

人由来組織利用研究円滑化のための社会的・技術的インターフェースの整備

所属 国立成育医療センター研究所移植・外科研究部
研究者 絵野沢 伸

研究要旨：日本において調達された人由来研究資源が公共的バンクを通じて公正かつ円滑に研究者に配分されるしくみを作るための活動を行った。人由来研究資源として、創薬研究に密接に関わる人肝細胞を対象とし、技術的要素として保存法や長期安定培養技術の開発を行い、社会的整備として、製薬企業に望まれる資源形態の模索を開始した。

分担研究者

- | | |
|--------------------|-------|
| (1) 東京医科大学外科学第三講座 | 青木達哉 |
| (2) 東京理科大学理学部応用科学科 | 大塚英典 |
| (3) 国立がんセンター研究所 | 落谷孝広 |
| (4) 帝京平成大学薬学部 | 石館光三 |
| (5) (NPO) HAB研究機構 | 鈴木 聡 |
| (6) (株) アビー | 大和田哲男 |
| (7) 田辺三菱製薬 (株) | 山田泰弘 |
| (8) 東洋合成工業 (株) | 池谷武志 |
| (9) (株) トランスパレント | 田向康人 |

A. 研究目的

医学研究において人由来研究資源の需要は年々増加している。例えば、創薬研究に中心的役割を有する肝細胞は、欧米の移植不適合肝由来の凍結細胞が日本に輸入され、用いられている。しかしながら、生存生着のよい細胞は少なく、また凍結融解操作に不確定要素が多いため、円滑な研究が進んでいるとは言い難い。その他の人由来研究資源も輸入に依存しているが、我が国の創薬を真に推進するには、国内における供給体制の整備が必要である。

我が国の人由来研究資源は、現状では移植臓器の調達経路とは両立できず、主に手術摘出検体からの供給となり、極めてわずかである。そこで、この貴重な原資源を、最大限に有効利用する必要がある。本研究では、新規保存法、新規3次元培養評価系、幹細胞分化細胞の利用、をもって、この問題への対策を検討する。最終成果としては、創薬研究者等が、権利的な制約を受けず、簡便に利用できる人由来細胞の利用システムの確立をめざす。

B. 研究方法

1. CAS(Cell Alive System)凍結を応用・発展させた新規保存法開発 (絵野沢、大和田)

ラットおよびブタの肝細胞をCAS法にて凍結し、保存後の生細胞率、生着度を調べた。

2. 特殊表面加工基板による三次元高機能持続性培養細胞系の改良 (大塚、池谷、佐倉、絵野沢)

大塚、片岡によって開発された特殊表面加工基板を用い、種々の評価を行った。

3. 創薬研究を目的とした幹細胞からの細胞分化 (落谷、山田)

脂肪組織由来の間葉系幹細胞について薬物代謝能、活性誘導能を調べた。

4. 細胞機能評価の標準化 (石館、山田、絵野沢)

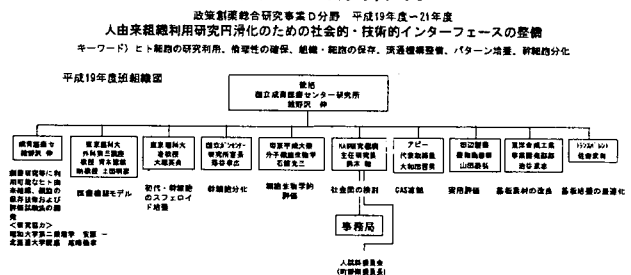
薬物代謝能としてテストステロン6位水酸化活性を、肝細胞基礎機能としてアルブミン分泌能を措置挙げ、培養環境と測定方法の標準化を行った。この標準プロトコルを用い、コーニング社の新規接着基材 UltraWeb 上でのラット肝細胞機能の評価を行った。

5. 社会システムの検討 (鈴木、青木、絵野沢)

HAB研究機構が平成18年より開始している人試料委員会(委員長; 町野朔上智大学法学部教授)をもとに、我が国における人由来研究資源の調達、分譲に関する現状把握、検討、考察、提案を行った。

東京医科大学病院にて、医療機関として倫理的、実効的によりよい原資源の調達システムの開発と、一次プロセス、特に肝細胞分離の実施準備を行った。

図1 研究体制



(倫理面への配慮)

動物実験については、国立成育医療センター研究所動物実験委員会の審査・承認を得て行った。人由

来組織利用実験については国立成育医療センター倫理審査の承認を得て行った。ヒト間葉系幹細胞の実験は分担研究者である落谷室長が所属先の国立がんセンター研究所の倫理審査を受け行った。

C. 研究結果

1. CAS(Cell Alive System)凍結による新規保存法開発 (絵野沢、大和田)

大和田分担者は従来の CAS 凍結器を改良し、磁界強度調節型を開発した。絵野沢はその器械にてラット、ヒト肝細胞の凍結保存実験をし、効果は強度に比例せず、最適値が存在することがわかった。また凍結用溶媒の種類を変えて検討している。

2. 細胞アレイ培養系の改良 (大塚、池谷、佐倉、絵野沢)

大塚、片岡らが開発の細胞アレイ (PCT/JP2002/007539) を改良した。大塚はより生理的なスフェロイド形成のため、培養時に混合する細胞の種類を変えて検討をしている。池谷、佐倉は、今まで基材をガラスでなく 6 穴および 96 穴プラスチックプレートに直焼きする方法を確立した。さらに、細胞アレイ作成時に必要なフィーダー細胞の血管内皮 HH 細胞を播種凍結して供給するシステムを確立し (絵野沢、池谷他、特願 2007-2730995)、利便性が著しく向上した。

3. 創薬研究を目的とした幹細胞からの細胞分化 (落谷、山田)

ヒト皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞から分化した肝細胞様細胞に十分量の薬物代謝活性が出現することを確認した (Banas、山田、鈴木、絵野沢、落谷他、第 8 回国際薬物動態学会、2007/10)。引き続き、誘導能の確認を行っている。

4. 肝細胞機能評価 (石館、山田、絵野沢、熊井)

石館分担者は、山田分担者の助言をもとに、絵野沢が培養した肝細胞のアルブミン合成能と薬物代謝活性、同誘導能を、ELISA および液体クロマトグラフィーで解析する系を確立した。本年度は、コーニング社が新規開発し、絵野沢に評価を依頼した UltraWeb を評価した (結果はコ社へ報告後に公表予定)。熊井協力者 (平成 20 年度より分担者) は、手術摘出肝組織に由来する肝細胞を用い、薬理的に細胞アレイの性能評価を行った。

5. 社会システムの検討 (鈴木、青木、絵野沢)

HAB 研究機構の人試料委員会 (委員長：町野朔上智大学法学部教授) が、8 月の第 11 回でひとまず終了し、報告書作成段階に入った。すでに草案は出来、さらに詳細な報告書を作成中である。青木分担者は、東京医科大学病院にて、手術摘出肝組織から分離した肝細胞をヒューマンサイエンス研究資源バンクに提供するための準備を、倫理的、実務的に遂行している。倫理審査は既に終了した。

D. 考察

わが国における手術摘出人由来研究資源の公的な収集・分譲は平成 13 年に開設されたヒューマンサイエンス研究資源バンクヒト組織バンクに始まる。本研究ではこのバンクを最終ゴールかつ研究者への窓口として設定している。現在、輸入ヒト由来試料の需要が増しているが、輸入ヒト由来試料にはいくつかの問題点がある。輸入ヒト由来試料は我が国の倫理指針に照らすと、入手の正当性が疑問視されるものも散見される。また一方、輸入ヒト由来試料は入手からプロセスに至る一連の過程を正確には把握できないという品質上の不安要素が存在する。研究者がヒト組織資源を安心して容易にアクセスし、すぐに使用できる環境を形成する必要がある。国内においてこのような観点で作成された代表的研究資源は、主任研究者絵野沢が行った日本人由来手術摘出肝組織から調製した細胞下画分と、ファーマコスニップコンソーシアムによる日本人由来 B リンパ細胞株パネルである。最後に、輸入ヒト由来試料には知的所有権の問題がある。輸入試料には、知的所有権の権利関係に条件のあるものが存在する。我が国にて供給の場合は、我が国の法令のもとに権利関係を判断できるので、トラブルの発生や研究上の制約が少なくできる。以上のように、本研究は国内の人由来研究資源の供給体制を我が国の状況に合わせて構築するもので、極めて独自性が強く、また、我が国の医学研究において必須の課題である。

こういった研究資源バンク事業で忘れてはならないのは、利用者の利便性を考慮することである。手続き上の問題はさておき、細胞分離など、やや煩雑な手順が必要なことはすでに終わっている試料形態が望ましい。できることなら、研究室に届いてすぐに培養できるようにすべきである。本研究班ではなるべくこの要請に応えられるよう、保存技術の開発に力点を置いている。この保存の中には、長期間培養できる環境も含まれる。本年度開発した HH フィーダー細胞播種プレートは、すぐに使えるという目的に大きく近づいた技術といえる。また、トランスパレント社が中心になって実用化を進めている細胞アレイを用いた培養が、長期間肝細胞固有機能を保持することも、利便性に大いに役立つ。こういったデバイス面と、東京医科大学をモデルケースとした肝細胞調達システムを組合せ、本研究期間中に、ユーザー本位の資源供給システムを試験運用したいと考えている。

E. 結論

1. CAS(Cell Alive System)凍結に関し、磁界強度調節型 CAS 凍結機を用い肝細胞の凍結保存実験

を行ったところ効果は磁界強度に比例せず、最適値が存在するらしいことがわかった。

2. 細胞アレイ培養系の改良として、6穴および96穴プラスチックプレートに直焼きされた基板が、従来のガラス基板と同等の効果を有することを確かめた。細胞アレイ使用時に必要なフィーダー細胞(HH細胞)を播種凍結して供給するシステムを確立した。

3. ヒト皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞から分化した肝細胞様細胞に十分量の薬物代謝活性が出現することを確認した。

4. 初代培養肝細胞のアルブミン合成能と薬物代謝活性、同誘導能を、ELISAおよび液体クロマトグラフィーで解析する系を確立、コーニング社新規開発のUltraWebを評価し、細胞アレイとの比較を行った。

5. 社会システムの検討として、HAB研究機構の人試料委員会に委員として参加。報告書作成を行った。東京医科大学病院にて、手術摘出肝組織から分離した肝細胞をヒューマンサイエンス研究資源バンクに提供するための準備を、倫理的、実務的に遂行した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Zhang H, Haga S, Fukai M, Oikawa Y, Inoue H, Ogawa W, Kano A, Maruyama A, Fu XY, Todo S, Enosawa S, Ozaki M. Identification of denovo STAT3 target gene in liver regeneration. *Hepatology Research* 38(4):374-84, 2008. Epub 2007 Nov 16

2) Yamazaki T, Enosawa S, Tsukiyama T, Tokiwa T. Presence of side-population cells in an immortalized non-tumorigenic human liver epithelial cell line. *In Vitro Cell Developmental Biology* 44(1-2):6-9, 2008. Epub 2007 Dec 22.

3) Tokiwa T, Yamazaki T, Ono M, Enosawa S, Tsukiyama T. Cloning and characterization of liver progenitor cells from the scattered cell clusters in primary culture of porcine livers *Cell Transplant in press*

4) Takezawa T, Takeuchi T, Nitani A, Takayama Y, Kino-oka M, Taya M, Enosawa S. Collagen vitrigel membrane useful for paracrine assays in vitro and drug delivery systems in vivo. *J Biotech* 131(1); 76-83, 2007

5) Zhang HQ, Ohmi K, Hirasawa A, Enosawa S, Hara Y, Tamura A, Tsujimoto G. Immunological tolerance-related genes in a spontaneous tolerant model of rat liver transplantation explored by suppression subtractive hybridization. *Cell Transplant in press*.

6) 絵野沢 伸. 中国における移植不適合肝の研究利用とそこから見えるもの 上海市の Research Institute for Liver Disease を訪問して. 特集; 中国における臓器移植の現状. *日中医学* 22(1); 3-6,

2007

7) 絵野沢 伸. 市民アンケートに見る再生医療への期待と不安. *Organ Biology* 14(2):109-117, 2007

8) 絵野沢 伸. 米国の移植臓器調達のシステム形態と経済的基盤. *Organ Biology* 14(2):163-171, 2007

9) 大政健史, 絵野沢 伸. 代謝デバイスの構築と応用 バイオ人工肝からマイクロリアクター、そしてナノテクの世界へ. 動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス. pp.295-301 酒井康行, 民谷栄一監修 シーエムシー出版 2007年8月 ISBN978-4-88231-950-4

10) Satomi T, Nagasaki Y, Kobayashi H, Tateishi T, Otsuka H. Physicochemical Characterization of Densely Packed Poly(ethylene glycol) Layer for Minimizing Nonspecific Protein Adsorption, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Volume 7, Number 7, pp. 2394-2399(6), 2007.

11) Sakata T, Maruyama S, Ueda A, Otsuka H, Miyahara Y. Stable Immobilization of an Oligonucleotide Probe on a Gold Substrate Using Tripodal Thiol Derivatives. *Langmuir*, Vol. 23, No. 5: February 27, 2007, pp 2269-2272.

12) Satomi T, Nagasaki Y, Kobayashi H, Otsuka H, Kataoka K. Density control of Poly(ethyleneglycol) layer to regulate cellular attachment, *Langmuir*, Vol. 23, No. 12: June 5, 2007, 6698-6703.

13) Uchida K, Hoshino Y, Tamura A, Yoshimoto K, Kojima S, Yamashita K, Yamanaka I, Otsuka H, Kataoka K, Nagasaki Y. Creation of a mixed poly(ethylene glycol) tethered chain surface for preventing the non-specific adsorption of proteins and peptides. *Biointerphases*, 2(4),126-130, 2007.

14) 大塚英典, 里見智美, 山本雅, 中曾根佑一. 高分子表面のパターニング技術とスフェロイドアレイ. *機能材料*. Vol.27, No.11, 61-70, 2007.

15) 大塚英典, 里見智美, 多田陽子, 山本雅, 中曾根佑一. スフェロイドアレイを用いたバイオエンジニアリング. *HAB NewsLetter*, vol.14, No.1, pp.31-36, 2007.

16) 大塚英典, 片岡一則. 高分子界面設計と細胞・組織(スフェロイド)エンジニアリング. 再生医療のためのバイオエンジニアリング, 6章, pp114-128, コロナ社(2007年4月12日).

17) 大塚英典, 片岡一則. ミセル, コロイド, ナノファイバー. ナノテクノロジー入門シリーズII, ナノテクのための化学・材料入門, 共立出版, 2007年3月30日, chapter2: 高次構造, pp.36-64.

18) 大塚英典, 片岡一則. 高分子表面の微細加工技術とスフェロイドアレイ. 動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス, シーエムシー出版, 2007年8月17日, 第3章, pp.74-83.

18) Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi M, Kashimoto N, Myojin Y, Kamiya K. Differentiation of

a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 354:841-845, 2007

19) Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 89:687-696, 2007

20) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46:219-228, 2007

21) Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*, 236:3228-3241, 2007.

22) Yamamoto Y, Banas, A, Kato T, Ochiya T. Plasticity of adult stem cells into liver. *Curr. Res. in Hepatol* 1:1-18, 2007.

23) Takeuchi T, Ochiya T, Takezawa T. Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage. *Tissue Eng*. 14(2): 267-274, 2008.

24) Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*. 275(6):1260-1273, 2008.

25) Takezawa T, Takeuchi T, Yanagihara K, Nakazawa Y, Nitani A, Terada S, Ochiya T, Ueno K.

[Advantages of culture models utilizing substrata made of TOSHI (tissue/organ sections for histopathology) or collagen vitrigel membrane and their application concept for drug development researches] (和文) *Yakugaku Zasshi*. 128(1):51-60, 2008.

26) 雨宮 浩、鈴木 聡. 人体試料の研究供与とわが国の活動. *医学のあゆみ* 222-2, p99-102

27) Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Iriyama S, Ideta R, Soma T, Yano K, Kawasaki C, Suzuki S, Shirakata Y, Hashimoto K, Kishimoto J. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. *J Invest Dermatol*. (2007) 127 (9): p2106-2115

28) 町野 朔、鈴木 聡 (編集協力). バイオの法律と倫理指針. 第1回-第3回. *バイオテクノロジージャーナル* 7(4); 446-449, 7(5); 609-612, 7(5); 748-752, 2007

29) 町野 朔、鈴木 聡 (編集協力). バイオの法律と倫理指針. 第4回. *実験医学* 26(1); 91-94, 2007

2. 学会発表

1) Enosawa S, Miyamoto Y, Hirano A, Suzuki S, Kato N, Yamada Y. Application of cell array 3D-culture system for cryopreserved human hepatocytes with low-attaching capability. 8th International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Sendai, Japan 10/9-12, 2007

2) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. CYSs metabolizing activities in hepatocytes generated from human adipose tissue-derived cells. 8th International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Sendai, Japan 10/9-12, 2007

3) Ohshita H, Kobayashi E, Enosawa S, Horie T, Yoshizato K. Non-restraint biliary excretion model as a novel tool for predicting human biliary excretion in PXB-mice --chimeric mice with humanized liver. 8th International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX), Sendai, Japan 10/9-12, 2007

4) 絵野沢 伸、宮本義孝、布施英一、浅野目一機、佐倉武司、池谷武志、鈴木 聡. パターン基板と血管内皮細胞共培養の組み合わせによるヒト肝細胞スフェロイド培養系の小スケール化の試み. 第14回HAB研究機構学術年会 平成19年5月18、19日 東京

5) 佐倉武司、城村友子、絵野沢 伸、片岡一則、長崎幸夫. 創薬スクリーニングを目指した細胞アレイの開発. ポスター2) 肝細胞と薬物. 第14回肝細胞研究会 平成19年6月22、23日 鹿児島

6) 絵野沢 伸. 研究対象者保護法 07 試案を読んで (問題提起). 生命倫理政策研究会・第87回くすり勉強会 共催シンポジウム 2007年7月7日 東京

<http://homepage3.nifty.com/kinmokusei04/070707sym-po-material/no14.pdf>

7) 宮本義孝、池谷武志、絵野沢 伸. 新しい三次元培養ツール、細胞アレイのフィーダー播種基板凍結保存. 第34回日本臓器保存生物医学会学術集会. 平成19年11月16-17日 札幌 (会長賞受賞演題)

8) 絵野沢 伸. 医薬品原材料としての生物由来物質の現状. シンポジウムI. 生体材料の医薬品開発. 第34回日本臓器保存生物医学会学術集会. 平成19年11月16-17日 札幌

9) 絵野沢 伸. 患者、患者家族のリスクマネジメント. 医療の質・安全学会第2回学術集会. 平成19年11月23-25日 東京

10) 絵野沢 伸. バイオインフォマティクスと再生医療. 近畿大学生物理工学部 大学院インターフェース分野特別講義 平成20年1月17日 和歌山県紀ノ川市

11) 竹澤俊明、竹内朋代、絵野沢 伸. 生体外の組織再構築および生体内の移植に有用なコーラゲンビトリゲル担体. 第7回日本再生医療学会総会 2008年3月13,14日 名古屋国際会議場

12) 大塚英典. 高分子を中心とした表面・界面安

定化技術, 顔料物性研究会総会・研究会, 東京, 平成19年3月8日(木), 学士会館

13) 山崎直幸、上野耕治、里見智美、大塚英典. クリックケミストリーを用いた新規ハイパーブランチ型糖鎖の合成と物性評価 日本化学会第87春季年会(2007)平成19年3月25日~3月28日, 関西大学千里山キャンパス

14) 山本雅、上野耕治、里見智美、大塚英典. スフェロイドアレイを内包したハイドロゲルの作成と機能評価. 日本化学会第87春季年会(2007)平成19年3月25日~3月28日, 関西大学千里山キャンパス

15) 島田和明、里見智美、上野耕治、大塚英典. 骨芽細胞の自己組織化、粒径制御と分化機能誘導. 第56回高分子学会年次大会, 2007年5月29日~31日, 国立京都国際会館

16) 山本雅、上野耕治、里見智美、大塚英典. スフェロイドアレイを内包したハイドロゲルの作成と機能評価, 第56回高分子学会年次大会, 2007年5月29日~31日, 国立京都国際会館

17) 深石真行、藤田洋平、里見智美、上野耕治、大塚英典. 高分子を用いた界面制御とその特性評価. 色材協会創立80周年記念会議, 東京理科大学九段校舎, 平成19年9月12日(水), 13日(木), 14日(金)

18) 大塚英典、山本雅、島田和明、佐藤涼平、佐藤慈之、里見智美、立石哲也. スフェロイドアレイを内包したハイドロゲルの作成と機能評価, 第56回高分子討論会, 2007年9月19日(水)~21日(金), 名古屋工業大学

19) 大塚英典、宮越美妃、深石真行、里見智美、藤田洋平. ポリマーインターフェイスでの生体分子認識特性の解明, 第56回高分子討論会, 2007年9月19日(水)~21日(金), 名古屋工業大学

20) 里見智美、鄭雄一、位高啓史、大塚英典. 微細加工高分子表面を用いた初代およびES細胞スフェロイドのパターン培養. 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月26日(月), 27日(火) 千里ライフサイエンスセンター

21) 山本雅、里見智美、上野耕治、大塚英典. スフェロイドアレイを内包したハイドロゲルの作製と機能評価, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月26日(月), 27日(火) 千里ライフサイエンスセンター

23) Ochiya T, Hokaiwado N, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi Therapy, SPIE Photonics West 2008 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 21-22, 2008 San Jose, CA, USA.) invited

24) Yamamoto Y, Kosaka N, Kato T, Ochiya T. MicroRNA expression profile to define mouse liver development. 2007 Keystone symposia-MicroRNA and Cancer. (Jun. 10, 2007 Colorado USA.)

25) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. CYPs metabolizing

activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells. The 8th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan)

26) Ochiya T. RNAi-based anti-cancer strategy 1st International Conference on Drug Design & Discovery. (Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE) invited

27) Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. 12th Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9, 2007 Seoul, Korea) invited

28) Takeshita F, Ochiya T. MicroRNA therapy for inhibition of bone metastatic human prostate tumor cells. 2008 Keystone symposium. (Mar. 25-30, 2008 British Columbia, Canada) invited

29) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes. Genetic and functional studies. 7th International Federation of Adipose Therapeutics and Science. (Oct. 18-20, 2007 Indianapolis, USA.)

30) Ueda S, Teratani T, Tsuda H, Ochiya T. Establishment and Maintenance of Rat Embryonic Stem Cell. 第66回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)

31) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Ochiya T. Cancer Patients Own Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells as a source for stem cell-based therapy for the liver cancer. 第66回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)

32) Takezawa T, Takeuchi T, Yanagihara K, Terada S, Ochiya T. A novel culture technology utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata useful for regulating cell behavior. 第6回国際動物実験代替法会議 (2007.8.21-25 東京)

33) 山本雄介、田中稔、宮島篤、小泉史明、金井弥栄、加藤尚志、落谷孝広. マウス肝臓発生と肝がん形成に関わる microRNA の同定、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)

24) 落谷孝広. 画像イメージングと毒性病理学の接点(ワークショップ)、第24回日本毒性病理学会学術集会 (2007.2.6-7 名古屋)

25) 竹内朋代、寺谷工、落谷孝広、竹澤俊明. 再生肝由来の切片担体を利用してES細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術とその創薬研究への応用構想. 日本薬学会第128年会 (2008.3.26-28 横浜)

26) 落谷孝広. 間葉系幹細胞の肝細胞分化と肝疾患治療への応用の期待. 平成19年度再生医療等研究事業成果発表会(2008.3.11, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 絵野沢 伸、宮本義孝、池谷武志. 細胞凍結物

固定化基材及び初代肝細胞培養ツール、並びに初代肝細胞培養ツール製造方法. 特願 2007-2730995. 出願人; 国立成育医療セ、東洋合成工業
2) 大塚英典、里見智美、上野耕治. 分岐ポリアルキレングリコール誘導体、感光性組成物、架橋体及び基板. 特願 2007-3163. 出願人; 東京理科

大学

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

医薬品開発の効率化を指向したヒトCYP分子種発現細胞系を用いる新規ヒト肝薬物代謝評価系の確立

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部
研究者 中澤 憲一

研究要旨 安定供給可能なヒト肝薬物代謝予測系実現に関する研究を企画し、アデノウイルスに薬物代謝酵素発現系の予測系としての評価を行った。また、HepaRG細胞の三次元培養に関する知見、及び、薬物代謝遺伝子のエピジェネティックな発現調節に関する知見を得ることができた。

分担研究者

- | | |
|-----------------------------|------|
| (1) 東北大学大学院薬学研究科 薬物動態学分野 | 山添 康 |
| (2) 岩手医科大学薬学部 薬物代謝動態学講座 | 幅野 涉 |
| (3) 第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所 | 二宮真一 |
| (4) ファイザー株式会社 中央研究所 | 嶋田 薫 |
| (5) 大日本住友製薬株式会社 薬物動態研究所 | 水木康之 |
| (6) 田辺三菱製薬株式会社 薬物動態研究所 | 山田泰弘 |
| (7) 塩野義製薬株式会社 新薬研究所 | 馬場隆彦 |

A. 研究目的

ヒトと実験動物間での肝代謝の種差のため、医薬品開発過程では、ヒト肝初代培養細胞を用いて薬物代謝動態能が評価されている。薬物代謝動態だけでなく、薬物代謝酵素の誘導の過程も見られることは、初代肝細胞の利点ではあるが、ヒトでの誘導能が再現可能な肝初代細胞の入手は容易ではない。また、入手可能な肝細胞のほとんどは欧米人由来であり、薬物代謝能の人種差ゆえ、開発中の医薬品の安全性評価に最適ではない。さらに入手後の肝細胞を用いた代謝試験、薬物代謝酵素誘導試験を実際に行ってはじめて、入手細胞の質の良否がわかるので、効率的な活用には程遠い状況である。

そこで、本研究課題では、安定供給可能なヒト肝薬物代謝の予測系の実現を目的とした研究を企画した。

本年度は、東北大学・薬学部の山添らにより

開発されたアデノウイルス発現ベクターによるヒトCYPをはじめとする薬物代謝酵素の高発現系をベースに、

- 1) 薬物代謝酵素分子種全てを高レベルで再現性よく発現する系の構築を検討した。
- 2) 複数種の肝薬物代謝酵素をコードするcDNAを、ヒト肝癌由来HepG2細胞に導入することを試みた。

また、

- 3) ヒト不死化肝細胞株HepaRGを三次元培養系に供し、その薬物代謝酵素誘導機構の分子生物学的・細胞生物学的解析を行った。

さらに、本研究課題では、経口投与薬において初回通過効果の要因としてヒト腸管上皮細胞での代謝が重要であることを鑑み、本年度は

- 4) 薬物代謝酵素やトランスポーター遺伝子の腸管組織における発現が、DNAメチル化など「epigenetic」な機構によっても制御され、さらにこれが初回通過効果に影響する可能性について基礎的な検討を行った。

B. 研究方法

- 1) ヒト型代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用 (中澤、二宮、嶋田、水木、山田、馬場)

CYP3A4発現アデノウイルス(AdCYP3A4)及びCYP2C19発現アデノウイルス(AdCYP2C19)は、東北大学院薬学研究科・薬物動態研究室(山添康教授ら)から提供された。アデノウイルスは、凍結下、万国郵便条約の通常郵便に関する施行規則、第413条 伝染性の材料を包有する郵便物の引受条件及び表示、および、各研究施設の規定(病原体等(レベル2)の移動;受入)に基づき搬送された。HepG2細胞は、住商ファー

マ (ATCC) より Lot No. 4004528 を購入した。Human CYP3A4 + P450 Reductase + Cytochrome b₅ SUPERSOME™ (CYP3A4 SUPERSOME) は、日本ベクトンディッキングソンより購入した。

細胞ロット依存性の検討に用いた HepG2 細胞は、以下の 3 ロットを使用した: Lot no. 6804263 (American Type Culture Collection から購入)、Lot no. 4004528 (国立医薬品食品衛生研究所から供与) および Lot no. 3814638 (田辺三菱製薬(株)薬理研究所から提供)。

培養培地は、D-MEM (GIBCO) に FCS、Penicillin-Streptomycin (GIBCO) および Non-Essential Amino Acid (GIBCO) をそれぞれ 10%、100 U/mL-100 μg/mL および 0.1 mM の濃度になるように添加して調整した。

(1) 感染操作

HepG2 細胞を 24、48 または 96 ウェルプレートに 0.5×10^5 、 0.25×10^5 または 0.125×10^5 cells/well で播種した 2 日後、各ウェルの培養液を除去し、0、10、20、50 MOI/well となるように AdCYP3A4 溶液、又は、AdCYP2C19 溶液を 100、50 または 25 μL 加え、プレートをシーソーのように揺らして、ウイルス液をすべての細胞にいきわたらせて感染させた。この操作を 20 分毎に 3 回行い (20、40、60 分後)、この間プレートは 37℃ の 5% CO₂ インキュベーター内に静置した。60 分後に 500、250 または 125 μL の培地を添加し、37℃ の 5% CO₂ インキュベーターで 3 日間培養した。この間培養液の交換は行わなかった。

(2) 細胞密度の検討

HepG2 細胞を 96 ウェルプレートに、 0.125×10^5 cells/well、培地量 125 μL、 0.08×10^5 cells/well、培地量 125 μL、 0.04×10^5 cells/well、培地量 80 μL となるように播種し、上述のようにウイルス感染を行った。そのときのウイルス液量は 25 μL で実施し、ウイルス感染後の総培地量は播種時と同量とした。

(3) 代謝反応並びに代謝物濃度測定

CYP3A4 代謝活性の測定

ウイルス感染 3 日後、各ウェルから培養液を除去し、5 μM ミダゾラム含有培養液に交換し (500 μL/24 ウェルプレート、250 μL/48 ウェルプレートまたは 125 μL/96 ウェルプレート)、37℃ の 5% CO₂ インキュベーターで 1 時間反応させた。このときの培養液には FCS、抗生物質を含まないものを用いた。

代謝反応後、培地上清を 100 μL (24 ウェルプレート)、50 μL (48 ウェルプレート) および 25 μL (96 ウェルプレート) 採取し、I. S. 入りメタ

ノール溶液をそれぞれ 300、150 および 75 μL 添加し、遠心上清を LC/MS/MS で分析し、1'-ハイドロキシミダゾラム (ミダゾラムの代謝物) の生成活性 (pmol/hr/well または pmol/hr/ml) を測定した。

Km 値の算出は、96-ウェルプレートにてアデノウイルス感染 3 日後、ミダゾラム終濃度 1-25 μM、インキュベーション時間 15 分間で行った。

ミダゾラム以外の基質の代謝反応及び代謝物濃度の測定はウイルス感染 3 日後、ジアゼパム、デキストロメトルファン、アミオダロン及びオキシブチリン (終濃度: 100 μmol/L) を基質とし、60 または 120 分間インキュベーションし、培地上清中の各基質及び代謝物を LC-MS/MS にて測定した。

CYP2C19 代謝活性の測定

CYP2C19 代謝活性は基質として、ジアゼパム (終濃度 20 μM) を用いた。基質は DMSO により溶解し、終濃度は 0.1% 以下とした。インキュベーション培地にはウシ胎児血清および抗生物質を含まないものを用いた。基質液添加後、37℃ の 5% CO₂ インキュベーター中で 1 時間、2 時間あるいは 4 時間インキュベートした。培養上清の一部をサンプリングし、同量のアセトニトリル-メタノール混液 (1:1) を添加後、遠心上清中のデスメチルジアゼパム (ノルジアゼパム) を LC-MS/MS にて分析し、N-脱メチル化活性を測定した。

(4) CYP3A4 発現 HepG2 細胞での CYP3A4 に対する阻害剤の検討

96-ウェルプレートにて、アデノウイルス感染 3 日後、CYP3A4 阻害剤であるケトコナゾール (終濃度範囲: 0.0625 - 2 μM)、リトナビル (終濃度範囲: 0.0625 - 10 μM) およびエリスロマイシン (終濃度範囲: 3.125 - 100 μM) を含む培養液で 15 分間プレインキュベーションした後、各阻害剤を含むミダゾラム添加培養液 (ミダゾラム終濃度: 5 μM) に置換し、15、30 および 60 分間インキュベーションして 1'-水酸化ミダゾラム代謝活性への影響について IC₅₀ 値 (μM) を算出した。

(5) バキュロウイルス発現系による解析

市販のバキュロウイルス発現系画分である CYP3A4+P450 Reductase + Cytochrome b₅ / Supersome (BD Gentest) を用いて、CYP3A4 発現 HepG2 細胞系との比較を行った。CYP3A4 含量およびインキュベーション時間については、反応が線形性を示す初速度条件下にて行った。

まず CYP3A4/supersome でのミダゾラムの Km

値を算出するために、CYP3A4/Supersome (2 pmol CYP) を含むリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) にミダゾラム水溶液 (終濃度: 0.5 - 12.5 μ M) を添加し、反応容量を 500 μ L にした。反応開始は NADPH (終濃度: 10 mM) で行い、37°C のウォーターバス中にて 2 分間反応し、同量のアセトニトリル/メタノール混液を添加後、遠心した (3000 rpm, 15 min, 4°C)。得られた遠心上清を定量し、 K_m 値を求めた。

阻害剤の影響については、ケトコナゾール (終濃度: 0.001 - 0.1 μ M)、リトナビル (終濃度: 0.001 - 0.1 μ M) およびエリスロマイシン (終濃度: 1.5625 - 100 μ M) を用いて、前述の条件にて反応を行い、 IC_{50} 値 (μ M) を算出した。溶媒終濃度としては 0.1 % 以内で行った。

その他の基質に関しては、リン酸緩衝液に CYP3A4 Supersome 10 pmol/mL とジアゼパム、デキストロメトルファン、アミオダロン及びオキシブチニン (終濃度: 100 μ mol/L) を加え 37°C で 5 分間プレインキュベーションした後、NADPH 生成系補酵素を加え反応を開始し、37°C で 30 及び 60 分間インキュベーション後各基質及び代謝物を LC-MS/MS にて測定した。

2) アデノウイルスによる多型性ヒト型薬物代謝酵素発現カクテル細胞系の開発と応用 (山添)

(1) アデノウイルスの感染

CYP3A4 あるいは CYP2C19 を発現するアデノウイルス AdCYP3A4 ならびに AdCYP2C19 は当研究室で以前に作製したものをを用いた。

HepG2 細胞 (東北大学加齢医学研究所) を 12-well プレートに 2.0×10^5 cell/well の密度で播種した。培養 48 時間後に培地を除き、上記アデノウイルスを含む培地を 0.15 ml ずつ各ウェルに添加し、1 時間反応させることによりウイルスを感染させた。その後、0.85 ml の培地を追加して一定期間培養した。なお、培地には MEM non-essential amino acids solution (Invitrogen) および 10% fetal bovine serum (BioWest) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (日水製薬) を用い、5% CO₂-95% 空気を気相とした 37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。

(2) 酵素活性の測定

テストステロンの 6 β 水酸化活性

培地にジメチルスルホキサイド (DMSO) に溶解したテストステロンを添加し、4 時間後に 0.5 ml の培地を回収した。これに内標準物質として 10 μ l の 0.1 mM 11 α -ヒドロキシテストステ

ロンを加えた後、1 ml の酢酸エチルを加えて抽出操作を行い、代謝産物を有機層に回収した。窒素ガスにより有機溶媒を留去した後、残渣を 50% メタノールに溶解した。6 β -ヒドロキシテストステロンの定量は HPLC を用いて Shimadara (Arch Biochem Biophys, 337, 34, 1997) の報告に準じて行なった。

オメプラゾールの 5 位水酸化活性

培地に DMSO に溶解したオメプラゾールを添加し、4 時間後に 0.5 ml の培地を回収した。これに内標準物質として 50 μ l の 0.25 mM フェナセチンを加えた後、1 ml の酢酸エチル抽出により、代謝産物を回収した。窒素ガスにより有機溶媒を留去した後、残渣を 100 μ l の 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 8.5) / アセトニトリル (8:2) に溶解した。5-ヒドロキシオメプラゾールの定量は HPLC を用いて以下の条件で行なった。

カラム: Capcellpak C18 SG120 ϕ 4.6x250 mm

流速: 1.0 ml/min

検出波長: 302 nm

移動相: 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 8.5) / アセトニトリル (8:2)

ジアゼパム代謝活性

培地に DMSO に溶解したジアゼパムを添加し、24 時間後に 0.5 ml の培地を回収した。これに内標準物質として 5 μ l の 0.1 mM 2-オクソクアゼパムを加えた後、1 ml の酢酸エチル抽出により、代謝産物を回収した。以下、テストステロンの 6 β 水酸化活性の測定と同様の方法でジアゼパム代謝産物であるテマゼパムならびにノルジアゼパムの定量を行なった。

ミダゾラムの 1' 水酸化活性

培地に PBS に溶解したミダゾラムを添加し、4 時間後に培地を回収した。培地中の 1'-ヒドロキシミダゾラムの定量は LC-MS/MS を用いて行なった。

(3) ウェスタンブロット

回収した細胞を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 150 mM NaCl / 0.1% SDS / 1% NP-40 / 0.5% sodium deoxy-cholate に溶解し、遠心にて不溶性画分を除去することで細胞総抽出液を調整した。ウェスタンブロットは常法に従って行なった。一次抗体には当教室で作製した抗 CYP3A4 抗体あるいは抗ラット CYP2C11 抗体を用いた。また、CYP 含量の定量には CYP3A4 あるいは CYP2C19 を発現している Supersome (BD Biosciences) を標品として用いて行なった。

(4) 凍結ヒト肝細胞を用いた実験

凍結ヒト肝細胞 (In Vitro Technologies; Lot, 10E) を Hepatocyte Isolation Kit (Xenotech) を用いて融解した後、24 ウェルプレートに 3.0×10^5 cell/well の密度で播種し、2 mM L-glutamine (Invitrogen) を添加した Williams' medium E (Invitrogen) 中で培養した。前述の方法に従いジアゼパムの代謝活性を測定した後、細胞を回収してウェスタンブロットにより CYP3A4 ならびに CYP2C19 含量を定量した。

3) HepaRG 細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析 (中澤)

(1) HepaRG 細胞の平面培養と分化誘導

HepaRG 細胞の培養は、Williams' medium E (Invitrogen 社) 培地に 10% FBS、2 mM Glutamine、5 μ g/mL insulin、50 μ M Hydrocortisone、50 U/mL penicillin and streptomycin を加えたものを用いて、5% CO₂ を含む気相下 37℃ で行った。肝実質細胞への分化誘導は、播種後 15 日目から 30 日目まで培地中に 2% DMSO を添加することにより行った。

(2) 網羅的遺伝子発現解析

HepaRG 細胞の培養期間中 4、7、15、30 日目の細胞より RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を回収し、定法に従い蛍光分子で標識した後、Affymetrix 社 Human genome U95Av2 GeneChip にて遺伝子発現量を網羅的に定量した。定量したデータは、4 日目と 7 日目、7 日目と 15 日目、15 日目と 30 日目で比較を行い、遺伝子情報を取得して解析した。

(3) HepaRG 細胞の三次元培養

HepaRG 細胞の三次元培養はエイブル株式会社のラジアルフロー型バイオリアクター (RFB; 5 mL) を用いて行い、同時に比較検討の培養として、通常のプラスチック培養皿を用いた平面培養も行った。HepaRG 細胞は、T75 フラスコで培養して DMSO により分化誘導を行った後に回収し、 1.0×10^8 個の細胞を朝夕 2 回に分けて RFB に播種した。7 日間の培養の終了後、リアクター一部分から担体を回収し、ナイフを用いて小片に切断して RNA の採取とメチレンブルーによる細胞の染色を行った。

4) ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発 (幅野)

(1) 大腸癌細胞株における DNA メチル化解析

ゲノムデータベースを用い、プロモータ領域に CpG island を有する薬物代謝関連遺伝子を検

索し抽出した。大腸癌細胞株 6 種 (HT29、HCT116、DLD1、LoVo、SW48、SW620) を対象に、上記の遺伝子の CpG island における DNA メチル化状態を bisulfite sequencing 法を用いて解析した。

(2) 大腸癌 (正常) 組織における DNA メチル化解析

大腸癌 3 症例の癌組織および正常組織を対象に、腺管分離法を用いて上皮細胞のみを分離・回収し、(1) で DNA メチル化が検出された遺伝子を解析した。

(3) 5-aza-dC 処理による脱メチル化の誘導

(1) で DNA メチル化が検出された培養細胞に、5-aza-dC (0、0.5、5 μ M) を 24 時間暴露し、96 時間培養後、ゲノム DNA および RNA を回収した。

(4) COBRA 法による DNA メチル化の解析

メチル化状態を定量的かつ簡便に解析するため、COBRA (combined bisulfite restriction analysis) 法を設計し、同法を用いて (3) のゲノム DNA サンプルを解析した。

(5) real-time PCR による mRNA 発現量の解析

SYBR Green I 色素または TaqMan プローブを用い、7500 Real-time PCR System を使用して (3) の RNA サンプルを解析した。

(倫理面への配慮)

分担課題 ヒト型代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用とアデノウイルスによる多型性ヒト型薬物代謝酵素発現カクテル細胞系の開発と応用 では市販凍結ヒト肝細胞および HepG2 細胞と Supersome を使用した。凍結ヒト肝細胞は In Vitro Technologies 社において連結不可能匿名化を行った後市販されているものである。HepG2 細胞は、ヒト由来であるものの、株化された培養細胞である。両細胞とも一般的に用いられているものである。また Supersome は昆虫細胞にバキュロウイルス感染させた細胞からミクロソーム画分を調製したもので、一般的に用いられているものである。故にこれら試料については倫理的な問題はないと考える。

受託課題 HepaRG 細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析 では、フランス INSERM にて樹立された HepaRG 細胞を用いたが、株化された培養細胞であり倫理的な問題はないと考える。

分担課題 ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発 では癌患者の癌組織由来の DNA、RNA 等を解析するため、以下の手続きを経て実施した。

(1) 学内倫理委員会における審査・承認

(2) 試料提供者に対する文書における事前説明

と自由意志による同意

(3) 試料の匿名化による個人情報の保護、厳重管理

(4) 研究従事者の守秘義務の徹底

C. 研究結果

1) ヒト型代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用

(1) アデノウイルス感染効率の HepG2 細胞ロット依存性の検討

CYP3A4 発現アデノウイルスを用いて、3 ロット (Lot no. 6804263, Lot no. 4004528 および Lot no. 3814638) の HepG2 細胞に CYP3A4 を発現させたときの活性値のロット間差について、プローブ基質としてミダゾラムとテストステロンを用いて検討した。その結果、何れのロットにおいても、感染価に依存して代謝活性は上昇した。Fig. 1 に 25 μ M テストステロンの結果を示す。また、各感染価での活性値は、何れのロットの HepG2 細胞においても類似していたが、テストステロンを基質とした場合のみ基質濃度に依存した代謝活性のわずかな上昇が認められた。

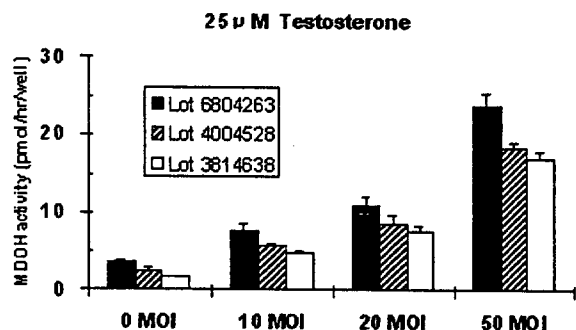


Fig. 1 アデノウイルス感染量と代謝活性の関係

(2) アデノウイルス感染プレートのスモールスケール化の検討

AdCYP3A4 発現系

HepG2 細胞に CYP3A4 発現アデノウイルスを感染させ、ミダゾラムの代謝活性について検討した。その結果、昨年度と同一条件で行った 24 ウェルプレートでは、同程度のミダゾラム代謝活性がみられ、CYP3A4 発現 HepG2 細胞の作製について再現性が確認された。また 48 ウェル、96 ウェルとスケールダウンを行ったところ、ウイルス感染価依存的に代謝活性は上昇した (Fig. 2)。

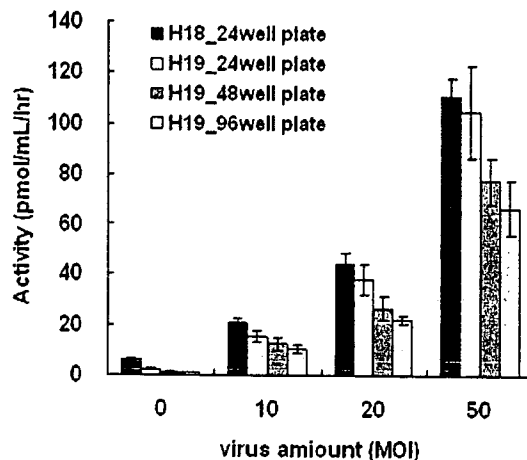


Fig. 2 感染プレート間でのウイルス量依存的なミダゾラム代謝活性の比較

更に、96 ウェルプレートを用いて、細胞密度を変えることによるミダゾラム代謝活性への影響を検討した結果、細胞濃度およびウイルス感染価依存的に代謝活性は上昇した (Fig. 3)。

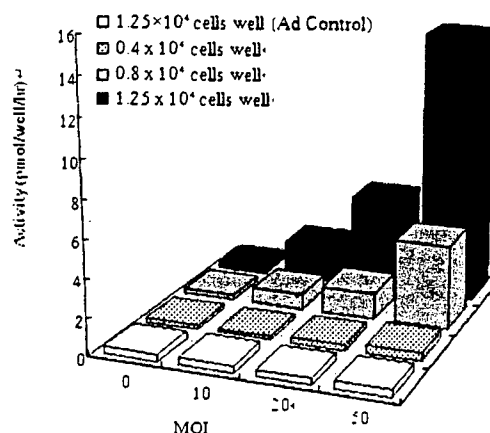


Fig. 3 細胞濃度およびウイルス感染価のミダゾラム代謝活性に及ぼす影響

このことから、CYP3A4 発現 HepG2 細胞の作製において、細胞数やウイルス使用量から効率的な 96 ウェルプレートの使用が可能であると判断した。

CYP3A4 発現 HepG2 細胞及びパキュロウイルス発現 CYP3A4/Supersome でのミダゾラムを用いた速度論的解析の結果、それぞれの Km 値は 5.5 μ M および 1.5 μ M であり、同程度の親和性であることが確認された。

AdCYP2C19 発現系

24 ウェルプレートを用いた場合の AdCYP2C19 感染効率と代謝反応時間について検討した結果、ジアゼパムの N-脱メチル化活性は、ウイルス感染効率の増加に相関して上昇し、代謝反応時間

4 時間、感染効率 50 MOI の条件下では 3.95 ± 0.53 pmol/hr/well の代謝活性レベルを示した。そこで、代謝反応時間を 4 時間に固定し、本系のスモールサイズ化について検討した。その結果、48 ウェルプレートおよび 96 ウェルプレートにおいても培養液 0.5 mL あたりに換算すると 24 ウェルプレート (11.732 ± 0.28 pmol/hr/0.5 ml) と同様な活性レベルを示し、CYP2C19 活性の測定が可能であることを示唆する結果が得られた。

(3) CYP3A4 発現 HepG2 細胞での CYP3A4 に対する阻害剤の検討

CYP3A4 発現 HepG2 細胞を用いてミダゾラムの代謝活性に対するケトコナゾールの阻害活性を検討したところ、ケトコナゾール濃度依存的にミダゾラム代謝活性は減少した。IC₅₀ 値は 0.05-0.15 μM と算出された。一方、CYP3A4/Supersome を用いた場合は 0.007 μM となり、CYP3A4 発現 HepG2 細胞と比べ強い阻害を示した。

同様にリトナビルの阻害効果を検討したところ、CYP3A4 発現 HepG2 細胞では IC₅₀ 値が 0.12-0.16 μM、CYP3A4/Supersome では IC₅₀ 値が 0.01 μM となり、ケトコナゾール同様に CYP3A4/Supersome の方が強い阻害を示した。

一方、エリスロマイシンでの阻害効果を検討したところ、CYP3A4 発現 HepG2 細胞では IC₅₀ 値は 16.9 - 19.5 μM、CYP3A4/Supersome では IC₅₀ 値は 13.9 μM となり、両系で同程度の阻害を示した。

(4) 各種基質に対する CYP3A4 発現 HepG2 細胞の代謝活性の検討

CYP3A4 発現 HepG2 細胞と CYP3A4/Supersome によるジアゼパム、デキストロメトルファン、アミオダロン及びオキシブチニンの代謝活性を測定した。その結果、代謝物生成量の間には高い相関が認められた(相関係数:0.9587、Fig. 4)。

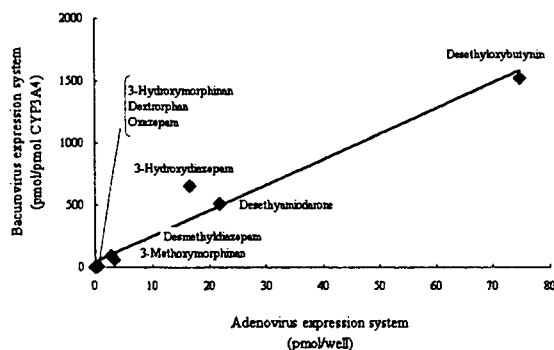


Fig. 4 CYP3A4 発現 HepG2 細胞と CYP3A4/Supersome による代謝物生成量の間相関

2) アデノウイルスによる多型性ヒト型薬物代謝酵素発現カクテル細胞系の開発と応用

(1) 単一 CYP 分子種発現細胞

単一の CYP 分子種を発現させて、感染後の CYP 発現量の変動を調べた結果、いずれの分子種においても感染 5 日後まで、酵素活性はほぼ直線的に増加した。次に、アデノウイルス感染量と CYP 分子種発現量の関連性を調べた結果、CYP3A4 と CYP2C19 のいずれについてもウイルス感染量に依存してアポタンパク質レベルは増加した。酵素活性については、CYP3A4 の場合は 75 MOI まで、CYP2C19 の場合は 50 MOI まで直線的に増加したが、それ以上では飽和する傾向が認められた。

さらに、ジアゼパムを基質として各種阻害薬の阻害効果を調べた。ジアゼパムは CYP3A4 あるいは CYP2C19 に代謝されると主にテマゼパムならびにノルジアゼパムに変換されることが報告されているが、本システムにおいても同様の結果が得られている(データ示さず)。CYP3A4 によるテマゼパム生成反応におけるケトコナゾールの IC₅₀ 値は 0.1 μM であり、CYP2C19 によるノルジアゼパム生成反応におけるミコナゾール、フルコナゾールならびにフルボキサミンの IC₅₀ 値はそれぞれ 0.2 μM、14.3 μM ならびに 0.8 μM であった。

(2) CYP3A4・CYP2C19 同時発現細胞

次に、CYP3A4 と CYP2C19 を同時に発現する細胞株の作製を試みた。CYP2C19 の発現量には遺伝的多型に基づく著しい個人差の存在が知られていることから、一定量の CYP3A4 と様々な量の CYP2C19 を発現する細胞の作製を目指し、HepG2 細胞に 50 MOI の AdCYP3A4 と 0-50 MOI の AdCYP2C19 を同時に感染させた。なお、コントロールウイルスを用いて全ウイルス量を 100 MOI に調整した。

まず、これら細胞における両 CYP 分子種のアポタンパク質レベルを測定したところ、いずれの細胞においても CYP3A4 タンパク質レベルはほぼ一定であり、また CYP2C19 タンパク質レベルは AdCYP2C19 の感染量に相関して増加した。

次にジアゼパム代謝について検討した。その結果、テマゼパムの生成量は CYP2C19 の発現量に関わらずほぼ一定であったのに対し、ノルジアゼパムの生成量は AdCYP2C19 の感染量に応じて増加した(Fig. 5)。

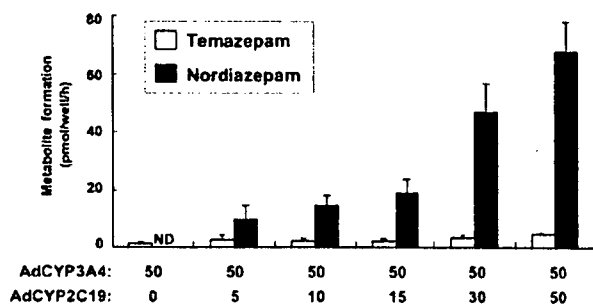


Fig. 5 CYP3A4 及び CYP2C19 共発現細胞のジアゼパム代謝プロファイル

最後に、ヒト凍結肝細胞を用いてジアゼパム代謝反応と CYP 分子種アポタンパク質レベルを測定し、本システムと比較した。用いたヒト肝細胞の CYP3A4 と CYP2C19 の含量比は約 25 対 1 であり、これは AdCYP3A4 と AdCYP2C19 をそれぞれ 50 MOI ならびに 5 MOI で感染させた時（約 16:1）と同程度であった。この細胞におけるジアゼパム代謝反応を解析したところ、テマゼパムに比べてノルジアゼパムが優位に産生された。また、この時のウェルあたりの反応速度は、AdCYP3A4 と AdCYP2C19 をそれぞれ 50 MOI ならびに 5 MOI で感染させた時と同程度であった。

3) HepaRG 細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析

(1) HepaRG 細胞の平面培養による網羅的発現遺伝子解析

培養期間中の 4、7、15、30 日目において細胞から RNA を抽出して遺伝子発現解析を行った。4-7 日目においては、細胞周期や有糸分裂に関わる遺伝子の発現が大きく低下した。また、アルコール脱水酸化酵素群の上昇も顕著であった。7-15 日目においては、急性期反応の指標である CRP (C-reactive protein) が最も大きく上昇し、他の急性期系遺伝子や補体系遺伝子の発現も上昇した。また、薬物代謝酵素である CYP 遺伝子ファミリーのうち CYP1A1 のみ発現量が大きく上昇した。15-30 日目においては、CYP 遺伝子ファミリーのうち、CYP3A4 に加え、CYP2 群の発現量が大きく上昇した。

7-15 日目において発現が上昇した急性期系に注目して他の関連遺伝子の発現を GeneChip のシグナル値を比較して解析したところ、急性期系の上流遺伝子である IL-6 の発現量が培養の 7 日目にのみ突出して高い発現が見られた。一方、他の急性期系に関わるサイトカイン遺伝子には変動が見られなかった。

(2) HepaRG 細胞の三次元培養

5 mL 容量の RFB を用い、分化誘導後の HepaRG 細胞を 1×10^8 個播種して、7 日間培養を行った。三次元培養終了後、PVA に付着した HepaRG 細胞をメチレンブルーで染色したところ、細胞の分布は一様ではなく、円筒状の担体の周縁部は濃く染まり、細胞が高密度の状態にあったと思われる。一方、内部は比較的染色が薄く、担体が露出している間隙が多く見られ、HepaRG 細胞の多くは増殖期にあったと考えられる。

Real-time PCR を用いて CYP3A4 の発現量変化を調べたところ、比較対照として行った平面培養が最も高い発現量を示した。

4) ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

(1) 12 種の薬物代謝関連遺伝子 (CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4, AhR, Arnt, CAR, PXR, NR2F1, SLC01B1, SLC10A1, CES2) を検索した結果、4 種の遺伝子 (CYP1A1, CYP1B1, NR2F1, CES2) においてプロモータ領域における CpG island が確認された。このうち CYP1B1, NR2F1, CES2 遺伝子の DNA メチル化状態を 6 種の大腸癌細胞株を対象に解析した結果、CYP1B1 遺伝子のメチル化が SW48 細胞において検出された。

(2) CYP1B1 遺伝子の DNA メチル化は大腸癌組織では 3 例中 1 例において検出された。一方、大腸正常組織では検出されなかった。

(3), (4) SW48 細胞や癌組織における CYP1B1 遺伝子のメチル化は、プロモータ領域の CpG island 全体で起こる。そこで Taq I および Mvn I 認識部位におけるメチル化状態を解析できるように COBRA 法を設計した。5-aza-dC 処理により SW48 細胞では CYP1B1 遺伝子の脱メチル化が誘導された。この脱メチル化の程度は 5-aza-dC の濃度に依存して増加した。

(5) CYP1B1 遺伝子の発現量は 5-aza-dC 濃度、すなわち脱メチル化の程度に依存して増加した (0.5 μ M で 6~7 倍、5 μ M で 20 倍程度)。一方、CYP1B1 遺伝子の発現をシグナル伝達系の上流で制御する AhR, Arnt の遺伝子発現量は、5-aza-dC 処理でも変化が認められなかった。これらの結果は CYP1B1 遺伝子の発現が、自身のプロモータ領域のメチル化によって制御されることを示唆した。

D. 考察

1) ヒト型代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用

AdCYP3A 発現系では、24 ウェルプレートを用

いたミダゾラム水酸化活性評価において、昨年度とほぼ同様の活性値とほぼ同様のウイルス感染価依存的な上昇を示し、本細胞系が再現性に優れた系であることが示唆された。また、各施設において代謝活性値に若干のばらつきはあるものの、同様の傾向が確認できた。更に、アデノウイルス感染価と CYP3A4 活性値の相関性における細胞ロット間差を検討したところ、何れのロットの HepG2 細胞においても感染価に依存して代謝活性は上昇し、その上昇プロファイルと活性値でロット間差はほとんど認められなかった。以上より、本系は高い再現性を有し、ヒト肝細胞の代替として CYP3A4 代謝活性を十分評価できる系と思われる。

48 および 96 ウェルプレートを用いた検討では、両プレートともに 24 ウェルプレートと同様の MOI 依存的な活性の上昇がみられ、本細胞系をスモールスケールダウン化しても活性評価が可能であることが示唆された。スモールスケール化することにより、多くの化合物の評価が可能になり、また種々の条件による検討も可能になるため、今後本細胞系を用いて様々な応用ができると考えられる。

各種プレート間での活性の比較、および細胞密度による活性の比較を行った結果、いずれも概ね細胞数に依存した活性の上昇がみられた。したがって、今後 96 ウェルプレートを用いた評価系においては細胞数を増やすことによってより高活性な評価系が構築できることが示唆された。

また CYP3A4 発現 HepG2 細胞とバキュロウイルス発現 CYP3A4/Supersome 画分での阻害試験の結果では、たとえばケトコナゾールでは IC₅₀ 値は 0.05-0.15 μM と算出され、阻害作用を検討する試験系として有用であると考えられた。その一方で、両法において若干の乖離がみられたが、これは、化合物の細胞内移行やタンパク結合率などに起因するものと思われる。

さらに、各種基質に対する CYP3A4 発現 HepG2 細胞の代謝活性を検討した結果、CYP3A4 発現 HepG2 細胞と CYP3A4/Supersome による代謝物生成量の間には高い相関が認められ、この結果からも本系の有用性が示された。

AdCYP2C19 発現系においても、感染効率 (0, 10, 20, 50 MOI) に依存的な CYP2C19 活性の上昇が、24 ウェルプレートにおいて確認された。さらに 48 ウェルプレートおよび 96 ウェルプレートにおいても、24 ウェルプレートと同様、感染効率に依存的な活性レベルが上昇しているこ

と、および、同じ感染効率においては CYP2C19 活性レベルはほぼ同様の値が得られていることから、本試験系はスモールサイズ化が可能で、創薬探索時における CYP2C19 代謝評価に有用であることが示唆された。

2) アデノウイルスによる多型性ヒト型薬物代謝酵素発現カクテル細胞系の開発と応用

アデノウイルスベクターを用いたヒト CYP 発現システムは、アデノウイルスの感染量を調節することで CYP 分子種の発現量が調節可能である。今回は CYP3A4 と CYP2C19 の 2 分子種の共発現を行い、それぞれの酵素により異なる代謝経路で代謝されることが知られているジアゼパムを用いて、本アデノウイルスシステムとヒト肝細胞における代謝プロファイルと比較検討した。その結果、今回用いた肝細胞の代謝プロファイルは、AdCYP3A4 と AdCYP2C19 の MOI 比を、この肝細胞における CYP3A4 と CYP2C19 の含量比とほぼ同程度の発現量比が得られる 50:5 で感染させた HepG2 細胞における代謝プロファイルと非常に良く一致していた。今回の解析では、本システムで複数の CYP 分子種を任意の比率で同時に発現させることが可能であることが確認された。現時点では CYP3A4 と CYP2C19 の 2 分子種の共発現しか行っていないが、理論的には全てのヒト CYP 分子種を、ヒト肝における含量比で同時に発現させることも可能である。さらに、そのような細胞において、遺伝的多型の知られている CYP2C19 や CYP2D6 の発現量を調節することで、各 CYP 分子種の extensive metabolizer や poor metabolizer を模した細胞を構築することも可能であると考えられる。CYP 発現アデノウイルスと株化培養細胞を用いた本システムでは、再現性良く CYP 発現細胞を供給することが可能であり、ヒトの薬物代謝を予測する新たな *in vitro* ツールとして有用であると考えられる。

ただし、単独 CYP 分子種発現細胞においてウイルス感染量を 50 MOI 以上に増加させた場合には、アポタンパク質レベルと酵素活性の間には必ずしも相関関係は認められなかった。この原因は現時点では不明であるが、CYP はヘム含有酵素であるため、CYP アポタンパク質レベルが大過剰の状態となった HepG2 細胞では、ヘムの供給が不足している可能性も考えられる。従って、基質の種類や基質濃度によっては発現レベルを制限する必要があるかもしれない、より多くの分子種を同時発現させる場合には感染させる総アデノウイルス量も多くなると考えられることから、感染量と酵素活性の相関性について、

今後より詳細に検討する必要があると思われる。

3) HepaRG 細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析

三次元培養した HepaRG 細胞の遺伝子発現の変化を経時的に解析した結果、7-15 日において、急性期系に関する遺伝子群の上昇が見られた。さらに、上流の遺伝子である IL-6 の発現と下流遺伝子の発現には時間的な遅延が観察された。IL-6 は肝の損傷時に肝実質細胞に作用して G0/G1 の移行を促進する作用があり、肝の再生に必須であることが知られている。IL-6 が HepaRG 細胞にどのように作用するか現時点では不明であるが、細胞の増殖を制御する因子として、作用機序の解明が望まれる。

分化誘導後の HepaRG 細胞は三次元条件下で培養が可能であることが確認された。しかし、CYP3A4 の発現量を比較した結果、比較対照として用いた平面培養の細胞が最も高い値を示した。分化誘導後の HepaRG 細胞を疎に播種し直すと、CYP3A4 の発現量は急速に低下するが、細胞密度が高いと CYP3A4 の発現量が維持される傾向にある。リアクター培養終了後に担体上の細胞をメチレンブルーにより染色したところ、周縁部に細胞が密集し、内部は比較的空隙が残されていた。また、細胞数の概算から作成した増殖曲線により、培養終了時、細胞はまだ対数増殖期であったことが推測される。したがって、担体内の細胞密度は平面培養に比べて薄い状態であり、このことが CYP3A4 の発現量の差につながったと考えられる。

4) ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

CYP1B1 遺伝子の発現が DNA メチル化によって制御されることが示された。CYP1B1 のような薬物代謝関連遺伝子が、生理的な環境においても DNA メチル化により発現が制御されているのかは依然不明である。だが、少なくとも「癌」をはじめとした病的な環境では、DNA メチル化状態の変化によって薬物代謝機能の変化が起こり得ることは明らかになった。このことは初回通過効果を適正な評価するためには、従来の遺伝子多型の情報だけでなく、薬物代謝関連遺伝子の epigenetic な変化に関する情報も必要となることを示唆した。

今後はさらに多くの薬物代謝関連遺伝子について同様の探索を行い、初回通過効果の評価に応用するための基礎的な検討を行う

E. 結論

AdCYP3A4 を用いて HepG2 細胞に発現される CYP3A4 量は、HepG2 細胞のロットに依存しないことを明らかにし、ロットが違っていても、同等の CYP3A4 活性を有する発現系細胞を常に安定的に創薬研究に提供できる可能性が示された。

AdCYP3A4 感染 HepG2 細胞のスマールスケール化を検討した結果、96 ウェルプレートにおいてもミダゾラム水酸化活性が観察された。AdCYP2C19 を用いた HepG2 細胞発現系においても同様の結果が観察された。以上の結果から、本発現細胞を用いたヒト代謝研究のハイスループト化が可能であることが示唆された。

さらに、CYP3A4 発現 HepG2 細胞の各種阻害剤による阻害試験、ならびに、各種基質に対する代謝活性試験の結果より、本系が十分評価可能な系であることが示唆された。

CYP3A4 に関しては複数の基質結合部位を有すると考えられているため、基質を変えることによる CYP3A4 に対する阻害試験や時間依存的阻害や mechanism-based inhibition など阻害試験系への応用が期待される。

AdCYP3A4 と AdCYP2C19 を共発現する HepG2 細胞を作製し、その薬物代謝反応プロファイルをもヒト肝細胞のそれと比較検討した結果、*in vivo* の薬物代謝プロファイルは再現可能であった。

以上初年度の解析により、アデノウイルスによる薬物代謝酵素発現系は、CYP 酵素活性の多型性を考慮してヒト肝における薬物代謝の予測ができる新たな *in vitro* 実験系として有用であるという知見を蓄積することができた。

ヒト不死化肝細胞株 HepaRG の薬物代謝酵素誘導機構の分子生物学的・細胞生物学的解析を行った結果、増殖期から分化における継時的な HepaRG 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析することによって、HepaRG 細胞の特性を理解し、今後の研究の基礎となる有用なデータベースを作成することができた。

更に、HepaRG 細胞の三次元培養においては、HepaRG 細胞を三次元的に増殖させ、CYP3A4 の基礎発現を確認することができた。さらに、リアクター内の位置による CYP3A4 の発現量の違いを正確に把握することができた。しかしながら、CYP3A4 の発現量は平面培養の方が高かった。したがって、今後は、リアクター内に高密度に増殖させる条件の検討などが必要であると考えられる。

薬物代謝酵素やトランスポーター遺伝子の腸管組織における発現に対する DNA メチル化など epigenetic な機構による制御について基礎的な検討を行った結果、薬物代謝関連遺伝子の発現が epigenetic な機構によって制御される可能性を示す知見を得ることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

T Matsubara, W Noracharttiyapot, T Toriyabe, K Yoshinari, K Nagata, and Y Yamazoe: Assessment of human pregnane X receptor-involvement in pesticide-mediated activation of CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* (2007) 35, 728-33.

2. 学会発表

1) Kazunobu Aoyama, Hye-Ji Kim, Kiyoshi Nagata, Kouichi Yoshinari, and Yasushi Yamazoe: Cytochrome P450 co-expressing adenovirus as a tool to predict human drug metabolism. 第8回 International meeting of ISSX (2007年10月10-12日、仙台)

2) Koyama, K., Miura, S., Okazaki, O., Mizuno, K., Shimada, K., Baba, T., Sekiya, Y., Komuro, K., Ninomiya, S., Yamada, Y., Miyajima, A., Sunouchi, M., Aoyama, K., Yoshinari, K., Nagata, K., Yamazoe, Y. and Ohno, Y.: Application of an Adenoviral Human CYP Expression System toward a Study for the Prediction of In Vivo Metabolism in Humans. 第8回 International meeting of ISSX (2007年10月10-12日、仙台)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ヒト胚性幹細胞 (ES細胞) に由来する血管内皮細胞の安定大量供給のための方法論の確立—基礎研究および薬効評価・毒性試験のためのヒト材料提供を目的として—

所属 国立国際医療センター研究所血液疾患研究部
研究者 佐伯 久美子

研究要旨 胚性幹細胞 (embryonic stem cell (ES 細胞)) はその無限増殖能と多能性分化能とから再生医療における有望な材料と期待され、昨今は、霊長類 ES 細胞の研究が注目されている。再生医療への応用のためには、異種動物由来の成分 (マウス由来フィーダー細胞やウシ胎児血清) の混入を回避する方策が急務である。本研究では、まず、ヒト ES 細胞研究の基礎検討として、あるいは、ヒト ES 細胞で制限されている研究を補うために、カニクイザル ES 細胞を用いて、無フィーダー分化誘導系による血管内皮細胞の産生を試みた。さらに、ヒト ES 細胞を用いて、未分化維持継代培養における無血清・無フィーダー・増殖因子無添加培養を確立した後に、このような動物成分成分を排除した未分化ヒト ES 細胞を出発点として、無フィーダー分化誘導系を駆使して血管内皮細胞の産生を試みた。血液細胞の分化誘導に至適とされる培養条件 (15%牛胎児血清と 6 種類のサイトカイン・増殖因子 (vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenic protein 4 (BMP-4), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6))) で培養を行い、血管内皮細胞の分化誘導が極めて順調に進捗した。培養法の基本は、前半の sphere 形成浮遊培養と後半の接着平面培養であり、マウスフィーダー細胞との共培養は用いなかった。その結果、敷石状の (cobblestone) 細胞の増殖を経て (サルの場合は、さらに、中心部での嚢状構造物 (sac-like structure) の形成を経て)、継代可能な血管内皮細胞が誘導された。均一な形態、全ての細胞での eNOS、von Willebrand factor、アセチル LDL 取込能陽性から、ほぼ 100% が血管内皮細胞と考えられ、未分化 ES 細胞の残存、平滑筋細胞の混在、リンパ管内皮細胞の誘導、マウス細胞の混入は全て否定されたが、血管内皮細胞特異的マーカーである VE-cadherin、PECAM-1 の解析から、双方陽性群と双方陰性群が混在することが示された。また、誘導された血管内皮細胞は、in vitro と in vivo の双方の機能を有することも確認された。また、分担研究においても、無フィーダー分化培養系において、ヒト ES 細胞由来のヘマンジオブラストとサル ES 細胞由来の血管構成細胞として重要な平滑筋細胞が誘導された。以上より、独自の無フィーダー分化誘導システムを駆使して、サル及びヒト ES 細胞からの極めて高効率な成熟機能を有する血管内皮細胞産生系を確立した。

分担研究者

(1) 近藤 靖

田辺三菱製薬 (株) 研究本部先端医療研究所
先端医療研究部 再生医療グループ
グループマネージャー

(2) 熊野 恵城

東京大学医学部付属病院無菌治療部
CREST 研究員

A. 研究目的

胚性幹細胞 (embryonic stem cell (ES 細胞)) はその無限増殖能と多能性分化能とから再生医療における有望な材料と期待されている。すでにマウス ES 細胞から試験管内で成体組織の作成が報告され、昨今は、霊長類 (サルおよびヒト) ES

細胞の研究が注目されている。また、ここ 2、3 年は、線維芽細胞などの体細胞を初期化して ES 細胞と同等の細胞 (induced pluripotent stem cells、iPS 細胞) を作成することに成功したとの報告が相次ぎ、ヒト iPS 細胞を用いた研究が活発化してきた。しかし、再生医療への応用のためには、先ず第 1 に、均一な分化誘導が容易ではない霊長類 ES 細胞 (ヒト iPS 細胞を含む) の高効率で均一な分化誘導系を確立することが重要である。第 2 には、異種動物細胞 (マウス由来フィーダー細胞) の混入を回避する培養法を開発することである。すなわち無フィーダーで高効率な分化誘導システムの開発が極めて重要である。

血管は全身の組織に分布しており、酸素や栄養成分の供給や老廃物の除去に必須であるのみなら

ず、脳を含む様々な組織の再生過程における組織幹細胞の適切部位への移動に重要な役割を果たしている。また癌における腫瘍血管や、糖尿病性網膜症における新生血管など、様々な疾患の病態進行への寄与も大きい。即ち、ヒト血管内皮細胞を材料とする基礎研究や臨床試験は、血管障害性疾患にとどまらず広範な疾患群を対象とする極めて需要の大きい分野である。換言すれば、ヒト血管材料の安定供給ベースを作成することは、創薬等の医療産業の発展における影響が甚大である。

しかしながら、ヒト生体から採取された血管内皮細胞は供給が非常に限られており、無限増殖能を持つヒト胚性幹細胞（ヒトES細胞）から血管内皮細胞を作成して供給することに大きな期待が寄せられてきたが、現在まで高効率にヒトES細胞から血管内皮細胞を分化誘導する技術は確立されていない。とりわけ、1) FACS装置等を使用した分画精製を要せず、2) 無フィーダー培養で、3) 高効率 (> 20%以上) な血管内皮細胞産生を可能とする技術は世界的に報告がない。

すでに申請者らはカニクイザルES細胞から無フィーダー培養にて血管内皮細胞を従来より高効率で分化誘導する技術をほぼ確立している。しかも、この手法はマウスフィーダー細胞の混入を排除できる無フィーダー培養である。このような技術をヒトES細胞研究にも応用することで「ヒト血管内皮細胞の安定大量供給」という医学研究界および医療産業界が待ち望んでいたシステムが完備されることとなり、基礎研究と医薬産業の発展における大きな貢献が期待される。

本研究では、ヒトES細胞を用いて、まず、無フィーダー・無血清・増殖因子無添加で未分化維持維持継代培養を安定化させて、そこから更に、無フィーダー分化誘導系を確立して、高効率な血管内皮細胞の産生システムの開発を目指す。なお、ヒトES細胞は、文科省の指針により、使用計画に書かれていない解析を急遽行う、あるいは、当研究室外には持ち出すなどの自由な研究の展開が不可能であるために、サルES細胞での検討を平行されることが避けられない。本研究においては、その様なサルES細胞を用いた基礎検討も平行して推進する。また、分担研究においては、ヒトもしくはサルES細胞からより未分化な段階の細胞（例えば hemangioblast、もしくは、血管内皮細胞と壁細胞の両方に分化しうる vascular progenitor cells, VPC）の分化誘導も試みた。なお、この系においては、フィーダー細胞との共培養も含めて基礎的段階から検討した。

B. 研究方法

1. 細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞（murine embryonic fibroblasts, MEF）はマイトマイシンC（MMC）処理またはX線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。ヒトES細胞（KhES-3）およびカニクイザルES細胞（CMK-6）は、MMC処理MEF上で20%KSR存在下に無血清培養により継代した。無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養に際しては、20%KSR存在下で、マトリゲル上で培養した。コロニーの大きさやディッシュ上でのコロニー密度に注意し、継代時の剥離はトリプシンとコラゲナーゼを用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells, HUVEC）、ヒト大動脈内皮細胞（human aortic endothelial cells, HAEC）、ヒトリンパ管内皮細胞（human dermal lymphatic microvascular endothelial cells, HMVEC-dLy）、ヒト大同若平滑筋細胞（human aortic smooth muscle cells, AOSMC）は、ロンザグループ社から購入した。

2. 分化誘導プロトコール

未分化ヒトES細胞をコラゲナーゼ・トリプシン含有剥離液処理により回収した後に、CellSeed社のHydro cellを用いて3日間スフェア

（sphere）形成させた。未分化サルES細胞の場合は、コラゲナーゼ処理によりMEFの混入を避けて回収した後に、ハンギングドロップ方により3日間スフェア（sphere）形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6種類のサイトカイン・増殖因子（vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6)) を添加した。その後、スフェアはゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。サイトカイン・増殖因子は同様の6種類である。ヒトの場合、平面培養後、2週間以内に敷石状の細胞が増殖して、その継代培養によって血管内皮細胞が分化誘導された。サルの場合は、2週間程度の平面培養で、スフェアが着地した箇所に嚢状構造物が形成され、その継代培養によって血管内皮細胞が分化誘導された。

一部の実験においては、ヒトES細胞（KhES-3）を、thrombopoietin (TPO), bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (Flt3-L), interleukin 3 (IL-3), interleukin 6 (IL-6) 存在下で10日間胚様体を形成させた後にフィーダー細胞（マウスストローマ細胞 OP9）と共培養した。また、一部の実験

においては、サル ES 細胞 (CMK-6) を、フィーダー細胞 (マウスストローマ細胞 OP9) と共培養した。

3. 形態学的組織化学的観察方法

生細胞は、培養皿や培養フラスコのまま倒立顕微鏡により形態観察した。浮遊状態の血液細胞はスライドガラス表面にサイトスピン固定した後に、ライトギムザ染色、ミエロペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色などを行い、正立顕微鏡により観察した。

4. フローサイトメトリー

膜表面抗原の同定は、細胞を PBS 中で 1 時間 1 次抗体と反応させた後に FACSCalibur を用いて解析した。解析した抗原は、VE-cadherin、PECAM-1 (CD31)、CD34、Tie-2、VEGF-R1 (Flt-1)、VEGF-R2 (KDR, Flk-1)、VEGF-R3 (Flt-4)、SSEA-4 である。

一部のサル ES 細胞の実験においては、VEGF-R2 (KDR, Flk-1) 陽性細胞をセルソーターで分取して培養した。

5. 免疫染色法

細胞の免疫染色は、細胞をアセトン・メタノール固定した後に、1 次抗体と反応させ、アレクサ標識 2 次抗体と反応させて、蛍光顕微鏡により観察した。解析した抗原は、VE-cadherin、Nanog、 α smooth muscle actin、eNOS、von Willebrand factor (vWF) である。

6. ウェスタンブロッティング

既報の手法によってウェスタンブロッティングを行った。2 次抗体と発色は ECL キットを用いた。解析した抗原は、calponin、LYVE-1、Prox-1、Oct-3/4、Nanog、 β -tubulin である。

7. PCR

ゲノム PCR は、マウス Iy9.2 とサル CD34 に関して、所定に方法にて行った。RT-PCR は、grobin ϵ 、globin ζ 、 β actin に関して、所定の方法にて行った。

8. 索状構造形成能

血管内皮細胞機能である索状構造形成能 (cord-forming activity) は、マトリゲルコートディッシュ上で行われた。培養液は EGM-2 キットを用い、索状構造形成は倒立顕微鏡にて観察した。

9. コロニーアッセー

造血コロニーアッセーは、市販のキットを用いて、メチルセルロース中にて造血因子のカクテル存在下で行い、2 週間後のコロニー形成を倒立顕微鏡にて観察した。

10. アセチル LDL 取込能

アセチル LDL 取込能は、4 穴チャックンバースライド中で、LDL を対照として、Dil Ac-LDL を用いて行った。取込は、蛍光顕微鏡にて観察した。

11. in vivo 内皮機能

in vivo 内皮機能としては、コラーゲンプラクアッセーを行った。分化した血管内皮細胞を、honeycomb コラーゲンスポンジに封入して、SCID マウスの腹腔中に移植した。35 日後に、FITC デキストランを尾静注して、マウス腹腔中の移植部分を取り出して固定し、HE 染色、免疫染色を行った。それぞれ、正立顕微鏡と蛍光顕微鏡により観察して評価した。

12. 染色体分析

未分化ヒト ES 細胞 (KhES-3) とそれに由来する分化細胞をコルセミド処理の後に、低調処理メタノール・酢酸固定した。G バンド選手による染色体分析は、SRL に外注した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は使用しないし、臨床研究もない。また、動物実験を行う計画はない。さらに、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいつさい含まれない。

ヒト ES 細胞研究を開始するための国立国際医療センターにおける生命倫理に対する取り組み

1. 主任研究者による使用計画書とその概要の作成
2. 機関内倫理委員会 (「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会」) の人選と確定
3. 当機関としての倫理規定、倫理委員会運営規定などの作成
4. 生命倫理に関する勉強会、講演会の開催と参加
5. 主任研究者が提出した使用計画に対する機関内倫理審査委員会の審査
第 1 回：平成 17 年 4 月 18 日
第 2 回：平成 17 年 5 月 30 日
第 3 回：平成 17 年 8 月 2 日
6. 使用計画書一式、機関内倫理委員会審査経

過を文部科学省に提出

7. 文部科学省特定胚及びヒトES細胞研究専門委員会にて当機関の使用計画が審査され承認。(平成17年9月30日)

最終的には、平成17年11月9日に当機関長宛に文部科学大臣の確認の文書(17諸文科振第734号)が送付され、ヒトES細胞使用が認められた。

その後、研究者の追加・削除と研究業績の変更、使用期間と使用の方法の変更、使用機関の基準に関する説明の変更についても平成18年11月24日に文部科学大臣の確認(18諸文科振第743号)を得た。

さらにその後、文部科学省指針の改定に伴う変更と使用の方法の変更についても平成19年12月18日に文部科学大臣の確認(19国文科振第26号)を得た。

さらにその後、研究者の追加・削除について機関内倫理委員会と機関長の了承を得て、平成20年3月11日に文部科学省に届け出た。

分担研究者(東京大学医学部付属病院無菌治療部)における倫理面での配慮

本研究は全能性幹細胞であるヒトES細胞を用いるものであり、ES細胞は万一ヒト胚に戻された場合には個体発生も理論上可能であるため、研究を行う場合はその内容について厳しい倫理審査を経ることが義務づけられている。本研究は所定の手続き・審査を経て、東京大学および文部科学大臣の承認を受けている。そして研究にあたっては、実験を許可された者がガイドラインに従った厳しい管理の下でES細胞を扱い、ヒトES細胞研究に要求される高度な倫理意識を保ちながら適切な研究が行われるよう配慮した。

C. 研究結果

1. 未分化ヒトES細胞の無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養での長期継代

まず、Thomsonらの方法に準じて無フィーダー培養、すなわち、KSR含有無血清培地の中でNoggin(500 ng/ml)とFGF(40 ng/ml)を添加して無フィーダー培養を行ったところ、安定した増殖と未分化維持が可能で、40継代以上培養可能であった。さらに、無血清、無フィーダーで未分化維持状態に有る細胞を、ある種の培養条件に移行するとNoggin、FGFの添加も不要となり、長期にわたって安定した増殖と未分化維持が可能であった。25継代以上培養可能であった。凍結保存後、再度融解し、安定した培養が可能であった。このように継代した未分化ヒトES細胞は、

未分化マーカー(Nanog、Oct-3/4、SSEA-4)を保持し、テラトーマ形成能を有していた。また、このような培養条件で長期継代されたヒトES細胞の染色体は正常であった。

2. 分化誘導培養の初期過程の解析

霊長類ES細胞からの血液細胞の分化誘導に最適とされる培養条件(15%牛胎児血清と6種類のサイトカイン・増殖因子(VEGF、BMP-4、SCF、Flt3-L、IL-3、IL-6))で培養を行い、サルES細胞とヒトES細胞のいずれにおいても、血管内皮細胞の分化誘導に成功した。培養法の基本は、前半のsphere形成浮遊培養と後半の平面培養であり、どちらもマウスフィーダー細胞は用いない。

ヒトES細胞の場合は、sphereをゼラチンコートディッシュに接着させた後に敷石状の(cobblestone)細胞が周囲に向かって増殖すると同時に、浮遊した球状細胞(血液細胞)も認められた。球状細胞(血液細胞)は、顆粒球・マクロファージ系の細胞で、CD45陽性率約90%、CD34陽性率約30%、CD14陽性率約90%で、コロニー形成能を有していた。明らかな好中球が観察され、2次造血が誘導されていると考えられた。以上より、培養初期から、1次造血、2次造血を伴った血管内皮細胞が誘導されていることが示唆された。

サルES細胞の場合は、敷石状の細胞が周囲に向かって増殖し始めて10日目以降には中心部(sphereが接着した場所)に嚢状構造物(sac-like structure)が形成された。嚢状構造物の中には球状細胞(血液細胞と想定される)が充満していた。この時期には、嚢状構造物中の球状細胞を除いて全ての細胞が免疫染色にてVE-cadherin陽性であった。一方、嚢状構造物中の球状細胞は、顆粒球・マクロファージ系の細胞で、コロニー形成能を有していた。明らかな好中球が観察され、2次造血が誘導されていると考えられた。また、これらの血球の中には、εグロビンやζグロビンを有する1次赤芽球造血が含まれることがRT-PCRから判明した。以上より、培養初期から、1次造血、2次造血を伴った血管内皮細胞の純粋な集団が誘導出来ていることが確認された。

3. 接着細胞の解析

ヒトES細胞からの分化系においては、敷石状の(cobblestone)接着細胞は、その形態から、サルES細胞由来の血管内皮細胞と極めて類似しており血管内皮細胞であることが強く示唆されたが、それを明らかにするために以下のような解析を行った。まず、血管内皮細胞特異的な表面抗原であるVE-cadherinとPECAM-1の2-color解析