

induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iCell-CMs) for evaluation of drug-induced QT prolongation. The 2nd HD physiology international symposium on multi-level systems biology. Tokyo, Japan 2013.06.28.

2. Yasunari Kanda, Li Min, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Development of human iPS cell-derived mature cardiomyocytes for assessment of drug-induced QT prolongation. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. Osaka, 2014.1.
3. Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. A novel approach for evaluation of drug-induced QT prolongation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco, USA, 2014.02.15.

著書

1. 諫田泰成：再生心筋細胞を用いた安全性薬理評価系の開発、再生医療における臨床研究と製品開発、p572-576、技術情報協会 (2013).

G. 知的所有権の取得状況

特許出願番号：2013-116243

「正常な内向きのカリウム電流特性を有する iPS 細胞由来心筋モデル細胞」

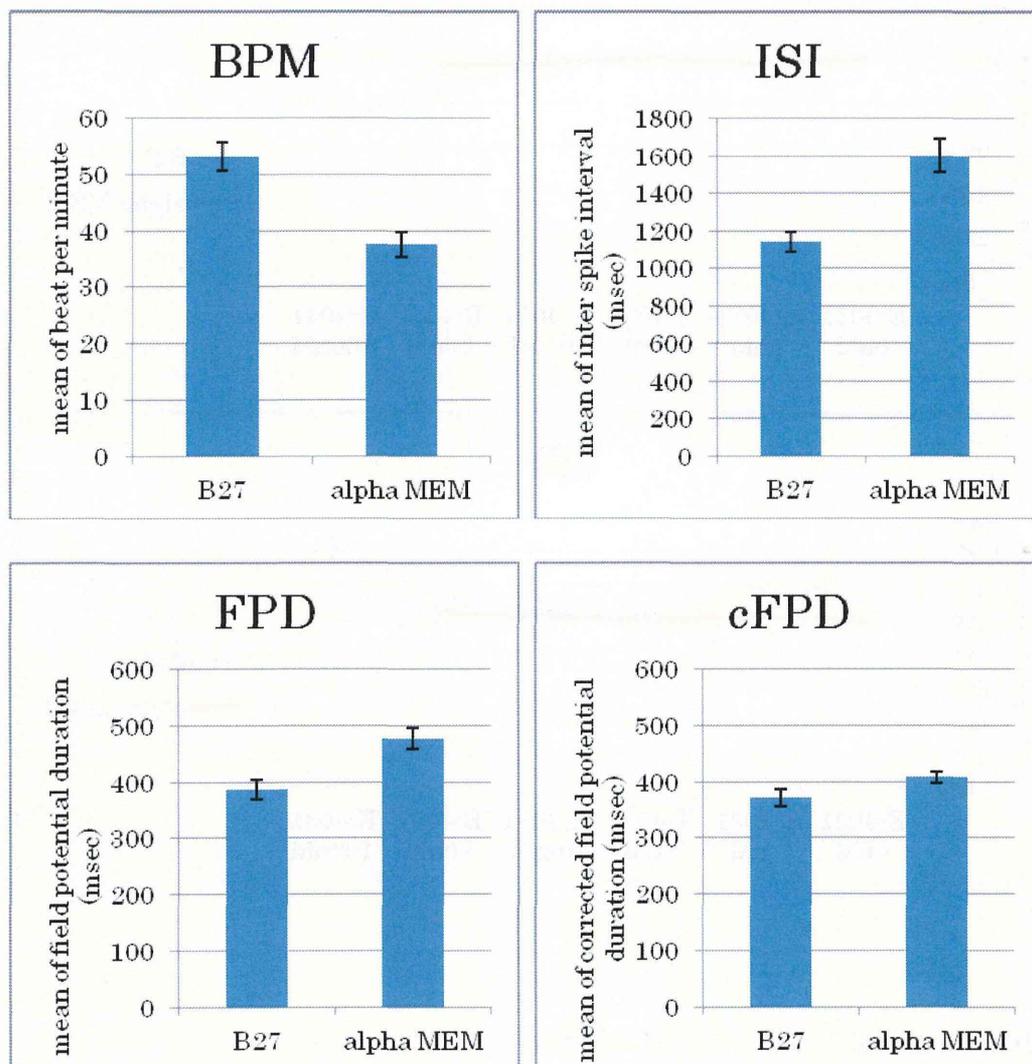


図1 分化心筋細胞の性質に対する培地の比較

分化心筋細胞の Beat per Minute (BPM)、 Interspike interval (ISI)、 Field potential Duration (FPD)、 FPD corrected with Fridericia's correction (cFPD)に対する培地の比較を行った。その結果、B27 培地及び alpha MEM によって BPM、 ISI、 FPD は多少の差は認められたが、cFPD はほぼ同じであった。n=7 (B27 培地)、n=3 (alpha MEM)。

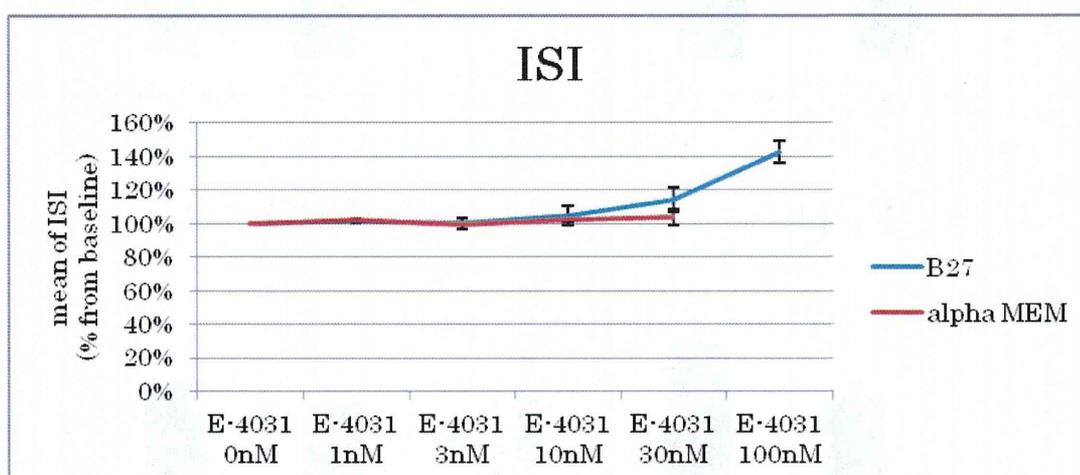
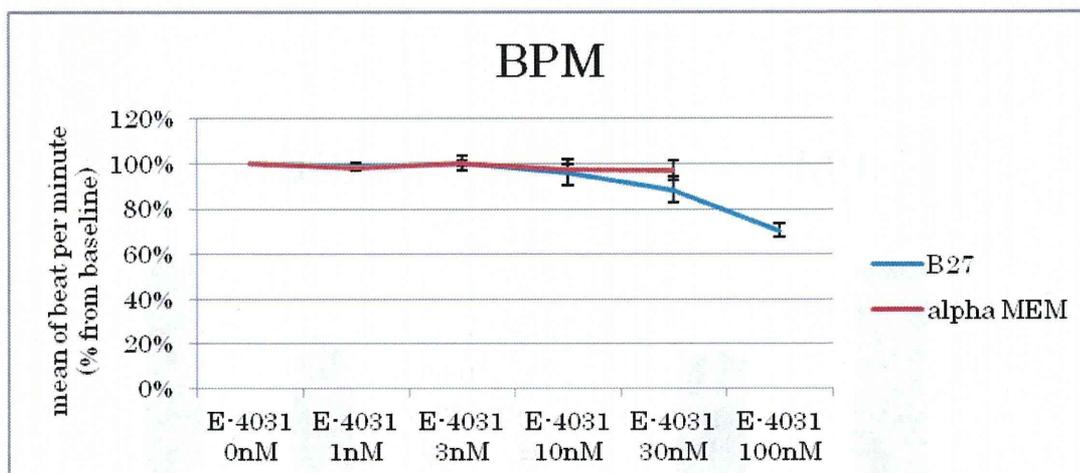


図2 BPMおよびISIに対するE-4031の影響

分化心筋細胞のBPMおよびISIに対するE-4031 (0~100 nM) の影響を検討した。その結果、alpha MEMによってBPM、ISIはほぼ変化が認められなかった。B27培地においては、BPMの減少およびISIの延長が認められた。n=3 (alpha MEM)、n=3 (B27)。

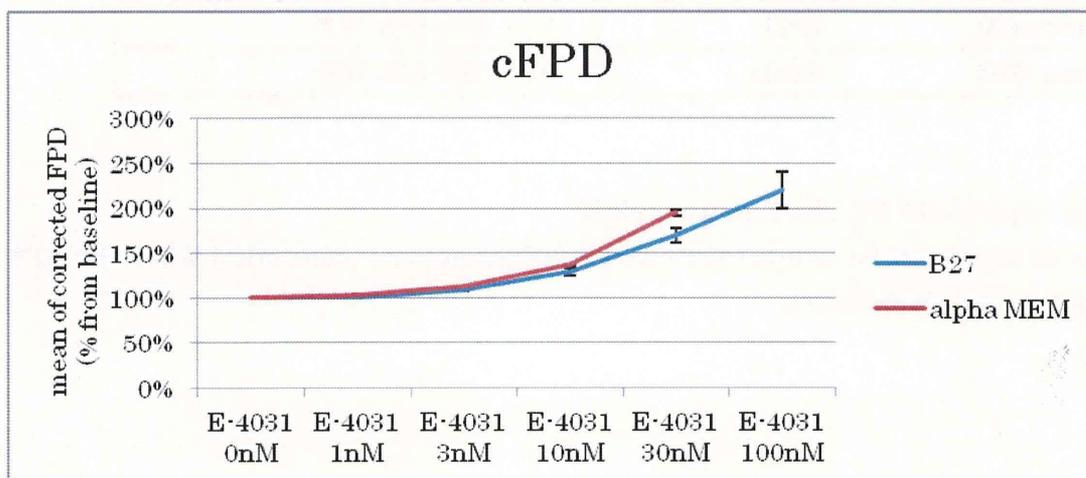
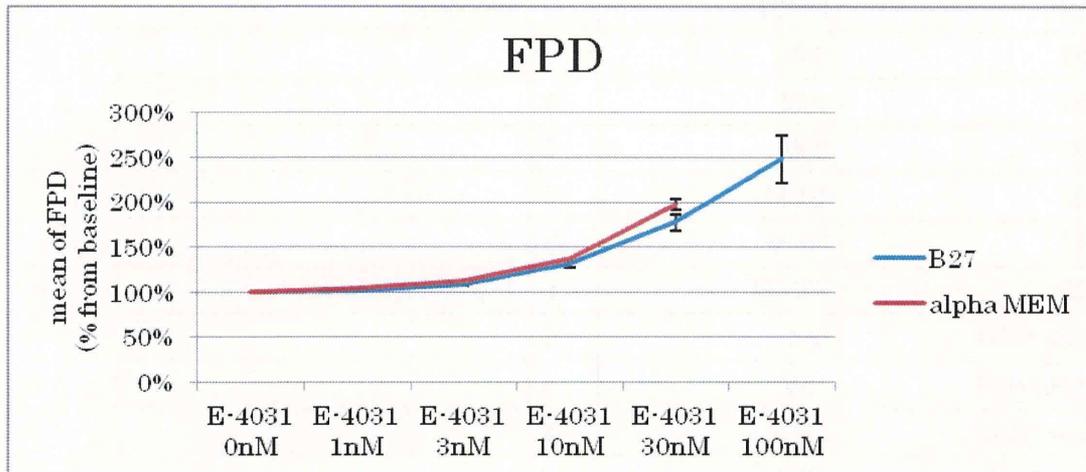


図3 E-4031によるFPD延長

分化心筋細胞のFPDに対するE-4031(0~100nM)の影響を検討した。その結果、alpha MEM、B27の両培地においては、FPDの延長が認められた。n=3(alpha MEM)、n=3(B27)。

培地	E-4031	N	EAD 発生
B27	0nM	3	
B27	1nM	3	
B27	3nM	3	
B27	10nM	3	
B27	30nM	3	
B27	100nM	2	1 例で EAD 発生
alpha MEM	0nM	3	
alpha MEM	1nM	3	
alpha MEM	3nM	3	
alpha MEM	10nM	3	
alpha MEM	30nM	2	1 例で EAD 発生
alpha MEM	100nM	3	3 例で EAD 発生

図 4 EAD の発生率に対する E-4031 の影響

E-4031 による EAD の発生率に対する培地の影響を比較した。alpha MEM 培地と B27 培地で反応性に差が認められた。

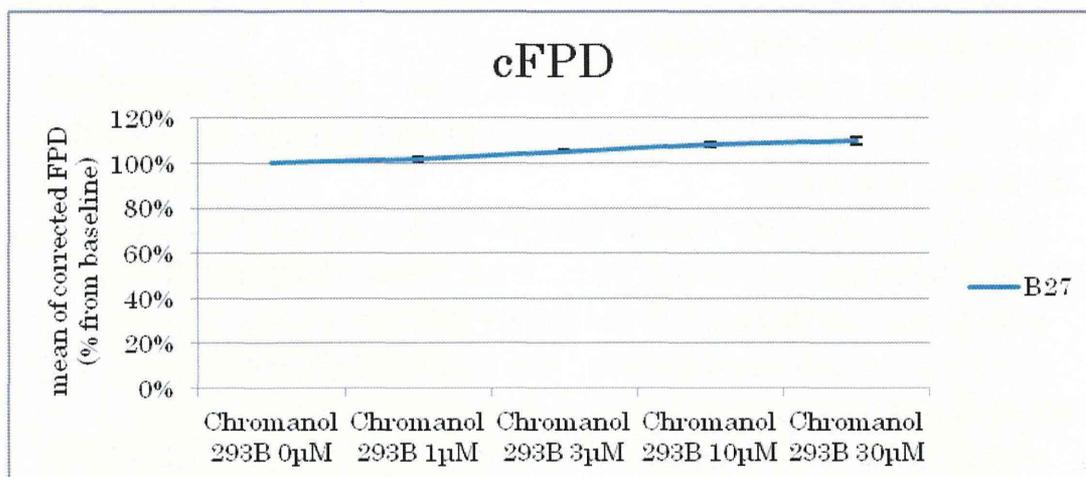
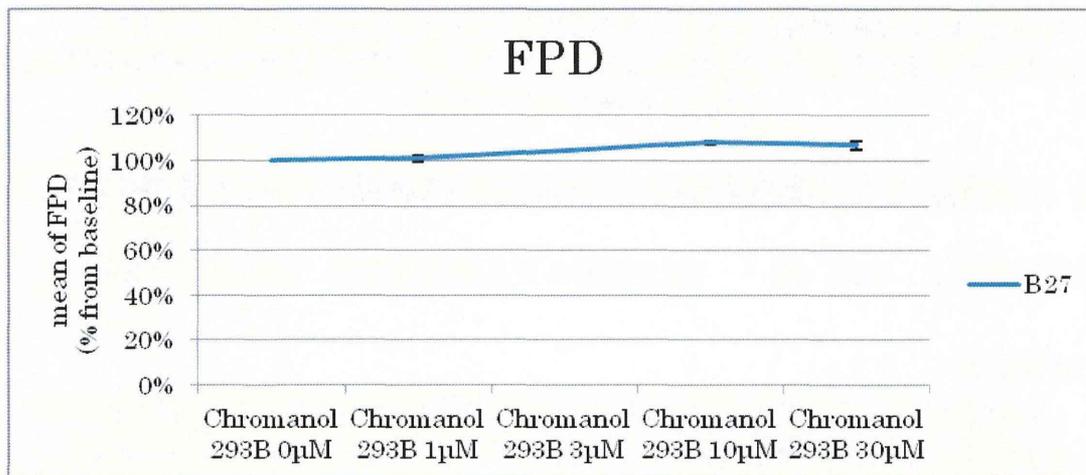


図5 FPD に対する Chromanol 293B の影響

B27 培地を用いて、FPD および cFPD に対する IKs 阻害剤 Chromanol 293B (0~30 μM) の影響を観察した。N=3。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業）
「ヒト iPS 分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化」
平成 25 年度分担研究報告

ヒト幹細胞由来肝実質細胞の有害反応評価試験への適応基準作成

研究分担者： 石田 誠一（国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第三室長）

研究要旨：

本年度は、三社より iPSC 由来肝細胞を入手し、薬物代謝関連遺伝子の活性発現と遺伝子発現を検討した。誘導に関しては、ガイドラインに従い CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 を中心に検討した。また、アセトアミノフェンに対する毒性発現を CYP 酵素活性阻害剤の非存在 / 存在下で検討した。

A 社細胞では、CYP3A4 において、発現は低いものの、活性並びに遺伝子発現の双方で、リファンピシンによる誘導が認められた。CYP2B6 も遺伝子発現レベルでは誘導がみられる可能性がある。

B 社細胞では、非常に高い CYP3A4 活性が認められた。また、リファンピシンによる誘導も遺伝子発現レベルでは確認できた。さらに CYP1A の誘導が認められた。

C 社細胞では、低いながらも CYP3A4 の遺伝子発現が認められた。

アセトアミノフェンによる毒性発現は、各社とも同じ程度の応答性を示した。CYP 阻害剤の効果は認められなかった。

昨年度の比較検討に比べ、iPSC 由来肝細胞の機能発現が高くなった。特に薬物代謝において、最も主要な CYP3A4 に関して、比較的高い発現と誘導が認められる例があり、来年度再現性等の検討が必要と考える。

キーワード：ヒト iPS 細胞由来肝細胞 薬物代謝 肝毒性評価

A. 研究目的

本研究は、iPSC 由来肝細胞を薬物代謝評価、薬物性肝障害評価に応用することを目的とし、評価するに際して満たすべき生物活性を設定し、入手可能な iPSC 由来肝細胞が必要とされる基準を満たすか評価するものである。

体内に取り込まれた薬物は、局所投与の場合を除き、多くが肝臓で代謝・排泄

を受ける。それゆえ、薬物の体内動態を正確に把握するためには、肝代謝を担う肝実質細胞における取り込み、代謝、排泄を正確に予測することが必須である。また、その過程において薬物原体やその代謝産物が有害反応を惹き起こすことがある。そのため、薬物の肝毒性評価にとって、薬物代謝能を保持した細胞を用いた試験系の構築は重要である。

このような目的のために、移植不適合肝臓から調製されたヒト肝細胞が多用されている。しかしながら、ドナー間差や調製間差によるばらつき、供給の安定性、倫理、などの問題を孕むため、代替する細胞が求められてきた。

従来、胚性並びに体性の幹細胞から肝細胞を誘導する試みは多くなされてきているが (Stem Cells. 2009 Mar; 27(3): 577 - 605)、2007年に山中らによりヒト iPS 細胞が開発され、胚性幹細胞とほぼ同等のヒト幹細胞の入手が格段と容易になり、iPS 細胞を出発材料とする肝細胞の分化誘導研究が加速された。

今後は、iPS 細胞等を出発材料として様々な手法により肝実質細胞が分化誘導されるようになると予測される。そのような分化誘導肝細胞を用いて薬物代謝予測や肝毒性評価を行う際には、試料である分化誘導細胞の規格化が重要になってくる。本研究では、iPSC 由来肝細胞の薬物代謝能の評価と肝毒性評価系構築の検討を行うことで、ヒト肝細胞由来肝実質細胞を有害反応評価試験に用いる際の基準を作成する。この目的の達成のために、本年度は、A 社、B 社、C 社より iPSC 由来肝細胞を入手し、薬物代謝関連遺伝子の活性発現と遺伝子発現を検討した。誘導に関しては、ガイドラインに従い CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 を中心に検討した。また、アセトアミノフェンに対する毒性発現を CYP 酵素活性阻害剤の非存在 / 存在下で検討した。

B. 研究方法

・iPSC 由来肝細胞

(A 社)市販の凍結細胞をマルチウェルプ

レートに播種し、用いた。

(C 社)市販の非凍結細胞を用いた。細胞は C 社より空輸された。

(B 社)pre-launch 版の凍結細胞をマルチウェルプレートに播種し、用いた。

・HepaRG 細胞

市販の凍結細胞をマルチウェルプレートに播種し、用いた。

・細胞培養条件

細胞培養はそれぞれの細胞の指定の方法によった。細胞培養の条件を表1に示す。

・CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 誘導

iPSC 由来肝細胞を各薬剤に一定期間曝露した。各実験は n=3 (独立した 3 ウェル)で行った。暴露濃度と暴露期間は以下に示す通り。

CYP1A2 : 50 μ M omeprazole, 1day

CYP2B6 : 500 μ M phenobarbital, 2 days

CYP3A4 : 20 μ M rifampicin, 2 days

・CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 酵素活性

CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 の酵素活性は発光法 (P450-Glo assay Kit, Promega)にて測定した。各実験は n=3 (独立した 3 ウェル)で行った。

・遺伝子発現

細胞から RNA を回収 (RNeasy mini kit, Qiagen)後、TaqMan Probe (Applied Biosystems)を用いた定量的 real-time PCR により測定した。検量線には、BioChain 社から購入したヒト肝由来 RNA8 ドナーをプールしたものをを用いた。各実験は n=3 (独立した 3 ウェル)で行ったが、C 社のみ RNA の回収率が悪かったため、3 ウェルをまとめて回収し、測定に供した。

・細胞毒性

分化誘導肝細胞を acetaminophen (0.5 mM – 50 mM) に 2 日間暴露したのち、生細胞を計測した (Celltiter-Glo assay Kit, Promega)。各実験は n=3 (独立した 3 ウェル) で行った。

C. 研究結果

評価する iPSC 由来肝細胞として、A 社及び C 社から市販されているものと、B 社から pre-launch 版を入手した。また、対照として、ヒト肝実質細胞の代替細胞として広く用いられている BIOPREDIC 社の HepaRG 細胞を入手した。それぞれの細胞について、酵素活性発現と酵素誘導、および、毒性発現を検討した。試験項目を表 2 にまとめた。酵素活性に関しては、Promega 社 P450-Glo アッセイキットで、細胞レベルでの測定が可能な酵素 3 種を選択した。mRNA については、第 I 相酵素の主要なものに加え、第 II 相酵素とトランスporter、またそれらの発現調節を担う転写因子を選択した。酵素誘導は、厚生労働省医薬食品局審査管理課が取りまとめた「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)」に従い、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 を選択し、それぞれの誘導剤としては、CYP1A2 - omeprazole、CYP2B6 - phenobarbital、CYP3A4 - rifampicin を用いた。それぞれの酵素に関して、酵素活性レベルと mRNA レベルでの測定を実施した。

毒性評価に関しては、初年度同様に細胞をアセトアミノフェンで 2 日間処理したのち、CellTiter Glo キットで相対的細胞数を求めることで比較した。また、

今年度は、それに加え、細胞をアセトアミノフェンに曝露する前日より、CYP 酵素阻害剤である 1-aminobenzotriazole で処理し、第 I 相の酵素活性を阻害した際の細胞毒性応答の変化を観察した。

細胞培養の手順を表 1 に示す。各細胞とも、細胞の供給元が示す培養方法、培養基材、培地を用いて培養した。培養期間中に異なる種類の培地を用いる際には、表中で色を変えて表示した。

図 1 に細胞の顕微鏡像を示す。B 社のみ MTA の関係でデータを表示していない。C 社の細胞は、敷石上の細胞のみが認められ、細胞集団は比較的均一と判断した。一方、A 社の細胞は、一部で敷石上の肝実質細胞様の形態を示すものがあつたが、繊維芽細胞様の細胞なども認められ、均一性が低かつた。B 社の細胞 (data not shown) は、凍結細胞を融解し播種した後、4 時間目で行う培地交換で死細胞の除去が十分でなかつたためか、シャーレ底面の敷石上の細胞の一部に死細胞塊が重層しているのが認められた。シャーレ底面の敷石上細胞は肝実質細胞様の形状を示していた。

・酵素活性評価

プロメガ社から市販されている、P450-Glo キットを用いて、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 各酵素の酵素活性を、酵素反応 1 時間と 2 時間の 2 ポイントで測定した。それぞれ、酵素反応終了後 CellTiter Glo キットを用いて、相対的細胞数を求め、先に求めた酵素活性値を相対的細胞数値で除することで、規格化した。酵素活性の有無の判定は、反応時間によって酵素活性の上昇が認められるかに因つた。ただし、CYP1A2 の活

性測定においては、活性測定時に用いる KHB 溶液によると思われる CellTiter Glo 値の時間依存的低下があり、時間期以下による活性上昇が見かけ以上大きく出る傾向になっていた点で注意を要した。

測定結果を図 2 (A) 左カラムに示す。全体を通じて、CYP2B6 活性は用いた P450-Glo キットでは正確に測定できないと判断された。以後、データは示してあるが、今回の検討から除外してある。特に、注目すべき点を抽出したものを図 2 (B) に示す。

HepaRG 細胞では、従来までの結果と同様に、CYP1A2 活性は低いながらも認められたのと、非常に高い CYP3A4 活性が認められた。

C 社 iPSC 由来肝細胞においては、CYP3A4 の活性が低いながらも認められた。

A 社 iPSC 由来肝細胞では、見かけ上 CYP1A2 活性がある結果となったが、先述の CellTiter Glo アッセイの結果による影響もあり、活性があるとの判断はしがたかった。

B 社 iPSC 由来肝細胞では、CYP3A4 に関して、比較的高い酵素活性が認められた。HepaRG 細胞との比較でも、若干弱いが比肩できる値を示していた。

・酵素活性による酵素誘導評価

次に、各細胞における酵素誘導能を、各細胞を誘導剤にばく露後、コントロール細胞 (DMSO のみで処理) と酵素活性を比較することで検討した。結果を図 2 (A) 中カラム (CYP1A2)、右カラム (CYP3A4) に示す。また、注目すべき点を抽出したものを図 2 (B) に示す。

HepaG 細胞では CYP1A2 に関して誘

導が認められた。今回の系では CYP3A4 の誘導が認められていないが、後述の RNA レベルでの検討と一致しないため、今後検討の必要があると考える。

C 社 iPSC 由来肝細胞では、特記すべき誘導活性は認められなかった。

A 社 iPSC 由来肝細胞では、CYP3A4 に関して誘導が認められた。図 2 (B) 右カラム下段にまとめを示すが、代謝活性測定時間にもよるが、2.8 倍ないし 8.9 倍の誘導が認められた。

B 社 iPSC 由来肝細胞では、CYP1A2 において弱いながらも誘導が認められた。

・酵素遺伝子の発現評価

次に、同じ実験で細胞から抽出した RNA を用いた薬物代謝関連遺伝子の発現の評価を行った結果を示す (図 3 (A) ~ (F))。

図 3 (A) : CYP1A 関連

図 3 (B) : CYP2B6

図 3 (C) : 発現に CAR/PXR の関与が知られている CYP 分子種

図 3 (D) : CYP3A 関連

図 3 (E) : 第 II 相酵素、トランスポーター

図 3 (F) : 薬物代謝遺伝子の発現調節を担う転写因子

本解析においては、検量線作成にヒト肝由来 RNA (BioChain 社) 8 ドナー分をプールしたものをを用いた。そのため、各グラフ中の測定結果において、発現量 1 はヒト肝臓における平均的発現量に相当する発現がサンプル中で認められたことを示す。また、参考として、各図中に HepaRG 細胞における各遺伝子の発現をヒト肝実質細胞と比較した文献のデータ (Drug Metab Dispos. 2008,

36, 1444) を示す。

iPSC 由来肝細胞に関連して、特筆すべき結果を以下にまとめる(各図参照)。

発現に CAR/PXR の関与が知られている CYP 分子種 4 種で、CYP2C9 と CYP2C19 について、B 社と Cellectis 社において比較的高い発現が認められた(図 3 (C))。

CYP3A 関連では、B 社で CYP3A4 の高い発現が認められた。また、同社の細胞では胎児期から幼児期に発現が高いとされる CYP3A7 の発現が非常に高かった(図 3 (D))。活性発現は低い C 社でも CYP3A4 の発現が認められた。

第 II 相酵素、トランスポーターでは、全般的に高い発現をしていた(図 3 (E))。各遺伝子で一番発現が低かった A 社でも、ヒト肝に比べ約 1/10 の発現が認められた。

薬物代謝遺伝子の発現調節を担う転写因子に関しても、第 II 相稿と同様、全体的に高い発現をしていた(図 3 (F))。

図 3 (B) から (F) までのうち、コントロールの発現量をまとめて、発現順位順にヒートマップで示した(図 4)。

総じて、HepaRG 細胞での発現が各遺伝子とも高い(図 4 中より赤い色で示されている)傾向にあったが、例えば CYP2D6 や RXR α 、CEBP α は B 社で、また、GSTA2、UGT1A1、HNF4 α は Cellctis 社で相対的に高い発現が認められた。また、再掲となるが、B 社細胞において、CYP3A7 の高い発現が認められた。

・ mRNA レベルでの酵素誘導評価

各 iPSC 由来肝細胞における、薬物代謝関連遺伝子の mRNA レベルでの誘導評価を行った。結果は、(図 3 (A) ~ (F))

に示した。

iPSC 由来肝細胞に関連して、特筆すべき結果を以下にまとめる(各図参照)。

CYP1A に関しては、B 社の細胞で誘導が認められた(図 3 (A))。

CYP2B6 に関しては、A 社のものに関して誘導が倍率は低いながらも認められた(図 3 (B))。

発現に CAR/PXR の関与が知られている CYP 分子種 4 種では、際立った誘導は認められなかった(図 3 (C))。

CYP3A4 に関しては、発現量が低いながらも A 社で誘導が認められた。また、B 社においても、誘導倍率は低い有意な誘導が認められた(図 3 (D))。

第 II 相酵素、トランスポーター、および、薬物代謝遺伝子の発現調節を担う転写因子に関しては、際立った誘導は認められなかった(図 3 (E)、(F))。

・ 細胞毒性発現

細胞を 0.5 mM – 50 mM アセトアミノフェンで 2 日間処理したのち、CellTiter Glo キットで相対的細胞数を求めることで比較した。また、細胞をアセトアミノフェンに曝露する前日より、CYP 酵素阻害剤である 1-aminobenzotriazole で処理し、第 I 相の酵素活性を阻害した際の細胞毒性応答の変化を観察した。各細胞でほぼ同じ用量-反応曲線を示し、細胞間での差異は少なかった。また、CYP 酵素阻害剤の処理については、明瞭な効果は認められなかった。

D. 考察

昨年度は、実施時期に市販され国内で流通している唯一の iPSC 由来肝細胞として A 社の細胞の評価を行った。本年

度は、国内で入、A社、C社、B社から細胞が入手可能であったので、この三社のiPSC由来肝細胞を検討の対象とした。また、現在広く用いられ始めているBioPredic社のHepaRG細胞を対照として、同時に検討した。

A社、B社、並びにHepaRG細胞は凍結際バイアルを入手し、当研究室で融解後、播種した。C社はスウェーデンから空輸された非凍結細胞を用いた。空輸期間は、現地より12月11日に発送され、当所には12月14日に配達されたので、4日間である。

播種後、顕微鏡下で細胞を観察した(図1)。HepaRGは、肝実質細胞と胆管上皮細胞が認められ、製品として購入した細胞も当研究室で培養維持している細胞と同様の形態を示した。

iPSC由来肝細胞間の比較では、C社の細胞の均一性が高く、細胞像も肝実質細胞に近かった。凍結融解後播種した、A社、B社は融解時に生じる死細胞が完全に除ききれていないことによる死細胞が認められた。B社の培養器底面に接着している細胞は肝実質様細胞を示していた。一方、A社は、明らかに肝実質細胞ではない細胞集団が認められており、細胞の均一性が他と比較して低かった。

各細胞について、

- ・ 酵素活性評価
 - ・ 酵素活性による酵素誘導評価
 - ・ 酵素遺伝子の発現評価
 - ・ mRNAレベルでの酵素誘導評価
 - ・ 細胞毒性発現
- を比較検討した。

特記すべき点を以下にまとめた。

- ・ 酵素活性評価 (図2)

B社の細胞で非常に高いCYP3A4活性が認められた。比較対照としたHepaRG細胞の活性に若干劣る程度である。HepaRG細胞のCYP3A4活性は、ほぼ初代培養肝細胞に匹敵することが知られているので、B社細胞も初代培養肝細胞に近い活性を有すると考えられる。

- ・ 酵素活性による酵素誘導評価 (図2)

酵素活性による酵素誘導では、CYP1A2の酵素誘導がB社細胞にて認められた。

A社細胞では、CYP3A4活性の誘導が認められた。定常状態での発現が低いいため、再現性の確認が必要であるが、薬物相互作用の評価においては重要な知見である。

- ・ 酵素遺伝子の発現評価 (図3)

今回の遺伝子発現では、検量線にヒト肝臓組織から調製されたRNAを8ドナ一分プールしたものをを用いた。そのため、各測定値は、肝臓組織での発現の相対値となっている。すなわち、発現が1前後であれば、そのサンプルでの遺伝子発現が肝臓とほぼ同等であることを示している。

調べた遺伝子の中では、第I相酵素の中では、CYP2C9がB社で、またCYP2C19がB社とC社で比較的高い発現が認められた(図3(C)、CYP2C9は肝臓の1/10~1/100程度、CYP2C19は肝臓の1/10程度)。また、B社細胞ではCYP3A4の発現が高かった(図3(D))。この結果は、図2に示した酵素活性の結果とも一致しており、B社細胞で、薬物代謝で最も主要な代謝酵素が、肝臓にかなり近いレベルで発現していることを示唆している。また、B社で

は胎児型の CYP3A と考えられる CYP3A7 の高い発現が認められている。このことは、B 社の細胞の成熟化がまだ不十分であることを指名しいると考えられる。CYP3A4 と CYP3A7 の酵素基質特異性は近いことが知られているが、Promega 社資料によれば、用いた基質は CYP3A4 のみで特異的に代謝されると報告されているため、図 2 で認められた酵素活性は CYP3A7 に由来するものではないと考えられるが、他の基質を用いるなどで確認が必要である。

第 II 相酵素並びにトランスポーターは、肝臓組織と同程度の発現を示すものが多かった (図 3 (E))。

また、第 I 相酵素、第 II 相酵素、トランスポーターの発現に重要な役割をしている転写因子に関しては、A 社を除き、肝臓に近い発現を示しているものが多かった (図 3 (F))。

以上の結果については、図 4 に各遺伝子の相対的発現量をヒートマップの形式で示しまとめた。各遺伝子の細胞間での発現の高低のパターンを比較して見ると、総じて対照とした HepaRG 細胞で発現が高いが、B 社や C 社で発現が最も高くなる遺伝子もあり、各遺伝子ごとに異なるパターンを示していた。まだサンプル数が少ないため、次年度は、新たにサンプル測定を行うことで測定値を増やし、特徴的なパターンを抽出できるかが検討課題である。例えば、特定の薬物代謝酵素の発現と同じ発現パターンを示す転写因子等を見出せると、iPSC 由来へパトサイトの評価指標を見出せる可能性があると考えられる。

・ mRNA レベルでの酵素誘導評価

酵素誘導に関しては、酵素活性で認め

られた誘導 (CYP1A2、CYP3A4) が RNA レベルでも認められた (図 3 (A)、(D))。

B 社細胞における CYP1A2 遺伝子の誘導、並びに、A 社細胞における CYP3A4 遺伝子の誘導が認められたのは、iPSC 由来肝細胞が薬物相互作用ガイドラインで重要とされている二つの酵素の評価系に用いることが出来ることを示唆するものであり、来年度も引き続き検討を行い、再現性やロット間差の確認をする価値があると考えられる。なお、今回 A 社細胞の CYP3A4 遺伝子の RNA レベルでの誘導は 3.1 倍であったが、A 社から提供されたデータでは 3.5 倍と比較的近い値が得られていたことは、今回の結果の再現性があることを示唆しているかもしれない。

・ 細胞毒性発現

アセトアミノフェン暴露による細胞毒性に関しては、HepaRG を含め、各社細胞がほぼ同一の要領作用曲線を与えた。今回は、CYP 酵素活性の阻害剤である 1-aminobenzotriazole を共存させて、代謝活性化の効果も同時に観察したが、阻害剤の有無で差は認められなかった。今回の酵素活性の測定結果からは、まだ代謝活性化による毒性発現に足る代謝産物を生成するほどの CYP 代謝活性が発現されていないことに因るかもしれない (アセトアミノフェンの代謝活性化を行う酵素は CYP2E1 が主で CYP3A4 も若干関与する)。ただし、アセトアミノフェン原体は、CYP 酵素による代謝活性化を受ける一方で、グルクロン酸抱合による抱合反応の経路でも排泄される。今回の遺伝子発現解析の結果からは、第 II 相酵素の発現が比較的高かった。そのため、第 II 相酵素によ

る排泄が主たる経路となり、無毒化されていることも考えられるので、来年度の検討では、グルクロン酸抱合を阻害したうえで毒性発現評価を行う必要があるかもしれない。

また、今回はアセトアミノフェンのみであったが、他の肝毒性を示す化合物も並行して評価を進め、反応性を検討することも必要である。

・各社の製品開発の状況

今回用いた各社の製品開発状況について、情報を図6 (A)、(B)、(C)にまとめた。既にC社は新しい分化誘導法による細胞の供給を開始しており、今回用いたものよりも活性が高いデータを示している。来年度は、このような新しい製品に関する評価を進めることも必要と考える。

E. 結論

本年度は、A社、B社、C社より細胞を入手し、薬物代謝関連遺伝子の活性発現と遺伝子発現を検討した。誘導に関しては、ガイドラインに従いCYP1A2、CYP2B6、CYP3A4を中心に検討した。また、アセトアミノフェンに対する毒性発現をCYP酵素活性阻害剤の非存在/存在下で検討した。

A社細胞では、CYP3A4において、発現は低いものの、活性並びに遺伝子発現の双方で、リファンピシンによる誘導が認められた。CYP2B6も遺伝子発現レベルでは誘導がみられる可能性がある。

B社細胞では、非常に高いCYP3A4活性が認められた。また、リファンピシンによる誘導も遺伝子発現レベルでは確認できた。さらにCYP1Aの誘導が認

められた。

C社細胞では、低いながらもCYP3A4の遺伝子発現が認められた。

他のCYPや第II相酵素、トランスポーター、またそれらの転写調節を担う転写因子では、比較的高い発現をしているものが多かった。

アセトアミノフェンによる毒性発現は、各社とも同じ程度の応答性を示した。CYP阻害剤の効果は認められなかった。CYP活性の発現が低いことと思われるが、第II相酵素の発現が比較的高いことを考慮すると、CYPで代謝を受ける前に抱合により無毒化されている可能性もある。

昨年度の比較検討に比べ、iPSC由来肝細胞の機能発現が高くなっていると考えられた。特に薬物代謝において、最も主要なCYP3A4に関して、比較的高い発現と誘導が認められる例があり、来年度は引き続き、再現性、ロット間差を検討し、また、新たな製品に関して知見を得ていくことが重要である。

また、遺伝子発現のパターンが会社ごとに異なる結果が得られている。データを増やし、薬物代謝関連遺伝子の発現と関連性の高い遺伝子の探索を進めることで、薬物代謝活性の高い分化誘導肝細胞を判断するバイオマーカーを見出す可能性が示唆された。

F. 研究発表 論文

1. Sekino, Y., Sato K., Kanda, Y. and Ishida, S. (2013) Developing and standardizing experimental protocols using human iPS-derived cells to predict

adverse drug reactions in pre-clinical safety studies. Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. 131: 25-34.

学会発表

1. Ayumi Oshikata, Seiichi Ishida, Toshiaki Takezawa: Development of A Culture Method Activating Hepatic Function of HepG2 Cells Utilizing A Collagen Vitrigel Membrane Chamber And Its Application To Assay System For Liver Metabolism And Toxicity, 日本組織培養学会 第 86 回大会 (2013, 5, つくば)
2. 石田誠一: 創薬安全性評価において iPS 細胞由来肝細胞に望まれる特性とは?、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013, 6, 千葉)
3. 石田誠一: iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬物安全性評価の展望と課題、第 3 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2013, 9, 東京)
4. Seiichi Ishida, Takashi Kubo, Maki Hojyo, Yukie Kuroda, Su-Ryang Kim, Yuko Sekino: Simple Culture Method for the Preparation of Deactivated Hepatic Stellate Cells, 17th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (2013, 9, Osaka)
5. Takashi Kubo, Yukie Kuroda, Maki Hojyo, Su-Ryang Kim, Anne Corlu, Fabrice Morel, Yuko Sekino, and Seiichi Ishida: Establishment of Simple Culture Method for the Stable Maintenance of Hepatic Progenitor Cells, 日本薬物動態学会第 28 回年会 (2013, 10, 東京)
6. Seiichi Ishida, Su-Ryang Kim, Takashi Kubo, Yukie Kuroda, Maki Hojyo, Atsuko Miyajima, Taku Matsushita and Yuko Sekino: COMPARATIVE ANALYSIS OF HUMAN FETAL AND ADULT HEPATOCYTES BY METABOLOMICS AND TOXICITY TEST, 日本薬物動態学会第 28 回年会 (2013, 10, 東京)
7. 石田誠一: in vitro 試験と代替法をつなぐ 計算毒性学の立ち上げ、CBI 学会 2013 年回大会 (2013, 10, 東京)
8. 石田誠一: 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、日本動物実験代替法学会第 26 回大会 (2013, 12, 京都)
9. 湯田浩太郎、石田誠一: hiPSC-肝細胞とインシリコのデータ融合による安全性予測/メカニズム解析に向けた考察、ヒト iPS 細胞の創薬プロセスへの応用 (2014, 2, 東京)
10. 石田誠一: in vitro 肝毒性評価系の計算毒性学への展開、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3, 熊本)

11. 押方歩、石田誠一、竹澤俊明：コ
ラーゲン美鳥膜チャンバーを利用
した新しい肝代謝試験法の開
発、日本薬学会第 134 年会（2014,
3, 熊本）

著書

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

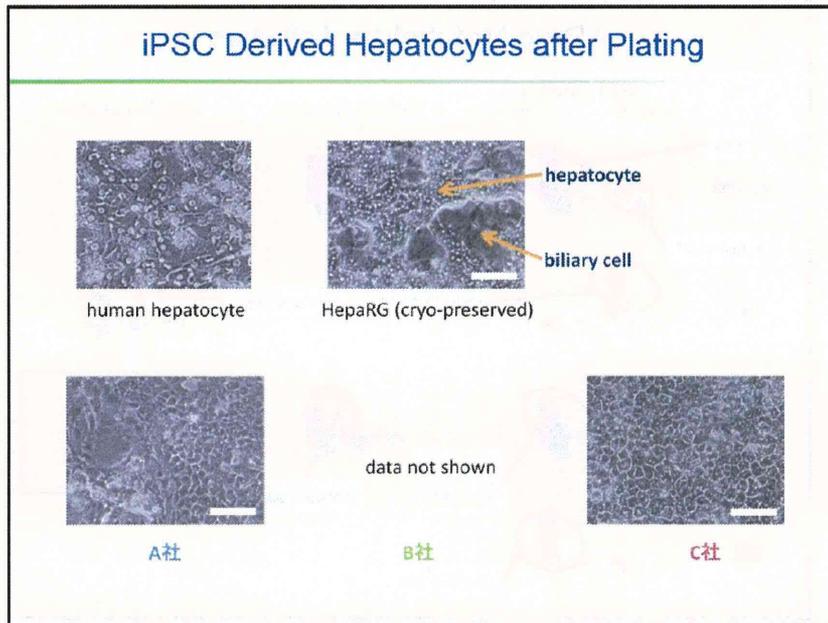


図1 今回用いた各細胞の顕微鏡像
B社はMTAの関係でdata not shownとなっている。

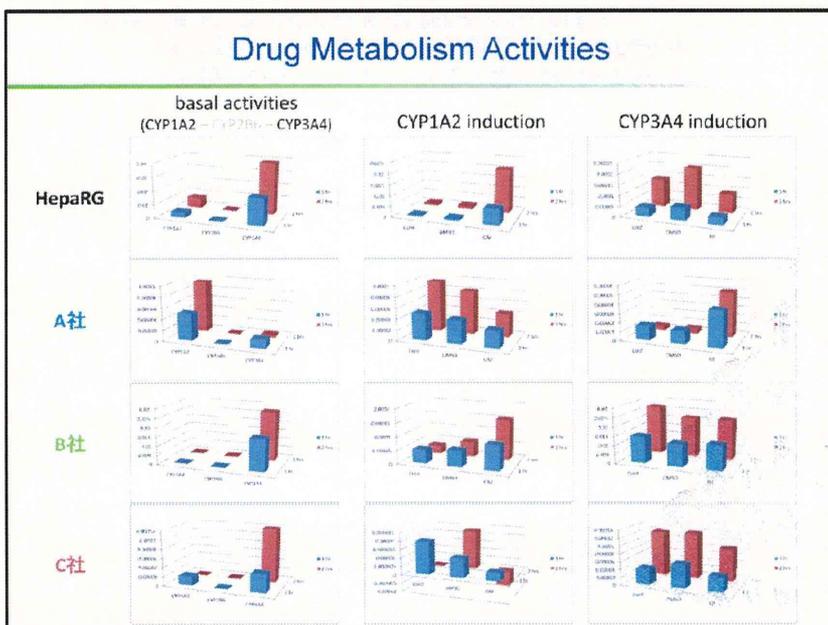


図2 酵素活性による評価の結果
(A) 三社のiPSC由来肝細胞の評価のまとめ
(HepaRGは比較対照)
左カラム: 酵素活性(無処理): 酵素活性基質と1時間
(青棒グラフ)と2時間(赤棒グラフ)した結果を示す。
中カラム: CYP1A2誘導活性(オメプラゾール1日処理)
右カラム: CYP3A4誘導活性(リファンピシン2日処理)

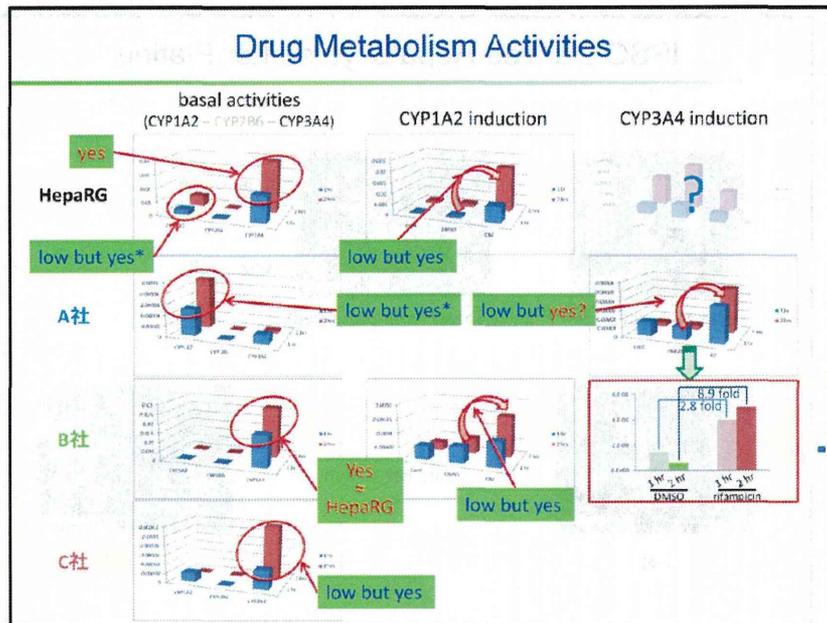


図2 酵素活性による評価の結果

(A) 三社のiPSC由来肝細胞の評価のまとめ
(HepaRGは比較対照)

左カラム: 酵素活性(無処理): 酵素活性基質と1時間
(青棒グラフ)と2時間(赤棒グラフ)した結果を示す。

中カラム: CYP1A2誘導活性(オメプラゾール1日処理)

右カラム: CYP3A4誘導活性(リファンピシン2日処理)

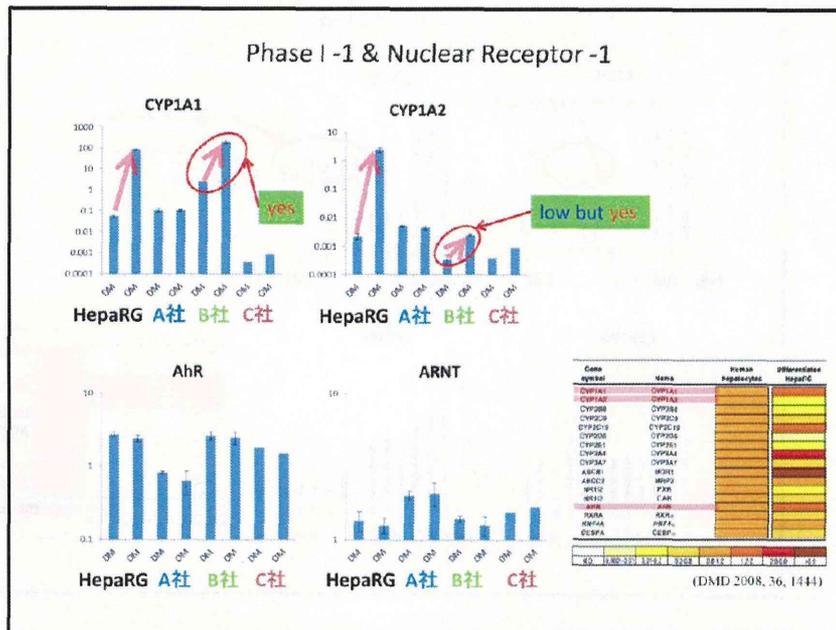
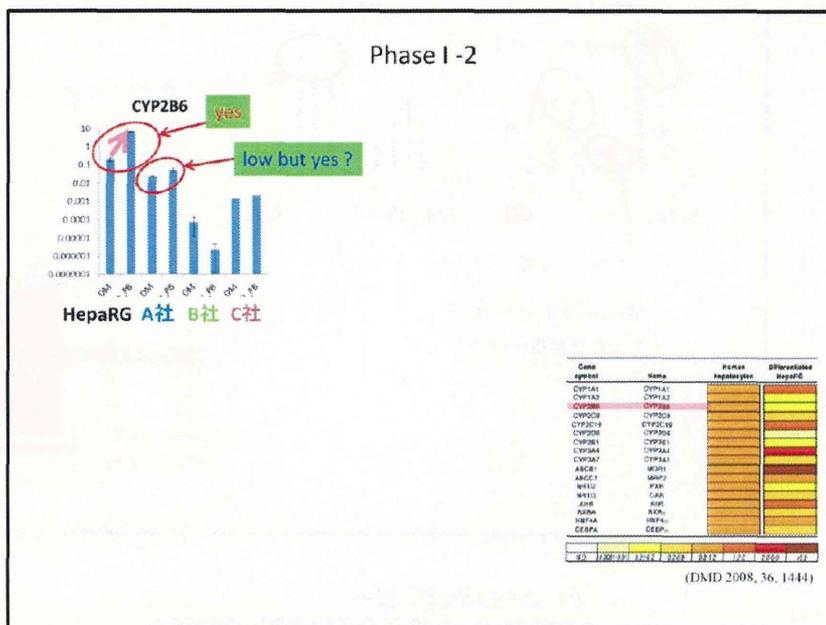


図3 遺伝子発現による評価の結果
 【参考】アストラゼネカ社による、初代培養肝細胞とHepaRG細胞の発現比較を挙げる
 (A) CYP1A関連遺伝子
 B社でCYP1A1、CYP1A2遺伝子の誘導が認められた。
 転写因子(AhR、ARNT)は比較的高く発現していた。



(B) CYP2B6
 A社で弱いながらも誘導が認められている。