

異なり、循環血中に入った後も、組織・あるいは臓器への分布や代謝・排泄等の消失がナノサイズのキャリアにより制御されているため、血中濃度の他に、標的組織、その他主要な臓器あるいは組織における有効成分の分布、さらには消失（代謝+排泄）の解析が重要であると考えられる。これらを考慮し文章をまとめることとした。

②毒性試験について：

ICH ガイドライン S4,S6,S9 を参考にすることとした。

有効成分を含まないミセル（有効成分が存在しない場合はミセル状態を呈しないことがあり、その際はばらばらのポリマーで存在）を用いた評価の在り方、新規添加剤とされた場合の評価の在り方、また有効成分が全く新規の場合と既に臨床で使用されている場合の評価の在り方、等の論点から、評価点をまとめることとした。

2-5) First in human 試験について

①非臨床試験に関して

高分子ミセル製剤の特性を考慮し、ヒト初回投与までに行っておくべき非臨床試験として記載することとした。

②臨床試験に関して

推奨されるヒトへの投与量の設定基準の決定にあたっては、ICH-M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に従って、また病態が進行性で致死的な抗悪性腫瘍薬に関しては、ICH-S9に規定される「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」に従い、関連する全ての非臨床試験データを十分配慮すべきであると考えられる。ヒト初回投与試験の安全性については、治験対象医薬品ヒト初回投与試験に関するガイダンス並びにICH-Q1A (R2), Q1B, -S3A, -S3B及びQ6A, Q6Bに従い、事前に集められた科学的知見

に基づき、十分な説明が必要である。これらを考慮し、文書をまとめることとした。

③品質に関して

FIH を開始するまでに試験法をできるだけ確立させておくことが望ましいであろう。また、通常の注射剤と同様に有効成分含量、純度、無菌性の保証など製剤(ミセル)として重要”critical”な物性値は何かを決めておくことが必要であろう。さらに少なくともFIH試験期間中の安定性が保証できる安定性データが必要である。その他、製法変更に関する考慮点等も踏まえて文書をまとめることとした。

2-6) 欧州医薬品庁訪問によるナノ医薬品(ナノメディシン)の評価に関わる情報収集：

平成24年3月15、16日に欧州医薬品庁を訪問し、ナノ医薬品(ナノメディシン)の評価に関して情報交換を行った。

欧州医薬品庁では、医薬品の品質・安全性・有効性の評価において中心的な役割を担っているヒト用医薬品委員会 CHMP (Committee for Human Medicinal Products) において、2006年に Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use (29/06/2006) を発出した。これは、昨今のナノテクノロジーを応用した医薬品の開発状況に対応し、EMA の考えを示したものである。

さらに、2009年には、CHMP はアカデミア及び規制側からなるナノメディシンの専門家会議を立ち上げた。メンバーはナノメディシンがもたらす新たな科学的知識について専門家としての情報を提供し EMA の活動をサポートするとともに、ナノメディシンに関連した国際的な規制当局間の議論についてアドバイスを与える等の役割を担っている。

以上のような体制強化を基盤として、2010年以降 EMA より個別のナノメディシン製品群に関連

した文書が発出されている。MRI 造影剤や鉄欠乏性貧血治療剤として利用されている鉄ナノ粒子製剤の後発品開発における非臨床試験に関するリフレクションペーパー”Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications が 2010 年に発出されている。さらに、2011 年には広く一般のリポソーム製剤をスコープとし、先発医薬品を対照として開発されたリポソーム製剤開発に関するリフレクションペーパー”Reflection paper on data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product”が発出されている。今回の欧州訪問により、昨今欧州より発出されているナノメディシンに関するリフレクションペーパーに関連し、薬物動態学的評価等について議論を行った。

D. 考察

本研究では、細胞、及び細胞内小器官レベルでの動態を共焦点顕微鏡により可視化する手法に着目し、リポソームを蛍光標識しその細胞内動態を追跡する手法を検討した。

共焦点顕微鏡を用いた細胞内動態の解析では、生細胞でリポソーム、あるいはその構成成分の局在を観察することが可能であり、リポソームの取り込み機構についても知見を得ることが可能であった。異なる構成脂質を別々に蛍光標識したリポソームを用いて、それぞれの細胞への取り込み機構や細胞内局在を追跡することで、リポソームがどのような状態で細胞内にとりこまれ、細胞内のどこで崩壊し薬物が放出されるかを考察することが可能となる。送達、標的性を指向した DDS 製剤では、有効成分の放出速度、放出場所を解析することは薬効や安全性への影響を考察する上で重要である。例えば、内包薬物が弱酸性条件下でも比較的安定な薬物であれば、本研究で用いた組成のリポソームのようにライソソーム内で放出されても薬効への影響は比較的少ないと考え

られるが、有効成分が核酸やペプチド、タンパク質のようにライソソーム内で分解されやすい場合は、初期エンドソームでリポソームが崩壊しそこで放出されるようなリポソーム組成の設計を行うことが必要になるであろう。以上のような考察が本評価手法を用いることにより可能となるであろう。

すでに我が国においても、リポソーム製剤、高分子ポリマー結合製剤など、「ナノメディシン」に分類されるようなナノメートルサイズの製剤は承認されている。さらに高分子ミセルなど新規な素材をキャリアとし、抗癌剤、核酸等の標的部位への送達を狙った製剤の研究開発は世界に先駆けて進行中であり、臨床試験中の製剤も複数存在する。これらナノメートルサイズの製剤は、従来の製剤とは体内での挙動や生体との相互作用など様々に異なると考えられ、ナノメディシンの特性に配慮した評価が必要と考えられる。そのため、ナノメディシンの評価基準作成は国際的に重要視されており、我が国においてもナノメディシン開発、承認申請、承認審査において、配慮すべきポイントを明確にし、さらには評価ガイドライン等としてまとめることが危急の課題となっている。今回まとめているブロック共重合体ミセル製剤の開発・評価に関する文書を国際的にも発信させていくことが重要であり、そのためにも国際的な規制当局間の対話を重視していく必要がある。ミセル製剤のような機能性製剤では、物理的・化学的特性や薬物動態学的な評価が、リポソームとも異なる点もあり、測定対象、分析手法に関してさらに議論を深める必要があるであろう。今後さらに精査し全体的な整合性に注意し文書化を目指すとともに、海外より発出されているナノメディシン関連の文書を参考にしつつ国際的な発信も視野に入れたい。

E. 結論

(1) リポソーム及び構成成分の細胞内取り込み、

細胞内移行をマイクロプレートリーダーや共焦点顕微鏡を用いて解析する手法を確立した。本手法は、内包薬物の細胞内放出を制御する製剤の開発、及び薬理作用や安全性に影響を及ぼす品質特性の評価に応用可能であると期待される。

(2) 世界的にみて我が国の開発が先行している高分子ミセル製剤に関して、品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性の評価にあたっての留意点および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって確認しておくべき事項のまとめに着手した。また、欧州医薬品庁を訪問し、ナノメディシンの評価について議論を深めた。

謝辞

厚生労働省及び国立医薬品食品衛生研究所が事務局となり設置された検討会「ナノ医薬品に関する勉強会」において、高分子ミセル製剤評価に関し技術的な御助言を賜りました勉強会委員の先生方に深謝致します。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sakai-Kato K, Nanjo K, Kawanishi T, Okuda H
Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites *Chem Pharm Bull.* **2012**, *60*, 391-396.
- (2) Sakai-Kato K, Ishikura K, Oshima Y, Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A, Yamaguchi T, Nishiyama N, Kataoka K, Kawanishi T, Okuda H
Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers *Int J Pharm.* **2012**, *423*, 401-409.
- (3) 加藤くみ子 “DDS製剤評価の動向と今後の課題” HUMAN SCIENCE 2012 23 (1) 28-31

2. 学会発表・講演

講演

- (1) 加藤くみ子 “ナノ DDS 製剤開発に関する動向と評価手法研究” 日本薬学会第 132 年会 札幌, 2012 年 3 月 29 日

学会発表

- (1) 運敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏 “リポソーム製剤の P-糖タンパク質(P-gp)を介した膜透過特性評価” 日本薬学会第 132 年会 札幌, 2012 年 3 月 31 日

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 本研究で用いたリポソームの組成と粒子径, ゼータ電位

	particle size (nm)	PDI	zeta-potential (mV)
DOPC:chol:NBD-labeled DOPC (45:50:5 at a molar ratio)	110±1.6	0.058±0.014	-0.073±0.20
DOPC:chol:NBD-labeled chol (50:45:5 at a molar ratio)	111±4.8	0.059±0.009	-0.055±0.19
DOPC:NBD-labeled DOPC (95:5 at a molar ratio)	107±2.3	0.068±0.021	-0.066±0.28

Each value represents the mean±S.D. (n=3)

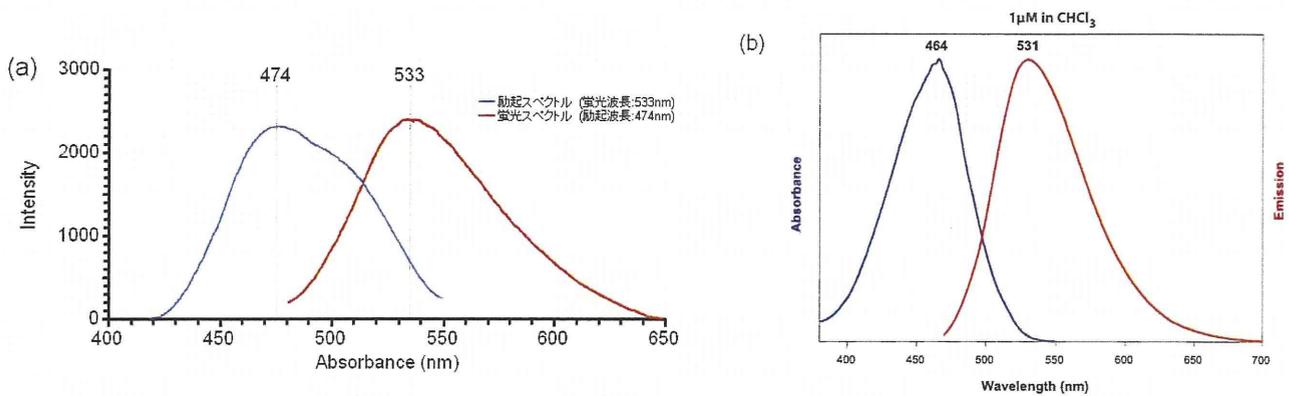


図1 実験に用いた蛍光標識リポソーム(a) 及び蛍光標識脂質 (b) の励起・蛍光スペクトル

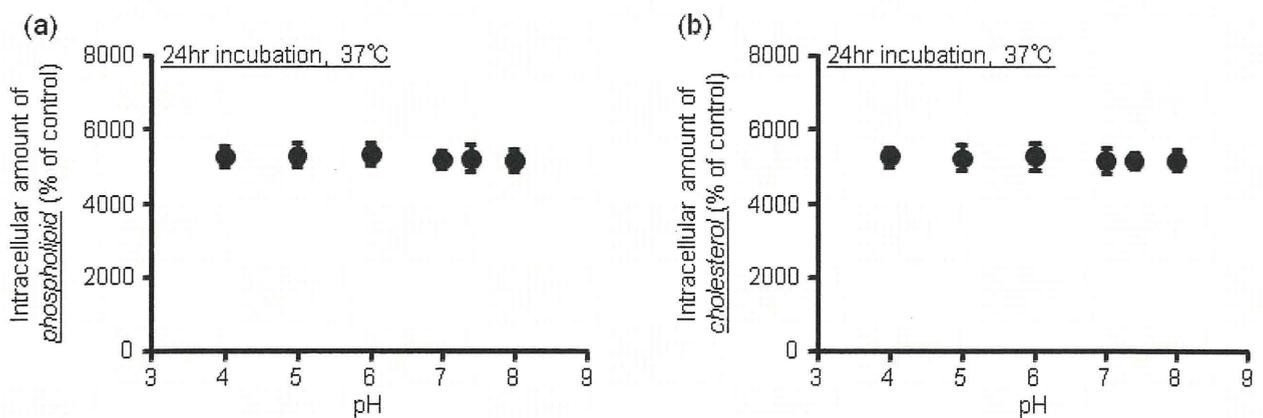


図2 蛍光標識リポソームの蛍光強度の pH 依存性

(a) リポソーム組成 DOPC:NBD-DOPC:Chol=45:5:50(mol)

(b) リポソーム組成 DOPC:Chol:NBD-Chol=50:45:5(mol)

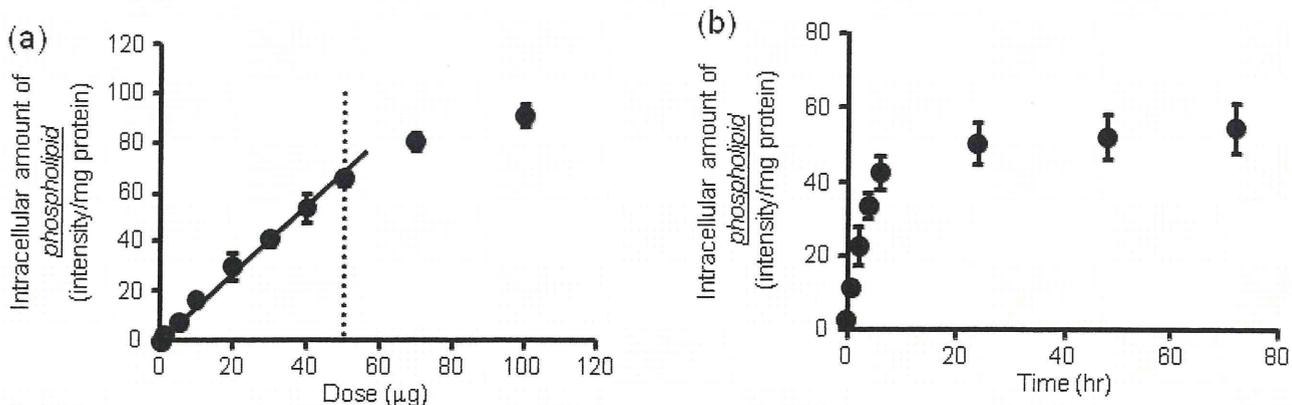


図3 蛍光標識リポソームの細胞取込の用量・時間依存性 (HeLa 細胞)

(a) 用量依存性 (b) 培養時間依存性

リポソーム組成 DOPC:NBD-DOPC:Chol=45:5:50(mol)

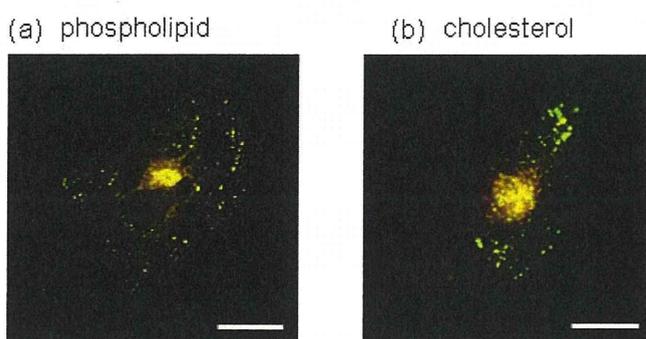
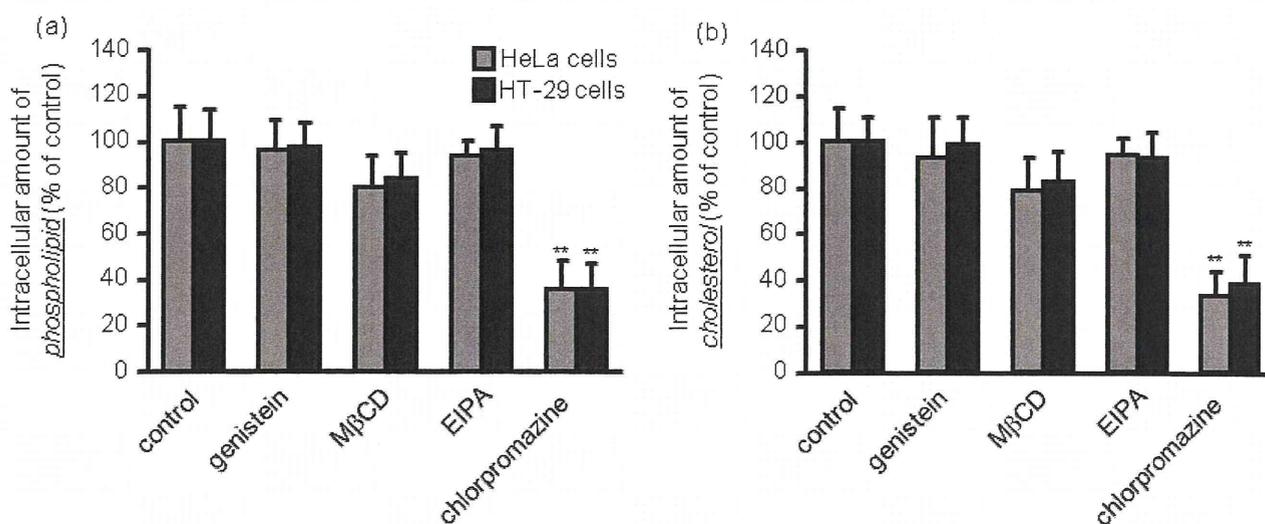


図4 HeLa 細胞への Liposome 添加 2 時間後における Phospholipid, Cholesterol の細胞内局在

(Phospholipid, Cholesterol: 緑, 初期/後期 endosome: 赤, scale bar:



** $P < 0.01$, compared with the corresponding group of control.

図5 HeLa 及び HT-29 細胞内へのリポソーム取込機構の解明

(a) リポソーム組成 DOPC:NBD-DOPC:Chol=45:5:50(mol)

(b) リポソーム組成 DOPC:Chol:NBD-Chol=50:45:5(mol)

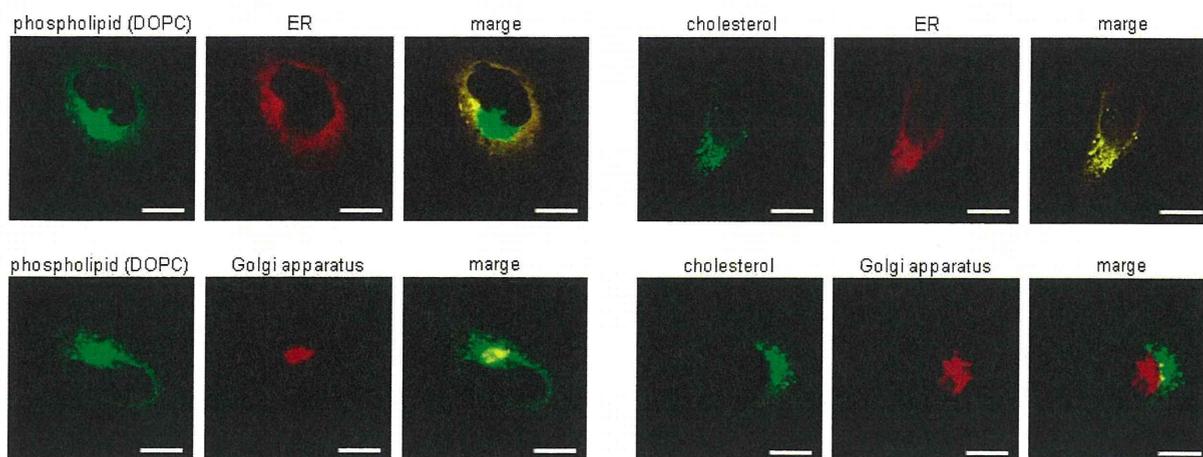


図6 HeLa 細胞へのリポソーム取込一定時間後のリポソーム構成成分の細胞内局在の評価
 Scale bar: 20 μ m ER:小胞体 Golgi apparatus:ゴルジ体

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）
研究分担報告書

有効性・安全性バイオマーカーの確立

研究分担者	齋藤 嘉朗	国立医薬品食品衛生研究所	医薬安全科学部	部長
研究協力者	黒瀬 光一	国立医薬品食品衛生研究所	医薬安全科学部	室長
研究協力者	前川京子	国立医薬品食品衛生研究所	医薬安全科学部	室長

研究要旨：

バイオマーカーの探索・検証に関するガイドライン案等の作成のため、試料要件およびバイオマーカーの選択や外挿のために必要な検討を行った。ゲノム DNA 試料に関しては、種々の方法・条件で調製・保管したゲノム DNA 試料について、高密度 DNA チップを用いて遺伝子多型を測定し、試みた全血での保管条件、ゲノム DNA の調製方法、調製後の保管条件に関し、全て安定に測定が可能であることが明らかとなった。またより高密度な DNA チップを用いて品質要件の妥当性も併せて検証した。血液試料に関しては、確立済みのメタボローム解析系（生体内内在性代謝物の網羅的解析）を用いて、ラットおよびヒト試料を対象に、血漿と血清間、男女間、およびヒトとラット間で内在性脂質代謝物レベルを比較した。概して比較 2 群間で同様のレベルを示す代謝物が多かったものの、一部にレベルが大きく異なる分子も認められた。探索したバイオマーカーが、これらに該当する場合には、試料選択や外挿において注意を要することが示唆された。

A. 研究目的：

医薬品産業は知識集約型産業であるため、資源の少ない我が国では高齢化社会の到来と相まって、特に成長が見込める業種である。一方で、近年、医薬品のシーズ発見から販売承認に至る成功率の低下が指摘されている。医薬品開発の効率化は、医薬品産業の活性化につながる重要な課題である。医薬品の規制環境の整備は、その土台を供すものであり、そのための「医薬品・医療機器の評価に関わるレギュラトリーサイエンス研究」は、規制整備の科学的基盤を与えるものである。

バイオマーカーは、臨床的な最終評価指標（エンドポイント）を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。医薬品の有効性および安全性の指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数はこの 10 年間で約 30 倍に増加している。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、適格性の指針に関しては、行政的にも米国における組織学的知見を陽性対照とした概要的ガイダンス案しかなく、実データを反映した明確な上記項目に関する評価要件がないため、その探索・検証・利用は個別に模索している状態である。

本研究は、本邦におけるバイオマーカーの適格性に関する評価ガイドライン案作成の一環

として、特にバイオマーカー探索・検証のための試料要件を確立するため、最初の検討として、1) ゲノム DNA に関する採取や保管要件の検討、2) 血液に関する試料選択やヒトとラット間の外挿性に関する検討、を行った。

B. 研究方法：

(1) ゲノム DNA に関する検討

(1-1) 全血保存条件

DNA 抽出のための全血は、採血後 2 時間以内に凍結され、 -80°C にて保存した 5 人の健常人末梢血（ProMedDx より購入）を用いた。全血は凍結状態で納入後、直ちに、 -80°C に保管した。全血保存状態の影響を検討するため、融解した後、次の 6 条件で全血を保管した。1) 0 時間、2) 4°C ・4 時間、3) 4°C ・24 時間、4) 25°C ・4 時間、5) 25°C ・24 時間、6) 凍結融解の 5 回繰り返し（ -80°C にて 10 分凍結後、 25°C 水浴中で融解）。全血は 6 条件の実施後、直ちに下記に示す (A) あるいは (B) 法により DNA 抽出作業を開始した。

(1-2) ゲノム DNA の抽出方法

(A) 液層分離法、あるいは、(B) シリカ膜スピнкаラム法、にてゲノム DNA の抽出を行った。

(A) 液層分離法には Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いた。添付のプロトコールに従ったが、概略は以下のとおりである。まず、全血に細胞溶解液を加え、遠心操作により核のみを沈殿・分離した。核溶解液を加え、

核を完全に溶解させた後、蛋白沈殿溶液を加え、遠心操作により蛋白質を沈殿させ、上清の DNA 溶液にイソプロパノールを加え、DNA を沈殿させた。70%エタノールで DNA を洗浄後、DNA 用バッファー (Tris-EDTA, pH 7.5) に溶解した。

(B) シリカ膜スピンカラム法には NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) を用いた。添付のプロトコールに従ったが、概略は以下のとおりである。全血をプロテアーゼ K にて処理し、シリカ膜スピンカラムに添加後、遠心操作によりシリカ膜に DNA を吸着させ、2 回の洗浄・遠心操作後、DNA 溶出バッファー (Tris-HCl, pH 8.5) にて溶出した。

(1-3) ゲノム DNA の保存条件

ゲノム DNA の保存条件を検討するため、(A) 法で抽出した DNA に対して、0 回、10 回、20 回の凍結融解を (-80°C にて 10 分凍結後、25°C 水浴中で融解) 行った。

(1-4) 品質評価

上記条件にて調製したゲノム DNA に対して Affymetrix 社の DNA マイクロアレイである GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array (25 万種の遺伝子多型 (SNPs) を測定) を用いてタイピングを実施し、アレイ当たりの (サンプル毎の) コールレート (タイピング成功率) を指標としてバイオマーカー探索用試料としての品質評価を行った。SNP タイピングは各ゲノム DNA 250 ng を用いて、Affymetrix 社の推奨マニュアルに従い、実施した。コーリングアルゴリズムとしては、まず、Dynamic Model (DM) アルゴリズムを用いて 93% 以上のコールレートが得られることを確認した後、Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier (BRLMM) アルゴリズムを用いて genotyping コーリングを行った。95% 以上のコールレートが得られた場合、品質基準を満たすものとした。また、BRLMM を用いて算出したコールレートに対する各条件群 (n=5) 間の平均値の差の有無は paired two tailed t-test により検定した。検定の多重性補正は、Bonferroni 法により行った。

(2) 血液中の内源性代謝物に関する検討

(2-1) 血液の採取と血漿・血清の調製

Sprague-Dawley 系雄性ラット 10 週齢 (計 5 匹) の血漿及び血清は、コージンバイオ (株) より購入した。ラットは同社にて普通食 (オリエンタル酵母 EF) により 7 日間の馴化期間を経て、16 時間の絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、前腸間膜動脈より無菌採血した。同一個体より EDTA-2Na を抗凝固剤として用いる条件及び、凝

固剤を用いない条件の 2 通りで採血を行い、それぞれ血漿及び血清を常法に従い分取した。血漿・血清ともに採血後 2 時間以内に分取し、直ちに -80°C に保存した。

ヒトの血漿及び血清は東京未来スタイル (株) を介して ProMedDx 社より購入した。食事制限を行っていない白人の健常ボランティア男性 5 名 (年齢 27-33 歳、中央値 30 歳)、女性 5 名 (年齢 26-33 歳、中央値 32 歳) より、EDTA-2K 採血及び凝固剤を用いない条件下で上腕部の静脈より採血を行い、常法に従い、同一個人より血漿・血清を採血した。血漿・血清ともに採血後 2 時間以内に分取し、直ちに -80°C に保存した。

(2-2) メタボローム測定

ラット及びヒト血清・血漿から、内部標準物質 (IS) 存在下、中性条件での Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出し、下層 (有機層) 及び上層 (水層) を分取した。リン脂質・トリアシルグリセロール等の脂溶性の高い代謝物を含む下層は、超高性能液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOFMS、超高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、飛行時間型質量分析計は waters 社 LCT Premier XE) を用いて、脂質代謝物 (リン脂質、リゾリン脂質、スフィンゴミエリン、セラミド、ジアシルグリセロール、トリアシルグリセロール) を網羅的に相対定量した。酸化脂肪酸 (oxFA) を含む上層は、さらに Oasis HLB Vac RC cartridge (Waters 社) を用いて固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、サンプルとした。超高速液体クロマトグラフ-三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計 (UPLC-MS/MS、高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計は AB SCIEX 社 QTRAP5500) を用いたネガティブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定した。

(2-3) データ解析

UPLC-TOFMS により得られたデータは、2DICAL (三井情報株式会社) を用いてピークを抽出し、内部標準物質 (IS) により補正を行った全ピークの height 値を用いて主成分分析 (PCA) を行い、群内サンプルばらつき、及び群間の類縁性の評価を行った。また、2 群間の直交 PCA 判別分析 (OPLS-DA) により、種々の条件下で変化が認められるピークにつき、代謝物の同定を行った後、対応のある Student's t-test (血漿と血清間

の比較) または、Mann-Whitney U-test (男女または種間の比較) 等による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定した。

UPLC-MS/MS より得られたデータは、MultiQuant ソフトウェア (AB SCIEX 社) を用いて各代謝物ピークの面積値を求めた後、IS により抽出操作の補正を行い、補正後の全ピークにつき、その面積値を用いて PCA 解析を行った。さらに、各ピークにつき、対応のある Student's t-test (血漿と血清間の比較) または、Mann-Whitney U-test (男女または種間の比較) 等による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定した。

(倫理面での配慮)

本研究は市販のヒト試料 (血液、血漿、血清及び血液より抽出したゲノム DNA) を使用する研究であるため、機関研究倫理審査委員会に申請し、承認を得た上で研究を遂行した (受付番号 215、課題名: バイオマーカー測定用試料における品質評価基準に関する研究)。

C. 研究結果:

(1) ゲノム DNA に関する検討

本研究において検討した全血保存条件、DNA 抽出法、DNA 保存条件について表 1 にまとめた。BRLMM を用いて算出したコールレートは全ての検体・条件で 95% 以上 (範囲は 98.77~99.78%) を示し、品質基準を達成した。

(1-1) DNA 抽出方法が及ぼす影響

全血融解後、直ちに液層分離法とシリカ膜スピンカラム法により抽出した DNA を用いて genotyping を行った。両抽出方法に対するコールレートの平均値は共に 99% を超えており、また、有意差は見られなかった (図 1 の (1) と (8))。

(1-2) 血液の保存状態が及ぼす影響

全血融解後、4°C 或いは 25°C で最長 24 時間まで保存し、抽出した場合でもコールレートの平均値はいずれも 99% を超えた。平均値の差を、全血融解直後に DNA 抽出を行った場合と比較すると、4°C・4 時間保存の群との間で有意差が見られた (図 1 の (1) と (4)) が、多重性の補正後は有意でなくなった ($p = 0.0525$)。また、全血状態で凍結融解を 5 回繰り返した場合でも、コールレートの平均値は 99% を超えており、全血融解直後に DNA 抽出を行った場合と比較しても有意差は見られなかった (図 1 の (8) と (9))。

(1-3) ゲノム DNA の凍結融解が及ぼす影響

抽出後の DNA に対して最大 20 回の凍結融解を

行ったが、凍結融解を行わなかった群と比べて、コールレートに有意差は見られなかった (図 1 の (1) と (3))。

また、実際の重篤副作用患者由来の血液 128 例より、(6) と同様の方法で調製したゲノム DNA を用いて、Illumina 社の HumanOmni2.5-8 BeadChip (250 万種の SNPs を測定) を用いてタイピングしたところ、コールレートは全て 99% 以上であった。

(2) 血液中の内在性代謝物に関する検討

(2-1) メタボロームデータの変量解析

UPLC-TOFMS により測定した脂質代謝物 (リン脂質、リゾリン脂質、スフィンゴミエリン、セラミド) を対象とした PCA スコアプロットを図 2 に示す。スコアプロットの第一主成分 (X 軸) により、ラットとヒトの試料が判別されたことから、種差により、これらピークのレベルが大きく変動していることが示唆された。一方、同一種内の血漿と血清のサンプルは、比較的近い位置にプロットされており、各ピークのレベル変化が少なく、ほぼ類似していると考えられた。また、同一群内サンプルの個体間差は、血漿・血清いずれの場合においてもラットと比較してヒトが大きいことが示された。

一方、UPLC-MS/MS により測定した脂肪酸代謝物 (高度不飽和脂肪酸、エイコサノイド等) を対象とした PCA スコアプロットでは、ラットの血漿と血清が、第一主成分により判別されており、両群間には、レベルの異なる脂肪酸代謝物が多く含まれることが示唆された (data not shown)。また、ラットの血漿・血清のサンプルは、スコアプロット上に点在しており、脂肪酸代謝物レベルの個体間差が大きいことが示唆された。一方、ヒトの血漿・血清のサンプルは、スコアプロット上で集積しており、ラットと比較して脂肪酸代謝物の変動が相対的に少ないことが示された (data not shown)。

(2-2) 血漿と血清間の脂質代謝物レベルの比較

ラットの血漿・血清間の比較において、顕著なレベル変化 ($p < 0.01$) を示したリン脂質代謝物として、36:5ePE (もしくは 36:4pPE、グリセロール骨格の 1 位の結合が e はエーテル型、p はプラズマローゲン型で、両者は精密質量が等しく、区別できない) が同定され、血漿と比較して血清で 2.1 倍の増加を認めた (図 3)。その他、ラットにおいて血漿より血清中のレベルが高い代謝物として、32:0PC (1.9 倍)、18:0LPC (1.3 倍)、38:5ePE (もしくは 38:4pPE、1.8 倍)、38:6ePE (もしくは 38:5pPE、1.8 倍) が同定された (data not shown)。一方、血清と比較して血漿中で有意に

レベルが高い脂質代謝物は見出せなかった。脂肪酸代謝物に関しては、22種の代謝物レベルが、血漿と比較して血清中で有意 ($p < 0.01$) に増加した。顕著な増加が認められた代謝物として、Thromboxane B2 (TXB2, 1,297倍)、12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE, 1,138倍)、12-hydroxyheptatrienoic acid (12-HHT, 1,102倍)、Prostaglandin D2 (PGD2, 113倍、図3)、Arachidonic acid (AA, 3.7倍)等のエイコサノイドが認められた。

一方、ヒトの血漿・血清間の比較においても、上記の5種の脂肪酸代謝物はラットと同様、血漿と比較して血清中に増加傾向にあったが、レベルの個体差が大きく、有意差 ($p < 0.01$) は認められなかった。すなわち、ヒト血漿に対する血清中の各代謝物の変化率の平均は、TXB2は男性24倍、女性45倍、12-HHTは男性36倍、女性55倍、12-HETEは男性59倍、女性63倍、PGD2は1.7倍、女性3.0倍、AAは男性1.6倍、女性1.9倍であった (data not shown)。

(2-3) 血漿・血清中脂質代謝物レベルの男女差

ヒト血漿もしくは血清の男女間の比較において、男性と比較して女性で有意 ($p < 0.01$) にレベルが低い代謝物として 11,12-dihydroxy-eicosatrienoic acid (11,12-DiHETrE, 0.57倍、女性/男性、図2) 及び 14,15-dihydroxy-eicosatrienoic acid (14,15-DiHETrE, 0.57倍)が見出された。血清の男女間の比較においても同様の変化が認められ、11,12-DiHETrE (0.51倍、 $p = 0.009$) 及び 14,15-DiHETrE (0.56倍、 $p = 0.02$) は女性のレベルが男性よりも低いことが示された。

(2-4) 血漿中脂質代謝物レベルの種差

ヒトとラットの血漿の比較において、顕著に変動 ($p < 0.01$) したリン脂質代謝物の一例として、20:4 Lysophosphatidylcholine (20:4LPC) を図2に示す。その他、34:1 Phosphatidylcholine (34:1PC)、34:1 Sphingomyelin (34:1SM) のレベルは、雄性ラットと比較してヒト男性で有意に高く、逆に、40:6 PC、20:4 LysoPC (図2) のレベルはラットの方がヒトと比較して有意に高かった。一方、血漿中の脂肪酸代謝物に関して、ラットと比較してヒト男性で有意にレベルが高いものは見いだせなかった。逆に、ヒト男性で有意にレベルが低い脂肪酸代謝物として、19種が同定された。顕著にレベルが異なるものとして、AA (0.21倍、ヒト男性血漿/ラット血漿)、Eicosapentaenoic acid (EPA, 0.22倍)、Docosahexaenoic acid (DHA, 0.13倍)、5-Hydroxy-eicosapentaenoic acid (5-HEPE, 0.08倍)、8-HEPE (0.17倍)、

5,6-Epoxy-eicosatrienoic acid (5,6-EET, 0.18倍)等が挙げられた ($p < 0.01$, data not shown)。

D. 考察

(1) ゲノム DNA に関する検討

(1-1) DNA 抽出方法に関して

液層分離法は、操作は煩雑 (所要時間は最短で2.5時間) であるが、長鎖 DNA の抽出が可能である。一方、シリカ膜カラム法は、操作が簡便である (所用時間は最短で30分) が、若干の断片化が認められた (data not shown)。しかしながら、コールレートの平均値は共に99%を超えており、十分に品質基準を満たした。また、両群間で有意差も認められなかったことから、DNA マイクロアレイ法によるゲノムバイオマーカーの探索に供する DNA 抽出法としては、簡便なシリカ膜カラム法で十分であると考えられる。

(1-2) 血液の保存状態に関して

全血融解後、25°Cで最長24時間までの保存を行っても、あるいは、全血融解後、凍結融解を5回繰り返しても、コールレートの平均値は99%を超えており、十分に品質基準を満たした。血液検体収集作業では、採血後24時間検体を室温で放置するケースはまれであると考えられるので、通常の作業工程 (採血後、冷蔵或いは凍結) において、停電等の突発的な事象が発生した場合でも、24時間程度であれば品質に問題が生じないと考えられる。また、全血融解直後に DNA 抽出を行った群と4°C・4時間保存の群との間で平均値に有意差が見られたが、多重性の補正後は有意でなくなった。またコールレートは99%を超えており、より高負荷の条件である4°C、24時間あるいは25°C・24時間保存の群との間では有意差が見られていないことから、品質としては問題がないと考えられた。

(1-3) ゲノム DNA の凍結融解が及ぼす影響

抽出後のDNAに対して少なくとも20回の凍結融解を行っても、コールレートはほとんど低下せず (有意差無し) 品質基準を十分に満たしていることが明らかになった。一般に、DNA の凍結融解を繰り返すことは、断片化を加速させ、品質低下を招くと言われており、断片化を防ぐために凍結に比べると条件の悪い4°Cでの保存を推奨するケースもある。しかし、DNA マイクロアレイ法によるゲノムバイオマーカーの探索に供するDNAの保存方法としては、working sampleであっても凍結保存の方が適していると考えられた。

(1-4) 今後の検討課題

本研究では、全血からのゲノムDNAの調製を想定して種々の検討を行ったが、品質要件のガイ

ドライン化を考える場合、この他、想定される試料として、パラフィン臨床検体（パラフィンブロック）が対象となる場合が考えられる。臨床では病理学試料としてパラフィンブロックの作製・保管が行われているが、パラフィンブロックの場合、作製方法が施設によって異なる場合が多く、また、全血からの調製に比べて、長鎖の DNA を得られにくい傾向にある。今後、バイオマーカーの探索に、パラフィンブロック検体を活用するケースが増えると考えられるため、本試料についても検討が必要と考えられる。また、現在のところ、網羅的な手法によるゲノムバイオマーカーの探索法としては高密度 DNA マイクロアレイを用いたゲノムワイド関連解析が主流であるが、近年、次世代シーケンサー（NGS）を用いたバイオマーカーの探索・同定の報告もなされるようになってきた。NGS は高密度 DNA マイクロアレイとは原理的に全く異なる手法であり、品質要件も異なる（より厳しくなる）ことが予想される。近年のゲノム解析技術の進歩は目覚ましく、今後 NGS の活用の増加が見込まれることから、NGS における管理要件の検討も必要であると考えられる。

（2）血液中の内在性代謝物に関する検討

（2-1）血漿と血清間の比較

ラットの血漿と血清間の比較において、血清中の AA およびその代謝物（12-HETE, TXB₂, 12-HHT, PGD₂ 等）のレベルが、血漿と比較して顕著に高いことが示された。これは、血液凝固の際に血小板が活性化し、アラキドン酸カスケードが進行したためと考えられる。一方、抗凝固剤として EDTA を用いた場合、血液凝固反応が阻害され、血小板からのエイコサノイドの放出が抑制されたと考えられる。ヒトにおいてもラットと同様に、これらの代謝物レベルは血清中で増加傾向を示したが、ラットほど顕著な上昇は認められなかった。この理由として、純粋な種差の他、採血条件の違い（通常非臨床試験および臨床現場の状況を反映させるため、今回、ラットの採血はエーテル麻酔下での開腹後、前腸管膜動脈からの採血であり、開腹から採血まで5分程度の時間を要していたのに対し、ヒトは上腕肘静脈からの一般的な採血であった点）が可能性として考えられた。この点は今後の検討課題である。また、血漿・血清間のリン脂質の変動として、36:5ePE もしくは 36:4pPE 等のアルキル型もしくはアルケニル型レベルの相違がラットで認められた。これらのリン脂質は、血小板活性化因子の合成中間代謝物であることから、血清収集の際の凝固反応における血小板の活性化が反映されていると考えている。

（2-2）男女間の比較

一方、ヒト血漿または血清において男女で有意にレベルが異なる代謝物としては、2 種のアラキドン酸の P450 代謝物（11,12-DiHETrE 及び 14,15-DiHETrE）レベルが、女性で男性より低いことが示された。基質となるアラキドン酸には有意な男女差が認められなかったことから、合成酵素（CYP2Cs 及び CYP2J、Epoxide hydrase 等）活性の種差が示唆された。

（2-3）ヒトとラット間の比較

ヒトとラット間の種差に関しては、血漿・血清中の数種のリン脂質レベルに顕著な違いが認められた。血漿・血清中の脂質代謝物の種類及びそのレベルは、食事の影響を大きく受けることが知られている。ラットとヒトでは、摂取する餌（食事）に含まれる脂肪酸の種類が異なることが予想され、これがリポタンパクのリン脂質の脂肪酸組成に影響を与えた可能性が示唆された。また、ヒトの食事はラットと比較して多様であり、大きな個体差の原因と考えられた。血漿中のエイコサノイドに関しては、いくつかの代謝物において、ラットと比較してヒトの血漿中レベルが有意に低く、基質となる AA、EPA、DHA レベルの違い及び合成酵素の活性の種差に起因していると考えられた。

（2-4）今後の検討課題

今後は、さらに代謝物範囲をアミノ酸や糖などの親水性代謝物まで広げると共に、ウサギ等の非臨床試験で用いられる他の動物種を対象とすること、また凍結融解回数や温度等の保管条件による安定性の違い等に関する詳細な検討を行うことが必要と考えられる。また食事の影響についても検討する必要がある。

E. 結論

（1）ゲノム DNA に関する検討

DNA マイクロアレイ法によるゲノムバイオマーカーの探索に供する全血の保管条件、DNA の抽出・保管条件の検討を行った。全血の保管に関しては 25°C・24 時間の保管、また全血凍結融解 5 回を行っても品質に悪影響は生じなかった。DNA の抽出方法に関しては、液層分離法、シリカ膜カラム法いずれでも同程度の高品質 DNA を抽出することが可能であった。DNA の凍結融解は少なくとも 20 回まで品質に影響を及ぼさないことが判明した。このことから、抽出法に関しては、より簡便なシリカ膜カラム法で十分であり、保管要件に関しては、通常の作業工程に則っていれば、高密度 DNA マイクロアレイを用いたゲノムバイオマーカー探索・検証のための DNA の品質は十分に確保されることが考えられる。

(2) 血液中の内在性代謝物に関する検討

メタボローム用試料（血液）に関し、ラットおよびヒト試料を対象にメタボローム解析を行い、ラットでは血漿と血清間で、ヒトでは男女間で、異なるレベルを示す内在性代謝物を明らかにした。血清は、血液凝固に伴うアラキドンカスケードの進行により、数種のエイコサノイドの濃度が血漿中とは異なると考えられた。さらに、ヒトとラット間で、数種のリン脂質・脂肪酸代謝物レベルに相違が認められることを明らかにした。これらの結果は、概して血漿と血清間、男女間、種間で、脂質代謝物に関しては同様のレベルであるものの、一部にはレベルが大きく異なる分子もあることを示したものである。探索したバイオマーカーが、これらの分子に該当する場合には、試料選択や外挿において注意を要することが示唆された。

E. 健康危険情報：

該当無し

G. 研究発表：

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

該当無し

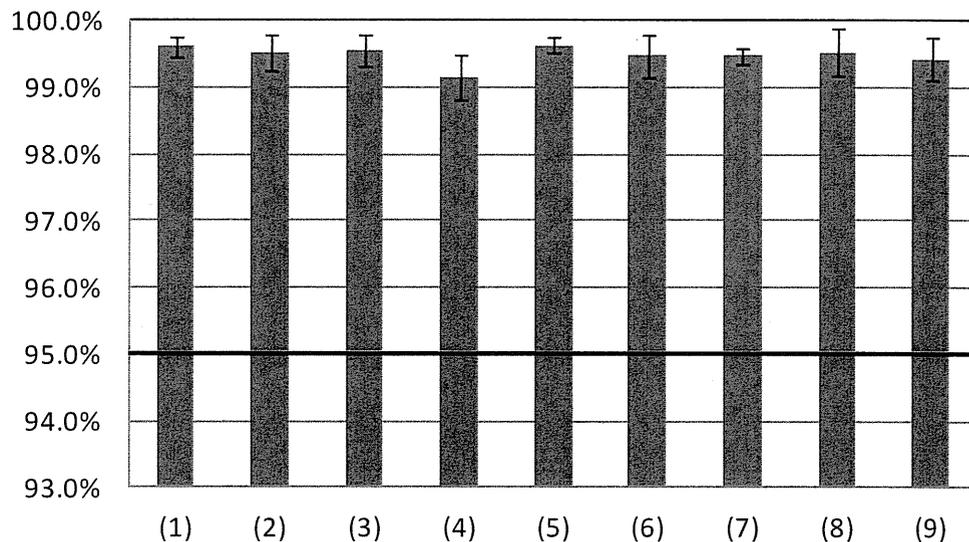
H. 知的財産権の出願・登録状況：

該当無し

表 1 全血保存条件、DNA 抽出法、DNA 保存条件

	全血試料	全血保存条件	DNA 抽出方法	DNA 凍結融解
(1)	A, B, C, D, E	0 h	液層分離	0 回
(2)	A, B, C, D, E	0 h	液層分離	10 回
(3)	A, B, C, D, E	0 h	液層分離	20 回
(4)	A, B, C, D, E	4 h・4°C	液層分離	-
(5)	A, B, C, D, E	4 h・25°C	液層分離	-
(6)	A, B, C, D, E	24 h・4°C	液層分離	-
(7)	A, B, C, D, E	24 h・25°C	液層分離	-
(8)	A, B, C, D, E	0 h	シリカ膜カラム	-
(9)	A, B, C, D, E	凍結融解 5 回	シリカ膜カラム	-

Call Rate (BRLMM)



全血保存条件	0 h	0 h	0 h	4 h 4°C	4 h 25°C	24 h 4°C	24 h 25°C	0 h	0 h 凍結融解x5
DNA凍結融解	-	x10	x20	-	-	-	-	-	-
抽出方法	液層分離							シリカ膜	

図1 グラフ下部に表示した各条件のゲノム DNA に対して GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array を用いて SNP タイピングを実施し、BRLMM アルゴリズムを用いて genotyping コーリングを行い、コールレートの平均値±SD (n=5) を算出した。品質基準ライン (95%) を赤線で示した。

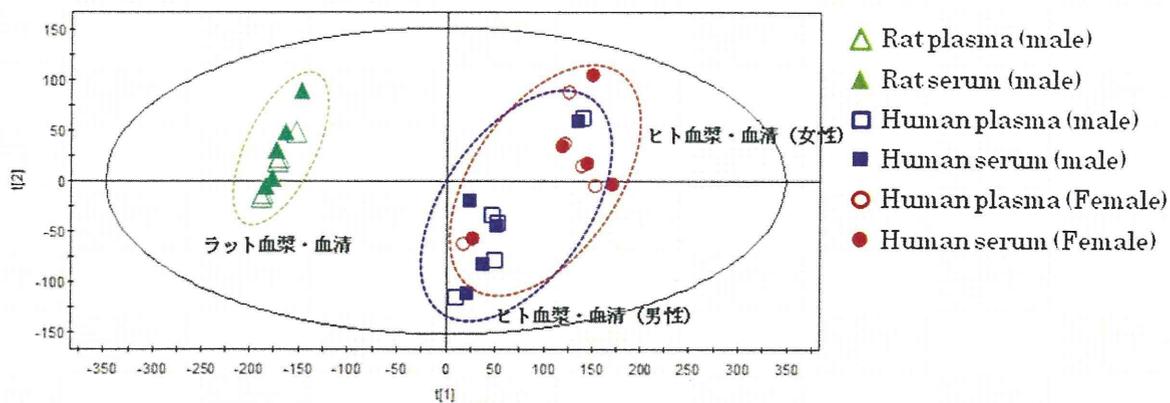


図2 UPLC - TOFMS によるメタボロームデータの多変量解析



図3 種々の条件下でレベル変動を示した脂質代謝物
平均±SEM (N=5)、human M (ヒト男性) human F (ヒト女性)、

厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）
「革新的医薬品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究」
平成 23 年度分担研究報告

－ヒト特異的有害反応の評価系構築に向けた研究－

研究分担者：関野 祐子（国立医薬品食品衛生研究所薬理部 部長）
研究協力者：佐藤 薫（国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第一室長）
諫田 泰成（国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第二室長）

研究要旨：

バイオテクノロジー応用医薬品など、従来の動物法での安全性評価の限界が懸念される医薬品が登場してきた。特にヒト細胞特異的タンパク質を標的とする医薬品については、標的タンパク質や標的臓器以外への影響などはヒト特異的であると考えられ、ヒトでの有害反応が動物試験では予想できない。そこで、ヒト iPS 技術を応用した薬理試験法の開発が期待される。

本研究事業では、ヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞と神経細胞を用いた新たな試験法開発のため、標本として用いる分化細胞の評価と標準化に関する研究を行った。試験法の開発のためには、実験方法を統一して複数の化合物に対する反応性を多施設で比較検討する必要がある。そのためには、品質のそろった実験材料の供給が必須である。どのような条件が実験材料の特質を左右するのか、また、どのような指標で実験材料を標準化すればいいのかなどの情報を提供する。

入手したヒト iPS 細胞株を比較したところ、初期化状態に差はなかったが心筋細胞への分化能は大きく違うことが判明した。ヒト iPS 細胞株 201B7 から作成した胚様体 (EB) を 3 週間浮遊培養すると、約 10% の EB が拍動した。拍動 EB から拍動細胞を単離し、心筋特異的 α アクチニンやトロポニンの発現を免疫組織染色にて確認した。ヒト iPS 細胞株 201B7 由来の拍動する胚様体 (EB) の細胞外電位を記録したところ、心電図 QT 間隔に対応する波形の標準化が困難であった。また、単離した細胞では、活動電位の波形が少なくとも 3 種類あることがわかった。そこで、シート状に培養して評価する方法を今後検討する。ヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞に関しては、201B7 と 253G1 由来の神経幹細胞株を入手し、神経細胞への分化過程を、細胞内カルシウムシグナル測定法と神経機能タンパク質発現の指標で解析した。iPS 株の違いにより分化成熟度に違いがあった。さらに、薬物応答性が分化誘導後の日数に依存することがわかった。

今後、分化心筋細胞については、陽性対照、陰性対照の複数化合物に対する応答を比較してヒト抗不整脈作用の予測試験の標準化を行い、分化神経細胞については、ATP 刺激、グルタミン酸刺激に対する細胞内カルシウム測定と免疫組織化学染色により、シナプス形成過程を評価する実験系を確立し、ヒト特異的有害反応評価系としての有用性を検証する。

キーワード:ヒト iPS 細胞、201B7、QT 延長、不整脈、神経幹細胞、神経分化、シナプス

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞と神経細胞を用いた新たな試験法開発のため、標本として用いる分化細胞の評価と標準化に関する研究をおこなった。

我が国は医薬品・医療機器シーズが数多く発見されているにもかかわらず、医療への実用化が欧米に比べると遅いことが問題となっている。この問題を解決するためには、先端医薬品・医療機器承認申請において考慮すべき要件の明確化、及び、基準作成を行う必要がある。その一助となるのがヒト特異的有害反応を早期に見いだすことであり、ヒト特異的有害反応の評価系確立が待たれている。2007 年に山中らが樹立を報告して以来 (Cell 131(5) 861-872, 2007)、ヒト iPS 細胞は倫理的問題を解決したヒト幹細胞として、ヒト特異的有害反応の予測、創薬の高速化・高効率化への応用が期待されている。

心筋細胞

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いて薬理試験が可能なのか明らかにするために、心筋細胞への分化誘導法の最適化および品質の評価を行った。ヒト iPS 細胞から胚様体 (EB) の作製を行い、拍動する EB から心筋細胞を単離し、マーカー分子の発現および活動電位について検討した。

神経細胞

中枢神経医薬に着目し、ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本を用いたヒト特異的有害反応の評価系構築をめざす。このようなヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の創薬応用研究はまだ端緒を開いたばかりであり、ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の評価試験系としての安定性、再現性についての情報も不十分である。そこで我々は複数研究機関

にヒト iPS 細胞由来神経幹細胞塊 (neurosphere) の供与を依頼し、neurosphere から同一のプロトコールで分化誘導をかけた神経細胞標本の神経特性解析を行い、生体内の神経機能をどこまで獲得するか、実験系の安定性、再現性について検討した。

B. 研究方法

心筋細胞

(1) ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 (京都大学で山中 4 因子のレトロウイルスを用いて樹立) は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した (#HPS0063)。未分化 iPS 細胞は、マイトマイシン C 処理済の SNL76/7 細胞 (European Collection of Cell Cultures) をフィーダー細胞として用いて、増殖培地 (bFGF を添加した霊長類 ES 細胞用培地 (リプロセル, #RCHEMD001)) で培養した。

(2) ヒト iPS 細胞の未分化マーカーの発現

ヒト iPS 細胞の未分化状態は、細胞を 4%PFA で固定後、未分化マーカー Nanog および Oct3/4 に対する抗体で免疫蛍光染色により解析した。

(3) ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導

ヒト iPS 細胞のコロニーを CTK 溶液 (0.1mg/ml collagenase IV, 0.25 % trypsin, 0.1 mM CaCl₂, 20 % Knockout Serum Replacement) で 5 分間処理後、スクレーパー (イワキ) で物理的にはがし、小さな塊を作成した。小さな塊を超低接着ディッシュ (コーニング) に移して増殖培地を用いて 4 日間培養し、EB を形成させた。さらに 3 週

間、分化培地 (20%FBS を含む α MEM) で浮遊培養を行い、拍動 EB を得た。

(4) 活動電位の測定

拍動 EB をトリプシン処理して個々の細胞を単離した後、マトリゲルでコートしたディッシュで培養した。再び拍動を開始した細胞を用いて、活動電位を測定した。

神経細胞

実験には京大が樹立したヒト iPS 細胞株 201B7 を用いた。慶應大学より、201B7 由来 neurosphere の供与をうけ、実験に使用した。basic fibroblast growth factor (bFGF) (peprotech), epidermal growth factor (EGF) (peprotech), human leukemia inhibitory factor (LIF) (millipore) を添加した neurosphere 培地を用いて 12 日間浮遊培養後、TripLE Select (invitrogen) により single cell にした後、100000 cells / 500 μ l / well の割合でポリオルニチン/フィブロネクチンコートした 8 well スライドチャンバー (nunc) に播種し、B27 supplement (gibco) を含む分化誘導培地に切り替えた。

(1) ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本のカルシウムイメージング

上記分化誘導条件で 30, 40 日間培養後、picrotoxin (50 μ M, 2min)、N-methyl-D-aspartate (NMDA) (50 μ M, 2 min)、L-glutamate (L-Glu) (100 μ M, 2 min)、adenosine-triphosphate (ATP) (100 μ M, 2 min)、High K⁺ (80 mM, 2 min)、Ionomycin (5 μ M, 1 min) に対するカルシウム応答を fura2-AM カルシウムイメージング法を用いて AQUACOSMOS / RATIO システムで測定した。

(2) ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の免疫組織化学的検討

上記分化誘導条件で 40 日間培養後、Tuj1, glial fibrillary acidic protein (GFAP), Nestin, MAP2, PSD95, synapsin1 の発現を免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。慶應大学よりヒト iPS 細胞由来 neurosphere 等を受け入れるため、慶應大学と MTA を取り交わした。Neurosphere に関しては、分化済み細胞塊であるため、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会より平成 23 年 1 月 31 日に倫理審査非該当と判定された。ストックバイアルは施錠可能な国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室にて有人監視のもと液体窒素中保管している。実験に使用した細胞は実験終了後全てオートクレーブし廃棄した。

C. 研究結果

心筋細胞

我々はヒト iPS 細胞株 201B7 を用いて、まず未分化状態を確認した。未分化状態に関しては、幹細胞マーカーの発現を免疫染色およびフローサイトメーターによって検討した。その結果、図 1A に示すように、Nanog および Oct3/4 が発現していることを確認した。さらに、細胞膜マーカーである Tra-1 についても発現を確認した (図 1B)。

次に、EB 形成による分化誘導法により心筋への分化誘導を行った。その結果、3 週間の浮遊培養により拍動 EB が得られ (図 2A)、その割合は約 10%であった。さ

らに、得られた拍動 EB から拍動する細胞を単離・培養し(図 2B)、心筋マーカー分子の発現を検討した。その結果、図 3 に示すように、 α アクチニンやトロポニンが陽性であった。従って、拍動能とともに心筋マーカー分子の発現から、得られた分化細胞が心筋であることが示唆された。

拍動 EB から単離した心筋細胞を用いて、活動電位の測定を行った。その結果、様々な活動電位のパターンが得られた。以下にその一例を示す。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の静止膜電位は全般的に浅い傾向にあることが明らかになった。(図 4)。拍動しない細胞に心筋が含まれる可能性があるのか明らかにするために、電気刺激を行って活動電位の測定を行った。その結果、非拍動細胞にもペーシングで活動電位の発生が認められた(図 5)。さらに Ba を用いた IK1 チャネルの抑制により活動電位時間の延長が認められたことから、IK1 チャネルが機能的であり心筋であることが裏付けられた。従って非拍動細胞にも心筋細胞が含まれることが示唆された。

神経細胞

(1)ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本のカルシウムイメージング

201B7 由来神経細胞標本の分化誘導 28 日目における位相差顕微鏡像では細胞体から長い突起を二本のばした bipolar type の神経細胞様細胞が多数見受けられた(図 6)。カルシウムイメージングでは、同じ dish 内でも well ごとのばらつきが大きいことが判明した。分化誘導 30 日目に適用したりガンドの内、ATP に対してのみ顕著な細胞内カルシウム濃度上昇を呈した細胞が観察された(35/53)(図 7)。また、highK⁺ 刺激に対しても反応を示した(5/53)。分化誘導 40

日目においては、ATP に加えて、L-Glu に対して反応を示した(24/34)(図 8)。標本は分化誘導 50 日目において dish 底面より剥離し、実験継続が困難となった。全ての実験セッションの最後に、Ionomycin によるカルシウム濃度上昇を観察したことから、本実験システムおよび細胞が正常に機能していたことが確認された。

(2)ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の免疫組織化学的検討

201B7 由来神経細胞標本がシナプス形成に至っているのかどうか検討するため、分化誘導 40 日目に免疫組織化学的検討を行った。前シナプス部位マーカーとして神経伝達物質の放出に関わる SNARE タンパク質の一つ、synapsin1、後シナプス部位マーカーとして NMDA 受容体の裏打ちタンパク質の一つ、PSD95 を選択した。また、樹状突起を可視化するため、樹状突起マーカーである MAP2 についても染色した(図 9)。PSD95 の発現は非常に低く、ごく稀にドットが検出された。一方、synapsin1 は極小のドット状の分布を示したが、PSD95 との共局在は観察されなかった。

D. 考察

心筋細胞

本研究において、我々はヒト iPS 細胞株 201B7 から拍動 EB 形成による分化誘導プロトコールの最適化を行った。また、心筋細胞の機能を活動電位記録により評価した。非拍動細胞にも電気刺激で活動電位が認められることから、拍動能だけでは評価法として不十分であることが示唆された。

分化誘導法は EB 形成法と EB を介さ

ない単層分化誘導法の 2 通りが報告されている(Burridge et al. Cell Stem Cell. 10:16-28 (2012))。今回は特別な試薬を必要とせず誰にでも追試可能なプロトコルを検証したところ、拍動する EB が得られた。しかしながら、この方法で作製した心筋細胞の静止膜電位が浅く成熟が不十分な可能性があることから、分化誘導法の改良を行う必要がある。また、第 2 回安全性薬理学会において、EB による心筋分化誘導では薬剤性 QT 延長に寄与する K チャネル (IKr) の機能が弱いことが報告されており、このことは薬剤による QT 延長の検出系としての今後の課題である。

現在、多形性心室性頻拍である torsades de pointes の予測として、hERG チャネルを強制発現させたヒト胎児腎由来 HEK293 細胞を用いた QT 延長の評価 (hERG 試験) が行われている。活動電位持続時間が遅延する心室筋細胞を用いることにより、QT 延長の予測性が向上すると考えられる。従って、心室筋細胞の割合やイオンチャネルなどの指標に分化細胞の標準化をすすめる必要がある。

薬剤の応答性に関しては、パッチクランプ法で個々の心筋細胞の活動電位を解析すれば、波形により心室筋細胞を選択して QT 延長の評価が可能となる。スループット性がないため、非臨床試験における早期スクリーニングには不向きであるが、非臨床試験の後期段階では特定の医薬品候補化合物を評価できる可能性がある。

以上述べてきたように、ヒト iPS 由来心筋細胞を用いて QT 延長を評価系するためには、均一で成熟した心筋細胞の作成技術の進展が必要不可欠である。そのような心筋細胞を用いることにより、薬剤性 QT

延長の評価に応用できる可能性がある。現在、S7B ガイドラインで用いられる hERG 試験は疑陽性が多いのが問題であり、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞でその課題を克服し S7B を補完するようなガイドラインに発展することが期待される。

神経細胞

fura2-AM カルシウムイメージング法を用いて各種リガンドへのカルシウム応答性の検出を行った。201B7 由来神経細胞標本においては、分化誘導 30 日目に ATP 反応性の細胞が現れ、分化誘導 40 日目に、L-Glu 反応性の細胞が現れることが明らかとなった。これは P2 受容体→L-Glu 受容体の順に神経細胞標本が受容体を発現していることを示している。それぞれの観察時点における P2 受容体および L-Glu 受容体のサブタイプについては、現在、mRNA レベル、タンパク質レベルでの網羅的解析を行っているところである。preliminary な実験としてマウス ES 細胞からの神経細胞分化誘導についてもカルシウムイメージング法を用いて検討している。マウス ES 細胞において、ATP, L-Glu の順序で反応性を獲得することを確認している(データ示さず)。従って、今回検討に用いた 201B7 由来神経細胞標本は正常な分化誘導過程をたどっている可能性が高い。しかし、免疫組織化学的検討により、前シナプス部位マーカーである synapsin1 のドット状の発現は確認できたものの、後シナプス部位マーカーである PSD95 の発現が非常に低いことが明らかとなった。機能的なシナプスが成熟している場合は synapsin1 と PSD95 の共局在が観察されるはずであり、すなわち、201B7 由来神経細胞標本は機能的シナプス成熟

には至っていないことが推察される。以上のように、各種リガンドに対するカルシウム応答性の fura-2 カルシウムイメージング法による解析と免疫組織化学的手法を用いた神経機能タンパク質の発現解析とを組み合わせることにより、ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の分化誘導能、神経細胞機能の獲得について詳細に検討可能であることが示された。一連の実験の簡便さもふまえ、このプロトコールがヒト iPS 細胞由来神経細胞標本機能解析プロトコールとして有力であることが示された。

201B7 由来神経細胞標本は、培養系の安定性が不十分であること、培養が安定した場合でも、P2 受容体および L-Glu 受容体の発現には至るが、シナプス成熟には至らないことが示された。今後、その他のヒト iPS 細胞株由来の神経細胞標本を用いて株間比較を行い、より生体内神経細胞機能を忠実に再現する標本の探索、さらに、神経細胞標本を用いたヒト特異的有害反応評価系の構築を行う予定である。

E. 結論

本研究において、ヒト iPS 細胞から心筋細胞を作製し、活動電位による品質評価を行った。今後、ヒト iPS 細胞から均一で安定な心筋細胞を作製し、薬剤応答に再現性が得られるような系を構築する必要がある。将来的には、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を利用した薬理試験法としてガイドラインに応用できることが期待される。

各種リガンドに対するカルシウム応答性の fura-2 カルシウムイメージング法による解析と免疫組織化学的手法を用いた神経機能タンパク質発現解析との組み合わせが、ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本

機能解析プロトコールとして有効であることが示された。本プロトコールでは、国内で汎用されているヒト iPS 細胞株 201B7 由来 neurosphere から分化誘導した神経細胞標本は、培養系の安定性が不十分であること、現在の培養可能日数ではシナプス成熟には至らないことが明らかとなった。

F. 研究発表

論文発表

1. Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa, K., Sekino, Y., Ohwada, T., Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without Interaction with estrogen receptors. *ACS Chem Neurosci* 3, 105-113 (C.A.), 2012
2. Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S., Koizumi, S., Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* (in press)
3. Takata, F., Dohgu, S., Yamauchi, A., Matsumoto, J., Machida, T., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Sato, K., Kataoka, Y., Koizumi, S., In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. *Plos ONE* (in press)