

201327052B

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～平成 25 年度

総合研究報告書

研究代表者 中村 和昭

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告		
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	-----	1
中村和昭		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

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実験薬理研究室長

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、ヒトを試験対象とした食品と医薬品との相互作用に対する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るが、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肝機能の評価系が必要である。また、医薬品の妊婦への投与に関しては、催奇形性に関する過去の痛ましい事件を教訓として、処方時に留意され、医薬品の摂取に関する妊婦の意識も高いと考えられるが、食品中の化学物質の催奇形性等の発生毒性に関しては十分な検討もなされておらず、その安全性あるいは危険性についての情報は乏しい。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、ヒト初代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および医薬品との複合摂取による肝細胞毒性試験系の確立と、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の構築を試みた。さらに、食品中の化学物質による胎児への影響を検討するため ES 細胞を用いた *in vitro* 発生毒性試験法 (EST 法) および肝細胞毒性試験系と EST 法との組み合わせによる、食品中の化学物質単独および医薬品との相互作用による胎児発育への影響について評価可能な新規試験系の構築を試みた。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および医薬品との複合摂取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る。

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、ヒトを試験対象とした医薬品との相互作用の観点に基づいた実験

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の摂取による CYP の阻害・誘導作用による薬物動態への影響が挙げられる。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、服用した医薬品の薬効を増減させ、あるいは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。

一方、妊婦における医薬品の摂取は、胎児への催奇形性の観点から処方時に留意されているが、食品中の化学物質による妊婦・胎児への影響については実験的な検証はほとんど行われておらず、また胎児への催奇形性が認められず安全だと考えられている医薬品においても、服用の際の食品の摂取状況によっては思わぬ有害事象が生じる可能性を否定できない。

上述の観点から、本研究では、肝移植手術の際に生じる余剰摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト新鮮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複合摂取による肝細胞毒性試験系を検討し、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の構築を試みる。さらに、食品中の化学物質による胎児への影響を検討するため、ES 細胞を用いた発生毒性試験法 (EST 法) および肝細胞毒性試験系と EST 法との組み合わせによる、食品中の化学物質単独および医薬品との相互作用による胎児発生への影響について評価可能な新規発生毒性試験系の構築を試みる。これまでにヒト肝細胞を用いた食品中の化学物質の安全性を評価する系は確立されておらず、本研究は新規の食品安全評価系の提案を念頭に、肝移植時に得られる摘出肝からの細胞単離に始まり胎児の発育における食品安全性の評価に至る一連の研究を遂行するものである。

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。

書面による同意あるいは保護者による代諾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°C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、細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液を低速遠心し、実質細胞（肝細胞）分画と非実質細胞分画に分離した。

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、肝細胞培地 (HMB basal medium + HCM Bullet Kit; Lonza) にて4日間培養した。培地は毎日交換した。試験化学物質を添加し、さらに2日間培養を行った。試験化学物質は、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、肝細胞様培地にて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。WST 法（同仁化学）により薬剤非添加条件時の値を100%とし、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

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ウェルプレートへ分化誘導培地（20%ウシ胎児血清、0.1mM 2-メルカプトエタノール、1%非必須アミノ酸、2mM L-グルタミンを含む DMEM 培地）により播種した。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。同様に、ピロバリド、ギンコリド A および C による ES 細胞への細胞毒性と ES 細胞の分化に与える影響を WST 法並びに定量 PCR 法にて検討した。

5) 食品中の化学物質の肝代謝産物による発生毒性試験

化学物質の肝臓による代謝産物に起因する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、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 添加培地にて行い、7 日目の NIH/3T3 細胞の細胞生存率を求めた。

また、ES 細胞分化に与える影響を検討するため、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て、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 (Millipore) のフィルタートレイへ 4.8×10^4 個/ウェルを播種しておき、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。

6) 食品中の化学物質との医薬品の相互作用による発生毒性試験

食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性を検討するため、上述の 5) の方法を用いて、VPA 並びにヒペルフォリンおよびギンコリド B との複合曝露による ES 細胞に対する細胞毒性を検討した。

(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。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

平成 24 年度、当センターにて施行した小児肝移植症例のうち、ドナー余剰肝ならびにレシピエント肝 41 例の肝検体より、肝組織の保存及び肝細胞の分離・培養・保存を行った。平成 25 年度には、32 例の肝検体より、肝組織の保存及び肝細胞の分離・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ピロバリド、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、通常考えられる摂取用量の西洋弟切草あるいはヒペルフォリン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、ビロバリド、ギンコリド A、C による ES 細胞に対する毒性を評価した結果、ギンコリド C においては、細胞毒性は認められなかったが、ビロバリドおよびギンコリド A 曝露において細胞毒性が認められ、ビロバリドにおいてはギンコリド A よりも強い細胞毒性が認められた。しかし、いずれもヒペルフォリンによる細胞毒性と比べ、その毒性は著しく低かった。また、ビロバリドおよびギンコリド A 曝露により ES 細胞分化誘導過程において、内胚葉マーカー遺伝子である TTR (transthyretin) の発現低下が認められた。

5) 食品中の化学物質の肝代謝産物による発生毒性試験

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。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。

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 GATA-binding factor 6 (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 bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) および natriuretic peptide A (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。

6) 食品中の化学物質と医薬品との相互作用による発生毒性試験

VPA 並びにヒペルフォリンおよびギンコリド B との複合曝露による ES 細胞に対する細胞毒性を検討した結果、ES 細胞と HepG2 細胞との共培養においては、いずれの複合曝露においても、WI-38 細胞との共培養と比べ細胞毒性の増悪は認められなかった。

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、ヒト初代培養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評価法の確立が見込まれ、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」および「5) 食品中の化学物質の肝代謝産物による発生毒性試験」の成果を進展させ、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。

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) Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A,

- Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source for hepatocytes. *Liver Transplantation*. 2014 20, 391-393.
- (2) Nakamura K*, Aizawa K, Yamauchi J, Tanoue A. *; corresponding author. Hyperforin inhibits cell growth and differentiation in mouse embryonic stem cells. *Cell Proliferation*. 2013 46, 529-537.
- (3) Nakamura K*, Aizawa K, Nakabayashi K, Kato N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A. *; corresponding author. DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLOS ONE*, 2013 8, e54036.
- (4) 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* 2012 25, 1, 77-82.
- (5) 今井弘一、中村和昭、田上昭人. 代謝活性因子を含めた in vitro 発生毒性評価法の開発. *Journal of Bio-Integration (バイオインテグレーション学会誌)* 2012 2, 1, 91-96.
2. 学会発表
- (1) 中村和昭、相澤和子、堀尚子、田上昭人、肝代謝活性を考慮した in vitro 発生毒性試験法の検討、日本動物実験代替法学会第 26 回大会 (ポスター発表) 2013 年 12 月・京都
- (2) 中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNA メチル化阻害剤ゼブラリンのヒト肝細胞癌に対する抗腫瘍活性、第 36 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 2013 年 12 月・神戸
- (3) 中村和昭、中林一彦、秦健一郎、田上昭人、DNA メチル化阻害剤ゼブラリンによるヒト肝細胞癌に対する細胞毒性、第 40 回日本毒性学会学術年会 (口頭発表) 2013 年 6 月・幕張
- (4) 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
- (5) 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
- (6) 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
- (7) Imai K, Watari F, Nakamura K, Tanoue A. Study of the C60 Fullerene on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. 24th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine. (ポスター発表) 2013 年 10 月・

Fukuoka.

(8) 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

(9) 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

(10) 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

(11) 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
Enosawa S, Hori kawa R, Yamamoto o A, Sakamoto S, Shigeta T, Naft osaka S, Fujim to J, Tanoue A, Nakamura K, Um ezawa A, Matsub ara Y, Matsui A, Kasahara M.	Hepatocyte transplan tation using the liv ing donor reduced-gr in a baby with o ornithine transcarbam ylase deficiency: a novel source for hep atocytes.	Liver Transp lantation.	20	391-393	2014
Nakamura K, Aiz awa K, Yamauchi J, Tanoue A.	Hyperforin inhibits cell growth and diff erentiation in mouse embryonic stem cell s.	Cell Prolife	46	529-537	2013
Nakamura K, Aiz awa K, Nakabay ashi K, Kato N, Yamauchi J, Hat a K, Tanoue A.	DNA methyltransfer ase inhibitor zebulari ne inhibits human he patic carcinoma cell s proliferation and induces apoptosis.	PLOS ONE.	8	e54036	2013
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	77-82	2012
今井弘一、中村和 昭、田上昭人。	代謝活性因子を含めた in vitro発生毒性評価 法の開発。	Journal of B io-Integrati on	B2	91-96	2012

Hepatocyte Transplantation Using a Living Donor Reduced Graft in a Baby With Ornithine Transcarbamylase Deficiency: A Novel Source of Hepatocytes

Received October 29, 2013; accepted November 17, 2013.

TO THE EDITORS:

We performed hepatocyte transplantation (HT) in an 11-day-old infant with ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD). We used cryopreserved hepatocytes prepared from remnant liver tissue, a byproduct of a hyper-reduced left lateral segment from living donor liver transplantation (LDLT). The patient exhibited hypothermia, drowsiness, and apnea at 3 days of age; these symptoms were accompanied by hyperammonemia (1940 $\mu\text{g}/\text{dL}$ at maximum), although there were no abnormalities at birth or an obvious family history (Fig. 1). Further examinations confirmed that the hyperammonemia was the result of OTCD. Multimodal treatments, including alimentotherapy, medications, and continuous hemodiafiltration (CHDF), did not improve the patient's clinical state, and severe hyperammonemia attacks recurred. Because of the patient's small body size (2550 g) and the lack of an available liver donor, HT was indicated. Hepatocytes of the same blood type were chosen from an institutional repository of cryopreserved hepatocytes prepared from the remnant tissue of segment III from unrelated living donors. Thawed hepatocytes were transplanted twice at 11 and 14 days of age with a double-lumen catheter inserted into the left portal vein via the umbilical vein (Fig. 2). The amounts of transplanted hepatocytes were 7.4×10^7 and 6.6×10^7 cells/body, and the viability rates were 89.1% and 82.6%, respectively. The portal flow was kept stable at greater than 10 mL/kg/minute, and the pressure was maintained at less than 20 mm Hg during and after HT. The immunosuppressive treatment followed the same protocol used for LDLT with tacrolimus and low-dose steroids.¹ The patient was weaned from CHDF and the ventilator at 26 and 30 days of age, respectively, with a stable serum ammonia level

of 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$. The patient was ultimately discharged 56 days after HT. During the 3 months of follow-up, the baby did well with protein restriction (2 g/kg/day), medication for OTCD, and immunosuppression. No neurological sequelae related to hyperammonemia have been observed so far (Fig. 1).

DISCUSSION

For children with metabolic liver disease, HT is indicated as an alternative or bridge to liver transplantation.² HT is less invasive than liver transplantation and can be performed repeatedly. Limitations to the widespread application of HT include the poor availability of hepatocytes. Therefore, it is important to find new sources of high-quality hepatocytes. We previously prepared a repository of hepatocytes obtained from remnant liver tissue, a byproduct of hyper-reduced left lateral segmentectomy in LDLT.¹

The cell donor was an unrelated volunteer with the same blood type who had previously undergone hyper-reduced left lateral segmentectomy. The main unit of segment II was used as a monosegmental liver graft for the primary recipient with end-stage liver disease, and the remnant was used to isolate hepatocytes with fully informed consent. The hepatocytes were isolated according to the collagenase perfusion method, as described elsewhere,³ with Liberase MTF C/T GMP grade (Roche). All procedures were performed at our cell processing center according to a strictly controlled protocol based on good manufacturing practices. The total number of transplanted live hepatocytes was 1.4×10^8 cells/body; the ammonia removal rate was more than 200 fmol/cell/hour (203.4 and 265.4 fmol/cell/hour with the first and second injections, respectively). The dose was judged to be sufficiently high to obtain therapeutic effectiveness according to our theoretical background.⁴

This work was supported by a grant-in-aid from the National Center for Child Health and Development and the Highway Program for the Realization of Regenerative Medicine (Japanese Science and Technology Agency). This study protocol was approved by institutional review board in National Center for Child Health and Development (reference number 433).

Address reprint requests to Mureo Kasahara, M.D., Ph.D., National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-Ku, Tokyo, Japan 157-8535. Telephone: +81-3-3416-0181; FAX: +81-3-3416-2222; E-mail: kasahara-m@ncchd.go.jp

DOI 10.1002/lt.23800

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

LIVER TRANSPLANTATION. DOI 10.1002/lt. Published on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases

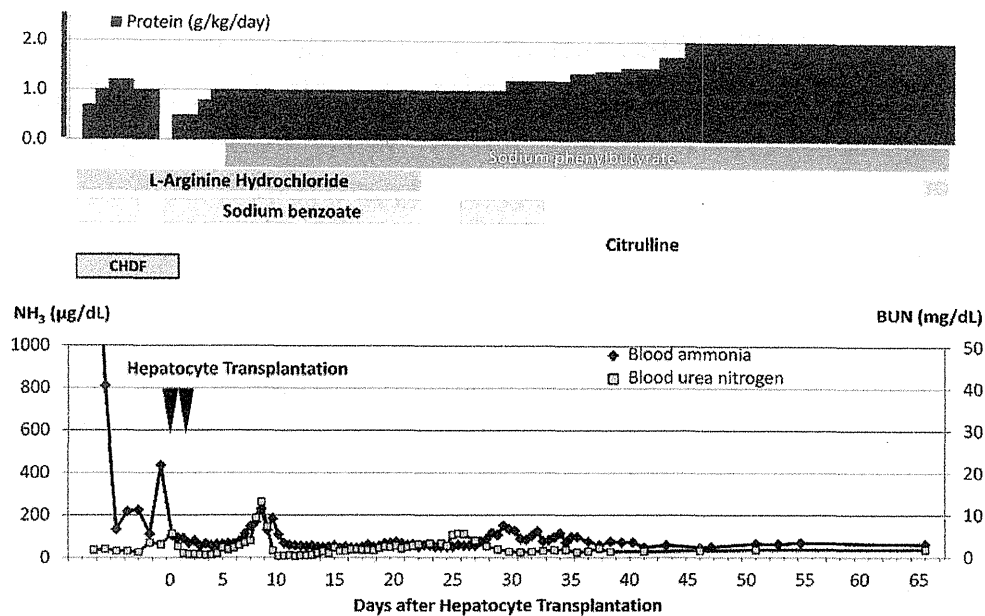


Figure 1. Treatment schedule (top) and patient condition (bottom). The changes with time for blood ammonia and blood urea nitrogen are shown. The baby was delivered vaginally as a first child. At 3 days of age, hypothermia, low oxygen saturation, and, finally, respiratory arrest occurred. The patient was incubated and given artificial respiration. Concurrently, hyperammonemia (1940 µg/dL) was found, and continuous hemodiafiltration (CHDF) was started in addition to alimentotherapy (protein withdrawal) and medications. Whenever the administration of essential amino acids was restarted, the blood ammonia level became elevated, and at 9 days of age, despite the suspension of essential amino acid administration, the level increased up to 434 µg/dL. At 11 days of age, HT was performed for the first time, and it was performed for the second time at 14 days of age. After HT, amino acid intake was restarted along with the continuation of multimodal treatments, and blood ammonia was controlled well except for episodic increases. The patient was weaned from CHDF and the ventilator at 26 and 30 days of age, respectively, and the patient was ultimately discharged 56 days after HT.

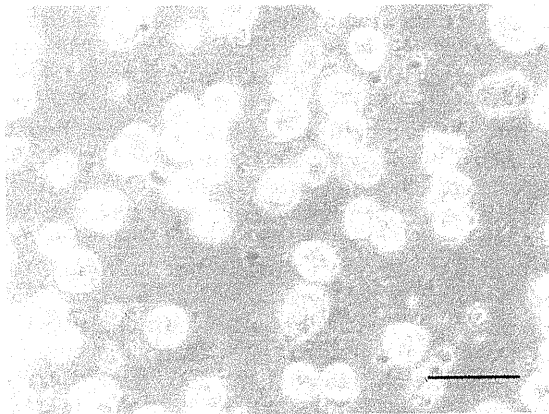


Figure 2. Hepatocytes transplanted during the first injection. The cells showed a glazed and firm surface. The bar indicates 50 µm.

Because liver transplantation is approved as a treatment for end-stage hepatic failure, donor livers are preferentially allocated for organ transplantation and not for hepatocyte isolation. On rare occasions, the lack of appropriate donor-recipient matching (eg, infant donor livers) provides good-quality hepatocytes.² Fetal livers are also considered to be an alternative cell source, although ethical issues remain to be resolved. At present, we have little choice but to use marginal donor tissues, such as livers obtained

from donors after cardiac death and organs with steatosis, fibrosis, or a long ischemia time. However, there are unfavorable issues related to the use of marginal donors, including low viability and vulnerability to cryopreservation. In this respect, the remnant liver tissue of hyper-reduction procedures used in LDLT has the same quality as that of left lateral segment grafts. As for availability, there are 5 cases of hyper-reduction per year at our institution on average.⁵ The use of remnant liver tissues obtained from hyper-reduced LDLT procedures will, therefore, help to address the shortage of hepatocyte donors.

Shin Enosawa, D.D.S., Ph.D.

Reiko Horikawa, M.D., Ph.D.

Akiko Yamamoto, M.D.

Seisuke Sakamoto, M.D., Ph.D.

Takanobu Shigeta, M.D.

Shunsuke Nosaka, M.D., Ph.D.

Junichiro Fujimoto, M.D., Ph.D.

Atsuko Nakazawa, M.D., Ph.D.

Akito Tanoue, M.D., Ph.D.

Kazuaki Nakamura, Ph.D.

Akihiro Umezawa, M.D., Ph.D.

Yoichi Matsubara, M.D., Ph.D.

Akira Matsui, M.D., Ph.D.

Mureo Kasahara, M.D., Ph.D.

National Center for Child Health and Development,
 Tokyo, Japan

REFERENCES

1. Kasahara M, Kaihara S, Oike F, Ito T, Fujimoto Y, Ogura Y, et al. Living-donor liver transplantation with monosegments. *Transplantation* 2003;76:694-696.
2. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, et al. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation* 2009;87:636-641.
3. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, et al. Large-scale isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell Transplant* 2005;14:845-853.
4. Enosawa S, Yuan W, Douzen M, Nakazawa A, Omasa T, Fukuda A, et al. Consideration of a safe protocol for hepatocyte transplantation using infantile pigs. *Cell Med* 2012;3:13-18.
5. Kanazawa H, Sakamoto S, Fukuda A, Uchida H, Hamano I, Shigeta T, et al. Living-donor liver transplantation with hyperreduced left lateral segment grafts: a single-center experience. *Transplantation* 2013;95:750-754.

Hyperforin inhibits cell proliferation and differentiation in mouse embryonic stem cells

K. Nakamura*, K. Aizawa*, J. Yamauchi* and A. Tanoue*

*Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, 157-8538, Japan

Received 17 May 2013; revision accepted 9 July 2013

Abstract

Objectives: Hyperforin, a phloroglucinol derivative of St. John's Wort, has been identified as the major molecule responsible for this plant's products anti-depressant effects. It can be expected that exposure to St. John's Wort during pregnancy occurs with some frequency although embryotoxic or teratogenic effects of St. John's Wort and hyperforin have not yet been experimentally examined in detail. In this study, to determine any embryotoxic effects of hyperforin, we have attempted to determine whether hyperforin affects growth and survival processes of employing mouse embryonic stem (mES) cells (representing embryonic tissue) and fibroblasts (representing adult tissues).

Materials and methods: We used a modified embryonic stem cell test, which has been validated as an *in vitro* developmental toxicity protocol, mES cells, to assess embryotoxic potential of chemicals under investigation.

Results: We have identified that high concentrations of hyperforin inhibited mouse ES cell population growth and induced apoptosis in fibroblasts. Under our cell culture conditions, ES cells mainly differentiated into cardiomyocytes, although various other cell types were also produced. In this condition, hyperforin affected ES cell differentiation into cardiomyocytes in a dose-dependent manner. Analysis of tissue-specific marker expression also revealed that hyperforin at high concentrations partially inhibited ES cell differentiation into mesodermal and endodermal lineages.

Conclusions: Hyperforin is currently used in the clinic as a safe and effective antidepressant. Our data indicate that at typical dosages it has only a low risk of embryotoxicity; ingestion of large amounts of hyperforin by pregnant women, however, may pose embryotoxic and teratogenic risks.

Introduction

Previous studies have demonstrated that many natural products with anti-bacterial, anti-inflammatory, and anti-tumour qualities, especially those related to chemoprevention and chemotherapy of various diseases, represent potential sources for new drug development (1–3). Extracts of St. John's Wort, *Hypericum perforatum*, have been used for centuries in traditional medicine, most notably for treatment of depression (4–6) and a number of its biologically active compounds have been isolated and characterized. These include naphthodianthrones, flavonoids and phloroglucinols such as hyperforin (6). Hyperforin has been identified as the major molecule responsible for the plant's anti-depressant effects. Its neurobiological consequences include neurotransmitter re-uptake inhibition, ability to increase intracellular sodium and calcium levels, recognized transient receptor potential activation and *N*-methyl-D-aspartic acid receptor antagonism (4–6). Hyperforin also displays several other biological properties of potential pharmacological interest, including anti-bacterial and anti-oxidant properties and an inhibitory effect on inflammatory mediators (5,6). In addition, hyperforin effectively inhibits proliferation of a number of mammalian cancer cell lines *in vitro* (4,5); it also induces apoptosis in K562 (chronic myeloid leukaemia) and U937 (acute myeloid leukaemia) cell lines through a caspase-dependent pathway (7,8).

St. John's Wort is an herbal medicine that has been shown to be effective in treating mild-to-moderate depression, which is common in women of childbearing

Correspondence: K. Nakamura, Division of Experimental Pharmacology, Department of Pharmacology, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8538, Japan. Tel.: +81 3 5494 7120; Fax: +81 3 5494 7057; Email: nakamura-kz@ncchd.go.jp

years. Given significant numbers of unplanned pregnancies, it is expected that exposure to St. John's Wort during pregnancy occurs with some frequency. Despite fears related to maternal and foetal safety, embryotoxic or teratogenic effects of St. John's Wort and hyperforin have not, up to now, been experimentally examined in detail.

One powerful tool for studying these risks is in embryonic stem (ES) cell research. As ES cells have the ability to develop into differentiated cell types of endodermal, ectodermal and mesodermal lineages, ES cell lines are highly valuable for analyses of mutagenic, cytotoxic and embryotoxic effects of chemical compounds, *in vitro*. The ES cell test (EST), which employs mouse ES (mES) cells to assess embryotoxic potential of the tested chemicals, has been validated as an *in vitro* developmental toxicity test (9–11). In our laboratory, we developed an assay system based on the EST in our previous studies, and tested this *in vitro* system by evaluating embryotoxicity of known *in vivo* teratogens valproic acid, carbamazepine and fluoxetine (12–14). In the study described here, to experimentally estimate embryotoxic effect of hyperforin, we have attempted to determine whether hyperforin would affect proliferation and survival processes of mES cells (representing embryonic tissue) and fibroblasts (representing adult tissues) using this system. In addition, we sought to characterize embryotoxicity of hyperforin.

Materials and methods

Cell culture and differentiation

Mouse ES cells (R1; SCRC-1011) and NIH/3T3 cells (CRL-1658) were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). NIH/3T3 cells were maintained at 37 °C in an atmosphere of 95% air and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% foetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. mES cells were maintained as previously described (12–14). ES cells were grown on gelatin-coated tissue culture dishes in standard ES cell culture medium [DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids, 0.1 mM βmercaptoethanol, 1000 U/ml LIF (Chemicon, Temecula, CA, USA), 50 U/ml penicillin G and 50 µg/ml streptomycin].

mES cell differentiation

R1 ES cell differentiation was carried out as described previously (12–14). In brief, ES cells were suspended in ES cell differentiation medium (DMEM supplemented with 20% FCS, 2 mM glutamine, 0.1 mM non-essential

amino acids, 0.1 mM βmercaptoethanol, 50 U/ml penicillin G, and 50 µg/ml streptomycin) containing the appropriate dilution of hyperforin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and cultured in hanging drops (500 cells/drop) as aggregates embryoid bodies, for 3 days. Embryoid bodies were then transferred to suspension culture dishes (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) and cultured for 2 days. These ($n = 1/\text{well}$) were then plated into 24-well tissue culture plates on day 5 and incubated for five additional days. To estimate efficiency of differentiation of ES cells into cardiomyocytes, cultures were analysed under an inverted phase-contrast microscope (Olympus, Tokyo, Japan) to examine distinctive beating movements of newly differentiated cardiomyocytes.

Cytotoxicity assay

To study for cytotoxic effects of hyperforin we followed the EST method (10) with some modifications. ES cells and NIH/3T3 fibroblasts in 100 µl culture medium containing appropriate dilution of hyperforin were seeded into 96-well flat-bottomed tissue culture microtitre plates and incubated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. On days 3 and 5, culture medium was removed. Subsequently, 100 µl of the same concentration test substance used on day 0 was added to the microtitre plates. After 24 h, 72 h or 7 days incubation with reagents, cell viability was determined using a CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega, Tokyo, Japan). Control cells cultured according to the same procedure, but without hyperforin, were considered to be 100% viable. Cell viability of each drug-treated sample was presented as percentage viability of control cells cultured without hyperforin.

Analysis of apoptosis

Quantification of apoptotic cells was performed using a cell death detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). This assay allows specific determination of mono- and oligonucleosomes in the cytoplasmic fraction of cell lysates. Enrichment of mono- and oligonucleosomes in the cytoplasm occurs due to DNA degradation in apoptotic cells before plasma membrane breakdown. After 24 or 72 h incubation with reagents, cells were lysed in lysis buffer (included in the kit) and the assay was performed according to the manufacturer's instructions. Absorbance values were measured at 405 nm using a microplate reader (ARVO; PerkinElmer Japan, Kanagawa, Japan). Apoptotic ratio of cells for each drug-treated sample is presented as fold-change from that of untreated samples. All samples were run five times per assay.

5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporation assay

DNA synthesis levels were determined by measuring BrdU incorporation using the commercial Cell Proliferation ELISA System (Roche Diagnostics). After 24 or 72 h incubation with reagents, cells were incubated for 3 h in BrdU labelling solution containing 10 μ M BrdU (included in the kit); the assay was performed according to the manufacturer's instructions. Absorbance values were measured at 405 nm using a microplate reader. All samples were run five times per assay.

Caspase assays

Caspases -3, -8, and -9 are important mediators of apoptosis; caspases -8 and -9 are initiators and caspase-3 is the executioner enzyme (15). Caspase-3/7, -8, and -9 activities were assayed with Caspase-Glo Assays (Promega) according to the manufacturer's respective standard cell-based assay protocol. Luminescence of each sample was measured using a plate-reading luminometer. Comparison of luminescence of a treated sample with that of a control sample enabled relative increase in caspase activity to be determined. All samples were run five times per same assay.

RNA isolation, cDNA synthesis and quantitative RT-polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from samples on day 10 of the differentiation assay, and from undifferentiated sam-

ples, using the RNeasy RNA extraction kit (Qiagen, Tokyo, Japan). cDNA was synthesized using RNA and PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Shiga, Japan). To analyse relative expression levels of various mRNAs, amount of cDNA was normalized on the basis of signals from ubiquitously expressed GAPDH mRNA. Real-time polymerase chain reaction was carried out using an SYBR Premix Ex Taq II (Takara) and a thermal cycler dice real time system (Takara) according to the manufacturer's standard instructions, to final volume of 25 μ l. Primer sequences are summarized in Table 1.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using unpaired Student's *t*-test or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least significant difference test *post-hoc*. Probability values (*P*) of less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effects of hyperforin on ES cell and fibroblast viability

In both ES cells and NIH/3T3 fibroblasts, hyperforin at high concentrations inhibited cell survival in a dose-dependent manner, after 7 days of hyperforin treatment (Fig. 1). However, there were some differences between

Table 1. PCR primers used in this study for the detection of tissue-specific marker gene expression

Gene symbol	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) CGGTCATTACCTGTGCAATG	GCATTTCTACGCCATAAGGTA
TTR	transthyretin (NM_013697) GTCCTCTGATGGTCAAAGTC	TCCAGTTCTACTCTGTACAC
BMP4	bone morphogenetic protein 4 (NM_007554.2) CTGCCGTCGCCATTCAT	TGGCATGGTTGGTTGAGTTG
NPPA (ANF)	natriuretic peptide type A (NM_008725.2) CGGTGTCCAACACAGATCTG	TCTCTCAGAGGTGGGTTGAC
NES	nestin (NM_016701.3) TGCATTTCTTGGGATACCAG	CTTCAGAAAGGCTGTACACAGGAG
GFAP	glial fibrillary acidic protein (NM_001131020.1) TGCCACGCTTCTCCTGTCT	GCTAGCAAAGCGGTCATTGAG
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NM_008084.2) TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTTC

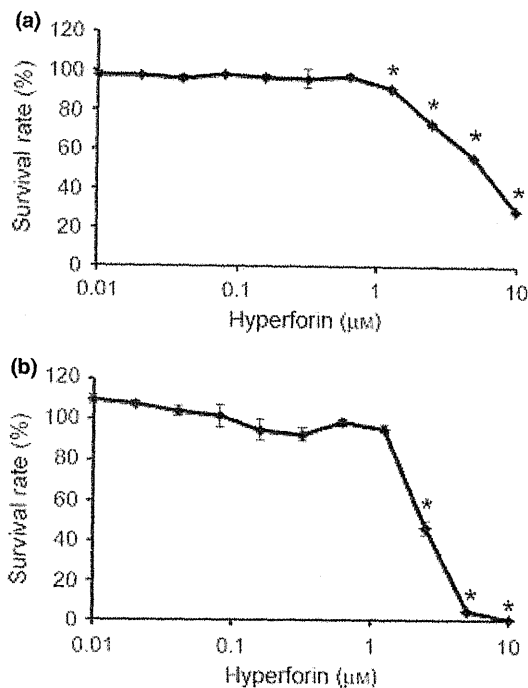


Figure 1. Effect of hyperforin on embryonic stem (ES) cell and fibroblast viability. Employing mouse ES cells (a) and NIH/3T3 cells (b) were treated with hyperforin at indicated concentrations for 7 days. Cell viability was measured by CellTiter-Glo luminescent cell viability assay. Cell cultures exposed to 0 µM drug were considered to be 100% viable. Cell viability of each drug-treated sample was presented as a percentage of viability of cultures treated with 0 µM drug. Data are mean \pm SEM of results from at least three independent experiments. * $P < 0.05$, compared to 0 µM.

ES cells (Fig. 1a) and NIH/3T3 fibroblasts (Fig. 1b) in cytotoxic sensitivity to hyperforin. IC_{50} values (inhibitory concentration of 50% cell viability) were 2.38 and 5.89 µM for NIH/3T3 fibroblasts and ES cells, respectively. Proportions of viable cells after treatment with 10 µM hyperforin were 0.32 ± 0.07 and $29.35 \pm 0.34\%$ for NIH/3T3 fibroblasts and ES cells, respectively.

Hyperforin inhibited proliferation of ES cells

To further examine effects of hyperforin on proliferation and viability of ES cells, cells were cultured for 24 or 72 h in the absence or presence of increasing concentrations of hyperforin. ES cell population growth was reduced in samples treated with high concentrations of hyperforin compared to untreated control samples after 24 and 72 h, respectively (Fig. 2a,b). Proportions of viable cells after treatment with 10 µM hyperforin were 37.38 ± 1.42 and $16.46 \pm 3.13\%$ after 24 and 72 h. To determine whether hyperforin induced death in ES cells, we measured apoptosis after 24 or 72 h hyperforin treat-

ment. The cell death detection ELISA assay indicated that hyperforin could not induce apoptosis, characterized by DNA fragmentation, in ES cells after 24 h (Fig. 2c) and 72 h (Fig. 2d). In addition, to determine whether hyperforin could inhibit proliferation of ES cells, we conducted a BrdU incorporation assay after 24 or 72 h hyperforin treatment. BrdU incorporation assay showed that uptake of BrdU by ES cells was reduced after exposure to hyperforin (Fig. 2e,f). These results indicate that high concentrations of hyperforin inhibited ES cell proliferation.

Hyperforin induced apoptosis of fibroblasts

To further examine effects of hyperforin on proliferation and viability of NIH/3T3 cells, cells were cultured for 72 h in the absence or presence of increasing concentrations of hyperforin. NIH/3T3 cell proliferation was markedly lower in samples treated with high concentrations of hyperforin compared to untreated control samples (Fig. 3a); proportion of viable cells after treatment with 10 µM hyperforin was $6.52 \pm 0.25\%$. To determine whether hyperforin induced apoptosis in NIH/3T3 cells, we measured it after 72 h hyperforin treatment. The cell death detection ELISA assay indicated that hyperforin induced apoptotic cell death in NIH/3T3 cells (Fig. 3b). In addition, activity of caspase-3/7 was significantly increased at growth-suppressive concentration of hyperforin (Fig. 3c), as were those of caspases -8 (Fig. 3d) and -9 (Fig. 3e).

Furthermore, to determine whether hyperforin could inhibit proliferation of NIH/3T3 cells, we conducted BrdU incorporation assay after 72 h hyperforin treatment. This indicated that uptake of BrdU by NIH/3T3 cells was lower after exposure to hyperforin (Fig. 3f).

Effects of hyperforin on tissue-specific marker gene expression in ES cells

To characterize effects of hyperforin in the ES cell differentiation system, we performed quantitative expression analysis of tissue-specific genes (thus of their products) in samples on day 10 of the differentiation assay. Under our cell culture conditions, ES cells mainly differentiated into cardiomyocytes, although various other cell types were also produced. We demonstrated that expression levels of Oct4 and Sox2 (undifferentiated markers) were markedly lower under differentiating conditions compared to non-differentiating conditions, and that these expression levels were enhanced after treatment with 10 µM hyperforin, although they remained below their initial undifferentiated levels (Fig. 4a,b). For endodermal lineages, expression levels of GATA6 and

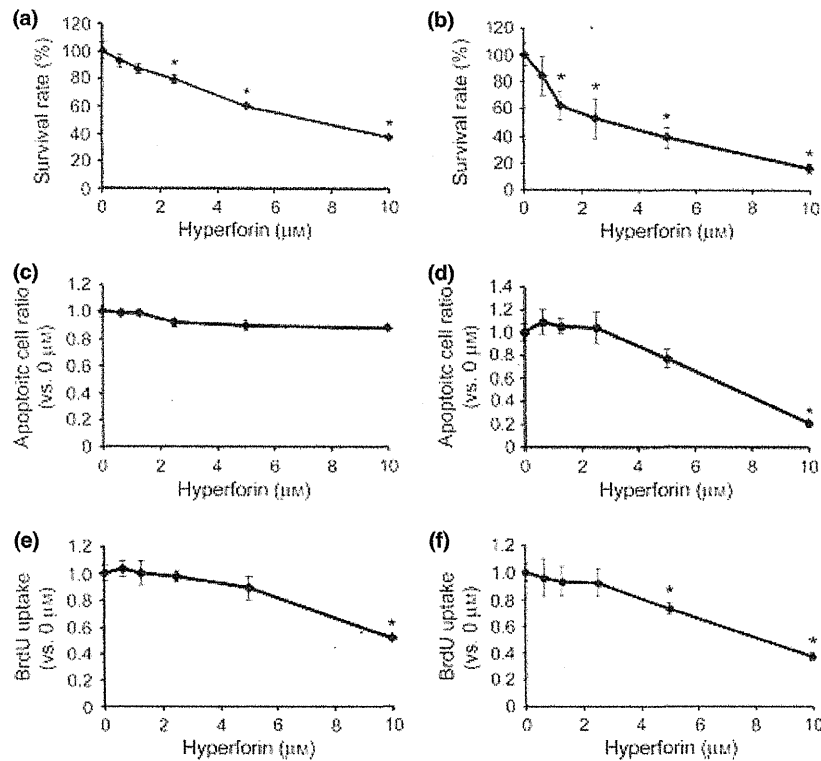


Figure 2. Effects of hyperforin on embryonic stem (ES) cell apoptosis and proliferation. (a, b) Employing mouse ES (mES) cells were treated with hyperforin at indicated concentrations for 24 h (a) or 72 h (b). Cell viability was measured by CellTiter-Glo luminescent cell viability assay. Cell cultures exposed to 0 μM drug were considered to be 100% viable. Cell viability of each drug-treated sample was presented as percentage of that of cultures treated with 0 μM drug. (c, d) mES cells were treated with hyperforin at indicated concentrations for 24 h (c) or 72 h (d). Apoptosis was measured by cell death detection ELISA assay. Apoptotic level in each drug-treated sample was presented as fold-change compared to that in cultures treated with 0 μM drug. (e, f) mES cells were treated with hyperforin at indicated concentrations for 24 h (e) or 72 h (f). Uptake of BrdU was measured by ELISA. BrdU incorporation in each drug-treated sample was presented as fold-change compared to that in cultures treated with 0 μM drug. Data are the mean ± SEM of results from at least three independent experiments. * $P < 0.05$, compared to 0 μM.

TTR were markedly higher under differentiating conditions compared to non-differentiating conditions, and high concentrations of hyperforin reduced these expression levels (Fig. 4c,d). Expression of mesodermal markers BMP4 and ANF were also markedly higher under differentiating conditions compared to non-differentiating conditions, and high concentrations of hyperforin reduced these expression levels (Fig. 4e,f). For ectodermal lineages, expression levels of neuron-specific markers such as nestin and Glial markers such as GFAP were not significantly affected by hyperforin (Fig. 4g,h). Proportion of induced cardiomyocytes was determined based on their autonomous contractile motions which was shown to reduce in a hyperforin concentration-dependent manner (Fig. 4i).

Discussion

In this study, we demonstrated that high concentrations of hyperforin significantly reduced viability of ES cells

(an embryonic tissue cell model) and NIH/3T3 fibroblasts (an adult tissue cell model).

Data we obtained from our various analyses suggest that hyperforin at high concentrations inhibits ES cell proliferation. Proliferating somatic cells spend much of their mitotic cycle in the G1 phase, and their progression to S phase is largely controlled by cyclin-dependent kinases (CDK), whose activity is regulated by various cyclins. Although they are expressed in ES cells, in some cases several major CDK-cyclin control complexes, including Cdk4/cyclin D, appear to exhibit little or no regulatory activity. Instead, division of ES cells is driven by the Cdk2/cyclin A/E pathway, constitutively active throughout the cell cycle (16). Given that hyperforin inhibits proliferation of ES cells, it may affect the function of cell cycle regulators such as the Cdk2/cyclin A/E pathway.

On the other hand, it is acknowledged that there are several types of cell death, including apoptosis, necrosis and autophagic cell death. Cells are archetypically known