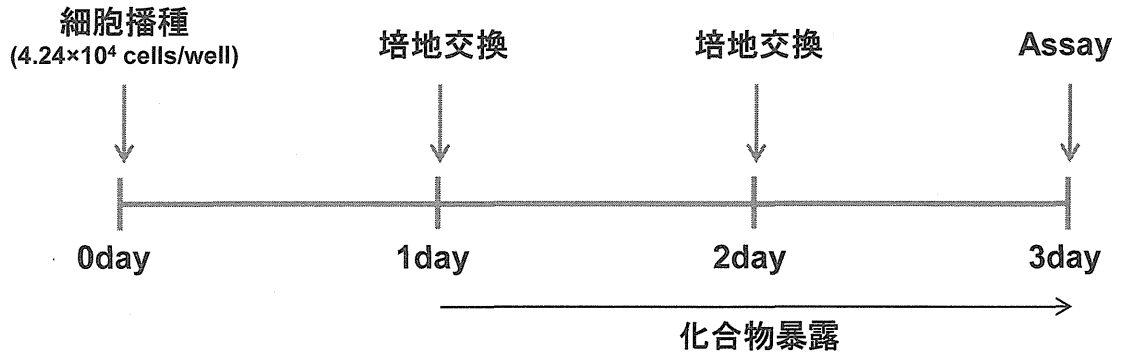


A)



B)

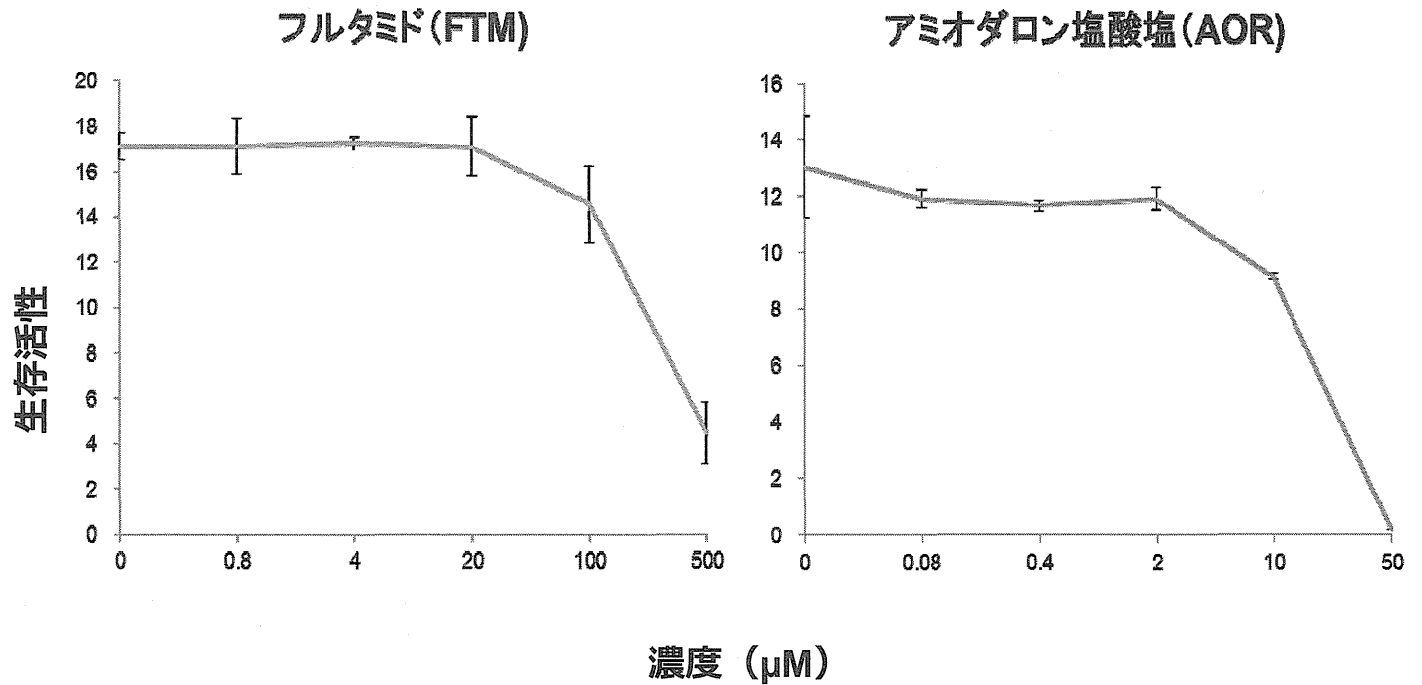


図 10 HepG2 における化合物の毒性試験

A) Time Course

B) フルタミド、アミノダロン塩酸塩添加時における生存活性 (CellTier-Glo)

表.1 LC-MS/MS (CYP3A4) 分析条件

CYP 分子種	分析対象物質	インジェクション量	イオン極性	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
CYP3A4	1'-Hydroxymidazolam	5 µL	Positive	342.2	203.3
	1'-Hydroxymidazolam- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> (内標準物質)		Positive	345.3	206.4

<LC 条件>

カラム : TSK-GEL ODS-100V, 3µm, 2.0 mm×50 mm (TOSOH)  
 移動相 : A; 0.1%ギ酸水溶液 / B; 0.1%ギ酸アセトニトリル溶液  
 グラジエント及び流速 :

Total time (min)	Flow rate (µL/min)	A (%)	B (%)
0.00	300	90.0	10.0
1.50	300	90.0	10.0
3.50	300	10.0	90.0
5.00	300	10.0	90.0
5.10	300	90.0	10.0
5.50	500	90.0	10.0
8.00	500	90.0	10.0

カラム温度 : 40°C  
 サンプル冷却温度 : 4°C  
 分析時間 : 8 min

<MS 条件>

Ionization mode : ESI (Electrospray ionization)  
 Source : Turbo Ion spray  
 Detection mode : MRM (Multiple Reaction Monitoring)  
 Turbo gas temperature : 650°C (CYP2C9, CYP3A4)  
 Nebulizer gas : Air  
 Curtain gas : Nitrogen  
 Collision gas : Nitrogen  
 Probe : X = 5 mm, Y = 4 mm

担当研究課題 新規基材を用いた肝代謝・動態等評価系構築と化合物を用いた評価

担当責任者 竹澤俊明 独立行政法人農業生物資源研究所 上級研究員

#### 研究要旨

コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いた HepG2 細胞の迅速肝機能賦活化培養法について、生物研・竹澤研究室で実施見学会を開催し、HepaRG 細胞等を担当する国立衛研・石田研究室および初代ヒト肝細胞等を担当するエーザイ・柿木研究室に技術を導入した。また、ヒト胆管がん由来細胞 2 株（肝内胆管がん由来 TKKK 細胞および肝外胆管がん由来 TFK-1 細胞）を購入して培養を開始し、それぞれ十分なストックを調製して液体窒素中に凍結保存した。

#### 研究協力者

石田誠一 国立医薬品食品衛生研究所

薬理部室長

柿木基治 エーザイ株式会社筑波研究所

主任研究員

がん由来細胞株）や初代ヒト肝細胞に応用するために各々の研究協力機関に技術を導入するとともに、当該培養法を発展させた共培養技術を開発して肝代謝・動態等の高次評価系を構築するためにヒト胆管がん由来細胞株である TKKK細胞およびTFK-1細胞の培養に着手することを目的とした。

#### A. 研究目的

竹澤らは、平成23～26年度に実施した農林水産省委託プロジェクト「アグリ・ヘルス実用化研究促進プロジェクト（現：医薬品作物、医療用素材等の開発）」の研究課題「牛等の動物由来の原料を用いた医療用新素材の開発」において、コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いてヒト肝がん細胞株であるHepG2細胞の肝機能を迅速（3日間）に賦活化する培養法を開発した。本研究課題では、この培養法を応用・発展することで、肝代謝・動態等の評価系を構築し、モデル薬物を用いて有用性を評価することを目的とする。本年度は、迅速肝機能賦活化培養法を創薬に有用なHepaRG細胞（DMSO処理により終末分化した肝細胞形質を発現するヒト肝

#### B. 研究方法

生物研・竹澤研究室にて、コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いてHepG2細胞の肝機能を迅速（3日間）に賦活化する培養法の実施見学会を開催した。具体的には、コラーゲンビトリゲル膜チャンバーの下面に脱着可能なPETフィルムを付着することでコラーゲンビトリゲル膜下を固相として、チャンバー内に培養液に懸濁したHepG2細胞を播種して「液相-固相」の界面で2日間培養した。その後、コラーゲンビトリゲル膜チャンバーの下面よりPETフィルムを取り外して12-wellプレートのwellに装着することでコラーゲンビトリゲル膜下を気

相として、さらに「液相-気相」の界面で1日間培養した(図1)。

また、ヒト胆管がん由来細胞2株(肝内胆管がん由来 TKKK 細胞および肝外胆管がん由来 TFK-1 細胞)を理化学研究所バイオリソースセンターより購入して培養を開始するとともに、それぞれ十分なストックを調製して液体窒素中に凍結保存した。

#### C. 研究結果

コラーゲンビトリゲル膜チャンバーを用いて HepG2 細胞の肝機能を迅速(3日間)に賦活化する培養法について、国立衛研・石田研究室およびエーザイ・柿木研究室に技術を導入した。

また、肝内胆管がん由来 TKKK 細胞はコラーゲンをコートしたプラスチックディッシュの底面上、肝外胆管がん由来 TFK-1 細胞は通常の培養用プラスチックディッシュの底面上で良好に接着、伸展および増殖したが、TFK-1 細胞に比べ TKKK 細胞の成長には時間を要することが分かった(図2)。両細胞とも十分なストックを調製して、液体窒素中に凍結保存した。

#### D. 考察

今後、HepG2 細胞の迅速肝機能賦活化培養法について、HepaRG 細胞等および初代ヒト肝細胞等を利用した研究への応用、および TFK-1 細胞や TKKK 細胞と共培養して肝代謝・動態等の高次評価系を構築する研究への発展が期待される。

#### E. 結論

HepG2 細胞の肝機能を迅速に賦活化する培養技術を、国立衛研・石田研究室およびエーザイ・柿木研究室に導入した。また、肝内胆管がん由来 TKKK 細胞および肝外胆管がん由来

TFK-1 細胞を購入して培養を開始し、それぞれ十分なストックを調製して液体窒素中に凍結保存した。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表等

論文発表等

該当なし

学会発表等

該当なし

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

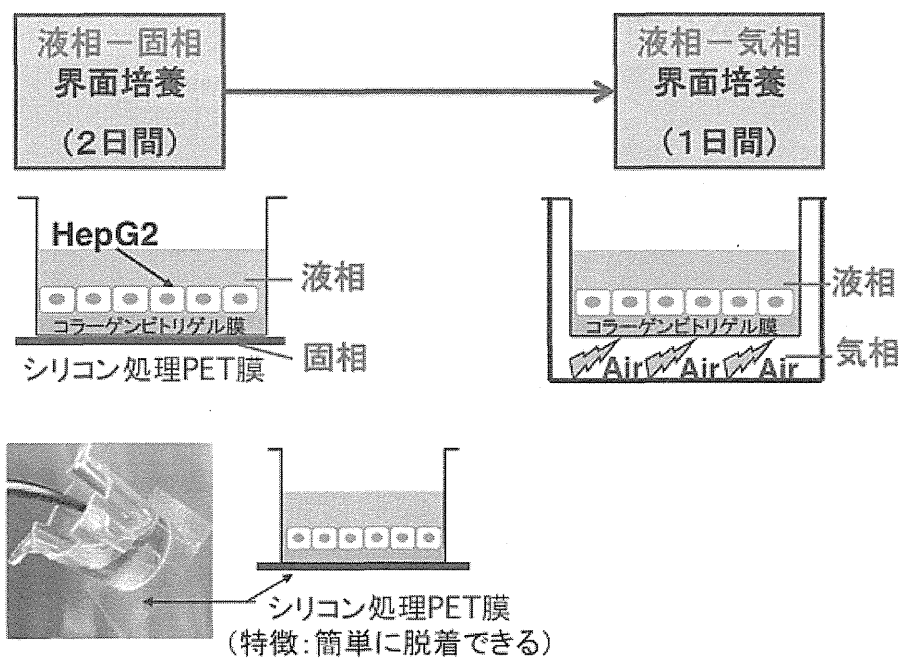
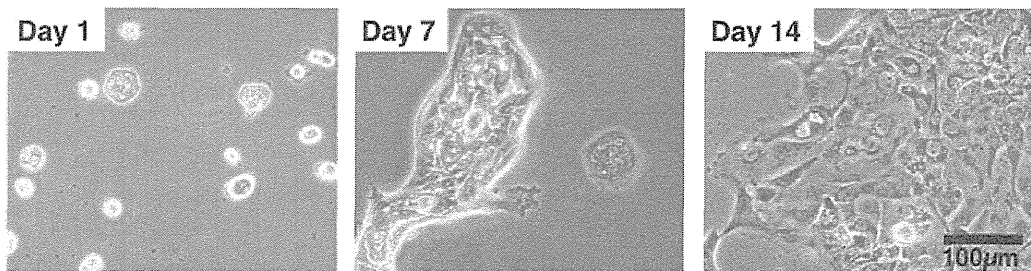


図1 HepG2 細胞の肝機能を迅速に賦活化する培養法

### 肝内胆管がん由来TKKK細胞



### 肝外胆管がん由来TFK-1細胞

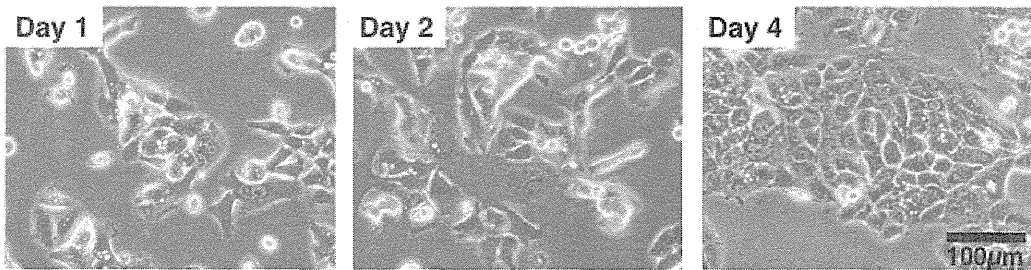


図2 TKKK細胞およびTFK-1細胞の位相差顕微鏡観察像

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 新規基材を用いた肝代謝・動態等評価の検証

担当責任者 柿木 基治 エーザイ筑波研究所

研究要旨

新規培養法として開発されたコラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー（ad-MED ビトリゲル®）を肝代謝・動態評価に導入することを目的にヒト凍結肝細胞を ad-MED ビトリゲル®で培養した後、ヒトにおけるチトクローム P450 (CYP) 代謝酵素活性について検討した。その結果、ad-MED ビトリゲル®培養における Phenacetine (CYP1A2)、Tolbutamide (CYP2C9)、S-Mephenytoin (CYP2C19)、Bufuralol (CYP2D6) 及び Midazolam (CYP3A4) を暴露させ代謝させた結果、それぞれの CYP 特異的な代謝物が検出された。また、ad-MED ビトリゲル®における代謝酵素活性は、従来法のコラーゲン単層培養を用いた時のそれと比較していずれの分子種においても同等あるいはそれ以上の活性を示した。以上のことから、ad-MED ビトリゲル®を用いた培養法は、創薬段階における開発化合物の肝代謝評価へ応用できる可能性が示唆された。

研究協力者

エーザイ株式会社

筑波薬物動態室 研究員 渡 隆爾

A. 研究目的

創薬段階でヒトにおける薬物動態学 (Pharmacokinetics, PK) 及び代謝物を正確に予測することは、医薬品候補化合物の臨床開発を円滑に進め行く上で重要である。しかしながら、これら予測の鍵となる *in vitro* 細胞培養において、従来法としてのコラーゲンを用いた単層培養法並びにコラーゲン及びマトリゲルを用いたサンドイッチ培養法を用いた *in vitro* 評価では、実際の生体における代謝酵素活性及び輸送活性と乖離した結果を示しており、化合物によっては *in vitro* と *in vivo* で PK 及び代謝物の様相が大きく異なる場合がある。したが

って、動態予測の立場から既存の培養法に代わる生体環境を模した新規培養法の開発が渴望されている。そこで本研究では、創薬段階における肝代謝・動態評価に導入することを目的に農業生物資源研究所・竹澤俊明上席研究員によって開発された新規培養法コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー（ad-MED ビトリゲル®）を用いてヒト Cytochrome P450 (CYP) 代謝酵素活性について従来法で培養した時のそれと比較検討した。

B. 研究方法

コラーゲン薄膜 (CMV) 直下を固相とした CMV チャンバー内でヒト肝細胞 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を 24 時間培養した後、「液相-固相」「液相-気相」及び「液相-液相」の各界面で培養を開始した。それぞれの界面培養における培養 4

日及び7日におけるヒトチトクローム P450 (CYP) 酵素活性を測定するためにそれぞれの CYP 分子種特異的なモデル基質を肝細胞に暴露させて所定時間インキュベーションさせた後、培地の一部を採取した (測定試料)。採取した測定試料をメタノール/アセトニトリル (3:7) の混液で除蛋白後、それぞれのモデル基質の代謝物を LC-MS/MS で測定した。また、ad-MED ビトリゲル®培養で得られた酵素活性値と従来法である市販のコラーゲン単層用培養プレート (日本 BD 製) で得られた活性とを比較検討した。下記に各 CYPs のモデル基質、反応、代謝物及び最終濃度の関係の一覧を示した。

CYP	基質	反応	代謝物	最終濃度 (µM)
1A2	Phenacetin	O-de-ethylation	Acetaminophen	100
2C9	Tolbutamide	Hydroxylation	OHTB	500
2C19	S-Mephenytoin	4'-Hydroxylation	OHMP	200
2D6	Bufuralol	1'-Hydroxylation	OHBF	50
3A4	Midazolam	1'-Hydroxylation	OHBF	100

## C. 研究結果及び考察

### C.1. CYP1A2 代謝酵素活性

培養 4 日目に CYP1A2 のモデル基質である Phenacetin (最終濃度 100 µM) を肝細胞に暴露し、45 分間インキュベーション後、代謝物である Acetaminophen (AAP) を LC-MS/MS にて測定して代謝活性値を算出した。ad-MED ビトリゲル®における「液相-固相」「液相-気相」及び「液相-液相」の代謝活性値は、それぞれ 5.45、5.30 及び 3.40 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (1.45 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と比較して ad-MED ビトリゲル®で培養した方が CYP1A2 代謝酵素活性は高い値を示した。また、ad-MED ビトリゲル®における代謝活性は、「液相-固相」≥「液相-気相」>「液相-液相」の順に高かった。培養 7 日目における「液相-固相」及び「液相-気相」の代謝活性値は、それぞれ 1.79 及び 2.91 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、

従来法のそれ (0.95 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と比較して高く、ad-MED ビトリゲル®培養は、従来法と比較して培養長期にわたり CYP1A2 活性を高く維持できることが示唆された。

### C.2. CYP2C9 代謝酵素活性

培養 4 日目に CYP2C9 のモデル基質である Tolbutamide (最終濃度 500 µM) を肝細胞に暴露し 45 分間インキュベーションした後、代謝物である 4'-hydroxy tolbutamide (OHTB) を LC-MS/MS で測定して代謝活性値を算出した。ad-MED ビトリゲル®における「液相-固相」、「液相-気相」及び「液相-液相」の代謝活性値は、それぞれ 0.46、0.27 及び 0.09 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (0.11 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と同等もしくはそれ以上の高い CYP2C9 代謝活性を示した。また、ad-MED ビトリゲル®における代謝活性は、「液相-固相」>「液相-気相」>「液相-液相」の順に高かった。培養 7 日目における「液相-固相」及び「液相-気相」の代謝活性値は、0.15 及び 0.08 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (0.05 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と比較して高く、ad-MED ビトリゲル®培養は、培養長期にわたり CYP2C9 活性を高く維持できることが示唆された。

### C.3. CYP2C19 代謝酵素活性

培養 4 日目に CYP2C19 のモデル基質である S-Mephenytoin (最終濃度 200 µM) を肝細胞に暴露し、45 分間インキュベーションした後、代謝物である 4'-Hydroxymephenytoin (OHMP) を LC-MS/MS で測定して代謝活性値を算出した。ad-MED ビトリゲル®における「液相-固相」及び「液相-気相」の代謝活性値は、それぞれ 1.37 及び 1.01 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (1.21 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) とほぼ同等の



活性を示した。一方、「液相-液相」の代謝活性値は、0.50 pmol/min/10<sup>6</sup>cells で低値であった。また、培養 7 日目における「液相-固相」及び「液相-気相」の代謝活性値は、0.12 及び 0.07 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (0.21 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と比較して、低い値を示した。

#### C. 4. CYP2D6 代謝酵素活性

培養 4 日目に CYP2D6 (最終濃度 50 µM) のモデル基質である Bufuralol を肝細胞に暴露し、45 分間インキュベーションした後、代謝物である 1'-Hydroxybufuralol (OHBF) を LC-MS/MS で測定して代謝活性値を算出した。ad-MED ビトリゲル®における「液相-固相」及び「液相-気相」及び「液相-液相」の代謝活性値は、それぞれ 1.15、0.99 及び 0.71 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (0.94 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) とほぼ同等の活性を示した。また、培養 7 日目における「液相-固相」及び「液相-気相」の代謝活性値は、0.59 及び 0.58 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (0.56 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と近似した値を示した。ad-MED ビトリゲル®培養における培養 4 日及び 7 日における CYP2D6 代謝活性については、従来法で培養した時の活性とほぼ同等であった。

#### C. 5. CYP3A4 代謝酵素活性

培養 4 日目に CYP3A4 のモデル基質である Midazolam (最終濃度 100 µM) を肝細胞に暴露し、10 分間インキュベーションした後、代謝物である 1'-Hydroxymidazolam (OHMDZ) を LC-MS/MS で測定して代謝活性値を算出した。ad-MED ビトリゲル®における「液相-固相」「液相-気相」及び「液相-液相」の代謝活性値は、それぞれ 10.70、9.50 及び 6.90

pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (5.61 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と比較して ad-MED ビトリゲル®で培養した方が高い代謝活性を示した。また、ad-MED ビトリゲル®における代謝活性は、「液相-固相」≥「液相-気相」>「液相-液相」の順であった。培養 7 日目における「液相-固相」及び「液相-気相」の代謝活性値は、4.96 及び 3.46 pmol/min/10<sup>6</sup>cells を示し、従来法のそれ (3.43 pmol/min/10<sup>6</sup>cells) と比較して同等以上であり、ad-MED ビトリゲル®培養は、長期間にわたり CYP3A4 活性を高く維持できることが示唆された。

今後は、薬物動態評価へ実用化するために ad-MED ビトリゲル®を用いた培地改良を含めた細胞培養方法の最適化を図り、ヒト凍結肝細胞を用いた CYPs 及び Non-CYP 酵素活性、化合物における代謝物検索及びヒト薬物動態予測のための肝固有クレアランス算出等について検討していく予定である。

#### D. 結論

ad-MED ビトリゲル®で培養した際のヒト凍結肝細胞における代謝酵素活性を検討した結論として、以下の 2 点が挙げられる。

①多くの医薬品及び開発化合物の代謝に重要な CYP3A4、2C9 及び 1A2 の代謝酵素活性は、ad-MED ビトリゲル®で培養した方が従来法と比べてより高い活性を示した。また、これら 3 分子種については、培養 7 日においても代謝活性が高いことから、長期にわたり酵素活性が維持できる培養系であることが示唆された。

②ad-MED ビトリゲル®で培養後の CYP2C19 及び CYP2D6 の代謝酵素活性は、従来法で培養後のそ

れと比較してほぼ同等の活性を示した。今後は、他のヒト凍結肝細胞ロットを用いた結果についても収集して、今回の結果の再現性と本法における代謝酵素活性への影響についての詳細を明らかにしていきたいと考えている。

E. 健康危機情報

該当なし

F. 研究発表等

学会発表等

- 1) 柿木基治：創薬を支援する先端培養技術：  
PKPD 予測に有用なヒト細胞の培養モデル。  
日本組織培養学会第 87 回大会（2014. 5, 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