

○城村友子^{3,5}, 荻原琢男^{1,2,5}, 上岡宏紀², 荒川大⁴

¹高崎健康福祉大学大学院薬学研究科, ²高崎健康福祉大学大学薬学部, ³東洋合成工業株式会社, ⁴金沢大学医薬保健研究域薬学系, ⁵安全性評価研究会in vitro肝代謝・毒性評価分科会

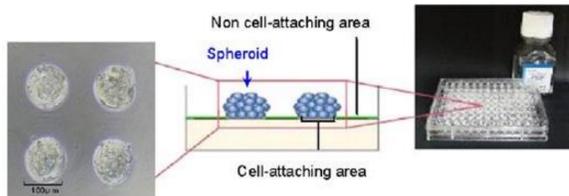
Introduction

ヒト肝細胞の三次元(スフェロイド)培養法は、比較的長期に安定した肝細胞の培養が可能である。そのため、従来の単層培養法やヒト肝がん由来細胞を用いた系では困難であったヒト固有の代謝物の検出、第1相代謝物がさらに第2相代謝を受ける等の複雑な代謝経路の追跡、薬物に長期に暴露されることによってはじめて検出される肝毒性の検討などに有用である^{1,2}。一方、肝代謝酵素の誘導は、併用薬や誘導薬自身の血中濃度の低下による薬効の減弱をもたらす。また、一般に肝毒性は活性代謝物や代謝過程に起因することが多く、そのため酵素誘導状態では肝毒性が増強される可能性がある。そこで、今回我々は、ヒト肝細胞の三次元培養による酵素誘導法を確立することを目的として検討を行った。

- 1) Ohkura T., Ogihara T., et al., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 373-378 (2014).
- 2) Ogihara T., Arakawa H., et al., *Fundam. Toxicol. Sci.*, **2**, 41-48 (2015).

Methods

支持(フィーダー)細胞として3T3-swiss albino細胞を三次元培養96-ウェルプレートCell-able™(東洋合成株式会社)に播種し、2日後に凍結ヒト肝細胞を播種した。培養2日から21日目までのCYP1A2, CYP2B6およびCYP3A4の酵素活性を測定した。また、核内受容体PXR, CARおよびAhRの発現量を定量PCR法により評価した。さらに誘導剤として、CYP1A2についてはオメプラゾール(OME), CYP2B6についてはフェノバルビタール(PB)およびCYP3A4についてはリファンピシン(RIF)を用いて、誘導剤曝露2日, 7日および14日目の各CYP発現誘導をmRNAおよび活性の変化により評価した。さらに、これらの検討について二次元培養法との比較を行なった。



TOYO GOSEI, 3D Culture System "Cell-able®"

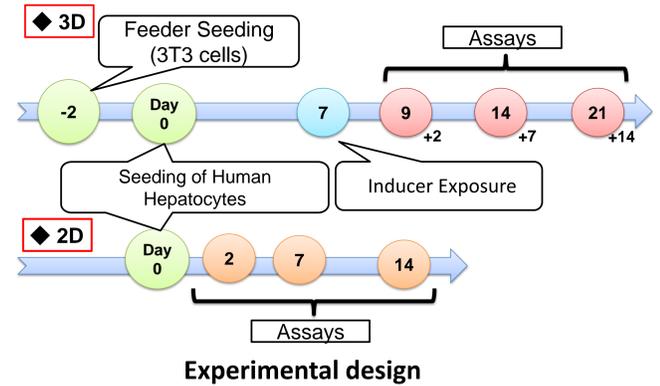


Table 1 Inducers, substrates and metabolites of CYPs

CYP	Nuclear Receptor	Inducer	Substrate	Metabolite
1A2	AhR	omeprazole	phenacetin	acetaminophen
2B6	CAR/PXR	phenobarbital	bupropion	hydroxybupropion
3A4	PXR/CAR	rifampicin	midazolam	1-hydroxymidazolam

Results & Discussion

代謝酵素活性

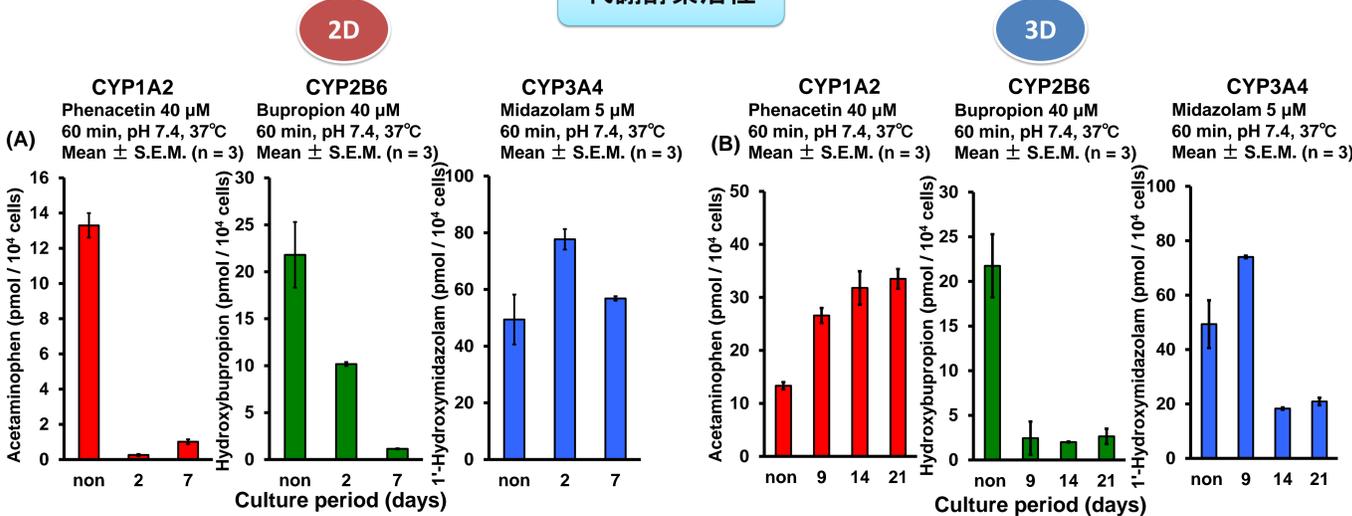


Fig.1 The Basal activities of CYP1A2, 2B6 and 3A4 in non-cultured and 2D-(A) or 3D-cultured(B) human hepatocytes

三次元培養において、CYP1A2, CYP2B6およびCYP3A4の各代謝酵素の活性は、少なくとも細胞播種後21日目まで維持されていたが、二次元培養法では7日までに酵素活性の顕著な低下が認められた。

核内受容体

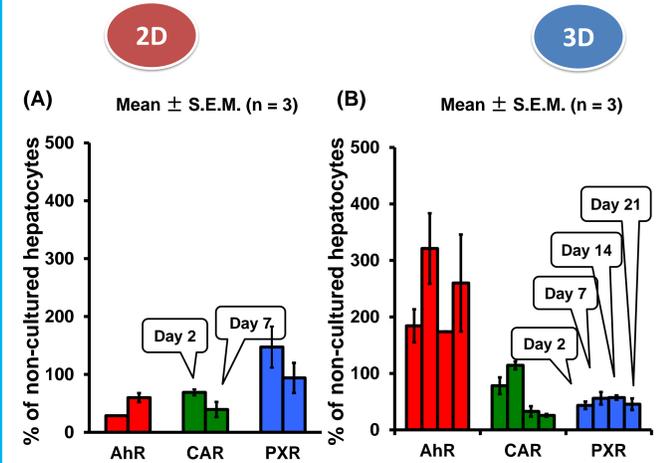


Fig.2 Gene expression levels of nuclear receptors in 2D-(A) and 3D-cultured(B) human hepatocytes.

核内受容体の遺伝子発現レベルは、三次元培養では21日まで安定的に発現していることが確認された。

代謝酵素誘導

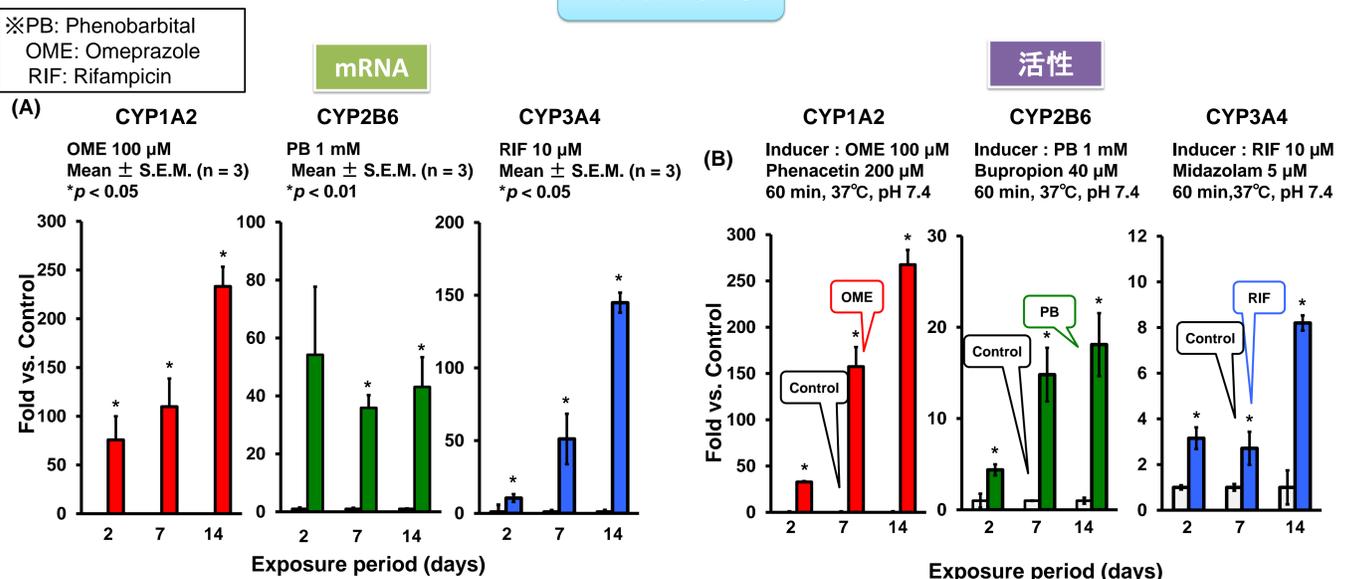


Fig.3(A) Fold induction of mRNA of CYP1A2, 2B6 and 3A4 in 3D-cultured hepatocytes.

Fig.3(B) Fold induction of activity of CYP1A2, 2B6 and 3A4 in 3D-cultured hepatocytes.

各種誘導剤曝露後、CYP1A2, CYP2B6およびCYP3A4のmRNAおよび酵素活性の誘導が観察された。

誘導活性

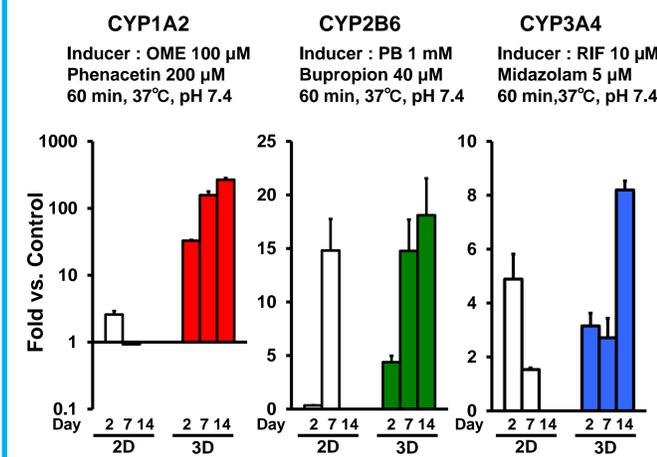


Fig.4 Comparison of induction ability in 2D- and 3D-cultured human hepatocytes.

CYP1A2, CYP2B6およびCYP3A4の誘導活性を比較すると、二次元培養では評価できない酵素活性誘導が三次元培養では検出できることが示唆された。

Conclusion

三次元培養法では従来の二次元培養法では困難であった長期間の細胞維持が可能となり、CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4の長期的かつ安定的な誘導評価が可能であることが示唆された。このことから、従来の二次元培養法よりも、より臨床的条件に近い代謝酵素誘導の予測が可能になると考えられる。