、今後は効率的な分化誘導法の検討や薬物動態学的な機能解析に加え、薬物動態試験に適した均一な細部集団を得るためにセレクションなども行っていく予定である。

E. 結論

低分子化合物 X の 168 時間添加は、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導において、分化効率あるいは機能獲得に有用であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 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. 著書

該当なし

3. 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. 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).

4. 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).

5. 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).

6. 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).

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

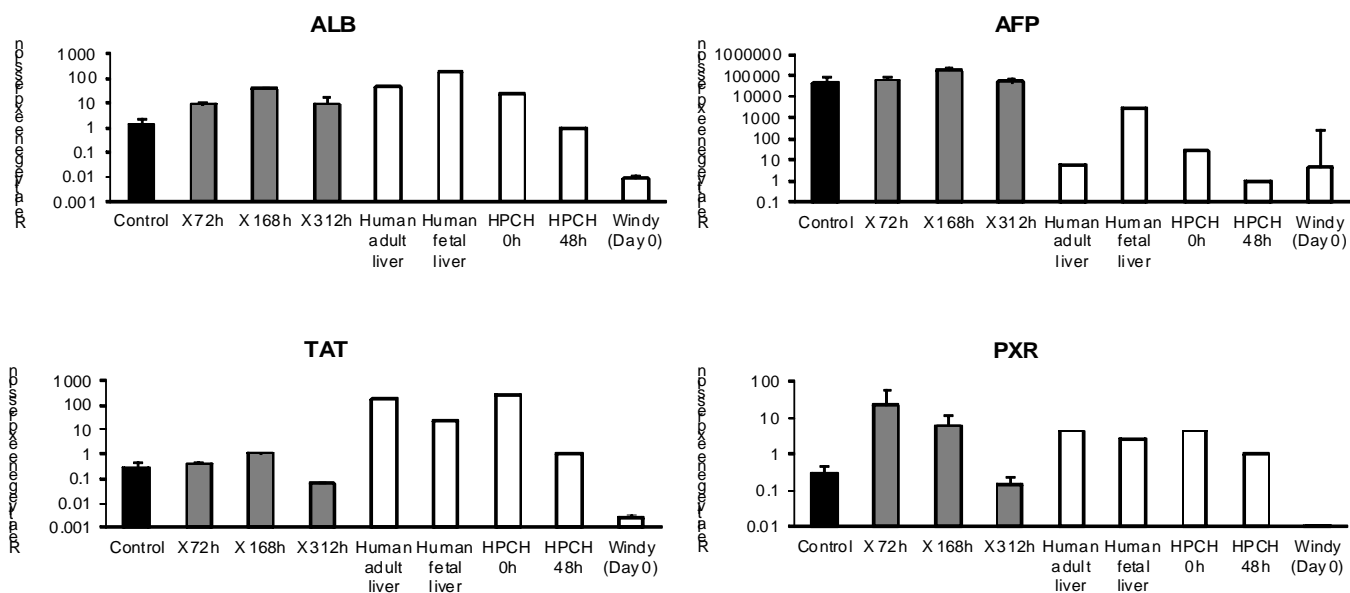


Fig. 1. mRNA expression levels of hepatocyte markers in the cells differentiated from human iPS cells. Each bar represents mean \pm SD from triplicate experiments. Values were normalized to the levels of GAPDH mRNA. The graph represents the relative gene expression level when the level in the HPCH 48 h (pooled cryopreserved human hepatocytes cultured for 48 hours) was taken as 1.

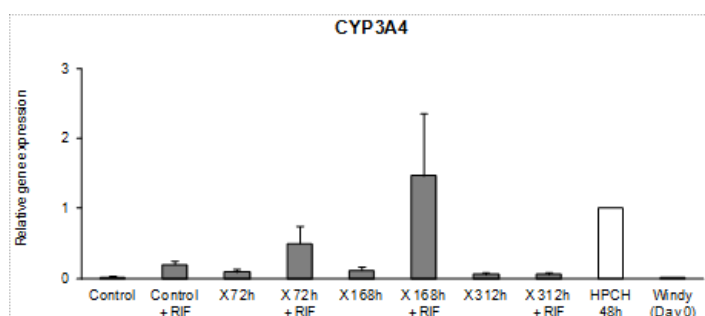


Fig. 2. Induction of CYP3A4 by rifampicin in the cells differentiated from human iPS cells. Each bar represents mean \pm SD from triplicate experiments. Values were normalized to the levels of GAPDH mRNA. The graph represents the relative gene expression level when the level in the HPCH 48h was taken as 1.

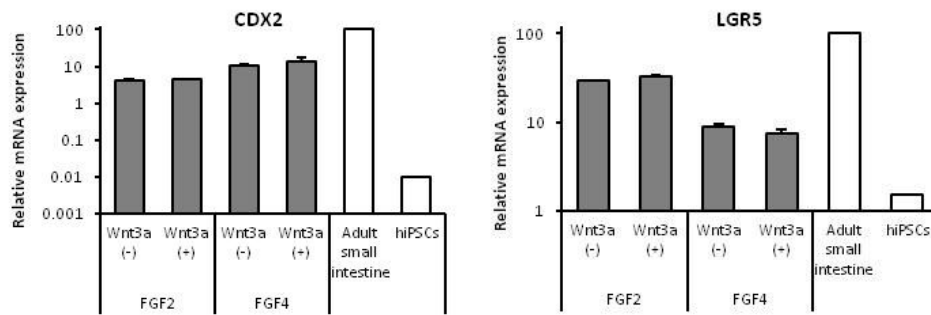


Fig. 3. Real-Time PCR analysis of intestinal stem cells markers for intestinal stem cell-like cells differentiation. Each bar represents mean \pm SD ($n = 3$). The level in the adult small intestine was taken as 100.

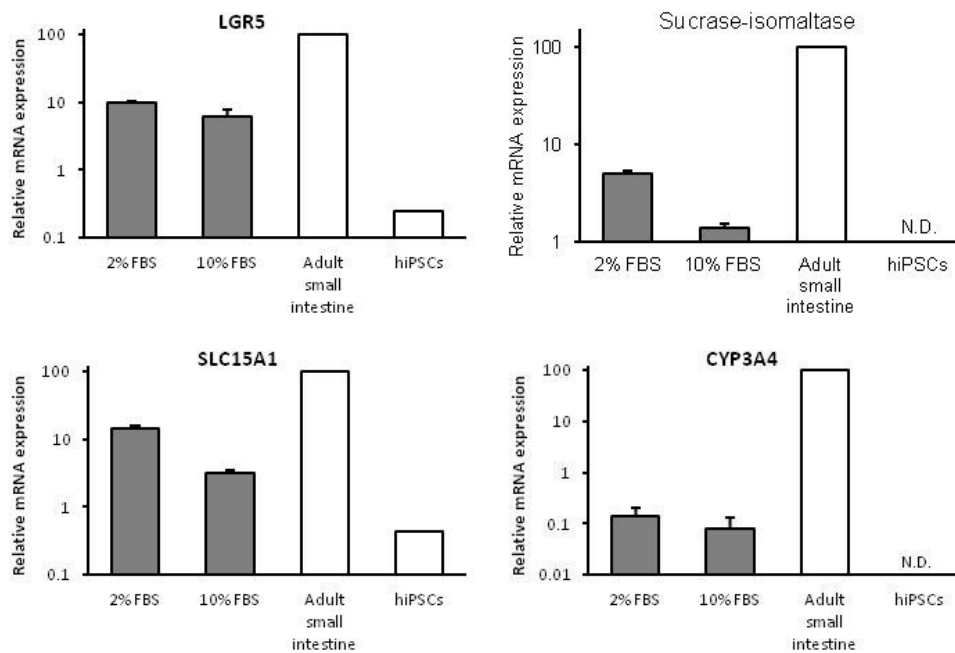


Fig. 4. Real-Time PCR analysis of intestinal stem cells and enterocytes markers for enterocyte-like cells differentiation. Each bar represents mean \pm SD ($n = 3$). The level in the adult small intestine was taken as 100.

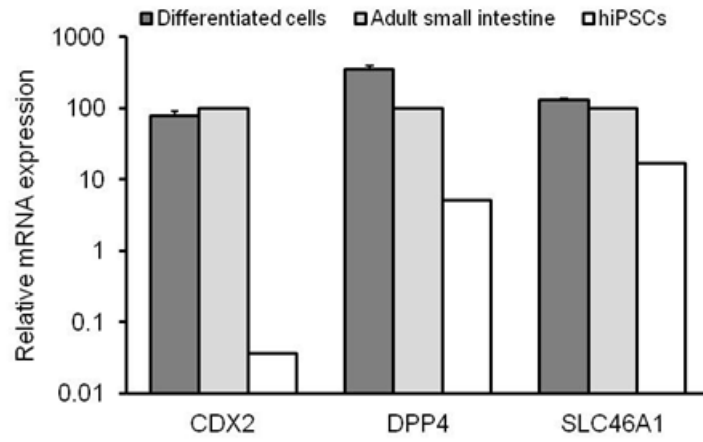


Fig. 5. Real-Time PCR analysis of enterocytes markers for enterocyte-like cells differentiation. Each bar represents mean \pm SD ($n = 3$). The level in the adult small intestine was taken as 100.

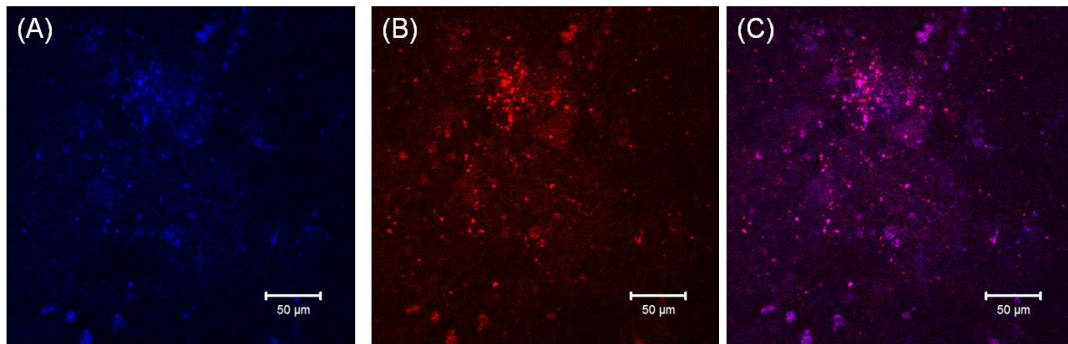


Fig 6. (A), Intracellular uptake of β -Ala-Lys-AMCA (blue); (B), immunofluorescence staining of sucrase-isomaltase (red); (C), overlay (Merge) image of β -Ala-Lys-AMCA and sucrase-isomaltase.

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

研究代表者 永田 清 東北薬科大学・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 榊原 明美 名古屋市立大学大学院薬学研究科・臨床教授
研究協力者 佐々木崇光 東北薬科大学・助教

研究要旨： 健康志向が高い現代において、健康食品は副作用がないとの先入観から、医薬品との安易な併用による薬物相互作用に起因した健康被害が頻発する可能性が高い。しかしながら、健康食品による薬物相互作用情報はもとより、健康食品自体の使用状況すら把握できない状況にある。そこで、健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目的に調剤薬局の来局患者を対象とした健康食品の使用実態アンケート調査を実施した。約 1,000 名の来局者からアンケートを回収し、解析した結果、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。これらの製品の服用頻度は、毎日及び週に 3~4 回の割合が 88%と高く、健康食品の服用による効果及び健康被害を感じている方は 58%と 3%であった。服用期間は、1 年以上が約半数を占め、健康食品の効果の有無には関わらず長期間服用していることが確認された。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。

A. 研究目的

いわゆる「健康食品」は保健機能食品とは異なり、安全性や有効性が明らかとなっていない多種多様な製品が流通し、その使用実態の把握及び医薬品との相互作用を予測することが難しい状況にある。一般に医薬品間の相互作用は、主にシトクロム P450 (CYP) が関与することから、本研究課題においては、医薬品及び代表的な健康食品有効成分による CYP の誘導及び阻害評価を進めてきた。しかし、より有益な情報を提供するためには、現在、市場に流通し、且つ服用されている健康食品について評価する必要がある。そこで、本研究では、健康食品と医薬品における相互作用解明を目的に健康食品の使用実態を明らかにするためのアンケート調査を行った。

B. 研究方法

健康食品使用実態調査のためのアンケート調査

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(図 1)。アンケートは、無記名による連結不可能匿名化で行い、東北薬科大学倫理委員会に承認された方法で実施した。

C. 研究結果および考察

健康食品使用実態調査のためのアンケート調査

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。本アンケート調査に回答した来局者は、男性 38%、女性 62%であり、年齢は、20 歳代 9%、30 歳代 20%、40 歳代 13%、50 歳代 16%、60 歳代 16%、70 歳代 18%、80 歳代 8%と各世代が均等に分布した集団であった(図 2)。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(図 3)、約 300 製品の健康食品の使用が確認された(図 5)。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(図 4)。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(図6)。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。次に、健康食品の服用頻度は、毎日服用が69%と最も多く、次いで週に3~4回服用が20%であり、その使用期間については健康食品服用来局者の約半数が1年以上であった(図7)。即ち、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った。

健康被害発生事例

本調査において、健康食品服用来局者の3%で健康被害発生事例が認められた。

例1) 60歳女性、アムロジピン服用

→牡蠣エキス配合製品服用(症状;無回答)

例2) 78歳女性、アムロジピン、エチゾラム服用

→牡蠣エキス配合製品服用(症状;服用後にめまい、もやもやする感覚)

牡蠣エキス配合製品は、亜鉛含有量が高く、この亜鉛がCYP3A4活性を阻害することが報告されている(Toxicol Lett., 156, 341-350, 2005)。アムロジピン及びエチゾラムはCYP3A4により代謝されることから、牡蠣エキス配合製品との相互作用が示唆された。また、にんにく抽出エキス配合製品や中国の民間生薬類似製品においても医薬品との相互作用の可能性が示唆された。

D. 結論

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、今後

は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。

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 著書

該当なし

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

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

健康食品の使用状況アンケート

年齢： 満（ ）歳 性別： 男 ・ 女

☆ この印のある項目は、特に重要な情報となります。可能な限り詳細なご回答をお願い致します。

1) 現在、飲んでいる薬はありますか？

はい いいえ

☆2) 1)で「はい」と答えた方、使用している薬は何の薬ですか？また、薬の名前などわかる場合は記入して下さい。(当てはまるものをすべて選んで下さい)

血圧 尿酸値 心臓 肝臓 糖尿病 コレステロール 胃腸
 喘息 アレルギー 鎮痛 ビタミン ミネラル
 その他（ ）

薬の名前など（ ）

3) 現在、健康食品やサプリメントを飲んでいますか？

はい いいえ

4) 3)で「はい」と答えた方、何種類の健康食品、サプリメントを使用していますか？

1種類 2種類以上

5) 3)で「はい」と答えた方、使用中の健康食品（サプリメント）についてお答えください。

※4)で「2種類以上」と答えた方は、2種類目以降は別紙1に記入して下さい。

☆●商品名（ ）

☆●メーカー名（ ）

●用途（ ）

●形状 錠剤 カプセル剤 粉剤 ドリンク剤 その他（ ）

●使用期間
 1カ月未満 1～3カ月 3～6カ月 6～12カ月 1年以上（ ）年

●使用頻度 毎日 週に3～4日 週に1～2日 その他（ ）

●使用タイミング（例：朝食後、疲労感があるときなど）
（ ）

●この健康食品（サプリメント）を何で飲まれていますか？
（当てはまるものをすべて選んで下さい）
 水 牛乳 お茶 ジュース ゼリー ヨーグルト その他（ ）

●この健康食品（サプリメント）を選んだ理由はなんですか？
（ ）

☆●この健康食品（サプリメント）を使用して効果はありましたか？

はい いいえ

☆●この健康食品（サプリメント）を使用して体調が崩れたりしたことはありますか？

はい いいえ

※「はい」と答えた方にお聞きします。具体的にどんなふうになりましたか？

()

6) 健康食品やサプリメントはどこで購入しますか？（当てはまるものをすべて選んで下さい）

病院 薬局・薬店 ドラッグストア 雑誌、テレビなどの通信販売
 インターネット販売 その他 ()

7) 5) で記入した以外に使用したことのある健康食品は何かありますか？

はい いいえ

「はい」と答えた人：商品名など記入

()

その使用を止めた理由

()

8) 健康食品についてどこで情報を得ているのですか？（当てはまるものをすべて選んで下さい）

病院 薬局・薬店 インターネット 書籍・雑誌 テレビ 新聞広告
 人づて（家族、友人など） その他 ()

9) 健康食品やサプリメントについて薬剤師などの専門家に相談したいと思いますか？

はい いいえ

10)他にこんな健康食品があったらいいなと思うものは何かありますか？

()

11) 健康食品について知りたいことは何かありますか？

()

アンケートにご協力ありがとうございました。

図1. アンケート調査用紙

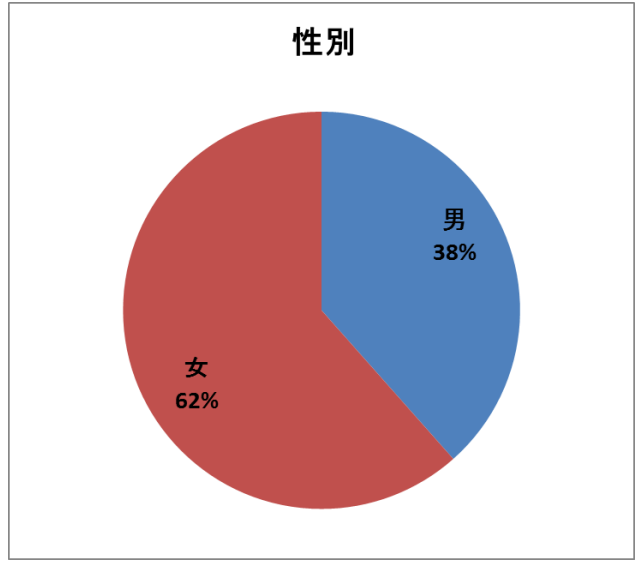
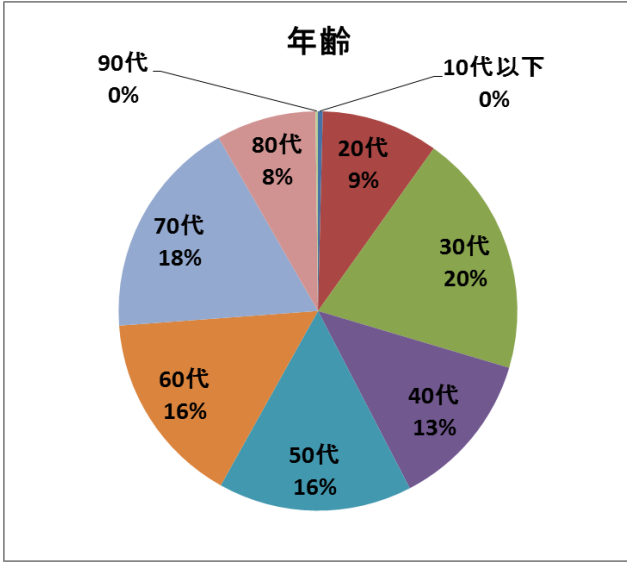


図 2 . アンケート調査回答者の年齢及び性別分布

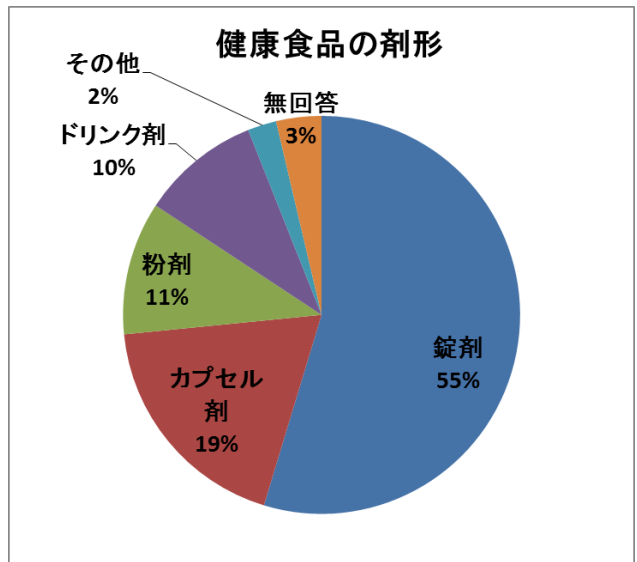
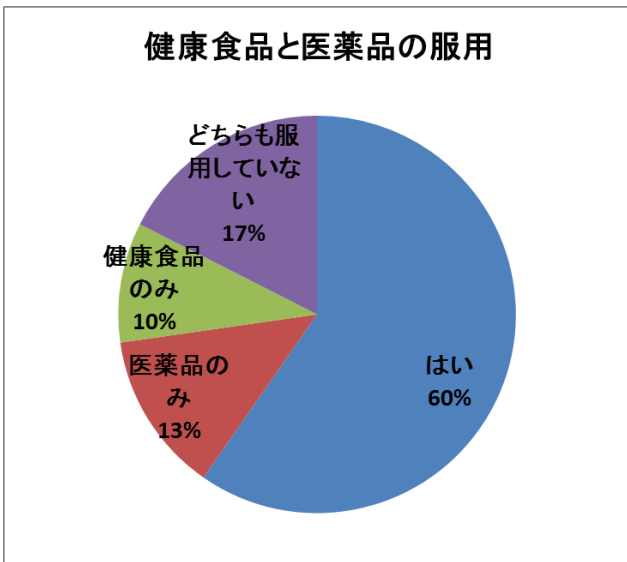


図 3 . 健康食品と医薬品の服用分布

図 4 . 健康食品の剤形

ファンケル	野菜不足	食物繊維:1.0~2.1g、-カロテン(ビタミンA換算):16~64µg、ビタミンC:16~32mg、ビタミンE(-トコフェロールとして):0.13~0.53mg、ビタミンK:53~94µg、カルシウム:46~75mg、カリウム:57~156mg、マグネシウム:8.3~17mg、総クロロフィル:6.1~18mg、SOD様活性:4800~12000単位、ツイントース:500mg	http://www.fancl.co.jp/Items/Detail?category=02&item_code=6582a
ダイレクトテレショップ	野菜不足	エネルギー、たんぱく質、脂質、炭水化物、ナトリウム、ビタミンC、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ナイアシン、パントテン酸、葉酸、カリウム、カルシウム、鉄分、マグネシウム、-カロテン、食物繊維	http://direct-teshshop.jp/feature/ajjiru01
小林製薬	健康維持・増進	アガリクスブラゼイエキス、グルカン含有酵母抽出物、サフラワー油、デキストリン、ミツロウ、グリセリン脂肪酸エステル、微粒酸化ケイ素	https://www2.kobayashi.co.jp/products/0/51520.html
小林製薬	パソコン作業や読書などで働きすぎの'ひとみ'におすすめ	アスタキサンチン、ルテイン、L-フェニルアラニン、L-メチオニン、L-トレオニン、L-トリプトファン、L-バリン、L-アルギニン塩酸塩、チアミン硝酸化物、リポフラビン、ピリドキシン塩酸塩、ビタミンE、ニコチン酸アミド、添加物	http://www2.kobayashi.co.jp/seihin/lt/asta/
大正製薬	肉体疲労・病中病後・胃腸障害・栄養障害・発熱性消耗性疾患・妊娠授乳期などの場合の栄養補給、滋養強壮、虚弱体質	ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、リン、マグネシウム、亜鉛、ビタミンA、-カロテン、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンC、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸、ナイアシン、パントテン酸、ピオ	http://www.catalog-taisho.com/00590.php
アボットジャパン		ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、リン、マグネシウム、亜鉛、ビタミンA、-カロテン、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンC、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、葉酸、ナイアシン、パントテン酸、ピオ	http://www.abbott.co.jp/general/nourishment/about_main.asp
GAIA 有限会社大里食品	ビタミンA、Bに富み、レシチン、蛋白質、脂肪酸も豊富、栄養たっぷりですフェイスケアに適しています。 疲労回復効果や血液を浄化することにより肩こりや腰痛の原因物質を取り除いて痛みを和らげる効果	ビタミンA、B	http://gaia-np.com/products/aroma_03.html
明治製菓	美容	紫うこん	http://www.amaminosima.com/product/817
味の素	アミノ酸補給	フィッシュコラーゲン、ヒアルロン酸、コエンザイムQ10、アルギニン、ビタミンE、エネルギー、たんぱく質、脂質、炭水化物、ナトリウム、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ナイアシン、パントテン酸、ビタミンD、ビタミンE、アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、バリン、グルタミン、アルギニン)	http://www.aminovital.com/products/vital/index.html
武田薬品工業	体がだるい、重いと感じたら	フルスルチアミン、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、パントテン酸カルシウム	http://alinamin.jp/lineup/alinamina.html
武田薬品工業株式会社	ビタミンB1誘導体フルスルチアミンに、神経や筋肉の働きに関わりの深いビタミンB6、ビタミンB12、血行をよくするビタミンEを配合。 カラダが疲れて固まったと感じる時のつらい'目の疲れ'、'肩こり'、'腰の痛み'などに、すぐれた効果をあらわします。	フルスルチアミン塩酸塩、ビタミンB6(ピリドキシン塩酸塩)、ビタミンB12(シアノコバラミン)、ビタミンEコハク酸エステルカルシウム、パントテン酸カルシウム、ガンマオリーブノール	http://alinamin.jp/lineup/alinaminexplus.html
カルピス フォーエバーリビングプロダクツ ジャパン	カラダの内側からバランスを整えて、外部ストレスに負けないカラダ作りをサポートする 食物繊維のような働きをして健康を維持	L-92乳酸菌	http://www.calpis.co.jp/products/functional/92_tab09.html
サントリー	気にかかる方、仕事や勉強で考えることが多い方 9つオリゴ糖(前向きな毎日)に、イチョウ葉エキスは日本では健康食品ですが、ドイツでは認知症治療に効果がある医薬品として販売されています。また、アメリカでは日本と同じ健康食品としての扱いですが、脳の機能に効果がある事が明記されています。イチョウ葉エキスの成分にはフラボノイドが含まれ、血管拡張作用・動脈硬化の改善等の効果があり、さらに活性酸素やフリーラジカルの除去の作用があります。イチョウ葉エキスの成分であるギンコライドBは、血小板凝集したり気管支の収縮等の障害を引き起こす'血小板活性化因子'を阻害する作用があります。	イチョウ葉抽出物、アスタキサンチン	http://www.suntory-kenko.com/supplement/main/43366/
持田製薬		イチョウ葉エキス末(フラボノイド24%以上/テルペラクトン6%以上含有)/120.0mg 植物レシチン(大豆由来 遺伝子組換えでない)/75.0mg ビタミンE含有植物油(d-トコフェロール40.2mg) 60.0mg	http://www.vitacollage.jp/item/item.html?property_id=3
アサヒフードアンドヘルスケア株式会社	血管の壁(平滑筋繊維)に直接作用しモロくなった血管を修復する。 硬化した血管に弾力性を持たせる。 狭くなった血管を広げ正常な口径にする。 血管内での血栓(血の固まり)ができ血管が詰まることを防ぐ。 末梢血管の抵抗を減少させ、ウツ血をなくす。 動脈、静脈、毛細血管を強化、正常化するが、特に脳及び末梢血管に働く。 血糖値を低下させる。 血液中のコレステロール値を低下させる。 年をとって収縮した膀胱を広げる作用もある。 内臓のあちこちで起こる小さな炎症を防ぎ正常な機能を果たせる。 生理活性物質の活性化をはかる。 生体内反応で発生する有害酸素の除去、免疫機能促進に関与する。	還元麦芽糖水飴、イチョウ葉エキス、コーンスターチ、セルロース、グリセリン脂肪酸エステル、糊料(メチルセルロース)、香料	http://www.asahi-fh.com/schwabe_ginkgo/products.html
アサヒフードアンドヘルスケア株式会社		イチョウ葉エキス、マルチツール、結晶セルロース、コーンスターチ、グリセリン脂肪酸エステル、メチルセルロース、メントール	http://www.mimaki-family.com/item/item_13359.html
小林製薬	更年期障害、更年期神経症、血の道症、のぼせ、生理不順、生理異常、生理痛、肩こり、冷え性、肌荒れ、めまい、耳鳴り、動悸、貧血、ニキビ、便秘、ヒステリー、帯下、産前産後、下腹腰痛、血圧異常、頭痛、頭重	ダイオウ末、カノコソウ末、ケイヒ末、センキュウ末、ソウジュツ末、シャクヤク末、ブクリョウ末、トウキ末、コウブシ末、ゴシュク、ハンゲ、ニンジン、コウカ	http://www.inochinohaha.jp/hahaa/product.html
エスエス製薬	生理痛、頭痛、歯痛、咽喉痛、関節痛、筋肉痛、神経痛、腰痛、肩こり痛、抜歯後の疼痛、打撲痛、耳痛、骨折痛、捻挫痛、外傷痛の鎮痛、悪寒・発熱時の解熱	イブプロフェン、アリルイソプロピルアセチル尿素、無水カフェイン	http://www.ssp.co.jp/product/all/evea/
タムラ活性株式会社	疲労回復	イミダペプチド、フェルラ酸、ビタミンC	http://www.arakiyakuten.com/c/cate_95_cl_2243.html

図5. 健康食品リスト 続き(一部抜粋)

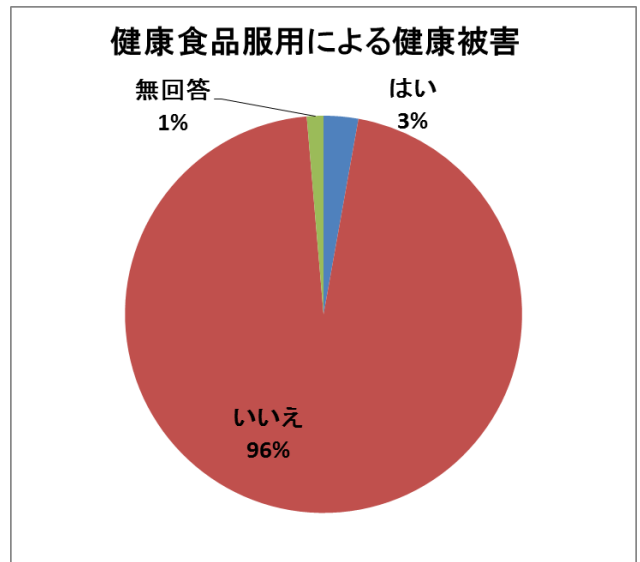
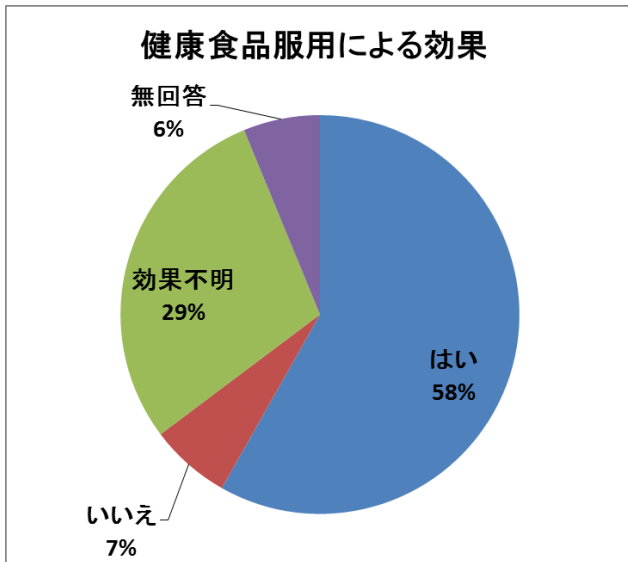


図 6 . 健康食品の効果及び健康被害

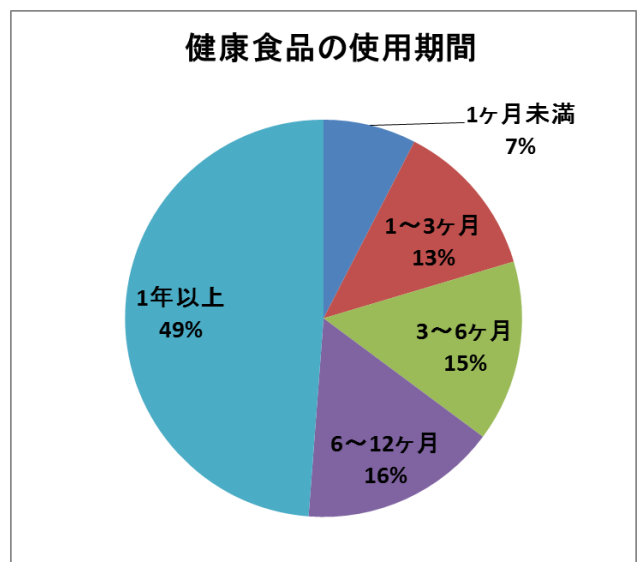
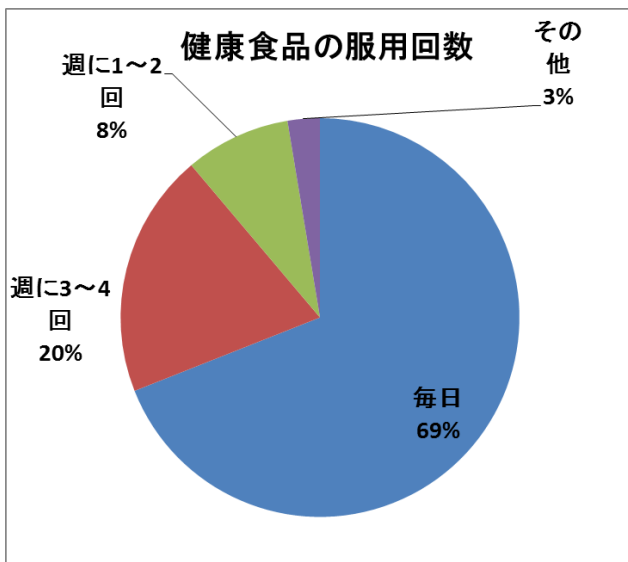


図 7 . 健康食品の服用回数及び使用期間

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

研究分担者 頭金 正博 名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授
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 大森 栄 信州大学医学部附属病院薬剤部・教授/薬剤部長
研究協力者 百瀬 泰行 信州大学医学部附属病院薬剤部・副薬剤部長

研究要旨： 健康食品と医薬品との相互作用を回避するためには、それらの使用実態を明らかにすることが必要である。そこで、信州大学医学部附属病院における入院時の持参薬及び健康補助食品の摂取状況調査の情報を用いて、患者の健康食品の使用状況と服薬している医薬品の種類及び副作用発現等を調べることを目的とし、今年度は、信州大学医学部附属病院における病院情報システムの構造を調査した。信州大学医学部附属病院においては、初回入院時面談で得られた情報をもとに、持参薬・健康補助食品の全ての「成分や効能」のリストを病院情報システム上で作製していた。そこで、病院情報システムから入院患者の年齢、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・生化学検査値を抽出する方法を設定した。

A. 研究目的

サプリメントや栄養補助食品等のいわゆる「健康食品」は、食品として取り扱われるため、医薬品と異なり、それらの使用については消費者の判断に委ねられ、規制する法律等はない。また、使用実態についてもほとんど把握されていない。一方、サプリメントや栄養補助食品であっても、一定の生理的、あるいは薬理的作用を有するものもあり、生理機能が低下している患者や、医薬品を服用している患者においては、想定外の健康被害が生じる可能性もある。特に、医薬品と同時に服用する場合は、これらの健康食品と医薬品との相互作用が懸念される。そこで、健康食品と医薬品との相互作用を回避するためには、まずその使用状況の実態を明らかにすることが求められている。本研究においては、信州大学医学部附属病院における入院時の持参薬（服用中及び服用経験のある医薬品及び健康食品、以下持参薬という）の摂取状況調査の情報を用いて、患者の健康食品

の使用状況と服薬している医薬品の種類及び副作用発現等を調べた。本研究は、調査結果が入力されたカルテ調査を主たる研究とした後ろ向き観察研究である。

B. 研究方法

本調査研究においては、信州大学医学部附属病院の電子カルテに記入されている入院患者の情報（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、血液・生化学検査値）を抽出する予定である。そこで、今年度は予備検討として、信州大学医学部附属病院における病院情報システムの構造を調査した。

（研究倫理上の配慮）

今年度の調査では、病院情報システムの構造を調査対象にしたのみで、個別の患者の実際のデータは調査対象としなかった。来年度の本調査の準備として、研究代表者である東北薬科大学と実地調査を担当する名古屋市立大学で、研究倫理委員会

から調査研究の実施が承認された。

C. 研究結果

入院時の持参薬調査

信州大学医学部附属病院においては、全ての診療科での入院患者を対象にして、薬剤部(薬剤師)が「入院時初回面談」を行っている。その面談調査においては、薬剤アレルギー・副作用の既往歴のみならず、入院時の持参薬・健康補助食品の摂取状況を患者から直接聴取している。それらの結果を病院情報システム上の入院時初回面談記録に、その他の基本情報(入院診療科、処方箋医薬品、服薬状況、薬剤禁忌、オーダー時注意事項)とともに記録している(図1)。さらに、薬剤アレルギー・副作用の情報をもとに、薬剤情報の確認・評価として「投与に注意すべき薬剤」のリストを作成している。また、持参薬・健康補助食品の摂取状況に関する情報をもとに全ての「成分や効能」のリストを病院情報システム上で作成している(図2)。

「投与に注意すべき薬剤」および「常用の市販医薬品・健康補助食品等の情報」の抽出

信州大学医学部附属病院における病院情報システムでの上記の持参薬・健康補助食品の摂取状況に関する情報やそれらの「成分や効能」のリスト、また「投与に注意すべき薬剤」のリストは患者単位で、いわゆる電子カルテ上に記載されている。そこで、それらの情報を抽出する方法を検討した。その結果、これらの情報は、システム構造上、一括して抽出することは不可能で、患者毎の該当する記録を表示させ、それを一人ずつワード等の汎用テキストファイルに電子的に転記する必要があることがわかった。

信州大学医学部附属病院の病院情報システムでの処方および検査結果の表示機能

信州大学医学部附属病院の病院情報システムでは、患者データのモニター機能として、患者ごとの処方歴(薬歴)および検査結果(検査歴)を

時系列で抽出・表示する機能を備えている(図3)。通常、入院患者は、健康補助食品等は、入院時には摂取を控えるように指導している。従って、薬歴の情報を参考にしながら、入院時の前後での検査値の変動を比較すれば、健康補助食品の影響を推定できる可能性もある。そこで、この薬歴と検査歴のデータを用いて、入院時の前後1週間の薬歴と検査歴のデータについても、抽出する方法を検討した。その結果、これらの情報についても、システム構造上、一括して抽出することは不可能で、患者毎の該当する記録を表示させ、それを一人ずつワード等の汎用テキストファイルに電子的に転記する必要があることがわかった(図3)。

D. 考察

患者の入院時に持参薬や日常的に摂取している健康補助食品を聞き取る調査をしている医療機関は比較的多いと推測されるが、信州大学医学部附属病院においては、それら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が調査している。これらの作業は、多大な労力を費やすが、健康補助食品の影響を評価するためには大変重要な情報である。当研究においては、それらの貴重な情報を用いて、市販薬や健康補助食品と処方薬の併用の実態について調査することとした。

一方、持参した医薬品や常用している健康補助食品などのデータは、患者毎に表示されるのみで、一括した抽出操作はできない。データの記載目的からすれば、病院情報システムでは当然の仕様であるが、これらのデータを調査研究に用いる場合は、データ抽出を患者毎に行う必要があり、効率的でない。病院情報システムにデータ抽出機能を持たせると、システムの安定性と患者情報の保護の観点から問題が生じる可能性があるが、今後は、病院情報システムの電子的情報を医療の向上のための調査研究に用いる研究の必要性が高まると思われるので、病院情報システムの構築時に工夫が必要になる。例えば、病院情報システムのデータを匿名化して、医療用の病院情報システムと

は別途の研究用データサーバーに定期的に蓄積
するようなシステムが考えられる。

E. 結論

信州大学医学部附属病院の電子カルテに記入
されている入院患者の年齢、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・生化学検査値を抽出する方法を
設定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 著書

該当なし

3. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

