

20/23405/A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品中の化学物質 および 食品中の化学物質と
医薬品との相互作用による肝毒性 ならびに
発生毒性の新規評価系の構築

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 中村 和昭

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
食品中の化学物質および食品中の化学物質と医薬品との相互作用 による肝毒性ならびに発生毒性の新規評価系の構築 中村和昭	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 7
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 8

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

食品中の化学物質および食品中の化学物質と医薬品との相互作用による

肝毒性ならびに発生毒性の新規評価系の構築

研究代表者 中村 和昭 国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部 室長

研究要旨

食品中の化学物質と医薬品との相互作用は、医薬品との飲み合わせの観点から医薬品相互作用と同様の基準で評価される必要がある。しかし、食品中の化学物質について、医薬品との相互作用の観点に基づいたヒトを試験対象とした実験的な検討は十分に行われていない。本研究では、肝移植手術の際に生じる摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独あるいは医薬品との併用による肝細胞毒性試験系を確立し、食品と医薬品の飲み合わせにおける食品の安全性評価系を構築することを目的とする。本年度は、健康食品として摂取される食品中の化学物質（ヒペルフォリン、ピロバリド、ギンコリドA、ギンコリドB、ギンコリドC）による肝臓の薬物代謝酵素チトクロム P450 (CYP)の発現変動、肝細胞毒性、発生毒性を検討し、さらに化学物質の肝代謝産物による発生毒性評価系の構築を試みた。

A. 研究目的

食品中の化学物質と医薬品との相互作用は、医薬品との飲み合わせの観点から医薬品相互作用と同様の基準で評価される必要がある。しかし、食品中の化学物質の発がん性等に関する動物や微生物等を用いた評価は行われているものの、医薬品との相互作用の観点に基づいたヒトを試験対象とした実験的な検討は十分に行われていない。医薬品間の相互作用は代謝過程における相互作用が重要であり、そのほとんどが薬物代謝酵素チトクロム P450 (CYP)の阻害または誘導に起因する。食品中の化学物質と医薬品との相互作用も同様の機構と考えられ、食品と医薬品の相互作用により有害事象を引き起こす代表的な例として、グレープフルーツジュースや西洋弟切草による

CYP の阻害・誘導作用が挙げられる。医薬品間の相互作用は処方時に留意されるのに対し、食品と医薬品との相互作用は消費者の食生活に依るところが大きく、日常生活において予期せず生じる可能性が高い。服用された薬物は体内へ吸収された後、その90%以上が肝臓の CYP により代謝されることから、食品中の化学物質による CYP 発現変動は、服用する医薬品の薬物動態を変化させ、副作用を増悪させる恐れがある。従って、食品中の化学物質による健康障害の予防の観点から、食品中の化学物質による CYP 発現への影響をはじめとする肝機能の評価系が必要である。本研究では、肝移植手術の際に生じる摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝機能への影

響の評価系および食品中の化学物質単独あるいは医薬品との併用による肝細胞毒性試験系を確立し、食品と医薬品の飲み合わせにおける食品の安全性評価系を構築する。

B. 研究方法

1) ヒト新鮮肝細胞の継続的な分離・培養・保存

国立成育医療研究センター・病院臓器移植センター及び臨床研究センター先端医療開発室と連携し、肝移植時の摘出肝からの肝細胞の分離・保存を行った。

書面による同意を頂いた提供者より、国立成育医療研究センターにて行われる小児生体肝移植手術の際生じる摘出肝組織（ドナー余剰肝組織及びレシピエント肝組織）のうち、移植術に用いずまた病理検査においても不要な廃棄予定の余剰肝組織を提供いただき、肝細胞の採取を行った。生体肝移植手術で摘出されたドナー肝組織は、手術室で執刀医が移植に必要な部位を確保した後の余剰廃棄部分を研究用として用いた。一方、摘出されたレシピエント肝組織においては、病理検査に必要な処理をした後の廃棄予定の組織を研究用として用いた。提供された肝組織は、一部を凍結保存あるいは組織観察用に固定し、残りは肝細胞分離に用いた。

肝細胞単離に当たっては、肝組織切断面より門脈もしくは中心静脈を確保し、血管腔へカニューレを挿入後血管周囲とともにカニューレを結索することにより固定し、灌流路を確保した後、37℃保温条件下でコラゲナーゼ液にて20分間灌流し、組織構造を消化した。コラゲナーゼ液処理後、組織を分散し、ガーゼとナイロンメッシュにて濾過す

ることにより大型の細胞塊を除去し、肝細胞懸濁液を得た。

2) 食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立

1) により得た肝細胞あるいは市販の凍結肝細胞を 2×10^5 個/ウェルにて24ウェルプレートへ播種し、4日間培養した。化学物質を添加し、さらに2日間培養を行った。化学物質は、薬物動態へ影響を与え、医薬品の薬効の増減・副作用発現に影響を及ぼす食品中の化学物質のモデル物質としてセントジョーンズワート（西洋弟切草）の活性成分であるヒペルフォリンやイチョウ葉エキス成分であるピロバリド、ギンコリド A、B、C を用いた。これら化学物質への暴露後、細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を得た。得られた cDNA を用いて、プローブ法による定量 PCR 法によりヒトにおいて主要な第 I 相薬物代謝酵素である CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 の発現変化を検討した。

3) 食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の確立

1) により得た肝細胞あるいは市販の凍結肝細胞を 3.2×10^4 個/ウェルにて96ウェルプレートへ播種し、4日間培養した。ヒペルフォリン、ピロバリド、ギンコリド A、B、C を添加し、さらに2日間培養を行った。これら化学物質への暴露後、WST 法（同仁化学）により薬剤非添加条件の値を 100% としたときの細胞生存率を求めた。

4) 食品中の化学物質による発生毒性試験系の確立

(a) 食品中の化学物質による発生毒性試験

ヒペルフォリンの発生毒性をマウス ES 細胞を用いた発生毒性試験法であ

る Embryonic Stem Cell Test (EST 法) により検討した。ES 細胞および NIH/3T3 細胞を 3.2×10^4 個/ウェルにて 96 ウェルプレートへ播種した。ヒペルフォリンを添加し、10 日間培養した後、CellTiter-Glo assay (Promega) にて ES 細胞の細胞数を定量し、薬剤非添加条件の値を 100%としたときの細胞生存率を求めた。また、ヒペルフォリン暴露条件下で hanging drop 法により ES 細胞の胚様体を作成し、10 日間培養した後、ES 細胞を回収した。回収した ES 細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、内胚葉、中胚葉および外胚葉分化マーカー遺伝子発現量を定量 PCR 法にて検討した。

(b) 食品中の化学物質の肝代謝産物による細胞毒性試験

肝臓による薬物代謝産物の発生毒性を検討するため、従来の EST 法を改良し、セルカルチャーインサートを用いて ES 細胞とヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 細胞およびヒト繊維芽細胞株 WI-38 細胞を非接触共培養する試験法 (Hep-EST 法) を構築し、すでに研究代表者の研究グループで EST 法により毒性評価が行われているバルプロ酸 (VPA) をモデル物質として、その肝代謝産物による発生毒性を検討した。

薬物代謝を担うヒト肝細胞として肝細胞株 HepG2 細胞、対照としてヒト繊維芽細胞 WI-38 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレート (Millipore) のフィルタートレイへ 9×10^3 個/ウェル播種した。翌日、マウス ES 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのレシーバートレイへ 1.25×10^3 個/ウェル播種し、HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞とともに培養した。培地には VPA を添加し、

3 日目、5 日目にそれぞれ同濃度の薬物添加培地で培地交換を行い、7 日目に CellTiter-Glo assay (Promega) にて ES 細胞の細胞数を定量し、薬剤非添加条件の値を 100%としたときの細胞生存率を求めた。同様に成熟細胞のモデルとして NIH/3T3 細胞と HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞との共培養を VPA を添加した培地にて行い、7 日目の NIH/3T3 細胞の細胞生存率を求めた。

(c) 食品中の化学物質の肝代謝産物による発生毒性試験

HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイへ 9×10^3 個/ウェル播種した。翌日、マウス ES 細胞を EZ-BindShut II (IWAKI) へ 750 個/ウェル播種し、HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞を播種したミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイと組み合わせ、培養した。培地に VPA を添加し、3 日目に同濃度の薬物添加培地で培地交換を行った。ES 細胞培養開始 4 日後に HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞をミリセル 24 セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイへ 4.8×10^4 個/ウェル播種しておき、5 日目に EZ-BindShut II での培養により形成された ES 細胞の胚様体をミリセル 24 セルカルチャーインサートプレートのレシーバートレイへ 1 ウェルあたり 1 個移し、HepG2 細胞ならびに WI-38 細胞を播種しておいたミリセル 24 セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイとともに 10 日目まで培養を行い、ES 細胞を回収した。

回収した ES 細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、内胚葉、中胚葉および外胚葉分化マーカー遺伝子発現量を定量 PCR 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究実施においては、対象患者個人のプライバシーをはじめとした人権擁護を最優先とし、危険性の排除や説明と理解（インフォームドコンセントおよびアセント）の徹底を図っている。

採取された肝組織を本研究に用いることは、国立成育医療研究センターの倫理審査委員会にて承認が得られている（「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・培養・保存」（受付番号 385 平成 21 年 12 月 8 日承認））。本研究に用いている肝組織は国立成育医療研究センター病院臓器移植センターにおいて主治医から説明を受け同意を得た後に提供されたドナー余剰肝およびレシピエント摘出肝であり、通常は医療廃棄物として廃棄される組織である。肝組織は国立成育医療研究センター病院にて匿名化された後に国立成育医療研究センター研究所に搬送され、肝組織の一部の保存と肝細胞分離の処理を行っている。国立成育医療研究センター研究所においては、連結可能匿名化され管理番号のみ附された検体を受け入れている。本研究は、平成 10 年厚生科学審議会答申が定める「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」にも従い遂行した。なお、本研究は国立成育医療研究センター倫理委員会にて

承認を得た以下の研究課題に基づいて実施している。

「生体肝移植時に生じる余剰肝等からのヒト肝細胞の分離・培養・保存」（受付番号 385）

「ヒト肝細胞・組織を用いた創薬研究および肝疾患・病態に関する基礎研究」（受付番号 396）

C. 研究結果

1) ヒト新鮮肝細胞の継続的な分離・培養・保存

本年度、当センターにて施行した小児肝移植症例数は 41 例であり、年間小児肝移植症例数は世界最多であった（平成 24 年 11 月現在）。このうち 33 例（胆道閉鎖症肝 15 例、先天代謝異常症 4 例、ドナー余剰肝 8 例、その他 6 例）の肝検体より、肝組織及び肝細胞の分離・培養・保存を行った。

2) 食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立

本研究により単離を行った新鮮初代肝細胞ならびに市販ヒト凍結肝細胞を用いて、肝機能評価系の構築を行った。西洋弟切草の成分であるヒペルフォリンを用いた検討から、ヒペルフォリンによる CYP3A4 発現亢進作用が認められた。また、イチヨウ葉エキスの成分であるビロバリド、ギンコリド A、B、C の評価をおこない、ギンコリド B による CYP3A4 発現亢進を認めた。

3) 食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の確立

本研究により単離を行った新鮮初代肝細胞ならびに市販ヒト凍結肝細胞を用いて、肝細胞毒性評価系の構築を行った。ヒペルフォリン、ビロバリド、ギンコリド A、B、C は、いずれも健康成人由来肝細胞においては肝細胞毒

性を示さなかった。一方、ヒペルフォリンは小児由来肝細胞において細胞毒性を示す可能性が考えられた。

4) 食品中の化学物質による発生毒性試験系の確立

ヒペルフォリンによる発生毒性評価を発生毒性試験法である EST 法にて行った結果、ヒペルフォリンは胎児モデルである ES 細胞および成人モデルである繊維芽細胞に対して細胞生存率を減少させたが、繊維芽細胞に対してはアポトーシスを誘導し、一方、ES 細胞に対しては細胞周期を停止させることにより細胞生存率を減少させ、細胞種によってその作用が異なると考えられた。また、組織特異的遺伝子発現解析から、ヒペルフォリンは ES 細胞の分化を抑制すると考えられた。しかし、ヒペルフォリンの *in vitro* におけるこれらの効果は、想定される西洋弟切草摂取時のヒペルフォリン血中濃度に比べて相当に高濃度のヒペルフォリン添加により認められるものであり、通常用量の西洋弟切草あるいはヒペルフォリンの摂取において催奇形性は極めて低いものの、過剰摂取には留意する必要があると考えられた。

一方、VPA の肝代謝産物による細胞毒性を検討するため、HepG2 細胞あるいは WI-38 細胞との共培養による VPA 添加時の ES 細胞および NIH/3T3 細胞の細胞生存率を求めた。NIH/3T3 細胞において、HepG2 との共培養では WI-38 との共培養に比べ VPA の細胞毒性が増悪した。ES 細胞においても、VPA 添加により、HepG2 との共培養では WI-38 との共培養に比べ細胞毒性が増悪した。

VPA の肝代謝産物による ES 細胞分化に対する影響を評価するため、VPA 添加による ES 細胞での種々の組織特異的分化マーカー発現を Real-time

PCR にて定量した。WI-38 細胞との共培養時には、未分化マーカーである Oct3/4 および Sox2 発現は、VPA 濃度依存的に発現が上昇した。一方、HepG2 細胞との共培養時には WI-38 細胞との共培養時に比べ VPA の未分化マーカー発現上昇が抑制された。外胚葉マーカーである Synaptophysin (Syn; 後期神経特異的マーカー) および Olig2 (オリゴデンドロサイトマーカー) 発現は、WI-38 細胞との共培養と HepG2 との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。同様に、内胚葉マーカーである GATA6 および Albumin(Alb)発現は、WI-38 細胞との共培養と HepG2 との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。一方、中胚葉マーカーである BMP-4 および ANF 発現は、VPA 添加時に WI-38 細胞との共培養に比べ HepG2 との共培養により有意な発現の上昇が見られた。

D. 考察

本研究「2) 食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立」の成果より、食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の確立が見込まれる。さらに、本評価系を他の化学物質へ応用することで、食品中の化学物質による肝機能への影響評価法の構築が可能であると考えられる。

また、本研究「3) 食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の確立」の成果より、食品中の化学物質による肝細胞毒性評価法の確立が見込まれる。本評価系を他の化学物質へ応用することで、食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系の構築が可能であると考えられる。

さらに、本研究「4) 食品中の化学

物質による発生毒性試験系の確立」の成果を進展させ、ヒト ES 細胞/iPS 細胞および繊維芽細胞を用いたより予測精度の高い発生毒性試験法の構築が可能と考えられる。加えて、Hep-EST 法により薬物肝代謝産物を考慮した発生毒性の評価が可能であると考えられる。本結果をもとに初代培養細胞を用いた系を構築することにより、より精度の高い食品中の化学物質と医薬品の相互作用による肝代謝産物の発生毒性評価が可能となる。

E. 結論

本研究の成果により食品中の化学物質による肝機能への影響の評価系および食品中の化学物質単独あるいは医薬品との併用による肝細胞毒性試験系ならびに発生毒性試験系の確立が可能であると考えられ、今後これら試験系を発展・活用・提供し、食品の安全性確保の一助としていきたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、山内淳司、田上昭人. 肝薬物代謝を考慮した Embryonic Stem Cell Test (EST 法) の検討. 日本小児臨床薬理学雑誌 25, 1, 77-82 (2012)

2. 学会発表

(1) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、今井弘一、田上昭人：細胞毒性発現機序を考慮した Embryonic Stem Cell Test (EST 法) による発生毒性評価、日本動物実験代替法学会第 25 回大会（口頭発表）2012 年 12 月・東京

(2) 今井弘一、武田昭二、中村和昭、田上昭人、ヒト肝細胞とマウス ES 細胞のハイブリッド培養による in vitro 発生毒性試験法の開発、日本動物実験代替法学会第 25 回大会（口頭発表）2012 年 12 月・東京

(3) 中村和昭、田上昭人、マウス胚性幹細胞を利用した hyperforin の発生毒性評価、第 39 回日本小児臨床薬理学会学術集会（口頭発表）2012 年 10 月・東京

(4) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、田上昭人、Hyperforin のマウス胚性幹細胞および繊維芽細胞に対する影響、日本動物学会第 83 回大阪大会（口頭発表）、2012 年 9 月・大阪

(5) 中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、田上昭人、薬物肝代謝産物の評価が可能な Embryonic Stem Cell Test (EST 法) の検討、第 39 回日本毒性学会学術年会（口頭発表）、2012 年 7 月・仙台

(6) 中村和昭、田上昭人、薬物肝代謝産物の評価が可能な Embryonic Stem Cell Test (EST 法) の検討、日本組織培養学会 第 85 回大会（口頭発表）、2012 年 5 月・京都

(7) 今井弘一、武田昭二、中村和昭、田上昭人、マウス ES 細胞とヒト肝細胞のハイブリッド培養による新しい in vitro 発生毒性試験システムの開発、第 59 回日本歯科理工学会（口頭発表）、2012 年 4 月・徳島

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
中村和昭、加藤奈津子、相澤和子、山内淳司、田上昭人	肝薬物代謝を考慮したEmbryonic Stem Cell Test (EST法) の検討	日本小児臨床薬理学会雑誌	第25巻1号	77-82	2012年

肝薬物代謝を考慮した Embryonic Stem Cell Test (EST 法) の検討

中村 和昭, 加藤 奈津子, 相澤 和子, 山内 淳司, 田上 昭人
 国立成育医療研究センター研究所 薬剤治療研究部

Development of Novel Embryonic Stem Cell Test in Consideration of Hepatic Drug Metabolism

Kazuaki Nakamura, Natsuko Kato, Kazuko Aizawa, Junji Yamauchi, Akito Tanoue
 Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development

要旨

本研究において、我々は肝臓による薬物代謝産物の発生毒性を検討するため、セルカルチャーインサートを用いてES細胞とヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 細胞あるいはヒト繊維芽細胞株 WI-38 細胞を非接触共培養する試験法 (Hep-EST 法) を構築した。Hep-EST 法によるバルプロ酸 (VPA) の細胞毒性を評価した結果、WI-38 細胞との共培養に比べ HepG2 細胞との共培養において VPA の ES 細胞に対する細胞毒性の増悪がみられた。また、ES 細胞に対する VPA の未分化マーカー発現誘導効果は HepG2 細胞との共培養により抑制され、一方で HepG2 細胞との共培養により中胚葉マーカー発現が上昇した。これらの結果から、HepG2 細胞により代謝された VPA の活性中間代謝産物により ES 細胞への毒性が増し、また VPA の ES 細胞分化に与える影響が変化したと考えられ、Hep-EST 法により薬物肝代謝産物を考慮した発生毒性の評価が可能であることが示された。

緒言

近年、動物実験に代わる様々な代替法の模索が続けられる中で、各種培養細胞の利用が注目されている。特に胚性幹細胞を含む幹細胞は多分化能を維持したまま未分化状態で無限に増殖させることが可能であり、再生医療への応用に加えて、創薬への応用も期待されている¹⁾。

Spielmannらによって開発された Embryonic Stem Cell Test (EST 法) は、マウスの ES 細胞の心筋細胞分化障害を指標とした *in vitro* 発生毒性試験法である²⁾。マウス ES 細胞は高栄養条件下で培養すると特別な誘導を行わなくても自然に心筋細胞へ分化し、その自律的収縮運動によって心筋細胞への分化を容易に検知できる。EST 法は、このようなマウス ES 細胞の特性を利用し、培養液に薬物を添加することにより、細胞生存率および心筋細胞への分化に対する薬物の影響を調べ、薬物の発生毒性を評価する方法である。また EST 法では、未熟な細胞である ES 細胞を動物実験における「胎児」、分化した細胞 (繊維芽細胞) を動物実験における「母動物」と仮定し、両細胞の生存率に対する薬物の影響を比較することにより、母体と胎児の感受性の差を検討することが可能である³⁾。このような EST 法は従来の動物実験を中心とする方法と比較すると、短時間で原因物質の特定やその解析が容易であり、すでにヨーロッパ各国の研究機関でのパ

リレーションテストが終了し、ヒトの発生毒性データとの高い相関性や再現性についても認められている^{3,4)}。しかし、従来の心筋細胞への分化を指標とした EST 法では心筋細胞以外の細胞系譜への分化に対する薬物の影響を評価できず、広範な催奇形性を含む薬物の毒性評価は難しいと考えられる。

これまでに我々は、神経管欠損等の神経系に対する催奇形性が報告されている抗けいれん剤であるバルプロ酸、カルバマゼピンの細胞分化過程に及ぼす薬剤の影響について、従来の EST 法に加え組織特異的分化マーカー発現の検討を行うことにより、ES 細胞の分化への影響をより詳細に解析してきた^{5,6)}。さらに我々は EST 法を進展させ、EST 法と ES 細胞の神経細胞分化誘導法である SDIA (Stromal cell-Derived Inducing Activity) 法を組み合わせ、神経系細胞分化に対する薬物の影響を検討可能な系を確立してきた^{7,8)}。

一方、胎児は子宮の中で胎盤を介して母体と密接に関わっており、個体発生は生理学的変動等の母体内の環境変化に影響されるため、薬物の発生毒性を単純な *in vitro* 系で評価するには限界がある。薬物の大部分が肝臓で代謝されることから、薬物の母体への暴露 (摂取) 後の肝臓による代謝産物の影響を考慮した発生毒性試験法が重要であると考えられる。しかし、従来の EST 法では試験薬物を培養液に直接添加するため、薬物の肝代謝産物の発生毒性を評価することはできなかった⁹⁾。この点を改良するため、今回我々は従来の EST 法を改良し、セルカルチャーインサートを用いて ES 細胞とヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 細胞あるいはヒト繊維芽細胞株 WI-38 細胞を非接触共培養する試験法 (Hep-EST 法) を構築し、肝臓による薬物代謝産物を考慮した発生毒性試験法の確立を目的に検討した。

方法

1) 細胞毒性試験

薬物代謝を担うヒト肝細胞として HepG2 細胞、対照としてヒト繊維芽細胞 WI-38 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレート (Millipore) のフィルタートレイへ 9×10^3 個/ウェル播種し、10% 非動化ウシ胎児血清、50 U/ml penicillin、50 μ g/ml streptomycin を含有する Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) にて、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。翌日、マウス ES 細胞をミリセル 96 セルカルチャーインサートプレートのレシーバートレイへ 1.25×10^3 個/ウェル播種

表1 本研究で用いた遺伝子特異的プライマー配列

Gene symbol (別名)	Official Full Name (NCBI Reference Sequence)	
	Forward (5' →3')	Reverse (5' →3')
Pou5f1 (Oct3/4)	POU domain, class 5, transcription factor 1 (NM_013633.3)	
	GGTGGAGGAAGCCGACAAC.	TTCGGGCACTTCAGAAACATG
Sox2	SRY-box containing gene 2 (NM_011443.3)	
	AGATGCACAACCTCGGAGATCAG	CCGCGGCCGGTATTTATAAT
Gata6	GATA binding protein 6 (NM_010258.3)	
	CGGTTCATTACCTGTGCAATG	GCATTTCTACGCCATAAGGTA
Alb	albumin (NM_009654.3)	
	GGAAGTGTCCAAGTACATGTGTGA	CAGCAATGGCAGGCAGATC
Bmp4	bone morphogenetic protein 4 (NM_007554.2)	
	CTGCCGTCGCCATTCACTAT	TGGCATGGTTGGTTGAGTTG
Nppa (ANF)	natriuretic peptide type A (NM_008725.2)	
	CGGTGTCCAACACAGATCTG	TCTCTCAGAGGTGGGTTGAC
Syp (Syn)	synaptophysin (NM_009305.2)	
	GTGGAGTGTGCCAACAAGAC	ATTCAGCCGAGGAGGAGTAG
Olig2	oligodendrocyte transcription factor 2 (NM_016967.2)	
	TGCGCCTGAAGATCAACAG	CATCTCCTCCAGCGAGTTG
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NM_008084.2)	
	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTC

し、HepG2細胞あるいはWI-38細胞とともに、10% 非動化ウシ胎児血清、0.1 mM 2-mercaptoethanol、1% Non-Essential Amino Acid、 10^3 U/ml Leukemia Inhibitory Factor、50 U/ml penicillin、50µg/ml streptomycinを含有するDMEM (EST試験培地)にて、37°C、5% CO₂の条件下で培養した。培地にはVPAを添加し、3日目、5日目にそれぞれ同濃度の薬物添加培地で培地交換を行い、7日目にCellTiter-Glo assay (Promega)にてES細胞の細胞数を定量し、薬剤非添加条件の値を100%としたときの細胞生存率を求めた。同様に成熟細胞のモデルとしてNIH-3T3細胞とHepG2細胞あるいはWI-38細胞との共培養をVPAを添加した10% 非動化ウシ胎児血清、50 U/ml penicillin、50µg/ml streptomycinを含有するDMEMにて行い、7日目のNIH-3T3細胞の細胞生存率を求めた。

2) 発生毒性試験

HepG2細胞ならびにWI-38細胞をミリセル96セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイへ 9×10^3 個/ウェル播種し、10% 非動化ウシ胎児血清、50 U/ml penicillin、50µg/ml streptomycinを含有するDMEMにて、37°C、5% CO₂の条件下で培養した。翌日、マウスES細胞をEZ-BindShut II (IWAKI)へ750個/ウェル播種し、HepG2細胞ならびにWI-38細胞を播種したミリセル96セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイと組み合わせて、EST試験培地にて、37°C、5% CO₂の条件下で培養した。培地に

VPAを添加し、3日目に同濃度の薬物添加培地で培地交換を行った。ES細胞培養開始4日後にHepG2細胞ならびにWI-38細胞をミリセル24セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイへ 4.8×10^4 個/ウェル播種しておき、5日目にEZ-BindShut IIでの培養により形成されたES細胞の胚様体をミリセル24セルカルチャーインサートプレートのレシーバートレイへ1ウェルあたり1個移し、HepG2細胞ならびにWI-38細胞を播種しておいたミリセル24セルカルチャーインサートプレートのフィルタートレイとともに、EST試験培地にて、37°C、5% CO₂の条件下で10日目まで培養した後ES細胞を回収した。

3) Real Time-PCR解析

回収したES細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成した。増幅にはExTaqポリメラーゼ (タカラバイオ)を使用した。表1にあげるプライマーを用いて、SYBR Premix Ex Taq I (タカラバイオ)によりReal Time-PCRを行い、Thermal Cycler Dice Real Time PCR System (タカラバイオ)を用いて発現量を定量した。各遺伝子発現量はglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)発現量にて補正し、VPA非添加時の発現量を1として、相対量として示した。

4) 統計

値は全て、平均値±標準誤差 (SEM)で示した。統計学

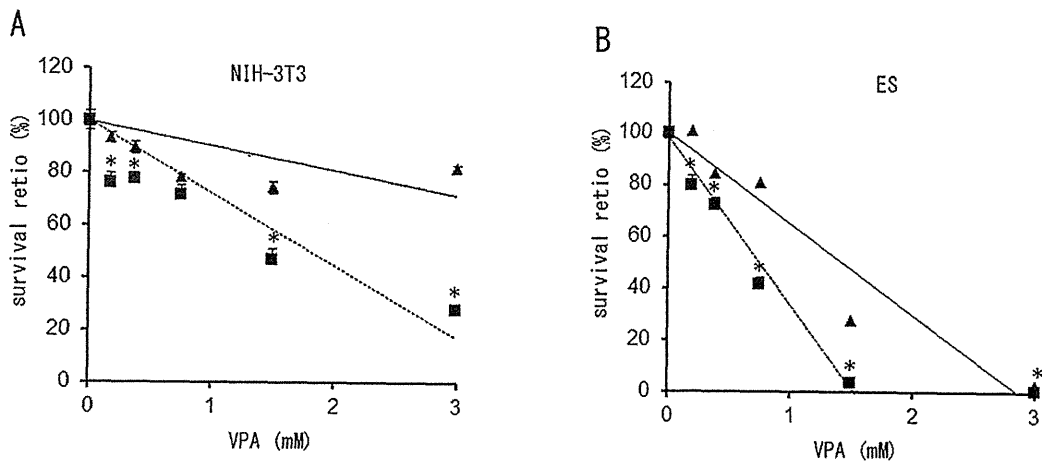


図1 Hep-EST法によるAVPの細胞毒性評価

(A) NIH-3T3細胞に対するAVPの細胞毒性。HepG2との共培養によって、NIH-3T3に対するVPAの細胞毒性は増強された。
 (B) ES細胞に対するAVPの細胞毒性。HepG2との共培養によって、ES細胞に対するVPAの細胞毒性は増強された。
 ■ ; HepG2細胞との共培養, ▲ ; WI-38細胞との共培養。* $p < 0.05$ vs. WI-38。

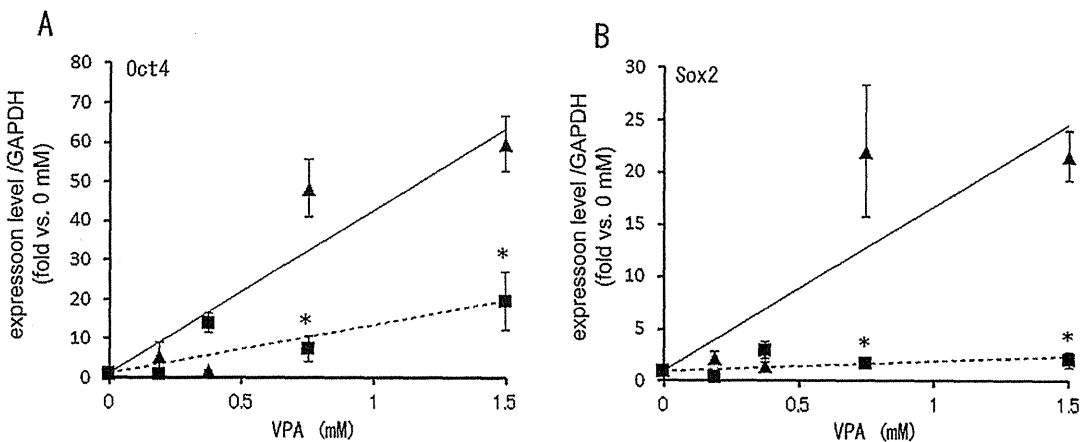


図2 Hep-EST法による未分化マーカー遺伝子発現評価

(A) Hep-EST法によるOct4発現評価。WI-38細胞との共培養時にはVPA濃度依存的にOct4発現が上昇した。一方、HepG2細胞との共培養時にはVPAのOct4発現誘導効果が抑制された。(B) Hep-EST法によるSox2発現評価。WI-38細胞との共培養時にはVPA濃度依存的にSox2発現が上昇した。一方、HepG2細胞との共培養時にはVPAのSox2発現誘導効果が抑制された。■ ; HepG2細胞との共培養, ▲ ; WI-38細胞との共培養。* $p < 0.05$ vs. WI-38。

的検定として、2群間の比較にStudent's t-testを用いた。いずれの場合も、 p 値が0.05未満の場合を有意とした。

結果

1. Hep-EST法によるVPAの細胞毒性試験

VPAの肝代謝産物による細胞毒性を検討するため、HepG2細胞あるいはWI-38細胞との共培養によるVPA添加時のES細胞およびNIH-3T3細胞の細胞生存率を求めた。NIH-3T3細胞において、HepG2細胞との共培養ではWI-38細胞との共培養に比べVPAの細胞毒性が増悪した(図1A)。ES細胞においても、VPA添加により、HepG2細胞との共培養ではWI-38細胞との共培養に比べ細胞毒性が増悪した(図1B)。

2. Hep-EST法によるVPAのES細胞分化試験

VPAの肝代謝産物によるES細胞分化に対する影響を評価するため、VPA添加によるES細胞での種々の組織特異的分化マーカー発現をReal-time PCRにて定量した。

WI-38細胞との共培養時には、未分化マーカーであるOct3/4およびSox2発現は、VPA濃度依存的に発現が上昇した。一方、HepG2細胞との共培養時にはWI-38細胞との共培養時に比べVPAの未分化マーカー発現上昇が抑制された(図2)。

外胚葉マーカーであるSynaptophysin (Syn; 後期神経特異的マーカー) およびOlig2 (オリゴデンドロサイトマーカー) 発現は、WI-38細胞との共培養とHepG2細胞との共培養との

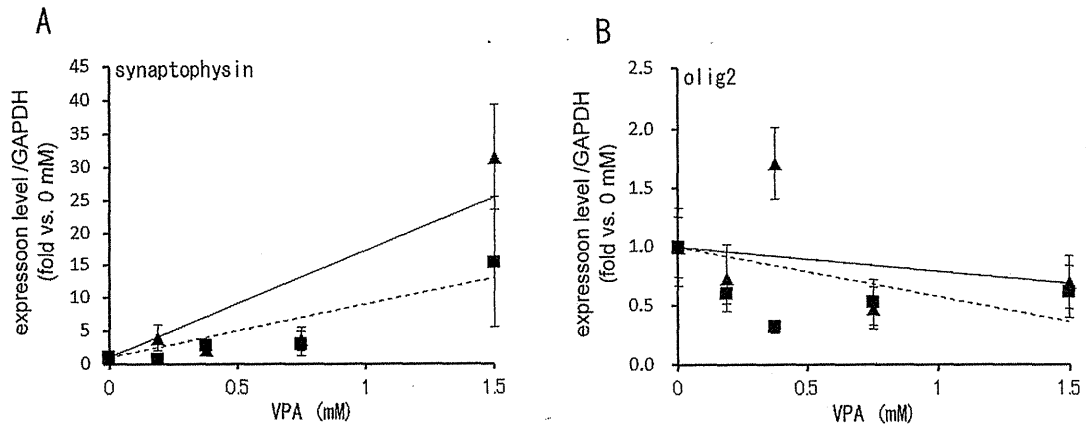


図3 Hep-EST法による外胚葉マーカー遺伝子発現評価

(A) Hep-EST法によるSyn発現評価。WI-38細胞との共培養とHepG2細胞との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。(B) Hep-EST法によるOlig2発現評価。WI-38細胞との共培養とHepG2細胞との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。■；HepG2細胞との共培養，▲；WI-38細胞との共培養。

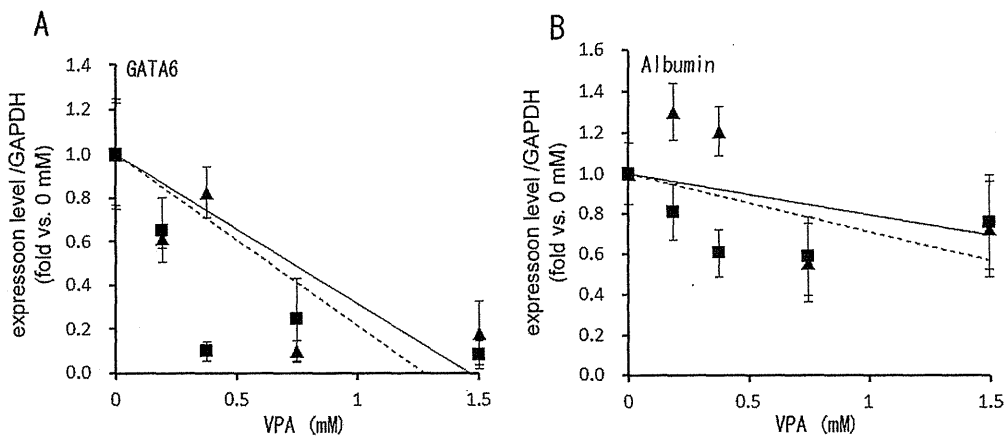


図4 Hep-EST法による内胚葉マーカー遺伝子発現評価

(A) Hep-EST法によるGATA6発現評価。WI-38細胞との共培養とHepG2細胞との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。(B) Hep-EST法によるalbumin発現評価。WI-38細胞との共培養とHepG2細胞との共培養との間で有意な発現差は認められなかった。■；HepG2細胞との共培養，▲；WI-38細胞との共培養。

間で有意な発現差は認められなかった(図3)。同様に、内胚葉マーカーであるGATA6およびAlbumin(Alb)発現は、WI-38細胞との共培養とHepG2細胞との共培養との間で有意な発現差は認められなかった(図4)。

一方、中胚葉マーカーであるBMP-4およびANF発現は、VPA添加時にWI-38細胞との共培養に比べHepG2細胞との共培養により有意な発現の上昇が見られた(図5)。

考察

本研究において、我々は薬物の肝代謝産物の影響を考慮した*in vitro*における発生毒性試験法開発の試みとして、VPAをモデル薬物として用いHep-EST法の構築を行った。Hep-

EST法による検討から、肝細胞であるHepG2細胞との共培養系では繊維芽細胞であるWI-38細胞との共培養系に比べVPAのES細胞に対する細胞毒性が増悪することが示された。

VPAは肝毒性を示すことが知られている。VPAの肝代謝産物は複数想定されているが、この中で ω -酸化経路の不飽和代謝産物である2-n-propyl-4-pentenoic acid(4-ene-VPA)由来の活性中間代謝産物がミトコンドリア内のグルタチオンプールを枯渇させ、あるいはcoenzyme A(CoA)と結合して β 酸化酵素を阻害する¹⁰⁾ことにより、肝毒性を示すと考えられている。4-ene-VPA産生にはCYP2C9が関与すると考えられており¹¹⁾、HepG2細胞におけるAVP代謝動態の報告はないものの、HepG2細胞においてもCYP2C9の発現が報

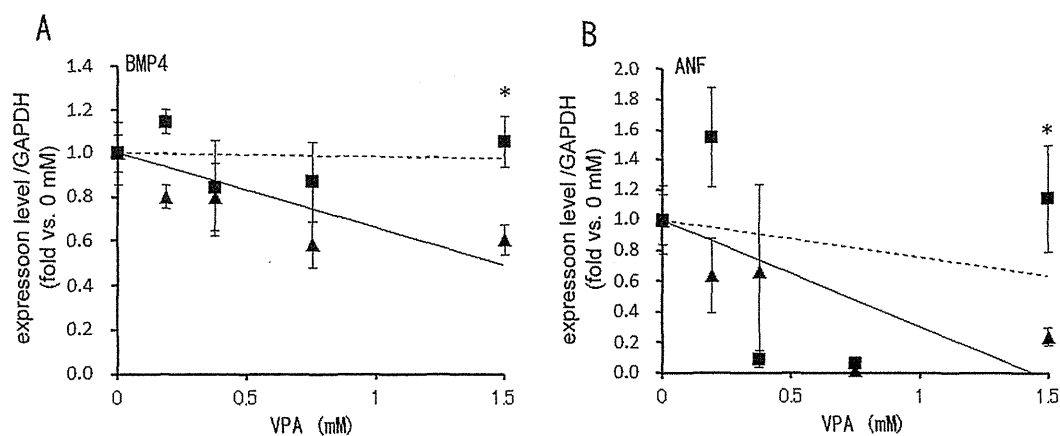


図5 Hep-EST法による中胚葉マーカー遺伝子発現評価

(A) Hep-EST法によるBMP4発現評価。WI-38細胞との共培養時にはVPA濃度依存的にBMP4発現が低下した。一方、HepG2細胞との共培養時にはBMP4発現低下は抑制された。(B) Hep-EST法によるANF発現評価。WI-38細胞との共培養時にはVPA濃度依存的にANF発現が低下した。一方、HepG2細胞との共培養時にはANF発現低下は抑制された。■; HepG2細胞との共培養, ▲; WI-38細胞との共培養。* $p < 0.05$ vs. WI-38。

告されていることから¹²⁾、本研究においてHepG2細胞との共培養でES細胞およびNIH-3T3細胞に対するVPAの細胞毒性が増悪した理由として、HepG2細胞によりVPAが代謝され、これにより生じた4-ene-VPAをはじめとするVPAの活性中間代謝産物により細胞毒性が増悪した可能性が考えられる。

これまでの我々の検討からVPAはES細胞の未分化マーカー発現を亢進させることが明らかになっている⁵⁾。本研究においても、WI-38細胞との共培養ではVPA添加によりOct3/4やSox2といった未分化マーカー発現の亢進が観察された。一方、HepG2細胞との共培養では、ES細胞の未分化マーカー発現は有意に抑制された。この結果は、肝代謝を受けたことにより、VPAのES細胞に対する未分化性の増強作用が減弱したことを示唆している。同時に、外胚葉マーカー発現および内胚葉マーカー発現はWI-38細胞およびHepG2細胞との共培養間で有意な変化はなかったが、HepG2細胞との共培養により中胚葉マーカー発現は亢進した。これらの結果から、VPAの肝代謝産物はVPAとくらべES細胞の中胚葉分化を維持させる作用を持つことが示唆される。

上述のように、WI-38細胞との共培養系とHepG2細胞との共培養系において、VPAのES細胞へ与える影響が変化した。これらの結果は、VPAの肝代謝産物のES細胞に与える影響がVPAとは異なることを示唆するものと考えられる。したがって、今回我々が確立したHep-EST法は、薬物の肝代謝を考慮した発生毒性を検討するための有用な試験系となると考えられる。

引用文献

- 1) Nakatsuji N. Embryonic stem cell lines for regenerative therapy and pharmaceutical research. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2002;120:295-302.
- 2) Genschow E, Spielmann H, Scholz G, et al. The embry-

onic stem cell test, in vitro embryo toxicity test using two permanent mouse cell line: 3T3 fibroblast and embryonic stem cells. *In vitro toxicology* 1997;10:119-127.

- 3) Genschow E, Spielmann H, Scholz G, et al. Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim* 2004;32:209-244.
- 4) Genschow E, Spielmann H, Scholz G, et al. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern Lab Anim* 2002;30:151-176.
- 5) Murabe M, Yamauchi J, Fujiwara Y, Hiroshima M, Sanbe A, Tanoue A. A novel embryotoxic estimation method of VPA using ES cells differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:164-169.
- 6) Murabe M, Yamauchi J, Fujiwara Y, et al. Estimation of the embryotoxic effect of CBZ using an ES cell differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;356:739-744.
- 7) Kusakawa S, Nakamura K, Miyamoto Y, et al. Fluoxetine promotes gliogenesis during neural differentiation in mouse ES cells. *J Neurosci Res* 2010;88:3479-3487.
- 8) Kusakawa S, Yamauchi J, Miyamoto Y, Sanbe A, Tanoue A. Estimation of embryotoxic effect of fluoxetine using embryonic stem cell differentiation system. *Life Sci* 2008;83:871-877.
- 9) Nakamura K, Kusakawa S, Tanoue A. Assessment of Embryotoxicity and Teratogenicity by the Embryonic Stem Cell Test. In: Craig, A, ed. *Methodological Advances in*

- the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications. InTech, Croatia, 2011.
- 10) Rettenmeier AW, Prickett KS, Gordon WP, et al. Studies on the biotransformation in the perfused rat liver of 2-n-propyl-4-pentenoic acid, a metabolite of the antiepileptic drug valproic acid. Evidence for the formation of chemically reactive intermediates. *Drug Metab Dispos* 1985;13:81-96.
 - 11) Sadeque AJ, Fisher MB, Korzekwa KR, et al. Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283:698-703.
 - 12) Westerink WM, Schoonen WG. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2007;21:1581-1591.

