

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670071

研究課題名(和文)一細胞レベルでのヒト胆汁排泄能力の定量的見積りによる医薬品の動態・毒性解析

研究課題名(英文) Analysis of pharmacokinetics and toxicological effects of drugs by quantitative estimation of human biliary excretion of drugs at a single cell level

研究代表者

前田 和哉 (Maeda, Kazuya)

東京大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：00345258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高感度質量分析計による一細胞における物質濃度の計測技術を活用して、肝細胞を極性維持した状態で培養可能なサンドイッチ培養系における薬物の挙動を定量化することを目的とした。その結果、胆管腔を蛍光色素の集積を使ってガイドすることで、胆管腔内の薬物の回収を確認できることを見出した。しかし、培養時に使用するマトリゲルがプローブの通過を妨害しており、高感度な薬物の測定においては更なる技術の向上が求められることが分かった。そこで、HepaRG細胞が胆管腔をゲル無しで構築可能であることを見出すと共に、複数の薬物の胆管腔への排出も観察されたことから、代替細胞の利用も考慮できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to optimizing the experimental conditions for quantifying the drug movement in sandwich cultured hepatocytes by utilizing the novel technique of measuring the substances in a single cell with high-spec mass spectrometry. As a result, we succeeded in guiding a sample collecting probe to the bile pocket and confirming the sample collection in the bile pocket by using fluorescent compounds efficiently accumulated in the bile pocket in parallel. However, matrigel layer may inhibit the passage of probe to the bile pocket and we should improve this point for the highly sensitive measurement of compounds in this system. We found that HepaRG cells could efficiently form bile pockets between cells without any gels and excretion of several drugs into bile pocket could be observed in HepaRG cells. Thus, the use of alternative cell lines such as HepaRG cells may overcome the current problem.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：肝細胞 薬物動態 トランスポーター 質量分析計 一分子測定

1. 研究開始当初の背景

本研究では、ヒトで測定不可能であることからあまり検討されていない医薬品や内因性物質のヒト胆汁排泄過程を定量的に精度よく解析することを目的として考案された。これまで、*in vitro* 実験において物質の胆汁排泄を模倣可能な系としては、培養する肝細胞の上下をコラーゲンやマトリゲルといった細胞外基質成分で挟んで培養することで、細胞間に効率よく胆管腔(bile pocket)を形成させることができるサンドイッチ培養肝細胞系が知られていた。また、bile pocket 中の薬物濃度についても、Ca²⁺イオンを含まないバッファーで肝細胞を一定時間インキュベーションすると、bile pocket を形成する tight junction が緩む性質を利用して、Ca²⁺イオンを含むバッファーと含まないバッファーの両方を用いることで、bile pocket 中の薬物濃度を定量する方法も既に報告されている。但し、本方法論では、両者の差分として、バッファー中に bile pocket 中からもれ出てきた薬物量を定量することから、薬物量がそれなりに多い量でないと、正確な定量が難しいといった欠点を持っていた。

研究分担者である升島らが独自に開発した一細胞質量分析法の技術では、細胞内コンパートメント中に直接ナノチップを挿入して吸い上げ、それを直接 ESI-MS/MS に導入することで、細胞内コンパートメント中の物質の濃度を正確に定量することに成功していた。そこで、本方法論を、サンドイッチ肝細胞の系に導入することにより、bile pocket ならびに細胞質中濃度を直接定量することで、異物解毒の各素過程に関わる速度論パラメータを算出できると考えた。さらに、肝毒性・胆汁うっ滞を引き起こす物質が、内因性物質の胆汁排泄に与える影響を考察すべく、bile pocket 中の内因性物質の一斉分析を試みることを企画した。

2. 研究の目的

本研究では、サンドイッチヒト肝細胞培養系に、研究分担者が有する計測技術である一細胞質量分析法を導入することによって、bile pocket 中および細胞内濃度を同時定量することにより、ヒト肝細胞内外の物質の動きを決定するクリアランスを従来法よりも直接的に求めることにより、ヒト肝細胞での異物解毒のミクロな理解を進め、薬物動態の精緻な予測モデルの構築につなげる成果を出すことを目的とした。併せて、化合物の暴露による薬物の胆汁排泄の変動を捉えることで、新たな毒性シグナルの探索を期待した。

3. 研究の方法

サンドイッチ培養ヒト肝細胞の実験系については、本方法論の考案者である Dr. Kim Brouwer らの過去の報告に準拠し、当研究室でも実績のある方法に従って行った。ヒト凍結肝細胞は、トランスポーターを介した輸送

活性にはロット差が極めて大きいことが知られていることから、Life Technologies 社のよりあらかじめ複数のロットの肝細胞を入手し、NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide)と BSEP (bile salt export pump)の両方の基質となる taurocholate や、OATP (organic anion transporting polypeptide)ファミリートランスポーターと、MRP2 (multidrug resistance associated protein 2)の両方の基質となる estradiol-17β-glucuronide について、過去の報告と同様の BEI (biliary excretion index) 値 $[\text{BEI} = \{(\text{Ca}^{2+}(+) \text{ buffer のときの細胞内薬物量}) - (\text{Ca}^{2+}(-) \text{ buffer のときの細胞内薬物量})\} / (\text{Ca}^{2+}(+) \text{ buffer のときの細胞内薬物量})]$ が出ることをあらかじめ確認した細胞ロットを用いた。

一細胞質量分析法については、既に升島らが実験系を確立しており、その方法論に従った。対象となる細胞部位を顕微鏡観察下で選択して、独自開発のナノスプレッチップに吸引することで捕捉する。その後、チップ中に有機溶媒を直接添加することでチップ内で除蛋白を行った後、専用の MS 導入口にチップを入れて、nano-ESI でイオン化を行う。イオン化された物質は、タンデム型質量分析計に導入され、親化合物及びフラグメントの分子量に合致する物質の量をピーク高より定量する。

HepaRG 細胞は、肝がん由来不死化細胞株である。本研究では、Biopredic International 社(Rennes, France)よりご供与いただいたものを実験に供した。本細胞は、これまでの研究から、比較的取り込み・排出トランスポーターの発現量がヒト肝細胞と数分の一～同程度に維持されていることが知られており、また、細胞外基質成分無しでも、ある程度細胞間に bile pocket を形成することができることが知られていたため、肝細胞の代替系として本細胞も実験に用いることとした。

4. 研究成果

(1) ヒト凍結肝細胞を用いたサンドイッチ培養系の確立および BEI の測定

細胞培養 dish 上に培養可能な platable ヒト凍結肝細胞の中から複数のロットを選択し、taurocholate ならびに estradiol-17β-glucuronide の BEI 値を測定した。その結果、platable 肝細胞として、接着効率は良好なロットであっても、十分な BEI 値が出ないロットも見受けられ、接着率や bile pocket の形成効率と、その肝細胞における物質の輸送活性は必ずしも一致しないことが示された。

上記検討により選抜されたロットを用いて、これまでに未変化体により胆汁排泄されることが既知の薬物について BEI 値の測定を実施したところ、pitavastatin, rosuvastatin, digoxin, DPDPE ([D-Pen2,5]Enkephalin)において、バッファ

一中の Ca²⁺有の時と比較して、Ca²⁺無のときにおいて、有意にインキュベーション 10 分後の細胞内蓄積量は小さくなっていることが明らかとなり、これらの差分として bile pocket 中への薬物の排出が確認されたものと考えることができた。

(2) 一細胞質量分析法による bile pocket 中濃度の定量に関する検討

Bile pocket 中に蓄積した薬物量を升島らの一細胞質量分析法を用いて定量するためには、まずナノチップの先を正確に bile pocket 中に挿入する必要がある。当初、位相差顕微鏡下にて bile pocket へのナノチップの挿入を狙ったが、肝細胞の上部にマトリゲルの層がのっていることから、深さを含む位置情報が不明瞭であった。そこで、正確にナノチップをガイドし、さらに bile pocket 中の内容物が確実に吸引されていることを担保するために、bile pocket を蛍光物質で染めることを着想した。CDF (carboxydichlorofluorescein) は、これまでの研究より、CDF-DA (diacetate) の形で肝細胞とインキュベーションすると、受動拡散により細胞内に取り込まれた後、細胞内に存在するカルボキシルエステラーゼによって、CDF へと切断され、胆管膜上に発現する MRP2 によって主に bile pocket へと輸送される。CDF は蛍光を有することから、これまでもサンドイッチ培養系において、bile pocket の形成効率を調べる目的にも、CDF による bile pocket の染色像が用いられてきた。そこで、まずは、ナノチップを用いて、bile pocket 中の CDF を吸引するための検討を実施した。

最初、肝細胞上部のマトリゲル層が予想以上に厚く、ナノチップがゲル層を突破できないという困難に見舞われた。そこで、ゲル層をチップが通過するときには、陽圧をチップ内に施すことで、ある程度克服できた。吸引を行うことで、bile pocket 中の蛍光が減少することで、吸引が成功しているかを明確にすることができることが分かった。但し、ゲル成分の一部がナノチップ中に入ってくるためか、MS/MS 内にイオンをスプレーする際にしばしばチップが詰まることが散見されており、今後の課題の一つである。

次に、CDF そのものの bile pocket 中の含量を MS/MS により定量を試みた。その結果、予想される位置に MS/MS のピークを観察することができた。これにより、本方法論を用いて、bile pocket に排出された薬物濃度も定量可能であることが示唆される結果を得た (図 1)。

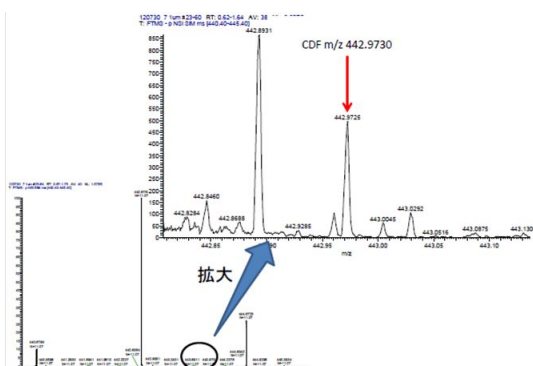


図 1 : bile pocket 中の CDF を示す MS/MS のピーク例

次に、実際の薬物の bile pocket 中への排出を本方法論により測定できるかについて検討するために、rosuvastatin をモデル化合物として選択した。あらかじめ、CDFDA と細胞をインキュベーション後、蛍光顕微鏡下で bile pocket における蛍光が観察されることを確認後、rosuvastatin 10 μM を 15 分程度インキュベーションした。その後、ナノチップにより bile pocket 中の薬物を定量したところ、rosuvastatin に合致する MS ピークは観察されたものの、検量線の定量限界を下回っており、今後更なる検出感度の向上が必要とされる結果を得た (図 2)。

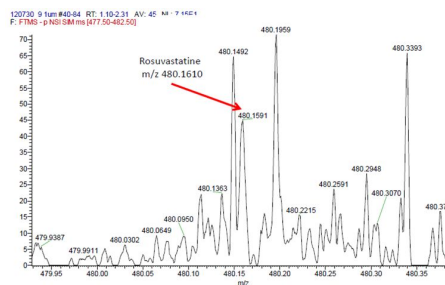


図 2 : bile pocket 中の rosuvastatin を示す MS/MS のピーク例

(3) HepaRG 細胞を用いた各種化合物の bile pocket への輸送の検討

当初の予想と反して、サンドイッチ培養肝細胞における bile pocket 中の薬物の濃度測定は、様々な条件から困難であることが分かった。その一つとして肝細胞上部に重層したゲルの厚みが考えられ、できるだけ減らすことで、サンプリングや測定に対する障壁を下げることができることも予想された。しかしながら、ゲル層の厚みを減少させると、bile pocket の形成効率や、トランスポーター発現量の維持効率が減少することが分かり、この戦略は適用しづらいことがわかった。そこで代替案として、近年、ヒト肝細胞と比べて、比較的取り込み・排出トランスポーターの発現量が維持されていることが知られている HepaRG 細胞を用いる可能性について検討を実施した。本細胞では、これまでの検討から、ゲルによるサンドイッチ培養を施さなくても、高効率に bile pocket が構築されるこ

とも知られており、ゲルが不要である点が有利であると考えられる。そこで、HepaRG 細胞を用いて、各種化合物の bile pocket への輸送を観察した。その結果、ヒト肝細胞と比較して、bile pocket への排出クリアランスは、数分の一～同程度であったことから、今後、輸送系ごとの発現量比較やクリアランスとの対応関係を定量的におさえていく必要があるものの、HepaRG 細胞を用いた実験系が、今回用いた一細胞質量分析法を用いた解析に適している可能性が考えられ、今後、本細胞系を用いて、定量的な輸送解析を行う基礎検討を進めるのが有用であろうと考えられる結果を得た。

以上、本研究においては、当初予定していたほどヒト肝細胞を用いた物質の胆汁排泄の予測系の確立にまでは至れなかったが、一細胞質量分析法により bile pocket 中の薬物濃度は、感度の向上などがあれば技術的には可能であることが確認されたのに加えて、HepaRG 細胞を代替系として用いることで、ゲル層による障壁を考慮しなくてもすむことから、より簡便に一細胞あたりの胆汁排泄における輸送クリアランスを予測できる可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

前田和哉、薬物動態の予測におけるヒト組織活用の意義、第4回レギュラトリーサイエンス学会学術大会(招待講演)、2015年9月4日~5日、一橋講堂(東京都千代田区)

前田和哉、Demonstration and Prediction of Clinical Importance of Drug Transporters as Determinants of Hepatic Clearance of Anionic Drugs, 5th Asia Pacific ISSX meeting(招待講演)、2015年5月10日~12日、Tianjin, China

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 和哉(MAEDA, Kazuya)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：00345258

(2)研究分担者

升島 努(MASUJIMA, Tsutomu)

理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号：10136054