

研究分担報告書

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ールの確立

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、標準的なプロトコー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。

A. 研究目的

本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、酵素誘導の標準的なプロトコールの作成を目的として検討を行った。

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 HNF4αcDNA を

pTARGET ベクターに組み込んだ HNF4α/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  $2.5 \times 10^5$  cell/well となるよう播種した。TransIT-LT1 0.6  $\mu$ l/well (Mirus, USA) と Opti-MEM 21.0  $\mu$ 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%CO<sub>2</sub> 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 (日水製薬, 東京) 0.5 ml/well で洗浄した後、PLB 100  $\mu$ 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® Reporter 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  $5 \times 10^4$  cells/well になるよう 10% FBS-DMEM 中 (NEAA, pen-st) で調整し、24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ L に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25  $\mu$ L 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 II (Bio-Rad Laboratories) を用いて行った。マイクロプレートに sample protein 5  $\mu$ L、A 試薬 25  $\mu$ L、B 試薬 200  $\mu$ L 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-prPXRE/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、HNF4 $\alpha$  の発現が少ないため、5  $\mu$ M 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、HNF4 $\alpha$ /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 HNF4 $\alpha$  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  $\mu$ M、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  $\mu$ M 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  $\mu$ M リファンピシンで 10.8 倍、ハイパーフォリンでは 0.1  $\mu$ M で 23 倍で濃度依存的に誘導率が増加し、0.5  $\mu$ M 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°C 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°C 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、リファンピシシン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シンを曝露した場合、結果のばらつきが大きいたことが示され、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  $\mu$ M 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。

リファンピシシンを 1 から 5  $\mu$ M 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, 222-233. (2010)

3. Hori T, Hosokawa M. DNA methylation and its involvement in carboxylesterase 1A1 (CES1A1) gene expression. *Xenobiotica*. 40, 119-128. (2010)

4. Satoh T, Hosokawa M. Carboxylesterases: Structure, Function and Polymorphism in Mammals. *J. Pestic. Sci*, 35, 218-228 (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, 229-239 (2010)

6. Hosokawa M. Are non-human primates useful experimental animals for pre-clinical study? *Drug Metab Pharmacokinet.* 25, 221-222 (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, 1387-1395 (2010)

## 2. 著書

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

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、齊藤浩司：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

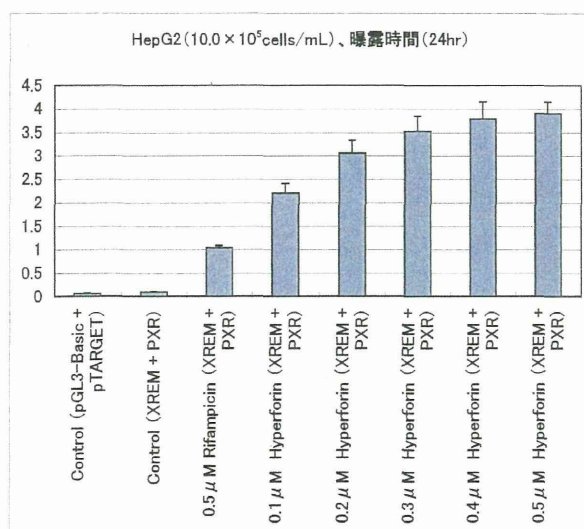


図1 HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによる、rifampicin と hyperforin に対する CYP3A4 の酵素誘導

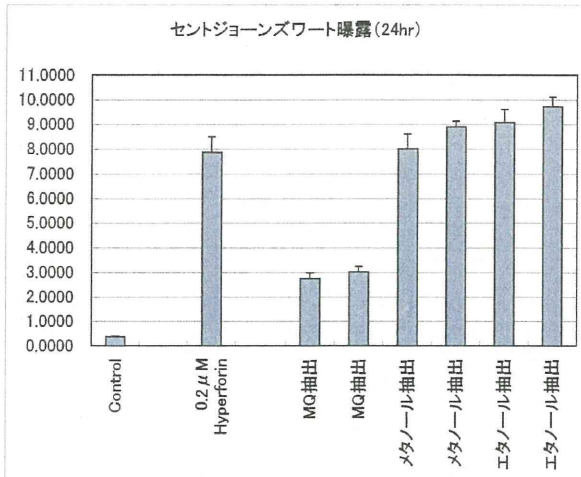


図2 市販のセントジョーンズワート (DHC) の CYP3A4 酵素誘導実験系に対する酵素誘導効果における MilliQ 水、メタノールおよびエタノール抽出の違い

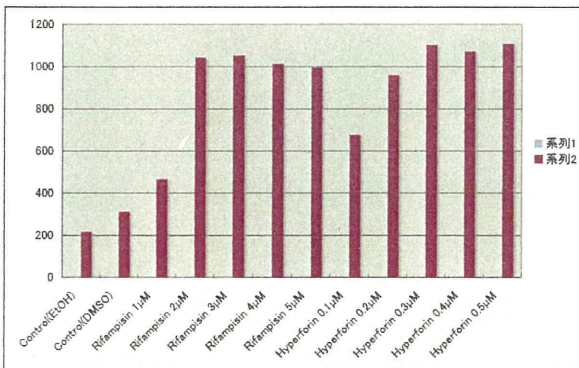


図3 CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いた rifampicin と hyperforin に対する CYP3A4 の酵素誘導

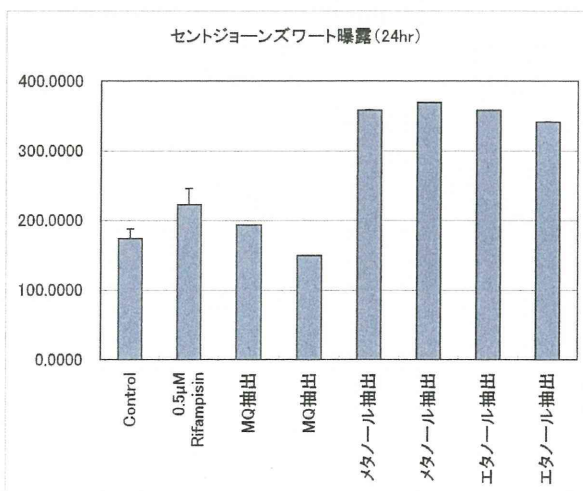


図4 3-1-10 細胞を用いた市販のセントジョーンズワート (DHC) の CYP3A4 酵素誘導実験系に対する酵素誘導効果における MilliQ 水、メタノールおよびエタノール抽出の違い

研究分担報告書

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。

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うえに、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

1. ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ M となるように添加し、5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下 CO<sub>2</sub> 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  $\beta$ -mercaptoethanol、1% dimethylsulfoxide、100 units/mL Penicillin G、100  $\mu$ 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 $\beta$ -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  $\mu$ 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  $\mu$ M ethoxyresorufin 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\beta$ -mercaptoethanol、100 units/mL penicillin G、100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 の誘導に関与する核内受容体 PXR や転写因子 HNF4 $\alpha$  及び PGC1 $\alpha$  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 I と比較して、ALB、PXR 及び HNF4 $\alpha$  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 $\beta$ -水酸化活性は、24 well-plate において DEX 及び RIF 処理により collagen I 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 $\beta$ -水酸化活性は、collagen I 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 の誘導に関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 I 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 $\beta$ -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応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

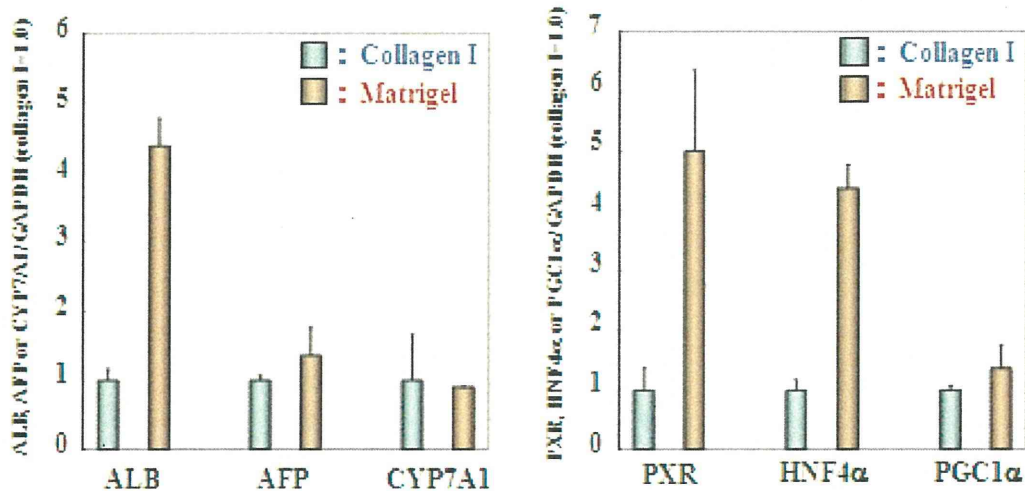


図 1 ヒト iPS 細胞より分化した細胞における肝細胞マーカー及び核内転写因子の mRNA 発現

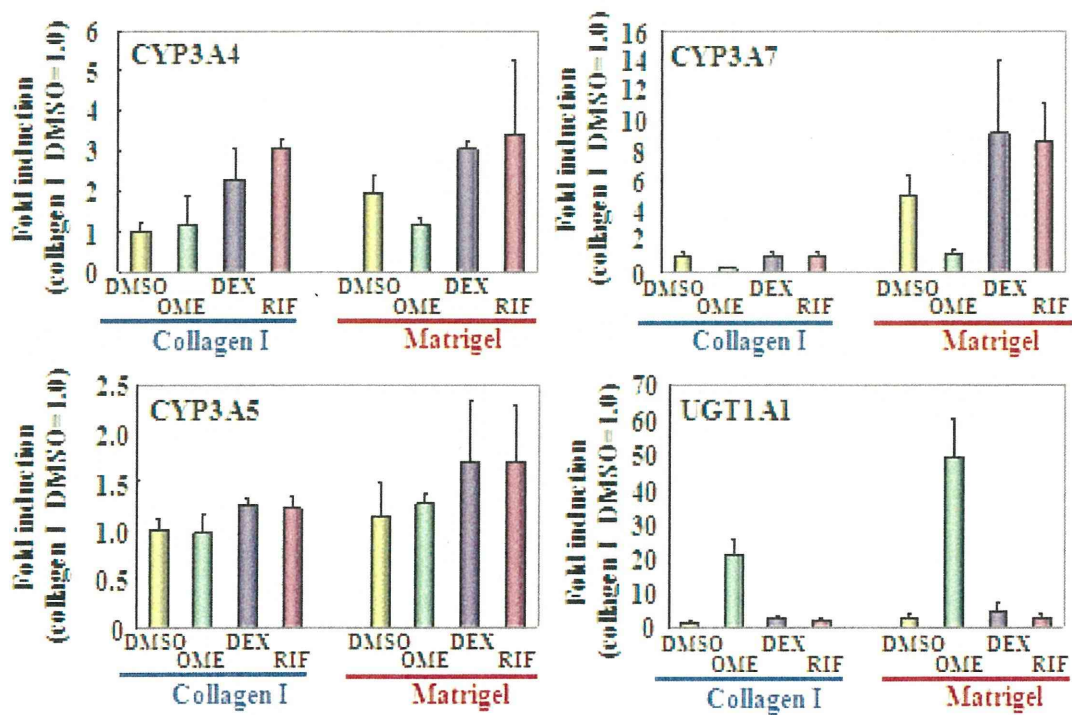


図 2 ヒト iPS 細胞より分化した細胞における CYP3As および UGT1A1 mRNA 発現

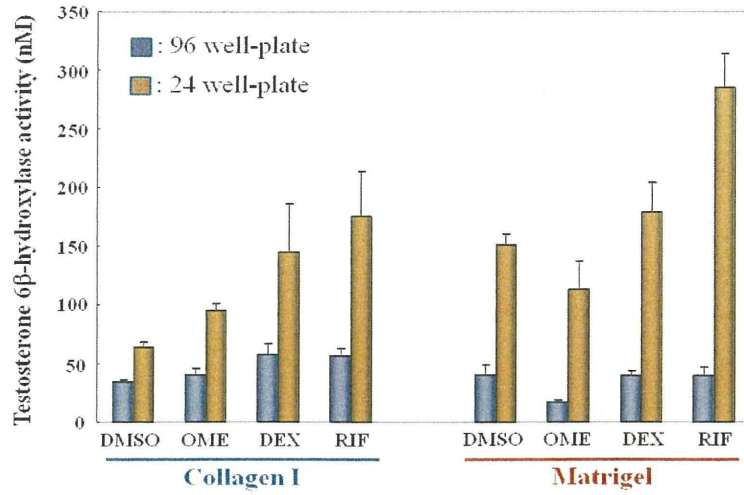


図 3 ヒト iPS 細胞より分化した細胞の testosterone 6β-水酸化活性

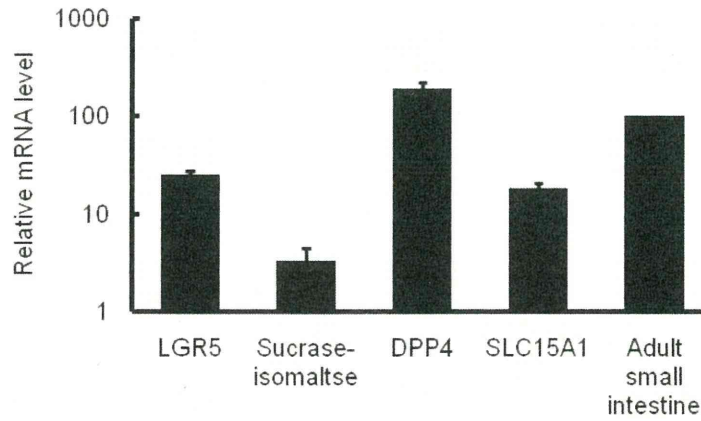


図 4 小腸幹細胞および上皮細胞マーカーの mRNA 発現解析 (プロトコール1)

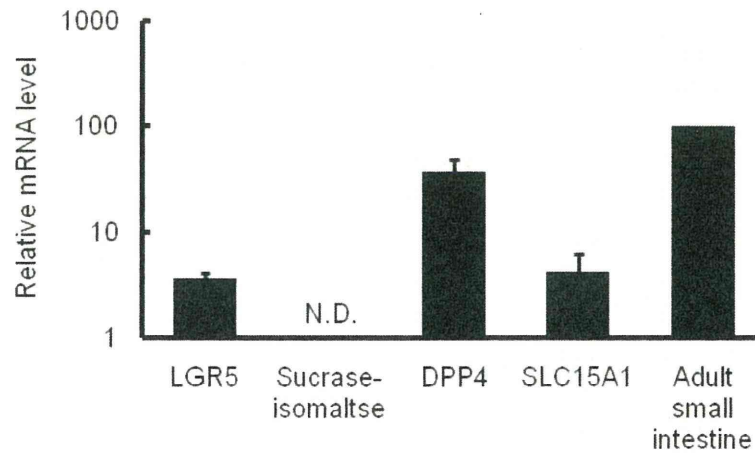


図 5 小腸幹細胞および上皮細胞マーカーの mRNA 発現解析 (プロトコール2)

### III. 平成 23 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・教授）

研究要旨

いわゆる「健康食品」の使用実態について調査を元に、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およびヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）を肝細胞あるいは小腸内皮細胞に分化させ、より正確な薬物相互作用評価法の構築を目指した。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）新たな導評価可能な培養細胞株の樹立についての研究を行った。

研究分担者

松永 民秀 名古屋市立大学・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

百瀬泰行 信州大学医学部附属病院薬剤部 副薬剤部長

鈴木 匡 名古屋市立大学・教授

榊原 明美 名古屋市立大学・客員教授

前田 徹 名古屋市立大学・講師

岩尾 岳洋 東名古屋市立大学・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

高橋 昌悟 東北薬科大学大学院薬学研究科・博士後期課程2年

近藤 祐樹 名古屋市立大学 大学院薬学研究科・博士後期課程1年

佐藤 大介 名古屋市立大学 大学院薬学研究科・博士後期課程1年

A. 研究目的

健康食品は副作用がないとの先入観から、毎日一定量、場合によっては過剰に摂取することがある。そのために食事として取る食物中の化学物質よりも、常に多量の化学物質が体に取り込まれることになり、その結果、医薬品と相互作用を起こす可能性が高くなることが懸念される。一方、食品による医薬品との相互作用は、

薬力学的に起こるものより薬物代謝酵素が関与するものの方が多く発生すると考えられている。しかしながら、医薬品とその他の多くのいわゆる「健康食品」との薬物代謝酵素が関わる相互作用についての情報はほとんどない状態である。従って、これらの情報を医療の現場に提供することが強く求められている。

本研究の目的は、いわゆる「健康食品」の使用実態を調査した上で、申請者らが構築した薬物代謝酵素活性阻害及び酵素誘導評価法を用いて、薬物相互作用を同時に評価するところにある。また、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を肝細胞あるいは小腸内皮細胞に分化させ、より正確な薬物相互作用評価法の構築を目指すことである。

## 2. 研究方法

「23年度」

### 1. 薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の測定と定量化（永田、頭金）

引き続き活性測定および誘導評価を行うが、データは数値化してまとめる。

### 2. ヒトiPS細胞から肝に分化した細胞における誘導評価（松永、永田）

レポータートランスジェニックヒトiPS細胞株が作成されれば肝細胞へ分化させ、CYP3A4およびCYP1A1/1A2の評価を試み、先の結果と比較しその有用性を検証する。

### 3. 抱合酵素およびトランスポーター誘導評価系の樹立（細川、永田）

UGT1A1およびMDR1遺伝子の誘導機構が明らかとなれば、レポータープラスミドにこれらの遺伝子を挿入し、培養細胞の染色体に組み込み安定的に誘導評価が可能な培養細胞株を作成する。

### 4. 薬物代謝酵素活性阻害および誘導のin vivo評価（永田）

培養細胞を用いたin vitroの結果は、主に動態の違いよりin vivoの結果と異なる場合がある。in vitroにおいて薬物代謝酵

素活性阻害および誘導を強く示した健康食品については、CYPおよび核内受容体をヒト化したマウスを用い、in vivoにおける相互作用の評価を行う。

### 3. 「進捗状況及び見込まれる研究結果（達成度）」について

本年度の主要な事業目標は、いわゆる「健康食品」の使用状況や副作用の種類についてのアンケート調査およびリスト作成、アンケート調査結果から抽出した候補健康食品による相互作用の確認、さらにヒトiPS細胞の肝及び小腸細胞経の分化誘導である。また、いわゆる「健康食品」の使用及び有害事象発生の状況をより正確に把握するために、患者に対するアンケート調査に加え、薬剤師に対する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に進行しており、幾つかは良好な結果を得ている。

#### 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（

昨年度は全国にわたる約 100 店舗の薬局に依頼し、健康食品の使用状況についてのアンケートを実施したが、アンケートの回収率が3割程度であった。本年度は、1000名のアンケート調査を目指し、さらに幾つかの調剤薬局にアンケート調査の依頼をした。その結果現在は、約700名の調査結果を得ており、使用状況や副作用の種類程度および使用目的、効果、副作用、安定性、含有成分などについてリストを予定通り作成している（国内発表予定）。また、有害事象発生の状況をより正確に把握するために、薬剤師にも使用状況や副作用の種類などのアンケート調査を実施したところである。来年度はこれに加え、大

学病院（信州大学、岡山大学など）において電子カルテに記載されている持参薬あるいは健康食品の使用状況や副作用の種類について、後ろ向き調査を行うことを予定している。

## ② 健康食品による相互作用の測定（進行中）

昨年度は、相互作用の測定法及び定量化についてのプロトコール及びハイスループット化した測定法を樹立したので、アンケート調査あるいは事前の文献調査から抽出した健康食品について、相互作用のスクリーニングを行った。活性阻害については、既存のものを含め幾つかのものは阻害を示した。また、誘導については、晩蘭根が比較的強い酵素誘導を示すことを本研究で始めて明らかとした（論文作成中）。現在、調査対象の健康食品種を増やし、実験を行っている。

## ③ ヒトiPS細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討（進行中）

昨年度は現在ヒトiPS細胞から胎児肝様細胞への分化に成功したが、成熟肝が示す高い薬物代謝活性を得るまでには至っていない。今年度は、より成人の肝臓に近い機能を有する細胞への分化させるために、幾つかの転写因子についてアデノウイルスを用いて導入した。その結果、HNF-6の導入により幾つかの薬物代謝酵素mRNA発現が強く上昇することがわかったが、成人の肝臓に近い機能を有する細胞への分化には至っていない（論文作成中）。現在、他の転写因子の導入を引き続き行うと共に、近年細胞の分化等に関わることが明らかとなっているmicroRNAを用いた分化誘

導実験を行っている。一方、小腸の細胞（腸管上皮細胞）に近い機能を有する細胞への分化については、培養液中に分化誘導が期待できる液性因子の添加により、腸管上皮細胞に非常に類似した性質を有する細胞分化に成功している（論文作成中）。CYP3A4およびCYP1A1/1A2レポーター遺伝子を染色体に組み込みについては、クローン細胞の単離に至っておらず、引き続き検討中である。

## ④ 抱合酵素およびトランスポーター誘導評価系の樹立

培養細胞の染色体に組み込み込むことで、トランスポーターMDR1の誘導評価を安定的に行うことが可能な細胞株の樹立に成功した（論文作成中）。現在この細胞株の誘導評価系を行っている。グルクロン酸抱合酵素UGT1A1遺伝子については、NCBIのデータベースからの遺伝子配列情報を基にPCRにて単離を試みているが、まだ得られていない。データベースの情報に誤りがあるのではないかと考えている。

## ⑤ 薬物代謝酵素活性阻害および誘導のin vivo評価

幾つかの健康食品により相互作用が予測されたので、in vivoにて同様に相互作用が起こるかマウスにヒトPXRを発現させ誘導を確認する実験の準備を行っている。

## 4. 研究発表（原著論文によるものに限る。）

(1) 国内 0件

そのうち主なもの

論文発表

（著者・題名・発表誌名・巻・項・発行年等も記入のこと）

(2) 海外 3 件

そのうち主なもの

論文発表

(著者・題名・発表誌名・巻・項・発行年等も記入のこと)

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

2. T Hori, L Jin, A Fujii, T Furihata, Y Nagahara, K Chiba, M Hosokawa, Dexamethasone-mediated transcriptional regulation of rat carboxylesterase 2 gene, *Xenobiotica* in press

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

2. 学会発表

1. Sugawara R, Kumagai T, Miura M, Takahashi S, Sasaki T, Sakaguchi S, Miyairi S, Nagata K. 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 (仙台) 平成 23 年 10 月

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. 第 26 回日本薬物動態学会年会 (広島) 平成 23 年 11 月

3. 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. 第 26 回日本薬物動態学会年会 (広島) 平成 23 年 11 月

4. Sakaguchi S, Miura A, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. 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- $\alpha$  誘導肝細胞障害の構築と NO の影響 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 平成 24 年 3 月

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. Takamitsu Sasaki, Yutaka Tanaka, Shogo Takahashi, Takeshi Kumagai, Shuhei Sakaguchi, Tamihide Matsunaga, Kiyoshi Nagata: Hepatocyte nuclear factor-6 enhances expression of CYP3A4 in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting, November 2011 (広島)

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. Takahiro Iwao, Kiyoshi Nagata, Tamihide Matsunaga: Differentiation into the enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting, November 2011 (広島)
4. Yuki Kondo, Takahiro Iwao, Masayoshi Saito, Takuro Niwa, Koichi Kurose, Kiyoshi Nagata, Tamihide Matsunaga: Effect of quercetin on differentiation into hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26<sup>th</sup> 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 31 日 (札幌).
7. 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.
8. 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.
9. 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.



研究分担報告書

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

#### A. 研究目的

近年、健康志向の高まりに伴い健康食品やサプリメント（民間生薬）の使用が増加している。一方、これらの薬物代謝酵素に及ぼす影響には不明な点が多く、臨床の場合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°C、5% CO<sub>2</sub> 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°C) 後、上清 (20 µl) を 96-well white plate に移し、各 well に luciferase assay reagent を加え Glomax<sup>96</sup> 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<sub>2</sub> 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<sub>50</sub>) 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<sub>2</sub> 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ョウウ葉エキスを用い、CYP3A4 レポーター活性を測定した結果、板藍根において CYP3A4 レポーター活性の上昇が認められた (図 1A)。また各濃度の板藍根を用い CYP3A4 誘導を検討した結果、板藍根は用量依存的な CYP3A4 レポーター活性の上昇を示した。(図 1B)。これらの結果から板藍根が CYP3A4 を誘導することが示唆された。

### 板藍根成分の CYP3A4 誘導能の検討

板藍根にはインディルビン (IND)、インディゴ (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関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 の関与が示唆された。

#### IND の CYP3A4 誘導における PXR 関与の検討

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

#### E. 結論

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

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

##### 2. 学会発表

1. Sugawara R, Kumagai T, Miura M, Takahashi S, Sasaki T, Sakaguchi S, Miyairi S, Nagata K. 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 (仙台) 平成 23 年 10 月

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. 第 26 回日本薬物動態学会年会 (広島) 平成 23 年 11 月

3. 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. 第 26 回日本薬物動態学会年会 (広島) 平成 23 年 11 月

4. Sakaguchi S, Miura A, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. 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- $\alpha$  誘導肝細胞障害の構築と NO の影響 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 平成 24 年 3 月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

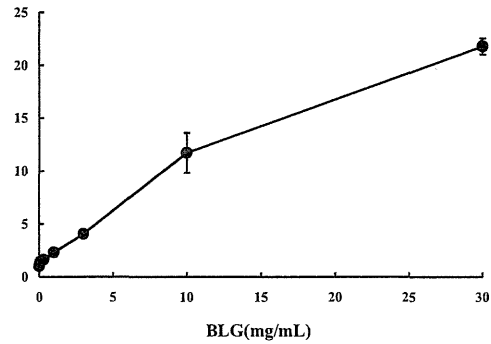
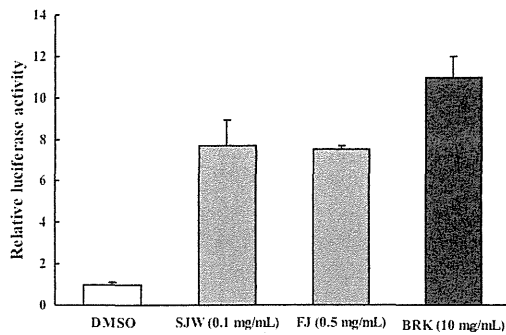
該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

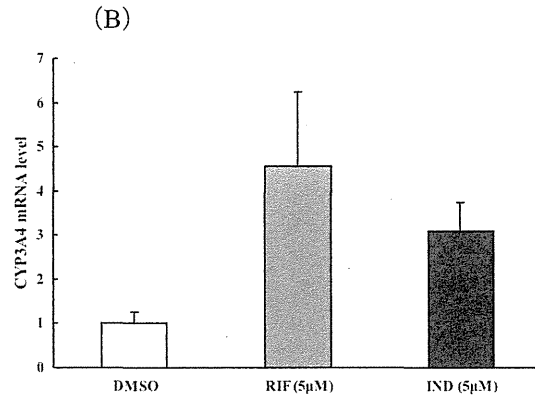
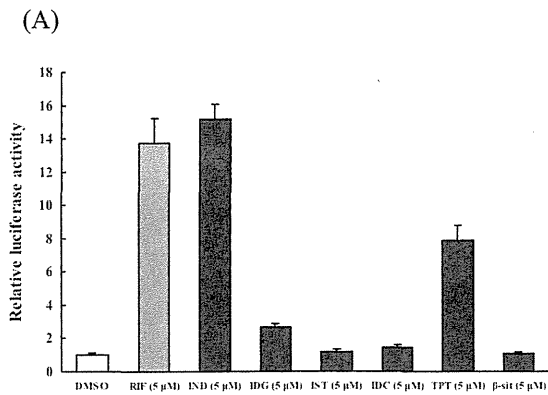
該当なし



(A)

(B)

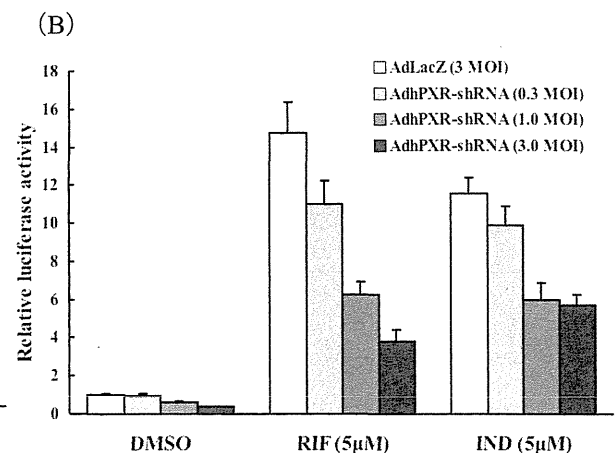
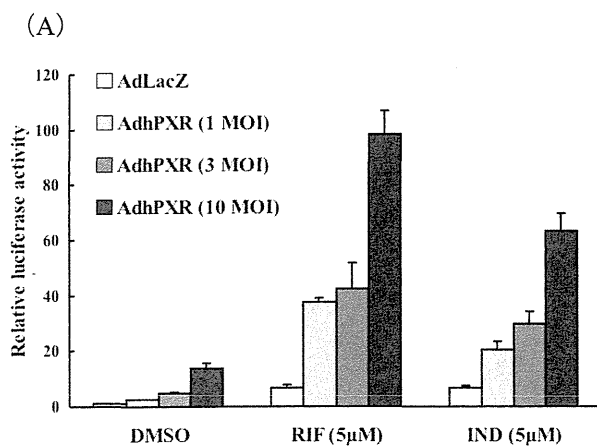
図1 CYP3A4 レポーター活性に及ぼす板藍根の影響。A：セントジョーンズワート (SJW)、イチヨウ葉エキス (GBE)、板藍根 (BLG) における CYP3A4 レポーター活性の比較。B：板藍根の用量依存的な CYP3A4 レポーター活性の検討。



(A)

(B)

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



(A)

(B)

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