

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07161

研究課題名(和文) 探索的薬物動態研究に資する高い薬物代謝機能を発現したヒト代替肝細胞の培養系構築

研究課題名(英文) Establishment of a culture system of alternative human hepatocytes with high expression of drug-metabolizing enzyme functions for exploratory drug metabolism and pharmacokinetic studies

研究代表者

山田 泰弘 (Yamada, Yasuhiro)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80464551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝癌由来細胞株HepG2細胞を5-アザシチジン(5-Aza)でエピゲノム処理することにより薬物代謝酵素活性を高発現することに注目し、更に高い酵素機能を発現させるための培養法を検討した。エピゲノム処理培地にSnail遺伝子の発現を抑制する低分子化合物-Xを添加することにより、5-Aza単独処理よりも短期間の培養で更に高い活性の発現とCYP誘導能の発現が認められた。更に、低分子化合物-Xを添加した培地のグルコース濃度を低下させることにより、より高い薬物代謝酵素活性を発現することが認められ、このエピゲノム処理したHepG2細胞は、探索的薬物動態試験に資する代替ヒト肝細胞である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト肝細胞は、創薬での薬物動態研究においては必須のツールである。しかし薬物代謝機能を高発現しているヒト肝細胞の入手経路は限られており、国内において入手することはほぼ不可能なために海外からの入手に依存している。そのために安定的な入手が困難かつ高額である。そこで、創薬研究でルーチン的に活用できる安価で安定供給可能な代替ヒト肝細胞の創製が望まれていることから、増殖可能なヒト肝癌細胞株HepG2細胞を5-アザシチジンでエピゲノム処理することにより薬物代謝酵素活性を高発現することに注目し、更なる高活性を発現するためのエピゲノム処理法を構築し、薬物動態研究に資する代替ヒト肝細胞を創製した。

研究成果の概要(英文)：We focused on the fact that epigenome treated of human hepatoblastoma-derived HepG2 cells with 5-azacytidine (5-Aza), a DNA methyltransferase inhibitor, resulted in high expression of drug-metabolizing enzyme activity, and investigated a culture method to further increase the expression of drug-metabolizing enzyme function. By adding low-molecular-weight compound-X, which suppresses Snail gene expression, to the epigenome-treated medium, higher enzyme activity and CYP inducibility were observed in a shorter period of culture than with 5-Aza alone treatment. Furthermore, higher drug-metabolizing enzyme activity was observed by decreasing the glucose concentration in the epigenome-treated medium, suggesting that HepG2 cells epigenome treated with the newly constructed medium in this study may be an alternative human hepatocyte that can be used for exploratory studies of drug metabolism and pharmacokinetics.

研究分野：薬物動態

キーワード：代替ヒト肝細胞 シトクロムP450 グルクロン酸転移酵素 硫酸転移酵素 HepG2細胞 ヒト肝癌由来細胞 DNAメチル基転移酵素阻害剤 Huh-7細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

創薬での初期から中期の過程において、数多く合成された新規化合物 (new chemical entity, NCE) を医薬品としての開発候補品へと最適化するには、ヒト肝細胞を用いた探索的薬物動態 (DMPK) 試験によるスクリーニング的な評価の実施が必須である。更に、探索的 DMPK 試験で最適化された開発候補品が臨床試験に資する薬物であるかを判断し、その開発候補品が高い成功率を持った開発品として臨床試験に入るためのトランスレーショナルリサーチのツールとして、ヒト肝細胞を用いた開発候補品のヒトにおける DMPK の予測も非常に重要なポジションを担っている。これらの探索的 DMPK 試験およびトランスレーショナルリサーチ結果に基づいて実施された DMPK 予測が、高い信頼性を持って実施されるためには、一定レベル以上の肝機能と高い薬物代謝機能を維持したヒト肝細胞の入手が重用である。しかし薬物代謝機能を高発現し維持しているヒト肝細胞の入手経路は限られており、国内において入手することはほぼ不可能であることから海外からの入手に依存している。そのために安定的な入手が困難で非常に高額である。そこで、創薬研究での探索的 DMPK 試験とトランスレーショナルリサーチでルーチンの活用できる安価で安定供給が可能な代替ヒト肝細胞の創製について検討した。

2. 研究の目的

創薬研究においてヒト肝細胞を用いた DMPK 評価試験は非常に有効であり、創薬研究の効率化および成功率の向上のために、創薬の初期から中期にヒト肝細胞を用いた探索的 DMPK 試験およびトランスレーショナルリサーチの 1 つであるヒト動態予測の実施は重要な役割を担っている。しかし、探索時 DMPK 試験およびヒト動態予測が正確かつ効率的に実施されるためには、解決しなければならない課題が未だにいくつか存在している。例えば、高い薬物代謝酵素活性と CYP 誘導能などの機能が維持されている良質なヒト肝細胞の入手が困難、培養期間中に薬物代謝酵素活性が急激に低下、薬物代謝酵素機能の非常に大きな個体差 (ドナー間差)

非常に高価であり安定的に入手することが困難、などである。これらの課題が、ヒト肝細胞を創薬 DMPK 研究に効果的に活用させるためのボトルネックとなっているので、創薬研究でルーチンの活用できる安価で安定供給が可能な代替ヒト肝細胞の創製が望まれている。探索的 DMPK 試験では、安価かつ増殖可能で安定供給可能なヒト肝癌由来細胞株が一般的に活用されることが多い。しかし、ヒト肝癌由来細胞株は薬物代謝酵素機能をほとんど発現しておらず、探索的 DMPK 試験に資する代替ヒト肝細胞であるとはいえず、精度の高い結果を得ることは困難である。そこで我々は、ヒト肝癌由来細胞株を DNA メチル基転移酵素 (DNMT) 阻害剤でエピゲノム処理することにより薬物代謝酵素活性を高発現することに注目し^{1,2)}、更なる高い薬物代謝酵素活性および薬物代謝酵素誘導能を発現するための新規エピゲノム処理法と新規培養法について検討し、創薬研究に資するヒト代替肝細胞を創製した。なお、このヒト代替肝細胞は、同一バッチのヒト肝癌由来細胞からエピゲノム処理されるので、薬物代謝酵素活性のバッチ間差の少ない代替ヒト肝細胞を長期間に亘って探索的 DMPK 研究やトランスレーショナルリサーチに提供することも可能になる。

3. 研究の方法

(1) HepG2 細胞と Huh-7 細胞のエピゲノム処理

HepG2 細胞あるいは Huh-7 細胞を T-25 フラスコあるいは 96-ウェルプレートに播種し、DNMT 阻害剤である 5-アザシチジン (5-Aza) を含む DMEM 培地 (エピゲノム処理培地) を用いて、7 日間毎に継代培養を続けながら 28 日間までエピゲノム処理を行った。なお、培地の交換は 2~3 日 (月、水、金) 毎に行い、7 日間毎に薬物代謝酵素活性の経時的発現変動を測定した。

(2) Snai1 遺伝子発現抑制剤およびサイクリン依存キナーゼ (CDK) 阻害剤の影響

Snai1 遺伝子発現抑制剤の影響

5-Aza 含有 DMEM 培地 (エピゲノム処理培地) に Snai1 遺伝子の発現抑制剤である低分子化合物-X を添加した培地を用いて、T-25 フラスコあるいは 96-ウェルプレートに播種した HepG2 細胞を 7 日間毎に継代培養を続けながら 28 日間のエピゲノム処理を行った。その際に薬物代謝酵素活性を 7 日間毎に経時的に測定した。

CDK 阻害剤の影響

上記の低分子化合物-X を添加した 5-Aza 含有 DMEM 培地で 28 日間のエピゲノム処理した HepG2 細胞を更に CDK 阻害剤であるジナシクリブを 3 日間暴露させて、薬物代謝酵素活性発現への影響を検討した。

(3) エピゲノム処理培地中のグルコース濃度と DMSO の影響

T-25 フラスコあるいは 96-ウェルプレートに播種した HepG2 細胞を高グルコース濃度あるいは低グルコース濃度の DMEM 培地に 5-Aza、低分子化合物-X および DMSO を添加した培地で 7 日間毎に継代培養を続けながら 28 日間のエピゲノム処理を行い、両培地間の薬物代謝酵素活性値を比較測定した。

(4) エピゲノム処理 HepG2 細胞の凍結保存

5-Aza のみ含有あるいは 5-Aza と低分子化合物-X 含有の低グルコース濃度 DMEM 培地で 28 日間エピゲノム処理した HepG2 細胞を凍結保存し、解凍後に 5-Aza のみ含有あるいは 5-Aza と低分子化合物-X 含有の低グルコース濃度 DMEM 培地で 5 日間継続培養し、凍結前後の薬物代謝酵素活性を比較検討した。

(5) 薬物代謝酵素誘導能

5-Aza のみ含有あるいは 5-Aza と低分子化合物-X を含有した低グルコース濃度 DMEM 培地で 28 日間エピゲノム処理した HepG2 細胞あるいは Huh-7 細胞をシトクロム P450 (CYP) の典型的な誘導剤である 50 μ M オメプラゾール (CYP1A2 誘導剤) あるいは 10 μ M リファンピシン (CYP2B6 と 3A 誘導剤) で 3 日間暴露処理した後、CYP1A2、2B6 および 3A 活性の誘導倍率を両培地間で比較検討した。

(6) エピゲノム処理済み HepG2 細胞のスフェロイド培養

低グルコース濃度 DMEM 培地に 5-Aza および低分子化合物-X を添加した培地で 28 日間エピゲノム処理した HepG2 細胞のスフェロイド (三次元) を 96-ウェル U-底プレートをを用いて作製し薬物代謝酵素活性を測定した。この活性値を通常の 96-ウェルプレートで二次元培養した際の薬物代謝酵素活性と比較検討した。

(7) 薬物代謝酵素活性の測定

薬物代謝の第 I 相反応 (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 および 3A の 7 分子種) および第 II 相反応 (グルクロン酸転移酵素および硫酸転移酵素) の酵素活性は、以前に報告³⁾したカクテル基質アプローチ法にほぼ従って、液体クロマトグラフィ - タンデム型四重極質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて一斉測定した。

4. 研究成果

(1) HepG2 細胞と Huh-7 細胞のエピゲノム処理

ヒト肝癌由来細胞株として、ヒト肝芽腫由来細胞株 HepG2 細胞と高分化型ヒト肝癌由来細胞株 Huh-7 細胞を選択し、各細胞株を 5-Aza で 28 日間エピゲノム処理した際の薬物酵素活性を両比較検討した (Fig. 1)。HepG2 細胞をエピゲノム処理することにより、SULT を除く全ての酵素において高い活性の発現が認められた。一方、未処理の Huh-7 では CYP2B6 と 2C8 の活性が全く検出されず、更にエピゲノム処理をしても発現は認められなかった。また、CYP1A2、2D6 および 3A の発現誘導は HepG2 細胞よりも低く、CYP2C9 と UGT はほぼ同程度であったが、CYP2C19 と SULT は Huh-7 の方が高かった。

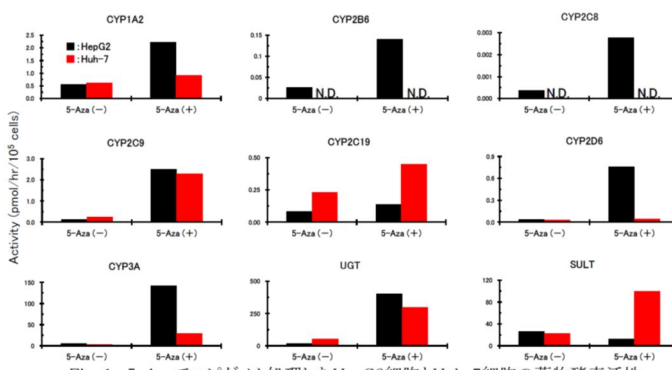


Fig. 1 5-Aza でエピゲノム処理した HepG2 細胞と Huh-7 細胞の薬物酵素活性
N.D.: 未検出

(2) Snail 遺伝子発現抑制剤およびサイクリン依存キナーゼ (CDK) 阻害剤の影響

Snail 遺伝子発現抑制剤の影響

HepG2 細胞を 5-Aza のみ含有培地あるいは 5-Aza のみ含有と Snail 遺伝子発現抑制剤である低分子化合物-X 含有培地で 28 日間エピゲノム処理した際の薬物代謝酵素活性を両培地間で比較した (Fig. 2)。5-Aza のみ含有培地よりも 5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理することにより、CYP2B6、2C8、2C9、2D6、3A および UGT でより高い活性の発現が認められたが、CYP1A2 についてはほとんど影響が認められず、一方 CYP2C19 と SULT

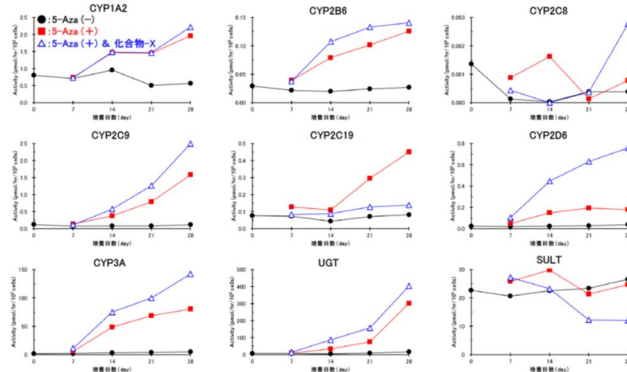


Fig. 2 5-Aza または 5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞の薬物代謝酵素活性

活性の発現は低下した。

CDK 阻害剤の影響

低分子化合物-X を添加した 5-Aza 含有 DMEM 培地で 28 日間のエピゲノム処理した HepG2 細胞を更に CDK 阻害剤であるジナシクリブを 3 日間暴露させてたところ、薬物代謝酵素活性の発現への影響はほとんど認められなかった（データは示さず）。

(3) エピゲノム処理培地中のグルコース濃度と DMSO の影響

エピゲノム処理中のグルコース濃度の薬物代謝酵素活性の発現への影響を検討した (Fig. 3)。

高グルコース濃度よりも低グルコース濃度の DMEM 培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞の方が、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、CYP2D6、CYP3A および UGT において高い活性の発現が認められた。また、DMSO 含有培地でのエピゲノム処理により、DMSO を含まない培地と比較して CYP3A と UGT 活性のより高い発現が認められたが、CYP2C9 と SULT 活性の発現は低下した。

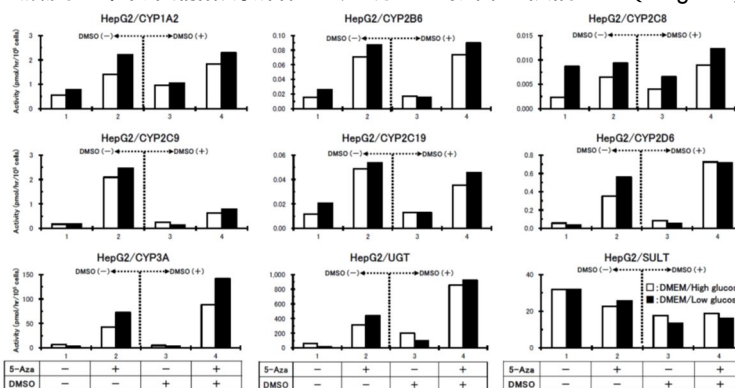


Fig. 3 HepG2細胞の5-Aza処理におけるグルコース濃度およびDMSOの影響

(4) エピゲノム処理 HepG2 細胞の凍結保存

エピゲノム培地で処理した HepG2 細胞の凍結保存と解凍後の薬物代謝酵素活性を比較することにより、凍結保存の影響について検討した (Fig. 4)。なお、この検討における CYP2C8 活性は、定量限界付近かそれ以下 (LLOQ) であり信頼性に乏しいので、今回の結果からは除外する。

5-Aza のみ含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞を凍結・解凍後に同じ培地で継続培養した際の薬物代謝酵素活性は、凍結前後でほぼ同じ活性を示し、凍結保存による影響はほとんど無いことが示された。

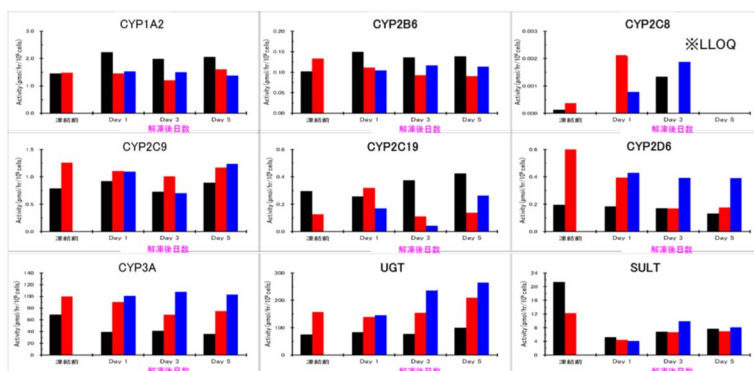


Fig. 4 エピゲノム処理HepG2細胞の凍結保存

- : 5-Azaのみ含有培地でエピゲノム処理したHepG2細胞を凍結保存後に解凍して5-Azaのみ含有培地で継続培養
- : 5-Azaと低分子化合物-X含有培地でエピゲノム処理したHepG2細胞を凍結保存後に解凍して5-Azaのみ含有培地で継続培養
- : 5-Azaと低分子化合物-X含有培地でエピゲノム処理したHepG2細胞を凍結保存後に解凍して5-Azaと低分子化合物-X含有培地で継続培養

5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞を凍結・解凍後に同じ培地で継続培養した際の薬物代謝酵素活性は、凍結前後でほぼ同じ活性を示し、凍結保存による影響はほとんど無いことが示された。また、5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞を凍結・解凍後に同じ培地で継続培養した際の薬物代謝酵素活性も凍結前後でほぼ同じ活性を示し、凍結保存による影響はほとんど無いことが示された。

(5) 薬物代謝酵素誘導能

HepG2 細胞 (Fig. 5)

無処置 HepG2 細胞 (コントロール) および 5-Aza のみ含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞でのオメプラゾールによる CYP1A2 活性の誘導倍率は約 2 倍程度であったが、5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞での誘導倍率は約 4 倍であった。

無処置 HepG2 細胞および 5-Aza のみ含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞でのリファンピシンによる CYP2B6 と 3A 活性の誘導は

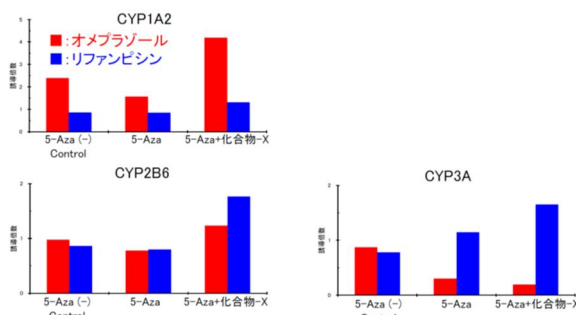


Fig. 5 HepG2細胞の典型的な誘導剤によるCYP誘導能

ほとんど認められなかったが、5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞での CYP2B6 と 3A 活性では、2 倍弱の誘導倍率が認められた。

Huh-7 細胞 (Fig. 6)

無処置 Huh-7 細胞 (コントロール) 5-Aza のみ含有培地および 5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理した Huh-7 細胞でのオメプラゾールによる CYP1A2 活性の誘導倍率は、いずれの細胞においても約 2 倍程度であった。

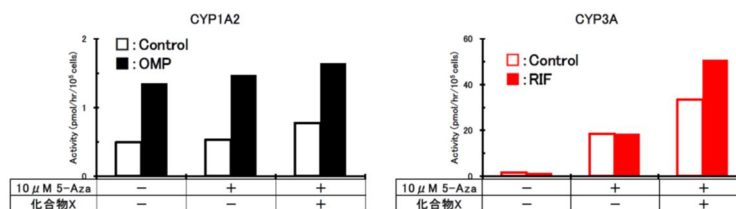


Fig. 6 Huh-7の典型的な誘導剤によるCYP誘導能

無処置 Huh-7 細胞および 5-Aza のみ含有培地でエピゲノム処理した Huh-7 細胞でのリファンピシンによる CYP3A 活性の誘導はほとんど認められなかったが、5-Aza と低分子化合物-X 含有培地でエピゲノム処理した Huh-7 細胞の CYP3A 活性では、2 倍弱の誘導倍率が認められた。なお、CYP2B6 活性の発現は、いずれの Huh-7 細胞でも認められず、またリファンピシン暴露でも活性の発現誘導は認められなかった。

(6) エピゲノム処理済み HepG2 細胞のスフェロイド培養

5-Aza と低分子化合物-X 含有の低グルコース濃度 DMEM 培地でエピゲノム処理した HepG2 細胞をスフェロイド培養した際の薬物代謝酵素活性を二次元培養した際のそれと比較した (Fig. 7)。スフェロイド培養での CYP1A2、2B6、2C8 および 2D6 活性は二次元培養より高い活性が認められたが、CYP2C9 および 2C19 活性は両培養間でほぼ同じであった。一方、CYP3A、UGT および SULT 活性は、スフェロイド培養の方が低かった。

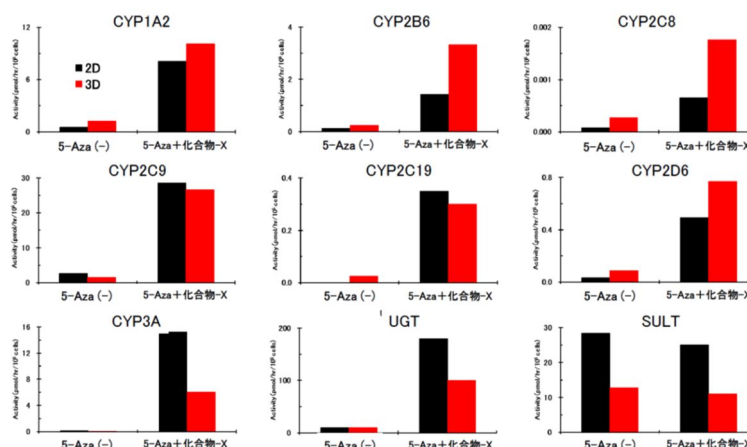


Fig. 7 HepG2細胞のスフェロイド培養

以上の結果から、安価で増殖可能かつ容易に入手可能な HepG2 細胞を 5-Aza および低分子化合物-X 含有の低グルコース濃度 DMEM 培地でエピゲノム処理するだけで、薬物代謝酵素活性を高発現し、CYP 誘導能も発現し、更に凍結保存も可能な細胞になるので、このエピゲノム処理された HepG2 細胞は、探索的 DMPK 試験やトランスレーショナルリサーチなどにおいてより有用な代替ヒト肝細胞となり得ることが示唆された。

<参考文献>

- 1) Gailhouste, L. et al. Epigenetic Reprogramming of Human Hepatoma Cells: A Low-Cost Option for Drug Metabolism Assessment. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017; 5(3):454-457
- 2) Nakamura, K. et al. Zebularine upregulates expression of CYP genes through inhibition of DNMT1 and PKR in HepG2 cells. *Sci Rep.* 2017; 7: 41093.
- 3) Kozakai, K. et al. Reliable high-throughput method for inhibition assay of 8 cytochrome P450 isoforms using cocktail of probe substrates and stable isotope-labeled internal standard. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2012; 27: 520-529.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------