

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：23803
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2010
課題番号：21790129
研究課題名（和文） 発がん前駆物質の遺伝毒性発現における異物-薬物相互作用の研究
研究課題名（英文） Effects of xenobiotic-drug interaction on the expression of procarcinogen-induced genotoxicity
研究代表者
関本 征史（SEKIMOTO MASASHI）
静岡県立大学・薬学部・講師
研究者番号：10381732

研究成果の概要（和文）：

本研究では、高血圧治療薬であるカルシウム（Ca）拮抗薬をモデル薬物として、発がん前駆物質の遺伝毒性発現における異物-薬物相互作用の可能性について、培養細胞や実験動物を用いて検討した。その結果、ニカルジピンをはじめとするジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬は、発がん性芳香族炭化水素類による肝 CYP1 酵素誘導を相乗的に増強することで、発がん性芳香族炭化水素類の代謝活性化を促し、発がんリスクを増加させる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined that the effects of xenobiotic-drug interaction on the expression of procarcinogen-induced genotoxicity using experimental animals and human hepatoma cell line. Nicardipine (Nic), a dihydropyridine calcium channel blocker (DHP-CCB), increase procarcinogen (3-methylcholanthrene, MC)-mediated inductions of CYP1 enzymes and their DNA adducts formation in human hepatoma cell line. Furthermore, our preliminary experiment indicated similar interaction between MC and Nic were observed in the rat liver, lung and kidney. These findings predicted that DHP-CCB including Nic might increase the risk of carcinogenesis by environmental carcinogens, which are metabolically activated by CYP1 enzymes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：衛生薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：異物代謝酵素、代謝活性化、異物-薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

高血圧治療薬であるカルシウム (Ca) 拮抗薬は、さまざまな薬物と相互作用を引き起こす。これは、Ca 拮抗薬がシトクロム P450 (CYP) 3A 分子種などの異物代謝酵素や、P-糖タンパクなどの異物排泄トランスポーターの基質となるために起こると考えられてきた。このような背景から、Ca 拮抗薬と他の併用薬、または異物 (化学物質、食品成分など) の相互作用の予測は、主に P450 酵素やトランスポーターの機能阻害を指標として行われてきた。

最近、申請者らはこれら Ca 拮抗薬のうち、とくにジヒドロピリジン (DHP) 系 Ca 拮抗薬であるニカルジピン (Nic) が、ラット及びマウス肝のさまざまな P450 分子種 (CYP1A、CYP2B、CYP3A 酵素) を、遺伝子・蛋白質発現・酵素活性レベルにおいて、それぞれ誘導することを明らかとした。P450 分子種は、異物代謝酵素として、外来異物の解毒代謝に必須である一方、発がん前駆物質の代謝活性化にも重要な役割を果たしている。このような背景から申請者は、Ca 拮抗薬が異物代謝酵素の誘導を介した薬物-薬物相互作用、すなわち、発がん前駆物質の代謝活性化を促し、遺伝毒性を増加させる可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、本来であれば発がん性を示さない Ca 拮抗薬をモデル医薬品として、異物-薬物相互作用に伴った発がんリスク増加の可能性を追究することを目的とした。具体的には、発がん前駆物質の遺伝毒性発現における異物-薬物相互作用の可能性を「異物代謝酵素の発現変動」「代謝活性化体の生成」を指標として、実験動物および培養細胞を用いて検討し、さらに、その機構を解析した。

3. 研究の方法

1) 被検化合物

CYP1A 酵素誘導剤としては、3-メチルコランズレン (MC)、ベンゾ[a]ピレン (B[a]P)、β-ナフトフラボン (BNF)、オメプラゾール (Ome)、および 3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール (Trp-P-1) を用いた。

Ca 拮抗薬としては、ニカルジピン塩酸塩 (Nic)、ニフェジピン (Nif)、ニモジピン

(Nim)、ニソルジピン (Nis)、ニトレンジピン (Nit)、ベラパミル塩酸塩 (Ver)、ジルチアゼム (Dil) を用いた。また、ジヒドロピリジン (DHP) 構造を持つ Ca 活性化剤 (S)-(-)-Bay K8644 (Bay K) を用いた。

また、異物トランスポーターに関する実験では、P-糖タンパク質 (P-gp) の阻害剤にはベラパミル (Ver) を、Multidrug resistance protein 2 (MRP2) の阻害剤には MK571 を、また、Breast cancer resistant protein (BCRP) の阻害剤には Ko143 をそれぞれ使用した。

2) 培養細胞株を用いた Ca 拮抗薬と CYP1A 酵素誘導剤の相互作用の解析

ヒト肝がん HepG2 細胞に対して、CYP1A 酵素誘導剤および Ca 拮抗薬をそれぞれ単独、もしくは同時に処理し、一定時間培養した。さらに、HepG2 細胞における CYP1 酵素遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により、CYP1A 蛋白質発現をウェスタンブロッティング法により、CYP1A 酵素活性を基質特異的な代謝物の生成を指標として、それぞれ測定した。

また、化学物質による CYP1A 酵素誘導には、芳香族炭化水素受容体 (AhR) が重要な役割を果たすことから、AhR レポーター細胞株 HepG2-A10 に対して同様の処理を行い、そのルシフェラーゼ活性を測定することで AhR 活性化の指標とした。

3) Ca 拮抗薬が細胞内 [³H]-MC 量および [³H]-MC-DNA 付加体形成に及ぼす影響

HepG2 細胞に [³H]-MC と Ca 拮抗薬を一定時間処理した後、細胞溶解液およびゲノム DNA を調製した。さらに、細胞溶解液中の [³H]-MC、およびゲノム DNA に由来する放射活性を測定し、それぞれ細胞内 [³H]-MC 量、³H]-MC-DNA 付加体量として算出した。

4) 異物トランスポーターの阻害が CYP1A 酵素誘導に及ぼす影響

HepG2 あるいは HepG2-A10 細胞に MC と各種阻害剤を処理した。一定時間培養し、CYP1 酵素遺伝子発現、CYP1A 蛋白質発現および CYP1A 酵素活性を測定した。また、HepG2-A10 におけるルシフェラーゼ活性を測定し、AhR 活性化の指標とした。

5) 実験動物を用いた Ca 拮抗薬と AhR 活性化剤の相互作用の解析

7 週齢の雄性 F344 ラットに対し、Nic (100 $\mu\text{mol/kg}$) を経口投与し、1 時間後に MC (2 $\mu\text{mol/kg}$) を腹腔内投与した。MC 投与から 6、12 および 23 時間後に屠殺し、肝臓、腎臓および肺を摘出した。さらに、各組織における CYP1 酵素遺伝子発現、CYP1A 蛋白質発現、CYP1A 酵素活性をそれぞれ測定した。

4. 研究成果

1) 培養細胞株を用いた Ca 拮抗薬と CYP1A 酵素誘導剤の相互作用の解析

ヒト肝がん細胞株 HepG2 に対し、Ca 拮抗薬である Nic (10 μM) と、CYP1A 酵素誘導剤である MC (30 nM) をそれぞれ単独、もしくは同時に処理し、CYP1 酵素 (CYP1A1、CYP1A2、および CYP1B1) の mRNA 発現量および酵素活性を測定した。その結果、Nic と MC の同時処理群において、それぞれの単独処理群で見られた誘導の和を大きく上回る相乗的な mRNA および酵素活性の誘導が認められた (Fig.1)。

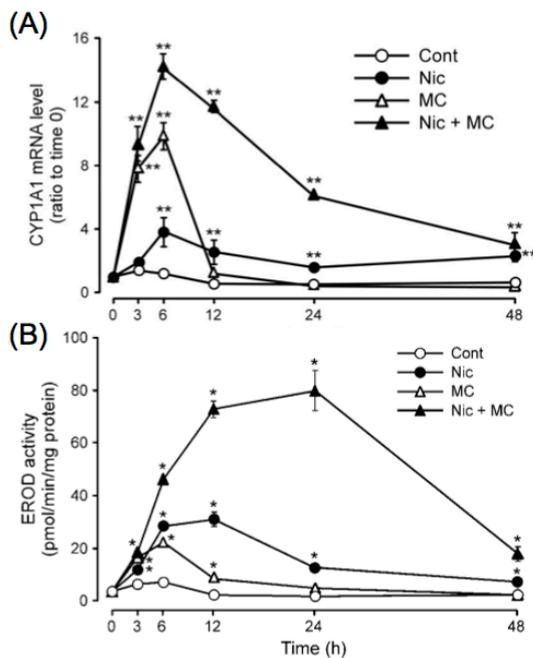


Fig. 1. Temporal changes in CYP1A1 mRNA expression and EROD activity after treatment of HepG2 cells with Nic, MC, or their combination. HepG2 cells were treated with vehicle alone (Cont), Nic (10 μM), MC (30 nM) or their combination for the indicated times. The symbols and bars represent the means and their SDs, respectively.

また、CYP1A タンパク発現量も同様に、MC と Nic の同時処理群で相乗的な増加が認められた。さらに、AhR 活性化に及ぼす影響を検討したところ、Nic は単独では AhR 活性化をほとんど引き起こさないが、MC 依存的な AhR 活性化に対しては増強作用を示した。これらのことから、Nic は MC の AhR 活性化を増強することで、相乗的な CYP1 酵素の誘導を惹起することが示唆された。

2) Ca 拮抗薬が $[^3\text{H}]$ -MC-DNA 付加体形成に及ぼす影響

PAH 類による発がんには、その代謝物と DNA の複合体 (DNA 付加体) 形成が重要であることから、HepG2 細胞に対し、 $[^3\text{H}]$ MC および Nic をそれぞれ単独、もしくは同時に処理し、MC-DNA 付加体形成に及ぼす影響を検討した。その結果、 $[^3\text{H}]$ MC の単独処理群に比べ、Nic と $[^3\text{H}]$ MC の同時処理群では、MC-DNA 付加体量が有意に増加した (Fig.2)。

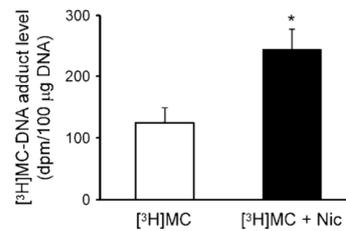


Fig. 2. Effect of Nic on the formation of the $[^3\text{H}]$ MC-DNA adduct in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 30 nM $[^3\text{H}]$ MC in the presence or absence of 10 μM Nic for 24 h. Total genomic DNAs were prepared from the cells, and the amounts of $[^3\text{H}]$ MC covalently bound to DNA were measured.

ここまでの結果から、Nic は MC と同時に処理することで CYP1A 酵素の相乗的な誘導を引き起こすだけでなく、MC の代謝活性化にともなった DNA 付加体形成をも増強することが明らかとなった。

3) Ca 拮抗薬と CYP1A 酵素誘導剤の相互作用における構造-活性相関

環境中には多種多様な CYP1A 酵素誘導剤が存在し、また、Ca 拮抗薬も数多くの種類が開発・利用されている。そこで、MC 以外の CYP1A 酵素誘導剤や他の Ca 拮抗薬との間における相互作用の有無を検討した。

まず、種々 CYP1A 酵素誘導剤と Nic の相互

作用について検討した。その結果、Nic は MC と同じく PAH 類に属する BaP の CYP1 酵素誘導を増強したが、他の誘導剤 (BNF、Ome および Trp-P-1) による CYP1A 酵素誘導に対しては増強作用を示さなかった。

次に、種々 Ca 拮抗薬と MC との相互作用を検討したところ、Nic を含めた 5 種の DHP 系 Ca 拮抗薬 (Nif、Nis、Nit、Nim、Nic) はいずれも単独で CYP1 酵素を誘導し、さらに MC との同時処理により相乗的に CYP1 酵素を誘導した。一方、非 DHP 系 Ca 拮抗薬 (Dil、Ver) は単独で CYP1 酵素誘導作用を示さず、MC と同時処理しても相乗的な誘導効果を示さなかった。そこで、DHP 構造を持ち、かつ Ca チャネル活性化剤として働く (S)-(-)-Bay K8644 (Bay K) の影響を検討したところ、DHP 系 Ca 拮抗薬の場合と同様、MC による CYP1 酵素誘導に対する増強作用が見られた。

これらの結果から、PAH 類と DHP 系 Ca 拮抗薬の複合曝露により、CYP1 酵素の相乗的誘導が起こること、また、この相乗的な誘導には、Ca チャネル遮断作用ではなく、その DHP 構造が重要であることが示された。

4) 異物トランスポーターの阻害が CYP1A 酵素誘導に及ぼす影響

P-gp をはじめとする薬物トランスポーターは、異物の細胞外排泄において重要な役割を果たす。さらに、Nic を含む Ca 拮抗薬はこれらトランスポーターに対して阻害作用を持つことが報告されている。そこで、Ca 拮抗薬が細胞内 PAH 量に及ぼす影響を、 ^3H MC の細胞内蓄積を指標として検討した。

その結果、Nic をはじめとする DHP 系 Ca 拮抗薬や Bay K の存在下では、細胞内 MC 蓄積量の増加が見られた。一方、Ver や Dil などの非 DHP 系 Ca 拮抗薬ではそのような効果は見られなかった (Fig.3)。

P-gp 阻害剤である Ver は同時処理によっても細胞内 ^3H MC 量を増加させなかったことから、BCRP および MRP2 の関与について同様に検討した。その結果、BCRP 阻害剤である Ko143 存在下、 ^3H MC の細胞内蓄積が著しく増加した。この作用は、MRP2 の阻害剤である MK571 に比べて著しく強いものであった。さらに、Ca 拮抗薬やトランスポーター

阻害剤と MC を同時処理した時の CYP1 酵素の mRNA 発現量と ^3H MC の細胞内蓄積との間に、強い正の相関が認められた。

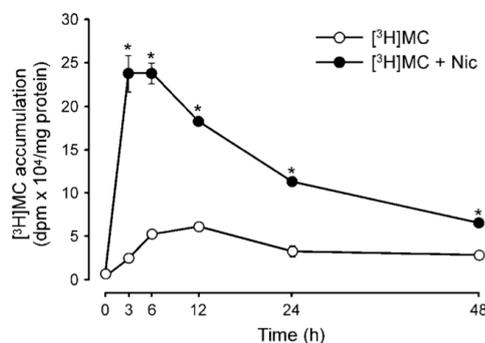


Fig. 3. Effect of Nic on the intracellular accumulation of MC in HepG2 cells.

HepG2 cells were treated with 30 nM ^3H MC in the presence or absence of 10 μM Nic for the indicated times, and the intracellular accumulation levels of ^3H MC were measured. The symbols and bars represent the means and their SDs, respectively (n = 4).

これらの結果から、DHP 系 Ca 拮抗薬は、BCRP などの異物排泄トランスポーターを阻害することで MC の細胞内濃度を高め、結果として CYP1 ファミリー酵素の相乗的誘導を引き起こしている可能性が示された。

5) 実験動物を用いた Ca 拮抗薬と AhR 活性化剤の相互作用の解析

最後に、Nic と MC の複合曝露による CYP1A 酵素の相乗的誘導が *in vivo* でも起こるかを検討した。7 週齢の雄性 F344 ラットに Nic (100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) を経口投与し、その 1 時間後に MC (2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) を腹腔内投与した。MC 投与後 6、12、23 時間後に肝臓、腎臓および肺を摘出し、各臓器の CYP1A 酵素遺伝子発現および酵素活性をそれぞれ測定した。その結果、誘導率は時間により異なるものの、遺伝子発現、酵素活性いずれにおいても、各臓器で相乗的な誘導が観察された (Table.1)。

Table.1 Effects of Nic, MC, or their combination on EROD activity in various tissues of male F344 rat.

	Cont	Nic	MC	Nic+MC
Liver	16.1 \pm 2.8	24.0 \pm 1.8	24.4 \pm 5.7	29.5 \pm 3.8
Kidney	3.9 \pm 1.2	2.9 \pm 0.9	5.2 \pm 2.1	9.5 \pm 2.1
Lung	1.6 \pm 0.0	1.7 \pm 0.1	3.3 \pm 0.4	5.4 \pm 1.7

* pmol/min/mg protein

Male F344 were treated with Nic (100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, *p.o.*), MC (2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, *p.o.*) or their combination for 6 hr. EROD activity were measured using microsome fraction from liver, kidney and lung of individual animals (n=5-6).

このことから、Nic と MC の間で起こる異物-薬物相互作用は、*in vitro* (培養細胞) 特有の現象ではなく、*in vivo* (実験動物) においても見られることが明らかとなった。実際に治療用量の Nic と MC の同時処理によっても同様の現象が起こるかに興味を持たれる。

6) まとめ

本研究では、Ca 拮抗薬と CYP1A 酵素誘導剤をモデル化合物として、その遺伝毒性発現における異物-薬物相互作用の可能性について検討した。その結果、DHP 系 Ca 拮抗薬が異物排泄トランスポーターの阻害を介して PAH 類の細胞内濃度を増加させ、CYP1 ファミリー酵素を相乗的に誘導することで、DNA 付加体形成を増強している可能性が示された。したがって、DHP 系 Ca 拮抗薬を服用している高血圧患者では、喫煙などの PAH 類に曝露される環境下において過度な CYP1 ファミリー酵素の誘導が起こり、発がんリスクが高まる可能性が懸念される。

以上、本研究から、単独では遺伝毒性作用を持たない医薬品であっても、異物との相互作用によって毒性が表面化する可能性が示された。今後、医薬品の安全性評価を行っていく上で、このような異物-薬物相互作用についても考えていく必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Sekimoto M: Sex- and species-differences on xenobiotic-induced toxicity: differences in constitutive and xenobiotic-mediated expression of cytochrome P450 1A subfamily enzymes (CYP1As). *Yakugaku Zasshi*, 131, 415-422 (2011) 査読有り
- (2) Hosaka T, Sekimoto M, Nemoto K, and Degawa M: Augmentation of 3-methylcholanthrene-induced bioactivation in the human hepatoma cell line HepG2 by the calcium channel blocker nicardipine. *Cancer Sci.* 101, 652-657 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 14 件)

- (1) 伝宝有美、鴨下彩加、関本征史、保坂卓臣、根本清光、出川雅邦: Nicardipine と 3-Methylcholanthrene を複合曝露したラット肝臓および腎臓での CYP1A 酵素の相加/相乗的な誘導、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡
- (2) Sekimoto M, Hosaka T, Kamoshita A, Nemoto K, and Degawa M: Effects of nicardipine on the expression of CYP1A subfamily enzymes in the rat liver and human hepatoma cell line HepG2. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference. The Latest Advances in Liver Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, 2011 年 3 月 2 日、舞浜
- (3) 鴨下彩加、関本征史、保坂卓臣、根本清光、出川雅邦: ニカルジピンと 3-メチルコランスレンの複合曝露が薬物代謝酵素誘導に与える影響、第 20 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 22 年度日本薬学会東海支部例会、2010 年 11 月 28 日、静岡
- (4) 関本征史、保坂卓臣、内山亮太、根本清光、出川雅邦: BCRP 阻害剤 Ko143 は MC 依存的な CYP1A1 酵素誘導を増強する、日本環境変異原学会第 39 回大会、2010 年 11 月 16 日、つくば
- (5) Hosaka T, Sekimoto M, Nemoto K, and Degawa M: Dihydropyridine calcium channel blockers enhance the 3-methylcholanthrene-mediated induction of CYP1A1 in human hepatoma HepG2 cells. The 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences, 2010 年 10 月 16 日、静岡
- (6) Hosaka T, Sekimoto M, Nemoto K, and Degawa M: Augmentation of 3-methylcholanthrene-mediated induction of CYP1A1 by Dihydropyridine calcium channel blockers. 第 69 回日本癌学会学術集会、2010 年 9 月 22 日、大阪
- (7) 保坂卓臣、関本征史、根本清光、出川雅邦: 3-メチルコランスレンとジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬による CYP1A1 の相乗的誘導、第 56 回日本薬

- 学会東海支部総会・大会、2010年7月3日、岐阜
- (8) 鴨下彩加、関本征史、保坂卓臣、根本清光、出川雅邦：ニカルジピンのCYP1A1酵素誘導作用：発がん前駆物質の代謝活性化に及ぼす影響、第56回日本薬学会東海支部総会・大会、2010年7月3日、岐阜
- (9) Hosaka T, Sekimoto M, Nemoto K, and Degawa M Augmentation of 3-methylcholanthrene-mediated induction of CYP1A1 and DNA-adduct formation by nicardipine. 日本環境変異原学会第38回大会、2009年11月26日、静岡
- (10) 内山亮太、関本征史、保坂卓臣、根本清光、出川雅邦：HepG2細胞でのニカルジピンによるCYP1A1酵素誘導に及ぼす種々リン酸化酵素阻害剤の影響。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2009、2009年11月23日、四日市
- (11) 保坂卓臣、関本征史、根本清光、出川雅邦：3-メチルコランズレンによるCYP1A1の誘導とDNA付加体生成に対するニカルジピンの増強効果。第8回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2009、2009年11月15日、名古屋
- (12) Hosaka T, Sekimoto M, Degawa M: Effect of nicardipine on chemical-mediated CYP1A1 induction in HepG2 cells. 第68回日本癌学会学術集会、2009年10月1日、横浜
- (13) Uchiyama R, Sekimoto M, Hosaka T, Nemoto K, Degawa M: Effect of JNK inhibitor, SP600195, on nicardipine-mediated CYP1A1 induction in HepG2 cells. 第68回日本癌学会学術集会、2009年10月1日、横浜
- (14) 関本征史:化学物質の毒性発現における種差・性差の解析：CYP分子種の発現変動を指標として。平成21年度日本薬学会東海支部総会・大会、2009年7月12日、名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.or.jp/hot-news/soreiso2.html>
(平成21年度日本薬学会東海支部奨励賞受賞研究紹介記事)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関本 征史 (SEKIMOTO MASASHI)
静岡県立大学・薬学部・講師
研究者番号：10381732
研究者番号：

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし