

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460167

研究課題名(和文) ヒト胎児肝細胞を用いた胎児毒性評価系の構築と分子毒性基盤

研究課題名(英文) Estimation of fetotoxicity of chemical compounds with human fetal liver cells and molecular basis of their toxicities

研究代表者

山折 大 (YAMAORI, Satoshi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授

研究者番号：40360218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト胎児肝細胞を用いた胎児毒性評価系を構築し、その分子毒性基盤を確立することを目的とした。妊婦への投与が禁忌となっている医薬品を含めた多くの化学物質の肝細胞毒性を評価した結果、タモキシフェン、ジクロフェナク、レチノイン酸などが強い毒性を示した。解毒酵素であるグルタチオン-S-転移酵素はこれらの毒性を軽減することができなかった。また、解析した多くの化学物質は胎児肝臓のシトクロムP450や硫酸転移酵素など多くの薬物代謝酵素の発現を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Fetotoxicity of chemical compounds was investigated with human fetal liver cells. Among the chemical compounds examined, tamoxifen, diclofenac, and retinoic acid induced strong cytotoxicity, from which glutathione S-transferase did not protect human fetal liver cells. A lot of test compounds induced the expression of drug-metabolizing enzymes such as cytochrome P450s and sulfotransferases in human fetal liver cells.

研究分野：薬物代謝学、衛生化学

キーワード：ヒト胎児肝細胞 胎児毒性 薬物代謝酵素

1. 研究開始当初の背景

現在、医薬品を含む化学物質の胎児への影響は倫理上の問題から実験動物を用いて検討されている。しかし、サリドマイドに代表されるように、化学物質に対する胎児の感受性は、動物種によって差異が認められることが多く、そのため2種類以上の実験動物を用いることとなっている。この感受性の違いは実験動物とヒトとの間でもしばしば見られる。この要因の1つとして、胎児肝での薬物代謝酵素の種差が考えられる。ヒトの胎児肝には薬物代謝酵素が胎児期の早い段階から発現しており、少なくとも胎齢 10 週以降から発現が認められている。一方、げっ歯類などの実験動物の胎児肝にはほとんど発現していない。したがって、化学物質のヒト胎児への影響を評価するには、ヒト胎児由来の組織や細胞などを用いる必要がある。当研究室では、これまでヒト胎児正常肝細胞を用いて、胎児期における薬物動態変動因子の解明に取り組んできた。その中で、ヒト胎児肝細胞に発現する薬物代謝酵素が成人肝細胞と異なる発現調節を受けることを明らかにしている。このことから、ヒト胎児肝細胞の化学物質に対する感受性は成人肝細胞と異なることが推察される。しかしながら、ヒト胎児肝細胞に対する化学物質の影響を網羅的に解析した研究はこれまで行われていない。したがって、ヒト胎児肝細胞を用いた胎児毒性評価系を構築することは、化学物質のヒト胎児への影響を明らかにする上で極めて重要である。

2. 研究の目的

ヒト胎児正常肝細胞を用いた胎児毒性評価系を構築し、その分子毒性基盤を構築する。

(1) 化学物質がヒト胎児肝細胞に対して細胞毒性を誘発するか否かについて評価する。

(2) 化学物質がヒト胎児肝細胞の薬物代謝酵素群に対してどのような影響を及ぼすのか明らかにする。

(3) 薬物代謝酵素群が化学物質の胎児肝毒性に対してどのような役割を果たすのか明らかにする。

本研究では、抗てんかん薬、ニコチンとその代謝物、ワルファリン、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬、スタチン系薬、抗がん薬(タモキシフェン、サリドマイド、レナリドミド、シクロホスファミド、5-フルオロウラシル)、アセトアミノフェン、ジクロフェナク、多環芳香族炭化水素、デキサメタゾン、全トランス型レチノイン酸、エタノールなど 70 種類の化合物を用いた。

3. 研究の方法

(1) ヒト胎児肝細胞に各種試験化合物を 1 ~ 24 時間処理した後に細胞毒性試験 (WST-1 アッセイ、LDH 放出アッセイ) を行った。

(2) ヒト胎児肝細胞に各種試験化合物を 24 時間処理し、その後、mRNA レベルの発現解析をリアルタイム PCR 法により行った。

(3) ヒト胎児肝細胞を播種してから 6 時間後にグルタチオン枯渇剤であるブチオニンスルホキシミンを添加し 18 時間処理した。その後、各種試験化合物を 3 または 24 時間処理した後に細胞毒性試験を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト胎児肝細胞に 68 種類の各種試験化合物を 24 時間処理した後に WST-1 アッセイを行った結果、タモキシフェン、全トランス型レチノイン酸、ジクロフェナク、テルミサルタン、アトルバスタチン、セリバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチンが強い (50% 以上の) 増殖抑制作用を示した。これらの化合物で LDH 放出アッセイを行ったところ、ほとんどの化合物は細胞膜を傷害したが、ジクロフェナクおよびテルミサルタンでは細胞膜の傷害は認められなかった。細胞毒性の経時変化を検討したところ、タモキシフェンおよびシンバスタチンは処理後 1 時間で 24 時間後と同等の毒性が認められたことから、薬物暴露初期より細胞毒性を誘発していることが示された。全トランス型レチノイン酸は処理後 1~6 時間で、またジクロフェナクは 6 ~ 24 時間で経時的に毒性が増強された。これらの細胞毒性にアポトーシスが関与しているか否かを明らかにするため、カスパーゼ-3 阻害剤を前処理したところ、タモキシフェン (10 μ M、6 時間) の毒性は有意に抑制されたが、全トランス型レチノイン酸 (25 μ M、3 時間) およびジクロフェナク (250 μ M、24 時間) の毒性は抑制されなかった。

(2) ヒト胎児肝細胞に 57 種類の各種試験化合物を 24 時間処理した後に mRNA レベルの発現解析を行った。その結果、CYP1A1 mRNA レベルの有意な上昇はイミダプリル、3-メチルコラントレン、ベンゾ[a]ピレンなど 15 種の化合物で認められた。CYP3A7 mRNA レベルの有意な上昇は 5-フルオロウラシル、デキサメタゾン、プレドニゾロンなど 7 種の化合物で認められた。エポキシドヒドロラーゼ 1 mRNA レベルの有意な上昇はリシノプリル、ベンゾ[a]アントラセンで認められた。グルタチオン-S-転移酵素である GSTM1 mRNA レベルの有意な上昇はベナゼプリル、アジルサルタン、ピレンなど 12 種の化合物で認められた。GSTP1 mRNA レベルの有意な上昇はフェノバルビタール、ベンゾ[a]アントラセン、フルオレンなど 6 種の化合物で認められた。GSTT1 mRNA レベルの有意な上昇はフェノバルビタール、アラセプリル、アジルサルタン、ピレ

ンなど 14 種の化合物で認められた。硫酸転移酵素である SULT1E1 mRNA レベルの有意な上昇はデキサメタゾン、プレドニゾロン、全トランス型レチノイン酸で認められた。

5-フルオロウラシルによる CYP3A7 の発現誘導についてさらに解析を進めた。その結果、5-フルオロウラシルは CYP3A7 の発現を濃度依存的に上昇させたが、CYP3A4 および CYP3A5 の発現には大きな影響を及ぼさなかった。5-フルオロウラシルは、ストレス応答性 MAPK の 1 つである p38 MAPK を活性化して炎症性サイトカインやトロンボスポンジン-1 の発現を誘導することが報告されている。そこで、p38 MAPK 阻害剤を用いて、5-フルオロウラシルの CYP3A7 発現誘導能に対する影響を検討した結果、5-フルオロウラシルによる CYP3A7 の発現誘導は p38 MAPK 阻害剤である SB203580 によって有意に抑制された。このことから、5-フルオロウラシルによる CYP3A7 の発現誘導には p38 MAPK が関与していることが示唆された。

デキサメタゾンによる SULT1E1 の発現誘導についてさらに解析を進めた。デキサメタゾンはヒト乳癌由来 MCF-7 細胞のグルココルチコイド受容体を介して SULT1E1 の発現を誘導することが報告されている。そこで、グルココルチコイド受容体アンタゴニストを用いて、デキサメタゾンの SULT1E1 発現誘導能に対する影響を検討したところ、デキサメタゾンによる SULT1E1 の発現誘導はグルココルチコイド受容体アンタゴニストである RU-486 によって有意に抑制された。このことから、デキサメタゾンによる SULT1E1 の発現誘導にはグルココルチコイド受容体が関与していることが示唆された。

(3)(1) の研究で細胞毒性を示したタモキシフェン、ジクロフェナク、全トランス型レチノイン酸を用いて、グルタチオン枯渇によりグルタチオン-S-転移酵素の機能が欠失したヒト胎児肝細胞に対する毒性評価を行った。その結果、タモキシフェン、ジクロフェナク、全トランス型レチノイン酸による細胞毒性はグルタチオン-S-転移酵素の機能が欠失しても増強しなかった。このことから、グルタチオン-S-転移酵素はこれらの細胞毒性の防御的役割を果たしていないことが示唆された。

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)

小澤秀介、小林愛子、高津亜希子、神田博仁、山折 大、塩沢丹里、大森 栄、切迫早産治療薬としてニフェジピンが奏功した一例、医療薬学、Vol.42、202-208 (2016)、査読有
<http://mol.medicalonline.jp/library/>

journal/abstract?GoodsID=db5pharm/2016/004203/009&name=0202-0208j&UserID=160.252.69.9.

Satoshi Yamaori、Yuka Kinugasa、Rongrong Jiang、Shuso Takeda、Ikuo Yamamoto、Kazuhiro Watanabe、Cannabidiol induces expression of human cytochrome P450 1A1 that is possibly mediated through aryl hydrocarbon receptor signaling in HepG2 cells、Life Sci.、Vol.136、87-93 (2015)、査読有
DOI; 10.1016/j.lfs.2015.07.007.

Satoshi Yamaori、Ken Takami、Ayaka Shiozawa、Kanao Sakuyama、Naoki Matsuzawa、Shigeru Ohmori、In vitro inhibition of CYP2C9-mediated warfarin 7-hydroxylation by iguratimod: possible mechanism of iguratimod-warfarin interaction、Biol. Pharm. Bull.、Vol.38、441-447 (2015)、査読有

DOI; 10.1248/bpb.b14-00711.

Satoshi Yamaori、Yoshimi Okushima、Ikuo Yamamoto、Kazuhiro Watanabe、Characterization of the structural determinants required for potent mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A1 by cannabidiol、Chem. Biol. Interact.、Vol.215、62-68 (2014)、査読有

DOI; 10.1016/j.cbi.2014.03.007.

〔学会発表〕(計 7 件)

山折 大、松永民秀、大森 栄、ヒト胎児肝細胞を用いた薬物の細胞毒性評価、日本薬学会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

山折 大、荒木規行、池畑くるみ、大森 栄、渡辺和人、エパルレスタットによる CYP4A11 選択的阻害作用、日本薬物動態学会、2015 年 11 月 12 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Satoshi Yamaori、Yousuke Nagata、Shigeru Ohmori、Ikuo Yamamoto、Kazuhiro Watanabe、Potency and mechanism of CYP2J2 inhibition by major phytocannabinoids、North American International Society for the Study of Xenobiotics、2015 年 10 月 20 日、Orlando (USA)

Kazuhiro Watanabe、Kiyo Inoue、Maki Murai、Noriyuki Usami、Satoshi Yamaori、Ikuo Yamamoto、Metabolism of major phytocannabinoids by human placenta microsomes and CYP19、The International Association of Forensic Toxicologists、2015 年 8 月 31 日、Florence (Italy)

Kazuhiro Watanabe、Satoshi Yamaori、

Rongong Jiang, Yuka Kinugasa, Yoshimi Okushima, Ikuo Yamamoto, Inducibility of CYP enzymes by cannabidiol、International Cannabinoid Research Society、2015年6月29日、Wolfville (Canada)

Satoshi Yamaori、Mio Shionoiri、Shigeru Ohmori、Kazuhito Watanabe、Evaluation of Luciferin-4A O-demethylase activity as a CYP4A11 marker in human liver and kidney microsomes、North American International Society for the Study of Xenobiotics and Japanese Society for the Study of Xenobiotics、2014年10月20日、San Francisco(USA)

山折 大、津田有加、大森 栄、渡辺和人、ダナゾールのヒトCYP3A活性に対する阻害作用、医療薬学フォーラム、2014年6月29日、ビッグサイトTFTホール(東京都・江東区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山折 大 (YAMAORI, Satoshi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・准教授

研究者番号：40360218

(2) 研究分担者

大森 栄 (OHMORI, Shigeru)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・教授

研究者番号：70169069