

Ⅱ. 平成 22 年度 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」の使用実態調査を基に、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のプロトコル化を行い、薬物相互作用の評価を行うこと及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。本年度は、1）アンケート及び文献調査によるいわゆる「健康食品」のリスト作成、2）相互作用の測定法及び定量化についてのプロトコルの設定、3）ハイスループット化した測定法の樹立、4）ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化、5）新たな薬物代謝酵素誘導評価可能な培養細胞株の樹立についての研究を中心に行った。

研究分担者

松永 民秀	名古屋市立大学・教授
細川 正清	千葉科学大学・教授
頭金 正博	名古屋市立大学・教授

研究協力者

大森 栄	信州大学・教授
中村 克徳	信州大学・准教授
鈴木 匡	名古屋市立大学・教授
前田 徹	名古屋市立大学・講師
岩尾 岳洋	名古屋市立大学・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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

「22年度」

1. 入手可能な健康食品を調べ、それらの文献あるいは製品のデータ調査を行い、使用目的、効果、副作用、安定性、含有成分などについてリストを作成する（永田、頭金）。
2. 健康食品は、種々の形状の物が販売されている。実際に実験サンプルとして使用するためには溶液として培地に添加するために、調査対象の健康食品が固形物質の場合は抽出を行う必要がある。従って、最終目的である信頼性の高いデータベース構築のために、医薬品による相互作用データを参考にして抽出法及び定量化等の明確な基準を決める（永田、松永、細川、頭金）。

3. 申請者らが構築した薬物相互作用の測定法は、ハイスループットを可能とした培養細胞中で行う。活性阻害は、複数の CYP を同時に発現させた培養細胞中にカクテルプローブ薬を加え、その培養液を LC-MS (東北薬科大学機器) にて分析する。また、測定が簡便な化学発光基質も検討する。酵素誘導評価は、既に作成した CYP3A4 及び CYP1A1/1A2 レポーター発現培養細胞株を用いて、レポーター活性の測定により行う (永田、細川)。
4. 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 CYP3A4 及び CYP1A1/1A2 レポーター遺伝子を染色体に組み込み、各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 (松永、永田)。
5. グルクロン酸抱合酵素 UGT1A1 及びトランスポーター MDR1 も薬物処置により誘導され、薬物の薬理効果あるいは副作用・毒性発現に強く影響を与えと報告されている。従って、これらについても誘導評価を行うことが重要である。UGT1A1 及び MDR1 の誘導評価系を構築するためにその遺伝子単離と誘導に関わる遺伝子領域の解析を行う (細川、永田)。

C. 研究結果

本年度の主要な事業目標は、いわゆる「健康食品」のリスト作成、実験の信頼性及び簡便性を得るためのプロトコル化及びハイスループット化、さらにヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導である。また、リスト作成のためには、いわゆる「健康食品」の使用及び有害事象発生の状況把握することが必要であるとの考えを基に、全国レベルのアンケート調査を本年度の事業計画として新たに組み入れた。事業の進捗状況は良好であり、幾つかは既に終了している。

① アンケート及び文献調査によるいわゆる「健康食品」のリスト作成 (永田、頭金)

全国約 100 店舗にわたる薬局に依頼し、約 1,000 名の来局者から健康食品の使用状況についてのアンケートを実施した。調査結果に基づいて、使用状

況や副作用の種類及び程度を明らかにし、データを構築する作業を行っている。また、既に薬物相互作用の報告がある健康食品の文献調査を行い、使用目的、効果、副作用、安定性、含有成分などについてリストを作成している。

② 相互作用の測定法及び定量化についてのプロトコルの設定 (永田、松永、細川、頭金)

本事業にて行う薬物代謝活性阻害、誘導及び細胞毒性評価について、実験手法の明確なプロトコルを設定した。特に調査対象の健康食品が固形物質の場合は、エタノールが最も成分を効率的に抽出することが判明した。このプロトコルに従い、薬物相互作用の報告がある健康食品について、薬物代謝活性阻害及び誘導の予備実験を実施中である。

③ ハイスループット化した測定法の樹立 (永田、細川)

宿主細胞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た P450 発現システムは、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、これまで用いられてきた *in vitro* 実験系 (リコンビナント酵素やヒト肝ミクロソームなど) と同様の結果が得られた。本システムを用いることにより化学発光基質を用い培養細胞中で行う測定法のハイスループット化が確立された。現在は、複数の CYP を同時に発現させた培養細胞中に複数のカクテルプローブ薬を加え、その培養液を LC-MS (東北薬科大学機器) を用いて活性阻害を一斉に分析する手法を検討している。一方、当研究室にて樹立した CYP3A4 および CYP1A1/2 レポーター遺伝子を安定に発現する細胞株を用いて本研究に於いて設定したプロトコルに従い誘導評価を行った。その結果、用いた既存の各誘導剤は、報告された結果とほぼ同様な酵素誘導能を示した。

ヒト iPS 細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討 (松永、永田)

申請者らはヒト iPS 細胞の分化誘導法の検討から胎児肝あるいはより成人の機能に近い肝細胞の作成に成功した（論文作成中）。本研究の成果は、世界で始めて薬物代謝活性が測定された所にある。今後は、成人肝細胞と比較し不足している一部の薬物代謝酵素発現を増大する分化誘導法を検討する。そのために培養液中に分化誘導が期待できる液性因子の添加と、外部からアデノウイルスベクターを用いて分化及び肝臓での遺伝子転写活性化に関与している転写因子の導入を目的に、その因子の同定を行った。その中でも現在 HNF-6 及び c/EBP α がヒト iPS 細胞の肝細胞への分化促進に関与する可能性を見出した。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は検討中である。

抱合酵素及びトランスポーター遺伝子の単離解析（細川、永田）

UGT1A1 及び MDR1 の誘導評価可能な培養細胞株の樹立については、MDR1 の遺伝子の単離と誘導に関わる遺伝子領域の解析後、培養細胞の染色体中に組み込み、誘導を示す細胞株のスクリーニングを行い、誘導評価可能な培養細胞株を単離した。現在その評価を行っている。UGT1A1 についてはデータベースに登録された遺伝子配列をもとに単離を試みている。

D. 考察

本研究では、いわゆる健康食品による薬物相互作用および細胞毒性に対して利用価値の高いデータベース構築を目的としており、そのための新規手法の開発を目指した研究を行っている。従来、薬物代謝酵素誘導は、代謝活性あるいは mRNA やタンパク質の発現量を測定することで調べられていた。一方、近年はレポータープラスミドに酵素の遺伝子を導入して、そのレポーター活性を測定する手法で誘導評価も行われるようになった。また、今までの薬物代謝酵素活性の阻害実験は、酵素試料と薬物を試験管に加え測定する手法であった。これらの手法は、測定を行うためのサンプル調整が煩雑で、再現性に問題がある。本研究で

我々は、レポーター遺伝子と酵素遺伝子連結した DNA を染色体に組み込み恒常的に誘導評価可能な培養細胞株の樹立およびアデノウイルス発現システムにより培養細胞で P450 を発現させる手法の樹立を行い、酵素誘導あるいは代謝活性の測定を培養細胞にて直接的に測定する手法を開発した。

本年度は開発したこれらの手法の再現性とハイスループット化が可能であるかについての研究を中心に行った。本手法では、均一な培養細胞の作成および凍結保存できるために、大量のサンプルの供給が可能である。酵素誘導については、既存の誘導薬物あるいは化学物質を用いて、現在臨床にて問題となっている CYP3A4 および CYP1A2 の誘導を評価したところ、本誘導評価系で得られた結果は既に報告されたものとほぼ同じであった。また、代謝活性阻害についても既存の阻害剤を用いて検討したところ、その阻害定数は報告されているものとほぼ同一の値を示した。さらに、抽出法及び定量化等の明確な基準、すなわち実験のプロトール化を行い、高い再現性とハイスループット化が可能であることが判明した。酵素活性阻害について、さらに複数の CYP を同時に発現させた培養細胞中に複数のカクテルプローブ薬を加え、その培養液を LC-MS（東北薬科大学機器）を用いて一斉に分析する手法を検討している。また、薬物代謝酵素誘導評価系については、UGT1A1 及び MDR1 の誘導評価可能な培養細胞株の樹立を試み、MDR1 は成功した。

本研究で確立した新規薬物代謝酵素誘導および酵素阻害評価系は、肝がん由来培養細胞である HepG2 細胞を用いている。この細胞性質は、肝臓細胞に近いと考えられているが、薬物代謝酵素の発現量は非常に低く、肝臓に発現する代謝酵素の種々の特性を正確には反映していない。本来ならば、初代肝培養細胞を用いた実験が理想的ではあるが、これはサンプルの入手が難しく、ロット間の大きなばらつき、高価である等の問題が存在している。そこで、我々は更なる新規手法の開発を目指し、ヒト iPS 細胞より成人の肝臓・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した。分化に成功した細胞は、成人肝臓と比較すると薬物代謝酵素活性は低い、胎児肝臓程度の活性を示した。他の肝分化マーカータンパク質の発

現量から判断しても、ヒト iPS 細胞は本手法にて胎児肝様の細胞に分化したと考えられた。また、本肝分化細胞は、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が、CYP1A2 の誘導は認められなかった。小腸の細胞（腸管上皮細胞）への分化は、今回は予備実験として検討した。その結果、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、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。

今回分化した細胞には、成熟肝細胞あるいは小腸上皮細胞において特異的発現に関与する重要な転写因子の発現が低かった。特に、肝臓では成熟肝分化誘導に必要な HNF-6、c/EBP α の顕著な mRNA 発現上昇は確認されなかった。そこで予備実験として発現不足が予想される HNF-6、C/EBP α アデノウイルスを用いて直接導入した。その結果、HNF-6 の導入により CYP3A4 などが転写活性化された。今後、種々の転写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

本年度の主要な研究実績は、いわゆる「健康食品」のリスト作成検討、新規手法を用いた実験の信頼性及び簡便性を得るためのプロトール化及びハイスループット化の完成、およびヒト iPS 細胞から胎児肝様細胞への分化誘導が成功したことである。また、リスト作成のためには、いわゆる「健康食品」の使用及び有害事象発生の状況把握することが必要であるとの考えのもとに、全国レベルのアンケート調査を本年度の事業計画として新たに組み入れた。事業の進捗状況は良好であり、幾つかは既に終了している。

F. 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
5. 細川正清：3・4 薬物の加水分解反応に関与する酵素系 3・4・1 エステラーゼ、3・4・2 エポキシドヒドロラーゼ 薬物代謝学 (第 3 版) 医療薬学・医薬品開発の基礎として(加藤隆一、山添康、横井毅 編集) 東京化学同人、東京、68-71、2010
6. 細川正清：2・2・2 第 I 相反応に関与する酵素とその反応 g.カルボキシルエステラーゼ、医療薬物代謝学 (鎌滝哲也、高橋和彦、山崎浩史 編集) 医学評論社、東京、50-53、2010
7. 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. 研究発表

1. Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. 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. Matsuda T, Shimada M, Sato A, Akase T, Yoshinari K, Nagata K, Yamazoe Y. 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)
3. 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)
4. Sato W, Suzuki H, Sasaki T, Kumagai T, Sakaguchi S, Mizugaki M, Miyairi S, Yamazoe Y, Nagata K. Construction of a system that simultaneously evaluates CYP1A1 and CYP1A2 induction in a stable human-derived cell line using a dual reporter plasmid. *Drug Metab Pharmacokinet.* 25, 180-189 (2010)
5. Suzuki H, Sasaki T, Kumagai T, Sakaguchi S, Nagata K. Malondialdehyde-modified low density lipoprotein (MDA-LDL)-induced cell growth was suppressed by polycyclic aromatic

- hydrocarbons (PAHs). *J Toxicol Sci.* 35, 137-147 (2010)
6. 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)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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)
 10. Sai K, Saito Y, Tatewaki N, Hosokawa M, Kaniwa N, Nishimaki-Mogami T, Naito M, Sawada J, Shirao K, Hamaguchi T, Yamamoto N, Kunitoh H, Tamura T, Yamada Y, Ohe Y, Yoshida T, Minami H, Ohtsu A, Matsumura Y, Saijo N, Okuda H. Association of carboxylesterase 1A genotypes with irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Br J Clin Pharmacol.* 70, 222-233 (2010)
 11. Hori T, Hosokawa M. DNA methylation and its involvement in carboxylesterase 1A1 (CES1A1) gene expression. *Xenobiotica* 40, 119-128 (2010)
 12. Satoh T, Hosokawa M. Carboxylesterases: Structure, Function and Polymorphism in Mammals. *J. Pestic.Sci.* 35, 218-228 (2010)
 13. Imai T, Hosokawa M. Prodrug approach using carboxylesterases activity: Catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue. *J. Pestic.Sci.* 35, 229-239 (2010)
 14. Hosokawa M. Are non-human primates useful experimental animals for pre-clinical study? *Drug Metab Pharmacokinet.* 25, 221-222 (2010)
 15. Igarashi M, Osuga J, Uozaki H, Sekiya M, Nagashima S, Takahashi M, Takase S, Takanashi M, Li Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Hosokawa M, Fledelius C, Jacobsen P, Yagyu H, Fukayama M, Nagai R, Kadowaki T, Ohashi K, Ishibashi S. The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. *Circulation Research*, 107, 1387-1395 (2010)
- H. 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-Glucuronocyltransferase: 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-Glucuronocyltransferase 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中成分の同定 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 沼田喜弘、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
 5. 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 p341
- I. 知的財産の出願・登録状況
- なし

研究分担報告書

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- α 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 β 、HNF-3 α 、HNF-3 β 、HNF-4 α 、HNF-6、c/EBP α 、c/EBP β 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

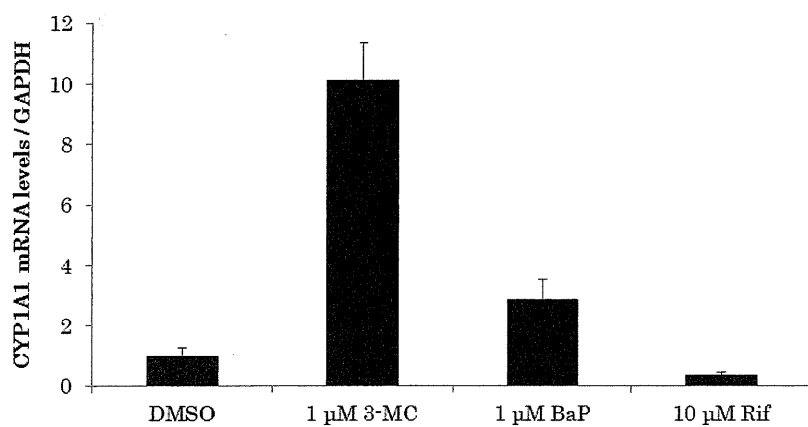


図 1. 本肝分化 iPS 細胞の 3-MC 及び BaP による CYP1A1 誘導の確認

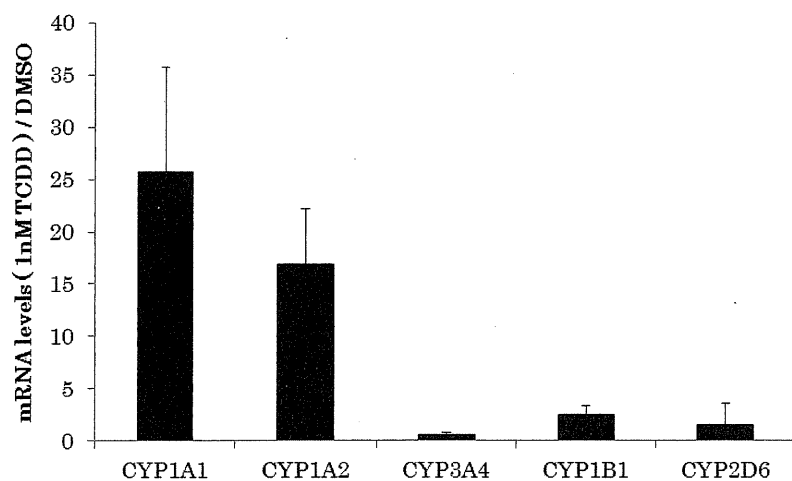


図 2. 本肝分化 iPS 細胞の TCDD による CYP1A1 誘導の確認

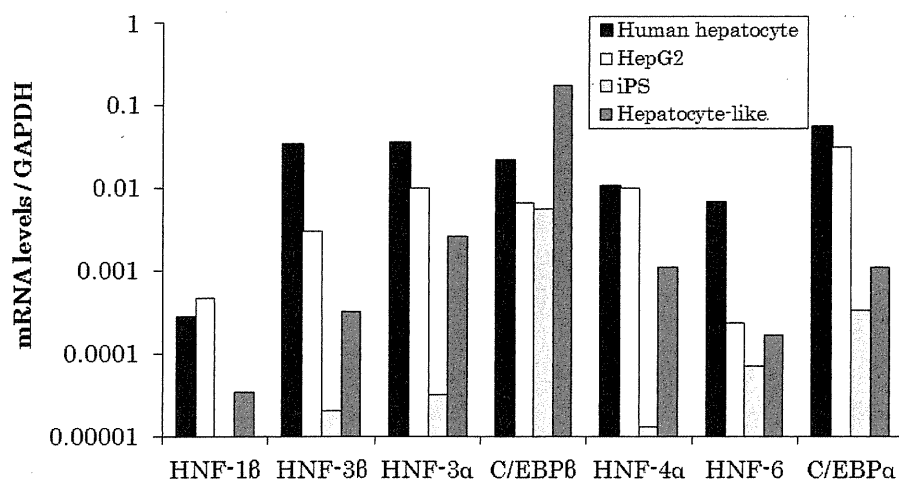


図 3. 本肝分化 iPS 細胞の肝特異的転写因子発現パターン解析

研究分担報告書

CYP1A1/1A2 誘導スクリーニングのための *in vitro* 同時評価系構築に関する研究

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的代謝あるいは、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

分子種を対象にしたもので、複数の分子種を対象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、β-naphthoflavone

(β -NF) 10 μ M 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。

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°C、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°C、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 β -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で 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

8. 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
9. 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

10. 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
11. 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

6. Ishii Y, Miyauchi Y, Koba H, Takeda S, Nagata K, Mackenzie IP, Yamazoe Y, Yamada H, Protein-protein Association of cytochrome P450 and UDP-Glucuronocyltransferase: Its Relevance to Enzyme Function. 25th JSSX Annual Meeting In Tokyo, Omiya, October 2010 p180
7. Kobe H, Ishii Y, Nurrochmad A, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie IP, Yamada H. Comparison of Catalytic Properties between UDP-Glucuronocyltransferase 1A7*3, an Allelic Variant, and Its Wild-type 1A7*1. 25th JSSX Annual Meeting In Tokyo, Omiya, October 2010 p283
8. 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
9. MRP3における新規転写誘導機構の解明 沼田喜弘、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 β -NF に対する誘導性の違い

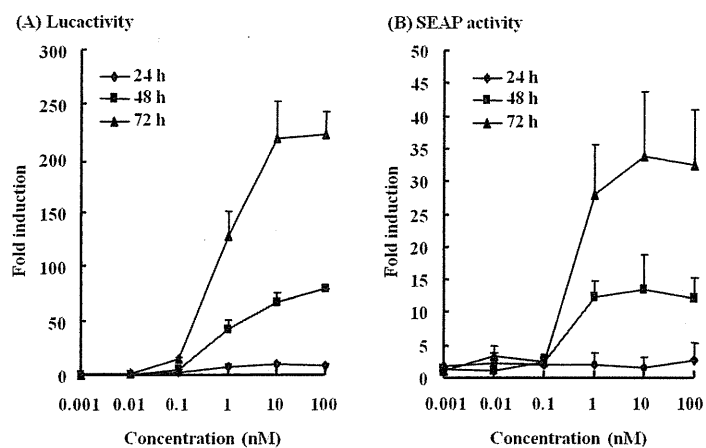
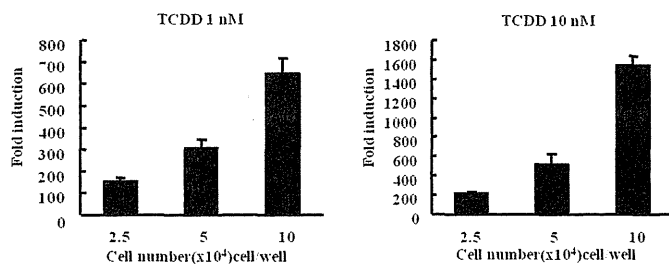


図 1. 安定発現細胞（クローン 5-1）の TCDD に対する濃度及び処置時間依存性

(A) Luc activity



(B) SEAP activity

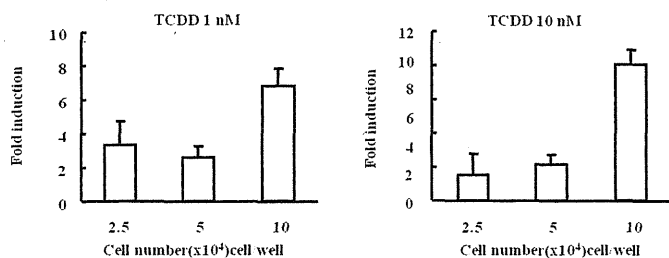


図 2. 安定発現細胞（クローン 5-1）の TCDD の誘導に対する細胞数依存性

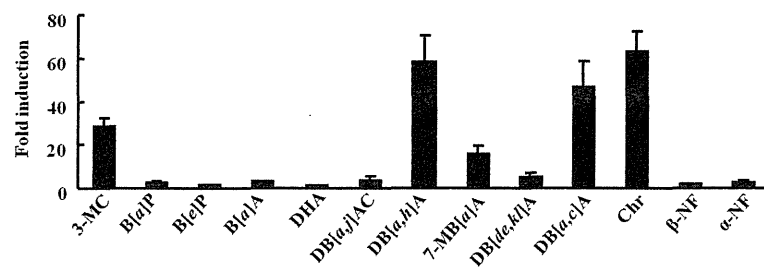
Compounds	Concentration	CYP1A1 (Luc)	CYP1A2 (SEAP)
		Fold induction (vs control)	Fold induction (vs control)
TCDD	1 nM	263.6±49.9	9.1±4.7
β-NF	10 μM	7.5±1.7	2.8±0.7
3-MC	1 μM	31.1±2.2	7.4±1.5
B[a]P	3 μM	17.7±1.3	3.9±0.9
OME	25 μM	17.1±5.2	2.3±0.8
LPZ	20 μM	9.2±1.0	2.7±1.1
ALB	3 μM	9.0±1.4	2.2±0.3
IND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

(A) Luc activity



(B) SEAP activity

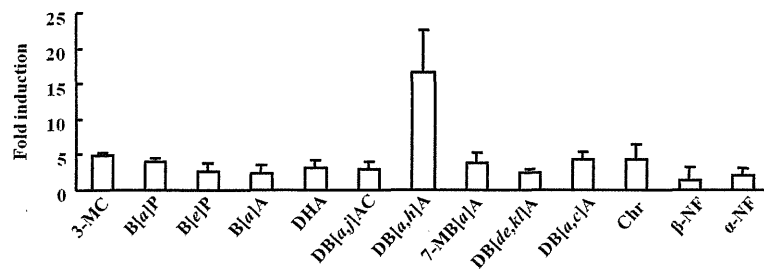


図 3. 本安定発現細胞の PAHs に対する反応性

研究分担報告書

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°C 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 cm² dish 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性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試料の提供が可能であると判明した。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

16. 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)
17. 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)

18. 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)
19. 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

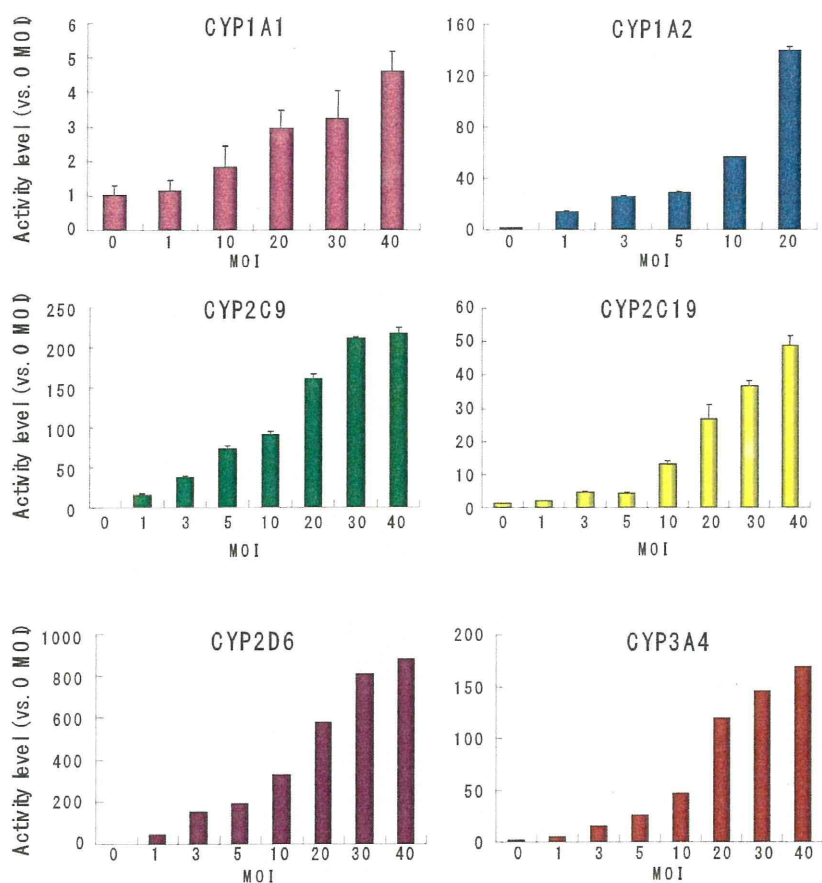


図 1. 単一の P450 分子種発現時における MOI 依存的な酵素活性

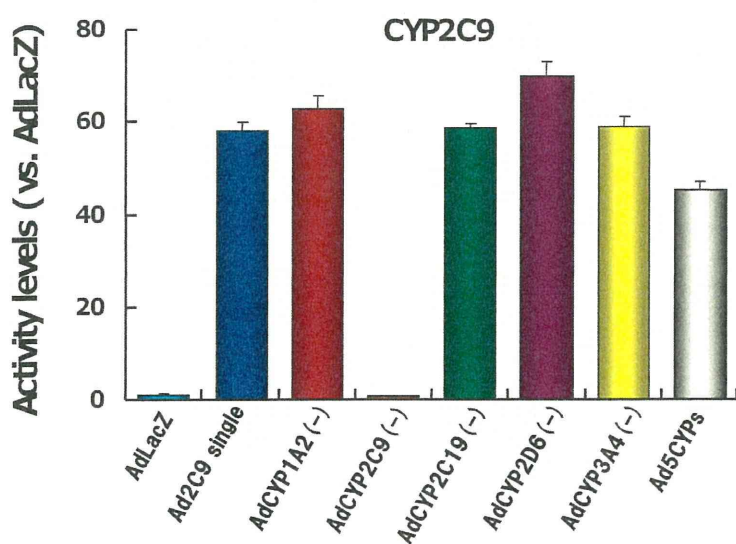


図 2. 5 種類同時感染における CYP2C9 活性

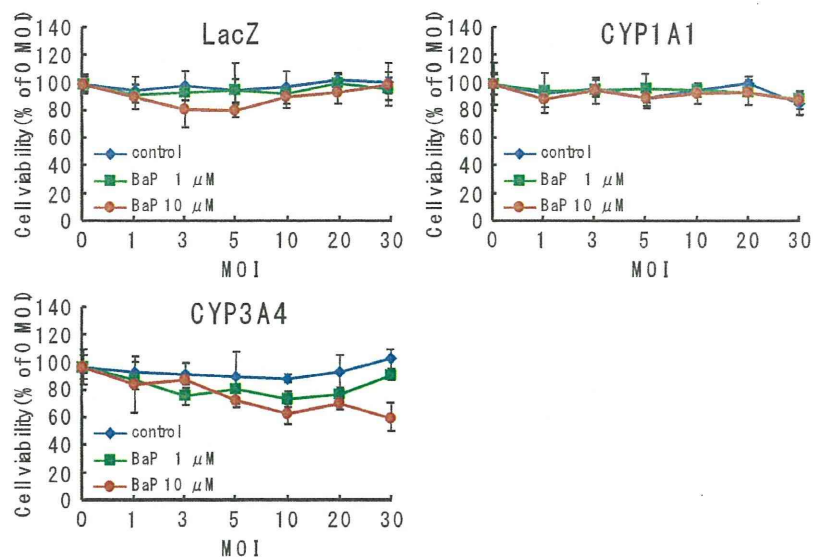


図 3. 本システムを用いた BaP 誘発性毒性発現評価

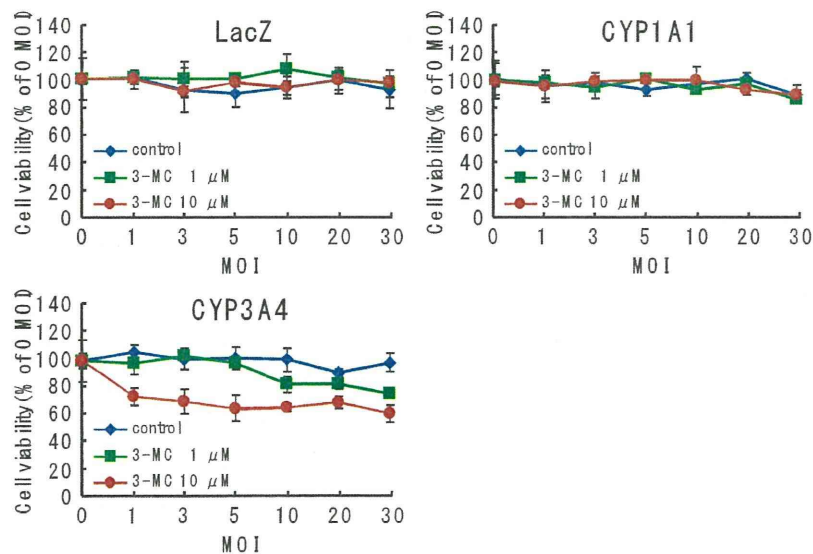


図 4. 本システムを用いた 3-MC 誘発性毒性発現評価

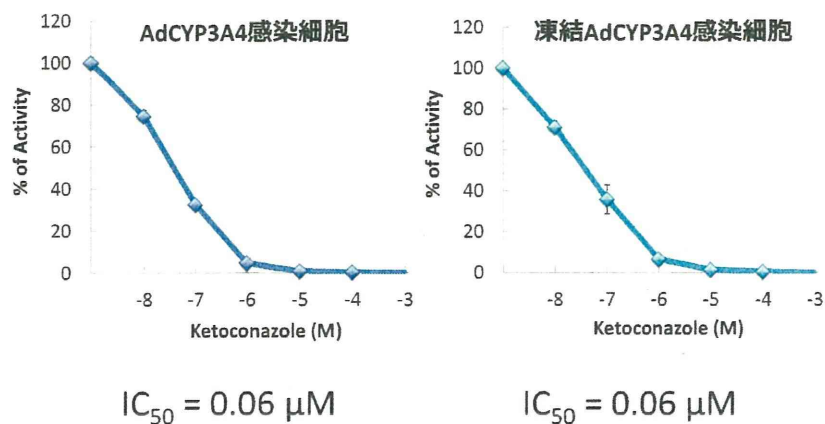


図 5. 本システムの凍結融解細胞を用いた CYP3A4 活性のケトコナゾールによる阻害実験

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）