

Cell-able®で3次元培養したキメラマウス由来ヒト肝細胞PXB-cells® (PXB-able™) の
微小構造解析と薬物性肝障害予測への応用

○城村友子¹⁾、山崎ちひろ²⁾、石田雄二²⁾³⁾、立野知世²⁾³⁾
1) 東洋合成工業株式会社 2) 株式会社フェニックスバイオ 3) 広島大学 肝臓プロジェクト研究センター

Introduction

近年、Cell-Based Assayは従来の2次元培養法から、より生体内を反映すると考えられている3次元培養法にシフトする傾向にあり、様々な3次元培養器材・方法の報告が増えてきている。本報告では、キメラマウス(PXBマウス®)由来新鮮ヒト肝細胞(PXB-cells®、株式会社フェニックスバイオ)を3次元培養プレート(Cell-able®、東洋合成工業株式会社)上でスフェロイド培養し(以後 PXB-able™)、薬物性肝障害予測への応用を検討した。同時に肝臓微小構造の再構築の確認、アルブミン産生能・酵素活性の維持などについて検討を行い、以下の知見が得られたので報告する。

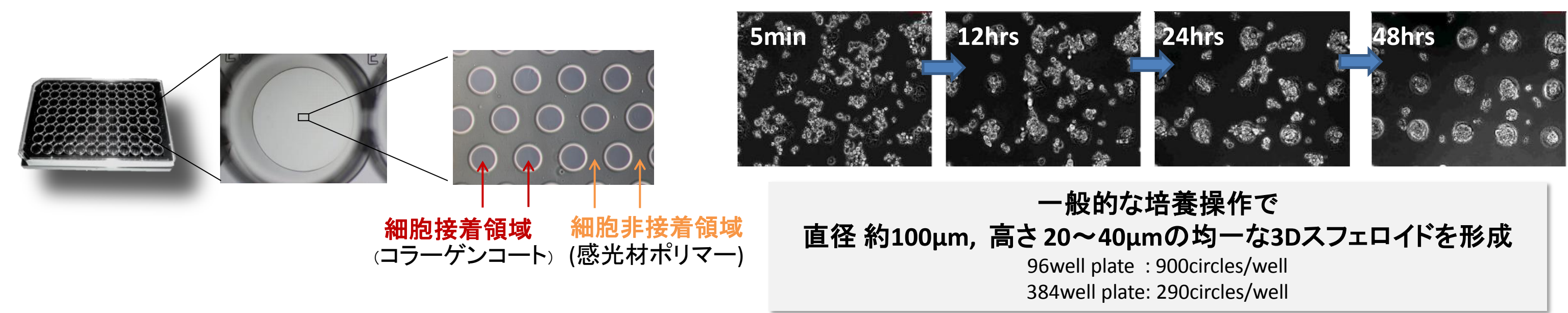
1) スフェロイド中に肝臓に認められるのと同様の**微細構造が再構築されることをTEM(透過型電子顕微鏡)写真により確認**した。

2) キメラマウスに移植した凍結ヒト肝細胞をCell-able®上で培養し、2週間のアルブミン分泌能と4週間のCYP3A活性をPXB-able™と比較した結果、両者は同等の性能を示した。

3) 本培養系を用いて薬物性肝障害の予測を行った所、HCS(High Content Screening)技術により**マルチプレックスでの検出可能**であった。

Materials and Methods

【Cell-able®とは】



【PXB-cells®とは】

PXB-cells®は、株式会社フェニックスバイオで安定生産しているPXBマウス®(ヒト肝細胞キメラマウス)から分離した新鮮ヒト肝細胞。現在、PXB-cells®は薬物代謝試験やHBVの持続感染試験などの様々な分野で利用されている。

【培養条件】

肝細胞接種1日前に3T3 swiss albinoを接種し、翌日PXB-cells®(キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞)を3次元培養パターンニングプレート(Cell-able®、東洋合成工業)上に96ウェルプレートの場合30,000 cells/well、384ウェルプレートの場合10,000 cells/wellで接種し、RM-101培地(東洋合成工業)或いはdHCGM (フェニックスバイオ)を用いて培養した(PXB-able™)。

培養条件概要	
培養器材	Cell-able® plate (96well plate, 384well plate)
フィーダー細胞	3T3 swiss albino (マウス繊維芽細胞)
肝細胞	ヒト肝キメラマウス(PXBマウス®)由来 ヒト新鮮肝細胞(PXB-cells®)
培地	RM101

【TEM写真撮影】

- ①グルタルアルデヒド固定後PBS(-)で洗浄し、1%四酸化オスミウムで固定
- ②エタノール上昇系列により脱水し、プロピレンオキサイド置換・樹脂浸透、エポキシ樹脂硬化後、超薄切
- ④電子染色 酢酸ウランとクエン酸鉛の2重染色
- ⑤透過電子顕微鏡 JEM-1400Plus (JEOL.co)で観察

【アルブミン分泌能測定】

アルブミン分泌能は、培養上清をサンプルとしてラテックス凝集法にて測定した。定量はヒトアルブミン標品を用いて行った。

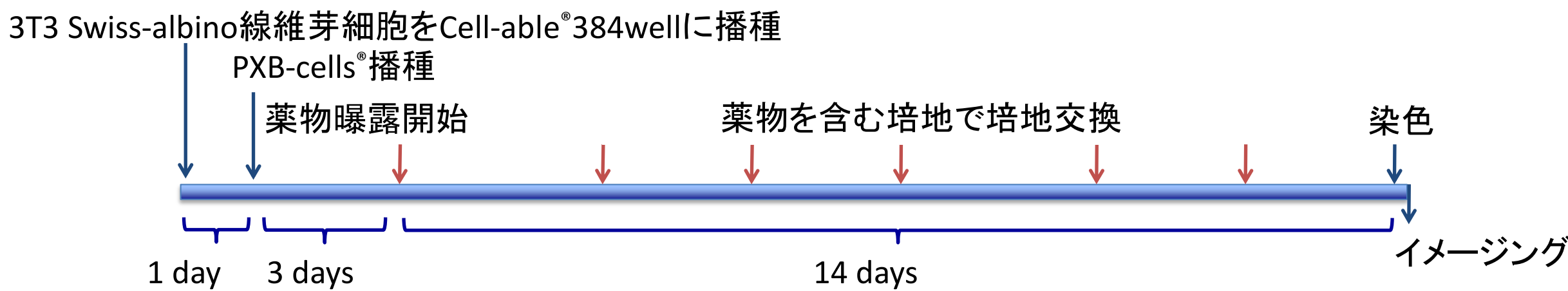
【CYP3A活性測定】

10μMのミダゾラムを基質としてウェルに添加し2時間反応後、上清を回収した。これをHPLCを用いて分析し、上清中の1'-Hydroxymidazolamの濃度を定量することにより、CYP3Aの活性を測定した。

【薬物性肝障害の予測】

Cell-able®で培養したPXB-cells®スフェロイドに薬物を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)³⁾による結果と比較した。薬物のDILI判定は、FDAのLTKB (Liver Toxicity Knowledge Base)³⁾を基に行った。

●実験スケジュール



●バイオマーカーの染色

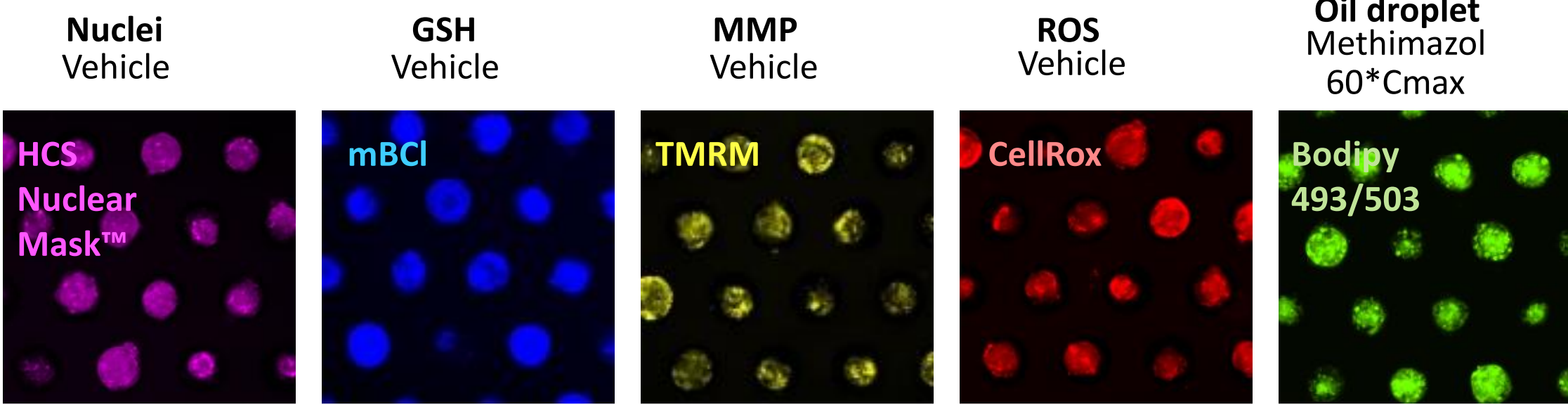
バイオマーカー	プローブ	染色濃度
核 (Nuclei)	HCS Nuclear Mask Deep Red	20 μg/ml
GSH	mBCL	80 μM
ミトコンドリア膜電(MMP)	TMRM	0.02 μM
活性酸素 (ROS)	CellRox orange	5 μM
油滴 (Oil droplet)	Bodipy 493/503	5 μM

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, mBCL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® Software (Molecular Devices) によるイメージング画像



モレキュラーデバイスジャパン株式会社 ImageXpressで撮影

薬物のDILI判定

	DILI Severity score ²⁾				各試験でのDILI判定基準		
Status/label	2,3	4,5	6-8		試験	検出法	DILI陽性判定基準
NM		N			TOYO GOSEI PXB-able™ 1-60 × Cmax 14日間曝露	イメージング	コントロールに対する比が ミトコンドリア膜電位:面積値<0.7 GSH:面積値<0.7 Oil droplet:面積値>1.3
AR		+/-			Xu, 2008 2D /Matrigel Overlay 100 × Cmax 24時間曝露	イメージング	コントロールに対する比が 核:面積値<0.4 ミトコンドリア膜電位:輝度値<0.4 GSH:面積値<0.65, 輝度値<0.4 ROS:総輝度値<2.5
WP	+/-	P	P				少なくとも1項目が陽性
D		P					
BW		P					
WD		P					

Drugs of no concern for DILI ; N
Drugs of less concern for DILI ; +/-
Drugs of most concern for DILI; P

LTKB*を参考に判定基準を決定²⁾

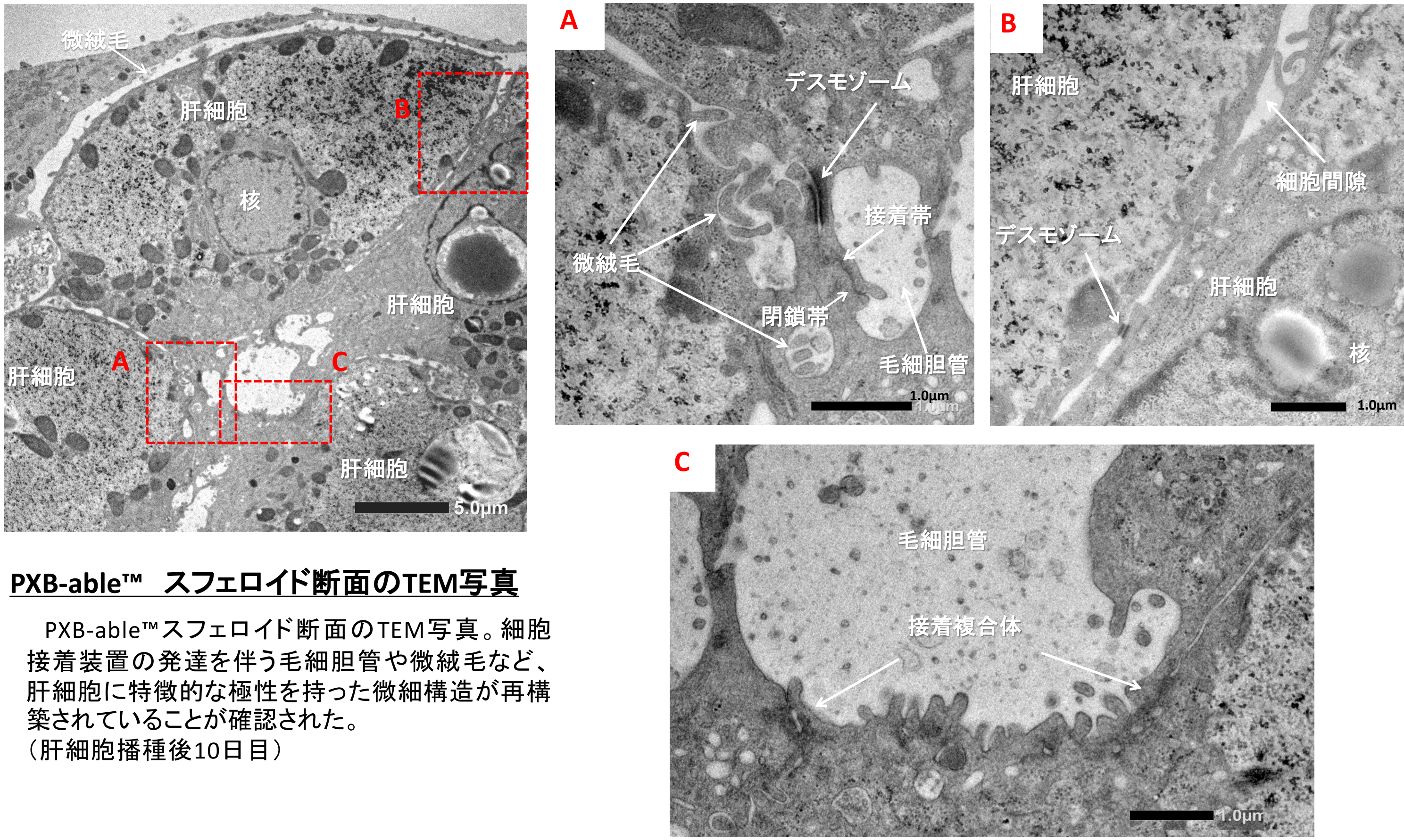
* Liver Toxicity Knowledge Base

FDA で承認されている、薬物がDILIを引き起こす度合いを示す指標の知識基盤
http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/LiverToxicityKnowledgeBase/ucm226811.htm

LTKBに記載が無い薬物については2008年Xuらの論文³⁾のClinical DILIの判定に従った

Results

【PXB-able™での肝微細構造の再構築】

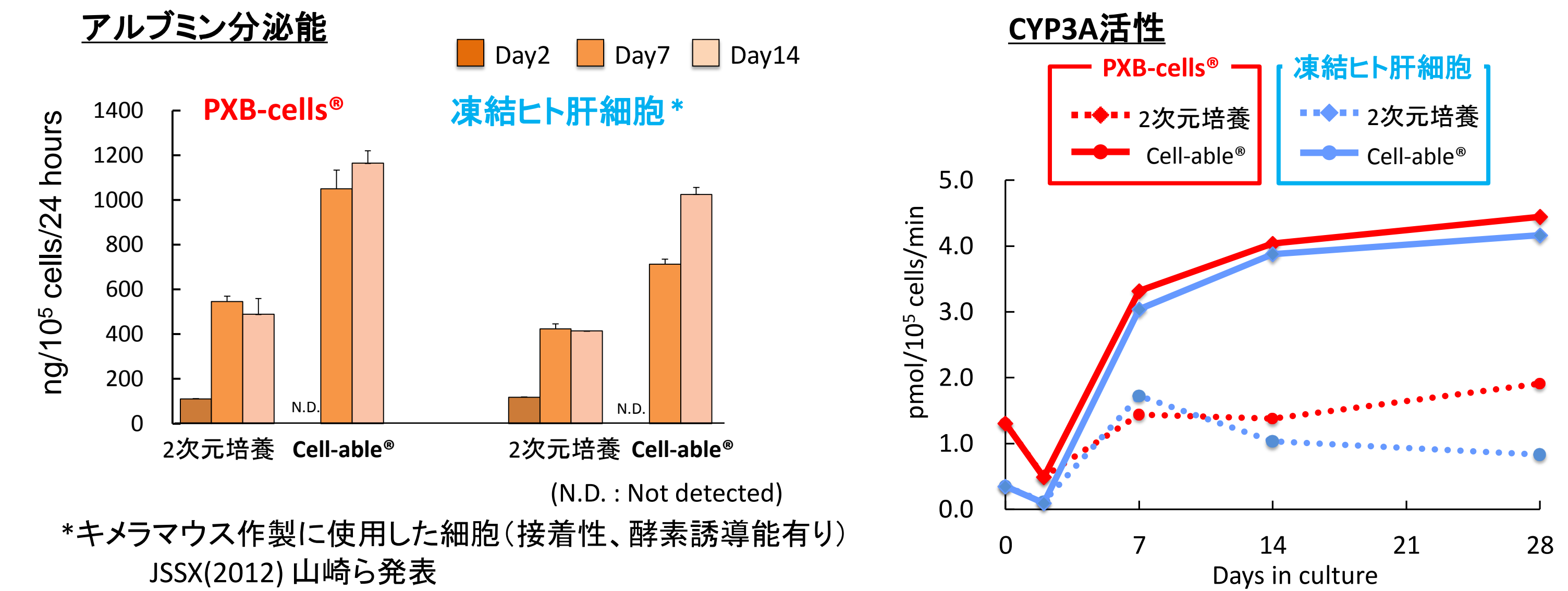


PXB-able™ スフェロイド断面のTEM写真

PXB-able™ スフェロイド断面のTEM写真。細胞接着装置の発達を伴う毛細胆管や微絨毛など、肝細胞に特徴的な極性を持った微細構造が再構築されていることが確認された。(肝細胞接種後10日目)

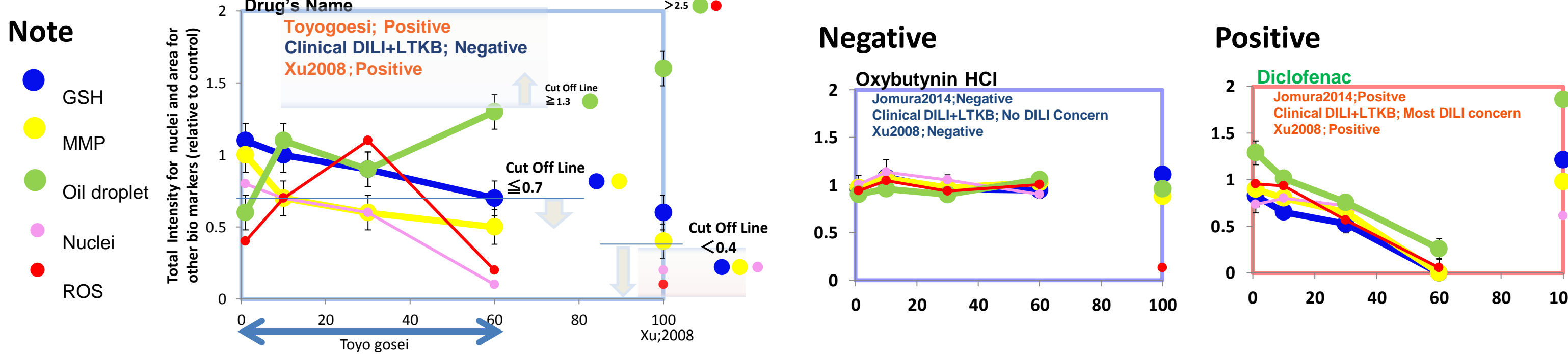
(データ監修: 旭川医科大学 医学部 病理学講座腫瘍病理分野 西川祐司教授)

【ヒト初代肝細胞とPXB-cells®の比較】



【HCSによる薬物性肝障害(DILI: Drug Induced Liver Injury)の予測】

データのグラフ化



各試験結果とLTKB+Clinical DILIとの相関

		Toyo gosei		Xu, 2008 Cryo-Human hepatocytes	
		negative	positive	negative	positive
LTKB*+Clinical DILI	negative	6	2	8	0
	+/-	3	7	8	1
	positive	4	11	7	5

各モデルの特異性と感度

	PXB-able™	Xu, 2008
特異性	75% (6/8)	100% (8/8)
感度	73% (11/15)	42% (5/12)

Conclusions

- Cell-able®上で新鮮肝細胞(PXB-cells®)と繊維芽細胞を3次元共培養することによって、**肝微細構造の再構築が確認された。**
- **PXB-cells®は、2次元培養、Cell-able®3D培養(PXB-able™)ともアルブミン分泌能・CYP3A活性のいずれも長期にわたってヒト初代肝細胞と同等の活性を示した。**
- PXB-able™を用いてHCSで薬物性肝障害予測を実施した結果、**従来法と同等以上の感度が得られた。**今後、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、特異性の改善・予測精度の向上を図る。

Acknowledgements

本発表にあたり、ご助言・ご指導を頂いた下記各位に心より感謝申し上げます。

・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
・モレキュラーデバイスジャパン株式会社 鈴木 真帆海 様
・日本電子株式会社 高木 孝士 様、池谷 綾美 様

References

- 1) Xu et al. (2008) Cellular Imaging Predictions of Clinical Drug-Induced Liver Injury. Toxicological Sciences 105, 97-105
- 2) Chen, Minjun, et al. FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. Drug Discovery Today, 2011, 16. 15: 697-703.