

令和元年6月21日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15515

研究課題名(和文) マーカー遺伝子の発現制御機構の解明を基盤としたヒト肝細胞の機能亢進因子の探索

研究課題名(英文) Search for the factors enhancing human hepatocyte function based on the unraveling of the transcriptional regulation of marker genes

研究代表者

保坂 卓臣 (Hosaka, Takuomi)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30611579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝薬物代謝酵素であるCYP3A4を肝成熟化マーカーとし、その発現上昇を指標としてヒト肝細胞の機能を亢進しうる栄養素を探索した。その結果、必須アミノ酸の混合物および非必須アミノ酸の混合物がその添加量依存的にヒト肝由来細胞株のCYP3A4発現量を上昇させることを見出した。また、この発現上昇は、アミノ酸センサーとして知られるmTORパスウェイおよびCYP3A4誘導に関わる核内受容体PXRの活性化によるものではなく、未知の機序で起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ヒトiPS細胞から肝細胞様細胞を作製することは可能であるが、その肝機能は未熟であるため創薬研究に応用可能なレベルではない。本研究結果より、培地中のアミノ酸組成を最適化することがヒトiPS細胞由来の肝細胞様細胞の肝機能を高めることにつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for nutrients that increase the expression of a hepatic drug-metabolizing enzyme CYP3A4 as an indicator of enhancement of human hepatocyte function. The results indicated that a mixture of essential amino acids or non-essential amino acids increases CYP3A4 expression level in a human liver-derived cell line HepG2 in a dose-dependent manner. Furthermore, it was suggested that the increase is not attributed to the activation of the amino acid-sensing mTOR pathway or the pregnane X receptor that is known to be involved in CYP3A4 induction, indicating the existence of an unknown mechanism.

研究分野：分子毒性学

キーワード：肝細胞 CYP3A4 栄養素 アミノ酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は薬物代謝の主要組織であることから、肝代謝試験(代謝安定性試験、酵素誘導試験等)は創薬においてヒト体内での薬物動態および薬物間相互作用を予測する上で非常に重要である。現在、ヒト肝モデルのゴールドスタンダードとして初代培養ヒト肝細胞が用いられているが、我が国ではほとんど入手できない。そのため、ヒト凍結肝細胞の輸入に頼っているが、個人差に基づくロット間差や同一ロットの供給量も限られていることなどの問題点がある。また、初代ヒト肝細胞の培養には、販売会社のプロトコルに基づいた培地が利用されるが、その組成は比較的単純であり、肝機能の賦活化・維持に最適化されているとは言い難い。実際、薬物代謝酵素の発現をはじめ、初代ヒト肝細胞の肝機能は培養開始後急激に低下する。

近年、iPS細胞等からの肝細胞の樹立研究が盛んに行われており、肝細胞の作製に成功したとの報告がいくつかある。しかし、実際にはこれら細胞は肝芽細胞や胎児肝細胞様の性状を示し、初代肝細胞と比較しても肝機能は未熟であるため、現状では創薬研究に応用可能なレベルではない。また、肝移植以外に有効な手段がない重篤な肝障害に対する治療法として、再生医療の観点からも iPS 細胞から成熟した肝細胞を樹立する方法の確立は重要な課題である。

### 2. 研究の目的

主要な肝薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現は、生後、徐々に増加することが知られている。この発現制御には、HNF4 をはじめとする肝特異的転写因子の関与が報告されている。また、生後、成長と共に摂取する食事由来の栄養成分は大きく変化することから、この発現制御に深く関与する栄養素が存在する可能性がある。実際、マウスにおいてコレステロール摂取量の低下により、転写因子 SREBP-2 の活性化を介して肝 Cyp3a11 の遺伝子発現が抑制されることが報告されている (Inoue *et al.*, *Mol Pharmacol*, 79: 148-56, 2011)。さらに研究代表者らは、ヒト肝細胞において、コレステロール処置が SREBP-2 の不活性化を介し、CYP3A4 遺伝子の発現を増加させることを見出している。このように、肝薬物代謝酵素の発現を制御する栄養素を特定できれば、ヒト肝細胞の機能賦活化および iPS 細胞由来肝細胞の成熟化を促す培地の開発につながると期待される。そこで本研究では、CYP3A4 を肝成熟化マーカーとして、その発現を上昇させる栄養素の同定および発現上昇機序の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) レポータージーンアッセイ

CYP3A4 遺伝子の 5' 上流約 12 kb をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に組込んだレポータープラスミド 3A4-12k-pGL4.10、およびレニラルシフェラーゼプラスミド pGL4.74 (プロメガ社) をヒト肝腫瘍由来 HepG2 細胞にトランスフェクションした。1 日後、種々栄養素を基礎培地である 10% FBS 含有 DMEM に添加した培地に交換して 2 日間培養し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (プロメガ社) を用いてホタルおよびレニラルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性をレニラルシフェラーゼ活性で除した値をレポーター活性とした。

#### (2) 遺伝子発現レベルの測定

MEM essential amino acids solution (50x) または MEM non-essential amino acids solution (100x) を種々の濃度で添加した培地を用いて HepG2 細胞を 2 日間培養後、総 RNA を抽出し、RT-qPCR により CYP3A4 をはじめとする肝特異的遺伝子の mRNA レベルを測定した。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH による補正を行い、各 mRNA レベルを表した。

### 4. 研究成果

肝成熟化マーカーである CYP3A4 の発現を上昇させる栄養素を探索するため、種々の栄養素を添加した培地で HepG2 細胞を培養後、CYP3A4 レポーター活性を測定した。

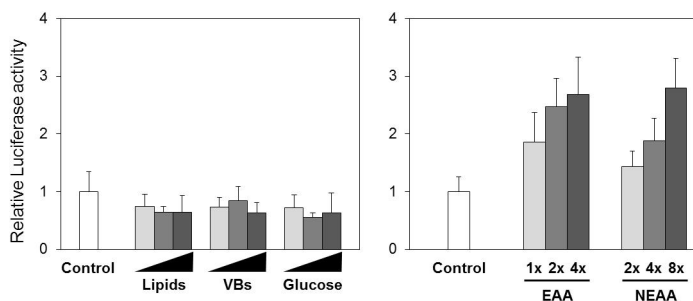


図 1. 種々栄養素による CYP3A4 レポーター活性の変動

その結果、脂質混合液 (Lipids)、ビタミン B 群混合液 (VBs) およびグルコースの添加群ではいずれの濃度でもレポーター活性の上昇は認められなかった一方、MEM 必須アミノ酸混合液 (MEM) および MEM 非必須アミノ酸混合液 (NEAA) の添加群では添加量に依存してレポーター活性が上昇した (図 1)。

そこで次に、mRNA レベルでも MEM および NEAA が CYP3A4 の発現を上昇させるかを RT-qPCR により調べた。また、CYP3A4 とともに代表的な肝薬物代謝酵素である CYP2B6 および CYP1A2 の mRNA レベルも測定した。

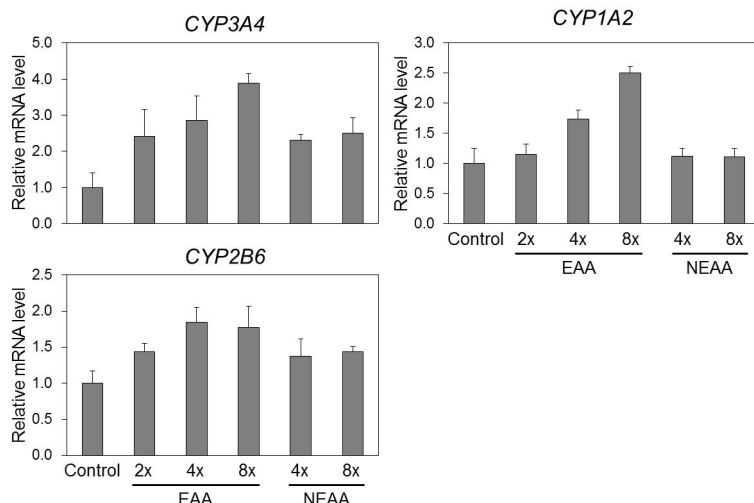


図 2. EAA および NEAA による CYP3A4、CYP2B6、CYP1A2 の mRNA レベルの変動

その結果、EAA の添加量に依存して CYP3A4 および CYP1A2 mRNA レベルが上昇し、CYP2B6 においても弱いながら上昇が認められた。NEAA 添加群においては CYP3A4 mRNA レベルの上昇は認められたものの、CYP2B6 および CYP1A2 mRNA レベルは大きく変動しなかった (図 2)。

アミノ酸濃度が高まることにより細胞内でどのようなシグナルが活性化するかについては、mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル以外ほとんど明らかになっていない。そこで、アミノ酸による mTOR シグナルの活性化が CYP3A4 の発現上昇に関わるか否か、mTOR 阻害薬ラパマイシンを用いて解析した。

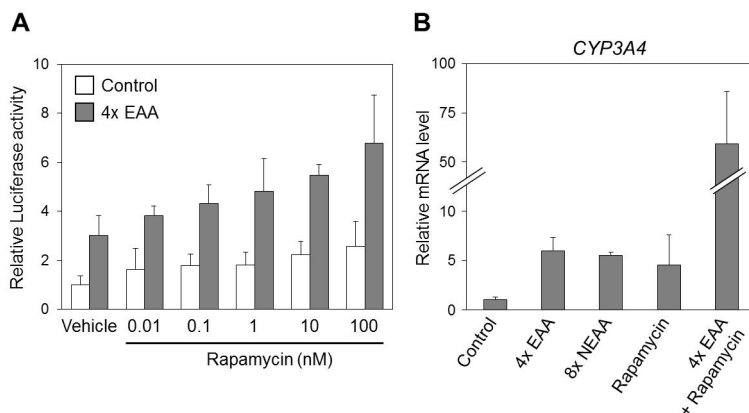


図 3. EAA による CYP3A4 発現上昇に対するラパマイシン共処置の影響

しかし、予想に反してラパマイシンの存在下ではその処置濃度に依存して EAA による CYP3A4 レポーター活性の上昇が増強された (図 3A)。また、ラパマイシン単独処置でも濃度依存的なレポーター活性の上昇が認められた。さらに、100 nM ラパマイシン存在下での EAA 添加は CYP3A4 mRNA レベルを相乗的に著しく強く上昇させた (図 3B)。このことから、アミノ酸による CYP3A4 発現上昇は mTOR シグナルの活性化を介して起こるわけではないことが示唆された。また、ラパマイシンと EAA の共処置が CYP3A4 の著しい発現上昇を引き起こしたことは非常に興味深く、本処置法の肝成熟化への応用も期待できる。

異物による CYP3A4 の発現誘導には核内受容体 pregnane X receptor (PXR) の活性化が深く関与することが知られている。また、FBS およびグルコース非存在下で HepG2 細胞を培養後、グルコース含有培地に交換すると、AMP-activated protein kinase (AMPK) の不活性化を介して PXR が活性化され、CYP3A4 発現レベルが増加することが近年報告された (Oladimeji *et al.*, *Sci Rep*, 7, 46751, 2017)。このことから PXR は栄養状態にตอบสนองして CYP3A4 の発現を制御している可能性も考えられる。そこで次に、CYP3A4 遺伝子上流に存在する PXR 応答配列 dNR1 の 4 回繰り返し配列を TK プロモーターの上流にエンハンサーとして組み込んだレポータープラスミドを作製し、アミノ酸添加によって PXR が活性化されるか否かレポーター遺伝子アッセイにより解析した。

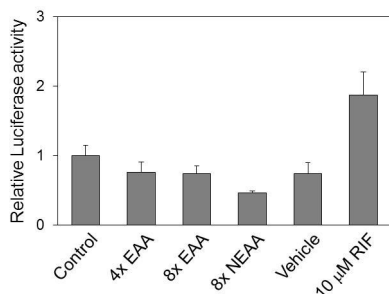


図 4. PXR 活性化レベルの評価

その結果、EAA および NEAA は PXR を活性化しないことが示された (図 4)。なお、代表的なヒト PXR アゴニストであるリファンピシン (RIF) 処置群においてレポーター活性の上昇を確認した。この結果より、アミノ酸による CYP3A4 発現上昇は PXR 活性化によるものではないことが示唆された。

さらに、種々の CYP3A4 レポーターコンストラクトを用いた解析の結果、CYP3A4 の転写制御に重要とされている遺伝子上流の領域である XREM や CLEM4 などだけではアミノ酸による CYP3A4 発現上昇を説明できないことが示された (data not shown)。

次に、EAA に含まれる 12 種のアミノ酸のうち、どのアミノ酸が CYP3A4 の発現を上昇させるかを明らかにするため、それぞれのアミノ酸単独添加 (4x EAA 中の各アミノ酸と同等の濃度) の影響を CYP3A4 レポーターアッセイにより調べたところ、レポーター活性を明らかに上昇させるアミノ酸はなかったが、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、シスチン (システイン 2 分子の結合体、Cys) の添加群において上昇傾向が認められた。そこで、これら 3 種のアミノ酸の組み合わせによりレポーター活性が上昇するか調べた。

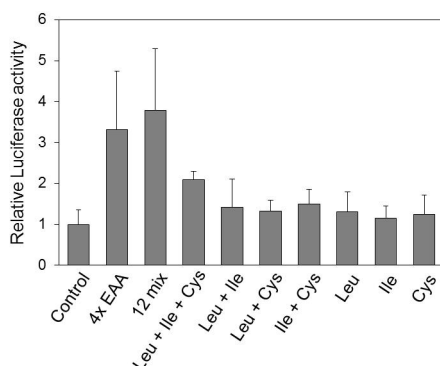


図 5. Leu、Ile、Cys の組み合わせ添加の影響

その結果、いずれか 2 種の組み合わせ添加ではほとんどレポーター活性は上昇しなかったが、3 種の組み合わせ添加により上昇が認められた (図 5)。しかし、その上昇倍率は EAA 添加群 (4x EAA) および 12 種アミノ酸の組み合わせ添加群 (12 mix) に比べて低かった。このことから、複数のアミノ酸の組み合わせまたは総アミノ酸濃度が CYP3A4 発現上昇に重要であることが示唆された。

以上、本研究の結果、EAA および NEAA がその添加量依存的に HepG2 細胞の CYP3A4 発現量を上昇させることを見出した。また、この発現上昇は、アミノ酸センサーとして知られる mTOR パスウェイおよび CYP3A4 誘導に関わる核内受容体 PXR の活性化によるものではなく、未知の機序で起こることが示唆された。さらに、複数のアミノ酸の組み合わせまたは総アミノ酸濃度が CYP3A4 発現上昇に重要であることが示唆された。

本研究成果より、培地中のアミノ酸組成を最適化することがヒト iPS 細胞由来の肝細胞様細胞の肝機能を高めることにつながると期待される。また、CYP3A4 の発現を調節する栄養素についてこれまでにほとんど報告がないため、本研究成果は薬物代謝酵素の発現制御研究を進める上で貴重な知見になると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1) Maya Okamura, Ryota Shizu, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari:

Possible involvement of the competition for the transcriptional coactivator glucocorticoid receptor-interacting protein 1 in the inflammatory signal-dependent suppression of PXR-mediated CYP3A induction in vitro. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (査読有), in press. DOI: 10.1016/j.dmpk.2019.04.005

- 2) Ryota Shizu, Makoto Kano, Taiki Abe, Saki Tsuchiya, Yuki Shimizu, Michiko Watanabe, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari: Screening of industrial and agricultural chemicals for searching a mouse PXR activator using cell-based reporter gene assays. *BPB Reports* (査読有), 1, 11-19 (2018)
- 3) Mika Nagai, Takuomi Hosaka, Masahiro Satsukawa, Kouichi Yoshinari: Characterization of CYP2C induction in cryopreserved human hepatocytes and its application in the prediction of the clinical consequences of the induction. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (査読有), 107, 2479-2488 (2018). DOI: 10.1016/j.xphs.2018.05.008

[学会発表](計 15 件)

- 1) 菅井琢也、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：腎不全に伴う肝薬物代謝酵素発現の低下機構に関する解析．日本薬学会第 139 年会（千葉） 2019 年 3 月 22 日
- 2) 木村爵、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：CYP3A4 の発現を指標とした肝機能亢進因子の探索：栄養素に着目した解析．日本薬学会第 139 年会（千葉） 2019 年 3 月 22 日
- 3) 保坂卓臣、曾田勇介、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：PXR 依存的な遺伝子発現における DNA 配列と転写活性の関連性．平成 30 年度内外環境応答・代謝酵素研究会（鳥取） 2018 年 11 月 23 日
- 4) 曾田勇介、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：PXR の転写活性化作用に対して PXR 結合 DNA 配列の相違が与える影響．第 28 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 30 年度日本薬学会東海支部例会（静岡） 2018 年 11 月 4 日
- 5) Maya Okamura, Ryota Shizu, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari: A possible involvement of transcriptional coactivators in the inflammation-dependent downregulation of PXR-mediated CYP3A induction. 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (金沢) 2018 年 10 月 2 日
- 6) Mika Nagai, Takuomi Hosaka, Masahiro Satsukawa, Kouichi Yoshinari: Characterization of CYP2C induction in cryopreserved human hepatocytes and its application in the prediction of the clinical consequences of the induction. 22nd North American ISSX Meeting (Montreal) 2018 年 7 月 17 日
- 7) 鶴田聡志、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：PPAR はヒト腸管由来 LS180 細胞における CYP3A4 誘導の新規制御因子である．日本薬物動態学会第 32 回年会（東京） 2017 年 11 月 29 日
- 8) 宮寄靖之、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：SREBP-2 による CYP3A4 の転写制御．日本薬物動態学会第 32 回年会（東京） 2017 年 11 月 29 日
- 9) 保坂卓臣、鶴田聡志、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：PPAR はヒト腸管由来 LS180 細胞における CYP3A4 誘導の新規制御因子である．平成 29 年度内外環境応答・代謝酵素研究会（福岡） 2017 年 9 月 9 日
- 10) 岡村麻絢、阿部 太紀、鶴田 聡志、志津 怜太、保坂 卓臣、佐々木 崇光、吉成浩一：薬剤性肝障害時の核内受容体 PXR の抗炎症作用における NF- B の役割．第 24 回日本免疫毒性学会学術年会（青森） 2017 年 9 月 4 日
- 11) 岡村麻絢、阿部太紀、鶴田聡志、志津怜太、保坂卓臣、佐々木崇光、児玉進、吉成浩一：核内受容体 PXR の抗炎症作用における NF- B の寄与の解析．フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台） 2017 年 9 月 2 日
- 12) Maya Okamura, Taiki Abe, Satoshi Tsuruta, Ryota Shizu, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Susumu Kodama, Kouichi Yoshinari: A possible role of NF- B in the anti-inflammatory effects of activated PXR.フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台） 2017 年 9 月 1 日
- 13) 岡村麻絢、阿部太紀、鶴田聡志、保坂卓臣、佐々木崇光、児玉進、吉成浩一：PXR の活性

化による抗炎症作用の機序解析．第 44 回日本毒性学会学術年会（横浜）2017 年 7 月 10 日

- 14) 鶴田聡志、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：肝臓と腸管における CYP3A4 誘導プロファイルの異同解明．第 63 回日本薬学会東海支部大会（岐阜）2017 年 7 月 8 日
- 15) 宮寄靖之、保坂卓臣、志津怜太、佐々木崇光、吉成浩一：コレステロールレベル調節因子 SREBP-2 による CYP3A4 の転写制御．第 63 回日本薬学会東海支部大会（岐阜）2017 年 7 月 8 日

〔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〕

なし

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし