

論 文 概 要

論 文 題 目：

コラーゲンビトリゲルを用いた
新規肝細胞長期培養技術による
薬物のヒト肝クリアランス予測に関する研究

指導教員：

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻
宮本 憲優教授

所 属：筑波大学大学院人間総合科学研究科
疾患制御医学専攻

氏 名：渡 隆爾

目 的:

医薬品候補化合物のヒト肝クリアランス (CL) をより正確に予測するには、生体内の肝臓に匹敵する肝機能を長期間維持できる新しい肝細胞培養法を開発することが重要である。しかし、従来の肝細胞評価系は、薬物代謝酵素として最も重要な cytochrome P450 (CYP) の活性が培養数時間で低下し、かつ数日の短期培養しか行えないという課題があった。そのため、本研究では創薬に活用できる、従来法よりも高い肝代謝能 (機能) を有し、その活性を長期間維持できる新規培養法の開発を目指すことを目的とした。

対象と方法:

新規培養基材であるビトリゲル膜による細胞培養法の構築のため、ヒト肝キメラマウスから単離した新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells) をビトリゲルおよび従来法であるコラーゲンコーティングプレート上に播種し、3 週間の培養を行った。肝特異的機能を評価するために、肝臓で主要な 5 つの CYP 分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、および CYP3A) の活性を、従来の単層培養と新規ビトリゲル培養との間で比較した。また、肝機能の指標であるアルブミン分泌および尿素合成能の評価、また、細胞形態観察も実施した。さらに、肝機能が向上してくる培養 14 日目の状態において、ヒト肝 CL 予測精度の検証を行うため、CYP の典型基質である 22 化合物を用いて、ビトリゲル培養法により得られた *in vitro* ヒト肝 CL とヒト臨床で得られた Nonrenal CL を比較し、予測精度を評価した。加えて、CYP 以外の代謝酵素 (Non-CYP) の基質となる 16 化合物の CL 予測も実施し、その精度を検証した。

結 果:

ビトリゲル膜上に PXB-cells を播種し、3 週間の長期培養過程で、従来法と比較して肝臓で主要な 5 つの CYP 分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、および CYP3A) の代謝活性が培養開始後 14 日~17 日で向上することを見出した。また、肝機能の指標であるアルブミン分泌や尿素合成能も 2 週間の培養において向上していることが示唆された。ただし、2 週間以降の肝機能維持に関しては課題が残った。また、これらの知見を受けて、ビトリゲル膜上で 2 週間培養した後、CYP の典型基質である 22 化合物を用い、ビトリゲル培養法により得られた *in vitro* ヒト肝 CL とヒト臨床で得られた Nonrenal CL を比較し、予測精度を評価した。その結果、検討した化合物の約 80% (18/22) について、*in vivo* との乖離が 3 倍以内であった。加えて、Non-CYP 基質化合物 (16 品) に関しても、予測精度 3 倍以内が約 70%であった。

考 察:

本研究では、PXB-cells を用いたビトリゲル培養法により、肝機能の向上および医薬品候補化合物に対するヒト肝 CL の予測精度を向上させることを目的とした。その結果、ビトリゲル培養法により、CYP 代謝酵素活性を始めとする肝機能の賦活化、さらにヒト肝 CL 予測精度の向上が可能となった。これまでのヒト CL 予測モデルは、肝細胞を 3D 化するスフェロイドや肝細胞と他細胞との共培養システムによる複雑な培養モデルが提示されていた。しかし、これらの培養系と比較して、ビトリゲル培養法は、ビトリゲル膜に肝細胞を播くみの簡便な培養法であり、CYP 活性などの肝機能を 2 週間以上維持でき、かつ、CYP のみならずグルクロン酸抱合酵素などの Non-CYP の基質となる化合物を含め、従来法では評価が難しい低 CL 型化合物の肝 CL の予測が可能な系として構築することができた。本研究により構築したビトリゲル培養法は、非臨床における化合物の最適化に活用中である。

近年の創薬では、代謝安定性の高い低 CL 型化合物や Non-CYP で代謝される薬剤候補が増加している。しかし、このような低 CL 型化合物や Non-CYP の基質になる化合物の CL の予測精度はいまだ低く、医薬品候補の CL 予測精度不足による臨床試験での脱落を減少させるためには、予測精度の高い評価システムが必須となる。そのため、低 CL 型化合物や Non-CYP 化合物の予測を本培養系で可能となったことは、今後の創薬活用にとって意義が高いと考える。

また、ビトリゲル培養は肝機能を長期間維持することができるため、短期培養系では検出が困難なヒト特有の代謝物の検出・同定が期待できる。さらに、ビトリゲル培養システムは、反応性代謝物や長期培養処理による肝毒性の研究にも応用できる可能性が示唆された。

結 論:

ビトリゲル培養法は、CYP 活性を含む肝特異的機能を 2 週間以上維持する優れた培養法であった。また、従来法では算出が難しい低 CL 型化合物の評価や CYP のみならず Non-CYP の基質となる化合物のヒト肝 CL を高精度に予測できる有望な *in vitro* システムであることが明らかになった。ただし、アルブミン分泌の肝機能維持が 3 週間以上は難しいこと、さらに、肝 CL 予測において、高タンパク結合率の化合物や Non-CYP でもアルデヒドオキシダーゼの基質化合物の CL 予測への適応には注意する必要がある。なお、本培養法による肝機能賦活化メカニズムは不明である。よって、どのような機序で代謝活性が維持・向上したかを明らかにすることが今後の肝代謝研究の一助となると考え、今後はメカニズム解明に向けた研究を実施する。加えて、本ビトリゲル培養法を Microphysiological System に適応することにより、より生体を模倣したシステムの開発も期待される。今後もビトリゲル培養法のさらなる創薬活用を検討していきたい。