

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

（総括）研究報告書

健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発に関する研究

HepG2細胞およびレポーターアッセイを用いた安全性評価系の検討

研究代表者 近藤 位旨

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 食品保健機能研究部 研究員

研究要旨

これまでの研究から、マウス初代培養肝細胞は再現性の問題から安全性評価系として適当ではなく、*in vitro*の安全性評価系を開発することができなかった。そこで、*in vitro*研究において汎用されているHepG2細胞を用いて、ヒトでの現象を評価する安全性評価系の検討を試みた。この研究では、HepG2を用いて、先の研究で選抜された健康食品成分の毒性を検討し、さらには薬物代謝酵素（CYP3A4）を対象としたレポーターアッセイを既存の報告から再構築し、CYP3A4への影響を評価した。その結果、試験対象14成分のうちルテオリンでのみ毒性が認められた。一方、対象成分はCYP3A4レポーターアッセイでは影響は認められなかった。HepG2は生体位で呈する代謝能を失っていることから、今回得られた結果は、対象成分そのものの作用を反映していると考えられる。つまり、本報告の方法は食品成分そのものの毒性およびCYP3A4への影響を評価することを可能とする。

研究分担者

鈴木 一平

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部

研究員

東泉 裕子

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部、

室長

A. 研究目的

本研究は健康食品による肝臓への影響を有害性情報も含めた情報をもとに細胞実験または動物実験から検証し、健康食品と被害情報の因果関係を科学的に解析し、一連の研究から健康食品による健康被害情報を踏まえた安全性評価系の開発することである。

本年度の研究目的は、ヒト肝細胞として汎用されているHepG2を用いて、健康食品成分の毒性および薬物

代謝酵素3A4への影響を評価する系を構築することである。

B. 研究方法

1. 試薬類

アントラキノン (A)、カフェ酸 (CA)、シネオール (CN)、リモネン (LM)、リナロール (LN)、ルテオリン (LU)、 α -ピネン (P)およびルチン (RU)は東京化成工業㈱から、 β -カロテン (BC)およびクマリン (CM)は富士フィルム和光㈱から、クロロゲン酸 (CH)はナカライテスクから、ケンフェロール (K)およびロスマリン酸 (RO)はCombi-Blocksから、ケルセチン (Q)はAlfa aesarから、カルバマゼピン (Carb)、デキサメタゾン (Dex)およびリファンピシン (Rif)はSigma-Aldrichから、ケトコナゾール (Ket)はLKT Laboratoriesから入手した。

2. 細胞培養

HepG2はJCRB細胞バンク(大阪)から供与された細胞を用いた。細胞培養は培養用培地(Dulbecco's modified eagle medium with phenol red (DMEM)、ウシ胎児血清10%添加)を用い、5%CO₂、37°Cの条件で行った。試験対象成分はジメチルスルホキシド (DMSO)に溶かした後、DMEMに添加した。なお、DMSO (0.1%または0.5%)を添加した培地を対照とした。

3. 細胞毒性

HepG2を96wellプレートに6 × 10⁴ cells/0.1 mLの濃度で播種し、1日培養後、試験培地で1-3日間の培養を行った。培養終了後、培地は遠心分離後(室温、5,000 x g、5分間)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)活性の測定に供与した。LDH活性の測定には、LDH-Cytotoxic test (和光純薬)を用いた。培地採取後、PBS(pH7.4)で2回の洗浄後、MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay kit (Promega)を用い、細胞増殖活性の測定を行った。

4. レポーターベクターの調製

CYP3A4レポーターベクターにはNanoLuc® reporter vector (pNL1.1)およびfirefly luciferase vector (pGL4.54, TK)を用いた。CYP3A4レポーターベクターは、pNL1.1にCYP3A4 5'上流領域 (NCBI Reference Sequence: NG_054901.1) を外挿することで調製した。各レポーターベクターは、pCYP3A4-0.5k、pCYP3A4-1.0k、pCYP3A4-2.0k、pCYP3A4-7.8kおよびpCYP3A4-0.4k-7.8kと名付け、外挿した各インサート領域 (CYP3A4 5' 上流領域) は-500 to +27 bp、-1000 to +27 bp、-2000 to +27 bp、-7822 to -7186 bp、and -400 to +27 bpおよび-7822 bp to -7186 bpである。なお、-500 to +27 bp、-1000 to +27 bp、-2000 to +27 bpはCYP3A4 の近位プロモーター領域 (CYP3A4PP)を-7822 to -7186 bpは異物応答領域 (XREM)を含んでいる^{1,2)}。

pCYP3A4-0.5k、pCYP3A4-1.0k、pCYP3A4-2.0kおよ

びpCYP3A4-7.8kは以下の通り調製した。インサート領域はヒトゲノムテンプレートを鋳型に、対応するプライマーを用いて増幅した(500 to +27 bp、プライマー①、④; -1000 to +27 bp、プライマー②、④; -2000 to +27 bp、プライマー③、④; -7822 to -7186 bp、プライマー⑤、⑥)。プライマーの配列は表1に示した。増幅したDNAフラグメントおよびpNL1.1は制限酵素 (Kpn I、HindIII)により切断した後、DNAリガーゼで結合した。

pCYP3A4-0.4k-7.8kは先と同様にインサート領域を調製し (-1000 to +27 bp、プライマー②と④; -7822 to -7186 bpプライマー⑤と⑦)、インサート領域およびpNL1.1を制限酵素 (Bgl II)で切断した。これらを先と同様にDNAリガーゼで結合した。

調製した各CYP3A4レポーターベクターはDH5αコンピテントセルを用いて増幅し、NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Takara)で精製した後、レポーターアッセイに供与した。

5. レポーターアッセイ

レポーターアッセイは以下の通りに行った。HepG2を24wellプレートに1 × 10⁵ cells/0.5 mLの濃度で播種し、1日培養後、TransIT®-LT1 reagent (Mirus)を用い、CYP3A4レポーターベクター15 ngおよびコントロールベクター (pGL4.54)250 ngを細胞にトランスフェクションした。次いで、試験培地を用いて2日間の培養を行った。培養終了後、細胞はpassive lyses solution (Promega)に溶解し、遠心上清 (4°C、12,000 x g、1分間)をルシフェラーゼ活性の測定に供与した。NanoLucルシフェラーゼ活性 (CYP3A4レポーターベクター)およびホタルルシフェラーゼ活性 (pGL4.54)はNano-Glo Dual-Luciferase reporter assay system (Promega)を用いて測定した。NanoLucルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ活性で除すことで、トランスフェクション効率の補正を行った。

レポーターベクターの妥当性はCYP3A4誘導薬 (Carb、Dexamethasone、Rif)および阻害薬 (Ket)への応答

性から検証した。レポーターベクターの妥当性検証結果をもとに、pCYP3A4-0.4k-7.8kを用いて、試験対象のCYP3A4への影響を検討した。

6. 統計解析

データは平均±標準偏差で示した。データの解析は、non-paired t-test (vs. control)、Dunnett's test (等分散データ)またはSteel's test (不等分散データ)から行った。

C. 研究結果

1. 健康食品成分の細胞毒性

DMSOを用いてHepG2細胞の毒性成分への応答性を検証した結果 (図1、A、B)、LDH活性は1%以上のDMSO処理によって増加した。一方、細胞増殖活性は4%DMSO処理でのみ低下した。

健康食品成分の毒性評価条件に関しては、ケルセチンなどの試験対象成分のヒト介入試験における最大血中濃度は0.1 μMから5 μM程度であることから、ヒトを想定した必須処置条件は10 μMが適当であると考えられる³⁾。そこで、試験対象の培地への可溶性性を踏まえ、毒性試験における健康食品成分の処置条件は10 μMを含む処置条件として0.1-10 μM、可溶性が高い物は1-100 μMを用いた。健康食品成分の毒性を検討した結果 (図2、A、B)、LDH活性は毒性対照 (2% DMSO)およびLU(100 μM)の処置により増加し、A (1、10 μM)、CA (1、10、100 μM)、CN (1、10、100 μM)、CM (10、100 μM)、K (0.1 μM)、LN (1、10 μM)、P (1、10、100 μM)、Q (1、10、100 μM)、RU (10、100 μM) および RO (10、100 μM)の処置により低下した。細胞増殖活性はLU (100 μM)の処置により低下し、A (0.1、1、10 μM)、BC (0.1、1、10 μM)、CA (1、10、100 μM)、CH (1、10 μM)、CN (10、100 μM)、CM (1、10 μM)、K (0.1、1 μM)、LM (1、10 μM)、LN (1、10、100 μM)、LU (1、10 μM)、Q (10、100 μM)、RU (1、10、100 μM) and RO (10、100 μM)の処置により増加した。

2. CYP3A4レポーターベクターの妥当性検証

CYP3A4PP領域を含むレポーターベクター (pCYP3A4-0.5k、pCYP3A4-1.0k、pCYP3A4-2.0k)はCYP3A4誘導薬であるRifの処置による影響はなかった (図3、A)。次に、異なるCYP3A4 5'上流領域を含むレポーターベクターにRifを作用させたところ、pCYP3A4-0.4k-7.8kおよびpCYP3A4-7.8kはRifの処置によりルシフェラーゼ活性が増加し、その増加はpCYP3A4-7.8kよりもpCYP3A4-0.4k-7.8kで強かった (図3、B)。さらに、pCYP3A4-0.4k-7.8kのCYP3A4誘導薬および阻害薬への応答性を詳細に検討した結果、Carb、Dex、RifおよびKetは濃度依存的にルシフェラーゼ活性を増加させた (図3、C)。

3. 健康食品成分のCYP3A4への影響

pCYP3A4-0.4k-7.8kを用いて、健康食品成分のCYP3A4への影響をレポーターアッセイにより検討した。10 μMの濃度では、いずれもルシフェラーゼ活性に影響を与えなかった (図4、A)。そこで、処置濃度を可能な範囲で高め、CYP3A4への影響を検討したところ、Qでのみルシフェラーゼ活性が増加した (図4、B)。A、BCおよびKは可溶性が低いため、溶媒であるDMSOの細胞毒性が生じない0.5%に変更することで処置濃度を高め、50 μM条件で試験を行ったもののルシフェラーゼ活性に影響はなかった (図4、C)。また、Rifの応答性は0.1%DMSOでの処置と同等であり、DMSOの濃度による影響は認められなかった。

D. 考察

HepG2は、細胞毒性が知られているDMSOによる処理から検討した結果のとおり毒性応答を示した。本細胞を用いて健康食品成分の毒性を検討したところ、ルテオリンでのみ毒性が観察された。しかし、この原因は不明である。昨年度のマウスの初代培養肝細胞では、肝毒性が知られているクマリンにおいて毒性応答が観察されていたものの、HepG2では毒性は観察されなかった。また、Takadaらの報告をもとにCYP3A

4レポーターベクターを調製し、健康食品成分の影響を検討した結果、いずれの成分でもルシフェラーゼ活性の増加は観察されなかった⁴⁾。

レポーターアッセイの妥当性の検証結果が示すように、CYP3A4はCYP3A4PP領域だけでは誘導されず、XREM領域を含む場合にのみ、CYP3A4誘導薬によるルシフェラーゼ活性の増加が認められる。XREM領域にはCYP3A4の発現に関与するヒトプレグネンX受容体 (hPXR)の遺伝子領域が含まれており、これら両遺伝子発現の増加がCYP3A4の増加を決定すると考えられる。XREM領域のみでもCYP3A4誘導薬に応答性を示すものの、その応答性はRifの濃度に依存しない(データ省略)。CYP3A4の阻害薬であるKetはCYP3A4の遺伝子発現を増加させることが報告されており、レポーターアッセイは遺伝子発現を反映しているため、Ketでもルシフェラーゼ活性が増加したと考えられる。XREMのみを含むレポーターベクターの応答は対照の2倍であり、CarbおよびKetは2倍以下であることから、CarbおよびKetは異物として認識されるもののCYP3A4PP領域には影響せず、ルシフェラーゼ活性を増加させたと考えられる。一方、pCYP3A4-0.4k-7.8kは、Rif以外のCYP3A4誘導薬においてもルシフェラーゼ活性が増加することからCYP3A4特異的なレポーターベクターであると考えられる。

HepG2は初代培養肝細胞とは異なり、肝臓での代謝能を失活している。そのため、HepG2では細胞内に取り込まれた試験対象は変化せず細胞内に存在する。昨年の初代培養細胞の試験結果、本研究での毒性応答を比較すると、HepG2での毒性試験は試験対象成分そのものの毒性の有無を意味すると考えられる。これはレポーターアッセイについても同様である。以上から、本報告で示した試験系は試験対象成分そのものの肝毒性およびCYP3A4への影響を検証することが可能であると考えられる。また、肝臓での代謝は細胞内のCYP類によって行われるため、生体位での代謝を踏まえた試験を行うには、試験対象成分にヒトミクロソーム画分を肝臓代謝酵素源として作用させた後に

本試験方法の処置成分として用いることで、肝臓代謝を考慮した*in vitro*の毒性評価が可能であると考えられる。ただし、試験対象成分の代謝物に関しては変化体の同定が必要になる。

E. 結論

HepG2を基盤とした健康食品成分における肝臓毒性試験およびレポーターアッセイを用いたCYP3A4への影響を評価する系の構築を試みた。その結果、本報告で示した方法は試験対象成分そのものの毒性およびCYP3A4への影響を評価することが可能であり、安全性評価系の1つとして適応可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

本研究から、健康食品に関する健康危険情報の提供はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

近藤位旨, 東泉裕子, 石見佳子. 肝臓を介した健康被害が予測される健康食品成分に関する情報解析. 栄養学雑誌. 79 (5), 311-319, 2021.

2. 学会発表

該当なし。

H. 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。

参考文献

- 1) Hashimoto H *et. al.*, Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional

control. Eur J Biochem. 218 (2), 585-595, 1993.

- 2) Goodwin B *et. al.*, The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. Mol Pharmacol. 56 (6), 1329-1339, 1999
- 3) Dabeek MD and Marra MV. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. Nutrients. 11 (10), p1-19, 2019
- 4) Takada T, *et. al.*, Differences in transactivation between rat CYP3A4 and human CYP3A4 genes by human pregnane X receptor. Drug Metab Pharmacokin. 19 (2), 103-113, 2004.

表 1 プライマー一覧

Primer no.	Primer name	Primer sequence 5' to 3'
①	5'-500-Kpn1	TTTTggtaccAAATGGTTACATCTGTGTGA
②	5'-1000-Kpn1	TTTTggtaccCCAGACATGCAGTATTTCCA
③	5'-2000-Kpn1	TTTTggtaccTCACTGAGCCTCAGTTTCTA
④	3'-27-Hind3	TTTT aagctt TCTTTGCTGGGCTATGTGCA
⑤	5'-7822-Kpn1	TTTTggtaccTCTAGAGAGATGGTTCATTC
⑥	3'-7186-Hind3	TTTTaagcttGAATGATATCGTCAACAGG
⑦	3'-7186-Bgl2	TTTTagatctGAATGATATCGTCAACAGG

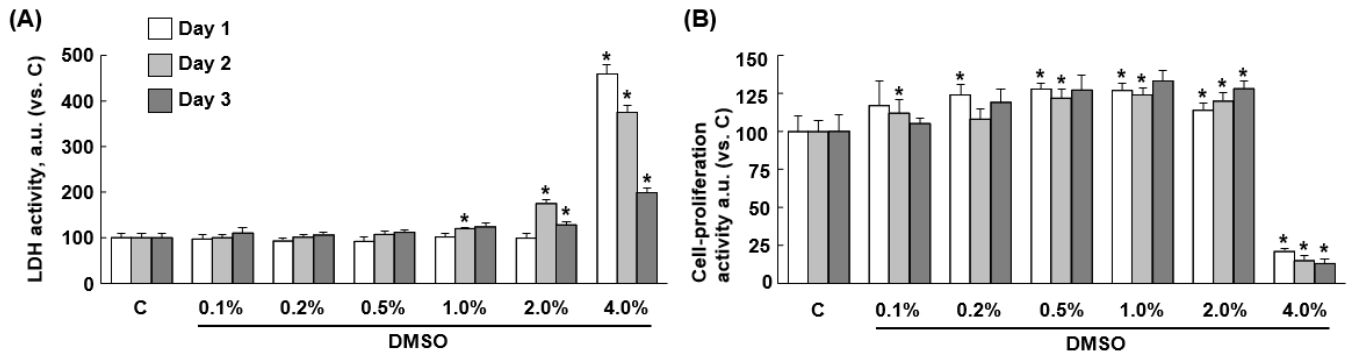


図1 HepG2 の DMSO による LDH 活性および細胞増殖活性への影響

HepG2 cells were treated with control without DMSO (C) and 0.1 to 4.0 % DMSO for 1 to 3 days without medium change. Data are expressed as the means \pm standard deviations (n = 3). Data were analyzed by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups on each day were analyzed by Dunnett's test (parametric data). *Statistical significance was set at $p < 0.05$ (vs. c).

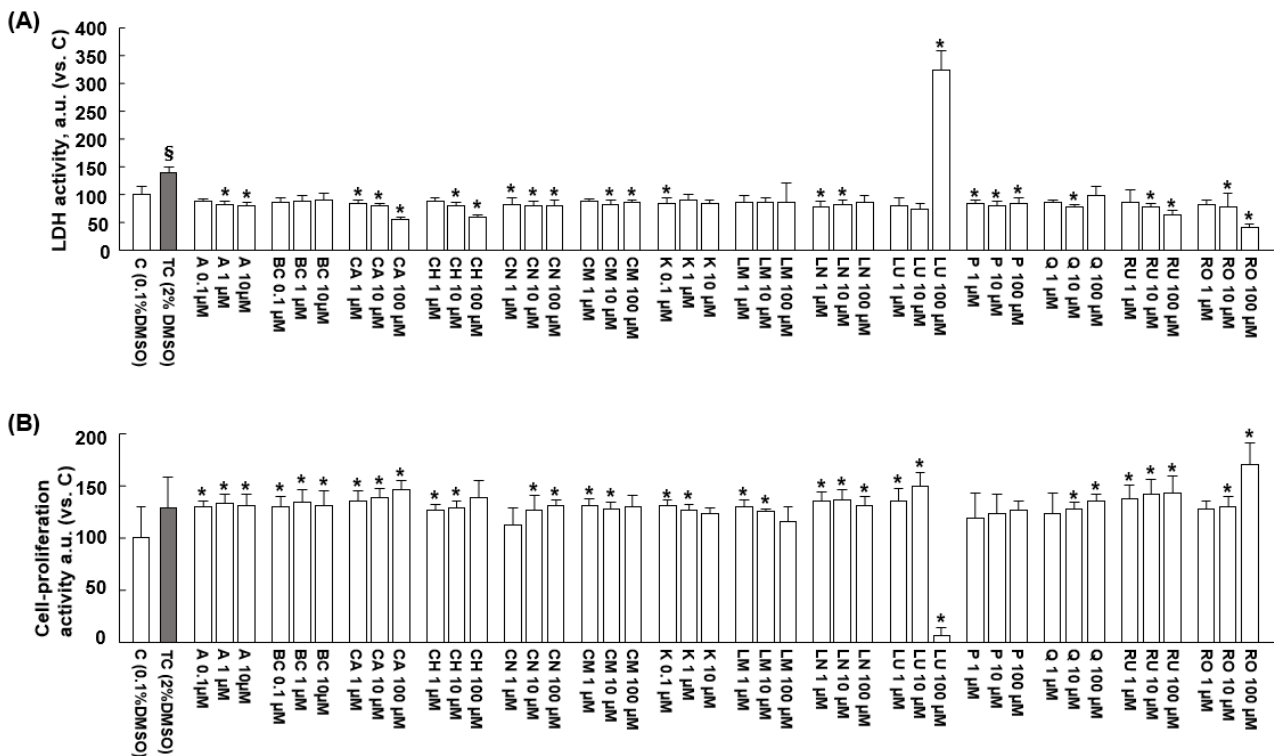


図2 健康食品成分の LDH 活性および細胞増殖活性に及ぼす影響

HepG2 cells were treated with control (C, 0.1%DMSO), toxic control (TC, 2%DMSO), 0.1 to 10 μ M Anthraquinone (A), 0.1 to 10 μ M β -caroten (BC), 1 to 100 μ M caffeic acid (CA), 1 to 100 μ M Chlorogenic acid (CH), 1 to 100 μ M cineole (CN), 1 to 100 μ M coumarin (CM), 0.1 to 10 μ M kaempferol (K), 1 to 100 μ M limonene (LM), 1 to 100 μ M linalool (LN), 1 to 100 μ M luteolin (LU), 1 to 100 μ M α -pinene (P), 1 to 100 μ M Quercetin (Q), 1 to 100 μ M rutin (RU) and 1 to 100 μ M rosmarinic acid (RO) for 2 days.

Data are expressed as the means \pm standard deviations (n = 3). Data were analyzed by non-paired t-test between control and TC, or by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups were analyzed by Dunnett's test (parametric data) or Steel's test (non-parametric data) in multiple comparison. §, * Statistical significance was set at $p < 0.05$ (vs. c).

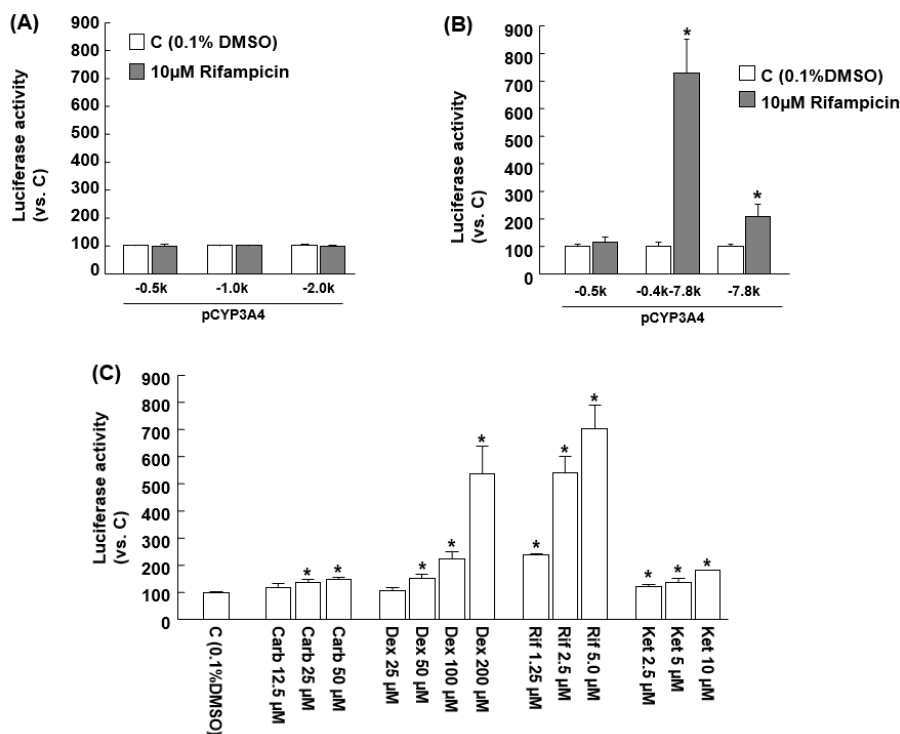


図3 (A) CYP3A4PP領域を含むレポーターベクターのリファンピシンへの応答性(B) CYP3A4PP、XREMおよび両遺伝子領域の組み合わせにおけるリファンピシンへの応答性(C) pCYP3A4-0.4k-7.8kのCYP3A4誘導薬および阻害薬への応答性

HepG2 cells were transfected each vector and treated with control (C, 0.1%DMSO), 12.5 to 50 μ M carbamazepine (Carb), 25 to 100 μ M dexamethasone (Dex), 1.25 to 10 μ M rifampicin (Rif) and 2.5 to 10 μ M ketoconazole (Ket) for 2 days. Data are expressed as the means \pm standard deviations (n = 3). Data were analyzed by non-paired t-test, or by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups were analyzed by Dunnett's test (parametric data) \S . * Statistical significance was set at p < 0.05 (vs. c).

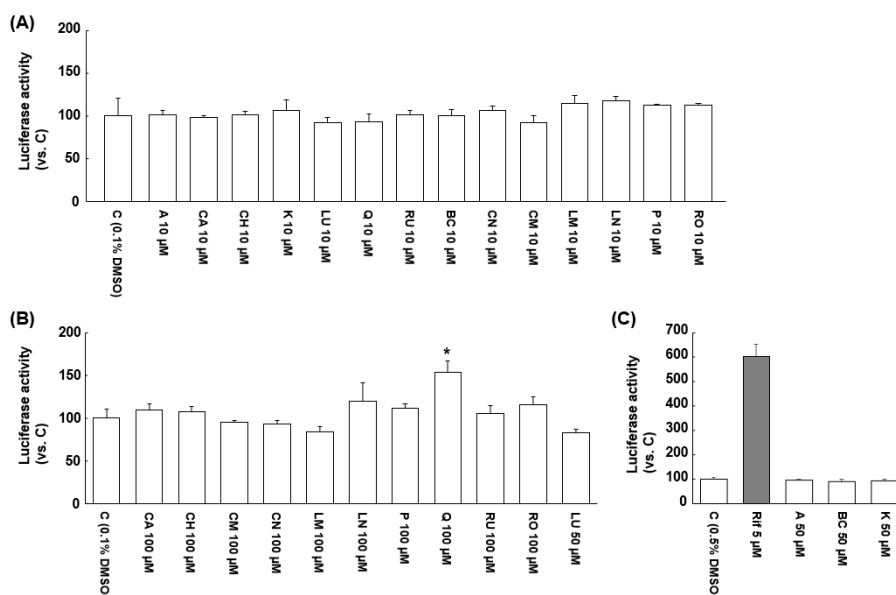


図4 (A) 10 μ M条件における健康食品成分のCYP3A4に及ぼす影響(B, C) 50または100 μ M条件における健康食品成分のCYP3A4に及ぼす影響

HepG2 cells were transfected the CYP3A4 reporter vector (pCYP3A4-0.4k-7.8k) and treated with control (C, 0.1% or 0.5% DMSO), 10, 50 or 100 μ M of targets and 5 μ M rifampicin (Rif) for 2 days. Data are expressed as the means \pm standard deviations (n = 3). Data were analyzed by non-paired t-test between control and TC, or by one-way analysis of variance. Differences between the control group and each of the treatment groups were analyzed by Dunnett's test (parametric data) or Steel's test (non-parametric data) in multiple comparison. * Statistical significance was set at p < 0.05 (vs. c).