

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20590142

研究課題名（和文） ヒト胎児肝細胞における CYP3A 分子種の発現変動要因の解明

研究課題名（英文） Expression Mechanism of CYP3A Isozymes in Human Fetal Liver Cells

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ヒト胎児肝(HFL)細胞では関連する核内受容体および転写を活性化するコアクチベーターの発現量が低いことが成熟肝細胞との薬物に対する CYP3A4 の誘導性に差が認められる原因であることが示唆された。また、HFL 細胞の擬似低酸素誘導化合物 DFO による CYP3As 誘導に低酸素誘導因子 HIF は直接関与せず、胎児特異的な応答性を示した。本研究より、胎児のような未熟な肝細胞は成熟肝細胞とは異なる CYP3As 発現調節機構を持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In HFL cells overexpressed PXR, RIF-mediated CYP3A4 induction was insufficient compared with HepG2 cells. Lower expression of HNF4 α and PGC1 α might impair RIF-mediated CYP3A4 induction in HFL cells. The expression levels of CYP3A4, CYP3A7 and VEGF mRNAs were significantly increased by DFO. The expression levels of CYP3A4 and CYP3A7 mRNAs in HFL cells were reduced by hypoxia (3%O₂), although the expression level of VEGF mRNA was enhanced. These results suggest that character of immature liver cells such as HFL cells with regard to CYP expression is different from that of highly differentiated human hepatocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	4,100,000	1,230,000	5,330,000

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：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

ヒトシトクロム P450 (CYP) 3A サブファミリーに属する分子種は、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 および CYP3A43 の 4 種類の存在が知られている。CYP3A4 はヒト成人肝の主要な分子種であるのに対して、CYP3A7 は胎児肝に特異的に発現している。

ヒト胎児の細胞や組織を用いた研究は、国内外でこれまで殆ど研究されていない。我々は、ヒト胎児肝細胞 (HFL 細胞) を用いた研究から、胎児での薬物代謝酵素の発現調節が成人とは異なるということを示した。しかし、その原因は不明のままである。

低酸素分圧で成熟肝細胞 HepaRG の CYP3A4 の発現は抑制されることが報告された。低酸素状態で活性化される転写因子 Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)が見出されて、低酸素応答系のタンパク質や酵素ならびに応答の分子機構の研究は急速に進展した。この低酸素の擬似状態を作る化合物としてデスフェロキサミン (DFO) が知られている。胎児は低酸素状態にあることから、低酸素条件下における CYP3A 分子種の調節機構を明らかにすることは、胎児の薬物動態を予測するには重要である。

2. 研究の目的

本研究は、薬物代謝型 CYP の主要な分子種である CYP3A の胎児における発現調節機構を解明すること目的とした。

3. 研究の方法

1) 細胞

本研究で用いた HFL 細胞は胎齢約 13 週の 6 胎児肝を混合した初代肝細胞であり、米国 Applied Cell Biology Research Institute 社がインフォームドコンセントに基づいて研究用に取得したものであり、大日本製薬 (現 大日本住友製薬) を通して入手した。HepG2 細胞は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより、293A 細胞は、東北大学薬学部薬物動態学研究室より御恵与頂いた。

2) アデノウイルス

本研究で用いた lacZ、ヒト PXR (hPXR)、ラット RXR α (rRXR α)、pGL3-Basic、pSEAP2-basic、CYP3A4-362-7.7k-Luciferase (Ad-CYP3A4-362-7.7k-Luc) および CYP3A 遺伝子上流約 10kb の配列を持つ組換え体アデノウイルス (pCYP3A4、pCYP3A7) は山添康教授 (東北大学薬学部薬物動態学研究室) および永田 清教授 (東北薬科大学薬学部環境衛生学教室) より御恵与頂いた。

3) 試薬

実験に使用した試薬類は市販品のキット

類、特級または生化学用のものを使用した。

4) 細胞の培養

HFL 細胞および HepG2 細胞は、予め 0.05% コラーゲン処理したフラスコにて 5% CO₂/95% air 条件下 CO₂ インキュベーター中 37°Cにて培養した。また、低酸素の影響については、5% CO₂/3% O₂/92% N₂ 条件下 CO₂ マルチガスインキュベーター中 37°Cにて培養した。

5) 薬物処理

薬物処理は、誘導剤を添加した FBS 含有培地で 48 時間培養することにより行った。誘導剤は、リファンピシン(以下 RIF、最終濃度 40 μ M)、ミフェプリストン(RU486、10 μ M)、クロトリマゾール(CTZ、5 あるいは 10 μ M)、デキサメタゾン(DEX、100 μ M)を DMSO に溶解して用いた。なお、DMSO は最終濃度 0.1% となるように添加し、DMSO のみを添加して培養したものをコントロールとした。また、DFO は培地に添加して一定期間培養することにより行った。

6) 総 RNA の抽出

総 RNA は、TRIzol Reagent あるいは市販のキットを用いて抽出した。

7) 逆転写反応

cDNA は SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR を使用し、添付マニュアルに従い SuperScript III Reverse Transcriptase を用いて合成した。

8) RT-PCR

PCR は最終容量 25 μ L とし、TaKaRa Ex Taq を用いて行った。

9) リアルタイム PCR 法による解析

反応は、7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて行った。発現量は内標準の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の値で補正した。

10) ルシフェラーゼ活性の測定

細胞溶解液 20 μ L、Luciferase Assay Reagent 35 μ L を 1.5 mL チューブに添加し、懸濁させた後 Sirius Luminometer (Berthold)で測定した。

11) テストステロン 6 β -水酸化活性に及ぼす DFO の影響

HFL 細胞培養時の培地中にテストステロンを添加し、6 時間培養、生成した培地中の代謝物を LC-MS/MS を用いて分析した。

4. 研究成果

4-1. hPXR 過剰発現の CYP3A4 mRNA 発現に及ぼす影響

HepG2 細胞では、hPXR 導入に関わらず RIF と同様に RU486、CTZ および DEX によって CYP3A4 が誘導された。hPXR を導入していない場合、RIF による誘導が最も強く、DMSO に対して 11 倍の発現量の増加を示した。一方、RU486 および CTZ に関して、各々 7 および 7.4 倍の発現量の増加が確認された。DEX においては、4 倍の発現量の増加がみられた (Fig. 1)。hPXR を導入すると、誘導剤の添加の有無に関わらず mRNA の発現量がいずれの分子種においても増加した。誘導剤を添加すると mRNA の発現量はさらに増加し、特に CTZ において最も強い誘導が認められ、DMSO と比較して 3.8 倍に発現量が増加した (Fig. 1)。

次いで HFL 細胞を用いて検討した。hPXR を導入していない場合には、RIF と同様に CYP3A4 の RU486 および CTZ による誘導は全くみられなかった。一方、HFL 細胞では DEX を添加した場合のみで誘導が確認され、3.4 倍に発現量は増加した。hPXR を導入すると、HepG2 細胞と同様に誘導剤の添加の有無に関わらず、CYP3A4 mRNA の発現量が増加した。HFL 細胞では hPXR を導入した場合でも DEX が最も強い誘導を示し、DMSO と比較してその誘導倍率は 2.8 倍であった。他の誘導剤に関しても、hPXR の過剰発現によって HepG2 細胞程ではないが CYP3A4 mRNA の発現量は増加傾向を示した (Fig. 1)。

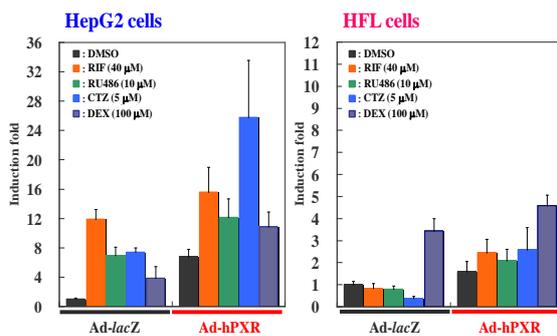


Fig. 1 SYBR Green real-time RT-PCR analysis of CYP3A4 gene expression in HepG2 and HFL cells.

4-2 CYP3A4 プロモーター活性に及ぼす Ad-hPXR および各種誘導剤の影響

hPXR の結合領域である DR-3 と ER-6 は、CYP3A4 のプロモーター領域の上流に存在する。本実験では HFL 細胞における CYP3A4 のプロモーター活性に及ぼす Ad-hPXR およ

び誘導剤の影響を検討するために、Ad-CYP3A4-362-7.7k-Luc を用いたレポータージーンアッセイを行った。レポーター遺伝子の導入には hPXR の導入と同様にアデノウイルスを用いて行った。

ポジティブコントロールとして用いた HepG2 細胞では、hPXR 導入に関わらず RIF、RU486 および CTZ により CYP3A4 のプロモーター活性が増加した。hPXR を導入しない場合は、RIF で最も強い誘導が認められ、DMSO と比較して 31.3 倍に、RU486 および CTZ では、各々 4.8 および 5.2 倍にプロモーター活性が増加した。hPXR を導入すると、誘導剤の添加に関わらずプロモーター活性は増加し、Ad-lacZ、DMSO 処理に比べ 33.7 倍になった。hPXR を導入し、誘導剤を添加するとプロモーター活性はさらに増加し、DMSO と比較して RIF で 12.3 倍、RU486 で 6.12 倍、CTZ では 5.22 倍となった (Fig. 2)。

一方、HFL 細胞では、hPXR を導入しない場合において CTZ で最も強いプロモーター活性の増加がみられたが、DMSO の約 2.5 倍で、HepG2 細胞と比較すると増加の程度は低かった。hPXR を導入すると、HepG2 細胞と同様に誘導剤の添加の有無に関わらずプロモーター活性は増加し、Ad-lacZ、DMSO 処理に比べ 2 倍になった。hPXR を導入し、さらに誘導剤を添加すると CTZ において最も強い誘導が認められ、DMSO と比較してプロモーター活性は 7.2 倍に増加した。RIF および RU486 に関しても、hPXR の過剰発現によって HepG2 細胞程ではないがプロモーター活性は増加傾向を示した (Fig. 2)。

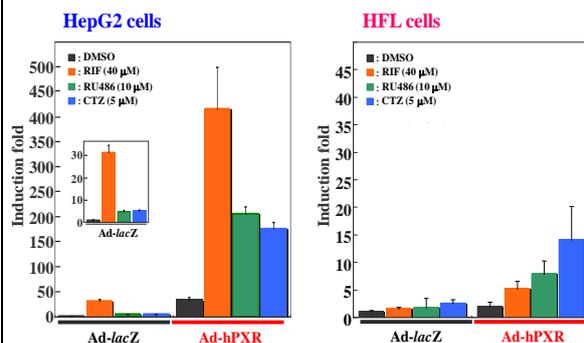


Fig. 2 Luciferase reporter gene assays of CYP3A4 promoter region in HepG2 and HFL cells.

4-3 CYP3A4 発現に関与する転写調節因子発現量の解析

HepG2 細胞における HNF4α の発現は対照とした成人の肝臓の 57% であった (Fig. 3)。一方、HFL 細胞では成人の肝臓の 17% であり、これは HepG2 細胞の 3分の1 程度の発現量に

相当する。また、HFL 細胞における PGC1 α の発現量は HepG2 と同程度で、HNF4 α と共に成人の肝臓の 20%以下であった。SRC1 の発現量は、HepG2 細胞では成人に対して 25% と少なかった。対照的に、HFL 細胞における SRC1 の発現量は他のコアクチベーターとは異なり、成人の 1.3 倍と非常に発現量が多かった。P300、CBP の発現量は HFL 細胞および HepG2 細胞では同程度であり、成人の 60~70%であった。成人と比較して HFL 細胞で mRNA の発現量が明らかに少ないコアクチベーターは HNF4 α 、PGC1 α であることが確認された。

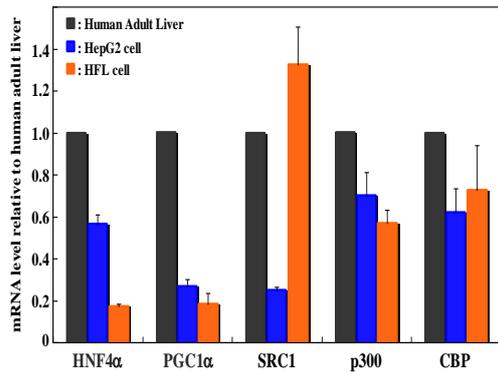


Fig. 3 RT-PCR analysis of coactivators gene expression in HepG2 and HFL cells.

コリプレッサー SMRT、NCoR1 の mRNA は、HepG2 細胞および HFL 細胞ともに成人の 70~90%発現していることを確認した(Fig. 4)。しかし、SHP の mRNA は、HepG2 細胞では成人の 89%の発現が認められたのに対し、HFL 細胞では SHP の発現は認められず、検出限界以下であった。

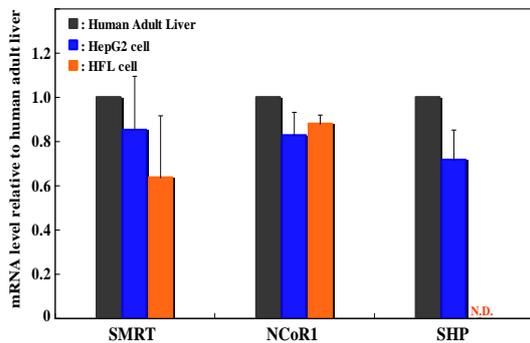


Fig. 4 RT-PCR analysis of corepressors gene expression in HepG2 and HFL cells.

4-4 ヒト胎児正常肝細胞の CYP3A 発現に及ぼす擬似低酸素誘導化合物 DFO の影響

DFO 存在下で計 72 時間培養した HFL 細胞について、CYP3A4、CYP3A7、HIF および血管内皮増殖因子 (VEGF) の mRNA 発現量を検討した。DFO 未添加のコントロール群と比べ、CYP3A4 および CYP3A7 の mRNA 発現量はともに DFO 存在下(N24H48)でコントロールのそれぞれ 10 および 134 倍と有意な上昇が認められた。また、HIF の mRNA は逆に有意な抑制が認められたが、VEGF の mRNA は DFO 存在下 (N24H48)で約 4 倍と有意に上昇した (Fig. 5)。

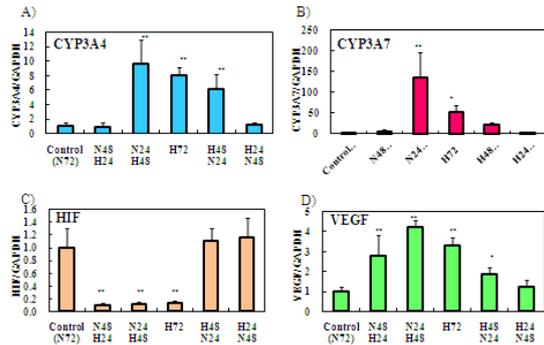


Fig. 5 Effect of DFO on CYP3As, HIF and VEGF mRNA expression in HFL cells.

4-5 CYP3A 遺伝子上のプロモーター活性に及ぼす DFO の影響

DFO 存在下で培養した HFL 細胞について、CYP3A4 および CYP3A7 両遺伝子上流域約 10kb のプロモーター活性は DFO 添加においても特に顕著な変動は認められず、ほぼ同程度の活性を示した。(Fig. 6)

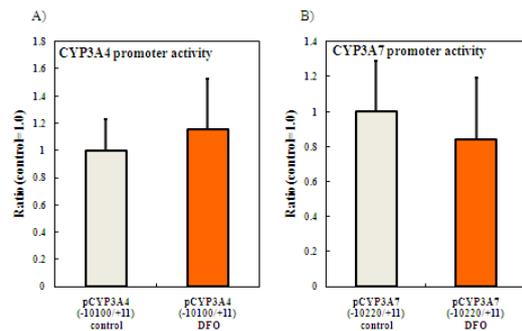


Fig. 6 Effect of DFO on promoter activity of CYP3A4 and CYP3A7 in HFL cells.

4-6 CYP3As および VEGF の mRNA 発現に及ぼす低酸素 (3%O₂) の影響

CYP3A4 の mRNA 発現は低酸素 3%O₂ による顕著な発現変動は見られなかった。一方、CYP3A7 の mRNA 発現はコントロールと比較して有意差は認められないものの 3%O₂ 条件下 (H72、N48H24)で発現抑制傾向を示した。

同様に 3%O₂ 条件下 (H72、N48H24、N24H48) で HIF の mRNA 発現は有意に抑制される一方で、VEGF はコントロールの約 2 倍程度の有意な発現上昇が認められた (Fig. 7)。

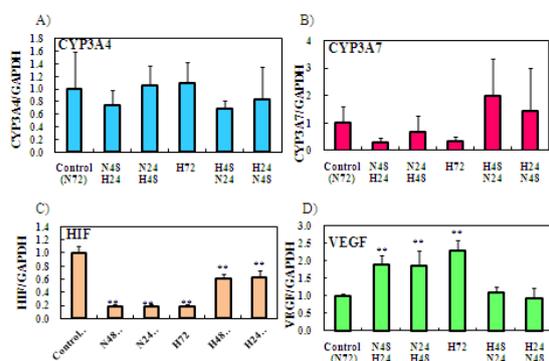


Fig. 7 Effect of hypoxia (3%O₂) on CYP3As, HIF and VEGF mRNA expression in HFL cells.

同様の方法で HepG2 細胞についても HFL 細胞と同様 3%O₂ の影響について検討を行ったところ、CYP3A4 および CYP3A7 の mRNA 発現は 3%O₂ 条件下 (H72) でコントロールと比較して各々 13 および 20% 程度まで抑制された。また、HIF の mRNA 発現は抑制されたが、VEGF の mRNA 発現は 3%O₂ 条件下 (H72) で 2.3 倍と有意な上昇が認められた (Fig. 8)。

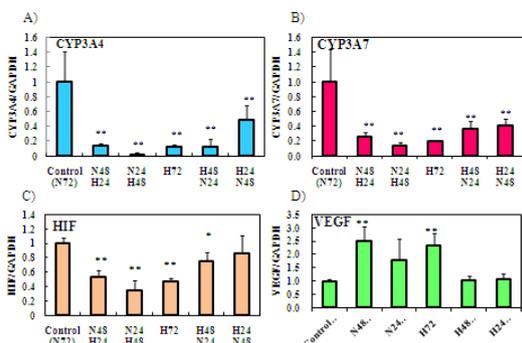


Fig. 8 Effect of hypoxia (3%O₂) on CYP3As, HIF and VEGF mRNA expression in HepG2 cells.

4-7 CYP3A4 遺伝子上のプロモーター活性に及ぼす低酸素(3%O₂)の影響

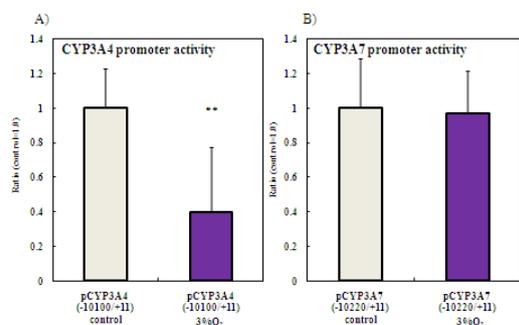


Fig. 9 Effect of hypoxia (3%O₂) on promoter activity of CYP3A4 and CYP3A7 in HFL cells.

HFL 細胞を 3%O₂ で培養した群で CYP3A4 および CYP3A7 遺伝子上流域約 10 kb のプロモーター活性はコントロールと比較して有意に低下した (Fig. 9)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Maezawa K, Matsunaga T, Takezawa T, Kanai M, Ohira S, Ohmori S: CYP3As gene expression and testosterone 6 β -hydroxylase activity in human fetal membranes and placenta at full term. *Biol Pharm Bull* **33**: 249-254, 2010.
2. 松永民秀, 大森 栄: ES 細胞の肝細胞への分化と薬物動態試験への応用. *医学のあゆみ* **232**: 99-104, 2010.
3. 松永民秀: トピックス 期待されるヒト ES 細胞由来肝細胞の創薬研究への応用. *ファルマシア*, **45**: 181-182, 2009.
4. Momose Y, Matsunaga T, Murai K, Takezawa T, Ohmori S: Differentiation of monkey embryonic stem cells into hepatocytes and mRNA expression of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism: Comparison of embryoid body formation conditions and matrices. *Biol Pharm Bull* **32**: 619-626, 2009.
5. Teramoto T, Matsunaga T, Toba M, Sunazuka T, Omura S, Ohmori S: Role of dexamethasone and oncostatin M on the formation of vacuoles in human fetal liver cells. *Biol Pharm Bull* **32**: 209-212, 2009.
6. 松永民秀, 大森 栄: ヒト胎児肝細胞における CYP3A 発現変動と ES 細胞研究. *Pharma VISION NEWS* No.12: 19-23, Nov. 2008.
7. 松永民秀, 丸山昌孝, 大森 栄: 胎児におけるシトクロム P450 の発現: 肝臓の CYP3A 分子種を中心として. *信州医学雑誌* **56**: 7-16, 2008.
8. Maezawa K, Miyazato K, Matsunaga T, Momose Y, Imamura T, Johkura K, Sasaki K, Ohmori S: Expression of cytochrome P450 and transcription factors during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Drug Metabol Pharmacokin* **23**: 188-195, 2008.
9. Matsunaga T, Toba M, Teramoto T, Mizuya M, Aikawa K, Ohmori S: Formation of large vacuoles induced by cooperative effects of oncostatin M and dexamethasone in human fetal liver cells. *Med Mol Morphol* **41**: 53-58, 2008.

[学会発表] (計 12 件)

1. 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, 2011 年 3 月.
2. 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, 2011 年 3 月.
3. 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. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2010 (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, 2010 年 11 月.
4. 前澤佳代子, 松永民秀, 竹澤 崇, 金井誠, 大平哲史, 木津純子, 大森 栄: ヒト卵膜および胎盤における CYP3A 遺伝子の発現と Testosterone 6 β -水酸化活性. 医療薬学フォーラム 2010/第 18 回クリニカルファーマシーシンポジウム, 広島, 2010 年 7 月.
5. 松永民秀, 百瀬泰行, 大森 栄: サル胚性幹細胞の肝細胞への分化と薬物代謝に関与するシトクロム P450 の mRNA 発現. 日本薬学会 第 130 年会 シンポジウム, 岡山, 2010 年 3 月.
6. 松永民秀. ES 細胞の肝細胞への分化と薬物動態研究への応用. 第 24 回日本薬物動態学会年会 フォーラム, 京都, 2009 年 11 月.
7. 松永民秀: サル胚性幹細胞の肝細胞への分化と薬物代謝に関与するシトクロム P450 の mRNA 発現: 肺様体作成条件および細胞外マトリックスの比較. 日本中毒学会第 28 年会, 金沢, 2009 年 6 月.
8. 松永民秀: 多能性幹細胞の肝細胞への分化と薬物動態試験への応用. 第 16 回 HAB 研究機構学術年会 シンポジウム, 東京, 2009 年 5 月.
9. Matsunaga T, Maezawa K, Miyazato K, Momose Y, Imamura T, Johkura K, Sasaki K, Ohmori S: Expression of cytochrome P450 and transcription factors during differentiation of mouse ES cells into hepatocytes, 16th International Conference on Cytochrome P450, Nago, Okinawa, Japan, June 21-25, 2009.
10. 松永民秀, 大森 栄: リファンピシンによるヒト胎児肝細胞 CYP3As 誘導に関する制御機構の解明. 平成 20 年度中部乳酸菌

研究会, 静岡, 2008 年 11 月.

11. 松永民秀, 大森 栄: ヒト胚性幹細胞の肝細胞への分化と動態研究, 第 23 回日本薬物動態学会年会 シンポジウム, 熊本, 2008 年 10 月.
12. 土屋広行, 丸山順也, 松永民秀, 大森 栄: 霊長類肝における CYP3A 分子種の発現. 新手法を用いた薬物代謝酵素活性の個人差研究会, 福島県安達郡大玉村, 2008 年 8 月.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

大森 栄 (OHMORI SHIGERU)
信州大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 70169069

(3) 連携研究者

()

研究者番号: