

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

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

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 …… 13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 …… 17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 …… 117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 …… 120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭 金正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭 金正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 ……	271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 ……	281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 ……	288
第4分野			
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 ……	307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 ……	315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 ……	319
第5分野			
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 ……	327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 ……	336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 ……	342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 ……	387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 ……	395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

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

高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発

所属 杏林大学医学部 総合診療科学
研究者 永森静志

研究要旨 機能保持ヒト肝細胞と新 3 次元バイオリアクターを利用し新薬開発時薬物動態・毒性を評価する。また新規バイオセンサーで肝産生蛋白・薬物代謝能、抗 HCV 薬の薬効評価に適した RFB/HCV 実験、ヒト肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認。

分担研究者

- (1) 杏林大学医学部薬理学 金井好克
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (3) 筑波大学学際物質科学研究 長崎幸夫
- (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) 国立感染症研究所 鈴木哲朗 相崎英樹
- (7) 名古屋大学大学院生命農学研究科 小田裕昭
- (8) 秋田大学医学部 杉山俊博
- (9) 中外製薬株式会社 木下春喜、西宮一尋
- (10) 京都大学医学部ウイルス研 下遠野邦忠
- (11) 岩手医科大学医学部 鈴木一幸
- (12) 順天堂大学医学部 市田隆文

A. 研究目的

高機能保持ヒト肝細胞と新 3 次元バイオリアクターを利用し新薬開発時薬物動態・毒性を評価する。また新規バイオセンサーで肝産生蛋白・薬物代謝能、抗 HCV 薬の薬効評価に適した RFB/HCV 実験、ヒト肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認。

* 千葉班：細胞アレイを用い、ヒト肝がん由来細胞株の、ヒトアルブミン産生量および薬物動態関連遺伝子の発現量が平面培養の場合と比較して増加するかどうかを明らかにする。

* 中外班：創薬においてヒト肝細胞を用いて化合物の肝毒性評価は、ヒトでの肝毒性を予測する上で重要である。近年、注目されている新規技術である

メタボノミクスの手法により、肝毒性を評価できる FLC 細胞を用いてバイオマーカーの検索を行った。

* 国立感染研班：分化型のヒト肝細胞株をラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) で三次元的な培養が肝臓分化機能の発現を亢進することを本研究班が確認した事実を用いて、新たな抗 HCV 薬の評価法を開発する。

* 京都大学班 (1) Huh7 細胞以外の細胞を用いた効率よい HCV 感染複製系の開発 (2) Huh7 細胞における自然免疫機構と HCV 感染・複製の接点の研究。(2) の研究を遂行するために、ヒト正常肝臓細胞を不死化し、その細胞を用いたウイルス感染系の開発を試みた。

* 名古屋大学班：肝臓特異的転写因子である HNF-4 が成熟肝細胞の機能維持に最も重要な転写因子の一つであることを明らかにしてきた。3 次元培養の人工肝臓への応用には大型化のための培養法の改良が必要であると考えられるが、ハイスループットを目指す薬物スクリーニングではむしろ小型化に向けた培養法の改良が必要になる。チップへのスケールダウンの前に、96 穴マイクロプレートへのスケールダウンを試みた。

* 岩手大学班：バイオ人工肝臓による劇症肝炎患者血漿の浄化が、肝細胞の増殖に与える影響を検討することを目的。

* 国立衛生研：永森らによって樹立されたヒト肝がん由来細胞である FLC4、FLC5、FLC7 細胞は不死化された培養細胞でありながら薬物代謝酵素である

P450 を高発現する極めて特異的な細胞である。これらのヒト肝臓由来培養細胞を用いて、ハイスループットによるスクリーニングを念頭においた、細胞毒性試験法、遺伝毒性試験法を確立することを目的とする。これら細胞は、ヒトでの薬物代謝機能の研究に有用であるばかりでなく、医薬品のヒトへの薬の効の判定、副作用の予想等に適用でき、創薬に大きく貢献できる可能性がある。

* 筑波大学班：肝細胞をサイズのコントロールされたスフェロイド形態でアレイ状に形成し、長期間培養するシステムを構築し、内皮細胞をフィード細胞とすることによって肝スフェロイドアレイの機能を維持することを目的とする。

* 杏林大学班：本研究は、「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」を最終ゴールとして、高機能保持ヒト由来肝細胞FLC4における薬物トランスポーターの遺伝子およびタンパク質発現プロファイリングを目的として行われている。

* 杏林永森：ヒト肝由来細胞とラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いて高密度三次元培養、ヒト肝に近似した機能発現能解析のため以下のことを行った。ラジアルフロー型バイオリアクターにおける培養方法の条件検討。また肝細胞特異的遺伝子の発現及び発現量の確認のため、各地の研究施設に細胞株配布し依頼した。

B. 研究方法

* 千葉班 1.平面培養 2.細胞アレイを用いた培養 3.ヒト初代肝細胞培養：

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるアルブミンの定量： 5. Total RNA 抽出：

6. Real-time PCR

* 中外班：薬物の *in vitro* 肝毒性評価パラメータとして用いることができるバイオマーカーを FLC 細胞と NMR を用いたメタボミクスにより検索した。

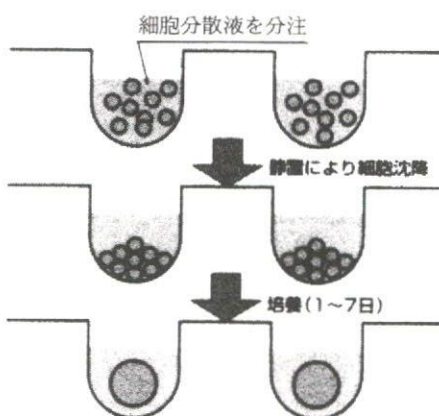
* 国立感染研班：新たな抗 HCV 薬の評価法を開発するため、HCV 遺伝子型 1b のゲノム遺伝子と薬剤耐性遺伝子を持つ full-length dicistronic HCV-RNA を導入した Huh-7 細胞株を樹立し、RFB システムで三次元培養を行った。

* 京都大学班：ヒト正常肝細胞は所属機関の倫理委員会の承認を得て入手した。この細胞に不死化因子である SV40LT 抗原遺伝子を導入し細胞を不死化し、HCV 感染実験を行った。

* 名古屋大学班：永森らにより樹立された FLC-4 細胞を用いた。細胞外マトリクスを変えることにより小規模 3 次元培養を行い、細胞形態を変える実験を行った。再構成基底膜ゲル (EHS-gel) を用いて 3 次元培養を行った。

* 岩手大学班：ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞を 96 時間培養し、各時点で BrdU 取り込み能および生細胞数を計測した。

* 国立衛生研：1. 細胞の三次元培養（支持体なし）サブコンフルに 2 次元培養した細胞を継代。



超低接着プレート (item#3261) を用いた。2 次元培養した細胞をカウントする。細胞を 5×10^4 個/plate で播種する。1~7 日間 CO2 インキュベータで培養する。2. CYP 活性測定 3. 3-methylcorancerene (3-MC) 処理による CYP (1A1) の誘導； 4. コメット試験

* 岡山大学班：1. 骨髄細胞培養。2. 免疫細胞化学染色。3. RT-PCR

* 筑波大学班：①ガラスのシラン処理 ガラス基板は濃硫酸と過酸化水素水 1：1 からなるピラニア液で洗浄したものを使用した。②マイクロパターンの構築 ③細胞培養ヒト肝癌細胞 FLC-4 を播種したそれぞれの細胞数は HH は基板面積に対して 100%、FLC-4 は 3×10^5 cells/mL を 2mL とした。

* 杏林大学班：FLC4 の輸送系 L の発現解析 FLC4 細胞の薬物トランスポーター ABCG2 の発現の検討。ラジアルフローバイオリアクターによる三次元培養法において FLC4 を培養し、平面培養でマトリゲ

ルコートディッシュにおいて培養した FLC4 と遺伝子発現を比較した。今回は、薬物代謝酵素 CYP2B6 と薬物の胆汁排泄を担う ABC トランスポーター ABCC2 (MRP2) のフェノバルビタールによる遺伝子発現誘導を逆転写 PCR により検討した。

* 杏林永森：単層培養と 3 次元培養における肝細胞特異的遺伝子の発現量の比較を FLC 細胞は単層培養 (シャーレ) と 3 次元培養 (ラジアルフロー) を行う。

肝細胞特異的遺伝子について；今回使用した肝臓特異的遺伝子 9 分子とコントロール遺伝子 2 分子

・分子名：acc#, Forward Primer sequence、Reverse Primer sequence、product size (bp)、Annealing Temp、サイクル数

肝臓特異的遺伝子 9 分子

コントロール：

b-actin

NM_001101 gagaaaatcttgaccacac ctcggtgaggatc
ttcat 340 55 25

b2-microglobulin、NM_004048、

gtggagcattcagacttgtc、aacaagctttgagtgaagag、479、
55、25

(倫理面への配慮)

倫理面については、プロジェクト全般にわたり各研究施設の倫理委員会での審議を受けた。

C. 研究結果

* 千葉班：1. FLC4-BIOS-1 細胞の平面培養および細胞アレイを用いた培養；平面培養では、培養開始 4 日後にコンフルエントとなり、その後の培養を中止した。一方、細胞アレイを用いた培養では、培養開始 18 日後においても細胞の脱落等は認められず、長期培養が可能であった。2. FLC4-BIOS-1 細胞のアルブミン産生量：細胞アレイを用いた培養下における FLC4-BIOS-1 細胞は、培養 12 日目からアルブミン産生量が増大し、回収した 17 日目までアルブミン産生能を保持していた。17 日目までの蓄積量は細胞が接着しうる底面積あたり 72 ng であった。一方、平面培養下におけるアルブミン産生量は、コンフルエントとなった培養 3 日目までの蓄積量として、細胞が接着しうる底面積あたり 0.003 ng と非常に少な

かった。3. 薬物動態関連遺伝子の mRNA 発現量に関する経時変化：細胞アレイを用いた培養を開始して 12 日目および 17 日目に回収した FLC4-BIOS-1 細胞における CYP 分子種の mRNA 量は、平面培養 3 日目の細胞に対して、CYP2B6 がそれぞれ 6.4 倍および 13.7 倍、CYP2C9 はそれぞれ 180 倍および 530 倍、CYP2C19 はそれぞれ 1,800 倍および 11,000 倍高い mRNA 発現量を示した。CYP3A4 の発現は平面培養および細胞アレイを用いた培養のいずれの場合においても認められなかった。転写因子については、細胞アレイを用いた培養の 12 日目および 17 日目における細胞では平面培養 3 日目の細胞に対して、HNF4・ がそれぞれ 8.9 倍および 18.3 倍、C/EBP・ はそれぞれ 15 倍および 29 倍、C/EBP・ はそれぞれ 3.4 倍および 16.2 倍高い mRNA 発現量を示した。いずれの遺伝子に関しても、程度の差はあるが培養 17 日目の細胞の方が 12 日目の細胞よりも高い発現量を示した。

4. 細胞アレイを用いて培養した FLC4-BIOS-1 細胞とヒト初代培養肝細胞における薬物動態関連遺伝子の mRNA 発現量の比較：細胞アレイを用いた培養による薬物動態関連遺伝子の発現量増加について再現性を確認するため、細胞アレイを用いた培養の 18 日目と平面培養 4 日目の FLC4-BIOS-1 細胞における薬物動態関連遺伝子の mRNA の発現量を比較した。その結果、albumin、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、HNF4・、C/EBP・ および C/EBP・ mRNA は、いずれも平面培養に対して発現量の増加が認められた (albumin は 180 倍、CYP2B6 は 7.5 倍、CYP2C9 は 460 倍、CYP2C19 は 600 倍、HNF4・ は 5.5 倍、C/EBP・ は 13.2 倍、C/EBP・ は 2.5 倍)。次に、細胞アレイを用いた培養 18 日目の FLC4-BIOS-1 細胞とヒト初代培養肝細胞における薬物動態関連遺伝子の mRNA の発現量を比較した。細胞アレイを用いた培養 18 日目の FLC4-BIOS-1 細胞における albumin mRNA の発現量はヒト初代培養肝細胞と比較して 4.0 倍低かった。CYP の発現についても、細胞アレイを用いた培養 18 日目の FLC4-BIOS-1 細胞ではヒト初代培養肝細胞に対して、CYP2B6 が 6.2 倍、CYP2C9 は 15 倍、CYP2C19 は 14 倍低い mRNA 発現量を示した。転写因子については、細胞アレイを用いた培養 18 日目の FLC4-BIOS-1

細胞ではヒト初代培養肝細胞に対して、HNF4・が2.1倍、C/EBP・は1.5倍、C/EBP・は倍とわずかではあるが低いmRNA発現量を示した。

* 中外班：Albumin, LDH, AST, ALTの平均値は溶媒添加コントロール群でそれぞれ0.21 g/L, 20 IU/L, 5.8 IU/L および0.97IU/L、溶媒非添加コントロール群ではそれぞれ0.22 g/L, 21IU/L, 6.1 IU/L および1.1IU/Lであった。これに対して肝毒性群1ではそれぞれ0.21 g/L, 21 IU/L, 5.8 IU/L および0.76IU/L、肝毒性群2ではそれぞれ0.21 g/L, 16 IU/L, 4.8 IU/L および8.7IU/Lであった。肝毒性群2のALT値は2つのコントロール群と比較して約8倍上昇した。

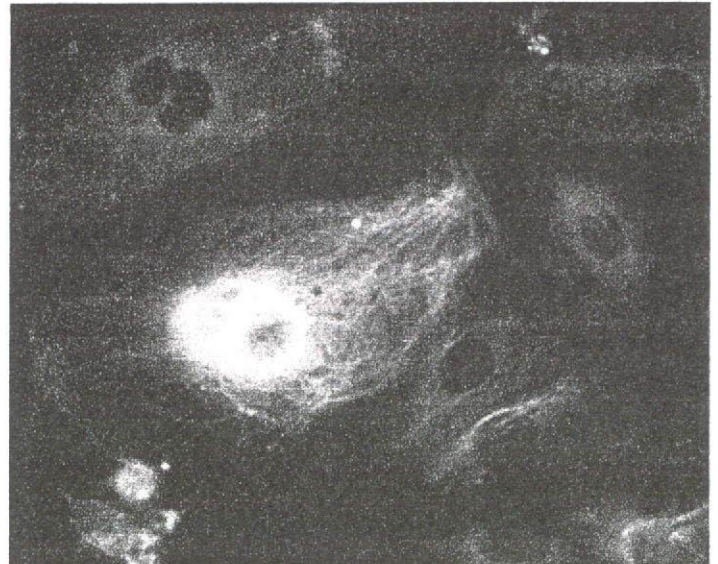
* 国立感染研班：RFB培養を行った場合、HCV粒子が免疫電子顕微鏡観察から示された。RFB培養系が、抗HCV薬のウイルス産生阻害作用及び肝臓機能発現への影響の評価に有用であることがインターフェロンを用いた実験から示された。

* 京都大学班：RT-PCRで検出できる程度のウイルスゲノム複製が観察された。TLR3を介したHCVゲノム複製制御についての知見を得ることを目的とした。Huh7はTLR3の活性が抑制されている。この細胞に外来的にTLR3遺伝子を導入すると、TLR3シグナルが活性化されその結果ウイルスゲノムの複製が強く抑制された。HCVゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスゲノムの構造を明らかにした。その結果、本細胞においてはウイルスポリメラーゼによる転写開始におけるヌクレオチド選択の冗長性が明らかになった。

* 秋田大学班 放線菌 *Streptomyces* sp. の新規な産生物#675はヒト肝癌由来細胞FLC4の増殖を促進した。FLC4細胞は牛胎児血清(FBS)無添加時には核の凝縮・DNA断片化などの典型的なアポトーシスの特徴が現われたが、#675の添加により用量依存的にアポトーシスが抑制された。

* 名古屋大学班：FLC-4細胞の丸底96穴マイクロプレートを用いて、方法もパターン化させることにより、安定的にコートすることが可能になった。EHS-gelをコートしたマイクロプレートでの細胞も、実験者の習熟度に依存することがわかったが、これは習熟度を上げる以外方法がないことがわかった。

細胞を利用してMTTアッセイを行ったが、アセトアミノフェンに対する毒性を観察出来なかった。チューブリン-EYFPを持つFLC-4細胞を8クローン、HNF-4-EGFPを持つFLC-4細胞を5クローン、Tetリプレッサーを持つFLC-4細胞を7クローン、EGFPを持つFLC-4細胞を5クローン選択した。チューブリン-EYFPを持つクローン株では、微小管ネットワークを生きた細胞でリアルタイムの観察が可能になった(図)



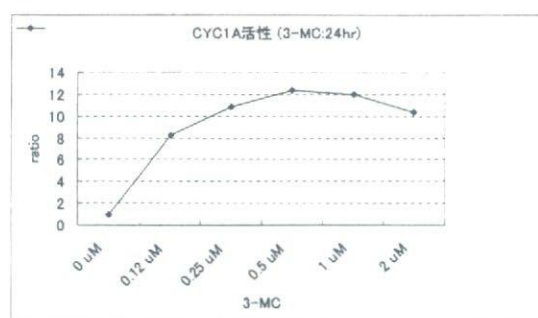
(チューブリン-EYFPによって可視化された微小管ネットワーク)

チューブリン-EYFPを持ったFLC-4細胞 HNF-4-EGFPを持ったFLC-4細胞では、核に局在する蛍光が観察された。EGFPを持つFLC-4細胞では、細胞全体に蛍光が見られた。いずれの細胞もクローン株ではあるが、親株のFLC-4細胞と同様に3次元培養によりHNF-4遺伝子発現の亢進が見られ、親株の3次元培養によって高機能化するという性質を受け継いでいることがわかった。Tetリプレッサーを持ったFLC-4細胞を用いてドキシサイクリンを培地から除くことによる外来遺伝子(今回はルシフェラーゼ)の誘導能を検討したところ、7クローンの内3クローンで100倍以上の誘導能がある細胞株が得られた。A、ドキシサイクリンを除去した培地で培養した細胞の蛍光観察。B、ドキシサイクリンを含むためEGFPの蛍光は観察されない。

* 国立衛研：1. 細胞の三次元培養とそれによる薬剤感受性の変化 HepG2、FLC4を、PCRチューブ、

およびコーニング社の超低接着プレート (item#3261) で培養し、3次元スフェロイド状の細胞凝塊を形成させ、代謝酵素活性の活性測定と、ベンツピレン(BP)に対するコメット試験を実施した。PCRチューブで形成された細胞塊は巨大であり、スフェロイド状を呈しなかった。CYP1A活性は2次元培養条件よりも低く、BPに対するコメット試験に対しても反応性を示さなかった。一方、超低接着プレートでは8から16個程度の細胞からなるスフェロイド状の細胞塊が自発的に形成された。CYP1A活性の増加は、HepG2では顕著ではなかったが、FLC4では2倍程度の活性の増加が観察された。

2. 3-MCによるCYPの誘発; HepG2細胞をCPによる3次元培養を行い、3-MCを添加し、CYP1A活性測定した。下図(国立衛研)



CYP1Aは3-MCの添加により誘導され、1μMの添加でコントロールの12倍程度の誘導が観察された。通常のプレートによる2次元培養ではこのような誘導は観察されなかった。

* 岡山大学班: 骨髄細胞をHGFおよびEGFを添加したHGM培地で培養。アルブミン、AFP、CK-8、CK-18のほか肝細胞の最終分化マーカーであるT0およびTATを発現する継代培養可能な成熟肝細胞類似の細胞を誘導できることが明らかとなった。

* 筑波大学班: ①内皮細胞パターンとFLC-4パターンの形状維持を比較はチップに内皮細胞、(b)は内皮細胞をフィーダ細胞としてFLC-4細胞を播種・培養した結果。内皮細胞は単層のパターンが1週間後も維持されているものの、LC-4細胞播種後1週間ではFLC-4細胞の増殖によって一面に細胞が広がった。

* 杏林大学班: FLC4の輸送系Lの発現: FLC4細胞におけるLAT3の発現を、ノーザンブロット及びLAT3特異抗体を用いたウェスタンブロットにより

検討した。ノーザンブロットにおいては、ヒト肝臓及びFLC4細胞に、同サイズのLAT3のバンドが検出された。ウェスタンブロットでは、抗LAT3抗体によりFLC4細胞に37KDaのバンドが検出されたが、このバンドはLAT3抗原ペプチドの存在下で完全に消失し、本抗体の特異性が確認された。これにより、LAT3のFLC4細胞での発現が確認された。LAT1及び4F2hcの発現を、ノーザンブロット及び抗LAT1抗体を用いたウェスタンブロットにより、FLC4細胞とヒト膀胱癌由来T24細胞で比較した。ノーザンブロットにおいては、LAT1はT24細胞とともにFLC4細胞に強い発現が見られたが、4F2hcの発現はFLC4細胞では極めて弱かった。そこでウェスタンブロットを行ったところ、非還元条件下では抗LAT1抗体によりT24細胞に125KDaのバンドが検出された。これは還元条件下で38KDaへシフトした。この125KDaのバンドは、LAT1と4F2hcのヘテロ二量体に相当し、38KDaのバンドは、LAT1の単体に相当するものである。FLC4細胞においては、38KDaのバンドのみが検出され、125KDaのバンドは非還元条件下においても検出されなかった。従って、FLC4細胞には、ヘテロ二量体型の機能性のLAT1は存在しないことが示された。FLC4細胞の薬物トランスポーターABCC2の発現: ラジアルフローバイオリクターによる3次元培養法においてFLC4を20日間培養し、平面培養でマトリゲルコートディッシュにおいて培養したFLC4と遺伝子発現を比較した。ラジアルフローバイオリクター培養、マトリゲルコートディッシュ培養ともに、CYP2B6及びABCC2の両者の遺伝子に関して、フェノバルビタールによる大きな誘導が観察された。本結果は、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を保持していることをさらに支持するものである。

* 杏林永森班: 単層培養とRFB培養でのFLC4細胞における、コントロール遺伝子(GAPDH)及びアルブミン遺伝子とαフェトプロテイン遺伝子の発現確認。GAPDHは、単層培養とRFB培養のどちらにおいても発現の確認が出来た。

* proto-cadherin LKC遺伝子の発現確認(PCR)。今回のRFB培養のサンプルは、単層培養と比較するとほぼ同じくらいの発現量であった。

* 細胞の分化を見る指標としてのカドヘリン分子の発現：そのためEカドヘリンだけでなく、他のカドヘリン分子の発現をFLC4のRFB培養と二次元培養において比較した。

たが、今回のマイクロアレイではシグナルが検出されなかった。

* Protocadherin-LKCとE-cadherinの発現を検討した。定量PCRではRFB培養によりProtocadherin-LKCは約3.7倍、E-cadherinは約1.9倍の発現変化がそれぞれ見られた。

* 血液凝固因子 mRNA 発現状況：10cm dishで単層培養を行ったJHH7細胞から抽出されたtotal RNA 1ugを逆転写してPCRの鋳型として使用した。単層培養での結果ではあるが、JHH7細胞は多くの凝固因子が発現している。

* 肝細胞株の保有する遺伝子研究のため、現在下記の研究施設に配布され、研究中である。

下記のヒト肝胆由来の腫瘍細胞株は2003年3月から2005年12月までの永森らが樹立し、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)に保存を依頼し、研究、試験、教育等に利用を希望する施設または研究者への細胞分譲状況を示した表である。

JHH：ヒト肝細胞癌由来細胞株、NOZ：ヒト胆のう癌由来細胞株、OZ：ヒト胆管癌由来細胞株

	FLC4_3D	FLC4_2D
CDH1(E cadherin)	1.75	0.508
CDH17(Liver - intestine)	3.318	0.73
CDH6 (fetal kidney)	3.573	0.828
PCDH1	3.559	A
PCDH7	2.603	A
PCDH15	2.897	1.725
PCDHB2	11.74	3.167
PCDHB3	1.879	0.903
PCDHB9	2.766	A
PCDHB13	3.396	0.861
MUCDHL	A	A
PC-LKC	A	A

RT-PCRではProtocadherin-LKCの発現増加がみられ

登録番号細胞名	03年1月～ 03年12月	03年3月～ 04年2月	03年4月～ 04年2月	04年4月～ 05年2月	05年2月～ 05年12月
JCRB1062 JHH-1	0	0	0	6	4
JCRB1028 JHH-2	1	1	1	6	2
JCRB0435 JHH-4	5	3	2	4	2
JCRB1029 JHH-5	4	4	3	4	2
JCRB1030 JHH-6	2	2	1	5	2
JCRB1031 JHH-7	4	4	2	4	4
JCRB1033 NOZ	6	6	6	4	5
JCRB1032 OZ	3	4	4	3	6
合計	25	24	19	36	27

1. 上記細胞株のおもな研究目的と研究タイトル

2003 年分

- * JCRB1028 JHH-2 肝細胞癌株における細胞周期と functional p53 の発現との関係
 - * JCRB1435 JHH-4 食品添加物の肝臓の細胞に及ぼす影響について
 - * JCRB1435 JHH-4 肝癌に対する各種薬剤の制癌効果に関する研究
 - * JCRB1029 JHH-5 肝癌に対する各種薬剤の制癌効果に関する研究
 - * JCRB1029 JHH-5 ヒト肝細胞癌発生の基礎研究
 - * JCRB1030 JHH-6 p38MAPK に対する糖尿病新薬 DHEA の影響
 - * JCRB1030 JHH-6 ヒト肝細胞癌発生の基礎研究
 - * JCRB1031 JHH-7 肝細胞癌株における細胞周期と functional p53 の発現との関係
 - * JCRB1031 JHH-7 B 型肝炎ウイルスの発癌メカニズムの解明
 - * JCRB1033 NOZ 代謝実験
 - * JCRB1033 NOZ 胆嚢癌におけるカドヘリン発現の研究
 - * JCRB1033 NOZ 胆嚢癌 cell line における homeodomain protein CDX2 の発現を研究する。
 - * JCRB1033 NOZ 癌遺伝子の検索、遺伝子治療研究
 - * JCRB1033 NOZ Development of gene therapy for gall bladder cancer.
 - * JCRB1032 NOZ 胆管癌の遺伝子発現プロファイルの解析
 - * JCRB1032 NOZ 胆管癌に対する自殺遺伝子療法
 - * JCRB1032 NOZ Cholangio carcinoma adenoviral gene therapy.
- ### 2004 年分
- * 遺伝子導入実験
 - * 化合物評価(培養系における装飾抑制)ヌードマウス移植後の抗腫瘍活性評価
 - * 胆管上皮の発生・分化についての研究
 - * 肝癌におけるチロシンキナーゼの発現とチロシンキナーゼ阻害薬の効果の検討
 - * 消化器癌の生物学的解析
 - * JHH-1 の分泌するコラーゲンの分析
 - * 各種薬剤暴露時の薬剤反応性関連遺伝子の発現変化の

解析

- * 胆管系癌に対する抗癌剤感受性試験
 - * 胆嚢がん細胞株に対する分子標的薬の効果
 - * 癌遺伝子の解析
 - * 肝細胞癌の発育・進展過程における FGF の役割についての検討
 - * 癌ゲノム異常解析
 - * Genetic research, screening for homologous deletion Investigation of the expression of hepatic transporters
- ### 2005 年分
- * JCRB1033 胆嚢癌における血管新生分子の網羅的解析
 - * JCRB1029 HBV の研究に使用
 - * JCRB1031 HBV の研究に使用
 - * JCRB0435 消化器癌の生物学的解析
 - * JCRB1031 消化器癌の生物学的解析
 - * JCRB1062 消化器癌の生物学的解析
 - * JCRB1032 肝内胆管癌細胞株の特定遺伝子の発現を調べる
 - * JCRB1032 膵癌・胆道癌の抗癌剤感受性規定因子の探索
 - * JCRB1033 膵癌・胆道癌の抗癌剤感受性規定因子の探索
 - * JCRB1033 胆嚢癌、癌遺伝子スクリーニング
 - * JCRB0435 肝炎ウイルス感染の解析
 - * JCRB1062 肝炎ウイルス感染の解析
 - * JCRB1033 K-ras mutation check (PCR-RFLP 法)に対する positive-negative control に使用する
 - * JCRB1031 マウスへの移植実験
 - * JCRB1032 細胞周期にかかわる糖鎖転移酵素の解析
 - * JCRB1028 肝癌肝細胞の同定
 - * JCRB1030 肝癌肝細胞の同定
 - * JCRB1062 肝細胞癌の機序解明
 - * JCRB1028 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討
 - * JCRB1029 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討
 - * JCRB1030 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討
 - * JCRB1031 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討

*JCRB1062 肝細胞癌の進展に関する分子の機能検討

*JCRB1032 Investigation of prognostic factor of gallbladder carcinoma

*JCRB1033 Investigation of prognostic factor of gallbladder carcinoma

*JCRB1032basic research

*JCRB1032 Testing cytotoxic activity of new chemical entities on bile duct carcinoma

D. 考察

* 千葉班：細胞アレイを用いて培養した FLC4-BIOS-1 細胞は薬物代謝評価系として有用である可能性が示唆された。

* 中外班：NMR スペクトルの SIMCA による解析では、肝毒性群とコントロール群が NMR スペクトルにより分離できる可能性が示唆された。今後、CC14 や NH₄NH₄ を暴露する濃度を上げて肝毒性が Albumin, LDH, AST, ALT の値で十分評価できた試料を再度、NMR スペクトルで評価する必要がある。

* 国立衛研班：FLC4 細胞はコメット試験による DNA 損傷性に対しては比較的安定した反応性を示すことから、コメット試験をパラメーターとして遺伝毒性の評価を行った。肝細胞を 3 次元培養することにより、薬物代謝活性が上昇し、2 次元培養に比べ、本来の肝臓の機能に近い状態を反映できること。

* 京都大学班：Huh7 はもともと TLR3 シグナルが抑制されておりそのことが HCV ゲノム複製効率を上げていると考えられた。Huh7 細胞における TLR3 シグナル機構の解明は HCV ゲノム複製の自然免疫による制御の解明の一助になると期待される。

* 秋田大学班：FLC4 細胞を用いることによって自然界に存在する新規有用物質の探索や、薬理効果の評価に有効であるが明らかになった。

* 名古屋大学班：微量検出系を開発する目的で外来遺伝子を導入した FLC-4 細胞株の作出を行った。外来遺伝子を導入してクローン化した細胞においても親株で観察された 3 次元培養への応答性を維持していた。微小管のネットワークの維持は、正常な肝機能にとって重要であることもわかっている。微小管のネットワークを指標として、肝毒性の場合には

チューブリンタンパク質の漏出を指標として薬物のスクリーニングが可能になるのではないかと考えられる。

* 岩手大学班：劇症肝炎患者血漿は、健常人血漿に比し BrdU 取込みを有意に抑制し、生細胞数の増加を遅延させた。劇症肝炎患者血漿添加直後から 48 時間までの BrdU 取り込みの低下が見られたがその後回復したことより、この時間内での増殖抑制がその後の生細胞数の差となったものと推定される。

* 国立衛研：3次元スフェロイドが肝機能を持つには、その大きさや、形態が重要であることがわかった。今回、小さなスフェロイド形成のために、2種類の3次元培養法；PCRチューブ法、コーニング社の超低接着プレート (item#3261) 法で培養を行った。前者では大きな細胞塊が形成されたが、薬物代謝酵素の誘導は認められず、コメット試験によるBPに対する感受性も変化がなかった。低接着性プレートでは8~16個程度の細胞からなるスフェロイドが形成され、薬物代謝酵素の誘導、BPに対する感受性が増加した。この現象はFLC4細胞では見られたが、HepG2細胞では観察されなかった。3次元培養による肝細胞の機能回復は、細胞に大きく依存することがわかった。しかしながら、三次元培養のHepG2細胞では3-MC処理により、CYP1A活性の誘導が見られた。HepG2は3次元培養だけでは、肝薬物代謝酵素の回復は無いが、その誘発能は獲得しているものと考えられる。

* 岡山大学班：ヒト骨髄より肝前駆細胞を分画し、培養基質、培地、培養法などの工夫によって、増殖可能な前駆細胞を高い効率で肝細胞に分化誘導できれば、生体内移植による肝不全治療に直接使用し得る理想的な細胞になる。

* 杏林大学班：

FLC4は、肝細胞の分化機能を高度に保持した細胞であり、分担研究者らは本細胞を材料としてすでに肝細胞型新規アミノ酸トランスポーターLAT3の分子クローニングに成功している。LAT3は、分化型の肝細胞に発現するの輸送系Lアミノ酸トランスポーターであり、FLC4細胞がこれを発現していることからトランスポーターの観点からも、FLC4細胞が正常肝

細胞の特質を保持していることが支持されたことになる。本年度の研究において、FLC4細胞が他の一般の培養細胞株と異なり、輸送系L-アミノ酸トランスポーターとしてLAT1ではなく、肝細胞型のLAT3の輸送特性を示す理由を検討した。その結果、FLC4細胞は、未分化肝細胞に存在するLAT1を発現するが、LAT1の機能発現に必須の補助因子4F2hcを欠いており、その結果、LAT1が機能できず、肝細胞型LAT3の活性が支配的となっていることが明らかになった。本研究において、FLC4細胞のラジアルフローバイオリアクター培養及びマトリゲルコートディッシュ培養において、薬物代謝酵素CYP2B6と薬物の胆汁排泄を担うABCトランスポーターABCC2(MRP2)のフェノバルビタールによる遺伝子発現誘導を逆転写PCRにより比較した。その結果、ラジアルフローバイオリアクター培養、マトリゲルコートディッシュ培養ともに、CYP2B6及びABCC2の両者の遺伝子に関して、フェノバルビタールによる大きな誘導が観察された。本結果は、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を保持していることを確認するものである。

FLCの薬物代謝特性を評価するためには、細胞内の薬物代謝酵素群の研究だけでなく、薬物およびその代謝産物の細胞膜通過を可能にする薬物トランスポーターの評価を行うことが必須である。この検討のもとに、FLCの薬物代謝系としての総合的な評価が可能となる。FLC4の薬物輸送に関わるトランスポーターの全体像を明らかにし、バイオリアクター上のFLC4を薬物トランスポーターの観点から肝細胞と比較することが、本分担研究の目的であり、本年度の検討に引き続き、来年度は、培養条件のさらなる検討による最適化を行い、ラジアルフローバイオリアクター上のFLC4の全薬物トランスポーターの発現量の把握と肝細胞との比較による薬物トランスポーターの観点からのFLC4の評価を行う。

* 杏林永森：肝細胞特異的遺伝子の発現及び発現量の確認：上皮細胞-間葉系細胞転換Epithelial-Mesenchymal transitionという現象が起こる。逆に細胞が上皮様細胞の極性を獲得するときはMesenchymal-epithelial transition間葉系細胞-上皮細胞転換が起こる。この現象のキー分子として

Eカドヘリンが重要である。カドヘリンの発現、血液凝固因子mRNA発現が認められ、さらにラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)では発現量が高まるものもあることが立証できた。しかしさらに良いRFBにおける培養方法の条件検討されなければならない。

E. 結論

中外：ヒドラジンをラジアルフロー培養したFLC細胞に添加し、経時的に増加するピークを検出した結果、肝毒性群とコントロール群がNMRスペクトルにより分離できる可能性が示唆された。

京都大学：自然免疫がHCVゲノム複製を強く制御することを示した。この成果は、HCV感染初期における樹状細胞の活性化の機構を考える上に重要な知見を与えると期待されるし、インターフェロン治療により効果が出にくい患者に対する治療法についても新たな知見を与えるものである。

名古屋：3次元培養のスケールダウンを試み、96穴丸底マイクロプレートでの培養系に成功してきたが、FLC-4細胞を用いた肝毒性試験の適正化が必要であることがわかった。EGFP、チューブリン、HFN-4の導入FLC-4クローンを作成した。これらの細胞の薬物スクリーニングへの最適化を図っていく必要がある。

国立衛研：代表的なヒト肝由来細胞株であるFLC4、HepG2を3次元培養し、コメット試験を指標として遺伝毒性試験を行った。両細胞は、3次元培養でスフェロイド状になることにより、薬物代謝能、薬物代謝誘発能を獲得し、代謝活性化を必要とする薬剤の遺伝毒性に感受性を示すことがわかった。今後、この性質を利用し、細胞を三次元チップ化し、スクリーニング系の開発に応用したい。

筑波大学：FLC-4をパタン基板上でスフェロイド培養した場合、増殖した細胞はパタン内で上方や外側へと増殖を続け、やがてパタンからあふれる様に基板へ接着することが確認された。本研究結果から、肝細胞のスフェロイドアレイ構築の技術により、肝細胞の活性を向上させることが示され、薬効検査などに利用可能なセンサチップとしての応用が期待される。

杏林大学：FLC4細胞は、分化型の肝細胞に発現する

の輸送系Lアミノ酸トランスポーターのLAT3を発現し、未分化肝細胞型LAT1の機能発現が抑えられている。このようにトランスポーターの観点からも、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を保持していることが支持された。また、FLC4細胞の薬物代謝酵素CYP2B6と薬物の胆汁排泄を担うABCトランスポーターABCC2(MRP2)のフェノバルビタールによる遺伝子発現誘導の検討の結果、FLC4細胞が正常肝細胞の特質を高度に保持した細胞株であることがさらに確認された。

杏林永森：自己樹立したFLCおよびJHH系のヒト肝由来細胞と新しく開発した3次元培養法であるラジアルフローバイオリアクター(RFB)のシステムにより、新薬開発時薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサー作製のため肝産生蛋白・薬物代謝能、抗HCV薬の薬効評価に適したRFB/HCV実験、肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認をした。

F. 研究発表

1. 論文発表

*Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K, et,al, Identification of HMG-CoA reductase inhibitors as activators for human, mouse and rat constitutive androstane receptor (CAR) *Drug. Metab. Dispos.* 2005 33:924-29.

*Honma, M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45, 162-176

* Wakui S, Yokoo K, Takahashi H, Muto T, Suzuki Y, Kanai Y, Hano H, Furusato M, Endou H: Prenatal 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl exposure modulates induction of rat hepatic CYP

*Nakanishi K, Kanai Y, et,al,: LAT1 expression in normal lung and in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch.* 448: 142-150, 2006.

* Hepatocellular carcinoma cells by inhibiting activity of endostatin secreted by the transplanted cells in nude mice. *International Journal of Oncology*, 25 (5), 1267-1271, 2004.

*秋山一郎・宮崎正博・市田隆文・永森静志：バイオ人工肝：臨床応用への課題：最新医学 60 (4)

842-849, 2005 :

*永森静志・小田裕昭・宮崎正博・細川正清・千葉寛・相崎英樹・鈴木哲朗他：バイオ人工肝—実業化のための基本的な条件：肝胆膵 51, 1, 107-120, 2005

1. 学会発表

* American Society for Artificial Internal Organs (ASAI0) 51st Annual Conference
平成 17 年 6 月 11 日 ワシントン DC

Expression of CYP3A4 by an immortalized human hepatocyteline using a Radial-Flow Bioreactor
I Akiyama, S Nagamori, M Miyazaki et, al,

1. 特許取得

特許取得

発明の名称：高機能保持ヒト肝由来細胞樹立

発明者：Nagamori et al.

特許取得日：1995.

特許番号：U. S. A. Patent No. 5. 804. 441)

特許出願

発明の名称：肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

発明者：永森静志

出願人：科学技術振興事業団

特許出願日：2002年8月21日

国際出願番号：PCT/JP00/05582

特許出願

発明の名称：ハイブリッド型人工肝臓

発明者：永森静志、旭メディカル株式会社

特願平9-58650

2. その他

1. 受賞

American Society for Artificial Internal Organs
51st Annual Conference Washington DC - June 9 -
11, 2005 で学会賞を授与された。

平成17年度

創業等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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