

か確かめる必要がある。

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、また、誘導が確認された遺伝子のうち、CYP1A1とCYP3A4の発現量はヒト肝細胞と遜色が無いくらいに高かった。このことよりB社の細胞は、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。今後、薬物誘導性評価にB社の細胞を応用するためには、より大きな誘導が観察される条件の検討と再現性の確認が必要である。

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。今後は、C社の細胞において明確な薬物代謝の誘導が観察できる条件を検討する予定である。

ゲノムDNAのメチル化の結果を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。今後はこれらの細胞間におけるクラスターの差異が、どのように薬物代謝能に関与するのかを調べていく予定である。

iPS細胞由来肝細胞を用いた誘導性評価試験のガイドライン案を作成するために、OECDのガイドラインを検討した結果、FDA、EPA、厚生労働省のガイドラインと酵素誘導を評価する指標（OECD：酵素活性、FDA、EPA、厚生労働省：mRNA）に違いがあった。このため酵素誘導の分子機構などを考慮し、どちらの指標が酵素誘導を評価するために適しているかを検討する必要がある。また今後、薬物誘導性評価に用いる標準物質の選定を更に進める予定である。

qPCR用検量線の検討を行った結果、BioChain社より入手したヒト幹細胞由来RNAのうち、遺伝子発現のばらつきが大きかった3ドナー除いた8ドナーのRNAをプールし検量線の作成に用いることによって、ヒト幹細胞における平均的な発現量を相対発現量1として評価できる系を確立した。

また、入手が遅れているA（ReproCELL）社の細胞に関して、今年度中の入手できる目処がたち、細胞が入手でき次第、実験を行う予定である。

F. 健康危機情報

該当なし

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.

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)
- 報道発表等
該当なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

B 社

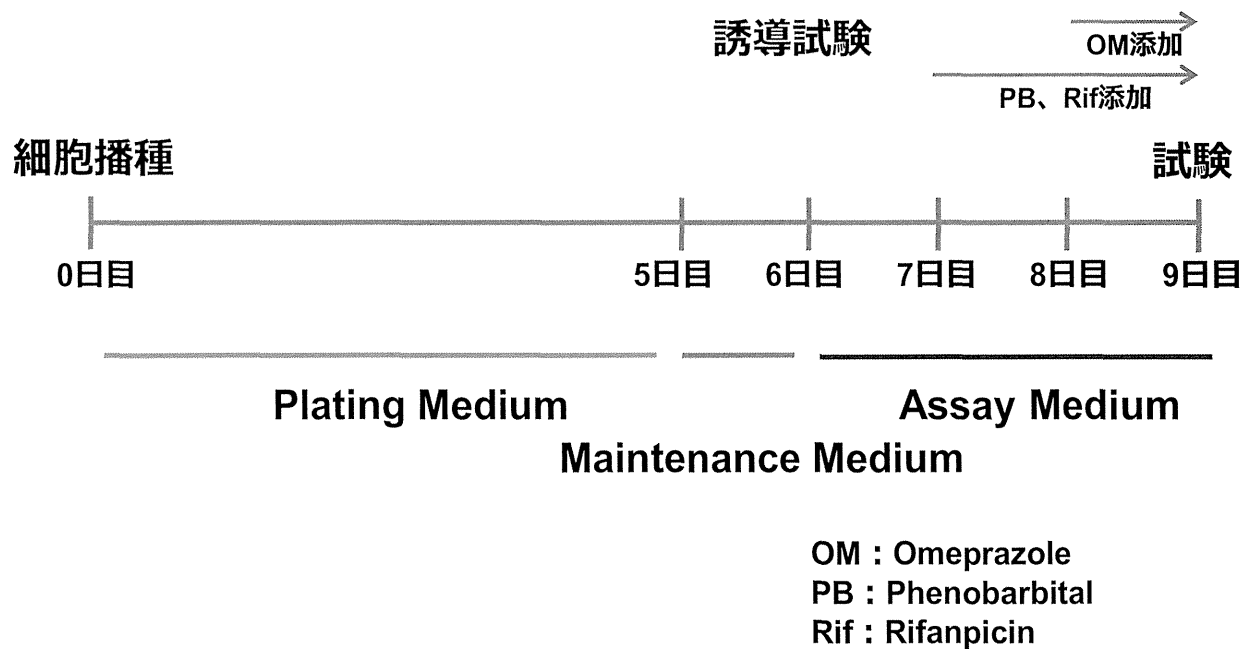
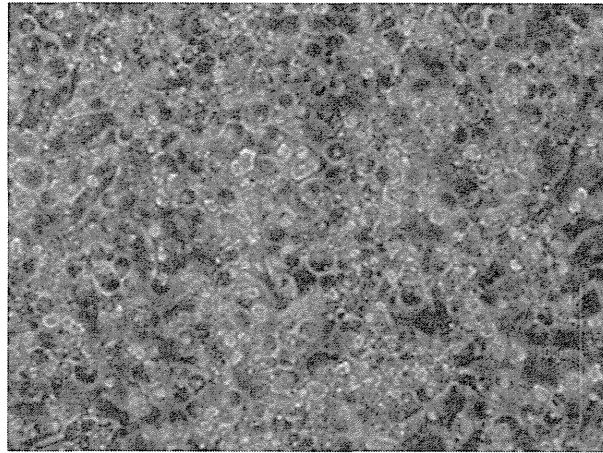


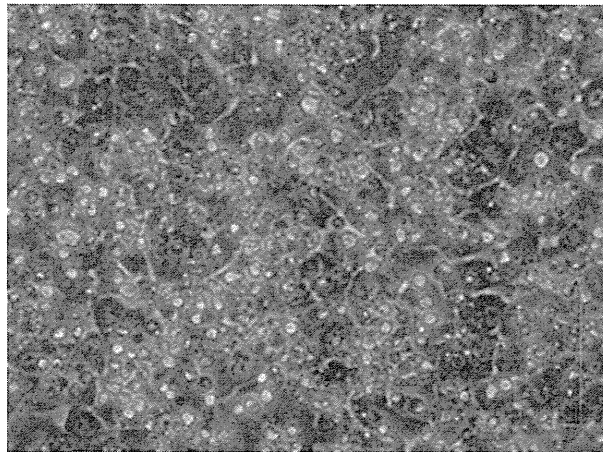
図1 B社の細胞に関する Time Course

9日目に real-timePCR による薬物代謝遺伝子の発現解析、LC-MS/MS による薬物代謝試験に供するサンプルの回収を行った。

1日目



3日目



**9日目
(試験当日)**

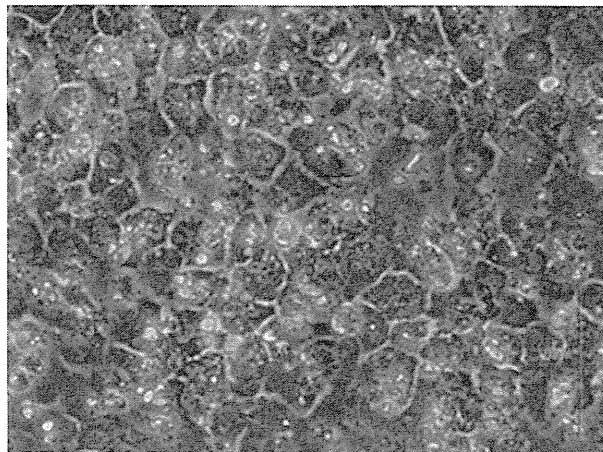
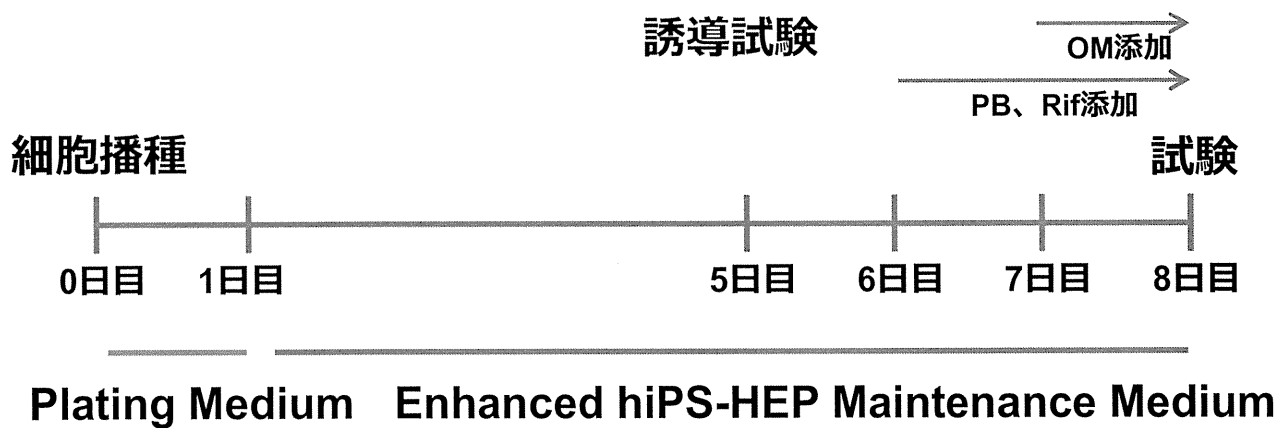


図2 B社の細胞の経時変化

- 1日目：形状が丸く接着が脆弱な細胞が多く存在していた。
- 3日目：殆どの細胞がプレートに接着した。
- 9日目：肝実質細胞様の形状を維持していた。

C 社

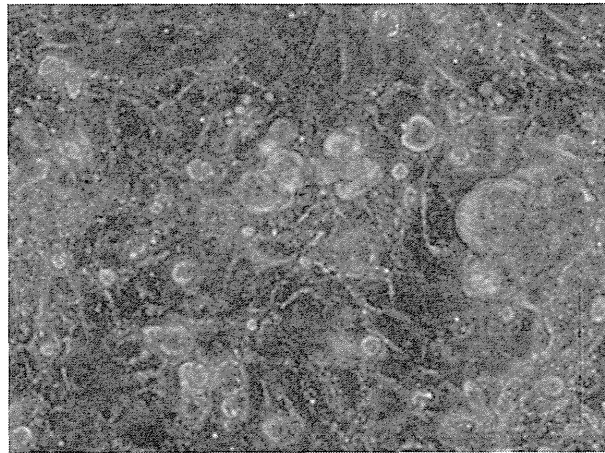


OM : Omeprazole
PB : Phenobarbital
Rif : Rifampicin

図 3 C 社の細胞に関する Time Course

8日目にP450-Gloによるアッセイとreal-timePCRによる薬物代謝遺伝子の発現解析、LC-MS/MSによる薬物代謝試験に供するサンプルの回収を行った。

1 日目



**8 日目
(試験当日)**

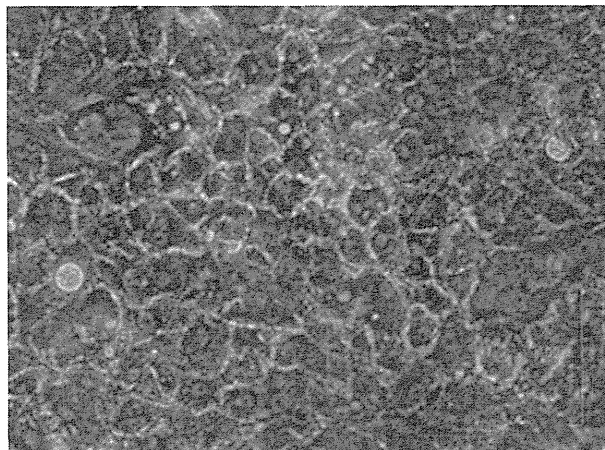


図 4 C 社の細胞の経時変化

1 日目：細胞がプレートに接着していた。

8 日目：肝実質細胞様の形状を維持していた。

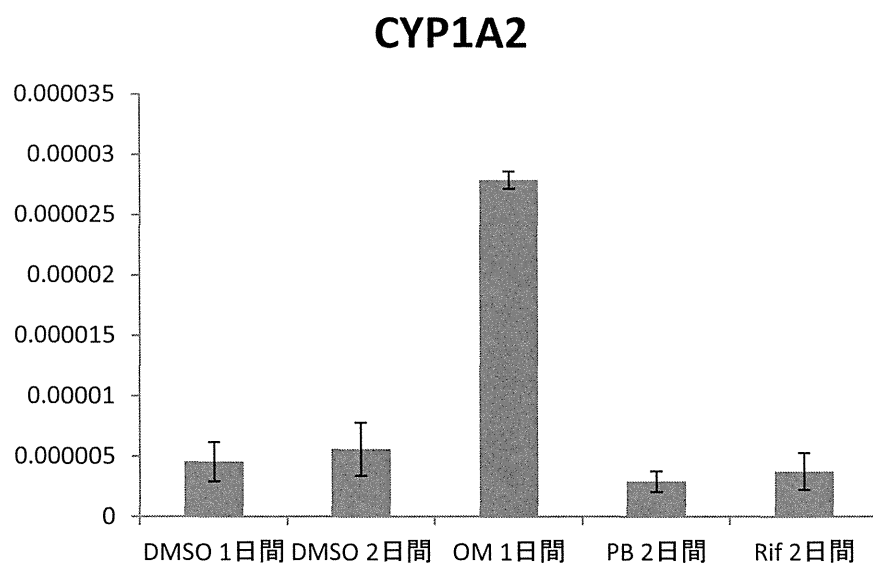
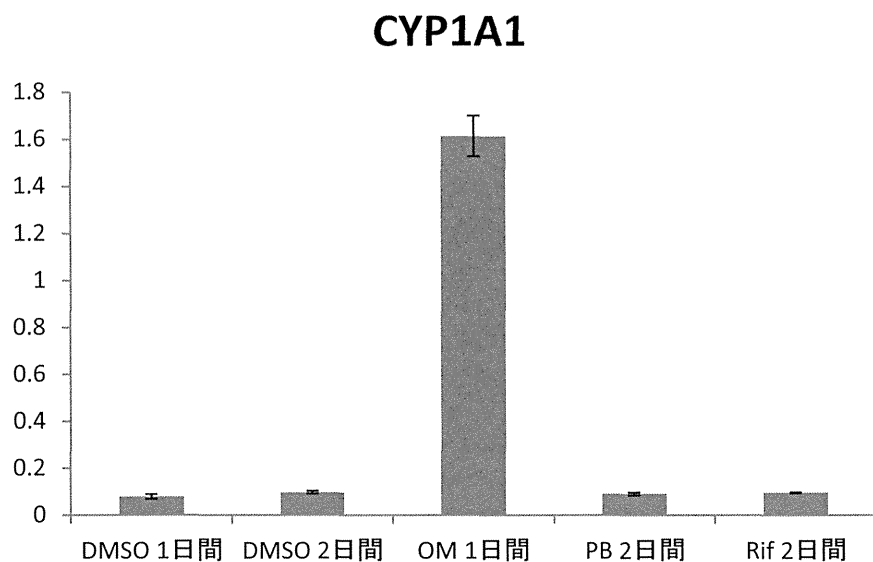


図5 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(CYP1A)
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

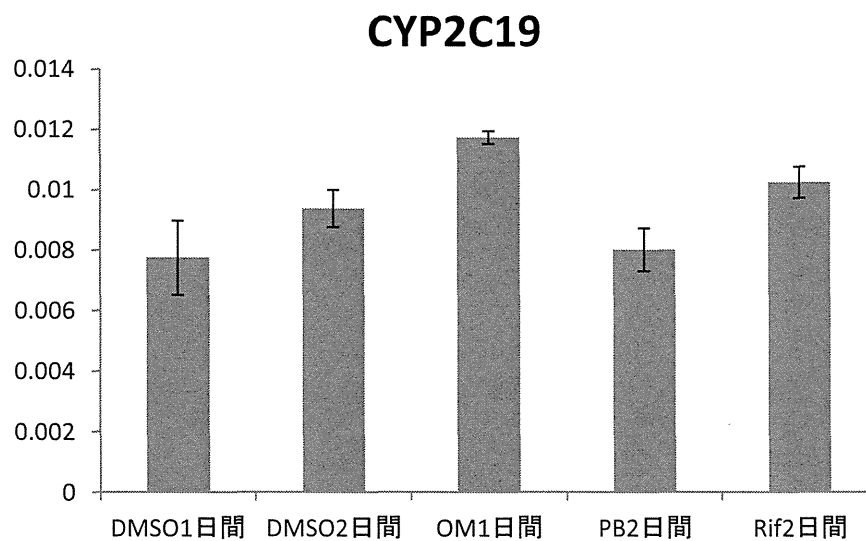
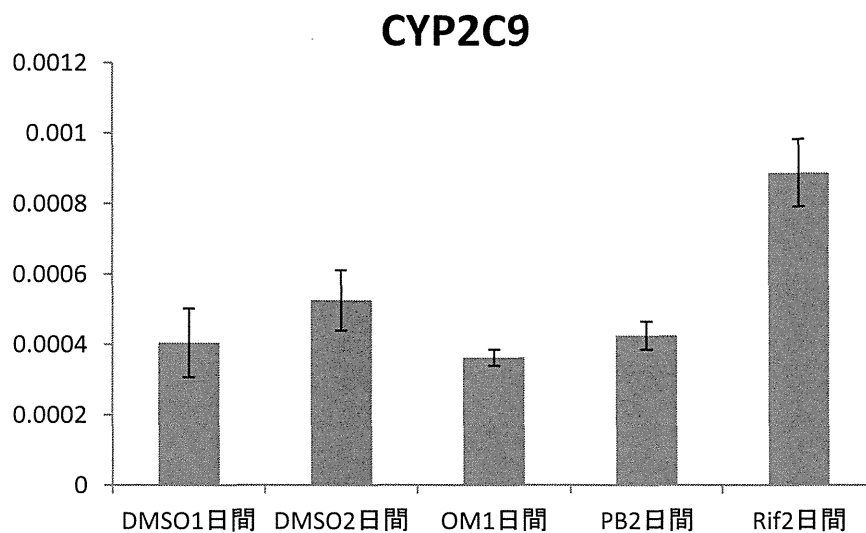
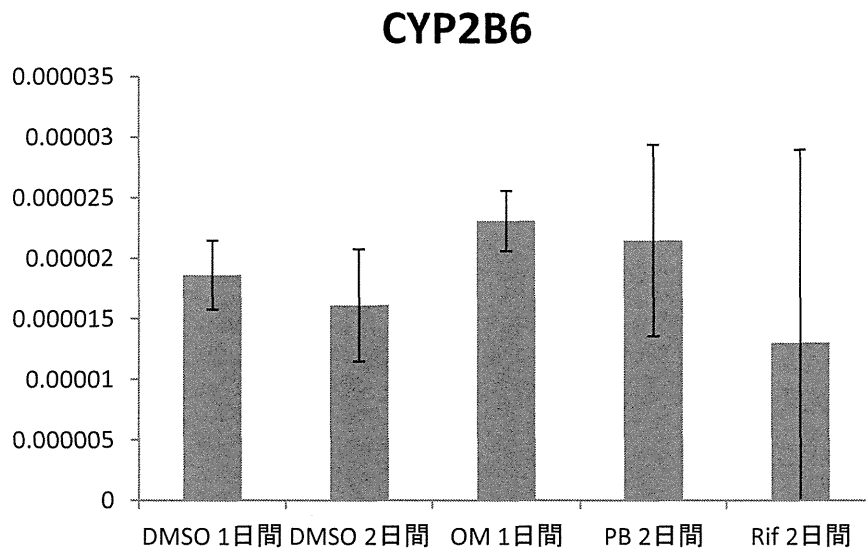
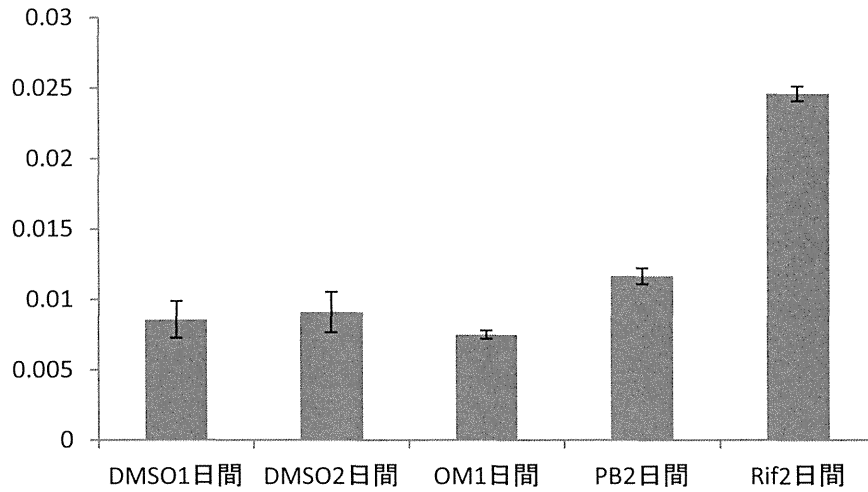


図6 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(CYP2B、2C)
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

CYP3A4



CYP3A7

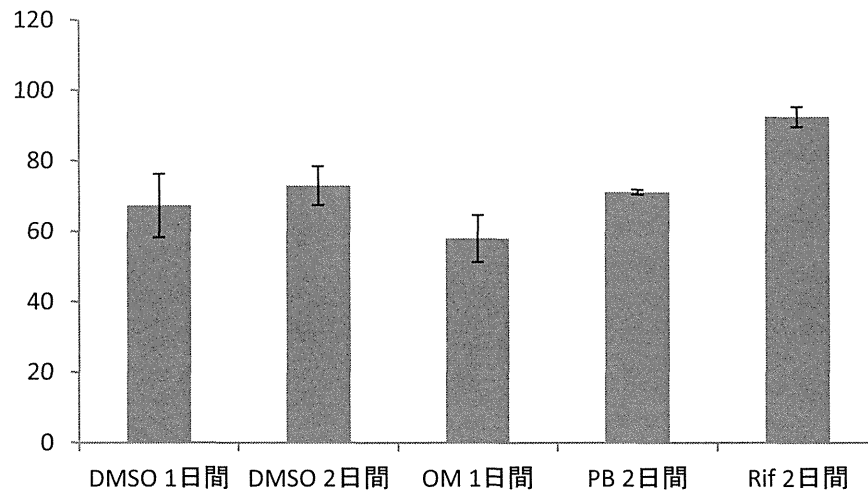


図7 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(CYP3A)
播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

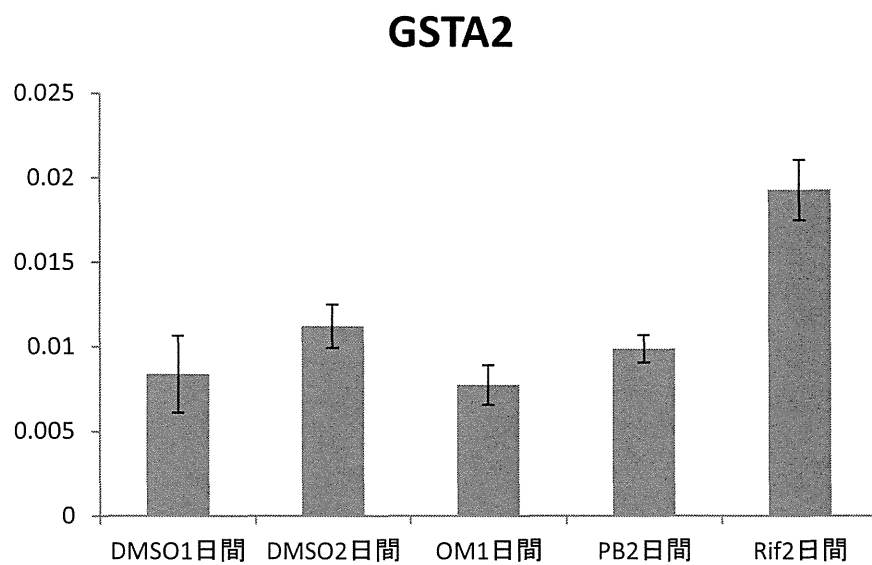


図8 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(第2相酵素)

播種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の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

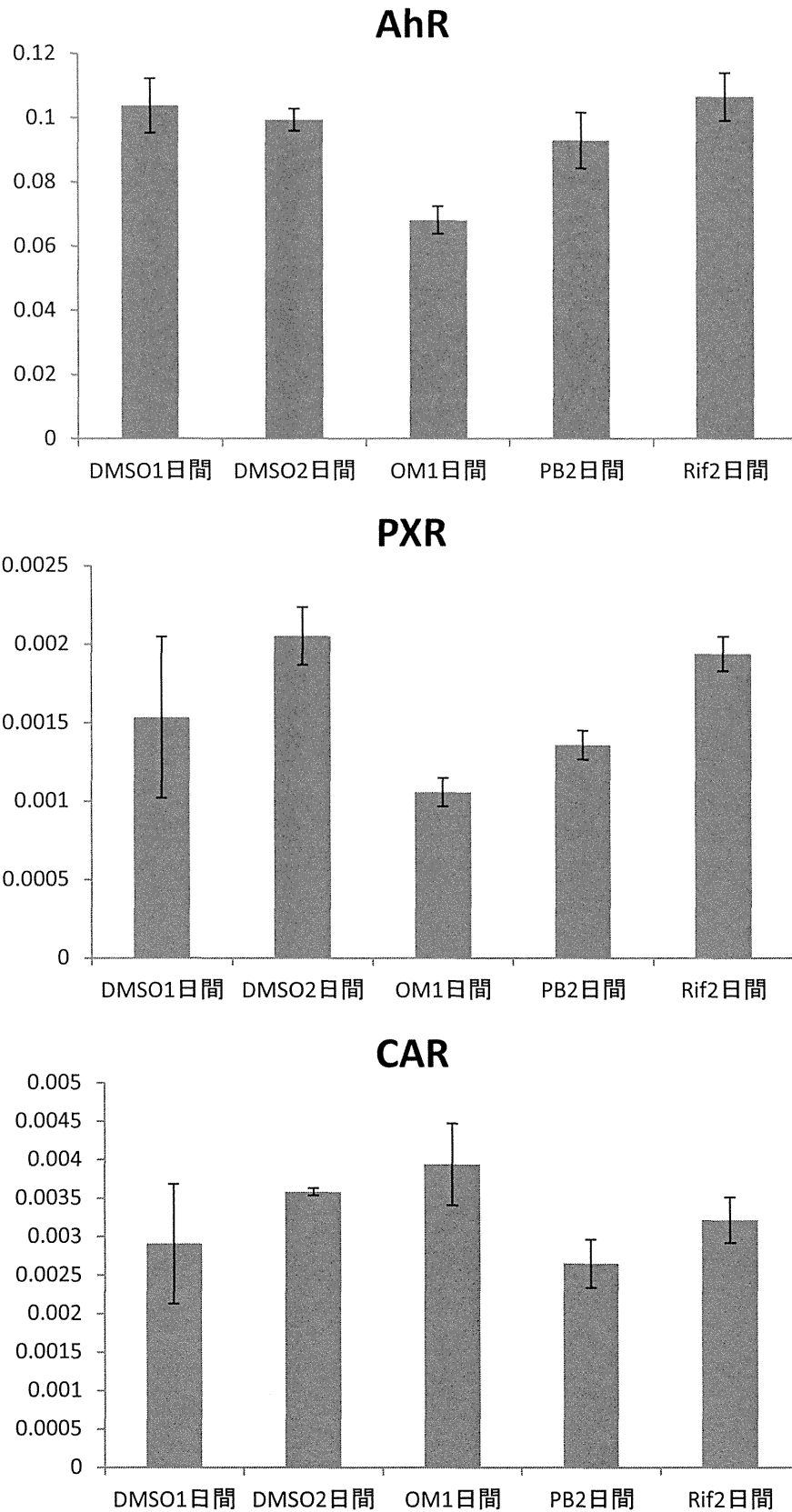


図9 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(核内受容体)

播種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の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

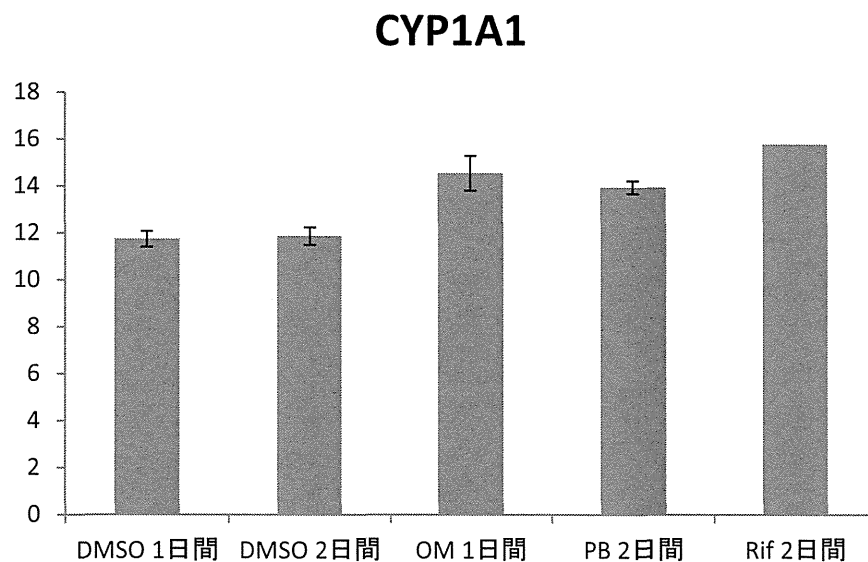
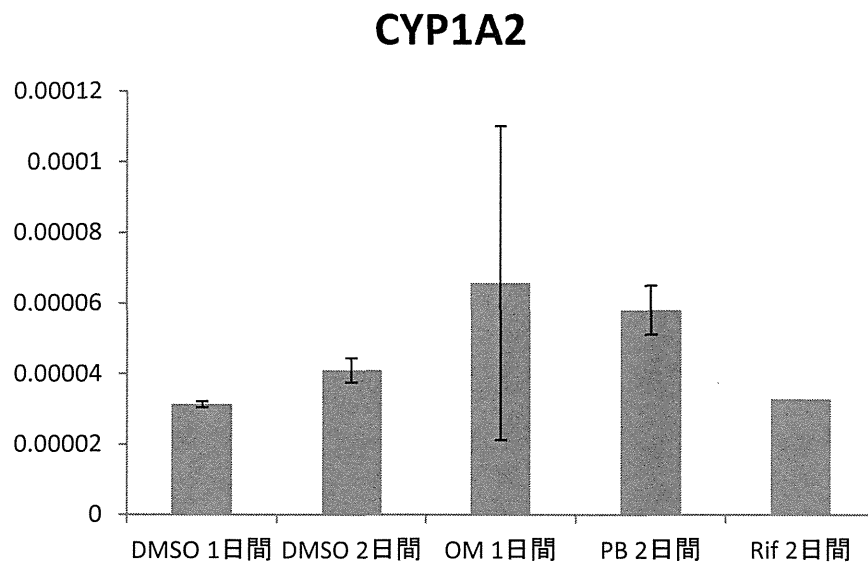


図 10 C社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP1A)
 播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で徐することによって規格化した値である。

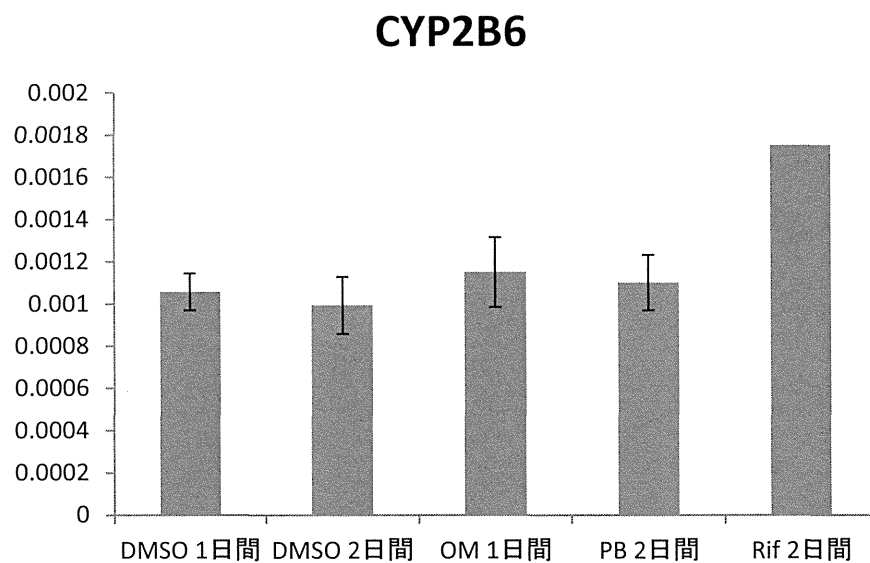
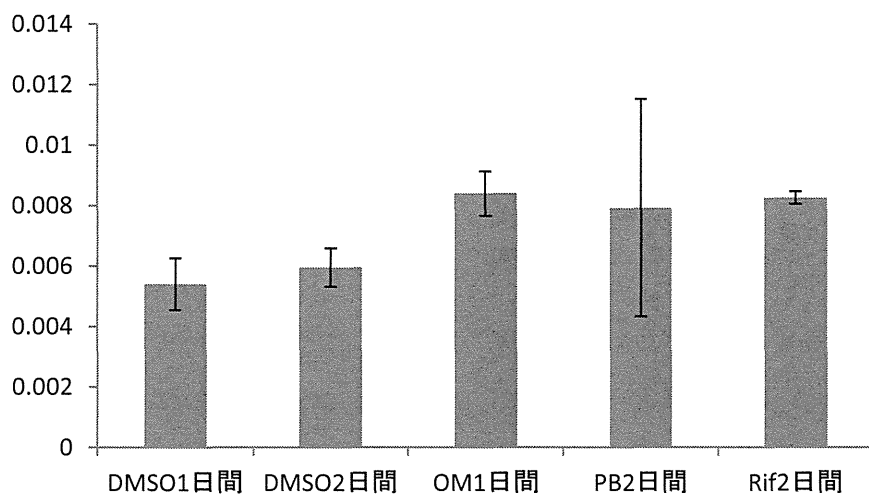


図 11 C 社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP2B)

播種 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を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で徐することによって規格化した値である。

CYP3A4



CYP3A7

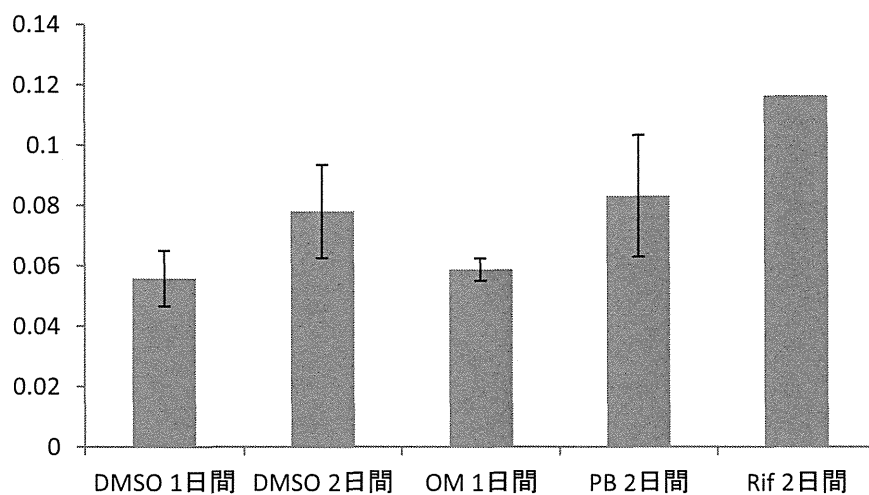


図 12 C 社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP3A)
播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で除することによって規格化した値である。

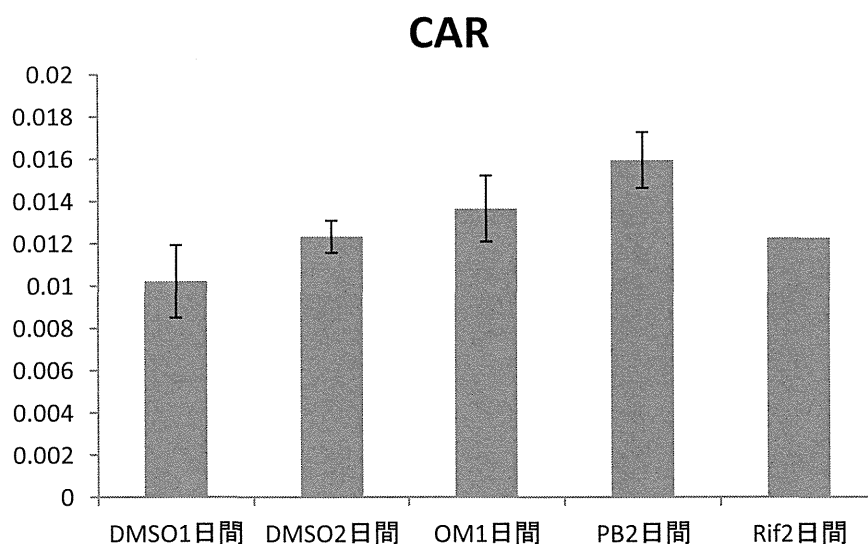
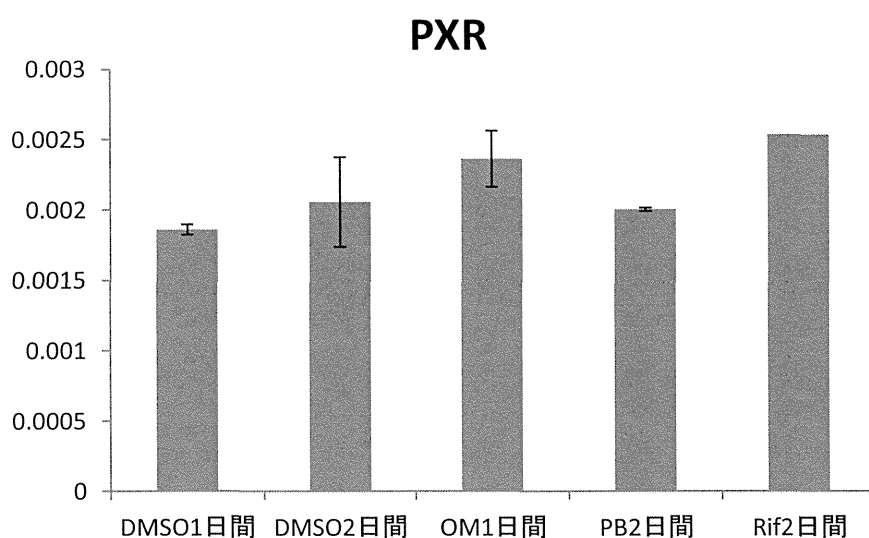
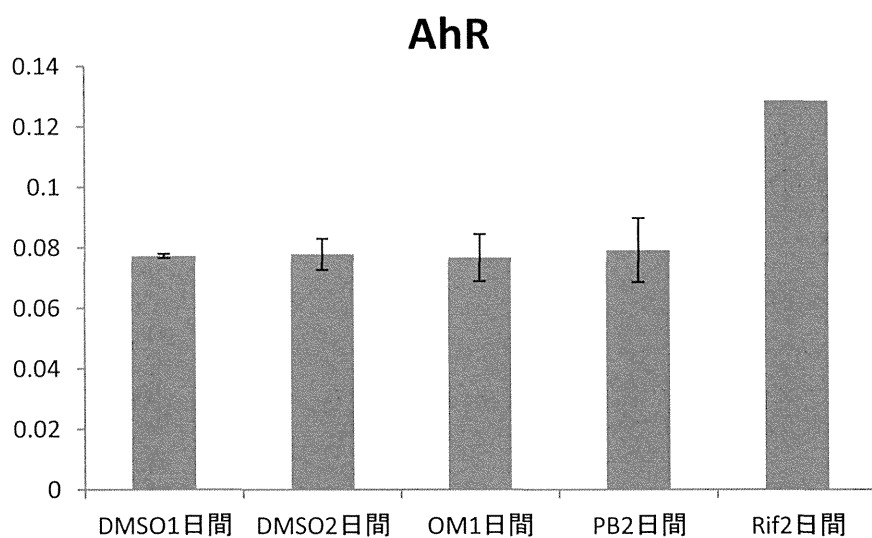


図 13 C社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (核内受容体)

播種 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を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で徐することによって規格化した値である。

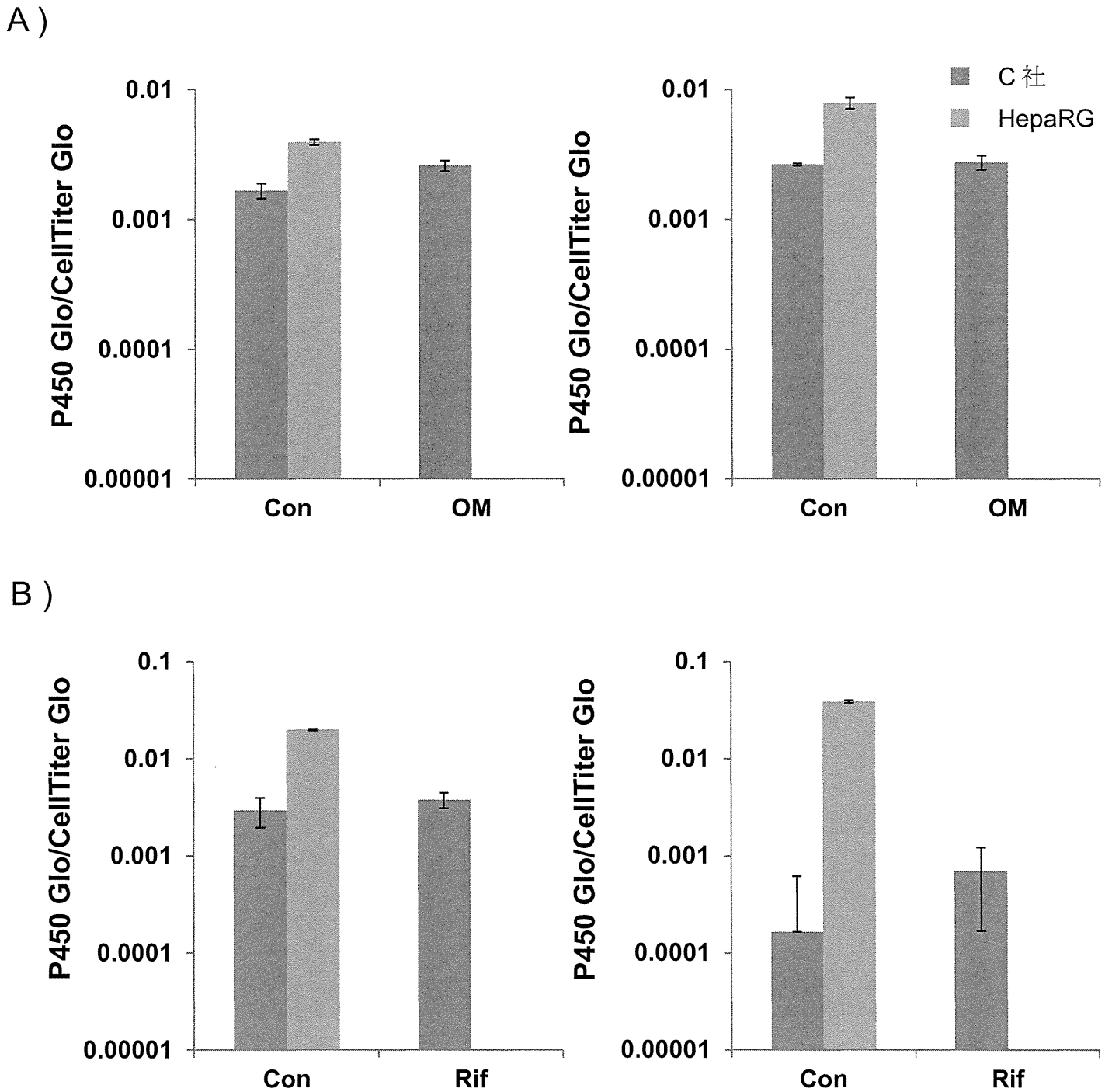


図 14 C 社の細胞における代謝活性

A) CYP1A2 B) CYP3A4

播種 8 日目に P450-Glo により、CYP1A2、CYP3A4 の酵素活性を測定した。縦軸は P450-Glo により測定した酵素活性を CellTiter-Glo により測定した生存活性で徐し規格化した値となっている。左カラムは P450-Glo を 1 時間反応させた結果、2 時間反応させた結果となっている

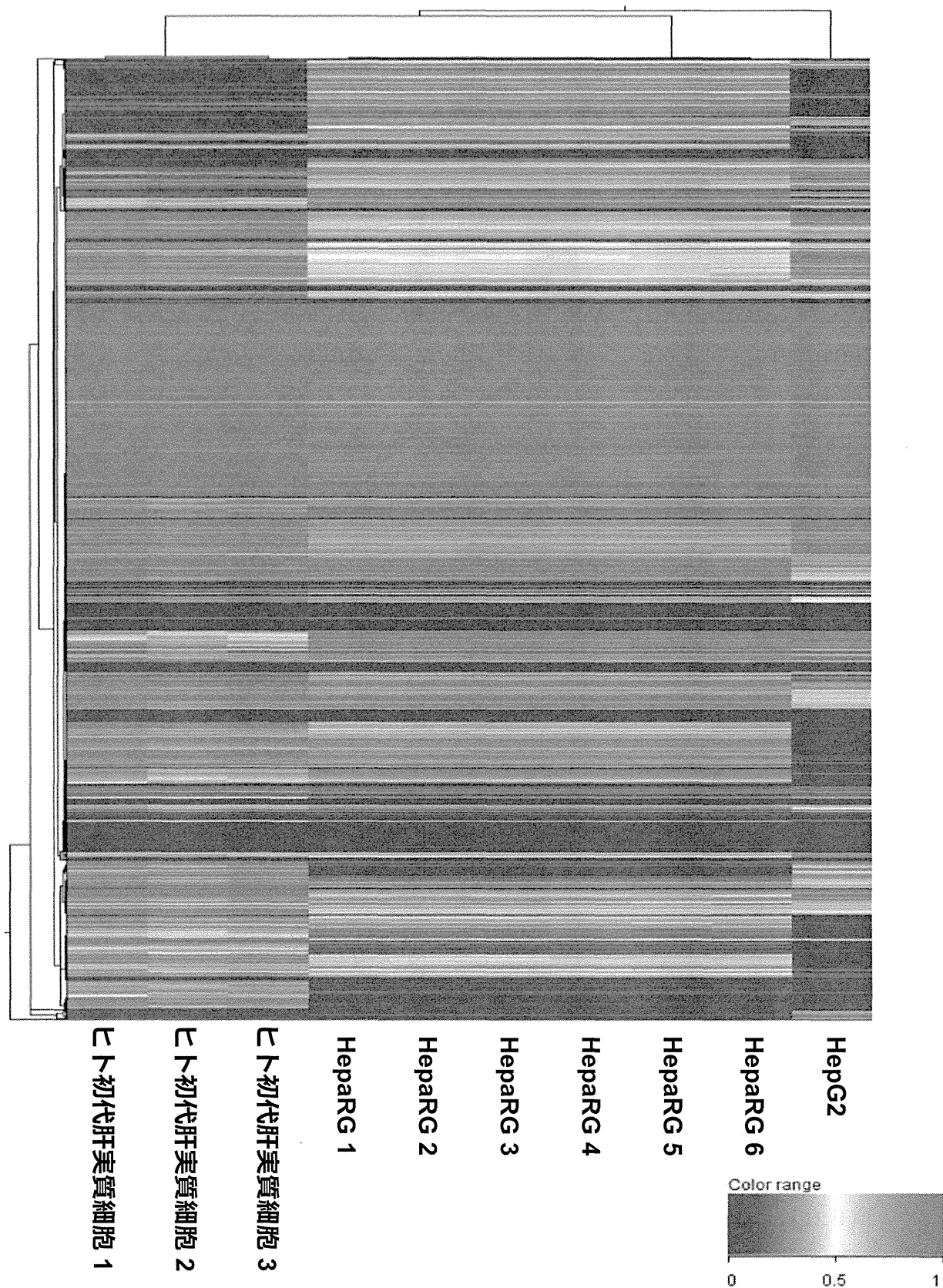
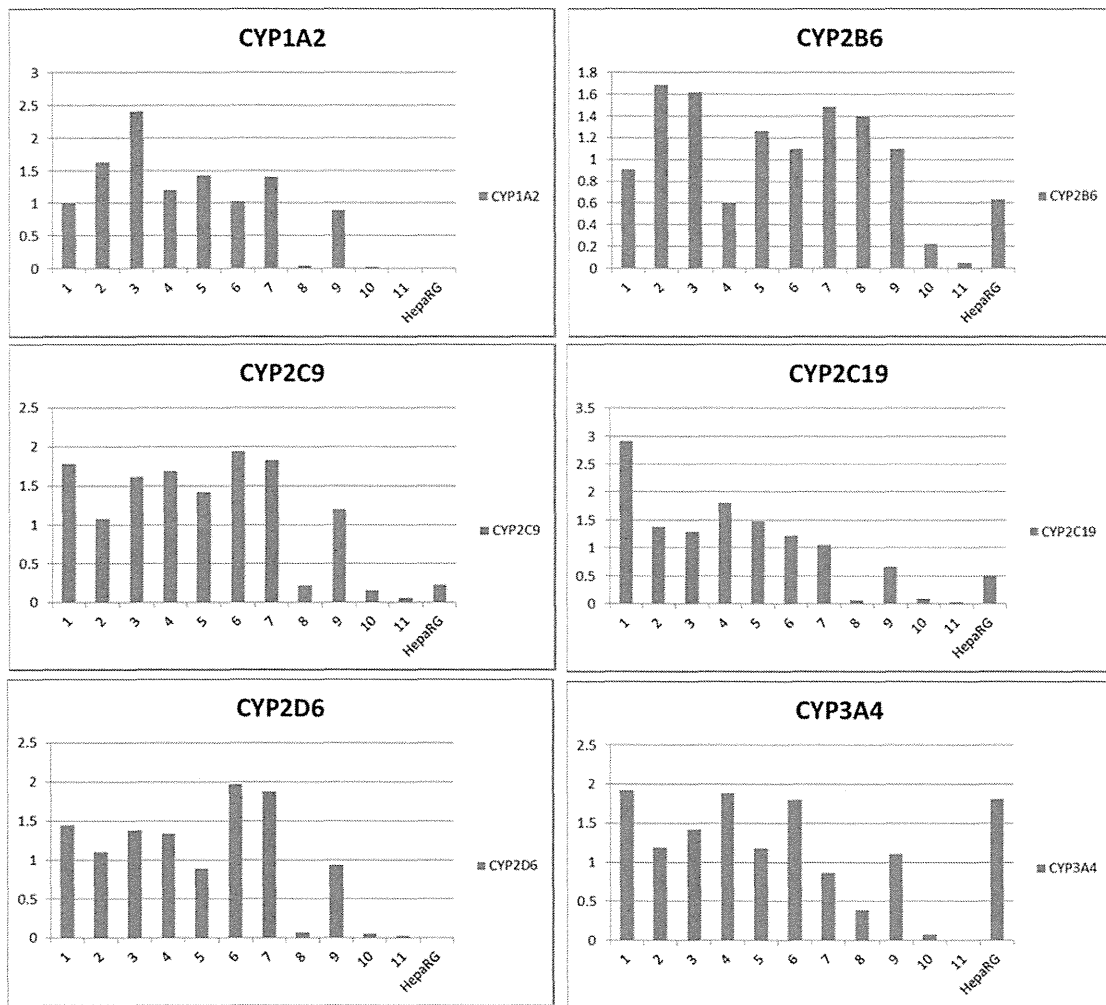


図 15 ゲノム DNA のメチル化解析

ヒト初代培養肝細胞、HepaRG 細胞、HepG2 細胞におけるメチル化のデータを hierarchical clustering により解析した。ヒートマップの色はメチル化の度合いを示しており、青は「メチル化の度合いが少ない」、赤は「メチル化の度合いが多い」ことを示している。



BioChain

human adult liver RNA.

- 1 : A602084.
- 2 : A610220.
- 3 : A507018.
- 4 : A610219.
- 5 : A605073.
- 6 : A801051.
- 7 : A801128.
- ~~8 : A801129.~~
- 9 : A801130.
- ~~10 : A801136.~~
- ~~11 : A801137.~~
- HepaRG.

pooled.

↓

used as standard curve.

↓

relative expression = 1

↓

expression level is equal to that in human liver

図 16 quantitative PCR (qPCR)用検量線作成のためのヒト肝臓由来 RNA の検討
BioChain 社のヒト肝臓由来の RNA を 11 種類用いて CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 発現を real-timePCR で測定した結果である。発現のばらつきが大きかった 3 ドナーの RNA を除いた RNA をプールして検量線作成に用いることにした。

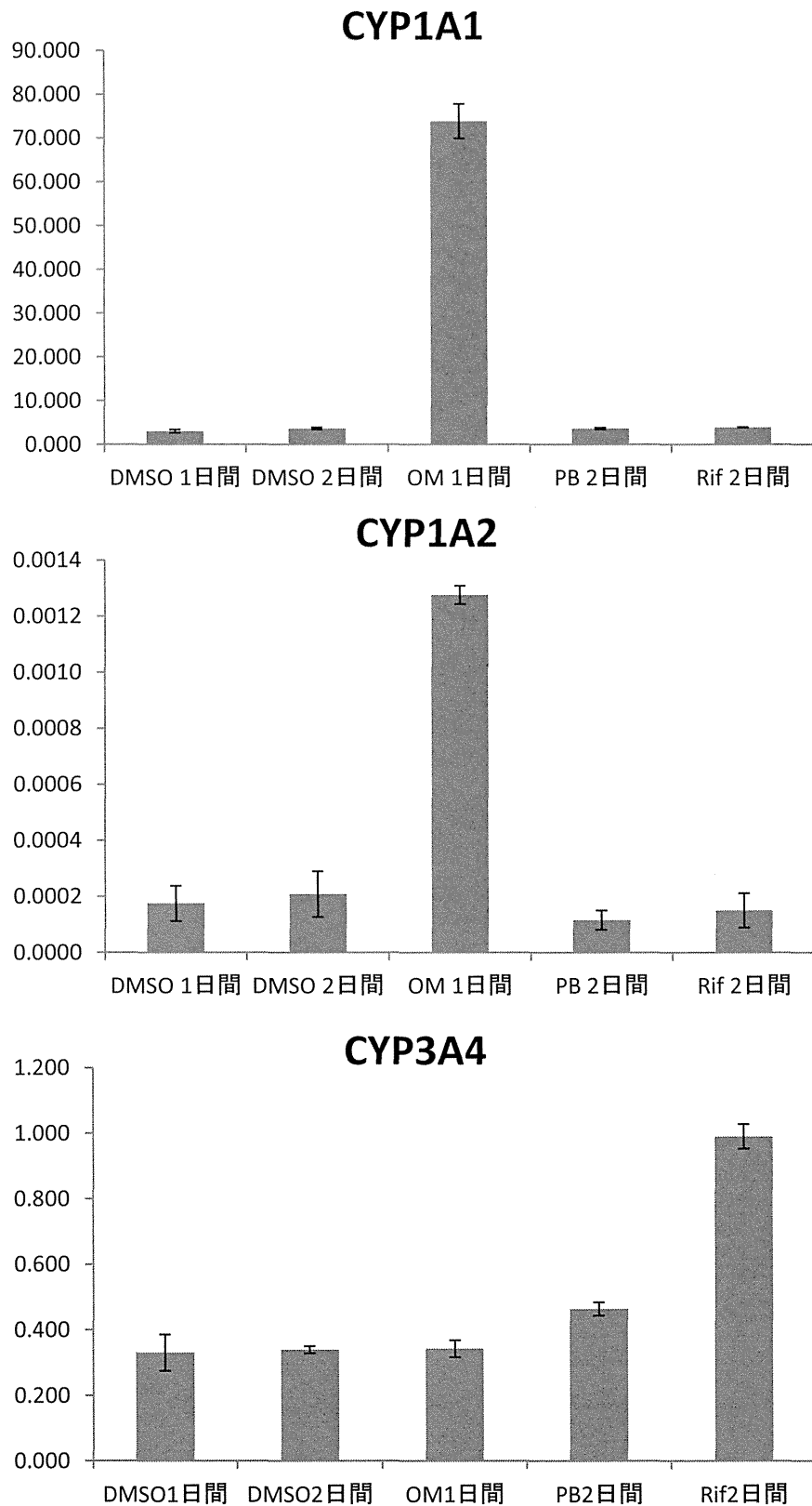


図 17 ヒト肝臓由来 RNA を使用した検量線を用いた発現量評価
 播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、BioChain 社のヒト肝臓由来の RNA を使用した検量線より求めた発現値である。

表 1. B 社 使用培地

iCell Hepatocytes 2.0 Plating Medium1, 2, 3, 4		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
RPMI	96	96%
B27	2	2%
Oncostatin M (10 µg/ml)	0.2	20 ng/ml
Dexamethasone (5 mM)	0.002	0.1 µM
Gentamicin	0.05	25 µg/ml
iCell Hepatocytes 2.0 Medium Supplement	2	1X

4°C で 1 週間保存可能。-20°C で保存してはいけない。

iCell Hepatocytes 2.0 Maintenance Medium*		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
RPMI	96	96%
B27	2	2%
Dexamethasone (5 mM)	0.002	0.1 µM
Gentamicin	0.05	25 µg/ml
iCell Hepatocytes 2.0 Medium Supplement	2	1X

その日に必要な量のMaintenance Mediumを用意する。

4°C で 1 週間保存可能。-20°C で保存してはいけない。

Assay medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
William's medium E (Phenol Red 不含)	200	96%
Dexamethasone (10mM)	0.005	0.1µM
Hepatocyte Maintenance Supplement Pack Cocktail B	8	4%

4°C で保存