

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790111

研究課題名(和文)肝細胞3次元培養を用いた医薬品の代謝的活性化による毒性予測評価

研究課題名(英文)Hepatotoxicity induced by metabolic activation of drugs in three-dimensional hepatocyte cultures

研究代表者

佐能 正剛(SANO, SEIGO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号：00552267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：一部の医薬品は、肝臓に発現する薬物代謝酵素によって毒性に関わる反応性代謝物が生成し、肝臓に障害を与える可能性が報告されている。医薬品開発では、このような肝毒性を予測できる評価系の構築が求められている。本研究では、細胞培養プレートに肝臓から単離した肝細胞を播種し、約100 $\mu$ m程度の細胞塊(スフェロイド)を形成させることで、実際の肝臓を模倣することが期待される3次元培養を行い、肝毒性評価系の構築した。この中で、代謝反応を介した医薬品の肝毒性を少なくとも定性的に予測できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Formation of the reactive metabolites of drugs by drug-metabolizing enzymes expressed in the liver could result in the hepatotoxicity. It is necessary to develop the methods for prediction of hepatotoxicity in drug development. In this study, the hepatocytes were seeded to the micro-space cell culture plate to construct the 3-dimensional culture (spheroid) which is expected to mimic the liver. We could confirm hepatotoxicity of acetaminophen by metabolic activation through cytochrome P450 in spheroids. It would be possible to predict the drug induced hepatotoxicity via metabolic activation qualitatively at least by using this approach.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：薬学 薬物代謝 肝細胞 3次元培養 肝毒性 代謝的活性化

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発の過程において、医薬品候補化合物の毒性が原因で開発が中止になる確率は高いと報告されている (Kola, 2004)。肝臓における薬物代謝酵素は本来解毒排泄酵素として働くが、一部、薬物代謝酵素によって毒性代謝物、反応性代謝物が生成し、毒性を引き起こす可能性がある。反応性代謝物による毒性は生体内の高分子 (タンパク・DNA) と共有結合することが引き金となる。薬物代謝酵素は肝臓に多く発現しているため、主に肝臓がそのターゲットとなり肝障害として現れる。そのため、医薬品開発においてこのような代謝的活性化による肝毒性を予測できる評価系の構築が求められている。

ヒトの肝臓における毒性は肝細胞を用いた評価が主流であるが、肝細胞内の薬物代謝酵素の活性が減弱することにより、代謝活性が低下し、実際のヒトで生成される代謝物を定性的、定量的に反映されないケースも報告される (Dalvie et al., 2009)。この背景から、通常の肝細胞を用いた毒性評価は代謝活性化による肝毒性を見誤る可能性があるため、薬物代謝酵素の活性を維持させた肝細胞培養系の構築が必要となる。

## 2. 研究の目的

医薬品の代謝的活性化による肝毒性を予測できる *in vitro* 評価系が求められている。実際の *in vivo* における肝臓中の薬物代謝酵素の発現量、活性を維持させるためには、肝細胞の培養系に工夫が必要となる。

そこで、本研究では、細胞培養法を改良した「3次元培養」に着目した。これは単一の細胞から細胞塊 (スフェロイド) を形成させたものである。肝細胞を単層で培養するよりも、より *in vivo* 環境に近い形で、かつ長期培養できるものと期待される。3次元培養が実際の *in vivo* の肝臓における薬物代謝酵素の発現量や活性を維持することができれば、前述のような医薬品の代謝活性化に伴う毒性予測評価を精度よく、効率的に見積もることができる。

3次元培養系を構築する研究は、複数報告されているが、本研究では3次元細胞培養プレート「Micro-Space Cell Culture Plate (株式会社クラレ)」を用いて評価を行った。本プレートの底面にはマイクロオーダの区画 (幅 200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$ 、高さ 50  $\mu\text{m}$ ) が規則的に配置されており、その空間内で、細胞が均一に3次元構造を形成できるよう工夫されている (図1)。Micro-Space Cell Culture Plate に細胞を播種すると、播種後5日後にスフェロイドが形成されることが確認されている (Nishimura et al., 2010)。

近年の医薬品候補化合物はその化学構造が多様化され、そのターゲットとなる薬物代謝酵素もチトクローム P450 (CYP) のみならずグルクロン酸転移酵素 (UGT) などの様々な薬物代謝酵素がその薬物代謝反応に寄与するようになってきている。このため、代謝的活性化による毒性を評価するためには、様々な薬物代謝酵素の寄与を見積もる必要がある。特に部分構造にカルボン

酸を有する医薬品は、UGT によってグルクロン酸抱合を受け、そのまま体外に排泄されることが多いものの、一部のグルクロン酸抱合体 (アシルグルクロナイド) は、生体内高分子と共有結合し、毒性発現すると考えられている。

本研究では、肝細胞の3次元培養系を用いた医薬品の代謝的活性化による肝障害を予測できる評価系の構築を目的とする。その際、検証化合物として、臨床で肝障害の報告があるアセトアミノフェンをはじめに、カルボン酸を部分構造に有する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を用いた。

## 3. 研究の方法

### ・肝細胞の単離・培養

CrI:CD (SD) ラット (7 週令雄性) の肝臓よりコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を単離した。肝細胞は trypan blue 法により生存率 90% 以上のものを使用した。肝細胞培養メEDIUM に分散させ micro-space cell culture plate (図1) に  $2 \times 10^5$  cells/well となるように播種した。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で培養し、播種後4時間後に培地を交換し、以後、培地を毎日交換した。



図1 Micro-space cell culture plate

### ・薬物代謝酵素・トランスポーターの mRNA 発現

Total RNA は、肝臓から肝細胞を単離し、プレートに播種前のもの (day 0)、プレートに播種後 1、3、5、7、9 日後の肝細胞もしくはスフェロイドから SV total RNA Isolation system (Promega) を用いて抽出した。cDNA は、total RNA に AMV Reverse Transcription Kit (Promega) と oligo dT promoters を用いて作成した。Real-Time RT-PCR は、KAPA<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR (日本ジェネティクス) を使用し、各薬物代謝酵素、トランスポーターの遺伝子発現量を Bio-RAD CFX Manager を用いて定量解析した。検量線から導き出されたサイクル数をもとに各遺伝子発現量を算出した。内部標準遺伝子として用いて ribosomal protein L19 の発現量により補正した。

### ・細胞内 ATP 量の測定

培養 7 日目のスフェロイドに検証化合物を 24 時間曝露し、CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を使用し、細胞内 ATP 量を測定した。

### ・肝細胞の蛍光イメージング

細胞生存評価には、Calcein-AM を細胞内グルタチオン量評価には mBCI (monochlorobimane) を蛍光プローブとして用い

た。スフェロイド内部のイメージング画像は、FV1000-D 共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス)を用いて解析した。

#### アセトアミノフェングルタチオン抱合体の定量

肝細胞を単離したプレートに播種前の細胞 (Day0) とプレートに播種後 Day7 の肝細胞にアセトアミノフェン 10mM を 24 時間曝露後の肝細胞もしくはスフェロイド(培養メディウムを含む)中のアセトアミノフェングルタチオン抱合体を LC/MS/MS を用いて定量した。LC は、0.1% 酢酸およびアセトニトリルのグラジエントで流し、カラムは YMC-Triart C18 column (5  $\mu$ m, 50 x 2.1mm) を用いた。アセトアミノフェングルタチオン抱合体の parent ion は 456.90 [M+H]<sup>+</sup>、product ion は 139.96 [M+H]<sup>+</sup> であった。

#### 4. 研究成果

ラット肝細胞を micro-space cell culture plate に播種したところ、播種後 5 日目から細胞塊であるスフェロイドを観察できた(図 2)。

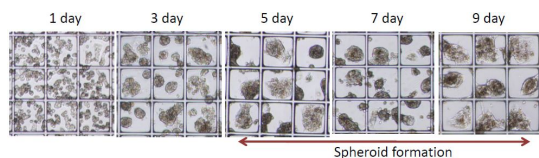


図 2 Micro-space cell culture plate におけるラット肝細胞スフェロイドの観察画像

ラット肝細胞を micro-space cell culture plate に播種前、播種後 1, 3, 5, 7, 9 日目における細胞内で発現する薬物代謝酵素ならびにトランスポーターの mRNA の経時変化を評価した。主にグルクロン酸転移酵素 (UGT) や硫酸転移酵素は、播種前の発現量を一定に維持していたが、複数のチトクローム P450 (CYP) 分子種は、播種後すぐに発現量は減少し、スフェロイドが観察される播種後 5 日目以降から発現量は一定に維持していた(図 3A)。

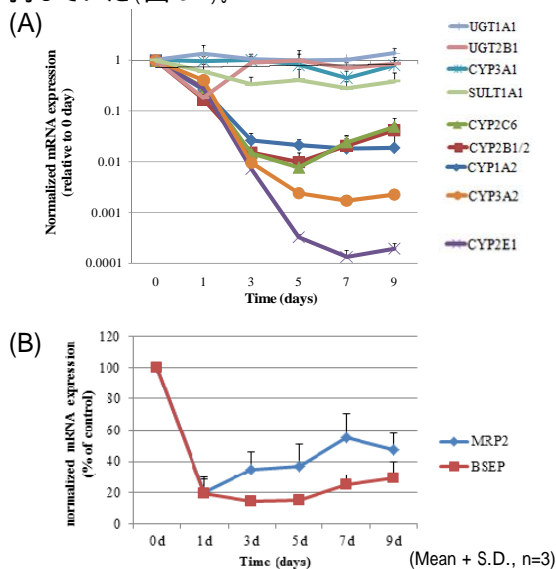


図 3 肝細胞における薬物代謝酵素、トランスポーターの mRNA 発現量の経時変化

また、排泄トランスポーターである MRP2, BSEP の mRNA 発現量も播種後減少するが、その後一定に維持していた(図 3B)。排泄トランスポーターの発現が確認できたことから、胆汁鬱滞による肝毒性評価も可能になるかもしれない。

ラット肝細胞を micro-space cell culture plate に播種後 7 日目にアセトアミノフェンを 24 時間曝露させ細胞内 ATP 濃度を測定したところ、濃度依存的に減少していた。また CYP 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (ABT) を 10mM アセトアミノフェンと共添加したところ、その ATP 濃度はコントロールレベルまで上昇した。このことから、*in vivo* 研究で報告されるアセトアミノフェンの CYP による代謝的活性化による肝毒性を反映することが示唆された(図 4)。

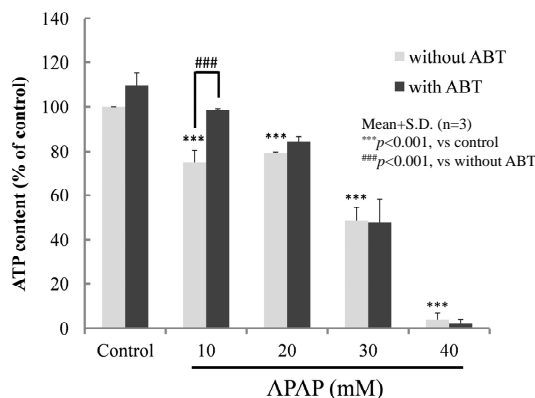


図 4 アセトアミノフェン曝露後のスフェロイドにおける ATP 量

ラット肝細胞を micro-space cell culture plate に播種後 7 日目にアセトアミノフェンを 24 時間曝露させ、生細胞、細胞内グルタチオン量の指標となる蛍光プローブを添加し、スフェロイド内部の蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。アセトアミノフェンの曝露によって、生細胞スフェロイドの形が崩れている画像も観察された。それぞれの蛍光強度を定量化したところ、アセトアミノフェン曝露で減少し、ABT 共添加によって増加することが確認できた(図 5A)。

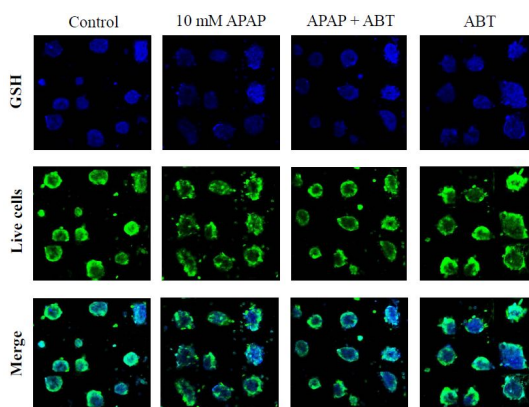


図 5A アセトアミノフェンを曝露後のスフェロイド内の蛍光画像

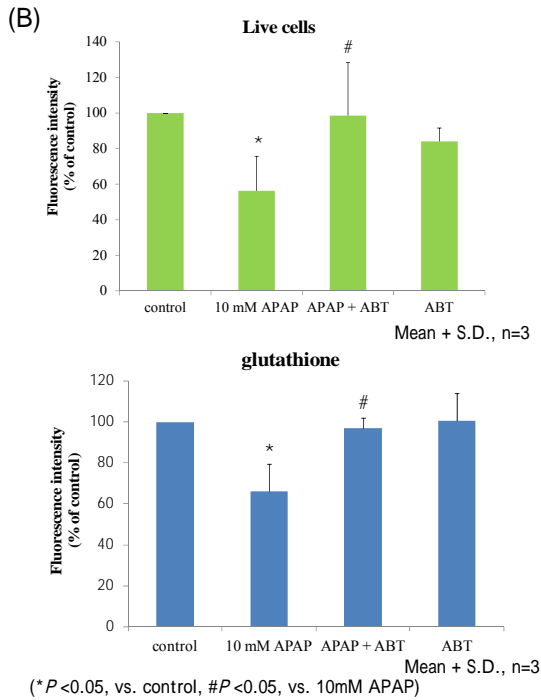


図 5B アセトアミノフェンを曝露後のスフェロイド内の蛍光強度の定量  
(蛍光強度は、プレートウェル内の9つのコンパートメントの平均値)

ラット肝細胞を micro-space cell culture plate に播種後7日目にアセトアミノフェンを24時間曝露させ、スフェロイドおよび細胞培地に含まれるアセトアミノフェングルタチオン抱合体を測定した。播種後7日目にアセトアミノフェングルタチオン抱合体が検出されたことより、アセトアミノフェンの活性代謝物 N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) が生成していたことが示唆された。しかし、アセトアミノフェンのグルタチオン抱合体量は、播種前に比べ減少していた(図6A)。また、ABT共添加によってアセトアミノフェングルタチオン量が減少していた(図6B)。前述の ABT 共添加によって肝細胞毒性が軽減したのは、アセトアミノフェングルタチオンの減少、つまり NAPQI の生成の抑制に起因するものと考えられる。アセトアミノフェングルタチオン抱合体量は播種前に比べ減少したが、これは CYP の mRNA 発現量の減少、とくに NAPQI の生成に起因する CYP3A および 2E の減少に基づくものと想定された。

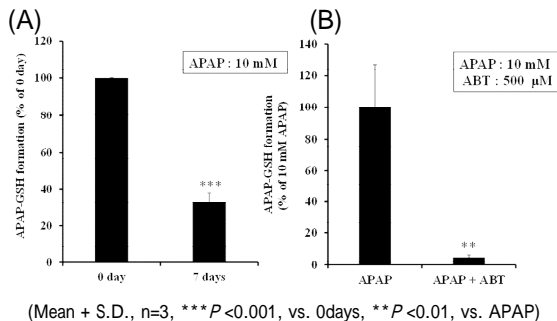


図 6 アセトアミノフェンを曝露のアセトアミノフェングルタチオン抱合体の検出

アセトアミノフェンの肝毒性は CYP3A および 2E によって生成される NAPQI が生体内高分子と結合することで肝毒性を引き起こすことが考えられている。また、解毒に働くグルタチオン量の減少も毒性に起因する(図7)。

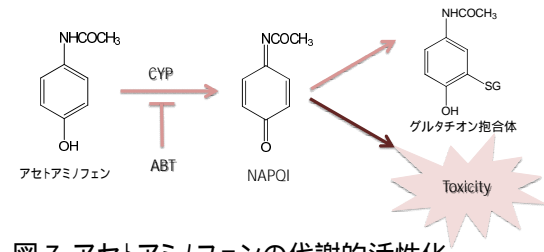
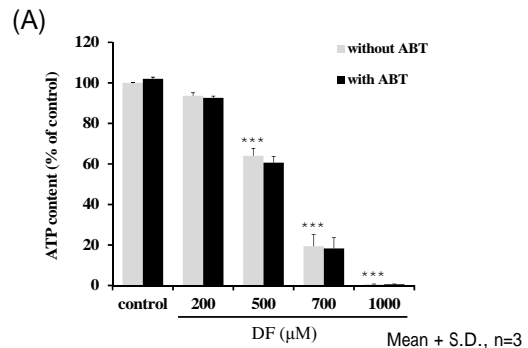


図 7 アセトアミノフェンの代謝的活性化

今回のスフェロイドを用いたアセトアミノフェンの毒性も、*in vivo* で報告される代謝活性化によるメカニズムを少なくとも定性的に反映していることが示唆された。しかし、スフェロイドにおいて薬物代謝酵素の発現量は一定に維持するものの、播種前に比べ減少しているものも見受けられることから、これら薬物代謝酵素による代謝的活性化の毒性の定量的な評価には課題も残った。

アセトアミノフェン以外にも解熱性鎮痛薬 (NSAIDs) であるジクロフェナク (DF) の代謝的活性化による肝毒性評価についてスフェロイドを用いて行った。アセトアミノフェンと異なり、ジクロフェナクは CYP や UGT によって代謝的活性化に伴う肝毒性が報告されているため、ジクロフェナクに ABT ならびに UGT 阻害剤である borneol を共添加させ、細胞内 ATP の変動を評価した。ジクロフェナクは濃度依存的に細胞内濃度を減少させていたが、阻害剤添加による ATP 量の変動は確認できなかった(図 8A, B)。一方、細胞内グルタチオン濃度は、borneol 共添加により細胞内グルタチオン量が増加する傾向も見られた(図 8C)。ジクロフェナク以外の NSAIDs であるブロムフェナク、イブフェナク曝露による細胞内 ATP 変化についても評価したが、代謝による毒性は反映していなかった (data not shown)。肝毒性には炎症サイトカインの産生に起因する報告もあり、評価系に非実質細胞も共添加するなどの工夫も必要となってくる。代謝的活性化の肝毒性メカニズムは化合物によって異なってくるのが想定され、*in vivo* の毒性を精度よく予測するためには、複数の評価系と組み合わせで見積もる必要もある。



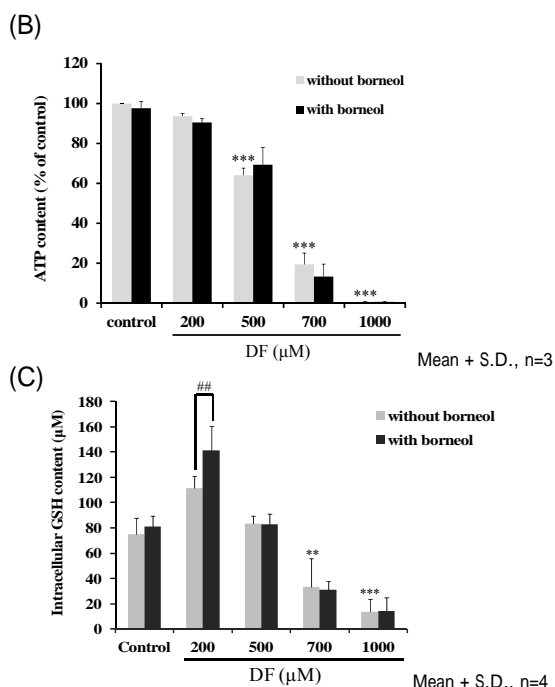


図7 ジクロフェナクを曝露後の細胞内ATP濃度、グルタチオン濃度

(\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , vs. control, ## $P < 0.01$ , vs. without DF)

## 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)

(雑誌論文) (計4件)

1. Sanoh S, Santoh M, Takagi M, Kanayama T, Sugihara K, Kotake Y, Ejiri Y, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Fluorometric assessment of acetaminophen-induced toxicity in rat hepatocyte spheroids seeded on micro-space cell culture plates. *Toxicol In vitro*, in press. doi: 10.1016/j.tiv.2014.05.007. (査読有)

2. Sanoh S, Ohta S. Chimeric mice transplanted with human hepatocytes as a model for prediction of human drug metabolism and pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos*. 2014;35(2):71-86. doi: 10.1002/bdd.1864. (査読有)

3. Kamikyouden N, Sugihara K, Watanabe Y, Uramaru N, Murahashi T, Kuroyanagi M, Sanoh S, Ohta S, Kitamura S. 2,5-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone: a novel major in vitro metabolite of benzophenone-3 formed by rat and human liver microsomes. *Xenobiotica*. 2013;43(6):514-9. doi: 10.3109/00498254.2012.742217. (査読有)

4. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using

chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(12):2267-72. doi: 10.1124/dmd.112.047555. (査読有)

(学会発表) (計6件)

1. 高木優志、佐能正剛、山頭征岳、江尻洋子、杉原数美、堀江透、北村繁幸、太田茂、3次元培養肝細胞を用いた医薬品の毒性予測評価系の構築、第31回メディカルケミストリーシンポジウム、2013年11月20日～2013年11月22日、アステールプラザ(広島)

2. 佐能正剛、山頭征岳、高木優志、江尻洋子、杉原数美、堀江透、北村繁幸、太田茂、マイクロ空間培養プレートを用いたアセトアミノフェンの代謝と肝細胞毒性評価、第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2013年10月26日～2013年10月27日、松山大学(愛媛)

3. 山頭征岳、佐能正剛、高木優志、江尻洋子、杉原数美、堀江透、北村繁幸、太田茂、ラット肝細胞スフェロイドにおける蛍光プローブを用いた医薬品の代謝活性化による肝毒性評価、日本薬物動態学会 第28年会 2013年10月9日～2013年10月11日、タワーホール船堀(東京)

4. 佐能正剛、山頭征岳、高木優志、杉原数美、江尻洋子、堀江透、北村繁幸、太田茂、ラット肝細胞3次元培養系を用いたアセトアミノフェンの肝毒性評価、第40回日本毒性学会学術年会、2013年06月17日～2013年06月19日、幕張メッセ国際会議場(千葉)

5. 山頭征岳、佐能正剛、杉原数美、江尻洋子、堀江透、北村繁幸、太田茂、ラット初代肝細胞スフェロイドにおける蛍光プローブを用いたアセトアミノフェンによる肝毒性評価、日本薬学会第133年会、2013年03月27日～2013年03月30日、パシフィコ横浜(横浜)

6. 山頭征岳、佐能正剛、杉原数美、江尻洋子、堀江透、北村繁幸、太田茂、ラット肝細胞スフェロイドにおける蛍光プローブを用いたアセトアミノフェン、ジクロフェナクによる肝毒性評価、日本薬物動態学会第27回年会、2012年11月20日～2012年11月22日、タワーホール船堀(東京)

(産業財産権)

1. 出願状況(計1件)

名称: 毒性スクリーニング方法

発明者: 佐能正剛、太田茂、山頭征岳、江尻洋子、細田雅也、綾野賢

権利者: 株式会社クラレ

(広島大学、株式会社クラレの共同出願)

種類: 特許

番号: 2012-231226

出願年月日: 2012年10月18日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐能 正剛 (SANOH SEIGO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号: 00552267