

ーターベクターを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、miR-455-5p および 3p の共発現によりルシフェラーゼ活性の優位な低下が見られた。miR-455-5p および 3p の結合配列に変異を加えたレポーターベクターではルシフェラーゼ活性の低下が見られないことから、miR-455 が HIF2 α の 3' UTR を標的として直接的に HIF2 α の発現を抑制することが明らかになった (図 2)。

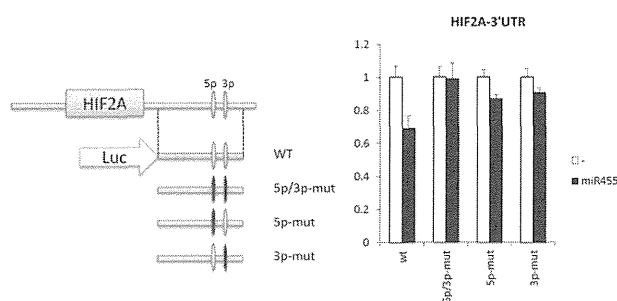


図2. miR-455によるHIF2 α 遺伝子の発現抑制

また、miR455 およびその宿主遺伝子の 27 型コラーゲン (Col27a) を人工ヌクレアーゼである TALEN を用いて、ノックアウトマウスの作製を試みた。その結果、miR-455 ノックアウトマウスの作製に成功し、生殖系列への伝達も確認できた。

D. 考察

これまでに、mRNA とタンパク質の発現に相関が見られないことが明らかにされており、それらを繋ぐあるいは調整する因子の存在が示唆されていたものの、その本体が何であるかについては明らかにされていなかった。近年、遺伝子の発現を転写後レベルで負に制御、すなわち mRNA の分解や翻訳の阻害で調節する因子として小さな non-coding RNA である miRNA が同定され、様々な研究により、この miRNA は癌、炎症性疾患をはじめ、様々な疾患に関与することが示されてきている。miRNA は一つで多くの遺伝子をターゲットにしていると考えられており、疾患の複雑な遺伝子ネットワークを理解する上で重要な因子となっている。しかしながら RA の発症に重要であると考えられている Th17 細胞分化に関わる miRNA はこれまでほとんど明らかにされていない。これらのことから *in vitro* での Th17 細胞および Treg 細胞分化系を用いてマイクロアレイ解析により網羅的に発現が変動する miRNA と mRNA を探索した。

miRNA および mRNA のプロファイリングより Th17 細胞の分化・機能において PI3K-Akt 経路の抑制因子である PTEN が miR-21 の標的として重要であることが示された。PI3K-Akt 経路の活性化は Th17 細胞の分化亢進に重要であることが報告されている (Kurebayashi et al. 2012 *Cell Reports*)。

これらの報告および本研究で明らかになった miR-21 が PTEN の発現抑制することによる PI3K-Akt 経路の活性化が Th17 の分化制御に重要であることが強く示唆される。一方で Treg 細胞は免疫システムの恒常性維持および自己免疫疾患、炎症性疾患の抑制において重要な役割を果たし、Th17 細胞と相互排他的な分化過程を経ることから Treg 細胞で高発現する miRNA が Th17 細胞の分化や機能において抑制的であることが予想される。我々は *in vitro* の Treg 細胞の分化誘導系を用いた miRNA の経時的な発現解析から miR-466f、miR-466q、miR-467f、miR-669h が Treg 細胞において高発現していることを見出した。これら miRNA はポリコム複合体を形成する分子である Sfm2 のイントロンにコードされており、その標的として Th17 細胞の分化に重要な HIF1 α や IRF4 が挙げられることから、Th17 細胞の分化抑制を介して Treg 細胞の分化を促進していると考えられる。

一方で OA の発症において軟骨細胞の恒常性の維持に miR-140 が重要であることを明らかにしてきた (Miyaki et al 2010 *Genes Dev*)。本研究において新たに、軟骨細胞に高発現する miRNA として miR-455 を同定した。miR-455 は、miR-455-5p および miR-455-3p 両鎖ともに軟骨細胞で発現が高く、また軟骨分化により発現が上昇することがわかり、軟骨分化に重要な機能を有する可能性が示された。また、miR-455-5p、-3p それぞれの過剰発現により、HIF2 α の発現低下が見られた。HIF2 α の発現低下は HIF2 α 遺伝子の 3' UTR 上に存在する miR-455-5p および 3p の結合配列が重要であることを明らかにした。

近年、人工ヌクレアーゼによるゲノム編集が新たな遺伝子改変ツールとして脚光を浴びている。我々は TALEN を用いた miRNA ノックアウトマウスの作製に成功した。miR-146a および miR-146a と同じシード配列を持つ miR-146b のノックアウトマウスを複数ライン作製することに成功し、生殖系列への伝達も確認できた。今後はこれらのマウスを用いた各 miRNA の *in vivo* における意義を意義らかにしていくことが重要であると考えられる。さらに、得られた実験データよりバイオインフォマティックス的手法を用いることで RA および OA の疾患発症ネットワークを明らかにすることで両疾患の質的な違いが明らかになることが期待される。

E. 結論

H25 年度の研究により RA および OA の発症に関与することが予想される新規 miRNA を複数同定し、その標的の同定および TALEN を用いた miRNA 欠損マウスの作製に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takada S, Sato T, Ito Y, Yamashita S, Kato T, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Igarashi A, Kato T, Tamano M, Asahara H. Targeted gene deletion of miRNAs in mice by TALEN system. *PLoS One*. 2013; 8(10): e76004.

2. 学会発表

Asahara H. MicroRNA and arthritis. 2013 ACR/ARHP Annual Meeting; ACR basic research conference: Beyond germline genetics: New perspectives on rheumatic disease predisposition- Day two; Session IV: Cartilage, bone and related tissues, San Diego, CA, USA. October 26, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

多能性幹細胞を医薬応用へ活かす生体親和性 次世代スケーラブル培養システムの確立

所 属 独立行政法人国立成育医療研究センター
課題責任者 阿久津 英憲

新たな細胞培養空間の開発を基盤とするが、マイクロデバイス開発のような高度な先端
的ナノテクノロジーからのアプローチではなく、より細胞の生命活動の観点に立ち細胞
コミュニケーションと足場の研究を展開する。

研究組織

(独)国立成育医療研究センター	阿久津英憲
(公財)がん研究会 がん研究所	原 英二
横浜市立大学医学部	梁 明秀
慶應義塾大学医学部	浜谷 敏生
大日本印刷(株) 研究開発センター	土屋 勝則
日油(株)筑波研究所	山田 智
(株)DNA チップ研究所	的場 亮
ライフテクノロジーズジャパン(株)	河田規予
(株)セルシード	遠藤 孝雄
ユニーテック(株)	新井 貴博

組織化学的解析により分化状態を解析する。ヒト iPS 細胞をナノインテリジェント器材で少なくとも 5 継代培養維持を試み、培養細胞の性質評価を行う。(成育、ユニーテック、セルシード、癌研究所、横浜市立大学、DNA チップ研、慶應大学)

分化誘導に優れた足場の開発

分化誘導を制御するテンプレート開発を行う。分化制御の質は、構築できる分化細胞がどれだけ均一なものかを遺伝子発現やタンパク質レベルの特異的マーカー解析により行う。均一性に関しては、70% 以上の効率で目的分化細胞が獲得できることを目指す。(成育、日油、大日本印刷)

(実験動物に対する動物愛護上の配慮)

各参画機関の動物実験の指針を遵守し、動物倫理委員会の承認を得て、動物愛護の精神のもとに実施する。と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。

国立成育医療センター研究所動物実験規程

<http://www.nch.go.jp/anim/animalkitei.htm>

国立成育医療センター動物実験に関する指針

<http://www.nch.go.jp/anim/animalshishin.htm>

(倫理面への配慮)

ヒト細胞に対する倫理面への配慮-iPS 細胞の樹立に用いるヒト細胞

国立成育医療研究センター研究所においては、ヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け承認を受けている。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

国立成育医療研究センター倫理審査委員会

<http://www.ncchd.go.jp/center/information/ethics/index.html>

C. 研究結果

ヒト多能性幹細胞を活かす多角的ゲノム評価の解析

複数種の iPS 細胞とヒト ES 細胞株を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。階層的クラスタリング解析により iPS 細胞と ES 細胞はクラスター化され、さらに iPS 細胞は由来により分けられた。網羅的遺伝子発現マイクロアレイ解析 (Agilent 60K) と miRNA 解析から新たな幹細胞特異的な分子特性として

A. 研究目的

本研究では、独自のマイクロファブリケーション技術を用いて iPS 細胞研究へ応用しスケーラブル細胞培養デバイス構築を目指す。加えて、液性細胞外基質として生体適合性ポリマーも含めたヒト多能性幹細胞の新規的培養空間の創出を行う。

B. 研究方法

ヒト多能性幹細胞を活かす多角的ゲノム評価の解析

主任研究者らが貢献してきたヒト ES 細胞培養の標準化システムを用いた環境下でのヒト iPS 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行う。iPS 細胞の遺伝子発現データをヒト ES 細胞とのデータとで *in silico* 解析を行っていき、遺伝子発現レベルから ES 細胞との類似性あるいは相異性を明らかにしていく。(成育、DNA チップ研、癌研究所)

幹細胞性質保持とゲノム安定化の足場の開発

マイクロファブリケーション技術を用いて 2D デバイスのパターンニング開発をから新規的な足場を創成する。(成育、大日本印刷、日油)

生体適合材料として 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) の低吸着性に着目し細胞間応答に基づく液性細胞外基質としての MPC 研究開発からヒト iPS 細胞の性質を制御する培養空間を作成する。(成育、日油、大日本印刷)

ヒト iPS 細胞培養環境が *in vivo* 分化動態に与える影響の検討

ヒト iPS 細胞培養の要素が免疫不全マウスへ移植した後の分化動態に与える影響を解析する。移植前の培養環境が *in vivo* での分化動態に及ぼす影響を検討する。移植後継時的に観察しサンプル回収後、組

miRNA のクラスターを複数見出した。miR302 群の標的遺伝子を複数抽出し、Wnt シグナル伝達系が関連することを見出した。

幹細胞性質保持とゲノム安定化の足場の開発

マイクロファブリケーション技術により細胞の足場を造形でき、それが、特定に分化挙動を誘導することが示された。パターンニングがあらゆる形状が可能であり、特定の円形サイズにより内胚葉系への分化を誘導することを見出した。

iPS 細胞のゲノム安定性の解析

種々のナノインテリジェントディッシュの継代酵素フリー培養を検討した結果、良好に培養出来ることを見出した。細胞株間による若干の反応性の差があることも判明し、グローバルな培養方法を開発していくリード的な要素を見出すことができた。

分化誘導に優れた足場の開発

細胞が主体となる生体適合性ポリマーによる細胞培養空間の開発特に、分化移行環境では、液性細胞外基質としての生体適合性ポリマーを用いた底面加工非接着系培養プレートにより、これまで胚様体形成分化誘導が不安定であったヒト iPS 細胞が安定的に効率よく胚様体形成が可能となり、網膜色素上皮や消化管組織等へ再現性をもって分化組織を構築することができた。

E. 結論

マイクロファブリケーション技術により細胞の足場を造形でき、細胞外マトリックスを選択することで異種成分を使用しない培地でも幹細胞の未分化性が維持できることが示された。安定した scaffolds は多能性幹細胞研究を行う上で必要不可欠であり、未分化維持が安定的に行える技術が整備できた。パターンニングがあらゆる形状が可能であり、足場を制御することで空間への増殖性も間接的に制御できることが示唆され、今後分化誘導を行う上で有効になる成果が得られた。

ヒト多能性幹細胞はその性質から細胞治療を含めた再生医療や創薬開発等の幹細胞産業化に期待されている。今回、バイオマーカーあるいは治療対象標的としても注目を集めている miRNA において、ヒト多能性幹細胞特異的発現をする miR302 群においてその標的分子を明らかにし、未分化→分化変動における機能で Wnt シグナル伝達系が働くことを明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

1. 論文発表

1) Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, **Akutsu H**, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2: 265-273.

2) Okumura N, **Akutsu H**, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. β -Catenin Functions Pleiotropically in Differentiation and Tumorigenesis in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *PLoS One* 2013; 8: e63265.

3) Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, **Akutsu H**, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet.* 2013; 14: 32.

4) Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, **Akutsu H**, Hata K, Nakabayashi K, Kono T. Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. *Epigenetics.* 2013; 8: 635-645.

5) 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.* 2013 Jul 2. Epub ahead.

6) Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, **Akutsu H**, Umezawa A, Nakamura KI, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell.* 2013; 45: 407-413.

7) Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, **Akutsu H**, Miura T, Miyado K, Tarin JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013; 11(1): 108.

8) 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.* 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]

9) Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, **Akutsu H**, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci.* 2013; 126(Pt 23): 5391-5399.

10) Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, **Akutsu H**, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating

mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae*. 2013; 4: 2.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願 1212-1870 「ヒト iPS 細胞への簡易的遺伝子導入法の開発および人工神経幹細胞様細胞の作製」阿久津英憲、梅澤明弘、三浦 巧

2. 実用新案登録
なし

3. その他

- ・政策提言：内閣府総合科学技術会議生命倫理専門調査会委員として動物性集合胚研究に関する文部科学省指針見直しの見解を作成(平成 25 年 8 月 1 日生命倫理専門調査会)

臍帯血移植後のドナーリンパ球輸注を可能とするための 基盤整備と第 I 相臨床試験

国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部
藤原成悦

研究要旨 臍帯血移植後のドナーリンパ球輸注を可能とするために、無血清リンパ球培養法の検討、GVHD に対処するための誘導制御性 T 細胞調製法の確立、マルチカラーフローサイトメトリーによるリンパ球迅速解析法の開発、ウイルス特異的 T 細胞調製法の検討などを行った。

研究組織

- (1) 国立成育医療研究センター研究所 藤原成悦
- (2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水則夫
- (3) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 森尾友宏
- (4) 国立成育医療研究センター研究所 清河信敬
- (5) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (6) 株式会社リンフォテック 茅野真一
- (7) 虎の門病院 谷口修一
- (8) 医療法人神鋼会 伊藤仁也
- (9) 東京大学医科学研究所 長村登紀子

A. 研究目的

造血幹細胞移植の 1 つ臍帯血移植は近年急速に普及しており、成人に対する移植も増加している。しかし、骨髄移植と比較して生着不全あるいは生着遅延の頻度が高いことなどの短所も知られるようになった。また、骨髄移植後の再発や感染症に対して、ドナーのリンパ球を大量に輸注するドナーリンパ球輸注療法 (DLI) が有効であるが、臍帯血移植の場合は、ドナーが乳幼児であるため必要量のリンパ球を得ることができず、従来の方法による DLI は不可能である。本研究チームはこれまでに、末梢血 T 細胞を *ex vivo* で活性化・増幅する技術確立し、この細胞をがん患者および重篤な感染症患者に投与し、良好な治療結果を得てきた。本研究は、この培養技術

を臍帯血に応用し、移植後に残された少量の臍帯血から T 細胞を活性化・増幅し、この細胞を輸注することにより従来の DLI と同等あるいはそれ以上の効果を得ることを最終の目標としている。また、DLI の副反応として想定される移植片対宿主反応 (GVHD) の治療に用いることを目的として、臍帯血から制御性 T 細胞を効率よく増殖させる培養法を確立することを第二の目標とする。今年度は、無血清培養液を用いて臍帯血 T 細胞を培養する方法を確立すること、臍帯血由来制御性 T 細胞増幅法の精度を上げ、得られた細胞をもちいてマウスで GVHD の治療実験を行うこと、マルチカラーフローサイトメトリーによるリンパ球マーカー発現の迅速検査法の確立、培養細胞に対する迅速ウイルス検査法の確立、ウイルス特異的 T 細胞調製法の検討などを中心に研究を進めた。

B. 研究方法

1. 無血清培養法の検討

無血清培養液は、ALyS basal medium、TexMACS (Miltenyi 社) 及び、自施設開発の培養液を用いた。凍結臍帯血は共同研究契約により東京臍帯血バンクから入手し、解凍の後に OKT3 抗体を固相化したフラスコを用い、IL-2 を加えて培養した。

2. ウイルス迅速検査法

1) 対象ウイルス : HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, ADV, HBV, PVB19。

2) PCR 条件

<反応液組成>

DNA sample	10ul
10XBuffer (no MgCl ₂)	2ul
25mMMgCl ₂	2.4ul
10mMdNTPs	2ul
Taq	0.2ul
water	3.2ul
Total	20ul

<PCR 条件>

Denature 95°C 10 sec

PCR 95°C 5 sec

60°C 30 sec

3) DNA 増幅酵素

以下の 6 種類の酵素を比較検討した：① Z-taq (TakaraBio)、② EX-taq (TakaraBio)、③ ThunderBIRD(TOYOBO)、④ Amplitaq (ABI)、⑤ BioTaq(Simazu)、⑥ GENE Ace(Nippongene)。

3. マルチカラーフローサイトメトリーによる活性化臍帯血 T 細胞のマーカー発現解析
FITC、PE、ECD、PC5.5、PC7 (PE-Cy7)、APC、APC-Alexa-700、APC-Alexa-750、Pacific-Blue、Krome-Orange の 10 種類の異なる蛍光色素で標識した単クローン性抗体のセットによる蛍光染色を行い、Digital flow cytometry Galios (Beckman-Coulter 社) を用いて 3 レーザー 10 カラー解析を行った。

4. 臍帯血誘導制御性 T 細胞 (iTreg) の体外増幅法

臍帯血 CD4⁺T 細胞を、固相化抗 CD3/CD28 抗体上で IL-2 および TGF- β を加えて培養するという基本条件のもとで、mammalian Target of Rapamycin (mTOR) を標的とする新規免疫抑制剤 Rapamycin (Rap) あるいは Everolimus(Eve) を添加しその効果を検証した。in vitro 免疫抑制機能の評価は、CFSE 染色したレスポンダー細胞と同種成熟樹状細胞との混合リンパ球反応(MLR)に、PKH26 染色した上記培養細胞(iTreg)を添加し CFSE 輝度の変化を測定した。また、xeno GVHD モデルマウスに iTreg を投与し、その治療効果を評価した。

5. ウイルス特異的 T 細胞の調製

健康人末梢血を用いて、overlapping peptides とサイトカインを用いて、ウイルス特異的 T 細胞の調製を試みた。対象はサイトメガロウイルス(CMV)、EB ウイルス(EBV)、アデノウイルス(ADV)の 3 種類から開始し、それぞれ

IE6, p65(CMV), LMP2, EBNA1, BZLF1 (EBV), Penton, Hexon (ADV)の抗原から 11 アミノ酸ずつ overlap する 15 アミノ酸長のペプチド混合物を用いて、培養を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「臨床研究に関する倫理指針」に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化されるため、個人情報漏洩の恐れはない。本研究は国立成育医療研究センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。

C. 研究結果

1. 無血清培養法の検討

凍結臍帯血由来リンパ球を、新規無血清培養液を用い標準作業手順書に従って培養した。前回までの解析と同様に、最初の数日において死細胞が多くなり、細胞凝集塊を作り、その後徐々に回復するという経過を辿った。この過程において標準作業手順書に一部変更を加え、培養液交換時期やアルブミンの添加、サイトカイン量の変更等の条件を変化させてマトリックス解析を行ったが、状況に変化を認めなかった。このように、凍結臍帯血から無血清培養液を用いての培養は困難だったため、臍帯血採取時に一部の細胞を培養しておくことが望ましいという結論に至った。

2. 臍帯血 DLI の安全性確保のためのウイルス検査法

培養した臍帯血 T 細胞を患者に投与するのに先立ちウイルス検査を行い、安全性を確保する必要がある。本研究チームはこれまでに、マルチプレックス PCR による他種ウイルス同時検出系の開発を進めてきた。本年度は、検査に必要なプライマー・プローブ・バッファー・dNTP・増幅酵素を 8 well strip に減圧乾燥・固化した固相化試薬の保存安定性試験を行なった。その結果、室温で 6 ヶ月保存し

ても検出感度が変化しないことが示された (図 1)。また、検査をさらに迅速化させるために、多種類のポリメラーゼを比較したところ、TakaraBio 社の Z-Taq を用いた場合に反応時間を最も短縮することができた。さらに、DNA 抽出のステップを省略するために、Ampdirect-plus を用いて検査を行ったところ、DNA 抽出を行った場合と比べて 1/5~1/10 に検出感度が低下した。

3. マルチカラーフローサイトメトリーによるリンパ球マーカー発現の解析

10 カラーフローサイトメトリーを用いて、微量の検体で活性化臍帯血 T 細胞の性状解析および臍帯血活性化 DLI 施行後の患者における免疫能解析が可能となる測定系を確立した。CD45, CD3, CD4, CD8, CD45RA を共通項目として、1) CD62, CD27, CD56, CD244, CD19 を追加した組み合わせにより CD4/8 細胞の機能的サブセットと NK 細胞、B 細胞の解析が、2) CD25, CD5, CD103, CD357, CD45RO を追加した組み合わせにより制御性 T 細胞を含む T 細胞サブセットの解析が可能となった。この測定法を用いることにより、最少 100 μ l の全血を用いた検査を 2 回行なうだけで、免疫能に関する詳細な情報を簡便に得ることができる。このプロトコールは、臍帯血 DLI 施行後のレシピエントの細胞免疫の状態をモニタリングするために有用であると考えられる。

4. 臍帯血 iTreg 細胞の体外増幅と解析

臍帯血 CD4⁺ T 細胞を固相化抗 CD3/CD28 抗体上で 5%FBS、IL-2、TGF- β 、Everolimus を添加することにより、安定して iTreg を調製することが可能になった。臨床で実際に iTreg を用いる場合には大量培養が必要になるのでその条件検討を開始した。凍結解凍臍帯血からのソーティング手法、オーストラリア産 FBS の評価など具体的手順を現在検討している。また、Luciferase 遺伝子を導入したヒト活性化 T 細胞をマウスに投与した後 iTreg を投与し、生体イメージングにて活性化 T 細胞の分布を経時的に追跡しながら GVHD の抑制効果やマウスの生存率を観察中である。GVHD 発症後の治療を想定し、活性化 T 細胞が生体イメージで広がった状態で iTreg を投与したが、細胞数比や投与時期の遅れによって現在のところ十分な抑制効果が得られていないが、投与時期等について検討を行っている。

5. ウイルス特異的 T 細胞の調製

健康人からはそれぞれのウイルス抗原に対

して特異的な T 細胞が増幅できたかどうかを、細胞内 IFN- γ 産生能検査 (FACS) 及び ELISPOT assay にて検討を行った。その結果、すべての抗原に対して、10-1,000 倍程度の増幅が認められ、合計すると 30%前後の細胞が特異的 T 細胞であることが明らかになった。至適サイトカイン濃度も決定し、20mL の血液から 12 日前後で 5000 万程度の細胞が得られるようになった。得られた細胞の 95%前後が CD3 陽性の T 細胞であった。約 3/4 が CD4 陽性であり、10-20%程度が CD8 T 細胞で、NK 細胞や B 細胞はほとんど認めなかった。T 細胞のほとんどは CD45RO⁺CD62L⁺のセントラルメモリー細胞であった。

D. 考察

凍結臍帯血からのリンパ球無血清培養はきわめて困難であることが判明したため、新鮮な臍帯血の一部をあらかじめ培養しておく必要であることが明らかになった。

従来、制御性 T 細胞の解析として一般的に用いられている細胞膜透過処理による細胞内転写因子 FoxP3 の検出に代えて、細胞表面の CD103 および CD357 を測定項目として追加することにより、煩雑な操作を伴わずに制御性 T 細胞の解析が可能と期待される。しかし、CD103 および CD357 を指標としてとらえられる分画と FoxP3 を指標とする分画が正確に同一のものであるかどうかについては、さらに検討を重ねる必要があると考えられる。

ウイルス特異的 T 細胞の調製についてはすでに抗原刺激を受けた (既感染の) ドナーからの細胞調製は、比較的簡便に行えることが明らかになった。一方 naïve T が主体である臍帯血では memory T の増幅が行えず、ペプチドとサイトカインのみに培養では増幅が著しく困難と想定される。今後ペプチドパルスの方法の工夫などの技術革新に至れば、臍帯血を資源とした特異的 T 細胞、そのバンク化なども可能になることが期待される。

これまでにモデルマウスによる前臨床研究やリンパ球解析法の改良などにより、臍帯血 DLI の第 I 相臨床試験の準備が整えられてきた。一方で「再生医療等の安全性確保等に関する法律」が可決され、臍帯血 DLI は、他家細胞を用いることから最もハードルの高い「第 1 種再生医療等技術」に属する可能性が生じた。また異種血清である FBS 使用についても問題視される可能性があるため、無血清

培養液による培養法を確立した上で臨床試験を実施する必要があると考えられた。

E. 結論

リンパ球の無血清培養は、新鮮臍帯血からは可能であったが、凍結臍帯血からは困難であった。第 I 相臨床試験は無血清培養法が確立された後行ふべきと考えられる。培養リンパ球の安全性確保のための迅速ウイルス検査法の改良が進んだ。臍帯血から GVHD に治療に用いるための iTreg を調製するためのプロトコルが確立された。マルチカラーフローサイトメトリーによる簡便な制御性 T 細胞検出プロトコルが作成された。末梢血からウイルス特異的 T 細胞を調製するプロトコルが作成された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current studies on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatrics International*, 2014, in press.
- 2) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr virus infection and pathogenesis in humanized mice. *Immune Network*, 2014, in press.
- 3) Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases. *pathogens* 2: 153-176, 2013.
- 4) Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, and Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae* 4:2, 2013.
- 5) Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ.: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood* 121: 4512-4520 (2013).
- 6) Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*. 52(2):201-11 (2013).
- 7) Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 324, 190-194(2013).
- 8) Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 2013 (in press).
- 9) Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Mori T, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Hino M, Inoue M, Ogawa H, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Morishima Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-versus-Host Disease to Corticosteroid Therapy: An Analysis from the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 19,1183-9, 2013.
- 10) Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.; GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Transpl Int*. 26, 631-9, 2013.
- 11) Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica*. 98,814-22, 2013.

12) 長村 登紀子、山本 由紀、mTOR 阻害剤による制御性 T 細胞の誘導、Induction of inducible regulatory T cells by mTOR inhibitor. 臨床免疫・アレルギー科, 60, 428-434, 2013

2. 著書・総説

1) 森尾友宏、宮坂あかね、小野敏明、落合央、藤田由利子、高橋聡：移植後ウイルス感染に対する多ウイルス特異的 CTL 療法、日本小児血液がん学会雑誌、50: 335-40, 2013.

2) 北條浩彦、清水則夫(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ. 北條浩彦編「基本編－原理と基本知識－リアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー／プローブの設計手順②マルチプレックスの場合」p72-74 羊土社, 2013

3) 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップ UP シリーズ. 北條浩彦編「実践編－プロトコルを中心に－IV 章 遺伝子量解析 15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」p192-202 羊土社, 2013

3. 学会発表

(国際学会)

1) Fujiwara S. Reproduction and Analysis of Epstein-Barr Virus Pathogenesis in Humanized Mice. 4th International Workshop on Humanized mice. Sep 30, 2013, Seoul.

2) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Diseases in Humanized Mice. Fall Conference of the Korean Association of Immunologists. Nov 8, 2013.

3) Matsuda G, Imadome K, Yajima M, Ochiai N, Mochizuki M, Kawano F, Shimizu N, Komano J, Yamamoto N, Fujiwara S. A humanized mouse model of cell-mediated immunotherapy against EBV-associated lymphoproliferative disorder. 38th Annual International Herpesvirus Workshop, Jul 20-24, 2013, Grand Rapids.

4) Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Kobayashi S, Yuzawa M, He H, Tsunoda H, and Tojo A. Impact of mTOR inhibitor, Everolimus on inducible regulatory T cells Derived from Cord Blood, International Society of Cellular Therapy (ISCT) Annual meeting, New Zealand, 2013.

5) Itonaga H, Iwanaga M, Aoki K, Aoki J,

Ishiyama K, Kobayashi T, Sakura T, Fukuda T, Yujiri T, Hirokawa M, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Atsuta Y, Ishikawa T, Miyazaki Y, Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia, New Orleans, 2013/12/7.

6) Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.

(国内学会)

1) 今留 謙一、松田 剛、川野 布由子、千葉 祐規乃、新井 文子、中澤 温子、伊藤 守、清水則夫、藤原 成悦. 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 11 日、神戸.

2) 堀野雅人、今留謙一、今井耕輔、王路丹、松田剛、浜崎霞、小松穂菜実、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV は T、NK 細胞に感染後 AID 発現とそれによる遺伝子変異蓄積をもたらす腫瘍発症に寄与する. 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌.

3) 王路丹、今留謙一、小松穂菜実、福田哲也、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV の感染により T、NK 細胞では IL-2 の存在下 CD137 発現が誘導され細胞生存が亢進する. 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌.

4) 小松穂菜実、今留謙一、王路丹、倉田盛人、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV 陽性 T、NK 細胞は FOXP3 を発現し制御性 T 細胞同様 T 細胞の増殖を抑制する. 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌.

5) 三春晶嗣、富田理、石橋武士、清河信敬. 10 カラーフローサイトメトリーによる T-ALL の MRD 検出. 第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会、東京、6 月 22 日-23 日、2013.

6) 清水則夫 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 9 月 (東京)

7) 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）

8) 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）

9) 森尾友宏: 造血細胞移植後のウイルス感染症、第43回東海小児造血細胞移植研究会、名古屋、2013年11月12日

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

図 表

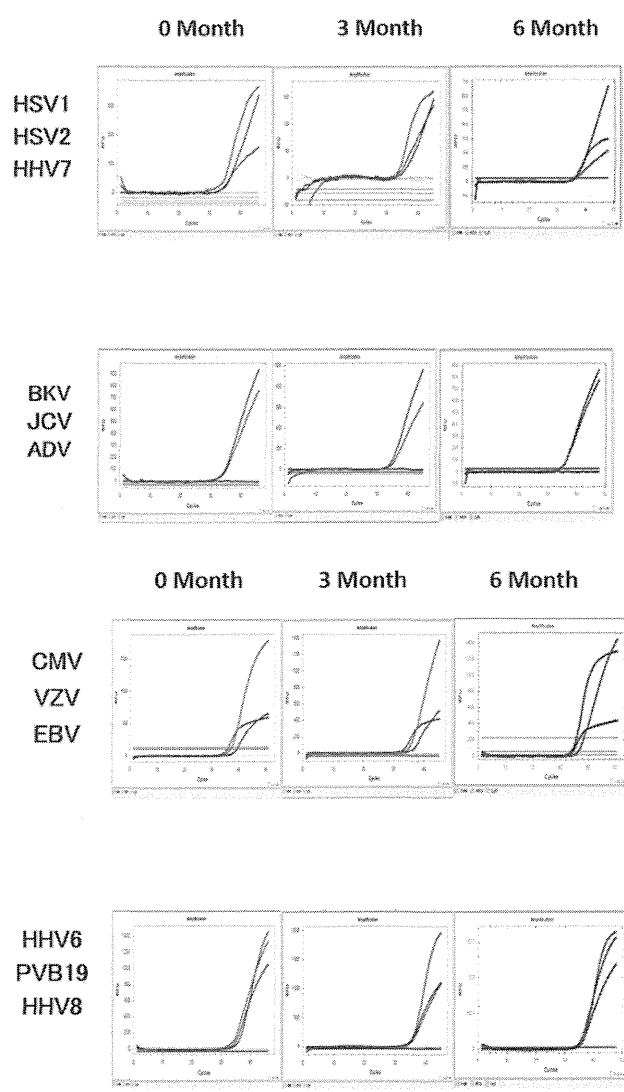


図 1. 固相化試薬の保存安定性試験

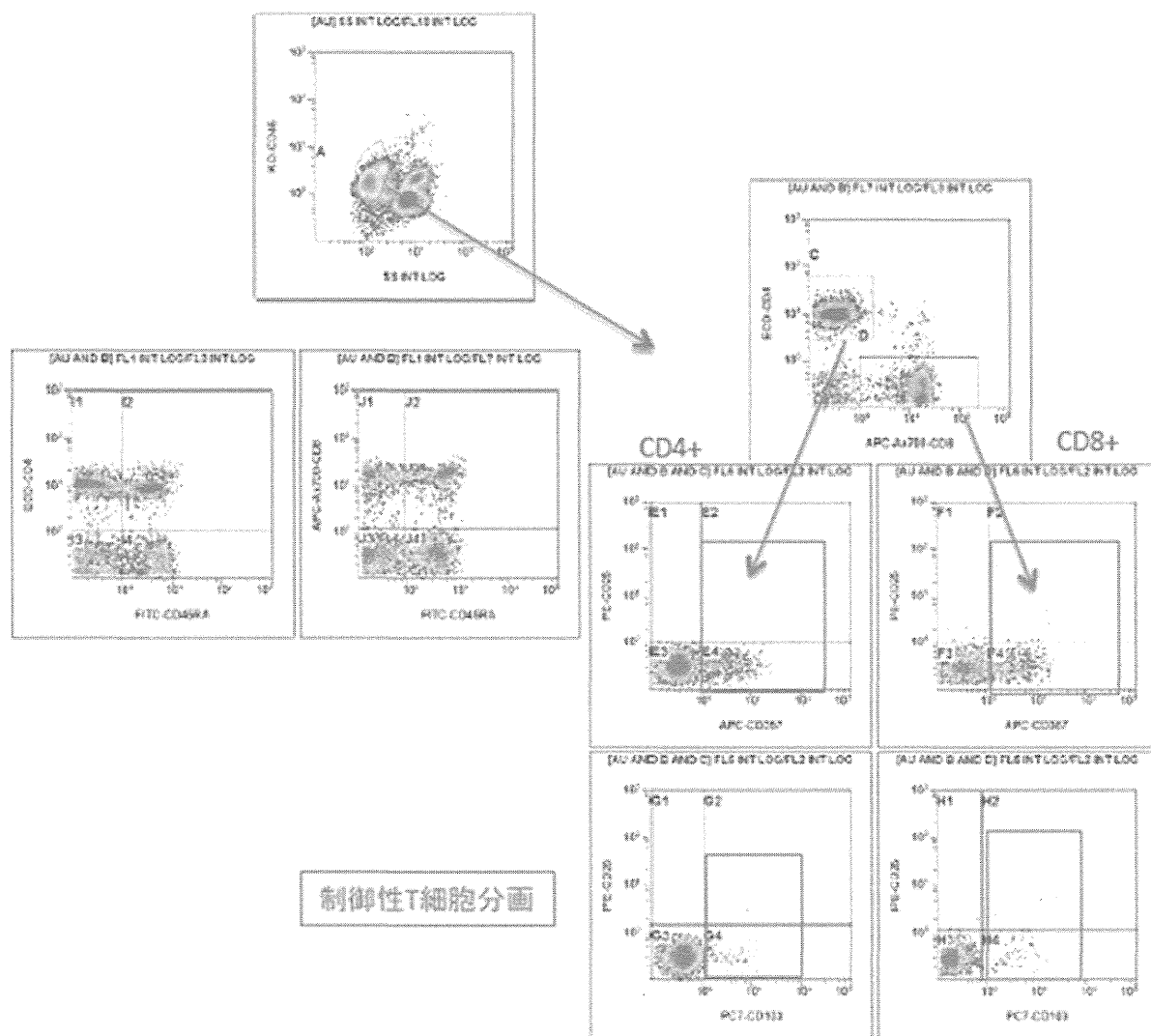


図 2. 制御性 T 細胞の解析. 10 カラーフローサイトメトリー解析の 1 例を示す. 前方散乱(FS)と側方散乱(SS)によって細胞を分画し、さらに KO 標識-CD45 と SS によって展開することにより (左上)、リンパ球、単球、顆粒球を明確に分離することが可能であり、このうちリンパ球にゲート(A)をかけて、CD56 と CD3 を展開することにより、T 細胞を選択する。CD3+CD56+細胞について、CD4 と CD8 で展開することによって (右上)、CD4+細胞 (ゲート C)、CD8+細胞 (ゲート D) それぞれについて、CD25 と CD367 あるいは CD103 の発現状況を観察することが可能である。

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 薬理部
石田 誠一

研究要旨 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。研究の成果は政策創薬におけるヒューマンサイエンス総合研究 (官民共同研究) 研究成果発表会、ならびに、日本動物実験代替法学会第 26 回大会にて成果発表シンポジウムとして報告された。

研究組織		(13) 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 山村典男
(1) 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部	石田誠一	
(2) 東北大学大学院薬学研究科 薬物動態学分野	吉成浩一	A. 研究目的
(3) 岩手医科大学薬学部 薬物代謝動態学講座	小澤正吾	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。
(4) (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	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。
(5) 積水メディカル株式会社 薬物動態研究所	青山晋輔	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)
(6) 田辺三菱製薬株式会社 薬物動態研究所	山田泰弘	
(7) 第一三共RDノバール株式会社 分析センター	鈴木恭介	
(8) (独) 理化学研究所 社会知創成事業	杉山雄一	
(9) 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	
(10) アステラス製薬株式会社 創薬推進研究所 (H24年10月29日よりH25年7月31日まで) (H25年 8月 1日より)	浜川 望 北村吏司	
(11) エーザイ株式会社 筑波薬物動態研究室	小森高文	
(12) 田辺三菱製薬株式会社 研究本部	久永紀子	

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」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) については、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必要がある。併せて、特異体質による薬物性肝障害が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。そこで、

3. 三次元培養系・共培養系の開発
- として、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、並びに、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行った。

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 予測システムを用いた阻害作用評価
- <予測>

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。他方、これら医薬品について ADME データベース (富士通九州システムズ) から CYP 代謝情報を収集した。データベースから代謝

情報が得られなかった医薬品については、添付文書、インタビューフォームおよび文献データベース (PubMed) から代謝情報を収集した。

<代謝試験>

CYP1A2 発現系 Ms (ロット C1A2R010B または C1A2R011A, Cypex) およびコントロール Ms (ロット BA087, Cypex)、NADPH Regenerating System Solution A (ロット 35585, BD Gentest) および NADPH Regenerating System Solution B (ロット 33993, BD Gentest) を用いた。

- ・CYP1A2 予測システムの検証と医薬品代謝への応用
- <実験材料>

Human CYP2E1 + Reductase + b5 microsomes (BD Biosciences) を利用した。

- ・CYP3A4 テンプレートの作成

<Core template の作成>

6 β 水酸化反応を受けるステロイド化合物を基に、core template の作成を行った。さらに、6 α 水酸化反応、16 α 水酸化反応、2 位及び 4 位水酸化反応を受ける化合物を重ね合わせることで、各々の代謝反応を矛盾なく説明できる core template を作成した。

<ヒト CYP3A4 基質 template の作成>

構造がリジットな化合物からフレキシブルかつ分子量の大きな化合物を順次 core template に重ね合わせることで、反応 template の拡張を行い、最終的なヒト CYP3A4 基質 Template の作成を行った。

<市販医薬品による template の妥当性検証>

世界売上上位品目の中から、template の妥当性検証に用いる低分子化合物を選抜し、代謝反応と物性値を確認した。その結果、選抜した市販医薬品 31 化合物のうち、CYP3A4 による代謝反応が確認されていないものは 16 化合物存在した。これら化合物の脂溶性は低い傾向にあり、ミクロソームに分配しにくい代謝を受けないことが予想される。よって、template を用いた分子形状的な予測に加えて、物性値 ($\log D \leq 0$) のフィルターをかけた予測も同時に実施した。

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

<ヒト凍結肝細胞における取り込みタイムコースの検討>

プールドヒト凍結肝細胞 (Lot. TFF) を用いて、肝細胞への取り込みタイムコースを調べた。

<ヒト凍結肝細胞への取り込みを阻害する rifampicin 濃度の検討>

プールドヒト凍結肝細胞 (Lot. TFF) を用いて、rosuvastatin の肝細胞への取り込み阻害における rifampicin 濃度 (10- 300 μM) の影響を検討した。

＜ヒト凍結肝細胞への取り込み定常状態における $K_{p,uu}$ 値及び f_T 値の条件間比較＞

プールドヒト凍結肝細胞 (Lot. TFF) 及びヒト凍結肝細胞 (Lot. Hu8075) において、氷冷下及び rifampicin 存在下の 2 条件で能動輸送を止めることにより $K_{p,uu,ss}$ 及び $f_{T,cell assay}$ 値を算出した。

＜ヒト肝ホモジネート中の非結合型分率の測定と方法間比較＞

Diazepam, pitavastatin, pravastatin, 及び rosuvastatin について、ヒト肝ブロックから調製したヒト肝ホモジネート中の結合率を平衡透析法により測定し、非結合型分率 ($f_{T, homogenate assay}$) を算出した。

・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

本研究では、未だ肝取り込み機構が明確になっていないカチオン性の薬物として、一連の高血圧治療薬の一種である β 受容体遮断薬 (β ブロッカー) および片頭痛治療薬の一種である 5-HT_{1B/1D} 受容体作動薬 (トリプタン) をモデル薬物として選択し、ヒトおよびラット遊離肝細胞を用いて、肝細胞への時間依存的な取り込み、およびそれに対する各種トランスポーター典型的阻害薬の共存の影響について検討した。

・肝 OATP を介した薬物間相互作用の PBPK モデルを用いた予測

肝 OATP による能動輸送と受動拡散によって血管側から肝臓内に取り込まれるスタチン系薬剤は、一部が肝臓内から血管側へと再び排出され、残りは薬物代謝酵素による代謝、もしくは毛細胆管膜上に発現するトランスポーター (BCRP、MRP2、MDR1) による未変化体の胆汁排泄によって体内から除去される。本研究では、サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて、スタチンの肝クリアランスを決定付ける要因である肝取り込み過程 (PS_{inf})、血管側への排出過程 (PS_{eff})、胆汁排泄過程 ($CL_{int,bile}$) および代謝過程 ($CL_{int,met}$) の各素過程クリアランスを評価した。一方、スタチンと OATP 阻害剤 (シクロスポリン、リファンピシン等) との併用で生じる薬物間相互作用の臨床データをもとに、構築した PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ (分布容積、吸収速度定数、肝臓における各素過程クリアランス、OATP に対する阻害定数 (K_i) 等) の最適化計算を行い、in vitro との比較を行った。

・基質依存的な OATP1B1 阻害作用の検討

＜OATP1B1 発現細胞における OATP1B1 基質薬物の取込み活性＞

OATP1B1 の基質薬物として報告されている 12 化合物の OATP1B1 発現細胞およびコントロール細胞への取込み時間推移を検討した。

＜OATP1B1 を介した濃度依存的取込み＞

OATP1B1 基質薬物の OATP1B1 を介した取込みについて速度論的解析を行った。

＜CsA, Rif および Gem の OATP1B1 に対する阻害活性＞

OATP1B1 を介した基質薬物の取込みに対する CsA, Rif および Gem の阻害活性を検討した。

＜阻害剤 CsA のプレインキュベーション効果＞

予め CsA に 1 時間細胞を曝露させることで CsA の OATP1B1 阻害活性の変化を検討した。

＜OATP1B1 を介した薬物間相互作用の定量的予測＞

前項の検討で得られた阻害剤 CsA, Rif, Gem の OATP1B1 に対する K_i 値、 E_2G , E_1S , BSP を基質として得られた各阻害剤の OATP1B1 に対する K_i 報告値 (Izumi et al., 2013)、および各阻害剤の臨床濃度を使用し、薬物間相互作用の定量的予測を static model に従い実施した。

・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＞

浮遊ヒト肝細胞への化合物取り込み試験を、下記の試験方法により実施した。

・評価化合物

[³H] estrone-3-sulfate (E_1S)

・阻害剤

rifampicin, cyclosporine A, tipranavir, lopinavir

・Human Serum Albumin (HSA) 濃度

0, 0.2, 0.5, 1, 2%

・インキュベーション時間

0.25 および 1.5 分

＜評価化合物・阻害剤の HSA 存在下における非結合型分率の算出＞

2% HSA 存在下における評価化合物・阻害剤の非結合型分率を、RED device (Thermo Scientific 社) を用いた標準プロトコルに従い、平衡透析法で算出した。

＜実験系での阻害剤実濃度の測定＞

2 倍濃度の評価化合物および阻害剤含有の Krebs-Henseleit buffer を等量添加しインキュベーションを開始した (HSA の最終濃度は、0% および 2%)。反応開始 1 分後に、試験管を遠心して上清を採取し、反応液中の阻害剤の実濃度を定量した。

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＞

本研究課題で昨年度開発していた灌流培養チップについて、ピペットにて細胞懸濁液を培養チャンバーに導入後、灌流流路構造部材を乗せてチップを組む方式に変更することにより、細胞塊を含む細胞懸濁液での評価を可能とした。

＜灌流培養チップによる薬物代謝酵素活性測定用プローブ基質代謝評価＞

細胞は、XenoTech LLC、Celsis IVT および HUVEC (正

常ヒト臍帯静脈内皮細胞、タカラバイオ)を用いた。チップの培養面は、予め所定の操作でコラーゲンをコートした。培養チャンバー当たりの導入細胞数は 5×10^4 とし、培養培地として InVitroGRO CP Medium、代謝測定培地として William' E を用いた。チップ導入前に Hepatocytes Isolation Kit (XenoTech) にて死細胞を分離除去した。さらに、所定のタイミング (Fig. 3) で薬物代謝酵素活性測定用プローブ基質 (Table 1) に所定時間暴露させ、灌流液を回収し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) により基質代謝物を定量した。

・共培養系

<TPA 分化 HL-60 細胞の共培養系における HuH-7 細胞のストレス応答関連 mRNA およびケモカインの mRNA レベルの比較>

ヒト白血病由来株細胞 HL-60 細胞を 16 nM 12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) で 48 時間分化させた。その後、HuH-7 細胞との共培養を 37℃、48 時間行い、HuH-7 細胞の総 RNA をグアニジンチオシアネート法で回収した。熱ショックタンパク Hsp70 (HspA6)、メタロチオネイン (MT2A)、ケモカイン (CXCL2) の mRNA レベルを Real-time PCR 法で測定した。

(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が、適宜、各研究機関の研究倫理委員会での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 予測システムを用いた阻害作用評価

代謝予測試験を阻害物質の探索に応用可能か、CYP2E1 代謝予測システムを用いて検討した。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化学物質データベースから、7 物質が非基質性の阻害物質である可能性が示され、このうち LC-MS/MS の検出が可能であった 6 化合物は 33 μ M から 63.2 μ M の IC₅₀ 値で、Chlorzoxazone の CYP2E1 による Chlorzoxazone の 6 位水酸化反応を阻害することが明らかとなった。さらに、これら 6 化合物が CYP2E1 の基質となるか否かを検討したところ、Bisphenol A、Genistein および p-Nitrobenzoic acid については、CYP2E1 の基質とならないことが強く示唆された。以上の結果から、本代謝予測システムでは、代謝反応の進行を予測出来るだけでなく、阻害作用の有無を予測できると考えられた。

・CYP1A2 予測システムの検証と医薬品代謝への応用

CYP1A2 による酸化が予測された 7 つの医薬品 (Aripiprazole、Esomeprazole、Formoterol、

Lansoprazole、Mycophenolate mofetil、Salmeterol、Quetiapine) について、CYP1A2 大腸菌発現系を利用して代謝試験を行い、LC-MS による代謝物構造の推定を行った。本研究では、LC-MS による構造の推定であるため、構造の完全な決定はできなかったが、推定結果を予測代謝部位と比較した。その結果、いずれの薬物についても酸化代謝物が得られ、これらが CYP1A2 の基質であるとの予測結果を一致した。

代謝部位の予測に関しては、若干の予測と実測の相違が認められた。

・CYP3A4 テンプレートの作成

立体選択的な代謝反応を受けるステロイド化合物から template の構築を開始した。X-Y 平面、X-Z 平面の 2 つの方向から 2 次元基質 template を作成することで、よりコンパクトな形状で矛盾なくステロイド類の代謝反応を説明可能な core template を作成することができた。ここから、リジットな化合物、分子量の大きなフレキシブルな化合物と適応範囲を広げていくことで、多くの医薬品分子を収容可能なコンパクトなヒト CYP3A4 の基質 template を作成することができた。また、方眼紙様の格子を使用するスコアリングシステムに template を載せることで、多様な構造を持つ医薬品分子の当てはめを容易にすることができた。

Template の検証に用いるべく、繁用されている市販医薬品を調査したところ、31 化合物中 16 化合物について CYP3A4 代謝の関与がない、あるいはほとんどないとされていた (医薬品インタビューフォームを中心に、論文およびデータベースを調査)。本検討では、分子形状的な代謝予測が目的であるため、代謝場であるミクロソームへ分配しにくい化合物を除く必要があると考えた。CYP3A4 で代謝されないとされる化合物の物性を調査したところ、Duloxetine、Telmisartan、Irbesartan、Formoterol を除き、極めて脂溶性が低く、ミクロソームに分配できないが故に代謝されないと考えられた (なお、Duloxetine は CYP1A2 及び 2D6、Irbesartan は CYP2C9、Formoterol は CYP2D6 及び CYP2C で代謝されることが報告されており、Telmisartan はグルクロン酸抱合を受けることが明らかとなっている)。そこで、template による代謝予測と分配係数 log D によるフィルタリング (log D ≤ 0 を除外) の効果を検討した。その結果、log D 値を併用することで予測精度の向上が認められた。しかしながら、その予測精度は十分でなかった (正答率 17/31)。

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

K_{p,uu} を推定する上でより簡便な *in vitro* 試験系の構築を目指し、肝取り込みの定常状態における肝細胞対

メディウム濃度比 (C/M ratio) に着目し、トレーサー濃度 1 点を用いて定常状態における 37°C の C/M ratio と能動輸送を止めた C/M ratio について比をとることにより $K_{p, \text{uni}}$ 値を推定する方法について、その妥当性を検証した。能動輸送を止める手段として、氷冷下及び肝取り込み阻害剤存在下の条件下で肝細胞への定常状態取り込みを評価した。アニオン性薬物を対象に、ヒト肝細胞への取り込み定常状態における氷冷下及び rifampicin 存在下条件で推定した非結合型基準の肝細胞内濃縮率及び肝細胞中の非結合型分率の違いは条件間でそれぞれ 3 倍以内であり、ヒト肝ホモジネート中の測定値とほぼ同じであった。

・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

物性が異なるトリプタン系薬物 5 種類 (sumatriptan, almotriptan, naratriptan, rizatriptan, zolmitriptan) のヒトおよびラット肝細胞への取り込みを観察したところ、いずれも on ice 条件下よりも 37°C 条件下の方が大きな取り込みが観察された。また、OCTs の典型的な基質・阻害剤である tetraethylammonium (TEA) 5 mM もしくは quinidine 100 μM を共存させた場合、ラット肝細胞においては、TEA の阻害は、quinidine の阻害よりも弱いことが多く、OCT1 以外の quinidine-sensitive な輸送機構の存在が示唆された。一方で、ヒト肝細胞においては、いずれのトリプタン系薬物についても、TEA と quinidine の阻害強度はほぼ等しく、主に OCT1 によって肝取り込みされている可能性が考えられた。一方で、 β ブロッカーについては、ヒト肝細胞およびラット肝細胞の両方において、TEA の阻害強度よりも quinidine の阻害強度の方が強い薬物 (acebutolol, pindolol, bisoprolol) と、TEA, quinidine のどちらでも阻害がかからない薬物 (celiprolol, talinolol) に 2 分された。

・肝 OATP を介した薬物間相互作用の PBPK モデルを用いた予測

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた各種スタチン (ピタバスタチン、ロスバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン) の取り込み・排出実験の結果、 PS_{inf} 、 PS_{eff} 、 $CL_{\text{int, bile}}$ の各素過程クリアランスを求めることができた。 PS_{inf} および PS_{eff} の値より計算される肝取り込み過程の受動拡散/能動輸送比 (R_{dif}) は 0.1~0.4 程度の値が得られた。また、アトルバスタチンは肝取り込みの後 CYP3A4 による代謝も受けるため、シクロスポリンによる CYP3A4 の阻害を介した相互作用も考慮する必要がある。アトルバスタチンと CYP3A4 代謝のプローブ薬物であるミダゾラムをカセットドーズでサンドイッチ培養ヒト肝細胞に添加して $CL_{\text{int, met}}$ を評価したところ、いずれの薬物についてもヒト肝ミクロソームに比べて低い傾向が見られた。一方

で、スタチンの腸肝循環を組み込んだ PBPK モデルを構築し、シクロスポリンとの相互作用データを説明可能な薬物動態パラメータを最適化計算したところ、in vivo におけるシクロスポリンの OATP に対する K_i は各種スタチンの例で類似した値が得られ、in vitro で報告されている値よりも小さい (阻害が強い) 結果となった。さらに、最適化計算によりスタチンの in vivo における R_{dif} は、in vitro の R_{dif} と同程度か小さい値に収束する傾向があることが示された。

・基質依存的な OATP1B1 阻害作用の検討

OATP1B1 の基質薬物として報告のある 12 化合物 (Pitavastatin, Atorvastatin, Fluvastatin, Rosuvastatin, Pravastatin, Repaglinide, Nateglinide, Glibenclamide, Bosentan, Valsartan, Torsemide および Fexofenadine) の OATP1B1 を介した取込みに対する CsA, Rif および Gem の In vitro 阻害活性を比較・検討し、使用する基質が in vitro OATP1B1 阻害試験結果および薬物間相互作用の定量的予測に与える影響を検証した。

OATP1B1 基質薬物を使用した際に得られた CsA, Rif および Gem の K_i 値はそれぞれ 0.0769~0.530 $\mu\text{mol/L}$ (6.9 倍)、0.358~1.23 $\mu\text{mol/L}$ (3.4 倍) および 9.65~252 $\mu\text{mol/L}$ (26 倍) であった。基質間で K_i 値に差が認められたものの、Torsemide を基質としたときに得られた CsA の K_i 値 (0.530 $\mu\text{mol/L}$) と Nateglinide を基質としたときに得られた Gem の K_i 値 (252 $\mu\text{mol/L}$) の 2 例を除いて、 E_2G を基質として得られた K_i 値とほぼ一致し、その 3 倍の範囲内に収まることが明らかとなった。一方で、 E_1S を基質とした時に得られた K_i 値 (CsA, 0.700 $\mu\text{mol/L}$; Rif, 6.65 $\mu\text{mol/L}$; Gem, 364 $\mu\text{mol/L}$) および BSP を基質とした時の K_i 値 (CsA, 0.680 $\mu\text{mol/L}$; Rif, 2.70 $\mu\text{mol/L}$; Gem, 169 $\mu\text{mol/L}$) は、OATP1B1 基質薬物あるいは E_2G を基質として得られた K_i 値に比べ大きかった。

OATP1B1 の阻害剤である CsA は、基質添加前にプレインキュベーションすることでその阻害活性が強くなることが過去に報告されていた。5 種類の異なる基質を使用しその効果を検討したところ 3.2~5.1 倍阻害活性が強まることが明らかとなったが、基質依存性は認められなかった。

算出された K_i 値および各阻害剤の臨床濃度を使用し、薬物間相互作用の定量的予測を static model に従い実施した。OATP1B1 基質薬物を使用した場合の R 値は、 E_2G を基質とした場合とほぼ同程度であった。一方で E_1S および BSP を基質とした場合には、他の基質に比べ R 値を低く見積もる傾向が認められた。

・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

トランスポーター基質の輸送能、阻害剤の阻害能に対する蛋白の影響を検討した。基質の輸送能、阻害剤

の阻害能ともに、HSA 濃度依存的な減弱が認められた。また、別試験より求められた非結合型分率、阻害剤の実測濃度を用いた検討から、両者ともに蛋白非結合型の基質のみがトランスポーターを介して輸送され、蛋白非結合型の阻害剤のみがトランスポーターを介した輸送に阻害能を示す、というフリー仮説に従う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

2 種類の hepatocyte (XenoTech : 非接着性細胞および Celsis : 接着性細胞) をチップ内で灌流培養し、8 種類の薬剤プローブ基質のカクテルを暴露させることにより、薬物代謝酵素活性を評価した。これら 2 種類の hepatocyte をチップ内で 1 週間、安定して培養することができた。代謝試験の結果については、第 2 相酵素の抱合酵素群については灌流により 1 週間程度の機能維持が認められたものの、第 1 相酵素のチトクローム P450 アイソフォーム群については灌流の効果は得られなかった。また、XenoTech と HUVEC を混合共培養した系では、第 1 相も機能を発現し、1 週間の機能維持が確認された。

・共培養系

トログリタゾンを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 細胞とを共培養系でその機構の解明を試みた。トログリタゾンは HuH-7 細胞内の分子シャペロン Hsp70、重金属毒性応答タンパク MT2A の発現を誘導させるが、単球系細胞共培養は、薬物毒性の防御的応答を減弱させることが示唆された。

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 予測システムを用いた阻害作用評価

・CYP1A2 予測システムの検証と医薬品代謝への応用

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、昨年度から本年度にかけて、以下の 2 点を検討した。

(1) 市販医薬品を利用した代謝予測の検証

(2) 阻害スクリーニングへの応用

その結果、基質・非基質の判定を精度よく行えることが実証できた。また主要代謝物もほぼ予測できた。ただし、いくつかの医薬品では、主要な代謝部位の予測は可能であったが、過度な代謝部位の予測、または予測代謝部位の不足が認められたため、今後はレトロスペクティブな手法により、予測作業の検証を行うとともに、予測システムのルールの修正を行いたいと考えている。他方、CYP2E1 代謝予測システムを利用して、阻害スクリーニングへの応用を試みた結果、非基質性の CYP2E1 阻害物質として 3 化合物の同定に成功した。

・CYP3A4 テンプレートの作成

ヒト CYP3A4 の 2 次元基質 template の構築のための基礎検討を実施した。昨年度の検討結果を踏まえ、立体選択的な代謝反応を受けるステロイド類を用い、直交する 2 平面でそれぞれ 2 次元基質 template を作成した。さらに、代謝部位が平面構造上にある化合物を用いて template を拡充した後にフレキシブルかつ分子量の大きな化合物を用いて、ヒト CYP3A4 基質 template を作成した。全世界における成分別売上高が 50 位以内の医薬品から低分子医薬品を抽出し、本 template の代謝予測性能を評価した。その結果、昨年度作成した template と比較して化合物の当てはめのしやすさ、予測精度は向上した。しかしながら今回作成した template のみを用いた分子形状的な予測の精度は不十分であり、化合物の脂溶性等の考慮が必要であることが示唆された。今後、①template 上の格子スコアの最適化、②より網羅的な予測化合物当てはめ方法の探索、③反応部位に配向した化合物の部分構造の反応性考慮、を検討することで、本法の有用性を検証する予定である。

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

今回、肝細胞への取り込み定常状態の C/M ratio に基づく $K_{p,uu}$ の推定法を提案した。本方法における $f_{T, cell assay}$ は温度依存性や rifampicin 添加時の影響が認められず、平衡透析法の測定結果と概ね同じであったことから、我々の方法論の妥当性を支持するものと推察された。一方、既報の薬物速度論パラメータに基づく方法では $f_{T,v0}$ が 1 以上となる薬物も見受けられた。評価化合物が OATP1B1/1B3 基質以外の場合には、肝取り込み阻害剤の十分な阻害濃度を設定する必要があることを踏まえ、能動輸送を止める手段として氷冷下が簡便且つ合理的な方法であると考えられた。

・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

カチオン性薬物の肝取り込み機構の解明に向けて、トリプタン系薬物と β ブロッカーについてラット及びヒト肝細胞を用いて検討を進めたところ、ヒトにおいては、トリプタン系薬物は、主に TEA 感受性の OCT1 によって肝取り込みされている可能性が高いと考えられた。一方で、 β ブロッカーについては、TEA 感受性の取り込み機構の寄与は小さく、quinidine 感受性、もしくは非感受性の輸送機構の存在が示唆されるデータを得た。今後、その分子論的な同定が期待される。

・肝 OATP を介した薬物間相互作用の PBPK モデルを用いた予測

OATPs 基質薬物に関する薬物相互作用のリスク評価のために有用な、PBPK モデルによる定量的な薬物動態の予測法を提案するために、in vitro 試験の結果をモデルに反映させるための一策として、sandwich 培養肝細胞の適用が可能であることが示されつつある。代謝については、sandwich 培養系では、代謝能力が低下する可能性が示唆されており、今後、ミクロソームを用いた代謝クリアランスを導入する必要があることが考えられた。このような検討を経て、最終的には、複数の in vitro 実験の結果をもって、統一的な方法により、OATPs 基質薬物の体内動態を正確に記述可能な PBPK モデル構築のための一般論が確立することが期待される。

・基質依存的な OATP1B1 阻害作用の検討

肝取り込みトランスポーター OATP1B1 は数多くの薬物を基質とすることが報告されており、臨床での薬物間相互作用の定量的予測という観点では、昨年度報告した典型的基質 Estradiol-17 β -D-glucuronide (E_2G) よりも実際に臨床で使用されている基質薬物を in vitro 阻害試験のプローブ基質として使用することが望ましい。しかしながら、基質薬物についても使用する基質に依存して OATP1B1 に対する in vitro 阻害活性が大きく異なる可能性は否定できず、ある基質で得られた結果を他の基質薬物に適用した場合に薬物間相互作用リスクの過小評価を引き起こす可能性がある。そこで、OATP1B1 に対する Cyclosporin A, Rifampin,

Gemfibrozil の in vitro 阻害活性を 12 種類の基質薬物を用いて評価した。その結果、基質間で顕著な阻害活性の差は認められず、 E_2G と同等の阻害活性・薬物間相互作用予測性が得られた。一方で E_1S および BSP を基質とした場合には、他の基質に比べ R 値を低く見積もる傾向があり、薬物間相互作用リスクを過小評価する可能性が示唆された。In vitro OATP1B1 阻害試験において、臨床で使用される OATP1B1 基質薬物、あるいはその代替となる E_2G を基質として選択することが推奨される。

・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

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。基質の輸送能、阻害剤の阻害能ともに、HSA 濃度依存的な減弱が認められた。また、別試験より求められた非結合型分率、阻害剤の実測濃度を用いた検討から、両者ともにフリー仮説に従う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

CYP 活性発現とその維持に対して、灌流培養の効果は認められなかった。第 2 相については、Celsis について静置培養に比べて高発現し、1 週間の維持を認めた。今回の検討では灌流そのものの効果は見出されていないが、上述の通りチップへの細胞導入にやや問題があり、また、今回の検討でも共培養の効果が見出されている。従って、今後は細胞導入法を改善したチップにおいて、1) スフェロイド形成、2) フィーダー細胞との共培養、3) 微小血管形成を目的とした間葉系幹細胞との共培養、について検討する必要がある。さらに、薬物収着/吸着を抑えたチップ材料の探索も必要である。

・共培養系

今回測定した 3 種の mRNA の遺伝子発現はトログリタゾン処理で誘導され、誘導倍率は 50 μM では 3 種の mRNA 共に 10 倍を超えていた。TPA 分化をさせていない HL-60 細胞の共存によりさらに発現亢進し、誘導倍率は 100 倍程度にまで達した。しかし、TPA 分化 HL-60 細胞が共存すると、発現亢進は非共培養時と同等かそれ以下であった。これまで HuH-7 細胞に対する毒性や HL-60 細胞の接着性を指標にしていたが、mRNA の発現レベルの変動はヒトの血中濃度に近づけた条件の 1 μM でも明瞭であり、鋭敏な毒性指標であった。HuH-7 単独では Hsp70 (HspA6) の遺伝子発現は 4 倍程度に上昇したが、共培養系では、ほとんど発現亢進が認められなかった。トログリタゾン 1 μM は臨床血中濃度範囲内であり、熱ショックタンパクであるとともに分子シャペロンである Hsp70 (HspA6) はトログリタゾンに

よる肝細胞のストレス応答に適正に応答するタンパクであると考えられ、HL-60 細胞の共培養は肝細胞のトログリタゾンストレス応答を抑制することが示唆された。今年度の研究結果から、分化 HL-60 との共培養系を用いて観察したトログリタゾン細胞毒性は、トログリタゾンの濃度により結果が大きく異なることが判明した。

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

本年度は CYP1A2 代謝予測システムを確立し、医薬品代謝への応用を検討した。他方、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、非基質性の CYP2E1 阻害物質として 3 化合物の同定に成功した。さらに、精度の高いヒト CYP3A4 の反応 template の構築を試み、昨年度作成モデルよりもコンパクトで大きな分子にも対応可能な CYP3A4 の基質 template を作成することができた。汎用される市販医薬品での template 検証結果から、物性値を考慮に入れることで予測精度が改善することが示唆された。

2. 肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測

肝細胞への取り込み定常状態の C/M ratio に基づく $K_{p,uu}$ の推定法を提案した。本方法における $f_{T, cell assay}$ は温度依存性や rifampicin 添加時の影響が認められず、平衡透析法の測定結果と概ね同じであったことから、我々の方法論の妥当性を支持するものと推察された。能動輸送を止める手段として氷冷下が簡便且つ合理的な方法であると考えられた。

カチオン性薬物の肝取り込み機構に関して、ヒトにおいては、トリプタン系薬物が TEA 感受性の OCT1 によると思われる取り込みが観察された一方、 β ブロッカーのように未知の輸送系が示唆される事例を発見した。

サンドイッチ培養肝細胞のデータを用いることで、in vitro 試験の結果に基づく PBPK モデルパラメータの設定が可能であるかについて検証し、サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた実験で得られたパラメータが PBPK モデルに適用可能と考えられる結果を得た。

OATP1B1 に対する 12 種類の基質薬物の阻害活性を評価したところ、典型的基質 Estradiol-17 β -D-glucuronide (E_2G) と同等の阻害活性・薬物間相互作用予測性が得られた。In vitro OATP1B1 阻害試験において、臨床で使用される OATP1B1 基質薬物、あるいはその代替となる E_2G を基質として選択することが推奨される。

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 にて検討を行った結果、薬物輸送能・阻害能ともに、蛋白結合の影響を受け、フリー仮説に従うことが確認された。

3. 三次元培養系・共培養系の開発

2 種類の hepatocyte をチップ内で灌流培養し、薬物代謝酵素活性を評価した。第 2 相酵素の抱合酵素群については灌流により 1 週間程度の機能維持が認められたものの、第 1 相酵素のチトクローム P450 アイソフォーム群については灌流の効果は得られなかった。また、HUVEC を混合共培養した系では、第 1 相も機能を発現し、1 週間の機能維持が確認された。

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マクロファージ系の細胞を共培養する系の構築を検討した。トログリタゾンを肝障害のモデル薬物として暴露したところ、ヒト肝癌由来細胞とマクロファージ系の細胞との共培養ではトログリタゾン細胞毒性は、トログリタゾンの濃度により結果が大きく異なることが判明し、臨床血中濃度範囲内では薬物毒性の防御的応答を減弱させることが示唆された。

4. 社会発信

以上の研究の成果は政策創薬におけるヒューマンサイエンス総合研究(官民共同研究)研究成果発表会、ならびに、日本動物実験代替法学会第 26 回大会にて成果発表シンポジウムとして報告された。

発表論文は「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン(案)」の参考文献に採択されている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Izumi S, Nozaki Y, Komori T, Maeda K, Takenaka O, Kusano K, Yoshimura T, Kusuha H, Sugiyama Y, Substrate-Dependent Inhibition of Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1: Comparative Analysis with Prototypical Probe Substrates, Estradiol-17 β -Glucuronide, Estrone-3-Sulfate, and Sulfo-bromophthalein. Drug Metab Dispos. 41, 1859-66 (2013)

2. 学会発表

山添康、伊藤和実、吉成浩一、CYP による薬物代謝の in silico 予測、日本動物実験代替法学会第 26 回大会、2013 年 12 月 20 日(京都)

Tomohisa Nakada, Kei Ogawa, Noriko Hisanaga, Kazuya Maeda and Yuichi Sugiyama, QUANTITATIVE EVALUATION OF UNBOUND INTRACELLULAR CONCENTRATIONS OF ANIONIC DRUGS HEPATOCYTES, 10th ISSX (2013, Oct., Toronto)