第20回 日本臨床薬理学会年会 1999年12月3~4日 横浜

HepG2 を用いた CYPs mRNA 誘導能の評価 —RT-Competitive PCR による定量的解析—

隅 田 昭 彦* 山 本 勇* 福 圓 修 一*
猶 原 雅 和* 松 田 秀 康* 木 下 香 葉子*
東 純 一*

【目的】新薬の開発において、化合物の有する特性として薬物代謝酵素、特に Cytochrome P450 (CYP) 誘導能を評価しておくことは臨床における薬物相互作用の把握の観点から重要である。しかし CYP 誘導の有無と程度には種差が存在することが明らかにされつつあり、動物実験の結果を直接ヒトへ外挿するのは困難である。現在、肝薬物代謝酵素誘導の実験的アプローチとしてヒト肝初代培養系あるいは肝スライスなどが供せられているが、肝薬物代謝酵素は初代培養細胞系にすると速やかにその発現が低下し、一定の発現量を維持するのは難しい。我々はこれまで、容易に入手できかつ肝実質細胞の特性を良く維持しているヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用いた *in vitro* 培養系において、多くの薬物代謝に関与している CYP3A4 および CYP2C9 の mRNA の誘導を、RT-competitive PCR (RT-cPCR) を用いて定量的に解析してきた。今回、CYP 誘導のモデル化合物として rifampicin (RFP) を用い、上記 2 分子種に加え CYP2E1 と CYP1A2 の mRNA 発現誘導についても評価した。さらに CYP3A4 mRNA 誘導に関して、薬剤の化学構造と酵素誘導能との関連性についても検討し若干の知見を得たので併せて報告する。

【方法】HepG2 細胞は 10% 牛胎児血清含 MEM/Earle's 培地にて 37 °C、5% CO₂ 条件下で単層培養した。RFP による CYP 誘導の経時変化を観察するため細胞を 50 μM RFP 存在下、所定の時間暴露した。つぎに RFP の濃度一誘導応答性を検討すべく、0~50 μM の RFP を添加した。所定時間培養後細胞から全 RNA を抽出し、各検体について逆転写反応を行い cDNA を得た。これを鋳型として各分子種特異的なプライマーと DNA competitor を用いて cPCR を行った。細胞内在性の目的産物および DNA competitor 由来の各バンド強度を NIH image program software を用いて数値化した。また検体間の実質的な鋳型量を揃えるため、ハウスキーピング遺伝子の β-actin 量を同時に定量することで各分子種の発現量を補正した。各分子種の発現量は copies/10⁶ of β-actin として表した。

化合物の化学構造と誘導能についての予備的検討では CYP3A4 mRNA 誘導のモデル化合物として reserpine (RSP) を選択し、その類縁化合物である rescinamine (RSN) 及び reserpinic acid (RA) の CYP3A4 mRNA 誘導能との比較を行った。

* 大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学
〒565-0871 吹田市山田丘 1-6

Fig. Time course of CYPs mRNA expression in HepG2 cells that were exposed to 50 μM RFP.

Data represents the mean $\pm$ S.E. obtained from three different cultures. Significantly different from untreated control cells of each time (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ by unpaired Student's t -test).

【結果】HepG2 における各分子種の常在発現量は培養 24~120 時間では有意な変動は認められなかったが、CYP2E1 のみ明らかに高い発現であった。RFP は CYP3A4 および CYP2C9 mRNA 量を濃度依存的かつ時間依存的に増加させた。HepG2 への 50 μM RFP 120 時間暴露により CYP3A4 で 8.4 倍、CYP2C9 で 6 倍の発現誘導を誘起した。一方 CYP2E1 および CYP1A2 に関しては、24~120 時間の RFP 処置でも mRNA 発現量に有意な変動は認められなかった。50 μM RFP 24~120 h 暴露で誘導がみられなかった CYP1A2 について、24 時間以前の発現変化を検討したところ、暴露 3~6 時間で誘導が観察された。未処置群の 36 倍まで増加したがこの発現誘導は一過性で、24 時間後には常在発現レベルまで減衰した。構造一誘導能に関する検討で、RSP では CYP3A4 mRNA 量が顕著に増加（未処置群の 3.3 倍）したのに対し、RSN および RA では有意な誘導作用は認められなかった。

【考察】HepG2 細胞は肝特異的機能である血漿蛋白類の産生などヒト肝の形質を良く維持しているとされており、さらに継代、維持が簡単なことから多岐に渡る研究に繁用されている細胞株である。しかし P450 酵素活性に関しては CYP1A 以外の分子種では認められず、さらに mRNA 発現に関しても Northern

blotting などの従来法では検出困難なことから、CYP 誘導の評価系として不適であるとされていた。今回我々は、ヒト肝の主たる P450 分子種 CYP3A4 を含む 4 種の CYP 分子種の mRNA の常在発現および誘導的発現を定量的 RT-cPCR 法により測定した。RFP による各 CYP mRNA の発現誘導には明らかな時間差が認められ、各分子種の発現調節が異なること、さらに同一薬物が異なる誘導経路を活性化しうることを示唆するものと考えられた。我々はヒト肝臓試料において CYP3A4 の代謝活性と RT-cPCR により測定した mRNA 量との間に高い相関 ($r=0.94$) を認め、CYP3A4 に関しては mRNA レベルでの誘導が代謝活性を反映することを報告した¹⁾。

以上、HepG2 を用いた in vitro 培養系が薬剤による CYPs mRNA 発現誘導の評価系として有用であり、さらに RT-cPCR により高感度かつ定量的に CYPs mRNA 量を測定できることを確認した。

【参考文献】

- 1) Sumida, A., Kinoshita, K., Fukuda, T., Matsuda, H., Yamamoto, I., Inaba, T., and Azuma, J., Relationship between mRNA levels quantified by reverse transcription-competitive PCR and metabolic activity of CYP3A4 and CYP2E1 in human liver., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 262 : 499-503 (1999).