

201451020A

厚生労働科学研究委託費
医薬品等規制調和・評価研究事業

ヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞による再現性のある薬物代謝
酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験の開発
(H26-医薬 B- 一般-022)

平成26年度 委託業務成果報告書

研究代表者 石田 誠一

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）による委託業務として、国立医薬品食品衛生研究所（石田誠一）が実施した平成26年度「ヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞による再現性のある薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 総括報告書

- ヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞による再現性のある薬物代謝酵素・トランスポーター誘導性評価試験の開発 誘導性評価試験の開発 1
石田 誠一 (国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

II. 委託業務成果報告書 (業務項目)

1. iPS 細胞由来細胞の薬物代謝酵素等の誘導性の評価・品質基準の作成・性状解析
石田 誠一 (国立医薬品食品衛生研究所 薬理部) 11
2. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成 39
松永 民秀 (名古屋市立大学 大学院薬学研究科)
3. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成 43
糸 昭苑 (東京工業大学 生命理工学研究科)
4. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成 49
水口 裕之 (大阪大学 院薬学研究科)
5. ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の成熟化と誘導性の評価・品質基準の作成 53
梅澤 明弘 (国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター)
6. iPSC 由来細胞の性状解析と薬物代謝酵素等の誘導性予測モデルの構築 57
樋坂 章博 (千葉大学大学院 薬学研究院)

III. 学会等発表実績 59

IV. 研究成果の刊行物・別刷 67

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

研究の総括 ヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞による再現性のある薬物代謝酵素・トランスポーター等の薬物誘導性評価試験の開発

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 第三室長
石田 誠一

厚生労働省より公布予定の「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）」によると、薬物の *in vitro* 酵素誘導性試験ではヒト初代培養肝細胞（3 ドナー以上）を用いること、経口投与薬では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。しかし、試験に用いる細胞に関しては、未だ、肝臓細胞の場合はドナー間差（ロット差）や供給の不安定さ、小腸の場合は細胞標本の入手困難が問題となっている。本研究では、これら問題を克服する細胞資源として期待が寄せられているヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞を用いた、薬物代謝酵素やトランスポーター等の薬物による誘導を評価する試験法の開発を行う。本年度は、肝細胞では市販細胞における薬物酵素誘導性を検討し、CYP1A、CYP2C9、CYP3A4 の誘導能を有する細胞を見出した。腸管上皮細胞は分化誘導法の改良による成熟化を検討し、腸管上皮細胞の成熟化を促進する化合物を見出すことが出来た。また、分化誘導された腸管上皮細胞は腸管上皮細胞マーカーを発現しており、CYP3A4 の発現と $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 による誘導能が認められた。また、OECD ガイドライン案等を参考に薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手し、評価遺伝子 mRNA の測定法の規格化を進めた。

研究分担者		教授
松永 民秀	名古屋市立大学大学院薬学研究科・教授	A. 目的 厚生労働省より公布予定の「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）」によると、薬物の <i>in vitro</i> 酵素誘導性試験ではヒト初代培養肝細胞（3 ドナー以上）を用いること、経口投与薬では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。しかし、試験に用いる細胞に関しては、未だ、肝臓細胞の場合はドナー間差（ロット差）や供給の不安定さ、小腸の場合
桑 昭苑	東京工業大学生命理工研究科・教授	
水口 裕之	大阪大学大学院薬学研究科・教授	
梅澤 明弘	独立行政法人国立成育医療研究センター研究所再生医療センター・センター長	
樋坂 章博	千葉大学大学院薬学研究院・	

は細胞標本の入手困難が問題となっている。本研究では、これら問題を克服する細胞資源として期待が寄せられているヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞を用いた、薬物代謝酵素やトランスポーター等の薬物による誘導を評価する試験法の開発を行う。本年度は、肝細胞では市販細胞における薬物酵素誘導性、腸管上皮細胞は分化誘導法の改良による成熟化を検討した。また、薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手し、評価遺伝子 mRNA の測定法の規格化を進めた。

B. 研究方法

iPS 細胞由来肝細胞の培養

B 社、C 社より iPS 細胞由来肝細胞を入手した。培養は各社推奨するプロトコルに従った。50・M omeprazole (CYP1A2)、500・M phenobarbital (CYP2B6)、20・M rifampicin (CYP3A4) に曝露し、酵素誘導試験を行った。暴露期間終了後、RNA を回収し、各種遺伝子の発現を TaqMan probe による qPCR により測定した。

iPS 細胞の腸管上皮細胞への分化誘導

国立成育医療研究センターでヒト胎児肺繊維芽細胞(MRC5)より樹立された iPS 細胞株(Tic、Widndy) などを用いた。細胞の分化は、細胞免疫染色、FACS を用いて評価した。薬物代謝酵素誘導実験では、 1α -25-ジヒドロキシビタミン D_3 を曝露した。ペプチドの取り込み実験では、 β -Ala-Lys-AMCA (蛍光ラベルされたジペプチド) を 5% CO₂/95% air 条件下 CO₂ インキュベーター中 37° C でインキュベートした後、細胞内取り込みを顕微鏡下で観察した。電気膜抵抗値 (TEER) 測定実験では、24well のチャンバー (BD Falcon) 上で培養したヒト iPS 細胞小腸上

皮細胞および Caco-2 細胞における TEER 値を、Millicell (Merk millipore) を用いて測定した。

iPS 細胞由来肝細胞のゲノム DNA のメチル化解析

調製したゲノム DNA のメチル化の解析は The Infinium Methylation Assay (Human Methylation 450) により行い、検出および定量化されたメチル化部位のデータを用いて同一群内の相関解析および細胞種間のメチル化部位の比較を行った (GeneSpring GX12.0, Agilent 社)。

臨床試験の薬物相互作用の情報を小腸と肝臓の寄与を分離して評価する手法 (CR-Fg-IR 法) の開発

既報の臨床試験における相互作用による AUC と消失半減期の変化から、小腸における代謝の程度を評価する新しい方法 (DDI 法) (Hisaka A et al. Assessment of intestinal availability (FG) of substrate drugs of cytochrome p450s by analyzing changes in pharmacokinetic properties caused by drug-drug interactions. Drug Metab Dispos. 2014;42(10):1640-5) を拡張し、多数の臨床試験の文献報告の成績にギブスサンプリング法を適用することで、CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬について、小腸の代謝の程度に加えて、代謝の阻害の程度を一斉解析した。

誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

ヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG を用いた薬物代謝酵素誘導能評価に関する基礎データ収集として、OECD Test

Guideline を検討した。

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/CYP-induction-PBTG-final-for-WNT-comments.pdf>

quantitative PCR (qPCR)用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

ヒト肝臓由来 RNA は BioChain 社のものを用いた。

<倫理面への配慮>

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究の実施に際しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、および当機関で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する

C. 結果

iPS 細胞由来肝細胞の酵素誘導評価

B 社の細胞において、Omeprazole により CYP1A1 が 20.4 倍、CYP1A2 が 5.8 倍、Rifampicin により CYP2C9 が 1.7 倍、CYP3A4 が 2.7 倍の発現誘導が観察された (n=3)。これらの遺伝子の発現に関与するレセプターは、薬物の暴露により発現誘導することはなかった。C 社のデータは RNA の回収率が悪かったために、Rifampicin により誘導したサンプルは n=1、その他は n=2 による結果である。Omeprazole により CYP1A2 の発現が 2.1 倍、Rifampicin により CYP2B6 の発現が 1.8 倍高くなったが、n 数が少ないため、この誘導が有意なものであるかを判断することができなかった。その他の薬物代謝酵素、レセプター、トランスポーターの薬物暴露による発現誘導は観察されなかった。

iPS 細胞の腸管上皮細胞への分化誘導と機能評価

良好に未分化維持された MRC5-iPS 細胞を平面培養系において無血清培地により分化誘導を行った。その分化誘導体に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ腸管上皮様構造を確認した。その固定標本に対して腸管細胞マーカーである CDX-2 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、腸管上皮様構造に CDX-2 陽性細胞が認められた。同様に E-CADHERIN も陽性となり腸管上皮様組織構造をとることが示唆された。

ヒト iPS 細胞からの腸管上皮細胞への分化誘導方法の最適化を検討したところ、ある化合物を加えることにより、分化誘導の日数の短縮が認められ、小腸への分化誘導効率が有意に上昇した。さらに、この化合物を用いて分化誘導した小腸上皮細胞は薬物代謝酵素 CYP3A4 を発現する細胞に分化することを確認した。薬物暴露による誘導性を薬物代謝酵素 CYP3A4、トランスポーターとして P-gp (MDR1/ ABCB1) の発現を指標として評価した。ビタミン D₃ 暴露により、CYP3A4 mRNA 量が上昇した。一方、P-gp の mRNA 量についてはほぼ変動しなかった。トランスウエル上でタイトジャンクションを形成できるかどうか調べるために、細胞膜抵抗値を測定したところ、300 Ω・cm² 程度の値を示した。なお、コントロールとして用いた Caco-2 細胞では約 400 Ω・cm² であった。

分化の途中段階の細胞について解析を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞マーカーとしては CDX2 が指標とされるが、CDX2+細胞には SOX17+と SOX17-細胞が存在し、その中でも CDX2+SOX17+細胞が CYP3A4 や MDR1 などを発現する小腸上皮細胞へ分化することを見出した。また CDX2+SOX17-に関しては胎盤の細胞

へ分化することを見出した。したがって、これらの結果から、CDX2 というマーカー単独だけでは、真の小腸上皮とは言えないことが明らかになった。CDX2 と同時に SOX17 を評価に使用し、CDX2+SOX17+細胞を指標として評価すれば、真の小腸上皮細胞であるといえる。

臨床試験の薬物相互作用の情報を小腸と肝臓の寄与を分離して評価する手法 (CR-Fg-IR 法) の開発

DDI 法を拡張し、多数の臨床試験の文献報告の成績にギブスサンプリング法を適用することで、CYP3A の 28 基質薬と 13 阻害薬について、小腸の代謝の程度に加えて、代謝の阻害の程度を一斉解析した。その結果、CYP3A の多数の基質薬と阻害薬について、小腸と肝臓の阻害の程度を分離評価することに成功した。また、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。

iPS 細胞由来肝細胞のゲノム DNA のメチル化解析

ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞との比較解析を進めた。全プローブデータによる hierarchical clustering を実施したところ、それぞれの細胞が比較的近くに分類された。ヒト初代培養肝細胞は他の細胞と比べ、ドナー間差を反映してばらつきが大きかったが、大きな分類としては同じ分岐に分類されていた。

誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

EU で実施されたヒト初代培養肝細胞とヒ

ト肝細胞前駆細胞 HepaRG を用いた、チトクローム P450 (CYP) の誘導性試験に関する比較的大規模なバリデーション試験の結果に基づく OECD ガイドライン案 (OECE GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS : Draft Proposal for a New Performance Based Test Guideline : Human cytochrome P450 (CYP) n-fold induction in vitro test method) が公開された。ヒト iPSC 由来肝細胞の誘導性評価試験の雛形として、ガイドライン案を検討した。誘導評価のための被験物質としては、Prototypical inducers (・-naphthoflavone、phenobarbital、rifampicin)、Proficiency substances (carbamazepine、phenytoin、sulfonpyrazone、bosentan) を用いていた。その他の点に関して、FDA、EMA、厚生労働省より出されているガイドライン (案)、ガイダンスと比較すると、誘導の評価指標が OECD ガイドライン案では酵素活性を採用しているのに対し、その他のものは mRNA を採用していた。また、OECD ガイドラインでは化合物暴露による酵素誘導の評価に濃度依存性を考慮しており、その他とは判断基準がより細かいものとなっていた。

quantitative PCR (qPCR) 用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

リアルタイム PCR による遺伝子発現定量に用いる検量線の作成を検討した。BioChain 社より購入したヒト肝臓由来 RNA11 ドナー分を用いて、CYP3A4、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 の遺伝子発現を測定した。ドナー間で発現にばらつきがあった。そこで、特定のドナーの発現パターンに偏らないようにするため、複数のドナー RNA をプールして検量線用の RNA 標品とすることとした。

D. 考察

入手した iPS 細胞由来肝細胞はいずれも試験に用いる段階において、殆ど全ての細胞が敷石状の形状をしており、肝実質細胞へと分化していたと考えられる。B社の細胞では、Omeprazole による CYP1A2 の発現誘導と Rifampicin による CYP3A4 の発現誘導が観察され、薬物誘導性評価への応用に向けて期待できる結果が得られた。C社の細胞では、明確な薬物代謝の誘導は観察できなかったが、基底状態において高い代謝活性が観察された。このことより、培地を含めた培養条件の検討により、明確な薬物代謝の誘導が観察できる条件を見つけることができるかもしれない。

生体内腸管組織は粘膜層、粘膜下層、筋層、漿膜下組織、漿膜に分かれており、吸収、免疫、蠕動といった複雑な機能を有する臓器である。腸管組織は、発生・分化・機能において複雑な器官であるが、経口薬物代謝評価系構築のためにはその分化誘導系の構築は重要である。今回我々が見出した低分子化合物を用いて分化誘導させた細胞は、スクラーゼ-イソマルターゼをはじめとした腸管上皮細胞マーカーや P-gp、BCRP などの薬物トランスポーター、主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 を発現していた。また、形態学的にも敷石状で腸管上皮細胞に類似した形態を示していたことから、この分化させた細胞は腸管上皮細胞様細胞であることが示唆された。さらに、薬物代謝酵素活性やペプチドの取り込み能に加え、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 による誘導能も認められたことから、腸管上皮細胞に特異的な薬物動態学的機能を有する細胞であることも明らかとなった。以上のことから、我々がヒト iPS 細胞から作製した腸管上皮細胞様細胞は薬物の吸収や代謝だけ

でなく、誘導性評価のためのモデル細胞としての有用性が示された。

CYP3A の多数の基質薬と阻害薬について、今回新規に確立された CR-Fg-IR 法に従うことで小腸と肝臓の阻害の程度を分離評価することに成功した。その結果、グレープフルーツジュースでは阻害が小腸選択的におきていること、そのほかの阻害薬では一般に小腸における阻害は肝臓よりもやや弱いことが明らかとなった。今後、この評価法を CYP3A の誘導薬についても適用する予定であり、そこで小腸の誘導の寄与が明らかになれば、*in vitro* の情報からそれを予測する方法論の構築が始めて可能となる。

ゲノム DNA のメチル化の解析を進めた。ヒト初代培養肝細胞は他の細胞と比べ、ドナー間差を反映してばらつきが大きかったが、大きな分類としては同じ分岐に分類されており、ドナー間差があるがヒト初代培養肝細胞としてのゲノムメチル化パターンが抽出できると考えられた。

薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に関しては、OECD ガイドライン案に提示されている 7 種の化合物の誘導性評価における有用性を今後検討していく必要がある。また、FDA、EPA、厚生労働省から提示されている CYP 酵素誘導に関する薬物—薬物相互作用に関連するガイドライン（案）では酵素誘導を RNA で評価することが提案されている。一方、今回参考とした OECD ガイドライン案では代謝酵素活性を指標としている。酵素誘導の分子機構とも考え併せて、今後班内でディスカッションが必要と考える。

複数ドナーのヒト肝臓由来の市販 RNA をプールして用いることで、ヒト肝臓における発現量と相対的に発現比較ができるように測定系を設定した。今回作成した RNA プールを検量線に用いることで、相対的発現量が 1 前後の遺伝子は、ヒト成人肝臓での発現にほぼ相当すると考えられる。

E. 結論

細胞資源として期待が寄せられているヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞を用いた薬物代謝酵素やトランスポーター等の薬物による誘導を評価する試験法の開発を行った。その結果、本年度は、肝細胞では市販細胞における薬物酵素誘導性を検討し、CYP1A、CYP2C9、CYP3A4 の誘導能を有する細胞を見出した。腸管上皮細胞は分化誘導法の改良による成熟化を検討し、腸管上皮細胞の成熟化を促進する化合物を見出すことが出来た。また、分化誘導された腸管上皮細胞は腸管上皮細胞マーカーを発現しており、CYP3A4 の発現と $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミン D_3 による誘導能が認められた。OECD ガイドライン案等を参考に薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手し、評価遺伝子 mRNA の測定法の規格化を進めた。

F. 健康危機情報

該当事項なし。

G. 研究発表等

論文発表等

1) Zeiger E, Gollapudi B, Aardema MJ, Auerbach S, Boverhof D, Custer L, Dedon P, Honma M, Ishida S, Kasinski AL, Kim JH, Manjanatha MG, Marlowe J, Pfuhler S, Pogribny I, Slikker W, Stankowski LF Jr,

Tanir JY, Tice R, van Benthem J, White P, Witt KL, Thybaud V.: Opportunities to integrate new approaches in genetic toxicology: An ILSI-HESI workshop report. *Environ Mol Mutagen.*, 2014; doi: 10.1002/em.21923.

- 2) Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, Matsunaga T: Human small intestinal epithelial cells differentiated from adult intestinal stem cells as a novel system for predicting oral drug absorption in humans. *Drug Metab Dispos*, 2014; 42: 1947-1954.
- 3) Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T: Histone deacetylase inhibitors promote hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One*, 2014; 9: e104010.
- 4) Kondo Y, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Kanehama Y, Maki Y, Enosawa S, Kurose K, Iwao T, Nakamura K, Matsunaga T: Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014; 29: 407-413.
- 5) Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab*

- Pharmacokinet, 2014; 29: 237-243.
- 6) 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*, 2014; 29: 44-51.
- 7) 松永民秀, 岩尾岳洋: 多能性幹細胞 (ES 細胞, iPS 細胞) の利用. 薬剤学実験法 必携マニュアル-Pharmaceutical Scientist のために- II 生物薬剤学, 日本薬剤学会出版委員会編, 南江堂, 東京, 2014 年; p. 299-311.
- 8) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation”, *Human Embryonic Stem Cells*, 3rd Edition (Springer’s Protocols On Line series) (Edited by Kursad Turksen), in press
- 9) Umeda K, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in “iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation -Methods and Protocols” *Methods Mol Biol*. 2014 [Epub ahead of print]
- 10) Yamazoe T, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, *Methods Mol Biol*. 2014 Nov 20. Epub. in “ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition” [Epub ahead of print]
- 11) Shiraki N, Ogaki S, Kume S*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. *Rev Diabet Stud*. 11(1):102-14, 2014.
- 12) Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S. Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system. *J. Mol. Cell Biol*. 6, 394-408, 2014.
- 13) Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S*. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab*. 19, 780-794, 2014.
- 14) 白木伸明 糸昭苑 「ES/iP 細胞を用いた内胚葉細胞 (膵、肝、小腸) への分化誘導」 『iPS 細胞研究最前線-疾患モデルから臓器再生まで』 医学のあゆみ」 251, 1153-1159, 2014. (長船健二 編集)
- 15) 坂野大介 糸昭苑 「ES 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用」 『特集 器官の発生と再生の基礎』 公益財団法人金原一郎医学医療振興財団(医学書院) 生体の科学 65. 197-202, 2014. 6 月
- 16) 白木伸明 糸昭苑 「メチオニンの代謝はヒトの ES 細胞および iPS 細胞の未分化維持および分化を制御している」 First Author’s <http://first.lifesciencedb.jp/archives/8655>
- 17) Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F.: A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2014; 111: E5292-5301.
- 18) Higuchi A, Ling QD, Kumar SS, Munusamy MA, Alarfaj AA, Chang Y, Kao SH, Lin KC, Wang HC, Umezawa A.: Generation of

- pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab Invest.*, 2015; 95: 26-42.
- 19) Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y.: A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One.*, 2014; 9: e110496.
 - 20) Santostefano KE, Hamazaki T, Biel NM, Jin S, Umezawa A, Terada N.: A practical guide to induced pluripotent stem cell research using patient samples. *Lab Invest.*, 2015; 95: 4-13.
 - 21) Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A.: Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep.*, 2014; 4: 5421.
 - 22) Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, Suzuki H, Okada H.: The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.*, 2015; 87: 233-238.
 - 23) Ichida JK, TCW J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, Akutsu H, Meissner A, Eggan K.: Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol.*, 2014; 10: 632-639.
 - 24) Toyoda M, Umezawa A.: Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ J.*, 2014; 78: 1582-1583.
- 学会発表等
- 1) 石田誠一：iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬剤毒性評価技術の最前線、CPhI Japan 2015 (国際医薬品原料・中間体展) (2014, 4, 東京)
 - 2) 石田誠一：iPS 細胞由来肝細胞の創薬応用の現状とその有効活用のための周辺技術、日本組織培養学会 第 87 回大会 (2014, 5, 東京)
 - 3) 石田誠一：iPS 細胞由来肝細胞を用いた医薬品安全性評価、動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会 (2014, 9, 札幌)
 - 4) 石田誠一：ヒト iPS 細胞由来肝細胞の技術的課題、CBI 学会 2014 年大会 (2014, 10, 東京)
 - 5) Seiichi Ishida, Takashi Kubo, Yukie Kuroda, Su-Ryang Kim, Yuko Sekino : Evaluation of Human iPS cell-derived Hepatocytes for the Application to ADME/Tox Tests in Drug Development、CBI 学会 2014 年大会 (2014, 10, 東京)
 - 6) 石田誠一：肝臓の代謝酵素誘導評価法の確立、第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて (2014, 12, 東京)
 - 7) Matsunaga T, Utility of iPS cells for drug metabolizing enzyme expression. 29th JSSX Meeting - 19th North American ISSX joint meeting (2014. 10, San Francisco, CA, USA).
 - 8) 壁谷知樹, 岩尾岳洋, 小玉菜央, 中村克徳, 松永民秀：ヒト iPS 細胞由来小腸幹細胞の至適培養法の開発. 第 66 回日本生物工学会大会 (2014. 9, 札幌). 1) 白木伸明「ヒト iPS 細胞から効率的かつ安定に肝

- 臓を分化誘導する方法の開発」第11回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム『ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて』日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会 (H26. 12. 9. 東京)
- 9) 白木伸明『幹細胞から様々な機能細胞を分化誘導する試み』ワークショップ (原孝彦・糸昭苑オーガナイザー) 第37回日本分子生物学会 (H. 26. 11. 26 横浜)
- 10) 津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、糸 和彦、遠藤 文夫、糸 昭苑、「ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性」“S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human pluripotent stem cells” 第37回日本分子生物学会 (H. 26. 11. 26 横浜)
- 11) Ogaki S., Morooka M, Otera K and Kume S. “A cost effective intestinal epithelial differentiation system from human iPS cells”. Key Forum, Kumamoto 2014, 9, 5.
- 12) Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. “S-adenosyl methionine is crucial for maintaining human ES/ iPS cells” Key Forum, Kumamoto 2014, 9, 5.
- 13) Otera K, Ogaki S, Kume S. “Easy purification of human iPSC-derived immature intestinal epithelial cells.” Key Forum, Kumamoto 2014, 9, 5.
- 14) 糸昭苑「多能性幹細胞から消化器官を創る」New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 平成 26 年 7 月 12 日 (東京)
- 15) Shoen Kume Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation. “Diabetes” session. ISSCR, 2014, June 20. Oral presentation (Vancouver)
- 16) Kume S “Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells” (Organizer, Erdal Karaoz) Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2014; Genova, June 10-13, 2014)
- 17) Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. 第12回幹細胞シンポジウム福岡 (12th SCRS-Fukuoka) May 30-31, 2014.
- 18) 小澤 辰哉、高山 和雄、櫻井 文教、立花 雅史、川端 健二、水口 裕之、薬物動態評価系への応用を目指したヒト ES/iPS 細胞由来小腸上皮細胞の作製、第37回日本分子生物学会、横浜、2014年11月
- 19) 三木卓也, 脇谷晶一, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 西野 光一郎.: ヒト iPS 細胞の状態遷移における DNA メチル化可変領域の解析 (DNA methylation kinetics in the state transition of human iPS cells) . 第8回日本エピジェネティクス研究会 (2014. 5, 東京).
- 20) Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Tamoto R, Umezawa A, Akutsu H.: Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors. 12th Annual Meeting of ISSCR (2014. 6, Vancouver, Canada).
- 21) 樋坂章博. 薬物吸収時の小腸の代謝および

輸送の定量的解析. 第5回杉山研究室(理研)公開シンポジウム(2015.2, 横浜).

- 22) Nakamura M, Koh S, Hisaka A, Suzuki H. Systematic Assessment of Intestinal Metabolism and Degree of Inhibition in Drug-drug interactions caused by Inhibition of CYP3A. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (ASCPT) 2015 Annual Meeting (2015.3, New Orleans, USA).

報道発表等

- 1) TOP STORY として論文の紹介 ESC & iPSC News 9.25 July 2, 2014 Web ニュース <http://s1832.t.en25.com/e/es.aspx?s=1832&e=123108&elq=ceb3aa38f4034b5d8ab46b1081cf4f3f>
- 2) 科学新聞「ヒト iPS/ES 細胞 メチオニン除去培養液で効率的に分化」2014. 4. 25
- 3) 熊本日日新聞「ヒト iPS、ES 細胞効率分化 熊本大研究所グループ メチオニン除去培養液を使用」2014. 4. 23.
- 4) 朝日新聞(熊本版)(生活面)『熊本大・白木助教と糸教授 アミノ酸組成着目「簡便な方法」発見』2014. 4. 19.
- 5) 朝日新聞全国版「万能細胞培養の効率アップ 熊本大などのチームが発見」2014. 4. 18.
- 6) 日経産業新聞「iPS・ES 細胞分化防ぐ ヒトのアミノ酸発見 熊本大・東大」2014. 4. 18.
- 7) 読売新聞熊本版「iPS 分化、効率的に 熊本大研究者ら成功 アミノ酸の働きで」2014. 4. 18.
- 8) NHK ニュース 2014. 4. 18. 6時55分
- 9) KKT テレビタミン 2014. 4. 18. 18時20分
- 10) RKK 夕方いちばん 2014. 4. 18. 18時19分

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 松永民秀, 岩尾岳洋「人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法」国際出願番号:PCT/JP2014/054379, 国際出願日: 2014年2月24日.
- 2) 糸 昭苑、遠藤文夫、白木伸明、白木恭子、糸 和彦、馬渡一徳「アミノ酸組成変更培地を用いた幹細胞の分化促進方法、及び該方法を用いて処理された幹細胞、並びに培地」特願 2014-32068 出願日: 2014年9月10日

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 iPS 細胞由来細胞の薬物代謝酵素等の誘導性の評価・品質基準の作成・
性状解析

担当責任者 石田誠一 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
薬理部 第三室長

研究要旨

薬物性肝障害評価に iPS 細胞由来肝細胞を利用するため、現在利用できる肝細胞は十分に分化誘導がされているのかについて、我々は市販 iPS 細胞由来肝細胞をモデルとして酵素誘導能を指標に検討した。そのために 3 社（A 社、B 社、C 社）より iPS 細胞由来肝細胞を入手した。2 社（B 社、C 社）より入手した iPS 細胞由来肝細胞は良好な最終分化過程を経て、均一な肝実質細胞様の形状へと変化した。B 社の細胞では、Omeprazole による CYP1A1、CYP1A2 の発現誘導と Rifampicin による CYP3A4 の発現誘導が観察され、薬物誘導性評価においてヒト初代培養肝細胞に代わる細胞として期待できる。C 社の細胞では、基底状態において高い代謝活性が観察されたが、明確な薬物代謝の誘導は観察できなかった。C 社の細胞は基底状態における代謝活性が高いために、薬物暴露による代謝誘導が生じづらい状況にあるのかもしれない。そこで、基底状態の代謝活性が低下するような培養条件を見つけることにより、C 社の細胞においても明確な薬物代謝の誘導が生じることが期待される。

ゲノム DNA のメチル化の解析では、結果を hierarchical clustering することにより、ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞を分類することができた。また、quantitative PCR に用いる検量線を検討したところ、8 ドナーのヒト肝細胞由来 RNA を使用することにより、発現量をヒト肝細胞と比較することが可能となった。OECD ガイドライン案等を参考に薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定に着手した。

研究協力者

堀内 新一郎 国立医薬品食品衛生研究所
非常勤職員

導性試験ではヒト初代培養肝細胞（3 ドナー以上）を用いること、経口投与薬では腸管上皮での薬物による酵素誘導の影響を考慮することが求められている。現在、肝臓に関しては、移植不適合肝臓から調製されたヒト肝細胞が試験に多用されているが、ドナー間差や調製間差によるばらつき、供給の安定性、倫理面などの問題があり、小腸に関しては、細胞標本を入手

A. 研究目的

厚生労働省より公布予定の「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）」によると、薬物の in vitro 酵素誘

することが困難であるのが現状である。これらの問題を克服する細胞資源として、ヒト iPS 細胞由来肝／小腸細胞が期待できる。ヒト iPS 細胞は 2007 年に山中らにより樹立された細胞 (Cell 131: 861-872) で、胚性幹細胞とほぼ同等の性質が確認されている。近年、iPS 細胞を出発材料とする分化誘導研究が加速しており、現在 3 社よりヒト iPS 細胞由来肝細胞が入手可能となっている。今後は、様々な方法により作成された分化誘導肝／小腸細胞が現れることが予想される。このような分化誘導肝／小腸細胞を用いて薬物誘導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 iPS 細胞由来肝細胞の安全性評価応用を検討してきた研究者らが連携し、薬物誘導性評価のために iPS 細胞由来肝／小腸細胞が満たすべき品質基準の作成と、CYP3A4 などの薬物代謝酵素と P-gp (MDR1/ABCB1) などのトランスポーターの誘導性を mRNA レベルで評価するプロトコルの整備を目指している。

本年度、肝細胞に関しては、A 社、B 社、C 社より iPS 細胞由来肝細胞を入手し、各種薬剤による薬物代謝の誘導を遺伝子発現レベル、酵素活性レベルで観察した。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。

B. 研究方法

細胞培養条件

B 社、C 社のいずれも凍結細胞を購入し、マルチウェルプレートに播種し培養を行った。細胞培養は各社指定の方法に従って行った。

B 社：細胞は解凍後、直ちに Plating medium に懸濁してマルチウェルプレートへ播種した。細胞を播種した 3 時間後に、張り付いていない

細胞を取り除くために培地交換を行い、その後は試験の日まで毎日培地交換を行った。その際の培地は、5 日目までが Plating Medium、5～6 日目が Maintenance Medium、6～9 日目が Assay Medium を用いた。培養に用いた培地の組成は表 1 に示した。

C 社：細胞は解凍した後、Thawing Medium に懸濁して室温 (15-25°C) で 15-20 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を Plating Medium に置換して細胞をマルチウェルプレートへ播種した。播種翌日にウェルを 2 回洗浄した後、Enhanced hiPS-HEP Maintenance medium に交換した。その後、播種 3 日目に培地交換し、5 日目以降は毎日培地交換を行った。培養に用いた培地の組成は表 2 に示した。

CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 誘導

iPS 細胞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。曝露濃度と曝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

P450-Glo による酵素活性測定

CYP3A4、CYP1A2 の酵素活性を P450-Glo™ Assay (Promega 社) により測定した。測定は添付の資料に従って行った。P450-Glo の測定結果は CellTiter-Glo によって測定した生存活性で除することによって規格化した。各実験は n=3 (独立した 3 ウェル) で行った。

遺伝子発現

細胞からの RNA の抽出は、RNeasy mini kit (QIAGEN 社) を用いて行った。調製した total

RNA は、TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems 社)を用い、添付の方法に従い、Oligo dT(16)をプライマーとして逆転写した。逆転写産物は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)と各種遺伝子に特異的な TaqMan プライマー(Applied Biosystems 社)を用いて以下の遺伝子の発現を ViiA™7 real time PCR system (Applied Biosystems 社)により発現量を測定した。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用いた。

CYP1A1 (Hs01054797_g1)
CYP1A2 (Hs00167927_m1)
CYP2B6 (Hs04183483_g1)
CYP2C9 (Hs00426397_m1)
CYP2C19 (Hs00426380_m1)
CYP3A4 (Hs00430021_m1)
CYP3A7 (Hs00426361_m1)
GSTA2 (Hs00747232_mh)
UGT1A1 (Hs01589938_m1)
ABCB1 (Hs00184500_m1)
ABCC2 (Hs00166123_m1)
AHR (Hs00169233_m1)
PXR (Hs00243666_m1)
CAR (Hs00230813_m1)
CEBPA (Hs00269972_m1)
HNF4 (Hs00230853_m1)

ゲノム DNA のメチル化解析

・細胞の培養とゲノム DNA の調製

A (Reprocell)社の ReproHepato 細胞および B 社の iCell Hepatocyte、C (Celartis)社の hiPS-HEP 細胞の 3 種の iPS 細胞由来肝細胞を使用した。各細胞は、マルチウェルプレートに播種後、各社指定の方法により培養した。細胞か

らの DNA の調製は、AllPrep DNA/RNA mini kit (Qiagen 社)を用いて行った。

・メチル化の解析

調製したゲノム DNA のメチル化の解析は The Infinium Methylation Assay (Human Methylation 450) により行い、検出および定量化されたメチル化部位のデータを用いて同一群内の相関解析および細胞種間のメチル化部位の比較を行った (GeneSpring GX12.0, Agilent 社)。

誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

ヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG を用いた薬物代謝酵素誘導能評価に関する基礎データ収集として、OECD Test Guideline を検討した。

OECE GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS
Draft Proposal for a New Performance Based
Test Guideline

Human cytochrome P450 (CYP) n-fold induction
in vitro test method

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/CYP-induction-PBTG-final-for-WNT-comments.pdf>

quantitative PCR (qPCR)用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

・ヒト肝臓由来 RNA は BioChain 社のものを用いた。

Product Code: CBR1234149

Lot:

1. A602084 (Asian, 30, M)
2. A610220 (Asian, 24, M)
3. A507018 (Asian, 64, M)
4. A610219 (Asian, 24, M)

5. A605073 (Asian, 24, M)
 6. A801051 (Asian, 27, M)
 7. A801128 (Asian, 33, M)
 8. A801129 (Asian, 26, M)
 9. A801130 (Asian, 29, M)
 10. A801136 (Caucasian, 70, F)
 11. A801137 (Caucasian, 59, M)
- ・ qPCR に用いた TaqMan プライマー
- CYP3A4 : Hs00430021_m1
CYP1A2 : Hs00167927_m1
CYP2B6 : Hs00167937_g1
CYP2C19 : Hs00426380_m1
CYP2C8 : Hs00258314_m1
CYP2C9 : Hs00426397_m1
CYP2D6 : Hs00164385_m1

<倫理面への配慮>

該当なし

C. 研究結果

B 社の hiPS 細胞由来肝実質細胞

細胞は解凍後、研究方法に記述した方法でマルチウェルプレートに播種した (図 1)。播種 2 日目までは、丸い形状の分化が未熟な細胞が多く存在していた (図 2)。この丸い形状の細胞は、液滴の落下によって剥がれてしまうくらい接着が脆弱なため、培地交換に慎重を要した。播種 3 日目になると、接着が脆弱であった丸い形状の細胞がプレートにしっかりと接着し、肝実質細胞様の形状 (敷石状) へと変化した。その後、播種 6 日目までの間に、より肝実質細胞様の形状へと変化した。播種 6 日目から試験日までは肝実質細胞様の形状を維持していた。また、プレートに貼り付いている細胞は均一な形状をしていたが、C 社と比較すると、丸い形状の細胞が多く重層していた。

C 社の hiPS 細胞由来肝実質細胞

細胞は解凍後、研究方法に記述した方法でマルチウェルプレートに播種した (図 3)。B 社とは異なり、播種 1 日目には細胞がしっかりプレートに接着していた (図 4)。しかし、この時点において、細胞は敷石状の形状を成しておらず、播種 5 日目までの間に、徐々に分化して肝実質細胞様の形状 (敷石状) へと変化した。5 日目から試験日までは肝実質細胞様の形状を保っていた。また、細胞は均一な形状していたが、所々に細胞の塊が存在していた。

B 社の細胞における薬物代謝酵素の発現誘導

B 社は播種後 9 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素 (CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A7、GSTA2) とその核内受容体 (AhR、PXR、CAR) の発現を測定した。測定された発現値は、 β -actin の発現値で徐することによって規格化を行った。なお、B 社のデータは n=3 による結果である。結果を図 5-9 に示した。B 社の細胞において、Omeprazole により CYP1A1 が 20.4 倍、CYP1A2 が 5.8 倍、Rifampicin により CYP2C9 が 1.7 倍、CYP3A4 が 2.7 倍の発現誘導が観察された。これらの遺伝子の発現に関与するレセプターは、薬物の暴露により発現誘導されることはなかった。

C 社の細胞における薬物代謝酵素の発現誘導

播種後 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現 (CYP1A1、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、CYP3A7) とその核内受容体 (AhR、PXR、CAR) を測定した。測定された発現値は、 β -actin の発現値で徐することによって規格化を行った。

なお、C社のデータはRNAの回収率が悪かったために、Rifampicinにより誘導したサンプルはn=1、その他はn=2による結果である。結果を図10-13に示した。OmeprazoleによりCYP1A2の発現が2.1倍、RifampicinによりCYP2B6の発現が1.8倍高くなったが、n数が少ないため、この誘導が有意なものであるかを判断することができなかった。その他の薬物代謝酵素、レセプター、トランスポーターの薬物暴露による発現誘導は観察されなかった。

C社の細胞における薬物代謝活性

P450-Gloキットを用いて、酵素反応を1時間、または2時間行い、CYP1A2とCYP3A4の酵素活性を測定し、OmeprazoleとRifampicinによる酵素活性の誘導を観察した。また、以前に当研究室で測定したHepaRGにおける基底状態の酵素活性と比較した。HepaRGはヒト肝実質細胞と同程度の酵素活性が確認されており（Drug Metab Dispos. 2008, 36, 1444）、C社の細胞におけるCYP1A2はHepaRGの約1/3、CYP3A4はHepaRGの約1/9であった（図14）。次に細胞をOmeprazoleとRifampicinに暴露した後、酵素活性をコントロール細胞（DMSOのみで処理）と比較することにより、酵素活性の誘導を評価した。CYP1A2の酵素活性がOmeprazoleへの曝露により約1.5倍有意に誘導した（P値=0.008）。Rifampicinへの曝露によるCYP3A4の酵素活性の誘導は観察できなかった。

ゲノムDNAのメチル化解析

市販iPS細胞由来肝細胞について、分化誘導過程の細胞と分化が完了した細胞でのゲノムメチル化の解析を行っている（解析中のためdata not shown）。ヒト初代培養肝細胞、HepaRG細胞、HepG2細胞との比較解析を進めた。全ブ

ローブデータによるhierarchical clusteringを実施したところ、それぞれの細胞が比較的近くに分類された（図15）。ヒト初代培養肝細胞は他の細胞と比べ、ドナー間差を反映してばらつきが大きかったが、大きな分類としては同じ分岐に分類されていた。

誘導能予測モデル開発のための基礎データ収集

EUで実施されたヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞HepaRGを用いた、チトクロームP450（CYP）の誘導性試験に関する比較的大規模なバリデーション試験の結果に基づくOECDガイドライン案（OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS : Draft Proposal for a New Performance Based Test Guideline : Human cytochrome P450 (CYP) n-fold induction *in vitro* test method）が公開された。ヒトiPS細胞由来肝細胞の誘導性評価試験の雛形として、ガイドライン案を検討した。

概要を記す。

○ 対象とする細胞：

- ・ヒト初代培養肝細胞（3ドナー由来）
- ・HepaRG細胞（3バッチ）

○ 対象とするCYP：

- ・CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 ⇒核内受容体（AhR、PXR、CAR）による活性化機構に基づき選択。

○ 測定方法：

- ・LC/MSによる活性測定（※1）

○ 試薬の濃度設定手順

1. 溶解性の確認
2. 毒性の確認（CellTiter Blue:Promega）
3. 濃度設定、公比1:1.5、、1:3

誘導反応条件

- ・HepaRG：誘導時間48時間
- ・cryo Hep：誘導時間72時間

○試験成立の条件

・ Prototypical inducers (β -naphthoflavone、phenobarbital、rifampicin) で ≥ 2 倍の誘導があること

・ Proficiency substances (carbamazepine、phenytoin、sulfonpyrazone、bosentan) の誘導性があること

○ 評価方法

・ definable measures : n 倍誘導性

・ observations : 用量作用曲線 (※2)

既に公開されている、FDA、EPA、厚労省のガイドラインと比較した差異 (※の箇所) について記す。

※1 : いずれのガイドラインでも mRNA による測定を採用している。

※2 : 要請対象とする誘導剤の暴露濃度は 1 点となっている。

quantitative PCR (qPCR) 用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討

リアルタイム PCR による遺伝子発現定量に用いる検量線の作成を検討した。BioChain 社より購入したヒト肝臓由来 RNA11 ドナー分を用いて、CYP3A4、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 の遺伝子発現を測定した (図 16)。ドナー間で発現にばらつきがあった。そこで、特定のドナーの発現パターンに偏らないようにするため、複数のドナー RNA をプールして検量線用の RNA 標品とすることとした。その際、特に、複数の CYP 遺伝子で特にばらつきの大きかった

8. A801129 (Asian, 26, M)

10. A801136 (Caucasian, 70, F)

11. A801137 (Caucasian, 59, M)

の 3 ドナーに由来する RNA は、プールから外した。

B 社の細胞において誘導が確認された遺伝子について、この検量線を用いて発現値 (ACTIN により規格化していない値) を求めた (図 17)。CYP1A1 の発現値は、大きく 1 を超えており、また Rifampicin に暴露した際の CYP3A4 の発現値は、約 1 であった。CYP1A2 の値は、大きく 1 を下回っていた。

D. 考察

C 社の細胞は 5 日目以降、B 社は 6 日目以降、プレートに接着している殆ど全ての細胞が肝実質細胞様の形状へと変化しており、均一な分化が行われたものと考えられる。播種直後の B 社の細胞は、C 社と比較して分化が未熟な細胞が多く存在した。このため播種直後の B 社の細胞は、接着が非常に弱く、剥がれやすいため、この間の培地交換は非常に慎重に行う必要がある。ただし、B 社の細胞も 3 日目以降は接着が強固になり、C 社の細胞と同様に培地交換を行えるようになった。

B 社の細胞では、Omeprazole により CYP1A1 が 20.4 倍、CYP1A2 が 5.8 倍、Rifampicin により CYP2C9 が 1.7 倍、CYP3A4 が 2.7 倍の発現誘導が観察された。また、BioChain 社のヒト肝臓由来の RNA を使用した検量線より求めた発現値が、CYP1A1 が 1 以上、CYP3A4 が約 1 であったことから、発現量もヒト肝細胞と比較して遜色のないものであったと言える。このことより B 社の細胞は薬物誘導性評価への応用へ向け、大いに期待できると考えられる。

C 社の細胞では、基底状態における代謝酵素活性が、HepaRG と比較して CYP1A2 が約 1/3、CYP3A4 が約 1/9 と比較的に高い値であった。また、基底状態の薬物代謝酵素の発現も、B 社と比較して高い値 (CYP1A1 : 148.5 倍、CYP1A2 : 8 倍、CYP2B6 : 68 倍) であった。しかし、C 社の

細胞における薬物代謝の誘導は、酵素活性レベルで Omeprazole による約 1.5 倍の CYP1A2 の誘導が観察できただけだった。このことより、C 社の細胞は、基底状態における代謝活性が高く、薬物暴露による代謝誘導が生じづらい状況にあるのかもしれない。そこで基底状態の代謝活性を下げるような培養条件（培地の組成など）を検討することによって、薬物暴露による代謝誘導が大きくなる条件を見出すことができるかもしれない。また、mRNA レベルにおいて Omeprazole により CYP1A2 の発現が 2.1 倍、Rifampicin により CYP2B6 の発現が 1.8 倍高い値になっていたが、n 数が少ないために、有意な誘導であるかを判断することができなかった。このために、n 数を増やして再度実験を行う必要がある。

ゲノム DNA のメチル化のデータを hierarchical clustering により解析したところ、ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞がそれぞれ近くに分類され、ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞をクラスターに分類することができた。これらの細胞間でのクラスターの差異を調べることにより、細胞間における薬物代謝能の違いの原因を解明できるかもしれない。

本研究では誘導能予測モデル開発のために、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の誘導性評価試験に対するガイドライン案を提示することを1つの目的としている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞の誘導性評価試験に対するガイドライン案の作成にあたり、ヒト初代培養肝細胞とヒト肝細胞前駆細胞 HepaRG を対象とした試験結果より作成された OECD ガイドライン案を検討したところ、FDA、EPA、厚生労働省のガイドラインとの差異があった。酵素誘導の指標として、OECD ガイドライン案では代謝酵素活性を用いているのに対し

て、FDA、EPA、厚生労働省のガイドラインでは mRNA の測定を用いている。酵素誘導の評価方法として、どちらの指標が適しているかを分子機構とも考え併せて、今後班内でディスカッションが必要と考える。また、薬物誘導性評価に用いる標準物質を選定するにあたり、OECD ガイドライン案に提示されている7種の化合物の誘導性評価における有用性を今後検討していく必要がある。

qPCR の検量線を作成するために、BioChain 社のヒト肝臓由来 RNA を用いて CYP3A4、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 の遺伝子発現を測定したところ、(11 ドナー中) 3 ドナーがその他のドナーと比較して、遺伝子発現のパターンが大きく異なっていた。これら 3 ドナーは正常のヒト肝臓細胞における薬物代謝遺伝子の発現を反映していないと推察される。また、比較的遺伝子発現パターンが近かった 8 ドナーに関しても、個別の遺伝子発現にはばらつきがあった。しかし、これらは正常なヒト肝細胞におけるばらつきの範囲内であると仮定し、これら 8 ドナーの RNA をプールして使用することにより、検量線の値が特定のドナーの発現パターンに偏らないようにでき、より平均的なヒト肝細胞における遺伝子発現を反映できると考えられる。

E. 結論

どちらの細胞も試験に用いる段階において、殆ど全ての細胞が敷石状の形状をしており、肝実質細胞へと分化していたと考えられる。B 社の細胞に関しては、播種 2 日目まで細胞の剥離に気を付ける必要があるが、どちらの細胞も煩雑な作業を必要とせず、安定して使用できる印象を持った。この点を確証するために、再度実験を行い、再度、均一な肝実質細胞が得られる