

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 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 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 μ M omeprazole (CYP1A2)、500 μ M phenobarbital (CYP2B6)、20 μ 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、1 μ M -25-ジヒドロキシビタミン D₃ を曝露した。ペプチドの取り込み実験では、-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 \cdot 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 \cdot 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、sulfipyrazone、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、1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 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 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 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 桑昭苑 「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 桑昭苑 「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 桑昭苑 「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