

平成 24 年度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

**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**

平成 22～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 永田 清  
平成 25 年 ( 2013 ) 4 月

## 目次

Ⅰ. 総合研究報告	
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	
永田 清	1
Ⅱ. 平成 22 年度 分担研究報告	
1. 肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素誘導及び肝特異的転写因子発現パターン解析	
健康食品使用状況調査に関するアンケート調査	
永田 清	16
2. CYP1A1/1A2 誘導スクリーニングのための <i>in vitro</i> 同時評価系構築に関する	
研究	
永田 清	20
3. P450 発現アデノウイルスベクターを用いた薬物代謝毒性発現予測系の確立	
頭金 正博	25
4. 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	
ルの確立	
細川 正清	30
5. 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	
松永 民秀	35
Ⅲ. 平成 23 年度 分担研究報告	
1. 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	
永田 清	40
2. 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-2	
細川 正清	44
3. 肝分化 iPS 細胞における肝特異的転写因子 HNF6 の薬物代謝酵素発現に対する影響	

	永田 清	47
4. 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	松永 民秀	52
5. 健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態アンケート調査	永田 清	59
6. 健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態アンケート調査	頭金 正博	67
IV. 平成 24 年度 分担研究報告		
1. 肝分化 iPS 細胞への肝特異的転写因子の薬物代謝酵素発現に対する影響	永田 清	73
2. 健康食品使用実態調査で使用が確認された健康食品による酵素誘導調査	永田 清	81
3. 薬物代謝酵素誘導を介した薬物相互作用の評価	細川 正清	86
4. いわゆる「健康食品」と医薬品との併用実態に関する調査研究	頭金 正博	93
5. 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	松永 民秀	101
. 研究成果の刊行に関する一覧表		

. 研究成果の刊行物・別刷  
115

.....

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保推進研究事業）

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

課題番号：H22-食品-一般-003

研究代表者名：所属機関 東北薬科大学  
氏名 永田 清

研究要旨： いわゆる「健康食品」の使用実態について調査を行い、申請者らが構築した薬物代謝酵素活性阻害および酵素誘導評価法のプロトコルを基に薬物相互作用の評価の実施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。平成24年度は、1）薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の測定と定量化、2）ヒト iPS 細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討、3）ヒト iPS 細胞から肝に分化した細胞における薬物代謝酵素誘導評価、4）培養細胞を用いた細胞障害の評価、5）病院カルテを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査、6）定量化された薬物代謝酵素活性阻害および誘導のデータベースの構築を行った。

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  
細川 正清 千葉科学大学薬学部・教授  
頭金 正博 名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授  
研究協力者  
大森 栄 信州大学医学部附属病院薬剤部・  
教授/薬剤部長

百瀬 泰行 信州大学医学部附属病院薬剤部・  
副薬剤部長  
岩尾 岳洋 名古屋市立大学大学院薬学研究科・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・博士後期課程3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2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」との薬物代謝酵素に関わる相互作用についての情報はほとんどない状態である。従って、これらの情報を医療の現場に提供することが強く求められてい

る。

本研究の目的は、いわゆる「健康食品」の使用実態を調査した上で、申請者らが構築した薬物代謝酵素活性阻害及び酵素誘導評価法を用いて、薬物相互作用を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。

「（倫理面への配慮）」

遺伝子組換え実験を行うに当たっては、各施設における許可を得た後に、規則を十分に遵守して行う。遺伝子組換え研究は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に準じて行う。iPS細胞の作成等については、東北薬科大学および名古屋市立大学薬学研

究科の倫理委員会の承認を得ている。また病院カルテルを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査については、名古

## B. 研究方法

### [平成 24 年度] 実際に行った研究

#### 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、細川)

活性阻害および誘導を示したものは含まれている個々の健康食品について、別途、薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の評価を行い、そのデータを数値化してまとめる。

#### ヒトiPS細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討 (松永、永田)

申請者らは現在ヒトiPS細胞から肝細胞への基本的な分化に成功しているが、より成人の肝臓・小腸の細胞(腸管上皮細胞)に近い機能を有する細胞への分化を検討するとともに細胞に分化した後に誘導評価が可能なヒトiPS細胞株を作製する。

#### ヒトiPS細胞から肝に分化した細胞における薬物代謝酵素誘導評価(松永、永田)

iPS細胞株が作製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。

#### 培養細胞を用いた細胞増殖への影響評価(永田、細川)

培養細胞を用いて健康食品が細胞増殖に影響を及ぼすかを調べる。

#### 病院カルテルを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査(松永、頭金、永田)

信州大学薬剤部にてカルテルから健康食品の使用状況並びに薬の服用状況の調査をおこなう。

#### 定量化された薬物代謝酵素活性阻害および誘導のデータベースの構築(永田、頭金)

初年度に作成したリストにどの程度

屋市立大学薬学研究科の倫理委員会の承認を得て行った。

の摂取により相互作用が生じるか等の情報を加え、データベース化したものを本にして公開する。

## C. 進捗状況及び見込まれる研究結果(達成度)

#### 薬物代謝酵素活性阻害および誘導能の測定と定量化

アンケート調査結果から243品目の健康食品の使用が確認されたので、これらの薬物代謝活性阻害および誘導の評価を行った。酵素誘導については現在までに約200品目の製品の評価を行った。その結果、程度に差はあるものの約40%の商品に誘導が認められた。特に、ダイエット健康食品、春秋ウコン粒およびガジュツパウダーに強いCYP3A4誘導が認められ、過去に誘導を引き起こすために臨床で問題となったセントジョーンズワートと同程度であった。またビタミン剤でも比較的強い誘導が認められたが、その程度には各社の製品間で違いが認められた。一方、CYP1A1/1A2の誘導については、イチヨウ葉&大豆レシチン+ビタミンE、セントジョーンズワート、オキュバイト+ルテイン、Life Pakが非常に強い誘導を示した。誘導を示した健康食品については、現在詳細な用量を検討し、誘導の強さの数値化を行った。

薬物代謝酵素活性阻害については、実験を行う上で大きなトラブルが生じたために、あまり進まなかった。現在、阻害実験を精力的に行っているが、以下のものに強い阻害作用が認められた。キャックロー、デビルスクロー、フーバーフュー、ペポゲスト、レッドクローバー、シビリアンエルセロ、中でもキャックローは、今回行ったCYP1A2、CYP2C9、CYP2D6およびCYP3A4のいずれの活性も強く阻害した。

## **培養細胞を用いた細胞増殖への影響評価（永田、細川）**

薬物代謝酵素誘導の評価を行うと同時に細胞の増殖に対する影響も調べた。顕微鏡下で細胞増殖抑制を観察した。その結果、程度の差はあるもののこれも約20%の製品において細胞増殖抑制が観察された。現在はより正確な細胞評価法として用いられているMTTアッセイ法を用いて、評価を行っている。

## **ヒトiPS細胞の肝・腸管上皮細胞への分化の検討（松永、永田）**

ヒトiPS細胞から分化した肝様細胞に薬物代謝酵素を発現させるために、2つの手法を用いた。一つは薬物代謝酵素の発現に必要な転写因子を強制発現させるものであり<sup>(1)</sup>、他方は薬物を用いて発現量を高め手法である。いずれも成熟肝細胞までには届かなかったが、薬物代謝活性を測定することに成功した。一方、小腸の細胞（腸管上皮細胞）に近い機能を有する細胞への分化を本研究にて世界で初めて成功した。これらの成果は、本年度の日本薬物動態学会でベストポスター賞を2つ受賞し、現在本論文は投稿中である。

## **ヒトiPS細胞から肝に分化した細胞における薬物代謝酵素誘導評価（松永、永田）**

薬物代謝活性を有する肝様細胞を用いて、CYP3A4およびCYP1A1/1A2を誘導するとされている代表的な化学物質を用いて誘導評価を試みた。いずれも誘導が確認された（投稿中）。

## **病院カルテルを用いた健康食品の使用状況の後ろ向き調査（松永、頭金、永田）**

信州大学薬剤部にてカルテルから健康食品の使用状況並びに薬の服用状況の調査を行う。

## **定量化された薬物代謝酵素活性阻害および誘導のデータベースの構築（永田、頭金）**

平成23年度は、全国約100店舗の調剤薬局を対象に、健康食品の使用状況を把握

するためのアンケート調査を行った。その結果、アンケート送付調剤薬局の店舗回収率は36.4%で、1,034件のアンケートが回収され、いわゆる健康食品については、243製品の使用が確認された。このアンケート調査情報を基に、既に確立済みの薬物代謝酵素誘導評価細胞等を用いて、使用が確認された243製品の大部分について評価を完了した。本年までに得られている文献情報並びに本研究グループで行ったアンケート調査及びこれに基づく*in vitro*試験結果をまとめ、現在、公開するためのデータベース化を進めている。文献情報は、アンケート調査により使用が確認されたいわゆる健康食品のうち主な含有成分、163成分を対象として調査を行った。その調査内容は、相互作用（誘導/阻害）、基質薬物、試験対象P450、試料（ヒト/株化細胞/実験動物）等とし、情報があるものに関してはPubMed上のabstractへリンクを貼付している。次に、我々が検討した結果については、アンケート調査により使用が確認された健康食品を同種同効製品ごとに分類し、まとめた。各製品に含まれる主な成分を表示し、文献情報がある成分については、PubMedへのリンクを貼付した。*in vitro*試験結果は、CYP誘導活性、CYP阻害活性（現在、調査中）のデータを公開する。この結果については、数値及びそれをまとめたグラフデータも本データベースの使用登録者のみに公開する予定にしている。

## D. 考察

健康食品による薬物相互作用の調査について、アンケート調査結果から243品目の健康食品の使用が確認されたので、これらの薬物代謝活性阻害および誘導の評価を行った。酵素誘導は約200品目の製品の検討を行ったが、CYP3A4とCYP1A1の誘導について予測以上に多くの健康食品が酵素誘導（CYP3A4とCYP1A1を合わせると40%）を引き起こすことが明らかとなった。誘導の強さには差が認められたが、CYP3A4で1μMリファンピシン濃度が示す誘導よりも強い誘導が認められたダイエット健康食品、春

秋ウコン粒およびガジュツパウダーは、ヒトにおいて相互作用が起こることが予測された。また、CYP1A1の誘導については、4 μM オメプラゾール濃度が示す誘導よりも強い誘導が認められた Lutin, イチョウおよび Life pak は、ヒトにおいて相互作用が起こることが予測された。また、マルチビタミン剤でも誘導が認められ、含有成分には大きな差がないにもかかわらずその程度は商品間で大きく異なっていた。恐らく、ビタミンの含有量あるいはそれ以外の化合物によって異なると予測された。一方、細胞増殖抑制を示す健康食品が調べた製品の20%において見いだされた。この点については、今後のさらに詳細の検討が必要であると考えている。

酵素阻害については、当初予定していた実験成果が得られなかった。その原因について、本研究で用いる予定であった薬物代謝 CYP および核内レセプター発現アデノウイルスは既に作成を終え、-80 °C でストックとして保存していたのであるが、本研究で使用するために解凍増殖させると、高い発現量が得られなかった。ウイルスのタイターを上げるため種々の努力を行ったが、どうしても作成した当時(5年前)の活性が得られなかった。本理由が分からない(ウイルスは増える)ことから、やもえず手法を変えて新たにこれらの発現アデノウイルスを作成することとなった。このために、酵素阻害実験は2年以上の遅れとなり、また、*in vivo* 実験は行えなかった。

iPS から肝臓への分化は、種々の幹細胞マーカータンパク質の発現から推測すると胎児肝細胞にまでは達したと考えられる。本研究において肝臓特異的転写因子を強制発現することにより薬物代謝活性を示す細胞の分化に成功した。特に HNF6 と HNF4 の共同発現により CYP3A4 および CYP1A2 の高い発現が認められた。しかし、発現の増加の認められない P450 分子種も存在し、さらなる検討が必要である。小腸への分化についても成功したが、高い薬物代謝活性を有する細胞への分化にはさらなる工夫が必要であると考えられた。本研究において行った健康食品の使用調査、研究結果および文献

調査はデータベース化して、ホームページに掲載することを想定し準備をしてきたが、本研究班の中で健康食品の製品名をそのまま公開することは問題にはならないかとの議論がなされた。このまま公表するとメーカー側からのクレームが予測されるため、ホームページへの掲載と公開については、慎重に検討していきたい。

## E. 結論

アンケート調査結果から 243 品目の健康食品の使用が確認されたので、これらの薬物代謝活性阻害および誘導の評価を行った。酵素誘導については現在までに約 200 品目の製品の評価を行った。その結果、程度に差はあるものの約 40%の商品に誘導が認められた。また、約 20%の製品において細胞増殖抑制が観察された。ヒト iPS 細胞の肝・腸管上皮細胞への分化については、薬物代謝活性を有する肝細胞への分化に成功した。さらに、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も世界で初めて成功した。また、本研究成果の公開するためのデータベース化の基礎構築が完了した。

## F. 研究発表

(1) 国内 4 件

「永田 清」

1. 坂口修平、高橋昌吾、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしての TNF- $\alpha$  誘導肝細胞死と酸化ストレス - シグナル伝達機構からのアプローチ- 日本エンドトキシン・自然免疫研究会、筒井ひろこ、小谷穰治、横地高志、エンドトキシン・自然免疫研究 15 - 飛躍する自然免疫研究-、医学図書出版、東京、53-57, 2013
2. 永田 清、化学物質の吸収・排泄経路、衛生薬学 - 健康と環境- 第5版、(平塚明、姫野誠一郎、長沼章、編集) 広川書店、349-355, 2012
3. 永田 清、薬物相互作用、薬害・副作用学 第1版、(川西正祐、小野秀樹、賀川義之 編集) 南山堂、2012



4. Takahashi S, Miura A, Sasaki H, Sakaguchi S, Nagata K. TNF- $\alpha$ /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of hepatocyte injury. *J Tohoku Pharm Univ.* 59, 69-74 (2012)

( 2 ) 海外 12 件

「永田 清」

1. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 653-657 (2012).
2. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 Chemical Stabilizer, CoCl(2) and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 398-404 (2012).
3. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Kumagai T, Matsunaga T, Omori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 enhances the expression of the CYP3A4 gene in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 in press

「松永民秀」

5. Nakamura K, Matsuzawa N, Ohmori S, Ando Y, Yamazaki H, Matsunaga T. Clinical evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28: 38-43 (2013).
6. Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, Ohmori S. Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and

expression analyses of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism. *Biol Pharm Bull.* 36, 292-298 (2012).

7. Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori S. Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 598-604 (2012).
8. Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S. Lower expression of HNF4 and PGC1 might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 430-438, 2012.

「細川正清」

9. Suzaki Y, Uemura N, Takada M, Ohyama T, Itohda A, Morimoto T, Imai H, Hamasaki H, Inano A, Hosokawa M, Tateishi M, Ohashi K. The effect of carboxylesterase 1(CES1) polymorphisms on the pharmacokinetics of oseltamivir in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 69, 21-30 (2013).
10. Suzaki Y, Uemura N, Hosokawa M, Ohashi K. Gly143Glu polymorphism of the human carboxylesterase1 gene in an Asian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 69, 735-736 (2012).

「頭金正博」

11. Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y. Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B\*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese.

*Drug Metab Pharmacokinet.* 27,  
447-450 (2012).

H. 学会発表 (22 件)

1. 佐々木崇光、沼田 喜弘、成田 昌代、高橋 昌悟、田中 大、松永 民秀、永田 清：肝特異的転写因子 HNF-6 による薬物代謝酵素発現誘導：新規薬物代謝研究ツールを志向した肝分化 iPS 細胞樹立への応用、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。
2. 熊谷 健、中澤 洋一、野崎 智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。
3. Iwao T、Nagata K、Matsunaga T. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells、19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands)。
4. Takahashi S、Numata Y、Narita M、Tanaka Y、Sasaki T、Matsunaga T、Nagata K. Enhanced expression of Cytochrome P450 genes by hepatocyte nuclear factor-6 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells、19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands)。
5. Ishii Y、Koba H、Oizaki T、Iwamoto Y、Ikushiro S、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. Alteration in the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by Cytochrome P450 3A4: Different susceptibility of UGT isoforms and UGT1A7 variants、19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands)。
6. Miyauchi Y、Ishii Y、Nagata K、Yamazoe Y、Mackenzie PI、Yamada H. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and 1A9 suppress Cytochrome P450 3A4 function: Evidence for the involvement of the cytosolic tail of UGT in the suppression、19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012 (Netherlands)。
7. 小西麻美子、奥崎 恭子、北畠 知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、榊原 明美、鈴木 匡、松永 民秀、頭金正博、細川 正清、大森 栄、永田 清：健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム 2012 年 7 月 (福岡)。
8. 齋藤詩奈子、高橋 昌悟、角間 元美、榊 聡美、伏見 彩、佐々木崇光、永田 清：健康食品によるシトクロム P450 活性阻害の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
9. 齋藤 雄大、笠原 彩、中澤 洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
10. 沼田 喜弘、佐々木崇光、千葉 文博、菅野 高弘、高橋 里菜、吉田美都里、松永 民秀、永田 清：HNF6 導入時期による肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
11. 菅野 高弘、佐々木崇光、沼田 喜弘、千葉 文博、吉田美都里、高橋 里菜、松永 民秀、永田 清：microRNA 導入による肝薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。

12. Miyauchi Y, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. Post-translational regulation of cytochrome P450 3A4 activity through protein-protein interactions with UDP-glucuronosyltransferase 2B7 and 1A9: The UGT domain(s) contributing to the interaction, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
13. Iwao T, Nakamura K, Nagata K, Matsunaga T. Generation of human induced pluripotent stem cell derived enterocytes with peptide transport function, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
14. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Sugiyama R, Sasaki T, Nagata K, Kurose K, Niwa T, Yamaori S, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T. Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from induced pluripotent stem cells, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
15. Nakamura T, Miyauchi Y, Takeda T, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Yuji Ishii Y. Cytochrome P450 3A1 alters the function of UDP-glucuronosyltransferase 2B3 which lacks potential glycosylation sites, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
16. Kinoshita K, Koba H, Miyauchi Y, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Yuji Ishii Y. Cytochrome P450 3A4 alters the affinity of UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms toward UDP-glucuronic acid, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
17. Sasaki T, Numata Y, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Matsunaga T, Nagata K. MicroRNA enhances the expression of *CYP* genes in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
18. Numata Y, Sasaki T, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Kanno S, Nagata K. Identification of a novel transactivation mechanism of the *MRP3* gene, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉).
19. Sasaki T, Numata Y, Takahashi S, Kumagai T, Matsunaga T, Nagata K. Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development, International Symposium for Neurosciences 2013, 2013年2月(仙台).
20. 宮内 優、石井祐次、永田 清、山添康、マッケンジー・ピーター、山田英之: Cytochrome P450 3A4 活性の UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 による抑制: UGT2B7 と calnexin の C 末端 cytosolic tail 置換による抑制作用の消失、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)。
21. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清: HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- $\alpha$  誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と HO-1 の関与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)。
22. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清: 健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)

## G . 知的財産権の出願・登録状況

### 1 . 特許出願

1. 発明の名称: 人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法  
 発明者: 松永民秀、岩尾岳洋、近藤祐樹、吉橋幸美

出願番号: 特願 2012-247010

出願日: 2012 年 11 月 19 日

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

2. 発明の名称：人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法

発明者：松永民秀、岩尾岳洋

出願番号：特願 2013-036434

出願日：2013年2月26日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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）

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

## 研究分担報告書

肝分化 iPS 細胞への肝特異的転写因子の薬物代謝酵素発現に対する影響

研究代表者 永田 清 東北薬科大学 薬学部 教授

研究協力者 高橋 昌悟 東北薬科大学 薬学部 博士後期課程 3 年

研究要旨：ヒト肝細胞は、医薬品開発における薬物動態試験等を行う上で必要不可欠なツールである。しかしながら、十分な細胞数を確保することは困難であり、近年、樹立された人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、新規肝細胞リソースとして期待されている。昨年度、我々は肝分化 iPS 細胞へ HNF6 を導入することにより、CYP3A4 を高発現させることに成功した。そこで、他の肝特異的転写因子(LETf)を HNF6 と共に導入し、薬物代謝酵素発現量の変化を測定した結果、HNF6 と他の LETf の組み合わせにより、多くの CYP 分子種で発現量の増加が認められた。本研究により、LETf の協調作用は、iPS 細胞の肝分化誘導に重要であることが示され、さらに、HNF6 および HNF4 の同時導入では CYP1A2 および CYP3A4 発現量の相乗的な上昇を初めて明らかにした。

### A. 研究目的

我々は、iPS 細胞を胎児肝細胞類似の遺伝子発現パターンを示す細胞まで分化させることに成功した。加えて、HNF6 発現アデノウイルスベクターを用いた分化法により、医薬品代謝に極めて重要な酵素である CYP3A4 を高発現した細胞への分化が可能となった。しかしながら、未だヒト肝細胞と比較して薬物代謝酵素群の発現は低く、その酵素活性も認められなかった。そこで、Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)および CCAAT/ Enhancer Binding Protein (C/EBP) ファミリーに代表される肝特異的転写因子(LETf)に注目した。中でも、HNF6、HNF1、HNF3、HNF3、HNF4 および C/EBP は、互いに協調し合いながら肝細胞において重要な役割を担っている。そこで、本研究では、これらを同時導入することにより、薬物代謝評価系にも応用可能な肝細胞への分化を目指した。

### B. 研究方法

#### ヒト胎児肝細胞(HFL細胞)を用いた LETf 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定

HFL 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cell/well(collagen-coated 24-well plate)で播種し、24 時間後に LETf 発現アデノウイルス(Ad-LETf)を感染させた。72 時間後、細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出を行った。次に、SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa)を用いたリアルタイム PCR 法により、各遺伝子の発現量を測定した。

#### 肝分化 iPS 細胞を用いた LETf 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定および CYP3A4 活性測定

ヒト iPS 細胞を既に確立した肝分化プロトコールに従い、肝分化 iPS 細胞を作製した。

この肝分化誘導中の day 9, day 12, day 15 に各 Ad-LETF を感染させ、day 20 に細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出を行った。次に、SYBR Premix EX Taq (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR 法によりアルブミン (ALB) および P450 発現量の変化を測定した (分化肝細胞における ALB および CYP3A4 の発現量を 1 としたときの相対値を黒から赤のヒートマップで示した)。また、day 19 に Ad-LETF を感染させ、72 時間後に、CYP3A4 の代表的基質であるテストステロン (300  $\mu$ M) を暴露させ、6 時間後の代謝物 (6 $\beta$ -ヒドロキシテストステロン) の濃度を測定した。

### C. 研究結果および考察

#### **HFL 細胞を用いた LETF 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定**

HFL 細胞を用いて、肝細胞マーカーである ALB および CYP3A4 に対する LETF の影響について検討した (図 2.)。ALB においては、HNF1 と HNF6、HNF1 と C/EBP $\beta$ 、HNF3 と HNF6、HNF3 と C/EBP $\beta$ 、HNF4 と HNF6 および HNF6 と C/EBP $\beta$  の組み合わせにより、それぞれ約 11 倍、11 倍、15 倍、31 倍、15 倍および 119 倍の発現量の上昇が認められた。次に、CYP3A4 について検討したところ、HNF1 および C/EBP $\beta$  の単一感染、HNF1 と HNF6、HNF3 と C/EBP $\beta$  および HNF4 と HNF6 の組み合わせ導入により、それぞれ、18 倍、26 倍、54 倍、57 倍および 67 倍の発現量の上昇が認められた。以上、本研究により LETF の 2 種同時導入により、ALB および CYP3A4 発現量を上昇させることが明らかとなった。特に、ALB における HNF6 および C/EBP $\beta$  同時導入、CYP3A4 に対する HNF4 および HNF6 の同時導入においては、他の組み合わせと比較しても、著しい発現上昇効果であり、この発現上昇効果は初めて明らかとなった。これらから、HNF6 は、LETF の相互作用の中でも中心的な役割を担ってい

ることが示唆された。

#### **肝分化 iPS 細胞を用いた LETF 導入による薬物代謝酵素および肝細胞マーカー発現誘導の測定および CYP3A4 活性測定**

iPS 細胞の肝分化過程に Ad-LETF を感染させ、ALB および CYP3A4 への影響を検討した (図 3)。その結果、day 12 おける LETF 導入が、ALB 発現量を上昇させる傾向が認められた。特に、HNF6 および C/EBP $\beta$  の同時導入において、コントロールと比較して約 100 倍の発現量の上昇が認められた。この 2 因子による肝分化 iPS 細胞における ALB の相乗的な上昇は、本研究により得られた初めての知見である。また、HNF1 および HNF6 の同時導入においても顕著な増加が認められた。これらの結果から、HNF6 は他の LETF との同時導入により、肝分化を促進させる可能性が示唆された。続いて、同様に CYP3A4 発現量においても検討した。CYP3A4 においても、感染時期により、LETF による影響が異なることが示唆された。特に、day 9、day 12 における HNF1、HNF3 の同時導入により、11 倍および 23 倍の著しい発現上昇が認められた。また、胎児肝細胞期である Day 15 においては、HNF4 および HNF6 の同時導入により、12 倍の発現量の相乗的な上昇が認められた。この知見も、本研究により初めて明らかとなった。そこで、HNF4 および HNF6 同時導入により CYP3A4 発現量の顕著な増加が認められたことから、肝分化 iPS 細胞における CYP3A4 酵素活性を測定した (図 4)。2 因子同時感染において、ヒト肝細胞の約 2% の CYP3A4 活性を示した。また、データは示せないが肝特異的な発現を示す CYP1A2 の発現量は 1000 倍の上昇が認められた。肝分化 iPS 細胞は、薬物代謝能を有さないことが大きな問題となっているが、HNF4 および HNF6 の導入により、薬物代謝能を有する

細胞へ分化促進できたと考えている。これらの結果からも、HNF6 は、薬物代謝能を有する肝細胞への分化に重要である可能性が示唆された。

#### D. 結論

HNF6 と他の LETF の協調作用は、薬物代謝酵素や肝細胞マーカーの発現調節に寄与している可能性が、HFL 細胞と肝分化 iPS 細胞を用いた検討から明らかとなった。また、HNF4 と HNF6 の胎児肝細胞期の肝分化 iPS 細胞へ導入させることで、CYP3A4 酵素活性を有する細胞へ分化することに成功した。今後は、HNF6 と他の LETF 導入の感染時期や 3 種以上の組み合わせを含めた更なる検討により、薬物代謝能を十分に有した分化肝細胞の確立を目指す。

#### F . 研究発表

( 1 ) 国内 1 件

1. Takahashi S, Miura A, Sasaki H, Sakaguchi S, Nagata K. TNF- $\alpha$ /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of hepatocyte injury. J Tohoku Pharm Univ. 59, 69-74 (2012)

( 2 ) 海外 3 件

- 「永田 清」
2. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Kumagai T, Matsunaga T, Omori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 enhances the expression of the CYP3A4 gene in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 in press
  3. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A Induction by

Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 653-657 (2012).

4. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 Chemical Stabilizer, CoCl<sub>2</sub> and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 398-404 (2012).

2. 著書 3 件

1. 永田 清、化学物質の吸収・排泄経路、衛生薬学 - 健康と環境- 第5版、(平塚明、姫野誠一郎、長沼章、編集) 広川書店、349-355、2012
2. 永田 清、薬物相互作用、薬害・副作用学 第1版、(川西正祐、小野秀樹、賀川義之 編集) 南山堂、2012
3. 坂口修平、高橋昌悟、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしてのTNF- $\alpha$  誘導肝細胞死と酸化ストレス、エンドトキシン・自然免疫研究15 - 飛躍する自然免疫研究-、(筒井ひろこ、小谷穰治、谷 徹、横地高志 編集) 医学図書出版、東京、53-57、2013 .

3. 学会発表 22 件

1. 佐々木崇光、沼田 喜弘、成田 昌代、高橋 昌悟、田中 大、松永 民秀、永田 清：肝特異的転写因子 HNF-6 による薬物代謝酵素発現誘導：新規薬物代謝研究ツールを志向した肝分化 iPS 細胞樹立への応用、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。
2. 熊谷 健、中澤 洋一、野崎 智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月 (仙台)。

3. Iwao T, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells, 19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012( Netherlands ).
4. Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Sasaki T, Matsunaga T, Nagata K. Enhanced expression of Cytochrome P450 genes by hepatocyte nuclear factor-6 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, 19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012( Netherlands ).
5. Ishii Y, Koba H, Oizaki T, Iwamoto Y, Ikushiro S, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. Alteration in the function of the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily by Cytochrome P450 3A4: Different susceptibility of UGT isoforms and UGT1A7 variants, 19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012( Netherlands ).
6. Miyauchi Y, Ishii Y, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B7 and 1A9 suppress Cytochrome P450 3A4 function: Evidence for the involvement of the cytosolic tail of UGT in the suppression, 19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting, June 2012 ( Netherlands ).
7. 小西麻美子、奥崎 恭子、北畠 知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、  
 榊原 明美、鈴木 匡、松永 民秀、頭金 正博、細川 正清、大森 栄、永田 清：健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム 2012 年 7 月 (福岡)。
8. 齋藤詩奈子、高橋 昌悟、角間 元美、榊 聡美、伏見 彩、佐々木崇光、永田 清：健康食品によるシトクロム P450 活性阻害の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
9. 齋藤 雄大、笠原 彩、中澤 洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
10. 沼田 喜弘、佐々木崇光、千葉 文博、菅野 高弘、高橋 里菜、吉田美都里、松永 民秀、永田 清：HNF6 導入時期による肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
11. 菅野 高弘、佐々木崇光、沼田 喜弘、千葉 文博、吉田美都里、高橋 里菜、松永 民秀、永田 清：microRNA 導入による肝薬物代謝酵素発現への影響、第 51 回日本薬学会東北支部退会、2012 年 10 月 (青森)。
12. Miyauchi Y, Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, Yamada H. Post-translational regulation of cytochrome P450 3A4 activity through protrin-protein interactions with UDP-glucuronosyltransferase 2B7 and 1A9: The UGT domain(s) contributing to the interaction, 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, November 2012 (千葉)。
13. Iwao T, Nakamura K, Nagata K, Matsunaga T. Generation of human induced pluripotent stem cell



- derived enterocytes with peptide transport function、27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting、November 2012 (千葉)。
14. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Sugiyama R, Sasaki T, Nagata K, Kurose K, Niwa T, Yamaori S, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T. Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from induced pluripotent stem cells、27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting、November 2012 (千葉)。
  15. Nakamura T, Miyauchi Y, Takeda T, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Cytochrome P450 3A1 alters the function of UDP-glucuronosyltransferase 2B3 which lacks potential glycosylation sites、27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting、November 2012 (千葉)。
  16. Kinoshita K, Koba H, Miyauchi Y, Ikushiro S, Yamazoe Y, Nagata K, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y. Cytochrome P450 3A4 alters the affinity of UDP-glucuronosyltransferase 1A isoforms toward UDP-glucuronic acid、27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting、November 2012 (千葉)。
  17. Sasaki T, Numata Y, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Matsunaga T, Nagata K. MicroRNA enhances the expression of *CYP* genes in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells、27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting、November 2012 (千葉)。
  18. Numata Y, Sasaki T, Kanno T, Chiba F, Takahashi R, Yoshida M, Kanno S, Nagata K. Identification of a novel transactivation mechanism of the *MRP3* gene、27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting、November 2012 (千葉)。
  19. Sasaki T, Numata Y, Takahashi S, Kumagai T, Matsunaga T, Nagata K. Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development、International Symposium for Neurosciences 2013、2013年2月(仙台)。
  20. 宮内 優、石井祐次、永田 清、山添 康、マッケンジー・ピーター、山田英之：Cytochrome P450 3A4 活性の UDP-glucurinosyltransferase (UGT) 2B7 による抑制：UGT2B7 と calnexin の C 末端 cytosolic tail 置換による抑制作用の消失、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)。
  21. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清：HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- 誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と H0-1 の関与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)。
  22. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清：健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)。

## 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

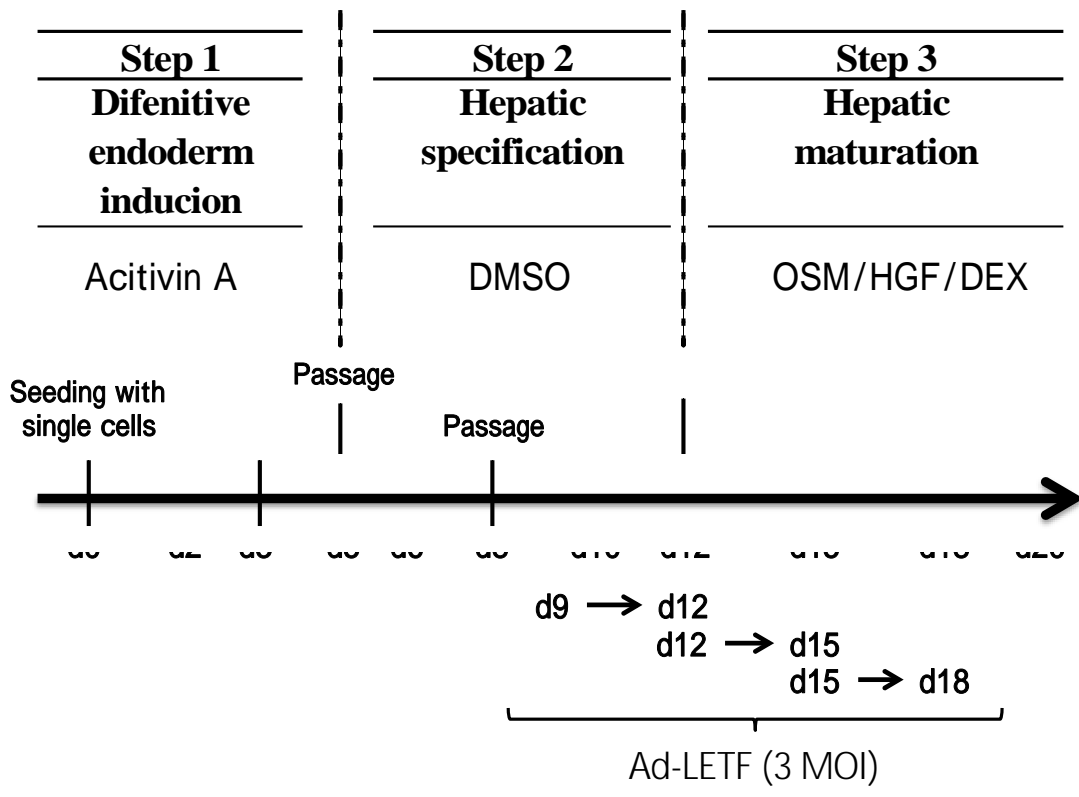


図1. iPS細胞の肝分化誘導およびAd-LETf感染プロトコール

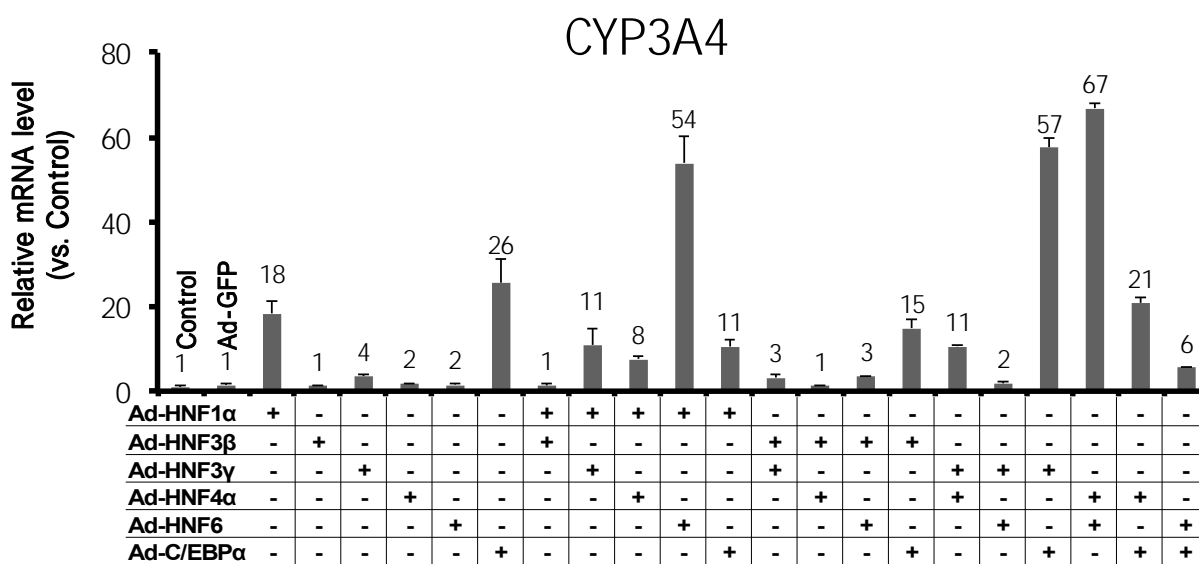
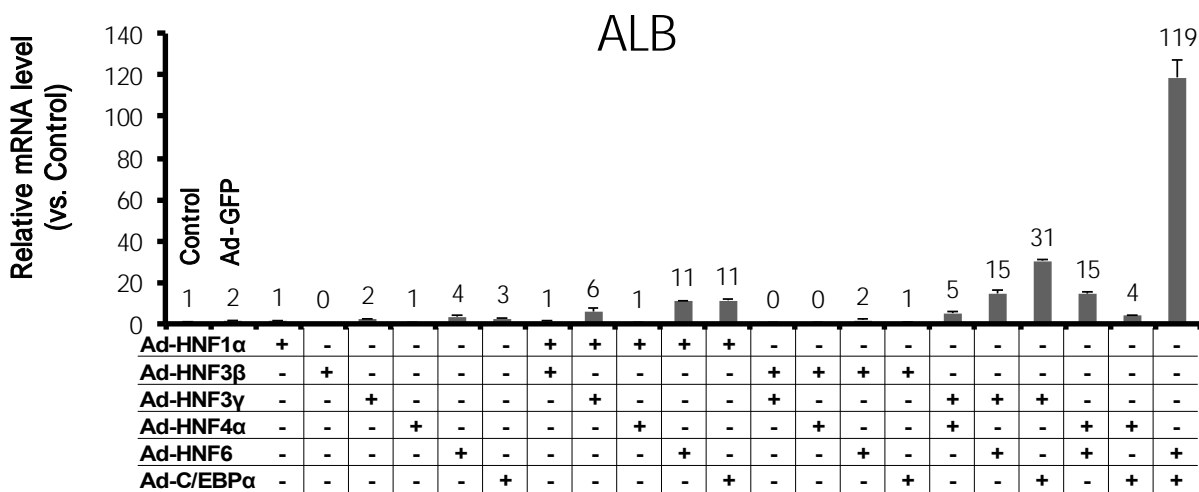


図2. HFL細胞におけるLETf導入によるALBおよびCYP3A4への影響

## ALB

アデノウイルス感染時期

day 9→12 12→15 15→18

0.0	0.0	0.0	iPS細胞
1.0	1.0	1.0	分化肝細胞
3.7	3.2	0.7	GFP
5.0	17	0.8	HNF1α
0.9	2.7	1.7	HNF3β
2.8	5.5	1.0	HNF3γ
6.0	6.0	0.8	HNF4α
4.0	26	0.9	HNF6
4.2	28	2.4	C/EBPα
0.4	14	0.0	HNF1α + HNF3β
1.4	19	1.6	HNF1α + HNF3γ
1.5	24	1.3	HNF1α + HNF4α
0.4	33	1.6	HNF1α + HNF6
5.0	58	2.9	HNF1α + C/EBPα
1.5	0.9	1.4	HNF3β + HNF3γ
1.7	1.7	6.8	HNF3β + HNF4α
0.6	9.5	8.9	HNF3β + HNF6
0.4	22	37	HNF3β + C/EBPα
1.5	4.1	0.8	HNF3γ + HNF4α
0.2	26	0.7	HNF3γ + HNF6
1.4	26	3.1	HNF3γ + C/EBPα
1.4	37	0.9	HNF4α + HNF6
1.4	7.9	2.7	HNF4α + C/EBPα
1.2	98	3.4	HNF6 + C/EBPα



## CYP3A4

アデノウイルス感染時期

day 9→12 12→15 15→18

0.0	0.2	0.1	iPS細胞
1.0	1.0	1.0	分化肝細胞
0.5	0.7	0.6	GFP
5.3	2.4	2.6	HNF1α
5.5	3.0	1.4	HNF3β
2.2	2.2	0.9	HNF3γ
1.7	1.9	1.5	HNF4α
2.0	1.6	1.8	HNF6
3.6	3.5	3.0	C/EBPα
11	23	3.5	HNF1α + HNF3β
5.0	6.9	2.4	HNF1α + HNF3γ
3.0	2.3	3.3	HNF1α + HNF4α
2.9	7.9	3.5	HNF1α + HNF6
5.1	2.9	2.9	HNF1α + C/EBPα
2.0	4.1	1.2	HNF3β + HNF3γ
2.3	2.6	1.3	HNF3β + HNF4α
1.9	5.3	2.0	HNF3β + HNF6
7.2	6.1	3.0	HNF3β + C/EBPα
1.4	1.3	1.1	HNF3γ + HNF4α
2.0	3.5	1.6	HNF3γ + HNF6
5.5	6.7	2.1	HNF3γ + C/EBPα
1.8	1.3	12	HNF4α + HNF6
5.1	4.2	7.0	HNF4α + C/EBPα
3.0	3.5	2.7	HNF6 + C/EBPα



図3. 肝分化iPS細胞におけるLETf導入によるALBおよびCYP3A4への影響

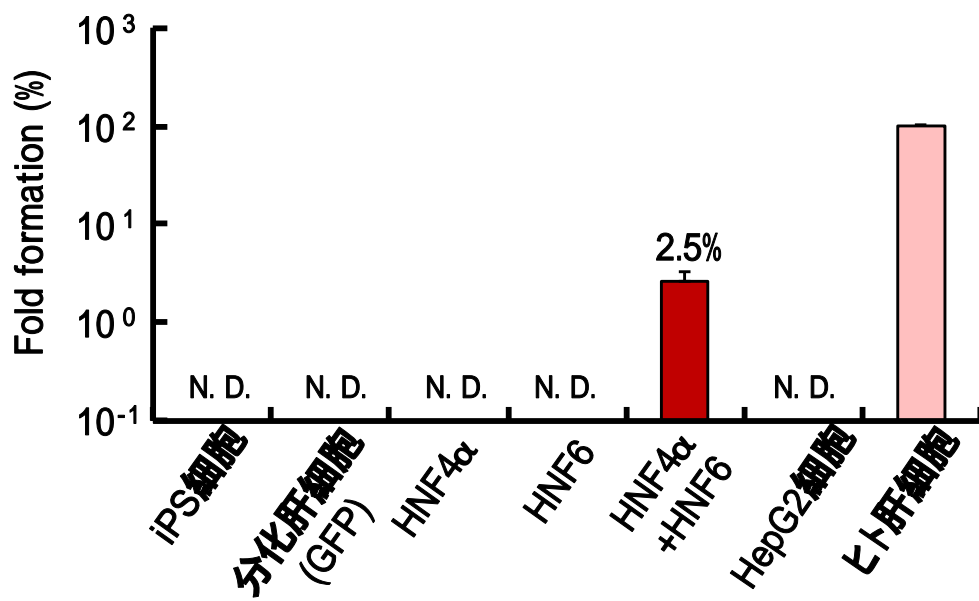


図4. 肝分化iPS細胞におけるLETf導入によるCYP3A4酵素活性への影響

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）

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

## 研究分担報告書

### 健康食品使用実態調査で使用が確認された健康食品による酵素誘導調査

研究代表者 永田 清 東北薬科大学・教授

研究協力者 熊谷 健 東北薬科大学・講師

研究要旨：本研究では、健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目的に調剤薬局を対象に行った「健康食品使用実態アンケート調査」の結果から、使用が確認された健康食品のヒトにおける主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 に対する誘導能を検討した。健康食品 176 製品について CYP3A4 レポーター活性を測定した結果、44 製品について製品間で差はあるもののレポーター活性の上昇が認められた（陽性率：25%）。特にダイエット系健康食品やウコン含有健康食品においてレポーター活性の顕著な上昇が認められた。また、176 健康食品中 35 製品について細胞数の減少が観察された。これらの結果より、ダイエット系健康食品やウコン含有健康食品の使用は、医薬品間との相互作用を惹起する可能性が示唆された。

#### A．研究目的

いわゆる「健康食品」には法的な規制が無く、食品扱いであるため安全性や有効性が明確でない。中でも、健康食品の服用による医薬品との相互作用の可能性が強く危惧されている。薬物相互作用は薬理的相互作用と薬物動態学的相互作用に大別されるが、薬物代謝酵素が関与する薬物相互作用の多くは薬物動態学的相互作用であり、中でもシトクロム P450 (CYP) をはじめとする薬物代謝酵素による代謝反応を介したものが多。従って健康食品と医薬品との相互作用を予測し回避するためには、健康食品による薬物代謝酵素活性への影響評価を行うことが求められている。しかしながら、現在日本国内で入手可能な健康食品は相当数に上っていることから、これら健康食品の薬物代謝酵素活性への影響評価を行うにはまず健康食品の使用実態の把握が重要となる。このことから健康食品と医薬品における相互作用解明を目的に調剤薬局の来局患者を対象とした健康食品の使用実態に関するアンケート調査を行い、得られた約 1000 件のアンケート結果から約 243 製品の健康食

品の使用が確認された。そこで本研究では、健康食品の使用実態アンケート調査で使用が確認された健康食品についてヒトにおける主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 に対する酵素誘導評価を行った。

#### B．研究方法

##### 実験材料

健康食品は、1 日推奨使用量を 10 mL の H<sub>2</sub>O 又は 70%EtOH 中で 37℃、2h 抽出後、遠心を行い、上清画分を健康食品抽出試料として用いた。細胞は、ヒト肝がん由来の HepG2 細胞および 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。

##### 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、3-1-10 細胞を 48-well プレートに播種し、10% FBS-DMEM 中、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養後、健康食品抽出試料含有培地に交換、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 ) 後、上清 (20  $\mu$ l) 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。また評価は CYP3A4 を誘導することが知られている rifampicin (RIF) の 1  $\mu$ M 処理時におけるレポーター活性を 100% とした時の相対活性値を算出し、健康食品抽出試料の添加量に依存的で RIF 1  $\mu$ M 処理時のレポーター活性の 30% 以上のレポーター活性を示した健康食品を CYP3A4 誘導活性有りと判定した。

### **細胞増殖への影響**

細胞毒性は、健康食品添加培地で 48 時間後、光学顕微鏡下で形態観察を行い、細胞数の減少が観察された健康食品について影響有りと評価した。

## **C. 研究結果および考察**

### **健康食品による CYP3A4 誘導能**

健康食品の使用実態アンケート調査で使用が確認された健康食品 176 製品について CYP3A4 レポーター活性を測定した結果、44 製品について製品間で差はあるもののレポーター活性の上昇が認められた (陽性率: 25%)。中でもすでに 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その他、ダイエット系健康食品やウコン含有健康食品において臨床で使用されている医薬品で CYP3A4 を強く誘導することが明らかとなっている RIF (1  $\mu$ M) と同程度またはそれ以上の強いレポーター活性を示す製品が認められた (図 1) (図の中の ND は、細胞増殖抑制のために活性の測定ができなかった)。従って、市販されているこれら健康食品の服用は、CYP3A4 を誘導し、薬物間相互作用を引き起こす可能性が示唆された。またマルチビタミン製品については、同様の効果を示す各社健康食品間でレ

ポーター活性の上昇に差が認められたことから (図 2)、各社のマルチビタミン製品に含有される成分の種類や含有量などがレポーター活性の上昇に関与していることが考えられた。さらに抽出溶媒によるレポーター活性への影響を検討した結果、レポーター活性の上昇を示したほとんどの健康食品において 70% EtOH 抽出群の方が H<sub>2</sub>O 抽出群に比べ強いレポーター活性を示したことから、健康食品に含有される CYP3A4 誘導成分の多くが脂溶性である可能性が考えられた。

以上の結果より、多くの健康食品が CYP3A4 を誘導することが示唆された。また健康食品による CYP3A4 誘導には、健康食品に含有する複数の成分が関与している可能性が示唆された。

### **健康食品による細胞増殖への影響**

健康食品の細胞増殖への影響を顕微鏡下における形態学的観察で検討した結果、検討した 176 健康食品中 35 製品について細胞数の減少が観察された。

## **D. 結論**

本研究の結果から、新たに CYP3A4 遺伝子発現を誘導する健康食品が認められ、特にダイエット系健康食品やウコン含有健康食品は CYP3A4 に対する強い誘導活性を示したことから、これら健康食品の使用によって医薬品間との相互作用を惹起する可能性が示唆された。

## **E. 研究発表**

### **1. 論文発表**

1. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, Ohmori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of *CYP3A4* in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.

*Drug Metab. Pharmacokinet.* In press.

## 2. 著書

1. 坂口修平、高橋昌悟、熊谷 健、佐々木崇光、永田 清、敗血症モデルとしての TNF- $\alpha$  誘導肝細胞死と酸化ストレス、エンドトキシン・自然免疫研究 15- 飛躍する自然免疫研究-、(筒井ひろこ、小谷穰治、谷 徹、横地高志 編集)、医学図書出版、東京、53-57、2012.

## 3. 学会発表

1. 熊谷 健、中澤洋一、野崎智紀、佐々木崇光、永田 清：消化管における薬物動態関連遺伝子の発現誘導評価系の構築、平成 24 年度東北薬科大学 創薬研究センターシンポジウム、2012 年 5 月(仙台)。

2. 小西麻美子、奥崎恭子、北畠知美、佐藤 裕、佐々木崇光、熊谷 健、榊原明美、鈴木 匡、松永民秀、頭金正博、細川正清、大森 栄、永田 清：健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態調査、医療薬学フォーラム 2012 第 20 回クリニカルフォーラムシンポジウム、2012 年 7 月(福岡)。

3. 齋藤雄大、笠原 彩、中澤洋一、熊谷 健、永田 清：健康食品による CYP3A4 遺伝子発現誘導の検討、第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012 年 10 月(青森)。

4. Sasaki T、Numata Y、Takahashi S、Kumagai T、Matsunaga T、Nagata K .Hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells by using factors involved in liver function and development . International Symposium for Neurosciences 2013、February 2013 (仙台)。

5. 坂口修平、佐々木 瞳、高橋昌悟、佐々木崇光、熊谷 健、永田 清：HepG2 細胞を用いた鉄存在下 actinomycin D による TNF- 誘導肝細胞死に対する NO の防御効果と HO-1 の関

与、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)。

6. 熊谷 健、笠原 彩、齋藤雄大、永田 清：健康食品による CYP1A1/1A2 遺伝子発現誘導の検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月(横浜)。

## 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



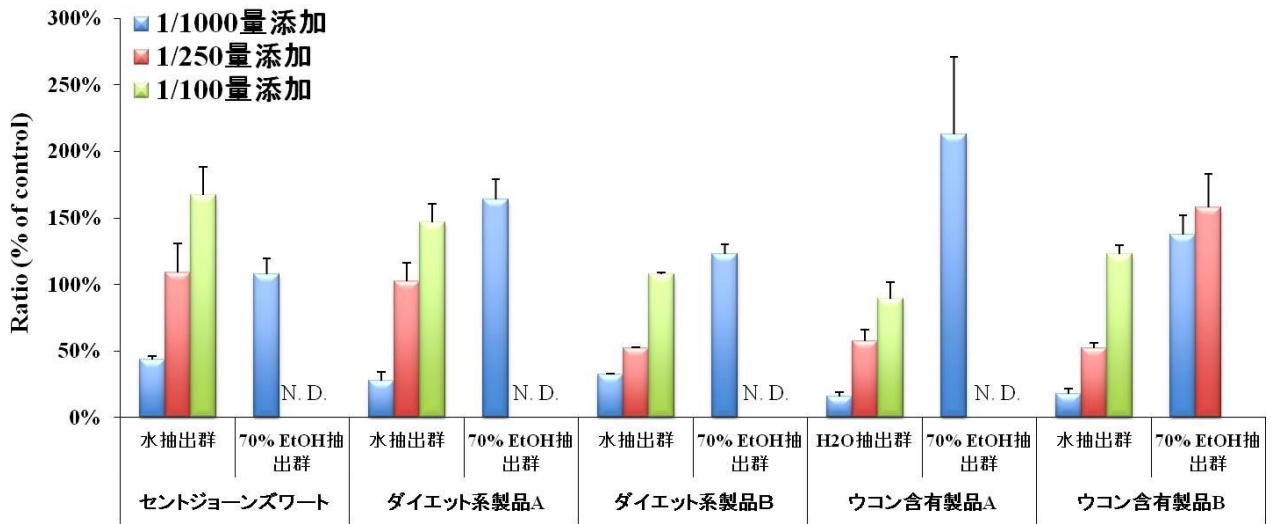


図1 RIF 1  $\mu$ Mと同程度の誘導活性を示した健康食品.各健康食品抽出物添加群の結果は、RIF 1  $\mu$ M処理時のレポーター活性を100%とした時の相対活性値として評価した.

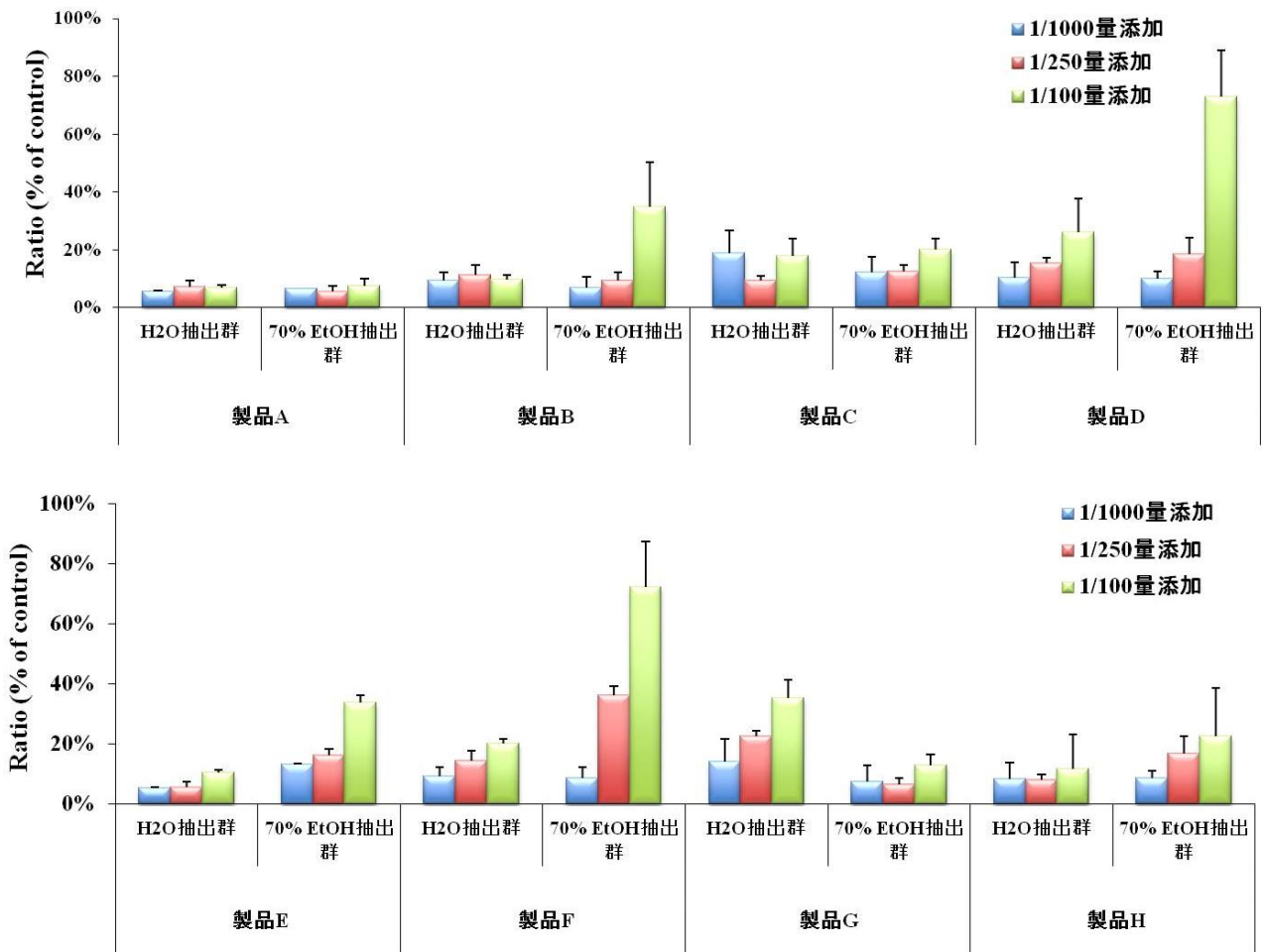


図2 マルチビタミン製品間によるCYP3A4誘導能の比較.各健康食品抽出物添加群の結果は、RIF 1  $\mu$ M処理時のレポーター活性を100%とした時の相対活性値として評価した.

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）

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

## 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

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

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、昨年度は標準的なプロトコールの作成を行った。本年度はこの標準的なプロトコールに基づいて、CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（3-1-10 細胞）に関しては、24 穴プレートに各々  $1 \times 10^5$  cells/well で、CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞株）に関しては、24 穴プレートに各々  $5 \times 10^4$  cells/well になるように播種し、24 時間後に健康食品を添加した。健康食品添加 48 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 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うとともに、市販のサプリメントを用いて酵素誘導の有無を調べた。

#### B．研究方法

細胞：本実験に用いた細胞は、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（3-1-10 細胞）および、CYP1A1/1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞株）を用いた。

#### ルシフェラーゼアッセイ（CYP3A4）

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  $1 \times 10^5$  cells/well になる

よう 10% FBS-DMEM 中 (NEAA, pen-st) で調製し、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ことで、誘導剤および健康食品抽出液の曝露を開始した。薬物曝露 48 時間後に、培地を除去後 PBS で 2 回洗浄を行った後、1xPBL を 0.1 mL/well それぞれ添加した。室温でプレートを 160 rpm で 30 分間振とうした後、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 x g、2 分間遠心を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。上清 20 μL に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25 μL を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turner designs, Sunnyvale, CA, USA) により測定した。

#### ルシフェラーゼアッセイ（CYP1A1）

CYP1A1/1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 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。

5-1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ことで、誘導剤および健康食品抽出液の曝露を開始した。薬物曝露 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 rpm で 30 分間振とうした後、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 x g, 2 分間遠心を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。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 (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、750 nm 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)市販の健康食品を用いた酵素誘導の検討 (3-1-10細胞)

ヒト CYP3A4 の応答配列を組み込んだ 3-1-10細胞を用いて健康食品による酵素誘導を調べた結果、表 1 に示したように、51 種類の健康食品の中で酵素誘導効果が 2 倍以上のものは、36 種類あった。これは使用した健康食品の 70% となった。また、リファンピシンの酵素誘導を基準にして、酵

素誘導が 10 倍以上のものは、13 品種であり、これらの健康食品はリファンピシンと同様に薬物相互作用に注意する必要があると考えられた。

#### 2)市販の健康食品を用いた酵素誘導の検討 (5-1細胞)

ヒト CYP1A1/1A2 の応答配列を組み込んだ 5-1細胞を用いて健康食品に取る酵素誘導を調べた結果、表 2 に示したように、51 種類の健康食品の中で酵素誘導効果が 2 倍以上のものは、34 種類あった。これは使用した健康食品の 66.6% であった。また、オメプラゾールの酵素誘導を基準にして、酵素誘導が 8 倍以上のものは、9 品種であり、これらの健康食品は薬物相互作用を引き起こす可能性が示唆された。また、1) の結果と合わせて、4 種は、CYP3A4 と CYP1A1/1A2 を同時に誘導する可能性が示唆されており、薬物相互作用に注意が必要である。

### **E . 結論**

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検討した結果、CYP3A4 と CYP1A1/1A2 の酵素誘導に関しては、標準的なプロトコールが完成した。この完成したプロトコールを用いて、市販の健康食品の中から、使用頻度が高いものを抽出し、酵素誘導を調べた結果、予想よりも多くの健康食品で酵素誘導が認められ、中にはセントジューズワートよりも酵素誘導能が高いものも認められた。これらの結果を踏まえて、今後は特に強く誘導された健康食品の成分の中で、酵素誘導の原因の成分を特定する必要があるものと考えられた。

## **F . 研究発表**

### 1. 論文発表

1. Suzuki Y, Uemura N, Takada M, Ohyama T, Itohda A, Morimoto T, Imai H, Hamasaki H, Inano A, Hosokawa M, Tateishi M, Ohashi K. The effect of carboxylesterase 1 (CES1) polymorphisms on the pharmacokinetics of oseltamivir in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 69、 21-30 (2013)

2. Suzuki Y, Uemura N, Hosokawa M, Ohashi K. Gly143Glu polymorphism of the human carboxylesterase1 gene in an Asian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 69,735-736 (2013)

## **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

表1 3-1-10 細胞 (CYP3A4) を用いた市販のサプリメントの酵素誘導効果

		Fold of Induction			Fold of Induction
Rifampicin	(P.C) 0.1 $\mu$ M-Rifampicin	1.248	製品6	1/1000添加量	1.243
	(P.C) 0.4 $\mu$ M-Rifampicin	2.015		1/250添加量	1.001
	(P.C) 1.0 $\mu$ M-Rifampicin	11.144		1/100添加量	1.890
製品1	1/1000添加量	14.425	製品7	1/1000添加量	1.184
	1/250添加量	35.868		1/250添加量	2.537
	1/100添加量	11.444		1/100添加量	1.990
製品2	1/1000添加量	1.543	製品8	1/1000添加量	3.265
	1/250添加量	4.663		1/250添加量	1.687
	1/100添加量	22.165		1/100添加量	8.609
製品3	1/1000添加量	0.953	製品9	1/1000添加量	7.776
	1/250添加量	11.167		1/250添加量	1.949
	1/100添加量	8.912		1/100添加量	11.710
製品4	1/1000添加量	1.246	製品10	1/1000添加量	2.934
	1/250添加量	4.967		1/250添加量	2.273
	1/100添加量	24.748		1/100添加量	2.400
製品5	1/1000添加量	3.369	製品11	1/1000添加量	7.395
	1/250添加量	16.367		1/250添加量	2.349
	1/100添加量	28.265		1/100添加量	3.641

製品12	1/1000添加量	0.794	製品19	1/1000添加量	2.263
	1/250添加量	1.400		1/250添加量	3.284
	1/100添加量	1.839		1/100添加量	10.825
製品13	1/1000添加量	1.474	製品20	1/1000添加量	3.229
	1/250添加量	0.840		1/250添加量	2.302
	1/100添加量	1.081		1/100添加量	2.764
製品14	1/1000添加量	0.764	製品21	1/1000添加量	3.040
	1/250添加量	1.017		1/250添加量	7.134
	1/100添加量	1.105		1/100添加量	17.321
製品15	1/1000添加量	0.784	製品22	1/1000添加量	2.377
	1/250添加量	0.895		1/250添加量	2.006
	1/100添加量	0.817		1/100添加量	3.009
製品16	1/1000添加量	1.046	製品23	1/1000添加量	1.866
	1/250添加量	1.485		1/250添加量	8.579
	1/100添加量	1.819		1/100添加量	-4.251
製品17	1/1000添加量	0.992	製品24	1/1000添加量	2.143
	1/250添加量	1.037		1/250添加量	1.934
	1/100添加量	1.314		1/100添加量	7.371
製品18	1/1000添加量	1.119	製品25	1/1000添加量	2.171
	1/250添加量	1.021		1/250添加量	2.227
	1/100添加量	2.634		1/100添加量	5.234

製品26	1/1000添加量	2.926	製品33	1/1000添加量	1.996
	1/250添加量	2.522		1/250添加量	1.660
	1/100添加量	3.707		1/100添加量	2.328
製品27	1/1000添加量	25.724	製品34	1/1000添加量	2.258
	1/250添加量	1.944		1/250添加量	2.456
	1/100添加量	5.383		1/100添加量	6.472
製品28	1/1000添加量	18.087	製品35	1/1000添加量	1.233
	1/250添加量	4.763		1/250添加量	1.408
	1/100添加量	-41.120		1/100添加量	3.892
製品29	1/1000添加量	2.960	製品36	1/1000添加量	1.564
	1/250添加量	2.939		1/250添加量	1.505
	1/100添加量	11.046		1/100添加量	2.691
製品30	1/1000添加量	2.278	製品37	1/1000添加量	1.115
	1/250添加量	4.208		1/250添加量	1.270
	1/100添加量	29.145		1/100添加量	2.625
製品31	1/1000添加量	2.216	製品38	1/1000添加量	0.969
	1/250添加量	1.438		1/250添加量	0.889
	1/100添加量	25.693		1/100添加量	1.891
製品32	1/1000添加量	0.840	製品39	1/1000添加量	0.917
	1/250添加量	0.727		1/250添加量	0.887
	1/100添加量	1.116		1/100添加量	1.271

製品40	1/1000添加量	1.187	製品46	1/1000添加量	0.946
	1/250添加量	0.779		1/250添加量	1.358
	1/100添加量	1.306		1/100添加量	1.488
製品41	1/1000添加量	1.094	製品47	1/1000添加量	1.122
	1/250添加量	1.598		1/250添加量	1.528
	1/100添加量	5.390		1/100添加量	2.574
製品42	1/1000添加量	1.057	製品48	1/1000添加量	2.691
	1/250添加量	0.903		1/250添加量	1.810
	1/100添加量	1.427		1/100添加量	4.598
製品43	1/1000添加量	0.875	製品49	1/1000添加量	2.863
	1/250添加量	0.786		1/250添加量	3.345
	1/100添加量	1.329		1/100添加量	4.519
製品44	1/1000添加量	0.912	製品50	1/1000添加量	1.151
	1/250添加量	1.571		1/250添加量	1.732
	1/100添加量	-11.001		1/100添加量	4.253
製品45	1/1000添加量	1.481	製品51	1/1000添加量	1.445
	1/250添加量	1.917		1/250添加量	1.746
	1/100添加量	2.437		1/100添加量	2.368

表2 5-1 細胞 (CYP1A1) を用いた市販のサプリメントの酵素誘導効果

		Fold of Induction			Fold of Induction
4 μ M-Omeprazole	オメプラゾール 1/250(4 μ M)	7.848	製品6	1/1000添加量	1.788
				1/250添加量	1.954
				1/100添加量	1.392
製品1	1/1000添加量	1.379	製品7	1/1000添加量	0.785
	1/250添加量	<b>4.560</b>		1/250添加量	1.441
	1/100添加量	<b>-69.655</b>		1/100添加量	1.365
製品2	1/1000添加量	1.431	製品8	1/1000添加量	<b>3.246</b>
	1/250添加量	1.905		1/250添加量	7.121
	1/100添加量	<b>2.686</b>		1/100添加量	<b>8.127</b>
製品3	1/1000添加量	1.253	製品9	1/1000添加量	1.592
	1/250添加量	2.712		1/250添加量	<b>2.436</b>
	1/100添加量	8.937		1/100添加量	<b>2.944</b>
製品4	1/1000添加量	2.880	製品10	1/1000添加量	1.507
	1/250添加量	<b>4.464</b>		1/250添加量	<b>2.984</b>
	1/100添加量	<b>11.793</b>		1/100添加量	<b>2.738</b>
製品5	1/1000添加量	1.050	製品11	1/1000添加量	1.575
	1/250添加量	1.762		1/250添加量	<b>2.168</b>
	1/100添加量	4.587		1/100添加量	<b>2.841</b>

製品12	1/1000添加量	<b>4.304</b>	製品19	1/1000添加量	0.862
	1/250添加量	1.678		1/250添加量	1.350
	1/100添加量	<b>2.216</b>		1/100添加量	1.775
製品13	1/1000添加量	1.125	製品20	1/1000添加量	<b>3.483</b>
	1/250添加量	1.616		1/250添加量	<b>8.539</b>
	1/100添加量	<b>2.249</b>		1/100添加量	<b>2.024</b>
製品14	1/1000添加量	1.688	製品21	1/1000添加量	1.938
	1/250添加量	<b>2.753</b>		1/250添加量	<b>2.376</b>
	1/100添加量	<b>6.899</b>		1/100添加量	<b>3.943</b>
製品15	1/1000添加量	2.369	製品22	1/1000添加量	0.776
	1/250添加量	<b>2.390</b>		1/250添加量	1.425
	1/100添加量	1.884		1/100添加量	1.274
製品16	1/1000添加量	0.872	製品23	1/1000添加量	0.606
	1/250添加量	0.960		1/250添加量	1.906
	1/100添加量	1.339		1/100添加量	<b>66.102</b>
製品17	1/1000添加量	0.006	製品24	1/1000添加量	0.905
	1/250添加量	0.015		1/250添加量	0.707
	1/100添加量	0.003		1/100添加量	1.410
製品18	1/1000添加量	1.273	製品25	1/1000添加量	0.828
	1/250添加量	<b>2.796</b>		1/250添加量	1.689
	1/100添加量	<b>3.117</b>		1/100添加量	<b>4.586</b>

製品26	1/1000添加量	0.798	製品33	1/1000添加量	0.004
	1/250添加量	1.244		1/250添加量	0.011
	1/100添加量	<b>2.426</b>		1/100添加量	0.011
製品27	1/1000添加量	1.253	製品34	1/1000添加量	1.356
	1/250添加量	0.894		1/250添加量	1.576
	1/100添加量	1.490		1/100添加量	<b>3.097</b>
製品28	1/1000添加量	<b>3.295</b>	製品35	1/1000添加量	<b>2.118</b>
	1/250添加量	<b>5.874</b>		1/250添加量	<b>2.632</b>
	1/100添加量	<b>166.787</b>		1/100添加量	<b>4.778</b>
製品29	1/1000添加量	1.264	製品36	1/1000添加量	1.490
	1/250添加量	1.535		1/250添加量	<b>3.142</b>
	1/100添加量	1.649		1/100添加量	<b>2.811</b>
製品30	1/1000添加量	1.602	製品37	1/1000添加量	1.938
	1/250添加量	1.791		1/250添加量	<b>2.376</b>
	1/100添加量	<b>3.103</b>		1/100添加量	<b>3.943</b>
製品31	1/1000添加量	1.541	製品38	1/1000添加量	<b>2.999</b>
	1/250添加量	<b>2.278</b>		1/250添加量	0.916
	1/100添加量	<b>2.632</b>		1/100添加量	0.993
製品32	1/1000添加量	1.363	製品39	1/1000添加量	0.006
	1/250添加量	1.998		1/250添加量	0.008
	1/100添加量	<b>2.708</b>		1/100添加量	0.020

製品40	1/1000添加量	2.185	製品46	1/1000添加量	0.990
	1/250添加量	3.508		1/250添加量	1.532
	1/100添加量	3.592		1/100添加量	1.407
製品41	1/1000添加量	1.687	製品47	1/1000添加量	0.850
	1/250添加量	2.504		1/250添加量	2.025
	1/100添加量	8.987		1/100添加量	2.499
製品42	1/1000添加量	0.960	製品48	1/1000添加量	0.006
	1/250添加量	1.048		1/250添加量	0.008
	1/100添加量	1.679		1/100添加量	0.009
製品43	1/1000添加量	0.789	製品49	1/1000添加量	1.395
	1/250添加量	1.183		1/250添加量	1.924
	1/100添加量	1.482		1/100添加量	1.790
製品44	1/1000添加量	0.734	製品50	1/1000添加量	5.535
	1/250添加量	2.134		1/250添加量	7.042
	1/100添加量	1.635		1/100添加量	43.045
製品45	1/1000添加量	2.421	製品51	1/1000添加量	26.868
	1/250添加量	4.014		1/250添加量	21.467
	1/100添加量	4.993		1/100添加量	24.126



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）

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

## 研究分担報告書

### いわゆる「健康食品」と医薬品との併用実態に関する調査研究

研究分担者 頭金 正博 名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授

研究分担者 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 大森 栄 信州大学医学部附属病院薬剤部・教授/薬剤部長

研究協力者 百瀬 泰行 信州大学医学部附属病院薬剤部・副薬剤部長

研究要旨： 健康食品と医薬品との相互作用を回避するためには、それらの使用実態を明らかにすることが必要である。そこで、信州大学医学部附属病院における入院時の持参薬及び健康補助食品の摂取状況調査の情報を用いて、患者での健康食品と医薬品の併用の実態を調査した。その結果、健康食品の使用実態としては、グルコサミンやブルーベリー系が比較的多く使用されており、また、医薬品としてはアムロジピンが多く併用されていた。少数例ではあるが中程度以上の健康被害（特に血液凝固系に係わる健康被害）を生じる可能性のある併用例もみられた。また、健康食品の摂取に影響を与える要因としては、一部で入院の原因となった原疾患の影響が見られたが、多くの場合は、性別や年齢によって影響を受けていると考えられた。

#### A. 研究目的

サプリメントや栄養補助食品等のいわゆる「健康食品」は、食品として取り扱われるため、医薬品と異なり、それらの使用については消費者の判断に委ねられ、規制する法律等はない。また、使用実態についてもほとんど把握されていない。一方、サプリメントや栄養補助食品であっても、一定の生理的、あるいは薬理的作用を有するものもあり、生理機能が低下している患者や、医薬品を服用している患者においては、想定外の健康被害が生じる可能性もある。特に、医薬品と同時に服用する場合は、これらの健康食品と医薬品との相互作用が懸念される。そこで、健康食品と医薬品との相互作用を回避するためには、まず

その使用状況の実態を明らかにすることが求められている。本研究においては、信州大学医学部附属病院における入院時の持参薬（服用中及び服用経験のある医薬品及び健康食品、以下持参薬という）の摂取状況調査の情報を用いて、患者での健康食品の使用状況と同時期に服薬している医薬品の種類を調べた。また、健康食品を摂取している患者の背景要因を調べ、健康食品の摂取に与える患者背景要因の影響を検討した。本研究は、調査結果が入力されたカルテ調査を主たる研究とした後ろ向き観察研究である。

#### B. 研究方法

本調査研究においては、信州大学医学部附属病院の電子カルテに記入されている

入院患者の情報（年齢、性別、原疾患名、持参した健康食品名及び持参あるいは処方された医薬品名、薬剤アレルギー・副作用に関する診療情報、血液・生化学検査値）を用いた。平成 22 年 9 月 1 日～平成 24 年 9 月 30 日までに信州大学医学部附属病院に新規入院した全ての患者のうち、薬剤師による入院時のチェックで健康食品摂取が申告された 790 名を調査対象患者とした。これらの患者の電子カルテ情報から、匿名化された患者 ID とともに、年齢、性別、診療科、入院時診断名、健康食品の名称と成分、服薬していた医薬品名を抽出した。この情報を用いて、健康食品と医薬品を併用している患者数や、健康食品を摂取している患者の背景要因の影響を検討した。

（研究倫理上の配慮）

本調査の実施については、研究代表者である東北薬科大学と実地調査を担当する名古屋市立大学、信州大学の研究倫理委員会等で承認された後に実施された。

## C. 研究結果

### **健康食品と医薬品の併用実態**

790 名の患者を対象にした調査において、最も使用されている健康食品はグルコサミン（125 名）であり、続いてブルーベリー系食品（107 名）であった。その他にも表 1 に示すように使用されている健康食品は多岐に亘っていた。一方、健康食品を使用している患者で併用されている医薬品はカルシウム拮抗薬のアムロジピン（127 名）が最も多かったが、併用薬も多岐に亘っていた。また、健康食品毎に併用されている医薬品を調べた（表 2）。その結果、いずれの健康食品においても、アムロジピンや酸化マグネシウムが多く併用されており、これら 2 剤は健康食品の摂取

に係わらず高頻度で使用されているためと考えられた。一方、全対象患者での使用頻度と比較して 2 倍以上の使用頻度を示したのは、グルコサミンとアスピリンの併用（全対象患者でのアスピリンの使用頻度が 7.9 % に対して、グルコサミン使用者では 16.8 %）と、黒酢とロスバスタチンの併用（全対象患者でのロスバスタチンの使用頻度が 4.9 % に対して、黒酢使用者では 12.6 %）であった（表 2）。

「健康食品・サプリメント（成分）のすべて～ナチュラルメディシン・データベース～」に医薬品と健康食品との併用によって中程度以上の健康被害が生じる可能性がある」と記載されている組み合わせについて、70 名の全対象患者での使用症例を探したところ、表 3 に示すように、比較的、血液凝固系に係わる健康被害が想定される症例が多かった。また、薬物代謝酵素の CYP3A4 の強い誘導作用が確認されたウコンを使用している患者で、CYP3A4 の基質となる医薬品を併用している症例を探したところ、少数ではあるが表 4 に示すように併用症例があった。今回、集積した医療情報にはこれらの症例の転帰は記載されておらず、実際に健康被害を生じたのかはわからなかった。

### **健康食品の摂取に影響を与える患者要因**

健康食品を摂取していた 790 名の男女比は、約 4:6 であり、女性の方が若干多かった（表 5）。また、男女での使用する健康食品を比較したところ、男性では DHA/EPA の使用頻度が女性と比較して高かった。一方、女性ではコラーゲンとヒアルロン酸の使用頻度が高かった（表 6）。また、全対象患者を年齢で 3 群に層別化して使用する健康食品を比較したところ、年齢によって使用頻度が大きく異なる健康

食品があった。最も顕著な差を示した健康食品はグルコサミンで、年齢が高くなるに従って使用頻度も高くなった。一方、コラーゲンは65歳未満では最も使用されている健康食品であるが、65歳以上での使用頻度は低かった(表7)。また、疾患毎に使用されている健康食品の頻度を調べたところ。悪性腫瘍患者においては、全対象患者の約27%を占めることから、健康食品毎の使用頻度は、全対象患者での健康食品毎の使用頻度と大きく変わることはなかったが(表8)、表9に示すフコダインや霊芝等の多糖類やキノコ類に属する健康食品の使用頻度は全対象患者と比較して特徴的に高かった。以上の結果から、健康食品の摂取は、単に罹患している原疾患のみならず、性別や年齢によっても影響も受けていることが明らかになった。

#### D. 考察

患者の入院時に持参薬や日常的に摂取している健康補助食品を聞き取る調査をしている医療機関は比較的多いと推測されるが、信州大学医学部附属病院においては、それらの情報を電子カルテ上に記載し、さらに摂取している健康補助食品の効能や成分を薬剤師が調査している。これらの作業は多大な労力を費やすが、薬物療法に必要な情報を入手するといった治療上の有用性に加えて、健康補助食品の使用実態を明らかにするためのデータベース構築にとっても大変有用である。そこで、当研究においては、それらの貴重な情報を用いて、市販薬や健康補助食品と処方薬の併用の実態について調査することとした。

健康食品の使用実態としては、グルコサミンやブルーベリー系が比較的多く使用されており、また、医薬品としてはアムロジピンが多く使われていたことから、グルコ

サミンとアムロジピン、ブルーベリー系とアムロジピンの併用症例の割合が多くなっていた。健康食品と医薬品との併用で比較的多い特徴的な併用としては、グルコサミンとアスピリンおよび黒酢とロスバスタチンとの併用があげられる。黒酢とロスバスタチンはいずれも脂質低下作用を期待していると推定されることから、高脂血症患者が併用している可能性が考えられる。しかし、グルコサミンとアスピリンについては、両者の薬理活性から推定される併用する理由は不明であった。また、少数例ではあるが中程度以上の健康被害を生じる可能性のある併用例もみられた。今回の調査では、併用による健康被害の確認までは至らなかったが、これまで以上に健康食品と医薬品との併用に医療関係者のみならず、一般の消費者も注意をする必要があることを示唆している。特に、血液凝固系に係わる健康被害に関する併用例が多かったことは、血液凝固系に重点をおいて監視をする必要性を示していると思われる。また、食品と医薬品の相互作用に関して、薬物動態上で相互作用を引き起こす例がグレープフルーツジュースとカルシウム拮抗薬との併用などで報告されている。今回の調査においてもCYP3A4の強い誘導作用のあるウコンが、CYP3A4の基質となる医薬品と併用されている症例もあった。このような薬物動態上の相互作用についても注意が必要である。

健康食品の使用に影響を与える患者要因について探索したところ、前述の黒酢とロスバスタチンの併用や、多糖類やキノコ類の使用が悪性腫瘍患者で多い点からは、患者の原疾患が健康食品の摂取に影響を与えていると考えられた。しかし、健康食品の使用全体からみるとこのような症例は一部であり、多くの場合は、性別や年齢

によって影響を受けていると考えられた。従って、健康食品を使用している患者の大半が、入院の原因となった疾患の治癒を目的としてはいないと推測される。この点は、医療関係者が患者に対して健康食品について問診をする際の注意点と思われる。

健康食品は、医薬品と比較して毒性評価データが一般的には少ない。一部の健康食品については、新機能食品として内閣府食品安全委員会でもリスク評価が行われる可能性もあるが、食品安全委員会では、基本的には健常人を対象にしたリスク評価を行っており、医薬品との併用に関しては、評価項目としていない。従って、今後は、健康食品についても、より詳細な毒性評価データが必要になると考えられる。

## E. 結論

健康食品の使用実態としては、グルコサミンやブルーベリー系が比較的多く使用されており、また、医薬品としてはアムロジピンが多く併用されていた。少数例ではあるが中程度以上の健康被害を生じる可能性のある併用例もみられた(特に血液凝固系に係わる健康被害)。また、健康食品の摂取に影響を与える要因としては、一部で入院の原因となった原疾患の影響が見られたが、多くの場合は、性別や年齢によって影響を受けていると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y. Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B\*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 447-450 (2012).

### 2. 著書

該当なし

### 3. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 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

表1 多く使用される健康食品

健康食品[%]
グルコサミン[15.8]
ブルーベリー系[13.5]
コラーゲン[12.0]
黒酢（香醋）[11.6]
DHA・EPA[10.1]
にんにく[9.9]
ヒアルロン酸[9.2]
コンドロイチン[8.6]
デキストリン[7.8]
葉酸[7.6]

表2 健康食品と併用される割合が高い医薬品

グルコサミン (n=125)	黒酢（香醋） (n=87)	にんにく (n=77)	コラーゲン (n=88)	ベリー系 (n=100)
アムロジピン [19.2]	アムロジピン [25.0]	アムロジピン [22.1]	酸化マグネシウム[15.9]	アムロジピン [17]
アスピリン [16.8]	エチゾラム [16.1]	酸化マグネシウム [10.4]	ロキソプロフェン [14.8]	メコバラミン [15]
酸化マグネシウム[12.0]	ロスバスタチン[12.6]	ケトプロフェン [10.4]	アムロジピン [12.5]	酸化マグネシウム[14]
レバミピド [11.2]	酸化マグネシウム [11.5]	ロスバスタチン [10.4]	メコバラミン [12.5]	ロキソプロフェン [13]
ニフェジピン [11.2]	レバミピド [8.0]	メコバラミン [9.1]	ニフェジピン [11.4]	テルミサルタン [12]
[%]				
ヒアルロン酸 (n=72)	コンドロイチン (n=68)	大麦若葉 (n=37)	DHA・EPA (n=80)	葉酸 (n=55)

アムロジピン [19.4]	アムロジピン [22.1]	酸化マグネシウム [18.9]	エチゾラム [16.3]	ロキソプロフェン [16.4]
レバミピド [18.1]	メコバラミン [17.6]	アロプリノール [13.5]	アムロジピン [13.4]	レバミピド [14.5]
エチゾラム [16.6]	酸化マグネシウム [16.1]	アムロジピン [13.5]	アスピロン [13.4]	酸化マグネシウム [14.5]
酸化マグネシウム [15.2]	アスピリン [10]	エチゾラム [13.5]	メコバラミン [13.4]	メコバラミン [10.9]
ロキソプロフェン [15.2]	ニフェジピン [10]	ロキソプロフェン [8.1]	ワルファリンK [9.0]	ファモチジン [9.1]

[%]

医薬品 (n=790) [%]
アムロジピン[16.1]
酸化マグネシウム[10.0]
ロキソプロフェン[9.9]
レバミピド[9.7]
エチゾラム[9.1]
メコバラミン[8.4]
ランソプラゾール[8.2]
アスピリン[7.8]
アロプリノール[6.2]
ニフェジピン[6.2]
アトルバスタチン[6.2]
ケトプロフェン[5.7]
カンデサルタン[5.6]
ロスバスタチン[5.0]
オメプラゾール[4.7]

表3 相互作用の起こりうる健康食品と医薬品の組み合わせの実症例数

健康食品(n数)	相互作用の可能性のある医薬品	症例数(件)
----------	----------------	--------

グルコサミン (125)	ワルファリン	6
ブルーベリー (92)	糖尿病治療薬	7
ビルベリー (71)	糖尿病治療薬	6
	血液凝固抑制	24
にんにく (78)	CYP3A4 代謝	11
	血液凝固抑制	23
DHA (72)	血液凝固抑制	22
	降圧薬	18
イチョウ葉エキ ス (24)	CYP2C19 代謝	6
	糖尿病治療薬	6
デビルズクロウ (10)	降圧薬	5

表4 ウコンと CYP 3 A4 基質の医薬品の併用症例

CYP3A4 基質医薬品	のべ患者数
ニフェジピン	1
アムロジピン	1
レバミピド	1
グリベンクラミド	1
計	4

表5 男女比

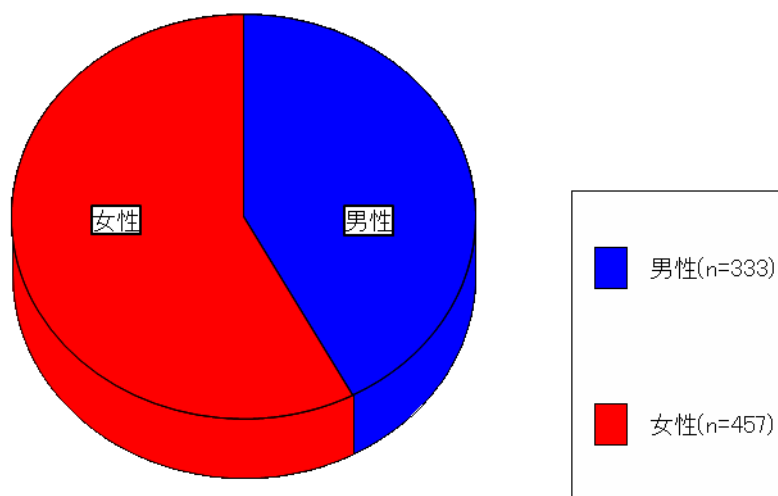


表 6 健康食品の摂取に対する性別の影響

全体(n=790)	女性 (n=457)	男性(n=333)
グルコサミン[15.8]	グルコサミン[15.5]	グルコサミン[16.2]
ブルーベリー類[13.5]	コラーゲン[13.8]	ブルーベリー類[16.0]
コラーゲン[12.0]	黒酢 ( 香醋 ) [12.3]	DHA・EPA[13.0]
黒酢 ( 香醋 ) [11.6]	ブルーベリー類[10.9]	にんにく[11.4]
DHA・EPA[10.1]	ヒアルロン酸[10.5]	黒酢 ( 香醋 ) [10.8]
にんにく[9.9]	コンドロイチン[9.0]	コラーゲン[9.6]
ヒアルロン酸[9.2]	にんにく[8.8]	コンドロイチン[8.1]
コンドロイチン[8.6]	葉酸[8.8]	ヒアルロン酸[7.2]
デキストリン[7.8]	DHA・EPA[7.9]	葉酸[6.0]
葉酸[7.6]	胚芽[5.3]	大麦若葉[5.4]

[%]

表 7 健康食品の摂取に対する年齢の影響

全体(n=790)	15 歳以上 65 未満(339)	65 歳以上 75 歳未満(255)	75 歳以上 (188)
グルコサミン ( 125 )	コラーゲン(42)	グルコサミン(49)	グルコサミン(51)



ブルーベリー類(107)	ブルーベリー類(42)	ブルーベリー類(38)	コンドロイチン(28)
コラーゲン(95)	葉酸(42)	黒酢（香醋）(36)	ヒアルロン酸(28)
黒酢（香醋）(92)	黒酢（香醋）(30)	DHA・EPA(33)	にんにく(27)
DHA・EPA(80)	グルコサミン(25)	にんにく(32)	黒酢（香醋）(26)

表8 健康食品の摂取に対する疾病による影響

悪性腫瘍(219)	眼瞼下垂症(27)	狭心症(18)
黒酢（香醋）[12.3]	DHA・EPA(7)	グルコサミン(3)
コラーゲン[12.3]	ベリー系(4)	コラーゲン(3)
グルコサミン[12.3]	コラーゲン(4)	DHA・EPA(3)
ブルーベリー類[11.9]	イチョウ葉エキス(4)	コンドロイチン(3)
DHA・EPA[10.5]	グルコサミン(3)	ヒアルロン酸(2)

表9 悪性腫瘍患者で特に使用率が高い健康食品

フコイダン	(9/9)
霊芝	(7/10)
マイタケ	(5/7)
雲南紅豆杉	(5/6)
しいたけ	(4/6)
オルニチン	(4/4)

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）

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

## 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 岩尾 岳洋 名古屋市立大学大学院薬学研究科・助教  
研究協力者 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 2 年

研究要旨： 本研究では、薬物代謝および毒性試験への利用を目指し、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から、肝細胞および腸管細胞への分化誘導を行った。その結果、ヒト iPS 細胞から肝細胞様細胞の分化誘導に成功した。さらに、mRNA 発現解析および機能解析の結果から、今回用いた低分子化合物 1 はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化促進剤として有用であることが明らかとなった。また、腸管上皮細胞様の機能を有する細胞への分化誘導にも成功し、低分子化合物 A および B は腸管幹細胞への分化を促進することも明らかとなった。

#### A. 研究目的

医薬品開発の薬物動態試験において実験動物が多用されているが、種差があるため結果をヒトへ外挿することが困難である。一方、ヒト初代肝細胞や凍結肝細胞ではロット間差が大きく、良質の肝細胞を安定して入手することが難しいため、研究の障害となっている。ヒト人工多能性幹（induced pluripotent stem: iPS）細胞は、2007 年に山中らによって樹立された。このヒト iPS 細胞は、多分化能とほぼ無限の増殖能をもつ細胞であり、医薬品開発のための安定した細胞供給源として期待される。現在、iPS 細胞から肝細胞への分化誘導方法がいくつか報告されている。その主な方法として分化誘導に増殖因子等の液性因子が用いられているが、非常に高価であること等が課題となっている。そのため、安価で取り扱いの容易な低分子化合物を分化誘導因子として用いることは非常に有用であると考えら

れる。本研究では、低分子化合物がヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導に与える影響を明らかにすることを目的とした。また、腸管も肝と同様、医薬品の薬物動態への関与が大きいことから、ヒト iPS 細胞から腸管細胞への分化も行った。

#### B. 研究方法

本研究では、国立成育医療研究センターにおいて樹立されたヒト iPS 細胞株（Windy）を用いた。

##### ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化

ヒト iPS 細胞をアクチビン A 処理することで内胚葉に、続いてジメチルスルホキシドにて肝芽細胞に分化させ、オンコスタチン M、デキサメタゾン、肝細胞増殖因子によって成熟させる方法にて肝細胞に分化誘導した。薬物代謝酵素の誘導剤処理は 40  $\mu$ M リファンピシン（RIF）を含む培地で回収前 48 時間培養することで行った。また、分化

の際に低分子化合物 1 もしくは 2 を添加し、肝細胞への分化に及ぼす影響について検討した。

分化後の細胞は real-time PCR 法により mRNA 発現解析を行った。低分子化合物 1 を添加した細胞においては、免疫蛍光染色にてアルブミン (ALB) 陽性細胞の分布を、インドシアニンググリーン (ICG) 染色により ICG 取り込み及び排泄能を、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色によりグリコーゲン貯蔵能を評価した。

### **ヒト iPS 細胞から腸管細胞への分化**

ヒト iPS 細胞をアクチビン A 処理することで内胚葉に、続いて線維芽細胞増殖因子 2 にて腸管系譜細胞に分化させ、上皮細胞成長因子によって腸管細胞に分化誘導した。CYP3A4 の誘導剤処理は 10 nM 1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) を含む培地で回収前 48 時間培養することで行った。また、分化の際に低分子化合物 A および B を添加し、腸管幹細胞への分化に及ぼす影響について検討した。

分化後の細胞は real-time PCR 法により mRNA 発現解析を行った。また、-Ala-Lys-AMCA (ジペプチド) の取り込みおよび sucrase-isomaltase (腸管上皮細胞の特異的マーカー) の免疫蛍光染色を行うことで機能を評価した。

## **C. 研究結果**

### **ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化**

分化後の細胞において、形態学的に肝細胞に特徴的な多核の細胞が観察され、肝細胞マーカーの発現が認められた (Fig. 1)。また、ALB、プレグナン X 受容体 (PXR)、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 及び UGT1A1 に関して、これらの mRNA 発現は低分子化合物 1 の添加により増加した (Fig. 2)。一方、低分子化合物 2 の添加によるこれら肝細胞

マーカーの mRNA 発現に顕著な差は認められなかった。CYP3A4 の誘導剤である RIF 処理を行ったところ、低分子化合物 1 を添加することで、増加した CYP3A4 がさらに 5 倍の mRNA 発現の誘導が認められた (Fig. 3)。しかし、低分子化合物 2 を添加した場合には RIF による CYP3A4 の mRNA 発現の誘導自体全く認められなくなった。

低分子化合物 1 を添加して分化させた細胞において、ALB 免疫蛍光染色を行ったところ、ほぼ全ての細胞で陽性を示した (Fig. 4)。また、この細胞は ICG 取り込み及び排泄能が認められ、PAS 染色にも陽性像を示した。

### **ヒト iPS 細胞から腸管細胞への分化**

我々が行った検討で最も効率良かった分化条件で分化させた細胞において、-Ala-Lys-AMCA の取り込みがみとめられ、この細胞は sucrase-isomaltase が発現していた (Fig. 5)。また、VD<sub>3</sub> で処理することで、7 倍程度の CYP3A4 の発現誘導が認められた (Fig. 6)。さらに、低分子化合物 A および B を分化の過程で処理することにより、腸管幹細胞マーカーの LGR5 および EphB2 の発現レベルの上昇が認められた (Fig. 7)。

## **D. 考察**

肝細胞への分化において、我々が行った分化誘導法で分化させたヒト iPS 細胞は、敷石状で多核など形態学的な肝細胞の特徴を示し、各種肝細胞マーカー遺伝子を発現したことから、分化した細胞は肝細胞様細胞であることが示唆された。また、低分子化合物 1 の添加により、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の肝細胞マーカーの mRNA 発現量が増加し、低分子化合物 1 はヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導において、分化を促進することが示唆された。さらに、RIF の

添加によって CYP3A4 が誘導され、薬物代謝酵素の誘導剤に対する応答性が肝細胞に類似していることが明らかとなった。低分子化合物 2 を添加して分化させた細胞は、肝細胞マーカーの mRNA 発現の上昇は認められず、分化に影響を与えない、もしくはむしろ抑制することが明らかとなった。なお、RIF による CYP3A4 の mRNA 発現誘導が認められなかった可能性として、CYP3A4 の誘導に関与する核内受容体 PXR の発現が低下したためと考えられた。

低分子化合物 1 を用いて分化させたヒト iPS 細胞の ALB 免疫蛍光染色の結果より、ほぼ全ての細胞が肝細胞様細胞に分化したことが示唆された。また、ヒト肝細胞と同様に、ICG 取り込み及び排泄能並びにグリコーゲン貯蔵能も有していた。これらの結果より、低分子化合物 1 を添加し分化させた細胞が肝細胞の機能を有する肝細胞様細胞であることが示唆された。

腸管細胞への分化において、ヒト iPS 細胞から分化させた細胞は腸管上皮マーカーである sucrase- isomaltase が発現していた。また、本細胞において腸管上皮細胞に特異的に発現しているペプチドトランスポーター SLC15A1/PEPT1 の基質薬物 (-Ala-Lys-AMCA) の取り込みが認められた。さらに、VD<sub>3</sub> によりビタミン D 受容体 (VDR) を介した CYP3A4 の発現誘導がみとめられたことから、ヒト iPS 細胞より腸管上皮細胞様の機能を有する細胞が作製できたことが示唆された。また、低分子化合物 A および B の添加は、腸管幹細胞への分化を促進することも明らかとなった。

## E. 結論

我々はヒト iPS 細胞から肝細胞様細胞の分化誘導に成功した。さらに、今回用いた低分子化合物 1 はヒト iPS 細胞から肝細胞

への分化促進剤として有用であることが明らかとなった。また、腸管細胞への分化において、腸管上皮細胞様の機能を有する細胞への分化誘導に成功した。さらに、低分子化合物 A および B は腸管幹細胞への分化を促進することが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S. Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 653-657 (2012).
2. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S. Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 Chemical Stabilizer, CoCl<sub>2</sub> and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 398-404 (2012).
3. Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, Ohmori S. Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and expression analyses of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism. *Biol Pharm Bull.* 36, 292-298 (2012).
4. Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori S. Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 598-604 (2012).
5. Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S. Lower expression of HNF4 and PGC1 might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 430-438 (2012).
6. Nakamura K, Matsuzawa N, Ohmori S, Ando Y, Yamazaki H, Matsunaga T. Clinical

evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28: 38-43 (2013).

7. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kondo Y, Kumagai T, Matsunaga T, Omori S, Nagata K. Hepatocyte nuclear factor 6 enhances the expression of the CYP3A4 gene in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 in press

## 2. 著書

該当なし

## 3. 学会発表

1. Iwao T, Nagata K, Matsunaga T. Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 19<sup>th</sup> Microsomes and Drug Oxidations (MDO) and 12<sup>th</sup> European Regional International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) Meeting, June 2012 (Noordwijk aan Zee, The Netherlands).
2. Iwao T, Nakamura K, Nagata K, Matsunaga T. Generation of human induced pluripotent stem cell derived enterocytes with peptide transport function. 26th JSSX Annual Meeting, November 2012 (Chiba).
3. Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Sugiyama R, Sasaki T, Nagata K, Kurose K, Niwa T, Yamaor S, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T. Small molecule compounds enhance differentiation to hepatocytes from human induced

pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting, November 2012 (Chiba).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1. 発明の名称：人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法

発明者：松永民秀、岩尾岳洋、近藤祐樹、吉橋幸美

出願番号：特願 2012-247010

出願日：2012年11月19日

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

2. 発明の名称：人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法

発明者：松永民秀、岩尾岳洋

出願番号：特願 2013-036434

出願日：2013年2月26日

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

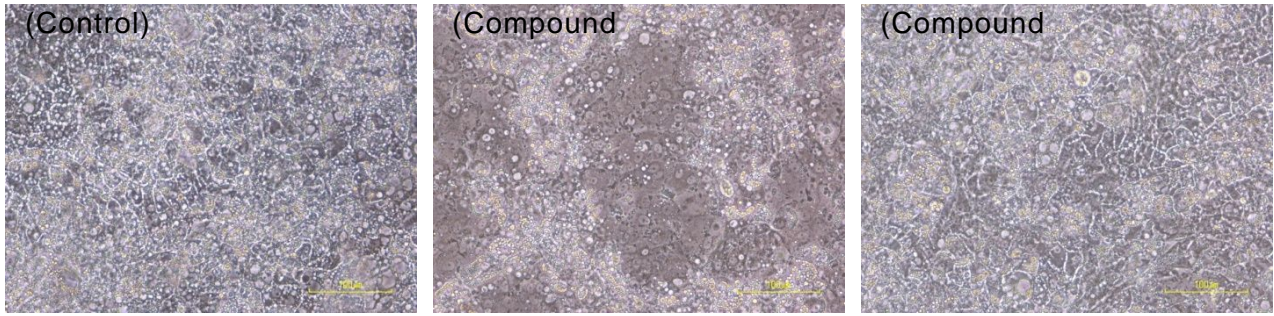


Fig. 1. 分化させたヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞の形態学的変化

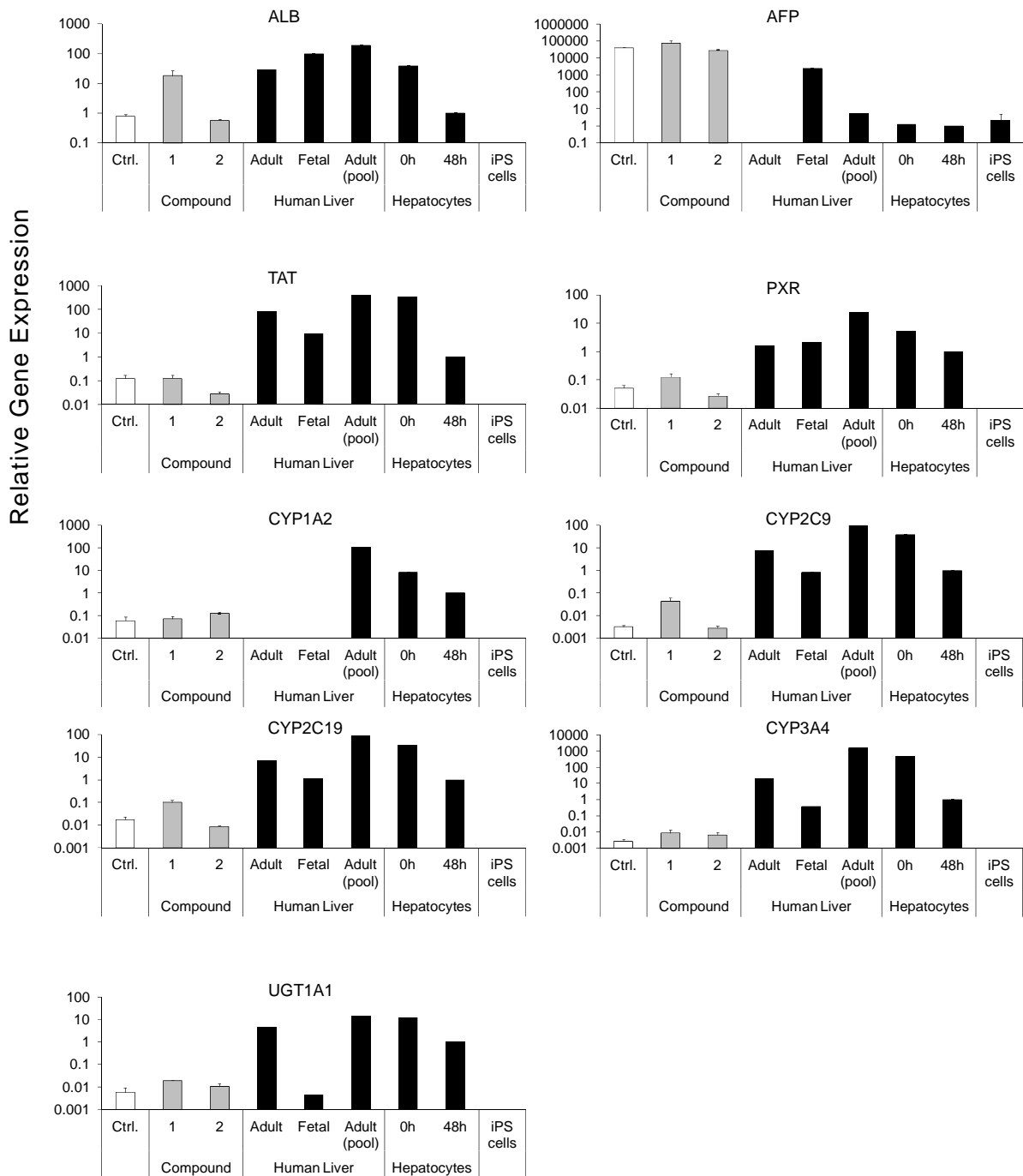


Fig. 2. 分化させたヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞における肝細胞マーカーの発現

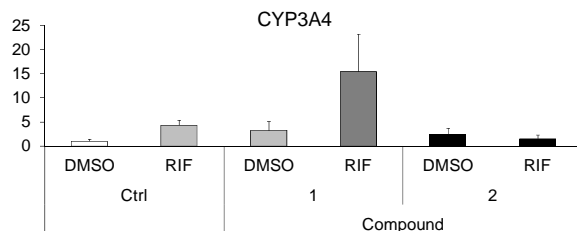


Fig. 3. 分化させたヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞の RIF に対する CYP3A4 の応答性

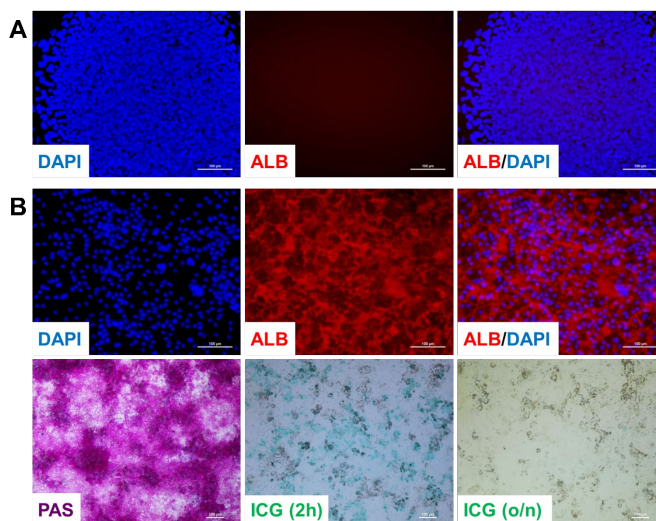


Fig. 4. 低分子化合物 1 を用いて分化させたヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞の ALB 免疫蛍光染色、ICG 染色及び PAS 染色  
 (A) 未分化 of ヒト iPS 細胞の ALB 免疫蛍光染色  
 (B) 低分子化合物 1 を用いて分化させたヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞

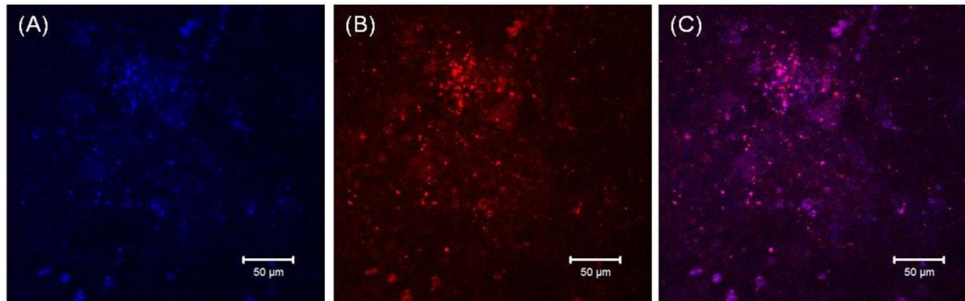


Fig. 5. ヒト iPS 細胞由来腸管細胞における -Ala-Lys-AMCA 取り込みおよび sucrase- isomaltase 免疫蛍光染色

- (A) -Ala-Lys-AMCA の取り込み
- (B) sucrase- isomaltase 免疫蛍光染色
- (C) (A) と (B) をマージした画像

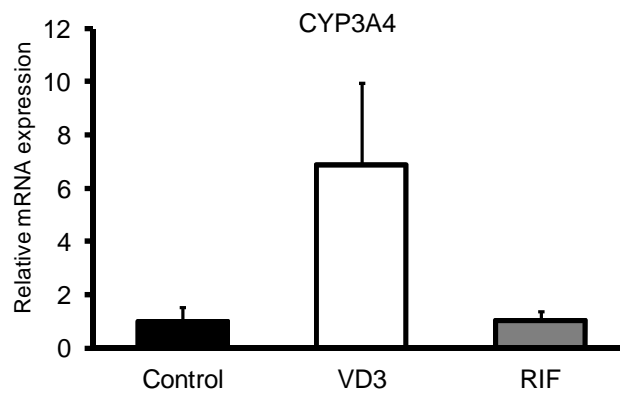


Fig. 6. ヒト iPS 細胞由来腸管細胞の  $VD_3$  に対する CYP3A4 の応答性

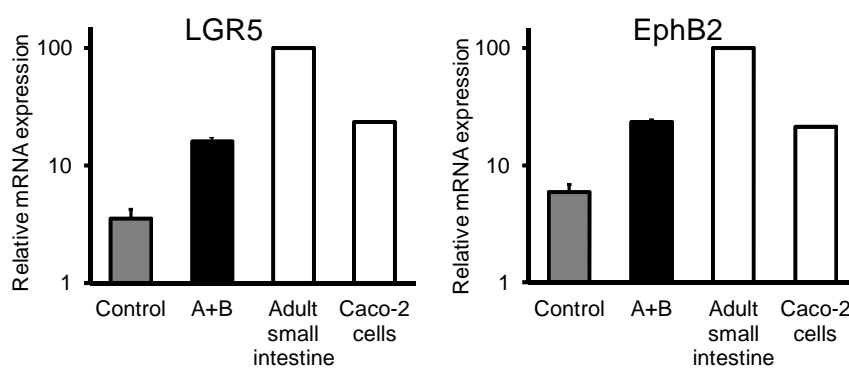


Fig. 7. ヒト iPS 細胞から腸管幹細胞への分化に対する低分子化合物の効果



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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	ページ	出版年
永田 清	化学物質の吸収・排泄経路、衛生薬学	平塚明、姫野誠一郎、長沼章	衛生薬学 -健康と環境- 第5版	広川書店	東京	349-355	2012
永田 清	薬物相互作用	川西正祐、小野秀樹、賀川義之	薬害・副作用学 第1版	南山堂	東京		2012
坂口修平、高橋昌吾、熊谷 健、佐々木崇光、永田清	永田 清、敗血症モデルとしてのTNF- $\alpha$ 誘導肝細胞死と酸化ストレス-シグナル伝達機構からのアプローチ	自然免疫研究会編	エンドトキシン	医学書点	東京	53-57	2013

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y.	Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	27	447-450	2012

	Japanese.				
Suzaki Y, Uemura N, Hosokawa M, Ohashi K.	Gly143Glu polymorphism of the human carboxylesterase1 gene in an Asian population.	<i>Eur J Clin Pharmacol</i>	79	735-736	2013
Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S	Effects of Hypoxia-Inducible Factor-1 Chemical Stabilizer, CoCl(2) and Hypoxia on Gene Expression of CYP3As in Human Fetal Liver Cells.	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	27	398-404	2012
Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S.	Lower expression of HNF4 and PGC1 might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	27	430-438	2012
Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S.	Mechanisms of CYP3A Induction by Glucocorticoids in Human Fetal Liver Cells.	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	27	653-657	2012
Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori S.	Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers.	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	27	598-604	2012
Takahashi S, Miura A, Sasaki H, Sakaguchi S,	TNF- $\alpha$ /actinomycin D-mediated HepG2 cells in the presence of iron as a model of	<i>J Tohoku Pharm Univ</i>	59	69-74	2012

Nagata K.	hepatocyte injury. J Tohoku Pharm Univ. 59, 69-74 (2012)				
Nakamura K, Matsuzawa N, Ohmori S, Ando Y, Yamazaki H, Matsunaga T	Clinical evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy.	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	28	38-43	2013
Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, Ohmori S.	Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and expression analyses of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism.	<i>Biol Pharm Bull</i>	36	292-298	2013
Suzaki Y, Uemura N, Takada M, Ohyama T, Itohda A, Morimoto T, Imai H, Hamasaki H, Inano A, Hosokawa M, Tateishi M, Ohashi K.	The effect of carboxylesterase 1(CES1) polymorphisms on the pharmacokinetics of oseltamivir in humans.	<i>Eur J Clin Pharmacol</i>	69	21-30	2013
Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, Omori S, Nagata K.	Hepatocyte nuclear factor 6 activate the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.	<i>Drug Metab Pharmacokinet</i>	28	250-259	2013