

した。その後、細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

一方、分化誘導後、経時的に細胞より抽出した RNA をプローブとし、Human whole genome ver.2.0(4X44K) (Agilent 社)を用いて網羅的に遺伝子発現プロファイルを収集し、IPA (interactive pathway analysis) システム等によって解析した。

また、ヒト iPS 細胞 Dotcom 株より肝細胞様細胞への分化誘導法に準じて上皮細胞様細胞に分化誘導を行ない、リアルタイム RT-PCR 法により、16 種類の UGT 分子種 (1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B17 及び 2B28) , 10 種類の腸管組織マーカー遺伝子 (CDX2, KLF5, SOX9, sucrase-isomaltase, E-cadherin, Claudin-2, BMI1, LGR5, FOXF2 及び HLX) 及び 2 種類の転写制御因子 (arylhydrocarbon receptor (AhR), pregnane X receptor (PXR)) の mRNA 発現解析を行った。また、薬物代謝酵素誘導剤の omeprazole (OME) あるいは rifampicin (RIF) を腸管上皮様細胞に処置し、その発現誘導を評価した。さらに、腸管上皮様細胞における 7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (7-HFC) のグルクロン酸抱合活性を HPLC 法により測定した。

1-2) インビトロアレルギー性予測系の開発

全身投与医薬品のアレルギー性評価に、in vitro 皮膚感作性試験法である h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の適用の可能性を検討した。ヒトでのアレルギー性副作用報告のある薬物を単球由来の THP-1 細胞に曝露し、感作性マーカー分子である CD54 と CD86 の発現量をもとに薬物のアレルギー性の検討を行った。また、300 万件を超える日本の診療報酬明細書 (レセプト) データから、アレルギー性副作用の発生頻度情報を基に、アレルギー性副作用のリスクについて薬剤の順位付けを行った。また、レセプトデータから導き出したアレルギー性副作用の発生頻度情報を基に、h-CLAT 法を評価した。

2) 臨床開発過程

安全性 BM の探索・同定と診断法の開発

2-1) 腎薬物トランスポーターに関連したバイオマーカー

1. Oat3(-/-)マウスを用いた in vivo 試験

野生型マウスおよび Oat3(-/-)マウスに、6 β -OHF を持続投与し、血漿中・腎臓中濃度、尿中排泄量を測定した。

2. 6 β -OHF のヒト腎スライス取り込みに対する probenecid, MPP+の阻害効果

ヒト腎組織への 6 β -OHF の取り込みに対して、probenecid (1mM)および MPP+による阻害効果を検討した。

3. 健康人被験者を対象とした薬物間相互作用試験由来の血漿・尿中 6 β -OHF の測定

OAT1 および OAT3 を対象とした健康人被験者における薬物間相互作用試験

(probenecid-benzylpenicillin および probenecid-adeфовir) において、probenecid 750mg が投与された 6 β -OHF の血漿中濃度および尿中排泄量を LC-MS/MS を用いて測定し、その腎クリアランスを評価した。また、MATE1 を対象とした健康人被験者における薬物間相互作用試験 (pyrimethamine-metformin) において、6 β -OHF の血漿中濃度および尿中排泄量を決定し、その腎クリアランスを評価した。いずれの臨床試験においても、阻害剤投与によるプローブ薬物の腎クリアランスの低下が認められている。Cortisol の血漿中濃度を LC-MS/MS を用いて測定し、6 β -OHF の尿中排泄量と AUC からみかけの 6 β -OHF 生成クリアランスを算出した。

2-2) GST-KO マウスを用いたメタボロミクス解析

7 週齢の WT, M1, T1 および MIT1 のそれぞれのマウスから、16 時間絶食後、麻酔下で胆嚢カニキュレーションを行って胆汁を採取した。得られた胆汁は、使用までは約 -80℃ の冷凍庫中で保管した。上記 4 群、各 6 例の胆汁試料は精製水で 10 倍希釈し、遠心分離後の上清を解析用試料とした。これらを UPLC(Waters Corp.)/LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific)で測定したデータを SIEVE(Thermo Fisher Scientific)でアライメント実施後、Simca-P (Umetrics)を用いて WT に対するノックアウト群での変動因子を抽出した。

2-3) 遺伝子多型とタイピング系の開発

日本人においてカルバマゼピン誘発性の SJS/TEN 発症に関連する HLA-A*31:01 と完全連鎖不平衡を示す候補 SNP を論文調査と公共データベースを用いて検索した。候補 SNP と HLA-A*31:01 との完全連鎖不平衡を HLA タイプが既知の重症薬疹を発症した患者検体の検体を用いて、TaqMan 法により確認した。この HLA-A*31:01 のサロゲートマーカー多型に関し、polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法により迅速タイピング系を構築した。また、薬物性肝障害を発症した患者の DNA を収集し、発症と関連する HLA 型及び遺伝子多型をそれぞれ PCR-Luminex 法

及び TaqMan 法等により探索した。

2-4) 安全性バイオマーカーの迅速検出系の開発

HLA-A*31:01 と絶対連鎖不平衡にあると推定される 2 つの SNPs (SNP-X, SNP-Y) に対して、独自の遺伝子多型検出法である BIST (Beads in Straw Tip) 法による迅速検出系としての実用性について検討した。ヒトゲノム検体 11 種 (配列未知)、および HLA-A*31:01 の Major Homo type, Miner Homo type, Hetero type のヒトゲノム 3 種 (検証用陽性対照) について、BIST 法による遺伝子多系解析を実施し、解析結果を TaqMan 法による結果と比較することで、手法の精度を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究には、市販の或いは公的バンクより頒布されるヒト由来細胞 (より得られた DNA) を用いており、必要に応じて「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、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。市販されているヒト由来試料等を用いる場合には、インフォームドコンセントを得て正当に採取された検体であることを購入時に業者に確認した。また、本研究で取り扱うヒト検体については、既に研究実施機関の倫理委員会の承認を得ており、被験者の同意も適正に得ている。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。動物実験は、「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なわれた。以上、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1) 非臨床開発過程

1-1) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮細胞の分化およびその評価。

「腸管細胞への分化に対する低分子化合物の効果」ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化の際に、低分子化合物 A, B, C を用いることで、腸管のマーカー遺伝子である intestine specific homeobox, villin 1, sucrase-isomaltase および腸管に発現する薬物トランスポーターである SLC15A1, ABCB1, ABCG2 の発現が増加した。腸管特異的なマーカーである sucrase-isomaltase に関しては、遺伝子発現の増加だけでなく免疫蛍光染色陽性細胞の割合も増加した。

腸管において主要な代謝酵素である CYP3A4 については、A, B, C を用いることで遺伝子発現が顕著に増加し、1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 で処理すると

その発現は強く誘導された。これは、CYP3A4 活性においても同様の効果が認められた。またジペプチドの取り込みも認められ、この取り込みはペプチドトランスポーターの阻害剤である ibuprofen の添加および取り込み時の温度を 4 $^{\circ}$ C にすることによって抑制された。

次に、低分子化合物 A, B, C と同様の作用を有する化合物群の分化に対する効果について検討を行った。その結果、これらの化合物群を用いることによって腸管上皮細胞への分化が促進する傾向が認められた。また、これらの化合物群の中でより効果的であると考えられた F, I, Q を組み合わせることで、sucrase-isomaltase や CYP3A4 発現の上昇、1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 による CYP3A4 の発現誘導など低分子化合物 A, B, C を用いて分化を行ったときと同様の効果が認められた (Fig. 1, 2)。

「細胞分化誘導過程におけるマーカー遺伝子の変動」iPS 細胞を用いて、小腸上皮幹細胞分化誘導処理後、0, 3, 7, 17, 26 日目の培養細胞から RNA を抽出し、細胞における遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイにより解析した。解析対象とする遺伝子は、昨年度と同様に (1) 未分化、及び (2) 小腸上皮細胞の分化段階、のマーカー遺伝子群とした。発生初期特異的、及び、消化管と小腸をキーワードとして遺伝子を選抜した結果、未分化マーカーとして、22 遺伝子、小腸上皮マーカーとして、27 遺伝子を選抜した。まず、代表的な未分化マーカー遺伝子は、小腸上皮細胞への分化誘導過程において、細胞分化誘導後、7 日目までは穏やかに減少し、NANOG 及び POU5F1 は 20 日まで、SOX2 及び SOX3 は 14 日目まで急激に減少し、細胞は分化状態になっていることが判明した。低分子化合物の添加は、A-E 及び C-E どちらの場合も同様に低下し、細胞が分化状態に変化していると判断できる。興味深いことに、標準の分化誘導系では、20 日以降 SOX2 及び SOX3 の発現が若干上昇するが、低分子化合物添加によって上昇が抑えられることが明らかとなった。この結果は低分子化合物の添加により細胞分化状態が安定化していることを示唆している。次に、小腸上皮マーカー遺伝子及び消化管マーカー遺伝子を解析したところ、解析した 22 種類の遺伝子がすべて、分化誘導 7 もしくは 14 日目以降発現誘導されていることが明らかとなり、iPS 細胞が誘導処理によって小腸細胞様へと分化していることと判断できる。低分子化合物添加は、A-E 及び C-E どちらの場合も腸上皮細胞遺伝子マーカーを発現誘導しており、腸上

皮細胞が分化していることが判明した。一方、一部の腸上皮細胞マーカー遺伝子は、低分子化合物の添加により、その発現誘導が影響を受けていた。TFF3やDACH1は、分添加では14日目以降に発現誘導が起きるが、低分子化合物添加では、7日目から発現が上昇する。また、SOAT2は、低分子化合物、特に、C-Eの添加により、より高発現が起きることが判明した。また、腸上皮細胞マーカー遺伝子全体としても、低分子化合物添加により、発現状態が安定に維持される傾向にあった。これらの結果より、低分子化合物の添加は細胞の分化状態の維持に影響すると考えられる。

「細胞分化誘導によって発現が変化した遺伝子による細胞状態の推定」細胞分化誘導後、発現が大きく変動した遺伝子群から、IPAデータベースを用いて機能解析を行い、誘導された細胞の状態を推定した。まず、細胞分化誘導後、50倍以上発現が減少した遺伝子群の生理的な機能分類を行った。その結果、減少した遺伝子群は、前年度の結果とほぼ同様に未分化状態特異的な遺伝子群が含まれていた。次に、細胞分化誘導後、50倍以上発現が上昇した遺伝子群の生理的な機能分類をIPAによって行った。その結果 morphology of digestive system (3.57E-10), morphology of intestine (7.13E-10), abnormal morphology of digestive system (1.79E-09), abnormal morphology of intestine (2.68E-09), abnormal morphology of duodenum (4.69E-08), abnormal morphology of small intestine (9.94E-08), morphology of liver (1.04E-06), abnormal morphology of liver (2.27E-06), morphology of colon (7.78E-06)に関与する遺伝子が含まれており、細胞は消化管上皮細胞に分化していると判断できた。また、50倍以上上昇した遺伝子群が形成するネットワーク (Fig. 3) から、上昇する遺伝子群は細胞分化に関与する遺伝子を多く含むことが明らかとなった。「分化誘導した腸管上皮様細胞において発現している薬物代謝酵素」

腸管上皮様細胞において9種類のUGT分子種(1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 2B4, 2B7, 2B10, 2B11及び2B15)のmRNAが発現していることを明らかにした。また、これらmRNA発現量をヒト成人小腸と比較したところ、UGT1A3及びUGT1A4はほぼ同程度であった。また不死化細胞(Caco-2細胞)と比べると、UGT1A3, 1A4, 1A5, 2B4, 2B10, 2B11及び2B15がほぼ同程度であった。腸管組織マーカー遺伝子は、sucrase-isomaltaseを除く9種類のmRNAが発現し、その発現量はSOX9がCaco-2細胞と比べて有意に高

く、KLF5, FOXF2及びHLXはほぼ同程度であった。CDX2, Claudin-2, BMI1, LGR5及びE-cadherinのmRNA発現は有意に低くかった。転写制御因子のAhR mRNAはCaco-2細胞と同程度に発現していたが、PXRの発現は見られなかった。腸管上皮様細胞に発現しているUGT1A3, 1A4, 1A5及び1A6のmRNAは、OME及びRIFのいずれにおいても変動しなかった。分化した腸管上皮様細胞に7-HFCを添加したところ、7-HFC濃度依存的に7-HFCグルクロニドの生成量が増加した。

1-2) インビトロアレルゲン性予測系の開発

アレルギー性副作用の発生頻度情報を調査し、副作用リスク表を作成した。アレルギー性副作用の発生頻度情報を基に本年度試験した10物質を含む26物質のh-CLATの結果を評価した。頻度情報で陽性の8物質のうち7物質がh-CLATで陽性となり、頻度情報で陰性7物質のうち2物質がh-CLAT陰性となった。

2) 臨床開発過程

安全性BMの探索・同定と診断法の開発

2-1) 腎薬物トランスポーターに関連したバイオマーカー

平成25年度の研究において、①cortisolの水酸化代謝物である6β-hydroxycortisol(以下6β-OHF)が尿細管分泌を受けること、ならびに②腎薬物トランスポーターOAT3, MATE1およびMATE2-K基質となることを各トランスポーターの強制発現系を用いたin vitro試験で明らかにした。6β-OHFがこれらトランスポーターによる薬効評価に利用できる可能性があることから、これらトランスポーターに対する阻害剤(OAT3:probenecidならびにMATEs:pyrimethamine)が血漿・尿中6β-OHFに与える影響を評価した(Fig. 4)。Oat3(-/-)マウスでは、野生型マウスに比較して、腎クリアランスの減少が認められた。ヒト腎切片への6β-OHFの取り込みはprobenecidにより顕著に阻害がかかり、MPP+による阻害も一部認められた。probenecid投与検体において、血漿中6β-OHFの増加が認められた。一方で、尿中排泄量に変動は認められなかった。Probenecid(750 mg, PO)投与時、尿細管分泌クリアランスは半分程度残っていた。反対に、pyrimethamine投与時、血漿中濃度ならびに尿中排泄量に変動は認められなかった。6β-OHFの尿中排泄量は肝CYP3A4活性の評価に利用される。そのため、我々は6β-OHFの腎クリアランスの変動も、肝CYP3A4活性に影響を

与える可能性を指摘していた。本研究において、 β -OHF の腎クリアランスの変動は認められたが、それに不随してみかけの生成クリアランスは影響を受けなかった。

2-2) GST-KO マウスを用いたメタボロミクス解析.

肝障害バイオマーカー探索として、Gstm1KO マウス(M1), Gstt1KO マウス(T1)および Gstm1-Gstt1KO マウス(M1T1)と野生型マウス(WT)の胆汁を採取し、LC/MS 法(ESI-positive) によるメタボロミクス解析を実施した。Score plot では KO 群と WT 群はそれぞれのクラスター形成が見られ、PC1 軸に対して左右に良好に分離した。WT と比較して M1T1, M1 および T1 の 3 群共通で変動したピークが 13 本確認され、全て KO 群で顕著に減少していた。M1T1 と M1 の 2 群共通では 8 本のピークに変動が見られ、全て KO 群で減少していた。M1T1 と T1 の 2 群共通では 9 本のピークに変動が見られ、1 本以外は全て KO 群で増加していた。M1 と T1 の 2 群共通では 3 本のピークに変動が見られ、いずれも KO 群で増加していた。その他、M1T1, M1 および T1 群の各群特有に変動が見られたピークがそれぞれ 2 本、4 本および 1 本確認され、M1T1 および T1 群では KO 群で顕著に減少していた。

2-3) 遺伝子多型とタイピング系の開発.

文献検索及び公共データベース検索により、日本人において HLA-A*31:01 で完全連鎖不平衡にある SNP 候補を 6 種類見出した。これらの候補 SNP のうち 3 種について、HLA タイプが既知の SJS/TEN 発症患者の DNA 検体 211 名 (A*31:01/A*31:01; 2 名, A*31:01/-; 35 名, -/-; 174 名) を対象に TaqMan 法にてタイピングを行い、完全連鎖不平衡 ($r^2=1.0$, $D'=1.0$) にあることを確認した。このうち一種のタイピング系を PCR-RFLP 法にて構築した。開発した PCR-RFLP 法による SNP の判定結果は TaqMan 法による結果と完全に一致したことから、PCR-RFLP 法によるタイピング結果は正確であり、かつ HLA-A*31:01 は完全連鎖不平衡にあった (fig. 5)。

薬物性肝障害患者の HLA タイプの解析を行い、HLA-B の抗原結合部位にアミノ酸置換を伴う新規の型 (300G>C, Glu100Asp) が見出され、直接シーケンス法により、本 HLA タイプは B*07:02:01 の亜型であることが判明した。国際免疫遺伝学情報システム (IMGT) に登録し、HLA-B*07:185 と命名された (Fig.6)。本 HLA 型と肝障害との関連は不明である。胆汁うった型の薬物性肝障害に関する候補遺伝子多型を同定した。

2-4) 安全性バイオマーカーの迅速検出系の開発.

まず、TaqMan 法による遺伝子解析を行い、ヒトゲノム検体 11 種のうち、2 検体が Hetero type, 9 検体が Major Homo type であることを明らかにした。また、作製した BIST ビーズに固定した TAG オリゴヌクレオチドと、ビオチン化ラベルした相補な TAG オリゴヌクレオチドを Magstration System 12GC でハイブリダイゼーション反応させ、ビーズのシグナル有無を確認した結果、目的の位置に特異的なシグナルが検出でき、BIST に目的の TAG が固定されたビーズが封入できていることを確認した。BIST 用 Primers を設計し検証用陽性対照ヒトゲノム 3 種を解析した結果、遺伝子型と一致する良好な結果が得られた。次に、ヒトゲノム検体 11 種を BIST 法にて解析した結果、TaqMan 法による遺伝子解析結果と一致する結果となった。しかし、Threshold の設定によって判定は問題ないものの、検体によっては SNP-X において非特異シグナルが検出された。これらの非特異シグナルを減らすため、TAG の入替および PCR 条件の更なる最適化が必要であると考え、リアルタイム PCR による BIST 解析用 Primer の TAG 配列の見直しを実施した結果、TAG を入れ替えることで、これまで使用していた TAG よりも増幅がよい TAG を見つけることができた。この入替した TAG を使用した BIST 解析の結果も、TaqMan 法で解析した結果と一致することを確認した。

D. 考察

1) 非臨床開発過程

1-1) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮細胞の分化およびその評価.

本研究で用いた低分子化合物は分化の際に用いることで、腸管上皮マーカーや薬物トランスポーター、CYP3A4 の発現を増加させたことから、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化を促進させることが示唆された。また、分化させた腸管上皮細胞様細胞は $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D3}$ によって CYP3A4 の発現が誘導されたことや、ペプチドトランスポーターを介した輸送機能を有していたことから、この分化させた細胞は腸管上皮細胞に特徴的な薬物動態学的機能を有する細胞であることが示された。

細胞分化誘導を行った iPS 細胞の特性解析の一環として、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。細胞分化マーカーを用いた解析においても、発現変化パターンからの細胞状態推定においても、分化誘導を行った細胞は、未分

化状態から分化状態に移行していることが判明した。さらに、分化状態の解析では、小腸上皮細胞が分化していることが明らかとなった。昨年度と同様な結果であったことから、iPS細胞からの分化誘導が再現よく起きていると判断できる。さらに、分化誘導時における低分子化合物の添加は、A-E及びC-Eどちらの組み合わせにおいても、分化誘導後の細胞の形質を安定化することが明らかとなった。

腸管上皮様細胞は分化誘導により UGT mRNA 発現量が増加し、UGT1A3 及び UGT1A4 の発現プロファイルはヒト成人小腸と類似していた。しかし、ヒト消化管特異的に発現している UGT1A8 及び UGT1A10,あるいは医薬品の代謝への寄与率が高い UGT1A1 などの mRNA 発現は認められなかった。一方、腸管組織マーカー遺伝子の sucrase-isomaltase mRNA は発現しておらず、細胞増殖部位に局在する SOX9 が高発現していた。このことから、腸管上皮様細胞は、吸収上皮細胞や杯細胞などの分化した機能的な腸管上皮細胞ではなく、細胞増殖部位の細胞に近い特徴を有している可能性が考えられる。また、分化した腸管上皮様細胞は、7-HFC のグルクロン酸抱合活性を有していたが、薬物代謝酵素誘導剤

(OME 及び RIF) による発現の影響は受けなかった。

1-2) インビトロアレルゲン性予測系の開発

日本で使用されている全身投与用医薬品のアレルギー性副作用の頻度情報はこれまで公表されていなかったため、今回の調査結果の有用性は高いと考えられる。また、アレルゲン性の検出が h-CLAT によって可能であることが明らかになったが、判定のカットオフ値や評価濃度の設定範囲を全身投与用医薬品用に最適化する必要があると考えられる。

2) 臨床開発過程

安全性 BM の探索・同定と診断法の開発

2-1) 腎薬物トランスポーターに関連したバイオマーカー

トランスポーターを介した薬物間相互作用を検出するプローブとして、トランスポーター機能に依存した血漿・尿中検体中の化合物を同定することを目的とした。Oat3(-/-)マウスでの in vivo 試験で腎クリアランスの低下が認められたことならびにヒト腎スライスで probenecid 感受性の取り込みが観察されたことから、6β-OHF の腎臓内への取り込み過程において OAT3 が主に関与していることが示唆された。Probenecid 投与を受けた健康人において、血漿中濃度の増加および腎クリアランスの低下が認められた

ことから、ヒト腎排泄にも OAT3 が関与していることが示唆される。

2-2) GST-KO マウスを用いたメタボロミクス解析

薬物代謝酵素グルタチオン S-転移酵素 (GST) は薬物解毒において重要な役割を果たすことが知られている。我々は、ヒトにおいて報告されている GST 遺伝子の GSTM1 および GSTT1 に注目し、それぞれの遺伝子欠損が肝へ与える影響を調べることで肝障害につながる途中段階での情報が得られた場合、毒性メカニズムの総合的な解明の大きなヒントになると考え、ヒト GSTM1 および GSTT1 に相当するマウス遺伝子 Gstm1 および Gstt1 に注目し、それぞれの欠損 (knockout, KO) マウスおよび Gstm1 と Gstt1 のダブル KO マウスを作製し、解析を実施した。3 群共通で変動したピークは WT に対していずれも顕著に減少しており、M1 と T1 の KO により先の代謝が亢進されたと考えられた。

MIT1 と M1 または T1 で共通して変動したピークはそれぞれ M1 または T1 を KO することにより変動したピークであると考え、MIT1 と M1 共通では 3 群同様にこれらの変動ピークは主として WT に対して顕著に減少しており、KO により代謝が亢進されたと考えられた。一方で、MIT1 と T1 および M1 と T1 共通ではこれらの変動ピークは主として WT に対して顕著に増加しており、代謝がブロックされ蓄積した結果と考えられた。その他、単群のみで変動が見られたピークは MIT1 と M1 ではいずれも WT に対して減少が見られたが T1 のみでは増加が見られた。WT に対する変動ピークとして、T1 では増加、M1 では減少する傾向が見られた。

2-3) 遺伝子多型とタイピング系の開発.

HLA-A*31:01 と絶対連鎖不平衡にある遺伝子多型の、安価で迅速なタイピング系は、日本人におけるカルバマゼピンによる SJS/TEN 発症の回避に有用な方法の一つとして期待される。薬物性肝障害発症と関連する遺伝子多型の探索においては、今後さらに検体数をふやした解析が必要である。

2-4) 安全性バイオマーカーの迅速検出系の開発

今後、より検体数を増やしての確認が必要ではあるが、HLA-A*31:01 と絶対連鎖不平衡にあると推定される 2 つの SNPs (SNP-X, SNP-Y) についても、BIST で解析することが可能であり、解析時間もこれまでと同様、核酸の抽出を含め、2.5 時間程度であった。核酸抽出に係る時間は、現在更なる見直しを行っていることから、より迅速な系を開発することができると考えている。

E. 結論

本研究で我々は、ヒト iPS 細胞から薬物動態学的特徴を有する腸管上皮細胞様細胞を作製することができた。その際用いた低分子化合物はヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化を促進させることが明らかとなった。iPS 細胞から小腸上皮細胞への分化誘導を DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により評価した結果、再現よく消化管上皮細胞が分化誘導されていることが明らかとなった。また、分化誘導時における低分子化合物の添加によって、分化誘導後の細胞の形質を安定化することが明らかとなった。リアルタイム RT-PCR 法ならびに HPLC 法により、ヒト iPS 細胞 Dotcom 株由来腸管上皮様細胞には 9 種類の UGT 分子種が発現し、それぞれの酵素の機能を有していることが明らかとなった。

本研究で調査した医薬品副作用頻度情報は、医師や患者にとって有用な情報となり得ると考えられる。また、最適化の必要性があるが h-CLAT を用いて医薬品インビトロアレルギー性の予測がある程度可能であると考えられた。

6 β -OHF が腎薬物トランスポーター OAT3 の内因性 in vivo プロブとして、その機能変動の評価に利用出来る。In vitro では、6 β -OHF は MATE 基質となるものの薬物間相互作用プロブとしては利用できない。

Gstm1 および Gstm1 欠損マウス胆汁のメタボロミクス解析において、GST ノックアウト状態の違いにより、野生型マウスと異なる内因性物質やその代謝物が変動していることを示唆する結果が得られた。しかしながら、変動ピークの組成解析等の精査については現状困難な状況である。

医薬品による副作用の発現と関連する遺伝子の多型に関し、迅速タイピング系を開発した。副作用発症患者の検体を収集し、薬物性肝障害患者において新規の HLA 型を見出した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

研究発表

1. 論文発表

1. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced

pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press.

2. Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 29, 44–51 (2014).
3. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, Ohmori S, Nagata K: Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 28, 250–259 (2013).
4. Mayumi K, Hanioka N, Masuda K, Koeda A, Naito S, Miyata A, Narimatsu S. Characterization of marmoset CYP2B6: cDNA cloning, protein expression and enzymatic functions. *Biochem Pharmacol* 2013 85(8):1182–1194.
5. Miyake Y, Mayumi K, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Narimatsu S, Hanioka N. cDNA cloning and functional analysis of minipig uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1. *Biol Pharm Bull* 2013;36(3):452–461.
6. Kokawa Y, Kishi N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Narimatsu S, Hanioka N. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A8 polymorphism on raloxifene glucuronidation. *Eur J Pharm Sci* 2013;49(2):199–205.
7. Yamamoto K, Mukai M, Nagaoka K, Hayashi K, Hichiya H, Okada K, Murata M, Shigeyama M, Narimatsu S, Hanioka N. Functional characterization of cynomolgus monkey UDP-glucuronosyltransferase 1A9. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, in press.
8. Takahara Y, Kinashi Y, Takahara Y, Hichiya H, Okada K, Murata M, Shigeyama M, Hanioka N. Butylbenzyl phthalate hydrolysis in liver microsomes of humans, monkeys, dogs, rats and mice. *Biol Pharm Bull*, in press.
9. Imamura Y, Tsuruya Y, Damme K, Heer D, Kumagai Y, Maeda K, Murayama N, Okudaira N, Kurihara A, Izumi T, Sugiyama Y, Kusuhara H. 6 β -hydroxycortisol is an Endogenous Probe for Evaluation of Drug-drug Interaction Involving a Multispecific Renal Organic Anion Transporter, OAT3/SLC22A8, in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos*, in press
10. Kusuhara H, Yoshida K and Sugiyama Y. In vivo characterization of interactions on transporters. In: *Transporters in Drug Development* (ed. By Yuichi Sugiyama and Bente Steffansen), pp23–36, Springer, New York, 2013
11. Maekawa K, Futagami T, Kusunoki Y, Matsuzaki Y, Takikawa H: Identification of a novel HLA-B allele HLA-B*07:185 in a Japanese individual. *Tissue Antigens*, In press.
12. 前川京子, 斎藤嘉朗, 薬物性肝障害の遺伝的素因, *医学のあゆみ* 248: 11-18 (2014)

13. 斎藤嘉朗, 佐井君江, 鹿庭なほ子, 田島陽子, 石川将己, 最上(西巻)知子, 前川京子: バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けて. 薬学雑誌, 133: 1373- 1379, 2013 .
14. 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の普及に向けた全自動遺伝子検査装置の開発, BIO Clinica Vol 28 (9), 69-73, 2013
15. 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の普及に向けた全自動遺伝子検査装置の開発, 細胞 Vol 45 (11), 537-541, 2013
16. 宮下雪子, 上田哲也: タンパク質自動解析用ツールの開発, 酵素工学ニュース 70 号, 26-30, 2013 年

2. 学会発表

1. 小玉菜央, 岩尾岳洋, 壁谷知樹, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 黒瀬光一, 中村克徳, 松永民秀: 複数の低分子化合物はヒト iPS 細胞から機能性を持った小腸上皮細胞様細胞への分化効率を改善する. 第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸), 2013 年 12 月.
2. 岩尾岳洋, 近藤祐樹, 小玉菜央, 中村克徳, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 黒瀬光一, 松永民秀: 低分子化合物はヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化を促進する. 日本薬物動態学会第 28 回年会 (東京), 2013 年 10 月.
3. 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 荻原留理, 佐々木崇光, 永田 清, 黒瀬光一, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 山折 大, 大森 栄, 中村克徳, 松永民秀: ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞の薬物動態学的機能. 日本薬物動態学会第 28 回年会 (東京), 2013 年 10 月.
4. 荻原留理, 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 山折 大, 大森 栄, 中村克徳, 松永民秀: 低分子化合物組み合わせによるヒト iPS 細胞から胚体内胚葉への分化. 日本薬物動態学会第 28 回年会 (東京), 2013 年 10 月.
5. 松永民秀, 近藤祐樹, 荻原留理, 岩尾岳洋, 永田清, 黒瀬光一, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 山折 大, 大森 栄, 中村克徳: ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬物代謝酵素誘導評価. フォーラム 2013 : 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡), 2013 年 9 月.
6. 鬼無悠, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 神野透人, 成松鎮雄: フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの抱合反応に関与するヒト UDP-グルクロン酸転移酵素分子種. フォーラム 2013 : 衛生薬学・環境トキシコロジー, 福岡, 2013 年 9 月 13-14 日.
7. 高須賀茜, 須野学, 伊藤雄大, 埴岡伸光: ヒト及びラット UGT1A8 を用いたミコフェノール酸グルクロン酸抱合反応の速度論的解析. 日本薬学会第 133 年会, 熊本 (熊本大学), 2014 年 3 月 28-30 日.
8. 楠原洋之 薬物トランスポーターによる細胞内からの排出輸送過程にお薬物相互作用の評価, 第 40 回 日本毒性学会学術年会, 千葉, 2013.6.17-19
9. 楠原洋之 薬物トランスポーターの発現・機能変動に伴い血漿中濃度・尿中排泄が変動する代謝物の探索, 第 86 回日本生化学会大会, 東京, 2013.9.11~13
10. 楠原洋之 薬物動態における薬物トランスポーターのインパクト, 第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 仙台, 2013.11.23~24
11. 楠原洋之, 薬物トランスポーターの生理学的基質の探索, 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014.3
12. 宮下雪子, 上田哲也, 前川京子, 宇梶真帆, 松澤 由美子, 鹿庭なほ子, 斎藤嘉朗, 黒瀬光一: BIST 法を用いたカルバマゼピン誘因性重症薬疹関連多型の迅速診断法の開発, 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013.12) (神戸)
13. 斎藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 佐井君江, 花谷忠昭, 中村亮介, 前川京子: ゲノミクスおよびメタボロミクス解析によるバイオマーカー探索. 第 16 回日本医薬品情報学会学術大会. 2013.8 (名古屋)

H. 知的所有権の所得状況

1. 特許

1. 発明の名称: 人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法 (PCT 出願予定)

発明者: 松永民秀, 岩尾岳洋

特許出願人: 公立大学法人 名古屋市立大学

2. 発明の名称: 人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法

発明者: 松永民秀, 岩尾岳洋, 近藤祐樹, 吉橋幸美, 宮田直樹, 鈴木孝禎

国際出願番号: PCT/JP2013/065298

国際出願日: 2013 年 6 月 1 日

公開日: 2013 年 12 月 12 日

特許出願人: 公立大学法人 名古屋市立大学

2. 実用新案登録 該当無し

3. その他 該当無し

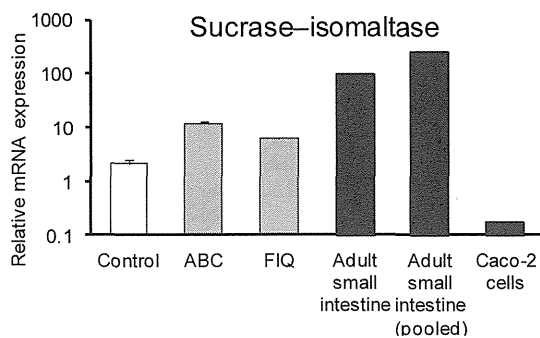


Fig. 1. 低分子化合物を用いて分化誘導させた腸管上皮細胞様細胞における sucrase-isomaltase の発現

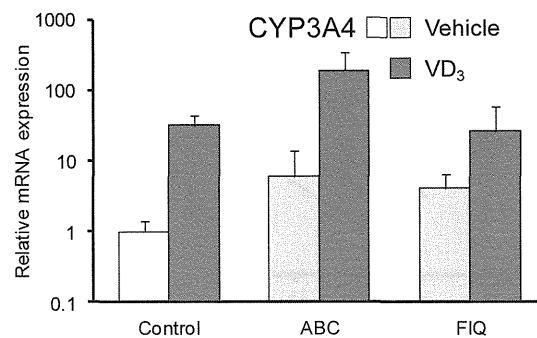


Fig. 2. 低分子化合物を用いて分化誘導させた腸管上皮細胞様細胞における CYP3A4 の発現とその薬物応答性

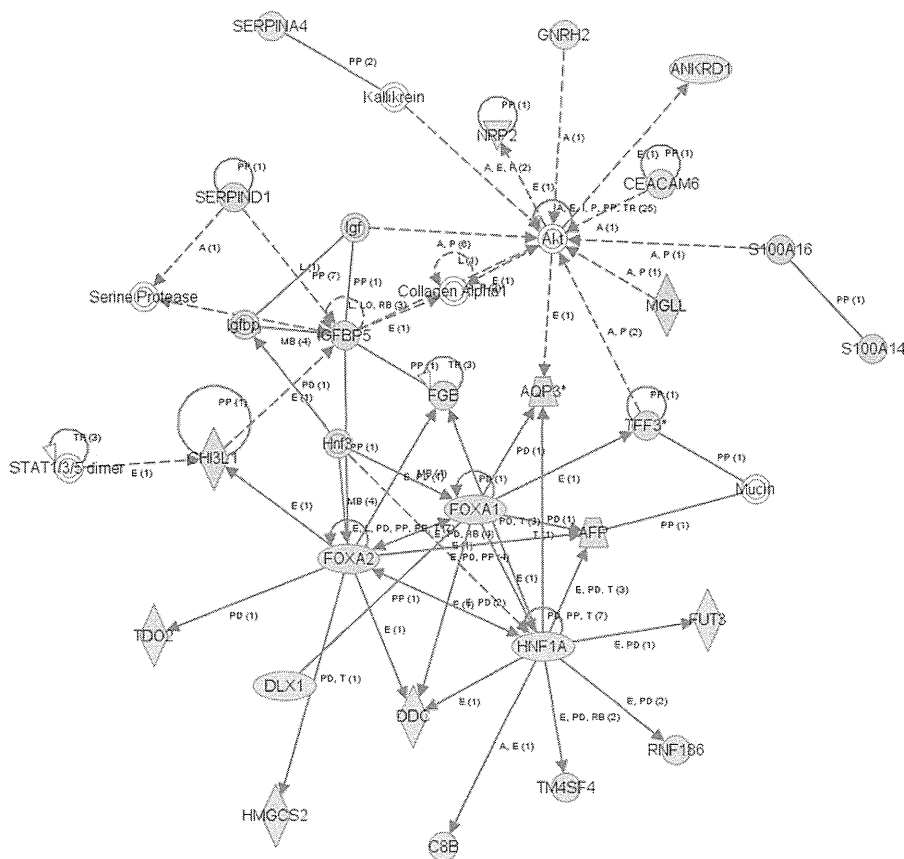


Fig. 3 分化誘導処理によって発現が上昇した遺伝子群のネットワーク解析
グレー色：発現上昇した遺伝子群

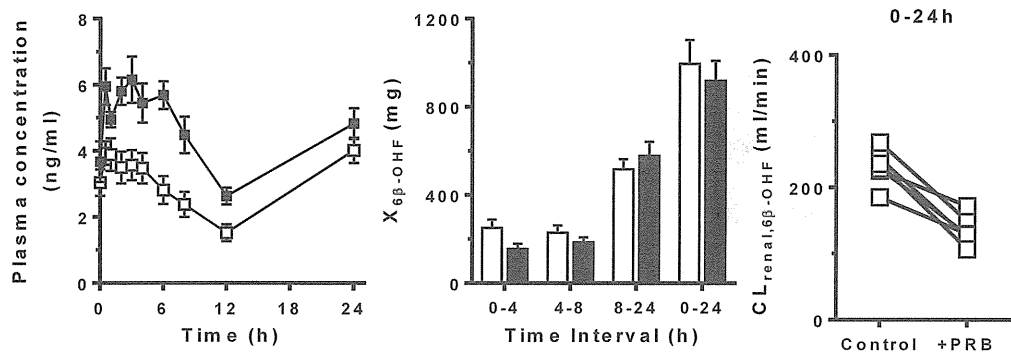


Fig. 4 健康人被験者において OAT3 阻害剤プロベネシドが血漿・尿中 6β-OHF, 腎クリアランスに与える影響

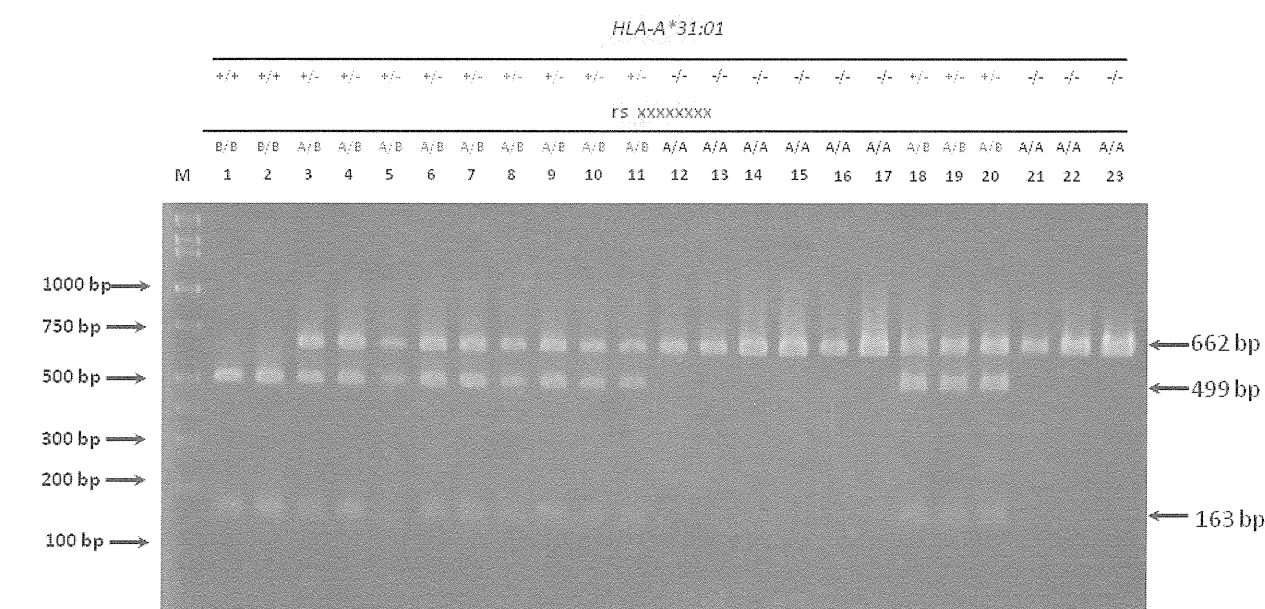


Fig. 5 HLA-A*31:01 と完全連鎖不平衡を示すサロゲートマーカー多型の PCR-RFLP 法による迅速タイピング

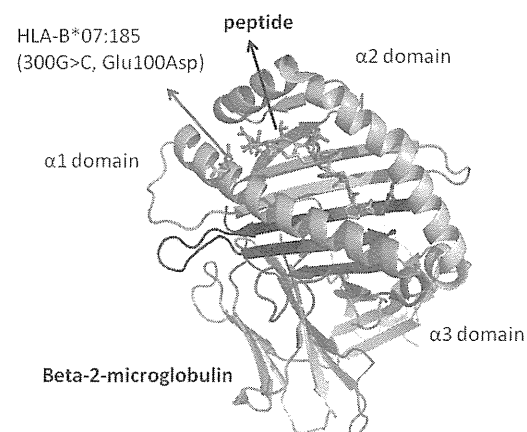


Fig.6 HLA-B*07:185 のアミノ酸変異部位 HLA-B7 の構造 (PDB ID 3VCL) に HLA-B*07:185 のアミノ酸変異部位を記した。

安全性評価手法の新機軸：統合型毒性試験

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
山田 雅巳

研究要旨 トランスジェニック動物を用いる遺伝毒性試験と一般毒性試験は統合しようという結果を得た。*Pig-a*試験法は他の遺伝毒性試験結果とよい相関を示し、有用性が認められた。*in vitro*試験法である蛍光細胞を用いる小核試験、全ゲノムの塩基配列を調べる手法等から、より多くの情報が得られることが示された。

研究組織

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所
山田雅巳、増村健一、石井雄二、堀端克良
- (2) 大阪府立大学 杉本憲治
- (3) サントリービネスイキスパート(株) 藤居 互
- (4) (株)蛋白精製工業 平田大介
- (5) (一財)食品薬品安全センター秦野研究所
須井 哉
- (6) 中外製薬(株) 竹入 章
- (7) 日本エス・エル・シー(株) 高木久宜

A. 研究目的

ICH ガイドラインにおいて医薬品の遺伝毒性評価の際には次の試験の組合せが標準バッテリーとされている。①微生物を用いる復帰突然変異試験②哺乳類細胞を用いる染色体異常試験③マウスを用いる小核試験。このうち①②は、動物を用いず、短時間に試験結果を得ることができる *in vitro* 試験法である。中でも、医薬品の開発初期において、少ない化合物量で多検体のスクリーニング試験を行うための微生物を用いた変異原性試験のハイスループット化、キット化等が強く望まれているが、まだルーチン化には至っていない。

医薬品等化学物質の安全性評価には、これまで実験動物を多用する毒性試験が実施されてきている。その中で、従来の標準バッテリーでは評価できない多臓器での評価に関して、トランスジェニック (Tg) 動物を用いる遺伝毒性試験法が広まりつつあり、*in vivo* 遺伝子突然変異試験として、2011 年に OECD ガイドラインが公開された。この試験法を一般毒性試験にも応用できるように、これまでの HS 官民共同研究で F344 系統 *gpt*-delta Tg ラットが開発された

(Environ Mol Mutagen, 41, 253-9, 2003)。それに加えて、新規 *in vivo* 試験法として、微量

の血液サンプルで簡便に測定可能な *Pig-a* 試験法が注目されている。これまでの研究成果から改良法も検討され、国際バリデーション研究にむけての有用な知見が得られており (Environ Mol Mutagen, 52, 774-783, 2011)、今後は官民共同による標準化が求められる。

これらを踏まえ、今年度は (1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良し、これまでの HS 重点研究により開発された FAT 改良法 (Genes Environ, 31, 47-55, 2009) のルーチン化、umu 試験のキット化、Tg 蛍光細胞を用いた小核試験に替わる新たな毒性評価法の開発の検討 (2) 安全性評価手法の新機軸となる、Tg ラットを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立に加えて、*Pig-a* アッセイの標準化および、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討を実施した。

B. 研究方法

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] トランスジェニック蛍光細胞を用いた小核試験代替法の確立

マウス胎児線維芽細胞株 (m5S) 由来の Tg 蛍光細胞である m5S (mCherry-H3 A14-6) を使用した。薬剤として、溶媒の DMSO を含め、変異原性が報告されていない、あるいは、疑われている phenol, capsaicin, estragole (ES) を使用した。各薬剤を培地に加えた後、グラスボトムディッシュを顕微鏡保温装置に設置し、6 分間隔で 65 時間継続してタイムラプス観察を行い、細胞周期が 1.5 倍になる濃度 ECC_{1.5} を決定した。各薬剤について、ECC_{1.5} で 24 時間曝露し、48 時間培養後の小核の形成頻度を比較した。

[山田] ホールゲノムシーケンシングを用いた遺伝毒性試験法の研究

0.5 ml の緩衝液に、0.1 ml の菌液と 0.1 ml の ethyl nitrosourea (ENU) 溶液を加えて 37°C の湯浴でゆっくり 20 分間振盪させたのち、1 µl を分取した残りに 2 ml の軟寒天 (0.6%) を加えて最小グルコース培地に播き、37°C で 2 日間培養して復帰変異コロニーを得た (①)。分取した菌液は 10⁶ 乗希釈して、0.1 ml を LB 培地に播き 37°C 一夜培養でコロニーを得た (②)。それぞれの培地、条件ごとにランダムに選んだ 3 コロニーを LB 培地で培養し、ゲノム DNA を調製して全塩基配列を、MiSeq (イルミナ社製) で決定した。

[須井] 実用的ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の構築

①被験物質として、Ames 試験陽性対照物質である 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) と Benzo[a]pyrene (B[a]P) を用いて従来用いていた菌数の 1/10 を処理 (37°C、170 rpm、90 分) した後、本培養 (37°C、170 rpm、90 分) を行った。Indicator medium を添加した後、反応液を 384 穴マイクロプレートへ分注した。

②5 種の検定菌 (*S. typhimurium* TA100、TA1535、WP2uvrA、TA98 および TA1537) から 2 種を選択して混合菌液を作製し、Ames 試験 (プレート法) を行った。

[平田] バクテリアを用いた代替毒性試験法の開発とその評価に関する研究

被験物質として、代謝活性化を経て遺伝毒性を示すことが知られる Trp-P-1、Trp-P-2、IQ、Glu-P-1、MeIQ を用いて、試験菌株として、ヒト型薬物代謝酵素を発現するようプラスミドを導入した *umu* 試験菌株 *S. typhimurium* OY1002/1A2 およびそれにシャペロンプラスミドを導入した OY1002/1A2/pKJE7 を用い、*umu* 試験を実施した。同じ化合物について、TA98 と TA100 を用いてラット S9mix 存在下で Ames 試験を実施した。各試験結果から最小検出感度を算出し、感度の比較を比較した。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立と Pig-a アッセイの統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

[堀端] トランスジェニック動物を用いた突然変異試験と Pig-a アッセイの比較に関する研究

有用性が期待されている *Pig-a* 遺伝子突然変異試験法 (*Pig-a* アッセイ) の精度を検証するため、*gpt*-delta Tg 変異試験との組合せ試験を実施する。*gpt*-delta Tg ラットに ENU を強制経

口投与し、経時的採血および 4 週目に組織を採取し *Pig-a* アッセイ (血液) および *gpt* アッセイ (骨髄および肝臓) により遺伝子変異体頻度の測定を行った。

[石井] トランスジェニック動物を用いた一般毒性・遺伝毒性統合試験系の検討

[実験 1] estragole を投与した F344 系 *gpt* delta ラットの肝臓について、病理組織学的検索及び *in vivo* 変異原性の検索に加え、細胞増殖活性の検索とその機序を探索した。

[実験 2] 2 年間、通常飼育した雌雄 F344 系 *gpt* delta ラットと F344 ラット各 75 匹について全身諸臓器の病理組織学的検索を継続した。

[藤居] F344 系 *gpt* delta ラットを用いた突然変異試験と小核試験の統合法の検討

F344 系統 *gpt* delta Tg ラット (雄) に 62.5、125 mg/kg/day の B[a]P を 28 日間経口投与し、最終投与翌日 (day29) および 3 日後 (day31) に採取した骨髄、肝臓、大腸を用いて *gpt* アッセイおよび小核試験を実施した。投与前日 (day0) および day4、15、29、31 に採取した血液を用いて末梢血小核試験を実施した。

[高木] 遺伝毒性試験用 *gpt* delta ラットの系統比較

遺伝毒性試験用 *gpt* delta ラットのうち、SD-Tg(*gpt* delta)および Slc:WistarHannover/Rcc-Tg(*gpt* delta)とそれぞれの背景系統に対し、安全性試験に準じた 12 ヶ月飼育試験を行い、背景データとした。

[竹入] DNA ポリメラーゼ改変マウスおよび培養細胞を用いた遺伝毒性評価に関する研究

DNA ポリメラーゼ kappa ($\text{pol } \kappa$) を不活性化した *gpt* delta マウス ($\text{pol } \kappa$ KI マウス) の遺伝毒性評価系としての可能性を探るため、クロスリンク剤である mitomycin C (MMC) および cisplatin (CDDP) に対する反応性を検討した。MMC または CDDP を 5 日間反復投与した $\text{pol } \kappa$ KI マウスおよび *gpt* delta マウス ($\text{pol } \kappa^+$ マウス) より採取した材料を用いて検討を行なった。遺伝毒性の指標として、遺伝子突然変異、小核および DNA 損傷の中から複数を選択した。

[増村] 改良型 *gpt* delta マウスを用いた高感度試験系の検討

①遺伝毒性試験用 *gpt* delta マウスおよび $\text{Pol } \kappa$ KI マウス (=改良型 *gpt* delta マウス) の、*in vivo* 変異原性の基礎データとして、化学物質で処理せず飼育した場合の (*gpt* delta は 4、26、52、78、104 週齢の雄、 $\text{Pol } \kappa$ KI マウスは 52 週齢の雌

雄) 肝臓と精巣における Spi⁻ 欠失変異体のシーケンズ解析を行った。

②同じく、*gpt delta* マウスおよび Pol κ KI マウスに B[a]P を経口投与し 8 週間後の大腸における *gpt* 点突然変異体頻度を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒトのサンプルを用いた実験は実施していない。動物実験は、各参加機関における動物実験委員会の承認に基づき、動物実験の適正な実施に関する規定等を遵守して実施した。

C. 研究結果

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] DMSO、phenol、capsaicin、ES の ECC_{1.5} はそれぞれ、307 μ M、2.6 mM、125 μ M、2.8 mM であった。この濃度で 24 時間処理した細胞の 48 時間培養後の小核形成頻度はいずれも 1.2-1.4% であった。

[山田] ①Ames 試験プレートでは、いずれのコロニーも *hisG46* に変異が確認された。塩基置換は、GC から AT が 80% 以上で、それ以外は AT から GC のみであった。②LB 培地プレートのコロニーでは塩基置換として、GC から AT へのトランスバージョンが 90% 程度であった。①と違って、AT から GC 以外も少数ながら検出された。この方法で、1 菌株で複数の突然変異が検出できた。また、標的配列以外の場所で起こる挿入・欠失変異 (フレームシフト) も検出された。

[須井] ①AF-2 および B[a]P について、従来の 1/10 の菌数を処理した後に本培養を行った結果、従来法よりも低用量から陽性結果が得られた。②TA100 と TA1535 の組み合わせにおいては、計測可能な復帰変異コロニーが平板上に認められた。

[平田] 最小検出感度について、代謝活性化にラットの S9mix を使用した Ames 試験では TA98 で nM オーダー、ヒト型薬物代謝酵素を発現する *umu* 試験菌株 OY1002/1A2/pKJE7 では μ M オーダーであった。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立と *Pig-a* アッセイの統合型遺伝毒性試験への組込みの検討

[堀端] ENU 投与動物由来の骨髓と肝臓を標的とした *gpt* 変異体頻度と血液細胞を標的とした *Pig-a* 変異体頻度は、溶媒投与群と比較して共に同程度に上昇した。

[石井] [実験 1] estragole を投与した F344 系

gpt delta ラットの肝臓において、高用量群でのみ遺伝子突然変異頻度の有意な上昇が認められ、合わせて細胞増殖活性の亢進と p38/Erk 経路の活性化及び PP2A のリン酸化も観察された。

[実験 2] 雄 *gpt delta* ラットにおいて、副腎の pheochromocytoma の発生率が背景動物と比較して有意な高値を示した。

[藤居] B[a]P 投与による *gpt* 点突然変異体頻度の増加は骨髓、肝臓、大腸のいずれにおいても確認できた。小核の誘発は骨髓および末梢血 (day4~31) において確認でき、骨髓、肝臓、大腸の小核試験結果は過去に実施した F344 系統の非 Tg ラットの結果と一致した。臓器サンプリング時期による差異は点突然変異体頻度では認められなかったが、骨髓と末梢血の小核は最終投与翌日より 3 日後で出現頻度が低下する傾向が認められた。

[高木] *gpt delta* ラットで背景系統と比較して体重増加抑制が確認された。血液学的検査において、SD-Tg 雄で赤血球数が、Slc:WistarHannover/Rcc-Tg 雌で白血球数が減少、血液化学的検査では、アルカリホスファターゼ、トリグリセリド、アルブミンなど有意なパラメーターの変動が観察された。組織学的検査ではいずれの系統にも心臓線維化、肝臓の小肉芽腫と細胞浸潤など通常も観察される所見があった。SD-Tg には長期飼育での発生が知られている慢性腎症、下垂体前葉過形成が確認された。

[竹入] MMC 投与により、両マウスともに γ H2AX フォーカスを持つ骨髓細胞および末梢血小核保有赤血球の出現頻度が有意に増加し、さらに pol κ KI マウスの方が *gpt delta* マウス (pol κ ⁺) より高い反応性を示した。CDDP 投与では、両マウスともに小核頻度および突然変異頻度が増加した。マウス間の比較では、突然変異頻度には有意な変化は見られなかったが、小核頻度は pol κ KI マウスの方がより高い値を示した。

[増村] 雄 *gpt delta* マウスにおいて 104 週齢の肝臓のみ欠失変異が有意に増加したが加齢に特徴的な変異タイプは認められなかった。52 週齢の Pol κ KI マウスの肝臓と精巣における欠失変異頻度は Pol κ ⁺ と同等であった。B[a]P を投与したマウスの大腸における点突然変異体頻度は用量依存的に増加したが Pol κ KI と Pol κ ⁺ の間に明らかな差は認められなかった。

D. 考察

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] phenol については、*in vitro* 小核試験で、capsaicin については、Ames 試験で陽性との報告があるが、*in vivo* の試験ではいずれの化合物も陰性とされている。今回の結果はいずれも陰性で、*in vivo* の結果と一致していたことになる。

[山田] 復帰変異を指標にする手法では検出できない、挿入・欠失変異（フレームシフト）も含め、いろいろな種類の突然変異が一つの菌株で検出できたことは、この手法の利点と考える。

[須井] 本培養を行うことにより少数の復帰変異菌が黄変ウェル出現に必要な菌数にまで増加したため、より低用量から陽性結果が得られたと考えられる。菌の生育に影響を及ぼし合う組み合わせが存在したことから、混合菌液の導入は FAT の感受性の向上にはつながらない。

[平田] umu 試験ではシャペロンプラスミド pKJE7 を導入していない OY1002/1A2 の方が高感度であった。その原因としてシャペロンプラスミドから CYP が十分に発現していないことが考えられる。S9mix を使用している Ames 試験の方が、CYP が発現している株で実施した umu 試験よりも感度が高かったことについては、化合物に対する酵素の感受性に種差があること等が挙げられる。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立と Pig-a アッセイの統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

[堀端] ラットにおいてもマウスと同様に Pig-a および *gpt* 変異体頻度はよく相関性を示すことが明らかになった。

[石井] [実験 1] ES の突然変異誘発性には p38/Erk 経路の活性化を介した細胞増殖活性の亢進が寄与することが明らかになった。

[実験 2] 遺伝子型間における自然発生腫瘍スペクトラムの違いについて、さらなるデータの蓄積が必要と考えられた。

[藤居] ラット発がん標的臓器と突然変異、小核の増加が認められる組織は必ずしも一致せず、活性代謝物の毒性への反応の違い等の影響が考えられた。B[a]P による点突然変異は評価した全ての臓器で、小核は骨髓および末梢血で増加が認められ、B[a]P の遺伝毒性は本法で検出可能であると確認できた。

[高木] 血液学的および血液化学的検査結果に

おいて確認された有意なパラメーターの変動は、週齢等の相関性がないことから偶発的な変動であると判断した。病理組織学的検査では、*gpt* delta ラットにおいてそれぞれの背景系統に発生することが知られている所見が確認され、特徴を備えていることが示唆された。

[竹入] Pol κ は MMC および CDDP によって誘発される DNA 損傷を抑制する何らかの機能を持ち、pol κ を不活性化させることでクロスリンク剤に対する感受性が増加したと考えられた。CDDP によって誘発された突然変異については変異スペクトラム解析を追加することで、より詳細な情報が得られると考えられる。

[増村] *gpt* delta マウスは、104 週齢時には加齢による変異蓄積とは異なる老化現象によって欠失変異が増加した可能性が考えられた。Pol κ KI マウスは自然突然変異のうち塩基置換突然変異に対してのみ高い感受性を示すことが示唆された。

E. 結論

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] 細胞周期を進行させながら、薬剤を 1 細胞周期分暴露させる手法は、*in vivo* の条件をよく反映していたことから、動物試験の代替としての利用が期待される。

[山田] 被験物質で処理した細菌を表現型によるセレクション無しに得たコロニーからゲノム DNA を調製し全塩基配列を解析する手法により、簡便に多くのハザード情報を得ることができた。

[須井] 従来の 1/10 の菌数を用いて処理を行った後、続けて本培養を行うことにより、FAT の感受性の向上が認められた。

[平田] umu 試験菌株として、ヒト型薬物代謝酵素を発現する株を使用することで種差を反映した試験結果を得ることができた。このような微生物を用いる遺伝毒性試験によって実験動物の削減に寄与できると考えられる。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立と Pig-a アッセイの統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

[堀端] 遺伝子変異試験としての Pig-a アッセイに関する将来的な有用性が提案できると考えられた。

[石井] *gpt* delta Tg ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性統合試験系は、遺伝毒性メカニズ

ムに関する情報が得られる有用な遺伝毒性試験系であると考えられた。

[藤居] 本統合法を用いて、B[a]Pによる突然変異と小核誘発がいずれも検出可能であることが確認された。サンプリング時期により小核試験の結果に差異が見られたことから、統合法におけるサンプリング日の設定には留意すべきと考えられた。

[高木] SD-Tg(*gpt* delta)およびSlc:WistarHannover/Rcc-Tg(*gpt* delta)はそれぞれの背景系統と同様な背景データを有する動物であり、統合型毒性試験系として有用なモデル動物であることが明らかになった。

[竹入] Pol κ を不活性化したマウスは、クロスリンク剤であるMMC、CDDPに対して高感受性を示すことが示された。

[増村] マウスにおける自然突然変異の蓄積には臓器特異性があり、加齢の影響は点突然変異と欠失変異で異なる。Pol κ KI マウスは自然突然変異の中でも塩基置換変異について高感受性であることが示された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Kuroda, D. Hibi, Y. Ishii, S. Takasu, A. Kijima, K. Matsushita, K. Masumura, M. Watanabe, Y. Sugita-Konishi, H. Sakai, T. Yanai, T. Nohmi, K. Ogawa, T. Umemura, Ochratoxin A induces DNA double-strand breaks and large deletion mutations in the carcinogenic target site of *gpt* delta rats, *Mutagenesis*, 29, 27-36 (2014)
 - 2) T. Kimoto, K. Horibata, S. Chikura, K. Hashimoto, S. Itoh, H. Sanada, S. Muto, Y. Uno, M. Yamada, M. Honma, Interlaboratory trial of the rat *Pig-a* mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody, *Mutation Research*, 755(2), 126-34 (2013)
 - 3) K. Horibata, A. Ukai, T. Kimoto, T. Suzuki, N. Kamoshita, K. Masumura, T. Nohmi, M. Honma, Evaluation of *in vivo* genotoxicity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, benzo[*a*]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the *Pig-a* and *gpt* assays, *Environ Mol Mutagen*, 54, 747-754 (2013)
 - 4) Y. Kawamura, H. Hayashi, Y. Kurata, K. Hiratsuka, K. Masumura, T. Nohmi. Evaluation of the genotoxicity of tamoxifen in the liver and kidney of F344 *gpt* delta transgenic rat in 3-week and 13-week repeated dose studies, *Toxicology*, 312, 56-62 (2013)
 - 5) T. Matsuda, M. Takamune, M. Yamada, A pilot study for the mutation assay using a high-throughput DNA sequencer, *Genes & Environ.*, 35, 53-56 (2013)
- ##### 2. 学会発表
- 1) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, A one-year feeding study for WistarHannover *gpt* delta transgenic rat, SOT 53rd Annual Meeting, USA (2014.3)
 - 2) 石井雄二, 高須伸二, 黒田顕, 横尾諭, 木島綾希, 能美健彦, 小川久美子, 梅村隆志, 肝発がん物質エストラゴールが引き起こす細胞増殖活性の亢進と突然変異誘発性への寄与, 第30回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 徳島(2014.1)
 - 3) 川喜多愛, 村田香織, 杉本憲治, 細胞周期遅延を指標にした細胞毒性評価と小核試験への応用, 日本環境変異原学会第42回大会、岡山 (2013.11)
 - 4) 山田雅巳, 高宗万希子, 松田知成, 次世代DNAシーケンサーを用いた、表現型によらない変異原性試験の開発, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山(2013.11)
 - 5) 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 鴨下渚, 本間正充, ラットを用いた*Pig-a*アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013.11)
 - 6) 青木康展, 松本みちよ, 松本理, 増村健一, 續輝久, 能美健彦, 臭素酸カリウムが*gpt* deltaマウス小腸で誘導する突然変異の閾値と変異スペクトルの用量依存性変化, 日

- 本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013. 11)
- 7) 増村健一, 豊田尚美, 権藤洋一, 能美健彦, 本間正充, *gpt* deltaマウスを用いたENU誘発突然変異と全エクソシーケンスによる経世代変異の検出, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013. 11)
 - 8) 堀妃佐子, 田中康浩, 増村健一, 山田雅巳, 藤居互, F344系*gpt* deltaラットを用いた突然変異試験と小核試験 (末梢血, 骨髓, 肝臓, 大腸) の統合法の検討, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013. 11)
 - 9) 本山茂記, 竹入章, 松尾沙織里, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Grúz P, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, MitomycinCによるDNA二本鎖切断誘発に対するDNA polymerase kappaの*in vivo*における役割, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013. 11)
 - 10) 堀端克良, 第6回IWGT報告および共同研究進捗報告: *Pig-a* アッセイ, MMS研究会第63回定例会, 岡山 (2013. 11)
 - 11) 増村健一, 第6回IWGT報告および共同研究進捗報告: 生殖細胞に影響を及ぼす変異原の同定, MMS研究会第63回定例会, 岡山 (2013. 11)
 - 12) K. Horibata, S. Ishikawa, A. Ukai, A. Sugano, M. Honma, Establishment of human *Pig-a* assay and application to genotoxicity monitoring of cancer chemotherapeutic patients, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013. 11)
 - 13) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, N. Osugi, Y. Ishii, T. Umemura, H. Takagi, A. Nishikawa, T. Nohmi, M. Honma, Spontaneous point mutations and deletions increased with aging in *gpt* delta transgenic mice and rats, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013. 11)
 - 14) 増村健一, 豊田尚美, 石井雄二, 梅村隆志, 能美健彦, 西川秋佳, 本間正充, *gpt* deltaラット肝臓における自然突然変異および加齢に伴う変異蓄積の検討, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013. 10)
 - 15) K. Masumura, Aging and accumulation of gene mutations: Identification of spontaneous mutations in the tissues of *gpt* delta transgenic mice, National Cancer Forum 2013, Thailand (2013. 8)
 - 16) 堀端克良, 共同研究報告II:*Pig-a*, MMS研究会第62回定例会, 諏訪 (2013. 5)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
以下の案件名 (案) で特許申請中 (2013/1/24 公開) である。
「磁気ビーズ濃縮法を利用した *Pig-a* 変異網状赤血球の測定法」
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

ヒト iPS 細胞由来機能細胞を利用した新規薬効評価系の構築

独立行政法人医薬基盤研究所
幹細胞制御プロジェクト
川端 健二

ヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞をメチルセルロース中で培養することにより、iPS 細胞からマスト細胞様細胞を分化誘導することに成功した。また、Wnt5a が iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化を促進することが示された。また、昨年度までに、ヒト ES 細胞 (KhES4)、ヒト iPS 細胞 (Tic) から作製した脾β細胞は、他のヒト ES/iPS 細胞から作製した脾β細胞と比較して、脾分化能が高いことを明らかにしたので、本年度は脾β細胞への分化誘導技術をさらに改良することを試みた。

研究組織

- (1) 独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト 川端健二
- (2) 大阪大学大学院薬学研究科 水口裕之
- (3) (株)リプロセル 木藤古孝行

A. 研究目的

近年、アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー性疾患の患者数は益々増加しており、社会問題となっている。アレルギー反応の主役はマスト細胞であり、抗アレルギー薬を新規に開発あるいは評価するには *in vitro* でマスト細胞を培養することが重要となるが、マスト細胞は *in vivo* では組織中に浸潤しているため、生体からマスト細胞を取り出し、培養することは非常に困難である。これまで、脱顆粒抑制薬 (=抗アレルギー薬) の評価は、ラット RBL-2H3 細胞等を用いて行われてきたが、種差がある、脱顆粒応答能にばらつきがある等の理由により薬効評価には十分な系とはいえない。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞からマスト細胞を分化誘導し、免疫毒性評価系へ応用することを目指す。当該年度は、ヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。また、iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を創薬へ応用するには安定的に培養可能な培養条件の検討が必須である。そこで当該年度はマスト細胞成熟化因子の探索を試みた。

これまでにヒト iPS 細胞から脾β細胞への分化誘導研究は多くなされているが、いまだに *in*

vitro 分化誘導系において、ヒト脾β細胞と同程度のグルコース応答能を有したヒト iPS 細胞由来脾β細胞は作製できていない (Cell Stem Cell. 2013 Feb 7;12(2):224-37.)。そこで、我々はヒト iPS 細胞由来脾β細胞のさらなる成熟化を目指し、種々の検討を行った。これまでに indolactam V などの化合物が脾分化を促進するという報告があるため (Nat Chem Biol. 2009 Apr;5(4):258-65)、ここでは最も脾分化を促進できる化合物の組み合わせを検討した。さらなる脾分化促進を行うために、胎児肝臓の血液細胞の培養上清を用いた検討も行った。胎児脾臓は豊富に血液細胞を含むことが知られているため、脾臓発生過程において、脾β細胞と血液細胞の間に相互作用があるのではないかと考え、本実験を試みた。

B. 研究方法

本研究は、研究代表者川端、分担研究者水口、木藤古の計3名で実施した。当該年度においては、主にヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立およびヒト iPS 細胞から独自の脾分化誘導法の開発を行った。方法の詳細は各分担報告書を参照されたい。

(倫理面への配慮)

本研究は、各研究者が所属する研究施設の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試

料は使用していない。

C. 研究結果

C-1. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血液・免疫細胞を誘導するには、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へ分化誘導する必要がある。H24 年度、EB 形成法あるいは C3H10T1/2 細胞との共培養法を用いることで、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へと分化誘導可能であることを示した。そこで H25 年度は、上記の方法で作製したヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立を試みた。EB 形成法あるいは C3H10T1/2 細胞との共培養法により得られた CD34+CD43+血液前駆細胞をセルソーターにて回収後、インターロイキン (IL) -6 および幹細胞増殖因子 (SCF) 含有メチルセルロース中で培養した。その結果、培養 5-6 週間後にコロニーが出現した。コロニーを顕微鏡下で採取し、メイ・ギムザ染色を行った結果、細胞内に顆粒を有することが示されたことから、出現したコロニーがマスト細胞様細胞であることが示された。また、出現したコロニーについて PCR 法を用いてマスト細胞関連遺伝子群 (高親和性 IgE 受容体 (FcεRI)、トリプターゼやカルボキシペプチダーゼ (マスト細胞特異的酵素) など) の発現量を検討した。その結果、メチルセルロース中に出現したコロニーにおけるマスト細胞マーカーの発現量は iPS 細胞由来 CD34+CD43+血液前駆細胞と比較して有意に上昇していた。したがって、ヒト iPS 細胞からマスト細胞様細胞が分化誘導可能であることが示された。

C-2. iPS 細胞由来成熟マスト細胞の大量培養法の開発に向けた基礎的検討

H24 年度、マウス iPS 細胞を骨髄ストローマ細胞株である OP9 細胞や Swiss 3T3 線維芽細胞と共培養することで成熟したマスト細胞が得られることを示した。分化誘導の再現性・安定性の向上を目指し、H25 年度は、OP9 細胞や Swiss 3T3 線維芽細胞が共通に産生する因子を同定することで、無フィーダー細胞条件下での iPS 細胞から成熟マスト細胞への誘導法の確立を試みた。

マスト細胞は、自己複製能を有し、SCF の受容体である c-kit を発現するなど、造血幹細胞と類

似した特徴を有することから、造血幹細胞の分化や維持に重要な因子を中心に OP9 細胞と Swiss 3T3 細胞が共通に発現する液性因子について検討した。その結果、SCF、Ang-1 等を共通に発現することが明らかとなった。また、Wnt リガンドに関して詳細な検討を行った結果、Swiss 3T3 細胞と OP9 細胞は Wnt5a などの種々の Wnt リガンドを共通に発現することが示された。

次に、iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化を Wnt シグナルが促進するか否かについて検討した。骨髄由来マスト細胞を用いた予備検討の結果、Wnt5a が骨髄由来マスト細胞の成熟化を促進することが示されていた。そこで、iPS 細胞由来マスト細胞を SCF、IL-3、Wnt5a 存在下で 20 日間培養後、マスト細胞特異的酵素活性や HDC mRNA 量を検討することによりマスト細胞の成熟度を評価した。その結果、マスト細胞特異的酵素活性の上昇が観察された。また、HDC mRNA 量が増加していたことから、Wnt5a は iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化を促進することが示された。

C-3. 低分子化合物 (ILV, PMA) を作用させることによるヒト ES/iPS 細胞から膵 β 細胞様細胞への分化促進

ヒト ES/iPS 細胞は内胚葉、膵前駆細胞、膵内分泌前駆細胞を介して膵 β 細胞様細胞へと分化することが知られている。これまでに indolactam V (ILV) を分化誘導 9 日目のヒト ES 細胞に作用させると、PDX1 陽性細胞の割合が約 2.5 %から約 26.9 %に向上することが報告されている (Nat Chem Biol. 2009 Apr;5(4):258-65)。そこで、ILV を用いた膵 β 様細胞への分化誘導プロトコルの改良を行うために、Tic あるいは K4 由来膵前駆細胞に ILV と他の低分子化合物や液性因子を組み合わせて作用させ、膵 β 細胞への分化をさらに促進できるか調べた。その結果、ILV および PMA を用いて作製した Tic 由来 β 様細胞において PDX と insulin (INS) の遺伝子発現が有意に上昇していた。同様の結果がヒト ES 細胞である K4 でも確認された。また、ILV と PMA を膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞の段階で作用させたのち 25 日まで培養した K4 および Tic 由来膵 β 様細胞をフローサイトメトリーにより C-peptide 陽性細胞の割合を評価した。その結果、ILV および PMA を用いて分化誘導を行うことによって、K4 由来膵 β 様細胞の C-peptide 陽性細胞の割合が 13.2 %から 19.5 %へと有意に上昇した。Tic 由来膵 β 様細胞

においても ILV と PMA を作用させて培養することで C-peptide 陽性細胞の割合は 9.4 % から 10.9% へと上昇した。ELISA 法を用いて、作製した膵β様細胞がグルコースに応答して C-peptide を放出できるかどうかを調べたところ、ILV および PMA を作用させて分化誘導した膵β様細胞において、high glucose 存在下での C-peptide 放出量は大きく増加した。ILV および PMA を作用させることによって、Tic 由来膵β様細胞では C-peptide 放出量比 (high glucose 存在下/low glucose 存在下) は 1.5 倍から 1.8 倍へと増加した。K4 由来膵β様細胞では ILV および PMA を作用させることによって、C-peptide 放出量比は 1.5 倍から 1.9 倍へと増加した。これらのことから、ILV と PMA は膵β様細胞への分化効率を高めるだけでなく、膵β様細胞の機能を向上させることが示された。

C-4. CM-mFLC を用いて培養することによるヒト ES/iPS 細胞から膵β様細胞への分化促進

ヒト ES/iPS 由来膵前駆細胞に ILV と PMA を作用させることで膵β様細胞への分化が促進されることが明らかになった。しかし、作製したヒト ES/iPS 由来膵β様細胞は生体内の膵β細胞と比較してグルコース応答 C-peptide 産生能などの機能が低かった。そのため、ヒト ES/iPS 細胞から作製した膵β様細胞のさらなる機能向上を目指した。マウス胎児膵臓は豊富に血液細胞を含んでおり、膵発生において血液細胞が重要な役割を果たす可能性が示唆されている (Diabetes. 2004 Aug;53(8):2143-52.)。そこで、マウス胎児肝臓細胞の培養上清 (conditional medium of mouse fetal liver cells ; CM-mFLC) を用いて、ヒト ES/iPS 細胞から高機能な膵β細胞を作製することを目指した。K4 あるいは Tic から分化誘導した膵β様細胞において、膵関連遺伝子の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、CM-mFLC を用いて分化誘導した K4 由来膵β様細胞において、膵β細胞のマーカーである INS、PDX、MafA、内分泌細胞のマーカーである NGN3 や NEUROD1 の遺伝子発現量がコントロール群と比較して有意に高かった。また、同様に Tic 由来膵β様細胞においても、膵関連遺伝子の発現量が上昇した。したがって、CM-mFLC は膵β様細胞への分化を促進できることが示唆された。

D. 考察

EB 形成法あるいは C3H10T1/2 細胞との共培養法により得たヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞をメチルセルロース中で培養することでマスト細胞様の細胞を得ることができた。しかしながら、得られた細胞でのマスト細胞特異的酵素や高親和性 IgE 受容体の発現量は未だ低い。過去の研究では、ヒト臍帯血あるいは末梢血由来 CD34+細胞から、12 週間かけてマスト細胞を分化誘導している。本研究では、ヒト iPS 細胞由来 CD34+細胞 (血液前駆細胞) をメチルセルロース中で 8 週間培養した細胞を用いているため、培養期間が短いことが原因として考えられる。今後は、得られた細胞をさらに長期間培養することや支持細胞との共培養法などを検討していく必要があると考えられる。

分化誘導の再現性・安定性の向上を目指し、H25 年度は、OP9 細胞や Swiss 3T3 線維芽細胞が共通に産生する因子を同定することを試みた。マウス iPS 細胞から成熟度の高いマスト細胞を得るには Wnt5a が有用な因子であることを本研究により示しており、ヒト iPS 細胞からマスト細胞を分化誘導する際にも Wnt5a が有用である可能性がある。したがって、Wnt5a を用いたより簡便で安定した、ヒト iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化誘導法の確立が期待される。

高機能な膵β様細胞を作製するために、C-3. では膵β様細胞への分化を促進できる低分子化合物の検討をおこなったが、ILV と PMA を組み合わせることで分化を促進できることを見出した。ILV および PMA はいずれも PKC シグナルを活性化することが知られているため、より強力に PKC シグナルを制御できるような操作を加えることで、膵β様細胞へのさらなる分化促進が期待できる。また、ヒト ES/iPS 由来膵β様細胞のグルコース応答インスリン産生能の向上を目指し、マウス胎児肝臓細胞の培養上清 (CM-mFLC) を用いてヒト ES/iPS 細胞から高機能な膵β様細胞への分化促進を試みた。その結果、CM-mFLC を用いてヒト ES/iPS 由来膵内分泌前駆細胞を培養することで膵β様細胞への分化が促進されることが示唆された。今後は高機能な膵β様細胞への分化を促進させる因子を特定することで、膵β細胞への分化メカニズムの解明だけでなく、移植可能な高機能な膵β様細胞の作製に繋がり、再生医療に貢献できることが期待される。分化誘導技術が十分に改善されたのち、膵β様細胞を大量に調整するため

の技術も開発したい。

E. 結論

- 1) C3H10T1/2 細胞との共培養法あるいは EB 形成法により得られたヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞をメチルセルロース中で培養することで、マスト細胞様細胞が得られた。
- 2) Wnt5a を作用させることで、マウス iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化が促進された。
- 3) 低分子化合物 ILV、PMA を用いることで脾 β 様細胞への分化が促進された。また、CM-mFLC を用いて培養することによっても、脾 β 様細胞への分化が促進された。しかしながら、ヒト脾 β 細胞よりも機能面で依然として劣っているため、今後も継続してグルコース応答能の高い脾 β 細胞の作出するための技術開発が必須であると考ええる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., Kawabata K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)
2. Taura A., Furuta K., Yamaguchi T., Kawabata K., Tanaka S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfil and Gfilb, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.*, in press
3. 山口朋子、川端健二、iPS 細胞由来マスト細胞を用いた難治性疾患の新規治療薬開発へ向けて、*Biophilia 電子版*、2、21-25 (2013)

G-2. 学会発表

- 1 山口朋子、田代克久、池田由美、田中智之、水口裕之、川端健二: Wnt シグナルによるマスト細胞の成熟化; 日本薬学会第 134 年会、

熊本、2014 年 3 月 27-30 日

- 2 平林玲子、山口朋子、田代克久、池田由美、水口裕之、川端健二: メチルセルロース法を用いたヒト ES/iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 3 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling; 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11-13 日
- 4 山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関与する新規因子の同定; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 5 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells: 第 11 回幹細胞シンポジウム、東京、2013 年 5 月 17-18 日
- 6 黒木亮、高山和雄、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之: マウス胎児肝臓細胞の培養上清を用いたヒト ES/iPS 細胞から脾 β 細胞の作製、京都、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2013 年 10 月
- 7 黒木亮、高山和雄、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之: 脾臓-血液間相互ネットワークを利用したヒト iPS 細胞から脾 β 様細胞の作製、熊本、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

川端健二、山口朋子 (発明人) ; 成熟マスト細胞の作製方法及び得られた成熟マスト細胞 ; 特願 2013-103582

フェレットに対する免疫原性を基盤とした 細胞培養インフルエンザワクチン株選定法確立

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター
浅沼秀樹

研究要旨

臨床分離インフルエンザ株をフェレットに感染させた抗血清を用いて抗原性試験を行った結果、レファランスと類似抗原であるにも関わらず、感染株によって抗原性の認識が異なった。適切なワクチン種株の選択の難しさと選定法確立の重要性が示唆された。

研究組織

- (1) 東海大・工学部 山口陽子
- (2) 国立感染症研究所 岸田典子
相内 章
永田典代
- (3) 東京化成工業株式会社 湯浅德行

A. 研究目的

現在インフルエンザの感染を予防、ないしは症状の軽減のために、ワクチンが用いられている。本邦では流行予測した株の皮下接種方式が用いられているが、予測とは異なる抗原性を有する株の流行には、予防効果が著しく低下するという欠点を持つ。さらに現行のワクチンには、製造過程において抗原性が変化するという問題も抱えている。

現行のインフルエンザワクチンは、流行株と抗原性の一致したウイルス株の遺伝子を改変し、製造に用いる発育鶏卵での増殖性を高くした株を用いている。しかし近年、ワクチン作製

用に準備される高増殖性のワクチン用種株が、発育鶏卵を介することで、鶏卵での増殖に適する変化をし、抗原性が野外株と大きく変わることが指摘されている。このような抗原性の変化は、ワクチン効果を著しく低下させ、症状が重篤になるだけでなく、流行が広範囲に渡するため、経済的損失も大きい。そのため、現行の発育鶏卵に代わる抗原性を変化させない増殖媒体の開発が期待されている。

細胞培養系を用いてワクチンを製造する場合、発育鶏卵で認められるような顕著な抗原性の変化は乏しく、抗原性が維持されていると考えられている。近々には細胞培養系で製造したプレパンデミックワクチンも実用化される。しかし、季節性ワクチンを細胞培養系で製造する場合には、使用する細胞株や種株選択の基準などの詳細は一切確立されていないため、このような基準の構築が急務とされている。

現行のインフルエンザワクチン株を選定する場合、流行株やワクチン種株の抗原性を比較検討する。この評価にはフェレットの感染血清