

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08426

研究課題名(和文) 簡便で効率的な3次元液滴培養法をヒト多機能分化誘導細胞へ応用する薬物相互作用研究

研究課題名(英文) Prediction system of risk assessments by change the drug metabolism activity in placenta for pregnancy

研究代表者

村山 典恵 (MURAYAMA, Norie)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90219949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：創薬や化学物質の毒性評価では、ヒト肝細胞が使用されている。しかし細胞の代謝機能については、ドナーの肝薬物処理能力に依存することから、使用する肝細胞のロットにより大きく異なってくる。近年、心筋細胞などへの分化誘導で良好な結果が得られているiPS細胞に関して、肝細胞への分化誘導の手法の開発が期待されている。本研究では、培地条件と培養期間に着目し、初代培養肝細胞や肝癌由来HepaRG細胞との肝薬物代謝酵素発現プロファイルの差異を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、創薬や化学物質の毒性評価に汎用されているヒト肝細胞であるが、良質な細胞の供給に関しては問題がある。細胞の代謝酵素活性には常にドナーの肝の代謝能力に影響を受けるためロットによる差が大きいと言われている。心筋などへの分化誘導が可能となっているiPS細胞を形態だけでなく機能を有した状態で分化させる条件を検討した本研究の成果は、多くの肝細胞の研究へのiPS細胞の導入に役立つものと考えている。また、各種ガイドラインでの細胞を用いた評価系の確立について、ヒト肝細胞からさらに1つの候補としてiPS細胞を提案し、ヒト肝細胞の十分な供給を可能にする社会的意義につながる。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem (iPS) cells are of great interest for applications in pharmacological research. For drug metabolism testing, commercially available hepatocytes derived from human iPS cells are generally recommended to be used 1week after seeding on plates. In this study, however, after 3-4 weeks of culture according to the manufacturer's instructions, human cytochromeP450(P450)2C9 and 2C19-dependent diclofenac 4'-hydroxylation and omeprazole 5-hydroxylation activities of the iPS-derived hepatocytes has significantly increased above the activities at 1week and had reached levels similar to those in HepaRG cells, a human hepatocyte like cell line. Our findings that the hepatic functions of human iPS-derived hepatocytes were enhanced by 3 weeks of simple culture could facilitate the use of these cells for drug metabolism and toxicity testing.

研究分野：薬物代謝

キーワード：肝細胞 チトクロムP450 サイトカイン 長期間維持培地

様式 C-19、F-19-1 Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景：創薬や化学物質の毒性評価では、初代培養ヒト肝細胞が使用されており、近年 OECD ガイドラインや DDI 評価系としての活用が期待されている。しかし、細胞の代謝能に関しては、ドナーの肝薬物処理能力に依存することから、ロットによって差が生じることが指摘されている。さらに初代培養肝細胞系は、数量的にも供給は不安定性である点が問題となっている。そこで、近年心筋細胞などへの分化誘導が報告されているヒト iPS 細胞を用いた薬物代謝酵素活性測定系の構築が期待され、機能と形態を維持した良好な培養系が検討されつつあったが、代謝酵素活性の維持について、十分な条件が確定されていない状態であった。
2. 研究の目的：初代培養肝細胞系での知見をもとに、iPS 細胞を形態と機能を維持した肝細胞への効率的な分化誘導を行うための簡便な培養条件を確立し、初代培養系と比較検討を行う。
3. 研究の方法：未分化の iPS 細胞 (リプロセル)の初期培養の条件として、Lot による違いや播種細胞数について、ヒト肝癌由来 HepaRG 細胞と比較検討を行った。培地は 24 時間ごとに交換し 4 週間まで培養を試みた。一定期間培養後、培地中に各種酵素の指標基質をカクテル添加し、1~3 時間培養後の培地中の代謝物濃度を LC-MS/MS で測定した。反応終了後の細胞は直ちに回収し、mRNA を調製した。RT-PCR 法により肝薬物代謝酵素チトクロム P450 の RNA レベルについて TaqMan プローブを用いて定量し活性との関連性を解析した。

4. 研究成果：

ヒト iPS 細胞を用いて培養時間経過に伴った肝薬物代謝酵素活性の変動について HepaRG 細胞を用いた活性測定で推奨される 1 週間の時点で比較検討を行った。培養 8 日目では、P4501A の指標活性であるフェナセチン O-脱エチル化活性およびミダゾラム 4-水酸化酵素活性 (P4503A4/5) は概ね同等の活性が認められた。

一方、ジクロフェナク 4'-水酸化活性(P4502C9), オメプラゾール 5-水酸化活性(P4502C19), メトプロロール O-脱メチル化活性 (P4502D6) 及びミダゾラム 1'-水酸化酵素活性 (P4503A4/5)に関しては、いずれも HepaRG 細胞に比べて低値を示した。iPS 細胞に関してはさらに培養を継続し 28 日目の時点で再度活性測定を行った。フェナセチン O-脱エチル化活性ならびにミダゾラム水酸化酵素活性以外では 8 日目と比較して、2~10 倍代謝活性に増加が認められた。今回入手できた 2 つの Lot でに検討結果から、ヒト初代培養肝細胞系と比較して Lot 間での活性値に大きな差異は認められなかった。活性測定細胞について各 P450mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR で測定した結果から、活性変動は、mRNA レベルの変動を伴っていることが明らかとなった。従来、初代培養肝細胞系やヒト肝癌由来

HepaRG 細胞について基底レベルで発現が低いとされている P450C9 に関して、今回の培養では、3 週間目で最も高い mRNA レベルを示した。また、P4503A や P4502B の誘導に關与している核内受容体の PXR の発現について RNA レベルで検討を行ったところ、培養時間内で定常的な発現が認められていることから、ヒト初代培養肝細胞系と同様に、薬物代謝酵素の誘導作用を検討するうえで iPS 細胞は培養 1 週間以降での活用が期待できる。以上の結果から、ヒト iPS 細胞の薬物代謝酵素活性は、これまで用いられてきたヒト肝株細胞と同様にヒト肝の各種薬物代謝に関する検討を行う上で、有効な手段となりうることを示唆された。

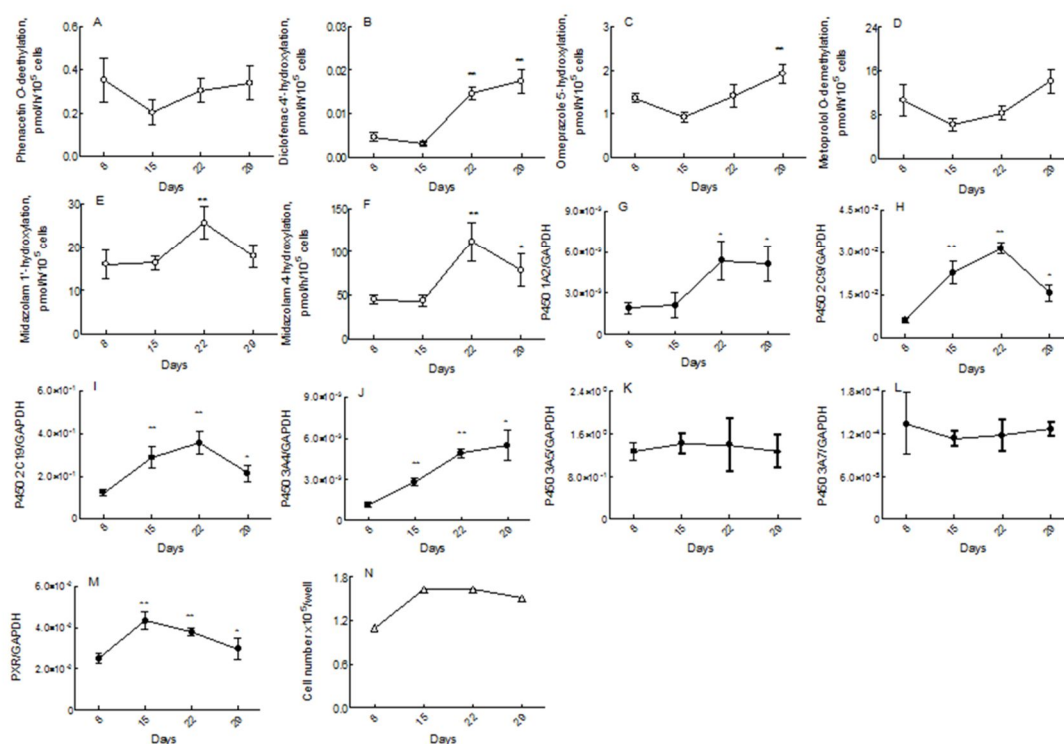


Fig. 1 Drug oxidation activities and mRNA expression levels of cultured hepatocytes derived from iPS cells at days 8,15,22 and 29, along with the cell cumber per well(N). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, one-way analysys of variance with Dnnett's post tests.

iPS 細胞はヒト肝初代培養肝細胞と比較して、薬物代謝酵素の発現は比較的緩やかな時間経過を有する事と成長に伴ったヒト肝での薬物代謝酵素の発現パターンと類似していると示唆された。初代培養肝細胞と胎盤細胞を用いて、薬物代謝能に影響を与えている要因について検討を行った。先行研究で、培養細胞系の培養液の添加物の状態によって基底レベルの発現が変動すること、それに伴って誘導効果が減弱してしまう可能性について検討を行っている。既製培地では、特に培地中のヒドロコルチゾン添加量によって、肝薬物代謝酵素チトクロム P450 の発現が

亢進されている可能性が考えられたことから、培地中の組成を必要最低限に設定し、各種ホルモン添加の影響について検討を行った(Table 1)。その結果、ハイドロコルチゾンの添加量に比例してP4503A4の基底レベルの発現が上昇するため誘導効果が反映されにくいことが明らかとなった。更にヒト胎盤由来 BeWo 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、通常設定培地よりも血清量を減らした状態では、胎盤に存在する薬物代謝 酵素に関して、典型的な誘導剤に対する反応性が認められた (Fig.2)。ヒトでは妊娠最終期に血中のステロイドホルモンレベルが上昇することから、胎盤の薬物代謝活性 への影響を今回検討した培地条件を利用して行くことでより正確に把握することができると考えている。

Table 1. Induction of drug oxidation activities of cultured BeWo cells in the modified condition.

drug	untreated	treated with		
		phenobarbital	rifampicin	thalidomide
hydroxylation	pmol product formed/h/10 ⁶ cells			
bupropion	2.9 ± 0.3	3.3 ± 0.8	2.3 ± 0.9	2.8 ± 0.7
midazolam (1')	16 ± 9	32 ± 11	27 ± 10	60 ± 10*
midazolam (4)	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
thalidomide (5)	0.23 ± 0.05	0.34 ± 0.09	0.33 ± 0.09	0.57 ± 0.18*

また3種サリドマイド類縁化合物の胎盤透過性について 検討を行った結果、特にレナリドマイドの透過性が低いことが明らかとなった、この要因として胎盤内での薬物アセチル化に伴って、薬物の極性が低下し細胞内 への取り込みに影響を与えている可能性が示唆され、胎児毒性評価に関して代謝物の胎盤透過性に関して考慮する必要性を明確に出来た。以上の結果を踏まえて、iPS の肝細胞への分化誘導と各種薬物代謝酵素発現を促す生体内因子を明らかにし、実験系として確立することによって、今後生体内物質と新規外来異物による代謝酵素発現誘導を検討する有効な手段として用いられることが期待出来る。

培養条件をより生理的状态を再現するように設定することで、細胞本来の反応性や各種酵素タンパク発現が期待できることが示唆されたことから、生理的変動一要因として生体内サイトカインに着目した。従来炎症時に生じるサイトカインの増加が肝臓の代謝酵素の 発現に対する影響について様々な報告がある。実際にこの影響を IL-1β, IL-2, IL-6, IL10, TNF-α, INF-γ, リポポリサッカライド(LPS)を用いて、初代培養ヒト肝細胞と医薬品の開発に用いられるサル肝細胞で検討を行なった。濃度 0.0001 ~ 1uM で段階的に検討した結果、特にヒト肝細胞では、IL-6の添加で P4503A mRNA 発現に関して酵素活性を伴った著しい減少が認められた。一方、対照としたサル肝細胞では、特に P4503A5mRNA に上昇が認められ、ミダゾラム水酸化酵素活性に関して同様の傾向が認められ、ヒトとは異なる影響が確認された。

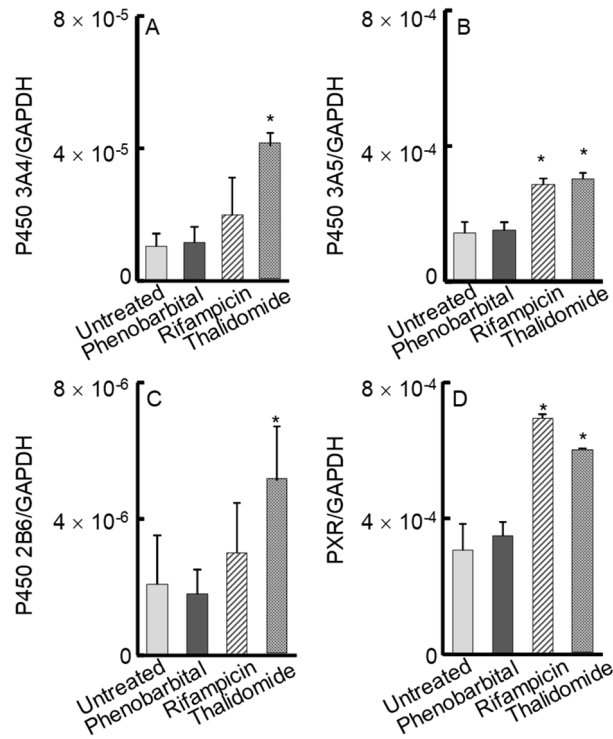


Fig 2. Induction of P450 3A4 (A), 3A5 (B), 2B6 (C), and PXR (D) mRNA levels in BeWo cells cultured in modified media containing 5% (v/v) charcoal-stripped fetal bovine serum by phenobarbital, rifampicin, and thalidomide.

近年ガイドラインの評価系細胞としてとりあげられている肝癌由来 HepaRG 細胞その作用濃度に関しては、およそ 100 倍高濃度側に IC₅₀ が変動していた。HepaRG を培養細胞評価系で用いる場合には、ヒト肝初代培養細胞と生理的要因に対する応答性に差があることが判明し、長時間培養可能とされている培地で培養を継続した場合には、これまでよりも特に P4502C の発現維持に影響する可能性が認められた。これらの情報は肝細胞の機能を維持した状態を再現するために iPS 細胞への応用性が期待できる。

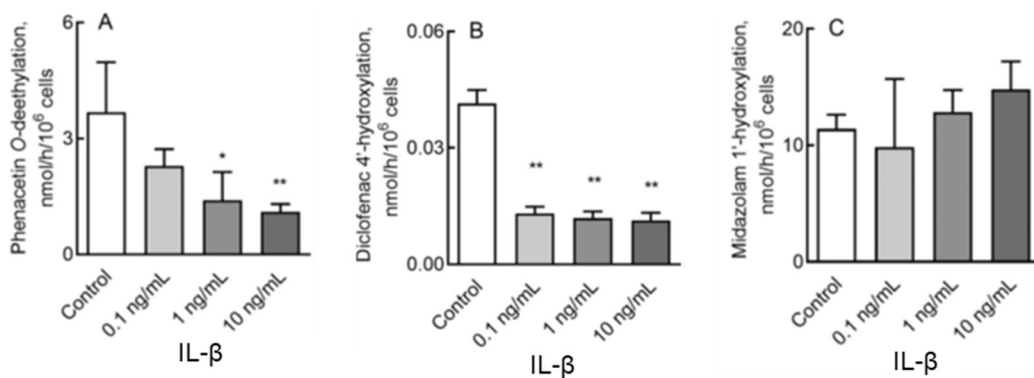


Fig.3 Enzyme activities of cytochrome P450s in primary hepatocytes treated with IL-1 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Uno, Y. and Murayama, N. and Yamazaki, H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Interleukin-1 and tumor necrosis factor- affect cytochrome P450 expression in cynomolgus macaque hepatocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 00-00
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.02001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Murayama, N. and Yamazaki, H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in commercially available hepatocytes derived from human induced pluripotent stem cells cultured for 3 weeks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J.Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 241-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Murayama N, Yajima K, Hikawa M, Shimura K, Ishii Y, Takada M, Uno Y, Utoh M, Iwasaki K, Yamazaki H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Assessment of multiple cytochrome P450 activities in metabolically inactivated human liver microsomes and roles of P450 2C isoforms in reaction phenotyping studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biopharm. Drug Dispos.	6. 最初と最後の頁 116-121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bdd.2115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Murayama,N., Suemizu,H., Uehara,S., Kusama,T. Mitsui,M., Kamiya,Y., Shimizu,M., Guengerich,F. P., and Yamazaki,H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Association of pharmacokinetic profiles of lenalidomide in human plasma simulated using pharmacokinetic data in humanized-liver mice with liver toxicity detected by human serum albumin RNA.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Toxicol.Sci	6. 最初と最後の頁 369-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.369.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suemizu, H., Kawai, K., Murayama, N., Nakamura, M., and Yamazaki, H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Chimeric mice with humanized liver as a model for testing organophosphate and carbamate pesticide exposure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pest Manag.Sci.	6. 最初と最後の頁 1424-1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ps.4825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murayama, N. and Yamazaki, H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in commercially available hepatocytes derived from human induced pluripotent stem cells cultured for 3 weeks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 241-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.241.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murayama, N, Kazuki, Y, Satoh, D, Arata, K, Harada, T, Shibata, N, Guengerich, FP, Yamazaki, H	4. 巻 42
2. 論文標題 Induction of human cytochrome P450 3A enzymes in cultured placental cells by thalidomide and relevance to bioactivation and toxicity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 33-348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.42.343.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Norie Murayama, F. Peter Guengerich, and Hiroshi Yamazaki
2. 発表標題 Cytochrome P450 3A Enzyme-dependent Thalidomide Toxicity and Inducibility in Cultured Human Placental Cells
3. 学会等名 22nd North American ISSX Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村山典恵、岩崎美友、小林由惟、大西潮、吉沢愛映、水野紗和、中里真悠子、中村仁美、
2. 発表標題 化学物質の肝毒性評価を目指した生理学的薬物動態モデルを用いたラット体内動態予測
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山崎 浩史 (YAMAZAKI Hiroshi) (30191274)	昭和薬科大学・薬学部・教授 (32624)	
研究分担者	清水 万紀子 (SHIMIZU Makiko) (90307075)	昭和薬科大学・薬学部・准教授 (32624)	