

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590148

研究課題名(和文) 異物代謝能の個人差を考慮した化学物質のリスク評価法の開発研究

研究課題名(英文) Development of risk evaluation method for xenobiotics based on the interindividual differences of drug-metabolizing enzymes

研究代表者

埴岡 伸光 (Hanioka, Nobumitsu)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70228518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：疾病を惹起する原因化学物質(内分泌攪乱物質及びシックハウス症候群原因化学物質など)の毒性発現における個人差を異物代謝酵素の分子レベルで解析し、各個人の体質を考慮した化学物質のリスク評価法を開発することを目的とした。その一環として、フタル酸エステル類のヒトにおける加水分解反応について検討した。その結果、ヒト肝臓におけるフタル酸エステル類の加水分解反応の速度は、それら化学構造の側鎖の高さに依存することが明らかとなった。また、ヒトiPSから肝細胞様細胞を作製し、その分化誘導細胞は薬物代謝酵素mRNAが発現していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop risk evaluation method for environmental pollutants such as endocrine-disruptors and sick-building syndrome substances. The finding in this study suggest that diester phthalate hydrolysis activities in human liver microsomes depend on the chemical structure, and that the expression and inducibility of UGT in iPS cell-derived hepatocyte-like cells are similar that of human livers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：異物代謝酵素 シトクロムP450 UDP-グルクロン酸転移酵素 フタル酸エステル類 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生活環境中には天然由来の化学物質に加え、多くの合成化学物質(医薬品、農薬、食品添加物及び産業用化学物質など)が存在する。これら化学物質は我々の社会や生活に利便性を与えている一方でヒトを含む生態系に発がん性や内分泌系攪乱作用など様々な悪影響を及ぼしている。時として社会的に大きな問題となる公害や殺人目的の忌まわしい事件を引き起こしてきた。化学物質は、生体にとって異物であり、ヒトはこれらの生体異物を解毒するための種々の異物代謝酵素を有している。異物代謝酵素は主に肝臓に発現しており、第1相反応(酸化、還元、加水分解)を触媒するものと、第2相反応(抱合)を触媒するものとに大別され、シトクロム P450 (CYP) と UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)はそれぞれの代表的酵素である。異物代謝酵素の発現及び機能は遺伝的要因(遺伝子多型)や環境的要因(誘導・抑制など)により大きく変動し、それら因子が医薬品の薬効・副作用発現における個人差の原因となることはよく知られている。近年、「テーラーメイド薬物療法」を目指した異物代謝酵素の遺伝子多型研究が精力的に行われており、医薬品の代謝に関与する CYP や UGT 酵素の変異型の同定及び機能解明が急速に進展している。一方、農薬や産業用化学物質の安全性・毒性評価は未だに実験動物を用いた試験に基づいて行われているのが現状である。

2. 研究の目的

本課題では、化学物質が原因となって様々な疾病が惹起され、その発現機序の解明が立ち後れている内分泌攪乱及びシックハウス症候群問題に着目した。これら疾病を惹起する原因化学物質の毒性発現における個人差を異物代謝酵素の分子レベルで解析し、各個人の体質を考慮した化学物質のリスク評価法を開発することを目的とした。この目的を達成するために、1) フタル酸エステル類のヒトにおける加水分解反応; 2) ヒト iPS 細胞由来の肝細胞様細胞における UGT 発現について検討した。

3. 研究の方法

(1) フタル酸エステル類の加水分解活性の測定

フタル酸エステル類(フタル酸ジブチル, DBP; フタル酸ベンジルブチル, BBzP; フタル酸ビス(2-エチルヘキシル), DEHP)加水分解活性は、酵素源に個人ヒト肝ミクロゾームを用いて HPLC 法により測定した。基質(DBP、BBP あるいは DEHP)を除く下記の反応溶液(500 μ L)を 37°C で 1 分間プレインキュベーション後、基質を添加することにより反応を開始した。反応は、2 M リン酸 20 μ L を添加することで反停止した。反応停止後、12,000 \times g、4°C で 20 分間遠心分離後、

上清を PTFE 膜(0.45 μ m)でろ過した。そのろ液 50 μ L を HPLC に付し、代謝物であるモノエステル体(フタル酸モノブチル, MBP; フタル酸モノベンジル, MBzP; フタル酸モノ-2-エチルヘキシル, MEHP)及びフタル酸生成量を絶対検量線法にて算出した。基質及びその代謝物はメタノールに溶解し、この反応溶媒濃度は 1%とした。HPLC 条件は下記のように設定した。カラム: Inertsil ODS-SP (5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm); 検出: UV 254 nm; 移動相: 溶媒 A (0.1% H₃PO₄/CH₃CN (85/15, v/v)) と溶媒 B (0.1% H₃PO₄/CH₃CN (15/85, v/v)) のグラジエント; 流速: 1.2 mL/min; カラム温度: 40°C。

(2) ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞 253G1 及び Dotcom 細胞株が 10 cm ディッシュで 50-70%まで生育した時点で、分化誘導培地 A 中で 3 日間、分化誘導培地 B 中で 2 日間培養することにより、胚体内胚葉への誘導を行った。Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤 Y-27632 を 1 mM となるように培地に添加し 1 時間インキュベートした。PBS (-)で 2 回洗浄した後に、アクターゼ (500-720 units/mL) 2 mL を添加し 5 分間インキュベートした。次に 1 mM Y-27632 含有分化誘導培地 C で 15 mL 遠心管に細胞を回収した。Y-27632 は 20 mM となるように DMSO に溶解させ、用時 2,000 倍希釈で使用した。DMSO 溶液上清を吸引除去した後に 12.5 mL の Y-27632 添加分化誘導培地 C に懸濁させ、コラーゲン でコーティングされた 24 well プレートに細胞懸濁液 500 mL/well となるように播種した。24 時間後に Y-27632 非添加の分化誘導培地 C に交換し、肝前駆細胞への誘導を 6 日間行った。最後に、分化誘導培地 D を用いて肝細胞への成熟化を 11 日間行った。

(3) UGT 及び転写制御因子の mRNA 発現の解析

分化誘導スケジュールの 30 日目において、ヒト iPS 細胞由来の分化肝細胞様細胞から total RNA を抽出した。16 種類の UGT 分子種、3 種類の転写制御因子及び 5 種類の各種マーカーの mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。内部標準遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト肝ミクロゾームによるフタル酸エステル類加水分解反応

個人ヒト肝ミクロゾームを酵素源にしてフタル酸エステル類の加水分解反応(図 1)の速度論的解析を行った。その速度論的パラメーターを表 1 に示す。いずれのフタル酸エステル類の加水分解反応も、Hill 式に従うアロステリックな挙動を示した (n , 1.37-1.96)

DBP の MBP への加水分解反応 (DBP→MBP)、BBP の MBzP への加水分解反応 (BBP→MBzP) 及び MBzP の MBP への加水分解反応 (BBP→MBP) の S_{50} 値はほぼ同程度であったが、DEHP の MEHP への加水分解反応 (DEHP→MEHP) の S_{50} 値は、DBP 及び BBP のそれらに比べて顕著に低かった。 V_{max} 値は、DBP→MBP > BBP→MBzP >> DEHP→MEHP ≥ BBP→MBP であり、 CL_{int} 値は、BBP→MBzP ≥ DBP→MBP > DEHP→MEHP > BBP→MBP であった。これらの結果より、ヒト肝臓におけるフタル酸エステル類の加水分解反応の速度は、それら化学構造の側鎖の高さに依存することが明らかになった。

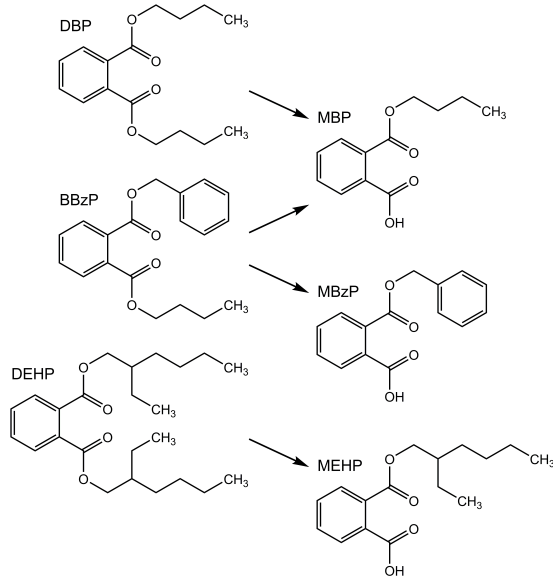


図1 フタル酸エステル類の加水分解反応

表1 フタル酸エステル類の加水分解反応の速度論的パラメーター

Substrate	Metabolite	S_{50}^a	V_{max}^b	n	CL_{max}^c
DBP	MBP	99.7±24.5	17.2±4.2	1.96±0.12	85.6±5.8
BBzP	MBP	95.4±33.3	0.39±0.09	1.37±0.08	2.38±0.20
BBzP	MBzP	71.7±16.1	13.0±3.2	1.84±0.22	91.3±6.0
DEHP	MEHP	8.40±0.92	0.43±0.08	1.50±0.21	27.5±4.5

^aµM. ^bnmol/min/mg protein. ^cµL/min/mg protein.

(2) 肝細胞系譜への分化誘導

253G1 及び Dotcom 細胞株の分化誘導の過程を位相差顕微鏡にて観察した。分化誘導 5 日目において、未分化細胞と比較して細胞の拡大、核/細胞質比の低下及び上皮細胞様形態が認められた。肝細胞系譜への方向付けの期間において、コード様構造が 253G1 細胞株において観察されたが、Dotcom 細胞株では確認されなかった。分化誘導 23 日目には、Dotcom 細胞株においてもコード様構造が観察され、また 253G1 細胞株ではその数の増加傾向が認められた。また、両細胞株において、2~3 個の核小体を含む丸い核を有した細胞及び多核細胞が観察された (図2)。

(3) UGT 及び転写制御因子の mRNA 発現

253G1 細胞株由来の肝細胞様細胞においては、UGT1A6、UGT2B4、UGT2B7、UGT2B10、UGT2B11 及び UGT2B15 の mRNA 発現が確認された (図3)。UGT2B11 及び UGT2B15 は、HepG2 細胞よりも高い mRNA 発現レベルを示した。一方、CYP では CYP1A1 及び CYP1B1 mRNA 発現が確認され、3-MC 処置によりその発現レベルがそれぞれ約 68 及び 12 倍に上昇した。Dotcom 細胞株由来の肝細胞様細胞では、UGT1A1、UGT1A6、UGT2B4、UGT2B7、UGT2B10、UGT2B11、UGT2B15 及び UGT2B17 の mRNA 発現が確認された。UGT1A1 mRNA 発現は、3-MC 処置により約 10 倍に上昇した。また、253G1 細胞株と同様に CYP1A1 及び CYP1B1 mRNA 発現が確認され、3-MC 処置によりそれぞれ約 115 及び 14 倍に上昇した。これらの結果より、ヒト iPS 細胞株間で成熟度が異なり、UGT mRNA 発現に影響を与えていることが示唆された。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を利用した新規肝毒性スクリーニング法の構築のためには、分化誘導による成熟度を高めること、並びに細胞株間での成熟度の差異を解消する必要があると考えられる。

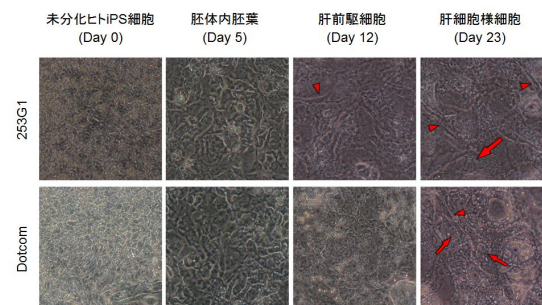


図2 分化誘導過程におけるヒト iPS 細胞の形態変化

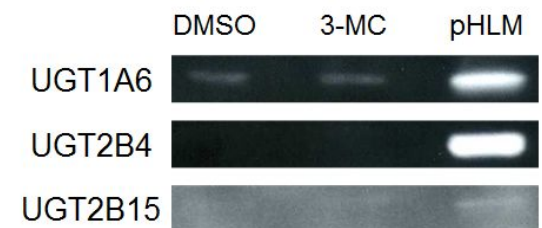


図3 253G1 由来肝細胞様細胞における UGT1A6、UGT2B4 及び UGT2B15 の mRNA 発現

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4件)

- 1) Hanioka N, Takahara Y, Takahara Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Narimatsu S. Hydrolysis of di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in human liver microsomes. Chemosphere 2012;89(9):1112–1117.
- 2) Hanioka N, Nonaka Y, Saito K, Kataoka

- H, Narimatsu S. Effect of aflatoxin B1 on UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in HepG2 cells. *Chemosphere* 2012;89(5):526-529.
- 3) Hanioka N., Iwabu H, Hanafusa H, Nakada S, Narimatsu S. Expression and inducibility of UDP-glucuronosyltransferase 1As in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110(3):253-258.
- 4) Hanioka N., Oka H, Nagaoka K, Ikushiro S, Narimatsu S. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation. *Arch Toxicol* 2011;85(11):1373-1381.

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 鬼無悠, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 神野透人, 成松鎮雄: フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの抱合反応に關与するヒトUDP-グルクロン酸転移酵素分子種. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 福岡, 2013年9月13-14日.
- 2) 畠山和久, 埴岡伸光, 黒瀬光一, 松永民秀, 成松鎮雄: ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞様細胞における UDP-グルクロン酸転移酵素の発現解析. 日本薬学会第133年会, 横浜(パシフィコ横浜), 2013年3月28-30日.
- 3) 畠山和久, 花房弘之, 松永民秀, 黒瀬光一, 斎藤嘉朗, 埴岡伸光, 成松鎮雄: ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞における UDP-グルクロン酸転移酵素の発現解析. 第53回日本生化学会中国・四国支部例会, 岡山(岡山大学), 2012年5月18-19日.
- 4) 高原有香, 高原佑輔, 埴岡伸光, 成松鎮雄: フタル酸ジエステル類の代謝に關与する加水分解酵素の種差. 51回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 松江(島根県民会館), 2012年11月10-11日.
- 5) 花房弘之, 松永民秀, 黒瀬光一, 斎藤嘉朗, 埴岡伸光, 成松鎮雄: Expression of CYP and UGT mRNAs in human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells (ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞における CYP 及び UGT mRNA 解析). 日本薬物動態学会第26回年会, 広島(広島国際会議場), 2011年11月16-18日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者
埴岡 伸光 (HANIOKA NOBUMITSU)
横浜薬科大学薬学部・教授
研究者番号: 70228518

(2)研究分担者
成松鎮雄 (NARIMATSU SHIZUO)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 20113037

(3)連携研究者
該当なし