

化粧品成分の安全性評価：CYP 誘導性と肝毒性の *in vitro* 評価系の構築

鳥取大学染色体工学研究センター染色体医療学研究部門

多田 政子

Human adult hepatocytes are required for cell-based assays to evaluate the potential risk of drug-drug interactions caused by the transcriptional induction of P450 (CYP) enzymes in early-phase drug discovery and development. We created transgenic HepaRG cells by replacing the protein-coding regions of human CYP3A4 and CYP3A7 with enhanced green fluorescent protein (EGFP) and DsRed reporters, respectively, in a bacterial artificial chromosome (BAC) vector that included whole regulatory elements. In the created BAC-transgenic HepaRG cells, EGFP can be used as a quality assurance marker for identifying functional hepatocytes derived from DsRed-positive bipotential stem cells in real time without the need for many time-consuming steps.

1. 緒 言

健康や美容に優れた効果が期待される成分が見つかったとしても、細胞毒性や薬物間相互作用を引き起こす危険性について慎重に精査しなければならない。開発期間の短縮や低コスト化には、それら成分の不都合な特性を可能な限り早い時期に把握することが重要である。薬物相互作用、いわゆる「飲み合わせ」の問題は、服用した化合物が薬物代謝酵素群 P450 (CYP) の阻害や発現誘導を引き起こすことに起因する。この反応には種差があるため、ヒト細胞を用いた評価系の確立が望まれる。この実現には、2つの大きな課題が残されている。1つは、評価に用いる充分な質と量のヒト肝細胞ソースが確保されていないこと、もう1つは短時間に多検体を評価できるハイコンテンツスクリーニング (HCS) 型の評価系が構築されていないことである。

我々は、市販薬の 50 - 60% の代謝を担う成人特異的な CYP3A4 と胎児肝臓で発現する CYP3A7 を 2 色蛍光で簡便かつ感度よく検出する一体型ベクターを開発した¹⁾。このベクターを用いると以下のことが可能になると予想した：①CYP3A7 を発現する肝芽細胞を赤色蛍光 (DsRed) で、CYP3A4 を発現する成人肝細胞を緑色蛍光 (EGFP) で同定することが可能になる。②成人肝細胞を緑色蛍光に基づいて分取することが可能になる。③ある種の化学物質は核内受容体の PXR や RXR と結合することで CYP3A4 発現誘導を引き起こすことが知られているが、この CYP3A4 誘導性を EGFP 蛍光量の増加に基づいて評価することが可能になる。

CYP3A4 と CYP3A7 はタンパク質レベルでは 90% 以上の

相同性を示し、抗体を用いて識別することが困難である²⁾。しかし、これらは、酵素反応性や基質特異性、更に発現誘導機序が異なっている。よって、CYP3A4 を発現している成人肝細胞の選択的利用が求められているものの、主なヒト肝細胞株は胎児性の遺伝子発現プロファイルを示すという問題がある。

本研究では、開発済みの一体型 2 色蛍光ベクター (CYP3A4G/7R BAC) をヒト肝細胞由来細胞株 HepaRG 細胞に導入しベクターの作動性を評価した。HepaRG 細胞は、ヒト肝細胞様への分化能を持ち、高い CYP3A4 発現を示すようになることが知られている^{3, 4)}。そこで、分化したトランスジェニック細胞 (CYP3A4G/7R HepaRG) がヒト肝細胞の代替モデル細胞として有用かどうか評価した。結果、CYP3A4G/7R HepaRG を用いると、EGFP 蛍光が内在性 CYP3A4 発現のインディケーターとなるため、HepaRG 細胞の分化状態のモニターや代謝活性の高い細胞を集めることが容易になった。更に、CYP3A4G/7R HepaRG に既知の CYP3A4 発現誘導剤を添加すると、EGFP 蛍光量が増加した。よって、CYP3A4G/7R HepaRG を用いることで、一度に多数の化合物に関して CYP3A4 発現誘導性をマルチウエルで評価できる HCS 系を構築できる可能性が示された。

2. 実 験

2. 1. 増殖培養と肝細胞分化

HepaRG 細胞 (Biopredic International) は、710 growth medium を用いて 5% CO₂、37℃ で増殖させた。HepaRG 細胞を分化させる場合は、710 growth medium で 2 週間培養し、連続的に 720 differentiation medium で 2 週間培養した。

2. 2. トランスジェニック細胞作製

2. 2. 1. loxP-HepaRG 細胞

CYP3A4G/7R BAC ベクター全長を Cre 酵素を介して受容細胞に 1 コピー導入する目的で、loxP サイトを BAC ベ



Dual-color fluorescent imaging of developmental shift from foetal hepatic cells to adult hepatocytes and CYP3A4 induction test in human hepatic carcinoma HepaRG

Masako Tada

Division of Chromosome Engineering & Therapeutics, Chromosome Engineering Research Center, Tottori University

クターに挿入した。次にBACベクターをHepaRG細胞に導入するため、loxPアクセプターサイトをもつHepaRG細胞 (loxP-HepaRG) を作製した。NotIで切断したloxPサイト導入用のプラスミドベクターをLipofectamine LTX (Life Technologies) でトランスフェクションした。loxP-HepaRGは、プラスミドベクター上のハイグロマイシン薬剤耐性遺伝子を用いて選択した。ゲノムDNAのPCR解析やDNA FISH法により、loxPの挿入やその染色体領域を同定した。

2. 2. 2. CYP3A4G/7R HepaRG細胞

CYP3A4G/7R BACはpCAG-Creベクターと共にloxP-HepaRGにLipofectamine LTXでトランスフェクションした。CYP3A4G/7R HepaRGクローンは、プラスミドベクター上のネオマイシン薬剤耐性遺伝子を用いて選択した。ゲノムDNAのPCR解析やDNA FISH法により、BACベクターの挿入やその染色体領域を同定した。

2. 3. CYP3A4 発現誘導

分化したCYP3A4G/7R HepaRGに10 μ Mリファンピシン (RIF)、25 μ Mデキサメタゾン (DEX)、25 μ Mクロトリマゾール (CLO)、100 μ Mニフェディピン (NIF) または25 μ M PCNを24–48時間添加した。全ての誘導剤に関して、細胞添加状態で0.1% DMSOになるようにDMSOに溶解したストック溶液を調整した。エリア総蛍光量を測定した後にRNAを抽出した。これにより、EGFP、DsRedおよび内在性CYP3A4のmRNA発現量変化と蛍光量変化を比較可能にした。cDNAはSuperscript III First-Strand Synthesis Kit (Life Technologies)を用いて合成し、LightCycler 480 (Roche Applied Science)を用いて通常の定量性RT-PCR法で解析した。

2. 4. CYP3A4 タンパク質発現解析

ウエスタンブロットは、10–20 μ gのHepaRG細胞タンパク質を25% LDS sample buffer (NuPAGE)に溶解し、5–20% SDS-polyacrylamide gradient gel (ATTO)を用いて分離した。Polyvinylidene fluoride membraneにトランスファーし、PBSに3%スキムミルクを溶解したブロッキング液を用いて、通常のウエスタンブロット法に従って抗体処理した。シグナルは、ECL Plus Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)を用いて検出した。使用した一次抗体は以下の通り：anti-CYP3A4/7 antibody (rabbit polyclonal, 1:500; Enzo)、anti-EGFP (mouse monoclonal, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、anti- β -actin (mouse monoclonal, 1:5,000; Abcam)。

2. 5. 蛍光陽性細胞のライブイメージング、数的評価および蛍光量解析

細胞の蛍光は通常の倒立型蛍光顕微鏡で観察できる。本

研究では、BZ-9000 蛍光顕微鏡(Keyence)で画像を取得し、専用の画像解析ソフトで相対的にエリア総蛍光量を比較した。また、自動蛍光画像取得および解析装置であるLEAP cell-processing workstation (Cyntellect)およびIncuCyte ZOOM (Essen BioScience)を適宜用いた。ライブセルイメージングには、VivaView FL (LCV-100) incubator fluorescence microscope (OLYMPUS)を用いた。EGFP陽性細胞は、FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences)で解析および分取した。

3. 結 果

3. 1. CYP3A4G/7R HepaRG細胞作製

本研究支援期間の結果は、既に論文発表済みである。よって、図の重複使用を避けるため、詳細データは論文を参照して頂きたい¹⁾。CYP3A4とCYP3A7は、ヒト7番染色体上に並んでいる。この123 kbを含むBACクローンRP11-757A13を、BAC recombineeringの手法を使って改変した。CYP3A4のタンパク質コード配列 (ORF)をEGFP遺伝子に、CYP3A7のORFをDsRed遺伝子に置換した。このCYP3A4G/7R BACは、CYP3A4上流35 kbとCYP3A7上流の全て23 kbの制御領域を含んでいる。また、Cre-loxPシステムにより容易に哺乳類細胞へ遺伝子導入できるように一カ所のloxP配列をBACに挿入した (Fig. 1A)。

CYP3A4G/7R BACを導入する細胞として、予め、loxPサイトを一カ所もつloxP-HepaRGトランスジェニック細胞株を取得した (Fig. 1B)。このloxP-HepaRG細胞には、loxPサイトをもつあらゆる発現ベクターをCre酵素を介して容易に導入することができる。次いで、環状のCYP3A4G/7R BACをCre発現ベクターと共にloxP-HepaRGに導入することで、複数のCYP3A4G/7R HepaRGトランスジェニック細胞クローンを得た。

3. 2. CYP3A4G/7R HepaRG細胞の特性

得られた全てのCYP3A4G/7R HepaRG細胞クローンは、増殖期にはDsRed蛍光が極めて高い状態であった。これを分化誘導すると、EGFP陽性細胞が出現した (Fig. 2)。

得られた複数のクローンの中から、分化能が高くEGFP陽性率が高く染色体が安定なクローンを選別した。この基準を満たしたC3クローンを中心に詳細な解析を進めた。C3クローンは分化培地で培養すると、DsRed蛍光が著しく減少した。一方、EGFPのmRNA発現は、分化開始時から2週間で7倍に増加した。また、EGFP蛍光量は7-8倍に増加し、mRNAレベルの増加率を反映していた。

分化C3クローンにおける内在性のCYP3A4タンパク質発現を親株 (WT) のHepaRGとウエスタンブロット法で比較した。WT HepaRGに対してC3 HepaRGは、半分のタンパク質レベルのCYP3A4発現に減少していた。これは

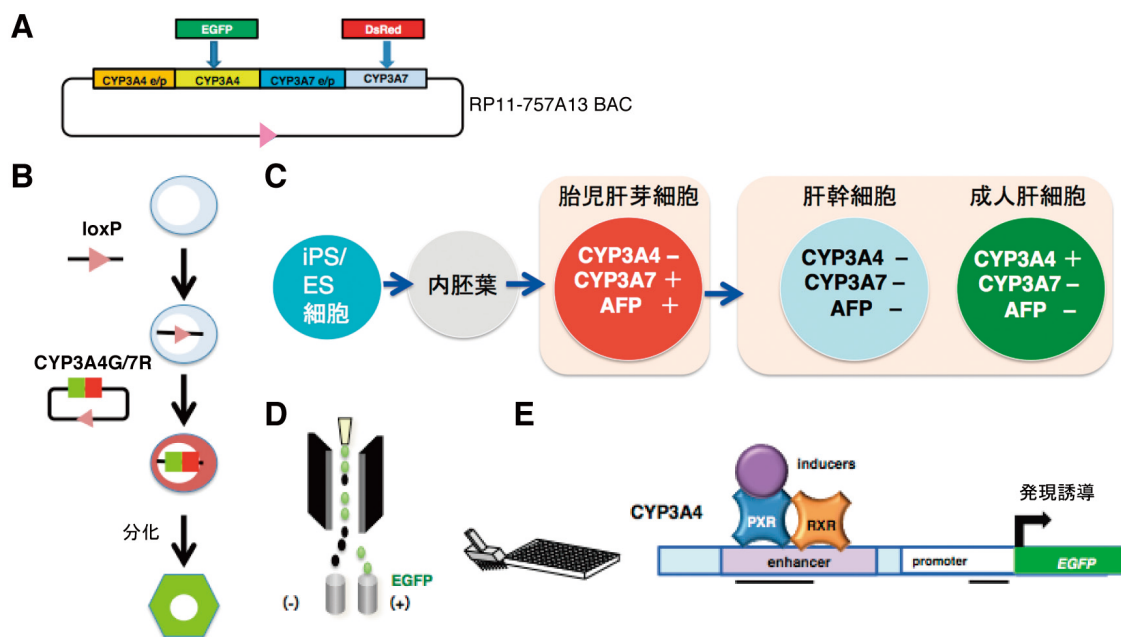


Figure 1 CYP3A4G/7R HepaRG 細胞の開発とその用途概要

- A. CYP3A4G/7R BAC 発現ベクターの概要。
 B. loxP-HepaRG 細胞と CYP3A4G/7R HepaRG 細胞の作製手順。
 C. CYP3A4G/7R BAC による肝細胞分化モニターの概要。
 D. EGFP 蛍光による CYP3A4 発現細胞の濃縮。
 E. EGFP 蛍光による CYP3A4 発現誘導性の評価系概要。

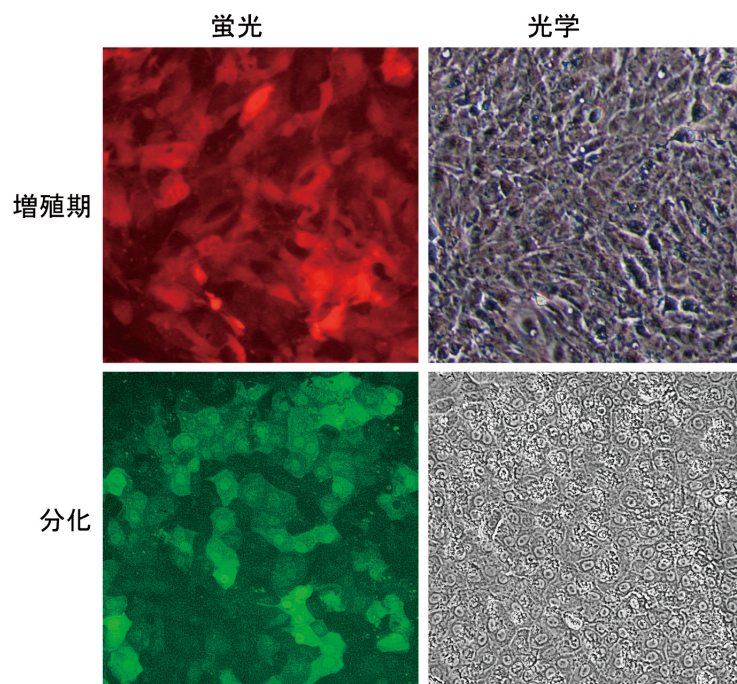


Figure 2 CYP3A4G/7R HepaRG 細胞の特性

(増殖期) 全ての細胞が DsRed 陽性で CYP3A7 発現状態であることを示す。
 (分化時) 分化細胞の一部が EGFP 陽性の CYP3A4 発現細胞になることを示す。

遺伝子クローニングによる分可能の低下によると考えられる。しかしながら、ウエスタンブロットで全くCYP3A4発現が確認できないHepG2細胞に比べ、十分に高い発現を示した。また、EGFPの発現量はウエスタンブロット法で十分に検出できるレベルであった。CYP3A4の発現レベルの向上は、EGFP発現の高いトランスジェニック細胞クローンの選別やEGFP陽性細胞の濃縮により更に改善可能と考えられる。

3. 3. DsRedとEGFPを用いた肝細胞分化過程の可視化

分化開始5日目のDsRed陽性細胞とEGFP陽性細胞が混在する分化途中のC3クローンの細胞集団をFACS解析した。結果、DsRed陽性細胞とEGFP陽性細胞に分離できたが、共に陽性の細胞集団は検出されなかった。このことは、CYP3A7陽性の胎児肝実質細胞である肝芽細胞は、CYP3A7非発現細胞状態を介してCYP3A4陽性の肝細胞、CYP3A4非陽性の肝細胞および胆管上皮細胞に分化することを示している。

次に、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いてリアルタイムにCYP3A4G/7R HepaRG C3クローンの分化のプロセスを観察した。結果、多くのDsRed陽性細胞が当初非蛍光細胞となり、その中からEGFP陽性の細胞が出現した。また、非蛍光細胞の中には、細胞分裂直後にEGFP陽性となる細胞が存在することが観察されている。よって、CYP3A7を発現していないが増殖能を持つ幹細胞状態を経てCYP3A4を発現する成人型肝細胞になる可能性が示された。

以上の結果は、CYP3A4G/7R BACベクターをヒトES細胞やiPS細胞に導入したトランスジェニック細胞を作製した場合も、内胚葉状態を経て分化状態をモニターできる可能性を示唆している (Fig. 1C)。

3. 4. FACSによるEGFP陽性CYP3A4発現細胞の濃縮

EGFPを指標にCYP3A4を発現している代謝能の高い肝細胞をFACSを用いて濃縮できるか検討した。EGFP陽性細胞と非陽性細胞において内在性のCYP3A4 mRNA発現を定量性RT-PCR法で調べた結果、分化細胞集団からCYP3A4発現細胞を濃縮できることが示された (Fig. 1D)。

3. 5. CYP3A4誘導剤によるEGFP蛍光量の増加

4種類 (10 μ M RIF、25 μ M DEX、25 μ M CLO、100 μ M NIF)の既知のCYP3A4誘導剤でHepaRG C3クローンを処理し、48時間後に一定エリアの平均蛍光量を誘導前と比較した。コントロールとして0.1% DMSOで処理した。また、CYP3A4を誘導しないが、マウスCyp3a11発現を誘導することが知られている25 μ M PCNでHepaRG C3クローンを処理した。結果、EGFP蛍光は、0.1% DMSO処理群よ

りRIFで約2倍、DEXで約2.5倍に増加し、NIFとCLOで約3倍に増加した。一方、PCNでは、EGFP蛍光の増加は見られなかった。よって、CYP3A4G/7R HepaRG細胞は、細胞を破壊して行う解析を用いずにCYP3A4誘導性を評価するシステムの構築に寄与できる可能性が高い (Fig. 1E)。

4. 考 察

機能的な肝臓細胞は、その機能の研究、化学物質の安全性試験、薬物代謝酵素P450誘導性試験および再生医療研究など広範な領域で需要が高い。CYP誘導性や代謝産物の解析結果は、評価に用いる「細胞の質」に大きく左右される。しかし、(1)ヒトの初代培養は機能的に低いヘテロな集団であり再現性に乏しい、(2)ヒト肝臓癌由来の細胞株の多くは胎児性の性質をもつ、(3)薬物代謝やCYP誘導性には種差があるため動物を用いた評価にはfalse negativeにより生じた薬害が少なからずある、(4)ヒトiPS細胞からは未だ機能的で均質な肝臓細胞を得ることが困難であるなどの諸問題を抱えている。本研究で用いたヒト肝細胞様細胞HepaRGは、増殖状態では肝細胞としての特性を示さないが、専用の分化培地で1-2週間培養すると成熟肝細胞の特性を示す。定量性RT-PCR解析では、HepG2細胞がヒト成人肝臓の1%程度のCYP3A4発現量に留まっているのに対し、HepaRG細胞は120%に達していた。このように高いCYP3A4発現を示す細胞株はかつてなかった。しかし、肝細胞として成熟化していることを見極めるためには、使い頃を判断できる手軽なマーカーが必要であった。CYP3A4G/7R BACベクターを導入したトランスジェニックHepaRG細胞は、赤から緑へ蛍光がシフトするため、細胞の分化度が簡単に把握できるようになっている。このように、HepaRG細胞の利便性を高めたことで、ヒト肝細胞の初代培養細胞を代替するモデル細胞としての利用が進むと期待される。

CYP3A4G/7R HepaRG C3クローンでは、EGFPの蛍光量、EGFPのmRNAおよび内在性のCYP3A4のmRNA発現量の変化に対応が見られた。また、生細胞で連続的に観察可能なことから、EGFPは遺伝子発現変動をモニターできるHCS対応型の良好なレポーター遺伝子になり得る。一方、ルシフェラーゼや β ガラクトシダーゼ等の酵素反応を用いた遺伝子発現レポーターシステムの場合は、基質を添加して染色量や発光量を測定する操作が必要である⁵⁻⁷⁾。また、作製したCYP3A4G/7R HepaRG細胞は、内在性の遺伝子に改変を加えていないため、EGFP陽性細胞をCYP3A4発現細胞として肝細胞の代わりに使用できる。このようなモデル細胞の開発により、再現性と信頼性向上、開発期間の短縮と低コスト化、安全性試験に要する実験動物の削減につながると期待できる。

5. 総 括

本研究では、肝細胞が成熟すると CYP3A7 から CYP3A4 へ発現がシフトすることを利用して、2 色蛍光に基づき (1) 肝細胞の分化度のモニター、(2) 分化因子の同定、(3) 肝細胞の分取、(4) CYP3A4 誘導性評価などが可能なヒト肝モデル細胞 HepaRG 細胞を作製した。今後、HepaRG 細胞の遺伝子発現プロファイルをヒト肝細胞に更に近づける工夫を加えることで、汎用化が期待される。また、この細胞は肝細胞の分化過程を促進する培養条件の探索に有効である。これにより、ヒト iPS 細胞から機能的な肝細胞を作り出す条件が明らかにできると期待される。結果、ヒト iPS 細胞を用いた肝臓の「再生医療」の加速化への波及効果も期待できる。

謝 辞

本研究遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご支援賜り深く感謝申し上げます。

(参考文献)

- 1) Tsuji S, Kawamura F, Kubiura M, Hayashi A, Ohbayashi T, Kazuki Y, Chesné C, Oshimura M, Tada M, : Dual-colour fluorescence imaging to monitor CYP3A4 and CYP3A7 expression in human hepatic carcinoma HepG2 and HepaRG cells. PLOS ONE, 9(8): e104123, 2014.
- 2) Bertilsson G, Berkenstam A, Blomquist P,: Functionally conserved xenobiotic responsive enhancer in cytochrome P450 3A7. Biochem Biophys Res Commun 280: 139-144, 2001.
- 3) Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, et al.: Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15655-15660, 2002.
- 4) Antherieu S, Chesne C, Li R, Camus S, Lahoz A, et al.: Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. Drug Metab Dispos 38: 516-525, 2010.
- 5) Robertson GR, Field J, Goodwin B, Bierach S, Tran M, et al.: Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation. Mol Pharmacol 64: 42-50, 2003.
- 6) Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, et al.: The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. Nat Med 9: 220-224, 2003.
- 7) Zhang W, Purchio AF, Chen K, Wu J, Lu L, et al.: A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying in vivo transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene. Drug Metab Dispos 31: 1054-1064, 2003.