

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26281028

研究課題名(和文) 異物代謝酵素に着眼した化学物質の暴露経路依存的なリスク評価法の構築

研究課題名(英文) Development of risk evaluation method for environmental chemicals based on the exposure routes

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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、化学物質の暴露経路を考慮した包括的in vitroリスク評価法の開発を目的とした。1) ヒトiPS細胞由来の腸管上皮細胞様細胞分化誘導を行い、その細胞は生体小腸に近いUGT mRNA発現プロファイルを示した。2) ヒト肝臓におけるCYPおよびUGT mRNAの発現量には3.7～136倍の個人差があることを認めた。3) フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの加水分解代謝物のモノ-2-エチルヘキシル(MEHP)グルクロン酸抱合反応には大きな種差があること、ならびにヒトにおいてはUGT1A3、UGT1A7、UGT1A9およびUGT2B7が重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop the risk evaluation method for environmental chemicals based on the exposure routes. 1) The expression profile of UGT mRNA of differentiated intestinal epithelial cell-like cells from Human iPS cells was similar that of human intestine. 2) The inter-individual differences (3.7-136-fold) in the expression levels of CYP and UGT mRNAs in human livers were observed. 3) The hepatic and intestinal glucuronidation of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) in humans, dogs, rats and mice was examined in an in vitro system using microsomal fractions. The metabolic abilities of UGT enzymes expressed in the liver and intestine toward MEHP markedly differed among humans, dogs, rats and mice. Furthermore, UGT1A3, UGT1A7, UGT1A9 and UGT2B7 were suggested to play important roles in the glucuronidation of MEHP in humans.

研究分野：衛生化学

キーワード：化学物質 曝露経路依存的 リスク評価法 異物代謝酵素 ヒトiPS細胞 シトクロムP450 (CYP) UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) フタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP)

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、産業用化学物質など)が存在する。これら化学物質は、人間社会や日常生活に利便性を与え、地球的規模にも文明を発達させている。このように我々は、多くの化学物質の恩恵を受けているが、一方でヒトを含む生態系に発癌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薬害や公害、さらには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および機能は生理的、遺伝的および環境的要因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、「テラーメド薬物療法」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 の構造と機能の関連性が急速に解明されてきている。一方、農薬や産業用化学物質の安全性・毒性評価は未だにマウス、ラットおよびイヌなどの実験動物を用いた安全性・毒性試験に基づいて行われているのが現状である。国民のより高い生活の質の向上(クオリティオブライフ, QOL)および安心・安全の高齢化社会の担保にはこの問題を解決しなければならぬ。

2. 研究の目的

本研究課題は、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暴露経路および異物代謝酵素の分子レベルの見地から、各個人の体質を考慮した化学物質の包括的 *in vitro* リスク評価法の開発を目指すことを目的とした。そのために、以下の課題について検討した。1) ヒト iPS 細胞の腸管上皮細胞様細胞への分化誘導およびその細胞における UGT mRNA 発現プロファイルの解析; 2) ヒト肝臓における CYP mRNA 発現量の個人差の解析; 3) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の加水分解代謝物のモノ-2-エチルヘキシル(MEHP)の肝臓および小腸におけるグルクロン酸抱合反応の種差、ならびにヒトにおける責任 UGT 分子種の同定。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞の腸管上皮細胞様細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞の腸管上皮細胞系譜への分化誘導は、腸管発生に倣って、増殖因子を利用した直接分化誘導法により行った。培養およびインキュベーションは全て 37°C、5% CO₂ 気相下で行った。ヒト iPS 細胞が φ10 cm ディッシュで約

50~70% まで生育した時点で、分化誘導培地 A (0.5% FBS、100 units/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 100 ng/mL アクチビン A 含有 RPMI 140) 中で 48 時間、分化誘導培地 B (2% FBS、100 units/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 100 ng/mL アクチビン A 含有 RPMI 140) 中で 24 時間培養することにより、胚体内胚葉への方向付けを行った。さらに分化誘導培地 C (2% FBS、1% GlutaMax および 250 ng/mL FGF2 含有 DMEM/Ham's F-12) 中で 4 日間培養することで腸管上皮幹細胞への方向付けを行った。GFR マトリゲルを氷冷した ES 細胞用培地で 30 倍に希釈し、24 well プレートに 200 μL/well となるように加えて 1 時間インキュベートすることで、薄層コーティング法によるマトリゲルコーティングプレートを準備した。Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤 Y-27632 を 10 μM 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。次に分化誘導培地 C で 50 mL 遠沈管に細胞を回収し、約 170×g (1,000 rpm) で 5 分間遠心した。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。遠心後上清を吸引除去し、Y-27632 添加分化誘導培地 D (2% FBS、2 mM L-グルタミン、1×非必須アミノ酸、100 units/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシン、1×B27 supplement および 1×N2 supplement 含有 DMEM/Ham's F-12) 12.5 mL に懸濁させ、あらかじめ用意したマトリゲルコーティングプレートに細胞懸濁液を 500 μL/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 D に交換し、20 日間培養することで腸管上皮細胞への成熟化を行った。

(2) CYP および UGT mRNA の発現解析

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞様細胞およびヒト肝臓の CYP および UGT mRNA の発現解析は、リアルタイム RT-PCR 法により行った。逆転写反応には ReverTra Ace qPCR RT kit (Toyobo)、PCR には THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix (Toyobo) を使用した。リアルタイム RT-PCR 法で使用したプライマーの塩基配列、およびプライマーによるイントロンの挟み込みの有無を Table 3 に示す。ゲノム DNA が混入している場合でも、イントロンを挟み込むように設計されたプライマーでは、非特異的増幅が起こりにくい。5 段階濃度 (5 倍または 2 倍希釈系列) の cDNA でリアルタイム PCR による測定を行い、横軸に DNA 濃度の常用対数値、縦軸に Ct 値をとった検量線を作成した。検量線の傾き (slope) を求め、 $[10^{(-1/slope)} - 1]$ により増幅効率を算出した。内部標準遺伝子として、ハウスキーピング遺伝子のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を使用した。検出は、SYBR Green の蛍光に基づくインターカラー法により行った。逆転写反応は total RNA (500 ng)、5×RT Buffer 5 μL、Primer Mix 0.5 μL、RT Enzyme Mix 0.5 μL から成る 10 μL スケールで調製した。

total RNA は 65°C で 5 分間インキュベートして RNA の二次構造を破壊した後に、氷上で約 1 分間放置してから反応系に添加した。逆転写反応は 37°C で 15 分間行った後に、98°C で 5 分間インキュベートして酵素を失活させた。逆転写反応により作製した cDNA 溶液は、リアルタイム PCR で使用するまで -20°C で保存した。リアルタイム PCR 系は cDNA 溶液 2 μ L、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 5 μ L、50 \times ROX 0.5 μ L、FP (0.4 μ M) および RP (0.4 μ M) から成る 10 μ L スケールで調製した。cDNA 溶液は 10 倍希釈したものを使用した。リアルタイム PCR は 95°C で 20 秒間インキュベートして酵素を活性化させた後に、95 $^{\circ}$ C で 3 秒間の熱変性、ならびに 60°C で 30 秒間のアニーリング/伸長反応を 40 サイクル行った。リアルタイム PCR 終了後は、直ちに融解曲線反応を行った。

(3) MEHP グルクロン酸抱合活性の測定

MEHP のグルクロン酸抱合活性は、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中に MEHP (1-1000 μ M)、肝ミクロゾーム (50 μ g protein/mL)、アラメチシン (20 μ g/mL)、MgCl₂ (5 mM) および UDPGA (2 mM) を含む反応液 (200 μ L) を 37°C で 20 分間インキュベートした。氷冷した 5% phosphoric acid/acetonitrile (50:50, v/v) を 200 μ L 添加し、混合して反応を停止させた。反応液に内部標準物質として、ジエチルフタレート (1000 pmol) を添加した後、12,000 \times g、4°C で 20 分間遠心し、上清を PTFE 膜 (孔径 0.45 μ m) で濾過した。その濾液 10 μ L を HPLC に付し、MEHP グルクロニドを定量した。MEHP 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, 3.0 mm i.d. \times 150 mm); 検出: UV 200 nm; 移動相: 0.1% phosphoric/acetonitrile (46:54, v/v); 流速 0.4 mL/min; カラム温度: 40°C。ヒト肝ミクロゾームにおける MEHP のグルクロン酸抱合活性 (基質濃度: 100 μ M) の測定の HPLC クロマトグラムを図 1 に示す。

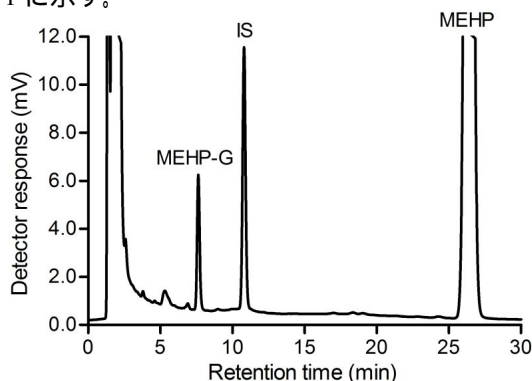


図 1 MEHP グルクロン酸抱合活性測定における HPLC クロマトグラム

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞の腸管上皮細胞様細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞 Dotcom 株 (継代数 46) の分化誘

導の過程を位相差顕微鏡にて観察し (図 2)。分化誘導 3 日目において、未分化細胞と比較して細胞一つ一つが大きく広がり、核/細胞質比が小さく、細胞間の境界が明瞭な多角形の上皮細胞様形態を示した。分化誘導 9 日目においては 3 日目に比べ、細胞が大きく広がり細胞間の境界が不明瞭に見える様子が確認された。しかし、分化誘導 26 日目では一つ一つの細胞が小さく明瞭に見え、それらの細胞が寄り集まっている様子が見られた。さらに、細胞が三次元的に重なって見えるオルガノイド様の構造が確認された (図 2 の矢印)。

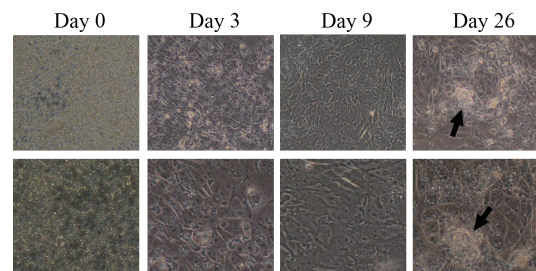
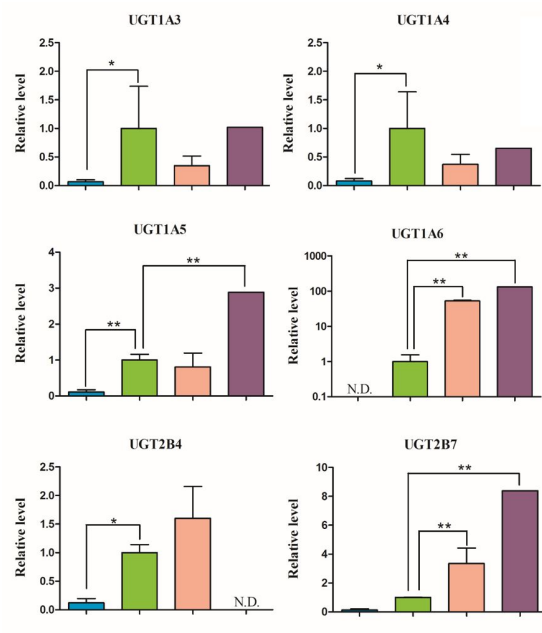


図 2 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞様細胞

(2) ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞様細胞における UGT mRNA の発現

iPS 細胞由来ヒト腸管上皮細胞様細胞において、UGT1A3、1A4、1A5、1A6、2B4、2B7、2B10、2B11 および 2B15 の発現が確認された (図 3)。発現が確認された UGT 分子種のなかで、UGT1A3、1A4、1A5、1A6、2B4、2B10 および 2B15 においてヒト iPS 細胞から有意に発現が上昇しており、UGT1A3 および 1A4 はヒト成人小腸と同程度の発現レベルを示した。また UGT1A3、1A4、1A5、2B4、2B10、2B11 および 2B15 は Caco-2 と同程度の発現レベルを示した。UGT2B4 および UGT2B10 についてはヒト成人小腸では見られなかった発現が、腸管上皮細胞様細胞ならびに Caco-2 細胞において確認された。



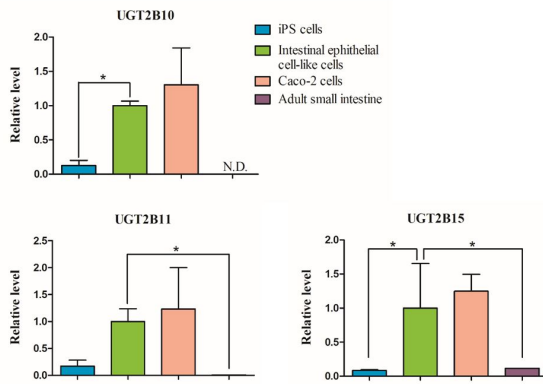


図3 ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞様細胞における UGT mRNA の発現

(2) ヒト肝臓における CYP mRNA 発現量の個人差

ヒト肝臓における CYP mRNA 発現量の個人差を検討した。10 名の正常ヒト(男性)肝臓由来 total RNA を MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) を用いて total RNA から cDNA を合成し、13 分子種の CYP(1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 3A43)の発現量をリアルタイム PCR により定量した。まず、初期鋳型量の補正に適した control 遺伝子を選択する目的で、GAPDH および β -actin mRNA, 18S rRNA を定量した。本研究で用いた試料に関しては、試料間における定量値の変動が少なく、また mRNA の品質の差異を補正し得る control 遺伝子として β -actin が適切であることが確認されことから、 β -actin mRNA の定量値を用いて初期鋳型量の補正を行った。本研究で解析の対象とした CYP mRNA については、その発現レベルに 3.7~136 倍の個人差が認められた。これまでに mRNA 発現量に比較的大きな個人差が存在することが報告されている CYP1A1, 3A4, 3A5 および 3A7 についてはそれぞれ 31, 12, 48 および 136 倍の差が認められた。また、CYP1A2 および 3A43 については 8 倍、CYP2C8 では 6 倍の個人差が観察された(図 4)。

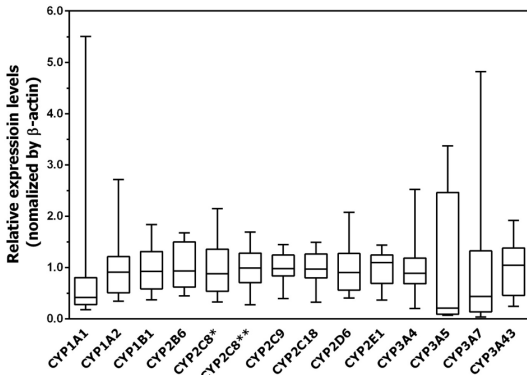


図4 ヒト肝臓における CYP mRNA 発現量の個人差

(3) MEHP グルクロン酸抱合反応の種差

DEHP は、プラスチック製品の可塑剤として広く用いられているが、内分泌攪乱やシックハウス

症候群を惹起する可能性が報告されている。哺乳動物では、DEHP は生体内で加水分解反応を受け、より毒性の高い MEHP に変換される。MEHP は、さらにグルクロン酸抱合反応を受けて、尿中あるいは糞中に排泄される(図 5)。DEHP の毒性発現の個人差を解明するための一環として、ヒト、イヌ、ラットおよびマウスの肝および小腸マイクロゾームによる MEHP のグルクロン酸抱合反応の速度論的解析を行った。

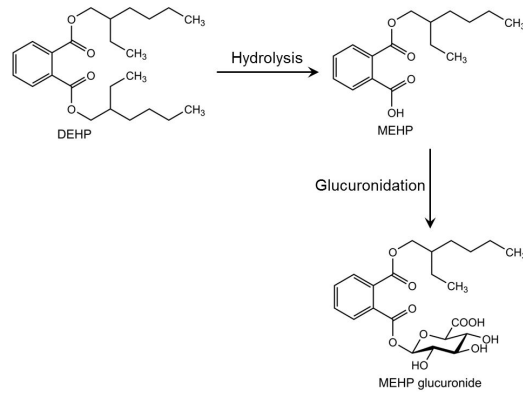


図5 哺乳動物における MEHP の代謝経路

いずれの動物種の肝および小腸マイクロゾームも MEHP に対してグルクロン酸抱合活性を有していた。肝マイクロゾームによる MEHP グルクロン酸抱合は、ヒトおよびイヌでは Michaelis-Menten、ラットおよびマウスでは Isoenzyme の速度論的挙動を示した。一方、小腸マイクロゾームによる MEHP グルクロン酸抱合の速度論的挙動は、ヒト、イヌおよびマウスでは Isoenzyme、ラットでは Michaelis-Menten のモデルに従った(図 6)。Eadie-Hofstee プロットに基づいて算出した V_{max} 値(ヒト=1.0)は、肝マイクロゾームでは、イヌ(2.0) > マウス(1.4) > ラット(1.0) ヒト(1.0)であり、小腸マイクロゾームでは、マウス(8.5) > イヌ(4.1) > ラット(3.1) > ヒト(1.0)であった。これらの結果より、MEHP のグルクロン酸抱合反応に参与する UDP-グルクロン酸転移酵素の分子種の機能および臓器・組織分布性は、動物種間で大きく異なることが示唆された。

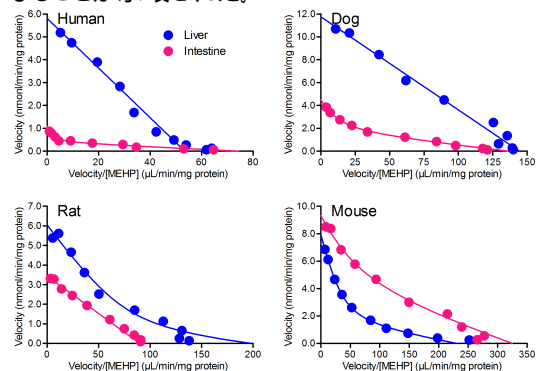


図6 肝臓および小腸マイクロゾームによる MEHP グルクロン酸抱合反応の種差

(4) MEHP グルクロン酸抱合反応に参与するヒトの UGT 分子種の同定

肝臓および小腸に発現している UGT 分子種(13 種類)について検討した。酵素源として、昆

虫細胞発現リコンビナント UGT を用いた。UGT1A3, 1A7, 1A8, 1A10, 2B4 および 2B7 が MEHP (100 μ M) に対してグルクロン酸抱合能を有し、なかでも UGT2B7 が最も高い活性を示した(図 7)。また、これら UGT 分子種の数値論的解析を行ったところ、*in vitro* クリアランス(CL_{int})値は、UGT1A9 > UGT2B7 > UGT1A8 > UGT1A10 > UGT1A3 > UGT2B4 であった。これらの結果より、MEHP の解毒反応には、肝臓では UGT1A3, 2B4 および 2B7 が、小腸では、UGT1A7, 1A8 および 1A10 が重要な役割を担っていることが示唆された(図 8)。

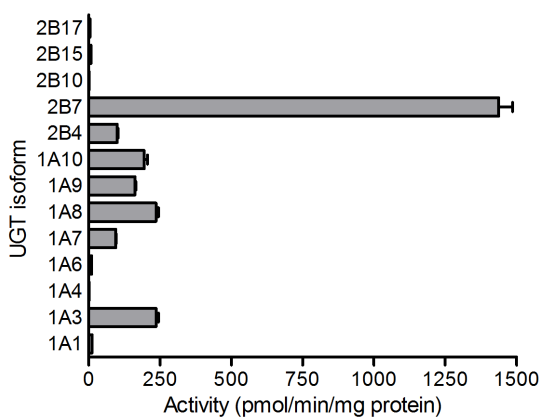


図 7 リコンビナント UGT 酵素の MEHP グルクロン酸抱合活性

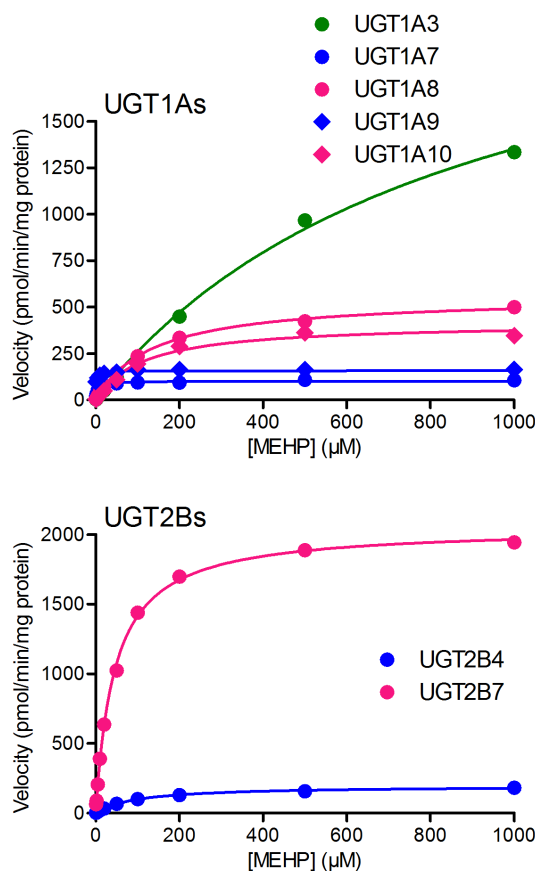


図 8 リコンビナント UGT 酵素による MEHP グルクロン酸抱合反応の速度論的解析

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

- 1) Takahara Y, Kinashi Y, Takahara Y, Hichiya H, Okada K, Murata M, Shigeyama M, Hanioka N*. Butylbenzyl phthalate hydrolysis in liver microsomes of humans, monkeys, dogs, rats and mice. *Biol Pharm Bull* 2014;37(4):703–706.
- 2) Miyake Y, Hirose R, Isobe T, Hanioka N*. Molecular cloning and functional analysis of minipig UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Xenobiotica* 2016;46(3):193–199.
- 3) Hanioka N*, Isobe T, Kinashi Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Hepatic and intestinal glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate, an active metabolite of di(2-ethylhexyl) phthalate, in humans, dogs, rats and mice: an in vitro analysis using microsomal fractions. *Arch Toxicol* 2016;90(7):1651–1657.
- 4) Hanioka N*, Kinashi Y, Tanaka-Kagawa T, Isobe T, Jinno H. Glucuronidation of mono(2-ethylhexyl) phthalate in humans: roles of hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases. *Arch Toxicol* 2017 91(2):689–698.
- 5) Hanioka N*, Isobe T, Ohkawara S, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Glucuronidation of 4-*tert*-octylphenol in humans, monkeys, rats, and mice: an in vitro analysis using liver and intestine microsomes. *Arch Toxicol* 2017 Mar;91(3):1227–1232.
- 6) Isobe T, Ohkawara S, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Hanioka N*. Hepatic glucuronidation of 4-*tert*-octylphenol in humans: inter-individual variability and responsible UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Arch Toxicol* in press.

(学会発表) (計 5 件)

- 1) 高原有香, 鬼無悠, 高原佑輔, 岡田賢二, 村田実希郎, 重山昌人, 比知屋寛之, 埴岡伸光: フタル酸ブチルベンジルの加水分解反応の種差: ヒト, サル, イヌ, ラットおよびマウス肝マイクロソームによる速度論的解析. 第 41 回日本毒性学会学術年会, 神戸, 2014 年 7 月 2-4 日.
- 2) 埴岡伸光, 磯部隆史, 香川(田中)聡子, 神野透人: フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの肝および小腸マイクロソームによるグルクロン酸抱合反応の種差. 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 27-29 日.
- 3) 香川(田中)聡子, 田原麻衣子, 齋藤育江, 武内伸治, 上村 仁, 大貫 文, 田中礼子, 竹熊美貴子, 中野いず美, 永田 淳, 酒井信夫, 五十嵐良明, 埴岡伸光, 神野透人: 室内空气中総揮発性有機化合物の分析法に関する研究. 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年 3 月 27-29 日.
- 4) 磯部隆史, 黒田勝也, 大河原晋, 香川(田

中) 聡子, 神野透人, 埴岡伸光: 4-tert-オク
チルフェノールの肝および小腸マイクロゾーム
によるグルクロン酸抱合反応の種差. 日本薬
学会第 137 年会, 仙台, 2017 年 3 月 25-27
日.

- 5) 香川(田中)聡子, 大河原晋, 磯部隆史, 埴
岡伸光, 神野透人: 消毒副生成物・ハロアセ
トアミドによるヒト侵害受容体 TRPA1 の活性
化. 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017 年 3
月 25-27 日.

(図書) (計 0 件)

(産業財産権) (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

重山 昌人 (SHIGEYAMA MASATO)

横浜薬科大学薬学部・教授

研究者番号: 90598327

(3) 研究分担者

須野 学 (SUNO MANABU)

岡山大学薬学部・准教授

研究者番号: 20621189

(4) 研究分担者

神野 透人 (JINNO HIDETO)

名城大学薬学部・教授

研究者番号: 10179096

(5) 連携研究者

村田 実希郎 (MURATA MIKIO)

横浜薬科大学薬学部・准教授

研究者番号: 80723478

(6) 連携研究者

比知屋 寛之 (HICHIYA HIROYUKI)

横浜薬科大学薬学部・講師 (2015 年 3 月 31
日退職)

研究者番号: 20548820

(7) 連携研究者

岡田 賢二 (OKADA KENJI)

横浜薬科大学薬学部・講師

研究者番号: 307137210

(8) 連携研究者

香川 聡子 (TANAKA-KAGAWA TOSHIKO)

横浜薬科大学薬学部・教授

研究者番号: 40188313