

Colorado USA.)

59. 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)
60. Ochiya T. RNAi-based anti-cancer strategy 1st International Conference on Drug Design & Discovery. (Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE) invited
61. Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. 12th Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9, 2007 Seoul, Korea) invited
62. 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
63. 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.)
64. 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)
65. 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)
66. 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)
67. 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)
68. 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)
69. 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)
70. 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)

<新聞記事>

1. 「セルエイブル」 ヒト肝細胞3次元培養キット トータル肝機能評価を実証. 薬事日報 2009年9月9日朝刊6面
2. トランスパレントが米国進出 10月から本格的に販促スタート 欧米製薬企業への導入を視野. 薬事日報 2009年9月18日朝刊7面
3. 生体に近い肝細胞培養 新薬開発コスト大幅減 化粧品、医療へ応用期待できる. 日本経済新聞 平成20年5月18日
4. ミニ肝臓で創薬を支援 培養・選別キット誕生. フジサンケイ ビジネスアイ 平成20年6月16日

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
3. 大塚英典, 深石真行, 石塚 崇. 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. 特願 2008-220573, 出願日: 2008年8月28日
2. 大塚英典, 深石真行, 石塚 崇. 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, 特願 2008-230337, 出願日: 2008年9月8日
3. 大塚英典, 里見智美, 上野耕治, 山本 雅, 中曾根祐一. 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, 特願 2008-230223, 出願日: 2008年9月8日
4. 大塚英典, 里見智美, 上野耕治, 山本 雅, 中曾根祐一, 明石京子. 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, 特願 2008-230224, 出願日: 2008年9月8日
5. 大塚英典, 鄭 雄一, 位高啓史, 里見智美, 上野耕治, 山本 雅, 中曾根祐一. スフェロイドの製造方法、およびスフェロイドアレイ. 特願 2008-137224, 出願日: 平成20年5月26日.

2. 実用新案登録

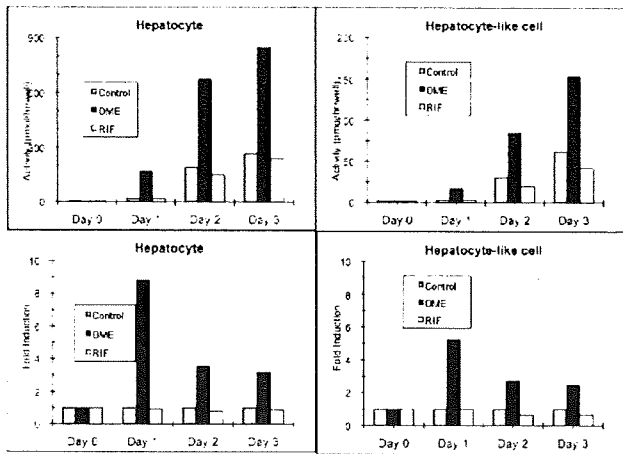
なし

3. その他

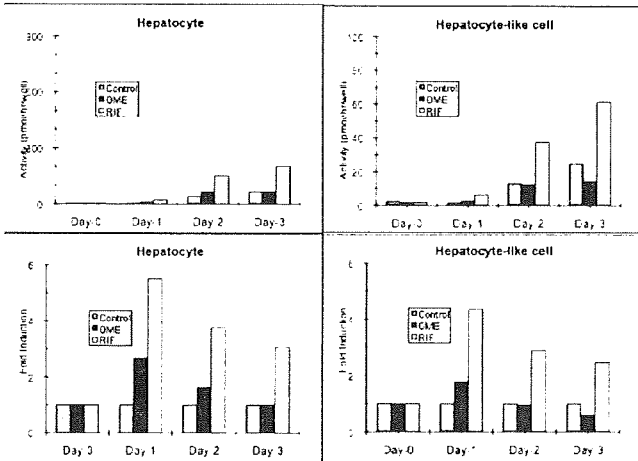
なし

図 1-4 各種 CYP 活性。右は対照の凍結ヒト肝細胞、左がヒト脂肪組織間葉系幹細胞分化肝細胞様細胞。

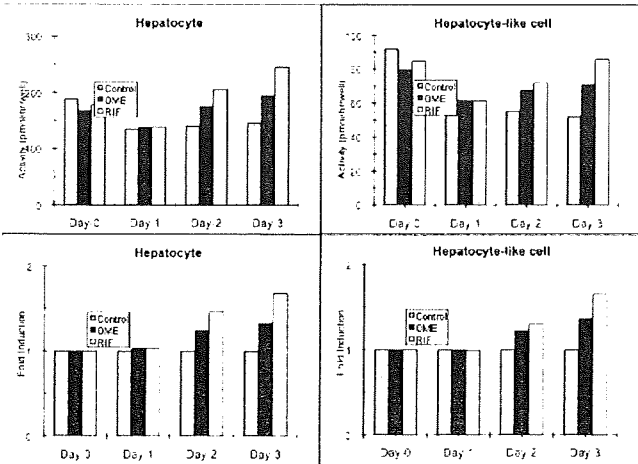
CYP1A2活性(上)と誘導倍率(下)



CYP2B6活性(上)と誘導倍率(下)



CYP2C9活性(上)と誘導倍率(下)



CYP3A活性(上)と誘導倍率(下)

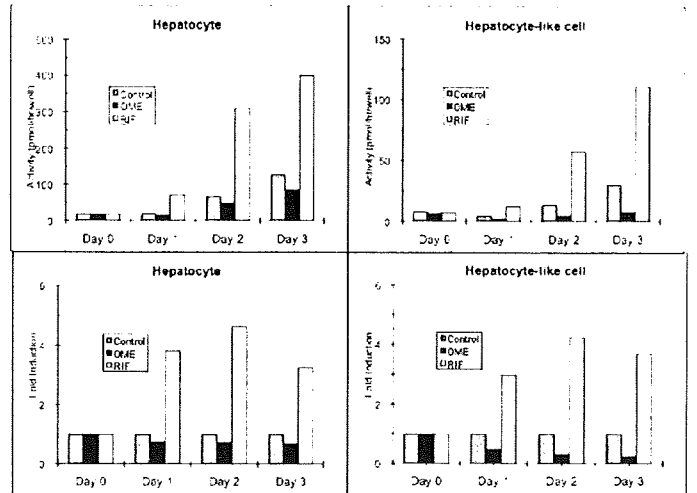


図 5 凍結ヒト肝細胞の薬物代謝活性と同活性の誘導能の経日変化。ここでは代表として CYP3A について示した。個々の活性の算術平均(第 4 カラム、ピンク)とプールド肝細胞の活性(第 5 カラム、黒)がほぼ同じであった。また活性は 28 日まで維持されていた。星印は、Lot. 808 の CYP3A 活性が極めて低いことを示している。このような場合も 3 ロットをプールドしておけば実験結果を得ることができる。

CYP3A活性

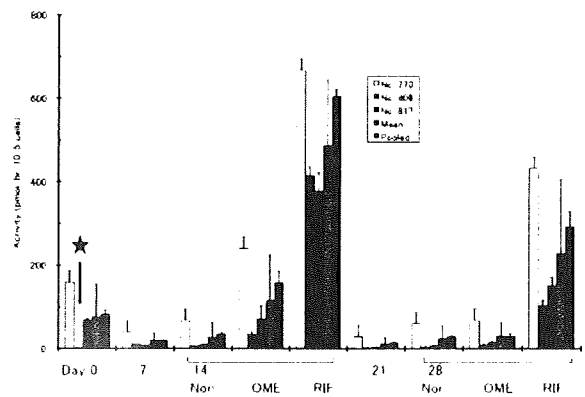


図 6 薬物代謝第 II 相の抱合酵素活性。抱合酵素活性は従来の単層培養では失われ易いが細胞アレイ培養ではよく維持できていることがわかる。ここでも個々の活性の算術平均(第 4 カラム、ピンク)とプールド肝細胞の活性(第 5 カラム、黒)が合っている。

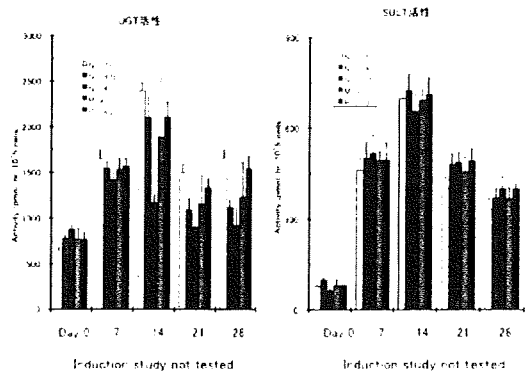


図7 周辺部と内側の活性値比較。CYP3A 活性値全 248 データについて、同じ実験条件の各値 (群内値, n=4~8) を偏差値化し、その偏差値の平均値と SD を求めた。この結果、外周の Well と内側の Well で活性値が異なるとはいえないことがわかった。

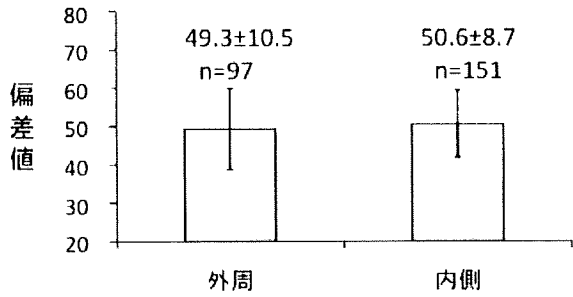


図8 共焦点レーザー顕微鏡によるヒト肝細胞スフェロイドの観察。矢印は胆汁プールと思われる像。このプールは Ca 非存在下で細胞間接着を緩めるとぼやけることから微細胆管構造に由来するものと考えられた。

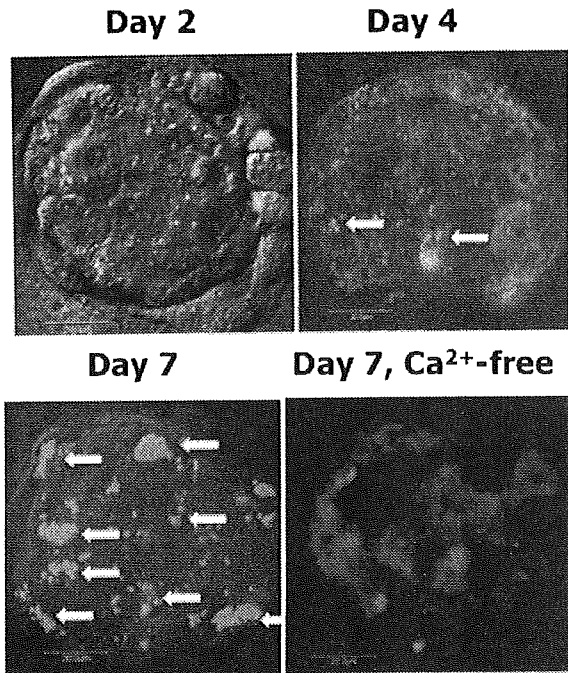


図9-11 上; 聖マリアンナ医科大学における手術摘出検体の研究利用状況。中; 熊井分担者による肝細胞三次元細胞アレイ培養の評価。mRNA 発現から見た CYP 維持能。下; 同じく熊井分担者による CYP 誘導能の検討。

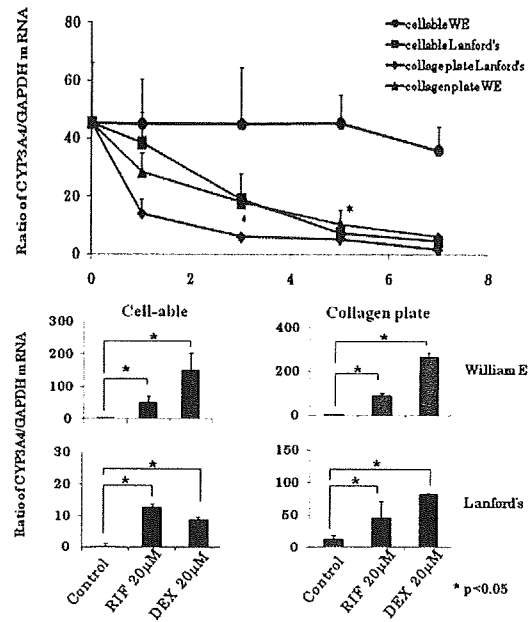
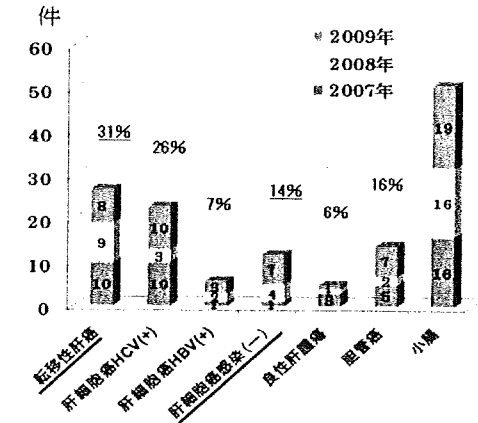
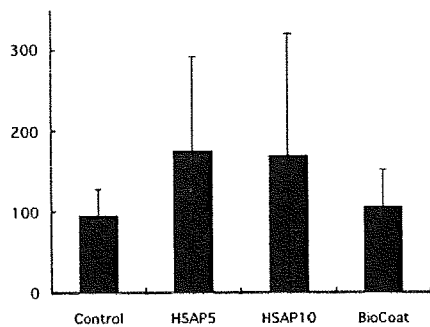


図 12 上は接着型 (Lot. 768)、中は非接着型 (Lot. 713) の各条件下での単位面積当たり生存細胞数。下は接着型 (Lot. 768) の培養状況 (位相差顕微鏡像)。

細胞数/mm²



細胞数/mm²

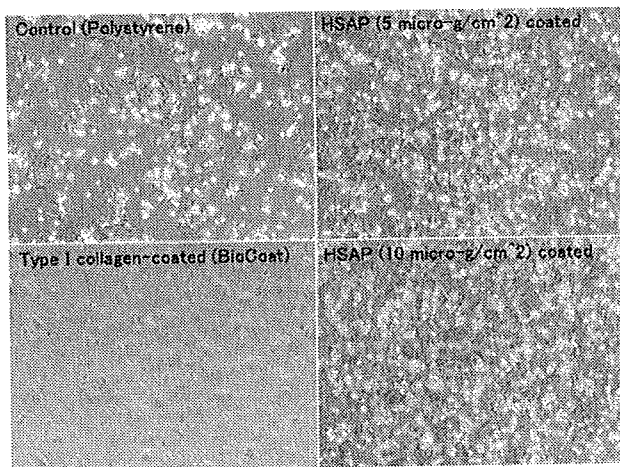
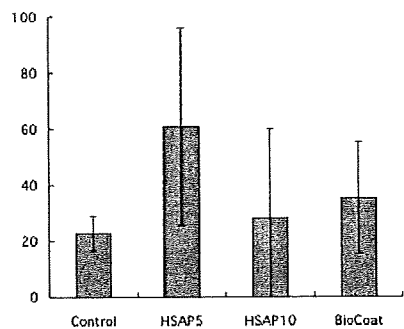
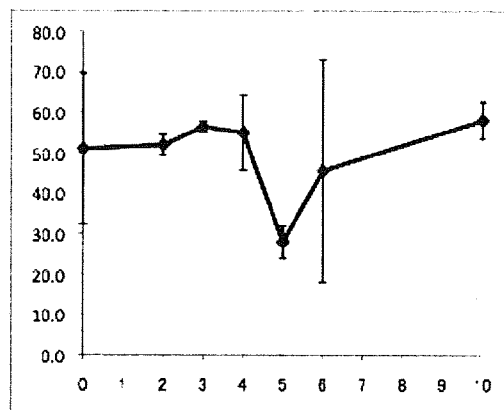
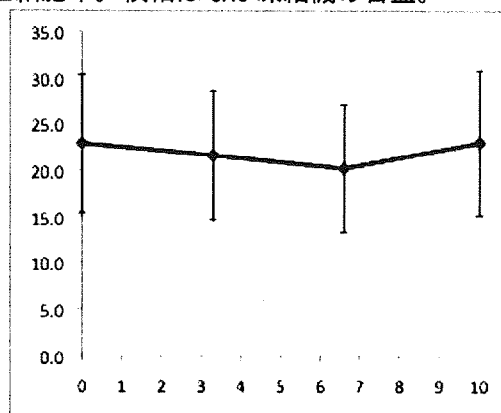


図 13, 14 CAS 凍結機で凍結したラット (n=10, 平均±SD) およびヒト (n=2, 平均±範囲) 肝細胞の生細胞率。横軸は CAS 凍結機の目盛。



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：標記研究課題について細胞生物学的側面から検討を行った。ヒト肝細胞からの代替細胞として期待される幹細胞分化肝細胞様細胞について、ヒト皮下脂肪に由来する間葉系幹細胞を取り上げ、薬物代謝活性ならびに同活性誘導能の有無を評価した。分化細胞で各種 CYP 活性ならびに rifampicin、omeprazole による CYP 誘導能が検出でき、その活性値は対照として測定したヒト凍結肝細胞の 20～80%にも達し、肝実質細胞の代替細胞として十分使用しようと考えられた。三次元細胞アレイプレートによる多ロット混合肝細胞培養で安定した薬物代謝活性および誘導能が維持された。3ドナー由来凍結肝細胞を混合培養した well は、個々の肝細胞が示す活性の算術平均値に近い値を示した。この活性は約 1 ヶ月の間保たれ、実験用に待機させることが可能とわかった。この時形成される三次元人工肝小葉の排泄トランスポーター活性を調べた。プローブとして CDFDA を用い Mrp2 の機能を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。胆汁プールの蛍光が検知された。Ca²⁺非存在下ではその境界が不鮮明になることから、肝細胞による排泄と微細胆管構造の構築がなされているものと考えられた。手術摘出肝組織由来肝実質細胞を用いた三次元細胞アレイプレートの評価は分担研究者の協力を得て複数の医療機関で行った。CYP3A4mRNA 発現量の維持について比較検討したところ、細胞アレイでは従来の培養法よりも高く維持され、同 CYP 誘導能もよく保持されていた。接着基質として、ヒト可溶化羊膜 HSAP を評価した。使用したヒト凍結肝細胞のロット（接着型、非接着型）それぞれにおいて、基質面における細胞占有率は、HSAP>コラーゲン>対照、の順であった。ヒト可溶化羊膜 HSAP はヒト凍結肝細胞の培養において従来のコラーゲンに勝る細胞 Scaffold になりうる可能性が示唆された。新しい凍結技術 CAS 凍結については、昨年度の研究で磁界強度に依存して冷却曲線が変化することがわかったので、磁界強度を変えてラットおよびヒトの肝細胞を凍結し、解凍時の生細胞率を測定した。その結果、磁界強度の中に最適値のあることを示唆する結果を得た。

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) 聖マリアンナ医科大学 | 熊井俊夫 |
| (5) (NPO) H A B 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 | 城村友子 |
| (10) (株) 生物資源応用研究所 | 桜川宣男 |

A. 研究目的

薬物動態研究においてヒト肝細胞は必須の研究ツールである。しかしながら、供給が少なく保存が難しいことから、安定して入手することは難しい。近年の再生医療研究の進展に伴い、幹細胞から肝細胞様細胞を分化できたとする報告が相次いでいる。そこで、この方法で得られた肝細胞様細胞が薬物動態研究に使用できるレベルの CYP 活性、同誘導能を表出しているかを調べることにした。

薬物代謝酵素の活性や誘導能における個人差の影響を弱めるために、創薬研究では複数ドナーからの肝細胞を用いることが実験上も申請面からも望ましいとされる。そこで東洋合成工業社が表面加工を加えた細胞アレイプレートを用い、複数ロットの凍結ヒト肝細胞およびそれらを混合したプールド肝細胞の薬物代謝活性を調べた。

初代肝細胞の単層培養は形態的にも機能的にも十分に in vivo の状態を反映しているとはいえない。近年、肝細胞の機能維持に優れる培養系として 3次元スフェロイド培養が注目されている。我々は 3次元培養基板の一つ、トランスパレント社の Cell-able の特性を評価している。Cell-able は均一な大きさの肝細胞スフェロイドをアレイ状に配置できる培養システムである。またフィーダー細胞として血管内皮細胞を使用する特徴がある。今回は排泄トランスポーター機能の解析を胆管腔構造およびトレーサー実験で検討した。

創薬スクリーニングにおいて初代ヒト肝細胞の使用は不可避である。ヒト肝細胞のソースは死体肝あるいは手術摘出肝組織であるが、世界的に流通して

いるのは前者由来の細胞である。すなわち肝移植のために提供を受けたが、医学的理由により移植に用いることができない（移植不適合）肝から分離される。このルートはわが国では現在法により禁止されているので、欧米で得られた肝細胞が凍結状態で輸入、販売されている。問題は肝細胞が極めて凍結保存に弱いことである。調製された過半数のロットは、凍結・融解後に細胞接着能が低下し、培養に適さなくなる。我々はこういった非接着ロット細胞も培養可能となる接着基質を探索している。今回、HSAPをこの目的で評価した。

肝実質細胞の凍結保存は未だに満足の行く結果が得られていない。そこで凍結保存技術の改良について、株式会社アビー製 CAS 凍結機で磁界強度を変えてラットおよびヒトの肝細胞を凍結し、解凍時の生細胞率を測定し、磁界の及ぼす効果を調べた。

B. 研究方法

1) 間葉系幹細胞分化肝細胞様細胞の評価

ヒト皮下脂肪由来間葉系幹細胞の分化は落谷の方法によった⁴。薬物プローブの代謝物測定は山田泰弘博士によった。

⁴Banas, Ochiya et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 24:70, 2009

2) 細胞アレイによる三次元培養系に関する評価

3 ドナー由来の凍結ヒト肝細胞（接着型, Xenotech, lot770, 808, 817）とそれらを混合した細胞を 96 穴細胞アレイプレート (Cell-Able) で培養した (2×10^4 /well)。フィーダー細胞として牛動脈内皮細胞株 HH を用いた。培養 28 日目までの 6 種の CYP 活性 (1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A) と 2 種の抱合酵素活性を LC-MS/MS によって調べた。CYP 誘導剤は omeprazole と rifampicin を用いた。

排泄トランスポーター活性の検出プローブとして 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein Diacetate (CDF-DA) を使用した。ヒト肝細胞は国立成育医療センターにて得られた手術摘出肝組織 (Monosegment 化ドナー肝余剰部、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症肝) から分離した (倫理審査 No. 305)。分離肝細胞は、フィーダー細胞 (ウシ大動脈内皮由来 HH 細胞, JCRB0099) を前培養した Cell-able に播種し、肝細胞用指定培地にて培養した。培養開始後 4, 7 日目に Ca^{2+} 存在下・非存在下における CDF の分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。トレーサー実験には [³H]-estrone sulfate を用いた。Cell-able はトランスバレント社製を用いた。

細胞アレイによる三次元培養系の評価は熊井分担者によっても別の視点から行われた。熊井分担者が所属する聖マリアンナ医科大学大学病院にて肝癌および肝疾患の外科手術適応患者より研究参

加の同意を受けて得られた肝組織の非疾患部位 (正常部位) 2 例から分離した初代肝細胞と NPO 法人 HAB 研究機構から得られた移植不適合肝臓組織 2 例、凍結ヒト肝細胞 (Xenotech, Lenexa, KS, USA) 2 例を用いた。細胞内 CYP3A4 の定量は、Real-time RT-PCR 法によった。誘導能は rifampin または dexamethasone、 $20 \mu M$ を添加し 48 時間培養して測定した。

3) 新規細胞接着基質、ヒト可溶性羊膜 HSAP の評価

ヒト凍結肝細胞は、米国 XENOTECH 社の接着型 (Lot. 768) と非接着型 (Lot. 713) を日本農産工業より購入した。HSAP は細胞応用資源研究所より供与を受けた。肝細胞は常法に従い解凍後、12 穴プレートに 1.9×10^5 cells/well (Lot. 768) または 2.5×10^5 cells/well (Lot. 713) の密度で播種した。接着基質として、対照 (Tissue culture plate)、HSAP コート (5, 10ug/cm²)、コラーゲンコート (Falcon, BioCoat) を比較した。

4) 肝細胞凍結に対する磁界の効果検討

分離直後のラットおよびヒト肝細胞を CP-1 液に懸濁し、CAS 凍結機により凍結した。各検体は 5×10^6 細胞を 0.5mL に懸濁した。凍結後は液体窒素中に保存し、1ヶ月〜6ヶ月後に解凍した。解凍は、37°C 温浴で 90 秒間加温し、解凍後直ちに氷冷した 10mL の DMEM 培地と混合した。遠心後、上清を除き、新しい培地に懸濁し、一部にトリプンプルーを加え細胞計数板で生死細胞を計数した。ラット肝細胞は 10 検体の平均と SD で、ヒト肝細胞は 2 検体の平均と差で表した。

5) 倫理的配慮

ヒト肝細胞は凍結標品の購入あるいは国立成育医療センターにて得られた手術摘出肝組織 (Monosegment 化ドナー肝余剰部) から分離して使用した (倫理審査 No. 305)。動物実験は国立成育医療センター研究所動物実験委員会の審査・承認の下に行った (No. 2000-001)。

C. 研究結果

1) 間葉系幹細胞分化肝細胞様細胞の評価

分化細胞において各種 CYP 活性ならびに rifampicin, omeprazole による CYP 誘導能が検出できた。分化細胞の活性値は対照として測定したヒト凍結肝細胞の 20〜80% と高く (図 1〜4)、代替細胞として十分使用しうると考えられた。

2) 細胞アレイによる三次元培養系に関する評価

すべての CYP 活性と誘導剤への反応性は細胞アレイプレートで良好に維持された。プールド肝細胞は個々の肝細胞が示す活性値のほぼ平均的な活性値を示した (図 5)。7-hydroxycoumarin のグルクロン酸抱合活性と硫酸抱合活性は CYP 活性と同じく維持された (図 6)。尚、本プレートでは well がどの位置にあるかによる影響は見られず、同じ細胞を播種した well 間のばらつき (群内変動) は小さく抑えられていた (図 7)。

ヒト肝細胞はスフェロイド形成後、局所に蛍光を発しており、微小胆管腔様構造が形成されたことを示唆していた(図8)。胆管腔構造は培養日数が経過するとともにスポットが大きく強くなり、発達しているようにみられた。また Tight Junction が開く Ca^{2+} 非存在下では明らかにスポットが消失し、蛍光化合物は胆管腔に蓄積することなく培地中に拡散していると考えられた。また、凍結保存を経た後に再度同条件下で実験をおこなった場合も同様の結果が確認できた。Estrone sulfate を用いたトレーサー実験では、3日目、7日目ともに同程度の排出活性値が得られた。単層培養では3日目、7日目ともに活性が見られなかった。

聖マリアンナ医科大学では肝癌および肝疾患の外科手術適応患者より組織採取の同意を得られる患者は、年間平均約30件である。その中で非感染症患者の検体は約45%を占めるが、初代培養肝細胞に使用できる検体数は約5件/年である(図9)。平成22年度はこのうち2件を本研究に使用した。その他の供給により計6ロットを実験に使用した。

単層培養を行った肝細胞の細胞形態は、William E に成長因子を添加した培地を使用した場合とランフォード培地を使用した場合のどちらでも5日間までその形態を維持して生存していた。7日目に、肝細胞の一部において線維芽細胞様に変化する細胞がみられた。また、cell-able を利用した肝細胞は1日目にフィーダー細胞(牛大動脈内皮細胞株:HH細胞)上に集積し、3日目にはスフェロイド様の形成が見られ、7日間維持された。Cell-able 上培養で William E 培地を用いた場合の CYP3A4 mRNA 発現量は、7日目まで単層培養より高い発現量が維持された(図10)。CYP3A4 の誘導は、各培養条件で確認できた(図11)。

3) 新規細胞接着基質、ヒト可溶性羊膜 HSAP の評価

解凍直後の生細胞率は Lot. 768 が 43.7%、Lot. 713 が 47.9%であった。播種後3日目の顕微鏡観察で肝細胞の培養状態は、接着型、非接着型それぞれの場合ともに、基質面における細胞占有率で、HSAP>コラーゲン>対照、の順であった(図12)。HSAP の濃度の違いは培養へ顕著な影響を及ぼさなかった。予備検討として測定した CYP3A4 活性 (Promega P450-Glo) は、各条件間で有意な差はみられなかった。凍結肝細胞の基質接着能が落ちる理由は不明である。

4) 肝細胞凍結に対する磁界の効果検討

ロット肝細胞では、解凍時の生細胞率の平均値が 20.2~23%と低く、また磁界強度の変化は特に差をもたらさなかった(図13)。一方、ヒト肝細胞では磁界強度5でやや落ち、また6はばらつきが大きいことからこのあたりに冷却の特異点があるのではないかと考えられた(図14)。

D. 考察

今まで幹細胞を肝細胞様に分化させた報告は相当数ある。それらの研究では、肝細胞分化の指標としてアルブミン合成・分泌、他、肝細胞特異的マーカーの mRNA 発現やタンパク発現によっていた。また、中には簡易アッセイキットを用いて薬物代謝活性、同活性誘導能を調べたものもあったが、創薬研究者の視点によって活性を調べたものはなかった。今回の研究で得られた CYP 活性はこれまでの幹細胞分化肝細胞様細胞の中でおそらく最高値であり、十分に創薬研究に使えると期待できるものである。

創薬研究においては細胞数の確保が必要である。今回用いた皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞は多分化能を有した状態で数パッセージの継代が可能である。現状のわが国における供給は手術摘出検体に依存しているが、1ドナー由来である程度の数量は確保できると考えられる。しかしながら今後は、死体からの採取も視野に入れるべきであろう。

プールド肝細胞は肝細胞ドナーの個人差を打ち消すことができ、仮に poor metabolizer が含まれていたとしても総体として誘導、阻害などのデータを得ることができる。また肝細胞をまとめることによって多くの同一活性の96穴プレートを作成することができる。さらに細胞アレイ化することによって、約1ヶ月の間実験に供するために待機させることが可能である。本研究により、細胞アレイ上のプールド肝細胞培養は薬物動態研究における費用と時間を縮減、短縮できると考えられた。

CDF-DA は細胞内に受動的(一部能動的)に取り込まれ MRP2 トランスポーターによって排泄される。CDF-DA は細胞でエステラーゼによって DA が水解され CDF となり発色する。また estrone も MRP2 によって排出される。本アッセイは培養液中の Ca^{2+} の有無により tight junction が開閉することを利用したもので今までも単層培養で行われてきたが、肝細胞のロットによっては活性が低いあるいは検出できないことも多かった。今回、Cell-able 上で3次元培養をすることによって、単層培養系よりも顕著な結果を得ることができた。

Cell-able によるヒト肝細胞培養は、分担者により別の実験系、視点によっても客観的評価がなされた。その結果から、熊井分担者は、フィーダー細胞の播種を手間とする以外は、従来の単層培養法と同じ培地で培養が可能であり、CYP3A4 mRNA の発現量を維持または誘導を保持できるため有用な培養法であるといえる。(中略) 今後は、CYP3A4 蛋白の発現や活性を評価し、また他の CYP 機能や輸送蛋白の機能も併せて検討し、薬効評価のツールとして有効な Cell-able の活用を確立したいと考える。と報告している。

市販ヒト凍結肝細胞で、接着型ロットは全体の1-2割とされ、価格も高い。非接着型細胞が培養実験に用いられるようになれば意義は極めて大きい。現在、

その目的にもっとも適った系は、ウシ血管内皮細胞をフィーダー細胞として用いる三次元培養系、Cell Able (株) トランスバレント) であるが、フィーダー細胞を使用しない系では未だ満足のゆく結果は得られていない。HSAP の可能性に期待したい。

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。昨年度の研究では機械的特性と凍結に及ぼす物理的影響を調べ、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。本年度はこの条件がラットおよびヒトの肝細胞の凍結にどのように効果を示すかを検討した。ラット肝細胞は以前より凍結が極めて難しいとされてきた。実際、今回も解凍時の平均生細胞率が 20% 余りと非常に悪かった。この状態では CAS 凍結の効果は特に見られなかった。ヒト肝細胞は状況によっては凍結解凍後に 60~80% 以上の生細胞率が得られる場合がある。今回のヒト肝細胞では、そこまで高率ではなかったが、50% 超の生細胞率が得られ、またその後に培養も可能であった。CAS 目盛 5 の位置で生細胞率が落ち、ここが何らかの特異点ではないかと考えられた。今後、さらにデータロガーと組合せ、詳細な検討を進めたい。

E. 結論

- 1) ヒト皮下組織由来間葉系幹細胞から分化誘導した肝細胞様細胞は、現状の分析系で十分検出できる CYP 活性ならびに同活性誘導能を有し、薬物動態研究に使用できると期待される。
- 2) 東洋合成工業社制作の三次元細胞アレイプレートによる肝細胞培養で安定した薬物代謝活性および誘導能が活性ならびに mRNA 発現量の測定から維持されることがわかった。複数ドナー由来肝細胞を混合して培養した well は、個々の肝細胞が示す活性の平均値を示した。この時形成される肝小葉類似の構造体は分泌トランスポーター活性も有することがわかった。
- 3) ヒト可溶化羊膜 HSAP はヒト凍結肝細胞の培養において従来のコラーゲンに勝る細胞 Scaffold になりうる可能性が示唆された。
- 4) 磁界強度調節型 CAS 凍結機の磁界強度を変えてラットおよびヒト初代肝細胞を凍結したところ、ヒト肝細胞において、磁界強度の影響と考えられる特異点があった。磁場強度が凍結過程に明らかに何らかの影響を与えていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto, Ikeya, Enosawa. Pre-conditioned cell array optimized for a three-dimensional

culture of hepatocytes. *Cell Transplant* 18; 677 - 681, 2009

2. 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* 18; 619-626, 2009

3. 絵野沢 伸. 医薬品原材料としての生物由来物質の現状. *Organ Biology* 16 (2); 217-223, 2009

4. 絵野沢 伸. ヒト肝組織からの肝細胞分離. *Organ Biology* 16 (3); 361-370, 2009

5. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: Its role in development and stem cells. *Dev Dyn* 238:265-276, 2009

6. 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, 2009

7. Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. Stem Cells for Hepatic Regeneration: the Role of Adipose Tissue derived Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther* in press.

8. Ochiya T., Yamamoto Y., Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation* in press

9. Song X, Guo Y, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T, Ding M, Deng H. A Mouse Model of Inducible Liver Injury Caused by Tet-on Regulated Urokinase for Studies of Hepatocyte Transplantation. *Am J Pathol* 75: 1975-1983, 2009

10. 山田泰弘. 創薬における探索薬物動態試験の役割と実践. 田辺三菱製薬研究年報. 2; 1-32, 2009 ISBN 978-4-901118-12-5

11. 山田泰弘. 創薬段階におけるハイスループット分析技術. 日薬理誌, 3月号 印刷中

<著書>

1. 絵野沢 伸. 心停止後の移植用臓器提供時における研究用組織提供にかかる諸問題. pp. 127-137, in バイオバンク構想の法的・倫理的検討- その実践と人間の尊厳- 町野 朔、雨宮 浩 共編 上智大学出版 ISBN978-4-324-08866-1 2009 年

2. 山田泰弘. 第一部 探索薬物動態試験, pp. 5-143, 152, 160, 164, 165-167, <探索・非臨床・臨床別> 薬物動態試験実践資料集 (株) 情報機構 2009 年

2. 学会発表

1. Enosawa, Miyamoto, Kubota, Jyomura, Ikeya. Construction of artificial hepatic

lobules-like spheroids on three dimensional culture device, CELL ABLE. Symposium 'Hepatocytes', 10th International Society of Cell Transplantation, Okayama, 4/20-21, 2009

2. Miyamoto, Ikeya, Suzuki, Enosawa. Biological evaluation of multicellular spheroids on microfabricated cell array, CELL ABLE, using cryopreserved/thawed human hepatocytes with low adhesion capability. 10th International Society of Cell Transplantation, Okayama, 4/20-21, 2009

3. 池谷武志、城村友子、高橋由里子、久保田久代、宮本義孝、絵野沢 伸. マルチウェル細胞アレイプレート、Cell-able を用いて作成した肝細胞機能小体の特性. 第16回HAB研究機構学術年会 平成21年5月22、23日 東京

4. 絵野沢 伸. ヒト凍結肝細胞接着基質としてのヒト可溶化羊膜 (HSAP). 第2回羊膜再生医療研究会. 平成21年5月23日 北里大学 (神奈川県相模原市)

5. 絵野沢 伸. コラーゲンビトリゲルの幅広い可能性: 創薬前臨床研究から医療材料としての応用まで. 公開シンポジウム 3次元培養担体として利用が進むコラーゲンビトリゲル研究の現状と展望. (独) 農業生物資源研究所 主催 平成21年11月20日、コンファレンススクエア エムプラス、東京 (講演要旨集 pp. 24-26, ISBN 978-4-931511-20-0)

6. Enosawa, Kato, Takatsu, Suzuki, Yamada. Successful application of pooled human hepatocytes on 96-well cell array 3D-culture plate for drug-metabolizing enzyme studies in drug discovery. 第24回日本薬物動態学会. 平成21年11月26-29日, 京都

7. 絵野沢 伸. ヒト肝細胞 創薬研究ツールから細胞医薬品へ. 第9回ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー 平成22年1月27日 大阪、千里ライフサイエンスセンター

8. Enosawa S. Introduction to the development and validation study of the new technology "Cell-able" for new drug discovery. Exhibitor hosted session, 49th Annual Meeting and ToxExpo, Society of Toxicology, 8th Mon - 11th Thur, March, 2010, Salt Lake City, Uta, USA

9. 落谷孝広. 間葉系幹細胞肝細胞による再生医療. 第10回 日本肝臓医生物研究会. 平成21年4月18-19日, 金沢

10. 落谷孝広. 幹細胞由来肝細胞の定義づけに関する勉強会. The Okayama 2009 Joint Conference of CTS & JSOPMB 会議. 平成21年4月20-21日, 岡山

11. 落谷孝広. ヒト間葉系幹細胞を用いた薬物の安全性・毒性試験. 日本薬物動態学会 第2回ビジョンシンポジウム. 平成21年6月5-6日, 東京

<新聞記事>

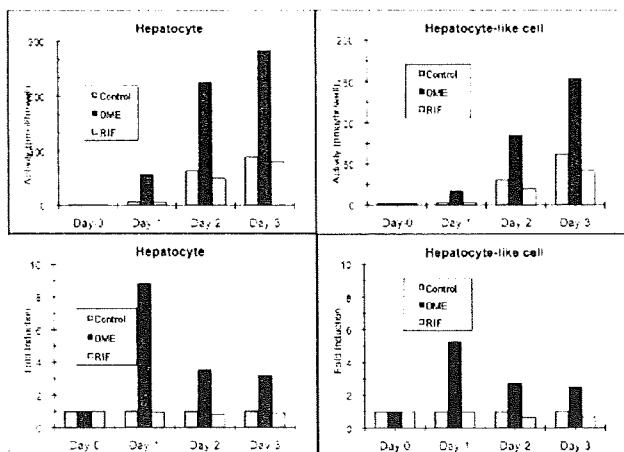
1. 「セルエイブル」 ヒト肝細胞3次元培養キット トータル肝機能評価を実証. 薬事日報 2009年9月9日朝刊6面
2. トランスパレントが米国進出 10月から本格的に販促スタート 欧米製薬企業への導入を視野. 薬事日報 2009年9月18日朝刊7面

G. 知的財産権の出願・登録状況

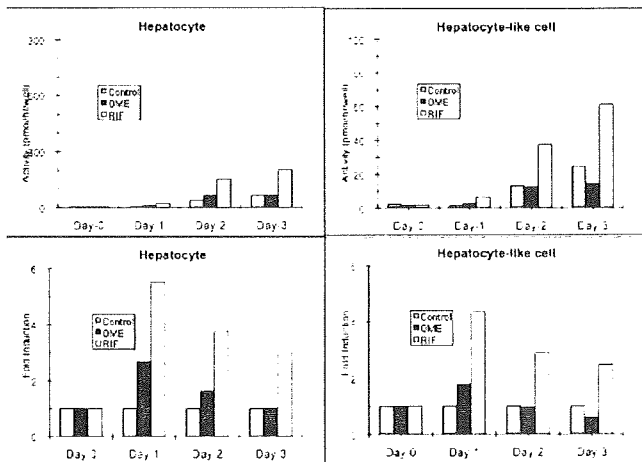
1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1-4 各種 CYP 活性。右は対照の凍結ヒト肝細胞、左がヒト脂肪組織間葉系幹細胞分化肝細胞様細胞。

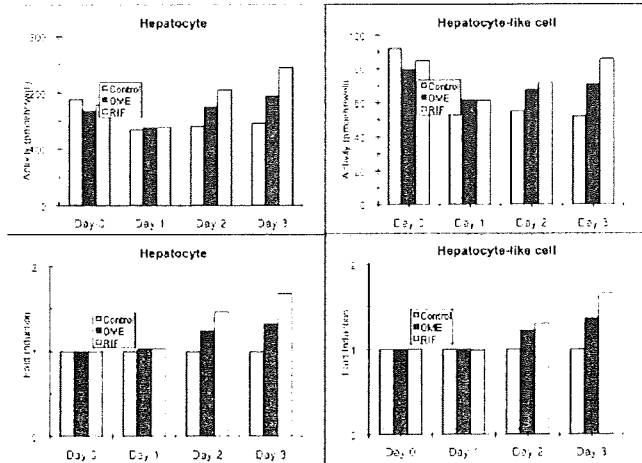
CYP1A2活性(上)と誘導倍率(下)



CYP2B6活性(上)と誘導倍率(下)



CYP2C9活性(上)と誘導倍率(下)



CYP3A活性(上)と誘導倍率(下)

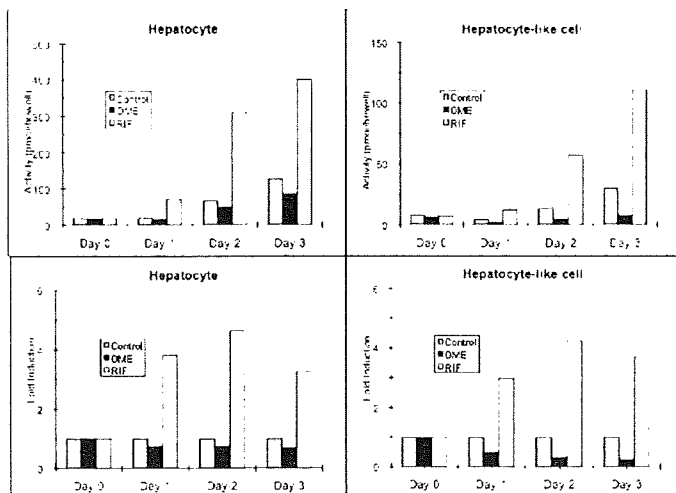


図5 凍結ヒト肝細胞の薬物代謝活性と同活性の誘導能の経日変化。ここでは代表としてCYP3Aについて示した。個々の活性の算術平均(第4カラム、ピンク)とプールド肝細胞の活性(第5カラム、黒)がほぼ同じであった。また活性は28日まで維持されていた。星印は、Lot. 808のCYP3A活性が極めて低いことを示している。このような場合も3ロットをプールしておけば実験結果を得ることができる。

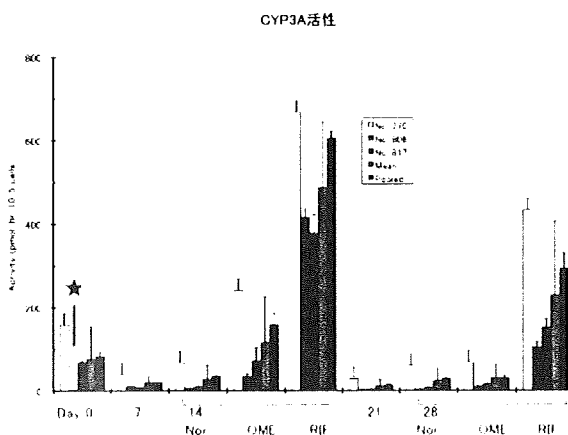


図6 薬物代謝第II相の抱合酵素活性。抱合酵素活性は従来の単層培養では失われ易いが細胞アレイ培養ではよく維持できていることがわかる。ここでも個々の活性の算術平均(第4カラム、ピンク)とプールド肝細胞の活性(第5カラム、黒)が合っている。

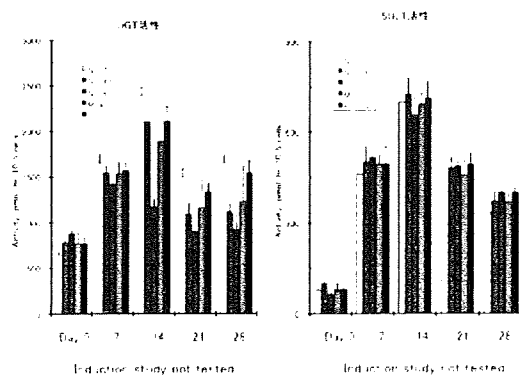


図7 周辺部と内側の活性値比較。CYP3A 活性値全 248 データについて、同じ実験条件の各値 (群内値, n=4~8) を偏差値化し、その偏差値の平均値と SD を求めた。この結果、外周の Well と内側の Well で活性値が異なるとはいえないことがわかった。

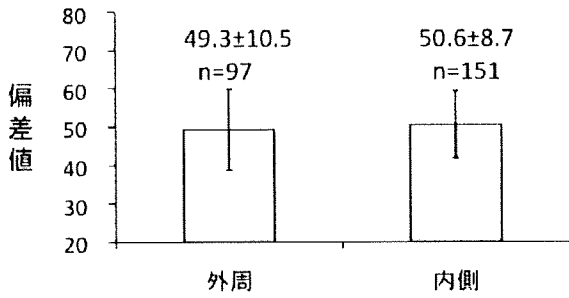


図8 共焦点レーザー顕微鏡によるヒト肝細胞スフェロイドの観察。矢印は胆汁プールと思われる像。このプールは Ca 非存在下で細胞間接着を緩めるとぼやけることから微細胆管構造に由来するものと考えられた。

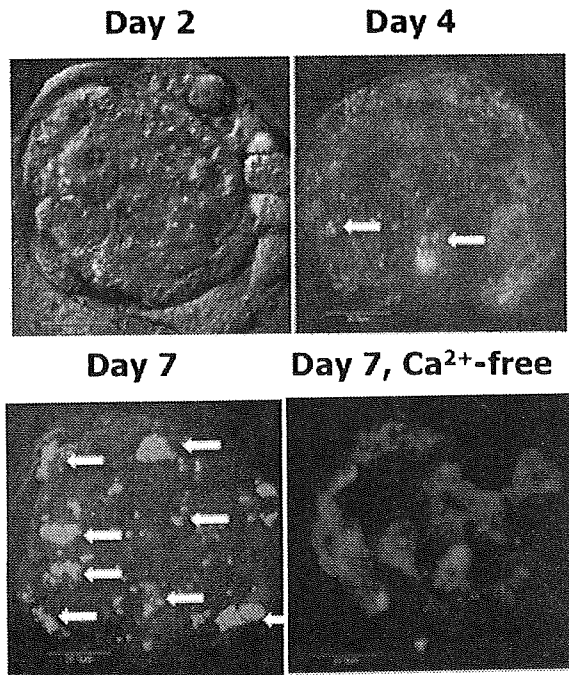


図9-11 上; 聖マリアンナ医科大学における手術摘出検体の研究利用状況。中; 熊井分担者による肝細胞三次元細胞アレイ培養の評価。mRNA 発現から見た CYP 維持能。下; 同じく熊井分担者による CYP 誘導能の検討。

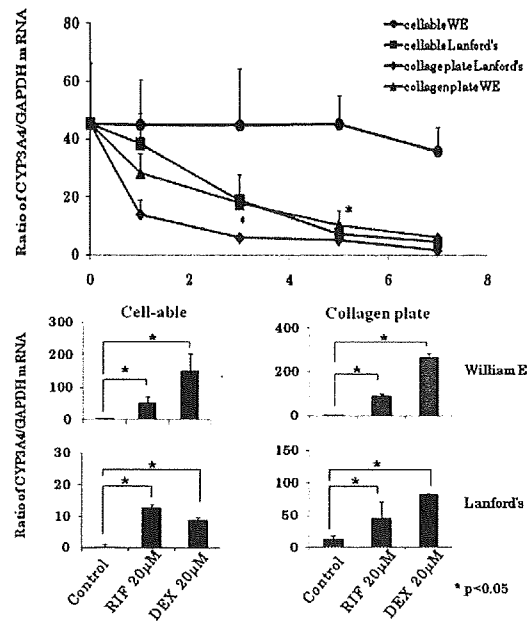
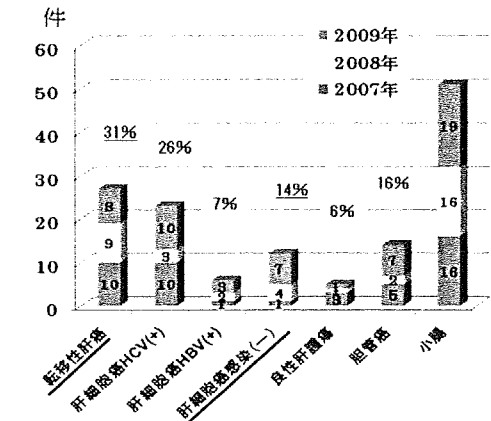


図 12 上は接着型 (Lot. 768)、中は非接着型 (Lot. 713) の各条件下での単位面積当たり生存細胞数。下は接着型 (Lot. 768) の培養状況 (位相差顕微鏡像)。

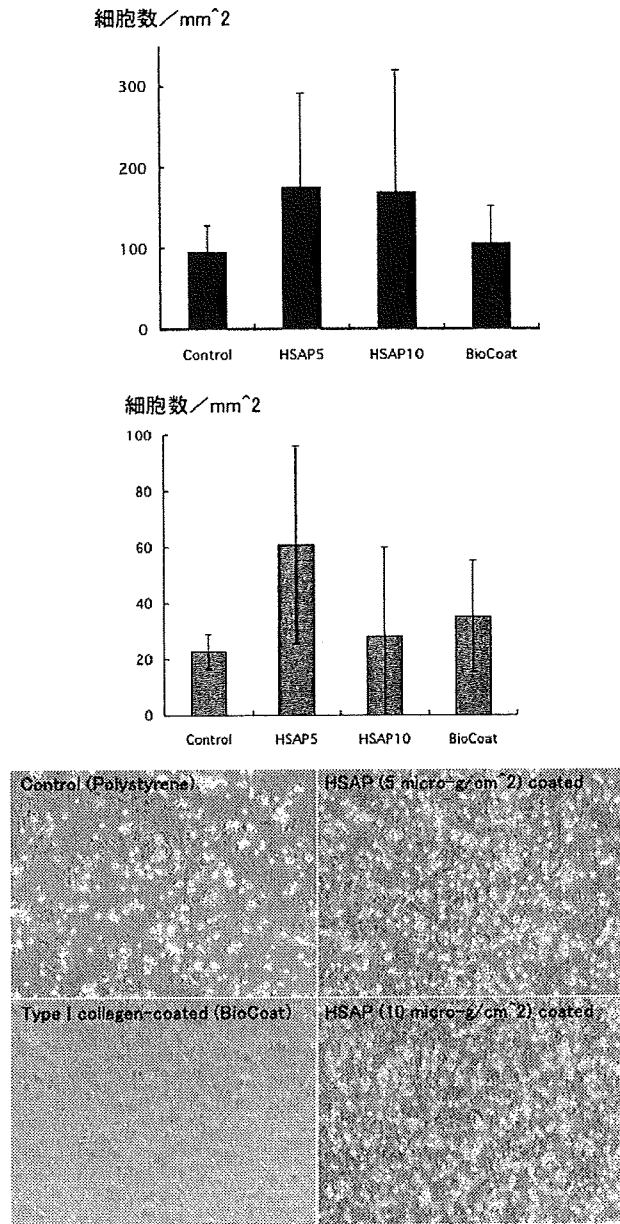
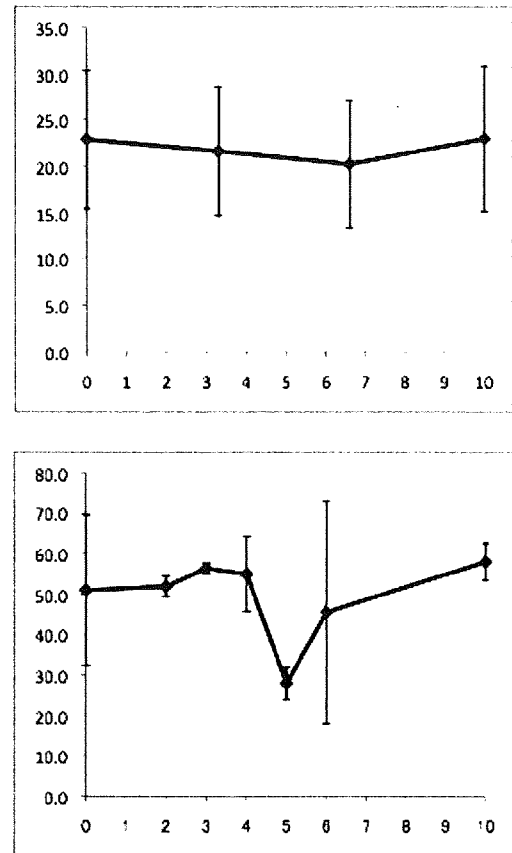


図 13, 14 CAS 凍結機で凍結したラット (n=10, 平均+/-SD) およびヒト (n=2, 平均+/-範囲) 肝細胞の生細胞率。横軸は CAS 凍結機の日盛。



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
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨 アデノウイルスベクターを用いたヒトチトクロム P450 (CYP) 発現システムについて検討を行ない、アデノウイルスによる薬物代謝酵素発現系がヒト肝における薬物代謝を予測できる新たな *in vitro* 実験系として有用であるという知見を得、有用性を国内外に示した。また、ヒト不死化肝細胞株 HepaRG の三次元培養への適用可能性について基礎的知見を得ることができた。腸管組織に於ける薬物代謝酵素等の発現への epigenetic な調節機構の関与を示唆する基礎データを取得した。

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) 田辺三菱製薬株式会社
薬物動態研究所 山田泰弘
- (6) 大日本住友製薬株式会社
薬物動態研究所 水木康之
(平成20年度まで)
- (7) ファイザー株式会社
中央研究所 嶋田 薫
(平成19年度まで)
- (8) 国立医薬品食品衛生研究所
大野泰雄
(平成21年度)

A. 研究目的

医薬品開発における薬物動態能の評価には、種差が存在するためヒト肝初代培養細胞が多用されているが、入手や倫理面で必ずしも最適な系とは言い難い。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研究を行った。

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、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検討した。

B. 研究方法

ヒト型代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用および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

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 CYP 発現ベクター (AdCYP3A4、AdCYP2C19 等) をヒト肝癌由来 HepG2 細胞等に導入することで、薬物代謝酵素 CYP3A4、CYP2C19 などの薬物代謝酵素単独又は複数を同時に発現する系を構築した。これらの系を用い、各薬物代謝酵素の酵素活性、阻害剤の影響と時間依存的阻害評価試験法を検討した。併せて、CYP 活性修飾因子の発現系を構築し AdCYP 発現ベクターと同時発現させ、CYP 活性に対する影響を検討した。更に、薬物トランスポーターを組み込んだ HepG2 細胞を作成し、薬物の取り込みと代謝の相互作用を評価することが可能な試験系の構築に着手した。また、AdCYP 発現 HepG2 細胞を短期間凍結したのち融解することで凍結融解の酵

素活性への影響の初期検討を行った。CYP3A4及びCYP2C19の代謝活性、阻害剤の効果の測定は定法に従い行った。対照としては、バキュロウイルス発現系、並びに、凍結ヒト肝細胞、ヒト肝ミクロソームを用いた。

感染操作、代謝反応並びに代謝物濃度測定の概要を以下に示す。

CYP3A4 発現アデノウイルス (AdCYP3A4)、CYP2C19 発現アデノウイルス (AdCYP2C19) 及び CYP2D6 発現アデノウイルス (AdCYP2D6) は、東北大学大学院薬学研究所・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、主に 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 $25 \mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、 37°C の 5% CO_2 インキュベーターにて 60 分間静置した。その後培養液を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、 37°C の 5% CO_2 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) 代謝反応並びに代謝物濃度測定

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°C の 5% CO_2 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 $50 \mu\text{L}$ 採取し、I. S. 入り MeOH 溶液を $200 \mu\text{L}$ 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。

HepaRG 細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析

ヒト不死化肝細胞株 HepaRG と HepG2 細胞を用い、三次元培養への適用と同条件下における細胞機能の変化と遺伝子発現への影響を調べた。更に HepaRG 細胞の細胞骨格の安定化による CYP 発現の薬剤による誘導について検討した。

ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

腸管組織における薬物代謝酵素とその転写を司る因子の発現の差異と、DNA メチル化などの epigenetic な機構が関与する可能性について、手術摘出ヒト腸管組織と大腸癌由来培養細胞株を用い検討した。

(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および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 細胞とヒト肝ミ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。ヒト肝ミクロソームは 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. 研究結果及び考察

ヒト型代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用および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

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 (CYP3A4、CYP2C19、CYP2D6) は、単独での発現、又は、二種の分子種の同時発現において他の代謝反応系とほぼ同等の性能を有しており、各薬物代謝酵素の酵素活性、阻害剤の影響など種々の代謝試験への応用が可能であることを示した (図 1、図 2、研究発表③、⑦、⑧、⑪、⑫、⑮)。

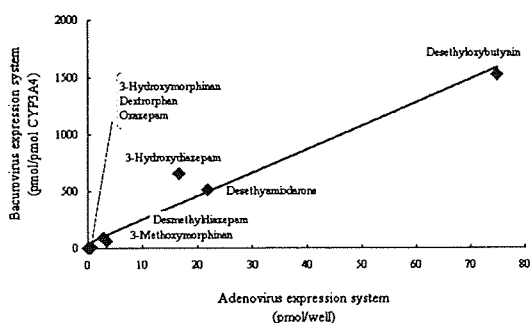


図 1 CYP3A4 発現 HepG2 細胞と CYP3A4/Supersome による代謝物生成量の間的相关

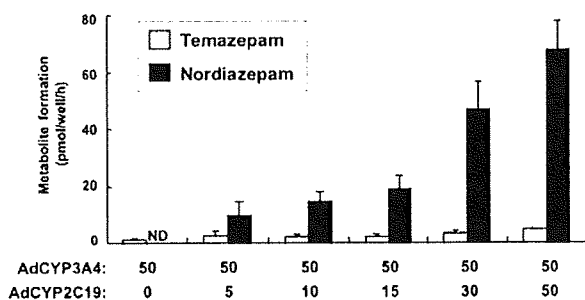


図 2 CYP3A4 及び CYP2C19 共発現細胞のジアゼパム代謝プロファイル

AdCYP3A4 を用いて 3 ロットの HepG2 細胞に CYP3A4 活性を発現させたときの活性値は、何れのロットにおいても感染力価に依存して増加し、その増加プロファイルにロット間差は認められなかった (図 3)。したがって、本

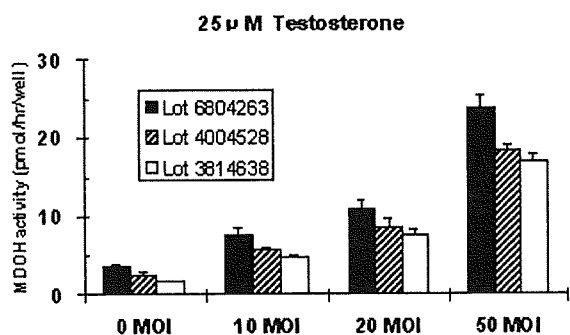


図 3 細胞のロット間での代謝活性の差異

システムで発現した CYP3A4 活性値は HepG2 細胞の由来に依存せず、一定の CYP3A4 活性値を有する発現系細胞を創薬研究に提供することが可能であることが示された。スモールスケール化についても検討を行い、96 ウェルプレートフォーマットでの試験法を確立した (図 4)。

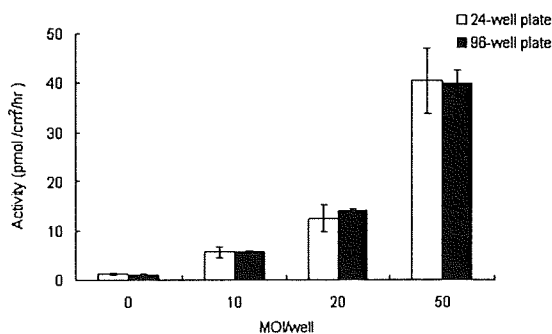


図 4 感染プレート間でのウイルス量依存的な CYP3A4 代謝活性の比較

時間依存的阻害については、培養条件の検討を行い長時間暴露による評価が可能であることを明らかとした (図 5)。そこで、本細

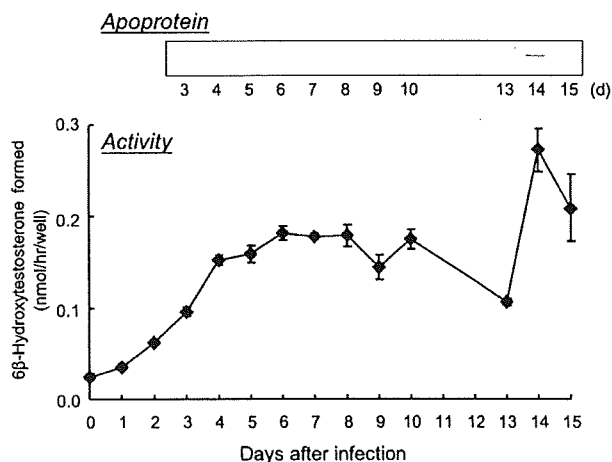


図 5 AdCYP3A4 感染後の HepG2 細胞における CYP3A4 活性の経時変化

胞での利点を活かし、長時間の化合物曝露に対する CYP3A4 の時間依存的阻害評価法について検討を行った。化合物の処置条件を、基質代謝反応時のみ (競合阻害評価)、前処置時のみ (時間依存的阻害評価)、前処置、基質代謝反応時ともに (総合的阻害評価) の 3 条件を設定し、ミダゾラムの代謝反応に対する各化合物の阻害評価を実施した。時間依存的阻害を示さないことが知られているケトコナゾール、シメチジンでは前処置による阻害

への影響が見られないのに対し、マクロライド系抗生物質（トロレアンドマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシン）や Ca^{2+} チャネルブロッカー（ミベフラジル、ジルチアゼム、ベラパミル）では前処置による阻害増強が確認され、化合物の代謝に伴う Mechanism-based inhibition (MBI) の影響を確認できた。また臨床薬物間相互作用試験での AUC 変化比と本評価での阻害率を比較したところ、総合的な CYP 阻害評価条件での阻害率との間に概ねの順列傾向を確認できた。本細胞では CYP3A4 の生合成が維持した条件で、化合物の比較的長時間の曝露が可能であることから、化合物の代謝に伴う MBI の影響を含めた総合的な CYP 阻害評価法であり、薬物間相互作用リスク予測法として有用であることが示唆された(図 6、研究発表⑮)。

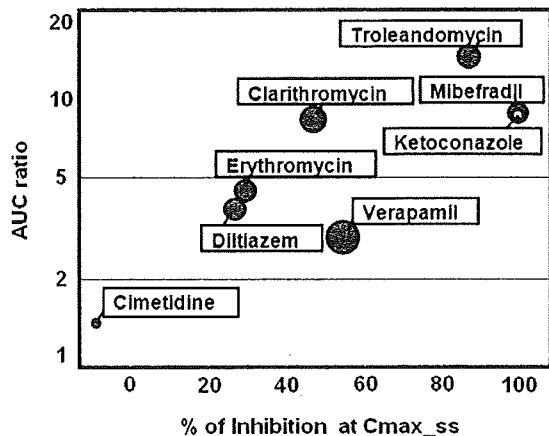


図 6 CYP3A4 発現 HepG2 細胞による総合的阻害評価条件における臨床血漿中最高濃度での阻害率と臨床で見られた AUC 変化比との相関

CYP 修飾因子のうちチトクロム b_5 は AdCYP3A4 と共発現すると CYP3A4 活性を上昇させることが明らかとなった(図 7、研究発表⑬)。

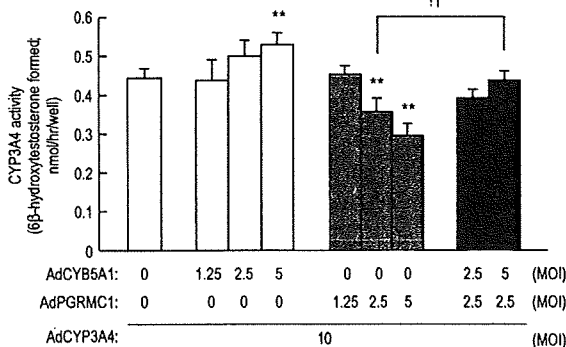


図 7 チトクロム b_5 の CYP3A4 活性への影響
又、ヒト結腸ガン由来の LS174T 細胞においても活性を有する CYP3A4 の発現に成功した。こ

の結果は、感染細胞種やその培養方法などを検討することで、より良い試験系の構築が可能であることを示唆している。更に、AdCYP 発現 HepG2 細胞の凍結保存は短期間で可能であることが示されたことから、長期間保存や凍結保存法の検討を行うことで評価法の簡略化に寄与できると期待される。

HepaRG 細胞の薬物代謝酵素誘導機構の解析

HepaRG 細胞をラジアルフロー型バイオリアクターで三次元培養すると細胞の形態が通常の平面培養とは異なっており、細胞機能も変化していることが観察された。そこで細胞骨格の変化の薬物代謝関連遺伝子発現への影響について HepG2 細胞を docetaxel で処理することで検討したところ、調べた 84 の薬物代謝酵素関連遺伝子中 70 の遺伝子で発現の亢進が認められた(研究発表⑥、⑩)。そこで、次に、HepaRG 細胞においても同様の現象が起こるかどうか検証した。HepaRG 細胞を docetaxel に暴露後、rifampicin による酵素誘導を観察した。その結果、CYP3A4 及び CYP2C9 の発現誘導倍率の亢進が見られた。

ヒト腸管組織を用いた薬物代謝酵素活性評価法の開発

腸管組織においては薬物代謝酵素やトランスporter 遺伝子の発現の差異と、それに対する epigenetic な機構の関与について検討を行った。その結果、*CYP1B1* 遺伝子で epigenetic な機構が発現の制御に関与するという知見を得た(研究発表⑤、⑨)。更に i) LS180、Caco-2 などの大腸癌細胞では、*CYP3A4* およびその発現制御因子 (*PXR*, *VDR*, *PRMT1*) の発現プロファイルにおいて heterogeneity が認められる。ii) *CYP3A4* 高発現細胞と低発現細胞の間では、5-azaC に対する応答性が異なっている。iii) 低発現細胞では、5-azaC 処理により発現量が回復するという知見を得た。これらより *CYP3A4* およびその発現制御因子 (*PXR*, *VDR*, *PRMT1*) において DNA メチル化による発現抑制機構の関与が示唆された。ただし、これらの細胞間で *CYP3A4*, *PXR*, *VDR*, *PRMT1* 遺伝子のメチル化状態の差は認められず、他の *CYP3A4* 発現制御因子が DNA メチル化の責任遺伝子となることが推測された。以上より、epigenetic な変化が腸管における薬物代謝関連遺伝子の発現調節においても重要であると考えられた(研究発表⑭)。

AdCYP 発現系は細胞内で複数の代謝酵素を任意に発現出来る特性を有することから、代謝能の個人差を反映した試験系の確立が期待される。その際、個々の代謝酵素活性を向上する手法としてトクローム b_5 との共発現や三次元的培養法の検討が有用であると考えられる。すでにスモールスケール化によるスループットの向上は図られたが、更に凍結保存法を工夫することでより試験系の簡略化が期待できる。更に、薬物トランスポーターと共発現することで、薬物の取り込みと代謝の相互作用を評価することが可能な試験系の構築が可能と考えられ、既に研究に着手している。更にまた、AdCYP 発現系は細胞レベルでの実験が可能であるため、医薬品候補化合物の毒性評価を代謝産物を含め試験することが可能である。AdCYP 発現細胞単体または肝非実質細胞など他の細胞との共培養系を構築することで、新たな毒性評価系の提示が可能と考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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**, 728-733.
- ② 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.
- ③ 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, **24**, 209-217.
- ④ 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.
- ⑤ 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**,1085-1091
- ⑥ 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**, 558-562.

2. 学会発表

- ⑦ 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)
- ⑧ 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)
- ⑨ 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)
- ⑩ 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)
- ⑪ ヒト代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用 二宮 瑞樹、山口 嘉隆、本橋理恵、安達 弥永、関谷 裕次、水木 康之、橋本 博幸、山田 泰弘、嶋田 薫、宮島 敦子、簾内 桃子、吉成 浩一、山添 康、

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)

- ⑫ 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 日本薬学会第 129 年会 (2009 年 3 月 26 日、京都)
- ⑬ ヒトチトクロム P450 酵素活性に対するチトクロム b_5 様ヘムタンパク質 PGRMC1 の効果：アデノウイルス発現系を用いた解析：新宮 究、吉成 浩一、山添 康、第 48 回日本薬学会東北支部大会 (2009 年 10 月 18 日、仙台)
- ⑭ 大腸癌細胞における PXR、VDR、PRMT1 遺伝子のメチル化と CYP3A4 発現調節における役割 幅野涉 他 日本薬物動態学会 第 24 回年会 (2009 年 11 月 27 日、京都)
- ⑮ アデノウイルス発現系を用いたヒト代謝研究のための薬物代謝酵素発現細胞の応用 藤島未来、安達 弥永、二宮真一、吉成 浩一、山添 康、中澤 憲一 日本薬物動態学会 第 24 回年会 (2009 年 11 月 28 日、京都)

E. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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 アデノウイルスベクターを用いたヒトチトクロム P450 (CYP) 発現システムについて CYP3A4、CYP2C19、CYP2D6 を対象に基礎検討を行なった。CYP3A4 発現細胞については時間依存的阻害評価法の可能性について検討した結果、代謝過程に伴う酵素の不活性化を含む総合的な阻害を確認できた。また、CYP3A4 活性修飾因子について検討し、本システムにおいてもチトクロム b_5 は CYP3A4 酵素活性を増強するのに対し、PGRMC1 は活性減弱作用を示すことが示された。HepaRG 細胞を細胞骨格を安定化するドセタキセルで処理すると、薬物代謝関連遺伝子の発現誘導が亢進することを見出した。大腸癌培養細胞における CYP3A4 遺伝子発現レベルに関してエピジェネティックな解析を行い、DNA メチル化が発現レベルに寄与する可能性が示唆された。

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) 田辺三菱製薬株式会社
薬物動態研究所 山田泰弘
- (6) 国立医薬品食品衛生研究所
大野泰雄

A. 研究目的

薬物代謝酵素は医薬品の体内動態を決定する主要な因子であるが、実験動物とヒトの間では、発現している酵素の種類、量そして酵素学的性質などの点で明確な種差が認められる。したがって、実験動物で得られた薬物代謝（薬物動態）の試験結果をヒトに外挿することは極めて困難である。そのため、医薬品開発においては、ヒト薬物代謝酵素の組換え酵素やヒト肝ミクロソームまたは培養ヒト肝細胞などを用いた *in vitro* 試験を行い、実験動物で得られた結果と組み合わせてヒトの薬物代謝が予測されている。しかしながら、臨床試験や上市後に、酵素誘導による薬物相互作用、活性代謝物の生成不足、あるいは代謝物による予期せぬ毒性など、ヒトにおける薬物代謝の予測が不十分であった

ために開発中止や発売中止となる医薬品（候補化合物）は依然として多い。このため、適切なヒト薬物代謝の予測系の重要性は増している。

現在我が国では前臨床段階でヒトにおける *in vivo* 薬物代謝試験を行なうことは事実上不可能であり、ヒト肝ミクロソームや凍結ヒト肝細胞などを用いた *in vitro* 試験によりヒトにおける薬物代謝を予測している。凍結ヒト肝細胞を用いた試験では、被験化合物を生細胞中で代謝させることから、ミクロソームを用いた試験よりもより *in vivo* に近い結果が得られるため、最も *in vivo* を反映する試験系として利用されている。しかし、ヒトの薬物代謝酵素の活性には大きな個人差があるため、肝細胞のロット間にも大きな活性差が認められる。このため、複数ロットの肝細胞を用いて試験を行なう必要があり、時間的、経済的な負担は大きい。また同一ロットの細胞の供給量には限りがあるため、同一条件での試験の再現が行えないこともある。

本研究ではこれらの問題点を克服する手段の1つとして、東北大学 山添らが開発したアデノウイルスによるヒトチトクロム P450 (AdCYP) 発現システムを用い検討を加えてきた。本システムでは、肝由来細胞へ非常に効率良く遺伝子を導入することができる。また、異なる分子種を発現する複数のウイルスを同時に感染させることで理論上は全てのヒト CYP 分子種を単一の細胞に発現することが可能と考えられる。さらに、タンパク質発現量は感染させるウイルス量

にほぼ比例することから、複数のウイルスを感染させる際にその量比を調節することで、希望の比率で複数の酵素を発現することができ、CYP酵素活性の多型性を考慮した解析も実施可能と考えられる。

実際昨年度までに、AdCYP3A4 と AdCYP2C19 の共発現系を確立し、両酵素により異なる経路で代謝されるジアゼパムを用いた代謝試験を行なった。その結果、AdCYP2C19 の発現量を変化させるとジアゼパムの代謝プロファイルは変化すること、そのプロファイルは培養ヒト肝細胞で得られたものや臨床報告とほぼ一致することを報告した (Aoyama *et al.*, Drug Metab Pharmacokinet, 24, 209, 2009)。

本年度は確立した AdCYP3A4 と AdCYP2C19 の共発現系をオメプラゾールを基質に用いて検証し、更に、AdCYP2D6 についても検討を加えた。また、アデノウイルスによるヒト CYP 発現システムの阻害試験への応用、酵素活性の改善ならびにトランスポーターとの共発現系の確立を目指してさらなる検討を行なった。

更に、昨年度まで検討を加えてきたフランス INSERM において樹立された HepaRG 細胞の三次元培養に伴う機能変化を検証するために、同細胞を微小管を安定化することが知られているドセタキセルに暴露し、薬物代謝関連遺伝子の発現への影響を調べた。

一方、有効かつ安全な内服薬の開発には、肝臓のみならず腸管壁を通過する際に受ける代謝変動の影響についても適正な評価が必要となる。腸管代謝を評価するための *in vitro* モデルとしては、小腸上皮細胞様の形質を示す大腸癌培養細胞が用いられる。だが小腸で重要な役割を果たす CYP3A4 の発現・機能を保持する大腸癌細胞は少なく多様性も認められる。本研究課題において、昨年度までに、CYP1B1 遺伝子プロモータ領域のメチル化が CYP1B1 遺伝子の発現抑制に寄与することを見出した (Habano *et al.*, Int J Oncol 34, 1085, 2009)。この結果は、腸管における薬物代謝動態関連遺伝子の発現が、DNA メチル化などエピジェネティックな機構によっても制御され、代謝変動の要因となることを示唆した。

そこで本年度は CYP3A4 の発現が、DNA メチル化によって制御され代謝変動の要因となる可能性について検討を行った。

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

(1) アデノウイルスによるヒト CYP 発現 HepG2 細胞の作成

CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 発現 HepG2 細胞の作成の為、ヒト CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (AdCYP3A4, AdCYP2C19, AdCYP2D6) は、東北大学大学院薬学研究科薬物動態学分野 (山添 康教授) より譲り受けた。

アデノウイルス CYP3A4 の発現細胞の作成例を示す。

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 AdCYP3A4 溶液を $25 \mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、37°C 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 $75 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、37°C の 5%CO₂ インキュベーターにて 3 日間培養した。

(2) CYP3A4 発現 HepG2 細胞での時間依存的阻害評価試験法の検討

CYP3A4 に対する時間依存的阻害評価法として、A: 基質代謝反応時に阻害剤添加を行い、競合的阻害を評価できる条件、B: 阻害剤を前処置し、阻害剤の代謝反応による時間依存的阻害を評価できる条件、C: 競合的阻害および時間依存的阻害の両方を含む総合的阻害を評価できる 3 つの条件を設定した (図 1)。

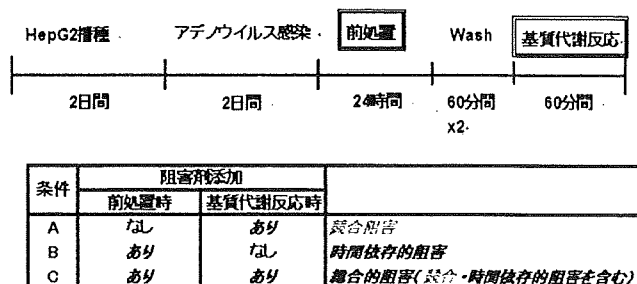


図 1 CYP3A4 発現 HepG2 細胞を用いた時間依存的阻害評価法の試験デザイン

前述の CYP3A4 発現 HepG2 細胞の作成に従い、阻害剤の前処置として、アデノウイルス感染 2 日後に培養液を除去後、阻害剤であるケトコナゾール (終濃度範囲: 15.6–250 nM)、シメチジン (終濃度範囲: 3.13–50.0 μM)、トロレアンドマイシン (終濃度範囲: 0.163–2.50 μM)、クラリスロマイシン、エリスロマイシン (終濃度範囲: 1.63–25.0 μM)、ミベフラジル (終濃度範囲: 0.063–1.00 μM)、ジルチアゼム、ペラパ