

のこれら既存免疫に与える影響について Protein Chip により解析を行った。種痘歴を踏まえ、対象を出生年で A 群 (1976 年以降に種痘を受けた群)、B 群 (1969 年～1975 年に種痘を受けた群)、C 群 (1962 年～1968 年に種痘を受けた群)、D 群 (1961 年以前に種痘を受けた群) の 4 群に分類し、Protein Chip による蛍光強度により、A 群 (未接種) と B～D 群 (既接種) の 2 群間比較を行った (Dunnett 法)。

- 4) 鼻腔内サル痘ウイルス Zr-599 株感染霊長類モデルにおける LC16m8 暴露後接種のサル痘発症予防効果。高度弱毒痘瘡ワクチン LC16m8 株暴露後接種のサル痘ウイルス感染症発症予防効果を、霊長類におけるサル痘ウイルス鼻腔内接種感染モデルを用いて解析した。昨年度はワクチン非接種群 (コントロール群, 4 頭)、サル痘ウイルス感染 (10^7 pfu) 後 15 分後に LC16m8 接種を行った群 (D0-ワクチン接種群, 4 頭)、および、サル痘ウイルス感染後 24 時間後に LC16m8 接種を行った群 (D1-ワクチン接種群, 4 頭) の臨床症状、予後、ウイルス血症レベル、抗体応答を調べた。
- 5) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究。Vaccinia WR の抗原を用いたワクチニアプロテオミックチップを利用し、LC16m8 ワクチンによる初回接種者及び過去 1 回接種者の再接種において惹起される抗ポックスウイルス抗体の抗原評価を網羅的に行った。これにより、LC16m8 ワクチン接種によりヒトに誘導される抗体のプロファイルが明らかにした。
- 6) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究。主にバイオテロのリスクが高いと考えられる地域に派遣される予定の陸上自衛隊員のうち、本研究協力で同意をされた方々が対象とされた。接種には指定の二又針が使用された。圧刺回数、初種痘 5 回、再種痘 10 回とした。種痘の前後 (後は種痘 1 ヶ月後) において、血圧、血液検査 (白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、血小板数)、生化学検査 (総コレステロール、総蛋白、アルブミン、尿素窒素、尿酸、クレアチニン、総ビリルビン、GOT、GPT、LDH、ALP、CRP、血糖)、尿検査 (蛋白、糖) の各検査を実施し、その変動について調査・分析した。
- 7) サル痘ウイルス経鼻接種後のサルにおける重症例の病理に関する研究。サル痘ウイルス増殖による重症化、劇症化の病理について明ら

かにする目的で、西アフリカ型のサル痘ウイルスを接種したカニクイザルの病理組織標本を用いて組織学的検索を行った。

- 8) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究。増殖温度感受性や低神経病原性に関する遺伝子あるいはその変異等を明らかにするため Lister 株の遺伝子による LC16m8 株 (Lister 株を親株として LC16m8 株が作製されるまでの中間段階産物で、温度感受性性質を有している) の温度感受性相補試験を実施した。
- 9) 動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究。LC16m8 により誘導された抗体が認識する抗原タンパク群の軽時的な変化を調査するために、ワクチン接種後最大 1 年経過したマウスから採取した血清について、ワクシニアウイルス WR 株の 95% 以上の構成タンパクを網羅する Proteome Microarray Chip を用いたプロテオミック解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究班で実施されたヒトを対象とした臨床的研究、動物が用いられた実験の全てが、各の施設における関連委員会 (倫理、動物実験) への申請と承認を得た上で実施された。

C. 研究結果

- 1) Lister 株または LC16m8 株の痘瘡ワクチン接種時における EEV 蛋白に対する抗体応答。LC16m8 株においては、EEV 関連蛋白のひとつである B5R 遺伝子に 1 塩基欠損によるフレームシフトが認められ、それが Lister 株に比べて高度弱毒化の性質を規定する因子のひとつである。Lister 株免疫時には、EEV 関連蛋白全てに抗体誘導が確認されたが、LC16m8 免疫時には A34R および B5R に対する免疫応答は弱く、特に B5R に対しては有意な抗体応答が認められた個体はなかった。Lister 株免疫時には B5R に対する抗体応答は認められるが、LC16m8 株をカニクイザルに接種した場合には B5R に対する抗体誘導はされないことが確認された。サル痘発症予防効果は Lister 株のそれに比較すると若干弱いことから、B5R 膜蛋白が誘導する免疫はサル痘発症予防には重要な蛋白のひとつであることが示唆された。
- 2) 長期保管に伴う検討、品質試験法改善に伴う検討及び生物基準・検定基準見直しに関する検討。原液の長期保管における安定性評価を

- 行い、24箇月目まで安定であることを確認した。添加剤についても、96箇月間冷蔵保管した検体で毒性等の変化は認められず、安定であることが確認された。また、凍結乾燥時の棚間における力価及び含湿度を比較検討し、大きな変動がないことを確認した。
- 3) LC16m8 の臨床評価に関する研究。種痘前の血清に関して、A群（1976年以降に種痘を受けた群）との比較によりB群（1969年～1975年に種痘を受けた群）ではA27L, H3Lが、C群（1961年以前に種痘を受けた群）1962年～1968年に種痘を受けた群）ではA24R, A41L, C4L, E5R, WR148が、D群ではA50L, B14R, I1Lに有意に高い（ $p < 0.05$ ）シグナルが確認された。一方、LC16m8接種後の血清では、B群でA27L及びH3Lに加えて、A14L, A27L, A56L, I2Lの4抗原に対するシグナルの有意な増強が認められ、C群においては、接種前後で変化は認められず、D群においては、A50L, B14R, I1LにA17L, A45L, B4R, B5R, C3L, F6Lの6抗原に対する有意なシグナル増強が認められた。
 - 4) 鼻腔内サル痘ウイルスZr-599株感染霊長類モデルにおけるLC16m8暴露後接種のサル痘発症予防効果。LC16m8の暴露後接種のサル痘発症予防効果は認められなかった。D1-ワクチン接種群の1頭は、劇症型サル痘（病理学的な解析により、細菌性敗血症を合併していることが確認された）により死亡した。重症で、かつ、死亡した全ての個体からは、サル痘ウイルス感染後14日目でもウイルスが分離された。Zr-599感染後4日目からコントロール群では、すべての個体が、D0-ワクチン接種群では5頭中3頭が、D1-ワクチン接種群では6頭中3頭がウイルス分離陽性を呈し、ほぼ全個体で感染後14日までウイルス分離陽性を呈した。D1-ワクチン接種群の1頭を除き、感染後18日目からはウイルスは分離されなかった。各群のウイルス分離成績における明らかな差異は認められなかった。
 - 5) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価における統計学的研究。中和・防御に関係する抗原群（D8L, A27L, A17L, H3L, A33R）について高い割合で陽転しており、LC16m8ワクチンの天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。D8L, H3Lの抗体価が中和抗体価と特に高い相関を示しており、中でもD8Lが中和抗体の重要な抗原である可能性が示唆されたほか、これまでに明らかにされていない抗原が中和と関係している可能性が示された。
 - 6) 細胞培養弱毒生痘そうワクチンの疫学的有効性及び安全性評価に関する研究。胸部X線の異常や脳炎や副種・種痘疹などの重篤な有害事象の報告はなく、血圧および臨床検査においても接種前後で有意な変動は認めなかった。善感例129例において報告された種痘後の局所所見では、水疱100(78%)、潰瘍12(9%)、痂皮40(31%)、腫脹19(15%)であった（重複あり）。平均発赤径は23.8mm、平均水疱径は7.6mmであった。副反応の発現率は、初回接種群では27.0%、再種痘群では5.6%と前者で有意に高かったが、逆に善感率は、初種痘群で94.4%、再種痘群で81.7%と初種痘群で有意に高かった。副反応の種類としては、リンパ節腫脹(19.4%)、接種部紅斑(5.2%)の報告が比較的高頻度にみられ、その他、発熱(1.5%)、倦怠感(0.7%)、サテライト(0.7%)、発疹(0.4%)、接種部腫脹(0.4%)、自家接種(0.4%)などが報告された。中和抗体に関する調査では、初回接種群が再接種群と比較して抗体上昇がより顕著であった。善感反応と中和抗体陽転率には強い相関を認めた。発赤径（局所所見）が10mmを超える群では、10mm未満の群と比較して、中和抗体価は有意に高かった。痘そうワクチンLC16m8は、疫学的有効性と安全性評価の両面で優れた痘そうワクチンであると結論する。
 - 7) サル痘ウイルス経鼻接種後のサルにおける重症例の病理に関する研究。サル痘ウイルスを経鼻感染後に重症化、劇症化した個体の病変を組織学的に評価した結果、劇症例では脾などのリンパ系組織において強いリンパ球の壊死、脱落が存在することがわかった。これは前年度の報告と同様な結果であった。よって、劇症例となった個体は共通して組織学的に免疫不全状態に陥っていることが明らかとなった。
 - 8) 弱毒生ウイルスワクチン（痘そうワクチン）の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究。温度感受性はB5R遺伝子以外にウイルスDNAのHindIII-A断片にある複数の遺伝子の変異・欠失によることが分かった。これまでにLC16mO/8株のA56R遺伝子の15塩基欠失が部分的に温度感受性に関与することが同定されたが、さらにA36R, A53R, A55R遺伝子の変異が関与する可能性が示唆された。一方、遺伝子配列の比較からはD8L遺伝子産物の1アミノ酸置換が低神経病原性に関与する可能性がある。D8L遺伝子をノックアウトしたワクチニアウイルスWR株は、プラークサイズの減少が見られるが温度感受

性には関与しなかった。

- 9) 動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究。Naïve, LC16m8及びLister接種群の経時的な抗原認識パターンにおいて、LC16m8接種群の反応強度はやや低いものの、LC16m8接種群とLister接種群はほぼ同様の抗原認識パターンを示した。両群は、調べられた抗原の中で33個の共通抗原を認識した。これらの抗原には防御や中和に重要と考えられている抗原が複数含まれていた。33種の認識抗原について経時的な認識率（認識血清数/全調査血清数）を解析したところ、接種1年後において、両群ともに認識率100%を示した抗原は8種類（L4R, H3L, D8L, D13L, A10L, A14L, A56R及びA11R）であった。これ以外に、Lister接種群のみで100%を示した抗原が9種類（F17R, A26L, H5R, A27L, A33R, I1L, B2R, F4L, A46R及びF13L）であった。

D. 考察

- 1) 霊長類を含む動物モデルを用いた高度弱毒天然痘ワクチン LC16m8 の有効性と安全性に関する研究。

霊長類に対して比較的病原性を高いサル痘ウイルスを鼻腔内噴霧経路で感染させた動物感染モデルを用いて、LC16m8の暴露後接種による発症予防効果または重症度低減効果を解析したが、その効果は認められなかった。本研究でも明らかにされたように、サル痘ウイルス感染によって霊長類では劇症型の致死性サル痘を発症する場合がある。このような個体では、細菌感染（敗血症）を合併していることが明らかにされた。暴露後にLC16m8接種がなされた個体でも劇症型サル痘を発症した個体もあった。ただし、これまでの研究では暴露前（3日以上前）にLC16m8接種がなされた個体では劇症型サル痘を発症した個体はない。一方、サル痘ウイルス皮下接種モデルでは暴露後LC16m8接種によりサル痘の軽症化を誘導できることが確認されている。サル痘ウイルス鼻腔内噴霧モデルでの検討で、LC16m8の暴露後接種効果が認められなかったのは、コントロール群でも臨床症状のばらつきが大きいことが挙げられる。

Lister株免疫時にはB5Rに対する抗体応答は認められるが、LC16m8株をカニクイザルに接種した場合にはB5Rに対する抗体誘導はされないことが確かめられた。霊長類においてLC16m8のサル痘発症予防効果は

Lister株のそれに比較すると若干弱いことから、B5R膜蛋白が誘導する免疫はサル痘発症には重要な蛋白のひとつであることが示唆された。しかし、この性質は安全性に強く関与する性質であると考えられる。

また、温度感受性を規定するLC16m8における遺伝子上の責任部位を明らかにする研究がなされ、一定の成果が得られたが、まだ、LC16m8の温度感受性責任遺伝子の全容を明らかにするところまでには至っていない。LC16m8の温度感受性は、本ワクチンの安全性、神経に対する低病原性に寄与する大切な性質であり、この科学的な基盤を解明することは重要なことと考えられる。

マウス等の小動物を用いたLC16m8の効果と安全性の評価モデル開発に関する研究も実施されているが、この領域においてもさらなる評価が必要である。

- 2) 同ワクチンが実際にヒトにおいて使用された場合における有効性と安全性に関する研究。

今年度の本研究班において、臨床応用される場合における安全性と有効性について詳細に観察された。これまでの研究においてそのことは徐々に解明されつつあると思われる。ヒトにおけるワクチニアウイルス（天然痘ワクチン）の各発現蛋白に対する抗体誘導能について詳細に解析し、天然痘予防誘導能との関連を解析した。今年度はLC16m8一回接種者における解析がなされたが、過去2回、3回接種経験者における解析プロトコルを策定し、追加でプロテオミック解析を実施し、長期残存抗体のプロファイル、異系統株接種者における抗体誘導プロファイルを解析することが必要と考えられる。また、臨床におけるLC16m8の安全性についても解析を行う必要がある。

- 3) 同ワクチン製剤の生産性の向上に関する研究。

化血研製造ロットの長期保存安定性試験により、乾燥細胞培養痘そうワクチンは、生物学的製剤基準に既定されている-20℃以下で保存した場合、60箇月まで力価の変化は認められず、その他の規格試験もいずれも適合であることから、安定であることが示された。千葉血清製造ロットを用いた安定性試験においても、96箇月まで有効性分等に変化がないことが示された。ワクチン原液の安定性試験において、-80℃で保存する場合、24箇月まで有効成分等に変化は無く安定であることも確認された。また、添加剤について

は、10℃以下の冷蔵保存でも少なくとも96箇月は毒性等に影響がないことが確認された。今後、生物基準の改正、検定基準の変更に向けて、感染研他、関係機関との協議を進めることになった。国家備蓄品としてさらに長期にわたる保管を行うことを想定し、安全性を確認する追加試験の検討等を今後も継続する必要があると考えられる。凍結乾燥工程における凍結乾燥機チャンバー内の場所による製剤の品質に変動は認められず、安定的に凍結乾燥されていることが確認された。生物基準の見直しでは、最終バルクの試験からマーカー試験を削除、原液の試験としてマーカー試験を追加し、さらに検定基準の中間段階の試験を最終バルクから原液に改訂する必要があると判断された。生物基準小分製品の安定性試験(37±1℃で4週間加温)は、製造方法の恒常性向上、長期安定性データ取得による有効期間内の品質の担保等により、その必要性が薄いと判断された。

E. 結論

細胞培養弱毒生痘そうワクチンLC16m8の安全性、有効性及び生産性に関する研究がなされ、バイオテロリズム対策およびワクチン製剤の安定的生産体制の維持と向上に寄与した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tajima, S., Takasaki, T., Kurane, I.: Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by additional mutations in NS4B. *Archives of Virology* 156:63-69, 2011
- 2) Imoto, J., Ishikawa, T., Yamanaka, A., Konishi, M., Murakami, K., Shibahara, T., Kubo, M., Lim, C.K., Hamano, M., Takasaki, T., Kurane, I., Udagawa, H., Mukuta, Y., Konishi, E.: Needle-free jet injection of small doses of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows. *Vaccine* 28:7373-80, 2010
- 3) Saijo, M., Morikawa, S., Kurane, I.: Recent progress in the treatment for Crimean-Congo hemorrhagic fever and future perspectives. *Future Virology* 5:801-809, 2010

4) Nakayama, E., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Igarashi, M., Kishida, N., Matuno, K., Marzi, A., Feldmann, H., Ito, K., Saijo, M., Takada, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 17:1723-1728, 2010

5) Mizutani, T., Sayama, Y., Nakanishi, A., Ochiai, H., Sakai, K., Wakabayashi, K., Tanaka, N., Miura, E., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., Ono, S.I.: Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology* (in press)

6) Ogawa, H., Miyamoto, H., Ebihara, H., Ito, K., Morikawa, S., Feldmann, H., Takada, A.: Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *J Virol Methods* 171(1):310-313, 2011.

7) Watanabe, S., Masangkay, J.S., Nagata, N., Morikawa, S., Mizutani, T., Fukushima, S., Alviola, P., Omatsu, T., Ueda, N., Iha, K., Taniguchi, S., Fujii, H., Tsuda, S., Endoh, M., Kato, K., Tohya, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., Akashi, H.: Bat coronaviruses and experimental infection of bats, the Philippines. *Emerg Infect Dis* 16:1217-1223, 2010

8) Watanabe S., Maeda K., Suzuki K., Ueda N., Iha K., Taniguchi, S., Shimoda, H., Kato, K., Yoshikawa, Y., Morikawa, S., Kurane, I., Akashi H., Mizutani, T.: Novel betaherpesvirus in bats. *Emerg Infect Dis* 16:986-988, 2010

9) 西條政幸: アレナウイルス. *日本臨床* 68 (増刊号):431-434, 2010

10) 西條政幸: 南米出血熱の診断法の概要. *日本医事新報* 4495: 83-84, 2010

2. 学会発表

- 1) 木下一美, 酒井宏治, 永田典代, 王麗欣, 伊藤(高山) 睦代, 中道一生, 森川茂, 倉根一郎, 西條政幸. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス核蛋白の単クローン抗体を用いた診断法の開発. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島(2010.11)
- 2) 伊波興一朗, 中内美奈, 谷口怜, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. アルゼンチン出血熱の実験室診断法の

- 患者血清を用いた評価. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
- 3) 西條政幸, 福士秀悦, 水谷哲也, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. 3分節RNAの塩基配列に基づく中国新疆ウイグル自治区におけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの分子疫学と進化. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島 (2010.11)
 - 4) Saijo, M., Fukushi, S., Mizutani, T., Kurane, I., Morikawa, S. Evolutional events of Crimean-Congo hemorrhagic fever viruses in Xinjinag, China, assessed with 3 segmented RNA genes. 44th US-Japan Cooperative Medical Science, Viral Diseases Panel Meeting, Sapporo, Japan (2010.06)
 - 5) Saijo, M. Molecular epidemiology on Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections based on the 3 segmented RNA genes. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections-2010, Busan, Korea (2010.07)
 - 6) 新倉綾, 池上徹郎, 森川茂, 山田靖子, C.J. Peters, 牧野伸治. リフトバレー熱ウイルスL蛋白のポリメラーゼ機能におけるロイシンジッパー様モチーフの重要性. 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010年11月
 - 7) 新井智, 永野昌博, 浅川満彦, 木村敏之, 近真理奈, 多屋馨子, 森川茂, 岡部信彦, Richard Yanagihara. Evolutionary insights from the genetic diversity of Asama virus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010年11月
 - 8) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS発症マウスモデルにおけるIFN- γ の投与効果. 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010年11月
 - 9) 渡辺俊平, Masangkay Joseph S, 永田典代, 森川茂, 水谷哲也, 福士秀悦, 大松勉, 上田直也, 伊波興一朗, 谷口怜, 藤井ひかる, 津田峻平, 加藤健太郎, 遠矢幸伸, 久和茂, 吉川泰弘, 明石博臣. フィリピンにおけるコウモリコロナウイルスの検出および飼育食果コウモリを用いたウイルス感染実験. 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010年11月
 - 10) 岩田奈織子, 永田典代, 辻隆裕, 長谷川秀樹, 佐藤由子, 横田恭子, 宇田晶彦, 水谷哲也, 西條政幸, 森川茂, 佐多徹太郎. SARS-CoV感染動物モデルを用いたUV不活化SARS-CoVの副反応について. 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010年11月
 - 11) 酒井宏治, 田丸精治, 前田健, 永田典代, 網康至, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 水谷哲也, 福士秀悦, 須崎百合子, 緒方もも子, 長谷川秀樹, 西條政幸, 山田靖子, 倉根一郎, 森川茂. カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスのサル及びビヌでの病原性の解析. 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010年11月
 - 12) 水谷哲也, 酒井宏治, 本道栄一, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂, 前田健. コウモリから分離された新規アデノウイルスのゲノム配列の決定および系統的解析. 第58回日本ウイルス学会, 徳島, 2010年11月
 - 13) 酒井宏治, 永田典代, 網康至, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 水谷哲也, 福士秀悦, 須崎百合子, 緒方もも子, 西條政幸, 長谷川秀樹, 山田靖子, 倉根一郎, 森川茂. カニクイザルで致死感染症を起こしたイヌジステンパーウイルスの性状と実験感染サルでの病原性の解析. 第150回日本獣医学会, 帯広, 2010年9月
 - 14) 谷口怜, 佐山勇輔, 渡辺俊平, 飯塚愛恵, 福士秀悦, 水谷哲也, 石井寿幸, 久和茂, 明石博臣, 吉川泰弘, 森川茂, 倉根一郎. レストンエボラウイルス膜糖蛋白を標的とした抗体検出系の確立. 第150回日本獣医学会, 帯広, 2010年9月
 - 15) 水谷哲也, 酒井宏治, 本道栄一, 福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂, 前田健. コウモリから分離された新規アデノウイルスの分子学的性状決定. 第150回日本獣医学会, 帯広, 2010年9月
 - 16) H. Yokote, T. Hanada, A. Satou, S. Maruno. Update of an attenuated smallpox vaccine LC16m8 research. 2011 ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting. Baltimore, USA, 2011
 - 17) 永井千草, 新村靖彦, 佐藤梓, 金原知美, 松井元, 丸野真一, 横手公幸, 志垣隆通, 大隈邦夫, 宮本誠二, 橋爪壯. ワクチニアウイルス株間の交差免疫誘導能を評価する動物モデルの検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 該当なし
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

ヒト細胞（初代培養細胞、ES/iPS由来分化細胞）を用いた生活習慣病（肥満、糖尿病、血管障害）に関する新規病態モデル系の構築と創薬への展開

所属 国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部
研究者 佐伯 久美子

研究要旨

本研究では、我々が独自に開発した細胞培養系を駆使し、生活習慣病の新規モデルを構築して創薬研究を展開することを目的とする。研究初年度である本年度は、ヒト血管内皮細胞の培養系を駆使して糖毒性（高血糖負荷時の細胞障害）のアッセイ系を安定化させることに成功し、活性酸素の関与、内皮細胞の種類による活性酸素産生機構の違い等を明らかにした。また、ヒト血管内皮細胞の平滑筋細胞の増殖に対する効果を接触培養と非接触培養の系により解明し、幹細胞から誘導した新鮮な血管内皮細胞の膜分子によると思われる増殖抑制作用を同定した。その他、ヒトiPS細胞等から肝細胞と褐色脂肪細胞を作成することにも成功した。肝細胞に関しては、ICG 取込能やcyp3A4活性などを有することも確認され、毒性試験や代謝実験に使用できることが期待される。

研究分担者

- (1) 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所糖尿病研究センター代謝疾患研究部
安田 和基
- (2) 株式会社リプロセル
浅井 康行
- (3) 多摩川精機株式会社東京バイオ開発センター
羽生 尚弘
- (4) 富山大学大学院医学薬学研究部内科学第一講座
戸邊 一之
- (5) 千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学
岩間 厚志

A. 研究目的

従来はヒト疾患モデルとして動物モデルの開発に力が注がれてきたが、適切な動物モデルが得られていないケースも多い。一方、ヒト初代細胞を用いた実験系では、培養に伴う形質変化のために病態生理を正しく反映するモデルの構築は必ずしも容易でない。本研究ではこれらの問題に対して、用いるヒト初代細胞のラインアップを増やすとともに、ヒトES/iPS細胞やヒト成体由来前駆細胞から作製した分化細胞を取り入れることで、病態生理を正しく反映できる細胞モデルを構築して創薬研究を展開する。

既に我々は、ヒト初代血管内皮細胞のラインアップを増やすことで、高ブドウ糖負荷による血管内皮細胞での活性酸素の産生機序に関して、それまで指

摘されなかった「組織特異性」が存在することを見出した。そして糖尿病性血管障害と一口に言ってもその種類（微小血管障害および大血管障害）に応じて適切なモデルを構築する必要性を世界に先駆けて示した。また、ヒトES細胞から純粋に血管内皮細胞を作製する技術を確立しており（Nakahara et al., Cloning Stem Cells 2009）、初代血管内皮細胞では表出不能であった「血管平滑筋細胞の増殖抑制効果」を世界で初めて表出することに成功した（特願2009-248406）。これらの知見は血管平滑筋細胞の過剰増殖が原因である虚血性疾患の病態を考える上で極めて重要であると考えられる。

糖尿病や生活習慣病の病態の解明には、肝臓と脂肪組織が極めて重要である。これらの組織は、肥満やインスリン抵抗性等における重要な役割を果たすことが知られている。また、脂肪細胞にはエネルギーを蓄えて肥満の元になる白色脂肪細胞の他に、熱を発してエネルギーを消費する褐色脂肪細胞という「善玉」の脂肪細胞があることが知られており、齧歯類などの小動物ではその存在がよく知られている。近年、ヒトにもこの「善玉」脂肪細胞が存在することが報告されて以来、ヒトでの役割やその利用法が注目されている。

我々は既に、ヒトiPS細胞の褐色脂肪細胞分化誘導に取り組み、褐色脂肪細胞のコミットメントに必須な転写因子PRDM16の発現誘導に成功している。この技術を発展させて褐色脂肪細胞の大量生産が可能になると、肥満やインスリン抵抗性の病態を

考える上で重要でありながらヒト検体の採取が不可能であった褐色脂肪細胞の創薬研究が世界で初めて可能となる。

肝臓は、上記のような栄養素の代謝という面のみではなく、解毒作用などの薬物代謝という面でも重要な臓器である。従って、創薬や薬剤の副作用の検定にはヒト肝細胞が必須であるが、現在の供給体制は不十分である。また、肝臓の機能が廃絶する肝硬変、先天性代謝異常などの重篤な肝機能障害における移植材料としての肝細胞も望まれているが、やはり十分な供給とはほど遠い状況である。この点においても、我々はヒト i P S 細胞からの肝細胞の誘導に成功している。

以上、本研究では、我々が独自に開発した細胞培養系を駆使し、生活習慣病（糖尿病・メタボリック症候群・肥満・虚血性疾患・血管障害、など）の新規モデルを構築して創薬研究を展開する。

B. 研究方法

1. 細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞 (murine embryonic fibroblasts, MEF) はマイトマイシン C (MMC) 処理または X 線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。ヒト ES 細胞 (KhES-1, KhES-3) ならびにヒト i P S 細胞 (京都大学由来株 (201B7, 253G1)、成育医療センター由来株 (#25, #40)) 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 Cell, HUVEC)、ヒト微小血管内皮細胞 (Human MicroVascular Endothelial Cells, HMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells, HAEC)、ヒト (腎) 糸球体血管内皮細胞 (Human (Renal) Glomerular Vascular Endothelial Cells, HGVEC) は、大日本住友製薬株式会社もしくはロンザグループ社から購入した。

ヒト初代培養肝細胞、HepG2 細胞、HepaRG 細胞は、それぞれ、DS PHARMA BIOMEDICAL、(財) ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク、BIOPREDIC INTERNATIONAL (仲介業者 (株) ケーエーシー) から購入した。

2. ヒト ES 細胞ならびにヒト i P S 細胞の血管内皮細胞への分化誘導プロトコール

未分化ヒト ES 細胞もしくは未分化ヒト i P S

細胞をコラゲナーゼ・トリプシン含有剥離液処理により回収した後に、CellSeed 社の Hydro cell を用いて 3 日間スフェア (sphere) 形成させた。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。2 週間程度の平面培養で、スフェアが着地した箇所には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。

3. ヒト ES 細胞ならびにヒト i P S 細胞の肝細胞への分化誘導プロトコール

分化誘導に先立って、未分化ヒト ES 細胞もしくは未分化ヒト i P S 細胞をマトリゲル上で 2 継代培養して MEF の影響の排除をはかった。その後は一貫してマトリゲル方で無フィーダー培養した。また、培養過程で牛胎児血清は使用せず無血清培養である。我々の肝細胞への分化誘導法は発生学の治験に基づく 5 段階培養である。第 1 段階では、100 ng/ml Activin A + 25 ng/ml Wnt 3A 存在下で 24 時間培養し、第 2 段階では 100 ng/ml Activin A のみ存在下で更に 24 時間培養した。この最初の 2 段階をあわせて内胚葉分化誘導のための第一相と呼ぶ。次の第 3 段階は 10 ng/ml FGF-2、20 ng/ml BMP-4、200 ng/ml Shh 存在下での 5 日間の分化誘導で、先の第一相 (内胚葉誘導) に続く第 2 相 (肝分化開始) である。次の第 4 段階は、第 3 段階とやや類似の培養条件で 20 ng/ml HGF、10 ng/ml FGF-2、20 ng/ml BMP-4 存在下での肝成熟分化誘導の初期段階で、5 日間の培養ある。最後の第 5 段階は 10 ng/ml OncostatinM、0.1 μ M dexamethasone による肝成熟段階で、5 - 15 日間の培養期間を要する。第 4 段階と第 5 段階をあわせて第 3 相 (肝成熟分化) と呼ぶ。

4. ヒト i P S 細胞の褐色脂肪細胞への分化誘導プロトコール

前半の浮遊培養、後半の接着培養からなる 2 段階培養法であるが、特許申請準備中にて、その内容の詳細は記載しない。

5. 細胞内 reactive oxygen species (ROS) の測定

5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を

Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 6、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 6、ヒト腎微小血管内皮細胞は day 7 で細胞を回収)、細胞内の活性酸素種、ROS は蛍光プローブ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA (Molecular Probes) を用いて FACS Calibur (日本ベクトン・ディッキンソン) により測定した。FACS buffer (5% FBS, 0.05% NaN₃, PBS) に懸濁した細胞 5 x 10⁵ 個に終濃度 200 μM の DCFH-DA を添加、蛍光 FL-1 (励起波長 480 nm / 蛍光波長 530 nm) を測定し、mean の値を算出した。ROS 阻害剤として用いた 5 mM N-acetyl-Cysteine; NAC (Sigma) は DCFH-DA を添加する 30 分および 1 時間前より添加した。

6. ヒト血管内皮細胞によるヒト平滑筋細胞への増殖抑制作用の測定

放射線照射したヒト血管内皮細胞を蛍光色素 CFSE で標識した後に培養皿に播種し、その上に CFSE とは異なる波長の蛍光色素 PKH-26 で標識したヒト大動脈平滑筋細胞を播種した。4 日後に細胞を回収し、FACS Calibur を用いて細胞の蛍光強度を測定して (PKH-26 陽性細胞 (ヒト大動脈平滑筋細胞) を gating して)、PKH-26 の分裂に伴う蛍光強度減少を ModFit™ ソフトウェアで解析し、ヒト大動脈平滑筋細胞の平均分裂回数を算出した。

7. 索状構造形成能のアッセー

5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EBM-2 培地 (10% FBS, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGF, 10 ng/ml VEGF) で培養した内皮細胞を Trypsin/EDTA で剥離し (ヒト臍帯静脈内皮細胞は day 5、ヒト微小血管内皮細胞は day 11、ヒト大動脈内皮細胞は day 7、ヒト腎微小血管内皮細胞は day 7 で細胞を回収)、Cord formation assay を行った。24 穴プレートに 100 μl の Matrigel (BD Biosciences) を 30 分コートし、内皮細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞は 5 x 10⁴ 個、ヒト微小血管内皮細胞は 6 x 10⁴ 個、ヒト大動脈内皮細胞は 2.5 x 10⁴ 個、ヒト腎微小血管内皮細胞は 6 x 10⁴ 個) をまき、5.5 mM あるいは 30 mM のグルコース含有 EGM-2 (Cambrex) 培地 (2% FBS) で培養 24 時間後に倒立顕微鏡 IX-70 (オリンパス) により観察を行った。

8. RT-PCR

肝分化や褐色脂肪細胞分化などの同定のために、それぞれの分化マーカー遺伝子の発現の確認のため

に、既報の手法により RT-PCR を行った。肝分化マーカーとしては、α-フェトプロテイン、アルブミン、AAT (α-1 antitrypsin)、HNF4 α、TAT (tyrosine aminotransferase)、cytochrome P450 (Cyp) 3A4 (Cyp3A4)、TDO2 (tryptophan 2, 3-dioxygenase) 等を用いた。

9. 定量的 RT-PCR

一部の実験においては定量的 RT-PCR も行った。肝分化マーカーとしては、TAT (tyrosine aminotransferase)、cytochrome P450 (Cyp) 3A4 (Cyp3A4)、TDO2 (tryptophan 2, 3-dioxygenase) を用いた。

10. ウェスタンブロッティング

肝分化や褐色脂肪細胞分化などの同定のために、それぞれの分化マーカー蛋白の発現の確認のために、既報の手法によりウェスタンブロッティングを行った。2次抗体と発色は ECL キットを用いた。肝マーカーとしては、α-フェトプロテイン、アルブミン、AAT (α-1 antitrypsin)、cytochrome P450 (Cyp) 3A4 (Cyp3A4) を用いた。

11. グリコーゲン貯留能測定

細胞内グリコーゲンは PAS 染色により同定した。具体的には、1% periodic acid と Schiff reagent ②より染色し、カウンターステインは hematoxylin を用いた。

12. ICG 取込能測定

ICG 取込と放出は、30 分間での取込と 6 時間での放出により既報の方法で検定した。

13. cytochrome P450 (Cyp) 3A4 活性測定

cyp3A4 活性の測定は、p450-Glo™ CYP3A4 Assay kit (プロメガ) を用いて測定した。活性の薬剤誘導は、dexamethasone (50 μM) もしくは rifampicin (100 μM) による 16 時間処理により測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト ES 細胞研究を開始するための生命倫理に対する取り組み

平成 17 年 1 月 9 日に、ヒト ES 細胞の使用計画 (血液細胞と血管内皮細胞の作成計画、使用計画の名称「ヒト ES 細胞の無フィーダー、無血清環境を駆使した新しい未分化維持増殖培養法ならびに血液細胞血管内皮細胞分化制御系の開発」) の文部科学大臣の確認を初めて受けた (1

7 諸文科振第 7 3 4 号)。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 1 月 2 4 日に文部科学大臣の確認を得た(18 諸文科振第 7 4 3 号)。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 1 月 2 1 日に文部科学大臣の確認を受けた(19 国文科振第 2 6 号)。さらにその後、研究者の追加・削除について平成 20 年 3 月 1 1 日、10 月 2 7 日に文部科学省に届け出た。さらにその後、使用の期間の変更、ヒト ES 細胞株の変更について平成 21 年 7 月 1 3 日に文部科学大臣の確認を得た(21 諸文科振第 6 4 9 1 号)。

肝細胞の作成計画(使用計画の名称「ヒト ES 細胞の無フィーダー・無血清条件での新しい肝細胞分化誘導系の開発」)に関しては、平成 22 年 4 月 7 日に文部科学大臣に届け出て研究を開始した。

C. 研究結果

①初代培養ヒト血管内皮細胞を用いた糖尿病合併症モデル系の確立

(糖毒性による *in vitro* 細小血管障害系の開発)とその分子機構解析

糖毒性の検定のために、血管内皮細胞を normal glucose (NG : 5.5 mM) と high glucose (HG : 30 mM) の条件で培養して、細胞内 reactive oxygen species (ROS) を測定した。ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞を用いて測定し、培養期間はそれぞれ 6 日間、11 日間、6 日間、7 日間である。その結果、何れの内皮細胞においても high glucose で高い値を得ることができた。このような高ブドウ糖濃度による細胞内 ROS の増加に関しては、その由来に関してミトコンドリアであるという説と細胞膜の NADPH オキシダーゼであるという 2 種類の学説が存在する。そこで、我々の観察した細胞内 ROS がこれらのいずれであるかを明らかにするために、それぞれの阻害剤での検討を行った。ミトコンドリアの阻害剤 (CCCP、TTFA) ヒト大動脈内皮細胞における ROS 産生を阻害したが、ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞における ROS 産生には作用しなかった。一方、NADPH オキシダーゼ阻害剤 (Apocynin) は、ヒト大動脈内皮細胞における ROS 産生には作用しなかったが、ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト微小

血管内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞における ROS 産生を阻害した。

血管内皮細胞の機能に対する high glucose の影響を明らかにするために、high glucose の索状構造形成能に対する作用を検討した。培養期間はヒト臍帯血静脈内皮細胞は 5 日間、ヒト微小血管内皮細胞は 11 日間、ヒト大動脈内皮細胞は 7 日間、ヒト腎微小血管内皮細胞は 7 日間である。いずれの血管内皮細胞においても high glucose で索状構造の形成が低下しており、糖毒性が血管内皮細胞の重要な機能に影響を与えていることが示された。

以上のようなヒト血管内皮細胞の糖毒性における発現変化遺伝子を同定して合併症発生進行機序を解析して合併症診断マーカーを開発するために、cDNA マイクロアレーを駆使した網羅的発現解析を行った。ヒト臍帯血静脈内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞の各培養期間において high glucose によって共通して発現誘導される遺伝子を検討したところ、Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) やインテグリンファミリーの分子 (ITGb4)、凝固線溶系の分子 (t PA、TFPI2) 等が発現上昇することが明らかとなった。TXNIP の増加は、蛋白レベルでも確認できた

②ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞における高ブドウ糖毒性関連活性酸素産生

次に我々は、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞における高ブドウ糖負荷による活性酸素産生を検討した。培養条件は、初代培養ヒト血管内皮細胞の場合と同様で、normal glucose (NG : 5.5 mM) と high glucose (HG : 30 mM) の条件で培養して、細胞内 reactive oxygen species (ROS) を測定した。

その結果、高ブドウ糖負荷により、ヒト ES 細胞ならびにヒト iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞のいずれにおいても、細胞内 ROS の上昇が認められた。

初代培養ヒト血管内皮細胞の場合と同様に、上昇した細胞内 ROS がミトコンドリア由来か、NADPH オキシダーゼ由来かを検討するために、ミトコンドリア阻害剤 (CCCP、TTFA) と NADPH オキシダーゼ阻害剤 (Apocynin) を用いた実験を行った。その結果、ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞においては、NADPH オキシダーゼの関与が、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞においては、NADPH オキシダーゼとミトコンドリアの両方

の関与が示唆された。

③ヒト血管内皮細胞(ヒトES細胞やヒトiPS細胞から誘導した細胞も含む)によるヒト平滑筋細胞の増殖動態への影響

ヒトES細胞から分化誘導した血管内皮細胞、ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞、初代培養ヒト血管内皮細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞1、HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞、HMVEC、ヒト大動脈内皮細胞、HAEC)、ヒト血管内皮前駆細胞から分化誘導した血管内皮細胞等を用いて、ヒト平滑筋細胞の増殖に対する影響を、接触培養と非接触培養の両方において検討した。

その結果、初代培養ヒト血管内皮細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞1、HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞、HMVEC、ヒト大動脈内皮細胞、HAEC)はいずれも、過去の報告に有るように、ヒト平滑筋細胞に対する増殖促進作用を有し、この作用は接触培養、非接触培養のいずれに系でも確認された。

一方、ヒトES細胞から分化誘導した血管内皮細胞は、非接触培養においては軽度のヒト平滑筋細胞増殖促進作用を示したが、接触培養においては有意な増殖抑制作用を示した。なお、ヒトiPS細胞から分化誘導した血管内皮細胞はいずれも、接触培養、非接触培養を問わず増殖促進作用を示した。

最後に、ヒト血管内皮前駆細胞(ヒト末梢血から分離した物)から分化誘導した血管内皮細胞は、ヒト平滑筋細胞の増殖を非接触培養においては促進したが、接触培養においては抑制した。

以上のような系を用いて、cDNAマイクロアレイを駆使した網羅的発現解析を行った。その結果、接触培養において平滑筋増殖抑制作用を有する血管内皮細胞において発現している2種類の遺伝子が同定され、その因果関係などについて解析を進めている。

④ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの肝細胞の分化誘導系の確立と創薬、毒性試験への展開

発生学の知見に基づく無フィーダー無血清3相5段階培養法を駆使して、創薬、毒性試験に使用できる肝細胞の作成を目指して研究を進めた。

ヒトiPS細胞を分化誘導後1週間以内に α -fetoprotein(α -FT)、albumine(Alb)、 α -1 antitrypsin(AAT)、などの肝細胞マーカーの遺伝子発現がRT-PCRにて検出され、その後、tyrosine aminotransferase(TAT)、cytochrome P450 3A4(Cyp3A4)、tryptophan 2,3-dioxygenase(TDO2)などのマーカーが検出された。tyrosine

aminotransferase(TAT)、cytochrome P450 3A4(Cyp3A4)、tryptophan 2,3-dioxygenase(TDO2)に関しては定量的RT-PCRによって分化誘導開始後2週間ぐらいで顕著に増加することが確認された。その発現レベルは、既存の肝(癌)細胞(株)に比較して十分であり、分化誘導のレベルは高いと考えられた。

蛋白レベルでは、 α -fetoprotein(α -FT)、albumine(Alb)、 α -1 antitrypsin(AAT)、cytochrome P450 3A4(Cyp3A4)が分化誘導後に増加することが確認された。

次に、我々の誘導系においてヒトiPS細胞から誘導された肝細胞様の細胞が、十分な成熟肝細胞機能を保有しているか否かを明らかにするために、ICG取込能、グリコーゲン蓄積、Cyp3A4活性を検討した。その結果、ヒトiPS細胞由来肝細胞は十分なICG取込と6時間後の放出を行うことができた。また、グリコーゲン蓄積能において、80%程度の分化細胞がグリコーゲンを細胞内に保有しており、極めて効率の分化であることが示された。更に、分化細胞は極めて高いCyp3A4活性を有していることも確認された。以上のいずれの機能に関しても、対象として用いられたヒト正常肝細胞や肝がん細胞と比較して、同等かそれ以上の機能であることが確認された。

最後に、ヒトES細胞(KhES-1株)からも我々の無フィーダー無血清培養による肝細胞分化誘導を試みた。その結果、ヒトiPS細胞の場合と同様に、蛋白レベルでは、 α -fetoprotein(α -FT)、albumine(Alb)、 α -1 antitrypsin(AAT)、cytochrome P450 3A4(Cyp3A4)が分化誘導後に増加することが確認された。また機能に関しても、ICG取込能、グリコーゲン蓄積、Cyp3A4活性のいずれにおいても、ヒトiPS細胞由来肝細胞と同等以上の結果を得ることが出来た。

⑤ヒトiPS細胞からの褐色脂肪細胞の分化誘導

ヒトiPS細胞から褐色脂肪細胞分化誘導のための条件検討を行い、分化誘導培地に添加するサイトカインカクテルの最適組成を決定した。本研究で開発された分化誘導技術は、従来のマウスの実験系において報告されたものとは全く異なる新規性の高いものであり、特許出願をすべく準備を進めているため、特許出願後の次年度の報告としたい。

D. 考察

本研究においては、実験動物モデルに頼らず、あくまでヒト細胞の簡便な培養系を駆使して、疾患の病態モデルの確立、治療法の開発や創薬に応

用できる系の展開、高品質の細胞移植材料につながる技術開発、等を目指して研究を進める。

本研究で標的とする疾患はがん以外の最重要疾患、即ち代謝関連の生活習慣病全般である。肥満、糖尿病、動脈硬化、血管障害、代謝関連肝障害、などが含まれる。このような標的疾患の研究のためには、血管内皮細胞、脂肪細胞、肝細胞などが重要であるが、入手の困難さなどから、現状ではその利用極めて制限されている。このような状況を打破して、十分な細胞を駆使して研究を強力に推進するために、さまざまのモデル細胞を系を確立してヒトでの研究を強力に推進できるものと考えられる。

糖尿病の予後を決定するもっとも主要な要素は合併症で、網膜症、腎症、神経症が知られており、いずれも進行すると患者のQOLに深刻な影響を及ぼす。このような合併症をこくふくできれば、糖尿病は恐れるに足る疾患ではなくなる。従って、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、その分子を標的とした特異性の高い「分子標的療法」が開発されれば、糖尿病を発症したとしても、その予後は格段に改善する。また、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーやパラメーターが明らかになれば、診断的ならびに患者状態のモニターという面での利点も大きい。この様に重要な研究課題であるにもかかわらず、合併症の研究は必ずしも進んでいない。近年、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえることができるという考え方が広まっている。すなわち、高血糖による血管内皮細胞などの傷害（「糖毒性」）が中心的な現象であるという可能性も含めた展開である。本研究においてはこのような観点から、ヒトの血管内皮細胞を用いて糖毒性解析のための *in vitro* の解析システムを構築して高血糖による血管内皮細胞傷害の機序を解明して、治療法開発や診断マーカー開発につなげる。

今回用いた4種類のヒト初代培養血管内皮細胞、すなわち、ヒト臍帯静脈内皮細胞、ヒト微小血管内皮細胞、ヒト大動脈内皮細胞、ヒト腎微小血管内皮細胞のすべてにおいて、数日間の高ブドウ糖濃度負荷によって細胞内の活性酸素が上昇することが観察された。この結果は、ウシ大動脈を用いての Brownlee らの報告やヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた他の研究グループからの報告と一致する成果で、高血糖が酸化ストレスに結びつくことが確認できた。このような酸化ストレスは活性酸素

消去剤である NAC で抑制されることも確認されており、実験系の妥当性が示されている。高ブドウ糖濃度によって細胞内の酸化ストレスが増大していることは、細胞内酸化還元状態を制御する重要分子である GSH が、高ブドウ糖濃度において減少していることから支持されており、この減少も検討した4種類のヒト血管内皮細胞すべてにおいて確認された。

高血糖の際の細胞内 ROS がどこから発生するかに関しては、ミトコンドリア由来という学説と細胞膜 NADPH オキシダーゼ由来という学説が混在している。両者の機構は全く異なり、機序の解明と分子標的の探索のためにはどちらであるかを解明することが必須である。我々の解析により、ヒト大動脈内皮細胞においてミトコンドリア由来、その他のヒト内皮細胞では細胞膜 NADPH オキシダーゼ由来で有ることが強く示唆された。したがって、Brownlee らのウシ大動脈内皮細胞を用いての研究からミトコンドリア説が提唱され、その他の多くの研究らがヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて NADPH オキシダーゼを唱えたことは、動物の種差による現象ではなくて内皮細胞の種類による現象と考えられる。なお、今回のヒト ES・iPS 細胞由来血管内皮細胞においては、主に検討では主に NADPH オキシダーゼの関与が示唆されたが、今後の更なる検討が必要と考えられた。

血管は内腔を裏打ちする血管内皮細胞とそれを取りまく血管平滑筋細胞から構成される。様々な臨床的知見等から、血管内皮細胞が血管平滑筋細胞の増殖を抑制しながら血管構造の安定化に寄与していると考えられている。例えば、動脈硬化などの血管狭窄症においては、まず内皮細胞が変性・脱落し、その後に血管平滑筋細胞が過剰増殖することで血管内腔が狭くなると考えられる。このように、生体内では血管内皮細胞が血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果を発揮していることは確実と思われるにも関わらず、これまでのヒト初代培養血管内皮細胞を用いた実験系では血管平滑筋細胞の増殖抑制作用は検出されず、むしろ血管内皮細胞は可溶性因子を介して血管平滑筋細胞の増殖を促進することが示されてきた。一般に「初代培養細胞」においては、生体内での機能がその継代培養過程で喪失される場合があることはよく知られている。即ち、血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果が検出されなかった原因として、実験に用いられたヒト初代培養血管内皮細胞ではすでに

その機能が喪失していたことが想定される。そこで我々は、ヒト初代培養血管内皮細胞の代わりに、霊長類（サル、ヒト）ES細胞から作製された血管内皮細胞、ならびに末梢血単球由来血管内皮前駆細胞から作製された血管内皮細胞を用いて実験を行うことにより本来の増殖抑制作用が検出できたのではないかと考えられる。

本研究においては、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から成熟機能を有するヒト肝細胞を誘導することに成功した。このような肝細胞は、薬剤毒性試験など応用が期待できる他に、糖尿病の重要病態であるインスリン抵抗性の研究に貢献しうるものと考えられる。また、先天性代謝異常症に合併した肝硬変の治療に使用できることが期待されている。さらに、肝炎ウイルス抵抗性等の様々な工夫を凝らせば、将来的には、ウイルス性肝炎患者の肝不全にも使用できる移植材料となりうるものと考えられる。

また、ほとんど解明されていないヒトの褐色脂肪細胞についても、ヒトiPS細胞からの誘導作成が成功しつつあるが、特許出願準備中であるに配慮して次年度に公表して考察を加えたい。

E. 結論

ヒト血管内皮細胞（ヒトES細胞やヒトiPS細胞から誘導した細胞も含む）を用いた糖尿病合併症モデル系の確立（糖毒性によるin vitro細小血管障害系の開発）、ヒト血管内皮細胞（ヒトES細胞やヒトiPS細胞から誘導した細胞も含む）によるヒト平滑筋細胞の増殖動態への影響の解析、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの肝細胞の分化誘導系の確立、ヒトiPS細胞からの褐色脂肪細胞の分化誘導、を推進し、一定の成果を上げることができた。

次年度以降は、以上の独自の系を駆使して分子機構の解明や創薬、毒性試験を推進する計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakahara M, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A, Saeki K: High efficiency production of subculturable vascular endothelial cells from feeder-free human embryonic stem cells without cell-sorting technique. *Cloning Stem Cells* 11:509-522, 2009.
2. Nakahara M, Saeki K, Nakamura N, Matsuyama S, Yogiashi Y, Yasuda K, Kondo Y, Yuo A:

Human embryonic stem cells with maintenance under a feeder-free and recombinant cytokine-free condition. *Cloning Stem Cells* 11:5-18, 2009.

3. Saeki K, Saeki K, Nakahara M, Matsuyama S, Nakamura N, Yogiashi Y, Yoneda A, Koyanagi M, Kondo Y, Yuo A: A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:59-67, 2009.
4. Gokoh M, Nakamura N, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K: Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells. *Cellular Reprogramming* in press, 2011.

2. 学会発表

1. 加納圭子、佐伯久美子、本間綾香、佐藤恵美、高橋枝里、奥村彰規、久保田浩之、湯尾明、鏑木康志：MRM法による糖尿病第3回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会・合同大会、2010年12月、神戸。
2. Nakamura N, Yasuda K, Saeki K, Yuo A: Tissue-specific involvements of mitochondrial electron transport chain in the hyperglycemia-induced superoxide overproduction in human vascular endothelial cells. The 7th Conference of Asia Society for Mitochondrial Research and Medicine, December 2010, Fukuoka, Japan.
3. 中村直子、佐伯久美子、松山さと子、高橋和利、山中伸弥、梅澤明弘、湯尾明：薬物代謝研究に使用可能なヒトESおよびiPS細胞由来肝細胞の作成。第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京。
4. 西尾美和子、中村直子、松山さと子、湯尾明、佐伯久美子：無フィーダー・無血清環境でのヒトES細胞からの赤血球および造血ストロマ細胞の作製。第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞由来高機能肝細胞とその製造方法及び薬剤代謝毒性試験方法
発明者：湯尾明、佐伯久美子、中村直子、松山さと子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護
出願人：独立行政法人国立国際医療研究セン

ター総長、ディナベック株式会社
特願2011-019103
平成23年 1月31日

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

創薬支援のためのヒト肝薬物輸送と代謝を評価する安定かつ再現性に優れた細胞レベルでの試験系の提示と毒性評価への応用研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
研究者 石田 誠一

研究要旨

創薬で希求されるヒト肝臓の薬物の輸送・代謝・毒性を予測できる *in vitro* 実験法の確立を目指し、肝細胞を代替し、いつでも目的に合わせて利用でき、再現性良くデータ取得が可能な細胞系の構築に関する基礎検討を行った。

アデノウイルスによる薬物代謝酵素発現系では、①トランスポーターを含む複数分子種による共発現系の構築、②三次元培養による発現効率の改善、③非実質培養細胞との共培養、④細胞の保存を試み、所期の結果を得た。

トランスポーターに関する研究では、①良好な輸送活性を有するヒト肝細胞を複数ロット確保した。②サンドイッチ培養に関して最適化条件を検討するとともに、胆汁排泄の予測には肝細胞中の基質濃度を基準とした胆汁中排泄固有クリアランスの評価が適切であるとする結果を得た。③HepaRG 細胞において不死化細胞においては極めてまれに見る、OATP1B1, OATP2B1, Ntcp の発現が確認され、基質の取り込みや阻害の活性より、本細胞が、薬物間相互作用の予測に利用でき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 | 小澤 正吾 |
| (3) 積水メディカル株式会社
薬物動態研究所 | 安達 弥永 |
| (4) 田辺三菱製薬株式会社
薬物動態研究所 | 山田 泰弘 |
| (5) 東京大学大学院薬学系研究科
医薬品評価科学講座 | 杉山 雄一 |
| (6) アステラス製薬株式会社
創薬推進研究所 | 神山 佳輝 |
| (7) エーザイ株式会社
筑波薬物動態研究室 | 竹中 理 |
| (8) 武田薬品工業株式会社
探索研究センター | 森脇 俊哉 |
| (9) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
神戸医薬研究所薬物動態・安全性研究部
(11月30日まで) | 五十嵐 隆 |
| (12月1日より) | オラフ・シェーファー |

A. 研究目的

創薬プロセスでは候補化合物の毒性予測の精度が高くない為に開発が中止となる例が未だに報告されている (*Nature Rev. Drug Discov.* 2004)。これは、ヒトと動物では同じ化合物でも細胞への取込みや排泄、代謝反応や反応性が違う種差によるところが大きい。また、創薬プロセスの初期過程ではヒトの *in vivo* のデータを手に入れることはほぼ不可能であることも理由である (*Chem. Res. Toxicol.* 2009)。この為、ヒト試料による *in vitro* 評価系としてヒト肝初代培養細胞による評価が広く行われているが、ドナーの個人差によるばらつきや再現性、供給を海外に依存している為、人種差や供給体制の問題がある。その為、それらに代わる安定供給が可能で高い再現性を持つ試験法の開発が求められている。又、毒性予測では代謝産物が毒性発現に関与している例も多く知られており、代謝活性を内包する毒性評価系の開発が必要である。そこで、本年度は、
○創薬支援の為に安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用：

- ① アデノ CYP 共発現系の展開
- ② アデノ CYP 発現細胞と肝非実質細胞等の共

培養系の開発

- ③ アデノウイルスによる CYP 発現細胞の凍結・融解による保存と輸送の検討

○肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立:

- ① ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み・トランスポーターの寄与率、ヒト in vivo 肝クリアランスの予測能力の検証
- ② サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた胆汁排泄評価の為のデータ取得、ヒト in vivo 肝クリアランスの予測能力の検証
- ③ HepaRG 細胞を用いた胆汁排泄評価のためのデータの取得、ヒト in vivo 肝クリアランス予測能力の検証

に関する検討を実施した。

当該研究により、ヒト肝初代細胞を代替し、いつでも目的に合わせて利用できる特性が確立し再現性の高い薬物の輸送と代謝の評価試験系の提示と毒性評価への応用が期待される。

B. 研究方法

1. ヒト肝臓で薬物代謝に関与している主要 5 CYPs のアデノウイルスによる共発現の検討

HepG2 細胞をプライマリア細胞培養用表面処理 96-well plate に播種した後、3 日間予備培養した。次に、所定の MOI のアデノウイルスを含む培地を 25 μ L ずつ各 well に添加し、1 時間培養することによりウイルスを感染させた。ついで、0.1 mL の培養培地を各 well に添加して 3 日間培養することにより各タンパク質を発現させた。各タンパク質を発現させた後、1/100 容量のカクテル基質溶液を含む反応培地を 0.125 mL ずつ各 well に添加し、37°C で 1 時間反応させた。インキュベーション終了後、各 well から反応液の一部を回収し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、上清中の基質代謝物を定量した。

2. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

HepG2 細胞を通常の 24 ウェルプレート (BD フェルコン) またはマイクロスペースプレート (100 nm \times 100 nm \times 100 nm : W \times D \times H; 以下 100 nm プレート) に播種し、培養 6 日後に、ウェル内の細胞数をカウントして、これを感染させるアデノウイルス量の計算に利用した。感染操作は以下の通り行った。まず、培地を除き、AdCYP3A4 を含む培地またはウ

イルスを含まない培地を 0.2 mL ずつ各ウェルに添加し、20 分毎に攪拌しながら 1 時間反応させた。その後、0.8 mL の培地を追加した。感染後 3 日目に酵素活性を測定した。

3. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の作成

OATP1B1 発現 HepG2 細胞株 (4 クローン、OATP1B1-1, OATP1B1-2, OATP1B1-3 及び OATP1B1-4) 及びコントロール細胞と、各基質を、37°C で 1, 2, 5 及び 10 min インキュベーションした。インキュベーション終了後、細胞表面を洗浄したのち細胞を溶解した。細胞中に取り込まれた化合物量を液体シンチレーションカウンターまたは LC-MS/MS にて測定した。また、細胞溶解液の一部を採取し、蛋白量を測定した。

4. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

HL-60 を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) でマクロファージ系へ、all-trans Retinoic acid (ATRA) で顆粒球へ分化誘導した。分化誘導後の HL-60 細胞を HuH-7 細胞と混合した。細胞増殖があまり起こらない濃度で薬剤に暴露させ HuH-7 細胞と HL-60 細胞を混合して 72 時間培養し、形態を観察した。

ヒト初代肝非実質細胞は SciKon 社より 5 ドナー (胎児 (6 週齢) 男性、17 才 女性、21 才 男性、59 才 女性、63 才 男性)、Celsis 社より 1 ドナー (73 才 女性)、BIOPREDIC 社より 3 ドナー (46 才 女性、61 才 女性、67 才 女性) 入手した。また、非実質細胞培養用の培地として、Non-paranchimal Cell Culture Media (SciKon 社)、InVitro GRO CP Medium (Celsis 社) を用いた。細胞を融解後、1,000 rpm \times 5 min 遠心したのちコラーゲンコートプレート (IWAKI 社) に播種し、細胞の形態を観察した。

5. AdCYP 細胞の凍結・融解による保存の検討

培養 4 日目の HepG2 細胞を細胞凍結液に懸濁し、-80°C にて保存した。細胞凍結液は、バンバンカー (Lymphotec 社)、TC プロテクター (DS ファーマバイオメディカル社)、セルバンカー 1, 2 (十慈フィールド社)、および DMEM + 15% FBS + 10% DMSO を用いた。8 週間保存後、凍結細胞を融解し、トリパンブルーで染色後、生細胞数、死細胞数を計測した。

6. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト in vivoにおけるクリアランスの予測能力の検証

ヒト凍結肝細胞を常法により融解し、薬液と試験管中で一定時間遊離の状態での incubation することにより、単位時間当たりの肝細胞内への薬物の取り込みを観察する。今年度は、今後本研究において利用可能な一定の基準を満たす肝細胞を選定することを主眼に置いたことから、OATP 基質として、 ^3H -estradiol-17 β -glucuronide、NTCP 基質として、 ^3H -taurocholate を選択し、取り込みを観察した。

7. ヒト凍結肝細胞を用いたサンドイッチ培養肝細胞系における胆汁排泄の評価のための基礎データの取得/ヒト in vivoにおけるクリアランス予測能力の検証

ヒト凍結肝細胞を常法により融解、あらかじめコラーゲンコートされた培養皿の上に播種し、1日後、上から Matrigel をオーバーレイすることにより、コラーゲン-Matrigel の中で肝細胞を 3, 4 日間培養し続けることにより、極性誘導を促し、肝細胞間に bile pocket を作らせる。今回は、取り込みトランスポーターの培養時間依存的な輸送を観察することとしたため、一定の培養時間後に、薬物を含む medium と細胞を一定時間 incubation して、薬物の細胞内への取り込みを観察した。

肝細胞を用いた胆汁中排泄は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を含有あるいは含有しない Hank's balanced salt solution による 10 分間の前処理後に、15 分間の化合物輸送を評価した。胆汁中排泄量は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 含有時の細胞内蓄積量から含有しない時の細胞内蓄積量を差し引くことで算出した。

8. HepaRG 細胞を用いた胆汁排泄の評価のための基礎データの取得ならびにヒト in vivoにおけるクリアランス予測能力の検証

HepaRG 細胞において取り込みトランスポーターの発現および機能を定量的に肝細胞との比較で評価することを目的とした。mRNA については、定量的 PCR 法を用い、蛋白量については、Western blot 法により、取り込みトランスポーター OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, NTCP について観察を行った。また、輸送能力については、HepaRG 細胞と薬物を含む buffer を一定時間 incubation したのちの細胞内に残存した薬物量を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施している。

C. 研究結果

I. 創薬支援の為に安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

1. ヒト肝臓で薬物代謝に関与している主要 5 CYPs のアデノウイルスによる共発現の検証

今年度は、ヒトの肝臓での薬物代謝に関与している主要な 5 CYPs の共発現について検討した。

AdCYP2C19, AdCYP2D6 および AdCYP3A4 は、MOI の力価に応じて各 CYP 活性を HepG2 細胞に発現させたが、AdCYP1A2 と AdCYP2C9 は CYP1A2 と CYP2C9 活性を全く発現させなかった。これは AdCYP1A2 と AdCYP2C9 の感染力が失活したためであると思われる。本年度の目的は 5 CYPs 活性を共発現させることであったが、CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 の 3 CYPs 活性のみを共発現させることに変更した。

主要 5 CYPs (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4) タンパク質を共発現した細胞を創薬研究に活用するためには、これらの CYPs 活性がインタクトな凍結ヒト肝細胞でのそれらとほぼ同程度であることが必要である。しかし、インタクトな凍結ヒト肝細胞と同等の CYPs 活性をアデノウイルス発現系で得ることは不可能であった。そこで、インタクトな凍結ヒト肝細胞における CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 の相対活性比とほぼ同等の相対活性比を HepG2 細胞に発現させることにした。まず、50 ドナーをプールした凍結ヒト肝細胞を用いて CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 活性を測定し、CYP3A4 活性を 1.0 とした時の CYP2C19 と CYP2D6 の相対活性を求めると、それぞれ 0.054 および 0.024 であった。この相対活性を発現させるためには、AdCYP2C19 を 1 または 2 MOI で、CYP2D6 を 5 MOI で、CYP3A4 を 30 MOI で、AdCYb5 を 8 MOI で感染させれば良いと計算された。そこで、これらの MOI で HepG2 を感染させたところ、発現した CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 の相対活性は、AdCYP2C19 が 1 MOI の場合はそれぞれ 0.037, 0.013 および 1.0 であり、AdCYP2C19 が 2 MOI の場合はそれぞれ 0.076, 0.014 および 1.0 であり、凍結ヒト肝細胞とほぼ同等の相対活性比を発現させることができた。

2. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

100 nm プレートを用いて、 2.0×10^5 cell/well で細胞を播種した場合、5 日目位から多くのスペースで凝集塊の形成が認められた。また、 5.0×10^5 cell/well の密度でも、多くのスペースで凝集塊の形成が認められた。そこで、次に、100 nm プレートと通常の細胞培養用プレートを用いて HepG2 細胞を前培養し、その後 AdCYP3A4 を感染させて、CYP3A4 酵素活性に対する 3 次元培養の効果を調べた。両プレートの細胞に AdCYP3A4 を 0、3、10 または 20 MOI で感染させ、3 日後に testosterone 6 β 水酸化活性を測定した。その結果、いずれのプレートにおいても、感染量に依存した酵素活性の増加が認められたが、両プレート間で単位タンパク質当りの酵素活性は大きく異なり、100 nm プレートの酵素活性は、通常プレートの酵素活性に比べて、3 MOI では 6 倍、10 MOI では 11 倍、20 MOI では 15 倍高かった。

3. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の作成

OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞を作成し、トランスポーター/薬物代謝酵素の相互作用の評価系の構築した。OATP1B1 発現 HepG2 細胞株 (4 クローン、OATP1B1-1、OATP1B1-2、OATP1B1-3 及び OATP1B1-4) について、OATP1B1 の典型的基質である ³H- estrone sulfate の取り込み量を検討した結果、細胞株 OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 による ³H- estrone sulfate の取り込み量はコントロール細胞による取り込み量よりも高く、細胞株 OATP1B1-3 及び OATP1B1-4 の取り込み量はコントロール細胞の取り込み量と差が認められなかった。OATP1B1/CYP3A4 共発現系の構築に先立ち、両活性を簡便に測定できる蛍光プローブ基質である Luciferin-PPXE 及び Luciferin-BE が細胞株 OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 に取り込まれるか否かについて検討した。その結果、Luciferin-PPXE は OATP1B1-1 および OATP1B1-2 によりコントロール細胞より高く取り込まれ、OATP1B1-1 への Luciferin-PPXE の取り込み量が最も高い値を示した。また、Luciferin-BE はいずれの OATP1B1 発現 HepG2 細胞株においても、コントロール細胞の取り込み量と差がほとんど認められなかった。

OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 の各細胞株が OATP1B1/CYP3A4 共発現系構築に有用なものであるか否かを検討するために、OATP1B1 及び CYP3A4 の基質である Atorvastatin 及び CYP3A4 の基質で

ある Midazolam を用い、その取り込み量について検討を行った。その結果、細胞株 OATP1B1/CYP3A4 両基質である Atorvastatin の OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 による取り込み量はコントロール細胞よりも高かったが、OATP1B1 基質ではない Midazolam は、OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 いずれの細胞への取り込み量もコントロール細胞の取り込み量と差が認められなかった。

4. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

多段階で起こる薬物肝障害のうち、障害肝細胞がマクロファージ系の細胞や単球系細胞との相互作用を通じて肝細胞の障害が亢進する条件の発見を目指し、ヒト肝癌由来細胞と HL-60 細胞およびそのマクロファージ系に分化した細胞、ならびに単球系細胞等を共培養する系の構築を企画した。各細胞単独で、細胞増殖阻害がわずかに起こる濃度を設定し、HL-60 細胞の分化後、両細胞を混合して薬剤存在下で培養した。今回は、共培養依存的に肝細胞に対する薬物の障害性が明確に増強する条件はみつからなかった。

ヒト初代肝非実質細胞に関しては、本年度は、まず現在市販されている複数のヒト初代肝非実質細胞を凍結状態で入手し、培養を試みた。各細胞と Non-paranchimal Cell Culture Media (SciKon)、InVitro GRO CP Medium (Celsis) 2 種の培地を組み合わせて培養を行い、形態を観察した。細胞と培地の組み合わせにより、凍結融解後の細胞生存率や形態は大きく異なっていた。BIOPREDIC 社のヒト肝非実質細胞を InVitro GRO CP Medium で培養した顕微鏡下の観察で複数の細胞種が認められ、生存率も良好であった。

5. AdCYP 細胞の凍結・融解による保存の検討

AdCYP 細胞は HepG2 細胞に CYP 発現アデノウイルスを感染させて作成する。実験に使用する毎にウイルスを感染させる煩雑さを避けるため、AdCYP 細胞を凍結保存する条件の検討を感染宿主となる HepG2 細胞を用いて行った。細胞凍結液により、回収されてきた生細胞数、生存率とも異なっていた。その中では、セルバンカー-1 (十慈フィールド) が生細胞数、生存率とも良好な結果を与えた。

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

6. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト in vivoにおけるクリアランスの予測能力の検証

次年度以降、十分な活性を有するヒト凍結幹細胞を用いた検討を進めていくために、適切なロット探索を実施した。10ロットについて、OATP 基質として、³H-estradiol-17 β -glucuronide、NTCP 基質として、³H-taurocholate を選択し、取り込みを観察し3ロットを選んだ。今回選択した3ロットの凍結ヒト肝細胞ではいずれの化合物の肝細胞への取り込みを確認することができたが、ロット間で取り込みクリアランスに差が認められた。また、2 研究施設（東京大、アステラス製薬）で共通プロトコールおよび凍結ヒト肝細胞ロットを用いて2化合物（estradiol-17 β -glucuronide および taurocholate）について得られた結果を比較した際には取り込みクリアランスの値に大きな差は認められず、ロット間差の傾向も非常に類似した結果であった。

最終的には3ロットについて今後のヒト肝クリアランス予測のための研究に供することとした。

7. ヒト凍結肝細胞を用いたサンドイッチ培養肝細胞系における胆汁排泄の評価のための基礎データの取得/ヒト in vivoにおけるクリアランス予測能力の検証

ヒト肝細胞について、ヒト凍結肝細胞供給元より提供を受けた胆汁排泄活性データをもとに、サンドイッチ培養ヒト肝細胞の培養条件の最適化を試みた。本検討では、taurocholate 及び estradiol-17 β -glucuronide の胆汁排泄機能が Reference に比べ低値を示した。両化合物の細胞内取り込み量は Reference と同等の値を示したが、胆管腔蓄積量は半分以下であった。

培養期間を延長し、評価を Day 7 に実施したところ、両化合物の細胞内取り込み量には影響を与えず、Biliary Excretion Index (BEI) 及び胆汁排泄クリアランスに改善が認められた。

Digoxin に関しては、本検討で調製したサンドイッチ培養ヒト肝細胞は Reference と同等以上の BEI および胆汁排泄クリアランスを示していた。しかしながら Day 7 では、digoxin の BEI 及び胆汁排泄クリアランスはともに Day 5 に比べ顕著に低値を示した。

化合物の消失経路が未変化体の胆汁排泄の場合、サンドイッチ培養した肝細胞間に形成される細胆管中への化合物の排泄が in vivo と関連することから、その予測性が North Carolina 大学をはじめ、

いくつかの研究機関から報告されている。しかし、血漿（メディアム）中濃度を基準とした胆汁排泄クリアランスの再現性および in vitro-in vivo 相関は必ずしも良好ではなく、ラットにおける相関性から予測される社内化合物の in vivo 胆汁中排泄は、4 化合物中 3 化合物で実測値とは乖離しており、予測確度は高くなかった。その原因が各過程に起因すると考え、ラットを用いて肝臓（肝細胞）中濃度基準での胆汁排泄過程のみの in vitro-in vivo の関係を検討した。その結果、相関性の改善は認めなかったものの、クリアランス値の in vitro-in vivo の乖離が小さくなった。ヒト肝細胞の各膜透過素過程の測定から、メディアム中濃度を基準とした見かけの胆汁排泄クリアランスは、細胞内取り込み、メディアム中排出、胆汁排泄、代謝、すべての過程が反映されたものであることがわかった。しかしながら、各素過程から算出した見かけの胆汁排泄クリアランスは必ずしも実測値とは一致しなかった。

サンドイッチ培養期間中における培養時間依存的な取り込みトランスポーターの輸送能力について、検討を行った。まず、ラット肝細胞を用いてサンドイッチ培養を行い、NTCP、OATP 類の典型的な基質薬物である、taurocholate, digoxin, pravastatin, rosuvastatin について、培養後 5 時間、24, 48, 72 時間後の取り込みを検討した。その結果、いずれも培養時間がたつにつれ、細胞内への取り込みは大きく低下することが示された。一方、ヒト凍結幹細胞においては、3 ロット試行したが、うち 2 ロットでは taurocholate, rosuvastatin の取り込みクリアランスの低下はみられず、残り 1 ロットにおいても、クリアランスの低下は半分程度にとどまるという結果を得た。

8. HepaRG 細胞を用いた胆汁排泄の評価のための基礎データの取得ならびにヒト in vivo におけるクリアランス予測能力の検証

HepaRG 細胞を用いて、OATP1B1, OATP1B3, NTCP の基質となる薬物 6 種類の取り込みを観察したところ、OATP1B3 選択的基質である CCK-8 を除き、有意な飽和性のある取り込みが観察された。また、taurocholate については、Na⁺依存的な取り込みが観察されたことから、ヒト肝細胞と同じく、NTCP により主に取り込まれていることが示唆された。さらに、その取り込みの絶対値をヒト肝細胞における取り込みと比較したところ、HepaRG 細胞への取り込みは、OATP 基質については、単位細胞数あたりで、約 1/2~1/5 程度であり、NTCP 基質であ

る taurocholate では、肝細胞とほぼ同等の取り込みが観察された。

次に、OATP トランスポーターの阻害剤について、HepaRG 細胞における評価が可能であるかどうかについて、各種阻害剤による³H-estradiol-17β-glucuronide の取り込み阻害について、阻害定数を求めた。その結果、HepaRG 細胞における阻害定数は、OATP1B1 発現 HEK293 細胞において得られた阻害定数と概ね相関していることが示された。

D. 考察

I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

1. ヒト肝臓で薬物代謝に関与している主要 5 CYPs のアデノウイルスによる共発現の検討

今年度行った AdCYP2C19, AdCYP2D6 および AdCYP3A4 3 種の共発現系の結果より、肝臓での主要 5 CYPs を発現することが可能になれば、この細胞を用いた CYP 阻害スクリーニング評価系への活用や遺伝子多型 (CYP2C9, 2C19, または 2D6 の EM と PM) を模倣した細胞を作成し、創薬でのスクリーニング評価系への活用が期待される。

2. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

アデノウイルス共発現系を容易に活用するために CYP3A4 活性をもう少し高くすることを目的として、アデノウイルスを用いて CYP3A4 を発現させた細胞を 3 次元培養し、酵素活性に対する効果を検討した。その結果、凝集塊を形成させた後に CYP3A4 を発現させた場合には、通常通り平面培養で発現させた場合に比べて、同じ MOI で感染させた場合の酵素活性が 6~15 倍高くなることが明らかになった。この現象を生じた正確な理由は現時点では不明だが、CYP3A4 (または CYP) 依存的、非依存的な理由が考えられる。今後、発現した CYP3A4 アポタンパク質レベルを測定すると共に、他の分子種での効果を確認し、上記の可能性を検証したい。

3. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の作成

ヒト肝細胞と HepG2 細胞ではトランスポーターの発現プロファイルが異なり、このため薬物の細胞内取り込み量も異なる可能性がある。そこでまず OATP1B1 を安定発現する HepG2 細胞株を樹立し、この細胞にアデノウイルスを用いて CYP 分子種を発現させることで、トランスポーターを介した輸

送をふまえた CYP 代謝システムの構築を行なうこととした。本年度の検討結果から、OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 が OATP1B1 を高発現している細胞株であることが示された。また基質を用いた検討から、Luciferin-PPXE は OATP1B1 により取り込まれ、OATP1B1/CYP3A4 共発現系の蛍光プローブ基質として有用であることが示唆された。以上より、OATP1B1-1 及び OATP1B1-2 は OATP1B1/CYP3A4 共発現系の構築するために十分な OATP1B1 発現細胞としての機能を有する細胞株であると考えられる。

4. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

多段階で起こる薬物肝障害のうち、障害肝細胞がマクロファージ系の細胞や単球系細胞との相互作用を通じて肝細胞の障害が亢進する条件の発見を目指し、実験系の構築を試みた。今回の条件では、共培養依存的に肝細胞に対する薬物の障害性が増強する条件は見いだせなかった。来年度引き続き条件を検討するとともに、HuH-7 細胞は肝由来ではあるが、薬物肝障害の初発段階と考えられている代謝活性化能は低いと予想されるので、薬物の代謝活性化に関わる P-450 分子種を強制発現させる、あるいは P-450 分子種の構成的発現、ならびに誘導に関連する核内受容体の強制発現を行う必要があると考えられた。

ヒト初代肝非実質細胞の培養に関しては、実際の培養開始に先立ち文献報告を検討したが、特に参考となる文献は見いだせなかった。

培養に関しては、複数の入手可能な供給元から細胞を受け入れた。供給元毎に 1 ドナー細胞を融解し、2 種の異なる培地で培養維持した。細胞と培地の組み合わせにより、凍結融解後の細胞生存率や形態は大きく異なっていた。その中で、BIOPREDIC 社のヒト肝非実質細胞を InVitro GRO CP Medium で培養した場合において、顕微鏡下の観察では良好な細胞の形態が認められた。本年度はまだ各供給元から得た細胞のうち、1 ドナー分の培養を試みたのみである。来年度以降、今年度得られた知見をもとに、入手済みの異なるドナー由来の細胞の培養を検討する必要がある。

また、非実質細胞のみの至適培養条件を見出したのち、AdCYP 細胞との共培養のために至適な培養条件の確立を行う必要がある。

5. AdCYP 細胞の凍結・融解による保存の検討

細胞の凍結融解による生細胞数、生存率を用いた細胞凍結液により大きく異なっていた。用いた

中では、セルバンカー1が生細胞数、生存率いずれにおいても最も良好な値を示していた。細胞凍結液による値の違いの原因は不明であるが、実用的な観点から判断してセルバンカー1を用い今後予定している AdCYP 細胞の凍結融解の検討を行うのがよいと判断した。

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

6. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト in vivoにおけるクリアランスの予測能力の検証

ヒト肝細胞には、現在においても輸送活性が十分なロットと十分でないロットが市場に存在することから、ヒト肝細胞を用いた輸送実験によるヒト in vivo 肝クリアランスの予測を行うためには、ロットチェックとして、典型的なトランスポーター基質の取り込みを観察する必要があることが示唆された。

7. ヒト凍結肝細胞を用いたサンドイッチ培養肝細胞系における胆汁排泄の評価のための基礎データの取得/ヒト in vivoにおけるクリアランス予測能力の検証

本研究では、高い胆汁排泄機能を保持したサンドイッチ培養ヒト肝細胞系確立に向けて、その最適化条件を検討した。taurocholate 及び estradiol-17 β -glucuronide の胆汁排泄機能が Reference に比べ低値を示した。両化合物の細胞内取り込み量は Reference と同等の値を示したが、胆管腔蓄積量は半分以下であった。この結果は、血管側に局在し taurocholate 及び estradiol-17 β -glucuronide の肝取り込みに関与している NTCP あるいは OATPs は本検討で調製したサンドイッチ培養ヒト肝細胞系において十分機能している一方、胆管側に局在し胆管腔への排泄に関与している BSEP あるいは MRP2 の機能が Reference に比べ低下していたことを示唆するものである。培養期間を延長し、評価を Day 7 に実施したところ、両化合物の細胞内取り込み量には影響を与えず、BEI 及び胆汁排泄クリアランスに改善が認められた。したがって、taurocholate 及び estradiol-17 β -glucuronide については、培養期間を最適化することで、血管側に発現する SLC トランスポーターの機能を維持しつつ、胆管側膜に発現する ABC トランスポーターの機能改善が期待できる。

Digoxin に関しては、本検討で調製したサンドイッチ培養ヒト肝細胞は Reference と同等以上の BEI および胆汁排泄クリアランスを示しており、OATP1B3 及び P-gp の機能が十分保持されていることが確認された。しかしながら Day 7 では、digoxin の BEI 及び胆汁排泄クリアランスはともに Day 5 に比べ顕著に低値を示した。OATP1B3 の機能は維持されているものの、P-gp の輸送活性が低下したものと推測される。

血漿中濃度を基準とした胆汁排泄クリアランスにはその他の過程が関与し、その変動や乖離が影響していることを示唆するものであった。したがって、メディアウム中濃度を基準とした見かけの胆汁排泄クリアランスの in vitro-in vivo 相関による予測性には堅牢性や精度が乏しく、肝臓（肝細胞）中濃度基準とした評価が必要と考えられた。肝臓中濃度基準での胆汁排泄クリアランスにおいても小さいながらも in vitro と in vivo で乖離が認められ、相関性も依然として良好ではなかった一因として、サンドイッチ培養による薬物排出トランスポーターの発現変動が考えられる。代謝酵素も含めた各素過程の変化が、メディアウム中濃度を基準とした見かけの胆汁排泄クリアランスの再現性に影響していると推定される。

サンドイッチ培養肝細胞においては、これまでも、in vivo 胆汁排泄クリアランスの予測が、複数のグループによって行われてきたが、輸送活性の大小関係には一定の相関が認められるものの、その絶対値は、予測値が実測値の約 1/10~1/20 にしかならないことが知られていた。我々は、胆汁排泄クリアランスが、トランスポーター基質については、速度論的に考えて、しばしば取り込み段階が律速段階であることに着目し、取り込みトランスポーターの機能低下が、予測の絶対値の underestimation を引き起こしていると仮説を立てて検証を行った。その結果、ラット肝細胞においては、トランスポーター基質のとり込み能力の低下が認められ、我々の仮説が実証された。

8. HepaRG 細胞を用いた胆汁排泄の評価のための基礎データの取得ならびにヒト in vivoにおけるクリアランス予測能力の検証

肝細胞代替系として、HepaRG 細胞を用いることができるかについて取り込みトランスポーターの輸送能力について検討を行ったところ、OATP, NTCP の各基質薬物の時間依存的かつ飽和性のある取り込みが観察された。過去、複数の不死化細胞において、取り込みトランスポーターの発現、