

## 凍結ヒト及びカニクイザル肝細胞の初代培養系を用いた薬物曝露による 薬物代謝酵素 mRNA 発現変動の評価

西村 益浩

### Evaluation of Induction of Drug-metabolizing Enzyme mRNAs in Primary Cultures of Cryopreserved Human and Cynomolgus Monkey Hepatocytes

Masuhiko NISHIMURA

*New Product and Business Development, Research and Development Center, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.,  
115 Kuguhara, Tateiwa, Muya-cho, Naruto, Tokushima 772-8601, Japan*

(Received February 14, 2009)

We introduce a method for measuring drug-metabolizing enzymes and transporters using real-time one-step RT-PCR with TaqMan probes. This method has the advantages of high sensitivity, simplicity, and linearity of quantification over a wide range of mRNA concentrations, making it particularly suitable for evaluating large numbers of samples, as required in expression profile determinations. We also introduce the use of primary cultures of cryopreserved human and cynomolgus monkey hepatocytes as an enzyme induction model. Furthermore, we introduce the combination of real-time one-step RT-PCR and hepatocytes for evaluating the potency of various drugs in inducing drug-metabolizing enzymes and transporters. We discuss the usefulness of evaluating the gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters following exposure to drugs in human and cynomolgus monkey hepatocytes. The combination of real-time one-step RT-PCR and primary cultures of cryopreserved hepatocytes is useful for preclinical drug evaluation and for screening to evaluate the induction potency of new drug candidates.

**Key words**—mRNA induction; primary culture; cryopreserved cynomolgus monkey hepatocyte; cryopreserved human hepatocyte; drug-metabolizing enzyme

#### 1. はじめに

薬物代謝酵素は、薬物、生体異物及び内因性物質の代謝に関与しており、これらの酵素群は肝臓に多く発現し、他の薬物、病態、栄養状態などの影響を受けて変動し、またヒト及び動物での種差も知られている。そこで、医薬品開発でしばしば問題となる薬物間相互作用の予測には、ヒト肝臓由来の試料を用いて薬物代謝酵素の誘導を評価することが最も有用と考えられており、ヒトの肝細胞を用いて薬物曝露後の薬物代謝酵素の誘導能の評価がなされている。<sup>1-6)</sup> 筆者らも、ヒトから摘出され遊離肝細胞として調製された後に凍結過程を経ず迅速に供給された新鮮ヒト肝細胞、あるいは調製後に液体窒素下で

凍結保存され、凍結状態で供給されたヒト肝細胞の初代培養系を用い、P450 に代表される第 I 相薬物代謝酵素群をはじめ、多くの薬物代謝酵素やトランスポーターについて mRNA 発現レベルでの誘導と回復を検討してきた。このような酵素誘導の評価には酵素活性あるいは酵素タンパク量を指標とした評価法も有用ではあるが、筆者らは、mRNA 発現量を指標にすることで、他の手法よりも鋭敏で汎用的な評価方法を構築した。また、これらの酵素誘導を調べる実験において溶解性に劣る化学物質（医薬品としての評価対象の試験物質）の溶解には dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いていることから、培地中の DMSO 濃度が mRNA 発現レベルに及ぼす影響についても調べた。さらに、医薬品開発での評価に使用が可能な、日本国内におけるヒト肝細胞の供給は限られていることから、遺伝子的にヒトに近いとされるサル肝細胞に着目した。しかし、サルは薬物代謝酵素の誘導において未解明な部

㈱大塚製薬工場、研究開発センター、探索・創薬研究部（〒772-8601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 115）  
e-mail: nisimums@otsukakj.co.jp  
本総説は平成 20 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

分が多く、ヒトにおいて薬物代謝酵素の誘導を引き起こす rifampicin (Rif), dexamethasone (Dex) 及び omeprazole (Ome) を陽性対照薬とし、カニクイザルの肝細胞培養系における薬物代謝酵素 mRNA 発現量に及ぼす影響をヒト肝細胞での結果と比較検討した。いずれの肝細胞も凍結状態で供給された試料を用いた。本稿では、まず筆者らが多用している TaqMan プローブを用いた mRNA 定量法について紹介した後、ヒト肝細胞の初代培養系での誘導と回復、DMSO の影響及びヒトとカニクイザル肝細胞での薬物代謝酵素やトランスポーターの誘導能の比較について述べる。

## 2. TaqMan プローブを用いた one-step の RT-PCR 法について

筆者らは、試料から調製した total RNA を出発検体として、TaqMan プローブを用いるリアルタイムの one-step RT-PCR 法を採用している。リアルタイムの one-step RT-PCR 法は、RT 反応を別途行わないために測定時間の短縮になり、測定毎に行う RT 反応も測定機器が自動で行っているため効率的な測定法と考えている。また、RT-PCR を行うときのプライマーとプローブの濃度は、ターゲット遺伝子毎に最適化する必要がある。しかし、個々の分析でプライマーとプローブの濃度を最適化していると、研究の進展によってターゲット遺伝子の数が増えると測定法の取り違いなどの可能性も増大し RT-PCR の反応が不十分な結果となるような場面も生じる。そこで、フォワードプライマーは 300 nM, リバースプライマーは 900 nM, TaqMan プローブは 200 nM の条件で問題なく反応するように、すべてのプライマーとプローブを設計した。この条件で、リバースプライマーの濃度を 900 nM とし、フォワードプライマーの 3 倍に設定したのは、RT 反応においてリバースプライマーを使用することから、RT 反応を確実にを行うように濃度を高めに設定したためである。筆者らはヒト<sup>7-11)</sup>とカニクイザル<sup>12)</sup>における多くの薬物代謝酵素やトランスポーターなどの mRNA の測定系を開発するにあたり、非常に高感度で、特異性が高く、定量範囲が広い本測定方法を採用し、以下に紹介する誘導実験などを通して医薬品の開発研究に応用している。

## 3. ヒト肝細胞の初代培養系を用いた評価

Bowen ら<sup>13)</sup>は新鮮なヒト肝細胞の初代培養系を

用いて P450 の mRNA 発現レベルでの誘導を報告した。筆者らも HAB 研究機構から供給された新鮮なヒト肝細胞の初代培養系を用い、化合物の曝露での P450 の mRNA 発現レベルでの誘導と回復を報告した。<sup>14)</sup>しかし、新鮮なヒト肝細胞は入手が不定期であることから、計画的な実験による評価を行うことができなかった。また、実験開始時におけるヒト肝細胞のプレートとの接着性や、陽性対照物質を置いて酵素誘導を評価する目的でも、陽性対照物質が期待通りに反応する肝細胞であったか否かは、実験が終了するまで確認できなかった。新鮮で供給されたドナー肝細胞では個体差が予測できないため、再現性のある研究とはならない状況であった。一方、凍結細胞を用いた評価では、同じドナーの肝細胞を保存しているため、予め接着性や陽性対照との反応性を確認した細胞で、効率的に実験ができる。本稿では、筆者らが凍結ヒト肝細胞の初代培養系を用いて、それぞれ CYP3A あるいは CYP1A を誘導する陽性対照である Rif と Ome を用いて mRNA 発現レベルでの誘導と回復を検討した例を紹介する。<sup>15)</sup>市販品として入手した凍結ヒト肝細胞は市販の専用培地に懸濁し、 $5 \times 10^4$  viable cells/cm<sup>2</sup> で蒔き、培養 24 時間後には hEGF と抗生物質を含まない培地に交換した。培養 48 時間後より、酵素誘導実験での陽性対照薬である Rif あるいは Ome を含む培地に交換し、24, 48 時間後までの mRNA 発現での誘導と、その 48 時間後までの回復をみた。薬物代謝酵素とトランスポーターの mRNA 発現量は、培養肝細胞から抽出した total RNA を ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System を用いたリアルタイムの one-step RT-PCR 法にて測定した。

凍結ヒト肝細胞の培養系において、陽性対照薬である Rif は、10  $\mu$ M の曝露により CYP3A4 の mRNA を強く誘導し、また CYP3A5 は濃度依存的な誘導がみられた (Fig. 1)。<sup>15)</sup>Ome では CYP1A1, CYP1A2 の濃度依存的な誘導を確認した (Fig. 1)。<sup>15)</sup>これらの結果は新鮮なヒト肝細胞の初代培養系を用いて評価している Bowen ら<sup>13)</sup>の報告ともよく一致している。更に、これらの mRNA レベルでの誘導は、試験物質を含まない培地に交換することにより経時的に回復することを確認した (Fig. 1)。<sup>15)</sup>

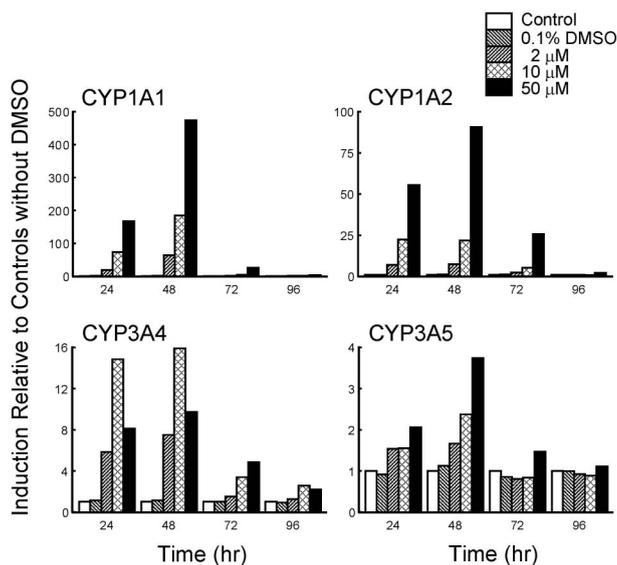


Fig. 1. Time course and effects on mRNA expression levels following exposure to omeprazole or rifampicin

Human hepatocytes were exposed to the probe drug for 24 and 48 h. The medium containing the probe drug was then replaced with fresh medium, and the hepatocytes were cultured for an additional 24 and 48 h (72 and 96 h, respectively, in the figure). The medium was changed daily. Data are expressed as the ratio of the target mRNA to GAPDH mRNA and are then shown as induction relative to controls at each time point. Experiments (in cultured human hepatocytes) were performed in triplicate, and data are shown as the mean value for three runs. CYP1A1 and CYP1A2, exposure to omeprazole; CYP3A4 and CYP3A5, exposure to rifampicin. (Modified from ref. 15.)

このように、筆者らは凍結ヒト肝細胞を用いた誘導実験でも新鮮なヒト肝細胞と同等の結果が得られることを示し、凍結ヒト肝細胞の有用性を示した。凍結ヒト肝細胞は新鮮な肝細胞と同等の代謝活性を有しているとの報告<sup>16)</sup>もあり、凍結調製法の進歩で、有用な凍結肝細胞が供給されるようになった。

#### 4. 培地中 DMSO の影響について

水に溶けにくい化学合成物質はしばしば DMSO に溶解して、酵素誘導の評価実験に使用される。そこで、筆者らは凍結ヒト肝細胞の初代培養系に曝露する DMSO 濃度の影響について検討した。Fig. 2A<sup>17)</sup>では、培養 48 時間後より、0.1%、0.5%あるいは 2.5% DMSO を含む培地に 24 時間曝露して CYP1 と CYP3A の mRNA 発現量への影響をみた。培地中の DMSO 濃度が 0.5% 以下ではこれらの mRNA 発現量の変化は比較的小さく、0.1% での変化はさらに小さかった。DMSO の濃度が 2.5% では DMSO を含まない培地と比べて CYP1B1 や CYP3A4 では明確な発現量の増加がみられ、一方、CYP3A7 のように発現量が減少する分子種もみられることも確認している。また、CYP1 (Fig. 2B)

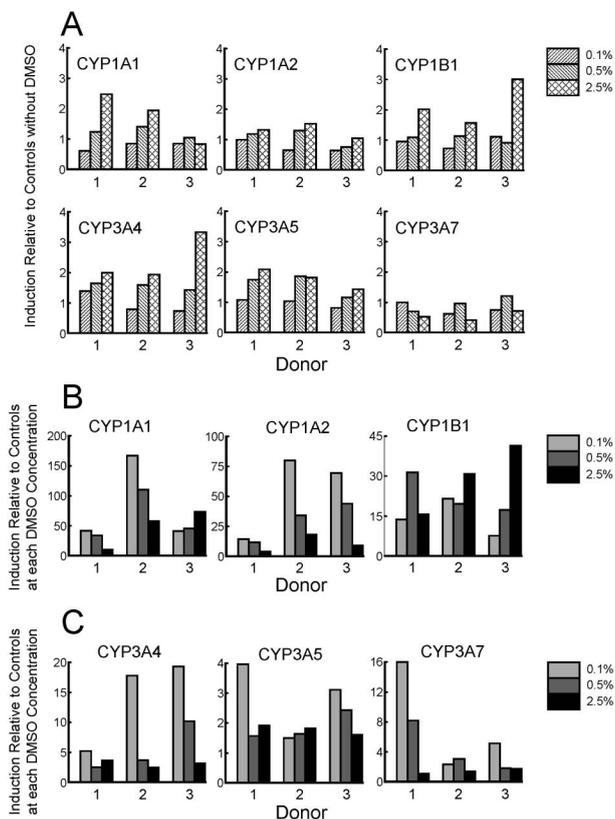


Fig. 2. Effects on mRNA expression levels following exposure to DMSO (A) and following exposure to  $\beta$ -naphthoflavone (B) or rifampicin (C) in the presence of DMSO at concentrations of 0.1%, 0.5%, and 2.5%

Experiments (in cultured human hepatocytes) were performed in duplicate, and data are shown as the mean value for two runs. Data are expressed as the ratio of the target mRNA to  $\beta$ -actin mRNA. (A) Human hepatocytes were exposed to DMSO at concentrations of 0.1%, 0.5%, and 2.5% for 24 h. Data are shown as the ratio to controls without DMSO. (B) Human hepatocytes were exposed to 5  $\mu$ M  $\beta$ -naphthoflavone for 24 h. Data are shown as the ratio to controls at each DMSO concentration. (C) Human hepatocytes were exposed to 10  $\mu$ M rifampicin for 24 h. Data analysis was the same as in experiment (B). (Modified from ref. 17.)

では  $\beta$ -naphthoflavone を、CYP3A (Fig. 2C) では Rif を陽性対照薬として、これらの曝露での誘導能と DMSO 濃度の関係を調べたところ、DMSO 濃度の上昇と共に陽性対照薬による曝露での影響がみられた。<sup>17)</sup> また、ヒト肝細胞を用いた誘導実験は、DMSO 濃度を 0.1% かそれ以下の濃度で実施されている。<sup>2-5,18-20)</sup> したがって、ヒトの肝細胞を用いた誘導実験においては、培地中の DMSO 濃度を 0.5% 程度以下に低く抑え、できれば 0.1% かそれ以下の濃度が好ましいと考えている。

#### 5. 凍結ヒト及びカニクイザル肝細胞の初代培養系での比較

遺伝的にヒトに近いとされるカニクイザルに着目し、サルの肝細胞とヒトの肝細胞の初代培養系と

の相違について検討した。比較実験では、いずれも凍結肝細胞を用い、前項に示した培養法に従い、培養 48 時間後より、CYP3A の発現量を増加させる陽性対照薬として Rif あるいは Dex, また CYP1A の発現量を増加させる陽性対照薬として Ome を含む培地に交換し、24 時間後の薬物代謝酵素とトランスポーターの mRNA の誘導能を調べた。

**5-1. CYP1A 及び CYP3A の誘導** カニクイザルの CYP3A8 は Rif と Dex 曝露で誘導がみられ、誘導パターンはヒトの CYP3A4 と類似していた (Fig. 3).<sup>21)</sup> また、カニクイザルへの Ome 曝露において、ヒトとカニクイザルともに CYP1A1 の顕著な誘導がみられたが、ヒトでみられるような明確な CYP1A2 の誘導はカニクイザルでは確認できなかった (Fig. 3).<sup>21)</sup> したがって、ヒトとカニクイザルは CYP1A1 と CYP3A において酵素誘導に関連した mRNA 発現量の増減の傾向が類似していると思われた。

**5-2. 硫酸抱合酵素及びグルクロン酸抱合酵素の誘導** HST (SULT2A1) はカニクイザルとヒトで共に Rif, Dex, Ome 曝露により誘導がみられたが、PST (SULT1A1) はカニクイザルの Dex と

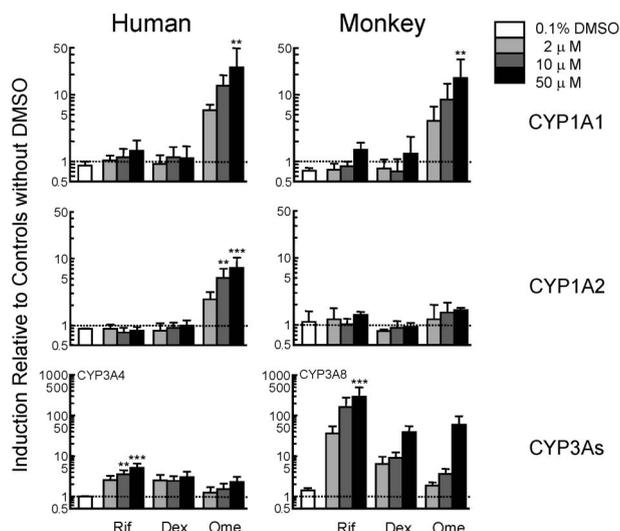


Fig. 3. Effects of exposure to drugs on the mRNA levels of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3As in primary cultures of human and cynomolgus monkey hepatocytes

Data are expressed as the ratio of the target mRNA to  $\beta$ -actin mRNA. Experiments (in cultured human and cynomolgus monkey hepatocytes) were performed in triplicate using three livers each, and the values are shown as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). The hepatocytes were exposed to the drugs at 48 h after inoculation. The hepatocytes were exposed to Rif, Dex, or Ome (2, 10, and 50  $\mu$ M each) for 24 h. The dotted line indicates the value for controls without DMSO, which was assigned a value of 1.  $**p<0.01$  and  $***p<0.001$  vs. controls at 0.1% DMSO. (Modified from ref. 21.)

Ome の曝露によりわずかに誘導された (Fig. 4).<sup>22)</sup> また、UGT1A1 はカニクイザル及びヒトでともに Rif, Dex, Ome 曝露により誘導され、カニクイザルで顕著であった (Fig. 4).<sup>22)</sup> UGT1A6 と UGT1A9 はカニクイザルにおいて陽性対照薬により誘導がみられたが、ヒトでの誘導は確認できなかった (Fig. 4).<sup>22)</sup> また、UGT2Bs は、カニクイザルとヒトでともに誘導を認めなかった。<sup>22)</sup> これらの結果より、UGT1As では、ヒトに較べてサルは強く反応し、注意を要するものの、硫酸抱合酵素とグルクロン酸抱合酵素の誘導能はヒトとカニクイザルで概ね類似性を示すことが分かった。

**5-3. MDR1, MRP1 及び MRP2 の誘導** Rif はヒトとカニクイザルともに MDR1 と MRP1 を誘

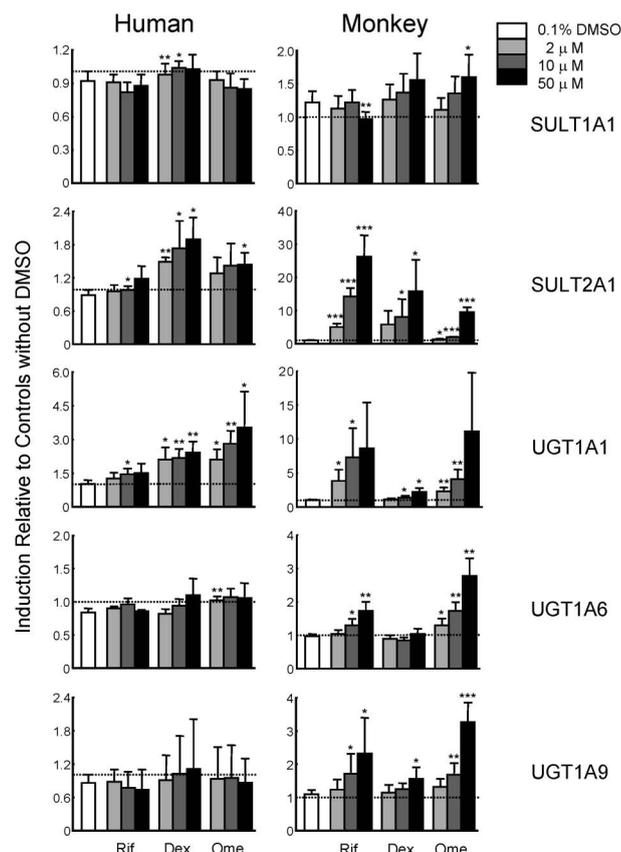


Fig. 4. Effects of exposure to drugs on the mRNA levels of SULTs and UGT1As in primary cultures of human and cynomolgus monkey hepatocytes

The hepatocytes were exposed to Rif, Dex, or Ome (2, 10, and 50  $\mu$ M each) for 24 h. Data are expressed as the ratio of the target mRNA to  $\beta$ -actin mRNA. Experiments (in cultured human and cynomolgus monkey hepatocytes) were performed in triplicate using four or five livers each, and the values are shown as mean  $\pm$  SD for four humans or five cynomolgus monkeys. The dotted line indicates the value for controls without DMSO, which was assigned a value of 1.  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ , and  $***p<0.001$  vs. controls at 0.1% DMSO. (Modified from ref. 22.)

導し、一方 Ome ではカニクイザルにおいてのみ MDR1 と MRP1 がわずかに誘導された (Fig. 5).<sup>23)</sup> また、Rif と Ome とともにヒトとカニクイザルの MRP2 を誘導した (Fig. 5).<sup>23)</sup> Dex ではヒトとカニクイザル共に MRP1 の発現量は低下する傾向がみられた (Fig. 5).<sup>23)</sup> このように、これらのトランスポーターの誘導能はヒトとカニクイザルで類似していることが分かった。

## 6. おわりに

医療の現場では複数の医薬品が同時に使用されることも多く、薬物間相互作用による医療過誤が問題となる。そこで、医薬品開発の過程において、開発候補品が薬物間相互作用のリスクをどの程度持っているかについて検討している。相互作用に至る要因は、薬物動態的な過程のみならず薬力学的な相互作用も考えられる。相互作用は大別すると酵素阻害と酵素誘導などが知られており、本稿では薬物動態的な原因による酵素誘導を評価するための手段を示した。酵素活性を指標とし、ヒト肝細胞を用いた酵素誘導の評価は非常に有用であるが、この手法に対して、筆者らは鋭敏なバイオマーカーとなる mRNA

発現解析を指標とした測定法を開発し、さらにヒト肝細胞の代替実験法としてカニクイザル肝細胞を用いた評価について示した。

その結果、ヒト肝細胞を用い陽性対照薬による曝露実験から mRNA 発現解析の反応性は十分であり、少量の培養細胞から鋭敏な誘導を検出できることが分かった。また、ヒトとカニクイザルの凍結肝細胞を用いた比較実験から、mRNA レベルでの誘導能でみると、カニクイザルの薬物代謝酵素やトランスポーターはヒトよりも反応性がやや高いものの、概ね類似性を示した。したがって、このような *in vitro* 試験系を用いた誘導作用に関する評価は、臨床 (ヒト) での薬物の相互作用を予測する上で重要な示唆を与えるものであると考えている。

**謝辞** 本研究を遂行するにあたり、終始暖かい御指導を賜りました千葉大学 佐藤哲男名誉教授、岡山大学 成松鎮雄教授、㈱イナリサーチ 小枝暁子氏及び㈱大塚製薬工場 内藤真策博士及びに共同研究者の方々に深く感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Kostrubsky V. E., Lewis L. D., Strom S. C., Wood S. G., Schuetz E. G., Schuetz J. D., Sinclair P. R., Wrighton S. A., Sinclair J. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **355**, 131–136 (1998).
- 2) Pichard-Garcia L., Hyland R., Baulieu J., Fabre J., Milton A., Maurel P., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 51–57 (2000).
- 3) Luo G., Cunningham M., Kim S., Burn T., Lin J., Sinz M., Hamilton G., Rizzo C., Jolley S., Gilbert D., Downey A., Mudra D., Graham R., Carroll K., Xie J., Madra A., Parkinson A., Christ D., Selling B., Lecluyse E., Gan L. S., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 795–804 (2002).
- 4) Meunier V., Bourrie M., Julian B., Marti E., Guillou F., Berger Y., Fabre G., *Xenobiotica*, **30**, 589–607 (2000).
- 5) Gerbal-Haloin S., Pascussi J., Pichard-Garcia L., Daujat M., Waechter F., Fabre J., Carrere N., Maurel P., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 242–251 (2001).
- 6) Silva J. M., Morin P. E., Day S. H., Kennedy B. P., Payette P., Rushmore T., Yergey J. A.,

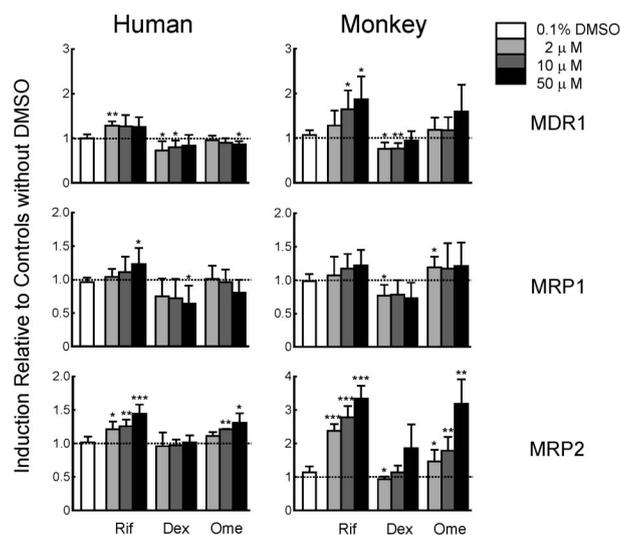


Fig. 5. Effects of exposure to drugs on the mRNA levels of MDR1, MRP1, and MRP2 in primary cultures of human and cynomolgus monkey hepatocytes

The hepatocytes were used for experiments at 48 h after inoculation. The hepatocytes were exposed to Rif, Dex, or Ome (2, 10, and 50  $\mu$ M each) for 24 h. Data are expressed as the ratio of the target mRNA to  $\beta$ -actin mRNA. Experiments (in cultured human and cynomolgus monkey hepatocytes) were performed in triplicate using five livers each, and the values are shown as mean  $\pm$  SD for five humans or five cynomolgus monkeys. The dotted line indicates the value for controls without DMSO, which was assigned a value of 1. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, and \*\*\* $p$ <0.001 vs. controls at 0.1% DMSO. (Modified from ref. 23.)

- Nicoll-Griffith D. A., *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 490–496 (1998).
- 7) Nishimura M., Yaguti H., Yoshitsugu H., Naito S., Satoh T., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 369–375 (2003).
- 8) Nishimura M., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 452–477 (2005).
- 9) Nishimura M., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 357–374 (2006).
- 10) Nishimura M., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23**, 22–44 (2008).
- 11) Nishimura M., Suzuki S., Satoh T., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 91–99 (2009).
- 12) Nishimura M., Koeda A., Morikawa H., Satoh T., Narimatsu S., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 139–144 (2009).
- 13) Bowen W. P., Carey J. E., Miah A., McMurray H. F., Munday P. W., James R. S., Coleman R. A., Brown A. M., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 781–788 (2000).
- 14) Morioka Y., Nishimura M., Imai T., Suzuki S., Harada M., Satoh T., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 19–28 (2006).
- 15) Nishimura M., Yoshitsugu H., Naito S., Hiraoka I., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 339–361 (2002).
- 16) Li A. P., Lu C., Brent J. A., Pham C., Fackett A., Ruegg C. E., Silber P. M., *Chem. Biol. Interact.*, **21**, 17–35 (1999).
- 17) Nishimura M., Ueda N., Naito S., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1052–1056 (2003).
- 18) Lindley C., Hamilton G., McCune J. S., Faucette S., Shord S. S., Hawke R. L., Wang H., Gilbert D., Jolley S., Yan B., Lecluyse E. L., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 814–821 (2002).
- 19) Ramachandran V., Kostrubsky V. E., Komoroski B. J., Zhang S., Dorko K., Esplen J. E., Strom S. C., Venkataramanan R., *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1194–1199 (1999).
- 20) Kostrubsky V. E., Ramachandran V., Venkataramanan R., Dorko K., Esplen J. E., Zhang S., Sinclair J. F., Wrighton S. A., Strom S. C., *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 887–894 (1999).
- 21) Nishimura M., Koeda A., Suganuma Y., Suzuki E., Shimizu T., Nakayama M., Satoh T., Narimatsu S., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 178–186 (2007).
- 22) Nishimura M., Koeda A., Shimizu T., Nakayama M., Satoh T., Narimatsu S., Naito S., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23**, 45–53 (2008).
- 23) Nishimura M., Koeda A., Morikawa H., Satoh T., Narimatsu S., Naito S., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2068–2072 (2008).