

合わせとして維持されたものを使用した。Gst1/ml マウスとそれに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、尿中あるいは胆汁中グルタチオン抱合体を測定し、排泄量を比較した。トログリタゾン、カルバマゼピンを肝ミクロソーム、NADPH、還元型 GSH と同時に incubation するとともに、大腸菌に発現させた各ヒト GST 分子種の精製酵素を添加し、一定時間後、incubation 液中の反応性代謝物のグルタチオン抱合体を LC-MS/MS (HPLC UFLC-XR, MS/MS QTRAP5500) により測定した。リコンビナント GST タンパクに比例して増加するグルタチオン抱合体を、GST 分子種により生成するグルタチオン抱合体とした。ヒト肝臓中発現している A1, A2, P1, M1, T1 による代謝活性を比較し、M1, T1 選択的に生成する代謝物を検索した。メタボローム解析用胆汁は、15 週齢の野生型 (C57BL/6J, 日本チャールス・リバー社より購入)、或いは、それぞれのノックアウトマウスから、16 時間絶食後、チオペンタール麻酔下で胆嚢カニキュレーションを行って採取した。測定および解析は、UPLC(Waters Corp.) / LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) にて ESI-positive モードで測定した LC/MS データを SIEVE (Thermo Fisher Scientific) でアライメント実施後、Simca-P (Umetrics) を用いて多変量解析を行い、野生型群に対するノックアウト群での変動因子を抽出した。

(3) iPS細胞による安全性評価系開発に向けてのiPS細胞特性解析、肝細胞への効率的分化法の開発等

ヒト iPS 細胞を当研究班で独自に樹立 (名市大) すると共に、京都大学、国立成育医療研究センターにて樹立された株も使用した。iPS 細胞の薬物動態関連遺伝子変異は、Affymetrix 社のマイクロアレイ DMET Plus を用いて確認した。肝細胞への分化に関しては、アクチビン A 及び DMSO により肝前駆細胞に誘導し、次に、オンコスタチン M 及びデキサメタゾンを処置して肝細胞の成熟を行った。薬物による代謝酵素誘導特性や分化誘導肝細胞の遺伝子発現特性を (リアルタイム) RT-PCR 法で解析した。また、未分化 iPS 細胞及び肝細胞への分化過程の経時的な遺伝子発現特性は、Agilent 社の HumanG2(8X44K) を用いて網羅的に解析した。肝特異的薬物代謝酵素活性は、プローブ基質の代謝物を UPLC/MS/MS 法にて測定することにより行った。また、ヒト iPS 細胞を用いた催奇形性予測試験を視野に、iPS 細胞対して催奇形性陽性薬剤及び陰性薬剤を用いて細胞毒性試験を実施した。

(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測法

国内の各施設からの、薬物性肝障害の症例集積を行った。症例は ALT \geq 150 and/or ALP \geq 2x 基準上限の症例に限定した。また、4-Phenylbutyrate (4PB) が、LPS 投与により低下したタウロコール酸 (TC) の胆汁中排泄におよぼす影響をラットで検討した。横紋筋融解に至らない筋障害症例の集積体制の構築を行った。筋障害発症が知られているスタチン系薬物の動態に係わる代表的高頻度遺伝子多型について検出系の開発を行った。第二相酵素、グルタチオン S-トランスフェラーゼ GSTA1 及び GSTA2 につき、ハプロタイプタグ多型の迅速タイピング系を一塩基プライマー伸長法により構築した。薬物相互作用に対する CYP3A4 多型の影響を検討するため、CYP3A4 野生型、CYP3A4.16 (T185S) および CYP3A4.18 (L293P) 酵素を用い、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インビトロで解析した。国衛研で見出した日本人重症薬疹発症に関連する遺伝子多型を、ビーズアレイを用いた独自の手法及び PCR-RFLP 法により検出する系の構築を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料を用いる場合は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、書面によりインフォームドコンセントを取得し、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。筋障害および薬物性肝障害の症例集積と分析に関する研究では研究実施機関において倫理審査の承認を得ており、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「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、本研究は「ヒト iPS 細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針」等の倫理的な指針には抵触しない。

C. 研究結果および考察

(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

アレルギー性副作用報告のある 18 医薬品に対して h-CLAT を試みた。18 物質のうち h-CLAT のアッセイ要件を満たしたものは 11 物質であり、これらはいずれも陽性判定となった。他の 6 物質 (いずれも脂溶性物質) については、h-CLAT アッセイ要件を満たさなかったが、界面活性剤を添加する改良法と暴露条件の最適化により、全身投与用医薬品に対するアレルゲン性予測へ適用可能なことが示唆された。一方、代謝活性化法の導入に関しては、肝 S9 自体に陽性応答することが判明し、医薬品の代謝を考慮する場合、別途工

夫が必要であると考えられた。その一つとして、代謝酵素安定発現細胞の構築があげられるが、本研究で試みた、MPO 安定発現細胞に関しては、MPO 発現量および MPO 代謝物の生成が検出されたものの十分ではなく、試験系として確立するためにはさらに検討が必要であると考えられた。

(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

今回、トログリタゾンの quinone 体、カルバマゼピンの 2,3-arene epoxide 体のグルタチオン抱合体 2 種類について、GSTM1 が主に関与していることが示唆された。このことは、過去 GSTM1 の遺伝子欠損患者において、トログリタゾン、カルバマゼピンにより誘起される肝障害リスクが上昇するとする過去の報告とも矛盾しない。前述の反応性代謝物が、肝障害の原因であるかについては、更なる検討が必要である。GSTM1 によって影響される反応性代謝物が特定のものに限られることは、肝障害を引き起こす反応性代謝物は、全体の中の一部であり、*in vitro* で、タンパク質への covalent binding のみを mass でみるだけでは不十分であることを示唆しており、今後、特定の活性代謝物の量と、肝障害誘起との関連を探る必要があると考えている。また、メタボローム解析により、Gstt1、ml、t1/ml で変動する胆汁成分を検出した。共通して減少する成分のほか、Gstt1 と t1/ml で共通して減少、Gstm1 と t1/ml で共通して減少が認められた。両 Gst 分子種が反応に関わるもの、それぞれの Gst 分子種が反応に関与するものと考えられる。構造推定のためには、さらに解析を継続する必要がある。また、バッククロス後の個体を用いた解析では、初回の解析を再現することができなかった。背景因子の違いのほか、飼育環境・食餌の影響等が考えられる。初回の解析で、胆汁排泄の低下が認められた個体はわずかであったのに対して、バッククロス後では複数のピークで胆汁成分の減少が認められたことから、Gstt1、ml が、内因正あるいは食品成分由来の活性代謝物を解毒する役割を担っていることが考えられる。ピーク強度が増加するものもみられ、adaptive regulation 等による、反応の促進に由来すると考えられる。

(3) iPS細胞による安全性評価系開発に向けてのiPS細胞特性解析、肝細胞への効率的分化法の開発等

アクチビン A を用いた方法により短期間で分化指向性を予測できることが示唆された。さらに、低分子化合物 X を併用することで、ヒト iPS 細胞の未分化状態を抑制し、ヒト iPS 細胞を肝細胞への分化を促進させ

ることが示唆された。また、経時的に回収した細胞の遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に解析した結果でも同様な結果が得られた。さらに、分化細胞に薬物代謝活性が認められ、肝細胞機能を有することが明らかとなった。これらのことから、iPS 細胞から肝細胞様細胞への分化誘導に成功したこと、さらに、薬物処理に対して薬物代謝関連遺伝子が期待通り応答していることが判明し、安全性試験に有効な iPS 由来肝細胞の誘導系がある程度確立されていると考えられた。また、網羅的遺伝子発現プロファイルが分化度や未分化状態の評価に有用である事を明かにした。さらに、各薬剤に最適な iPS 由来肝細胞を用いることにより、より適切な安全性試験が構築できる可能性も明らかとなった。また、iPS 細胞を用いて安全性や薬効の評価をする場合には、薬物代謝動態関連の genotyping により、影響を及ぼす変異情報を踏まえた検討を行う必要があることが判明した。胎児毒性について、ヒト iPS 細胞を用いた催奇形性予測試験を視野に、催奇形性陽性薬剤 (5-fluorouracil) 及び陰性薬剤 (sodium ascorbate) を用いて細胞毒性試験を実施した結果、ヒト iPS 細胞を用いることにより催奇形性予測の可能性が示唆された。

(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測法

薬物性肝障害に関しては、これまで 15 施設から 104 症例を集積した。肝障害のタイプでは肝細胞障害型が多く、DDW-Japan 2004 の薬物性肝障害のスコアリングの検出感度は良好であった。被疑薬としては抗菌薬・抗真菌薬、非ステロイド性抗炎症薬、精神科用薬、健康食品、漢方薬、消化器用薬、循環器用薬が多かった。また、ラットでの検討より、LPS 投与により低下した TC の最大排泄量および胆汁流量は、4PB 投与により回復したことから、肝内胆汁うっ滞に 4PB が有効であると考えられた。薬物性筋障害に関しては、国内 9 大学との共同研究体制を構築し、筋障害症例およびコントロール症例の集積を進行中である。両副作用とも、今後、発症予測因子の解析を行う予定である。副作用予測系に関しては、スタチン系薬剤による筋障害に係わるトランスポーターSLC01B1 (OATP1B1) およびBCRP (ABCG2) の複数遺伝子多型について検出系を確立した。抗がん剤をはじめ各種薬物の解毒代謝に関与するGSTA1及びGSTA2のハプロタイプタグ多型13種のタイピング系を一塩基プライマー伸長法により確立した。CYP3A4多型による薬物相互作用に関してCYP3A4.16が野生型とは異なる薬物相互作用を引き起こす可能性を明かにした。また、日本人重症薬疹の発症と関連する一塩基多型(rs9263726)に関して、制

限酵素 FokI を用いた PCR-RFLP 法により、簡便なタイピング系を開発した。また、3 か所の遺伝子多型を、ビーズアレイでタイピングする試薬の開発を行った結果、日本人重症薬疹発症と関連が強い 2 か所の遺伝子多型の検出が可能なる系を構築することができた。この測定系は自動化に適しており、現在のところ自動化についての条件検討を行っている。

D. 結論

医薬品のアレルギー性を検出するための試験法として、THP-1 細胞を用いた h-CLAT およびその改良法の有用性を明らかにした。トログリタズン、カルバマゼピンの反応性代謝物に由来すると考えられるグルタチオン抱合体のうち、GSTM1 が主に関与すると考えられる代謝物を同定した。Gstm1、t1、t1/m1 ノックアウトマウスの胆汁成分の比較の結果、マウス胆汁中に Gst のバイオマーカーとして利用可能な代謝物が含まれることが明らかとなった。ヒト iPS 細胞の肝細胞への効率的分化法を開発し、分化状態や肝細胞特性の評価系を開発した。また、胎児毒性評価系としての検討を行い、催奇形性予測の可能性が示唆された。薬物性肝障害および筋障害の遺伝的要因による発症を解析するための症例収集システムを構築し、現在、順調に症例集積が進んでいる。また、遺伝的要因に基づく副作用の予測系として、筋障害（横紋筋融解症）・重症薬疹に関連する遺伝子多型について迅速タイピング系を開発するとともに、CYP3A4*16 多型の薬物間相互作用に対する影響を明らかにした。また、薬物性肝障害に関しては症例をさらに集積し、わが国の現況を明らかにするとともに、このデータを用いて、注意喚起をしたい。また、ラットを用いた実験により、4PB は肝内胆汁うっ滞に有効と考えられた。以上、副作用を予測するための評価系を開発し、医薬品開発過程を迅速・効率化するための技術基盤確立に向けた研究を推進した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurose K, Sugiyama E, Saito Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics /pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: Implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 9-54 (2012).
- 2) Maekawa K, Hamaguchi T, Saito Y, Tatewaki N, Kurose K, Kaniwa N, Eguchi Nakajima T, Kato K, Yamada Y, Shimada Y, Yoshida T, Kamatani N, Ura T, Saito M, Muro K, Fuse N, Yoshino T, Doi T, Otsu A, Saijo N, Sawada J, Okuda H, Matsumura Y: Genetic variation and haplotype

structures of the glutathione S-transferase genes GSTA1 and GSTA2 in Japanese colorectal cancer patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011, 26(6):646-658.

- 3) Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M and Saito Y: Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet.* in press.
- 4) 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の自動化に対応する全自動遺伝子解析装置の開発, *Medical Science Digest Vol 38 (1), 644-648, 2012.*
- 5) Hanioka N, Matsumoto K, Saito Y, Narimatsu S. Influence of CYP2C8*13 and CYP2C8*14 alleles on amiodarone N-deethylation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;108(5):359-362.
- 6) Narimatsu S, Nakata T, Shimizudania T, Nagaoka K, Nakura H, Masuda K, Katsu T., Koeda A, Naito S, Yamano S, Miyata A, Hanioka N. Regio- and stereoselective oxidation of propranolol enantiomers by human CYP2D6, cynomolgus monkey CYP2D17 and marmoset CYP2D19. *Chem Biol Interact* 2011;189(3):146-152.
- 7) Hanioka N, Oka H, Nagaoka K, Ikushiro S, Narimatsu S. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation. *Arch Toxicol* 2011;85(11):1373-1381.
- 8) Narimatsu S, Nakanishi R, Hanioka N, Saito K, Kataoka H. Characterization of inhibitory effects of perfluorooctane sulfonate on human hepatic cytochrome P450 isoenzymes: focusing on CYP2A6. *Chem Biol Interact* 2011;194(2-3): 120-126.
- 9) Hanioka N, Iwabu H, Hanafusa H, Nakada S, Narimatsu S. Expression and inducibility of UDP-glucuronosyltransferase 1As in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110(3):253-258.
- 10) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ. Genetic variation at the SLC01B1 gene locus and low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin in the elderly. *Atherosclerosis* 2012;220:413-417.
- 11) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ,

- Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ. KIF6, LPA, TAS2R50, and VAMP8 genetic variation, low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin, and heart disease risk reduction in the elderly. *Atherosclerosis* 2012;220:455-462.
- 12) Kawai Y, Sato-Ishida R, Motoyama A, Kajinami K. Place of pitavastatin in the statin armamentarium: promising evidence for a role in diabetes mellitus. *Drug Des Devel Ther* 2011;5:283-297.
- 13) Kajinami K, Akao H. Probucol: Can we step forward in atherosclerosis prevention with an old drug? *Atherosclerosis* 2012;221:34-35.
- 14) Tanaka A, Ohira H, Kikuchi K, Nezu S, Shibuya A, Bianchi I, Podda M, Invernizzi P, Takikawa H. Genetic association of Fc receptor-like 3 polymorphisms with susceptibility to primary biliary cirrhosis: ethnic comparative study in Japanese and Italian patients. *Tissue Antigens* 77, 239-243, 2011
- 15) Miura R, Tanaka A, Takikawa H. Urinary bile acid sulfate levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 41, 358-363, 2011
- 16) Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, Hunt CM, Wilke RA, Avigan M, Kaplowitz N, Bjornsson E, Daly AK. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther* 89, 806-815, 2011
- 17) Fukami M, Tanaka A, Takikawa H. Effect of penicillin G on the biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18, 684-688, 2011
- 18) Tanaka A, Invernizzi P, Ohira H, Kikuchi K, Nezu S, Kosoy R, Seldin MF, Gershwin ME, Takikawa H. Replicated association of 17q12-21 with susceptibility of primary biliary cirrhosis in a Japanese cohort. *Tissue Antigens* 78, 65-68, 2011
- 19) Tanaka A, Harada K, Ebinuma H, Komori A, Yokokawa J, Yoshizawa K, Abe M, Miyake Y, Kikuchi K, Ohira H, Zeniya M, Yamamoto K, Ishibashi H, Onji M, Nakanuma Y, Tsubouchi H, Takikawa H. Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: a rationale for corticosteroids use based on a nation-wide retrospective study in Japan. *Hepatol Res* 41, 877-886, 2011
- 20) Mitamura K, Hori N, Iida T, Suzuki M, Shimizu T, Nittono H, Takaori K, Takikawa H, Hofmann AF, Ikegawa S. Identification of S-acyl glutathione conjugates of bile acids in human bile by means of LC/ESI-MS. *Steroids* 76, 1609-1614, 2011
- 21) Hayashi H, Mizuno T, Horikawa R, Nagasaka H, Yabuki T, Takikawa H, Sugiyama Y. 4-Phenylbutyrate modulates ubiquitination of hepatocanicular MRP2 and reduces serum total bilirubin concentration. *J Hepatol* in press
- 22) Okada R, Maeda K, Nishiyama T, Aoyama S, Tozuka Z, Hiratsuka A, Ikeda T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Involvement of different human glutathione transferase isoforms in the glutathione conjugation of reactive metabolites of troglitazone. *Drug Metab Dispos* 39(12):2290-7, 2011
- 23) Maekawa K, Harakawa N, Yoshimura T, Kim SR, Fujimura Y, Aohara F, Sai K, Katori N, Tohkin M, Naito M, Hasegawa R, Okuda H, Sawada J, Niwa T, Saito Y.:CYP3A4*16 and CYP3A4*18 Alleles Found in East Asians Exhibit Differential Catalytic Activities for Seven CYP3A4 Substrate Drugs. *Drug Metab Dispos*. 2010, 38(12):2100-2104.
- 24) Takikawa H. Recent status of drug-induced liver injury and its problems in Japan. *JMAJ* 53, 243-247, 2010
- 25) Goto H, Takikawa H. Effect of genipin on cholestasis induced by estradiol-17 β -glucuronide and lithocholate-3-O-glucuronide in rats. *Hepatol Res* 40, 524-529, 2010
- 26) Nagasaka H, Yorifuji T, Kobayashi K, Takikawa H, Komatsu H, Inui A, Fujisawa T, Miida T, Tsukahara H, Takatani T, Hayashi H. Favorable effect of 4-phenylacetate on liver functions attributable to enhanced bile salt export pump expression in ornithine transcarbamylase-deficient children. *Mol Gen Metab* 100, 123-128, 2010
- 27) 赤尾浩慶、河合康幸、梶波康二 スタチンのファーマコゲノミクス 臨床検査 2010 ; 54:1178-1182
- 28) Montali L, Tanaka A, Riva P, Takahashi H, Cocchi C, Ueno Y, Miglioretti M, Takikawa H, Vecchio L, Frigerio A, Bianchi I, Jorgensen R, Lindor KD, Podda M, Invernizzi P; Italian-Japanese PBC Study Group. A short version of a HRQoL questionnaire for Italian and Japanese patients with Primary Biliary Cirrhosis. *Dig Liver Dis* 42, 718-723, 2010

2. 学会発表

- 1) 前川京子, 齋藤嘉朗, 西川 潤, 松木 淳, 石川 卓, 矢島和人, 小杉伸一, 神田達夫, 畠山勝義: 消化管間質腫瘍患者のイマチニブ治療による副作用発現と薬物動態関連分子の遺伝子多型との関連, 第 32 回日本臨床薬理学会 2011 年 12 月
- 2) 宮下雪子, 上田哲也, 田島秀二, 小泉朋子, 杉山永見子, 鹿庭なほ子, 齋藤嘉朗, 黒瀬項光一, BIST 法を用いたアロプリノール誘因性重症薬疹関連多型の迅速診断法の開発, 日本薬学会第 132 年会, 2012. 3
- 3) C. Hilliker, Y. Miyashita, T. Sugimoto, O. Segawa, T. Ueda

- and H. Tajima, "geneLEAD XII: Fully-automated Sample to Answer Real Time PCR system from Precision System Science", SLAS 2012
- 4) T. Ueda, "Fully-automated sample to answer system for NAT 'geneLEAD and geneTYPIST'", Biotechnica 2011, Hannover, Germany
 - 5) C. Hilliker, T. Sugimoto, S. Yoda, S. Okazaki, Y. Miyashita, O. Segawa, T. Ueda, K. Obata and H. Tajima, "geneLEAD and geneTYPIST: Two new fully automated sample to answer systems", LabAutomation 2011
 - 6) 黒瀬光一, 宇梶真帆, 杉山永見子, 小泉朋子, 打田光宏, 土屋敏行, 関口和孝, 水垂 亨, 山口嘉隆, 斎藤嘉朗, インビトロ皮膚感作性試験 h-CLAT の適用拡大に関する検討, 日本薬学会第 132 年会 (2012. 3) (札幌)
 - 7) 打田光宏, 土屋敏行, 関口和孝, 水垂 亨, 山口嘉隆, 宇梶真帆, 杉山永見子, 小泉朋子, 斎藤嘉朗, 黒瀬光一, インビトロ皮膚感作性試験 h-CLAT の全身投与用医薬品のアレルゲン性評価, 日本薬学会第 132 年会 (2012. 3)
 - 8) 花房弘之, 埴岡伸光, 松永民秀, 成松鎮雄: ヒト iPS 細胞由来分化肝細胞の CYP 及び UGT mRNA の発現解析. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会, 広島, 2011 年 5 月.
 - 9) 伊豆野祥太郎, 埴岡伸光, 江尻洋子, 細田雅也, 内藤真策, 成松鎮雄: マイクロ空間プレートを用いた 3 次元培養 HepG2 細胞における UGT 発現解析. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会, 広島, (2011. 5)
 - 10) 花房弘之, 松永民秀, 黒瀬光一, 斎藤嘉朗, 埴岡伸光, 成松鎮雄: Expression of CYP and UGT mRNAs in human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. 日本薬物動態学会第 26 回年会, 広島, (2011. 11).
 - 11) 長岡憲次郎, 埴岡伸光, 生城真一, 山野茂, 成松鎮雄: How does *N*-glycosylation affect the enzymatic functions of UGT2B7?. 日本薬物動態学会第 26 回年会, (2011. 11).
 - 12) D. Sato, N. Harimoto, C. Matsumura, T. Matsunaga: Examination of simple prediction system of the differentiation characteristics into hepatocyte between human induced pluripotent stem cell lines. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2011 年 12 月.
 - 13) Y. Kondo, S. Yoshihashi, K. Mimori, R. Sugiyama, T. Iwao, K. Kurose, T. Matsunaga: Effect of Small Molecule on Differentiation into Hepatocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, (2011. 12).
 - 14) D. Sato, N. Harimoto, C. Matsumura, K. Kurose, T. Matsunaga: Differentiation characteristics of human induced pluripotent stem cells are prescribed at early stage. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima, November 2011.
 - 15) Y. Kondo, T. Iwao, M. Saito, T. Niwa, K. Kurose, K. Nagata, T. Matsunaga: Effect of quercetin on differentiation into hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima, November 2011.
 - 16) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukerna JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ. , Genetic variation at the SLCO1B1 gene locus and low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin in the elderly. , American Heart Association, Scientific Meeting. Nov 13, 2011 (Orlando)
 - 17) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukerna JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ., KIF6, LPA, TAS2R50, and VAMP8 genetic variation, low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin, and heart disease risk reduction in the elderly., American Heart Association, Scientific Meeting. Nov 13, 2011 (Orlando)
 - 18) Kajinami K, Maeda K, Ieiri I, Fukizawa S, Yamane N, Masauji T, Sugiyama Y., Genetic polymorphisms of transporters affecting atorvastatin pharmacokinetics in Japanese patients with hyperlipidemia. 日本薬物動態学会第 26 回年会(2011. 11).
 - 19) 滝川 一, ランチョンセミナー: 薬物性肝障害 Up to date, 第 47 回日本肝臓学会総会 (2011. 6. 2, 東京)
 - 20) 相磯光彦, 田中 篤, 滝川 一, ワークショップ: 薬物性肝障害 revised. 国内 11 施設による薬物性肝障害症例の前向き症例集積. 第 47 回日本肝臓学会総会 (2011. 6.)
 - 21) Maekawa K, Harakawa N, Yoshimura T, Kim SR, Fujimura Y, Aohara F, Sai K, Katori N, Tohkin M, Okuda H, Sawada J, Niwa T and Saito Y, CYP3A4*16 and CYP3A4*18 alleles Found in East Asians Exhibit Differential Catalytic Activities for Seven CYP3A4 Substrate Drugs, 9th International meeting of International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) (2010.10, istanbul)
- F. 知的財産権の出願・登録状況
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、次の4項目に関して研究を行い、成果を得た。(1) ヒトでのアレルギー性を予測可能なインビトロ感作性試験法、(2) GST T1 および M1 KO マウスを用いたバイオマーカー探索、(3) iPS 細胞の各種特性解析法、肝細胞への効率的分化・機能評価法、(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測法

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
前川京子
- 2) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
杉山永見子
- 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
田代康介
- 8) Meiji Seika ファルマ(株) 医薬研究所
土屋敏行
- 9) 第一三共(株) 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
- 15) プレシジョン・システム・サイエンス(株)
上田哲也

A. 研究目的

医薬品開発の効率化や安全性の確保を目指して、副作用予測法・評価法を開発を行う。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。具体的な項目としては、必要性和参加企業のニーズを踏まえ、次の4項目とした。(1) ヒトでのアレルギー性を予測し得るインビトロ感作性試験法の開発、(2) GST T1 および 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、(3) iPS 細胞による安全性評価系開発に向けての iPS 細胞特性解析、肝細胞への効率的分化法の開発等、(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測系の開発として薬物性肝障害・筋障害の症例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

B. 研究方法

(1) インビトロ感作性試験法の開発

1-1) 新規感作性試験法

ヒト THP-1 細胞において免疫応答性の補助刺激分子 CD86 と結合因子 CD54 とが皮膚感作性物質により発現誘導されることを利用する human Cell Line Activation Test (h-CLAT) 法の適用と応用を検討した。h-CLAT は、定法に従い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感作性の有無を判定した。また、被験物質のより低い暴露濃度で h-CLAT 陽性応答が見られるように界面活性剤との同時暴露による被験物質に対する感度上昇の改良を試みた。界面活性剤として Tween 80, Tween 20, Triton N-101, Triton X-100, Nonidet P-40, Emulgen 911 を試験し、このうち判定が陰性となる物質を同時暴露試験に用いた。また、被験物質の代謝活性化も含めた評価が行えるように、ラットおよびヒト肝 S9 を利用して代謝活性化法の導入を検討した。

1-2) アレルギー性試験法開発のための新規培養細胞系の調製と検討

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を恒常的に発現す

る THP-1 細胞の樹立にあたって、前年度から引き続き MPO/THP-1 シングルクローン 15 種の選択培養を続け、これらの中から、EIA 法により MPO 発現レベルを測定し、高 MPO 発現クローンを選択し、大量培養して液体窒素保存した。また、従来法に加え、エピソーマル型ベクターである pEBMulti ベクターを用いた MPO 発現 THP-1 株を樹立するために、MPO を組み込んだ pEB-Multi ベクター(EpiMPO)を調製し、THP-1 細胞に遺伝子導入した。さらに、MPO 発現 THP-1 細胞における MPO 代謝活性を調べるため、本酵素による代謝が報告されているチクロピジン、アミノピリン、フェニトインの代謝物分析を LC/MS/MS 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

Gstm1-, Gstt1-ノックアウトマウスは、第一三共(株)安全性研究所において、定法である ES 細胞の相同組換え法により、C57BL/6J と 129S1 系統の掛け合わせとして維持されたものを使用した。

2-1) Gstm1-, Gstt1-欠損マウス胆汁成分のメタボロミクス解析

胆汁は、15 週齢の、野生型 (C57BL/6J, 日本チャールス・リバー社より購入)、それぞれのノックアウトマウスから、16 時間絶食後、チオペンタール麻酔下で胆嚢カニューレーションを行って採取し、使用までは約-80°Cの冷凍庫中で保管した。測定および解析は、UPLC(Waters Corp.) / LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific)にて ESI-positive モードで測定した LC/MS データを SIEVE (Thermo Fisher Scientific)でアライメント実施後、Simca-P (Umetrics)を用いて多変量解析を行い、野生型群に対するノックアウト群での変動因子を抽出した。

2-2) GST T1 と GST M1 によるカルバマゼピンのグルタチオン抱合体代謝物の探索

カルバマゼピンを肝ミクロソーム、NADPH、還元型 GSH と同時に incubation するとともに、大腸菌に発現させた各ヒト GST 分子種の精製酵素を添加し、一定時間後、incubation 液中の反応性代謝物のグルタチオン抱合体を LC-MS/MS (HPLC UFLC-XR, MS/MS QTRAP5500)により測定した。リコンビナント GST タンパクに比例して増加するグルタチオン抱合体を、GST 分子種により生成するグルタチオン抱合体とした。ヒト肝臓中発現している A1, A2, P1, M1, T1 による代謝活性を比較し、M1, T1 選択的に生成する代謝物を検索した。

(3) iPS細胞による安全性評価系開発に向けてのiPS細胞特性解析、肝細胞への効率的分化法の開発等

ヒト iPS 細胞を当研究班で独自に樹立(名市大)すると共に、京都大学、国立成育医療研究センターにて

樹立された株を使用した。計 6 株を用いて肝細胞へ分化し易い iPS 細胞株を簡易に予測する方法について検討を行った。また、肝細胞へ分化し易いと判断した株を用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に及ぼす低分子化合物の影響についても検討した。肝細胞への分化に関しては、アクチビン A 及び DMSO により肝前駆細胞に誘導し、次に、オンコスタチン M 及びデキサメタゾンを処置して肝細胞の成熟を行う方法を基本とした。なお、比較のために EB (embrioid body) 形成法も採用した。薬物による代謝酵素誘導特性や分化誘導肝細胞の遺伝子発現特性を(リアルタイム) RT-PCR 法で解析した。また、未分化 iPS 細胞及び肝細胞への分化過程の経時的な遺伝子発現特性は、DNA チップ (Agilent 社の HumanG2(8X44K)) を用いて網羅的に解析した。肝特異的薬物代謝酵素活性は、プローブ基質の代謝物を UPLC/MS/MS 法にて測定することにより行った。また、ヒト iPS 細胞を用いた催奇形性予測試験を視野に、iPS 細胞対して催奇形性陽性薬剤及び陰性薬剤を用いて細胞毒性試験を実施した。

(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測法

(4-1) 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、多型についての迅速検出系の開発を行った。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。

(4-2) 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、国内の各施設に、薬物性肝障害の症例の前向き集積をお願いし、登録用紙を送って貰うように依頼した。症例は ALT ≥ 150 and/or ALP $\geq 2 \times$ 基準上限の症例に限定した。項目は施設名、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、胆道疾患、ショック肝、飲酒歴、発熱、皮疹、薬物治療、転帰(死亡の場合は死因も)、DDW-J2004 スコア、RUCAM(ICM)スコアである。

薬物起因性ラット胆汁うっ滞の病態解析については、雄性 Sprague-Dawley 系ラット(体重 250 g)に、4-Phenylbutyrate (4PB) 1,200 mg/kg を 2 回/日で 4 日間経口投与した。LPS 2.5 mg/100g 体重を投与 18 時間後に、麻酔下に開腹し胆管カニューレーションを行い、30 分後に

大腿静脈より[14C]タウロコール酸を 1.0 μ mol/分/100g で 60 分間持続投与した。胆汁を 10 分おきに採取し放射活性を測定し、胆汁中最大排泄量を検討した。

(4-3) 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

(4-3-1) アロプリノール誘発性SJS/TENの発症に関連するマーカー多型のPCR-RFLP法による迅速タイピング系

日本人において *HLA-B*58:01* と絶対連鎖不平衡 ($G^2 = 1, D' = 1$) を示す乾癬感受性遺伝子(*PSORS1C1*)上に位置する rs9263726 (110G>A, Arg37His)を対象とし、polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法による迅速タイピング系を構築した。まず多型部位を含む断片をゲノムDNAより特異的にPCR増幅した。得られたPCR産物は制限酵素 FokI による消化を行い、アクリルアミドゲルを用いたDNA電気泳動により分離した。ゲルをエチジウムブロマイド染色し、UV照射によりDNA切断パターンを検出した。また、PCR-RFLP法のタイピング結果の正確性を比較する対照として、TaqMan SNP Genotyping Assays を用いて rs9263726 のタイピングを行った。中国系アメリカ人の健常者の臍帯血由来ゲノムDNAはAllCells社(Emeryville, CA, USA)より購入した。SJS/TEN発症患者は、2006年7月より2010年4月までSJS/TEN遺伝子解析研究班(the Japan Severe Adverse Reactions (JSAR) research group)に参加する研究者が所属している医療機関より集積された。さらに、国立医薬品食品衛生研究所症例集積システムにより全国の医療機関から症例を収集した。ゲノムDNAは末梢血白血球から定法に従い抽出した。HLA-Bのタイプは、SeCore® Kits (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いたシークエンス法により決定した。

(4-3-2) アロプリノール誘発性SJS/TENの発症に関連するマーカー多型のBIST (Beads in Straw Tip) 法による迅速タイピング系

ヒトのゲノム配列と相同性の低い 31-37 mer のオリゴヌクレオチド (TAG) を設計し、合成した。合成したオリゴヌクレオチドを、非磁性ビーズと EDC 存在化で反応させ、粒子表面に固定した。18種類の異なる配列を持つオリゴヌクレオチドを固定した反応ビーズを、キャピラリーチップに封入した。SNP解析では、2個のビーズを使って判定する。製造したBISTは、将来性を考慮し、最大9 SNPsが同時解析できる仕様とした。BISTを用いた遺伝子多型同定法においては、Allele Specific Primer Extension-PCR法(ASPE-

PCR)を用いた。それぞれの遺伝子多型検出が可能なDNA配列の5'末端側に、ビーズに固相したオリゴヌクレオチドと相同な配列を付加したプライマーを合成した。これらのプライマーを用いてASPE-PCR反応を行い、BISTに封入されたオリゴヌクレオチド固定化ビーズと反応させた。このPCR反応中にDIG取り込ませることで、増幅産物の検出を行った。反応後に、PCR産物をキャピラリー内のビーズと反応させ増幅の有無を検出した。検出結果より遺伝子多型の判定を行った。上記で構築した遺伝子多型同定法の全自動化は、核酸抽出機能、PCR機能、ハイブリダイゼーション機能、シグナル検出機能を併せ持つ機器「geneTYPIST」を用いて行った。全血を試料とし、DNAの抽出、PCR、ハイブリダイゼーション、シグナルの検出の工程を自動化したプロトコルを構築し、反応を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料を用いる場合は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、書面によりインフォームドコンセントを取得し、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。筋障害および薬物性肝障害の症例集積と分析に関する研究では研究実施機関において倫理審査の承認を得ており、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「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、本研究は「ヒトiPS細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針」等の倫理的な指針には抵触しない。

C. 研究結果

(1) インビトロ感作性試験法の開発

1-1) 新規感作性試験法

アレルギー性副作用報告のある医薬品被験物質の暴露によるh-CLATの結果、試験を試みた医薬品18物質のうちh-CLATのアッセイ要件を満たしたものは11物質であり、これらはいずれも陽性判定となった。他の6物質(いずれも脂溶性物質)については、最大溶解濃度になるよう被験物質を培地に加えても細胞生存率が十分に低下せず、アッセイ要件の一つであるCV75(被験物質の暴露による75%の細胞生存率)を満たすことができなかった。この問題を解決するためには、より低い暴露濃度でh-CLAT陽性応答が見られるように被験物質に対する感度上昇の改良が必要であると考え、細胞障害性はあるがh-CLAT陰性となる界面活性剤と被験物質を同時暴露することによりCV75

を達成し、単独暴露時よりも低い被験物質濃度で h-CLAT が陽性となるか否か検討した。その結果、界面活性剤との同時暴露により大幅に感度の上昇 (40 倍) する可能性があるが、本来陽性判定であったものが陰性となる場合もあることが判明した。一方、代謝活性化法の導入に関しては、肝 S9 自体に陽性応答することが判明し、試験系としては適用できない事が明らかになった。

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

定法により作成した MPO 安定発現 THP-1 株のうち、最も高い MPO 発現レベルを示した MPO/THP-1_6 株においてもその発現レベルは、MPO の高発現が知られる HL-60 と比較すると 10 分の 1 程度であった。一方、pEB_Multi ベクターを用いて樹立した MPO 安定発現株の MPO 発現レベルは、THP-1 細胞の 5 倍程度と低レベルであった。また、従来法で樹立した MPO 安定発現株は継代を重ねると MPO の発現レベルが低下し、1 ヶ月以上継代した場合には樹立した当初の 10% 程度に低下することが判明した。次に、MPO/THP-1_6 株を用いて、MPO により代謝を受けることが知られている化合物の代謝物分析を LCMS を用いて実施した。その結果、チクロピジン処置細胞においては、MPO によって生成した代謝物と同じ m/z を有する代謝物 (m/z ; チクロピジン-2) が検出された。得られた代謝物の詳細な構造解析を実施するため、チクロピジン及び 2 体の LC/MS/MS 解析を実施した。チクロピジンと 2 体の MS² フラグメントを比較した結果、2 体はテトラヒドロチエノピリジン環の酸化体であることが明らかとなり、本代謝物は MPO によって生成した代謝物 TM であることが示唆された。

(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) Gstm1-, Gstt1-欠損マウス胆汁成分のメタボロミクス解析

雄・雌性マウスの胆汁を分析した結果、PLS プロット上で、各群のクラスタリングが明確だったのは、雄であったことから、以降の解析は雄性マウス胆汁を対象に実施した。野生型マウスに対して、ピーク強度が減少する成分として、 m/z 520.341, 496.342, 522.357 の 3 ピークを検出できた。反対に、ノックアウトマウスに共通して増加する成分として、480-787 の分子量をもつ複数のピークを検出した。特に、 m/z 760.588 のピークは、野生型マウスではまったく検出されていない。さらに、バッククロス完了個体を用いて、同様の解析を実施した。野生型マウスと Gstm1, t1, t1/m1 の各ノ

ックアウトマウスの 2 群間比較で、変動したピークを探索した。ノックアウトマウスで共通して変動が見られたピークとして、 m/z 460.251, 466.261, 593.332 (いずれも増加)、 m/z 597.363 は減少が見られた。また、Gstm1, t1/m1 ノックアウトマウスで共通して変動するピークとして、 m/z 555.308, 576.215, 597.352, 724.332 は減少し、 m/z 593.332 は増加が見られた。また、Gstt1, t1/m1 ノックアウトマウスで共通変動するピークとして、 m/z 428.300, 430.316, 456.331 はピーク強度の減少が認められ、 m/z 655.168 はピーク強度の増加が認められた。初回の解析で、変動が検出された成分を再現することはできなかった。

2-2) GST T1 と GST M1 によるカルバマゼピンのグルタチオン抱合体代謝物の探索

カルバマゼピンの反応性代謝物に由来すると考えられるグルタチオン抱合体は、過去の報告に基づくと全部で 14 種類同定されているが、今回の検討においても、これら 14 種類の化合物とフラグメントパターンが一致するピークが同定された。さらに、これらピークは、いずれも GSH 添加量を上げていくと、ピーク強度が GSH 濃度依存的に増加したことから、いずれもグルタチオン抱合体であることが示唆された。次に、GSH 抱合に関与する GST 分子種の同定を行うために、GSTA1, A2, M1, T1, P1 の 5 分子種の GST タンパクを反応性代謝物生成系の中に添加したところ、M5/M6 (カルバマゼピンの arene epoxide 体のグルタチオン抱合体)以外のピークは、GST の添加によって、あまり変動が見られず、ほとんどのグルタチオン抱合体が、non-enzymatic に進んでいることが示唆された。一方で、M5/M6 のピークについては、GSTA1, M1, P1 によってピーク強度のそれぞれ 1.5, 2, 2 倍程度の増加がみられ、うち、M1, P1 の添加による増加は、統計的に有意であることが示された。

(3) iPS細胞による安全性評価系開発に向けてのiPS細胞特性解析、肝細胞への効率的分化法の開発等

3-1) ヒトiPS細胞の成熟肝細胞への分化誘導法

EB 形成後、経時的に細胞を回収し、それぞれの分化時点における内胚葉マーカー GSC, SOX17, FOXA2 の発現量について解析した。その結果、内胚葉マーカーの発現量は Windy 株及び Dotcom 株が高く、HFIPSCs 株, 201B7 株, 253G1 株で低い結果となった。一方、activin A 処理時における内胚葉分化誘導 5 日目時点の遺伝子発現量について解析したところ、iPS 細胞株間の分化傾向は EB 形成時と同じ傾向ではあるものの、その程度は EB 形成時に認められた差の数十〜百倍であった。次に、これら内胚葉マーカー

の発現量の差が iPS 細胞を肝細胞へと分化誘導する際にどの程度寄与するか検討した。その結果、肝細胞マーカーである albumin (ALB) の mRNA 発現量は、Windy 及び Dotcom では発現量の低い群 (HF iPSCs, 201B7, 253G1) と比較し、数十～数百倍の差が認められた。さらに薬物代謝酵素の mRNA 発現量についても Windy, Dotcom では 201B7 と比較し 10 倍程度高かった。一方、胎児肝細胞特異的に発現している α -fetoprotein (AFP) や CYP3A7 の発現量が高いこと、成熟肝マーカー tyrosine aminotransferase (TAT) の発現量が低いことから十分に成熟した肝細胞様細胞が得られたとは言いがたいが、これらの結果もまた前述までの結果と同様に Windy, Dotcom では高発現量であった。一方、低分子化合物 X の分化に及ぼす影響について検討するために、5 日間の分化を行い mRNA 発現の解析を行ったところ、activin A 及び低分子化合物 X 併用群では、内胚葉マーカーの mRNA 発現の増加に加え、未分化マーカーの mRNA 発現の減少が認められた。そこで次に、肝細胞にまで分化誘導した際の影響について明らかにするために 25 日間の分化を行った細胞の mRNA 発現を解析した結果、ALB, AFP, hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α), 成人の肝臓における主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現が認められた。このことから、低分子化合物 X を併用することで、ヒト iPS 細胞の未分化状態を抑制し、ヒト iPS 細胞を肝細胞への分化を促進させることが示唆された。

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) iPS 細胞から異なる方法で分化誘導した肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性

iPS 細胞から 4 種の異なる分化誘導条件、すなわち、分化誘導培地に①Wnt3a のみを添加、②Quercetin のみを添加、③Wnt3a と Quercetin の両者を添加、④Wnt3a と Quercetin のいずれも添加しない(対照群)、という 4 条件で、分化させた 4 種の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) を測定した。代謝酵素誘導剤の処理を行っていないベース活性についてみると、②Quercetin を添加した群において CYP1A ($P<0.05$) および CYP3A ($P<0.01$) 活性の有意な上昇が観察された。また、有意ではないものの、CYP2B および CYP2D においてもやや高めの活性を示した。①Wnt3a を添加した群において SULT の有意な上昇が認められた ($P<0.05$)。③Wnt3a と Quercetin の両者を添加した群では、相加的あるいは相乗的な効果は認められなかった。以上のように、薬物代謝酵素活性は②Quercetin を添加し

た群において、他の群と比較してやや高い傾向が認められた。なお、CYP2C9 および CYP2C19 については 4 種のいずれの細胞においても活性が検出されなかった。誘導剤に対する反応性については、いずれの株においても、ほぼ同様な変動を示し、株間に明確な差異は認められなかった。

3-2-2) 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

異なる 3 株の iPS 細胞を用いて、肝細胞分化誘導処理過程の、0, 6, 15, 23, 30 日目の細胞における遺伝子発現変動を DNA チップにより解析した。解析対象とした遺伝子は、(1)未分化、(2)中内胚葉・内胚葉、(3)肝幹(前駆)細胞、(4)成熟肝細胞、への分化の指標となるマーカー遺伝子群である。肝細胞への分化誘導により、全ての未分化マーカー遺伝子の発現が時間軸に沿って大きく減少し、3 種類の iPS 細胞すべてが分化状態に移行したことが判明した。発現低下の程度は、iPS#51 株が最も大きく、細胞分化がより進行していると推定された。中内胚葉・内胚葉のマーカーである FOXA2, SOX17 遺伝子では、201B7 細胞株の発現量が他 2 種類の細胞よりやや低めではあったが、いずれの細胞も 6 目で一旦発現上昇し、その後、減少に転じた。このことは、iPS 細胞が中内胚葉・内胚葉を経由して肝幹細胞へ分化移行する様を示しており、既報と合致する結果が得られた。肝幹細胞のマーカー遺伝子群では、AFP 遺伝子の発現上昇が 15 日目から iPS#25 株及び iPS#51 株において急激に発現上昇することが検出され、これら 2 種類の細胞は、肝幹細胞へ分化が進行していることが判明した。しかしながら、これら 2 種の細胞は、30 日目になっても AFP の発現量が低下していないため、成熟肝細胞への分化に関しては十分ではないことが示唆された。一方、201B7 細胞では、いずれの肝幹細胞マーカー遺伝子の発現増加も見られず、肝幹細胞への分化の進行は認められないと考えられた。成熟肝細胞の指標となるマーカー遺伝子群では、ALB 及び TDO2 の発現が iPS#25 及び iPS#51 細胞において大きく上昇していることが明らかとなり、成熟肝細胞へと細胞が分化していると考えられた。また、iPS#51 細胞においては、他の成熟肝細胞マーカー遺伝子の発現もわずかに増加しており、iPS#25 と比較し、より分化状態にあることが判明した。一方、201B7 細胞では、成熟肝細胞マーカー遺伝子の発現が検出されず、肝細胞への分化は起きていないことが明らかとなった。以上の解析結果から、用いた 3 種類の iPS 細胞株は肝細胞への分化誘導操作によっ

て、すべて未分化状態から細胞分化状態に移行しているが、肝細胞への分化が進行したのは、iPS#25 及び iPS#51 細胞であり、201B7 細胞は肝細胞への分化の程度が低いことが判明した。成熟した肝細胞の分化が認められた iPS#25 及び iPS#51 細胞における分化の程度は、iPS#51 株が最も高いと結論された。しかしながら、iPS#51 株においても、肝幹細胞マーカーである AFP の発現量が最後まで高く維持されており、必ずしも成熟度が高いとは言えないことが判明した。

3-2-3) iPS細胞 253G1 株及びDotcom株の肝細胞への分化とCYP及びUGTの発現解析

iPS 細胞 253G1 及び Dotcom 株を用いて、肝細胞様細胞に分化し、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の mRNA 及びタンパク質発現プロファイル、並びにシトクロム P450 (CYP) の薬物代謝酵素誘導能について検討した。その結果、253G1 細胞株由来の肝細胞様細胞において、成人肝で発現している 6 種類の UGT 分子種 mRNA 発現が確認された。Dotcom 細胞株由来の肝細胞様細胞では、253G1 細胞株由来のもので発現している UGT 分子種に加えて UGT1A1, UGT1A5 及び UGT2B17 の mRNA 発現が確認された。また、3-メチルコラントレン (3-MC) により CYP1A1 及び CYP1B1, 並びに UGT1A1 mRNA 発現が誘導されたことから、生体肝の特性である薬物代謝酵素誘導能を有していることが確認された。

3-2-5) ヒトiPS細胞を用いた胎児毒性試験系の検討

ヒト iPS 細胞を用いた催奇形性予測試験を視野に、ヒト iPS 細胞株 (253G1, Dotcom), ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) に対して催奇形性陽性薬剤 (5-Fluorouracil) 及び陰性薬剤 (Sodium ascorbate) を用いて細胞毒性試験を実施した。評価法は、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) によるマウス ES 細胞株 (ES-D3 細胞) を用いた方法を採用した。細胞数の指標となる WST-1 の媒体 (DMSO 終濃度 0.25%) における 450nm の吸光度を 100% に対し、50% の値となる化合物濃度を細胞毒性の IC50 値とした。細胞毒性について、ヒト iPS 細胞株 (253G1, Dotcom), ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) の 3 株で比較した結果ヒト iPS 細胞及びヒト皮膚線維芽細胞を用いた細胞毒性評価は可能と考えられた。また、ヒト iPS 細胞株 (253G1, Dotcom) 2 株における細胞毒性に違いはなく、いずれの株を用いて実験しても違いはないと考えられた。

(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測法

(4-1) 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抽出した。また、BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2) についての多型を迅速検出する系を確立し、種々のサンプルコンディションでの作動を確認した。さらに前年度発足させた 9 大学による多施設共同研究チームにより、スタチン投与に伴う筋障害例を集積する手順の策定、その他問題点について討議した。現在までミオパチーを過去に生じた計 15 例が登録され、順次遺伝子解析が進行中である。

(4-2) 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

2011 年末までに、国内の 15 施設から 104 例の薬物性肝障害症例を集積した。男性が 39 例、女性が 65 例で、年齢分布は図 1 のごとくで、平均年齢は 56 歳であった。肝障害のタイプでは肝細胞障害型が 61% と最も多く、混合型が 23%、胆汁うっ滞型が 16% であった。好酸球増多は 26% で認められ、DLST は施行率 54% で、48% で陽性であった。発症までの期間は、30 日以内が 51% で、90 日以上も 27% みられた。DDW-Japan 2004 の薬物性肝障害のスコアリングは、可能性が高いが 90%、可能性あり以上が 99% と、検出感度は良好であった。被疑薬としては抗菌薬・抗真菌薬 (12%)、非ステロイド性抗炎症薬 (11%)、消化器科用薬 (10%)、循環器科用薬 (9%)、健康食品 (8%)、精神点神経科用薬 (7%) の順に多かった。

タウロコール酸 (TC) の最大排泄量は LPS 投与により、対照の $0.94 \pm 0.25 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ から $0.35 \pm 0.21 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ に低下したが、4PB 投与により $0.84 \pm 0.23 \mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ まで回復した。また投与 60 分後の胆汁流量は、対照の $10.7 \pm 2.3 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ から LPS 投与により $2.8 \pm 2.0 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ に低下したが、4PB 投与により $9.0 \pm 3.0 \mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ まで回復した。

(4-3) 副作用発症に関連する遺伝子多型の迅速タイプピング系の開発

(4-3-1) アロプリノール誘発性SJS/TENの発症に関連するマーカー多型のPCR-RFLP法による迅速タイプピング系

rs9263726 (110G>A, Arg37His) を挟む 260 bp の DNA 断片を増幅した後、Fok I による制限酵素消化により多型の有無を判定できることが明らかとなった。すなわち、PCR 増幅産物が A アレルを含む場合は、141 bp と 119 bp の 2 つの断片に消化され、G アレルを含む場

合は、制限酵素消化を受けずに 260bp の断片が検出された。このことは、中国系アメリカ人健常者のゲノムを用いて、確認を行った。また、PCR-RFLP 法による解析結果は TaqMan SNP assay 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。さらに HLA-B タイプが既知の SJS/TEN 発症患者のゲノム DNA を用いて、本 PCR-RFLP 法による rs9263726 のタイピングを行い、HLA-B*58:01 ヘテロ保因者は rs9263726 がヘテロ接合体であることを確認した。

(4-3-2) アロプリノール誘発性SJS/TENの発症に関連するマーカー多型のBIST (Beads in Straw Tip) 法による迅速タイピング系

HLA-B*5801 と完全連鎖する SNP rs9263726 と、高い連鎖不平衡 ($r^2 = 0.931$, $D' = 1$) を示す rs2734583 を対象とした 2 種の遺伝子多型迅速タイピング系の開発を行った。その結果、Allele Specific PCR 法を使った rs9263726 と rs2734583 の 2 SNPs の多型解析が可能な系を構築することができた。この方法を取り入れることで、コンタミネーションのリスクも下がり、自動化も容易となる。BIST による遺伝子解析手法を自動化した機器「geneTypist」でこのプロトコルを用いた rs9263726 と rs2734583 の同時多型解析についても、良好な結果を得ることができ、遺伝子多型解析の全自動化の可能性も実証できた。

D. 考察

(1) インビトロ感作性試験法の開発

h-CLAT およびその改良法の適用により、全身投与用医薬品に対するアレルギー性を予測可能なことが示唆された。しかし、S9 を用いた場合、その処理のみで陽性となるため、医薬品の代謝を考慮する場合、別途工夫が必要であると考えられた。その一つとして、代謝酵素安定発現細胞の構築があげられるが、本研究で試みた、MPO 安定発現細胞に関しては、MPO 発現量および代謝活性共に検出されたものの十分ではなく、試験系として確立するためにはさらに検討が必要であると考えられた。一方、細胞毒性の低いことあるいは難溶性のために十分な暴露濃度を得られないことに対する改良法としては、界面活性剤と被験物質の暴露濃度を最適化することにより、実用化が可能と考えられる。

(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) Gstm1-, Gstt1-欠損マウス胆汁成分のメタボロミク

ス解析

メタボローム解析により、Gstt1, m1, t1/m1 で変動する胆汁成分を検出した。共通して減少する成分のほか、Gstt1 と t1/m1 で共通して減少、Gstm1 と t1/m1 で共通して減少が認められた。両 Gst 分子種が反応に関わるもの、それぞれの Gst 分子種が反応に関与するものと考えられる。構造推定のためには、さらに解析を継続する必要がある。また、バッククロス後の個体を用いた解析では、初回の解析を再現することができなかった。背景因子の違いのほか、飼育環境・食餌の影響等が考えられる。初回の解析で、胆汁排泄の低下が認められた個体はわずかであったのに対して、バッククロス後では複数のピークで胆汁成分の減少が認められたことから、Gstt1, m1 が、内因正あるいは食品成分由来の活性代謝物を解毒する役割を担っていることが考えられる。ピーク強度が増加するものもみられ、adaptive regulation 等による、反応の促進に由来すると考えられる。

2-2) GST T1 と GST M1 によるカルバマゼピンのグルタチオン抱合体代謝物の探索

カルバマゼピンに関して 14 種類の反応性代謝物由来のグルタチオン抱合体を検出することができた。各々の生成量については、各分子のイオン化効率などにも左右されることから、一概に多寡を判断することはできない。また、反応性代謝物の場合、量的な問題だけではなく、少量であっても特定の反応性代謝物が生体に悪影響を及ぼすことは十分に考えられる。今回、活性代謝物であるカルバマゼピンの 2,3-arene epoxide 体のグルタチオン抱合体 2 種類について、GSTM1, P1 の添加によって、抱合体の生成が増えたことから、この抱合体の生成に GSTM1, P1 の関与が示唆された。M1 の方が、P1 より 4 倍程度発現量が高いことから、抱合体の生成の時間依存的なプロファイルを正確にとる必要がある。今回得られた結果が、生成速度を反映していると仮定すれば、M5/M6 の肝細胞内における生成には、GSTM1 が主に関与していることが示唆される。すなわち、GSTM1 が、活性代謝物の解毒に関与しており、その機能低下が M5/M6 の前駆体の反応性代謝物の量を増大させ、肝障害のリスクを亢進したと考えることができる。実際に、M5/M6 の前駆体の反応性代謝物が、肝障害の原因であるかについては、明確な報告はなく、更なる検討が必要であると考えているが、少なくとも GSTM1 によって影響される反応性代謝物が特定の者に限られることは、肝障害を引き起こす反応性代謝物は、全体の中の一部であり、*in vitro* で、タンパク質への covalent binding のみを mass でみるだけでは不十分であることを示唆しており、今後、特定の活性代謝物の量と、肝障害誘起との関連を探る必要があると考えている。

(3) iPS細胞による安全性評価系開発に向けてのiPS細胞特性解析, 肝細胞への効率的分化法の開発等

3-1) ヒトiPS細胞の成熟肝細胞への分化誘導法

EB 形成や activin A 処理の結果から, iPS 細胞株間には内在的に内胚葉へ分化しやすい性質を持つものが存在することが明らかとなった。また, 5 日間の activin A 処理にて肝細胞への分化指向性を予測するツールとしたが, この方法は EB 形成法と比較し, 内胚葉分化マーカーの変化が現れやすいことや分化誘導期間が短期間で可能であることから, iPS 細胞を用いた肝細胞への分化指向性を予測する簡便かつ効率的な方法と考えられた。また, 低分子化合物 X の併用は, ヒト iPS 細胞の未分化状態を抑制し, ヒト iPS 細胞を肝細胞への分化を促進させることが示唆された。

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) iPS細胞から異なる方法で分化誘導した肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性

iPS 細胞の特性解析の一環として, 異なる 4 種の条件で分化誘導した肝細胞様細胞の薬物代謝酵素活性および薬物代謝酵素誘導剤に対する反応性を検討した。薬物代謝酵素誘導剤での処理をしていないベース活性は, ②Quercetin を添加した群において, 他の 3 種の肝細胞様細胞と比較して, やや高い薬物代謝酵素活性が検出されたことから, Quercetin が iPS 細胞から肝細胞様細胞への分化誘導を促進する可能性が示唆された。薬物代謝酵素誘導剤に対する反応は 4 種のいずれの肝細胞様細胞においても大きな差異は認められず, ほぼ同様な変化が観察された。ヒト初代肝細胞と比較すると若干異なる変化も認められたが, 肝細胞の特徴を有する細胞への分化誘導にある程度は成功しているものと考えられた。しかしながら, 薬物代謝酵素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。

3-2-2) 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過程における遺伝子発現プロファイルを解析した。用いた 3 種類の iPS 細胞株は, いずれも未分化状態から分化状態に移行しており, さらに, iPS#25 及び, iPS#51 細胞は肝細胞分化誘導に成功していると考えられた。しかしながら, 肝幹細胞マーカー AFP の発現が分化最終段階でも低下しないことから, 成熟度は十分ではないことが考えられた。今後, 肝幹細胞から肝細胞への成熟度をさらに進めるための工夫が必要である

が, DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により, iPS 細胞から成熟肝細胞への分化過程の

3-2-3) iPS細胞 253G1 株及びDotcom株の肝細胞への分化とCYP及びUGTの発現解析

253G1 及び Dotcom 細胞株を用いて, ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞において初めて網羅的に UGT mRNA の発現解析を行った。また, 3-MC により CYP1A1 及び CYP1B1, 並びに UGT1A1 mRNA 発現が誘導されたことから, 生体肝の特性である薬物代謝酵素誘導能を有していることを確認した。さらにヒト iPS 細胞株間で成熟度が異なり, UGT mRNA 発現に影響を与えていることが示唆された。ヒト iPS 細胞由来肝細胞を利用した新規肝毒性スクリーニング法の構築のためには, 分化誘導による成熟度を高めること, 並びに細胞株間での成熟度の差異を解消する必要があると考えられる。

3-2-5) ヒトiPS細胞を用いた胎児毒性試験系の検討

ヒト iPS 細胞及を用いた細胞毒性評価は可能であることが判明した。今後は, ヒト iPS 細胞の分化に対する作用の検討が必要と考えられる。また, 催奇形性予測試験として活用されているマウス ES 細胞株を用いた Embryonic Stem Cell Test との対比によりその有用性を明らかにすることが必要である。

(4) 遺伝的要因に基づく副作用予測法

(4-1) 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

確立した個々の遺伝子多型迅速検出法と, 市販の全ゲノム網羅的解析プラットフォームとの相関について, 日本人データベースを用いて検討する必要があると考えられる。また, 今後とも, 症例(発症例・コントロール例)集積を目的とする共同研究を継続し, コントロール例の集積手順を最終決定し, サンプル収集を更に進める予定である。

(4-2) 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

今回の約 100 例の薬物性肝障害症例の前向き集積結果は, 我々が以前に行った, 1997 年から 2006 年の 1676 例の後ろ向き集積結果とほぼ同様の結果であり, 最近の傾向は一定していると考えられた。また, LPS による胆汁うっ滞では, Bsep の毛細胆管膜での発現低下が知られており, TC の胆汁中排泄の低下はこれに基づくものと考えられる。4PB は Bsep の毛細胆管膜での発現増加により, LPS により低下した TC の胆汁中排泄を増加させたと推定される。

(4-3) 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

今回、高尿酸血症治療薬アロプリノールによる重症薬疹発症に関連する *HLA-B*58:01* のサロゲートマーカーとなりうる SNPs について2つの手法、PCR-PFLP 法と BIST 法によるタイピング系を開発した。両手法とも HLA のタイピングと比較して、簡便かつ迅速に行うことが可能であり、日本人におけるアロプリノール誘因性 SJS/TEN 発症の回避に有用な方法の一つと考える。

E. 結論

医薬品のアレルギー性を検出するための試験法として、THP-1 細胞を用いた h-CLAT およびその改良法の有用性を明らかにした。カルバマゼピンの反応性代謝物に由来すると考えられる 14 種類のグルタチオン抱合体のうち、M5/M6 の生成には、GSTM1, P1 の関与が示唆された。Gstm1, t1, t1/ml ノックアウトマウスの胆汁成分の比較の結果、いずれの系統でも減少する成分、m1 選択的、t1 選択的に減少するピークが認められ、マウス胆汁中に Gst のバイオマーカーとして利用可能な代謝物が含まれることが明らかとなった。ヒト iPS 細胞の肝細胞への効率的分化法を開発し、分化状態や肝細胞特性の評価系を開発した。また、胎児毒性評価系としての検討を行い、催奇形性予測の可能性が示唆された。薬物性肝障害および筋障害の遺伝的要因による発症を解析するための症例収集システムを構築し、現在、順調に症例集積が進んでいる。また、遺伝的要因に基づく副作用の予測系として、筋障害（横紋筋融解症）・重症薬疹に関連する遺伝子多型について迅速タイピング系を開発した。また、薬物性肝障害に関しては症例をさらに集積し、わが国の現況を明らかにするとともに、このデータを用いて、注意喚起をしたい。また、ラットを用いた実験により、4PB は肝内胆汁うっ滞に有効と考えられた。以上、副作用を予測するための評価系を開発し、医薬品開発過程を迅速・効率化するための技術基盤確立に向けた研究を推進した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurose K, Sugiyama E, Saito Y. Population differences in major functional: polymorphisms of pharmacokinetics /pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans: Implications in the clinical trials for novel drug development. *Drug Metab Pharmacokinet.* 27, 9-54 (2012).
- 2) Maekawa K, Hamaguchi T, Saito Y, Tatewaki N, Kurose

K, Kaniwa N, Eguchi Nakajima T, Kato K, Yamada Y, Shimada Y, Yoshida T, Kamatani N, Ura T, Saito M, Muro K, Fuse N, Yoshino T, Doi T, Otsu A, Saijo N, Sawada J, Okuda H, Matsumura Y: Genetic variation and haplotype structures of the glutathione S-transferase genes GSTA1 and GSTA2 in Japanese colorectal cancer patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011, 26(6):646-658.

- 3) Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M and Saito Y: Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet.* in press.
- 4) 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の自動化に対応する全自動遺伝子解析装置の開発, *Medical Science Digest Vol 38 (1), 644-648, 2012.*
- 5) Hanioka N, Matsumoto K, Saito Y, Narimatsu S. Influence of CYP2C8*13 and CYP2C8*14 alleles on amiodarone N-deethylation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011;108(5):359-362.
- 6) Narimatsu S, Nakata T, Shimizudania T, Nagaoka K, Nakura H, Masuda K, Katsu T., Koeda A, Naito S, Yamano S, Miyata A, Hanioka N. Regio- and stereoselective oxidation of propranolol enantiomers by human CYP2D6, cynomolgus monkey CYP2D17 and marmoset CYP2D19. *Chem Biol Interact* 2011;189(3):146-152.
- 7) Hanioka N, Oka H, Nagaoka K, Ikushiro S, Narimatsu S. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation. *Arch Toxicol* 2011;85(11):1373-1381.
- 8) Narimatsu S, Nakanishi R, Hanioka N, Saito K, Kataoka H. Characterization of inhibitory effects of perfluorooctane sulfonate on human hepatic cytochrome P450 isoenzymes: focusing on CYP2A6. *Chem Biol Interact* 2011;194(2-3): 120-126.
- 9) Hanioka N, Iwabu H, Hanafusa H, Nakada S, Narimatsu S. Expression and inducibility of UDP-glucuronosyltransferase 1As in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110(3):253-258.
- 10) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ. Genetic variation at the SLCO1B1 gene locus and low density lipoprotein cholesterol lowering response to

- pravastatin in the elderly. *Atherosclerosis* 2012;220:413-417.
- 11) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ. KIF6, LPA, TAS2R50, and VAMP8 genetic variation, low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin, and heart disease risk reduction in the elderly. *Atherosclerosis* 2012;220:455-462.
- 12) Kawai Y, Sato-Ishida R, Motoyama A, Kajinami K. Place of pitavastatin in the statin armamentarium: promising evidence for a role in diabetes mellitus. *Drug Des Devel Ther* 2011;5:283-297.
- 13) Kajinami K, Akao H. Probucol: Can we step forward in atherosclerosis prevention with an old drug? *Atherosclerosis* 2012;221:34-35.
- 14) Tanaka A, Ohira H, Kikuchi K, Nezu S, Shibuya A, Bianchi I, Podda M, Invernizzi P, Takikawa H. Genetic association of Fc receptor-like 3 polymorphisms with susceptibility to primary biliary cirrhosis: ethnic comparative study in Japanese and Italian patients. *Tissue Antigens* 77, 239-243, 2011
- 15) Miura R, Tanaka A, Takikawa H. Urinary bile acid sulfate levels in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 41, 358-363, 2011
- 16) Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, Hunt CM, Wilke RA, Avigan M, Kaplowitz N, Bjornsson E, Daly AK. Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther* 89, 806-815, 2011
- 17) Fukami M, Tanaka A, Takikawa H. Effect of penicillin G on the biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18, 684-688, 2011
- 18) Tanaka A, Invernizzi P, Ohira H, Kikuchi K, Nezu S, Kosoy R, Seldin MF, Gershwin ME, Takikawa H. Replicated association of 17q12-21 with susceptibility of primary biliary cirrhosis in a Japanese cohort. *Tissue Antigens* 78, 65-68, 2011
- 19) Tanaka A, Harada K, Ebinuma H, Komori A, Yokokawa J, Yoshizawa K, Abe M, Miyake Y, Kikuchi K, Ohira H, Zeniya M, Yamamoto K, Ishibashi H, Onji M, Nakanuma Y, Tsubouchi H, Takikawa H. Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: a rationale for corticosteroids use based on a nation-wide retrospective study in Japan. *Hepatol Res* 41, 877-886, 2011
- 20) Mitamura K, Hori N, Iida T, Suzuki M, Shimizu T, Nittono H, Takaori K, Takikawa H, Hofmann AF, Ikegawa S. Identification of S-acyl glutathione conjugates of bile acids in human bile by means of LC/ESI-MS. *Steroids* 76, 1609-1614, 2011
- 21) Hayashi H, Mizuno T, Horikawa R, Nagasaka H, Yabuki T, Takikawa H, Sugiyama Y. 4-Phenylbutyrate modulates ubiquitination of hepatocellular MRP2 and reduces serum total bilirubin concentration. *J Hepatol* in press
- 22) Okada R, Maeda K, Nishiyama T, Aoyama S, Tozuka Z, Hiratsuka A, Ikeda T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Involvement of different human glutathione transferase isoforms in the glutathione conjugation of reactive metabolites of troglitazone. *Drug Metab Dispos* 39(12):2290-7, 2011
- ## 2. 学会発表
- 1) 前川京子, 齋藤嘉朗, 西川 潤, 松木 淳, 石川 卓, 矢島和人, 小杉伸一, 神田達夫, 畠山勝義: 消化管間質腫瘍患者のイマチニブ治療による副作用発現と薬物動態関連分子の遺伝子多型との関連, 第 32 回日本臨床薬理学会 2011 年 12 月
- 2) 宮下雪子, 上田哲也, 田島秀二, 小泉朋子, 杉山永見子, 鹿庭なほ子, 齋藤嘉朗, 黒瀬項光一, BIST 法を用いたアロプリノール誘因性重症薬疹関連多型の迅速診断法の開発, 日本薬学会 第 132 年会, 2012. 3
- 3) C. Hilliker, Y. Miyashita, T. Sugimoto, O. Segawa, T. Ueda and H. Tajima, "geneLEAD XII: Fully-automated Sample to Answer Real Time PCR system from Precision System Science", SLAS 2012
- 4) T. Ueda, Fully-automated sample to answer system for NAT 'geneLEAD and geneTYPiST, Biotechnica 2011, Hannover, Germany
- 5) C. Hilliker, T. Sugimoto, S. Yoda, S. Okazaki, Y. Miyashita, O. Segawa, T. Ueda, K. Obata and H. Tajima, geneLEAD and geneTYPiST: Two new fully automated sample to answer systems, LabAutomation 2011
- 6) 黒瀬項光一, 宇梶真帆, 杉山永見子, 小泉朋子, 打田光宏, 土屋敏行, 関口和孝, 水垂 亨, 山口嘉隆, 齋藤嘉朗, インビトロ皮膚感作性試験 h-CLAT の適用拡大に関する検討, 日本薬学会第 132 年会(2012. 3) (札幌)
- 7) 打田光宏, 土屋敏行, 関口和孝, 水垂 亨, 山口嘉隆, 宇梶真帆, 杉山永見子, 小泉朋子, 齋藤嘉朗, 黒瀬項光一, インビトロ皮膚感作性試験 h-CLAT の全身投与用医薬品のアレルゲン性評価, 日本薬学会第 132 年会 (2012. 3)
- 8) 花房弘之, 埴岡伸光, 松永民秀, 成松鎮雄: ヒト iPS 細胞由来分化肝細胞の CYP 及び UGT mRNA の

- 発現解析. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会, 広島, 2011 年 5 月.
- 9) 伊豆野祥太郎, 埴岡伸光, 江尻洋子, 細田雅也, 内藤真策, 成松鎮雄: マイクロ空間プレートを用いた 3 次元培養 HepG2 細胞における UGT 発現解析. 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会, 広島, (2011. 5)
- 10) 花房弘之, 松永民秀, 黒瀬光一, 斎藤嘉朗, 埴岡伸光, 成松鎮雄: Expression of CYP and UGT mRNAs in human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. 日本薬物動態学会第 26 回年会, 広島, (2011. 11).
- 11) 長岡憲次郎, 埴岡伸光, 生城真一, 山野茂, 成松鎮雄: How does *N*-glycosylation affect the enzymatic functions of UGT2B7?. 日本薬物動態学会第 26 回年会, (2011. 11).
- 12) D. Sato, N. Harimoto, C. Matsumura, T. Matsunaga: Examination of simple prediction system of the differentiation characteristics into hepatocyte between human induced pluripotent stem cell lines. 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2011 年 12 月.
- 13) Y. Kondo, S. Yoshihashi, K. Mimori, R. Sugiyama, T. Iwao, K. Kurose, T. Matsunaga: Effect of Small Molecule on Differentiation into Hepatocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. 第 34 回日本分子生物学会年会, (2011. 12).
- 14) D. Sato, N. Harimoto, C. Matsumura, K. Kurose, T. Matsunaga: Differentiation characteristics of human induced pluripotent stem cells are prescribed at early stage. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima, November 2011.
- 15) Y. Kondo, T. Iwao, M. Saito, T. Niwa, K. Kurose, K. Nagata, T. Matsunaga: Effect of quercetin on differentiation into hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting in Hiroshima, November 2011.
- 16) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ. , Genetic variation at the SLCO1B1 gene locus and low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin in the elderly. , American Heart Association, Scientific Meeting. Nov 13, 2011 (Orlando)
- 17) Akao H, Polisecki E, Kajinami K, Trompet S, Robertson M, Ford I, Jukema JW, De Craen AJM, Westendorp RDJ, Shepherd J, Packard C, Buckley BM, Schaefer EJ., KIF6, LPA, TAS2R50, and VAMP8 genetic variation, low density lipoprotein cholesterol lowering response to pravastatin, and heart disease risk reduction in the elderly., American Heart Association, Scientific Meeting. Nov 13, 2011 (Orlando)
- 18) Kajinami K, Maeda K, Ieiri I, Fukizawa S, Yamane N, Masauji T, Sugiyama Y., Genetic polymorphisms of transporters affecting atorvastatin pharmacokinetics in Japanese patients with hyperlipidemia. 日本薬物動態学会第 26 回年会(2011. 11).
- 19) 滝川 一, ランチョンセミナー: 薬物性肝障害 Up to date, 第 47 回日本肝臓学会総会 (2011. 6. 2, 東京)
- 20) 相磯光彦, 田中 篤, 滝川 一, ワークショップ: 薬物性肝障害 revised. 国内 11 施設による薬物性肝障害症例の前向き症例集積. 第 47 回日本肝臓学会総会 (2011. 6.)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

免疫調整作用に基づく医薬品探索とその安全性評価技術の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部
研究代表者 手島 玲子
研究期間 平成 21 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨 食品素材等から骨免疫、粘膜免疫、神経免疫系に有効な成分の探索と評価技術開発を行った。プロポリスの破骨細胞分化抑制作用、プロシアニジンの培養樹状細胞と培養腸管上皮細胞の機能抑制、神経変性疾患予防のための評価法が見いだされた。

研究分担者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 榎山浩
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 近藤一成
- (3) 千葉大学大学院薬学研究院 戸井田敏彦
- (4) 東京大学大学院農学研究科 戸塚護
- (5) 愛知学院大学薬学部 中西守
- (6) アサヒグループホールディングス株式会社
舛田晋
- (7) カゴメ株式会社総合研究所 相澤宏一
- (8) アピ株式会社長良センター 市原賢二
- (9) 三栄源エフ・エフ・アイ 中川誠

A. 研究目的

近年、社会構造の高度化に伴い、食生活の欧米化が関連していると思われる、食物アレルギーや炎症性腸疾患等の粘膜免疫異常疾病、過剰ストレスから起こる多発性硬化症、パーキンソン関連疾患、アルツハイマー等の神経免疫疾患、関節リュウマチや骨粗鬆症等の骨免疫異常疾病等の現代社会に特徴的な疾病が増加傾向にあり、社会問題になりつつある。これら疾病の発症原因は、粘膜免疫系、神経免疫系、骨免疫系が複雑に関連している。本研究はそれらの疾病を予防・治療する医薬品の開発をめざし食品素材等から有用な成分の探索を行うこと、及び有効成分の安全性評価技術の開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

①プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究では、アピ株式会社にて調製した中国及びブラジル産グリーン及び赤プロポリス抽出物及びその精製物を用いて、RBL-2H3 細胞を用いる抗アレルギー活性並びにマウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の分化への影響を検討し、RANKL を投与した骨粗鬆症モデルマウスへのプロポリス抽出

物の混餌投与も行った。②粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立では、アサヒビール株式会社にて調製されたリンゴ縮合型タンニン (ACT)、三栄源より供与されたカラギナン、多糖類の酵母細胞壁由来グルコマンナン(YGM)等及びジペプチドであるカルノシンを用いて、樹状細胞へ分化させたヒト単球系細胞 (THP-1) 及びマウス小腸由来腸管上皮細胞株 MoS13 への影響評価を CD86 の発現等を指標に評価した。さらに、食品由来の多糖類として、コンドロイチン硫酸、納豆由来レバンについても腸管免疫系への影響を検討した。また、天然由来ウロン酸含有多糖類に含まれるウロン酸の分離定量法を新たに開発した。③神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析においては、ラット副腎髄質由来 PC12 細胞を用いて神経保護作用の検討を行い、また新たにヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いた神経変性疾患 (パーキンソン病) の凝集体形成の *in vitro* モデル系の構築、並びに PC12 細胞に EGFP-Htt-Q60~150 (ハンチンチン変異型、Q リピート数 60~150) を発現させたハンチントン病の *in vitro* モデル系を構築し、凝集体の分解を促進する物質の探索を行った。

(官民共同研究)

本研究班の構成は、レギュラトリーサイエンスとしての食品、医薬品にかかる問題をよく知る国立研究機関の研究者 (手島、榎山、近藤) と、品質が高い食品素材の供給ができる食品関連企業の研究者 (舛田、相澤、市原、中川) と、先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者 (戸井田、戸塚、中西) からなり、共同研究の形で効率的な研究の遂行をめざした。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会規定に従って行った。

C. 研究結果

[1] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

最も強い脱顆粒抑制活性を示した中国産プロポリスのエタノール抽出物中より活性成分としてクリシン、ガランギン、ケンフェロール、3-O-メチルケンフェロールの4種のフラボノイドを単離した。これらはフラボノール（またはフラボン）骨格のA環全体およびC環4位のカルボニル基、2-3位の二重結合など共通の構造上の特徴を有しており、この部分が活性の発現に重要であることが示唆された。ブラジル産プロポリス試料中にはこれらは全くあるいはほとんど検出されず、プロポリス抽出物に見られる脱顆粒抑制作用の強弱はこうした成分組成の違いを反映したものと考えられた。

一方ブラジル産赤プロポリスは、内陸部で採取されるグリーンプロポリスとは異なり、ブラジル北東部のアラゴアス州を中心とした沿岸地域で採取される。赤プロポリス抽出液には、HPLC分析によりフラボノイド類とそれより疎水性の高い物質群が確認され、脱顆粒抑制活性はこのうちフラボノイド画分に見られた。ここから主要な活性物質として、メディカルピンおよび7-O-メチルベスチロールを単離した。これらの基本骨格はプテロカルパンおよびイソフラバンであり、マメ科植物に特有のファイトアレキシンあるいは抗菌物質として知られるものであった。また、骨芽細胞に関しては、プロポリスのエタノール抽出液、ドルパニンおよびバッカリンによる分化促進が観察され、分化促進時には分化マーカー遺伝子の発現が増大することを確認した。また、骨芽細胞分化に重要なBMPシグナル経路だけでなく、発生時に重要な役割を果たすことが知られているWntシグナル経路の因子の発現も変化するという興味深い結果が得られた。一方、エタノール抽出物、水抽出物、及び精製成分であるp-クマル酸、カフェ酸、クロロゲン酸、カフェ酸フェネチルエステルが破骨細胞分化抑制作用を有することも示した。

また、RANKL投与による骨粗鬆症モデル系を用い、プロポリス含有混餌（1%、3%）を4週間自由摂取させた後にRANKL投与を行ったところ、骨密度低下が抑制された。この時血中骨吸収マーカーであるCTX-I（I型コラーゲン架橋C-テロペプチド分解物）の濃度上昇も抑制されたことから、破骨細胞の機能である骨吸収が実際に低下したことが明らかとなった。またRANKL投与により骨密度を低下させた後にプロポリス含有混餌（1%、2%）を4週間自由摂取させたところ、骨密度の回復が促進されることが示された。

[II] 粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

ACTを用いた研究で、6量体画分がヒト樹状細胞への最も強いアポトーシス活性を有しており、マウス小腸上皮細胞株へは、5量体以上で、TLRのリガンド（フラジェリン）刺激で誘導されるIL-6産生を増強した。

また、多糖体の免疫影響に関する研究では、酵母細胞壁由来グルコマンナン（YGM）とそばアレルゲン（Fag e 1）の複合体のそばアレルギーマウスへの投与実験において、下痢症状の改善や血清中のIgE量の低下といった顕著なアレルギー症状の改善効果が見られた。また、コンドロイチン硫酸が免疫担当細胞膜上のL-セレクチンに結合することによりTh1/Th2バランスをTh1優位に誘導することを見出した。またコンドロイチン硫酸に含まれる硫酸化に関しても、E構造（N-アセチルガラクトサミンの4位、6位が同時に硫酸化されている構造）が高い結合能とサイトカイン産生誘導能を示すことを明らかにした。さらに、納豆由来のレバンを用いてマクロファージ細胞株からのTNF- α 産生量を測定したところ、TNF- α 産生量の顕著な増加が認められた。また分子量455 kDaのレバンを用いて表面プラズモン共鳴

（SPR）法を用いてToll like receptor（TLR）4との相互作用解析を行った結果、レバンはTLR4に対して高い結合親和性を持つことが確認された。

その他、天然由来ウロン酸含有多糖類に含まれるウロン酸（酸性糖）の蛍光ポストカラムHPLC法を用いる分離定量法を新たに開発し、天然物由来ウロン酸含有多糖類、すなわち植物由来ペクチン、海藻由来アルギン酸、動物由来グリコサミノグリカンに含まれるウロン酸の分析に応用し、確立した方法が再現性の高い、高感度定量法であることが明らかになった。

[III] 神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

ロイヤルゼリー由来の中鎖脂肪酸2種が神経分化促進作用を有することが分かった。また、6ハイドロキシドーパミンによる細胞死に対する抑制効果は、ケルセチンのみ認められた。神経変性疾患に対する評価系として、EGFP- α -Syn（シヌクレイン）を過剰発現させたEG SH-SY5Y細胞とRRK2（ロイシンリッチリピートキナーゼ）の共存下で一部の細胞に凝集体が確認された。また、EGFP-Htt-Q60~150（ハンチンチン変異型、Qリピート数60-150）をPC12細胞内に発現させて、凝集体を形成させることに成功し、凝集体の分解促進を指標に、抑制的に働く分子（compound 13）を見出した。今後、この分子の抑制効果の再確認

を行い、さらに毒性の低い分子の探索を行うことにより、低分子化合物でこれら疾患を予防する可能性が示唆された。

D. 考察

[I] プロポリスの骨免疫系を含む免疫影響に関する研究

各種のプロポリスより、抗アレルギー物質としてこれまでに6種類の物質を単離同定した。またブラジル産プロポリスの成分ライブラリーより、骨芽細胞分化促進作用を有する物質として、バツカリンおよびドルパニンが見出された。各物質の作用機序および動物試験についてはとも検討が行われ、概ね当初計画通りの成果が得られた。

[II] 粘膜免疫調整作用に基づく医薬品の探索と評価法の確立

タンニンとして ACT を用いて、ヒト樹状細胞、マウス小腸上皮細胞への影響評価が行われ、食品由来の多糖体として、グルコマンナン、コンドロイチン類等を用いて、免疫細胞からのサイトカイン等の産生を指標とした影響評価手法を確立した。食品素材に含まれる糖鎖の免疫系への作用について初期の目標を達成できた。また、ウロン酸の定量測定系も確立することができた。

[III] 神経調整作用に基づく食品素材成分の評価と解析

ケルセチンの6ハイドロキシドーパミンによる神経細胞死抑制効果を見出し初期の目的を達した。シヌクレインやハンチンチン変異型など凝集体形成を原因とする神経変性疾患の *in vitro* モデル系を構築し、凝集タンパクが原因で起こる神経細胞死を抑制する成分を見出すことを可能とした。

なお、上記で得られた成果の国際的位置づけとしては、プロポリスから同定した抗アレルギー物質はいずれも既知物質であったが、プロポリス成分としては初の知見であり、論文発表を行った。また、プロポリスの中に、骨代謝を改善する有用な成分が含まれることが明らかとなったことは、新規の報告であり、意義が大きいと考えられる。また、食品素材に含まれる糖鎖が種々の免疫作用を有していること、またその評価系を確立できたことは、今後これらの多糖類を用いる際の安全性及び有効性評価において有用な情報が得られたものと思われる。神経調整作用では、凝集体形成による神経変性疾患の *in vitro* モデル系を用いて根本的治療薬のない神経難病の治療や予防に役立つものと思われる。

E. 結論

食品素材等から骨免疫、粘膜免疫、神経免疫系に有効な成分の探索と評価技術開発を行った。骨芽細胞分化促進及び破骨細胞分化抑制を促すもの、培養樹状細胞と培養腸管上皮細胞の機能に影響を及ぼすもの、培養神経細胞の保護作用を有するもの等が見いだされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Nakamura, R. Adachi, S. Ohta, K. Ichihara, S. Mishima, R. Teshima: Effect of propolis components in propolis on differentiation of osteoblastic cell, submitted
- 2) Furuno, T., Nakanishi, M.: Analysis of neuro-immune interactions by an *in vitro* co-culture approach. In "Neuropeptide: Methods and Protocol" (Ed. Walker, J.) in "Methods in Molecular Biology" vol 789, Springer, p171-180 (2011).
- 3) Hagiya M., Furuno T., Hosokawa Y., Lino T., Ito T., Inoue T., Nakanishi M., Murakami Y., Ito A.: Enhanced nerve-mast cell interaction by a neuronal short isoform of adhesion molecule-1, CADM1. *J. Immunol.*, 186, 5983-5992 (2011)
- 4) Inoh Y., Furuno T., Hirashima N., Kitamoto D., Nakanishi M.: Rapid delivery of small interfering RNA by biosurfactant MEL-A-containing liposomes. *Biochem. Bio-phys. Res. Commun.* 414, 635-640 (2011)
- 5) T. Iwamoto, K. Yamada, M. Shimizu, and M. Totsuka, Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(5), 925-929 (2011)
- 6) Jin M, Iwamoto T, Yamada K, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M: Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(7), 1283-1289 (2011)
- 7) Masuko S., Higashi K., Wang Z., Bhaskar U., A. M., Zhang F., Toida T., Dordick J. S., Linhardt R. J., "Ozonolysis of the double bond of the unsaturated uronate residue in low-molecular-weight heparin and K5 heparosan.", *Carbohydr. Res.*, 346(13):1962-1966 (2011).
- 8) Higashi K., Ly M., Wang Z., Masuko S., Bhaskar U., Sterner E., Zhang F., Toida T., Dordick J. S., Linhardt R. J., "Controlled Photochemical Depolymerization of K5 Heparosan, a Bioengineered Heparin Precursor.", *Carbohydr. Polym.*, 86(3):1365-1370 (2011).
- 9) Higashi K., Hosoyama S., Ohno A., Masuko S., Yang B., Sterner E., Wang Z., Linhardt R. J., Toida T.: "Photochemical Preparation of a Novel Low Molecular Weight Heparin." *Carbohydr Polym.* 87(2):1737-1743 (2012).
- 10) Kondo K, Obitsu S, Teshima R.: α -Synuclein

- Aggregation and Transmission Are Enhanced by Leucine-Rich Repeat Kinase 2 in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Biol. Pharma. Bull.*, 34, 1078 (2011).
- 11) 近藤一成, アポトーシスの分析法、*ぶんせき* 423, 139 (2010).
 - 12) Kondo K, Obitsu S, Ohta S, Matsunami, K, Otsuka H, Teshima R.: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1-independent apoptosis-inducing factor (AIF) release and cell death are induced by eleostearic acid and blocked by alpha-tocopherol and MEK inhibition. *J. Biol. Chem.*, 285, 13079 (2010).
 - 13) Nakamura R., Nakamura R., Watanabe K., Oka K., Ohta S., Mishima S., Teshima R.; Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis; *Int. Immunopharmacol.*, 10, 1107-1112 (2010).
 - 14) Sato Y., Akiyama H., Matsuoka H., Sakata K., Nakamura R., Ishikawa S., Inakuma T., Totsuka M., Sugita-Konishi Y., Ebisawa M., Teshima R., Dietary carotenoids inhibit oral sensitization and the development of food allergy, *J Agric Food Chem.*, 58, 7180 (2010)
 - 15) Suzuki S., Kassai S, Hirose T., Katayama S., Nakamura K., Akiyama H., Teshima R., Nakamura S. Modulation of immunoresponse in BALB/c mice by oral administration of Fag e 1-glucomannan conjugate. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9787 (2009)
 - 16) Ly M., Leach F.E. 3rd, Laremore T.N., Toida T., Amster I.J., Linhardt R.J.: The proteoglycan bikunin has a defined sequence. *Nat. Chem. Biol.*, 7, :827 (2011).
 - 17) 安達玲子、中村厚: *in vitro* における骨代謝系細胞の分化・機能解析法、*ぶんせき* 11、591-595 (2010)
- ## 2. 学会発表
- 1) 小櫃冴未, 近藤一成, 手島玲子: PARP-1 やカスパーゼを經由しないエレオステアリン酸刺激による細胞死における AIF の解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (2010, 12)
 - 2) 近藤一成, 小櫃冴未, 太田小夜香, 手島玲子: 培養神経細胞を用いた HDAC 阻害剤によるエレオステアリン酸刺激による細胞死の抑制効果と解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学大会合同大会 (2010, 12)
 - 3) 小櫃冴未, 近藤一成, 手島玲子 Eleostearic acid induces necroptosis via Erk1/2 and Ripk1, which is blocked by U0126, necrostatin-1, and Ripk1 knockdown 第 33 回日本分子生物学会年会 (2011, 12)
 - 4) 安達玲子、中村厚、太田象三、市原賢二、手島玲子: プロポリスの破骨細胞分化及び骨密度低下に対する抑制効果、日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
 - 5) 中村里香、中村亮介、渡邊佳代子、三島敏、手島玲子: プロポリスの抗アレルギー作用、第 82 回 日本生化学大会 (2009, 10)
 - 6) 中村厚、安達玲子、太田象三、市原賢二、三島敏、手島玲子: プロポリスは骨芽細胞分化を促進する、第 83 回日本生化学大会 (2010, 12)
 - 7) Kondo K. Obitsu S., Teshima R.: ERK1/2 is a critical for PARP-1-independent neuronal cell death.: Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Canada, 2010.3)
 - 8) 中村里香、中村亮介、渡邊佳代子、三島敏、手島玲子: プロポリスの抗アレルギー作用、第 2 回先端創薬医療シンポジウム (2009.12)
 - 9) 松岡英樹、中村厚、安達玲子、穂山浩、太田象三、市原賢二、手島玲子: プロポリス抽出物摂取による免疫系への影響について、日本薬学会第 131 年会 (2011.3)
 - 10) 石川えり、片山茂、穂山浩、手島玲子、中村宗一郎、マンナン多糖修飾 ovalbumin の抗原提示能抑制効果、日本農芸化学会 2011 年度大会 (2011.3)
 - 11) 石川えり、片山茂、穂山浩、手島玲子、中村宗一郎、酵母細胞壁由来グルコマンナン修飾はソバ主要アレルゲン Fag e 1 の抗原提示を抑制する、日本農芸化学中部支部例会、(2010,10)
 - 12) Yamauchi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Katayama, S., Nakamura, S., Attenuated allergenic symptoms by novel phenolic compounds prepared by enzymatic glycosylation with rutinase, *Pacificchem 2010* (2010,12)
 - 13) Kukita, T., Akiyama, H., Teshima, R., Katayama, S., Nakamura, S., Immuno-modulatory effect of yeast glucomannan on pollen allergy, *Pacificchem 2010* (2010,12)
 - 14) Nakamura, S., Suzuki, Y., Kassai, K., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Katayama, S. Immunomodulatory effect of a hypoallergenic buckwheat Fag e 1 prepared by Maillard-type glycosylation with yeast glucomannan, *Pacificchem 2010* (2010,12)
 - 15) 古野忠秀、柴田麻希、寫田有希、伊納義和、中西 守 「神経刺激に伴うマスト細胞の脱顆粒に及ぼすプロポリスの影響」日本薬学会第 131 年会. (2011, 3)
 - 16) 津田悠一、岩本 拓、戸塚 護、清水 誠: マウス腸管上皮細胞の Toll 様受容体リガンド刺激で誘導されるサイトカイン産生に対する食品因子の増強作用. 第 6 回日本食品免疫学会学術大会 (JAFI2010) (2010,6)
 - 17) 近藤一成, 小櫃冴未, 手島玲子: エレオステアリン酸が誘導するネクロプトーシス第 84 回日本生化学大会合同大会 (2011, 9)
 - 18) 近藤一成, 小櫃冴未, 手島玲子: エレオステアリン酸による RIP1 を介したネクロプトーシス, 日本薬学会第 132 回年会 (2012.3)
 - 19) 久木田卓弥, 片山茂, 石川えり, 中島翔平, 舛田晋, 神田智正, 穂山浩, 手島玲子, 中村宗一郎: 樹状細胞様 THP-1 細胞を用いた抗原提示能抑制物質の探索, 第 4 回食品薬学シンポジウム (2011,10)
 - 20) 久木田卓弥, 片山茂, 中島翔平, 舛田晋, 神田智正, 穂山浩, 手島玲子, 中村宗一郎: リンゴ由来プロシアニジンの抗原提示抑制効果, 日本農芸化学大会, 2012 年 3 月 23 日 (京都)
 - 21) 古野忠秀、榊原ゆかり、伊納義和、中西 守: マスト細胞の活性化に及ぼすケフィランの影響、日本薬学会第 131 年会(2012, 3)
- ## 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む) 特になし