

令和元年6月17日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15527

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いたin vitro胆汁うっ滞型肝障害試験法の構築

研究課題名(英文) In vitro bile acid-dependent hepatocyte toxicity assay system using human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes

研究代表者

堺 陽子 (Sakai, Yoko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50723079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、サンドイッチ培養ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来肝細胞(SCHiHs)を作製し、薬剤性胆汁鬱滞型肝障害評価系の開発を行った。サンドイッチ培養ヒトiPS細胞由来肝細胞(SCHiHs)には、毛細胆管形成やMRP2発現及び胆汁酸の取り込み/排泄能が認められた。しかし、BSEPのmRNA発現量はほとんど認められなかった。また、薬剤性肝障害(DILI)を起こすことが知られている22化合物のうち7化合物において、ヒト血清胆汁酸依存的に細胞毒性が認められたが、SCHiHsにおいて、BSEP発現量が低いため、ヒト初代肝細胞で検出されたいくつかの化合物は検出できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞毒性評価系モデルの構築に対する報告は、国内外問わず、少ないと思われる。また、今回、開発したサンドイッチ培養ヒトiPS細胞由来肝細胞(SCHiHs)を用いた薬剤性胆汁うっ滞型肝毒性評価系は、ヒトiPS細胞由来であるため、大量生産可能かつ個々の遺伝的背景を反映させた系の構築に繋がる特色がある。また、動物を使用することなく、安全性、毒性評価を行う方法を見出すことは、非臨床試験における肝毒性評価系の一つとして、今後の世論の動向とマッチしており、動物代替法および安全性の高い医薬品の開発に繋がるため、有意義なモデル系だと思われた。

研究成果の概要(英文)： We investigated whether sandwich-cultured human induced pluripotent stem cell (iPS cell)-derived hepatocytes (SCHiHs) are suitable for evaluating cholestatic hepatotoxicity. Fluorescent N-(24-[7-(4-N,N-dimethylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole)]amino-3,7,12-trihydroxy-27-nor-5 α -cholestan-26-oyl)-2'-aminoethanesulfonate (tauro-nor-THCA-24-DBD) and CDF (substrate of BSEP or MRP2) were accumulated in bile canaliculi, which supports the presence of functional bile canaliculi lumen. MRP2 was highly expressed, whereas BSEP was hardly detectable in Western blot analysis. MRP3/4 mRNA levels were maintained. Of the 22 compounds known to cause DILI with BAs, 7 showed significant cytotoxicity. Most higher risk drugs were detected using the current SCHiH system. However, a shortcoming was the considerably low protein expression level of BSEP, which led to the non-detection of some relevant drugs whose risks should be detected in primary human hepatocytes.

研究分野：臨床薬学

キーワード：胆汁酸 胆汁鬱滞肝障害 ヒトiPS細胞 MRP2/3/4 サンドイッチ培養 毛細胆管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、代謝や解毒、胆汁の生成・分泌など生体内において重要な役割を担っている臓器である。医薬品開発において、医薬品候補化合物の肝毒性は開発中止の原因になることから、これをより早期に発見する技術を見出すことは、リスクやコストの面から非常に有用である。特に非臨床試験における毒性試験は、必須項目であることから、肝臓における医薬品候補化合物がどの程度の毒性を有するのかをより詳細に予測することは非常に重要となる。したがって、肝臓の主要タンパク質である代謝酵素やトランスポーターに着目した評価系は、肝毒性を正確に予測するためにはかかせないモデルとなる。*in vitro* 試験系としては、ATP 依存的な小胞内輸送の検証のために胆管側膜ベシクルを用いた報告があるが、他のトランスポーターとの生体内相互作用を解析できない難点がある。そこで、ヒト初代肝細胞、ヒト肝ガン由来の HepaRG 細胞や HepG2 細胞などが用いられている。しかし、ヒト初代肝細胞は高額に加え、新鮮な肝細胞の入手が困難であり、培養によって機能が著しく低下すること、HepaRG 細胞は、一つの株に依存してしまうと個人差が検討できない、そして HepG2 細胞は輸送活性が極めて低いなど、生理的状态を再現しているとは言い難い。このように、現段階の新規医薬品の安全性評価系は、トランスポーターを介した毒性試験法において、ヒトへの外挿が困難であり、さらなる改善が必要であることが示唆される。また、国内外問わず、主に薬剤の添加によるトランスポーターを介した機能や細胞死の検討がなされており、肝細胞毒性評価系モデルの構築に対する報告は少ないと思われた。そこで、申請者は胆汁酸取り込み・排泄型トランスポーターを有した肝細胞を作製し、そのモデルを開発したいと思い、本課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究においては、以下のことを目的とした。胆汁酸取り込み・排泄トランスポーターの mRNA やタンパク質発現量の優れた細胞外マトリックスの組み合わせ、培地に加え培養期間を探索し、血管側膜と胆管側膜の機能的に異なる細胞膜を有するサンドイッチ培養ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (SCHiHs) への分化誘導法の確立を行う。また、作製した SCHiHs において、取り込み・排泄トランスポーターが機能を有しているのかを検討するために、蛍光基質を用いた手法により定量・定性評価を行う。さらに、外部から胆汁酸と薬剤の暴露に伴う薬剤性胆汁うっ滞型肝障害試験法の開発を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法

ヒト iPS 細胞株は、国立成育医療研究センター梅澤博士よりご供与いただいた。また、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化において、これまでに確立した方法があるため、申請者もその条件を基に研究を行った。さらに、低分子化合物である valproic acid (VPA) を用いることで、効率よくヒト iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導する方法も見出しており、申請者も同様に行った。

(2) 細胞外マトリックスを用いたサンドイッチ培養ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (SCHiHs) の作製

細胞外マトリックスは多くの種類があり、肝細胞の機能向上に対する効果を期待してよく用いられているものには、コラーゲン、マトリゲルが知られている。この 2 種類の細胞外マトリックスを組み合わせたサンドイッチ培養により作製した SCHiHs の遺伝子発現量、タンパク質量、細胞極性、毛細胆管形成能、そして機能解析の測定を行う (Table.1.)。

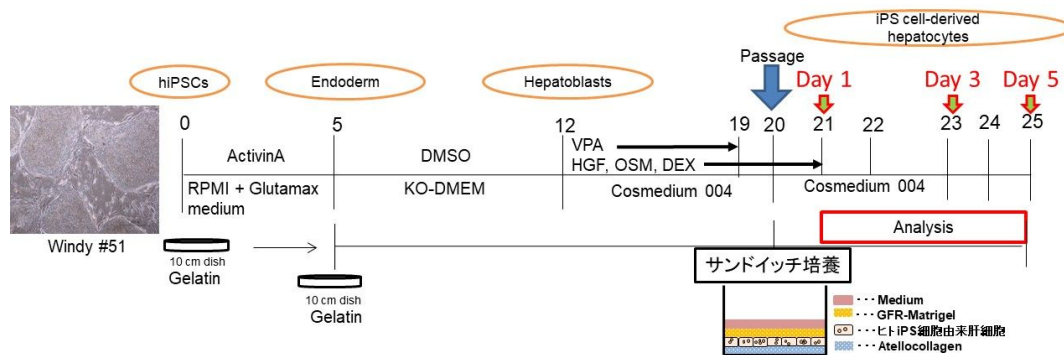


Table. 1. サンドイッチ培養を用いた ヒトiPS細胞から肝細胞様細胞への分化誘導プロトコール

Activin A, 100 ng/mL; dimethyl sulfoxide, (DMSO), 1%; valproic acid, (VPA), 2 mM; hepatocyte growth factor, (HGF), 10 ng/mL; oncostatin M, (OSM), 20 ng/mL; dexamethasone, (DEX), 100 nM

(3) サンドイッチ培養ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (SCHiHs) に添加するヒト血清胆汁酸濃度の調製

SCHiHs に添加する胆汁酸濃度の決定は、調製したヒト血清胆汁酸濃度と CsA 添加群または非添加群を用意し、SCHiHs 自身の毒性は現れず、CsA 添加の有無による差が大きい部分にした。これは、24 時間暴露し、培地中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出にて評価を行った。

(4) 胆汁酸と薬剤暴露に伴う薬剤性胆汁うっ滞型肝障害評価系の開発

SCHiHs に調製した血清胆汁酸と肝障害を引き起こすことが知られている 22 種類の薬剤を同時に 24 時間暴露し、培地中の LDH 漏出にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞外マトリックスによってサンドイッチ培養したヒト iPS 細胞由来肝細胞における遺伝子発現量並びにタンパク質量の効果

I 型コラーゲンをコートした培養皿にヒト iPS 細胞由来肝細胞を播種し、4 時間後、マトリゲルで覆ったサンドイッチ培養法により、mRNA 発現量において、サンドイッチ培養後 3 日目において、Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)、multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)、breast cancer resistance protein (BCRP) はヒト初代肝細胞 (HPHs (48 時間)) とほぼ同等の発現量を確認した。しかし、bile salt export pump (BSEP) や multidrug resistance protein (MDR)1 は低値であった。この時、ウェスタンブロット法によるタンパク定量において、MRP2 タンパク量は、HPHs (0 時間) とほぼ同等の発現量に増加した。

(2) サンドイッチ培養ヒト iPS 細胞由来肝細胞 (SCHiHs) における細胞極性と毛細胆管形成能

明視野にて経日的に毛細胆管が形成した (Fig.1.)。毛細胆管指標マーカーである radixin も染色した。また、ファロイジン - アクチン染色との併用による免疫染色において、MRP2 は確認でき、これより細胞膜への局在も観察され、毛細胆管形成の裏付けとなった。

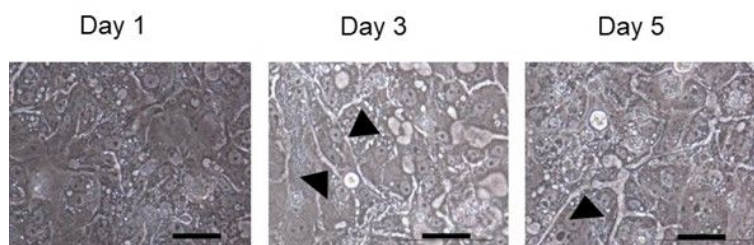


Fig.1. サンドイッチ培養後のヒトiPS細胞由来肝細胞の形態

(3) サンドイッチ培養ヒトiPS細胞由来肝細胞(SCHiHs)における機能解析

MRP2、NTCP/BSEPの機能に関して、蛍光基質である5-(and 6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA) や N-(24-[7-(4-N,N-dimethylaminosulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole)]amino-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-27-nor-5 β -cholestan-26-oyl)-2'-aminoethanesulfonate (tauro-nor-THCA-24-DBD)を用い評価したところ、インセルアナライザーによりCDFが毛細胆管に蓄積する様子が観察された。また、BSEPなどの阻害剤として知られているCyclosporin AによりTauro-nor-THCA-24-DBDの取り込みが阻害され、排泄トランスポーターだけでなく、NTCPにも機能が備わっていることも確認できた(Fig.2.)。

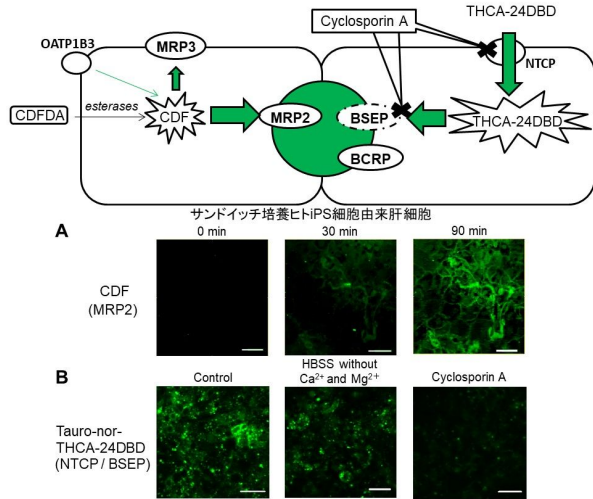


Fig. 2. サンドイッチ培養ヒトiPS細胞由来肝細胞におけるCDF及びTauro-nor-THCA-24DBDの輸送活性 Scale bar, 50 μ m.

(4) サンドイッチ培養ヒトiPS細胞由来肝細胞(SCHiHs)による胆汁うっ滞肝毒性評価系の開発

22化合物を100倍のヒト血清胆汁酸濃度の存在下または非存在下で24時間同時添加することによって細胞傷害性の評価を行った結果、7化合物において、胆汁酸存在下で細胞毒性を引き起こした。この時、細胞毒性はヒト血清胆汁酸濃度依存的に増強し、100倍の胆汁酸濃度で平衡に達した(Fig.3.)。これらの結果から、ヒトiPS細胞由来肝細胞のサンドイッチ培養により胆汁うっ滞型肝毒性を評価できる可能性が示唆された。しかし、SCHiHsにおいて、BSEP発現量が低いため、ヒト初代肝細胞で検出されたいくつかの化合物は検出できなかった。

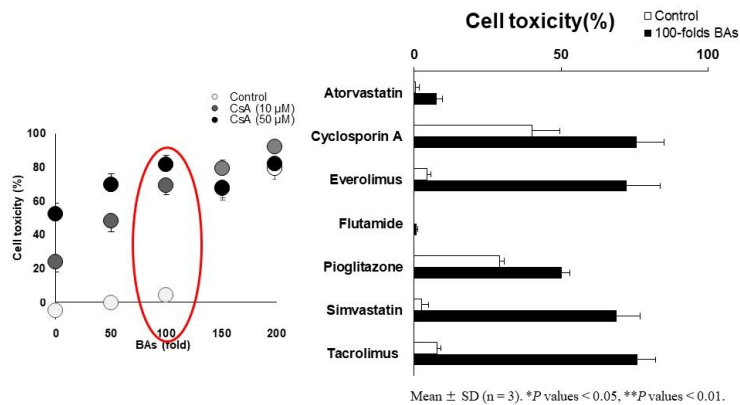


Fig. 3. サンドイッチ培養ヒトiPS細胞由来肝細胞におけるin vitro胆汁鬱滞型肝毒性評価系の構築

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Yoko Sakai, Takahiro Iwao, Takeshi Susukida, Akinori Takemura, Takumi Nukaga, Shuichi Sekine, Kousei Ito, Tamihide Matsunaga, *In vitro* bile acid-dependent hepatocyte toxicity assay system using human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes: Current status and disadvantages to overcome, *DMPK*, (in press) (査読あり)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2019.04.004>

[学会発表] (計3件)

Yoko Sakai, Takahiro Iwao, Takeshi Susukida, Akinori Takemura, Takumi Nukaga, Shuichi

Sekine, Kousei Ito, Tamihide Matsunaga, *In Vitro* Cholestatic Drug-Induced Liver Injury Evaluation System Using Human iPS Cell-Derived Hepatocytes, International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, Kanazawa, Japan, oral presentation

Yoko Sakai, Takahiro Iwao, Takeshi Susukida, Akinori Takemura, Takumi Nukaga, Shuichi Sekine, Kousei Ito, Tamihide Matsunaga, *In Vitro* Cholestatic Drug-Induced Liver Injury Evaluation System Using Human iPS Cell-Derived Hepatocytes, International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, Kanazawa, Japan, poster

Yoko Sakai, Takahiro Iwao, Takeshi Susukida, Akinori Takemura, Takumi Nukaga, Shuichi Sekine, Kousei Ito, Tamihide Matsunaga, Establishment of Cholestatic Drug-Induced liver Injury Evaluation System *In Vitro* Using Sandwich Cultured Human iPS Cell-Derived Hepatocytes, 21st North American ISSX Meeting, poster

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ryc/index.html>

名古屋市立大学薬学部薬学科臨床薬学教育センター

名古屋市立大学大学院薬学研究科臨床薬学分野

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※ 科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。