

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 ) 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 μM omeprazole, 1day

CYP2B6 : 500 μM phenobarbital, 2 days

CYP3A4 : 20 μM 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、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、 $\beta$ -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、 $\beta$ -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 (  $\beta$ -naphthoflavone、phenobarbital、rifampicin ) で  $\geq 2$  倍の誘導があること

・ Proficiency substances ( carbamazepine、phenytoin、sulfipyrazone、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ようような培養条件(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、厚労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

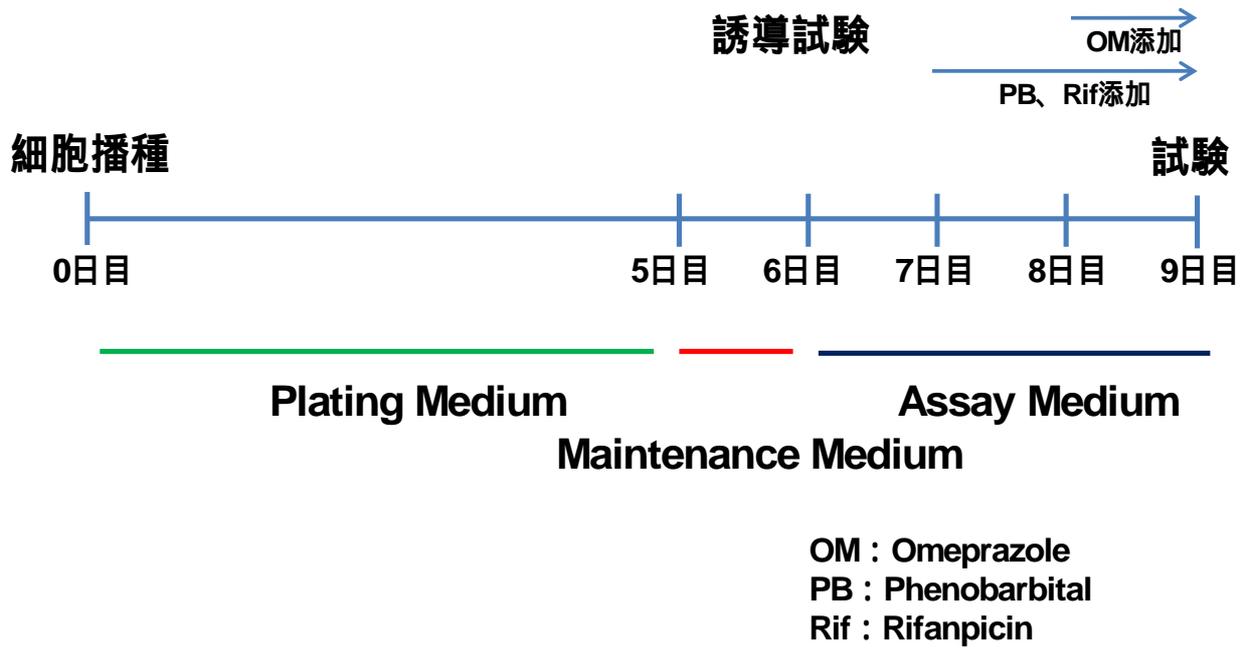
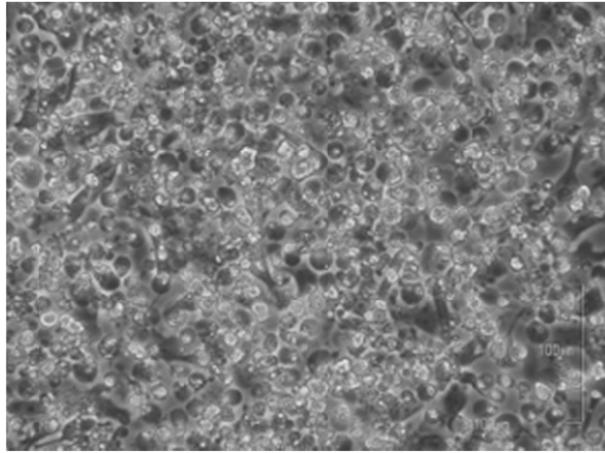


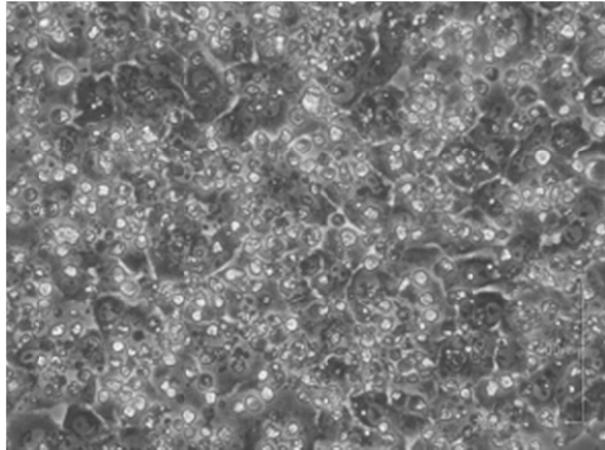
図1 B社の細胞に関する Time Course

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)**

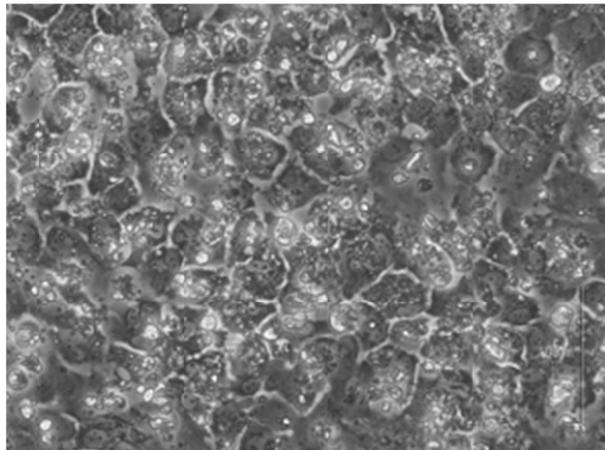
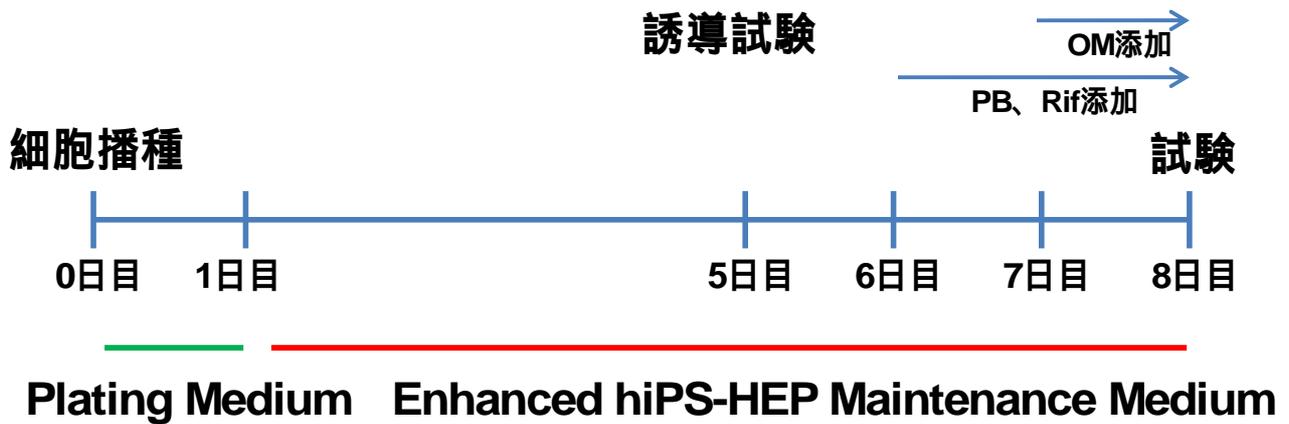


図 2 B 社の細胞の経時変化

- 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

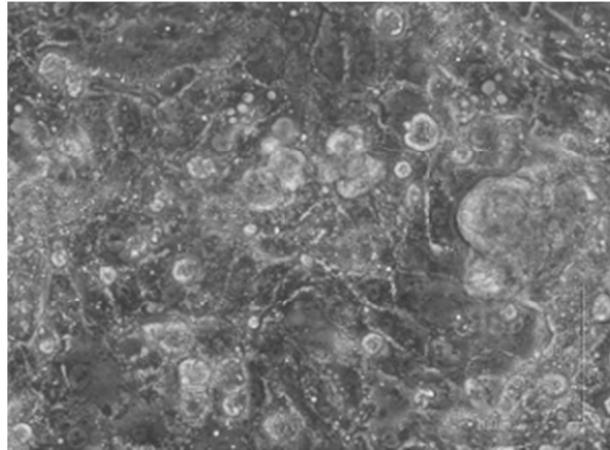


OM : Omeprazole  
PB : Phenobarbital  
Rif : Rifampicin

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)**

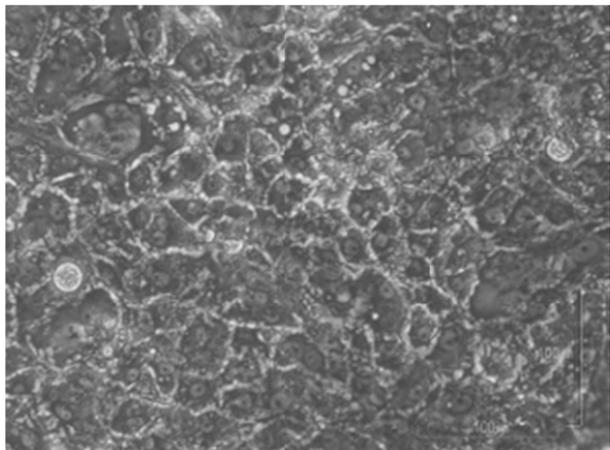


図4 C社の細胞の経時変化

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。

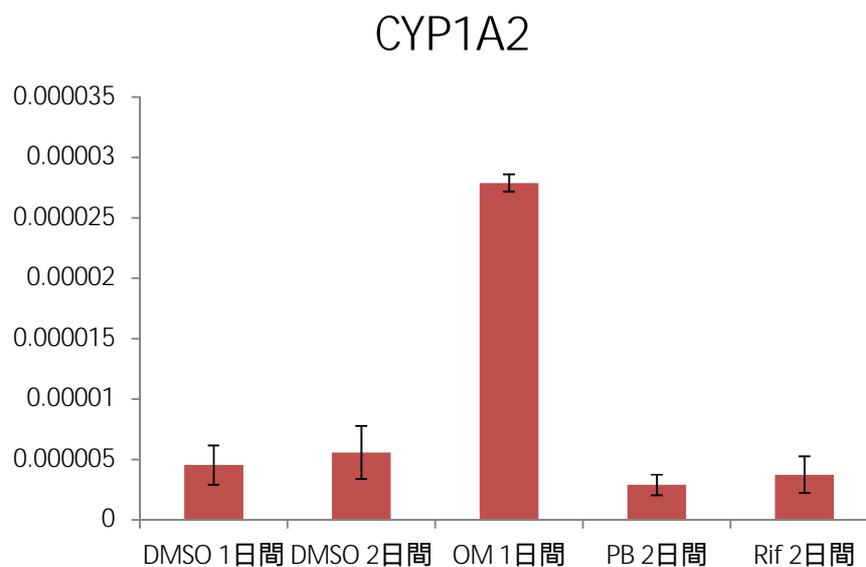
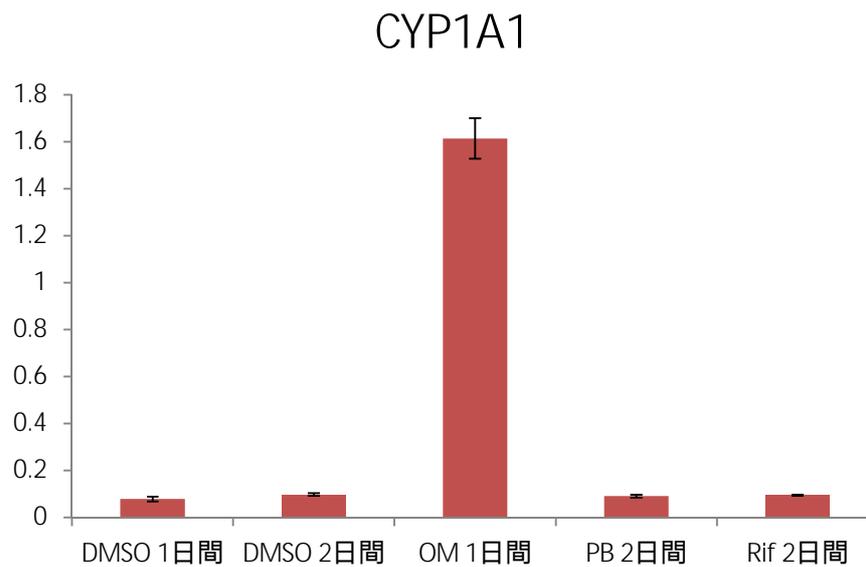


図5 B社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP1A)

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。

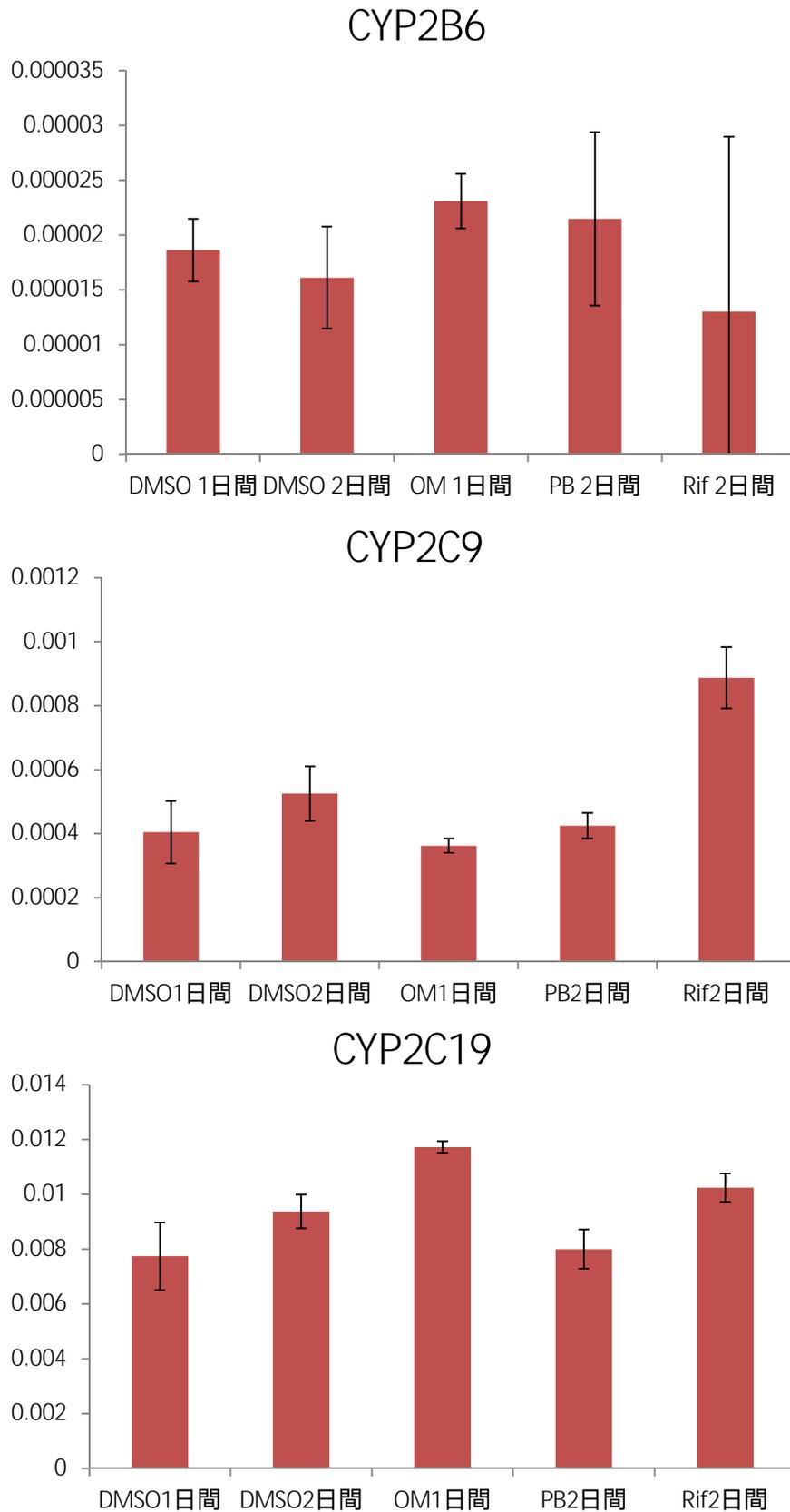


図6 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(CYP2B、2C)  
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で除することによって規格化した値である。

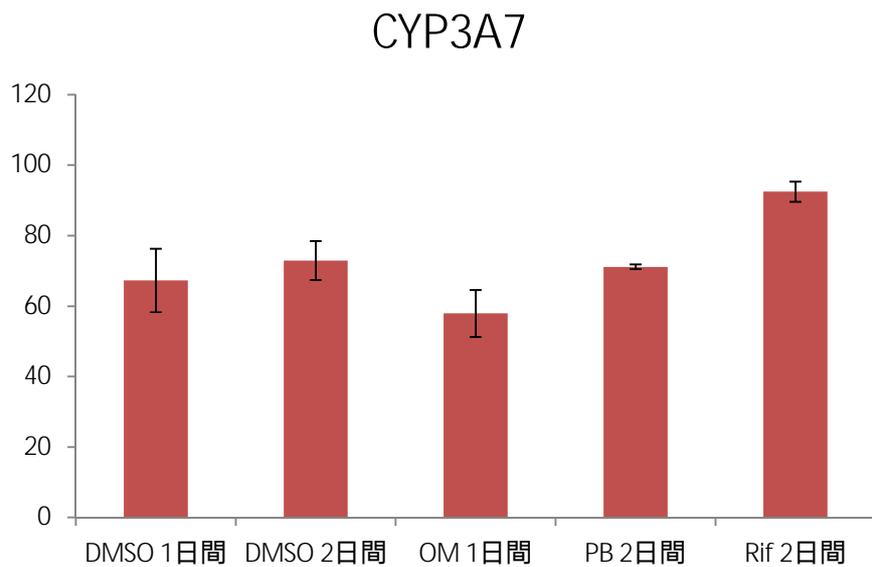
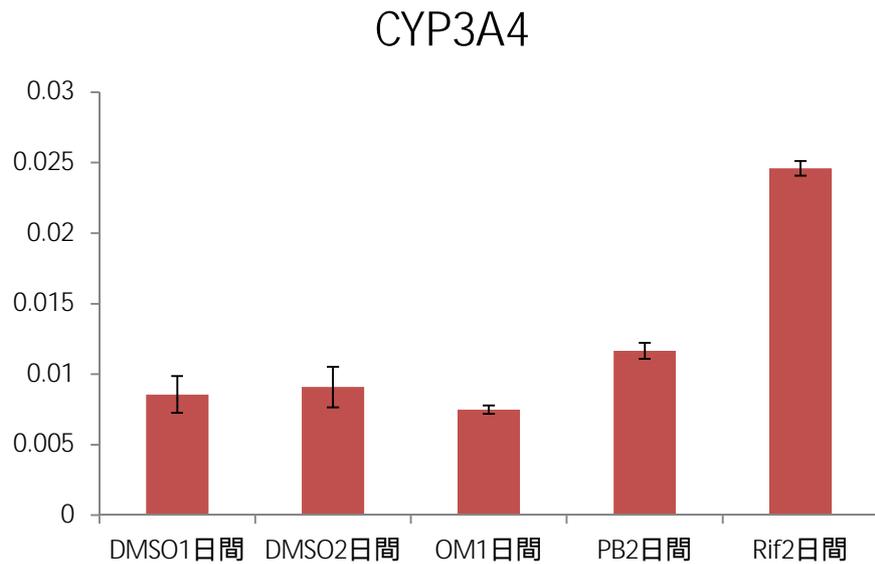


図7 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(CYP3A)  
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

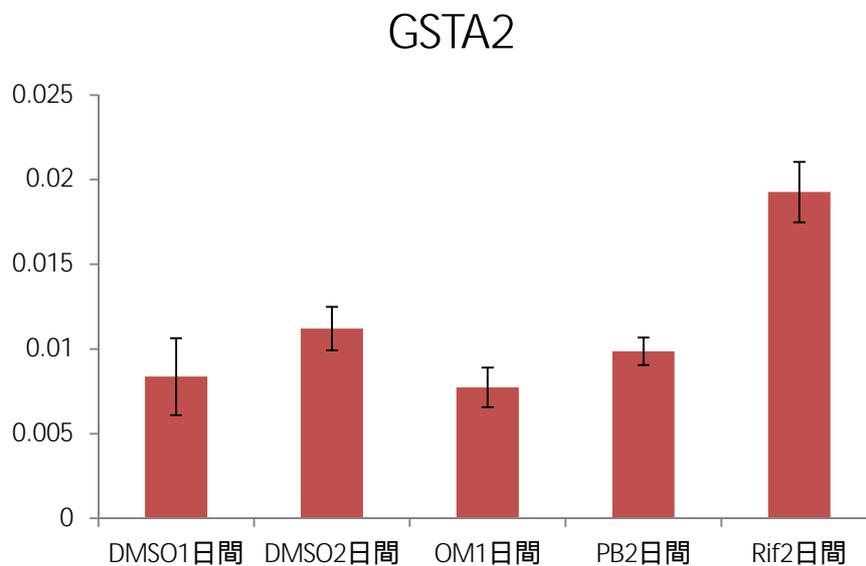


図8 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(第2相酵素)  
播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で徐することによって規格化した値である。

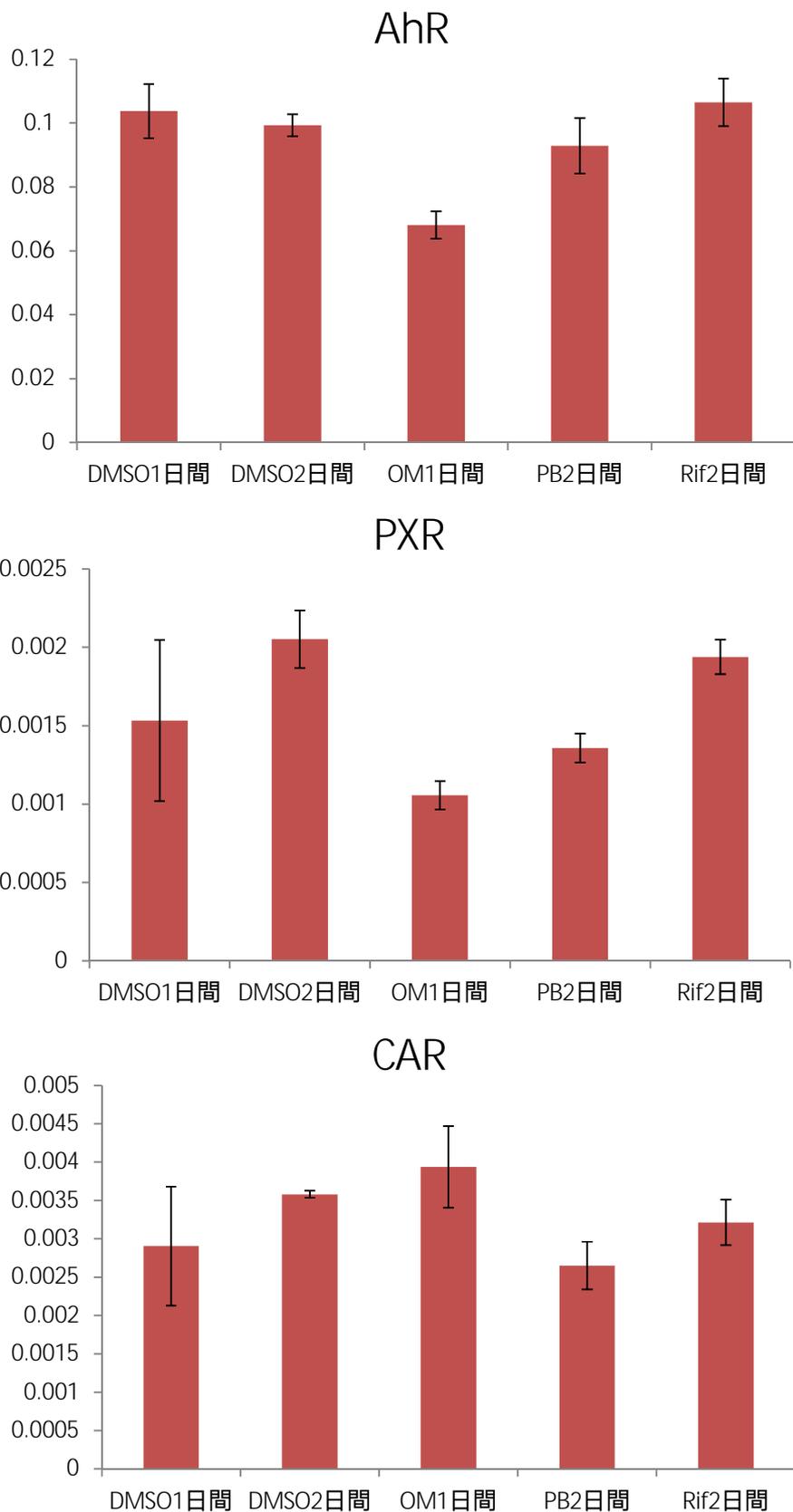


図9 B社の細胞におけるqPCRによるCYP代謝酵素の発現解析(核内受容体)  
 播種9日目にRNAを回収し、real-time PCRにより、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値をActinの発現値で除することによって規格化した値である。

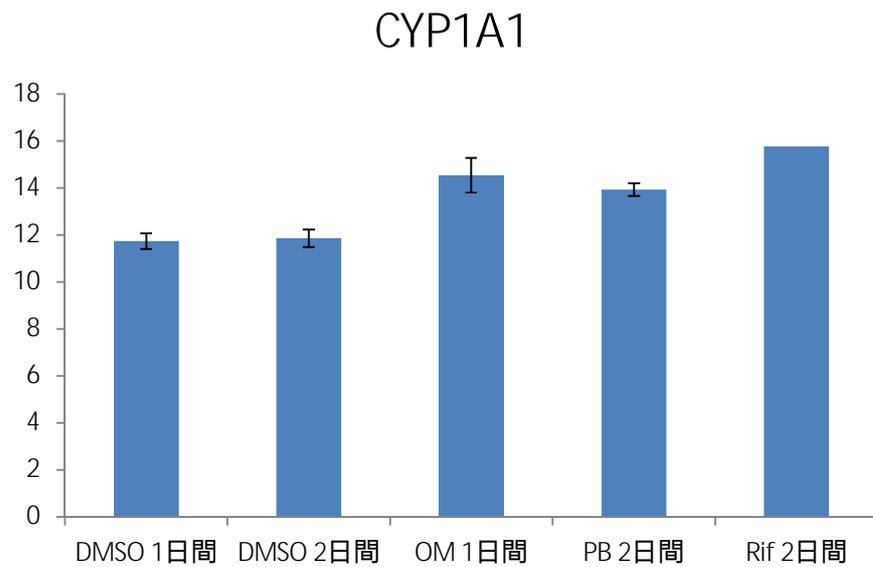
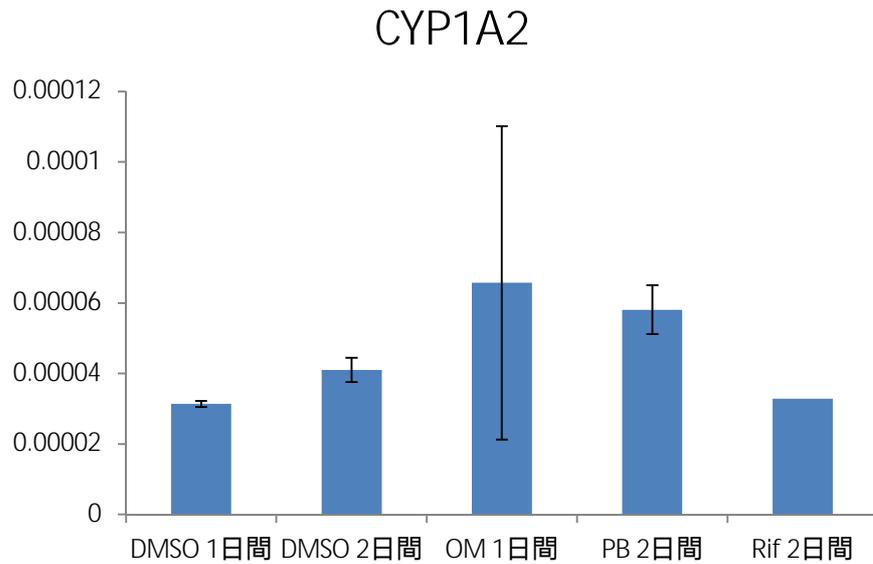


図 10 C社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP1A)

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 の発現値で除することによって規格化した値である。

## CYP2B6

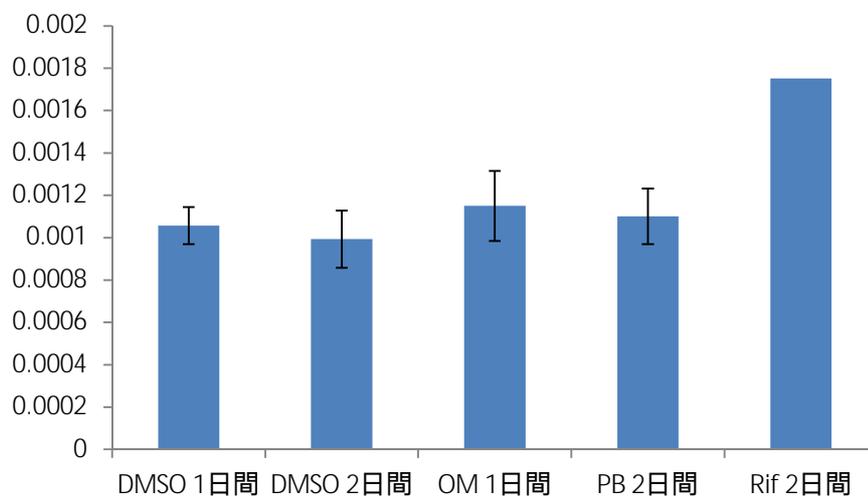


図 11 C 社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP2B)  
播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で徐することによって規格化した値である。

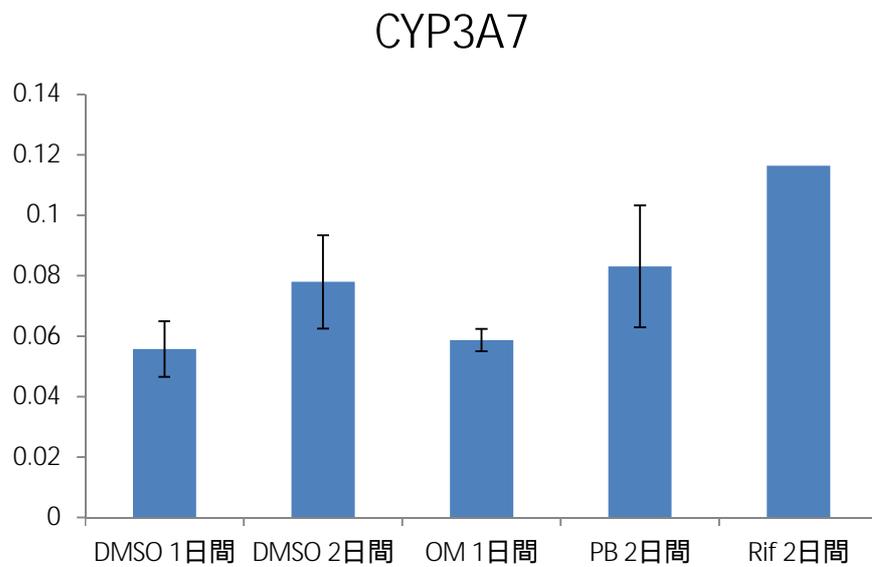
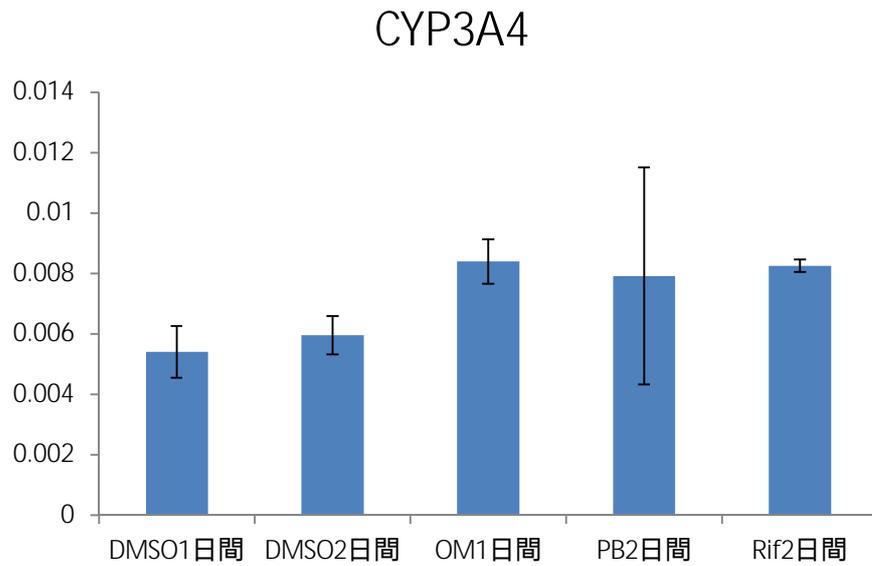


図 12 C社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (CYP3A)  
 播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で徐することによって規格化した値である。

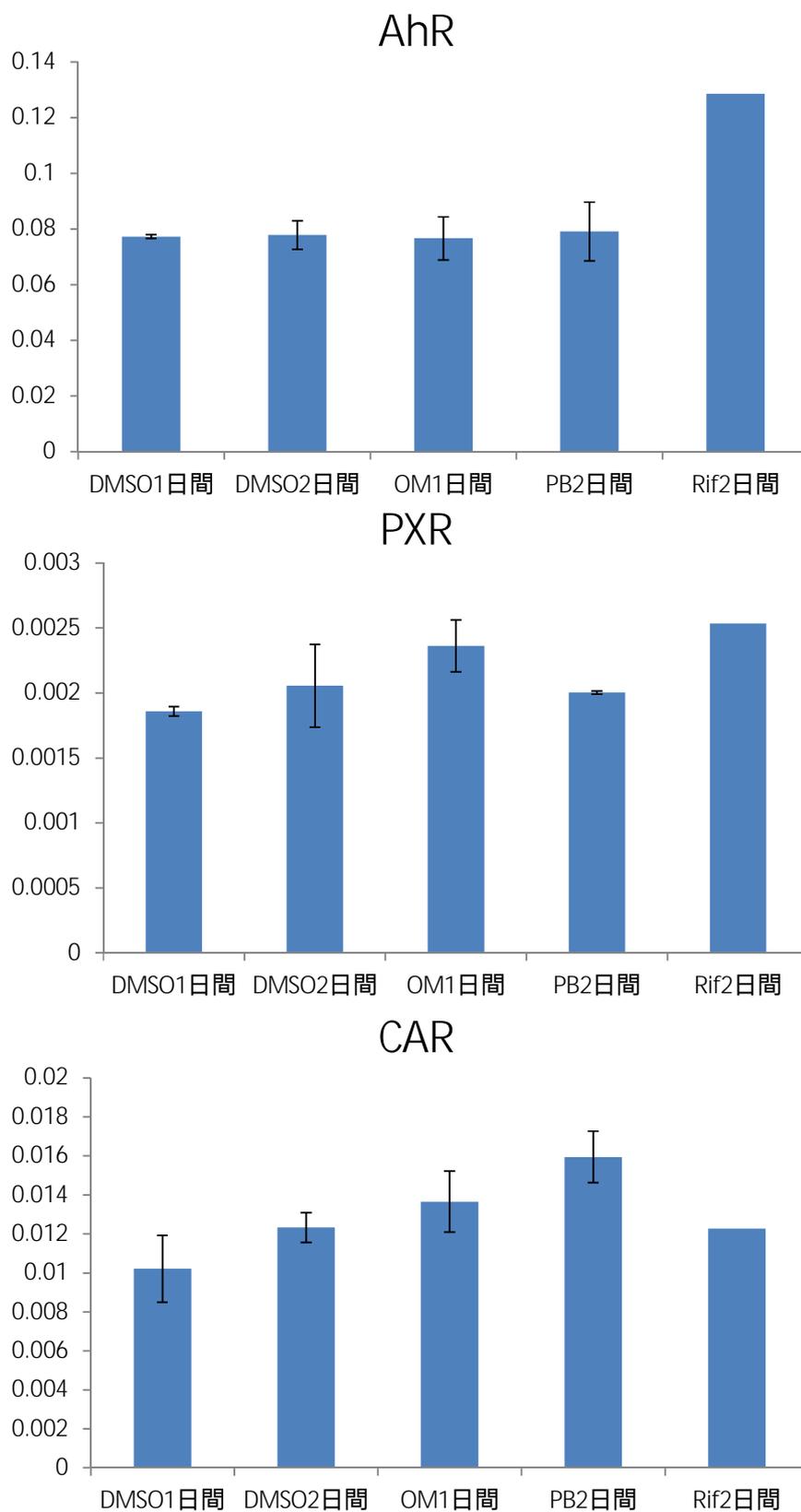


図 13 C 社の細胞における qPCR による CYP 代謝酵素の発現解析 (核内受容体)  
 播種 8 日目に RNA を回収し、real-time PCR により、それぞれの薬物代謝酵素の発現を測定した。縦軸の値は、測定された薬物代謝酵素の発現値を Actin の発現値で除することによって規格化した値である。

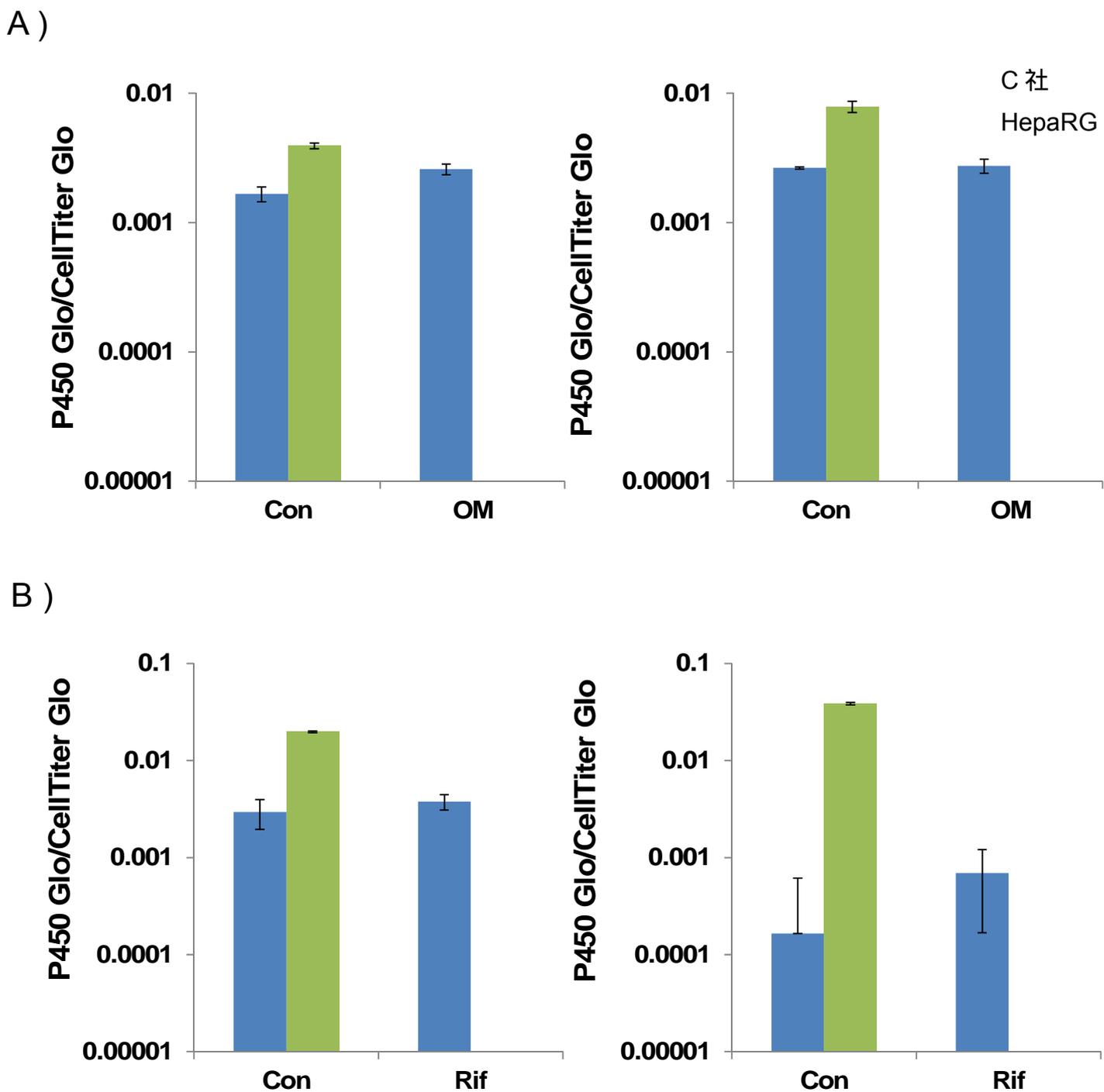


図 14 C社の細胞における代謝活性

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

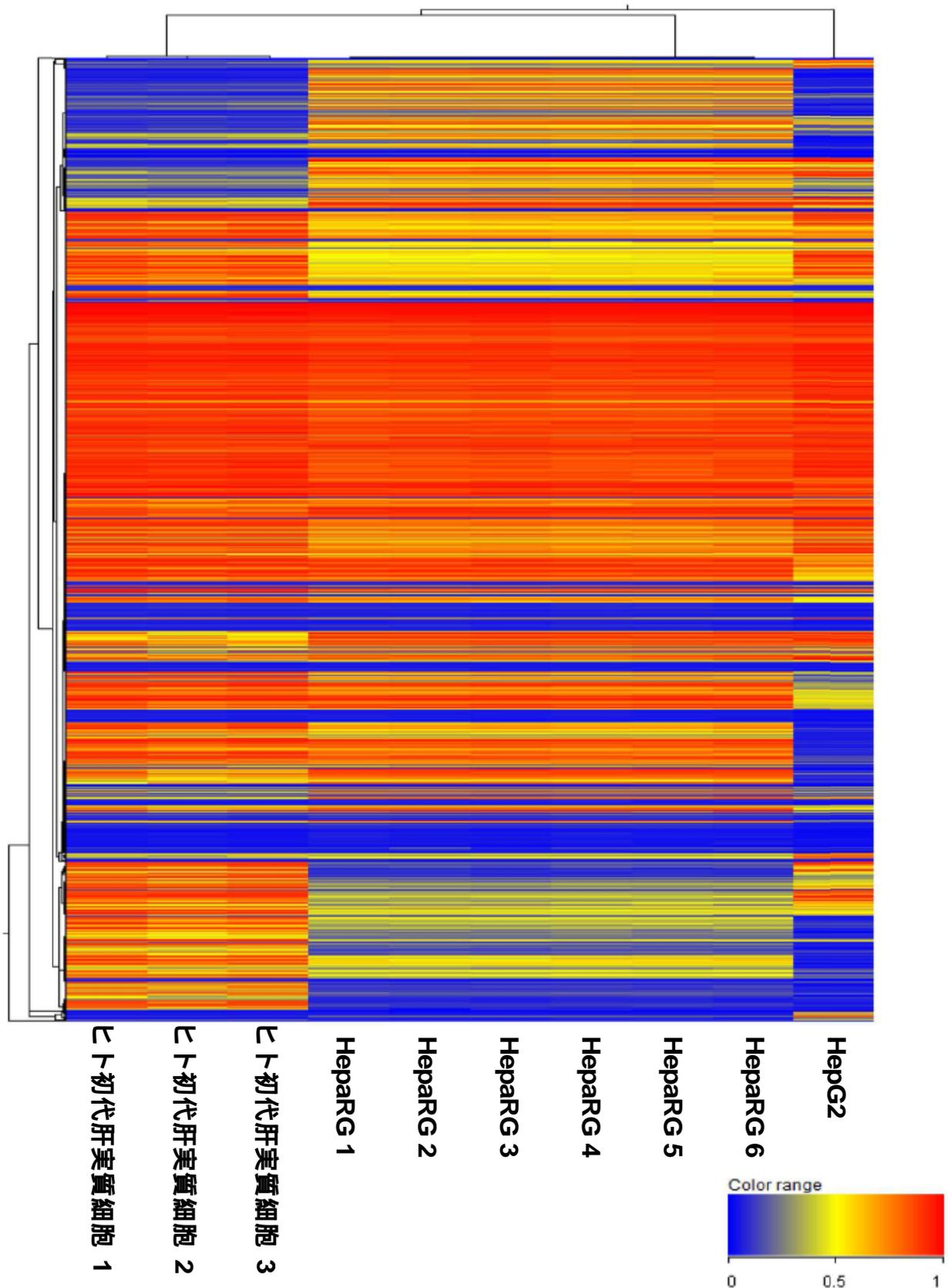
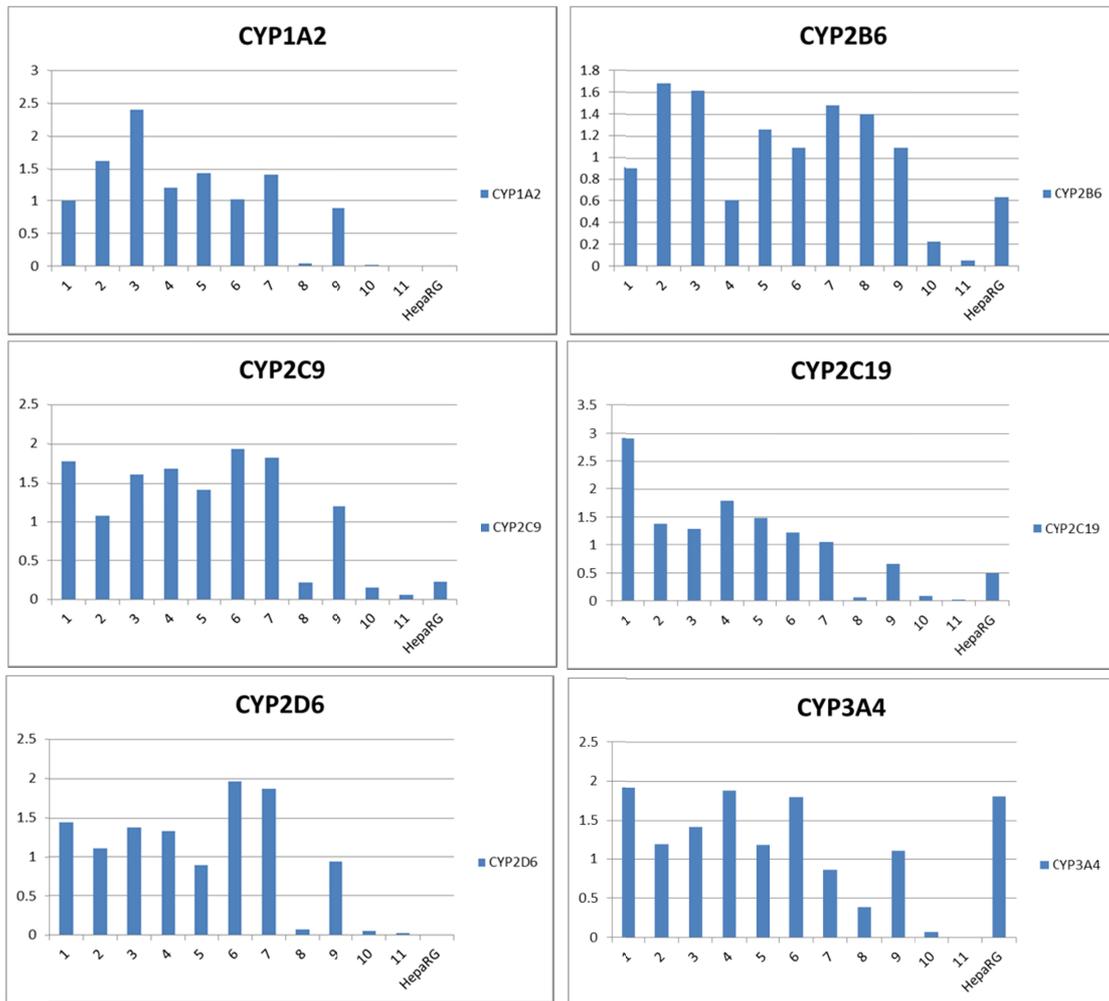


図 15 ゲノム DNA のメチル化解析

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。

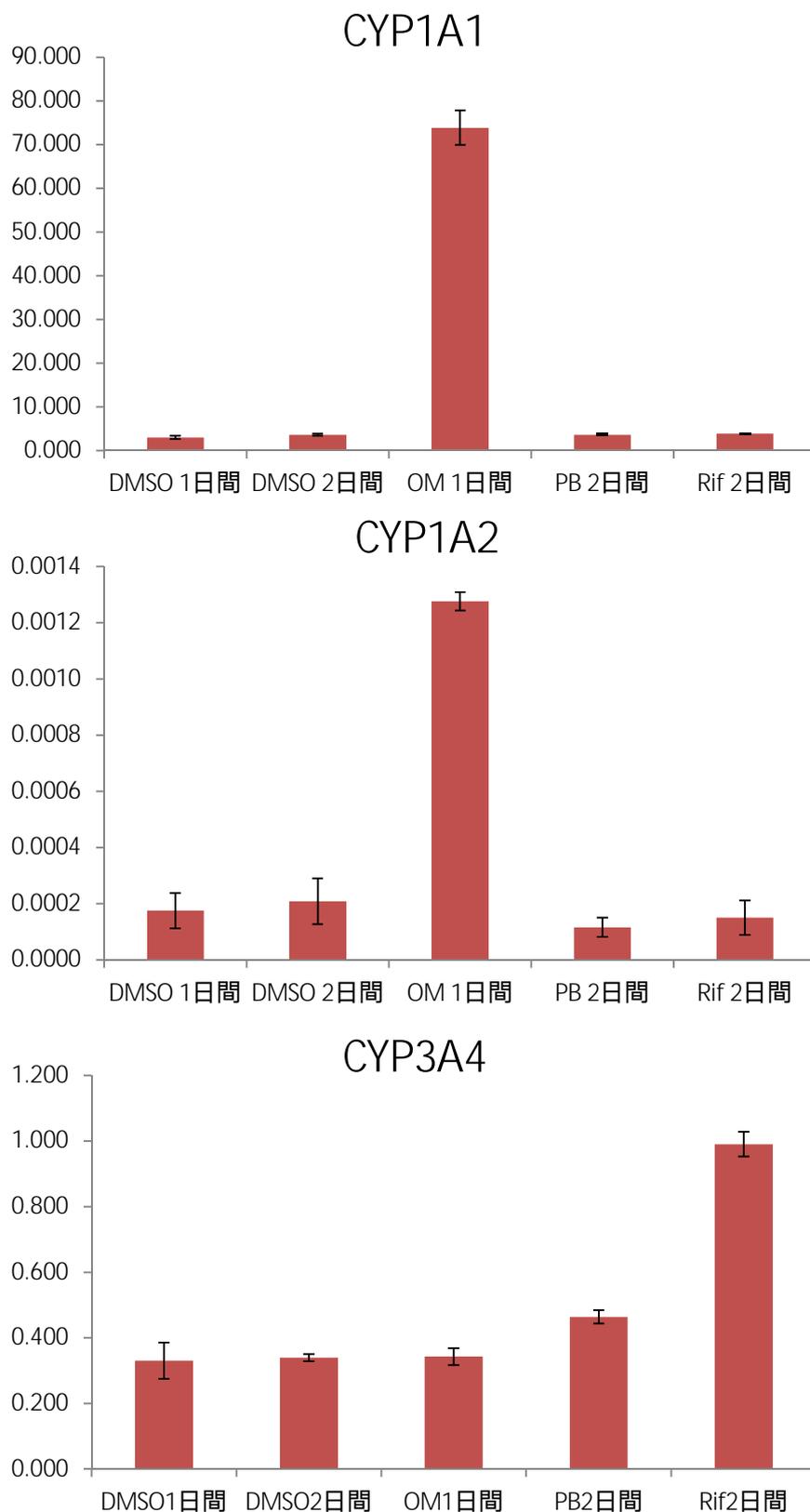


図 17 ヒト肝臓由来 RNA を使用した検量線を用いた発現量評価

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

<b>iCell Hepatocytes 2.0 Plating Medium<sup>1, 2, 3, 4</sup></b>		
<b>Component</b>	<b>Amount (ml)</b>	<b>Final Concentration</b>
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。

<b>iCell Hepatocytes 2.0 Maintenance Medium*</b>		
<b>Component</b>	<b>Amount (ml)</b>	<b>Final Concentration</b>
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。

<b>Assay medium</b>		
<b>Component</b>	<b>Amount (ml)</b>	<b>Final Concentration</b>
William's medium E ( Phenorl Red 不含 )	200	96%
Dexamethasone (10mM)	0.002	0.1µM
Hepatocyte Maintenance Supplement Pack Cocktail B	8	4%

4 で保存

表 2 . C 社 使用培地

Thawing Medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
InVitroGRO HT	250	99.5%
Penicillin-Streptomycin	1.25	0.5%

2~8 で保存 ( 1 ヶ月間 )

その日に必要な量の培地を分注し、使用前に Y27632( 室温 ) を終濃度 5  $\mu$ M, で添加する。

Plating Medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
InVitroGRO CP	250	99.5%
Penicillin-Streptomycin	1.25	0.5%

2~8 で保存 ( 1 ヶ月間 )

その日に必要な量の培地を分注し、使用前に Y27632( 室温 ) を終濃度 5  $\mu$ M, で添加する。

Base Maintenance medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
William's medium E	500	99.9%
Penicillin-Streptomycin	0.5	0.1%

2~8 で保存 ( 1 ヶ月間 )

Enhanced hiPS-HEP Maintenance medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
Base Maintenance medium	49	%
HEP Supplement	1	2%
DMSO	0.25	0.5%

-15 以下で保存 ( 1 ヶ月 ) 凍結融解を繰り返してはいけない

Assay medium		
Component	Amount (ml)	Final Concentration
William's medium E ( Phenol Red 不 含 )	50	96%
Dexamethasone (10mM)	0.007	1.4 $\mu$ M
Hepatocyte Maintenance Supplement Pack Cocktail B	2	4%

4 で保存