

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893153

研究課題名(和文) ヒト人工染色体を用いた薬物膜透過に伴う薬物代謝予測可能な新規動態モデル開発

研究課題名(英文) The pharmacokinetic model development observing drug metabolism with the drug membrane transport using the human artificial chromosome.

研究代表者

佐藤 大介 (SATO, Daisuke)

鳥取大学・染色体工学研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：40734992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消化管における薬物代謝と薬物吸収を同時に評価可能なモデルを作製することを目的とした。方法は、我々の研究室が開発した人工染色体に目的遺伝子を搭載し、それを消化管細胞Caco-2細胞へと移入することを目指した。今回の開発では、CYP過剰発現Caco-2作製のための人工染色体を構築した。さらに構築した人工染色体は別のヒト由来細胞 (HT1080細胞)に移入することが可能であることを示した。さらにこの人工染色体はHT1080細胞内にて導入遺伝子を保持し、タンパク発現を有すること示した。今後、本研究にて開発した人工染色体をCaco-2細胞に移入することで、本目的を達成できることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was intended that I made evaluable gastrointestinal models for drug metabolism and the drug absorption at the same time. The method carried the purpose genes in the artificial chromosome which our laboratory developed and aimed at carrying it into gastrointestinal cells (Caco-2 cells). By this development, I built an artificial chromosome for CYPs overexpression-Caco-2 cells. Furthermore, the artificial chromosome which I built showed what I could put into a cells (HT1080 cells) derived from different human cells. Furthermore, this artificial chromosome held transgene in an HT1080 cells and showed that I had protein expression. It will be thought that I can achieve this purpose by carrying the artificial chromosome which I developed in this study into Caco-2 cells in future.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬物代謝酵素 CYP シトクロムP450 薬物動態 薬物代謝 肝細胞 HepG2

## 1. 研究開始当初の背景

経口バイオアベイラビリティを予測する方法は、実験動物を用いた実験結果を生理学的モデルに組み込むことにより、ある程度可能である。しかし、薬物代謝関連酵素やトランスポーターの種差のため、吸収と初回通過代謝の結果が決定される消化管における薬物動態のより正確な予測にはヒト正常細胞あるいは組織等を用いたモデル系が望ましい。小腸は代謝の寄与が小さいと考えられ、主に吸収・排泄が注目されてきた。しかし、小腸では上皮細胞を透過する際にほぼすべての薬物が代謝酵素に暴露されるため、代謝酵素の絶対量以上に小腸の寄与は大きく、CYP3A で代謝される医薬品の体内動態や薬物相互作用に小腸の初回通過代謝が大きく関わることが最近知られるようになってきた。特に、CYP3A と MDR1/P-gp に対して重複する基質においては相乗的な相互作用が考えられている (1, 2)。また小腸には CYP3A と共に複数のグルクロン酸転移酵素 (UGT) が高発現しており、これらによる Raloxifene をはじめとする薬物の低い吸収性の要因であることも報告されている (3)。従って、CYP 以外の代謝酵素や薬物トランスポーターも考慮した総合的な小腸代謝評価の重要性が高まってきている (4, 5)。しかし、ヒト正常小腸上皮細胞の入手はほぼ不可能であるため、薬物の吸収・排泄の予測には大腸がん由来 Caco-2 細胞が最もよく利用されている。しかし Caco-2 細胞は薬物トランスポーターの発現が小腸とは異なる上に、CYP3A4 など薬物代謝酵素の発現量が極めて低い。また、受容体 PXR が発現していないため酵素誘導の評価ができないなどさまざまな欠点がある。一方、そうした薬物代謝酵素の発現が低いことが課題であったことから、CYP3A4 やその関連遺伝子を導入した Caco-2 細胞の作製がウイルスベクターなどを用いて行われてきた。しかし、そのような細胞では、長期的に培養をすると遺伝子発現が低下するという課題がある。また、安定発現を目的としたウイルスベクターを利用した場合、ベクターはランダムに宿主染色体上に挿入されるため、本来の細胞の性質を変化させる懸念がある。さらに、挿入部位やコピー数の違いによって各細胞クローン間に発現量の差異を生じさせるため、コントロールが困難である。そのため、これらの課題を克服するためのベクター技術を用いて薬物代謝関連遺伝子を導入した Caco-2 細胞を作製する必要性が製薬会社等から望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究は、小腸と比較し Caco-2 細胞に欠けた薬物動態関連遺伝子を人工染色体技術を用いて複数遺伝子を導入することで小腸代謝レベル・薬物応答レベルの細胞株を樹立する。尚且つ、小腸膜輸送時における薬物代謝能について予測可能な評価系を構築するこ

とを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 人工染色体ベクターへの遺伝子搭載ベクターの構築

小腸上皮細胞で発現する CYP 分子種 CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 および還元酵素 POR cDNA を強制発現プロモーター-CAG 下流に搭載した。さらに、遺伝子発現を安定にする配列であるインスレーターで上記遺伝子を挟み、人工染色体ベクターに搭載できるように遺伝子サイトを搭載した環状ベクターを構築した。

### (2) 遺伝子搭載ベクターの人工染色体導入 CHO 細胞への移入

上記で作製した環状ベクターと Cre 発現ベクターを人工染色体導入 CHO 細胞へ一過性に導入することで、人工染色体ベクター上に目的遺伝子を搭載した。

### (3) 目的遺伝子搭載細胞の取得

トランスフェクションした細胞は翌日継代を行い、翌々日からヒポキサン、アミノプテリン、ン、チミジン (HAT) 含有培地にて選択培養を行い、モノクローン化した。目的の遺伝子を搭載した細胞クローンの確認は、PCR 法、FISH 法により選別した。

### (4) 遺伝子搭載人工染色体ベクターの HT1080 細胞への移入

CHO 細胞から目的遺伝子搭載人工染色体を微小核細胞融合法により、HT1080 細胞に導入し、目的の人工染色体が導入されたクローンを PCR 法、FISH 法により選別した。

## 4. 研究成果

### (1) 人工染色体ベクターへの遺伝子搭載ベクターの構築

人工遺伝子合成にて目的 CYP 遺伝子 4 種類および POR を合成し、その両端を XhoI-NotI site にて切断した後に、強制発現プロモーター (CAG) 保持ベクター下流の XhoI-NotI site にライゲーションし、CAG-CYP プラスミドおよび CAG-POR プラスミドを各種作製した。次に、各 CAG-CYP プラスミドおよび CAG-POR プラスミドを SalI-AvrII site にて切断した後に、インスレーター配列 (ins) 保持ベクター下流の SalI-AvrII site にライゲーションし、各 ins-CAG-CYP プラスミドおよび ins-CAG-POR プラスミドを各種作製した。その後、ins-CAG-CYP2C9 プラスミドを NheI-AscI site にて切断し、AscI-AvrII site にて切断した ins-CAG-CYP2C19 をライゲーションし、ins-CAG-CYP2C19-ins-CAG-CYP2C9 プラスミドを作製した。同様に、ins-CAG-CYP2D6 プラスミドを NheI-AscI site にて切断し、AscI-AvrII site にて切断した ins-CAG-CYP3A4 をライゲーションし、ins-CAG-CYP3A4-ins-CAG-CYP2D6 プラスミ

ドを作製した。

最後に前述にて作製したプラスミドを AscI-AvrII site にて切断し、NheI-AscI site にて切断した ins-HPRT 保持 P1-derived artificial chromosome (PAC) に順次ライゲーションし、4 種類の CYP 遺伝子および POR 配列を搭載した PAC ベクターを作製した (図 1 左)。PAC コンストラクト作製の各段階では PCR 解析にて各目的遺伝子が順次搭載されていることを確認した(図 1 右)。

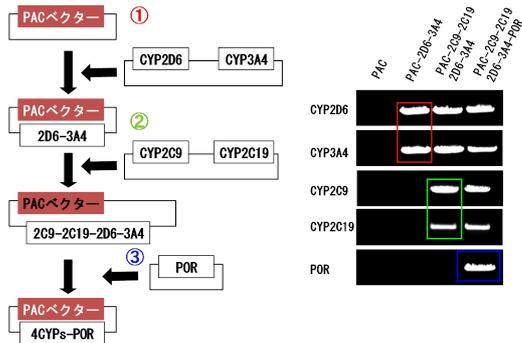


図 1. 人工染色体へ搭載するための PAC ベクターコンストラクト

図左はコンストラクト作成のためのフローチャート。図右は作成した各段階における遺伝子領域を PCR にて確認した電気泳動の結果

### (2) 遺伝子搭載ベクターの人工染色体導入 CHO 細胞への移入

上記で作製した環状 PAC ベクターと Cre 発現ベクターを人工染色体導入 CHO 細胞へ一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は翌日継代を行い、翌々日から HAT 含有培地にて選択培養を行い、トランスフェクションした遺伝子を保持する人工染色体保持 CHO 細胞をクローニングし、合計 40 株の HAT 耐性 CHO 細胞を取得した。取得した 40 株の CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 および POR の遺伝子発現量を real-time PCR にて解析を行ったところ、トランスフェクション前に発現が認められなかった CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 および POR の発現が認められた。図 2 は、real-time PCR の結果、導入した各遺伝子間の発現量が同程度であるものを 4 株選択し、電気泳動した結果である。

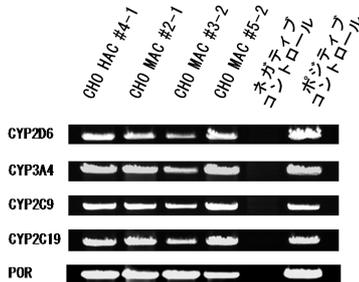


図 2. 人工染色体への目的遺伝子の搭載

ネガティブコントロールにはトランスフェクション前の CHO 細胞、ポジティブコントロールには導入した PAC を用いた。

次に前述した導入した 5 種類の遺伝子発現のコピー数が同程度である 4 株の FISH 解析を行った(図 3)。その結果、CHO 細胞の宿主染色体の他に、人工染色体を示すシグナルが認められた。さらに人工染色体上には導入した 5 種類の遺伝子を示すシグナルも観察することができたことから、目的人工染色体を作製したことを確認した。

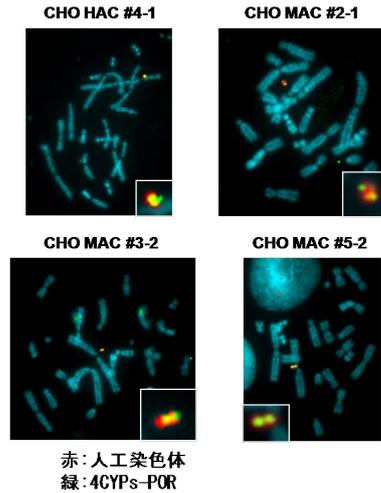


図 3. CHO 細胞における FISH 解析

### (3) 遺伝子搭載人工染色体ベクターの HT1080 細胞への移入

前述で作製した人工染色体保持 CHO 細胞に麻疹ウイルスエンヴェロップを一過性に発現させた。翌日細胞を継代し、翌々日 0.1 μg/mL コルセミドを 72 時間処理することで CHO 細胞内にて微小核を形成した。その後サイトカラシン存在下にて 11,800 × g にて遠心分離し、微小核を単離した。その後得られた微小核を精製処理し、あらかじめ培養していた HT1080 細胞と共培養することで、細胞と微小核を融合させた。その後、人工染色体保持 HT1080 細胞を取得することを目的として、予め人工染色体に搭載しているネオマイシン耐性遺伝子を利用し G418 にて選択培養を行った。最終的に HT1080 細胞から 1 株の G418 耐性クローンを取得した。得られた G418 耐性クローンの CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 および POR の遺伝子搭載を genomic PCR にて確認したところ人工染色体に搭載した配列を有することを示した(図 4)。

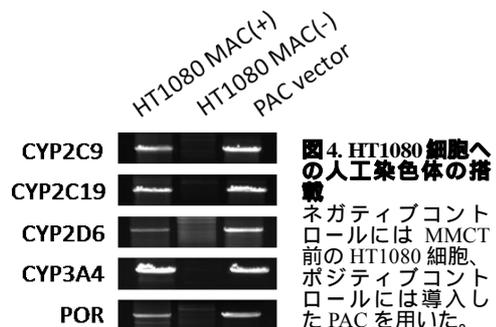


図 4. HT1080 細胞への人工染色体の搭載  
ネガティブコントロールには MMCT 前の HT1080 細胞、ポジティブコントロールには導入した PAC を用いた。

導入した人工染色体にとる遺伝子発現を免疫染色にて解析を行ったところ、トランフェクション前に発現が認められなかった CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 および POR の発現が認められた(図 5)。

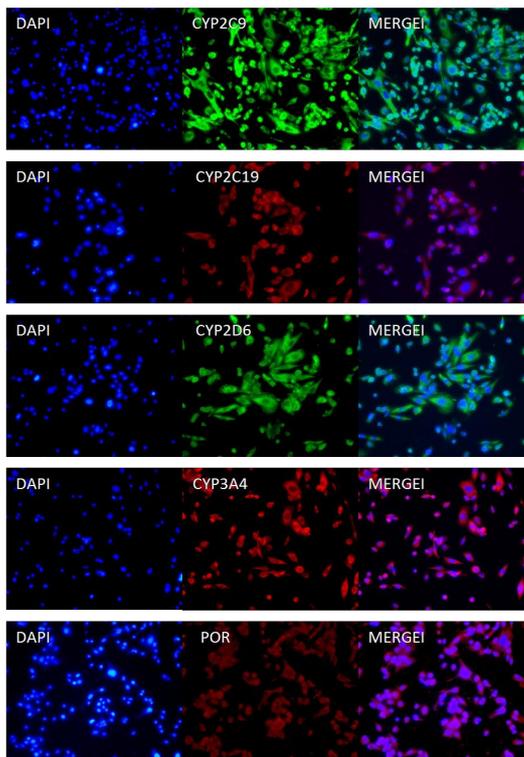


図 5. 人工染色体搭載 HT1080 細胞の免疫染色

今回の開発では、CYP 過剰発現 Caco-2 作製のための人工染色体を構築した。さらに構築した人工染色体は別のヒト由来細胞 (HT1080 細胞) に移入することが可能であることを示した。さらにこの人工染色体は HT1080 細胞内にて導入遺伝子を保持し、タンパク発現を有すること示した。今後、本研究にて開発した人工染色体を Caco-2 細胞に移入することで、本目的である吸収と代謝を同時評価可能な薬物動態モデルを構築することができることが考えられる。

#### 参考文献

1. Int J Pharm 277: 3-9, 2004
2. Curr Drug Metab 14: 102-111, 2013
3. Drug Metab Pharmacokinet 26: 592-601, 2011
4. Drug Metab Rev 43, 476-498, 2011;
5. Drug Metab Dispos 41, 2033-2046, 2013

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 大介 (SATO, Daisuke)  
鳥取大学 染色体工学研究センター  
プロジェクト研究員  
研究者番号: 40734992

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし