

13) Ogawa M, et al. Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol.* 56(6):529-535, 2012.

14) Sugita S, et al. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12;53(8):4692-8, 2012.

15) Ogawa M, et al. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250(12):1877-1883, 2012.

16) Sugita S, et al. Detection of *Candida* & *Aspergillus* species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250:391-398, 2012.

総説 (英文)

1) Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases. *pathogens* 2: 153-176, 2013.

2. 著書 (和文)

1) 森尾友宏: 大学病院などの再生医療を支える細胞プロセッシング室運営マニュアル (新潟大学 医歯学総合病院 生命科学医療センター編著、森尾友宏、嶋賢一郎、中田光監修)、星雲社、2012年6月30日

3. 学会発表

(国際学会)

1) Kazunari Aoki, Ken Ishiyama, Tokiko Nagamura, et al. Unfavorable Outcome of Single-Unit Umbilical Cord Blood Transplantation for Elderly Patients with Myelodysplastic Syndromes 第54回米国血液学会 2012/12/9

2) Fujiwara S. Mouse Models of Epstein-Barr Virus-Related Diseases. 1st Samsung Humanized Mice Symposium, April 14, 2012, Seoul.

3) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models of Chronic Active EBV Infection and EBV-Associated Hemophagocytic

Lymphohistiocytosis Reveals a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. VII. International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs. 2012.2.4-6 Tokyo.

(国内学会)

1) 森尾友宏: 再生医療・細胞治療領域で問題となる微生物のモニタリング、第60回日本ウイルス学会学術集会 (シンポジウム)、大阪、2012年11月13日-11月15日

2) 森尾友宏: Challenge for Innovation - 日本初の再生医療の普及に向けて-、第11回日本再生医療学会総会 (パネルディスカッション)、横浜、2012年6月13日

3) 森尾友宏: 「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」: 免疫細胞療法における指針及び治療の現状と展望、第60回日本輸血細胞治療学会 (シンポジウム)、福島、2012年5月27日

4) 三春晶嗣, 清河信敬, 小林健一郎, 大喜多肇, 飯島一智, 森鉄也, 斎藤正博, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 小児白血病MRD検出における10カラーフローサイトメトリーの有用性. 第22回日本サイトメトリー学会学術集会, 大阪, 6月29日-30日, 2012.

5) 藤原成悦. EBウイルス関連疾患の病態を再現するモデルマウス. 北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会 「感染・免疫・炎症・発癌」. 平成24年」6月8日、札幌.

6) 長村登紀子 テクニカルセミナー 細胞処理の基本的操作と検査 第60回日本輸血・細胞治療学会総会 2012/5/25

7) 何海萍, 長村登紀子, 東條有伸ら. Characterization of primitive markers in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells 臍帯由来間葉系幹細胞における未熟細胞マーカーの解析 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/19

8) 山本由紀, 長村登紀子, 東條有伸ら. mTOR inhibitorの制御性T細胞の誘導増幅に及ぼす影響 The influence of mTOR inhibitor on inducible regulatory T cells 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/20

9) 幸道秀樹, 高橋敦子, 長村登紀子, 菅有紗, 笠根萌美, 星野茂角, 松本太郎, 麦島秀雄, 勝

村秀樹 初回移植における生着率 The rate of engraftment in the first cord blood transplantation is higher than those in later. 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/21

10) 大橋一輝、長村登紀子、東條有伸、宮村耕一、石川淳、森島泰雄、矢部普正、熱田由子、長村 文孝、坂巻 壽. 慢性骨髄性白血病の同種移植の幹細胞別移植成績の比較—日本造血細胞移植学会 CML 成人 Working Group—第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/19

11) 湯沢 美紀、尾上和夫、山本 由紀、東條有伸、長村(井上) 登紀子ら. 東大医科研における臍帯血移植時の解凍検査について 第134回日本輸血・細胞治療学会関東甲信越支部例会 2012/9/29

12) Makoto Murata, T. Nagamura-Inoue, and Ritsuro Suzuki. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-Versus-Host Disease to Corticosteroid Therapy 第54回米国血液学会 2012/12/9.

13) 吉山裕規 他3名 EBV 遺伝子 BNLF2a と BNLF2b は溶解感染初期と潜伏期に発現し、腫瘍化に関与する 第60回日本ウイルス学会 2012年11月(大阪)

14) 清水則夫 網羅的ウイルス検査法の開発と臨床ウイルス学的検査への応用 第30回日本染色体遺伝子検査学会学術集会 2012年11月(東京)

15) 清水則夫 移植医療・細胞治療におけるウイルス検査系の開発輸血学会関東甲信越支部会 2012年9月(東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

図表

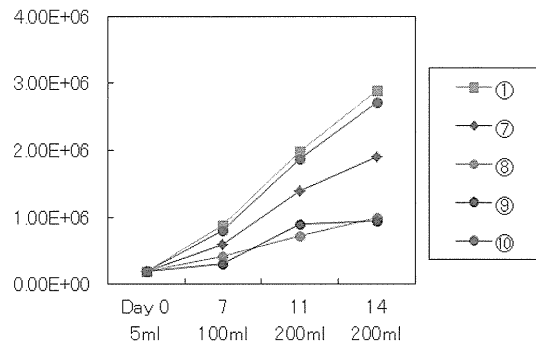


図1. 無血清培養液による臍帯血活性化 T 細胞の調製. 研究方法に示す①～⑤の培養液による培養結果を示す.

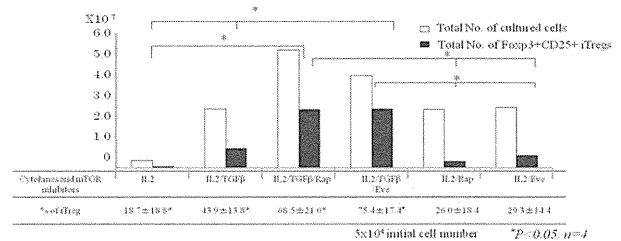


図2. 誘導制御性 T 細胞調製法の比較. 研究方法に示す6通りの培養法による結果を示す.

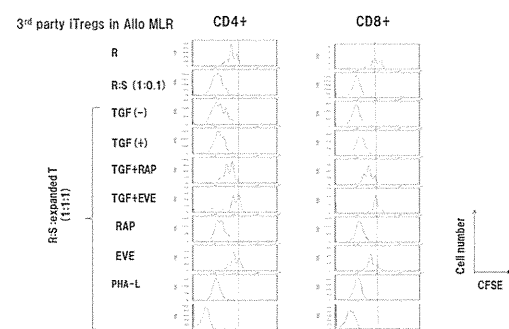


図3. 同一ドナー由来および 3rd party 由来 iTreg による MLR 抑制効果の比較. 同種樹状細胞による抗原刺激を用いた MLR の結果を示す.

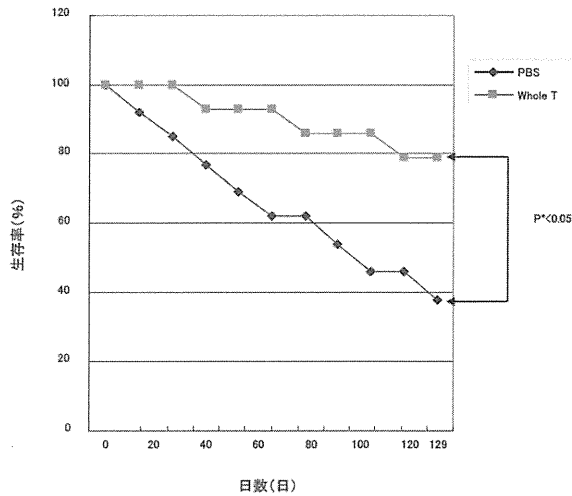


図 4. EBV 関連リンパ増殖性疾患モデルマウスに対する臍帯血 DLI の効果. 活性化臍帯血 T リンパ球を投与したマウス (赤四角) と対照として PBS を投与したマウス (黒菱形) の生存曲線を示す.

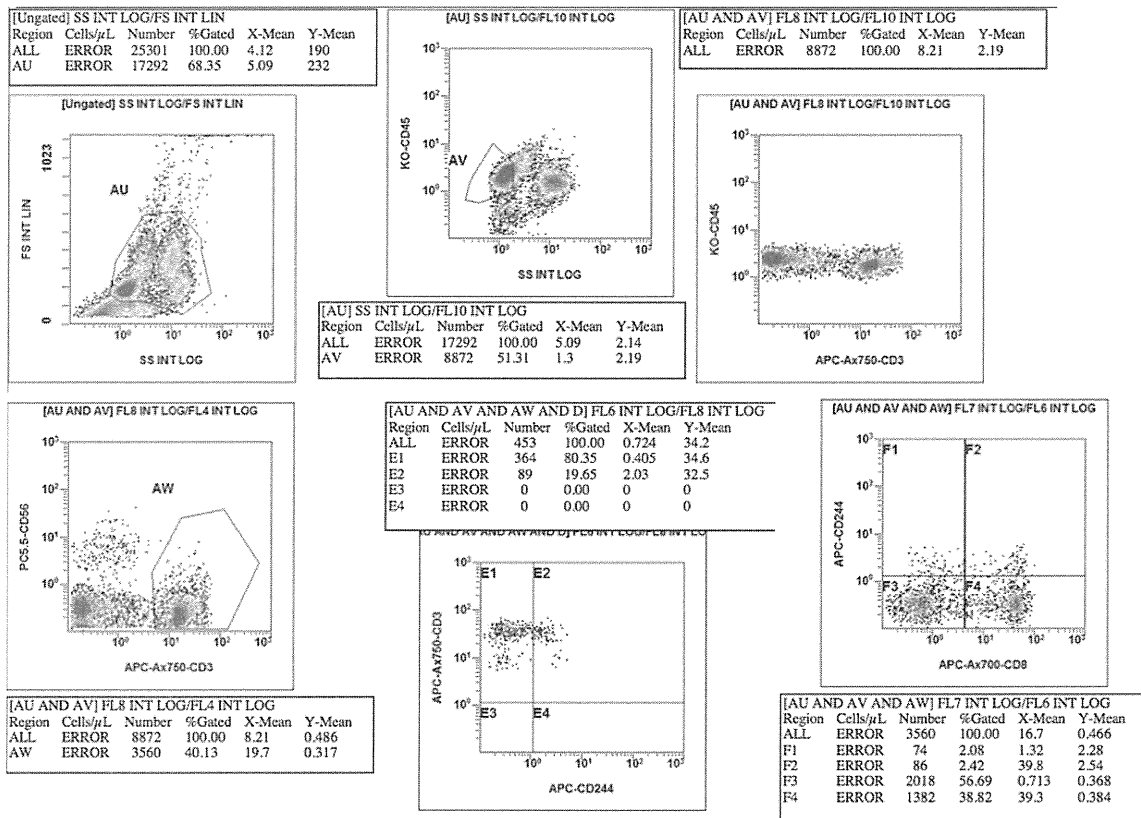


図 5. 10 カラー解析フローサイトメトリーによる T 細胞と NK 細胞の解析. 前方散乱(FS)と側方散乱(SS)によって細胞を分画し、さらに KO 標識-CD45 と SS によって展開することにより、リンパ球、単球、顆粒球を明確に分離することが可能であり、このうちリンパ球にゲート(AV)をかけて、CD45 と CD3 を展開することにより、T 細胞を選択することが可能である。一方、CD56 と CD3 で展開することによって、CD56+ の NK 細胞を解析可能であり、同時にわずかに存在する NKT 細胞 (CD3+CD56+) も検出できる。CD244 は NK 細胞と細胞障害性 T 細胞に発現することから、CD56-CD244+ の分画は CD8 細胞の一部の細胞障害性 T 細胞であることがわかる。

創薬支援に有用なヒト肝 in vitro/in silico 代謝・ 輸送予測モデルの提案と薬物動態評価における実証

国立医薬品食品衛生研究所

石田 誠一

研究要旨

医薬品開発において必須な新規医薬品候補化合物の薬物動態学的な特徴を創薬の早い段階から捉えるために、ヒト CYP 分子種による代謝プロファイルやヒト CYP 分子種に対する阻害プロファイルの in silico 予測法と薬物トランスポーターの相互作用の予測法の開発・整備を行った。薬物間相互作用の in vivo 臨床データを解析することにより (Top-down アプローチ)、in vitro からヒトの予測 (Bottom-up アプローチ) の精度を高める必要性が示唆されており、それを支援するためのマイクロプロセスによる三次元培養と肝非実質細胞との共培養の検討を行った。本研究班の成果の一部は日本薬学会第 133 年会にて成果発表シンポジウムとして報告された。

研究分担者

- | | |
|--|---------------|
| (1) 東北大学大学院薬学研究科
薬物動態学分野
(H24 年 6 月 30 日まで)
(H24 年 7 月 1 日より) | 山添 康
吉成 浩一 |
| (2) 岩手医科大学薬学部
薬物代謝動態学講座 | 小澤 正吾 |
| (3) (独) 産業技術総合研究所
幹細胞工学研究センター | 金森 敏幸 |
| (4) 積水メディカル株式会社
薬物動態研究所 | 青山 晋輔 |
| (5) 田辺三菱製薬株式会社
薬物動態研究所 | 山田 泰弘 |
| (6) 第一三共 RD ノバーレ株式会社
分析センター | 鈴木 恭介 |
| (7) (独) 理化学研究所
社会知創成事業 | 杉山 雄一 |
| (8) 東京大学大学院薬学系研究科
医薬品評価科学講座 | 前田 和哉 |
| (9) アステラス製薬株式会社
創薬推進研究所
(H24 年 10 月 28 日まで)
(H24 年 10 月 29 日より) | 神山 佳輝
浜川 望 |
| (10) エーザイ株式会社
筑波薬物動態研究室 | 竹中 理 |
| (11) 田辺三菱製薬株式会社 | |

研究本部

- | | |
|--|------------------------------|
| (12) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
神戸医薬研究所薬物動態・安全性研究部
(H24 年 12 月 31 日まで)
(H25 年 1 月 1 日より) | 鈴木 將之
オラフ・シェーファー
山村 典男 |
|--|------------------------------|

A. 研究目的

肝臓は薬物をはじめとする種々の物質の異物解毒器官であり、数多くの代謝酵素・トランスポーターの発現により、多種多様な物質に対して生体を効率よく防御するためのシステムが備わっている。特に医薬品開発において、新規医薬品候補化合物の薬物動態学的な特徴を捉える上で、肝臓における代謝・輸送を理解することは必須である。

そのような中でも、チトクローム P450 (CYP) による薬物代謝は、医薬品の体内動態を決定する主要な要因である。また、CYP 代謝の阻害や誘導は薬物間相互作用の主要な原因である。さらには、遺伝的または後天的要因により CYP 活性には著しい個人差が認められるため、特定の CYP 分子種のみで代謝される医薬品は好ましくないとされる。これらのことから、創薬の比較的早い段階において、医薬品候補化合物のヒト CYP 分子種による代謝プロファイルやヒト CYP 分子種に対する阻害プロファイルが調べられている。医薬品候補化合物の CYP 代謝情報の取得には、現在ヒト肝ミクロソ

ームやヒト肝細胞を用いたインビトロ試験が利用されているが、被験物質を合成しなければ試験結果を得ることはできない。そのため、実際に合成した化合物を用いてインビトロで行われているこれらの代謝試験を、コンピューター上 (in silico) で行うことを可能とする「ヒト CYP 代謝の in silico 予測システム」の構築は、創薬の効率化に大きく貢献すると思われ、東北大学山添らはヒト薬物代謝予測に有用な in silico ツールとして、「二次元基質テンプレートを利用したヒト CYP 代謝予測システム」(fig. 1) の開発を進めている。

また、近年、薬物トランスポーターの役割がクローズアップされており、遺伝子多型や相互作用による薬物動態の変動が数多くの臨床研究により報告されてきている。一方で、最近、ヒト凍結肝細胞は比較的容易に入手可能となったが、ヒト in vivo における肝クリアランス予測がどの程度の精度で可能であるか、またどのような実験系・評価系を用いるのが適切かなど、肝臓におけるトランスポーターを介した輸送を定量的に予測できるかについて、系統だった検討・妥当性の評価が必要であると考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では、

1. CYP による基質代謝部位の in silico 予測モデルの検証
2. 肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測を実施した。

更に上述の研究課題でも汎用されるヒト初代肝細胞 (hepatocyte) について、細胞のロットによって代謝活性が著しく異なる、および、肝特異的機能が経時的に低下する、といった大きな問題点を克服するために、マイクロ空間で培養環境を精密に制御し、培地を還流しながら hepatocyte から自発的にスフェロイドを形成させるマイクロプロセスによる三次元培養法の検討を行った。

併せて、近年上市された医薬品の撤退理由として重要な問題になっている特異体質による薬物性肝障害を評価する系として、ヒト肝癌由来細胞と HL-60 細胞およびそのマクロファージ系に分化した細胞、ならびに単球系細胞等を共培養する系の構築を検討した。

研究成果の社会発信の一環として、本研究班の成果の一部を日本薬学会第 133 年会年會にて成果発表シンポジウムとして報告した。

B. 研究方法

1. CYP による基質代謝部位の in silico 予測モデルの検証

・CYP2E1 非基質性阻害物質の探索

インシリコ予測は、(独)製品評価技術基盤機構で公開されている有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) データベースに含まれる約 500 物質のうち、ポリマーおよび無機化合物を除く約 470 物質に対して CYP2E1 予測システム (Drug Metab Rev, 43:409, 2011) を適用した。

非基質性阻害物質と考えられた化合物に関して、以下の反応液を調製し、37℃で 10 分間反応させ、インビトロ阻害試験を行った。

反応液 (0.5 mL) :

- ・ヒト CYP2E1 発現系ミクロソーム (Human CYP2E1 + Reductase + b5 microsomes; BD Biosciences)
- またはコントロールミクロソーム (5 nmol/L)
- ・Chlorzoxazone (100 μ M)
- ・NADPH 生成系 (1.3 mM β -NADP⁺, 3.3 mM G-6-P, 0.4 U/mL, 3.3 mM MgCl₂)
- ・被験物質 (0, 1, 10, 100 μ M)

・CYP1A2 予測システムの検証と医薬品代謝予測への応用

CYP1A2 予測システムの検証として、文献情報から、CYP1A2 テンプレートの作製に使用しなかった CYP1A2 の基質 (233 反応) および非基質/貧基質 (60 反応) を抽出し、これらに対して予測システムを適用した。

市販医薬品の CYP1A2 代謝予測の事例として、2010 年度の医薬品製品別売り上げ上位 100 品目のうち、高分子医薬品を除く上位 51 化合物 (49 品目: 合剤があるため化合物数と一致しない) に対して、CYP1A2 予測システムを適応した。CYP 代謝情報は ADME データベース (富士通九州システムズ)、添付文書およびインタビューフォームから取得した。

・CYP3A4 テンプレートの作成

多環芳香族水素類を用いた CYP3A4 の core template を作成するために 15 化合物のヒト CYP3A4 による代謝情報を収集し、代謝部位を明記した構造式を作成した。六員環を多数結合したハニカム状の格子をコンピューター上に作成し、代謝部位を中心として重なり合う面積が最大となるように、全ての化合物を重ね合わせ、化合物が CYP3A4 内で固定化される領域を決定した。重なり頻度を各々の格子点について計算し、化合物が固定化される領域内の重要度として点数化し、固定化されやすい格子点と、固定化には不利な格子点を算出し、core template を作成した。その後、ステロイド化合物による core template の検証と

典型的な CYP3A4 基質によるテンプレートの確認を行った。

2. 肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測

・肝細胞内の薬物の濃縮率の見積もりに関する

In vitro 実験・データ解析

ヒト凍結肝細胞を常法により融解し、薬液と試験管中で一定時間遊離の状態 incubation することにより、細胞内外の基質の移動が定常に達した時点における肝細胞内への薬物の取り込みは silicone oil layer 法によって測定した。そして、細胞内と medium 中の総濃度比 (C/M ratio) を算出した。対象となる薬物は、化合物の物性や電荷が多様な複数ものを選択した。能動輸送を止めるための手段としては、氷冷下、大過剰濃度の基質存在下、対象となるトランスポーターの比較的強力な阻害剤存在下を用いて、結果を比較した。また、細胞内における蛋白結合率を定量的に評価する方法として、ヒト肝臓ホモジネートを作成し、異なる希釈倍率のホモジネート存在下で薬物の蛋白結合率を求め、100%ホモジネート存在下における薬物の結合率を補外することにより見積もった。

・有機カチオン類の肝取り込みに関与するトランスポーターの同定

clarithromycin, erythromycin について、両者の肝取り込み機構が同じであるか否かについて検討を進めた。具体的には、ラットおよびヒト肝細胞を用いて、OATPs や他の取り込み阻害剤が、両化合物の取り込みに対する影響を観察することにより、各トランスポーターの寄与率を推定する方法論をとった。

・ヒト肝 OATP を介した薬物間相互作用の PBPK モデルに基づいた解析

OATP 基質としてスタチン類、阻害剤としてシクロスポリン A やリファンピシンが関わる薬物間相互作用の臨床データを収集した。これら薬物の体内動態特性をもとに、PBPK モデルに組み込む臓器コンパートメントや置くべき未知パラメータの検討をおこなった。続いて、収集した臨床データを用い、クリアランスコンセプトに基づいた見かけの肝固有クリアランス (CL_{int, all}) の算出後、PBPK モデルにおける未知パラメータ (分布容積、吸収速度定数、肝臓における各素過程 (取り込み、排出、代謝・胆汁排泄) のクリアランス、in vivo 阻害定数等) の最適化計算を行った。得られたパラメータを in vitro における条件と比較した。

・基質依存的な OATP1B1 阻害作用の検討

OATP1B1 発現細胞における OATP1B1 典型的基質の取り込み活性は、HEK293 細胞に OATP1B1 遺伝子を安定導入した OATP1B1 発現細胞およびコントロール細胞を使用し試験を実施した。OATP1B1 の典型的基質として [³H]Estradiol-17 β-D-glucuronide (E₂G), [³H]Estrone-3-sulfate (E₁S), [³H]Bromosulphophthalein (BSP) を使用した。OATP1B1 に対する阻害活性は、KHB に典型的基質 ([³H]E₂G, [³H]E₁S, あるいは [³H]BSP) および阻害評価化合物 (E₁S, CsA, BSP, Ritonavir, Rif, Tacrolimus, Erythromycin, E₂G, Ketoconazole, Taurocholate, Verapamil, Gemfibrozil, Probenecid, あるいは Cimetidine) を溶解した Assay Buffer を調製し、試験を実施した。典型的基質の OATP1B1 を介した濃度依存的取り込みは、KHB に [³H]E₂G (0.003~100 μmol/L), [³H]E₁S (0.003~10 μmol/L), あるいは [³H]BSP (0.007~10 μmol/L) を溶解した Assay Buffer を調製し、試験を実施した。さらに、典型的基質間の阻害様式を検討する目的で、非標識 E₁S (0.1 μmol/L) あるいは BSP (0.3 μmol/L) 存在下における [³H]E₂G の濃度依存的取り込み、非標識 E₂G (10 μmol/L) あるいは BSP (0.3 μmol/L) 存在下における [³H]E₁S の濃度依存的取り込み、および非標識 E₂G (10 μmol/L) あるいは E₁S (10 μmol/L) 存在下における [³H]BSP の濃度依存的取り込みを観察した。

・タンパク結合型の阻害剤が、トランスポーターの輸送阻害に与える影響に関する検討

薬物輸送阻害能に与える蛋白量の影響を評価化合物として [³H] estrone-3-sulfate (ES)、阻害剤として cyclosporin A, rifampicin, tipranavir, lopinavir を用いて Human Serum Albumin (HSA) 濃度 0, 0.2, 0.5, 1.0 および 2.0% 存在下測定した。

3. 三次元培養系・共培養系の開発

・三次元培養系

灌流培養チップの設計・作製は既に開発している灌流培養チップを応用した。灌流培養チップ機能の基礎評価は、HepG2 細胞を用いて細胞導入およびスフェロイド形成状況を確認した。チップの培養面は、予め所定の操作でコラーゲンコートを行った。

・共培養系

HL-60 細胞を 16 nM 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) または、100 nM の *all-trans* retinoic acid (ATRA) で 48 時間分化させた。蛍光

観察可能な 8 穴チャンバースライドに HuH-7 細胞を播種し、蛍光標識した HL-60 細胞を共培養した。48 時間後、蛍光観察により HuH-7 細胞に接着している HL-60 細胞数を計測した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. CYP による基質代謝部位の *in silico* 予測モデルの検証

・CYP2E1 非基質性阻害物質の探索

阻害物質の探索に *in silico* 予測システムが利用可能か否かを検討するために、予測の実施が比較的簡便な CYP2E1 の予測システムを CYP2E1 で代謝されやすい比較的低分子の化合物が多く含まれる HESS データベースの物質に対して適用した。その結果、7 物質が非基質性の阻害物質である可能性が示された。これら化合物について、CYP2E1 組換え酵素を用いた代謝試験での阻害作用を検討し、いずれの化合物も CYP2E1 を阻害することが確認された。この結果から、本予測システムにより非基質性の阻害物質の探索が可能であることが明らかになった。

・CYP1A2 予測システムの検証と医薬品代謝予測への応用

ヒト CYP1A2 代謝予測システムに関して、データベース情報を利用してシステムの検証と精度算出を行った。その結果、基質・非基質（貧基質）の判定を 95%以上の精度で行うことが可能であることが示された。この精度は、これまでに東北大学から報告している CYP2B6、CYP2D6、CYP2E1 および CYP4A11 の代謝予測システムと同程度であった。

市販医薬品に対して CYP1A2 代謝予測システムを適用したところ、富士通 ADME データベースや添付文書・インタビューフォームには CYP1A2 で代謝を受けることが記載されていない多くの薬物が CYP1A2 で代謝を受ける可能性が示された。

・CYP3A4 テンプレートの作成

平面かつリジッドな構造を持つ芳香族炭化水素類からテンプレートの構築を開始し、ステロイド類に広げて行くことでコンパクトなヒト CYP3A4 の基質テンプレートを作成することができた。また、ハニカム状の格子点を方眼紙様のスコアリン

グシステムに載せることで、多様な構造を持つ医薬品分子のテンプレートへの当てはめを容易にすることができた。

一方、CYP3A4 の典型基質である医薬品による検証では、比較のリジッドな構造を持つ化合物は良い予測性を示したものの、フレキシブルな部分構造を持つ diltiazem, ketoconazole の予測性は低いものであった。

2. 肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測

・肝細胞内の薬物の濃縮率の見積もりに関する *in vitro* 実験・データ解析

理論的に、肝細胞対血漿中非結合型薬物濃度比 (K_p, uu 値) は、通常の取り込み実験から得られる C/M ratio と、担体輸送を止めた条件で測定された C/M ratio の比で表すことができる。そこで、①氷冷、②取り込みトランスポーター阻害剤の共存、③取り込みトランスポーターを飽和させる過剰量の基質薬物の存在の 3 条件で担体輸送を止めることを試み、 K_p, uu 値を 13 薬物について決定した。その結果、3 条件下での C/M ratio は、② (cation) > ② (anion) \approx ① > ③といった傾向を示した。5 つのアニオン性薬物については、各条件間の差異は 3 倍以内であった。

・有機カチオン類の肝取り込みに関与するトランスポーターの同定

Clarithromycin, erythromycin は、共に 4°C 条件下と比較して、37°C 条件では、肝細胞に非常に高い活性で取り込まれることが明らかとなった。さらに、複数の阻害剤による取り込み抑制実験の結果より、両化合物の肝取り込み機構は異なる可能性が示唆された。

・ヒト肝 OATP を介した薬物間相互作用の PBPK モデルに基づいた解析

PBPK モデルを用いた臨床データの解析により、複数の薬物間相互作用例において、OATP 基質および阻害剤のパラメータを求めることができた。In vivo における OATP 阻害剤の阻害定数は、*in vitro* 実験で報告されている阻害定数よりも小さい傾向が見られた。

・基質依存的な OATP1B1 阻害作用の検討

OATP1B1 発現細胞を用い、OATP1B1 の典型的基質である [^3H]E₂G, [^3H]E₁S, および [^3H]BSP の取り込みに対する阻害剤 E₁S, CsA, BSP, Ritonavir, Rif, Tacrolimus, Erythromycin, E₂G, Ketoconazole, Taurocholate, Verapamil, Gemfibrozil,

Probenecid, および Cimetidine の阻害活性を評価、比較した (table 1)。本検討から、使用する OATP1B1 の基質と阻害剤の組み合わせによって、OATP1B1 に対する阻害活性が大きく異なることが明らかとなった。さらに、 $[^3\text{H}]E_2G$ は高感度で阻害活性を検出できる OATP1B1 プローブ基質であり、本基質を使用することで薬物間相互作用の過小評価リスクを低減できることが示唆された。

・タンパク結合型の阻害剤が、トランスポーターの輸送阻害に与える影響に関する検討

rifampicin, cyclosporine A, tipranavir, および lopinavir を阻害剤として共存させた時のヒト肝細胞への ES 取り込みクリアランスの変動を HSA の存在下および非存在下で比較した。その結果、いずれの化合物の場合においても HSA 濃度依存的に取り込みクリアランスが低下し、かつ、阻害剤濃度依存的に取り込み活性が低下した。そこで、各 HSA 濃度における阻害剤非添加時の取り込みクリアランスを 100% としたときの取り込みクリアランスと、各 HSA 濃度存在下の阻害が free hypothesis に従うと仮定したときの理論阻害曲線を計算により求めた。その結果、理論曲線に比較して実測された取り込みクリアランス値は小さく、非結合型の阻害剤のみでの阻害では HSA 存在下の取り込みクリアランスは説明できないことが示唆された。

3. 三次元培養系・共培養系の開発

・三次元培養系

灌流培養チップはソフトリソグラフィ法で作製し (fig. 2)、灌流培養は、我々が既に開発した空気圧駆動の自動制御装置を用いた。

作製した灌流培養チップについて、HepG2 による細胞導入およびスフェロイド形成を確認したところ、問題無く行うことができた。

そこで次に、XenoTech 社 hepatocyte により灌流培養チップによるモデル薬物代謝評価の操作手順の確認を行った。その結果、hepatocyte は細胞塊が多量に含まれており、均一な細胞導入ができなかった。さらに、3 日培養を行ったが、スフェロイド形成を確認できなかった。

・共培養系

共培養系での HL-60 細胞と HuH-7 細胞の相互作用の観察を目的として、生細胞の細胞膜を染色する DiOC13(3) (Molecular Probes) を用いて細胞を色調で分別して観察した。その結果、TPA 分化した HL-60 細胞の共培養系では、トログリタゾンが存在すると、HuH-7 細胞に接着した蛍光剤標識

HL-60 細胞の接着数が増加した。

D. 考察

創薬プロセスでは候補化合物の毒性予測の精度が高くない為に開発が中止となる例が未だに報告されている (Nature Rev. Drug Discov. 2004)。これは、ヒトと動物では同じ化合物でも細胞への取込みや排泄、代謝反応や反応性が違う種差によるところが大きい。また、創薬プロセスの初期過程ではヒトの in vivo のデータを入手することはほぼ不可能であることも理由である (Chem. Res. Toxicol. 2009)。この為、ヒト試料による in vitro 評価系としてヒト肝初代培養細胞による評価が広く行われているが、ドナーの個人差によるばらつきや再現性、供給を海外に依存している為、人種差や供給体制の問題がある。その為、それらに代わる安定供給が可能で高い再現性を持つ試験法の開発が求められている。又、毒性予測では特に特異体質による毒性発現で免疫担当細胞が関与している例も知られており、共培養による毒性評価系の開発が必要である。そこで、本年度は、

1. CYP による基質代謝部位の in silico 予測モデルの検証
2. 肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測
3. 三次元培養系・共培養系の開発について検討した。

1. CYP による基質代謝部位の in silico 予測モデルの検証

・CYP2E1・CYP1A2 予測システムの検証

ヒト薬物代謝予測に有用な in silico ツールとして、東北大学山添らにより開発された「二次元基質テンプレートを利用したヒト CYP 代謝予測システム」の創薬への応用を可能とするために、本年度は、(1)本システムの阻害スクリーニングへの適応、(2)市販医薬品を利用した代謝予測の実証試験、を行った。CYP1A2 代謝予測に関してはシステムを確立し、医薬品代謝への応用の検討を開始した。また、新たな取り組みとして代謝阻害スクリーニングへの応用を目指し、CYP2E1 代謝予測システムを利用した検討を実施し、インシリコ代謝予測試験およびインビトロ代謝阻害試験の結果から、CYP2E1 阻害物質として 6 化合物を同定した。

・CYP3A4 テンプレートの作成

本年度は、ヒト CYP3A4 の反応テンプレートの構築のための基礎検討として、平面かつリジッドな構造を持つ芳香族炭化水素類、ステロイド類を用

いた検討を行った。テンプレート作成の方法論をほぼ確立し、市販医薬品を用いた検証を実施した。フレキシブルな分子、またテンプレート作成に用いた化合物よりも大きな分子における予測精度が低いことが明らかになった。

2. 肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測

・肝細胞内の薬物の濃縮率の見積もりに関する *in vitro* 実験・データ解析

ラット肝細胞における $K_{p,uu}$ 値及び f_T 値の推定条件の一つとして、①氷冷、②取り込みトランスporter阻害剤の共存、③取り込みトランスporterを飽和させる過剰量の基質薬物の存在の3条件で、定常状態下の肝取り込みを検討した。カチオン性化合物については更なる条件検討が必要であるが、OATP 基質については、氷冷下 (①) もしくは、適切な取り込み阻害剤存在下 (OATPs においては rifampicin) (②) の両方法論が有効であり、ほぼ同程度の $K_{p,uu}$ 値を与えることが実証された。

・有機カチオン類の肝取り込みに関与するトランスporterの同定

ほとんど構造的に差異がみられない clarithromycin および erythromycin の肝取り込みに対する少なくとも複数の阻害剤の感受性が異なることから、両者の肝取り込み機構は異なることが示唆された。

・ヒト肝 OATP を介した薬物間相互作用の PBPK モデルに基づいた解析

本研究では、*in vitro* 実験の実施と併せて、薬物間相互作用の臨床データを PBPK モデルで解析することにより (Top-down アプローチ)、*in vitro* からヒトの予測 (Bottom-up アプローチ) の精度を高めるための検討をおこなった。その結果、OATP の *in vivo* 阻害定数が *in vitro* 実験で報告されている阻害定数よりも小さかったことから、数理モデルを用いた相互作用予測において、*in vitro* 実験データからの積み上げのみでは阻害定数を含め、予測は困難であることを示すことができた。

・基質依存的な OATP1B1 阻害作用の検討

本年度は、薬物トランスporter OATP1B1 発現細胞を用い、異なる3種類の典型的基質における OATP1B1 に対する14化合物の阻害活性を比較することで、より網羅的に基質依存的な OATP1B1 阻害を検証した。その結果、同一の阻害剤であっても使用する基質により OATP1B1 に対する阻害活性が

異なることを明らかとした。さらに [3 H]Estradiol-17 β -D-glucuronide を基質として用いることで薬物間相互作用リスクの過小評価を回避できることが示唆された。

・タンパク結合型の阻害剤が、トランスporterの輸送阻害に与える影響に関する検討

トランスporter阻害剤の阻害能に対するタンパク結合の影響について *in vitro* 実験により検討した。その結果、いずれの化合物においても HSA 濃度依存的な阻害の減弱が確認された。しかしながら、別試験より求められた非結合型分率 (f_u) より算出される非結合型の阻害剤濃度より推定される阻害強度に比べて強い阻害を示した。これらの結果より、非結合型の阻害剤のみがトランスporterを阻害するという仮説” free hypothesis” に従わない可能性が示唆された。

3. 三次元培養系・共培養系の開発

・三次元培養系

本年度は、チップの設計および試作を終え、HepG2 を用いて基本動作を確認した。Hepatocyte を用いた操作確認実験では、細胞塊によってチップ上の細胞導入流路が閉塞し、培養実験には至らなかった。原因としては、細胞塊による流路閉塞によりスフェロイド形成に必要な細胞が十分量でなかったこと、および、灌流が良好ではなかったことが考えられる。

・共培養系

昨年度までに、トログリタゾンを経肝障害のモデル薬物とし、ヒト肝癌由来細胞 HuH-7 と TPA によりマクロファージ様に分化させた HL-60 細胞との共培養をすることで、分化していない HL-60 細胞の共存時に比べて、細胞障害が強められたことが明らかとなった。今年度、HL-60 細胞を蛍光染色試薬でラベルした後に共培養したところ、分化をさせない HL-60 細胞に比し、TPA 分化させてトログリタゾンを作用させた共培養時に HuH-7 細胞へ接着した HL-60 細胞が多くみとめられた。これにより、薬物による細胞障害に、マクロファージ様の分化が関連する機能が重要であることが示唆された。

E. 結論

1. CYP による基質代謝部位の *in silico* 予測モデルの検証

ヒト CYP 代謝インシリコ予測システムの創薬への応用を目指して、CYP2E1 代謝予測モデルを用いた阻害物質の探索を行い、インビトロ代謝阻害試

験による評価からCYP2E1阻害物質として6物質を同定できた。また、CYP1A2代謝予測モデルを用いた医薬品代謝の予測と検証を行ない、「非基質」については「非基質」として予測できた。さらに、ヒトCYP3A4の2次元基質テンプレートの構築のための基礎検討を実施し、コンパクトなヒトCYP3A4の2次元基質テンプレートを作成することができた。

2. 肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測

肝細胞におけるカチオン性基質の取り込みメカニズムに複数のものが関与していることを見出すとともに、薬物相互作用予測の際に必要な細胞内の阻害剤濃縮率の簡便な実験法を構築・検証することができた。さらに、数理モデルを用いた相互作用予測において、*in vitro* 実験データからの積み上げのみでは阻害定数を含め、予測は困難であることを示すことができた。

OATP1B1 に対する阻害活性は、同一の阻害剤であっても使用する基質に依存し異なることが明らかとなり、さらに $[^3\text{H}]$ Estradiol-17 β -D-glucuronide を基質として用いることで薬物間相互作用リスクの過小評価を回避できることが示唆された。

ヒト凍結肝細胞を用いてトランスポーター阻害剤の阻害能に対する蛋白結合の影響について *in vitro* にて検討を行った。その結果、タンパク結合型の薬物がトランスポーターへの阻害効果を持つことが示唆された。一方でトランスポーターの基質は、タンパク非結合型のみが輸送されることが示された。

3. 三次元培養系・共培養系の開発

チップの設計および試作を終え、HepG2 を用いて基本動作を確認した。

特異体質による薬物性肝障害を評価する系として、ヒト肝癌由来細胞と HL-60 細胞およびそのマクロファージ系に分化した細胞、ならびに単球系細胞等を共培養する系の構築を検討し、薬物による細胞障害に、マクロファージ様の分化が関連する機能が重要であることが示唆する結果を得た。

4. 社会発信

以上の研究成果のを社会発信する機会として、日本薬学会第 133 年年会にてシンポジウムを企画し採択された。

F. 研究発表

1. 論文発表

The Effects of Cytoskeletal Structure Changes induced by Docetaxel on Gene Expressions.: A View from Different Point of Docetaxel Functions., Ishida, S., In “Horizons in Cancer Research Vol. 50” (Ed. Watanabe HS.) Nova Scientific Publishers, Inc., 2012, 101-119

Kotani N, Maeda K, Debori Y, Camus S, Li R, Chesne C, Sugiyama Y., Expression and Transport Function of Drug Uptake Transporters in Differentiated HepaRG Cells. Mol Pharmaceutics, *in press* (2012)

2. 学会発表

DEVELOPMENT OF IN VITRO TOXICITY TESTS USING HEPATOCYTE DIFFERENTIATED FROM HUMAN STEM CELLS

Seiichi Ishida, Workshop : “Genetic Toxicology : Opportunities to Integrate New Approaches” (2012, 4, Silver Spring, MD, USA)

三次元培養による肝前駆細胞の分化様式の調節

石田誠一、久保崇、黒田幸恵、Anne Corlu、Fabrice Morel、関野祐子、第 19 回肝細胞研究会(2012, 6, 札幌)

GENOMIC DNA METHYLATION AS A POTENTIAL MARKER OF STEM CELL DURING HEPATIC CELL DEFFERENTIATION

Takashi Kubo, Tamaki Hori, Yukie Kuroda, Atsuko Miyajima, Momoko Sunouchi, Anne Corlu, Fabrice Morel, Shogo Ozawa, Yuko Sekino and Seiichi Ishida, ISSCR2012 (2012, 6, 横浜)

COMPARATIVE ANALYSES OF GENOMIC DNA METHYLATIONS AND GENE EXPRESSIONS IN HEPATIC CELLS

Takashi Kubo, Tamaki Hori, Yukie Kuroda, Maki Hojyo, Atsuko Miyajima, Momoko Sunouchi, Anne Corlu, Fabrice Morel, Shogo Ozawa, Yuko Sekino and Seiichi Ishida, 第 27 回日本薬物動態学会年会、(2012, 11, 東京)

医薬品開発における動物細胞利用の現状と将来

石田誠一、第 29 回医用高分子研究会講座、(2012, 11, 東京)

創薬支援のためのヒト肝薬物代謝を評価する安定かつ再現性に優れた細胞レベルでの試験系の開発

石田誠一、日本薬学会第 133 年会、(2013, 3, 横浜)

肝前駆細胞の簡便で安定的な培養維持法の開発

石田誠一、久保崇、黒田幸恵、北條麻紀、Anne Corlu、Fabrice Morel、関野祐子、日本薬学会第 133 年会、(2013, 3, 横浜)

創薬を支援する薬物代謝研究ツール: In vitro 試験から in silico 予測へ

吉成浩一、山添康、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日

ヒト肝細胞の長期間三次元培養およびヒトチトクローム P450 アイソフォームが共発現された新しい細胞システムの創薬研究への活用

山田泰弘、日本薬学会第 133 年会、(2013, 3, 横浜)

薬物性肝障害検出を目的として共培養システムによる細胞接着性の評価法

佐藤初音、小澤正吾、田村宏明、大村麗美、南場龍彦、鈴木李果、蒲生俊恵、幅野涉、寺島潤、日本薬学会 133 年会 (2013,3)

スタチン系薬剤とシクロスポリン A との薬物間相互作用の PBPK モデルを用いた定量的解析

吉門崇、前田和哉、中田智久、設楽悦久、吉田健太、杉山雄一、日本薬物動態学会第 27 回年会 千葉 2012 年 11 月 20 日～22 日

Sandwich 培養肝細胞を用いた薬物の胆汁排泄評価に与える取り込みトランスポーターの発現変動の影響

前田和哉、小谷直生、渡辺貴夫、平松万里子、Li-kun Gong、Yi-an Bi、竹澤俊明、楠原洋之、杉山雄一、第 20 回肝病態生理研究会 金沢 2012 年 6 月 6 日

肝取り込みトランスポーターの阻害を介した薬物間相互作用の生理学的薬物速度論モデルに基づいた解析
吉門崇、中田智久、小谷直生、吉田健太、前田和哉、杉山雄一、第 20 回肝病態生理研究会 金沢 2012 年 6 月 6 日

肝臓内非結合型薬物濃度を予測するための in vitro 実験系の検討

池尻和明、前田和哉、杉山雄一、第 20 回肝病態生理研究会 金沢 2012 年 6 月 6 日

薬物間相互作用の精確な予測に必要な肝臓内蛋白非結合型阻害剤濃度の評価

池尻和明、前田和哉、楠原洋之、杉山雄一、日本薬物動態学会第 27 回年会 千葉 2012 年 11 月 20 日～22 日

ヒト凍結肝臓細胞における OATP を介した輸送に対する阻害強度に与える Human serum albumin の影響
浜川 望、日本薬学会第 133 年会、(2013, 3, 横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

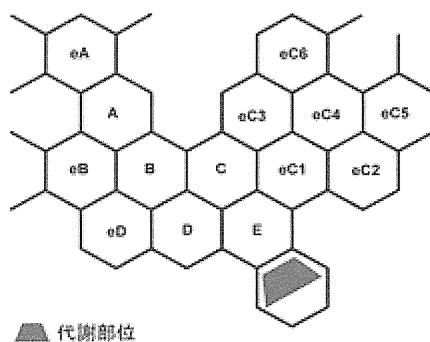


fig. 1 ヒトCYP1A2代謝予測テンプレート

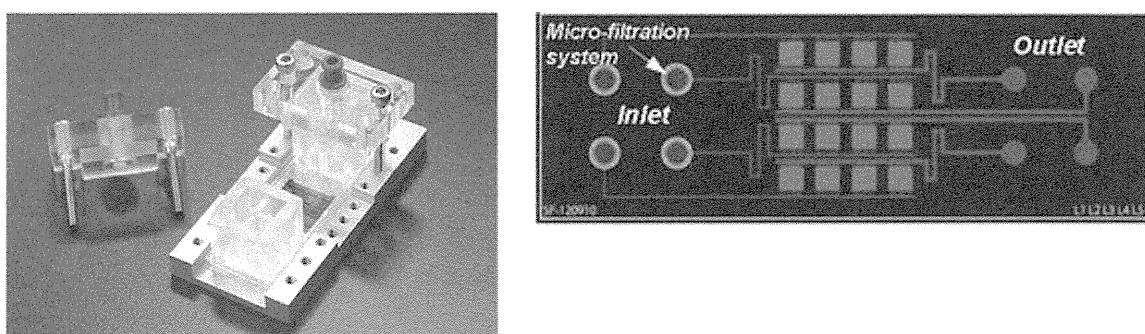


fig. 2 灌流培養チップの外観(左)とフォトマスク(右)

table 1 各阻害剤の K_i

Inhibitors	Substrates		
	E_2G	E_1S	BSP
		K_i ($\mu\text{mol/L}$)	
E_1S	0.095 ± 0.015	0.271 ± 0.013	0.429 ± 0.175, 611 ± 387
CsA	0.118 ± 0.015	0.732 ± 0.224	0.694 ± 0.149
BSP	0.131 ± 0.014	0.215 ± 0.058	0.327 ± 0.033
Ritonavir	0.397 ± 0.023	46.4 ± 9.8	3.38 ± 0.66
Rifampin	0.585 ± 0.074	6.96 ± 1.31	1.13 ± 0.15
Tacrolimus	0.668 ± 0.156	1.78 ± 0.34	3.57 ± 0.43
Erythromycin	4.88 ± 0.65	13.4 ± 4.0	63.3 ± 11.5
E_2G	7.04 ± 0.53	16.6 ± 2.4	39.3 ± 9.0
Ketoconazole	9.90 ± 2.40	15.4 ± 3.7	60.9 ± 26.1
Taurocholate	19.0 ± 1.0	50.0 ± 4.8	162 ± 34
Verapamil	22.3 ± 4.2	44.0 ± 7.3	84.3 ± 30.1
Gemfibrozil	26.4 ± 2.1	381 ± 60	173 ± 34
Probenecid	79.4 ± 5.8	227 ± 69	740 ± 181

K_m values are shown in red.

検討した阻害剤のうち、特にRitonavirの K_i は用いる基質に依存し、0.397~46.4 $\mu\text{mol/L}$ と最大117倍もの乖離を示した。また、Gemfibrozil (K_i : 26.4~381 $\mu\text{mol/L}$)およびErythromycin (K_i : 4.9~63.3 $\mu\text{mol/L}$)もそれぞれ最大14倍、13倍の乖離を示した。上記以外の阻害剤の K_i も、基質間で、2~12倍の乖離を示した。

腫瘍等ヒト疾患組織の長期継代維持・保存・データベース化による医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築

独立行政法人 医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部
野村 大成

研究要旨：医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築のため、ヒト組織移植に最適な SCID マウス、前立腺がん、GIST の樹立、24 年度までに 61 症例の永久凍結保存腫瘍株を樹立した。腫瘍等ヒト疾患組織のデータベース化を計り、創薬研究上の有用性を確認する。

研究分担者

- (1) 医薬基盤研究所 難病・資源研究部
梁 治子
- (2) 医薬基盤研究所 難病・資源研究部
小原 有弘
- (3) 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部
竹森 洋
- (4) 医薬基盤研究所 難病・資源研究部
吉留 克英
- (5) 大阪大学大学院医学系研究科 立花 功
- (6) 大阪大学大学院医学系研究科 野々村 祝夫
- (7) 大阪大学大学院医学系研究科 奥村 明之進
- (8) 新潟大学大学院医歯学総合研究科
榎本 隆之
- (9) 第一三共株式会社 癌研究所 市川 公久
- (10) 株式会社桃谷順天館 山原 年
- (11) 武田薬品工業株式会社 医薬研究本部
改正 善彦

A. 研究目的

Bosma 博士の開発した T 細胞、B 細胞機能の欠如した SCID マウスより IgM, IgG が検出限界以下のものを 20 代以上選択的兄妹交配することにより、Leaky、白血病死を激減させた。これにより、これまで生着したことのないヒト悪性腫瘍が急激に増殖し、自然遠隔転移すること (J Rad Res, 1900, Jpn J Cancer Res, 1991, 93)、ヒト良性腫瘍もゆっくり増殖すること (Carcinogenesis, 1992, Cancer Det, 1997, Cancer Lett, 1998,

2002)、最終的には、ヒト正常臓器・組織の長期間 (~3 年) の継代維持に成功した (Cancer Res, 1997, Cancer Lett, 1998 ; 以後 Super-SCID と呼ばれる)。350 回にわたり、腫瘍等ヒト疾患組織の維持を行ったところ移植後の病理組織像、機能、遺伝子発現等はよく維持されている (Mutat Res, 2008)。また、移植ヒト皮膚に太陽紫外線類似光を照射し、世界で初めて、人工的ヒトがん誘発に成功した (Cancer Res, 1997)。骨髄、免疫細胞 (Mutat Res, 2008)、ヒト胎児組織も増殖分化し継代維持でき、この分野で他国の追随を許さず世界をリードし続けている。

平成21年より実施中の政策創薬総合研究では、20年前継代維持プログラム凍結保存したヒト頭頸部腫瘍、婦人科・生殖器腫瘍、消化器腫瘍、内分泌腫瘍等の再移植再生に成功し、新たにヒト腫瘍300症例の移植、100正常組織、胎児由来組織の継代維持とプログラム凍結保存に努め、総括的ヒト組織維持システム構築の基礎を確立中である。その成果は、本年開催の評価委員会 (ヒアリング) においても医薬基盤研究所の特有の研究として高く評価され、来年度以降は企業も含め大きく発展させるように指示され、それにより本マッチング研究に参加した。本研究では、創薬、化粧品等企業のニーズに合わせ大学等研究者と共に官民共同研究を行う。24年度は、これまでの不足症例の補充、CTCよりのがん再生等を試み、25年度は、臨床所見、遺伝子変異、発現異常を併せデータベース化を行う。いずれも我々が20年以上世界をリードしてきた研究の発展を期するものであり、その成果は医薬品等の有効性・安全性評価に用いられ、新薬開発を促進し、国民の保健・医療・福祉の向

上に大きく貢献できる。

B. 研究方法

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持と薬剤およびヒト組織に合わせた系統の作成・増産；これまで SCID マウスに生着・増殖しなかった腫瘍（前立腺がんなど）が、LPS non-responder の C3H/HeJ-*scid*:LPS マウスで継代移植に成功した。*bg^J*, *W^V* 遺伝子を導入した SCID マウスも作成する。また、薬剤等により代謝活性化出来ないマウス系統があることより、薬剤およびヒト腫瘍に適切な SCID マウスを野村が用意する必要がある。それぞれのヒト組織、試験医薬品に適した SCID マウスを各企業研究者が基盤研にて選別し目的にあったものを増産する（野村、委託企業を含む全分担研究者）。
2. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；ヒト臨床腫瘍のうち、未完成の腎腫瘍他泌尿生殖器腫瘍他の移植継代維持を行う（野村、吉留、立花、野々村、榎本、奥村、研究協力者；足立、辻村、坂巻、鳥、松宮）。
3. 前立腺がんは、成人男子がんのトップになるようとしているが、可移植性の前立腺がんは、我々の成功したもの以外にはなく、繰り返し移植を試みるとともに CTC(Circulating Tumor Cell)からの作成を含め重点的に実施する（野村、野々村、吉留、立花、研究協力者；辻村、坂巻、鳥、松宮）
4. 継代、維持、保存できたヒト腫瘍の微生物モニタリングを行い安全に使用できるようにする（小原、野村）
5. ヒト正常成人組織・胎児組織の長期維持；継代維持が可能になったヒト胎児由来組織（脂肪、皮膚他）の資源保存を行う（野村、竹森、山原、榎本）。ヒト皮膚組織、特に胎児皮膚組織についてはマイクロアレイによる遺伝子発現を含み解析し、ヒト皮膚疾患の原因タンパクを同定する。研究施設および移植技術の関係から、移植皮膚による研究を医薬基盤研究所にて行う（野村、山原、竹森、梁）。
6. データベース化に向けての移植組織の継代維持による形態・機能および遺伝子変化・発現の変化の調査；継代による組織変化の病理学的検索（野村、吉留、榎本、野々村、奥村、立

花、研究協力者；坂巻、鳥）、PCR 解析、マイクロアレイを用いた遺伝子発現レベルでの解析を行う（野村、梁、竹森、各企業研究者；市川、山原、改正）。

7. ヒト臨床腫瘍を有する免疫不全マウスを用いて抗腫瘍活性を評価し本システムの有意性を検証する（野村、市川、吉留、立花、奥村）。

（倫理面への配慮）

- 1) 手術等による成人ヒト組織に対しては、「ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等および先端医療評価システムの開発」（承認番号：8、代表・野村）、12週未満胎児組織に対しては、「ヒト胎児組織維持SCIDマウスを用いた医薬品等評価システムの開発」（承認番号：9、代表・野村）の2課題で、倫理委員会の承認をえている。手術時等で採取されるヒト組織の譲渡に関しては、医療機関（大阪大学医学部附属病院、隈病院、神戸海星病院、平松クリニック、大阪警察病院、大阪中央病院）、骨髄細胞については、医薬基盤研究所、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を受け、厳重な管理の下、医薬基盤研究所において野村が移植・継代維持をおこなっている。譲渡されるヒト組織に対しては、人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除に関して、文書・口頭で十分にインフォームド・コンセントをとり、同意を得、同意書にサインを頂いている。18歳未満の方に対しては、本人および親権者の同意を得ている。

また、大学等および企業研究所との所外共同研究についても、医薬基盤研究所理事長の承認のもとに実施できるよう倫理委員会の承認を得ている（承認番号：8、代表・野村）。

- 2) 動物実験に関しては、課題「ヒト組織維持SCIDマウスを用いた環境因子および医薬品等先端医療評価システムの確立」（承認番号：DS18-086R7、代表・野村）により、医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもと、ガイドラインに沿い、研修、登録のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し、研究を行っている。

C. 研究結果

本研究課題について、当初研究計画・方法どおり実施し、予定通りの成果が得られた。

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウスの維持・増産；
C. B17-*scid* [原種] 由来の C57BL/6J-*scid*、C3H/HeJ-*scid* 等マウスを常備し、*bg^J*, *W^V* 導入

を行い、24年度に C3H/HeJ/N0s-*scid*; *bg^l*; *LPS*、C3H/HeJ/N0s-*scid*; *bg^l*; *LPS^W* を新たに近交化し量産化を行った (表1) (野村、足立)。

また、単に拒絶反応を起こさないだけでなく、薬剤等により代謝活性化出来ないマウス系統があることより、薬剤およびヒト腫瘍に適切な SCID マウスを基盤研にて選別・用意し、それぞれのヒト組織、試験医薬品に適した SCID マウスを各分担研究者がヒト組織移植実験に使用している (野村、梁、小原、竹森、吉留、野々村、奥村、市川、山原、改正)。

2. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；

平成22年度に新規ヒト腫瘍131症例を、23年度には新規ヒト腫瘍146症例を移植した平成24年度には新規ヒト腫瘍110症例、特にこれまで欠けていた腎がんを含む泌尿生殖器腫瘍28症例を SCID マウスに新たに移植した (図1) (野村、吉留、立花、野々村、榎本、奥村、研究協力者；足立、辻村、鳥、坂巻、松宮)。

移植したヒト組織の殆どは維持されるが、3-4ヵ月で消失する例が少数例でみられた。SCID マウスへの継代移植を行い2-3代継代しても増殖の遅いもの (継代移植後6-8ヵ月たっても腫瘍が大きくなる) は中止し、6ヵ月以内に大きな腫瘍を形成するものを選び順次プログラムフリーザーにて凍結保存した。23年度創薬基盤推進研究事業で報告したように特定のプログラムで緩慢に凍結した場合 (-0.1°C/min) では、20年前に凍結したヒトがん組織がもとのまま再生された。急速凍結法は、難移植性ヒト腫瘍には不向きであり消失した。図1に、現在再生可能な形で永久凍結保存できている各臓器がんの症例数を記載した。

今まで移植が極めて困難であったヒト前立腺がん (辜丸転移巣) を適切な SCID マウスに移植することにより SCID マウス皮下で増殖するようになり、継代維持に成功した (22年度報告)。移植後腫瘍が大きくなるにつれマウス血中のヒト PSA 濃度が増加している。本症例は転移で発見され未治療の症例であったためホルモン感受性前立腺がんと考えられた。実際雌マウスに移植しても全く増殖せず、移植マウスの去勢により消失する (野村、足立)。前臨床試験には格好の症例である。医薬基盤研究所において樹立された本ヒト前立腺腫瘍株は、企業分担研究者においても順調に生着・継代ができた。担癌マウスを去勢したところ速やかに腫瘍の退縮がみられ、ホルモン依存性の特徴を備えていることが確認された。遺伝子発現・変異につ

いて調査中である (改正)。

新たに前立腺がん2症例が症状に応じた最適 SCID マウスに移植することにより継代維持、プログラム凍結に成功した (図1)。第一成功例と異なりいずれも PSA を分泌しておらず、ホルモン抵抗性症例である (野村、野々村、足立)。マイクロアレイ解析を含め詳細な解析を進めている。2症例ともに TNFRSF21 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21) の発現が欠損している (野村、足立、梁)。第一症例と併せ、創薬研究には欠かせない評価システムになると思われる (図2)。

また、これまで GIST は移植、継代維持に成功していなかった。倍加時間がヒト体内にけると同様に (遅いものは1年) 極めてゆっくりであることによる。23年度に肝転移症例で比較的早く増殖し、凍結保存にも1例成功したことを報告した。しかし、工夫を凝らすことにより、8症例の GIST 原発巣が増殖が速く凍結保存も可能となっている (図1)。図3に移植経緯、組織像等を示した。遺伝子変異等も検出されている (野村、吉留、鳥、足立)。

3. CTC、がんの浸潤、転移のフォロー；

1) CTC；

前立腺がんは、成人男子がんのトップになるうとしている。前述のごとく、可移植性の前立腺がんは、我々の成功したもの以外にはない。そこで、骨転移 (血行性転移) を起こしやすいことより、CTC (Circulating Tumor Cell) からの作成を行った。高値の PSA を伴う症例で、末梢血を皮下、腹腔内に注入したが今のところ成功していない (野村)。近年、各種のがんにおいてがん幹細胞の存在が示唆されており、治療成績の向上のためにはがん幹細胞の制御が必要であることから、奥村は、肺腺がんにおいて NROB1 (DAX-1) の発現亢進、PPAR γ の発現抑制によりがん幹細胞の性質が発現すること、NROB1 が PPAR γ と会合して転写活性を負に制御することを示した (奥村)。

体液からのがん細胞の検出法として、新たに、胸水からのがん組織の樹立を行った。肺がん患者4例からの胸水を Super-SCID マウスに移植した。全て巨大な腺がんを形成したが、1例、胸水中にがん細胞が同定できかねる胸水の移植により、肺腺がん組織が増殖した。今後、非手術的に (内科的に) 採取されたヒト資料からもヒトがん組織を樹立できることを示している (野村、立花)。また、立花は、小細胞肺が

んの大部分には、転移抑制因子 CD9 が発現しておらず、CD9 を発現させるとアポトーシスが誘導される。小細胞肺癌培養株とその CD9 トランスフェクタントのプロテオミクス解析を行ったところ、(1) CD9 トランスフェクタントにカルシウム結合神経タンパク、カルレチニンが発現されること、(2) カルレチニンがアポトーシスを誘導することを見出した (図4) (立花)。

2) がんの浸潤、転移のフォロー；

ヒト組織、マウス組織を正確に識別する普遍的な手技として、梁がマイクロサテライト解析法により迅速、客観的に識別する手段を確立している。ヒトがん組織を継代、移植することにより巨大なヒト腫瘍を形成するが、がん種により周辺組織への浸潤に加えて、腋窩部、鼠蹊部、肺門部リンパ節、肺、肝等内臓に転移を形成することがある。これがマウス由来かヒト由来か、病理組織診断に加え、客観的な証拠を得るために、組織断片を梁が解析した。病理学的に移植ヒトがん組織の、腋下、肺門、肺、肝等への自然遠隔転移を疑っていた腫瘍の全てで、明確に、ヒトマウスマイクロサテライトパターンが識別できた (梁、野村)。また、稀であるが、肺がん患者の正常肺組織を SCID マウスに移植したところ、3 症例で未分化な肺腺がんが急速に増殖した。逆に、SCID マウスへのヒトがん組織移植部位にマウス白血病が発生することもある。マイクロサテライト解析にて早急にヒト、マウス由来を確定することにより、再手術、予後の診断を下すのに役立った (野村、坂巻、梁)。

ヒト乳がんは、図1にも示した通り、SCID マウスに移植しても、急速な増殖は認めがたく、マウス内での自然遠隔転移も起こりにくい。吉留は、臨床的に転移を迅速に検出する手技として、One-step Nucleic Acid Amplification 法を併用した術中センチネルリンパ節転移検索を行い、予後因子として有用であると考えられた。また、細胞周期プロファイリング法が新規の腫瘍増殖解析法であることを確認した (吉留)。

榎本は、in vitro システムとして、婦人科癌臨床検体から CTOS (cancer-tissue originated spheroid) を樹立し、化学療法奏効性を判定できるシステムを確立し、個別化治療に応用することを目指している。

4. 継代、維持、保存ヒト腫瘍の微生物モニタリ

ング；

ヒト臨床がん組織の移植に際しては、マイコプラズマ、肝炎抗原/抗体、成人 T 細胞白血病、HIV、梅毒反応陰性症例の組織のみ医薬基盤研究所動物実験施設に導入している。Super-SCID マウスに移植、継代維持、保存を行っているヒト組織について、使用上の安全のため、ウィルス検査を小原が実施した。検査総数 41 腫瘍で 27 腫瘍の EBV 陽性例を除き、調べた限り全て陰性であった。EBV は日本人においては 90% が抗体を保有しているとされている (小原)。

5. ヒト正常成人組織・胎児組織の長期維持；

継代維持が可能になったヒト胎児由来組織 (脂肪、皮膚他) の資源保存を行った (野村)。また、マイクロアレイ解析も行っている。ヒト皮膚組織、特に胎児皮膚組織については、竹森、山原がマイクロアレイによる遺伝子発現を解析し、ヒト皮膚疾患の原因タンパクを同定できるように準備した。研究施設および移植技術の関係から、移植皮膚による研究を医薬基盤研究所にて行えるようにした。

ヒト臓器・組織の移植に際しては、組織摘出から移植までの組織保存、即ち、酸化障害をいかに回避するかが成否を左右する。竹森は、臓器保存・臓器移植や虚血性疾患に有用な抗酸化ストレスを効率良く発揮する物質を含む素材を簡便にスクリーニングする系を構築し、さらに、有効成分を大量にかつ安全に濃縮方法を検討したところ、タカクマムラサキエキスや精製成分が細胞や臓器の保存にも利用できると期待されることがわかった (図5)。山原、竹森は、ヒト皮膚疾患、特に老化を標的として、若いヒト皮膚のケラチノサイトと中年のケラチノサイトの mRNA をマイクロアレイ解析を行い、若いケラチノサイトに特異的な因子の同定を行った (図6)。また、老化に関わるメラニン産生抑制効果で評価を行うことで、システインとの組み合わせで有効な結果を得た。皮膚疾患における老化防止や、臓器保存の基礎を構築できた。

6. データベース化に向けての移植組織の継代維持による形態・機能および遺伝子変化・発現の変化の調査；

臨床所見に加え、継代維持凍結組織の病理学的検索、遺伝子変異の検索、マイクロアレイを用いた遺伝子発現レベルでの解析を開始した (野村、梁、吉留、立花、野々村、榎本、奥村、足立、坂巻、鳥、松宮)。

7. ヒト臨床腫瘍を有する SCID マウスを用いて抗腫瘍活性を評価し本システムの有意性を検

証した。(野村、市川、吉留、立花、奥村)。

市川は、本プロジェクトで構築されたヒト臨床腫瘍担癌マウスの内、ヒト肝臓がん担がマウスを用いて腫瘍増殖速度等の特性、継代や凍結保存が可能であることを確認した。さらに、本プロジェクトで樹立された担がんモデル由来の腫瘍での遺伝子発現プロファイリングやタンパク発現解析により、がんで特異的に発現が亢進していることが報告されている複数の分子が、当該モデルにおいても高発現していることが確認された。当該モデルがこれら分子を標的とする抗がん剤候補の抗腫瘍効果評価、作用機作解析さらにはバイオマーカー探索に有用な系である可能性が示唆された。

前述のごとく、改正は、ヒト前立腺腫瘍株の有用性を検証した。継代したあとの生着は良好であり(現在3代まで継代済み)、凍結ストックを作製し、凍結ストックから免疫不全マウスに移植した場合も生着を確認できた。腫瘍の生着したマウスにおいてPSAを確認した。一定の大きさに成長した腫瘍が生着したマウスを去勢すると、前立腺腫瘍が退縮することを確認した。

ヒトがん以外に、良性の前立腺肥大組織も長期間継代維持が可能になっている(野村、足立)。新しい薬剤であるタダラフィルとデュタステライドの前立腺組織への影響を、super-SCIDマウスモデルで検討したところ、両剤とも、早期から前立腺増殖を抑制することが確認され、NOやPGの関与も推測された。前立腺肥大症に対する治療効果判定に有効であり、期待できるものであることが分かった(野村、足立、野々村、辻村)。

D. 考察

本研究では、ヒト組織長期維持SCIDマウスを用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築による創薬研究支援を目的としている。SCIDマウスは、C.B17-*scid*, C57BL/6J-*scid* 等に加え、C3H/HeJ/NOS-*scid* LPS⁻, bg, W等を用意し、がん等ヒト疾患組織、使用される医薬品の薬物代謝の面から適切なものを選べるようにした。マウスの身体を借りて、ヒトでの創薬研究支援の基盤を築くものと考えられ、開始1年で、参加企業等でその有用性が検証されている。本研究を、全ての臓器腫瘍において確立するとともに、各ひと腫瘍の持つ病態(形態、分子レベル)を併せることにより、データベース化等への発展を期するものであり、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性の研究、環境(宇

宙を含む)の人体影響評価に用いられ、このシステムを完成させることにより、世界をリードできるものとする。

E. 結論

腫瘍等ヒト疾患組織の長期継代維持・保存・データベース化による医薬品等の有効性、安全性評価システムの構築を行う基盤として、ヒト臨床がん組織等移植に最適のSCIDマウスの作成と利用、これまで不可能だったヒト前立腺がん、GISTの使用も可能にした。24年度は、泌尿生殖器腫瘍28例の他、82症例の移植を新たに行った。また、61症例のヒトがん組織が継代維持、再生可能な形で凍結保存でき、当初予定を超える成果を得た。臨床腫瘍組織、疾患組織移植マウスは、創薬研究に有効であることが示された。また、有効なヒト臓器・組織保存、ヒト皮膚老化防止研究の基盤も構築できた。

F. 健康危険情報

該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Masao Iwamori, Masanori Nakasa, Kentaro Yamazaki, Yuriko Iwamori, Kyoko Tanaka, Daisuke Aoki, Shigeki Adachi, Taisei Nomura. Bacterial species-characteristic profiles of molecular species, and the antigenicity of phospholipids and glycolipids in symbiotic *Lactobacillus*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* species. *Glycoconj J* (2012) 29:199-209

2) 野村大成、足立成基、梁 治子、畑中英子、菊谷理絵、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤 哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、若命浩二、D. K. Parida, R. I. Bersimbay. 宇宙環境の人体影響評価と防護に関する研究;放射線盤発影響の防御。 *Space Utiliz Res.* 28: 126-129, 2012.

3) Capes-Davis A, Reid YA, Kline MC, Storts DR, Strauss E, Dirks WG, Drexler HG, Macleod RA, Sykes G, Kohara A, Nakamura Y, Elmore E, Nims RW, Alston-Roberts C, Barallon R, Los GV, Nardone RM, Price PJ, Steuer A, Thomson J, Masters JR, Kerrigan L. Match criteria for human cell line authentication: Where do we draw the line? *Int J Cancer.* (2012) 印刷中。

4) Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga

- M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K, Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. PLoS One. 2013;8(1) 印刷中。
- 5) Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii M, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. PLoS ONE 7 e37803, 2012.
- 6) Popov S, Venetsanou K, Chedrese PJ, Pinto V, Takemori H, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Mochizuki N, Soares-da-Silva P, Bertorello AM. Increases in intracellular sodium activate transcription and gene expression via the salt-inducible kinase 1 network in an atrial myocyte cell line. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 303: H57-65, 2012.
- 7) Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, Abe T, Kiyonari H, Tanaka T, Sakai J, Takahashi SI, Itoh H. Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1. EMBO J. 17: 2275-2295, 2012.
- 8) Sasagawa S, Takemori H, Uebi T, Ikegami D, Hiramatsu K, Ikegawa S, Yoshikawa H, Tsumaki N. SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice. Development 139: 1153-63, 2012.
- 9) Dietrich JB, Takemori H, Grosch-Dirrig S, Bertorello A, Zwiller J. Cocaine induces the expression of MEF2C transcription factor in rat striatum through activation of SIK1 and phosphorylation of the histone deacetylase HDAC5. Synapse 66: 61-70, 2012.
- 10) 西田俊朗、吉留克英、鳥正幸。消化管間質腫瘍(GIST)-チロシンキナーゼ阻害薬一。日本臨牀 70: 452-455, 2012.
- 11) Masa-Aki Shibata, Jayakrishna Ambati, Eiko Shibata, Katsuhide Yoshidome, Mariko Harada-Shiba. Mammary cancer gene therapy targeting lymphangiogenesis: VEGF-C siRNA and soluble VEGF Receptor-2, a splicing variant. Med Mol Morphol 45: 179-184, 2012.
- 12) Nakai Y, and Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. Int J Urol, 20(2), 150-160, 2013.
- 13) Yoshioka Y, Suzuki O, Nishimura K, Nonomura N et al. Analysis of late toxicity associated with external beam radiation therapy for prostate cancer with uniform setting of classical 4-field 70 Gy in 35 fractions: a survey study by the Osaka Urological Tumor Radiotherapy Study Group. J Radiat Res, 54(1), 113-125, 2013.
- 14) Hatano K, Nishimura K, Nakai Y, Nonomura N et al Weekly low-dose docetaxel combined with estramustine and dexamethasone for Japanese patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. Hatano K, et al. Int J Clin Oncol, in press.
- 15) Nishimura K, Nonomura N, Hashine K, et al. Prolonged treatment with three-weekly docetaxel plus daily prednisolone for metastatic castration-resistant prostate cancer: a multicenter, phase II, open-label, non-comparative, extension study in Japan. Int J Clin Oncol, in press.
- 16) 高尾徹也、野々村祝夫ら、前立腺肥大症患者の夜間頻尿に対するナフトピジルの効果＝夜間頻尿特異的 QOL 質問票(N-QOL 質問票)を用いた評価。高尾徹也ら、泌尿器外科, 25(6), 1373-1380, 2012.
- 17) 竹澤健太郎、野々村祝夫ら、前立腺癌尿管転移の 1 例。泌尿器外科, 26(1), 44-48, 2013.
- 18) Susaki Y, Inoue M, Minami M, Sawabata N, Shintani Y, Nakagiri T, Funaki S, Aozasa K, Okumura M, Morii E. Inhibitory effect of PPAR γ on NROB1 in tumorigenesis of lung adenocarcinoma. Int J Oncol. 2012 e-pub ahead.
- 19) Yoshihara K, Tsunoda T, Shigemizu D, Fujiwara H, Hatae M, Fujiwara H, Masuzaki H, Katabuchi H, Kawakami Y, Okamoto A, Nogawa T, Matsumura N, Udagawa Y, Saito T, Itamochi H, Takano M, Miyagi E, Sudo T, Ushijima K, Iwase H, Seki H, Terao Y, Enomoto T, Mikami M, Akazawa K, Tsuda H, Moriya T, Tajima A, Inoue and Tanaka K. High-Risk Ovarian Cancer Based on 126-Gene Expression Signature Is Uniquely Characterized by Downregulation of Antigen Presentation Pathway, Clin Cancer Res, 18, 1374-1385, 2012.
- 20) Yoshino K, Hiramatsu K, Enomoto T, Fujita M, Ueda Y, Kimura T, Kobayashi E, Kiyohara Y, Tsutsui T and Kimura T. Salvage Chemotherapy Using Gemci Tabine for Taxane/Platinum-

resistant Recurrent Ovarian Cancer: A single Institutional Experience. *Anticancer Research*, 32(9), 4029-33, 2012.

21) Kim A, Enomoto T, Ueda Y, Naka T. Therapeutic Strategies in Epithelial Ovarian Cancer, *J Exp Clin Cancer Res*, 31(1), 14, 2012.

22) Yokoyama T, Enomoto T, Serada S, Morimoto A, Matsuzaki S, Ueda Y, Yoshino K, Fujita M, Kyo S, Iwahori K, Fujimoto M, Kimura T, Naka T. Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *IntJ Cancer*:132, 472-484 2012.

2. 学会発表

1) 野村大成。放射線と化学物質複合曝露 第26回環境ホルモン学会講演会 特別講演 (H24/6/12 東京大学山上会館)。

2) 辻村 晃、福原慎一郎、木内 寛、竹澤健太郎、奥田英伸、山本圭介、吉岡 徹、高尾徹也、宮川 康、野々村祝夫、足立成基、野村大成、成田道郎。デュタステリドのヒト前立腺への影響—スーパーSCID マウスへの移植モデルを用いた組織学検討— 第19回日本排尿機能学会 (H24/8/29-31 名古屋国際会議場)。

3) Taisei Nomura, Rie Kikuya, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Eiko Hatanaka, Momoyo Kaji, Koujun Yasuda, Hiroo Nakajima, Tadashi Hongyo, Dillip Kumar Parida, Koji Wakame, Prevention of Cancer and Radiation Induced Disorders by Active Hexose Correlated Compound, AHCC in Mice and Humans. 20th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (2012/7/21-22, Hotel Royton Sapporo)。

4) Taisei Nomura, Plenary Lecture: Direct effect of radiation and chemicals on human tissues maintained in super SCID mice. 2012 International Conference on Radiation Biology (2012/11/22-24, ACTREC, Tata Memorial Centre, Navi Mumbai, India)。

5) 林田みどり、小澤裕、家村将士、柳原加奈、小原有弘、古江一楠田美保、ヒト多能性幹細胞の緩慢凍結法による細胞凍結・解凍における改善の検討 日本組織培養学会第85回大会 5月 (京都)、2012。

6) 大谷梓、松永典子、家村将士、川口英子、平山知子、林田みどり、小澤裕、塩田節子、古江一楠田美保、原澤亮、小原有弘、培養細胞にお

けるマイコプラズマ汚染の現状について第39回日本マイコプラズマ学会学術集会5月(岩手)、2012。

7) 鈴木孝昌、小原有弘、松本真理子、広瀬明彦、林 真、本間正充ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性 日本環境変異原学会 第41回大会11月(静岡)、2012。

8) A. Kohara, N. Hirayama, Y. Ozawa, M. Ozawa, A. Ohtani, N. Matsunaga, M. Iemura, S. Shioda Profiles of genomic instability in high-carcinogenicity genetic disease cell lines collection by high-resolution array-based comparative genomic hybridization (aCGH). ASCB San Francisco (2012)。

9) 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、竹森洋 SIK3によるクラスII-HDAC制御がコレステロール-胆汁酸代謝へ与える影響 第85回日本生化学会 2012年12月16日(福岡)。

10) 熊谷彩子、堀家なな緒、伊東祐美、長岡康夫、竹森洋 塩誘導性キナーゼ2(SIK2)の新規メラニン合成調節機構について 第85回日本生化学会 2012年12月16日(福岡)。

11) 佐野坂真人、伊東祐美、藤本穰、大河原知治、仲哲治、竹森洋 SIK3はマクロファージにおける炎症性サイトカインの発現を制御する 第85回日本生化学会 2012年12月16日(福岡)。

12) Kimura T, Yoshino K, Hiramatsu K, Kiyohara Y, Morimoto A, Yokoyama T, Kobayashi Eiji, ueda Y, Fujita M, Inoue M, Enomoto T, Kimura T. Establishment of cancer-tissue originated spheroids (CTOSs) and chemosensitivity test for endometrial cancer. AACR Annual meeting 3/31-4/4, 2012, Chicago.

13) 須崎剛行、奥村明之進、他。Stage IA 肺癌における DAX-1、PPAR γ 発現と予後の関係。日本呼吸器外科学会 2012年。口演。(秋田)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得:

24.11.14 「チロシナーゼ誘導抑制剤及びメラニン合成抑制剤」 竹森 洋、熊谷 彩子、森田 純子、湊野 裕之、川原 信夫、飯田 修、杉村 康司、志賀 幸生、鎌田 文広、香月 茂樹、河原 秀久、長岡 康夫 (発明人)、株式会社桃谷順天館 (出願人)、特願 2012-249917

2. 実用新案登録:

該当なし

3. その他:

表 1

SCID Mice in Osaka University and NIBIO

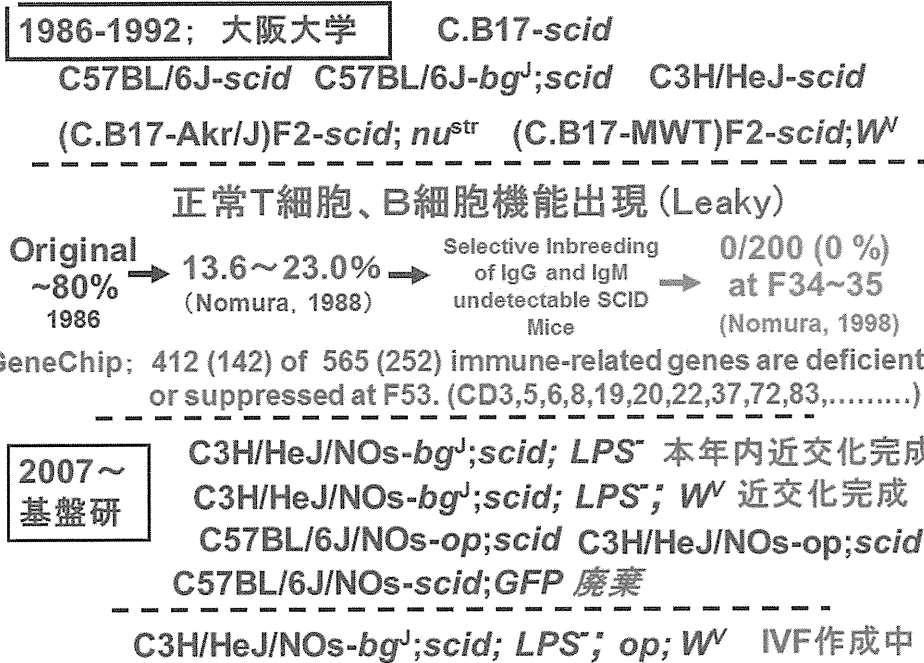
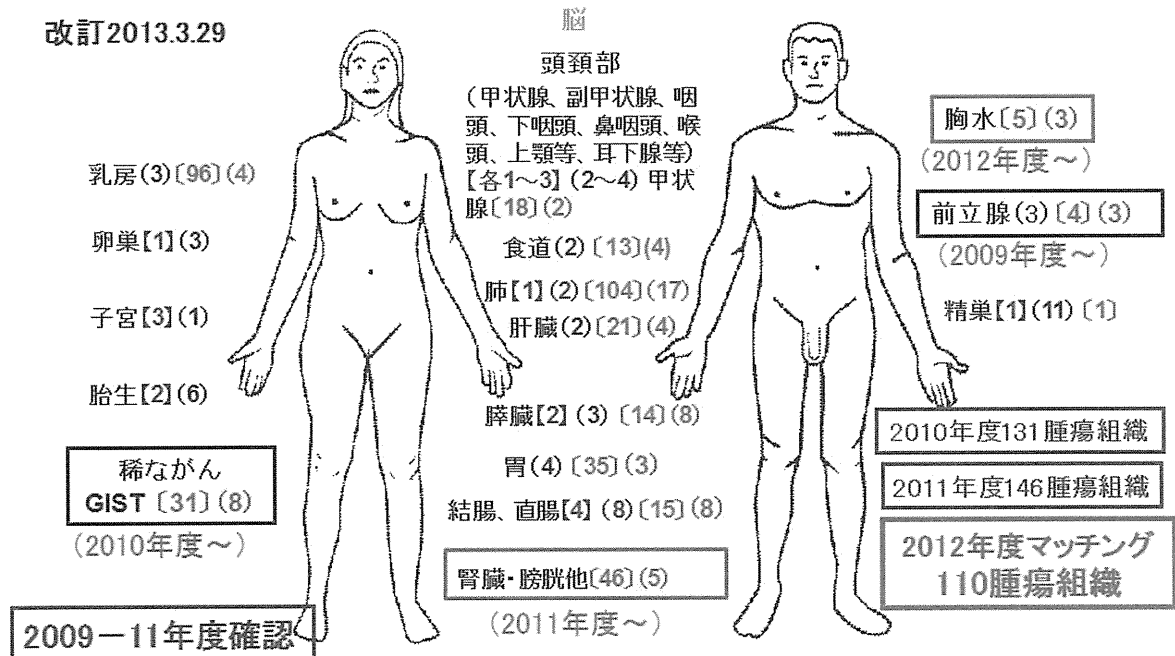


図 1 Human Cancer Transplantable, Program-frozen and Re-transplantable to Super-SCID Mice



【継代・凍結保存・再生可; 1986~1997)】(継代・単純凍結)[進行中; ~2012.9.30](TS)
 (三菱財団、高松宮、未来開拓他~1998、基盤A、野村Pj、政策創業2009-2011)