



図4 ARBの添付文書に記載されている一日当たりの通常用量と最大用量 (単位は全て mg/day)

 最大用量  
 通常用量

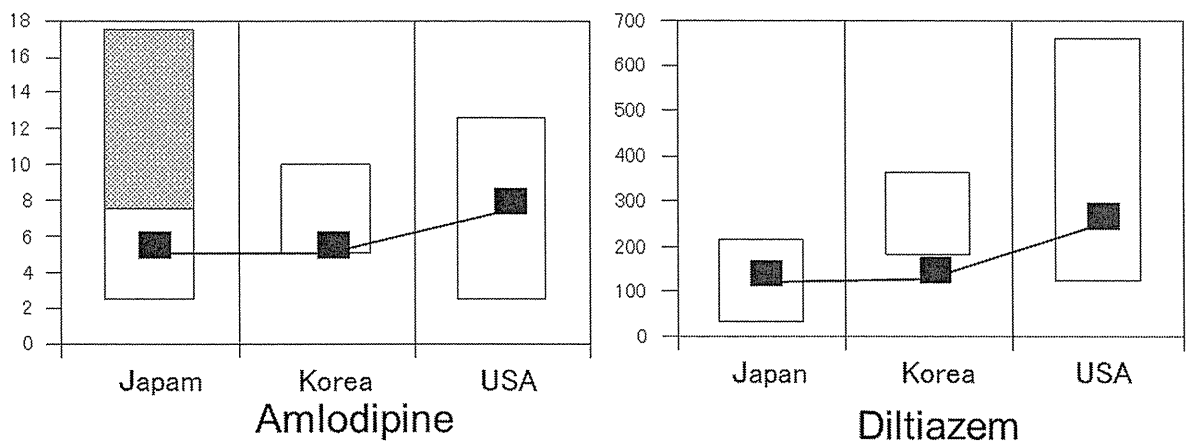




図5 カルシウム拮抗薬の添付文書に記載されている一日当たりの通常用量と最大用量 (単位は全て mg/day)

 最大用量  
 通常用量

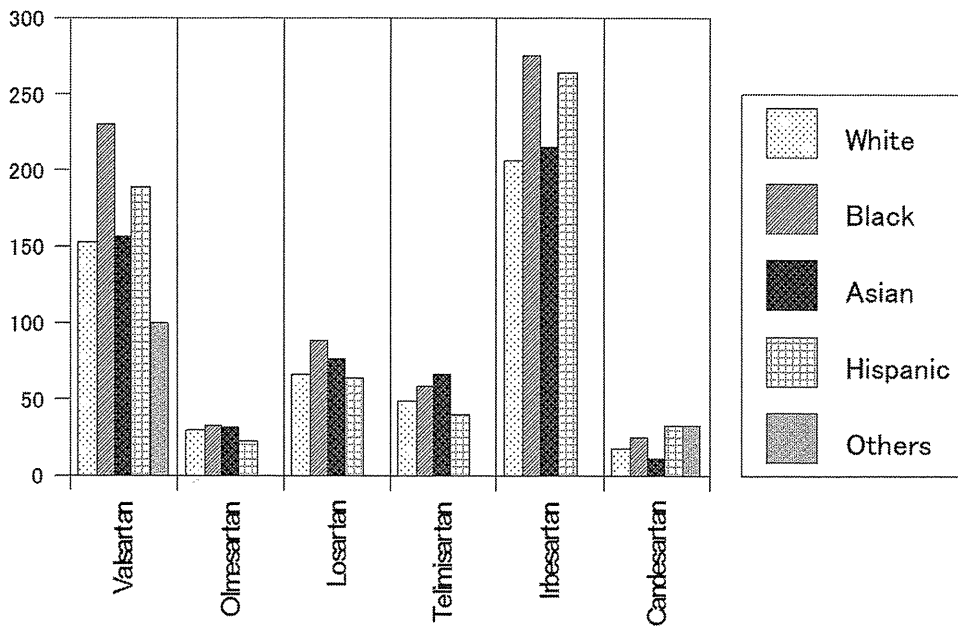


図 6 米国内での各人種での ARB の一日平均処方量 (単位は全て mg/day)

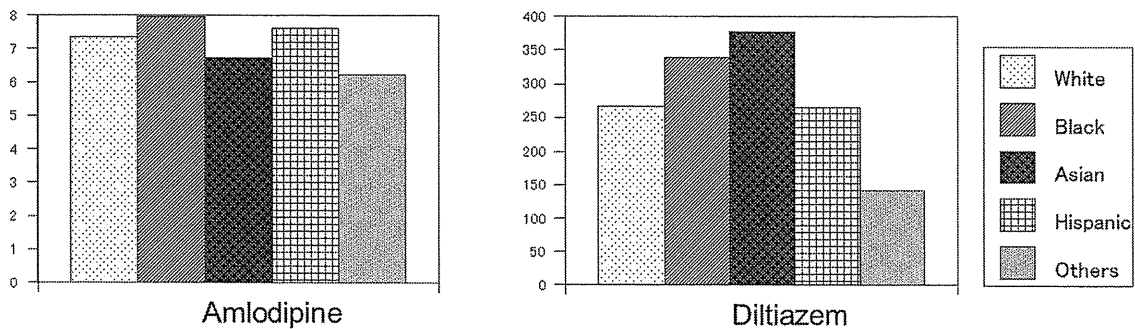


図 7 米国内での各人種でのカルシウム拮抗薬の一日平均処方量 (単位は全て mg/day)

表 3 抗糖尿病薬の適応疾患

### ICD-10 国際疾病分類第10版

- E11 インスリン非依存性糖尿病<NIDDM>
- E12 栄養障害に関連する糖尿病
- E13 その他明示された糖尿病
- E14 詳細不明の糖尿病

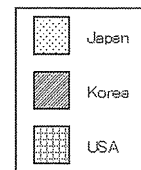
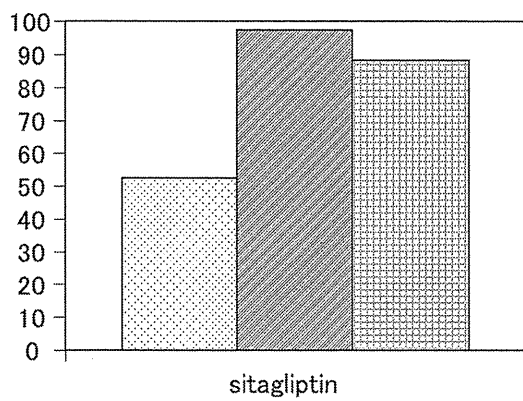
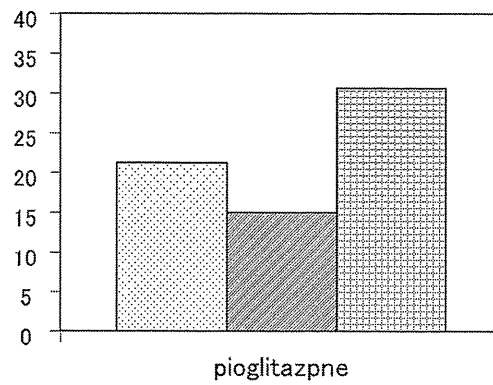
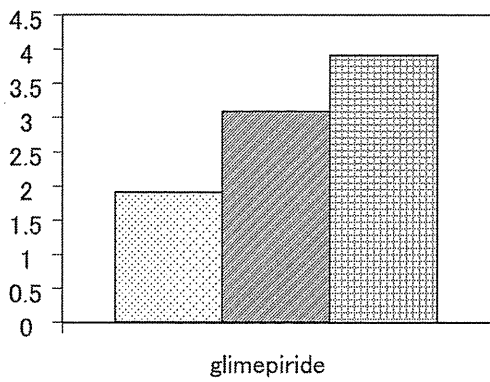


図 8 日米韓での抗糖尿病薬の一日平均処方量 (単位は全て mg/day)

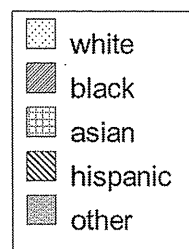
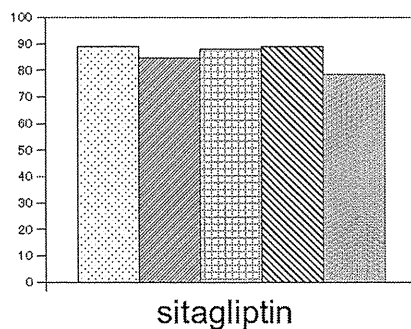
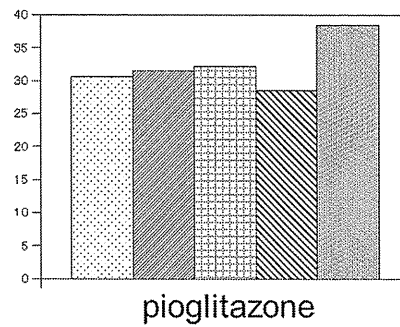
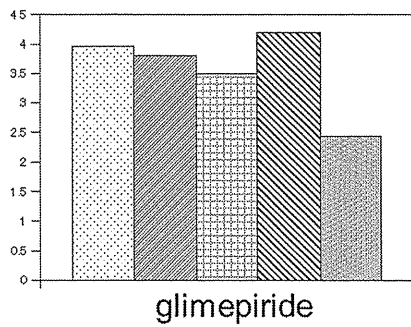


図 9 米国内での各人種での抗糖尿病薬の一日平均処方量 (単位は全て mg/day)

表 4 日米韓でのグリメピリドの承認用量（単位は全て mg/day）

<b>Glimepiride</b>			
	<b>Japan</b>	<b>Korea</b>	<b>USA</b>
Maximum	6	(concomitant use with insulin; 8mg)	8
Maintenance	1~4		
starting	0.5~1	1	1
strengths	0.5,1,3	1,2,3,4	1,2,4

表 5 日米韓でのピオグリタゾンの承認用量（単位は全て mg/day）

<b>Pioglitazone</b>				
	<b>Japan</b>		<b>Korea</b>	<b>USA</b>
Maximum	Single agent or with other agent	With insulin		
	45	30	30	45
Maintenance	15~30	15		
starting			15	15
strengths	15,30		15,30	15,30,45

表 6 日米韓でのシタグリプチンの承認用量（単位は全て mg/day）

<b>Sitagliptin</b>			
	<b>Japan</b>	<b>Korea</b>	<b>USA</b>
Maximum	100	100	100
Maintenance	50	100	100
starting			
strengths	25,50,100	25,50,100	25,50,100

多地域臨床試験データの一貫性評価に関する研究

研究分担者 竹内 正弘 北里大学薬学部 教授  
研究協力者 高橋 史朗 北里大学薬学部 講師  
研究協力者 吉田 顕臣 北里大学薬学部 研究員  
研究協力者 張 鳴雨 北里大学薬学部薬学研究科

研究要旨：

多地域臨床試験における薬物動態、治療効果の一貫性を評価するために、頻度論および経験ベイズ法による評価指標を提案した。モンテカルロシミュレーションを用いて、これらの指標と従来法との比較検討を行った。頻度論に基づいた指標は量的かつ包括的な方法で、従来の質的な方法とほぼ同程度の性能があると示唆された。経験ベイズ法に基づいた指標は、ある条件のもとでは従来法よりも高い性能を持つことが示唆された。

A. 研究目的：

1998 年に日米欧医薬品国際医薬品規制調和会議 (ICH) の E5 ガイドラインが通知され、ブリッジ試験の実施要件などがまとめられた。これにより海外の既承認薬を日本でより早期に承認できるようになった。さらに、医薬品の世界同時開発を目的とした国際共同試験も近年増加傾向にある。しかし、メトプロロールの国際共同試験などで治療効果が地域ごとに異なるといった事例が報告されている。こういった地域間の違いは内因性要因(遺伝的要因など)および外因性要因(医療設備など)によるものであると ICH の E5 ガイドラインで規定されている。国際共同試験は同一のプロトコールで臨床試験を実施するため、こういった要因を可能な限り小さくすることができるが、あくまでグレープフルーツジュースによる薬物代謝酵素阻害などの既知の要因のみを取り除くものである。そのため、未知の要因が存在する場合には、薬物動態や治療効果の一貫性を示すことが困難になる。そこで、本研究ではこういった未知の要因による変動をある程度許容して一貫性評価を行う方法を 2 つ提案した。1 つは地域間差の最大値の分布がある同等領域に入る確率を計算し、この値が一定以上になったときに一貫性があると判断する指標である(1 年目)。もう 1 つは経験ベイズ法の仮定の妥当性を評価する指標を利用した方法である(2~3 年目)。これら 2 つの提案法の性能評価のためにそれぞれ比較対照の手法を設定して、モンテカルロシミュレーションを実施した。

B. 研究方法：

提案した 2 つの方法の概要と実施したシミュレ

ーションについて説明する。

1) 1 年目の提案法

この方法では平均血中濃度 AUC の地域間差  $T_{ij} (i=1, \dots, K, j \neq i)$  の最大値の分布に注目する。地域間差の最大値の分布において、事前に定めた同等領域  $(-L, L)$  が含まれる確率

$$\Pr(\max |T_{ij}| \leq L) \\ = \int_0^\infty \sum_{i=1}^K \int_{-\infty}^\infty \prod_{j \neq i} \{ \Phi_j(y_i + \sqrt{2}Lx) - \Phi_j(y_i - \sqrt{2}Lx) \} d\Phi_i(y_i) F_\nu(x) dx$$

を算出する。ただし、 $y_k$  は地域  $k$  の治療効果、

$x = \sqrt{\chi_\nu^2 / \nu}$ 、 $\chi_\nu^2$  は自由度  $\nu$  の  $\chi^2$  分布に従う確率変数、 $F_\nu(x)$  は  $x$  の確率密度関数を表す。この確率のカットオフ値と同等領域をモンテカルロシミュレーションによって探索し、既存の手法である Cochran の Q 統計量との比較を行った。

2) 2~3 年目の提案法

この方法では他の地域の情報を利用して推測を行う手法である経験ベイズ法の仮定の妥当性の評価指標(Efron JASA 1996;91:538-550)を一貫性評価に利用する。提案法は全地域を併合した際に治療効果があり、かつ仮定が妥当である場合に一貫性があると判断する指標である。具体的には、興味のある地域  $i$  の真の治療効果  $\theta_i (i=1, \dots, K)$  とそれ以外の地域の真の治療効果が 1 つの事前分布  $g_A(\theta_i)$  に事前確率  $h_A$  で従うと仮定する。

$g_A(\theta_i)$  と  $\theta_i$  の点推定値  $\hat{\theta}_i$  の尤度関数  $f(\hat{\theta}_i)$  から

事後分布  $f_A(\theta_i | \hat{\theta}_i)$  を計算する。また、 $\theta_i$  が  $g_A(\theta_i)$  とは別の無情報事前分布  $g_B(\theta_i)$  に事前確率  $h_B (= 1 - h_A)$  で従うとする。こちらでも同様に事後分布  $f_B(\theta_i | \hat{\theta}_i)$  を計算する。事前確率  $h_A, h_B$  と事後分布  $f_A(\theta_i | \hat{\theta}_i), f_B(\theta_i | \hat{\theta}_i)$  からベイズファクター

$$BF_{AB} = \frac{h_A \int f_A(\theta_i | \hat{\theta}_i) d\theta_i}{h_B \int f_B(\theta_i | \hat{\theta}_i) d\theta_i}$$

を計算する。この値を各地域で計算し、その最小値が 3 以上もしくは 10 以上になった場合に経験ベイズ法の仮定が妥当であると判断する (Kass&Raffery(JASA,1995;90:773-795) および Jeffreys(Theory of Probability. Oxford, 1961))。そのうえで全地域を併合した際に有意な治療効果が検出された場合に一貫性があると判断する。この新たな一貫性評価指標を既存の手法との比較で性能を評価するためモンテカルロシミュレーションを行った。比較対照の手法は厚生労働省が例示した 2 つの方法(「国際共同試験の実施に関する基本的考え方について」,PMDA,2007) (厚労省法 1,2), Cochran の Q 統計量,質的交互作用を検出するための制約付きの尤度比検定 (Gail & Simon, Biometrics 1985; 41: 361-372) (GS)、経験ベイズ法による 2 つの事後分布の混合分布によって一貫性を評価する方法 (Huang et al; Pharm. Stat 2013;12:59-64) (Huang1,2,3) とした。Huang らの方法は提案法で計算した事後分布と事前確率を用いるがパラメータ推定の方法と事前分布  $g_B(\theta_i)$  が異なる。正確な比較のため、 $g_B(\theta_i)$  を提案法と同じにした Huang2 および  $g_B(\theta_i)$  とパラメータ推定の方法の両方を提案法と同じにした Huang3 も比較対象とした。Huang1 はオリジナルとする。

### C. 研究結果：

1 年目の研究では地域数 4 で 1 地域が異質な状況を想定し、Cochran の Q 統計量の p 値が 0.1 以下、0.1~0.25、0.25~0.5、0.5 以上となる割合がそれぞれ 80%以上になるように薬物動態データを発生させた。ここで発生させたデータはそれぞれ高度異質、中度異質、低度異質、同等なデータとなる。同等領域を  $(\log(0.8), \log(1.25))$  から  $(\log(0.5), \log(2.0))$  まで変化させ、高度異質、中度異質、低度異質、同等とそれぞれ判断する同等確率のカットオフ値を求めた(表 1)。同等領域が広すぎると、いずれのカットオフ値も 1 に近い値

で異質程度の判断が困難である。同等確率が小さい場合には高度異質、大きい時には同等と判断する適切なカットオフ値は同等領域が  $(\log(0.75), \log(1.33))$  である時のカットオフ値 0.25,0.60,0.75 であると考えられる。

求めた同等領域とカットオフ値の性能を評価するため、モンテカルロシミュレーションによって Cochran の Q 統計量と比較を実施した。その結果を図 1 に示す。横軸は 4 地域中 1 地域の平均エフェクトサイズを表し、縦軸には高度異質、中度異質、低度異質、同等とそれぞれ判断する割合を示した。また、Cochran の Q 統計量で高度異質と判断される割合を折れ線グラフで示した。1 地域のエフェクトサイズが 0 の時、提案法で高度異質となる割合は 1%、Cochran の Q 統計量では 13.2%となり、第一種の過誤の確率が提案法では十分に制御されていた。1 地域のエフェクトサイズの増加に伴い、提案法、CochranQ 統計量ともに高度異質と判断する割合が増加するが、エフェクトサイズ 4.0 までは Cochran の Q 統計量のほうがその割合が高く、4.5 でほぼ同じ割合になった。

2~3 年目の研究では全地域で真の治療効果がある場合、ない場合、異なる地域が含まれる場合、症例数割合を変化させた場合、地域数 3~10 など様々なシミュレーション条件で提案法の性能評価を行った。2 年目の研究結果については、シミュレーションプログラムに重大なバグがあり検出力 90%であるにもかかわらず t 検定で有意となった割合が 90%に達していなかった。そのため研究結果についてはおもに 3 年目の結果を報告し、2 年目で報告した内容についてはバグを取り除いたプログラムでのシミュレーション結果を報告する。評価指標は一貫性証明同時確率を用いた。

まず真の治療効果が等しいパターンでの結果を報告する(表 2)。真の治療効果が 0 の場合には全手法いずれの条件でも有意水準 5%を保っていた。次に真の治療効果が 0.2 の場合について記述する。提案法(基準値 3 および 10)、Huang3 は地域数、症例数割合の影響を受けず 90%に近い一貫性証明同時確率となった。GS も同様の挙動を示したが、10 地域で症例数の少ない地域が多く含まれる場合には 40%程度に低下した。厚労省法 2 は地域数が 1 地域増えるごとに 10%程度一貫性証明同時確率が低下し、症例数の少ない地域を多く含む場合にも 10%程度一貫性証明同時確率が低下した。厚労省法 1 はこれと同様の挙動で厚労省法 2 よりも全体的に 10%程度低い一貫性証明同時確率となった。Cochran の Q 統計量は例数一定の場合には地域数によらず 80%程度の一貫性証明同時確率であったが、症例数の少ない地域を

多く含む場合には、地域数の増加に伴い大きく一貫性証明同時確率が低下した。Huang2 は例数一定の場合には地域数によらず一貫性証明同時確率は80%程度であったが、症例数の少ない地域を多く含む地域数が3以外の場合には60%程度に低下した。Huang1 は例数一定の場合には地域数が3の時は一貫性証明同時確率が50%程度で、それ以外では60~70%程度であった。症例数の少ない地域を多く含む場合には、地域数が増えるごとに一貫性証明同時確率が低下し、その値は30~40%程度となった。

次に真の治療効果が1地域だけ0.2となった場合について記述する(表3)。提案法(基準値3)とHuang3 は例数一定の場合には地域数の増加に伴い一貫性証明同時確率が増加し、10地域で50~60%程度となった。症例数が少ない地域が多く含まれる場合には地域数10以外では一貫性証明同時確率が60%程度で、10地域では80%程度となった。基準値10の提案法では一貫性証明同時確率が全体的に5~10%程度低くなった。厚労省法1,2は全ての条件で20%以下の一貫性証明同時確率となり、症例数が少ない地域が多く含まれる場合の方が高くなる傾向がみられた。Huang1 は地域数、症例数割合の影響をほとんど受けず、一貫性証明同時確率は全ての条件で10%以下となった。Huang2 は症例数が一定の場合には地域数の増加に伴い一貫性証明同時確率が増加し、10地域で30%程度になった。症例数の少ない地域を多く含む場合、3から5地域までは徐々に低下し(15~20%)、10地域で40%程度に増加した。GSは症例数が一定の場合には地域数の増加に伴い一貫性証明同時確率が増加し、10地域で75%程度になった。症例数の少ない地域を多く含む場合には10地域以外は40%程度であったが、10地域では25%程度まで低下した。

#### D. 考察 :

3年間で2つの一貫性評価指標を提案し、さまざまな条件のもとでシミュレーションを実施し、その性能評価を行った。1年目の提案法はCochranのQ統計量と比較した結果、第1種の過誤の確率が十分に制御されているが、異質な場合に正しく判断する確率はCochranのQ統計量のほうが高くなった。同等であるつまり一貫性があることを判断する指標としては提案法はCochranのQ統計量よりも優れていると考えられる。

2~3年目の提案法は、経験ベイズ法に基づいたHuangらが提案法の変法Huang3とほぼ同じ挙動を示し、一貫性がある状況での性能は比較対照のいずれの手法よりも優れていると考えられた。しかしながら、1地域のみマイナスの治療効果とな

る一貫性のない状況では、一貫性証明同時確率が高くなってしまった。そのため、一貫性のない状況でも一貫性があると判断してしまいやすいため、被験薬の効果がある程度期待できる第3相の検証試験でこれらの方法を用いることが適切であり、第3相以前の探索試験では用いるべきではないと考えられる。

本研究で提案した2つの方法を比較した研究は行ってないが、1年目の提案法は一貫性がない状況でも正しく一貫性がないと判断しているため、探索試験、検証試験のいずれでも利用できるかもしれない。今後はこれらの手法を比較するための研究が必要であると考えられる。

#### E. 健康危険情報 :

該当項目なし

#### F. 研究発表 :

1. 張鳴雨,高橋史朗,竹内正弘,東アジア国際共同試験における各国薬物動態同等性評価基準の研究,Statistical Experiment and Its Related Topics研究会,2012年3月6日,京都
2. M. Takeuchi, H. Uno, A. Yoshida, M. Takeuchi, F. Takahashi, Statistical Analysis for Multi-National Clinical Trials in Inter-Variations among Regions, FDA/Industry Workshop, 2012年9月, USA
3. 吉田顕臣, 高橋史朗, 竹内正弘, 地域一貫性指標に関する考察, RIMS 共同研究 Asymptotic Expansions for Various Models and Their Related Topics 研究会, 2013年3月4日, 京都
4. 竹内正弘, 統計学的手法と民族差, 第34回日本臨床薬理学会学術総会 シンポジウム, 2013年12月5日, 東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 :

該当項目なし

#### H. 添付資料

該当項目なし

表 1.異質程度に対する同等領域ごとのカットオフ値

	高度異質	中度異質	低度異質	同等
p-value-Q	0.10 以下	0.10～0.25	0.25～0.50	0.50 以上
Cochran Q 統計量	6.251 以上	4.108～6.251	2.359～4.108	2.359 以下
log(0.80)-log(1.25)	0.05 以下	0.05～0.20	0.20～0.45	0.45 以上
log(0.75)-log(1.33)	0.25 以下	0.25～0.60	0.25～0.75	0.75 以上
log(0.70)-log(1.43)	0.65 以下	0.65～0.85	0.85～0.95	0.95 以上
log(0.65)-log(1.54)	0.88 以下	0.88～0.97	0.97～0.99	0.99 以上
log(0.60)-log(1.67)	0.98 以下	0.98～0.995	0.995～0.999	0.999 以上
log(0.55)-log(1.82)	0.998 以下	0.998～0.999	0.999～0.999	0.999 以上
log(0.50)-log(2.00)	0.9998 以下	0.9998～0.99998	0.99998～0.99999	0.99999 以上



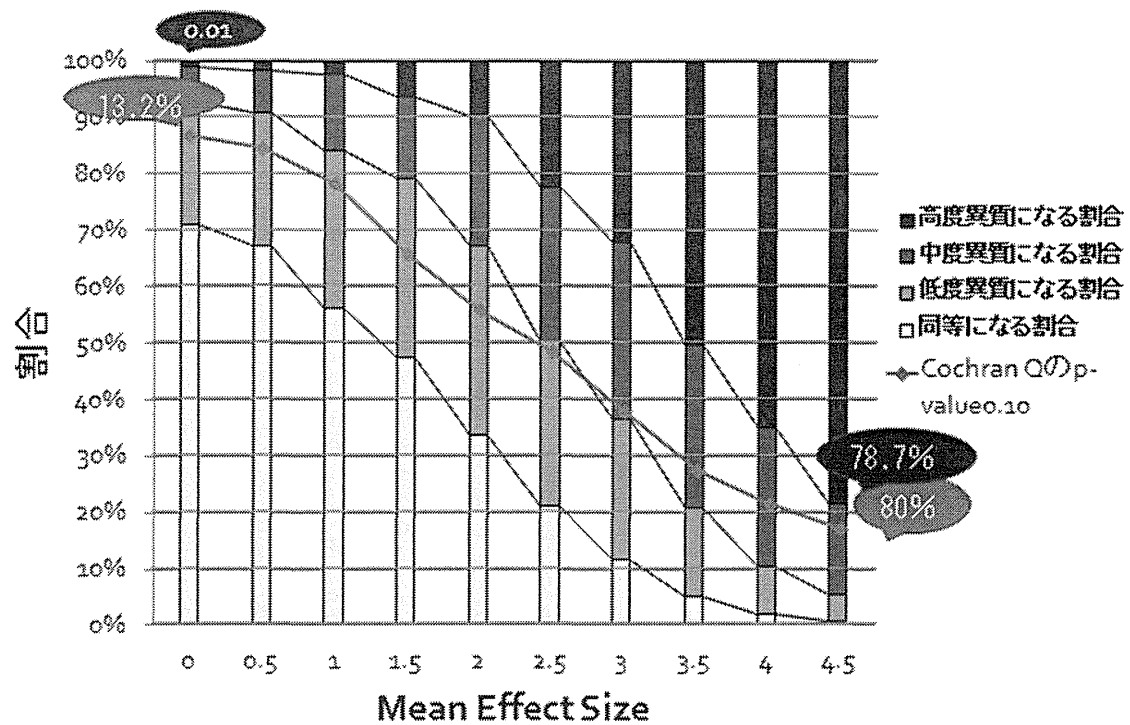


図 1 提案法による各異質程度の判断割合と Cochran の Q 統計量による高度異質と判断する割合の比較

表 2 提案法と各手法のシミュレーション条件ごとの一貫性証明同時確率(全地域の真の治療効果が等しい場合)

地域数	症例数割合	Welch 検定	真の治療 効果	提案法>3 ( $h_A=0.5$ )	提案法>10 ( $h_A=0.5$ )	厚労省 法 2	厚労省 法 1	Huang1 ( $h_A=0.5$ )	Huang 2 ( $h_A=0.5$ )	Huang 3 ( $h_A=0.5$ )	Cochran	GS
3	(.33,.33,.34)	0.054	0	0.053	0.052	0.021	0.015	0.012	0.022	0.026	0.05	0.054
	(.33,.33,.34)	0.37	0.1	0.366	0.359	0.329	0.248	0.184	0.305	0.365	0.35	0.37
	(.33,.33,.34)	0.906	0.2	0.895	0.878	0.865	0.731	0.506	0.802	0.9	0.858	0.906
	(.1,.45,.45)	0.052	0	0.051	0.05	0.019	0.014	0.011	0.028	0.024	0.039	0.051
	(.1,.45,.45)	0.372	0.1	0.366	0.358	0.291	0.23	0.159	0.314	0.363	0.261	0.36
	(.1,.45,.45)	0.904	0.2	0.888	0.868	0.776	0.652	0.423	0.778	0.892	0.643	0.886
4	(.25,.25,.25,.25)	0.053	0	0.052	0.052	0.017	0.012	0.017	0.024	0.025	0.051	0.053
	(.25,.25,.25,.25)	0.371	0.1	0.365	0.358	0.268	0.188	0.257	0.328	0.365	0.352	0.371
	(.25,.25,.25,.25)	0.899	0.2	0.887	0.867	0.777	0.626	0.676	0.828	0.892	0.85	0.899
	(.1,.3,.3,.3)	0.049	0	0.048	0.047	0.011	0.009	0.007	0.021	0.023	0.014	0.045
	(.1,.3,.3,.3)	0.378	0.1	0.366	0.357	0.224	0.174	0.13	0.25	0.371	0.116	0.359
	(.1,.3,.3,.3)	0.911	0.2	0.883	0.858	0.656	0.522	0.365	0.626	0.899	0.281	0.884
5	(.2,.2,.2,.2,.2)	0.049	0	0.048	0.046	0.011	0.006	0.018	0.024	0.024	0.045	0.049
	(.2,.2,.2,.2,.2)	0.376	0.1	0.372	0.364	0.21	0.141	0.266	0.342	0.368	0.356	0.376
	(.2,.2,.2,.2,.2)	0.908	0.2	0.896	0.876	0.679	0.534	0.71	0.855	0.897	0.858	0.908
	(.1,.1,.1,.1,.6)	0.056	0	0.049	0.048	0.009	0.006	0.008	0.025	0.025	0.011	0.045
	(.1,.1,.1,.1,.6)	0.379	0.1	0.37	0.36	0.173	0.128	0.123	0.229	0.371	0.089	0.355
	(.1,.1,.1,.1,.6)	0.91	0.2	0.89	0.867	0.549	0.428	0.36	0.575	0.899	0.215	0.878
10	0.1*10	0.049	0	0.047	0.045	0.001	0	0.016	0.024	0.023	0.045	0.049
	0.1*10	0.377	0.1	0.368	0.351	0.027	0.016	0.236	0.331	0.36	0.351	0.377
	0.1*10	0.911	0.2	0.888	0.848	0.198	0.134	0.645	0.846	0.885	0.848	0.911
	(.025*8,.4*2)	0.051	0	0.048	0.044	0	0	0.009	0.025	0.024	0	0.017
	(.025*8,.4*2)	0.376	0.1	0.358	0.33	0.014	0.011	0.104	0.22	0.355	0.001	0.132
	(.025*8,.4*2)	0.908	0.2	0.862	0.798	0.066	0.049	0.289	0.561	0.875	0.002	0.41

表 3、提案法と各手法のシミュレーション条件ごとの一貫性証明同時確率(1 地域だけ真の治療効果が-0.2 の場合)

地域数	症例数割合	真の治療効果	Welch 検定	提案法 > 3 (h <sub>A</sub> =0.5)	提案法 > 10 (h <sub>A</sub> =0.5)	厚労省 法 2	厚労省 法 1	Huang 1 (h <sub>A</sub> =0.5)	Huang 2 (h <sub>A</sub> =0.5)	Huang 3 (h <sub>A</sub> =0.5)	Cochran	GS
3	(.33,.33,.34)	(-.2,.2,.2)	0.187	0.093	0.069	0.021	0.008	0.002	0.03	0.075	0.04	0.165
	(.1,.45,.45)	(-.2,.2,.2)	0.735	0.627	0.549	0.126	0.07	0.036	0.248	0.565	0.133	0.38
4	(.25,.25,.25,.25)	(-.2,.2,...)	0.359	0.224	0.174	0.039	0.015	0.012	0.081	0.176	0.125	0.326
	(.1,.3,.3,.3)	(-.2,.2,...)	0.592	0.598	0.515	0.113	0.064	0.021	0.105	0.587	0.052	0.364
5	(.2,.2,.2,.2,.2)	(-.2,.2,...)	0.494	0.345	0.277	0.048	0.023	0.023	0.136	0.275	0.225	0.464
	(.1,.1,.1,.1,.6)	(-.2,.2,...)	0.656	0.623	0.543	0.091	0.055	0.015	0.081	0.569	0.041	0.397
10	0.1*10	(-.2,.2,...)	0.748	0.643	0.558	0.032	0.018	0.056	0.309	0.532	0.553	0.738
	(.025*8,.4*2)	(-.2,.2,...)	0.74	0.799	0.715	0.027	0.02	0.07	0.393	0.768	0.001	0.253

ヒト肝薬物代謝能の個人間差・民族間差の原因解明に向けた脂質関連転写因子による  
ヒト P450 発現調節機序の解析

研究分担者 吉成 浩一 東北大学 准教授（山添 康 東北大学 教授）

**研究要旨：**

薬物代謝酵素の発現レベルには大きな個人間差、人種間差、民族間差が認められるが、その原因は必ずしも明確になっていない。栄養・生理状態の変化は肝 P450 発現に影響を与えることが知られていることから、当研究室では、栄養素摂取量と P450 発現の関連性に関する解析を進めている。本分担研究では、ステロール応答性転写因子 LXR $\alpha$  および SREBP-2 に着目し、ヒト CYP3A4 および CYP1A2 の発現制御機構の解明を試みた。ヒト肝細胞における mRNA レベル変動解析および培養細胞を用いたレポーターアッセイ等の結果、LXR $\alpha$  の活性化は、異物応答性転写因子 PXR を介した CYP3A4 の発現を抑制し、これにはコアクチベーターの競合が関与する可能性が示された。また、この LXR $\alpha$  による遺伝子発現抑制は、他の PXR 標的遺伝子である CYP2B6 や CYP2A6 でも認められることが明らかになった。一方で、SREBP-2 の活性化は、ヒト肝細胞において CYP3A4 の発現を抑制することが示された。しかし、その抑制には、マウスとは異なり HNF-4 $\alpha$  は関与していない可能性が示された。さらに、LXR $\alpha$  は、CYP1A1 および CYP1A2 遺伝子の転写を共通の転写調節領域を介して活性化することも明らかになった。以上の結果より、摂取コレステロール量の変化は、肝 P450 分子種の発現レベルに影響を及ぼすことが強く示唆された。したがって、コレステロールや摂取量やその代謝・合成能力の差が、薬物代謝酵素発現レベルの個人差・民族間差を生じる一因となっている可能性が示された。

**A. 研究目的：**

薬物代謝は、医薬品の体内動態や薬効を決定する主要な要因である。その中心的役割を果たすのが第一相薬物代謝酵素チトクローム P450 (P450 または CYP) であり、ヒト P450 の 5 つの分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4) は臨床使用されている医薬品の 7 割以上の代謝に関与することが知られている。これらの P450 分子種の発現レベルには大きな個人差や人種・民族間差が認められる。その原因として、CYP2C9、CYP2C19 および CYP2C19 では遺伝的要因（遺伝子多型）の寄与が大きいとされている。一方、CYP1A2 や CYP3A4 では後天的要因が大きいと考えられているが、その詳細は明確になっていない。

P450 の発現レベルは薬物暴露により増加することが古くから知られており、CYP1A2 の誘導には Ah 受容体が、CYP3A4 の誘導には PXR や CAR と呼ばれる核内受容体が関与することが知られている。P450 の発現レベルはまた、疾病や栄養・生理状態の変化によっても影響を受けることが古くから知られているが、その分子機構は不明である。分担者のグループでは、栄養成分のうち、コレステロール摂取量の変化が、ステロール応答性の転写因子である SREBP-2 や LXR $\alpha$  を介してマウス肝における *Cyp3a11* 発現レベルに影響を及ぼすこと

を報告している (*Mol Pharmacol*, 79:148, 2011)。

食習慣の違いにより、食事成分の摂取量が個人間だけでなく民族間でも異なる可能性、また人種・民族により生体内コレステロール代謝能に差が認められる可能性があり、食事成分による P450 発現変動機構の解明は、これら薬物代謝酵素の発現レベルの個人間差・民族間差の原因解明に有用と思われる。そこで本分担研究では、コレステロールホメオスタシスに重要な 2 つのステロール応答性転写因子、LXR $\alpha$  および SREBP-2 に着目し、これらのヒト CYP3A4 および CYP1A2 の発現制御に対する寄与の解明を目指した。

**B. 研究方法：**

1. CYP3A4 遺伝子の発現調節

1-1. レポーターアッセイ

①LXR $\alpha$ による CYP3A4 遺伝子の発現調節：

既知の PXR 応答配列を含む、当研究室で既に作製した CYP3A4 遺伝子の luciferase レポーター遺伝子 (p3A4, *Mol Pharmacol*, 75, 677-684, 2009) を基に、各種欠失・変異プラスミドを作製した。ヒト LXR $\alpha$ 発現プラスミドは、pTarget (Promega) を利用して当研究室で作製した。PGC-1 $\alpha$ 発現プラスミド (*Mol Pharmacol*, 75, 677-684, 2009) は

当研究室で既に作製したものを用いた。SRC-1 および GRIP-1 発現プラスミドは Promega より購入した。

## ②SREBP-2 による CYP3A4 遺伝子の発現調節：

CYP3A4 の CLEM および XREM 領域を pGL4. 10 に挿入してレポーターコンストラクトを作製した。SREBP-2 発現プラスミドは当研究室で既に作製したものを用いた (*Mol Pharmacol*, 75, 677-684, 2009)。

これらを利用して HepG2 細胞、HuH-7 細胞または LS174T 細胞でレポーターアッセイを行った。レポーター活性の測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。

### 1-2. ヒト肝細胞における mRNA レベル測定

凍結ヒト肝細胞は Biopredic または Life Technologies から購入し、常法に従って融解、培養した。HepaRG 細胞は Life Technologies から購入し、説明書に従って融解・培養した。これら細胞を各種薬物で 48 時間処置した後、SV Total RNA Isolation System (Promega) および High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を利用して総 RNA 抽出と cDNA 合成を行った。定量的 PCR は GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用いて行った。

### 1-3. siRNA 利用実験

HepaRG 細胞に INTERFERin (Polyplus transfection) を利用して、2 種類のヒト LXR $\alpha$  標的二本鎖 siRNA (Life Technologies) を導入し、48 時間後から各種薬物を 48 時間処置し、上記手法で mRNA レベルを測定した。

## 2. CYP1A1/CYP1A2 遺伝子の発現調節

### 2-1. レポーターアッセイ

当研究室では、CYP1A1 の転写活性を luciferase 活性として、CYP1A2 の転写活性を secreted form of alkaline phosphatase (SEAP) 活性として測定可能なデュアルレポーターコンストラクトを作製している (*Mol Pharmacol* 69, 1924-1930, 2006; *Biochem Pharmacol* 76, 139-145, 2008; *Biochem Pharmacol* 79, 261-269, 2010)。本研究ではこれらを用いて HuH-7 細胞にてレポーターアッセイを行った。点変異コンストラクトは QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) を利用して作製した。

### 2-2. ゲルシフトアッセイ

核内受容体タンパク質インビトロ合成用プラスミドは PCR により増幅した cDNA を pTNT (Promega) に導入して作製した。常法に従い、<sup>32</sup>P で標識した二本鎖 DNA プローブとインビトロで合成した LXR $\alpha$  および RXR $\alpha$  を反応させ、電気泳動に

より分離した。その後 FLA-3000 を利用してバンドを検出した。なお、インビトロタンパク質合成には TNT SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) を用いた。

(倫理面での配慮)

ヒト肝細胞、ヒト肝由来試料を用いた実験に関しては、東北大学大学院薬学研究科ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会の承認を受けて実施した。

## C. 研究結果：

### 1. LXR $\alpha$ による CYP3A4 遺伝子の発現調節

#### 1-1. LXR $\alpha$ による CYP3A4 転写活性化

まず、LXR $\alpha$  が CYP3A4 遺伝子の転写活性化作用を有するか否かを明らかにするために、p3A4 レポーター遺伝子を用いて HepG2 細胞でレポーターアッセイを行った (Fig. 1)。その結果、LXR $\alpha$  を発現させ、LXR $\alpha$  リガンドの GW3965 または 24S-hydroxycholesterol (24S-HC) を処置することで、レポーター活性が上昇した。これらの結果から、活性化型 LXR $\alpha$  は CYP3A4 遺伝子の転写を正に調節する作用を有することが示された。

次に、CYP3A4 プロモーター上の LXR $\alpha$  応答配列を同定するために、p3A4 の欠失または変異コンストラクトを作製し、レポーターアッセイを行った (Fig. 2)。LXR $\alpha$  の DNA 配列選択性は、CYP3A4 の異物応答性発現誘導に関与する PXR と類似していることから、PXR 応答配列に特に着目して解析を行った。その結果、LXR $\alpha$  は、既に PXR 応答配列として報告されている 2 つの核内受容体結合モチーフ (dNR1 および eNR3A4) を介して CYP3A4 遺伝子の転写を活性化することが示唆された。当研究室では、PXR による CYP3A4 遺伝子の発現には eNR3A4 が重要であり、eNR3A4 を変異させたレポーターコンストラクトでは、dNR1 モチーフが残っていても PXR による転写活性化が認められないことを報告しているが (*Mol Pharmacol*, 75: 677-684, 2009)、LXR $\alpha$  は dNR1 または eNR3A4 モチーフ単独で CYP3A4 の転写を活性化すると考えられた。実際に、dNR1 または eNR3A4 モチーフのみを 5 個タンデムに連結し、tk プロモーター上流に導入したレポータープラスミドを用いた場合にも、LXR $\alpha$  による転写活性化は認められた (data not shown)。さらに、LXR $\alpha$  が、RXR $\alpha$  ヘテロダイマーとして dNR1 および eNR3A4 モチーフに結合することは、ゲルシフトアッセイによっても確認された (data not shown)。

#### 1-2. CYP3A4 転写における LXR $\alpha$ と PXR のクロスト

## ーク

上記結果から、CYP3A4 遺伝子発現において、LXR $\alpha$ とPXRが相互に影響しあうクロストークの存在が示唆された。そこで次に、LXR $\alpha$ の活性化がPXRを介した薬物によるCYP3A4誘導に及ぼす影響を解析した。

まず、p3A4 および HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイにおいて、LXR $\alpha$ とPXRを共発現させ、LXRリガンドGW3965の存在下および非存在下におけるPXRリガンドrifampicin処置による転写活性の上昇作用を比較した (Fig. 3)。その結果、GW3965非存在下では、rifampicin処置によりレポーター活性は約19倍に上昇したのに対し、GW3965存在下では、rifampicin処置に伴うレポーター活性の上昇率は2.4倍と低かった。GW3965単独処置で約4倍にレポーター活性が上昇したことを併せて考えても、GW3965とrifampicinの同時処置時のレポーター活性は、rifampicin単独処置時より低く、溶媒処置群の約10倍であった。以上の結果から、LXR $\alpha$ の活性化は、PXRを介したCYP3A4遺伝子の転写活性に対して抑制的に作用すると考えられた。

次に、この現象が実際にヒト肝細胞でも認められるか否かを、初代ヒト肝細胞の代替細胞として近年利用されているHepaRG細胞におけるCYP3A4 mRNAレベルを測定することで解析した (Fig. 4A)。その結果、CYP3A4 mRNAレベルは、rifampicin処置により約11倍、GW3965単独処置で約3倍、GW3965とrifampicinの同時処置で約7倍となり、レポーターアッセイの場合と同様に、GW3965の存在によりrifampicinのCYP3A4発現亢進作用は著しく減弱した。

同じサンプルを用いて、CYP3A4と同様にPXRやCARを介して酵素誘導を受けるCYP2B6のmRNAレベルを測定した (Fig. 4B)。その結果、CYP2B6 mRNAレベルは、rifampicinやCITCO (ヒトCARリガンド) 処置により上昇したが、GW3965存在下では、その上昇は全く認められなかった。同様の結果はCYP2A6遺伝子においても認められた (data not shown)

次に3ロットのヒト肝細胞を用いて同様の実験を行った (Fig. 4C)。その結果、これらの細胞ではGW3965処置によるCYP3A4 mRNAレベルの上昇は認められず、むしろ若干低下傾向を示した。しかし、いずれのロットにおいても、rifampicinとGW3965の同時処置時のCYP3A4 mRNAレベルは、rifampicin単独処置時のレベルの15%~78%であり、GW3965存在下ではrifampicinによるCYP3A4誘導が抑制されることが示唆された。

次いで、LXR $\alpha$ のPXRに対する抑制作用を検証するために、siRNAを利用して、HepaRG細胞におい

てLXR $\alpha$ の発現抑制がrifampicin処置に伴うCYP3A4 mRNAレベルの上昇に及ぼす影響を解析した (Fig. 5)。その結果、LXR $\alpha$ の発現を抑制すると、構成的なCYP3A4 mRNAレベルは著しく低下した。さらに、この条件下では、rifampicin処置によるCYP3A4 mRNAレベルの増加率は、GW3965の存在下および非存在下でほぼ同程度であった。

次に、LXR $\alpha$ によるPXR依存的な転写抑制の機序の解明を目指した。まず、この作用に何らかの細胞内因子が関与するか否かを明らかにするため、これまで使用していたHepG2細胞とは異なる2つのヒト由来細胞 (ヒト肝癌由来HuH-7細胞およびヒト大腸がん由来LS174T細胞) を用いて、レポーターアッセイを行った (Fig. 6)。その結果、HuH-7細胞では、LXR $\alpha$ とPXRの単独の活性化は、CYP3A4の転写を同程度亢進した。これはHepG2細胞ではPXRに比べてLXR $\alpha$ は著しく弱い転写活性化作用しか示さないことと異なっていた。また、HuH-7細胞では、LXR $\alpha$ の活性化はPXR依存的なCYP3A4の転写を抑制したが、その程度はHepG2細胞に比べて弱かった。一方、LS174T細胞では、HepG2細胞と同様にLXR $\alpha$ はPXRに比べて弱い転写活性化作用しか示さないかったが、PXR依存的な転写を抑制しなかった。以上のことから、CYP3A4発現に対するLXR $\alpha$ とPXRの寄与ならびに両転写因子のクロストークは、細胞依存的事であることが明らかとなった。

そこで次に、LXR $\alpha$ とPXRの共通のヘテロダイマー形成パートナーであるRXR $\alpha$ 、ならびに転写コアクチベーター (SRC-1、GRIP-1 およびPGC-1 $\alpha$ ) のLXR $\alpha$ によるPXR依存的な転写抑制における役割を明らかにするために、これら因子の発現プラスミドを用いてレポーターアッセイを行った (Fig. 7)。その結果、LXR $\alpha$ による抑制作用は、RXR $\alpha$ を共発現しても認められたが、3種のコアクチベーターを同時に発現した場合には消失した。

最後に、LXR $\alpha$ による抑制効果の酵素誘導評価における意義を明らかにするために、ヒト肝細胞を用いたCYP3A4誘導評価とレポーターアッセイを利用したPXR依存的なCYP3A4転写活性化作用評価において、PXRアゴニストのrifampicinとPXR/LXRデュアルアゴニストのT0901317の作用を比較した (Fig. 8)。その結果、T0901317は、レポーターアッセイにおいてrifampicinに比べて強いPXR活性化作用 (CYP3A4転写活性化作用) を示したのに対し、ヒト肝細胞におけるCYP3A4誘導作用はrifampicinに比べて弱かった。

## 2. SREBP-2によるCYP3A4遺伝子の発現調節

SREBP-2が、CYP3A4遺伝子の発現調節に寄与するか否かを明らかにするため、HepaRG細胞をコレ

ステロール (10  $\mu$ g/mL) および 25-hydroxy-cholesterol (25-HC; 1  $\mu$ g/mL) で処置し、*CYP3A4* と SREBP-2 の標的遺伝子 (*HMGCS1* および *LDLR*) の mRNA レベルを測定した (Fig. 9)。なお、上記ステロール混合物の処置により、内因性 SREBP-2 の活性が抑えられることが知られている。その結果、ステロール混合物の処置により、*HMGCS1* および *LDLR* の mRNA レベルは有意に低下したのに対し、*CYP3A4* mRNA レベルは有意に上昇した。

*CYP3A4* 遺伝子の転写調節には、CLEM4 と呼ばれる構成的発現に関与するプロモーター領域および XREM と呼ばれる異物応答性発現に関与するプロモーター領域が重要とされている。そこで、これら領域を含むレポーターコンストラクトと、活性型 (N 末端) SREBP-2 発現プラスミドを用いて、レポーターアッセイを行った (Fig. 11)。その結果、SREBP-2 は CLEM4 の領域を介して *CYP3A4* 遺伝子の発現を抑制することが示された。

さらに、SREBP-2 応答領域を同定するために、様々な長さの CLEM4 を含むレポーターコンストラクトを作製してレポーターアッセイを行った (Fig. 10)。その結果、SREBP-2 は、-11129 から -10423 の領域を介して *CYP3A4* の発現を抑制することが示された。

私達の研究室では、マウス *Cyp3a11* の SREBP-2 による抑制には、HNF-4 $\alpha$  が関与することを明らかにしている。しかし、今回同定した *CYP3A4* の SREBP-2 応答領域には、HNF-4 $\alpha$  結合配列や SREBP-2 結合配列は存在しなかった。そこで、この領域に作用する転写因子を同定するために、TESS (Transcription Element Search System, University of Pennsylvania) を用いてこの領域を検索したところ、2つの C/EBP 結合配列を見出した (data not shown)。

### 3. LXR $\alpha$ によるヒト *CYP1A1*/*CYP1A2* 遺伝子の発現調節

ヒト *CYP1A1* および *CYP1A2* 遺伝子は、第 15 番染色体上に、約 23 kb 隔てて互いに逆向きに転写される位置で存在している。そのため、両遺伝子の発現は共通の転写因子や転写領域により制御されている可能性がある。そこでまず、両遺伝子の約 23 kb のプロモーター領域をすべて含むデュアルレポータープラスミドおよびその欠失コンストラクトを用いて、HuH-7 細胞に LXR $\alpha$  を共発現させてレポーターアッセイを行った (data not shown)。その結果、LXR $\alpha$  は、*CYP1A1* の -511~-554 および -461~-510 の領域を介して *CYP1A1* と *CYP1A2* 両遺伝子を共に転写活性化することが示された。

次いで、ゲルシフトアッセイにより LXR $\alpha$  結合配

列の同定を試みた (data not shown)。まず、-511~-554 の領域について解析した。この領域には既に当研究室で同定した CAR 結合配列の ER8 型モチーフ (ER8<sub>1</sub> と命名) が含まれることから、LXR $\alpha$  が ER8<sub>1</sub> モチーフに結合するか否かを調べたところ、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマーは野生型の ER8<sub>1</sub> プローブには結合したが、変異プローブには結合しなかった。次にもう一つの領域の解析を行った。-461~-510 の領域をカバーする長鎖のプローブを用いた解析により、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマーは -451~-487 の間に結合すると考えられた。この領域には ER8 型のモチーフ (ER8<sub>2</sub> と命名) が含まれていたことから、野生型および変異型 ER8<sub>2</sub> プローブを用いて解析した結果、LXR $\alpha$ /RXR $\alpha$  ヘテロダイマーはこの ER8<sub>2</sub> モチーフに結合することが示された。

最後に、LXR $\alpha$  結合モチーフとして同定した ER8<sub>1</sub> および ER8<sub>2</sub> モチーフの転写活性化における寄与を確認するために、両モチーフに単独または同時に変異を導入したレポーターコンストラクトを用いてレポーターアッセイを行った (data not shown)。その結果、ER8<sub>1</sub> へ変異を導入すると LXR $\alpha$  依存的な *CYP1A1* および *CYP1A2* の転写活性化は減弱したが、完全には消失しなかった。しかし、さらに ER8<sub>2</sub> モチーフに変異を導入したところ、LXR $\alpha$  依存的な両遺伝子の転写活性化は全く認められなくなった。

以上の結果から、LXR $\alpha$  は *CYP1A1* 転写開始点近傍の 2 つの ER8 型モチーフを介して *CYP1A1* および *CYP1A2* 遺伝子の転写を共に活性化することが示唆された。

### 4. 考察

本分担研究では、食事成分がヒト P450 の発現変動要因、すなわち個人間差や民族間差の原因となっている可能性を検討するため、コレステロールと *CYP3A4* および *CYP1A2* 発現の関連性について、ステロール応答性転写因子であり、コレステロール過剰時にコレステロールレベルの低下に働く LXR $\alpha$ 、およびコレステロール欠乏時にコレステロールの合成・取り込み亢進に働く SREBP-2 に着目して研究を行った。その結果、本研究により以下のことを明らかにした。

(1) LXR $\alpha$  は *CYP3A4* 遺伝子転写活性化作用を有しており、ヒト肝細胞における *CYP3A4* の構成的発現に寄与している可能性が示された。

(2) LXR $\alpha$  の活性化は、異物応答性転写因子 PXR を介した *CYP3A4* の発現を抑制し、これにはコアクチベーターの競合が関与する可能性が示された。また、この LXR $\alpha$  による遺伝子発現抑制作用は、他の PXR 標的遺伝子である *CYP2B6* や *CYP2A6*

でも認められた。

(3) SREBP-2の活性化は、ヒト肝細胞においてCYP3A4の発現を抑制する可能性があるが、その抑制は、マウス *Cyp3a11* の場合とは異なり、HNF-4 $\alpha$ 以外の因子を介して起こると考えられた。

(4) LXR $\alpha$ はCYP1A1転写開始点近傍の領域を介してCYP1A1およびCYP1A2遺伝子の転写を共に活性化することが示唆された。

以上の結果より、ヒトにおいても、肝細胞内コレステロールレベルの変化は、CYP3A4遺伝子およびCYP1A2遺伝子の発現に影響を及ぼすことが強く示唆された。したがって、コレステロールや摂取量やその代謝・合成能力の差が、P450発現レベルの個人差・民族間差を生じる一因となっている可能性が示された。

#### D. 健康危険情報：

特になし

#### E. 研究発表：

学術論文

1. Araki K, Watanabe K, Yamazoe Y, Yoshinari K: Liver X receptor  $\alpha$  bidirectionally transactivates human *CYP1A1* and *CYP1A2* through two cis-elements common to both genes. *Toxicol Lett*, 215:16-24, 2012.
2. Watanabe K, Sakurai K, Tsuchiya Y, Yamazoe Y, Yoshinari K: Dual roles of nuclear receptor liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) in the CYP3A4 expression in human hepatocytes as a positive and negative regulator. *Biochem Pharmacol*. 86:428-436, 2013.

招待講演

1. 吉成浩一：Role of sterol-responsive transcription factors in CYP3A gene expression. 日本薬物動態学会第28回年会、2013年10月11日（東京）
2. 吉成浩一：薬物代謝酵素誘導に関わる転写調節因子の生理機能とその毒性学的意義. 日本薬学会第134年会、2014年3月29日（熊本）

学会発表

1. 吉成浩一、荒木希久子、山添康. 核内受容体LXR $\alpha$ によるヒトCYP1A1およびCYP1A2遺伝子の転写活性化、第39回日本毒性学会学術年会、2012年7月17日-19日（仙台）
2. Yoshinari K, Araki K, Yamazoe Y. Transcriptional activation of human

*CYP1A1* and *CYP1A2* genes by LXR $\alpha$ . 6th international congress of ASIATOX, 2012年7月17日-20日（仙台）

3. Yoshinari K, Watanabe K, Sakurai K, Yamazoe Y. Transcriptional regulation of CYP3A4 by oxysterol-responsive nuclear receptor LXR $\alpha$ 、日本薬物動態学会第27回年会、2012年11月20日-22日（東京）
4. 渡邊圭祐、櫻井香織、槌谷友里、山添康、吉成浩一：PXR依存的なCYP3A4遺伝子の発現はLXR $\alpha$ により抑制される. 日本薬物動態学会第28回年会、2013年10月10日（東京）
5. 櫻井香織、井上晋一、渡邊圭祐、山添康、吉成浩一：SREBP-2を介したCYP3A4遺伝子の転写抑制機構の解明. 第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日（仙台）
6. 渡邊圭祐、櫻井香織、槌谷友里、山添康、吉成浩一：PXR依存的なCYP3A4遺伝子の発現はLXR $\alpha$ により抑制される. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013年11月24日（仙台）
7. 櫻井香織、井上晋一、渡邊圭祐、山添康、吉成浩一：SREBP-2を介したCYP3A4遺伝子の転写抑制機構の解明. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013年11月24日（仙台）

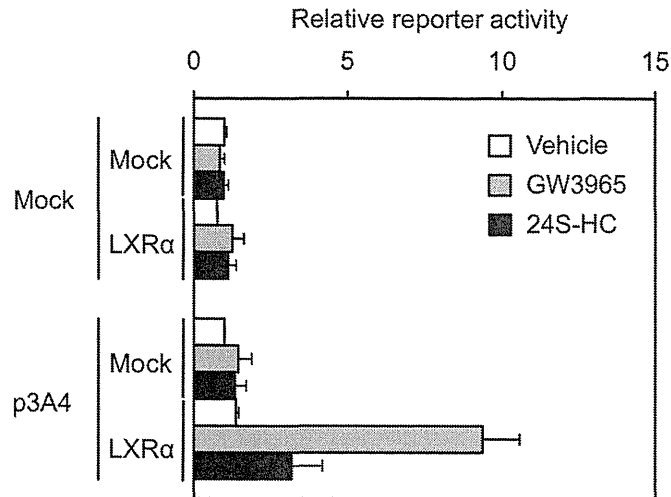
#### F. 知的財産権の出願・登録状況：

なし

#### G. 添付資料

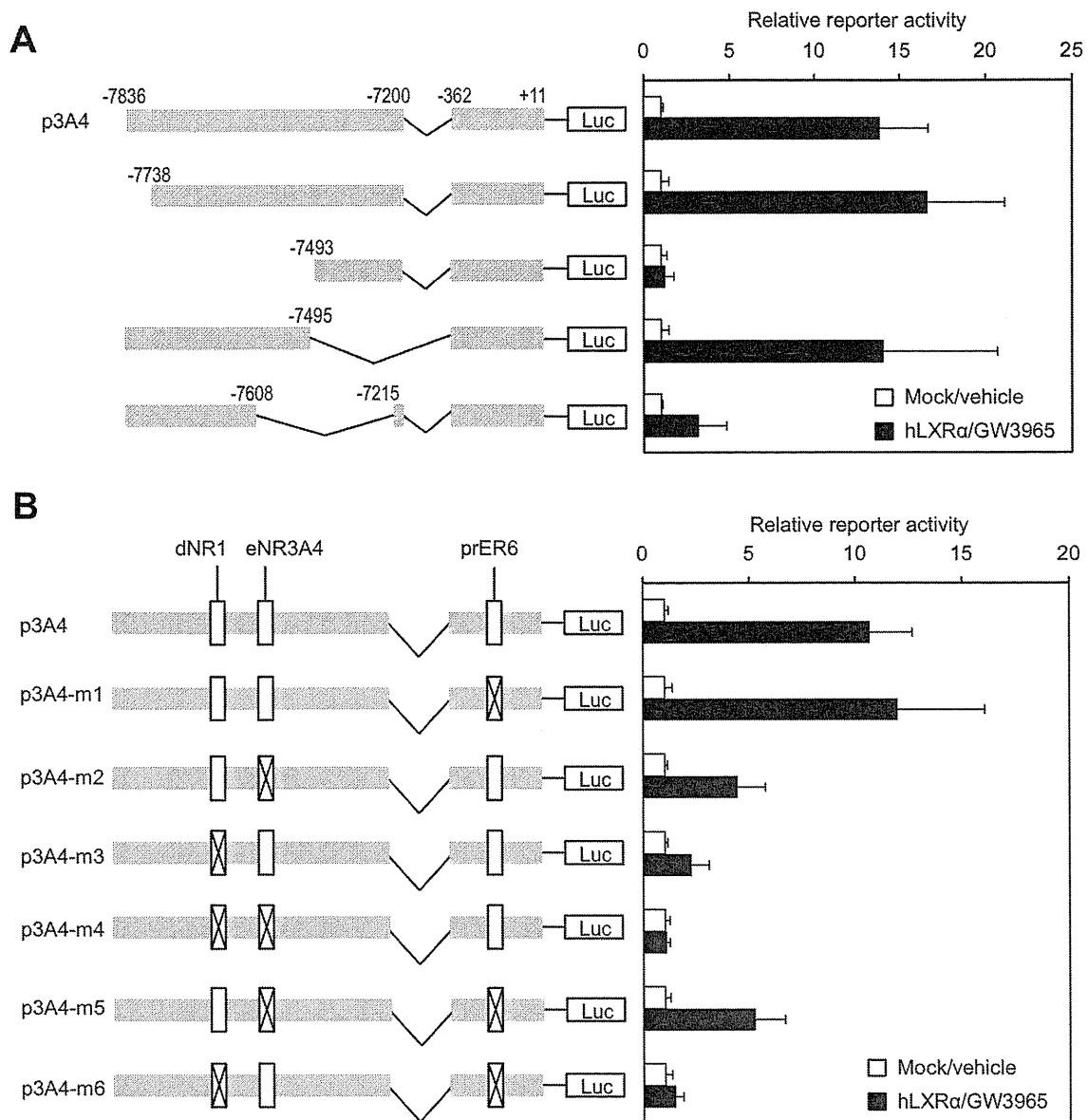
なし

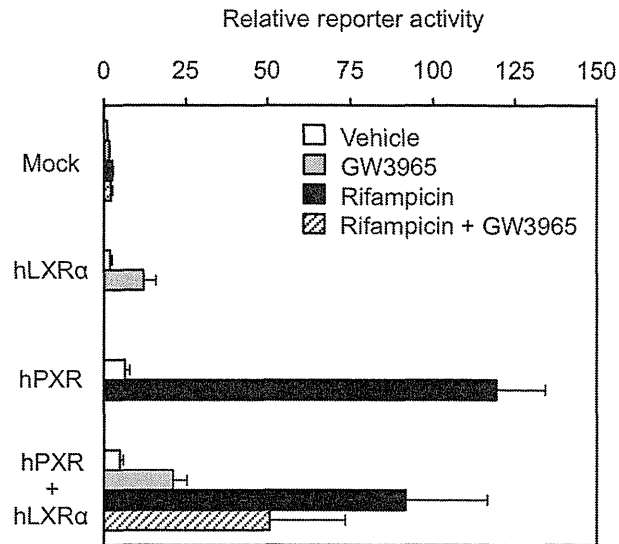




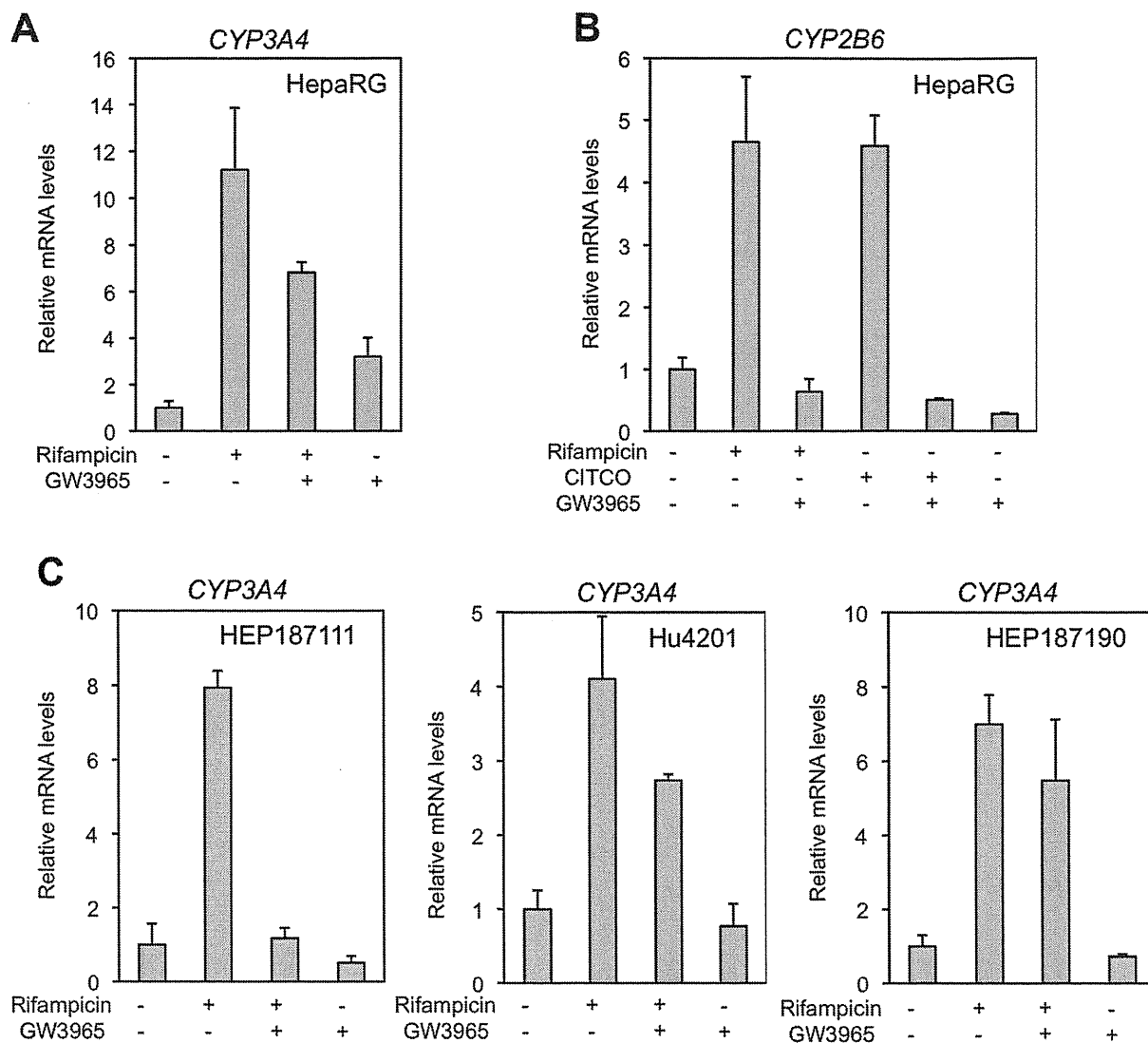
**Fig. 1. LXR $\alpha$ -mediated transactivation of *CYP3A4***

HepG2 cells ( $3 \times 10^4$  cells/well in 48-well plate) were transfected with each reporter plasmid (0.5  $\mu$ g), pRL-TK (0.025  $\mu$ g) and either pTarget-hLXR $\alpha$  or empty pTarget (0.1  $\mu$ g). Twenty hours after transfection, the cells were treated with vehicle (0.1% DMSO), GW3965 (2  $\mu$ M) or 24S-hydroxycholesterol (24S-HC, 10  $\mu$ M) for 48 h, and reporter activities were measured. Firefly luciferase activities were normalized with Renilla luciferase activities. Data are expressed as relative activities to those in vehicle-treated cells for each reporter construct. Data are the mean  $\pm$  SD (n = 4) of one representative experiment from 2 independent experiments.





**Fig. 3. Influences of LXR $\alpha$  activation on the PXR- dependent *CYP3A4* transactivation in reporter assays.** HepG2 cells ( $3 \times 10^4$  cells/well in 48-well plate) were transfected with p3A4 (0.5  $\mu$ g), phRL-TK (0.025  $\mu$ g) and expression plasmids (hLXR $\alpha$ ; pTarget-hLXR $\alpha$  (0.05  $\mu$ g) and empty pTarget (0.05  $\mu$ g), hPXR; pTarget-hPXR (0.05  $\mu$ g) and empty pTarget (0.05  $\mu$ g), hPXR + hLXR $\alpha$ ; pTarget-hPXR (0.05  $\mu$ g) and pTarget-hLXR $\alpha$  (0.05  $\mu$ g)). Twenty hours after transfection, the cells were treated with vehicle (0.2% DMSO), T0901317 (1  $\mu$ M), GW3965 (2  $\mu$ M) or rifampicin (10  $\mu$ M) for 48 h, and reporter activities were measured. Firefly luciferase activities were normalized with *Renilla* luciferase activities.



**Fig. 4. Influences of GW3965 treatment on CYP3A4 mRNA levels in human hepatocyte**

Differentiated HepaRG cells (A, C) and primary human hepatocytes (B), cultured as described under Materials and Methods, were treated with vehicle (0.2% DMSO), rifampicin (10  $\mu$ M) or CITCO (0.3  $\mu$ M) in the absence or presence of GW3965 (2  $\mu$ M) for 48 h. CYP3A4, CYP2B6 and ACTB mRNA levels were determined as described in Materials and Methods. The results are expressed as relative mRNA levels to those in vehicle-treated cells. Data are the mean  $\pm$  SD (n = 3-4). Experiments with HepaRG cells were carried out twice and representative data from one experiment are shown.