

コラーゲンビトリゲル®を用いた 新規肝細胞培養系における薬物動態研究

Drug metabolism and pharmacokinetics research
in novel hepatocyte culture system using collagen vitrigel® membrane

渡 隆爾
Ryuji WATARI

エーザイ株式会社 DHBL メディシン開発バイオフィーマシューティカル・
アセスメント機能ユニット グローバル薬物動態研究部 マネージャー
Global Drug Metabolism and Pharmacokinetics Biopharmaceutical Assessments (BA) Core Function Unit (CFU),
Medicine Development, DHBL, Eisai Co., Ltd. (Manager)

KEYWORD ▶

コラーゲンビトリゲル®

細胞培養法

薬物動態

はじめに

01

本稿では、創薬研究における薬物動態の役割を示し、動態研究における肝細胞培養技術と評価法の変遷を辿る。これらを踏まえて、関東化学株式会社より販売されているad-MED ビトリゲル®を用いた新規肝細胞培養法の構築、及び肝代謝に関わる代謝酵素であるシトクロムP450 (CYP) の活性評価について述べる。さらに、CYPの典型基質を用いたヒト肝クリアランス(CL)の予測を実施し、実際のヒト臨床値との比較にも言及する。

医薬品開発における薬物動態の役割

02

医薬品開発は、低分子化合物の場合、成功確率が約4%であり、一つの医薬品を開発する期間として約13年、研究開発費用として約2,000億円がかかるといわれている¹⁾。従って、医薬品開発の成功確率を向上させ、開発期間の短縮並びに開発費を低減することは、製薬企業として極めて重要な課題である。また、医薬品の開発中止や市場撤退も、製薬会社として回避すべき事象であり、薬を望む患者様の期待に応えるためにもできる限りの対策を講じることが必要である。

過去の医薬品開発の歴史を振り返ると、1990年代は薬物動態 (DMPK: Drug Metabolism and Pharmacokinetics) が原因で開発中止となる医薬品候補化合物が、全体の約40%を占めていた²⁾が、2000年代以降は約10%以下に減少した³⁾。これは、肝細胞や肝ミクロソームなどのヒト生体試料が使用できるようになり、薬物動態研究の進展とともにヒトにおける動態予測を主としたトランスレーショナル/リバーstransレーショナル研究の推進が寄与したと考えられる。一方で、安全性および薬理効果については依然として開発中止の原因として多くを占めており、その比率は過去と比較しても大きく変動していない^{2, 3)}。つまり、現在の医薬品開発で特に大きな障害となっているのは、薬理活性

の不足や予期せぬ毒性発現である。しかし、従来の評価方法ではヒトにおける薬理効果や毒性発現に対する予測精度は低い。従って、非臨床段階 (探索研究) でヒトにおける薬理効果や安全性を正確に予測できる新たな評価法を構築し、可能な限りリスクの少ない開発候補品を選出できれば、成功確率の向上とともに、臨床研究の効率的な進捗に貢献できる。

医薬品開発において、薬物動態研究は、探索研究から、臨床研究、承認申請まで幅広いステージに関わっている。同時に、薬理効果や安全性研究をサポートする大切な役割も担っている。薬理効果や毒性の発現は、投与された薬物の全身暴露や薬効・毒性発現組織への移行が大きく関わっている。そのため、薬物動態研究において重要なことは、探索研究の段階において、最終候補医薬品のヒトでの安全性領域を保ち、かつ、有効薬効用量を正確に予測・提案することにある。さらに、最終開発候補品を決定する段階では、ヒトPK予測に加え、薬理効果や安全性を予測するPK/PD (Pharmacokinetics/Pharmacodynamics) 及びTK/TD (Toxicokinetics/Toxicodynamics) の実施が重要である。PK/PD及びTK/TDは、ヒト投与量を基に規定される。ゆえに、薬理効果や毒性の発現の予測には、ヒトPK予測の精度が肝となる。このヒトPK予測の精度を向上させるための取り組みの一つが、薬物代謝の中心臓器である肝臓を扱う肝代謝研究である。

筆者らは、肝代謝研究に必要な肝細胞培養法の検討を行い、薬物動態評価に適した培養法の研究を推進した。

肝細胞培養技術の変遷

03

薬物動態研究では、医薬品候補化合物の生体内における肝CLの予測や、代謝酵素誘導性及び細胞毒性を評価するin vitro評価モデルとして肝細胞が利用されている。しかしながら、従来の単純なin vitro評価法においては、薬物代謝酵素として最も重要なCYP活性が培養中に低下してしまう上、細胞は播種後数日しか培養できない。そのため単純な培養法では、生体における肝臓の

生理学的機能を再現することは困難であった。医薬品候補化合物のヒト肝CLや肝毒性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維持した新しい肝細胞培養法を構築する必要がある。そこで筆者らは、従来法よりも優れた培養法の開発を目指した。

細胞培養法の開発を考える上で重要な項目は3つある。それは、①培養基材(培養システム)、②細胞、そして③培地である。本項においては、特に、培養基材に焦点を当て、肝細胞培養法の変遷を辿る。

3.1 従来の培養基材(システム)

従来の培養法では、市販のコラーゲンコーティング済みプレート(培養基材)を用いるのが一般的であるが、そうした簡便な方法では代謝活性が数日間までしか維持ができない⁴⁾。そのため、代謝活性を長期に渡り維持する培養基材(システム)の開発が進められている。以下に、肝代謝評価で開発されてきた手法に関して簡単に述べる。

3.2 Relay法

肝細胞を用いた代謝活性評価法では、凍結肝細胞を使用するのが一般的であり、凍結融解直後の浮遊細胞(Suspension)を用いて、各化合物のCLを算出する。しかし、足場のない、細胞間接着の少ない浮遊状態では、4時間程度しか代謝活性が維持されないことが知られている⁴⁾。そのため、肝細胞を4時間毎に交換して化合物のCLを算出するRelay法がPfizer社により開発された⁵⁾。本手法により、代謝活性を長時間維持しないと評価できない代謝安定性の高い低CL型化合物の評価が可能となった。一方で、高価な凍結肝細胞あるいは新鮮肝細胞を大量に投入し、4時間毎に細胞を交換しなければならないため、人的及び物的コストが大きいという欠点がある。

3.3 共培養システム

3.1から3.2項で見てきた培養法は、肝臓組織における実質細胞としての肝細胞に焦点を当てている。本来、肝臓組織は、実質細胞である肝細胞と非実質細胞である星細胞・クッパー細胞・血管内皮系細胞によって構成された臓器である。生体肝臓組織を模倣するには、実質細胞だけではなく、非実質細胞の存在も忘れてはならない要素である。近年、実質細胞以外の細胞とともに培養を行う共培養法が多く研究されており、線維芽細胞との共培養法として、Hepato-pac法^{6,7)}やHμREL法⁸⁾が開発され、長期培養及び肝機能向上が認められるとともに、肝CL評価法として注目されている。Hepato-pac法に関しては、培養プレートにマイクロパターンニング手法を施すことで、細胞接着の場を制御するという培養基材側の工夫もなされている⁶⁾。

ただし、これら共培養法は肝細胞以外の細胞による影響を加味する必要があり、得られた結果に対する非実質細胞や線維芽細胞の寄与に注意を要する。また、Hepato-pac法のようなマイクロパターンニング手法を取り入れた培養基材は、現在日本での入手が困難である。更に、共培養法は評価コストが高く、操作が複

雑であることから、Relay法と同様に探索研究段階で多くの医薬品候補化合物を評価するスクリーニング手法としては不向きであるといえる。使用場面としては、数種類の医薬品候補化合物の中から1品に絞る後期の段階において、活用することが想定される。

3.4 スフェロイド培養

コラーゲンコーティングしたプレートに単純に細胞を播種する2次元平面培養では、複雑な立体構造を有する生体組織を模倣することはできない。そのため、細胞同士を集合させることによって、3次元細胞塊を形成するスフェロイド培養が提案された⁹⁾。スフェロイド培養では、細胞同士が自発的に凝集することで、細胞間相互作用が高まり、細胞機能の向上が期待されるとともに、立体的な組織を構築することで生体環境に近づけることができると考えられた。ただし、細胞凝集塊は自律的なものではなく、単純な集合体であるため、細胞塊の大きさが一定以上を超えると、細胞塊内部の細胞まで、酸素や栄養素の供給ができず、壊死してしまうという問題がある。こうした課題を解決するため、Cell-able[®](東洋合成工業株式会社)のような、細胞塊の大きさを一定以内に制御するプレートを開発して、細胞塊の品質を安定させることで代謝活性を維持する手法もある¹⁰⁾。また、代謝活性評価に限らず、スフェロイド培養を毒性評価に適用した事例も報告されている¹¹⁾。なお、スフェロイド培養には、線維芽細胞のような足場を作るフィーダー細胞の存在を必要とする。フィーダー細胞は、細胞の接着に必要な、細胞外マトリックスの供給など、細胞機能に必要な足場を提供する。一方で、フィーダー細胞による代謝活性や毒性評価への影響を考慮する必要があり、フィーダー細胞を必要としないスフェロイド培養法も提案されてきた¹²⁾。

このように、2次元培養法や3次元培養法の取り組みも活発化しているが、薬物動態研究の観点として、3次元培養法の代謝活性のレベルはsuspensionを使った従来法と比べて低く、ヒト肝CL予測評価モデルとしては課題も多い。

3.4 オルガノイド

スフェロイドのような、自発的な細胞凝集を用いた3次元培養法をさらに発展させた形として、より自律的に、複数の細胞種を伴って小器官(ミニ臓器)を形成する手法をとっているのが、オルガノイドである。オルガノイド形成の際に使用する細胞種に関しては、Embryonic Stem cell (ES細胞:胚性幹細胞)、induced Pluripotent Stem cell (iPS細胞:人工多能性幹細胞)のように幹細胞を主な細胞源としているものが多い。肝臓に関しては、iPS細胞から分化させた肝細胞と、endothelial cell(内皮細胞)としてヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells:HUVEC)、mesenchymal cells(間葉系幹細胞)の3種類を組み合わせた肝オルガノイドが報告されている¹³⁾。幹細胞による自律的な組織構築が可能となり、創薬利用にも期待されている¹⁴⁾。一方で、肝オルガノイドは薬理評価や毒性評価に利用することが多く、薬物動態評価に適応している例は少ないのが現状である。

3.5 Microphysiological system (MPS)

従来のin vitroモデルは単一細胞かつ静置培養を基本とする閉鎖系であり、生体における血流要素や多種多様な細胞・組織・臓器が存在する生体の複雑な環境を模倣していない。生体の模倣を狙う上では、各臓器を個別に考えるだけでは不十分であり、臓器同士の連結による応答、さらには全身への連関を考慮する必要がある。そうした中で、Microphysiological system (MPS:生体模倣システム)と呼ばれる新しい培養システムが考案され、生体に近い環境を再現しようとする試みがなされている。中でも肝MPSに関しては、肝機能の再現を目指すおおよその指標も提示されている¹⁵⁾。しかし、MPSは主に安全性・薬理効果での研究が主流であり、オルガノイド研究と同様に薬物動態評価としての研究報告は少ない。

このように、様々な培養システム(培養基材)が提案、研究されてきているが、薬物動態評価での活用には多くの課題が存在し、探索研究において真に創薬活用できる簡便な培養システム(培養基材)の開発が必要である。

コラーゲンビトリゲル[®]による 新規培養法の開発

04

前項では主に、培養基材に焦点を当てて、培養法の変遷を辿ったが、培養基材以外の細胞・培地も重要な要素である。これら3つの要素を適切に選択し、条件を設定していくことがより良い培養法構築の要である。我々は、培養基材:コラーゲンビトリゲル[®]、細胞:PXB-cells[®]、培地:dHCGM¹⁶⁾を基礎とする新規肝細胞培養法の開発を行った。以下に、決定した3つの要素に関して、紹介を行う。

4.1 培養基材:コラーゲンビトリゲル[®]

コラーゲンビトリゲル[®]は、竹澤 俊明グループ長(国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門)が開発された新規培養基材である¹⁷⁾。コラーゲンビトリゲル[®]を選んだ理由として、本培養基材は、生体内の結合組織に匹敵する高密度コラーゲン線維網で構成されており、生体内を擬似的に模倣した環境を提供できると期待したからである。また、共培養法や3次元培養も捨てがたい方法であったが、まずは簡便

な2次元培養で肝機能の向上及び長期培養を実現することが、創薬研究の観点から活用しやすいと判断した。本素材は、関東化学株式会社より「ad-MED ビトリゲル[®]」として、Transwell[®] (Corning社)のような細胞培養用インサートとして販売されている(図1)。本研究では、12ウェルプレート用のビトリゲル[®]を使用して評価を実施した。

4.2 細胞:PXB-cells[®]

コラーゲンビトリゲル[®]の先行研究として、株化細胞であるHepG2細胞を用いて、代謝活性や肝機能の指標であるアルブミン分泌及び尿素合成能が向上した例がある¹⁸⁾。しかし初代肝細胞を用いた実績はなかったため、本研究ではヒト初代肝細胞を用いて検討することにした。肝細胞は、凍結ヒト肝細胞が一般的に利用されているが、高コスト、ロット間差の大きさ、使用個数・期間の制限といった障壁がある。評価系構築の際には、再現性の観点から、ロット間差の大きい細胞源を扱うことはデータ解釈の上で問題となる可能性が高い。そこで我々は、ヒト肝細胞を移植したヒト肝置換キメラマウス(PXB-mouse[®])より単離した新鮮ヒト肝細胞であるPXB-cells[®]に注目した。PXB-mouse[®]は、ヒトの薬物動態の予測において高い予測性を示す有望なモデル動物^{19,20)}として近年認知度が上がっている。キメラマウスより単離した肝細胞は、一つのロットを安定的に数年に渡って使用することができ、低コストかつ、新鮮肝細胞の持つ良好な接着性・再現性・代謝能を実現したヒト肝細胞の代替品として使用が期待される。

4.3 培地:dHCGM

本来培地は、購入する細胞ごとに最適化された推奨培地が存在し、各メーカーにより多種の製品が販売されている。ところが、各メーカー独自に開発された培地は、培地組成が開示されていないため、培地成分の何が良いのか、改善する部分はどこにあるのかを把握しにくい点が、ユーザー側として悩ましい部分である。新たな培養法の開発を行う際には、培地組成が明らかなものを使用したいという意図があったため、培地の検討を行う上では、培地組成の開示にこだわり、研究を進めた。その結果、最終的に、PXB-cells[®]を販売している株式会社フェニックスバイオから入手できるdHCGM培地に決定した。本培地は、DMEMを基本培地として組成成分が公開されており^{16, 21)}、PXB-cells[®]の培養に用いる標準的な培地として販売されている。

4.4 ビトリゲル[®]培養法による肝機能評価

上記の細胞培養法構築のための3要素を基に、コラーゲンビトリゲル[®]膜、並びにコラーゲンを塗布した従来のプレートにPXB-cells[®]を播種し、3週間の長期培養を行い、CYP代謝活性及び肝特異的機能を比較した。その結果、肝臓で主要な5つのCYP分子種(CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A)の代謝活性が、従来法では培養開始後10日以降に減少するのに対し、ビトリゲル[®]培養法では、培養14日～17日目まで代謝活性の向上が認められ、高い活性を維持することを見出した(図2)²²⁾。

また、ビトリゲル[®]培養法では培養14日目において、肝機能の

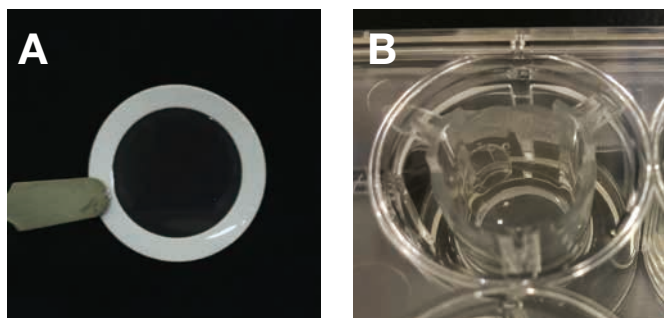


図1 A環状ナイロン膜の支持体付きコラーゲンビトリゲル[®]薄膜(提供:関東化学株式会社)、B ad-MED ビトリゲル[®]膜チャンパーの製品

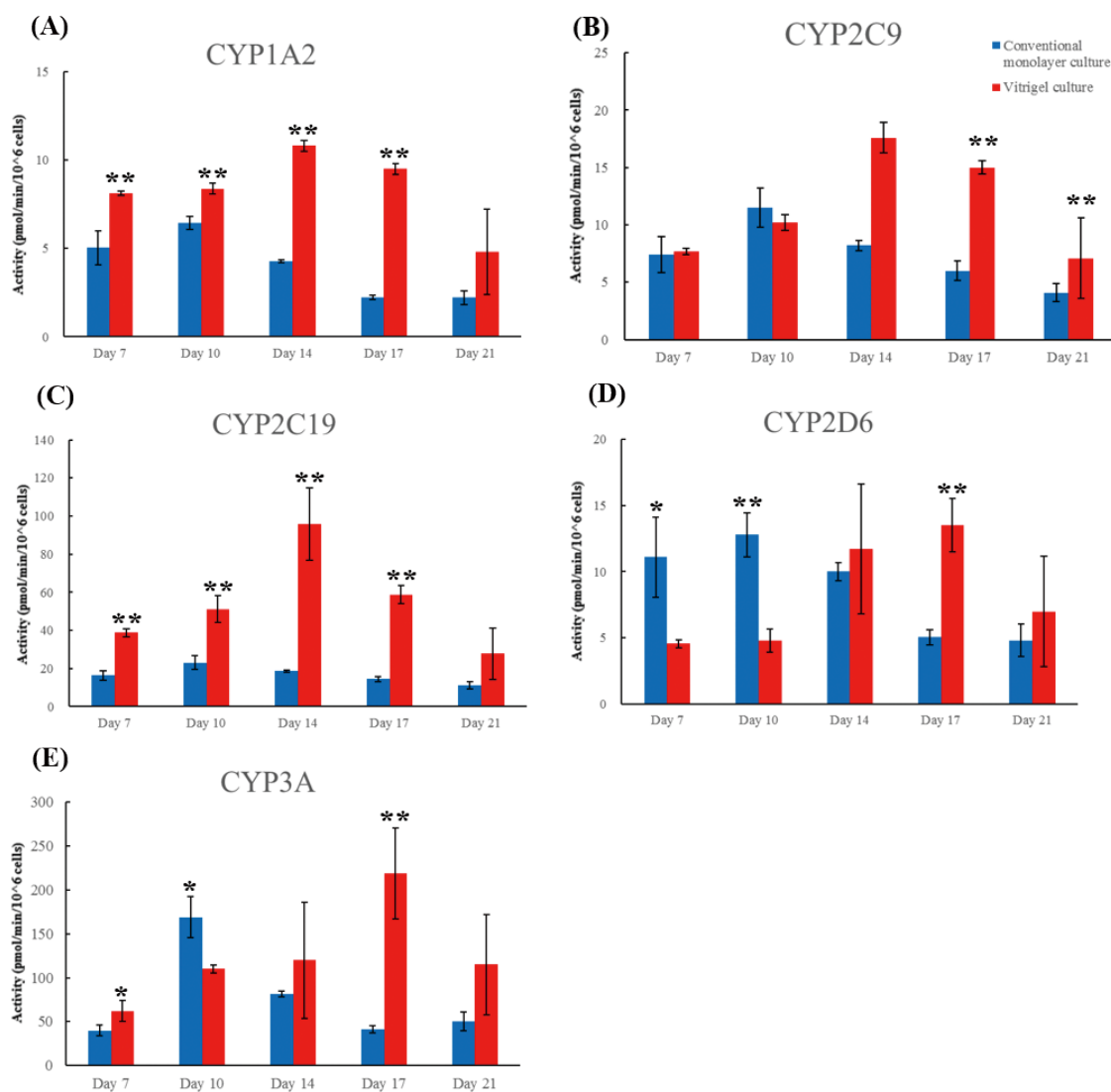


図2 ビトリゲル®培養法及び従来法におけるCYP典型基質化合物での代謝活性評価²²⁾

指標であるアルブミン分泌能や尿素合成能が従来法と比較して増加することが確認された。

上記の結果から、コラーゲンビトリゲル®とPXB-cells®、dHCGMを組み合わせたビトリゲル®培養法を構築し、従来法と比べてCYP代謝能を含む肝機能を長期に賦活化することが可能となった。

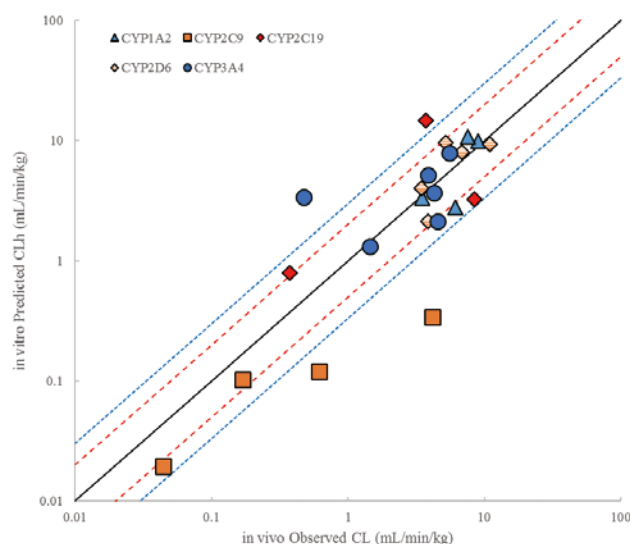
ビトリゲル®培養法における ヒト肝クリアランス予測への応用

05

PXB-cells®を使用したビトリゲル®培養法では、播種後2週間付近で代謝活性のピークがあることがわかったため、播種後2週間目にCYP典型基質22化合物の代謝評価を実施した。さらに、ビトリゲル®培養法で算出したCL値と、ヒト臨床で得られたCL値を比較し、本培養法の予測精度を検証した。その結果、評価化合物の約80%が3倍以内の予測精度と高い予測性を示した(図3)

²³⁾。さらに、ビトリゲル®培養法によりCYP代謝活性の向上と維持を実現したことから、従来法ではCLを求めることが困難であった warfarin や tolbutamide といった低CL化合物のCL値の予測も可能であった。

一方、5倍以上の過大評価又は過小評価となった化合物は、alprazolam、diclofenac及びglimepirideの3化合物であった(表1)。DiclofenacとglimepirideはPXB-cells®への結合やコラーゲンビトリゲル®膜への非特異的吸着も疑われ、かつ両化合物ともに血漿タンパク結合率が非常に高く(fu, p=0.005以下)、非結合型化合物濃度が低くなるため、ビトリゲル®培養法では過小評価になったと推察される。なお、本研究ではコラーゲンビトリゲル®膜への非特異的吸着やPXB-cells®への結合は評価していないが、Hepato-pac法でも同様の現象が確認されている⁷⁾。こうしたタンパク結合率が高い化合物は、過小評価となる危険がある。そのため、代謝評価を実施する際に、アッセイ培地中に分泌されるアルブミンを考慮して、アルブミンへの結合率を補正することにより予測精度が向上した例も報告されている²⁴⁾。ビトリ

図3 ビトリゲル®培養法によるCYP典型基質化合物の肝CL予測²³⁾表1 ビトリゲル®培養法による各CYP典型基質化合物の肝CL及びヒト臨床値²³⁾

Compound name	Responsible metabolic enzymes	f_{up}	R_b	Human CL (mL/min/kg)	F_{renal}	In vivo observed CL (mL/min/kg)	In vitro predicted CL_{int} (μ L/min/million cells)	In vitro predicted CL_h (mL/min/kg)	Ratio*
Clozapine	CYP1A2	0.044 ^{b)}	0.70 ^{b)}	6.1 ^{b)}	0.005 ^{c,d)}	6.07	23.2	2.77	0.46
Lidocaine	CYP1A2	0.3 ^{a)}	0.84 ^{a)}	9.2 ^{a)}	0.02 ^{a)}	9.02	17.4	9.86	1.1
Mexiletine	CYP1A2	0.36 ^{a)}	1 ^{a)}	8.3 ^{a)}	0.095 ^{c,d)}	7.51	14.8	10.7	1.4
Riluzole	CYP1A2	0.02 ^{a)}	1.7 ^{a)}	3.52 ^{a)}	<0.01 ^{a)}	3.48	56.2	3.32	0.95
Diclofenac	CYP2C9	0.005 ^{a)}	0.55 ^{a)}	4.22 ^{a)}	<0.01 ^{a)}	4.18	22.6	0.339	0.081
Glimepiride	CYP2C9	0.005 ^{a)}	0.55 ^{a)}	0.62 ^{a)}	<0.005 ^{a)}	0.617	7.88	0.120	0.19
Tolbutamide	CYP2C9	0.058 ^{a)}	0.55 ^{a)}	0.17 ^{a)}	<0.01 ^{a)}	0.168	0.580	0.103	0.61
(S)-(-)-Warfarin	CYP2C9	0.01 ^{a)}	0.55 ^{a)}	0.045 ^{a)}	<0.02 ^{a)}	0.0441	0.638	0.0195	0.44
Diazepam	CYP2C19	0.015 ^{a)}	0.71 ^{a)}	0.38 ^{a)}	<0.01 ^{a)}	0.376	17.8	0.791	2.1
Omeprazole	CYP2C19	0.05 ^{a)}	0.59 ^{a)}	8.4 ^{a)}	0 ^{c,d)}	8.40	25.5	3.26	0.39
Voriconazole	CYP2C19	0.42 ^{a)}	1 ^{a)}	3.80 ^{a)}	<0.02 ^{a)}	3.72	22.4	14.6	3.9
Atomoxetine	CYP2D6	0.013 ^{a)}	0.55 ^{a)}	3.92 ^{a)}	0.01 ^{a)}	3.88	59.1	2.12	0.55
Desipramine	CYP2D6	0.184 ^{b)}	0.89 ^{b)}	7.0 ^{b)}	0.02 ^{c)}	6.86	19.8	8.00	1.2
Flecainide	CYP2D6	0.39 ^{a)}	0.89 ^{a)}	9.1 ^{a)}	0.43 ^{a)}	5.19	12.5	9.67	1.9
Metoprolol	CYP2D6	0.88 ^{b)}	1.2 ^{b)}	12.1 ^{b)}	0.10 ^{c,d)}	10.9	4.62	9.40	0.86
Risperidone	CYP2D6	0.11 ^{a)}	0.67 ^{a)}	3.56 ^{a)}	0.03 ^{a)}	3.45	14.7	4.03	1.2
Alprazolam	CYP3A4	0.29 ^{a)}	0.78 ^{a)}	0.59 ^{a)}	0.20 ^{a)}	0.472	4.38	3.39	7.2
Midazolam	CYP3A4	0.02 ^{a)}	0.69 ^{a)}	4.6 ^{a)}	0.01 ^{a)}	4.55	38.3	2.14	0.47
Prednisolone	CYP3A4	0.28 ^{a)}	1 ^{a)}	1.73 ^{a)}	0.17 ^{a)}	1.44	1.58	1.31	0.91
Quinidine	CYP3A4	0.25 ^{b)}	0.92 ^{b)}	4.7 ^{b)}	0.18 ^{c,d)}	3.85	8.15	5.18	1.3
Sildenafil	CYP3A4	0.0941 ^{b)}	1 ^{a)}	6.0 ^{b)}	0.075 ^{c,d)}	5.55	36.7	7.94	1.4
Zolpidem	CYP3A4	0.13 ^{b)}	0.76 ^{b)}	4.3 ^{b)}	0.005 ^{c,d)}	4.28	10.8	3.68	0.86

f_{up} : fraction unbound in plasma. R_b : blood to plasma ratio. CL: clearance. CL_{int} : intrinsic clearance. CL_h : hepatic clearance. F_{renal} : the fraction of drug excreted by renal elimination. a) Chan *et al.*⁴⁾ b) Stringer *et al.*¹⁵⁾ c) Dave *et al.*¹⁶⁾ d) Obach *et al.*¹⁷⁾ e) Uchimura *et al.*¹⁸⁾ f) R_b was assumed as 1. g) These values were obtained by dividing the reference value (% Urinary Excretion) by one hundred. * Ratio = in vitro Predicted CL_h /in vivo Observed CL.

ゲル®培養法では、培養後2週間でアルブミン分泌量も増加しているため、アルブミンへの結合率の補正処理を行う必要性が高いと考える。

以上、コラーゲンビトリゲル®膜チャンバーとPXB-cells®を用いたビトリゲル®培養法は、CYP基質、特に低CL型化合物のヒト肝CLを精度良く予測できる培養システムであることが明らかになった。ただし、タンパク結合率が高い化合物への適応には課題があり、そうした課題を踏まえた上で評価系を活用することが重要である。今回、新たに構築したビトリゲル®培養法は、探索研究段階の創薬活動において精力的に活用していく。

おわりに

06

本稿では、薬物動態におけるヒト予測の意義を説明し、薬物動態評価のための肝細胞培養法に関する変遷を、培養基材(培養システム)を中心に辿った。そして、培養基材としてコラーゲンビトリゲル®、細胞としてPXB-cells®、培地としてdHCGMを組み合わせた新規肝細胞培養法を提案し、ヒト肝CL予測精度の高い評価モデルを構築した(図4)。

今後は、培養基材の改良として、MPSとの組み合わせや、長期間に渡って高い代謝活性の維持ができる利点を活かし、安全性

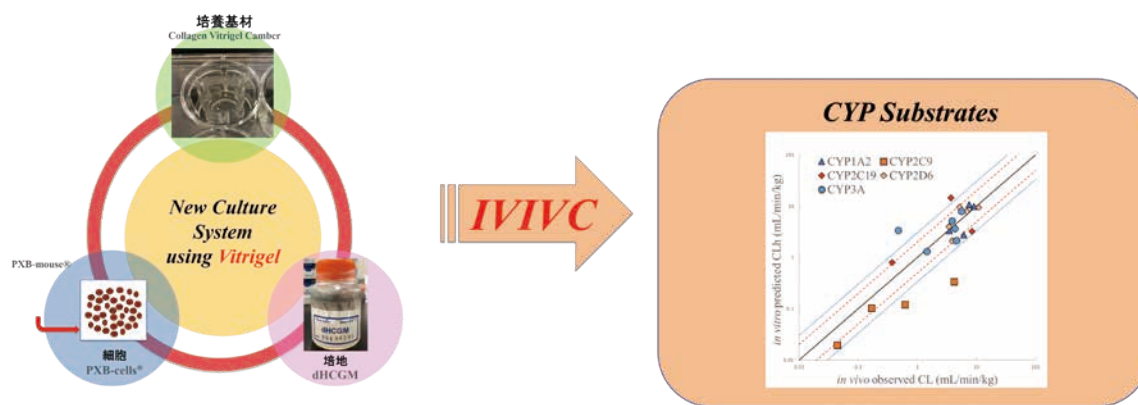


図4 ヒト肝CL予測精度の高いビトリゲル®評価モデル²³⁾

評価への応用も検討している。

以上、探索研究から臨床へと繋ぐ創薬研究を支援する評価系の一つとして、今後もビトリゲル®を用いた薬物動態研究を進めていきたい。

参考文献

1. S.M. Paul, D.S. Mytelka, A.L. Schacht, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 203-214.
2. I. Kola, J. Landis. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 711-715.
3. J. Arrowsmith, P. Miller. Phase II and Phase III attrition rates 2011-2012. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013, 12, 569.
4. C. Rodriguez-Antona, M.T. Donato, M.J. Gómez-Lechón, et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica.* 2002, 32, 6, 505-520.
5. L. Di, P. Trapa, L. M. Tremaine, et al. A Novel Relay Method for Determining Low-Clearance Values. *Drug Metab. Dispos.* 2012, 40, 9, 1860-1865.
6. S.R. Khetani, S.N. Bhatia. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* 2008, 26, 1, 120-126.
7. T.S. Chan, H. Yu, D. Tweedie, et al. Meeting the Challenge of Predicting Hepatic Clearance of Compounds Slowly Metabolized by Cytochrome P450 Using a Novel Hepatocyte Model. *HepatoPac. Drug Metab. Dispos.* 2019, 47, 1, 58-66.
8. I. Hultman, C. Vedin, M. Darnell, et al. Use of HμREL® human co-culture system for prediction of intrinsic clearance and metabolite formation for slowly metabolized compounds. *Mol. Pharmaceutics.* 2016, 13, 8, 2796-2807.
9. T. Ohkura, K. Ohta, T. Ogihara, et al. Evaluation of Human Hepatocytes Cultured by Three-dimensional Spheroid Systems for Drug Metabolism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2014, 29, 5, 373-378.
10. C.C. Bell, D.F.G. Hendriks, M. Ingelman-Sundberg, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci. Rep.* 2016, 6, 25187.
11. S.U. Vorrink, Y. Zhou, V.M. Lauschke, et al. Prediction of Drug-Induced Hepatotoxicity Using Long-Term Stable Primary Hepatic 3D Spheroid Cultures in Chemically Defined Conditions. *Toxicol. Sci.* 2018, 163, 2, 655-665.
12. T. Ogihara, H. Arakawa, H. Kojima, et al. Utility of human hepatocyte spheroids without feeder cells for evaluation of hepatotoxicity. *J. Toxicol. Sci.* 2017, 42, 4, 499-507.
13. T. Takebe, K. Sekine, T. Ogaeri, et al. Ran-Ran Zhang, Yasuharu Ueno, Yun-Wen Zheng, Naoto Koike, Shinsuke Aoyama, Yasuhisa Adachi, and Hideki Taniguchi. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature.* 2013, 499, 481-484.
14. T. Shinozawa, H. Yoshikawa, T. Takebe. Reverse Engineering Liver Buds Through Self-Driven Condensation and Organization Towards Medical Application. *Developmental Biology.* 2016, 420, 221-229.
15. A.R. Baudy, M.A. Otieno, W.R. Proctor, et al. Liver microphysiological systems development guidelines for safety risk assessment in the pharmaceutical industry. *Lab Chip.* 2020, 20, 215-225.
16. C. Yamasaki, C. Tateno, K. Yoshizato, et al. Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro. *J. Hepatol.* 2006, 44, 749-757.
17. T. Takezawa, K. Ozaki, T. Shimo-Oka, et al. Collagen Vitrigel: A Novel Scaffold That Can Facilitate a Three-Dimensional Culture for Reconstructing Organoids. *Cell Transplant.* 2004, 13, 463-473.
18. A. Oshikata-Miyazaki, T. Takezawa. Development of an oxygenation culture method for activating the liver-specific functions of HepG2 cells utilizing a collagen vitrigel membrane chamber. *Cytotechnology.* 2016, 68, 5, 1801-1811.
19. S. Sanoh, Y. Naritomi, S. Ohta, et al. Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica.* 2015, 45, 7, 605-614.
20. M. Miyamoto, S. Iwasaki, H. Hirabayashi, et al. Comparison of predictability for human pharmacokinetics parameters among monkeys, rats, and chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica.* 2017, 47, 12, 1052-1063.
21. C. Tateno, K. Yoshizato. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol* 1996;148:383-392.
22. R. Watari, M. Kakiki, K. Kusano, et al. A long-term culture system based on a collagen vitrigel membrane chamber that supports liver-specific functions of hepatocytes isolated from mice with humanized livers. *J. Toxicol. Sci.* 2018, 43, 8, 521-529.
23. R. Watari, M. Kakiki, K. Kusano, et al. Prediction of Human Hepatic Clearance for Cytochrome P450 Substrates via a New Culture Method Using the Collagen Vitrigel Membrane Chamber and Fresh Hepatocytes Isolated from Liver Humanized Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 2019, 42, 3, 348-353.
24. F. Da-Silva, X. Boulenc, P. Poulin, et al. Improving Prediction of Metabolic Clearance Using Quantitative Extrapolation of Results Obtained From Human Hepatic Micropatterned Cocultures Model and by Considering the Impact of Albumin Binding. *J. Pharm. Sci.* 2018, 107, 1957-1972.