

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16051

研究課題名（和文）NTCP, BSEP強制発現HepG2細胞を用いた薬剤性胆汁鬱滞型肝障害評価

研究課題名（英文）Establishment of in vitro cholestatic drug-induced liver injury evaluation system using HepG2-hNTCP-hBSEP-C4 cells.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：凍結ヒト肝細胞（PHHs）に着目し、毛細胆管構造の形成とトランスポーターの機能向上に効果的な培養方法の検討を行った。その結果、培地RM-101にZ-VAD-FMKとRevitaを添加した培養（新規法）により、長く太い線状の毛細胆管様構造を多く確認した。また、従来法で培養したPHHsに比べ、新規法では胆汁酸排泄トランスポーターであるBSEPの基質となるtauro-nor-THCA-24-DBDの毛細胆管様構造部分への蓄積がより多く認められた。デバイス上に新規法で培養したPHHsにサンドイッチ培養を行った後、胆汁うっ滞肝毒性評価としてCsAの経時的な細胞毒性を検討したところ、その上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤性胆汁鬱滞型肝障害評価系の構築のために、主な胆汁酸排泄トランスポーターであるBSEPの発現や機能にも焦点を当てて研究しており、BSEPの機能不全が起こる原因やその疾患にも応用することができる。また、本研究室で開発したデバイスと組み合わせ、培地を灌流した薬剤性胆汁鬱滞型肝障害評価系を開発することにも新規性がある。医薬品候補化合物の毒性を見極めるスクリーニングにおいて安価かつ容易に大量生産可能であり、短期間に評価可能であるため、安全性の高い医薬品の開発の礎になると思われる。

研究成果の概要（英文）：Although laboratory animals are used, the use of human-derived cells is required due to species differences. One of the problems with primary human hepatocytes (HPHs) is the rapid loss of function after culture, and difficult to form bile canalicular. We investigated a culture method for efficient formation of bile canalicular in primary human hepatocytes (HPHs). The results indicated that HPHs cultured with Z-VAD-FMK, a total caspase inhibitor, and RevitaCellITM Supplement, an irreversible ROCK inhibitor, in combination with RM-101 from 1 hr after thawing to day 2 formed bile canalicular on day 6 of culture. The expression on F-actin in bile salt export pump (BSEP) was observed and it also had a function. In additionally, HPHs with a novel method cultured on the device were able to predict cholestatic DILI risk.

研究分野：医療薬学

キーワード：毛細胆管 bile salt export pump 凍結ヒト肝細胞 薬剤性胆汁うっ滞肝障害 カスパーゼ MPS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

非臨床試験における肝毒性試験は、必須項目である。そのため、薬剤性肝障害(DILI)を早期に発見する研究は、医薬品開発の臨床試験の段階あるいは上市後に起こるリスク削減の面から有用である。DILIには、肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、混合型の3タイプが知られており、これらの要因は、グルタチオン枯渇、ストレスキナーゼ活性化、ミトコンドリアストレスや小胞体ストレスを引き起こす。DILIの一つである胆汁うっ滞肝障害の原因としては、肝細胞に発現している排泄トランスポーターである bile salt export pump (BSEP)の機能が薬物によって阻害され、肝細胞内に胆汁酸が蓄積するために起こることが知られている。また、生体内では、消化管内に分泌された胆汁酸は、主な胆汁酸取り込みトランスポーターである Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) を介して肝細胞内へ取り込まれるため、その阻害によっても、胆汁うっ滞肝障害が起こる可能性がある。既存の研究において、薬物添加による肝細胞毒性では、国内外問わず、代謝酵素やトランスポーターの機能の検討は行われている。しかし、評価系の開発に関する報告は少ない。したがって、申請者は、非臨床試験の肝毒性評価において、トランスポーターの機能を制御した胆汁うっ滞肝毒性評価系は、肝毒性を予測するためには欠かせないモデルの一つになると考えた。さらに、この評価系の開発における肝細胞の選択は、非常に重要となる。

現在、実験動物が多く用いられているが、ヒトの間には種差があり、3Rの規制強化が進み、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に注目が集まっている。そこで、安価で容易に扱える HepG2 細胞に着目したが、トランスポーターの遺伝子発現量が低いことから難しいとの報告があった(*J. Pharm. Sci.*, 105; 1550-1560, 2016)。取り込みトランスポーターNTCPの強制発現細胞株である HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いたところ、細胞内への胆汁酸取り込み量は増加し、胆汁鬱滞肝毒性評価系の確立が見込めた(*Toxicol. in vitro*, 61; 104619, 2019)。しかし、ヒト凍結肝細胞による胆汁鬱滞肝毒性評価系とは低い相関性を示し、主な胆汁酸排泄トランスポーターである BSEP の重要性を把握した。

近年、microphysiological system (MPS) はマイクロ流体デバイスで細胞の培養環境を制御し、*in vivo* に近い機能を発現させる技術として注目されている。本研究室では、取り扱いが容易で再現性が高い灌流型小腸-肝臓連結デバイス(デバイス)の開発を行い、このデバイスプレートの肝細胞播種部分は、平面(パターンニングなし:2D)またはスフェロイド(パターンニングあり:3D)培養ができるように工夫を施している。申請者は、本研究室のデバイスと作製した細胞を組み合わせることで、胆汁酸および肝毒性を持つ薬物を灌流した胆汁鬱滞肝毒性評価系の構築が可能になり、より生体内を模倣するのではないかと思ひ、本研究課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

申請者は HepG2-hNTCP-hBSEP-C4 細胞を用いて、毒性試験の応用を可能にする薬剤性胆汁鬱滞型肝障害試験法の開発を目的とする。

1. HepG2-hNTCP-C4 細胞にヒト BSEP 強制発現プラスミドを導入した HepG2-hNTCP-hBSEP-C4 細胞を作製する。それに加えて、ヒト凍結肝細胞における長期間の培養による低い毛細管形成能や BSEP の機能維持が困難であるとの問題点にも着目し、それらの保持や機能向上を目指した培養法の検討も行う。

2. 上記によって作製された細胞において、胆汁酸と薬物の同時添加に伴う薬剤性胆汁鬱滞型肝障害試験法の確立を行う。また、本研究室で開発したデバイスを用いることで、培地を灌流しながら胆汁鬱滞肝毒性評価系の開発を行い、血液の流れを考慮した、より生体内に近いモデルの開発が可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) HepG2-hNTCP-hBSEP-C4 細胞の作製

申請者は、ベクターにヒト BSEP 遺伝子(インサート)を組み込んだヒト BSEP 強制発現プラスミドを作製し、HepG2-hNTCP-C4 細胞に導入した HepG2-hNTCP-hBSEP-C4 細胞を作製する予定であった。ヒト BSEP 強制発現プラスミドは作製できたが、それを HepG2-hNTCP-C4 細胞へ導入することが困難であったため、今期間に作製できなかった。現在、詳細に検討中である。

(2) ヒト凍結肝細胞 (HPHs) における毛細胆管形成能と BSEP の機能維持を目指した培養法の確立

HPHs に対して、肝細胞の機能向上に効果が認められている低分子化合物および培地の組み合わせを検討した。また、肝細胞の機能向上によく用いられているコラーゲン、マトリゲルを組み合わせたサンドイッチ培養法も取り入れた。これらの培養法の中で、最も毛細胆管構造の形成に効果的な培養方法を従来法と比較し解析した (Fig. 1)。その解析法では、取り込み・排泄トランスポーターの遺伝子、タンパク質発現および BSEP の機能活性ならびに細胞極性、毛細胆管構造の確認を行った。

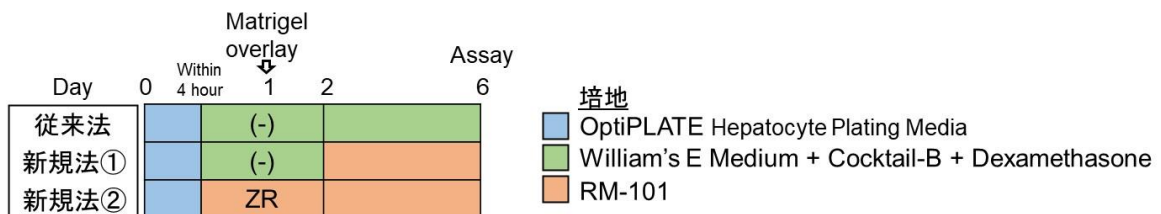


Fig. 1. 凍結ヒト肝細胞の培養方法
Z: Z-VAD-FMK, R: Revita

(3) サンドイッチ培養した HPHs に添加するヒト血清胆汁酸濃度の調製

HPHs 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シクロスポリン A (CsA) 添加群 (+) または非添加群 (-) を用意し、24 時間暴露後、HPHs 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と定めた。評価は、培地中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出にて行った。

(4) デバイスを用いた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

申請者は、デバイスで用いるフッ素コートをしたシリコンチューブに対する CsA の収着を検証した。デバイス上に HPHs を播種し、新規法②で培養を行った後、12 種類の胆汁酸と CsA を灌流しながら胆汁うっ滞肝毒性試験の開発を行った。

4. 研究成果

(1) サンドイッチ培養した HPHs における毛細胆管様構造の作製

I 型コラーゲンをコートした 24 well plate に HPHs を播種し、最低 1 時間は静置後、Z-VAD-FMK および Revita 含有 RM-101 (新規法②) に交換した。そして、播種 4 時間後には、マトリゲルで覆ったサンドイッチ培養法を行った。この方法において、より太く長い毛細胆管様構造を多く観察することができた (Fig. 2)。毛細胆管の形成には、適切な細胞密度が重要である。したがって、ROCK 阻害剤とカスパーゼ阻害剤を同時に添加

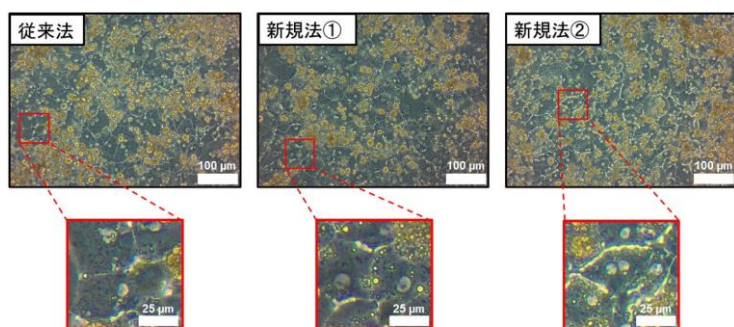


Fig. 2. HPHs における毛細胆管様構造の形態

することで、細胞へのストレスやアポトーシスを軽減させ、適切な細胞密度が保たれた結果、毛細胆管構造の形成につながったと考えられた。

(2) サンドイッチ培養した HPHs における機能解析

トランスポーターによる取り込み・排泄能は、蛍光基質である Tauro-nor-THCA-24-DBD や 5 (and 6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA) を用い、定性・定量評価も行った。従来法で培養した群に比べ、新規法②で培養した群では BSEP の基質である tauro-nor-THCA-24-DBD の毛細胆管様構造部分への蓄積がより多く観察された (Fig. 3)。また、新規法②において、HBSS (+) 処理時の tauro-nor-THCA-24-DBD 蓄積量が、従来法と比較して有意に増加した (Fig. 4)。これは、NTCP の機能が向上したことが示された。

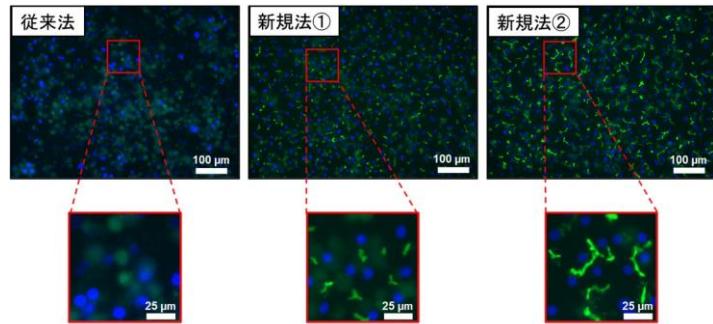


Fig. 3. HPHsにおけるtauro-nor-THCA-24-DBDの毛細胆管への蓄積
緑：tauro-nor-THCA-24-DBD、青：DAPI

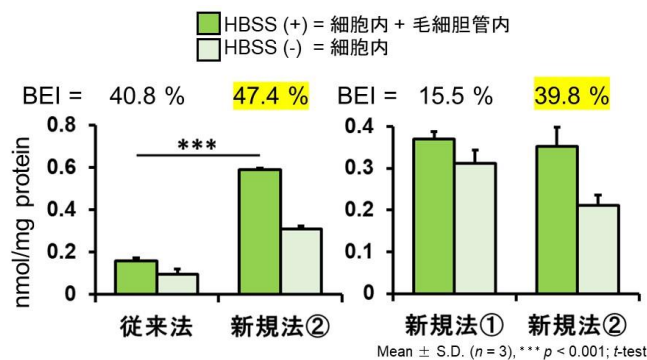


Fig. 4. HPHsにおけるtauro-nor-THCA-24-DBDの毛細胆管への蓄積量
Mean ± S.D. (n = 3), *** p < 0.001; t-test

加えて、新規法②は、従来法や新規法①と比較して、BEI (%)が増加したことから、BSEP の機能も向上したと考えられた。MRP2 の基質である CDF の毛細胆管様構造部分への蓄積も認められた (Fig. 5)。

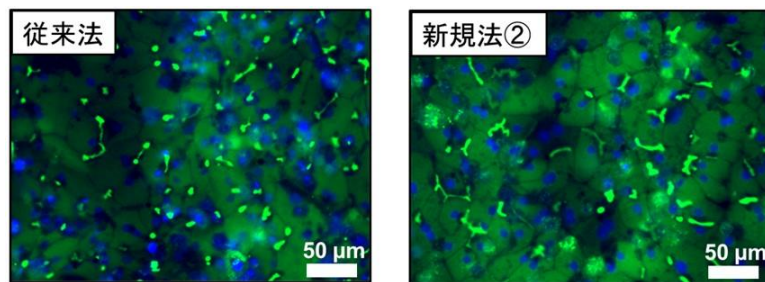


Fig. 5. HPHsにおけるCDFの毛細胆管への蓄積
緑：CDF、青：DAPI

(3) サンドイッチ培養した HPHs の取り込み・排泄トランスポーターの遺伝子およびタンパク発現

胆汁酸取り込み・排泄型トランスポーターの mRNA や NTCP、BSEP タンパク発現をリアルタイム PCR や免疫染色法にて測定を行った。従来法および新規法②により培養した HPHs の NTCP、BSEP、MRP2 の遺伝子発現は、新規法②で BSEP、MRP2 の発現が有意に低下した。NTCP

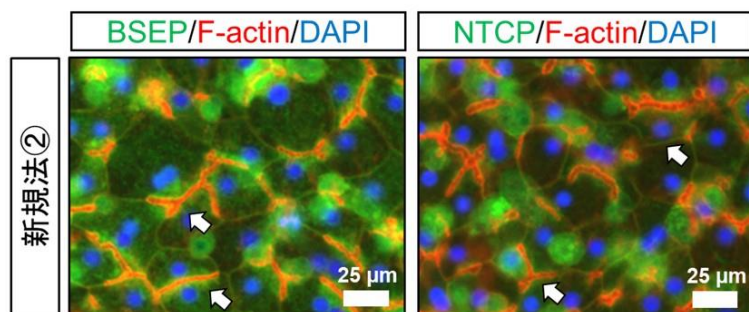


Fig. 6. 新規法②で培養したPHHsにおける免疫蛍光染色

においては、従来法と同等の遺伝子発現を示した。また、新規法②のタンパク発現では、NTCP が細胞膜上に発現し、BSEP は細胞骨格マーカーである F-actin の付近に発現が確認された (Fig. 6)。

(4) サンドイッチ培養した HPHs に添加するヒト血清胆汁酸濃度の決定およびデバイスを用いた胆汁うっ滞肝毒性評価系の開発

胆汁うっ滞肝毒性を示す代表的な医薬品である CsA 添加群において、胆汁酸濃度を高めることで細胞毒性は増加した。ヒト血清濃度の 100 倍の胆汁酸を加えた際に最も高い細胞毒性を示した (Fig. 7)。一方、CsA 非添加群において、胆汁酸濃度を高めても細胞毒性はほとんど認められなかった。したがって、CsA 添加群と非添加群との差が最も大きくなり、高い毒性検出感度が得られたヒト血清濃度の 100 倍の胆汁酸量に決定した。また、CsA のシリコンチューブに対する収着を検討したところ、灌流培養によって 24 時間後には半分量に減少した (Fig. 8)。そのため、一方通行型の灌流培養により胆汁うっ滞肝毒性評価を行うことにした。

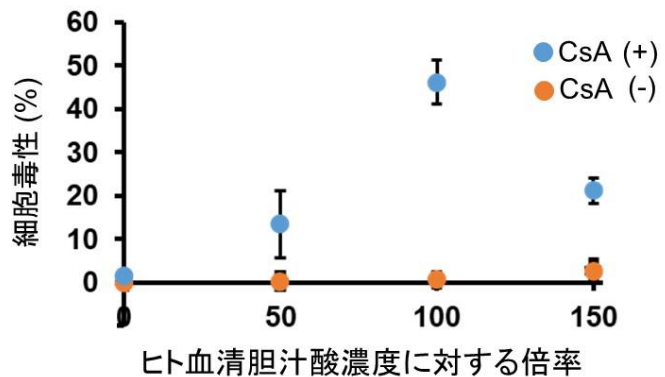


Fig. 7. ヒト血清胆汁酸濃度に対する細胞毒性評価

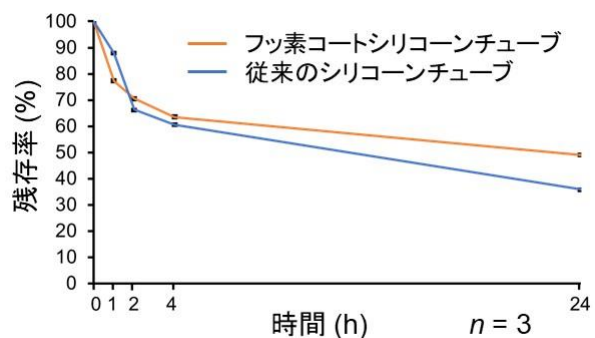


Fig. 8. CsA の残存率

デバイス上に HPHs を播種し、サンドイッチ培養を行った後に、灌流しながら胆汁うっ滞肝毒性試験を行った結果、CsA を添加した群において、経時的な細胞毒性の上昇が認められた。今後は、小腸上皮細胞を搭載して、小腸での医薬品の吸収や代謝の影響も加味した評価系として利用することで、より生体内に近い環境下での胆汁鬱滞肝毒性評価に繋がると考えられる。

本研究で得られた成果は、容易に扱え、毛細胆管構造ならびに生体に近い十分なトランスポーターの発現や活性を有した細胞の作製にある。また、デバイスをもちい、ヒト血清濃度の胆汁酸や薬物を灌流しながら、胆汁うっ滞肝毒性の評価を行うことは、既存に類がなく独自性、新規性があるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 岩尾 岳洋, 堺 陽子, 深谷 壮弥, 小川 勇, 松永 民秀	4. 巻 39(16)
2. 論文標題 小腸-肝臓連結MPSの開発と薬物動態・毒性評価への利用.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2573-2575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷壮弥, 堺 陽子, 松村将成, 徳島優樹, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 初回通過効果の評価を行うための小腸肝臓2臓器連結デバイスの有用性
3. 学会等名 細胞アッセイ研究会シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷壮弥, 堺陽子, 岩尾 岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 小腸 - 肝臓2臓器連結デバイスでのヒト凍結肝細胞長期培養
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村 将成, 堺陽子, 岩尾岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 ヒト凍結肝細胞の毛細胆管形成に着目した培養法の最適化
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷壮弥, 堺陽子, 岩尾 岳洋, 松永民秀
2. 発表標題 小腸-肝臓2臓器連結デバイスにおけるヒト凍結肝細胞長期培養法の検討
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堺 陽子, 奥村啓樹, 岩尾岳洋, 渡士幸一, 伊藤晃成, 松永民秀
2. 発表標題 サンドイッチ培養したHepG2-hNTCP-C4細胞による胆汁鬱滞肝毒性評価
3. 学会等名 第27回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

DMPK_News Letter (NL) の「若手が取り組む動態研究」4月号 (37 - 2号)

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
---------	---------