#### 研究領域1

## 肝P450発現誘導における食品-薬物相互作用の研究 Studies on food-drug interaction in the induction of hepatic P450 enzymes

出川 雅邦 Masakuni DEGAWA 薬学研究科薬学専攻衛生分子毒性学教室 教授 Professor, Department of Molecular Toxicology, Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka



# Profile

1998年 静岡県立大学薬学部教授 1998年 東北大学薬学部助教授

米国国立毒性学研究センター(FDA/NCTR:文部省在外研究員) 薬学博士(東北大学) 1982年 1979年 東北大学薬学部助手

東北大学薬学部教務職員 1974年 財団法人東京生化学研究所助手 1974年 東京理科大学薬学研究科修士課程修了 1972年 東京理科大学薬学部製薬学科卒業

Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences.

University of Shizuoka Associate Professor, Pharmaceutical Institute, Tohoku University

Visiting Scientist, FDA/NCTR, USA 1982 Ph.D. (Tohoku University)

Assistant Professor, Pharmaceutical Institute, Tohoku University Research Associate, Pharmaceutical Institute, Tohoku University 1974 Research Associate Tokyo Biochemical Research Institute Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University

of Science (Master Course)

1972 Faculty of Pharmaceutical Sciences. Tokyo University of Science

Contact

T E L 054-264-5685 +81-54-264-5685

e-mail degawa@u-shizuoka-ken.ac.jp URL http://w3pharm.u-shizuoka-

ken.ac.ip/eisei/

#### ■ 序論

肝シトクロムP450(CYP)に多くの分子種が存在し、それらは医薬 品の解毒や、プロドラッグや前駆型がん原性物質の代謝活性化に 関わる主要酵素になっている。CYPの各分子種は、それぞれ異なっ た基質特異性を有し、また対応する各基質(医薬品を含む異物)の 摂取・暴露でしばしば誘導される。このようなCYPの誘導が医薬品 の薬効減弱や有害化合物の毒性増強に繋がる場合もある。さらに、 CYPの発現や活性の変動は、医薬品服用時だけでなく、特定の食 品中成分の摂取によってもしばしば起こることが知られている。従っ て、医薬品の適正使用や化学物質による毒性発現の観点から、医 薬品·有害化合物・食品中成分の複合摂取時における肝CYPの分 子種レベルでの発現変動の解析は重要な課題となる。

本研究では、多くの癌原性化合物の代謝活性化や医薬品である テオフィリンなどの代謝に関わるCYP1Aサブファミリー酵素に焦点を 合わせ、それら酵素誘導剤の検索に叶うレポーター細胞株を樹立し た。またさらに、それら樹立細胞株を用いて医薬品と有害化合物の 複合影響を検討し、有用な知見を得た。

#### ■ 成果

ヒト肝がん細胞株HepG2に、CYP1Aサブファミリー酵素遺伝子の 転写活性化因子(AhR)が結合する応答配列(XRE)を組み込ん だレポータープラスミドXRE-Lucを安定導入し、ヒトAhR-basedレ ポーター細胞株HepG2-A10を樹立した(図1)。本細胞株に、ヒト AhRリガンドを処理すると、レポーター(ルシフェラーゼ)遺伝子の発 現が上昇するだけでなく、宿主細胞内の標的遺伝子である CYP1As遺伝子やそれら酵素蛋白質の発現が上昇し、さらにそれら 酵素活性も増加した。これらの結果から、HepG2-A10細胞株がヒト CYP1A酵素誘導剤の検索に有効であることが確認された。

次いで、ラットやマウスの肝臓にCYP1Aサブファミリー酵素を誘導 するジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬のニカルジピン(NIC)と、代 表的なAhRリガンドである癌原性多環芳香族炭化水素(PAH)の 3-メチルコラントレン(MC)を試料として、各化合物単独処理およびこ れら化合物複合処理によるCYP1A酵素誘導への影響を HepG2-A10細胞を用いて追究した。その結果、NICには、MCによる ヒトAhRの活性化やヒトCYP1A誘導を増強する作用があることが 明らかになった。また、NICの共存により、MCの細胞内蓄積や MC-DNA付加体形成がいずれも顕著に増加することも示された

このような増強作用はNICだけでなく、ジヒドロピリジン系カルシウム 拮抗薬に共通した特徴であることや、この現象は細胞レベルだけで なく、ラットの種々臓器(肝・腎・肺)においても起こることを見出した。

#### ■ 展望

HepG2-A10細胞株の樹立に成功し、医薬品や食品成分のヒト AhR活性化能およびCYP1ファミリー酵素誘導能を簡便に評価する ことが可能となった。また、各化合物自身のみならず種々化合物との 複合影響も容易に把握できるため、HepG2-A10細胞株を用いた CYP1ファミリー酵素誘導・阻害の更なる研究は、医薬品の適正使 用および食の安全確保に資するものと期待される。

#### Introduction

Hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymes play an important role in metabolism (detoxification and/or activation) of xenobiotics, including drugs and carcinogens. The CYPs consist of super-families and have different substrate specificities. The extent to which they are expressed is influenced not only by physiological factors but also by exposure to xenobiotics including food additives. Xenobiotic-mediated changes in expression of CYPs sometimes lead to reduction in the therapeutic effects of drugs and increases in carcinogenic effects of carcinogens. Therefore, to ensure food safety and effective drug therapy, it is necessary to understand the effects of xenobiotics. including foods and drugs, and their interactions on expression of CYPs at the level of CYP molecular form.

In this study, we focused on CYPIA subfamily enzymes, which can catalyze the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines and the metabolism of theophylline, an anti-asthmatic drug. We also established the human hepatocarcinoma-derived reporter cell line, HepG2-A10, for the screening of human CYPIA inducers. Furthermore, we verified the usefulness of the established HepG2-A10 cell line.

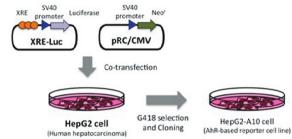
#### Results

We established a human AhR-based luciferase reporter cell line. HepG2-A10, by transfecting a luciferase reporter plasmid XRE-Luc including the xenobiotic (AhR ligand) responsive element, which is an important sequence in induction of CYPIA subfamily enzymes, into the human hepatocarcinoma-derived cell line, HepG2 (Fig. I). In HepG2-A IO cells, we observed significant induction of luciferase and CYPI family enzymes by exposure to 3-methylcholanthrene (MC), a representative AhR ligand, indicating that this cell line is useful for screening human AhR activators and CYPI enzyme inducers.

Using HepG2-A10, we further examined the effects of dihydropyridine calcium channel antagonists, including nicardipine (NIC), and the effects of a combination of NIC and MC on induction of luciferase and CYPIA subfamily enzymes. Although NIC can, to some extent, induce CYPIA subfamily enzymes but not luciferase, treatment with a combination of NIC and MC led to synergistic inductions of the CYPIA subfamily enzymes and luciferase (Fig. 2). We believe that this synergistic effect occurs through NIC-mediated inhibition of defluxion transporter of MC, because the intracellular concentration of MC in HepG2 cells was increased in the presence of NIC. In addition, the amount of MC-DNA adduct in the cells was significantly increased in the presence of NIC. Other dihydropyridine calcium channel antagonists besides NIC showed similar combination effects. Incidentally, we even observed such effects of a combination of NIC and MC on induction of CYPI family enzymes, including CYPIAI, CYPIA2, and CYPIBI in vivo. Thus, such combination treatment of rats leads to synergistic induction of CYPIs in the liver, kidney, and lung.

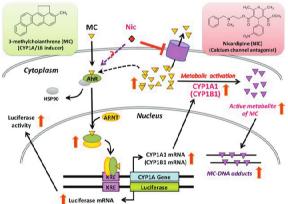
#### Perspectives

In this study, we established an AhR-based reporter cell line, HepG2-A10, which is useful for in vitro screening of human CYPI family enzyme inducers in our environment. This HepG2-A10 cell line bioassay could help to predict drug/food-mediated changes in expression of CYPI enzymes and thus could provide effective drug



ヒトAhR活性化を介したレポーター遺伝子発現細胞株HepG2-A10の樹立

Establishment of a human AhR-based reporter cell line, HepG2-A10.



MCによるAhR活性化、CYP1A酵素誘導およびDNA付加体形成に対する NICの増強効果: NICによるMCの細胞内蓄積量の増加

Augmented effects of NIC on MC-mediated activation of AhR, induction of CYPIA subfamily enzymes, and formation of DNA adduct in HepG2-A10 cells, NIC mediates increase in intracellular accumulation of

### ■ 代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

- I. H. Sanada, M. Sekimoto, A. Kamoshita, M. Degawa: Changes in expression of hepatic cytochrome P450 subfamily enzymes during development of adjuvant-induced arthritis in rats. J. Toxicol. Sci., 36, 181-190 (2011)
- 2. M. Kojima, M. Sekimoto, M. Degawa: Androgen-mediated down-regulation of CYPIA subfamily genes in the pig liver. J. Endocrinol., 207,
- 3. T. Hosaka, M. Sekimoto, K. Nemoto, M. Degawa: Augmentation of 3-methylcholanthrene-induced bioactivation in the human hepatoma cell line HepG2 by the calcium channel blocker nicardipine. Cancer Sci., 101, 652-657 (2010)
- 4. M. Kojima, T. Ashino, T. Yoshida, Y. Iwakura, M. Sekimoto, M. Degawa: IL-I regulates the Cyp7a I gene and serum total cholesterol level at steady state in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., 379, 239-242 (2009)
- 5. M. Kojima, M. Sekimoto, M. Degawa: A novel gender-related difference in the constitutive expression of hepatic cytochrome P4501A subfamily enzymes in Meishan pigs. Biochem. Pharmacol., 75, 1076-1082 (2008)
- 6. M. Sekimoto, H. Kawamagari, S. Nakatani, K. Nemoto, M. Degawa: Establishment of a human hepatic cell line HepG2-A10 for a reporter gene assay of arylhydrocarbon receptor activators. Genes Environ., 29, 11-16 (2007)
- 7. S. Miyajima, K. Nemoto, M. Sekimoto, T. Kasahara, S. Souma, M. Degawa: Induction of hepatic cytochrome P450 isoforms by nicardipine at therapeutic doses in spontaneously hypertensive rats. J. Toxicol. Sci., 32, 79-90 (2007)

45 44