

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590157

研究課題名(和文)代謝活性化を考慮した医薬品のin vitroアレルギー性試験法の開発

研究課題名(英文)Development of an in vitro allergenicity test method for drugs considered metabolic activation

研究代表者

黒瀬 光一 (KUROSE, Kouichi)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：30280754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品に対する簡便でハイスループットなin vitroアレルギー性試験法を確立するために、ヒト単球様株化細胞THP-1を用いたリアルタイムRT-PCR法による評価系を開発した。また、この評価系に用いる細胞株として、多くの医薬品代謝に関わっている代表的なCYP分子種であるCYP3A4を安定発現するCYP3A4安定発現THP-1細胞株を樹立した。

研究成果の概要(英文)：Using human monocytic cell line THP-1, we developed a simple and high-throughput method to evaluate drug allergenicity in vitro, which is utilizing real-time RT-PCR. In addition, we established the cell lines, from THP-1, stably expressing a representative drug metabolizing enzyme CYP3A4, which is expected to be utilized for our new method above mentioned.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インビトロ試験法 薬物アレルギー 感作性

1. 研究開始当初の背景

薬物アレルギーは予測が難しく、アナフィラキシー等の重症例では死に至る場合も有ることから、前臨床段階での予測が医薬品開発において重要である。しかしヒトにおけるアレルギー性(感作性)は、動物を用いた試験で必ずしも予測することはできず、未だ確立された試験法は無い。一方、化粧品等によるアレルギー性接触皮膚炎に対しては、ヒト単球様培養細胞 THP-1 を用いた human Cell Line Activation Test (h-CLAT) 法の有用性が認められ、in vitro 皮膚感作性試験法として確立されつつある。そこで、申請者らは h-CLAT 法を外用だけでなく、全身投与を目的とした医薬品に適用できないかと考え、アレルギー性副作用の起因薬として報告のあるいくつかの薬物に対して h-CLAT を行ったところ、いずれも陽性判定を得ることができた。これにより、h-CLAT の医薬品への適用が可能であることが示唆された。ただし、医薬品の多くは薬物代謝酵素で代謝されることにより生じる反応性代謝物が生体内分子と結合し、アレルギー性を獲得すると考えられるので、薬物代謝能の低い THP-1 細胞を用いて医薬品の in vitro アレルギー性試験法を開発する場合、何らかの工夫が必要となる。また、h-CLAT では THP-1 細胞に被験物質を暴露し、発現誘導される CD86 (B7-2: 共刺激分子) および CD54 (Intercellular adhesion molecule-1: 接着分子) の細胞表面発現量を、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリーにて測定し、被験物質の感作性を評価するが、この方法は煩雑でスループットも低い。以上のことから申請者は、THP-1 細胞上の表面抗原 CD86 と CD54 がアレルギー性被験薬物により発現誘導されることをベースに、薬物代謝酵素による被験物質の代謝を考慮し、さらに、簡便性とハイスループット化を加味した試験系を開発することとした。

2. 研究の目的

CD86 および CD54 分子の発現誘導をより簡便に検出するために、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の 5' 上流にそれぞれの遺伝子の発現制御領域を組み込んだレポータープラスミドを構築し、THP-1 への導入を行い、CD86・CD54 遺伝子のレポーター遺伝子アッセイ用安定発現株を樹立する。また、医薬品の代謝を考慮するために、薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) を安定発現する THP-1 細胞株を樹立する。樹立した細胞株を用いて、薬物代謝酵素による代謝を考慮した簡便でハイスループットな in vitro アレルギー性試験法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) CD86、CD54 の遺伝子発現制御領域のクローニングと転写活性の解析
感作性物質による遺伝子発現応答に関与

する制御領域を特定するために、in vitro アッセイ系として使用するヒト単球由来の THP-1 細胞より抽出・精製したゲノム DNA を鋳型に用いて、PCR 法により、CD86、CD54 遺伝子の転写開始点から上流 7.9kb、7.2kb をそれぞれ増幅し、ルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングした。さらに 5' 欠失変異体 (CD54 は 5.8 kb と 4.5 kb、CD86 は 4.2 kb と 2.3 kb) を作成し、THP-1 細胞に対する一過性発現によるレポーターアッセイにより、既知感作性物質に対する応答性を解析した。

- (2) 安定発現用 EBV-based Episomal 型ベクターによる CYP3A4 および POR 安定発現株樹立の試み

多くの医薬品代謝に関わっている代表的な CYP 分子種である CYP3A4 と、CYP の活性発現に必要な NADPH-P450 酸化還元酵素 (POR) を THP-1 細胞に安定発現させるために、ベクターには、細胞分裂後の娘細胞にプラスミドとして分配され、安定的に維持されていく EBV-based Episomal 型ベクター (pEBMulti) を用いて CYP3A4・POR 発現プラスミドを構築し、それぞれ G418・Hygromycin B 選択培地にて安定発現株樹立を試みた。

- (3) CD86、CD54 遺伝子のレポーター遺伝子アッセイ用安定発現株の樹立

レポーターベクター pNLuc3.1 に Zeocin 耐性遺伝子を導入したベクターを新たに作製し、これに CD86 及び CD54 の遺伝子発現調節領域を組み込んだレポーター遺伝子プラスミドを作製した。プラスミドを THP-1 細胞にトランスフェクションし、Zeocin 選択培地を用いて薬剤耐性を指標にして限界希釈法により各々安定発現株を得た。得られた安定発現株に対してルシフェラーゼアッセイを行い、感作性物質応答性を解析した。

- (4) CD86 および CD54 を指標としたリアルタイム RT-PCR 法によるアレルギー性評価系

被験物質として、感作性物質および非感作性物質を用い、細胞生存率が 75% となる濃度で THP-1 細胞に暴露し、24 時間後に細胞を回収後、リアルタイム RT-PCR 法にてマーカー分子である CD86 および CD54 の発現量を解析した。感作性の評価は、GAPDH を内在性コントロールとし、溶媒のみの暴露時に対するマーカー分子の相対発現量を Cq 法により算出し、感作性物質を陽性、非感作性物質を陰性として検出可能な条件を検討した。

- (5) CYP3A4 安定発現 THP-1 細胞株の樹立と特性解析

CYP3A4 を THP-1 細胞に安定発現させるために pIREShyg3 ベクターに CYP3A4

cDNA をサブクローニングし、発現プラスミドを作製した。プラスミドを THP-1 細胞にトランスフェクションし、Hygromycin 選択培地を用いて薬剤耐性を指標にして限界希釈法により安定発現株を得た。CYP3A4 遺伝子の発現は RT-PCR 法により解析した。酵素活性については、P450-Glo CYP3A4 Assay により解析し、CYP3A4 の阻害剤である ketoconazole による阻害実験も行った。また、CYP3A に特異的なミダゾラム水酸化活性を測定した。

4. 研究成果

(1) CD86、CD54 の遺伝子発現制御領域のクローニングと転写活性の解析

CD86、CD54 遺伝子の発現制御領域それぞれ上流 7.9kb、7.2kb までの領域についてレポーター遺伝子アッセイを行ったところ、応答性は 5' 側の欠失度合、感作性物質により異なったが、CD86、CD54 それぞれ 7.9kb、7.2kb までの領域に陽性感作性物質に対する応答性が認められた。このことにより、欠失変異体を含めて、CD86、CD54 それぞれ最長 7.9kb、7.2kb までの領域を含むレポータープラスミドを用いてレポーターアッセイ用安定発現細胞株を作製することにした。

(2) 安定発現用 EBV-based Episomal 型ベクターによる CYP3A4 および POR 安定発現株樹立の試み

CYP3A4 および POR cDNA をそれぞれ Episomal 型ベクターである pEBMulti-Neo、pEBMulti-Hyg にサブクローニングし、各発現プラスミドを Nucleofector により THP-1 細胞に導入し、G418 あるいは Hygromycin B 選択培地にて培養を続けたが、継代を重ねるごとにプラスミドの脱落が生じた。トランスフェクションの条件や薬剤の濃度を様々に検討したが、安定発現株は得られなかった。そこで、安定発現株の樹立には従来法である宿主細胞染色体に組み込む方法で行うことにした。

(3) CD86、CD54 遺伝子のレポーター遺伝子アッセイ用安定発現株の樹立

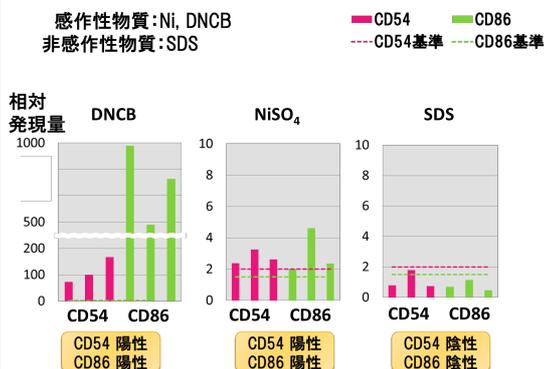
得られた安定発現株に感作性物質を暴露し、ルシフェラーゼアッセイにより感作性物質に対する応答性を解析した。その結果、2 倍程度の応答性を示す安定発現株が得られたが、応答性の高いクローンはいずれも細胞増殖速度が遅く、実用性に欠けることが判明した。

(4) CD86 および CD54 を指標としたリアルタイム RT-PCR 法によるアレルゲン性評価系

ルシフェラーゼレポーターアッセイ用安定発現細胞株を用いたアッセイ系の構築が当初の予定通りに進まないことから、THP-1 細胞

に被験物質を暴露することによって、誘導される CD86 と CD54 の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法により検出し、感作性を評価する方法を試みた。被験物質は、感作性物質として NiSO₄ および 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) を、非感作性物質として sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いた。溶媒暴露時に対する被験物質暴露時の CD86 および CD54 の相対発現量を求め、陽性基準を h-CLAT と同じく、CD86 で 1.5 倍以上、CD54 で 2.0 倍以上とした場合、独立した 3 回の試験全てで、感作性物質を陽性、非感作性物質を陰性と正しく判定することができた (図 1)。

図 1 リアルタイム RT-PCR 法による CD86 および CD54 を指標とした感作性評価



本方法は、h-CLAT と比較すると、操作が簡便であり、かつ、96 穴プレートで行うことができるため、ハイスループットな試験系であるといえる。

(5) CYP3A4 安定発現 THP-1 細胞株の樹立と特性解析

Hygromycin 選択培地を用いたスクリーニングにより得られた薬剤耐性株が CYP3A4 を発現しているのかどうか、まず、CYP3A4 遺伝子の発現を RT-PCR 法により確認した。酵素活性については、P450-Glo CYP3A4 Assay により解析し、CYP3A4 活性シグナルを確認した。さらに、活性シグナルが CYP3A4 の阻害剤である ketoconazole により阻害されたことから、CYP3A4 活性を有することが確認できた (図 2)。また、CYP3A に特異的なミダゾラム水酸化活性が検出されたことから、本薬剤耐性株が CYP3A4 に特異的な薬物代謝活性を実際に有していることが明らかになった。以上のことから CYP3A4 安定発現 THP-1 細胞株の樹立に成功したといえる。本安定発現株は、CYP3A4 による医薬品の代謝活性化を考慮した評価系に有用であると考えられる。

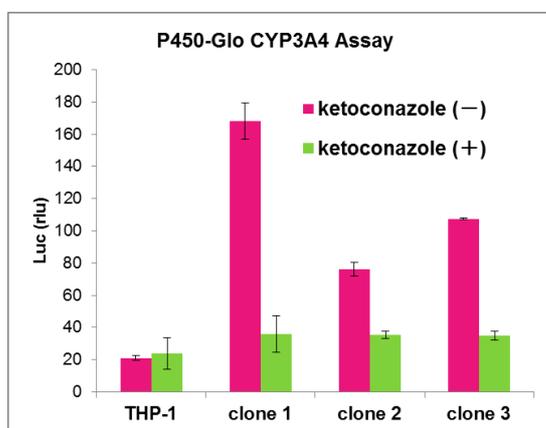


図2 CYP3A4 安定発現 THP-1 細胞株
ketoconazole による CYP3A4 活性の阻害

今後は、上記(5)で樹立した CYP3A4 安定発現 THP-1 細胞株を用いて、上記(4)の評価系を、CYP3A4 で代謝されるアレルギー性副作用頻度の高い、または低い薬物について実施し、測定結果と被験薬物のアレルギー性副作用発生頻度の情報をもとに、陽性・陰性の判定基準の最適化を行うとともに、細胞培養条件、被験薬物暴露時間等の検討を行い、試験法として設定すべき基準を定める必要がある。

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)

[学会発表](計 1 件)

西川真帆、西窪太志、清信智、嶋倉邦嘉、田代康介、黒瀬光一：THP-1 細胞を用いた食品含有低分子化合物のアレルゲン性評価の試み、日本食品化学学会第 21 回 総会・学術大会、2015 年 5 月 21 日、東京ビッグサイト (東京都江東区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒瀬 光一 (KUROSE, Kouichi)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：30280754

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし