

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）		氏名	横山 雄一
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当			
論文題目				
HepaRG 細胞を用いた代謝的活性化による肝障害の評価				
論文審査担当者				
主査	教授	高野 幹久	印	
審査委員	教授	黒田 照夫		
審査委員	准教授	河合 秀彦		
〔論文審査の結果の要旨〕				
<p>薬剤誘発性肝障害は医薬品開発に中断における最も主要な原因のひとつであり，創薬の初期段階において，肝毒性リスクを回避するための有用な評価系が望まれる。肝毒性発現の機序の一つに薬剤の代謝物による毒性発現が考えられる。代謝物を介した肝毒性の検出系として，ヒト肝細胞を用いた評価系などが用いられてきたが，ヒト肝細胞は肝薬物代謝酵素活性のロット間差が大きく，創薬初期における安定な評価系が必要な段階において使用が難しい。また薬物代謝酵素活性の高いロットの入手が難しいなどの問題がある。一方比較的培養も容易で，ロット間差等の少ない安定的なヒト肝細胞系として，HepG2 をはじめとしたヒト肝腫瘍由来細胞株も用いられるが，多くの薬物代謝酵素活性がヒト肝細胞と比較し非常に低いため，薬剤の代謝を介した毒性発現の検出が難しい。2002 年に Gripon らより樹立されたヒト肝腫瘍由来細胞株 HepaRG 細胞は，ヒト肝細胞と同様に肝薬物代謝酵素やトランスポーターなどを発現し，その機能を維持している細胞系として注目されているものの，代謝物を加味した肝毒性まで評価している報告はほとんどない。そこで本研究では，代謝物を介して発現する肝毒性を検出・評価できるかという観点から，HepaRG 細胞のヒト肝細胞モデル評価系としての有用性を検討した。</p> <p>HepaRG 細胞を播種・一晚接着後，前培養培地で 7 日間分化培養し，各種評価に用いた。まず薬物代謝酵素活性の評価として，分化後の HepaRG 細胞について CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, UGT, SULT 活性値の測定を行い，ヒト凍結肝細胞 3 ロット，および HepG2 細胞と比較した。その結果 HepaRG 細胞においては，すべての分子種についてヒト凍結肝細胞と同等に薬物代謝酵素活性を有しており，SULT 以外の代謝酵素活性がほとんど認められなかった HepG2 細胞と比べ，代謝能が著しく高かった。また HepaRG 細胞ではヒト凍結肝細胞に比べロット間でのばらつきが少ないという結果であった。続いて代表的な 5 つの肝毒性発現物質 Aflatoxin B1 (AFB1), Acetaminophen (APAP), Cyclophosphamide (CPA), Tamoxifen, Troglitazone を用いて細胞毒性の評価を行った。細胞毒性は ATP アッセイを用いて評価した。その結果 HepaRG 細胞の各肝毒性物質への感受性はヒト凍結肝と同等であった。続いて，これらの細胞毒性の発現が代謝的活性化を介したものであるかを確認するため，CYP の非特異的な阻害剤である 1-aminobenzotriazole (ABT) を用いて，AFB1 及び CPA の細胞毒性への影響を評価した。CYP を十分阻害する ABT の処理条件において共処理したところ，AFB1 及び CPA の細胞毒性は ABT の処理により減弱した。これはヒト凍結肝細胞でも同様に認められ，AFB1 及び CPA の細胞毒性が CYP による代謝活性化を介して発現していることが示唆された。これらの CYP により代謝活性化され，細胞障害性のある代謝物は，グルタチオン (GSH) で抱合・解毒されることが知られており，次のこれらの細胞毒性への GSH の影響を評価した。GSH の生合成の阻害剤である L-Buthionine-(S, R)-Sulfoximine (BSO) を事前に処理し，細胞内 GSH を枯渇させた状態で肝毒性物質を処理したところ，AFB1, CPA, APAP において細胞毒性がより感度よく検出された。またこれらの ABT 及び BSO に加え，さらに UGT, SULT の阻害剤である Salicylamide (SAM) を用いて APAP の細胞毒性への影響を評価したところ，第二相酵素である SAM 及び BSO 処理で APAP の細胞毒性は増強され，それらの細胞毒性は CYP の阻害剤である ABT</p>				

により減弱した。またこれらの細胞上清中の APAP の抱合代謝物を測定したところ、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体殿に阻害剤である SAM により生成が阻害されていることが確認できた。これらの変化はすでに知られている APAP の代謝経路に沿った形で細胞毒性が発現しており、肝毒性物質のヒトにおける毒性発現に関わる原因代謝物及び解毒経路などを評価可能な細胞系であった。

以上の結果から、本論文は、HepaRG 細胞は肝毒性物質の代謝的活性化を介した毒性発現を評価できる肝細胞評価系であり、創薬における毒性スクリーニングや肝障害評価のメカニズム検討に使用できる有用な肝細胞モデルであることが示された。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

別記様式第 7 号（第 16 条第 3 項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）	氏名	横山 雄一
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
HepaRG 細胞を用いた代謝的活性化による肝障害の評価			
最終試験担当者			
主査	教授	高野 幹久	印
審査委員	教授	黒田 照夫	
審査委員	准教授	河合 秀彦	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記 3 名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 30 年 6 月 13 日の第 37 回広島大学大学院医歯薬保健学研究科発表会（薬学系）及び平成 30 年 8 月 3 日、本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 HepaRG 細胞における薬物代謝酵素活性について 2 HepaRG 細胞における薬物の毒性発現機序について 3 HepaRG 細胞の有用性および既存評価系との比較 4 創薬研究段階における HepaRG 細胞を用いた評価の位置づけ <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			