

Cell-able[®]で培養したヒト新鮮肝細胞(PXB-able)の 微小構造およびこれを用いた薬剤性肝障害の予測

佐倉武司^{1, 3}, 城村友子^{2, 3}

1: 住友ベークライト株式会社, 2: 東洋合成工業株式会社,

3: 安全性評価研究会 *in vitro*肝代謝・毒性評価分科会

Cell-able[®]

 TOYO GOSEI

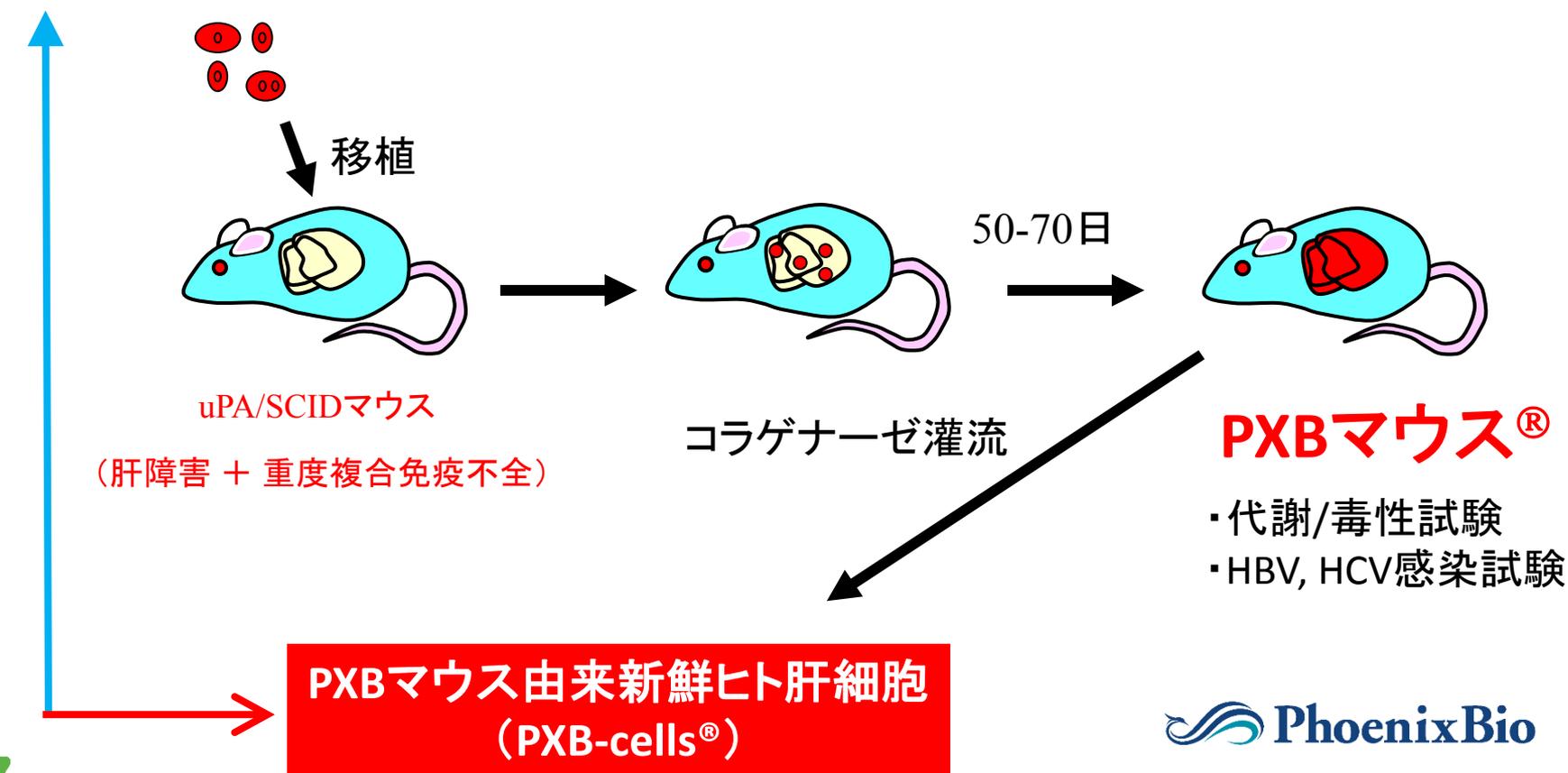
本日の発表の内容

1. Cell-able[®]での肝細胞／線維芽細胞の共培養
2. Cell-able[®]での肝微小器官の再構築 (構造的特徴)
3. アルブミン分泌能とCYP3A4活性
4. HCSによる薬物性肝障害(DILI: Drug Induced Liver Injury)の予測

1. Cell-able®での肝細胞／線維芽細胞の共培養

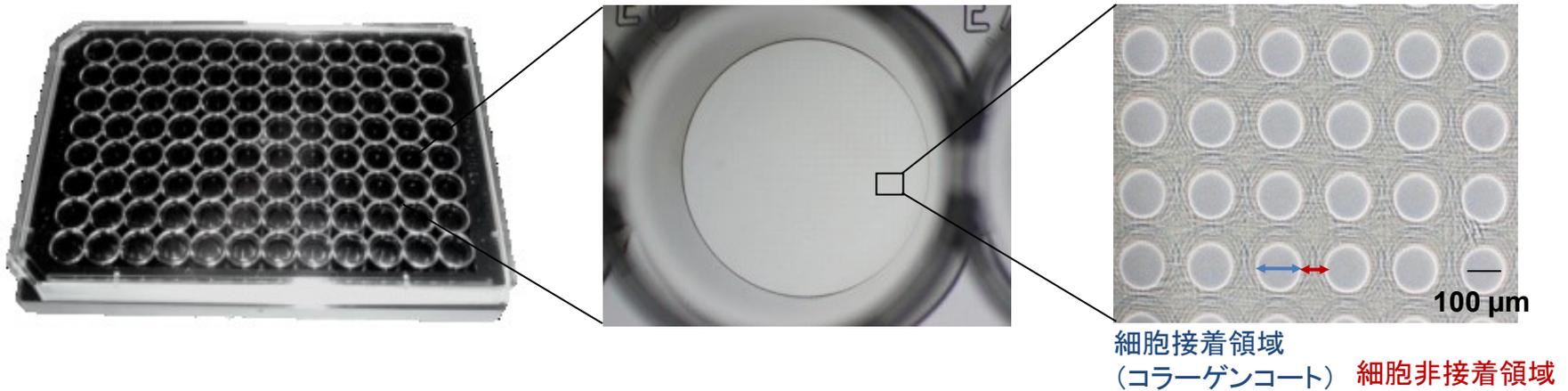
今回使用したヒト新鮮肝細胞(PXB-cells®)とは

市販の凍結ヒト肝細胞



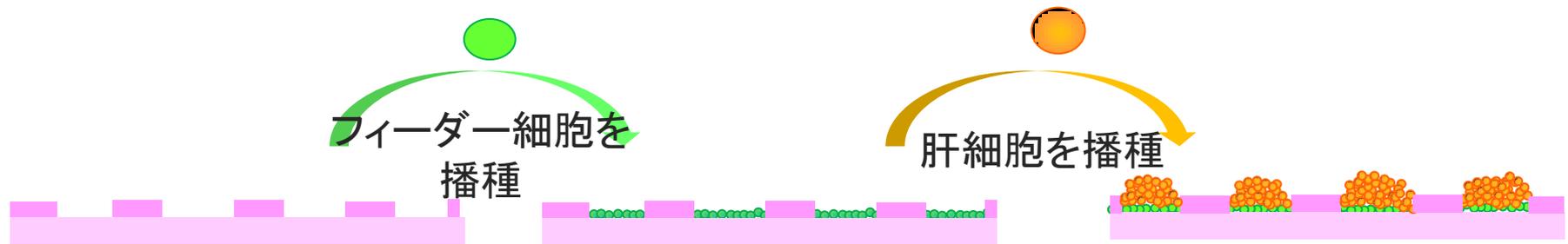
1. Cell-able®での肝細胞／線維芽細胞の共培養

Cell-able® 外観と培養表面



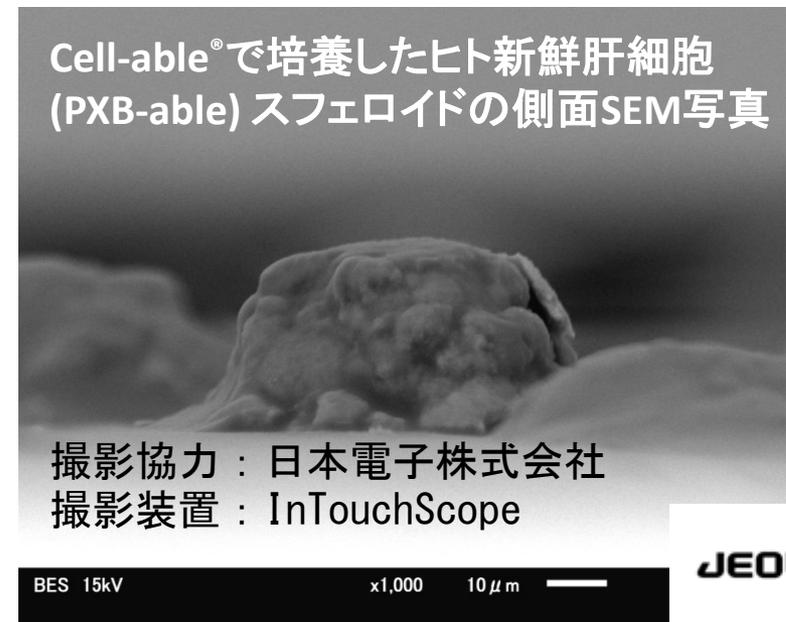
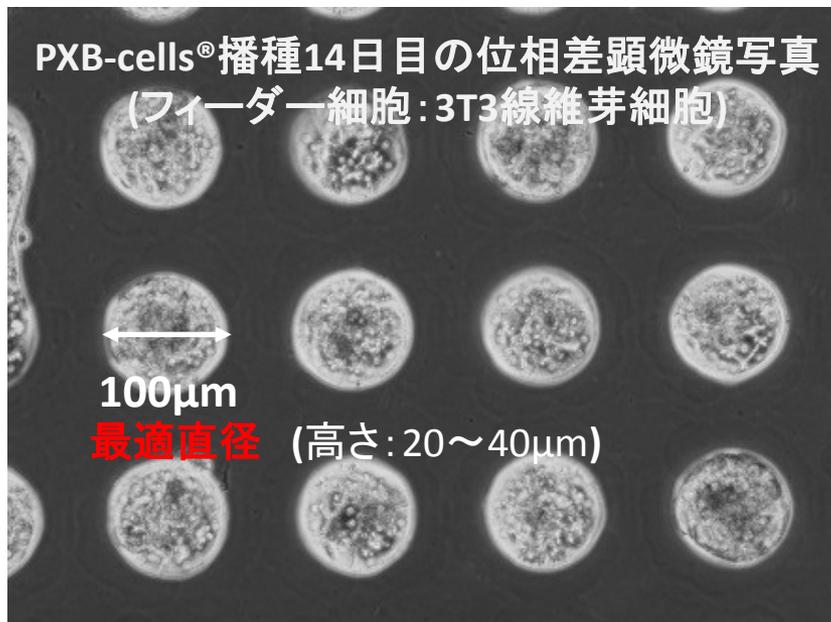
一般的な培養操作で
直径 約 $100\mu\text{m}$, 高さ $20\sim 40\mu\text{m}$ の3Dスフェロイドを形成
96well plate : 800circles/well
384well plate: 250circles/well

1. Cell-able®での肝細胞／線維芽細胞の共培養



フィーダー細胞 : 8×10^3 cells/well

肝細胞 : $2-4 \times 10^4$ cells/well (96ウェルプレートの場合)



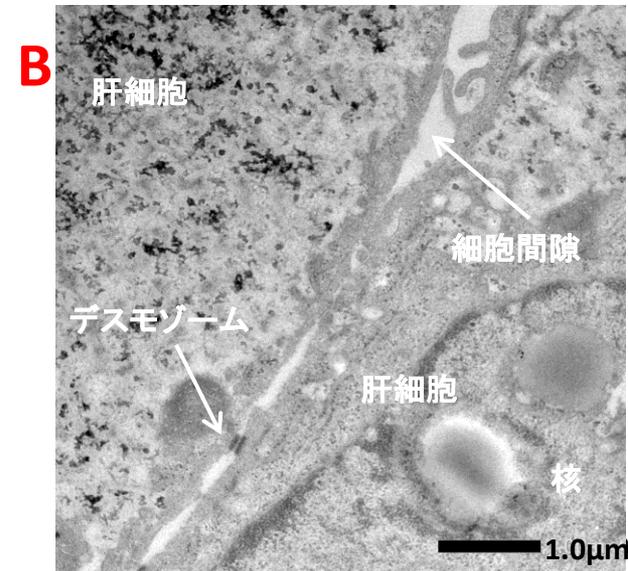
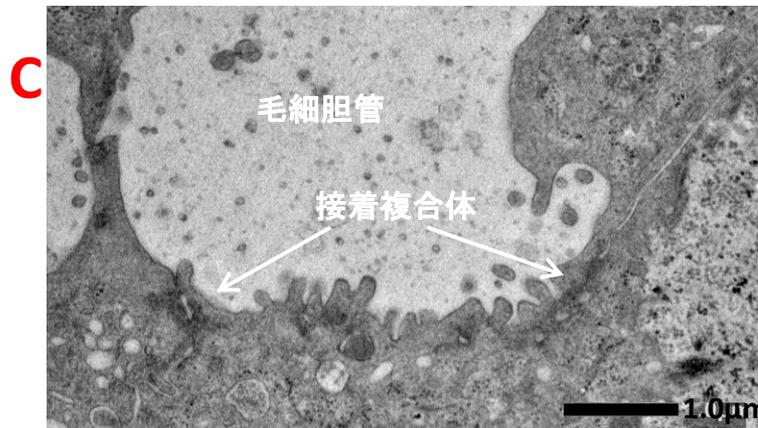
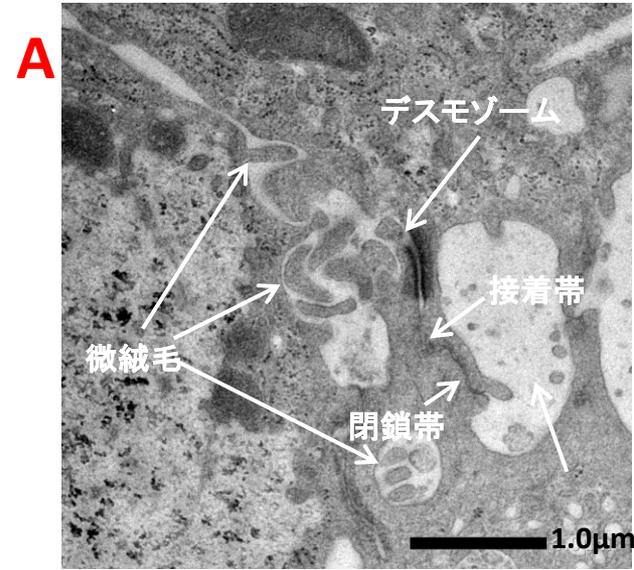
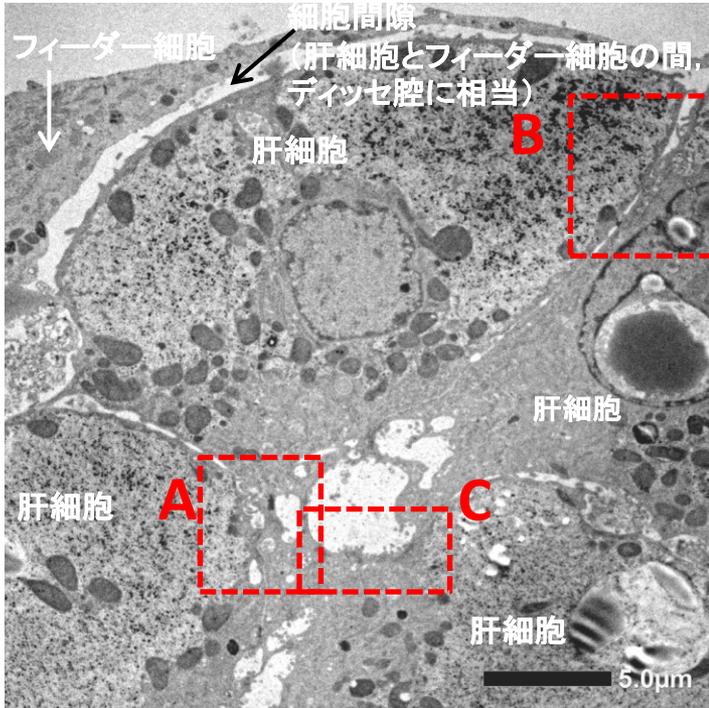
本日の発表の内容

1. Cell-able[®]での肝細胞／線維芽細胞の共培養
2. Cell-able[®]での肝微小器官の再構築 (構造的特徴)
3. アルブミン分泌能とCYP3A4活性
4. HCSによる薬物性肝障害(DILI: Drug Induced Liver Injury)の予測

2. Cell-able®での肝微小器官の再構築 (構造的特徴)

PXB-able TEM写真

(データ監修: 旭川医科大学 医学部 病理学講座 腫瘍病理分野 西川祐司教授)

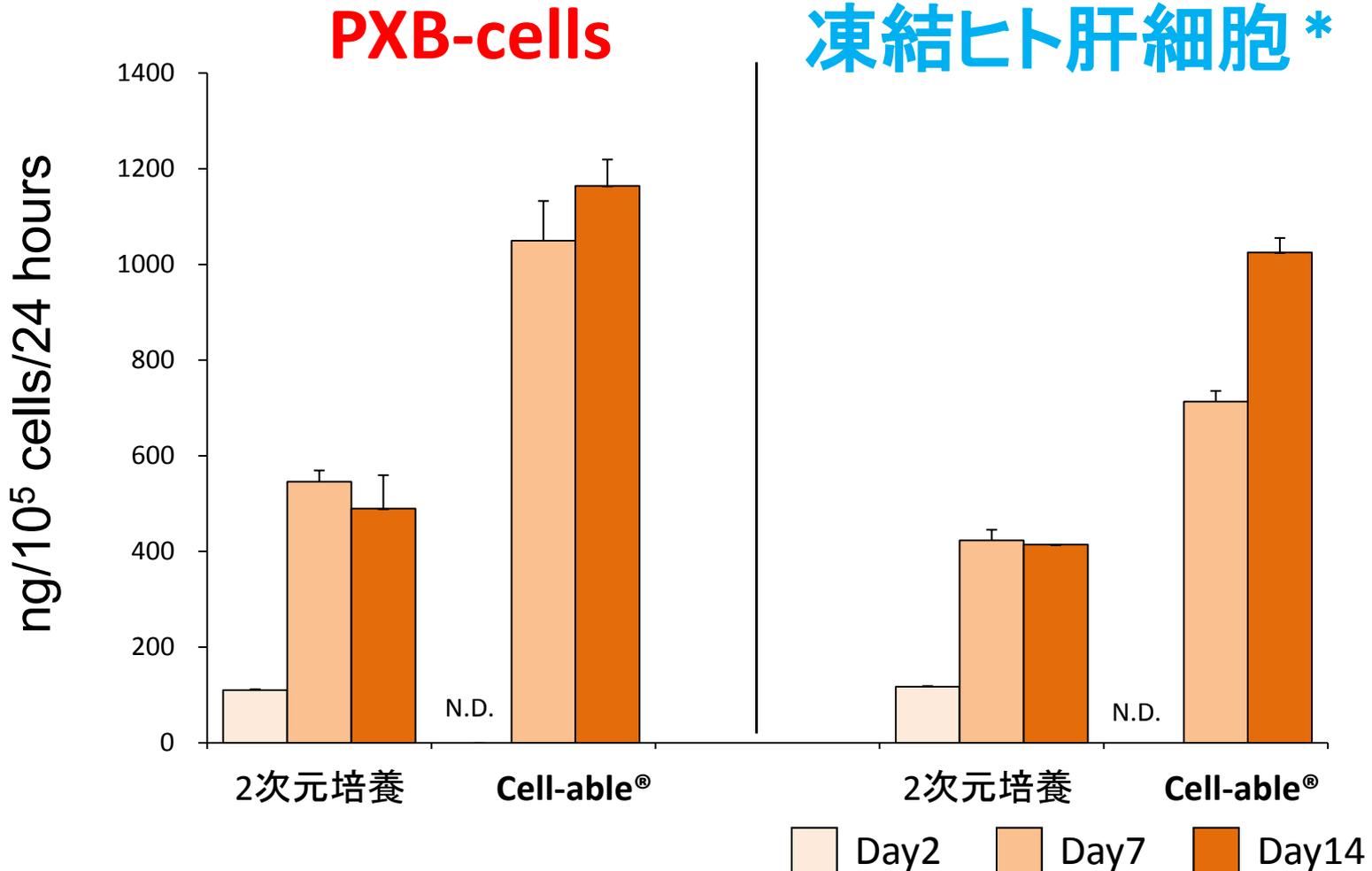


本日の発表の内容

1. Cell-able[®]での肝細胞／線維芽細胞の共培養
2. Cell-able[®]での肝微小器官の再構築 (構造的特徴)
- 3. アルブミン分泌能とCYP3A4活性**
4. HCSによる薬物性肝障害(DILI: Drug Induced Liver Injury)の予測

3. アルブミン分泌能とCYP3A4活性

3-1. アルブミン分泌能



*キメラマウス作製に使用した細胞(接着性, 酵素誘導能有り)

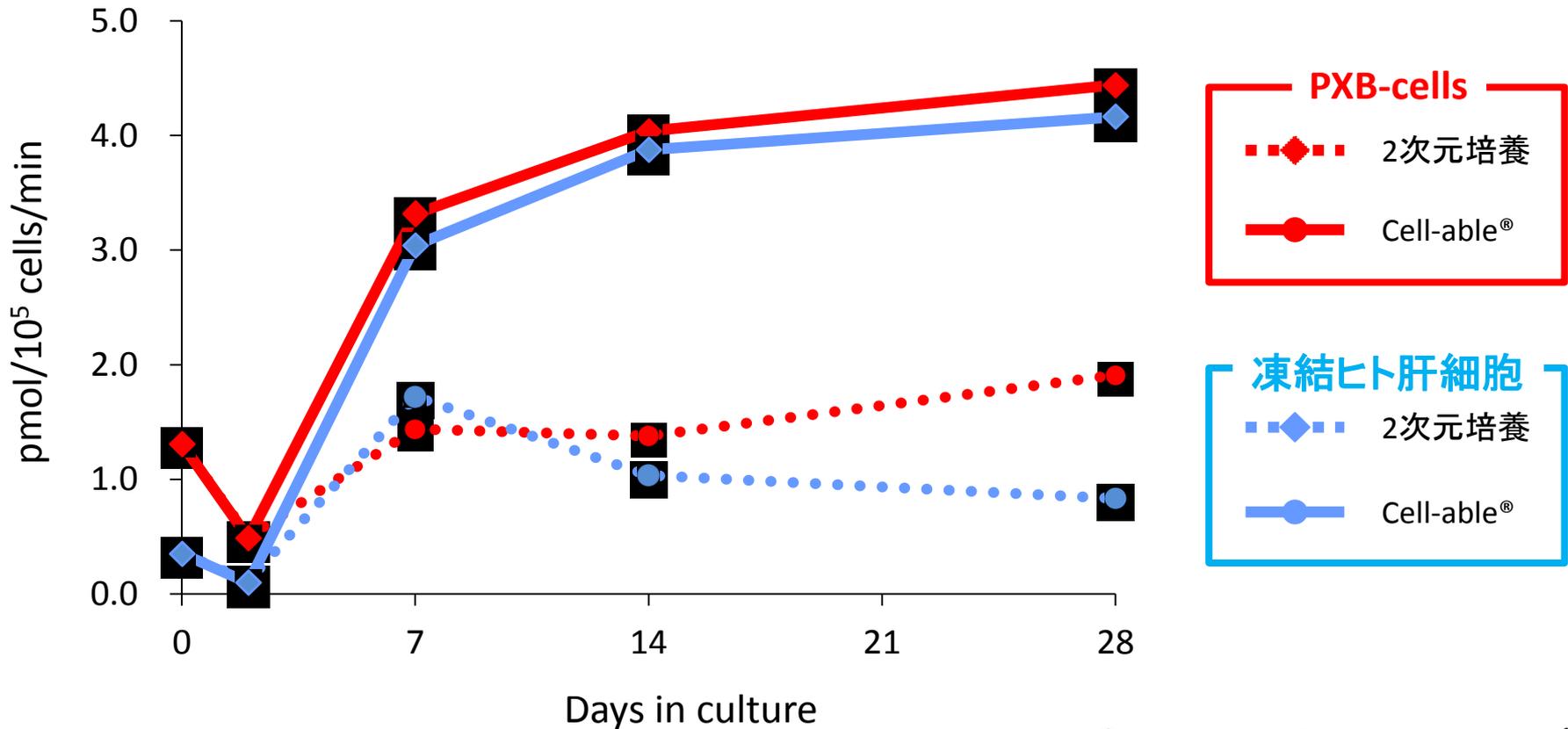
JSSX(2012) 山崎ら発表

3. アルブミン分泌能とCYP3A4活性

3-2. CYP3A4活性

Enzymes	Enzyme activity	Substrate	Incubation time	Metabolite
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylase	10 μ M Midazolam	2 hours	1'-Hydroxymidazolam

Measurement by HPLC



本日の発表の内容

1. Cell-able[®]での肝細胞／線維芽細胞の共培養
2. Cell-able[®]での肝微小器官の再構築 (構造的特徴)
3. アルブミン分泌能とCYP3A4活性
4. HCSによる薬物性肝障害(DILI: Drug Induced Liver Injury)の予測

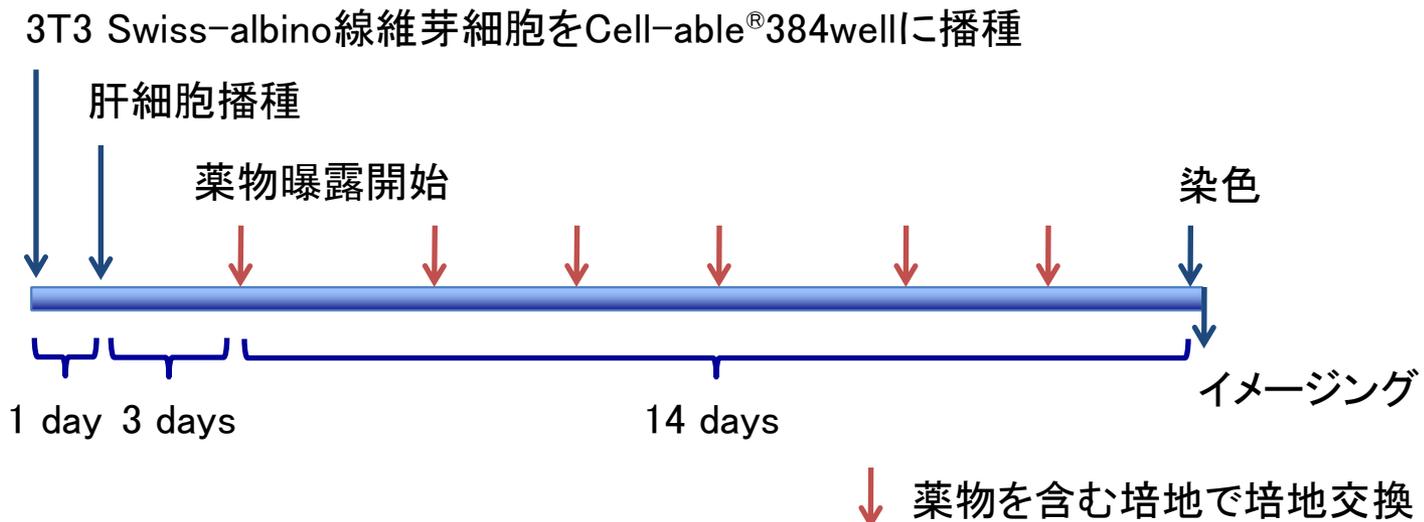
4. HCSによる薬剤性肝障害の予測

【試験概要】

- Cell-able[®]で培養したキメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞フェロイドに32薬物を14日間曝露し、薬物によって引き起こされる**肝障害(DILI)**をImageXpress Micro (Molecular Devices)によるイメージング解析により予測した。

⇒ この結果を、**マトリゲルサンドイッチ培養24時間薬物曝露(Xu et al.,2008)**による結果と比較した。薬物のDILI判定は、FDAのLTKB (Liver Toxicity Knowledge Base)を基に行った。

実験スケジュール



4. HCSによる薬剤性肝障害の予測

● 染色方法 (2 steps)

Step-1 培養上清を除去し, 全てのプローブを含む染色液を添加して45分間インキュベート

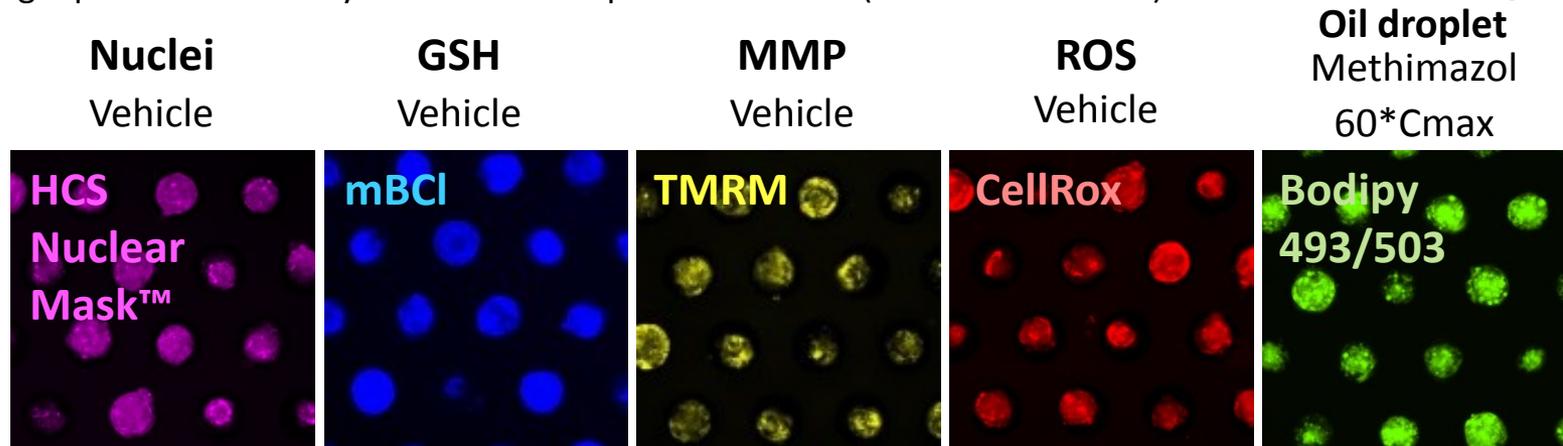
Step-2 染色液を除去して1回洗浄後, TMRM, mBCIを含む染色液を添加

測定
解析

HCS: ImageXpress MICRO (Molecular Devices), 5プローブ 約1時間/384 well

● 各バイオマーカーの蛍光染色イメージングと解析

ImageXpress® Micro XL System and MetaXpress® Softwear (Molecular Devices) によるイメージングと解析



4. HCSによる薬剤性肝障害の予測

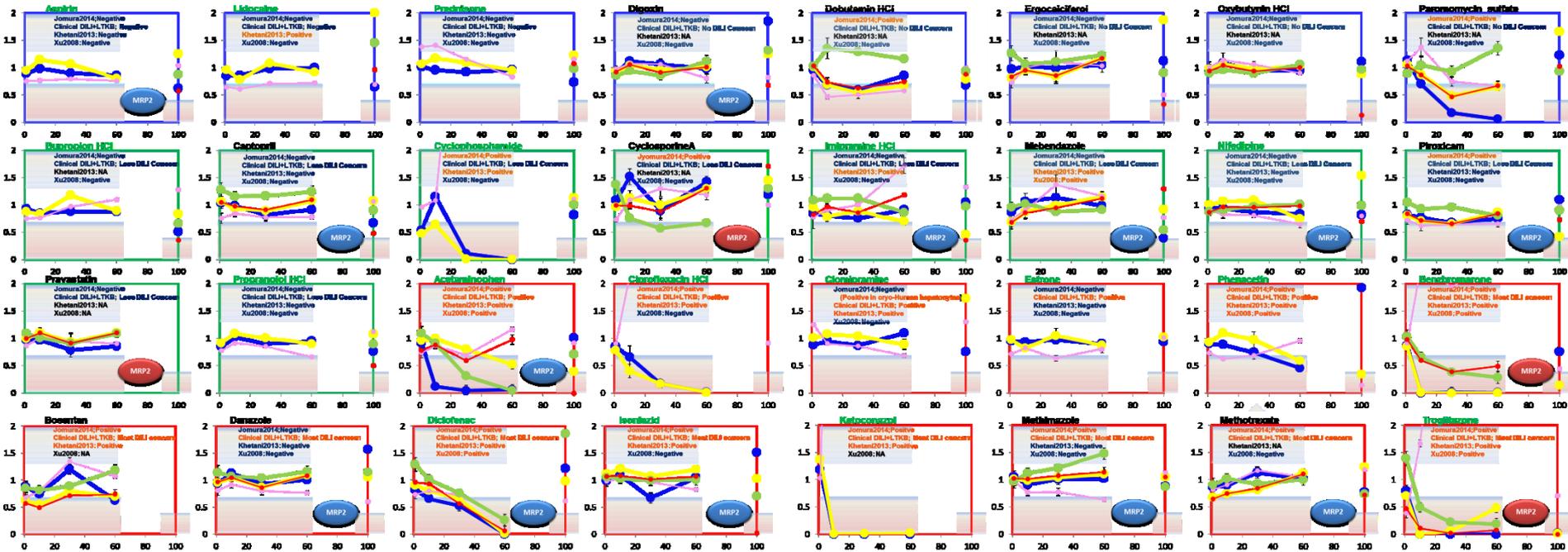
各試験の陽性判定基準

試験	測定項目				
	Nuclei	MMP	GSH	ROS	Oil droplet
Xu, 2008 2D plate 100 × Cmax 24時間暴露	面積値 < 0.4	輝度値 < 0.4	面積値 < 0.65 or 総輝度値 < 0.4	総輝度値 > 2.5	不明
Cell-able® PXB-able 1-60 × Cmax 14日間曝露		面積値 < 0.7	面積値 < 0.7		輝度値 > 1.3

コントロールに対する比が上記基準を少なくとも1項目が満足した場合を陽性と判定した

4. HCSによる薬剤性肝障害の予測

HCSの解析結果



グラフの枠線の色の意味

- 青： 陰性
- 緑： 致命的な障害は無いが何らかの障害が発生し投薬を中断すると回復する
- 赤： 陽性

4. HCSによる薬剤性肝障害の予測

Table.1 各試験結果とLTKB+Clinical DILIとの相関

		Cell-able®	
		PXB-able	
		negative	positive
LTKB*+Clinical DILI	negative	6	2
	+/-	3	7
	positive	4	11

		Xu, 2008	
		Cryo-Human hepatocytes	
		negative	positive
LTKB*+Clinical DILI	negative	8	0
	+/-	8	1
	positive	7	5

Table 2. 各モデルの特異度と感度

	Cell-able®	Xu, 2008
特異度	75% (6/8)	100% (8/8)
感度	73% (11/15)	42% (5/12)

まとめと今後の展望

- Cell-able®上で新鮮肝細胞(PXB-able)と線維芽細胞を共培養することによって、肝微小器官が再構築された。
 - ➡ 薬物動態および毒性予測精度をさらに向上させることを目的として、免疫系細胞など線維芽細胞以外の非実質細胞を組み込んで、より生体に近い微小環境を構築する。
- 2次元培養と比較して、Cell-able®上で培養した場合において、アルブミン分泌能・CYP3A4いずれも長期化にわたって高い活性を示した。
- HCSによって我々の3次元培養での評価では、従来法と同等以上の感度の肝毒性予測結果が得られた。
 - ➡ バイオマーカーや試薬の種類などアッセイ系の最適化改良を行い、予測精度の向上を図る。

謝辞

- 旭川医科大学 医学部 病理学講座 腫瘍病理分野 西川祐司 教授
- 株式会社フェニックスバイオ 石田雄二 様
- モレキュラーデバイス株式会社 鈴木真帆海 様
- 日本電子株式会社 高木孝士 様, 池谷綾美 様
- 安全性評価研究会 *in vitro* 肝代謝・毒性評価分科会

ご清聴ありがとうございました。

 **住友ベークライト株式会社**

 S-バイオ事業部 佐倉武司

 **TOYO GOSEI 東洋合成工業株式会社**

感光材研究所 バイオ応用グループ 城村友子