

	個々の細胞	クラスター
分化細胞の凍結	○可能	×不可 (再形成させる必要)
特別な機器購入	○不要 (オートパッチ)	×必要 (細胞外電位測定など)
バラつき	△各サブタイプが存在する	○クラスターの作成によりバラつきが小さくなる可能性

表1 個々の細胞 とクラスターの比較

医薬品	有害作用報告件数	TdPの発生件数	致死的TdPの件数
ソタロール	2758	130	1
シサプリド	6489	97	6
アミオダロン	13725	47	1
エリスロマイシン	24776	44	2
イブチリド	173	43	1
テルフェナジン	10047	41	1
キニジン	7353	33	2
クラリスロマイシン	17448	33	0
ハロペリドール	15431	21	6
フロキセチン	70929	20	1

表2 有害作用に含まれるTdPの割合

1983年から99年までの間にTdPの発生件数の多かった薬剤トップ10
(Yap, Y.G. and Camm, A.J. (2003). *Heart* 89: 1363-1372.より改変)

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」
平成 23 年度分担研究報告

ーヒト由来幹細胞の肝実質細胞分化に関する調査研究ー

研究分担者:石田 誠一 (国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第三室長)

研究要旨:

iPS 細胞が開発され、胚性幹細胞とほぼ同等のヒト幹細胞の入手と研究が格段と容易になり、iPS 細胞を出発材料とする肝細胞の分化誘導研究が加速された。本研究では、この iPS 細胞に由来する肝細胞の研究開発を取り巻く現状を調査し、品質管理に関する懸念、分化誘導肝細胞を用いるリスクとベネフィット、細胞の評価指標としてゲノム DNA のメチル化の可能性について情報を収集した。

キーワード:ヒト iPS 細胞由来肝細胞 薬物代謝 ヒト特異的有害反応 リスクとベネフィット

A. 研究目的

肝臓は局所に投薬された薬剤を除き、体内に取り込まれた薬物を代謝・排泄する主要器官である。また、これまで多くの薬物で、薬物原体でなく肝臓において代謝を受けた化合物が、その他の臓器、例えばコアバッテリー、において有害事象を引き起こす事例も報告されている。そのため、創薬のプロセスにおいて、肝臓におけるヒト特異的な有害反応の評価と薬物の代謝産物を同定することは重要である。肝臓における代謝には種差が知られているため、モデル動物における評価には限界があり、ヒト初代培養肝細胞が多用されてきた。しかしながら、初代培養細胞には個人差が存在することや、研究倫理の問題により本邦ではその供給のほとんどが海外に依存しているため供給に不安があることなどから代替する細胞が求められてきた。従来、胚性並びに体性の幹細胞から肝細胞を誘導する試みは多くなされてきているが

(Stem Cells. 2009 Mar;27(3):577-605)、平成 20 年に山中らによりヒト iPS 細胞が開発され、胚性幹細胞とほぼ同等のヒト幹細胞の入手が格段と容易になり、iPS 細胞を出発材料とする肝細胞の分化誘導研究が加速された。本研究では、この iPS 細胞に由来する肝細胞の研究開発を取り巻く現状を調査し、その展望と課題を明確化することを試みた。

B. 研究方法

既存の安全性薬理試験法との比較検討

本年度は安全性薬理試験に用いられる素材である iPS 細胞由来肝細胞の産業開発の状況を web 上での検索により調査した。

それと合わせ、先端医療開発特区(スーパー特区)への参加を通じ情報収集を行った。また、第一回レギュラトリーサイエンス学術大会にてシンポジウムを企画し、そこでの討論を通じて広く情報を得た。更に、

韓国国立保健院を訪問した際、韓国での幹細胞研究に関して意見交換を行った。

肝臓細胞の分化レベルマーカーの検討と機能解析法の提示

肝臓細胞の分化度の評価指標となるマーカーの候補を探索する目的で、文献調査を行った。

C. 研究結果

既存の安全性薬理試験法との比較検討

iPS 細胞由来肝細胞の産業開発の状況を web 上での検索により調査した。その結果、平成 24 年 3 月において、iPS 細胞より分化誘導された肝細胞の市場への供給は、米国の Cellular Dynamics International (CDI) 社と本邦の株式会社リプロセルがそれぞれ平成 24 年前半をメドに準備を進めていた。CDI 社の詳細は未定であった。リプロセル社は凍結バイアルでの提供を予定している。iPS 細胞はリプロセル社で樹立したものを扱い、次に述べる大阪大学 水口らの方法に準拠し肝細胞へと分化誘導している。分化誘導法を調整することで、CYP3A4 活性の高いタイプの細胞、CYP1A2 活性の高いタイプの細胞などを提供する。

iPS 細胞を分化誘導する学術研究としては、スーパー特区に参加している大阪大学 水口らが効率よく肝細胞の誘導に成功したことを報告している (Mol Ther. 2012 Jan;20(1):127-37)。本法では、既存の液性因子による分化誘導に加え、分化誘導の段階に応じて三種類のアデノウイルスを細胞に感染させることで、分化誘導の方向性を規定し、分化効率を高めている (図 1)。また、この方法によって得られた肝細胞は代謝活性を有していて、代謝

活性化による薬物の肝障害の発生を検出できると報告している (図 2)。

第一回レギュラトリーサイエンス学術大会では、“iPS 細胞技術のレギュラトリーサイエンスへの応用—その展望と課題”と題して、4 人の演者による講演と討論を行った。まず、日本製薬工業会(製薬協)の中村が「医薬品業界における iPS 細胞利用の現状と期待」として、製薬協参加企業を対象に行ったアンケート調査の結果を紹介した。大阪大学の水口は、「創薬応用を目指したヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術開発」について学術領域での開発状況について報告した。続いて、国立医薬品食品衛生研究所の佐藤が「ヒト iPS (様)細胞を加工して製造される分化細胞の品質」に関して主に再生医療のガイドラインを作成した経験を踏まえて紹介した。最後に、研究分担者が「iPS 細胞技術のレギュラトリーサイエンスへの応用」について、展望と課題を紹介したのち、全体討論として、iPS 細胞に由来する分化誘導細胞を創薬過程における候補化合物の評価と申請に適用する際の問題点などを議論した。

平成 23 年 12 月に研究分担者は、韓国国立保健院 Ji-Won Jung 博士の研究室を訪問し、韓国における幹細胞の研究の状況について意見交換を行った。韓国では、国立保健院を中心に国内の幹細胞の収集とバンク化を進めており、調査時点で既に 50 を超える細胞株が登録されていた (図 3) (報告書作成時点では 68 株)。

肝臓細胞の分化レベルマーカーの検討と機能解析法の提示

ゲノム DNA のメチル化は、下流の遺伝子の発現を調節するエピゲノムの分子機

構として知られており、例えば体細胞の分化方向を規定する要因と考えられている。そこで、肝細胞の成熟度を規定する分子マーカーとして、ゲノム DNA のメチル化を用いることが出来ないかに関して、文献調査を行った。分化誘導した肝細胞間で、肝細胞としての生物活性とゲノム DNA メチル化を比較した論文はまだ報告例がなかった。しかしながら、幹細胞から肝細胞への分化誘導過程におけるゲノム DNA メチル化の変化を解析した報告例が見いだされた (Hum Mol Genet. 2011 Jul 15;20(14):2722-33)。Kimらは、ヒトES細胞を肝細胞へと分化誘導し、その過程で幹細胞、胚体内胚葉、肝細胞の各段階においてメチル化により発現が調節されていると考えられる遺伝子群を網羅的解析により抽出した。多くの遺伝子でメチル化の変化が観察され、それらの遺伝子を用いることで、細胞分化の方向性を規定する因子の解析が可能であるとする結果を報告していた。

D. 考察

本研究で対象となる iPS 細胞から分化誘導した肝細胞の産業開発は、調査時は 2 社において進行中であった。うち、リプロセルは分化条件を調整し、CYP 発現の特異性を持たせるという特徴があった。しかしながら、本来はヒト初代肝細胞を代替する細胞としての試料の提供が求められることを考えると、CYP 活性に偏りがある本細胞の有用性に関しては、更なる調査が必要と思われた。また、リプロセル社の分化誘導法の基盤となる技術である、大阪大 水口らの方法が報告された。その方法によると、従来の液性因子に加え、アデノウイルスによる分化の方向付けをすることで、誘導効

率の上昇が認められている。しかしながら、まだ必ずしも十分とは言えず、より高い薬物代謝酵素活性を得るためには、培養法の改良として例えば三次元培養などを検討することも必要であると考えられる (Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jan 16;378(3):558-62) (図 4) (図 5)。

さらに、水口らの方法では分化誘導過程が複雑になることを考えると、多くの肝細胞を一定品質で供給するための品質管理が難しくなり、産業応用の方法として適当かは、本法により得られた肝細胞の活性とその再現性の評価を待つ必要がある。また、幹細胞からの肝細胞分化は心筋などと比べ、更に複雑な段階を踏むため、本質的に再現性の管理は困難である。その点からすると、既に商用に供されている肝前駆細胞 HepaRG 細胞 (図 6) のような細胞の開発が必要と考えられた。

このような状況の中、平成 23 年 9 月に iPS 細胞技術のレギュラトリーサイエンスへの応用に関するシンポジウムを第一回レギュラトリーサイエンス学術大会にて行った。製薬協 中村の報告から、製薬産業界では iPS 由来分化細胞への期待は高いことが窺えたが、創薬現場の研究者においても現在の開発状況が満足いくものではないことも報告され、上述の点と考え併せて今後の課題であった。国立衛研 佐藤は創薬と再生医療で用いられる iPS 細胞由来分化細胞の品質の差異について、議論を行った。既に再生医療の分野では、iPS 細胞の品質に関するガイドライン化も進んでいる。本議論を交え、創薬応用のガイドライン作成における相違点として、再生医療・細胞治療の場合、どのような疾患を対象に、どのような有効性・安全性を示す iPS 細胞加工医薬品を開発するかが第一

義的課題であり、非臨床安全性試験系の場合にはどのような臓器・細胞種のような機能を再現した試験系を構築するのが第一義的課題となることが浮き彫りになった。研究分担者の発表並びにその後の総合討論において、肝細胞由来細胞の創薬応用におけるリスク(旧来の方法に依らないことにより生じる偽陽性、偽陰性の判定、など)とベネフィット(動物実験によらず、ヒトサンプルでの評価が行えるため種間の壁がなくなる、など)について、検証と考察を重ねることが、今後のガイドライン化において重要であると考えられた。更に、分化誘導肝細胞単独ではすべての薬物性肝障害が評価できないことが知られている。そのような例として、特異体質による肝障害がある。これは、発生頻度が低く、限られた人を対象にした臨床試験では見いだされることが難しく、医薬品が市場に出回り多くの患者に投与されて初めて判明する重篤な副作用である。この作用機序には、肝細胞だけでなく肝臓に存在する他の細胞(非実質細胞)の関与が考えられている。今までは初代肝細胞の供給に限りがあるため、幹細胞と非実質細胞の共培養系の検討には限りがあったが、分化誘導肝細胞が安定に供給されるようになると、このような薬物性肝障害の評価も可能となると考えられる。

本邦ではヒト胚性幹細胞の作成には倫理上厳格な規制が実施され、研究のための細胞株の樹立はハードルが高いが、韓国ではすでに多くの細胞株が登録され、利用可能な状況が整えられつつあった。幹細胞の中には、肝細胞への分化誘導性の異なる株が存在することが知られており、多種の細胞株を出発材料と用いることが出来る状況は有利と考えられる。もし、上

述した肝前駆細胞 HepaRG のような、安定して簡便に肝細胞に分化誘導できる株が見いだされると、産業応用の貴重なシーズになると考えられる。

このような幹細胞由来の肝細胞の品質を評価に当たり、従来多く研究されてきている発現レベルでの肝細胞分化マーカーだけでなく、ゲノム DNA のメチル化も有益な指標と考えられた。

E. 結論

本研究では、iPS 細胞から得られる肝細胞の産業界並びに研究レベルでの開発状況を調査することで、品質管理に関する懸念が見いだされた。また、レギュラトリーサイエンス学会学術大会でのシンポジウムでは、その様な分化誘導肝細胞を用いるリスクとベネフィットの判断が今後求められていくことが改めて浮き彫りとなった。分化誘導を簡潔にするためには、肝前駆細胞様の細胞の開発が有用であり、また、そのような細胞の評価指標としてゲノム DNA のメチル化も考慮すべきであると考えられた。

F. 研究発表 学会発表

1. 石田 誠一:iPS 細胞技術のレギュラトリーサイエンスへの応用—その展望と課題—、第 1 回 レギュラトリーサイエンス学会学術大会(2011,9,東京)
2. 石田誠一:ヒト iPS 由来肝細胞を用いた *in vitro* 毒性試験の開発、日本環境変異学会 MMS 研究会第 59 回定例会 (2011,11,東京)
3. 石田誠一:分化誘導肝細胞によるアドメックス(ADME/Tox)、厚生労働省科学研究費公開シンポジウム ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロ

ードマップ(2012,2,東京)

G. 知的所有権の取得状況

なし

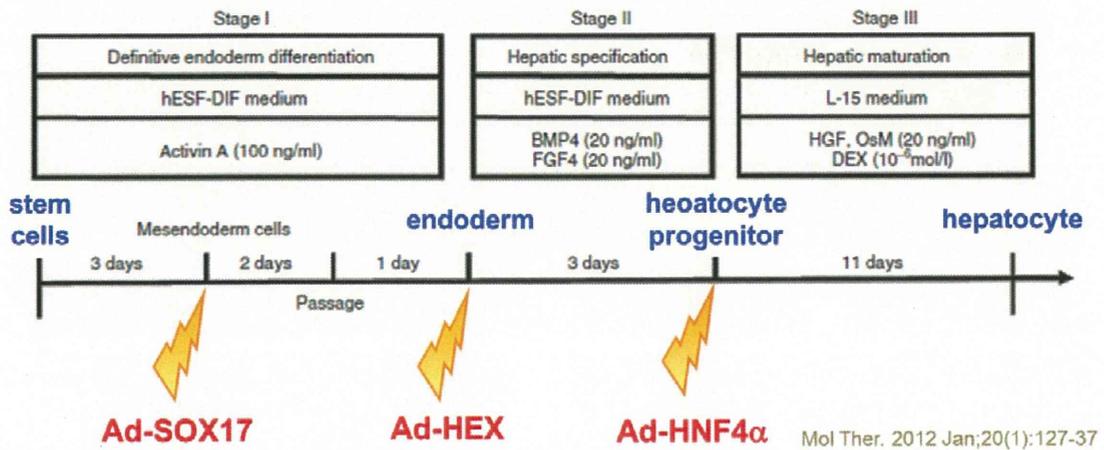


図 1 アデノウイルスベクターを用いた肝細胞分化誘導の効率化 (Mol Ther. 2012 Jan;20(1):127-37 一部改)

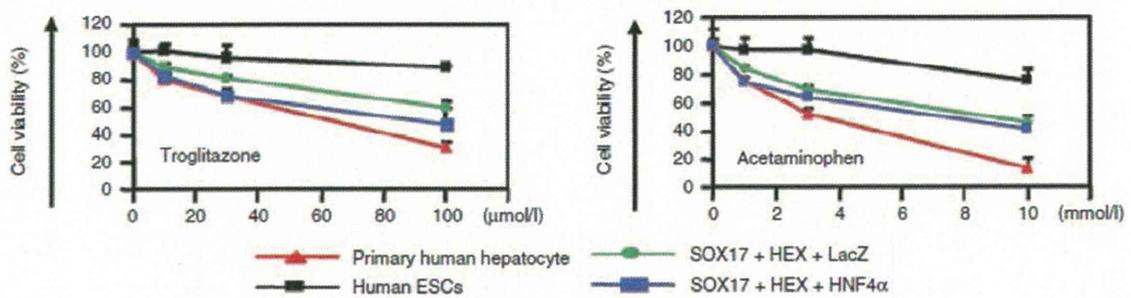


図 2 iPS 細胞由来肝細胞における薬物の代謝活性化による肝障害発現



図 3 韓国 国立保健院を中心とする幹細胞の資源化

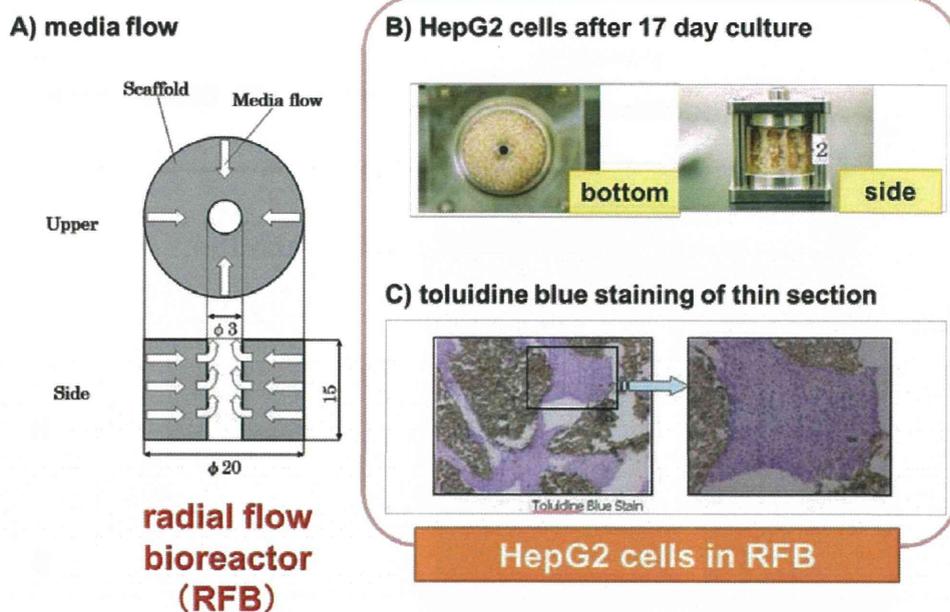


図 4 ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) を用いた三次元培養。A) ラジアルフロー型バイオリアクターの構成とその中の培地の流路(⇒) B) RFB で HepG2 細胞を培養した際の様子(培養 17 日目) C) B) の細胞から薄切切片を作成し、トルイジンブルーで細胞を染色した。細胞が重層化しているのが認められる。

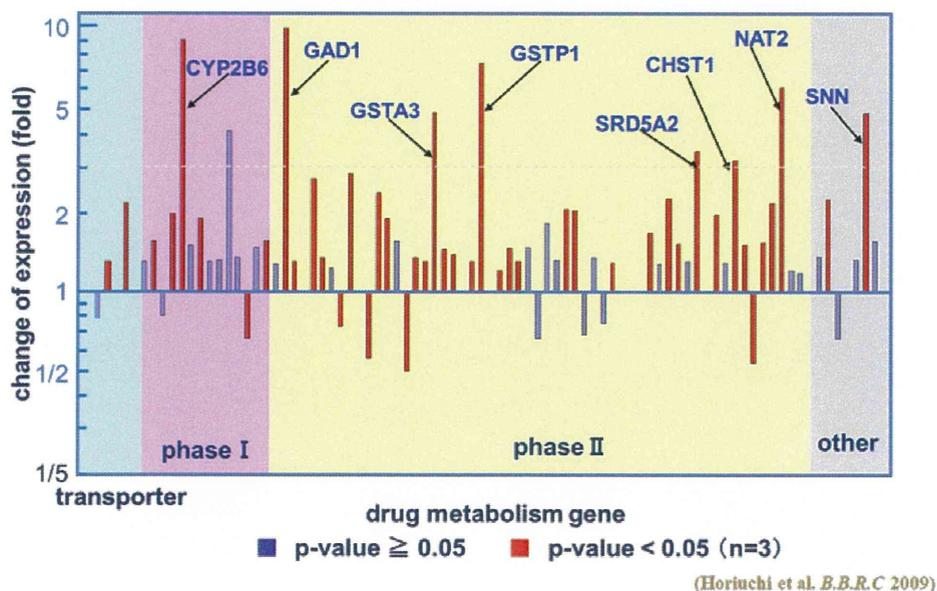


図 5 RFB による 3 次元培養をすると、薬物代謝関連遺伝子の発現が亢進した。RFB と通常の培養ディッシュで培養した HepG2 細胞における、薬物代謝関連遺伝子の発現を比較し、発現比 (RFB / 培養ディッシュ) で表した。

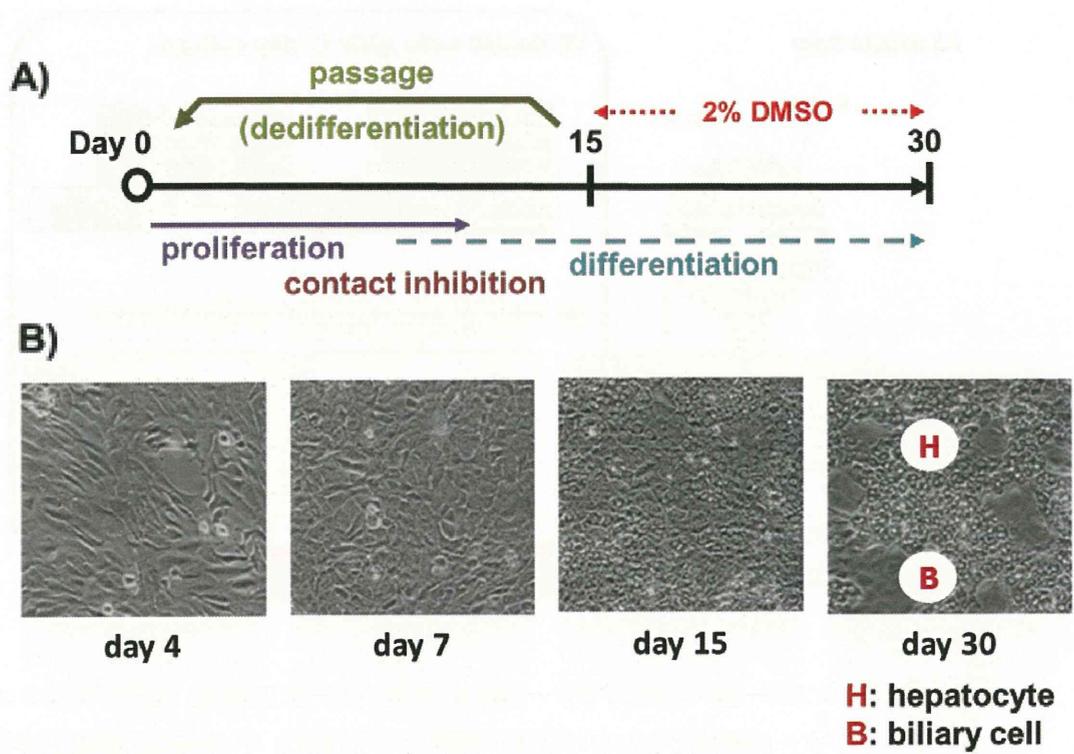


図 6 HepaRG 細胞の A) 分化方法と B) 分化による形態の変化

Ⅲ. 公 開 シ ン ポ ジ ウ ム

公開シンポジウム

「ヒトiPS細胞を用いた 安全性薬理試験への ロードマップ」

平成23年度厚生労働省科学研究補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」研究班

2012年2月25日(土)

会場 長井記念ホール

主催 国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 薬理部

公開シンポジウム

ヒトiPS細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ

平成23年度厚生労働省科学研究補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」研究班

■趣 旨

ヒトiPS細胞から分化誘導した細胞を医薬品承認申請のための安全性薬理試験に応用し実用化するためには、どのような科学的根拠が必要なのだろうか。まずは薬理試験に利用する分化誘導細胞の標準化が必須である。本シンポジウムでは、産官学の各界の取り組みを紹介し、実用化にむけたロードマップを明らかにする。

■主 催 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 薬理部

■日 時 2012年2月25日（土）
開場12：30 開演12：50

■会 場 長井記念ホール
〒150-0002 東京都渋谷区渋谷2-12-15 TEL：03-3406-3326

プログラム

12:50～ 開会の辞

関野祐子 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長

■座長：白尾智明（群馬大学大学院医学系研究科 神経薬理学 教授）

13:00～ 「分化誘導肝細胞によるアドメトックス (ADME/Tox)」

石田誠一（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第三室長）

13:40～ 「iPS細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング」

佐藤 薫（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第一室長）

14:20～ 休憩

■座長：杉山 篤（東邦大学医学部 薬理学 教授）

14:30～ 特別講演「ヒト心筋細胞を用いた臨床心毒性の予測」

澤田光平（エーザイ(株) グローバルCV評価研究部長）

15:20～ 「幹細胞ビジネス戦略と世界の動向」

酒井 明（iPSアカデミアジャパン(株) 研究技術部長）

16:00～ 「分化心筋細胞のクオリティコントロール」

諫田泰成（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第二室長）

16:40～ 休憩

■座長：豊島 聰（日本薬剤師研修センター 理事長）

16:50～ 特別講演「ヒトiPS細胞からの心筋分化誘導」

吉田善紀（京都大学iPS細胞研究所 初期化機構研究部門 講師）

17:40～ 「実用化のためのロードマップ」

関野祐子（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長）

17:55～ 閉会の辞

川西 徹（国立医薬品食品衛生研究所 副所長）

分化誘導肝細胞によるアドメトックス(ADME/Tox)

石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第三室長

ヒト初代培養肝実質細胞は、薬事申請に係る非臨床試験の様々な場面で用いられ製薬業界での需要は高いが、その供給はほぼ100%を海外に頼っているのが現状である。そのため、iPS細胞等から分化誘導された肝実質細胞が供給されることが希求されている。また、初代培養肝実質細胞にみられるドナー間差やロット間差が少なくなり、試験結果の再現性が増す点や研究倫理の観点からも望ましい試料として期待されている。

本演題では、iPS細胞等から分化誘導された肝実質細胞が満たすべき要点を薬事申請に際して作成される承認申請書 (ICH Common Technical Document: CTD) に沿って整理する。

CTDにおいて、肝実質細胞を用いた試験系が用いられている、または、代替できる可能性があるのは、モジュール2：非臨床試験のうち、2.6.4 薬物動態試験の主に2.6.4.5 代謝と2.6.4.7薬物動態学的薬物相互作用試験、並びに2.6.6 毒性試験であり、複数の項目に及ぶ。そのため、必ずしも各試験で用いられる評価指標は同じではなく、分化誘導肝細胞にも評価指標に応じた活性が求められる。すなわち、それぞれの試験に応じて、分化誘導細胞の満たすべき要点を設定する必要がある。

更に毒性試験では、肝実質細胞だけではなく非実質細胞が引き起こす炎症反応との関係を見ることが、発症率は稀であるが重篤になりやすいアレルギー性肝障害の評価の観点から重要となってきた。

これら試験系に適した「分化誘導肝細胞とは、どのようなものか」について、具体例を交えつつ議論したい。

平成23年度厚生労働省科学研究補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」研究班

2012年2月25日

分化誘導肝細胞によるADMET/Tox

国立医薬品食品衛生研究所
石田 誠一

創薬クリティカルパス と非臨床・臨床試験

ターゲットの探索 → スクリーニング → 化合物の最適化 (薬効、安全性、毒性、薬物動態) → 製造法の確立 → ヒトでの薬効、安全性、毒性評価 → 申請

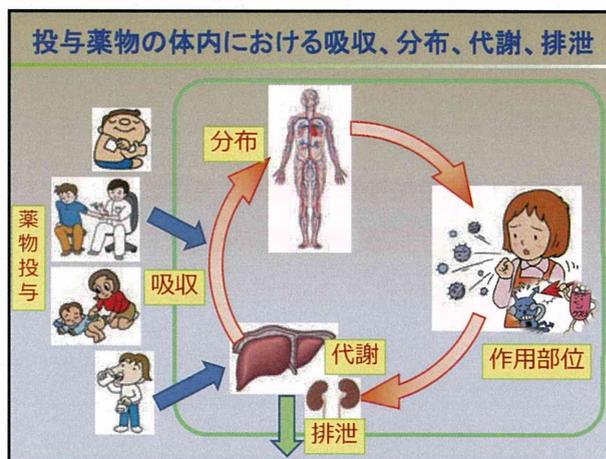
試験(調査)	試験内容	
物理化学的性状等試験	品質の保証	
非臨床試験	毒性試験	急性・慢性毒性、発がん性
	薬効薬理試験	作用機序、用法・容量の基礎的検討
	一般薬理試験	安全性薬理学的検討
	薬物動態試験	体内動態の検討
臨床試験	第I相試験	少数の献上成人での安全性の確認
	第II相試験	選択された患者での有効性・安全性、用法・容量の確認
	第III相試験	対象患者を広げ、有効性・安全性を対象薬と比較、有用性を調べる
市販後調査	開発段階では不明の臨床効果・副作用の調査	
	市販後臨床試験	開発段階の臨床試験の不足を補う臨床試験

創薬クリティカルパス と非臨床・臨床試験

ターゲットの探索 → スクリーニング → 化合物の最適化 (薬効、安全性、毒性、薬物動態) → 製造法の確立 → ヒトでの薬効、安全性、毒性評価 → 申請

試験(調査)	試験内容	
物理化学的性状等試験	品質の保証	
非臨床試験	毒性試験	急性・慢性毒性、発がん性
	薬効薬理試験	作用機序、用法・容量の基礎的検討
	一般薬理試験	安全性薬理学的検討
	薬物動態試験	体内動態の検討
臨床試験	第I相試験	少数の献上成人での安全性の確認
	第II相試験	選択された患者での有効性・安全性、用法・容量の確認
	第III相試験	対象患者を広げ、有効性・安全性を対象薬と比較、有用性を調べる
市販後調査	開発段階では不明の臨床効果・副作用の調査	
	市販後臨床試験	開発段階の臨床試験の不足を補う臨床試験

First in Human Patients



創薬クリティカルパス と非臨床・臨床試験

ターゲットの探索 → スクリーニング → 化合物の最適化 (薬効、安全性、毒性、薬物動態) → 製造法の確立 → ヒトでの薬効、安全性、毒性評価 → 申請

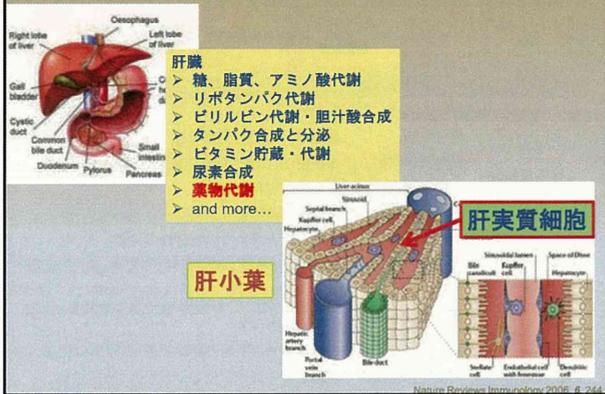
試験(調査)	試験内容	
物理化学的性状等試験	品質の保証	
非臨床試験	毒性試験	急性・慢性毒性、発がん性
	薬効薬理試験	作用機序、用法・容量の基礎的検討
	一般薬理試験	安全性薬理学的検討
	薬物動態試験	体内動態の検討
臨床試験	第I相試験	少数の献上成人での安全性の確認
	第II相試験	選択された患者での有効性・安全性、用法・容量の確認
	第III相試験	対象患者を広げ、有効性・安全性を対象薬と比較、有用性を調べる
市販後調査	開発段階では不明の臨床効果・副作用の調査	
	市販後臨床試験	開発段階の臨床試験の不足を補う臨床試験

各非臨床試験と薬物動態試験

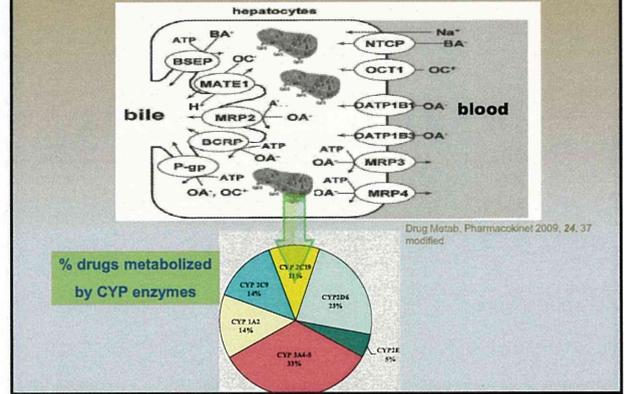
一般毒性試験	毒性試験 単回投与毒性試験 反復投与毒性試験 生殖発生毒性試験 遺伝毒性試験	薬理試験 薬効を裏付ける試験 副次的薬理試験 薬学的相互作用試験
	安全性薬理試験	薬物動態試験 吸収 (Absorption) 分布 (Distribution) 代謝 (Metabolism) 排泄 (Excretion)
	特殊毒性試験 がん原生試験 局所刺激性試験 その他の毒性試験 (依存性、抗原性) (皮膚感作性) (皮膚光感作性) (光遺伝毒性)	

(医薬品評価概説 監修 内山・豊島 2009 一部改)

肝臓の構造と働きを担う肝実質細胞



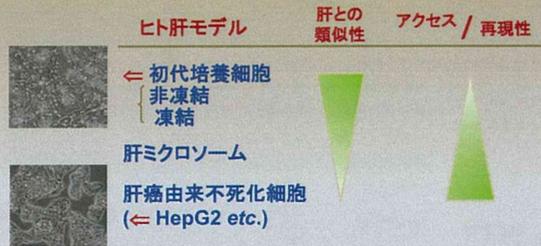
肝実質細胞における取り込み、代謝、排泄



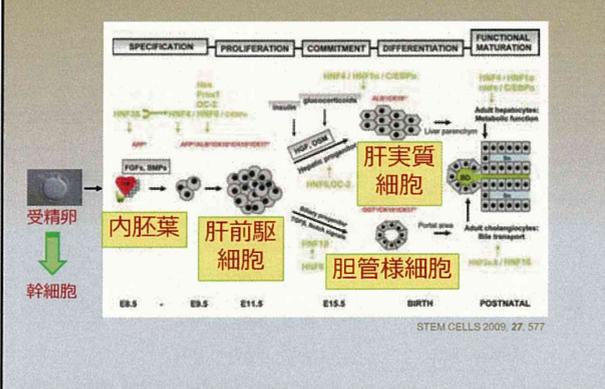
求められる肝細胞培養系のポイント

- 1) 入手・取扱いに関する考察
- 2) ヒト肝臓機能の再現に関する考察
- 3) 代謝活性の再現性に関する考察

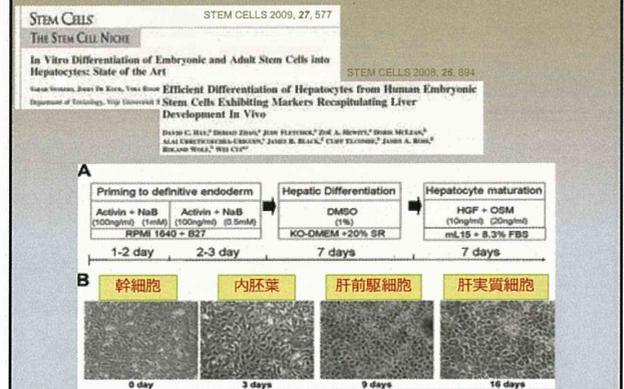
ADEM評価系として入手可能な肝モデル

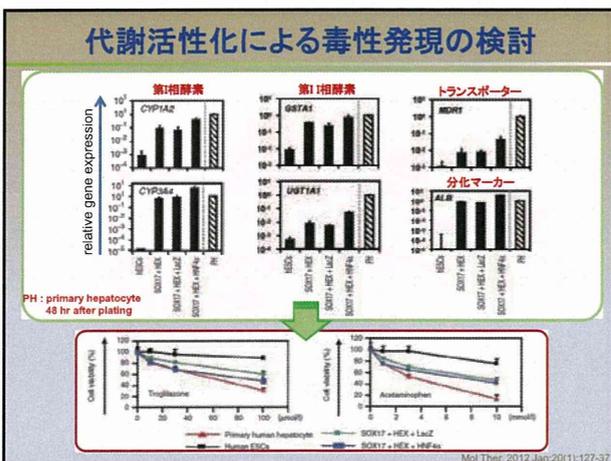
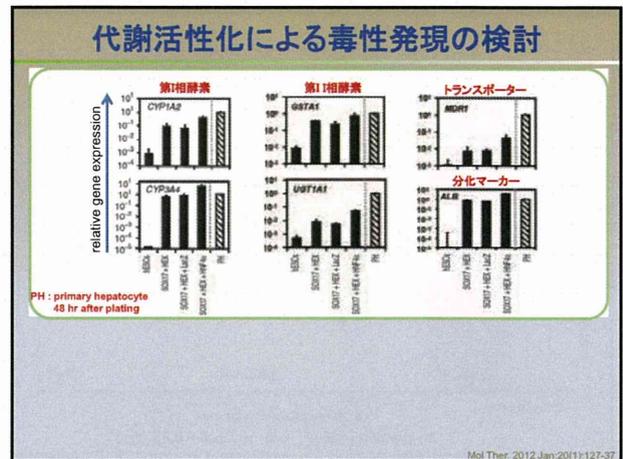
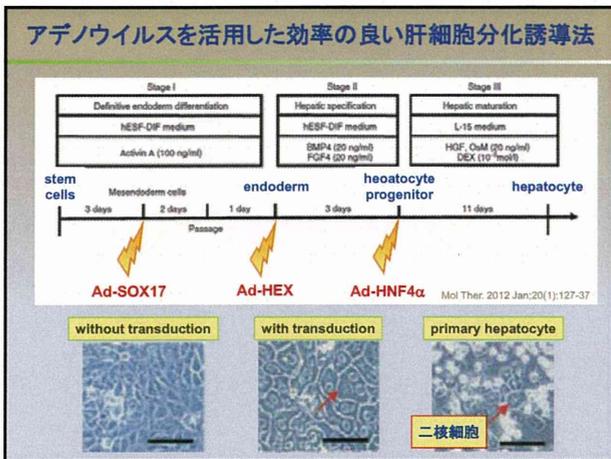
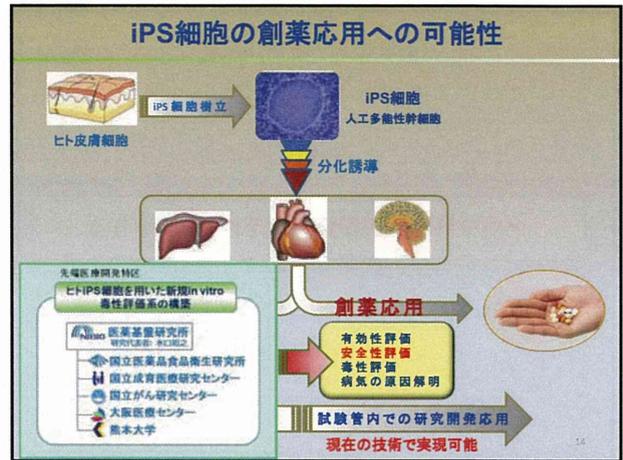
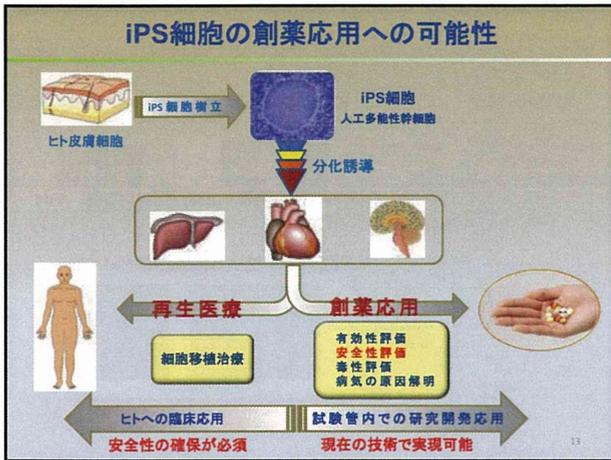


発生における肝細胞分化の過程



幹細胞から肝実質細胞への分化誘導法





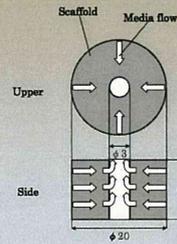
- ### iPS細胞由来肝細胞の現状と問題点
- iPS細胞は分化誘導肝細胞の供給源として有望
⇔ しかし.....
 - 1) 入手・取扱いは平易か?
 - 十分量の供給は可能となっていない。
 - 2) ヒト肝臓の機能を再現しているか?
 - 薬物代謝活性を有する分化誘導肝細胞ができていますが、必ずしも活性は十分とは言えない。
 - 3) 再現性は良いか?
 - 現在の分化誘導法は決して単純ではない。

克服すべき課題 ①

iPS由来肝細胞の薬物代謝活性を亢進させる

三次元培養への取り組み

A) media flow



ラジアルフロー型
バイリアクター
(RFB)

B) HepG2 cells after 17 day culture

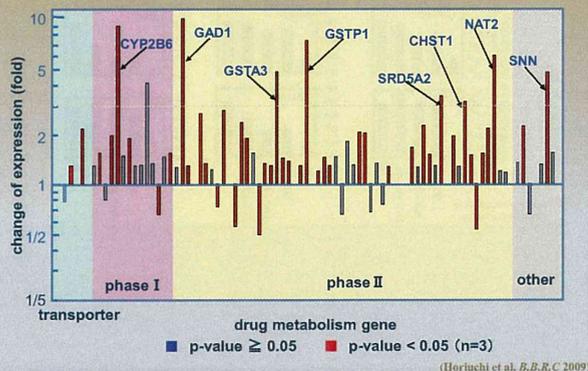


C) toluidine blue staining of thin section



RFB内のHepG2細胞の様子

RFBを用いた三次元培養による細胞機能の改善



克服すべき課題 ②

ヒト肝臓の機能を再現する

特異体質による薬物性肝障害の予測性を高める

特異体質



First in Human

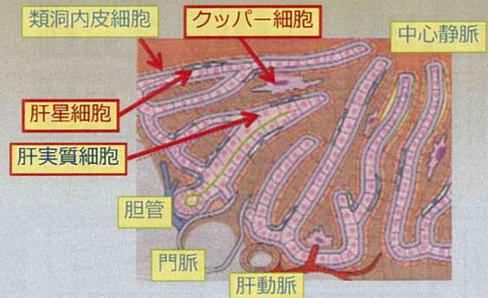
Patients

薬物性肝障害の例 (米国のケース)

販売中止(年)	用量(daily)
Iproniazid (1956)	100 - 250 mg
Ticrynafen (1979)	250 - 500 mg
Benoxaprofen (1982)	600 mg
Bromfenac (1998)	75 - 100 mg
Troglitazone (2000)	400 - 600 mg
Ximelagatran (2006)	48 - 72 mg

寺岡、真穂 肝薬理誌 2008; 132: 347

肝臓を構成する細胞と構造



肝臓の構造を模倣した共培養系の開発

collaboration with **NIA3**

期待される効果

- 星細胞からのパラクラインによる肝実質細胞の活性化
- 肝実質細胞と星細胞との間でのクロストーク応答

stellate-shaped mesenchymal cells that exist in the space of Disse of the liver and contain many fat droplets in cytoplasm.

克服すべき課題 ③

簡便な分化誘導法を開発する

HepaRG 細胞

collaboration with **Inserm**

- フランスINSERMとの共同研究
- C型肝炎患者の肝臓細胞より樹立
- 2% DMSOにより肝実質細胞様(H)と胆管上皮細胞様(B)細胞への分化誘導が可能
- DMSOによりP450などが非常に高く誘導される

differentiation scheme

Day 0 → passage (dedifferentiation) → Day 15 (2% DMSO) → Day 30

proliferation → contact inhibition → differentiation

morphology

H: hepatocyte
B: biliary cell

HepaRG細胞の分化に伴う遺伝子発現の変化

collaboration with **Inserm**

K-means and hierarchical clustering
Functional characterization

GeneChip signals

DMSO-dependent increase (Cluster 1)
DMSO-independent increase (Cluster 4)

JRC EUROPEAN COMMISSION, EFMD, IUP

The pre-validation: HepaRG and cryoheps

Phase I SOP refinement "lead laboratory" Lab 1

Phase II SOP transfer/refinement naive laboratories Labs 2 & 3

Phase III Reproducibility & mechanistic/predictive relevance Labs 1, 2 & 3

Validation Management Group

Well-standardised robust metabolic competent system → large datasets generation using the standard metabolic competent system

http://ec.europa.eu/enterprise/eipaa/2_activities/2_1_science/2_1_sancta_coecke_metabolism.pdf

分化誘導肝細胞によるアドメトックスの評価事例

Comparison of Cryopreserved HepaRG Cells with Cryopreserved Human Hepatocytes for Prediction of Clearance for 26 Drugs

Ugo Zanelli, Nicola Pasquale Camarasa, David Hallifax, Elvan Turkali, and J. Brian Houston

Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins

Wahid S. Nigam, He-Min Yao, Amy Ramachandran, Graham J. Murray, Shih-Boo, Barbara Lantier, Sarah Murray, Andre Colclough, and Valeria Pizzarello

HepaRG Cells: A Human Model to Study Mechanisms of Acetaminophen Hepatotoxicity

Wahid S. Nigam, He-Min Yao, Amy Ramachandran, Graham J. Murray, Shih-Boo, Barbara Lantier, Sarah Murray, Andre Colclough, and Valeria Pizzarello

Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays

総括

iPS細胞は分化誘導肝細胞の供給源として有望であるが、

- 現時点では十分量の供給は可能となっていない。
- 薬物代謝活性を有する分化誘導肝細胞ができているが、必ずしも活性は十分とは言えない。
- ⇒ 三次元培養系や共培養系の開発も必要
- 現在の分化誘導法は決して単純ではない。
- ⇒ 肝前駆細胞の開発も必要