

単層培養法では分化誘導効率が実験間で異なってしまうため、次に、胚様体 (embryoid body: EB) を形成させて分化誘導を行った。低接着性の 96 ウェルプレートへ単細胞に解離したヒト iPS 細胞を播種したところ、培養 2 日目には均一な大きさの EB が形成されていた。さらに培養を進めたところ、CD34 や VE-Cadherin を発現する細胞を誘導できていることが確認された。EB 法では、実験間で CD34 と VE-Cadherin を共発現する血管内皮細胞様の細胞への分化効率に大きなばらつきはなかった。本手法ではヒト iPS 細胞 201B7 株だけでなく、その他のヒト iPS 細胞株においても血管内皮細胞を誘導できていた (データ略)。なお、得られた CD34 をセルソーターにて単離し、増殖させて機能を確認したところ、アセチル化 LDL の取り込み能や管腔形成能も有しており、機能的な血管内皮細胞が得られていることが示された。したがって、EB 形成法により、ヒト iPS 細胞から安定的に機能的な血管内皮細胞を誘導可能であることが明らかとなった。

C-2. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法として、支持細胞との共培養法や EB 形成法などが繁用されている。そこで、iPS 細胞を VEGF 存在下で骨髄ストローマ細胞株である OP9 細胞やマウス間葉系細胞株である C3H10T1/2 細胞と共培養することを試みた。iPS 細胞を OP9 細胞と

共培養した結果、血液前駆細胞マーカーである CD34 と CD43 を共に発現する細胞は得られなかった。一方、iPS 細胞を C3H10T1/2 細胞と共培養した結果、iPS 細胞から CD34 と CD43 を共発現する血液前駆細胞を分化誘導可能であった。しかし、ばらつきが大きく、安定した結果を得ることが出来なかった (データ略)。次に、EB 形成法によりヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導を試みた。iPS 細胞と共に放射線照射した C3H10T1/2 細胞をペトリディッシュに播種したところ、培養 2 日目には EB が形成されていた。さらに培養を進めたところ、培養 8 日目には CD34+CD43+血液前駆細胞が得られた。EB 形成法は、C3H10T1/2 との共培養法と比較し、短期間で効率良く安定的に血液前駆細胞を分化誘導可能であることが確認された。また、本手法は、ヒト iPS 細胞 201B7 株だけでなく、その他のヒト iPS 細胞株においても血液前駆細胞を分化誘導可能であった (データ略)。なお、得られた CD34+CD43+血液前駆細胞をセルソーターにて単離し、コロニー形成能を検討したところ、種々のコロニーが検出されたことから、iPS 細胞由来 CD34+CD43+ 細胞は血液多能性を有する未熟な血液細胞であることが示された。

D. 考察

iPS 細胞を研究へ応用する場合、iPS 細胞そのものではなく、iPS 細胞から特定の細胞に分化させる必要がある。本年度は、コントロールとして使用できる中胚葉 (血

管内皮細胞、血液細胞)への分化プロトコールの決定を目的に研究を行った。ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法については、EB 形成法が最も再現性の良いプロトコールであることが確認された。単層培養法(分散法・コロニー法)でも検討を行ったが、分散法については、細胞の接着が安定しないために、分化誘導効率は不安定であった。また、コロニー法についても安定的に血管内皮細胞を誘導できなかった。詳細な原因は不明であるが、コロニーの大きさ等は実験者の感覚・経験に委ねられているため、一般的なプロトコールとしては困難である可能性がある。一方、EB 形成法ではヒト iPS 細胞株や実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞を誘導可能であったことから、本分化誘導法は、コントロールとして使用可能な血管内皮細胞への分化誘導法となり得ると考えられた。

ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法についても、EB 形成法が最も再現性の良いプロトコールであることが確認された。共培養法では、iPS 細胞を単細胞に解離せず、塊のまま支持細胞上に播種する。播種するコロニーの大きさ等にはばらつきが生じるため、安定した結果が得られなかった。一方、EB 形成法では iPS 細胞を単細胞に解離し、一定の細胞数を播種するため、安定的な結果が得られたと考えられる。なお、iPS 細胞から血管内皮細胞および血液前駆細胞への分化誘導に使用する培地や、サイトカインやプレートをも更に改良することで分化効率が向上する可能性

もあるため、今後は EB 形成法を軸として、さらに再現性・安定性・有用性の高い分化誘導プロトコールの確立を行っていく予定である。

E. 結論

胚様体形成法を用いることにより、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞を分化誘導可能であったことから、胚様体形成法はコントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコールとなり得る可能性が示された。これらの結果は、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞を用いた創薬研究の基盤技術となることが期待される。

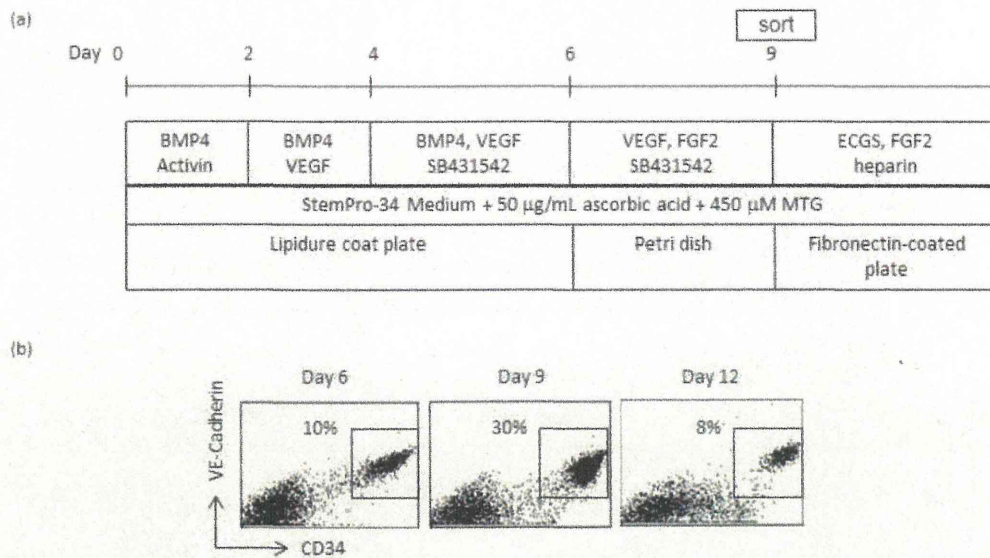


Figure 1 Differentiation of CD34+VE-Cadherin+ cells from human iPS cells by EB formation. (a) Differentiation protocols. (b) Proportion of CD34+VE-Cadherin+ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry.

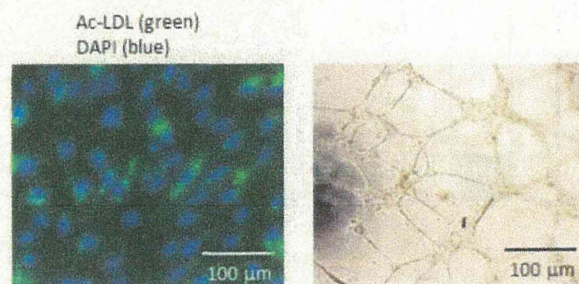


Figure 2 Characterization of human iPS cell-derived endothelial cells. (a) Morphology of human iPS cell-derived endothelial cells. (b) The expression of endothelial marker was examined by immunostaining. (c) Ac-LDL uptake assay (left) and Matrigel tube formation assay (right) were performed.

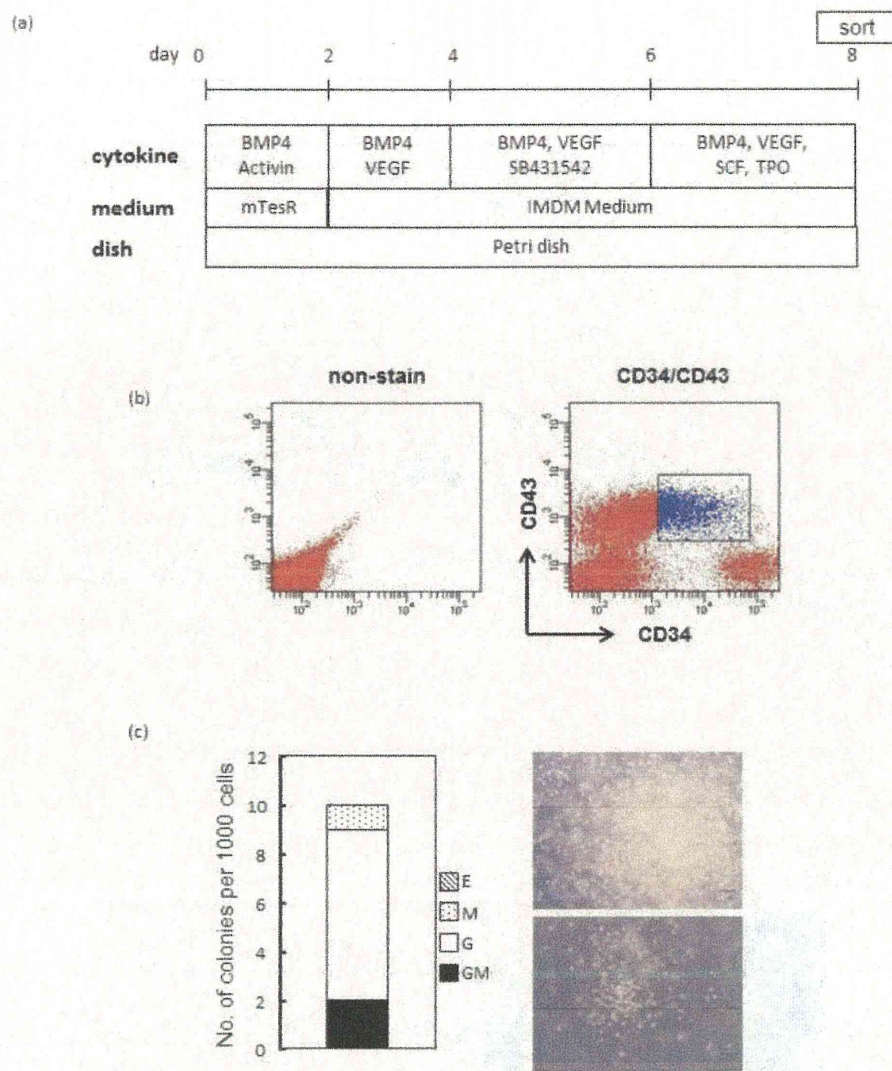


Figure 3 Differentiation of CD34⁺CD43⁺ cells from human iPS cells by EB formation.
 (a) Differentiation protocols. (b) The proportion of CD34⁺CD43⁺ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry. (c) Sorted CD34⁺CD43⁺ cells were subjected to CFU-C assay. E, M, G, and GM stand for colony containing erythroid cells, monocytes, granulocytes, and granulocytes and monocytes, respectively.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., Kawabata K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)
2. Taura A., Furuta K., Yamaguchi T., Kawabata K., Tanaka S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfi1 and Gfi1b, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.*, in press
3. 山口朋子、川端健二、iPS 細胞由来マスト細胞を用いた難治性疾患の新規治療薬開発へ向けて、*Biophilia 電子版*、2、21-25 (2013)

2. 学会発表

- 1 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: *In vitro* 血液脳関門モデルの構築を目的としたヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 2 平林玲子、山口朋子、田代克久、池田由美、水口裕之、川端健二: メチルセルロース法を用いたヒト ES/iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞へ

の分化誘導; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日

- 3 山口朋子、田代克久、池田由美、田中智之、水口裕之、川端健二: Wnt シグナルによるマスト細胞の成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 4 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling; 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11-13 日
- 5 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: 血液脳関門モデルの構築を目指したヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 6 山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関する新規因子の同定; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 7 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞の作製に関する基礎的検討; 第 14 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム、東京、2013 年 6 月 1 日
- 8 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells: 第

11 回幹細胞シンポジウム、東京、2013
年 5 月 17-18 日

川端 健二、田代 克久
多能性幹細胞から脳血管内皮細胞を製造
する方法

G. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号：特願 2014-038105

1. 特許取得

出願日：平成 26 年 2 月 28 日

川端健二、山口朋子

成熟マスト細胞の作製方法及び得られた
成熟マスト細胞

2. 実用新案登録

該当なし

出願番号：特願 2013-103582

3. その他

出願日：平成 25 年 5 月 15 日

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

iPS 細胞由来分化細胞の品質の検証

研究分担者 山田 弘

（独）医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト

プロジェクトリーダー

研究要旨：iPS 細胞の創薬への応用に関する研究が精力的に行われている中、iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞に関する品質管理技術の確立が急務となっている。本分担研究の目的は、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースの情報を活用し、当データベースに蓄積されたヒト初代培養肝細胞と iPS 細胞由来分化細胞の薬剤応答性トランスクリプトームデータをインフォマティクス手法で比較解析することにより、iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞の品質変動に関わる要因を明らかにすることである。本年度は、iPS 細胞由来分化肝細胞の品質検証に用いる化合物の選択及び検証データを取得するための実験条件の確立を目指した研究を行った。具体的には、(1) トキシコゲノミクスデータベースに登録されている 166 種の化合物の中から検証に適していると考えられる化合物の選択、(2) 検証の対象とする遺伝子プローブの絞り込み、(3) 検証実験における化合物曝露条件の設定を行った。その結果、3 種の実験条件でデータを取得することにより、目的とする遺伝子変動の約 45 %が検出可能であることが示された。今後、上記条件の最適化、iPS 細胞由来分化細胞からの薬剤応答性トランスクリプトームデータ取得などを行い、品質評価系の確立を目指す。

研究協力者 五十嵐芳暢

プロジェクト研究員

iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞を創薬に応用するためには、それら細胞の性状を明らかにするとともに、安定した品質の確保が不可欠となる。

研究協力者 中津 則之

プロジェクト研究員

本研究事業は、iPS 細胞の品質を変動させる要因を明らかにするとともに、実用化に向けて開発が進んでいる培養技術の標準化を目指し

A. 研究の目的

ている。この中で本分担研究は、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースの情報を活用し、当データベースに蓄積されたヒト初代培養肝細胞と iPS 細胞由来分化細胞の薬剤応答性トランスクリプトームデータをインフォマティクス手法で比較解析することにより、iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞の品質変動に関わる要因を明らかにすることを目的としている。トキシコゲノミクスデータベースには、医薬品を中心とした約 170 種の化合物をヒト初代培養肝細胞に曝露した際の遺伝子発現情報が蓄積されている。データベース構築においてはヒト肝細胞を用いているが、曝露した化合物の多くは薬効メカニズムが知られた医薬品であることから、単に肝毒性に関わる遺伝子発現変化だけでなく、薬理作用に起因した変化も捉えられる可能性がある。従って、まずは肝細胞の特性に着目した研究を進めるが、次の段階では肝細胞で得られた知見の他臓器細胞への応用についても検証を行う。

B. 研究の方法

(1) 品質評価データ取得に用いる化合物の選択

トキシコゲノミクスデータベースにデータが登録されている 166 種の化合物をヒト初代培養肝細胞に曝露した際の遺伝子発現情報を解析し、これらの化合物の中から様々なシグナル伝達、及び肝細胞の機能の特徴づける薬物代謝酵素や肝毒性パスウェイに関わる遺伝子発現において顕著な変動を誘発する化合物を検索

した。

(2) 検証の対象とする遺伝子プローブの抽出

トキシコゲノミクスデータベースに格納されている遺伝子発現データは、アフィメトリクス社のマイクロアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0 array) を用いて取得しており、1 マイクロアレイあたり 54,675 個のプローブセットが搭載されている。これらのプローブセットの中から検証の対象とする遺伝子プローブの抽出を行った。

方法は、54,675 個のプローブセットのアノテーション情報を整理し、これらの情報からシグナル伝達及び肝臓の機能の特徴付けると考えられる薬物代謝酵素などに関わる遺伝子 (プローブセット) を抽出した。

(3) 検証実験における化合物曝露条件の設定

(1) で選択した化合物については、それぞれ 3~4 用量、曝露後 2~3 時点 (2、8、24 時間) のデータが取得されている。品質評価を行う上で全ての条件におけるデータを取得することは、効率性及び費用の面から考えても有効な方法とは言えない。従って、実験条件を絞り込むための検討を行った。

方法は、(1) で選択した化合物の全遺伝子発現データから、(2) でリスト化したプローブセットに関わるデータを抽出し、そ

れらの中で溶媒対照に対して有意に発現変動している遺伝子の数を全ての化合物、時点、用量の組合せ（実験条件）についてカウントした。なお、上記解析における有意な発現変動は、溶媒対照群に対して変動幅が1.5倍以上もしくは0.667倍以下かつPA consistency 値が1の場合とした。最後に、最も変動遺伝子数の多い実験条件から順に並び換え、さらに上位の実験条件ではカバーできない遺伝子の変動をより多く検出できる実験条件が上位となるように並び換えた。

（倫理面への配慮）

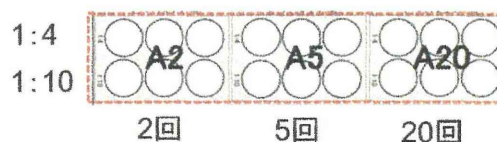
本研究では、ヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究を実施する場合には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、その他の研究は「臨床研究に関する倫理指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。また、コントロール細胞として使用するヒトES細胞使用研究に関しては「ヒトES細胞の使用に関する指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた規定を遵守して研究を遂行する。動物実験については、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに各研究機関の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施するものであり、倫理審査の承諾を得て行う。これらを含めて、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については研究開始前に所定

の手続きを行う。将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、研究を推進する。

C. 研究結果

（1）品質評価データ取得に用いる化合物の選択

トキシコゲノミクスデータベースにデータが登録されている166種の化合物の中から、ヒト初代培養肝細胞に曝露した際、様々なシグナル伝達、あるいは肝細胞の機能の特徴づける薬物代謝酵素や肝毒性パスウェイなどに関わる遺伝子に対して顕著な変動を誘発する化合物として、以下の10種の化合物を選択した。



- ①イソニアジド、②フェノバルビタール、③バルプロ酸、④オメプラゾール、⑤エチオニン、⑥メタピリレン、⑦コルヒチン、⑧カフェイン、⑨テオフィリン、⑩ヒトインターフェロン α

（2）検証の対象とする遺伝子プローブの抽出

全54,675個のプローブセットのアノテーション情報を整理し、これらの情報から様々なシグナル伝達、あるいは肝細胞の機能の特徴づける薬物代謝酵素や肝毒性パスウェイなどに関わる遺伝子に関わる2,146個のプローブセットを抽出し

た。

(3) 検証実験における化合物曝露条件の設定

化合物 10 種、時点数 2~3、用量段階 3~4 の全ての組合せについて、

(2) で抽出した 2,146 個のプローブセットの発現変動を解析し、最も遺伝子変動数の多い組み合わせから順に並び変え、さらに上位の実験条件ではカバーできない遺伝子の変動をより多く検出できる実験条件が上位となるように並び換えた。その結果、得られた上位 1 種の実験条件 (化合物・時点・用量) では 2,146 個のプローブセットのうち 575 個 (26.8%)、上位 2 種の実験条件では 833 個 (38.8%)、上位 3 種のプローブセットでは 971 個 (45.2%) のプローブセットの有意な発現変動を検出することができた。なお、上位 25 種まで実験条件を拡大した場合の検出は 1,290 プローブセット (60.1%) であり、必ずしも実験条件の設定数と検出率は比例関係には無かった。

上位 3 種の実験条件では 21 種のチトクローム P450 遺伝子の発現変動が検出できることを確認した (図 1)。

D. 考察

本年度は、iPS 細胞由来分化肝細胞の品質検証に用いる化合物の選択及び検証データを取得するための実験条件の確立を目指した研究を行った。実験条件を幅広く設定し、より多くのデータを取得すればそれに伴って検出力は向上すると考えられるが、効率性及び費用の面か

ら考えると有効な方法とは言えない。従って、品質評価を行うための実験条件をどの程度まで絞り込むことが可能か検討を行った。その結果、3 種の実験条件を設定してデータを取得することにより、目的とする約 45% の遺伝子変動が検出でき、これらの遺伝子変動の中には 21 種のチトクローム P450 遺伝子が含まれていることを確認した。一方で、実験条件を上位 25 種まで拡大してもカバー率は 60% 程度であり、極端な改善は認められなかった。

今後は、さらに多くの情報が得られ、且つより限定された実験条件の設定について検討を行うとともに、iPS 細胞由来分化細胞からの薬剤応答性トランスクリプトームデータ取得などを行い、品質評価系の確立を目指す。

E. 結論

iPS 細胞由来分化肝細胞の品質検証に用いる化合物の選択及び検証データを取得するための実験条件の確立を目指した研究を行い、目的とする遺伝子のうち 21 種のチトクローム P450 遺伝子を含む約 45% の遺伝子に対する発現変動を検出できる実験条件の設定を達成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okubo S., Miyamoto M., Takami K., Kanki M., Ono A., Nakatsu N., Yamada H., Ohno Y. and Urushidani T., Identification of novel liver-specific mRNAs in plasma for biomarkers of drug-induced liver injury and quantitative evaluation in rats treated with various hepatotoxic compounds, *Toxicol. Sci.*, **132**(1), 21-31, 2013

Nyström-Persson J., Igarashi Y., Ito M., Morita M., Nakatsu N., Yamada H., Mizuguchi K., Toxygates: Interactive Toxicity Analysis on a Hybrid Microarray and Linked Data Platform, *Bioinformatics*, **29**(23), 3080-3086, 2013

Uehara T., Horinouchi A., Morikawa Y., Tonomura Y., Minami K., Ono A., Yamate J., Yamada H., Ohno Y. and Urushidani T., Identification of metabolomic biomarkers for drug-induced acute kidney injury in rats, *J. Appl. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表

【招待講演】

山田弘, 第28回日本薬物動態学会年会, 日本TDM学会&日本薬物動態学会共催シンポジウム 医薬品適正使用における薬物動態・毒性インフォメーションの有効活用(東京),

2013.10

前川京子, 齊藤公亮, 山田弘, 斎藤嘉朗, 医薬品化合物によるリン脂質症の解析, 日本薬学会第134年会, メタボロミクスの食品・環境分野への新展開(熊本), 2014.3

【ポスター発表】

五十嵐芳暢, 中津則之, 山田弘, 免疫系に作用する化合物群の予測モデル構築, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

大村功, 森川裕二, 上原健城, 林仁美, 三森国敏, 南圭一, 神吉将之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, 肝発がんにおけるDNAメチレーションと遺伝子発現の関連, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

南圭一, 上原健城, 近藤千晶, 大村功, 神吉将之, 堀之内彰, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, ラット腎におけるmiRNA発現と腎障害モデルにおける変動の比較検討, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

花房弘之, 森川裕二, 上原健城, 兼藤雅子, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, マルチプレックスイムノアッセイによるラット肝障害時のサイトカイン変動解析, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

Nakayama S., Kiyosawa N., Morikawa Y., Ito K., Kazunori F., Takuya M., Kobayashi Y., Nishiya T., Yamada H., Ohno Y., Urushidani T., Takasaki W. and Izumi T., Identification of the gene transcript associated with formation of the drug covalent binding to

macromolecules, 第 28 回日本薬物動態学会年会(東京), 2013.10.

坂手龍一, 深川明子, 平田誠, 山下智也, 山田弘, 高橋一朗, 増井徹, 創薬・疾患研究をサポートする医薬基盤研究所のデータベース, 科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター主催: トーゴの日シンポジウム2013(東京), 2013.10.

五十嵐芳暢, Johan T. Nystrom-Persson, 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxygates, トキシコゲノミクスデータと linked data の統合解析プラットフォーム, 科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター主催: トーゴの日シンポジウム2013(東京), 2013.10.

齊藤公亮, 前川京子, 浦田政代, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 田島陽子, 大野泰雄, 中津則之, 山田弘, 斎藤嘉朗, メタボロミクスを用いた肝臓性リン脂質症の血中バイオマーカー探索, 第 34 回日本臨床薬理学会(東京), 2013.12.

五十嵐芳暢, 中津則之, 山田弘, イソフルラン, ジエチルエーテル, ペントバルビタールが麻酔剤としてラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響についての検討, 第7回次世代アジュバント研究会(大阪), 2014.1.

Omura K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A., Ohno, Y., Urushidani, T., Comprehensive DNA methylation and gene expression study on livers using 2-stage hepatocarcinogenesis model in rats, 53rd Society of Toxicology Annual Meeting (Phoenix, US), 2014.3.

齊藤公亮, 前川京子, 浦田政代, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 中津則之, 山田弘, 斎藤嘉朗, 脂質メタボロミクスを用いた薬剤性リン脂質症の肝バイオマーカー探索, 日本薬学会第 134 年会(熊本), 2014.3.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1 上位3種の実験条件における代表的な薬物代謝酵素関連遺伝子の発現変動

Probe_Set	Gene_Symbol	Gene_Title	Sample1	Sample2	Sample3
205402_at	CYP17A1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, pol	1.587	0.740	4.229
207246_at	UGT2B17	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polype	1.313	0.755	0.365
205766_at	CYP3A6	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	5.212	1.387	0.771
208596_s_at	UGT1A1 // UGT UDP glucuronosyltransferase 1 family, polype		0.682	0.334	0.832
216607_s_at	CYP51A1 // LRFcytochrome P450, family 51, subfamily A, pol		1.028	1.272	2.302
1553977_a_at	CYP39A1	cytochrome P450, family 39, subfamily A, pol	1.042	0.440	0.884
214320_x_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.252	0.609	2.027
202436_s_at	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, poly	1.570	4.888	1.568
216026_x_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.749	0.222	1.075
211295_x_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.119	0.948	1.993
1554837_a_at	CYP4A11 // CYPcytochrome P450, family 4, subfamily A, poly		0.411	0.411	0.209
205676_at	CYP27B1	cytochrome P450, family 27, subfamily B, pol	0.862	1.000	0.506
204532_x_at	UGT1A1 // UGT UDP glucuronosyltransferase 1 family, polype		0.743	0.289	0.861
215126_s_at	UGT1A1 // UGT UDP glucuronosyltransferase 1 family, polype		0.692	0.232	0.774
216687_x_at	UGT2B15	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polype	0.691	0.154	0.162
207958_at	UGT2A1 // UGT:UDP glucuronosyltransferase 2 family, polype		1.231	0.722	1.534
214234_s_at	CYP3A6	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	3.387	1.425	0.692
205073_at	CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, poly	0.790	1.229	0.906
206754_s_at	CYP2B6 // CYPcytochrome P450, family 2, subfamily B, poly		1.776	1.094	4.628
202437_s_at	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, poly	0.886	4.612	1.499
217133_x_at	CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, poly	1.702	1.159	4.739
207126_x_at	UGT1A1 // UGT UDP glucuronosyltransferase 1 family, polype		0.716	0.280	0.827
1554931_at	CYP4A11	cytochrome P450, family 4, subfamily A, poly	0.437	0.907	0.301
216661_x_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.672	0.157	1.045
209975_at	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, poly	1.508	1.345	3.344
206153_at	CYP4F11	cytochrome P450, family 4, subfamily F, poly	0.855	1.750	1.753
206539_s_at	CYP4F12	cytochrome P450, family 4, subfamily F, poly	1.868	0.760	0.667
214421_x_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.644	0.150	1.099
214622_at	CYP21A2	cytochrome P450, family 21, subfamily A, pol	1.487	0.660	1.264
211231_x_at	CYP4A11	cytochrome P450, family 4, subfamily A, poly	0.190	0.189	0.380
1494_f_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.278	0.737	2.557
214236_at	CYP3A6	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	1.563	1.040	0.393
207244_x_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.490	1.707	2.470
209976_s_at	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, poly	1.722	1.429	3.833
214419_s_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.495	0.270	0.498
205998_x_at	CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	2.235	0.598	0.263
205999_x_at	CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	4.319	1.011	1.068
210272_at	CYP2B7P1	cytochrome P450, family 2, subfamily B, poly	1.933	1.196	2.493
210452_x_at	CYP4F2	cytochrome P450, family 4, subfamily F, poly	0.651	1.332	2.216
205939_at	CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	3.767	0.989	0.477
211682_x_at	UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polype	1.983	0.318	0.308
207608_x_at	CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, poly	0.816	0.659	0.740

脚注1) Sample: 実験条件(化合物・時点・用量)

脚注2) 赤は2倍以上、橙は1.5倍以上2倍未満、青は0.5倍未満、緑は0.5倍以上0.667倍未満、灰はPA consistencyが0(変動倍率の信頼性が低い)であることを示す。

分担研究報告書

iPS 細胞等の代謝解析

分担研究者 竹森 洋

所属 独立行政法人医薬基盤研究所

研究要旨： 細胞のエネルギー獲得方法は主に2つあり、1つは解糖系でもう1つはミトコンドリア内での酸化的リン酸化反応である。前者は酸素を利用せず、後者は利用する。iPS 細胞は急速に増殖するためのエネルギーを主に解糖系から得ているが、一部分化してしまった iPS 細胞集団のエネルギー代謝がいかなるものかは詳細には調べられていない。本研究では、iPS 細胞集団の質を評価するための細胞内エネルギー代謝測定法の確立を目指す。

A. 研究目的

質の良い iPS 細胞は急速に増殖するために、解糖系を主に利用して生体エネルギーである ATP を合成している。解糖系の一部は核酸合成やグルタチオン合成とも連動しており、細胞増殖に適している。一方、解糖系で合成できる ATP は僅かであるという欠点を有する。反対に、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化は、大量の ATP を合成できる反面、酸素を必要とし有害な活性酸素の発生原因となりうる。そのため、iPS 細胞におけるミトコンドリアの活性化は DNA 等の損傷に繋がる可能性もあり、質に影響を及ぼす要因となりうる。本研究では、解糖系を利用して増殖するヒト iPS 細胞のエネルギー産生能を ATP 合成以外も含めて評価することで、ヒト iPS 細胞の品質管理基準作成に役立つ項目を選出することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞のエネルギー代謝との比較のためにマウス肝臓由来培養細胞

AML-12 (ATCC から入手) を利用した。AML-12 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium / F-12 (DMEM/F-12: Wako 社) に、10%胎児血清、1 X ITS サプリメント (Invitrogen 社)、1 X アンピシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。解糖系の NADH は WST-8 (Dojin 社) を、ミトコンドリアの NADH は MTT-assay Kit (Roche 社) を利用した。ATP の測定は、Luciferase-kit (Toyo Ink 社) を利用した。

細胞外酸素消費量と乳酸分泌量 (細胞外酸性度速度) の測定には Flax-analyzer XFe24 (Seahorse 社) を利用し、ミトコンドリアの膜電位の測定には JC-1 (Invitrogen 社) で染色した。

ヒト iPS 細胞は、医薬基盤研究所・ヒト幹細胞応用開発室で培養された細胞を利用した。

(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞の利用は医薬基盤研究所倫理委員会の承認の元で行った。

C. 研究結果

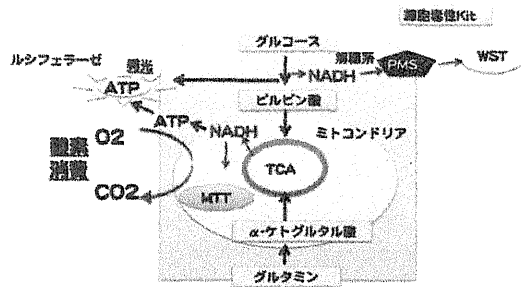


図1 細胞毒性 Kit を活用した細胞内エネルギー代謝測定系

図1に今回利用した細胞内のエネルギー代謝測定法の原理を示す。NADHは解糖系とミトコンドリアの双方で合成されるが、双方間での行き来はできない。細胞質側はWST-Kitで測定でき、ミトコンドリア側はMTT-Kitで測定できる。これは、WSTは細胞透過性が少ないため、WSTへの電子供給にPMSを利用するが、このPMSがミトコンドリアへは入らないためである。単離したミトコンドリアでもPMSの還元はできないが、ミトコンドリアを0.1%のTritonX-100で処理するとミトコンドリア内のNADHでPMSが還元されることからPMS-WST検出系は解糖系に特化できると結論した。反対に、MTT試薬はすばやくミトコンドリアに集積し、NADHで還元されるため、細胞質側の影響を受けず、ミトコンドリアで産生されるNADHのみを測定できると考える。

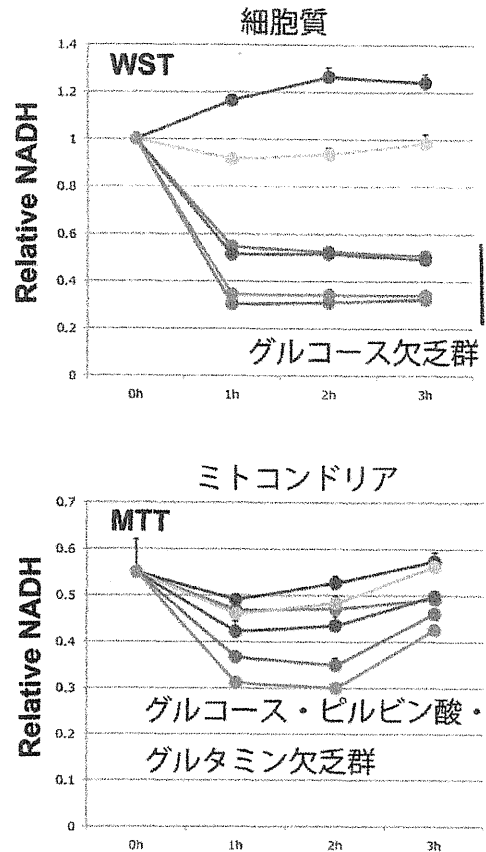


図2 WSTとMTT-kitの特性

実際にWSTとMTTで細胞にエネルギーの代謝の場を検出し分けることができるか否かを検討した(図2)。グルコースを欠乏させると、解糖系が低下し、そこで産生されるNADHも低下するはずである。事実、AML-12細胞をグルコース欠乏にすると、WSTで検出される値が低下した。他の重要な細胞エネルギー源(ピルビン酸・グルタミン)を欠乏させると、その値はさらに低下した。このことから、WSTは確かに解糖系で産生されるNADHを検出していると結論した。

一方、MTTで検出されるNADHはグルコース・ピルビン酸・グルタミン欠乏培地において最も低下した。これらは、全てミトコンドリアでのNADH産生に利用されるエネルギー源になり得るためである。

また、エネルギー源欠乏後 2 時間からは MTT で検出される値が上昇に転じた。このとき、脂肪燃焼阻害剤を加えておくと、この上昇は阻害されることから、ペーター酸化を検出していると示唆された。ペーター酸化もミトコンドリアで NADH 産生を行うことから、本系は細胞内エネルギー代謝、とりわけ解糖系とミトコンドリア利用比率を予測するには十分な系と結論した。

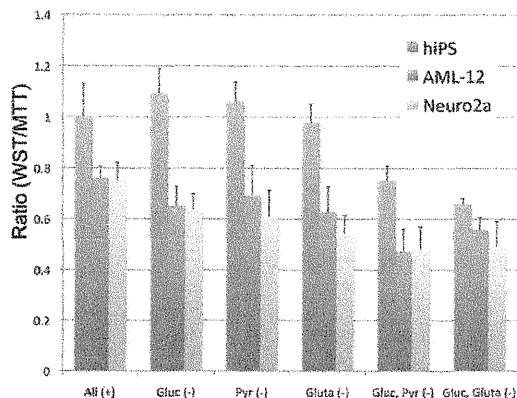


図 3 NADH 量の解糖系 (WST) / ミトコンドリア (MTT) 比率。AML-12 肝臓細胞、Neuro2a 神経芽細胞。Gluc、グルコース; Pyr、ピルビン酸; Gluta、グルタミン

そこで、ヒト iPS 細胞での評価を行った。予想した様に、WST で検出される NADH が高く、MTT 側は低い結果となった (図 3)。WST と MTT の呈色数値が NADH 量一致しない (MTT 側は NADH で検量線を作成できない) ことから、評価には、AML-12 細胞や Neuro2a 神経芽細胞の結果との相対比較とした。ヒト iPS 細胞の WST/MTT 比はグルコースを欠乏させた培地でも高く、なんらかの方法で解糖系を絶えず利用していることが示唆された。また、ヒト iPS 細胞で維持される解糖系はグルコースと同時にピルビン酸やグルタミンを除くと低下した。これは、他の細胞種 (分化細胞) はミトコンドリアへピルビン酸を供給するために解糖系が必要であるのに対して、ヒト iPS 細胞では、最低限のミトコンドリア活性が解糖系の維持に必要と予想される。また、この解糖系維持作用には、

グルタミンが重要である。さらに、MTT の検出値はヒト iPS 細胞を維持するためのフィーダー由来の値も僅かではあるが含まれていることから、MTT 検出値はフィーダーや質が低下した iPS 細胞の双方に由来するものと予想する。

続いて、酸素消費量を元にした検討を行った。

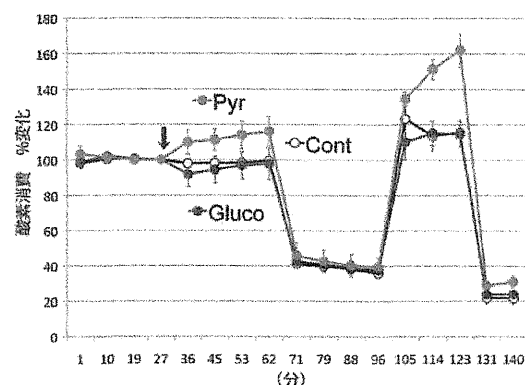


図 4-1 酸素消費量の変化 (ミトストレステスト: AML-12 細胞)

図 4-1 は、AML-12 細胞を Flax-analyzer で酸素消費量を検出した際の結果である。AML-12 細胞をあらかじめエネルギー源を低下させた (0.625mM グルコース/0.5mM グルタミン) 培地で馴化し、矢印部分で解糖系を亢進させるために 25mM グルコースを、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化を亢進させるためには 10mM ピルビン酸を添加し酸素消費量の変化を検討した。結果として、グルコースとピルビン酸で酸素消費量変化が反対に推移した。また、解糖系の指標である培地の酸性度変化量指標も酸素消費とは反対に推移した (図 4-2)。

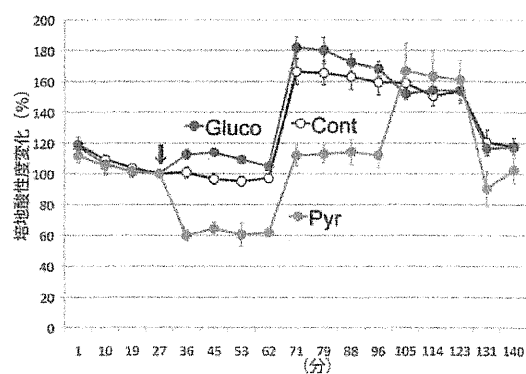


図 4-2 培地酸性度 (解糖系指標) の変化 (ミトストレステスト: AML-12 細胞)

そこでヒト iPS 細胞で同様な検討を行った。培地の酸性度変化量指標に顕著な差が検出されたことから、ヒト iPS 細胞はグルコースを主なエネルギー源として利用し、解糖系を最大限活用していることが再確認できた。肝臓の AML-12 細胞がグルコース添加で 120% ほど解糖系が亢進するのに対して、ヒト iPS 細胞は 250% まで解糖系が上昇した。

また、ヒト iPS 細胞の解糖促進作用は、iPS 細胞の継代に必要な特殊培地で増強されることも確認できた (図 5)。これらのことから、Flax-analyzer がヒト iPS 細胞の解糖系維持能力 (品質) を評価するために有用であることが示された (図 5)。

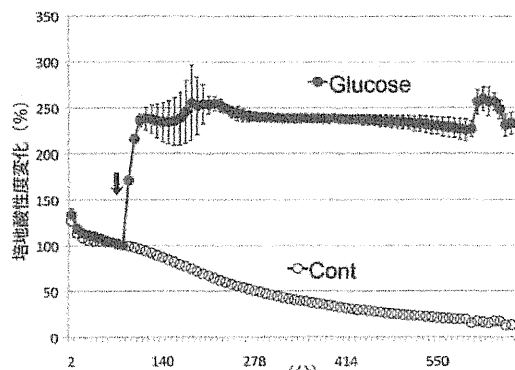


図 5 培地酸性度(解糖系指標)の変化 (ミトストレステスト:ヒト iPS 細胞)

最後に、ミトコンドリアの膜電位に関して検討を行った (図 6)。ミトコンドリアを蛍光染色するための指示薬を複数試験したところ、JC-1 が有効であることが示唆された。JC-1 は生細胞と死細胞を区別するための指示薬であり、元々は緑の蛍光を呈し、死細胞内ではそのまま緑の蛍光を発する。一方、JC-1 は膜電位が存在する (生細胞でのミトコンドリア膜) と、重合し赤色の蛍光を呈する。ミトコンドリア機能が十分であると細胞内が赤色蛍光を発することとなる。AML-12 細胞で、ミトコンドリアでの ATP 合成を阻害し、ATP 合成に必要な H^+ (プロトン) を停滞させ

ると、JC-1 の赤色蛍光強度が上昇した。反対に、ミトコンドリア機能を停止させると、赤色蛍光は低下した。

同様な方法でヒト iPS 細胞でも検討した。その結果、ヒト iPS 細胞は JC-1 で染色されず、ミトコンドリアは最低限しか利用されていないことが確認できた。

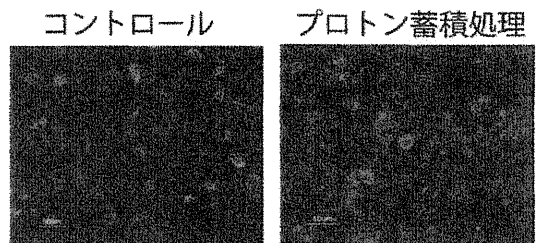


図 6 JC-1 によるミトコンドリア膜電位の変化の検出

D. 考察

本研究ではヒト iPS 細胞を利用するにあたり、細胞のエネルギー代謝面で標準化指標として活用できる可能性のある方法を抽出した。いずれの方法も低侵襲性であり、簡便である。Flax-analyze は機器としての利用とはなるが、酸素消費および酸性度指標は低侵襲性の液体試薬も販売されており、他の方法同様に簡便に評価できると期待される。また、細胞内エネルギー代謝の応用は、ヒト iPS 細胞を分化させる評価にも応用可能であり、既に多くの報告例がある。今後、ヒト iPS 細胞においても、細胞内エネルギー代謝変化を活用した品質基準値作成が重要になると予想される。

E. 結論

ヒト iPS 細胞の品質管理に細胞内エネルギー代謝の指標が有効であることが示唆された。

F. 参考文献

1) Popov S*, Takemori H*, Tokudome T, Mao Y, Otani K, Mochizuki N, Pires N, Pinho MJ, Franco-Cereceda A, Torielli L, Ferrandi M, Hamsten A, Eriksson P, Bertorello AM, Brion L. (* equally contributed)

Lack of SIK2 prevents the development of cardiac hypertrophy in response to chronic high-salt intake

PLoS ONE 9:e95771 (2014)

2) Tang HM, Gao WW, Chan CP, Siu YT, Wong CM, Kok KH, Ching YP, Takemori H, Jin DY

LKB1 tumor suppressor and salt-inducible kinases negatively regulate human T-cell leukemia virus type 1 transcription.

Retrovirology. 10: 40, 2013

3) 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

4) Yu J, Hu X, Yang Z, Takemori H, Li Y, Zheng H, Hong S, Liao Q, Wen X. Salt-inducible kinase 1 is involved in high glucose-induced mesangial cell proliferation mediated by the ALK5 signaling pathway.

Int J Mol Med. 32: 151-157, 2013

5) 伊東祐美、竹森 洋

注目の病態因子「AMPK」

分子脳血管病 12: 290-294, 2013

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S.

Prostaglandin E promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase.

Nat Commun. 4:1685, 2013

2. 学会発表

1) Ito Y, Sanosaka M, Kumagai A, Takemori H, Fuchino H, Kawahara N, Doi J, Ota M.

Effects of Pterosin B from *Pteridium Aquilinum* on the blood glucose level in db/db mice.

The EMBO meeting (AMSETDAM)
2013年9月22日

2) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Ito Y, Kumagai A, Naka T, Takemori H. SIK3 regulates pro-inflammatory cytokine expression in mouse macrophage.

2013 ASCB Annual Meeting (New Orleans) 2013年12月15日

3) Tang HM, Gao WW, Chan CP, Siu YT, Wong CM, Kok KH, Ching YP, Takemori H, Jin DY

Metformin inhibits human T-cell leukemia virus type 1 transcription through activation of LKB1 and salt-inducible kinases

16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses (Montreal) 2013年6月23日

RETROVIROLOGY 2014 11(Suppl 1) P112

4) 川村知裕, 舟木壮一郎, 中桐伴行, 新谷 康, 井上匡美, 澤端章好, 南 正人, 杉村康司, 飯田修, 淵野裕之, 川原信夫, 竹森 洋, 奥村明之進

カルノソール・カルノソール誘導体による酸化ストレスに対する臓器保護
第194回近畿外科学会 (大阪) 2013年11月9日

5) 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、竹森 洋、淵野裕之、土居純子、太田美穂

ワラビPterosinのdb/dbマウスにおける血糖値低下作用

第67回日本栄養・食糧学会 (名古屋)
2013年5月24日

6) 津田正明、福地守、高崎一朗、竹森 洋、田淵明子 Gタンパク質共役型受容体GPCR活性化によるCa²⁺/カルシニューリン経路を介した活動依存的な遺伝子発現制御系に関する解析

Neuro 2013 (京都) 2013年6月21日

7) 竹森 洋

疾患モデルマウスを活用した評価系
地域資源の高度利用を図るバイオリフ
ァイナリーの基盤形成とその実用化セ
ミナー (東京) 2013年12月20日

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 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)
- 2) 特願 2013-135040 「プレロシン誘導
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. 特許登録

- 1) 特許第 5498754 号 「肝機能の保護・
改善薬」河原秀久、長岡康夫、竹森 洋、
小出芳栄 (学校法人関西大学、独立
行政法人医薬基盤研究所、有限会社一
栄)

3. 実用新案

該当せず

4. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

研究報告書

iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究

分担代表者 櫻井 文教

大阪大学大学院 薬学研究科

分子生物学分野 准教授

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的にヒト iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足がヒト iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明することを目的としている。本研究において、我々はヒト iPS 由来肝細胞を用いた創薬研究を目指す研究者らがコントロールとして使用できる再現性の高い肝細胞への分化プロトコルを策定したのち、様々な品質のヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導能の評価を行う予定である。本年度は、これまでに論文発表されている代表的な肝細胞への分化プロトコルの収集を行い、我々のプロトコルへのフィードバックに着手した。

研究協力者

水口裕之 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

高山和雄 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は創薬過程において薬効評価および毒性評価等への応用が期待されている。高品質なヒ

ト iPS 細胞を安定的に供給するには高い水準の培養操作技術レベルを要する。そのため、研究者間でヒト iPS 細胞の品質が大きく変動することが深刻な問題となっている。ヒト iPS 細胞由来製品を創薬応用するには、再現よく分化誘導できる高品質なヒト iPS 細胞を培養する技術を開発することが急務である。本課題では、①(i)培養手技の違いが iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検証する。また、(ii)培養条件の違いによる品質変動を検証する。②