

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590133

研究課題名（和文） ヒト iPS 細胞を利用したビタミン K サイクルを標的とする発がん予防機構の研究

研究課題名（英文） Chemopreventive effects of vitamin K cycle using human iPS cells

研究代表者

中村 克徳（NAKAMURA KATSUNORI）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：20361363

研究成果の概要（和文）：本研究は、VKORC1 などの Vitamin K サイクル関連遺伝子を解析し、Vitamin K 補充による効果的な発がん予防およびがん化学療法の研究への応用を検討した。また、ヒト iPS 細胞由来肝細胞による酵素誘導能評価を行い、発がん予防研究の評価系としての有用性を明らかにした。がんとの因果関係は不明であるものの、抗がん剤との併用の際に重要となる Vitamin K 代謝酵素とワルファリン投与量の関係について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Final goal of this study was to find the way to improve the cancer chemotherapies and cancer chemo-preventions from the information of Vitamin K cycle-related genetic polymorphisms. The human iPS cells would be useful as an appropriate assay of a variety of drug metabolism study as well as the study of cancer chemo-preventions. The effect of Vitamin K cycle-related genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose was observed and this could have some importance when warfarin prescribed during cancer chemotherapies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ケモプリベンション、ビタミン K、iPS 細胞、PIVKA-II、VKORC1

## 1. 研究開始当初の背景

近年注目を集めているがんの予防医学の研究により、塩分の過剰摂取などの食生活や、喫煙習慣により発症リスクが高まることが報告されている。これに対して、緑茶カテキンや化学物質によるケモプリベンション（抗がん作用のある物質を摂取することによって体内の防御システムを増強し、発がんリス

クを軽減させる試み）の可能性も検討されている。森らのグループは、Vitamin K が肝臓がんの発がん抑制作用を持つことを報告している。一方、Vitamin K は経口摂取だけでは生体維持に不十分であるため、肝ミクロゾームに存在する酵素 Vitamin K Oxide Reductase (VKORC1) を構成タンパクとする Vitamin K サイクルにより合成（活性体へ

変換) されている。この VKORC1 をコードする遺伝子である VKORC1 は、血栓塞栓症の予防・治療薬であるワルファリンの抵抗性を引き起こす原因遺伝子として発見されたが、遺伝子多型による疾患への影響は申請者らによって現在研究が始まったばかりである。本研究では、Vitamin K サイクルに関連する酵素の遺伝子多型を解析し、酵素活性の低下した患者における発がんリスクを解析することにより、Vitamin K の投与でがん発症を予防することを目的とする。また、臨床の場合においてがん化学療法施行中に抗がん剤が効かなくなり、がんが進行する「がん細胞の薬剤耐性化現象」が現在の化学療法における重大な障害になっている。現在まで、薬剤耐性は化学構造も作用機序も異なる複数の抗がん剤に対して耐性化する多剤耐性 (multidrug resistance: MDR) があり、このメカニズムとして、P-糖蛋白質が過剰に発現し、抗がん剤を細胞外に排出することが原因の一つとして明らかになっている。一方、ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞は、2007 年に京都大学再生医科学研究所の山中伸弥教授のグループにより、体細胞にそれぞれ 4 つの遺伝子、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC をレトロウイルスベクターで導入することによって樹立された。このヒト iPS 細胞は、1998 年 Thomson 等によって樹立されたヒト胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞と同様な、多分化能とほぼ無限の増殖能をもつ細胞である。

## 2. 研究の目的

現在のがん治療法には、治療効果に大きな個人差が存在することが問題となっている。さらに人種間で治療および予防に用いる薬物の投与量および薬物の種類が大きく異なることが明らかになっている。申請者は現在まですでに CYP2C9 および VKORC1 遺伝子多型頻度の人種差が存在し、日本人と欧米白人の VKORC1 遺伝子多型頻度の大きな人種差が存在する。本研究により薬物代謝酵素 CYP2C9 の遺伝子型の他に、Vitamin K サイクルに関与する VKORC1 遺伝子型を考慮して分類した Vitamin K 投与量を設定することにより、発がんリスクの高い患者には予防効果を発揮することを目的とする。また、医薬品開発の薬物動態試験において、ヒトにおける薬物代謝酵素誘導評価系の確立は重要である。人工多能性幹 (iPS) 細胞は、あらゆる組織細胞に分化可能で、増殖力に優れていることから、薬物動態試験のための安定した細胞供給源として期待されている。本研究では、ヒト iPS 細胞を成熟肝細胞へ分化させ、薬物代謝酵素等の発現変動評価系としての有用性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 新規に発見した変異型 VKORC1 (アミノ酸変異 Cys16Ser、Asp38Ser、His68Arg 等を有する。) を発現する大腸菌およびサルモネラ菌発現系を樹立し、Vitamin K 代謝酵素活性を解析する。血中 Vitamin K 濃度および Vitamin K 代謝酵素関連遺伝子を解析するため、群馬大学および信州大学医学部遺伝子倫理委員会および治験審査委員会の審査を受け承認をうける。

(2) (1) で樹立した大腸菌およびサルモネラ菌発現系を用い、発癌への影響を検討する。具体的には、変異原物質に対する感受性を調べ、培地中に変異原物質と Vitamin K を共存させることにより、Vitamin K が変異原物質による発がんの抑制効果があるか検討する。

(3) 肝細胞に分化させた iPS 細胞および ES 細胞を、変異原物質共存下で培養し、Vitamin K の培地への添加による発がん抑制効果を検討した。ヒト iPS 細胞は Fetch (国立成育医療研究センター研究所、梅澤ら) を用いた。ヒト iPS 細胞を activin A 処理することで内胚葉に分化させ、dimethyl sulfoxide にて肝細胞に分化誘導後、oncostatin M、dexamethasone、hepatocyte growth factor により成熟肝細胞へ分化させた。続いて、benzo [a] pyrene を培地に添加し、mRNA 発現量の変化を検討した。

## 4. 研究成果

①日本人で高頻度に存在する VKORC1 遺伝子多型を解析し、欧米人などの人種差を明らかにした。さらに、VKORC1 に加えて、CYP4F2 遺伝子多型を解析した結果、Vitamin K 代謝とワルファリン投与量の関係における人種差を明らかにした。(図1)。

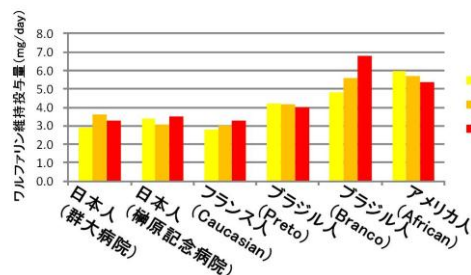


図1 ワルファリン維持投与量とCYP4F2遺伝子多型

②肝細胞様細胞に分化させた iPS 細胞は、肝細胞マーカー、薬物代謝酵素及び核内受容体の mRNA 発現が認められ、基本的な肝機能を有する細胞へ分化したことが示唆された。iPS 細胞および ES 細胞の安定した維持について検討し、細胞の培養に用いる因子や培地に関する様々な研究結果を蓄積した。iPS

細胞などの人工多能性幹細胞は、体を作るあらゆる細胞に分化可能であり、増殖力に優れていることから、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。本研究では、iPS 細胞から分化させた肝細胞様細胞の mRNA の解析を行った結果、肝細胞マーカー、CYP1A1 や CYP1B1 などの薬物代謝酵素及び CYP3A4 の誘導に関与する核内受容体や転写因子の発現が認められた。しかし、CYP3A4 および CYP1A2 の発現および誘導ほとんど見られなかった。より成熟した肝細胞を効率よく分化する方法について、さらなる検討が進行中である。また、Vitamin K サイクルに関係している酵素および代表的な薬物代謝酵素の mRNA 発現解析を行った。

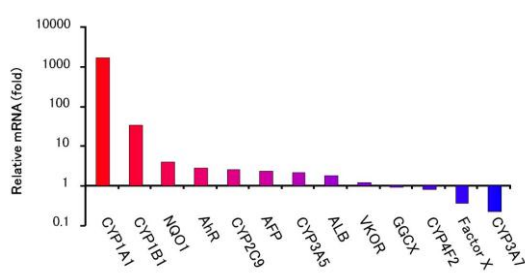


図2 肝細胞様細胞の benzo[a]pyrene による mRNA 誘導

Benzo [a] pyrene により CYP1A1、CYP1B1、CYP2C9、CYP3A5、NQO1 および AhR の mRNA 発現量はそれぞれ 1600、34、2.5、2.1、3.9 および 2.8 倍へ増加した (図 2)。一方、CYP3A7 および血液凝固第 X 因子の mRNA 発現量はそれぞれ 0.21、0.35 倍へ減少した。これより、ヒト iPS 細胞由来の肝細胞様細胞は、ヒト肝細胞と同様に薬物による酵素誘導能を有し、薬物代謝酵素の発現変動評価系として有用である可能性が示された。iPS 細胞から分化させた肝細胞様細胞が、Vitamin K サイクル関連酵素で、発がん感受性と関係があることが報告されている NQO1 の発現および benzo [a] pyrene による誘導が認められたことから、Vitamin K サイクルに関係している酵素の発現変動評価系さらには発がん予防研究の評価系として有用である可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① 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. 2013;36(2):292-298. 査読あり

② Hashita T, Katsuyama Y, Nakamura K, Momose Y, Komatsu D, Koide N, Miyagawa S, Nakamura T, Yamamoto K, Ohmori S. : Treatment of a GIST patient with modified dose of sunitinib by measurement of plasma drug concentrations. Oncol Lett. 2012;4(3):501-504. 査読あり

③ 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. Drug Metab Pharmacokinet. 2012;27(6):598-604. 査読あり

④ Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S. : Lower expression of HNF4 $\alpha$  and PGC1 $\alpha$  might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR is overexpressed in human fetal liver cells. Drug Metab Pharmacokinet. 2012;27(4):430-438. 査読あり

⑤ Matsuzawa N, Nakamura K, Matsuda M, Ishida F, Ohmori S. : Effect of *CYP2C19* gene variations on thalidomide treated patients in Japanese. Biol Pharm Bull. 2012; 35(3): 317-320. 査読あり

⑥ Nakamura K, Obayashi K, Araki T, Aomori T, Fujita Y, Okada Y, Kurabayashi M, Hasegawa A, Ohmori S, Nakamura T, Yamamoto K. : *CYP4F2* gene polymorphism as a contributor to warfarin maintenance dose in Japanese subjects. J Clin Pharm Ther. 2012;37(4):481-485. 査読あり

⑦ Araki T, Shimizu K, Nakamura T, Baba M, Kawai Y, Nakamura K, Mitani Y, Obayashi K, Aomori T, Fujita Y, Miyamae Y, Kakegawa S, Kaira K, Lezhava A, Hayashizaki Y, Takeyoshi I, Yamamoto K. : Clinical screening assay for EGFR exon 19 mutations using PNA-clamp smart amplification process version 2 in lung adenocarcinoma. Oncol Rep. 2011; 26(5): 1213-1219. 査読あり

⑧ Aomori T, Matsumoto N, Nakamura K, Fujita Y, Sekizuka M, Araki T, Nakamura T,

Yamamoto K.: Determination of landiolol in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 34(19): 2411-2419. 2011. 査読あり

⑨ Akiyoshi T, Saito T, Murase S, Miyazaki M, Murayama N, Yamazaki H, Guengerich FP, Nakamura K, Yamamoto K, Ohtani H.: Comparison of the inhibitory profiles of itraconazole and cimetidine in cytochrome P450 3A4 genetic variants. Drug Metab Dispos. 39(4): 724-728. 2011. 査読あり

⑩ Aomori T, Obayashi K, Fujita Y, Araki T, Nakamura K, Nakamura T, Kurabayashi M, Yamamoto K.: Influence of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on time to determine the warfarin maintenance dose. PHARMAZIE. 2011; 66: 222-225. 査読あり

[学会発表] (計 17 件)

①佐藤大介, 前田徹, 伊藤哲哉, 松村治穂, 中村克徳, 絵野沢伸, 齋藤伸治, 松永民秀.: 糖原病 Ib 型患者肝非実質由来 iPS 細胞の樹立と肝臓、好中球への分化誘導及び機能評価. 日本人類遺伝学会 第 57 回大会, 東京, 2012 年 10 月 25-26 日.

②Yuki Kondo, Takahiro Iwao, Sachimi Yoshihashi, Kayo Mimori, Ruri Sugiyama, Takamitsu Sasaki, Kiyoshi Nagata, Kouichi Kurose, Takuro Niwa, Satoshi Yamaori, Shigeru Ohmori, Katsunori Nakamura, Tamihide Matsunaga.: Small Molecule Compounds Enhance Differentiation to Hepatocytes from induced Pluripotent Stem Cells. 第 27 回日本薬物動態学会年会, 船堀, 2012 年 11 月 20-22 日.

③Takahiro Iwao, Kiyoshi Nagata, Katsunori Nakamura, Tamihide Matsunaga.: Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Enterocytes with Peptide Transport Function. 第 27 回日本薬物動態学会年会, 東京, 2012 年 11 月 20-22 日.

④竹田晶子, 村田稔弥, 鳥羽美恵, 丸山順也, 中村克徳, 百瀬泰行, 金井誠, 大森栄.: 妊婦に対するお薬相談 妊娠と薬情報センター拠点病院に参加して. 日本薬学会 第 132 年会, 札幌市, 2012 年 3 月 28-31 日.

⑤中村克徳, 近藤祐樹, 杉山留理, 相川香織, 松永民秀, 大森 栄.: ヒト人工多

能性幹細胞から分化させた肝細胞による薬物代謝酵素の酵素誘導評価. 日本薬学会第 132 年会, 札幌市, 2012 年 3 月 28-31 日.

⑥伊藤 真理恵, 秋好 健志, 村瀬 沙織, 宮崎 光江, 中村 克徳, 中村 智徳, Guengerich F. Peter, 山本 康次郎, 大谷 壽一.: CYP3A4 各種変異型分子種の代謝活性に対する MBI 阻害剤の阻害強度の比較. 日本薬学会第 132 年会, 札幌市, 2012 年 3 月 28-31 日.

⑦中村克徳, 大森栄.: 遺伝薬理学を用いた個別化医療の推進に関する研究. 平成 23 年度中部乳酸菌研究会, 新潟市, 2011 年 11 月 25-26 日.

⑧青沼安希子, 鈴木英二, 中村克徳, 松永民秀, 大森栄.: 正常ヒト胎児肝細胞の CYP3A 発現に及ぼす擬似低酸素誘導化合物デフェロキサミンの影響. 日本薬学会第 131 年会, 静岡市, 2011 年 3 月 28-31 日.

⑨星山望, 中村克徳, 松永民秀, 大森栄.: 大型類人猿の肝薬物代謝酵素の特性について. 日本薬学会第 131 年会, 静岡市, 2011 年 3 月 28-31 日.

⑩中村克徳, 松澤直樹, 大森 栄.: 遺伝子多型を考慮したサリドマイド適正使用の試み. シンポジウム 20 病院薬剤師による薬物治療個別化への遺伝子情報の活用. 第 20 回日本医療薬学会年会, シンポジスト, 千葉市, 2010 年 11 月 13-14 日.

⑪坂下真大, 勝山義彦, 松澤直樹, 井上博夫, 栗崎功己, 田辺智明, 中村克徳, 百瀬泰行, 西沢 理, 大森栄.: 腎細胞癌患者におけるスニチニブ血中濃度と副作用の相関性. 第 20 回日本医療薬学会年会, 千葉市, 2010 年 11 月 13-14 日.

⑫中村克徳, 大森栄.: ビタミン K 代謝の個人差と血栓塞栓症発症リスク因子の解析. 平成 22 年度中部乳酸菌研究会, 松本市, 2010 年 11 月 26-27 日.

⑬青沼安希子, 鈴木英二, 中村克徳, 松永民秀, 大森栄.: 正常ヒト胎児肝細胞の CYP3A 発現に対する擬似低酸素誘導化合物の効果. 第 20 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 22 年度 日本薬学東海支部例会, 静岡市, 2010 年 11 月 28 日.

⑭丸山順也, 坂本栄, 松永民秀, 中村克徳, 菊池伸次, 大森栄.: サル ES 細胞の肝細胞への分化と薬物動態研究 (DIFFERENTIATION

OF MONKEY EMBRYONIC STEM CELLS TO HEPATOCYTES AND PHARMACOKINETIC STUDIES). 第 25 回日本薬物動態学会年会, 大宮市, 2010 年 10 月 7-9 日.

⑮土屋広行, 松永民秀, 中村克徳, 市川比奈子, 佐々木克典, 大森栄.: ヒト ES 由来肝細胞の CYP1A 誘導剤検出系としての評価 (EVALUATION OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS- DERIVEDHEPATOCYTES TO DETECTION SYSTEM OF CYPIA INDUCER). 第 25 回日本薬物動態学会年会, 大宮市, 2010 年 10 月 7-9 日.

⑯松澤直樹, 中村克徳, 百瀬泰行, 松永民秀, 松田正之, 大森 栄.: CYP2C19 遺伝子多型によるサリドマイド体内動態変化に関する研究. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 宜野湾市, 2010 年 6 月 16-18 日.

⑰勝山善彦, 坂下真大, 松澤直樹, 中村克徳, 西澤 理, 大森 栄.: HPLC-UV 検出器を用いた Sunitinib および活性代謝物 N-desethylsunitinib 血中濃度測定法の確立と臨床応用. 第 27 回日本 TDM 学会学術大会, 札幌市, 2010 年 6 月 26-27 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 克徳 (NAKAMURA KATSUNORI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：20361363

### (2) 研究分担者

松永 民秀 (MATSUNAGA TAMIHIDE)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：40209581

大森 栄 (OHMORI SHIGERU)

信州大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70169069