

灌流液への胆汁混入の問題がクリアになったことは、この目的へのひとつのステップを踏み出した非常に価値のある実験であったと考えられる。

食品の冷凍保存に優れた性能を発揮している CAS 凍結は、医療における冷凍保存にも大きな期待が持たれている。今回は、その予備実験として、その機械的特性と凍結に及ぼす物理的影響を調べた。その結果、CAS 凍結槽内での磁場分布および CAS 目盛と磁場強度の関係、さらにこの強度変化が溶媒の冷却に及ぼす影響がわかった。この結果をもとに、細胞凍結の最適化を進めている。

細胞アレイは現在東京理科大学理学部准教授の大塚英典博士（本研究グループ分担研究者）が東京大学大学院工学系研究科の片岡一則教授（東京大学ナノバイオインテグレーション拠点（CNBI）リーダー）と筑波大学学際物質科学研究センターの長崎幸夫教授らとともに開発したものである。現在、この原型から発展した Cell Able が東洋合成工業社により製造、（株）トランスパレント社により販売されている。この技術の基礎は容器表面へのタンパク質などの非特異吸着を防ぐポリマー材、ポリエチレングリコール（PEG）誘導化合物が細胞の接着を阻害することである。その応用で細胞培養面のパターンニングが出来、細胞アレイとなった。細胞接着面は直径 100 μm の円形で、間隔は 100 μm であり、スフェロイド内部の壊死が起きず、スフェロイド間の細胞のつながりができない。細胞接着面積は全体の 20%に減少するが、スフェロイド化すると結局単層培養の場合と同数の細胞を保持できる。このパターン面に肝実質細胞を播種するとスフェロイドができ、薬物代謝活性、アンモニア除去活性、アルブミン合成分泌能は単層培養に比べて高く維持される。しかしながら高活性の持続は 1 週間程度である。そこでもうひとつの工夫として血管内皮細胞との共培養がなされるようになった。本年度の研究により、細胞アレイ上培養は単層培養に比べヒト肝細胞固有機能の長期維持に優れ、また接着力の弱い凍結ヒト肝細胞も培養実験に使用できることが確認された。また分担研究者熊井は、彼自身が培った別の手技により Cell Able の有効性を認めている。この結果をもとに、さらに創薬ツールとしての利用領域を広げようと考えている。

さらに分担研究者落谷は幹細胞からの肝細胞様細胞の分化について医学生物学的な解析を行い、この分野で世界トップクラスの成果を生み出している。本研究グループは、特に創薬分野の専門家との融合により、この幹細胞分化肝細胞が現状で研究ツールとしての潜在能力がどの位あるか、またその将来性

について検討を進めている。研究計画最終年である次年度に何らかの結果を出すべく鋭意研究を続けている。

E. 結論

ヒト組織調達・供給面では肝組織小片からの初代肝細胞採取の技術的検討を行い、方法をほぼ確立した。肝細胞保存では磁界強度調節型 CAS 凍結機の磁界強度ならびに槽内での分布、および溶媒の冷却曲線を調べた。肝細胞長期培養では本研究参加の（株）トランスパレント社より商品化された Cell Able を用い、肝細胞培養の評価を行った。その結果、先行器材である細胞アレイ同様の効果を有し、また使用感はそれに優ることがわかった。また新培養素材開発としてパターンニング材料に関しフォトレジストの分子構造に着目して詳細な検討を行った。幹細胞分化肝細胞ではヒト脂肪組織中間葉系幹細胞の肝細胞分化をより短期間で完了するための方法に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Araki N, Tsuruoka S, Wang N, Hasegawa G, Yanagihara H, Ando H, Omasa T, Enosawa S, Nagai H, Fujimura A. Human CYP3A4-introduced HepG2 cells: in vitro screening system of new chemicals for the evaluation of CYP3A4-inhibiting activity. *Xenobiotica* 38(11): 1355-1364, 2008
- 2) 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* 17; 179-186, 2008
- 3) Miyamoto Y, Enosawa S, Takeuchi T, Takezawa T. Cryopreservation in situ of cell monolayers on collagen vitrigel membrane culture substrata: Ready-to-use preparation of primary hepatocytes and ES cells. *Cell Transplant* in press.
- 4) Miyamoto Y, Ikeya T, Enosawa S. Preconditioned cell array optimized for a three-dimensional culture of hepatocytes. *Cell Transplant* in press.
- 5) 遠藤光史、土田明彦、小澤 隆、粕谷和彦、齊藤 準、高橋総司、林田康治、絵野沢 伸、青木達哉. 手術摘出肝組織の公共的組織バンクへの提供システムの構築. *日本外科系連合会雑誌* 33; 574-578, 2008
- 6) 絵野沢 伸. 細胞培養に見る医工連携 ―チャールズ・リンダーバーグから Cell Able まで―. *ファインケミカル* 37(12); 42-51, 2008
- 7) Yoda S, Satomi T, Ueno K, Otsuka H. Construction and functional estimation of NHDF spheroid array for the three dimensional skin equivalent. *Fragrance Journal*, Vol.36, No.9, pp.65-69, 2008.

- 8) H. Otsuka. Metal and Semiconductor Nanoparticle Dispersion. *J Jpn Soc Colour Mater*, 81(6), 219-225, 2008
- 9) Yamamoto M, Satomi T, Ueno K, Otsuka H. Spheroid array incorporated in hydrogel as a tissue-engineered construct. *Trans Mater Res Soc Jpn*, 33(3), 725-728, 2008
- 10) Yamazaki Y, Ueno K, Otsuka H. Characterization of newly synthesized dendron-type sugars with self-assembling properties. *Trans Mater Res Soc Jpn*, 33(3), 747-750, 2008
- 11) Fukaishi M, Satomi T, Ueno K, Otsuka H. Physicochemical characterization of the pyridine-g-PEG copolymer at the interface. *Trans Mater Res Soc Jpn*, 33(3), 721-724, 2008
- 12) Sato R, Ueno K, Otsuka H. Physicochemical characterization of PEG hydrogel to estimate biocompatibility. *Trans Mater Res Soc Jpn*, 33(3), 775-777, 2008
- 13) Otsuka H, Satomi T. Integration of Surface Modification and Cell Culture for Cell-based Assays, in *Surface Design and Modification of Biomaterials*, Chapter 6. 2008
- 14) 大塚英典. バイオチップ実用化ハンドブック、第5節技術展望へバイオチップの将来技術へ、印刷中。
- 15) 大塚英典. 「化学と工業」2009年5月号「再生医療応用を目指す材料開発」、印刷中
- 16) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 24:70-77, 2008
- 17) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. IFATS Collection: In vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *STEM CELLS* 26:2705-2712, 2008
- 18) 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* 275:1260-1273, 2008

2. 学会発表

- 1) 絵野沢 伸、宮本義孝、久保田久代、佐倉武司、池谷武志. パターン基板とフィーダー細胞による肝細胞機能小体の培養. 日本組織培養学会第81回大会. 平成20年5月19-20日、茨城県つくば市
- 2) 宮本義孝、池谷武志、絵野沢 伸. 三次元培養ツール、細胞アレイの凍結保存. 第44回日本移植学会総会 平成20年9月19、20日 大阪国際会議場
- 3) 宮本義孝、鈴木 聡、寺本直純、佐々木真宏、林 衆治、絵野沢 伸. 絹タンパク質セリシンを用いたヒト肝細胞の凍結保存. 第44回日本移植学会総会 平成20年9月19、20日 大阪国際会議場
- 4) 宮本義孝、鈴木聡、寺本直純、佐々木真宏、林衆治、絵野沢伸. 肝細胞凍結保存における保護剤の有用性. 第35回日本臓器保存生物医学学会 平成20年11月22-23日 東京
- 5) Miyamoto Y, Suzuki S, Takezawa T, Ikeya T, Hayashi S, Enosawa S. Improvement of Cryopreservation of Human and Rat Hepatocytes using Oligosaccharides and 3D Culture Matrix. Workshop6 Technology of cryobiology for liver regeneration, The 35th Annual Meeting of the Japan Society for Low Temperature Medicine, 22nd-23rd Nov, 2008, Tokyo (第35回日本低温医学会 平成20年11月22-23日 東京)
- 6) 飼持麻衣子、山崎直幸、上野耕治、大塚英典. 両親媒性デンドロン型糖鎖の乳化機能. 第57回高分子学会年次大会 2008年5月28日-30日、パシフィコ横浜 展示ホールDアネックスホール
- 7) 吉田真理、佐藤涼平、上野耕治、大塚英典. 高分子末端に存在する糖鎖のタンパク質相互作用力の評価. 第57回高分子学会年次大会 2008年5月28日-30日、パシフィコ横浜 展示ホールDアネックスホール
- 8) 北村育美、山崎直幸、大塚英典. 酸化ナノ粒子の糖鎖修飾剤の合成とタンパク質認識凝集. 第57回高分子学会年次大会 2008年5月28日-30日、パシフィコ横浜 展示ホールDアネックスホール
- 9) 山本 雅、里見智美、上野耕治、立石哲也、大塚英典. 組織再生へ向けたスフェロイド含有ハイドロゲルの機能化. 第57回高分子学会年次大会, 2008年5月28日-30日、パシフィコ横浜 展示ホールDアネックスホール
- 10) 山崎直幸・上野耕治・大塚英典. 表層にデンドロン型糖鎖を有する乳化粒子の合成と機能評価. 第57回高分子学会年次大会, 2008年5月28日-30日(金), パシフィコ横浜 展示ホールDアネックスホール
- 11) 依田理美、里見智美、上野耕治、矢作彰一、岡野由利、正木 仁、大塚英典. 三次元培養皮膚の創製を目指した真皮線維芽細胞スフェロイドの作製と機能評価. 第21回日本動物実験代替法学会, 2008年11月13・14日、埼玉会館(埼玉)
- 12) 大塚英典. 医療の革新を目指したバイオ界面科学. 2008年10月28日、第3回総合研究機構フォーラム2008
- 13) 佐藤涼平、上野耕治、大塚英典. バイオチップへの応用を目指した PEG ハイドロゲルの物理

化学的評価, バイオ・マイクロシステム研究会-
バイオチップのスマート化技術- 2009年2月27
日 東京大学内会議室

14) 明石京子, 上野耕治, 大塚英典. パターン化
スフェロイドの接着制御を目指した温度応答性培
養基の創製, バイオ・マイクロシステム研究会-
バイオチップのスマート化技術-, 2009年2月27
日 東京大学内会議室

15) Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer.
RNAi World Congress 2008, Boston, USA

16). Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S.
Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer.
Progress in Biomedical Optics and Imaging _ SPIE
2008, San Jose, CA, USA

16) Ochiya T. Therapeutic potential of adipose tissue
derived mesenchymal stem cells in liver disease.
FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA

17) Yamamoto Y, Ochiya T. Global expression
profiling of miRNA in liver development. FASEB
Summer Research Conference, Colorado, USA

18) Ochiya T. Therapeutic potential of adipose derived
stem cells on liver failure. The 2nd International
Symposium on Regenerative Medicine and Stem Cell
Research. 2008, Seoul, Korea

19) Ochiya T. Therapeutic potential of microRNA
against cancer. The Right RNAi Meeting in 2008,
Brussels, Belgium

20) 幹細胞の持つ肝細胞分化能と肝疾患治療効果,
落谷孝広, 第 15 回肝細胞研究会総会 (2008.6.27-
28 静岡)

21) 川又理樹, 落谷孝広. Transgenic Rat for
Establishment of Embryonic Stem Cells. 第 67 回日
本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)

22) 落谷孝広. Organ Biology における再生医学の
役割-ヒト間葉系幹細胞による肝再生医療の実現
に向けて- (シンポジウム) 第 35 回日本臓器保存

生物医学会定期学術集会 (2008.11.22-23 東京)

23) 川又理樹, 清水 卓, 玉井淑貴, 落谷孝広,
未分化ラット ES 細胞の樹立を目指した
Oct4/Venus トランスジェニックラットの作成, 第
31 回日本分子生物学会 (2008.12.9-12 神戸)

24) 落谷孝広. 脂肪に由来する間葉系幹細胞の創
薬・治療研究への応用, 第 8 回ヒューマンサイエ
ンス研究資源バンクセミナー (2009.1.27 大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 特願 2008-220573, 表面改質剤、該表面改質剤
により改質された被改質体およびナノ粒子の分散
液、並びにナノ粒子の製造方法, 大塚英典、深石
真行、石塚 崇, 出願日: 2008年8月28日

2) 特願 2008-230337, 重合性モノマーおよびその
製造方法、並びにグラフト共重合体, 大塚英典、
深石真行、石塚 崇, 出願日: 2008年9月8日

3) 特願 2008-230223, スフェロイド含有ハイドロ
ゲルおよびその製造方法, ならびにスフェロイド
含有ハイドロゲル積層体, 大塚英典、里見智美、
上野耕治、山本 雅、中曽根祐一、出願日: 2008
年9月8日

4) 特願 2008-230224, スフェロイド複合体および
その製造方法、ならびに多層型スフェロイド複合
体, 大塚英典、里見智美、上野耕治、山本 雅、
中曽根祐一、明石京子, 出願日: 2008年9月8日

5) 特願 2008-137224, 「スフェロイドの製造方法、
およびスフェロイドアレイ」, 大塚英典、鄭 雄
一、位高啓史、里見智美、上野耕治、山本 雅、
中曽根祐一, 出願日: 平成 20 年 5 月 26 日.

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、アデノウイルスベクターに薬物代謝酵素遺伝子を組み込んだヒト薬物代謝酵素発現システム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新たな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) 積水メディカル株式会社
薬物動態研究所 安達弥永
- (4) 塩野義製薬株式会社
新薬研究所 山口嘉隆
- (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

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初代肝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

系を用い、昨年度得られた基礎的検討結果をもとに、アデノウイルス由来CYP3A4及びCYP2C19発現HepG2細胞での阻害剤と時間依存的阻害評価試験法を中心に検討を行った。併せて、アデノウイルス由来CYP発現HepG2細胞の凍結融解の酵素活性への影響と、アデノウイルス由来CYP3A4の腸管細胞での発現を検討し、CYP1A2とCYP2E1発現アデノウイルスのウイルス液の調製を行った。

また、ヒト不死化肝細胞株HepaRGを三次元培養系に供し、その機能変化を解析した。併せて、HepG2細胞の細胞骨格を変化させた場合の薬物代謝関連遺伝子の発現変化について検討した。

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継続して行った。

B. 研究方法

1) 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

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、特記

無き場合、住商ファーマ(ATCC)より購入した Lot No. 4004528 を用いた。

(1) 感染操作

アデノウイルスCYP発現HepG2細胞の作成は、昨年度のスモールスケール化の検討結果を受け、96-well plateでの感染条件にて実施した。

96-well plateにてHepG2細胞を 1.25×10^4 cells/wellで播種し、2日間の前培養を行った。培養液を除去後、50 MOI/wellになるようにAdCYP3A溶液を25 μ L/wellで添加し、培養液が全細胞に行き届くように20分間毎にプレートをしーソーのように揺らし、37℃の5%CO₂インキュベーターにて60分間静置した。その後培養液を100 μ L/well添加し、37℃の5%CO₂インキュベーターにて3日間培養した。この間培養液の交換は行わなかった。

(2) 代謝反応並び代謝物濃度測定

代謝反応及び代謝物濃度測定は、昨年度と同様の方法によった。概略と本年度新規に行った、mehenytinとfluoxetineの例を示す。

(概要) ウイルス感染3日後、各ウェルから培養液を除去し、AdCYP感染細胞に基質含有培養液を添加し、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50 μ L採取し、I.S.入りMeOH溶液を200 μ L添加し、遠心上清をLC/MS/MSで分析し、それぞれの代謝物の生成活性(pmol/hr/well)を測定した。

(例) AdCYP2C19発現細胞における(S)-mephenytoin及びfluoxetine代謝反応の検討

96-well plateにHepG2細胞を 1.25×10^4 cells/well (0.125 mL)で播種し、37℃、5%CO₂-Air下にて培養した。培養2日後、AdCYP2C19をMOI=50で感染させた。感染3日後、(S)-mephenytoin又はfluoxetine(終濃度: 3, 10, 30, 100, 300 μ mol/L)を基質として添加した培地(0.125 mL)に置換し、1、4時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、この培地0.1 mLを採取して等量の内標準溶液[1 μ mol/L niflumic acid in MeOH/MeCN (1:1=v/v)]と混和した。15,000 rpmで10分遠心して得られた上清中4'-hydroxymephenytoin又はnorfluoxetineをLC-MS/MSにて測定し、基質濃度との関係からkinetic parameterを算出した。

(3) AdCYP発現HepG2細胞での阻害評価試験法の検討

ウイルス感染3日後、各ウェルから培養液を除去し、阻害剤含有培養液に交換し、37℃の5%

CO₂インキュベーターでAdCYP3A4の場合、1時間(この場合培養液はFCS、抗生物質を含まない)あるいは24時間、AdCYP2C19の場合4時間反応させた。反応後、各ウェルから培養液を除去、PBSによる洗浄を実施し、CYP活性測定用基質含有培養液(FCS、抗生物質を含まない)に交換し、37℃の5%CO₂インキュベーターで反応させた。

(4) AdCYP3A4発現細胞凍結融解の活性への影響

ウイルス感染3日後に細胞を回収し、 1.0×10^6 cells/mLの濃度でRecovery Cell Culture Freezing medium (Invitrogen社)に懸濁し、-20℃フリーザーに24時間静置した後、-80℃フリーザーにて保存した。

保存した細胞を96ウェルプレートに 0.125×10^5 cells/wellで播種し、終濃度0.5-50 μ Mになるようにmidazolam含有培養液(FCS、抗生物質を含まない)を添加し、37℃の5%CO₂インキュベーターで1時間反応させた。

(5) 腸管細胞を用いた検討

HepG2細胞(理化学研究所)およびLS174T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。AdCYP3A4の感染は、10、20または50 MOIとなるように行なった。感染2日後に培地を交換し、さらに1日培養した後、testosteroneの6 β 水酸化活性を定法に従って測定した。その後細胞を回収した。なお、培地にはMEM non-essential amino acids solution (Invitrogen)および10% FBS (BioWest)を添加したDMEM (HepG2細胞)またはMEM (ICN: LS174T細胞)を用いた。

(6) ヒトCYP1A2およびCYP2E1を発現するアデノウイルス溶液の調製

HEK293細胞を用い、定法に従いウイルス溶液を回収した。ウイルス溶液は使用まで-80℃で保存した。調製したウイルス力価の測定は、HEK293細胞において、Adeno-X™ Rapid Titer Kit (Clontech-Takara Bio)を用いて行なった。

2) HepaRG細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析

(1) ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)によるHepaRG細胞の三次元培養

RFBによる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)を用いて定法に従って行った。細胞増殖の足場となる担体にはPVA (polyvinyl alcohol; 孔径130 μ m又は300 μ m)を用いた。

(2) VECCELLによるHepaRG細胞の培養

VECELL(ベセル社)は6穴培養皿用を用いた。VECELLは、24または6穴の細胞培養皿に挿入し

て用いる細胞培養器具で、細胞は小分子が通過できる多孔質膜上で培養される。この多孔質膜はコラーゲンでコートされた繊維で構成され、細胞一個一個が球状になることが期待される。

培養は、通常の平面培養で播種する細胞数の2倍、4倍の密度で播種して、7日間、14日間培養を行った。また、分化誘導後の細胞を回収直前の細胞密度の2倍、3倍となるように VECCELL 上に播種し、翌日から培地中に DMSO を 2% 添加し、さらに 3 日間培養した。対照実験として、通常の 6 穴培養皿を用いた培養を行った。

(3) HepG2 細胞の docetaxel 暴露実験

Docetaxel で 微小管を安定化させ、薬物代謝関連遺伝子の発現への影響を調べた。薬物代謝関連遺伝子の発現への微小管の影響を調べるにあたり、毒性試験より得られた IC50 の前後の濃度 (0, 0.01, 0.03, 0.5 μ M) で HepG2 細胞を docetaxel に暴露した。HepG2 細胞播種 24 時間後、docetaxel を添加した培地に交換して 3 日間培養した。この間、1 日毎に培地の交換を行った。培養期間終了後、細胞より RNA を回収し、薬物代謝関連遺伝子の発現を PCR-Array (SuperArray 社) により測定した。

3) 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)大腸癌細胞株 (HT29, HCT116, DLD1, LoVo, SW48, SW620, Caco-2) および 3 組の癌・正常組織を対象に、CYP1B1 遺伝子の CpG island における DNA メチル化状態の詳細を調べるために、大腸菌プラスミドベクターを用いたサブクローニングを行い、コピー毎の DNA メチル化 CpG 部位の同定を行った。癌・正常組織については、腺管分離法を用いて分離・回収した上皮細胞のみの DNA を用いた。

(2)(1)の培養細胞に 5-aza-2'-dC (0, 0.5, 5 μ M) を 24 時間暴露して脱メチル化の誘導し、ゲノム DNA および RNA を回収した。

(3)癌特異的なメチル化を定量的かつ簡便に解析するため、(1)において癌細胞 (組織) でのみメチル化が検出された CpG 部位を標的とした COBRA (combined bisulfite restriction analysis) 法を設計した。同法を用いて(2)のゲノム DNA サンプルを解析した。

(4)SYBR Green I 色素を用いた real-time PCR による mRNA 発現量の解析を(2)の RNA サンプルを対象に行った。

(5)大腸癌 40 症例の癌および正常組織の腺管分離材料を対象に、(3)の COBRA 法を用いて CYP1B1 遺伝子のメチル化の解析を行った。

(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 細胞とヒト肝マイクロソームを使用した。凍結ヒト肝細胞は XenoTech LLC 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。ヒト肝マイクロソームは XenoTech 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、LS174T 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マイ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) 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) アデノウイルス感染後の CYP3A4 酵素活性の経時変化

時間依存的阻害に関連した阻害試験への応用を目指し、発現量の経時変動について、AdCYP3A4 を感染させた HepG2 細胞の酵素活性を指標に解析し、合成と分解が平衡となる培養条件の探索を試みた。HepG2 細胞に AdCYP3A4 を 20 MOI または 50 MOI で感染させ、経時的に培地に testosterone を添加し、6 β -hydroxy testosterone 生成量を測定したところ、いずれの感染量で発現させた場合にも、感染 4 日目までは直線的に 6 β -hydroxytestosterone 生成量は増加したが、5 日目以降、活性は非感染細胞程度まで急激に低下した。

(2) 各種基質に対する AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞の代謝活性の検討

昨年度に引き続き、CYP3A4 典型基質の種類を増やし各種代謝反応系を用いた代謝評価を行った。得られた Km 値を表 1 にまとめた。

	Bactosome	Supersome	HLM	AdCYP3A4
Midazolam	3.2	3.8	2.6	4.1
Testosterone	64.2	42.2	55.6	35.7
Felodipine	3.2	7.2	3.6	46.3
Nifedipine	8.0	13.7	14.3	28.6
Terfenadine	0.3	1.0	0.9	2.4
Diltiazem	10.2	16.4	25.1	29.9

表 1 各代謝反応系における CYP3A4 基質の Km 値比較 (単位: μM)

midazolam、testosterone、nifedipine、terfenadine、diltiazem は AdCYP 発現系で得られた Km 値が概ね他の発現系で得られた Km 値と一致した。一方で、felodipine は他の発現系での Km 値と比較して、AdCYP 発現系での Km 値は約 7~10 倍高く、他の発現系との大きな乖離が観察された。

(3) AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞での CYP3A4 に対する阻害剤の検討

AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞あるいはバキュロウイルス発現 CYP3A4/SUPERSOME によるミダゾラム代謝活性に対する 8 種の阻害剤の阻害効果を検討したところ(表 2)、AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞では CYP3A4/SUPERSOME と比べ、若干阻害率が弱い傾向にあるものの、clarithromycin や diltiazem のように同程度の IC50 値を示すものが多かった。一方で、ketoconazole、ritonavir および mibefradil では AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞と CYP3A4/SUPERSOME で阻害率が大きく異なり、IC50 値で 10 倍程度の乖離がみられた。基質として testosterone を用いた場合でも、midazolam と同様に ketoconazole、ritonavir および mibefradil で阻害率の乖離が大きく、IC50 値でも 10 倍程度の乖離がみられた(表 2)。

なお、AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞および CYP3A4/SUPERSOME とともに、CYP3A4 基質間で阻害効果に違いはほとんど認められなかった(表 2)。

Inhibitor	AdCYP3A4/HepG2		CYP3A4/SUPERSOME	
	midazolam	testosterone	midazolam	testosterone
	IC ₅₀ (μM)			
Ketoconazole	0.33	0.30	0.044	0.020
Ritonavir	0.32	0.18	0.032	0.021
Mibefradil	0.97	0.73	<0.1	<0.1
Erythromycin	29	28	9.2	19
Clarithromycin	19	28	14	28
Verapamil	17	<3.125	4.2	3.7
Diltiazem	21	7.8	12	6.6
Cimetidine	>50	>50	>50	>50

表 2 AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞と発現酵素 CYP3A4/SUPERSOME での midazolam 1'-水酸化活性および testosterone 6

β -水酸化活性に対する各阻害剤の IC50 値 (μM) の比較

(4) AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞での時間依存的阻害評価試験法の検討

AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞における CYP3A4 阻害剤による時間依存的阻害の評価の可能性について検証した。AdCYP3A4 発現系を用いて、CYP3A4 の mechanism based inhibitor として報告のある erythromycin、troleandomycin、verapamil、diltiazem の評価を実施した。感染 3 日後に各阻害剤を 1 時間プレインキュベーションし、PBS による wash を実施して阻害剤を除去したのち、CYP3A4 の典型的基質である midazolam の代謝反応を実施した。その結果、阻害剤濃度依存的に midazolam の代謝活性が低下した。さらに、この結果から得られる酵素不活化速度を、阻害剤濃度とプロットした(図)。

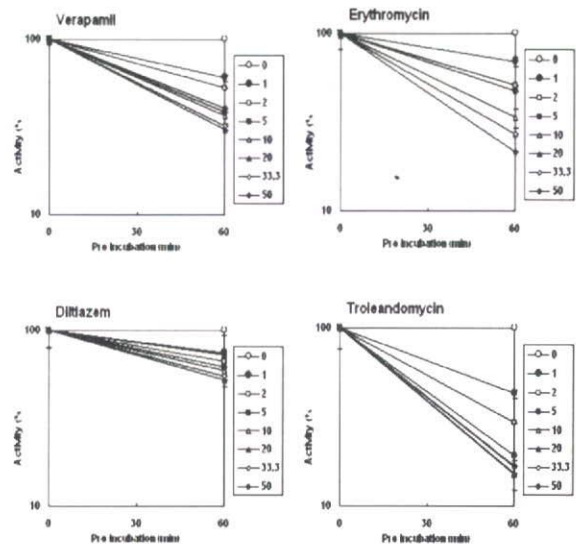


図 AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞における mechanism based inhibitor の濃度・時間依存的阻害および阻害剤濃度と酵素不活化速度の関係

この結果からさらに最大不活化速度定数 (k_{inact}) と、酵素と阻害剤の見かけの乖離定数 (K'_{app}) を算出し、これらのパラメーターを、ヒト肝ミクロソームを用いて算出した文献値と比較した。 K'_{app} は文献値と概ね一致していたが、 k_{inact} はいずれも文献値よりも低い結果であった。

プレインキュベーションを 24 時間とした場合、diltiazem に関しては、CYP3A4 による代謝に依存した阻害の増強を示唆した。一方、erythromycin や clarithromycin では CYP3A4 による代謝に依存した阻害がわずかに増強される傾向が見られた程度であり、verapamil や mibefradil では、その傾向もみられなかった

(データ示さず)。

(5) 各種基質に対する AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞の代謝活性の検討

昨年度の midazolam に引き続き、CYP2C19 基質の種類を増やし各種代謝反応系を用いた代謝評価を行った。

AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞による (S)-mephenytoin 代謝活性、並びに、fluoxetine 代謝活性について、1 時間インキュベーション、4 時間インキュベーションでの代謝活性は反応時間との直線性を示した。この結果から、インキュベーション時間を 4 時間、(S)-mephenytoin 濃度、及び、fluoxetine 濃度を 3、10、30、100、300 $\mu\text{mol/L}$ に設定して、 K_m 値を求めた。その結果、(S)-mephenytoin の K_m 値は 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、であった。Fluoxetine については、ラセミ体では 172.8 $\mu\text{mol/L}$ 、S 体では 47.66 $\mu\text{mol/L}$ 、R 体では 286.7 $\mu\text{mol/L}$ であった

これらの結果は Supersome、凍結ヒト肝細胞での値とおおむね一致した。一例として、凍結ヒト肝細胞との比較を表 3 に示す。

CYP activity	Cell species	酵素キネティックパラメータ	
		K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol/hr/mg protein}$)
MPOH	rhCYP2C19	11.9 \pm 0.7	7790 \pm 108
	Hepatocytes	10.4 \pm 0.7	215 \pm 3

表 3 AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞と凍結ヒト肝細胞における mephenytoin の酵素キネティックパラメータ

(6) AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞での阻害評価試験法の検討

AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞での mephenytoin 水酸化活性に対する N-benzyltirivanol の阻害曲線と IC_{50} 値を求め、凍結ヒト肝細胞と比較検討した。N-benzyltirivanol による AdCYP2C19 細胞と凍結ヒト肝細胞での MPOH 活性の IC_{50} 値は、それぞれ 1.4 および 0.7 μM であった。

Mechanism based inhibitor として知られる ticlopidine の (S)-mephenytoin 代謝活性に対する阻害作用を検討した結果、MBI 検討群及び direct inhibition 検討群、いずれにおいても、(S)-mephenytoin 代謝活性は ticlopidine 依存的に減少し、算出された IC_{50} 値はそれぞれ 0.0274 $\mu\text{mol/L}$ 及び 0.157 $\mu\text{mol/L}$ であった。

(7) CYP3A4・CYP2C19 同時発現細胞

AdCYP2C19 と AdCYP3A4 の共発現細胞による diazepam 代謝能の検討を行った結果、diazepam 濃度 3 $\mu\text{mol/L}$ では nordiazepam が優位に生成し、その活性は AdCYP 2C19 感染量に依存するのに対し、diazepam 濃度 100 $\mu\text{mol/L}$ では

temazepam が優位に生成し、その活性は AdCYP 3A4 感染量に依存する傾向を示した。更に、同じ条件で感染させた AdCYP2C19-AdCYP3A4 共発現 HepG2 細胞による (S)-mephenytoin 及び midazolam の代謝活性を測定した。その結果、(S)-mephenytoin 濃度 100 $\mu\text{mol/L}$ において、AdCYP2C19 感染量に依存した (S)-mephenytoin 代謝活性が認められ、AdCYP 2C19 感染量が $MOI=50$ で一定の場合に AdCYP3A4 の影響はほとんどなかった。midazolam 濃度 100 $\mu\text{mol/L}$ では、Ad 3A4 感染量に依存した midazolam 代謝活性が認められ、AdCYP2C19 感染量が $MOI=50$ で一定の場合に AdCYP2C19 の影響はほとんどなかった。

(8) CYP 発現の最適化

最大の CYP 活性を安定的に発現させるために、培養用プレートの種類、予備培養期間、播種細胞数について検討した。

① プレートの種類

細胞培養用プレートとプライマリア細胞培養用プレートでの培養の違いによる CYP 活性の違いについて、比較検討したところ、後者の培養で活性が 3 ~ 4 倍高かった。

② 予備培養期間

プライマリア細胞培養用プレートに HepG2 細胞を播種してからアデノウィルスに感染させるまでの予備培養期間の違いによる CYP 活性の違いについて、比較検討したところ、2 日間より 3 日間の予備培養の方が 2 ~ 3 倍高かった。

③ 播種細胞数

プライマリア細胞培養用プレートに HepG2 細胞を 5 または 10×10^4 cells/well の細胞濃度で播種して、播種細胞数の違いによる CYP 活性の違いについて、比較検討したところ、何れの細胞数でもほぼ同じ活性値であった。

④ 96-well plate での CYP 活性の well 間変動

最適化された培養条件で 96-well plate を用いて CYP2C19 あるいは CYP3A4 を発現させたところ、MPOH および MDOH 活性の各 well 間の変動は小さかった (CV が 9% 以下)。

(9) AdCYP3A4 発現細胞凍結融解の活性への影響

AdCYP3A4 発現細胞の凍結融解による活性の影響を検討した。25 cm^2 フラスコにて 50 MOI で感染させた HepG2 細胞を凍結保存し、一定期間後に融解した細胞を 96well plate に 0.125×10^5 cells/well で播種したのち、CYP3A4 の典型的基質である midazolam の代謝活性を測定した。凍結をしない条件下で算出した K_m 、 V_{max} 値と比較したところ、いずれも概ね一致した。

(10) 腸管細胞を用いた検討

ヒト結腸ガン由来LS174T細胞とHepG2細胞にAdCYP3A4を10、20または50 MOIで感染させ、3日後に培地にtestosteroneを添加し、6 β -hydroxytestosterone生成量を測定することでCYP3A4活性を測定した。その結果、HepG2細胞と同様に、LS174T細胞においても、AdCYP3A4感染量依存的な6 β -hydroxytestosterone生成量の増加が認められた。しかしながら増加の程度はHepG2細胞に比べて低く、10分の1程度であった。一方、非感染時の6 β -hydroxytestosterone産生量はHepG2細胞に比べてLS174T細胞で高かった。次に細胞総抽出液を用いてウェスタンブロットを行なったところ、HepG2細胞の抽出液を用いた場合にはAdCYP3A4感染量依存的なCYP3A4アポタンパク質レベルの増加が認められたが、LS174T細胞の抽出液を用いた場合にはCYP3A4アポタンパク質レベルは検出限界以下であった。

(11) ヒトCYP1A2およびCYP2E1を発現するアデノウイルス溶液の調製

HEK293細胞を利用して既に作製しているAdhCYP1A2とAdhCYP2E1の増幅を行なった。得られた両ウイルス液をHepG2細胞に感染させ、ウェスタンブロットを行なったところ、感染量依存的な発現量の増加が認められた。これらのウイルス溶液の力価を測定したところ、それぞれ 1.03×10^9 ifu/mlおよび 4.57×10^8 ifu/mlであった。

2) HepaRG細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析

(1) ラジアルフロー型パイオリアクター(RFB)によるHepaRG細胞の三次元培養

HepaRG細胞に適した孔径を求めるために、130 μ mと300 μ mの孔径を持つPVAを用いて培養を行った。細胞のグルコース消費量から推定した増殖曲線、及び溶存酸素の変化はともに孔径の小さいPVA内で細胞の増殖が早いことが分かった。PVA内部の細胞の分布をヘマトキシリン-エオシン染色(HE染色)した薄切切片で調べると、平面培養では見られなかった細胞の重層化(組織化)が見られた。回収した細胞での*cyclin B1*のmRNAの発現をreal-time PCRで調べると、両孔径のPVAのどの領域でも平面培養時の増殖期の細胞の2割程度であった。このことは、両孔径のPVA内の細胞は共に、培養終了時には定常状態に達していたことを示唆している。

(2) VECCELLによるHepaRG細胞の培養

通常の平面培養で播種する2倍または4倍の

細胞数を播種し、2週間培養して膜の断面を作成し、HE染色で細胞を可視化して観察したところ、単独の細胞が多く見られ、膜全体を覆うまでは細胞が増殖しないことが分かった。*cyclin B1*のmRNAの発現は、細胞間の接着が密になるコンフルエントの状態を迎える前に、細胞増殖が抑制されていることを示唆していた。

次に、分化誘導後の細胞を平面培養でコンフルエント時の2倍または3倍の密度でVECELLに播種し直して4日間培養し、断面を観察したところ、細胞は単層で膜に付着していた。*CYP3A4*の発現を調べたところ、対照と比較してVECELL上で培養した細胞では3分の1程度であった。

(3) 微小管が薬物代謝関連遺伝子の発現へ及ぼす影響

我々は、ヒト肝癌由来培養細胞株HepG2を、HepaRGと同様にRFBで三次元培養すると、薬物代謝関連遺伝子の発現亢進とともに、細胞骨格を構成する微小管の発現も上昇することを見出してきた。そこで微小管と薬物代謝関連遺伝子の発現の関連性を明らかにするために、微小管の安定化剤であるdocetaxelにHepG2を暴露し、84種の薬物代謝関連遺伝子の発現変化をPCR-arrayを用いて調べた。調べた遺伝子のうち、70遺伝子でdocetaxel処理による発現の有意な亢進が確認された。

3) ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

7種の大腸癌細胞株を対象としたdirect sequencing解析の結果、CYP1B1遺伝子(SW48、Caco-2細胞)およびCYP1A1遺伝子(HT29細胞)のメチル化が検出された。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。CYP1A1遺伝子のDNAメチル化は調べたすべての細胞、組織(癌および正常)で検出された。

SW48、Caco-2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全体で起こっていたが、コピー毎のDNAメチル化状態を調べた結果、特にSegment 4内のSp1結合部位近傍において濃密なメチル化が検出された。そこで同領域内の制限酵素HpyCH4IV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-2'-dC処理によりSW48およびCaco-2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-2'-dCの濃度に依存して増加した。CYP1B1遺伝子の発現

量は 5-aza-2'-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。

一方、5-aza-2'-dC 処理により HT29 細胞においてのみ CYP1A1 遺伝子の発現量の上昇が認められた。他の 6 種の細胞株や癌組織との間に CYP1A1 遺伝子のメチル化状態の差が認められないことから、i)プロモータ以外の領域での脱メチル化、ii)CYP1A1 遺伝子の発現を上流で制御する転写因子の脱メチル化、が HT29 細胞における発現量の上昇に寄与した可能性が示唆された。

大腸癌 40 症例中、2 症例 (5%) において CYP1B1 遺伝子のメチル化が検出された。一方、すべての正常組織において DNA メチル化は検出されなかった。

D. 考察

1) 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) アデノウイルス感染後の CYP3A4 酵素活性の経時変化

本アデノウイルス発現システムは、医薬品の薬物代謝プロファイル試験だけでなく、阻害効果の解析にも有効であると考えられる。ヒト肝細胞では CYP 分子種のタンパク質レベルはその合成と分解が平衡に達しているため、経時的な変動は小さいのに対し、アデノウイルス感染細胞では CYP タンパク質合成が盛んであるため、感染後発現量は経時的に増加する。したがって、アデノウイルス発現系では、肝細胞に比べて、MBI などの酵素を不活性化するような阻害効果を検出しにくい可能性がある。そこで、発現量の経時変動について、AdCYP3A4 を感染させた HepG2 細胞の酵素活性を指標に解析し、合成と分解が平衡となる培養条件の探索を試みた。その結果、これまでの結果とほぼ一致して感染 4 日後まではほぼ直線的に活性が上昇したが、その後予想に反して急激に酵素活性は減少し、非感染細胞の活性と同程度となった。CYP3A4 アポタンパク質レベルについての変動は現在解析中であるため、この活性低下が、CYP3A4 アポタンパク質レベルの低下に因るのか、ホロ酵素レベルの低下に因るのか、あるいは CYP 還元酵素などの補因子の欠除に因るのかは現時点では明ら

かではない。今後、これらの点を考慮しながら、細胞密度や感染濃度、培地交換の頻度など培養条件を再検討する必要がある。

(2) 各種基質に対する AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞の代謝活性の検討

AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞における CYP3A4 典型基質の代謝評価を実施したところ、felodipine を除いた 5 化合物において Baculosome、Supersome、ヒト肝ミクロソームの他の代謝反応系とほぼ同等の K_m 値が得られた。これらの結果から、AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞は他の発現系と同様の性質を持ち合わせているものと考察される。felodipine のみが他の発現系に比べ極端に高い K_m 値を示したが、felodipine はプラスチックに対して吸着性が高いことが知られており、AdCYP3A4 発現 HepG2 の系のみ、用いたプレートの素材が異なっていることから、化合物の吸着が結果に影響していることが原因の一つとして考えられる。

(3) AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞での CYP3A4 に対する阻害剤の検討

今回の検討では、昨年度の結果を受け AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞と CYP3A4/SUPERSOME での阻害剤の効果について検討したが、基質の違いによる阻害剤の効果については顕著な違いは認められず、CYP3A4/SUPERSOME 同様の傾向を示した。一方で、ketoconazole、ritonavir および mibefradil については、CYP3A4/SUPERSOME と比べ IC_{50} 値が 10 倍程度高く乖離傾向がみられたが、これらはタンパク結合率が高いことが知られている。CYP3A4 発現 HepG2 細胞では細胞内移行やタンパク結合率といった *in vitro-in vivo* 外挿を行う際に影響する因子を加味した形で評価しており、*in vitro* 系において有用な阻害実験モデルと考えられる。

(4) AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞での時間依存的阻害評価試験法の検討

AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞を用いて、Mechanism-based inhibition (MBI) の評価を実施した。プレインキュベーション 1 時間では、いずれも MBI のポテンシャルを有するという結果が得られた一方で、kinact 値が文献値よりも低く見積もられた。これは AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞では CYP3A4 の発現が定常状態ではなく、評価時にはまだ蛋白の生合成が進んでいる状態にあることが原因の一つであるものと考えられる。一方で、4 化合物の MBI の強弱は文献値と同じ順列になることから、ランクオーダー評価には使用できる可能性が示唆された。プレインキュ

バージョンを 24 時間にすると、ritonavir や diltiazem では阻害増強が観察されたが、mibefradil や verapamil ではその影響を判断することが困難であった。今回の結果は、本試験方が阻害剤の前処置時間や曝露濃度など最適化すべき課題もあるものの、代謝反応を介した酵素の不活性化現象の影響を評価する上で有用な評価法と考えられる。

更に、MBI の評価は通常ヒト肝ミクロソームを用いて評価することが多いが、ヒト肝ミクロソームを希釈する操作や、別途ミクロソーム蛋白への結合も評価しなければならないなど、非常に煩雑である。AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞は細胞の洗浄操作によって阻害剤を除去できる点や、蛋白濃度が低く阻害剤の非特異的結合率を評価しなくてもよいと考えられる点から、非常に大きなメリットを持つ。

(5) 各種基質に対する AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞の代謝活性の検討

CYP2C19 の基質として知られる (S)-mephenytoin 及び fluoxetine について、AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞を用いた kinetic parameter の検討を行った結果、算出された Km 値は、既知のヒト肝ミクロソームを用いた結果やバキュロウイルス発現系、凍結ヒト肝細胞の結果とほぼ同等の値が得られた。このことから、AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞を用いた試験系がヒト肝ミクロソーム試験系やバキュロウイルス発現系と同様に薬物代謝研究において有用であることが示唆された。

(6) AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞での阻害評価試験法の検討

AdCYP2C19 あるいは凍結ヒト肝細胞の midazolam 水酸化活性に対する N-Benzylmirtazapin による阻害の応答性について検討したところ、AdCYP 細胞と凍結ヒト肝細胞でほぼ同等の阻害プロファイルを示した。更に、mechanism based inhibitor として知られている ticlopidine の阻害作用について検討した結果、時間依存的 CYP2C19 不活化の影響が認められた。このことから AdCYP2C19 発現 HepG2 細胞を用いた試験系は時間依存的阻害作用の実験モデルとしても有用であることが示唆された。

(7) CYP3A4・CYP2C19 同時発現細胞

AdCYP2C19 と AdCYP3A4 の共発現細胞による diazepam 代謝能の検討を行った結果、本アデノウイルス試験系は、CYP 酵素の発現量を任意に調整することが可能であり、ヒト個体間変動を考慮した肝薬物代謝モデルとして有用である

ことが示された。また、共発現細胞において、感染時の AdCYP2C19 及び AdCYP3A4 のウイルスの組み合わせによって各酵素の発現量には影響が無いことが確認された。

(8) CYP 発現の最適化

『医薬品開発の効率化を指向したヒト CYP 分子種発現系細胞を用いる新規ヒト肝薬物代謝評価系を確立』するためには、高い CYP 活性を安定的に発現し、その発現された CYP の酵素キネティックパラメータはヒト肝細胞と同等であり、CYP 阻害剤に対する応答性もヒト肝細胞と同等であることが重要である。条件検討の結果、高い CYP 活性を発現するための最適な培養条件は、プライマリア細胞培養用 24-well plate に HepG2 細胞を 5×10^4 cells/well の細胞濃度 (96-well plate の場合は 1.25×10^4 cells/well) で播種し、3 日間予備培養した後、3 日間 AdCYP を感染させることであることが明らかとなった。

(9) AdCYP3A4 発現細胞凍結融解の活性への影響

AdCYP3A4 発現 HepG2 の凍結保存による影響も確認した。AdCYP3A4 発現 HepG2 はスループット性・再現性は高いが、ウイルス感染から実際の代謝試験までには日数を要するという欠点がある。凍結保存が可能であれば、アデノウイルス感染 HepG2 細胞を大量に作製・凍結保存し、随時試験に供することができる。今回は CYP3A4 典型基質である midazolam の代謝評価を実施したが、凍結前後による代謝能に大きな差はなく、AdCYP3A4 発現 HepG2 細胞が凍結保存可能であることが示唆された。

(10) 腸管細胞を用いた検討

CYP3A4 は肝臓だけでなく、ヒト小腸の上皮細胞にも多く発現しており、小腸は経口投与された医薬品の初回通過効果に大きく寄与している。しかし、ヒト小腸の薬物代謝モデル試験系はほとんどない。アデノウイルスは肝臓由来の細胞に効率良く感染するが、その他の細胞にも感染することから、本アデノウイルスを用いてヒト CYP 分子種を発現する腸管細胞を構築可能か否か検討することとした。その結果、LS174T 細胞においても AdCYP3A4 を利用することで感染量依存的な CYP3A4 の発現は認められた。しかしながら、その発現効率は HepG2 細胞における場合に比べて著しく低く、約 10 分の 1 であった。アデノウイルスは受容体を介して細胞内へ取り込まれることから、本研究結果で認められた両細胞間での発現効率差は、この受容体の発現量の差に起因する感染効率の差によるものと思われる

る。

(11) ヒト CYP1A2 および CYP2E1 を発現するアデノウイルス溶液の調製

本研究では CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2D6、CYP2E1 ならびに CYP3A4 の主要 7 分子種をヒト肝細胞とほぼ同様な比で発現させること、またその多分子種発現系において CYP2C19 や CYP2D6 の発現量を変動させたこれら分子種の多型性を反映するモデル細胞系を構築することを最終的な目標としている。本年度はこの準備段階として、ヒト CYP1A2 を発現する AdhCYP1A2 ならびにヒト CYP2E1 を発現する AdhCYP2E1 の増幅を行った。両ウイルスとも比較的高力価なウイルス溶液が得られたことから、今後酵素活性の確認を行い、共発現系への応用を行う予定である。

2) HepaRG 細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析

(1) ラジアルフロー型バイオリクター (RFB) による HepaRG 細胞の三次元培養

孔径 130 μm の PVA において、良好な細胞増殖が得られた。さらに、RFB 培養においては、平面培養では見られない細胞の重層化が観察された。今後は、培地の供給を増やしたり、より小さな系を用いたりして、培養環境の改善を行うことが必要であると考えられる。

(2) VECCELL による HepaRG 細胞の培養

VECCELL 培養においては、通常の培養では十分にコンフルエントになる日数培養した場合でも、膜断面の HE 染色では単独の細胞が多く見られたこと、また、分化誘導後の細胞を播種して培養した場合球状の細胞が多く見られたことなど、通常の平面培養とは明らかに異なる結果が観察された。細胞一個一個について形態や免疫染色によるタンパク発現の評価などが今後必要である。

(3) 微小管が薬物代謝関連遺伝子の発現へ及ぼす影響

HepaRG 細胞の RFB 及び VECCELL による培養の結果は、細胞を三次元培養すると細胞の形態のみでなく、細胞機能に関しても通常の平面培養と異なることを示唆した。我々は、既にヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 を三次元培養すると細胞骨格を構成する微小管分子である tublin-bII 遺伝子の発現が亢進することを見出している。そこで、微小管の安定化することが知られている docetaxel で HepG2 細胞を処理すると、HepG2 細胞を RFB で三次元培養した際と同様に多数の遺伝子で発現の亢進が観察された。この結果は、三次元培養が細胞骨格に影響

し、多くの遺伝子の発現を変化させる可能性を示唆している。

3) 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 遺伝子の発現がプロモータ領域の特に Sp1 結合部位近傍における DNA メチル化によって制御されることが明らかになった。同領域における CYP1B1 遺伝子のメチル化は大腸正常組織では検出されないことから、癌化にともなう epigenetic な変化であり、癌細胞における CYP1B1 機能の変化による薬物応答性の変動の原因となる可能性が強く示唆された。

本年度の研究成果は、薬物応答性を適正な評価するために薬物代謝関連遺伝子の epigenetic な変化に関する情報が重要であることをあらためて示唆することになった。

今後は CYP1A1 遺伝子の脱メチル化剤処理による発現誘導の分子機構の解明を試みるとともに、他の薬物代謝関連遺伝子についても薬物応答性の評価に応用するための基礎的な検討を行う。

E. 結論

今回の結果から、HepG2 細胞においてアデノウイルスベクターによって発現させた薬物代謝酵素は他の代謝反応系とほぼ同等の性能を有しており、MBI 評価のような種々の代謝試験への応用が可能であることが示唆された。しかしながら、MBI 評価については、発現速度のコントロールなど培養条件の変更等の検討を行い適切な条件の確立を計る必要がある。AdCYP 発現 HepG2 細胞は凍結保存が可能であることが示されたことから、試験期間の短縮も図れるものと考えられる。更に、ヒト結腸ガン由来の LS174T 細胞においても、HepG2 細胞に比べて発現効率は低かったが、活性を有する CYP3A4 の発現に成功した。今後は、他の CYP 分子種や数分子種の発現系についての詳細な検討、および複数分子種発現系での各種応用研究へ適応が可能かどうかの検討が必要である。

RFB を用いた三次元培養において、平面培養では見られなかった細胞の重層化が見られた。また、VECCELL-3D insert を用いた培養系において球形の細胞を観察することが出来た。これらの結果から、両培養系の HepaRG 細胞は共に、平面培養時とは異なる性質を持つ可能性が示唆された。更に、HepG2 細胞を docetaxel で処理した結果は、これらの変化が細胞骨格の変化に由来することを示唆していた。今後は、細胞間接着や骨格に関わる遺伝子、他の薬物代謝関連遺

伝子の変動を観察することにより、細胞機能の変化のさらなる解析が必要である。

CYP1B1 遺伝子がプロモータ内 Sp1 結合部位近傍領域におけるメチル化によって発現が制御されることが、培養細胞およびヒト組織において証明された。同遺伝子のメチル化が薬物応答性の変動要因となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Aoyama, K. Yoshinari, H.-J. Kim, K. Nagata, and Y. Yamazoe: Simultaneous expression of plural forms of human cytochrome P450 at desired ratios in HepG2 cells: Adenovirus-mediated tool for cytochrome P450 reconstitution. **Drug Metab Pharmacokinet** ,2009, in press.

T. Toriyabe, K. Nagata, T. Takada, Y. Aratsu, T. Matsubara, K. Yoshinari, and Y. Yamazoe: Unveiling a new essential cis-element for the transactivation of the CYP3A4 gene by xenobiotics. **Mol Pharmacol** ,2009, 75, 677-684.

T. Matsubara, K. Yoshinari, K. Aoyama, M. Sugawara, Y. Sekiya, K. Nagata, and Y. Yamazoe: Role of vitamin D receptor in the lithocholic acid-mediated CYP3A induction in vitro and in vivo. **Drug Metabolism and Disposition** ,2008, 36, 2058-2063.

W.Habano, T.Gamo, T.Sugai, K. Otsuka, G.Wakabayashi, S.Ozawa. CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. **Int J Oncol.**, 2009, 34,1085-91

Horiuchi S, Ishida S, Hongo T, Ishikawa Y, Miyajima A, Sawada JI, Ohno Y, Nakazawa K, Ozawa S. Global gene expression changes including drug metabolism and disposition induced by three-dimensional culture of HepG2 cells - Involvement of microtubules. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2009, 378, 558-62.

2. 学会発表

大腸癌細胞におけるプロモータ CpG 配列メチル化による CYP1B1 遺伝子の転写抑制
幅野 渉、蒲生俊恵、菅井 有、小澤正吾
日本薬物動態学会 第 23 回年会
(2008 年 10 月 30 日、熊本)

Effects of three-dimensional culture on the drug metabolism gene expressions in hepg2 human

hepatoma cell line

石田誠一、堀内新一郎、堀 環、宮島敦子、簾内桃子、本郷有克、石川陽一、澤田純一、小澤正吾、中澤憲一

日本薬物動態学会 第 23 回年会
(2008 年 10 月 30 日、熊本)

N-OH-MDMA のヒト肝における N-脱水酸化および N-脱メチル化反応について

宮島敦子、簾内桃子、中澤憲一、花尻 (木倉) 瑠理、合田幸広
(2009 年 3 月 26 日、京都)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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 細胞を用いて、さらには、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、ヒト iPS 細胞も併用して、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。3種類のいずれの万能細胞においても、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 morphogenetic 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可能であった。この6種類のサイトカインは全て重要、必須であった。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 ES 細胞の場合は、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、N-cadherin 陽性、Tie-2 陽性、Weibel-Palade 小体陽性も確認された。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。特に、ヒト ES 細胞からの分化誘導においては、KhES-1 株からは双方陰性群のみが誘導された。また、誘導された血管内皮細胞は (KhES-1 株から誘導された双方陰性群のみの集団においても)、in vitro と in vivo の双方の機能を有することも確認された。しかしながら、サル ES 細胞、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞いずれの細胞における分化誘導においても、細胞増殖の遅延・停止、細胞のサイズの増大、等の細胞老化を示す所見が認められ、細胞老化に伴う β ガラクトシダーゼの発現も確認された。老化に関わる細胞内シグナル伝達機構に関しては、p16Ink4a や p38MAP キナーゼに関与が示唆され、p38MAP キナーゼによる老化阻止も一部確認された。

分担研究者

- (1) 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
近藤 靖
(2) 筑波大学大学院人間総合科学研究科
千葉 滋

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ES細胞やヒトiPS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細胞やヒトiPS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細胞やヒトiPS細胞の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。本年度においては、ヒトES細胞は2株を使用して詳細な解析と比較検討を行ったので、株間の際なども含めて報告する。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。さらに、本年度においては、最近樹立されたヒトiPS細胞に関しても研究対象として取り扱い、その未分化維持を十分に確立した上で、血管内皮細胞の分化誘導に取り組む。また、特に本年度においては、ヒトES細胞、サルES細胞、ヒトiPS細胞

から分化誘導した血管内皮細胞に共通の特徴である細胞老化という現象を発見して解析したので、報告する。

また、分担研究においては、ヒト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。カニクイザルES細胞(CMK-6)、ヒトES細胞(KhES-1, KhES-3, HES-3)、ヒトiPS細胞(201B6, 201B7, 253G1)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

未分化サルES細胞(CMK-6)、ヒトES細胞(KhES-1, KhES-3)、ヒトiPS細胞(201B6, 201B7, 253G1)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。一部の実験においては、未分化ES細胞、iPS細胞を、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 morphogenic 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

に囊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、SCF、Flt3-L、BMP-4、TPO、IL-6/IL-6受容体キメラ蛋白質 (FP6) 存在下で17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、ヒトES細胞 (HES-3) 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。

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、CD14、CD45、等である。

5. ソーティング

一部のサルES細胞の実験においては、順天堂大学免疫学教室(奥村教授、八木田準教授)との共同研究により、FACS Aria (ベクトンディキンソン社) を用いて VEGF-R2 (KDR, Flk-1) 陽性細胞分画の分離採取を行った。また、一部のヒトES細胞に実験においても、ソーティングを行った。

6. 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、N-cadherin、Nanog、 α smooth muscle actin、PDGFR β 、eNOS、von Willebrand factor (vWF)、p16Ink4a、リン酸化 p38MAP キナーゼ、等である。p38MAK キナーゼの阻害実験においては、特異的低分子阻害剤である SB203581 を用いた。

7. ウェスタンブロットング

既報の手法によってウェスタンブロットングを行った。2次抗体と発色は ECL キットを用いた。解析した抗原は、VE-cadherin、calponin、LYVE-1、

Prox-1、Oct-3/4、Nanog、 β -tubulin である。

8. RT-PCR

VE-cadherin 発現の確認のために、既報の手法により RT-PCR を行った。

9. 電子顕微鏡解析

細胞を固定した後は、メディカルラボラトリーに外注して電子顕微鏡解析を行った。

10. 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。

11. アセチル LDL 取込能

アセチル LDL 取込能は、4穴チャ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。

12. 血管構築の再構成を目的とする3次元培養

一部に実験においては、血管構築の再構成を目的とする3次元培養を行った。具体的には、I-A型コラーゲンゲル(Cellmatrix typeI-A)を用い、マウスES細胞で報告されている方法 (Yamashita J, *et al. Nature* 2000; 408: p92-96) に準じて行った。

13. 染色体分析

未分化ヒトES細胞 (KhES-1、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バンド染色による染色体分析は、SRL に外注した。

14. β ガラクトシダーゼ測定

細胞を 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde で固定した後に、SA- β -Gal 染色液で反応させて、測定した。

15. in vivo 内皮機能

in vivo 内皮機能としては、マトリゲルブラクアッセーを行った。分化した血管内皮細胞を、マトリゲルに封入して、SCID マウスの皮下に移植した。3週間後に、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。染色体分析は、SRL に外注した。

1 6. hemogenic endothelium (2次造血) の確認

一部の実験においては、内皮細胞を介するとされる2次造血の確認のために、血液細胞の分化誘導後の2次造血(好中球産生)を、形態、機能、等により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者検体は使用しないし、臨床研究もない。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、研究はいっさい含まれない。

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、10月27日に文部科学省に届け出た。

分担研究者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. サルES細胞での分化誘導系の確立

アカゲザルES細胞の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種類の増殖因子(VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6))で培養を行い、カニクイザルES細胞からの血管内皮細胞の分化誘導が達成された。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かった。未分化ES細胞を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。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し始め、10日目以降には中心部(sphereが接着した場所)に囊状構造物(sac-like structure)が形成された。囊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。囊状構造物の壁を切除して中の球状細胞(血液細胞)を培養上清中に放出させた後に、囊状構造物の壁を構成する細胞と周囲の敷石状細胞をトリプシン・EDTAで剥離して、新たなゼラチンコートディッシュに継代した。継代された細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HEVEC)に極めて類似した紡錘状の形態をなして活発に増殖した。このような分化細胞は、索状構造形成能を有し、アセチルLDL取込能が陽性で、成熟血管内皮細胞の指標であるeNOSとvWFが免疫染色にて陽性であった。以上より、継代後の分化細胞は、均一な血管内皮細胞として増殖、分化していることが示唆された。すなわち、我々の開発した無フィーダー分化誘導システムは、ほぼ100%の純度の血管内皮細胞を産生することが出来る系であることが示された。このような血管内皮細胞のうちで、約30%の細胞が

VE-cadherin と PECAM-1 の両抗原とも陽性の典型的な血管内皮細胞であった。

以上のような分化誘導系に用いたサイトカインは全て血液細胞の分化誘導に関与するサイトカインであり、内皮細胞の誘導における必要性に関して検討した。まず、IL-3、IL-6 のいずれかを抜くと、前半の sphere 形成が不安定となり平面培養に移行できないことがあり、いずれも必須と考えられた。他の4種類のサイトカイン (VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L) に関しては、VEGF を抜くと、VE-cadherin と PECAM-1 の両抗原とも陽性の「典型的な血管内皮細胞」が出現しなくなり、BMP-4, SCF, Flt3-L のいずれかを抜いた場合も、このような「典型的な血管内皮細胞」の出現率が低下する傾向にあった。よって、「典型的な血管内皮細胞」の安定的な誘導には6種類全てのサイトカインが必要と考えられた。

2. サル ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞の詳細な解析

本年度においてサル ES 細胞からの 100% の血管内皮細胞の分化誘導が確立されたが、VE-cadherin と PECAM-1 の両抗原とも陽性の「典型的な血管内皮細胞」は 30% に止まり、残りは、いずれの抗原も陰性の「非典型的な」血管内皮細胞であった。そこで、FACS Aria により両分画を分けて採取して、さらに詳細な解析を行った。その結果、① VE-cadherin 陽性 PECAM-1 陽性細胞は、免疫染色でも細胞膜での VE-cadherin 陽性、CD34 陽性、VEGF-R2 陽性であること、② VE-cadherin 陰性 PECAM-1 陰性細胞は、CD34 陰性、VEGF-R2 陰性であること、③ VE-cadherin 陰性 PECAM-1 陰性細胞は、細胞内には VE-cadherin の mRNA、蛋白を有していること、④ いずれの分画の細胞も、VEGF-R1 陽性、VEGF-R3 陽性、Tie-2 陽性で十分な内皮細胞機能 (索状構造形成能、アセチル LDL 取込能) を有すること、が示された。以上より、VE-cadherin 陰性 PECAM-1 陰性の「非典型的な」血管内皮細胞も、内皮細胞としての性格を十分に有していることが明らかとなった。

3. サル ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞の老化に関する検討

サル ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は 8 継代までは増殖したが、次第に細胞のサイズが増大して、細胞増殖が遅延し、最終的には増殖を停止した。この現象は、細胞の老化に由来する可能性を考えて、細胞老化に特異的な β ガラクトシダーゼ測定を測定したところ、継代を重ねた増殖停止時期の細胞 (P10) において陽性で、

継代の若い増殖期の細胞 (P1) では陰性であることが確認され、継代と共に細胞老化が起きていることが明らかにされた。

次に、酸化ストレス等による老化における細胞周期停止に関与する CDK インヒビター

(p16Ink4a) の発現を増殖期 (P2) と老化期 (P6) において検討したところ、老化期においてのみ発現が認められた (一部は核内集積を示していた)。さらに、老化における細胞内シグナル伝達機構において p16Ink4a の上流に位置する p38MAK キナーゼの活性化 (リン酸化) を検討したところ、老化細胞においてのみリン酸化型が認められ、しかも核内に集積していた。このような細胞老化現象 (細胞のサイズの増大) は、p38MAK キナーゼの阻害剤である SB203581 によってある程度阻止されることが確認された。

4. 2 種類のヒト ES 細胞からの分化誘導培養の初期過程の解析

無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養で長期継代したヒト ES 細胞株 2 株 (KhES-1、KhES-3) を分化誘導実験に用いた。

霊長類 ES 細胞からの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 (VEGF, BMP-4, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-6)) で培養を行い、2 種類のヒト ES 細胞株 (KhES-1、KhES-3) のいずれにおいても、サル ES 細胞 (CMK-6) の場合と同様に、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。

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した。細胞形態は一部不均一な部分もあったが、概ね均一な形態を示し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) と極めて類似の形態を示した。2 種類のヒト ES 細胞株 (KhES-1、KhES-3) から誘導した血管内皮細胞の形態はやや異なり、KhES-1 株由来の分化細胞の方がやや大型の細胞の存在が目立った。また、サル ES 細胞の分化誘導系の場合と異なり、囊状構造物 (sac-like structure) は観察されなかった。

5. 2 種類のヒト ES 細胞からの継代可能な接着細胞の解析

2 種類のヒト ES 細胞株 (KhES-1、KhES-3) から誘導した敷石状の (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やヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical

vein endothelial cells, HUVEC) 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 解析を行った。その結果、KhES-3 株から誘導した分化細胞はサル ES 細胞から誘導された分化細胞と同様に 20-30% の両抗原陽性細胞が認められたが、KhES-1 株から誘導された分化細胞は全て両抗原陰性であった。すなわち、KhES-3 株由来血管内皮細胞は「典型的」血管内皮細胞と「非典型的」血管内皮細胞の 2 群から成り立ち、KhES-1 株由来血管内皮細胞は全て「非典型的」血管内皮細胞であった。

このように、KhES-1 株由来血管内皮細胞と KhES-3 株由来血管内皮細胞は大きく異なる一面を有していたが、以下のような様々の結果からどちらも均一で質の高い血管内皮細胞と考えられた。すなわち、どちらも VE-cadherin 遺伝子発現陽性、N-cadherin 陽性、索状構造形成能陽性、アセチル LDL 取込能陽性、成熟血管内皮細胞の指標である eNOS と vWF が免疫染色にて陽性、Tie-2 陽性、Weibel-Palade 小体陽性、であった。従って、継代後の分化細胞は均一な血管内皮細胞として増殖、分化していることが示された。すなわち、我々の開発した無フィーダー分化誘導システムは、ほぼ 100% の純度の血管内皮細胞を産生することが出来る系であることが示された。なお、分化細胞中には、未分化 ES 細胞 (Nanog、Oct-3/4、SSEA-4 陽性の細胞) の残存は認められず、pericytes などの平滑筋細胞のマーカー (calponin-1、 α smooth muscle actin、PDGFR β) も陰性であることが示された。また、リンパ管内皮細胞のマーカー (LYVE-1、Prox-1、VEGF-R4) も陰性であった。さらに、血液細胞マーカー (CD45)、単球マクロファージマーカー (CD14) も陰性であった。また、染色体分析の結果、未分化 ES 細胞と分化細胞のいずれにおいても正常核型であることが確認された。

5. ヒト ES 細胞 (KhES-1 株) から分化誘導された「非典型的」血管内皮細胞の *in vivo* における機能解析

以上の解析結果により、KhES-1 株由来血管内皮細胞と KhES-3 株由来血管内皮細胞はいずれも、成熟蛋白と成熟機能を有する高純度の血管内皮細胞であることが示された。しかし、KhES-1 株由来血管内皮細胞は、その全てが VE-cadherin と PECAM-1 がどちらも陰性の「非典型的」血管内皮細胞であり、このような「非典型的」血管

内皮細胞が真に生体内で血管構造を構築する機能があるかどうかを、マトリゲルプラクアッセーを行った。SCID マウスに移植後 3 週間で、移植した血管内皮細胞 (ヒト HLA を有しヒト由来細胞であること、内皮細胞マーカー PECAM-1 陽性であること、が確認された) は管空構造を形成し、しかも、その構造中には血液が流れ、マウス体循環と連結していること (マウス尾静注した FITC デキストランが確認されること) が示された。すなわち、KhES-1 株由来の非典型的な血管内皮細胞は、マウス体内で血管内皮細胞として機能していることが示された。

6. ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞での細胞老化に関する解析

カニクイザル ES 細胞と同様の分化誘導手法、すなわち、15% 牛胎児血清と 6 種類の増殖因子 (VEGF、BMP-4、SCF、Flt3-L、IL-3、IL-6) 存在下での無フィーダー 2 段階培養法 (前半の sphere 形成浮遊培養と後半の平面培養) によって、サル ES 細胞の場合と同様の 100% の血管内皮細胞の分化誘導が可能であった。しかしながら、サル ES 細胞からの分化誘導の場合と同様に、継代を重ねると細胞増殖の遅延と細胞サイズの増大など、細胞老化と考えられる状態に陥った。細胞老化に至るまでの継代数は、サル ES 細胞の場合と異なりヒト ES 細胞 (KhES-1) では 20 継代程度、ヒト iPS 細胞では 10 継代程度であった。

次に、サル ES 細胞の場合と同様に、老化における細胞周期停止に関する CDK インヒビター (p16Ink4a) の発現と老化における細胞内シグナル伝達機構において p16Ink4a の上流に位置する p38MAK キナーゼの活性化 (リン酸化) を検討した。ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞いずれにおいても、まず、増殖期においていち早く p38MAK キナーゼの活性化 (リン酸化) が認められ、その後に、p16Ink4a の発現と、更に遅れてその核内集積が認められた。

7. 上記の 1-6 とは異なるヒト ES 細胞の血管内皮細胞、平滑筋細胞分化誘導系の成果

OP9 細胞との共培養によって、ヒト ES 細胞 (HES-3 株) から、培養 8 日目に VEGF-R2 (KDR、Flk-1) 陽性細胞の誘導が可能であった。培養 8 日目の細胞群から、セルソーターで VEGF-R2 (KDR、Flk-1) 陽性、VE-cadherin 陰性の分画を採取して、IV 型コラーゲン上で VEGF 存在下に培養すると、VE-cadherin、PECAM-1、CD34、eNOS 陽性の血管内皮細胞と PECAM-1 陰性、 α smooth muscle actin 陽性の平滑筋細胞が分化誘導された。一方、同じ分画を IV 型コラーゲン上で

VEGF 非存在下で培養すると、 α smooth muscle actin 陽性、calponin 陽性の平滑筋細胞が分化誘導された。従って、ヒト ES 細胞から分化誘導される VEGF-R2 (KDR, Flk-1) 陽性細胞は、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞 (壁細胞) の双方に分化できる血管前駆細胞 (Vascular Progenitor Cells: VPC) であると考えられた。このようなヒト ES 細胞由来の VPC は、3 次元培養系において、血管ネットワーク構造を形成し、内皮細胞による管腔形成とその外側に内皮細胞とギャップジャンクションを有する周皮細胞の裏打ち構造を有する血管状の管腔構造が観察された。

8. 上記の 1-7 とは異なるヒト ES 細胞の血管内皮前駆細胞 (2 次造血) 分化誘導系の成果

ヒト ES 細胞 (KhES-3 株) を、SCF、Flt3-L、BMP-4、TPO、IL-6/IL-6 受容体キメラ蛋白質 (FP6) 存在下で 17 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。共培養後約 13 日目において、成熟好中球 (形態、機能の両面で) の分化誘導が認められた。すなわち、hemogenic endothelium を介する 2 次造血を再現することができた。

D. 考察

我々の行った分化培養によって、サル ES 細胞、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞の 3 種類の万能細胞から、極めて高効率に血管内皮細胞が分化誘導できた。世界的に見てもこれほど高効率での分化誘導は例が無く、極めて優れた技術開発に成功したと言っても過言ではない。また、ヒト iPS 細胞での成果は世界初の成果であり、特記すべき内容である。

他の研究グループで達成できなかった高純度の血管内皮細胞分化誘導が、我々の研究室で、しかも、サル ES 細胞、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞という 3 種類の万能細胞で可能であった理由として、以下の 2 点が推測される。まず第 1 に、我々の分化誘導系に用いたサイトカイン、増殖因子は、どちらかという血液細胞の分化に作用する物が主体で、血管内皮細胞の分化誘導用としては着想しにくい組み合わせである。本年度の解析により、今回用いた血液系サイトカイン 6 種類は、全てが血管内皮細胞の至適分化誘導に重要または必須であることが示された。第 2 には、我々の分化誘導系は前半の細胞凝集塊形成浮遊培養と後半の平面培養の 2 段階システムからなる分化誘導系であることであると考えられる。血液、血管内皮細胞分化誘導などの中胚葉分化法においては、このよう

な 2 段階培養は殆ど試みられておらず、我々の系の独自性が良好な結果につながった。

今回の検討から、とりわけ様々の成熟蛋白と成熟機能の存在から、あるいは極めて均一な形態から、分化細胞全てが血管内皮細胞と想定される。すなわち、ほぼ 100% の分化誘導効率と考えられる。しかし、VE-cadherin、PECAM-1 の細胞膜発現の有無に関しては、均一ではなく、両者が陽性の集団 (典型的な血管内皮細胞) と、両者とも陰性の集団 (非典型的な血管内皮細胞) に分かれることが明らかにされた。両者陽性集団 (典型的な血管内皮細胞) が血管内皮細胞であることは疑いの余地がないが、両者陰性の集団 (非典型的な血管内皮細胞) についても、分画操作による詳細な解析の結果、十分な内皮細胞としての性質を有することが解明された。今後は、肝の類洞内皮のような非典型的な血管内皮細胞に近い細胞の生体内での意義を更に明らかにしてゆく必要がある。さらに、本年度の成果により、2 種類のヒト ES 細胞のうちで、KhES-1 株からは双方とも陰性の集団 (非典型的な血管内皮細胞) しか誘導されないことが確認され、このような均一な非典型的な血管内皮細胞を用いて実験を行うことに成功した。その結果、非典型的な血管内皮細胞も十分な生体内での血管構造構築能を有することが証明された。興味深いことに、生体内で血管構造を構築した時の細胞が、もともと陰性であった PECAM-1 を発現していることが示され、VE-cadherin も含めた解析が必要である。

本年度の成果により、サル ES 細胞、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞の 3 種類の万能細胞から分化誘導される血管内皮細胞の共通の特徴としての細胞老化現象が明らかにされた。このような現象は、他のヒト初代培養血管内皮細胞やヒト平滑筋細胞などでは認められず、細胞老化研究の貴重な培養モデルと考えられる。その細胞内シグナル伝達機構としては、ストレス依存性細胞老化において報告されている p38MAK キナーゼ、p16Ink4a の経路の関与が示唆されたが、p21Cip1/WAF1 の関与が示唆される系もあり (予備検討の結果)、来年度に向けての課題となった。また、このような細胞老化が克服できて増殖が低下しないような内皮細胞が作成できるか否かも来年度の重要な課題であるし、老化阻止薬探索のためのスクリーニングの系としての応用も有りうるであろう。

E. 結論

サル ES 細胞、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞の 3 種類の万能細胞から、極めて高純度の成熟機能を有する血管内皮細胞を無フィーダー分化誘導系