

・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、CYP2E1 による Chrorzoxazone 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

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。そこで、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 で代謝されないと考えら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

メディアウム濃度比 (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 $K_{p,uu}$ 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

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。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 μ M 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

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。

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} 、 $CL_{int,bile}$ 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 $CL_{int,met}$ 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 発現細胞を用い、OATP1B1 の典型的基質である $[^3H]E_2G$ 、 $[^3H]E_1S$ 、および $[^3H]BSP$ の取り込みに対する阻害剤 E_1S , CsA, BSP, Ritonavir, Rif, Tacrolimus, Erythromycin, E_2G , Ketoconazole, Taurocholate, Verapamil, Gemfibrozil, Probenecid, および Cimetidine の阻害活性を評価、比較した。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、 $[^3H]E_2G$ 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。

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 μ mol/L (6.9 倍)、0.358~1.23 μ mol/L (3.4 倍) および 9.65~252 μ 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 μ mol/L) と Nateglinide を基質としたときに得られた Gem の K_i 値 (252 μ 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、E₁S を基質とした時に得られた K_i 値 (CsA, 0.700 μmol/L; Rif, 6.65 μmol/L; Gem, 364 μmol/L) および BSP を基質とした時の K_i 値 (CsA, 0.680 μmol/L; Rif, 2.70 μmol/L; Gem, 169 μmol/L) は、OATP1B1 基質薬物あるいは E₂G 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、E₂G を基質とした場合とほぼ同程度であった。一方で E₁S 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

灌流培養チップはソフトリソグラフィー法で作製し、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。

そこで、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。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、CYP2E1 阻害物質として6化合物を同定した。そのうち、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 $f_{T,vo}$ 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、clarithromycin、erythromycin、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。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。トリプタン系薬物は、ヒトにおいては、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

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。そこで、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

薬物トランスポーター 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 [³H]Estradiol-17β-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。

肝取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 (E₂G) 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、E₂G 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 E₁S 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 E₂G 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 μ M 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 μ M 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 μ M 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、インシリコ代謝予测试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。

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、予測は困難であった。そこで、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 [³H]Estradiol-17β-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。また、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-17β-D-glucuronide (E₂G) 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、臨床で使用する OATP1B1 基質薬物、あるいはその代替となる E₂G 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、日本薬学会第 133 年年会、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

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

2. 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, 9, 3434-41 (2012)

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

2. 学会発表

総発表件数 26 件

Development of in vitro toxicity tests using hepatocyte differentiated from human stem cells, Seiichi Ishida, HESI Workshop: “Genetic Toxicology : Opportunities to Integrate New Approaches” (2012, 4, Silver Spring, MD, USA)

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, 3, 横浜)

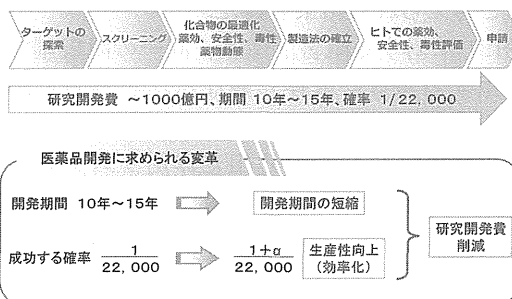
ヒト肝細胞の長期間三次元培養およびヒトチトクローム P450 アイソフォームが共発現された新しい細胞システムの創薬研究への活用、山田泰弘、日本薬学会第 133 年会、(2013, 3, 横浜)

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)

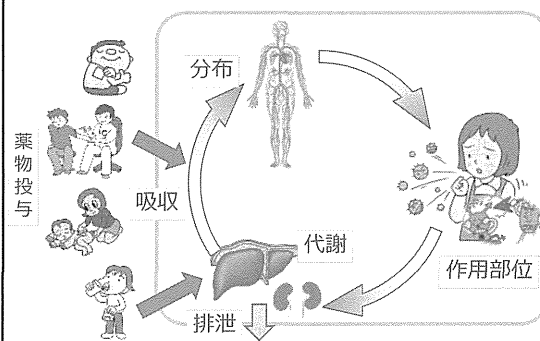
OATP1B1 を介した薬物間相互作用リスクの適正評価を指向した in vitro 試験に用いるプローブ基質の検討、野崎芳胤、和泉沙希、小森高文、前田和哉、楠原洋之、杉山雄一、日本動物実験代替法学会第 26 回大会 (2013, 12, 京都)

G. 知的財産権の出願・登録状況

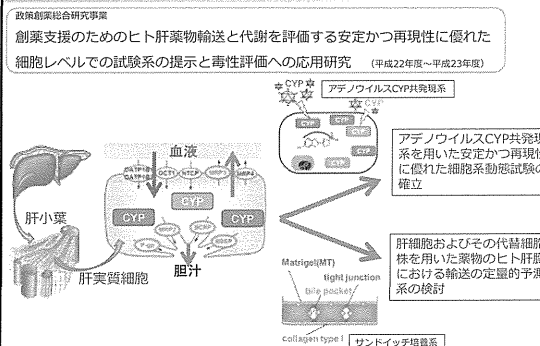
該当事項なし



ターゲットの 探索	スクリーニング	化合物の最適化 薬効、安全性、毒性 薬物動態	製造法の確立	ヒトでの薬効、 安全性、毒性評価	申請
試験（調査）		試験内容			
物理化学的性状等試験		品質の保証			
非臨床試験	毒性試験	急性・慢性毒性、発がん性			
	薬効薬理試験	作用機序、用法・容量の基礎的検討			
	一般薬理試験	安全性・薬理学的検討			
	薬物動態試験	体内動態の検討			
臨床試験	第Ⅰ相試験	少数の健康成人での安全性の確認			
	第Ⅱ相試験	選択された患者での有効性・安全性・用法・用量の確認			
	第Ⅲ相試験	対象患者を広げ、有効性・安全性を対象薬と比較、 有用性を調べる			
		開発段階では不明の臨床効果・副作用の調査			
市販後調査	市販後臨床試験	開発段階の臨床試験の不足を補う臨床試験			



ヒト肝モデル	肝との 類似性	アクセス / 再現性
 ≡ 初代培養細胞 { 非凍結 凍結		
 肝ミクロソーム		
 肝癌由来不死化細胞 (≡ HepG2 etc.)		



研究の目的と実施体制

(平成24年度～平成25年度)

創薬プロセスの早い段階から、新規化合物の動態を輸送と代謝 両面から予測・評価し、薬物動態特性が最適化された医薬品の創製を可能とする系の確立を目指す。

○ 二次元基質テンプレートを用いたヒトチトクロームP450(CYP)による代謝生成物予測モデルの検証

○ 肝細胞およびその代替細胞株を用いた薬物輸送の定量的予測評価系の確立

CYP班

東北大学 (山添 康)

岩手医科大学 (小澤正吾)

産総研 (金森敏幸)

積水メディカル

田辺三菱

第一三共

国立衛研

トランスポーター班

東京大学 (前田和哉)

理研 (杉山雄一)

アステラス

エーザイ

田辺三菱

日本ベーリンガー

インゲルハイム

国立衛研

研究の総括: 国立衛研 薬理部

研究の概要

CYPによる基質代謝部位のin silico予測モデルの検証

肝細胞を用いたヒト肝臓における輸送の定量的予測

・テンプレートとして酵素活性部位を表現し、代謝部位を予測する

・候補薬物の修飾、改変に利用

・薬物の細胞内濃縮率のin vitro実験による見込みの検証と検証

・トランスポーターを介した薬物間相互作用の生理学的速度論モデルに基づいた解析

・トランスポーターを介した薬物間相互作用の適正評価に向けた取り組み

in vitro実験系の確立

肝スフェロイド連続培養チップ

肝細胞共培養系

代替モデル細胞

ヘパトサイト

非実質細胞

具体的な取り組みのご紹介

基質・代謝物構造に基づいたインシリコ代謝予測システムの開発

✓ CYPの酵素学的特徴: 低い基質特異性

⇒ 1つの分子種について、多種多様な基質構造、代謝物構造 (代謝反応部位) の情報が得られる。

✓ CYPの医薬品代謝における高い寄与度

✓ ヒト由来試料 (組換え酵素、ミクロソーム) の利用の容易さ

✓ LC-MS/MSなどの分析技術の進歩

⇒ ヒトCYP分子種について非常に多くの代謝試験が実施され、代謝物の詳細な情報が公開されている (多くの基質で代謝反応部位が同定されている)

基質と代謝物の構造情報を基盤とした、構造活性相関解析やファーマコフォア解析に類似した手法により、ヒトCYP分子種の代謝を予測できるのではないかと

CYP1A2代謝予測テンプレートの導出

化学構造の重ね合わせ

✓ 第一基準: 代謝部位 (黒) の重なり

✓ 第二基準: 構造全体 (赤) の重なり

基本テンプレートの導出

集約

ヘムの近接方向を仮定

コア構造

代謝部位

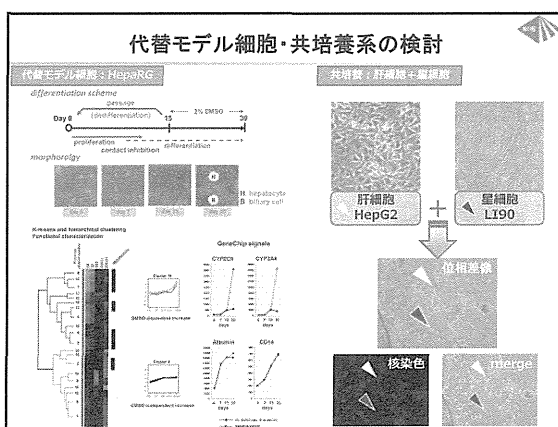
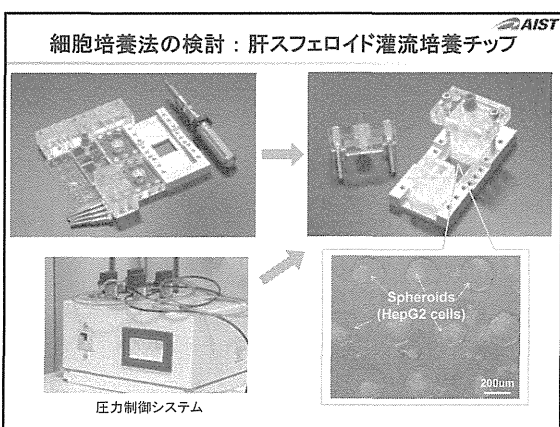
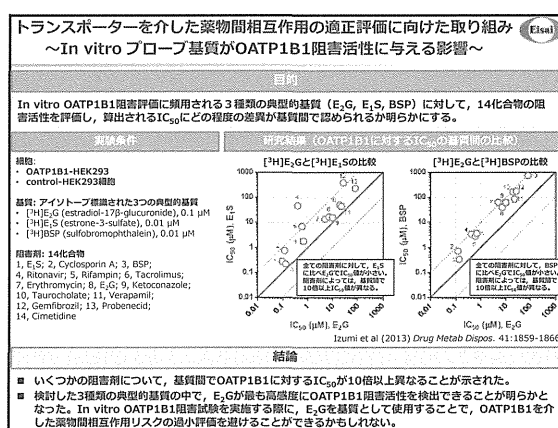
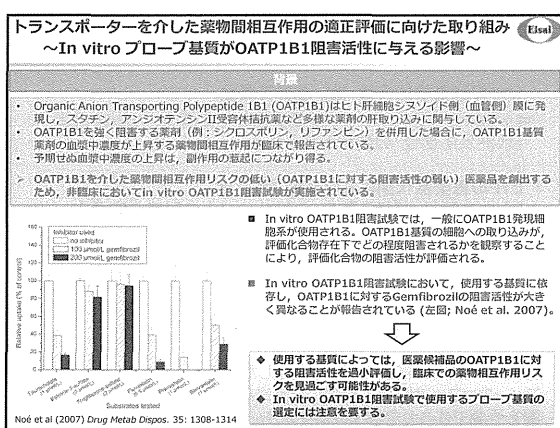
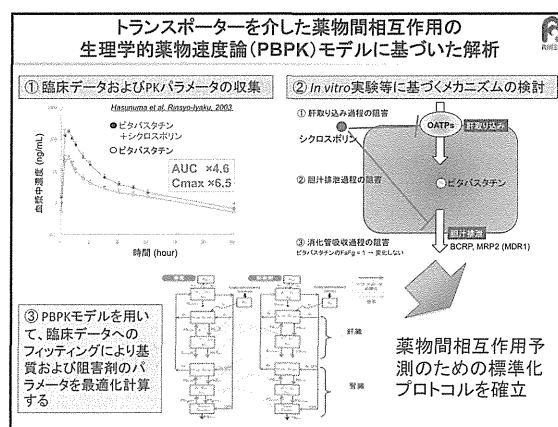
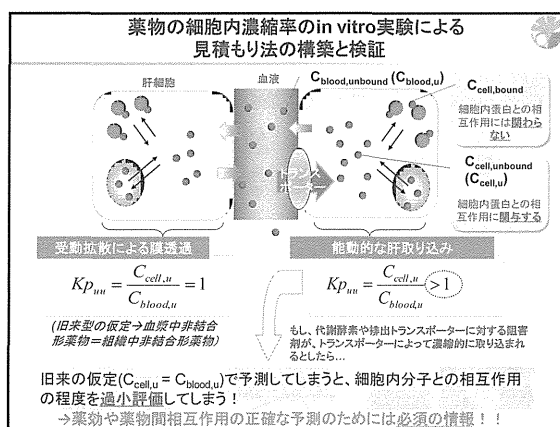
拡張CYP1A2テンプレートを利用した代謝予測の検証

		予測結果	
		基質	非基質
報告 (実測) (299反応)	基質 (233反応)	232	6 [#]
	非基質 (60反応)	1 [*]	54
一致率		99.6%	90.0%

^{*}Norclomipramine 8-hydroxylation.

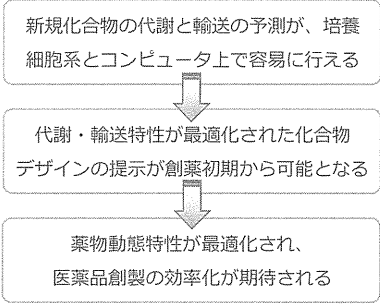
[#]Aminoflavone 3-oxidation, dibenz[a,j]acridine 1,2-oxidation/N-oxidation, pimozide N-dealkylation, rutacarpine 11-oxidation/12-oxidation: CYP1A2による代謝は非常にマイナーな反応として報告されている。

- 143 -

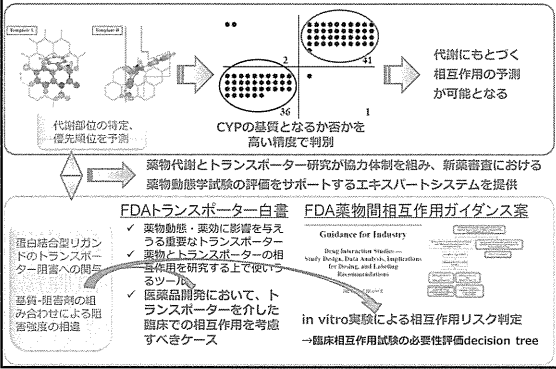


期待される成果

本研究の推進により……



行政への貢献



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

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 ヒト組織移植に最適な Super-SCID マウスを用い、平成 24～25 年度にヒト患者由来がん組織等疾患組織 230 例および正常組織 54 例の移植を行い、80 症例の臨床がん組織の再生可能な形での凍結保存に成功した。移植腫瘍が自然遠隔転移することをマイクロサテライトを用いて確認すると共に、微生物モニタリングも実施し安全性を確認した。これら患者由来の疾患組織 PDX に対して、臨床所見、病理所見に加えて、遺伝子変異・発現の変化をプロファイルし、新薬開発における有用性を産学官で検証した。創薬ニーズに合致した有効性、安全性評価システムの基盤を構築することにより、国民の保健・医療・福祉の向上に役立てる。

研究組織

- (1) 医薬基盤研究所難病・資源研究部
野村大成、梁 治子、小原有弘、吉留克英
- (2) 医薬基盤研究所創薬基盤研究部 竹森 洋
- (3) 大阪大学医学系研究科（平成25年3月まで）
医薬基盤研究所難病・資源研究部（平成25年4月以降） 立花 功
- (4) 大阪大学医学系研究科 野々村祝夫、
奥村明之進
- (5) 大阪大学医学系研究科（平成24年8月まで）
新潟大学医学系研究科（平成24年9月以降）
榎本隆之
- (6) 第一三共株式会社 癌研究所 市川公久（平成25年3月まで）、鎌井泰樹（平成25年4月以降）
- (7) 株式会社桃谷順天館 山原 年
- (8) 武田薬品工業株式会社医薬研究本部
改正善彦（平成25年10月まで）、
山岡万寿夫（平成25年11月以降）

A. 研究目的

SCID (Severe Combined Immunodeficient) マウスを改良することにより、①これまでヌードマウス等では生着の報告がない悪性腫瘍も急激に増殖し、②自然遠隔転移すること (J Rad Res, 1990, Jpn J Cancer Res, 1991, 93)、③ヒト良性腫瘍もゆっくり増殖すること (Carcinogenesis, 1992, Cancer Lett, 1998, 2002、他)、④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, 他；以後 Super-SCID と呼ばれる)。更に、500 回にわたり腫瘍等ヒト疾患組織の継代維持を行い、移植後の病理組織像や生理機能等が良く維持され、ヒト胎児組織も分化増殖した。太陽紫外線類似光によるヒト皮膚がんの誘発にも世界で初めて成功した (Cancer Res, 1997)。また、1990 年にプログラム凍結したヒトがん組織が 20 年後に再生し、形態、機能の変化も殆どないことを証明した。

従来より非臨床試験に用いられてきた培養がん細胞株を移植した動物モデルは、臨床腫瘍の特徴を反映し難いため、モデルでは有効性を示したにも拘わらず臨床試験では有効性を示さず、新薬開発の高失敗率・非効率の原因と言われており、新薬開発上、大きなデメリットになっている。ヒトへの外挿性が高い非臨床薬効評価系として、日本人患者由来のがん組織-Super-SCID-PDX (Patient-Derived Xenograft) モデル確立に対する強い要望（ニーズ）が製薬企業等からあり、2009年に医薬基盤研究所にコンソーシアムを設け、厚労科研費等にて研究を再開し、新たなヒト腫瘍等疾患組織移植・保存に努め、総括的ヒト組織維持システム構築を目指している。

本研究は、24 年度より創薬基盤推進研究事業として実施するものであり、Super-SCID マウスを用い、ヒト患者由来がん組織等疾患および正常組織の長期継代維持と再生可能な形での凍結保

存と新たな難移植組織の継代維持・保存を行い、創薬ニーズに合致した有効性、安全性評価のためのヒト組織維持システムを世界に先駆けて産学官共同で構築することにより創薬に役立て、国民の保健・医療・福祉の向上に貢献するのを目的とする。

B. 研究方法

創薬ニーズに基づく PDX 確立をめざし、以下の計画で、企業等と産学官共同研究を行った。

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製・増産：C.B17-*scid*, C57BL/6J-*scid*, C3H/HeJ-*scid*; *LPS* マウスに加え、*bg^l*, *β²* 遺伝子を導入した SCID マウスを作製する。また、薬剤により代謝活性化出来ないマウス系統があるので、それぞれのヒト組織、試験医薬品に適した SCID マウスを用意し、目的にあったものを増産する(野村、研究協力者：足立、小浦)。25 年度より新たに *op* 遺伝子の導入を行い、マクロファージ機能欠損 SCID マウスを開発する。
2. 原発腫瘍、転移組織の新規移植；ヒト臨床腫瘍のうち、腎腫瘍他泌尿生殖器腫瘍等の移植継代維持を行う。複数の前立腺がんの継代維持と転移モデルの作製、子宮体部癌肉腫の発生機序解析、新たに成功した GIST の継代維持、マーカー遺伝子の検索を行う。また、非手術的臨床がん組織保存法として、CTC、胸水等からの樹立を試みる(野村、野々村、吉留、榎本、立花、奥村、改正-山岡、市川-鎌井、研究協力者；辻村、坂巻、鳥、松宮、遠城)。
3. 前立腺がんは血行転移する。
CTC(Circulating Tumor Cell)からの作製を含め重点的に実施する(野村、野々村、吉留、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、梁、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の解析を行う。また、摘出ヒト組織の運搬時の保存法の開発も行う(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異・発現の変化の調査；移植継代維持、再生可能なプログラム凍結保存されたヒト腫瘍等疾患組織について、臓器・組織別、臨床・病理分類にそって、臨床所見、病理病態所見、遺伝子変異・

発現の変化等を加え、臨床がん組織のプロファイルを作製する。これにより、生きたヒト腫瘍等疾患組織を用いた医薬品等の有効性、安全性評価システムを構築する(野村、吉留、榎本、野々村、奥村、立花、改正-山岡、市川-鎌井、研究協力者；坂巻、鳥、遠城)。

7. がん等ヒト臨床組織 PDX モデル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-鎌井、改正-山岡、吉留、立花、奥村)。

8. まとめ(野村)。

(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、医療機関、医薬基盤研究所の倫理委員会の承認を受け、厳重な管理の下、移植・継代維持をおこなっている。匿名化の上、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、大学および企業研究所等との所外共同研究についても、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、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

1. ヒト臓器・組織長期維持用 SCID マウス C3H/HeJ-*scid*; *LPS* を用い、2 年間で臨床がん組織 230 症例、正常、疾患組織 54 例の移植を行った。これまでヌード、SCID マウスに生着・増殖しなかった腫瘍(前立腺がん等)、GIST の継代維持・保存にも成功した。*bg^l*, *β²* 遺伝子を導入し、ヒト組織、試験医薬品に適した近交系コンジュニック SCID マウス作製し、量産した。更に、マクロファージ機能をなくする為、*op* 遺伝子の導入を IVF により試みている。
2. ヒト臨床腫瘍のうち、移植困難な前立腺がん、GIST に加え、抗がん剤の効果に乏しい腎腫瘍

他泌尿生殖器腫瘍他 230 症例の移植を行い、腎がん・膀胱がん等 13 症例を含む 80 症例の PDX モデルを作製した。また、20 年近く前にプログラム凍結保存したヒト頭頸部、生殖器、消化器腫瘍等の SCID マウスへの再移植・再生に成功し、ヒト疾患組織、正常組織の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た。また、体液中のがん幹細胞の探索を試みた。一例として、胸水沈渣からがん細胞が殆ど検出されない胸水を注入し、典型的な腺がん構造を持つ腫瘍が形成された。また、卵巣がんにおいても、幹細胞性を持つ細胞集団を確認した。

3. 移植維持が困難とされたヒト前立腺がん、GIST（倍化時間が平均 1 年）等の継代維持、再生可能な形で凍結保存に成功した。前立腺がんは、移植後日数、腫瘍サイズに比例して、マウス血中の PSA 値が上昇した。また、ホルモン感受性前立腺がんに加えて、新たなホルモン非感受性、抵抗性前立腺がんの維持に成功した。遺伝子変異も検出した。GIST も制がん剤高感受性、抵抗性 6 症例の維持・保存に成功した。新たな前臨床試験系として我が国専有のモデルとなる。
4. 継代維持、保存のできた全てのヒト腫瘍の微生物モニタリングを行った。EB ウィルスが約 90%に検出されたが、他のウィルスは検出されなかった。
5. ヒト正常成人・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。特に、成人皮下、腹腔内、胎児由来脂肪組織とのマイクロアレイを用いた比較では、遺伝子発現に大きな差（褐色脂肪）があり、代謝疾患解析に役立つ可能性を示した。ヒト皮膚組織でなければ増殖しないウィルス（例；ヘルペスー皮膚）の増殖にも成功した。また、摘出後の臓器のより安定した維持、輸送技術を開発した。
6. ヒト疾患組織の臨床経過、病理所見に加え、本研究で構築されたヒト臨床腫瘍担癌マウスについて、モデルの特性や分子情報の解析により、これらモデルが臨床腫瘍の特徴を有し、抗癌剤の非臨床評価系として有用であることが示唆された。
7. 本研究で構築されたヒト臨床腫瘍担癌マウスは順調に生着・継代でき、当該モデルを抗癌剤の薬効評価系として活用できることがわかった。

D. 考察

本研究は、ヒト組織長期維持・保存・データベース化により医薬品等の有効性、安全性評価システムを構築し、創薬研究基盤技術の確立を

目指している。24～25年度だけでも80症例の患者由来の臨床がん移植PDXモデルを作製し、臨床所見、病理所見に加え、小数例ながら遺伝子変異、発現の変化を調査できた。また前立腺肥大組織も加えて民間企業との共同研究を行い、PDXの有用性も検証することが出来た。PDXは臨床がんの特性をよく示すものである一方、がんは heterogeneity が強く各組織腫瘍当たり10種以上の合計200種以上のPDXを作製する必要がある。今後、更なる基盤の充実が必要である。これにより、生きたヒト組織での医薬品等の有効性・安全性評価を推進し、創薬の最前線において世界をリードできるものと考ええる。

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を構築するため平成 24～25 年度で新たに、臨床がん組織 230 例、正常組織 54 例の移植を行った。2 年間で、80 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た。移植ヒトがん組織は、SCID マウス体内で自然遠隔転移することもマイクロサテライト法で確認でき、臨床がんの転移モデルとしても優れていることを証明できた。また、移植ヒトがん組織の微生物モニタリングにより EB ウィルス以外の感染がなく安心して使用できることを証明した。前立腺がん、肺がん、膵がん等、まだ限られた症例であるが、臨床所見、病理所見に加え、遺伝子変異・発現の変化を調査した。患者由来の臨床腫瘍 PDX は、臨床がんの特性をよく反映しており、創薬研究に有用であることが示された。前立腺肥大組織の長期保存と薬効試験にも成功し、臓器移植の重大な問題である摘出ヒト正常組織の保存法の開発も行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masao Iwamori, Yuriko Iwamori, Satoshi Matsumoto, Shigeki Adachi and Taisei Nomura. Enhanced expression of fucosyl GA1 in the digestive tract of immune-deficient scid, nude and pIgR(-/-) mice. J. Biochem. 154(6):541- 549, 2013.
- 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) 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, 8(1):e54122. 2013.
 - 4) 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, 132: 2510-2519, 2013.
 - 5) Capes-Davis A, Alston-Roberts C, Kerrigan L, Reid YA, Barrett T, Burnett EC, Cooper JR, Freshney RI, Healy L, Kohara A, Korch C, Masters JR, Nakamura Y, Nims RW, Storts DR, Dirks WG, MacLeod RA, Drexler HG. Beware imposters: MA-1, a novel MALT lymphoma cell line, is misidentified and corresponds to Pfeiffer, a diffuse large B-cell lymphoma cell line. Genes Chromosomes Cancer. 52(10): 986-8, 2013.
 - 6) 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.
 - 7) Tamaki Y, Sato N, Homma K, Takabatake D, Nishimura R, Tsujimoto M, Yoshidome K, Tsuda H, Kinoshita T, Kato H, Taniyama K, Kamio T, Nakamura S, Akiyama F, Noguchi S Routine clinical use of the one-step nucleic acid amplification assay for detection of sentinel lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter study in Japan; Japanese One-Step Nucleic Acid Amplification Study Group. Cancer, 15;118(14):3477-83, 2012.
 - 8) Horibe I, Satoh Y, Shiota Y, Kumagai A, Horike N, Takemori H, Uesato S, Sugie S, Obata K, Kawahara H, Nagaoka Y. Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells. J Nat Med. 67: 705-10, 2013.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) Yingji Jin, Isao Tachibana, Yoshito Takeda, Ping He, Sujin Kang, Mayumi Suzuki, Hanako Kuhara, Satoshi Tetsumoto, Kazuyuki Tsujino, Toshiyuki Minami, Takeo Iwasaki, Kaori Nakanishi, Satoshi Kohmo, Haruhiko Hirata, Ryo Takahashi, Koji Inoue, Izumi Nagatomo, Hiroshi Kida, Takashi, Kijima, Mari Ito, Hideyuki Saya, Atsushi Kumanogoh. Statins decrease lung inflammation in mice by upregulating tetraspanin CD9 in macrophages. PLoS One. 8(9): e73706, 2013.
 - 12) Nakai Y, Nonomura N. Inflammation and prostate carcinogenesis. Int J Urol. 20(2):150-60, 2013.
 - 13) Nishimura K, Nonomura N, Hashine K, Kanayama HO, Ozono S, Miura T, Miki T, Kakehi Y, Arai Y, Ogawa O, Fujita R, Nonomura K, Mizokami A, Hoshi S, Akaza H. 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. 18(2): 306-313, 2013.
 - 14) Hatano K, Nishimura K, Nakai Y, Yoshida T, Sato M, Kawashima A, Mukai M, Nagahara A, Uemura M, Oka D, Nakayama M, Takayama H, Shimizu K, Meguro N, Tanigawa T, Yamaguchi S, Tsujimura A, Nonomura N. Weekly low-dose docetaxel combined with estramustine and dexamethasone for Japanese patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. Int J Clin Oncol. 18(4): 704-710, 2013.

- 15) Kawase A, Yoshida J, Miyaoka E, Asamura H, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Okumura M, Yokoi K; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry., Visceral pleural invasion classification in non-small-cell lung cancer in the 7th edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer: validation analysis based on a large-scale nationwide database. J Thorac Oncol 8:606-611, 2013.
- 16) Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M, pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg 96:425-433, 2013.
- 17) Abulaiti A, Shintani Y, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Okumura M, Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF- β signaling by IL-6. Lung Cancer, 82:204-213, 2013.
- 18) Yoshino, K. Enomoto, T. Fujita, M. Ueda, Y. Kimura, T. Kobayashi, E. Tsutsui, T. Kimura, T., Salvage chemotherapy for recurrent or persistent clear cell carcinoma of the ovary: a single-institution experience for a series of 20 patients, Int J Clin Oncol, 18(1), 148-53, 2013.
- 19) Hisamatsu, T., Mabuchi, S., Yoshino, K., Fujita, M., Enomoto, T., Hamasaki, T., Kimura, T., Prediction of Progression-Free Survival and Response to Paclitaxel Plus Carboplatin in Patients With Recurrent or Advanced Cervical Cancer, Int J Gynecol Cancer, 22(4): 623-9, 2012.
- 20) Okazawa, M., Mabuchi, S., Isohashi, F., Suzuki, O., Ohta, Y., Fujita, M., Yoshino, K. Enomoto, T., Kamiura, S., Kimura, T., The prognostic significance of multiple pelvic node metastases in cervical cancer patients treated with radical hysterectomy plus adjuvant chemoradiotherapy. Int J Gynecol Cancer, 22, 490-497, 2012.
(論文総数 ; 英文 70、和文 6)

2. 学会発表

- 1) 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).

- 2) Nomura T. Opening lecture, Direct effects of radiation and chemicals on human tissue maintained in super-SCID mice. 11th Int. Conference on Environmental Mutagens. Page 45-46. Cataratas do Iguassu São Paulo, Brazil, Nov. 3-8, 2013.
- 3) Hiroshi Kiuchi, Akira Tsujimura, Testuya Soda, Kentaro Takezawa, Hidenobu Okuda, Shinichiro Fukuhara, Tetsuya Takao, Yasushi Miyagawa, Norio Nonomura, Sigeki Adachi, Taisei Nomura. Inhibitory effects of Tadalafil on prostate cell growth; a study using a novel human benign prostatic hyperplasia xenografts in super-SCID mice. International Continence Society Annual Meeting (Aug. 30, 2013).
(発表数、国際学会 11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願2012-249917 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、瀧野 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)。
- 2) 特願 2013-094995「カスパーゼ1活性化阻害剤、抗炎症剤、鎮痒剤、及びカスパーゼ1活性化阻害剤の評価方法」竹森 洋、佐野坂真人、伊東祐美、瀧野裕之、川原信夫 (独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館)
- 3) 特願 2013-135040「プテロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤」妻木範行、竹森 洋、瀧野裕之、川原信夫 (国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所)
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

心不全に対する再生医療と人工心臓による統合治療戦略

独立行政法人国立成育医療研究センター

梅澤 明弘

平成24年4月～平成26年3月

新生児の約 1%は何らかの心臓疾患を有している。これらの疾患の終末期には、薬剤・手術を含めた介入は十分な効果を示さない。本研究では再生医療を薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することが必要であると考え、特に胎盤(胚外中胚葉)及び骨髄に由来する $CD29^{high} CD34^{low} c-kit^{+} CD140a^{+}$ 細胞に注目し前臨床研究を推進した。

研究組織

(独)国立成育医療研究センター

京都府立医科大学

福井大学医学部

(地独)東京都健康長寿医療センター

株式会社カルディオ

ジェイ・エム・エス株式会社

株式会社カネカ

セルテスコメディカルエンジニアリング

株式会社

コアフロント株式会社

株式会社ミラキュア

株式会社 NRL ファーマ

ファーマバイオ株式会社

梅澤 明弘

五條 理志

宮本 薫

豊田 雅士

石田 智咲

阿藤 大志

鈴木 康二

田中 聖真

櫻井 裕士

前田 博巳

藤沢 章

西岡 秀展

松崎 正晴

加賀谷 伸治

増田 憲二郎

ーション

心筋分化能を促進する因子について遺伝子発現解析によるバリデーションを実施した。その結果から得られた情報をもとに、臨床研究に対応する組換え体蛋白質（キメラ蛋白質）を作用させ、 $CD29^{high} CD34^{low} c-kit^{+} CD140a^{+}$ 細胞の増殖能の検討を行い、寿命の延長、心筋分化誘導による細胞機能の評価を行った。

2. 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

精製した心筋誘導因子候補を一つ一つ心筋細胞に分化させ骨髄間葉系細胞の評価を行った。またそれらの細胞、心筋誘導因子の遺伝子導入を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行った。

3. $CD29^{high} CD34^{low} c-kit^{+} CD140a^{+}$ 細胞に有効なヒト血清分離技術の開発

ヒト血清分離システムを用いて $CD29^{high} CD34^{low} c-kit^{+} CD140a^{+}$ 細胞に最適な培養システムの構築を目指した。

4. 小動物による有効性・安全性の検討

免疫不全マウスにて心筋内への直接注入と大動脈基部への選択的経冠状動脈的投与に近い状態の2つを行い、その優劣を比較検討した。

5. 大動物による前臨床研究

大動物（ブタ、イヌ）における心不全モデルの安定的作製のための技術的改善を進め、細胞移植実験による効果判定のための心機能評価項目の選定を行った

6. 施設バリデーション項目の検討

心筋再生医療に用いる製造管理・品質管理・衛生管理に合致した SOP（標準作業手順書）の構築と品質管理基準の明確化を行った。

（倫理面への配慮）

国立成育医療研究センターにおいて、ヒト細胞に関し倫理審査委員会の承認を既に受けている。また、それぞれの施設については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に

A. 研究目的

新生児の約 1%は何らかの心臓疾患を有している。小児心臓外科の進歩により、適切な時期に適切な手術を行うことで、先天性心疾患を有する患児の予後は著しく向上した。しかし、術後心不全はある一定の確率で生じること、心筋症や慢性呼吸器疾患の合併症としての心不全は、心臓のポンプ失調が心筋の不可逆的な障害に至る場合が少なくない。これらの疾患の終末期には、薬剤・手術を含めた介入は十分な効果を示さない。世界的には小児用補助人工心臓（DeBakey および Berlin Heart）は 1992 年頃より実用化が始まっているものの、成人よりも更に限られた施設での使用がなされているのみであり、成人の重症心不全に関する治療戦略から考えると、小児における選択可能な治療法の少なさは著しい。本研究では再生医療を薬剤・人工臓器・細胞組織工学とともに集学的に投入することが必要であると考え、特に胎盤(胚外中胚葉)及び骨髄に由来する $CD29^{high} CD34^{low} c-kit^{+} CD140a^{+}$ 細胞に注目し前臨床研究を推進することにより、臨床研究に対する礎を築き上げることを目標に置くものである。

B. 研究方法

1. $CD29^{high} CD34^{low} c-kit^{+} CD140a^{+}$ 細胞のバリデ

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。

C. 研究結果

1. CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞のバリデーション

間葉系細胞を効率よく心筋細胞に分化させる因子を質量分析、糖鎖分析などにより網羅的に分析し、複数精製した。さらに、高い心筋分化効率を有する間葉系幹細胞株にのみ強発現している遺伝子を MicroArray 法により同定し、骨髄間葉系幹細胞から心筋細胞に分化しやすい細胞を選択する方法を確立した。さらに臨床応用にむけたキメラタンパク質の増殖等と与える活性を評価し、心筋分化特性を維持するための最適な条件を見いだした。

2. 心筋形成因子を用いた細胞治療戦略

同定した心筋誘導因子による分化誘導を行った骨髄間葉系細胞の傷害心筋への *in vivo* 移植実験を行った。分化誘導なしの骨髄間葉系細胞移植実験と比較してその効果を比較した。しかし組織への移植細胞の生着率の向上の課題改善が必要であることがわかり、イメージング技術による生着細胞の動態を明らかにすることを進めた。

3. CD29^{high} CD34^{low} c-kit⁺ CD140a⁺ 細胞に有効なヒト血清分離技術の開発

血清中の PDGF によって生じる MAPK/p16^{ink4a} を介した細胞周期ブレーキングシステムの解明とその対策についての検討を行った。増殖能低下につながるいくつかの候補因子を見だし、各因子を除外もしくは阻害因子を活性化するための血清分離を進め、一定の効果を見いだす方法を見いだした。

4. 小動物による有効性・安全性の検討

冠動脈結紮による心筋梗塞モデルでの急性期と慢性期の 2 つの相においての効果を検討した。安定的なモデル構築と心機能の評価系を確立した。また、ヒト骨髄細胞を免疫不全動物に移植し、長期間の経過観察の下、その造腫瘍性、生体内動態を経時的に観察することで安全性試験を行った。ここでは特に組織学的な評価を試みた。幹細胞移植における安全性や有効性は、入れた細胞の組織内動態を明らかにすることにある。投与手法の違いによる細胞の動態についてはおおむね心筋組織に収束する傾向を認めた。さらに周囲組織や他の組織での細胞動態について詳細な検討を進めた。

5. 大動物による前臨床研究

大動物（ブタ、イヌ）における細胞移植実験を行った。疾患設定は、小動物と同様に冠動脈結紮による心筋梗塞とし、急性期と慢性期の両方で細

胞移植の効果を判定した。ドナー細胞としては同種移植を前提としてブタ由来の骨髄および胎盤組織由来細胞を単離して実験に供した。ブタ由来の細胞がヒト間葉系細胞に相当するかを検証し、その上で動物への移植実験を実施した。大動物心筋梗塞モデルを安定的作製の技術を確立したとともに、機能評価項目の抽出を行った。その結果、移植した間葉系細胞の一定程度の生着が確認され、それが心筋へと分化していることが示された。さらに機能的に新機能を改善効果が認められた。

6. 施設バリデーション項目の検討

本研究プロジェクトにおいては、心筋再生医療に用いる製造管理・品質管理・衛生管理に合致した SOP（標準作業手順書）の構築と品質管理基準の明確化を行い、施設バリデーションは、世界のトップレベルの品質管理基準に焦点を合わせた。

D. 考察

再生医療の臨床研究は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 18 年 7 月 3 日厚生労働省）により枠組みが示されている。薬事法においては、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（平成 12 年 12 月 26 日付け医薬発第 1314 号厚生省医薬安全局長通知）をもとに検討され、2008 年に示された「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」ならびに「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」を遵守する必要がある。これらの指針・ガイドラインに対する見直しは、厚生労働省医政局研究開発振興課によるヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会が進められている。また、薬事法の下ではヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保のあり方に関する研究班において見直しが進められている。このように、臨床研究あるいは治験という枠組みが存在しているなかで、世界における治験の実施状況をみると、再生医療は広範な対象疾患へ適応されており、40 社近い企業により 100 件程度の治験が実施されている。技術が成熟しておらずビジネス上のリスクがある再生医療分野において、本研究は産業界の要素技術を活用することで、再生医療の一つのモデルを構築することになる。特に細胞移植の機能改善効果のメカニズム・投与細胞数・投与方法・ドナー細胞のマーキングプロトコルの開発、ホストのプレコンディショニングに関する基盤情報を獲得することは重要な課題であり、再生医療のドラッグデザインにおけるモデルケースとなる。

E. 結論

再生医療の臨床研究は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 18 年 7 月 3 日厚生労働省）により枠組みが示されている。薬事法においては、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」（平成 12 年 12 月 26 日付け医薬発第 1314 号厚生省医薬安全局長通知）をもとに検

討され、2008 年に示された「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」ならびに「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」を遵守する必要がある。これらの指針・ガイドラインに対する見直しは、厚生労働省医政局研究開発振興課によるヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会で進められており、研究代表者はその委員を務めている。また、薬事法の下ではヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保のあり方に関する研究班において見直しが進められている。このように、臨床研究あるいは治験という枠組みが存在しているなかで、本研究は再生医療の一つのモデルを構築することになる。

F. 研究発表

論文発表

1. Kaneko S, Bonasio R, Saldaña-Meyer R, Yoshida T, Son J, Nishino K, Umezawa A, Reinberg D. Interactions between JARID2 and Noncoding RNAs Regulate PRC2 Recruitment to Chromatin. *Mol Cell*. 53(2):290-300, 2014.
2. 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*. 126(Pt 23):5391-5399, 2013.
3. Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Burger H, Simpson ER, Umezawa A, Shihara D, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T. Genomic Basis of Aromatase Excess Syndrome: Recombination- and Replication-Mediated Rearrangements Leading to CYP19A1 Overexpression. *J Clin Endocrinol Metab*. 98(12):E2013-2021, 2013.
4. Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura K, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*. 45(6):407-413, 2013.
5. Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: A novel source for hepatocytes. *Liver Transpl*. doi: 10.1002/lt.23800 (in press, 2013).
6. Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N, Umezawa A, Yoshimura Y. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 11:108, 2013.
7. Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T, Fukami M. De novo Frameshift Mutation in Fibroblast Growth Factor 8 in a Male Patient with Gonadotropin Deficiency. *Horm Res Paediatr*. (in press, 2013).
8. Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A,

- Gojo S. Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine. *BMC Biotechnol*. 13(1):102, 2013.
9. Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsushashi Y, Amagai M. Mutations in SERPINB7, encoding a member of the serine protease inhibitor superfamily, cause Nagashima-type palmoplantar keratosis. *Am J Hum Genet*. 93(5):945-56, 2013.
10. Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, Goshima N, Umezawa A, Kiyono T. Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation. *Mol Cell Biol*. 33(22):4434-4447, 2013.
11. 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*. 4(1):2, 2013.
12. Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, Tadokoro M, Kami D, Komazaki S, Tokuhara M, Takada H, Ito Y, Kuno S, Yoshimura K, Umezawa A, Ohgushi H, Asashima M, Kurisaki A. N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 438(4):753-759, 2013.
13. Matsumura T, Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Ayabe T, Katsumata N, Fukami M, Inatani M, Akagi Y, Umezawa A, Ogata T, Miyamoto K. Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *FASEB J*. 27(8):3198-3208, 2013.
14. 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*. (in press, 2013).
15. 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*. 8(5):e63265, 2013.
16. Higuchi A, Ling QD, Chang Y, Hsu ST, Umezawa A. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chem Rev*. 113(5):3297-3328, 2013.
17. 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*. 14:32, 2013.
18. Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Matsumura T, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Shimada M, Kitano T, Umezawa A,

- Miyamoto K. Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 369(1-2):42-51, 2013.
19. 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.* 2(4):265-273, 2013.
 20. Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Androgen/Androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 369, 42-51, 2013.
 21. Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 370, 1-10, 2013
 22. Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K. : A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 154(4), 1648-1660, 2013. Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., Mizutani, T., Miyamoto, K., Sato, T., Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y.: Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 154(8), 2870-2880, 2013.
 23. Matsumura, T., Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., Miyamoto, K. : Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *The FASEB Journal* 27(8), 3198-3208, 2013.
 - 24.
 25. Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep.* 2:930, 2012.
 26. Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshida K, Harada Y, Takezawa Y, Kanai S, Ono C, Takahashi Y, Kimura K, Shida T, Miyado K, Umezawa A. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biol Open.* 1(7):640-747, 2012.
 27. Ju Y, Mizutani T, Imamichi Y, Yazawa T, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Umezawa A, Kangawa K, Miyamoto K. Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology.* 153(11):5522-5534, 2012.
 28. Nishijima Y, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Sugiyama T, Miyazawa M, Muramatsu T, Nakamura K, Narimatsu H, Umezawa A, Mikami M. Glycan profiling of endometrial cancers using lectin microarray. *Genes Cells.* 17(10):826-836, 2012.
 29. Lu H, Kawazoe N, Kitajima T, Myoken Y, Tomita M, Umezawa A, Chen G, Ito Y. Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity. *Biomaterials.* 33(26):6140-6146, 2012.
 30. Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, Sekiya I. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther.* 14(3):R136, 2012.
 31. Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Mochida J. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. *J Orthop Res.* 30(12):1915-1922, 2012.
 32. Seko Y, Azuma N, Kaneda M, Nakatani K, Miyagawa Y, Noshiro Y, Kurokawa R, Okano H, Umezawa A. Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of CRX, RX and NEUROD. *PLoS One.* 7(4):e35611, 2012.
 33. Furuya M, Okuda M, Usui H, Takenouchi T, Kami D, Nozawa A, Shozu M, Umezawa A, Takahashi T, Aoki I. Expression of angiotensin II receptor-like 1 in the placentas of pregnancy-induced hypertension. *Int J Gynecol Pathol.* 31(3):227-235, 2012.
 34. Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 3(2):8, 2012.
 35. Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A. Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cell Reprogram.* 14(2):171-185, 2012.
 36. Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M, Kiyono T, Umezawa A, Nishina H, Azuma N. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One.* 7(1):e29677, 2012.
 37. Zhang J, Dong J, Gu H, Yu S, Zhang X, Gou Y, Xu W, Burd A, Huang L, Miyado K, Huang Y, Chan HC. CD9 is critical for cutaneous wound healing through JNK signaling. *J Invest Dermatol.* 132(1):226-36, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

再生医療技術を駆使した、生活習慣病（虚血性疾患、肥満、糖尿病、高脂血症）の新規病態モデルの開発と創薬研究

国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部
佐伯 久美子
平成24年4月～平成26年3月

研究要旨

本研究では、ヒト ES/iPS 細胞などから作製した分化細胞を取り入れることで、生活習慣病の病態生理を正しく反映できる新規の培養細胞モデル系を構築して創薬研究を展開する。我々が世界で初めて作成したヒト ES/iPS 細胞に由来するヒト褐色脂肪細胞を駆使して、基盤研究、代謝関連研究を推進した。一方、様々のヒト血管内皮細胞の平滑筋細胞の増殖に対する効果を接触培養と非接触培養の系により検討し、ヒト初代培養血管内皮細胞、ヒト ES 細胞由来血管内皮細胞、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞、など、血管内皮細胞の種類によって異なる特徴を明らかにした。

研究組織

- (1) 独立行政法人国立国際医療研究センター
研究所糖尿病研究センター代謝疾患研究部
安田 和基
- (2) 株式会社リプロセル技術部
木藤古 孝行、浅井 康行
- (3) 株式会社医学生物学研究所技術生産本部
技術開発部
久原 基樹
- (4) ディナベック株式会社事業本部
細胞工学事業部
佐伯 晃一
- (5) 多摩川精機株式会社
バイオトロニクス研究所
羽生 尚弘
- (6) 富山大学大学院医学薬学研究部
内科学第一講座
戸邊 一之
- (7) 千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学
岩間 厚志

A. 研究目的

ヒトの病気の病態メカニズムの研究に際しては、疾患動物モデルの開発に力が注がれてきたが、適切な動物モデルが得られていないケースも多い。一方、ヒト初代細胞を用いた *in vitro* の実験系では、培養に伴う細胞の形質変化のために病態を正しく反映するモデルの構築は容易ではない。本研究ではこれらの問題に対して、用いるヒト初代細胞のラインアップを増やすとともに、ヒト ES/iPS 細胞やヒト成体由来前駆細胞から作製した分化細胞を取り入れることで、生活習慣病の病態

生理を正しく反映できる新規の培養細胞モデル系を構築して創薬研究を展開する。

B. 研究方法

1. 細胞など研究材料

ヒト ES 細胞 (KhES-1、KhES-3、KhES-5) ならびにヒト iPS 細胞 (京都大学由来株 (201B7、253G1)、成育医療センター由来株 (#25)) は、MMC 処理 MEF 上で 20%KSR 存在下に無血清培養により継代した。無フィーダー・無血清・増殖因子無添加培養に際しては、20%KSR 存在下で、マトリゲル上で培養した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC)、ヒト微小血管内皮細胞 (Human MicroVascular Endothelial Cells、HMVEC)、ヒト大動脈内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells、HAEC)、ヒト冠状動脈内皮細胞 (Human Coronary Artery Endothelial Cells、HCAEC) は、大日本住友製薬株式会社もしくはロンザグループ社から購入した。

ヒト白色脂肪細胞は、市販の分化誘導培地を用いてヒト間葉系幹細胞から分化誘導した。ヒト間葉系幹細胞は、ロンザグループから購入した。

2. センダイウイルスベクターを駆使したヒト iPS 細胞の樹立

新生児皮膚由来線維芽細胞 BJ、HUVEC からヒト iPS 細胞の樹立を行った。山中 4 因子を搭載したセンダイウイルス (SeV) ベクター (SeV18+OCT3/4/TSΔF, SeV18+SOX2/TSΔF, SeV18+KLF4/TSΔF, SeVHNLc-MYC/TS15ΔF)