

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

課題番号		
20030960A KH71066	免疫抑制剤の体内動態並びに薬効発現に関わる蛋白群の遺伝子解析を基盤とした移植臓器における拒絶反応防御に関する研究	乾 賢一 …… 1
961A KH71067	インフォームドコンセントに基づいた外科手術切除ヒト組織の医学研究利用ネットワーク体制の確立とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション	大野泰雄 …… 11
962A KH71068	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用	永森静志 …… 21
963A KH71069	ヒト組織・細胞の新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究－ヒト組織バンクの効率的運用へ向けて－	松浦成昭 …… 25
964A KH72076	公共的な研究利用ヒト組織バンクシステム構築の検討	小林英司 …… 30
965A KH72077	眼組織からの幹細胞等の同定・単離・細胞株化およびこれらの保存方法に関する研究	篠崎尚史 …… 36
966A KH72078	ヒト組織の創薬研究資源化に関する研究	林 真 …… 42

高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用

所属 杏林大学医学部

研究者 永森静志

研究要旨 FDAでは、新鮮肝組織の初代単層培養を主体として薬物の検定を試みて肝特異機能は短時間しか保持できないとしている。本研究は、人肝由来株化培養細胞と新しい3次元培養装置によりそれらの問題点を解決し従来法に勝る検定方法を確立することにある。

分担研究者

- (1) 杏林大学医学部 遠藤仁、金井好克
- (2) 国立感染症研究所ウイルス第2部 鈴木哲朗
- (3) 国立医薬品食品衛生研究所異変遺伝部 本間正充
- (4) 千葉大学大学院薬学研究院 千葉寛、細川正清
- (5) 岡山大学大学院医歯学総合研究科 宮崎正博
- (6) 名古屋大学大学院生命農学研究科 小田裕昭
- (7) 金沢大学医学部 中沼安二
- (8) 京都大学医学部 下遠野邦忠
- (9) 秋田大学医学部 杉山俊博、妹尾春樹
- (10) 食品薬品安全センター秦野研究所 梅田誠
- (11) 東京慈恵会医科大学医学部 松浦知和
- (12) 中外製薬株式会社 吉田彪、西宮一尋

A. 研究目的

ヒト細胞・組織を利用して薬物の有効性判定および安全性評価法の研究を行い、安全な新しい創薬等の検定法を開発することを主旨とした。

1. 細胞の機能を十分発揮させるための3次元培養を可能とするバイオリアクターの改良と機能の検討。ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) の開発。
2. 遺伝子導入によるヒト培養肝細胞の改良開発。
3. 医薬品の有効性や安全性確認装置の開発、実際の医薬品の有効性や安全性の検討とシステム化である。

B. 研究方法

1. 梅田・永森らが寄り多機能性を有するヒト肝細胞由来の FLC series から多くの株化樹立。ヒト樹立肝細胞利用バイオリアクター(3次元培養法)の開発：RFB バイオ人工肝開発を新しい担体、培養添加物を変えて機能亢進を試みた。肝機能の亢進の試み：HNF-4 などの肝臓特異的転写因子の発現を単層培養、3次元培養の比較による機能を検討。
2. ヒト正常肝細胞から、ヒト胎児由来の初代肝細胞にシミアンウイルス 40 ラージ T 抗原遺伝子

(SV40LT)を導入して不死化ヒト肝細胞株(OUMS-29)を樹立。機能を調べた。

3. ヒト肝細胞を用いたがん原性物質代謝活性系の評価。

3次元培養法 RFB による肝炎ウイルスの *in vitro* での増殖の試み。インターフェロンの作用機序などを検討。

【論理面への配慮】

論理面については、プロジェクト全般にわたり国立研究所、大学医学部論理委員会での審議を受けた。本プロジェクトで使用するヒト組織は既に以上のような過程を経て30年前に樹立した細胞株であり、また使用方法も直接ヒトに作用させるものでない、また、肝細胞株は肝炎ウイルスの感染がないことを確認しており、安全性は高い。一部不死化細胞の樹立および抗ウイルス剤の検定で新たにヒト組織を使用した、該当研究施設での論理委員会の審査を受けた。本システムは実験動物の使用量を大幅に削減でき、動物愛護の観点からも非常に有益なシステムである。

C. 研究結果

1. RFB バイオ人工肝開発 (特願平 9-58650) をおこなった。妹尾らも独自の開発を試みたが、生理活性物質などの十分な測定は今後予定されている。永森・松浦らがより高度な3次元培養のため、担体としてハイドロオキシアパタイやガラスビーズで好成績をあげた。

永森は細胞・細胞間接着分子として重要なカドヘリンの存在と3次元培養で高産生能を示すことをはじめて証明した。これは、実質細胞由来を示すよい指標である。

中沼らの胆肝系細胞での実験は、いまだ他の研究員が利用可能な成果は、あと少しの研究を要する。

小田らは、RFB による3次元培養によって亢進した肝機能は、ヒト正常肝臓と比較できるものであった。その分子メカニズムとして、細胞内の微小管を介した肝臓特異的転写因子 HNF-4 の遺伝子発現が重要であることが明らかにした。

薬物代謝検定系の開発を、千葉・細川が多くの医薬品の代謝に関与している CYP3A4 を中心に薬物相互作用を研究した。本研究では CYP3A4 の誘導に関与する核内レセプターである PXR のリガンドとなる種々の化合物による転写活性化と構造的特徴との関係を明らかにした。また EHS-gel およびバイオリアクターを用いた 3 次元培養法は FLC 細胞の機能を高めることができ、分化表現型を高く長く維持することにより生体肝レベルに近づけることが可能となり、平面培養に比べてより in vivo に近い状態で薬物代謝を評価できる系であることが強く示唆した。

アミノ酸輸送系の評価：FLC4 における輸送系 L トランスポーターの解析。金井・遠藤らは、ヒト由来肝細胞の薬物トランスポーター面からの評価を行った。研究成果として FLC4 細胞のアミノ酸輸送系 L の特性が他の細胞と著しく異なることを明らかにし、機能発現クローニングを施行し、新規アミノ酸トランスポーター LAT3 を同定した。平成 15 年度は、前年度までに得られた分子プローブを用いて FLC4 細胞のアミノ酸輸送機構を解析し、バイオリアクターと平板培養を比較するとともに、LAT3 をもとに分子ファミリーの確立を目的とした類縁分子の探索とその解析を行った。FLC4 細胞においては、LAT3 と類似の構造を持つ新規アミノ酸トランスポーター LAT4 が同定され、新規トランスポーターファミリー SLC43 が確立された（特許申請中）。

2. 不死化ヒト肝細胞株 (OUMS-29) 細胞株は非腫瘍性で正常肝細胞に匹敵する高い肝機能を保持している。この細胞株にヒト肝特異転写因子 HNF4 α 遺伝子を導入して機能改良した細胞株 OUMS-29/H-11 を樹立した。さらに、ヒト肝癌細胞株 HLE にヒトのチトクローム P450 (CYP) 2E1 遺伝子を導入して CYP2E1 高発現細胞株 (HLE/2E1) を樹立した。これらの細胞株をラジアルフローバイオリアクターにて 3 次元高密度培養して細胞機能をより高度化に成功した。

3. ヒト型の遺伝毒性試験法の確立の研究がなされた。とくに、本間はヒト肝細胞 FLC4 が遺伝的に不安定であることから小核試験に利用するには、極めて困難であることが確認した。小核試験自体には HepG2 細胞が利用しやすいが、この細胞での突然変異スペクトルは変異原物質の特徴を反映することから、単なる試験系としてだけでなく、化学物質による遺伝毒性誘発のメカニズムの研究にも利用できるものと期待できることを示唆した。

また、永森・鈴木らは上記システムを利用して HCV 大量増殖系開発の肝炎ウイルス薬の開発（国際特許出願番号：PCT/JP00/05582）。

下遠野らは HCV ゲノムを自己複製する肝臓由来培養細胞（レプリコン細胞）の構築：これまでに肝臓がん由来の培養細胞（Huh7）において効率よく自己複製する HCV ゲノムの一部を単離した。この HCV ゲノムを永森らが樹立した高機能保持ヒト肝培養

細胞株 FLC4、あるいは FLC7 細胞などに導入し自己複製する細胞を樹立することを試みる。薬物代謝の解析に用いるためには HCV 全ゲノムが自己複製する細胞を樹立する必要があるため、Huh7 細胞を用いて HCV 全ゲノムが自己複製する細胞の構築も行う。この系の作成に引き続き、ウイルス全ゲノム RNA を導入した FLC4 細胞の構築も行った。HCV レプリコン細胞の樹立はこれまで遅れていた HCV のウイルス学的な方面からの研究を進展させるために大きな進歩である。また、このことが契機となり、HCV 感染による疾患への対策に対して抗ウイルス剤の開発の基礎的な研究が可能になった。一方、C 型慢性肝炎患者における薬物代謝と肝疾患の増悪についても解析が可能になりつつあると考える。また、ウイルス蛋白質が核内受容体の転写活性を制御しつつ細胞の増殖をコントロールしている可能性が示された。このことは正常の肝細胞の増殖に及ぼす核内受容体の機能の解析、あるいは肝細胞の薬剤代謝の解明にも寄与するものと期待される。新しい分野として研究途中より参加の杉山・妹尾らは分化・再生に関与するペプチド因子の探索とその薬理作用・安全性評価への応用を試みましたが、途中からの参加でもあり十分な成果はない。

D. 考察

平成 15 年度の本研究班の成果は、2 つの特許出願と国際的な専門誌へ掲載が示すように、十分な結果が得られたと考える。

しかしながら、ヒト由来の肝細胞株を利用して、3 次元培養 RFB の改良はいまだ十分ではない。さらに、簡易な方法に改良する必要がある。

E. 結論

高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物有効性、安全性評価法の確立とその応用のための基本的な方法および手段を確立することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

* Takahashi, S., Takahashi, T., Mizobuchi, S., Matsumi, M., Yokoyama, M., Morita, K., Miyazaki, M., Namba, M., Akagi, R., and Sassa, S. CYP2E1 overexpression up regulates both non-specific δ -aminolevulinic synthase and heme oxygenase-1 in the human hepatoma cell line HLE/2E1. International Journal of Molecular Medicine, 11(1), 57-62, 2003.

* Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T: CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a

- bioartificial liver. *Hepatology* 37:665-673, 2003
- * Mimura N, Kobayashi K, Nakamura Y, Shimada N, Hosokawa M, Chiba K. Metabolism of medroxyprogesterone acetate (MPA) via CYP enzymes in vitro and effect of MPA on bleeding time in female rats in dependence of CYP activity in vivo. *Life Sci* 73:3201-12, 2003
 - * Furihata T, Hosokawa M, Nakata F, Satoh T, Chiba K: Purification, molecular cloning, and functional expression of inducible liver acylcarnitine hydrolase in C57BL/6 mouse, belonging to the carboxylesterase multigene family. *Arch Biochem Biophys* 416:101-9, 2003
 - * Imai T, Yoshigae Y, Hosokawa M, Chiba K, Otagiri M. Evidence for the involvement of a pulmonary first-pass effect via carboxylesterase in the disposition of a propranolol ester derivative after intravenous administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 307:1234-42, 2003.
 - * 細川正清: 代謝酵素とトランスポーターの機能協関による異物解毒(4) *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* Vol. 18, レクチャーノート 11-15, 2003
 - * 細川正清 *Pharmacogenomics と抗癌剤 呼吸器科* Vol 3(6), 530-538, 2003
 - * 永森静志: バイオ人工肝可能性と課題. *細胞*, 35: 449-455, 2003
 - * Honma, M., Izumi, M., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Wang, W., Yatagai, F., and Hayashi, M. Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 42, 288-298 (2003)
 - * Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D., Zhang, L., Suzuki, T., Hayashi, M. and Honma, M. Genotoxicity of microcystine-LR in human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.*, 557, 1-6 (2004)
 - * Sato M, Suzuki S, Senoo H (2003) Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Func*, 28: 105-112.
 - * Higashi N and Senoo H (2003) Distribution of vitamin A-storing lipid droplets in hepatic stellate cells in liver lobules-A comparative study-. *Anat Rec*, 271A: 240-248.
 - * Wang D-R, Sato M, Li L-L, Miura M, Kojima N, Senoo H (2003) Stimulation of pro-MMP-2 production and activation by native form of extracellular type I collagen in cultured hepatic stellate cells. *Cell Struct Func*, 28: 505-513.
 - * Miura K, Nagai H, Ueno Y, Goto T, Mikami K, Nakane K, Yonayama K, Watanabe D, Terada K, Sugiyama T, Imai K, Senoo H, Watanabe S (2003) Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun*, 311: 415-423.
 - * Wold H L, Wake K, Higashi N, Wang D-R, Kojima N, Imai K, Blomhoff R, Senoo H (2004) Vitamin A distribution and content in tissues of the lamprey (*Lampetra japonica*). *Anat Rec*, 276A: 134-142.
 - * Suzuki S, Sato M, Senoo H, Ishikawa K (2004) Involvement of EMMPRIN in pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts through MT1-MMP. *Exp Cell Res*, 293: 259-266
 - * Kakiuchi N, Fukuda K, Nishikawa F, Nishikawa S, Shimotohno K. Inhibition of hepatitis C virus serine protease in living cells by RNA aptamers detected using fluorescent protein substrates. *Comb Chem High Throughput Screen.* 6:155-160. 2003
 - * Kato N, Sugiyama K, Namba K, Dansako H, Nakamura T, Takami M, Naka K, Nozaki A, Shimotohno K. Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 306:756-66.
 - * Miyanari Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral RNA replication. *J Biol Chem.* 278: 50301-50308, 2003
 - * Ohshima T, Shimotohno K. TGF- β mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J Biol Chem.* 2003, 278:50833-50842.
 - * Watashi K, Shimotohno K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci.* 94:937-943. 2003
 - * Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M,

Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology*. 38 :1282-1288. 2003

* Hideki Aizaki, Seishi Nagamori, Tetsuo Miyamura Production and release of infectious Hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology*. 314: 16-25. 2003

* Pineau P., Nagamori S., Dejean A. Homozygous deletion scanning in hepatobiliary tumor cell line reveals alternative pathways for liver carcinogenesis. *Hepatology*. 37: 852-861. 2003

* Ellappan babu, Seishi Nagamori, Hitoshi Endou Identification of a Novel System L Amino Acid Transporter Structurally Distinct from Heterodimeric Amino Acid Transporters. *J Biol Chem*. 278:43838-4384. 2003

2. 学会発表

* 秋山一郎, 宮崎正博, 間阪拓郎, 森 将晏, 細川正清, 永森静志, 許南浩: ラジアルフローバイオリアクターによる不死化ヒト肝細胞株 (OUMS-29) の3次元高密度培養. 第76回日本組織培養学会大会, 東京, 2003年5月22日.

* 秋山一郎, 宮崎正博, 間阪拓郎, 森将晏, 細川正清, 永森静志, 許南浩: ラジアルフローバイオリアクターによる不死化ヒト肝細胞株 (OUMS-29) のCYP3A4活性の増加. 第10回肝細胞研究会, 東京, 2003年7月11日.

* 小田裕昭, 村瀬大樹, 月岡清夏, 永森静志. ヒト肝細胞-FLC-4細胞-の3次元培養による高機能化の分子機構. 第10回肝細胞研究会 (2003)

* バイオ人工肝臓のヒト薬物代謝評価系への応用. 松浦知和. 日本薬物動態学会第17回ワークショップ「創薬研究・臨床開発促進のための Emerging Technology と Bioinformatics」テーマ5 肝細胞に関する新技術. 平成15年4月18日, 東京

* バイオ人工肝臓を用いた薬物代謝評価系へのモデリングの応用. 池脇克則, 松浦知和, 斎藤勝也, 政木隆博, 前橋はるか, 細川正清, 千葉寛. 第39回日本肝臓学会総会, 平成15年5月22日, 福岡.

* 高密度3次元還流培養下ヒト肝細胞癌株 FLC-5におけるCYP3A4誘導性に関する検討. 松浦知和, 齋藤勝也, 政木隆博, 大川清, 細川正清, 千葉寛, 岩堀徹, 鈴木哲朗. 第10回肝細胞研究会. 平成15年7月11日, 東京.

* バイオ人工肝臓の開発とSEM. 松浦知和, 幡場

良明. SCANTECH 2003 ワークショップ「明日のサイエンスを支えるSEM/FIB技術」. 平成15年9月5日, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

高機能保持ヒト肝細胞を樹立 (FLC series): 米国

3. その他

高機能保持ヒト肝細胞の3次元培養システム: ジアルフロー型バイオリアクターの確立: 特許申請中

高機能保持ヒト肝細胞の3次元培養システムによりC型肝炎ウイルスの増殖に成功: JSTより米、英、仏、独、日の特許申請

細胞チップのシステムの確立: 国際特許申請中

各種ナノセンサーの作製: 国際特許申請中

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社