

博士論文

HepaRG 細胞を用いた
代謝的活性化による肝障害の評価

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

医歯薬学専攻

生体機能分子動態学研究室

平成 25 年度入学 横山 雄一

主指導教員 古武 弥一郎

略号一覽

CYP:	cytochrome P450
UGT:	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase
SULT:	sulfotransferase
GLP:	good laboratory practice
ATP:	adenosine triphosphate
LDH:	lactate dehydrogenase
DMSO:	dimethyl sulfoxide
AFB1:	aflatoxin B1
CPA:	cyclophosphamide
APAP:	acetaminophen
TAM:	tamoxifen
TGZ:	troglitazone
ABT:	1-aminobenzotriazole
GSH:	glutathione
BSO:	L-buthionine-(<i>S</i> , <i>R</i>)-sulfoximine
NAPQI:	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzoquinone imine
SAM:	salicylamide
GAPDH:	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
UPGMA:	unweighted pair group method with arithmetic mean

目次

【略語一覧】

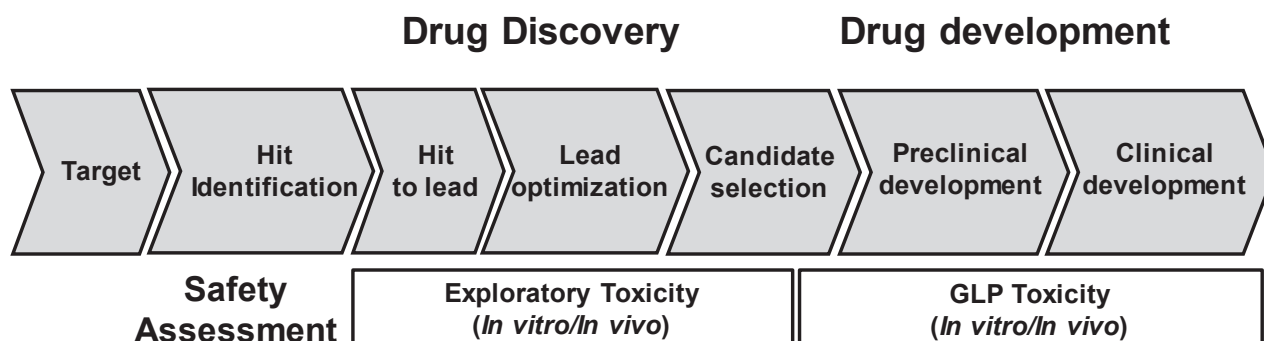
1. 第1章 序論	1
2. 第2章 肝細胞評価系の薬物代謝酵素活性評価	4
2.1 第1節 緒言	4
2.2 第2節 HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性評価	4
2.2.1 第1項 HepaRG 細胞の分化培養条件	4
2.2.2 第2項 分化した HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性評価	7
2.3 第3節 ヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞の薬物代謝酵素活性評価	7
2.4 第4節 ヒト凍結肝細胞の薬物代謝酵素活性評価	8
2.5 第5節 小括	9
3. 第3章 肝毒性物質を用いた細胞毒性評価	11
3.1 第1節 緒言	11
3.2 第2節 ヒト凍結肝細胞を用いた細胞毒性評価	12
3.3 第3節 HepaRG 細胞を用いた細胞毒性評価	13
3.4 第4節 小括	14
4. 第4章 肝毒性物質を用いた網羅的遺伝子発現変動解析	16
4.1 第1節 緒言	16
4.2 第2節 HepaRG 細胞及び HepG2 細胞を用いた遺伝子発現解析	17
4.3 第3節 小括	20
5. 第5章 肝毒性物質の代謝物による毒性発現評価	21
5.1 第1節 緒言	21
5.2 第2節 細胞毒性発現に対する CYP による代謝の影響	22
5.2.1 第1項 ヒト凍結肝細胞を用いた細胞毒性評価	22
5.2.2 第2項 HepaRG 細胞を用いた細胞毒性評価	25
5.3 第3節 細胞毒性に対する生体内抗酸化物質 GSH の影響	30
5.4 第4節 アセトアミノフェンの毒性発現に対する代謝物の影響の評価	33
5.5 第5節 小括	37
6. 第6章 考察と総括	38
【実験の部】	42
【引用文献】	51
【本論文の基礎となる原著】	58
【謝辞】	59

1. 第1章 序論

近年、新規創薬標的分子の枯渇により、低分子化合物の創薬が困難になってきていると考えられており、そのため、限られた候補化合物を確度高く創薬・開発することが求められている。医薬品の開発ステージでの開発中止の要因のうち、安全性面での問題が原因となる場合の占める割合が高い (Kola and Landis 2004; Hornberg *et al.*, 2014)。Waring らの報告によると海外大手製薬メーカーを対象とした解析結果で、経口低分子医薬品の開発候補品 812 化合物の中で、上市まで至らずに開発中止となった 605 化合物の内、240 化合物 (約 40%) が非臨床試験での毒性が原因であったとの報告もある (Waring *et al.*, 2015)。薬効面で有望なくつかの開発候補化合物の内、安全性・毒性理由により開発中止となるリスクの少ない化合物を選出するために、創薬の初期段階から毒性のリスクを予測、回避するための評価系が不可欠である。

安全性が問題となり医薬品開発が中止となるケースにおいて、最も主要な原因のひとつに肝障害が挙げられる (Hornberg *et al.*, 2014)。薬剤誘発性肝障害に対する研究は比較的盛んに行われているが、Idiosyncratic (特異体質性) な肝障害など、発現メカニズムが十分解明されていないものもあり、未だ十分とは言えない。

創薬のプロセスは一般的に『ターゲット発掘・ヒット化合物の探索・化合物の最適化・開発候補品の選出・申請に必要な非臨床データの取得』という流れに区切られる。その中で、安全性評価に関しては、化合物最適化・選抜の過程で実施する探索的な毒性試験、開発候補品について実施するレギュラトリーに対応した GLP 毒性試験という過程で行われる (Fig. 1)。探索的な毒性試験では *in vitro* 及び *in vivo* の試験系を用いて、開発候補に選出する化合物の毒性ポテンシャルの把握およびより毒性懸念のない候補品を選出するためのスクリーニングを行い、GLP 毒性試験では、開発候補品の毒性プロファイル・薬効に対する安全域の算出を行うためのデータを取得し、臨床開発を進めていく流れとなる。開発候補品が小動物 (マウス, ラット), 大動物 (イヌ, サル) などを用いた非臨床の毒性試験で肝障害性を示した場合、その毒性発現メカニズムの解析・ヒトへの外挿性の検証を行い、メカニズムに応じた肝障害性回避のためのスクリーニング系の構築、毒性回避化合物の選出という流れで、創薬研究における肝毒性への対応が行われるのが一般的である。この毒性発現メカニズムの解析や、スクリーニング系の構築において、ヒトへの肝障害性を評価するためのヒト肝細胞モデルが必要となる。



Hornberg *et al.*, *Drug Discov Today.*, **19**, 1137–1144 (2014)より一部改変

Figure 1 Process of drug discovery and drug development

ヒト肝臓培養細胞系のゴールドスタンダードとして使用されるのが、ヒト肝細胞である。ヒト肝細胞の中でもヒト新鮮肝細胞、ヒト凍結肝細胞などがある。新鮮肝細胞は入手が容易ではなく創薬研究での使用は難しいが、凍結肝細胞は比較的容易に入手でき、創薬における薬物動態研究、毒性研究に使用されることが多い。ヒト凍結肝細胞はその凍結保存技術の発展に伴い、薬物代謝活性などの機能を維持した状態で入手することが可能になり、代謝活性の高いヒト肝細胞を試験研究に使用できるようになった。しかしながら、ヒト凍結肝細胞はドナーの個体に由来する薬物代謝酵素のロット間差が大きいという欠点がある。またロットによっては一部の代謝酵素活性が低いロットが存在する場合などがあり、創薬研究、特に安定な評価系が必要な初期のスクリーニングなどでは使用しづらいという欠点がある。さらに、播種直後や懸濁状態での使用では薬物代謝能が高いが、毒性評価などの単層培養などの接着状態で試験を行う場合、一晚接着後、代謝活性が著しく低下してしまうなどの課題もある。代謝活性が高く、分子種により活性値に欠損がない、代謝プロファイルの良好なロットも存在するが、そのようなロットは一定の利用者にロットごと包括購入され入手できないなど、有望なロットの安定的な供給も難しい。また、ヒト凍結肝細胞は、比較的高価であり、初期のスクリーニングで細胞を大量に使用する創薬の初期段階では使用が難しいという欠点がある。一方、機能などが均質でロット間差などが少ない細胞として、株化されたセルラインなどが挙げられ、肝細胞についてもヒト肝腫瘍由来細胞株の HepG2 細胞などが汎用性高く使用されている。これらの細胞は比較的培養も容易で、機能なども安定しているため、初期のスクリーニングに使用しやすいという利点があるが、多くの薬物代謝酵素の発現がヒト肝細胞と比較し非常に低いため、ヒトの肝臓の機能の特徴の一つである薬物代謝酵素の影響を十分には評価できない。毒性評価の観点でも、代謝を介した化合物の影響や、代謝物の毒性を過小評価する可能性がある。このように、創薬研究において、ヒトの薬物代謝機能を安定的に有し、毒性のスクリーニングやメカニズム解析に使用できる肝細胞モデルが望まれるが、それぞれの肝細胞モデルには課題がある。

HepaRG 細胞は 2002 年に Gripon らより樹立・報告されたヒト肝腫瘍由来の細胞株であるが (Gripon *et al.*, 2002), DMSO 及び hydrocortisone などの代表的な分化誘導剤が含まれる特殊な培地を用いた培養条件で一定期間培養し分化させると, 肝細胞様の形態を示す細胞と胆管上皮様の形態を示す 2 つの形態をもつ細胞の共培養系の状態を示すようになる. このように分化された HepaRG 細胞は形態のみならず, 肝臓に特異的な albumin, aldolase B などの発現に加え, 毛細胆管の発現が認められるなどの, 各種肝臓機能をヒト肝細胞と同様に反映したプロファイルを示す (Gripon *et al.*, 2002; Parent *et al.*, 2004). また, HepaRG 細胞は分化させることで, 肝薬物代謝酵素が, ヒト肝細胞と同等レベルに発現している細胞系であることが知られている (Gripon *et al.*, 2002; Guillouzo *et al.*, 2007; Aninat *et al.*, 2006). これらのことから HepaRG 細胞は薬物動態研究や毒性研究などでヒト肝細胞の代替として使用できる細胞系として注目され, 創薬研究などに使用されつつある. 実際にこれまで薬物代謝試験での有用性に関する報告 (Kanebratt and Andersson, 2008^(a); Lübberstedt *et al.*, 2011), 薬物相互作用に関わる CYP 誘導, CYP 阻害の評価に関する報告 (Kanebratt and Andersson, 2008^(b); Turpeinen *et al.*, 2009; Anthérieu *et al.*, 2010; Ogasawara *et al.*, 2016), 薬物のクリアランス予測への有用性に関する報告など (Zanelli *et al.*, 2012) 動態研究に関わる報告が多くなされてきている.

HepaRG 細胞を用いた毒性評価に関する研究もいくつかなされてきている (Aninat *et al.*, 2006; Jossé *et al.*, 2008; Gerets *et al.*, 2012). 薬物代謝機能をヒト肝細胞と同等レベル保有していることから, HepG2 細胞などのセルラインと比較し, よりヒト肝細胞に近い毒性評価モデル細胞系としてその有用性が検証されてきているが, その HepaRG 細胞の代謝活性と毒性発現との関係や HepaRG 細胞を用いた代謝的活性化を介した毒性発現機構に関する研究はこれまであまりされてきていない. そこで本研究では, HepaRG 細胞がこれら代謝的活性化を介して発現する肝障害性を検出・評価できる系であるかという観点で, HepaRG 細胞の細胞毒性評価系としての有用性に関する研究を行った.

2. 第2章 肝細胞評価系の薬物代謝酵素活性評価

2.1 第1節 緒言

HepaRG 細胞は分化させることでヒト肝細胞並みに薬物代謝酵素活性を有していることが知られる (Lübberstedt *et al.*, 2011). また株化された細胞であるためヒト肝細胞と比較し、ロット間差が少ないことが期待されるが、HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性について複数ロット比較して活性を評価している報告は少ない. 本章では HepaRG の分化・培養後の代表的な薬物代謝酵素活性の評価を行い、ヒト凍結肝細胞及び代表的な肝細胞の株化細胞である HepG2 細胞の代謝活性と比較した.

2.2 第2節 HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性評価

2.2.1 第1項 HepaRG 細胞の分化培養条件

HepaRG 細胞は播種後、専用の培地 (HepaRG[®] MAINTENANCE/METABOLISM MEDIUM 620) で培養後 4 日~7 日で薬物代謝能が上昇し、14 日後まで活性が維持され、試験に使用できるが (Manufacture protocol 参照), 本研究での HepaRG 細胞の培養条件を確認するため、播種後の形態観察及び薬物代謝酵素活性の測定を行った (Fig. 2-1).

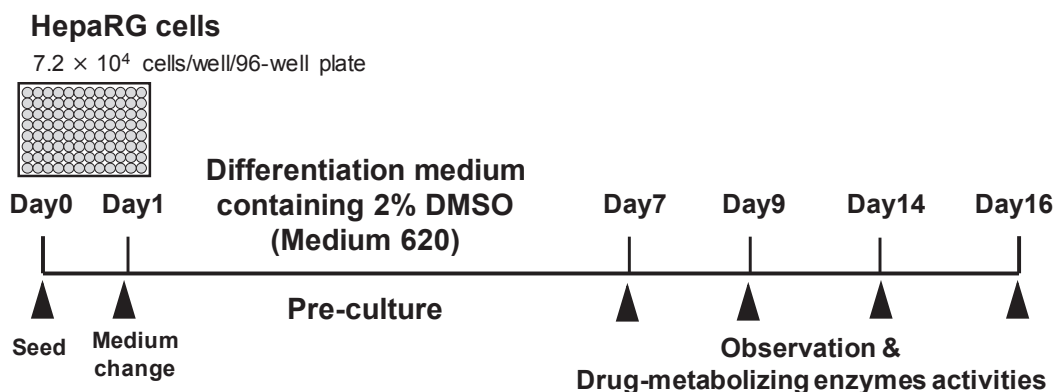
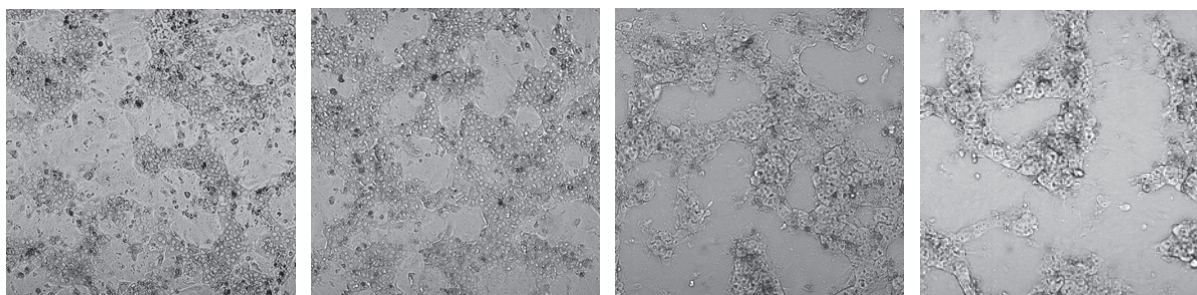


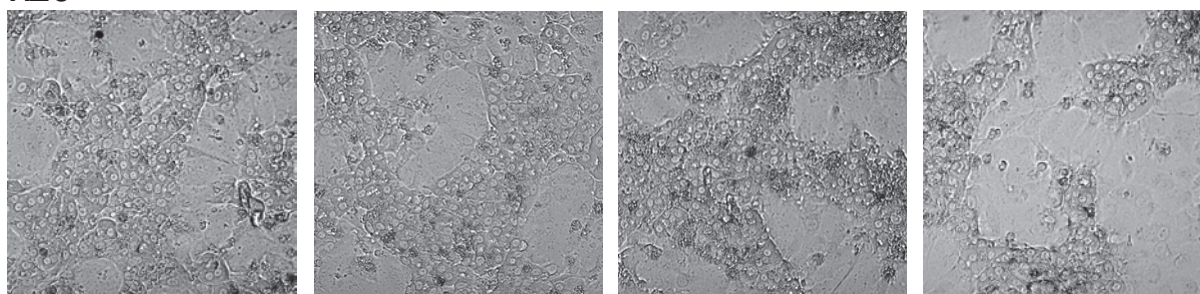
Figure 2-1 Differentiation of HepaRG cells and the determination of drug-metabolizing enzymes activities in the differentiated HepaRG cells.

その結果, HepaRG は Day7 で肝細胞様を示す細胞及び胆管上皮様を示す細胞の共培養系のような形態が観察され (Fig. 2-2), 既報の通りであった (Gripon *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2012). また経時的に, より肝細胞様形態を示す細胞が接近, 凝集している様子が観察された. 各種薬物代謝酵素活性測定の結果から, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 活性については経時的に上昇することが確認された. CYP2C9, UGT, SULT については Day7 で最も高く, Day16 までに徐々に低下傾向が認められた (Fig. 2-3, Table 2-1). このように経時的に活性値の変動が認められたが, ヒト凍結肝細胞 (3 ロット) の薬物代謝酵素活性 (第2章, 第3節) と比較したところ, 分化培養 Day7 の活性値は, ヒト凍結肝細胞の活性値と同等以上であったため, 播種後分化 Day7 の条件を以降の試験系に使用する分化条件とした.

x10



x20



Day 7

Day 9

Day 14

Day 16

Figure 2-2 Observation of morphology of differentiated HepaRG cells.

Table 2-1 Drug-metabolizing enzymes activities in the differentiated HepaRG cells

Cell	Time point*	Drug-metabolizing enzyme activity (pmol·min ⁻¹ ·mg protein ⁻¹)							
		Mean ± SD							
		CYP1A2	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4	UGT	SULT
HepaRG	Day 7	7.65 ± 0.41	10.6 ± 2.3	3.79 ± 0.16	2.73 ± 0.39	2.33 ± 0.33	131 ± 15	1644 ± 24	20.5 ± 0.8
	Day 9	8.99 ± 0.70	11.8 ± 1.4	3.07 ± 0.10	3.02 ± 0.18	3.71 ± 0.06	222 ± 19	1827 ± 17	22.2 ± 1.3
	Day 14	11.5 ± 0.8	18.1 ± 1.5	2.52 ± 0.38	4.96 ± 0.43	3.71 ± 0.34	216 ± 4	1477 ± 44	18.3 ± 0.3
	Day 16	10.7 ± 0.6	21.5 ± 1.6	2.59 ± 0.29	5.19 ± 0.20	3.78 ± 0.05	234 ± 25	1287 ± 71	17.6 ± 0.8

CYP1A2: Phenacetin-*O*-deethylase, CYP2B6: Bupropion hydroxylase, CYP2C9: Diclofenac 4-hydroxylase, CYP2C19: Mephenytoin 4'-hydroxylase, CYP2D6: Bufuralol 1-hydroxylase, CYP3A4: Midazolam 1'-hydroxylase, UGT: 7-hydroxycoumarin glucuronidation, SULT: 7-hydroxycoumarin sulfation.

*: The day thawing and seeding was count as Day 0

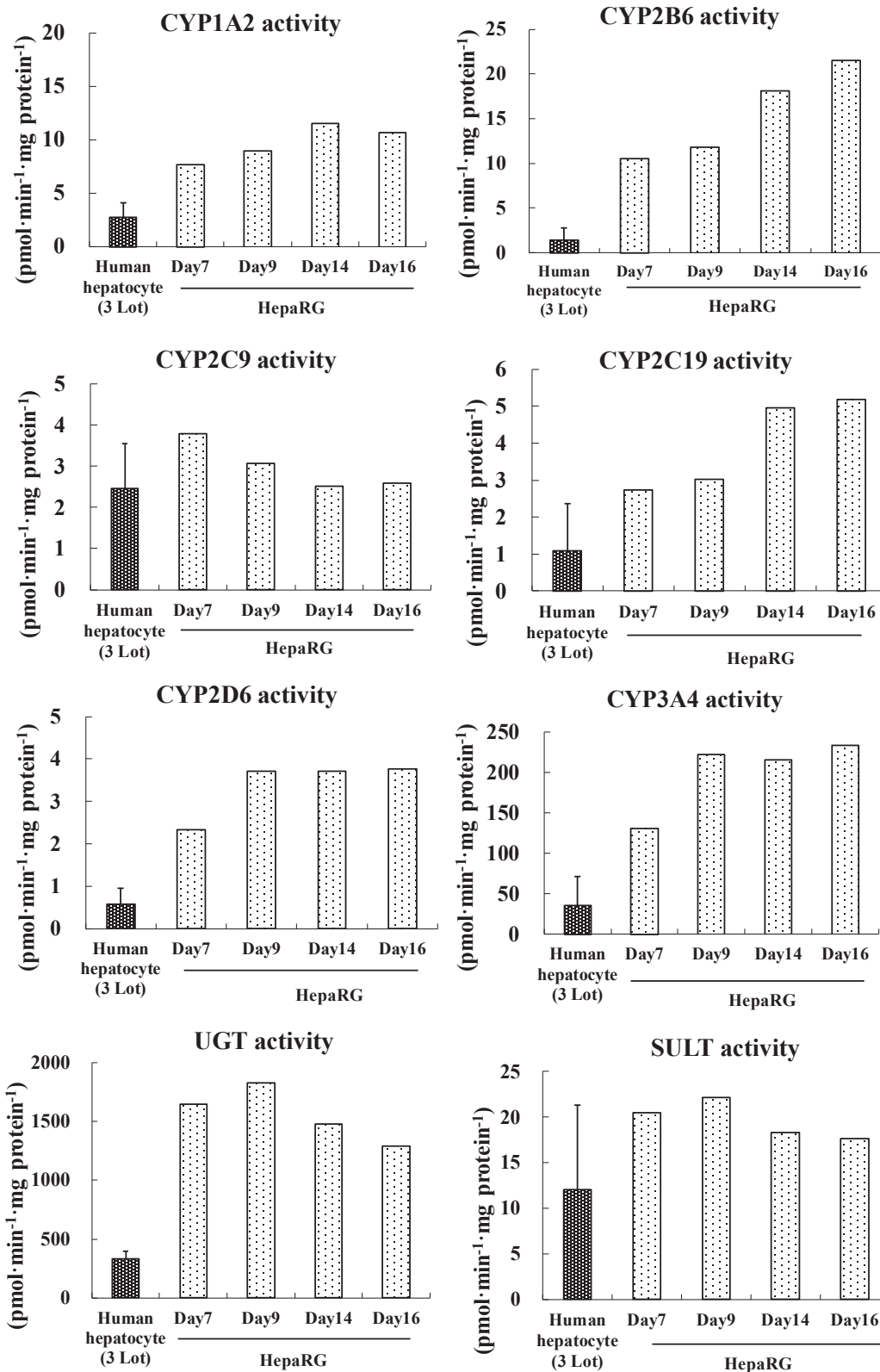


Figure 2-3 Determination of drug-metabolizing enzymes activities at the several time points of differentiation duration in HepaRG cells, and the comparison of those activities in human hepatocyte of 3 donors

2.2.2 第2項 分化した HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性評価

2.2.1 で分化条件として設定した播種後前培養 Day7 の HepaRG 細胞 3 ロットについて、薬物代謝酵素活性を測定した。その結果、確認したすべての分子種について活性が認められ、欠損しているものは認められなかった。活性値のロット間差も最大でも CYP2B6, CYP2C19 における約 5 倍程度であり、大きなロット間差は認められなかった (Table 2-2)。

Table 2-2 Drug-metabolizing enzymes activities in the differentiated HepaRG cells

Cell	Lot No.	Drug metabolizing enzyme activity (pmol·min ⁻¹ ·mg protein ⁻¹)							
		Mean ± SD							
		CYP1A2	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4	UGT	SULT
HepaRG	HPR116062	7.65 ± 0.41	10.6 ± 2.3	3.79 ± 0.16	2.73 ± 0.39	2.33 ± 0.33	131 ± 15	1644 ± 24	20.5 ± 0.8
	HPR116150	8.33 ± 1.23	34.4 ± 2.8	19.4 ± 4.9	6.21 ± 0.31	3.34 ± 0.48	114 ± 20	1962 ± 121	61.4 ± 2.3
	HPR116169	10.2 ± 1.9	50.7 ± 3.9	12.5 ± 2.8	10.3 ± 0.9	2.21 ± 0.39	69.6 ± 11.9	2254 ± 253	61.8 ± 7.5

CYP1A2: Phenacetin-*O*-deethylase, CYP2B6: Bupropion hydroxylase, CYP2C9: Diclofenac 4-hydroxylase, CYP2C19: Mephenytoin 4'-hydroxylase, CYP2D6: Bufuralol 1-hydroxylase, CYP3A4: Midazolam 1'-hydroxylase, UGT: 7-hydroxycoumarin glucuronidation, SULT: 7-hydroxycoumarin sulfation.

2.3 第3節 ヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞の薬物代謝酵素活性評価

分化後の HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性と比較するため、ヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞の薬物代謝酵素活性を測定した。その結果、確認したほとんどの薬物代謝酵素活性について検出下限以下であった。ほとんど活性値の認められなかった Phase I 酵素と比較し、Phase II 酵素である、UGT, SULT に関しては活性値が認められ、これらのプロファイルは過去の報告 (Wilkening *et al.*, 2003) による発現量と同様のプロファイルであった (Table 2-3)。

Table 2-3 Drug-metabolizing enzymes activities in the HepG2 cells

Cell	Drug metabolizing enzyme activity (pmol·min ⁻¹ ·mg protein ⁻¹)							
	Mean ± SD							
	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4	UGT	SULT
HepG2	ND	ND	ND	ND	0.0150 ± 0.0101	0.225 ± 0.047	33.7 ± 5.1	20.8 ± 4.8

CYP1A2: Phenacetin-*O*-deethylase, CYP2B6: Bupropion hydroxylase, CYP2C9: Diclofenac 4-hydroxylase, CYP2C19: Mephenytoin 4'-hydroxylase, CYP2D6: Bufuralol 1-hydroxylase, CYP3A4: Midazolam 1'-hydroxylase, UGT: 7-hydroxycoumarin glucuronidation, SULT: 7-hydroxycoumarin sulfation.
 ND: Not detected

2.4 第4節 ヒト凍結肝細胞の薬物代謝酵素活性評価

分化後のHepaRG細胞の薬物代謝酵素活性と比較するため、ヒト肝細胞の薬物代謝酵素活性を測定した。ヒト肝細胞として、個別別のヒト凍結肝細胞(Cryopreserved Human Hepatocyte, Plateable, BioreclamationIVT社)を3ロット(3ドナー)を使用した。凍結肝細胞を播種、一晚接着後、薬物代謝酵素活性を測定した。凍結肝細胞は、融解・播種直後は最も薬物代謝酵素活性が高く、播種後時間経過に伴い、活性値が低下することが一般的に知られているが、本測定では、凍結肝細胞を用いた細胞毒性評価のアッセイデザインと合わせ、播種・一晚接着後、薬物曝露を開始するタイミングで活性を評価した。その結果、播種一晚接着後も薬物代謝酵素活性は認められたが、ロットSHMに関してはCYP2B6, CYP2C19については検出下限以下であった。またCYP3A4についても、最も活性の高かったロットYEMと比較し、約200倍程度活性値が低いという結果であった。この結果は添付のデータシート(Certificate of analysis)と同様の傾向であり、ドナーの個体に由来する活性値の差であることが示唆された(Table 2-4)。

Table 2-4 Drug-metabolizing enzymes activities in the cryopreserved human hepatocytes

Cell	Lot No.	Drug metabolizing enzyme activity (pmol·min ⁻¹ ·mg protein ⁻¹)							
		Mean ± SD							
		CYP1A2	CYP2B6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4	UGT	SULT
CHHs	SHM	2.06 ± 1.31	ND	1.81 ± 0.40	ND	0.178 ± 0.038	0.349 ± 0.132	255 ± 94	22.7 ± 6.4
	CPQ	1.94 ± 0.44	1.66 ± 0.34	1.84 ± 0.33	2.49 ± 0.59	0.908 ± 0.149	33.7 ± 5.7	391 ± 76	7.12 ± 1.02
	YEM	4.34 ± 1.05	2.61 ± 0.68	3.72 ± 0.65	0.788 ± 0.185	0.660 ± 0.175	72.6 ± 16.7	342 ± 62	6.24 ± 1.31

CYP1A2: Phenacetin-*O*-deethylase, CYP2B6: Bupropion hydroxylase, CYP2C9: Diclofenac 4-hydroxylase, CYP2C19: Mephenytoin 4'-hydroxylase, CYP2D6: Bufuralol 1-hydroxylase, CYP3A4: Midazolam 1'-hydroxylase, UGT: 7-hydroxycoumarin glucuronidation, SULT: 7-hydroxycoumarin sulfation, ND: Not detectable

2.5 第5節 小括

分化した HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性のプロファイルを確認するため、HepaRG, HepG2, ヒト凍結肝細胞の活性値を測定し、比較した (Fig. 2-4). その結果、HepaRG 細胞代謝酵素活性はヒト凍結肝細胞の酵素活性と比較し、確認したすべての分子種について、同等以上の活性であった. このことはヒト初代肝細胞と活性を比較した過去の報告とも一致している (Lübberstedt et al., 2011). またヒト凍結肝細胞は分子種によっては活性が著しく低い、または検出下限以下のロットが認められたが、HepaRG 細胞は確認した分子種のすべてについて活性値を保持しており、今回確認した3ロットについてだけでも、ロット間で活性値について最大 200 倍 (CYP3A4) 程度の差が認められたのに対して、HepaRG 細胞はロット間差が最大でも 5 倍程度 (CYP2B6, CYP2C19) であった. 薬物代謝酵素活性のロット間差が比較的少なく、肝細胞評価系として安定した代謝酵素活性を保有していた.

HepaRG 細胞の CYP2D6 の活性については、報告にあるように、ドナーの個体に由来する poor metabolizer であることが知られているが (Gripon et al., 2002; Guillouzo et al., 2007), 今回の HepaRG 細胞の活性測定の結果では CYP2D6 の基質である Bufuralol の代謝物である 1-hydroxybufuralol の生成は認められ、活性値はヒト凍結肝細胞と同等レベルであった. 今回の測定の結果を細胞数補正した結果は $0.514 - 1.03 \text{ pmol/min/10}^6\text{cells}$ (基質濃度: $5 \text{ }\mu\text{mol/L}$ bufuralol) であった. 同じ基質を用いた報告では約 $3.0 \text{ pmol/min/10}^6\text{cells}$ (基質濃度: $25 \text{ }\mu\text{mol/L}$ bufuralol) という結果であり (Lübberstedt et al., 2011), 基質濃度の違いを考慮すると、今回の HepaRG 細胞の結果は当該報告と同等レベルの活性であると思われる. また同報告では確認したヒト初代肝細胞と HepaRG 細胞の Bufuralol 水酸化活性は同等レベルであったと報告している.

HepG2 細胞について測定した代謝酵素活性の結果からは、既報の通り (Wilkening et al., 2003; Westerink et al., 2007^(a); Westerink et al., 2007^(b)), SULT の活性については、ヒト凍結肝細胞と同等レベルの活性を保有していたが、ほとんどの分子種の薬物代謝酵素についてはヒト凍結肝細胞と比較し、活性が著しく低いまたは、検出下限以下であった. HepG2 に比べて HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性は十分に高く、HepaRG 細胞は肝臓の特徴的な機能である薬物代謝酵素活性を十分に保有している肝株化細胞として HepG2 より有用であることが示唆された.

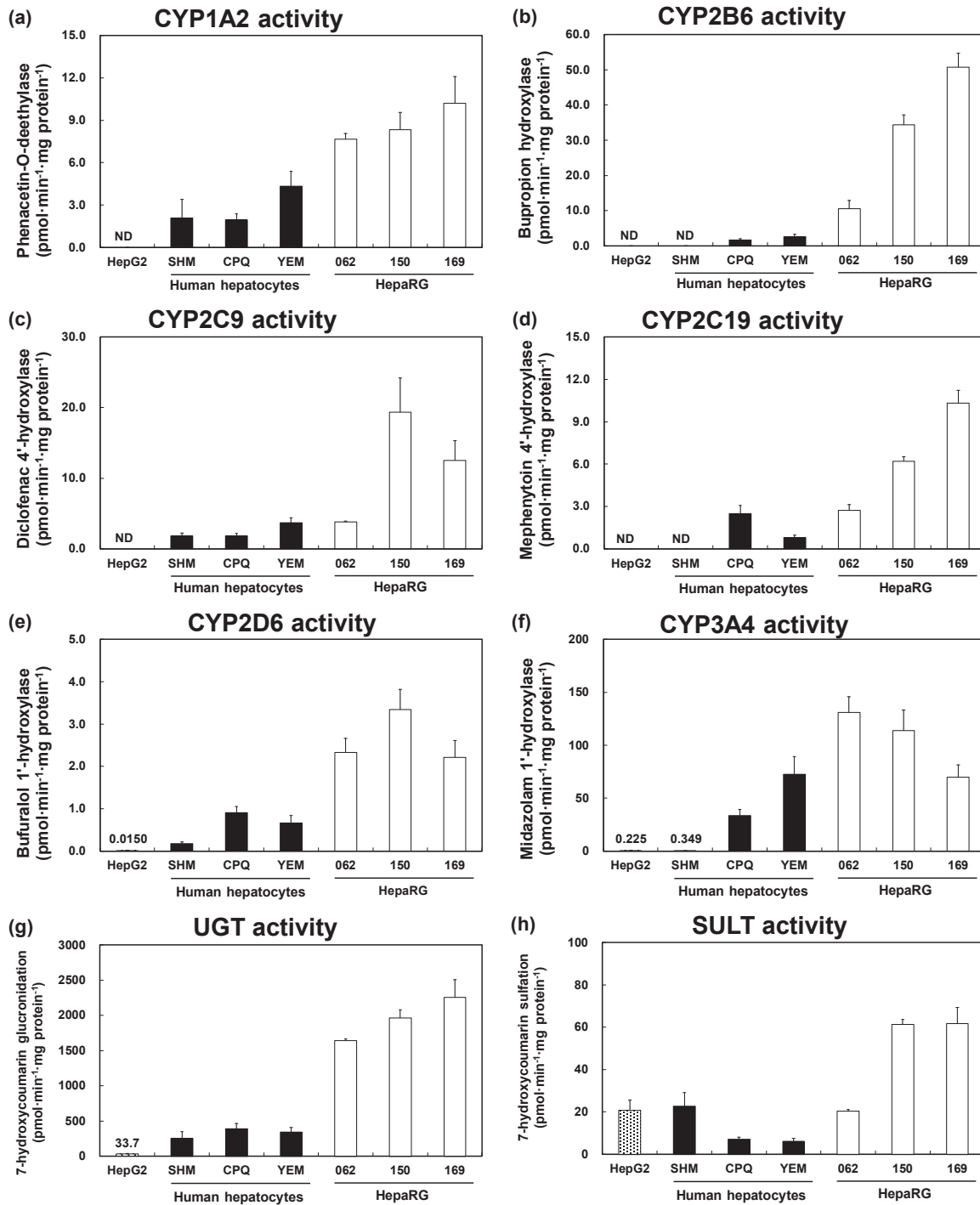


Figure 2-4 Comparison of drug metabolizing enzyme activities in HepG2 cells, cryopreserved human hepatocytes, and HepaRG cells.

Three different lots of CHHs (Lot. SHM, CPQ, and YEM) and HepaRG cells (Lot. HPR116062, HPR116150, and HPR116169) were examined. Results of HepG2 cell analysis: gray bars are means \pm standard deviation (S.D., $n = 8$). Results of CHHs: black bars are means \pm S.D.; Lot. SHM: $n=6$, CPQ: $n=3$, YEM: $n=6$. Results of HepaRG cells: white bars are means \pm S.D., Lot. HPR116062, $n=3$; HPR116150, $n=6$; HPR116169: $n=5$. ND: Not detectable

3. 第3章 肝毒性物質を用いた細胞毒性評価

3.1 第1節 緒言

分化した HepaRG 細胞はヒト肝細胞と同等レベルの薬物代謝能を保有していることが示されたが、この HepaRG 細胞が肝毒性物質の肝障害性を評価するヒト肝細胞評価系として有用であるかを検討するため、5 つの代表的な肝毒性物質を用いて細胞毒性の評価を行い、その細胞障害性をヒト凍結肝細胞と比較した。肝毒性物質として用いた 5 つの化合物（Aflatoxin B1, Cyclophosphamide, Acetaminophen, Troglitazone, Tamoxifen）は、CYP による代謝的活性化によって毒性発現することが知られている。

3.2 第2節 ヒト凍結肝細胞を用いた細胞毒性評価

分化した HepaRG 細胞はヒト肝細胞と同等レベルの薬物代謝能を保有していることが示されたが、この HepaRG 細胞が肝毒性物質の肝障害性を評価するヒト肝細胞評価系として有用であるかを検討するため、ヒト凍結肝細胞を用いて肝毒性物質による細胞毒性評価を行った。ヒト凍結肝細胞は第2章、第4節で薬物代謝酵素活性を評価したヒト凍結肝細胞（Cryopreserved Human Hepatocyte, Plateable, BioreclamationIVT社）を3ロット（3ドナー）使用した。化合物を曝露し48時間後に細胞障害性を評価した。細胞障害性の評価にはATPアッセイ（CellTiter-Glo™, Promega）を用いた。

その結果をTable 3-1に示す。AFB1, CPA, TAMについてはどのロットの凍結肝細胞に対しても濃度依存的な細胞障害性が認められた。APAPについては、ロットCPQについてのみ、最高濃度の10000 µmol/Lにおいて細胞障害性がわずかに確認されたが（Cell viability: 91.6%）、2ロットについては今回評価した最高濃度まで細胞障害性は認められなかった。TGZについては、3ロットとも今回評価した最高濃度100 µmol/Lまで細胞障害性は認められなかった。

Table 3-1 Results of cytotoxicity assays of five hepatotoxicants in cryopreserved human hepatocytes

Compound	Conc. (µmol/L)	Lot. SHM			Lot. CPQ			Lot. YEM		
		Cell viability (% of control)		IC ₅₀ (µmol/L)	Cell viability (% of control)		IC ₅₀ (µmol/L)	Cell viability (% of control)		IC ₅₀ (µmol/L)
		Mean	S.D.		Mean	S.D.		Mean	S.D.	
AFB1	0	100.0	2.6	7.8	100.0	2.4	≈20	100.0	2.4	4.7
	0.2	117.5	2.8		-	-		-	-	
	0.6	122.7	3.4		112.7	1.5		107.9	2.3	
	2	120.0	3.7		118.7	1.1		89.1	2.6	
	6	85.3	2.6		82.7	2.5		38.1	1.5	
	20	18.4	1.1		59.4	3.3		6.2	0.7	
CPA	0	100.0	2.0	>25,000	100.0	1.0	>25,000	100.0	1.3	≈25,000
	250	100.1	2.1		-	-		-	-	
	750	101.3	1.9		96.9	0.4		101.3	1.8	
	2,500	105.3	0.8		98.0	1.8		99.4	1.0	
	7,500	107.7	1.9		94.9	1.4		93.5	2.7	
	25,000	79.8	1.1		91.2	1.8		50.4	2.0	
APAP	0	100.0	3.4	>10,000	100.0	2.4	>10,000	100.0	2.2	>10,000
	100	100.6	3.2		-	-		-	-	
	300	102.1	2.2		94.6	3.0		101.8	2.9	
	1,000	102.0	1.3		94.1	4.0		99.2	2.6	
	3,000	103.5	1.2		90.1	4.9		94.9	3.5	
	10,000	98.6	0.8		91.6	0.2		104.9	9.8	
TGZ	0	100.0	3.5	>100	100.0	1.6	>100	100.0	4.3	>100
	1	100.5	1.0		-	-		-	-	
	3	100.4	1.4		103.2	3.3		107.0	2.1	
	10	98.8	2.8		103.8	4.2		107.8	1.0	
	30	95.0	1.6		102.9	2.1		102.8	3.9	
	100	96.4	0.8		99.1	1.3		98.0	2.6	
TAM	0	100.0	3.1	40.3	100.0	0.8	54.4	100.0	0.3	60.9
	1	100.0	1.6		-	-		-	-	
	3	100.4	1.0		94.3	1.5		100.6	2.1	
	10	96.5	2.9		86.3	1.9		97.0	2.5	
	30	67.5	3.7		73.8	3.9		81.8	2.3	
	100	0.2	0.0		0.3	0.0		0.2	0.0	

AFB1: Aflatoxin B1, CPA: Cyclophosphamide, APAP: Acetaminophen, TAM: Tamoxifen, TGZ: Troglitazone, Conc.: Concentration

3.3 第3節 HepaRG 細胞を用いた細胞毒性評価

第3章、第2節でヒト肝細胞への5種の肝毒性物質の細胞毒性を評価したが、同様の肝毒性物質の HepaRG 細胞に対する細胞毒性を評価した。分化した HepaRG 細胞に肝毒性物質（AFB1, CPA, APAP, TGZ, TAM）を曝露し、48 時間後に細胞障害性を評価した。細胞障害性の指標には ATP アッセイを用いた。使用したロットは薬物代謝活性がどのロットも同等レベルであったので、任意の1ロット（HPR116150）を使用した。

その結果を Table 3-2 に示す。すべての化合物について濃度依存的に細胞障害性が確認された。細胞毒性の IC₅₀ が算出された化合物が AFB1（IC₅₀=5.0 μmol/L）、TGZ（IC₅₀=80.0 μmol/L）、TAM（IC₅₀=15.8 μmol/L）であり、CPA と APAP については IC₅₀ が算出されなかったが、最高濃度の細胞毒性がそれぞれ CPA については 25000 μmol/L で 56.7%、APAP について 10000 μmol/L で 75.4% であり細胞障害性が確認された。

Table 3-2 Results of cytotoxicity assays of five hepatotoxicants in HepaRG Cells

Compound	Conc. (μmol/L)	Lot. HPR116150		IC ₅₀ (μmol/L)
		Cell viability (% of control)		
		Mean	S.D.	
AFB1	0	100.0	2.3	5.0
	0.2	96.7	3.3	
	0.6	87.3	3.9	
	2	76.4	3.1	
	6	43.7	1.1	
	20	10.5	0.6	
CPA	0	100.0	3.4	≈25,000
	250	99.1	1.3	
	750	98.9	0.6	
	2,500	99.3	1.6	
	7,500	95.9	2.4	
	25,000	56.7	1.1	
APAP	0	100.0	1.5	>10,000
	100	97.4	3.2	
	300	97.7	2.6	
	1,000	96.1	3.6	
	3,000	95.8	4.6	
	10,000	75.4	2.0	
TGZ	0	100.0	1.6	80.0
	1	98.8	1.6	
	3	98.7	1.3	
	10	98.1	2.1	
	30	96.4	1.0	
	100	0.3	0.0	
TAM	0	100.0	3.1	15.8
	1	100.5	0.4	
	3	98.0	0.5	
	10	98.0	1.1	
	30	0.3	0.0	
	100	0.1	0.0	

AFB1: Aflatoxin B1, CPA: Cyclophosphamide, APAP: Acetaminophen, TAM: Tamoxifen, TGZ: Troglitazone, Conc.: Concentration.

3.4 第4節 小括

HepaRG 細胞の肝毒性評価系としての有用性を確認するため、代謝的活性化により毒性を発現することが知られる 5 種の肝毒性物質について、HepaRG 細胞を用いて細胞毒性を評価し、ヒト凍結肝細胞の毒性の感受性と比較した (Fig. 3). その結果、AFB1 については HepaRG 細胞 $IC_{50}=5.0 \mu\text{mol/L}$ 、ヒト凍結肝細胞 (3 ロット) では $IC_{50}=4.7 \mu\text{mol/L}$ ~約 $20 \mu\text{mol/L}$ とヒト凍結肝細胞の感受性とほぼ同等であった。ヒト凍結肝細胞の中で最も AFB1 への感受性が高かったロット YEM は AFB1 の毒性に関係することで知られる代謝物 AFB1-8,9-epoxide 体の生成に関与する代謝酵素 CYP1A2, CYP3A4 の活性が最も高いロットであり、HepaRG 細胞も同等の代謝活性であり、細胞毒性の感受性も最も近しかった。CPA も最も代謝活性が高かったロット YEM で細胞毒性が高く、HepaRG 細胞と最も細胞毒性の感受性が近しかった。最もヒト凍結肝細胞と HepaRG 細胞で感受性が異なったのは TGZ への感受性の違いであり、ヒト凍結肝細胞では 3 ロットとも最高濃度の $100 \mu\text{mol/L}$ で細胞障害性が認められなかったのに対して、HepaRG 細胞では $100 \mu\text{mol/L}$ で Cell viability 0.3%とほとんど死滅しているという結果であった ($IC_{50}=80 \mu\text{mol/L}$)。この結果は再現性を確認しても同様の結果となり、この結果の違いについて詳細の検討は未実施ではあるが、HepaRG 細胞は SULT の代謝活性が高く、TGZ は毒性発現に、CYP による代謝活性化のみならず、硫酸抱合体の細胞毒性も知られるため (Funk *et al.*, 2001; Saha *et al.*, 2010)、その影響の可能性も示唆された。これらのことから、確認した 5 つの肝毒性物質について HepaRG 細胞はヒト凍結肝と同等以上の細胞毒性の感受性を有していることが明らかとなった。

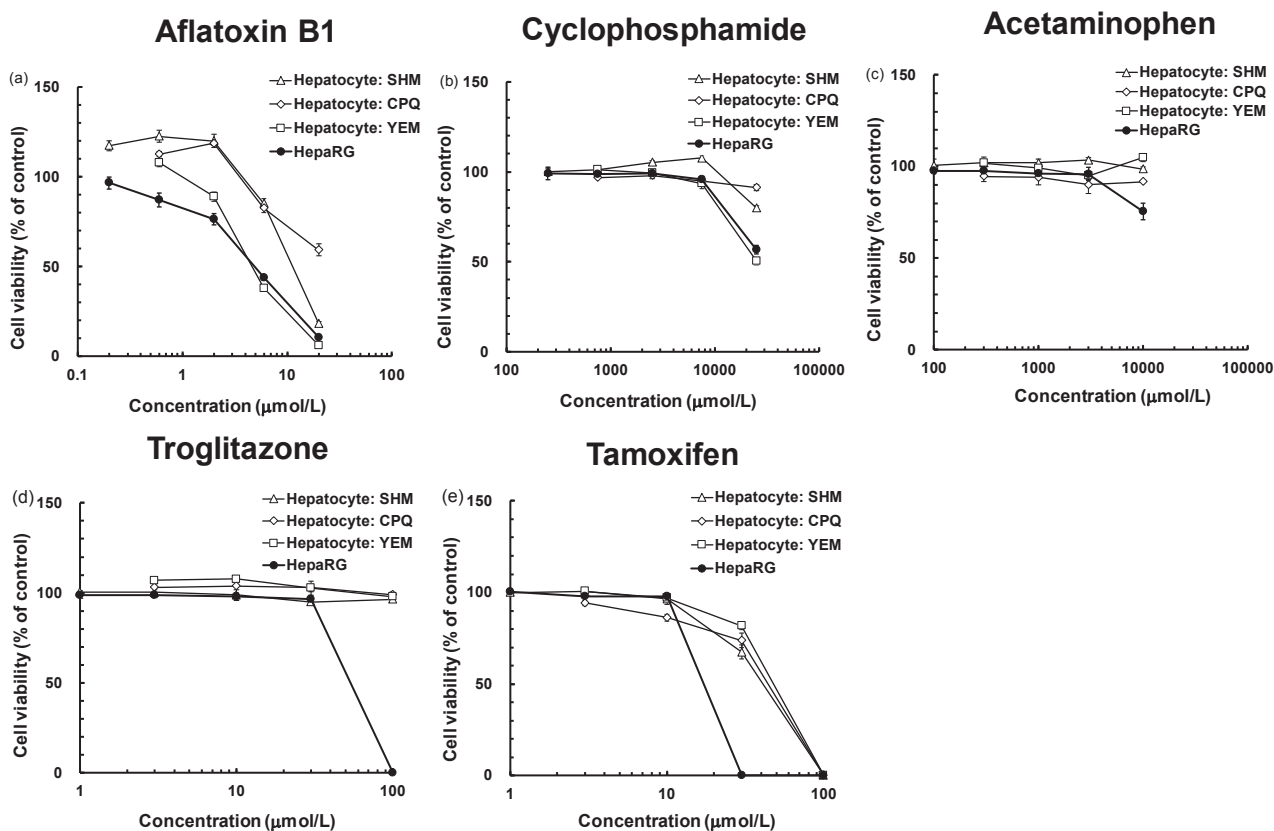


Figure 3 Cytotoxicity of hepatotoxicants in cryopreserved human hepatocytes and HepaRG cells.

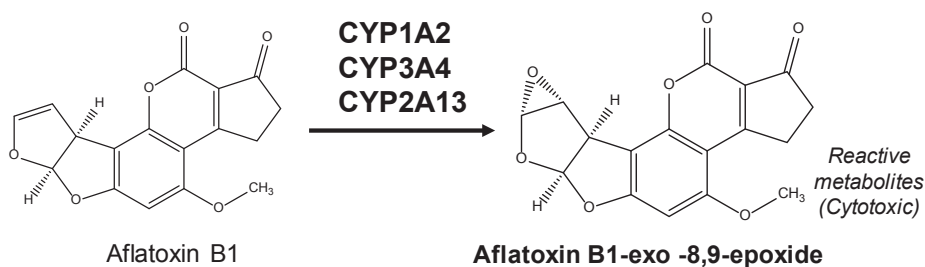
Comparative cytotoxic effects of AFB1, CPA, APAP, TGZ, and TAM on cryopreserved human hepatocytes (CHHs) and HepaRG cells. Results of CHHs are open symbols (Lot. SHM, Lot. CPQ, Lot. YEM). Results of CHHs are closed symbols (Lot. HPR116150). CHHs and HepaRG cells were exposed to test compounds for 48 h. Cell viability was evaluated using CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay. Results are normalized to control cells levels and expressed as means ± standard deviation (S.D., n=3 cultures). The Figure 3 shows the summarized results of Table 3-1 and Table 3-2.

4. 第4章 肝毒性物質を用いた網羅的遺伝子発現変動解析

4.1 第1節 緒言

肝毒性の毒性発現の機序解明の手法の一つとして網羅的遺伝子発現変動解析などの手法が用いられる。化合物を曝露することにより変動する遺伝子を網羅的に解析し、*up-regulate* 又は *down-regulate* している遺伝子を抽出し、活性化又は抑制されている遺伝子群・パスウェイを解析し、毒性発現に関係しているメカニズムを推定する手法である。このような手法で肝毒性発現機序解析を *in vitro* の試験系で行う場合、有用な肝細胞モデル試験系が必要となる。これまで HepG2 などの株化された肝がん細胞はロット間差等を考慮する必要がなく汎用性高く用いられてきたが、薬物代謝能が低く、肝臓の代謝を反映された系として不十分である。そこで本章では HepaRG 細胞が網羅的遺伝子発現変動解析の手法を用いて、肝毒性物質のメカニズム解析に使用することができる評価系であるかの検討を行った。肝毒性物質として細胞毒性評価を行った化合物のうち、CYP1A2, CYP3A4 等により代謝され生成する epoxide 体が毒性を示す AFB1, CYP2B6, CYP3A4 等により生成する 4-hydroxy 体が、acrolen などのより細胞障害性のある代謝物が生成することが知られている CPA を評価化合物として使用した (Fig. 4-1)。

(a): Aflatoxin B1



(b): Cyclophosphamide

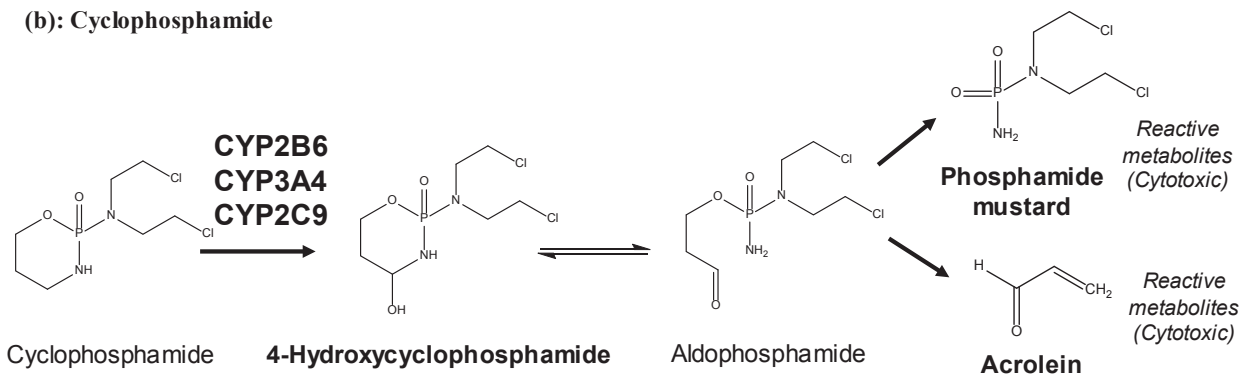


Figure 4-1 Metabolic pathway of aflatoxin B1 and cyclophosphamide and the toxic metabolites

4.2 第2節 HepaRG 細胞及び HepG2 細胞を用いた遺伝子発現解析

分化させた HepaRG 細胞及び、肝毒性物質 AFB1 又は CPA を 24 時間曝露後、細胞を回収し RNA 抽出、GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。対照として、HepG2 細胞を用いた。播種後一晩接着させた HepG2 細胞に AFB1 又は CPA を 24 時間曝露後、同様の方法で網羅的遺伝子発現変動解析を実施した。54675 probe set の遺伝子を対象としたが、化合物起因の変動遺伝子数を Table 4-1 に示す。続いて AFB1 及び CPA の毒性発現に関わることで知られる p53 関連遺伝子について抽出し、化合物曝露による変動結果を Spotfire DecisionSite 9.1.1 (TIBCO Software) を用いて階層的クラスタリング解析を行い、結果をヒートマップで示した (Fig.4-2)。

その結果、AFB1 又は CPA 処理による Control 群に対する変動遺伝子数は、2 倍または 0.5 倍を threshold とした場合 HepG2 細胞と比較してより多くの遺伝子が HepaRG 細胞において変動していた。AFB1 (5.63 $\mu\text{mol/L}$) 処理については、2329 個の遺伝子が fold-change ≥ 2 の変動、1403 個の遺伝子が fold-change < 0.5 の変動を HepaRG 細胞で示した。HepG2 細胞では、同一濃度の AFB1 の処理において、320 個の遺伝子が fold-change ≥ 2 の変動、319 個の遺伝子が fold-change < 0.5 の変動を示した。CPA (10 mmol/L) 処理については、4424 個の遺伝子が fold-change ≥ 2 の変動、2275 個の遺伝子が fold-change < 0.5 の変動を HepaRG 細胞で示した。HepG2 細胞では、同一濃度の CPA の処理において、429 個の遺伝子が fold-change ≥ 2 の変動、518 個の遺伝子が fold-change < 0.5 の変動を示した。p53 関連遺伝子について抽出して解析した結果においても、AFB1、CPA 共に HepaRG において、HepG2 と比較しより多くの p53 関連の遺伝子の変動がより低い濃度で認められるという結果であり、AFB1 及び CPA の曝露により、HepaRG 細胞でより p53 signaling のパスウェイ (Helton *et al.*, 2007; Lukas *et al.*, 2004) が活性化されていた。具体的に変動している遺伝子のプローブを Table 4-2 に抜粋したが、AFB1 処理により HepaRG 細胞では、G1 checkpoint に関連する *CDKN1A* (p21)、*GADD45*、*FBXW7* 及び *BTG2*、Apoptosis signaling に関連する *BAX* 及び *APAF1*、Mismatch repair 関連の *MSH2* 及び *PCNA*、Global genome repair に関係する *XPC* 及び *DDB2*、Homologous recombination に関わる *RAD51*、p53 の分解制御に関わる抑制因子である *MDM2* などの遺伝子が 2 倍以上の上昇を示した。一方 HepG2 細胞では、*BTG2*、*CDKN1A*、*MDM2*、*DDB2*、*GADD45A* のみ変動が確認された。CPA 処理についても同様の傾向で、2 倍以上の上昇の変動を示したものは、HepaRG 細胞では *BTG2*、*CDKN1A*、*FBXW7*、*GADD45A*、*XPC*、*APAF1* などの遺伝子の変動が確認されたが、HepG2 細胞では、抽出した遺伝子のうち変動の傾向は認められたが、fold-change ≥ 2 、 < 0.5 の変動を示す遺伝子は認められなかった。

Table 4-1 Number of up-regulated or down-regulated genes in HepG2 and HepaRG cells after exposure to aflatoxin B1 or cyclophosphamide

Compound		AFB1				CPA	
Concentration		1.41 μ M	2.81 μ M	5.63 μ M	11.25 μ M	10 mM	20 mM
HepG2	2 fold	-	293	320	521	110	429
	0.5 fold	-	109	319	762	196	518
HepaRG	2 fold	1302	1480	2329	-	1632	4424
	0.5 fold	735	1084	1403	-	1373	2275

Number of genes affected by AFB1 or CPA with a threshold fold-change ≥ 2.0 or < 0.5 after 24 h treatment of HepaRG and HepG2 cells is shown. Gene probes with detection call of “P” or “M” were used for analysis.

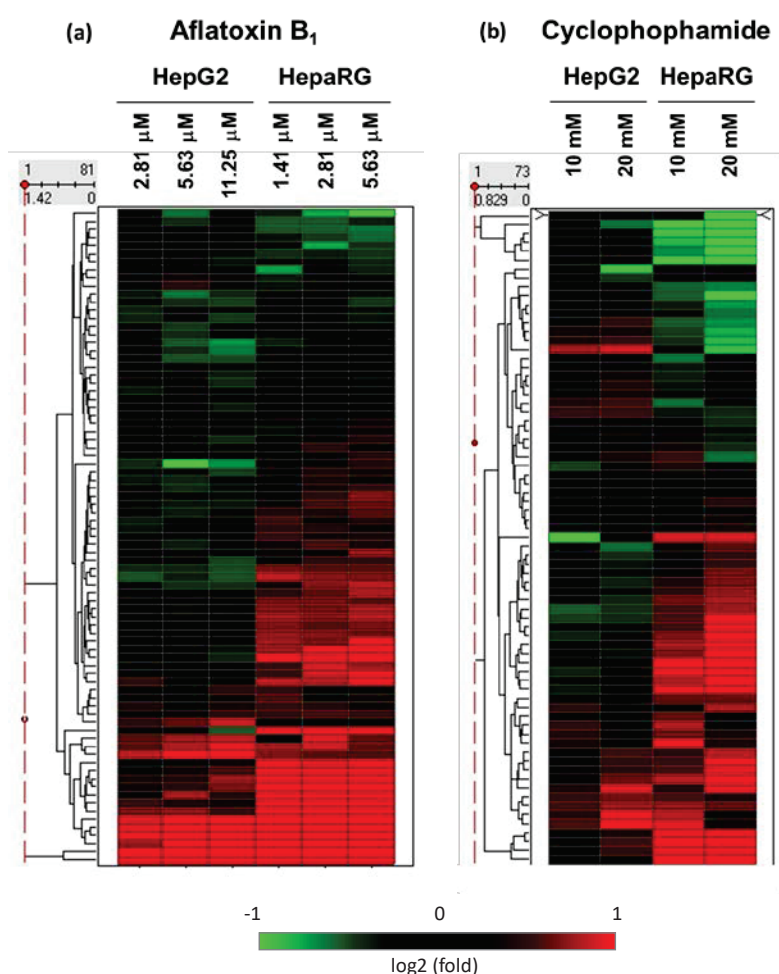


Figure 4-2 Gene expression profiles in p53 signaling pathway in HepG2 and HepaRG cells treated with (a) aflatoxin B1 or (b) cyclophosphamide

Gene expression was visualized as a heatmap by using hierarchical clustering with Spotfire DecisionSite 9.1.1 (TIBCO) using UPGMA method. Gene probes whose detection call was “P” or “M” were used for analysis

Table 4-2 Gene expression changes in p53 signaling pathway after exposure of HepG2 and HepaRG cells to aflatoxin B1 or cyclophosphamide

Probe Set ID	Gene Symbol	HepG2			HepaRG			HepG2		HepaRG	
		AFB1			AFB1			CPA		CPA	
		2.81 μ M	5.63 μ M	11.25 μ M	1.41 μ M	2.81 μ M	5.63 μ M	10 mM	20 mM	10 mM	20 mM
	fold	fold	fold	fold	fold	fold	fold	fold	fold	fold	
204859_s_at	APAF1	1.60	1.51	1.75	1.65	2.22	2.28	1.20	1.11	0.98	0.47
209903_s_at	ATR	1.03	0.89	0.93	1.60	1.49	1.58	1.03	0.96	1.22	0.79
208478_s_at	BAX	1.63	1.45	1.71	2.34	2.60	2.59	0.97	0.81	1.08	0.99
201236_s_at	BTG2	3.37	3.54	5.28	2.89	2.92	3.18	NE	NE	1.90	2.69
202284_s_at	CDKN1A	4.44	5.62	8.12	3.07	3.66	3.37	1.16	1.43	2.56	3.44
203409_at	DDB2	1.77	1.79	2.27	2.04	2.51	2.38	0.98	0.62	0.75	0.54
229419_at	FBXW7	1.19	1.28	1.82	2.26	2.71	3.34	1.19	1.18	1.57	2.92
203725_at	GADD45A	1.76	1.95	2.61	2.58	2.63	3.28	1.42	1.81	2.50	4.97
211040_x_at	GTSE1	0.95	0.75	0.81	1.21	1.28	1.41	1.00	0.73	0.90	0.86
229711_s_at	MDM2	1.94	2.21	2.53	2.34	3.02	3.07	1.46	1.69	1.67	1.54
202520_s_at	MLH1	1.11	1.05	1.08	1.52	1.46	1.42	0.99	0.90	0.92	0.71
209421_at	MSH2	0.94	0.85	0.68	2.54	2.85	3.21	1.13	0.91	NE	NE
209361_s_at	PCBP4	1.06	1.00	1.36	1.39	1.20	1.14	0.95	0.74	1.21	1.41
201202_at	PCNA	0.99	1.25	1.11	2.33	2.51	2.59	0.99	0.93	1.48	1.21
205024_s_at	RAD51	1.20	1.03	0.99	2.36	2.19	2.54	1.22	1.09	NE	NE
201746_at	TP53	1.05	1.01	0.99	1.67	1.63	1.57	0.97	1.07	1.15	1.35
205667_at	WRN	0.72	0.82	0.53	1.26	1.01	0.98	1.30	1.43	1.22	1.59
209375_at	XPC	1.28	1.49	1.69	1.88	2.24	2.88	0.93	1.11	1.70	2.58

Fold-change in gene expression related to p53 signaling pathway in treatment groups relative to control group is shown. Red and blue values represent fold-changes ≥ 2 and < 0.5 , respectively. N.E., not evaluated, because detection call was "A" in one or more samples.

4.3 第3節 小括

本章では、分化させた HepaRG 細胞を用いて、肝毒性物質 AFB1 又は CPA を曝露し、網羅的遺伝子発現変動解析を実施し、その遺伝子変動を HepG2 細胞と比較した。その結果、AFB1 及び CPA の曝露により、HepG2 細胞と比較し、HepaRG 細胞でより多くの遺伝子が発現変動していた。それぞれの肝毒性発現メカニズムと関係することで知られる p53 関連遺伝子についても、HepaRG 細胞でより多く遺伝子が HepG2 細胞と比較し変動していた。AFB1 は CYP1A2, CYP3A4 など代謝的活性化を受けて生成する AFB1 exo-8,9 epoxide 体が毒性を示すことで知られている (McLean *et al.*, 1995; Gallagher *et al.*, 1996)。CPA は CYP2B6, CYP3A4, CYP2C8/9 などにより生成される 4-hydroxy CPA, また最終的に生成する acrolein 及び phosphoramidate mustard などにより毒性を発現することが知られている (Chang *et al.*, 1997; Gut *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2017)。これらの代謝物が DNA 障害を引き起こすことで、DNA damage response である p53 関連遺伝子の変動が引き起こされる (Denissenko *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2008; Boehme *et al.*, 2010)。HepaRG 細胞が HepG2 と比較し、薬物代謝活性が高いことから、これらの DNA 障害を引き起こす代謝物が HepaRG 細胞でより多く生成され DNA 障害を引き起こし、より感度よく p53 関連遺伝子の変動が捉えることができたと考えられる。

5. 第5章 肝毒性物質の代謝物による毒性発現評価

5.1 第1節 緒言

肝毒性の発現には様々な要因が関係していると考えられるが、その中でも肝臓の機能の特徴の一つである薬物代謝酵素により、化合物が肝臓で代謝をうけ生成される代謝物が肝毒性の発現に関することもしばしばある。第2章の検討から、分化した HepaRG 細胞は第I相・第II相代謝酵素ともに確認した分子種については活性をヒト肝細胞並みに保有していた。またこれまでの検討から HepaRG 細胞を用いて肝毒性物質の毒性発現を評価できる細胞系であることが示唆されたが、本章ではその肝障害の発現が代謝を介した毒性発現であるか、代謝物の毒性発現への影響を評価できる試験系であるかという観点で詳細な検討を行った。

5.2 第2節 細胞毒性発現に対する CYP による代謝の影響

5.2.1 第1項 ヒト凍結肝細胞を用いた細胞毒性評価

医薬品の代謝に関わる主な薬物代謝酵素に CYP が挙げられるが、報告によると、代謝によりクリアランスをうける医薬品のうち約70%が CYP で代謝されることが知られている (Yokoi., 2009). そのように医薬品の代謝に寄与の大きい CYP ではあるが、CYP によって生成する代謝物が肝毒性の発現に関与している場合も多い. 第4章, 第3節で述べたように、今回肝毒性物質として使用した AFB1, CPA など CYP により生成する代謝物とその毒性発現に関与していることが知られている. 本節では CYP による代謝活性化により引き起こされる細胞毒性が HepaRG 細胞で検出できるかを検討するため CYP の阻害剤を用いて細胞毒性の発現への影響を評価した.

まずヒト凍結肝細胞を用いて AFB1 及び CPA による細胞毒性への CYP の阻害剤の影響の評価を行った. ヒト凍結肝細胞は第2章, 第3章で使用した同じロットのヒト凍結肝細胞 (Cryopreserved Human Hepatocyte, Plateable, BioreclamationIVT 社) を3ロット (3ドナー) 使用した. CYP の阻害剤としては非特異的な CYP の阻害剤である ABT を用いた. ABT は Mechanism-based inactivator として知られ、自身が CYP で代謝され CYP の活性中心のヘムを N アルキル化することで CYP を分子種非特異的に阻害する阻害剤である (Fig. 5-1) (Ortiz *et al.*, 1981, Paul *et al.*, 1984, and Emoto *et al.*, 2005). 本検討ではヒト凍結肝細胞に AFB1 と CPA と同時に ABT (500 $\mu\text{mol/L}$) を曝露し、48 時間後に細胞障害性を評価した. なお、本 ABT の条件は既報告 (Ogimura *et al.*, 2011) で使用された条件を用いたが、CYP が十分に阻害されることを確認した (Fig. 5-2). 細胞障害性の指標には ATP アッセイを用いた.

その結果、AFB1 はすべてのロットのヒト凍結肝細胞に細胞毒性を示したが、CYP の阻害剤である ABT を共処理することによって、その細胞毒性は減弱し、完全に阻害された. また、CPA の細胞毒性が認められたロット YEM については、CPA よって引き起こされた細胞毒性が ABT により有意に減弱していることが確認され、AFB1 及び CPA のヒト凍結肝細胞への毒性には CYP による代謝物が寄与していることが示唆された (Fig. 5-3).

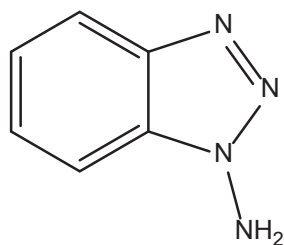


Figure 5-1 Structure of 1-aminobenzotriazole (ABT), a non-specific broad CYP Inhibitor

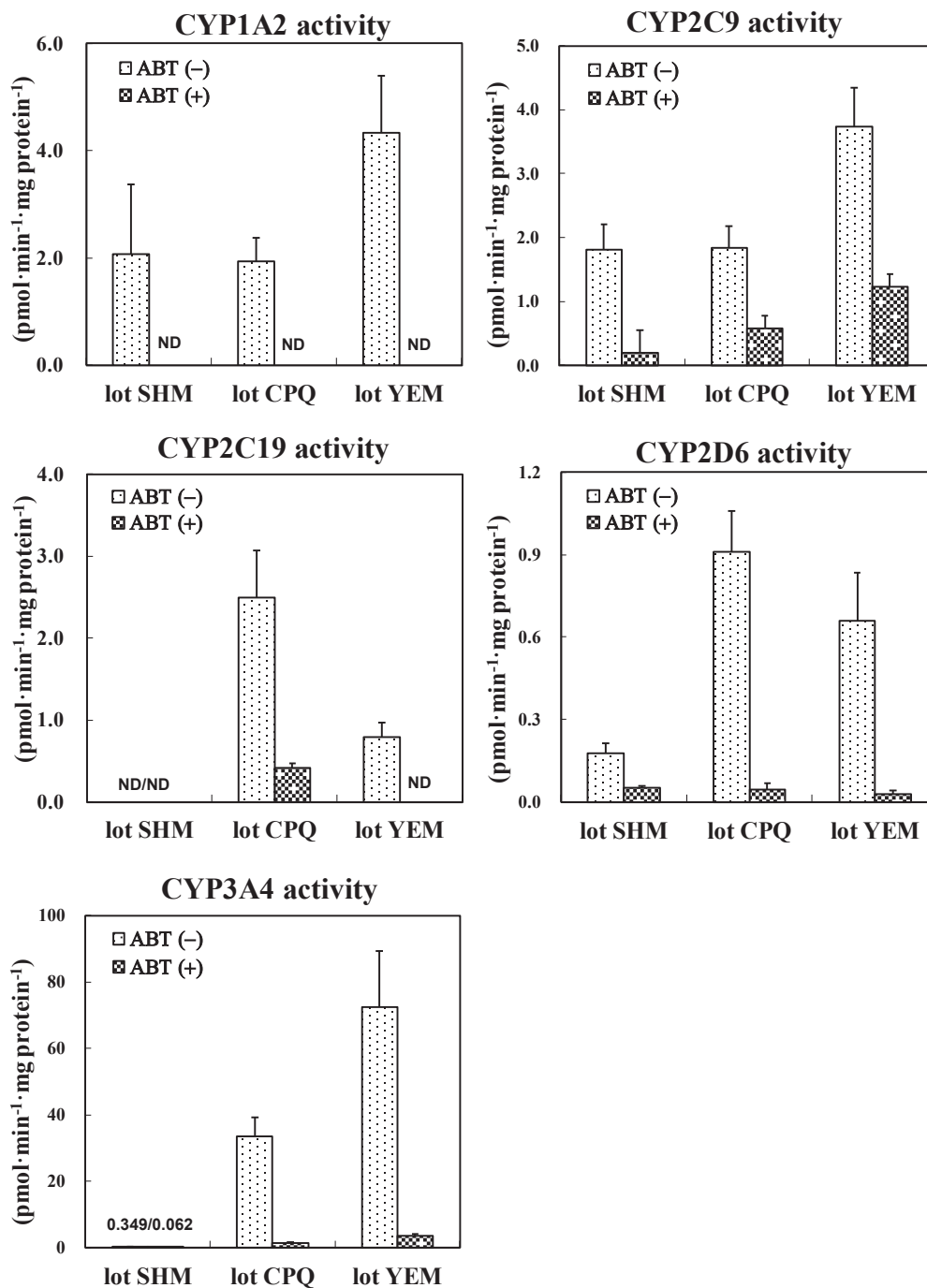


Figure 5-2 Inhibitory Effects of ABT against CYP activity in cryopreserved human hepatocytes

Inhibitory effects of 500 $\mu\text{mol/L}$ ABT on several CYP activities (CYP1A2; phenacetin *O*-deethylase, CYP2C9; diclofenac 4'-hydroxylase, CYP2C19; S-mephenytoin 4'-hydroxylase, CYP2D6; bufuralol 1'-hydroxylase, CYP3A4; midazolam 1'-hydroxylase) in cryopreserved human hepatocytes (CHHs) were confirmed using each lot of CHHs (Lots SHM, CPQ, and YEM). Results of CHHs without ABT: ABT(-) are means \pm S.D.; Lot. SHM: n=6, CPQ: n=3, YEM: n=6. Results of CHHs with 500 $\mu\text{mol/L}$ ABT: ABT(+), Lot. SHM: n=3, CPQ: n=3, YEM: n=3. ND: not detectable.

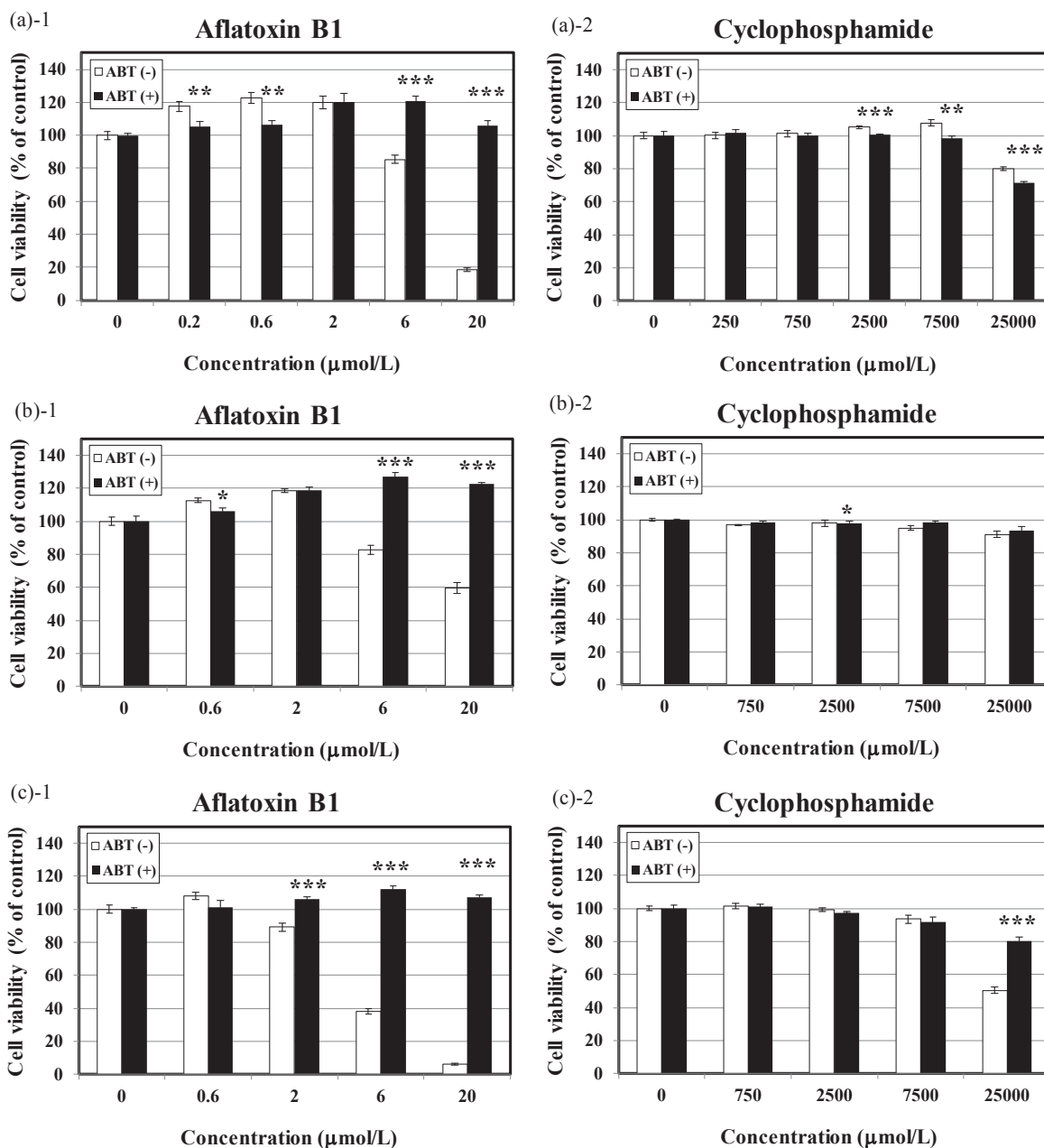


Figure 5-3 Effects of broad CYP inhibitor on cytotoxicity of AFB1 and CPA in cryopreserved human hepatocytes

Cytotoxicity of AFB1 and CPA was examined in cryopreserved human hepatocytes (CHHs) with or without 1-aminobenzotriazole (ABT), a non-selective CYP inhibitor. Results are black bar for with ABT and white bar for without ABT. CHHs (Lot. SHM; (a), CPQ; (b), and YEM; (c)) were exposed to AFB1 (-1) and CPA (-2) for 48 h with or without ABT (ABT(-) or ABT(+)). ABT concentrations were 500 μmol/L. Cell viability was evaluated using CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay. Results are normalized to control cells and expressed as means ± S.D. (n = 3 cultures). The data shown in Figure 5-3 (without ABT) and Figure 3 (a, b) are the same. Student's t-tests were conducted at the same concentration of test compound with or without ABT (*:p< 0.05, **:p< 0.01, ***p< 0.001).

5.2.2 第2項 HepaRG細胞を用いた細胞毒性評価

第1項にてヒト凍結肝細胞を用いて、CYPによる代謝物による毒性発現への影響を確認することができたが、HepaRG細胞で同様にCYPによる代謝的活性化による毒性発現の影響を評価できるか検討を行った。肝毒性物質としてヒト凍結肝細胞の検討時と同様にAFB1, CPAを用いて、HepaRG細胞への細胞毒性に対するABTの共処理による影響を評価した。ABTの処理条件の検討として事前に濃度をふって細胞毒性及びCYP活性への影響を評価し、条件を設定した。細胞毒性の評価としてはATPアッセイ, LDHアッセイ(LDH Cytotoxicity Detection Kit, Takara)を用いた。その結果ABTはHepaRG細胞に対して、100~500 µmol/Lの濃度範囲において明らかな細胞毒性は示さなかった(Fig. 5-4 (a)-1, (a)-2)。続いて、ABTの薬物代謝酵素活性に対する阻害効果も確認した。濃度を100 µmol/L及び500 µmol/Lの2濃度、前処理の有無の検討ということで酵素活性評価のための基質曝露の1時間前のABTの曝露の有無の4条件(ABT 100 µmol/L前処理なし/ABT 500 µmol/L前処理なし/ABT 100 µmol/L前処理1時間/ABT 500 µmol/L前処理1時間)について、CYP6分子種, 抱合酵素2分子種について評価を行った。なおこのときのHepaRG細胞の分化条件は、今回試験系に用いた7日間分化後のHepaRG細胞の活性よりも、酵素活性が高い、分化Day9, Day14, Day16のHepaRG細胞を用いて条件を検討した。その結果、すべてのCYP分子種についてABTの阻害効果が認められた(Fig. 5-5)。CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4については、濃度が高い条件の阻害効果が高く、前処理の効果も認められたが、100 µmol/L前処理なしの条件でも阻害効果は十分であった。CYP2C9についても濃度が高い方がより阻害効果が高い傾向であったが、全体的に阻害効果が弱く、これは既報(Emoto *et al.*, 2003)の通りであった。CYP1A2, CYP2D6についてはどの条件でも十分な阻害効果が認められた。UGT及びSULTについては、阻害効果は認められなかった。これらの検討結果から、CYP2C9の阻害効果は弱いものの、ABT 100 µmol/Lまたは500 µmol/Lでもほぼ同程度の阻害であったことと、100 µmol/Lの条件でも十分なCYP活性の阻害効果が認められたため、より細胞への影響が少ない濃度で、また、実験上の操作性も考慮し、本試験系でのHepaRG細胞に対するABTの処理条件は濃度100 µmol/L(前処理無し)とした。なお決定した条件で分化Day7のHepaRG細胞を用いて、経時的なABTの阻害効果の評価を行った。その結果、確認したすべてのCYP分子種について、ABTによる阻害効果が認められ、処理後72時間まで阻害が維持されており、十分な阻害条件であることが確認できた(Fig. 5-6)。CYP2C9に対する阻害効果は他の分子種よりは低かったが、阻害作用は72時間まで維持していた。

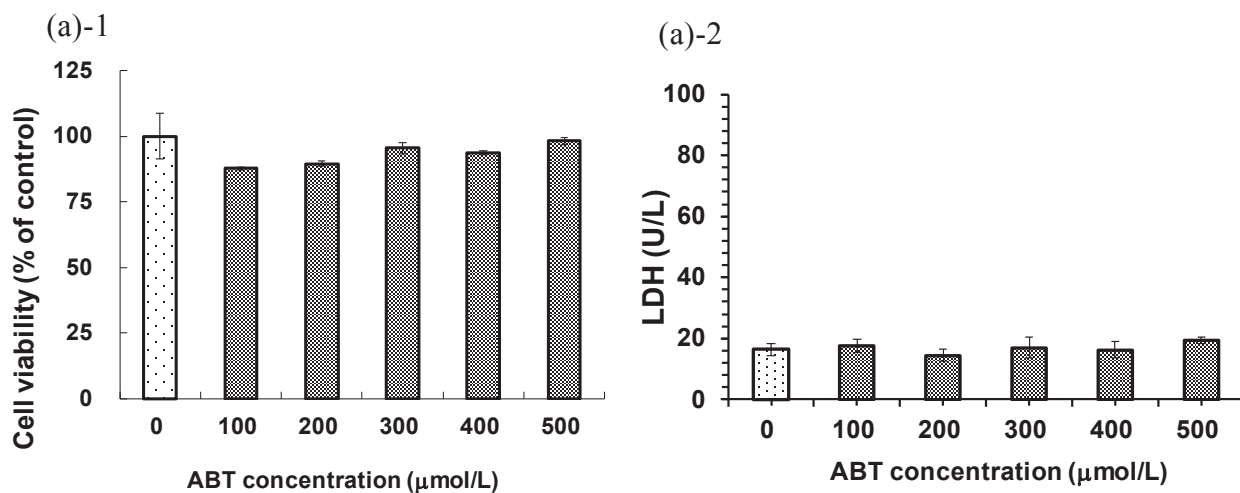


Figure 5-4 Cytotoxicity of ABT for 72 h exposure in HepaRG cells

Cytotoxicity of 1-aminobenzotriazole (ABT) was examined in HepaRG cells to find the dose concentration for treatment. HepaRG cells were exposed to ABT for 72 h and cytotoxicity assay were evaluated using both ATP assay ((a)-1) and LDH assay ((a)-2). ATP assay was conducted using CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay (n = 3 cultures). LDH assay was conducted using LDH Cytotoxicity Detection Kit (n = 3 cultures).

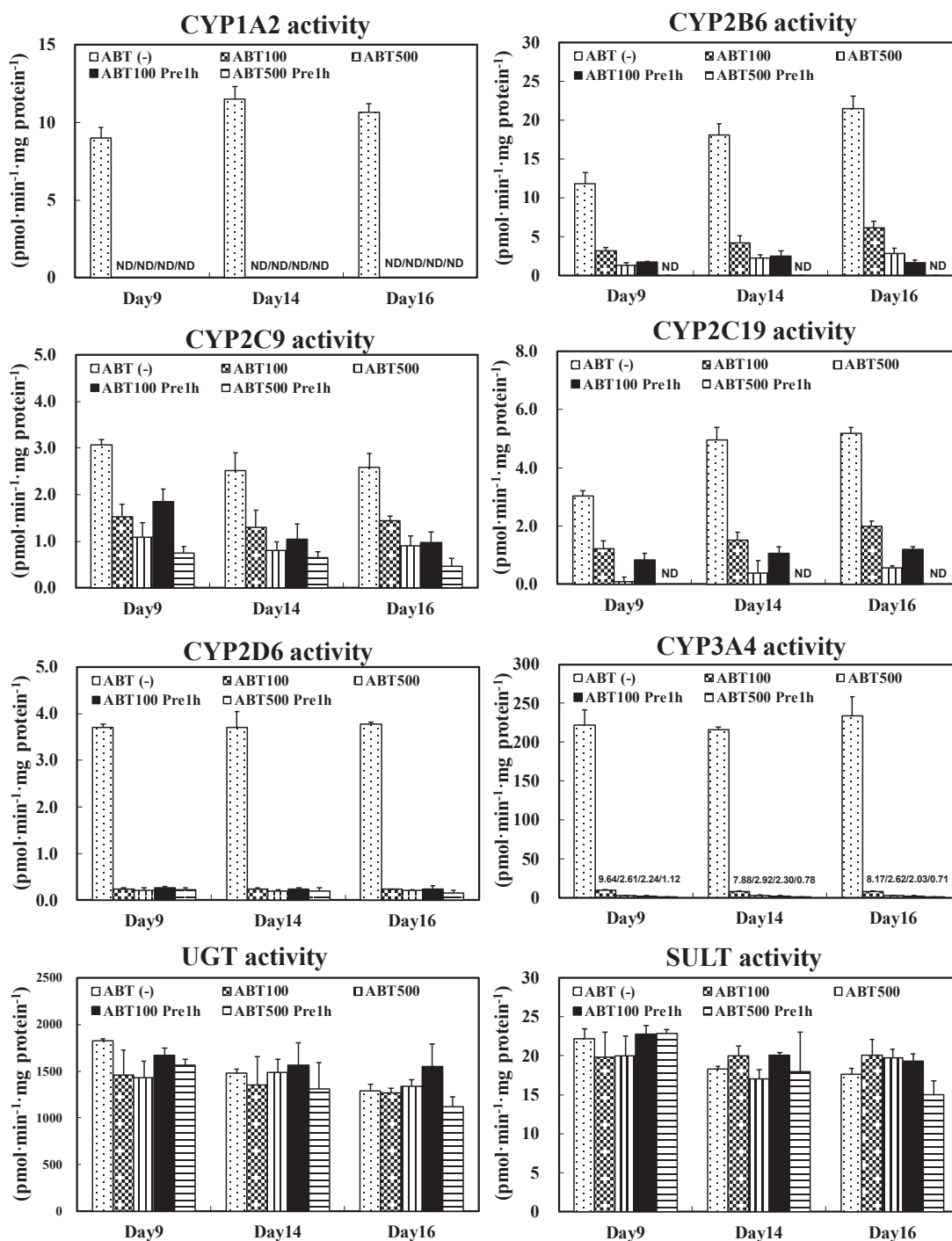


Figure 5-5 Inhibitory effects of ABT against drug-metabolizing enzyme activity in HepaRG cells

Inhibitory effects of ABT on several CYP activities (CYP1A2; phenacetin *O*-deethylase, CYP2C9; diclofenac 4'-hydroxylase, CYP2C19; S-mephenytoin 4'-hydroxylase, CYP2D6; bufuralol 1'-hydroxylase, CYP3A4; midazolam 1'-hydroxylase) in HepaRG cells were confirmed. Results are means \pm S.D. ABT(-): without ABT, ABT100: 100 μ mol/L ABT without pre-incubation, ABT500: 500 μ mol/L ABT without pre-incubation, ABT100 Pre1h: 100 μ mol/L ABT with 1-h pre-incubation, ABT500 Pre1h: 500 μ mol/L ABT with 1-h pre-incubation

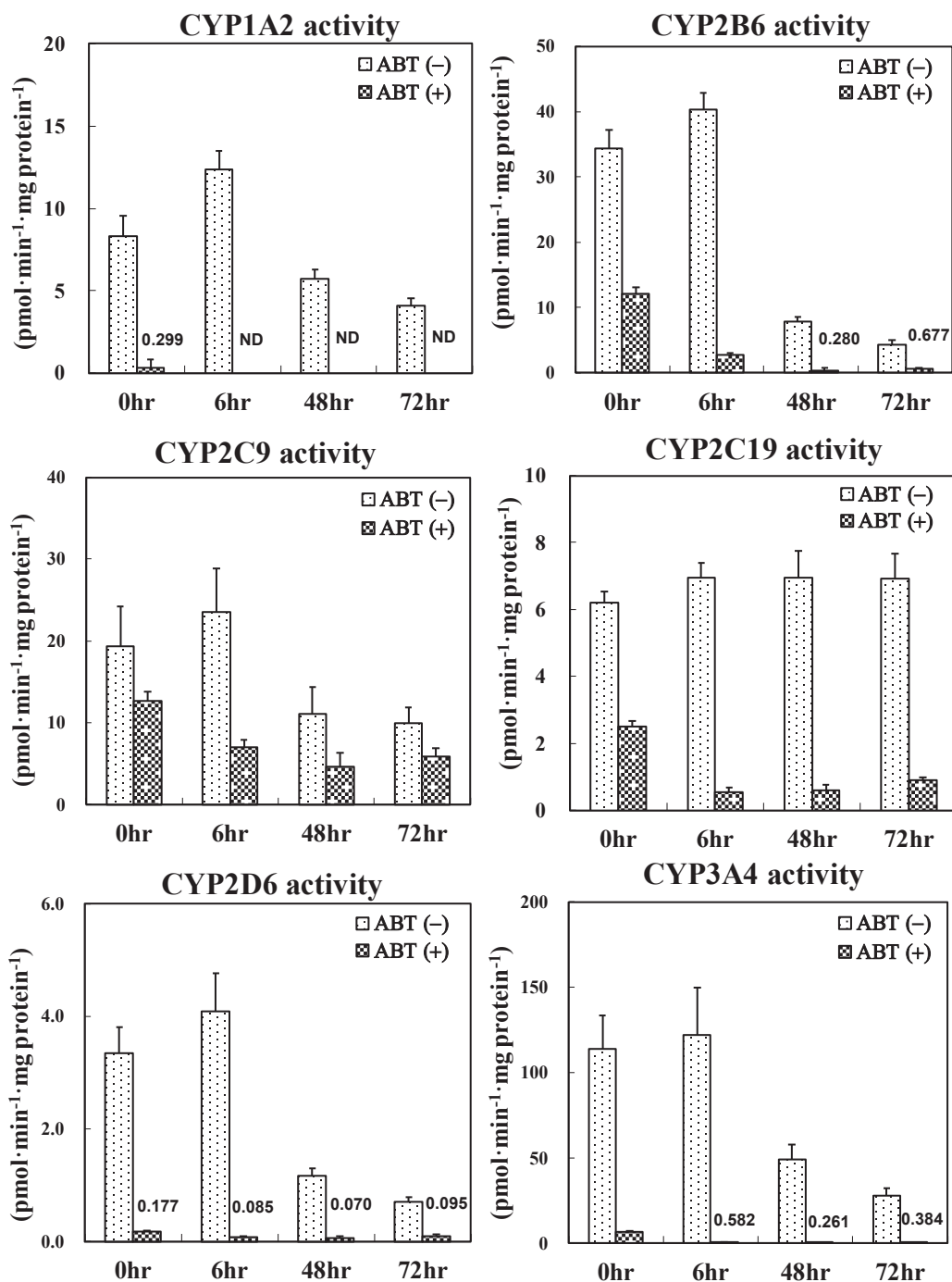


Figure 5-6 Inhibitory effects of ABT (100 $\mu\text{mol/L}$) against CYP activity for 72 h in HepaRG cells

Inhibitory effects of 100 $\mu\text{mol/L}$ ABT on several CYP activities (CYP1A2; phenacetin *O*-deethylase, CYP2C9; diclofenac 4'-hydroxylase, CYP2C19; S-mephenytoin 4'-hydroxylase, CYP2D6; bufuralol 1'-hydroxylase, CYP3A4; midazolam 1'-hydroxylase) in HepaRG cells were confirmed. Results are means \pm S.D (n = 3). ABT(-): without ABT, ABT(+): with 100 $\mu\text{mol/L}$ ABT, ND: not detectable.

このように設定した ABT の条件を用いて、細胞毒性評価をおこなった。分化させた HepaRG 細胞に AFB1 と CPA と同時に ABT (100 $\mu\text{mol/L}$) を曝露し、48 時間後に細胞障害性を評価した (ATP アッセイ)。その結果、濃度依存的な細胞毒性を示した AFB1 に対して、ABT 処理で細胞毒性の明らかな減弱が認められた (Fig. 5-7, (a)-1)。また最高濃度の 25000 $\mu\text{mol/L}$ で細胞毒性を示した CPA についても、ABT の処理で、25000 $\mu\text{mol/L}$ の細胞毒性が著しく減弱していた (Fig. 5-7, (a)-2)。これらの結果から、CYP によって生成される代謝物による毒性を HepaRG 細胞でとらえられていることが示唆された。

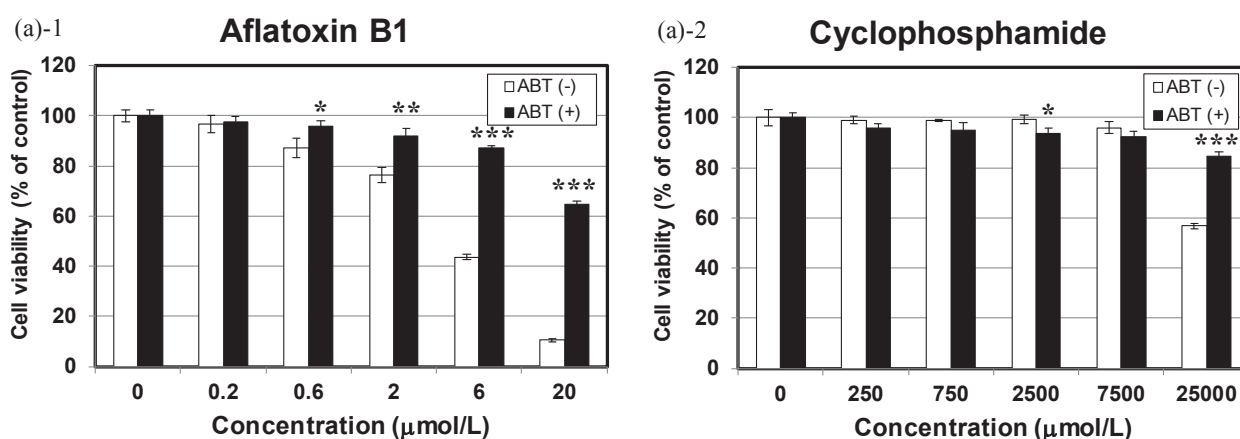


Figure 5-7 Effects of broad CYP inhibitor on cytotoxicity of AFB1 and CPA in HepaRG cells

Cytotoxicity of AFB1 and CPA was examined in HepaRG cells with or without 1-aminobenzotriazole (ABT), a non-selective CYP inhibitor. Results are white bar for without ABT and black bar for with ABT. HepaRG cells were exposed to AFB1 (-1) and CPA (-2) for 48 h with or without ABT (ABT(-) or ABT(+)). ABT concentrations were 100 $\mu\text{mol/L}$. Cell viability was evaluated using CellTiter-GloTM luminescent cell viability assay. Results are normalized to control cells and expressed as means \pm S.D. ($n = 3$ cultures). The data shown in Figure 5-7 (without ABT) and Figure 3 (a, b) are the same. Student's t-tests were conducted at the same concentration of test compound with or without ABT (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

5.3 第3節 細胞毒性に対する生体内抗酸化物質 GSH の影響

第2節において、HepaRG細胞を用いてCYPによる代謝物による細胞毒性を、ヒト凍結肝細胞と同様にとらえられることができることが明らかとなったが、このように細胞障害性を示すような代謝物は電子的に不安定で反応性が高く、細胞内で代謝され生成すると同時に、細胞内のタンパク質やDNAに結合し、細胞障害を引き起こす代謝物（反応性代謝物）として知られている（Leung *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2016）。

生体内抗酸化物質として知られるGSHは、生体内のフリーラジカルスカベンジャーとして生体中の種々の酸化ストレスに対して保護的に働くが、exogenousな化学物質由来の反応性の高い求電子性の代謝物などとも反応し、これらを解毒化し、このような反応性代謝物から細胞内のタンパク質、DNAなどを守っている（Mitchell and Russo., 1987）。GSHを枯渇させて、反応性代謝物による毒性の感度を上げ、ポテンシャルを評価する系はこれまで*in vitro*, *in vivo*で検討報告されてきているが（Fujimoto *et al.*, 2010, Watanabe *et al.*, 2003, Nishiya *et al.*, 2008）、今回HepaRG細胞を用いて、GSHを枯渇させて、より感度よく反応性の高い代謝物の毒性を評価する系を構築することを検討した。GSHの枯渇にはGSHの前駆体である γ -glutamylcysteineの合成酵素（ γ -glutamylcysteine synthetase）の阻害剤であるBSOを用いて（Griffith and Meister., 1979; Griffith 1982）、GSHの生合成を阻害することとした。BSOの処理条件の検討として事前に濃度をふって細胞毒性及び生体内GSH量への影響を評価し、条件を設定した。分化させたHepaRG細胞に100~500 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でBSOを曝露し96時間後、細胞毒性を評価した。細胞毒性の評価としてはATPアッセイ、LDHアッセイを用いた。その結果BSOはHepaRG細胞に対して、100~500 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲において、ATPアッセイを指標としたCell viabilityには影響が認められなかったが、LDHアッセイを指標とした評価では、200~500 $\mu\text{mol/L}$ の濃度において濃度依存的な細胞障害性が確認でき、わずかな細胞毒性が確認された（Fig. 5-8 (a)-1, (a)-2）。続いて、BSO（62.5~1000 $\mu\text{mol/L}$ ）の細胞内GSH量に対する影響を評価した。BSOを曝露し96時間後、細胞内GSH含量を測定した。その結果、確認した62.5~1000 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲において、細胞内GSH量の十分な減少を確認できた（Fig. 5-8 (b)）。これらのことから、BSOの処理条件は100 $\mu\text{mol/L}$ とし、72時間の細胞毒性アッセイを行う24時間前の前処理条件として、細胞毒性評価に適用した。

本処理条件において、AFB1, CPA, APAPの細胞毒性へのBSO処理の影響を評価した（Fig. 5-9）。その結果、AFB1については、10, 30 $\mu\text{mol/L}$ の濃度について、BSO処理で細胞毒性が増強された。またCPA及びAPAPについてはすべての濃度についてBSOの処理で細胞毒性が増強された。これらのことから、AFB1, CPA及びAPAPによる細胞毒性の発現には寄与すると知られる反応性の高い代謝物の毒性をHepaRG細胞でとらえることができていることが明らかとなった。また、このようにBSOを用いてGSHを枯渇させた細胞系を用いてより感度よく反応性の高い代謝物の細胞障害性のポテンシャルおよびその寄与度を評価することができることが示唆された。

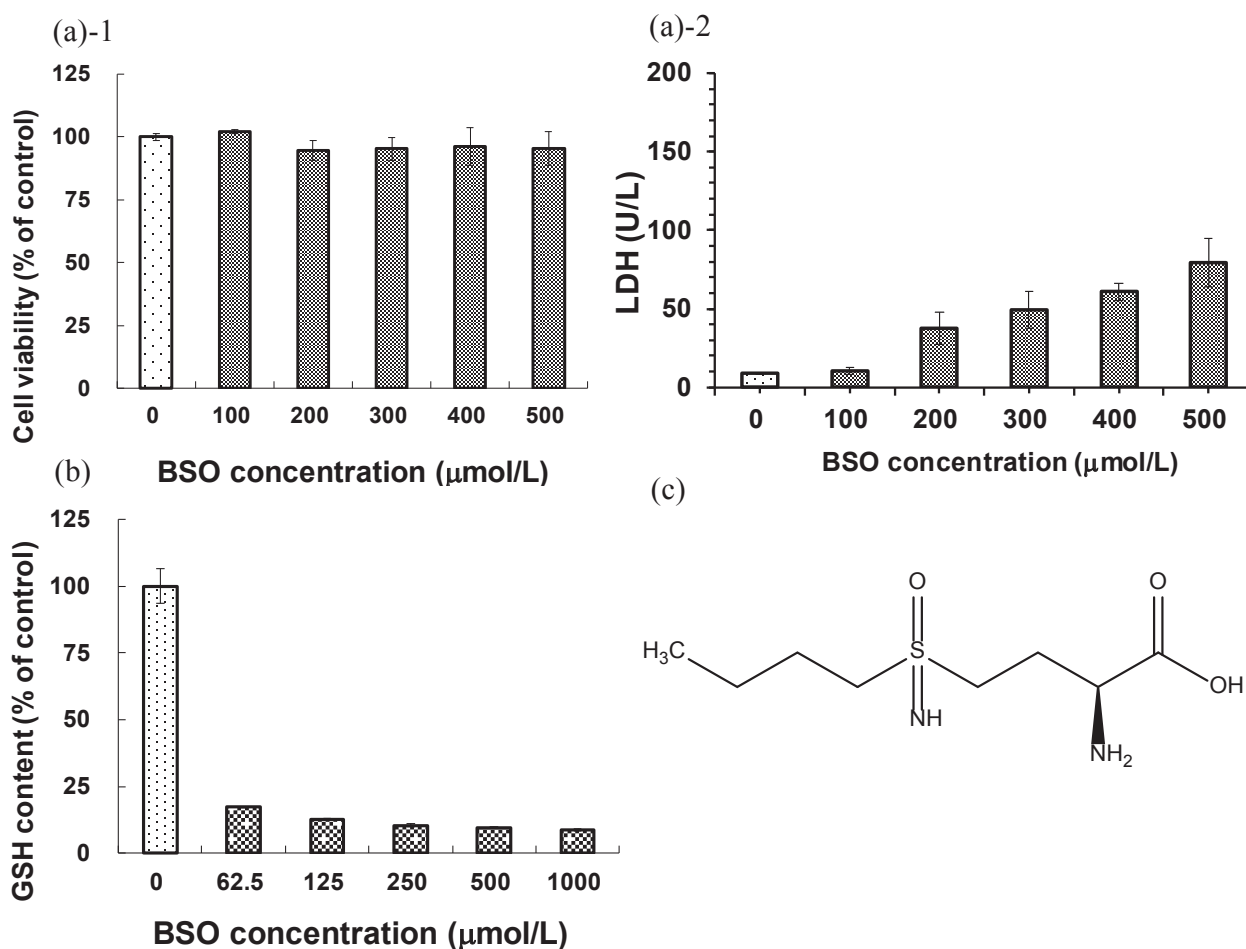


Figure 5-8 Cytotoxicity and effect of BSO on intracellular GSH content in HepaRG cells after 72 h exposure of BSO

Cytotoxicity of L-Buthionine-(S,R)-Sulfoximine (BSO) was examined in HepaRG cells to find the dose concentration for treatment. HepaRG cells were exposed to BSO for 96 h and cytotoxicity assay were evaluated using both ATP assay ((a)-1) and LDH assay ((a)-2). ATP assay was conducted using CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay. LDH assay was conducted using LDH Cytotoxicity Detection Kit. Intracellular GSH content in HepaRG cells after 96 h exposure of BSO were determined using GSH-Glo™ Glutathione assay (b). Structure of BSO are shown (C).

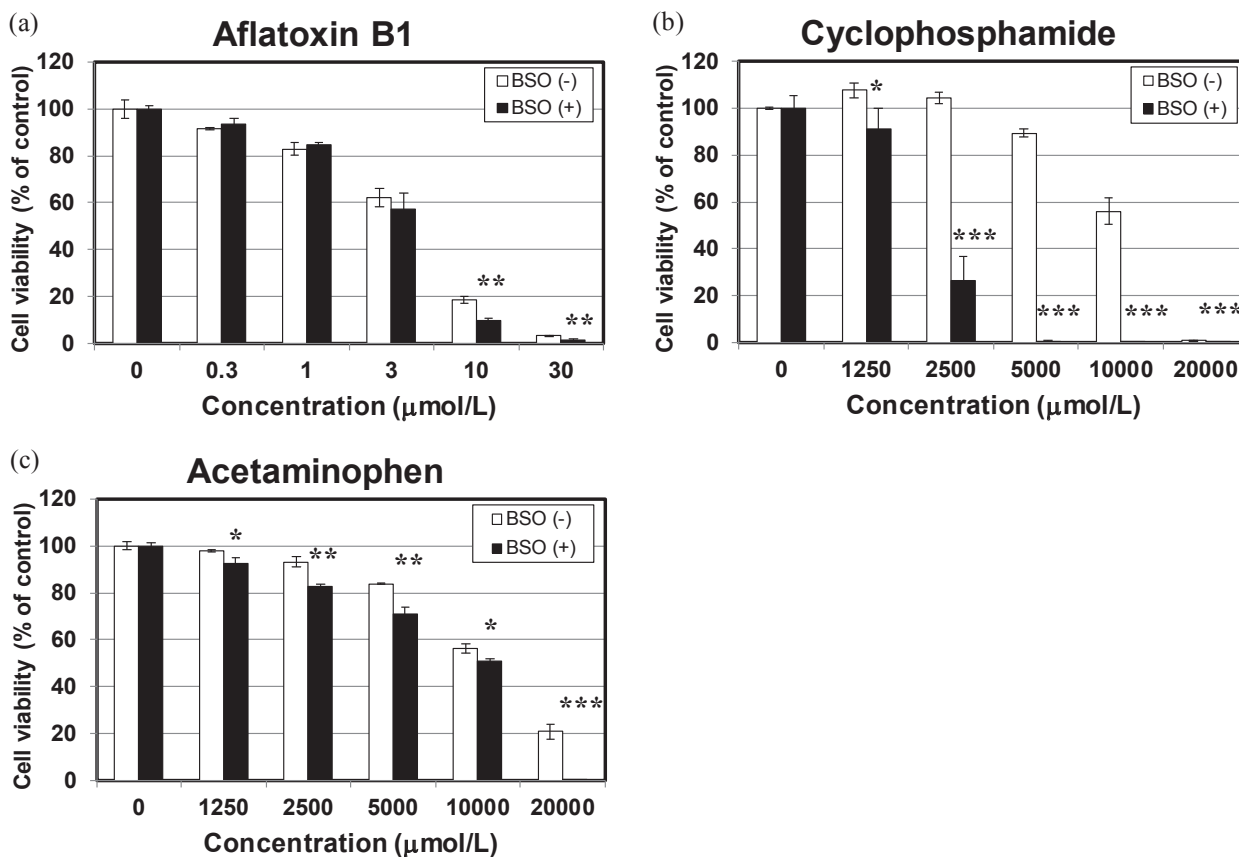


Figure 5-9 Effects of GSH biosynthesis inhibitor on cytotoxicity of AFB1, CPA, and APAP in HepaRG cells

Cytotoxicity of AFB1, CPA, and APAP was examined in HepaRG cells with or without BSO, a GSH biosynthesis inhibitor. Results are white bar for without BSO and black bar for with BSO. HepaRG cells were exposed to AFB1(a), CPA(b), and APAP(c) for 72 h with or without BSO (BSO(-) or BSO(+)). 100 μmol/L BSO concentrations were pre-incubated for 24 h before test compound exposure. Cell viability was evaluated using CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay. Results are normalized to control cells and expressed as means ± S.D. (n = 3 cultures). Student's t-tests were conducted at the same concentration of test compound with or without BSO (*:p< 0.05, **:p< 0.01, ***p< 0.001).

5.4 第4節 アセトアミノフェンの毒性発現に対する代謝物の影響の評価

医薬品は生体内で種々の薬物代謝酵素により様々な代謝を受けている。生体内に吸収された医薬品は主に肝臓中で代謝され生体外に排泄されるが、その代謝経路は薬物により様々で、かついくつかの解毒・活性化の経路が複雑に絡み合っている。肝毒性の発現にもこういった薬物代謝の盛んな肝臓における様々な代謝パスウェイの寄与が考えられる。APAPの代謝パスウェイを Fig. 5-10 に示すが、APAP は生体でグルクロン酸抱合、硫酸抱合で抱合代謝を受け、排泄される経路と、CYPにより生成された反応性の高いNAPQIという代謝物がGSHで抱合され排泄される経路が知られている (James *et al.*, 2003)。本節ではこれらのAPAPの代謝に関わる代謝酵素の阻害剤を用いて、それらを組み合わせることで、代謝経路に応じた、代謝物の毒性への影響の評価がHepaRG細胞を用いて行えるかの検討を行った。使用した阻害剤はこれまで条件を検討してきたCYPの阻害剤であるABT (100 $\mu\text{mol/L}$)、GSHの生合成阻害剤のBSO (100 $\mu\text{mol/L}$)に加え、グルクロン酸抱合、硫酸抱合の競合阻害剤として知られるSAM (Fig. 5-11)を使用した (Lilienblum *et al.*, 1985)。SAMの処理条件の検討として事前に濃度をふって細胞毒性を評価し、条件を設定した。分化させたHepaRG細胞に500~2000 $\mu\text{mol/L}$ の濃度でSAMを曝露し72時間後、細胞毒性を評価した。細胞毒性の評価としてはATPアッセイ、LDHアッセイを用いた。その結果SAMはHepaRG細胞に対して、500~2000 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲において、濃度依存的な細胞毒性が認められた。500 $\mu\text{mol/L}$ の濃度においては細胞障害性は軽微であったため (ATP assay: 93.7%, LDH assay: 500 $\mu\text{mol/L}$; 17.0 U/L, Control; 12.3 U/L), 500 $\mu\text{mol/L}$ の濃度をSAMの条件とした (Fig. 5-12 (a)-1, (a)-2)。

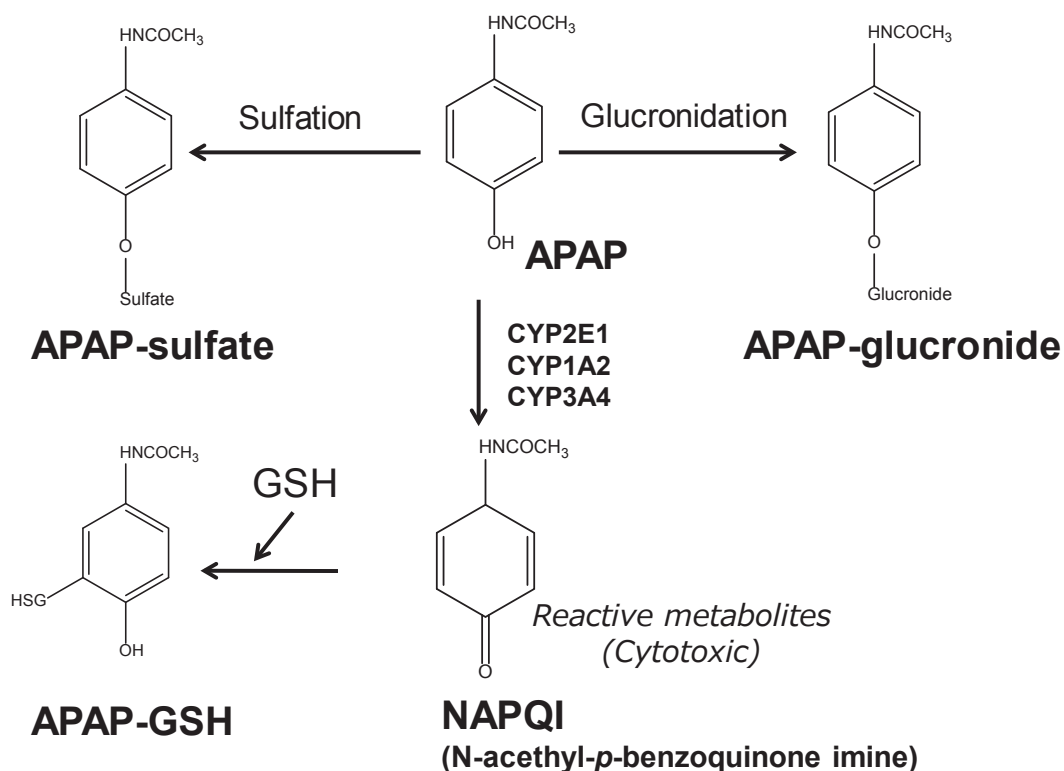


Figure 5-10 Metabolic pathway of acetaminophen

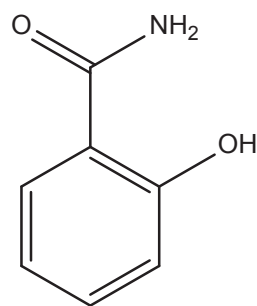


Figure 5-11 Structure of salicylamide (SAM)

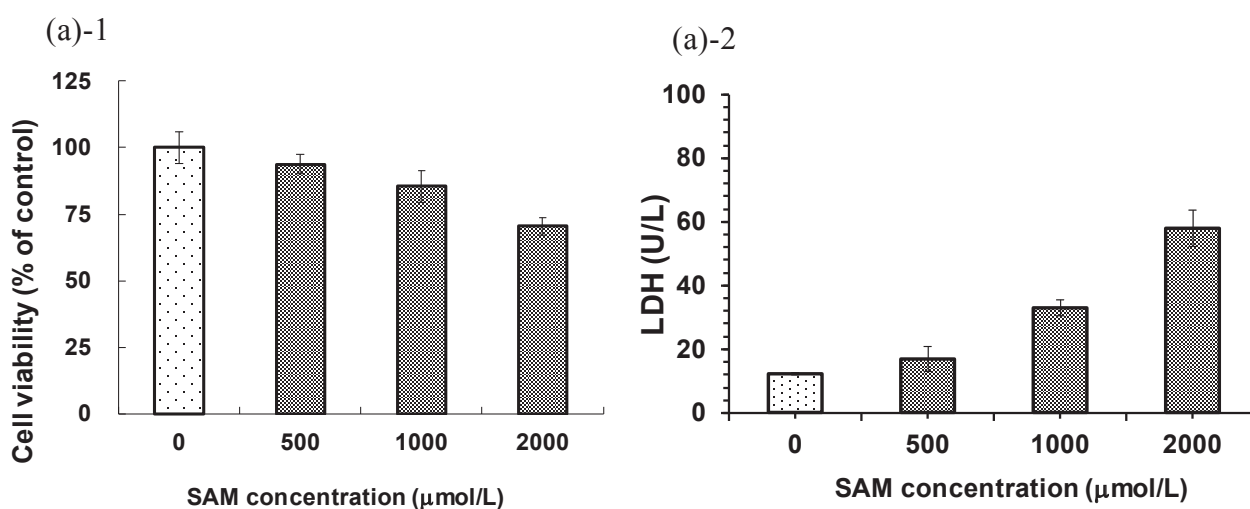


Figure 5-12 Cytotoxicity of SAM for 72 h exposure in HepaRG cells

Cytotoxicity of salicylamide (SAM) was examined in HepaRG cells to find the dose concentration for treatment. HepaRG cells were exposed to SAM for 72 h and cytotoxicity assay were evaluated using both ATP assay ((a)-1) and LDH assay ((a)-2). ATP assay was conducted using CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay (n = 3 cultures). LDH assay was conducted using LDH Cytotoxicity Detection Kit (n = 3 cultures).

これら阻害剤の処理条件を用いて、各種阻害剤を組み合わせ、APAPのHepaRG細胞に対する細胞毒性への影響の評価した。APAPの濃度として5 mmol/L、10 mmol/Lを用いた。その結果5 mmol/L、10 mmol/LのAPAPによって引き起こされる細胞毒性は、BSO及びSAMの処理（グルクロン酸抱合、硫酸抱合、グルタチオン抱合の阻害）により増強した。また、その増強した細胞毒性はCYPの阻害剤である、ABTの処理により完全に減弱し、細胞死が阻害された (Fig. 5-13)。これらの結果はFig. 5-10に示したAPAPの代謝パスウェイに従って生成する代謝物が毒性発現に寄与していることを示しており、HepaRG細胞を用いた本評価系に各種阻害剤を組み合わせることで、その代謝物の毒性発現/解毒の寄与を確認することができることが示唆された。

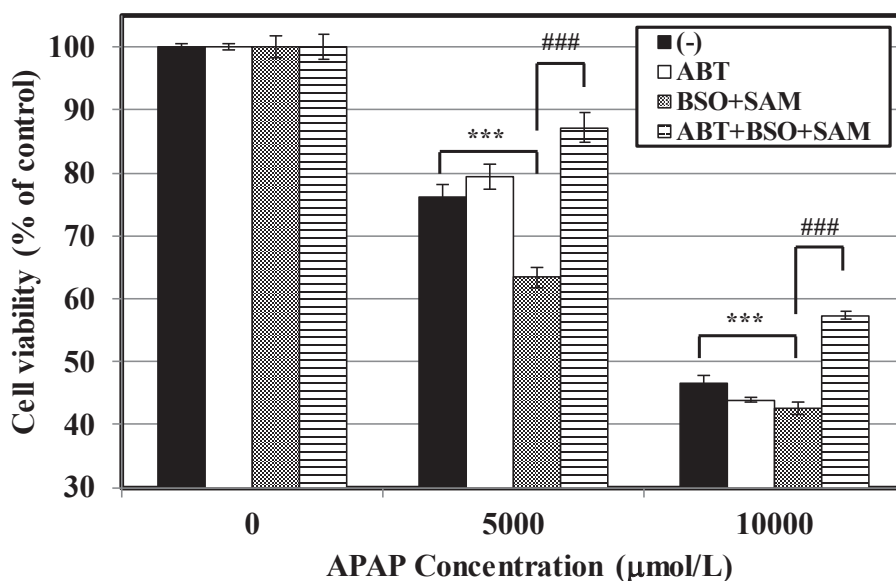


Figure 5-13 Effects of several enzyme inhibitors on APAP-induced cytotoxicity in HepaRG cells

Cytotoxicity of APAP was examined in HepaRG cells with or without several enzyme inhibitors. Results are black bar for without inhibitor, white bar for with ABT, grey bar for with BSO+SAM and striped bar for with ABT+ BSO+SAM. HepaRG cells were exposed to 5 mmol/L or 10 mmol/L APAP for 72 h with or without inhibitors ((-), ABT, BSO+SAM, or ABT+ BSO+SAM). BSO concentrations were pre-incubated for 24 h before test compound exposure and other inhibitors were treated at the same time of test compound exposure (ABT:100 µmol/L, BSO:100 µmol/L, SAM:500 µmol/L). Cell viability was evaluated using CellTiter-Glo™ luminescent cell viability assay. Results are normalized to control cells and expressed as means ± S.D. (n = 5 cultures). Tukey test was conducted (***: p< 0.001, ####: p< 0.001).

続いて、実際に SAM で UGT, SULT が阻害されているか確認をするため、細胞毒性評価を行った well (APAP 5 mmol/L 群) の薬物曝露後の培地上清を採取し、上清中の代謝物 (APAP のグルクロン酸抱合体, 硫酸抱合体) の濃度の測定を行った。その結果、APAP グルクロン酸抱合体, APAP 硫酸抱合体ともに Control 群 (及び ABT 単独処理群) と比較し濃度が低く、SAM 処理により、APAP の各抱合代謝が阻害されていることが確認できた (Fig. 5-14)。

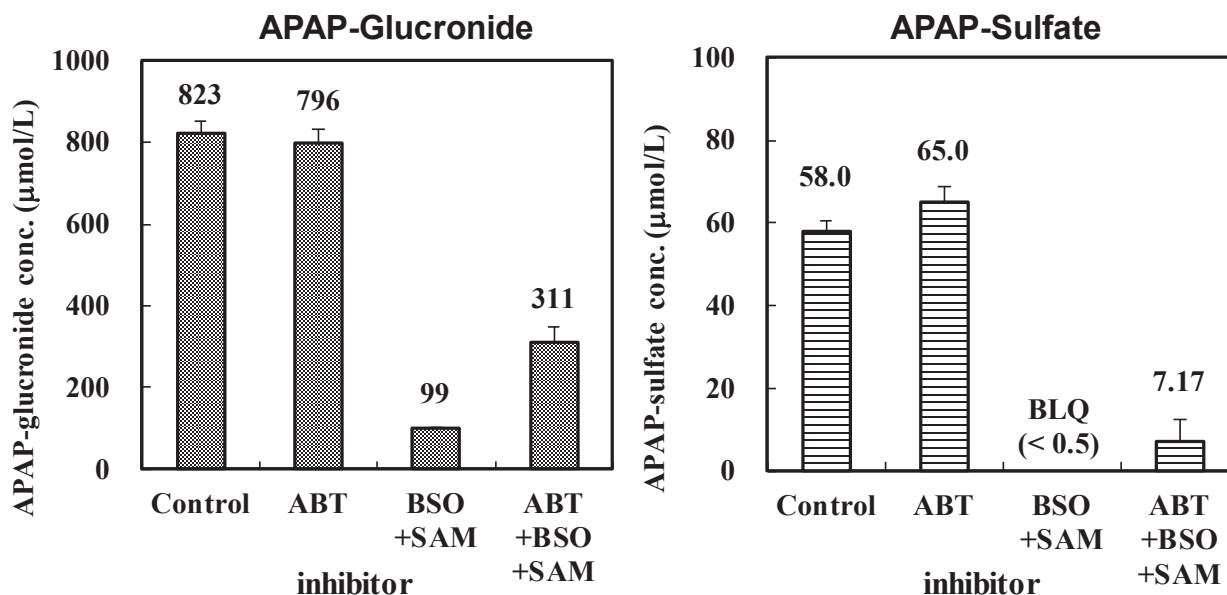


Figure 5-14 Effects of several enzyme inhibitors on metabolism of APAP in HepaRG cells

Metabolites of APAP (APAP-glucuronide and APAP-sulfate) in the culture supernatant after APAP exposure to HepaRG cells with or without several inhibitors for cytotoxicity assay (Fig. 5-13) were determined. Results are expressed as means \pm S.D. (n = 5 cultures). BLQ: below lower limit of quantification.

5.5 第5節 小括

本章では、HepaRG 細胞を用いた細胞系で、各種薬物代謝に関する阻害剤を用いて、その細胞毒性に対する影響について評価した。CYP の非特異的な阻害剤である ABT を共処理することにより、AFB1 及び CPA によって引き起こされる細胞毒性が減弱した。AFB1 及び CPA は第4章、3節に記述した通り CYP により生成する活性代謝物が毒性を発現することが知られているが、今回最適化した ABT の条件において、HepaRG 細胞の CYP 活性は十分に阻害されていることを確認しており、CYP による代謝的活性化で発現する毒性を HepaRG 細胞で検出できることが示唆された。

このように CYP により代謝的活性化で細胞障害性を示す代謝物は、電子的に不安定で反応性の高い代謝物であることが多く、AFB1 の AFB1 exo-8,9 epoxide や CPA の代謝物である acrolein も反応性が高く、細胞中のタンパク質や、DNA に結合し、細胞障害性を示す (McLean and Dutton., 1995; Gallagher *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Gut *et al.*, 2000)。このような反応性の高い代謝物は生体内抗酸化物質として働く GSH で抱合解毒されることが知られている (Mitchell and Russo., 1987; Lu., 2013)。GSH の生合成阻害剤である BSO を処理したところ、ラット肝細胞を用いて報告がある GSH 枯渇細胞モデル (Fujimoto *et al.*, 2010) と同様に HepaRG 細胞でも、GSH 枯渇の細胞系が確立できた。この GSH を枯渇させた HepaRG 細胞にて、AFB1, CPA 及び APAP の細胞毒性を評価したところ、より感受性高く細胞毒性が確認できた。これらのことから AFB1, CPA, APAP が HepaRG 細胞に引き起こす細胞障害性は、GSH で解毒されるような代謝物が寄与していることが示唆された。

また APAP への各種阻害剤を用いた毒性へ各種酵素の寄与を確認する検討において、今回用いた APAP は主に CYP2E1, CYP3A4 および CYP1A2 で代謝され、NAPQI という反応性代謝物を生成することが知られている (James *et al.*, 2003)。今回は ABT による CYP2E1 の活性の阻害効果は確認していないが、ABT の CYP2E1 活性に対する阻害効果は $K_i=8.7 \mu\text{mol/L}$ であるという報告があり (Emoto *et al.*, 2003)、今回の条件で活性を十分に阻害する条件であると考えられる。上清中代謝物の定量の結果から、APAP グルクロン酸抱合体、APAP 硫酸抱合体ともに Control 群 (及び ABT 単独処理群) と比較し濃度が低く、SAM 処理により、APAP の各抱合代謝が阻害されていることが確認できた。GSH 抱合代謝物については未測定ではあるが、ABT+BSO+SAM 処理群において、各抱合代謝物の増加が認められ、GSH 抱合は CYP の酸化代謝により生成する NAPQI の解毒機構であることから、GSH 抱合体の寄与も示唆された。

これらの結果から、このような代謝的活性化、抱合・解毒など複数のパスウェイに関わる APAP のような化合物について、これらの各種代謝酵素の阻害剤を組み合わせ、評価することにより、代謝物への毒性への寄与を推察することができると考えられた。

6. 第6章 考察と総括

薬剤誘発性肝障害は医薬品の開発中止、市場撤退の理由の主な原因の一つであり、医薬品創薬研究において、いかに肝障害性のない化合物を選出し開発するかが課題となっている。これらのことから医薬品研究のより初期の段階で肝障害性のリスクを予測し、化合物のそのポテンシャルを見極める必要がある。本研究では、その肝障害性リスクの予測及び評価に HepaRG 細胞が有用な評価系であるか否かという観点で検討を行った。

HepaRG 細胞は特殊な培養条件で分化させるとヒト肝細胞と同等の薬物代謝酵素活性を有するという報告がなされている (Gripon *et al.*, 2002; Aninat *et al.*, 2006; Lübberstedt *et al.*, 2011)。Gripon らの報告によると、分化誘導用の培地には、DMSO 及び hydrocortisone などの代表的な分化誘導剤が含まれており、この培地で前培養することで薬物代謝酵素活性が上昇してくるが、同報告では同一条件で HepG2 細胞を培養しても、薬物代謝酵素の発現はみとめられないことから (Gripon *et al.*, 2002)、HepaRG 細胞の特徴の一つであると考えられる。

ヒト凍結肝細胞はドナーの個体差に反映された薬物代謝酵素活性のロット間差が存在し、ロットによっては一部の分子種の酵素活性が著しく低いロットなどが存在するなど、ヒト肝細胞モデルとして、試験系のバラツキを生み出す要因となりうるため、創薬初期のスクリーニング系の構築などへの適用の際にはその点を考慮する必要があると考えられる。HepaRG 細胞は株化された細胞であるため、個体差によるロット間差はないと考えられるが、製造元からの分化過程を経て供給されることから、供給ロットが存在する。まず 3 ロット分の HepaRG 細胞について、CYP6 分子種 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4)、抱合酵素 2 分子種 (UGT, SULT) について、薬物代謝酵素活性を測定し、ヒト凍結肝細胞 (3 ロット) の活性値、HepG2 細胞の活性値と比較した。その結果、ヒト凍結肝細胞についてはロット (個体) により薬物代謝酵素活性に差が認められた。またロットによっては一部の分子種について、活性値が認められないという結果であった (Fig. 2-4)。さらに多くの薬物代謝に寄与し重要な分子種である CYP3A4 については、最も活性が高いロット (lot YEM) と、低いロット (lot SHM) との差が約 200 倍程度あり、均質な試験系の構築に使用する場合にはやはり留意が必要であることが考えられた。なお今回使用した凍結肝細胞 3 ロットの薬物代謝酵素活性は、購入元のメーカーの Certificate of analysis に記載の酵素活性値の結果から (実験の部, Supplemental table 参照)、22 ロット分の活性値の各分子種の平均値に鑑みても、大きくは偏りはない活性値のプロファイルを示す 3 ロットであった。HepG2 細胞について測定した代謝酵素活性の結果からは既報の通り (Wilkening *et al.*, 2003; Westerink *et al.*, 2007^(a))、ほとんどの分子種の薬物代謝酵素についてはヒト凍結肝細胞に比較し、活性が著しく低いまたは、検出下限以下であった。SULT の活性については、ヒト凍結肝細胞の活性値と同等の活性値を示し、本結果も既報の通りであった (Wilkening *et al.*, 2003; Westerink *et al.*, 2007^(b))。これらのことから HepG2 細胞は通常の単層培養で用いる場合はやはり薬物代謝酵素活性は低く、代謝を介した毒性の評価への適用は難しいことが示唆された。

測定した 3 ロット分の HepaRG 細胞の薬物代謝酵素活性値の結果から、確認したすべての分子種について、著しい低い活性値などは認められず、どの分子種についてもヒト凍結肝細胞と同等かまたはそれ以上の活性値を示した。確認した 3 ロットについて、最もロット間差が認められた

のは CYP2B6, CYP2C9 の約 5 倍程度であり, ヒト凍結肝細胞よりもロット間差が少なく, 安定した評価系であることが示唆された. 主要な代謝酵素である CYP3A4 については, 約 1.9 倍程度の活性値の差が認められた (Table 2-2). これらの活性値の差はヒト凍結肝細胞で認められたロット間差よりは小さかったものの, 分子種によっては薬物代謝への寄与率が高いものもあり, また初期のスクリーニングの際には, 化合物の代謝に寄与する酵素の分子種も明らかになっていないことがある場合も多いため, 試験系構築の際に使用ロットが変わる場合は留意が必要であると考えられる. HepaRG 細胞について多少ではあるが供給ロットにより活性値の差が認められた原因については明確には不明であるが, 分化のため前培養過程において, バッチ間差が生じた可能性が考えられる. HepaRG 細胞の CYP2D6 の活性については, 報告にあるように, ドナーの個体に由来する poor metabolizer であることが知られているが (Gripon *et al.*, 2002; Guillouzo *et al.*, 2007), 今回の HepaRG 細胞の活性測定の結果では CYP2D6 の基質である bufuralol の代謝物である 1-hydroxybufuralol の生成は認められ, 活性値はヒト凍結肝細胞と同等レベルであった. 今回の測定の結果を細胞数補正した結果は 0.514 – 1.03 pmol/min/10⁶cells (基質濃度: 5 μmol/L bufuralol) であった. 同じ基質を用いた報告では約 3.0 pmol/min/10⁶cells (基質濃度: 25 μmol/L bufuralol) という結果であり (Lübberstedt *et al.*, 2011), 基質濃度の違いを考慮すると, 今回の HepaRG 細胞の結果は当該報告と同等レベルの活性であると思われる. また同報告では確認したヒト初代肝細胞と HepaRG 細胞の Bufuralol 水酸化活性は同等レベルであったと報告している. Phase II 代謝酵素については HepaRG 細胞のグルクロン酸抱合活性及び硫酸抱合活性共にヒト凍結肝細胞の活性よりも高かったことから, 抱合代謝により解毒される化合物についてはその毒性評価には留意が必要であると考えられる.

分化させた HepaRG 細胞はヒト凍結肝細胞と同等レベルの薬物代謝能を保有していたが, その HepaRG 細胞の細胞毒性の感度を確認するため, 代謝的活性化で毒性を発現することが知られる代表的な肝毒性物質を用いて, 細胞毒性評価を行い, ヒト凍結肝細胞の感度と比較した. その結果評価した 5 種の化合物について HepaRG 細胞はヒト凍結肝細胞と同等以上の感受性であった. ヒト凍結肝細胞については, CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 などの活性の最も高かったロット (YEM) について, 各代謝酵素により代謝的活性化が毒性発現に関与することで知られる AFB1 や CPA の細胞毒性の感受性が最も高く (Fig. 3), 代謝的活性化の影響をとらえられていることが示唆された. AFB1 及び CPA に対する HepaRG 細胞の細胞毒性の感受性はこの最も活性が高かったロットと同等レベルの感受性であると考えられた. TAM については CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C19 などによって生成される 4-hydroxy-TAM が毒性発現に関与することで知られているが (Moorthy *et al.*, 1996; Crewe *et al.*, 1997; Jena *et al.*, 2015), TAM についても, HepaRG 細胞とヒト凍結肝細胞の細胞毒性は同等レベルであった. 最もヒト凍結肝細胞と HepaRG 細胞で感受性が異なったのは TGZ への感受性の違いであり, ヒト凍結肝細胞では 3 ロットとも最高濃度の 100 μmol/L で細胞障害性が認められなかったのに対して, HepaRG 細胞では 100 μmol/L でほとんど死滅している (Cell viability: 0.3%) という結果であった (Fig. 3). この結果の違いについて詳細の検討は未実施ではあるが, HepaRG 細胞は SULT の代謝活性が高かったが, TGZ は毒性発現に, CYP による代謝活性化のみならず, 硫酸抱合体の細胞毒性も知られるため (Funk *et*

al., 2001; Saha et al., 2010), その影響の可能性も考えられた。

網羅的遺伝子発現変動解析は、毒性の発現機序解析の手法の一つであり、肝毒性が発現した際も、*in vitro* や *in vivo* の試験系を用いて化合物に起因する遺伝子発現の変動を解析し、毒性発現に関与する遺伝子群や、活性化又は抑制されているパスウェイを解析し、その肝毒性発現の機序解明にあたる。本研究でも HepaRG 細胞がこのような遺伝子発現変動解析に有用な細胞系であるかを確認するための検討を行った。化合物としては AFB1 及び CPA という共に代謝的活性により生成される反応性代謝物が DNA 障害を引き起こし、p53 シグナルが活性化するというメカニズム既知の化合物を用いて評価した。比較対象としては遺伝子発現解析に汎用的にしようされる HepG2 細胞を用いた。その結果薬物代謝酵素活性がより高い HepaRG で HepG2 に比べてより多くの p53 関連遺伝子が発現しており、p53 シグナルパスウェイが活性化されていることが示唆された。これらのことから HepaRG においては代謝的活性化を受け反応性の高い代謝物が生成され、DNA 障害を引き起こしていることが示唆された。HepG2 細胞においても一部 p53 関連遺伝子が発現していたが、HepaRG においてより低濃度から多くの遺伝子が発現しており、感度よく遺伝子発現変動を捉えることができていた。これらのことから HepaRG は代謝的に活性化により発現する毒性をより感度よく捉えることができることを遺伝子レベルでも確認できた。

ここまでの検討結果から HepaRG は薬物代謝能が高く、細胞毒性評価、細胞毒性発現のメカニズム検討などに使用できる細胞系であることが示唆されたが、毒性発現に薬物代謝能が関与しているか否かを検討するため、より詳細の検討を行った。まず CYP による代謝的な活性化が毒性発現に関与しているかを検討するため、CYP の非特異的な阻害剤の ABT を用いて HepaRG 細胞での阻害条件を検討・確立した。その条件において ABT 処理すると、AFB1 及び CPA によって引き起こされる細胞毒性が著しく減弱し、毒性発現に CYP による代謝的な活性化による毒性発現を HepaRG 細胞で捉えることができていた。

このような細胞障害性を示す反応性の高い代謝物は生体の GSH により抱合され解毒することが知られているがそれらの GSH による解毒の影響を評価するため、細胞中 GSH を枯渇させた細胞評価系の作製を検討した。GSH の前駆物質の生合成の阻害剤である BSO を用いて、HepaRG 細胞での条件を検討し、GSH を枯渇させた細胞系を構築した。このモデルを用いて、AFB1、CPA 及び APAP の細胞毒性を評価したところ、より高感度にこれらの化合物の毒性を捉えることができ、HepaRG 細胞の系で反応性代謝物による毒性の寄与が確認することができた。これらの評価系は代謝的活性化により反応性の高い代謝物が生成し肝障害性を示す化合物のポテンシャル及びその寄与を評価でき、細胞障害性を示す反応性の高い代謝物を生成するリスクのより少ない化合物を選出するための高感度なスクリーニング系として有用であることが示唆された。

医薬品は生体内で種々の薬物代謝酵素により様々な代謝を受けている。肝毒性の発現にも代謝経路の寄与が考えられる。HepaRG を用いて APAP の毒性発現に対して各種阻害剤をもちいてその影響を評価したところ、APAP の既知の代謝経路に従い、代謝活性化、抱合解毒による影響を評価することができた。このような形で HepaRG 細胞を用いて各種阻害剤を加えることにより、化合物の毒性発現に対する各種代謝酵素の寄与について検討することは、各化合物の代謝物がどの

ように毒性発現に関わるかを予測することができる有用なツールになりうると考えられる。今回の検討では CYP の非選択的な阻害剤を用いて網羅的に CYP の影響を評価することも可能だが、絞られた開発候補化合物について、毒性発現に関わる代謝物の生成に関わる分子種の推定などには各種分子種の阻害剤などを使用し、その影響を評価することも有用な手法であり、このような評価にも HepaRG 細胞を使用することができると考えられる。

創薬研究における初期の化合物探索のための毒性スクリーニングにおいては実験間差、バッチ間差が少ない安定で均質な評価系が望まれる。個体間差によるロット間差があるヒト肝細胞は個体による差が毒性発現にどう影響するかを評価するためのツールとしての有用性に関する報告もあり (Utkarsh *et al.*, 2016; Parmentier *et al.*, 2018), 高次の評価系として非常に有用ではあると考えられるが、均質な評価系が必要な創薬の初期段階のスクリーニング系においては安定的な評価系が望まれ、HepaRG 細胞の方が適用しやすいと思われる。そのような評価系を目的に応じて使い分けることが重要である。また HepaRG 細胞は長期間の培養も可能であることから、長期反復毒性試験のデザインを想定した長期間曝露の試験の報告もあり (Teng *et al.*, 2015; Pomponio *et al.*, 2015), 長期曝露でのみ発現する毒性や、長期曝露で生成する代謝物による影響を評価できる *in vitro* の評価系の構築にも HepaRG 細胞は有用であると考えられる。

以上、本研究により、HepaRG 細胞を用いた肝細胞培養系は、肝毒性物質の代謝的活性化を介して発現する毒性を検出ことができ、代謝物の影響を評価することができるヒト肝細胞モデル系として有用であることを示した。この評価系を用いることによりヒトにおける肝障害性のポテンシャル予測や医薬品開発候補品の毒性発現機序の解析などに有用なアプローチとなり得ると考えられる。さらには、創薬の初期段階における毒性スクリーニングの中で、より肝毒性リスクの少ない医薬品開発候補品の選定にも貢献できると考えられる。

最後に本研究を契機の一つに、肝毒性リスクのない医薬品開発候補品の効率的な選出により創薬効率の向上、および薬剤誘発性肝障害などの副作用のない医薬品の創製につながることを期待する。

実験の部

1. 試薬

Sigma-Aldrich

acetaminophen, cyclophosphamide, 7-hydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarin-glucuronide, diclofenac, caffeine, niflumic acid, 1-aminobenzotriazole, L-buthionine-sulfoximine, acetaminophen-sulfate, acetaminophen-glucuronide :

富士フィルム和光純薬株式会社

aflatoxin B1, tamoxifen, phenacetin, midazolam, salicylamide, acetonitrile, methanol, DMSO

Corning Gentest

4'-hydroxy diclofenac, 1'-hydroxyl midazolam, 7-hydroxycoumarin-sulfate

Toronto Research Chemicals

4'-hydroxy mephenytoin, hydroxyl bupropion, bupropion

住化分析センター

bufuralol, 1'-hydroxybufuralol

Enzo Life Sciences, Inc.

S-mephenytoin, troglitazone

2. 機器

LC-MS/MS : HPLC; ACQUITY UPLC (Waters), MS/MS; API4000 (Sciex)

Multilabel Counter (1420 ARVO SX, PerkinElmer)

SpectraMax Plus (Molecular Devices, LLC).

NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Asahi Glass Co.,Ltd.)

SpectraMax Plus (Molecular Devices, LLC).

2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix).

GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix)

3. 細胞培養

3.1 HepaRG 細胞

細胞：HepaRG[®]（凍結バイアル，BIOPREDIC INTERNATIONAL）

培地：

細胞播種時：Medium 670 (BIOPREDIC INTERNATIONAL)

前培養（分化誘導）時：Medium 620 (BIOPREDIC INTERNATIONAL)

化合物曝露時：Medium 640 (BIOPREDIC INTERNATIONAL)

HepaRG 細胞（凍結バイアル）を， Medium 670 を用いて融解した後， 7.2×10^4 cells/0.1 mL に調製し， 100 μ L/well ずつコラーゲンコート 96 ウェルプレートに播種した（Day 0）. CO₂インキュベーター（37°C， 5% CO₂）で培養し， Day 1 に Medium 620 に全量培地交換後， 1 回/1~3 日で培地交換し， 6 日間分化培養した.

3.2 ヒト凍結肝細胞

細胞：Cryopreserved Human Hepatocyte（Plateable， BioreclamationIVT） Lot No. SHM, CPQ, YEM

培地：CP Medium[®] with Torpedo Antibiotic Mix[®] (1:45, v/v)

ヒト凍結肝細胞を， 培地を用いて融解した後， 3.5×10^4 cells/0.1 mL に調製し， 100 μ L/well ずつコラーゲンコート 96 ウェルプレートに播種し， CO₂インキュベーター（37°C， 5% CO₂）で培養し， 一晚接着後に各種アッセイに使用した. 各ロットのメーカーCoA 記載の活性値を Supplemental table にまとめる.

3.3 HepG2 細胞

細胞：Human hepatocellular carcinoma HepG2 cells（American Type Culture Collection）

培地：Minimum essential medium（以下の組成含有：1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum）（Life Technologies Inc.).

HepG2 細胞を， 上記培地を用いて T75 または T225 flask を用いて 80%以下の confluence で継代培養した. 継代時は 0.25% trypsin/0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (Sigma-Aldrich)で細胞をはがした. 融解した後， 7×10^4 cells/0.1 mL に調製し， 100 μ L/well ずつ 96 ウェルプレートに播種し， CO₂インキュベーター（37°C， 5% CO₂）で培養し， 一晚接着後に各種アッセイに使用した.

Supplemental table: Summary of Lot Characterization Results of human hepatocytes

Lot No.	Activity (pmol/10 ⁶ cells/min)									
	CYP1A2	CYP2A6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4	CYP1A2/2E1	UGT/ST	CGT/ST
	PHEN	COUM	TOLB	MEPH	DEX	CZX	TEST	ECOD	7-HCG	7-HCS
YEM	15.5	107.0	37.5	8.0	1.8	71.7	129.0	154.0	415.0	18.6
CPQ	18.0	105.0	36.4	17.8	32.1	49.9	95.2	78.0	440.0	41.0
SHM	4.0	26.0	9.0	2.0	65.0	54.0	15.0	27.0	347.0	52.0
MAX	57.2	127.0	92.8	29.0	76.0	81.6	154	560	558	62.6
AVERAGE	20.3	62.0	30.1	11.4	25.2	37.0	66.5	81.1	360	31.5
MIN	2.0	2.8	8.0	0.2	0.4	8.0	10.9	9.0	15.0	5.0

PHEN:Phenacetin-O-deethylation, COUM:Coumarin hydroxylation, TOLB: Tolbutamide 4'-methyl-hydroxylation, MEPH:Mephenytoin 4'-hydroxylation, DEX:Dextromethorphan-O-Demethylation, CZX:Chlorzoxazone 6-hydroxylation, TEST:Testosterone 6-beta-hydroxylation, ECOD:7-Ethoxycoumarin-O-deethylation, 7-HCG:7-hydroxycoumarin glucuronidation, 7-HCS:7-hydroxycoumarin sulfation

Substrate concentration are unknown.

MAX, MIN, AVERAGE values were calculated using the results of 22 donor lots in the Certificate of Analysis.

4. 実験方法

4.1 薬物代謝酵素活性測定

分化させた HepaRG 細胞 (7.2×10^4 cells/0.1 mL per well/96 well plate), 播種後一晚接着させたヒト凍結肝細胞 (3.5×10^4 cells/0.1 mL per well/96 well plate) および HepG2 細胞 (7×10^4 cells/0.1 mL per well/96 well plate) について, 各細胞の培地を各分子種の特異的基質カクテルを含む培地に交換する. 基質カクテルは各細胞用の培地 (HepaRG 細胞: Medium 640, ヒト凍結肝細胞: CP Medium[®] with Torpedo Antibiotic Mix[®](1:45, v/v), HepG2 細胞: 培養用 Minimum essential medium) に混合し, 各基質の最終濃度とした ($40 \mu\text{M}$ phenacetin, $50 \mu\text{M}$ bupropion, $5 \mu\text{M}$ diclofenac, $100 \mu\text{M}$ S-mephenytoin, $5 \mu\text{M}$ bufuralol, $5 \mu\text{M}$ midazolam, and $100 \mu\text{M}$ 7-hydroxycoumarin). 基質曝露後, 37°C で 60 分培養し, 60 分後, 上清培地 $100 \mu\text{L}$ を採取し, $2 \mu\text{M}$ caffeine を含む MeCN を $50 \mu\text{L}$ を添加し反応終了させた. 反応停止後のサンプルは凍結保存 (-80°C) した. 凍結保存したサンプルは, $1 \mu\text{M}$ niflumic acid (Negative ion mode の IS) を添加したのち, メタノールによる除タンパク法で前処理し, 上清を Dry up させ, 再溶解溶液 (Water/acetonitrile/methanol (9/5/1, v/v/v)) に溶解させ, LC-MS/MS 用の分析サンプルとした.

【分析条件】

分析機器: LC-MS/MS [Waters ACQUITY UPLC interfaced with an API4000 (Sciex)]

移動相: A: 0.1% (v/v) acetic acid in water, B: acetonitrile.

カラム: UPLC ACQUITY HSS T3 column (2.1×50 mm, $1.8\text{-}\mu\text{m}$; Waters)

カラム温度: 40°C

流量: 0.4 mL/min

グラジエント条件:

A/B = 99/1, 99/1, 10/90, 2/98, 2/98, 99/1, and 99/1 (at 0, 0.4, 2.0, 2.2, 2.6, 2.61, and 4.0 min).

測定対象とした分子種および各基質の特異的代謝物 (Q1/Q3 (m/z) transition) を以下に示す.

	特異的代謝物	Q1/Q3 (m/z), mode
Phenacetin <i>O</i> -deethylase activity (CYP1A2)	: APAP	152/110, +
Bupropion hydroxylase activity(CYP2B6)	: hydroxybupropion	256/238, +
Diclofenac 4'-hydroxylase activity (CYP2C9)	: 4'-hydroxydiclofenac	312/231, +
S-mephenytoin 4'-hydroxylase activity (CYP2C19)	: 4'-hydroxymephenytoin	235/150, +
Bufuralol 1'-hydroxylase activity (CYP2D6)	: 1'-hydroxybufuralol	278/186, +
Midazolam 1'-hydroxylase activity (CYP3A4)	: 1'-hydroxymidazolam	342/324, +
7-hydroxycoumarin glucuronidation activity (UGT)	: 7-HC-glucuronide	339/163, +
7-hydroxycoumarin sulfation activity activity (SULT)	: 7-HC-sulfate	241/161, -
Internal standard (IS) for positive mode :	caffeine	195/138, +
Internal standard (IS) for negative mode :	niflumic acid	281/237, -

4.2 APAP 代謝物測定

分化させた HepaRG 細胞 (7.2×10^4 cells/0.1 mL per well/96 well plate) に APAP および各種阻害剤を 72 時間曝露後の上清培地をサンプリングし、凍結保存 (-80°C) した。

サンプル 10 μL に 2 μM caffeine (IS)を含む acetonitrile/methanol (5/1, v/v)を 200 μL 添加し徐タンパク後 filtration (0.45 μm)したもの、超純水 300 μL を添加・混合し、LC-MS/MS 用の分析サンプルとした。

【分析条件】

分析機器：LC-MS/MS [Waters ACQUITY UPLC interfaced with an API4000 (Sciex)]

移動相：A：Water/formic acid (1000/1, v/v), B：Acetonitrile/formic acid (1000/1, v/v)

カラム：UPLC ACQUITY HSS T3 column (2.1 \times 50 mm, 1.8- μm ; Waters)

カラム温度：40 $^\circ\text{C}$

流量：0.4 mL/min

グラジエント条件：

A/B = 99/1, 99/1, 10/90, 2/98, 2/98, 99/1, 99/1 (at 0, 0.4, 2.0, 2.2, 2.6, 2.61, 4.0 min).

測定対象とした代謝物 (Q1/Q3 (m/z) transition) を以下に示す。

代謝物	Q1/Q3 (m/z), mode
7-APAP-glucuronide	328/152, +
7-APAP-sulfate	232/152, +
caffeine	195/138, +

4.3 細胞毒性評価

分化させた HepaRG 細胞 (7.2×10^4 cells/0.1 mL per well/96 well plate) 及び播種後一晚接着させたヒト凍結肝細胞 (3.5×10^4 cells/0.1 mL per well/96 well plate) に被験物質を含む培地に交換し、被験物質を曝露した。曝露用培地は、HepaRG 細胞が Medium 640, ヒト凍結肝細胞が CP Medium[®] with Torpedo Antibiotic Mix[®](1:45, v/v)を用いて、被験物質の原液を DMSO を溶媒として 200 倍濃度で調製し、培地で 200 倍希釈し曝露した (CPA は蒸留水を溶媒とした)。被験物質曝露後 48 時間または 72 時間 (第 5 章, 第 3, 4 節の HepaRG 細胞を用いた評価のみ) 後に ATP assay にて Cell viability 測定した。

各種阻害剤の処理条件を以下に記す。

ABT:100 μ M (HepaRG 細胞) /500 μ M (ヒト凍結肝細胞) (溶媒: 蒸留水), 被験物質と同時処理

BSO:100 μ M (溶媒: 蒸留水), 被験物質処理 24 時間前に処理

SAM:500 μ M (溶媒: DMSO 0.025%), 被験物質と同時処理

4.4 網羅的遺伝子発現変動解析

4.4.1 RNA 抽出

HepG2細胞 (1×10^5 cells/1 mL per well/24 well plate) を播種後一晩接着させた後、培地を被験物質 (AFB1又はCPA) 含有培地 (1 mL) に交換し、24時間曝露後、細胞を回収した。

HepaRG細胞 (48×10^4 cells/0.5 mL per well/24 well plate) をMedium 670を用いて播種後一晩接着させ、Medium 620に交換し、6日間培養した。その後CPA含有のMedium 640に交換し、24時間曝露後細胞を回収した。分化したHepaRG細胞 (0.45×10^6 cells/ cm²/24 well plate, プレート接着タイプ) にMedium 630で2日間培養後、Medium 620に交換し5日間培養、AFB1含有のMedium 630に培地交換し、24時間曝露し、細胞を回収した。

上記手順で回収した細胞からTotal RNAをRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。抽出操作はキットのプロトコールの手順通りに行った。約60%のTotal RNAを回収できる条件のサンプルを、網羅的遺伝子変動解析に使用した (N=1)。

4.4.2 DNA マイクロアレイ解析

Total RNA の品質の指標として A260/A280 比を NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Asahi Glass Co.,Ltd.)を用いて測定し、RNA integrity number (RIN)は 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて算出した。RNA サンプルの品質担保のクライテリアとして、A260/A280>1.6, RIN>8 を設定した。Biotin-labeled cRNA を GeneChip[®] HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix), GeneChip[®] HT IVT Labeling Kit (Affymetrix) または GeneChip[®] 3' IVT Express Kit (Affymetrix)を用いて手順に従い合成した。網羅的遺伝子変動解析には GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)を使用し、ハイブリダイゼーション、洗浄、染色は GeneChip[®] Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix)を用い、GeneChip[®] Fluidics Station 450 (Affymetrix)により行った。ハイブリダイゼーション後のシグナルは GeneChip[®] Scanner 3000 (Affymetrix)により検出し、検出結果を Expression Console Ver.1.1 (Affymetrix)のソフトウェアを用いて、解析した。GAPDH の 3'/5' signal ratio> 3 を品質担保のクライテリアとして設定した。GeneChip データは MAS 5.0 algorithm with the GeneSpring GX (Agilent Technologies)は補正し、補正後のデータを用いて、vehicle control 群に対する被験物質処理群の相対的な fold-change を算出した。その結果を upregulated および downregulated のクライテリアをそれぞれ fold change \geq 2, fold change< 0.5 と定義し、解析した。その結果を Spotfire DecisionSite 9.1.1 (TIBCO Software) を用いて、UPGMA 法により階層的クラスタリング解析を行い、結果をヒートマップで示した。

4.5 各種測定

4.5.1 タンパク定量

カクテル基質曝露後、上清培地を全量除去し、100 μ L の lysis buffer (CellLytic™ M, Sigma-Aldrich) を添加し、well 内の Lysate を回収した。Lysate 内のタンパク量を Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて測定した。測定はキットのプロトコールの手順通りに行った。吸光度を SpectraMax Plus を用いて測定した。

4.5.2 ATP assay

化合物曝露後の細胞内 ATP 量を CellTiter-Glo™ luminescent Cell Viability Assay (Promega)を用いて測定した。測定はキットのプロトコールの手順通りに行った。luminescence は Multilabel Counter (1420 ARVO SX, PerkinElme)を用いて測定し、IC₅₀ values は SOFTMax Pro (Molecular Devices)を用いて算出した。

4.5.3 LDH assay

化合物曝露後の上清中の LDH を LDH Cytotoxicity Detection Kit (TaKaRa) を用いて測定した。測定はキットのプロトコールの手順通りに行った。吸光度は Microplate Reader (SpectraMax Plus384, MDS)を用いて測定した。

4.5.4 GSH assay

化合物曝露後の細胞内 GSH 量を GSH-Glo™ Glutathione assay (Promega)を用いて測定した。測定はキットのプロトコールの手順通りに行った。luminescence は Multilabel Counter (1420 ARVO SX, PerkinElme)を用いて測定した。

引用文献

Andersson TB, Kanebratt KP, Kenna JG. The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 8, 909–920 (2012).

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.*, 34, 75–83 (2006).

Anthérieu S, Chesné C, Li R, Camus S, Lahoz A, Picazo L, Turpeinen M, Tolonen A, Uusitalo J, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.*, 38, 516–525 (2010).

Boehme K, Dietz Y, Hewitt P, Mueller SO. Activation of P53 in HepG2 cells as surrogate to detect mutagens and promutagens in vitro. *Toxicol Lett.*, 198, 272–281 (2010).

Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res.*, 57, 1946–1954 (1997).

Crewe HK, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.*, 53, 171–178 (1997).

Denissenko MF, Cahill J, Koudriakova TB, Gerber N, Pfeifer GP. Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat Res.*, 425, 205–211 (1999).

Emoto C, Murase S, Sawada Y, Iwasaki K. In vitro inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole. *Drug Metab Pharmacokinet.* 18, 287–295 (2003).

Emoto C, Murase S, Sawada Y, Iwasaki K. In vitro inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations in human liver microsomes: a comparison with SKF-525A. *Drug Metab Pharmacokinet.* 20, 351–357 (2005).

Fujimoto K, Kishino H, Yamoto T, Manabe S, Sanbuissho A. In vitro cytotoxicity assay to evaluate the toxicity of an electrophilic reactive metabolite using glutathione-depleted rat primary cultured hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 188, 404–411 (2010).

Funk C, Ponelle C, Scheuermann G, Pantze M. Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol Pharmacol.*, 59, 627–635 (2001).

Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL. The kinetics of aflatoxin B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 141, 595–606 (1996).

Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, Atienzar FA. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol.*, 28, 69–87 (2012).

Griffith OW, Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem.* 254, 7558–60 (1979).

Griffith OW. Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem.* 257,13704–12 (1982).

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99, 15655–15660 (2002).

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.*, 168, 66–73 (2007).

Gut I, Danielová V, Holubová J, Soucek P, Klucková H. Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol.*, 74, 437–446 (2000).

Helton ES, Chen X. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem.*, 100, 883–896 (2007).

Hornberg JJ, Laursen M, Brenden N, Persson M, Thougard AV, Toft DB, Mow T. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. *Drug Discov Today.*, 19, 1131–1136 (2014).

- Hornberg JJ, Laursen M, Brenden N, Persson M, Thougard AV, Toft DB, Mow T. Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part II: Screening strategies. *Drug Discov Today.*, 19, 1137–1144 (2014).
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 31, 1499–506 (2003).
- Jena SK, Suresh S, Sangamwar AT. Modulation of tamoxifen-induced hepatotoxicity by tamoxifen-phospholipid complex. *J Pharm Pharmacol.* 67, 1198–206 (2015).
- Jossé R, Aninat C, Glaise D, Dumont J, Fessard V, Morel F, Poul JM, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos.*, 36, 1111–1118 (2008).
- Kanebratt KP, Andersson TB. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos.*, 36, 1444–1152 (2008) (a).
- Kanebratt KP, Andersson TB. HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos.*, 36, 137–145 (2008) (b).
- Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 3, 711–715 (2004).
- Leung L, Kalgutkar AS, Obach RS. Metabolic activation in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev.* 44, 18–33 (2012).
- Lilienblum W, Bock-Hennig BS, Bock KW. Protection against toxic redox cycles between benzo(a)pyrene-3,6-quinone and its quinol by 3-methylcholanthrene-inducible formation of the quinol mono- and diglucuronide. *Mol Pharmacol.* 27, 451–458 (1985).
- Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830, 3143-53 (2013).
- Lübberstedt M, Müller-Vieira U, Mayer M, Biemel KM, Knöspel F, Knobloch D, Nüssler AK, Gerlach JC, Zeilinger K. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 63, 59–68 (2011).
- Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 3, 997–1007 (2004).

- McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol Ther.*, 65, 163–192 (1995).
- Mitchell JB, Russo A. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br J Cancer Suppl.* 8, 96–104 (1987).
- Moorthy B, Sriram P, Pathak DN, Bodell WJ, Randerath K. Tamoxifen metabolic activation: comparison of DNA adducts formed by microsomal and chemical activation of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen with DNA adducts formed in vivo. *Cancer Res.* 56, 53–7 (1996).
- Nishiya T, Kato M, Suzuki T, Maru C, Kataoka H, Hattori C, Mori K, Jindo T, Tanaka Y, Manabe S. Involvement of cytochrome P450-mediated metabolism in tienilic acid hepatotoxicity in rats. *Toxicol Lett.* 183, 81–89 (2008).
- Ogasawara A, Torimoto N, Tsuda N, Aohara F, Ohashi R, Yamada Y, Taniguchi H. New Screening Criteria Setting on Evaluation of Cytochrome P450 Induction Using HepaRG Cells with Multiplex Branched DNA Technologies in Early Drug Discovery. *Drug Metab Lett.*, 10, 152–160 (2016).
- Ogimura E, Sekine S, Horie T. Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 416, 313–317 (2011).
- Ortiz de Montellano PR, Mathews JM. Autocatalytic alkylation of the cytochrome P-450 prosthetic haem group by 1-aminobenzotriazole. Isolation of an NN-bridged benzyne-protoporphyrin IX adduct. *Biochem J.* 195, 761–764 (1981).
- Parent R, Marion MJ, Furio L, Trépo C, Petit MA. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology.* 126, 1147–56 (2004).
- Parmentier C, Hendriks DFG, Heyd B, Bachellier P, Ingelman-Sundberg M, Richert L. Inter-individual differences in the susceptibility of primary human hepatocytes towards the cholestatic drug hepatotoxicity are compound and time dependent. *Toxicol Lett.* In press (2018).
- Paul R, Ortiz de Montellano, James M. Mathews, Kevin C. Langry. Autocatalytic inactivation of cytochrome p-450 and chloroperoxidase by 1-aminobenzotriazole and other aryne precursors. *Tetrahedron*, 40, 511–519 (1984).

Pomponio G, Savary CC, Parmentier C, Bois F, Guillouzo A, Romanelli L, Richert L, Di Consiglio E, Testai E. In vitro kinetics of amiodarone and its major metabolite in two human liver cell models after acute and repeated treatments. *Toxicol In Vitro*. 30, 36-51 (2015).

Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos.*, 27, 655–666 (1999).

Saha S, New LS, Ho HK, Chui WK, Chan EC. Direct toxicity effects of sulfo-conjugated troglitazone on human hepatocytes. *Toxicol Lett.*, 195, 135–141 (2010).

Suzuki H, Inoue T, Matsushita T, Kobayashi K, Horii I, Hirabayashi Y, Inoue T. In vitro gene expression analysis of hepatotoxic drugs in rat primary hepatocytes. *J Appl Toxicol.*, 28, 227–236 (2008).

Thompson RA, Isin EM, Ogese MO, Mettetal JT, Williams DP. Reactive Metabolites: Current and Emerging Risk and Hazard Assessments. *Chem Res Toxicol*. 29, 505–533 (2016).

Teng S, Barcellini-Couget S, Beaudouin R, Brochot C, Desousa G, Rahmani R, Pery AR. BK/TD models for analyzing in vitro impedance data on cytotoxicity. *Toxicol Lett*. 235, 96-106 (2015).

Tong J, Mo QG, Ma BX, Ge LL, Zhou G, Wang YW. The protective effects of Cichorium glandulosum seed and cynarin against cyclophosphamide and its metabolite acrolein-induced hepatotoxicity in vivo and in vitro. *Food Funct*. 8, 209–219 (2017).

Turpeinen M, Tolonen A, Chesne C, Guillouzo A, Uusitalo J, Pelkonen O. Functional expression, inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicol In Vitro.*, 23, 748–753 (2009).

Utkarsh D, Loretz C, Li AP. In vitro evaluation of hepatotoxic drugs in human hepatocytes from multiple donors: Identification of P450 activity as a potential risk factor for drug-induced liver injuries. *Chem Biol Interact*. 255, 12-22 (2016).

Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, Pairaudeau G, Pennie WD, Pickett SD, Wang J, Wallace O, Weir A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov*. 14, 475–486 (2015).

Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W, Manabe S. A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci*. 28, 455–469 (2003).

Westerink WM, Schoonen WG. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro.*, 21, 1581–1591 (2007) (a).

Westerink WM, Schoonen WG. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro.*, 21, 1592–1602 (2007) (b).

Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 31, 1035–42 (2003).

Yokoi T, 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 134, 334–337 (2009).

Zanelli U, Caradonna NP, Hallifax D, Turlizzi E, Houston JB. Comparison of cryopreserved HepaRG cells with cryopreserved human hepatocytes for prediction of clearance for 26 drugs. *Drug Metab Dispos.*, 40, 104–110 (2012).

参考図書

Manufacture protocol: DIFFERENTIATED HepaRG® CELLS CRYOPRESERVED Description and user guide for thawing, culture and use (BIOPREDIC international).

本論文の基礎となる原著

Yokoyama Y, Sasaki Y, Terasaki N, Kawataki T, Takekawa K, Iwase Y, Shimizu T, Sanoh S, Ohta S.
Comparison of Drug Metabolism and Its Related Hepatotoxic Effects in HepaRG, Cryopreserved Human
Hepatocytes, and HepG2 Cell Cultures. *Biol Pharm Bull.* **41**, 722-732 (2018)

謝辞

本研究は広島大学大学院医歯薬保健学研究科 太田 茂教授（現・和歌山県立医科大学・教授）、古武弥一郎教授のもとで行われたものであり、幅広い知見，経験から御指導，御鞭撻を賜りました同教授に謹んで感謝の意を表します。

また，本研究を遂行するにあたり、直接御指導下さり，御助言・御協力を頂きました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 佐能 正剛助教に心から感謝御礼申し上げます。

本研究に際して，数々の御助言，御協力を頂きました，広島大学大学院医歯薬保健学研究科 森岡 徳光教授，同研究科 湯元 良子准教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究において，審査，御助言を賜りました，広島大学大学院医歯薬保健学研究科 高野 幹久教授，同研究科 黒田 照夫教授，同研究科 河合 秀彦准教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究の遂行に際して，多大なる御協力ならびに御助言・御議論を賜りました，田辺三菱製薬株式会社 佐々木義文氏，寺崎奈都子氏，川瀧 拓氏，竹川 晃司氏，清水 俊敦氏，榎富 直哉氏，岩瀬裕美子氏に厚く御礼を申し上げます。

本研究の薬物代謝酵素活性評価の実施に際し、直接御指導・御議論賜りました，田辺三菱製薬株式会社 山田 泰弘氏（現・日本薬科大学・教授），小坂井一将氏，池永 有香氏に厚く御礼を申し上げます。

本研究の遂行に際して，このような貴重な機会を与えて頂き，御支援・御協力賜りました，田辺三菱製薬株式会社 久米 俊行氏，久米 英介氏，北村 和之氏，宇野 芳文氏，谷口 友美氏，杉山 明男氏，大山 直樹氏，渡邊 達也氏に厚く御礼を申し上げます。

本研究の遂行に際して，御支援・御協力を賜りました，田辺三菱製薬株式会社 伊藤 雅仁氏，加藤 杏子氏，河野 道弘氏，小林 雅典氏，高野三美恵氏，田原 沙織氏，林 治美氏，藤村 久子氏，日比野優衣氏，三輪 恵子氏，和崎千佳子氏に心から感謝致します。

最後にこのような勉強する機会を与えてくれた家族に心から感謝します。