

や胆管系酵素が放出されるか否かを確認したところ、未分化ヒト i P S・E S細胞では検出されなかったが、分化誘導された肝細胞においては肝酵素 (GOT、GPT、LDH4、LDH5) が著明に放出されることが明らかとなった。興味深いことに、分化細胞の培養上清中においては胆管系酵素 (γ -GTP、LAP) も検出され、胆管上皮細胞の存在が示唆された。このような細胞毒性は肝保護剤である PGE1 によって抑制された。

次に、肝細胞のみならず胆管上皮細胞の存在を確認するために、電子顕微鏡による微細形態を検討した。肝細胞に特有の中程度の長さの絨毛、細胞間のデスマゾームとタイトジャンクション、肝内微細胆管構造、グリコーゲン α 顆粒 (ロゼット形成) が確認され、成熟肝細胞の存在が明らかとなった。さらに、短い絨毛と反対側の基底膜構造を有する胆管上皮細胞も確認された。

以上より、肝細胞のみならず胆管上皮細胞の誘導も確認されたので、両者の前駆細胞である肝芽細胞の確認を試みた。免疫染色による検討により単層で増殖マーカー陰性の成熟肝細胞領域 (2核の細胞、AFP 陰性、AAT 陽性、アルブミン陽性) の他に、重層で増殖マーカー陽性、AFP 陽性、EpCAM 陽性の肝芽細胞領域と思われる部分が存在することが明らかになった。また、このような分化細胞は継代可能で、継代後にはラット肝芽細胞と類似の増殖能の高い「小型細胞」が出現することも確認した。

⑤ヒト E S細胞、ヒト i P S細胞からの褐色脂肪細胞の分化誘導

本年度は、ヒト E S細胞ならびにヒト i P S細胞から褐色脂肪細胞分化誘導を分化誘導することに成功した。手法は、前半の浮遊培養、後半の接着培養からなる 2 段階培養法で、全過程を通じて無フィーダー無血清である。

分化培養開始後 10-14 日間で細胞質に微細な脂肪滴を有する細胞が誘導され、褐色脂肪細胞の代表的なマーカーである PRDM16、UCP-1 の発現が陰性対照のヒト白色脂肪細胞とは異なり顕著に確認された。さらに、その他の褐色脂肪細胞マーカー (pgc1 α 、cide-A、cyt-c、elovl3、ppar α) の発現の確認、脂肪細胞全般のマーカー (ppar γ 、アディポネクチン) の確認、白色脂肪細胞マーカー (psat1、Ednra) が発現していないことの確認も行われた。UCP-1 のミトコンドリア局在確認が行われると同時に、そのような細胞の陽性率が 90-95%と、極めて純度の高い高効率な分化誘導であると判明した。電子顕微鏡による微細形態の検討においても、脂肪敵やミトコンドリアなど白色脂肪細胞とは大きく異なり、褐色脂肪細胞

の特徴を備えていると判定された。分化系路の検討においては、沿軸中胚葉 (PDGFR α 陽性) を経て、骨格筋のマーカー (Myf5、Pax3、Pax7) を発現し、従来の発生学の知見と合致していた。また、誘導に用いたサイトカインは造血系のサイトカインが主な組み合わせであるが、そのうちの 1 つ無くなっても褐色脂肪細胞への分化誘導ができなくなることが確認された。

次に、このような褐色脂肪細胞様々な機能について詳細に検討した。培養液中での高い酸素消費レベルと β アドレナリン受容体アゴニストによる亢進、マウス体内でのアドレナリン受容体アゴニストによる発熱、マウス体内における血中中性脂肪の低下作用、マウス体内における血糖降下作用、等が確認された。

D. 考察

本研究においては、実験動物モデルに頼らず、あくまでヒト細胞の簡便な培養系を駆使して、疾患の病態モデルの確立、治療法の開発や創薬に応用できる系の展開、高品質の細胞移植材料につながる技術開発、等を目指して研究を進める。

本研究で標的とする疾患はがん以外の最重要疾患、即ち代謝関連の生活習慣病全般である。肥満、糖尿病、代謝関連肝障害、などが含まれる。このような標的疾患の研究のためには、脂肪細胞、肝細胞などが重要であるが、入手の困難さなどから、現状ではその利用極めて制限されている。このような状況を打破して、十分な細胞を駆使して研究を強力に推進するために、さまざまなモデル細胞を系を確立してヒトでの研究を強力に推進できるものと考えられる。

糖尿病の予後を決定するもっと重要な要素は合併症 (網膜症、腎症、神経症) であり、いずれも進行すると患者の QOL に深刻な影響を及ぼす。この様な合併症を克服できれば、糖尿病は恐れるに足る疾患ではなくなる。従って、合併症の発生と進展の分子機序を解明して、その成果に基づく先駆的治療が開発されれば、糖尿病の予後は格段に改善する。また、合併症発生の初期の変化をとらえるマーカーが明らかになれば、患者状態のモニターという面での利点も大きい。近年、糖尿病の合併症の病態を「細小血管症」としてとらえ、高血糖による血管内皮細胞などの傷害 (「糖毒性」) が合併症につながるという考え方である。本研究においてはこのような観点から、ヒトの血管内皮細胞を用いて糖毒性解析のための *in vitro* の解析システムを構築して高血糖によ

る血管内皮細胞傷害の機序を解明して、治療法開発や診断マーカー開発につなげる。今回用いた4種類のヒト初代培養血管内皮細胞すべてにおいて、高ブドウ糖濃度負荷によって細胞内の活性酸素が上昇することが観察された。この結果は、ウシ大動脈を用いてのBrownleeらの報告やヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた他の研究グループからの報告と一致する成果で、高血糖が酸化ストレスに結びつくことが確認できた。このような酸化ストレスは活性酸素消去剤であるNACで抑制されることも確認されており、実験系の妥当性が示されている。高血糖の際の細胞内ROSがどこから発生するかに関しては、ミトコンドリア由来という学説と細胞膜NADPHオキシダーゼ由来という学説が混在している。両者の機構は全く異なり、機序の解明と分子標的の探索のためにはどちらであるかを解明することが必須である。我々の解析により、ヒト大動脈内皮細胞等においてミトコンドリア由来、その他の多くのヒト血管内皮細胞では細胞膜NADPHオキシダーゼ由来で有ることが強く示唆された。したがって、Brownleeらのウシ大動脈内皮細胞を用いての研究からミトコンドリア説が提唱され、その他の多くの研究らがヒト臍帯静脈内皮細胞を用いてNADPHオキシダーゼを唱えたことは、動物の種差による現象ではなくて内皮細胞の種類による現象と考えられる。

血管は内腔を裏打ちする血管内皮細胞とそれを取りまく血管平滑筋細胞から構成される。様々な臨床的知見等から、血管内皮細胞が血管平滑筋細胞の増殖を抑制しながら血管構造の安定化に寄与していると考えられている。例えば、動脈硬化などの血管狭窄症においては、まず内皮細胞が変性・脱落し、その後に血管平滑筋細胞が過剰増殖することで血管内腔が狭くなると考えられる。このように、生体内では血管内皮細胞が血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果を発揮していることは確実と思われるにも関わらず、これまでのヒト初代培養血管内皮細胞を用いた実験系では血管平滑筋細胞の増殖抑制作用は検出されず、むしろ血管内皮細胞は可溶性因子を介して血管平滑筋細胞の増殖を促進することが示されてきた。一般に「初代培養細胞」においては、生体内での機能がその継代培養過程で喪失される場合があることはよく知られている。即ち、血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果が検出されなかった原因として、実験に用いられたヒト初代培養血管内皮細胞ではすでにその機能が喪失していたことが想定される。そこ

で我々は、ヒト初代培養血管内皮細胞の代わりに、霊長類（サル、ヒト）ES細胞から作製された血管内皮細胞、ならびに末梢血単球由来血管内皮前駆細胞から作製された血管内皮細胞を用いて実験を行うことにより本来の増殖抑制作用が検出できたのではないかと考えられる。

本研究においては、ヒトES細胞やヒトiPS細胞から成熟機能を有するヒト肝細胞を誘導することに成功した。このような肝細胞は、薬剤毒性試験など応用が期待できる他に、糖尿病の重要病態であるインスリン抵抗性の研究に貢献しうるものと考えられる。また、先天性代謝異常症に合併した肝硬変の治療に使用できることが期待されている。さらに、肝炎ウイルス抵抗性等の様々の工夫を凝らせば、将来的には、ウイルス性肝炎患者の肝不全にも使用できる移植材料となりうるものと考えられる。また、我々の肝臓作成培養系では、胆管上皮細胞とその前駆細胞も同時に誘導されることが確認された。肝障害のみならず、胆管上皮細胞の疾患や障害も临床上重要であり、我々の培養の応用範囲が大きく広がったものと考えられる。

脂肪細胞には、脂肪をため込みメタボへと進む悪玉の白色脂肪細胞の他に、エネルギーを消費して発熱し、寒冷刺激に対応して脂肪や糖を消費する善玉と呼ぶべき褐色脂肪細胞が存在する。このような善玉の褐色脂肪細胞がマウスなどの小動物に存在することは古くから知られているが、ヒトを始めとする大型動物にも存在することが近年明らかにされ、注目されている。このような特殊な脂肪細胞は、白色脂肪細胞と異なり、体内の奥深く（例えば椎体脇）など得ることが困難な部位に局在し、研究がほとんど行われていない。本研究によってヒトES細胞やヒトiPS細胞からヒト褐色脂肪細胞が分化誘導できれば、細胞移植療法のための細胞作成という観点のみならず、メタリックシンドロムの創薬にも貢献できる貴重な細胞材料の創出という展開も想定され、代謝性疾患の医療に幅広く応用されうるものと考えられる。

E. 結論

ヒト血管内皮細胞（ヒトES細胞やヒトiPS細胞から誘導した細胞も含む）を用いた糖尿病合併症モデル系の確立（糖毒性による*in vitro*細小血管障害系の開発）、ヒト血管内皮細胞（ヒトES細胞やヒトiPS細胞から誘導した細胞も含む）によるヒト平滑筋細胞の増殖動態への影響の解析、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの肝細胞の分化誘導系の確立、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞からの褐色脂肪細胞の分化誘導、

を推進し、顕著な成果を上げることができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Gokoh M, Yasuda K, Saeki Ku, et al.: Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells. Cellular Reprogramming 13:361-370, 2011.
2. Saeki Ku. A Feeder-Free Culture Method for the High Efficiency Production of Subculturable Vascular Endothelial Cells from Human Embryonic Stem Cells. Lineage-Specific Differentiation of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Methods and Protocol (Chapter 20) edited by Kaiming Ye; Sha Jin; Heather Tanner. Springer Protocols Handbook series, Humana Press, Springer Science and Business, LLC, USA.
3. Nakamura N, Saeki Ku, Saeki Ko, et al: Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. Cellular Reprogram 14:171-185, 2012.

2. 学会発表

1. Nakamura N, Yasuda K, Saeki Ku, et al.: Tissue-specific involvements of mitochondrial electron transport chain in the hyperglycemia-induced superoxide overproduction in human vascular endothelial cells. The 7th Conference of Asia Society for Mitochondrial Research and Medicine, December 2010, Fukuoka, Japan.
2. Saeki Ku, Saeki Ko, et al.: A feeder-free and serum-free production of multi-functional mature hepatocytes with electron microscopically valid morphologies: towards an establishment of the global standard for human ES/iPS-based drug discovery tools. 9th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2011, Toronto, Ontario, Canada.
3. Saeki Ku, Saeki Ko, et al.: A novel system for the evaluation of vascular endothel-mediated smooth muscle growth inhibition: towards

development of novel therapeutics for arteriostenosis. The 4th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, November 2011, Beijing, China.

4. Saeki Ku, et al.: Directed differentiation of human pluripotent stem cells into brown adipocyte-like cells. The 4th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, November 2011, Beijing, China.
5. 佐伯久美子、他：薬物代謝研究に使用可能なヒトESおよびiPS細胞由来肝細胞の作成。第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京。
6. 佐伯久美子、他：無フィーダー・無血清環境でのヒトES細胞からの赤血球および造血ストロマ細胞の作製。第10回日本再生医療学会総会、2011年3月、東京。
7. 佐伯久美子、他：Directed differentiation of human pluripotent stem cells into brown adipocyte-like cells. シンポジウム「褐色脂肪細胞の新展開」、2011年6月、札幌。
8. 佐伯久美子：動脈狭窄に対する創薬標的分子同定ならびにオーダーメイド医療開発に向けた細胞モデルの開発。第2回創薬イノベーションフォーラム、2011年7月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞由来高機能肝細胞とその製造方法及び薬剤代謝毒性試験方法
発明者：湯尾 明、佐伯久美子、中村直子、松山さと子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社

特願2011-019103

平成23年 1月31日

発明の名称：多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞とその製造方法並びに細胞療法的使用

発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社

特願2011-100218

平成23年 4月27日

発明の名称：多能性幹細胞由来高機能肝細胞とその製造方法及び薬剤代謝毒性試験方法

発明者：湯尾 明、佐伯久美子、中村直子、
松山さと子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川
護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究セン
ター総長、ディナベック株式会社

PCT/JP2012/052007

平成24年 1月31日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

創薬支援のためのヒト肝薬物輸送と代謝を評価する 安定かつ再現性に優れた細胞レベルでの試験系の 提示と毒性評価への応用研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
研究代表者 石田 誠一

研究期間：平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨

創薬で希求されるヒト肝臓の薬物の輸送・代謝・毒性を予測できる *in vitro* 実験法の確立を目指し、肝細胞を代替し、いつでも目的に合わせて利用でき、再現性良くデータ取得が可能な細胞系の構築に関する検討を行い、所期の結果を得た。

研究分担者

- | | |
|--|-------|
| (1) 東北大学大学院薬学研究科
薬物動態学分野 | 山添 康 |
| (2) 岩手医科大学薬学部
薬物代謝動態学講座 | 小澤 正吾 |
| (3) 積水メディカル株式会社
薬物動態研究所 | 安達 弥永 |
| (4) 田辺三菱製薬株式会社
薬物動態研究所 | 山田 泰弘 |
| (5) 東京大学大学院薬学系研究科
医薬品評価科学講座 | 杉山 雄一 |
| (6) アステラス製薬株式会社
創薬推進研究所 | 神山 佳輝 |
| (7) エーザイ株式会社
筑波薬物動態研究室 | 竹中 理 |
| (8) 武田薬品工業株式会社
薬物動態研究所 | 森脇 俊哉 |
| (9) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
神戸医薬研究所薬物動態・安全性研究部
(H23 年 11 月 30 日まで) 五十嵐 隆
(H23 年 12 月 1 日より)オラフ・シェーファー | |

A. 研究目的

創薬プロセスでは候補化合物の毒性予測の精度が高くない為に開発が中止となる例が未だに報告されている (*Nature Rev. Drug Discov.* 2004)。これは、ヒトと動物では同じ化合物でも細胞への取込みや排泄、代謝反応や反応性が違う種差によるところが大きい。また、創薬プロセスの初期過程ではヒトの *in vivo* のデータを入手することはほぼ不可能であることも理由である (*Chem. Res. Toxicol.* 2009)。この為、ヒト試料による *in vitro*

評価系としてヒト肝初代培養細胞による評価が広く行われているが、ドナーの個人差によるばらつきや再現性、供給を海外に依存している為、人種差や供給体制の問題がある。その為、それらに代わる安定供給が可能で高い再現性を持つ試験法の開発が求められている。又、毒性予測では代謝産物が毒性発現に関与している例も多く知られており、代謝活性を内包する毒性評価系の開発が必要である。そこで、本研究では、

- I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用：
 1. ヒト肝臓で薬物代謝に関与している主要 5 CYPs のアデノウイルスによる共発現の検討
 2. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3次元培養の効果
 3. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討
 4. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発
 5. AdCYP 細胞の凍結・融解による保存の検討
- II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立：
 6. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト *in vivo* におけるクリアランスの予測能力の検証
 7. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 実験の結果からヒト *in vivo* における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集
 8. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評

価のための sandwich culture 実験系の確立に関する検討を実施した。

当該研究により、ヒト肝初代細胞を代替し、いつでも目的に合わせて利用できる特性が確立し再現性の高い薬物の輸送と代謝の評価試験系の提示と毒性評価への応用が期待される。

B. 研究方法

1. ヒト肝臓で薬物代謝に関与している主要 5 CYPs のアデノウイルスによる共発現の検討

HepG2 細胞をプライマリア細胞培養用表面処理 96-well plate に播種した後、3日間予備培養した。次に、所定の MOI のアデノウイルスを含む培地を 25 μ L ずつ各 well に添加し、1時間培養することによりウイルスを感染させた。ついで、0.1 mL の培養培地を各 well に添加して 3 日間培養することにより各タンパク質を発現させた。各タンパク質を発現させた後、1/100 容量のカクテル基質溶液を含む反応培地を 0.125 mL ずつ各 well に添加し、37°C で 1 時間反応させた。インキュベーション終了後、各 well から反応液の一部を回収し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、上清中の基質代謝物を定量した。

2. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

○ マイクロスぺースプレート

HepG2 細胞をマイクロスぺースプレート (200 nm \times 200 nm \times 100 nm : W \times D \times H : クラレ) に、 4.0×10^5 cell/well の密度で播種した。また、対照実験として、通常の細胞培養用 24 ウェルプレート (BD ファルコン) に 1.0×10^5 cell/well の密度で播種した。前者は培養 6 日後に、後者は培養 3 日後にアデノウイルスの感染操作を行なった。アデノウイルス感染量を一定とするために、感染直前に両プレートの 3 ウェル分の細胞をトリプシン処理により回収し、ウェル内の細胞数を計数した。

○ Cell-able 24-well plate

(Scheme 1) スフェロイド形成予備培養

三次元培養の場合は、HepG2 細胞を Cell-able 24-well plate (トランスパレント) に播種した後、2、3、4 あるいは 7 日間予備培養した。二次元培養の場合は、HepG2 細胞をプライマリア 24-well plate (BD FALCON) に播種し、3日間予備培養した。予備培養後ウイルス感染させた。

(Scheme 2) 重複感染

HepG2 細胞をプライマリア 24-well plate ある

いは Cell-able 24-well plate に播種し、3日間予備培養した後ウイルス感染させた。重複感染の場合は、初回感染の 24 時間後に 2 回目の感染を行った。

(Scheme 3) 播種時の感染

HepG2 細胞をプライマリア 24-well plate あるいは Cell-able 24-well plate に播種し、直ちにウイルス感染させた。

3. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討

OATP1B1 安定発現 HepG2 細胞は平成 22 年度に実施の研究において輸送活性の高かった 2 ロットのクローンを用い、それぞれに対する CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞を作成した。コントロールは、上述の CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞と同様の条件で、コントロール細胞 (ベクターのみをトランスフェクションした HEK293 細胞) に LacZ adenovirus vector を感染させたものを用いた。この CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞を用い、1) OATP1B1 基質の輸送に対する阻害剤の影響を見るために Estrone sulfate または Atorvastatin の細胞内への取り込みに対する Ketoconazole (CYP3A4 阻害剤) 及び Rifampicin (OATP1B1 阻害剤) の効果、2) CYP3A4 基質の代謝に対する阻害剤の影響を見るために、Midazolam または Atorvastatin の CYP3A4 による代謝に対する Ketoconazole 及び Rifampicin の効果について検討を行った。

4. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

HuH-7 細胞と予め phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) でマクロファージ系へ分化を誘導した HL-60 細胞を混合して培養し、トログリタゾン を 2~4 日間作用させた後、MTT 法で細胞増殖阻害作用を調べた。

5. AdCYP 細胞の凍結・融解による保存の検討

培養 4 日目の HepG2 細胞を細胞凍結液に懸濁し、 -80°C にて保存した。細胞凍結液は、バンバンカー (Lymphotec 社)、TC プロテクター (DS ファーマバイオメディカル社)、セルバンカー 1, 2 (十慈フィールド社)、および、DMEM + 15% FBS + 10% DMSO を用いた。8 週間保存後、凍結細胞を融解し、トリパンブルーで染色後、生細胞数、死細胞数を計測した。

6. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト in vivo におけるクリアランスの予

測能力の検証

基質として、 $[^3\text{H}]$ Estradiol-17 β -D-glucuronide (E₂17 β G)、 $[^3\text{H}]$ Estrone-3-sulfate (E₁S)、 $[^3\text{H}]$ Bromosulfo phthalein (BSP)、および $[^3\text{H}]$ Pravastatin (PRV) を使用した。また阻害剤として、Rifampicin (Rif)、Cyclosporin A (CysA)、BSP および Gemfibrozil (Gem) を使用した。

常法に則りヒト凍結肝細胞 (Lot. Hu8075、Invitrogen 社) を融解後、Krebs-Henseleit Buffer (KHB) を用いて細胞懸濁液を調製し、ガラス試験管に分注後、実験開始まで氷上に保存した。また KHB に最終濃度の 2 倍の濃度となるように基質化合物および阻害剤を溶解し、Assay Buffer とした。反応開始前に肝細胞懸濁液を 37 $^{\circ}\text{C}$ の水浴で 2 分間温ブレインキュベーションし、あらかじめ 37 $^{\circ}\text{C}$ に温めておいた Assay Buffer を肝細胞懸濁液に等量添加することで取り込み反応を開始した。ヒト血清アルブミン (HSA) 添加群は 2% HSA 含有 Krebs-Henseleit buffer にて反応を開始した。能動輸送を止めるための手段としては、氷冷下、大過剰濃度の基質存在下、対象となるトランスポーターの比較的強力な阻害剤存在下、ATP 代謝阻害剤 (rotenone など) 存在下を用いて、結果を比較した。反応開始 0.5 分、2 分後にサンプリングを行い、Oil-Spin 法により肝細胞と Buffer を分離した後、回収した肝細胞は 2 N NaOH 水溶液で可溶化した。肝細胞および Buffer 中放射活性は、液体シンチレーションカウンターにて測定した。

7. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 実験の結果からヒト *in vivo* における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集

ヒト凍結肝細胞 (Lot. Hu4152 および GHA) をコーゲンコートプレートに播種後、1 日後に Matrigel を重層し、細胞播種後 6 日目に、rosuvastatin の胆汁中への排泄輸送を評価した。Sandwich-cultured human hepatocytes (SCHH) を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を含有あるいは含有しない Hank's balanced salt solution による 10 分間の前処理後に、rosuvastatin を添加し、0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 および 15 分間の胆汁中輸送を評価した。胆汁中排泄量は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 含有時の細胆管を含めた細胞内蓄積量から $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を含有しない時の細胆管開放時の細胞内蓄積量を差し引くことで算出した。胆汁排泄固有 CL は、細胞内タンパク非結合型濃度を基準として求めた。なお、細胞中タンパク非結合型分率は silicon layer 法より算出

した。輸送初期における細胞内取り込み CL は 0.5 分から 2 分間における細胞内蓄積量の傾きから、メディアウム中への排出 CL は rosuvastatin を preloading した細胞から 0.5 分から 2 分間に排出された化合物量の傾きから、代謝 CL は 60 分間までの消失量から、それぞれ求めた。

8. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評価のための sandwich culture 実験系の確立

HepaRG 細胞および OATP1B1 遺伝子発現細胞の両方を用いて、Estradiol-17 β -glucuronide (E₂17 β G) の取り込みに対する各種阻害剤の阻害定数を算出し、両者実験系間での比較を実施した。本年度は、昨年度に引き続き、化合物数を 12 に増やして、相関を観察することとした。

さらに、HepaRG 細胞を用いて、胆汁排泄トランスポーターの機能を評価するために、sandwich culture 系の確立を試みた。ヒト肝細胞と同様に、HepaRG 細胞の上下を collagen および Matrigel で覆い、培養を続け、bile pocket の形成能や carboxyldifluorescein (CDF)-diacetate が細胞内に入って代謝されて出す CDF の蛍光の細胞内から bile pocket への移動を観察できるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施している。

C. 研究結果

I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

1. ヒト肝臓で薬物代謝に関与している主要 5 CYPs のアデノウイルスによる共発現の検討

AdCYP2C19, AdCYP2D6, AdCYP3A4 及び AdCypb5 を任意の MOI で HepG2 細胞に感染させることで、ヒト肝細胞におけるそれぞれの相対比 (2C19:2D6:3A4=0.054:0.024:1) とほぼ同等の各 CYP 活性を共発現させることができた。

2. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

○ マイクロスペースプレート

アデノウイルス感染時の細胞数をほぼ一定とする条件下で AdCYP3A4 を感染させて、CYP3A4 酵素活性を測定した。その結果、単位タンパク質当た

りの酵素活性は、3次元培養時に1.6~2.2倍高かった。細胞当たりのCYP3A4発現量が3次元培養時に高かったのではないかと考え、ウェスタンブロット法により、単位タンパク質当たりのCYP3A4アポタンパク質レベルを比較したが、3次元培養に伴うアポタンパク質レベルの増加は認められなかった。そこで、ヘム合成量が亢進し、CYP3A4ホロ酵素の割合が増加している可能性を検討するために、ヘム合成の律速酵素である δ -アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1)の発現量を定量的逆転写PCR法により解析した。その結果、マイクロスペースプレートで培養して凝集塊を形成させると、ALAS1 mRNAレベルは1.9倍程度に増加した。一方、相互作用によりCYP3A4酵素活性を増強するNADPH-P450還元酵素(POR)やチトクロムb5(CYB5A1)に関しては、CYB5A1 mRNAレベルは減少傾向を示し、PORのmRNAレベルには変動が認められなかった。

○ Cell-able 24-well plate

(Scheme 1) 予備培養を3、4あるいは7日間行いスフェロイドを形成後AdCYP3A4感染させた場合、何れの予備培養期間においてもCYP3A4活性値はほぼ同じであった。また、それらの活性値は二次元培養でのそれらとほぼ同じであり、三次元培養による効果は認められなかった

(Scheme 2) 二次元および三次元培養共における重複感染による影響を検討したところ、何れの培養法であってもCYP3A4活性はほぼ同じであり、二次元および三次元培養ともに重複感染による効果は認められなかった。

(Scheme 3) 細胞播種と同時にAdCYP3A4感染を行った。二次元と三次元培養におけるCYP3A4活性は、ほぼ同じ値であり、三次元培養による効果は認められなかった。

3. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討

CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞を作成し、その細胞の輸送及び代謝活性について検討を行った。その結果、CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞中への Estrone sulfate 及び Atorvastatin の取り込み量はいずれのクローンもコントロール細胞より高く、時間依存的な取り込み量の増加も認められた。また、Pravastatin については、コントロール細胞と CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞の取り込み量の差はわずかであるものの、いずれのクローンにおいても取り込み時間 1 min においてはコントロールとの有意な差が認められた。CYP3A4/OATP1B1 共発現

細胞による Midazolam または Atorvastatin の代謝について、いずれのクローンにおいても CYP3A4 依存的代謝物である 1'-Hydroxymidazolam 及び p-Hydroxyatorvastatin の生成が認められ、その生成量は時間依存的に増加した。

CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞における 1) OATP1B1 基質輸送と 2) CYP3A4 代謝に対する Ketoconazole (CYP3A4 阻害剤) と Rifampicin (OATP1B1 阻害剤) の影響を検討した。その結果、1) Ketoconazole は Estrone sulfate 及び Atorvastatin の細胞内輸送に対して阻害作用を示さなかったが、Rifampicin は阻害作用を示し、2) Ketoconazole は Midazolam 及び Atorvastatin 代謝に対して阻害作用を示し、Rifampicin は Midazolam 及び Atorvastatin 代謝に対して阻害作用を示さなかった。これらより、それぞれの輸送及び代謝活性は各阻害剤により阻害されることが示され、本研究で作成した CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞はそれぞれの機能を正しく有していることが確認できた。

4. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

TPA 処理を 48~72 時間して分化を誘導した HL-60 細胞と HuH-7 細胞を共存した際に、トログリタゾンに対する細胞毒性の増強が観察された。HL-60 細胞の TPA 曝露依存的な細胞毒性の発現には細胞密度が密接に関連し、96 穴プレートで 1 ウェルあたり、HL-60 細胞、HuH-7 細胞共に 5 万の細胞を共存させた時に、TPA 曝露依存的な細胞障害性の増強が認められた。

5. AdCYP 細胞の凍結・融解による保存の検討

AdCYP 細胞は HepG2 細胞に CYP 発現アデノウイルスを感染させて作成する。実験に使用する毎にウイルスを感染させる煩雑さを避けるため、AdCYP 細胞を凍結保存する条件の検討を感染宿主となる HepG2 細胞を用いて行った。細胞凍結液により、回収されてきた生細胞数、生存率とも異なっていた。その中では、セルバンカー1 (十慈フィールド) が生細胞数、生存率とも良好な結果を与えた。

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

6. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト in vivo におけるクリアランスの予測能力の検証

本研究実施に当たり、十分な活性を有するヒト

凍結幹細胞を用いた検討を進めていくために、平成 22 年度においては、適切なロット探索を実施した。10 ロットについて、OATP 基質として、 ^3H -estradiol-17 β -glucuronide、NTCP 基質として、 ^3H -taurocholate を選択し、取り込みを観察し 3 ロットを選んだ。それらを用い以下の結果を得た。

○ ヒト凍結肝細胞を用いた蛋白非結合型阻害剤の濃縮率の評価法の確立

最初に、ATP 依存的な能動輸送を止めるための実験系として、氷冷条件下と ATP depletor である rotenone 存在下の両方で、定常状態における各種基質の細胞内と medium 中の総濃度比 (C/M ratio) を算出した。その結果、いずれの基質においても、氷冷下では、基質の輸送がほぼ完全にストップするのに対して、rotenone 存在下では、部分的にしか輸送が止まらないことが明らかとなった。このことから、以後は、氷冷条件下における C/M ratio と常温 (37 $^{\circ}\text{C}$) 条件下における C/M ratio を比較することにより、肝細胞内への非結合型リガンドの濃縮率 $K_{p, \text{uu}}$ 値および肝細胞内での蛋白結合率を見積もった。その結果、受動輸送によってしか輸送されないと考えられている antipyrine や diazepam については、C/M ratio が、氷冷下と 37 $^{\circ}\text{C}$ において変化ないことから、能動輸送の関与がないことが確認された。一方で、カチオンやアニオン性を示すトランスポーター基質薬物については、いずれも氷冷下より 37 $^{\circ}\text{C}$ における C/M ratio の方が高くなったことから、能動輸送が確認された。また、全体傾向として、有機アニオンの $K_{p, \text{uu}}$ 値の方が、カチオンの $K_{p, \text{uu}}$ 値より大きな値を示すことが分かり、いずれの化合物についても $K_{p, \text{uu}}$ 値は、1 以上の値となったことから、能動輸送の関与が示された。

○ 薬物輸送阻害能に与える蛋白量の影響

トランスポーター阻害剤の阻害能に対するタンパク結合の影響について in vitro 実験により検討した。その結果、rifampicin および cyclosporine A はヒト血清アルブミン (HSA) によって阻害の程度が変化しなかったことから、HSA の影響を受けないことが考えられた。一方、tipranavir、および lopinavir は HSA 存在下では IC_{50} 値が高濃度側へシフトしたことから、タンパク非結合型濃度で説明できると推測された。

○ 肝取り込みトランスポーター阻害活性の基質依存性に関する検討

本検討では、OATP1B1 典型的基質のヒト肝細胞および OATP1B1 発現細胞への取り込みに対する、典型的阻害剤の阻害活性の評価を行った。

ヒト肝細胞への典型的基質の取り込みに対し、使用する基質によって Rif の IC_{50} に 4~28 倍程度の乖離が認められた。また CysA では、 ^3H E₂17 β G、 ^3H E₁S および ^3H BSP の取り込みに対して同程度の IC_{50} を示したものの (0.11~0.21 $\mu\text{mol/L}$)、 ^3H PRV に対しては 30 $\mu\text{mol/L}$ 存在下においても顕著な阻害活性は認められなかった。さらに、BSP についても ^3H PRV を基質として用いた場合、他の基質に比べ IC_{50} が 9~15 倍程度高く算出された。一方で、Gem の阻害効果に顕著な基質依存性は認められなかった。このように、ヒト肝細胞において同一の阻害剤を用いた場合であっても、使用する基質に依存し IC_{50} の乖離が認められた。

7. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた in vitro 実験の結果からヒト in vivo における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集

平成 22 年度においては、胆汁排泄の予測には肝臓 (肝細胞) 中濃度基準とした胆汁中排泄固有クリアランスの評価が適切と考えられる結果を得た。ラットサンドイッチ培養系では、取り込みトランスポーターの機能低下により、胆汁排泄クリアランスの予測値の過小評価が起きていることを明らかにした。それらを踏まえ、平成 23 年度に実施した検討により以下の結果を得た。

○ 膜透過素過程の評価

Rosuvastatin の代謝消失は認められなかったことから、SCHH における rosuvastatin の代謝 CL はほぼ無視できると判断した。細胞内取り込み、メディウム中排出、細胞内濃度基準の胆汁排泄、これら各素過程 CL から算出したメディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL は、実測値から算出したメディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL と同等であった。メディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL およびこれを規定する膜透過素過程 CL には、最大で 3 倍の乖離が試験間および細胞ロット間で認められた。

○ rosuvastatin の経時的な胆汁排泄評価

SCHH における rosuvastatin の細胞内蓄積量は、輸送開始から 15 分までほぼ直線的に上昇し、胆汁排泄量は、輸送開始 15 分後で最大であった。各時点から算出される胆汁排泄 CL は時間依存的に上昇したのに対して、取り込み CL は、全ての時点で概ね一定であった。取り込み CL およびメディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL を基に well-stirred モデルから算出される肝消失 CL は、血漿中濃度を基準とする肝消失 CL よりもそれぞれ 1/5-1/3 および 1/10 以下であった。

8. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評価のための sandwich culture 実験系の確立

HepaRG 細胞を用いて、OATP1B1, OATP1B3, NTCP の基質となる薬物 6 種類の取り込みを観察したところ、OATP1B3 選択的基質である CCK-8 を除き、有意な飽和性のある取り込みが観察された。また、taurocholate については、Na⁺依存的な取り込みが観察されたことから、ヒト肝細胞と同じく、NTCP により主に取り込まれていることが示唆された。さらに、その取り込みの絶対値をヒト肝細胞における取り込みと比較したところ、HepaRG 細胞への取り込みは、OATP 基質については、単位細胞数あたりで、約 1/2~1/5 程度であり、NTCP 基質である taurocholate では、肝細胞とほぼ同等の取り込みが観察された。

平成 24 年度は 12 種類の典型的な OATP1B1 阻害剤に阻害剤の数を増やし、HepaRG 細胞ならびに OATP1B1 遺伝子発現系における E₂17βG の輸送に対する阻害定数を算出した。その結果、遺伝子発現系および HepaRG 細胞の両方で見積もられた K_i 値を比較したところ、ほぼ 3 倍以内の良好な相関関係が認められたことから、HepaRG 細胞を用いて、OATP1B1 を介した薬物間相互作用を定量的に予測できる可能性が示唆された。

さらに、胆汁排泄過程を HepaRG 細胞で観察できる系を立てるために、collagen-coated dish 上に培養された HepaRG 細胞にさらに、Matrigel を overlay することによって、ヒト肝細胞と同様の sandwich culture 系での培養が可能かどうかについて検討を行った。はじめ、ヒト肝細胞と同様のプロトコルを用いて Matrigel を overlay したところ、Ca²⁺イオンを buffer から抜いた条件下において、有意に well 内の蛋白量の減少がみられたことから、Ca²⁺イオンが欠乏することにより、細胞の viability に影響が出ている可能性が示唆された。そこで、Matrigel の量をふって、HepaRG 細胞の viability を調べたところ、ヒト肝細胞の sandwich 培養で用いる量の 2 倍以上を用いた時に、Ca²⁺イオン欠乏条件下においても viability が低下しないことが示唆された。そこで、bile pocket への排出輸送が維持されているかを機能的に調べるために、CDF-DA の細胞内での代謝物 CDF の蛍光が細胞内から bile pocket への移動が観察されるかについて検討したところ、Ca²⁺イオン存在下では、CDF-DA と肝細胞を一定時間 incubation 後、bile pocket とみられる線状構造の蛍光が観察された一方、Ca²⁺イオン欠乏下では、bile pocket の

形成がなされず、線状の蛍光は観察されなかったことから、機能的にも、胆管側のトランスポーター（ここでは主に MRP2）が能動的な排出に寄与していることが明らかとなった。

D. 考察

I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

1. ヒト肝臓で薬物代謝に関与している主要 5 CYPs のアデノウイルスによる共発現の検討

AdCYP2C19, AdCYP2D6 および AdCYP3A4 3 種の共発現系の結果より、肝臓での主要 5 CYPs を発現することが可能になれば、この細胞を用いた CYP 阻害スクリーニング評価系への活用や遺伝子多型（CYP2C9、2C19、または 2D6 の EM と PM）を模倣した細胞を作成し、創薬でのスクリーニング評価系への活用が期待される。

2. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

マイクロスペースプレートを用いることで、ヒト肝細胞やラット肝細胞、あるいはヒト肝癌由来細胞において、スフェロイド様の凝集塊の形成が認められ、これらの細胞では薬物代謝関連遺伝子の発現上昇や酵素活性の増大が認められることが報告されている。本研究でも凝集塊を形成させた後に CYP3A4 を発現させた場合には、平面培養時に比べて、同じ MOI で感染させた場合の酵素活性が 2 倍程度に高くなることがわかった。その際、感染効率やタンパク質の発現効率は 2 次元培養時と変わらないが、ヘム合成の増加に伴うホロ酵素の生成量（割合）が増加する可能性が示された。

一方、Cell-able 24-well plate を用いた場合は、スフェロイド形成予備培養、重複感染、播種時の感染の三通りの三次元培養条件下で CYP3A4 活性を発現させて従来の二次元培養法によるそれと比較検討したが、何れの三次元培養条件でも CYP3A4 活性の発現量は二次元培養のそれと同等であった。

3. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討

CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞による OATP1B1 基質取り込みに対する阻害剤の影響と CYP3A4 基質代謝に対する阻害剤の影響を検討した結果、本研究で作成した CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞はそれぞれの機能を正しく有していることが確認できた。本共発現細胞を用いることにより、薬物代謝酵素とトランスポーターを共発現

した評価系で各々の分子種における薬物相互作用評価が可能であり、今後の薬物動態研究の上で有用な *in vitro* 試験系の一つである可能性が示唆された。しかし、OATP1B1 の基質として知られている Pravastatin の取り込みは認められず、今後の検討課題としてより高活性の OATP1B1 安定発現 HepG2 細胞の開発が示唆された。

4. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

障害肝細胞とマクロファージ系/単球系細胞との細胞間相互作用による肝細胞障害性の増悪を捉える系を開発する目的で共培養系の実験を試みた。HuH-7 細胞と TPA 処理によりマクロファージに分化した HL-60 細胞を細胞数 5 万として共培養した場合、TPA 曝露依存的に肝細胞に対するトログリタゾンの障害性が増強した。HuH-7 細胞は肝由来ではあるが、薬物肝障害の初発段階と考えられている代謝活性化能は低いと予想される。そのような条件でも分化 HL-60 細胞共存下、トログリタゾンの細胞障害性の増強がみとめられたことは、トログリタゾンの細胞障害性に、分化した HL-60 細胞特有の機能がかかわっていることを示す重要な知見と考えられた。

5. AdCYP 細胞の凍結・融解による保存の検討

細胞の凍結融解による生細胞数、生存率は用いる細胞凍結液により大きく異なっていた。用いた中では、セルバンカー 1 が生細胞数、生存率いずれにおいても最も良好な値を示していた。細胞凍結液による値の違いの原因は不明であるが、実用的な観点から判断してセルバンカー 1 を用い今後予定している AdCYP 細胞の凍結融解の検討を行うのがよいと判断した。

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

6. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト *in vivo* におけるクリアランスの予測能力の検証

平成 22 年度の検討により、輸送活性を十分に有するヒト肝細胞のロットを複数確保することが出来た。それらを用いて実施した検討の結果、以下のことが判明した。

○ ヒト凍結肝細胞を用いた蛋白非結合型阻害剤の濃縮率の評価法の確立

肝臓内において起こる CYP P450 を標的とした薬物間相互作用を考える場合、CYP に対する相互作用

に関わる薬物は、理論的には、肝臓内の蛋白非結合型リガンド濃度が対象となると考えられる。一般的には、膜透過に能動輸送がない場合においては、血中の蛋白非結合型濃度と肝臓内の非結合型濃度が一致すると考えられ、血中における蛋白非結合型濃度が分かれば、正確に薬物間相互作用を予測できると考えられる。しかしながら、仮に阻害剤が、能動輸送によって肝細胞内に取り込まれる場合、肝臓内の非結合型濃度は、血中の非結合型濃度より高くなることが想定され、血中非結合型濃度からの相互作用予測を行うと、予想より実際には大きな相互作用が起きる可能性があり、false-negative な予測を生み出す危険性がある。そこで、肝臓内への非結合型薬物の濃縮率 ($K_{p,un}$ 値) を見積もることを試みた。能動輸送を止めるための方法論としては、氷冷下ならびに ATP 代謝阻害剤 (rotenone など) 存在下での輸送を測定することで、どちらの方法論が $K_{p,un}$ 値を求めるのに妥当であるかを評価することを試みた。その結果、後者では、完全に能動輸送を止めることができないことから、正確な $K_{p,un}$ 値の算出は難しいと判断された。一方で、氷冷下では、能動輸送がほぼ完全に見られなくなったことから、以後は、本方法論を適用して、実際に細胞内で起こる相互作用の予測に $K_{p,un}$ 値を適用することで、より正確な予測が可能となるかについて検討を進める予定である。

○ 薬物輸送阻害能に与える蛋白量の影響

本研究の結果、阻害剤によりタンパク結合の影響を受ける化合物と受けない化合物が存在する可能性が考えられた。tipranavir および lopinavir は高濃度側へのシフトの程度が異なる要因として、両化合物のタンパク非結合型分率の差が考えられ、タンパク非結合型濃度の 100 倍低い tipranavir が lopinavir よりも阻害曲線が大きく高濃度側へシフトしたものと推察された。これまでトランスポーターへの阻害効果はタンパク非結合型濃度で説明できると考えられていたが、阻害剤によってはタンパク非結合型濃度だけでなく総濃度が必要となる可能性が考えられた。

○ 肝取り込みトランスポーター阻害活性の基質依存性に関する検討

本検討を通じて使用する基質と阻害剤との組み合わせにより阻害活性に乖離を生じることが示唆された。今回は単一ドナーから調製した肝細胞を使用したことから、異なるヒト凍結肝細胞ロットにおいても同様の結果が得られるか確認する必要がある。また、OATP1B1 発現細胞においても、 $[^3H]PRV$ を基質として使用した場合に他の典型的

基質に比べ IC₅₀ を高く見積もる傾向にあるか否か検討を要する。

7. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた in vitro 実験の結果からヒト in vivo における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集

○ 膜透過素過程の評価

各膜透過素過程から算出したメディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL は、実測値と同等であったことから、これら膜透過素過程 CL は適切に評価できていると判断した。また、これら CL が、試験間および細胞ロット間で最大で 3 倍のばらつきを示すことから、定量的な胆汁排泄 CL を評価する上では、このばらつきを念頭に考察するべきである。Rosuvastatin は in vivo での消失が取り込み律速過程であると報告されているが、SCHH における取り込み CL はメディウム中濃度基準の胆汁排泄 CL と一致しなかった。したがって、律速段階が in vitro と in vivo で異なることが示唆された。

○ rosuvastatin の経時的な胆汁排泄評価

SCHH を用いた rosuvastatin の経時的な細胞内蓄積量は、輸送開始 15 分までほぼ直線的な上昇が観察されていることから、胆汁排泄 CL に、bile flow の欠損は影響していなかった。

8. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評価のための sandwich culture 実験系の確立

肝細胞代替系として、HepaRG 細胞を用いることができるかについて取り込みトランスポーターの輸送能力について検討を行ったところ、OATP, Ntcp の各基質薬物の時間依存的かつ飽和性のある取り込みが観察された。過去、複数の不死化細胞において、取り込みトランスポーターの発現、機能が確認されなかった例は数多く知られているが、HepaRG 細胞は、それらの例に反して、主要な取り込みトランスポーターの発現・機能のある程度維持しており、極めてユニークな性質を有する細胞であるといえる。ただ、ヒト肝臓において重要な役割を果たすトランスポーターの 1 つである OATP1B3 の発現が見られない点、また、OATP1B1 の遺伝子が、*1a/*5 と、片方のアレルで機能低下を示唆する遺伝型を持っていることには留意しておく必要があると思われる。

HepaRG 細胞に関する過去の検討から、有機アニオンの取り込みトランスポーター OATP 類については、OATP1B1 が、ヒト肝細胞の数分の 1 レベルでは発現していること、また、胆管側膜のトラン

スポーターについては、比較的発現が維持されていることなどを考えると、HepaRG 細胞において、sandwich culture 系が組めれば、胆汁排泄過程を HepaRG 細胞を用いて検討できる可能性が考えうる。そこで、本年度は、HepaRG 細胞を用いて、sandwich culture 系を用いた定量的な胆汁排泄の検討を行うための実験系の確立を実施した。最初、ヒト肝細胞と同じプロトコルを用いて実施したが、bile pocket を開放するために、Ca²⁺イオンを抜いた buffer と接触させた折に、well あたりの蛋白量が減少したことから、viability の低下が疑われた。そこで、Matrigel の量を増やしたところ、2 倍程度まで増やすと、viability の低下が Ca²⁺イオン欠乏時にもおこらないことが示唆された。Matrigel の量を増やすほど、viability の改善が見込まれたが、一方で、bile pocket への薬物の排出を定量的に見る際に、比較的脂溶性の高い薬物については、Matrigel への吸着も大きく、非特異的な取り込みを誤ってしまう可能性も考えられたことから、できるだけ実験に支障がない程度に Matrigel の量を減らしたいという考えもあったことから、以後は、ヒト肝細胞実験の 2 倍量の Matrigel を用いて、複数の化合物について、胆管側への薬物の排出実験を実施する予定である。

E. 結論

I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

AdCYP2C19, AdCYP2D6 および AdCYP3A4 は、MOI に応じた各 CYP 活性を発現させることができた。さらに、AdCYP2C19, AdCYP2D6, AdCYP3A4 および AdCYPb5 を任意の MOI で HepG2 細胞に感染させることにより、ヒト肝細胞における CYP2C19, 2D6 および 3A4 活性のそれぞれの相対比とほぼ同等の各 CYP 活性を共発現させることができた。ヒト CYP 遺伝子を組み込んだアデノウィルスベクターを用いて、HepG2 細胞に CYP タンパク質をより高発現させるために、マイクロスペースプレートと基盤パターン細胞アレイ (Cell-able™) の応用を検討した。マイクロスペースプレートを利用した 3 次元培養を取り入れることで、従来に比べて高い酵素活性が得られる可能性が示された。一方、基盤パターン細胞アレイでは種々の三次元培養条件下で CYP3A4 活性を発現させて従来の二次元培養法によるそれと比較検討したが、何れの三次元培養条件でも CYP3A4 活性の発現量は二次元培養のそれと同等であった。

薬物代謝酵素/トランスポーターの相互作用評

価系の構築を目的とし、CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞の構築、評価を行った。本研究にて作成した CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞は、CYP3A4 及び OATP1B1 の活性を有しており、またそれぞれの輸送及び代謝活性は各阻害剤により阻害された。本細胞系が代謝酵素とトランスポーターの相互作用評価系として有用である可能性が示唆された。

障害肝細胞とマクロファージ系/単球系細胞との細胞間相互作用による肝細胞障害性の増悪を捉える系を開発する目的で共培養系の実験を試みた。薬物肝障害において障害肝細胞がマクロファージ系細胞等との相互作用を通じ、肝細胞が障害される条件を見出した。

AdCYP 細胞の利便性を高めるための凍結のための条件検討を行い、生存率の高い細胞凍結保存液を選定した。

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

平成 22 年度においては輸送活性を十分に有するヒト肝細胞のロットを複数確保することができ、計画を円滑に進めることができる体制を整えた。ヒト凍結幹細胞を用いて、肝細胞内における非結合型薬物濃度を見積もるための濃縮率を定量的に評価する方法論の構築に着手した。その結果、現時点では、氷冷下と 37℃における肝細胞へのリガンドの定常状態での C/M ratio を評価することが適している可能性が示唆されている。また、トランスポーター阻害剤の阻害能に対する蛋白結合の影響について *in vitro* 実験により検討した結果、阻害剤によりタンパク結合の影響を受ける化合物と受けない化合物が存在する可能性が考えられた。これまでトランスポーターへの阻害効果はタンパク非結合型濃度で説明できると考えられていたが、阻害剤によってはタンパク非結合型濃度だけでなく総濃度が必要となる可能性が考えられた。更に、薬物トランスポーター OATP1B1 の典型的基質について、ヒト肝細胞への取り込みに対する各種阻害剤の阻害活性を検証した結果、同一の阻害剤を用いた場合であっても、使用する基質に依存し阻害活性に乖離を生じることが示唆された。

サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 実験の結果からヒト *in vivo* における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集を行った。その結果、サンドイッチ培養したヒト凍結肝細胞による薬物の胆汁排泄クリアランス、およびこれを規定する膜透過

素過程クリアランスには、試験間および細胞ロット間で最大 3 倍のばらつきが認められた。In vivo の胆汁排泄クリアランスが過小評価される一因として、サンドイッチ培養ヒト凍結肝細胞では、薬物消失の律速段階が *in vivo* と異なることが考えられた。

さらに、HepaRG 細胞には、不死化細胞においては極めてまれに見る、OATP1B1, OATP2B1, NTCP の発現が確認され、さらにこれら基質の取り込みについてもヒト肝細胞の 1/2~1/5 程度には観察された。ヒト初代培養肝細胞の代替系として、HepaRG 細胞について検討を行い、HepaRG 細胞を用いて sandwich culture 系を構築することに成功し、CDF が発する蛍光が bile pocket に蓄積したことから、胆汁排泄に関わる能動輸送を担うトランスポーターが正常に機能していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kotani N, Maeda K, Watanabe T, Hiramatsu M, Gong LK, Bi YA, Takezawa T, Kusuhara H, Sugiyama Y.

CULTURE PERIOD-DEPENDENT CHANGES IN THE UPTAKE OF TRANSPORTER SUBSTRATES IN SANDWICH-CULTURED RAT AND HUMAN HEPATOCYTES. *Drug Metab Dispos.* 3, 1503-10 (2011)

2) Masanori Nakakariya, Midori Ono, Nobuyuki Amano, Toshiya Moriwaki, Kazuya Maeda, Yuichi Sugiyama

IN VIVO BILIARY CLEARANCE SHOULD BE PREDICTED BY INTRINSIC BILIARY CLEARANCE IN SANDWICH-CULTURED HEPATOCYTES., *Drug Metab Dispos.* 40, 602-609 (2012)

3) Naoki Kotani, Kazuya Maeda, Yasuyuki Debori and Yuichi Sugiyama

ELUCIDATION OF THE EXPRESSION AND FUNCTION OF DRUG UPTAKE TRANSPORTERS IN HUMAN HEPATOMA DERIVED HEPARG CELLS., manuscript in preparation

4) Seiichi Ishida

THE EFFECTS OF CYTOSKELETAL STRUCTURE CHANGES INDUCED BY DOCETAXEL ON GENE EXPRESSIONS. : A VIEW FROM DIFFERENT POINT OF DOCETAXEL FUNCTIONS. In "Docetaxel: Composition, Therapeutic Applications and Effects" Nova Scientific Publishers, Inc., accepted for publication

2. 学会発表

1) Tamaki Hori, Takashi Kubo, Atsuko Miyajima, Momoko Sunouchi, Ken Nakazawa, Yuko Sekino, Shogo Ozawa, Fabrice Morel, Anne Corlu and Seiichi Ishida

EFFECTS OF A NEWLY DEVELOPED 3D-CELL CULTURE VESSEL ON DRUG METABOLISM-RELATED GENE EXPRESSIONS IN HepaRG CELLS, 第

- 25 回日本薬物動態学会年会 (2010, 10)
- 2) 石田誠一
医薬品の安全性・毒性研究への幹細胞の応用 — ガイドライン案作成への取り組み、日本動物実験代替法学会、第 23 回大会 (2010, 12)
- 3) 前田和哉、小谷直生、吉田健太、渡辺貴夫、渡辺友子、山田哲裕、杉山雄一
ヒト肝臓組織サンプルと遺伝子発現細胞を併用した肝臓での薬物の解毒能力および薬物間相互作用の定量的予測法の開発 ～動物実験の代替法としてのヒト組織の活用～、日本動物実験代替法学会、第 23 回大会 (2010, 12)
- 4) 石田 誠一、黒田 幸恵、久保 崇、金 秀良、宮島 敦子、簾内 桃子、関野 祐子
新規三次元培養器材による肝細胞成熟化促進の検討、日本薬学会 第 131 年会 (2011, 3)
- 5) 小谷直生、前田和哉、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一
肝腫瘍由来不死化細胞株 HepaRG 細胞における薬物の取り込みトランスポーターの発現・機能解析、日本薬剤学会 第 26 年会 (2011.5)
- 6) 小谷直生、前田和哉、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一
肝腫瘍由来不死化細胞株 HepaRG 細胞における薬物トランスポーターの機能解析、第 19 回肝病態生理研究会 (2011.6)
- 7) 小谷直生、前田和哉、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一
薬物の取り込みトランスポーターの輸送能力の評価系としての HepaRG 細胞の有用性の検討、第 6 回トランスポーター研究会年会 (2011.6)
- 8) Seichi Ishida
DEVELOPMENT OF IN VITRO TOXICITY TESTS USING HEPATOCYTE DIFFERENTIATED FROM HUMAN IPS CELLS., 2011 In Vitro Biology Meeting (2011, 6)
- 9) Naoki Kotani, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara, Yuichi Sugiyama
EFFECT OF CULTURE PERIOD ON THE UPTAKE ACTIVITY OF TRANSPORTER SUBSTRATES IN SANDWICH-CULTURED RAT AND HUMAN HEPATOCYTES, International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, (2011.6)
- 10) 石田 誠一
iPS 細胞技術のレギュラトリーサイエンスへの応用—その展望と課題—、第 1 回 レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2011, 9)
- 11) Kazuya Maeda
THE USE OF HEPATOCYTE CELL MODELS TO INVESTIGATE DRUG UPTAKE TRANSPORTERS, HepaRG Workshop 2011 (2011.9)
- 12) Takashi Kubo, Tamaki Hori, Yukie Kuroda, Atsuko Miyajima, Momoko Sunouchi, Anne Corlu, Fabrice Morel, Shogo Ozawa, Yuko Sekino, Seiichi Ishida
ROLE OF GENOMIC DNA METHYLATION DURING THE HEPATIC MATURATION OF HepaRG HUMAN HEPATOCYTE BIPOTENT PROGENITORS, 第 26 回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)
- 13) Miki Fujishima, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, Shinichi Ninomiya, Koichi Yoshinari, Yasushi Yamazoe, Momoko Sunouchi, Kenichi Nakazawa, Seiichi Ishida
THE USEFULNESS OF CYP3A4/OATP1B1-DOUBLE EXPRESSING CELLS FOR EVALUATION OF HUMAN PHARMACOKINETICS, 第 26 回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)
- 14) 前田和哉、小谷直生、Sandrine Camus, Ruoya Li, Christophe Chesne, 杉山雄一
ヒト肝腫瘍由来 HepaRG 細胞における取り込みトランスポーターの発現および機能解析、第 26 回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)
- 15) 青山晋輔、前田和哉、安達弥永、伊藤清美、杉山雄一
グリベンクラミド、レパグリニドおよびナテグリニドのヒトヘパトサイトへの取り込みに対する OATP トランスポーターの寄与について、第 26 回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)
- 16) Masanori Nakakariya, Midori Ono, Nobuyuki Amano, Toshiya Moriwaki, Kazuya Maeda, Yuichi Sugiyama
IN VIVO BILIARY CLEARANCE SHOULD BE PREDICTED BY INTRINSIC BILIARY CLEARANCE IN SANDWICH-CULTURED HEPATOCYTES, 第 26 回日本薬物動態学会年会 (2011, 11)
- 17) 石田誠一
ヒト iPS 由来肝細胞を用いた in vitro 毒性試験の開発、日本環境変異学会 MMS 研究会第 59 回定例会 (2011, 11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

創薬支援のためのヒト肝薬物輸送と代謝を評価する 安定かつ再現性に優れた細胞レベルでの試験系の 提示と毒性評価への応用研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所
研究代表者 石田 誠一

研究要旨

創薬で希求されるヒト肝臓の薬物の輸送・代謝・毒性を予測できる *in vitro* 実験法の確立を目指し、肝細胞を代替し、いつでも目的に合わせて利用でき、再現性良くデータ取得が可能な細胞系の構築に関する検討を行い、所期の結果を得た。

研究分担者

- | | |
|---|-------|
| (1) 東北大学大学院薬学研究科
薬物動態学分野 | 山添 康 |
| (2) 岩手医科大学薬学部
薬物代謝動態学講座 | 小澤 正吾 |
| (3) 積水メディカル株式会社
薬物動態研究所 | 安達 弥永 |
| (4) 田辺三菱製薬株式会社
薬物動態研究所 | 山田 泰弘 |
| (5) 東京大学大学院薬学系研究科
医薬品評価科学講座 | 杉山 雄一 |
| (6) アステラス製薬株式会社
創薬推進研究所 | 神山 佳輝 |
| (7) エーザイ株式会社
筑波薬物動態研究室 | 竹中 理 |
| (8) 武田薬品工業株式会社
薬物動態研究所 | 森脇 俊哉 |
| (9) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
神戸医薬研究所薬物動態・安全性研究部
オラフ・シェーフアー | |

A. 研究目的

創薬プロセスでは候補化合物の毒性予測の精度が高くない為が開発が中止となる例が未だに報告されている (*Nature Rev. Drug Discov.* 2004)。これは、ヒトと動物では同じ化合物でも細胞への取込みや排泄、代謝反応や反応性が違う種差によるところが大きい。また、創薬プロセスの初期過程ではヒトの *in vivo* のデータを手に入れることはほぼ不可能であることも理由である (*Chem. Res. Toxicol.* 2009)。この為、ヒト試料による *in vitro*

評価系としてヒト肝初代培養細胞による評価が広く行われているが、ドナーの個人差によるばらつきや再現性、供給を海外に依存している為、人種差や供給体制の問題がある。その為、それらに代わる安定供給が可能で高い再現性を持つ試験法の開発が求められている。又、毒性予測では代謝産物が毒性発現に関与している例も多く知られており、代謝活性を内包する毒性評価系の開発が必要である。そこで、本年度は、
I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用：

1. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果
 - マイクロスぺースプレート
 - Cell-able 24-well plate
2. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討
3. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立：

4. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み・トランスポーターの寄与率、ヒト *in vivo* 肝クリアランスの予測能力の検証
 - ヒト凍結肝細胞を用いた蛋白非結合型阻害剤の濃縮率の評価法の確立
 - 薬物輸送阻害能に与える蛋白量の影響
 - 肝取り込みトランスポーター阻害活性の基質依存性に関する検討
5. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 実験の結果からヒト *in vivo* における

薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集

6. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評価のための sandwich culture 実験系の確立に関する検討を実施した。

当該研究により、ヒト肝初代細胞を代替し、いつでも目的に合わせて利用できる特性が確立し再現性の高い薬物の輸送と代謝の評価試験系の提示と毒性評価への応用が期待される。

B. 研究方法

1. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

○ マイクロスぺースプレート

HepG2 細胞をマイクロスぺースプレート (200 nm × 200 nm × 100 nm : W × D × H : クラレ) に、 4.0×10^5 cell/well の密度で播種した。また、対照実験として、通常の細胞培養用 24 ウェルプレート (BD ファルコン) に 1.0×10^5 cell/well の密度で播種した。前者は培養 6 日後に、後者は培養 3 日後にアデノウイルスの感染操作を行なった。アデノウイルス感染量を一定とするために、感染直前に両プレートの 3 ウェル分の細胞をトリプシン処理により回収し、ウェル内の細胞数を計数した。

○ Cell-able 24-well plate

(Scheme 1) スフェロイド形成予備培養

三次元培養の場合は、HepG2 細胞を Cell-able 24-well plate (トランスパレント) に播種した後、2、3、4 あるいは 7 日間予備培養した。二次元培養の場合は、HepG2 細胞をプライマリア 24-well plate (BD FALCON) に播種し、3 日間予備培養した。予備培養後ウイルス感染させた。

(Scheme 2) 重複感染

HepG2 細胞をプライマリア 24-well plate あるいは Cell-able 24-well plate に播種し、3 日間予備培養した後ウイルス感染させた。重複感染の場合は、初回感染の 24 時間後に 2 回目の感染を行った。

(Scheme 3) 播種時の感染

HepG2 細胞をプライマリア 24-well plate あるいは Cell-able 24-well plate に播種し、直ちにウイルス感染させた。

2. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討

OATP1B1 安定発現 HepG2 細胞は平成 22 年度に実施の研究において輸送活性の高かった 2 ロットの

クローンを用い、それぞれに対する CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞を作成した。コントロールは、上述の CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞と同様の条件で、コントロール細胞 (ベクターのみをトランスフェクションした HEK293 細胞) に LacZ adenovirus vector を感染させたものを用いた。この CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞を用い、1) OATP1B1 基質の輸送に対する阻害剤の影響を見るために Estrone sulfate または Atorvastatin の細胞内への取り込みに対する Ketoconazole (CYP3A4 阻害剤) 及び Rifampicin (OATP1B1 阻害剤) の効果、2) CYP3A4 基質の代謝に対する阻害剤の影響を見るために、Midazolam または Atorvastatin の CYP3A4 による代謝に対する Ketoconazole 及び Rifampicin の効果について検討を行った。

3. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

HuH-7 細胞と予め phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) でマクロファージ系へ分化を誘導した HL-60 細胞を混合して培養し、トログリタゾン を 2~4 日間作用させた後、MTT 法で細胞増殖阻害作用を調べた。

4. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト in vivo におけるクリアランスの予測能力の検証

基質として、 $[^3\text{H}]$ Estradiol-17 β -D-glucuronide (E_2 17 β G)、 $[^3\text{H}]$ Estrone-3-sulfate (E_1 S)、 $[^3\text{H}]$ Bromosulfo phthalein (BSP)、および $[^3\text{H}]$ Pravastatin (PRV) を使用した。また阻害剤として、Rifampicin (Rif)、Cyclosporin A (CysA)、BSP および Gemfibrozil (Gem) を使用した。

常法に則りヒト凍結肝細胞 (Lot. Hu8075、Invitrogen 社) を融解後、Krebs-Henseleit Buffer (KHB) を用いて細胞懸濁液を調製し、ガラス試験管に分注後、実験開始まで氷上に保存した。また KHB に最終濃度の 2 倍の濃度となるように基質化合物および阻害剤を溶解し、Assay Buffer とした。反応開始前に肝細胞懸濁液を 37 $^{\circ}\text{C}$ の水浴で 2 分間温プレインキュベーションし、あらかじめ 37 $^{\circ}\text{C}$ に温めておいた Assay Buffer を肝細胞懸濁液に等量添加することで取り込み反応を開始した。ヒト血清アルブミン (HSA) 添加群は 2% HSA 含有 Krebs-Henseleit buffer にて反応を開始した。能動輸送を止めるための手段としては、氷冷下、大

過剰濃度の基質存在下、対象となるトランスポーターの比較的強力な阻害剤存在下、ATP 代謝阻害剤 (rotenone など) 存在下を用いて、結果を比較した。反応開始 0.5 分、2 分後にサンプリングを行い、Oil-Spin 法により肝細胞と Buffer を分離した後、回収した肝細胞は 2 N NaOH 水溶液で可溶化した。肝細胞および Buffer 中放射活性は、液体シンチレーションカウンターにて測定した。

5. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた in vitro 実験の結果からヒト in vivo における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集

ヒト凍結肝細胞 (Lot. Hu4152 および GHA) をコーゲンコートプレートに播種後、1 日後に Matrigel を重層し、細胞播種後 6 日目に、rosuvastatin の胆汁中への排泄輸送を評価した。Sandwich-cultured human hepatocytes (SCHH) を $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を含有あるいは含有しない Hank' s balanced salt solution による 10 分間の前処理後に、rosuvastatin を添加し、0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 および 15 分間の胆汁中輸送を評価した。胆汁中排泄量は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 含有時の細胆管を含めた細胞内蓄積量から $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を含有しない時の細胆管開放時の細胞内蓄積量を差し引くことで算出した。胆汁排泄固有 CL は、細胞内タンパク非結合型濃度を基準として求めた。なお、細胞中タンパク非結合型分率は silicon layer 法より算出した。輸送初期における細胞内取り込み CL は 0.5 分から 2 分間における細胞内蓄積量の傾きから、メディアム中への排出 CL は rosuvastatin を preloading した細胞から 0.5 分から 2 分間に排出された化合物量の傾きから、代謝 CL は 60 分間までの消失量から、それぞれ求めた。

6. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評価のための sandwich culture 実験系の確立

HepaRG 細胞および OATP1B1 遺伝子発現細胞の両方を用いて、Estradiol-17 β -glucuronide (E₂17 β G) の取り込みに対する各種阻害剤の阻害定数を算出し、両者実験系間での比較を実施した。本年度は、昨年度に引き続き、化合物数を 12 に増やして、相関を観察することとした。

さらに、HepaRG 細胞を用いて、胆汁排泄トランスポーターの機能を評価するために、sandwich culture 系の確立を試みた。ヒト肝細胞と同様に、HepaRG 細胞の上下を collagen および Matrigel で

覆い、培養を続け、bile pocket の形成能や carboxyldifluorescein (CDF)-diacetate が細胞内に入って代謝されて出す CDF の蛍光の細胞内から bile pocket への移動を観察できるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト初代肝細胞は市販されているものであり、ドナー情報は連結不可能匿名化されており倫理的に問題はない。しかし、適宜倫理委員会に申請をし、審査承認を経たのち実施している。

C. 研究結果

I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

1. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

○ マイクロスぺースプレート

アデノウイルス感染時の細胞数をほぼ一定とする条件下で AdCYP3A4 を感染させて、CYP3A4 酵素活性を測定した。その結果、単位タンパク質当たりの酵素活性は、3 次元培養時に 1.6~2.2 倍高なった。細胞当たりの CYP3A4 発現量が 3 次元培養時に高かったのではないかと考え、ウェスタンブロット法により、単位タンパク質当たりの CYP3A4 アポタンパク質レベルを比較したが、3 次元培養に伴うアポタンパク質レベルの増加は認められなかった。そこで、ヘム合成量が亢進し、CYP3A4 ホロ酵素の割合が増加している可能性を検討するために、ヘム合成の律速酵素である δ -アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) の発現量を定量的逆転写 PCR 法により解析した。その結果、マイクロスぺースプレートで培養して凝集塊を形成させると、ALAS1 mRNA レベルは 1.9 倍程度に増加した。一方、相互作用により CYP3A4 酵素活性を増強する NADPH-P450 還元酵素 (POR) やチトクロム b5 (CYB5A1) に関しては、CYB5A1 mRNA レベルは減少傾向を示し、POR の mRNA レベルには変動が認められなかった。

○ Cell-able 24-well plate

(Scheme 1) 予備培養を 3、4 あるいは 7 日間行いスフェロイドを形成後 AdCYP3A4 感染させた場合、何れの予備培養期間においても CYP3A4 活性値はほぼ同じであった。また、それらの活性値は二次元培養でのそれらとほぼ同じであり、三次元培養による効果は認められなかった

(Scheme 2) 二次元および三次元培養共における重複感染による影響を検討したところ、何れの培

養法であっても CYP3A4 活性はほぼ同じであり、二次元および三次元培養ともに重複感染による効果は認められなかった。

(Scheme 3) 細胞播種と同時に AdCYP3A4 感染を行った。二次元と三次元培養における CYP3A4 活性は、ほぼ同じ値であり、三次元培養による効果は認められなかった。

2. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討

CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞を作成し、その細胞の輸送及び代謝活性について検討を行った。その結果、CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞中への Estrone sulfate 及び Atorvastatin の取り込み量はいずれのクローンもコントロール細胞より高く、時間依存的な取り込み量の増加も認められた。検討された 2 クローンの活性はクローン 2 に対してクローン 1 の方が高い取り込みが認められた。また、Pravastatin については、コントロール細胞と CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞の取り込み量の差はわずかであるものの、いずれのクローンにおいても取り込み時間 1 min においてはコントロールとの有意な差が認められた。CYP3A4/OATP1B1 共発現細胞による Midazolam または Atorvastatin の代謝について、いずれのクローンにおいても CYP3A4 依存的代謝物である 1'-Hydroxymidazolam 及び p-Hydroxyatorvastatin の生成が認められ、その生成量は時間依存的に増加した。

CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞における 1) OATP1B1 基質輸送と 2) CYP3A4 代謝に対する Ketoconazole (CYP3A4 阻害剤) と Rifampicin (OATP1B1 阻害剤) の影響を検討した。その結果、1) Ketoconazole は Estrone sulfate 及び Atorvastatin の細胞内輸送に対して阻害作用を示さなかったが、Rifampicin は阻害作用を示し、2) Ketoconazole は Midazolam 及び Atorvastatin 代謝に対して阻害作用を示し、Rifampicin は Midazolam 及び Atorvastatin 代謝に対して阻害作用を示さなかった。これらより、それぞれの輸送及び代謝活性は各阻害剤により阻害されることが示され、本研究で作成した CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞はそれぞれの機能を正しく有していることが確認できた。

3. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

TPA 処理を 48~72 時間して分化を誘導した HL-60 細胞と HuH-7 細胞を共存した際に、トログ

リタゾンに対する細胞毒性の増強が観察された。HL-60 細胞の TPA 曝露依存的な細胞毒性の発現には細胞密度が密接に関連し、96 穴プレートで 1 ウェルあたり、HL-60 細胞、HuH-7 細胞共に 5 万の細胞を共存させた時に、TPA 曝露依存的な細胞障害性の増強が認められた。

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

4. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト in vivo におけるクリアランスの予測能力の検証

○ ヒト凍結肝細胞を用いた蛋白非結合型阻害剤の濃縮率の評価法の確立

最初に、ATP 依存的な能動輸送を止めるための実験系として、氷冷条件下と ATP depletor である rotenone 存在下の両方で、定常状態における各種基質の細胞内と medium 中の総濃度比 (C/M ratio) を算出した。その結果、いずれの基質においても、氷冷下では、基質の輸送がほぼ完全にストップするのに対して、rotenone 存在下では、部分的にしか輸送が止まらないことが明らかとなった。このことから、以後は、氷冷条件下における C/M ratio と常温 (37°C) 条件下における C/M ratio を比較することにより、肝細胞内への非結合型リガンドの濃縮率 $K_{p,uu}$ 値および肝細胞内での蛋白結合率を見積もった。その結果、受動輸送によってしか輸送されないと考えられている antipyrine や diazepam については、C/M ratio が、氷冷下と 37°C において変化ないことから、能動輸送の関与がないことが確認された。一方で、カチオンやアニオン性を示すトランスポーター基質薬物については、いずれも氷冷下より 37°C における C/M ratio の方が高くなったことから、能動輸送が確認された。また、全体傾向として、有機アニオンの $K_{p,uu}$ 値の方が、カチオンの $K_{p,uu}$ 値より大きな値を示すことが分かり、いずれの化合物についても $K_{p,uu}$ 値は、1 以上の値となったことから、能動輸送の関与が示された。

○ 薬物輸送阻害能に与える蛋白量の影響

トランスポーター阻害剤の阻害能に対するタンパク結合の影響について in vitro 実験により検討した。その結果、rifampicin および cyclosporine A はヒト血清アルブミン (HSA) によって阻害の程度が変化しなかったことから、HSA の影響を受けないことが考えられた。一方、tipranavir、およ

び lopinavir は HSA 存在下では IC₅₀ 値が高濃度側へシフトしたことから、タンパク非結合型濃度で説明できると推測された。

○ 肝取り込みトランスポーター阻害活性の基質依存性に関する検討

本検討では、OATP1B1 典型的基質のヒト肝細胞および OATP1B1 発現細胞への取り込み対する、典型的阻害剤の阻害活性の評価を行った。

ヒト肝細胞への典型的基質の取り込みに対し、使用する基質によって Rif の IC₅₀ に 4~28 倍程度の乖離が認められた。また CysA では、^[3H]E₂17β G、^[3H]E₁S および ^[3H]BSP の取り込みに対して同程度の IC₅₀ を示したものの (0.11~0.21 μmol/L)、^[3H]PRV に対しては 30 μmol/L 存在下においても顕著な阻害活性は認められなかった。さらに、BSP についても ^[3H]PRV を基質として用いた場合、他の基質に比べ IC₅₀ が 9~15 倍程度高く算出された。一方で、Gem の阻害効果に顕著な基質依存性は認められなかった。このように、ヒト肝細胞において同一の阻害剤を用いた場合であっても、使用する基質に依存し IC₅₀ の乖離が認められた。

5. サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 実験の結果からヒト *in vivo* における薬物の胆汁排泄クリアランスを推定する方法論の確立へ向けた基礎データの収集

○ 膜透過素過程の評価

Rosuvastatin の代謝消失は認められなかったことから、SCHH における rosuvastatin の代謝 CL はほぼ無視できると判断した。細胞内取り込み、メディアム中排出、細胞内濃度基準の胆汁排泄、これら各素過程 CL から算出したメディアム中濃度基準の胆汁排泄 CL は、実測値から算出したメディアム中濃度基準の胆汁排泄 CL と同等であった。メディアム中濃度基準の胆汁排泄 CL およびこれを規定する膜透過素過程 CL には、最大で 3 倍の乖離が試験間および細胞ロット間で認められた。

○ rosuvastatin の経時的な胆汁排泄評価

SCHH における rosuvastatin の細胞内蓄積量は、輸送開始から 15 分までほぼ直線的に上昇し、胆汁排泄量は、輸送開始 15 分後で最大であった。各時点から算出される胆汁排泄 CL は時間依存的に上昇したのに対して、取り込み CL は、全ての時点で概ね一定であった。取り込み CL およびメディアム中濃度基準の胆汁排泄 CL を基に well-stirred モデルから算出される肝消失 CL は、血漿中濃度を基準とする肝消失 CL よりもそれぞれ 1/5-1/3 および 1/10 以下であった。

6. HepaRG 細胞を用いた肝胆系輸送における薬物間相互作用の予測ならびに胆汁排泄の評価のための sandwich culture 実験系の確立

12 種類の典型的な OATP1B1 阻害剤を用いて、HepaRG 細胞ならびに OATP1B1 遺伝子発現系における E₂17βG の輸送に対する阻害定数を算出した。その結果、遺伝子発現系および HepaRG 細胞の両方で見積もられた K_i 値を比較したところ、ほぼ 3 倍以内の良好な相関関係が認められたことから、HepaRG 細胞を用いて、OATP1B1 を介した薬物間相互作用を定量的に予測できる可能性が示唆された。

さらに、胆汁排泄過程を HepaRG 細胞で観察できる系を立てるために、collagen-coated dish 上に培養された HepaRG 細胞にさらに、Matrigel を overlay することによって、ヒト肝細胞と同様の sandwich culture 系での培養が可能かどうかについて検討を行った。はじめ、ヒト肝細胞と同様のプロトコルを用いて Matrigel を overlay したところ、Ca²⁺イオンを buffer から抜いた条件下において、有意に well 内の蛋白量の減少がみられたことから、Ca²⁺イオンが欠乏することにより、細胞の viability に影響が出ている可能性が示唆された。そこで、Matrigel の量をふって、HepaRG 細胞の viability を調べたところ、ヒト肝細胞の sandwich 培養で用いる量の 2 倍以上を用いた時に、Ca²⁺イオン欠乏条件下においても viability が低下しないことが示唆された。そこで、bile pocket への排出輸送が維持されているかを機能的に調べるために、CDF-DA の細胞内での代謝物 CDF の蛍光が細胞内から bile pocket への移動が観察されるかについて検討したところ、Ca²⁺イオン存在下では、CDF-DA と肝細胞を一定時間 incubation 後、bile pocket とみられる線状構造の蛍光が観察された一方、Ca²⁺イオン欠乏下では、bile pocket の形成がなされず、線状の蛍光は観察されなかったことから、機能的にも、胆管側のトランスポーター（ここでは主に MRP2）が能動的な排出に寄与していることが明らかとなった。

D. 考察

I. 創薬支援の為の安定かつ再現性に優れた細胞系動態試験の提示と毒性評価への応用

1. アデノウイルスで発現させた CYP3A4 の酵素活性に対する 3 次元培養の効果

マイクロスペースプレートを用いることで、ヒト肝細胞やラット肝細胞、あるいはヒト肝癌由来細胞において、スフェロイド様の凝集塊の形成が

認められ、これらの細胞では薬物代謝関連遺伝子の発現上昇や酵素活性の増大が認められることが報告されている。本研究でも凝集塊を形成させた後に CYP3A4 を発現させた場合には、平面培養時に比べて、同じ MOI で感染させた場合の酵素活性が 2 倍程度に高くなることがわかった。その際、感染効率やタンパク質の発現効率は 2 次元培養時と変わらないが、ヘム合成の増加に伴うホロ酵素の生成量（割合）が増加する可能性が示された。

一方、Cell-able 24-well plate を用いた場合は、スフェロイド形成予備培養、重複感染、播種時の感染の三通りの三次元培養条件下で CYP3A4 活性を発現させて従来の二次元培養法によるそれと比較検討したが、何れの三次元培養条件でも CYP3A4 活性の発現量は二次元培養のそれと同等であった。

2. OATP1B1 及び CYP3A4 共発現細胞の輸送及び代謝活性について検討

CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞による OATP1B1 基質取り込みに対する阻害剤の影響と CYP3A4 基質代謝に対する阻害剤の影響を検討した結果、本研究で作成した CYP3A4/OATP1B1 共発現 HepG2 細胞はそれぞれの機能を正しく有していることが確認できた。本共発現細胞を用いることにより、薬物代謝酵素とトランスポーターを共発現した評価系で各々の分子種における薬物相互作用評価が可能であり、今後の薬物動態研究の上で有用な *in vitro* 試験系の一つである可能性が示唆された。しかし、OATP1B1 の基質として知られている Pravastatin の取り込みは認められず、今後の検討課題としてより高活性の OATP1B1 安定発現 HepG2 細胞の開発が示唆された。

3. 肝実質細胞/AdCYP 細胞と非実質細胞等の共培養系の開発

障害肝細胞とマクロファージ系/単球系細胞との細胞間相互作用による肝細胞障害性の増悪を捉える系を開発する目的で共培養系の実験を試みた。HuH-7 細胞と TPA 処理によりマクロファージに分化した HL-60 細胞を細胞数 5 万として共培養した場合、TPA 曝露依存的に肝細胞に対するトログリタゾンの障害性が増強した。HuH-7 細胞は肝由来ではあるが、薬物肝障害の初発段階と考えられている代謝活性化能は低いと予想される。そのような条件でも分化 HL-60 細胞共存下、トログリタゾンの細胞障害性の増強がみとめられたことは、トログリタゾンの細胞障害性に、分化した HL-60 細

胞特有の機能が関わっていることを示す重要な知見と考えられた。

II. 肝細胞及び代替細胞株を用いた薬物のヒト肝臓における輸送の定量的予測を目指した評価系の確立

4. ヒト凍結肝細胞を用いた薬物の肝取り込み能力の評価/ヒト *in vivo* におけるクリアランスの予測能力の検証

○ ヒト凍結肝細胞を用いた蛋白非結合型阻害剤の濃縮率の評価法の確立

肝臓内において起こる CYP P450 を標的とした薬物間相互作用を考える場合、CYP に対する相互作用に関わる薬物は、理論的には、肝臓内の蛋白非結合型リガンド濃度が対象となると考えられる。一般的には、膜透過に能動輸送がない場合においては、血中の蛋白非結合型濃度と肝臓内の非結合型濃度が一致すると考えられ、血中における蛋白非結合型濃度が分かれば、正確に薬物間相互作用を予測できると考えられる。しかしながら、仮に阻害剤が、能動輸送によって肝細胞内に取り込まれる場合、肝臓内の非結合型濃度は、血中の非結合型濃度より高くなることが想定され、血中非結合型濃度からの相互作用予測を行うと、予想より実際には大きな相互作用が起きる可能性があり、false-negative な予測を生み出す危険性がある。そこで、肝臓内への非結合型薬物の濃縮率 ($K_{p, \text{unb}}$ 値) を見積もることを試みた。能動輸送を止めるための方法論としては、氷冷下ならびに ATP 代謝阻害剤 (rotenone など) 存在下での輸送を測定することで、どちらの方法論が $K_{p, \text{unb}}$ 値を求めるのに妥当であるかを評価することを試みた。その結果、後者では、完全に能動輸送を止めることができないことから、正確な $K_{p, \text{unb}}$ 値の算出は難しいと判断された。一方で、氷冷下では、能動輸送がほぼ完全に見られなくなったことから、以後は、本方法論を適用して、実際に細胞内で起こる相互作用の予測に $K_{p, \text{unb}}$ 値を適用することで、より正確な予測が可能となるかについて検討を進める予定である。

○ 薬物輸送阻害能に与える蛋白量の影響

本研究の結果、阻害剤によりタンパク結合の影響を受ける化合物と受けない化合物が存在する可能性が考えられた。tipranavir および lopinavir は高濃度側へのシフトの程度が異なる要因として、両化合物のタンパク非結合型分率の差が考えられ、タンパク非結合型濃度の 100 倍低い tipranavir が lopinavir よりも阻害曲線が大きく高濃度側へシフトしたものと推察された。これまでトランス