

## E. 結論

- 1) ヒト肝に多く発現している薬物代謝酵素 CYP3A4 を発現する Ad ベクターを用い、ラット肝癌由来細胞発現させた。さらに、shRNA 発現 Ad ベクターを用いる手法により細胞内 GSH 含量を減少させることで、肝障害報告がある種々の薬物の細胞障害性が増強されることを見出した。
- 2) 従来型 shRNA 発現 Ad ベクターと比較して少量の Ad ベクターで効率よく RNAi を誘導可能な、安全性と高い有効性を兼ね備えた新規 RNAi 誘導用 Ad ベクターを作製することに成功した。
- 3) 従来型 Ad ベクターと同等の遺伝子導入効率を示す VA-RNAs 欠損 Ad ベクターを作製することに成功した。本ベクターは、“目的遺伝子のノックダウン効果が高い” shRNA 発現 Ad ベクターとしての応用が期待される。

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

- 1) Hiroko Hosomi, Sho Akai, Keiichi Minami, Yunitaka Yoshikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. An in vivo drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase knockdown cells. *Toxicology in Vitro*, 24 (3), 1032-1038, 2010
- 2) Motegi Y., Katayama K., Sakurai F., Kato T., Yamaguchi T., Matsui H., Takahashi M., Kawabata K., and Mizuguchi H. An effective gene-knockdown using multiple shRNA-expressing adenovirus vectors. *J. Cont. Rel.*, in revision.

### F-2. 学会発表

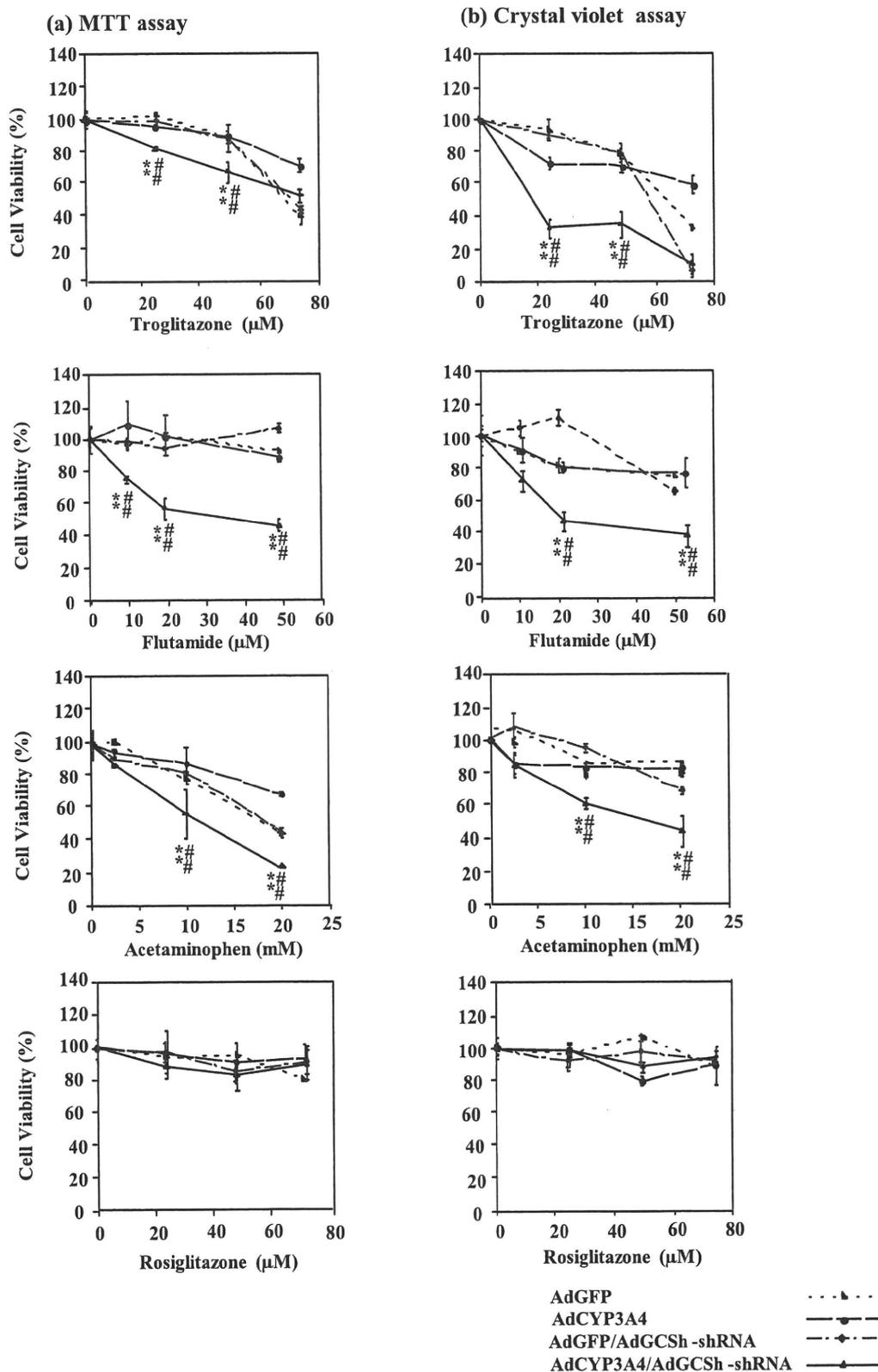
- 1) 水口裕之、次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への応用（第 10 回日本 DDS 学会永井賞受賞講演）第 26 回 DDS 学会、大阪、2010 年 6 月
- 2) 横井 毅：代謝物を考慮した薬物誘導性肝障害の予測試験系の検討、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄、2010 年 6 月
- 3) 細見浩子、深見達基、岩村 篤、中島美紀、

横井 毅：CYP3A4 による代謝的活性化を考慮した薬物誘導性肝障害の高感度試験系 日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京、2010 年 12 月

- 4) 岩村 篤、深見達基、細見浩子、中島美紀、横井 毅：アデノウイルスベクターを用いた CYP2C9 による代謝的活性化の高感度評価系の構築 日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京、2010 年 12 月
- 5) 町谷充洋、形山和史、櫻井文教、山口朋子、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之 Virus-associated RNA (VA-RNA) 欠損アデノウイルスベクターの開発と機能評価、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月

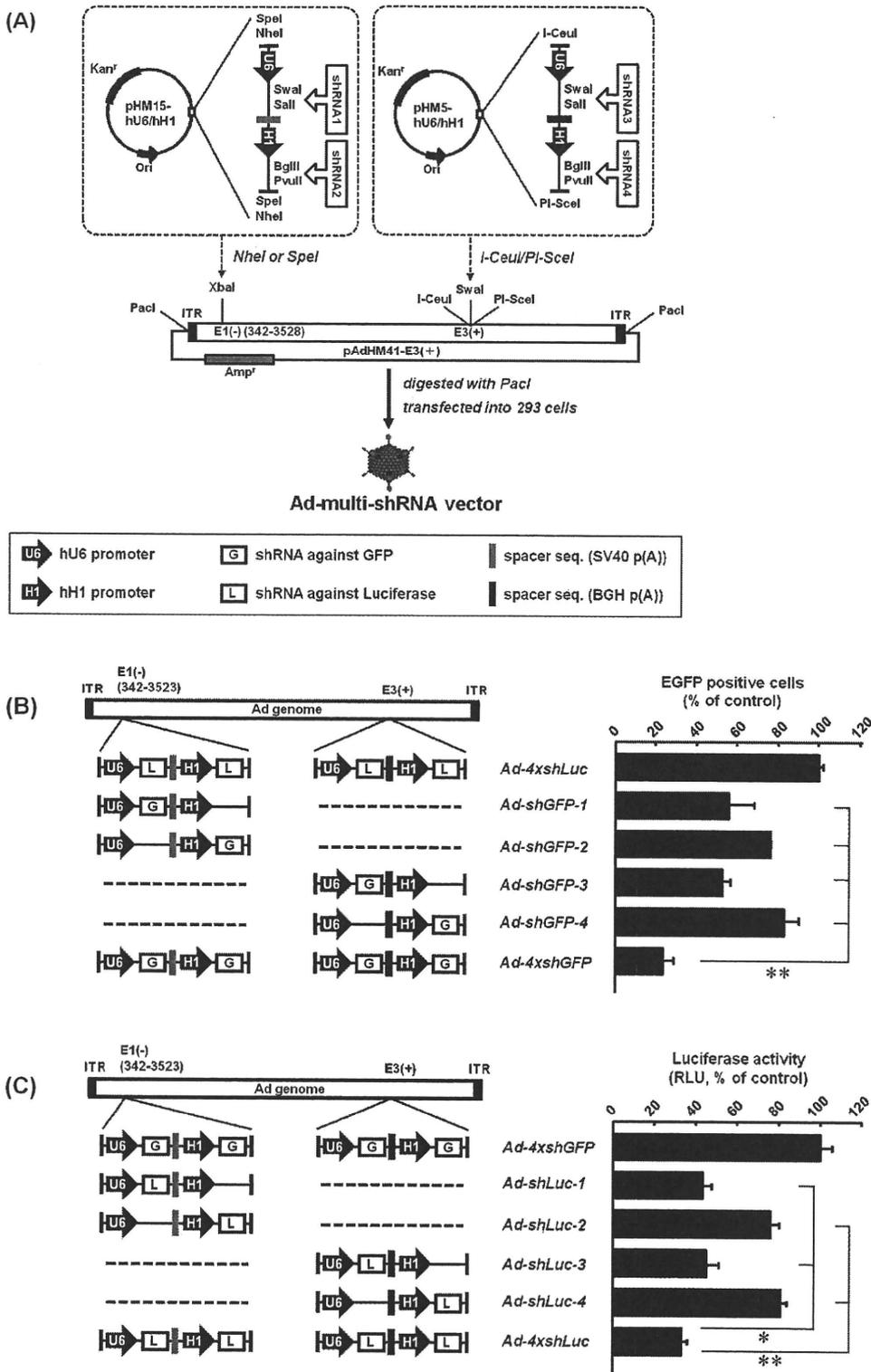
## G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 発明の名称 : VA-RNAs が発現しないアデノウイルスベクター  
出願番号 : 特願 2011-48013 号  
出願日 : 2011/3/4  
出願人 : 国立大学法人 大阪大学  
発明人 : 水口裕之、形山和史

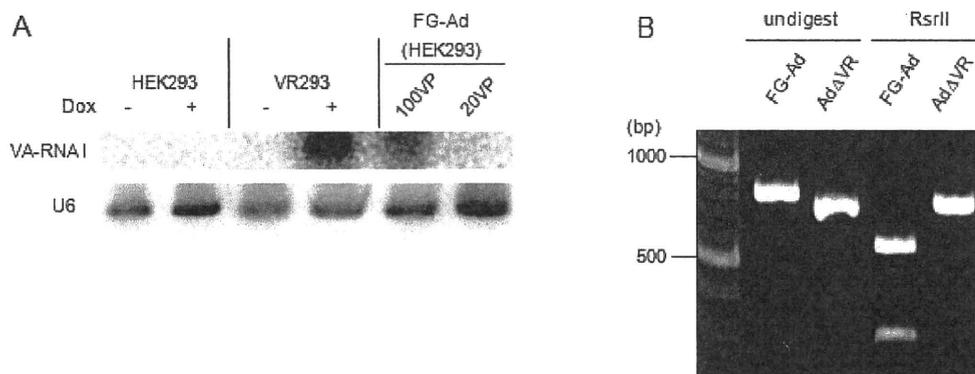


**Figure 1. Cell viability measured by MTT assay (a) and crystal violet assay (b) in drug-treated H4IIE cells.**

H4IIE cells were infected with various adenoviruses for 2 days, and treated with troglitazone, flutamide, acetaminophen, and rosiglitazone for 24 hrs (MTT assay) or 48 hrs (Crystal violet assay). ( $\blacktriangle$ ) AdCYP3A4 and AdGCSH-shRNA; ( $\bullet$ ) AdCYP3A4; ( $\blacktriangleleft$ ) AdGFP; ( $\blacklozenge$ ) AdGFP and AdGCSH-shRNA. AdCYP3A4, AdGFP and AdGCSH-shRNA were infected at MOI 10, 10 and 20, respectively. Each point represents mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\* $P < 0.01$  compared with AdCYP3A4 groups, # $P < 0.01$  compared with AdGFP groups.

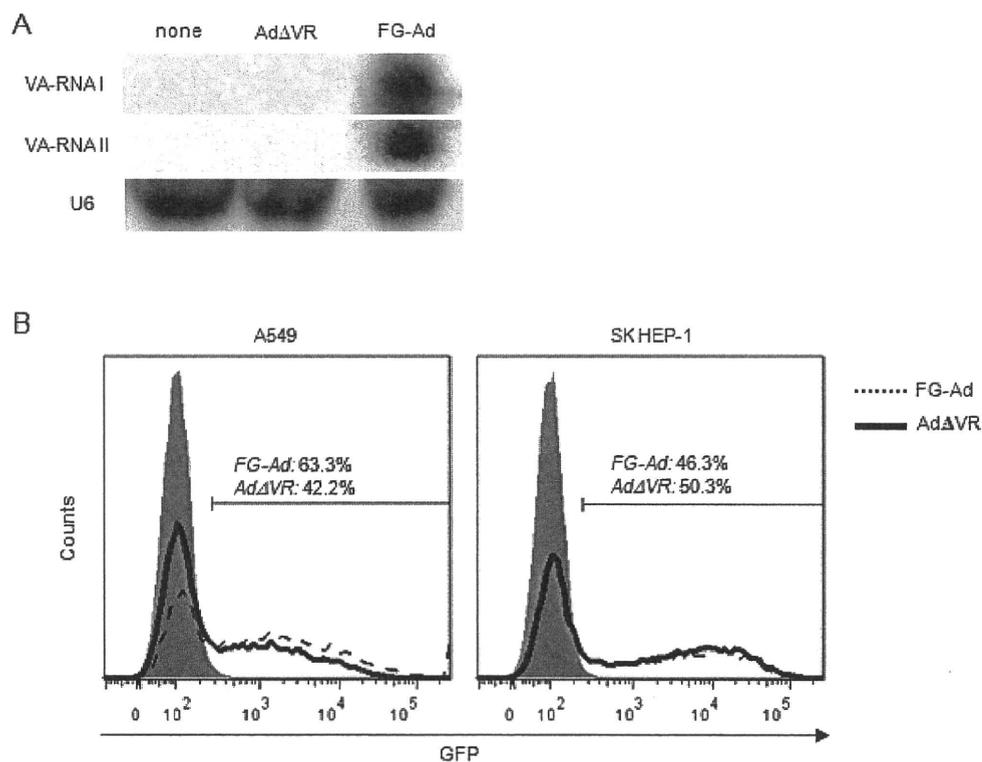


**Figure 2. An Ad vector carrying multiple shRNA-expression cassettes induces RNAi more efficiently.** Schematic representation of the construction of the Ad-multi-shRNA vector (A). The procedures are described in the Materials and Methods. HeLa-EGFP cells (B) or A549-Luc cells (C) were transduced with the indicated Ad vectors for 1.5 h at 1000 VP/cell and then cultured with fresh medium for an additional three days. The knockdown efficiency of each target gene was evaluated by flow cytometry or by measuring luciferase activity. The data are expressed as the mean  $\pm$  SD (n=3). These experiments were repeated at least three times, and representative data are shown. ITR: inverted terminal repeat. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (Tukey's-Kramer).



**Figure 3. HEK293 cells inducibly expressing VA-RNA I allowed the generation and propagation of AdΔVR vector.**

(A) Northern blot analysis for the expression and induction levels of VARNAs in VR293 cells. HEK293 and VR293 cells were cultured with Dox-containing medium (Dox +; 50 ng/ml) or normal medium (Dox -) for 48 h. As a positive control, HEK293 cells were transduced with a FG-Ad vector (FG-Ad-GFP; 100 or 20 VP per cell) and cultured for 24 h. Expression levels of human U6 were detected as an internal control. (B) A PCR based analysis to confirm the propagation of AdΔVR vector. The sequences corresponding to VA-RNAs coding region were amplified with the DNA samples which were purified from the cells transduced with FG-Ad-GFP or AdΔVR-GFP. The PCR-amplicons were digested by *RsrII* and loaded on a 2 % agarose gel.



**Figure 4. AdΔVR-GFP showed efficient transduction in human cultured cell lines.**

(A) VARNAs expression in the cells transduced with Ad vectors. HEK293 cells were transduced with FG-Ad-GFP or AdΔVR-GFP at 0.1 MOI and then cultured for 24 h. Expression levels of VA-RNA I and VA-RNA II were determined by Northern blot analysis. (B) Comparison of the transduction efficiency of FG-Ad and AdΔVR vectors. A549 or SKHEP1 cells were transduced with FG-Ad-GFP (dashed line) or AdΔVR-GFP (solid line) at 5 MOI and cultured for 24 h. The gray region represents no transduced cells. These experiments were repeated at least three times, and representative data are shown.

## 神経免疫ネットワークの破綻・修復の基盤研究と評価法の確立

所 属 独)国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所免疫研究部  
研究代表者 三宅 幸子

研究要旨 試験管内でのミクログリア様細胞の誘導法開発、MAIT 細胞と多発性硬化症疾患活動性の相関の発見、脊髄損傷マウスにおける IL-1 の炎症とその修復における役割の検討、核蛋白質によるアミロイドベーター繊維形成阻害物質としてプロタミンの同定を行った。

### 研究分担者

- (1) 昭和大学医学部 第一解剖学 塩田清二
- (2) 日生バイオ株式会社 松永政司

### A. 研究目的

炎症を伴う神経疾患において病態とミクログリアの機能をモニターすることにより、ミクログリアがどのようにその作用を使い分けているか、またその作用を決定づける因子は何かについて検討し、ミクログリアやその機能を調節する他の細胞を介した病態のモニターや薬剤効果の評価法を確立することを目的とする。治療法が乏しく新規治療法の開発が切望されている多発性硬化症(Multiple Sclerosis:MS)、脊髄損傷、アルツハイマー病を標的疾患とし、その病態とミクログリアの機能がどのように相関するかを明らかにする。脊髄損傷では炎症および再生となるマーカーを探索する。また、MAIT 細胞や骨髄幹細胞による病態抑制効果、核蛋白質による神経炎症の予防・治療効果の検討を行い、これらの病態におけるミクログリア細胞の機能解析を行う。

### B. 研究方法

試験管内ミクログリア様細胞誘導方法：GFP トランスジェニックマウス骨髄より骨髄細胞を抽出し、CD3, CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD11b/MAC-1 $\alpha$ , B220, Gr-1, TER-119 抗体を付着。磁気ビーズを用いてこれらの抗体に付着した細胞を除去することにより、lineage marker negative (LN) 細胞を調整した。GFP トランスジェニックマウス末梢血から Ficoll を用いて単球を調整後、CD11b 陽性細胞をセルソーターを用いて分離した。初代混合グリア培養は、生後 3-5 日の C57BL/6J マウスの中枢神経を、髄膜

除去後にリベラーゼ、ブレンザイム、ならびに DNaseI 存在下でホモジナイズし、27%, 72%パーコールを用いて細胞を分離。10%FCS, 1%グルコースを含む Eagle 培地を用いて 14 日間培養した。アストロサイトはその後、CD11b 付着ビーズを用いて CD11b 陽性細胞を除去したものをを用いた。スライスカルチャーは、生後 5-7 日の C57BL/6J マウスの脳から 350nm のスライスを用いて調整し、porous translucent membrane 上で培養した。細胞表面分子発現については、フローサイトメトリーを用いて解析した。Trem2 の発現ならびに形態学的観察には、免疫組織染色後に共焦点顕微鏡を用いて解析した。

MAIT 細胞の解析：健常者、および寛解期、再発期の MS 患者を対象とし、末梢血単核細胞を分離後、MAIT 細胞の頻度、表面抗原をフローサイトメーターで解析した。MAIT 細胞は V $\alpha$ 7. 2<sup>+</sup>CD161<sup>high</sup> の  $\alpha\beta$  T 細胞集団と定義した。加えて、MAIT 細胞の頻度と V $\alpha$ 24NKT 細胞, Natural Killer (NK) 細胞、およびそれらのサブポピュレーションの頻度との相関関係を解析した。

脊髄損傷モデル解析：脊髄損傷モデルの作成は、C57BL/6 マウス、IL-1 遺伝子欠損 (IL-1KO) マウスを使用し、第 9-10 胸椎間をマイクロ剪刀にて切断後、患部を止血し作製した。術後 14 日間、脊髄損傷マウスの下肢の Basso mouse scale (BMS) により運動機能評価を行った。脊髄損傷領域の定量は、GFAP 非染色領域を計測した。脊髄は冷凍保存後にホモジネートし、遠心分離にて得た上清中

の IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , galectin-3 を ELISA 法を用いて測定した。またこの上清中の Ym1 を Western blotting にて検出した。

アミロイド  $\beta$  ペプチドのアミロイド線維形成法および核タンパク質の効果の検討:アミロイド  $\beta$  ペプチド (1-42) (A $\beta$ ) 凍結乾燥粉末は、DMSO に溶解。ペプチド凝集体はシャフトジェネレーターにて粉碎、均一化した後、超音波処理を行い 10 mM PBS で最終濃度 10  $\mu$ M に希釈し反応に供した。A $\beta$  の線維形成量は、チオフラビン T が、アミロイド線維に特徴的な四次構造であるクロス  $\beta$  構造に結合すると蛍光強度が上昇することにより測定した。A $\beta$  を含む溶液に、チオフラビン T (10  $\mu$ M) および核蛋白質、プロタミン、DNA もしくは溶媒 (対照群) を混合し、96 ウェルマイクロプレートに添加、37°C でインキュベート開始後、20 分毎に 30 時間後までチオフラビン T 由来蛍光強度 (Ex: 440 nm, Em: 480 nm) を測定し、A $\beta$  線維形成量の経時変化を調べた。測定した各試料の蛍光強度は、インキュベート開始 30 時間後における対照群の蛍光強度を 100% とした際の相対値で表した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

MS 患者ならびに健常人末梢血の解析に際しては、文書を用いて説明し同意を得た上で行った。個人情報の管理を含め、当センターの倫理規定にしたがった。

### C. 研究結果

**試験管内マイクログリア様細胞誘導法の開発:** マウス骨髄 LN 細胞は、初代混合グリア培養上もしくはアストロサイト上で培養すると、免疫組織染色ならびにフローサイトメトリーによる解析を行うと、マイクログリアと類似したフェノタイプ (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup>MHC-ClassII<sup>low</sup>Trem2<sup>+</sup>) を有していた。次いで末梢血単球を新生仔初代混合グリア培養上もしくはアストロサイト上で培養すると、LN 細胞を培養した場合と同様に、マイクログリアと類似したフェノタイプを有していた。末梢血単球を、Gr1 陽性細胞、Gr1 陰性細胞に分離しアストロサイト上で培養を行うと、Gr1 陽性細胞は高率にマイクロ

グリア様細胞に変化した。Gr1 陰性細胞は、ほとんどマイクログリア様細胞に変化しなかった。これらの培養で得られたマイクログリア様細胞は、脳のスライスカルチャーに添加すると翌日にはマイクログリアでみられるような ramified 様の突起を伸ばすが、単球や脾臓マクロファージではこの現象がみられなかった。

**MAIT 細胞の解析:** MAIT 細胞については、末梢血  $\alpha\beta$  T 細胞において、健常者で平均 3.92%、寛解期 MS 患者で平均 2.32%、再発期 MS 患者で平均 0.73% であり、MS 患者では再発期、寛解期とも健常者と比べ有意に低値であった。また、MAIT 細胞の頻度は MS の疾患活動性が高い患者でより低値であり、同一患者の再発期と寛解期を比較すると、再発期でより低値であった。CD4<sup>+</sup>NKT 細胞、CD56<sup>bright</sup>NK 細胞はこれまで MS 患者において、免疫制御細胞としての機能が報告されている。健常者では MAIT 細胞の頻度と CD4<sup>+</sup>NKT 細胞、CD56<sup>bright</sup>NK 細胞の頻度との間に正の相関が見られたが、MS 患者ではこの相関はみられなかった。

**脊髄損傷モデル解析:** IL-1 遺伝子欠損による脊髄損傷後の運動麻痺および損傷体積について野生型と比較すると、BMS スコアによる運動麻痺は、脊髄損傷直後および 1 日後には有意な差を認めなかったが、IL-1 KO マウス群は受傷 3 日目以降に BMS スコアが有意に高かった。脊髄損傷領域は、3 日目で最も高く 14 日まで漸減した。受傷 3 日目は両群に有意な差を認めなかったが、受傷 7 および 14 日目において、IL-1KO マウスの脊髄損傷領域は有意に小さかった。脊髄損傷後の IL-1 $\beta$  は受傷前にはわずかに検出されるかもしくはほとんど検出できなかった (約 3pg/mg) が、受傷 1 日目に増加 (10pg/mg) し、実験期間中僅かに低下するが高値を示し、その産生細胞は Iba-1 陽性細胞 (マクロファージ及びマイクログリア: MG/M $\phi$ ) であり、神経細胞およびアストロサイトでの産生はみられなかった。TNF $\alpha$  は損傷前には両群とも同様の値を示したが、脊髄損傷後野生型においては 3 日目に約 2 倍となったのに対し、IL-1 KO マウスでは実験期間中ほとんど変動をしなかった。IL-1 KO マウスの TNF $\alpha$  は 3 日目以降に有意に低値を示した。増殖性 MG/M $\phi$  マーカーである galectin-3 は脊髄損傷前には野生型および IL-1 KO いずれにおいても同様の値を示した。脊髄損傷後は両群で増加し、

受傷 7 日目以降ほぼプラトーに達し、IL-1 KO 群は受傷 14 日目において有意に高値を示した。野生型において galectin-3 陽性反応は損傷部位中心部とその周囲近傍に認められたのに対し、IL-1 KO マウスは損傷部位よりもむしろ損傷遠位周辺部に多くの galectin-3 陽性細胞を認めた。報告者らはこれまで、galectin-3 陽性/Ym1 陽性細胞が脳虚血後に骨髄由来間葉系幹細胞を移植した際に組織中に増加し神経細胞死を抑制している可能性を示している。脊髄損傷前および受傷 3 日間は両群とも Ym1 シグナルに違いを認めなかったが、野生型では受傷 7 および 14 日後に Ym1 のシグナルが受傷前の約 12 倍に増加したのに対し、IL-1 KO マウスのそれは 4 倍程度の増加しか認めなかった。Ym1 陽性細胞を多重免疫染色により同定したところ、その陽性反応は MG/M $\phi$  マーカーの F4/80 と共存しかつ IGF-1 と共存した。

**核蛋白質によるアミロイド  $\beta$  線維形成抑制：**  
終濃度 10  $\mu$ M の A $\beta$  とチオフラビン T をインキュベートした結果、チオフラビン T 由来蛍光強度の経時的な上昇が観察され、本実験条件において A $\beta$  がアミロイド線維を形成したと考えられた。終濃度 0.6、6、60  $\mu$ g/ml の核蛋白質を反応溶液中に添加したところ、インキュベート開始 30 時間後におけるチオフラビン T 由来の蛍光強度は、対照群に比べそれぞれ、93.0  $\pm$  6.8、83.8  $\pm$  12.5、23.1  $\pm$  7.9 % であり、核タンパク質による A $\beta$  の線維形成を濃度依存的に抑制がみられた。次に、核タンパク質の主要成分であるプロタミンおよび DNA を用い、これらが A $\beta$  の線維形成に影響を与えるか検討したところ、プロタミンは対照群に比べ蛍光強度の上昇を抑制した。終濃度 0.1、1、10、100、1000  $\mu$ g/ml のプロタミンを添加したところ、30 時間後におけるチオフラビン T 由来の蛍光強度は、それぞれ、96.8  $\pm$  14.0、105.2  $\pm$  20.7、59.9  $\pm$  4.8、56.4  $\pm$  6.6、18.4  $\pm$  2.1 % であり、プロタミンは A $\beta$  の線維形成を濃度依存的に抑制した。一方、終濃度 0.1、1、10、100、1000  $\mu$ g/ml の DNA を添加したところ、30 時間後におけるチオフラビン T 由来の蛍光強度は、それぞれ、107.6  $\pm$  13.3、108.7  $\pm$  25.9、112.2  $\pm$  17.7、108.9  $\pm$  23.1、92.5  $\pm$  22.2 % 対照群と有意な差を認めなかった。

#### D. 考察

マウス末梢血単球をアストロサイト上で培養することにより、ミクログリアと類似したフェノタイプを有するミクログリア様細胞を誘導した。ミクログリアは血球由来の細胞と考えられているが、単球もしくはマクロファージと完全に分離できる表面マーカーがない。そこで、CD45 低発現、MHC Class II 低発現、TREM2 発現などを指標として用いた。in vitro で誘導したミクログリア様細胞は、これら表面抗原の発現パターンのみならず、スライスカルチャー内での形態から、脳内に存在するミクログリアと同様の性質を有する細胞であると考えられた。ミクログリア様細胞は、初代混合グリア培養上清のみでは誘導できず、共焦点顕微鏡で観察すると、必ず初代混合グリア培養のアストログリア上に存在している。アストロサイト上ではなくチャンバースライドに直接接触した骨髄 LN 細胞もしくは単球は Trem2 陰性のミクログリアとは異なるフェノタイプを持つ細胞に変化していた。これらの結果はミクログリア様細胞の誘導には、アストロサイトとの接触が必要であることを示唆している。ミクログリア様細胞への分化に必要なアストロサイト表面分子を同定することは、ヒトミクログリア様細胞の培養を可能にするために重要であると考えられる。

ヒト末梢血中において、MAIT 細胞は単一の  $\alpha$  鎖を発現する細胞としては大きな細胞集団を形成することが明らかとなった。Va24NKT 細胞が末梢血 T 細胞の 0.01~0.5% であることを考えると MAIT 細胞は相当に大きな細胞集団であると言える。その頻度は MS の疾患活動性と関連し、疾患活動性が高いほど低下しており、MS の病勢を反映すると考えられた。また、CD4<sup>+</sup>NKT 細胞、CD56<sup>bright</sup>NK 細胞の頻度と相関関係があることは、これらの免疫制御細胞と MAIT 細胞は協調して免疫制御を行っていることが示唆され興味深い。さらに、MS においてこのシステムに乱れが存在する可能性が示唆された。

脊髄損傷時においては、IL-1 KO マウスは受傷 3 日目以降有意な運動機能回復が認められ、7 日目以降に有意な損傷領域の改善が認められたが、これは脳虚血モデルマウスにおける結果と一致した。脳虚血後の IL-1 $\beta$  mRNA は一過性に増加し数日で低下したが、脊髄損傷後は 14 日間にわたり長期間持続した。これらは、脊髄損傷が出血、すなわち

blood brain barrier の破壊を伴うために、造血系の免疫細胞を動員する炎症状態が長く持続しているためと考えられ、TNF $\alpha$  もまた受傷 1 日後より増加し 14 日目まで高値で持続した。TNF $\alpha$  レベルは IL-1 KO マウスは TNF $\alpha$  レベルがほとんど増加せず、IL-1 が炎症惹起に重要であることが示唆された。MG/M $\phi$  の活性化マーカーとされる galectin-3 の解析から、脊髄損傷後、急性期においては違いがないが、損傷修復・再生期における MG/M $\phi$  の活性化もしくは増殖は IL-1 の欠損により促進することが示唆された。また、Ym1 は、脊髄損傷 1 日後一過性の増加を認め、両群とも有意な違いを認めなかった。野生型マウスは、受傷 7 日後に再び急激な増加を認めたが IL-1 KO ではほとんど増加せず、IL-1 が初期の炎症のみならず、修復および再生にも関与していると考えられた。

アミロイド線維形成は、アルツハイマー病で蓄積が認められる A $\beta$  を用いて行った。鮭白子由来核タンパク質の影響を検討した結果、核タンパク質は、添加濃度依存的に A $\beta$  の線維形成を抑制し、プロタミンが DNA に比べて、A $\beta$  の線維形成に対して顕著な抑制効果を有することがわかった。本実験に使用された核タンパク質に含まれるプロタミンおよび DNA の含有量（重量比）はそれぞれ、51.6%、32.7%であり、対象群に比べて有意な阻害効果を示した 60  $\mu$ g/ml の核タンパク質を添加した試料中に含まれるプロタミンおよび DNA 濃度を換算すると、それぞれ、31.0  $\mu$ g/ml、19.6  $\mu$ g/ml に相当する。プロタミンによる阻害効果を検討した結果では、終濃度 10  $\mu$ g/ml 以上を添加した場合に有意な阻害効果が認められたが、DNA による阻害効果は 1000  $\mu$ g/ml 添加しても認められなかったことから、核タンパク質による阻害効果は、主にプロタミンに起因すると考えられた。正電荷に富んだポリアミン化合物が熱によるタンパク質の凝集を抑制することが報告され、アミノ酸による凝集抑制効果を比較するとアルギニンが最も高い抑制効果を示す事が報告されている。その詳細な機構は不明であるが、アルギニンのアミノ基がその抑制に関与していると考えられている。すなわちアルギニンがタンパク質の表面に結合し、そのアミノ基がタンパク質の見かけの電荷を陽性に傾け

ることにより、熱変性時のタンパク質の凝集を抑えている。本研究で検討したプロタミンは、アルギニンを多く含むタンパク質であることから、アルギニン残基の側鎖のアミノ基が同様な作用をした可能性が考えられる。しかし、核タンパク質はプロタミンと DNA が複合体を形成した状態であり、プロタミン、DNA の単独の場合と状態が異なる。そのため、プロタミン、DNA が複合体を形成した場合と、それぞれ単独で存在する場合と、A $\beta$  に対する作用がそれぞれ異なる可能性も考えられるため、核タンパク質によるアミロイド線維形成の阻害機構については、より詳細な検討が必要であると考えられる。

## E. 結論

マウス末梢血単球をアストロサイト上で培養することにより、ミクログリア様細胞を試験管内で誘導する方法を見いだした。脊髄損傷モデルにおいて、炎症のみならず修復過程においてもマクロファージ・ミクログリアが産生する IL-1 が関与することがわかった。また、神経炎症に関与する細胞として、MAIT 細胞が MS 患者末梢血で低下し、その頻度は疾患活動性と相関することが明らかとなった。アルツハイマー病態に重要であるアミロイド線維形成は、核蛋白により阻害され、阻害効果はプロタミンが有することが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

原著

- 1) Noto D, Takahashi K, Miyake S, Yamada M. In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells into microglia-like cells. *Eur J Neurosci* 31:1155-63, 2010
- 2) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci*

- 3) Ohtaki H, Yofu S, Nakamachi T, Satoh K, Shimizu A, Mori H, Sato A, Iwakura Y, Matsunaga M, Shioda S: Nucleoprotein Diet Ameliorates Arthritis Symptoms in Mice Transgenic for Human T-Cell Leukemia Virus Type I (HTLV-1). *J Clin Biochem Nutr.* 46(2):93-104,
- 4) Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S: Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. *J Mol Neurosci.* 42(3):397-403
- 5) Tanaka S, Kondo H, Kanda K, Ashino T, Nakamachi T, Sekikawa K, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T.: Involvement of interleukin-1 in lipopolysaccharide-induced microglial activation and learning and memory deficits. *J Neurosci Res.* 89(4):506-514, 2011
- 6) 養父佐知子, 小川哲郎, 中町智哉, 佐藤和恵, 清水藍, 松永政司, 塩田清二:「LPS 誘導性肝障害モデルマウスに対する核酸・核蛋白摂取の効果」, *日本臨床生理学学会雑誌* 40(3):137-143, 2010

## 総説

- 1) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Role of NKT cells in multiple sclerosis: In a quest to understand and overcome their highly efficient double edged swords. *Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell Differentiation"* Gramm U, ed, Springer-Verlag, Heidelberg, 51:127-147, 2010
- 2) 三宅幸子: NKT 細胞と疾患. *臨床リウマチ*

- 3) 三宅幸子, 山村隆: NKT 細胞と多発性硬化症. *Mebio.* 27(6):95-101, 2010
- 4) 三宅幸子: NKT 細胞と自己免疫疾患. *医学のあゆみ* 235(11):1138-1140, 2010

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Miyake S. MAIT cells in autoimmunity Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, Kyoto, August 18, 2010
- 2) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR1-restricted MAIT cells in the pathogenesis of murines models of arthritis. 10<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS, Boston, June 24, 2010 (Clinical Immunology, 135S:S52, 2010)
- 3) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR1-restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug 24, 2010
- 4) Ogura H, Satoh M, Gilfillan S, Miyake S, Onoe K, Iwabuchi K: MR1-restricted NKT cells exhibit beneficial role for the development of atherosclerosis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 5) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, through induction of "armoured" regulatory T cells. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010

- 6) Chihara N, Sato W, Aranami T, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010
- 7) Noto D, Kazuya T, Yamamura T, Masahito Y, Miyake S: In vitro differentiation of lineage-negative bone marrow cells and monocyte into microglia-like cells. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010
- 8) Chiba A, Miyazaki Y, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity suppresses inflammatory disorders by inhibiting inflammatory cytokines. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010
- 9) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010
- 10) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, by induction of "armoured" T regs. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010
- 11) Chiba A, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity inhibits arthritis by suppressing IL-23 and inflammatory cytokines. American College of Rheumatology 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 7, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S371, 2010)
- 12) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells contribute to the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 11, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S938, 2010)
- 13) Sato A, Ohara K, Ohtaki H, Atsumi T, Shioda S: Interleukin-1 influence microglia/macrophage activation after spinal cord injury in mice. 10<sup>th</sup> International Congress of Neuroimmunology (ISNI 2010), Sites, Spain, October, 2010
- 14) Ishii A, Tanaka S, Ohtaki H, Nakamachi T, Numazawa S, Shioda S, Yoshida T: Activation of microglia lead to onset of Parkinson disease animal model. The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, October, 2010
- 15) Shioda S: PACAP and neuronal cell death. 5th International Peptide Symposium, Kyoto, Japan, December, 2010
- 国内学会
- 1) 三宅幸子: NKT 細胞と自己免疫. 第 53 回日本リウマチ学会, 横浜、2010. 4 (第 54 回日本リウマチ学会総会抄録集 p243)
- 2) 千原典夫、佐藤和貴郎、荒浪利昌、宮崎雄生、三宅幸子、岡本智子、小川雅文、山村隆: 視神経脊髄炎 (NMO) における B 細胞の役割について. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会、東京、2010. 3

- 3) 宮崎雄生, 三宅幸子, Olivier Lantz, 山村隆: 多発性硬化症における Mucosal Associated Invariant T 細胞に関する研究. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会、東京、2010.3
- 4) 能登大介, 高橋和也、山村隆、三宅幸子: 末梢血単球からミクログリアへの分化誘導法に関する検討. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会、東京、2010.3
- 5) 千葉麻子、三宅幸子: 関節リウマチなど関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割、第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、2010.4(第 54 回日本リウマチ学会総会抄録集 p500)
- 6) 塩田清二: 酸化的ストレスとアンチエイジング (特別講演). 第 30 回秦学会、日立、2010.3
- 7) 佐藤 敦・小原賢司・大滝博和・安藤美貴子・渥美 敬・塩田清二: インターロイキン 1 遺伝子欠損マウスにおける脊髄損傷後の神経炎症反応抑制効果. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会、盛岡、2010.3
- 8) 養父佐知子, 小川哲郎, 中町智哉, 大滝博和, 松永政司, 佐藤和恵: 「LPS 誘発肝障害モデルマウスに対する核タンパク摂取の効果」, 第 115 回日本海某学会総会・全国学術集会、岩手・盛岡、2010.3
- 9) 澤智華, 養父佐知子, 小川哲郎, Randeep Rakwal, 齋藤智美, 村山綾, 中町智哉, 佐藤和恵, 松永政司, 塩田清二: 「Lipopolysaccharide (LPS) 単回投与によるマウス肝臓障害モデルに対する核酸・核タンパク質摂取の効果-炎症関連遺伝子の発現解析-」, 第 5 回核酸・核タンパク機能性研究会学術集会、北海道・恵庭、2010.8
- 10) 小林夏季, 大滝博和, 宋丹丹, 宮本和幸, 圓谷智海, 吉田武美, 松永政司, 塩田清二: 「核蛋白質によるパーキンソン病予防効果の検討」, 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(神奈川・横浜), 2011.3
- 11) 桑形麻樹子, 養父佐知子, 小川哲郎, 村山綾, 齋藤智美, 澤智華, ラクワール・ランディープ, 宇住晃治, 松永政司, 佐藤和恵, 塩田清二: 「Lipopolysaccharide (LPS) 反復投与によるマウス肝臓障害モデルに対する核酸・核タンパク摂取の効果-病理組織学的検討」, 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(神奈川・横浜), 2011.3
- 12) 齋藤智美, 養父佐知子, 小川哲郎, 澤智華, ラクワール・ランディープ, 村山綾, 松永政司, 宇住晃治, 佐藤和恵, 塩田清二: 「マウスにおける LPS 投与後の肝臓及び脾臓の網羅的遺伝子発現解析」, 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(神奈川・横浜), 2011.3
- 13) 澤智華, ラクワール・ランディープ, 小川哲郎, 養父佐知子, 桑形麻樹子, 齋藤智美, 村山綾, 宇住晃治, 松永政司, 佐藤和恵, 塩田清二: 「核酸・核タンパク摂取による粘膜免疫の活性化への影響」, 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(神奈川・横浜), 2011.3

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

アミロイド線維の形成を伴う神経変性疾患の予防・改善薬、(発明者) 塩田清二、大滝博和、小林夏季、(出願人) フォーデイズ株式会社、特願 2011-32506 (平成 23 年 2 月 17 日)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 医薬品開発のための副作用予測法・評価法の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部  
 研究代表者 黒瀬 光一

研究要旨： 副作用の予測法・評価法として、(1) ヒトでのアレルゲン性を予測し得るインビトロ感作性試験法、(2) GST T1 および GST M1 ノックアウトマウスを用いた新しい毒性評価法、(3) iPS 細胞による安全性評価系開発に向けての iPS 細胞各種特性解析、肝細胞への効率的分化法、および機能評価法、(4) 遺伝的要因に基づく副作用として薬物性肝障害・筋障害の臨床情報集積と分析および副作用発症に関連する遺伝子多型の迅速タイピング系の開発・多型の機能解析、に関する研究を行った。

### 研究分担者

- |                         |      |
|-------------------------|------|
| 1) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 | 斎藤嘉朗 |
| 2) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 | 前川京子 |
| 3) 積水メディカル(株) つくば研究所    | 森 篤雄 |
| 4) 田辺三菱製薬(株) 薬物動態研究所    | 丹羽卓朗 |
| 5) 東京大学大学院 薬学系研究科       | 杉山雄一 |
| 6) 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科    | 埴岡伸光 |
| 7) 九州大学大学院 農学研究院        | 久原 哲 |
| 8) 明治製菓 (株) 医薬研究所       | 土屋敏行 |
| 9) 第一三共株式会社 薬物動態研究所     | 渡邊伸明 |
| 10) 帝京大学 医学部            | 滝川 一 |
| 11) 金沢医科大学 循環器内科学       | 梶波康二 |
| 12) 塩野義製薬株式会社 創薬・開発研究所  | 山口嘉隆 |
| 13) 名古屋市立大学大学院 薬学研究科    | 松永民秀 |
| 14) 小野薬品工業 (株) 創薬技術部    | 松本範人 |

### A. 研究目的

医薬品開発において、候補化合物が新薬として承認される率が非常に低い理由の一つに安全性の問題がある。開発過程において安全性を担保できるような副作用予測法・評価法を確立することができれば、創薬のより早い段階において、開発候補薬の効率的で的確な絞り込みが可能となり、開発期間の短縮や開発費の削減、さらには、より安全な医薬品供給の促進が期待される。医薬品による副作用発症の要因としては、活性代謝物の生成やタンパク質への結合等、医薬品自体の化学構造や代謝に起因するものと、発症患者に特有の遺伝的背景に基づくものが考えられる。本研究では、

これら両面から研究を進め、副作用予測の簡便な評価系を開発する。即ち、副作用のインビトロ評価系として医薬品候補化合物のアレルゲン性・細胞障害性の評価系の開発および iPS 細胞による創薬過程での安全性スクリーニング系の開発を行う。ヒトにおけるアレルゲン性(感作性)は、動物を用いた試験で必ずしも予測することはできず、免疫毒性試験ガイドラインにもアレルゲン性試験法は記載されていない。一方、アレルギーは、肝障害、皮膚障害、肺障害など、多くの副作用の原因となっており、本研究では、ヒトでのアレルゲン性を予測しうるインビトロ感作性試験法の確立を目指す。また改変動物を用いた新しい毒性評価法の開発も行う。創薬過程で iPS 細胞を活用するためには解決すべき課題が多い。本研究では特に安全性のスクリーニング系に iPS 細胞を利用するために、まず、iPS 細胞株の基本特性の解析を行い、また、ヒト肝細胞などの機能細胞への効率的分化法の確立、機能細胞の評価(品質管理)法の確立、胎児毒性試験系の開発を行う。一方、遺伝的要因による副作用に関しては、主として薬物性肝障害、横紋筋融解症等のミオパチーを取り上げる。これらの副作用は広範な薬剤が原因となり、その発症に遺伝的要因が考えられている。本研究では、その発症に関連する遺伝子多型の迅速タイピング系を開発し、副作用予測法を確立する。また、抗がん剤による副作用発症に関連する薬物動態関連多型のタイピング系開発・機能解析等も併せて行う。このような、遺伝情報を利用した副作用回避の予測手法は、医薬品開発を行う上で今後ますます重要になってくると考えられる。

## B. 研究方法

### (1) 医薬品候補化合物の感作性試験法の開発

#### 1-1) 新規感作性試験法の確立

human Cell Line Activation Test (h-CLAT)を応用して医薬品候補化合物のアレルゲン性試験法を開発する。h-CLATとは、ヒト単球由来細胞株 THP-1 に被験物質を暴露し、CD54 と CD86 の発現量の増加を指標として皮膚感作性の有無を試験する方法である。本年度は、h-CLAT の3施設間(国立衛研、明治製菓、塩野義製薬)でのバリデーションを目的に、皮膚感作性陽性物質として  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と DNCB (2,4-dinitrochlorobenzene)を、陰性物質として SDS (sodium dodecyl sulfate)を用いて h-CLAT を実施した。陽性・陰性物質は国立衛研で調製した同じロットの高濃度溶液を3施設で適宜希釈して使用した。THP-1 細胞は、国立衛研で大量調製した同じロットの細胞を3施設で使用した。また、アレルゲン性のある医薬品の評価のためにアンピシリン (Ampicillin Sodium) とネビラピンを用いて h-CLAT を実施した。

#### 1-2) アレルゲン性試験法開発のための新規培養細胞系の調製と検討

本年度はミエロペルオキシダーゼ(MPO) を恒常的に発現する THP-1 細胞の樹立を行った。G418 耐性 MPO 発現プラスミドを THP-1 細胞にトランスフェクションし、G418 存在下で継代培養する事により、G418 耐性 THP-1 細胞を得た。限界希釈法により、クローニングを行い、MPO cDNA の保持の確認を PCR 法により行った。MPO タンパク発現量の測定は ELISA 法 (human Myeloperoxidase Enzyme Immunometric Assay kit, Assay designs Stressgen 社) および Western blot 法 (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE ヘルスケア社) により行った。

### (2) GST T1 と GST M1 ノックアウトマウスを用いたバイオマーカーの探索

#### 2-1) 薬物誘起性肝障害を未然に防ぐための評価系の構築

GST M1 と GST T1 の両欠損型マウスとそれと対応した野生型マウスに、トログリタゾンを経口投与し、LC-MS/MS を用いて投与後 24 時間までの尿中グルタチオン抱合体を測定し、それぞれグルタチオン抱合体ごとにその尿中排泄量を比較した。さらにトログリタゾンを静脈より投与し、投与後 4 時間までの胆汁中グルタチオン抱合体を測定し、胆汁中排泄量を比較した。ヒト肝ミクロソームの反応系に、発現系大腸菌から精製したリコンビナント GST タンパクを添加し、GST 非添加時として増加したグルタチオン抱合体生成量を

GST を介したグルタチオン抱合反応によるものと考え、LC-MS/MS を用いて測定した。ヒト肝臓中には GST M1 と T1 以外に、A1、A2、P1 分子種も発現しているため、これら 5 種類の分子種間で生成量の増加を比較した。次に、GST M1 による関与が大きいと示唆されたグルタチオン抱合体において、単位 GST タンパク当たりの抱合活性を求め、その抱合活性とヒト肝臓の GST 分子種の発現量の報告値から、ヒト肝臓における GST M1 の抱合反応への寄与率を算出した。

#### 2-2) GST M1 KO マウスの DCNB に対する毒性評価

実験デザイン：14~16 週齢のマウスに 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB)を投与した。単回試験での用量は、0、500、1000 mg/kg、14 日連投試験では、0、150、300、600 mg/kg を用いた。TK (toxicokinetics) および遺伝子発現解析サンプル採取：血液は、投与後 1 日目と 14 日目の投与 2 時間後に採取し、血漿を分離後、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。メトヘモグロビン (MetHb) 数は 7011 臨床分光計 (日立製作所) で測定した。TK 測定：血漿中 DCNB 濃度とそのグルタチオン抱合代謝物 M0 は、エタノール除タンパク質処理後、HPLC を使用し、UV 吸収 (270 nm) を用いて定量した。

### (3) ヒト iPS 細胞による安全性スクリーニング系の開発

#### 3-1) ヒト iPS 細胞の成熟肝細胞への分化誘導法と安定供給法の確立

ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化：ヒト iPS 細胞は国立成育医療研究センターにおいて樹立された 2 株 (iPS#25, iPS#51) および京都大学にて樹立された iPS 201B7 の計 3 株を使用した。肝細胞への分化は、ヒト iPS 細胞が培養ディッシュに対し、未分化コロニーの占める割合が約 70%になった状態で開始した。0.5% FBS、100 ng/mL activin A、100 units/mL penicillin G、100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin sulfate を含む RPMI + GlutaMax medium で 3 日間、2% knockout serum replacement (KSR)、100 ng/mL activin A、100 units/mL penicillin G、100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin sulfate を含む RPMI + GlutaMax medium で 2 日間培養した。Activin A 処理後、Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ阻害剤である Y-27632 を 10  $\mu\text{M}$  となるように添加し、5%  $\text{CO}_2/95\%$  air 条件下  $\text{CO}_2$  インキュベーター中  $37^\circ\text{C}$ にて 60 分間処理した細胞を accutase にて剥離し、あらかじめヒト iPS 細胞用培地にて 30 倍に希釈した GFR Matrigel にてコートした細胞培養用 6 well-plate もしくは細胞培養用 6 cm ディッシュに播種した (Y-27632 は播種後 24 時間、培地に添加した)。その後、20% KSR、1% GlutaMax、1% non essential

amino acid、0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、1% dimethylsulfoxide、100 units/mL Penicillin G、100  $\mu$ g/mL Streptomycin Sulfate を含む knockout Dulbecco's modified Eagle's medium で 7 日間、10 ng/mL hepatocyte growth factor、20 ng/mL oncostatin M、 $10^{-7}$  M dexamethasone を含む変法ランフォード培地で 11 日間、変法ランフォード培地で 7 日間培養することにより行った。分化誘導 6 日、15 日、23 日及び 30 日（分化終了）後、RNA をトリゾールにて回収した。

ヒト iPS 細胞樹立：山中ファクターを HFLung III に導入することにより樹立を試みた。

### 3-2) 医薬品開発に資するための iPS 細胞株の特性解析

#### 3-2-1) 薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型解析

iPS 細胞株 (iPS#25、201B7) 或いは iPS 細胞樹立予定株 (HFLung III、TGBC18TKB、2C6) のゲノム DNA について薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型解析を行い、各細胞株の遺伝的バックグラウンドの一部を検証した。CYP2D6\*5 と CYP2D6\*36 single の検出は、PCR 産物を電気泳動で確認することにより行った。ABCC4 2269G>A (E757K), ABCB11 1331C>T (A444V), SLC22A2 808G>T (A207S), CYP3A7 -159T>A, ABCC1 2168G>A (R723Q), SLCO1B1 521T>C (V174A) については、TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Mix を用いた Realtime PCR 法にて行った。ABCB1 遺伝子多型 12 種 -1789G>A, -129T>C, 325G>A (E109K), 1236C>T (412Gsilent), IVS13+81C>T, 2677G>A (A893T,A893S), IVS21+49T>C, 3435C>T (1145Isilent), IVS26+59T>G, 3587T>G (I1196S), IVS27-182G>T, 3751G>A (V1251D) のタイピングには、SNaPshot 法を用いた。

#### 3-2-2) iPS 細胞から分化誘導した肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性

薬物代謝酵素の代表的誘導剤である rifampicin、omeprazole、phenobarbital、dexamethasone、3-methylcholanthrene、dimethylsulfoxide を iPS#25、iPS#51、201B7 から分化誘導された肝細胞様細胞に 2 日間暴露した後、薬物代謝酵素の基質である phenacetin (CYP1A)、bupropion (CYP2B)、diclofenac (CYP2C9)、s-mephenytoin (CYP2C19)、bufuralol (CYP2D)、midazolam (CYP3A)、7-hydroxycoumarin (UGT and SULT) を加え、6 時間インキュベートし (n=3)、培地中の基質代謝物を UPLC/MS/MS システムを用いて定量した。

#### 3-2-3) iPS 細胞から分化誘導した肝細胞様細胞の遺伝子発現プロファイル

iPS 細胞 3 株 (iPS#25、iPS#51、201B7) の肝細胞分化

誘導処理後、0、6、15、23、30 日後の細胞、及び上述の薬物代謝酵素の誘導剤暴露細胞における遺伝子発現プロファイルを DNA チップ (Agilent 社 HumanG2(8X44K)) により解析した。ラベル体の作成やハイブリダイゼーションは Agilent 社が提供しているプロトコルに従った。

#### 3-2-4) iPS 細胞 253G1 株の肝細胞への分化と CYP 及び UGT の mRNA 発現解析

iPS 細胞から肝細胞への分化誘導：253G1 株 (継代数 35) が 50-60%まで成育した 10 cm ディッシュを用いて分化誘導を行った。分化誘導スケジュールは基本的に上記 3-1)と同様であるが、最後の 3 日間は 3-MC (3-methylcholanthrene) 処置 (コントロールとして DMSO 処置) を行った。CYP 及び UGT の分子種についての mRNA 発現解析は RT-PCR 法により行った。

#### 3-2-5) ヒト iPS 細胞を用いた胎児毒性試験系の開発

ヒト iPS 細胞を用いた研究に先立ち、本年度はマウス ES 細胞株 (ES-D3 細胞) を用いた Embryonic Stem Cell Test を欧州代替法バリデーションセンター (European Center for the Validation of Alternative Methods; ECVAM) が発表した方法に準拠して実施した。

#### (4) 医薬品に関する筋肉障害と関連する遺伝子多型の調査・解析

過去の症例報告ならびに分子疫学研究報告に基づき、ミオパチー発症に関わる候補遺伝子および候補遺伝子多型を抽出した。また、日本全国の臨床研究機関のうち、薬剤誘発性ミオパチーをきたすことで知られるスタチンの使用経験の豊富な多施設を募り、共同研究チームを発足させ症例集積を開始した。

#### (5) 薬物性肝障害の臨床情報集積と分析および薬物起因性ラット胆汁うっ滞の病態解析

薬物性肝障害の臨床情報集積と分析については、登録施設に、薬物性肝障害の症例の前向き集積を依頼し、登録用紙を送って貰うように依頼した。症例は ALT $\geq$ 150 and/or ALP $\geq$ 2x 基準上限の症例に限定した。登録内容は、年齢、性別、基礎疾患、臨床病型、被疑薬、薬効分類、発症までの日数、DLST、WBC、好酸球%、AST、ALT、ALP、GGT、T.Bil、HAV、HBV、HCV、ANA、AMA or M2 および胆道疾患、ショック肝、飲酒歴、発熱、皮疹、薬物治療、転帰、DDW-J2004 スコアおよび RUCAM(ICM)スコアである。症例の解析をするとともに、DDW-Japan 2004 の薬物性肝障害の診断基準に基づくスコアリングを行った。薬物起因性ラット胆汁うっ滞の病態解析については、体重 250 g の雄性 Sprague-Dawley 系ラットに、4-フェニルブチレ

ート (4PB) 750 mg/kg を2回に分け3日間もしくは1200 mg/kg を2回に分け4日間経口投与した。麻酔後開腹し胆管カニュレーションを行い、30分後に大腿静脈より [14C] タウロコール酸 (TC) を 1.5  $\mu$  mol/min/100g またはスルホプロモフタレイン (BSP) を 0.2  $\mu$  mol/min/100g で60分間持続投与した。胆汁を10分おきに採取し、TC濃度は放射活性から、BSP濃度はアルカリ化後比色法で測定し、胆汁中最大排泄量を検討した。

## (6) 副作用と関連する遺伝子多型のタイピング系の開発

### 6-1) GSTA1 多型のタイピング系開発

GST A1 遺伝子に関して、日本人を対象にした遺伝子多型解析でハプロタイプタグ多型として同定された7種の遺伝子多型 (-5184G>T, IVS2-452A>C, IVS2-324A>C, IVS4+4C>T, IVS4+113A>G, IVS4+251C>T, \*187T>A) を対象とした。これらの多型により、日本人において認められる主要な8種のハプロタイプ (ハプロタイプ頻度>0.018) を判別することが可能である。まず各多型部位を含む断片をゲノム DNA (50ng) より Ex-Taq DNA polymerase を用いて特異的に増幅した。この際、7種の多型を、それぞれ4種及び3種ずつ2グループ (グループ1及びグループ2) に分類し、近傍の SNP は1つの PCR 増幅断片に含まれるように工夫することで、両グループともに2 PCR 増幅断片を Multiplex PCR 法により増幅した。一塩基プライマー伸長反応は、ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit を用いて行った。精製した multiplex PCR 増幅産物を鋳型とし、各グループにつき、それぞれ4種及び3種の濃度の異なるタイピングプライマーを用いた。タイピングプライマーは、その3'末端が各 SNP の直前にアニーリングする20 mer から21 mer の相補的配列をもち、その5'側にはプライマー長を調整するため、d(GACT) からなる非相補的な配列を付加した。非特異的ピークの出現を減らすため、forward プライマーまたは reverse プライマーのうち、プライマー自身の二次構造やプライマー間のダイマー形成の可能性が少ない方を選択した。反応終了後、精製し、ABI PRISM 3130XL DNA Analyzer を用いたキャピラリー電気泳動を行い、GeneMapper Software を用いて解析した。

### 6-1) GSTA2 多型のタイピング系開発

日本人を対象にした遺伝子多型解析でハプロタイプタグ多型として同定された6種の遺伝子多型 (-6066A>T, 328C>T [Pro110Ser], 335C>G [Thr112Ser], IVS5+152T>C, 629A>C [Glu210Ala], 814 (\*145)C>A) を対象とした。これらの多型により、日本人において主に認められ

る6種のハプロタイプ (ハプロタイプ頻度>0.032) を判別することが可能である。GST A1 と同様に、ゲノム DNA (50ng) より6種の多型を含む3 PCR 増幅断片を Multiplex PCR 法により増幅し、精製した multiplex PCR 増幅産物を、2グループに分割し (グループ1及びグループ2)、各グループにつき、それぞれ3種の濃度の異なるタイピングプライマーを用いて GST A1 と同様にタイピングを行った。

## (7) 副作用と関連する遺伝子多型の機能解析

ヒト CYP3A4 野生型 (CYP3A4\*1) およびヒト NADPH-P450 還元酵素 (POR) をバキュロウイルスに導入し昆虫細胞 (Sf21) で発現・調製したマイクロソーム、ヒト CYP3A4\*16 および POR をバキュロウイルスに導入し昆虫細胞 (Sf21) で発現・調製したマイクロソーム、ヒト CYP3A4\*18 および POR をバキュロウイルスに導入し昆虫細胞 (Sf21) で発現・調製したマイクロソームを試料として用い、CYP3A4 の代表的な基質として知られるミダゾラム (MDZ) の1位水酸化活性に対する各種薬剤の阻害効果を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の一部に関しては、市販の或いは公的バンクより頒布されるヒト由来細胞 (より得られた DNA) を用いる場合があり、必要に応じて「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に従い、各研究実施機関で研究倫理審査委員会の承認が得られた後、解析を行った。市販されているヒト由来試料等を用いる場合には、インフォームドコンセントを得て正当に採取された検体であることを購入時に業者に確認した。筋障害および薬物性肝障害の臨床情報集積と分析に関する研究では研究実施機関である金沢医科大学および帝京大学医学部において既に倫理審査の承認を受けており、臨床研究に関する倫理指針を遵守して行った。また、動物実験に関しては「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守して実験を行った。なお、ヒト iPS 細胞に関しては、臨床研究に用いることはなく、また、「生殖細胞への分化誘導及びそれらを用いた受精卵の作製、ヒト胚作製、ヒトを含む動物との混合胚作製、ヒトに対する治療目的のための使用」のいずれにも該当しない。

## C. 研究結果

### (1) 医薬品候補化合物の感作性試験法の開発

#### 1-1) 新規感作性試験法の確立

皮膚感作性陽性 (NiSO<sub>4</sub> 及び DNCB) ・陰性 (SDS) 物質を用いた h-CLAT を3施設間 (国立衛研、明治製菓、塩野義製薬) でを行い、3施設とも NiSO<sub>4</sub> 及び

DNCB は陽性、SDS は陰性の結果が得られた。また、医薬品に対して h-CLAT を適用可能かどうか検討する目的で、アレルゲン性のあることが知られているペニシリン類であるアンピシリンを用いて h-CLAT を行った結果、陽性判定を得た。一方、ネビラピンに関しては、溶媒 (saline 或いは DMSO) への溶解度が低く、標準暴露濃度である CV75 (75%細胞生存率時の被験物質濃度) を得ることができなかった。適用可能な最高濃度である 100 µg/mL を最高 dose として h-CLAT を 3 試験実施したが、最高 dose での細胞生存率がいずれも 90%を上回ったため、試験として成立しなかった。

### 1-2) アレルゲン性試験法開発のための新規培養細胞系の調製と検討

MPO を恒常的に発現する THP-1 細胞株が得られた。PCR 法により MPO cDNA の保持が確認された。ELISA 法による MPO タンパク発現量の測定では、培養上清および細胞抽出液ともに MPO タンパクが検出できた。高い MPO 活性を有する事が知られている HL-60 細胞と比べるとその発現量は 1/10 以下であった。MPO 安定発現 THP-1 細胞抽出液を用いた Western blot による解析では MPO タンパクの検出はできなかった。

### (2) GST T1 と GST M1 ノックアウトマウスを用いたバイオマーカーの探索

#### 2-1) 薬物誘起性肝障害を未然に防ぐための評価系の構築

ヒト肝ミクロソームによるトログリタゾンの代謝実験では観察された 5 種類のグルタチオン抱合体のうち、マウス胆汁中には 2 種類のグルタチオン抱合体しか観察されなかった。これら 2 種類の胆汁中排泄量を欠損型マウスと野生型マウスで比較したところ、欠損型マウスにおける排泄量の低下は観察されなかった。

in vitro 代謝試験の結果、既報の通り 5 種類のグルタチオン抱合体を検出することができた。グルタチオン抱合体によって、その生成に関わる GST 分子種は異なる。このうち、GST M1 が大きく関与することが推察されたグルタチオン抱合体が 1 種類観察された。この抱合体の生成には GST A1 と P1 も関与していることを見いだした。このグルタチオン抱合体の生成活性を定量的に評価したところ、GST A1 と P1 の寄与は GST M1 の 0.2 倍、0.02 倍となり、GST M1 が大きく寄与していることが示唆された。

2-2) GST M1 KO マウスの DNCB に対する毒性評価  
Mu class GST の特異的な基質である DCNB を用い、GST M1 KO マウスにおける毒性変化を調べた。DCNB の単回投与では、Wildtype マウスに比べ、GST M1 KO マウスでの血中 MetHB の増加が顕著に観察さ

れたが、これは代謝酵素である GST M1 の欠損により DCNB の高い曝露がかかったため生じたものと考えられた。DCNB の 14 日間反復投与により GST M1 KO マウスでは、メトヘモグロビン血症への適応応答が強く認められた。このことは、増強された適応反応が毒性発現を軽減してしまう可能性を示唆しており、遺伝子改変動物を用いた毒性評価には注意深い解釈が必要であると考えられた。

### (3) ヒト iPS 細胞による安全性スクリーニング系の開発

#### 3-1) ヒト iPS 細胞の成熟肝細胞への分化誘導法と安定供給法の確立

ヒト iPS 細胞の作成に HFLung III 細胞を用い、山中ファクターの 4 因子 (Oct3, Klf4, Sox2, c-Myc 遺伝子) をレンチウイルスにて遺伝子導入した。遺伝子の導入の評価は、コントロールに GFP を用いて、Transfection 効率 80%以上、Infection 効率 40%以上のものを使用した。培地はウイルス感染後 4、5 日で交換した。培地交換翌日フィーダー細胞である MEF 上へ撒き直し、2 日置きにヒト iPS 用の培地と交換した。遺伝子導入後、10 日で HFLung III 細胞に変化が観察された。その後、2 週間後でコロニーが観察された。このコロニーは、未分化遺伝子 Oct3 を発現しており、外来遺伝子のサイレンシングが確認できた。また、細胞表面抗原として未分化マーカー TRA1-60 に陽性であることが確認された。さらに、アルカリフォスファターゼ染色陽性であった。しかし、ヒト iPS 細胞に特徴的な単層のコロニーとならず、細胞の保存もできなかった。

#### 3-2) 医薬品開発に資するための iPS 細胞株の特性解析

##### 3-2-1) 薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型解析

本年度解析を行った 8 遺伝子 (CYP2D6, CYP3A7, SLCO1B1, SLC22A2, ABCB11, ABCC1, ABCC4, ABCB1), 21 多型に関して、CYP3A7, SLCO1B1, ABCC1, ABCC4 の本研究で解析した座位に関しては、変異が認められなかった。iPS#25 細胞は、ABCB11 (BSEP) の 1331C>T 変異をヘテロで有する以外は今回調べた中では活性に影響を及ぼす変異は認められなかった。1331C>T 変異により A444V のアミノ酸置換が生じるが、この変異により発現の上昇することが報告されているので注意が必要であると考えられる。HFLung III 細胞は、CYP2D6 の全欠損により活性が消失する \*5 変異をヘテロで有する事が判明したので、CYP2D6 活性の減少に注意が必要である。ABCB11 に関しては iPS#25 細胞同様、1331C>T 変異をヘテロで有することが判明した。ABCB1 に関しては 7 座位に

ついてヘテロであった。活性影響が予想されるヘテロ変異が7座位認められたので、注意が必要である。201B7細胞は、ABCB1の3座位にSNPが認められた以外は、今回調べた中では活性に影響を及ぼす変異は認められなかった。ABCB1 3435C>Tに関しては発現量、薬物血中濃度、薬物応答性の変化が報告されており、当該SNPが及ぼす活性影響に関する結論は出ていないものの、注意する必要があると考えられる。TGBC18TKB細胞はABCB1 1331C>Tのホモ変異を有することが判明した。1331C>T変異によりA444Vのアミノ酸置換が生じ、この変異により発現の上昇することが報告されている。TGBC18TKBはこの変異をホモで有するので注意が必要である。ABCB1については4座位についてSNPが検出された。ABCB1 3435C>Tに関しては発現量の増減が報告されており、注意する必要があると考えられる。2C6細胞はSLC22A2 808G>Tのヘテロ変異を有することが判明した。この変異によりA207Sのアミノ酸置換が生じ、活性の低下することが報告されているので注意が必要である。また、ABCB1については5座位についてヘテロSNPが検出された。ハプロタイプについては本解析からだけでは決められないため不明ではあるが、ABCB1 -129T>C、1236C>Tに関しては発現量の増減が報告されており、当該SNPが及ぼす活性影響に関する結論は出ていないものの、注意する必要があると考えられる。

### 3-2-2) iPS細胞から分化誘導した肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性

3株のiPS細胞から分化誘導した肝細胞様細胞について8種の薬物代謝酵素活性(CYP1A, CYP2B, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D, CYP3A, UGT, SULT)測定した。まず誘導剤の処理を行っていない溶媒対照群についてみるとCYP2C9およびCYP2C19については3株とも活性が検出されなかった。CYP3Aについては、iPS#25およびiPS#51では活性が検出されたが、201B7では活性を検出できなかった。測定可能であった溶媒対照群の活性を3株間で比較すると概ね、iPS#51>iPS#25>201B7であった。SULTは比較的強い活性を示し、いずれの株においても活性が確認された。誘導剤処理群では溶媒対照群と比較して、活性が有意に上昇するケース、有意に低下するケース、様々であった。iPS#25とiPS#51は誘導剤に対して概ね似た変化を示した。即ち、3-MethylcholanthreneでCYP1A活性が上昇したこと、DexamethasoneでCYP3A活性が上昇したことは肝細胞らしい反応であった。しかしながら、OmeprazoleでCYP1Aの活性が上昇しない、RifampicinでCYP3Aの活性が上昇しな

いなど、ヒト肝細胞とは異なる反応も観察された。201B7については、RifampicinによるCYP1A活性の上昇、3-methylcholanthreneによるCYP2Dの活性上昇など、ヒト肝細胞とは異なった挙動を示した。

### 3-2-3) iPS細胞から分化誘導した肝細胞様細胞の遺伝子発現プロファイル

<肝細胞分化誘導に関して> 3株のiPS細胞を用いて、肝細胞分化誘導処理後、0、6、15、23、30日後の細胞における遺伝子発現変化をDNAチップにより解析した。肝細胞分化誘導により、細胞内の遺伝子発現プロファイルは大きく変動することが明らかとなった。3種類のiPS細胞において共通に発現上昇する遺伝子を選択後、遺伝子データベースによりその機能分類を検索すると、肝臓関連遺伝子が有意に含まれていることから、3株は肝細胞に分化していると推定される。また、遺伝子データベースにおいて、肝細胞分化関連遺伝子と分類されている406遺伝子や薬物代謝に分類されている18遺伝子の発現変化を解析したところ、201B7株ではほとんど発現上昇が認められないが、iPS#25およびiPS#51では顕著な関連遺伝子の発現上昇が観察され、特に、iPS#51において最も大きい発現上昇が検出された。これらの結果から、用いたiPS細胞株は、いずれも肝細胞分化誘導処理によって肝細胞へと分化しており、分化の程度は、iPS#51株が最も高いことが推測できた。

<薬物関連代謝酵素の発現誘導剤の影響> 分化誘導した3株の肝細胞様細胞について、5種類の薬物代謝関連酵素誘導剤処理後の薬物代謝関連酵素遺伝子の発現誘導をDNAチップにより解析した。CYP遺伝子群、UGT遺伝子群、SULT遺伝子群についてそれぞれ解析を行ったところ、用いた3種類のiPS由来肝細胞は、処理薬剤に反応して薬物代謝関連遺伝子の発現誘導する細胞であるが、各薬剤への反応性は細胞株によって大きく異なっていることが推察された。

### 3-2-4) iPS細胞253G1株の肝細胞への分化とCYP及びUGTのmRNA発現解析

本研究の分化誘導スケジュールにより、ヒトiPS細胞253G1株は肝細胞に特徴的な構造を示した。RT-PCRによるmRNA発現解析では、正常ヒト肝組織において発現が確認されているいくつかのCYP及びUGT分子種のmRNA発現が確認された。また、3-MC処置により、正常肝組織と同様にCYP1A1及びCYP1B1のmRNA発現誘導が見られた。

### 3-2-5) ヒトiPS細胞を用いた胎児毒性試験系の開発

ヒトiPS細胞を用いた研究に先立ち、マウスES細胞株を用いたEmbryonic Stem Cell Testを実施した。リファレンス化合物の評価を行い、16化合物中15化合物

について正しく予測することができた。

#### (4) 医薬品に関する筋肉障害と関連する遺伝子多型の調査・解析

PubMed などの公開データベースから、横紋筋融解に関する過去の症例報告ならびに分子疫学研究報告をサーチし、ミオパチー発症に関わる候補遺伝子および候補遺伝子多型を約 100 種抽出した。9 大学による多施設共同研究チームを発足させ、まずはスタチンに関して以下の手順で症例集積を開始する事とした。

\* スタチン投与中に横紋筋融解症のみならず筋痛症など広くミオパチーを生じた症例を後ろ向きに登録するとともに、同意の得られた症例では遺伝子解析用サンプルを採取する。

\* 既にスタチンが投与されているがミオパチーを生じていない症例を同じく後ろ向きに登録するとともに、同意の得られた症例では遺伝子解析用サンプルを採取する。

\* 臨床的適応に沿ってスタチンが投与される症例を前向きに登録するとともに、同意の得られた症例では遺伝子解析用サンプルを採取する。

#### (5) 薬物性肝障害の臨床情報集積と分析および薬物起因性ラット胆汁うっ滞の病態解析

2010 年末までに集計された 11 施設よりの 50 症例であり、分析結果は以下の様であった。対象症例数は 50 例 (男性 18 例、女性 32 例) で、平均年齢は 54 歳 (17 歳~82 歳) であった。肝障害のタイプは肝細胞障害型 34 例 (68%)、混合型 8 例 (16%)、胆汁うっ滞型 8 例 (16%) であった。好酸球増多は 13 例 (26%) で認められた。DLST は 33 例で実施 (実施率 66%) され、うち 15 例が陽性 (陽性率 45%) であった。DDW-Japan 2004 の薬物性肝障害のスコアリングでは可能性が高い 5 点以上は 45 例 (90%) であった。被疑薬内服から発症までの期間を累積%で示すと 14 日以内が 15 例 (30%)、30 日以内が 29 例 (58%)、60 日以内が 35 例 (70%)、90 日以内が 38 例 (76%) であり、91 日以上も 12 例 (24%) あった。被疑薬 (重複あり) としては抗菌薬・抗真菌薬が 13 例、非ステロイド性抗炎症薬が 11 例、精神科用薬 11 例、消化器用薬 10 例、循環器用薬 8 例、健康食品 7 例、漢方薬 6 例、抗アレルギー薬 6 例などであった。薬物起因性ラット胆汁うっ滞の病態解析については、TC の最大排泄量は対照の  $0.86 \pm 0.1 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$  に比し、4PB 750 mg/kg 3 日間投与で  $1.17 \pm 0.28 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ 、4PB 1200 mg/kg 4 日間投与で  $1.26 \pm 0.34 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$  と有意に増加した。しかし BSP の最大排泄量は対照の

$87 \pm 9 \text{ nmol}/\text{min}/100\text{g}$  に比し、4PB 750 mg/kg 3 日間投与で  $87 \pm 24 \text{ nmol}/\text{min}/100\text{g}$ 、4PB 1200 mg/kg 4 日間投与で  $91 \pm 10 \text{ nmol}/\text{min}/100\text{g}$  と変化しなかった。

#### (6) 副作用と関連する遺伝子多型のタイピング系の開発

##### 6-1) GSTA1 多型のタイピング系開発

日本人由来ヒト培養細胞 12 株のゲノム DNA を用いて、開発した一塩基プライマー伸長法による 7 遺伝子多型 (-5184G>T, IVS2-452A>C, IVS2-324A>C, IVS4+4C>T, IVS4+113A>G, IVS4+251C>T, \*187T>A) のタイピングを試みたところ、全ての多型・細胞株につき明瞭なタイピング結果が得られた。また、これら一塩基プライマー伸長法による解析結果は直接シーケンス法による結果と完全に一致したことから、結果は正確であり、今回確立した方法によるタイピング系は有用であることが示された。

##### 6-1) GSTA2 多型のタイピング系開発

日本人由来ヒト培養細胞 12 株のゲノム DNA を用いて、開発した一塩基プライマー伸長法による 6 遺伝子多型 (-6066A>T, 328C>T [Pro110Ser], 335C>G [Thr112Ser], IVS5+152T>C, 629A>C [Glu210Ala], 814 (\*145)C>A) のタイピングを試みたところ、全ての多型・細胞株につき明瞭なタイピング結果が得られた。また、これら一塩基プライマー伸長法による解析結果は直接シーケンス法による結果と完全に一致したことから、結果は正確であり、今回確立した方法によるタイピング系は有用であることが示された。

#### (7) 副作用と関連する遺伝子多型の機能解析

CYP3A4\*16 のミダゾラム代謝に対するアトルバスタチン、パクリタキセル、エリスロマイシン、及びプロポフォールの阻害活性は、CYP3A4\*1 と比較して減弱したが、ドセタキセル及びケトコナゾールの阻害活性は、CYP3A4\*1 と同等であった。このことは、CYP3A4\*16 は、CYP3A4\*1 とは異なる薬物-薬物相互作用を引き起こしうること、また、両者の薬物-薬物相互作用における相違の程度は薬剤ごとに異なる可能性があることを示している。一方、CYP3A4\*18 のミダゾラム代謝に対し、用いた 5 種の阻害剤は CYP3A4\*1 と同等の阻害活性を有しており、CYP3A4\*18 によりもたらされる薬物-薬物相互作用の程度は、CYP3A4\*1 と同等であることが推測される。

#### D. 考察

##### (1) 医薬品候補化合物の感作性試験法の開発

##### 1-1) 新規感作性試験法の確立

h-CLAT に関して施設間差無く陽性・陰性コントロールによるアッセイ結果を得ることができた。h-CLAT は本来、皮膚感作性の試験法であるが、これを医薬品の感作性試験法として確立するためには検討すべき課題が多いと考えられる。アレルゲン性のあることが知られているペニシリン類であるアンピシリンに関しては h-CLAT の標準プロトコールで陽性判定を得られたが、ネビラピンに関しては試験系として適用外となった。ネビラピンの臨床での副作用としては 20-40% の皮疹が報告されており、高いアレルゲン性を有すると考えられる。また、経口投与された後、P450 により代謝され生成される 12 水酸化体がアレルギー反応に寄与することが報告されている。従って、h-CLAT を医薬品の感作性試験法として確立するためには、被験物質の代謝を考慮する必要があると考えられ、また、溶解性に関する検討、さらには指標する表面抗原或いは他のマーカー分子の検討なども必要と考えられ、次年度以降の課題とする。

#### 1-2) アレルゲン性試験法開発のための新規培養細胞系の調製と検討

MPO 安定発現 THP-1 細胞株を樹立した。MPO 発現量はそれほど高くないが、現在当該クローン以外に MPO 発現量未測定 G418 耐性の THP-1 を十数クローン単離しており、増殖を待って発現量の測定を行う予定である。THP-1 野生株は本来 MPO 活性を有しないが、MPO 安定発現 THP-1 細胞株の利用により、MPO で代謝される医薬品（アミノピリン、カルバマゼピンなど）への h-CLAT 試験の適用が期待される。

#### (2) GST T1 と GST M1 ノックアウトマウスを用いたバイオマーカーの探索

##### 2-1) 薬物誘起性肝障害を未然に防ぐための評価系の構築

薬物誘起性肝障害を未然に防ぐための評価系の構築を目指して、トログリタゾンモデル化合物として用い、GST M1/T1(-/-)マウスを用いた in vivo 試験、ならびに精製 GST 酵素を用いた in vitro 試験系の構築に取り組んだ。グルタチオン抱合体における、マウス肝臓での GST M1 と GST T1 の寄与は小さいことが示唆された。in vitro 試験によって算出した GST M1 と GST T1 の寄与は、in vivo 試験で観察された遺伝子型の影響と合致するものと考えられた。GST M1 の発現差異が、毒性に深く関わる反応性代謝物の解毒活性を変化させ、毒性発症のリスクが高まることが示唆された。トログリタゾンの肝障害における GST M1 と GST T1 の影響は動物実験で未だ再現できていないが、これは肝障害のトリガーとなる反応性代謝物がマウスでは生成されず、

生成された他の反応性代謝物は、GST M1 と T1 以外の GST 分子種によって解毒されるために、肝障害が引き起こされないことが示唆された。

##### 2-2) GST M1 KO マウスの DNCB に対する毒性評価

TK 測定において、GST M1 KO マウスでは、Wild type マウスに比べ、DNCB の高い曝露が見られた。これは、DNCB の代謝経路は完全には明らかになっていないものの、類似化合物である p-nitrochlorobenzene においては、GST による抱合代謝が主代謝経路であることから、DNCB の代謝に GST M1 が関与しており、その欠損マウスでの曝露が高くなった可能性が示唆される。今回、DNCB のグルタチオン抱合代謝物 M0 の血漿中濃度も同時に測定した結果、Wildtype マウスに比べて、GST M1 KO マウスでは、M0 の濃度が有意に低いものであったことから、DNCB の代謝に GST M1 によるグルタチオン抱合経路が関与していることが示された。

#### (3) ヒト iPS 細胞による安全性スクリーニング系の開発

##### 3-1) ヒト iPS 細胞の成熟肝細胞への分化誘導法と安定供給法の確立

ヒト iPS 細胞の樹立に関しては最終的な細胞株を得るまでは至らなかったが、今後の参考になるものと思われた。

##### 3-2) 医薬品開発に資するための iPS 細胞株の特性解析

###### 3-2-1) 薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子多型解析

本年度は薬物代謝酵素 CYP2D6, CYP3A7, およびトランスポーターSLCO1B1, SLC22A2, ABCB11, ABCC1, ABCC4, ABCB1 の 8 遺伝子 21 座位について多型解析を行った。各細胞株いずれも活性に影響を及ぼす可能性のある多型を有しており、医薬品候補化合物の評価に iPS 細胞を活用する場合にはその点を考慮に入れる必要があると考えられた。

###### 3-2-2) iPS 細胞から分化誘導した肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性

誘導剤処理群では溶媒対照群と比較して、活性が有意に上昇するケース、有意に低下するケース、様々であった。活性低下の原因は不明であるが、例数が 3 例と少ないので偶発的な事象かもしれないし、細胞毒性の可能性も考えられる。今回評価した 3 株の中では、iPS#51 から誘導された肝細胞様細胞が薬物代謝酵素の活性および誘導剤に対する反応を総合的に判断して最も肝細胞に近い特性を示したと思われる。しかしながら、誘導剤に対してヒト肝細胞とは異なる反応も観察されたことから、今後、肝細胞への分化誘導法の更なる改良が望まれる。

### 3-2-3) iPS 細胞から分化誘導した肝細胞様細胞の遺伝子発現プロファイル

iPS 細胞の特性解析の一環として、肝細胞分化誘導処理後の iPS 細胞の変化を遺伝子発現プロファイルの変化として解析した。肝細胞分化の程度は差があるものの、遺伝子発現プロファイル上は、3種類いずれも肝細胞分化誘導に成功していると考えられた。薬物代謝遺伝子誘導剤処理に対する各肝細胞の反応性の解析では、それぞれの細胞において有意に薬物代謝関連遺伝子の変化が認められた。一方、各細胞の誘導剤への反応性は様々であることも判明した。これは、様々な薬物試験において各薬剤に最適な iPS 由来肝細胞が設定できる可能性も示唆している。

### 3-2-4) iPS 細胞 253G1 株の肝細胞への分化と CYP 及び UGT の mRNA 発現解析

今回得られた分化誘導肝細胞は、正常肝組織にある程度反映していることが示唆された。しかし、正常肝組織において発現が確認されている UGT1A1 や UGT1A3 などの分子種の発現が確認されていない課題も残された。分化肝細胞において発現が確認できた分子種 (CYP1A1、CYP1B1、UGT1A4、UGT1A5、UGT1A9、UGT2B4) については、今後、ウェスタンブロット分析によるタンパク質レベルでの発現並びに高速液体クロマトグラフィーによる酵素機能解析を行い、さらに薬物代謝酵素の発現制御に関与する受容体型転写因子 (AhR、CAR、PXR、RXR、GR) についても同様の検討を加える予定である。

### 3-2-5) ヒト iPS 細胞を用いた胎児毒性試験系の開発

今回、得られた試験成績からマウス ES 細胞株を用いた Embryonic Stem Cell Test は催奇形性予測試験として有用であると考えられた。今後は、ヒト iPS 細胞株を用いた研究を検討し、マウス ES 細胞株との対比によりその有用性を明らかにする予定である。

### (4) 医薬品に関する筋肉障害と関連する遺伝子多型の調査・解析

個々の遺伝子多型について迅速検出法確立を進めるとともに、市販の全ゲノム網羅的解析プラットフォームの適用妥当性を検証する必要がある。また症例 (発症例・コントロール例) 集積を目的とする共同研究チームの機能的運用を目指し、定期的会合・サーキュラー発行を予定している。

### (5) 薬物性肝障害の臨床情報集積と分析および薬物起因性ラット胆汁うっ滞の病態解析

現時点までに集積した 50 例の傾向は、2008 年に行った全国調査の傾向に類似していた。今後、症例をさら

に集積していく予定である。ラット胆汁うっ滞の病態解析については、今回用いた 4PB の投与量では、Bsep の代表的基質である TC の胆汁中最大排泄量が増加し、TC 投与により毛細胆管膜で増加した Bsep 量がさらに増加したと考えられた。これに対して、グルタチオン抱合体として胆汁中に排泄される BSP の胆汁中最大排泄量は変わらず、この条件下では Mip2 量の増加は起こらないと考えられた。

### (6) 副作用と関連する遺伝子多型のタイピング系の開発

GSTs は求電子物質のグルタチオン抱合を触媒する第二相酵素であり、生体異物や薬物の解毒代謝に関与する。今回対象とした GST A1 及び GST A2 の遺伝子多型は、発現量との相関判別できるタグ多型であり、大腸がんの発症リスク乳がん患者の 5 年生存率などとも相関することが報告されている。我々はすでに、GST A1 及び GST A2 の遺伝子多型を直接シーケンシング法にて探索し、これらの機能変化を伴う多型が比較的高いアレル頻度で日本人に検出されることを見出しているが、今回、これらの多型を含む主要なハプロタイプを同定するためのタグ多型をそれぞれ 7 種及び 6 種を選定し、一塩基プライマー伸長反応法によるタイピング系を確立した。本タイピングは、使用ゲノム量も比較的少なく、多くの多型を一回の反応で、迅速にタイピングできる点で優れており、GST A1 及び GST A2 が体内動態に関与する薬物のファーマコゲノミクス解析に有用と思われる。

### (7) 副作用と関連する遺伝子多型の機能解析

薬物代謝酵素 CYP3A4 の \*16、及び \*18 多型により引き起こされ得る薬物相互作用の詳細な解析のため、昆虫細胞にて発現した野生型及び変異型酵素を用いて、ミダゾラム 1' 位水酸化活性に対する各種薬剤の阻害効果を解析した。今回のミダゾラム 1' 位水酸化活性を指標とした阻害剤の阻害率の測定系は、CYP3A4\*16 及び CYP3A4\*18 により引き起こされる CYP3A4 酵素活性の変化のうち、Km の変化率を推測する簡便な系としても有効である可能性が考えられる。今後、この点に関し、さらに阻害剤の種類を増やして検討を行う予定である。

### E. 結論

・h-CLAT を応用して医薬品候補化合物のアレルゲン性試験法を開発するために、まず、陽性化合物及び陰性化合物を用いて、h-CLAT の施設間バリデーションを実施し、施設間における再現性を確認することがで