

マイクロ空間プレートを用いた肝細胞 3次元培養法の薬物動態研究への応用

株式会社大塚製薬工場 研究開発センター
西村益浩, 内藤真策



西村益浩

1. はじめに

薬物や生体異物の代謝には、薬物代謝酵素が関与しており、これらの酵素群は肝臓に多く発現し、種差も知られている。そこで、ヒト肝臓由来の試料を用いた薬物代謝酵素の誘導の評価は、臨床での薬物相互作用を予測する上で有用と考えられている。また、薬物動態におけるトランスポーターの役割も非常に大きいものがある。

著者らもこの課題に取り組み、新鮮および凍結で供給されたヒト肝細胞の初代培養系を用い、多くの薬物代謝酵素やトランスポーターについて mRNA 発現レベルでの変動を検討している^{1,2)}。

しかし *in vitro* 研究の欠点として、薬物代謝酵素の多くは、初代肝細胞培養系において発現量が経時的に低下することが知られている。著者らは培養開始後のできるだけ早いタイミングでの実験と、高感度な mRNA 分析法により、この課題に対処した。一方、細胞機能を *in vivo* に近い状態で維持する目的でマトリゲルを用いた方法³⁾、コラーゲンサンドイッチ法⁴⁾、フィーダー細胞を使用した方法⁵⁾、中空糸モジュールを使用した方法⁶⁾などの3次元培養法が研究され、その幾つかの手法は器具・培地として市販されている。

そこで、著者らは *in vivo* に近い肝臓の機能を維持でき、簡単に培養できることをコンセプトに、マイクロ空間プレート Elplasia (株式会社クラレ製)を用いた新規の3次元培養法を検討している。本稿では、薬物代謝酵素やトランスポーターの誘導能評価へのヒト肝細胞3次元培養法の有用性についてマイクロ空間プレートを用いた新規方法を中心に紹介したい。

2. マイクロ空間プレートを用いたヒト肝細胞の培養について

著者らはヒト肝細胞の3次元培養に用いる培養プレートとして、溶解微細転写プロセス⁷⁾により縦横200 μm 、深さ50 μm のマイクロ空間になるようにマイクロ容器パターンが穴底全面に形成された24穴のマイクロ空間プレート(図1)を用いた。なお、現在24穴と96穴のマイクロ空間プレートが市販されており、縦横100 μm 、深さ50 μm の容

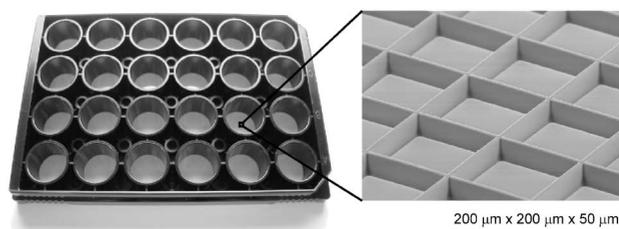


図1 マイクロ空間プレート

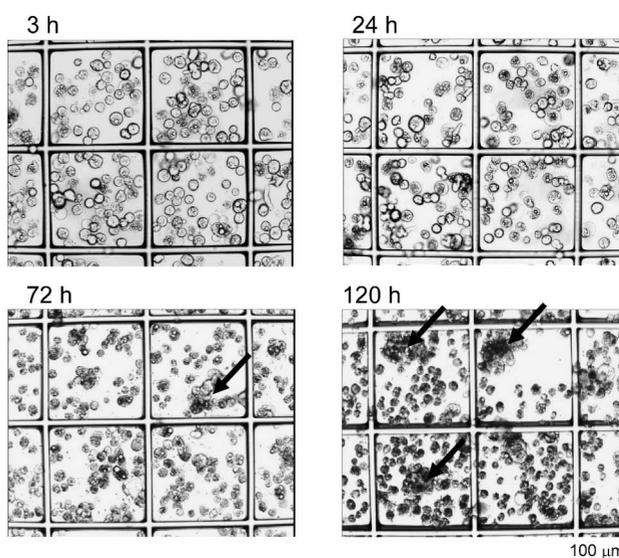


図2 マイクロ空間プレートに播種後のヒト肝細胞の経時変化(位相差顕微鏡像)

器パターンと縦横200 μm 、深さ100 μm の容器パターンのマイクロ空間も含めて3種類のプレートが入手可能である。

本プレートの特徴として、容器パターン内の細胞数に応じて形成されるスフェロイドの大きさが決まることから、スフェロイドが大きくなり、その内部が壊死するといったことも起こらない。また、培養細胞種によって容器パターンの最適化も研究されている。

図2はヒト肝細胞を 5×10^4 生細胞/ cm^2 で播種した場合の経時的な細胞の状態を示している⁸⁾。培養開始3時間時点の培地交換後において、肝細胞は緩やかに接着しており、24時間後も同様の状態で維持されている。72時間時点において矢印で示しているようにスフェロイド用の形態が見え始め、120時間時点では明確にスフェロイドが観察でき、単独で存在する細胞も72時間時点以降は立体構造を示している。移植されたヒト肝細胞に置換されたキメラマウスの肝細胞を播種後には一定の大きさのスフェロイドが形成されることも報告されている⁹⁾。

また、平板プレートとマイクロ空間プレートで培養120

時間後の細胞内 LDH 活性量を比較し、両プレート間の細胞数に差が無いことを確認しており⁸⁾、従来法と同じように培地交換を行っても適度な接着性が維持され、細胞が脱落することはないようであった。

図3に示すアルブミンの培地中への分泌量は肝細胞の機能を推定する指標となり、培養開始72時間以降、マイクロ空間プレートで培養した肝細胞が平板プレートよりも有意に高値を示し⁸⁾、マイクロ空間プレートを用いた3次

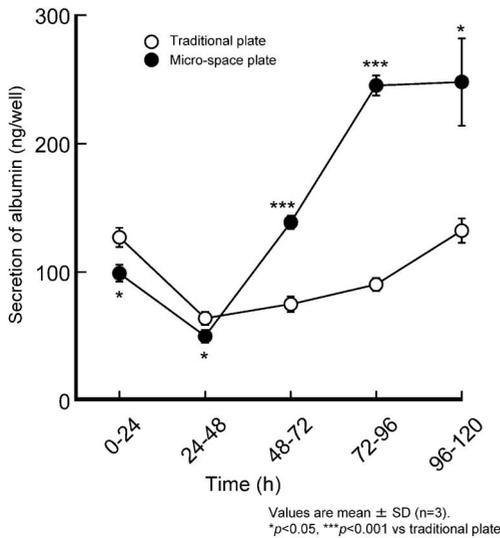


図3 ヒト培養肝細胞から培地への経時的なアルブミン分泌量の比較

元培養が従来法よりも優れていた。3次元培養は培養96時間時点が肝細胞の機能が充実する目安と考えられた。さらに、マイクロ空間プレートを用いた3次元培養はCYP1A2やCYP3A4の活性及びmRNA発現が従来の単層培養と比較して維持されることも報告されている⁹⁾。

3. 発現プロファイルの比較

著者らは培養120時間時点でのCYP酵素のmRNA発現レベルについて単層培養と3次元培養間の比較をした¹⁰⁾。図4に示したように、CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4など多くのCYP酵素mRNAのマイクロ空間プレートを用いた3次元培養におけるレベルは単層培養と比較して高値を示した。また、CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5など両プレート間でmRNA発現レベルが同程度の分子種もみられた。一方、3次元培養におけるmRNA発現レベルが単層培養と比較して低値をとるCYP分子種はみられなかった。さらに、培養120時間時点での薬物代謝第II相酵素、トランスポーター及び核内レセプターのmRNA発現レベルについても単層培養と3次元培養間の比較をした¹⁰⁾。SULT1A1やSULT1B1などの硫酸抱合酵素やUGT1A1やUGT1A6などグルクロン酸抱合酵素もCYPと同様にマイクロ空間プレートで高値をとるか、もしくは両プレート間で同程度となり、低値になる分子種はなかった。ABCB1/MDR1のmRNAレベルは両プレートとも培養開始120時間後も変化はみられなかった。また、他のABCトランスポー

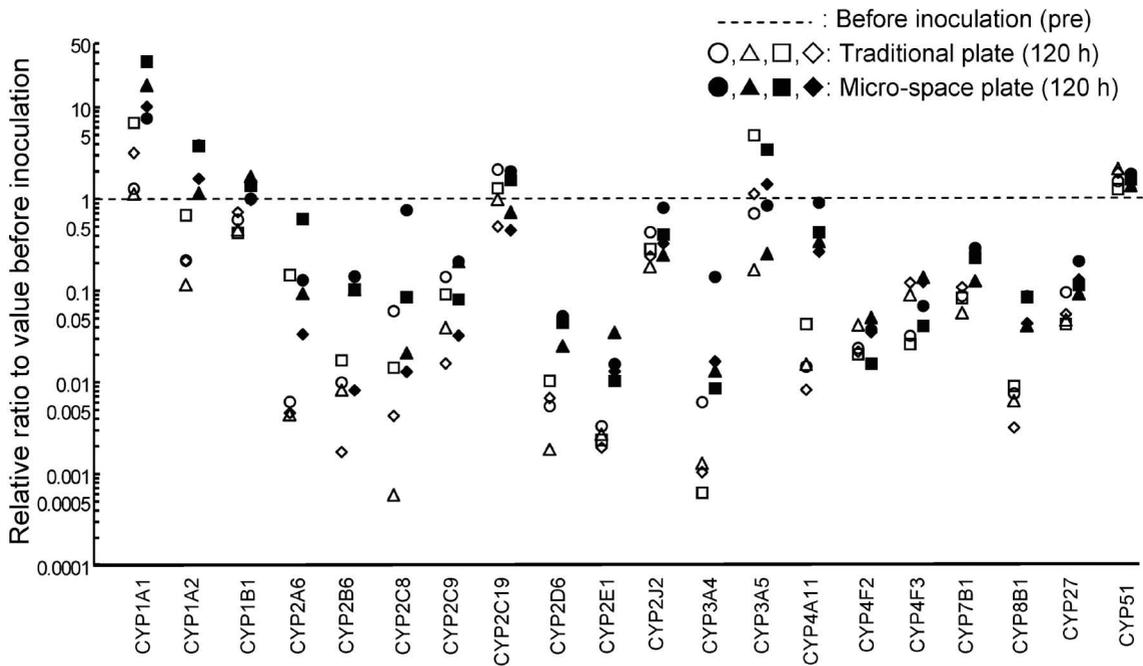


図4 ヒト肝細胞120 h 培養時点の mRNA 発現レベルでみた単層培養と3D培養の比較

ターは ABCC1/MRP1 および ABCC2/MRP2 のように培養前と比べて mRNA 発現レベルが上昇するか、もしくは ABCB11/BSEP のように低下したが、その変化は従来の単層培養と比較して3次元培養で小さいかもしくは同程度であった。SLC トランスポーターも ABC トランスポーターと同様の傾向を示した。また、培養120時間時点で、核内レセプターの mRNA レベルは培養開始前と同程度で推移し、両プレート間にほとんど差異を認めなかった。さらに、糖や脂質代謝など細胞の生理的な機能に関連する酵素群の mRNA 発現について両プレート間で比較するなど、多くの遺伝子の mRNA 発現情報のデータベース化を進めている。

4. 酵素誘導の評価試験へ応用

著者らは、リファンピシンあるいはオメプラゾール曝露による CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の誘導について、アルブミン分泌量を目安に、培養96時間時点から24時間の曝露により、従来の平板プレートを用いた単層培養とマイクロ空間プレートを用いた3次元培養の比較を行った⁸⁾。なお、mRNA 発現レベルでの酵素誘導の評価は、ハウスキーピング遺伝子に対して標的遺伝子の発現レベルで評価し、測定法の高感度と相まって正確な評価を示すことができる。そのため、必ずしも mRNA 絶対量の増減を示すものではない。そこで、従来の単層培養と比較して mRNA 発現レベルが良好に維持されているマイクロ空間プレートを用いた場合における酵素誘導の程度に注目した。

一般的に酵素誘導が評価されている CYP1A2 と

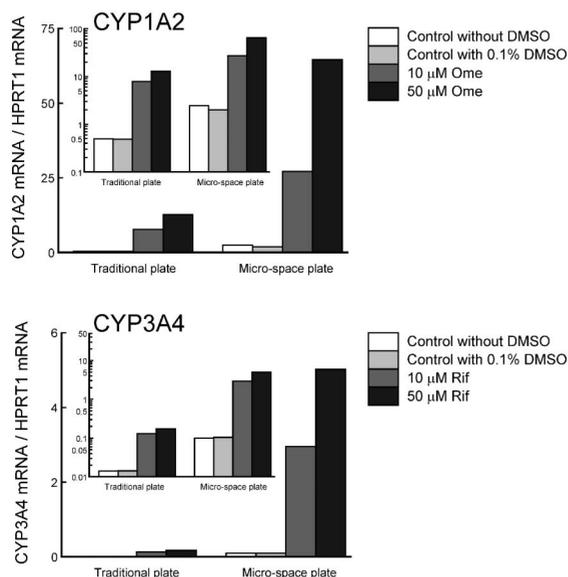


図5 RifあるいはOme 24時間曝露によるヒト肝細胞でのCYP mRNAの誘導

CYP3A4は、共に両プレートとも濃度依存的な誘導を確認できた(図5)。さらに、他のCYP酵素、抱合酵素およびトランスポーター mRNAの誘導についても評価し、例えばCYP2A6 mRNAの誘導は平板プレートと比較してマイクロ空間プレートの方が大きな誘導が見られるなど、誘導前の発現レベルが高いにも関わらず誘導されやすい分子種も確認している(未発表)。このように、マイクロ空間プレートを用いた3次元培養は従来の単層培養と比較して、mRNA発現レベルが高く維持された状態で、感度良く誘導を検出できる評価系と考えている。

5. マイクロ空間プレートを用いた研究の未来

著者らは、酵素誘導実験への応用について述べてきた。従来の単層培養が培養48時間から24時間の曝露評価を基準にするのに対して、マイクロ空間プレートを用いた3次元培養は培養96時間から24時間曝露とした。わずか48時間の培養を加算することにより、マイクロ空間プレートでの培養法は多くの薬物動態関連遺伝子の発現プロファイルが従来法と比較して培養前の発現レベルに近づき、*in vivo*を類推するための代謝試験や毒性評価などへの応用も今後期待できる。

さらに、マイクロ空間プレートを用いたヒト肝幹細胞から肝細胞への分化誘導についての検討がなされており¹¹⁾、近い将来、このプレートを基盤技術に肝幹細胞、iPS細胞、ES細胞などから肝細胞に分化誘導して、様々な研究に利用することも可能になるとと思われる。

6. おわりに

マイクロ空間プレートを用いたヒト肝細胞の3次元培養と従来の平板プレートを用いた単層培養との比較を行った。その結果、3次元培養において、アルブミン分泌量の上昇から肝機能の回復を確認した。CYP酵素等の薬物代謝酵素やトランスポーターの誘導を mRNA レベルで感度良く検出することができた。さらに、CYP1A2やCYP3A4の活性が単層培養と比較して維持されることが報告されている。

3次元培養では、肝細胞がスフェロイドのような立体構造を取ることで *in vivo* に近い機能を示すことができると考えられ、薬物代謝酵素やトランスポーターの誘導評価に有用と思われる。今後、3次元培養系を用いた研究が益々発展し、薬物代謝や薬物相互作用の評価に役立つことを期待したい。

謝辞

マイクロ空間プレートを用いた3次元培養の研究は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授 成松鎮雄先生のご指導のもとで行いました。また、研究を遂行するにあた

り，特定非営利活動法人HAB研究機構 佐藤哲男先生，鈴木聡先生，デイ・スリー研究所 堀江透先生，株式会社クラレつくば研究センター 江尻洋子先生，㈱大塚製薬工場研究開発センター鳴門研究所 岸本早苗氏，萩美恵子氏，中山満雄室長のご協力を頂きました。

参考文献

- 1) Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Naito, S. and Hiraoka, I.: Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, **122**: 339–361 (2002).
- 2) Morioka, Y., Nishimura, M., Imai, T., Suzuki, S., Harada, M., Satoh, T. and Naito, S.: Assessment of induction of cytochrome P450 by NO-1886 (ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, in primary cultures of human hepatocytes and in female rat liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**: 19–28 (2006).
- 3) Moghe, P. V., Berthiaume, F., Ezzell, R. M., Toner, M., Tompkins, R. G. and Yarmush, M. L.: Culture matrix configuration and composition in the maintenance of hepatocyte polarity and function. *Biomaterials*, **17**: 373–385 (1996).
- 4) LeCluyse, E. L., Audus, K. L. and Hochman, J. H.: Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am. J. Physiol.*, **266**: C1764–C1774 (1994).
- 5) Miyamoto, Y., Ikeya, T. and Enosawa, S.: Preconditioned cell array optimized for a three-dimensional culture of hepatocytes. *Cell Transplant.*, **18**(5): 677–681 (2009).
- 6) Funatsu, K., Ijima, H., Nakazawa, K., Yamashita, Y., Shimada, M. and Sugimachi, K.: Hybrid artificial liver using hepatocyte organoid culture. *Artif Organs.*, **25**: 194–200 (2001).
- 7) 焼本数利, 伊東 宏, 折出 修, 岸田和人, 福田始弘: マイクロ・ナノ構造体の熔融微細転写プロセス. 成形加工, **21**: 543–547 (2009).
- 8) Nishimura, M., Hagi, M., Ejiri, Y., Kishimoto, S., Horie, T., Narimatsu, S. and Naito, S.: Secretion of albumin and induction of CYP1A2 and CYP3A4 in novel three-dimensional culture system for human hepatocytes using micro-space plate. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**: 236–242 (2010).
- 9) 一丁田(江尻)洋子, 鶴田仁志, 中村和昭, 水谷玲子, 田上昭人: マイクロ空間を有する細胞培養チップの開発. 日本小児臨床薬理学会雑誌, **22**: 87–89 (2009).
- 10) Nishimura, M., Ejiri, Y., Kishimoto, S., Suzuki, S., Satoh, T., Horie, T., Narimatsu, S. and Naito, S.: Expression levels of drug-metabolizing enzyme, transporter, and nuclear receptor mRNAs in a novel three-dimensional culture system for human hepatocytes using micro-space plates. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **26**: 137–144 (2011).
- 11) 谷口英樹: ヒト肝幹細胞ライブラリーの構築によるファーマコセロミクスの開発. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**: 185–190 (2011).